



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.
6. **Все ответы должны быть перенесены на БЛАНК ОТВЕТОВ, распечатанный из личного кабинета.**



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	Надпись на пробирке	Количество	Отметка о присутствии
Бактериальная культура клона 1	-	K1.1	1,5 мл	
Бактериальная культура клона 1	-	K1.2	0,5 мл	
Бактериальная культура клона 2	-	K2.1	1,5 мл	
Бактериальная культура клона 2	-	K2.2	0,5 мл	
Буфер для ресуспензирования	-	R	520 мкл	
Буфер для лизирования	-	L	520 мкл	
Буфер для нейтрализации	-	N	720 мкл	
Буфер для промывки	-	W	1420 мкл	
Буфер для элюции	-	E	70 мкл	
Буфер для рестрикции Rose	10X	Rose	10 мкл	
Буфер для нанесения	4X	LD	12 мкл	
Раствор FeSO ₄	0,1 M	I	1 мл	
Вода стерильная	-	mQ	10 мкл	



Шифр _____

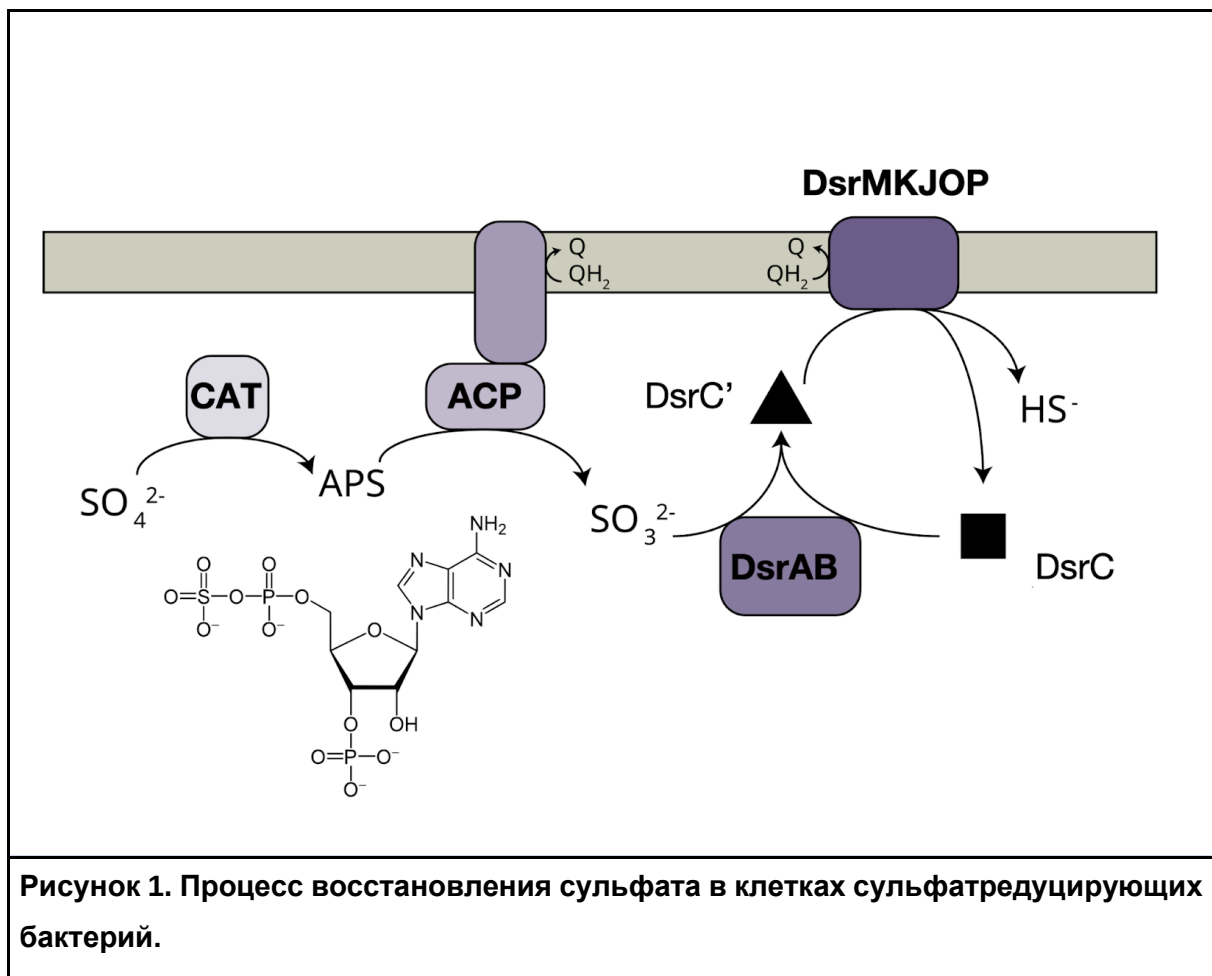
Помимо этого, в процессе работы вам понадобится оборудование, которое используется всеми участниками в аудитории, его местоположение вам покажет волонтер или преподаватель. Включение и выключение данного оборудования производится **ТОЛЬКО волонтерами или преподавателем**. Обратите внимание, что некоторые 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	Надпись на пробирке
Центрифуга настольная	-	-
Термостат для пробирок	-	-
Камера для проведения горизонтального электрофореза	-	-
Лабораторный источник тока	-	-
Эндонуклеаза рестрикции BamHI	10000 ед/мл	Bam
Эндонуклеаза рестрикции HindIII	10000 ед/мл	Hind



Шифр _____

Сульфатредуцирующие микроорганизмы – это экологическая группа, включающая в себя бактерий и архей. Микроорганизмы из этой группы (*Desulfovibrio*) способны осуществлять анаэробное дыхание, при котором конечным акцептором электронов из дыхательной цепи является сульфат-ион, поступающий из внешней среды. Они потребляют из среды метан, углеводы или спирты, окисляют их и выделяют в среду сульфид-ионы и сероводород. Сульфат-ион – это плохой акцептор электронов, так как разность его восстановительного потенциала с NADH или ферредоксином очень велика. Поэтому для того, чтобы восстанавливать сульфаты в клетках сульфатредукторов протекает несколько ферментативных реакций (рис. 1).



В первой реакции сульфат ионы при помощи фермента сульфат аденилилтрансферазы (CAT) формируют аденозинфосфосульфат (APS), который затем конвертируется ферментом аденилсульфат редуктазой (ACP) в сульфит-ион. Наконец при помощи белка DsrC и нескольких ферментов сульфит-ион окисляется до сульфида, который и может выделяться во внешнюю среду.



Шифр _____

Задание 1. Внимательно проанализируйте схему метаболизма сульфат-редуцирующих бактерий и ответьте на приведенные ниже вопросы.

1.1. Рассмотрите таблицу с типами метаболизма живых организмов и выберите те варианты, которые соответствуют метаболизму сульфат-редукторов (1.5 балла).

Фактор	Типы метаболизма	
Источник углерода	Неорганический углерод автотрофы	Органический углерод гетеротрофы
Источник энергии	Свет фототрофы	Химические связи хемотрофы
Источник электронов	Неорганические соединения литотрофы	Органические соединения органотрофы

1.2. Какое количество АТФ и электронов необходимо использовать для того, чтобы восстановить один сульфат-ион до сульфида? (2 балла)

Количество АТФ: _____.

Количество электронов: _____.

Задание 2. Представители рода *Desulfovibrio* являются одними из самых изученных сульфатредукторов. Для нескольких представителей рода известны геномные последовательности. Перейдите в геномный браузер (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>) и введите в поле поиска родовое название бактерии.

2.1. Какое количество геномных сборок бактерий рода *Desulfovibrio* доступно в генбанке? (1 балл).

Московская олимпиада школьников по генетике, 23.03.2025.
Заключительный этап. Практический тур.
10-11 классы



Шифр _____

Какое количество полных сборок (complete), в которых вся бактериальная хромосома собирается в один контиг бактерий рода *Desulfovibrio* доступно в генбанке? (1 балл).

В каком году была опубликована первая геномная последовательность бактерии рода *Desulfovibrio*? (1 балл).

К какому виду рода принадлежала бактерия рода *Desulfovibrio*, последовательность генома которой была первой опубликована в генбанке? (1 балл).

2.2. *Desulfovibrio mangrovi* – это известный редуктор донных отложений в мангровых зарослях. Зайдите на страницу сборки генома данной бактерии (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/2976983/>) и перейдите на вкладку с таблицей аннотированных генов (view annotated genes).

Какое количество белок-кодирующих генов было найдено у данного вида бактерии? (1 балл).

2.3. Вы хотите изучить положение генов, участвующих в сульфат редукции. Для этого вам необходимо написать название гена или его символьное название в строку поиска, затем перейти на страницу этого гена. Для представленных в таблице гена определите их геномные координаты и длину (в аминокислотах). Если описанный ген в геноме отсутствует, то на месте геномных координат и длины поставьте прочерк (‘-’). Приведенную таблицу перенесите в бланк ответов (можно схематично).

Название гена	Геномные координаты	Длина в аминокислотах
Сульфат аденил трансфераза (SAT, sulfate adenylyl transferase)		
Аденилилсульфат редуктаза (ASR, adenylylsulfate reductase)		
DsrAB		
DsrC		



Шифр _____

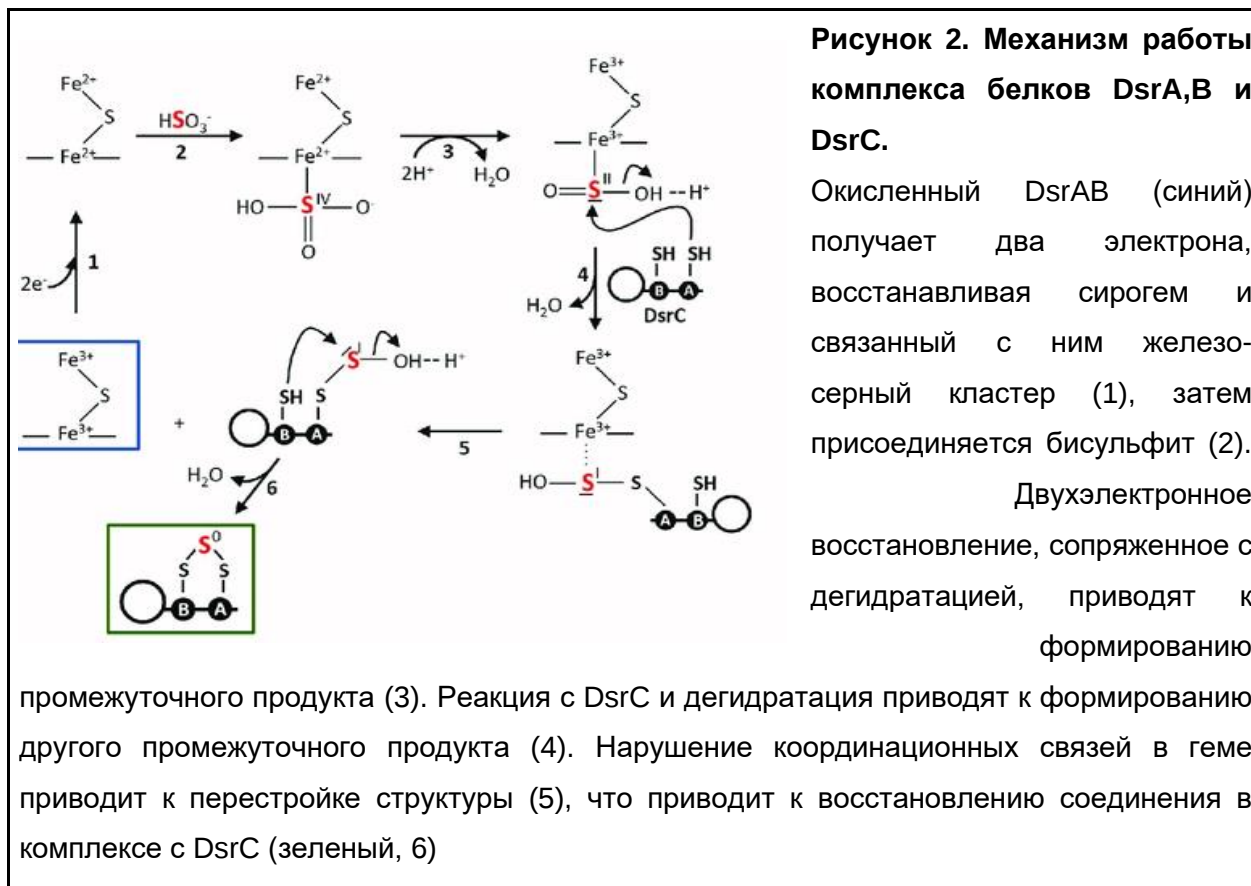
2.4. Предположите экспрессия каких из представленных генов может регулироваться совместно? Объясните свой ответ? (1 балл)

2.5. Используя данные из геномного браузера (см. задание 2.2) определите, какие ещё гены могут входить в оперон с обнаруженными в задании 2.4. Ответ поясните с позиции биохимических процессов, происходящих в процессе сульфатредукции (3 балла).

Задание 3. Известно, что белок DsrC способен связывать сульфит-ион (рис. 2). Внимательно изучите механизм протекания реакции восстановления сульфит ионов.



Шифр _____



3.1. Какие аминокислоты в белке участвуют в связывании серосодержащих соединений в белке DsrC?. (1 балл).

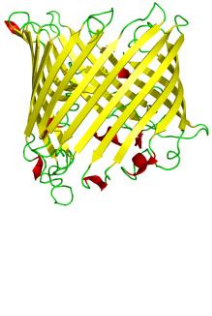
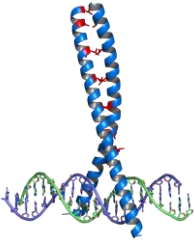
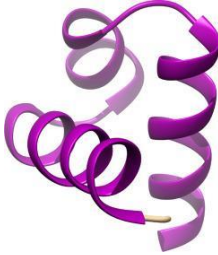
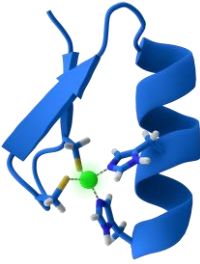
3.2. Используя ранее установленную кристаллическую структуру белка DsrC определите позиции аминокислот, которые участвуют в связывании серосодержащих соединений. Для этого перейдите в базу данных Pfam (<http://pfam.xfam.org/>), выберите поиск по структурам (View a structure) и введите идентификатор кристаллической структуры белка DsrC (1sau) (2 балла). Приведенную таблицу перенесите в бланк ответов.

Позиция в белке	Аминокислота



Шифр _____

3.3. Рассмотрите наиболее известные варианты мотивов структур белка. Какой из изображенных мотивов можно наблюдать в белке *dsrC*? (1 балл)

				
А	Б	В	Г	Д



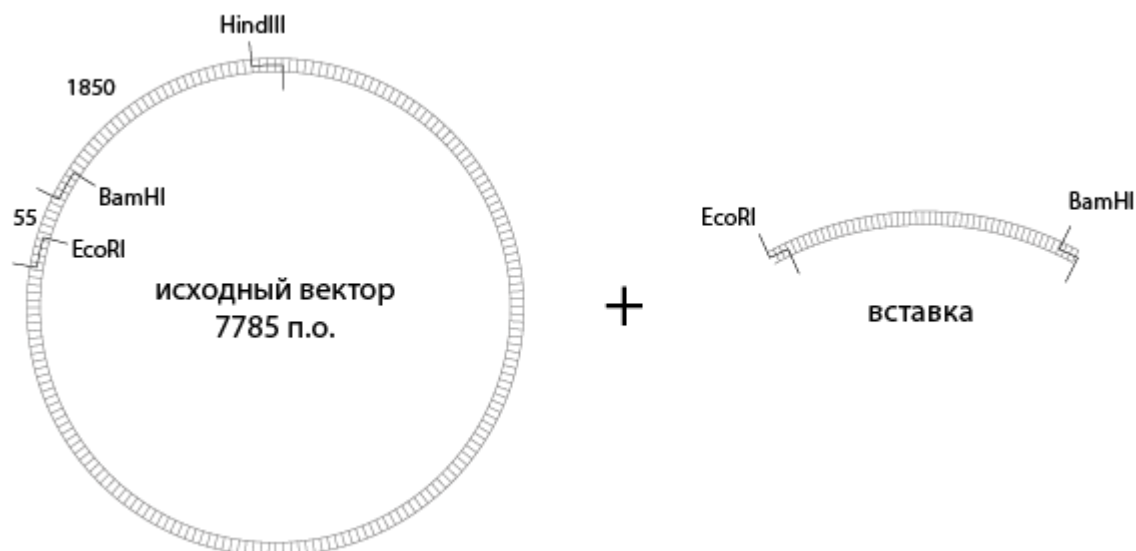
Шифр _____

3.4. Очень часто для определения взаимосвязей между белками биоинформатики используют базы данных, которые отражают связи между разными белками. Характер связей может быть разным (от совместной регуляции до белок-белковых взаимодействий). Одной из таких баз данных является база STRING (<https://string-db.org/>). Найдите связи, которые можно обнаружить у белка dsrC в организме *Desulfovibrio vulgaris*.

Связи с какими белками были экспериментально подтверждены для DsrC? (2 балла)

С какими метаболическими процессами, помимо сульфатредукции может быть связан белок DsrC? (2 балла)

Целевой ген АТФ-сульфуриказы встроили в плазмиду, содержащую ген устойчивости к канамицину. Для этого к последовательности гена «пришили» сайты рестрикции EcoRI и BamHI. Карта рестрикции исходного вектора представлена на рисунке:



После трансформации бактерий полученными плазмидами их выращивали в среде, содержащей сульфаты, фумарат и антибиотик канамицин. Было получено 2 клона, которые затем были перенесены в жидкую среду для наращивания биомассы и выделения полученных плазмид.



Шифр _____

Клон	Плазмида	Обозначение на пробирке
Клон 1	Плазмида 1	K1.1 и K1.2
Клон 2	Плазмида 2	K2.1 и K2.2

Для подтверждения полученных генных конструкций вам необходимо выделить плазмиды из бактериальных культур K1 и K2, а затем провести аналитическую рестрикцию.

Задание 4. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмид обычно используется метод очистки ДНК на специальных колонках. Этот метод основан на адсорбции ДНК на матрице из оксида кремния внутри колонки.

На первом этапе проводят лизис клеток с использованием щелочного буфера. Затем получившийся лизат нейтрализуют кислым раствором, в результате чего белки и хромосомная ДНК образуют осадок, а плазмидная ДНК остается в растворе. Полученный осадок удаляется с помощью центрифугирования, а надосадочная жидкость наносится на колонку для последующей очистки.

После адсорбции плазмидной ДНК на колонке проводят несколько последовательных промывок спиртовыми растворами для удаления оставшихся примесей, а после элюируют очищенную ДНК с колонки.

1. Центрифугируйте бактериальные культуры K1.1 и K2.1 для осаждения клеток в течение 1 минуты при 1700 g. Полностью удалите супернатант.
2. Добавьте 250 мкл ресуспензирующего раствора. Тщательно ресуспензируйте до образования мутной суспензии с помощью пипетирования или перемешивания на вортексе.
3. Добавьте 250 мкл лизирующего буфера. Осторожно перемешайте содержимое пробирки переворачиванием, пока лизат не станет прозрачным.

Московская олимпиада школьников по генетике, 23.03.2025.
Заключительный этап. Практический тур.
10-11 классы



Шифр _____

4. Добавьте 350 мкл нейтрализующего буфера. Осторожно перемешайте до образования творожистого осадка.
5. Центрифугируйте пробирку в течение 10 минут с ускорением 11 000 g.
6. Подготовьте 2 колонки, вставленные в специальные собирательные пробирки (без крышки).
7. Перенесите осветленный супернатант в колонку и центрифугируйте 30 секунд с ускорением 11 000 g.
8. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку.
9. Добавьте 700 мкл промывочного раствора в колонку. Центрифугируйте в течение 30 с ускорением 11 000 g.
10. Удалите фильтрат из собирательной пробирки. Колонку верните в собирательную пробирку. Центрифугируйте пустую колонку 1 минуту для полного удаления промывочного раствора.
11. Подготовьте и пробирки объемом 1.5 мл для элюции образца.
12. Поместите колонки в новые пробирки с открытой крышкой и оставьте при комнатной температуре на 5 минут для полного испарения остатка спирта.
13. Нанесите в центр мембраны 30 мкл элюирующего раствора. Инкубируйте при комнатной температуре 1 минуту. Центрифугируйте в течение 1 минуты.
14. Полученные элюаты содержат выделенную плазмидную ДНК.



Шифр _____

Задание 5. Аналитическая рестрикция

Метод аналитической рестрикции — это способ идентификации ДНК с использованием эндонуклеаз рестрикции. Эти ферменты вносят двуцепочечные разрывы в определённых местах ДНК.

Эндонуклеазы распознают палиндромные последовательности нуклеотидов (сайты рестрикции) в ДНК и разрезают обе цепи, часто в пределах этих последовательностей. Поскольку ферменты распознают последовательности из четырёх и более специфических нуклеотидов, вероятность нахождения сайтов рестрикции в ДНК ограничена. Поэтому можно сказать, что каждый фермент рестрикции имеет свой уникальный паттерн разрезания конкретной молекулы ДНК.

Это позволяет использовать рестрикцию для идентификации ДНК по набору полученных фрагментов при разрезании. Для определения плазмид в данном случае будут использоваться рестриктазы BamHI и HindIII.

Задание 5.1.

1. В листе ответов заполните таблицу расчета рестрикционной смеси (таблица приведена на последней странице заданий, её **необходимо перенести на бланк ответов!**). Выберите из доступных все необходимые реагенты для проведения этой реакции. Для каждого из компонентов укажите требуемое количество. Обратите внимание: итоговый объем каждой реакции рестрикции должен составлять 40 мкл; на одну реакцию требуется 10 ед. активности каждой из рестриктаз; для рестрикции необходимо взять максимум имеющейся у вас плазмиды. (5 баллов)

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	мкл в реакционной смеси
Плазмида			
buffer Rose			
Рестриктаза BamHI			



Шифр _____

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	мкл в реакционной смеси
Рестриктаза EcoRI			
mQ			

- У вас в доступе имеются только пипетки с диапазонами 2-20, 20-200 и 100-1000 мкл. Продумайте алгоритм смешивания реакций так, чтобы вы могли отобрать все необходимые вам объемы.
- После расчета количества всех необходимых компонентов обратитесь к преподавателю для получения реактивов, которые хранятся в холодильнике.
- Смешайте рестрикционные смеси согласно вашему плану.
- 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.
- Оставьте рестрикционные смеси инкубироваться при 37°C на 15-20 минут.
- По окончании времени обратитесь к преподавателю, чтобы он выдал вам ваши пробирки.

Задание 6. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле — это метод разделения нуклеиновых кислот по их размеру. За счет наличия заряда нуклеиновые кислоты способны двигаться в электрическом поле, а плотная среда (агарозный гель) влияет на скорость движения фрагментов ДНК в зависимости от их размера.

- Для нанесения полученных фрагментов 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 ДНК.
- Укажите в **бланке ответов**, какой объем рестрикционной смеси и буфера для нанесения вы возьмете для каждого из образцов. Пример таблицы можно найти в Приложении 1. (2 балла)



Шифр _____

Компонент	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3
Рестрикционная смесь, мкл			
Буфер для нанесения, мкл			
Маркер длин			

3. Обратитесь к преподавателю в аудитории и нанесите образцы в указанные преподавателем лунки геля.
4. Порядок нанесения образцов в гель: Лунка 1 — маркер длин; Лунка 2 — результат рестрикции Плазмиды 1; Лунка 3 — результат рестрикции Плазмиды 2.

Задания по электрофорезу и аналитической рестрикции

Задание 6.1

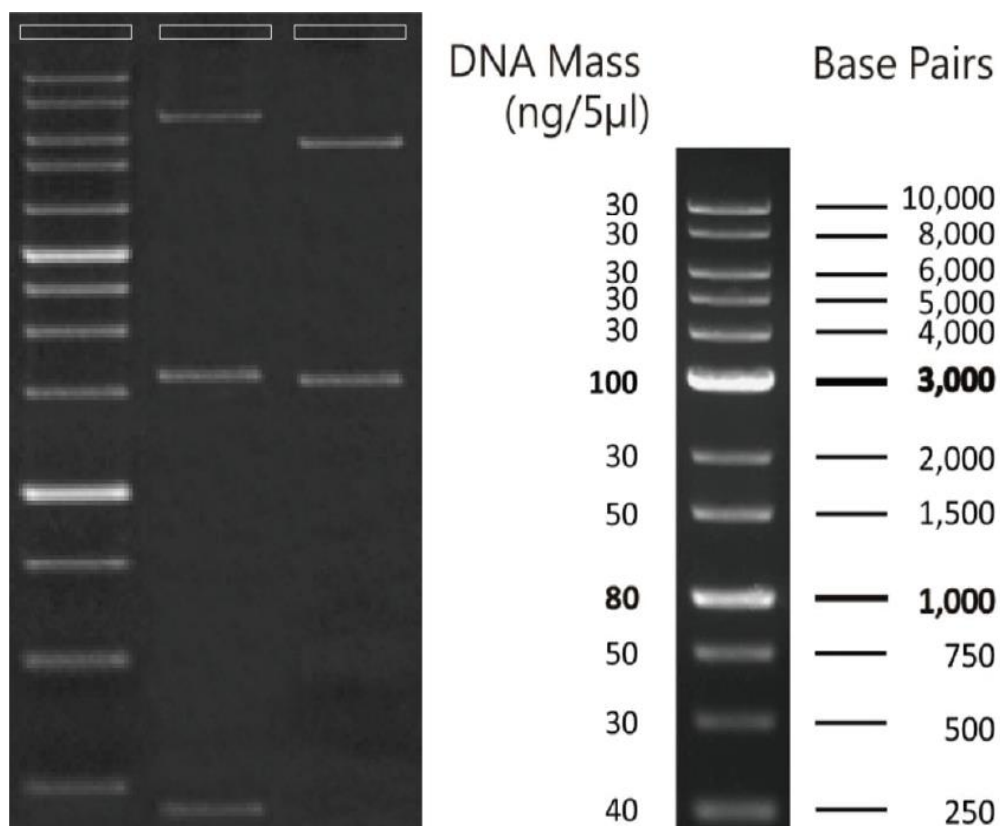
Используя карту плазмиды, представленную в тексте, и последовательность гена из предыдущих заданий, предположите, какие фрагменты ДНК получатся при рестрикции целевой плазмиды со вставкой рестриктазами HindIII и BamHI? (2 балла)

Задание 6.2

Изучите ожидаемые результаты проведенного вами электрофореза:



Шифр _____



Используя результаты электрофореза и размеры фрагментов, используемых в маркере длин, постройте калибровочную кривую в следующих координатах: по оси ординат — $\lg(\text{длины фрагментов ДНК})$, по оси абсцисс — R_f (относительная длина пробега = абсолютная длина пробега/абсолютная длина пробега наименьшего фрагмента). Для построения графика калибровочной кривой используйте миллиметровую бумагу.

Определите по калибровочной кривой длину фрагментов в экспериментальных образцах. Укажите ее в таблице: заполняйте таблицу сверху вниз от самого большого фрагмента. Пример таблицы можно найти в Приложении 1, таблицу необходимо перенести в бланк ответов. (10 баллов)



Шифр _____

Задание 6.3

Сравните полученные результаты для разных клонов. Отличаются ли они, и если отличаются, то почему? (3 балла)

Задание 7. Определение физиологической активности сульфатредукторов

1. Для качественного определения сульфатного дыхания в бактериальной культуре можно использовать сульфат железа(II).
2. Для проведения качественной реакции к 500 мкл 0,1 М раствора сульфата железа(II) добавьте 500 мкл бактериальной культуры и перемешайте переворачиванием или на вортексе.
3. В бланке ответов укажите полученный результат реакции для каждой из бактериальных культур (например, выпадение белого творожистого осадка или выделение газа с резким запахом). Если качественная реакция не идет, поставьте X в соответствующей ячейке. (1 балл)
4. Укажите в бланке ответов, о чем свидетельствуют такие результаты реакции, есть ли сульфатное дыхание в культуре или нет. (2 балла)
5. Запишите химическую реакцию, которая протекает при определении сульфатного дыхания сульфатом железа(II). Укажите, с каким продуктом сульфатного дыхания проходит эта реакция. (2 балла)

Московская олимпиада школьников по генетике, 23.03.2025.
Заключительный этап. Практический тур.
10-11 классы



Шифр _____

Приложение 1. Таблицы для заполнения.

Задание 2.1

Название гена	Геномные координаты	Длина в аминокислотах
Сульфат аденил трансфераза (SAT, sulfate adenylyl transferase)		
Аденилилсульфат редуктаза (ASR, adenylylsulfate reductase)		
DsrAB		
DsrC		

Задание 5.1. Аналитическая рестрикция (5 баллов)

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	мкл в реакционной смеси
Плазмида			
buffer Rose			
Рестриктаза BamHI			
Рестриктаза EcoRI			
mQ			

Московская олимпиада школьников по генетике, 23.03.2025.
Заключительный этап. Практический тур.
10-11 классы



Шифр _____

Электрофорез в агарозном геле

Задание 6 (2 балла)

Компонент	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 3
Рестрикционная смесь, мкл	-		
Буфер для нанесения, мкл	-		
Маркер длин	6. мкл		

(10 баллов) Оценка за технику нанесения, выставляется преподавателем в аудитории.

Задание 6.2

Лунка для Плазмиды 1	Лунка для Плазмиды 2	Лунка для Плазмиды 3	Контроль