



### 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.**



**Перед началом работы**

Все расчеты проводятся исключительно в аудитории, предназначенной для участия в олимпиаде. Перемещение в лабораторию, где осуществляется практическая часть, возможно только в сопровождении дежурного сотрудника. Осуществление расчетов непосредственно в лаборатории не предусмотрено правилами олимпиады.

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

Реактивы и оборудование	Концентрация	Подпись на пробирке	Количество	Отметка о присутствии
ПЦР микс	5x	5x PCR mix	20 мкл	
Праймер прямой	2,5 мкМ	F	16 мкл	
Праймер обратный	2,5 мкМ	R	16 мкл	
Матрица 1		M1	12 мкл	
Матрица 2		M2	12 мкл	
Матрица 3		M3	12 мкл	
Буфер для нанесения проб в агарозный гель	2x	1x LD	20 мкл	
Микропробирки 1,5 мл	-	-	3 шт	
Микропробирки 0,2 мл	-	-	6 шт	
Пипетка-дозатор, 2-20 мкл	-	-	1 пипетка	
Перчатки	-	-	1 пара	



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.

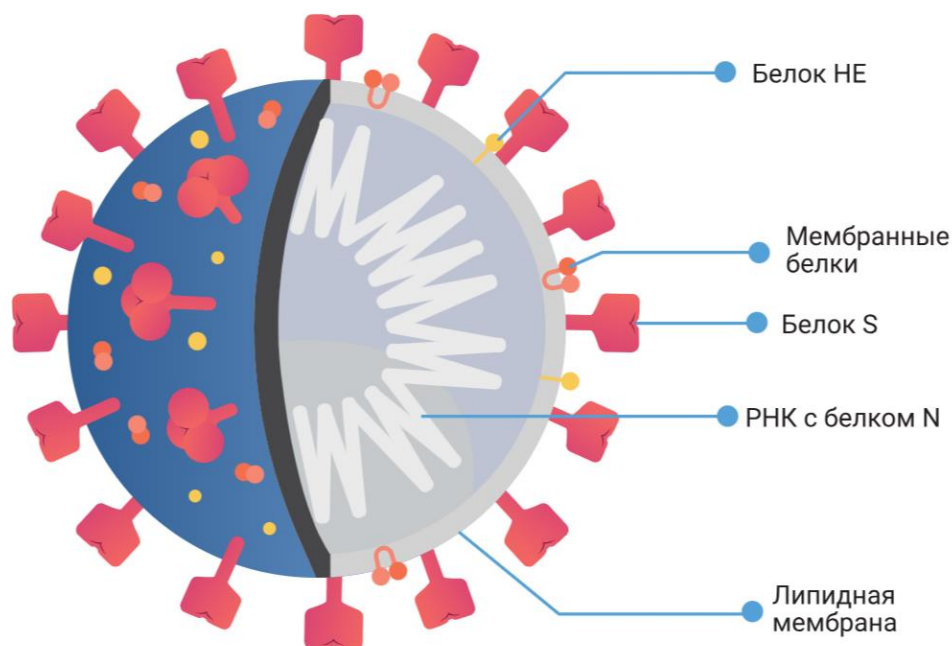
Реактивы и оборудование	Концентрация	Конечная концентрация	Подпись на пробирке
Полимераза	2 ед/ мкл	2 ед на реакцию	Pol
Амплификатор/ термоциклер	-	-	-
Камера для проведения горизонтального электрофореза	-	-	-
Лабораторный источник тока	-	-	-



## ВВЕДЕНИЕ

Коронавирус SARS-CoV-2 – представляет из себя оболочечный вирус. Впервые патоген был выявлен в конце 2019 года в городе Ухань, а вызванное им инфекционное заболевание получило название COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Отличительной особенностью морфологии данного вируса является наличие крупных шиповидных отростков, состоящих из белка S (spike), которые придают ему характерный короноподобный вид при электронной микроскопии.

Ниже представлена схема структуры коронавируса.



### Задание 1. Основы вирусологии

Для систематизации знаний о жизненном цикле вирусов используется классификация, предложенная Дэвидом Балтимором (Нобелевская премия 1975 года), которая основана на типе генетического материала и механизме его репликации. Согласно этой системе, все вирусы разделены на семь классов:

1. **I класс – дцДНК-вирусы**

Геном: двуцепочечная ДНК.

Репликация: в ядре клетки, зависит от клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

2. **II класс – оцДНК-вирусы**

Геном: одноцепочечная ДНК

некомплементарная мРНК.

Репликация: в ядре, сначала синтезируется комплементарная цепь с образованием дцДНК.



3. **III класс – дцРНК-вирусы**

Геном: двуцепочечная РНК.

Репликация: прямое копирование РНК в цитоплазме клетки-хозяина.

4. **IV класс – (+)-оцРНК-вирусы**

Геном: одноцепочечная РНК, функционирующая как мРНК(используется для синтеза вирусных белков).

Репликация: копирование через стадию (-)-РНК

5. **V класс – (-)-оцРНК-вирусы**

Геном: одноцепочечная РНК, комплементарная мРНК.

Репликация: копирование через стадию (+)-РНК

6. **VI класс – РНК-ретровирусы**

Геном: одноцепочечная (+)-РНК.

Репликация: с помощью обратной транскриптазы синтезируется дцДНК, которая встраивается в геном хозяина.

7. **VII класс – дцДНК-ретровирусы**

Геном: двуцепочечная ДНК

Репликация: после транскрипции в РНК обратная транскриптаза синтезирует ДНК, которая встраивается в геном.

1.1 Какие ферменты участвующие в репликации РНК-содержащих кодируются в вирусном геноме? (2 балла)

(Ответ должен содержать: РНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-репликаза), РНК-зависимая ДНК-полимераза (Обратная транскриптаза, ревертаза))

1.2 Какие основные виды вакцин существуют, перечислите их? (4 балла)

Живые вакцины/ инактивированные вакцины/ мРНК вакцины/ векторные вакцины/ субъединичные вакцины

1.3 Какой белок играет ключевую роль для прикрепления коронавируса к клетке? (2 балла)

(белок S-спайковый)

1.4 Какой элемент вирусной частицы является главной мишенью для создания вакцин? (2 балла)

(белок S-спайковый)

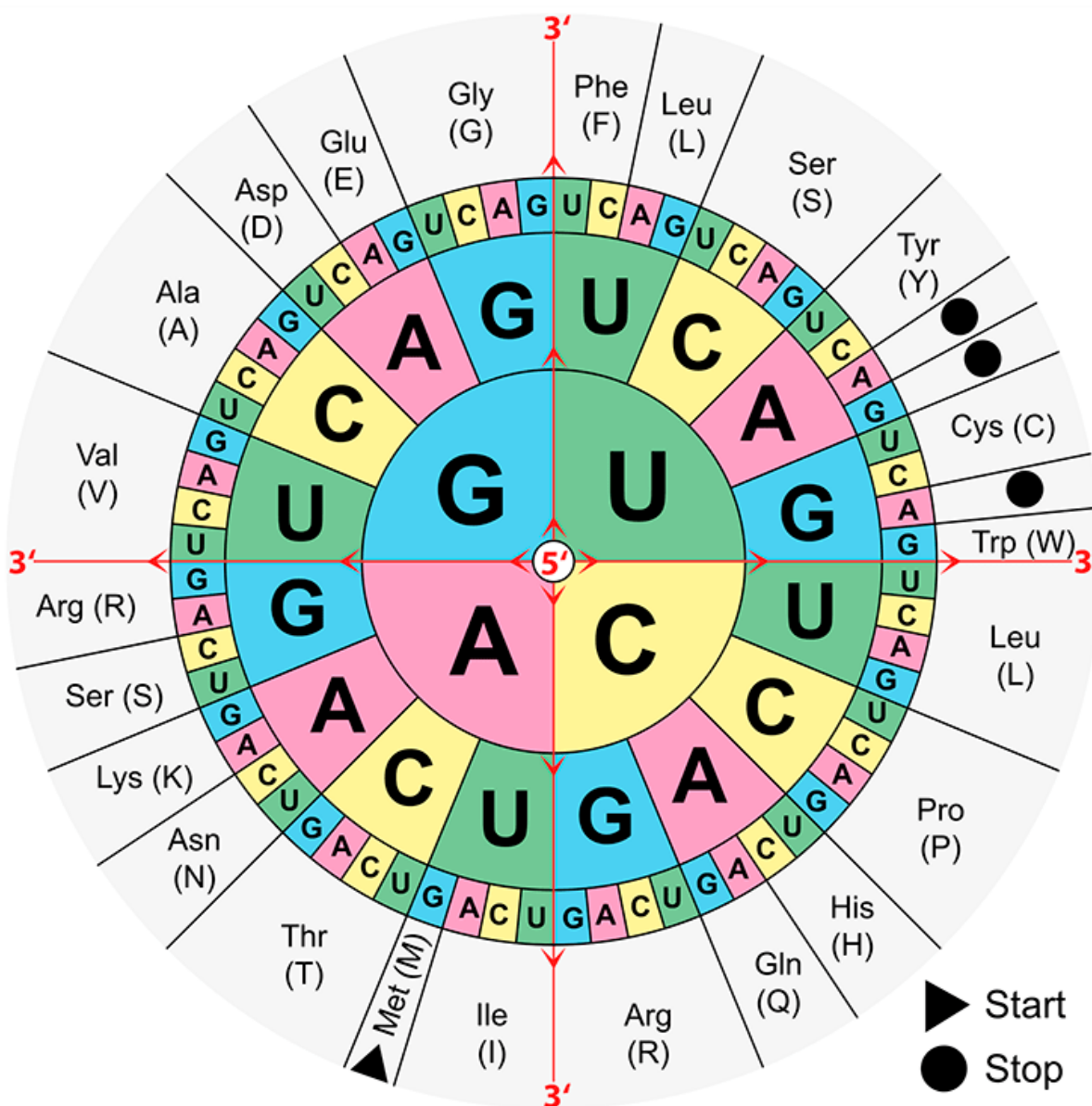
1.5 Какие преимущества дает открытая рамка считывания (ORF) для вирусов? (6 баллов)

(Открытая рамка считывания позволяет кодировать большее разнообразие белков)



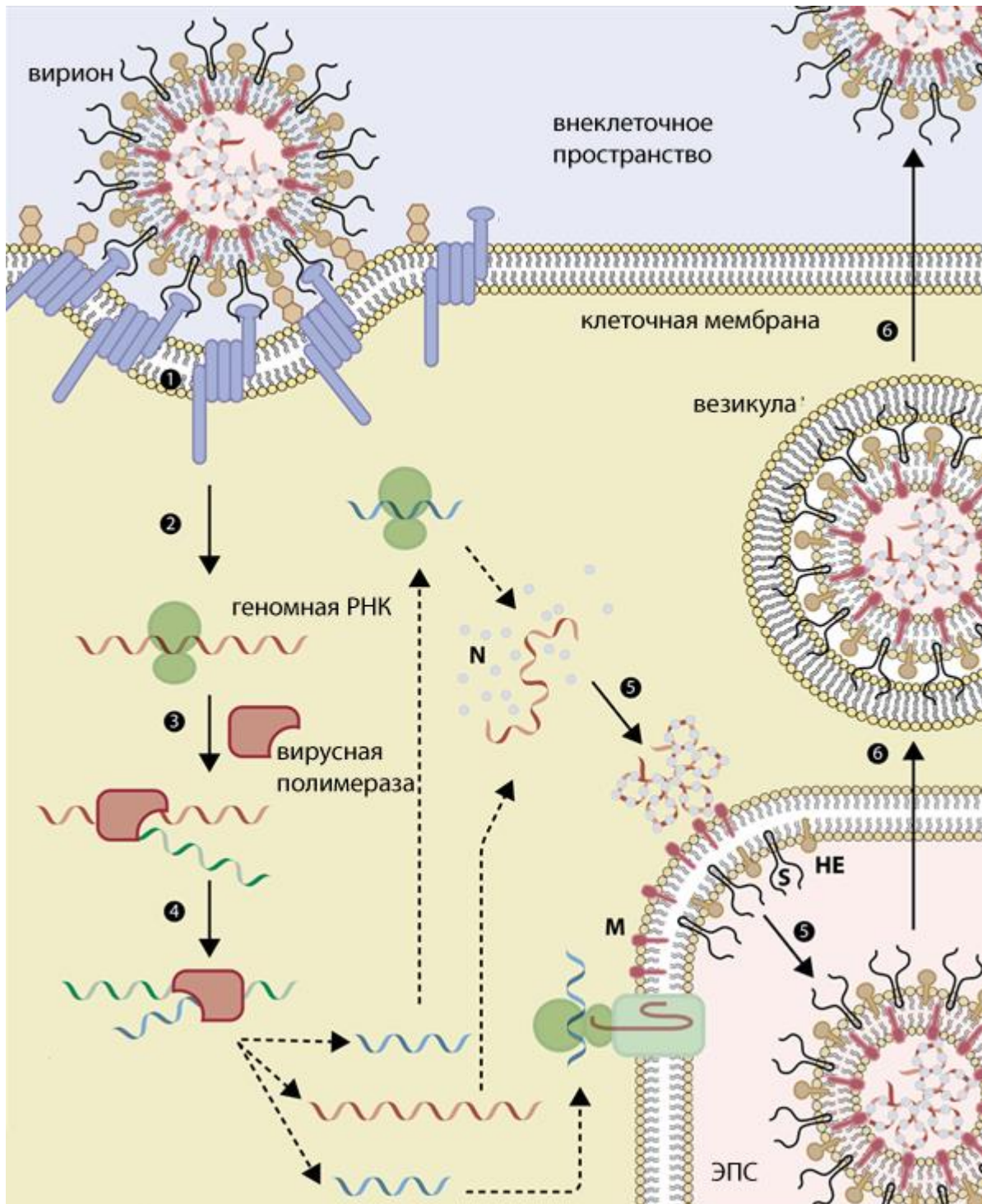
1.6 Используя таблицу генетического кода, определите какую последовательность аминокислот кодирует один и тот же участок геномной нуклеиновой кислоты 5'-GGACGCGAGCGCGAGCGG-3' в разных группах вирусов по Балтимуру (3 балла)

Класс по Балтимуру	Последовательность аминокислот
II класс	Gly-Arg-Glu-Arg-Glu-Arg
IV класс	Gly-Arg-Glu-Arg-Glu-Arg
V класс	Pro-Leu-Ala-Leu-Ala-Ser





1.7 Изучите жизненный цикл коронавируса и выберите верные утверждения.



- A. Оболочка вириона коронавируса формируется из цитоплазматической мембраны клетки-хозяина
- B. Корonavирусы относятся к IV класс по Балтимору
- C. Белки капсида коронавируса синтезируются в цитоплазме
- D. Стадия 4 - синтез (-)-РНК



- Е. Капсид коронавируса формируется за счет взаимодействия вирусных белков N, M и S
- Ф. Одна из стадий жизненного цикла вируса проходит в ядре клетки хозяина

Для определения вирусной инфекции в организме стали широко применять метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для тестирования на ковид используют мазок из носа или ротоглотки. Первый этап исследования – выделение РНК, с последующей амплификации с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для получения комплементарной ДНК (кДНК). Второй этап - проведение ПЦР для специфичных вирусных последовательностей с полученной кДНК и анализ результатов.

Этот метод имеет как свои преимущества, так и ограничения и недостатки. Существует множество факторов, которые могут дать ложноотрицательный результат при тестировании, например слишком ранняя диагностика, использование антисептиков перед взятием мазка, неправильное взятие мазка, малое количество генетического материала, и т.д.

В данной работе вам предстоит выполнить второй этап работы – ПЦР с кДНК.

Длина РНК-последовательности SARS-CoV-2 составляет около 30 000 нуклеотидов. Для проведения ПЦР вам необходимо амплифицировать наименее вариабельный участок (размером для лучшего отжига праймеров и детекции вируса).

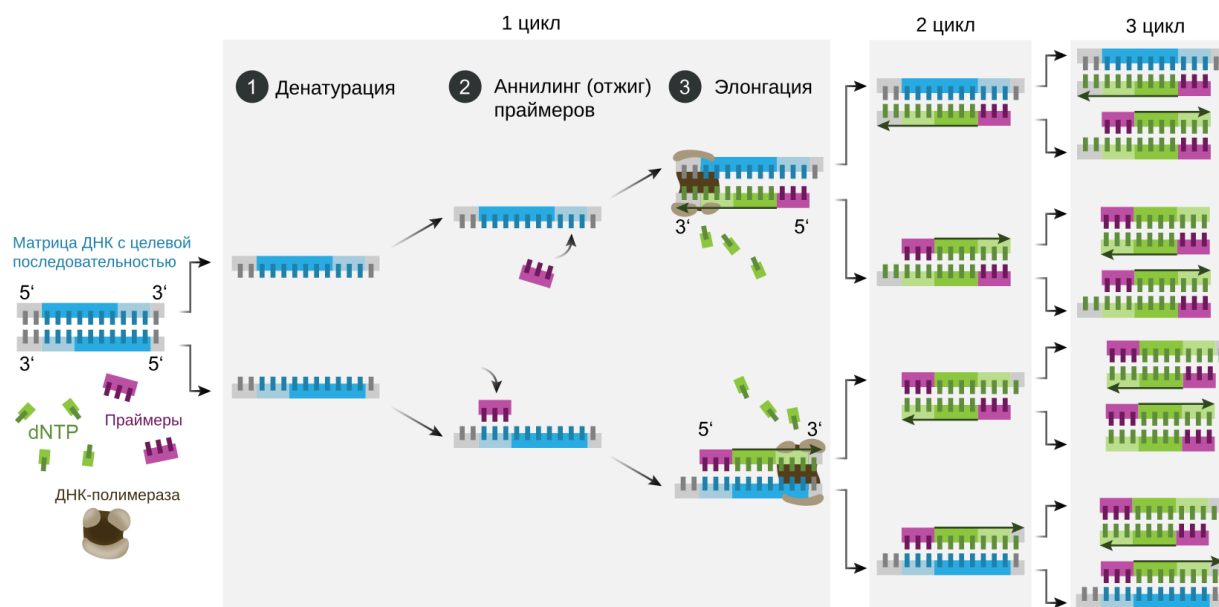
Чтобы изучить эффективность теста вы исследуете несколько “матриц кДНК” методом ПЦР.

Образец	Название образца
Исследуемая матрица	M2
Положительная матрица	M1
Отрицательная матрица	M3



## Задание №2. Полимеразная Цепная Реакция

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.



Метод основан на реакции синтеза ДНК ферментом (ДНК-зависимой-ДНК-полимеразой). ПЦР идет в 3 основных этапа:

- **Денатурация:** разделение цепей исходной ДНК(матрицы) при высокой температуре (~95°C);
- **Отжиг праймеров:** присоединение праймеров к матрице  
*Праймер - это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов, комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Праймеры служат затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы и определяют участок на котором будет происходить копирование. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи.*
- **Элонгация:** копирование цепей ДНК за счет присоединения трифосфат нуклеотидов к 3' концу растущей цепи ДНК(праймера).



Эти 3 этапа образуют цикл и многократно повторяются в ходе одной ПЦР, за счет этого количество целевых молекул ДНК в пробирке многократно возрастает.

Для успешной детекции инфекции, необходимо выбрать консервативный участок вируса и подобрать праймеры комплементарные этому фрагменту. Это позволяет амплифицировать (увеличить в количестве) малые количества только вирусной ДНК и впоследствии обнаружить ее с помощью метода электрофореза нуклеиновых кислот.

## 2.1 ПЦР

2.1.1 Рассчитайте необходимое количество реагентов для проведения ПЦР для всех трех исследуемых проб. Обратите внимание, что объем реакционной смеси должен быть 24 мкл. Ответы внесите в бланк.

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	Мкл в реакционной смеси
Матрица	5 нг/мкл	50 нг на реакцию	10 мкл
ПЦР смесь	5x	1x	5 мкл
Праймер F	2,5 мкМ	100 нМ	4 мкл
Праймер R	2,5 мкМ	100 нМ	4 мкл
Полимераза (если она не сразу в смеси)	2 ед/ мкл	2 ед на реакцию	1 мкл

2.1.2 После расчета количества всех необходимых компонентов обратитесь к преподавателю для получения реактивов, которые хранятся в холодильнике.

2.1.3 Приготовьте ПЦР смесь согласно вашему плану. Затем перенесите нужный объем ПЦР-премикса и матриц в пробирки для амплификации объемом 0,2 мл и подпишите их.



2.1.4 Обратитесь к преподавателю в аудитории, чтобы он помог вам поставить пробирки в амплификатор. Проследите, что ваши пробирки подписаны, и вы отличите их от чужих.

2.1.5 По окончании времени обратитесь к преподавателю, чтобы он выдал вам ваши пробирки.

### Теоретические задания по полимеразной цепной реакции

2.2 Рассчитайте температуру отжига праймера для ПЦР. Ответ запишите в виде числа. (2 балла)

СТТТАGСССAAGGTATGCGA

Формула для расчета  $Tm=2 \times (A+T)+4 \times (G+C)$ .

60

2.3 Какое количество молекул ДНК теоретически можно получить, если поставить 30 циклов ПЦР используя в качестве матрицы 5 молекул ДНК? (3 балла)

5

368

709

120

2.4 Для постановки ПЦР используется *Taq*-полимераза выделенная из *Thermus aquaticus* — граммотрицательной палочковидной экстремально-термофильной бактерии. Какие преимущества имеет эта полимеразы в реакции ПЦР? Ответ поясните. (4 балла)

Термостабильность, ферменты из термофильных бактерий более устойчивы к нагреванию (2 балла)

Для разрушения двуцепочечной структуры матрицы смесь ПЦР нагревается до 95°C, при такой температуре обычные ферменты денатурируют (2 балла)

2.5 Любой тест может давать ложно положительные (положительные при отсутствии заболевания) и ложно отрицательные (отрицательные у больного человека). В клинической практике и эпидемиологических исследованиях важно оценить, насколько точно лабораторный тест позволяет выявить заболевание. Для этого используют три ключевые характеристики: чувствительность, специфичность и точность.



- Чувствительность (sensitivity) – это вероятность того, что тест будет положительным, если человек болен.
- Специфичность (specificity) – это вероятность того, что тест будет отрицательным, если человек здоров.
- Точность (accuracy) – вероятность того что тест выдаст правильный результат.

Используя результаты исследования некоторого ПЦР теста, определите его характеристики. Ответы укажите в процентах.

Результаты проведенного исследования	
Истинно положительные результаты	Ложно положительные результаты
90	8
Истинно отрицательные результаты	Ложно отрицательные результаты
392	10

Характеристики

ПЦР

теста:

Чувствительность: 90%

Спцифичность: 98%

Точность: 96,4%

**2.6** Однако более важным показателем в доказательной медицине считается прогностическая ценность положительного результата(ПЦПР) - вероятность оказаться больным если был получен положительный результат теста на заболевание. Данный показатель зависит от характеристик теста и распространенности заболевания в популяции. Для расчета ПЦПР можно использовать формулу Байеса:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A) P(A)}{P(B)},$$



где,  $P(A|B)$  - вероятность события А при условии наступления события В,  $P(B|A)$  - вероятность события В при условии наступления события А,  $P(A)$  - вероятность события А(вне зависимости от события В),  $P(B)$  - вероятность события В(вне зависимости от события А).

По статистическим оценкам наибольшая доля одновременно болеющих коронавирусом(штамм омикрон) в Москве была зафиксирована в феврале 2022 года и составляла 300 000 человек. Считайте что всего в москве проживает 13 миллионов человек. Рассчитайте ПЦПР для теста на коронавирус со следующими характеристиками:

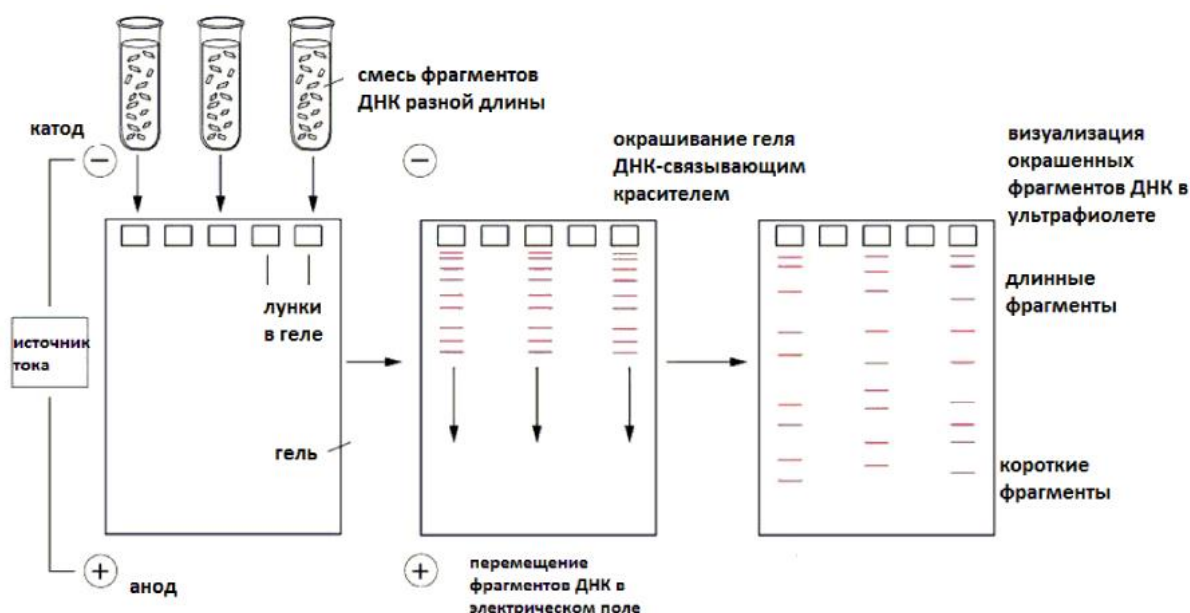
- Чувствительность: 92%
- Специфичность: 95%
- Точность: 93%

*Подсказка: ПЦПР можно записать как*

***$P(\text{быть больным} \mid \text{получить положительный результат теста})$***

### **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 двухкратный (2x) буфер для нанесения с образцом в количестве, необходимом для достижения рабочей концентрации буфера (1x). Обратите внимание, что **максимальный** объем нанесения в лунку - 10 мкл. Для большей четкости электрофореграммы мы советуем наносить максимально возможное количество пробы.

2. Укажите в бланке (3.1), сколько микролитров рестрикционной смеси и буфера вы возьмете для нанесения своего образца. (2 балла)

**Ответ: 5 мкл смеси и 5 мкл буфера**

3. Обратитесь к преподавателю в аудитории и нанесите свои образцы в указанные преподавателем лунки геля.

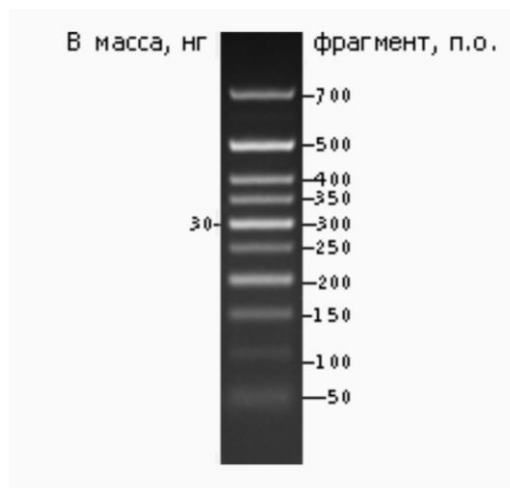
4. После окончания электрофореза вы получите распечатанную фотографию вашего геля для анализа. Прикрепите фотографию к бланку ответов (3.2). (10 баллов)

**Ответ: На геле должны быть нанесены 3 пробы. Один фрагмент в диапазоне 205 п.н., второй 151п.н.)**



### Теоретические задания по электрофорезу

**3.3** Изучите полученную электрофореграмму исследуемых образцов, определите приблизительный размер фрагментов, используя референсные значения (см. рисунок справа) для маркера длин. Размер фрагмента укажите в виде диапазона соседних фрагментов маркера длин (например, 300-350 п.н.) (5 баллов)  
( 250–500 п.н./ 100-150 п.н.).



#### Задание

#### 3.4

Отличается ли длинна полученных фрагментов в исследуемых пробах(если да то какой из фрагментов имеет большую длинну)? С чем это может быть связано?  
(5 баллов)

Да, фрагмент из пробы ..... длинее фрагмента из пробы .... (2 балла)

Наличие двух разных вариантов инфекции, у одной из них произошла делеция  
(3 балла)

#### Задание 3.5

При анализе электрофорезного геля с помощью трансиллюминатора (детекция нуклеиновых кислот с помощью УФ) в лунке К(-) вы можете обнаружить яркий “хвост”. Как можно это объяснить? Как это можно предотвратить, перечислите не менее двух вариантов. (3 балла)

Контаминация. Смена носиков, проверка реактивов, использование перчаток и халата.

## Критерии оценивания

### 1 часть (20 баллов)

#### 1.1 ( 2 балла)

РНК-зависимая РНК-полимераза (РНК-репликаза) - 1 балл

РНК-зависимая ДНК-полимераза (Обратная транскриптаза, ревертаза) - 1 балл

#### 1.2 ( 3 балла)

Ответ: Живые вакцины/ инактивированные вакцины/ мРНК вакцины/ векторные вакцины/ субъединичные вакцины

4-5 видов – 3 балла

3 вида – 2 балла

1-2 вида - 1 балл

#### 1.3 ( 2 балла)

белок S-спайковый (шиповидный)

#### 1.4 ( 2 балла)

белок S-спайковый (шиповидный)

#### 1.5 ( 5 баллов)

ответ на 3 из 3 вопросов, дали пояснения - 5 баллов

ответ на 2 из 3 вопросов, дали пояснения - 4 баллов

ответ на 1 из 3 вопросов, дали пояснения - 3 баллов

нет ответ на 3 вопроса, дали пояснения - 2 баллов

ответ на 3 из 3 вопросов, без пояснения - 3 баллов

каждый ответ на вопрос - 1 балл

пояснение эволюционного механизма - 3 балла

#### 1.6 ( 3 балла)

3/3 - 3 балла

2 /3 - 2 балла

1/ 3 - 1 балл

#### 1.7 ( 3 балла)

Ответ: А, В, С

Каждый правильный ответ - 1 балл

Если выбрали 3 правильных и 1 неправильный - 2 балла

2 правильных и 2 неправильных - 1 балл

## **2 часть 30 баллов)**

### **2.1 ( 3 балла)**

Матрица – 0,5 балла

ПЦР смесь – 0,5 балла

Праймер F– 0,5 балла

Праймер R – 0,5 балла

Полимераза – 1 балла

### **2.2 ( 6 баллов)**

Каждый верный праймер 3 балла

### **2.3 ( 3 баллов)**

5368709120, правильный ответ – 3 балла

Если есть формула для подсчета - 1,5 балла

### **2.4 ( 4 баллов)**

Термостабильность, ферменты из термофильных бактерий более устойчивы к нагреванию (2 балла)

Для разрушения двуцепочечной структуры матрицы смесь ПЦР нагревается до 95°C, при такой температуре обычные ферменты денатурируют (2 балла)

### **2.5 ( 6 баллов)**

Характеристики ПЦР теста:

Чувствительность: 90%

Специфичность: 98%

Точность: 96,4%

За каждый правильный ответ 2 балла

## **2.6 ( 8 баллов)**

Вычисление только  $P(A)$  верно - 2,5 балла

Вычисление только  $P(B)$  верно - 2,5 балла

Вычисление  $P(A/B)$  верно - 8 балла

## **3 часть (25 баллов)**

### **3.1 ( 2 баллов)**

5 мкл смеси и 5 мкл буфера

### **3.2 ( 10 баллов)**

Наличие фотографии геля после электрофореза

### **3.3 ( 5 баллов)**

200-250 п.н. - 2,5 балла

100-150 п.н. - 2,5 балла

### **3.4 ( 5 баллов)**

Да, фрагмент из пробы 200-250 длинее фрагмента из пробы 100-150 – 2 балла

Наличие двух разных вариантов инфекции /у одной из них произошла делеция – 3 балла

### **3.5 ( 3 балла)**

Контаминация - 1 балл

Смена носиков - 1 балл

Проверка реактивов - 0,5 балла

Использование перчаток и халата - 0,5 балла