



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*, распечатанных из личного кабинета участника. 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 штрих-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.



Перед началом работы

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

Реактивы и оборудование	Подпись на пробирке	Количество	Отметка о присутствии
Вектор, плаزمида pTagBFP-C	pTag-C	1 пробирка	
Исследуемый образец, плазмида pTagBFP-actin	pTag-actin	1 пробирка	
Буфер для Taq полимеразы	Taq buf	1 пробирка	
Хлорид магния	MgCl ₂	1 пробирка	
Стерильная вода	mQ	1 пробирка	
Раствор нуклеотидов	dNTP	1 пробирка	
Прямой праймер	FWD	1 пробирка	
Обратный праймер	REV	1 пробирка	
Пробирки для ПЦР 0,2 мл	-	3 пробирки	
Микропробирки 1,5 мл	-	6 пробирок	
Буфер для проведения рестрикции	SE buf	1 пробирка	
Перчатки	-	1 пара	
Камера для горизонтального электрофореза	-	1 на 2-х человек	
Контейнер с агарозным гелем для проведения электрофореза	-	1 на 2-х человек	
Пипетка-дозатор, 2-20 мкл	-	1 шт	
Пипетка-дозатор, 20-200 мкл	-	1 шт	
Коробка с наконечниками для пипетки дозатора на 2-20 мкл	-	1 на 2-х человек	
Коробка с наконечниками для пипетки дозатора на 20-200 мкл	-	1 на 2-х человек	
Буфер для нанесения проб в агарозный гель	LD	1 пробирка	



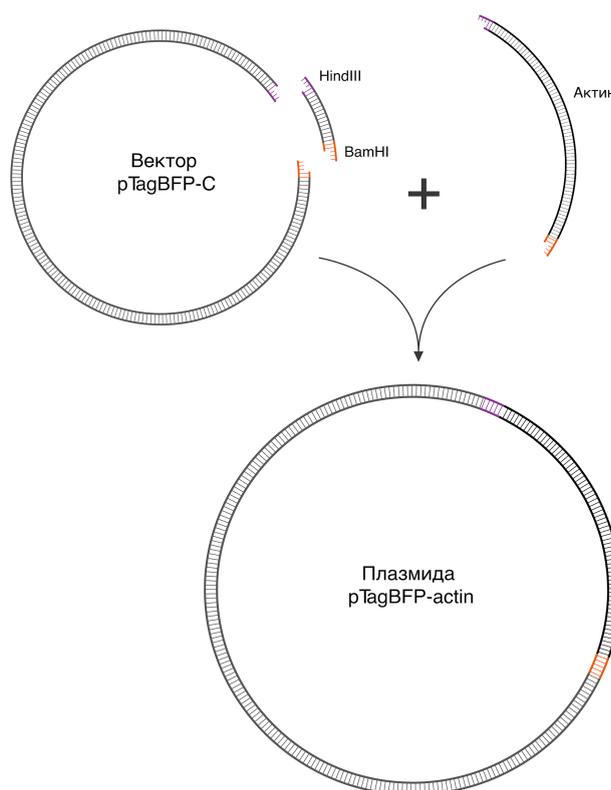
Помимо этого, в процессе работы вам понадобится оборудование, которое используется всеми участниками в аудитории, его местоположение вам покажет волонтер или преподаватель. Включение и выключение данного оборудования производится **ТОЛЬКО волонтерами или преподавателем**. Помимо этого, некоторые необходимые 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	Подпись на пробирке
Амплификатор	-
Термостат для пробирок	-
Эндонуклеаза рестрикции EcoRI	EcoRI
Эндонуклеаза рестрикции BamHI	BamHI
Эндонуклеаза рестрикции HindIII	HindIII
Эндонуклеаза рестрикции EcoRV	EcoRV
Taq полимеразы	Taq pol

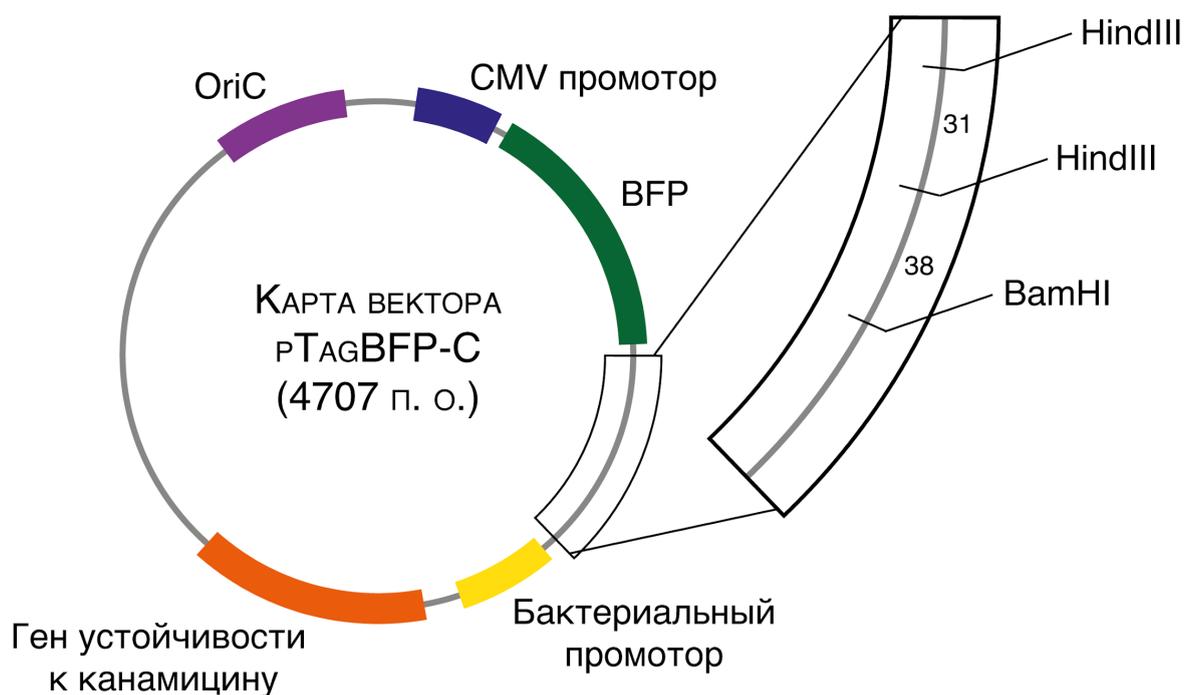


Практический тур

Для исследования свойств актиновых филаментов в клетке вами была получена плазмида, которая при трансфекции клеток эукариот обеспечивает в клетке синтез гибридного белка β -актин~BFP. С помощью последовательных реакций рестрикции и лигирования в вектор pTagBFP-C был встроен фрагмент ДНК, кодирующий β -актин. Таким образом, о данной генной конструкции вам известно следующее.



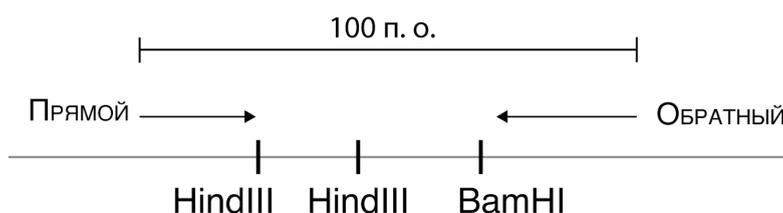
1. В ходе ее получения использовалась плазмида pTagBFP-C (карта представлена ниже) и нуклеотидная последовательность кодирующая β -актин (карта представлена ниже).
2. При клонировании (сборке генно-инженерной конструкции) фрагмент ДНК, кодирующий β -актин, и исходный вектор обрабатывали эндонуклеазами HindIII и BamHI, затем очищали от нецелевых фрагментов и сшивали с помощью ДНК-лигазы. Однако, прежде чем проводить эксперименты с этой плазмидой, вам необходимо подтвердить ее структуру. Вы можете сделать это двумя доступными вам методами: ПЦР и аналитической рестрикцией.



КАРТА ВСТАВКИ



МЕСТА СВЯЗЫВАНИЯ ПРАЙМЕРОВ НА ВЕКТОРЕ



ПЦР

ПЦР - полимеразная цепная реакция, метод молекулярной биологии, который позволяет увеличить (амплифицировать) количество исследуемых фрагментов ДНК. В основе этого метода лежит циклическая активация работы термостабильной ДНК-зависимой-ДНК-полимеразы. В ходе работы этот фермент множество раз копирует целевой фрагмент ДНК.



Перед началом работы фермента смесь ДНК, фермента и необходимых компонентов реакционной смеси нагревается до 95°C, чтобы денатурировать ДНК (стадия 1). Специфичность копирования ДНК определяется специальными ДНК затравками – праймерами. Они комплементарно связываются с последовательностью ДНК и дают возможность ДНК-полимеразе связаться с ДНК-матрицей и начать синтез (стадия 2). Далее смесь нагревается до оптимальной температуры работы фермента и фермент осуществляет синтез фрагментов ДНК (стадия 3). Затем цикл (стадии 1-3) повторяется, что в теории приводит к увеличению числа целевых фрагментов ДНК в $(2^n - 2n)$ раз. Такой способ позволяет не только увеличить число копий молекул ДНК, но и понять, присутствует ли некая определенная ДНК в растворе, поскольку праймеры имеют специфическую последовательность.

Для подтверждения с помощью ПЦР того, что в исследуемой плазмиде присутствует нужная вставка, необходимо одновременно провести 3 реакции, в которых будет отличаться только исследуемый образец: в одном случае это будет вода (отрицательный контроль), во втором случае - исходный вектор pTagBFP-C (положительный контроль) и в третьем - исследуемый образец. Поскольку во всех трех реакциях отличаться будет только матрица для ПЦР, удобно будет смешать все необходимые реактивы, кроме матрицы, и затем разделить эту смесь по необходимому количеству пробирок и добавить матрицу. Смесь, содержащая все необходимые компоненты, кроме матрицы, будет далее называться премикс. На случай ошибки пипетки премикс обычно смешивается на большее количество пробирок, чем нужно.

Ход работы

1. Смешайте премикс на 4 реакции. Суммарный объем реакции 20 мкл, из них 1 мкл - это матрица, которая на этом этапе не добавляется. **(1.1)** Исходя из этого, рассчитайте необходимое количество реактивов на 1 реакцию (1x) и на весь премикс (4x) и заполните таблицу в листе ответов. Taq-полимераза хранится исключительно в холодильнике, попросите ее у преподавателя после того, как смешаете остальные реактивы. При добавлении каждого компонента следите за тем, чтобы в наконечнике дозатора не было пузырей. Тщательно перемешайте смесь с помощью пипетирования (попеременного набора и сливания смеси пипеткой, рекомендуемый объем ~20 мкл). Затем перенесите по 19 мкл ПЦР-премикса в пробирки для амплификации на 0,2 мл. подпишите пробирки: “1”, “2”, “3”.



Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация
Turbo Buf	10x	1x
Fwd	10 mM	0.5 mM
Rev	10 mM	0.5 mM
Mg ²⁺	50 mM	2.5 mM
dNTPs	2mM	0.2 mM
mQ	-	-
Taq-полимераза	5 ед/мкл	2,5 ед на реакцию

- Далее добавьте матрицу по 10 нг (1 мкл): в “1” - 1 мкл стерильной воды, в “2” - 1 мкл вектора pTagBFP-C, в “3” - 1 мкл образца pTagBFP-actin.
- Передайте пробирки волонтеру или преподавателю. Попросите вписать номера ячеек амплификатора, в которые он поставил ваши пробирки.

1	2	3

Теоретические задания про ПЦР

1.2 В описании хода работы представлены все компоненты, входящие в состав реакционной смеси ПЦР. Опишите в таблице в листе ответов, какие функции выполняет каждый из компонентов.

1.3 Ниже приведена таблица температур и временных интервалов для разных стадий проводимой вами ПЦР. Укажите в листе ответов, от чего будет зависеть значение параметров 1, 2 и 3.



Стадия		Температура, °С	Время, m:ss
Первичная денатурация		95	3:00
цикл (x20)	Денатурация	95	0:20
	Отжиг	62 (1)	0:15
	Элонгация	72 (2)	0:15 (3)
Финальная элонгация		72	3:00

Укажите ответы на следующие вопросы в листе ответов.

1.4 В чем заключается роль реакции “1” как отрицательного контроля? Какие выводы можно сделать, если в этой реакции мы увидим такой же фрагмент, как и в исследуемом образце, и какие, если НЕ увидим никаких фрагментов?

1.5 В чем заключается роль реакции “2” как положительного контроля? Какие выводы можно сделать, если в этой реакции мы увидим амплифицированный фрагмент, и какие, если НЕ увидим амплифицированных фрагментов?

1.6 Основываясь на представленных выше картах вектора и вставки, рассчитайте ожидаемую длину полученных в результате ПЦР фрагментов для реакций “2” и “3”.



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. Значит, имея точную карту молекулы ДНК с отмеченными сайтами рестрикции, можно с помощью рестрикции определенными рестриктазами отличить одну ДНК от другой, обращая также внимание на длины и подвижность полученных фрагментов ДНК на электрофореграмме.

2.1 Основываясь на картах вектора и фрагмента, составьте и нарисуйте предполагаемую карту рестрикции исследуемой плазмиды и предложите, какие рестриктазы (или пары рестриктаз) можно использовать для того, чтобы однозначно отличить пустой вектор и исследуемую плазмиду со вставкой.

Ход работы

1. Выберите одну или две рестриктазы необходимые вам для идентификации плазмид. **(2.2)** Впишите их в таблицу в листе ответов и объясните, какой длины фрагменты вы хотите получить, и как будут отличаться реакция 2 и 3. Сообщите волонтеру, чтобы он выдал вам пробирки с этими ферментами.
2. Рассчитайте в листе ответов **(2.3)** необходимое количество буфера и воды (mQ) в реакционной смеси и смешайте две реакционные смеси: одну для вектора и одну для исследуемого образца. В качестве Rest1 и Rest2 используйте ранее подобранные для каждой плазмиды эндонуклеазы рестрикции.



Компонент	Исходная концентр ация	Конечная концентрац ия.	1x[20мкл]
Buf	10x	1x	
Rest 1	-	-	2
Rest 2	-	-	2
mQ	-	-	
Плазмида	10 нг/мкл	50 нг на реакцию	5

3. Подпишите пробирки “2” - вектор, “3” - целевой образец.
4. В пробирку “1” добавьте 5 мкл исследуемой плазмиды pTagBFP-actin и доведите до 20 мкл водой mQ.
5. Поставьте в термостат **2 пробирки (2 и 3)** на 15 минут.



Теоретические задания по аналитической рестрикции

Укажите решения в листе ответов.

- 2.4 Эндонуклеазы рестрикции выделяют из бактерий. Какую роль эти ферменты выполняют в бактериальных клетках?
- 2.5 Постройте карту рестрикции для вектора, если известно, что на нем есть еще и сайты рестрикции эндонуклеазы XmaI. При рестрикции вектора двумя эндонуклеазами HindIII и XmaI получается 4 фрагмента, два из которых имеют длину 2436 п.н. и 1015 п.н. При рестрикции вектора эндонуклеазами BamHI и XmaI получается 3 фрагмента, два из которых имеют длину 1187 п.н. и 1015 п.н.
- 2.6 Рассчитайте среднее расстояние между сайтами рестрикции HindIII в геномной ДНК.



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 шестикратный (6х) буфер для нанесения с образцом в количестве, необходимом для достижения рабочей концентрации буфера (1х).
(3.1) Укажите в листе ответов, какое количество буфера для нанесения вы добавили к каждой из смесей.
2. Нанести по 15 мкл каждого образца, смешанного с буфером для нанесения, в соответствующие лунки геля (строго соблюдайте порядок нанесения в лунки, представленный ниже) и в 4 лунку 6 мкл маркера длин.

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7
Образец	ПЦР (1) вода	ПЦР(2) вектор	ПЦР (3) образец	Маркер длин	Рестр. (1) Исходный образец	Рестр. (2) Вектор после рестр.	Рестр. (3) Образец после рестр.

3. Позовите волонтера или преподавателя, чтобы он запустил источник тока.



Теоретические задания по электрофорезу

Укажите решения в листе ответов.

- 3.2 В каком направлении будут двигаться нуклеиновые кислоты в электрическом поле? Ответ поясните.
- 3.3 Почему скорость движения нуклеиновых кислот в агарозном геле пропорциональна их длине?
- 3.4 Агарозные гели для электрофореза отличаются по процентному содержанию агарозы в них: чем выше содержание агарозы - тем более плотный гель получается. Что будет изменяться в процессе электрофореза при изменении содержания агарозы в геле? В каких случаях лучше использовать гели с высоким содержанием агарозы, а в каких - с низким?
- 3.5 Для идентификации ДНК в агарозном геле в него добавляется специальное вещество, которое связывается с ДНК и флуоресцирует при освещении ультрафиолетом. Это вещество - бромистый этидий, его структура представлена ниже. Предположите, каким образом он взаимодействует с ДНК.

