

## Московская олимпиада школьников по генетике, 03.04.2022

### Заключительный этап. Практический тур.

#### 10-11 классы

Перед началом практического тура убедитесь, что у вас на рабочем месте находится автоматическая пипетка 2-20 с соответствующими наконечниками и следующие эппендорфы в штативе для эппендорфов:

- 1) геномная ДНК пациента (подпись DNA);
- 2) ПЦР-смесь (подпись PCR);
- 3) олиго-смесь (подпись 590 или 481);
- 4) деионизованная вода (MQ);
- 5) рестриктаза BamHI (подпись B);
- 6) рестриктаза KpnI (подпись K);
- 7) рестриктаза TaqI (подпись T);
- 8) буфер B;
- 9) буфер Y;
- 10) буфер R;
- 11) ПЦР-продукт для рестрикции (подпись X).

Остальное оборудование, необходимое для выполнения заданий практического тура, может использоваться только в присутствии преподавателя и будет дополнительно озвучено в ходе начального инструктажа.

#### Задание 1 (2 балла).

Вам необходимо приготовить в отдельном эппендорфе образец для ПЦР в реальном времени (real time PCR). Для этого сначала заполните пустые ячейки таблицы, если известно, что ПЦР-смесь, а также олиго-смесь в 5 раз более концентрированы, чем должны быть в итоговом образце для ПЦР:

Реагент	Объём
геномная ДНК (подпись DNA)	5 мкл
ПЦР-смесь (подпись PCR)	5 мкл (0,5 балла)
олиго-смесь (подпись 590 или 481)	5 мкл (0,5 балла)
деионизованная вода (MQ)	10 мкл (1 балл)
<b>Общий объём</b>	<b>25 мкл</b>

После расчёта объёмов всех необходимых реагентов смешайте их в эппендорфе для ПЦР в реальном времени (стенки такого эппендорфа пропускают флуоресценцию). Такой эппендорф необходимо попросить у преподавателя, находящегося в аудитории проведения практического тура.

После смешения всех необходимых реагентов отдайте эппендорф преподавателю, преподаватель поместит эппендорф в амплификатор, а затем через 1,5 часа отдаст вам распечатанные результаты ПЦР. Во время прохождения ПЦР решайте другие задания.

#### Задание 2.

ПЦР в реальном времени вы используете для определения наличия или отсутствия в геномной ДНК пациента определённого однонуклеотидного полиморфизма (SNP). SNP – это замена одного нуклеотида в основном аллельном варианте какого-либо геномного локуса на другой нуклеотид.

**2.1 (2 балла, по 0,4 балла за выбранный верный пункт и невыбранный неверный пункт).** К каким последствиям может привести однонуклеотидная замена в промоторе белок-кодирующего гена?

**а) повышению уровня экспрессии белка, кодируемого обсуждаемым геном**

б) снижению уровня экспрессии этого белка

в) появлению в клетке дефектного варианта обсуждаемого белка

г) появлению более длинного варианта обсуждаемого белка

д) однонуклеотидная замена в промоторе может не привести ни к каким последствиям

**2.2 (2 балла, по 0,4 балла за выбранный верный пункт и невыбранный неверный пункт).** К каким последствиям может привести однонуклеотидная замена в кодирующем участке белок-кодирующего гена?

а) замене определённой аминокислоты в обсуждаемом белке

б) повышению уровня экспрессии белка, кодируемого обсуждаемым геном

в) появлению в клетке дефектного варианта обсуждаемого белка

г) появлению более короткого варианта обсуждаемого белка

д) однонуклеотидная замена в кодирующем участке может не привести ни к каким последствиям

В нашем задании вы исследуете несколько полиморфизмов в кодирующих участках гена NAT2, ответственного за синтез фермента N-ацетилтрансферазы 2. Данный фермент участвует в метаболизме некоторых лекарственных средств, поэтому привлекает внимание медиков и фармакологов.

ПЦР в реальном времени – это разновидность полимеразной цепной реакции, при которой благодаря накоплению флуоресцентного сигнала можно следить в реальном времени за накоплением ПЦР-продукта. Данный метод не требует следующего за классической ПЦР электрофореза для детекции ПЦР-продукта. Помимо этого, ПЦР в реальном времени сильно более чувствительна, чем классическая ПЦР, поэтому может быть использована для анализа проб, содержащих очень маленькие количества матричной ДНК.

Для детекции SNP используют две модификации ПЦР в реальном времени:

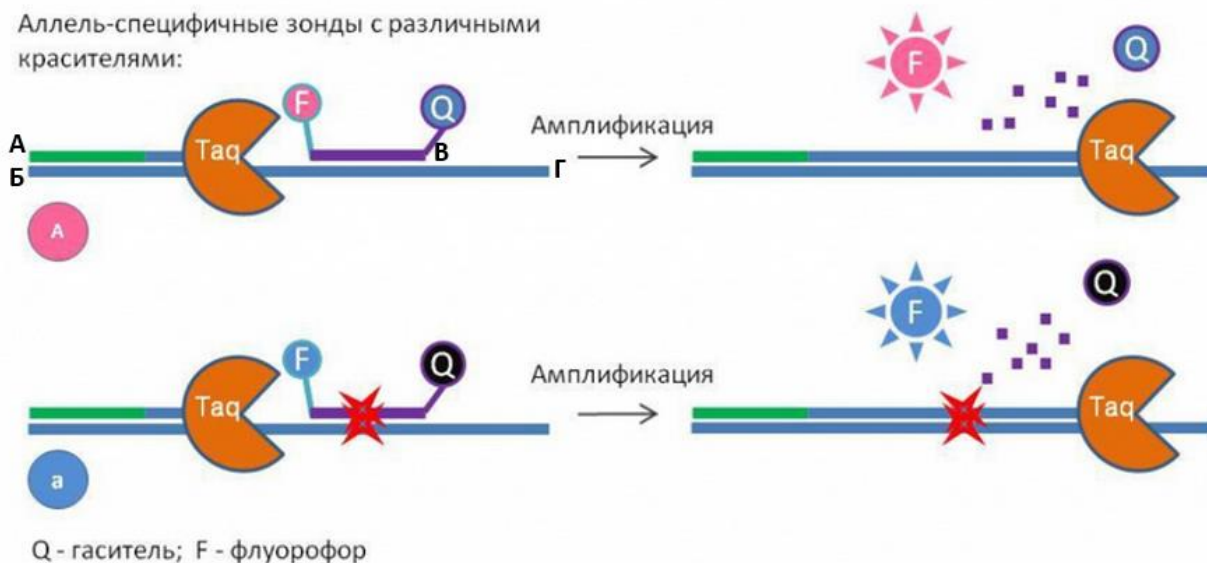
- 1) метод с использованием разных аллель-специфических зондов;
- 2) метод с использованием одного аллель-специфического зонда.

В первом методе подбирают небольшие последовательности ДНК (зонды), комплементарные участку гена, где может быть полиморфизм. Для каждого полиморфизма существует свой зонд, последовательность нуклеотидов которого полностью комплементарна какому-то из полиморфных вариантов. Если по полиморфному локусу встречается только два полиморфных варианта, то нужно два специфических зонда. Каждый из этих зондов несёт на себе ковалентно присоединённую флуоресцентную метку (флуорофор F), флуоресцирующую конкретным светом (например, как на рисунке, розовым либо голубым).

Если зонд, благодаря своей полной комплементарности, гибридизуется с исследуемым локусом генома, то такая конструкция не флуоресцирует, так как к зонду, помимо флуорофора, присоединён ковалентно ещё и гаситель флуоресценции Q – вещество, блокирующее флуоресценцию от флуорофора, если флуорофор и гаситель находятся достаточно близко друг к другу. Свободный зонд в растворе также не флуоресцирует, так как соединён и с флуорофором, и с гасителем.

Благодаря наличию в ПЦР-смеси праймеров (на рисунке показаны зелёным) и Taq-полимеразы (показана оранжевым) начинается синтез комплементарных цепей ДНК. Как только полимеразы доходит до места нахождения зонда, она, из-за своей 5'-3'-экзонуклеазной активности, расщепляет зонд на отдельные нуклеотиды, в результате чего флуорофор освобождается от гасителя, свободно диффундирует в раствор и начинает флуоресцировать. Таким образом, уровень флуоресценции раствора будет расти вместе с накоплением определённых ПЦР-продуктов. Если в ДНК пациента не встречается

конкретный полиморфный вариант исследуемого локуса, то соответствующий зонд не будет гибридизоваться с ДНК и, как следствие, не будет расщепляться ДНК-полимеразой, поэтому его флуоресценцию в пробе мы не увидим.



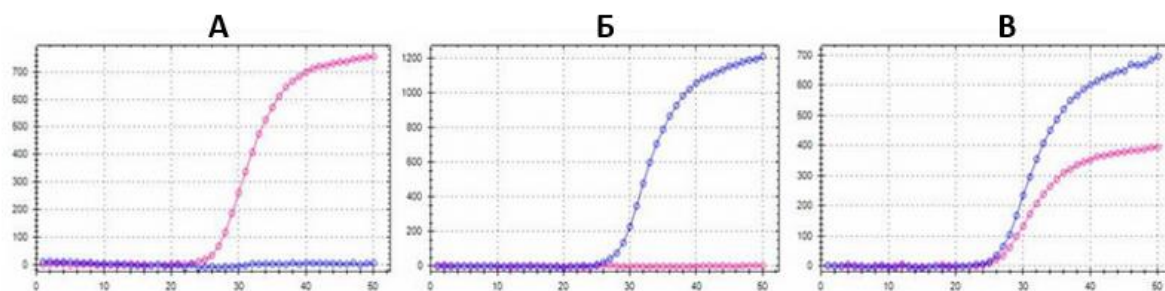
**Задание 2.3(2 балла, по 0,5 балла за пункт).** На рисунке буквами А, Б, В, Г обозначены определённые концы цепей ДНК, подпишите, какой конец находится на месте каждой буквы.

А – 5', Б – 3', В – 3', Г – 5'

**Задание 2.4(1 балл).** Какие связи разрушает ДНК-полимераза в процессе уничтожения зонда?

- а) N-гликозидные
- б) O-гликозидные
- в) фосфоэфирные
- г) фосфоангидридные

**Задание 2.5 (1 балл за все верные пункты, в остальных случаях 0).** Кривые накопления флуоресценции при использовании метода ПЦР в реальном времени с разными аллель-специфическими зондами выглядят как показано на рисунке ниже. Для каждого из графиков А-В подпишите, какому пациенту (гетерозиготному/гомозиготному по исследуемому полиморфизму) он принадлежит.



А – гомозигота, Б – гомозигота, В – гетерозигота

**Задание 2.6 (3 балла, по 0,5 балла за полностью верную ячейку).** Подбор флуорофоров и гасителей флуоресценции для ПЦР в реальном времени составляет отдельную задачу в процессе планирования эксперимента. Вам представлены таблицы с данными по самым часто используемым флуорофорам и гасителям. Согласно этим таблицам, напишите, какие гасители можно использовать с каждым из упомянутых флуорофоров.

Флуорофор	Длина волны максимума в спектре поглощения, нм	Длина волны максимума в спектре флуоресценции, нм
FAM	490	520
R6G	520	550
TAMRA	550	580
ROX	580	610
Cy5	645	670
Cy5.5	680	705

Гаситель	Длина волны максимума поглощения, нм	Диапазон гашения, нм
RTQ-1	520	470-570
BHQ-1	535	480-580
BHQ-2	575	550-650
RTQ-2	625	580-670
BHQ-3	670	620-730

Флуорофор	Гасители, которые можно с ним использовать
FAM	RTQ-1, BHQ-1
R6G	RTQ-1, BHQ-1, BHQ-2
TAMRA	BHQ-1, BHQ-2, RTQ-2
ROX	BHQ-2, RTQ-2
Cy5	RTQ-2, BHQ-3
Cy5.5	BHQ-3

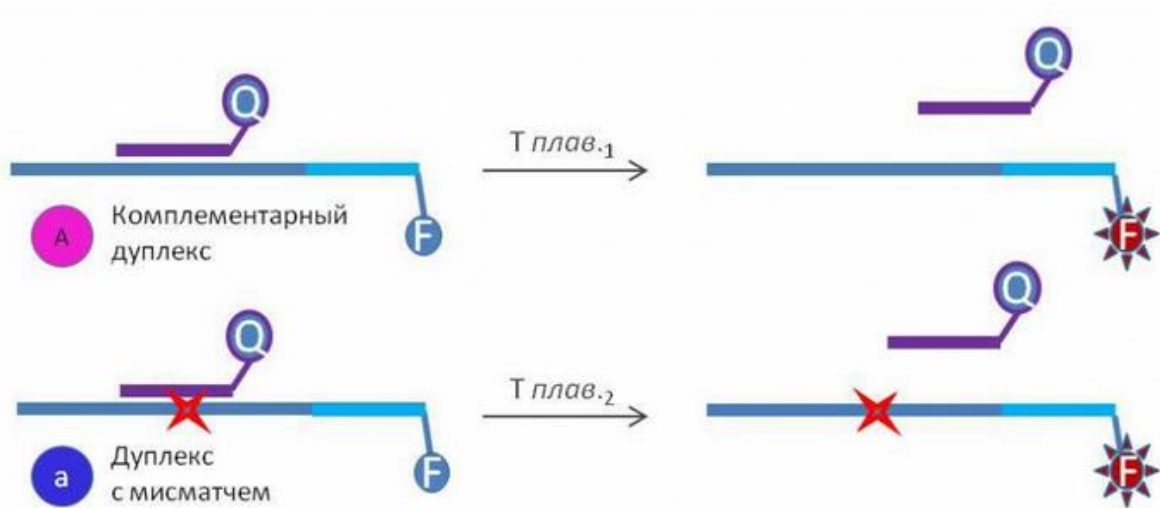
**Задание 2.7(5 баллов).** Метод с использованием одного аллель-специфического зонда к полиморфному участку исследуемого локуса по-другому называется метод плавления дуплексов. Один используемый зонд полностью комплементарен основному варианту и, соответственно, неполностью комплементарен полиморфным вариантам.

В начале такого эксперимента проводят асимметричную ПЦР, то есть ПЦР с избытком одного из двух концевых праймеров к исследуемому участку. Далее под действием высокой температуры полученные дуплексы ДНК денатурируют, после чего при понижении температуры одноцепочечные молекулы ДНК могут гибридизоваться с зондом. Так как в данном случае зонд один, с ним гибридизуются все полиморфные варианты исследуемого локуса, однако, некоторые варианты неполностью комплементарны и содержат так называемый мисматч (mismatch), то есть не Уотсон-Криковскую (не АТ и не ГЦ) пару нуклеотидов. Затем температуру в ПЦР-пробирке постепенно очень медленно повышают и анализируют кривую плавления дуплекса ДНК с зондом. Так как для разных полиморфных вариантов при гибридизации с зондом образуется разное количество комплементарных пар оснований, температура плавления этих гибридных молекул будет разной. Температуру плавления определяют как максимум/минимум на кривой плавления.

В данном методе кривую плавления строят по сигналу накопления флуоресценции от флуорофора, полностью или частично комплементарно присоединённого к зонду. Рассмотрите схему метода и объясните, флуоресцирует ли в данном случае отдельный зонд,

гибридная молекула зонда и целевая ДНК, почему накапливается флуоресценция в процессе эксперимента?

Отдельный зонд не флуоресцирует, так как на нём нет флуорофора, а есть только гаситель (1,5 балла). После гибридизации одноцепочечных участков ПЦР-продуктов с зондами полученные гибридные молекулы не флуоресцируют, так как флуорофор и гаситель сближены (1,5 балла). При повышении температуры для построения кривой плавления определённая доля молекул зонда в каждый момент времени диссоциирует из дуплекса, в результате чего гаситель, находившийся на флуорофоре, больше не гасит флуоресценцию флуорофора, соединённого с одной цепью ПЦР-продукта, что, в свою очередь, приводит к накоплению флуоресценции (2 балла).



**Задание 2.8 (6 баллов: 5 баллов за кривую плавления нужного вида, 1 балл за верное определение гомозиготы/гетерозиготы по полученной кривой).** После прохождения ПЦР в реальном времени, которую вы поставили в задании 1, преподаватель распечатает вашу кривую плавления, а также кривые плавления двух контрольных пациентов (ПЦР для них поставил преподаватель). Контрольные пациенты – это, соответственно, гомозигота по основному варианту исследуемого локуса и гомозигота по конкретному полиморфизму. Используя кривые, принесённые преподавателем, определите генотип (гомозигота/гетерозигота) пациента, для которого вы ставили ПЦР.

**Задание 3 (2 балла).** Для выявления полиморфизмов также можно использовать метод рестрикции, если в районе полиморфизма находится специфический сайт определённой эндонуклеазы рестрикции. Однуклеотидная замена приводит к изменению сайта рестрикции, в результате эндонуклеаза уже не может внести разрез в этом месте.

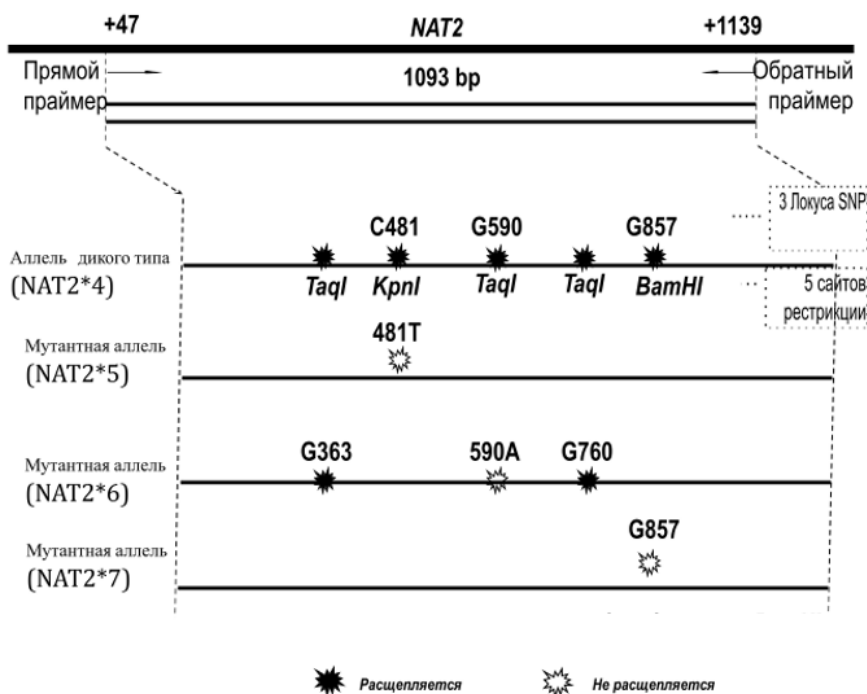
Вам предлагается поставить рестрикцию белок-кодирующего участка гена NAT2. Этот участок был заранее получен при помощи классической ПЦР преподавателем. Необходимо поставить три отдельные пробирки с рестриктными смесями: для рестриктазы *VamHI*, *KpnI* и *TaqI*. В состав каждой рестриктной смеси входит ПЦР-продукт, рестрикцию которого необходимо провести, буфер для работы рестриктазы (свой для каждой рестриктазы), эндонуклеаза рестрикции и вода. Зная, что буфер для работы рестриктазы в 10 раз более концентрирован, чем должен быть в итоговой рестриктной смеси, заполните пустые ячейки в таблице.

Реагент	Объём
ПЦР-продукт для рестрикции (подпись X)	3 мкл
буфер	1,5 мкл (1 балл)
рестриктаза	0,5 мкл
деионизованная вода (MQ)	10 мкл (1 балл)
<b>Общий объём</b>	<b>15 мкл</b>

После заполнения таблицы смешайте в трёх пробирках рестриктные смеси для трёх рестриктаз и оставьте их на 40 минут в термостате при 37 градусах. Соответствие буфера и рестриктазы спрашивайте у преподавателя.

Во время прохождения рестрикции выполняйте следующие задания.

На схеме показано положение концевых праймеров, использованных преподавателем для амплификации гена NAT2, а также расположение сайтов рестрикции для трёх используемых рестриктаз.





Полиморфный вариант NAT2\*5 содержит замену С в 481 позиции на Т, полиморфный вариант NAT2\*6 – замену G в 590 позиции на А, а вариант NAT2\*7 – замену G в 857 позиции на А.

**Задание 4.1(1 балл в случае полностью верного ответа на задание).** Напишите, использование какой эндонуклеазы рестрикции позволит выявить каждый из трёх полиморфных вариантов.

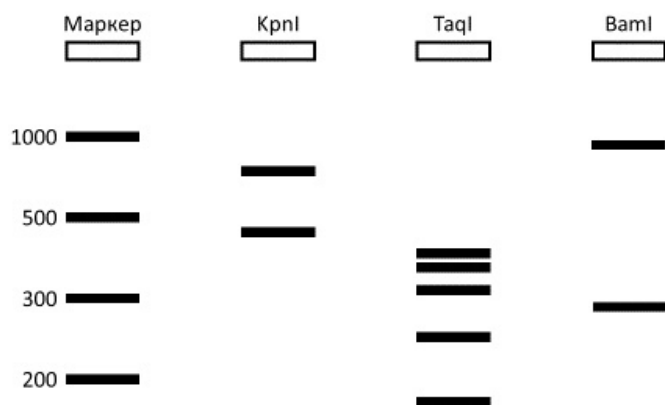
Полиморфный вариант	Эндонуклеаза рестрикции
NAT2*5	KpnI
NAT2*6	TaqI
NAT2*7	BamHI

**Задание 4.2(12 баллов: по 1 баллу за каждую верно заполненную ячейку).** Напишите, сколько продуктов рестрикции и какого размера вы ожидаете получить при рестрикции аллели дикого типа и рестрикции каждой из трёх полиморфных аллелей разными рестриктазами. Общие размеры ПЦР-продукта, использованного для рестрикции, вы можете рассчитать, исходя из положения праймеров на схеме. Для расчёта размеров продуктов рестрикции можно упрощённо считать, что разрыв вносится рестриктазой симметрично перед нуклеотидом, отмеченным соответствующей звёздочкой на схеме.

Рестриктаза	BamHI	KpnI	TaqI
<b>Аллель</b>			
NAT2*4	2 фрагмента: 810 283	2 фрагмента: 659 434	4 фрагмента: 380 316 227 170
NAT2*5	2 фрагмента: 810 283	1 фрагмент: 1093	4 фрагмента: 380 316 227 170
NAT2*6	2 фрагмента: 810 283	2 фрагмента: 659 434	3 фрагмента: 397 380 316
NAT2*7	1 фрагмент: 1093	2 фрагмента: 659 434	4 фрагмента: 380 316 227 170

**Задание 4.3(2 балла).** Скорость работы фермента NAT2 влияет на ацетилирование лекарства от туберкулёза изониазида. Если это лекарство не ацетируется, то накапливается в печени и оказывает вред её клеткам. Если пациент является гомозиготой по аллели NAT2\*4, то активность NAT2 высокая, изониазид не токсичен. Если пациент имеет только один из показанных выше полиморфных вариантов и является гетерозиготой по этому полиморфному варианту, активность NAT2 средняя. Если пациент имеет более одного полиморфного варианта или является гомозиготой хотя бы по одному из обсуждаемых полиморфных вариантов, то активность NAT2 низкая, изониазид токсичен. В связи с описанной ситуацией, определение генотипа пациентов относительно гена ацетилтрансферазы 2, очень важно для установления оптимальной дозировки изониазида. Предположим, что вы получили результаты электрофореза после проведения рестрикции гена NAT2 определённого пациента. Определите генотип этого пациента относительно всех

исследуемых полиморфных локусов, свой ответ поясните. На электрофореграмме, представленной ниже, есть дорожка с маркером молекулярных масс (массы молекул ДНК подписаны сбоку), а также три дорожки – для каждой из используемых рестриктаз.



Согласно заполненной выше таблице 2 фрагмента после рестрикции KpnI означают, что пациент гомозиготен по основному варианту C481 (0,5 балла). 2 фрагмента после рестрикции BamHI означают, что пациент гомозиготен по основному варианту G857 (0,5 балла). 5 фрагментов после рестрикции TaqI могло получаться только в случае гетерозиготности пациента по полиморфизму G590A.

**Задание 4.4(1 балл).** Какова активность NAT2(высокая/средняя/низкая) у пациента из предыдущего задания? **Ответ: средняя.**

**Задание 4.5(1 балл).** Исследования динамики приёма изониазида разными пациентами позволили выявить эмпирическую формулу для определения концентрации изониазида в сыворотке спустя 2 часа после приёма 300 мг.

**Концентрация изониазида в сыворотке (мг/л) =  $13.821 - 0.1 \times (\text{вес тела, кг}) - 2.273 \times n$ ,** где  $n = 2$  у пациентов с высокой активностью NAT2, 1 у пациентов со средней активностью и 0 у пациентов с низкой активностью.

Вычислите по этой формуле концентрацию изониазида у пациента из задания 4.3 спустя 2 часа после приёма 300 мг препарата, если его масса тела составляет 70 кг. **Ответ: 4,548.**

**Задание 4.6(1 балл).** В результате исследований также было выяснено, что оптимальная для противотуберкулёзного воздействия и в то же время не токсичная для печени концентрация изониазида в сыворотке спустя определённое время после приёма составляет от 3 до 6 мг/л. В одной таблетке содержится 100 мг изониазида.

Какое минимальное и какое максимальное количество таблеток можно принимать этому пациенту за один приём, чтобы лечение было эффективным и не было токсичности для печени? **Ответ: минимальное количество таблеток две, так как при приёме двух таблеток спустя 2 часа концентрация в сыворотке будет  $4,548/3 \times 2 = 3,032$ , что попадает в диапазон от 3 до 6 (0,5 балла). Максимальное количество таблеток три, так как, например, при приёме четырёх таблеток концентрация в сыворотке спустя 2 часа после приёма будет 6,064, что больше 6. Однако, если приведён расчёт, где данное значение округляется до 6, то можно засчитывать ответ «4 таблетки» (0,5 балла).**

**Задание 4.7(6 баллов).**

После окончания поставленной вами в задании 3 рестриктивной реакции, смешайте каждый образец с буфером для нанесения на электрофорез (пробирка с подписью LD). Считайте, что буфер в 4 раза более концентрированный, чем должен быть при нанесении в лунку геля. Объём каждой рестриктивной смеси из задания 3 составляет 15 мкл. Каким тогда должен быть объём LD, добавляемый к каждому образцу? **5 мкл (1 балл)**

После смешения образцов с LD, обратитесь к преподавателю и в его присутствии наносите свои образцы на гель электрофореза. Не забудьте в отдельную лунку нанести маркер



молекулярных масс в объёме 5 мкл. (5 баллов за верную картину электрофореграммы после рестрикции)

**Результатов электрофореза дожидаться не надо! Преподаватели самостоятельно завершат электрофорез с вашими пробами и оценят качество приготовления и нанесения ваших образцов. Свои электрофореграммы можно будет увидеть в личном кабинете олимпиады вместе со сканами работ практического тура.**