



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	Подпись на пробирке	Количество	Отметка о присутствии
Плазмида 2	20 нг/мкл	Пл 1	15 мкл	
Буфер для рестрикции Rose	10x	Rose	10 мкл	
Стерильная вода	-	mQ	50 мкл	
Микропробирки 1,5 мл	-	-	2 пробирки	
Буфер для нанесения проб в агарозный гель	4X	LD	12 мкл	
Перчатки	-	-	1 пара	
Пипетка-дозатор, 2-20 мкл	-	-	1 пипетка	



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

GFP (green fluorescent protein) — белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, который под действием ультрафиолетового света флуоресцирует в зелёном диапазоне.

Для изучения свойств данного белка вы планируете создать генную конструкцию, которая позволит экспрессировать его в клетках *E. coli*.

Задание 1. Основы генной инженерии

1. Какую молекулу, кодирующую данный белок следует выделить для последующих манипуляций и внесения в *E.coli*: геномную ДНК или мРНК?

Ответ поясните. (4 балла)

Ответ: РНК. Так как ДНК эукариот содержит интроны, которые будут мешать правильной экспрессии в бактериальной клетке.

2. Какие элементы должен содержать вектор (плазмида) для экспрессии целевого гена и сохранения плазмиды в клетках бактерий? (2 балла)

Ответ:

Точка начала репликации(Ориджин);

Селективный маркер: Ген, который позволяет отбирать бактерии, успешно получившие плазмиду. Чаще всего это ген устойчивости к антибиотику;

Промотор и терминатор транскрипции;

Последовательность Шайна-Дальгарно

(Полный балл при указании минимум 2 верных)

3. Какую длину имеет кодирующая часть мРНК GFP, если белок состоит из 231 аминокислоты? (3 балла)

Ответ: 696 нуклеотидов

4. Какие еще существуют способы внесения искусственных генетических конструкций в клетки, кроме плазмид? (2 балла)

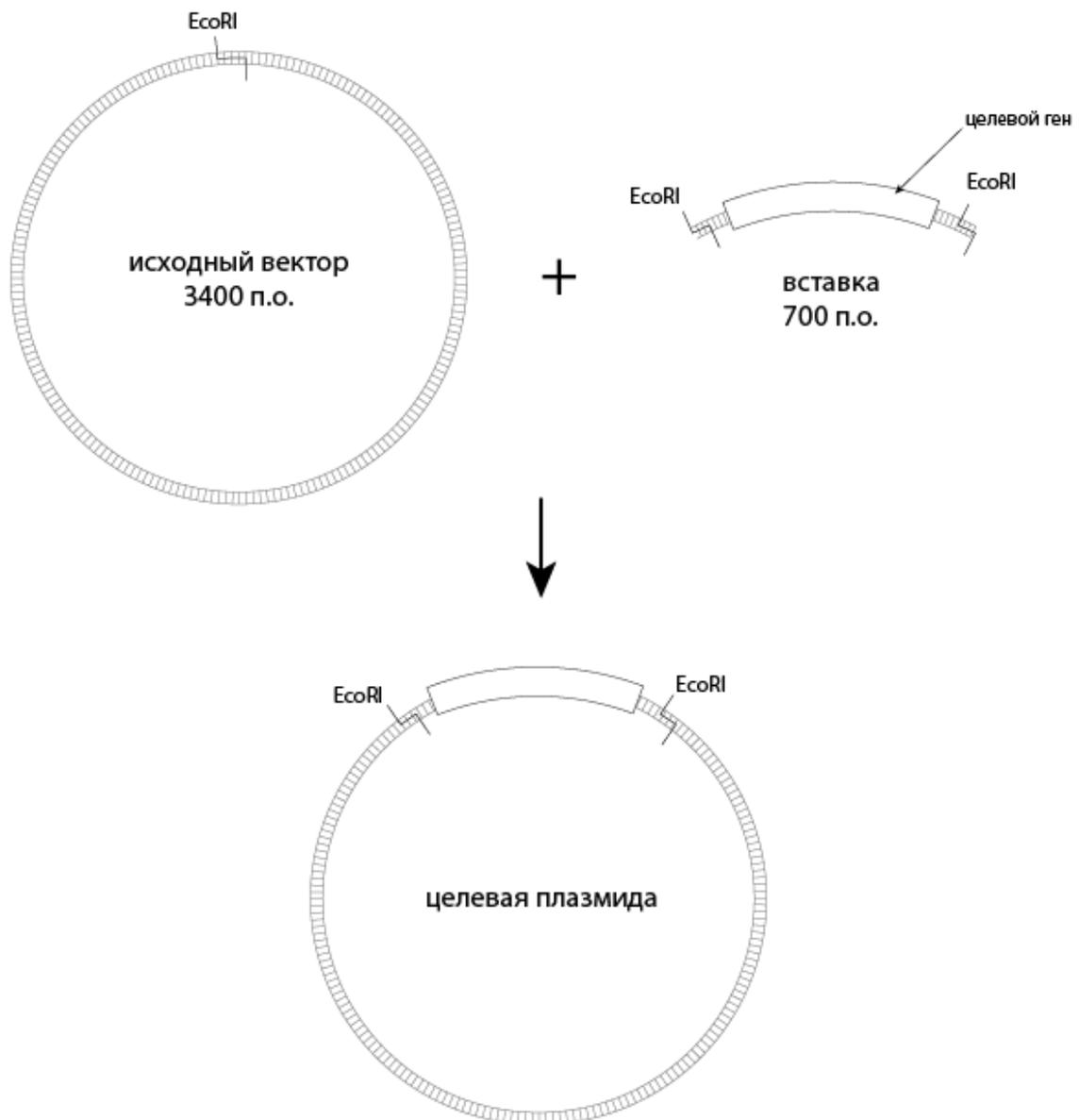
Ответ: Вирусные векторы и искусственные хромосомы.



Шифр _____

Фрагмент ДНК, содержащий белок, на концах имеет сайты рестрикции эндонуклеазы EcoRI. Такая же последовательности есть и в выбранном векторе, поэтому вы решаете встроить последовательность белка с использованием этого сайта.

Сначала вы обрабатываете вектор и вставку рестриктазами, затем выделяете нарезанные 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.





Шифр _____

Выбранный вектор содержит ген устойчивости к антибиотику ампициллину, что позволяет отбирать бактерий, содержащих данную плазмиду. При добавлении в среду для выращивания ампициллина все бактерии, не содержащие плазмиду, погибают. 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 выделяете плазмиду из нескольких полученных клонов.

Клон	Флуоресценция	Название плазмиды
Клон 1	Светится в ультрафиолетовом свете (целевая плазида)	Плазида 1
Клон 3	Не светится в ультрафиолетовом свете	Плазида 2
Клон 3	Светится в ультрафиолетовом свете	Плазида 3

Чтобы изучить структуру выделенных плазмид, вы решаете воспользоваться методом аналитической рестрикции.

Задание 2. 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



Шифр _____

рестрикции определенными рестриктазами можно отличить одну ДНК от другой, обращая также внимание на длины и подвижность полученных фрагментов ДНК на электрофореграмме.

Задание 2.1. Рестрикция Плазмиды 2 (5 баллов)

2.1.1 Рассчитайте необходимое количество реагентов для проведения рестрикции. Обратите внимание, что общий объем реакционной смеси должен быть 40 мкл. Ответы внесите в бланки.

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	Мкл в реакционной смеси
Плазида	20 мг/мл	240 нг	12
Буфер Rose	10x	1x	4
Рестриктаза BamHI	5000 ед/мл	10 ед	2
Рестриктаза Hind III	5000 ед/мл	10 ед	2
mQ (H ₂ O)	-	-	20

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

2.1.3 Смешайте рестрикционную смесь согласно вашему плану.

2.1.4 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.

2.1.5 Оставьте рестрикционную смесь инкубироваться при 37°C на 30 минут.

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



Шифр _____

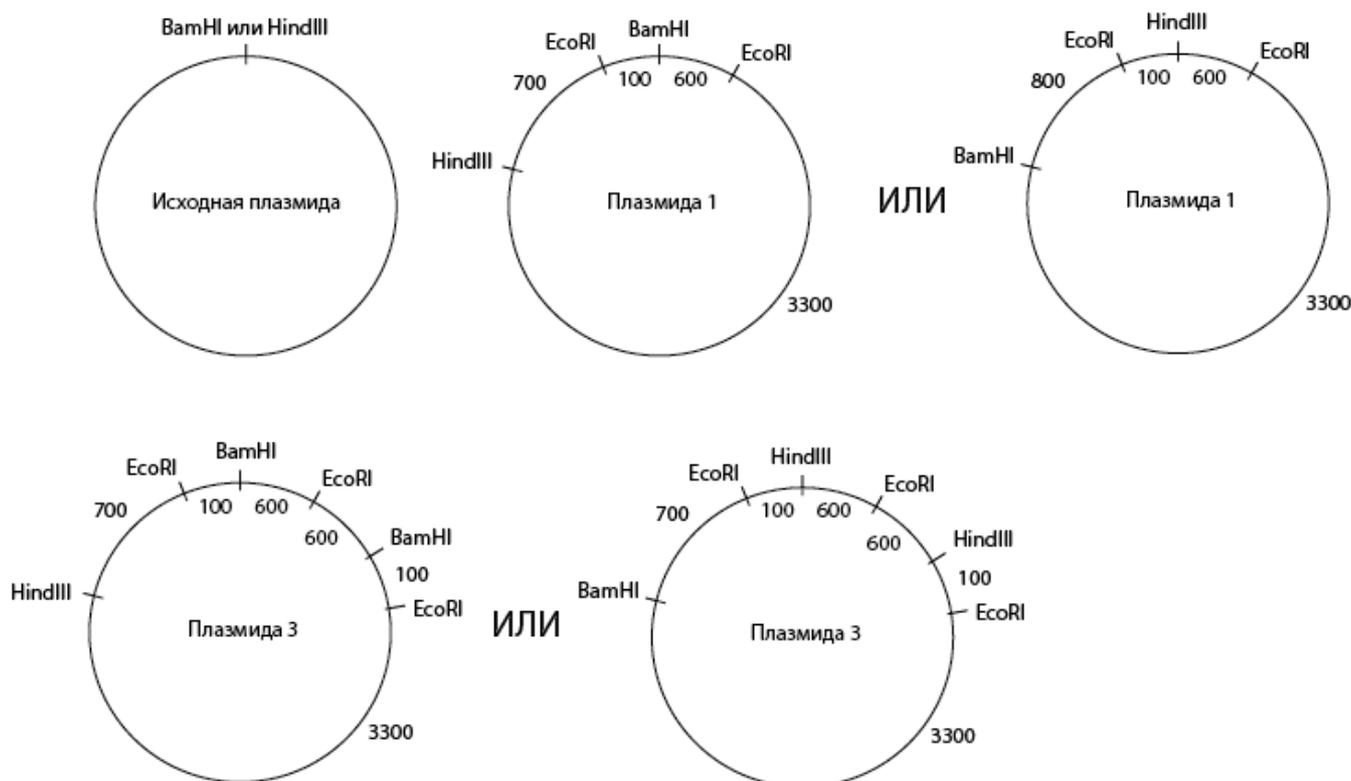
Теоретические задания по аналитической рестрикции

Задание 2.2 Для остальных плазмид и исходного вектора вы также провели рестрикцию с использованием данных ферментов. Полученные результаты представлены в таблице.

Плазмида	Получаемые фрагменты
Исходный вектор	3400
Плазмида 1	3300, 800
Плазмида 3	3400, 800, 600

Нарисуйте рестрикционные карты исходного вектора, встраиваемого гена и плазмид 1 и 3 с указанием положения сайтов рестрикции всех трех рестриктаз, указанных в тексте заданий (BamHI, EcoRI и HindIII), и расстояний между ними. (4 балла)

Ответ:





Шифр _____

Задание 2.3

Рассчитайте среднее расстояние между сайтами рестрикции BamHI в геномной ДНК. Считайте, что геномная ДНК достаточно длинная и разнообразная — вероятность встречи определенного нуклеотида в последовательности $\sim 1/4$. (1 балл)

Ответ: 4096

Задание 2.4

Среди рестриктаз встречаются ферменты, работающие схожим образом, например:

- Изошизомеры — это пары рестриктаз, имеющих специфичность к распознаванию одинаковых последовательностей и разрезающих эти последовательности в одинаковых местах.
- Гетерошизомеры — ферменты, узнающие одинаковую последовательность, но по-разному ее разрезающие.
- Изокаудомеры — ферменты, распознающие разные последовательности, но формирующие одинаковые концы при разрезании.

Изучите таблицу и укажите все пары изошизомеров, гетерошизомеров и изокаудомеров. Место разреза указано знаком \wedge . (6 баллов)

Рестриктаза	Сайт узнавания
Sph I	CGTAC \wedge G
Sma I	GGG \wedge CCC



Шифр _____

RsI	G [^] AATTC
Bbu I	CGTAC [^] G
Xma I	G [^] GGCCC
EcoRI	G [^] AATTC
AflII	C [^] AATTG

Ответ:

Изошизомеры:

- Sph I (CGTAC[^]G) и Bbu I (CGTAC[^]G)
- RsI (G[^]AATTC) и EcoRI (G[^]AATTC)

Гетерошизомеры:

- Sma I (GGG[^]CCC) и Xma I (G[^]GGCCC)

Изокаудомеры:

- EcoRI (G[^]AATTC) и AflII (C[^]AATTG)
- RsI (G[^]AATTC) и AflII (C[^]AATTG)

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



Шифр _____

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

Ответ: 15 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

5. Вклейте фотографию в бланк ответов (3.2). (10 баллов)

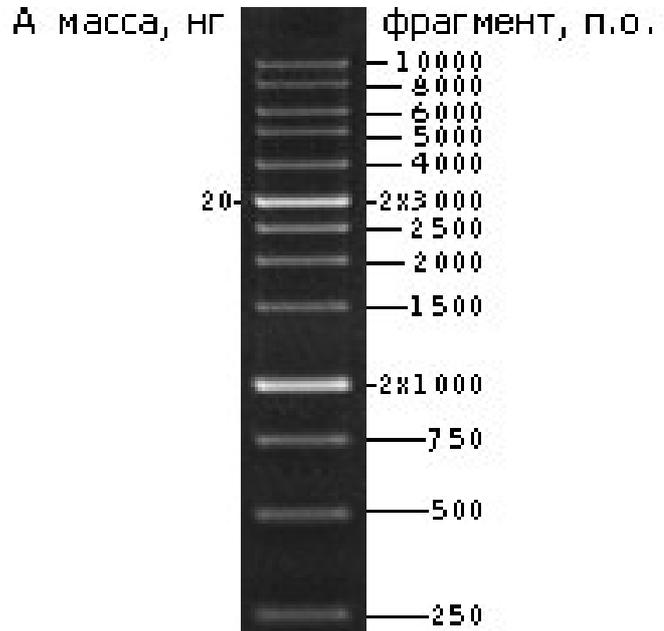
Ответ: На Геле должны быть нанесен маркер и образец в образце 2 полосы. Один фрагмент в диапазоне 3000-4000 п.о., второй фрагмент в диапазоне 500-750 п.о..

Теоретические задание по электрофорезу



Шифр _____

Задание 3.3 Изучите полученную электрофореграмму рестрикционной смеси плазмиды 2 и определите приблизительный размер фрагментов, используя референсные значения (см. рисунок справа) для маркера длин. Размер фрагментов укажите в виде диапазона соседних фрагментов маркера длин (например, 250–500 п.о.). (6 баллов)



Ответ: Один фрагмент в диапазоне 3000-4000 п.о., второй фрагмент в диапазоне 500-750 п.о..

Задание 3.4

Предположите, почему бактерии, содержащие Плазмиду 2, не флуоресцируют? (2 балла)

Ответ: Из-за использования одинаковых сайтов рестрикции на концах вставки вставка могла перевернуться и последовательность гена транскрибируется в неправильном направлении.

Задание 3.5

На движение ДНК в геле влияет не только ее размер, но и ее форма; чем более компактную форму принимает ДНК, тем быстрее она будет двигаться в геле. Так, например, можно заметить, что неразрезанная плаزمида при электрофорезе двигается в геле тремя полосами, что говорит о наличии трех форм этой молекулы в клетке. Предположите, что это за формы и в каком порядке они будут расположены на электрофорезе между положительно и отрицательно заряженными электродами. (5 баллов)

Ответ: анод(+) - суперскрученная форма - линейная форма - кольцевая форма- катод(-)