



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.

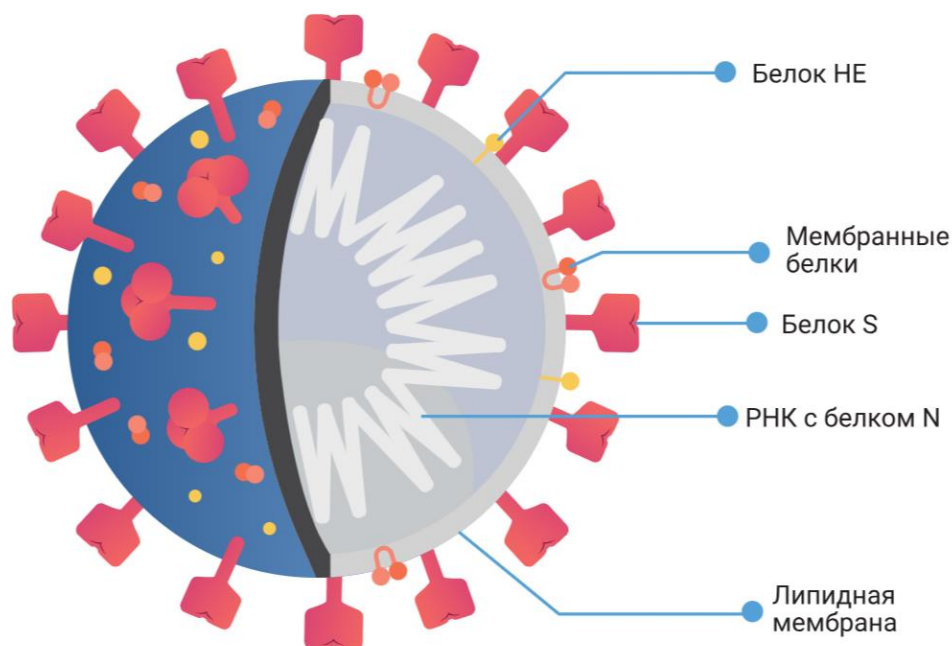
Реактивы и оборудование	Концентрация	Конечная концентрация	Подпись на пробирке
Полимераза	2 ед/ мкл	2 ед на реакцию	Pol
Амплификатор/ термоциклер	-	-	-
Камера для проведения горизонтального электрофореза	-	-	-
Лабораторный источник тока	-	-	-



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)

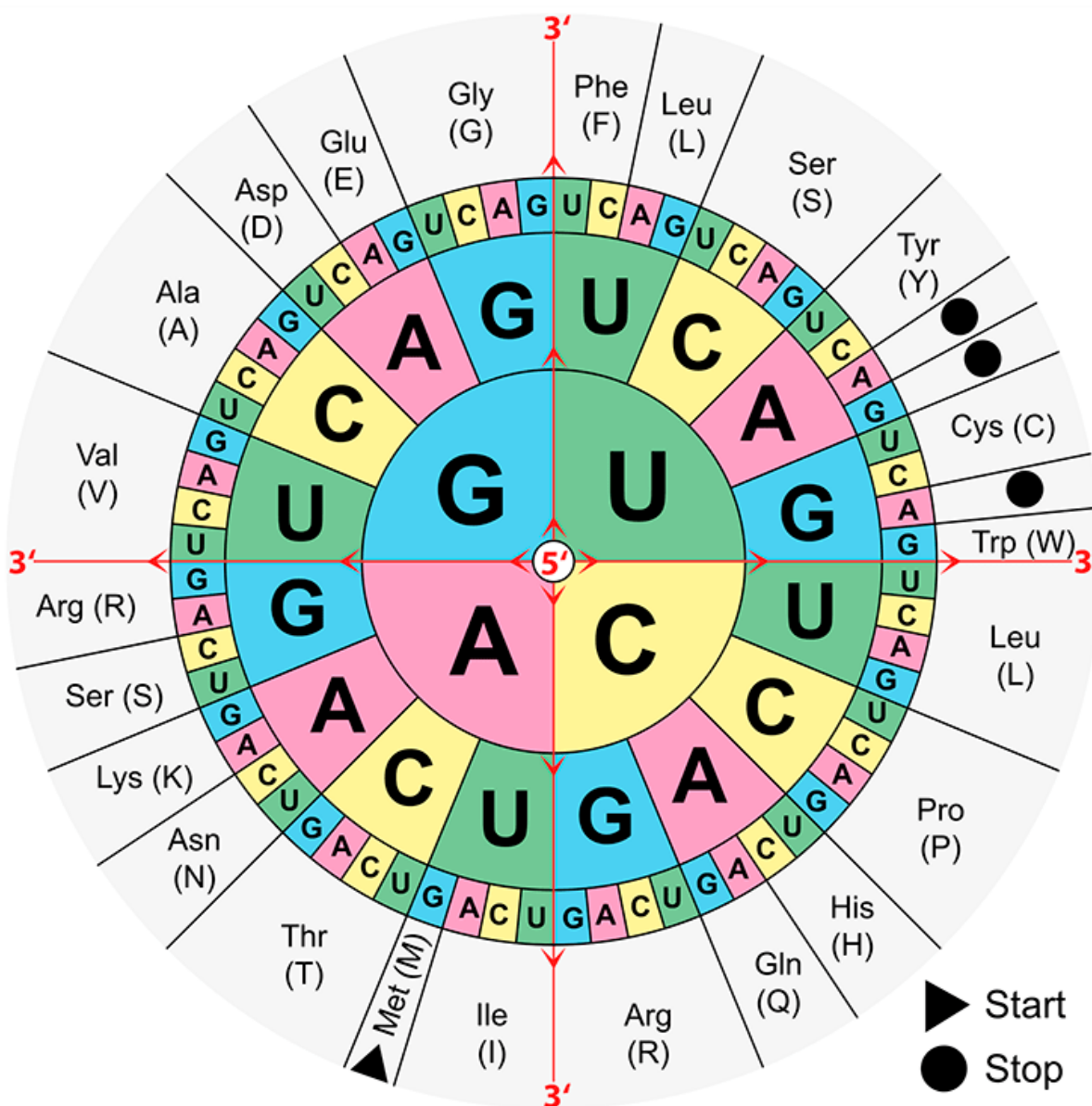
1.5 Какие преимущества дает открытая рамка считывания (ORF) для вирусов? (6 баллов)

(Открытая рамка считывания позволяет кодировать большее разнообразие белков)



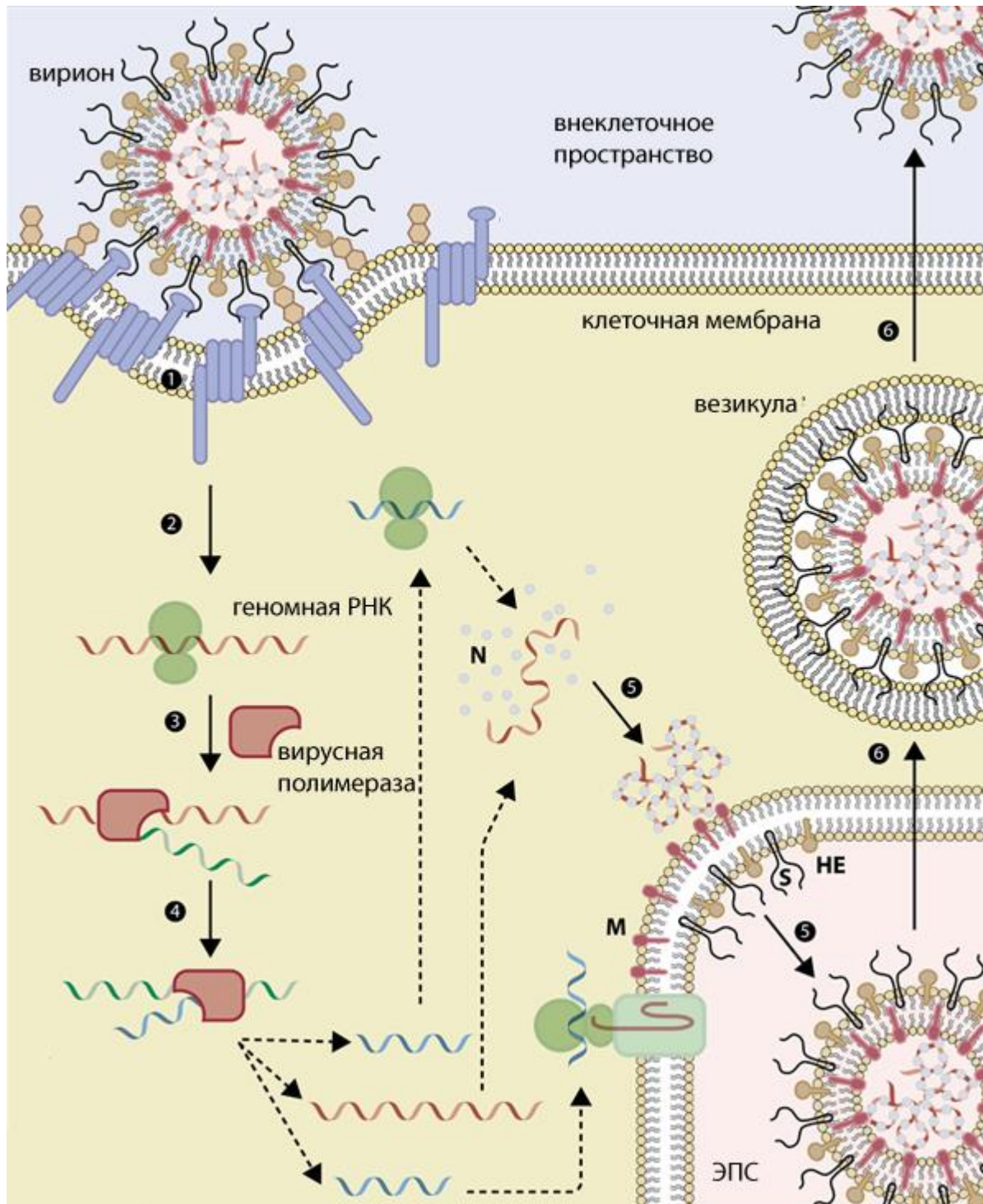
1.6 Используя таблицу генетического кода, определите какую последовательность аминокислот кодирует один и тот же участок геномной нуклеиновой кислоты 5'-GGACGCGAGCGCGAGCGG-3' в разных группах вирусов по Балтимору (3 балла)

Класс по Балтимору	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. Коронавирусы 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.

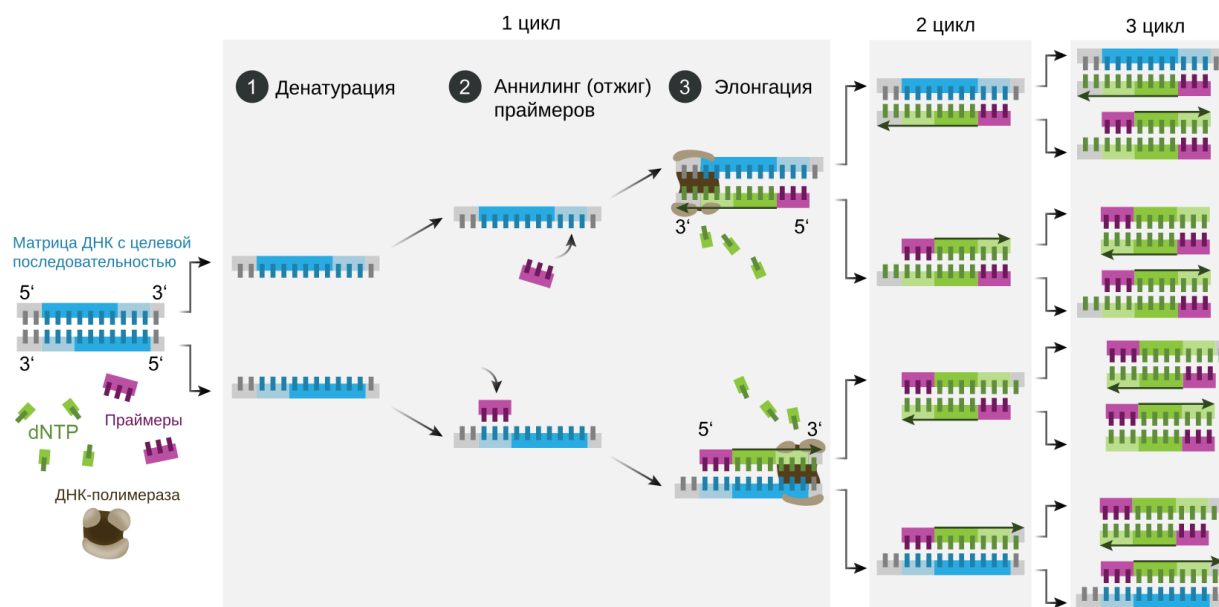
Чтобы изучить эффективность теста вы исследуете несколько “матриц кДНК” методом ПЦР.

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:

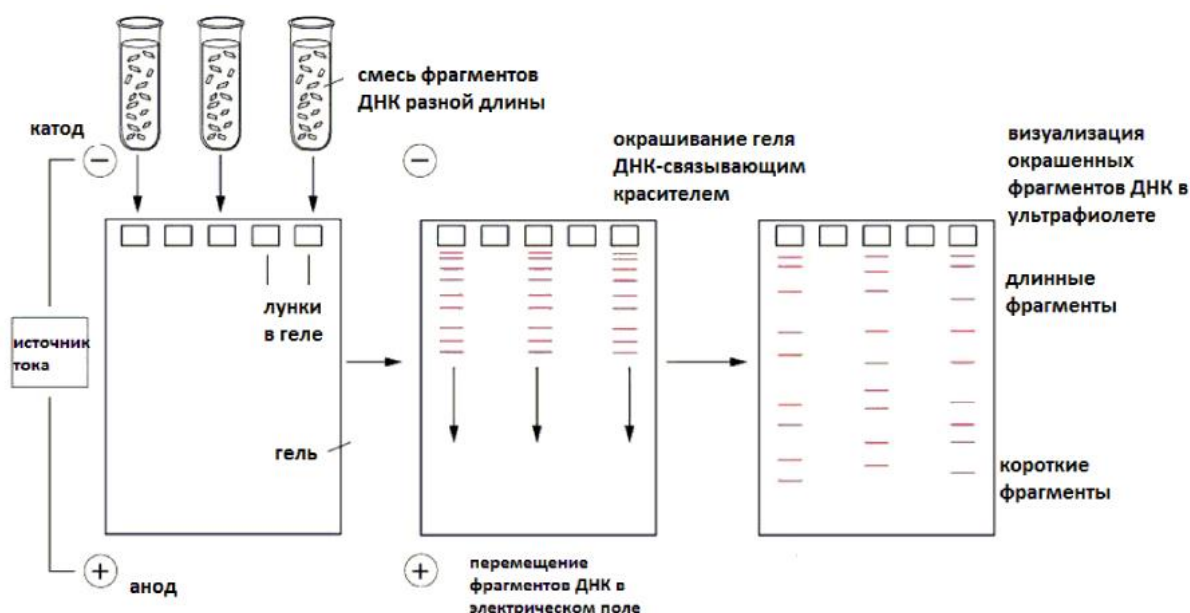
- Чувствительность: 92%
- Специфичность: 95%
- Точность: 93%

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.

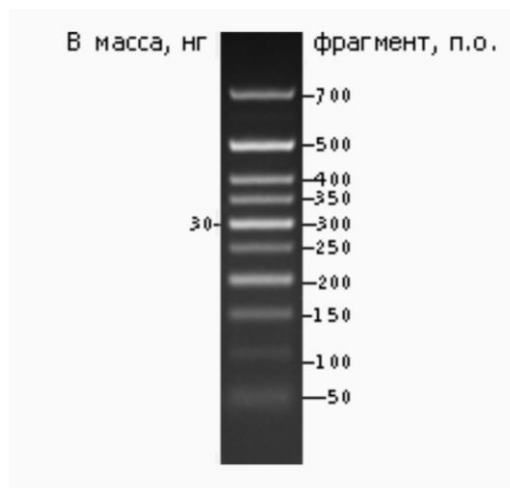
4. После окончания электрофореза вы получите распечатанную фотографию вашего геля для анализа. Прикрепите фотографию к бланку ответов (3.2). (10 баллов)

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.