

§2 Второй отборочный тур

Второй отборочный тур проводится индивидуально в сети Интернет, работы оцениваются автоматически средствами системы онлайн-тестирования. Для двух групп участников (9 класс или 10-11 класс) предлагался свой набор междисциплинарных командных заданий по направлениям “Создание и работа с замкнутыми живыми системами”- 9кл и “Молекулярная биология” -10-11кл.

На решения командных заданий участникам выделялось по 2-3 недели (в зависимости от заданий) и представлялись обучающие материалы (Онлайн-курсы, обучающее видео и электронные книги).

Решения принимались или от индивидуального участника, если он не состоял в команде, или от одного представителя команды.

Решение каждого задания давало определенное количество баллов и применялась система дисконтирования, учитывающая количество попыток ввода ответа: за каждую последующую попытку ввода ответа участникам давалось $1/N$ (где N-номер попытки) от максимального количества баллов. Баллы зачислялись в полном объеме за правильное решение задачи с первой попытки.

По результатам второго тура баллы за задания суммировались. В третий (финальный тур) прошли индивидуальные участники и сформировавшиеся команды, набравшие 10 баллов из 31 (для 9 класса) и 36,3 из 60 (для 10-11 класса).

2.1 Задания второго отборочного этапа (9 класс)

Задача 2.1.1

Условие:

Исходя из приведенных ниже параметров, рассчитайте посадочную численность малька и удельную ихтиомассу посадки для проектируемой системы с целью получения максимально возможного увеличения массы рыбы.

Известные параметры:

- Общий объём системы - 1000 м^3
- Масса малька карпа - 250 гр
- Длина малька карпа - 6 см
- Максимальная удельная ихтиомасса в системе без снижения скорости роста - 70 кг/м^3
- Товарный вес карпа - 1,5 кг
- Товарная длина карпа - 40 см
- Выбраковка особей в результате гибели и отставания в развитии не больше 5% популяции/год
- Время выращивания 3 года

Масса особей в расчетах приводится в кг.

В промежуточных расчетах количество особей округляется до целых.

Задание:

1. Рассчитайте посадочную численность малька (шт, с точностью до 100 шт.)
2. Рассчитайте значение удельной ихтиомассы* посадки (ответ округлите до сотых и приведите только число)

*Удельная ихтиомасса рассчитывается по формуле

$$D = \frac{P}{0,001[W-P]}$$

D - удельная ихтиомасса, кг/м³; P- ихтиомасса, кг; W - объём воды, л.

Материалы для подготовки:

1. Замкнутые системы в аквакультуре : монография / А. В. Жигин. - Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2011. - 664 с.; ISBN 978-5-9675-0538-6

2. Руководство по аквакультуре в установках замкнутого водоснабжения/ Якоб Брайнбалле, Копенгаген, 2010г. (<http://aquacultura.org/upload/files/pdf/library-5.pdf>)

ОТВЕТ:

1. 54400 (ответ принимался с погрешностью +/- 100) Максимальное количество баллов-3

2. 13,79 (ответ принимался с погрешностью +/- 0,01) Максимальное количество баллов-2

Решение

Предположим, что выбраковка за 3 года выращивания карпа составляет 0%. Тогда, необходимо рассчитать количество мальков, равное итоговому числу рыбы с ихтиомассой 70 кг/м³

Из приведённых данных нам важен товарный вес карпа (1,5 кг) и общий объём системы 1000 м³

Решим пропорцию:

$$\frac{70 \text{ кг}}{\text{м}^3} = \frac{x \text{ кг}}{1000 \text{ м}^3} = \frac{70 \text{ кг}}{\text{м}^3} = \frac{x \text{ кг}}{1000 \text{ м}^3}, \text{ откуда предельная масса рыбы в системе составляет } \frac{70000 \text{ кг}}{1,5 \text{ кг}} = 47 \text{ тыс особей} = \frac{70000 \text{ кг}}{1,5 \text{ кг}} = 47 \text{ тыс особей}$$

что соответствует конечному числу особей, равному 46667.

Поскольку каждый год, согласно условиям задачи, мы теряем 5% особей, то 46667 карпов - это 95% от количества особей в начале года. Тогда число особей в начале года составляло:

$$(46667 * 100) / 95 = \frac{47000}{x} = \frac{95}{100} x = \frac{4700000}{95} = 49474 \text{ тыс особей} \quad 49123$$

Повторим расчёт для 2-го и 1-го года и соответственно получим число особей равное: 51708 особей и 54429 особей.

Тогда, посадочная плотность малька, округленная до 100 равна 54400 особей на м³.

Ихтиомасса посадки составляет $(54400 * 0,25) / (0,001(1000000 - 54400 * 0,25)) = 13,79 \text{ кг/м}^3$

Задача 2.1.2

Условие:

В УЗВ (установке замкнутого водоснабжения), расположенной в помещении подвала, уровень продуктов белкового обмена рыб достиг критического значения (прирост массы не происходит, рыба угнетена, заглатывает воздух с поверхности воды при достаточной концентрации кислорода в воде).

pH воды в УЗВ колеблется в пределах 6,9±0,2. Объём воды в системе 1000 л.

По данным химического анализа концентрация NO₃⁻ в воде УЗВ после 45 дней работы системы при полной загрузке составляет 350 мг/л. Скорость роста параметра является равномерной линейной. Замена воды в УЗВ не возможна. Возможно лишь подключение гидропонного блока для выращивания растений.

Рассчитайте требуемое количество растений (в шт.), способное компенсировать накопление азота в системе, если для решения поставленной задачи предлагается использование редиса и салата в равных количествах.

Дополнительная информация:

На 10 т. салата нужно 22 кг азота, на 10 т. редиса нужно 50 кг азота.

Потребление азота растениями в течении всего периода вегетации считать постоянным.

Кочанный салат сорт "Хрустик" среднего срока созревания (40 дней). Розетка листьев полупрямостоячая, высотой 22 см, диаметром 30 см. Лист среднего размера, обратотреугольной формы, зеленый, слабопузырчатый, слабоволнистый по краю, с мелкими надрезами в верхушечной части. Кочан закрытый, плоскоокруглый, средней плотности. Масса кочана — 220 г. Консистенция ткани листьев хрустящая. Вкус отличный. Урожайность — 3,5 кг/кв.м.

Редис сорт "18 дней" - Розетка листьев полупрямостоячая, сам лист имеет яйцевидную форму, желтовато-зелёного цвета. Диаметр корнеплода составляет, в среднем, 1,5-2 сантиметра. Кожица имеет красный цвет. Мякоть белая, плотная, очень сочная. Корнеплод имеет овально-цилиндрическую форму. Сорт 18 дней очень устойчив к пониженным температурам и засухе. Очень высокие товарные качества. Предназначен для употребления в свежем виде, а так же для изготовления салатов. Средняя масса товарного плода составляет 17 грамм. Урожайность с 1 квадратного метра составляет 2-2,5 килограмм. Вкусовые качества — отличные, вкус средне острый.

Список источников для ознакомления:

http://www.ponics.ru/2009/04/agro_trip1/ - салат и зелень методом проточной гидропоники;

введение в аквапонику: <https://youtu.be/pdUMNBher-U> - общий подход и ориентиры для начинающих.

Решение:

Рассчитаем, одно растение будет поглощать азота в сутки.

- одно растение салата потребляет за период вегетации:

$$\frac{10000}{22} = \frac{0,22 \cdot 10000}{x \cdot 22} = \frac{0,22}{x}, \text{ откуда } x = \frac{0,22 \times 22}{10000} = 0,484 \text{ гр. азота}$$
$$\frac{0,22 \times 22}{10000} = 0,484 \text{ гр. азота}$$

за 40 дней или 0,0121 гр/сут

- одно растение редиса потребляет за период вегетации:

$$\frac{10000}{50} = \frac{0,017 \cdot 10000}{x \cdot 50} = \frac{0,017}{x}, \text{ откуда } x = \frac{0,017 \times 50}{10000} = 0,085 \text{ гр. азота}$$
$$\frac{0,017 \times 50}{10000} = 0,085 \text{ гр. азота}$$

за 18 дней или 0,0047 гр/сут

Масса нитрат-ионов в системе составляет 350 мг*1000 = 350гр.

Количество атомарного азота составляет 350/(14г/моль + 3*16г/моль)= 5,64 моль

Масса азота составляет 5,64*14= 78,96г.

Т.к. накопление азота является линейной величиной, в день прирост составляет 78,96/45=1,75гр в день.

Общее потребление 1 салата и 1 редиса составляет 0,0167 гр в сутки. Таким образом, для потребления 1,75 понадобится 104-105 растений редиса и салата.

Ответ:

Салата и редиса по 105 растения (+1) 5баллов

Задача 2.1.3

Условие:

Определите конфигурацию гидропонного блока, при которой скорость роста концентрации азота до первоначальных значений будет минимальной и время, за которое система придёт к начальным условиям по концентрации азот. Определите количество растений, которое необходимо разместить в блоке для компенсации образующегося в аквапонной системе Азота.

Какова будет длина гряды (М) для размещения растений в проектируемом гидропонном блоке?

Дополнительная информация:

На 10 т. салата нужно 22 кг азота, на 10 т. редиса нужно 50 кг азота.

Потребление азота растениями в течении всего периода вегетации считать постоянным. Диаметр горшка при посадке - 5 см.

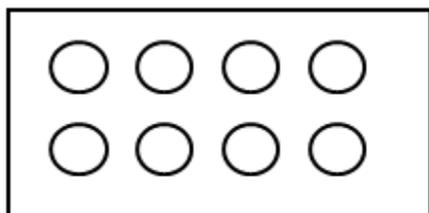
Ширина гидропонного модуля 1,25 м. Глубина гидропонного блока 25 см.

Кочанный салат сорт "Хрустик" среднего срока созревания (40 дней). Розетка листьев полупрямостоячая, высотой 22 см, диаметром 30 см. Лист среднего размера, обратотреугольной формы, зеленый, слабопузырчатый, слабоволнистый по краю, с мелкими надрезами в верхушечной части. Кочан закрытый, плоскоокруглый, средней плотности. Масса кочана — 220 г. Консистенция ткани листьев хрустящая. Вкус отличный. Урожайность — 3,5 кг/кв.м.

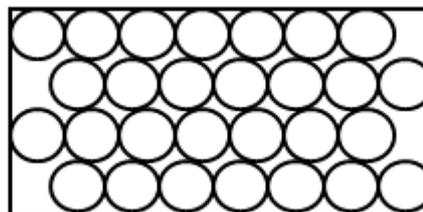
Редис сорт "18 дней" - Розетка листьев полупрямостоячая, сам лист имеет яйцевидную форму, желтовато-зелёного цвета. Диаметр корнеплода составляет, в среднем, 1,5-2 сантиметра. Кожица имеет красный цвет. Мякоть белая, плотная, очень сочная. Корнеплод имеет овально-цилиндрическую форму. Сорт 18 дней очень устойчив к пониженным температурам и засухе. Очень высокие товарные качества. Предназначен для употребления в свежем виде, а также для изготовления салатов. Средняя масса товарного плода составляет 17 грамм. Урожайность с 1 квадратного метра составляет 2-2,5 килограмм. Вкусовые качества — отличные, вкус средне острый.

Количество растений может отличаться от предыдущего задания.

Для решения задачи выберите один из вариантов размещения растений в гидропонном блоке из представленных ниже:



А



Б

Решение:

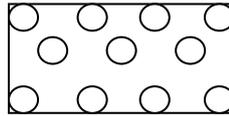
- Зная по условиям задачи глубину, объём и ширину гидропонного блока легко найти его длину:

$$L = 2000 / (0,25 \times 1,25) = 6,4 \text{ м}$$

- Поскольку диаметр кочана составляет 30 см, постановка рассады салата

возможна на расстоянии между горшками в 25 см⁴. (5 см - диаметр горшка)

- К моменту достижения редисом товарной спелости (18-20 дней) пройдет лишь половина срока вегетации для салата, что гарантирует отсутствие конкуренции за свет между этими видами и сортами растений. После уборки редиса, салат наберёт свою массу и объём. Т.о. создаём кассеты со смешанной посадкой, чередуя в шахматном порядке редис и салат.
- Т.к. салат является основной культурой, а редис вспомогательной, расстояние между центрами посадки редиса и салата составят: 21,2 см. (высчитывается по чертежу).



Вычислим сколько элементарных блоков уместится по длине и по ширине гидропонного блока:

- $6,4 \text{ м} / 0,3 \text{ м} = 21,3$ шт в длину, что соответствует **21 модулю** и ещё 10 см пространства;
- $1,25 \text{ м} / 0,3 \text{ м} = 4,15$ шт в длину, что соответствует 4 модулям и ещё 5 см.
- оставшееся пространство заполняется "концевыми модулями" (см рисунок на след странице. дети пусть головы поломают и порисуют, как это всё должно располагаться... *вряд ли кто-то дойдёт до допусков по размерам*)

Число растений, в целом будет следующим:

84 салата + 84 редиса + 26 салата итого **110 салата и 84 редиса**

Ответ:

110 кочанов салата (+2) -5 баллов

84 растений редиса (+2) - 5 баллов

Длина гряды- 6,4м (+0.1) -1 балл

Задача 2.1.4

Условие:

Известно, что спектр поглощения листовой пластинки высших растений имеет два максимума в области красного и синего свечения. (см. рис. 1).

⁴ Обычно, шаг между горшками составляет 18 см. У нас - 25, т.к. выбранный сорт имеет крупный кочан + мы ограничены шириной гряды по условиям задачи.

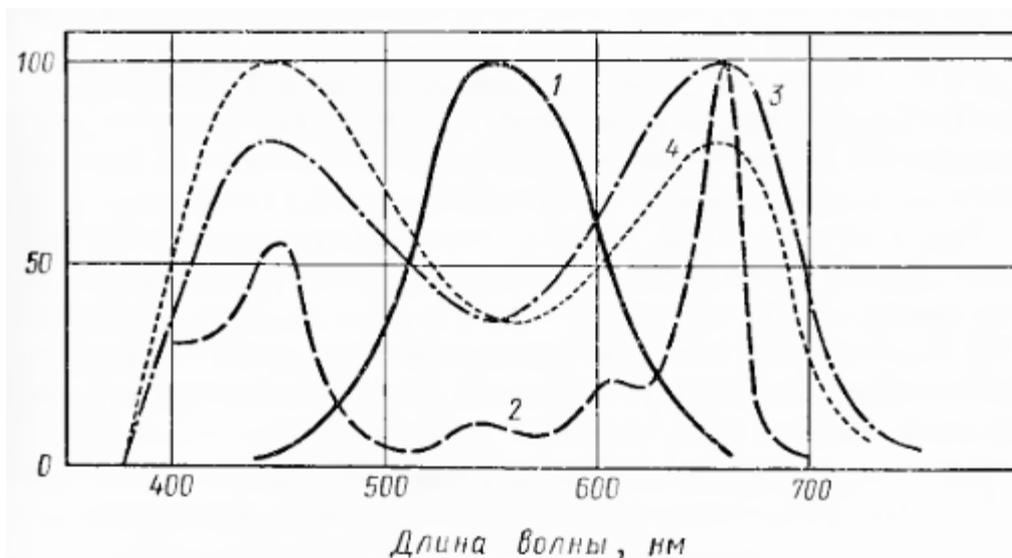


Рис. 2. Спектральные кривые:

1 — средней видности человеческого глаза; 2 — синтез хлорофилла; 3 — фотосинтеза; 4 — поглощения лучистой энергии листом

Светодиоды - источники светового излучения, имеющие узкие спектральные характеристики длин волн. Современные светодиоды, в своём многообразии, перекрывают весь видимый диапазон оптического спектра: от красного до фиолетового цвета.

Диапазон длин волн излучения светодиодов в красной области спектра составляет от 610 до 620 нм, в желтой - от 585 до 595 нм, в зеленой - от 525 до 535 нм, в голубой - от 465 до 475 нм и в синей - от 450 до 465 нм.

В экспериментах на растениях отмечено, что если большая часть излучения приходится на синюю область спектра, это приводит к формированию низкорослых растений с интенсивным фотосинтезом, но низкой продуктивностью. Сильная накачка красным, наоборот, приводит к излишнему росту вегетативных органов в ущерб генеративным.

Так же показано, что гидробионты (в д. сл. рыбы) увеличивают продуктивность на единицу корма в условиях оптимальных по освещённости с периодичностью светового дня 12 часов (затраты корма на единицу продуктивности снижаются в 1,2 - 1,8 раза). Световой диапазон, оказывающий оптимальное влияние на рыб видоспецифичен. Для карпа оптимальным является зелёный диапазон спектра, для серебристого карася - синий диапазон. (А.В. Жигин "Замкнутые системы в аквакультуре" М.2011 стр. 233).

Оптимальная освещённость для карпа составляет 7000 лк, карася - 1200 лк.

Редис является светолюбивым растением, ему необходимо яркое освещение. Редис — растение длинного дня — при недостатке света растения вытягиваются и медленно образуют корнеплод, а с увеличением светового периода развитие редиса ускоряется. В защищенном грунте при освещенности 9–14 тысяч люкс на рассадных комплексах резко сокращается период выращивания. Но следует учитывать, что если световой день длиннее 14 часов, да еще на фоне высоких температур, то редис будет стрелковаться и зацветет, результатом чего станет ухудшение формирования корнеплода, поэтому ростки редиса необходимо затенять с 8 часов вечера до 8 часов утра. Тогда как при укороченном световом дне — 10–12 часов, растение дает хороший урожай сочных корнеплодов, цветение при этом задерживается или не наступает совсем.

Сходно ведут себя растения салата. Оптимальное освещение для салатной зелени является 10 тысяч люкс . Освещённость измеряется в верхней точке листовой пластинки,

максимально удалённой от плотика (уровня грунта).

Задача:

- Найдите (в справочной литературе) оптимальный интервал интенсивности ($\text{Вт}/\text{м}^2$) освещения растений — **(2 балла)**
- Найдите (в справочной литературе) % соотношение светодиодов разных диапазонов светимости. **(2 балла)**
- подберите оптимальное количество светодиодов разных спектров для увеличения продуктивности аквапонного модуля по рыбе (отдельно для карпа и карася) и растениям (салат+ редис), используя данные задачи.
Эффективность светодиода – порядка $100 \text{ Лм}/\text{Вт}$, Так, например, светодиод мощностью 5 Вт даёт 500 Лм .
Потребляемую мощность светодиода принять за 3 Ватта .
Число светодиодов округлите до целых (в большую сторону) **(4 балла)**
- Определите максимальное и минимальное число светодиодов (*исходя из результатов предыдущего задания 3.2*) каждого диапазона в источнике света на кв. м. поверхности гидропонного модуля (красных, зелёных и синих).
Эффективность светодиода – порядка $100 \text{ Лм}/\text{Вт}$, Так, например, светодиод мощностью 5 Вт даёт 500 Лм .
Потребляемую мощность светодиода принять за 3 Ватта .
Число светодиодов округлите до целых (в большую сторону) **(4 балла)**

Решение:

- Для ответа необходимо было найти табличные значения.
- На 1 кв. м гидропонного модуля будет приходиться (согласно правилам округления):
 30% синих светодиодов, сл-но от 9 до 14 шт;
 20% зелёных светодиодов сл-но от 6 до 9 шт;
 50% красных светодиодов, сл-но от 15 до 24 шт.
- Эффективность светодиода – порядка $100 \text{ Лм}/\text{Вт}$, Так, например, светодиод мощностью 5 Вт даёт 500 Лм . (люкс = люмен/ м^2 поверхности)
т.к. 1 светодиод, потребляющий 3 ватта даёт $300 \text{ Лм}/\text{кв. м}$ поверхности, можно рассчитать, сколько светодиодов дают освещённость в 7000 люкс и 1200 люкс соответственно.
 $7000 : 300 = 23,3.../\text{м кв}$ для карпа
 $1200 : 300 = 4 /\text{м кв}$ для карася
 $9000 : 300 = 30 /\text{м кв}$ - нижний предел освещенности гидропонного модуля;
 $14000 : 300 = 46,6.../\text{м кв}$ - верхний предел освещённости гидропонного модуля на кв.м.
т.о. число светодиодов (по правилам округления) колеблется между $30 - 47$ на кв. м. гидропонного модуля.

Ответ:

- Наиболее благоприятной для выращивания светолюбивых растений является интенсивность в пределах: от $\sim 150 \text{ Вт}/\text{м}^2$ до $220 \text{ Вт}/\text{м}^2$
- Оптимальный состав излучения имеет следующее процентное соотношение энергий по спектру: 30% - в синей области ($380-490 \text{ нм}$), 20% - в зеленой ($490-590 \text{ нм}$) и 50% - в красной ($600-700 \text{ нм}$)
- Для карпа необходимо 24 светодиода на м^2 ; для карася- 4 светодиода на м^2 .
Нижний предел гидропонного модуля - 30 светодиодов на м^2 , верхний предел гидропонного модуля- 47 светодиодов на м^2

- На 1 кв. м гидропонного модуля будет приходиться (согласно правилам округления) от 9 до 14 светодиодов на м². Нижний предел гидропонного модуля - 30 синих светодиодов. От 6 до 9 светодиодов зеленого спектра. И от 15 до 24 светодиодов красного спектра излучения

2.2 Задания второго отборочного этапа (10 – 11 класс)

Задание 2.2.1

Условие:

Перед вами представлено несколько плазмид (и описания к ним), которые в дальнейшем могут быть использованы для встраивания гена, кодирующего целевой белок.

Описания приведены с официальных сайтов производителей на английском языке.

При необходимости, вы можете самостоятельно попробовать найти описание на русском языке.

1. pET32b+ (<http://biochem.web.utah.edu/hill/links/pET32.pdf>)
2. pTwinI (<https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/4A37CBDBFD964EF9B6167DCE275D40F9/Datacards%20or%20M...>)
3. pET SUMO ([https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pET_SUMO_\(linearized\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pET_SUMO_(linearized)/))
4. pGEX-4T-1 ([https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_\(ge_healthcare\)/pGEX-4T-1/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/pgex_vectors_(ge_healthcare)/pGEX-4T-1/)
<https://www.addgene.org/vector-database/2876/>)
5. pUC19 (https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/image_consortium_plasmids/pUC19/
<https://www.neb.com/products/n3041-puc19-vector#pd-references>)

Перед тем, как начать планирование эксперимента по встраиванию целевых генов и дальнейшей наработке желаемого белка, необходимо выбрать подходящие плазмиды, для чего вам надо провести небольшую аннотацию предложенных выше конструкций.

Укажите следующие параметры для всех предложенных плазмид:

- Размер (пар оснований) (1 балл)
- Устойчивость к какому антибиотику закодирована в плазмиде (5 баллов)?
- Какие промоторы входят в состав плазмид? (3 балла)
- Какие операторы входят в состав плазмид? (3 балла)
- Укажите сайты рестрикции, входящие в состав полилинкера. (25 баллов)
- Какие дополнительные белковые последовательности закодированы в плазмиде (3 балла)?

Для подготовки к решению этого и последующих заданий мы рекомендуем вам начать изучать следующие разделы онлайн-курсов по молекулярной биологии:

1. Базовые методы генной инженерии (<https://stepik.org/>, Курс: “Биотехнологии: генная инженерия”)
2. Рестрикция. Классы рестриктаз (<https://stepik.org/>, Курс: “Биотехнологии: генная инженерия”)
3. Лигирование (<https://stepik.org/>, Курс: “Биотехнологии: генная инженерия”)
4. Плазмиды и их структурные элементы (Часть1) (<https://stepik.org/>, Курс: “Биотехнологии: генная инженерия”)
5. Плазмиды и их структурные элементы (Часть2) (<https://stepik.org/>, Курс: “Биотехнологии: генная инженерия”)

Ответ:

Все необходимые параметры представлены в таблице:

Плазмида	Размер, пар оснований	Устойчивость к какому антибиотику	Промотор	Оператор	Полилинкер	Дополнительные белковые последовательности
pET32b+	5900	Ампицилин	T7	Lac	AvaI XhoI EagI NotI HindIII SalI SacI EcoRI BamHI EcoRV NcoI	Тиоредоксин (Trx) His Tag S Tag Сайт расщепления для тромбина Сайт расщепления для энтерокиназы
pTwinI	7375	Ампицилин	T7	Lac	SapI NcoI NotI EcoRI XhoI SapI	<i>Mxe</i> GyrA <i>Ssp</i> DnaB Хитин-связывающий домен (CBD)
pET SUMO	5642	Канамицин	T7	Lac	нет	SUMO (Small ubiquitin-like modifier) His Tag Сайт расщепления для тромбина
pGEX-4T-1	4969	Ампицилин	Tac	Lac	BamHI EcoRI TsoMI- XmaI SmaI SalI AccI PaeR7I- PspXI- XhoI EagI-NotI	Глутатион S трансфераза (GST) Сайт расщепления для Тромбина
pUC19	2686	Ампицилин	Lac	Lac	ApoI- EcoRI Eco53kI BanII-SacI Acc65I AvaI- BsoBI- KpnI BmeT110I SmaI BamHI	нет

					XbaI SalI AccI HincII PstI-SbfI BfuAI- BspMI SphI HindIII	
--	--	--	--	--	-----------------------------------------------------------------------------------	--

Пояснения к заданию №1:

Основные компоненты плазмиды были указаны на самой плазмиде, а именно её схеме.

Ниже приведена расшифровка обозначений структурных элементов плазмиды и их функции:

- Сайт рестрикции (участок узнавания) — короткая последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК, которая распознаётся ферментом эндонуклеазой рестрикции-модификации (рестриктазой).
- Промотор — в генетике это последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической, или осмысленной, транскрипции
- Оператор — это последовательность нуклеотидов ДНК, с которой связывается регуляторный белок — репрессор или активатор. Впервые оператор был описан в составе лактозного оперона *E. coli* как участок, перекрывающийся с промотором находящийся перед генами в составе оперона
- Ori (Origin) – точка начала репликации, участок ДНК богатый АТ и поэтому легкоплавкий.
- Ap(AmpR) – нуклеотидная последовательность, кодирующая фермент (бета-лактамазу), инактивирующий антибиотик ампициллин. Антибиотик в данном случае выступает в качестве селективного маркера, а именно в питательной среде с антибиотиком будут расти только те бактерии, которые содержат в себе плазмиду, поскольку именно эта плаزمида придаёт бактерии резистентность к указанному антибиотику. Если в плазмиде указана нуклеотидная последовательность с обозначением Cm, значит данная плазмида придаёт резистентность бактерии к антибиотику канамицин.
- Полилинкер – участок богатый сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции

Дополнительные белковые последовательности:

Функции дополнительных белковых последовательностей

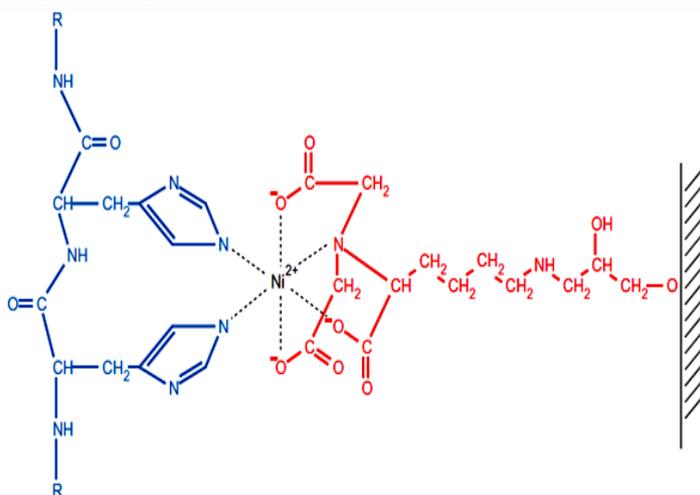
- увеличение стабильности целевого белка внутри клетки (особенно это важно для маленьких гетерологичных белков, таких как пептидные гормоны, которые подвергаются протеолитической деградации в *E.coli*)
- получение гибридного белка в растворимой форме (например, при присоединении к интересующему белку тиоредоксина), и обратно, в нерастворимой форме (при объединении с β-галактозидазой и белком TrpE)
- увеличение уровня экспрессии гена гибридного белка
- способствование рефолдингу целевого белка
- присоединение метки, позволяющей отслеживать образование и локализацию белка в клетке
- транспорт белков на поверхность клетки
- увеличение срока жизни белковых лекарственных препаратов в кровотоке

- облегчение процесса очистки за счет присоединения аффинной группы. Присоединение к белкам аффинных участков — высокоэффективный способ очистки белков, позволяющий выделить практически любой белок без предварительной информации о его биохимических свойствах и произвести очистку до гомогенности за одну стадию аффинной хроматографии

Конкретные примеры дополнительных белковых последовательностей и их функции:

Тиоредоксин (Trx). Белок-партнер, в результате высокоэффективной трансляции в бактериальной клетке он накапливается в большом количестве (40% от общего количества белка клетки) в растворимой форме. Относительно маленький размер тиоредоксина вносит небольшой вклад в общий вес молекулы гибридного белка, что предопределяет возможность присоединения как к N-концу, так и к C-концу рекомбинантного белка. Является термостабильным белком ($T_m=85^\circ\text{C}$), термическое высаживание белков является очень эффективным этапом очистки белков. Для очистки гибридного белка с измененным тиоредоксином также разработана методика аффинной очистки. Принцип заключается во взаимодействии иммобилизованного мышьяк-содержащего вещества с окислительно/восстановительно-чувствительным местным дитиолом сайта тиоредоксина.

His Tag (His His His His His His). Последовательность из шести гистидинов, которая используется для очистки и выделения белка методом аффинной хроматографии. Принцип основан на сродстве в водном растворе ионов переходных металлов таких, как Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} к гистидину и цистеину. Принцип очистки рекомбинантных His-меченных белков посредством металл-аффинной хроматографии основывается на относительно высоком сродстве и специфичности некоторых металлов к эпитопу, содержащему шесть или более остатков гистидина.



Сайты расщепления для тромбина. Тромбин - сериновая протеаза, которая узнает сайт *Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (LVPR^GS)* и вносит разрыв между аргинином и глицином. Тромбин – довольно высокоспецифичная протеаза, однако может гидролизовать пептидные связи в неспецифических местах. Тромбин удобно использовать при работе с мембранными белками, поскольку протеаза нечувствительна к буферным растворам с детергентом. После фермент-зависимого протеолиза тромбин может быть легко удален посредством Benzamidin Sepharose 6B (GE Healthcare), которая используется для очистки или удаления сериновых протеаз. Существенным недостатком протеазы является то, что фермент выделяется из плазмы крови, а не получается биотехнологическим путем, что сильно ограничивает его применение в промышленных масштабах.

Сайт расщепления для энтерокиназы. Специфическая протеиназа, подобно

трипсину и химотрипсину, является сериновой протеазой, которая гидролизует пептидные связи. Энтерокиназа является мембранно-связанным белком и состоит из двух цепей: тяжелая цепь (115 kDa) заякоривает фермент в мембране, когда как легкая цепь (Enterokinase light chain, EKL, 35 kDa) является ферментативной субъединицей, обладающая полной ферментативной активностью. Используют легкую цепь энтерокиназы для промышленного применения. Легкая цепь энтерокиназы распознает последовательность *Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-X(DDDDK^X)* и вносит разрыв после лизина с разной эффективностью протеолиза в зависимости от аминокислоты в положении X.

Если в положении X стоит аминокислота с «жестким» (пролин) или большим трехмерным заместителем (например, триптофан), эффективность расщепления составляет менее 70%, если аминокислота с длинным/тонким/маленьким радикалом (например, аланин, изолейцин, аспарагин и т.д.) – эффективность протеолиза более 80%.

Mxe GyrA и *Ssp DnaB*. ИВ основе метода выделения целевого белка с помощью данных дополнительных белковых последовательностей лежит явление белкового сплайсинга. Более подробную информацию вы можете посмотреть в инструкции к плазмиде pTWIN1.

Хитин-связывающий домен (CBD). Состоит из 51 аминокислоты и представляет собой С-концевой домен хитиназы A1 из *Bacillus circulans* WL-12. Хитин-связывающий домен связывает хитин – полисахарид, широко распространённый в природе и входящий в состав клеточных стенок грибов, экзоскелета насекомых, нематод и т.д. Принцип обратимого связывания CBD с хитином лежит в основе аффинной хроматографии гибридного белка с присоединенным CBD на С- или N-конце.

SUMO (Small ubiquitin-like modifier). Поскольку для сайт-специфического отщепления последовательности убиквитина от целевого белка необходимо равное соотношение субстрата и фермента, что делает технологию дорогой, в настоящее время все чаще используется альтернативная экспрессионная система, в которой в качестве белка-партнера используется SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier). SUMO представляет собой небольшой пептид, состоящий из 100 аминокислот и модулирующий активность, и структуру посредством ковалентной модификации интересующего белка в эукариотах. Как правило SUMO прикрепляется к N –концу целевого белка. Аминокислотные последовательности убиквитина (Ub) и SUMO совпадают на 18%, также оба tag-белка имеют общую трехмерную структуру плотно свернутой глобулы из β -листов, завернутыми вокруг одной α -спирали. Присоединение SUMO к белку-мишени, как и в случае с убиквитином, является жестко регулируемым и динамичным процессом. Отщепление tag-последовательности происходит специфической SUMO-протеазой.

Глутатион S трансфераза (GST). Одношаговая очистка рекомбинантного белка с использованием глутатион S-трансферазы (GST). GST представляет собой белок, состоящий из 211 аминокислот (26 кДа), выделенный из *Schistosoma japonicum*. GST используется в качестве аффинной метки для очистки на смоле, с привитыми молекулами глутатиона. Глутатион представляет собой трипептид (Glu-Cys-Gly), иммобилизованный через сульфгидрильные группы к твердому носителю (чаще всего агарозе).

Задание 2.2.2

Условие:

В представленной ниже нуклеотидной последовательности спрятана закодированная последовательность белка, которая фланкирована двумя сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *sph*I и *Bam*HI.

GCAATGTCAGATAGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATA
TCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGC
CGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTG
GCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTTGTGAGGATCCTGTTTGGATAAG

- Найдите эти сайты в нуклеотидной последовательности.

В поле ответа введите нуклеотидную последовательность, расположенную между указанными сайтами рестрикции. (4 балла)

Ответ:

TCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGACCGTT
GCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTG
GTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGT
GCACTGTTGTGA

- Выберите плазмиду (из списка предложенного в задании 1 второго тура), в которую вы будете клонировать найденную нуклеотидную последовательность белка (2 балла)

Ответ:

pUC19

- Определите аминокислотную последовательность белка, который можно транслировать с предложенного полинуклеотида после встраивания в плазмиду
- Приведите последовательность аминокислотных остатков (в однобуквенной форме, англ.). (4 балла)

Ответ:

MLSDAILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATK
VGALL

В данном задании было необходимо сначала определить указанные сайты эндонуклеаз рестрикции *sph*I и *Bam*HI. Для этого было достаточно определить в интернете нуклеотидную последовательность каждого из сайтов.

*sph*I - GCATGC

*Bam*HI – GGATCC

В нуклеотидной последовательности они помечены красным. Зелёным цветом помечены нуклеотиды, которые нужно было отбросить, поскольку они не относились к решению задачи.

GCAATGTCAGATAGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATA
TCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGC
CGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTG
GCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTTGTGAGGATCCTGTTTGGATAAG

Из пяти плазмид подходила лишь одна плазида рUC19, поскольку только она содержала указанные сайты рестрикции.

При переводе нуклеотидной последовательности белка в аминокислотную нужно было руководствоваться знанием того, что любой синтез белка начинается с аминокислоты Метионин (ATG). Сложность заключалась в том, что данная аминокислота закодирована в сайте рестрикции SphI.

Поэтому нуклеотидная последовательность, кодирующая белок имеет вид:
ATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACCTGAC
CGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCC
GTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTG
GGTGCCTGTTGTGA

И заканчивается на стоп кодоне, который подчеркнут.

Зная нуклеотидную последовательность белка можно спокойно с помощью программы (например, http://molbiol.ru/scripts/01_13.html) или вручную переписать данную нуклеотидную последовательность в аминокислотную.

Аминокислотная последовательность белка:

MetLeuSerAspAlaIleLeuAspGluIleAlaAspGluTyrGlnGlyLysLeuThrValAlaLysLeuAsn
IleAspGlnAsnProGlyThrAlaProLysTyrGlyIleArgGlyIleProThrLeuLeuLeuPheLysAsnGlyGluV
alAlaAlaThrLysValGlyAlaLeuLeuOp*

Задание 2.2.3

Условие:

Для представленной нуклеотидной последовательности
GCAATGTCAGATAGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATA
TCAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAAACCCTGGCACTGCGC
CGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCAAAAACGGTGAAGTG
GCGGCAACCAAAGTGGGTGCACTGTTGTGAGGATCCTGTTTGGATAAG

Вопрос 2.2.3.1 (2 балла)

Выберете из представленных **прямых** праймеров (последовательности приведены от 5' к 3') те, которые подходят для амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей целевой белок с необходимыми для встраивания в плазмиду сайтами рестрикции (Задание 2.2.3).

1. GGTGGTGCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATAT
2. GGTGGTGCATGCTCTCAGTCTGGATGAAAT
3. GGTGGTGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAAT
4. GGTGGTGCATGCTCTCAGATGCGGGATTTCGGGGAAAT
5. GGTGGTGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATAT
6. GGTGGTTCGTACGTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAAT

Ответ:

Праймер №3

Вопрос 2.2.3.2 (2 балла)

Выберете из представленных **обратных** праймеров (последовательности приведены от 5' к 3') те, которые подходят для амплификации нуклеотидной последовательности, кодирующей целевой белок с необходимыми для встраивания в плазмиду сайтами рестрикции (Задание 2.2.3).

- 1) GGTGGTCCSTAAGGTCACAACAGTGCACCCACTTTGGTTGCCGCCAC
- 2) GGTGGTGGATCCCCTAGGTGCACCCACTTTGGTTGCCGCCAC

- 3) GGTGGTGGATCCTCACAACAGTGCACCCACTTTG
- 4) GGTGGTGGATCCCCTAGGTCACAACAGTGCACC
- 5) GGTGGTGGATCCCCTAGGTCACAACAGTGCACCCACTTTGGTTGCCGCCAC
- 6) GGTGGTGGATCCCCTAGGCCCTCAGGCAACAGTGCACC
- 7) GGTGGTCCTAGGCCCTAGGTCACAACAGTGCACC

Решение:

Из представленных праймеров правильными являются только
Обратный праймер
GGTGGTGGATCCTCACAACAGTGCACCCACTTTG

Прямой праймер
GGTGGTGCATGCTCTCAGATGCGATTCTGGATGAAAT

Фиолетовым цветом помечена часть праймера, которая является комплементарной амплифицируемой последовательности ДНК, и только она берётся в расчёт температуры отжига данного праймера.

Дело в том, что праймеры используются в полимеразной цепной реакции. Праймеры должны быть комплементарны амплифицируемой ДНК и иметь близкие значения температуры отжига. Данные праймеры имеют температуру отжига в пределах от 55 до 63⁰С (в зависимости от способа подсчёта), посчитанную в программе <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>

Также температуру отжига праймеров возможно посчитать вручную. Упрощенный расчет оптимальной температуры отжига праймера:
 $T_m = [(A+T) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C}] + [(G+C) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}]$ (если суммарная длина олигонуклеотида не превышает 20 оснований)

$T_m = 22 + 1.46([2 \times (G+C)] + (A+T))$ (если суммарная длина олигонуклеотида составляет 20-30 оснований)

Температура отжига, посчитанная по программе, может отличаться от посчитанной вручную, так температура отжига, посчитанная вручную имеет значения 72 и 70⁰С соответственно. Поэтому в таких случаях лучше пользоваться программой, поскольку она учитывает ещё концентрации соли и праймера.

В данном задании основными критериями, которыми вы должны были руководствоваться для выбора праймеров, являлись их комплементарность амплифицируемому участку ДНК, близкая температура отжига, не превышающая 72⁰С (разница не более 4-6 градусов) и правильность написания сайта рестрикции, содержащегося в праймере.

Ответ:

Праймер №3

Вопрос 2.2.3.3 (6 баллов)

Составьте из представленных блоков последовательный алгоритм действий, включающий все основные процессы трансформации бактериальных клеток:

Выбор плазмиды и определение сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции, по которым будет проходить клонирование

Очистка продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле

Идентификация продуктов рестрикции в геле

Идентификация продуктов ПЦР в геле (Как определяют наличие и расположение ДНК в агарозном геле)

Выделение продукта ПЦР из геля с помощью специального набора реагентов

Выбор оптимальной буферной системы для наиболее эффективного процесса рестрикции плазмиды и продуктов ПЦР

Обработка плазмиды и продукта ПЦР эндонуклеазами рестрикции (Как после обработки плазмиды эндонуклеазами рестрикции определить, что процесс рестрикции прошёл успешно)

Аmplификация целевого гена методом ПЦР (как называется метод ПЦР, позволяющий количественно определить содержание ДНК в образце)

Очистка продуктов рестрикции с помощью электрофореза в агарозном геле

Выделение продуктов рестрикции из геля с помощью специального набора реагентов

Синтез праймеров необходимых для амплификации целевого гена

Лигирование продуктов рестрикции посредством T4-ДНК-лигазы

Трансформация штамма *E.coli* полученным вектором

Посев трансформированных клеток на агаризованную среду с антибиотиком на Чашки Петри

Ответ:

Правильная последовательность эксперимента:

- Выбор плазмиды и определение сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции, по которым будет проходить клонирование
- Синтез праймеров необходимых для амплификации целевого гена
- Амплификация целевого гена методом ПЦР (Реал тайм ПЦР)
- Очистка продуктов ПЦР с помощью электрофореза в агарозном геле
- Идентификация продуктов ПЦР в геле (После разделения (краситель вносят в расплавленную агарозу) фрагменты ДНК разной длины визуализируют при помощи флюоресцентных красителей, специфично взаимодействующих с ДНК, например, агарозные гели обычно красят бромистым этидием, который интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах)
- Выделение продукта ПЦР из геля с помощью специального набора реагентов
- Выбор оптимальной буферной системы для наиболее эффективного процесса рестрикции плазмиды и продуктов ПЦР
- Обработка плазмиды и продукта ПЦР эндонуклеазами рестрикции (Плазмидная ДНК образует вторичные структуры, например, скручивается, в суперспираль. Эти структуры проходят через агарозный гель с разными скоростями, поэтому на агарозном геле интактная плазида, которая не подверглась рестрикции, будет представлена двумя полосками. У плазмиды, которая подверглась рестрикции, будут отсутствовать элементы вторичной структуры. Поэтому на агарозном геле она будет представлена одной полоской.)
- Очистка продуктов рестрикции с помощью электрофореза в агарозном геле
- Идентификация продуктов рестрикции в геле
- Выделение продуктов рестрикции из геля с помощью специального набора реагентов
- Лигирование продуктов рестрикции посредством T4-ДНК-лигазы
- Трансформация штамма *E.coli* полученным вектором
- Посев трансформированных клеток на агаризованную среду с антибиотиком на Чашки Петри