

# Командный практический тур

10-11 классы

*«Мокрые биологи». 1 день.*

Здравствуйте, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых» биологов (за-

дачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

### *Клонирование части гена Cas9*

#### *Задача III.2.1.1. МБ1. Подбор буферных условий. (1 балл)*

Найдите оптимальный буфер (буфер B, G, O, W, Y, Rose, с или без BSA) для проведения рестрикции с участием двух эндонуклеаз рестрикции (№1 и №2 из данных биоинформатиков БИЗ).

Рестриктаза	BSA	Активность (в % от максимальной)					
		B	G	O	W	Y	Rose
Aat II	-	10–25	25–50	10–25	25–50	100	50
Afe I	-	10–25	25–50	75–100	75–100	100	100
Ahl I	+	100	75–100	25–50	25–50	75–100	100
Bsp1720 I	-	50–75	100	50–75	50–75	75–100	75
Dra III	+	25–50	50–75	75–100	75–100	50–75	100
EcoR I	+	50–75	75–100	75–100	75–100	50–75	50
FauND I	+	50–75	75–100	10–25	50–75	100	100
Hind III	+	10–25	25–50	0–10	100	0–10	100
Hpa II	-	100	50–75	10–25	25–50	50–75	50
Kpn I	+	100	25–50	25–50	25–50	75–100	50
Mfe I	+	100	75–100	10–25	25–50	75–100	25
Pct I	-	25–50	50–75	100	75–100	10–25	50
Rsa I	-	100	50–75	0–10	50–75	75–100	50
Sfr303 I	-	100	50–75	10–25	10–25	75–100	100
Vsp I	-	0–10	10–25	50–75	100	25–50	50
Xba I	+	75–100	75–100	100	50–75	75–100	25
Xma I	-	75–100	50–75	0–10	0–10	100	50
Zrm I	+	50–75	25–50	0–10	0–10	100	50

#### *Система оценки*

- (0,56)+BSA(0,56).

**Ответ:** Буфер B

#### *Задача III.2.1.2. МБ2. Рестрикция. (1 балл)*

Для того, чтобы провести пробные реакции по разрезанию плазмид эндонуклеазами рестрикции №1 и №2 необходимо приготовить реакционную смесь, содержащую следующие компоненты: вода, буфер, плазида рMJ806 или рBluescript II SK (-), эндонуклеазы рестрикции №1 и/или №2. Расчитайте для каждой буквы (A-J) значения и внесите в ответ (числа округлять до десятых).

Разбавление плазмид:

Название	Начальная концентрация, нг/мкл	Конечная концентрация, нг/мкл	V плазмиды, мкл	V H <sub>2</sub> O, мкл
pMJ806	530	100	2	A
pBluescript II SK (-)	590	100	2	B

Делаем реакции на 5 мкл:

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация	V, мкл
H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	-	Для рестрикции одним ферментом — C мкл
			Для рестрикции двумя ферментами — D мкл
Буфер	10x	1x	E
Плазида	100 нг/мкл	20 нг/мкл	F
Эндонуклеазы рестрикции №1 и №2	20 U/мкл	2 U/мкл	Для рестрикции одним ферментом — G мкл
			Для рестрикции двумя ферментами — по G каждого

Инкубируем реакции в течение 1 ч при 37 °С

Добавляем H мкл 6xБуфера для нанесения.

Проводим электрофорез в 1% агарозном геле (I г агарозы, 80 мл 1xTAE буфера, J  $\mu$ L EtBr (начальная концентрация 10 мг/мл, конечная — 0,5 мкг/мл)).

### *Система оценки*

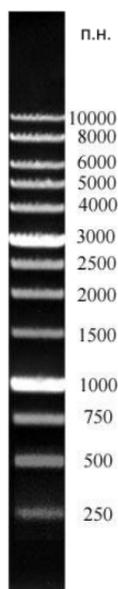
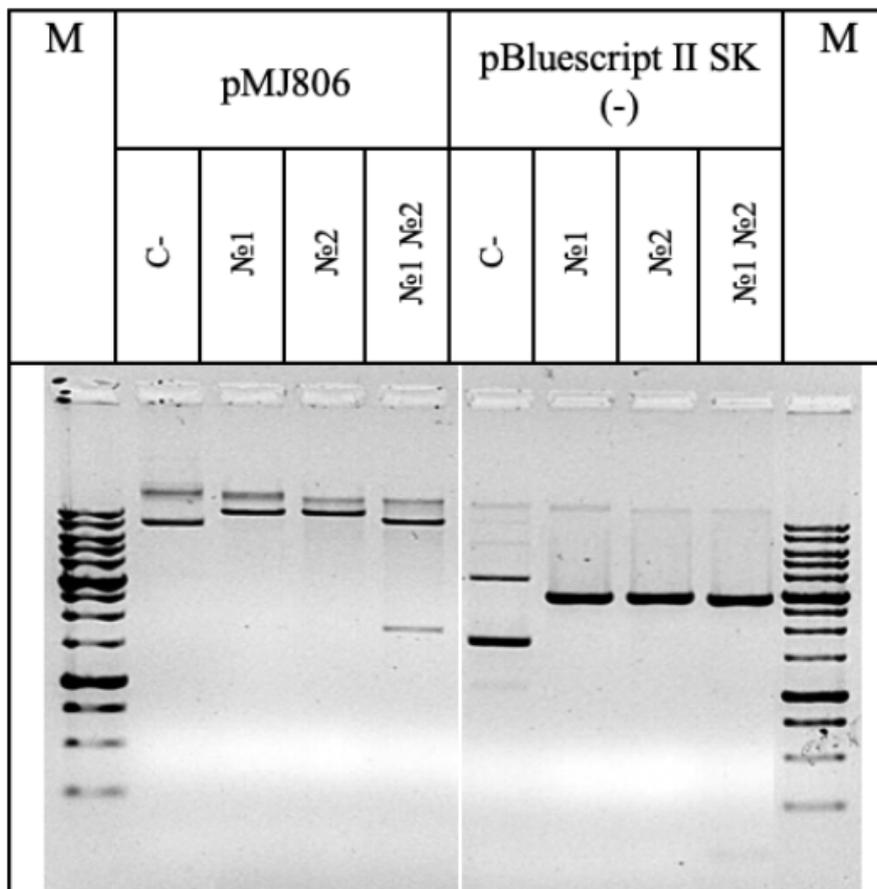
- по 0,16 за верный ответ.

**Ответ:**

A	8,6	F	1
B	9,8	G	0,5
C	3	H	1
D	2,5	I	0,8
E	0,5	J	4

### Задача III.2.1.3. МБЗ. Результаты рестрикции. (4 балла)

По ДНК-маркеру (картинка слева) определите примерную длину фрагментов плазмид рMJ806 (2 видимых фрагмента) и рBluescript II SK (-) (1 видимый фрагмент), получившихся в результате разрезания двумя эндонуклеазами рестрикции. Ответ запишите в виде длины (п.н., пар нуклеотидов) полосок маркера, соответствующих верхней и нижней границе для конкретных фрагментов.



**Система оценки**

- 2 верно 0,3б, 4 верно 0,6б, все верно 1б

**Ответ:**

Фрагмент	Верхняя граница, п.н.	Нижняя граница, п.н.
pMJ806 Большой фрагмент	10000	8000
pMJ806 Малый фрагмент	2000	1500
pBluescript II SK (-) Большой фрагмент	3000	2500

**Задача III.2.1.4. МБ4. Препаративный гель-электрофорез (1 балл)**

Заполните таблицы, чтобы провести препаративный гель-электрофорез. Впишите для каждой буквы (А-Ј) ответ (числа округлять до десятых).

Масштабирование реакции (100 мкл):

Название	Начальная концентрация, нг/мкл	Масса, мкг	V плазмиды, мкл
pMJ806	590	10	А
pBluescript II SK (-)	530	10	В

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация.	V, мкл
H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	-	Для pMJ806 — С мкл Для pBluescript II SK (-) — D мкл
Буфер	10x	1x	Е
Эндонуклеазы рестрикции №1 и №2	20U/мкл	0,5 U/мкл	Суммарно F мкл, по G мкл каждой

Инкубируем реакции в течение 1 ч при 37 °С

Добавляем H мкл (0,1 V реакционной смеси) 80% глицерина

Проводим электрофорез в 1% агарозном геле (I г агарозы, 100 мл 1xTAE буфера, J  $\mu$ L EtBr (начальная концентрация 10 мг/мл, конечная — 0,5 мкг/мл)).

**Система оценки**

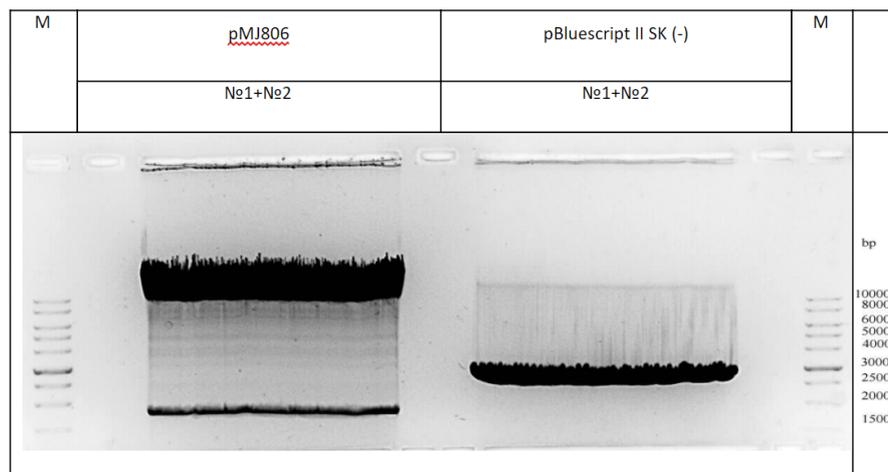
- по 0,1б за верный ответ

**Ответ:**

A	16,945=17,0	F	5
B	18,9	G	2,5
C	68,1	H	10
D	66,1	I	1
E	10	J	5

**Задача III.2.1.5. МБ5. Выделение фрагментов из геля. (1 балл)**

Посчитайте молярную концентрацию фрагментов, зная длину фрагментов из данных биоинформатиков (БИ5) и среднюю молярную массу пары нуклеотидов (618 г/моль/п.н.). Выпишите для каждой буквы (А-С) ответ (числа округлять до целых)



Выделяем фрагменты ДНК из геля (Qiagen Extraction gel kit).

Элюируем фрагмент 30 мкл EB буфера.

Измерили концентрацию ДНК фрагментов на микроспектрофотометре (NanoDrop)

Название	Концентрация, нг/мкл	Концентрация, нМ
pMJ806 Малый фрагмент	47,3	A
pBluescript II SK (-) Большой фрагмент	210	B

**Система оценки**

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:**

A	42
B	118

**Экспериментальная часть****Задача III.2.1.6. МБ6. Лигирование. (1 балл)**

Выпишите для каждой буквы (А-С) ответ (числа округлять до десятых)

Название	Начальная кон- центрация	Конечная кон- центрация	V, мкл
1. H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	до 20 мкл	А
2. Буфер (SE)	10x	1x	В
3. pBluescript II SK (-) Большой фрагмент	20 нМ	1 нМ	С
4. pMJ806 Малый фрагмент	40 нМ	3 нМ	Д
5. T4 ДНК лигаза (SE)	200U/мкл	10 U/мкл	Е

**Система оценки**

- по 0,26 за верный ответ

**Ответ:**

А	14,5
В	2
С	1
Д	1,5
Е	1

1. Последовательно смешайте все реагенты (1.-5.)
2. Инкубируйте при 16 °С в течение 1 ч
3. Инактивируйте фермент при 65 °С в течение 10 мин
4. Охладите смесь на льду

**Экспериментальная часть****Задача III.2.1.7. МБ7. Трансформация химически компетентных клеток *E. coli* штамма NEB 5- $\alpha$ . (1 балл)**

1. Разморозьте клетки на льду (100 мкл)
2. Перенесите 50 мкл клеточной суспензии в дополнительную пробирку
3. Маркируйте пробирки: контроль (Номер команды и «-») и смесь после лигирования (Номер команды и «+»)
4. В пробирку с «Номер команды и «+»» добавьте 5 мкл смеси после лигирования из МБ6

5. Инкубируйте пробирки с клеточной суспензией в течение 40 мин на льду
6. Инкубируйте пробирки с клеточной суспензией в течение 5 мин при 37 °С
7. Маркируйте пробирки с 1 мл SOC-средой: контроль (Номер команды и «-») и смесь после лигирования (Номер команды и «+»)
8. Добавьте клеточной суспензией в соответствующие пробирки с SOC-средой
9. Инкубируйте клетки в течение 40 мин при 37 °С

Подготовка чашек Петри (2 шт), содержащих 100 мкг/мл ампициллина (Amp)

1. К чашкам Петри добавьте по 45 мкл смеси, содержащей X-gal и ИПТГ
2. С помощью шпателя равномерно распределите смесь на поверхности чашек вплоть до высыхания поверхности LB-агара
3. Маркируйте чашки: контроль (Штамм, Номер команды, «-», дата, антибиотик) и смесь после лигирования (Штамм, Номер команды, «-», дата, антибиотик)

Посев клеток на питательную среду.

1. Центрифугируйте клетки в настольной центрифуге в течение 2 мин при 6000 об./мин ( $r = 60$  мм)
2. Отберите 1 мл супернатанта и вылейте в слив, в оставшемся объеме ресуспендируйте клетки и перенесите суспензию в соответствующую чашку Петри.
3. С помощью шпателя равномерно распределите смесь на поверхности чашек вплоть до высыхания поверхности LB-агара. Для каждой чашки используйте новый шпатель.
4. Инкубируйте чашки в течение ночи при 37 °С

Переведите скорость вращения центрифуги, приведенную выше, в относительное центробежное ускорение ( $RCF$ ) используя формулу:

$$RCF = 1.12 \cdot r \cdot (RPM/1000)^2,$$

где  $r$  — радиус, который представляет собой расстояние в миллиметрах (мм) от центра вращения до некоторой точки внутри ротора,  $RPM$  (revolutions per minute) — скорость вращения в оборотах в минуту (об/мин).

**N.b.!** Относительное центробежное ускорение измеряется в единицах, кратных ускорению свободного падения на Земле, обозначаемого латинской буквой  $g$ .

Определите скорость вращения другой центрифуги с  $r = 120$  мм, чтобы провести центрифугирование с одинаковым относительным центробежным ускорением.

### *Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:**  $RCF = 2419 \times g$ , Скорость вращения = 4243 об./мин

### **Задача III.2.1.8. МБ8. Необходимо данные БИ8 Бело-голубая селекция. (1 балл)**

В МБ7 вы трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* штамма NEB® 5-alpha лигазной смесью из МБ6 и посеяли их на чашки Петри с LB-агаром,

содержащие X-gal, ИПТГ и антибиотик (см. строки №1-2 в таблице ниже).

Определите какой результат должен вас ожидать (нет колоний, белые колонии, голубые колонии, белые и голубые колонии) после инкубирования чашек с LB-агаром, содержащих X-gal, ИПТГ с разными плазмидами и разными антибиотиками (см. строки №1-8 в таблице ниже, Amp — ампициллин или Kan — канамицин)

### Система оценки

- 1 верно 0,13б, 2 верно 0,25б, 4 верно 0,5б, 8 верно 1б

Ответ:

	Чем трансформировали	Антибиотик	Результат
1	-	Amp	нет колоний
2	Смесь из МБ6	Amp	белые и голубые колонии
3	pBluescript II SK (-)	Amp	голубые колонии
4	pMJ806	Amp	нет колоний
5	-	Kan	нет колоний
6	Смесь из МБ6	Kan	нет колоний
7	pBluescript II SK (-)	Kan	нет колоний
8	pMJ806	Kan	белые колонии

### Задача III.2.1.9. МБ9. (1 балл)

Сравните геном *E. coli* с геномом *H. sapiens* соматической клетки по размеру, форме и количеству ДНК-структур.

### Система оценки

- 2 верно 0,3б, 4 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:

	<i>E. coli</i>	<i>H. sapiens</i>
Размер	4,6 миллиона п.о.	3 миллиарда п.о.
Форма	кольцевая	линейная
Кол-во	1	46+Митохондриальная

### Задача III.2.1.10. МБ10. (1 балл)

Что содержится в буфере для T4 ДНК лигазы, участвующее в реакции лигирования?

### Система оценки

- по 0,5б за верный ответ

Ответ: АТФ, Mg<sup>2+</sup>

### Биоинформатики. 1 день.

Здравствуйтесь, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых биологов» (задачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

**БИ1-3. Помогите «мокрым» биологам выбрать эндонуклеазы рестрикции для клонирования фрагмента Cas9.**

#### Задача III.2.1.11. БИ1 (1 балл)

Найдите на сайте Addgene (<https://www.addgene.org/>) плазмиду pMJ806 (Plasmid #39312). Нажмите на странице плазмиды ссылку «Sequences», в появившемся окне скачайте полную последовательность плазмиды — «Full Sequences from Addgene» в формате GenBank. У вас должен загрузиться файл «addgene-plasmid-39312-sequence-116214.gbk», переименуйте его в «pMJ806.gbk». Откройте этот файл в программе Ugene.

#### Задача III.2.1.12. БИ2 (1 балл)

Аналогично найдите карту вектора pBluescript II SK (-) (<https://www.addgene.org/vector-database/1947/>). Нажмите на странице плазмиды ссылку «Sequences», скопируйте полную последовательность плазмиды в формате GenBank, вставьте в блокнот информацию, и сохраните в «pBluescript II SK (-).gbk». Откройте этот файл в программе Ugene. Вам необходимо клонировать ген Cas9 из плазмиды pMJ806 в pBluescript II SK (-). Для этого вам необходимо найти две уникальные эндонуклеазы рестрикции (№1 и №2) для этих плазмид из списка доступных в файле «RE.txt» и вставить ответ ниже.

Условия поиска:

1. Эндонуклеазы рестрикции должны разрезать плазмиду с «липкими» концами.
2. Эндонуклеазы рестрикции должны иметь один сайт разрезания как в pMJ806, так и в pBluescript II SK (-).
3. Сайт для первой эндонуклеазы рестрикции должен быть перед геном Cas9, но за MBR.
4. Сайт для второй эндонуклеазы рестрикции разделять ген Cas9 ближе к середине.

**Задача III.2.1.13. БИЗ Необходимо для МБ1 (1 балл)****Система оценки**

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** эндонуклеаза рестрикции №1 — Ahi I, эндонуклеаза рестрикции №2 — Kpn I

**Задача III.2.1.14. БИ4. (1 балл)**

Смогли бы вы найти необходимые эндонуклеазы рестрикции, исходя из условий поиска предоставленных выше, если бы информация о плазидах была предоставлена в формате FASTA? Почему?

**Система оценки**

- по 1б за верный ответ

**Ответ:** Нет, потому что в формате FASTA нет аннотаций

**Задача III.2.1.15. БИ5. (1 балл)**

Необходимо для МБ5 Используйте эндонуклеазы рестрикции №1 и №2 для создания фрагментов плазмид рMJ806 (1) и рBluescript II SK (-) (2). Напишите размер всех фрагментов для каждой из плазмид без учета липких концов (п.о. bp).

**Система оценки**

- по 0,25б за верный ответ

**Ответ:**

Плазида	Фрагмент 1	Фрагмент 2
рMJ806	1805	8764
рBluescript II SK (-)	68	2885

**Задача III.2.1.16. БИ6. (1 балл)**

Клонируйте часть гена Cas9 в разрезанный вектор и создайте новую плазмиду "рVIP1". Напишите длину (п.о., bp) получившейся плазмиды в поле для ответа.

**Система оценки**

- 1б за верный ответ

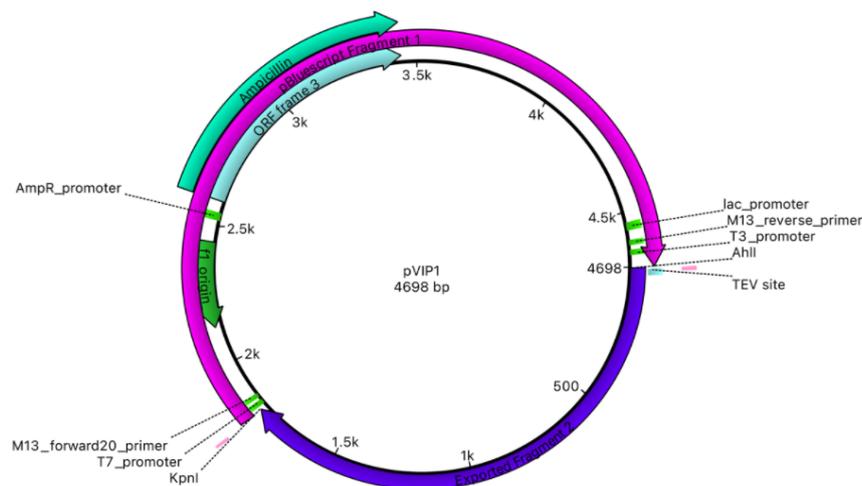
Ответ: 4698

**Задача III.2.1.17. БИ7. (1 балл)**

Сохраните карту плазмиды pVIP1 в формате GenBank — «pVIP1.gb»

**Система оценки**

- 1б за карту



**Задача III.2.1.18. БИ8. (1 балл)**

Необходимо для МБ8 Ген устойчивости к каким антибиотикам присутствует в плаزمидах рMJ806, рBluescript II SK (-), рVIP1.

**Система оценки**

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:

Плаزمида	Ген устойчивости к
рMJ806	Кап
рBluescript II SK (-)	Amp
рVIP1	Amp

**Задача III.2.1.19. БИ9. (1 балл)**

В плазмидах рBluescript II SK (-) и рVIP1 найдите открытую рамку считывания (ORF) длиной от 300 до 2000 (п.о., bp), которая не относится гену устойчивости к

антибиотику, и укажите ее размер.

### *Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:**

Плазмида	Размер ORF
pBluescript II SK (-)	363
pVIP1	1791

### *Задача III.2.1.20. БИ10. (1 балл)*

Исходя из данных БИ9, сделайте вывод о том, что произошло в процессе клонирования фрагмента Cas9 и как это помогло/не помогло «мокрым биологам».

### *Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** При клонировании фрагмента Cas9 нарушился ген альфа-комплемента гена LacZ и поэтому можно проводить бело-голубую селекцию, что облегчает отбор клонов.

### *«Мокрые биологи». 2 день.*

Здравствуйтесь, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых» биологов (задачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

### *Анализ клонов*

### *Задача III.2.1.21. МБ1. (1 балл)*

Расположите олигонуклеотиды в порядке убывания температуры плавления их комплементарных комплексов, укажите приблизительные температуры плавления  $T_m$ , исходя из формулы  $T_m(^{\circ}C) = 2x(A + T) + 4x(G + C)$ :

1. dpCCATTTGCGCTG
2. dpGTCGCGAAAACC
3. dpCCCGCCGCCGCG
4. dpCGGCGGCGGCGG

Ответ:  $4=3>2=1$ .

### Задача III.2.1.22. МБ2. (1 балл)

Оцените количество молекул плазмиды pVIP1 (4698 пар нуклеотидов) содержащихся в 0,5 нг (гипотетическое количество плазмидной ДНК в одной колонии) . Средняя молярная масса пары нуклеотидов — 618 г/моль/п.н.

Ответ:  $1,036 \cdot 10^8$

### Задача III.2.1.23. МБ3. (1 балл)

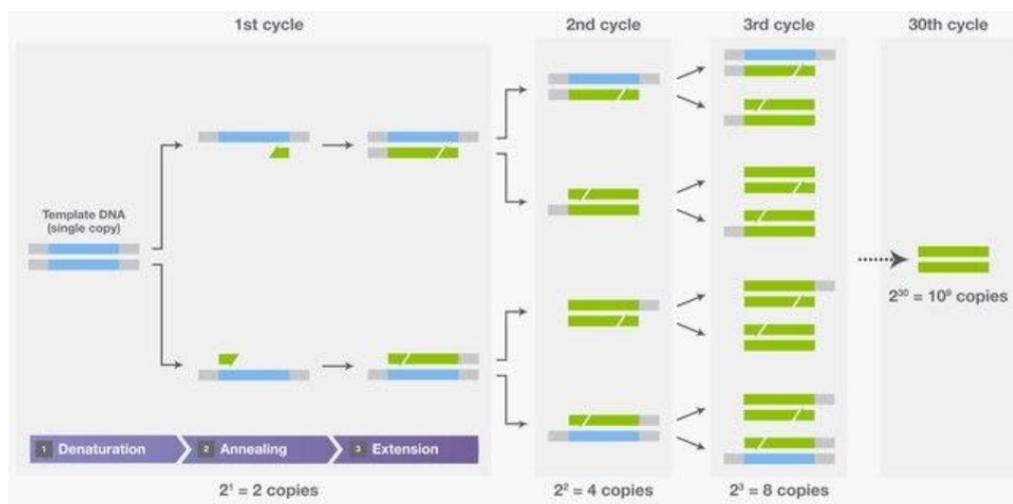
Какие побочные продукты получают после ПЦР реакции? При каких условиях ПЦР побочные продукты будут представлять помеху для получения целевого продукта? Сопоставьте количество продуктов при 30 циклах ПЦР.

#### Система оценки

- 0,5б за  $2n$ , 0,5б за указание продуктов

Ответ: Основной продукт  $2n-2n$

Побочный продукт  $2n$



#### Экспериментальная часть

### Задача III.2.1.24. МБ4. ПЦР с колоний. (1 балл)

#### Приготовление смеси для ПЦР

Выпишите для каждой буквы (A-D) ответ (числа округлять до целых)

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация	V, мкл
1. H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	до 200 мкл	A
2. БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (MM)	2x	1x	B
3. Праймер #1 (PrI)	10 мкМ	0,5 мкМ	C
4. Праймер #2 (PrII)	10 мкМ	0,5 мкМ	D

### Система оценки

- по 0,25б за верный ответ

### Ответ:

A	80
B	100
C	10
D	10

1. Последовательно смешайте все реагенты (1.-4.) в одной пробирке, перемешайте пипетированием
2. Возьмите 4 пробирки для ПЦР и добавьте к каждой по 40 мкл смеси
3. Маркируйте пробирки: контроль (Номер команды и «0») и колонии (Номер команды и «1/2/3») Например: 10, 11, 12, 13 — для первой команды пробирка с контролем (10), с колониями (11, 12, 13)
4. Выберите и пронумеруйте 3 единичные колонии с чашки Петри, маркированной «штамм, номер команды, «+», дата, антибиотик», для того чтобы проверить их на наличие вставки в вектор
5. С помощью носика аккуратно соберите часть колонии (если колонии маленькие, то можно собрать всю колонию) и перенесите ее в соответствующую пробирку для ПЦР, повторите эту процедуру для каждой колонии.
6. Поставьте пробирки в амплификатор с программой:

№	Температура, °C	Длительность	Кол-во циклов
1	95	удержание	1
2	95	5 мин	1
3	95	30 сек	30
4	62	30 сек	1
5	72	2 мин 30 сек	
6	72	15 мин	
7	4	удержание	1

7. Запустите амплификатор

### Задача III.2.1.25. МБ5. (1.2 баллов)

Для шагов № 2-6 ПЦР программы из МБ4 опишите предназначение.

*Система оценки*

- по 0,2б за верный ответ

**Ответ:**

2	Активация полимеразы, первичная денатурация матрицы
3	Денатурация матрицы
4	Отжиг праймеров
5	Элонгация
6	Достройка фрагментов

**Задача III.2.1.26. МБ6 (1 балл)**

Для ПЦР используется реагент БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color с «горячим стартом», что значит «горячий старт» и в чем его преимущество?

*Система оценки*

- 0,5б за «не активна», 0,5б за специфичность

**Ответ:** Полимераза не активна при комнатной температуре за счет аптамеров, которые ингибируют ее активность и необходимо разогреть смесь, чтобы полимераза стала активной, что является большим преимуществом, так как реакция начинается происходить только в амплификаторе.

**Задача III.2.1.27. МБ7 (1 балл)**

Скорость продвижения Taq ДНК-полимеразы — 1 т.п.о./ мин. Рассчитайте за какое гипотетическое время одна молекула Taq ДНК-полимеразы прошла бы по геному *E. coli* (4639221 п.о.) и человека (3088286401 п.о.). Для *E. coli* ответ запишите в днях, а для человека — в годах, числа округлять до десятых.

*Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** 3,2 дня

5,9 лет

**Задача III.2.1.28. МБ8. (1 балл)**

Что содержится в буфере для Taq ДНК-полимеразы, участвующее в реакции полимеризации?

### *Система оценки*

- по 1б за верный ответ

**Ответ:** Mg<sup>2+</sup>

### *Экспериментальная часть*

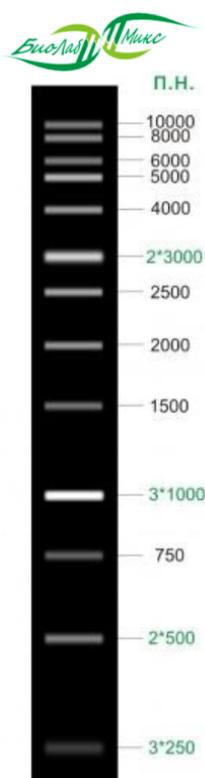
#### **Задача III.2.1.29. МБ9. Анализ ПЦР с колоний с помощью агарозного гель-электрофореза (1 балл)**

Оборудование и реактивы

- Камера для электрофореза.
- Источник питания.
- Трансиллюминатор.
- Агароза.
- Раствор ТАЕ 1X, стоковый раствор ТАЕ 50X.
- ДНК-маркер Sky-High.
- Дозаторы, наконечники для дозаторов.

#### **Протокол**

1. Приготовить 100–200 мл 1% агарозного геля на 1X ТАЕ (в зависимости от размеров заливочного столика).
2. Разогреть агарозу в буферном растворе в микроволновой печи, охладить.
3. Добавить бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл геля.  
Осторожно! Бромистый этидий — сильный мутаген, при работе с ним следует соблюдать чрезвычайную осторожность.
4. Залить в камеру для горизонтального электрофореза, установить гребенки.
5. На гель нанести 5 мкл ДНК-маркера (Sky-High), 5 мкл контроля, 5 мкл каждой из 3 ПЦР реакций (всего 5 дорожек).
6. Проводить электрофорез в течение 40 минут при 110 В.
7. Визуализировать результаты на трансиллюминаторе, распечатать фотографию, вклеить, либо зарисовать результаты.



Проанализируйте гель. Для наиболее интенсивной полосы для колоний №1-3 запишите их размер в виде длины (п.н., пар нуклеотидов) полосок маркера, соответствующих верхней и нижней границе. Укажите соответствует ли значения подвижности ПЦР продукта биоинформатическим данным.

### Система оценки

- 0,5б за границы, 0,5б за понимание/соответствие

Ответ:

Колония	Верхняя граница, п.н.	Нижняя граница, п.н.	Соответствует ли значения биоинформатическим данным
1	2500	2000	pVIP1
2	750	500	pBlueScript II SK(-)
3			

### Задача III.2.1.30. МБ10. (1 балл)

Куда мигрирует бромистый этидий при агарозном гель-электрофорезе и как это связано с фоном геля?

*Система оценки*

- 0,5б за направление, 0,5б за фон

**Ответ:** Мигрирует к катоду (-), так как Et+Br-, поэтому гель окрашен лучше сверху, чем снизу

*Биоинформатики. 2 день.*

Здравствуйтесь, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых биологов» (задачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

*Задача III.2.1.31. БИ1 (1 балл)*

Выберете прямой праймер, который комплементарен плазмиде pVIP1

*Система оценки*

- 1б за верный ответ

**Ответ:**

Праймер 1	ACACAAAGCCGCTCCATCAG
Праймер 2	AGCTGGACATCACCTCCCACAACG
Праймер 3	AATATACCTCTATACTTTAACGTC
<b>Праймер 4</b>	<b>GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC</b>
Праймер 5	CAGCACAAAAGGAAACTCACC

*Задача III.2.1.32. БИ2 (1 балл)*

Выберете из обратный праймер, который комплементарен плазмиде pVIP1

*Система оценки*

- 1б за верный ответ

**Ответ:**

Праймер 1	GCCCAGTCATAGCCGAATAG
Праймер 2	ACCCTAACTGACACACATTCC
Праймер 3	GAAATTTGTGATGCTATTGC
Праймер 4	CATAGCGTAAAAGGAGCAACA
<b>Праймер 5</b>	<b>CCCAGTCACGACGTTGTA AACG</b>

**Задача III.2.1.33. БИЗ (1 балл)**

Напишите температуру плавления праймеров и температуру отжига, которую вам предлагает Ugene при *in silico* ПЦР

**Система оценки**

- 2 верно 0,3б, 4 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:

Tm первого праймера	59,74
Tm второго праймера	57,06
Ta праймеров	59,23

**Задача III.2.1.34. БИ4 (1 балл)**

Используйте прямой и обратный праймер для *in silico* ПЦР на плазмиде pVIP1, напишите длину получившегося продукта

**Система оценки**

- все верно 1б

Ответ: 2315.

**Задача III.2.1.35. БИ5 (1 балл)**

Используйте прямой и обратный праймер для *in silico* ПЦР на плазмиде pBluescript II SK (-), напишите длину получившегося продукта

**Система оценки**

- все верно 1б

Ответ: 578

**Задача III.2.1.36. БИ6 (1 балл)**

Сделайте 3 аннотации в плазмиде pVIP1 аминокислот K163, F164, R403 в клонированной части белка Cas9. Сохраните плазмиду в формате GenBank — «pVIP1 aa.gb»

**Система оценки**

- 0,5б за аннотацию, 0,5б за смысл

### Задача III.2.1.37. БИ7 (1 балл)

Выберите кодон для замен K163A, F164A, R403A который чаще встречается в *Escherichia coli* B, используя базу данных <https://www.kazusa.or.jp/codon/> и вставьте ответ ниже

#### Система оценки

- все верно 1б

Ответ: GCG

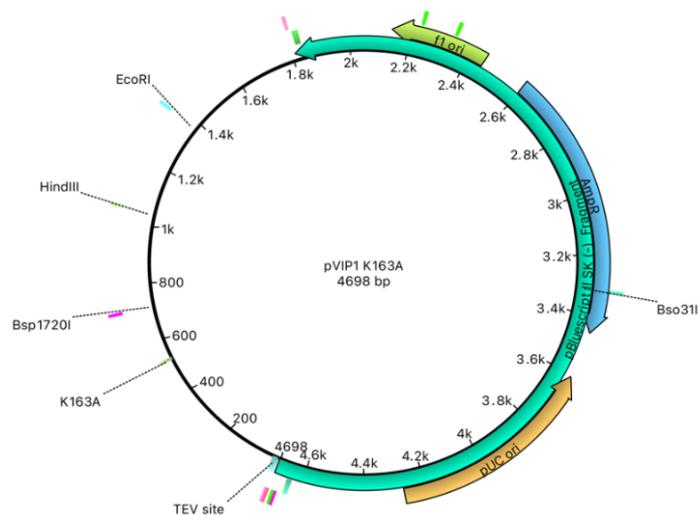
### Задача III.2.1.38. БИ8 (1 балл)

Создайте плазмиду pVIP1 с аминокислотной заменой K163A и измените аннотацию с K163 на K163A. Сохраните плазмиду в формате GenBank — «pVIP1 K163A.gb»

#### Система оценки

- 0,5б за замену, 0,5б за смысл

Ответ:



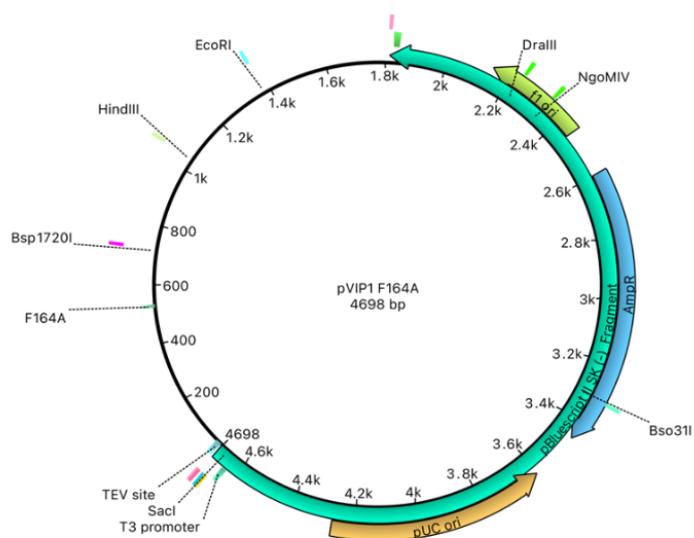
### Задача III.2.1.39. БИ9 (1 балл)

Создайте плазмиду pVIP1 с аминокислотной заменой F164A и измените аннотацию с K163 на K163A. Сохраните плазмиду в формате GenBank — «pVIP1 F164A.gb»

#### Система оценки

- 0,5б за замену, 0,5б за смысл

Ответ:



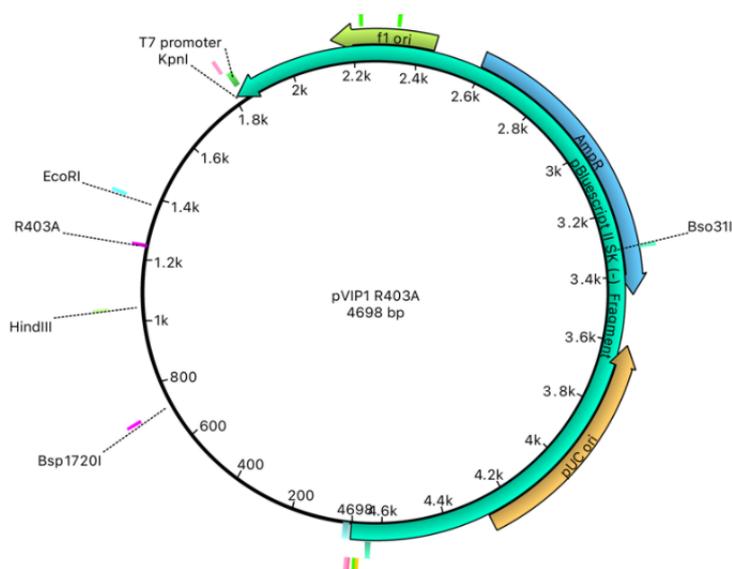
### Задача III.2.1.40. БИ10 (1 балл)

Создайте плазмиду pVIP1 с аминокислотной заменой R403A и измените аннотацию с K163 на K163A. Сохраните плазмиду в формате GenBank — «pVIP1 R403A.gb»

#### Система оценки

- 0,5б за замену, 0,5б за смысл

Ответ:



## «Мокрые биологи». 3 день.

Здравствуйтесь, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых» биологов (задачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

### Экспериментальная часть

#### Задача III.2.1.41. МБ1. Рестрикционный анализ ПЦР продукта (1 балл)

Название	V, мкл
1. ПЦР смесь выбранного клона	8
2. Буфер	1
3. Эндонуклеаза рестрикции	1

1. Последовательно добавьте все реагенты (1.-3.) в одной пробирке, перемешайте пипетированием
2. Поставьте инкубироваться в течение 1 ч при 37 °С
3. Инактивируйте в течение 20 мин при 80 °С

Что происходит при инактивации фермента?

#### Система оценки

- 0,5б — денатурация, 0,5б не работает фермент

**Ответ:** Денатурация и поэтому рестриктаза не разрезает ДНК

### Экспериментальная часть

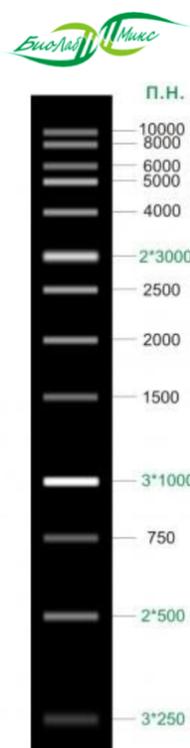
#### Задача III.2.1.42. МБ2. Анализ ПЦР с колоний с помощью агарозного гель-электрофореза (1 балл)

##### Протокол

1. Приготовить 100–200 мл 1% агарозного геля на 1X ТАЕ (в зависимости от размеров заливочного столика).
2. Разогреть агарозу в буферном растворе в микроволновой печи, охладить.
3. Добавить бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл геля. Осторожно! Бромистый этидий — сильный мутаген.
4. Залить в камеру для горизонтального электрофореза, установить гребенки.
5. На гель нанести ДНК-маркер, 8 мкл контроля, 10 мкл смеси после рестрикции
6. Проводить электрофорез в течение 40 минут при 110 В.

7. Визуализировать результаты на трансиллюминаторе, распечатать фотографию, вклеить, либо зарисовать результаты.

Проанализируйте гель. Для фрагмента(ов) запишите их размер в виде длины (п.н., пар нуклеотидов) полосок маркера, соответствующих верхней и нижней границе. Укажите соответствует ли значения подвижности ПЦР продукта биоинформатическим данным.



### Система оценки

- 0,5б за границы, 0,5б за соотнесение

Ответ:

Фрагмент	Верхняя граница, п.н.	Нижняя граница, п.н.	Соответствует ли значения биоинформатическим данным
1	1000	1500	да
2	1000	1500	да

### Задача III.2.1.43. МБЗ. (1 балл)

После подтверждения вставки, выделили препаративное количество плазмиды pVIP1 и использовали ее для сайт-направленного мутагенеза части гена Cas9. Заполните таблицы для того, чтобы провести 3 параллельные реакции сайт-направленного мутагенеза с однонуклеотидными заменами K163A, F164A, R403A. Впишите для каждой буквы (А-Н) ответ (А-Г числа округлять до десятых, Н до целых).

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация	V, мкл
Q5 реакционный буфер	5X	1X	A
дНТФ	10 мМ каждого	200 мкМ каждого	B
Q5 High-Fidelity ДНК полимеразы	1 U/мкл	0,02 U/мкл	C
H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	До 25 мкл	D
Прямой праймер	5 мкМ	0,5 мкМ	E
Обратный праймер	5 мкМ	0,5 мкМ	F
Плазмида pVIP1(4698 п.о.)	5 нг/мкл	0,2 нг/мкл	G

### ПЦР программа:

Шаг	Температура	Время
Начальная денатурация	98°C	30 с
25 Циклов	98°C	60°C
72°C	10 с	20 с
Н с (30 с/ т.п.н)	Финальная достройка	72°C
2 мин	Хранение	4–10°C

### Система оценки

- 1- 0,126, 2- 0,256, 4-0,56, 8-16

### Ответ:

A	5	E	2,5
B	0,5	F	2,5
C	0,5	G	1
D	13	H	141

### Задача III.2.1.44. МБЗ. (1 балл)

После подтверждения вставки, выделили препаративное количество плазмиды pVIP1 и использовали ее для сайт-направленного мутагенеза части гена Cas9. Заполните таблицы для того, чтобы провести 3 параллельные реакции сайт-направленного мутагенеза с однонуклеотидными заменами K163A, F164A, R403A. Впишите для каждой буквы (A-H) ответ (A-G числа округлять до десятых, H до целых).

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация	V, мкл
Q5 реакционный буфер	5X	1X	A
дНТФ	10 мМ каждого	200 мкМ каждого	B
Q5 High-Fidelity ДНК полимеразы	1 U/мкл	0,02 U/мкл	C
H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	До 25 мкл	D
Прямой праймер	5 мкМ	0,5 мкМ	E
Обратный праймер	5 мкМ	0,5 мкМ	F
Плазмида pVIP1(4698 п.о.)	5 нг/мкл	0,2 нг/мкл	G

### ПЦР программа:

Шаг	Температура	Время
Начальная денатурация	98°C	30 с
25 Циклов	98°C	60°C
72°C	10 с	20 с
Н с (30 с/ т.п.н)	Финальная достройка	72°C
2 мин	Хранение	4–10°C

### Система оценки

- 1- 0,126, 2- 0,256, 4-0,56, 8-16

### Ответ:

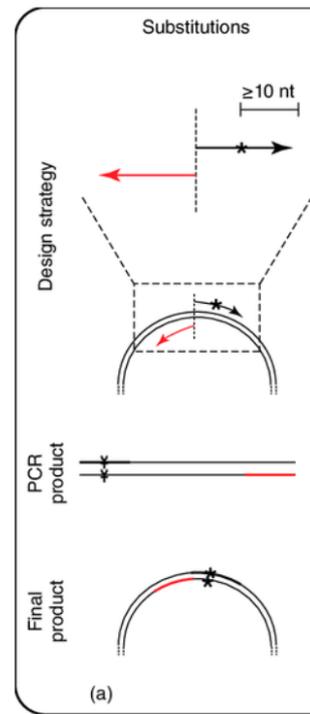
A	5	E	2,5
B	0,5	F	2,5
C	0,5	G	1
D	13	H	141

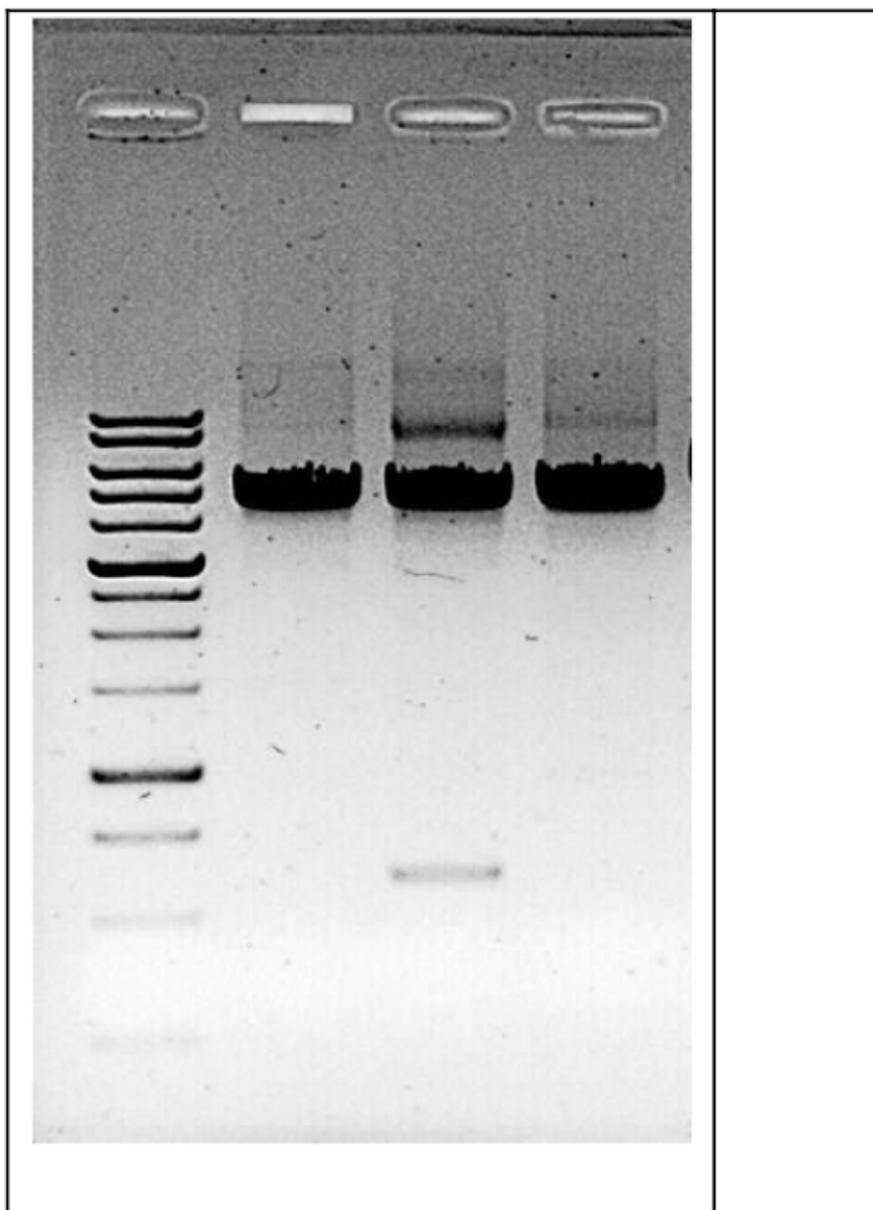
### Задача III.2.1.45. МБ4. (1 балл)

После ПЦР\* провели агарозный гель-электрофорез (рисунок ниже). Раствор после сайт-направленного мутагенеза обработали KDL смесью (содержит Киназу, DpnI (рестриктаза), Лигазу). Химически трансформировали клетки E. coli штамма DH5α и посеяли их на чашку Петри с LB-агаром, содержащую ампициллин (Amp). Инкубировали чашки при 37 °C в течение ночи. Отобрали колонию, инокулировали в LB среду с ампициллином и инкубировали при 37 °C в течение ночи. Выделили плазмиду из ночной культуры. Для чего необходим каждый из компонент KDL смеси?

\*Олигонуклеотиды не содержат фосфата с 5' конца

M	K163A	F164A	R403A	
				10000
				8000
				6000
				5000
				4000
				3000
				2500
				2000
				1500
				1000
				750
				500
				250





### *Система оценки*

- 0,3б за 1, 0,6б за 2, 1б за все верное

**Ответ:** Киназа — фосфорилирование концов , DpnI — деградация матрицы, Лигаза — соединение концов

### *Задача III.2.1.46. МБ5. (1 балл)*

Обратное клонирование фрагмента гена Cas9. Произвели рестрикцию плазмид pVIP1 K163A, pVIP1 F164A, pVIP1 R403A и выделение фрагмента гена Cas9 согласно предыдущим протоколам (день 1). Лигирование произвели согласно протоколу ниже. Выпишите для каждой буквы (А-Н) ответ (А-В округлять до сотых, остальное до целых). Дополнительная информация: средняя молекулярная масса пары нуклеотидов — 618 г/моль/п.н.

Название	Концентрация, нг/мкл	Длина, п. н.	Молярная масса, МДа	Концентрация, нМ
pMJ806 №1 №2 Большой фрагмент	284	8772	A	C
pVIP1 с заменой №1 №2 Малый фрагмент	36	1805	B	D

Разбавили фрагменты плазмид до 20 нМ концентрации

Название	Начальная концентрация	Конечная концентрация	V, мкл
Буфер	10x	1x	E
pVIP1 с заменой №1 №2 Малый фрагмент	20 нМ	3 нМ	F
pMJ806 №1 №2 Большой фрагмент	20 нМ	1 нМ	G
H <sub>2</sub> O (Mili-Q)	-	до 20 мкл	H
T4 ДНК лигаза	400U/мкл	20 U/мкл	1

Инкубировали при 16°C в течение ночи.

Инактивировали фермент при 65 °C в течение 10 мин.

Остудили на льду

### *Система оценки*

- 1- 0,126, 2- 0,256, 4-0,56, 8-16

**Ответ:**

A	5,42	E	2
B	1,12	F	3
C	52	G	1
D	32	H	13

### ***Задача III.2.1.47. МБ6. Трансформация. (1 балл)***

Трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* штамма DH5 $\alpha$  и посеяли их на чашку Петри с LB-агаром, содержащую канамицин (Kan). Инкубировали чашку в течение ночи при 37 °C. Выбранная колония была инокулирована в LB среде с Kan. После инкубирования в течение ночи при 37 °C, плазмиды были выделена коммерческим набором. Почему использовали химически компетентные клетки, а не электрокомпетентные для трансформации лигазной смесью?

*Система оценки*

- 1б за верный ответ

**Ответ:** При лигировании в смеси много солей, что мешает при электропорации, поэтому необходимо очищать лигазную смесь перед использованием для электропорации.

*Задача III.2.1.48. МБ7 (1 балл)*

Как работает система рестрикции-модификации в клетках бактерий?

*Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** За рестрикцию

За модификацию

*Задача III.2.1.49. МБ8 (1 балл)*

Как работает система CRISPR/Cas в клетках бактерий?

*Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** За приобретение спейсера

За интерференцию

*Задача III.2.1.50. МБ9 (1 балл)*

Одна клетка начинает делиться. После четвертого деления в одной из дочерних клеток возникает мутация А (на жизнеспособность клеток она не влияет). После девятого деления в одной из дочерних клеток той же линии (то есть, уже несущих мутацию А) возникает мутация В, приводящая к гибели клетки. Сколько клеток только с мутацией А будет существовать в популяции после 12 деления? Какой процент от общего числа клеток они составят?

*Система оценки*

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:** 248 клеток

6,07%

**Задача III.2.1.51. МБ10 (1 балл)**

мРНК содержит: А — 30%, G — 20%, U — 14%.

Какой нуклеотидный состав (в процентах) ДНК, кодирующую эту мРНК?

**Система оценки**

- по 0,25б за верный ответ

**Ответ:**

Нуклеотид	%
А	22%
С	28%
G	28%
Т	22%

**Биоинформатики. 3 день.**

Здравствуйтесь, дорогие участники олимпиады, за эти дни вам предстоит решить по-настоящему научную задачу. Чтобы это сделать, вам необходимо будет объединить усилия биоинформатиков (задачи с индексом "БИ") и «мокрых биологов» (задачи с индексом "МБ"). Блуждая по просторам экспериментальных данных, вы найдете верный путь к решению не самой простой задачи даже для профессионалов. Желаю вам удачи в этом исследовании!

**Задача III.2.1.52. БИ1 Подбор эндонуклеазы рестрикции для рестрикционного анализа. (1 балл)**

Найдите уникальную эндонуклеазу рестрикции из списка доступных «RE3day.txt» и вставьте ответ ниже. Условия поиска: 1) Эндонуклеаза рестрикции должна быть уникальной для pVIP1 2) Эндонуклеаза рестрикции должна разрезать фрагмент гена Cas9 3) Эндонуклеаза рестрикции не должна разрезать pBluescript II SK (-). **Ответ:**

Bsp1720I

**Задача III.2.1.53. БИ2 (1 балл)**

Данные необходимы «мокрым биологам» Используйте эндонуклеазу рестрикции из БИ1 для разрезания ПЦР фрагмента «PCR fragment pVIP1.gb» и запишите длины 2 фрагментов:

**Система оценки**

- по 0,5б за верный ответ

**Ответ:**

Фрагмент	Длина, п.о.
№1	1148
№2	1164

### Задача III.2.1.54. БИЗ (1 балл)

Используя сервис <http://nebasechanger.neb.com/>, подберите праймеры для сайт-направленного мутагенеза плазмиды pVIP1 для каждой из замен K163A, F164A, R403A. Ниже вставьте последовательность праймеров и температуру отжига.

#### Система оценки

- по 0,16, все верно 16

Ответ:

Замена	Праймеры	Ta
K163A	GСАТАТGАТТgсgТТТСGТGGТCАТТТТТТG GСТАAGGССAAАТАGАТТАAG	60°C
F164A	ТАТGАТТАAGgсgСGТGGТCАТТТТТТGАТТGAG TGСGСТАAGGССAAАТАG	61°C
R403A	GСGСAAAGСAAgсgACСТТТGАСААС	58°C

### Задача III.2.1.55. БИЗ (1 балл)

Используя сервис <http://nebasechanger.neb.com/>, подберите праймеры для сайт-направленного мутагенеза плазмиды pVIP1 для каждой из замен K163A, F164A, R403A. Ниже вставьте последовательность праймеров и температуру отжига.

#### Система оценки

- по 0,16, все верно 16

Ответ:

Замена	Праймеры	Ta
K163A	GСАТАТGАТТgсgТТТСGТGGТCАТТТТТТG GСТАAGGССAAАТАGАТТАAG	60°C
F164A	ТАТGАТТАAGgсgСGТGGТCАТТТТТТGАТТGAG TGСGСТАAGGССAAАТАG	61°C
R403A	GСGСAAAGСAAgсgACСТТТGАСААС	58°C

### Задача III.2.1.56. БИЗ Анализ данных секвенирования. (1 балл)

Для секвенирования плазмиды после сайт-направленного мутагенеза использовали один из праймеров: 5'-ТААТАСGАСТСАСТАТАGGG-3' или

5'-GCAATTAACCCCTCACTAAAGG-3'. Сделайте выравнивание секвенированных последовательностей:

"pVIP1 K163A.ab1" на плазмиды pVIP1 и pVIP1 K163A:

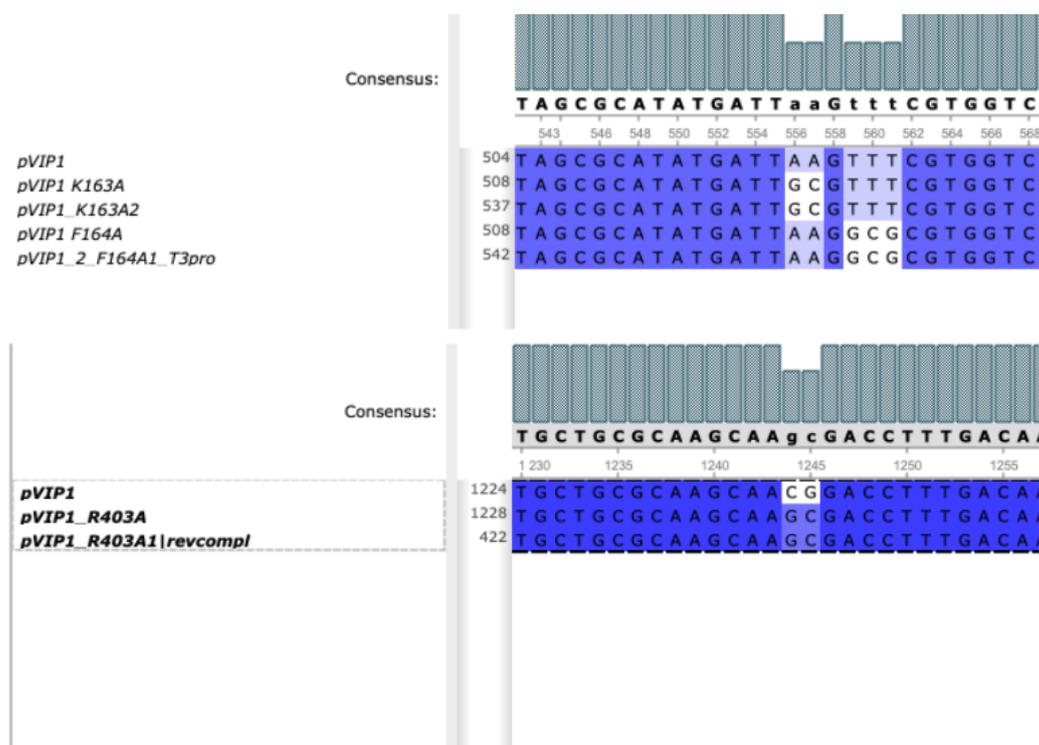
"pVIP1 F164A.ab1" на плазмиды pVIP1 и pVIP1 F164A:

"pVIP1 R403A.ab1" на плазмиды pVIP1 и pVIP1 R403A.

### Система оценки

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:



Загрузите подписанные 3 картинки с выравниванием измененного кодона.

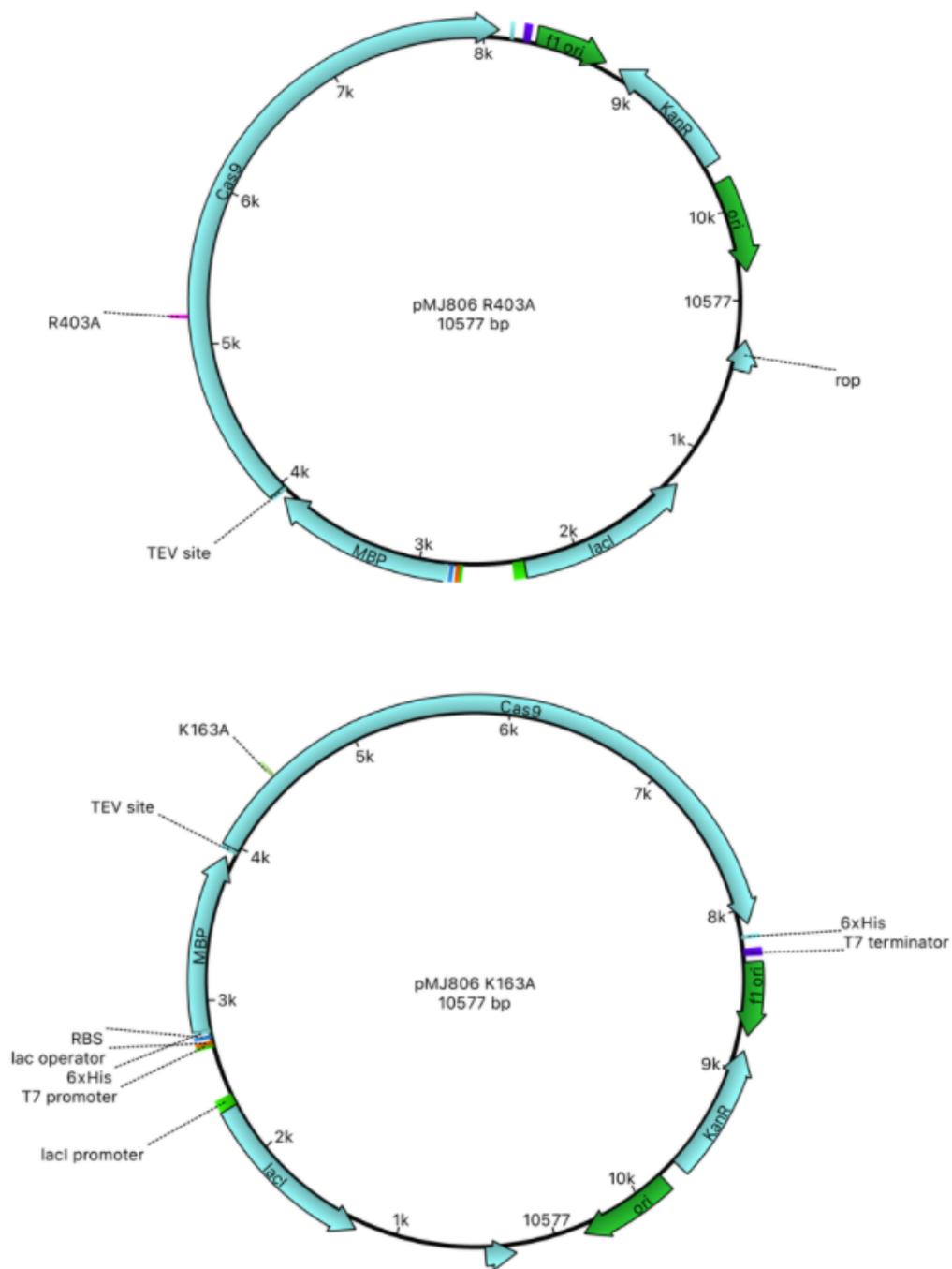
### Задача III.2.1.57. БИ5 Плазмиды pMJ806 с аминокислотной заменой. (1 балл)

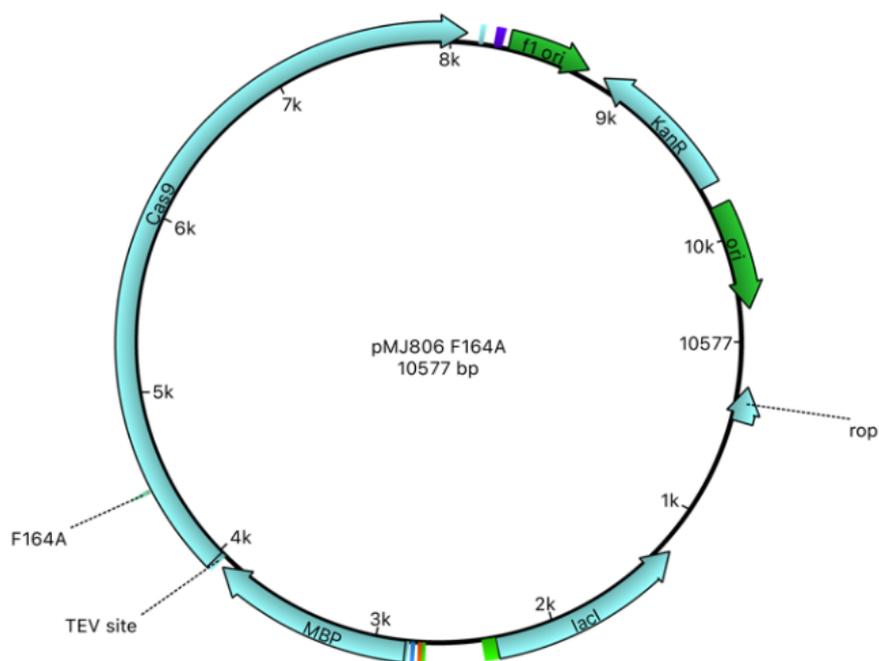
Создайте в UGENE 3 плазмиды с одной аминокислотной заменой K163A, F164A, R403A, сделайте аннотацию для замены, назовите ее "K163A "F164A "R403A". Назовите плазмиды "pMJ806 K163A "pMJ806 F164A "pMJ806 R403A" соответственно и сохраните файлы с расширением .gb или .gbk

### Система оценки

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:





### Задача III.2.1.58. БИ6. (1 балл)

Подбор праймеров для секвенирования. Выберите праймер из представленных ниже для секвенирования измененного кодона для плазмид:

#### Система оценки

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

#### Ответ:

- рMJ806 K163A (Праймер 2)
- рMJ806 F164A (Праймер 2)
- рMJ806 R403A (Праймер 3)

Праймер	Последовательность
Праймер 1	5'-CTTCCGCTGTCTCTCCACTG-3'
Праймер 2	5'-GCATCTGATAAATTCTTAGCTGCCA-3'
Праймер 3	5'-TGCTGGTTTTTCGCATTCCTTC-3'
Праймер 4	5'-ATGCCGCCCCATTA CTTTGA-3'
Праймер 5	5'-CAAAGCAGTTCC AACGACGG-3'
Праймер 6	5'-CACTAGCCAGCATCCGTTTAC-3'
Праймер 7	5'-CTGGCAAGTGTAGCGGTCA-3'

### Задача III.2.1.59. БИ7. Анализ данных секвенирования. (1 балл)

Сделайте выравнивание секвенированной последовательностей:

"pMJ806 K163A.ab1" на плазмиды pMJ806 и pMJ806 K163A:

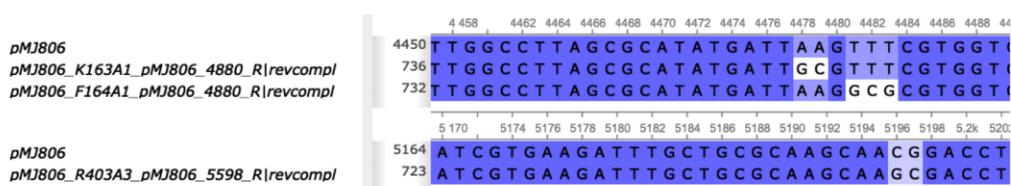
"pMJ806 F164A.ab1" на плазмиды pMJ806 и pMJ806 F164A:

"pMJ806 R403A.ab1" на плазмиды pMJ806 и pMJ806 R403A.

#### Система оценки

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

Ответ:



Загрузите подписанные 3 картинки с выравниванием измененного кодона.

### Задача III.2.1.60. БИ8 (1 балл)

Размер химерного белка 6xHis-MBP-TEV site-Cas9 с аминокислотной заменой.

В UGENE в картах pMJ806 K163A, pMJ806 F164A, pMJ806 R403A найдите ORF с минимальной длиной >3000 п.о. Копируйте последовательность белка и вставьте в онлайн сервис <https://web.expasy.org/protparam/>. Вставьте молекулярный вес и длину (а.о.) этих белков в ответ.

#### Система оценки

- по 0,25б за верный ответ

Ответ:

Белок	Молекулярный вес, Да	Длина, а.о.
6xHis-MBP-TEV site-Cas9 (K163A)	201687.17	1762
6xHis-MBP-TEV site-Cas9 (F164A)	201668.17	
6xHis-MBP-TEV site-Cas9 (R403A)	201659.16	

**Задача III.2.1.61. БИ9 (1 балл)**

Для чего необходима каждая из частей химерного белка:

**Система оценки**

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

**Ответ:** 6xHis — для выделения белка с использованием Ni-NTA

MBP — для увеличения растворимости белка/выделения белка на аффинной колонке

TEV site — для расщепления TEVp, чтобы избавиться от 6xHis и MBP

**Задача III.2.1.62. БИ10 (1 балл)**

Какие данные хранит в себе формат .ab1?

**Система оценки**

- 1 верно 0,3б, 2 верно 0,6б, все верно 1б

**Ответ:** Последовательность ДНК

Хроматограмма

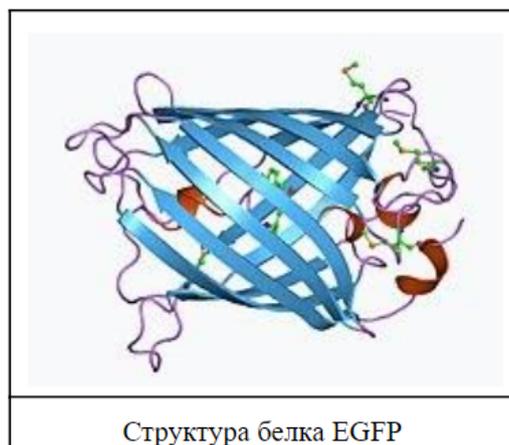
Качество для каждого нуклеотида

**8-9 классы****Анализ продуктов работы системы геномного редактирования**

В лаборатории геномной и белковой инженерии ИХФБМ СО РАН был проведен эксперимент по редактированию гена EGFP методом CRISPR/Cas9. Отредактированные клетки по одной были отсортированы в индивидуальные лунки 96-луночного планшета. В течение нескольких дней были выращены колонии клеток. Из этих клеток выделяли геномную ДНК, проводили ПЦР с праймерами, направленными на редактируемый участок ДНК. Продукты ПЦР клонировали в плазмидную ДНК при помощи TA-клонирования. Клетки *E. coli* трансформировали полученной плазмидной ДНК.

В результате получены чашки Петри с колониями, содержащими плазмиды с фрагментами гена исходного и мутантного EGFP, которые предоставлены вам для анализа.

Используя ПЦР и рестрикционный анализ определите эффективность работы системы геномного редактирования, определите колонии, содержащие фрагмент исходного гена EGFP и его мутантной формы.



### *ТА-клонирование*

ТА-клонирование используют для быстрого клонирования продуктов ПЦР без предварительной обработки рестриктазами или эндонуклеазами. Вектор для ТА-клонирования представляет собой линейизованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Эффективное лигирование ПЦР-продукта в ТА-вектор основано на способности (особенности) Таq-полимеразы и ее аналогов нематрично добавлять на 3'-конце синтезированной цепи дезоксиаденозин. Таким образом, ПЦР продукты несут комплементарные концам ТА-вектора 3'-концевые нуклеотиды А:Т. Наличие таких «липких» концов обеспечивает высокую эффективность лигирования.

Для ТА-клонирования в пробирку с реакционной смесью добавляют стерильную воду, буфер для лигирования, ТА-вектор, ПЦР-продукт, T4 ДНК лигазу и инкубируют в течение нескольких (5–15) минут при комнатной температуре.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* проводят лигазной смесью по стандартному протоколу. Например, для химической трансформации используют неочищенную лигазную смесь. К 100 мкл клеточной суспензии добавляют 5–10 мкл лигата.

Для отбора клонов, содержащих встройку, используют ПЦР с колоний (colony-ПЦР) или бело-синюю селекцию.

### *Правила работы с автоматическими дозаторами*

Автоматический дозатор имеет регулировочный винт (задает отбираемый объем образца), и два положения рычага для наполнения. Для отбирания образца следует обязательно надеть на дозатор одноразовый пластиковый наконечник (синий — для дозатора до 1 мл, желтый — для дозаторов до 20, 200 мкл, прозрачный — для дозаторов до 10 мкл).

Перед отбором следует сбросить жидкость на дно пробирки. Боковыми стенками наконечника не следует касаться боковых стенок пробирки.

1. Выставить на дозаторе необходимый объем (в интервале мкл, указанном на дозаторе, например, 20–200 мкл)
2. Надеть наконечник на дозатор
3. Нажать рычаг дозатора до первого упора

4. Опустить наконечник в жидкость
5. Медленно отпустить рычаг дозатора
6. Перенести дозатор с наконечником в другую пробирку
7. Выдавить жидкость, нажав на рычаг до второго упора
8. При необходимости, сменить наконечник

### **Внимание**

- Следует плавно отпускать рычаг дозатора вверх
- Не следует переворачивать дозатор с надетым наконечником, не следует класть на стол дозатор
- Не следует сбрасывать наконечник, в котором есть жидкость
- Если что-то пошло не так, пожалуйста, обратитесь к сотруднику лаборатории

## ***Амплификация фрагмента гена EGFP методом colony-ПЦР (ПЦР из колоний)***

Метод полимеразной цепной реакции позволяет специфически амплифицировать достаточно протяженные фрагменты двуцепочечной ДНК.

ДНК-полимераза Taq имеет «горячий старт», поэтому все манипуляции с реакционной смесью можно проводить при комнатной температуре.

Компоненты реакционной смеси находятся в штативах в морозильном отделении холодильника. Чашки Петри с колониями для анализа — в холодильном отделении.

### **Оборудование и реактивы**

- Автоматические дозаторы до 200 мкл, 20 мкл, до 10 мкл, наконечники к ним
- Амплификатор
- Вортекс
- Микроцентрифуга
- Компоненты реакционной смеси
- Чашки Петри с колониями *E. coli*
- Штативы, пробирки 0,6 мл, 0,2 мл (для ПЦР)

### **Приготовление реакционной смеси**

Компонент, исходная концентрация	Количество на 6 реакций по 20 мкл	Конечная концентрация
Вода	48 мкл	
Мастер-микс, 2X	60 мкл	1X
10 $\mu$ М праймер 1	6 мкл	0.5 $\mu$ М
10 $\mu$ М праймер 2	6 мкл	0.5 $\mu$ М
	Всего 120 мкл	

### **Протокол**

1. Пометить маркером 5 отдельных колоний на чашке Петри, пронумеровать их. Подписать на чашке название команды.
2. Компоненты реакционной смеси смешать в пробирке 0,6 мл.

3. Перенести в 6 пробирок для ПЦР по 20 мкл реакционной смеси.
4. Наконечником прикоснуться к каждой из пяти помеченных колоний, поместить конец наконечника в реакционную смесь, ресуспендировать 2–3 раза. Для каждой колонии использовать новый наконечник. В контрольный образец (пробирка 6) не добавлять материал с колоний. Подписать пробирки.
5. Перемешать на вортексе, отцентрифугировать перед тем, как поставить пробирки в амплификатор.

Внести расположение пробирок в таблицу рядом с амплификатором и указать команду.

### **Параметры ПЦР**

1. Предварительная денатурация (горячий старт) — 3 минуты при 95 ° С
2. Амплификация — 25 циклов
  - Денатурация 95 ° С, 20 сек
  - Отжиг 58 ° С, 20 сек
  - Элонгация 72 ° С, 20 сек
3. Финальная элонгация 72 ° С, 2 мин
4. Охлаждение до 4–8 С

### **Вопросы**

Какие преимущества имеет метод бело-синей селекции перед ПЦР с колоний?

Не требуется проводить ПЦР-анализ

Какие преимущества имеет метод ПЦР с колоний перед бело-синей селекцией?

ПЦР показывает наличие специфической последовательности ДНК

## ***ПДРФ-анализ продуктов ПЦР***

ПДРФ-анализ (от англ. Restriction fragment length polymorphism — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) используют для определения наличия сайтов рестрикции в фрагменте ДНК. Для этого ДНК гидролизуют с помощью эндонуклеазы рестрикции и далее проводят разделение продуктов рестрикции гель-электрофорезом ДНК в агарозном геле.

Наличие или отсутствие сайта рестрикции, и, соответственно, образование продуктов рестрикции соответствующей длины, позволяет определить последовательность заданного участка ДНК.

### **Оборудование и реактивы**

- Автоматические дозаторы до 200 мкл, 20 мкл, до 10 мкл, наконечники к ним.
- Вортекс.
- Микроцентрифуга.
- Штативы, пробирки.
- Термостат твердотельный.
- 1 мкл рестриктазы BseI1 с концентрацией 20 ед. активности в 1 мкл.
- 20 мкл 10X буферного раствора Y для рестрикции.

### **Протокол**

Для каждого из 6 полученных ампликонов подготовить смесь для ПДРФ-анализа.

Компонент смеси для RFLP	Объем
Вода	8 мкл
Буфер Y 10X	2 мкл
Продукт ПЦР	10 мкл
Суммарный объем	20 мкл

1. Компоненты для анализа каждой реакционной смеси поместить в отдельные пробирки объемом 0,6 мл.
2. В анализируемые пробирки добавить по 2 ед. активности рестриктазы BseI в однократном буфере Y. Перемешать пипетированием. Инкубировать 1 ч при 37 С в твердотельном термостате.
3. Остаток ПЦР-продукта использовать как отрицательный контроль рестрикции

## ***Анализ продуктов рестрикции***

### **Оборудование и реактивы**

- Автоматические дозаторы до 200 мкл, 20 мкл, до 10 мкл, наконечники к ним
- Вортекс
- Микроцентрифуга
- Штативы, пробирки
- Камера для горизонтального электрофореза
- 1 мкл рестриктазы BseI с концентрацией 20 ед. активности в 1 мкл
- 20 мкл 10X буферного раствора Y для рестрикции
- Агароза, ТАЕ 50X, микроволновая печь

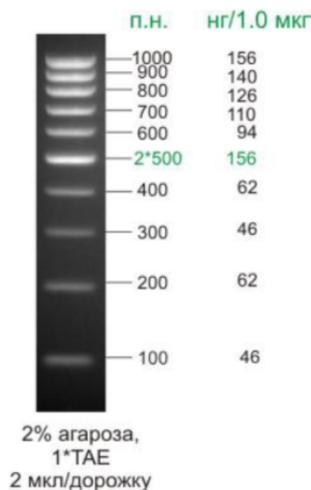
### **Протокол**

1. Приготовить 150 мл 1% агарозного геля на 1X ТАЕ (или другой объем, в зависимости от размеров заливочного столика).
2. Разогреть агарозу в буферном растворе в микроволновой печи, охладить
3. Залить в камеру для горизонтального электрофореза, установить гребенки
4. Смешать содержимое пробирок после ПДРФ-анализа с \_\_ мкл 4X краски; смешать содержимое пробирок после ПЦР с \_\_ мкл 4X краски для нанесения на агарозный гель.
5. На каждый гель в отдельный карман нанести 2 мкл ДНК-маркера (Step100)
6. Проводить электрофорез в течение около 40 минут при 80–120 В
7. Окрасить гель раствором бромистого этидия (EtBr) — работать в перчатках!
8. Визуализировать результаты на трансиллюминаторе, распечатать фотографию, вклеить либо зарисовать результаты

### **Результаты**

*вклеить или зарисовать результаты здесь*

**ДНК маркер Step100**



**Вопросы** Результаты эксперимент Используя маркер длин ДНК определите длину полученного ПЦР-продукта

Около 700 пар нуклеотидов

Какие из колоний содержат фрагмент с мутацией в гене EGFP, если известно, что в результате мутации сайт рестрикции *VseI* исчезает. Обоснуйте ответ.

Колонии, ПЦР-продукты наработанные из которых, гидролизуются рестриктазой, не содержат мутацию. Продукты, не гидролизующиеся рестриктазой — содержат мутацию.

Какие из колоний содержат ДНК без мутации в гене EGFP? Обоснуйте ответ.

В которых не проходит рестрикция

Что можно сказать по результатам данного эксперимента об эффективности работы инструментов редактирования генома в исходных клетках?

Активность инструментов геномного редактирования привела к образованию мутации в гене EGFP

### **ПЦР с колоний (colony-ПЦР)**

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) используют для амплификации коротких фрагментов ДНК. В качестве матрицы обычно используют ДНК, выделенную фенол-хлороформным методом, на колонках или магнитных частицах. В некоторых случаях ПЦР может успешно проходить и без выделения ДНК.

Метод ПЦР с колоний позволяет определить наличие вставки в плазмиде после трансформации компетентных клеток продуктами реакции лигирования. Для этого используют автоклавированные зубочистки, кончиком которых слегка касаются колоний, выросших в чашке Петри на селективной среде и далее помещают в реакционную смесь. Обычно процесс повторяют для 10 колоний.

Для амплификации использовали реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую эквимлярную смесь дНТФ с общей концентрацией 400 нМ, праймеры для определения вставки в концентрации 100 нМ каждого, а также другие компоненты (Taq-ДНК-полимераза, MgCl<sub>2</sub>, KCl и др.) в оптимальных концентрациях, в 10 про-

бирок внесли образец материала с 10 колоний, в пробирку с положительным контролем внесли 2 нг другой плазмиды, содержащей точно такую же вставку, в пробирку с отрицательным контролем внесли в качестве матрицы плазмиду без встройки. Известно, что длина плазмиды pUC19, использованной для клонирования — 3222 п. н. (теоретическая длина вместе со встройкой).

После 20 циклов ПЦР в оптимальных условиях продукты реакции смешали с 6 мкл 4X буфера для нанесения и проанализировали в 2% агарозном геле (1X TAE). Длина ПЦР-продукта — 480 п.н., по результатам анализа, вставка содержалась в 3 колониях из 10. Используя маркер длины молекулярной массы ДНК, для отдельных бэндов которого известна масса ДНК в каждой из полос, оценили, что в пробирке №2 масса ПЦР-продукта составляет примерно 250 нг.

### Вопрос 1

Предположив, что pUC19 содержащая вставку, содержится в каждой клетке в количестве ровно 500 копий, и предполагая, что плазмидная ДНК попала в реакционную смесь ровно из половины всех внесенных клеток *E. coli*, вычислите, сколько клеток перенесено в пробирку №2. Относительную молекулярную массу пары оснований принять равной 660 г/моль. Приведите основные вычисления ниже.

**Ответ:** В пробирку 2 перенесено 1800 клеток *E. coli* .

### Вопрос 2

Как однозначно доказать наличие вставки?

**Ответ:** Секвенированием.

### Вопрос 3

Можно ли из условий задачи оценить эффективность лигирования и трансформации колоний.

**Ответ:** Нет, так как для однозначного ответа недостаточно данных.

### Вопрос 4

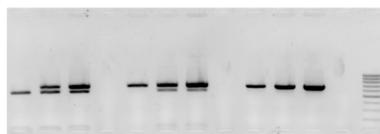
Для чего используют положительные и отрицательные контрольные образцы при постановке полимеразной цепной реакции?

**Ответ:** Положительный контрольный образец (ПКО) содержит матрицу, отрицательный (ОКО) не содержит матрицу. Отсутствие продукта ПЦР в положительном контрольном образце свидетельствует о том, что реакционная смесь либо программа амплификации составлена неверно. Наличие продукта ПЦР в отрицательном контрольном образце свидетельствует о загрязнении (контаминации) образца матрицей. Наличие продукта в ПКО и отсутствие в ОКО позволяет интерпретировать полученные результаты, соответственно, отсутствие продукта в ПКО и/или наличие в ОКО свидетельствует о том, что полученные результаты недостоверны.

### Вопрос 5 (по задаче вторника)

Подпишите дорожки и состав соответствующих им реакционных смесей. Проведите анализ результатов ПДРФ трех клонов, если известно, что на три дорожки наносили 5, 10 и 20 мкл ПЦР-продукта, добавляли к ним 2 е. а. рестриктазы *BseI* в соответствующем буферном растворе.

5 мкл	10 мкл	20 мкл	5 мкл	10 мкл	20 мкл	5 мкл	10 мкл	20 мкл
Дикий тип			Гетерозигота			Мутант		



Определите колонии, содержащие вставку ПЦР-продукта, полученного с мутантной копии гена и продукта, полученного с неотредактированной копии гена.

## *Анализ результатов секвенирования целевого гена в модифицированных клеточных линиях*

### Формулировка задания:

Основываясь на данных секвенирования по Сэнгеру, определить характер мутаций, которые произошли в геноме моноклональных модифицированных клеточных линий после применения системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.

### До начала выполнения задания:

- Будет проведена краткая лекция о Web-инструменте «TIDE» (Tracking of Indels by DEcomposition) и его применении для анализа мутаций в клеточных линиях, полученных методами геномного редактирования.
- Далее для ознакомления с сервисом участникам будет предоставлено 30 минут на самостоятельное изучение инструкций и литературы сервиса по ссылке <https://tide.nki.nl/> (будет использован сервис TIDE, не TIDER).

### Исходные данные для решения задачи:

1. В папке по ссылке <https://goo-gl.su/x1EL> размещены файлы трех экспериментов (Exp1, Exp2, Exp3) по редактированию генома клеточных линий. Каждая папка содержит текстовый файл с информацией о направляющей последовательности (Guide\_Sequence), а также файлы с разрешением .ab1, содержащие в себе информацию о результатах секвенирования области редактирования как для контрольных клеточных линий (control), так и для модифицированных клеточных линий (test).
2. Участникам олимпиады необходимо с применением Web-инструмента «TIDE» и ряда других инструментов [список ниже] ответить на поставленные вопросы в приведенной ниже таблице:

Для ответа на часть вопросов могут потребоваться дополнительные доступные инструменты:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> (доступен для поиска по запросу «blast»)

<https://genome.ucsc.edu/> (доступен для поиска по запросу «genome browser»)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (доступен для поиска по запросу «ncbi»)

<https://www.gear-genomics.com/teal/> — инструмент позволяет просматривать файлы .ab1

Отправить файл с ответами на почту: [evgenijur@gmail.com](mailto:evgenijur@gmail.com). В названии файла обязательно указать название команды и фамилию биоинформатика.

### Результаты эксперимента 1 (папка /Experiment\_1)

Какие мутации несут аллели модифицированной клеточной линии?	+1 -2
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации? (почему?)	гетерозигота

### Результаты эксперимента 2 (папка /Experiment\_2)\*

\* иногда для обнаружения мутаций необходимо тщательно варьировать условия поиска

testA	
Какие мутации несут аллели модифицированной клеточной линии?	-13
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации?	гомозигота
Определить последовательность РАМ, которая была использована для направления sgРНК	TGG

testB	
Какие мутации несут аллели модифицированной клеточной линии?	-16 -44
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации?	гетерозигота
Определить последовательность РАМ, которая была использована для направления sgРНК	TGG
Выбрать направляющую РНК, которая была использована при редактировании (обосновать ответ, можно схематично)	РНК номер 2) Т.к. начало совпадает с направляющим фрагментом, который дан для анализа сиквенсов в TIDE. Плюсик если вставят картинку взаимодействия системы CRISPR/Cas9

1) 5'-TGTGAAAACAGATACTATGAGTTTTAGAG  
STAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG

GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA  
GTCGGTGC-3'

2) 5'-ATGAATGCCAACCGCTCTGAGTTTTAGAG  
STAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG

GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA  
GTTCGGTGC-3'

3) 5'-AGTATCATAGACAAAAGTGTGTTTTAGAG  
STAGAAATAGCAAGTTAAAATAAG

GCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA  
GTTCGGTGC-3'

4) 5'-CTGTCACTACGGAAGGTTGGAGTTTTAGA  
GCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA

GGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG  
AGTTCGGTGC-3'

### Результаты эксперимента 3 (папка /Experiment\_3)\*\*

\*\* иногда требуется внести запланированную мутацию в определенную область гена. Эксперимент 3 как раз и был направлен на специфическую замену фрагмента гена. Известно, что вносимый фрагмент имеет длину на 5 п.н. больше, чем исходный фрагмент, характерный контрольным клеткам.

С использованием Web-инструмента TIDE проанализируйте полученные модифицированные клеточные линии и ответьте на следующие вопросы:

testA	
Произошла ли в данном клоне запланированная замена фрагмента гена?	да
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации?	гетерозигота
Несет ли клеточная линия еще какую-либо мутацию в данном фрагменте гена? Если да, то какую?	Да, +1

testB	
Произошла ли в данном клоне запланированная замена фрагмента гена?	да
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации?	гомозигота
Несет ли клеточная линия еще какую-либо мутацию в данном фрагменте гена? Если да, то какую?	Нет

testC	
Произошла ли в данном клоне запланированная замена фрагмента гена?	да
Является ли клеточная линия гомозиготой / гетерозиготой по мутации?	гетерозигота
Несет ли клеточная линия еще какую-либо мутацию в данном фрагменте гена? Если да, то какую?	Да, -23

Попробуйте установить для клеточной линии test В эксперимента 3 последовательность фрагментов:	1) GCCAACCGCT
который был заменен	2) TTCAGAATGGTТААА
который был вставлен	
в результате редактирования.	
Какая модифицированная клеточная линия в третьем эксперименте, с вашей точки зрения, наиболее удовлетворяет поставленной задаче по получению клеточной линии с заранее запланированной мутацией? (почему?)	testВ т.к. она является гомозиготой, две остальные являются гетерозиготами и соответственно мутации во втором аллеле будут оказывать эффект при проведении дальнейших экспериментов.

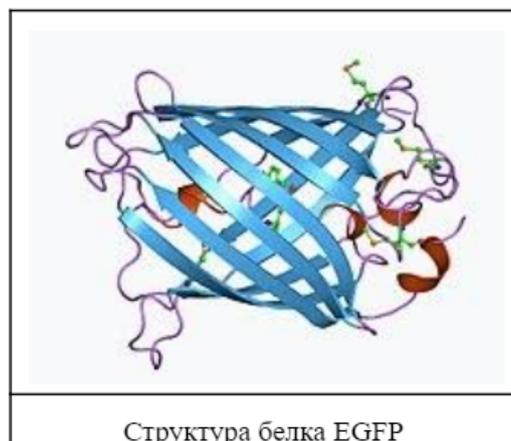
Общие вопросы к трем экспериментам	
Учитывая, что все эксперименты по редактированию были проведены внутри одного гена, постарайтесь определить название данного гена?	GAS5, Homo sapiens growth arrest specific 5 gene
Поразмышляйте, для каких целей исследователи стараются получить клеточные линии с заранее запланированной мутацией (как в случае эксперимента 3), а для каких достаточно внесение спонтанных мутаций (как в случае эксперимента 1 и 2)	Запланированная — моделирование генетического заболевания, связанного с опред. последовательностью в гене, с опред. мутацией. Внесение определенных аминокислотных мотивов в транскрибируемую полипептидную цепь. Спонтанная — простое выключение гена, для выявления его функциональной значимости.

### Результаты эксперимента 3 («3\_Control», «3\_exp»)

Выбрать направляющую РНК, которая была использована при редактировании (обосновать ответ)

- 5'- TGTGAAAACAGATACTATGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA ATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-3'
- 5'-GGGCTGTCACTACGGAAGGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-3'
- 5'-AGTATCATAGACAAAAGTGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAA TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-3'
- 5'-CTGTCACTACGGAAGGTTGGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA ATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC-3'

## *Анализ продуктов работы системы геномного редактирования*



В лаборатории геномной и белковой инженерии ИХФБМ СО РАН был проведен эксперимент по редактированию гена EGFP методом CRISPR/Cas9. Лизаты клеток находятся в штативах.

Используя ПЦР в реальном времени с флуоресцентным зондом определите, какие линии клеток содержат исходный ген EGFP и его мутантную форму.

### *Выделение ДНК из клеточного лизата*

#### **Оборудование и реактивы**

- Реактивы для выделения ДНК
- Микропробирки 1,5 мл
- Автоматические дозаторы и наконечники к ним
- Настольная центрифуга 12000 об/мин
- Перчатки

#### **Правила работы с автоматическими дозаторами**

Автоматический дозатор имеет регулировочный винт (задает отбираемый объем образца), и два положения рычага для наполнения. Для отбирания образца следует обязательно надеть на дозатор одноразовый пластиковый наконечник (синий — для дозатора до 1 мл, желтый — для дозаторов до 20, 200 мкл, прозрачный — для дозаторов до 10 мкл).

Перед отбором следует сбросить жидкость на дно пробирки. Боковыми стенками наконечника не следует касаться боковых стенок пробирки.

1. Выставить на дозаторе необходимый объем (в интервале мкл, указанном на дозаторе, например, 20-200 мкл)
2. Надеть наконечник на дозатор
3. Нажать рычаг дозатора до первого упора
4. Опустить наконечник в жидкость
5. Медленно отпустить рычаг дозатора

6. Перенести дозатор с наконечником в другую пробирку
7. Выдавить жидкость, нажав на рычаг до второго упора
8. При необходимости, сменить наконечник

### **Внимание**

- Следует плавно отпускать рычаг дозатора вверх
- Не следует переворачивать дозатор с надетым наконечником, не следует класть на стол дозатор
- Не следует сбрасывать наконечник, в котором есть жидкость
- Если что-то пошло не так, пожалуйста, обратитесь к сотруднику лаборатории

Протокол выделения ДНК состоит из двух основных этапов: щелочной лизиса клеток и последующая сорбция ДНК на кремниевой мембране (силика), промывка и элюция очищенного продукта. На одной колонке возможно выделение до 20 мкг ДНК. Можно параллельно выделять ДНК из всех трех предоставленных вам образцов (на трех колонках).

### **Осторожно!**

Буферы для лизиса LB, нейтрализации NB и промывки WB1 содержат вещества, оказывающие раздражающее и токсичное действие. При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Растворы токсичны при попадании на кожу и внутрь. Вызывают ожоги. При попадании на кожу немедленно промыть большим количеством воды.

### **Протокол**

1. Осадить клетки из среды центрифугированием, 1 мин, 12000 об/мин. Удалить супернатант (надосадочную жидкость).
2. К осадку клеток добавить 250 мкл буфера SB. Ресуспендировать пипетированием.
3. К суспензии клеток добавить 250 мкл буфера для лизиса LB. Аккуратно перемешать вручную, аккуратно переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!
4. Добавить 400 мкл буфера для нейтрализации NB. Аккуратно перемешать вручную, переворачивая пробирку 5–10 раз до получения однородной смеси. Не использовать вортекс!  
Примечание: Перемешать суспензию сразу после добавления буфера NB, чтобы избежать образования крупных частиц.
5. Центрифугировать 10 мин, 12000 об/мин.
6. 800 мкл супернатанта нанести на колонку. Центрифугировать 30 с, 12000 об/мин. Удалить фильтрат.
7. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB1. Центрифугировать 30 с, 12000 об/мин. Удалить фильтрат.
8. Нанести на колонку 500 мкл буфера для промывки WB2. Центрифугировать 30 с, 12000 об/мин. Удалить фильтрат.
9. Центрифугировать колонку 3 мин, 12000 об/мин для полного удаления буфера WB2.
10. Перенести колонку в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1.5 мл с отрезанной крышечкой. Крышечку не выбрасывать.
11. Нанести на центр фильтра колонки 60 мкл буфера для элюции EB. Инкубиро-

вать 3 мин при комнатной температуре.

12. Центрифугировать 1 мин, 12000 об/мин.

Буфер EB для элюции содержит 0.01 М Tris-HCl (pH 8.0). Элюировать образец также можно TE буфером (0.01 М Tris-HCl, 0.001 М EDTA, pH 8.0–8.5) либо водой (pH 8.0–8.5).

### Вопросы

Сопоставьте растворы, использованные при выделении ДНК и их основные (значимые на данной стадии выделения) компоненты. NB! Не все растворы содержат один из перечисленных в таблице компонентов.

	Ацетат калия	Гидроксид натрия	Этиловый спирт
SB			
LB		входит	
NB	входит		
WB1			входит
WB2			входит

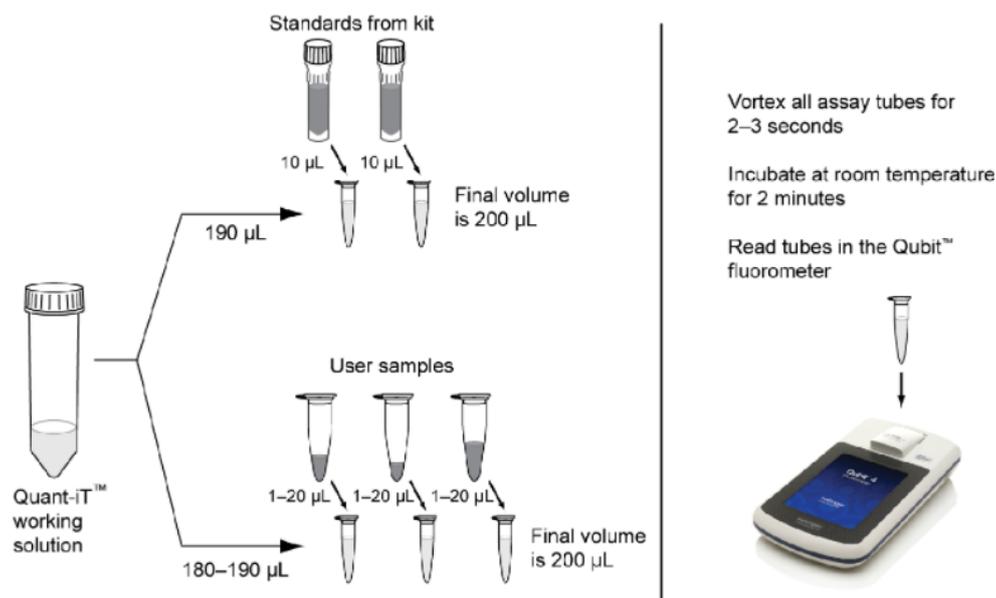
## Определение концентрации ДНК

### Оборудование

- Спектрофлуориметр Qubit
- Реактивы для определения концентрации ДНК
- Автоматические дозаторы и наконечники к ним (до 200 мкл, до 10 мкл)
- Тонкостенные пробирки 0,6 мл
- Вortex-встряхиватель для пробирок

Спектрофлуориметр Qubit позволяет специфически определить концентрацию двуцепочечной ДНК в растворе, содержащем РНК, в интервале от 10 пг/мкл до 100 нг/мкл. Реагент совместим с растворами солей, свободных нуклеотидов, детергентов, белков и органическими растворителями.

Прибор откалиброван, для анализа следует использовать сохраненную ранее калибровку.



## Протокол

1. В пробирке объемом 0.6 мл приготовить разведение в 10 раз образца ДНК, выделенного на колонке
2. В тонкостенную пробирку объемом 0.6 мл внесено 199 мкл рабочего раствора (РР) Quant-iT (хранится в темноте, в холодильнике)
3. Добавить 1 мкл полученного раствора ДНК (указать в настройках прибора), перемешать пипетированием.
4. Встряхнуть пробирки на вортексе. Сбросить раствор на дно пробирки на центрифуге
5. Инкубировать в течение 2 минут.
6. Измерить концентрацию на Qubit. Если концентрация недостаточна, добавить еще 1 мкл раствора ДНК. Указать, какой объем раствора ДНК добавлен в тонкостенную пробирку для измерения.

## Внимание

**Не следует подписывать пробирки сбоку!**

## Расчеты

Разведение образцов ДНК, выделенных на колонке

Определение концентрации ДНК, элюированной с колонок

## Результаты

	Порядковый номер на пробирке	Разведение образца, элюированного с колонки	Объем образца, добавленный в пробирку с реагентом	Показания прибора (в т. ч. указать единицы измерения)	Концентрация ДНК, элюированной с колонки, нг/мкл
1					
2					
3					

## Вопросы

Почему из трех образцов были выделены различные количества ДНК?

Три образца содержали разное количество клеток и ДНК

## *Анализ однонуклеотидной замены методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентным зондом*

### Оборудование и реактивы

- Праймеры, мастер-микс, проба, вода
- Стрипы для ПЦР (8 лунок)
- Ранее полученный раствор ДНК, элюированный с колонки
- Автоматические дозаторы, наконечники для дозаторов

### Протокол

1. Приготовить разведение препаратов ДНК, полученных элюцией с колонки в 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> раз (для раствора с концентрацией 100 нг/мкл).
2. Приготовить реакционную смесь для ПЦР в реальном времени, добавить по 2 мкл матрицы, разбавленной в указанное число раз
3. Записать в схеме планшета название команды в одном из столбцов, подписать стрип со стороны, обозначенной буквой (А–Н).
4. Внести образцы и реакционную смесь с праймерами по схеме

праймер С образец 1	праймер С образец 2	праймер С образец 3	праймер С NTC
праймер Т образец 1	праймер Т образец 2	праймер Т образец 3	праймер Т NTC

NTC — no template control — контрольный образец, не содержащий матрицы

### Приготовление реакционной смеси

Компонент	Конечная кон- центрация	Начальная кон- центрация	Добавить
Аллель С			
2X мастер-микс			10 мкл
Праймер EGFP_f_C	0,4 мкМ	4 мкМ	2 мкл
Праймер EGFP_r	0,4 мкМ	4 мкМ	2 мкл
Проба EGFP_pr	0,2 мкМ	4 мкМ	1 мкл
Образец ДНК, разведенный в 106–107 раз			2 мкл
Вода до 20 мкл			3 мкл
Аллель Т			
2X мастер-микс			10 мкл
Праймер EGFP_f_T	0,4 мкМ	4 мкМ	2 мкл
Праймер EGFP_r	0,4 мкМ	4 мкМ	2 мкл
Проба EGFP_pr	0,2 мкМ	4 мкМ	1 мкл
Образец ДНК, разведенный в 106–107 раз			2 мкл
Вода до 20 мкл			3 мкл

Образцы будут термоциклироваться в амплификаторе Bio-Rad CFX по программе

1. Денатурация — 15 минут, 95 С
2. Амплификация — 40 циклов
  - Денатурация 95 С, 10 сек
  - Отжиг 60 С, 20 сек (регистрация данных по каналу ROX)
  - Элонгация 72 С, 20 се

Внесите полученные значения  $C_q$  в таблицу

праймер С				праймер Т			
образец 1	образец 2	образец 3	NTC	образец 1	образец 2	образец 3	праймер С

**Вопрос 1.** Используя данные предыдущих экспериментов, определите генотип дикого типа

10 <sup>-4</sup>	Мутантный образец				10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	
	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$f_C$	23.69	26.21	26.42	26.87	14.02	15.08	20.02	22.01	5.14	17.23	21.15	26.02
$f_C$	7.01	17.2	21.88			21.12	27.36	32.76	6.22	17.95	21	24.39

Генотип дикого типа: гомозигота по аллелю С

Генотип мутантного образца: гомозигота по аллелю Т

**Вопрос 2.** Определите наличие мутации в проанализированных вами образцах

