

# Второй отборочный этап

## Первый этап

Дорогие участники второго тура профиля «Геномное редактирование» Олимпиады Кружкового движения НТИ!

**Расписание** Задания первого этапа открываются 16 ноября 2020. Эти задачи — индивидуальные и близки к заданиям прошлых лет. Первый этап необходим для того, чтобы проверить вашу готовность к решению более сложных задач, близких к финальной.

Предлагаем познакомиться с двумя компетенциями:

- работа в молекулярно-биологической лаборатории (расчеты реакционных смесей), теоретические задания, связанные с молекулярно-биологическими процессами — «Мокрая» биология
- инструменты биоинформатического анализа («сухая» биология) — работа в Unipro UGENE и базах данных

Задания второго тура будут открываться в четыре этапа. За решение каждого блока задач можно будет набрать разное количество баллов, в сумме можно будет набрать 100 баллов. В каждом этапе будет предложено несколько задач разной сложности. На решение каждой задачи первого этапа у вас есть две попытки.

Первый блок: 16 ноября — 6 декабря — 10 баллов  
Второй блок: 1—14 декабря — 20 баллов  
Третий блок: 15—28 декабря — 30 баллов  
Четвертый блок: 29 декабря 2020 — 6 января 2020 — 40 баллов

Вопросы вы можете задать в группе [https://vk.com/onti\\_genome](https://vk.com/onti_genome)

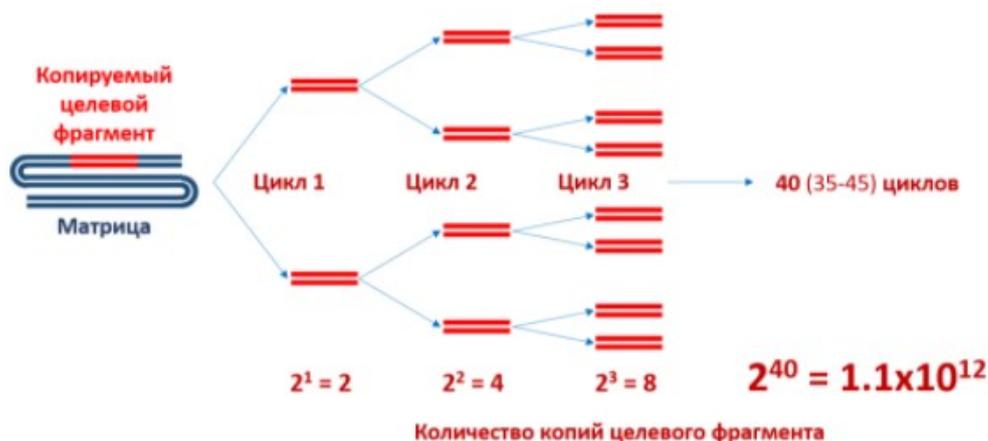
Если вы в первый раз принимаете участие в профиле "Геномное редактирование" рекомендуем познакомиться со сборниками заданий прошлых лет <https://vk.com/docs-173786512>

### «Мокрая» биология.

#### Задачи 8-9 класса

##### *Задача П.1.1.1. Полимеразная цепная реакция (1 балл)*

Полимеразная цепная реакция — один из самых востребованных методов молекулярной биологии. Данный метод позволяет в течение часа получить миллиарды копий исходной молекулы ДНК.



Задача. Сколько молекул ДНК образуется в пробирке с реакционной смесью на 10 цикле ПЦР, если известно, что в реакционную смесь добавили 100 копий матрицы ДНК.

#### Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>.

#### Решение

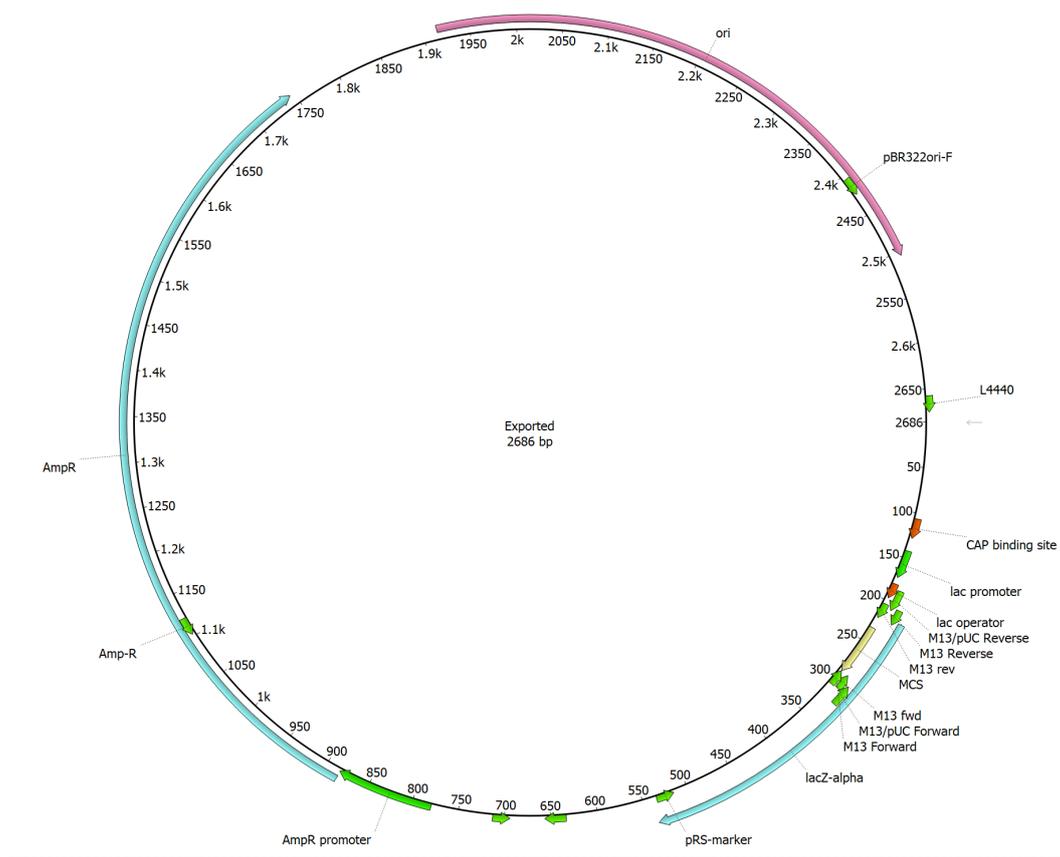
Следует возвести 2 в 10 степень и умножить на 100.

Ответ: 102400; 100000.

#### Задача II.1.1.2. Приготовление реакционной смеси (1 балл)

Концентрацию компонентов в растворе обозначают различными способами. Широко используют количественные характеристики, например, г/л, моль/л (М), % и другие [1].

Согласно протоколу в реакционную смесь для рестрикции необходимо добавить 200 нг плазмиды pUC19 (длина 2686 пар нуклеотидов). В лаборатории имеется раствор с концентрацией pUC19 50 нг/мкл.



**Задача.** Какой объем раствора pUC19 необходимо добавить в пробирку с реакционной смесью?

Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

#### Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии о концентрации смеси ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\\_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8)).
2. Информация о плазмиде pUC19 на сайтах Addgene.org (<https://www.addgene.org/50005/>) и GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/6691170>).

#### Решение

Необходимо массу разделить на концентрацию.

Ответ: 4.

#### Задача II.1.1.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле (1 балл)

Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле [1].

**Задача.** Выберите правильные утверждения

1. Под действием электрического поля молекулы ДНК двигаются от отрицательно заряженного анода к положительно заряженному катоду.
2. Электрофорез ДНК проводят в водном растворе хлорида натрия.
3. Для визуализации ДНК после агарозного геля используют интеркалирующий краситель бромистый этидий.
4. Во время электрофореза более короткие молекулы ДНК двигаются в агарозном геле быстрее.
5. Для электрофореза плазмидной ДНК обычно используют 0,1-0,2% агарозный гель.
6. Под действием электрического поля молекулы ДНК двигаются от положительно заряженного катода к отрицательно заряженному аноду.
7. Для визуализации ДНК после агарозного геля используют интеркалирующий краситель бромфеноловый синий.
8. Электрофорез ДНК проводят в водном растворе гидроксида натрия.
9. Под действием электрического поля молекулы ДНК диссоциируют на одноцепочечные молекулы.
10. Во время электрофореза более длинные (и, соответственно, несущие больший заряд) молекулы ДНК двигаются в агарозном геле быстрее.

#### Рекомендованные ссылки

1. Статья "Электрофорез ДНК" в википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7\\_%D0%94%D0%9D%D0%9A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7_%D0%94%D0%9D%D0%9A))

Ответ: 1; 3; 4.

#### *Задача II.1.1.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле (2 балла)*

Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле [1]. В качестве электролита для агарозного электрофореза используют 1X Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) [2].

Известно, что для приготовления 50X ТАЕ необходимо взять следующие компоненты:

- Трис (основание) — 24,22 г.
- ЭДТА (динатриевая соль) — 1,862 г.
- Уксусная кислота (ледяная) — 8,96 мл.
- H<sub>2</sub>O (деионизированная) — до 100 мл.

**Задача.** Вычислите концентрацию Трис в 1X растворе ТАЕ. Ответ приведите в мМ, округлите до ближайшего целого числа.

#### Рекомендуемые ссылки

1. Статья "Электрофорез ДНК" в Википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7\\_%D0%94%D0%9D%D0%9A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7_%D0%94%D0%9D%D0%9A)).
2. Статья "Трис-ацетатный буфер" в Википедии (<https://ru.wikipedia.org/wiki>)

/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D1%81-%D0%B0%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B9\_%D0%B1%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80).

### *Решение*

Необходимо вычислить концентрацию Трис в 50X ТАЕ и разделить на 50.

**Ответ:** 40.

## «Мокрая» биология. Задачи 10-11 класса

### *Задача II.1.2.1. Репликация ДНК (1 балл)*

Репликация ДНК — процесс синтеза дочерней молекулы на матрице ДНК. У всех живых организмов процесс репликации ДНК обеспечивает точную передачу генетической информации из клетки и в клетку и из поколения в поколение. Репликация обычно происходит перед делением клетки.

**Задача.** Выберите правильные суждения о принципах репликации ДНК, особенностях ДНК-полимеразы и процессе синтеза ДНК.

1. ДНК-полимераза движется по матрице одноцепочечной ДНК в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .
2. ДНК-полимераза синтезирует новую цепочку ДНК в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .
3. В клетках эукариот фермент праймаза синтезирует РНК-затравку, которую затем достраивает ДНК-полимераза.
4. ДНК-полимераза синтезирует новую цепочку ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .
5. ДНК-полимераза может удлинять существующие нуклеотидные последовательности только с  $5'$ -конца.
6. У прокариот в результате репликации происходит укорочение кольцевой ДНК.
7. ДНК-полимераза движется по матрице одноцепочечной ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .
8. Синтез ДНК по отстающей цепи происходит фрагментами Оказаки.
9. Молекулы ДНК после репликации содержат одну цепочку материнской и одну цепочку дочерней ДНК.
10. У эукариот в результате репликации происходит укорочение концов хромосом.

### **Рекомендуемые ссылки**

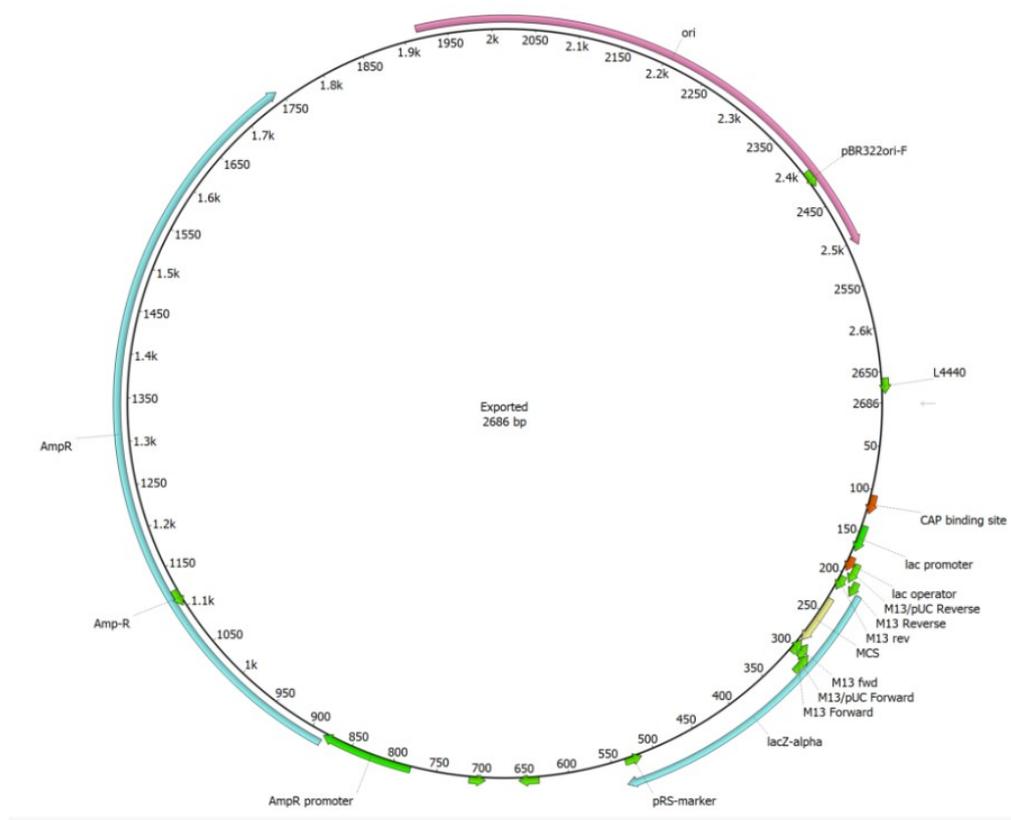
1. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) (<https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>).
2. Курс молекулярной биологии (МГУ, Асеев) (<https://www.youtube.com/watch?v=5k-WuhdJJCo&list=PLcsjsqLLSfNBSQRWQXz0Pgf11LkFz8GKx>).

**Ответ:** 1; 3; 4; 8; 9; 10.

### Задача П.1.2.2. Приготовление реакционной смеси (1 балл)

Концентрацию компонентов в растворе обозначают различными способами. Широко используют количественные характеристики, например, г/л, моль/л (М), % и другие [1].

Согласно протоколу в реакционную смесь для рестрикции необходимо добавить 2 мкг плазмиды pUC19 (длина 2686 пар нуклеотидов). В лаборатории имеется раствор с концентрацией pUC19 200 нг/мкл.



**Задача.** Какой объем исходного раствора pUC19 необходимо добавить к 30 мкл раствора, содержащего рестриктазу и буферные компоненты, для того, чтобы реакционная смесь содержала заданное количество плазмидной ДНК? Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

#### Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии о концентрации смеси ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\\_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8)).
2. Информация о плазмиде pUC19 на сайтах Addgene.org (<https://www.addgene.org/50005/>) и GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/6691170>).

#### Решение

2 мкг плазмиды содержится в 10 мкл раствора с концентрацией 200 нг/мкл.

**Ответ:** 10.

### Задача II.1.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле (2 балла)

Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле.

**Задача.** Заполните пропуски (в качестве десятичного разделителя используйте запятую, целые числа запишите без десятичного знака).

#### Заполните пропуски

Для проведения гель-электрофореза ДНК в агарозном геле нужно приготовить 200 мл буферного раствора ТАЕ. В лаборатории имеется в наличии стоковый (исходный) раствор 50x ТАЕ. В колбу для приготовления рабочего раствора необходимо добавить \_\_\_\_\_<sup>1</sup> мл 50x раствора ТАЕ и затем добавить дистиллированную воду до отметки 200 мл. Заливочный столик, который имеется в лаборатории, рассчитан на гель объемом 200 мл. Для приготовления 1,5% агарозного геля в колбу следует внести \_\_\_\_\_<sup>2</sup> г порошка агарозы. Тщательно перемешать содержимое колбы и дважды довести до кипения в микроволновой печи. Охладить полученный гель под струей проточной воды при перемешивании. Для визуализации двуцепочечной ДНК перед заливкой геля в колбу следует добавить \_\_\_\_\_<sup>3</sup> мкл раствора интеркалирующего красителя EtBr с концентрацией 10 мг/мл для достижения конечной концентрации в геле — 0,5 мкг/мл.

#### Рекомендованные ссылки

1. Статья "Электрофорез ДНК" в википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7\\_%D0%94%D0%9D%D0%9A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7_%D0%94%D0%9D%D0%9A))

**Ответ:** 1 — 4; 2 — 3; 3 — 10.

### Задача II.1.2.4. Полимеразная цепная реакция (2 балла)

Какие компоненты содержит реакционная смесь, используемая для отрицательного контроля при ПЦР?

1. Матрица ДНК.
2. Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dCTP, dTTP, dGTP).
3. Обратный праймер.
4. АТФ.
5. Хлориды калия и магния.
6. ДНК-полимераза.
7. Буферный раствор.
8. Прямой праймер.
9. Дистиллированная вода.

#### Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula>.

[ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia](http://ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia).

Ответ: 2; 3; 5; 6; 7; 8; 9.

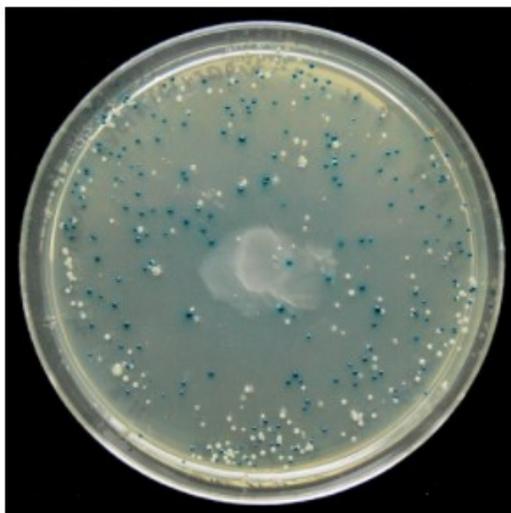
## Биоинформатика («сухая» биология). Задачи 8-9 класса

### *Задача П.1.3.1. Определение числа фрагментов ДНК после рестрикции (1 балл)*

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК, искать сайты рестрикции вручную, крайне затруднительно. Специально для таких работ разработаны онлайн-сервисы и программы для ПК, например, бесплатная Unipro UGENE [1].

Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции — ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы позволяют "вырезать" гены [5] из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе UGENE.

Плазмиды pBlueScript позволяют проводить бело-синнюю селекцию [3] клонов после встройки.



В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой PvuII получено несколько фрагментов.

Используя программу UGENE [1], карту плазмиды pBluescript [2], проведите анализ фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции.

**Задача.** Определите число фрагментов плазмиды pBluescript, образовавшихся после рестрикции PvuII.

### Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE(ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UVUUM31/Restriction+Analysis>.
2. Последовательность pBlueScript — <https://yadi.sk/d/1e08no3g5L7xHg>.
3. Статья "Бело-синяя селекция" в Википедии — [https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white\\_screen](https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white_screen).

### Решение

Используя инструмент UGENE, определить число сайтов рестрикции и длину фрагментов ДНК между ними.

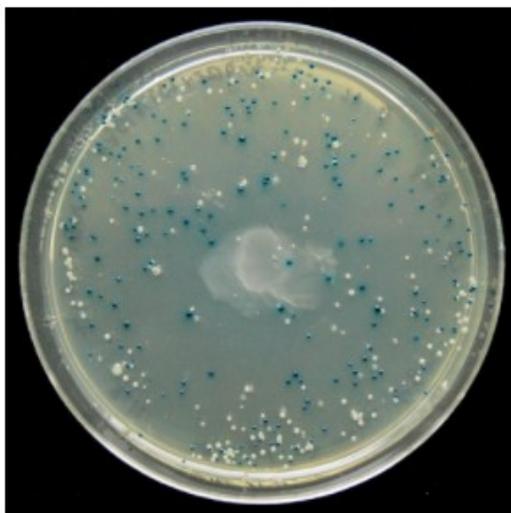
Ответ: 2.

### Задача II.1.3.2. Определение массы фрагмента ДНК (1 балл)

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК, искать сайты рестрикции вручную, крайне затруднительно. Специально для таких работ разработаны онлайн-сервисы и программы для ПК, например, бесплатная Unipro UGENE [1].

Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции — ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы позволяют "вырезать" гены [5] из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе UGENE.

Плазмиды pBlueScript позволяют проводить бело-синюю селекцию [3] клонов после встройки.



В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой PvuII получено несколько фрагментов.

Используя программу UGENE [1], карту плазмиды pBluescript [2], проведите анализ длины фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции.

**Задача.** Определите длину самого проятженного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции PvuII. Ответ введите в виде числа.

#### Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE(ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Последовательность pBlueScript — <https://yadi.sk/d/1e08no3g5L7xHg>.
3. Статья "Бело-синяя селекция" в Википедии — [https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white\\_screen](https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white_screen).

#### Решение

Используя инструмент UGENE, определить число сайтов рестрикции и длину фрагментов ДНК между ними.

**Ответ:** 2513.

### *Задача II.1.3.3. Определение массы фрагмента ДНК (2 балла)*

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК, искать сайты рестрикции вручную, крайне затруднительно. Специально для таких работ разработаны онлайн-сервисы и программы для ПК, например, бесплатная Unipro UGENE [1].

Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции — ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы позволяют "вырезать" гены [5] из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе UGENE.

Плазмиды pBlueScript позволяют проводить бело-синюю селекцию [3] клонов после встройки.



В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой PvuII получено несколько фрагментов.

Используя программу UGENE [1], карту плазмиды pBluescript [2], проведите анализ длины фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции.

**Задача.** Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции PvuII, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2020 нг. Ответ округлите до целого числа.

#### Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE(ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Последовательность pBlueScript — <https://yadi.sk/d/le08no3g5L7xHg>.
3. Статья "Бело-синяя селекция" в Википедии — [https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white\\_screen](https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white_screen).

#### Решение

Используя инструмент UGENE, определить число сайтов рестрикции, длину фрагментов ДНК между ними, массу фрагментов.

**Ответ:**  $1714 \pm 1$ .

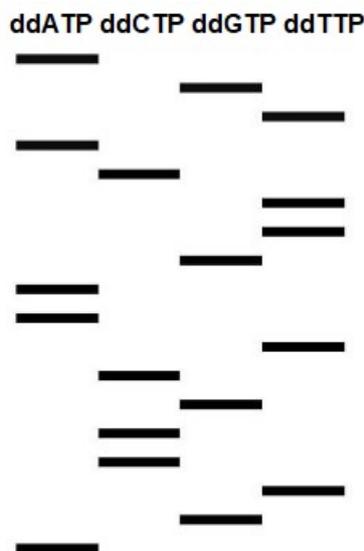
#### Задача II.1.3.4. Секвенирование по Сэнгеру (1 балл)

Севенирование позволяет «побуквенно» прочитать нуклеотидную последовательность ДНК. Наиболее распространенный метод секвенирования, который используется в рутинной лабораторной практике, был изобретен Фредериком Сэнгером [1, 2, 3]. Данный метод также называется методом терминирующих оснований.

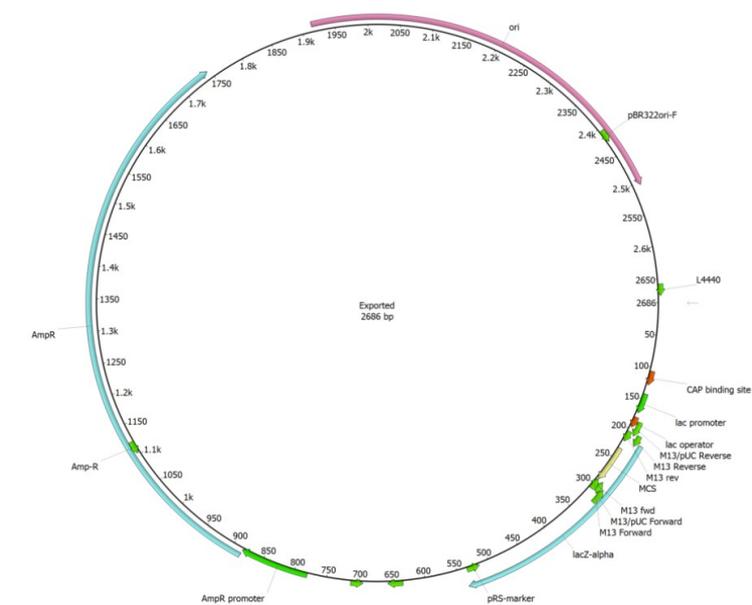
Ключевым моментом является использование дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTPs), которые не имеют 3'-ОН группы для образования связи со следующей фосфатной группой. Поэтому в результате включения подобного дигидроксинуклеотида синтез комплементарной цепи ДНК терминируется. При проведении анализа

для каждого образца ДНК готовится 4 реакционных смеси, которые содержат смесь четырех dNTP, ДНК-полимеразу и один из терминирующих ddNTP.

Результаты реакции визуализируют с помощью гель-электрофореза и по набору полос восстанавливают исходную последовательность.



интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК, искать сайты рестрикции вручную, крайне затруднительно. Специально для таких работ разработаны онлайн-сервисы и программы для ПК, например, бесплатная Unipro UGENE [1].



Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции — ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы позволяют "вырезать" гены [5] из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе UGENE.

Плазмида pUC19 (см. рис) была разработана в 1983 году в Университете Калифорнии [2]. Плазмида содержит N-конец гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* в котором находятся сайты узнавания нескольких эндонуклеаз рестрикции (MCS).

Рестриктаза *Hae*III выделена из микроорганизма *Haemophilus aegyptius* в 1970 году [6]. *Hae*III узнает палиндромную последовательность GGCC и разрезает ее между нуклеотидами G и C с образованием тупых концов.

Задача. Используя программу UGENE [1], последовательность нуклеотидов плазмиды pUC19 [3, 4], определите число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе данной плазмиды эндонуклеазой рестрикции *Hae*III. Введите число фрагментов в поле "ответ".

### Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE(ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UVUUM31/Restriction+Analysis>.
2. Norrander J., Kempe T., Messing J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. // Gene. — 1983. — 26. — P. 101–106. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6323249/>).
3. Информация о плазмиде pUC19 на сайте Addgene — <https://www.addgene.org/50005/>.

4. Информация о плазмиде pUC19 на сайте genbank — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/6691170>.
5. Статья о рестриктазах в Википедии — Эндонуклеазы рестрикции ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B\\_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8)).
6. Статья о рестриктазе HaeIII в Википедии — <https://en.wikipedia.org/wiki/HaeIII>.
7. Методы генетической инженерии <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>.

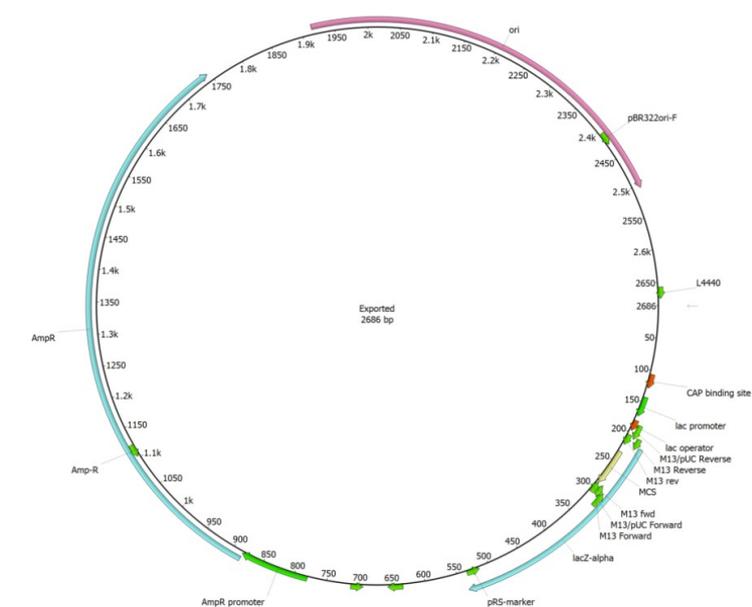
### Решение

Определить количество сайтов, используя инструмент UGENE.

Ответ: 11.

### Задача П.1.4.2. Рестриктазы (1 балл)

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК, искать сайты рестрикции вручную, крайне затруднительно. Специально для таких работ разработаны онлайн-сервисы и программы для ПК, например, бесплатная Unipro UGENE [1].



Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции — ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы [5] позволяют "вырезать" гены из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные.

Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе UGENE.

Плазмида pUC19 (см. рис) была разработана в 1983 году в Университете Калифорнии [2]. Плазмида содержит N-конец гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* в котором находятся сайты узнавания нескольких эндонуклеаз рестрикции (MCS).

Рестриктаза HaeIII выделена из микроорганизма *Haemophilus aegyptius* в 1970 году [6]. HaeIII узнает палиндромную последовательность GGCC и разрезает ее между нуклеотидами G и C с образованием тупых концов.

Задача. Используя программу UGENE [1], последовательность нуклеотидов плазмиды pUC19 [3, 4], определите длину наиболее протяженного фрагмента ДНК который образуется при исчерпывающем (полном) гидролизе pUC19 эндонуклеазой рестрикции HaeIII. Введите числовое значение длины фрагмента в поле "ответ".

### Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE(ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Norrander J., Kempe T., Messing J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. // Gene. — 1983. — 26. — P. 101–106. (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6323249/>).
3. Информация о плазмиде pUC19 на сайте Addgene — <https://www.addgene.org/50005/>.
4. Информация о плазмиде pUC19 на сайте genbank — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/6691170>.
5. Статья о рестриктазах в Википедии — Эндонуклеазы рестрикции ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B\\_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8)).
6. Статья о рестриктазе HaeIII в Википедии — <https://en.wikipedia.org/wiki/HaeIII>.
7. Методы генетической инженерии <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>.

### Решение

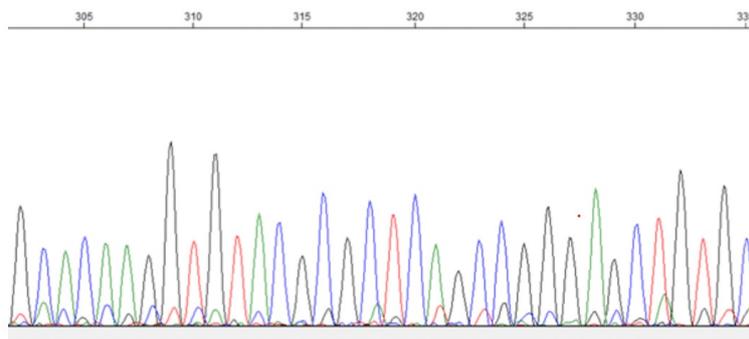
Определить количество сайтов, используя инструмент UGENE, определить длину наиболее длинного фрагмента.

**Ответ:** 587.

### Задача II.1.4.3. Анализ секвенограмм (1 балл)

Современный вариант исполнения метода Сэнгера [1, 2] предполагает использование автоматических капиллярных ДНК-анализаторов, которые определяют наличие флуоресцентно-меченых мономеров-терминаторов в составе продуктов реакции. Затем с помощью программного обеспечения прибора устанавливают соответствия

между длиной продуктов и положением конкретного нуклеотида. В итоге получается «секвенограмма», аналогичная представленной на рисунке.



Разные цвета обозначают положения различных нуклеотидов (четыре цвета — четыре нуклеотида):

- Зеленая линия — положения А.
- Красная линия — положения Т.
- Черная линия — положения G.
- Синяя линия — положения С.

Установите последовательность и с помощью сервиса Blast [3] определите, какому гену она принадлежит. Ответ должен содержать краткое обозначение гена в виде трех латинских букв и одной цифры без пробела, без дефиса или других знаков препинания (формат XYZ9).

#### Рекомендуемая литература

1. Биомолекула: 12 методов в картинках — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovykh-kislot>.
2. Видеолекция о методе Сэнгера — <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>.
3. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> выбрать NucleotideBLAST.

#### Решение

Определить последовательность нуклеотидов согласно цветам пиков на секвенограмме.

**Ответ:** IRF7.

#### Задача II.1.4.4. Анализ секвенограмм (1 балл)

Современный вариант исполнения метода Сэнгера [1, 3] предполагает использование автоматических капиллярных ДНК-анализаторов, которые определяют наличие флуоресцентно-меченых мономеров-терминаторов в составе продуктов реакции. Затем с помощью программного обеспечения прибора устанавливают соответствия между длиной продуктов и положением конкретного нуклеотида.

Откройте файл секвенограммы (.ab1) [2] в UGENE и с помощью сервиса Blast [4] определите, какому гену она принадлежит. Ответ введите в виде сокращения (три

латинских буквы и одной цифры без пробела), или текстом на английском языке.

### Рекомендуемая литература

1. Биомолекула: 12 методов в картинках — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinykh-kislot>.
2. Видеолекция о методе Сэнгера — <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>.
3. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> выбрать NucleotideBLAST.

### Заполните пропуски

Откройте файл сенограммы (.ab1) в UGENE и с помощью сервиса Blast [4] определите, какому гену она принадлежит. Ответ введите в виде сокращения (три латинских буквы и одной цифры без пробела), или текстом на английском языке. Вводить название вида не нужно. \_\_\_\_\_<sup>1</sup>

### Решение

Определить последовательность нуклеотидов используя инструмент UGENE.

**Ответ:** ITS; ITS1; internal transcribed spacer; ITS2; internal transcribed spacer 1; internal transcribed spacer 2.

## Второй этап

### Задания второго этапа. Задачи 8-9 класса

#### *Задача П.2.1.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле (2 балла)*

Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле [1]. В качестве электролита для агарозного электрофореза используют 1X Трис-ацетатный буфер (ТАЕ) [2].

Известно, что для приготовления 50X ТАЕ необходимо взять следующие компоненты:

- Трис (основание) — 24,22 г.
- ЭДТА (динатриевая соль) — 1,862 г.
- Уксусная кислота (ледяная) — 8,96 мл.
- H<sub>2</sub>O (деионизированная) — до 100 мл.

Например, для приготовления 100 мл 1% агарозного геля необходимо приготовить навеску 1 г сухого порошка агарозы, прилить в колбу с агарозой 100 мл 1X ТАЕ, довести до кипения в микроволновой печи два раза, залить гель в форму.

**Задача.** Вычислите концентрацию ЭДТА в 100 мл 1X раствора ТАЕ. Ответ приведите в мМ, округлите до первого знака после запятой.

### Рекомендованные ссылки

1. Статья "Электрофорез ДНК" в Википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7\\_%D0%94%D0%9D%D0%9A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7_%D0%94%D0%9D%D0%9A)).
2. Статья "Трис-ацетатный буфер" в Википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D1%81-%D0%B0%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B9\\_%D0%B1%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A2%D1%80%D0%B8%D1%81-%D0%B0%D1%86%D0%B5%D1%82%D0%B0%D1%82%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B1%D1%83%D1%84%D0%B5%D1%80)).

### Решение

Определить молярную концентрацию 50X буфера и разделить на 50.

Ответ:  $1.1 \pm 0.2$ .

### Задача II.2.1.2. Полимеразная цепная реакция (3 балла)

Количество молекул двуцепочечной ДНК, которые образуются в результате полимеразной цепной реакции ( $N$ ), описывается формулой, в которой  $m$  — исходное число молекул матрицы ДНК, а  $n$  — количество циклов ПЦР.

$$N = m \cdot 2^n$$

**Задача.** Определите, сколько копий ДНК ( $N$ ) содержалось в пробирке к концу 28го цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 50 молекул ДНК ( $m$ ). Ответ введите в виде целого числа. При расчетах примите значение числа Авогадро равным  $6,02 \cdot 10^{23}$  шт.

#### Рекомендуемые ссылки

1. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTnrKI>.
2. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) — <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.

### Решение

Возвести 2 в степень 28 и умножить на 50.

Ответ:  $13421772800 \pm 500000000$ .

### Задача II.2.1.3. Диагностика COVID-19 (4 балла)

Для диагностики COVID-19 используют метод ОТ-ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и детекцией результатов в режиме реального времени) [1-4]. В качестве матрицы используют кДНК, полученную обратной транскрипцией.

**Задача.** Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики.

1. Выделенную геномную вирусную РНК обрабатывают ДНКазой для удаления возможных совыделяющихся примесей ДНК.

2. В качестве мишени в протоколе ВОЗ используют ген обратной транскриптазы SARS-CoV-2 (RdRp).
3. В результате ОТ-ПЦР-РВ происходит наработка миллиардов копий фрагмента вирусной РНК.
4. Количество нарабатываемых молекул ДНК пропорционально количеству копий вирусной геномной РНК SARS-CoV-2.
5. Ввиду крайне высокой чувствительности метода для детекции даже минимальных количеств вирусной геномной РНК достаточно провести 20-25 циклов амплификации.
6. Для детекции результатов ОТ-ПЦР-РВ используют гель-электрофорез.
7. Обратная транскрипция происходит после полимеразной цепной реакции.

#### Рекомендуемые ссылки

1. Инструкция ВОЗ по детекции коронавирусной ДНК методом ОТ-ПЦР-РВ — <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>.
2. Метод ПЦР на сайте Биомолекула — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>.
3. Статья в Википедии — Полимеразная цепная реакция в реальном времени ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%8F\\_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BD%D0%B0%D1%8F\\_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F\\_%D0%B2\\_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%B%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%BC\\_%D0%B2%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%B0%D0%B7%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%86%D0%B5%D0%BF%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%BA%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%B2_%D1%80%D0%B5%D0%B0%D0%B%D1%8C%D0%BD%D0%BE%D0%BC_%D0%B2%D1%80%D0%B5%D0%BC%D0%B5%D0%BD%D0%B8)).
4. Информация на сайте МАГАТЭ — <https://www.iaea.org/bulletin/infectious-diseases/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>.

Ответ: 2; 4.

### *Задача II.2.1.4. Приготовление разведений растворов (2 балла)*

Концентрацию компонентов в растворе обозначают различными способами. Широко используют количественные характеристики, например, г/л, моль/л (М), % и другие [1]. Например, при приготовлении растворов для нанесения образцов на гель, или при расчете компонентов смеси для ферментативных реакций часто используют кратные растворы (2х, 4х, 5х, 10х). Например, для приготовления 100 мл однократного раствора (1х), нужно взять 50 мл двукратного раствора (2х) и добавить 50 мл воды или другого раствора.

**Задача.** Сколько 50% раствора глицерина необходимо добавить к 40 мкл реакционной смеси для достижения 10% концентрации?

Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

#### Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии о концентрации смеси ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\\_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8)).

**Решение**

Разбавление в 5 раз: 40 мкл разделить на 4 = 10 мкл.

**Ответ:** 10.

**Задача II.2.1.5. Секвенирование по Сэнгеру (3 балла)**

Секвенирование позволяет «побуквенно» прочитать нуклеотидную последовательность ДНК. Наиболее распространенный метод секвенирования, который используется в рутинной лабораторной практике, был изобретен Фредериком Сэнгером [1, 2]. Данный метод также называется методом терминирующих оснований.

Ключевым моментом является использование дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTPs), которые не имеют 3'-ОН группы для образования связи со следующей фосфатной группой. Поэтому в результате включения подобного дигидроксинуклеотида синтез комплементарной цепи ДНК терминируется.

В результате реакции Сэнгера получена следующая последовательность нуклеотидов, содержащая фрагмент

5'-TTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA-3'

**Задача.** Используя инструмент BLAST [3], определите, какому гену человека соответствует данная последовательность.

**Рекомендуемая литература**

1. Статья Метод Сэнгера" в Википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4\\_%D0%A1%D1%8D%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D1%80%D0%B0](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4_%D0%A1%D1%8D%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D1%80%D0%B0)).
2. Биомолекула: 12 методов в картинках — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovykh-kislot>.
3. Лекция о секвенировании ДНК по Сэнгеру (к. б. н., н. с. ИХБФМ СО РАН, Артем Тикунов) — <https://youtu.be/hBicxm20n2g>.
4. Анализ последовательностей ДНК, полученных методом Сэнгера в UGENE (Ольга Голосова) — <https://youtu.be/1MLPqFIVPFM>.

Ответ введите в виде сокращения (две латинских буквы и одной цифры без пробела), или текстом на английском языке.

**Решение**

Использовать инструмент NucleotideBLAST.

**Ответ:** IL6; IL-6; interleukin 6.

**Задача II.2.1.6. База данных NCBI (3 балла)**

База данных NCBI содержит информацию о последовательностях белков, нуклеиновых кислот, научных публикациях. Проведите поиск в NCBI [1] по идентификатору, полученному в прошлой задаче.

**Задача.** Проанализировать информацию на странице гена, ответить на вопросы.

#### Рекомендуемые ссылки

1. NCBI — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Заполните пропуски Ген находится в \_\_\_\_\_<sup>1</sup> хромосоме человека и содержит \_\_\_\_\_<sup>2</sup> экзонов.

**Ответ:** 1 — 7; 2 — 6.

#### *Задача II.2.1.7. Сайты рестрикции (3 балла)*

Плазмида содержит 4000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт  $\text{HaeIII}$  распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество  $\text{A}=\text{T}=\text{Ц}=\text{Г}$ . Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза?

**Задача.** Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

#### *Решение*

Вероятность встречи 4 нуклеотидов в плазмиде длиной 4000 п. о. =  $(0,25)^4 \cdot 4000 = 15,625$ .

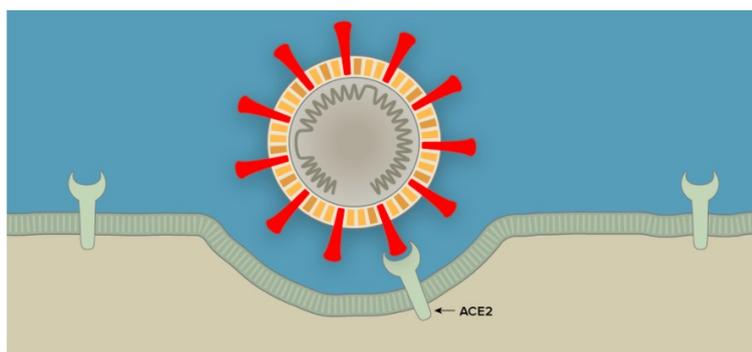
**Ответ:**  $15 \pm 1$ .

## Задания второго этапа. Задачи 10-11 класса

#### *Задача II.2.2.1. ACE2 — рецептор SARS-CoV-2 (4 балла)*

Рецептором нового коронавируса SARS-CoV-2 в организме человека является ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [1]. После заражения белок Spike на

поверхности вириона связывается с ACE2 и таким образом вирус попадает внутрь клетки.



В одной из статей для амплификации мРНК гена ACE2 использовали следующие пары праймеров:

*ace2.1f* 5'-GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA-3' ,

*ace2.1r* 5'-AGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'

и

*ace2.2f* 5'-AAACATACTGTGACCCCGCAT-3' ,

*ace2.2r* 5'-CCAAGCCTCAGCATATTGAACA-3'

Используйте последовательности в базе данных NCBI NM\_021804.3 и NP\_068576.1 [2], соответствующие мРНК и белку ACE2 и инструмент UGENE "PCR in silico для определения длины получаемых ПЦР-фрагментов.

Задача. Ввести числовой ответ в соответствующее поле (без обозначений п.о.).

#### Рекомендованные ссылки

1. Статья на Биомолекуле — <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-что-мы-знаем-i-чего-не-знаем>.
2. Информация о гене ACE2 в базе NCBI — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>.
3. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTnrKI>.
4. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) — <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.

**Заполните пропуски** В результате ПЦР с праймерами ace2.1 образуется продукт длиной \_\_\_\_\_<sup>a</sup> пар оснований, при использовании пары праймеров ace2.2 образуется продукт длиной \_\_\_\_\_<sup>b</sup> пар оснований.

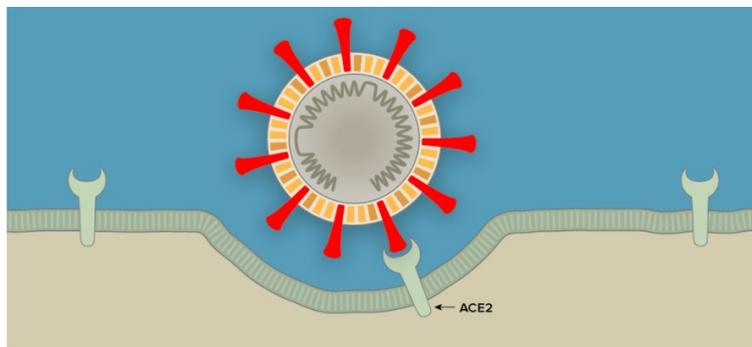
#### Решение

Определить последовательность нуклеотидов при помощи инструмента UGENE ПЦР in silico.

**Ответ:** a — 124; b — 199.

### Задача II.2.2.2. ACE2 — рецептор SARS-CoV-2 (5 баллов)

Рецептором нового коронавируса SARS-CoV-2 в организме человека является ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [1]. После заражения белок Spike на поверхности вириона связывается с ACE2 и таким образом вирус попадает внутрь клетки.



База данных NCBI содержит несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека [2].

Используя последовательности NM\_021804.3 и NP\_068576.1, найдите информацию о мРНК и белковом продукте гена ACE2.

Известно, что мРНК содержит 3'- и 5'- нетранслируемые области (НТО) [3].

ORIGIN

```

1  ggcaactcata  catacaactct  ggcaatgagg  acactgagct  cgcttctgaa  atttgacaag
61  ataaccacta  aaatctcttt  gaattctatg  ttgttgtgat  cccatggcta  cacaggatca
121  ggagttgaca  tagataactct  ttggatttca  taccatgttg  aggctttctt  acttccacgt
181  gaccttgact  gagttttgaa  tagcgcccaa  cccaagtcca  aaggctgata  agagagaaaa
241  tctcatgagg  aggttttagt  ctagggaag  tcattcagtg  gatgtgatct  tggctcacag
301  gggacgatgt  caagctcttc  ctggctcctt  ctcagccttg  ttgctgtaac  tgctgctcag
361  tccaccattg  aggaacaggc  caagacattt  ttggacaagt  ttaaccacga  agccgaagac
421  ctgttctatc  aaagttcact  tgcttcttgg  aattataaca  ccaatattac  tgaagagaat
481  gtccaaaaca  tgaataatgc  tggggacaaa  tggtctgcct  ttttaaagga  acagtccaca
541  cttgcccaaa  tgtatccact  acaagaaatt  cagaatctca  cagtcaagct  tcagctgcag
601  gctcttcagc  aaaatgggtc  ttcagtgctc  tcagaagaca  agagcaaacg  gttgaacaca
661  attctaaata  caatgagcac  catctacagt  actggaaaag  tttgtaacc  agataatcca
721  caagaatgct  tattacttga  accaggtttg  aatgaaataa  tggcaaacag  tttagactac
781  aatgagaggc  tctgggcttg  ggaaagctgg  agatctgagg  tcggcaagca  gctgaggcca
841  ttatatgaag  agtatgtggt  cttgaaaaat  gagatggcaa  gagcaaatca  ttatgaggac
901  tatggggatt  attggagagg  agactatgaa  gtaaattggg  tagatggcta  tgactacagc
961  cgccggccagt  tgattgaaga  tgtggaacat  acctttgaag  agattaaacc  attatgaa
1021  catctcatg  cctatgtgag  ggcaaagtgg  atgaatgcct  atccttcta  tatcagtcca
1081  attggatgcc  tcctgctca  tttgcttgg  gatatgtggg  gtagattttg  gacaaatctg
1141  tactctttga  cagttccctt  tggacagaaa  ccaaacatag  atgttactga  tgcaatggtg
1201  gaccaggcct  gggatgcaca  gagaatattc  aaggaggccg  agaagttctt  tgtatctggt
1261  ggtcttcta  atatgactca  aggattctgg  gaaaattcca  tgctaacgga  cccaggaaat
1321  gttcagaaag  cagtctgcc  tcccacagct  tgggacctgg  ggaagggcga  cttcaggatc
1381  cttatgtgca  caaaggtgac  aatggacgac  ttcctgacag  ctcatcatga  gatggggcat
1441  atccagtatg  atatggcata  tgctgcacaa  ccttttctgc  taagaaatgg  agctaattgaa
1501  ggattccatg  aagctgttgg  ggaatcatg  tcactttctg  cagccacacc  taagcattta
1561  aaatccattg  gtcttctgtc  acccgatttt  caagaagaca  atgaaacaga  aataaacttc

```

**Задача.** Ввести числовой ответ в соответствующее поле (без обозначений п.о.), выбрать правильные суждения.

Ген ACE2 содержит \_\_\_\_\_<sup>a</sup> экзон(ов). В мРНК гена ACE2 человека \_\_\_\_\_<sup>b</sup>

- первый;

- второй;
- третий;
- четвертый;
- пятый;
- шестой;
- седьмой;
- восьмой;
- девятый;
- десятый.

кодон АТГ является стартовым. Ген ACE2 находится в \_\_\_\_\_<sup>c</sup>

- коротком;
- длинном.

плече \_\_\_\_\_<sup>d</sup>

- первой;
- второй;
- третьей;
- двадцать первой;
- двадцать второй;
- половой (X).

хромосомы.

#### Рекомендованные ссылки

1. Статья на Биомолекуле — <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-что-мы-знаем-i-чего-ne-znaem>.
2. Информация о гене ACE2 в базе NCBI — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>.
3. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTnrKI>.
4. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) — <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.

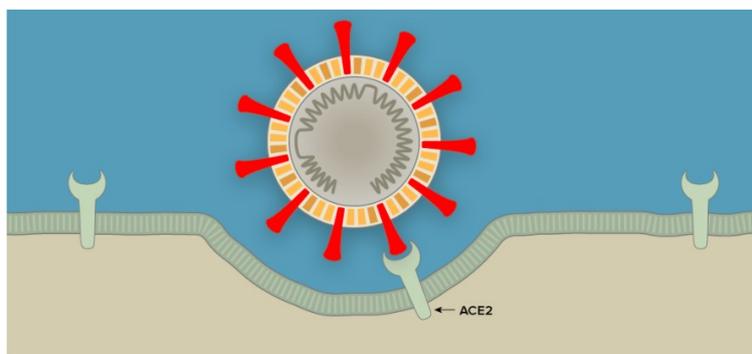
#### Решение

Использовать материалы, представленные на странице <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>

**Ответ:** а — 21; b — седьмой; c — коротком; d — половой (X).

#### Задача II.2.2.3. ACE2 — рецептор SARS-CoV-2 (5 баллов)

Рецептором нового коронавируса SARS-CoV-2 в организме человека является ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) [1]. После заражения белок Spike на поверхности вириона связывается с ACE2 и таким образом вирус попадает внутрь клетки.



Базы данных NCBI и UniProt содержат несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека [2, 3]. Используя последовательности NP\_068576.1 и Q9BYF1, найдите информацию о ферменте ACE2.

Известно, что данный белок содержит внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены.

**Задача.** Ввести числовой ответ в соответствующее поле (без обозначений п.о.).  
Коронавирус SARS-CoV-2 связывается с \_\_\_\_\_<sup>a</sup>

1. внеклеточным;
2. трансмембранным;
3. внутриклеточным.

доменом ACE2. В белке ACE2 наиболее представлены остатки аминокислоты \_\_\_\_\_<sup>b</sup>,  
в трансмембранном домене наиболее представлены остатки аминокислот \_\_\_\_\_<sup>c</sup>

1. валин и изолейцин;
2. изолейцин и валин;
3. лейцин и валин;
4. лейцин и глутамат;
5. глутамат и лейцин;
6. лейцин и глутаминовая кислота;
7. лейцин и глутамин.

Ангиотензинпревращающий фермент 2 относят к классу \_\_\_\_\_<sup>d</sup>

#### Рекомендованные ссылки

1. Статья на Биомолекуле — <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-что-мы-знаем-i-чего-ne-znaem>.
2. Информация о гене ACE2 в базе NCBI — <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>.
3. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTNRKI>.
4. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) — <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.

#### Решение

Использовать материалы, представленные на страницах <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272> и <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>

**Ответ:** a — 1; b — лейцин; c — 1 и 2; d -гидролазы.

### **Задача II.2.2.4. ACE2 — рецептор SARS-CoV-2 ( баллов)**

Для амплификации фрагмента гена ACE2 длиной 200 пар оснований использовали образец ДНК, выделенный из буккального эпителия пациента с COVID-19.

Объем реакционной смеси — 30 мкл, проведено 30 циклов ПЦР, получено 70 нг ПЦР-продукта.

Известно, что длина генома человека 3,2 млрд пар оснований, масса пары оснований — 660 г/моль.

**Задача.** Рассчитать, сколько молекул матрицы ДНК было добавлено в реакционную смесь. При расчетах считайте, что неспецифические продукты ПЦР не образуются. Ответ введите в виде числа (без "шт." или других обозначений). При расчетах примите значение числа Авогадро равным  $6,02 \cdot 10^{23}$  шт.

#### **Рекомендованные ссылки**

1. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTnrKI>.

#### **Решение**

Использовать формулу  $N = m \cdot 2^n$ , где N-число молекул, образующихся в результате ПЦР, m-количество молекул матрицы, добавленных в реакционную смесь, n-число циклов ПЦР.

**Ответ:**  $298 \pm 5$ .

### **Задача II.2.2.5. Сайты рестрикции (1 балл)**

Плазмида pBluescript содержит 2961 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество A=T=C=G. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Отличается ли число теоретических сайтов от реально существующих в плазмиде? Почему?

**Задача.** Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

#### **Решение**

Теоретическое число сайтов можно вычислить, исходя из того, что вероятность встречи одного нуклеотида 0,25, соответственно,  $0,25^4 \cdot 2961 = 11.56$ .

Ответ:  $11 \pm 1$ .

## Третий этап

### Задания третьего этапа. Задачи 8-9 класса

#### *Задача II.3.1.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле (5 баллов)*

Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле [1].

**Задача.** Выберите правильные утверждения

1. Под действием электрического поля отрицательно заряженные молекулы ДНК двигаются от положительного электрода к отрицательному.
2. Для электрофореза плазмидной ДНК обычно используют 0,8-1,5% агарозный гель.
3. Агарозный гель готовят на водопроводной воде.
4. Во время электрофореза более короткие молекулы ДНК двигаются в агарозном геле быстрее.
5. Для визуализации ДНК после агарозного геля используют интеркалирующий краситель бромистый этидий.
6. Электрофорез ДНК проводят в водном растворе гидроксида натрия.
7. Для визуализации ДНК используют источник ультрафиолетового излучения.
8. Для определения молекулярной массы (длины) фрагмента ДНК используют маркеры, содержащие фрагменты известной длины.

**Рекомендованные ссылки**

1. Статья "Электрофорез ДНК" в википедии ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7\\_%D0%94%D0%9D%D0%9A](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D1%82%D1%80%D0%BE%D1%84%D0%BE%D1%80%D0%B5%D0%B7_%D0%94%D0%9D%D0%9A))

Ответ: 2; 4; 5; 7; 8.

#### *Задача II.3.1.2. Полимеразная цепная реакция (5 баллов)*

Какие компоненты необходимы для проведения полимеразной цепной реакции?

**Задача.** Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь.

1. Обратный праймер.
2. Прямой праймер.
3. Буферный раствор.
4. ДНК-зависимая ДНК-полимераза.
5. 0,1 М соляная кислота.

6. Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов.
7. 0,1 М гидроксид натрия.
8. ДНК-матрица.
9. ДНК-зависимая РНК-полимераза.
10. Хлорид магния.

### Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР — <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>.
3. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTNRKI>.

### Решение

Щелочь, кислота и РНК-полимераза не нужны для ПЦРю

Ответ: 1; 2; 3; 6; 8; 9; 10.

### Задача II.3.1.3. Приготовление разведенных растворов (5 баллов)

Концентрацию компонентов в растворе обозначают различными способами. Широко используют количественные характеристики, например, г/л, моль/л (М), % и другие [1]. Например, при приготовлении растворов для нанесения образцов на гель, или при расчете компонентов смеси для ферментативных реакций часто используют кратные растворы (2х, 4х, 5х, 10х). Например, для приготовления 100 мл однократного раствора (1х), нужно взять 50 мл двукратного раствора (2х) и добавить 50 мл воды или другого раствора.

**Задача.** Сколько красителя 6X для нанесения на гель необходимо добавить к 50 мкл реакционной смеси?

Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

### Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии о концентрации смеси ([https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\\_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8))

### Решение

Необходимо 50 мкл разделить на 5.

Ответ: 10.

### Задача II.3.1.4. Полимеразная цепная реакция (5 баллов)

Количество молекул двуцепочечной ДНК, которые образуются в результате полимеразной цепной реакции ( $N$ ), описывается формулой, в которой  $m$  — исходное число молекул матрицы ДНК, а  $n$  — количество циклов ПЦР.

$$N = m \cdot 2^n$$

Задача. Определите, сколько копий матрица ДНК ( $m$ ) содержалось в реакционной смеси до начала ПЦР, если к концу 30го цикла в пробирке находилось около 16 млрд копий. Ответ введите в виде целого числа. При расчетах примите значение числа Авогадро равным  $6,02 \cdot 10^{23}$  шт.

#### Рекомендуемые ссылки

1. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTNRKI>.
2. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) — <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.

#### Решение

Для вычисления  $m$  необходимо разделить число молекул ( $N$ ) на  $2^n$ .

Ответ:  $15 \pm 1$ .

### Задача II.3.1.5. Сайты рестрикции (2 балла)

Плазмида содержит 3000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт  $\text{HaeIII}$  распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество  $A=T=C=G$ .

Таким образом, вероятность того, что в данном месте находится нуклеотид  $G = 1/4$ . Соответственно, вероятность встречи динуклеотида  $GG = 1/4 \cdot 1/4 = 1/16$ .

Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде теоретически имеет данная рестриктаза?

Задача. Введите число теоретических сайтов рестрикции.

#### Решение

Вероятность встречи 4 нуклеотидов в плазмиде длиной 3000 п. о. =  $(0,25)^4 \cdot 3000 = 11,71$ .

Ответ: 11; 12.

### Задача II.3.1.6. Синтез ДНК (2 балла)

В каком направлении происходит синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой и обратной транскриптазой?

1. ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .
2. ДНК-полимераза катализирует синтез ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .
3. обратная транскриптаза катализирует синтез ДНК в направлении  $3' \rightarrow 5'$ .
4. обратная транскриптаза катализирует синтез ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$ .

*Решение*

ДНК полимераза и обратная транскриптаза синтезируют ДНК в направлении  $5' \rightarrow 3'$

**Ответ:** 2; 4.

**Задача II.3.1.7. Генетический код (2 балла)**

Выберите корректные тезисы, показывающие функциональное отношение кодонов и аминокислот.

1. Несколько кодонов не кодируют аминокислоты.
2. Один кодон может кодировать несколько аминокислот.
3. Одну аминокислоту может кодировать несколько кодонов.
4. Одну аминокислоту кодирует только один кодон.

**Ответ:** 1; 3.

**Задача II.3.1.8. Комплементарная ДНК (2 балла)**

Исследователь пытался получить комплементарную ДНК, кодирующую целевой белок. Он выделил и размножил образец мРНК. В конце эксперимента студент получил молекулы, содержащие только рибонуклеотиды.

**Задача.** Выберите правильные тезисы

1. Получены продукты работы обратной транскриптазы.
2. В реакционную смесь не была добавлена обратная транскриптаза.
3. Синтез кДНК прошел успешно.
4. В реакционную смесь была добавлена РНК-полимераза.

**Ответ:** 2.

**Задача II.3.1.9. Трансформация бактерий (2 балла)**

Исследователь пытался экспрессировать ген в бактериальной клетке. Для этого кДНК гена была клонирована в плазмиду. Клетки бактерий были трансформированы полученной плазмидой. Вечером исследователь понял, что забыл добавить на чашку Петри, куда были помещены трансформированные бактерии, антибиотик.

**Задача.** Что увидит исследователь в чашке Петри на следующий день?

1. Чашку Петри, на которой не выросли бактерии.

2. Переполненную чашку Петри, на которой выросли нетрансформированные и трансформированные бактерии.
3. Чашку Петри с нетрансформированными бактериями, так как антибиотик требовался для трансформации.
4. Чашку Петри с отдельными колониями трансформированных и нетрансформированных бактерий.

**Ответ:** 2.

## Задания третьего этапа. Задачи 10-11 класса

### *Задача II.3.2.1. Полимеразная цепная реакция (5 баллов)*

Количество молекул двуцепочечной ДНК, которые образуются в результате полимеразной цепной реакции ( $N$ ), описывается формулой, в которой  $m$  — исходное число молекул матрицы ДНК, а  $n$  — количество циклов ПЦР.

$$N = m \cdot 2^n$$

Задача. Определите, сколько (примерно) копий ДНК будет получено к концу 25го цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 256 молекул ДНК, а длина продукта ПЦР составляет 330 пар нуклеотидов.

1. 33 миллиона.
2. 256 миллионов.
3. 500 миллионов.
4. 1 миллиард.
5. 2 миллиарда.
6. 3 миллиарда.
7. 4 миллиарда.
8. 8 миллиардов.

**Ответ:** 8.

### *Задача II.3.2.2. Полимеразная цепная реакция (5 баллов)*

Какие компоненты необходимы для проведения полимеразной цепной реакции?

**Задача.** Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь.

1. CsCl.
2. ДНК-матрица.
3. Обратный праймер.
4. Прямой праймер.
5. MgCl<sub>2</sub>.
6. Отрицательный контроль.
7. Смесь дидезоксинуклеозидтрифосфатов.

8. NaCl.
9. РНК-зависимая ДНК-полимераза.
10. Положительный контроль.

#### Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР — <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>.
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция — <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaya-reaktsiia>.
3. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) — <https://youtu.be/V2qm9jTnrKI>.

**Ответ:** 2; 3; 4; 5;.

**Разработка вектора для системы геномного редактирования** В экспериментах по геномному редактированию при помощи системы CRISPR/Cas9 используют конструкции, несущие ген эндонуклеазы Cas9 и направляющую РНК (нРНК), участок которой комплементарен участку гена-мишени, который необходимо отредактировать.

Предсказать эффективность такой конструкции для решения определенной задачи теоретически достаточно тяжело, поэтому проверку эффективности проводят *in vitro* при помощи бинарной системы векторов. Помимо основного вектора, который содержит Cas9 и нРНК и используется для редактирования, система содержит Target-вектор, который содержит маркерный ген (например, ген GFP). В последовательность этого гена встраивают участок гена-мишени, который нарушает рамку считывания и приводит к потере продукта. Если система CRISPR/Cas9 работает, в последовательность этой вставки вносится мутация, которая приводит к восстановлению рамки считывания и восстановлению продукта (в данном случае — желтый флюоресцентный белок). По проценту трансформированных клеток, в которых произошло это событие, можно судить об эффективности разработанной системы.

**Задание.** Разработать Target-вектор на основе вектора pNB1. Обработать данный вектор рестриктазами BamHI и EcoRI, выделить и очистить фрагмент, несущий ген YFP и произвести лигирование этого фрагмента с разработанным двуцепочечным олигонуклеотидом, несущим комплементарные лишние концы. Провести анализ вставки при помощи ПЦР.

Используя программу UGENE (или аналогичную) и последовательность плазмиды pNB1, решите следующие задания.

#### Обучающие видео (UGENE)

1. Работа с эндонуклеазами рестрикции в UGENE <https://youtu.be/9MmL90FBFco>.
2. Полимеразная цепная реакция в UGENE <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>.
3. Клонирование в UGENE <https://youtu.be/VXBi6-VgMrg>.

#### Рекомендуемые источники

1. Система CRISPR/Cas9 — универсальный инструмент геномной инженерии — [https://yadi.sk/i/L4hG7H\\_RBi\\_qJQ](https://yadi.sk/i/L4hG7H_RBi_qJQ).
2. Молекулярное клонирование "Биомолекула" — [https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya\\_biblioteka/431719/Molekulyarnoe\\_klonirovanie\\_ili\\_Kak\\_pomestit\\_v\\_kletku\\_chuzherodnyy\\_geneticheskiy\\_material](https://elementy.ru/nauchno-populyarnaya_biblioteka/431719/Molekulyarnoe_klonirovanie_ili_Kak_pomestit_v_kletku_chuzherodnyy_geneticheskiy_material).

3. Работа системы CRISPR/Cas9  
[https://ru.qaz.wiki/wiki/CRISPR\\_gene\\_editing](https://ru.qaz.wiki/wiki/CRISPR_gene_editing).
4. Молекулярное клонирование — [https://ru.qaz.wiki/wiki/Molecular\\_cloning](https://ru.qaz.wiki/wiki/Molecular_cloning).
5. Лигирование — [https://ru.qaz.wiki/wiki/Ligation\\_\(molecular\\_biology\)](https://ru.qaz.wiki/wiki/Ligation_(molecular_biology)).

#### Ссылки на используемые последовательности

1. Последовательность плазмиды pNB1 и вставки — <https://yadi.sk/d/jQcnQikFi5-Bw?w=1>.

### Задача II.3.2.3. Ген устойчивости к антибиотикам в плазмиде (5 баллов)

**Задание.** Как называется ген устойчивости к антибиотикам, который содержится в векторе pNB1? Введите краткое название гена латинскими буквами.

#### Ссылки на используемые последовательности

1. Последовательность плазмиды pNB1 и вставки — <https://yadi.sk/d/jQcnQikFi5-Bw?w=1>.

Как называется ген устойчивости к антибиотикам, который содержится в векторе pNB1? Введите краткое название гена латинскими буквами.

#### Решение

Использовать инструмент UGENE для анализа последовательности.

**Ответ:** Amp.

### Задача II.3.2.4. Структура олигонуклеотида-вставки (5 баллов)

Олигонуклеотид имеет структуру  $5'-GGTCGACAAGGTCTGTACGG-3'$ , для лигирования нужно добавить "липкие" концы на прямую и обратную цепь.

С учетом липких концов, структура олигонуклеотида будет следующей:

$5'-XXXXN1-20-3'$  (прямая цепь)

$5'-YYYY(complementaryN20-1)-3'$  (обратная комплементарная цепь),

где XXXX, YYYY — липкие концы, N — последовательность олигонуклеотида.

**Задание.** Ввести структуру липких концов (в направлении  $5' \rightarrow 3'$ ) для прямой и обратной цепи олигонуклеотида. Ответ представить в виде XXXXYYYY

Ввести структуру липких концов (в направлении  $5' \rightarrow 3'$ ) для прямой и обратной цепи олигонуклеотида. Ответ представить в виде "XXXXYYYY"(от 5'-конца к 3'-концу). \_\_\_\_\_<sup>a</sup>

Для того, чтобы получить вставку с «липкими» концами, нужно \_\_\_\_\_<sup>b</sup>

1. провести ПЦР;
2. заказать отдельно два олигонуклеотида;

3. лигировать к последовательности вставки четырехнуклеотидные фрагменты;
4. вырезать ее рестриктазой BsaI из более длинного дуплекса.

#### Ссылки на используемые последовательности

1. Последовательность плазмиды pNB1 и вставки — <https://yadi.sk/d/jQcnQikFi5-Bw?w=1>

**Ответ:** a — GATCAATT; b — 2.

#### Решение

Анализировать приведенные последовательности в UGENE для анализа липких концов.

#### Задача II.3.2.5. Реакционная смесь (5 баллов)

После обработки вектора pNB1 рестриктазами BamHI и EcoRI и выделения целевого фрагмента, производят лигирование этого фрагмента с олигонуклеотидом, структура которого описана в предыдущей задаче.

Реакцию лигирования проводят в реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей:

1. 50 нг фрагмента вектора pNB1;
2. 3 мкл олигонуклеотида;
3. 2 мкл Quick Ligase Buffer;
4. 1 мкл T4 Quick Ligase;
5. воды без примесей нуклеаз.

Концентрация фрагмента вектора pNB1 — 23.8 нг/мкл.

**Задача.** Сколько мкл воды необходимо добавить в раствор?

#### Решение

Объем добавляемого pNB1 =  $50/23,8 = 2.1$  мкл, объем воды — 2 мкл.

**Ответ:**  $1.9 \pm 0.1$ .

#### Задача II.3.2.6. ПЦР-анализ результатов клонирования (5 баллов)

Проделайте процедуру клонирования олигонуклеотида (insertion\_in\_pNB1) в вектор pNB1 в программе UGENE.

После осуществления вставки олигонуклеотида, нужно провести ПЦР in silico для амплификации данного участка и проверки наличия вставки. Выберите, какая из четырех пар праймеров, подходит для решения этой задачи.

1. forward 5'-CTGCCCGACAACCACTACC-3'  
reverse 5'-GCCGATTTTCGGCCTATTGGTT-3'

2. forward 5'-GCGCTAGGGCGCTGGCAAG-3'  
reverse 5'-GGGCCGAGCGCAGAAGTGG-3'
3. forward 5'-TATGGATGAACGAAATAGACAG-3'  
reverse 5'-TGTTATCCGCTCACAATTCC-3'
4. forward 5'-TCCCACTATCCTTCGCAAGAC-3'  
reverse 5'-GCCATGATATAGACGTTGTGG-3'

**Задание.** Введите длину продукта, который получится в результате ПЦР с подходящей парой праймеров с полученным вектором после успешной встройки.

*Решение*

Вычислить длину ПЦР-продукта используя пару праймеров, соответствующую данному участку.

Ответ: 689; 685.

## Четвертый этап

Задания четвертого этапа. Задачи 8-9 класса

### *Задача П.4.1.1. Бело-синяя селекция (5 баллов)*

Для экспрессии рекомбинантных белков в кишечной палочке широко используют плазмидные векторы. При помощи эндонуклеаз рестрикции, требуемую последовательность ДНК клонируют в плазмиду. Для определения бактерий, содержащих плазмиду со вставкой, используют бело-синюю селекцию. После трансформации компетентных клеток в таком случае используют среду, содержащую соединение X-gal. Трансформированные клетки, содержащие плазмиду со вставкой и без вставки, отличаются по цвету.



**Задача.** Выберите правильные суждения.

1. Колонии, содержащие плазмиду со встройкой, окрашены в белый цвет.

2. Вставка последовательности в плазмиду приводит к нарушению функционированию гена LacZ.
3. Бета-галактозидаза гидролизует синий X-gal с образованием неокрашенного продукта.
4. Клетки, не содержащие плазмиду, не вырастают на чашке Петри с антибиотиком.
5. Колонии, содержащие плазмиду со встройкой, окрашены в синий цвет.
6. Синие колонии превращаются в белые после вставки необходимой последовательности в плазмиду.
7. Белковый продукт гена LacZ — фермент бета-галактозидаза.
8. Плазида, содержащая вставку, вызывает накопление X-gal в клетках.
9. Белые колонии превращаются в синие после вставки необходимой последовательности в плазмиду.
10. Бета-галактозидаза гидролизует бесцветный X-gal с образованием окрашенного продукта.

**Ответ:** 1; 2; 4; 7; 10.

**Расчетные задачи** Вычисления и расчеты являются неотъемлемой частью работы исследователя в молекулярно-биологической лаборатории. Как правило, необходимые для этого знания ограничиваются одной-двумя формулами и знаниями курса математики 5–6 класса средней школы.

Для того, чтобы решать подобные задачи, необходимо понимать, что же происходит с используемыми веществами и растворами.

Некоторые из предложенных задач — искусственные, другие — реально встречаются в повседневной практике научных сотрудников и лаборантов.

### ***Задача II.4.1.2. Приготовление раствора заданной концентрации (5 баллов)***

В лаборатории имеется 0,5 М и 5 М растворы NaCl

**Задача.** Приготовить 500 мл 3 М раствора NaCl, используя имеющиеся растворы.

Для приготовления 500 мл 3 М раствора NaCl нужно взять \_\_\_\_\_<sup>1</sup>

- 120.
- 130.
- 220.
- 230.
- 320.
- 330.
- 420.
- 430.

мл 0.5 М раствора NaCl и \_\_\_\_\_<sup>2</sup>

- 70.

- 80.
- 170.
- 180.
- 270.
- 280.
- 370.
- 380.

мл 5 М раствора NaCl.

*Решение*

Необходимо решить систему уравнений.  $V_2 \cdot 5 + V_1 \cdot 0.5 = 3 \cdot 500$  и  $V_1 + V_2 = 500$

**Ответ:** 1 — 220, 230; 2 — 270, 280.

**Задача II.4.1.3. Расчет реакционной смеси (5 баллов)**

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержит:

- фрагмент плазмидной ДНК после рестрикции;
- продукт ПЦР;
- 1 мкл ДНК-лигазы фага T4;
- 10X буферный раствор для лигазной реакции.

Известно, что длина плазмиды после рестрикции 2021 пара оснований, длина ПЦР-продукта — 979 пар оснований. Концентрация плазмиды, измеренная на спектрофлуориметре — 20 нг/мкл, концентрация ПЦР-продукта — 30 нг/мкл.

**Задача.** Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК и 60 нг ПЦР-продукта.

Ответы введите в мкл, округлите до ближайших целых значений.

Заполните пропуски В реакционную смесь необходимо добавить \_\_\_\_\_<sup>a</sup> мкл раствора плазмидной ДНК, \_\_\_\_\_<sup>b</sup> мкл ПЦР-продукта и \_\_\_\_\_<sup>c</sup> мкл дистиллированной воды.

**Ответ:** a — 5; b — 2; c — 10.

**Задача II.4.1.4. Расчет реакционной смеси (5 баллов)**

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержит:

- фрагмент плазмидной ДНК после рестрикции;
- продукт ПЦР;
- 1 мкл ДНК-лигазы фага T4;
- 10X буферный раствор для лигазной реакции.

Известно, что длина плазмиды после рестрикции 2021 пара оснований, длина

ПЦР-продукта — 979 пар оснований. Концентрация плазмиды, измеренная на спектрофлуориметре — 20 нг/мкл, концентрация ПЦР-продукта — 30 нг/мкл.

**Задача.** Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК и 60 нг ПЦР-продукта.

Ответы введите в мкл, округлите до ближайших целых значений.

В реакционную смесь необходимо добавить 5 мкл раствора плазмидной ДНК, 2 мкл ПЦР-продукта и 10 мкл дистиллированной воды.

#### ***Задача П.4.1.5. Приготовление разведенных растворов (5 баллов)***

Для приготовления 100 мл однократного раствора (1x), нужно взять 50 мл двукратного раствора (2x) и добавить 50 мл воды или другого раствора.

**Задача.** Сколько красителя 4X для нанесения на гель необходимо добавить к 30 мкл реакционной смеси?

Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

**Ответ:** 10.

**Геномное редактирование** Нобелевская премия по химии в 2020 году была вручена "за разработку метода редактирования генома" Эмманюэль Шарпентье и Дженнифер Даудне. основополагающие статьи были опубликованы в 2012 году, за 8 последующих лет было опубликовано более 20 тысяч работ, посвященных данному методу.

## The Nobel Prize in Chemistry 2020



© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.  
**Emmanuelle Charpentier**  
 Prize share: 1/2



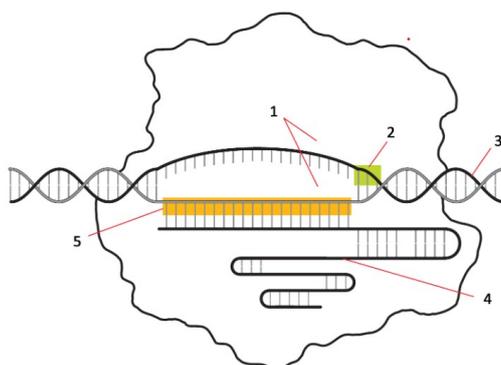
© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.  
**Jennifer A. Doudna**  
 Prize share: 1/2

### Задача II.4.1.6. Схема работы системы CRISP-Cas9 (5 баллов)

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

- фермент Cas9;
- направляющая РНК (sgRNA) — синтетический олигонуклеотид, который содержит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: crRNA и tracrRNA;
- мотив протоспейсера (PAM).

**Задание.** Соотнесите компоненты системы редактирования генома с обозначениями на схеме



Сопоставьте значения из списка с нумерацией на картинке

- a. sgRNA.
- b. ДНК.
- c. Протоспейсер.
- d. Участок разрезания.
- e. PAM.

**Ответ:** 1 — d; 2 — e; 3 — b; 4 — a; 5 — c.

**Творческое задание** Умение анализировать научную информацию, работать с литературными источниками, письменно излагать свои мысли — является крайне востребованным навыком для молодого исследователя.

Опыт проведения второго тура Олимпиады КД НТИ в 2019—2020 году показал, что написание короткого текста с развернутым ответом на вопрос — оказалось одним из самых трудных заданий. В этом году мы решили повторить это задание в слегка модифицированном виде.

Для выполнения творческого задания можно и нужно использовать литературные источники (в том числе, тексты в Интернете), но не стоит копировать большие фрагменты текста. Размер требуемого текста ограничен, помните, что краткость — сестра таланта.

PS Составители Олимпиады будут читать ваши работы с интересом и удовольствием!

## Задания четвертого этапа. Задачи 10-11 класса

### *Задача П.4.2.1. Продукты геномного редактирования (15 баллов)*

**Задание.** Напишите текст (эссе) объемом не более 3000 символов (с учетом пробелов) на тему "Являются ли организмы, полученные в результате геномного редактирования, генетически модифицированными?" Постарайтесь в ответе привести аргументы в пользу обеих точек зрения. Авторы лучших текстов получают специальные призы от спонсоров и партнеров профиля "Геномное редактирование"

Комментарии, критерии оценивания:

- Правильная аргументация, обоснование ответа.
- Ссылки на литературные источники приветствуются.
- Заимствование больших фрагментов текста не приветствуется.
- Достаточно отправить одно эссе от команды (при наличии нескольких одинаковых/стереотипных текстов, будет оцениваться загруженный первым, остальные будут оценены в 0 баллов).
- При совпадении фрагментов текстов у разных команд, будет оценен первый загруженный текст, остальные будут оценены в 0 баллов).
- При превышении рекомендованной длины текста, оцениваться будут первые 3000 символов (с учетом пробелов).

**Расчетные задачи** Вычисления и расчеты являются неотъемлемой частью работы исследователя в молекулярно-биологической лаборатории. Как правило, необ-

ходимые для этого знания ограничиваются одной-двумя формулами и знаниями курса математики 5–6 класса средней школы.

Для того, чтобы решать подобные задачи, необходимо понимать, что же происходит с используемыми веществами и растворами.

Некоторые из предложенных задач — искусственные, другие — реально встречаются в повседневной практике научных сотрудников и лаборантов.

### **Задача II.4.2.2. Секвенирование по Сэнгеру (5 баллов)**

Для анализа последовательности нуклеиновых кислот по методу Сэнгера в настоящее время используют автоматические генетические анализаторы.

**Задача.** Выберите правильные суждения.

1. Метод Сэнгера с использованием автоматического анализатора позволяет в одной секвенирующей реакции получить последовательность до 1 тысячи пар нуклеотидов.
2. Для проведения реакции Сэнгера используют ДНК-полимеразу.
3. Секвенирующую реакцию с разными флуоресцентными ddNTP можно проводить в одной пробирке.
4. Для терминации (обрыва цепи) в методе Сэнгера используют dNTP.
5. Для проведения одной секвенирующей реакции в современной версии метода Сэнгера используют четыре пробирки с разными терминаторами.
6. В современной версии метода Сэнгера используют радиоактивно меченые субстраты.
7. Продукты секвенирующей реакции разделяют в генетическом анализаторе методом капиллярного электрофореза.
8. Концентрация терминирующих ddNTP в реакционной смеси сопоставима с концентрацией dNTP.

**Ответ:** 1; 2; 3; 7.

### **Задача II.4.2.3. Приготовление раствора заданной концентрации (5 баллов)**

В лаборатории имеется 0,2 М и 2 М растворы NaCl

**Задача.** Приготовить 800 мл 1 М раствора NaCl, используя имеющиеся растворы. Ответ введите в виде целого числа (без обозначения мл).

Для приготовления 0,8 л 1 М раствора NaCl нужно взять \_\_\_\_\_<sup>a</sup> мл 0,2 М раствора NaCl и \_\_\_\_\_<sup>b</sup> мл 2 М раствора NaCl.

**Решение**

Необходимо решить систему уравнений.  $V_2 \cdot 0,2 + V_1 \cdot 2 = 800 \cdot 1$   $V_1 + V_2 = 800$

**Ответ:** a — 444; b — 356.

**Полимеразная цепная реакция** Полимеразная цепная реакция используется для специфической амплификации фрагмента ДНК длиной от 100–150 до 20000 пар нуклеотидов. ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (количественная ПЦР) имеет определенные преимущества перед ПЦР с детекцией результатов по конечной точке.

Количественную ПЦР широко используют в клинико-диагностических лабораториях, в том числе, для анализа РНК SARS-CoV-2.

#### **Задача П.4.2.4. Расчет реакционной смеси (5 баллов)**

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержит:

- фрагмент плазмидной ДНК после рестрикции;
- продукт ПЦР;
- 1 мкл ДНК-лигазы фага T4;
- 10X буферный раствор для лигазной реакции.

Известно, что соотношение (молярное) плазмиды (длина 3500 пар оснований) к ПЦР-продукту (длина 700 пар оснований) в реакционной смеси должно быть 1:3. Концентрация плазмиды, измеренная на спектрофлуориметре — 25 нг/мкл, концентрация ПЦР-продукта — 20 нг/мкл.

**Задача.** Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК.

Ответы введите в мкл, округлите до ближайших целых значений.

В реакционную смесь необходимо добавить \_\_\_\_\_<sup>a</sup> мкл раствора плазмидной ДНК, \_\_\_\_\_<sup>b</sup> мкл ПЦР-продукта и \_\_\_\_\_<sup>c</sup> мкл дистиллированной воды.

**Ответ:** a — 4; b — 3; c — 10.

**Геномное редактирование** Нобелевская премия по химии в 2020 году была вручена "за разработку метода редактирования генома" Эмманюэль Шарпентье и Дженнифер Даудне. Основополагающие статьи были опубликованы в 2012 году, за 8 последующих лет было опубликовано более 20 тысяч работ, посвященных данному методу.

## The Nobel Prize in Chemistry 2020



© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.  
**Emmanuelle Charpentier**  
 Prize share: 1/2



© Nobel Media. Ill. Niklas Elmehed.  
**Jennifer A. Doudna**  
 Prize share: 1/2

### *Задача II.4.2.5. ПЦР-диагностика COVID-19 (5 баллов)*

Для диагностики COVID-19 используют метод ОТ-ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией и детекцией результатов в режиме реального времени). В качестве матрицы используют кДНК, полученную обратной транскрипцией.

**Задача.** Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики SARS-CoV-2.

1. Количество нарабатываемых молекул ДНК пропорционально количеству копий геномной РНК SARS-CoV-2 в образце.
2. Для детекции результатов количественной ПЦР используют гель-электрофорез.
3. В процессе обратной транскрипции на матрице вирусной РНК образуется несколько копий комплементарной ДНК.
4. Кривые амплификации пациента с COVID-19 выходят позже, чем у здоровых пациентов.
5. Номер цикла, на котором выходит кривая амплификации образца пациента соответствует циклу развития вируса в организме.
6. При детекции SARS-CoV-2 полимеразная цепная реакция происходит после обратной транскрипции.
7. Перед ПЦР-анализом на COVID-19, анализируемый образец обрабатывают ДНКазой для удаления возможных примесей совыделяющейся ДНК.
8. Использование зонда в количественной ПЦР позволяет в реальном времени следить за наработкой специфического продукта.
9. Преимущество количественной ПЦР по сравнению с ПЦР с детекцией по ко-

нечной точке в том, что вероятность контаминации продуктами количественной ПЦР, намного ниже.

10. В результате ПЦР происходит наработка миллиардов молекул геномной РНК SARS-CoV-2.

**Ответ:** 1; 3; 6; 8; 9.

**Творческое задание** Умение анализировать научную информацию, работать с литературными источниками, письменно излагать свои мысли — является крайне востребованным навыком для молодого исследователя.

Опыт проведения второго тура Олимпиады КД НТИ в 2019—2020 году показал, что написание короткого текста с развернутым ответом на вопрос — оказалось одним из самых трудных заданий. В этом году мы решили повторить, в слегка модифицированном виде, это задание.

Для выполнения этого задания можно и нужно использовать литературные источники (в том числе, тексты в Интернете), но не стоит копировать большие фрагменты текста. Размер требуемого текста ограничен, помните, что краткость — сестра таланта.

PS Составители Олимпиады будут читать ваши работы с интересом и удовольствием!

### ***Задача II.4.2.6. Механизм работы системы CRISPR-Cas9 (5 баллов)***

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

- фермент Cas9;
- направляющая РНК (sgRNA) — синтетический олигонуклеотид, который содержит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: crRNA и tracrRNA;
- мотив протоспейсера (PAM).

**Задание.** Заполните пропуски

На первом этапе работы системы геномного редактирования происходит связывание \_\_\_\_\_<sup>a</sup>

1. Cas9 с активирующим доменом.
2. sgRNA с Cas9.
3. sgRNA с комплементарным участком PAM.
4. crRNA с tracrRNA.
5. скаффолдом.
6. sgRNA с PAM.
7. Cas9 с sgRNA.

, далее образовавшийся комплекс связывается с \_\_\_\_\_<sup>b</sup>

1. скаффолдом.
2. NGG.

3. Cas9.
4. PAM.
5. sgRNA.

ДНК-мишени. PAM последовательность имеет вид \_\_\_\_\_<sup>c</sup>

1. 3'-NGG.
2. 5'-GGN.
3. 3'-GGN.
4. 5'-NGG.
5. 5'-NNN.
6. 5'-GGG.

. После связывания Cas9 и PAM, происходит \_\_\_\_\_<sup>d</sup>

1. разделение цепей ДНК;
2. гидролиз цепей ДНК;
3. расплетание цепей ДНК;
4. образование двуцепочечного разрыва в ДНК-мишени;
5. диссоциация Cas9 и sgRNA.

и sgRNA связывается с \_\_\_\_\_<sup>e</sup>

1. двуцепочечной ДНК ;
2. последовательностью PAM на прямой цепи;
3. последовательностью PAM на обратной цепи;
4. комплементарной последовательностью одноцепочечной ДНК.

. Cas9 делает \_\_\_\_\_<sup>f</sup>

1. одноцепочечный;
2. двуцепочечный ;
3. перекрестный;
4. комплементарный.
5. связывающий.

разрыв на расстоянии 3 нуклеотида от PAM. Комплекс \_\_\_\_\_<sup>g</sup>

1. Cas9 и тупого конца ДНК;
2. sgRNA и PAM ;
3. Cas9 и PAM;
4. Cas9 и sgRNA;
5. sgRNA и Cas9.

диссоциирует от ДНК.

**Ответ:** а — 2, 7; b — 2, 4; c — 4; d — 1, 3; e — 4; f — 2; g — 4, 5.

### ***Задача П.4.2.7. Проблемы и задачи геномного редактирования (15 баллов)***

**Задание.** Напишите текст (эссе) объемом не более 3000 символов (с учетом пробелов) на тему "Проблемы и задачи геномного редактирования". Авторы лучших текстов получают специальные призы от спонсоров и партнеров профиля "Геномное редактирование"

Постарайтесь ответить на вопросы:

- Какие проблемы (задачи) стоят сегодня перед технологией геномного редактирования CRISPR-Cas?
- Как решали эти задачи до появления технологии CRISPR-Cas?

Комментарии, критерии оценивания:

- Правильная аргументация, обоснование ответа.
- Ссылки на литературные источники приветствуются.
- Заимствование больших фрагментов текста не приветствуется.
- Достаточно отправить одно эссе от команды (при наличии нескольких одинаковых/стереотипных текстов, будет оцениваться загруженный первым, остальные будут оценены в 0 баллов).
- При совпадении фрагментов текстов у разных команд, будет оценен первый загруженный текст, остальные будут оценены в 0 баллов).
- При превышении рекомендованной длины текста, оцениваться будут первые 3000 символов (с учетом пробелов).