

Геномное редактирование

2022/23 учебный год

Заключительный этап

Инженерный тур

Общая информация

Финалисты 8–9 классов работают с репортерными плазмидными конструкциями с однонуклеотидными модификациями для различных исследований *in vivo*, связанных с геномным редактированием.

Финалисты 10–11 классов клонируют ген SOPP3 в плазмиду, содержащую ген dCas9 и анализируют полученные клоны.

Одноцепочечные разрывы в плазмидной ДНК являются удобным инструментами для анализа работы системы репарации ДНК в клетке.

Требования к команде и компетенциям участников

Количество участников в команде: 3.

Компетенции, которыми должны обладать члены команды:

1. Биоинформатик (1 участник);
2. Младшие научные сотрудники молекулярно-биологической лаборатории (2 участника).

Оборудование и программное обеспечение

Оборудование: автоматические дозаторы, центрифуги, ПЦР-амплификатор, термостат, система гель-документации.

Программное обеспечение: биоинформатики используют Python (Anaconda), UGENE, MEGA, базы данных NCBI и другие.

Описание задачи 8–9 классы

Легенда задачи

На исследовательском корабле PDB-4СМР неожиданно раздался звонок. Два мирно спящих существа повыпрыгивали из постелей и побежали скорее узнать, в чем дело. Потирая сонный глаз, Ковалентик все же нашел кнопку «ответить».

— Отряд 4СМР, я капитан ННН! Поступила тревога из отдела «эксцизионной репарации оснований». Сообщают, что у них страшная нехватка субстратов для исследований репарации окислительных повреждений. Нам срочно нужна ваша помощь, отряд 4СМР!

— Здравствуйте, капитан! Мы с Гликозилазкой уже готовы приступить к вашему заданию! Есть ли какие-то наводки?

— Сообщают, что недавно был предложен новый способ получения плазмидных субстратов с однонуклеотидным повреждением.

— В чем особенность этого метода? — спросил Ковалентик.

— Насколько мне известно, в нем используются ДНК-никазы. Вам необходимо разобраться в этом методе и как можно скорее передать субстраты в отдел «эксцизионной репарации оснований»! Удачи, отряд 4СМР!

— Хоро. . . — хотела сказать Гликозилазка, но связь прервалась.

Два заспанных существа еще продолжали смотреть в черный экран корабля, где только что говорил капитан, потом медленно повернулись и посмотрели друг на друга:

— Кофе. . . — одновременно произнесли они, — сначала кофе, мировые проблемы — потом!

Этап 1. Получение плазмидной конструкции с одноцепочечной брешью

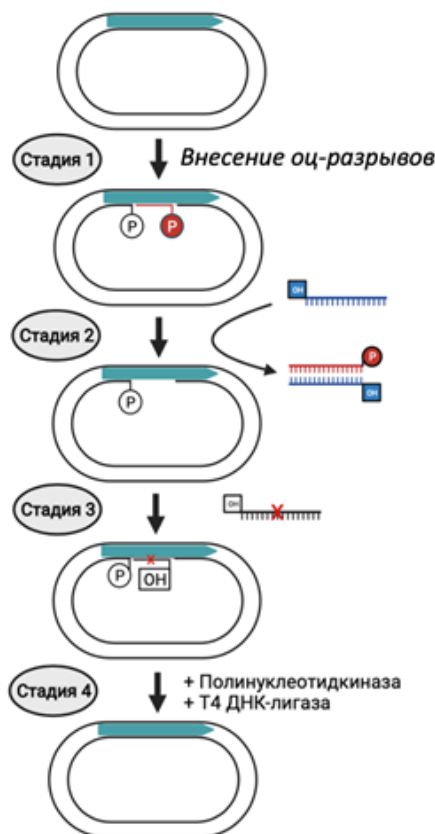
Каждый живой организм обладает генетической информацией, которая хранится и передается с помощью нуклеиновых кислот. У бактерий различают геномную ДНК — хромосомы — и мобильную ДНК — плазмиды. Обмениваясь плазмидами, бактерии способны приспосабливаться к меняющимся условиям окружающей среды. Плазмида представляет собой кольцевую молекулу двуцепочечной ДНК и прекрасный субстрат для генно-инженерных задач. В такую молекулу можно клонировать практически любой интересующий ген и изучать его, как в бактериях, так и в клетках эукариот.

Поскольку ДНК такой важный объект, обеспечивающий всю жизнедеятельность клетки, необходимо поддерживать ее целостность. Может показаться, что нуклеиновые кислоты крайне стабильны и устойчивы, раз именно они стали главным генетическим носителем. Но на самом деле, все обстоит намного сложнее. ДНК постоянно подвергается различным внешним и внутренним воздействиям. Это и различные опасные излучения, так и, например, избыток активных форм кислорода и другие различные метаболиты внутри клеток. Для сохранения генетической информации, возникающие повреждения восстанавливаются с помощью специальных систем репарации — наборов ферментов, обеспечивающих удаление и замещение повреждения нужной «нуклеотидной заплаткой».

Репортерные плазмиды — это модельные конструкции, сконструированные под определенные задачи исследователя. Как правило, основой для репортерных конструкций служат гены флуоресцентных белков (маркер). Отслеживая уровень экспрессии маркерного белка, можно качественно и количественно оценивать различные биохимические механизмы, а также, в целом, локализацию таких процессов в клетке. Например, можно вносить однонуклеотидное повреждение в одну из цепей плазмидной ДНК, трансформировать плазмиду в клетку и анализировать эффективность репарации. Поскольку в каждой конструкции только одно повреждение, то очень легко проводить именно количественную оценку.

Одним из методов получения такой конструкции заключается в использовании ДНК-никаза для внесения двух близкорасположенных одноцепочечных разрывов на одной из цепей ДНК в кодирующей последовательности *eGFP*. Далее проводят отжиг олигонуклеотида, комплементарного выщепленному, для формирования одно-

цепочечной брешы. В брешь лигируют синтетические олигонуклеотиды с однонуклеотидным повреждением основания ДНК.



Практическая часть

В первый день вам предстоит, ввести одноцепочечные разрывы в транскрибируемую цепь плазмиды pUC19, получить одноцепочечную брешь, очистить конструкцию для последующих этапов внесения однонуклеотидных модификаций и провести аналитический гель-электрофорез.

Никирование плазмиды pUC19 нуклеазами nCas9^{D10A} и nCas9^{H840A}

Материалы и оборудование

- Нуклеазы nCas9^{D10A} 13,1 мкМ (**D10A**) и nCas9^{H840A} 8,5 мкМ (**H840A**);
- Направляющие РНК: tracrРНК-crРНК_b1 (**tracr-b1**) 10 мкМ и tracrРНК-crРНК_t1 (**tracr-t1**) 10 мкМ;
- Плазмида pUC19 809 нг/мкл и 100 нг/мкл;
- Реакционный буфер **KJ 5x** (0,1 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 0,5 М КСl, 25%-ный глицерин, 5 мМ ДТТ);
- Раствор **MgCl₂** 100 мМ;
- Деионизированная вода (**mQ**);
- Настольный термостат (1 шт);
- Автоматический пипетатор (1–5 мкл, 10–20 мкл, 10–100 мкл);

- Наконечники (10 мкл, 200 мкл);
- Пробирки (0,6 мл);
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм) .

Протокол

1. Для обозначения пробирок будет использоваться следующий код: «**N-1-2**», где **N** — номер команды, 1 — номер раздела, а 2 — порядковый номер пробирки. Например, для команды №3 для пробирки №1 из раздела №4 код будет «**3-4-1**».
2. В двух пробирках замешайте реакции:

Реагент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	N-1-0	N-1-1	N-1-2
			Добавить, мкл		
nCas9 ^{D10A}	13,1 мкМ	0,8 мкМ	—	—	1,5
nCas9 ^{H840A}	8,5 мкМ	0,8 мкМ	—	2,4	—
tracr-crRNA_b1	10 мкМ	0,8 мкМ	—	2,0	—
tracr-crRNA_t1	10 мкМ	0,8 мкМ	—	—	2,0
Буфер КJ	5x	1x	2,0	5,0	5,0
MgCl ₂	100 мМ	10 мМ	1,0	2,5	2,5
H ₂ O (mQ)			6,0	11,9	12,8
Итоговый объем реакционной смеси, мкл			9,0	23,8	23,8

3. Тщательно перемешайте реакционные смеси пипетированием.
4. Инкубируйте пробирки при 37 °С в течение 15 мин. Сбросьте жидкость внутри пробирок коротким центрифугированием на микроцентрифуге.
5. В новой пробирке смешайте по 23,8 мкл **N-1-1** и **N-1-2** (**N-1-0** оставьте при комнатной температуре). Далее пробирка будет обозначаться как **N-1-3**.
6. Добавьте к **N-1-3** 2,5 мкл (2 мкг) плазмиды pUC19. Быстро перемешайте пипетированием и инкубируйте пробирку при 37 °С в течение 10 мин (не перерживайте!).
7. В пробирку **N-1-0** добавьте 1 мкл (100 нг) плазмиды pUC19, перемешайте и инкубируйте при 37 °С в течение 10 мин.
8. Поставьте пробирки **N-1-0** и **N-1-3** в лед для замедления реакции гидролиза.

Check point 1: остаются пробирки **N-1-0** и **N-1-3**.

Отжиг комплементарных олигонуклеотидов для получения одноцепочечной брешки

Материалы и оборудование

- Реакционная смесь после никирования **N-1-3** (концентрация pUC19 ~ 40 нг/мкл);
- Комплементарные олигонуклеотиды **comp-b1-t1** (200 мкМ);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл);
- Пробирки (0,6 мл);
- ПЦР-амплификатор / настольный термостат;
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм).

Протокол

1. Добавьте 1,2 мкл комплементарных олигонуклеотидов **comp-b1-t1** в реакционную смесь **N-1-3**. Тщательно перемешайте пипетированием, используйте пи-

петатор на 20 мкл.

2. Инкубируйте реакционную смесь в ПЦР-амплификаторе на следующей программе:

4 °C	2 мин
80 °C	10 мин
4 °C	∞

3. Сбросьте жидкость внутри пробирки коротким центрифугированием на микроцентрифуге.
4. Из пробирки **N-1-3** отберите 2,6 мкл (100 нг pUC19) на анализ и разведите водой до 10 мкл в новой пробирке. Далее пробирка будет обозначаться как **N-2-1**.

Check point 2: остаются пробирки **N-1-0** и **N-2-1**.

Очистка плазмидной ДНК

Материалы и оборудование

- Реакционная смесь после получения оц-бреши **N-1-3** (концентрация pUC19 39 нг/мкл);
- Буфер для нанесения на колонку (**PB**) с добавлением этилового спирта;
- Буфер для промывки (**WB**) с добавлением этилового спирта;
- Буфер для элюции (**EB**);
- Колонка для сорбции образца (1 шт);
- Пробирки (1,5 мл);
- Автоматический пипетатор (100–200 мкл, 1 мл);
- Наконечники (200 мкл, 1 мл);
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм);
- Спектрофотометр NanoDrop One C.

Протокол

1. К реакционной смеси **N-1-3** добавьте 250 мкл буфера **PB**, перемешайте и сбросьте капли жидкости коротким центрифугированием на микроцентрифуге.
2. Поместите колонку в пробирку на 1,5 мл и назовите ее **N-3-1**.
3. После подготовки образца (п. 1) сразу нанесите его на колонку (плотно закройте крышку колонки!).
4. Центрифугируйте в течение 30 с при 10000 gcf (~ 12200 гpm), фильтрат удалите. Обязательно уравновесьте пробирку!
5. Промойте колонку 500 мкл буфера **WB**, центрифугируйте 30 с при 10000 gcf (~ 12200 гpm) и удалите фильтрат.
6. Центрифугируйте колонку еще 3 мин при 10000 gcf (~ 12200 гpm) для полного удаления буфера **WB**. Фильтрат удалите.
7. Перенесите колонку в новую пробирку на 1,5 мл. Далее пробирка будет обозначаться **N-3-2**.
8. Нанесите 60 мкл буфера **EB** в центр колонки, не задевая мембрану наконечником! Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре.

9. Центрифугируйте 1 мин при 10000 gcf (~12200 rpm).
10. Аккуратно перемешайте фильтрат пипетированием и повторно нанесите на колонку.
11. Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре и центрифугируйте 1 мин при 10000 gcf (~12200 rpm).
12. Из пробирки **N-3-2** отберите аликвоту 5 мкл в новую пробирку. Данная пробирка будет транспортирована в институт для анализа концентрации ДНК после очистки. В связи с этим, подпишите данную пробирку **N-3-3**.

Check point 3: остаются пробирки **N-1-0**, **N-2-1** и **N-3-2**; **N-3-3** — сдать организаторам.

Заливка агарозного геля

Материалы и оборудование

- Агароза (MP);
- Буфер ТАЕ 1x (40 mM Трис-ацетат (pH 8,0), 1 mM ЭДТА-NaOH (pH 8,3));
- Бромистый этидий (10 мг/мл);
- Заливочный столик;
- Ванночка для заливки;
- Гребенка на 13 дорожек;
- Настольные весы;
- Микроволновая печь/нагревательная плитка;
- Коническая колба (500 мл);
- Мерный цилиндр (100 мл);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В конической колбе взвесьте 0,8 г агарозы и растворите ее в 100 мл ТАЕ 1x. **(Для организаторов)**
2. Нагрейте раствор до закипания и охладите при комнатной температуре. **(Для организаторов)**
3. Соберите установку для заливки: заливочный столик, ванночка для заливки и гребенка. **(Для организаторов)**
4. Добавьте 5 мкл бромистого этидия в расплавленную и охлажденную агарозу перемешайте и залейте в ванночку. **(Для организаторов)**
5. Дождитесь полной полимеризации агарозы.

Подготовка образцов

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-1-0**, **N-2-1** и **N-3-2**;
- Бромфеноловый синий;
- Деионизированная вода;
- Пробирки (0,6 мл);

- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В новой пробирке смешайте 3 мкл **N-3-2** и 7 мкл воды. Далее пробирка будет обозначаться как **N-5-1**.
2. В пробирки **N-1-0**, **N-2-1** и **N-5-1** добавьте по 2 мкл бромфенолового синего и тщательно перемешайте пипетированием.
3. Пробирку **N-3-1** сдайте организаторам.

Check point 5: остаются пробирки **N-1-0**, **N-2-1** и **N-5-1**; **N-3-2** — сдать организаторам.

Гель-электрофорез

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-1-0**, **N-2-1**, **N-5-1**;
- ДНК-маркер (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 пн; «СибЭнзим»);
- Буфер для электрофореза (40 мМ Трис-ацетат (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА-NaOH (pH 8,3), 0,5 мкг/мл бромистый этидий);
- 0,8%-ный агарозный гель в ванночке для заливки;
- Камера для электрофореза;
- Источник напряжения;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. Соберите установку для электрофореза: камера, источник напряжения и ванночка с агарозным гелем. Залейте буфер для электрофореза. (**Для организаторов**)
2. Нанесите образцы на агарозный гель по следующей схеме:

№карм.	1	2	3	4	5	6	7
№коман.		1			2		
Образец	ДНК маркер	N-1-0	N-2-1	N-5-1	N-1-0	N-2-1	N-5-1
Нанести, мкл	6	10	10	10	10	10	10

№карм.	8	9	10	11	12	13
№коман.	3			4		
Образец	N-1-0	N-2-1	N-5-1	N-1-0	N-2-1	N-5-1
Нанести, мкл	10	10	10	10	10	10

3. Вести электрофорез при 110 В в течение 30 мин.
4. Зафиксируйте результат электрофореза на гель-документирующей системе и интенсивности свечения бендов при помощи ПО «QuantityOne». (**Для организаторов**)

Check point 6: пробирки **N-3-2** и **N-3-3** сданы организаторам!

Теоретическая часть

Задача VI.2.4.1. Никазы и конструкции (8 баллов)

Не так давно методы направленного внесения однонуклеотидных модификаций в ДНК стали активно распространяться для исследований в области репарации ДНК и эпигенетики. В лабораторной работе вы начали знакомство с одним из самых эффективных способов получения репортерных конструкций с одиночным повреждением основания плазмидной ДНК на основе CRISPR/Cas9-никаз. Но изначально система была разработана для ДНК-никаз — эндонуклеаз рестрикции.

Вопрос 1

У Гликозилазки и Ковалентика есть следующие реактивы: оц-ДНК (плазида), различные эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага Т4, ДНК-полимераза I, Q5 ДНК-лигаза, SSB-белки, полинуклеотидкиназа фага Т4, РНК-полимераза, редактор оснований, оц-олигодезоксирибонуклеотиды, оц-олигорибонуклеотиды, направляющая РНК, дц-олигодезоксирибонуклеотиды с липкими концами, *Taq* ДНК-полимераза, дц-ДНК (плазида), дц-олигодезоксирибонуклеотиды с тупыми концами, ДНК-лигаза фага Т7.

Предположите, какими еще способами можно получить плазмидную конструкцию с однонуклеотидной модификацией в одной из цепей ДНК? Как вы думаете, какой из ваших вариантов будет наиболее эффективен? (1 балл)

Приятным совпадением оказалось, что коммерческая пара ДНК-никаз Nb.Vru10I и Nt.Vru10I имеют близко расположенные сайты кодирующей последовательности нефлуоресцентного варианта eGFP (усиленный зеленый флуоресцентный белок).

Ответ: Любой из способов 1 балл, при неточности 0,5 баллов.

1. Лигирование синтетического дуплекса по липким или тупым концам через разрезание эндонуклеазой рестрикции.
2. Отжиг синтетического оц-олигонуклеотида на оцДНК, удерживаемую SSB-белками, и достроение цепи высокоточной ДНК-полимеразой Q5.
3. Через никирование дц-плазмиды и лигирование Т4 ДНК-лигазой оц-олигонуклеотида, который предварительно фосфорилируется Т4 полинуклеотидкиной (наиболее эффективный способ).
4. Комплекс направляющей РНК с редактором оснований.

Вопрос 2

Вектор pEGFP-N3 параллельно обработали либо никазой Nb.Vru10I, либо Nt.Vru10I и инкубировали 2 ч при 37 °С в присутствии 10 мМ Tris-HCl (pH 8.5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl и 0,1 мг/мл БСА. После чего никазу инактивировали при 80 °С в течении 20 мин. Ниже представлен ген eGFP в fasta-формате и сайты гидролиза той самой пары никаз. Найдите позиции сайтов разрезания описанных выше реакций, а также длину выщепляемого олигонуклеотида. В какие цепи ДНК данные никазы вносят одноцепочечные разрывы? (1 балл)

>AAB08064.1 Enhanced Green Fluorescent Protein [Cloning vector pEGFP-N3]

```
1 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCAACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC
61 GCGGACGТАА АСGGCCACAА GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC
121 GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCAACC
181 CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
```


241 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
 301 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG
 361 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC
 421 AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
 481 GGCATCAAGG TGAАСТTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC
 521 GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
 601 TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC
 661 CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAGTAA

Nt.Bpu10I
 5'-CC|TNAGC-3'
 3'-GGANT|CG-5'

Nb.Bpu10I

N — любой мононуклеотид (A, T, G или C)

Данный нефлуоресцентный вариант eGFP был специально разработан для исследования экспрессии в живых клетках в реальном времени. Дело в том, что повышение флуоресценции от «нуля» намного легче зафиксировать, чем снижение интенсивности свечения от максимального показателя. За счет этого увеличивается чувствительность детекции.

Ответ:

>AAB08064.1 Enhanced Green Fluorescent Protein [Cloning vector pEGFP-N3]

1 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC
 61 GCGGACGТАА ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC
 121 GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCACCC
 181 CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
 241 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
 301 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG
 361 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC
 421 AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
 481 GGCATCAAGG TGAАСТTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC
 521 GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
 601 TACC{TGA[GCA CCCAGTCCGC CC}TGA}GCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC
 661 CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAGTAA

Nt.Bpu10I
 5'-CC|TNAGC-3'
 3'-GGANT|CG-5'

Nb.Bpu10I

N — любой мононуклеотид (A, T, G или C)

1. Сайты узнавания и разрезания: Nt.Bpu10I (604 и 622) и Nb.Bpu10I (607 и 625). (0,4 балла)
2. «Выщепляемый» олигонуклеотид — TGAGCACCCAGTCCGCCC (для Nt.Bpu10I) GCACCCAGTCCGCCCTGA (для Nb.Bpu10I) => длина выщепляемого олигонуклеотида составляет 18 нп. (0,4 балла)
3. Названия цепей ДНК — транскрибируемая (матричная) и нетранскрибируемая (кодирующая). (0,2 балла)

Вопрос 3

«Выключение» флуоресценции eGFP проводили за счет внесения точечной мутации в критические кодоны гена eGFP — 204–206 а.о. В таблице ниже представлены данные кодоны. Используя таблицу генетического кода пропишите все возможные мутации, вызванные однонуклеотидной заменой. Какая из мутаций позволит получить нефлуоресцентный вариант eGFP? (4 балла)

№кодона и аминокислота	204 Thr	205 Gln	206 Ser
Кодон, 3'-5'	ACC	CAG	UCC
Замены			
Мутации			

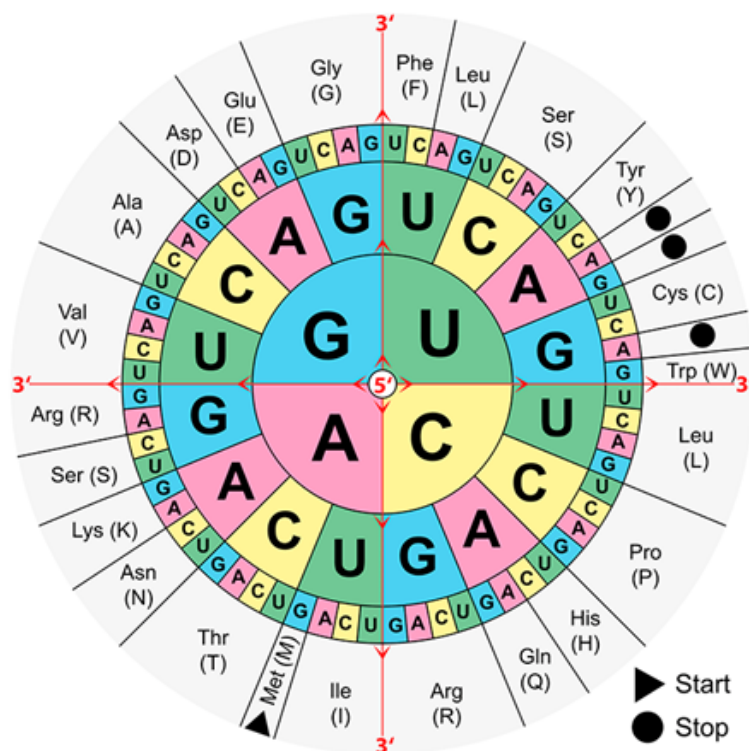


Рис. VI.2.1. Таблица генетического кода

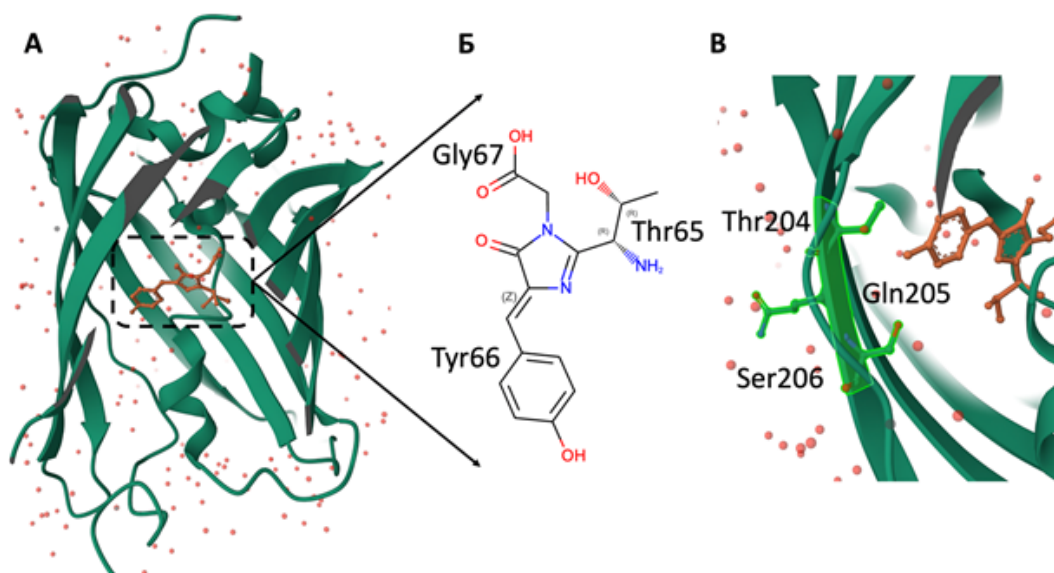


Рис. VI.2.2. Трехмерная кристаллическая структура белка eGFP (PDB ID 2Y0G). А — расположение хромофора; Б — строение хромофора; В — взаимодействие хромофора с мутируемыми аминокислотами Т204, Q205, S206. Красными шариками обозначены молекулы воды

Какие еще мутации теоретически могут привести к снижению интенсивности флуоресценции? Найдите их и объясните с чем это связано, ориентируясь на рис. VI.2.2.

Ответ:

№кодона и аминокислота	204 Thr	205 Gln	206 Ser
Кодон, 3'-5'	ACC	CAG	UCC
Замены (<i>1,5 балла</i>)	610T>C / G / A 611G>T / C / A 612G>T / C / A	613G>T / C / A 614T>C / G / A 615C>T / G / A	616A>T / C / G 617G>T / C / A 618G>T / C / A
Мутации (<i>1,5 балла</i>)	T204 A / P / S N / S / I = / = / =	Q205 K / E / * R / P / L = / H / H	S206 T / A / P Y / C / F = / = / =

1. Мутация Q205* приведет к полной потере флуоресценции, поскольку образуется стоп-кодон, препятствующий дальнейшему синтезу белка. (*0,5 баллов*)
2. Мутации смены класса аминокислоты могут привести к снижению интенсивности флуоресценции, поскольку это сильнее влияет на микроокружение активного центра белка. Вероятные мутации выделены в таблице. Для мутаций, обозначенных зеленым цветом, изменения интенсивности флуоресценции будет изменяться незначительно, поскольку они положительно заряжены и стабилизируют хромофор. (*0,5 баллов*)

Вопрос 4

Таковую же операцию провели и для кодона 207 и смогли получить мутацию, которая не только на скрининге показала близкую к нулю интенсивность флуоресценции. Данная мутация позволяет исследовать пару нуклеотидов G:C. Включая различные модификации напротив этих нуклеотидов, можно изучать биохимические процессы их преодоления клеткой. Ниже приведен пример такого взаимодействия — G:X, где X — вносимое повреждение. Ориентируясь на данную схему, пропишите аналогич-

ную для найденной инактивирующей мутации из вопроса 3. (1 балл)

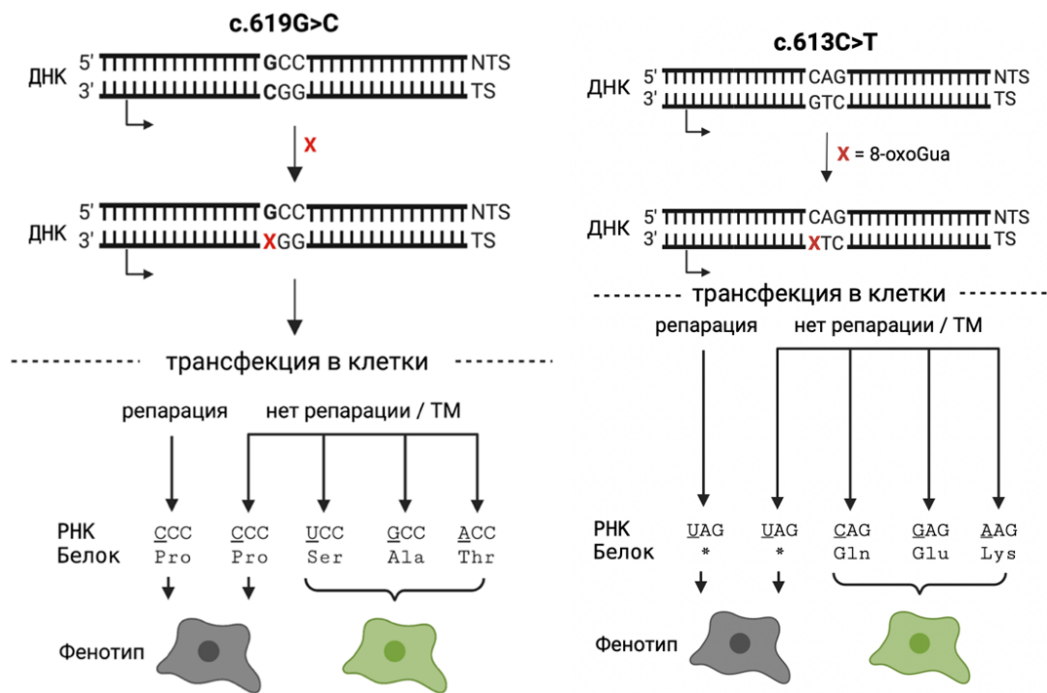


Рис. VI.2.3. Слева — задача, справа — ответ

Анализ трансфекции и результаты репарации проводят с помощью проточной цитометрии. Проточная цитометрия — это метод сортировки клеток в зависимости от их флуоресценции. Поскольку используемая репортерная система основана на нефлуоресцирующем варианте белка eGFP, дополнительно проводят котрансфекцию, то есть трансфекцию двумя плазмидами — маркерной (постоянно экспрессирующей флуоресцентный белок) с плазмидой и исследуемой (гена нефлуоресцентного варианта eGFP с повреждением, который в отсутствие репарации будет восстанавливать свою флуоресценцию). Восстановление флуоресценции обеспечивается РНК-полимеразой, когда она включает неверный рибонуклеотид напротив повреждения. Такое явление называется транскрипционным мутагенезом. Простыми словами, РНК-полимераза ошибается и в результате при трансляции часть белка синтезируется с неверной аминокислотной последовательностью — мутантной.

Проточный цитометр выдает графики распределения клеточных популяций в зависимости от флуоресценции. Каждая точка отражает одну клетку, расположение соответствует интенсивностью флуоресценции маркерного белка (BFP — голубой флуоресцентный белок) и исследуемого (eGFP). Чем выше интенсивность флуоресценции клетки, тем больше молекул флуоресцентного белка в клетке и тем дальше от нуля располагается точка на графике.

Ответ: см. рис. VI.2.3.

Вопрос 5

Клеточные популяции, дефицитные по основным генам эксцизионной репарации оснований, были котрансфицированы либо исходной конструкцией, либо конструкцией, в которую был внесен 8-оксогуанин (вопрос 4), совместно с белком BFP. После анализа на проточном цитометре получились следующие распределения клеточных популяций (рис. 05):

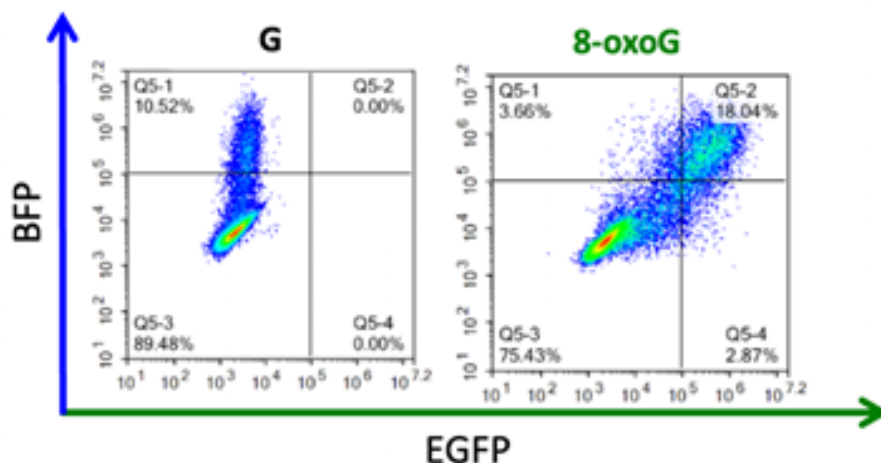


Рис. VI.2.4

Объясните причину смещения клеточной популяции, трансфицированной конструкцией с повреждением, в правую полуплоскость. (1 балл)

Ответ:

1. Конструкция «G» является контрольной и кодирует нефлуоресцентный вариант eGFP \Rightarrow данные клетки флуоресцируют BFP и не флуоресцируют eGFP. (0,5 баллов)
2. Клеточная популяция дефицитна по основным генам репарации BER \Rightarrow в данных клетках 8-оксогуанин не репарируется \Rightarrow РНК-полимераза включает неверные основания, которые приводят к мутациям, восстанавливающим флуоресценцию eGFP \Rightarrow клетки флуоресцируют и BFP, и eGFP. Поэтому, появляющаяся флуоресценция eGFP способствует смещению клеточной популяции вправо — растет по оси интенсивности eGFP. (0,5 баллов)

Задача VI.2.4.2. Никазы и конструкции (8 баллов)

Система CRISPR/Cas9 за последнее десятилетие произвела революцию в области редактирования генов. CRISPR представляет собой семейство ДНК-последовательностей, которые были обнаружены в геномах прокариот. Эти последовательности были приобретены в результате инфицирования бактериофагами и представляют собой повторы, разделенные *спейсерами* — включенными частями генома бактериофага. Такие последовательности стали использоваться для обнаружения и уничтожения ДНК подобных бактериофагов при последующих заражениях. Таким образом, CRISPR-последовательности играют ключевую роль в системе антифаговой защиты прокариот и обеспечивают форму приобретенного иммунитета.

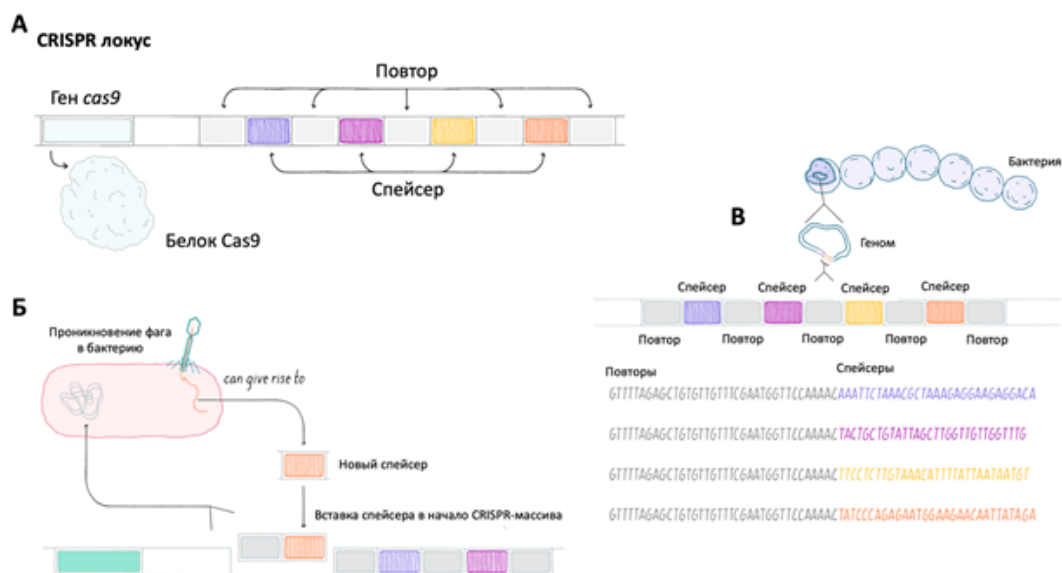


Рис. VI.2.5. Структура CRISPR-локуса

- А — Расположение Cas-генов относительно CRISPR-массива.
- Б — Приобретение новых спейсеров CRISPR. После инвазии бактериофага часть фагового генома расщепляется, и эта ДНК (теперь называемая спейсером) вставляется в передний конец массива CRISPR в бактериальном геноме.
- В — Массив CRISPR в геноме бактерий. Повторы идентичны по последовательности, в то время как каждый спейсер отличается. Таких повторов-спейсеров может быть до 50.

Вопрос 1

Белок *spCas9* состоит из важных функциональных доменов. Найдите их на рис. VI.2.6, подпишите и укажите функцию. (1 балл)

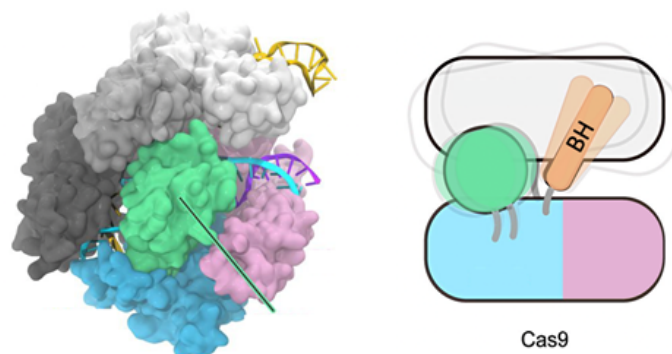


Рис. VI.2.6

Обозначения нуклеиновых кислот:

- Желтый — направляющая РНК;
- Розовый — кодирующая цепь ДНК;
- Циановый-синий — матричная цепь ДНК.

Cas9 представляет собой метал-зависимый рибонуклеопротеиновый комплекс. На рисунке ниже под буквой **А** изображены активные сайты двух метал-зависимых до-

менов Cas9. Розовым цветом выделена наиболее важная аминокислота в активном центре. Рядом (буква **Б**) представлен механизм действия одного из доменов.

Ответ:

1. REC-lobe (REC1, REC2, REC3) — распознавание гетеродуплекса и подталкивание HNH к сайту разрезания. *(0,45 баллов)*
2. NUC-lobe (HNH + RuvC + PI / CTD) — внесение оц. разрывов RuvC и HNH в неадресуемую и адресуемую цепи, соответственно + распознавание PAM. *(0,45 баллов)*
3. VH — связывание долей REC и NUC. *(0,1 балла)*

Вопрос 2

Определите основную каталитическую функцию доменов под буквой А (она идентична для обоих доменов), а также объясните почему для активности доменов необходим ион металла. Напишите продукты, которые образуются в результате реакций под буквой Б. *(2 балла)*

Ковалентную с Гликозилазой необходимо выяснить какой именно ион металла обеспечивает наибольшую активность Cas9. Для этого они использовали для реакции все возможные металлы, которые у них были — Mg, Mn, Ca, Zn, Co, Ni, Cu. Продукты данной реакции представлены на рисунке ниже под буквой **В**.

Ответ:

1. На рисунке под буквой А изображены нуклеазные домены RuvC и HNH, основная функция которых — внесение оц-разрывов. *(1 балл)*
2. Ион металла необходим для стабилизации фосфатной группы сахарофосфатного остова цепи ДНК и смещения электронной плотности молекулы воды. *(0,5 баллов)*
3. Разрыв фосфодиэфирной связи с сохранением 3'-ОН и 5'-PO₄ (стандартной направленности). *(0,5 баллов)*

Вопрос 3

Проанализируйте результаты эксперимента под буквой В, проведенного отрядом 4СМР. Объясните различия в продуктах реакции и определите наилучшие условия для активности Cas9. С помощью каких компонентов можно запустить реакцию гидролиза Cas9? *(2 балла)*

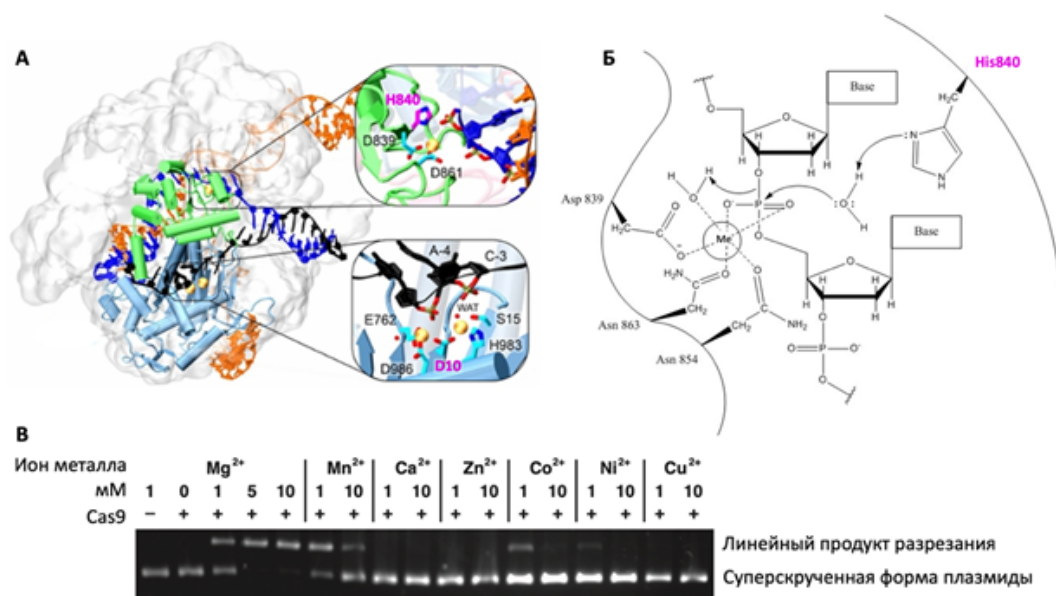
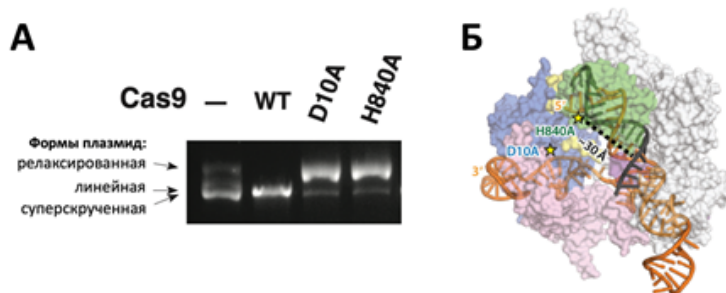


Рис. VI.2.7

Обозначения нуклеиновых кислот:

- Желтый — направляющая РНК;
- Розовый — кодирующая цепь ДНК;
- Циановый-синий — матричная цепь ДНК.

На основе белка Cas9 были получены генноинженерные никазы — эндонуклеазы, способные вносить одноцепочечные разрывы в одну из цепей ДНК, но не являющиеся оригинально эндонуклеазами рестрикции. Было показано, что мутанты Cas9 с точечными заменами H840A и D10A в каталитических доменах при гидролизе плазмид дают преимущественно продукты в релаксированной форме, в то время как белок Cas9 дикого типа гидролизует ДНК до линейной формы. На основе данных замен был получен dCas9 — «мертвый» белок Cas9, способный только нацеливаться на ДНК.



Ответ:

1. В результате реакции должен преимущественно образовываться линейный продукт, т. к. вносятся два оц-разрыва на разных цепях ДНК напротив друг друга, обеспечивая дц-разрыв. Как видно по рисунку, максимальное расщепление обеспечивается для ионов магния в концентрации 5–10 мМ. (1 балл)
2. Как видно из контролей реакций (первые две дорожки) разрезания плазмиды не происходит в отсутствие ионов металла. При этом для запуска реакции,

также необходим и сам субстрат — ДНК. В его отсутствие реакция также не будет проходить. (1 балл)

Вопрос 4

Как и вы в экспериментах первого дня, Ковалентик и Гликозилазка будут вносить однонуклеотидную модификацию в определенную область плазмиды pUC19:

```
5' - ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACASACAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAG |
   ↪ GCCTGGGG
3' - TATCGASAAAGGACASACSTTTAACAATAGGCGAGTGTTAAGGTGTGTTGTATGCTCGGCSTTCGTATTTACATTT |
   ↪ CGGACCCC
```

Для этого им нужно выбрать наилучшую комбинацию направляющих комплексов tracr-crRNA-b1, tracr-crRNA-b3, tracr-crRNA-b4 и tracr-crRNA-t1:

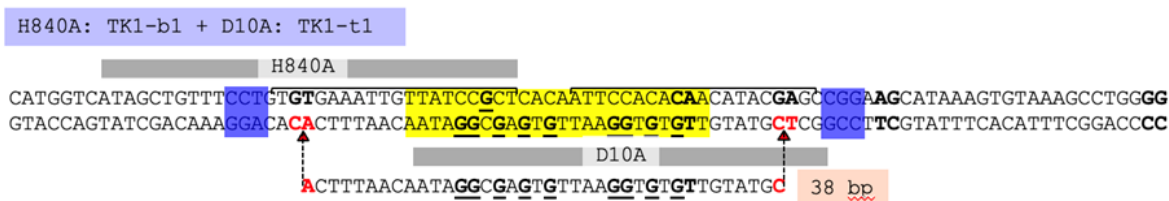
```
b1 - 5' - AGCGGAUAACAUUUCACACGUUUUAGAGCUAGA-3'
b3 - 5' - CUUCCGGCUCGUAUGUUGUGUUUUAGAGCUAGA-3'
b4 - 5' - GGUUUACACUUUAUGCUUCGUUUUAGAGCUAGA-3'
t1 - 5' - AUUCCACASACAUAACGAGCGUUUUAGAGCUAGA-3'
tracr - 5' - GAAUAGCAAGUUAUUUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
```

Найдите сайты вносимых одноцепочечных разрывов Cas9-никазами, которые были использованы в эксперименте с никированием, — nCas9^{H840A}-crRNA^{b1} и nCas9^{D10A}-crRNA^{t1}. Какую Cas9-никазу необходимо использовать для направляющих РНК tracr-crRNA-b3 и tracr-crRNA-b4, чтобы вносимые разрывы позволяли в дальнейшем получить оц-брешь в комбинации с nCas9^{H840A}-crRNA^{b1}? Объясните почему. Для всех вариантов обозначьте РАМ и протоспейсер, если используются никазы на основе spCas9. Также, напишите комплементарное расположение повтора и антиповтора crRNA и tracrRNA, соответственно. (2 балла)

Экспериментальным образом был определен футпринт (footprint) белка Cas9 — область ДНК, покрываемая белком Cas9 с учетом не только сайта связывания, но и прилегающих аминокислотных остатков, формирующих полную структуру белка. Данные о футпринте Cas9 разнятся. На основе 3D-модели было выявлено, что футпринт Cas9 содержит 26 пн. Но биохимический анализ демонстрирует, что белок покрывает 25 пн. Максимальное расчетное значение футпринта Cas9 составляет 35 пн, где 10 нуклеотидов выходят за РАМ.

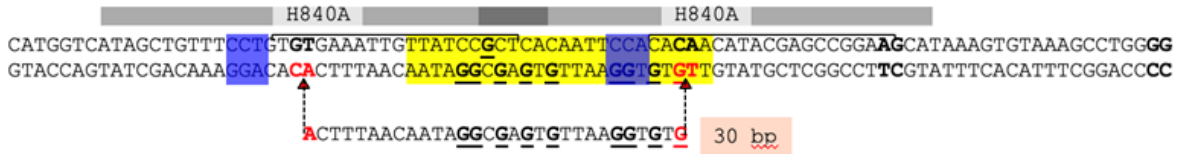
Ответ:

1. Сайты разрезания nCas9^{H840A}-crRNA^{b1} и nCas9^{D10A}-crRNA^{t1}. (0,5 баллов)

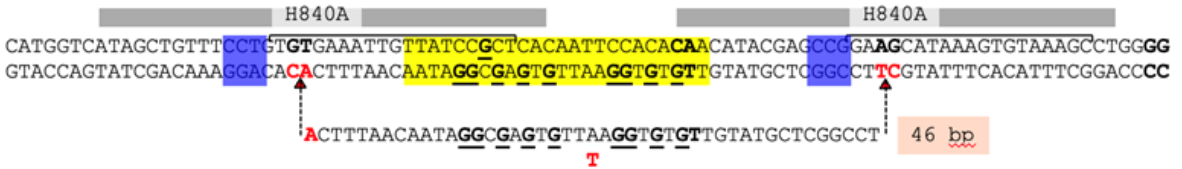


2. nCas9^{H840A}, поскольку с crRNA b1-b4 она позволяет вносить оц-разрыв в ту же цепь. (0,5 баллов)
3. (0,5 баллов)

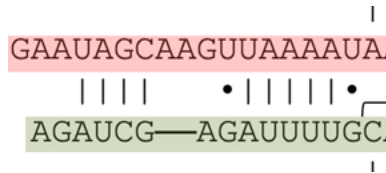
H840A: TK1-b1 + TK1-b3



H840A: TK1-b1 + TK1-b4



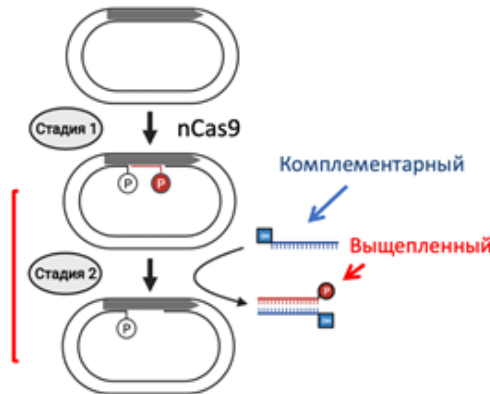
4. (0,5 баллов)



- розовый — tracrRNA;
- зеленый — crRNA.

Вопрос 5

Для метода получения репортерных плазмид с однонуклеотидной модификацией важную роль играет длина оц-бреши. Чем ближе друг к другу расположены сайты оц-разрывов, тем ниже температура плавления и тем легче будет удалить «выщепленный» олигонуклеотид между ними. Для комбинации nCas9^{H840A}-crRNA^{b1} с nCas9^{D10A}-crRNA^{t1} и определенных в **вопросе 4** вычислите длину «выщепляемого» олигонуклеотида и найдите наилучшую пару для метода получения репортерных плазмид с однонуклеотидной модификацией. Для нее напишите последовательность комплементарного олигонуклеотида в направлении 5'→3'. (1 балл)



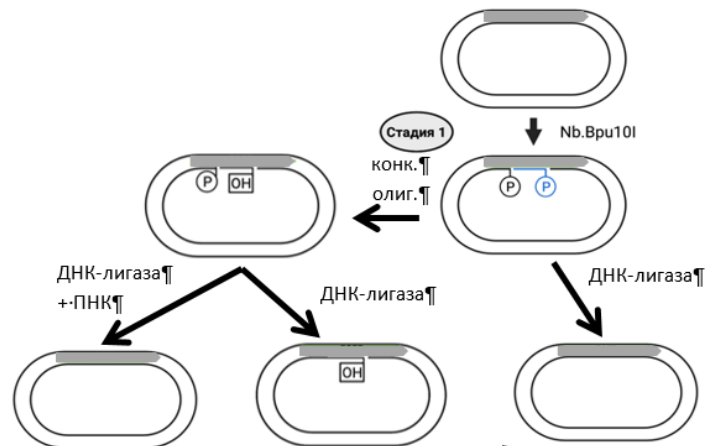
Ответ:

1. Длины «выщепляемых» олигонуклеотидов указаны в ответе на вопрос 4. Наилучшей парой является $nCas9^{H840A}$ -crRNA^{b1} и $nCas9^{D10A}$ -crRNA^{t1}, поскольку позволяет давать олигонуклеотид наименьшей длины без перекрытия футпринтов $nCas9$. (0,5 баллов)
2. 5'-TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG-3' (0,5 баллов)

Этап 2. Аналитическое лигирование

Силы Ковалентика и Гликозилазки уже на исходе! Целый день трудились, работали не покладая рук, в поте лица и с такими далекими мечтами об успехе...

- Ох-ох-ох, Ковалентик! Я не знаю, как мне быть...
- Гликозилазка, почему на тебе лица нет? — взволнованно ответил Ковалентик.
- Я сходила на межсубъединичный трансиллюминатор... Сделала фотографии нашего агарозного геля, и...
- Ну же, Гликозилазка, не томи!
- Результаты неоднозначные... Нам необходим план Б.
- Давай сообщим об этом капитану HNH и спросим совета? Не переживай, Гликозилазка, мы обязательно сможем получить репортерные конструкции и помочь отделу эксцизионной репарации оснований!



В этапе 1 вы провели первые этапы получения репортерной плазмиды с однонуклеотидной модификацией. При помощи рибонуклеопротеиновых комплексов $nCas9^{H840A}$ -tracrRNA-crRNA^{b1} и $nCas9^{D10A}$ -tracrRNA-crRNA^{t1} вам удалось внести оц-разрывы в одну из цепей плазмиды pUC19. Затем вы провели отжиг комплементарных нуклеотидов, связавших выщепленную область между двумя оц-разрывами, и тем самым получили оц-брешь длиной 38 пн.

Организаторы провели агарозный гель-электрофорез с предоставленными вами образцами для анализа. Но полученных результатов недостаточно для полной уверенности, чтобы сказать о точном присутствии оц-бреши в плазмидных конструкциях. Чтобы подтвердить это, проводят аналитическое лигирование — берут небольшое количество ДНК (50–100 нг) и лигируют синтетический олигонуклеотид на место предполагаемой бреши. Для этого используют два фермента — ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу (ПНК или РНК), а также нефосфорилированные олигонуклеотиды. Если при добавлении всех компонентов реакции преимущественно образуется

ковалентно-замкнутая форма плазмиды, то можно с уверенностью утверждать, что конструкция содержит оц-разрыв.

Практическая часть

Вам предстоит провести аналитическое лигирование плазмидных конструкций, полученных на прошлом этапе на присутствие одноцепочечной бреши в транскрибируемой цепи плазмиды pUC19.

Фосфорилирование конкурентных олигонуклеотидов

Материалы и оборудование

- Реакционная смесь после очистки: **N-3-2**;
- Конкурентные олигонуклеотиды (2 мкМ): **oligo**;
- Реакционный буфер для T4 ДНК лигазы (10x, «Thermo Fisher Scientific»): **lig buf 10x**;
- Реакционный буфер для T4 ДНК лигазы (1x, «Thermo Fisher Scientific»): **lig buf 1x**;
- T4 полинуклеотидкиназа (10 Ед.Акт./мкл, «СибЭнзим»): **T4 ПНК**;
- T4 ДНК-лигаза (4 Ед.Акт./мкл, «Thermo Fisher Scientific»): **ДНК лиг**;
- Деионизированная вода: **mQ**;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл);
- Пробирки (0,6 мкл);
- ПЦР-амплификатор (1 шт)/настоольный термостат (2 шт);
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм).

Протокол

1. Разведите плазмидную ДНК **N-3-2** до конечной концентрации 20 нг/мкл и объема — 25 мкл — заполнив таблицу ниже (*обратитесь к организаторам, чтобы получить результаты измерения концентрации*):

Реагент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Добавить, мкл
Плазмидная ДНК	_____ нг/мкл	20 нг/мкл	_____
mQ	—	—	_____
Итоговый объем реакционной смеси, мкл			25

2. В 4-х пробирках замешайте реакционные смеси **N-1-1-4**, соответственно (обязательно подпишите пробирки!):

Реагент	N-1-1	N-1-2	N-1-3	N-1-4
	Добавить, мкл			
Плазмидная ДНК	5,0	5,0	5,0	5,0
mQ	8,5	8,5	5,6	4,6
Лигазный буфер 10x	1,5	1,5	1,5	1,5
Конкурентные олигонуклеотиды	—	—	2,9	2,9

Реагент	N-1-1	N-1-2	N-1-3	N-1-4
	Добавить, мкл			
Т4 ПНК (4 Ед.Акт./мкл)	–	–	–	0,5
Итоговый объем смеси, мкл	15,0	15,0	15,0	15,5

3. Тщательно перемешайте реакционные смеси **N-1-1-4**, сбросьте жидкость при помощи короткого микроцентрифугирования и инкубируйте в ПЦР-амплификаторе на следующей программе или используйте настольные термостаты:

4 °С	2 мин
37 °С	30 мин
80 °С	10 мин
4 °С	∞

4. Добавьте лигазный буфер 1x или Т4 ДНК-лигазу согласно таблице:

Реагент	1	2	3	4
Фосфорилр. реакционная смесь	15,0	15,0	15,0	15,5
Лигазный буфер 1x	5,0	–	–	–
Т4 ДНК лигаза (0,4 Ед.Акт./мкл)	–	5,0	5,0	5,0
Итоговый объем смеси, мкл	20,0	20,0	20,0	20,5

5. Тщательно перемешайте реакционные смеси **N-1-1-4**, сбросьте жидкость коротким микроцентрифугированием и инкубируйте в ПЦР-амплификаторе на следующей программе или используйте настольные термостаты:

4 °С	2 мин
37 °С	60 мин
65 °С	15 мин
4 °С	∞

Заливка агарозного геля

Материалы и оборудование

- Агароза;
- Буфер ТАЕ 1x (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА-NaOH (рН 8,3));
- Бромистый этидий (10 мг/мл);
- Заливочный столик;
- Ванночка для заливки;
- Гребенка на 10 дорожек;
- Настольные весы;
- Микроволновая печь/нагревательная плитка;
- Коническая колба (500 мл);
- Фольга;

-
- Мерный цилиндр (100 мл);
 - Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
 - Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В конической колбе взвесьте 1,2 г агарозы и растворите ее в 150 мл ТАЕ 1х.
2. Нагрейте раствор до закипания и охладите при комнатной температуре.
3. Соберите установку для заливки: заливочный столик, ванночка для заливки и гребенка.
4. Добавьте 7,5 мкл бромистого этидия в расплавленную и охлажденную агарозу перемешайте и залейте в ванночку.
5. Дождитесь полной полимеризации агарозы.

Подготовка образцов

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-1-1-4**;
- Бромфеноловый синий;
- Деионизированная вода;
- Пробирки (0,6 мл);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В пробирки **N-1-1-4** добавьте по 2 мкл бромфенолового синего и тщательно перемешайте пипетированием.
2. Пробирку **N-3-2** сдайте организаторам.

Гель-электрофорез

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-1-1-4**;
- ДНК-маркер (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 пн; «СибЭнзим»);
- Буфер для электрофореза (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА-NaOH (рН 8,3), 0,5 мкг/мл бромистый этидий);
- 0,8%-ный агарозный гель в ванночке для заливки;
- Камера для электрофореза;
- Источник напряжения;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. Соберите установку для электрофореза: камера, источник напряжения и ванночка с агарозным гелем. Залейте буфер для электрофореза.
2. Нанесите образцы на агарозный гель.

3. Нанесите 6 мкл ДНК-маркера.
4. Вести электрофорез при 110 В в течение 30 мин.
5. Зафиксируйте результат электрофореза на гель-документирующей системе.

Теоретическая часть

Задача VI.2.4.3. Бромистый этидий (9 баллов)

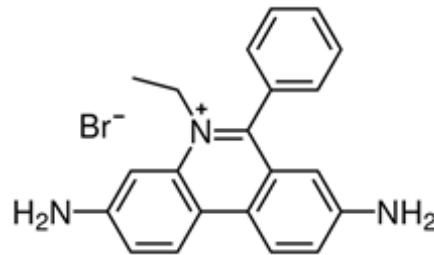


Рис. VI.2.8

Бромистый этидий — это флуоресцентный краситель, используемый для детекции нуклеиновых кислот. Молекула бромистого этидия необратимо связывается с двумя цепями, поэтому данное вещество представляет собой опасный мутаген. Матричные ферменты, такие как, ДНК- и РНК-полимеразы натываются на бромистый этидий и не могут преодолеть его. Таким образом, биосинтез в клетке останавливается.

Агароза представляет собой линейный полисахарид, получаемый при очистке агара из красных водорослей от агаропектина. Агароза представляет собой белый порошок, который плавится в кипящей жидкости и формирует гелеобразную структуру после застывания. Благодаря данному свойству, агароза стала активно применяться в генетической инженерии. Варьируя концентрацию (процентность раствора) агарозы, можно изменять размер пор, формируемых линейными полисахаридными цепями. Таким образом, молекулы ДНК способны разделяться, застревают и проскакивают в этих порах.

Вопрос 1

Ковалентик и Гликозилазка сильно торопятся и никак не могут сосредоточиться, чтобы приготовить 0,8%-й агарозный гель с бромистым этидием (EtBr). Помогите им определить навеску агарозы (306,267 г/моль), необходимую для приготовления 130 мл 0,8%-го раствора агарозы, а также сколько нужно добавить мкл EtBr до конечной концентрации в этом растворе 0,5 мкг/мл EtBr, если стоковая концентрация составляет 10 мкг/мл. В ответе укажите массу навески агарозы в мг, а также объем EtBr (10 мкг/мл) в мкл с точностью до 2-го знака после запятой. (3 балла)

Ответ:

1. Для приготовления 130 мл 0,8%-ного раствора агарозы необходимо взвесить $130 \times 0,8/100 = 1,04 \text{ г} = 1040,00 \text{ мг}$. (1,5 балла)
2. Необходимо добавить $130 \times 0,5/10 = 6,5 \text{ мкл}$ бромистого этидия. (1,5 балла)

Для анализа продуктов аналитического лигирования крайне важно добавить бромистый этидий в буфер для электрофореза. Бромистый этидий, как интеркалирующий агент (связывающийся с молекулой ДНК), изменяет свойства молекулы ДНК,

такие как вес, конформация, гибкость и заряд. Таким образом, EtBr может иметь решающее значение для определения близких размеров молекул или их формы.

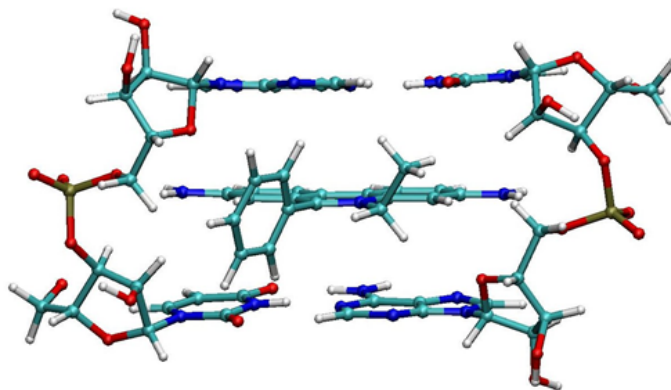


Рис. VI.2.9

Вопрос 2

Изучите рисунок VI.2.9 и напишите тип взаимодействия между бромистым этидием и основаниями пар нуклеотидов. Например, вторичная структура ДНК по большей части обеспечивается водородными взаимодействиями. (1 балл)

Ответ: Между молекулой бромистого этидия и дцДНК возникают слабые взаимодействия, также известные как, стэкинг-взаимодействия (между гетероциклами).

Код пробирки	Реакционная смесь	Состав
N-1-0	Отрицательный контроль	<ol style="list-style-type: none"> 100 нг pUC19 (2686 пн); 1x буфер КЖ (20 мкМ Трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ КСl, 5%-ный глицерин, 1 мМ ДТТ); 10 мМ MgCl₂.
N-2-1	Образец после получения оц-бреши	<ol style="list-style-type: none"> ~100 нг pUC19; 1x буфер КЖ (20 мкМ Трис-НСl (рН 7,5), 100 мМ КСl, 5%-ный глицерин, 1 мМ ДТТ); 10 мМ MgCl₂; ~4,8 мкМ олигонуклеотидов (38 пн); 1,6 мкМ tracrРНК-crРНК (101 п); 1,6 мкМ Cas9-никазы.
N-3-3	Образец после очистки	???

Вопрос 3

Проанализируйте результаты гель-электрофореза вашей команды (5 баллов):

1. Продукты какой длины наблюдаются в каждой дорожке?
2. В какой области расположен целевой продукт (плазида с оц-брешиью)?

3. Как вы думаете, может ли бромистый этидий взаимодействовать с молекулой РНК?
4. Основываясь на результаты команды №1, предположите, что происходит с образцом после этапа очистки?
5. В качестве контрольного образца вам была предоставлена очищенная плазмида рUC19 длиной 2686 пн. То есть, в смеси нет других плазмид и молекул ДНК иной длины. Почему в отрицательном контроле (без добавления нуклеаз) присутствует несколько продуктов?

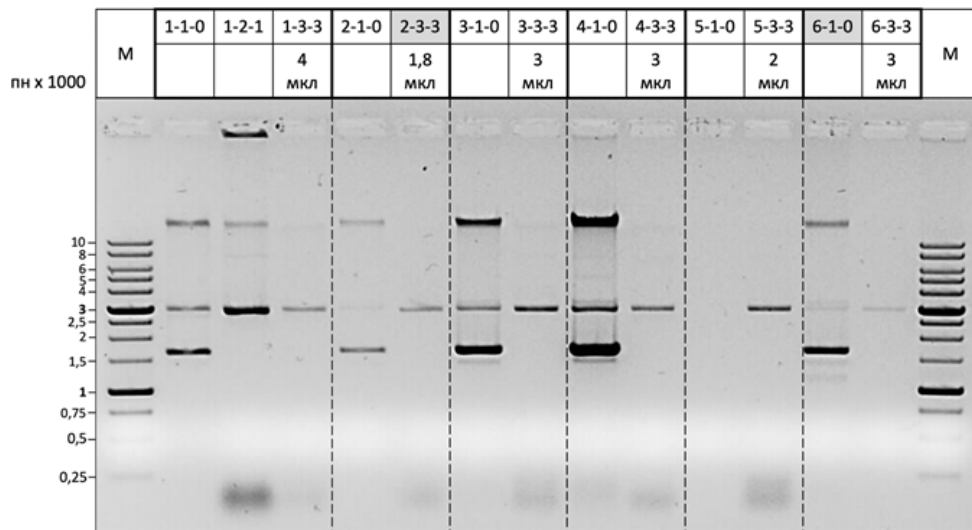


Рис. VI.2.10. Фотография 0,8%-го агарозного геля с образцами, предоставленными участниками в 1-й день. М — ДНК-маркер, выделенные образцы были предоставлены организаторами

Ответ:

1. (1 балл)

1 команда	1 — > 10 kb + 3 kb + 1,5 < x < 2 kb 2 — > 10 kb + 3 kb + < 0,25 kb 3 — 3 kb(+ < 0,25 kb)
2 команда	1 — > 10 kb + 3 kb + 1,5 < x < 2 kb 2 — 3 kb+ < 0,25 kb
3 команда	1 — > 10 kb + 3 kb + 1,5 < x < 2 kb 2 — 3 kb+ < 0,25 kb
4 команда	1 — > 10 kb + 3 kb + 1,5 < x < 2 kb 2 — 3 kb+ < 0,25 kb
5 команда	2 — 3 kb+ < 0,25 kb
6 команда	1 — > 10 kb + 3 kb + 1,5 < x < 2 kb (+ 1 < x < 1,5 kb) 2 — 3 kb+ < 0,25 kb

2. Целевой продукт расположен в области 3kb. (1 балл)
3. Бромистый этидий встраивается в дц-нуклеиновые кислоты между парами оснований. Поскольку РНК также может формировать дуплексы, то и бромистый этидий может связываться с молекулой РНК. (1 балл)
4. В результате очистки остается только целевой продукт, уходят олигонуклеоти-

ды, РНК и мультимерные формы. (1 балл)

5. Это связано с тем, что плазида как правило находится в двух состояниях. Со временем она накапливает оц-разрывы и переходит в релаксированную форму, которая движется медленнее суперскрученной формы — истинной, без разрывов фосфодиэфирных связей. (1 балл)

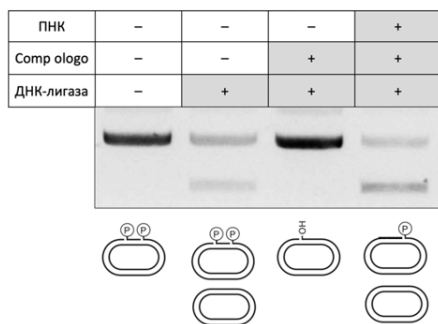
Задача VI.2.4.4. Аналитическое лигирование (3 балла)

Во 2-й день лабораторных работ вам предложено провести аналитическое лигирование для анализа эффективности (1) внесения оц-разрывов Cas9-никазами и (2) получения оц-бреши. Для этого вы используете два фермента — ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага Т4, а также синтетические олигонуклеотиды. Если бы вы работали с никазами-эндонуклеазами рестрикции, то вам было бы необходимо провести два аналитических лигирования — отдельно для (1) и для (2).

Вопрос 1

На рисунке VI.2.11 изображены результаты двух аналитических лигирований для (1) и (2), соответственно. Ориентируясь на состав реакционной смеси (таблица), продукты реакций и их схематичное изображение под фотографией агарозного геля для аналитического лигирования двух оц-разрывов, дорисуйте недостающие схемы 1? и 2? для аналитического лигирования оц-бреши. (2 балла)

Аналитическое лигирование: оц-разрывы



Аналитическое лигирование: оц-брешь

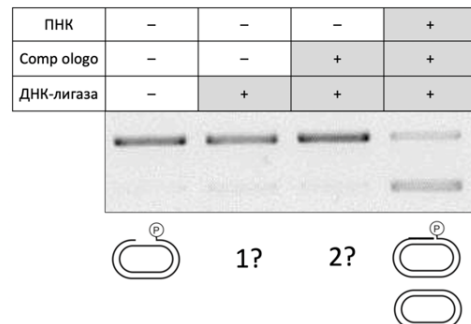


Рис. VI.2.11. Фотографии 0,8%-ных агарозных гелей с продуктами реакций аналитического лигирования оц-разрывов и оц-бреши

Ответ:



Рис. VI.2.12. Фотографии 0,8%-ных агарозных гелей с продуктами реакций аналитического лигирования оц-разрывов и оц-бреши

Вопрос 2

Объясните различие в продуктах реакций аналитического лигирования оц-разрывов и аналитического лигирования оц-бреши, расположенных на вторых дорожках (где добавлена только ДНК-лигаза). (1 балл)

Ответ: это связано с тем, что при наличии двух оц-разрывов, они способны лигироваться Т4 ДНК-лигазой. Что не может произойти с оц-брешью, поскольку там нет нескольких нуклеотидов и фосфодиэфирная связь просто не может восстановиться. (1 балл)

Задача VI.2.4.5. Отжиг (3 балла)

В 1-й день лабораторных работ вы проводили отжиг комплементарных олигонуклеотидов, которые связывают выщепленный и образуется оц-брешь. Для внесения оц-разрывов вы использовали комплексы nCas9^{H840A}-tracrRNA-crRNA^{b1} и nCas9^{D10A}-tracrRNA-crRNA^{t1}.

Вопрос 1

Основываясь на последовательности выщепленного олигонуклеотида, определите последовательность комплементарного олигонуклеотида, который необходимо синтезировать Гликозилазке. Последовательность выщепленного олигонуклеотида представлена ниже. Ответ запишите в направлении 5'-3'. (1 балл)

Выщепленный олигонуклеотид:

5'-CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCGA-3'

Ответ: 5'-TGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG-3' (1 балл)

Вопрос 2

Используя упрощенную формулу для оценки температуры плавления дц-олигонуклеотидов: $T_m(^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$, рассчитайте T_m для комплементарного олигонуклеотида. (2 балла)

Ответ: $T_m(^{\circ}C) = 2 \times (13 + 10) + 4 \times (4 + 11) = 106^{\circ}C$.

Этап 3. Препаративное лигирование

— Гликозилазка! Просыпайся! — воодушевленно кричал Ковалентик, параллельно стягивая одеялко с мирно спящей Гликозилазки.

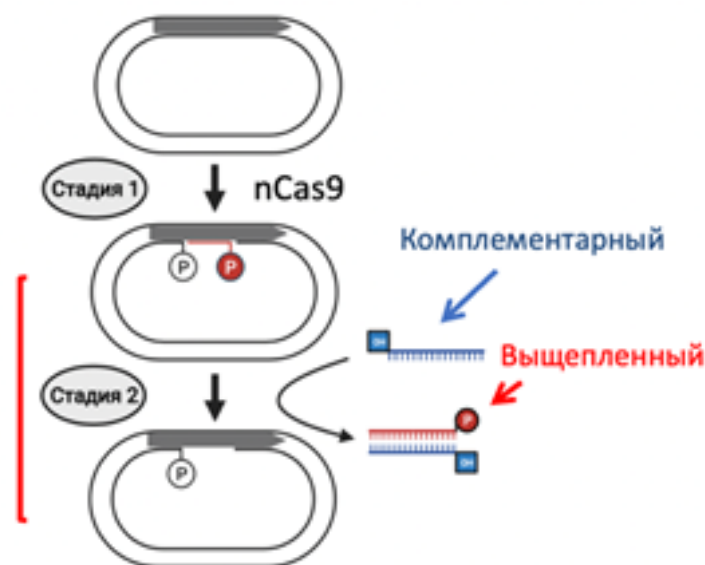
— Ммм... Что такое? Уже моя очередь дежурить? — Гликозилазка получила подушкой по голове от Ковалентика.

— Что?! Да почему ты так себя ведешь?! — разозлилась Гликозилазка.

— Гликозилазка, пока ты тут спала, я тут такое сделал! Ты только посмотри!...

Теоретическая часть

В результате аналитического лигирования была получена следующая фотография агарозного геля:



Поскольку для 4-го образца мы наблюдаем присутствие ковалентно замкнутой формы плазмиды (бэнд в районе 1,5–2 kb), можно с уверенностью сказать, что нам удалось получить оц-брешь! Таким образом, теперь можно повторить реакцию лигирования и использовать синтетический олигонуклеотид с повреждением.

Практическая часть

Третий день лабораторных работ разделен на две части. В первую — вам предстоит провести препаративное лигирование для окончательного внесения однонуклеотидных модификаций в плазмиду pUC19.

Фосфорилирование комплементарных олигонуклеотидов

Материалы и оборудование

- Реакционная смесь после очистки **N-3-2**;
- Олигонуклеотиды с модификациями:

Название	Последовательность	Конц., мкМ
Oligo-G	5'-CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA-3'	2
Oligo-8G	5'-CGTATGTTGTGTGXAAATTGTGAGCGGATAACAATTTCA-3' X = 8oxoG	2

- Реакционный буфер для T4 ДНК лигазы (10x, «Thermo Fisher Scientific»): **lig buf 10x**;
- Реакционный буфер для T4 ДНК лигазы (1x, «Thermo Fisher Scientific»): **lig buf 1x**;
- T4 полинуклеотидкиназа (10 Ед.Акт./мкл, «СибЭнзим»): **T4 ПНК**;
- T4 ДНК-лигаза (4 Ед.Акт./мкл, «Thermo Fisher Scientific»): **ДНК лиг**;
- Деионизированная вода: **mQ**;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл);

- Пробирки (0,2 мкл);
- ПЦР-амплификатор (1 шт)/настоольный термостат (2 шт);
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм).

Протокол

1. Разведите плазмидную ДНК N-3-2 до конечной концентрации 20 нг/мкл и объема — 50 мкл — заполнив таблицу ниже (обратитесь к организаторам, чтобы получить результаты измерения концентрации):

Реагент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Добавить, мкл
Плазмидная ДНК	_____ нг/мкл	20 нг/мкл	_____
mQ	—	—	_____
Итоговый объем реакционной смеси, мкл			50

2. В 4-х новых пробирках на 0,2 мкл замешайте реакции по следующей таблице (обязательно подпишите пробирки!):

Реагент	N-1-1	N-1-2	N-1-3	N-1-4
	Добавить, мкл			
Плазмидная ДНК (N-3-2)	15	5	15	5
mQ	13,8	6,6	13,8	6,6
Лигазный буфер 10x	4,5	1,6	4,5	1,6
Олигонуклеотиды G	8,7	2,9	—	—
Олигонуклеотиды 8G	—	—	8,7	2,9
T4 ПНК (4 Ед.Акт./мкл)	3	—	3	—
Итоговый объем смеси, мкл	45,0	15,0	45,0	15,5

3. Тщательно перемешайте реакционные смеси N-1-1-4, сбросьте жидкость при помощи короткого микроцентрифугирования и инкубируйте в ПЦР-амплификаторе на следующей программе или используйте настольные термостаты:

4 °C	2 мин
37 °C	30 мин
80 °C	10 мин
4 °C	∞

4. Добавьте T4 ДНК-лигазу согласно таблице:

Реагент	N-1-1 и N-1-3	N-1-2 и N-1-4
Фосфорилр. реакционная смесь	45,0	15,0
T4 ДНК лигаза (0,1 Ед.Акт./мкл)	15,0	5,0
Итоговый объем смеси, мкл	60,0	20,0

5. Тщательно перемешайте реакционные смеси, сбросьте жидкость коротким микроцентрифугированием и инкубируйте в ПЦР-амплификаторе на следующей программе или используйте настольные термостаты:

4 °C	2 мин
22 °C	60–30 мин
70 °C	5 мин

4 °C	∞
------	---

6. Тщательно перемешайте реакционную смесь и отберите аликвоты по 10 мкл плазмидной ДНК из пробирок **N-1-1** и **N-1-3** на анализ. Далее пробирки с аликвотами будут обозначаться как **N-1-5** и **N-1-6**.
7. Сдайте пробирки **N-1-1**, **N-1-3** и **N-3-2** организаторам.

Заливка агарозного геля

Материалы и оборудование

- Агароза;
- Буфер ТАЕ 1x (40 mM Трис-ацетат (pH 8,0), 1 mM ЭДТА-NaOH (pH 8,3));
- Бромистый этидий (10 мг/мл);
- Заливочный столик;
- Ванночка для заливки;
- Гребенка на 10 дорожек;
- Весы;
- Микроволновая печь/нагревательная плитка;
- Коническая колба (500 мл);
- Фольга;
- Мерный цилиндр (100 мл);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В конической колбе взвесьте 1,2 г агарозы и растворите ее в 150 мл ТАЕ 1x.
2. Нагрейте раствор до закипания и охладите при комнатной температуре.
3. Соберите установку для заливки: заливочный столик, ванночка для заливки и гребенка.
4. Добавьте 7,5 мкл бромистого этидия в расплавленную и охлажденную агарозу перемешайте и залейте в ванночку.
5. Дождитесь полной полимеризации агарозы.

Подготовка образцов

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа геля **N-1-2**, **N-1-4**, **N-1-5** и **N-1-6**;
- Бромфеноловый синий (**BFP**);
- Деионизированная вода;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В пробирки **N-1-2**, **N-1-4**, **N-1-5** и **N-1-6** добавьте по 2 мкл бромфенолового синего и тщательно перемешайте пипетированием.

- Сбросьте жидкость на дно пробирки при помощи короткого микроцентрифугирования.

Гель-электрофорез

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-1-3, N-1-4, N-1-5 и N-1-6**;
- ДНК-маркер (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 пн; «СибЭнзим»);
- Буфер для электрофореза (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА-NaOH (рН 8,3), 0,5 мкг/мл бромистый этидий);
- 0,8%-ный агарозный гель в ванночке для заливки;
- Камера для электрофореза;
- Источник напряжения;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

- Соберите установку для электрофореза: камера, источник напряжения и ванночка с агарозным гелем. Залейте буфер для электрофореза в камеру.
- Нанесите образцы на агарозный гель по следующей схеме:

№карм.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Нанесение	ДНК маркер	G		8G		G		8G		ДНК маркер
		N-1-1	N-1-5	N-1-3	N-1-6	N-1-1	N-1-5	N-1-3	N-1-6	
Нанести, мкл	6	10	10	10	10	10	10	10	10	6

- Ведите электрофорез при 110 В в течение 30–40 мин.
- Зафиксируйте результат электрофореза на гель-документирующей системе.

Теоретическая часть

Задача VI.2.4.6. ДНК-лигазы и эндонуклеазы рестрикции (6,5 баллов)

Вопрос 1

Объясните принцип действия эндонуклеаз рестрикции. В чем заключается биологический смысл рестриктаз? Какие разновидности данных ферментов выделяют в настоящий момент? *(1,5 балла)*

Ответ:

- Эндонуклеазы рестрикции связываются со своим сайтом узнавания, затем вносят оц-разрыв в каждую из цепей ДНК. *(0,5 баллов)*
- Биологический смысл рестриктаз заключается в обеспечении внутриклеточного иммунитета бактерий. *(0,5 баллов)*

3. Существует несколько классификаций рестриктаз: рестриктазы/никазы; дающие липкие или тупые концы; гидролизующие метилированный или деметилированный сайт; один сайт узнавания и разрезания или разрезание происходит на расстоянии. (за одно любое 0,5 баллов)

Вопрос 2

Среди представленных сайтов узнавания определите какие эндонуклеазы рестрикции являются изошизомерами? Можно ли *Xma I* и *Sma I* назвать изошизомерными рестриктазами? (1 балл)

<i>Xho I</i>	5' C↓T C G A G 3' 3' G A G C T ↑ C 5'	<i>XmaC I</i>	5' C ↓ C C G G G 3' 3' G G G C C ↑ C 5'
<i>Xba I</i>	5' T ↓ C T A G A 3' 3' A G A T C ↑ T 5'	<i>Sal I</i>	5' C ↓ T C G A G 3' 3' G A G C T ↑ C 5'
<i>Xma I</i>	5' C ↓ C C G G G 3' 3' G G G C C ↑ C 5'	<i>Sma I</i>	5' C C C ↓ G G G 3' 3' G G G ↑ C C C 5'
<i>Kpn I</i>	5' G G T A C ↓ C 3' 3' C ↑ C A T G G 5'	<i>Ksp I</i>	5' C C G C ↓ G G 3' 3' G G ↑ C G C C 5'

Ответ:

1. Изошизомеры: *Xho I* и *Sal I*, *Xma I* и *XmaC I*. (0,5 балла)
2. Нельзя, так как сайты гидролиза отличаются. Данные рестриктазы — неизошизомерные. (0,5 балла)

Вопрос 3

Какие два типа продуктов могут давать эндонуклеазы рестрикции? Придумайте примеры соответствующих сайтов разрезания, используя нуклеотидный код (A, T, G, C). (1 балл)

Ответ:

1. Рестриктазы могут давать продукты гидролиза с липкими или тупыми концами. (0,5 балла)
2. (0,5 балла)

Липкие концы	Тупые концы
5' C ↓ C C G G G 3' 3' G G G C C ↑ C 5'	5' C C C ↓ G G G 3' 3' G G G ↑ C C C 5'

Вопрос 4

Какую ДНК-лигазу используют для получения плазмидных конструкций с однонуклеотидным повреждением? Предположите, чем отличается *Taq* ДНК лигаза от *E.coli* ДНК лигазы? (3 балла)

	Т4 ДНК лигаза	Т3 ДНК лигаза	Т7 ДНК лигаза	<i>Taq</i> ДНК лигаза	<i>E.coli</i> ДНК лигаза
Лигирования по липким концам	★★	★★	★★	★	★
Лигирования по тупым концам	★★	★★			

	Т4 ДНК лигаза	Т3 ДНК лигаза	Т7 ДНК лигаза	Taq ДНК лигаза	<i>E. coli</i> ДНК лигаза
Лигирования только липких концов			★★★		
Лигирование одноцепочечных разрывов	★★★	★★	★★	★★	★★

Ответ:

1. Для получения плазмидных конструкций с однонуклеотидным повреждением используют Т4 ДНК-лигазу, поскольку она более эффективно лигирует оц-разрывы. (2 балла)
2. Данные лигазы различаются тем, что Taq ДНК-лигаза, полученная из термофильной бактерии, устойчива к высоким температурам. (1 балл)

Задача VI.2.4.7. Буфер для нанесения ДНК на агарозный гель (4,5 баллов)

В молекулярной биологии для нанесения образцов на агарозный гель используют специальные загрузочные буферы. Как правило, в их состав входят глицерин, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и один или несколько красителей.

Вопрос 1

В чем заключается функция каждого компонента загрузочного буфера? (1,5 балла)

Ответ:

1. Краситель — визуализация. (0,5 баллов)
2. Глицерин — загрузка образца в карман. (0,5 баллов)
3. ЭДТА — связывание катионов металлов. (0,5 баллов)

Вопрос 2

Загрузочный буфер представляет собой концентрированный раствор. Рассчитайте сколько мкл загрузочного буфера бх необходимо добавить к образцу, который будет наноситься на агарозный гель, если его объем составляет 10 мкл. Ответ выразите в мкл и округлите до целых. (1,5 балла)

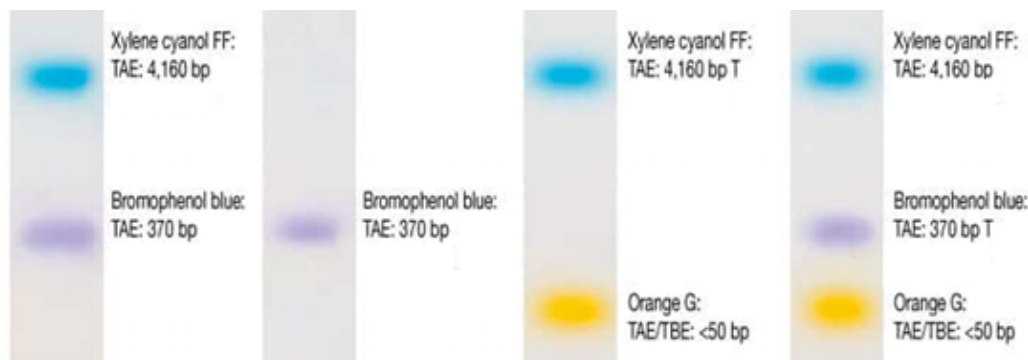


Рис. VI.2.13. TAE — буфер для электрофореза, bp — пар оснований

Ответ:

$$6x \times V = (10 + V) \times 1x,$$

$$6V = 10 + V,$$

$$5V = 10,$$

$$V = 2 \text{ (мкл)}.$$

Вопрос 3

По какой причине при нанесении образцов на агарозный гель в нашей работе мы используем Bromophenol blue (бромфеноловый синий), если длина целевого продукта находится в районе 3 000 пн? *(1,5 балла)*

Ответ: в работе используется бромфеноловый синий, поскольку позволяет эффективно отслеживать процесс электрофореза без засвечивания целевого продукта. *(1,5 балла)*

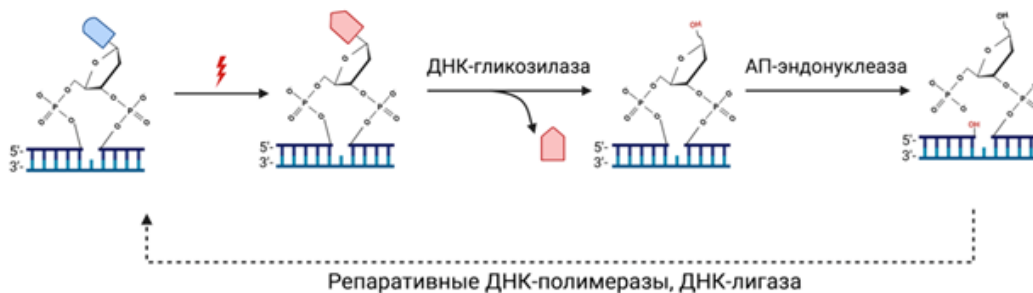
Этап 4. Анализ плазмидных конструкций на присутствие повреждения

— Здравствуйте, капитан ННН! У нас хорошие новости. За то время, что мы не были на связи, нам удалось разобраться в методике получения репортерных плазмидных конструкций с однонуклеотидной модификацией. С помощью Cas9-никаз мы успешно ввели оц-разрывы на расстоянии 38 пн. Затем добавили комплементарные олигонуклеотиды и получили плазмидную конструкцию с одноцепочечной брешью. Ну, и в конце, нам удалось лигировать на ее место олигонуклеотид с повреждением.

— Отличные новости, отряд 4СМР! Я так полагаю, что конструкции уже готовы?

— Нет, капитан. Дело в том, что мы столкнулись с проблемой. Перед транспортировкой конструкций в отдел «эксцизионной репарации оснований» нам необходимо подтвердить наличие повреждения в них. . .

Генетический материал клетки постоянно подвергается действию различных факторов, как внешних, так и внутренних. К внешним факторам можно отнести ультрафиолетовое и ионизирующее излучение и разного рода ксенобиотики, а ко внутренним — активные формы кислорода и другие метаболиты, которые появляются в процессе нормальной жизнедеятельности клетки. В результате в ДНК появляются повреждения, которые в случае отсутствия репарации приводят к ошибкам репликации и мутациям. В число важнейших систем, ответственных за репарацию повреждений, входит эксцизионная репарация оснований (BER, от англ. base excision repair). На первой стадии процесса BER специфичные к повреждениям ДНК-гликозилазы узнают поврежденное основание и гидролизуют N-гликозидную связь. На следующих стадиях осуществляется удаление возникшего апурин-апириимидинового сайта (АП-сайта) основания при помощи АП-эндонуклеазы, включение неповрежденного нуклеотида и образование фосфодиэфирной связи.



Относительно всех нуклеотидов гуанин сильнее всего подвержен окислению. Поэтому 8-оксогуанин представляет собой один из наиболее распространенных продуктов окисления ДНК. Он отличается от обычного гуанина наличием кислорода в положении С8 и протонированным азотом в положении N7. Особенность такой модификации заключается в том, что 8-охоGua способен образовывать как каноническую, так и неканоническую пары. В анти-конформации образуется стандартная уотсон-криковская пара с цитозином, но в син-конформации формируется хугстиновская пара с аденином. Таким образом, при отсутствии своевременной репарации 8-охоGua может произойти трансверсия G→T в случае неверного включения dAMP (дезоксиаденинофосата) ДНК-полимеразой напротив повреждения в матрице.

В бактериальных клетках главным ферментом репарации, ответственным за удаление окислительного повреждения 8-оксогуанина, является Fpg — формамидопириимидин-гликозилаза. В результате реакции основание 8-оксогуанин удаляется и остается AP-сайт (апурин/апириимидиновый сайт — сайт без основания), на место которого в последствии ДНК-полимераза вставляет новое основание и ДНК-лигаза восстанавливает фосфодиэфирную связь.

Практическая часть

Во вторую часть лабораторных работ третьего дня вы проведете анализ полученных плазмидных конструкций на присутствие окислительного повреждения.

Гидролиз плазмидных конструкций ферментом Fpg

Материалы и оборудование

- Реакционные смеси **N-1-1** и **N-1-1**;
- Реакционный буфер 10x (10 mM Трис-НСl (рН 7,9), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 100 мкг/мл БСА);
- Fpg 58 мкМ (**Fpg**);
- Деионизированная вода;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл);
- Пробирки (0,6 мкл);
- ПЦР-амплификатор (1 шт) / настольный термостат (2 шт);
- Настольная центрифуга MiniSpin ($r = 60$ мм).

Протокол

1. В двух новых пробирках замешайте реакции по следующей таблице (подпишите пробирки!):

Реагент	N-G	N-8G
	Добавить, мкл	
N-1-1/N-1-2	10	10
mQ	5	5
Реакционный буфер 10x	3	3
Fpg	12	12
Итоговый объем смеси, мкл	30	30

2. Перемешайте и инкубируйте реакционные смеси в ПЦР-амплификаторе или настольных термостатах по следующей схеме:

37 °C	60 мин
65 °C	10 мин

Заливка агарозного геля

Материалы и оборудование

- Агароза;
- Буфер ТАЕ 1x (40 mM Трис-ацетат (pH 8,0), 1 mM ЭДТА-NaOH (pH 8,3));
- Бромистый этидий (10 мг/мл);
- Заливочный столик;
- Ванночка для заливки;
- Гребенка на 10 дорожек;
- Весы;
- Микроволновая печь/нагревательная плитка;
- Коническая колба (500 мл);
- Фольга;
- Мерный цилиндр (100 мл);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. В конической колбе взвесьте 1,2 г агарозы и растворите ее в 150 мл ТАЕ 1x.
2. Нагрейте раствор до закипания и охладите при комнатной температуре.
3. Соберите установку для заливки: заливочный столик, ванночка для заливки и гребенка.
4. Добавьте 7,5 мкл бромистого этидия в расплавленную и охлажденную агарозу перемешайте и залейте в ванночку.
5. Дождитесь полной полимеризации агарозы.

Подготовка образцов

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: N-G, N-8G;
- Бромфеноловый синий;
- Деионизированная вода;

- Пробирки (0,6 мл);
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. Добавьте по 3 мкл бромфенолового синего и тщательно перемешайте пипетированием.

Гель-электрофорез

Материалы и оборудование

- Аликвоты для анализа гель-электрофорезом: **N-G, N-8G**;
- ДНК-маркер (10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 пн; «СибЭнзим»);
- Буфер для электрофореза (40 мМ Трис-ацетат (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА-NaOH (рН 8,3), 0,5 мкг/мл бромистый этидий);
- 0,8%-ный агарозный гель в ванночке для заливки;
- Камера для электрофореза;
- Источник напряжения;
- Автоматический пипетатор (2–20 мкл);
- Наконечники (10 мкл).

Протокол

1. Соберите установку для электрофореза: камера, источник напряжения и ванночка с агарозным гелем. Залейте буфер для электрофореза в камеру.
2. Нанесите образцы на агарозный гель по следующей схеме:

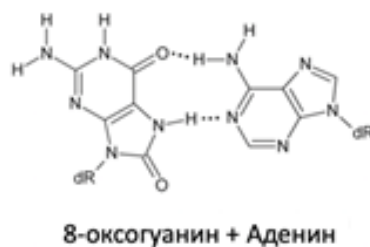
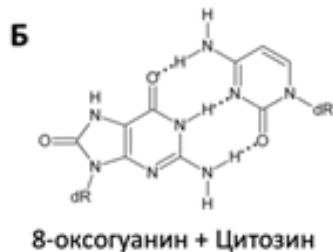
№карм.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Нанесение	ДНК маркер	N-G	N-8G	N-G	N-8G	N-G	N-8G	N-G	N-8G	ДНК маркер
Нанести, мкл	6	10	10	10	10	10	10	10	10	6

3. Ведите электрофорез при 110 В в течение 30–40 мин.
4. Зафиксируйте результат электрофореза на гель-документирующей системе.

Теоретическая часть

Задача VI.2.4.8. 8-оксогуанин (5 баллов)

8-оксогуанин представляет собой один из наиболее распространенных продуктов окисления ДНК. Он отличается от обычного гуанина наличием кислорода в положении С8 и протонированным азотом в положении. Особенность такой модификации заключается в том, что 8- оксогуанин способен образовывать как каноническую, так и неканоническую пары. В анти-конформации образуется стандартная уотсон-криковская пара с цитозином, но в син-конформации формируется хугстиновская пара с аденином. Таким образом, при отсутствии своевременной репарации 8-оксогуанина может произойти трансверсия G→T в случае неверного включения dAMP ДНК-полимеразой напротив повреждения в матрице.



Вопрос 1

Предположите, как изменится генетический код, если бы вместо обычного гуанина в генетический код входил 8-оксогуанин. (5 баллов)

Ответ:

	ДНК	РНК	Белок	ДНК	РНК	Белок	ДНК	РНК	Белок
А	8G-A-A	C-U-U	Leu	A-8G-A	U-C-U	Ser	A-A-8G	U-U-C	Phe
		A-U-U	Ile		U-A-U	Tyr		U-U-A	Leu
	8G-A-T	C-U-A	Leu	A-8G-T	U-C-A	Ser	A-T-8G	U-A-C	Tyr
		A-U-A	Ile		U-A-A	Met / stop		U-A-A	Met / stop
	8G-A-C	C-U-G	Leu	A-8G-C	U-C-G	Ser	A-C-8G	U-G-C	Cys
		A-U-G	Met / stop		U-A-G	Met / stop		U-G-A	Met / stop
Т	8G-T-T	C-A-A	Gln	T-8G -T	A-C-A	Thr	T-T-8G	A-A-C	Asn
		A-A-A	Lys		A-A-A	Lys		A-A-A	Lys
	8G-T-A	C-A-U	His	T-8G-A	A-C-U	Thr	T-A-8G	A-U-C	Ile
		A-A-U	Asn		A-A-U	Asn		A-U-A	Ile
	8G-T-C	C-A-G	Gln	T-8G-C	A-C-G	Thr	T-C-8G	A-G-C	Ser
		A-A-G	Lys		A-A-G	Lys		A-G-A	Arg
С	8G-C-C	C-G-G	Arg	C-8G-C	G-C-G	Ala	C-C-8G	G-G-C	Gly
		A-G-G	Arg		G-A-G	Glu		G-G-A	Gly
	8G-C-A	C-G-U	Arg	C-8G-A	G-C-U	Ala	C-A-8G	G-U-C	Val
		A-G-U	Ser		G-A-U	Asp		G-U-A	Val
	8G-C-T	C-G-A	Arg	C-8G-T	G-C-A	Ala	C-T-8G	G-A-C	Asp
		A-G-A	Arg		G-A-A	Glu		G-A-A	Glu

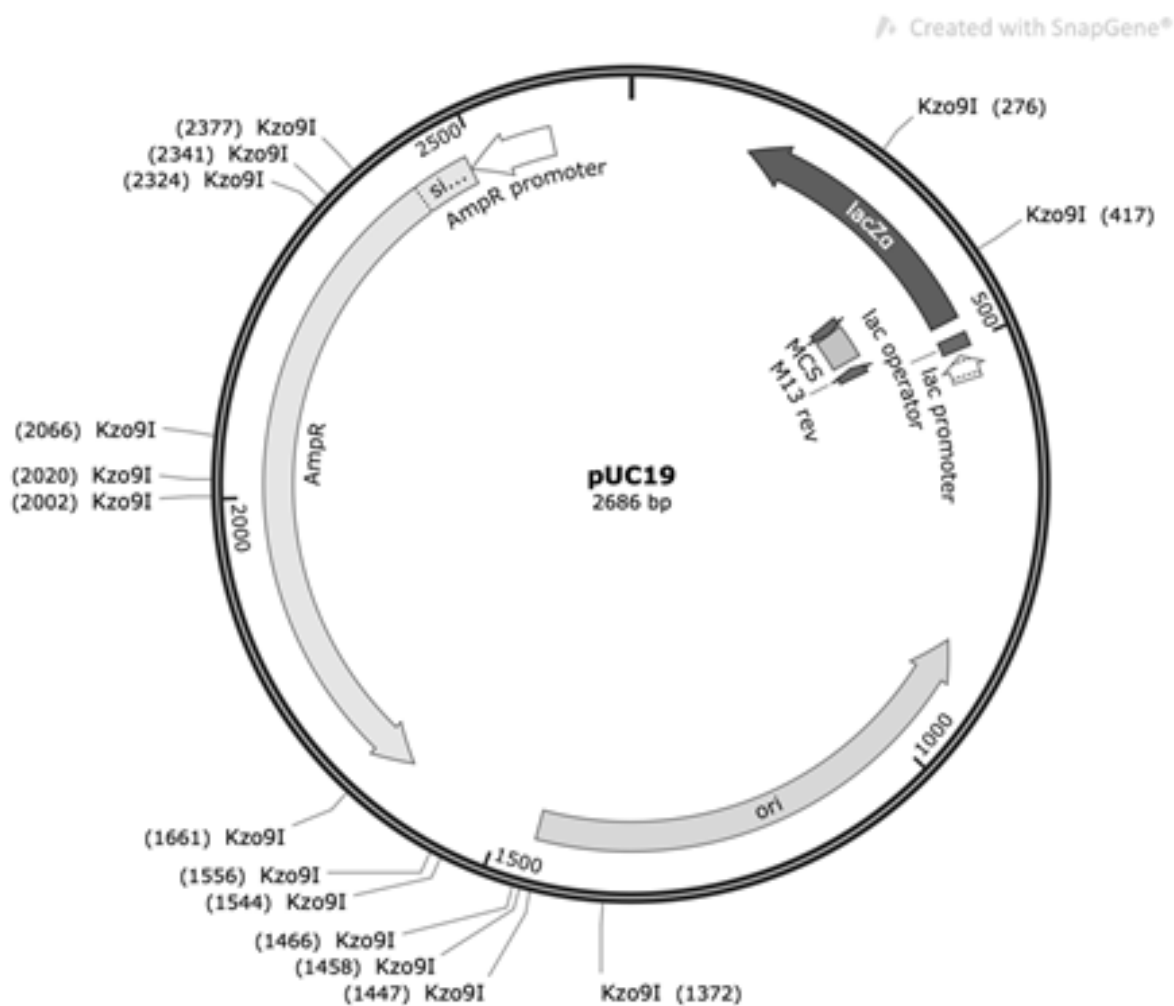
Задача VI.2.4.9. ДНК-маркеры (8 баллов)

ДНК-маркеры — специальные наборы молекул ДНК с известной длиной фрагментов для соотнесения длины исследуемых образцов при гель-электрофорезе в агарозном геле. Как правило, такие маркеры получают при обработке плазмиды или

относительно небольшого генома эндонуклеазой рестрикции. В начале разработки ДНК-маркеров в качестве субстрата использовали ДНК фага λ, который гидролизуют рестриктазой Hind III. На сегодняшний день используют смеси субстратов и ферментов, для получения максимально разнообразных по длине фрагментов для точности определения размера ДНК при электрофоретическом анализе.

Вопрос 1

В рамках нашего проекта мы используем плазмиду pUC19, которая представляет собой стандартный вектор для трансформации бактерий. Данную плазмиду также используют для получения ДНК-маркеров рестриктазами Kzo9 I или Msp I. Определите количество и длину фрагментов, полученных при обработке pUC19 рестриктазой Kzo9 I. (4 балла)



Ответ: всего 15 фрагментов: 141, 585, 36, 17, 258, 46, 18, 341, 105, 12, 78, 8, 11, 75 и 955 пн.

Вопрос 2

Изобразите, как полученные фрагменты будут распределены в агарозном геле. Сколько бендов будет наблюдаться при визуализации данного ДНК-маркера? (4 балла)

Ответ:

1. Правильно обозначена направленность расположения бэндов по размеру. (2 балла)
2. Бэнды соответствуют рассчитанным. (2 балла)

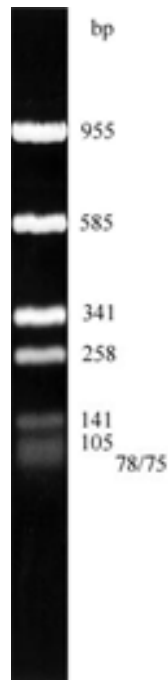


Рис. VI.2.14. 1 мкг pUC19/Kzo9I ДНК маркера в 1,9% агарозном геле в буфере ТАЕ. Длина геля —12 см

Этап 5. Архивирование последовательностей ДНК в формате fasta

В биоинформатической работе часто приходится хранить большие объемы последовательностей ДНК (например, геномы). Эти последовательности могут занимать много места на жестком диске, и конечно же хочется его экономить. Для этого можно архивировать последовательности, используя различные алгоритмы. Для этого существуют различные программы, такие как gunzip, 7zip, winrar и прочие. Но в этом задании вам предстоит разработать свой собственный алгоритм для архивирования последовательностей.

На вход программе подается последовательность ДНК в формате fasta. Первая строка в этом формате начинается со знака > и содержит заголовок последовательности. Затем, на следующей строке идет сама последовательность. Читайте этот файл и сохраните саму последовательность (без заголовка) в переменную. (2 балла)

Реализуйте следующий алгоритм архивирования. Пройдите циклом по символам в последовательности. Для каждого символа посчитайте, сколько раз подряд он встречается. И запишите в новую последовательность количество раз, которое встречается этот символ, плюс сам символ (например, для «АААА» нужно записать «4А»). Затем пропустите все повторы этого символа и перейдите к следующему новому символу. Например, для последовательности ААААТТТСГ правильный ответ будет следующий: 4А3Т1С1G. Вычислите, сколько места удалось сэкономить благодаря этой архивации. (8 баллов)

Запишите полученную архивированную последовательность в новый файл. Этот новый файл должен содержать заголовок, идентичный заголовку исходного файла + слово «archived» в конце. На следующей строке должна быть сама архивированная последовательность. (2 балла)

В файле `EXAMPLE_Sequence_1.txt` приведен пример входных данных, в файле `EXAMPLE_Sequence_1_answer.txt` пример выходных данных. Эти файлы даны для ознакомления, с ними ничего делать не нужно. Последовательность, которую необходимо заархивировать, находится в файле `TEST_Sequence.txt`. Архивируйте последовательность из этого файла и сохраните в папку с вашей фамилией файл с архивированной последовательностью и файл с кодом, которым вы это сделали.

Пример программы-решения

```
def zip_seq(seq):
    new_seq = ''
    for i in range(len(seq)):
        if i == 0 or seq[i-1] != seq[i]:
            counter = 1
            if i+counter >= len(seq)-2 or seq[i] == seq[i+1]:
                while True:
                    counter += 1
                    if i+counter >= len(seq) - 1 or seq[i+counter] != seq[i]:
                        break

            new_symbol = str(counter) + seq[i]
            new_seq += new_symbol

    return new_seq

new_seq = zip_seq(seq)
print(f'Новая последовательность: {new_seq}')
> 1T1C1G1A1T1C1G1C1G4C12G7A9T1C1G1A1T1C1G1A10C1T3G1T1G1A1T2A1T3A1T1C1G3C1G1C9G1
↪ A1
T9A1C10G9A8T9C1T1A1G1C1A1T1C1G1A1T1A9C2A5T3G3A2G1C1A4C2A4T1A4C1A1T1A1T3A2T2G
print(f'Длина старой последовательности: {len(seq)}')
> Длина старой последовательности: 200
print(f'Длина новой последовательности: {len(new_seq)}')
> Длина новой последовательности: 155
print(f'Новая последовательность на {len(seq)-len(new_seq)}
↪ ({round((len(seq)-len(new_seq))/len(seq)*100,2)}%) короче старой')
> Новая последовательность на 45 (22.5%) короче старой

print(f'Было сэкономлено {round((sys.getsizeof(seq)-sys.getsizeof(new_seq))/sys
↪ .getsizeof(seq)*100,2)}% памяти на хранение новой
↪ последовательности')
> Было сэкономлено 18.07% памяти на хранение новой последовательности
```

Этап 6. Клонирование гена *eGFP* в плазмиду *pHDE-35S-Cas9*

Молекулярным биологам зачастую необходимо клонировать гены для генетической модификации, секвенирования, наработки продукта гена. Для клонирования

генов используются плазмиды. В плазмиде pHDE-35S-Cas9 закодирован ген Cas9, который исследователю необходимо экспрессировать в растении, однако в плазмиде отсутствует маркерный ген. Ученый выбрал ген флюоресцентного белка eGFP для визуализации результата. Этот ген находится в плазмиде 35S-eGFP-nosT.

В данном задании Вам предлагается помочь «мокрому» биологу и провести клонирование гена eGFP в плазмиду pHDE-35S-Cas9 in silico с помощью программы Ugene.

На практике зачастую гены не вырезаются из одной плазмиды и не вставляются в другую напрямую, а предварительно амплифицируются методом ПЦР с введением сайтов рестрикции. Для экспрессии любого гена необходимы промотор и терминатор, поэтому предлагается клонировать ген eGFP вместе со своими промотором CaMV35S и NOS терминатором.

1. Найдите в целевой плазмиде pHDE-35S-Cas9 два одиночных (встречающихся только 1 раз) сайта рестрикции, которые находятся в районе 1–4000 bp (район выбран, так как в нем отсутствуют функциональные элементы плазмиды). Убедитесь, что выбранных вами сайтов нет внутри гена eGFP. Одиночные сайты рестрикции указаны в картах плазмид. (5 баллов)
2. Список эндонуклеаз рестрикции, имеющихся в лаборатории: AatII, AleI, AluI, AseI, AsiSI, BamHI, BbvCI, BglI, BglII, BsrGI, BstAUI, CciNI, ClaI, DraI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Kzo9I, MspI, MluI, NruI, PmeI, Psp124EI, PstI, PvuII, RsaI, SacII, Sall, Sse9I, TaqI, XbaI, ZraI.
3. Предложите прямой и обратный праймер для амплификации гена eGFP. В каждом праймере должны быть комплементарный плазмиде участок, сайт рестрикции и дополнительные 6 нуклеотидов, т. к. ферменты эндонуклеазы рестрикции не могут связываться с концами ДНК. (5 баллов)
4. Проведите ПЦР с подобранными праймерами в программе Ugene. (2 балла)
5. Проведите рестрикцию плазмиды pHDE-35S-Cas9 и лигирование фрагмента рестрикции с ПЦР-продуктом гена eGFP. (4 балла) В ответе на задание вам необходимо загрузить полученную плазмиду, названия и сайты рестрикции выбранных Вами эндонуклеаз, последовательности прямого и обратного праймеров (в направлении 5'-3', с добавленными дополнительными последовательностями).

Инструкция к выполнению работы

1. Откройте карты плазмиды и выберите два сайта рестрикции (сайты рестрикции имеют тоже название, что и соответствующие рестриктазы). Важно, чтобы это были рестриктазы, работающие с образованием длинных липких концов (выступающих на 3–5 нуклеотидов). Сайты рестрикции можно найти в сети Интернет.
2. Откройте оба файла с плазмидами в программе Ugene. Выберите ПЦР *in silico*. В открывшейся вкладке вставьте выбранную вами часть праймера в «Прямой праймер». Затем добавьте с 5'-конца последовательность сайта рестрикции. Добавьте любые 6 букв с 5'-конца сайта рестрикции (нужны, чтобы эндонуклеаза рестрикции смогла разрезать последовательность и сделать липкий конец, необходимый для успешного лигирования). Помните, что последовательности всегда записываются от 5' к 3'-концу.
3. Для обратного праймера выполните те же действия. При копировании выбо-

-
- рите опцию «Копировать комплементарную 5'-3' последовательность».
4. Чтобы ПЦР мог пройти выберете «Несоответствия» равным длина сайта рестрикции + 6 (случайные 6 букв).
 5. Проведите наработку ПЦР продукта (игнорируете предупреждения).
 6. Для плазмиды рHDE-35S-Cas9 и ПЦР-продукта проведите поиск выбранных сайтов рестрикции
 7. Выполните рестрикцию ПЦР фрагмента и плазмиды рHDE-35S-Cas9 с последующим лигированием по этим сайтам. Не забудьте поставить галочку напротив пункта «Сделать круговой».
 8. Отправьте ответы организаторам.

Пример решения

Сайтами рестрикции в рHDE-35S-Cas9-mCherry могут быть любые одиночные сайты рестрикции в первой четверти плазмиды или месте, где это не нарушает других элементов. Рестриктазы должны работать с образованием длинных липких концов (3–5 нт). Важно, чтобы эти рестриктазы не резали промотор, ген и терминатор eGFP.

Пример ответа

Рестриктазы и их сайты рестрикции:

AatII — GACGTC
MluI — ACGCGT

Прямой праймер:

AAATTT GACGTC CTCAGAAGACCGAGGGCTAT

Обратный праймер:

AAATTT ACGCGT TGTTTGACAGCTTATCATCG

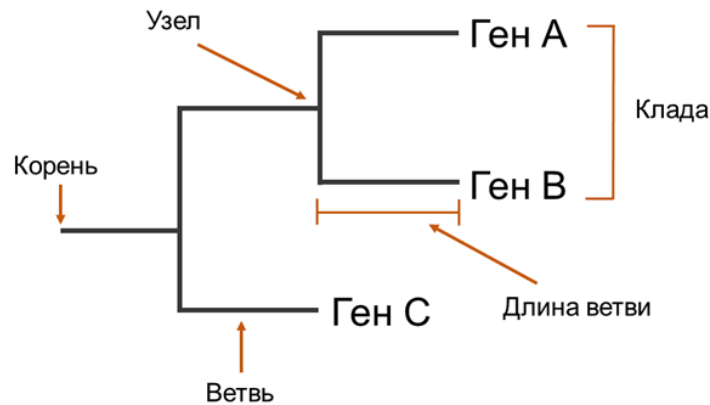
- Любые 6 нуклеотидов с 5'-конца.
- Сайт рестрикции.
- Последовательность, комплементарная участку гена.

Важно:

Праймеры не должны быть слишком короткими или длинными (Длина участка гена 18–22 нт).

Этап 7. Филогенетический анализ

Филогенетика — это область биологической систематики, которая занимается выявлением эволюционных отношения среди разных биологических существей, например организмов, генов или белков. Филогенетическое дерево — это способ отображения родства между различными существиями. Корень дерева — это общий предок всех организмов, листья — сами организмы (или гены), а узлы в дереве — это эволюционные события, то есть разделение между видами (или генами).



Строить филогенетические деревья можно на основе различных биологических данных, в том числе на выравнивании нуклеотидных последовательностей генов. Ниже приведен фрагмент выравнивания генов WIN1 разных видов растений. AtWIN1 — ген растения арабидопсис, StWIN1 — ген картофеля, HvWIN1 — ген ячменя, TaWIN1 — ген пшеницы. Цель этого задания — построить филогенетическое дерево по этому выравниванию, используя алгоритм UPGMA.

```
HvWIN1 ATGCATCGACGCTTGTAGCGTTCAGTCGCTGCTAAGCGGAGTCA
TaWIN1 ATGCATCGACGCTTGTGCGGTTTCAGTCGCTGCTAAGCCCGAGTCA
AtWIN1 ATGCGACGACGAGTGTAGCGATCAGTCGCAGCTAAGCCCGAGTCA
StWIN1 ATGCAACGACGAGTGTAGCGTTCAGTCACAGCTAAGCCCGACCCA
**** ***** ** ** ***** * ***** ** **
```

1. На первом этапе необходимо вычислить дистанцию между всеми последовательностями. Для этого возьмите все возможные пары последовательностей, и для каждой пары посчитайте долю отличающихся нуклеотидов (отношение количества отличающихся нуклеотидов ко всей длине последовательности). Эта доля и будет дистанцией между последовательностями. (2 балла)
2. После того, как посчитали дистанцию между всеми парами последовательностей, найдите пару с наименьшей дистанцией. Эта пара будет формировать первую кладу на дереве. Длина ветви от узла до каждого из этих листьев будет составлять половину дистанции между этими последовательностями. (2 балла)
3. Теперь, когда у вас есть первая кладка на дереве, необходимо пересчитать дистанцию от этой кладки до всех остальных последовательностей. Для этого усредните дистанцию между каждой последовательностью внутри кладки и другими последовательностями, вне кладки. Из получившихся дистанций снова выберите наименьшую, и объедините эти последовательности (или эти кладки) в новую кладку. Повторяйте так до тех пор, пока все последовательности не будут объединены в кладки. Нарисуйте итоговое дерево и для каждой ветви подпишите ее длину. (4 балла)
4. Подумайте, как могла протекать эволюция этих генов. Назовите как можно точнее, когда у этих генов существовал общий предок. На основании чего можно сделать вывод о времени существования общего предка? (2 балла)
5. Данный метод построения филогенетического дерева базируется на одном очень важном допущении, касающемся скорости эволюции. Сформулируйте, какой

должна быть скорость эволюции для того, чтобы данный метод показывал верные результаты. Всегда ли соблюдается это допущение? (2 балла)

Пример решения

1. Дистанция между:

- AtWIN1 и StWIN1 = $4/45 = 0,09$;
- AtWIN1 и TaWIN1 = $6/45 = 0,13$;
- AtWIN1 и HvWIN1 = $6/45 = 0,13$;
- StWIN1 и TaWIN1 = $7/45 = 0,16$;
- StWIN1 и HvWIN1 = $8/45 = 0,18$;
- TaWIN1 и HvWIN1 = $2/45 = 0,04$.

Матрица дистанций:

	AtWIN1	StWIN1	TaWIN1	HvWIN1
AtWIN1		0,09	0,13	0,13
StWIN1			0,16	0,18
TaWIN1				0,04
HvWIN1				

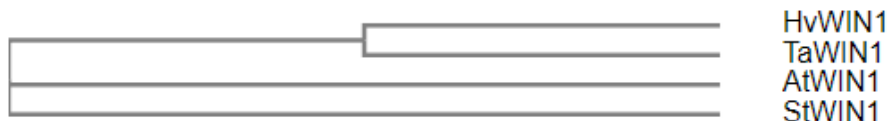
2. Меньше всего дистанция между генами TaWIN1 и HvWIN1, поэтому они формируют первый кластер с длиной ветвей $0,04/2 = 0,02$. Переписываем исходную таблицу с дистанцией между кластером (TaHvWIN1) до гена StWIN1 = $(0,16 + 0,18)/2 = 0,17$, до гена AtWIN1 = $(0,13 + 0,13)/2 = 0,13$.

	AtWIN1	StWIN1	TaHvWIN1
AtWIN1		0,09	0,13
StWIN1			0,17
TaHvWIN1			

3. Теперь меньше всего дистанция между геном StWIN1 и геном AtWIN1. Они формируют новый кластер (StAtWIN1) с длиной ветвей $0,09/2 = 0,045$. Переписываем матрицу с дистанцией между этим кластером и геном F3'5'H-4 = $(0,13 + 0,17)/2 = 0,15$.

	StAtWIN1	TaHvWIN1
StAtWIN1		0,15
TaHvWIN1		

Последняя дистанция в новой матрице между кластером TaHvWIN1 и кластером StAtWIN1 = 0,15, поэтому они образуют последнее ответвление с длиной ветвей $0,15/2 = 0,075$. Итоговое дерево выглядит так:



4. Гены разделились до расхождения однодольных и двудольных растений, примерно 90 миллионов лет назад (принимается ответы 100 ± 20 миллионов лет назад).

5. Скорость эволюции должна быть постоянной во всех таксонах.

Описание задачи 10–11 классы

Легенда задачи. Введение «О гене SOPP3»

- Станция Cas9, прием. Говорит центр белковой и геномной инженерии.
 - Прием. У нас чрезвычайная ситуация! Активные центры деактивированы, каталитический статус станции «dead». Нам нужно что-то с этим делать!
 - Необходимо присоединить модуль. Подача синглетного кислорода поможет выжить!
 - Импакт-фактор слишком велик! Индекс-Хирша не стабилен! Нам нужна помощь...
 - Прием, станция Cas9. Станция Cas9!
- Командир центра, 8-Оксогуанин, отчаянно пытался связаться со станцией. Но времени было мало.
- Экстренное совещание!
- В комнату вошли двое.
- Что случилось? — спросил, инженер Касовик-затейник.
 - Необходимо спасти станцию dCas9, подача синглетного кислорода недостаточна. У нас есть подходящие модули?
 - Пилотные испытания модуля KillerRed не увенчались успехом, проблемы с димеризацией. Но, кажется, есть модуль получше. Юнга, достаньте чертежи pMI2 и текущие генные заказы, они нам пригодятся в конструировании.
- Юнга прибежал на склад и нашел там кое-что непонятное.
- Касовик-затейник, вот чертежи pMI2 и PbLUEsCRIPtisk(+)_{sOpP3}.
- Касовик-затейник взглянул на чертежи и увидел надпись «SOPP3».
- У нас есть еще надежда! Нужно доставить модуль SOPP3 к dCas9, но согласно чертежам придется делать стыковку по тупым концам модуля. Шанс операции не велик, но стоит попробовать.

Этап 1

Практическая часть

Аmplификация гена SOPP3

Оборудование:

- Амплификатор;
- Пробирки на 0,6 мл;
- Пробирки для ПЦР (0,2 мл);
- Носики на 10 мкл;

- Маркеры;
- Штатив для пробирок.

Реагенты:

- Реакционный буфер Q5, 5x (**QB, 20 мкл**);
- дНТФ, 2,5 mM (**dNTP, 8 мкл**);
- Прямой праймер, pATGGAAAAAAGCTTTGTGATTACCG, 282 мкМ (**fwd, 2 мкл**);
- Обратный праймер, pGCTGCCATCCAGCACCAC, 209 мкМ (**rev, 2 мкл**);
- pBlueScript II SK(+) SOPP3 288 нг/мкл (**pBS, 2 мкл**);
- ДНК-полимераза Q5 (**у организаторов**);
- Вода (**mQ, 1 мл**).

Протокол

1. Разбавьте праймеры до концентрации 10 мкМ, используя воду (mQ);
2. Разбавьте плазмиду до концентрации 5 нг/мкл, используя воду (mQ);
3. Возьмите две пробирки для ПЦР, подпишите:
 - на первой сбоку «№команды»-«1-1». Например, для команды №N шифр N-1-1;
 - на второй сбоку «№команды»-«1-2». Например, для команды №N шифр N-1-2.
4. Приготовьте реакционную смесь для ПЦР:

Таблица VI.2.1: Объем реакционной смеси, 25 мкл

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	N-1-1, мкл	N-1-2, мкл
1	Вода	–	–	13,5	14,5
2	Реакционный буфер Q5	5x	1x	4,75	4,75
3	дНТФ	2,5 mM	200 мкМ	2	2
4	Прямой праймер	10 мкМ	0,5 мкМ	1,25	1,25
5	Обратный праймер	10 мкМ	0,5 мкМ	1,25	1,25
6	pBlueScript II SK(+) SOPP3	5 нг/мкл	0,2 нг/мкл	1	–
7	ДНК-полимераза Q5	–	–	1,25	1,25

5. Приготовьте программу для ПЦР (*для ассистентов*):

Таблица VI.2.2: Программа ПЦР

Количество циклов	Этап	Температура	Время, с
1	Денатурация	98	30
30	Денатурация	98	10
	Отжиг праймеров	65	20
	Элонгация	72	10
1	Элонгация	72	120

6. Поставьте пробирки «N-1-1» и «N-1-2» в амплификатор и запустите ПЦР.

Анализ продуктов ПЦР с помощью агарозного гель-электрофореза

Оборудование:

- Камера для гель-электрофореза;
- Носики на 10 мкл;
- Пробирки на 0,6 мл;
- Штатив для пробирок;
- Микроволновая печь/плитка;
- Трансиллюминатор.

Реагенты:

- Агароза;
- Буфер ТАЕ, 1х;
- ДНК маркер Step50 plus, 0,1 мг/мл;
- Бромистый этидий, 10 мг/мл (**BE**);
- Буфер для нанесения, 6х (30% (об. /об.) глицерин, 0,25% (м./об.) ксилол цианоловый FF) (**XLB**, 4 мкл).

Протокол

1. Добавьте к навеске агарозы однократный буфер ТАЕ (1х) согласно таблице ниже.

Компонент	Конечная концентрация	Количество компонента	Общий объем, мл
ТАЕ	1х	100 мл	100 мл
Агароза	2%	2 г	
Бромистый этидий	0,5 мкг/мл	5 мкл	

2. Накройте сосуд и доведите до кипения.
3. Остудите раствор агарозы до температуры ± 50 °С, добавьте бромистый этидий и залейте в форму для геля.
4. После застывания поместите гель в камеру для электрофореза, наполненную ТАЕ (1х).
5. Возьмите две пробирки, подпишите:
 - на первой сбоку «№команды»-«2-1» Например, для команды №N шифр N-2-1;
 - на второй сбоку «№команды»-«2-2» Например, для команды №N шифр N-2-2.
6. Добавьте к пробиркам «N-2-1» и «N-2-2» по 5 мкл ПЦР-смеси из «N-1-1» и «N-1-2» и по 1 мкл буфера для нанесения (6х).
7. Нанесите по 5 мкл ДНК маркера Step50 plus в первый и последний карман (*для ассистентов*).
8. Нанесите по 3 мкл смеси «N-2-1» и «N-2-2» в карманы.
9. Проведите гель-электрофорез при 110 В в течение 30 минут.
10. Сфотографируйте гель с помощью трансиллюминатора и проанализируйте концентрацию продукта ПЦР с помощью программного обеспечения «Quantity One» *для ассистентов*. X нг/мкл = _____.

Обработка MalI

Оборудование:

- Носики на 10 мкл;
- Пробирки на 0,6 мл;
- Штатив для пробирок;
- Термостат.

Реагенты:

- Вода (**mQ**, 1 мл);
- Буфер Mal I, 10x (SibEnzyme) (**MB**, 8 мкл);
- ПЦР смесь «N-1-1» (X нг/мкл), ПЦР-продукт с pMI2 (**pcr**, 10 мкл, **38,3 нг/мкл, для одной реакции!!!**);
- MalI, 5 ед./мкл (SibEnzyme) (**у организаторов**).

Протокол

1. Возьмите две пробирки на 0,6 мл и подпишите:
 - на первой сбоку «№команды»-«З-1» Например, для команды №N шифр N-3-1;
 - на второй сбоку «№команды»-«З-2» Например, для команды №N шифр N-3-2.
2. Приготовьте реакционную смесь согласно таблице:

Таблица VI.2.3: Объем реакционной смеси, 25 мкл

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	N-3-1, мкл	N-3-2, мкл
1	Вода (mQ)	—	—	7	7
2	SE-буфер Mal I	10x	1x	2	2
3	N-1-1	X нг/мкл	X/2 нг/мкл	10	—
4	ПЦР-продукт с pMI2	46,0,3 нг/мкл	23,0 нг/мкл	—	10
5	MalI	5 ед./мкл	0,25 ед./мкл	1	1

3. Инкубируйте реакцию в термостат в течение часа минут при 37 °С.
4. Инактивируйте MalI в течение 20 минут при 65 °С.

Обработка термолабильной щелочной фосфатазой

Оборудование:

- Носики на 10 мкл;
- Пробирки на 0,2 мл;
- Штатив для пробирок;
- Амплификатор.

Реагенты:

- Вода (**mQ**, 1 мл);
- Буфер W, 10x (SibEnzyme) (**WB**, 8 мкл);
- pMI2 AfeI не очищенный (pA, 49,7 нг/мкл, 10 мкл) и pMI2 AfeI очищенный (**pAp**, **43,7 нг/мкл, 2 мкл, только для одной реакции!!!**);

- Термолабильная щелочная фосфатаза, 5 ед./мкл (SibEnzyme) (**у организаторов**).

Протокол

1. Возьмите две пробирки и подпишите:
 - на первой сбоку ««№команды»-«4-1»» Например, для команды №N шифр N-4-1;
 - на второй сбоку ««№команды»-«4-2»» Например, для команды №N шифр N-4-2.
2. Приготовьте реакционную смесь согласно таблице:

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	N-4-1, мкл	N-4-2, мкл
1	Вода (mQ)	—	—	2,2	1
2	Буфер W	5x	1x	1,8	1
3	pM12 AfeI не очищенный	49,7 нг/мкл	24,9 нг/мкл	5	—
4	pM12 AfeI очищенный	43,7 нг/мкл	17,5 нг/мкл	—	2
5	Термолабильная щелочная фосфатаза	5 ед./мкл	0,25 ед./мкл	1 мкл	1 мкл

3. Инкубируйте реакцию в термостат в течение часа минут при 16 °С.
4. Инактивируйте термолабильную щелочную фосфатазу в течение 20 минут при 65 °С.

Лигирование фрагментов

Оборудование:

- Носики на 10 мкл;
- Пробирки на 0,6 мл;
- Штатив для пробирок;
- Термостат с охлаждением.

Реагенты:

- Вода (**mQ, 1 мл**);
- Буфер для T4 ДНК лигазы, 10x (SibEnzyme) (**ТВ, 6 мкл, у организаторов**);
- Реакционные смеси N-3-1, N-3-2, N-4-1, N-4-2;
- T4 ДНК лигаза, 200 ед./мкл (SibEnzyme) (**у организаторов**).

Протокол

1. Возьмите три пробирки и подпишите:
 - на первой сбоку ««№команды»- «5-1»» Например, для команды №N шифр N-5-1;
 - на второй сбоку ««№команды» -«5-2»» Например, для команды №N шифр N-5-2;
 - на третьей сбоку ««№команды» -«5-2»» Например, для команды №N шифр N-5-3.
2. Приготовьте реакционную смесь согласно таблице:

Таблица VI.2.4: Объем реакционной смеси, 25 мкл

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	5-1, мкл	5-2, мкл	5-3, мкл
1	Вода (mQ)	—	—	1,8 мкл	2,1 мкл	0,6 мкл
2	Буфер для Т4 ДНК лигазы	10x	1x	1	1	1
3	N-3-1	X/2 нг/мкл	300 фмоль	A	A	A
4	N-3-2	23,0 нг/мкл	30 фмоль	B	—	—
5	N-4-1	24,9 нг/мкл	30 фмоль	—	B	—
6	N-4-2	17,5 нг/мкл	30 фмоль	—	—	Г
7	Т4 ДНК лигазы	200 ед./мкл	—	1	1	1

3. Инкубируйте реакцию в течение ночи при 4 °С.

Теоретическая часть

Вопрос 1

Определите точный размер ПЦР продукта с матрицы pBlueScript II SK(+) SOPP3.
pBlueScript II SK(+) SOPP3:

СТАААТТГТААГCGTTAАТАТТТТГТТААААТТCGCGTTAААТТТТГТТАААТCAGCTCAТТТТТТААССАА
TAGGCCGAAATCGGCAAAATCCСТТАТАААТCААААГААТАGACCCGAGATAGGGTTGAGTGTТТCCAGTTT
GGAACAAGAGTCCACTATТАААГАACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG
CCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTT
AAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGA
AAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACCCCGCGCTTAA
TGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCCGCAATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC **GATC** GGTGCGGGC
CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTT
TCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTA
CCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTCAT **ATGGAAAAAGCTTTGTGATTACC** **GATC** CG
CGCCTGCCGATAACCCGATTATTTTTGCGAGCGATGGCTTTCTGGAACTGACCGAATATAGCCGCAAGAAA
TTCTGGGCCGCAACGGCCGCTTTCTGCAGGGCCCGAAACC **GATC** GCGATTGCG **GATC** AGCGCGAAATTAC
CGTGCAGCTGATТААСТАТАССАААAGCGGCAAAAAATTTCTGAACCTGCTGAACCTGCAGCCGATTGCG **GA**
TC AGAAAGGCGAACTGCAGGCGTTTATTGGC **GTGGTGTCTGGATGGC** **TAA** ТААСТCGAGGGATCCACTAGT
TCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCG
ТААТСАТGGTCАТАGCTGTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATACGAGCCGGAA
GCATAAAGTGТААAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAАСТCАCАТТААТТGCGTTGCGCTCACTGCCCGC
TTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATТААТGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGT
ATTGGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGG
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG
CATCASAААААТCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTC
GGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTG
GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGG
TGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAАСТACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG
CTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT **GATC** CGGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAG **GATC** TCAAGAA **GATC** CTTT **GATC** TTTT

CTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG **GA**
TC TTCACCTA **GATC** CTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGG
TCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC **GATC** TGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTT
GCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC
CGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCA
GTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTT
CATTACAGCTCCGGTTCCCAAC **GATC** AAGGCGAGTTACAT **GATC** CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGC
TCSTTCGGTCCCTCC **GATC** GTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTG
CATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCT
GAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCTGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAG
AACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAG **GATC** TTACCGCTGTTGA **G**
ATC CAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACT **GATC** TTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCTTTTCAATATTTATGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT
ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

Укажите какой нуклеотиды были заменены в ходе ПЦР. Рассчитайте количество ДНК (А), зная размер продукта ПЦР и среднюю молекулярную масса пары оснований — 618 г/(моль·п.н). Ответ округлите до десятых. (2,5 баллов)

Ответ: за найденные праймеры по 0,5 баллов.

- ТАА (0,5 баллов);
- 321 п.н. (0,5 балл);
- для X= 50 нг/мкл: $300 \text{ фмоль} \cdot 321 \text{ п.н.} \cdot 618 \text{ г}/(\text{моль} \cdot \text{п.н}) / (50/2 \text{ нг}/\text{мкл}) = 2,4 \text{ мкл}$ (0,5 баллов).

Вопрос 2

Рассчитайте количество ДНК (Б,В,Г), если плазида рМ12 имеет размер 4698 п.н., а средняя молекулярная масса пары оснований — 618 г/(моль·п.н). Ответ округлите до десятых. (1,5 балла)

Ответ:

- Б= $30 \text{ фмоль} \cdot 4698 \text{ п.н.} \cdot 618 \text{ г}/(\text{моль} \cdot \text{п.н}) / (23 \text{ нг}/\text{мкл}) = 3,8 \text{ мкл}$ (0,5 баллов);
- В= $30 \text{ фмоль} \cdot 4698 \text{ п.н.} \cdot 618 \text{ г}/(\text{моль} \cdot \text{п.н}) / (24,9 \text{ нг}/\text{мкл}) = 3,5 \text{ мкл}$ (0,5 баллов);
- Г= $30 \text{ фмоль} \cdot 4698 \text{ п.н.} \cdot 618 \text{ г}/(\text{моль} \cdot \text{п.н}) / (17,5 \text{ нг}/\text{мкл}) = 5,0 \text{ мкл}$ (0,5 баллов)

Вопрос 3

Найдите в последовательности рМ12 праймеры для получения «ПЦР-продукт с рМ12 (pcr)». Укажите направления праймеров (прямой, обратный). (2 балла)

Праймеры:

5'-CCCGGGTCCCTGGAATAACAGGTTTTTC-3' **обратный**
5'-AGCGCTGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAG-3' **прямой**

За найденные праймеры по 0,5 баллов, за направление по 0,5 баллов.

рМ12:

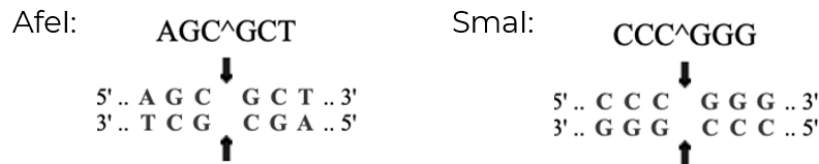
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCSTTATCCSTTTTTTTCGGCATTTTGCSTTCCSTGTTTTTGTCTCAC

CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAA **GATC** AGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTG **GA**
TC TCAACAGCGGTAA **GATC** CTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAG
TTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTC
TCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA
TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAAC **GATC** GGAGGACCGAAG
GAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGG **GATC** ATGTAACCTCGCCTT **GATC** GTTGGGAACCGGAGCTGAA
TGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTA
ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGAC
CACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG
GCAACTATGGATGAACGAAATAGACA **GATC** GCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCA
GACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAG **GATC** TAGGTGAA **G**
ATC CTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA
GAAAA **GATC** AAAG **GATC** TTCTTGA **GATC** CTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAC
CACCGCTACCAGCGGTGTTTGTGTTGCCG **GATC** AAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA
GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGCTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
ACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACC
GGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGC
CCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAACCTAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC
CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCA
GGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTG
GCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGA
GCTGATAACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAA
TACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGTTTTCCCGACTGGAA
AGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATG
CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATT
ACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAG
AACTAGT **GAAAACCTGTATTTCCAGGGA CCGGGG AGCGCT GATAAGAAATACTCAATAGGCTTAG** CTAT
CGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGT **GATC** ACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAAGTTCAAGTTCT
GGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGCTCTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCG
GAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACAGTCGGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGG
AGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGGAA
AGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATAT
CCAACTATCTATCATCTGCGAAAAAATTTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTAATCTATTTGG
CCTTAGCGCATATGATTAAGTTTCGTGGTCATTTTTTATTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGT
GGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAACCTACAATCAATTTTGAAGAAAACCCCTATTAACGCAAGTGGAA
GTAGATGCTAAAGCGATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCC
CCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGACCCCTAATTTTAAATC
AAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAGATACTTACGATGATGATTTAGATAATTTA
TTGGCGCAAATTGGA **GATC** AATATGCTGATTTGTTTTTGGCAGCTAAGAAATTTATCAGATGCTATTTTACTT
TCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAAGGCTCCCTATCAGCTTCAATGATTAACGCTACGATG
AACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTGCAACAACACTTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTT
TTTT **GATC** AATCAAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATT
TATCAAACCAATTTTAGAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAAACTAAATCGTGAAGATTTGCTG
CGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATTCCCATCAAATTCCTTGGGTGAGCTGCATGCTATTTTGA
GAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTCGAAT
TCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGTCATGGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACA
ATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAA
ACTTTGATAAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGCTTTATGAGTATTTTACGGTTTA

TAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTCTTTTCAGGTGAACAGAAG
AAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAAACAAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCA
AAAAATAGAATGTTTTGATAGTGTGAAATTTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCCA
ATTCGCCSTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC
TGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
ACC **GATC** GCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAA
AATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCSTTATAA
ATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTG
GACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCSTAATCAA
GTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACG
GGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGT
GTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCA
STTTTCGGGAAATGTGCGCGAACCCSTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
GAGACAATAACCSTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT

Вопрос 4

Найдите уникальные сайты AfeI и SmaI в последовательности плазмиды рM12.
(2 балла)



По 1 баллу за сайт.

Вопрос 5

Найдите общее количество нуклеотидов N_{tb} , мутированных N_{mb} и правильных нуклеотидов N_{cb} после 2-го цикла ПЦР для ампликона длиной $L = 4698$ п.н., используя Q5 ДНК-полимеразу и Taq ДНК-полимеразу. Ответ округлите до целых.
(3 балла)

Частота ошибок Q5 ДНК-полимеразы = $5 \cdot 10^{-7}$ замен/нт/удвоение.

Частота ошибок Taq ДНК-полимеразы = $1 \cdot 10^{-4}$ замен/нт/удвоение.

Эффективность репликации $R = 1,6$.

Начальные условия:

- Общего количество нуклеотидов $N_{tb}^0 = 2 \cdot L$.
- Мутированных нуклеотидов $N_{mb}^0 = 0$.
- Правильных нуклеотидов $N_{cb}^0 = 2 \cdot L$.

Общего количество нуклеотидов N_{tb} , мутированных нуклеотидов N_{mb} и правильных нуклеотидов N_{cb} на i -ом цикле:

$$\begin{aligned}
 N_{tb}^i &= N_{tb}^{i-1} \cdot R, \\
 N_{mb}^i &= N_{mb}^{i-1} \cdot R + N_{cb}^{i-1} \cdot (R - 1) \cdot E, \\
 N_{cb}^i &= N_{tb}^i - N_{mb}^i.
 \end{aligned}$$

Ответ:

$$N_{tb}^1 = 2 \cdot 4698 \cdot 1,6 = 15033,6,$$

$$N_{mb}^1 = 2 \cdot 4698 \cdot 0,6 \cdot 5 \cdot 10^{-7} = 0,0028188,$$

$$N_{cb}^1 = 15033,5971812,$$

$$N_{tb}^2 = 15033,6 \cdot 1,6 = 24053,76 = 24054, (0,5 \text{ баллов})$$

$$N_{mb}^2 = 0,0028188 \cdot 1,6 + 15033,5971812 \cdot 0,6 \cdot 5 \cdot 10^{-7} = 0,00451008 + 0,00451007915436 =$$

$$= 0,00902015830872 = 0, (0,5 \text{ баллов})$$

$$N_{cb}^2 = 24053,76 - 0,00902015830872 = 24053,75097984169 = 24054, (0,5 \text{ баллов})$$

$$N_{tb}^1 = 2 \cdot 4698 \cdot 1,6 = 15033,6,$$

$$N_{mb}^1 = 2 \cdot 4698 \cdot 0,6 \cdot 1 \cdot 10^{-4} = 0,56376,$$

$$N_{cb}^1 = 15033,03624,$$

$$N_{tb}^2 = 15033,6 \cdot 1,6 = 24053,76 = 24054, (0,5 \text{ баллов})$$

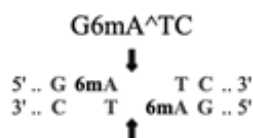
$$N_{mb}^2 = 0,56376 \cdot 1,6 + 15033,03624 \cdot 0,6 \cdot 1 \cdot 10^{-4} = 0,902016 +$$

$$+ 0,9019821744 = 1,8039981744 = 2, (0,5 \text{ баллов})$$

$$N_{cb}^2 = 24053,76 - 1,8039981744 = 24051,9560018256 = 24052. (0,5 \text{ баллов})$$

Вопрос 6

Сколько сайтов *M*alI находится в плазмиде pBlueScript II SK(+) SOPP3 и pMI2, если эти плазмиды полностью метилированы (6-метиладенин, 6mA). Зачем проводить реакцию с *M*alI после ПЦР? Что будет, если провести реакцию с *M*alI до ПЦР? (3 балла)



Ответ:

- 19 сайтов и 17 сайтов (по 1 баллу точный подсчет в каждой плазмиде, по 0,5 за 50% сайтов в каждой плазмиде);
- Чтобы избавиться от матрицы (0,5 баллов);
- ПЦР не пройдет (0,5 баллов).

Вопрос 7

Термолабильная щелочная фосфатаза катализирует дефосфорилирование 5'- и 3'-концов ДНК. Какие из ДНК фрагментов N-3-1, N-3-2, N-4-1, N-4-2 имеют фосфатные группы на концах, а какие нет? Почему? (4 балла)

Ответ:

- N-3-1, есть, праймеры содержат фосфаты (1 балл);
- N-3-2, нет, праймеры не содержат фосфаты (1 балл);
- N-4-1, нет, обработка термолабильной щелочной фосфатазой (1 балл);
- N-4-2 нет, обработка термолабильной щелочной фосфатазой (1 балл);

Вопрос 8

Будут ли отличаться продукты лигирования N-5-1, N-5-2, N-5-3? Почему?

Какие лигазы могут использоваться в реакциях N-5-1, N-5-2, N-5-3?

Предположите, чем отличается Taq ДНК лигаза от E.coli ДНК лигазы? (2 балла)

	Т4 ДНК лигаза	Т3 ДНК лигаза	Т7 ДНК лигаза	Taq ДНК лигаза	E.coli ДНК лигаза
Лигирования по липким концам	★★	★★	★★	★	★
Лигирования по тупым концам	★★	★★			
Лигирования только липких концов			★★★★		
Лигирование одноцепочечных разрывов	★★★★	★★	★★	★★	★★

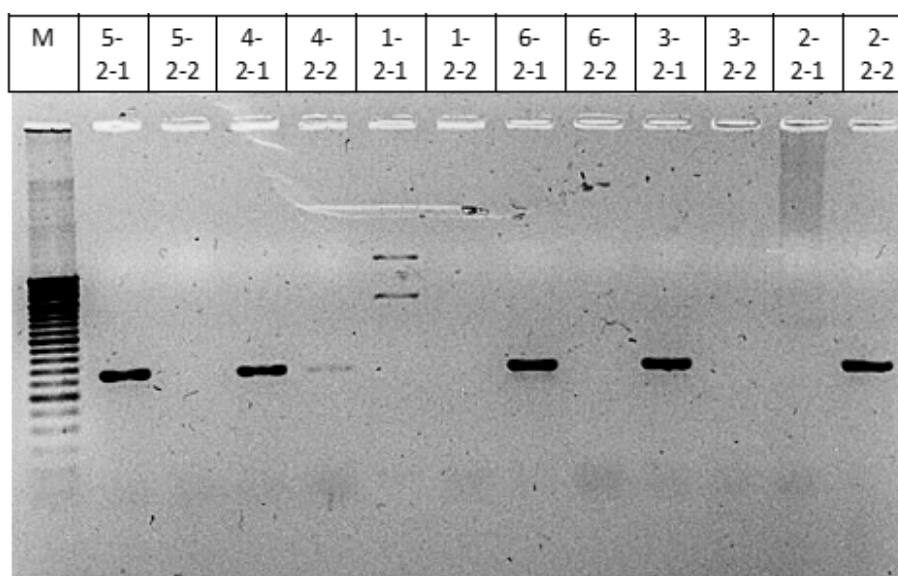
Ответ:

- Да, так как для N-5-1 вставка гена будет до сайта AfeI, а N-5-2 и N-5-3 внутри (1 балл);
- Т4 ДНК лигаза и Т3 ДНК лигаза (0,5 баллов);
- Термостабильность (0,5 баллов).

Этап 2

Практическая часть

Трансформация химически компетентных клеток



— Кажется, у нас получилось собрать модуль «SOPP3» по чертежам и запустить его к станции dCas9 — сказал инженер Касовик-затейник.

— Да, но стыковка по тупым концам модуля прошла ночью. Нам остается только надеяться, что все получилось.

— Юнга, не нужно паниковать. Сегодня мы свяжемся с Е. Колей и проверим состояние модуля.

— Станция слишком далеко, доставка сообщения будет длиться сутки.

— Сутки... Опять ночь не спать.

Оборудование:

- Лед;
- Термостат/шейкер-инкубатор;
- Пробирки (0,6 мл);
- Носики на 10 мкл;
- Маркеры;
- Штатив для пробирок.

Реагенты:

- Химически компетентные клетки *E. coli* шт. *NEB®5-alpha* (100 мкл, 2 пробирки);
- SOC-среда (1 мл, 4 пробирки);
- Лигазные смеси N-5-1, N-5-2, N-5-3.

Протокол

1. Разморозьте 2 аликвоты (100 мкл) клеток *E. coli* шт. *NEB®5-alpha* на льду.
2. Перенесите по 50 мкл клеточной суспензии в две дополнительные, заранее охлажденные на льду пробирки.
3. Подпишите 4 пробирки с клеточной суспензией по 50 мкл:
 - на первой «№команды»-«6-0» Например, для команды №N шифр N-6-0;
 - на второй «№команды»-«6-1» Например, для команды №N шифр N-6-1;
 - на третьей «№команды»-«6-2» Например, для команды №N шифр N-6-2;
 - на четвертой «№команды»-«6-3» Например, для команды №N шифр N-6-3.
4. Добавьте 5 мкл лигазной смеси:
 - Из N-5-1 в N-6-1.
 - Из N-5-2 в N-6-2.
 - Из N-5-3 в N-6-3.
5. Инкубируйте пробирки с клеточной суспензией в течение 40 мин на льду.
6. Маркируйте 4 пробирки с 1 мл SOC-средой аналогично п.3, т.е. N-6-0, N-6-1, N-6-2, N-6-3. Нагрейте их в термостате при 37 °С.
7. Инкубируйте пробирки с клеточной суспензией N-6-0, N-6-1, N-6-2, N-6-3 в течение 5 мин при 37 °С.
8. Переместите весь объем клеточных суспензий N-6-0, N-6-1, N-6-2, N-6-3 в соответствующие пробирки с SOC-средой.
9. Инкубируйте клетки в течение 40 мин при 37 °С.

Подготовка чашек Петри (4 шт)

Оборудование:

- Плитка/ микроволновая печь;
- Чашки Петри (4 шт);
- Ламинар.

Реагенты:

- Ампициллин (Амп, 100 мг/мкл);
- LB-агар (80 мл).

Протокол

1. Расплавьте 80 мл LB-агара. Дождитесь пока он остынет до 50-60°C.
2. К жидкому LB-агару добавьте 80 мкл ампициллина (Амп, 100 мг/мкл).
3. Перемешайте жидкий LB-агар и залейте его в чашки Петри по 20 мл.
4. Маркируйте чашки:
 - *E. coli* NEB®5-alpha, N-6-0, дата, Амп 100 мкг/мл;
 - *E. coli* NEB®5-alpha, N-6-1, дата, Амп 100 мкг/мл;
 - *E. coli* NEB®5-alpha, N-6-2, дата, Амп 100 мкг/мл;
 - *E. coli* NEB®5-alpha, N-6-3, дата, Амп 100 мкг/мл.

Посев клеток на питательную среду

Оборудование:

- Мини-центрифуга;
- Шпатель Дригальского;
- Спиртовка;
- Ламинар.

Протокол

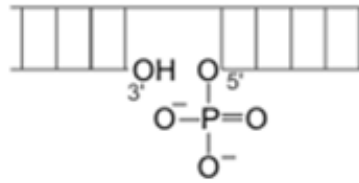
1. Центрифугируйте клетки N-6-0, N-6-1 N-6-2 N-6-3, в течение 3 мин при 6000 об./мин.
2. Отберите и поместите в слив 950–1000 мкл супернатанта. Должно остаться 50–100 мкл SOC-среды.
3. Ресуспендируйте клеточные осадки в 50–100 мкл SOC-среды и перенесите их в соответствующие чашки Петри.
4. С помощью стерильного шпателя Дригальского равномерно распределите смесь на поверхности LB-агара вплоть до ее высыхания.
5. Поместите чашки, предварительно их перевернув, в инкубатор и оставьте их в течение ночи при 37 °С.

Теоретическая часть

Вопрос 1

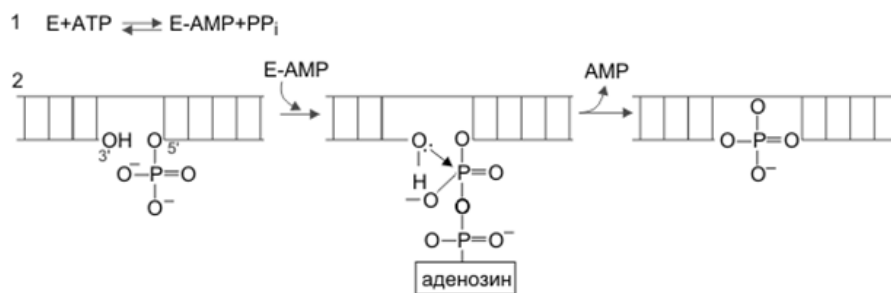
Предложите механизм действия ДНК лигазы (3 стадии) на одноцепочечном разрыве ДНК, если для лигирования необходима молекула АТФ. Какие продукты об-

разуются из АТФ? (4 балла)



Ответ:

- АМФ и пиррофосфат (1 балл);
- (3 балла).



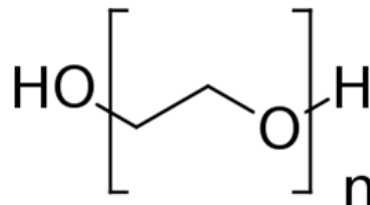
Вопрос 2

По сравнению с лигированием липких концов, лигирование тупых концов в 10–100 раз менее эффективно. Почему?

Полиэтиленгликоль 8000 (ПЭГ8000, PEG8000) используют, чтобы увеличить эффективность лигирования тупых концов. Изобразите структуру полиэтиленгликоля. Предположите, что обозначает число 8000 в названии вещества. (3 балла)

Ответ:

- Это связано с тем, что, в отличие от липких концов, между комплементарными выступающими нуклеотидами нет водородных связей, которые стабилизируют формирование структуры вектор/вставка (1 балл).
- (1 балл).



- 8000 — средняя молекулярная масса (1 балл).

Вопрос 3

Рассчитайте сколько было бы одноцепочечных разрывов в одном дочернем геноме *E. coli* после репликации, если бы отсутствовала ДНК лигаза *E. coli*. Размер кольцевой молекулы ДНК *E. coli* — 4800000 п.н. Размер фрагментов Оказаки — 1500 п.н. Что такое фрагменты Оказаки? Для чего необходима РНКаза III в ходе репликации? (3 балла)

Ответ:

- $4800000/2 = 2400000$ п.н. для запаздывающей цепи.
- 2400000 п.н./1500 = 1600 фрагментов Оказаки.
- 1600 фрагментов Оказаки + 1 лидирующая цепь = 1601 фрагмент ДНК = 1601 одноцепочечных разрывов (**1 балл**).
- Фрагменты Оказаки — относительно короткие фрагменты ДНК (с РНК-праймером на 5'-конце), которые образуются на отстающей цепи в процессе репликации ДНК (**1 балл**).
- РНКаза HI необходима для разрезания ДНК-РНК гибридных участков ДНК, образованных праймазой (**1 балл**).

Вопрос 4

Одна клетка *E. coli* начинает делиться. После третьего деления в одной из дочерних клеток возникает мутация **A** (на жизнеспособность клеток она не влияет). После шестого деления в одной из дочерних клеток той же линии (то есть, уже несущих мутацию **A**) возникает мутация **B**, приводящая к гибели клетки. После девятого деления в одной из дочерних клеток линии, уже несущих мутацию **A**, возникает мутация **C** (на жизнеспособность клеток она не влияет).

Сколько клеток только с мутацией **A** будет существовать в популяции после 15 деления? Сколько клеток с мутацией **A** и **C** будет существовать в популяции после 15 деления?

Какой процент от общего числа клеток они составят? Ответ округлите до десятых. (**4 балла**)

Ответ:

- Общее количество клеток с мутацией **A** = $2^{15-3} - 2^{15-6} = 2^{12} - 2^9 = 4096 - 512 = 3584$.
- Общее количество клеток = $2^{15} - 2^{15-6} = 32768 - 512 = 32256$.
- Общее количество клеток с мутацией **C** = $2^{15-9} = 2^6 = 64$.
- Количество клеток только с мутацией **A** = $3584 - 64 = 3520$ (**1 балл**).
- Количество клеток только с мутацией **A** и **C** = 64 (**1 балл**).
- Процент клеток только с мутацией **A** = $3520/32256 \cdot 100\% = 10,9\%$ (**1 балл**).
- Процент клеток с мутацией **A** и **C** = $64/32256 \cdot 100\% = 0,2\%$ (**1 балл**).

— Наконец-то пришло сообщение от Е. Коли! — прокричал инженер Касовик-затейник.

— Все хорошо? — спросил Юнга.

— На станции все живы, но состояние модуля не определено!

— Что же делать?

— Необходимо проанализировать состояние. Высылаем группу ПЦР!

— А они справятся?

— Конечно, мы с ними отправим лучшего специалиста по стыковке — Афоню!

Этап 3

Практическая часть

Приготовление проб для анализа

Оборудование:

- Ламинар;
- Пробирки (0,6 мл);
- Носики на 200 мкл или на 20 мкл;
- Маркер;
- Штатив для пробирок.

Реагенты:

- 0,8% NaCl (**NaCl, 480 мкл**);
- H₂O (**mQ, 1,5 мл**).

Протокол

1. Возьмите 24 пробирки на 0,6 мкл.
2. Подпишите их:

N-7-1	N-7-2	N-7-3	N-7-4	N-7-5	N-7-6	N-7-7	N-7-8	N-7-9	N-7-10	N-7-11	N-7-12
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

N-8-1	N-8-2	N-8-3	N-8-4	N-8-5	N-8-6	N-8-8	N-8-8	N-8-9	N-8-10	N-8-11	N-8-12
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

где N — номер команды.

3. В пробирки N-7-1... N-7-12 добавьте 20 мкл 0,8% NaCl.

N-7-1	N-7-2	N-7-3	N-7-4	N-7-5	N-7-6	N-7-7	N-7-8	N-7-9	N-7-10	N-7-11	N-7-12
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

4. В пробирки N-8-1... N-8-12 добавьте 18 мкл H₂O.

N-8-1	N-8-2	N-8-3	N-8-4	N-8-5	N-8-6	N-8-8	N-8-8	N-8-9	N-8-10	N-8-11	N-8-12
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

5. Выберите по 4 колонии с чашек N-6-1, N-6-2, N-6-3. Внесите в таблицу номер чашки, с которой вы будете брать колонию и вносить в пробирки N-7-1... N-7-12.

N-7-1	N-7-2	N-7-3	N-7-4	N-7-5	N-7-6	N-7-7	N-7-8	N-7-9	N-7-10	N-7-11	N-7-12

6. С помощью стерильного наконечника пипетки отберите одну колонию и перенесите в соответствующую пробирку. Ресуспендируйте клетки пипетированием.
7. Повторите процедуру для остальных 11 колоний.
8. Перенесите по 2 мкл суспензии клеток в пробирки с водой. Перемешайте растворы пипетированием.

N-7-1	N-7-2	N-7-3	N-7-4	N-7-5	N-7-6	N-7-7	N-7-8	N-7-9	N-7-10	N-7-11	N-7-12
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------

↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
N-8-1	N-8-2	N-8-3	N-8-4	N-8-5	N-8-6	N-8-8	N-8-8	N-8-9	N-8-10	N-8-11	N-8-12

ПЦР с колоний

Оборудование:

- Пробирки в стрипах для ПЦР (2 стрипа 8×0,2 мл);
- Носики на 200 мкл или на 20 мкл;
- Маркер;
- Штатив для пробирок;
- Амплификатор.

Реагенты:

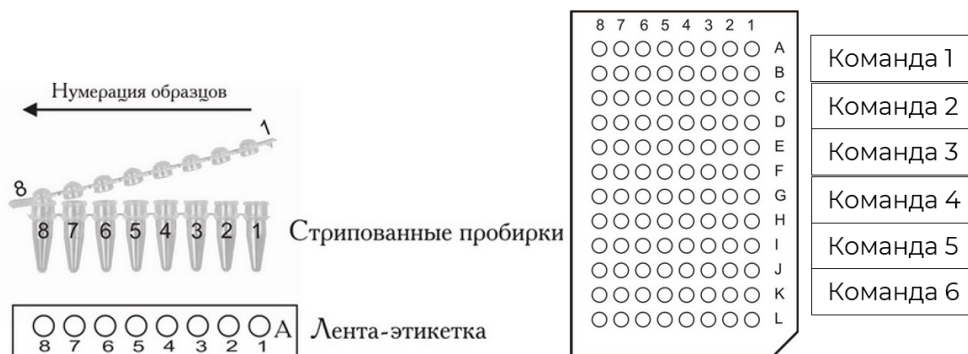
- H₂O (mQ, 1,5 мл);
- BioMaster HS-Taq, PCR Color (**HS-Taq, 150 мкл**);
- Прямой праймер, GCTCACATGTTCTTTTCCTGCGTTATCC (**fwd, 10 мкМ**);
- Обратный праймер, CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG (**rev, 10 мкМ**).

Протокол

1. Приготовьте мастер-микс, для этого в пробирку с BioMaster HS-Taq, PCR Color (HS-Taq, 150 мкл) добавьте остальные компоненты:

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Мастер-микс, мкл
1	BioMaster HS-Taq, PCR Color	2x	1x	150
2	Вода	—	—	60
3	Прямой праймер	10 мкМ	0,5 мкМ	15
4	Обратный праймер	10 мкМ	0,5 мкМ	15

2. Подпишите каждую полоску стрипованных пробирок тонким стойким маркером: сами пробирки в направлении от 1 до 8, полоску-крышку с одного конца 1, с другого — 8 (соответственно).



3. Добавьте к пробиркам в стрипах по 20 мкл мастер-микса (ММ).
Первый стрип:

ММ	ММ	ММ	ММ	ММ	ММ	ММ	ММ
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1	2	3	4	5	6	7	8

Второй стрип:

ММ	ММ	ММ	ММ				
↓	↓	↓	↓				
1	2	3	4	5	6	7	8

4. Добавьте образцы N-8-1... N-8-12 согласно схеме:

Первый стрип:

N-8-1	N-8-2	N-8-3	N-8-4	N-8-5	N-8-6	N-8-7	N-8-8
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
1	2	3	4	5	6	7	8

Второй стрип:

N-8-9	N-8-10	N-8-11	N-8-12				
↓	↓	↓	↓				
1	2	3	4	5	6	7	8

5. Приготовьте программу для ПЦР (*для ассистентов*).

Таблица VI.2.5: Программа ПЦР

Количество циклов	Этап	Температура	Время
1	Денатурация	95	5 мин
25	Денатурация	95	30 с
	Отжиг праймеров	62	30 с
	Элонгация	72	2 мин 30 с
1	Элонгация	72	15 мин

6. Передайте пробирки в стрипах организаторам.

Анализ продуктов ПЦР с помощью агарозного гель-электрофореза

Оборудование:

- Камера для гель-электрофореза;
- Носики на 10 мкл;
- Пробирки на 0,6 мл;
- Штатив для пробирок;
- Микроволновая печь/плитка;
- Гель-документирующая система.

Реагенты:

- Агароза;
- Буфер ТАЕ, 1x;
- ДНК маркер 1kb (SibEnzyme);
- Бромистый этидий, 10 мг/мл (**BE**).

Протокол

1. Добавьте к навеске агарозы однократный буфер ТАЕ (1x) согласно таблице ниже.

Компонент	Конечная концен-трация	Количество ком-понента	Общий объем, мл
ТАЕ	1x	100 мл	100 мл
Агароза	1%	1 г	
Бромистый этидий	0,5 мкг/мл	5 мкл	

2. Накройте сосуд и доведите до кипения.
3. Остудите раствор агарозы до температуры ± 50 °С, добавьте бромистый этидий и залейте в форму для геля.
4. После застывания поместите гель в камеру для электрофореза, наполненную ТАЕ (1x).
5. Нанесите по 6 мкл ДНК маркера 1kb (SibEnzyme) в первый и последний карман (*для ассистентов*).
6. Нанесите по 3 мкл ПЦР смеси N-8-1 и N-8-12 в карманы.
7. Проведите гель-электрофорез при 135 В в течение часа.
8. Сфотографируйте гель с помощью гель-документирующей системы.

Рестрикционный анализ

Оборудование:

- Пробирки 0,6 мкл;
- Носики на 20 мкл;
- Маркер;
- Штатив для пробирок;
- Термостат.

Реагенты:

- H₂O (**mQ**, 1,5 мл);
- Буфер ROSE (**ROSE**, 10x, **SibEnzyme**);
- AfeI (**10 ед./мкл**, **SibEnzyme**);
- Буфер для нанесения, 6x (30% (об. /об.) глицерин, 0,25% (м./об.) бромфеноловый синий) (**8 мкл**).

1. Приготовьте мастер-микс, для этого в пробирку добавьте компоненты:

№	Компонент	Начальная концентрация	Конечная концентрация	Мастер-микс, мкл
1	Вода	—	—	13
2	Буфер ROSE	10x	1x	2
3	AfeI	10 ед./мкл	0,5 ед./мкл	1

2. Подпишите 4 пробирки на 0,6 мкл: N-10-1, N-10-2, N-10-3, N-10-4.
3. Добавьте к ним по 4 мкл мастер-микса.
4. Из данных «9. Анализ продуктов ПЦР с помощью агарозного

гель-электрофореза» выберете 4 ПЦР-образца для проверки с помощью рестриктазы AfeI. Запишите выбранные образцы в таблицу. Например, N-8-3, N-8-5, N-8-10, N-8-12.

N-10-1	N-10-2	N-10-3	N-10-4
↓	↓	↓	↓

5. Добавьте к пробиркам N-10-1, N-10-2, N-10-3, N-10-4, по 1 мкл соответствующих ПЦР-образцов.
6. Инкубируйте реакцию в термостате в течение 10 минут при 37°C.
7. Инактивируйте реакцию в течение 20 минут при 65°C (опционально).
8. Добавьте по 1 мкл буфера для нанесения (6x), перемешайте пипетированием.
9. Приготовьте агарозный гель согласно протоколу «9. Анализ продуктов ПЦР с помощью агарозного гель-электрофореза» п. 1–5.
10. Нанесите по 5 мкл N-10-1, N-10-2, N-10-3, N-10-4.
11. Проведите гель-электрофорез при 135 В в течение часа.
12. Сфотографируйте гель с помощью гель-документирующей системы.

Теоретическая часть

Задача VI.2.5.1. (5 баллов)

Вопрос 1

Для того, чтобы узнать размер побочного ПЦР-продукта с колоний, найдите праймеры в плазмиде pM12 (последовательность записана с 5' по 3'). Посчитайте размер ПЦР-продукта с плазмиды pM12.

Какие размеры фрагментов побочного ПЦР-продукта вы будете наблюдать после разрезания AfeI? Сайт AfeI выделен: AGCGCT.

Почему может образовываться плаزمид pM12 в ходе клонирования? (5 баллов)

Прямой праймер:

5'-GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC-3'
 5'-GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC-3'

Прямой праймер, обратная комплементарная последовательность:

5'-GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGC-3'
 5'-GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC-3'

Обратный праймер:

5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

Обратный праймер, обратная комплементарная последовательность:

5'-CGTTTTACAACGTCGTGACTGGG-3'
5'-**CCAGTCACGACGTTGTAAAACG**-3'

pMI2:

ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGTCCACC
CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT
CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGA
ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA
TACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGA
ACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
TTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT
TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCACCGCTACCAGCG
GTGGTTTGTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC
CAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCT
CGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGA
CGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGAGCGGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG
TATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC
GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGGCCTTTT **GCTCACA**
TGTTCTTTCCTGCGTTATCC CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGTAGTGAGCTGATACCGCTC
GCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAACCGCC
TCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAG
CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA
TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGC
AATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGAAGTGTGAAAAC
CTGTATTTCCAGGGACCCGGGAGCGCTGATAAGAAATACTCAATAGGCTTAGCTATCGGCACAAATAGCGTGG
GATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTCTAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCA
CAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTTTTTATTTGACAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAA
CGGACAGCTCGTAGAAGGTATACAGCTCGGAAGAATCGTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGA
TGCGGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTTCATCGACTTGAAGAGTCTTTTTTGGTGAAGAAGACAAGAAGCATGA
ACGTCATCCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTTGCTTATCATGAGAAATATCCAACCTATCTATCATCTG
CGAAAAAATTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATTTGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTA
AGTTTCGTGGTCATTTTTGATTGAGGGAGATTTAAATCCTGATAATAGTGATGTGGACAACTATTTATCCA
GTTGGTACAAACCTACAATCAATTTTTGAAGAAAACCTATTAACGCAAGTGGAGTAGATGCTAAAGCGATT
CTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAAATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATG
GCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTTGACCCCTAATTTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGA
AGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAGATACTTACGATGATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTGGAGAT
CAATATGCTGATTTGTTTTGGCAGCTAAGAATTTATCAGATGCTATTTTACTTTTACAGATATCCTAAGAGTAA
ATACTGAAATAACTAAGGCTCCCCTATCAGCTTCAATGATTAACGCTACGATGAACATCATCAAGACTTGAC
TCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAACAACCTCCAGAAAAGTATAAAGAAATCTTTTTTGTATCAATCAAAAAAC
GGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAGAAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAA
AAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAACTAAATCGTGAAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGA

CAACGGCTCTATTCCCCATCAAATTCACCTGGGTGAGCTGCATGCTATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTAT
 CCATTTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAATCTTGACTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCAT
 TGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATGGATGACTCGGAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGA
 AGAAGTTGTCGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATTTATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAATCTTCCA
 AATGAAAAAGTACTACCAAAACATAGTTTGTCTTATGAGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCA
 AATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTTCTTTTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACT
 CTTCAAAAACAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTAAGAAGATTATTTCAAAAAAATAGAATGTTTTGAT
 AGTGTGAAATTTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATGCTTCATTAGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG
 TATTACGCGCGCTCACTGGCCGT **CGTTTTACAACGTCGTCGACTGGG** AAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAAT
 CGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC
 AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGT
 TAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGA
 TAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG
 AAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCATAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGC
 CGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGG
 CGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGT
 AACCACCACACCCGCCGCGCTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGC
 GGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAA
 TGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT

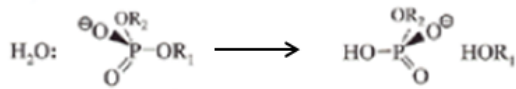


Ответ:

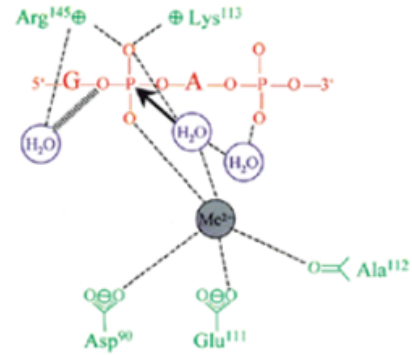
- Найденные праймеры — (по 1 баллу, оба 2 балла);
- Размер — 2315 п.н. (1 балл);
- Осталась матрица рМІ2 (не сработал MаII) или разрезанный вектор не дефосфорилировался и произошло самолигирование рМІ2 (1 балл, по 0,5 за половину ответа);
- 468 + 1847 (1 балл).

Задача VI.2.5.2. (5 баллов)

Рестриктаза AfeI впервые обнаружена в грамотрицательных бактериях *Alcaligenes faecalis*, используемой в производстве полусинтетических антибиотиков и некоторых аминокислот. AfeI специфично расщепляет двухцепочную молекулу ДНК, содержащую последовательность:



EcoRI



где стрелками обозначено место расщепления. AfeI относится ко второму типу рестриктаз, подтипу P, называемых также ортодоксальными рестриктазами. Они представляют собой гомодимер, массой около 60 кДа, распознающий палиндромную последовательность длиной 4–8 п.н. Для протекания реакции расщепления ДНК необходимы ионы Mg_2^+ , при этом расщепление может происходить как внутри сайта распознавания, так и в смежной с ним последовательности. Реакции расщепления ДНК рестриктазами этого типа были изучены на основе рестриктаз EcoRI и EcoRV. Для их описания были предложены два механизма.

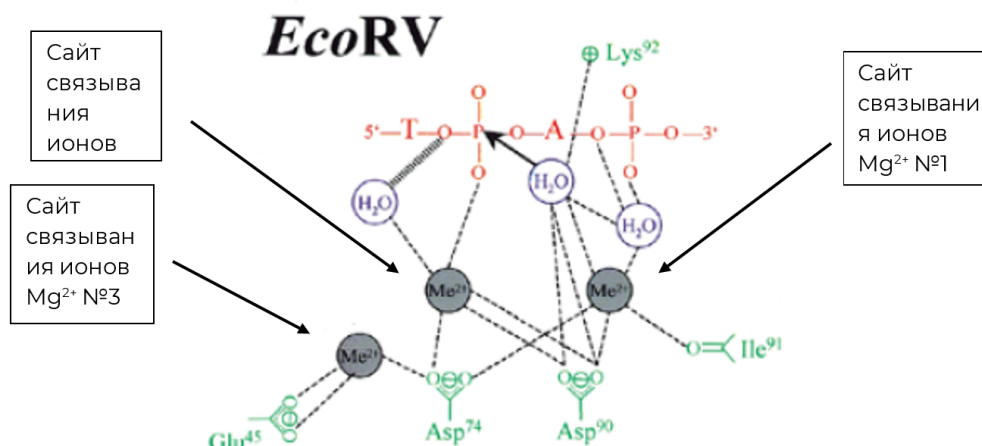
Вопрос 1

За счет разрыва каких связей происходит разрезание молекул ДНК? (0,5 балла)

Вопрос 2

Предложите механизмы протекания этой реакции? Какое название имеет каждый из предложенных Вами механизмов? (1,5 балла)

Среди рестриктаз второго типа распространен каталитический мотив PD...D/EХК, где Х-карбонильной группа главной цепи неполярной аминокислоты. Рестриктазы IIР, являясь металлзависимыми ферментами, требуют в качестве кофактора ионы магния. На один акт реакции может приходиться от одного до трех ионов металлов. Так, у EcoRV есть три металлсвязывающих сайта, а EcoRI только один.



Вопрос 3

Какую роль выполняет ион металла в данной реакции? Как участвует Mg^{2+} в катализе данной реакции в первом и втором сайтах связывания EcoRV? (1,5 балла)

Основным кофактором рестриктаз данного типа выступает ион Mg^{2+} . Однако ионы магния могут замещаться различными ионами двухвалентных металлов (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и другие в зависимости от фермента), но не ионом кальция Ca^{2+} , так как последний, как правило приводит к ингибированию рестрикции.

Вопрос 4

Как замена магния на ионы других двухвалентных металлов в активном центре рестриктаз повлияет на катализируемую реакцию и почему? Как называется это явление? (1,5 балла)

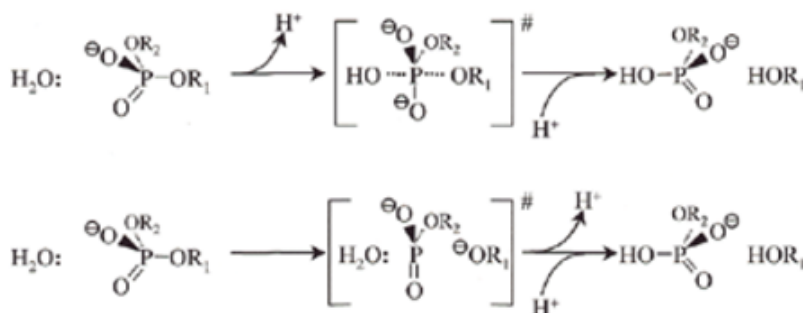
Ответ:

1. Гидролиз фосфодиэфирной связи. Указан тип связи — 0,5 балла, в противном случае ноль.

2. Ассоциативный и диссоциативный механизмы.

Вместо ассоциативного механизма также принимается нуклефильное присоединение, что является первой стадией этого механизма с последующим отщеплением.

За приведение правильного механизма ставится 0,5 балла, двух — 1 балл. Если приведены оба названия — 0,5 балла, если только одно — 0,25 балла.



3. За каждый из этих пунктов (6 пунктов) дается по 0,25 балла:

- Стабилизация фермент-субстратного комплекса за счет электростатических взаимодействий с сахарофосфатным остовом.
- Координация молекул воды в активном центре.
- Стабилизация структуры активного центра. Ион магния образует ионные пары с аминокислотами, входящими в активный центр.
- Способствует диссоциации молекулы воды за счет образования ионных связей с остатками аминокислот. Вода, содержащаяся в координационной сфере магния, находится под воздействием основных остатков аминокислот, что может повышать нуклеофильность молекулы воды.
- Роли в разных сайтах:
 - одна из двух молекул воды из гидратного окружения ионных пар первого сайта выступает в роли нуклеофила, атакуя атом фосфора при расщепляемой связи;

– молекула воды гидратного окружения ионных пар второго сайта протонирует уходящую группу, способствуя расщеплению этой фосфор-кислородной связи.

4. При замене магния на марганец в активном центре происходит снижение специфичности рестриктазы.

- Ионный радиус марганца больше, чем у магния, что приводит к искажению структуры активного центра и, как следствие, нарушает необходимость для дискриминации специфического субстрата взаимодействия между ферментом и расщепляемой последовательностью.
- Снижается специфичность распознавания и расщепления последовательности ДНК.
- Явление носит название звездчатая активность (Star activity).

За каждый пункт — 0,5 балла.

Задача VI.2.5.3. (5 баллов)

Для того чтобы определить клоны, содержащие целевую плазмиду pMI2-SOPP3 на чашках N-6-2, N-6-3, необходимо ответить на вопросы.

Вопрос 1

Какие размеры фрагментов ПЦР-продукта с целевой плазмиды pMI2-SOPP3 (последовательность записана с 5' по 3') вы будете наблюдать после разрезания AfeI? (1 балл)

Вопрос 2

Какие размеры фрагментов ПЦР-продукта с побочной плазмиды pMI2-SOPP3rev вы будете наблюдать после разрезания AfeI, если в этой плазмиде последовательность вставки обратно-комплементарная? (1 балл)

Для того чтобы определить клоны, содержащие плазмиду pMI2-SOPP3-PCR на чашках N-6-1, необходимо ответить на вопросы.

Вопрос 3

Какие размеры фрагментов ПЦР-продукта с целевой плазмиды pMI2-PCR-SOPP3 (вставка гена SOPP3 в наработанный ПЦР продукт pMI2) вы будете наблюдать после разрезания AfeI? (1 балл)

Вопрос 4

Какие размеры фрагментов ПЦР-продукта с побочной плазмиды pMI2-PCR-SOPP3rev вы будете наблюдать после разрезания AfeI, если в этой плазмиде последовательность вставки обратно-комплементарная? (1 балл)

Вопрос 5

Предложите альтернативный метод клонирования. Напишите его преимущества и недостатки относительно рестриктазно-лигазного метода. (1 балл)

Праймеры выделены:

GCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCC и **CGTTTTACAACGTCGTGACTGGG**

Сайт AfeI по которому произошла вставка выделен: **AGC** **GCT**.

Вставка гена SOPP3 выделена:

ATGGAAAAAGCTTTGTGATTACCGATCCGCGCCTGCCGGATAACCCGATTATTTTTGCGAGCGATGGCTTT
 CTGGAAGTACCGAATATAGCCGCGAAGAAATCTGGGCCGCAACGGCCGCTTTCTGCAGGGCCCGAAACC
 GATCAGGCGACCGTGCAGAAAATTCGCGATGCGATTTCGCGATCAGCGCGAAATTACCGTGCAGCTGATTAAC
 TATACAAAAGCGGCAAAAAATTTCTGAACCTGCTGAACCTGCAGCCGATTTCGCGATCAGAAAAGCGAACTG
 CAGGCGTTTATTGGCGTGGTGTGGATGGCAGC

pMI2-SOPP3:

ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCCACC
 CAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGTTACATCGAACTGGATCT
 CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG
 CTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGA
 ATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
 TGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTA
 ACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCA
 TACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGA
 ACTACTTACTCTAGCTTCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
 CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCA
 TTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT
 GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTT
 TACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTG
 ATAATCTCATGACCAAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
 AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCG
 GTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAC
 CAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCT
 CGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGA
 CGATAGTTACCGGATAAGGGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA
 CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
 GGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGG
 TATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC
 GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCGCCTTTT **GCTCACA**
TGTTCTTTCCTGCGTTATCC CCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTGTAGTGAGCTGATACCGCTC
 GCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCC
 TCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAG
 CGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA
 TGTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGC
 AATTAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGTGAAAAC
 CTGTATTTCCAGGGACCCGGG **AGC** ATGGAAAAAGCTTTGTGATTACCGATCCGCGCCTGCCGGATAACCC
GATTATTTTTGCGAGCGATGGCTTTCTGGAAGTACCGAATATAGCCGCGAAGAAATCTGGGCCGCAACGG
CCGCTTTCTGCAGGGCCCGAAACCGATCAGGCGACCGTGCAGAAAATTCGCGATGCGATTTCGCGATCAGCG
CGAAATTACCGTGCAGCTGATTAACATAACAAAAGCGGCAAAAAATTTCTGAACCTGCTGAACCTGCAGCC
GATTCGCGATCAGAAAGCGAACTGCAGGCGTTTATTGGCGTGGTGTGGATGGCAGC **GCT** GATAAGAAAT
 ACTCAATAGGCTTAGCTATCGGCACAAATAGCGTCGGATGGGCGGTGATCACTGATGAATATAAGGTTCCGTC
 TAAAAAGTTCAAGGTTCTGGGAAATACAGACCGCCACAGTATCAAAAAAATCTTATAGGGGCTCTTTTATTT
 GACAGTGGAGAGACAGCGGAAGCGACTCGTCTCAAACGGACAGCTCGTAGAAGGTATACACGTCGGAAGAATC
 GTATTTGTTATCTACAGGAGATTTTTTCAAATGAGATGGCGAAAGTAGATGATAGTTTCTTTTCATCGACTTGA
 AGAGTCTTTTTTGGTGGAAGAAGACAAGAAGCATGAACGTCATCTATTTTTGGAAATATAGTAGATGAAGTT
 GCTTATCATGAGAAATATCCAACCTATCTATCATCTGCGAAAAAATTTGGTAGATTCTACTGATAAAGCGGATT
 TGCGCTTAATCTATTTGGCCTTAGCGCATATGATTAAGTTTTCGTGGTCATTTTTTGTGATTGAGGGAGATTTAAA
 TCCTGATAATAGTGATGTGGACAAACTATTTATCCAGTTGGTACAAAACCTACAATCAATATTTGAAGAAAAC
 CCTATTAACGCAAGTGGAGTAGATGCTAAAGCGATTCTTTCTGCACGATTGAGTAAATCAAGACGATTAGAAA

ATCTCATTGCTCAGCTCCCCGGTGAGAAGAAAAATGGCTTATTTGGGAATCTCATTGCTTTGTCATTGGGTTT
GACCCCTAATTTTAAATCAAATTTTGATTTGGCAGAAGATGCTAAATTACAGCTTTCAAAAGATACTTACGAT
GATGATTTAGATAATTTATTGGCGCAAATTTGGAGATCAATATGCTGATTTGTTTTGGCAGCTAAGAATTTAT
CAGATGCTATTTTACTTTCAGATATCCTAAGAGTAAATACTGAAATAACTAAGGCTCCCCTATCAGCTTCAAT
GATTAACGCTACGATGAACATCATCAAGACTTGACTCTTTTAAAAGCTTTAGTTCGACAACAACCTTCCAGAA
AAGTATAAAGAAATCTTTTTGATCAATCAAAAAACGGATATGCAGGTTATATTGATGGGGGAGCTAGCCAAG
AAGAATTTTATAAATTTATCAAACCAATTTTAGAAAAAATGGATGGTACTGAGGAATTATTGGTGAACSTAAA
TCGTGAAGATTTGCTGCGCAAGCAACGGACCTTTGACAACGGCTCTATCCCCATCAAATTCACCTTGGGTGAG
CTGCATGCTATTTTGAGAAGACAAGAAGACTTTTATCCATTTTTAAAAGACAATCGTGAGAAGATTGAAAAAA
TCTTGACTTTTTCGAATTCCTTATTATGTTGGTCCATTGGCGCGTGGCAATAGTCGTTTTGCATGGATGACTCG
GAAGTCTGAAGAAACAATTACCCCATGGAATTTTGAAGAAGTTGTGATAAAGGTGCTTCAGCTCAATCATT
ATTGAACGCATGACAACTTTGATAAAAAATCTTCCAAATGAAAAAGTACTACCAAACATAGTTTGCTTTATG
AGTATTTTACGGTTTATAACGAATTGACAAAGGTCAAATATGTTACTGAAGGAATGCGAAAACCAGCATTCT
TTCAGGTGAACAGAAGAAAGCCATTGTTGATTTACTCTTCAAAAACAATCGAAAAGTAACCGTTAAGCAATTA
AAAGAAGATTATTTCAAAAAAATAGAATGTTTTGATAGTGTGAAATTTTCAGGAGTTGAAGATAGATTTAATG
CTTCATTAGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCGCTCACTGGCCGT **CGTTTTACAACGT**
CGTGACTGGG AAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGT
AATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGAAATTGTAAG
CGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATC
GGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTC
CACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGA
ACCATCACCCATAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCC
CGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG
CTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACA
GGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCA
AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTCAGATGTTCTTTCTGCGTTATCC

Ответ:

1. 789 и 1847 (1 балл).
2. 468 и 2168 (1 балл).
3. 789 и 1847 (1 балл).
4. 789 и 1847 (1 балл).
5. Метод + обоснование метода клонирования (1 балл).

Задача VI.2.5.4. (6,5 баллов)

Тaq-полимераза — термостабильная ДНК полимераза, нашедшая широкое применение в ПЦР. Обладает 5'-3'-полимеразной, 5'-3'-флэп-эксонуклеазной и терминально трансферазной активностями, которые проявляются и при комнатной температуре. Следовательно, проведение ПЦР осложняется побочными реакциями, а именно неспецифическим синтезом ДНК и полиаденилированием. Для предотвращения протекания побочных реакций необходимо инактивировать Тaq-полимеразу перед приготовлением реакционных смесей для ПЦР. Методы повышения специфичности за счет запуска реакции только при высокой температуре носят название «Hot-Start methods».

Исторических первым методом повышения специфичности ПЦР был метод исключения, при котором один из ключевых компонентов смеси (полимераза, кофактор и др.) добавлялся только после достижения высокой температуры. Однако у

этого метода бы ряд недостатков.

Вопрос 1

Почему может осуществляться неспецифический синтез ДНК при ПЦР без инактивации полимеразы при комнатной температуре? (0,5 балла)

Вопрос 2

Каковы проблемы метода исключения повышения специфичности ПЦР? (0,5 балла)

Следующим поколением Hot-Start методов стало использование антител, специфичных к Taq-полимеразе. Данный способ применяют и сейчас. При комнатной температуре антитела, связываясь с полимеразой, инактивировали ее, а при нагревании комплекс с полимеразой диссоциировал, антитело денатурировало, и реакция запускалась. Недостатком Hot-Start, основанного на антителах была повышенная вероятность контаминации, так как использовались антитела животных. Также их использование ограничено компаниями, имеющими лицензию на их производство. Вслед за этим методом пришла обратимая химическая модификация боковых цепей аминокислот Taq-полимеразы. Слабой стороной химической модификации становились жесткие условия их снятия и время, затрачиваемой на реактивацию. Этот подход применения не нашел.

Новым методом, разработанным несколько лет назад, стала инактивация с помощью аптамеров. Аптамером называю олигонуклеотидную или пептидную последовательность, специфически и нековалентно связывающуюся с целевыми молекулами, например, белками. В ПЦР применяются олигонуклеотидные аптамеры. Такая инактивация является хорошо обратимой. Диссоциация комплекса аптамера с полимеразой происходит уже при температуре выше 40 °С. Как правило, аптамеры, применяемые в ПЦР имеют выраженную вторичную структуру, а длина варьируется от 20 до 30 нуклеотидов.

Вопрос 3

Чем опасны жесткие условия (длительное нагревание, добавление активных реагентов) для ПЦР? (0,5 балла)

Вопрос 4

Предложите структуру олигонуклеотида, который может служить аптамером. (1 балл)

Вопрос 5

Какой аптамер лучше: с константой диссоциации (K_d) равной 3,4 нМ, 40 нМ или 1 мкМ? (0,5 балла)

Вопрос 6

Как изменяется константа диссоциации при повышении температуры. Приведите формулу зависимости? (1,5 балл)

Вопрос 7

Что такое концентрация полуингибирования (IC_{50})? Как ее рассчитывают? (1,5 балла)

Вопрос 8

У вас три аптамера: с IC_{50} равной 10, 50, и 100 нМ? Какой вы выберете? (0,5 балла)

Ответ:

1. Ввиду активности терминальной трансферазы, Таq-полимераза может доставлять праймеры, что может привести к их неселективному отжигу. В результате такой реакции может быть множество не специфичных продуктов.
Нужно указать, что полимераза достраивает праймеры, что влияет на их гибридизационную способность — 0,5 баллов.
2. Главной проблемой данного метода является необходимость проводить реакцию в открытых пробирках, что может приводить к контаминации.
Необходимо сказать о риске контаминации — 0,5 баллов.
3. Два наиболее важных пункта, которые необходимо упомянуть: возможность повреждения матричной ДНК и инактивация значительной части молекул фермента.
За один из этих пунктов — 0,25 баллов, за оба — 0,5 баллов.
4. В качестве аптамеров используются олигонуклеотиды длиной 20–30 нуклеотидов, образующие шпильки. Они могут быть с тупыми или с липким концами. В центре комплементаризирующихся фрагментов может находиться одна или две пары некомплементарных нуклеотидов.
Если в ответе была предложена шпилька — 1 балл.
5. 3,4 нМ. Аптамеры при высоких температурах разрушаются, что гарантирует диссоциацию комплекса аптамера и полимеразы. Однако, чем стабильнее комплекс при комнатной температуре, тем меньше активных молекул фермента, что предупреждает неспецифические реакции. Чем выше константа диссоциации, тем лабильнее комплекс.
За правильный ответ 0,5 балла.
6. Константа диссоциации растёт при повышении температуры.

$$Kd = \exp\left(-\frac{G}{RT}\right),$$

где G — потенциал Гиббса реакции диссоциации комплекса,

R — газовая постоянная,

T — температура.

За указание на рост константы диссоциации 0,5 балла. За формулу 1 балл.

7. Концентрация полуингибирования — это такая концентрация ингибитора, при которой скорость реакции составляет половину от максимальной. Определить IC50 можно из уравнения $V = V_{max}/2$.
За определение концентрации полуингибирования 0,75 балла, за формулу 0,75 балла.
8. 10 нМ. Чем ниже IC50, тем меньше нужно ингибитора для снижения скорости реакции вдвое, следовательно, это более эффективный ингибитор.
За правильный ответ 0,5 балла.

Этап 4. Биоинформатика

Изучение генома человека

Как известно, геном человека состоит из генов, разделенных длинными межгенными участками. Гены, в свою очередь, состоят из экзонов и интронов, а также нетранслируемых областей (UTR). При этом гены могут быть белок-кодирующими,

а также кодировать различные формы РНК, например длинные некодирующие РНК (lncRNA). Цель этого задания — изучить геном человека. Для этого вам предстоит работать с аннотацией генома в формате `gtf` (файл `genecode.v43.basic.annotation.gtf`). В этом файле описаны все участки генома. В первом столбце приведен номер хромосомы, во втором — источник аннотации, в третьем — тип описываемого в этой строке региона, в четвертом и пятом — координаты начала и конца региона, соответственно, в седьмом — цепь ДНК, на которой располагается регион («+» — прямая цепь, «-» — обратная цепь), в девятом — подробное описание этого региона.

1. Посчитайте суммарную площадь, которую гены занимают в данном участке генома. При этом учтите, что координаты генов могут перекрываться, а также один ген может полностью находиться внутри другого. В таких случаях нельзя учитывать одну и ту же координату больше одного раза. *(5 баллов)*
2. Посчитайте суммарную площадь, которую занимают экзоны в данном участке генома. При этом также учитывайте перекрытия и тот факт, что экзоны могут находиться как на прямой, так и на обратной цепи ДНК. Найдите все типы генов, к которым относятся экзоны в данном участке генома. Посчитайте отдельно площадь экзонов, которые относятся к белок-кодирующим генам. *(5 баллов)*
3. Посчитайте суммарную площадь, которую занимают межгенные участки. При этом также учитывайте перекрытия. *(2 балла)*

Пример решения

```
path_to_gtf = r"genecode_annotation.gtf"

def get_feature_list(path, feature, condition=False):
    feature_list = []
    with open(path) as infile:
        for line in infile:
            if line.split('\t')[2] == feature:
                if condition:
                    if line.split(';')[2].split('"')[1] == condition:
                        feature_list.append([int(line.split('\t')[3]),
                                             ↪ int(line.split('\t')[4])])
                else:
                    feature_list.append([int(line.split('\t')[3]),
                                         ↪ int(line.split('\t')[4])])

    return feature_list

def drop_nested(inpt_list):
    global_nested_list = [inpt_list]
    while True:
        nested_list = global_nested_list[-1]
        wo_nested_list = [nested_list[0]]
        for i in range(1, len(nested_list)):
            if nested_list[i][1] >= nested_list[i-1][1]:
                wo_nested_list.append(nested_list[i])

    if wo_nested_list == nested_list:
        break
```

```

        else:
            global_nested_list.append(wo_nested_list)

    return wo_nested_list

def merge_regions(cons_list):
    new_coord_list = []
    coord = -1
    while True:
        coord += 1
        if coord >= (len(cons_list) - 1):
            if new_coord_list[-1][1] != cons_list[-1][1]:
                new_coord_list.append([cons_list[-1][0], cons_list[-1][1]])
            break

        if cons_list[coord][1] > cons_list[coord+1][0]:
            start = coord
            while cons_list[coord][1] > cons_list[coord+1][0]:
                coord += 1
                if coord == len(cons_list) - 1:
                    break
            new_coord_list.append([cons_list[start][0], cons_list[coord][1]])
        else:
            new_coord_list.append([cons_list[coord][0], cons_list[coord][1]])

    return new_coord_list

def count_feature_length(path, feature, condition=False):
    feature_list = get_feature_list(path, feature, condition)
    feature_list_s = sorted(feature_list, key=lambda x: x[0])
    feature_list_s_wo_n = drop_nested(feature_list_s)
    feature_list_wo_n_merged = merge_regions(feature_list_s_wo_n)

    feature_length = 0
    for f in feature_list_wo_n_merged:
        feature_length += f[1] - f[0]

    return feature_length, feature_list_wo_n_merged

gene_total_length = count_feature_length(path_to_gtf, 'gene')[0]
print(f'Общая площадь, занимаемая генами, = {gene_total_length}')

exon_total_length = count_feature_length(path_to_gtf, 'exon')[0]
print(f'Общая площадь, занимаемая экзонами, = {exon_total_length}')

def find_gene_types(path):
    feature_list = []
    with open(path) as infile:
        for line in infile:
            if line.split('\t')[2] == 'exon':
                feature_list.append(line.split(';')[2].split(',')[1])

    return feature_list

```

```

print(f'Типы генов, которые присутствуют в аннотации, {"",
↪ ".join(list(set(find_gene_types(path_to_gtf))))}')

prot_cod_exons_total_length = count_feature_length(path_to_gtf, 'exon',
↪ 'protein_coding')[0]
print(f'Общая площадь, занимаемая белок-кодирующими экзонами, =
↪ {prot_cod_exons_total_length}')

def get_intergene_length(path_to_gtf, feature='gene'):
    gene_ranges = count_feature_length(path_to_gtf, 'gene')[1]
    intergene_length = 0
    for i in range(1, len(gene_ranges)):
        if gene_ranges[i][0] - gene_ranges[i-1][1] > 0:
            intergene_length += gene_ranges[i][0] - gene_ranges[i-1][1]

    return intergene_length

intergene_total_length = get_intergene_length(path_to_gtf, 'gene')
print(f'Общая площадь, занимаемая межгенными участками, равна
↪ {intergene_total_length}')

> Общая площадь, занимаемая генами, = 390541
> Общая площадь, занимаемая экзонами, = 41581
> Типы генов, которые присутствуют в аннотации, snRNA, processed_pseudogene,
↪ protein_coding, unprocessed_pseudogene, transcribed_processed_pseudogene,
↪ lncRNA, transcribed_unprocessed_pseudogene, miRNA
> Общая площадь, занимаемая белок-кодирующими экзонами, = 3553
> Общая площадь, занимаемая межгенными участками, равна 120518

```

Клонирование гена eGFP в плазмиду pHDE-35S-Cas9

Молекулярным биологам зачастую необходимо клонировать гены для генетической модификации, секвенирования, наработки продукта гена. Для клонирования генов используются плазмиды. В плазмиде pHDE-35S-Cas9 закодирован ген Cas9, который исследователю необходимо экспрессировать в растении, однако в плазмиде отсутствует маркерный ген. Ученый выбрал ген флюоресцентного белка eGFP для визуализации результата. Этот ген находится в плазмиде 35S-eGFP-nosT.

В данном задании Вам предлагается помочь «мокрому» биологу и провести клонирование гена eGFP в плазмиду pHDE-35S-Cas9 *in silico* с помощью программы Ugene.

На практике зачастую гены не вырезаются из одной плазмиды и не вставляются в другую напрямую, а предварительно амплифицируются методом ПЦР с введением сайтов рестрикции. Для экспрессии любого гена необходимы промотор и терминатор, поэтому предлагается клонировать ген eGFP вместе со своими промотором CaMV35S и NOS терминатором.

1. Найдите в целевой плазмиде pHDE-35S-Cas9 два одиночных сайта рестрикции, которые находятся в районе 1–4000 bp и подходят для того, чтобы клонировать ген eGFP в эту плазмиду. (5 баллов)
Список эндонуклеаз рестрикции, имеющихся в лаборатории: AatII, AelI, AluI,

AseI, AsiSI, BamHI, BbvCI, BglI, BglII, BsrGI, BstAUI, CciNI, ClaI, DraI, EcoRI, EcoRV, HaeIII, HindIII, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Kzo9I, MspI, MluI, NruI, PmeI, Psp124EI, PstI, PvuII, RsaI, SacII, Sall, Sse9I, TaqI, XbaI, ZraI.

2. Предложите прямой и обратный праймер для амплификации гена eGFP. Праймеры должны соответствовать следующим критериям качества: иметь подходящий ГЦ-состав и температуру плавления (с небольшой разницей между праймерами), а также не иметь устойчивых димеров и шпилек, продукт ПЦР должен быть оптимальной длины. К последовательностям праймеров добавьте необходимые для клонирования в плазмиду pHDE-35S-Cas9 последовательности. Приведите последовательности получившихся олигонуклеотидов в направлении 5'-3'. (5 баллов)
3. Проведите ПЦР с подобранными праймерами в программе Ugene. Сохраните получившуюся в результате ПЦР последовательность. (2 балла)
4. Выполните клонирование получившегося ПЦР-продукта гена eGFP в плазмиду pHDE-35S-Cas9. (4 балла)

В ответе на задание Вам необходимо загрузить полученную плазмиду, названия и сайты рестрикции выбранных Вами эндонуклеаз, последовательности прямого и обратного праймеров (в направлении 5'-3', с добавленными дополнительными последовательностями).

Пример решения

Сайтами рестрикции в pHDE-35S-Cas9-mCherry могут быть любые одиночные сайты рестрикции в первой четверти плазмиды или месте, где это не нарушает других элементов. Рестриктазы должны работать с образованием длинных липких концов (3–5 нт). Важно, чтобы эти рестриктазы не резали промотор, ген и терминатор eGFP.

Пример ответа

Рестриктазы и их сайты рестрикции:

AatII — GACGTC MluI — ACGCGT

Прямой праймер:

AAATTT GACGTC CTCAGAAGACCGAGGGCTAT

Обратный праймер:

AAATTT ACGCGT TGTTTGACAGCTTATCATCG

- Любые 6 нуклеотидов с 5'-конца.
- Сайт рестрикции.
- Последовательность, комплементарная участку гена.

Важно:

Праймеры не должны быть слишком короткими или длинными (Длина участка гена 18–22 нт).

Филогенетический анализ генов цитохром P450

Цитохром P450 — это крупное суперсемейство ферментов, которые катализируют реакции окисления различных соединений. Они участвуют в метаболизме жирных кислот, желчных кислот, стероидов, а также экзогенных соединений, например лекарств и ядов. Гены, кодирующие белки цитохром P450, встречаются во всех царствах живых существ. Цель этого задания — изучить гены цитохром P450 у двудольных растений.

1. Используя базу данных NCBI, найдите любой ген, кодирующий цитохром P450 у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). Кратко опишите этот ген: на какой хромосоме он находится, сколько экзонов включает, какая длина у локуса в геноме, который содержит этот ген. К какому семейству и подсемейству относится белок, кодируемый этим геном. (2 балла)
2. Используя последовательность мРНК этого гена, выполните Blast по базе данных RefSeq_gna в двудольных растениях. Выберите наиболее подходящий алгоритм и параметры. Объясните, почему был выбран именно этот алгоритм. Отсортируйте результаты по убыванию покрытия и сохраните в файл в формате fasta те найденные последовательности, у которых покрытие не меньше 70%. (2 балла)
3. Для того, чтобы укоренить филогенетическое дерево, при его построении к найденным последовательностям нужно добавить аутгруппу. В качестве аутгруппы можно использовать ген, который будет заведомо удален от всех генов в дереве (но при этом не слишком сильно, с минимальной гомологией). Найдите подходящий ген в аутгруппу. Приведите его идентификатор в NCBI и объясните, почему считает этот ген подходящим. Найдите его последовательность и добавьте ее к скачанным последовательностям в формате fasta. (2 балла)
4. Используя сохраненные последовательности, выполните множественное выравнивание в программе MEGA. Удалите из получившегося выравнивания неинформативные (или вредные) для построения филогенетического дерева участки. Сохраните полученное очищенное выравнивание. (2 балла)
5. Используя сохраненное очищенное выравнивание, постройте филогенетическое дерево при помощи алгоритма UPGMA. Интерпретируйте полученное дерево. Покажите на дереве примеры паралогов и ортологов, а также монофилетическую группу. (4 балла)

В решении должен содержаться текстовый файл с описанием найденного гена цитохром P450, с идентификатором мРНК этого гена, с описанием запуска блада (какой алгоритм и почему), с кратким описанием результатов блада (сколько последовательностей с coverage >50% было найдено), с описанием гена-аутгруппы и описанием построенного дерева, а также файлы с сохраненными последовательностями в формате fasta, файл с очищенным множественным выравниванием и файл с филогенетическим деревом.

Пример решения

1. CYP78A5, Gene ID: 837932 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/837932>). Хромосома 1, экзона 2, длина локуса 2037. family 78, subfamily A.
2. Идентификатор мРНК: NM_101240. 4. Алгоритм для запуска blast — discontinuous megablast.

Всего было найдено 24 последовательности с coverage $\leq 70\%$. Они были сохранены в файл в формате `fasta blastresult.txt`.

3. В качестве аутгруппы подойдет ген цитохром P450 однодольного растения, например ячменя (Gene ID: 123441543). Последовательность его мРНК (XM_045117934.1) была добавлена в файл `blastresult.txt`.
4. Из выравнивания необходимо удалить участки, которые содержат много гэпов.
5. Пример построенного дерева с выделенными паралогами, ортологами и монофилитической группой.



Система оценивания

Оцениваются решения, аргументация и интерпретация полученных экспериментальных результатов.

Материалы для подготовки

Генетическая инженерия в школе:

- группа в ВК: <https://vk.com/genengschool>;
- канал в Ютубе: https://www.youtube.com/@gen_eng.

Практическая биоинформатика и молекулярная биология (Школа синтетической биологии):

- группа в ВК: https://vk.com/nsu_synbio;
- канал в Ютубе: <https://www.youtube.com/@nsusynbio>.

Образовательная программа для подготовке к профилю «Геномное редактирование»:

- доступна в группе ВК: <https://vk.com/docs-173786512>.