

Задания Полуфинала (кейс)

Кейс №1. «Молоко плюс» (9 класс)



9-й класс

Молоко плюс

Направленная селекция пород с учётом генетики и состава белков молока для растущего рынка производства молока и молочных продуктов



Описание проблемной ситуации

Крупный рогатый скот (в первую очередь это коровы, популяция которых в России порядка 8 млн голов) — это не только источник мяса, но и основной источник молока, которое, в свою очередь, является основой для целого спектра продукции, от сыров до простокваши.

В России производится порядка 32 млн тонн молока в год, и эффективность производства повышается год от года. Таким образом, даже внутренний рынок производителей и переработчиков молока в России достаточно большой и активно развивающийся и, главное, имеет хорошие перспективы роста. Актуальным представляется не только технологическое развитие способов производства и переработки, но и прикладное изучение научных основ селекции и разработки новых способов оценки качества молока.

Известно, что качество, потребительские свойства молока и характеристики, влияющие на его использование для получения различных молочных продуктов, определяется в том числе и особенностями белкового состава.

Основными белковыми компонентами, определяющими качество молока, являются казеины.

Обычно их относительное содержание среди белков молока варьируется от 75 до 85%. Чем выше отношение количества казеинов к остальным белкам молока (их называют сывороточными белками), тем более качественные и вкусные продукты могут быть из этого молока получены. К сожалению, селекция коров молочных пород ради увеличения надоев часто приводит к уменьшению содержания казеина в молоке.

Наиболее широко используемым способом разделить белки молока на отдельные фракции является электрофорез белков в присутствии специального денатурирующего агента — додецилсульфата натрия (sodium dodecylsulfate — SDS). В этом случае белки под действием электрического поля разделяются в толще

полимерного геля в зависимости от их молекулярной массы: более мелкие белки движутся быстрее и в итоге обнаруживаются ближе к нижней границе геля. При разделении белков молока обычно выявляются несколько фракций казеина и несколько полос различных белков сыворотки.

Состав белков молока играет существенную роль в дальнейшем использовании этого важного продукта питания человека и, соответственно, зависит от генов, кодирующих входящие в состав молока белки. В частности, полиморфизм вариантов каппа-казеина связан с применимостью молока в сыроделии. Так, у молочных пород крупного рогатого скота из 10 возможных аллелей гена CSN3 (кодирует каппа-казеин) встречаются два: А и В. Молоко от животных с генотипом ВВ предпочтительнее использовать для производства твёрдых и полутвёрдых сыров, чем от животных с генотипом АА и АВ. Это связано с более высоким выходом сыра и более нежной консистенцией сгустка при использовании молока от коров с генотипом ВВ по гену CSN3.

Не исключено, что полиморфизм этого гена может быть связан и с другими свойствами и характеристиками молока. Кроме того, можно предполагать, что важными могут быть также аллельные различия в генах альфа-лактальбумина (LALBA) и бета-лактоглобулина (LACB).

Тем не менее, в современных хозяйствах, даже для селекции молочных пород, часто используются более общие и, зачастую, немного устаревшие подходы для разведения молочных пород, и не всегда учитываются данные о казеиновом составе молока и аллелей генов, влияющих на его свойства. Таким образом, разработка и внедрение методов оценки аллелей генов и доступных способов оценки казеинового состава молока является важным и перспективным направлением селекции.

1 задание

Анализ белкового состава молока коров разных пород.

Часто для определения наиболее перспективных родительских особей в ходе выведения новой молочной породы необходимо охарактеризовать свойства молока, которое они производят. Одной из возможных целей селекции молочных пород является повышение содержания казеина в молоке.

В этом задании вам предстоит ознакомиться с современным состоянием проблемы, ориентируясь на литературные данные и на эталонные результаты электрофореза белков молока. Оцените, какое обычно число фракций казеина удаётся выявить на электрофорезе, где они расположены после разделения в геле, и каким образом по результатам электрофореза можно установить относительное содержание белков в образце.

Проанализируйте результаты электрофореза белков предоставленных вам образцов молока коров разных пород, определите для каждого из них относительное содержание казеинов и отметьте, какие две породы будут наиболее подходящими для начала выведения новой породы. Достаточно ли этих данных для выбора родительской породы для дальнейшей селекции?

Как вы думаете, насколько хорошо молоко от новой породы подойдет для приготовления сыров? На какие особенности состава форм казеина необходимо ориентироваться при ответе на поставленный вопрос и почему?

В качестве ответа на данное задание предложите схему метода оценки состава молока на основе SDS PAGE с указанием времени, оборудования и реактивов, необходимых для каждого этапа. Какие недостатки есть у этого подхода?

Подсказка

LF — лактоферрин, SA — сывороточный альбумин, β -LG — β -лактоглобулин, α -LA — α -лактальбумин, IgG — иммуноглобулин G, α 1-CN — α 1-казеин, α 2-CN — α 2-казеин, β -CN — β -казеин, κ -CN — κ -казеин.

Заметьте, что подвижность полос при электрофоретическом разделении может меняться, разные фракции казеинов могут сливаться между собой или некоторые могут быть не видны.

Для анализа электрофореграмма можно использовать программу GelAnalyzer. В user guide расписаны возможности использования программы.

2

задание

Молекулярно-генетический анализ в животноводстве для отбора особей с наилучшим сочетанием хозяйственных свойств.

Чтобы понять, на какие из аллелей генов казеина CSN3, альфа-лактальбумина (LALBA) и бета-лактоглобулина (LACB) следует обращать внимание в рамках программы по выведению новой породы, необходимо провести анализ известных к настоящему времени сведений относительно различий в свойствах и характеристиках молока в зависимости от генетического разнообразия генов CSN3, LALBA и LACB.

По результатам анализа вам необходимо сделать заключение, какие аллели каких генов будут наиболее перспективны для планирования селекции молочных пород. Предполагается, что эти гены и их аллели будут идентифицированы в геноме потомков от скрещивания родительских пород для получения генотипов для продукции наиболее высококачественного молока.

В ходе подготовки к выведению новой породы для проверки метода анализа вы решили проверить распределение генотипов у некоторых потомков второго поколения (F2) от скрещивания двух родителей с одинаковыми генотипами CSN3(AB) LALBA(AB) LACB(BB) и CSN3(AB) LALBA(AA) LACB(AA).

Наиболее широкое распространения для этих целей получил метод [TaqMan-ПЦР](#) (подробнее про ПЦР и его применение можно [почитать в этом пособии](#)).

Для определения аллельных вариантов генов с помощью TaqMan-зондов вам необходимо подобрать праймеры, с помощью которых вы будете проводить амплификацию участков генов, которые позволяют идентифицировать различные аллели. Информация о генных последовательностях, участках межаллельного полиморфизма приведена в [дополнительном файле](#).

Для конструирования праймеров можно использовать программу Primer-Blast (NCBI - WWW Error Blocked Diagnostic) или [Primer 3.0](#).

О принципах работы в программе можно [прочитать в статье](#).

После подбора праймеров проводят ПЦР анализ образцов, как описано выше, от 10 потомков второго поколения от указанных выше родителей. [По ссылке вам доступен результат такого ПЦР-анализа](#), проведённого лаборантом. Интерпретируйте их и установите генотип каждого животного.

3

задание

Вам прислали [список оборудования](#), которое есть в доступе в центре коллективного пользования (ЦКП). Проанализируйте его.

Какое оборудование из этого списка понадобится для анализа белкового состава молока и генотипирования родителей и потомства?

Что вам ещё понадобится для этого анализа? Какие расходные материалы вам понадобятся для проведения таких анализов?

По возможности оцените стоимость расходных реагентов для 1 анализа.

Какие ещё исследования, полезные для проблематики данного кейса, можно провести на данном оборудовании?



Кейс №2. «Супербактерии» (9 класс)



9-й класс

Супербактерии

Изучение механизма устойчивости бактерий
к колистину для разработки подходов к его преодолению



Описание проблемной ситуации

Колистин — циклический полипептидный антибиотик группы полимиксинов, активный в отношении грамотрицательных микроорганизмов, включая большинство видов семейства *Enterobacteriaceae*.

Естественным продуцентом этого антибиотика является спорообразующая палочка *Bacillus polymyxa* подвида *colistinus*. Механизм действия колестилина связан с электростатическим взаимодействием с наружной мембраной бактерий и конкурентным замещением ионов кальция и магния, стабилизирующих липополисахариды в её составе. В результате происходит разрушение наружной мембраны, утечка содержимого периплазматического пространства и лизис клетки.

Колистин был открыт ещё в середине 20-го века и доступен для клинического использования с конца 50-х годов. Вскоре применение этого препарата в медицинской практике было прекращено из-за сообщений о его нефро- и нейротоксичности, а также в связи с открытием новых, более эффективных и безопасных антибиотиков, таких как карбапенемы, фторхинолоны и цефалоспорины третьего поколения.

Хотя в медицине интерес к колестину вернулся только в последние годы, в сельском хозяйстве его использовать не прекращали никогда, что закономерно приводило к давлению отбора и возникновению резистентных форм микроорганизмов.

Долгое время единственной известной причиной устойчивости к колестину были хромосомные мутации.

Вертикальный перенос генов устойчивости представляет меньшую угрозу, чем горизонтальный, что, по всей видимости, и обусловило длительное сохранение высокого

уровня восприимчивости. Однако в 2015 году в Китае, после регистрации резкого всплеска резистентности к колестину на свинофермах и птицефабриках, был обнаружен новый механизм устойчивости, связанный с передачей плазмиды, несущей ген *mcr-1* (mobilized colistin resistance gene). Фермент, закодированный в этом гене, присоединяет фосфатидилэтаноламин к липиду А, что делает липополисахариды клеточной стенки плохой мишенью для колестилина.

Плаزمиды были изначально выделены от *Escherichia coli* и оказались способной эффективно передаваться путём конъюгации бактериям того же вида и путём трансформации - *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, при этом стабильно поддерживаясь в клетках-реципиентах. Позднее *mcr-1* был найден в контексте разных плазмид у различных энтеробактерий.

Плазмиды с геном *mcr-1* были обнаружены более чем в 40 странах на 5 континентах. Частоты встречаемости генов устойчивости к колестину варьируют в широких пределах в зависимости от страны, исследуемого материала и времени выделения образцов.

Показательно шестикратное увеличение частоты *mcr-1* в изолятах от курок в Китае в период с 2009 по 2014 год. В изолятах от людей *mcr-1* в среднем выявляется относительно редко (около 1%). Помимо *mcr-1*, были открыты также *mcr-2,3,4,5* и *-6*. Выявлены случаи хромосомной интеграции.

Материалы для изучения

[Статья 1](#) | [Статья 2](#) | [Статья 3](#)

1

задание

Опишите методы анализа резистентности бактерий к антибиотикам.

Проведите их сравнение по критериям применимости в рутинных исследованиях на животноводческих комплексах.



2

задание

Вам даны нуклеотидные последовательности двух генов – *mcr1* и *mcr2*.

Для анализа методом ПЦР использовались праймеры:

MCR1-2-U Ccgtattctgtgccgtgatgt

MCR1-2-R TTATCCATCACGCCCTTTGAGTC

Подберите эндонуклеазу рестрикции, с помощью которой можно будет отличить, какой ген (*mcr1* или *mcr2*) присутствует в данной бактерии.



3

задание

Найдите последовательности генов *mcr3*, *mcr4* и *mcr5*

Воспользуйтесь [системой поиска](#).

Можно ли использовать праймеры из задания 2 для выявления этих генов?

Ответ обоснуйте.



Лишние антибиотики

Снижение угрозы роста антибиотикорезистентности у различных микроорганизмов из-за широкого применения антибиотиков в агротехе

Описание проблемной ситуации

Антибиотики — природные и синтетические антимикробные вещества, применяемые для лечения инфекций, способные убивать микроорганизмы или останавливать их размножение.

С 1928 года, когда Александр Флеминг выделил пенициллин, прошёл почти век. С тех пор было выявлено и синтезировано более 2000 антибиотиков. Эти соединения, спасая жизни миллионов людей, получили широкое применение не только в медицине, но и в животноводстве для борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных животных.

В статье отмечается, что более 73% противомикробных препаратов во всем мире потребляются сельскохозяйственными животными.

По оценкам экспертов глобальное использование антибиотиков в сельском хозяйстве с 2010 по 2030 год увеличится более чем на 65%, в основном за счёт увеличения использования в развивающихся странах БРИКС. Известно, что в животноводстве применяются более семидесяти видов антибиотиков.

В то же время применение антибиотиков в сельском хозяйстве связано с рядом негативных последствий.

Так, от наличия в сырье антибиотиков страдают и производители молочных продуктов, поскольку наличие их в молоке замедляет или полностью прекращает процесс сквашивания. При повышенном содержании антибиотиков в организме человека, употребяющего молоко и молочные продукты, могут возникать аллергические реакции, изменение микрофлоры желудочно-кишечного тракта, дисбактериоз и угнетение активности ферментов. Широко применяемые антибиотики тетрациклиновой группы имеют способность накапливаться в костной ткани, тем самым нарушая её формирование, что приводит к замедлению роста у детей,

а у взрослых приводит к разрушению зубов.

Кроме того, широкое использование антибиотиков ведёт к формированию антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, вызывающих заболевания как сельскохозяйственных животных, так и человека.

Поэтому по всему миру вводятся законодательные и другие ограничения на использование антибиотиков в сельском хозяйстве. В частности, в 2017 году Всемирная организация здравоохранения настоятельно рекомендовала сократить использование антибиотиков животными в пищевой промышленности.

При этом в России контролируются четыре базовых группы антибиотиков: левомицетин, стрептомицин, тетрациклин и пенициллин. Например, норма остаточного содержания тетрациклина в продукции согласно законодательству РФ — 100 мкг/кг. Превышение данного показателя в производстве является противозаконным.



1

задание

Как регулируется применение антибиотиков в России?

Какие антибиотики регулируются, какие существуют нормативы и как их устанавливают?

Приведите примеры антибиотиков только медицинского и только сельскохозяйственного назначения.

Как регулируется применение антибиотиков в других странах?

Какие из этих подходов можно применить у нас?



2

задание

Какие методы можно использовать для выявления антибиотиков в молочных продуктах?

Предложите и обоснуйте с точки зрения экономики и чувствительности методик способы определения антибиотиков на каждом из звеньев цепи: отдельная ферма — пункт сбора молока на сельхозпредприятии — пункт приемки молока на молокоперерабатывающем предприятии — контроль качества готовой продукции.

Какой из этих этапов будет наиболее критичным?

Какие из предложенных методик могут быть использованы для определения нормы остаточного содержания тетрациклина в продукции — 100 мкг/кг?



3

задание

В местном центре дообразования организовали лабораторию ([список оборудования](#)).

Можно ли на основании этой лаборатории проводить анализ АБ в молочных продуктах каким-то из этих методов?

Какое ещё оборудование понадобится?

