



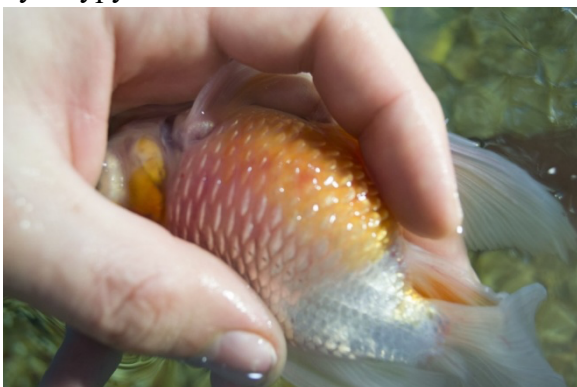
Задания заключительного этапа (финала)  
Всероссийской олимпиады студентов «Я – профессионал»  
по направлению «Биология»

Категория участия «Бакалавриат»

### МИКРОБИОЛОГИЯ И ЗООЛОГИЯ ПОЗВОНОЧНЫХ

На день рождения мальчику Васе мама подарила рыбок. Василий хорошо заботился о них: регулярно менял воду в аквариуме, кормил 3-4 раза в день, но через неделю рыбки стали погибать... Что только не предпринимал Василий для спасения рыб: и замена воды в аквариуме, и частое кормление. Ничего не помогло... Умерли все...

Василий отметил, что рыбы перед смертью сбрасывали чешую и вели себя менее активно. Он решил установить причину смерти рыб и сделал посевы чешуи рыб, получил чистую культуру.



1. Проведите окраску по Граму данной культуры, зарисуйте ее, сохраняя масштабы, определите ее грам принадлежность. Ответ и рисунок запишите в бланке ответов (**7 баллов**).
2. Покажите препарат преподавателю (**5 баллов**).
3. Учитывая грампринадлежность культуры выберите группы антибиотиков, которые мог бы использовать Василий для лечения рыб (**5 баллов, по 1 баллу за каждый правильный ответ**), для определения мишени антибиотика воспользуйтесь рисунком

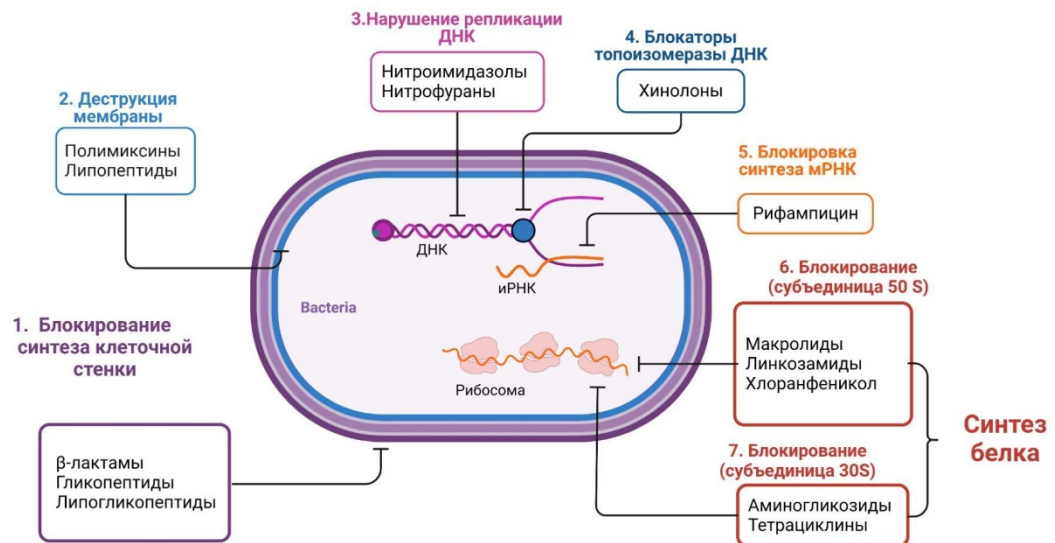


Рисунок 1. Механизмы действия антибиотиков

В процессе выяснения возможной причины смерти рыбок Вася активно искал в интернете информацию про своих рыб. На одном из форумов он с удивлением прочитал, что у таких рыбок, которые были у него, нет желудков. В ужасе он побежал к маме и стал спрашивать, как же могли нормально есть корм его рыбки, если у них нет желудка? На что мама сказала, что в интернете много чего пишут и не все правильно.

1. Определите и запишите в таблицу в бланке ответов систематическое положение рыбок Васи. **(5 баллов)**
2. Вернемся к вопросу Васи. Есть ли желудок у его рыб? Зарисуйте пищеварительную систему васиной рыбы и подпишите основные элементы в поле в бланке ответов. **(6 баллов)**
3. А есть ли у вида, к который лежит перед вами, какие-нибудь зубы? Если да, то как они называются и какую функцию выполняют? **(3 балла)**
4. Как отличаются открытопузырные рыбы от скрытопузырных? К какой группе относятся рыбки Васи? **(3 балла)**



## Бланк ответов кабинета микробиологии и зоологии позвоночных

### Раздел микробиология

1. Проведите окраску по Граму данной культуры, зарисуйте ее, сохраняя масштабы, определите ее грам принадлежность. Ответ и рисунок запишите в данном бланке (7 баллов)

*7 баллов- правильно определен морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), выполнен биологический рисунок, грамотрицательные.*

*6 баллов- правильно определен морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), выполнен биологический рисунок, грамотрицательные, но на рисунке изображены дополнительные структуры у клеток (например: в биологическом рисунке заштрихованы только концы клеток).*

*5 баллов- правильно определен морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), выполнен биологический рисунок, указана отрицательная принадлежность по граму и споры.*

*4 балла- правильно нарисован морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), но на рисунке изображены и другие морфотипы с одинаковой грам принадлежностью, все морфотипы грамотрицательные.*

*3 балла- правильно нарисован морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), но на рисунке изображены и другие морфотипы с разной грам принадлежностью, у искомого морфотипа определена отрицательная грам принадлежность.*

*2 балла- правильно нарисован морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), но на рисунке изображены и другие морфотипы с одинаковой грам принадлежностью, у искомого морфотипа определена положительная грам принадлежность/ правильно определен морфотип, нет дополнительных морфотипов, но положительная грам принадлежность.*

*1 балл- правильно нарисован морфотип (прямая или слегка изогнутая форма), но на рисунке изображены и другие морфотипы с разной грам принадлежностью, у искомого морфотипа определена положительная грам принадлежность.*

*0 баллов- морфотип не представлен на рисунке.*



2. Покажите препарат преподавателю (5 баллов).

*5 баллов- препарат грам отрицательный, возможно увидеть морфотип бактерий, в препарате нет пятен красителя, бактерии не образуют конгломерат.*

*4 балла- препарат грам отрицательный, возможно увидеть морфотип бактерий, в препарате есть пятна красителя.*

*3 балла- препарат грам отрицательный, возможно увидеть морфотип бактерий, в препарате есть пятна красителя, бактерии в виде конгломерат.*

*2 балла- препарат грам отрицательный, но нет возможности увидеть морфотип бактерий, в препарате есть пятна красителя, бактерии в виде конгломерат.*

*1 балл- препарат грам положительный, возможно увидеть все морфотипы бактерий, в препарате нет пятен красителя, бактерии не образуют конгломерат.*

*0 баллов- препарат не предоставлен/ препарат грам положительный, нет возможности увидеть все морфотипы бактерий, в препарате есть пятна красителя, бактерии в виде конгломерат.*

3. Учитывая грампринадлежность культуры выберите группы антибиотиков, которые мог бы использовать Василий для лечения рыб (5 баллов, по 1 баллу за каждый правильный ответ), для определения мишени антибиотика воспользуйтесь рисунком 1.

Таблица 1. Применение антибиотиков

Название антибиотика	Можно ли применять при данной инфекции (да/нет, напишите словами)?
Аминогликозиды	да
Рифампицин	да
$\beta$ -лактамы	нет



Полимиксины	да
Гликопептиды	нет

*По 1 баллу за каждый правильный ответ.*

*Одним из важных факторов, определяющих спектр природной чувствительности) *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам, является строение ее внешней мембраны. Основным компонентом внешней мембраны у *Pseudomonas aeruginosa*, как и у других грамотрицательных микроорганизмов, является липополисахаридный слой. Уровень природной активности бета-лактамовых антибиотиков в отношении *Pseudomonas aeruginosa* минимален из-за: их сниженной способности проникать через внешнюю мембрану *Pseudomonas aeruginosa*, способности индуцировать бета-синтез хромосомных бета-лактамаз и устойчивости к гидролизу этими ферментами. Поэтому антибиотики, нарушающие синтез муреина (ликопептиды и  $\beta$ -лактамы) не являются антибиотиками выбора в отношении грамотрицательных бактерий (Glen K. A., Lamont I. L.  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: current status, future prospects //Pathogens. – 2021. – Т. 10. – №. 12. – С. 1638, Егорова О. Н., Брусина Е. Б., Григорьев Е. В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации //Москва. – 2014.).*

*Аминогликозиды вытесняют дивалентные катионы из участков их связывания в липополисахаридном слое мембраны *Pseudomonas aeruginosa*, что приводит к дестабилизации и повышению проницаемости последней.*

*Механизм действия полимиксинов связан с нарушением целостности внешней мембраны *Pseudomonas aeruginosa* (действие по типу поверхностно-активных веществ). Достоверных случаев устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* к полимиксину В не описано. Показатель чувствительности к полимиксину В может быть использован для дифференцировки *Pseudomonas aeruginosa* от некоторых родственных микроорганизмов (Егорова О. Н., Брусина Е. Б., Григорьев Е. В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации //Москва. – 2014.).*

*Бактериостатическое, а в высоких концентрациях и бактерицидное действие рифампицина основано на подавлении ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Рифампицин препятствует её присоединению к ДНК, и ингибирует транскрипцию РНК. Благодаря подавлению транскрипции рифампицин эффективен в отношении и грамположительных, и грамотрицательных бактерий (Hu Y. F. et al. In vitro antibacterial activity of rifampicin in combination with imipenem, meropenem and doripenem against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* //BMC infectious diseases. – 2016. – Т. 16. – С. 1-10).*

*Общий балл за раздел микробиологии: 17 баллов*



1. Определите и запишите в таблицу систематическое положение рыбок Васи (класс, отряд, семейство, род и вид). **(5 баллов)**

Класс (1 балл)	<i>Лучепёрые рыбы или (Костные рыбы - Osteichthyes)</i>
Отряд (1 балл)	<i>Карпообразные</i>
Семейство (1 балл)	<i>Карповые</i>
Род (1 балл)	<i>Караси</i>
Вид (1 балл)	<i>Золотая рыбка, Карась китайский, карась серебряный, (Карась золотой)</i>

2. Вернемся к вопросу Васи. Есть ли желудок у его рыб? Зарисуйте пищеварительную систему Васиной рыбы и подпишите основные элементы (пожалуйста, подписи делайте аккуратно, разборчиво). **(6 баллов)**

*Указано, что желудка нет - 2 балла*

*Обозначены ротовое и анальное отверстия - 1 балл*

*Обозначен пищевод - 1 балл*

*Отмечен кишечник - 1 балл*

*Отмечены печень и желчный пузырь - 1 балл*

3. А есть ли у вида, к который лежит перед вами, какие-нибудь зубы? Если да, то как они называются и какую функцию выполняют? **(3 балла)**

*Есть зубы (1 балл), они называются глоточными (1 балл), необходимы для механической обработки пищи, перетирания (1 балл)*

4. Как отличаются открытопузырные рыбы от скрытопузырных? К какой группе относятся рыбки Васи? **(3 балла)**

*Открытопузырные рыбы - сохраняют связь плавательного пузыря с пищеводом (1 балл), скрытопузырные не имеют протока, соединяющего пищевод и пузырь (1 балл), рыбки Васи - открытопузырные (1 балл).*

*Общий балл за раздел зоологии позвоночных: 17 баллов*



## РАСТЕНИЯ: ФИЗИОЛОГИЯ, АНАТОМИЯ И МОРФОЛОГИЯ (33 балла)

**Цель работы:** исследовать донорно-акцепторные взаимодействия в электронтранспортной цепи фотосинтеза

**Оборудование:** спиртовой экстракт листьев петрушки (*Petroselinum crispum*), штатив с 5-ю пробирками, пипетка Пастера для переноса жидкости, перманентный маркер, бумажные полотенца, линейка.

**Реактивы и оборудование на столе преподавателя:** этиловый спирт 96°, спиртовой раствор метилового красного, аскорбиновая кислота, фольга.

### ЧАСТЬ 1. Реакция Красновского

Метилловый красный – необратимый редокс-индикатор, широко используемый при окислительно-восстановительном титровании. При восстановлении он необратимо обесцвечивается. Поскольку редокс-потенциал его восстановления (+0,8 эВ) близок к значению редокс-потенциала при окислении хлорофилла, метилловый красный может быть искусственным акцептором для хлорофилла.

1. В штативе на Вашем рабочем столе 5 пробирок. В первые 4 пробирки налейте по 3 мл спиртовой вытяжки хлорофилла, а в последнюю – 3 мл этанола. Затем в пробирки 1, 2, 3 добавьте одинаковое количество спиртового раствора метилового красного (МК), пока зеленая окраска не приобретет бурый цвет (ПО КАПЛЯМ!). В пробирку 5 добавьте такое же количество МК, как и в другие пробирки. В пробирки 1, 2, 4 и 5 добавьте по 30 мг (на кончике скальпеля) кристаллической аскорбиновой кислоты (АК). Пробирку 2 со всех сторон закройте фольгой. Штатив с пробирками поставьте на свет. Перемешивать содержимое пробирки после добавления аскорбиновой кислоты не нужно! Запишите в таблицу №1 в листе ответов исходные цвета вытяжек в пробирках.
2. Через 40 мин от начала экспозиции рассмотрите и запишите в таблицу №1 в листе ответов цвета всех пробирок. Если вытяжка имеет неоднородный цвет, опишите или зарисуйте то, что Вы наблюдаете.
3. Заполните таблицу №1 в листе ответов в соответствии с результатами проведенного эксперимента. Ответьте на вопросы в листе ответов.

### ЧАСТЬ 2. Исследование транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов

На большом практикуме по фотосинтезу студенты кафедры физиологии растений изучали транспорт электронов в ЭТЦ хлоропластов полярографическим методом (по изменению концентрации кислорода в ячейке). Студенты получили суспензию хлоропластов из листьев гороха (*Pisum sativum*), при этом в процессе выделения были разрушены обе наружные мембраны и хлоропласты лишились содержимого стромы.

Для исследования ЭТЦ фотосинтеза использовали следующие реактивы:

- ✓ Феррицианид калия ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ), акцептор электронов ФСІ
- ✓ Дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ) – в восстановленной форме – донор электронов для ФСІ, в окисленной – акцептор для Q<sub>b</sub>
- ✓ Метилвиологен (MV) – акцептор электронов ФСІ, далее передает полученный электрон на кислород с образованием супероксид анион радикала ( $O_2^{\cdot-}$ )
- ✓ Хлорид аммония ( $NH_4Cl$ ) - разбавитель



- ✓ Диурон – ингибитор транспорта электронов между  $Q_a$  и  $Q_b$
- ✓ Аскорбат (Asc) – антиоксидант, донор электронов для ДХФИФ
- ✓ Дибромтимохинон (DBMIB) – ингибитор цитохром  $b_6/f$  комплекса
- ✓ Аденозиндифосфат (АДФ)

Составы реакционных смесей для полярографической ячейки были внесены в таблицу №2 (см. лист ответов), и с этими смесями были проведены эксперименты, однако студенты перепутали номера всех смесей, кроме последней (VI) и не успели заполнить таблицу.

**а.** По экспериментальным данным (см. Приложение рис. 1 – 6) рассчитайте скорости изменения концентрации кислорода для каждого эксперимента;

**Результаты должны быть представлены в  $\text{мкмоль O}_2 \cdot [\text{мг хлорофилла}]^{-1} \cdot [\text{час}]^{-1}$**

Для расчётов используйте следующие параметры:

- ✓ скорость движения диаграммной ленты прибора 720мм/час
- ✓ 5 маленьких клеточек диаграммной ленты равны 1 см
- ✓ 1мм диаграммной ленты соответствует изменению концентрации кислорода равному  $2 \cdot 10^{-3}$  мкмоль
- ✓ содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов – 0,88мг/мл, количество (объем) суспензии, использованное для каждого эксперимента, подписано на диаграммной ленте

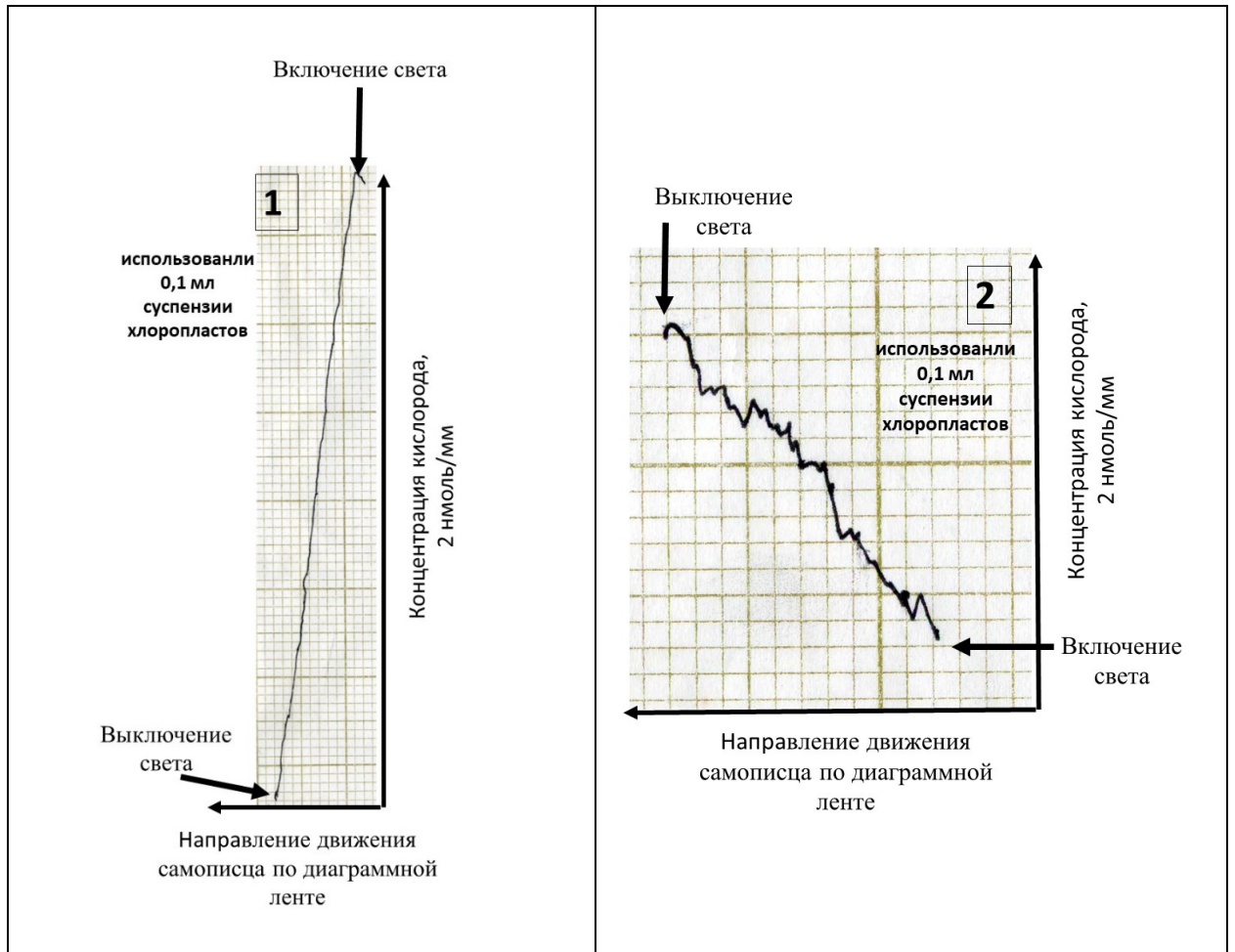
**б.** Дополните схемы экспериментов в таблице №2 в листе ответов, отметьте, сможет ли работать АТФ-синтаза в каждом варианте эксперимента;

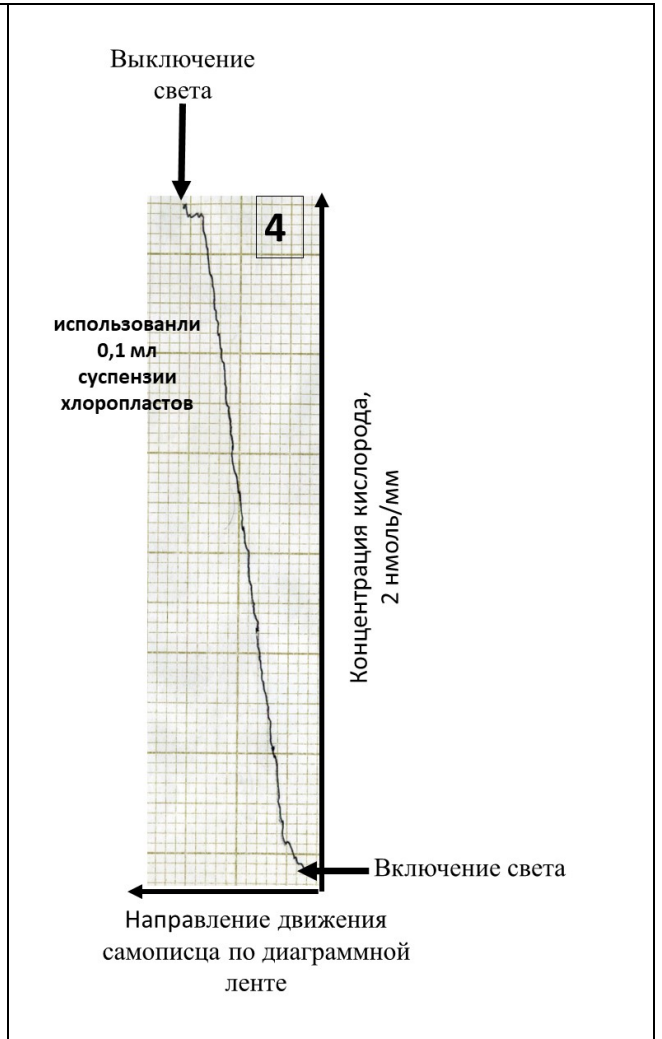
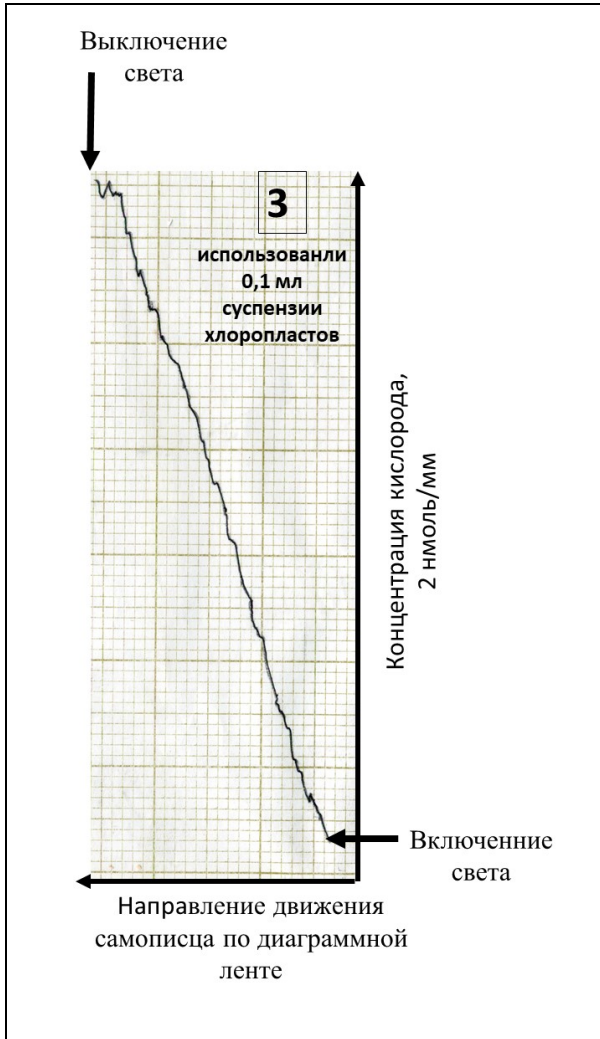
**с.** Исходя из теоретических знаний, соотнесите полученные скорости изменения концентрации кислорода с условиями эксперимента и внесите в таблицу №2 в листе ответов;

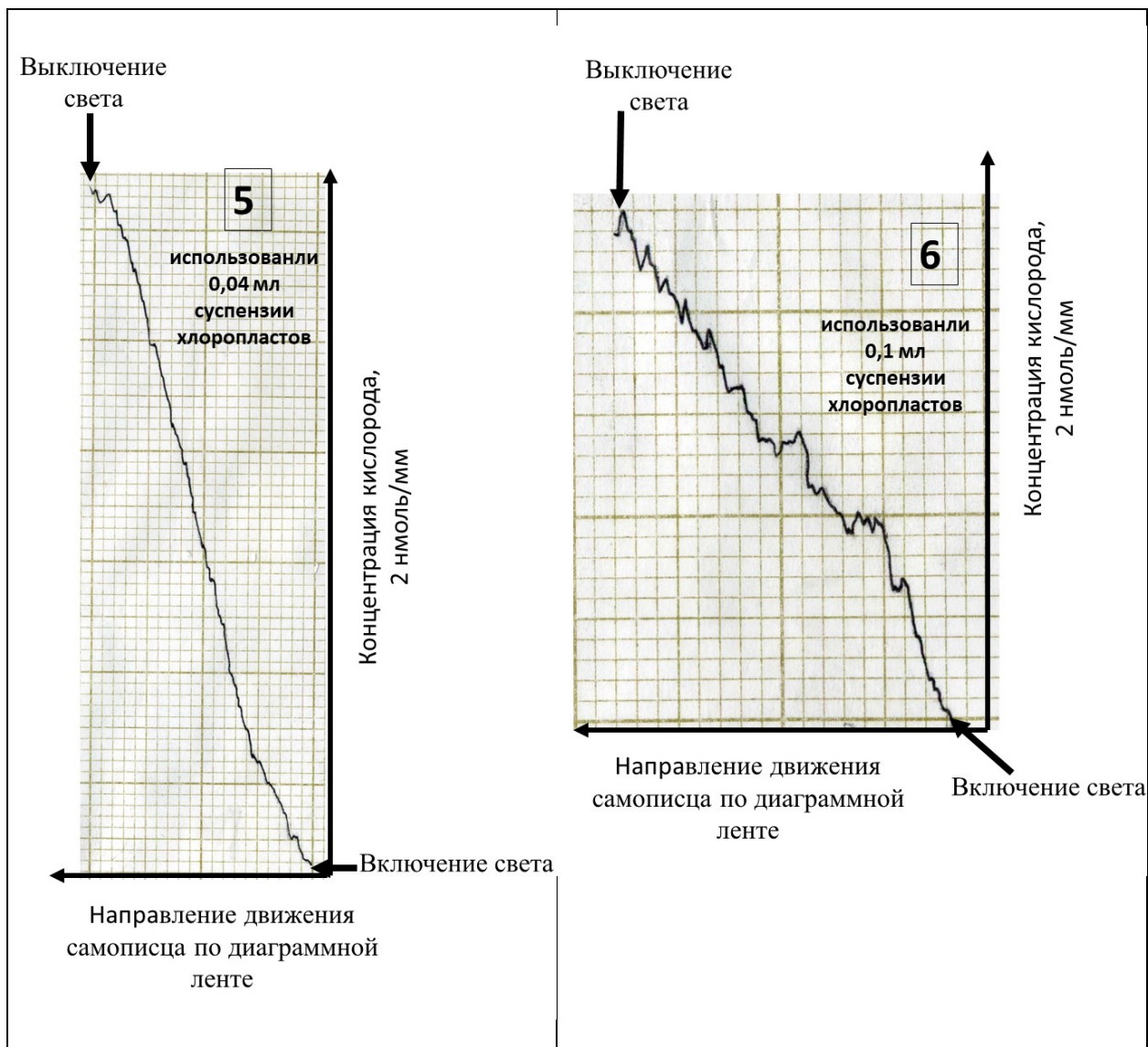
**д.** Приняв результат эксперимента I за 100%, рассчитайте процентные соотношения для остальных экспериментов. Результаты внесите в таблицу №2 в листе ответов.

**Приложение. Рис. 1 – 6. Экспериментальные кривые, отражающие зависимость изменения концентрации кислорода в полярографической ячейке от времени**









### ЛИСТ ОТВЕТОВ

#### РАСТЕНИЯ: ФИЗИОЛОГИЯ, АНАТОМИЯ И МОРФОЛОГИЯ (33 балла)

Таблица №1. Фотосенсибилизация хлорофилла (10 баллов)

№ пробирки	Компоненты среды и освещенность	Цвет вытяжки до экспозиции	Цвет вытяжки после экспозиции	Причины изменения цвета или их отсутствия (впишите буквы утверждений)
1	Хл + МК + АК + hv	бурый	буро-зеленый, зеленый	А, Б, В
2	Хл + МК + АК + темнота	бурый	бурый	Г, Д, Е



3	Хл + МК + hv	бурый	буро-зеленый	А, Б, Ж, З
4	Хл + АК + hv	зеленый	зеленый	А, И, (В)
5	Этанол + МК + АК + hv	красный	красный	Е, К, (Г)

За каждую правильно отмеченную ячейку в последнем столбце – 2 балла; если одна из букв указана неправильно – 1 балл, если две буквы неправильно указаны – 0 баллов; если указана только одна буква (или две) и она правильная – 1 балл.

Ниже представлены утверждения о процессах, происходивших в Ваших пробирках. Выберите верные утверждения о каждой из пробирок. Буквы ответов впишите в таблицу №1.

**А.** Происходит возбуждение хлорофилла; **Б.** Хлорофилл передает электрон на метиловый красный, обесцвечивая его; **В.** Аскорбат отдаёт электроны на хлорофилл; **Г.** Хлорофилл не возбуждается; **Д.** Метиловый красный не получает электрон от хлорофилла, несмотря на то, что они оба присутствуют в растворе; **Е.** Метиловый красный не меняет свой цвет; **Ж.** Поскольку дополнительного донора электронов нет, обесцвечивание метилового красного происходит в меньшей степени, чем при его наличии; **З.** Нет дополнительного источника электронов для хлорофилла; **И.** Нет акцептора электронов от хлорофилла; **К.** Нет молекулы, способной к фотосенсибилизации.

**Задание 1. (1 балл).** Выберите верное(-ые) утверждение(-я) об аскорбате (правильный(-ые) ответ(-ы) обведите):


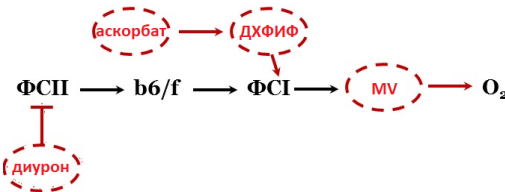
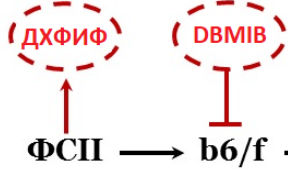
- Аскорбат принимает участие в работе виолаксантинового цикла, являясь донором электрона для де-эпоксидазы. +
- Аскорбат необходим для работы фермента, участвующем в псевдоциклическом потоке электронов в ЭТЦ фотосинтеза. +
- Аскорбат способен проявлять антиоксидантные свойства, непосредственно вступая в реакции с активными формами кислорода. +

Все ответы верны. Если какой-либо ответ не обведён, т.е. не указан верным, то задание не засчитывается – 0 баллов.

**Таблица №2.** Исследование транспорта электронов в ЭТЦ хлоропластов (22 балла).

№ экспериментальной смеси	Состав смеси	Схема эксперимента	Может ли работать АТФ-синтаза ? (да/нет)	№ эксперимента (по Рис_)	Скорость изменения концентрации кислорода, [мкмоль O <sub>2</sub> /(мг хлорофилла*час)]	Скорость изменения концентрации кислорода в % от результата эксперимента № I
I	суспензия хлоропластов, K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	ФСII → b <sub>6</sub> /f → ФСI → $(K_3[Fe(CN)_6])$	нет	3	40 – 60	100%



II	суспензия хлоропластов, $K_3[Fe(CN)_6]$ , АДФ	$\Phi\Pi \longrightarrow b6/f \longrightarrow \Phi C I \longrightarrow (K_3[Fe(CN)_6])$	да	4	80 – 130
III	суспензия хлоропластов, $K_3[Fe(CN)_6]$ , $NH_4Cl$	$\Phi\Pi \longrightarrow b6/f \longrightarrow \Phi C I \longrightarrow (K_3[Fe(CN)_6])$	нет	5	120 – 150
IV	суспензия хлоропластов, $K_3[Fe(CN)_6]$ , диурон	$\Phi\Pi \longrightarrow b6/f \longrightarrow \Phi C I \longrightarrow (K_3[Fe(CN)_6])$ 	нет	2	15 – 20
V	суспензия хлоропластов, диурон, Asc, ДХФИФ, MV	$\Phi\Pi \longrightarrow b6/f \longrightarrow \Phi C I \longrightarrow MV \longrightarrow O_2$ 	нет	1	(- 100) – (-140)
VI	суспензия хлоропластов, ДХФИФ, ДВМІВ	$\Phi\Pi \longrightarrow b6/f \longrightarrow \Phi C I$ 	нет	6	20 – 30

За каждую правильно подписанную схему (столбец №3) по 1 баллу; за каждый правильный ответ про работу АТФ-синтазы – 1 балл; за правильно отмеченный номер эксперимента (столбец №5) по 2 балла. Итого: столбец №3 – 6 баллов, столбец №4 – 6 баллов, столбец №5 – 10 баллов.



## БИОИНФОРМАТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

**Задание 1.** Драйверные мутации, приводящие к возникновению рака, иногда приводят к образованию неоантигенов, которые могут распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами пациентов. В таком случае у пациентов возникают показания к применению иммунотерапии, поскольку наличие опухолеспецифических эпитопов предполагает возможность Т-клеточного иммунного ответа на раковые клетки. В простейшем случае для возникновения неоантигена необходимо, чтобы: 1) мутация в опухолевых клетках приводила к образованию новой аминокислотной последовательности к какому-либо белку, 2) эпитоп, содержащий эту последовательность, мог бы презентироваться молекулами МНС I этого конкретного пациента, 3) прежняя аминокислотная последовательность белка не имела аналогичного эпитопа.

В таблице ниже показаны последовательности четырех экзонов, найденные в результате полноэкзомного секвенирования четырех солидных опухолей, а также генотипы МНС I этих пациентов. Драйверные мутации указаны в скобках, жирным шрифтом – нуклеотид, найденный в опухоли, курсивом – характерный для нормальных тканей того же пациента. Пример – запись **(A/C)** означает, что в норме в этом положении находится цитозин, а в опухоли встречается аденин.

- 1) Найдите с помощью алгоритма BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> гены, которым принадлежат данные экзоны, запишите названия генов на Листе Ответов.
- 2) Переведите нуклеотидную последовательность опухолевого экзона в аминокислотную последовательность соответствующего белка, используя инструмент ORF Finder [https://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html). Найдите в базе данных NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=> полноразмерный белок по названию гена (для этого во вкладке гена надо перейти в раздел RefSeq Proteins) и при помощи алгоритма BLAST выполните попарное выравнивание полноразмерного белка и его фрагмента, получающегося при трансляции опухолевого экзона.
- 3) Запишите на Листе Ответов для каждого пациента ID белка в RefSeq (начинается на NP\_ ) и аминокислотную замену, вызываемую драйверной мутацией в анализируемом гене в формате XYZ, где X – аминокислота белка дикого типа, Y – ее порядковый номер в белке, Z – аминокислота в опухолевом варианте белка.
- 4) Используя сервис по предсказанию презентруемых молекулами МНС эпитопов <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetMHC-4.0/>, найдите лучший опухолевый неоэпитоп для каждой опухолевой драйверной мутации. Не меняйте настройки по умолчанию, в окне ввода скопируйте 19-20 аминокислот с опухолевой заменой посередине, в списке **Peptide length** выберите размеры от 8mer до 10mer, в окне **or type allele names** скопируйте из таблицы перечень аллелей МНС (Генотип HLA). Результаты работы сервиса представляют собой таблицу, в которой последний столбец BindLevel остается пустым для большинства пептидов (они не связываются с молекулами МНС). WB означают слабое связывание, SB – сильное связывание. При сравнении эпитопов используйте столбец Affinity – чем меньше значение константы диссоциации комплекса МНС/пептид, тем лучше эпитоп. Запишите лучший опухолевый эпитоп и презентрующий его вариант HLA на Листе Ответов.
- 5) Сравните эпитопы этого же участка нормального белка. Определите, есть ли показания к применению иммунотерапии рака, запишите на Листе Ответов, кому из Пациентов стоит назначить иммунотерапию и почему.



Пациент	Последовательность нуклеотидов анализируемого экзона	Генотип HLA
А	GCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC TG(A/G)TGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATT CAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAG	HLA-A0201, HLA-A0205, HLA-B0801, HLA-B1402, HLA-C0303, HLA-C0701
Б	TTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTT ATCAAACCCTTTTGTGAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGA CAATCATGTTGCAG(G/C)AATTCAGTGTAAAGCTGGAAAGGGACGAA CTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTACATCGGGGCAAATTTTAA AAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAG AAAAAAG	HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-B0702, HLA-B0803, HLA-C0303, HLA-C0501
В	AGGGAACCCCTTACCTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGA TGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCAGAGTC AGCTCGTGTTGGCAACATACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAA GTTCCCAATTGAAAGTTGCAGAATCTGCCAGAGTCCAGCTG CTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGA AAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGA AAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGT(T/C)TGGCCTG ACCCCAGAAGAATTT	HLA-A0101, HLA-A0201, HLA-B0702, HLA-B1402, HLA-C0501, HLA-C0701
Г	TCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTGTCCC CGGACGATATTGAACAATGGTTCACTGAAGACCCAGGTCCAG ATGAAGCTCCCAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCCCGTGGCCC CTGCACCAGCAGCTCCTACACCGGCGGCCCTGCACCAGCCC CCTCCTGGCCCCTGTCACTTCTGTCCCTTCCCAGAAAACCTA CCAGGGCAG(A/C)TACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCAATTCTG GGACAGCCAAGTCTGTGACTTGCACG	HLA-A0101, HLA-A0205, HLA-B0801, HLA-B0803, HLA-C0401, HLA-C0701

**Задание 2.** Для постановки экспериментов в молекулярной биологии часто предварительно получают необходимые векторы – проводят молекулярное клонирование. Перед вами стоит задача выбрать векторы, эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) и подобрать праймеры для молекулярного клонирования, а также описать его протокол. Ваша цель – получить вектор для экспрессии в культуре клеток человека (культура HeLa) слитого белка, состоящего из двух рамок считывания (ORF – open reading frame): белка ORF1 и EGFP на С-конце. Между этими белковыми фрагментами должен быть линкер GGGGS, и не должно быть больше никаких лишних последовательностей аминокислот (в том числе кодируемых сайтами рестрикции). Белок ORF1 – это белок цитоплазматической мембраны, пронизывающий мембрану один раз. Вы должны предложить схему клонирования, позволяющую собрать необходимый вектор со слитым белком за одну реакцию лигирования.

В вашем распоряжении есть плазмиды, кодирующие ORF1 ([pUC19\\_ORF1](#)) и EGFP ([pUC19\\_EGFP](#)), а также 4 варианта векторов, в которые вы можете вставить ген слитого белка ([вектор 1](#), [вектор 2](#), [вектор 3](#), [вектор 4](#)). Скачайте схемы этих плазмид по указанным ссылкам на свой рабочий стол (нажмите на название плазмиды, зажав ctrl). Для работы с последовательностями плазмид вам потребуется программа SnapGene Viewer, установленная на компьютере (ярлык на рабочем столе). Краткую инструкцию по работе с программой можно посмотреть [здесь](#). Определения элементов аннотации плазмид даны ниже в приложении к заданию.



Также в вашем распоряжении есть набор рестриктаз (Таблица 1). Вам нужно подобрать праймеры для ПЦР, с помощью которых вы амплифицируете нужные фрагменты для вставки их в вектор с использованием некоторых из перечисленных рестриктаз. Вы можете использовать праймеры длиной до 55 нуклеотидов. Участок праймера, отжигающийся на матрицу, должен быть длиной 20 нуклеотидов (не учитывайте GC-состав). Учтите, что сайт рестрикции эндонуклеаз должен быть минимум в 4-х нуклеотидах от конца фрагмента ДНК, иначе эндонуклеаза не будет эффективно взаимодействовать с этим сайтом.

**Таблица 1.** Рестриктазы, имеющиеся в вашем распоряжении.

Рестриктаза	Сайт рестрикции, место разрезания отмечено стрелкой
<i>BsmBI</i>	CGTCTCN↑ GCAGAG(N) <sub>5</sub> ↓
<i>HindIII</i>	A↑AGCTT TTCGA↓A
<i>BamHI</i>	G↑GATCC CCTAG↓G
<i>SpeI</i>	A↓CTAGT TGATC↑A
<i>EcoRI</i>	G↑AATTC CTTAA↓G
<i>XbaI</i>	T↑CTAGA AGATC↓T
<i>NcoI</i>	C↑CATGG GGTAC↓C

Ответьте на следующие вопросы на Листе Ответов.

**2.1.** Напишите последовательность ДНК (5'→3'), кодирующую GGGGS линкер, используя таблицу генетического кода (выберите лучший, на ваш взгляд, вариант). Здесь и в других заданиях используйте для записи нуклеотидов строчные буквы (a, t, g, c), поскольку заглавные G и C легко перепутать.

**2.2.** Какой из предложенных векторов (1–4) подходит для клонирования в него последовательности, кодирующей слитый белок? Объясните, почему другие векторы не подходят.





**2.3.** Можно ли использовать исходные плазмиды, содержащие ORF1 и EGFP, для наработки этих белков: а) в бактериальных системах экспрессии, б) в клетках млекопитающих? Поясните ваши ответы.

**2.4.** Нарисуйте блок-схему (не обязательно линейную), описывающую процесс молекулярного клонирования при получении необходимого вектора с использованием подобранных вами праймеров и выбранных рестриктаз. Используйте указанные в списке шаги (буквы), расположив их в необходимом порядке и дописав необходимые элементы:

А) Обработка ... рестриктазами .... (на схеме вписать, какая ДНК обрабатывается, и названия рестриктаз)

Б) ПЦР с плазмидой .... (указать название/номер) в качестве матрицы и праймерами (указать название) из таблицы

В) Трансформация компетентных бактерий полученной смесью

Г) Лигирование ... (вписать, каких молекул ДНК)

Д) Селекция бактерий на антибиотике ... (вписать название антибиотика), содержащемся в среде

Е) Очистка смеси от белков и олигонуклеотидов

Ж) ПЦР с выросших колоний бактерий для идентификации колоний, содержащих плазмиду со вставкой

З) Обработка .... (каких молекул ДНК) щелочной фосфатазой (отщепляет 5'-фосфат от фрагментов ДНК)

**2.5.** Напишите в таблице последовательности праймеров (5'→3'), которые необходимо использовать для амплификации ORF1 и EGFP. Подчеркните в праймерах узнаваемые выбранными рестриктазами сайты. Поясните, какие последовательности входят в состав праймеров.

**2.6.** Создайте файл в SnapGene Viewer, содержащий последовательность целевого вектора с ORF1-EGFP. Далее аннотируйте эти рамки считывания на карте. Добавьте на карту праймеры, которые вы бы использовали для амплификации ORF1 и EGFP (придумайте им названия). Загрузите его в систему по ссылке [mag.exam.msu.ru](http://mag.exam.msu.ru), войдя в свой личный кабинет. Назовите файл вашим шифром.

**2.7.** В каких органеллах клетки будет обнаруживаться флуоресценция GFP после их трансфекции полученной плазмидой? Поясните ваш ответ.

**2.8.** Почему в большинстве клеток культуры, трансфицированной полученной плазмидой, через пару недель после трансфекции не будет наблюдаться слитый белок?



**Приложение.** Расшифровка обозначений на картах доступных вам векторов.

6xHis	Последовательность из 6 гистидинов
AmpR	Ген устойчивости к ампициллину
CMV enhancer и CMV promoter	Энхансер и промотор цитомегаловируса. Этот вирус относится к семейству герпесвирусов.
KanR	Ген устойчивости к канамицину
Kozak sequence	Последовательность Козак (GCCACC <u>ATGG</u> ), содержит старт-кодон (подчеркнут)
AmpR promoter	Промотор гена устойчивости к ампициллину
Lac promoter	Промотор лак-оперона
Lac operator	Оператор лак-оперона
LacI	Ген лак-репрессора
LacZa	Ген фрагмента бета-галактозидазы
MCS	Полилинкер (multiple cloning site). Участок, содержащий много сайтов рестрикции.
NeoR	Ген устойчивости к неомицину
PolyT	Поли-Т участок (терминатор для РНК-полимеразы III)
RBS	Сайт посадки рибосом, включающий последовательность Шайна-Дальгарно
SV40 promoter	Промотор вируса Simian virus 40 — вирус, обнаруженный в клетках обезьян
SV40 intron	Интрон из генома вируса SV40
SV40 poly(A) signal	Сигнал полиаденилирования вируса SV40
T7 promoter и T7 terminator	Промотор и терминатор бактериофага T7
thrombin site	Сайт узнавания тромбином. Участок разрезания отмечен стрелкой
TSS	Точка старта транскрипции



U6 promoter	Промотор гена малой ядерной РНК U6
Ori	Ориджин репликации

### ЛИСТ ОТВЕТОВ

#### 1.1 Заполните таблицу

Пациент	Ген с драйверной мутацией (по 1 баллу)	ID белка и аминокислотная замена (по 1 баллу)	Эпитоп и презентующий его HLA	
			HLA 1 балл за 1-2 аллели, 2 балла за 3-4 аллели.	Эпитоп (по 1 баллу)
<b>А</b>	KRAS	G12D	HLA-A0205	KLVVVGAD <b>D</b> GV
<b>Б</b>	PTEN	A121G	HLA-C0501	EDDNHVA <b>G</b> I
<b>В</b>	BRCA1	S1655F	HLA-A0201	RMSMVV <b>F</b> GL
<b>Г</b>	TP53	S106R	HLA-A0101 HLA-C0401 HLA-C0401 HLA-C0701	Любой из четырех эпитопов: PSQKTYQ <b>G</b> RY TYQ <b>G</b> RYGFR <b>R</b> YGFRLGFL <b>G</b> RYGFRLGF

Баллы за аллель HLA выставляются только в случае верно названного эпитопа. Красным в эпитопах выделены опухолеспецифические аминокислоты.

1.2. Показания к иммунотерапии есть у пациента (ов) В и Г. Обоснуйте Ваш выбор:

У них есть опухолевые неопитопы, имеющие более высокую силу связывания (более низкую Кд), по сравнению с эпитопами нормальных форм белка (1 балл), значит цитотоксические клетки, узнающие такие эпитопы, могли бы избежать отрицательной селекции (1 балл).         

2.1. Последовательность ДНК, кодирующая GGGGS линкер

ggcgcgcgcgcgс 1 балл

С другими кодонами G (GGT, GGA, GGG) или S (TCT, TCG, TCC, TCA, TGU) – 0,5 балла

2.2. Вектор 2 (0,5 балла)         . Другие не подходят, потому что 1 и 4 векторы не имеют промотора для эукариотической экспрессии и последовательности Козак, вектор 3 содержит промотор для экспрессии генов малых РНК. по 0,5 балла за вектор.

2.3. а) Нельзя никакой, т.к. рамка считывания ориентирована в обратном направлении относительно промоторов в плазмиде (0,5)

б) Нельзя никакой, т.к. отсутствуют промоторы для эукариотической полимеразы (0,5)

2.4. Блок-схема клонирования (3 балла)

А (Вектор2 NcoI или BsmBI + SpeI) → 3 → E → Г

Б (вектор ORF1 prF1+prR1) → E → А (+BsmBI) → E → Г



Б (вектор EGFP prF2+prR2) → Е → А (+BsmBI (+SpeI)) → Е → Г

Г → (Е) → В → Д (амп.) → Ж

Ошибки (по –1 балл за каждую): неправильные рестриктазы, неправильные векторы, перепутали стадии, пропустили стадии очистки.

2.5. Праймеры для клонирования; придумайте им названия (8 баллов) – по 2 балла за праймер. Баллы ставились, даже если вы в предыдущих пунктах выбрали неправильные рестриктазы и вектор, но написали в остальном правильные праймеры под эти рестриктазы/вектор.

**1. Прямой на ORF1:**

ORF1\_f\_Bsm: aaaaCGTCTCNcatggctgggatttctatt (под NcoI) или aaaaCGTCTCNccatggctgggatttctatt (под BsmBI)

**2. Обратный на ORF1 + прямой на EGFP (см таблицу):**

Важно при подборе обратного праймера на ORF1 не захватить случайно стоп-кодон. N – любой

	Обратный праймер ORF1	Прямой праймер EGFP
Линкер в ORF1_r, липкий конец от линкера	aaaaCGTCTCN <del>gctg</del> ccgccgcccttgt catcgtcgtccttgt	aaaaCGTCTCNcagcatggtgagcaagggcgagga
Линкер в ORF1_r, липкий конец от EGFP	aaaaCGTCTCNccatgctgccgccgcc ctgtcatcgtcgtccttgt	aaaaCGTCTCNatggtgagcaagggcgagga – <b>нельзя такую комбинацию, если для разрезания вектора используется BsmBI! (т.к. одинаковые липкие концы будут)</b>
Линкер в EGFP_f, липкий конец от ORF1	aaaaCGTCTCNcttgtcatcgtcgtccttgt	aaaaCGTCTCNcaagGGCGGCGGCGGCAGCatggtgagcaagggcgagga
Линкер в EGFP_f, липкий конец от линкера	aaaaCGTCTCNcgcccttgtcatcgtcgtcctt gt	aaaaCGTCTCNGGCGGCGGCGGCAGCatggtgagcaagggcgagga

нуклеотид.

**3. Обратный на EGFP:**

EGFP\_r\_Spe: aaaaACTAGTtcactgtacagctcgtcca

Либо EGFP\_r\_BsmBI: aaaaCGTCTCNctagtactgtacagctcgtcca

2.6. Загрузите карту в систему. Название файла не должно содержать ваши ФИО, а только ВАШ ШИФР

2.7. GFP будет обнаруживаться в (1 балл)



**Шереховатая ЭПР, транспортные везикулы, аппарат Гольджи, цитоплазматическая мембрана**

По 0,25 балла за каждый элемент ответа. За неверные вчитается по 0,25 балла, но не меньше нуля за пункт. Если написан только один элемент из четырех (например, цитоплазматическая мембрана), ставится 0 баллов за весь пункт 2.7.

**2.8. Через две недели после трансфекции (1 балл)**

Т.к. в плазмиде нет ориджина репликации, клетки будут постепенно терять плазмиду при делении (нестабильная, транзистная трансфекция). Белки в клетках обновляются (старые белки деградируют), поэтому постепенно флуоресценция потеряется.