

Ассоциация участников технологических кружков

УТВЕРЖДАЮ
Президент Ассоциации



А.И. Федосеев

Дополнительная общеразвивающая образовательная программа

Профиль: «Геномное редактирование»

направление подготовки: Естественно-научное
общая трудоемкость – **186 часов**
образовательные технологии – **предметно-ориентированные**

Разработчики:
Каххарова З.И.,
команда разработчиков профиля
«Геномное редактирование» НТО

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ

На сегодняшний день существенным фактором, препятствующим развитию инновационных отраслей в области биомедицины, биотехнологии, нанотехнологии является острый недостаток специалистов, способных квалифицированно подходить к организации проектной работы в промышленности и научно-исследовательской деятельности.

Представленный курс предназначен для подготовки школьников, которые смогут поступать в высшие учебные заведения на специальность «Биология», «Химия», «Биотехнология», «Химическая биотехнология» и другие и затем продуктивно работать в качестве научных сотрудников в научных и диагностических лабораториях, а также инженеров на биотехнологическом производстве.

Тематика курса позволяет получить теоретические знания, выходящие за рамки школьной программы, освоить современные методы, получить навык проектной деятельности, в том числе, работы в команде, и поэтому является чрезвычайно актуальной.

Основной задачей данного курса является формирование у обучающихся естественно-научного мировоззрения, освоение в теории и на практике актуальных методов молекулярной биологии, биотехнологии. Это обеспечит потенциал к проектной деятельности, условиям работы в конкретных проектах и организациях, а также развитию собственных проектов и стартапов.

Теоретическая и практическая основа курса построена исходя из современных представлений об организации научных, диагностических и прикладных работ в различных отраслях, для которых важно сочетание технологичной организации труда, освоения современных методов анализа и творческого выполнения заданий. Курс также будет полезен для подготовки школьников к участию в Олимпиаде НТИ по профилю «Геномное редактирование».

Другой важной задачей курса является формирование у обучающихся фундаментальных знаний, которые подкрепляются практическими навыками, что обеспечивает прочное освоение материала. Для этого изложение теоретических основ опирается на результаты, полученные на практических занятиях. В свою очередь, тематика практических занятий, основана на теоретическом курсе. Также курс направлен на формирование навыков проектной деятельности, освоению методик, применяемых в настоящее время на практике, на развитие способности самостоятельного поиска информации в научной литературе, работе с базами данных статей и патентов по тематике курса, основам биоинформатики.

Знания и навыки, полученные при изучении данного курса, помогут учащимся в дальнейшем обучении в высшей школе или организациях среднего профессионального образования. Знакомство с современными методами молекулярной биологии, биотехнологии, биомедицины увеличит мотивацию абитуриентов к поступлению на соответствующие отделения вузов. Задачи, поставленные в данном курсе, могут быть успешно решены ввиду оптимальной формы проведения курса, который организован в виде лекций, практических и самостоятельных занятий.

Цель программы

Создание условий для мотивации, подготовки и профессиональной ориентации школьников для возможного продолжения учебы в ВУЗах и последующей работы в области биотехнологии.

Задачи программы

Образовательные

- формирование понимания взаимосвязи и взаимозависимости естественных наук;
- формирование понимания влияния естественных наук на окружающую среду, экономическую, технологическую, социальную и этическую сферы деятельности человека;
- создание условий для развития навыков учебной, проектно-исследовательской деятельности;
- формирование навыков безопасной работы во время проектно-исследовательской и экспериментальной деятельности, при использовании лабораторного оборудования;
- овладение методами самостоятельной постановки биологических экспериментов, описания, анализа и оценки достоверности полученного результата;
- знание основ методов молекулярной биологии и биохимии;
- подготовка к участию в Олимпиадах НТИ.

Воспитательные

- повышение мотивации учащихся к исследовательской деятельности;
- формирование у учащихся стремления к получению качественного законченного результата;
- умение работать в команде, распределять обязанности и делегировать задачи.

Развивающие

- формирование умений анализировать, оценивать, проверять на достоверность и обобщать научную информацию;
- формирование навыков проектного мышления;
- формирование мотивации к саморазвитию.

Категория обучающихся:

учащиеся 8–11-х классов, успешно осваивающие школьные курсы биологии и химии. Программа может быть скорректирована в зависимости от возраста учащихся. Некоторые темы взаимосвязаны со школьным курсом и могут с одной стороны служить пропедевтикой, с другой стороны опираться на него.

Сроки реализации программы

Программа рассчитана на 1- 2 года обучения, может быть изменена в соответствии с материально-техническим обеспечением организации (кружка), в котором планируется ее реализация.

Режим занятий

Занятия проводятся 2 раза в неделю по 2 академических часа (**186 часов**).

Формы проведения занятий

Реализация программы предполагает групповую, подгрупповую, индивидуальную и самостоятельную работу.

МТО смотри в приложении 2.

Планируемые результаты освоения программы

Личностные результаты.

Готовность и способность к обучению и познанию, сформированность устойчивых познавательных интересов.

Сформированность целостного мировоззрения, соответствующего современному уровню развития науки и общественной практики.

Сформированность ответственного отношения к учению

Метапредметные результаты.

Готовность и способность к усвоению межпредметных понятий «система», «факт», «закономерность», «среда», «анализ», «синтез» «функция», «материал», «процесс», и др. через:

- приобретение навыков работы с информацией – сформированность навыка систематизировать, сопоставлять, анализировать, обобщать и интерпретировать информацию, содержащуюся в готовых информационных объектах; выделять главную и избыточную информацию, выполнять смысловое свертывание выделенных фактов, мыслей; представлять информацию в виде плана, наглядно символической форме и др.

- участие в проектной деятельности – приобретение опыта проектной деятельности, способствующей воспитанию самостоятельности, инициативности, ответственности, повышению мотивации и эффективности учебной деятельности; умение выбирать адекватные задаче средства, принимать решения, в том числе в ситуациях неопределенности; возможность развить способности к разработке нескольких вариантов решений, к поиску нестандартных решений, анализу результатов поиска и выбору наиболее приемлемого решения.

Формирование универсальных учебных действий (УУД):

- регулятивные УУД – умение самостоятельно определять цели обучения, ставить и формулировать новые задачи в учёбе и познавательной деятельности; определять совместно с педагогом критерии оценки планируемых результатов; выдвигать версии преодоления препятствий, формулировать гипотезы, прогнозировать конечный результат; ставить цель и формулировать задачи деятельности с учетом выявленных затруднений и существующих возможностей, обосновывая выбранные подходы и средства; умение самостоятельно планировать пути достижения целей, в том числе альтернативные, осознанно выбирать наиболее эффективные способы решения учебных и познавательных задач; выбирать из предложенных вариантов и самостоятельно искать средства/ресурсы для решения задачи/достижения цели; составлять план решения проблемы (описывать жизненный цикл выполнения проекта, алгоритм проведения исследования); определять потенциальные затруднения при решении учебной и познавательной задачи и находить средства для их устранения; описывать свой опыт, оформляя его для передачи другим людям в виде алгоритма решения практических задач; корректировать свои действия в соответствии с изменяющейся ситуацией. обосновывать достижимость цели выбранным способом.

- познавательные УУД – умение определять понятия, создавать обобщения, устанавливать аналогии, классифицировать, самостоятельно выбирать основания и критерии для классификации, устанавливать причинно-следственные связи, строить логическое рассуждение, умозаключение (индуктивное, дедуктивное, по аналогии) и делать выводы; выделять общий признак или отличие двух или нескольких предметов или явлений и объяснять их сходство и отличия; объединять предметы и явления в группы по определенным признакам, сравнивать, классифицировать и обобщать факты и явления; различать/выделять явление из общего ряда других явлений; выделять причинно-

следственные связи наблюдаемых явлений или событий, выявлять причины возникновения наблюдаемых явлений; строить рассуждение от общих закономерностей к частным явлениям и от частных явлений к общим закономерностям; самостоятельно указывать на информацию, нуждающуюся в проверке, предлагать и применять способ проверки достоверности информации; объяснять явления, процессы, связи и отношения, выявляемые в ходе познавательной и исследовательской деятельности; выявлять и называть причины события, явления, самостоятельно осуществляя причинно-следственный анализ; делать вывод на основе критического анализа разных точек зрения, подтверждать вывод собственной аргументацией или самостоятельно полученными данными; умение создавать, применять и преобразовывать знаки и символы, модели и схемы для решения учебных и познавательных задач – обозначать символом и знаком предмет и/или явление; определять логические связи между предметами и/или явлениями, обозначать данные логические связи с помощью знаков в схеме; создавать абстрактный или реальный образ предмета и/или явления; строить модель/схему на основе условий задачи и/или способа ее решения; создавать вербальные, вещественные и информационные модели с выделением существенных характеристик объекта для определения способа решения задачи в соответствии с ситуацией; развитие мотивации к овладению культурой активного использования словарей, справочников, открытых источников информации и электронных поисковых систем; соотносить полученные результаты поиска с задачами и целями своей деятельности.

- коммуникативные УУД – умение организовывать учебное сотрудничество с педагогом и совместную деятельность с педагогом и сверстниками; работать индивидуально и в группе: находить общее решение; формулировать, аргументировать и отстаивать свое мнение; формирование и развитие компетентности в области использования информационно-коммуникационных технологий (далее – ИКТ) – целенаправленно искать и использовать информационные ресурсы, необходимые для решения учебных и практических задач с помощью средств ИКТ; оперировать данными при решении задачи; выбирать адекватные задаче инструменты и использовать компьютерные технологии для решения учебных задач; использовать информацию с учетом этических и правовых норм; соблюдать информационную гигиену и правила информационной безопасности.

Предметные результаты

Сформированность собственной позиции по отношению к биологической информации, получаемой из разных источников, сформированность системы знаний об общих биологических закономерностях, законах, теориях

Сформированность умений исследовать и анализировать биологические объекты и системы, объяснять закономерности биологических процессов и явлений, прогнозировать последствия значимых биологических исследований.

Сформированность умений объяснять результаты биологических экспериментов, решать биологические и биоинформатические задачи.

Сформированность убежденности в необходимости соблюдения этических норм и экологических требований при проведении биологических исследований

СОДЕРЖАНИЕ ПРОГРАММЫ

Курс разделен на теоретическую и практическую части. Теоретическая часть включает в себя 6 разделов, каждый раздел включает в себя 2 модуля.

Модуль 1 содержит в себе необходимые теоретические темы для освоения данной программы, а также задачи, для решения которых не требуется специальное ПО и лабораторное оборудование. Освоив данный модуль, вы получите необходимые базовые знания в области геномного редактирования, а также научитесь решать практические задачи, с которыми исследователи сталкиваются в работе. С данными навыками вы сможете принимать участие в профиле “Геномное редактирование” олимпиады кружкового движения НТИ и решить примерно 60% задач отборочных этапов. Так же эти знания помогут принимать участие в различных олимпиадах от городского до всероссийского уровня.

Модуль 2 содержит в себе задачи, относящиеся к теории из модуля 1, требующие специального ПО. Освоив данный модуль, вы научитесь работать с биоинформатическими программами, сможете решать практические задачи при помощи этих программ. С данными навыками сможете принимать участие в профиле “Геномное редактирование” олимпиады кружкового движения НТИ и решить примерно 40% задач отборочных этапов. Также вы сможете принимать участие в чемпионате Worldskills и решить 30% поставленных задач, биоинформатических хакатонах и летних школах по биоинформатике.

Практический часть (Раздел 7) содержит практические работы, относящиеся к темам теоретических разделов. Освоив данный раздел, вы приобретете навыки работы в лаборатории, научитесь решать настоящие научные задачи. С данными навыками вы сможете участвовать в финале олимпиады кружкового движения НТИ в профиле “Геномное редактирование”, принимать участие в чемпионате Worldskills и решить 70% поставленных задач, участвовать в биохакатонах и летних школах по направлениям биоинженерной биологии.

УЧЕБНО-ТЕМАТИЧЕСКИЙ ПЛАН

№ п/п	Наименование разделов, модулей, тем	Кол-во часов		
		Теория	Практика	Форма контроля
РАЗДЕЛ 1				
Модуль 1 (24 часа)				
1.1.1	Урок НТИ. Знакомство с Олимпиадой НТИ. Проектные смены в области инженерной биологии	2		
1.1.2	Что такое инженерная биология? История инженерной биологии, биотехнологии	2		
1.1.3	Сравнение методов селекции, генетики, генетической инженерии	3	1	Решение задачи
1.1.4	Строение и функции нуклеиновых кислот. ДНК	1	3	Решение задач
1.1.5	Способы выделения ДНК, электрофоретический анализ ДНК	4		
1.1.6	Строение и функции нуклеиновых кислот. РНК	1	3	Решение задач
1.1.7	История открытия структуры ДНК, методы исследования нуклеиновых кислот	4		

Модуль 2 (2 часа)				
1.2.1	Решение Биоинформатических задач по теме «Секвенирование по Сэнгеру»		2	Решение задач
РАЗДЕЛ 2				
Модуль 1 (14 часов)				
2.1.1	Генетическая инженерия	6		
2.1.2	Клонирование ДНК, эндонуклеазы рестрикции, плазмидная ДНК	1	3	Решение задач
2.1.3	Генетически модифицированные организмы, трансформация бактерий	2	2	Решение задач
Модуль 2 (12 часов)				
2.2.1	Решение Биоинформатических задач по теме «Рестрикционный анализ плазмид»		12	Решение задач
РАЗДЕЛ 3				
Модуль 1 (28 часов)				
3.1.1	Основные молекулярно-генетические процессы. Репликация ДНК	4	2	Решение задач
3.1.2	Основные молекулярно-генетические процессы. Транскрипция	3	1	Решение задач
3.1.3	Основные молекулярно-генетические процессы. Трансляция	4		
3.1.4	Генетический код и его свойства	1	1	Решение задач
3.1.5	Структура генома: хромосомы, упаковка ДНК, регуляторные элементы	4		
3.1.6	Структура гена: промоторы, терминаторы, сплайсинг; кодирующие и некодирующие участки генома	4		
3.1.7	История полимеразной цепной реакции, классификация ПЦР, использование ПЦР в молекулярной биологии, диагностике	1	3	Решение задач
Модуль 2 (4 часа)				
3.2.1	Решение биоинформатических задач по темам «Полимеразная цепная реакция» и «Открытые рамки считывания»		4	Решение задач
РАЗДЕЛ 4				
Модуль 1 (28 часов)				
4.1.1	Строение и функции белков	6		
4.1.2	Классификация белков, ферментов	4		
4.1.3.	Основы биокатализа, ферментативной кинетики	4		

4.1.4	Антитела. Строение, функции	6		
4.1.5	Генетические основы разнообразия антител	4		
4.1.6	Ферменты в организме человека. Использование ферментов в биотехнологии, медицине. Качественные реакции	4		
Модуль 2 (2 часа)				
4.2.1	Решение Биоинформатических задач		2	
РАЗДЕЛ 5				
Модуль 1 (14 часов)				
5.1.1	Использование ферментов в биотехнологии, медицине.	?		
5.1.2	Хроматография – история метода и принципы разделения веществ	6		
5.1.3	Хроматография в биотехнологии	4		
5.1.4	Выделение и анализ рекомбинантных белков. Зеленый флуоресцентный белок. Электрофорез белков	4		
Модуль 2 (2 часа)				
5.2.1	Решение Биоинформатических задач		2	Решение задач
РАЗДЕЛ 6				
Модуль 1 (6 часов)				
6.1.1	Редактирование генома CRISPR\Cas9, РНК-интерференция		6	Проверочная работа и творческое задание (6 часов)
Модуль 2 (2 часа)				
6.2.1	Решение биоинформатических задач по теме «Мутагенез»		2	
РАЗДЕЛ 7 (42 часа)				
7.1	Определение ГМО в продуктах питания (см. Приложение 2)		6	
7.2	Состав злаков в хлебной продукции (см. Приложение 2)		6	
7.3	Определение гена метаболизма кофеина (см. Приложение 2)		6	
7.4	Определение пола человека (см. Приложение 2)		6	
7.5	Равновесие в популяции (см. Приложение 2)		6	

7.6	Определение резус-фактора (см. Приложение 2)		6	
7.7	Тонкослойная хроматография, определение активности ферментов. (см. Приложение 2)		6	
ИТОГО		89	91	6

Содержание курса

Тема	Содержание	Формат занятий
Раздел 1. Модуль 1 (24 часа)		
Урок НТИ. Знакомство с Олимпиадой НТИ. Проектные смены в области инженерной биологии		Лекция
Что такое инженерная биология? История инженерной биологии, биотехнологии		Лекция
Сравнение методов селекции, генетики, генетической инженерии		Лекция
	Задача 1. Дан текст, в котором сравниваются методы селекции и геной инженерии. Необходимо выбрать корректные по смыслу варианты. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.	Практика
Строение и функции нуклеиновых кислот. ДНК		Лекция
	Задача 2. В процессе выделения ДНК исследователь получил несколько пробирок, содержащих по 1 мл раствора ДНК. Сколько пробирок можно одновременно центрифугировать без применения противовеса в центрифуге с ротором на 12 пробирок?	Практика
	Задача 3. Необходимо определить примерную длину каждого из трех заданных фрагментов ДНК. Соотнести фрагменты и их длину в п. н.	Практика

	Задача 4. Вычислите концентрацию ЭДТА в 100 мл 1X раствора ТАЕ. Ответ приведите в мМ, округлите до первого знака после запятой.	Практика
	Задача 5. Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле. Выберите правильные утверждения.	Практика
Способы выделения ДНК, электрофоретический анализ ДНК		Лекция
Строение и функции нуклеиновых кислот. РНК		Лекция
	Задача 6. В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGACATTTT-5'. Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	Практика
	Задача 7. В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов матричной цепи гена 5'-CATCCTCGGC-3'. Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	Практика
	Задача 8. В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGACATTTT-5'. Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	Практика
	Задача 9. Дан текст. Правильно укажите пропущенные в тексте слова.	Практика
	Задача 10. Нуклеиновые кислоты отличаются по электрофоретической подвижности.	Практика

	<p>Определите подвижность различных видов нуклеиновых кислот в геле, начиная с наименее (сверху) и заканчивая наиболее подвижной (снизу).</p>	
<p>История открытия структуры ДНК, методы исследования нуклеиновых кислот</p>		Лекция
	<p>Задача 11. Лаборант приготовил реакционную смесь из стоковых (исходных) растворов компонентов. Определите конечную концентрацию компонентов в реакционной смеси, если известно, что к реакционной смеси добавили 5 мкл 10-кратного раствора смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов с флуоресцентно мечеными дезоксинуклеозидтрифосфатами.</p>	Практика
	<p>Задача 12. "Прочитать" результаты геле-электрофореза и определить последовательность нуклеотидов в анализируемом образце ДНК</p>	Практика
	<p>Задача 13. Для анализа последовательности нуклеиновых кислот по методу Сэнгера в настоящее время используют автоматические генетические анализаторы. Выберите правильные суждения</p>	Практика
<p>Раздел 1. Модуль 2 (2 часа)</p>		
<p>Решение Биоинформатических задач по теме «Секвенирование по Сэнгеру»</p>	<p>Задача 1. Определите последовательность нуклеотидов и с помощью сервиса Blast определите, какому гену она принадлежит.</p>	Практика
	<p>Задача 2. Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера</p>	Практика

	Ссылка для скачивания файла с секвенограммой - https://yadi.sk/d/5L7HCaMMuYD_YbQ	
	Задача 3. Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера Ссылка для скачивания файла с секвенограммой - https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw	Практика
	Задача 4. Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой с Яндекс-диска https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw	Практика
	Задача 5. Используя программу UGENE проведите сборку контига двух продуктов секвенирования. Ответ представьте в виде числа, соответствующего длине контига. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой https://yadi.sk/d/zZ0gnpHP3uos7g	Практика
	Задача 6. В результате реакции Сэнгера получена следующая последовательность нуклеотидов, содержащая фрагмент 5'-TTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA-3' Используя инструмент BLAST, определите, какому гену человека соответствует данная последовательность.	Практика
Раздел 2. Модуль 1 (14 часов)		
Генетическая инженерия		Лекция

Клонирование ДНК, эндонуклеазы рестрикции, плазмидная ДНК		Лекция
	Задача 1. В тексте описывается работа с последовательностями ДНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте.	Практика
	Задача 2. Ферменты метаболизма ДНК используют в генетической инженерии для получения двуцепочечных молекул ДНК из одноцепочечных, а также для синтеза ДНК на матрице РНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте.	Практика
	Задача 3. В результате разрезания плазмиды pBR322 (длина 4361 п.н.) рестриктазой АссBSII образовались два фрагмента длиной 2560 п.н. и 1801 п.н. Определите массу фрагмента длиной 1801 п.н., если известно, что масса исходной плазмиды составляла 1000 нг.	Практика
	Задача 4. Плазида pBluescript содержит 2961 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт NaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество $\text{A}=\text{T}=\text{Ц}=\text{Г}$. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.	Практика
	Задача 5. Плазида содержит 4000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт NaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество $\text{A}=\text{T}=\text{Ц}=\text{Г}$. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.	Практика
Задача 6. Плазида содержит 3000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт NaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество $\text{A}=\text{T}=\text{Ц}=\text{Г}$.	Практика	

	Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде теоретически имеет данная рестриктаза?	
Генетически модифицированные организмы, трансформация бактерий		Лекция
	Задача 7. Исследователь пытался экспрессировать ген в бактериальной клетке. Для этого кДНК гена была клонирована в плазмиду. Клетки бактерий были трансформированы полученной плазмидой. Вечером исследователь понял, что забыл добавить на чашку Петри, куда были помещены трансформированные бактерии, антибиотик. Что увидит исследователь в чашке Петри на следующий день?	Практика
	Задача 8. После трансформации компетентных клеток в таком случае используют среду, содержащую соединение X-gal. Трансформированные клетки, содержащие плазмиду со вставкой и без вставки, отличаются по цвету. Выберите правильные суждения.	Практика
	Задача 9. После трансформации компетентных клеток в таком случае используют среду, содержащую соединение X-gal. Трансформированные клетки, содержащие плазмиду со вставкой и без вставки, отличаются по цвету. Выберите правильные суждения.	Практика
Раздел 2. Модуль 2 (12 часов)		
Решение Биоинформатических задач по теме «Рестрикционный анализ плазмид»	Задача 1. Используя программу UGENE, файлы с картами соответствующих плазмид, необходимо "вырезать" ген ДНК-лигазы из плазмиды pCA24N-ligase и "встроить" его в pBluescript [1, 4]. Определите теоретическую длину плазмиды pBluescript после встройки гена ДНК-лигазы. Ссылка для скачивания последовательности в fasta http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm . Plasmid #87741 - pCA24N-ligase http://www.addgene.org/87741/	Практика

	<p>последовательность в виде gb-файла (https://media.addgene.org/data/plasmids/87/87741/87741-attachment_Z4nGnCtL59S_.gb).</p>	
	<p>Задача 2. В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой SspI образовались два фрагмента. Определите массу более длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции SspI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2018 нг. Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе SnapGene Viewer https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/</p>	Практика
	<p>Задача 3. В результате разрезания плазмиды pBR322 рестриктазами HindII и BstBAI образовалось несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBR322, образовавшегося после гидролиза рестриктазами HindII и BstBAI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2019 нг. Ссылка для скачивания файла pBR322 для работы в программе SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/</p>	Практика
	<p>Задача 4. В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой AcoI получено несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции AcoI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2020 нг. Ссылка для скачивания последовательности в fasta http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm.</p>	Практика
	<p>Задача 5. Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе</p>	Практика

	<p>SnapGene Viewer https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/</p> <p>Вариант 1 Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите эндонуклеазы рестрикции (PvuII, BstBAI, RsaI, EcoICRI, SspI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду.</p> <p>Вариант 2 Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите длины фрагментов плазмидной ДНК, которые будут получены при действии рестриктаз AccI, BstBAI, HindII, PvuII, SspI и ZmI с пробирками, которые содержат реакционные смеси с разными рестриктазами.</p> <p>Вариант 3 Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript, сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.</p> <p>Вариант 4 Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript, сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.</p> <p>Вариант 5 Используя программу UGENE, карту плазмиды pUC19 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta), сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК</p>	
--	---	--

	рUC19 различными эндонуклеазами рестрикции.	
	<p>Задача 6. Информация о плазмиде pBR322 https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool</p> <p>Вариант 1 Используя программу UGENE, карту плазмиды pBR322, определите число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции GluI. Ответом является число.</p> <p>Вариант 2 Используя программу UGENE, карту плазмиды pBR322, определите число фрагментов ДНК длиннее 100 пар нуклеотидов, которое получится при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции HaeIII.</p>	Практика
	<p>Задача 7. Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBR322 (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/), соотнесите эндонуклеазы рестрикции (EcoRI, NruI и PstI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду.</p>	Практика
Раздел 3. Модуль 1 (28 часов)		
Основные молекулярно-генетические процессы. Репликация ДНК		Лекция
	Задача 1. Сопоставьте правильные суждения о принципах репликации ДНК, особенностях ДНК-полимеразы и процессе синтеза ДНК.	Практика
	Задача 2. Выберите правильные суждения о репликации ДНК в клетках человека.	Практика
	Задача 3. В каком направлении происходит синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой и обратной транскриптазой? Выберите все подходящие ответы из списка	Практика

	Задача 4. Исследователь пытался получить комплементарную ДНК, кодирующую целевой белок. Он выделил и размножил образец мРНК. В конце эксперимента студент получил молекулы, содержащие только рибонуклеотиды. Выберите правильные тезисы	Практика
Основные молекулярно-генетические процессы. Транскрипция		Лекция
	Задача 5. База данных NCBI содержит несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272). Используя последовательности NM_021804.3 и NP_068576.1, найдите информацию о мРНК и белковом продукте гена ACE2.	Практика
Основные молекулярно-генетические процессы. Трансляция		Лекция
Генетический код и его свойства		Лекция
	Задача 6. Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TACGCCTTCGCCTTCGCC-3'. Закодированный полипептид состоит из 6 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь трех аминокислот, которая содержит: аминокислота М (1 часть), аминокислота К (2 части), аминокислота А (3 части). Запишите последовательность аминокислот в пептиде	Практика
	Задача 7. Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TGGGCTGTTGAAGTTGAAGTT-3'. Закодированный полипептид состоит из 7 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь 4 аминокислот, которая содержит: аминокислота Q (3 части), аминокислота L (2 части),	Практика

	аминокислота R (1 часть), аминокислота T (1 часть). Запишите последовательность аминокислот в пептиде	
	Задача 8. Выберите корректные тезисы, показывающие функциональное отношение кодонов и аминокислот.	Практика
Структура генома: хромосомы, упаковка ДНК, регуляторные элементы		Лекция
Структура гена: промоторы, терминаторы, сплайсинг; кодирующие и некодирующие участки генома		Лекция
История полимеразной цепной реакции, классификация ПЦР, использование ПЦР в молекулярной биологии, диагностике		Лекция
	Задача 9. Определите, сколько (примерно) копий ДНК будет получено к концу 25го цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 256 молекул ДНК, а длина продукта ПЦР составляет 330 пар нуклеотидов.	Практика
	Задача 10. Сколько шестикратного (6x) буферного раствора для нанесения пробы на гель необходимо добавить в 25 мкл реакционной смеси для достижения в реакционной смеси однократной (1x) концентрации буферного раствора? Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".	Практика
	Задача 11. Заполните пропуски в тексте.	Практика
	Задача 12. Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в	Практика

	<p>реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 50 мкл. Необходимо сопоставить концентрацию компонента в реакционной смеси и объем данного компонента в мкл, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации.</p>	
	<p>Задача 13. Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 25 мкл. Сопоставьте компоненты реакционной смеси и их финальные концентрации и объем данного компонента, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации</p>	Практика
	<p>Задача 14. Лаборант-исследователь подготовил реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавил в пробирку следующие компоненты: Двухкратный буфер для ПЦР (с Mg²⁺), ДНК-матрица, Прямой праймер. Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь</p>	Практика
	<p>Задача 15. Лаборант-исследователь готовит реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он уже добавил в пробирку следующие компоненты: Таq-полимераза (ДНК-зависимая ДНК-полимераза), Буферный раствор, содержащий Mg²⁺, Прямой и обратный праймеры, Дистиллированная вода. Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь</p>	Практика
	<p>Задача 16. Выберите корректные суждения о полимеразной цепной реакции ДНК на матрице мРНК играет важную роль в биотехнологии, для экспрессии определенных генов, в частности, в бактериальных клетках.</p>	Практика

	Задача 17. Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики SARS-CoV-2.	Практика
	Задача 18. Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики.	Практика
	Задача 19. При решении предыдущих задач оказалось, что при использовании одной и той же пары праймеров, продукт ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК значительно длиннее, чем когда в качестве матрицы используют зрелую мРНК. Чем можно объяснить наблюдаемый результат?	Практика
	Задача 20. Дан текст, посвященный методу ПЦР. Выберите варианты ответа, максимально соответствующие по смыслу.	Практика
	Задача 21. В лаборатории имеется 0,2 М и 2 М растворы NaCl, необходимо приготовить 800 мл 1 М раствора NaCl, используя имеющиеся растворы.	Практика
	Задача 22. Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК.	Практика
Раздел 3. Модуль 2 (4 часа)		
Решение биоинформатических задач по темам «Полимеразная цепная реакция» и «Открытые рамки считывания»	Задача 1. Определите открытые рамки считывания (ORF) [1, 2] в плазмиде pBluescript, в которую прошла встройка гена ДНК-лигазы. Какая из открытых рамок считывания соответствует гену ДНК-лигазы?	Практика
	Задача 2. Заполните пропуски: Трансляция открытой рамки считывания, соответствующей ДНК-лигазе, приведет к	Практика

	<p>синтезу полипептида, содержащего (1) остатка(ов) глутаминовой кислоты, (2) остатка(ов) лизина и (3) остатка(ов) лейцина.</p>	
	<p>Задача 3. Заполните пропуски: Белок, соответствующий ORF гомолога VP1, содержит (1) остаток(ов) фенилаланина, (2) остаток(ов) треонина и (3) остаток(ов) триптофана.</p>	Практика
	<p>Задача 4. Проведите сборку контига из секвенограмм, полученных при анализе генома коронавируса. Определите, сколько открытых рамок считывания (ORF) может иметь данный контиг. Ссылка для скачивания файлов с секвенограммами с Яндекс-диска - https://yadi.sk/d/ocf0cAdtVwhQdg</p>	Практика
	<p>Задача 5. Олигонуклеотид имеет структуру 5'-GGTCGACAAGGTCTGTACGG-3', для лигирования нужно добавить "липкие" концы на прямую и обратную цепь. Последовательность плазмиды pNB1 и вставки - https://yadi.sk/d/jQcnQi-kFi5-Bw?w=1</p>	Практика
	<p>Задача 6. Определите последовательность обратного праймера длиной 16 нуклеотидов, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-CTCGCAACGGAAAACC-3'</p>	Практика
	<p>Задача 7. Заполните пропуски В результате ПЦР с праймерами асе2.1 образуется продукт длиной X пар оснований, при использовании пары праймеров асе2.2 образуется продукт длиной Y пар оснований.</p>	Практика
	<p>Задача 8. Определите последовательность прямого праймера длиной 20 нуклеотидов, если в качестве обратного праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-CCTAGGCCCGCCGAGAGGGCT-3', и известно,</p>	Практика

	что длина ПЦР- фрагмента равна 210 пар нуклеотидов	
	<p>Задача 9. Определите последовательность обратного праймера длиной 18 нуклеотидов, использованного для амплификации фрагмента гена SRY человека, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-TGACATAAAAAGGTCAATG-3', и известно, что длина ПЦР-фрагмента равна 218 пар нуклеотидов.</p>	Практика
	<p>Задача 10. Используя информацию о гене АСТВ в базе данных NCBI, его кодирующей части NG_007992.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007992.1?from=5001&to=8454&report=fasta) определите при помощи UGENE длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой: 5'-CACCATTTGGCAATGAGCGGTTTC-3' и 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'</p>	Практика
	<p>Задача 11. Используя информацию об изоформе NM_001101.5 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001101.5) мРНК гена АСТВ в базе данных NCBI, определите при помощи UGENE длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой: 5'-CACCATTTGGCAATGAGCGGTTTC-3' и 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'</p>	Практика
	<p>Задача 12. Объем реакционной смеси — 30 мкл, проведено 30 циклов ПЦР, получено 70 нг ПЦР-продукта. Известно, что длина генома человека 3,2 млрд пар оснований, масса пары оснований — 660 г/моль. Рассчитать, сколько молекул матрицы ДНК было добавлено в реакционную смесь. При расчетах считайте, что неспецифические продукты ПЦР не образуются.</p>	Практика

	<p>Задача 13.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Подобрать праймеры для амплификации участка гена MSH2, с которым связывается направляющая РНК. Размер ампликона должен быть около 500 п.н. 2. Известно, что белок Cas9 вносит двуцепочечный разрыв на расстоянии 3 п.н. от PAM в направлении 5'. Необходимо подобрать эндонуклеазы рестрикции для исследования модифицированных и немодифицированных клеток. 	Практика
Раздел 4. Модуль 1 (28 часов)		
Строение и функции белков		Лекция
Классификация белков, ферментов		Лекция
Основы биокатализа, ферментативной кинетики		Лекция
Антитела. Строение, функции		Лекция
Генетические основы разнообразия антител		Лекция
Ферменты в организме человека.	Использование ферментов в биотехнологии, медицине. Качественные реакции	Лекция
Раздел 4. Модуль 2 (2 часа)		
Решение Биоинформатических задач	Базы данных NCBI и UniProt содержат несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека. Используя последовательности NP_068576.1 и Q9BYF1, найдите информацию о ферменте ACE2.	Практика
Раздел 5. Модуль 1 (14 часов)		
Использование ферментов в		Лекция

биотехнологии, медицине.		
Хроматография – история метода и принципы разделения веществ		Лекция
Хроматография в биотехнологии		Лекция
Выделение и анализ рекомбинантных белков. Зеленый флуоресцентный белок. Электрофорез белков		Лекция
Раздел 6. Модуль 1 (6 часов)		
Редактирование генома CRISPR\Cas9, РНК- интерференция	Дан текст, который посвящен использованию метода редактирования генома CRISPR-Cas9. Выберите корректные по смыслу варианты из выпадающего списка. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.	Практика
	Представлена кодирующая цепь: 5’- GTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACA CCATGGGAAGTGA-3’ Выберите корректные последовательности РАМ	Практика
	Представлена кодирующая цепь: 5’- AAGTTGTCTGATTTTAAACACTGATGCA GCTGGCCTCA-3’ Выберите корректные последовательности РАМ	Практика
	Сопоставьте значения из списка с нумерацией на картинке	Практика
	Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:	Практика

	<ul style="list-style-type: none"> • фермент Cas9; • направляющая РНК (sgRNA) — синтетический олигонуклеотид, который со- держит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: crRNA и tracrRNA; • мотив протоспейсера (PAM). <p>Заполните пропуски</p>	
	Зачем нужно получать новые белки-гомологи инструментов геномного редактирования?	Практика
Раздел 6. Модуль 2 (2 часа)		
Решение биоинформатических задач по теме «Мутагенез»	<p>Чтобы получить мутантный белок Cas9 аспирант взял плазмиду pVIP1 (карта плазмиды pVIP1.gb) с фрагментом гена Cas9 и высокоточную ДНК-полимеразу Q5 (NEB https://international.neb.com/products/m0491-q5-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information) для сайт-направленного мутагенеза. После ПЦР с праймерами, содержащими тринуклеотидную замену (см. ниже), лигирования и трансформации клеток E. coli были получены плазмиды с пяти разных колоний (pVIP1_*). Проведите множественное выравнивание секвенограмм (файлы *.ab1). Какую аминокислотную замену хотел произвести аспирант? Папка с файлами, необходимыми для решения задачи - https://yadi.sk/d/8wWYNff2j5_1-g</p>	Практика
	Охарактеризуйте каждую из плазмид, полученных на предыдущем этапе, на наличие мутаций.	Практика
Раздел 7. (42 часа)		
Определение ГМО в продуктах питания		Практика

Состав злаков в хлебной продукции		Практика
Определение гена метаболизма кофеина		Практика
Определение пола человека		Практика
Равновесие в популяции		Практика
Определение резус-фактора		Практика
Тонкослойная хроматография, определение активности ферментов.		Практика

Контрольно-измерительные материалы

Контроль знаний учащихся производится за счет проверки правильности решения задач

№ п.п.	Условие задачи	Ответ
Раздел 1. Модуль 1		
1	Дан текст, в котором сравниваются методы селекции и генной инженерии. Необходимо выбрать корректные по смыслу варианты. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.	гибридизации, скрещивании; гомозиготность, единообразие; самоопыление; инбридинг; вида; организмами разных видов; ферментов-рестриктаз; флуоресцентные аквариумные рыбки.
2	В процессе выделения ДНК исследователь получил несколько пробирок, содержащих по 1 мл раствора ДНК. Сколько пробирок можно одновременно центрифугировать без применения противовеса в центрифуге с ротором на 12 пробирок?	1, 2, 3, 4, 6
3	Необходимо определить примерную длину каждого из трех заданных фрагментов ДНК. Соотнести фрагменты и их длину в п. н.	1 - б, 2 - в, 3 - а.
4	Вычислите концентрацию ЭДТА в 100 мл 1X раствора ТАЕ. Ответ приведите в мМ, округлите до первого знака после запятой.	0,9
5	Для анализа фрагментов ДНК, получаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или эндонуклеазами рестрикции, используют электрофорез в агарозном геле. Выберите правильные утверждения.	1, 2, 3, 5, 7
6	В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGTACATTTT-5'.	AAAAUGUACA

	Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	
7	В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов матричной цепи гена 5'-CATCCTCGGC-3'. Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	GUAGGAGCCG
8	В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGTACATTTT-5'. Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК.	AAAAUGUACA
9	Дан текст. Правильно укажите пропущенные в тексте слова.	1 - моносахарид / пентозу; 2 - рибоза; 3 - аденином и тиминном; 4 - аденин и урацил; 5 - щелочной среде; 6 - не содержит 2'-гидроксильной группы.
10	Нуклеиновые кислоты отличаются по электрофоретической подвижности. Определите подвижность различных видов нуклеиновых кислот в геле, начиная с наименее (сверху) и заканчивая наиболее подвижной (снизу).	1, 6, 3, 4, 2, 5.
11	Лаборант приготовил реакционную смесь из стоковых (исходных) растворы компонентов. Определите конечную концентрацию компонентов в реакционной смеси, если известно, что к реакционной смеси добавили 5 мкл 10-кратного раствора смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов с флуоресцентно мечеными дезоксинуклеозидтрифосфатами.	1 - а, 2 - в, 3 - б, 4 - д, 5 - г.
12	"Прочитать" результаты гель-электрофореза и определить последовательность нуклеотидов в анализируемом образце ДНК	AGCTTGTCAAGCCTAC GA

13	Для анализа последовательности нуклеиновых кислот по методу Сэнгера в настоящее время используют автоматические генетические анализаторы. Выберите правильные суждения	5, 6, 8, 9, 10
Раздел 1. Модуль 2		
1	Определите последовательность нуклеотидов и с помощью сервиса Blast определите, какому гену она принадлежит.	IRF7
2	Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой - https://yadi.sk/d/5L7HCaMMuD_YbQ	CYP21A
3	Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ответ представьте в виде трехбуквенного идентификатора соответствующего гена, используйте латинские буквы. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой - https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw	Sry
4	Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой с Яндекс-диска https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw	FMR1
5	Используя программу UGENE проведите сборку контига двух продуктов секвенирования. Ответ представьте в виде числа, соответствующего длине контига. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой https://yadi.sk/d/zZ0gnpHP3uos7g .	303
6	Используя программу UGENE проведите сборку контига двух продуктов секвенирования. Ответ представьте в виде числа, соответствующего длине контига.	IL6

	Ссылка для скачивания файла с секвенограммой https://yadi.sk/d/zZ0gnpHP3uos7g	
	В результате реакции Сэнгера получена следующая последовательность нуклеотидов, содержащая фрагмент 5'-TTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA-3' Используя инструмент BLAST, определите, какому гену человека соответствует данная последовательность.	
Раздел 2. Модуль 1		
1	В тексте описывается работа с последовательностями ДНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте	1 - клонирования; 2 - специфически; 3 - двуцепочечной; 4 - липкими; 5 - тупыми; 6 - ДНК-лигазу.
2	Ферменты метаболизма ДНК используют в генетической инженерии для получения двуцепочечных молекул ДНК из одноцепочечных, а также для синтеза ДНК на матрице РНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте.	фрагмент Кленова; Thermus aquaticus; магния; 3'; матричной; ревертазой, обратной транскриптазой; праймера, завтравки; кДНК.
3	В результате разрезания плазмиды pBR322 (длина 4361 п.н.) рестриктазой АссBSII образовались два фрагмента длиной 2560 п.н. и 1801 п.н. Определите массу фрагмента длиной 1801 п.н., если известно, что масса исходной плазмиды составляла 1000 нг.	413
4	Плазида pBluescript содержит 2961 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество А=Т=Ц=Г. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Отличается ли число теоретических сайтов от реально существующих в плазмиде? Почему? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.	11
5	Плазида содержит 4000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество А=Т=Ц=Г. Сколько сайтов	15

	рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза? Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.	
6	Плазида содержит 3000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт NaeIII распознает сайт GGCC . Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество $\text{A}=\text{T}=\text{Ц}=\text{Г}$. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде теоретически имеет данная рестриктаза?	12
7	Исследователь пытался экспрессировать ген в бактериальной клетке. Для этого кДНК гена была клонирована в плазмиду. Клетки бактерий были трансформированы полученной плазмидой. Вечером исследователь понял, что забыл добавить на чашку Петри, куда были помещены трансформированные бактерии, антибиотик. Что увидит исследователь в чашке Петри на следующий день?	3
8	После трансформации компетентных клеток в таком случае используют среду, содержащую соединение X-gal . Трансформированные клетки, содержащие плазмиду со вставкой и без вставки, отличаются по цвету. Выберите правильные суждения.	2, 4, 6, 8, 9
Раздел 2. Модуль 2		
1	Используя программу UGENE, файлы с картами соответствующих плазмид, необходимо "вырезать" ген ДНК-лигазы из плазмиды pCA24N-ligase и "встроить" его в pBluescript [1, 4]. Определите теоретическую длину плазмиды pBluescript после встройки гена ДНК-лигазы. Ссылка для скачивания последовательности в fasta http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm . Plasmid #87741 - pCA24N-ligase http://www.addgene.org/87741/ последовательность в виде gb-файла (https://media.addgene.org/data/plasmids/87/87741/87741-attachment_Z4nGnCtL59S_.gb).	4430
2	В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой SspI образовались два	1929

	<p>фрагмента. Определите массу более длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции SspI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2018 нг.</p> <p>Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе SnapGene Viewer https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/</p>	
3	<p>В результате разрезания плазмиды pBR322 рестриктазами HindII и BstBAI образовалось несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBR322, образовавшегося после гидролиза рестриктазами HindII и BstBAI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2019 нг.</p> <p>Ссылка для скачивания файла pBR322 для работы в программе SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/</p>	778
4	<p>В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой AcoI получено несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции AcoI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2020 нг.</p> <p>Ссылка для скачивания последовательности в fasta http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm.</p>	982
5	<p>Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе SnapGene Viewer https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/</p> <p>Вариант 1</p> <p>Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите эндонуклеазы рестрикции (PvuII, BstBAI, RsaI, EcoICRI, SspI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду.</p>	1 - б, 2 - д, 3 - г, 4 - а, 5 - в

	<p>Вариант 2 Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите длины фрагментов плазмидной ДНК, которые будут получены при действии рестриктаз Acc16I, BstBAI, HindII, PvuII, SspI и ZrmI с пробирками, которые содержат реакционные смеси с разными рестриктазами.</p>	1 - в, 2 - д, 3 - г, 4 - б, 5 - а, 6 - е
	<p>Вариант 3 Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript, сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.</p>	1 - д, 2 - в, 3 - а, 4 - г, 5 - б
	<p>Вариант 4 Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript, сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.</p>	1 - е, 2 - д, 3 - б, 4 - г, 5 - а, 6 - в
	<p>Вариант 5 Используя программу UGENE, карту плазмиды pUC19 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta), сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pUC19 различными эндонуклеазами рестрикции.</p>	1 - е, 2 - в, 3 - а, 4 - б, 5 - д, 6 - г
6	<p>Информация о плазмиде pBR322 https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool</p> <p>Вариант 1 Используя программу UGENE, карту плазмиды pBR322, определите число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции GlaI. Ответом является число.</p>	31
	<p>Вариант 2 Используя программу UGENE, карту плазмиды pBR322, определите число фрагментов ДНК длинее 100 пар нуклеотидов, которое получится при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции NaeIII.</p>	13

7	Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBR322 (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/), соотнесите эндонуклеазы рестрикции (EcoRI, NruI и PstI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду.	1 - б, 2 - а, 3 - ж, 4 - д, 5 - г, 6 - в, 7 - е
Раздел 3. Модуль 1.		
1	Сопоставьте правильные суждения о принципах репликации ДНК, особенностях ДНК-полимеразы и процессе синтеза ДНК.	1 - ж, 2 - в, 3 - д, 4 - е, 5 - а, 6 - б, 7 - г.
2	Выберите правильные суждения о репликации ДНК в клетках человека.	3, 6, 8
3	В каком направлении происходит синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой и обратной транскриптазой? Выберите все подходящие ответы из списка	1, 2
4	Исследователь пытался получить комплементарную ДНК, кодирующую целевой белок. Он выделил и размножил образец мРНК. В конце эксперимента студент получил молекулы, содержащие только рибонуклеотиды. Выберите правильные тезисы	4
5	База данных NCBI содержит несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272). Используя последовательности NM_021804.3 и NP_068576.1, найдите информацию о мРНК и белковом продукте гена ACE2.	Ген ACE2 содержит 21 экзон(ов). В мРНК гена ACE2 человека седьмой кодон ATG является стартовым. Ген ACE2 находится в коротком плече половой (X) хромосомы
6	Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TACGCCTTCGCCTTCGCC-3'. Закодированный полипептид состоит из 6 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь трех аминокислот, которая содержит: аминокислота М (1 часть), аминокислота К (2 части), аминокислота А (3 части). Запишите последовательность аминокислот в пептиде	МАКАКА

7	<p>Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TGGGCTGTTGAAGTTGAAGTT-3'.</p> <p>Закодированный полипептид состоит из 7 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь 4 аминокислот, которая содержит: аминокислота Q (3 части), аминокислота L (2 части), аминокислота R (1 часть), аминокислота T (1 часть).</p> <p>Запишите последовательность аминокислот в пептиде</p>	TRQLQLQ
8	<p>Выберите корректные тезисы, показывающие функциональное отношение кодонов и аминокислот.</p>	1, 2
9	<p>Определите, сколько (примерно) копий ДНК будет получено к концу 25го цикла ПЦР, если в качестве матрицы использовали 256 молекул ДНК, а длина продукта ПЦР составляет 330 пар нуклеотидов.</p>	7
10	<p>Сколько шестикратного (6x) буферного раствора для нанесения пробы на гель необходимо добавить в 25 мкл реакционной смеси для достижения в реакционной смеси однократной (1x) концентрации буферного раствора? Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".</p>	5
11	<p>Заполните пропуски в тексте.</p>	1 - 20, 2 - 1.8, 3 - 15
12	<p>Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 50 мкл.</p> <p>Необходимо сопоставить концентрацию компонента в реакционной смеси и объем данного компонента в мкл, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации.</p>	1 - б, 2 - г, 3 - з, 4 - ж, 5 - и, 6 - е, 7 - к, 8 - в, 9 - а, 10 - д
13	<p>Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 25 мкл.</p> <p>Сопоставьте компоненты реакционной смеси и их финальные концентрации и объем данного компонента, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации</p>	1 - л, 2 - ж, 3 - д, 4 - г, 5 - в, 6 - и, 7 - з, 8 - е, 9 - б, 10 - а
14	<p>Лаборант-исследователь подготовил реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавил в пробирку следующие компоненты: Двухкратный буфер</p>	1, 4, 5, 6, 8.

	для ПЦР (с Mg ²⁺), ДНК-матрица, Прямой праймер. Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь	
15	Лаборант-исследователь готовит реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он уже добавил в пробирку следующие компоненты: Taq-полимераза (ДНК-зависимая ДНК-полимераза), Буферный раствор, содержащий Mg ²⁺ , Прямой и обратный праймеры, Дистиллированная вода. Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь	1, 2.
16	Выберите корректные суждения о полимеразной цепной реакции ДНК на матрице мРНК играет важную роль в биотехнологии, для экспрессии определенных генов, в частности, в бактериальных клетках.	1, 4, 6, 8, 9.
17	Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики SARS-CoV-2.	1, 2, 4, 5, 10
18	Выберите верные суждения об использовании метода ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для диагностики.	2, 3
19	При решении предыдущих задач оказалось, что при использовании одной и той же пары праймеров, продукт ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК значительно длиннее, чем когда в качестве матрицы используют зрелую мРНК. Чем можно объяснить наблюдаемый результат?	6
20	Дан текст, посвященный методу ПЦР. Выберите варианты ответа, максимально соответствующие по смыслу.	гена; праймеры, олигонуклеотиды; 20; нуклеотидов; длину; ионы магния; дез-оксинуклеозидтрифосфаты; амплификатор; 30-40; денатурации, плавления; отжига праймеров; элонгации.

21	В лаборатории имеется 0,2 М и 2 М растворы NaCl, необходимо приготовить 800 мл 1 М раствора NaCl, используя имеющиеся растворы.	440, 360
22	Вычислите объем плазмиды, фрагмента ДНК, буферного раствора и воды, если известно, что в реакционную смесь следует добавить 100 нг плазмидной ДНК.	4, 3, 10
Раздел 3. Модуль 2		
1	Определите открытые рамки считывания (ORF) [1, 2] в плазмиде pBluescript, в которую прошла встройка гена ДНК-лигазы. Какая из открытых рамок считывания соответствует гену ДНК-лигазы?	1 - 40; 2 - 41; 3 - 44
2	Заполните пропуски: Трансляция открытой рамки считывания, соответствующей ДНК-лигазе, приведет к синтезу полипептида, содержащего (1) остатка(ов) глутаминовой кислоты, (2) остатка(ов) лизина и (3) остатка(ов) лейцина.	1 - 40; 2 - 41; 3 - 44.
3	Заполните пропуски: Белок, соответствующий ORF гомолога VP1, содержит (1) остаток(ов) фенилаланина, (2) остаток(ов) треонина и (3) остаток(ов) триптофана.	1 - 9; 2 - 23; 3 - 1
4	Проведите сборку контига из секвенограмм, полученных при анализе генома коронавируса. Определите, сколько открытых рамок считывания (ORF) может иметь данный контиг. Ссылка для скачивания файлов с секвенограммами с Яндекс-диска - https://yadi.sk/d/ocf0cAdtVwhQdg	159
5	Олигонуклеотид имеет структуру 5'-GGTCGACAAGGTCTGTACGG-3', для лигирования нужно добавить "липкие" концы на прямую и обратную цепь. Последовательность плазмиды pNB1 и вставки - https://yadi.sk/d/jQcnQi-kFi5-Bw?w=1	GATCAATT
6	Определите последовательность обратного праймера длиной 16 нуклеотидов, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-СТСГСААСГГАААСС-3'	GGCTGTTGСТААТАТТ

7	Заполните пропуски В результате ПЦР с праймерами ace2.1 образуется продукт длиной X пар оснований, при использовании пары праймеров ace2.2 образуется продукт длиной Y пар оснований.	X - 124, Y - 199
8	Определите последовательность прямого праймера длиной 20 нуклеотидов, если в качестве обратного праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'- CCTAGGCCGCGAGAGGGCT-3', и известно, что длина ПЦР- фрагмента равна 210 пар нуклеотидов	GAGCTCGGAAGGGCC TAGT
9	Определите последовательность обратного праймера длиной 18 нуклеотидов, использованного для амплификации фрагмента гена SRY человека, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'- TGACATAAAAGGTCAATG-3', и известно, что длина ПЦР-фрагмента равна 218 пар нуклеотидов.	ATGAAACTTGCATTTCC GC
10	Используя информацию о гене ACTB в базе данных NCBI, его кодирующей части NG_007992.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NG_007992.1?from=5001&to=8454&report=fasta) определите при помощи UGENE длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой: 5'- CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' и 5'- AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	230
11	Используя информацию об изоформе NM_001101.5 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_001101.5) мРНК гена ACTB в базе данных NCBI, определите при помощи UGENE длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' и 5'- AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	230
12	Объем реакционной смеси — 30 мкл, проведено 30 циклов ПЦР, получено 70 нг ПЦР-продукта. Известно, что длина генома человека 3,2 млрд пар оснований, масса пары оснований — 660 г/моль. Рассчитать, сколько молекул матрицы ДНК было добавлено в реакционную смесь. При расчетах считайте, что неспецифические продукты ПЦР не образуются.	297

13	<ol style="list-style-type: none"> 1. Подобрать праймеры для амплификации участка гена MSH2, с которым связывается направляющая РНК. Размер ампликона должен быть около 500 п.н. 2. Известно, что белок Cas9 вносит двуцепочечный разрыв на расстоянии 3 п.н. от РАМ в направлении 5'. Необходимо подобрать эндонуклеазы рестрикции для исследования модифицированных и немодифицированных клеток. 	<p>Прямой праймер 5'-СТТСААССАГГАГГТ GAGGA-3' (1 б)</p> <p>Обратный праймер 5'-GAACAATGCATТААА ATGCC-3' (1 б) Размер ампликона 514 нуклеотидов. (1 б) Рестриктаза TaI. (1 б)</p> <p>В результате мутации изменяется сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции. Фрагмент не разрезается. Детекция при помощи агарозного гель-электрофореза. (2 б)</p> <p>Если мутация не происходит, происходит разрезание ДНК. Детекция при помощи агарозного гель-электрофореза. (2 б)</p> <p>Вносить мутации целесообразно в начале гена, в экзоны. Желательно получить мутации, вызывающие появление стоп-кодона, либо сдвиг рамки считывания. (2 б)</p>
Раздел 4. Модуль 2		
1	<p>Базы данных NCBI и UniProt содержат несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека. Используя последовательности NP_068576.1 и Q9BYF1, найдите информацию о ферменте ACE2.</p>	<p>Коронавирус SARS-CoV-2 связывается с внеклеточным доменом ACE2. В белке ACE2 наиболее представлены остатки аминокислоты лейцин, в трансмембранном</p>

		домене наиболее представлены остатки аминокислот валин и изолейцин . Ангиотензинпревращающий фермент 2 относят к классу гидролаз
Раздел 6. Модуль 1		
1	Дан текст, который посвящен использованию метода редактирования генома CRISPR-Cas9. Выберите корректные по смыслу варианты из выпадающего списка. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.	выключения заранее выбранных генов; комплементарной; белок, фермент, нуклеаза; разрезание; расщепление; репарации.
2	Представлена кодирующая цепь: 5'- GTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGG GAAGTGA-3' Выберите корректные последовательности PAM	3, 4, 6
3	Представлена кодирующая цепь: 5'- AAGTTGTCTGATTTTTTAAAACACTGATGCAGCTGG CCTCA-3' Выберите корректные последовательности PAM	2, 5
4	Сопоставьте значения из списка с нумерацией на картинке	1 — d; 2 — e; 3 — b; 4 — a; 5 — c
5	Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты: <ul style="list-style-type: none"> • фермент Cas9; • направляющая РНК (sgRNA) — синтетический олигонуклеотид, который со- держит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: crRNA и tracrRNA; • мотив протоспейсера (PAM). Заполните пропуски	a — 2, 7; b — 2, 4; c — 4; d — 1, 3; e — 4; f — 2; g — 4, 5

6	<p>Зачем нужно получать новые белки-гомологи инструментов геномного редактирования?</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Гомологи Cas9 позволяют использовать другие РАМ 2. Мутантные формы гомологов Cas9 позволяют еще сильнее расширить функционал белков 3. Белки, активность которых отличается от консенсусного Cas9 из <i>Streptococcus pyogenes</i>, могут быть использованы для решения других задач, чем редактирование генома 																														
<p>Раздел 6. Модуль 2</p>																																
1	<p>Чтобы получить мутантный белок Cas9 аспирант взял плазмиду pVIP1 (карта плазмиды pVIP1.gb) с фрагментом гена Cas9 и высокоточную ДНК-полимеразу Q5 (NEB https://international.neb.com/products/m0491-q5-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information) для сайт-направленного мутагенеза. После ПЦР с праймерами, содержащими тринуклеотидную замену (см. ниже), лигирования и трансформации клеток <i>E. coli</i> были получены плазмиды с пяти разных колоний (pVIP1_*). Проведите множественное выравнивание секвенограмм (файлы *.ab1). Какую аминокислотную замену хотел произвести аспирант? Папка с файлами, необходимыми для решения задачи - https://yadi.sk/d/8wWYNff2j5_1-g</p>	<p>GCG</p>																														
2	<p>Охарактеризуйте каждую из плазмид, полученных на предыдущем этапе, на наличие мутаций.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Плазмида</th> <th>pVIP1_1</th> <th>pVIP1_2</th> <th>pVIP1_3</th> <th>pVIP1_4</th> <th>pVIP1_5</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Сайт-направленный мутагенез прошел</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>Сайт-направленный мутагенез не прошел</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Плазмида содержит желаемую мутацию</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Плазмида не содержит желаемую мутацию</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table>	Плазмида	pVIP1_1	pVIP1_2	pVIP1_3	pVIP1_4	pVIP1_5	Сайт-направленный мутагенез прошел	+	+	+	+	+	Сайт-направленный мутагенез не прошел						Плазмида содержит желаемую мутацию	+	+	+	+		Плазмида не содержит желаемую мутацию					+
Плазмида	pVIP1_1	pVIP1_2	pVIP1_3	pVIP1_4	pVIP1_5																											
Сайт-направленный мутагенез прошел	+	+	+	+	+																											
Сайт-направленный мутагенез не прошел																																
Плазмида содержит желаемую мутацию	+	+	+	+																												
Плазмида не содержит желаемую мутацию					+																											

Учебно-методические материалы

1. Подробнее о методе: https://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis_of_nucleic_acids
2. Статья о маркерах молекулярной массы https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_weight_size_marker
3. Статья "Электрофорез ДНК" в Википедии
4. Статья "Трис-ацетатный буфер" в Википедии
5. Статья "Электрофорез ДНК" в Википедии
6. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) <https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>.
7. Статья о секвенировании по Сэнгеру в википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4_%D0%A1%D1%8D%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D1%80%D0%B0
8. Видеоуроки о секвенировании по Сэнгеру на Степике <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>
9. Статья о методе Сэнгера на сайте "Биомолекула" <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinykh-kislot>
10. Биомолекула: 12 методов в картинках <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinykh-kislot>
11. Видеолекция на степике о методе Сэнгера <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>
12. Инструкция по сборке контига <http://ugene.net/practical-tasks-of-molecular-biology/> раздел "Assembling the virus" (в последней версии UGENE следует выбрать в меню Tools - Sanger data analysis - Reads de novo assembly).
13. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Контиг>.
14. Статья "Метод Сэнгера" в Википедии
15. Биомолекула: 12 методов в картинках - <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinykh-kislot>
16. Лекция о секвенировании ДНК по Сэнгеру (к. б. н., н. с. ИХБФМ СО РАН, Артем Тикунов) — <https://youtu.be/hBicxm20n2g>
17. Анализ последовательностей ДНК, полученных методом Сэнгера в UGENE (Ольга Голосова) — <https://youtu.be/1MLPqFIVPFM>

18. Генетическая инженерия <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-i-istoricheskaiia>
19. "Синтетическая биология" Статья в журнале "Наука из первых рук" <https://scfh.ru/papers/sinteticheskaya-biologiya/>
20. CRISPR <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
21. Инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
22. Информация о плазмиде https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%E2%80%93white_screen
23. Клонирование в программе UGENE <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM15/Molecular+Cloning+in+silico>.
24. Статья о рестриктазах в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8
25. Статья о рестриктазах в Википедии Эндонуклеазы рестрикции [https://ru.wikipedia.org/wiki/Эндонуклеазы_рестрикции](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8).
26. Методы генетической инженерии <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>.
27. Статья на Биомолекуле - <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-chto-my-znaem-i-chego-ne-znaem>
28. Статья в Википедии - Нетранслируемые области
29. Статья в википедии о концентрации смеси https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BD%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D1%81%D0%BC%D0%B5%D1%81%D0%B8
30. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>
31. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
32. Стратегия подбора праймеров http://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_1781847
33. ПЦР <https://cyberpedia.su/2x6e17.html>
34. Инструкция ВОЗ по детекции коронавирусной ДНК методом ОТ-ПЦР-РВ - <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>

35. Метод ПЦР на сайте Биомолекула - <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
36. Статья в Википедии - Полимеразная цепная реакция в реальном времени
37. Информация на сайте МАГАТЭ - <https://www.iaea.org/bulletin/infectious-diseases/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>
38. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>
39. Статья в википедии - Открытая рамка считывания (https://ru.wikipedia.org/wiki/Открытая_рамка_считывания).
40. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. - 1999. - V. 1419. - P. 173-185
1. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273699000644?via%3Dihub>
41. Статья о мутации white в Википедии [https://ru.wikipedia.org/wiki/White_\(%D0%BC%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/White_(%D0%BC%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F))
42. Статья о праймерах в английской Википедии. Внимательно изучите иллюстрацию [https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology))
43. Статья на Биомолекуле - <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-chto-my-znaem-i-chego-ne-znaem>
44. Информация о гене ACE2 в базе NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>
45. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) - <https://youtu.be/V2qm9jTNrKI>
46. Полимеразная цепная реакция. Использование инструмента UGENE (Ольга Голосова, Унипро) - <https://youtu.be/kc6DakXUtUU>
47. Статья о генах PAX в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D1%8B_Pax
48. Статья о гене SRY в Википедии <https://ru.wikipedia.org/wiki/SRY>
49. Синдром Свайера в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D1%80%D0%BE%D0%BC_%D0%A1%D0%B2%D0%B0%D0%B9%D0%B5%D1%80%D0%B0
50. Статья в википедии - ПЦР in silico (https://ru.wikipedia.org/wiki/Виртуальная_ПЦР).
51. Статьи об актине в википедии - Актин (<https://ru.wikipedia.org/wiki/Актин>), beta-Actin (<https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-actin>).
52. Информация о гене АСТВ в NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=60>.

53. Праймеры для количественной ПЦР гена бета-актина https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp204660/beta-actin-actb-human-qpcr-primer-pair-nm_001101
54. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) - <https://youtu.be/V2qm9jTNRKI>
55. Полимеразная цепная реакция. Введение от Артема Тикунова (к. б. н., научный сотрудник ИХБФМ СО РАН) - <https://youtu.be/V2qm9jTNRKI>
56. Статья на Биомолекуле - <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-chto-my-znaem-i-chego-ne-znaem>
57. Информация о гене ACE2 в базе NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>
58. Информация о белке ACE2 в базе UniProt - <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>
59. Редактирование генома с CRISPR/Cas9 <https://postnauka.ru/faq/59807>
60. Статья в Википедии о CRISPR <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
61. Статья о возможностях редактирования генома https://chrnk.ru/sci/ot_bezobidnoi_kartoshki_do_biologicheskogo_oruzhiya
62. Статья в Википедии о методе CRISPR-Cas <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
63. НЕМУДРЫЙ А.А., ВАЛЕТДИНОВА К.Р., МЕДВЕДЕВС П.П., ЗАКИЯНС М. СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ TALEN И CRISPR/CAS - ИНСТРУМЕНТЫ ОТКРЫТИЙ // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. - С. 20. <https://yadi.sk/i/0epvvqFx2SrMoQ>
64. Videoblog UGENE "Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру" <https://www.youtube.com/watch?v=IDovNM1oZEw>.
65. Статья о редактировании генома на сайте Addgene <https://www.addgene.org/crispr/guide/>.

Материально-техническое оснащение

- **Персональный компьютер**
- **Программное обеспечение:**
 - Программа UGENE (ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>).
 - Бесплатная программа Chromas <http://www.technelysium.com.au/Chromas265Setup.exe>
 - SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/
 -

-
- Дополнительные инструменты:
 - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, выбрать NucleotideBLAST, ввести полученную последовательность нуклеотидов в желтое поле, нажать кнопку Blast.
 - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> выбрать инструмент NucleotideBLAST
 - <https://ugene.unipro.ru/wiki/display/UUOUM16/ORF+Marker>
 - Интерфейс для поиска <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>
 - Инструмент PCR insilicov UGENE -<https://ugene.net/wiki/display/UUOUM15/In+Silico+PCR>

Используемое оборудование

- штатив для микропробирок;
- пипетка автоматическая;
- амплификатор (например, БИС);
- термостат для микропробирок твердотельный;
- микроцентрифуга;
- вортекс;
- УФ-трансиллюминатор.
- Электрофорезная горизонтальная камера

Необходимые реактивы:

- Набор ” Определение ГМО в продуктах питания” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-gmo-v-produktakh-pitaniya-lineyka-ptsr/>
- Набор “Состав злаков в хлебной продукции” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-sostav-zlakov-v-khleбноy-produktsii-lineyka-ptsr/>
- Набор “Определение гена метаболизма кофеина” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-gena-metabolizma-kofeina-lineyka-ptsr/>
- Набор “Определение пола человека” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-pola-cheloveka-lineyka-ptsr/>
- Набор “Равновесие в популяции” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-ravnovesie-v-populyatsii-lineyka-ptsr/>
- Набор “Определение резус-фактора” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-rezus-faktora-lineyka-ptsr/>



- Набор “Тонкослойная хроматография, определение активности ферментов”
<https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-tskh-mbs-detyam-aktivnost-fermentov-lineyka-khromatografiya/>

Раздел 1

Модуль 1

1. Сравнение методов селекции, генетики, генетической инженерии.

Задача 1

Данный текст сравнивает методы селекции и генной инженерии. Выберите корректные по смыслу варианты. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.

Метод селекции основан на (гибридизации / получении / разнообразии / скрещивании / элиминировании) особей с интересными для исследователя признаками и дальнейшем (изучении / размножении / отборе / элиминировании) полученных потомков. На следующем этапе обычно требуется повысить (гетерозиготность / гомозиготность / единообразие / продуктивность / разнообразие) полученных форм. Для этого у растений широко используют (вегетативное размножение / обработку колхицином / отбор наиболее приспособленных форм / самоопыление / эффект гетерозиса), а у животных (аутбридинг / возвратное скрещивание / инбридинг / отбор наиболее приспособленных форм / партеногенез). Таким образом, селекция позволяет оперировать исключительно генофондом (вида / одной популяции / организма / особи / человека). В отличие от селекции, методы генетической инженерии позволяют переносить гены между (ДНК разных видов / митохондриями и ядром / организмами разных видов / разными клетками / ядром и цитоплазмой). Считается, что генетическая инженерия появилась благодаря открытию в 1971 году (генетического кода / строения генома эукариот / структуры ДНК / ферментов-рестриктаз / универсальности генетического кода). При помощи генетической инженерии были созданы генно-модифицированные (породы пчел / сорта арбузов без косточек / устойчивые к сорнякам сорта сои / флуоресцентные аквариумные рыбки / штаммы сибирской язвы).

Пояснения к ответу: в некоторых случаях возможно несколько правильных ответов.

Ответ: гибридизации, скрещивании; гомозиготность, единообразие; самоопыление; инбридинг; вида; организмами разных видов; ферментов-рестриктаз; флуоресцентные аквариумные рыбки.

2. Способы выделения ДНК, электрофоретический анализ ДНК.

Задача 1

В процессе выделения ДНК исследователь получил несколько пробирок, содержащих по 1 мл раствора ДНК. Сколько пробирок можно одновременно центрифугировать без применения противовеса в центрифуге с ротором на 12 пробирок?

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

Решение

В роторе на 12 мест невозможно уравновесить только 1 и 11 пробирок.

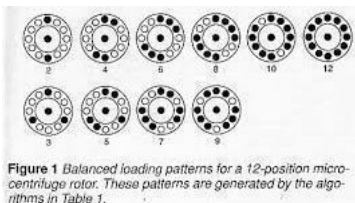


Figure 1 Balanced loading patterns for a 12-position microcentrifuge rotor. These patterns are generated by the algorithms in Table 1.

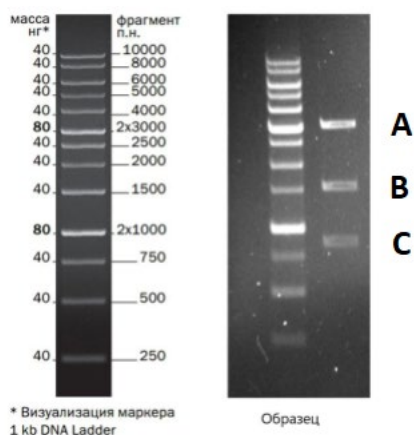
Ответ: 1, 2, 3, 4, 6.

Задача 2

Для визуализации ДНК-фрагментов а также их разделения в зависимости от длины использует гель-электрофорез [1].

Для определения длины полученных ДНК фрагментов используются коммерческие растворы ДНК, которые содержат фрагменты ДНК молекул строго определенных длин. Такие растворы называется «маркерами длин ДНК-фрагментов» («DNA ladder», «линейка», «маркеры ДНК») [2].

На иллюстрации приведена фотография геля, на который был нанесен маркер ДНК (слева) и образец ДНК (справа), и расшифровка длин ДНК фрагментов маркера.



Необходимо определить примерную длину каждого из трех фрагментов ДНК. Соотнесите фрагменты и их длину в п. н.

1. Фрагмент С
 2. Фрагмент В
 3. Фрагмент А
- а. 3000-4000 п.н.
 - б. 750-1000 п.н.
 - в. 1500-2000 п.н.

Рекомендуемая литература

1. Подробнее о методе https://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis_of_nucleic_acids
2. Статья о маркерах молекулярной массы https://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_weight_size_marker

Пояснения к ответу: следует соотнести длины полученных фрагментов ДНК и длины фрагментов ДНК маркера.

Ответ: 1 - б, 2 - в, 3 - а.

Задача 3

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

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

- Трис (основание) — 24,22 г
- ЭДТА (динатриевая соль) — 1,862 г
- Уксусная кислота (ледяная) — 8,96 мл
- H₂O (деионизированная) — до 100 мл

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

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

Рекомендованные ссылки

- Статья "Электрофорез ДНК" в Википедии
- Статья "Трис-ацетатный буфер" в Википедии

Решение: определить молярную концентрацию 50X буфера и разделить на 50

Ответ: 0.9

Задача 4

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

Рекомендованные ссылки

- Статья "Электрофорез ДНК" в википедии

Выберите правильные утверждения

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

Ответ: 1, 2, 3, 5, 7

3. Строение и функции нуклеиновых кислот. РНК.

Задача 1

В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGTACATTTT-5'.

Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК. Введите только символы нуклеотидов в латинской раскладке.

Рекомендуемые ссылки

1. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) <https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>.

Решение: необходимо построить последовательность нуклеотидов мРНК в направлении 3' → 5' по смысловой цепи ДНК. По принципу комплементарности нуклеотиду А в ДНК соответствует U в РНК, нуклеотидам Т, G, С в ДНК соответствуют нуклеотиды А, С, G в РНК. Таким образом, правильная последовательность РНК 3'- AAAAUGUACA-5'.

Ответ: AAAAUGUACA.

Задача 2

В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов матричной цепи гена 5'- CATCCTCGGC-3'.

Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК. Введите только символы нуклеотидов в латинской раскладке.

Решение: необходимо построить последовательность нуклеотидов мРНК в направлении 3' → 5' по смысловой цепи ДНК. По принципу комплементарности нуклеотиду А в ДНК соответствует U в РНК, нуклеотидам Т, G, С в ДНК соответствуют нуклеотиды А, С, G в РНК. Таким образом, правильная последовательность РНК 3'- GUAGGAGCCG-5'

Ответ: GUAGGAGCCG.

Задача 3

В лаборатории была определена последовательность нуклеотидов гена 3'-TGTACATTTT-5'.

Напишите последовательность нуклеотидов мРНК (в направлении 3'-...-5'), которая будет синтезирована на данной матрице ДНК. Введите только символы нуклеотидов в латинской раскладке.

Рекомендуемые ссылки

1. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) <https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>.

Решение: необходимо построить последовательность нуклеотидов мРНК в направлении 3' → 5' по смысловой цепи ДНК. По принципу комплементарности нуклеотиду А в ДНК соответствует U в РНК, нуклеотидам Т, G, С в ДНК соответствуют нуклеотиды А, С, G в РНК. Таким образом, правильная последовательность РНК 3'- AAAAUGUACA-5'

Ответ: AAAAUGUACA.

Задача 4

Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК представляют собой биополимеры, состоящие из нуклеотидов. Нуклеотиды состоят из сахаро-фосфатного остова и азотистых оснований. Сахаро-фосфатный остов ДНК содержит (моносахарид / пентозу / гликозид / аминокислоту / фруктозу) дезоксирибозу, в сахаро-фосфатный остов РНК входит (рибонуклеотид / рибоза / арабиноза / глицин / гликозид). Азотистые основания, входящие в состав ДНК, представлены гуанином и цитозином, а также (аденином и тиминном / тиминном и урацилом / тиминном и инозином / аденином и урацилом) в состав РНК входят (аденин и тимин / тимин и урацил / тимин и 4 инозин / аденин и урацил). Различия в строение сахаров, входящих в состав ДНК и РНК, обуславливает их физико-химические свойства. Например, молекула РНК неустойчива в (магнитном поле / кислой среде / щелочной среде / нейтральной среде / 3 М растворе NaCl) вследствие гидролиза, в то время как ДНК в данных условиях стабильна, так как (не ионизируется / удерживается водородными связями / не содержит 2'-гидроксильной группы / является нерегулярным биополимером /).

Ответ: 1 - моносахарид / пентозу; 2 - рибоза; 3 - аденином и тиминном; 4 - аденин и урацил; 5 - щелочной среде; 6 - не содержит 2'-гидроксильной группы.

Задача 5

Нуклеиновые кислоты отличаются по электрофоретической подвижности.

Определите подвижность различных видов нуклеиновых кислот в геле, начиная с наименее (сверху) и заканчивая наиболее подвижной (снизу).

1. 5.8S рибосомная РНК
2. 18S рибосомная РНК
3. транспортная РНК
4. геномная ДНК
5. 28S рибосомная РНК
6. 5S рибосомная РНК

Пояснения к ответу: необходимо упорядочить приведенные формы нуклеиновых кислот по их длине.

Ответ: 1, 6, 3, 4, 2, 5.

4. История открытия структуры ДНК, методы исследования нуклеиновых кислот.

Задача 1

Для постановки секвенирующей реакции Сэнгера с флуоресцентно мечеными дидезоксинуклеозидтрифосфатами часто используют продукт, наработанный в ПЦР и один

из праймеров - прямой или обратный. Перед началом эксперимента необходимо приготовить рабочий раствор. Лаборант приготовил реакционную смесь из стоковых (исходных) растворов компонентов.

Концентрации стоковых растворов

- прямой праймер, 6 мкМ
- хлорид магния, 0,1 М
- Трис рН 8.5, 1М
- хлорид калия, 1 М
- матрица ДНК, 50 пМ

Определите конечную концентрацию компонентов в реакционной смеси, если известно, что к реакционной смеси добавили 5 мкл 10-кратного раствора смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов с флуоресцентно мечеными дезоксинуклеозидтрифосфатами.

Сопоставьте компоненты реакционной смеси, добавленный объем (слева) и их финальные концентрации (справа).

1. прямой праймер, 6 мкМ
2. хлорид магния, 0,1 М
3. Трис рН 8.5, 1 М
4. хлорид калия, 1 М
4. матрица ДНК, 50 пМ

- а. 0.15 мкМ
- б. 2 мМ
- в. 1 пМ
- г. 40 мМ
- д. 50 мМ

Пояснения к ответу: следует вычислить финальную концентрацию каждого компонента исходя из стоковой концентрации и добавленного объема. Соотнести компонент и конечную концентрацию.

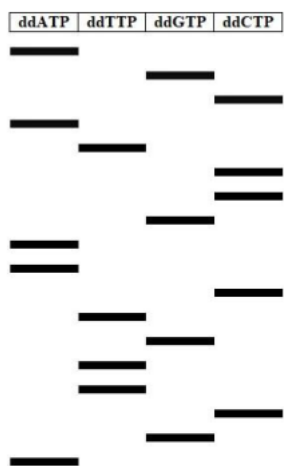
Ответ: 1 - а, 2 - в, 3 - б, 4 - д, 5 - г.

Задача 2

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

Ключевым моментом является использование дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTPs), которые не имеют 3'-ОН группы для образования связи со следующей фосфатной группой. Поэтому в результате включения подобного дигидроксинуклеотида синтез комплементарной цепи ДНК терминируется. При проведении анализа для каждого образца ДНК готовится 4 реакционных смеси, которые содержат смесь четырех dNTP, ДНК-полимеразу и один из терминирующих ddNTP. Результаты реакции визуализируют с помощью гель-электрофореза и по набору полос восстанавливают исходную последовательность.

Задача: "Прочитать" результаты гель-электрофореза и определить последовательность нуклеотидов в анализируемом образце ДНК.



Ответ привести в виде последовательности нуклеотидов, в направлении от 5'- к 3'-концу, латинскими буквами, без обозначений 3'-, 5'-, пробелов, например: ТАТТСТА

Рекомендуемая литература

1. Статья о секвенировании по Сэнгеру в википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9C%D0%B5%D1%82%D0%BE%D0%B4_%D0%A1%D1%8D%D0%BD%D0%B3%D0%B5%D1%80%D0%B0
2. Видеоуроки о секвенировании по Сэнгеру на Степике <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>
3. Статья о методе Сэнгера на сайте "Биомолекула" <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinykh-kislot>

Пояснения к ответу: Следует прочитать последовательность, начиная с нижней части геля (на рисунке).

Ответ: AGCTTGTCAAGCCTACGA.

Задача 3

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

Выберите правильные суждения, выберите все подходящие ответы из списка:

1. Для проведения одной секвенирующей реакции в современной версии метода Сэнгера используют четыре пробирки с разными терминаторами
2. Метод Сэнгера с использованием автоматического анализатора позволяет в одной секвенирующей реакции получить последовательность до 10 тысяч пар нуклеотидов
3. Для терминации (обрыва цепи) в методе Сэнгера используют дезоксинуклеозидтрифосфаты
4. Концентрация терминирующих ddNTP в реакционной смеси сопоставима с концентрацией dNTP
5. Секвенирующую реакцию обычно проводят в ПЦР-амплификаторе
6. В современной версии метода Сэнгера используют не радиоактивно, а флуоресцентно меченые субстраты
7. Реакционная смесь содержит ДНК-зависимую РНК-полимеразу
8. Продукты секвенирующей реакции разделяют в генетическом анализаторе методом капиллярного электрофореза
9. Для проведения секвенирующей реакции можно использовать очищенный от примесей ПЦР-продукт и один из праймеров (секвенирующий)
10. Секвенирующую реакцию с разными флуоресцентными ddNTP можно проводить в одной пробирке

Ответ: 5, 6, 8, 9, 10

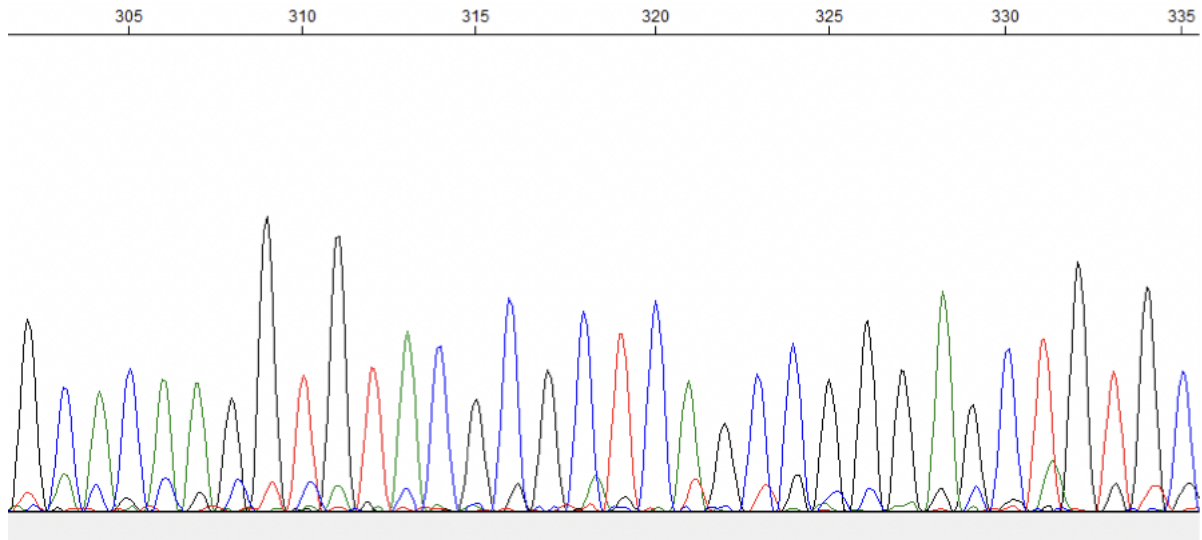
Модуль 2

Задача 1

Современный вариант исполнения метода Сэнгера [1, 2] предполагает использование автоматических капиллярных ДНК-анализаторов, которые определяют наличие флуоресцентно-меченых мономеров-терминаторов в составе продуктов реакции. Затем с помощью программного обеспечения прибора устанавливают соответствия между длиной продуктов и положением конкретного нуклеотида. В итоге получается «секвенограмма», аналогичной той, что представлена на рисунке:

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

1. Зеленая линия – положения А 2. Красная линия – положения Г 3. Черная линия –
положения G 4. Синяя линия – положения С



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

Рекомендуемая литература

1. Биомолекула: 12 методов в картинках <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovyx-kislot>
2. Видеолекция на степике о методе Сэнгера <https://stepik.org/lesson/13696/step/7?unit=3835>
3. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, выбрать NucleotideBLAST, ввести полученную последовательность нуклеотидов в желтое поле, нажать кнопку Blast.

Пояснения к ответу: следует соотнести цвета «пиков» секвенограммы с положениями терминирующих дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, определить ген при помощи сервиса Blast.

Ответ: IRF7.

Задача 2

Результаты секвенирования ДНК по методу Сэнгера (с использованием флуоресцентно меченых ддНТФ) могут быть представлены в виде "секвенограммы" - результата разделения фрагментов ДНК капиллярным электрофорезом. Для анализа этих файлов можно использовать универсальные программы, например UGENE [1].

Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера [2]. Ответ представьте в виде латинских символов и цифр, соответствующих краткому обозначению гена, всего шесть первых символов в обозначении гена (букв и цифр).

Рекомендуемые ссылки

1. Программа UGENE (ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>).
2. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой - https://yadi.sk/d/5L7HCaMMyD_YbQ.

Решение: открыть UGENE, открыть файл .ab1, используя сервис “Blast” определить гомологичный ген человека.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy			
Sequences producing significant alignments							
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		Download Manage Columns Show 100					
		GcnBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant 1, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	NM_000500.9
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant 3, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	NM_001388143.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant 4, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	NM_001368144.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), gene, exon 3 and partial cds	150	150	100%	2e-34	100.00%	MF401543.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant X3, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	XM_024452557.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant X2, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	XM_024452556.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED: Homo sapiens cytochrome P450 family 21 subfamily A member 2 (CYP21A2), transcript variant X1, mRNA	150	150	100%	2e-34	100.00%	XM_024452555.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Homo sapiens CYP21A2 recombination region (LOC106780800) on chromosome 6	150	150	100%	2e-34	100.00%	NC_045215.1

Ответ: CYP21A.

Задача 3

Результаты секвенирования ДНК по методу Сэнгера (с использованием флуоресцентно меченых ддНТФ) могут быть представлены в виде "секвенограммы результата разделения фрагментов ДНК капиллярным электрофорезом. Для анализа этих файлов можно использовать бесплатные программы, рекомендованные производителем оборудования [1], а также универсальные программы, например SnapGene Viewer [2].

Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ответ представьте в виде трехбуквенного идентификатора соответствующего гена, используйте латинские буквы.

Рекомендуемая литература

1. Бесплатная программа Chromas
<http://www.technelysium.com.au/Chromas265Setup.exe>

2. SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/
3. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой с Яндекс-диска <https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw>

Пояснения к ответу: необходимо определить последовательность нуклеотидов в секвенограмме. При помощи сервиса Blast определить соответствующий ген.

Ответ: Sry.

Задача 4

Результаты секвенирования ДНК по методу Сэнгера (с использованием флуоресцентно меченых ддНТФ) могут быть представлены в виде "секвенограммы результата разделения фрагментов ДНК капиллярным электрофорезом. Для анализа этих файлов можно использовать бесплатные программы, рекомендованные производителем оборудования [1], а также универсальные программы, например SnapGene Viewer [2].

Используя программу для анализа результатов секвенирования, определите ген человека, последовательность которого была амплифицирована при помощи ПЦР и далее в реакции Сэнгера. Ответ представьте в виде четырех символов, соответствующих краткому обозначению гена, используйте латинские буквы (при необходимости, цифры).

Рекомендуемая литература

1. Бесплатная программа Chromas
<http://www.technelysium.com.au/Chromas265Setup.exe>
2. SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/
3. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой с Яндекс-диска <https://yadi.sk/d/9kOZjICHs2zVKw>

Пояснения к ответу: необходимо определить последовательность нуклеотидов ДНК из секвенограммы и далее определить идентификатор гена, используя базу данных NCBI.

Ответ: FMR1.

Задача 5

Результаты секвенирования ДНК по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых ддНТФ представляют собой хроматограммы разделения фрагментов ДНК капиллярным электрофорезом. Файлы с "секвенограммами" могут иметь разное расширение, *.ab1. Пример секвенограммы приведен на рисунке. Для визуализации такого файла можно использовать бесплатные программы, рекомендованные производителем оборудования [2] или универсальные программы, например, UGENE [1].

Как правило, секвенирующую реакцию проводят с ПЦР-продуктом с прямого и обратного праймера. В таком случае, получают фрагменты ДНК, частично комплементарные друг

другу. Такие перекрывающиеся фрагменты ДНК можно наложить друг на друга и получить консенсусную последовательность - контиг [3]. В случае нескольких фрагментов ДНК эту операцию можно произвести и вручную, но для сборки генома или длинной последовательности ДНК обычно используют специализированное ПО.

Используя программу UGENE проведите сборку контига двух продуктов секвенирования. Ответ представьте в виде числа, соответствующего длине контига.

Рекомендуемые ссылки

1. Программа UGENE (ссылка для скачивания); инструкция по сборке контига <http://ugene.net/practical-tasks-of-molecular-biology/> раздел "Assembling the virus" (в последней версии UGENE следует выбрать в меню Tools - Sanger data analysis - Reads de novo assembly).
2. Ссылка для скачивания файла с секвенограммой (также в папке находится дистрибутив программы для просмотра секвенограмм) с Яндекс-диска <https://yadi.sk/d/zZ0gnpHP3uos7g>.
3. <https://ru.wikipedia.org/wiki/Контиг>.

Решение: открыть UGENE, запустить инструмент «Сборка контигов с помощью CAP3», добавить файлы .ab1, собрать контиг. Длина перекрывающихся фрагментов секвенограмм составляет 303 нуклеотида.

Ответ: 303.

Задача 6

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

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

В результате реакции Сэнгера получена следующая последовательность нуклеотидов, содержащая фрагмент

5'-TTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCA-3'

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

Рекомендуемая литература

- Статья "Метод Сэнгера" в Википедии
- Биомолекула: 12 методов в картинках - <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-sekvenirovanie-nukleinovyykh-kislot>

- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> выбрать инструмент NucleotideBLAST
- Лекция о севенировании ДНК по Сэнгеру (к. б. н., н. с. ИХБФМ СО РАН, Артем Тикунов) — <https://youtu.be/hVicxm20n2g>
- Анализ последовательностей ДНК, полученных методом Сэнгера в UGENE (Ольга Голосова) — <https://youtu.be/1MLPqFIVPFM>

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

Решение: использовать инструмент NucleotideBLAST

Правильный ответ: IL6

Раздел 2

Модуль 1

1. Клонирование ДНК, эндонуклеазы рестрикции, плазмидная ДНК.

Задача 1

В тексте описывается работа с последовательностями ДНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте.

Плазмиды широко используют с середины 20 века для наработки коротких или достаточно протяженных фрагментов ДНК. Для этого интересующие исследователя последовательности помещают в плазмидную ДНК. Данный процесс получил название (генетического анализа / генетического инжиниринга / клонирования / маркирования / секвенирования / фрагментирования)¹ ДНК. Для выполнения такой процедуры использовали ферменты эндонуклеазы рестрикции, которые могут (адресно / аналитически / качественно / количественно / специфически)² разрезать молекулы (двухспиральной / двуцепочечной / консервативной / одонитевой / одноцепочечной)³ ДНК с образованием различных типов концов получаемых фрагментов. Если в результате разрезания ДНК на концах образуются короткие одноцепочечные неспаренные нуклеотиды, такие фрагменты называют (вонючими / инструктивными / колючими / липкими / одонитевыми / острыми / сопряженными / тонкими / тупыми)⁴ концами, если неспаренные нуклеотиды не образуются, такие фрагменты ДНК называют (вонючими / инструктивными / колючими / липкими / одонитевыми / острыми / сопряженными / тонкими / тупыми)⁵ концами. Для получения генно-инженерных плазмид обычно используют рестриктазы, образующие фрагменты с неспаренными концами. Плазмидную ДНК, и ДНК, содержащую интересующую исследователя последовательность, разрезают одинаковыми рестриктазами, отбирают фрагменты интересующей длины и смешивают их в одной пробирке. В результате фрагменты, содержащие комплементарные друг другу

одноцепочечные последовательности ДНК, соединяются друг с другом. Далее в пробирку добавляют фермент (ДНК-лигазу / ДНК-полимеразу / метилирования ДНК/ модификации / репарации ДНК / рестриктазу / экзонуклеазу / эндонуклеазу). Фрагменты, содержащие одноцепочечные неспаренные участки, могут объединяться случайным образом, поэтому далее требуется отделить конструкции интересующей исследователя длины. Для этого используют электрофорез в агарозном геле.

Ответ: 1 - клонирования; 2 - специфически; 3 - двуцепочечной; 4 - липкими; 5 - тупыми; 6 - ДНК-лигазу.

Задача 2

Ферменты метаболизма ДНК используют в генетической инженерии для получения двуцепочечных молекул ДНК из одноцепочечных, а также для синтеза ДНК на матрице РНК. Выберите наиболее корректные варианты пропущенных фраз в тексте.

К ферментам матричного синтеза нуклеиновых кислот относят ДНК-зависимые ДНК-полимеразы: это ДНК-полимераза I из *E. coli*, ее фрагмент, так называемый (фрагмент синоним / фрагмент Кленова / фрагмент Оказаки / фрагмент 67 кДа), ДНК-полимеразу фага T4, Taq-полимеразу (из (Taq-зонда / Taq-фрагмента / *Thermus aquaticus* / Thermos / Thermo Scientific Fisher)). Все эти ферменты в присутствии ионов (натрия / калия / кальция / магния / железа) осуществляют синтез ДНК, комплементарной матричной цепи ДНК и для функционирования требуют наличия затравки (праймера) со свободным (2' / 3' / 4' / 5')-ОН-концом, комплементарного (соответствующей / матричной / синтезируемой / участку) ДНК. Фермент, синтезирующий ДНК на матрице РНК, называют РНК-зависимой ДНК-полимеразой, или (интегразой / ревертазой / обратной транскриптазой / ДНКазой / РНКазой / ДНК-РНКазой). Так же, как и обычные ДНК-полимеразы, РНК-зависимые ДНК-полимеразы функционируют только при наличии (матричной РНК / праймера / завтрака / затравки / олиго-ДНК), комплементарной РНК-матрице. Эти ферменты находят применение в синтезе двуцепочечных ДНК, комплементарных мРНК, так называемых (кРНК / мДНК / рРНК / кДНК / дРНК). Процесс синтеза ДНК на матрице мРНК играет важную роль в биотехнологии, для экспрессии определенных генов, в частности, в бактериальных клетках.

Рекомендуемая литература

1. Генетическая инженерия <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzheneriia-chast-i-istoricheskaia>
2. "Синтетическая биология" Статья в журнале "Наука из первых рук" <https://scfh.ru/papers/sinteticheskaya-biologiya/>
3. CRISPR <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>

Пояснения к ответу: в некоторых случаях возможно несколько правильных ответов.

Ответ: фрагмент Кленова; *Thermus aquaticus*; магния; 3'; матричной; ревертазой, обратной транскриптазой; праймера, затравки; кДНК.

Задача 3

В результате разрезания плазмиды pBR322 (длина 4361 п.н.) рестриктазой АссBSII образовались два фрагмента длиной 2560 п.н. и 1801 п.н.

Определите массу фрагмента длиной 1801 п.н., если известно, что масса исходной плазмиды составляла 1000 нг.

Ответ округлите до целого числа.

Пояснения к ответу: следует соотнести длину фрагмента и массу исходной плазмиды.

Ответ: 413.

Задача 4

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

Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

Решение: теоретическое число сайтов можно вычислить, исходя из того, что вероятность встречи одного нуклеотида 0,25, соответственно, $0,25^4 * 2961 = 11,56$

Ответ: 11

Задача 5

Плазмида содержит 4000 пар оснований. Эндонуклеаза рестрикции узнает сайт HaeIII распознает сайт GGCC. Предположим, что нуклеотиды в плазмиде распределены случайно, количество A=T=C=G. Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде могла бы иметь данная рестриктаза?

Введите число предполагаемых сайтов рестрикции.

Решение: вероятность встречи 4 нуклеотидов в плазмиде длиной 4000 п. о. = $(0,25)^4 * 4000 = 15,625$

Ответ: 15

Задача 6

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

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

Сколько сайтов рестрикции в данной плазмиде теоретически имеет данная рестриктаза?

Введите число теоретических сайтов рестрикции.

Решение: вероятность встречи 4 нуклеотидов в плазмиде длиной 3000 п. о. = $(0,25)^4 * 3000$
= 11.71

Ответ: 12

2. Генетически модифицированные организмы, трансформация бактерий.

Задача 1

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

Что увидит исследователь в чашке Петри на следующий день?

Выберите все подходящие ответы из списка

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

Ответ: 3

Задача 2

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



Выберите правильные суждения.

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

Ответ: 2, 4, 6, 8, 9

Модуль 2

Задача 1

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Для "вырезания" фрагментов ДНК используют ферменты эндонуклеазы рестрикции. Для анализа сайтов рестрикции удобно использовать бесплатную программу UGENE [1]. Плазмиду pBluescript (длина 2961 п.н.) используют для экспрессии различных рекомбинантных белков [2].

Сайт Addgene (<http://www.addgene.org/>) позволяет исследователям в лабораториях по всему миру заказывать плазмиды, имеющиеся в коллекции (более 80 тысяч плазмид). Аспирантка Даша заказала с сайта Addgene плазмиду, экспрессирующую ДНК-лигазу, но ее не удовлетворяет уровень экспрессии данного белка. Для переклонирования Даша использовала рестриктазы (BamHI и NotI), указанные в описании плазмиды pCA24N-ligase.

Используя программу UGENE, файлы с картами соответствующих плазмид, необходимо "вырезать" ген ДНК-лигазы из плазмиды pCA24N-ligase и "встроить" его в pBluescript [1, 4]. Определите теоретическую длину плазмиды pBluescript после встройки гена ДНК-лигазы (в поле ответ введите длину в виде четырехзначного числа без пробелов, букв и других символов).

Рекомендуемые ссылки

1. Программа UGENE (ссылка для скачивания); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Информация о плазмиде https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%28%80%93whi+te+_screen ссылка для скачивания последовательности в fasta <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm>.
3. Plasmid #87741 - pCA24N-ligase <http://www.addgene.org/87741/> последовательность в виде gb-файла (https://media.addgene.org/data/plasmids/87/87741/87741-attachment_Z4nGnCtL59S_.gb).
4. Клонирование в программе UGENE <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM15/Molecular+Cloning+in+silico>.

Решение

Запустить UGENE, загрузить последовательность плазмидной ДНК pCA24N-ligase, получить фрагмент гена при помощи рестриктаз BamHI и NotI, гидролизовать плазмиду pBluescript рестриктазой NotI (рестриктаза BamHI дает несовместимые липкие концы),

провести лигирование двух фрагментов, определить длину кольцевой молекулы (4430 пар нуклеотидов).

Ответ: 4430.

Задача 2

В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой SspI образовались два фрагмента. Определите массу более длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции SspI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2018 нг. Ответ округлите до целого числа.

Для работы с плазмидами существует несколько программ для ПК, например, бесплатная SnapGene Viewer [1]. Карту плазмиды pBluescript для работы в программе SnapGene Viewer можно скачать по ссылке [2].

Рекомендуемая литература

1. Ссылка для скачивания программы SnapGeneViewer https://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/
2. Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе SnapGene Viewer [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK\(+\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/)

Пояснения к ответу: следует определить сайты рестрикции, длины фрагментов ДНК, получающихся в результате рестрикции, соотнести длину фрагментов и массу исходной плазмиды.

Ответ: 1929.

Задача 3

В результате разрезания плазмиды pBR322 рестриктазами HindII и BstBAI образовалось несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBR322, образовавшегося после гидролиза рестриктазами HindII и BstBAI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2019 нг. [2]. Ответ округлите до целого числа.

Для работы с плазмидами существует несколько программ для ПК, например, бесплатная SnapGene Viewer [1]. Карту плазмиды pBR322 для работы в программе SnapGene Viewer можно скачать по ссылке [2].

Рекомендуемая литература

1. Ссылка для скачивания программы SnapGeneViewer https://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/

2. Ссылка для скачивания файла pBR322 для работы в программе SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/

Пояснения к ответу: следует определить сайты рестрикции, длины фрагментов ДНК, получающихся в результате рестрикции, соотнести длину фрагмента и массу исходной плазмиды.

Ответ: 778.

Задача 4

В результате разрезания плазмиды pBluescript (длина 2961 п.н.) рестриктазой AcoI получено несколько фрагментов. Определите массу самого длинного фрагмента плазмиды pBluescript, образовавшегося после рестрикции AcoI, если известно, что масса исходной плазмиды составляла 2020 нг. Ответ округлите до целого числа.

Используя программу UGENE (или аналогичную) [1], карту плазмиды pBluescript (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta) [2], проведите анализ длины фрагментов ДНК которые образуются в результате рестрикции.

Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE (ссылка для скачивания); инструкция по рестрикционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Информация о плазмиде https://en.wikipedia.org/wiki/Blue%2%80%93white_screen ссылка для скачивания последовательности в fasta <http://www2.kumc.edu/soalab/LabLinks/vectors/pbluescr.htm>.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность плазмидной ДНК, ввести названия рестриктазы AcoI, выбрать фрагмент с максимальной длиной (984).

Ответ: 982.

Задача 5

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Для работы с плазмидами существует несколько программ для ПК, например, бесплатная SnapGene Viewer [1] или бесплатная UGENE[2]. Молекулярные биологи активно используют плазмиду pBluescript для отбора успешно трансформированных клонов [3]. Карту этой плазмиды для работы в программе SnapGene Viewer можно скачать по ссылке [4].

Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции - ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК [6]. Рестриктазы

позволяют "вырезать" гены из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции имеется в программе SnapGene Viewer или UGENE.

Плазмиду pBluescript (длина 2961 п.н.) используют для экспрессии различных рекомбинантных белков. Плазмиду pUC19 (длина 2686 п.н.) используют для экспрессии различных рекомбинантных белков.

Рекомендуемая литература

1. Программа SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/ При установке рекомендуем выбрать Sibenzyme верхней строчкой поставщика эндонуклеаз рестрикции.
2. Программа UGENE (ссылка для скачивания; <http://ugene.net/download.html>); инструкция по рестриционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
3. Информация о плазмиде pBluescript <https://en.wikipedia.org/wiki/PBluescript>
4. Ссылка для скачивания файла pBluescript II SK (+) для работы в программе SnapGene Viewer [https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK\(+\)/](https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBluescript_II_SK(+)/)
5. Информация о плазмиде pUC19, <https://en.wikipedia.org/wiki/PUC19> ссылка для скачивания последовательности в fasta <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool>.
6. Статья о рестриктазах в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D0%BD%D0%B4%D0%BE%D0%BD%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D0%B0%D0%B7%D1%8B_%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%82%D1%80%D0%B8%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%B8

Вариант 1

Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите эндонуклеазы рестрикции (PvuII, BstBAI, RsaI, EcoICRI, SspI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду.

1. PvuII+BstBAI
2. RsaI + EcoICRI
3. SspI + RsaI
4. PvuII+SspI

5. EcoICRI + BstBAI

а. 130+448+510+1873

б. 302 + 448 + 2211

в. 530 + 2431

г. 130+324+636+1871

д. 102 + 1090 + 1769

Пояснения к ответу: следует определить сайты рестрикции, длины фрагментов ДНК, получающихся в результате рестрикции, соотнести длины фрагментов и комбинации рестриктаз.

Ответ: 1 - б, 2 - д, 3 - г, 4 - а, 5 - в.

Вариант 2

Используя программу SnapGene Viewer, карту плазмиды pBluescript, соотнесите длины фрагментов плазмидной ДНК, которые будут получены при действии рестриктаз Acc16I, BstBAI, HindII, PvuII, SspI и ZrmI с пробирками, которые содержат реакционные смеси с разными рестриктазами.

1. Acc16I + HindII

2. HindII + SspI

3. SspI + ZrmI

4. ZrmI + PvuII

5. PvuII + BstBAI

6. BstBAI + Acc16I

а. 302, 448, 2211

б. 448, 964, 1549

в. 197, 1172, 1592

г. 130, 324, 2507

д. 130, 657, 2174

е. 252, 920, 1789

Пояснения к ответу: следует определить сайты рестрикции, длины фрагментов ДНК, получающихся в результате рестрикции, соотнести длины фрагментов и комбинации рестриктаз.

Ответ: 1 - в, 2 - д, 3 - г, 4 - б, 5 - а, 6 - е.

Вариант 3

Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta), сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.

Сопоставьте значения из двух списков

1. SspI + VspI.

2. AcsI + PciI + EcoRI.

3. HgaI + GsaI.

4. AjiI.

5. Acc16I + AcuI + DriI.

а. 197+381+730+820+833.

б. 222+345+445+727+1222.

в. 11+452+661+1837.

г. 13+121+288+317+2222.

д. 59+130+632+905+1235.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность плазмидной ДНК, ввести комбинации рестриктаз из левой колонки, сопоставить длину образующихся фрагментов в правом столбце.

Ответ: 1 - д, 2 - в, 3 - а, 4 - г, 5 - б

Вариант 4

Задача. Используя программу UGENE, карту плазмиды pBluescript (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta), сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pBluescript различными эндонуклеазами рестрикции.

Сопоставьте значения из двух списков

1. FokI.
2. AcsI + PciI.
3. EcoRI + DriI + GsaI + PciI.
4. AcuI + PvuII.
5. Bst6I + DriI.
6. SspI + VneI.
 - а. 520+637+795+1009.
 - б. 308+452+585+1616.
 - в. 130+137+1246+1448.
 - г. 448+724+777+1012.
 - д. 11+452+661+1837.
 - е. 181+287+1036+1457.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность плазмидной ДНК, ввести названия рестриктаз из левой колонки, сопоставить длину образующихся фрагментов в правом столбце.

Ответ: 1 - е, 2 - д, 3 - б, 4 - г, 5 - а, 6 - в.

Вариант 5

Используя программу UGENE, карту плазмиды pUC19 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta), сопоставьте число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК pUC19 различными эндонуклеазами рестрикции.

Сопоставьте значения из двух списков

1. Bm^uI.
 2. VneI.
 3. Acc16I.
 4. PvuII.
 5. RsaI.
 6. AccBSI.
- а. 1023+1663.
 - б. 322+2364.
 - в. 497+943+1246.
 - г. 241+644+1801.
 - д. 241+676+1769.
 - е. 1306+1380.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность плазмидной ДНК, ввести названия рестриктаз из левой колонки, сопоставить длину образующихся фрагментов в правом столбце.

Ответ: 1 - е, 2 - в, 3 - а, 4 - б, 5 - д, 6 - г.

Задача 6

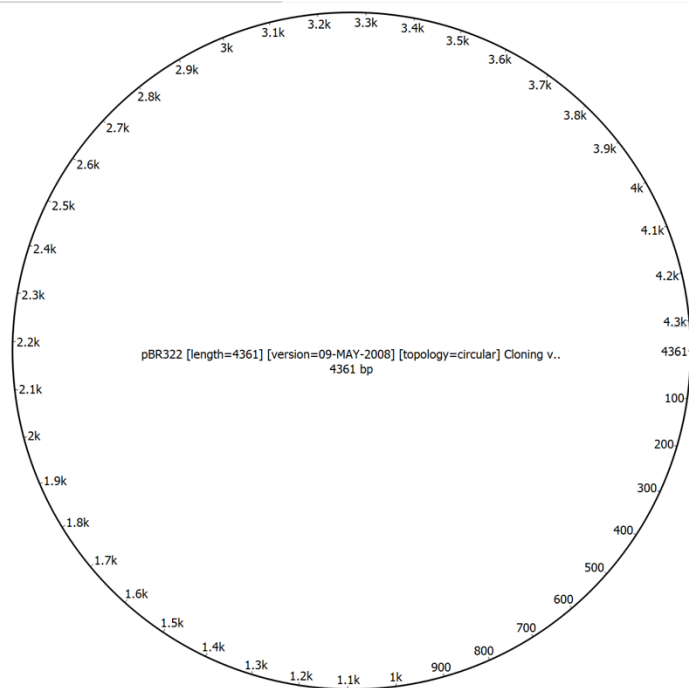
Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Работать с последовательностями нуклеотидов плазмидной ДНК вручную, искать самостоятельно сайты рестрикции, крайне затруднительно. Специально для таких работ существуют несколько программ для ПК, например, бесплатная UGENE (пример визуализации плазмидной ДНК см. на рисунке П.2.1).

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

Молекулярные биологи активно использовали плазмиду pBR322 в течение многих лет.

Рекомендованные ссылки

1. Программа UGENE (ссылка для скачивания <http://ugene.net/download.html>) инструкция по рестриционному анализу <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM31/Restriction+Analysis>.
2. Информация о плазмиде pBR322 <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/dna-sequences-and-maps-tool>.
3. Статья о рестриктазах в Википедии Эндонуклеазы рестрикции https://ru.wikipedia.org/wiki/Эндонуклеазы_рестрикции.
4. Методы генетической инженерии <https://biomolecula.ru/articles/12-metodov-v-kartinkakh-gennaia-inzhe-neriia-chast-ii-instrumenty-i-tehniki>.



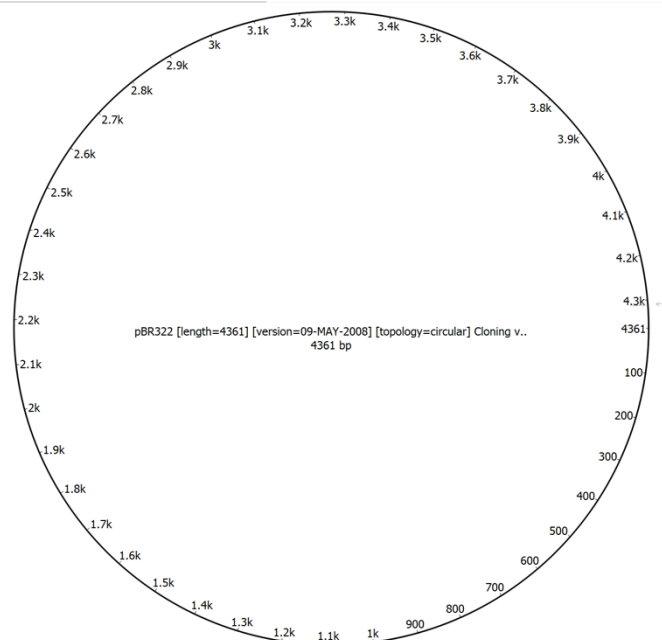
Вариант 1

Используя программу UGENE (или аналогичную) [1], карту плазмиды pBR322 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta) [2], определите число фрагментов ДНК которые образуются при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции *GlaI*. Ответом является число.

Решение: запустить UGENE, открыть карту плазмиды, выбрать «Операции – Анализ – Поиск сайтов рестрикции», выбрать рестриктазу *GlaI*. В результате полной рестрикции образуется 31 фрагмент.

Ответ: 31.

Вариант 2



Используя программу UGENE (или аналогичную) [1], карту плазмиды pBR322 (последовательность нуклеотидов можно найти по ссылке, сохранить в блокноте в текстовом формате с расширением .fasta) [2], определите число фрагментов ДНК длиннее 100 пар нуклеотидов, которое получится при гидролизе плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции *NotI*. Введите число фрагментов заданной длины в поле "ответ".

Решение: запустить UGENE, открыть карту плазмиды, выбрать «Операции – Анализ – Поиск сайтов рестрикции», выбрать рестриктазу *NotI*. Из 22 сайтов рестрикции выбрать фрагменты, длиннее 100 пар нуклеотидов, фрагментов с такой длиной – 13.

Ответ: 13.

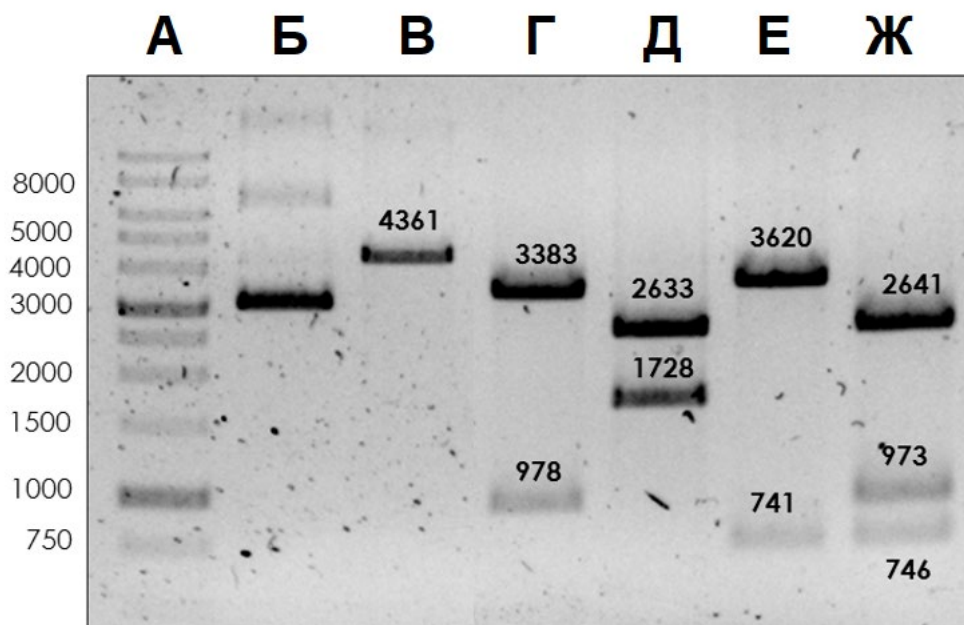
Задача 7

Искусственные плазмиды активно используют в генетической инженерии в качестве векторов, в которые клонируют гены, кодирующие белки, представляющие интерес для исследований. Для работы с плазмидами существует несколько программ для ПК, например, бесплатная SnapGene Viewer [1]. Плазмиду pBR322 активно использовали в 1980-е годы. Карту этой плазмиды для работы в программе SnapGene Viewer можно скачать по ссылке [2].

Для решения задач в области генетической инженерии широко используют эндонуклеазы рестрикции - ферменты, позволяющие "разрезать" двуцепочечную ДНК. Рестриктазы

позволяют "вырезать" гены из одного источника и далее клонировать полученные последовательности в различные векторы, в том числе, плазмидные. Информация о специфичности эндонуклеаз рестрикции, а также сайты рестрикции плазмид имеются в программе SnapGene Viewer.

Используя программу SnapGene Viewer (или аналогичную) [1], карту плазмиды pBR322 [2], соотнесите эндонуклеазы рестрикции (EcoRI, NruI и PstI) и фрагменты, которые будут получены при их действии на данную плазмиду. Фотография геля с продуктами рестрикции приведена на рисунке. Числа около фрагментов на дорожках В-Ж соответствуют расчетным длинам продуктов рестрикции.



1. А 2. Б 3. В 4. Г 5. Д

6. Е 7. Ж

а. pBR322 б. Маркер в. pBR322 г. pBR322 д. pBR322 е. pBR322

ж. pBR322

молекулярной массы ДНК + PstI + EcoRI + PstI + NruI + EcoRI + NruI

+ PstI + NruI + EcoRI + PstI

Рекомендуемая литература

4. Программа SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/ При установке рекомендуем выбрать Sibenzyme верхней строчкой поставщика эндонуклеаз рестрикции.

5. Ссылка для скачивания файла pBR322 для работы в программе SnapGene Viewer http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pBR322/

Пояснения к ответу: следует определить сайты рестрикции, длины фрагментов ДНК, получающихся в результате рестрикции, соотнести длины фрагментов и комбинации рестриктаз.

Ответ: 1 - б, 2 - а, 3 - ж, 4 - д, 5 - г, 6 - в, 7 - е.

Раздел 3

Модуль 1

1. Основные молекулярно-генетические процессы. Репликация ДНК (180 минут).

Задача 1

Репликация ДНК - процесс синтеза дочерней молекулы на матрице ДНК. У человека и кишечной палочки процесс репликации ДНК обеспечивает точную передачу генетической информации из клетки и в клетку и из поколения в поколение и обычно происходит перед делением клетки.

Сопоставьте правильные суждения о принципах репликации ДНК, особенностях ДНК-полимеразы и процессе синтеза ДНК.

Рекомендуемые ссылки

1. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) <https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>
2. Курс молекулярной биологии (МГУ, Асеев) <https://www.youtube.com/watch?v=5k-WuhdJJCo&list=PLcsjsqLLSfNBSQRWQXz0Pgf1lLkFz8GKx>
1. Инициация.
2. Матричный синтез.
3. Недорепликация 3'-концевых участков хромосом.
4. Антипараллельность.
5. Полуконсервативность.
6. Прерывистость.
7. Потребность в затравке.

а. Молекулы ДНК после репликации содержат только одну цепочку материнской ДНК.

- б. Синтез ДНК по отстающей цепи происходит фрагментами. в. Для репликации ДНК-полимеразе требуется матрица одноцепочечной ДНК.
- г. ДНК-полимераза может удлинять существующие полинуклеотиды только с 3'-конца.
- д. В результате репликации происходит укорочение линейных хромосом.
- е. ДНК-полимераза движется по матрице одноцепочечной ДНК в направлении 3'→5'.
- ж. Репликация начинается в особых местах хромосом, называемых ориджинами репликации.

Ответ: 1 - ж, 2 - в, 3 - д, 4 - е, 5 - а, 6 - б, 7 - г.

Задача 2

Репликация ДНК - процесс синтеза дочерней молекулы на матрице ДНК. У человека и кишечной палочки процесс репликации ДНК обеспечивает точную передачу генетической информации из клетки и в клетку и из поколения в поколение и обычно происходит перед делением клетки.

Выберите правильные суждения о репликации ДНК в клетках человека.

Рекомендуемые ссылки

1. 25 лекций по молекулярной биологии (НГУ, Дымшиц) <https://e-lib.nsu.ru/reader/bookView.html?params=UmVzb3VyY2UtMzQ5OQ/cGFnZTAwMQ>.

Выберите все подходящие ответы из списка

1. Для синтеза ДНК в качестве матрицы используется только одна (материнская) цепочка ДНК, вторая цепь (комплементарная) используется для проверки корректности работы полимеразы.
2. ДНК-полимераза самостоятельно денатурирует ДНК, восстанавливая при этом водородные связи.
3. Репликация ДНК осуществляется по полуконсервативному механизму, при котором дочерняя цепь синтезируется на матрице материнской.
4. Репликация ДНК происходит только в ядре клетки.
5. Репликацию ДНК осуществляет комплекс из ДНК-зависимой ДНК-полимеразы и коротких последовательностей ДНК, комплементарных матричной цепи (фрагменты Оказаки).
6. Синтезированные фрагменты ДНК сшивает ДНК-лигаза.
7. Репликация начинается в определенном сайте кольцевой хромосомы, называемом ориджином (ori) репликации.
8. Концевые участки хромосом недореплицируются на 10-20 нуклеотидов.

9. Молекула ДНК-полимеразы двигается по материнской цепочке в направлении $5' \rightarrow 3'$, синтез ДНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$.

Решение: так как репликация проходит по полуконсервативному механизму, верный вариант 1; так как фрагменты Оказаки, синтезируемые по отстающей цепи, сшиваются ДНК-лигазой, верный вариант 5; так как концевые участки (теломеры) недореплицируются на 10–20 нуклеотидов, верный вариант 7.

Ответ: 3, 6, 8.

Задача 3

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

Выберите все подходящие ответы из списка

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

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

Ответ: 1, 2

Задача 4

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

Выберите правильные тезисы

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

Ответ: 4

2. Основные молекулярно-генетические процессы. Транскрипция.

Задача 1

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

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

Используя последовательности NM_021804.3 и NP_068576.1, найдите информацию о мРНК и белковом продукте гена ACE2.

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

```

/pos= major open site
ORIGIN
   1 ggcaactcata catacactct ggcaatgagg acactgagct cgcttctgaa atttgacaag
  61 ataaccacta aaatctcttt gaattctatg ttgttgatgat cccatggcta cagaggatca
 121 ggagttgaca tagatactct ttggatttca taccatgttg aggctttctt acttccacgt
 181 gaccttgact gagttttgaa tagcgcccaa cccaagtta aaggctgata agagagaaaa
 241 tctcatgagg aggttttagt ctagggaag tcattcagtg gatgtgatct tggctcacag
 301 gggacgatgt caagctcttc ctggctcctt ctcagccttg ttgctgtaac tgcctgcag
 361 tccaccattg aggaacaggc caagacattt ttggacaagt ttaaccacga agccgaagac
 421 ctgttctatc aaagttcact tgccttctgg aattataaca ccaatattac tgaagagaat
 481 gtccaaaaaca tgaataatgc tggggacaaa tggctctgctt ttttaaagga acagtccaca
 541 cttgccaaaa tgtatccact acaagaaatt cagaatctca cagtcaagct tcagctgcag
 601 gctcttcagc aaaatggggtc ttcagtgctc tcagaagaca agagcaaacg gttgaacaca
 661 attctaaata caatgagcac catctacagt actggaaaag tttgtaacc agataatcca
 721 caagaatgct tattacttga accaggtttg aatgaaataa tggcaaacag tttagactac
 781 aatgagaggc tctgggcttg gaaagctgg agatctgagg tggcaagca gctgaggcca
 841 ttatatgaag agtatgtggt cttgaaaaat gagatggcaa gagcaaatca ttatgaggac
 901 tatggggatt attggagagg agactatgaa gtaaatgggg tagatggcta tgactacagc
 961 cgcggccagt tgattgaaga tgtggaacat acctttgaag agattaaacc attatatgaa
1021 catcttcatg cctatgtgag ggcaaagtgg atgaatgcct atccttcta tatcagtcca
1081 attggatgcc tccctgctca tttgcttgg gatatgtggg gtagattttg gacaaatctg
1141 tactcttga cagttccctt tggacagaaa ccaaacatag atgttactga tgcaatggtg
1201 gaccaggcct gggatgcaca gagaatattc aaggaggccg agaagttctt tgtatctgtt
1261 ggtcttcta atatgactca aggattctgg gaaaattcca tgctaacgga cccaggaaat
1321 gttcagaaag cagtctgcca tcccacagct tgggacctgg ggaaggcga cttcaggatc
1381 cttatgtgca caaaggtagc aatggacgac ttctgacag ctcatcatga gatggggcat
1441 atccagtatg atatggcata tgctgcacaa cttttctgc taagaaatgg agctaataa
1501 ggattccatg aagctgttgg gaaatcatg tcactttctg cagccacacc taagcattta
1561 aaatccattg gtcttctgtc acccgatttt caagaagaca atgaaacaga aataaacttc

```

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

Рекомендованные ссылки

- Статья на Биомолекуле - <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-chto-my-znaem-i-chego-ne-znaem>
- Информация о гене ACE2 в базе NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>
- Статья в Википедии - Нетранслируемые области

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

Ответ: Ген ACE2 содержит **21** экзон(ов). В мРНК гена ACE2 человека **седьмой** кодон АТГ является стартовым. Ген ACE2 находится в **коротком** плече **половой (X)** хромосомы.

3. Генетический код и его свойства (180 минут).

Задача 1

Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TACGCGCTTCGCGCTTCGCC-3'.

Закодированный полипептид состоит из 6 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь трех аминокислот, которая содержит: аминокислота М (1 часть), аминокислота К (2 части), аминокислота А (3 части).

Запишите последовательность аминокислот в пептиде (без пробелов, латинскими буквами).

Решение: следует сопоставить триплеты матричной цепи ДНК с заданной частотой встречаемости аминокислот, порядок следования аминокислот задается последовательностью ДНК. Соответствие триплетов и аминокислот: TAC – М, TTC – К, GCC – А. Порядок аминокислот в полипептиде – МАКАКА.

Ответ: МАКАКА.

Задача 2

Представлена последовательность оснований матричной цепи ДНК: 5'-TGGGCTGTTGAAGTTGAAGTT-3'.

Закодированный полипептид состоит из 7 аминокислотных остатков. При гидролизе этого пептида, получается смесь 4 аминокислот, которая содержит: аминокислота Q (3 части), аминокислота L (2 части), аминокислота R (1 часть), аминокислота T (1 часть).

Запишите последовательность аминокислот в пептиде (без пробелов, латинскими буквами), если дополнительный анализ пептида показал, что аминокислота R не является N- или C-концевой.

Решение: следует сопоставить триплеты матричной цепи ДНК с заданной частотой встречаемости аминокислот, порядок следования аминокислот задается последовательностью ДНК. Соответствие триплетов и аминокислот: TGG – T, GCT – R (из условий задачи следует, что эта аминокислота не является концевой), GTT – Q, GAA – L. Порядок аминокислот в полипептиде – TRQLQLQ.

Ответ: TRQLQLQ.

Задача 3

Выберите корректные тезисы, показывающие функциональное отношение кодонов и аминокислот.

Выберите все подходящие ответы из списка

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

Ответ: 1, 2

4. **История полимеразной цепной реакции, классификация ПЦР, использование ПЦР в молекулярной биологии, диагностике (180 минут).**

Задача 1

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

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

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

Выберите один вариант из списка

1. 2 миллиарда
2. 33 миллиона
3. 500 миллионов

4. 256 миллионов
5. 4 миллиарда
6. 1 миллиард
7. 8 миллиардов
8. 3 миллиарда

Ответ: 7

Задача 2

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

Сколько шестикратного (6х) буферного раствора для нанесения пробы на гель необходимо добавить в 25 мкл реакционной смеси для достижения в реакционной смеси однократной (1х) концентрации буферного раствора? Ответ введите в виде натурального целого числа без "мкл".

Рекомендуемая литература:

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

Пояснения к ответу: необходимо определить объем 6х буферного раствора, который следует добавить до достижения 1х концентрации.

Ответ: 5.

Задача 3

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

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

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

Для проведения гель-электрофореза ДНК в агарозном геле нужно приготовить 1 л буферного раствора ТАЕ. В лаборатории имеется в наличии стоковый (исходный) раствор 50х ТАЕ. В колбу для приготовления рабочего раствора необходимо добавить ¹ мл 50х раствора ТАЕ и затем добавить дистиллированную воду до отметки 1000 мл. Заливочный столик, который имеется в лаборатории, рассчитан на гель объемом 150 мл. Для приготовления 1,2% агарозного геля в колбу следует внести ² г порошка агарозы и прилить раствор ТАЕ 1х до отметки 150 мл. Тщательно перемешать содержимое колбы и дважды довести до кипения в микроволновой печи. Охладить полученный гель под струей проточной воды при перемешивании. Для визуализации двуцепочечной ДНК перед заливкой геля в колбу следует добавить ³ мкл 10000х раствора интеркалирующего красителя SYBR Green (конечная концентрация SYBR Green в геле - 1х).

Ответ: 1 - 20, 2 - 1.8, 3 - 15.

Задача 4

Смесь для проведения ПЦР состоит из нескольких компонентов. Перед началом эксперимента часто нужно сначала приготовить рабочий раствор. Обычно в лаборатории имеются стоковые (исходные) растворы компонентов, необходимых для проведения ПЦР.

Концентрации стоковых растворов:

- ДНК-полимераза, 40х;
- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, 15 мМ каждого;
- прямой праймер, 5,5 мкМ; • обратный праймер, 5 мкМ;
- матрица ДНК, 140 нг/мкл; • хлорид магния, 30 мМ;
- Tween 20, 3%;
- Трис-НСl рН 8.5, 0,35 М;
- хлорид калия, 0,35 М.

Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 50 мкл. Необходимо сопоставить концентрацию компонента в реакционной смеси и объем данного компонента в мкл, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации.

1. ДНК-полимераза, 1х;
2. дНТФ, 0,45 мМ;

3. прямой праймер, 300 нМ;
4. обратный праймер, 300 нМ;
5. матрица ДНК, 10 нг/мкл;
6. хлорид магния, 2,5 мМ;
7. Твин 20, 0,15%;
8. Трис-НСl рН 8,5, 80 мМ;
9. хлорид калия, 50 мМ;
10. вода бидистиллированная.

- а. 7,1.
- б. 1,3.
- в. 11,4.
- г. 1,5.
- д. 12,7.
- е. 4,2.
- ж. 3,0.
- з. 2,7.
- и. 3,6.
- к. 2,5.

Решение: необходимо вычислить разведение каждого из компонентов (разделить концентрацию стокового раствора на конечную концентрацию) и сопоставить объемы, добавляемые в реакционную смесь с объемами в правом столбце таблицы. Например, исходная концентрация ДНК-полимеразы 40х, конечная – 1х, разбавление в 40 раз, нужно добавить $50/40 = 1,3$ мкл; исходная концентрация дНТФ 15 мМ, конечная – 0,45 мкМ, разбавление $15/0,45 = 33,3$ раза, нужно добавить $50/33,3 = 1,5$ мкл.

Ответ: 1 - б, 2 - г, 3 - з, 4 - ж, 5 - и, 6 - е, 7 - к, 8 - в, 9 - а, 10 - д.

Задача 5

Смесь для проведения ПЦР состоит из нескольких компонентов. Перед началом эксперимента часто нужно сначала приготовить рабочий раствор. Обычно в лаборатории имеются стоковые (исходные) растворы компонентов, необходимых для проведения ПЦР.

Даны концентрации стоковых растворов

- ДНК-полимераза, 1.5 ед/мкл

- смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, 10 мМ каждого
- прямой праймер, 6 мкМ
- обратный праймер, 3.75 мкМ
- матрица ДНК, 50 нг/мкл
- хлорид магния, 30 мМ
- Tween 20, 1.25%
- Трис pH 8.5, 0.3 М
- хлорид калия, 0.25 М

Определите, какой объем стоковых растворов и воды следует добавить в реакционную смесь, если известно, что конечный объем реакционной смеси 25 мкл.

Сопоставьте компоненты реакционной смеси и их финальные концентрации и объем данного компонента, который следует добавить в реакционную смесь для достижения заданной концентрации.

1. вода деионизованная
 2. ДНК-полимераза, 0.03 ед/мкл
 3. нуклеозидтрифосфаты, 0.4 мМ каждого
 4. прямой праймер, 300 нМ
 5. обратный праймер, 300 нМ
 6. матрица ДНК, 4.5 нг/мкл
 7. хлорид магния, 3 мМ
 8. Tween 20, 0.15%
 9. Трис pH 8.5, 45 мМ
 10. хлорид калия, 40 мМ
- а. 4 мкл
- б. 3.75 мкл
- в. 2.0 мкл
- г. 1.25 мкл
- д. 1.0 мкл
- е. 3 мкл
- ж. 0.5 мкл
- з. 2.5 мкл

и. 2.25 мкл

л. 4.75 мкл

Пояснения к ответу: следует вычислить разведение стокового раствора до финальной концентрации, определить объем добавляемого стокового раствора, соотнести объем и компонент.

Ответ: 1 - л, 2 - ж, 3 - д, 4 - г, 5 - в, 6 - и, 7 - з, 8 - е, 9 - б, 10 - а.

Задача 6

Лаборант-исследователь подготовил реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР), добавил в пробирку следующие компоненты:

- Двухкратный буфер для ПЦР (с Mg^{2+})
- ДНК-матрица
- Прямой праймер

Затем лаборант отвлекся на смс-сообщение, а когда вернулся к протоколу, задумался, каких компонентов не хватает в реакционной смеси.

Определите, какие компоненты нужно добавить в реакционную смесь

1. дезоксигуанозинтрифосфат
2. РНК-матрица
3. РНК-зависимая ДНК-полимераза
4. дезокситимидинтрифосфат
5. дезоксиаденозинтрифосфат
6. дезоксицитидинтрифосфат
7. ДНК-зависимая РНК-полимераза
8. ДНК-зависимая ДНК-полимераза
9. обратный праймер
10. дезоксиуридинтрифосфат

Рекомендуемая литература

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

Пояснения к ответу: необходимо выбрать компоненты, которые являются субстратами ДНК-полимеразы и принимают участие в репликации ДНК.

Ответ: 1, 4, 5, 6, 8.

Задача 7

Лаборант-исследователь готовит реакционную смесь для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Он уже добавил в пробирку следующие компоненты:

- Таq-полимераза (ДНК-зависимая ДНК-полимераза).
- Буферный раствор, содержащий Mg²⁺
- Прямой и обратный праймеры.
- Дистиллированная вода.

Рекомендуемая литература

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

Определите, какие еще компоненты нужно добавить в реакционную смесь

1. ДНК-матрица;
2. смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP);
3. АТФ;
4. хлорид натрия;
5. активатор ДНК-полимеразы.

Решение: Хлорид натрия не является компонентом реакционной смеси (вариант 1), для ПЦР не требуется активатор ДНК-полимеразы (вариант 4), АТФ не является субстратом ДНК-полимеразы (вариант 5). Таким образом, правильные ответы 2 и 3.

Ответ: 1, 2.

Задача 8

Для успешной специфичной наработки фрагмента ДНК в ходе ПЦР важны все компоненты реакционной смеси. В литературе подробно описаны принципы подбора праймеров, закономерности специфичности ПЦР, а также многие другие особенности [1, 2, 3].

Выберите корректные суждения о полимеразной цепной реакции ДНК на матрице мРНК играет важную роль в биотехнологии, для экспрессии определенных генов, в частности, в бактериальных клетках.

1. увеличение концентрации ионов Mg²⁺ приводит к снижению специфичности ПЦР

2. ДНК-полимераза может использовать АТФ в качестве субстрата при синтезе дочерней цепи
3. для увеличения специфичности ПЦР в пробирки иногда добавляют минеральное масло
4. проведение более 50 циклов ПЦР невозможно, так как снижается процессивность ДНК-полимеразы и/или заканчиваются субстраты ДНК-полимеразы
5. ДНК-полимераза добавляет нуклеотиды к 5'-концу прямого праймера
6. укорочение праймера приводит к снижению температуры отжига
7. стандартная Taq-полимераза эффективно амплифицирует протяженных фрагменты ДНК длиной более 10 тысяч пар нуклеотидов
8. увеличение длины праймера приводит к повышению специфичности ПЦР
9. отсутствие спаривания на 5'-конце праймера не приводит к значительному снижению уровня наработки продукта ПЦР

Рекомендуемая литература

1. Стратегия подбора праймеров http://www.rfbr.ru/rffi/ru/books/o_1781847
2. ПЦР <https://cyberpedia.su/2x6e17.html>

Ответ: 1, 4, 6, 8, 9.

Задача 9

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

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

Выберите все подходящие ответы из списка

1. Преимущество количественной ПЦР по сравнению с ПЦР с детекцией по конечной точке в том, что вероятность контаминации продуктами количественной ПЦР, намного ниже
2. Использование зонда в количественной ПЦР позволяет в реальном времени следить за наработкой специфического продукта
3. Перед ПЦР-анализом на COVID-19, анализируемый образец обрабатывают ДНКазой для удаления возможных примесей совыделяющейся ДНК
4. При детекции SARS-CoV-2 полимеразная цепная реакция происходит после обратной транскрипции

5. Количество нарабатываемых молекул ДНК пропорционально количеству копий геномной РНК SARS-CoV-2 в образце
6. Номер цикла, на котором выходит кривая амплификации образца пациента соответствует циклу развития вируса в организме
7. Для детекции результатов количественной ПЦР используют гель-электрофорез
8. В результате ПЦР происходит наработка миллиардов молекул геномной РНК SARS-CoV-2
9. Кривые амплификации пациента с COVID-19 выходят позже, чем у здоровых пациентов
10. В процессе обратной транскрипции на матрице вирусной РНК образуется несколько копий комплементарной ДНК

Ответ: 1, 2, 4, 5, 10

Задача 10

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

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

Рекомендуемые ссылки

- Инструкция ВОЗ по детекции коронавирусной ДНК методом ОТ-ПЦР-РВ - <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf>
- Метод ПЦР на сайте Биомолекула - <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
- Статья в Википедии - Полимеразная цепная реакция в реальном времени
- Информация на сайте МАГАТЭ - <https://www.iaea.org/bulletin/infectious-diseases/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>

Варианты ответа

1. Ввиду крайне высокой чувствительности метода для детекции даже минимальных количеств вирусной геномной РНК достаточно провести 20-25 циклов амплификации

2. Количество нарабатываемых молекул ДНК пропорционально количеству копий вирусной геномной РНК SARS-CoV-2
3. В качестве мишени в протоколе ВОЗ используют ген обратной транскриптазы SARS-CoV-2 (RdRp)
4. Для детекции результатов ОТ-ПЦР-РВ используют гель-электрофорез
5. Выделенную геномную вирусную РНК обрабатывают ДНКазой для удаления возможных совыделяющихся примесей ДНК
6. Обратная транскрипция происходит после полимеразной цепной реакции
7. В результате ОТ-ПЦР-РВ происходит наработка миллиардов копий фрагмента вирусной РНК

Ответ: 2, 3

Задача 11

При решении предыдущих задач оказалось, что при использовании одной и той же пары праймеров, продукт ПЦР при использовании в качестве матрицы геномной ДНК значительно длиннее, чем когда в качестве матрицы используют зрелую мРНК.

Чем можно объяснить наблюдаемый результат?

1. для ПЦР *in silico* были использованы праймеры для ПЦР в реальном времени;
2. наличие регуляторной последовательности в гене АСТВ;
3. использование одной пары праймеров для матрицы мРНК и ДНК;
4. последовательность мРНК не гомологична использованной последовательности ДНК;
5. полученная кДНК укорочена на длину праймеров, использованных при обратной транскрипции;
6. сплайсинг пре-мРНК гена АСТВ.

Решение: так как в результате сплайсинга вырезается интрон, длина ПЦР-продукта изоформы с этими же праймерами будет короче – правильный ответ 6.

Ответ: 6.

Задача 12

Данный текст посвящен методу ПЦР.

Выберите варианты ответа, максимально соответствующие по смыслу.

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) необходимо, в первую очередь, выбрать участок (антигена / гена / генетического кода / молекулы / рибосомы) и сконструировать (азотистые основания / молекулы / нуклеотиды / олиго- нуклеотиды / праймеры), комплементарные участкам выбранного гена. Праймеры обычно выбирают длиной около (2 / 12 / 20 / 200 / 2000) (азотистых оснований / нуклеотидов / олигонуклеотидов / пар нуклеотидов / пар олигонуклеотидов). Положение праймеров задаёт (длину / массу / пространство / температуру плавления / ширину) конечного продукта. Затем нужно подготовить матрицу ДНК. Далее в пробирке смешивают все необходимые компоненты: ДНК-матрицу, праймеры, реакционный буфер, содержащий (ионы калия / ионы кальция / ионы магния / ионы натрия), (дезоксинуклеозидтрифосфаты / дезокситрифосфаты / нуклеозидтрифосфаты / трифосфаты), фермент ДНК-зависимую ДНК-полимеразу. На приборе, который называется (амплификатор / термостат / хроматограф / центрифуга) задают протокол ПЦР, который обычно состоит из (10-15 / 15-25 / 30-40 / 40-60 / 60-80) циклов, каждый из которых содержит последовательно стадии (денатурации / отжига праймеров / плавления / поглощения / ренатурации / репликации / терминации / элонгации), (денатурации / достройки / плавления / отжига праймеров / удлинения / элонгации) и (денатурации / комплементации / поглощения / ориентации / отжига праймеров / элонгации).

Рекомендуемая литература

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

Пояснения к ответу: в некоторых случаях возможно несколько правильных ответов.

Ответ: гена; праймеры, олигонуклеотиды; 20; нуклеотидов; длину; ионы магния; дезоксинуклеозидтрифосфаты; амплификатор; 30-40; денатурации, плавления; отжига праймеров; элонгации.

Задача 13

В лаборатории имеется 0,2 М и 2 М растворы NaCl, необходимо приготовить 800 мл 1 М раствора NaCl, используя имеющиеся растворы. Ответ введите в виде целого числа (без обозначения мл).

Для приготовления 0.8 л 1 М раствора NaCl нужно взять **440** мл 0,2 М раствора NaCl и **360** мл 2 М раствора NaCl.

Решение: необходимо решить систему уравнений. $V_2 \cdot 0,2 + V_1 \cdot 2 = 800 \cdot 1$ и $V_1 + V_2 = 800$

Ответ: 440, 360

Задача 14

Реакционная смесь объемом 20 мкл содержит:

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

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

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

Ответы введите в мкл, округлите до ближайших целых значений.

В реакционную смесь необходимо добавить **4** мкл раствора плазмидной ДНК, **3** мкл ПЦР-продукта и **10** мкл дистиллированной воды.

Решение: так как необходимо добавить 100 нг плазмидной ДНК, ее объем равен 4 мкл. Так как соотношение плазмиды и ПЦР-продукта должно быть 1:3, а их длина отличается в $3500/7=5$ раз, следует добавить $100/5*3=60$ нг ПЦР-продукта (3 мкл). Остальной объем – вода.

Ответ: 4, 3, 10

Модуль 2

Задача 1

Определите открытые рамки считывания (ORF) [1, 2] в плазмиде pBluescript, в которую прошла встройка гена ДНК-лигазы. Какая из открытых рамок считывания соответствует гену ДНК-лигазы? Скопируйте последовательной этой рамки считывания в транслированном виде (Ctrl+T) и вставьте ее в виде отдельного объекта. Проанализируйте содержание остатков аминокислот в этом белке. Укажите количество некоторых аминокислот в данном пептиде (введите только число/цифру).

Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии - Открытая рамка считывания (https://ru.wikipedia.org/wiki/Открытая_рамка_считывания).
2. <https://ugene.unipro.ru/wiki/display/UUOUM16/ORF+Marker>.

Заполните пропуски:

Трансляция открытой рамки считывания, соответствующей ДНК-лигазе, приведет к синтезу полипептида, содержащего ¹ остатка(ов) глутаминовой кислоты, ² остатка(ов) лизина и ³ остатка(ов) лейцина.

Решение: Запустить UGENE, найти открытую рамку считывания, соответствующую гену ДНК-лигазы. Анализ открытой рамки считывания данной плазмиды дает информацию о содержании остатков аминокислот E (40), K (41) и L (44).

Ответ: 1 - 40; 2 - 41; 3 - 44.

Задача 2

Заполните пропуски:

Трансляция открытой рамки считывания, соответствующей ДНК-лигазе, приведет к синтезу полипептида, содержащего (1) остатка(ов) глутаминовой кислоты, (2) остатка(ов) лизина и (3) остатка(ов) лейцина.

Решение: запустить UGENE, найти открытую рамку считывания, соответствующую гену ДНК-лигазы. Анализ открытой рамки считывания данной плазмиды дает информацию о содержании остатков аминокислот E (40), K (41) и L (44).

Ответ: 1 - 40; 2 - 41; 3 - 44.

Задача 3

Заполните пропуски:

Белок, соответствующий ORF гомолога VP1, содержит (1) остаток(ов) фенилаланина, (2) остаток(ов) треонина и (3) остаток(ов) триптофана.

Решение: запустить UGENE, найти открытую рамку считывания, соответствующую гену ДНК-лигазы. Анализ открытой рамки считывания данной плазмиды дает информацию о содержании остатков аминокислот.

Ответ: 1 - 9; 2 - 23; 3 - 1.

Задача 4

Результаты секвенирования ДНК по методу Сэнгера с использованием флуоресцентно меченых ддНТФ представляют собой хроматограммы разделения фрагментов ДНК капиллярным электрофорезом. Файлы с "секвенограммами" могут иметь разное расширение, например, .ab1. Для визуализации результатов секвенирования, обработки и анализа секвенограмм можно использовать универсальную программу для биоинформатического анализа, например, UGENE [1].

Проведите сборку контига из секвенограмм, полученных при анализе генома коронавируса [2]. Определите, сколько открытых рамок считывания (ORF) может иметь данный контиг [3].

Укажите длину наиболее короткой открытой рамки считывания в полученном контиге, последовательность нуклеотидов которой гомологична белку VP1. Ответ представьте в виде числа, без знаков препинания, пробелов и других символов.

Рекомендуемые ссылки

1. Программа UGENE (<http://ugene.net/download.html>).
2. Ссылка для скачивания файлов с секвенограммами с Яндекс-диска - <https://yadi.sk/d/ocf0cAdtVwhQdg>.
3. Статья в википедии - Открытая рамка считывания (https://ru.wikipedia.org/wiki/Открытая_рамка_считывания).

Решение: открыть UGENE, запустить инструмент «Сборка контигов с помощью CAP3», добавить файлы .ab1, собрать контиг, найти открытые рамки считывания, определить длину самой короткой рамки считывания (dna_len = 159), гомологичной белку VP1 (использовать сервис “Blast”). Не все открытые рамки считывания гомологичны белку VP1.

orf

Location = 487..645
dna_len = 159
protein_len = 53
Sequence = ATGGTTCAACACGCGGCCACAAAGCTACAGTGTACTGG ...
Translation = MVQHAATKLQCTL ...

AAGAАСТАААССАТТСТСТГТСССAGТТТТААСТГТТGAGGAGATGACCAATTCАAGATTCCCCATTCCSTTTGGAAA
TTCTTGATTTGGTAAGAGACAGGGTCAAAATTGACAАСТССТСТACTGGTTAAGTTCАAGGGGTAAGGAAACSTTT
CCACATCACAGGTAGTCGCAАСТACACAATGAATTTGGCTTCTCAAAATTGGAACAАСТATGACCCAAACAGAAGAAA
GGTGTAGTGTCCATCAGCGTTGATGTGTTACTTAAACCGAAGAGTTTTAACSTTGTGATACTGGGTGTCTTCTTT
AAAАСТGGGTAGAGTTCAATTTGAAАСТGACACAGACCATGATTTTGAAGCTAATCAAAACACAАAGTTTCACCCСAG
TTTTGACCCATCTCAAGTTAAАСТTTGACTGTGTCTGGTACTAAAАСТTCGATTAGTTTTGTGTTTCAAGTGGGGTCT

Ответ: 159.

Задача 5

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

С учетом липких концов, структура олигонуклеотида будет следующей:

5'-XXXXN1-20-3' (прямая цепь)

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

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

Ввести структуру липких концов (в направлении 5'→3') для прямой и обратной цепи олигонуклеотида. Ответ представить в виде XXXXYYYY

Ссылки на используемые последовательности

- Последовательность плазмиды pNB1 и вставки - <https://yadi.sk/d/jQcnQi-kFi5-Bw?w=1>

Решение: анализировать приведенные последовательности в UGENE для анализа липких концов

Ответ: GATCAATT

Для того, чтобы получить вставку с "липкими" концами, нужно **заказать отдельно два олигонуклеотида**

Задача 6

Полимеразная цепная реакция является исключительно важным современным методом молекулярной биологии. Принцип метода изложен в работах [1], [2]. В честь дня рождения Томаса Ханта Моргана лаборант решил получить ПЦР-продукт гена white длиной 152 пары нуклеотидов. Ген white кодирует транспортер прекурсоров пигментов глаза дрозофилы, мутация в нем приводит к формированию белых глаз [3, 4]. Последовательность данного гена в базе данных Gene Bank имеет идентификатор X02974.2 [5] Для амплификации участка ДНК методом ПЦР требуется заказать прямой и обратный праймер [6]. Последовательность праймеров принято записывать от 5'- конца к 3'-концу.

Определите последовательность обратного праймера длиной 16 нуклеотидов, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-СТCGCAACGGAAAACC-3'.

Введите последовательность обратного праймера латинскими буквами, без знаков 5'-, 3'-, и пробелов.

Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>

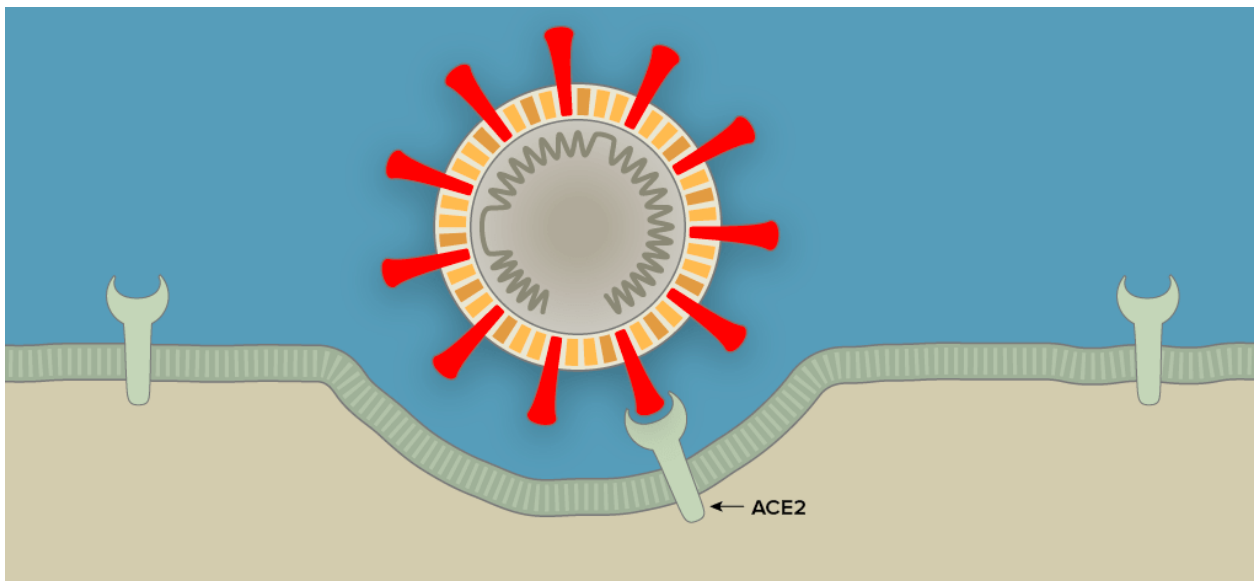
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция
<https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
3. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. - 1999. - V. 1419. - P. 173-185
1. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273699000644? via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273699000644?via%3Dihub)
4. Статья о мутации white в Википедии [https://ru.wikipedia.org/wiki/White_\(%D0%BC%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F\)](https://ru.wikipedia.org/wiki/White_(%D0%BC%D1%83%D1%82%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F))
5. Интерфейс для поиска <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>
6. Статья о праймерах в английской Википедии. Внимательно изучите иллюстрацию [https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology))

Пояснения к ответу: Для решения задачи следует воспользоваться интерфейсом NCBI (ссылка 5).

Ответ: GGCTGTTGСТААТАТТ.

Задача 7

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



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

ace2.1f 5'-GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA-3' ,
ace2.1r 5'-AGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'

и

ace2.2f 5'-AAACATACTGTGACCCCGCAT-3' ,
ace2.2r 5'-CCAAGCCTCAGCATATTGAACA-3'

Используйте последовательности в базе данных NCBI NM_021804.3 и NP_068576.1 [2], соответствующие мРНК и белку ACE2 и инструмент UGENE "PCR *in silico*", для определения длины получаемых ПЦР-фрагментов.

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

Рекомендованные ссылки

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

Заполните пропуски

В результате ПЦР с праймерами ace2.1 образуется продукт длиной **X** пар оснований, при использовании пары праймеров ace2.2 образуется продукт длиной **У** пар оснований.

Решение: определить последовательность нуклеотидов при помощи инструмента UGENE ПЦР *in silico*

Правильный ответ: X - 124, У - 199

Задача 8

Полимеразная цепная реакция является исключительно важным современным методом молекулярной биологии. Принцип метода изложен в работах [1], [2]. Для амплификации участка ДНК методом ПЦР требуется заказать прямой и обратный праймер [3].

Ген PAX6 относят к семейству генов PAX [4], которые кодируют тканеспецифичные факторы транскрипции. Мутации в данном гене приводят к нарушениям строения органов зрения. Ортолог (гомолог) данного гена у дрозофилы называется *eyless*. Последовательность данного гена в базе данных GeneBank имеет идентификатор NG_008679.1 [5]

Последовательность праймеров принято записывать от 5'-конца к 3'-концу. Определите последовательность прямого праймера длиной 20 нуклеотидов, если в качестве обратного праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-ССТАГГССГССГАГАГГГСТ-3', и известно, что длина ПЦР-фрагмента равна 210 пар нуклеотидов.

Введите последовательность прямого праймера латинскими буквами, без знаков 5'-, 3'-, и пробелов.

Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaia-reaktsiia>
3. Статья о праймерах в английской Википедии. Внимательно изучите иллюстрацию [https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology))
4. Статья о генах PAX в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B5%D0%BD%D1%8B_Pax
5. Интерфейс для поиска <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>

Пояснения к ответу: необходимо открыть последовательность гена в базе NCBI, найти последовательность, соответствующую обратному, вычислить последовательность, соответствующую прямому праймеру.

Ответ: GAGCTCGGAAGGGCCTAGT.

Задача 9

Полимеразная цепная реакция является исключительно важным современным методом молекулярной биологии. Принцип метода изложен в работах [1], [2]. Для амплификации участка ДНК методом ПЦР требуется заказать прямой и обратный праймер [3].

Ген SRY кодирует фактор транскрипции, который входит в семейство ДНК-связывающих белков HMG. Белок, кодируемый данным геном называют фактором развития семенников, данный белок определяет пол у мужчин. Мутации в данном гене приводят к формированию женских гениталий у лиц с генотипом XY (синдром Свайера) [5]. Транслокация данного участка Y-хромосомы на X-хромосому приводит к мужскому фенотипу у лиц XX. Последовательность гена SRY человека в базе данных GeneBank имеет идентификатор NG_011751.1 [6]

Последовательность праймеров принято записывать от 5'-конца к 3'-концу. Определите последовательность обратного праймера длиной 18 нуклеотидов, использованного для амплификации фрагмента гена SRY человека, если в качестве прямого праймера был использован следующий олигонуклеотид 5'-TGACATAAAAGGTCAATG-3', и известно, что длина ПЦР-фрагмента равна 218 пар нуклеотидов.

Введите последовательность прямого праймера латинскими буквами, без знаков 5'-, 3'-, и пробелов.

Рекомендуемая литература

1. Рекомендации по постановке ПЦР <http://evrogen.ru/kit-user-manuals/Evrogen-PCR-recommendation.pdf>
2. 12 методов в картинках: полимеразная цепная реакция <https://biomolecula.ru/articles/metody-v-kartinkakh-polimeraznaia-tsepnaiia-reaktsiia>
3. Статья о праймерах в английской Википедии. Внимательно изучите иллюстрацию [https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_\(molecular_biology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Primer_(molecular_biology))
4. Статья о гене SRY в Википедии <https://ru.wikipedia.org/wiki/SRY>
5. Синдром Свайера в Википедии https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B8%D0%BD%D0%B4%D1%80%D0%BE%D0%BC_%D0%A1%D0%B2%D0%B0%D0%B9%D0%B5%D1%80%D0%B0
6. Интерфейс для поиска <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore>

Пояснения к ответу: необходимо открыть последовательность гена в базе NCBI, найти последовательность, соответствующую прямому праймеру, вычислить последовательность, соответствующую обратному праймеру.

Ответ: ATGAAACTTGCATTTTCGC.

Задача 10

Для анализа продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) обычно используют электрофорез в агарозном геле. Для проведения ПЦР требуется заказать пару праймеров, а это достаточно длительная и не совсем дешевая процедура. В связи с этим, практическое значение имеют различные инструменты, позволяющие смоделировать продукты реакции амплификации с заданной парой праймеров. Одним из таких инструментов является ПЦР *in silico* [1], при котором программа анализирует участки возможного связывания праймеров на заданной матрице и предсказывает получаемый продукт [2]. Ген АСТВ кодирует в организме человека белок актин, важный немышечный компонент цитоскелета. Данный ген является геном "домашнего хозяйства". мРНК АСТВ часто используют в качестве референсной в ПЦР в реальном времени. Известно, что данный ген располагается в 7 хромосоме человека. Белок имеет массу около 42 кДа.

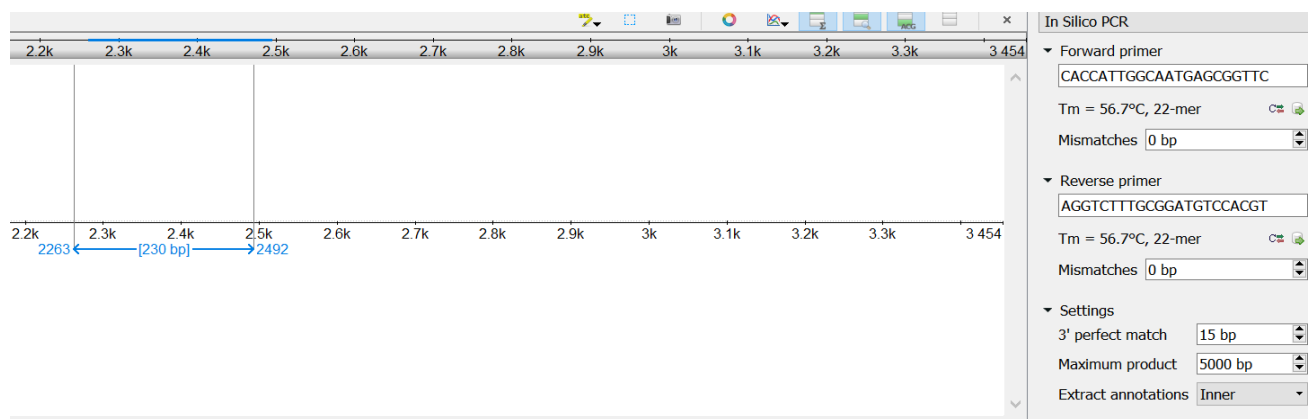
Используя информацию о гене АСТВ в базе данных NCBI [4], его кодирующей части NG_007992.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NG_007992.1?from=5001&to=8454&report=fasta) определите при помощи UGENE [2] длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTTC-3' и 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3' [5].

Длину продукта ПЦР (п. н.) введите в поле "ответ" в виде числа.

Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии - ПЦР in silico (https://ru.wikipedia.org/wiki/Виртуальная_ПЦР).
2. Инструмент PCR in silico в UGENE - <https://ugene.net/wiki/display/UUOUM15/In+Silico+PCR>.
3. Статьи об актине в википедии - Актин (<https://ru.wikipedia.org/wiki/Актин>), beta-Actin (<https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-actin>).
4. Информация о гене ACTB в NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=60>.
5. Праймеры для количественной ПЦР гена бета-актина https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp204660/beta-actin-actb-human-qpcr-primer-pair-nm_001101.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность из базы данных NCBI, на вкладке «ПЦР in silico» ввести последовательности прямого и обратного праймеров, определить длину продукта (230 bp).



Ответ: 230.

Задача 11

Для анализа продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) обычно используют электрофорез в агарозном геле. Для проведения ПЦР требуется заказать пару праймеров, а это достаточно длительная и не совсем дешевая процедура. В связи с этим, практическое значение имеют различные инструменты, позволяющие смоделировать продукты реакции амплификации с заданной парой праймеров. Одним из таких инструментов является ПЦР in silico [1], при котором программа анализирует участки возможного связывания праймеров на заданной матрице и предсказывает получаемый продукт [2].

Ген ACTB кодирует в организме человека белок актин, важный немышечный компонент цитоскелета. Данный ген является геном "домашнего хозяйства". мРНК ACTB часто используют в качестве референсной в ПЦР в реальном времени. Известно, что данный ген располагается в 7 хромосоме человека. Белок имеет массу около 42 кДа.

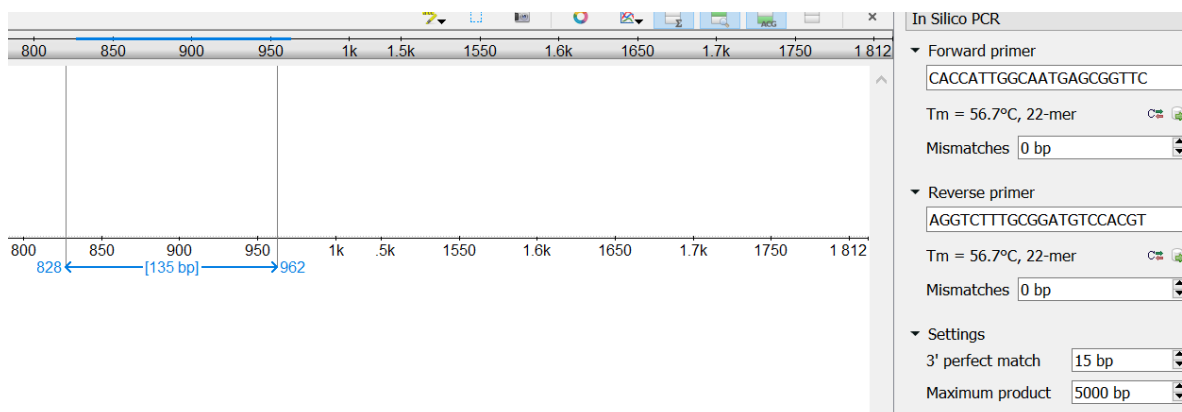
Используя информацию об изоформе NM_001101.5 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucscore/NM_001101.5) мРНК гена АКТВ в базе данных NCBI [4], определите при помощи UGENE [2] длину продукта ПЦР, если в качестве праймеров использовать пару прямой:

5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' и 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3' [5].
Длину продукта ПЦР (п. н.) укажите в виде числа.

Рекомендуемые ссылки

1. Статья в википедии - ПЦР in silico (https://ru.wikipedia.org/wiki/Виртуальная_ПЦР).
2. Инструмент PCR in silico в UGENE - <https://ugene.net/wiki/display/UUO/UM15/In+Silico+PCR>.
3. Статьи об актине в википедии - Актин (<https://ru.wikipedia.org/wiki/Актин>), beta-Actin (<https://en.wikipedia.org/wiki/Beta-actin>).
4. Информация о гене АКТВ в NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=60>
5. Праймеры для количественной ПЦР гена бета-актина https://www.origene.com/catalog/gene-expression/qpcr-primer-pairs/hp204660/beta-actin-actb-human-qpcr-primer-pair-nm_001101.

Решение: запустить UGENE, загрузить последовательность из базы данных NCBI, на вкладке «ПЦР in silico» ввести последовательности прямого и обратного праймеров, определить длину продукта (135 bp).



Ответ: 230.

Задача 12

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

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

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

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

Рекомендованные ссылки

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

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

Правильный ответ: 297

Задача 13

	Последовательность, 5'-3'
Направляющая РНК	AGGGGGTGATCAAGTACATG
Праймер прямой	GAAGGAGACGCTGCAGTTG
Обратный праймер	GGAATGCGACTGCTGGAAA
Часть гена MSH2 Подчеркиванием обозначен сайт разрезания белком Cas9	AAGCTGATTGGGTGTGGTCCGCGTGGCCGGACGCCGCTCGGGG GACGTGGGAGGGGAGGCGGAAACAGCTTAGTGGGTGTGGGGT CGCGCATTTTCTTCAACCAGGAGGTGAGGAGTTTCGACATGGC GGTGCAGCCGAAGGAGACGCTGCAGTTGGAGAGCGCGGCCGAG GTCGGCTTCGTGCGCTTCTTTCAGGGCATGCCGGAAGAAGCCGA CCACCACAGTGCCTTTTCGACCGGGGCGACTTCTATACGGCG CACGGCGAGGACGCGCTGCTGGCCGCCCGGAGGTGTTCAAGAC CCAGGGGGTGATCAAGTACATGGGGCCGGCAGGTGAGGG CCGGGACGGCGCGTGTGGGAGGGACCCGGGGCCTTGTGGCG CGGCTCCTTTCCCGCCTCAGAGAGTGGGCGGTGAGCAGCCTCT CCAGTGCGGAGGCACGGGGGCGGAACGTTGGTGTGTTGTGCGGA TTCCGCGTCCCCAGGTTCTGCTTGGCTCCGGAGGGACGCCCC CCTCAGCCCTGAAACCCGTGCCTCTCCAGCCGCCCCGGATCTG AACTTGTGATCACGGAGTGTTCACGTCGTGCCAGGCATTTTAA TGCATTGTTCTAGTTCATTTTCCAGCAGTCGCATTCCTCGCCT TGGCCCT
Эндонуклеаза рестрикции для анализа модифици- рованных клеток	RsaI

Задача

1. Подобрать праймеры для амплификации участка гена MSH2, с которым связывается направляющая РНК. Размер ампликона должен быть около 500 п.н.

2. Известно, что белок Cas9 вносит двуцепочечный разрыв на расстоянии 3 п.н. от РАМ в направлении 5'. Необходимо подобрать эндонуклеазы рестрикции для исследования модифицированных и немодифицированных клеток.

Дано

1. Последовательность гена MSH2
2. Последовательность направляющей РНК

Решение

Прямой праймер 5'-СТТСААССАГГАГГТГАГГА-3' (1 б) Обратный праймер 5'-ГААСААТГСАТТААААТГСС-3' (1 б) Размер ампликона 514 нуклеотидов. (1 б) Рестриктаза *TatI*. (1 б)

В результате мутации изменяется сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции. Фрагмент не разрезается. Детекция при помощи агарозного гель-электрофореза. (2 б)

Если мутация не происходит, происходит разрезание ДНК. Детекция при помощи агарозного гель-электрофореза. (2 б)

Вносить мутации целесообразно в начале гена, в экзоны. Желательно получить мутации, вызывающие появление стоп-кодона, либо сдвиг рамки считывания. (2 б)

Раздел 4

Модуль 2

Задача 1

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

Базы данных NCBI и UniProt содержат несколько последовательностей, соответствующих гену ACE2 человека [2, 3]. Используя последовательности NP_068576.1 и Q9VYF1, найдите информацию о ферменте ACE2.

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

Рекомендованные ссылки

- Статья на Биомолекуле - <https://biomolecula.ru/articles/covid-19-chto-my-znaem-i-chego-ne-znaem>
- Информация о гене ACE2 в базе NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59272>

- Информация о белке ACE2 в базе UniProt - <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9BYF1>

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

Ответ: Коронавирус SARS-CoV-2 связывается с **внеклеточным** доменом ACE2. В белке ACE2 наиболее представлены остатки аминокислоты **лейцин**, в трансмембранном домене наиболее представлены остатки аминокислот **валин** и **изолейцин**. Ангиотензинпревращающий фермент 2 относят к классу **гидролаз**

Раздел 6

Модуль 1

1. Редактирование генома CRISPR\Cas9, РНК-интерференция.

Задача 1

Приведенный ниже отрывок текста посвящен использованию метода редактирования генома CRISPR-Cas9 [1, 2].

Выберите корректные по смыслу варианты из выпадающего списка. В некоторых местах возможно несколько правильных вариантов, выберите любой из них.

Метод редактирования генома, использующий систему CRISPR/Cas9, может быть использован для (анализа родословной / исключения заранее выбранных генов / разработки штаммов бактерий, устойчивых к любым антибиотикам / создания новых видов животных / увеличения продуктивности экосистем). Молекулярный процесс редактирования гена включает несколько стадий. На первой происходит связывание комплекса белка-нуклеазы Cas9 и направляющей РНК с (антипараллельной / антисмысловой / идентичной / коллинеарной / комплементарной) целевой областью ДНК. Далее (белок / фермент / нуклеаза / рестриктаза / протеаза) Cas9 осуществляет (разрезание / расщепление / диссоциацию / стабилизацию / сопоставление) нуклеотидной последовательности ДНК в области непосредственного взаимодействия РНК-ДНК с образованием двуцепочечного разрыва. На последнем этапе ферменты (репарации / репликации / ретардации / лигирования / рестрикции) ДНК восстанавливают образующийся разрыв с формированием мутаций в виде делеций или инсерций.

Рекомендуемая литература

1. Редактирование генома с CRISPR/Cas9 <https://postnauka.ru/faq/59807>
2. Статья в Википедии о CRISPR <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
3. Статья о возможностях редактирования генома https://chr.dk.ru/sci/ot_bezobidnoi_kartoshki_do_biologicheskogo_oruzhiya

Пояснения к ответу: В некоторых случаях возможно несколько правильных ответов.

Ответ: исключения заранее выбранных генов; комплементарной; белок, фермент, нуклеаза; разрезание; расщепление; репарации.

Задача 2

Механизм действия системы редактирования CRISPR/Cas9 включает несколько этапов:

1. поиск и узнавание последовательности PAM (от англ. protospacer adjacent motif — мотив, смежный с протоспейсером)
2. формирование дуплекса между направляющей РНК и целевым участком ДНК
3. разрезание цепи ДНК нуклеазой Cas9 с образованием двуцепочечного разрыва
4. репарация ДНК по механизму гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов

Найдите в выбранном участке гена все возможные варианты последовательности PAM. Представлена кодирующая цепь:

5'-GTCGCCAGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCATGGGAAGTGA-3'

Выберите корректные последовательности PAM из предложенных ниже.

1. CCA
2. GAG
3. CGG
4. GGG
5. GCC
6. TGG
7. CTC

Рекомендуемая литература

1. Статья в Википедии о методе CRISPR-Cas <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
2. НЕМУДРЫЙ А.А., ВАЛЕТДИНОВА К.Р., МЕДВЕДЕВС.П., ЗАКИЯНС.М. СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ TALEN И CRISPR/CAS - ИНСТРУМЕНТЫ ОТКРЫТИЙ // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. - С. 20. <https://yadi.sk/i/0epvvqFx2SrMoQ>

Пояснения к ответу: следует определить последовательности PAM, содержащиеся в приведенной и комплементарной ей цепи ДНК (выделены жирным).

Ответ: 3, 4, 6.

Задача 3

Механизм действия системы редактирования CRISPR/Cas9 включает несколько этапов:

1. поиск и узнавание последовательности PAM (от англ. protospacer adjacent motif — мотив, смежный с протоспейсером)
2. формирование дуплекса между направляющей РНК и целевым участком ДНК
3. разрезание цепи ДНК нуклеазой Cas9 с образованием двуцепочечного разрыва
4. репарация ДНК по механизму гомологичной рекомбинации или негомологичного соединения концов

Найдите в выбранном участке гена все возможные варианты последовательности PAM. Представлена кодирующая цепь:

5'-AAGTTGTCTGATTTTTTAAAACACTGATGCAGCTGGCCTCA-3'

Выберите корректные последовательности PAM из предложенных ниже.

1. 5'-TGA
2. 5'-TGG
3. 5'-GTC
4. 5'-GGG
5. 5'-AGG
6. 5'-CCG
7. 5'-CGG

Рекомендуемая литература

1. Статья в Википедии о методе CRISPR-Cas <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>
2. НЕМУДРЫЙ А.А., ВАЛЕТДИНОВА К.Р., МЕДВЕДЕВС.П., ЗАКИЯНС.М. СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ TALEN И CRISPR/CAS - ИНСТРУМЕНТЫ ОТКРЫТИЙ // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. - С. 20. <https://yadi.sk/i/0epvvqFx2SrMoQ>
3. Статья на сайте Addgene <https://www.addgene.org/crispr/guide/>

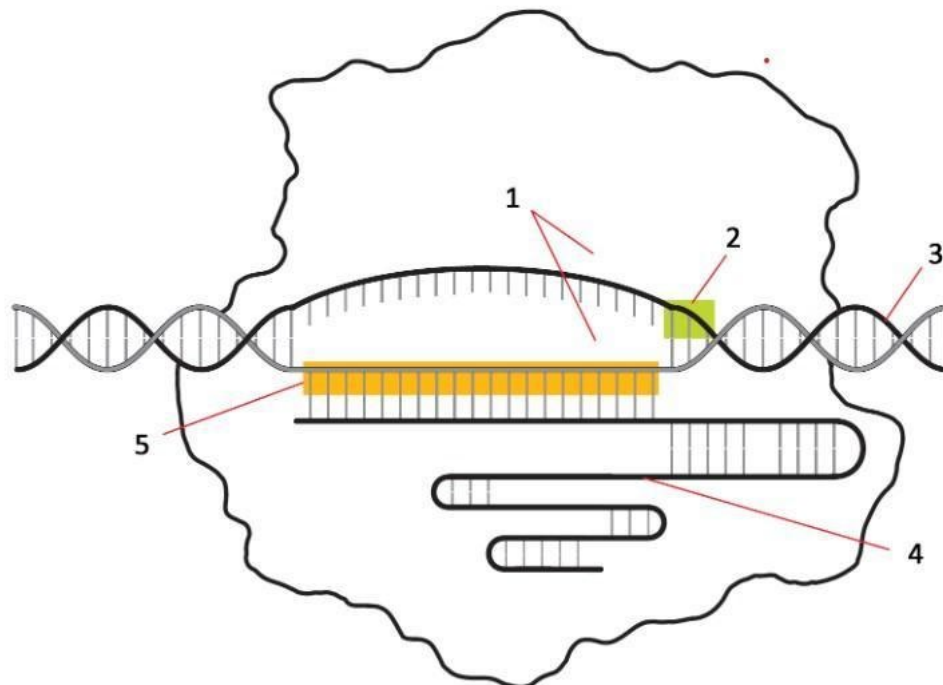
Пояснения к ответу: необходимо выбрать последовательности PAM, встречающиеся в представленной и комплементарной цепи ДНК.

Ответ: 2, 5.

Задача 4

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

- фермент Cas9;
- направляющая РНК (sgRNA) — синтетический олигонуклеотид, который содержит два участка, в природе представленные в виде двух молекул: crRNA и tracrRNA;
- мотив протоспейсера (PAM). Задание. Соотнесите компоненты системы редактирования генома с обозначениями на схеме



Сопоставьте значения из списка с нумерацией на картинке

- sgRNA.
- ДНК.
- Протоспейсер.
- Участок разрезания.
- PAM.

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

Задача 5

Система редактирования генома включает следующие белково-нуклеиновые компоненты:

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

Заполните пропуски:

На первом этапе работы системы геномного редактирования происходит связывание (a):

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

, далее образовавшийся комплекс связывается с (b):

1. скаффолдом.
2. NGG.
3. Cas9.
4. PAM.
5. sgRNA.

ДНК-мишени. PAM последовательность имеет вид (c):

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

. После связывания Cas9 и PAM, происходит (d):

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

и sgRNA связывается с (e):

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

Cas9 делает (f):

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

разрыв на расстоянии 3 нуклеотида от PAM. Комплекс (g):

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

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

Задача 6

Зачем нужно получать новые белки-гомологи инструментов геномного редактирования?

Система оценки

1. Гомологи Cas9 позволяют использовать другие PAM
2. Мутантные формы гомологов Cas9 позволяют еще сильнее расширить функционал белков

3. Белки, активность которых отличается от консенсусного Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, могут быть использованы для решения других задач, чем редактирование генома.

Модуль 2

Задача 1

Чтобы получить мутантный белок Cas9 аспирант взял плазмиду pVIP1 (карта плазмиды pVIP1.gb) с фрагментом гена Cas9 и высокоточную ДНК-полимеразу Q5 (NEB <https://international.neb.com/products/m0491-q5-high-fidelity-dna-polymerase#Product%20Information>) для сайт-направленного мутагенеза. После ПЦР с праймерами, содержащими тринуклеотидную замену (см. ниже), лигирования и трансформации клеток *E. coli* были получены плазмиды с пяти разных колоний (pVIP1_*). Проведите множественное выравнивание секвенограмм (файлы *.ab1) [1].

Какую аминокислотную замену хотел произвести аспирант? Введите в поле "ответ" последовательность из трех нуклеотидов, которая закодирована в праймере.

Дополнительная информация

Праймеры, использованные для получения плазмид pVIP1_1, pVIP1_2, pVIP1_3, pVIP1_4:

- Primer1_F 5'-TATGATTAAGGCGCGTGGTCATTTTTTGGATTGAG-3'.
- Primer1_R 5'-TGCGCTAAGGCCAAATAG-3'.

Праймеры, использованные для получения плазмиды pVIP1_5:

- Primer2_F 5'-ATATGATTAAGGCGCGTGGTCATTTTTTGGATTGAGG-3'.
- Primer2_R 5'-GCGCTAAGGCCAAATAGA-3'.

Праймер, использованный для секвенирования:

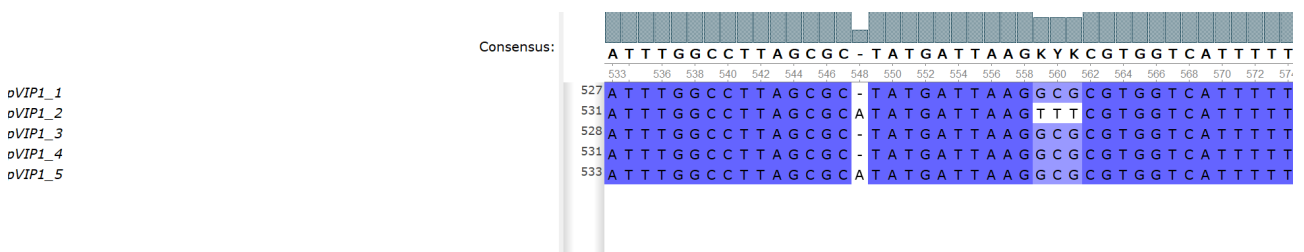
- Праймер T3-промотора 5'-GCAATTAACCCTCACTAAAGG-3'.

Рекомендуемые ссылки

1. Папка с файлами, необходимыми для решения задачи - https://yadi.sk/d/8wWYNff2j5_1-g.
2. Videоблог UGENE "Анализ результатов секвенирования по Сэнгеру" <https://www.youtube.com/watch?v=lDovNM1oZEw>.
3. Статья в Википедии о методе CRISPR-Cas <https://ru.wikipedia.org/wiki/CRISPR>.

4. НЕМУДРЫЙ А.А., ВАЛЕТДИНОВА К.Р., МЕДВЕДЕВ С.П., ЗАКИЯН С.М. СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ TALEN И CRISPR/CAS - ИНСТРУМЕНТЫ ОТКРЫТИЙ // Acta Naturae. - 2014. - Т. 6. - С. 20. <https://yadi.sk/i/0epvvqFx2SrMoQ>.
5. Статья о редактировании генома на сайте Addgene <https://www.addgene.org/crispr/guide/>.

Решение: запустить UGENE, загрузить карту исходной плазмиды, выровнять с секвеннограммами полученных плазмид, определить триплет, «закодированный» в праймерах – нуклеотиды 559–561 (GCG).



Ответ: GCG.

Задача 2

Охарактеризуйте каждую из плазмид, полученных на предыдущем этапе, на наличие мутаций.

Плазмида	pVIP1_1	pVIP1_2	pVIP1_3	pVIP1_4	pVIP1_5
Сайт-направленный мутагенез прошел					
Сайт-направленный мутагенез не прошел					
Плазмида содержит дополнительную мутацию рядом					
Плазмида не содержит дополнительную мутацию рядом					

Решение: запустить UGENE, загрузить карту исходной плазмиды, выровнять с секвеннограммами полученных плазмид, оценить, произошла ли замена в результате ПЦР, содержит ли плазмида дополнительную мутацию рядом с триплетом GCG (нуклеотид 548).

Плазмида	pVIP1_1	pVIP1_2	pVIP1_3	pVIP1_4	pVIP1_5
Сайт-направленный мутагенез прошел	+		+	+	+
Сайт-направленный мутагенез не прошел		+			
Плазмида содержит дополнительную мутацию рядом	+		+	+	
Плазмида не содержит дополнительную мутацию рядом		+			+

В данном разделе содержатся описания практических работ, которые вы можете выполнить с учениками после прохождения теоретических разделов. Для выполнения практики вам потребуется оборудование, список которого будет указан для каждой практической работы, а также наборы реактивов. Необходимые реактивы вы можете заказать заранее собранным набором в «МБС-детям».

Содержание:

Раздел 7

- 7.1 Определение ГМО в продуктах питания
- 7.2 Состав злаков в хлебной продукции
- 7.3 Определение гена метаболизма кофеина
- 7.4 Определение пола человека
- 7.5 Равновесие в популяции
- 7.6 Определение резус-фактора
- 7.7 Тонкослойная хроматография, определение активности ферментов.

Практические работы 7.1-7.6

Используемое оборудование

- штатив для микропробирок;
- пипетка автоматическая;
- амплификатор (например, БИС);
- термостат для микропробирок твердотельный;
- микроцентрифуга;
- вортекс;
- УФ-трансиллюминатор.
- Электрофорезная горизонтальная камера

Необходимые реактивы:

- Набор ” Определение ГМО в продуктах питания” <https://pharmase.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-gmo-v-produktakh-pitaniya-lineyka-ptsr/>
- Набор “Состав злаков в хлебной продукции” <https://pharmase.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-sostav-zlakov-v-khleбноy-produktsii-lineyka-ptsr/>

- Набор “Определение гена метаболизма кофеина” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-gena-metabolizma-kofeina-lineyka-ptsr/>
- Набор “Определение пола человека” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-pola-cheloveka-lineyka-ptsr/>
- Набор “Равновесие в популяции” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-ravnovesie-v-populyatsii-lineyka-ptsr/>
- Набор “Определение резус-фактора” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-mbs-detyam-opredelenie-rezus-faktora-lineyka-ptsr/>

Практические работы 7.1-7.6 делятся на 3 занятия, общее время, необходимое на выполнение 1 работы - 6 академических часов, то есть 3 занятия. На 1 занятии проводится выделение ДНК, на 2 занятии ПЦР, на 3 занятии полученные результаты анализируются при помощи гель-электрофореза.

Практическая работа 7.7

Практическая работа 7.7 выполняется за один раз, 6 академических часов, так как этапы работы нельзя разбить на несколько дней. Для выполнения этой работы специального оборудования не требуется.

Необходимые реактивы:

- Набор “Тонкослойная хроматография, определение активности ферментов” <https://pharma-se.ru/equipments/oborudovanie-i-materialy-dlya-obrazovatelnykh-uchrezhdeniy/sovremennye-laboratornye-raboty-po-biologii/nabor-tskh-mbs-detyam-aktivnost-fermentov-lineyka-khromatografiya/>