

Место для баллов:

Код:

### КАБИНЕТ № 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

(30 баллов)

Продолжительность выполнения задания – 90 минут

#### Введение



Аспиранта Васю пригласили в засекреченную лабораторию, в которой лучшие умы научного сообщества объединились для борьбы с особо опасным существом, угрожающим и наносящим колоссальный экономический ущерб не только на территории Республики Беларусь, но и всего мира – тлей. Это насекомое обладает устойчивостью к инсектицидам, и теперь сельскохозяйственный урожай в страшной опасности! Помогите Васе с постановкой и интерпретацией результатов экспериментов, чтобы его не лишили зарплаты, а жители нашей страны смогли наслаждаться продуктами местного производства по доступным ценам.

#### Блок 1

Изучив множество литературных данных, аспирант Вася нашёл информацию о гене *CYP6CY3*, который предположительно отвечает за один из механизмов формирования устойчивости тлей к инсектицидам класса неоникотиноидов.

Для начала необходимо поставить эксперимент на выживаемость тлей, с полулетальной концентрацией инсектицида. Длительность эксперимента – от нескольких часов до суток, цель – отобрать тлей, выживших после питания на растении, обработанном инсектицидом. В вашем распоряжении всё, что есть в лаборатории. Выберите всё необходимое для успешного проведения эксперимента, и обоснуйте свой выбор.

<p><b>А</b> свекла в цветочном горшке</p> 	<p><b>Б</b> лабораторный журнал</p> 	<p><b>В</b> фильтровальная бумага</p> 	<p><b>Г</b> термостат лабораторный</p> 	<p><b>Д</b> микроманипулятор</p> 
<p><b>Е</b> инсектицид класса неоникотиноидов</p> 	<p><b>Ж</b> набор для выделения ДНК</p> 	<p><b>З</b> листья свеклы</p> 	<p><b>И</b> дистиллированная вода</p> 	<p><b>К</b> амплификатор</p> 
<p><b>Л</b> спирт, 96%</p> 	<p><b>М</b> стерильная чашка петри</p> 	<p><b>Н</b> лабораторный дозатор</p> 	<p><b>О</b> лабораторный стакан</p> 	<p><b>П</b> микроскоп</p> 

1. Обоснуйте свой выбор по тем пунктам, которые вы выбрали (обведите букву в кружок): (0,2 балла за каждый верный ответ + 0,3балла за корректное обоснование выбранного)

<b><u>А</u></b>	
<b><u>Б</u></b>	<i>Нужен, чтобы внести данные о ходе эксперимента: концентрацию инсектицида, количество выживших/погибших тлей и т.д.</i>
<b><u>В</u></b>	<i>Пропитывается водой, чтобы лист растения не высох</i>
<b><u>Г</u></b>	
<b><u>Д</u></b>	
<b><u>Е</u></b>	<i>Инсектицид необходим как изучаемое средство воздействия на насекомых</i>
<b><u>Ж</u></b>	

<u><b>З</b></u>	<i>Лист растения необходим для обработки его инсектицидом</i>
<u><b>И</b></u>	<i>Лист растения необходим для обработки его инсектицидом</i>
<b>К</b>	
<b>Л</b>	
<u><b>М</b></u>	<i>Нужна как объект, в котором во время эксперимента будет находиться пул тлей и пропитанный инсектицидом лист</i>
<u><b>Н</b></u>	<i>Необходим, чтобы добавлять воду на фильтровальную бумагу, а также для разведения инсектицида</i>
<u><b>О</b></u>	<i>Необходим для разведения инсектицида</i>
<b>П</b>	

2. Чего не хватает и почему? 1 балл (не более 4 вариантов)

*халат, перчатки – для безопасной работы.*

*тля – объект исследования.*

*таймер – для проверки через определенный промежуток времени числа выживших и погибших тлей.*

*ножницы – чтобы отрезать часть листа, которая не поместится в чашку Петри.  
и т.д.*

**Блок 2**

В результате первого эксперимента из 12 тлей выжила половина. Из погибших и выживших особей была выделена РНК, затем получена кДНК. Итоговые образцы амплифицировали при помощи ПЦР.

Аспирант Вася решил выяснить, обусловлена ли устойчивость тлей активной экспрессией анализируемого гена.

См. ниже результаты амплификации.

1. Назовите тип полимеразной цепной реакции, результаты которой приведены ниже. Дайте его краткую характеристику. 0,5 балла

*ПЦР в реальном времени / количественная ПЦР / Real-time PCR / qRT-PCR. Позволяет детектировать накопление продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Так как кинетика накопления ампликонов напрямую зависит от числа копий исследуемой матрицы, это позволяет проводить количественные измерения ДНК или РНК.*

2. Что отображают оси? 0,5 балла

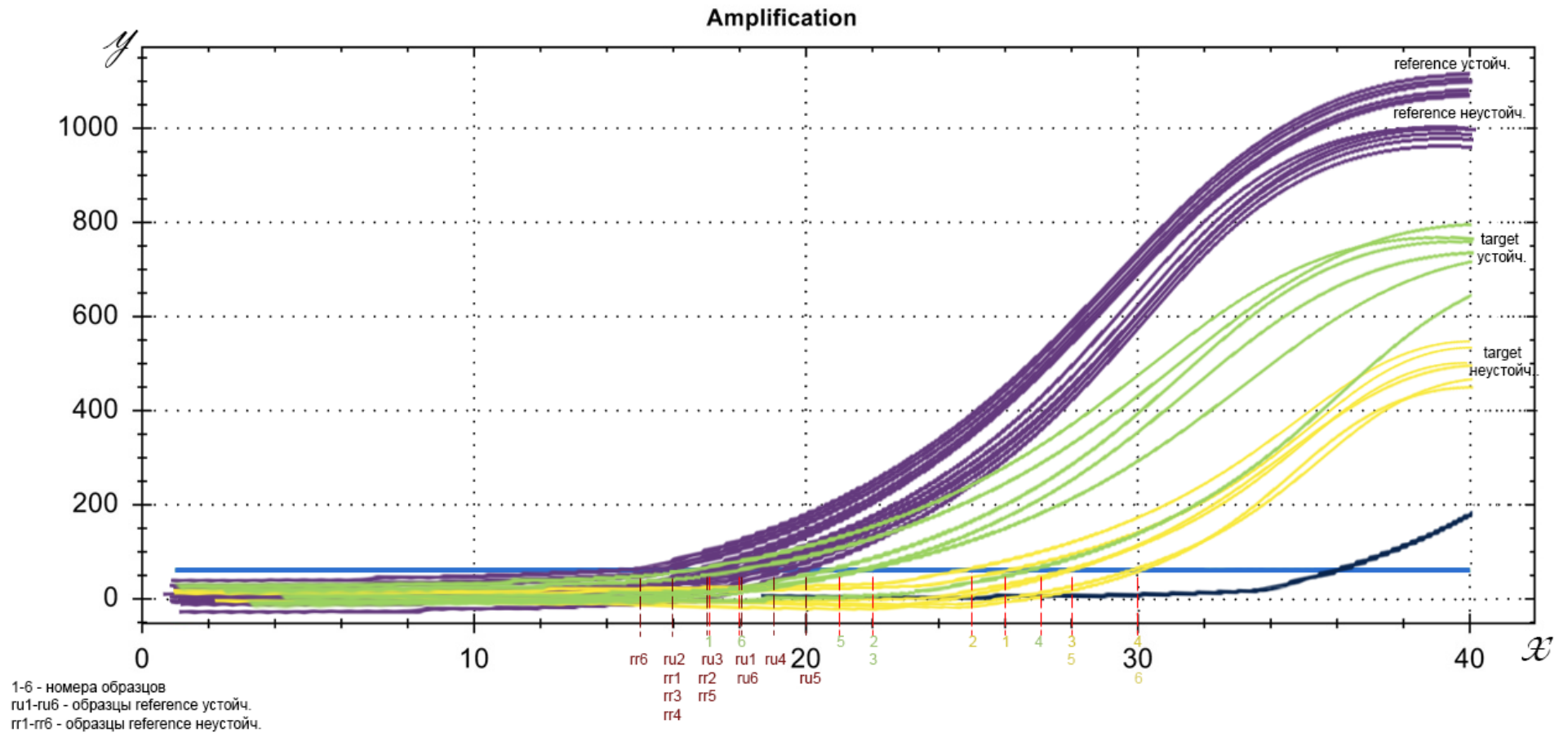
*Ось x: количество пройденных циклов, шт.*

*Ось y: уровень флуоресценции, относительные единицы флуоресценции (о.с.ф. / R.F.U)*

3. Был ли использован контроль? Если да, какого он цвета (фиолетовый, зеленый, желтый, голубой, синий, красный) и что демонстрирует? 0,5 балла

*Да, был. На графике контроль изображен в виде синей кривой. Это отрицательный контроль, который отображает отсутствие экспрессии на протяжении практически всех циклов (не происходит / незначительное увеличение числа копий матриц).*

Результаты амплификации:



4. Рассчитайте, используя  $2^{\Delta C_T}$  метод, экспрессию генов CYP6CY3 у погибших и устойчивых тлей. 4 балла (1 балл за каждый правильно заполненный столбец)

Неустойчивые	$C_T$ CYP6CY3	$C_T$ reference	Формула для вычислений	Итоговое значение экспрессии	
1	26	18	$2^{C_T(\text{reference}) - C_T(\text{target})}$	$2^{-8} = 0,0039$	
2	25	16		$2^{-9} = 0,0020$	
3	28	17		$2^{-11} = 0,0005$	
4	30	19		$2^{-11} = 0,0005$	
5	28	20		$2^{-8} = 0,0039$	
6	30	18		$2^{-12} = 0,0002$	
Устойчивые					
1	17	16		$2^{-1} = 0,5000$	
2	22	17		$2^{-5} = 0,0313$	
3	22	16		$2^{-6} = 0,0156$	
4	27	16		$2^{-11} = 0,0005$	
5	21	17		$2^{-4} = 0,0625$	
6	18	15	$2^{-3} = 0,1250$		

5. Исходя из результатов расчетов дайте ответ, в каком образце наблюдается самый высокий уровень экспрессии. Обоснуйте свой выбор. 2 балла

*Самый высокий уровень экспрессии наблюдается в образце №1. Чем ниже степень, тем выше уровень экспрессии.*

6. Что обозначает голубая линия на графике? 0,5 балла

*Голубая линия на графике – пороговая линия. Отображает уровень флуоресценции, сигнал выше которого можно использовать для определения порогового цикла (Ct) для образца / сигнал ниже которого не учитывается как реальный флуоресцентный сигнал.*

7. Во сколько раз отличается уровень экспрессии генов СУР6СУ3 между устойчивыми и неустойчивыми тлями? Используйте средние значения для расчетов. Ответ запишите в виде целого числа. 2 балла

*В 67 раз.*



### Блок 3

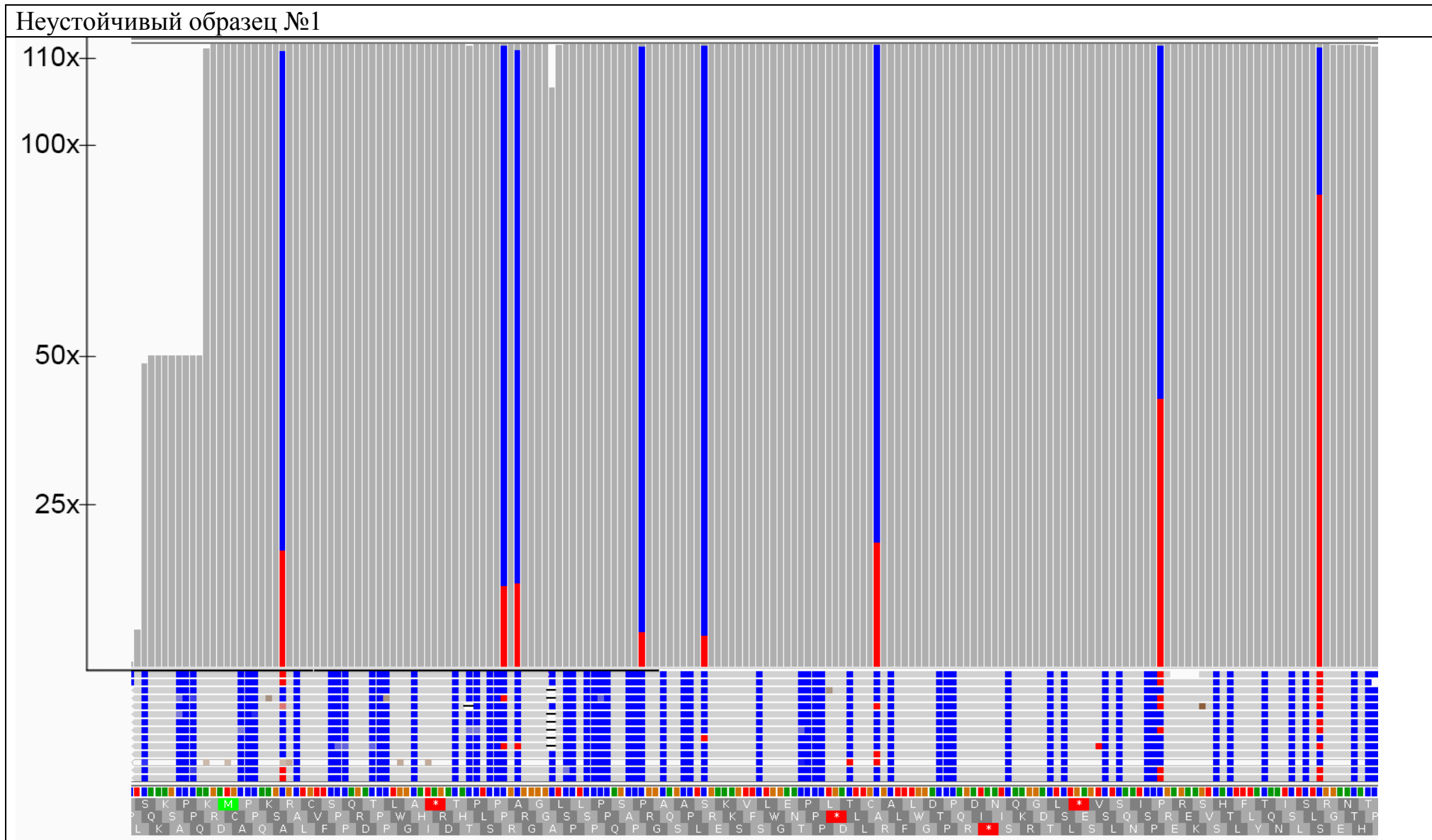
Неудовлетворенный до конца полученными данными, аспирант Вася провел полногеномное секвенирование. Количество секвенированных нуклеотидов составило 1,5Гб (размер генома тли составил приблизительно 300Мб). Аспирант изучил результаты и провел анализ покрытия гена CYP6CY3 прочтениями, чтобы установить количество копий генов CYP6CY3 у тлей.

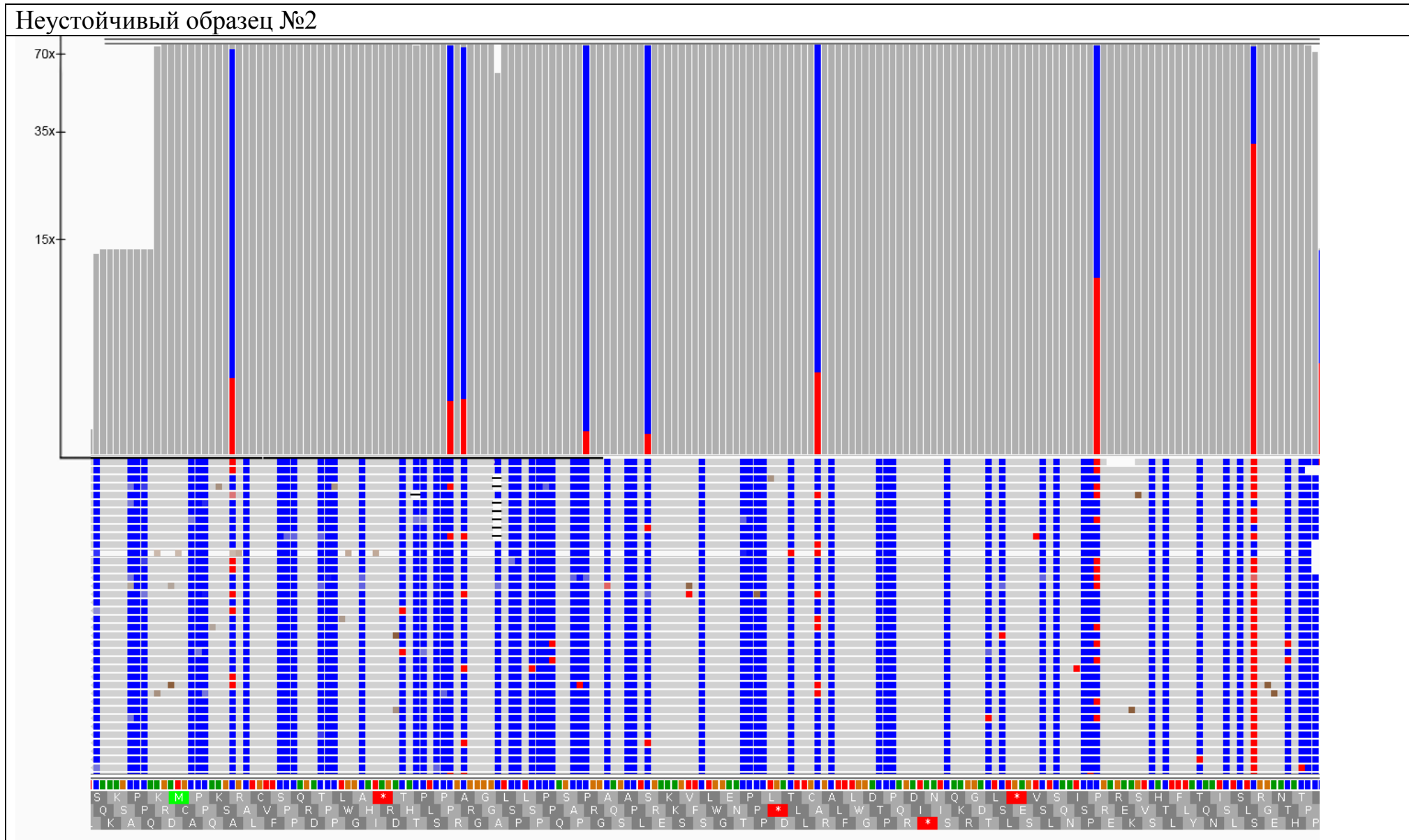
1. Какие из полученных в блоке 2 данных послужили основанием для проведения дополнительного исследования? 1 балл

*В образце под номером 4 уровень экспрессии приблизительно равен таковому у неустойчивых тлей*

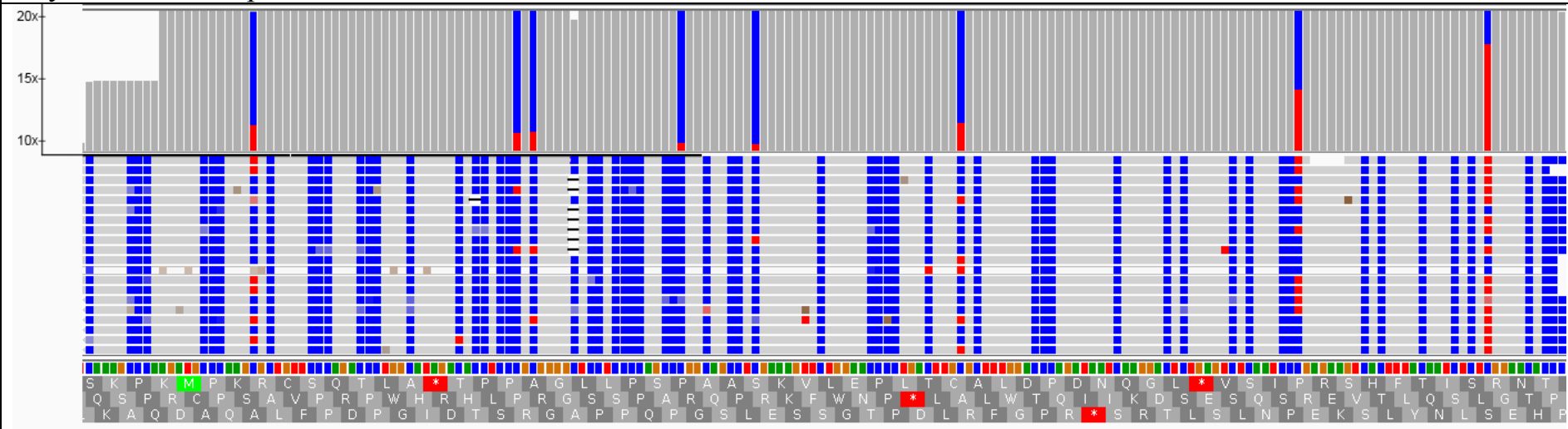
2. Перед вами гистограммы покрытия. Исходя из полученной информации, заполните таблицу. 2 балла

Номер образца	Неустойчивые						Устойчивые					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Количество генов CYP6CY3	22	14	4	1	1	1	2	25	20	1	18	1

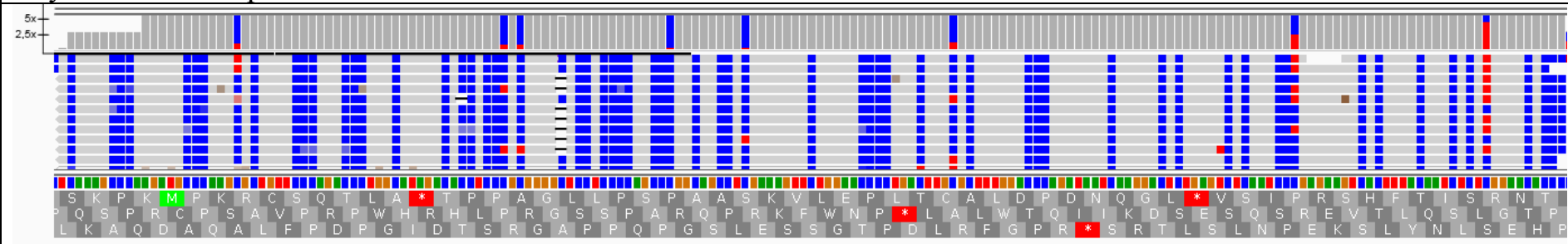




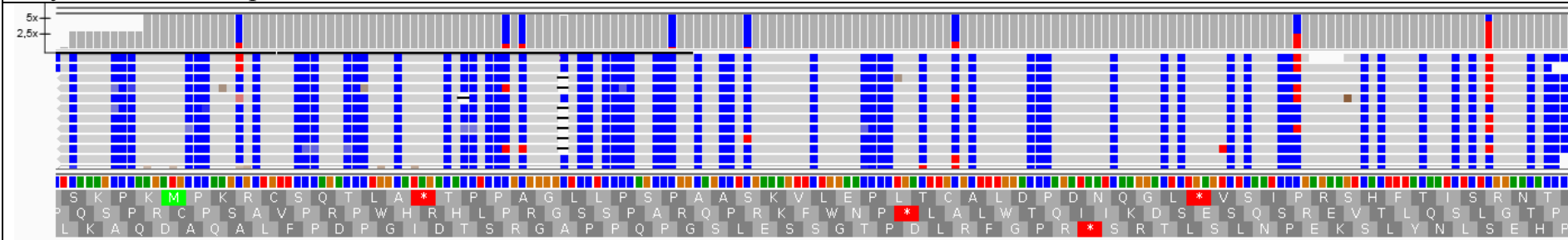
### Неустойчивый образец №3



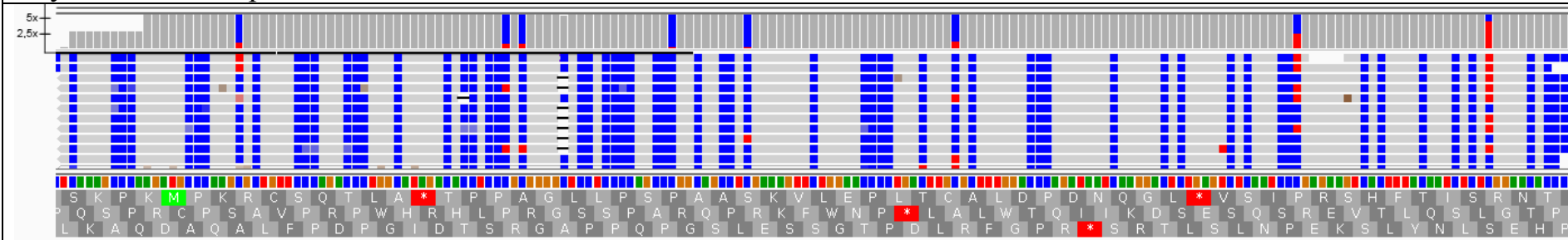
### Неустойчивый образец №4



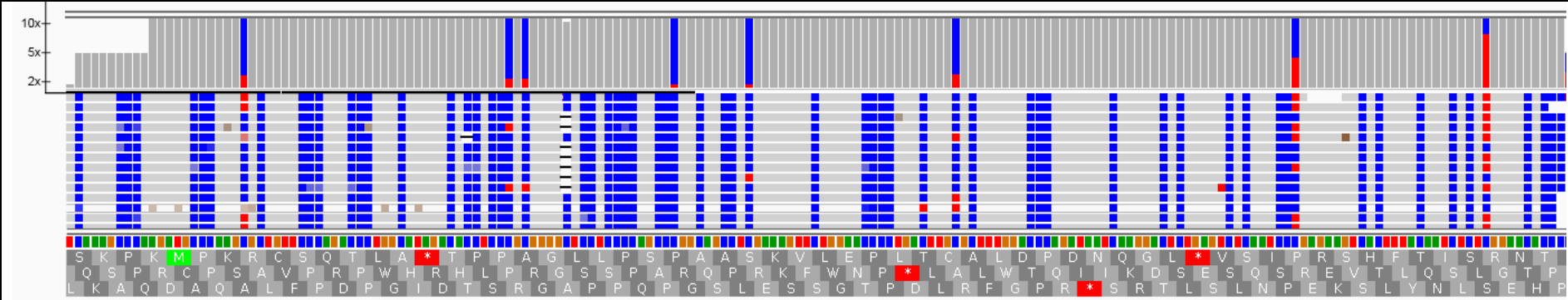
Неустойчивый образец №5

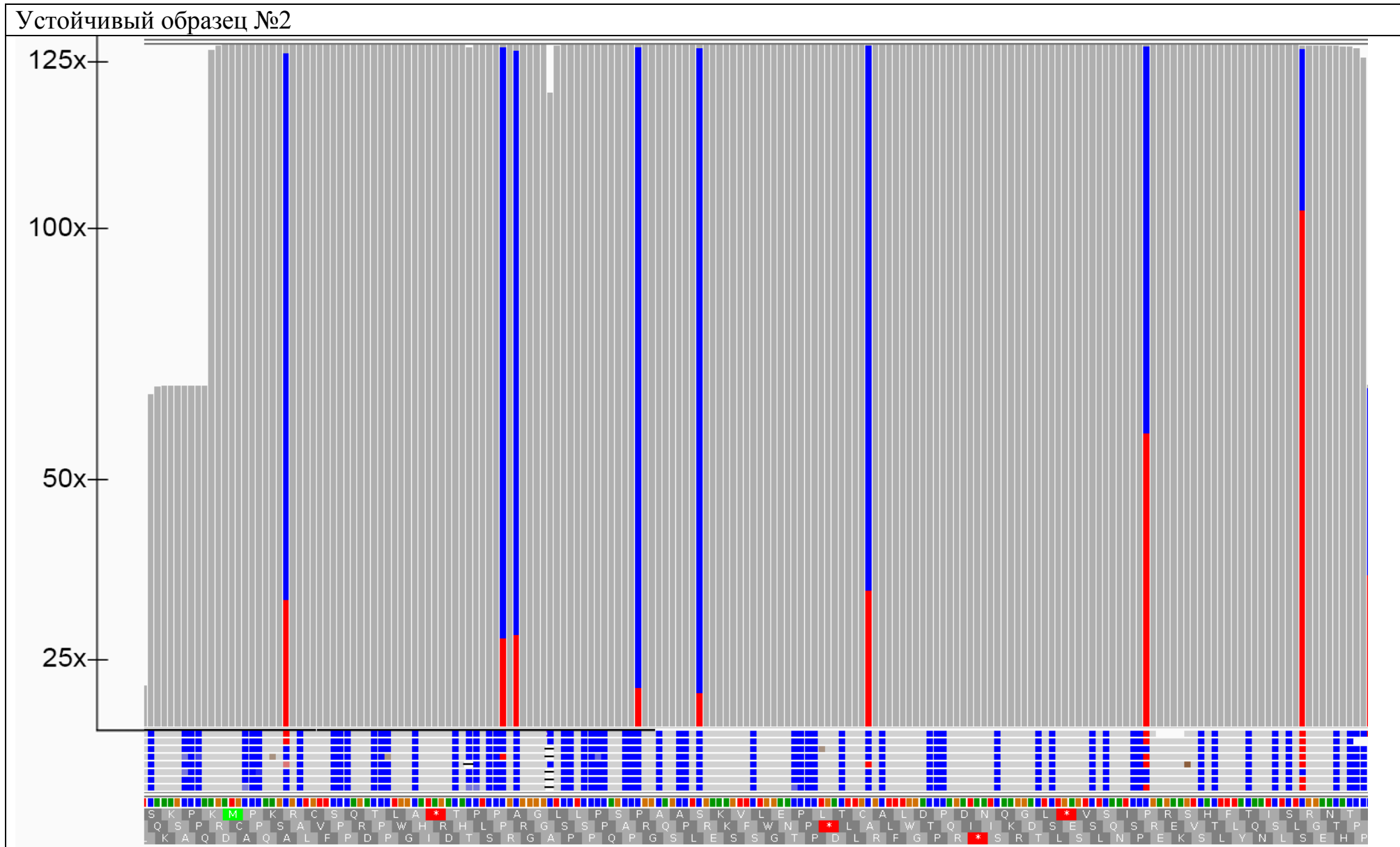


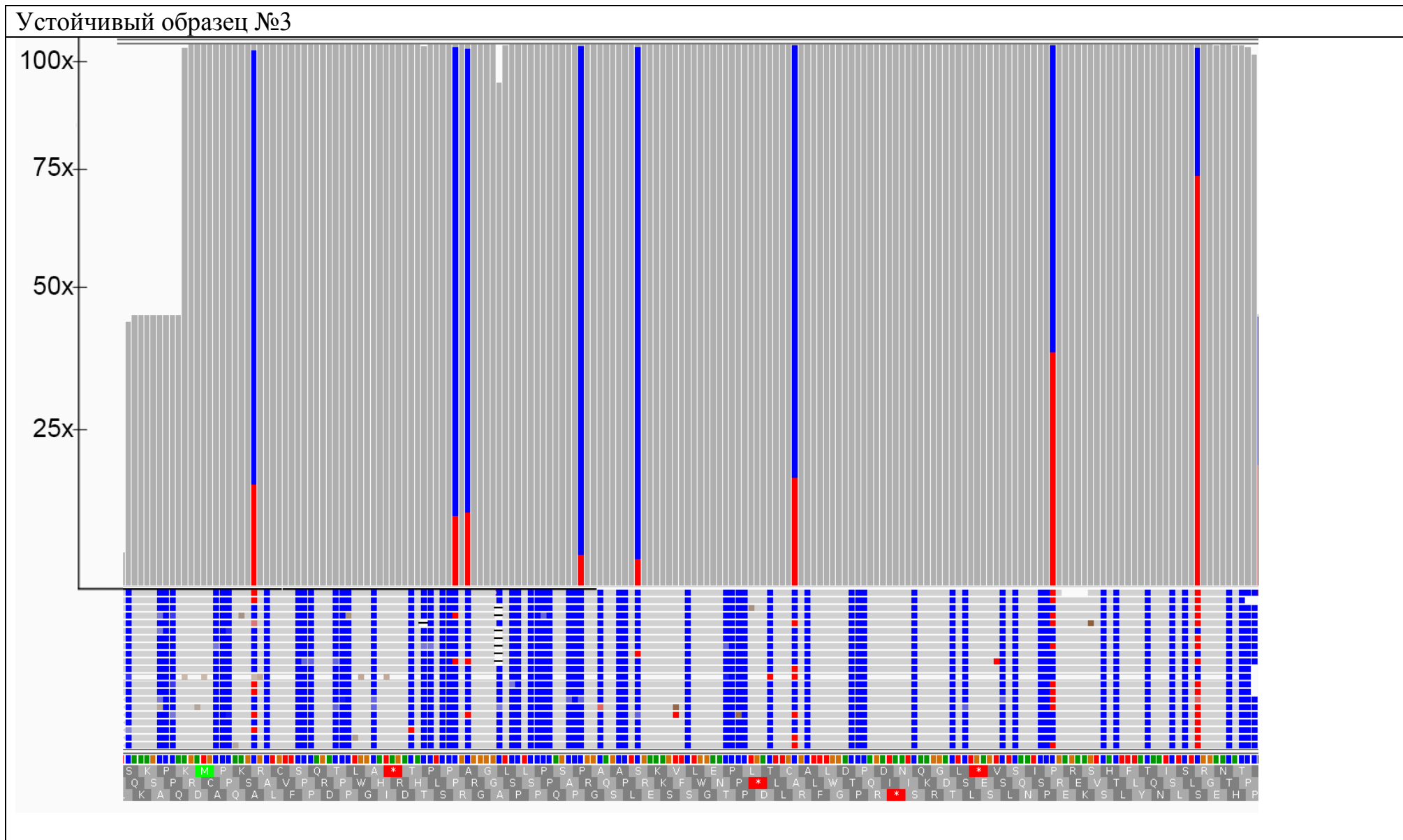
Неустойчивый образец №6



Устойчивый образец №1

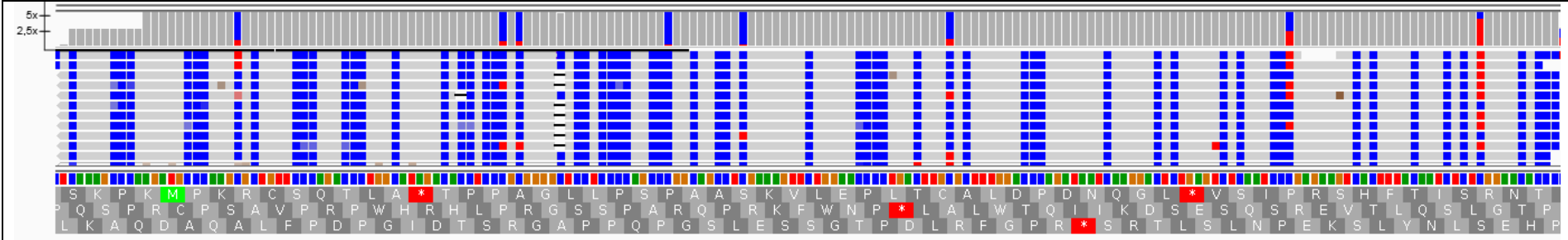


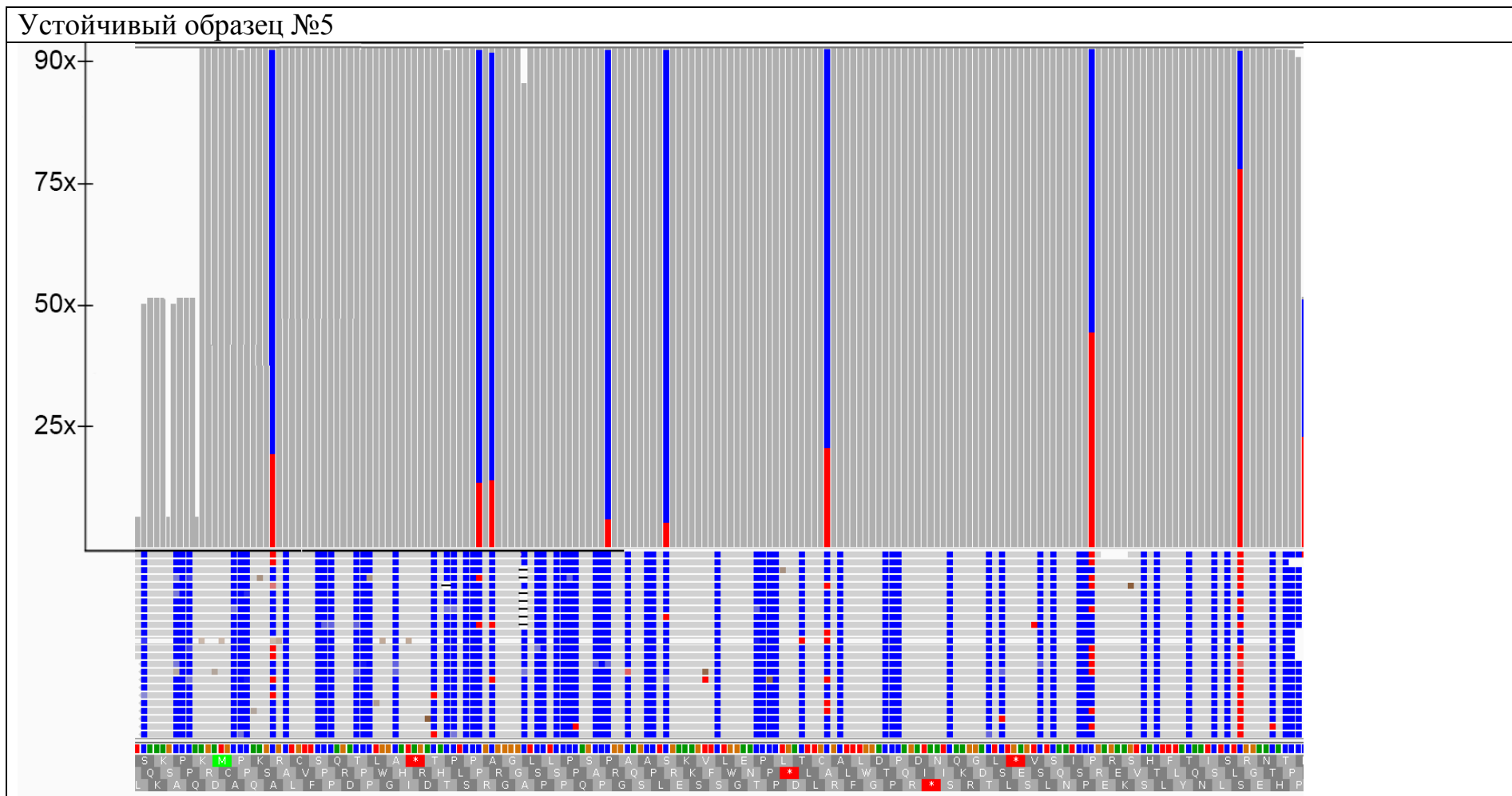


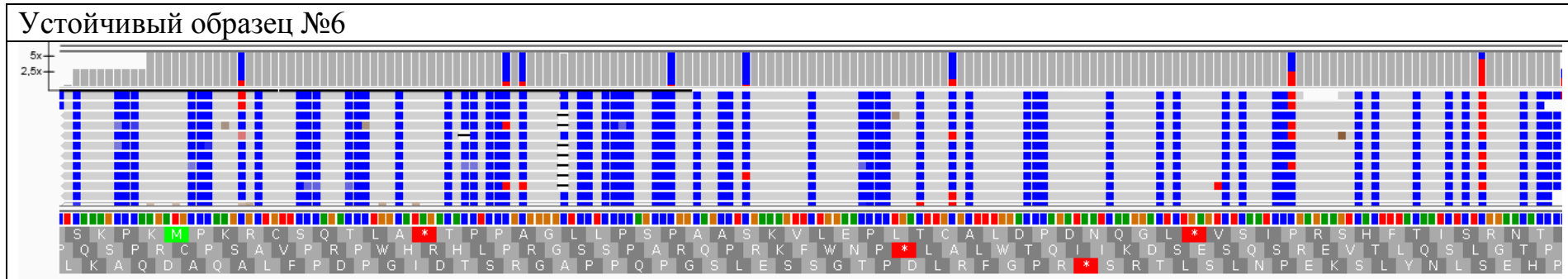




Устойчивый образец №4







3. Если необходимо, проведите расчеты. Какие из устойчивых тлей выжили благодаря количеству генов *CYP6CY3*, а не из-за более активной экспрессии? Обоснуйте свой ответ. 2 балла

*Для корректного сравнения необходимо установить уровень экспрессии в расчете на 1 ген.*

Номер образца	Неустойчивые						Устойчивые					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Уровень экспрессии на 1 ген	0,0002	0,0001	0,0001	0,0005	0,0039	0,0002	0,2500	0,0013	0,0008	0,0005	0,0035	0,1250

*По результатам расчетов уровня экспрессии на 1 ген становится понятно, что повышенный уровень экспрессии характерен для объектов под номерами 1 и 6, при этом данные образцы имеют по 1 и 2 копии гена соответственно. Для устойчивых образцов под номерами 2,3,5 уровень экспрессии в расчете на 1 ген невысокий, и из-за большого количества копий гена можно сделать вывод о том, что именно эти тли устойчивы благодаря многокопийности гена *CYP6CY3*.*

### Блок 4

Все еще недовольный, аспирант Вася изучил дополнительную литературу и нашел информацию о мутации в молекуле мишени – одной из субъединиц никотинацетилхолинового рецептора, благодаря которой тля может приобретать устойчивость к неоникотиноидам.

Перед вами выравнивание нуклеотидных последовательностей участка, в котором локализована искомая мутация. Данный участок представляет собой часть белок-кодирующей последовательности:

1. 1-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGATGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
2. 2-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
3. 3-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
4. 4-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAT
5. 5-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAT
6. 6-unresistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAT
7. 1-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
8. 2-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
9. 3-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
10. 4-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC
11. 5-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGGTTGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAT
12. 6-resistant	TGCAGTTCAGCCATTCCGCTGTTGCCATCATAACTGTTCTCGTGTGGCACCGTCAATTATTTACGAGCGGTCAAAAAAGATGGTGCATTGCAAGTAAAAAAGCCGTAC

		Second base					
		U	C	A	G		
First base	U	UUU } фенилаланин UUC } UUA } лейцин UUG }	UCU } серин UCC } UCA } UCG }	UAU } тирозин UAC } UAA } стоп-кодон UAG } стоп-кодон	UGU } цистеин UGC } UGA } стоп-кодон UGG } триптофан	Third base	U
	C	CUU } лейцин CUC } CUA } CUG }	CCU } пролин CCC } CCA } CCG }	CAU } гистидин CAC } CAA } глутамин CAG }	CGU } аргинин CGC } CGA } CGG }		C
	A	AUU } изолейцин AUC } AUA } метионин AUG } старт-кодон	ACU } треонин ACC } ACA } ACG }	AAU } аспарагин AAC } AAA } лизин AAG }	AGU } серин AGC } AGA } аргинин AGG }		A
	G	GUU } валин GUC } GUA } GUG }	GCU } аланин GCC } GCA } GCG }	GAU } аспарагиновая кислота GAC } GAA } глутаминовая кислота GAG }	GGU } глицин GGC } GGA } GGG }		G

1. В каких образцах есть интересующая нас мутация? 0,5 балла

*В образце 4*

2. Напишите полную классификацию мутации. 1 балл

*Генная, прямая, точечная, миссенс, без сдвига рамки считывания, трансверсия*

3. Опишите механизм возникновения мутации. 1 балл

*Спонтанная апуринизация или индуцирование нитрозогуанидином (НГ), этилметансульфатом или нитрозометилмочевинной.*

4. Какая смена аминокислот наблюдается при этой мутации? Как изменились физико-химические свойства аминокислоты в данном положении? Как это повлияет на взаимодействие с лигандом? 3 балла

*Аргинин меняется на треонин. Произошла замена положительно заряженной аминокислоты на незаряженную. Если это произошло в активном центре, то, вероятно, не будет образовываться связь с лигандом (уменьшается аффинность), если же не в активном центре – нарушается конформация.*

5. Как изменяются физико-химические свойства молекулы? 1 балл

*У молекулы изменяется заряд, следовательно – изоэлектрическая точка, растворимость и др. свойства.*

6. Предположите локализацию трансмембранного домена на данном участке выравнивания, при его наличии (с какого по какой нуклеотид). Как вы определили, что это он? 2 балла

*С 1 по 63 нуклеотид. Трансмембранные домены характеризуются наличием продолжительного ряда неполярных аминокислот.*

**Выводы**

В результате проведенного исследования было установлено, что для данного таксона насекомых характерны различные механизмы приобретения устойчивости к неоникотиноидам: высокая экспрессия гена, количество копий гена, наличие определенной мутации.

1. Заполните таблицу информацией о конкретном механизме формирования устойчивости, установленном в ходе экспериментов: 0,25 балла за каждый правильный ответ

Образец устойчивой тли	Механизм формирования устойчивости
1	<i>высокая экспрессия гена</i>
2	<i>количество копий гена</i>
3	<i>количество копий гена</i>
4	<i>наличие определенной мутации</i>
5	<i>количество копий гена</i>
6	<i>высокая экспрессия гена</i>