

Место для баллов:

Код:

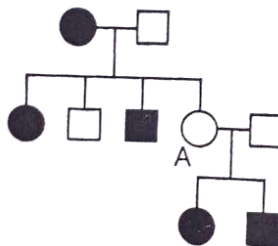
КАБИНЕТ №3
ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
(30 баллов)

Продолжительность выполнения заданий – 1 час 30 минут (90 минут).

Раздел 1. Генетика
(15 баллов)

Задание 1.1

На рисунке ниже приведена родословная по передаче доминантного фенотипа (например, окраски), детерминируемого аутосомным геном.



1.1.1 Что можно сказать на основании родословной об особенностях проявления фенотипа?

Ответ:

(1 балл)

1.1.2 Какие особенности генотипа у организма А?

Ответ:

(1 балл)

Задание 1.2

Цветовод скрестил два сорта колокольчика, один из которых имел синюю окраску цветков, а другой – белую. Все потомство имело голубую окраску цветков. Когда на следующий год цветовод получил F₂ и подсчитал соотношение цветов различной окраски, то был удивлен необычным расщеплением – 7 белых : 6 голубых : 3 синих. Немного подумав, он нашел генетическую причину, почему так произошло.

1.2.1 С каким явлением столкнулся цветовод?

Ответ:

(1 балл)

1.2.2 Какой генотип у растений F1?

Ответ:

(1 балл)

1.2.3 Объясните, как получилось такое расщепление, составив решетку Пеннета.

Ответ (2 балла):

1.2.4 Узнав, как наследуется окраска у данных растений, определите, каким должен быть генотип колокольчика с белыми цветами из F2, если при скрещивании его с голубым колокольчиком из F1 расщепление потомства составляет – 5 белых : 3 голубых.

Ответ:

(1,5 балла)

Задание 1.3

Курицу с розовидным гребнем скрестили с петухом, имеющим листовидный гребень, все потомство получилось с розовидным гребнем. При этом самцов было в два раза больше самок.

При скрещивании двух особей из этого потомства получилось следующее расщепление – 6 петухов с розовидным гребнем : 3 курицы с розовидным гребнем : 2 петуха с листовидным гребнем : 1 курица с листовидным гребнем.

1.3.1 Составьте схему скрещивания и объясните полученные результаты.

Ответ (1,5 балла):

Объяснение (1 балл):

1.3.2 Какое будет расщепление в потомстве курицы из F1 при возвратном скрещивании?

Ответ: _____ **(2 балла)**

--

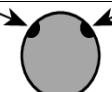
Задание 1.4

У перечисленных ниже людей были взяты для анализа клетки слизистой оболочки ротовой полости.

- А) Женщина с синдромом Дауна
- Б) Женщина с синдромом Шерешевского –Тернера
- В) Мужчина с нормальным кариотипом
- Г) Женщина с синдромом кошачьего крика
- Д) Мужчина с синдромом Клайнфельтера
- Е) Женщина с трисомией по X хромосоме

1.4.1 В левом столбце таблицы изображены ядра клеток слизистой оболочки ротовой полости человека с различным числом телец Барра (тельца Барра указаны стрелками). В правом столбце таблицы, напротив каждого из рисунков впишите выбранные варианты кому из перечисленных ниже людей мог бы соответствовать данный рисунок (выбрать букву из списка).

В случае отсутствия соответствия в списке для какого-то из рисунков – в ячейке таблицы необходимо поставить прочерк. Обратите внимание, что список может быть избыточен, то есть для кого-то из списка может не найтись подходящего варианта рисунка, а для кого-то может оказаться подходящим несколько рисунков.

Рисунок	Буква из списка
	
	
	
	

Раздел 2. Микробиология и биотехнология (15 баллов)

Вы работаете в биотехнологической лаборатории. Перед Вами поставили задачу клонировать ген, кодирующий человеческий интерферон альфа-2b, для получения белкового продукта в клетках бактерий *Escherichia coli* (кишечная палочка). На первом этапе работы Вы нашли нуклеотидную последовательность, кодирующую интерферон альфа-2b в базе данных GenBank (Рисунок 2.1)

```

1 atgtgtgacc taccacaaac ccacagcctg ggtagcagga ggaccttgat gctcctggcg
61 cagatgagga gaatctctct tttctcctgc ttgaaggaca gacatgactt tggatttccc
121 caggaggagt ttggcaacca gttccaaaag gctgaaacca tccctgtcct ccatgagatg
181 atccagcaga tcttcaacct cttcagcaca aaagactcat ctgctgcttg ggtgagagacc
241 ctccctagaca aattctacac tgaactctac cagcagctga atgacctgga agcctgtgtg
301 atacagggggg tgggggtgac agagactccc ctgatgaagg aggactccat tctggctgtg
361 aggaaataact tccaaagaat cactctctat ctgaaagaga agaaatacac cccttgtgcc
421 tgggaggttg tcagagcaga aatcatgaga tctttttctt tgtcaacaaa cttgcaagaa
481 agtttaagat ctaaagagta atga
    
```

Рисунок 2.1 – Нуклеотидная последовательность интерферона альфа-2b в базе данных GenBank

2.1 Определите длину кодируемого данной последовательностью белка.

Ответ:

(2 балла)

Вы знаете, что для более эффективной экспрессии человеческого гена в клетках бактерий *E. coli*, его нуклеотидную последовательность необходимо оптимизировать, потому что триплеты, кодирующие одни и те же аминокислоты, в геномах разных организмов встречаются с разной частотой. Зная, что критичными для экспрессии генов являются редко встречающиеся в геноме *E. coli* синонимичные триплеты, кодирующие аминокислоту аргинин, Вам необходимо произвести замену в гене кодонов, соответствующих этой аминокислоте, воспользовавшись таблицей генетического кода и таблицей частот использования кодонов для оптимальной экспрессии в клетках *E. coli*, представленными ниже.

Таблица генетического кода

		Вторая позиция кодона					
		U	C	A	G		
Первая позиция кодона	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	U	C
	C	CUU } лейцин CUC } CUA } CUG }	CCU } пролин CCC } CCA } CCG }	CAU } гистидин CAC } CAA } CAG }	CGU } аргинин CGC } CGA } CGG }	C	A
	A	AUU } изолейцин AUC } AUA } AUG } метионин старт-кодон	ACU } треонин ACC } ACA } ACG }	AAU } аспарагин AAC } AAA } лизин AAG }	AGU } серин AGC } AGA } аргинин AGG }	A	G
	G	GUU } валин GUC } GUA } GUG }	GCU } аланин GCC } GCA } GCG }	GAU } аспарагино- вая кислота GAC } GAA } глутамино- вая кислота GAG }	GGU } глицин GGC } GGA } GGG }	G	G

Таблица частот использования кодонов для оптимальной экспрессии гена
в клетках *E. coli*

Амино-кислота	Кодон	Частота	Амино-кислота	Кодон	Частота
Ala	GCA	0.28	Leu	CTT	0.05
Ala	GCC	0.07	Leu	TTA	0.03
Ala	GCG	0.21	Leu	TTG	0.02
Ala	GCT	0.45	Lys	AAA	0.81
Arg	AGA	0.02	Lys	AAG	0.19
(Arg)	AGG	0	Met	ATG	1
(Arg)	CGA	0	Phe	TTC	0.79
Arg	CGC	0.24	Phe	TTT	0.21
(Arg)	CGG	0.01	Pro	CCA	0.08
Arg	CGT	0.73	(Pro)	CCC	0.01
Asn	AAC	0.91	Pro	CCG	0.82
Asn	AAT	0.09	Pro	CCT	0.08
Asp	GAC	0.72	Ser	AGC	0.15
Asp	GAT	0.28	(Ser)	AGT	0.01
Cys	TGC	0.8	Ser	TCA	0.02
Cys	TGT	0.2	Ser	TCC	0.39
Gln	CAA	0.14	Ser	TCG	0.04
Gln	CAG	0.86	Ser	TCT	0.39
Glu	GAA	0.83	Stop	TAA	0.83
Glu	GAG	0.17	Stop	TAG	0.17
(Gly)	GGA	0	Stop	TGA	0
Gly	GGC	0.5	Thr	ACA	0.02
(Gly)	GGG	0.01	Thr	ACC	0.56
Gly	GGT	0.48	Thr	ACG	0.05
His	CAC	0.83	Thr	ACT	0.36
His	CAT	0.17	Trp	TGG	1
Ile	ATA	0.02	Tyr	TAC	0.8
Ile	ATC	0.86	Tyr	TAT	0.2
Ile	ATT	0.12	Val	GTA	0.21
(Leu)	CTA	0.01	Val	GTC	0.07
Leu	CTC	0.06	Val	GTG	0.15
Leu	CTG	0.83	Val	GTT	0.57

Примечания: обозначения аминокислот: **Ala** – аланин, **Arg** – аргинин, **Asn** – аспарагин, **Asp** – аспарагиновая кислота, **Cys** – цистеин, **Gln** – глутамин, **Glu** – глутаминовая кислота, **Gly** – глицин, **His** -гистидин, **Ile** - изолейцин, **Leu** – лейцин, **Lys** – лизин, **Met** – метионин, **Phe** – фенилаланин, **Pro** – пролин, **Ser** – серин, **Thr** – треонин, **Trp** – триптофан, **Tyr** – тирозин, **Val** – валин, **Stop** – стоп-кодон. Частота означает процент встречаемости синонимичных кодонов, кодирующих аминокислоты в высокоэкспрессируемых белках *E. coli*, выраженный в долях.

2.2 Сколько остатков аргинина в человеческом интерфероне альфа-2b?

Ответ:

(2 балла)

2.3 Сколько редких для бактерий *E. coli* триплетов, кодирующих аргинин, необходимо заменить для оптимизации гена?

Ответ:

(2 балла)

2.4 Запишите найденные Вами в гене редкие для бактерий *E. coli* триплеты, кодирующие аргинин.

Ответ:

(2 балла)

2.5 Сколько штук каждого из найденных Вами редких для бактерий *E. coli* триплетов, кодирующих аргинин, Вы нашли?

Ответ:

(2 балла)

Вы разработали концевые праймеры, с помощью которых ввели в последовательность гена сайты узнавания рестриктаз HindIII и EcoRI. Вы провели полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и получили нужный Вам фрагмент ДНК. Обработали фрагмент рестриктазами, теми же рестриктазами обработали плазмиду (вектор) pET-32b, в которую планируете встроить ген. Ниже представлена карта плазмиды (Рисунок 2.2).

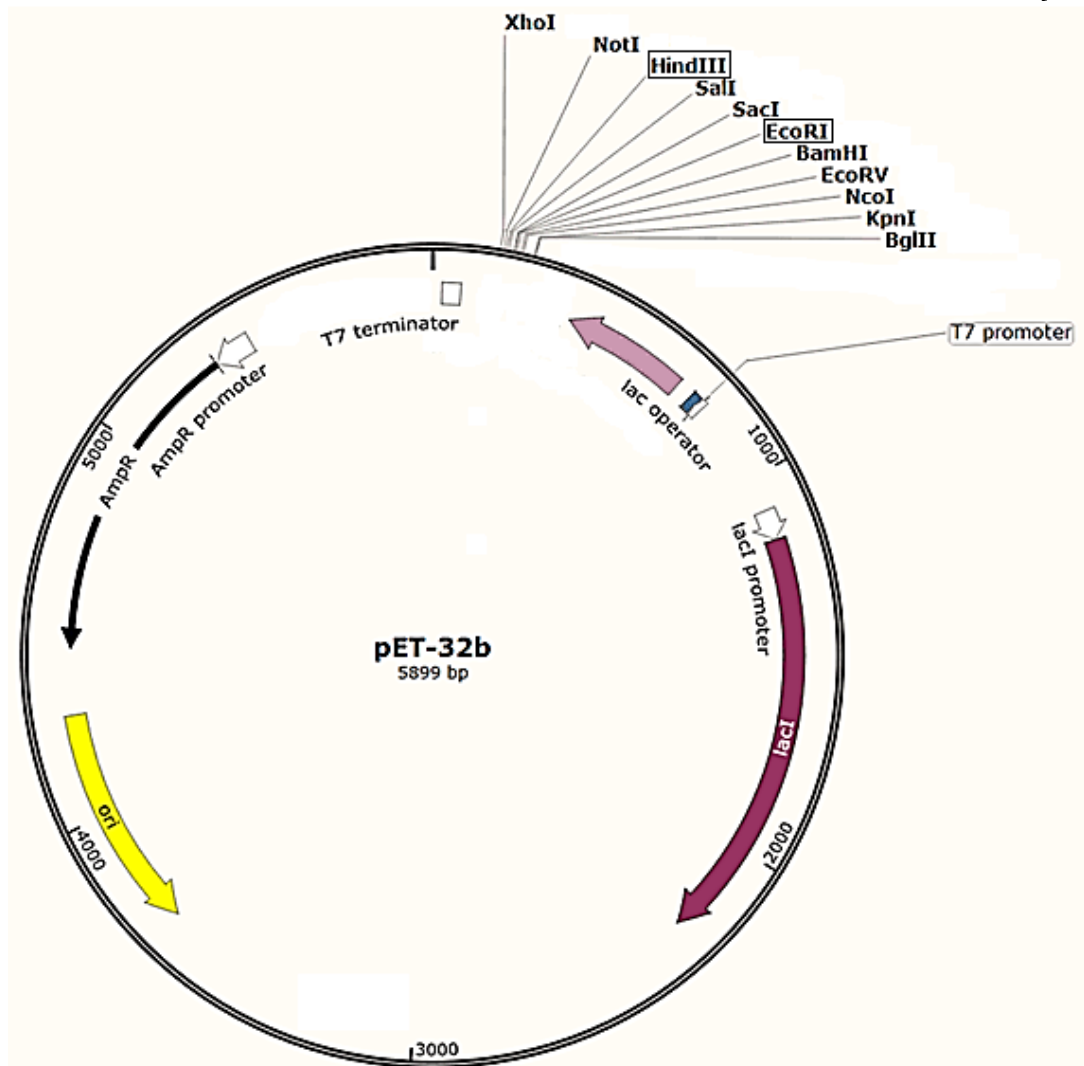
2.6 Изучите карту плазмиды и укажите, на какие концы гена, кодирующего человеческий интерферон альфа-2b, Вы внесли сайты узнавания рестриктаз с помощью концевых праймеров.

Ответ:

(2 балла)

на 5'- конце гена ввели сайт узнавания рестриктазы

на 3'- конце гена ввели сайт узнавания рестриктазы



lacI – последовательность, кодирующая белок-репрессор промоторно-операторной области со своим промотором, **lac operator** (lac оператор)/**T7promoter** (T7 промотор) – гибридная промоторно-операторная область, **T7terminator** (T7 терминатор) – терминаторная область, **AmpR** – последовательность, отвечающая за устойчивость к антибиотику ампициллину со своим промотором, **ori** – точка начала репликации плазмиды

Рисунок 2.2 – Карта вектора pET-32b для экспрессии гена, кодирующего человеческий интерферон альфа-2b в клетках бактерий *E. coli*

Вы провели после рестрикции лигирование (сшивание с помощью фермента лигазы) гена и плазмиды, после чего лигазной смесью обработали (трансформировали) клетки бактерий *E. coli*, в которых в дальнейшем планируете получать человеческий интерферон альфа-2b (белок будет синтезироваться и накапливаться внутри клеток бактерий). Схема получения бактерий-продуцентов белка показана на рисунке 2.3.

Ознакомьтесь с краткой методикой проведения кальциевой трансформации бактерий.

Жидкую культуру бактерий со значением оптической плотности 0,3–0,4 (кюветы с длиной оптического пути 1 см) охлаждают на ледяной бане, центрифугируют, надосадок сливают, а клетки ресуспендируют в охлажденном растворе хлорида кальция, чтобы перевести клетки в состояние компетентности.

Затем к суспензии клеток в растворе хлорида кальция добавляют лигазную смесь и через некоторое время проводят тепловой шок (резко нагревают суспензию до 42 °С и снова охлаждают на ледяной бане). После этого к суспензии клеток добавляют полноценную жидкую питательную среду и выдерживают 1 час при оптимальной для бактерий температуре, затем высевают 0,1 мл бактериальной культуры с помощью микробиологического шпателя на селективную агаризованную питательную среду в чашке Петри, содержащую антибиотик. Если трансформация прошла удачно, через сутки роста бактерий на селективной питательной среде при оптимальной температуре появятся изолированные колонии.

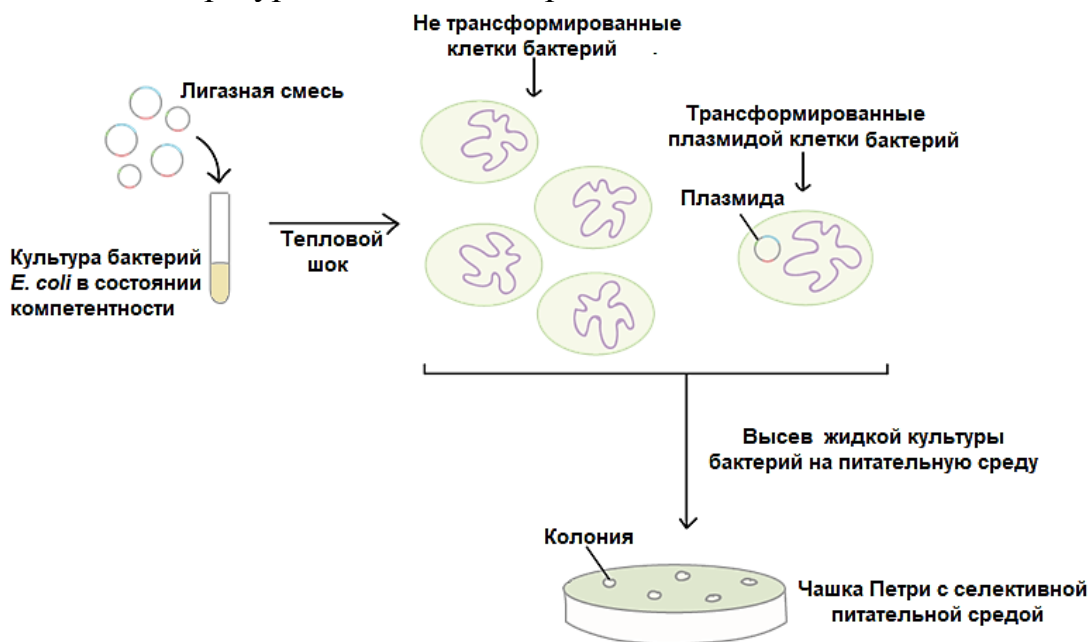


Рисунок 2.3 – Схема трансформации клеток бактерий *E. coli* лигазной смесью с целью получения бактерий-продуцентов рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b

2.7 Назовите оптимальную для роста бактерий *E. coli* температуру культивирования.

Ответ:

(0,5 балла)

2.8 Какое вещество в Вашем эксперименте с трансформацией бактерий *E. coli* необходимо добавить в агаризованную полноценную питательную среду, чтобы она стала селективной и на ней появились изолированные колонии?

Ответ:

(1 балл)

2.9 Почему именно это вещество Вам следует добавить в агаризованную полноценную питательную среду для создания селективных условий роста бактерий?

Ответ:

(1,5 балла)