

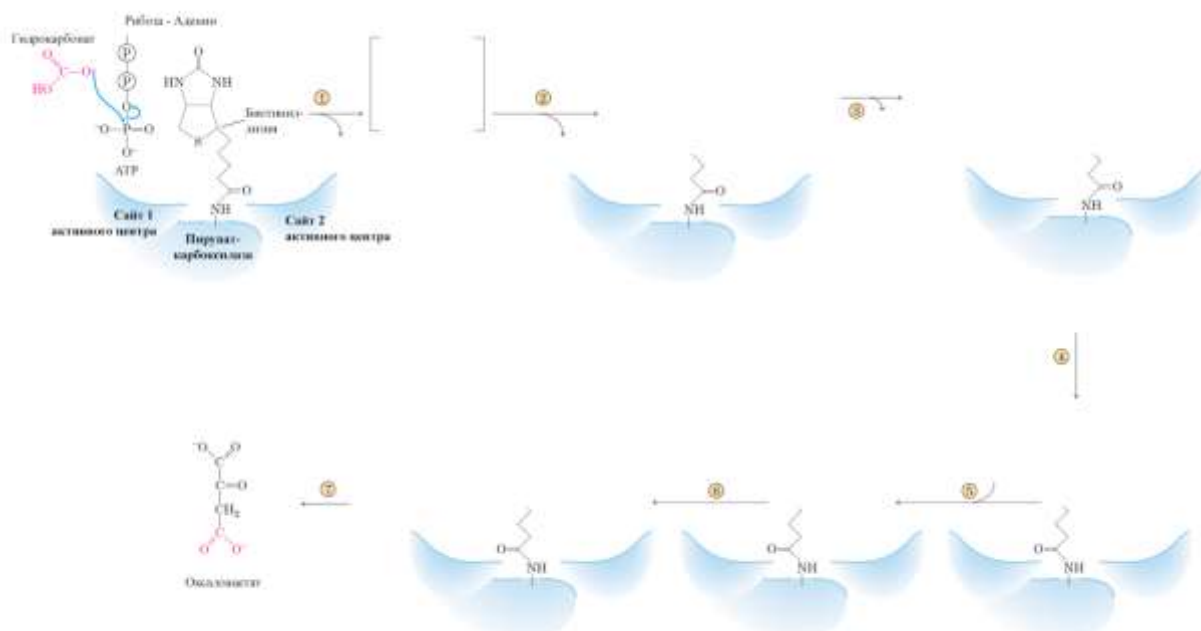
Всероссийская олимпиада студентов «Я – профессионал»

Критерии оценивания ответов на задания заключительного этапа
по направлению «Биобезопасность, биоинженерия и биоинформатика»

Категория участия: «Бакалавриат»
(для поступающих в магистратуру)

Задача 1. Пируваткарбоксилаза (20 баллов)

Молекула биотина играет важную роль в реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой. Известно, что биотин присоединен через амидную связь к ε-аминогруппе остатка лизина в активном центре с образованием биотинил-лизина. На рисунке приведена схема, иллюстрирующая механизм реакции карбоксилирования пирувата.



- Дополните схему механизма реакции карбоксилирования пирувата недостающими структурами. Стрелочками укажите направления переноса электронной плотности (как на схеме в верхней левой части). Укажите молекулы и/или ионы, которые образуются в результате реакций (1, 2, 3, 5) или являются их субстратами.
- Сопоставьте стадии каталитического процесса (цифры 1 – 7 в кружочках) с описаниями происходящих реакций.

Описание стадии каталитического процесса	Стадия
А. Активация бикарбоната АТФ с образованием карбоксифосфата	
Б. Взаимодействие пирувата с углекислым газом с образованием оксалоацетата	
В. Взаимодействие углекислого газа с биотином с образованием карбоксибиотина	

Г. Декарбоксилирование биотина, превращение пирувата в енольную форму	
Д. Карбоксифосфат расщепляется с образованием углекислого газа	
Е. Освобождение оксалоацетата	
Ж. Перенос биотином углекислого газа от одного активного центра к другому	

3. Определите верны или неверны суждения. Для каждого из них аргументируйте свой выбор.

А. Биотин является витамином Н

Б. Биотин является простетической группой пируваткарбоксилазы

В. Биотин и авидин широко используют в биотехнологии для выделения и очистки белков.

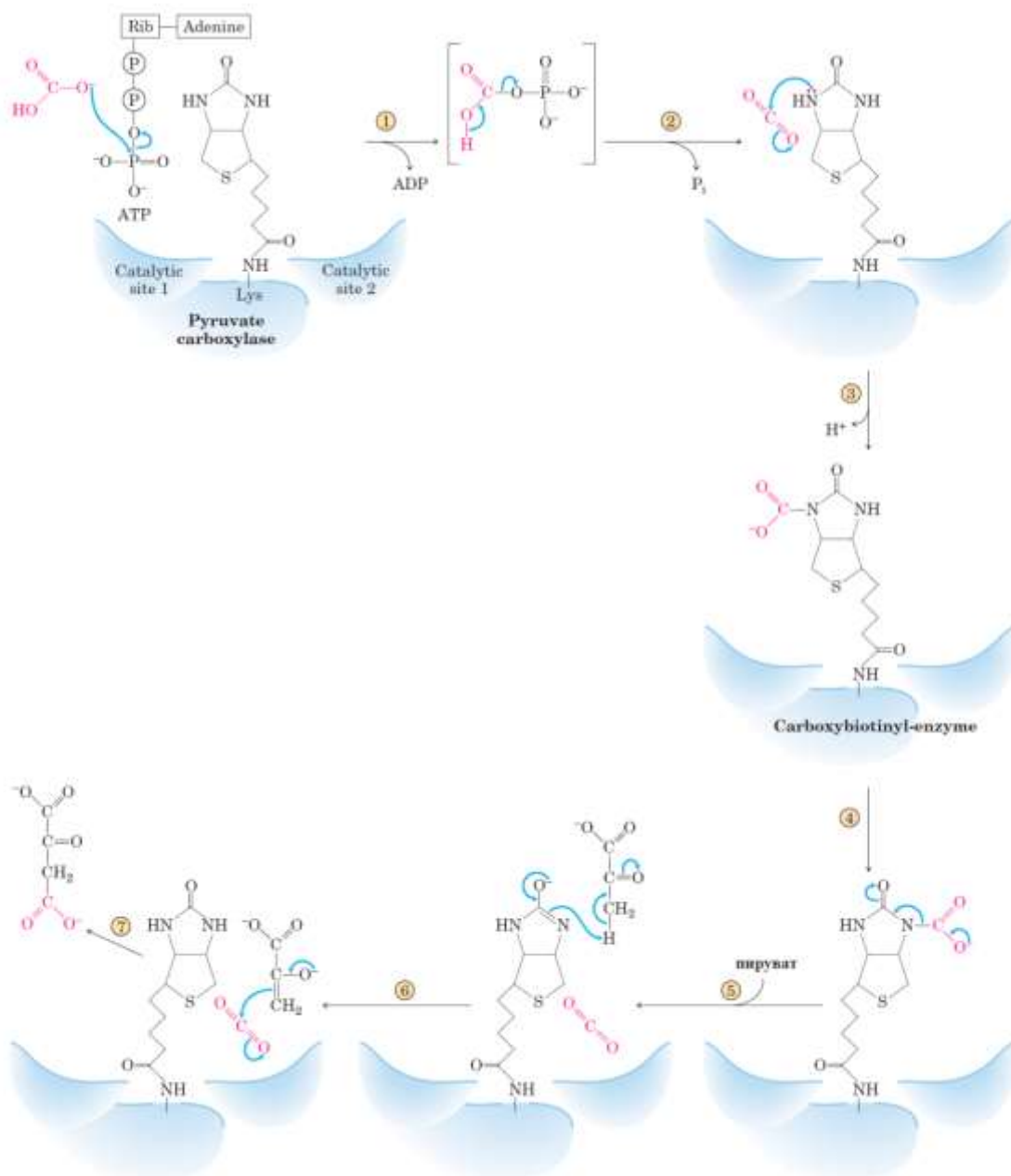
Г. В реакции карбоксилирования пирувата переносчиком CO_2 вместо биотина может принимать участие S-аденозилметионин и тетрагидрофолат.

Д. Пируваткарбоксилаза является частью пируватдегидрогеназного комплекса.

Е. Карбоксилирование пирувата является анаплеротической реакцией цикла Кребса.

Критерии оценивания:

1. Дополнена схема механизма реакции карбоксилирования пирувата недостающими структурами (см. рисунок). Указаны направления переноса электронной плотности (6 баллов). Указаны молекулы и/или ионы, которые образуются в результате реакций (1, 2, 3, 5) или являются их субстратами (4 балла).



2. Правильно сопоставлены стадии каталитического процесса с описаниями происходящих реакций. (7 баллов)

Описание стадии каталитического процесса	Стадия
Активация бикарбоната АТФ с образованием карбоксифосфата	1

Взаимодействие пирувата с углекислым газом с образованием оксалоацетата	6
Взаимодействие углекислого газа с биотином с образованием карбоксибиотина	3
Декарбоксилирование биотина, превращение пирувата в енольную форму	5
Карбоксифосфат расцепляется с образованием углекислого газа	2
Освобождение оксалоацетата	7
Перенос биотином углекислого газа от одного активного центра к другому	4

3. Выбраны правильные и неправильные суждения (3 балла)

- А. Биотин является витамином Н (**верно**)
- Б. Биотин является простетической группой пируваткарбоксилазы (**верно**)
- В. Биотин и авидин широко используют в биотехнологии для выделения и очистки белков (**верно**)
- Г. В реакции карбоксилирования пирувата переносчиком CO_2 вместо биотина может принимать участие S-аденозилметионин и тетрагидрофолат. (**не верно**)
- Д. Пируваткарбоксилаза является частью пируватдегидрогеназного комплекса (**не верно**)
- Е. Карбоксилирование пирувата является анаплеротической реакцией цикла Кребса (**верно**)

Задача 2. ПЦР (20 баллов)

ПЦР (полимеразная цепная реакция) – это метод, позволяющий амплифицировать специфические фрагменты ДНК. В ходе ПЦР используют ДНК-полимеразы, производящие синтез новых цепей ДНК на основе содержащихся в растворе матричных ДНК; исходя из свойств данного метода, после проведения каждого следующего цикла реакции количество ДНК увеличивается в 2 раза по сравнению с предыдущим циклом (при условии 100% эффективности реакции).

Для амплификации фрагмента ДНК длиной 300 пар оснований провели 50 циклов ПЦР, использовали праймеры длиной 20 пар оснований, в качестве матрицы использовали 100 молекул двуцепочечной геномной ДНК человека. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала эквимольную смесь дНТФ с общей концентрацией 400 нМ, праймеры в концентрации 100 нМ каждого, а также другие компоненты (Taq-ДНК-полимераза, MgCl_2 , KCl и др.) в оптимальных концентрациях.

1. Предполагая, что содержание $\text{A}=\text{T}=\text{G}=\text{C}$ в заданном фрагменте ДНК, вычислите, какой из субстратов ПЦР (праймеры или дНТФ) закончится первым.

2. Вычислите, сколько молекул специфического фрагмента ДНК образовалось в данной реакции.
3. Вычислите массу данного фрагмента ДНК в нг, если принять массу одной пары нуклеотидов равной 660 г/моль.
4. Будет ли видна полоса, соответствующая данному фрагменту, на агарозном геле, если известно, что при окраске бромистым этидием хорошо визуализируется более 50-100 нг?

Критерии оценивания:

1. Проведены вычисления (за округление $2^{10}=10^3$ балл не снижали)
 $n(\text{dNTP}) = 400 \cdot 10^{-9} \cdot 20 \cdot 10^{-6} = 8 \cdot 10^{-12}$ моль дНТФ
 $n(\text{праймеров}) = 200 \cdot 10^{-9} \cdot 20 \cdot 10^{-6} = 4 \cdot 10^{-12}$ моль праймеров
 Для синтеза одной молекулы ДНК длиной 300 пар нуклеотидов необходимо 2 молекулы праймеров и $(300-20) \cdot 2 = 560$ молекул дНТФ. Соотношение числа молекул праймеров и дНТФ, расходуемых в реакции составляет 2:560 -> 1:280. По условиям реакции реакционная смесь содержала эквимольные количества дНТФ и праймеров, тогда праймеры в избытке, дНТФ в недостатке **(8 баллов)**
 Также можно было вычислить, что дНТФ закончатся примерно на 27 цикле.
2. Произведен расчет числа молекул специфического фрагмента.
 Предполагая, что дНТФ израсходуются полностью, имеющегося в реакционной смеси количества молекул достаточно для синтеза $(8 \cdot 10^{-12} / 560) = 1.43 \cdot 10^{-14}$ моль ДНК или $1.43 \cdot 10^{-14} \cdot 6,02 \cdot 10^{23} = 8,6 \cdot 10^9$ молекул ДНК **(5 баллов)**
3. Рассчитана масса фрагмента ДНК $m(\text{DNA}) = 1.43 \cdot 10^{-14} \cdot 660 \cdot 300 = 2.83 \cdot 10^{-9}$ г или около 3 нг **(5 баллов)**
4. Полоса не будет видна на агарозном геле при окрашивании EtBr ($3 < 100$ нг) **(2 балла)**.

Задача 3. Редкий вид (20 баллов)

В лесах Небуландии на острове Фишляндия проживает птица Андода Краснохвостая, которая питается личинками жуков двух видов. Личинки одного из этих видов обитают в почве и для того, чтобы их эффективно извлекать, нужно иметь короткий и широкий, мощный “роющий” клюв. Личинки другого вида развиваются в коре деревьев, и наиболее эффективно их извлекают птицы с длинным и узким клювом. При этом личинки жуков, живущих в почве, мимикрируют под личинки третьего вида жуков, которые ядовиты для Андод. Птицы, особенно молодые, плохо отличают ядовитые и безвредные личинки, поэтому иногда гибнут от отравления. В среднем, особи с коротким клювом доживают до половозрелости на 25% реже, чем особи с длинным клювом, потому что гибнут от отравлений. В других аспектах (по питательной ценности, численности и т. д.) различия между древесными и почвенными личинками минимальны.

Форма клюва у Андод определяется двумя аллелями, А и а. Гомозиготы АА имеют короткий клюв, аа – длинный, а гетерозиготы Аа – усреднённую форму

клюва, которая не подходит ни для рытья почвы, ни для извлечения личинок из коры — около половины таких особей погибает, не оставляя потомства. При этом особи с генотипом АА имеют синее оперение, Аа — серое, а аа — бледно-серого цвета. Впрочем, окраска перьев на выживаемость Андод никак не влияла, по крайней мере, до появления на острове человека.

Однажды, на остров Фишляндия явились люди. В это время, в популяции Андод было приблизительно равное число птиц с длинным и коротким клювом. Люди отметили, что синие Андоды очень красивые, и начали отлов этих птиц. Вскоре, численность длинноклювых Андод стала в разы больше, чем короткоклювых. После этого международные организации ввели мораторий на отлов Андод, но было уже поздно...

1. Как наследуется форма клюва у Андод?
2. Как называется ситуация, при которой один генетический вариант А влияет сразу на два признака, например, форму клюва и цвет оперения?
3. Что будет происходить с оставшимися Андодами со временем? Как изменится численность особей с коротким и длинным клювом? Ответ поясните.
4. Как менялась бы численность коротко- и длинноклювых Андод, если бы вмешательства человека не произошло? Ответ поясните.
5. Как менялась бы численность Андод, если бы люди проводили отлов длинноклювых животных? Ответ поясните.
6. Изменится ли ответ, если бы смертность от отравлений оставляла не 25% , а 5%? Подтвердите расчетами.

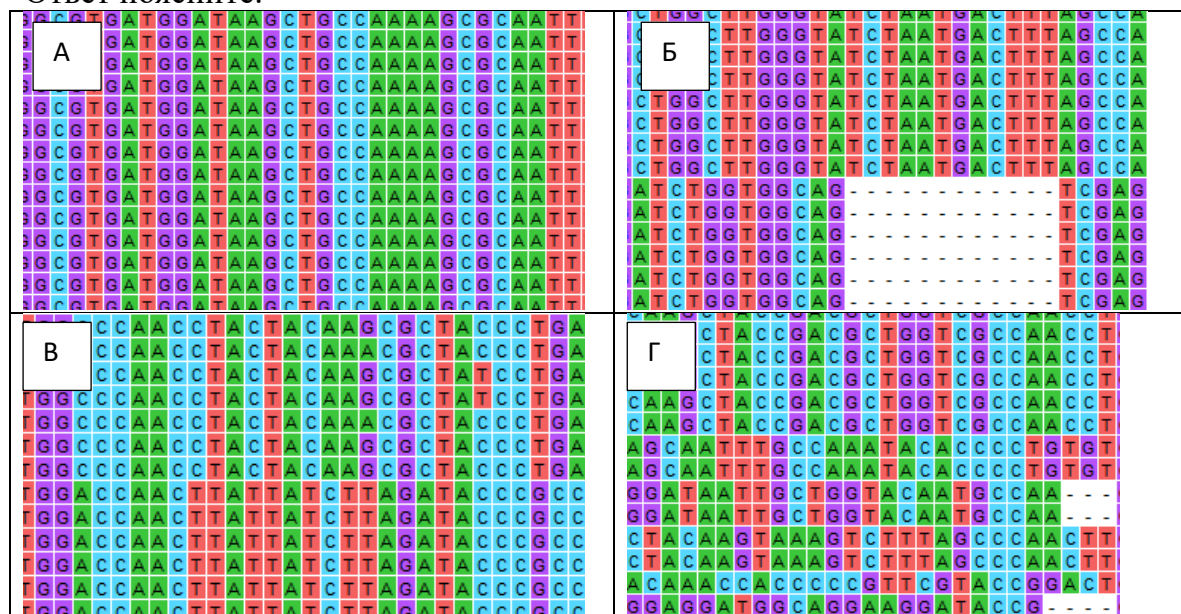
Критерии оценивания:

1. Указан ответ: неполное доминирование (1 балл)
2. Указан ответ: плейотропия (1 балл)
3. Указание на то, что численность короткоклювых со временем будет снижаться (1 балл)
Приведены рассуждения о том, что АА гибнут на 25%, поэтому восстановить численность не смогут (1 балл);
Приведены расчеты и рассуждения о том, что гетерозиготы Аа гибнут в 50% случаев, что вместе с гибелью АА ведет к снижению численности короткоклювых. (1 балл)
4. Поскольку идет отбор, то популяция не находится в равновесии по Харди-Вайнбергу. Все ответы, где есть указание на равновесие Харди получают 0 баллов.
Остальное аналогично п.3. (3 балла)
5. Указание, на то, что доля короткоклювых со временем будет расти. (1 балл)
Рассуждение о том, что отлов уравнивает естественный отбор короткоклювых. (2 балла)
Расчеты при полном отлове длинноклювых (2 балла)
Рассуждение об общем снижении численности популяции (1 балл)
6. По п. 3. – нет
По п.4. – уменьшение численности будет происходить медленнее
По п.5 – если предположить, что убрали всех длинноклювых, то нет или ускорится фиксация короткоклювых (6 баллов)

Задача 4. Колистин (20 баллов)

Колистин – антибиотик, который является антибиотиком «последнего резерва», то есть антибиотиком, который применяют в случае, если ко всем другим антибиотикам инфекционный агент проявляет устойчивость. Несмотря на то, что колистин был обнаружен очень давно, из-за своей токсичности он не применялся в лечении инфекционных заболеваний человека. Однако, широко применялся в сельскохозяйственной практике. В связи с этим бактерии все-таки имеют гены устойчивости к колистину, хотя еще и не так сильно распространенные.

1. Действие колистина связано с его взаимодействием с LPS. В некоторых бактериальных клетках случаются мутации, которые приводят к модификации LPS и, таким образом, колистин не связывается с клеточной мембраной и, соответственно, бактерии приобретают устойчивость к колистину. Из приведенного списка выберите гены, модификация которых наиболее вероятно приведет к возникновению устойчивости:
 - фосфотаноламин-липид А трансфераза
 - уридин-5-дифосфат глюкурозилтрансфераза
 - Фосфоглюконатдегидрогеназа
 - Фенилаланин-4-монооксигеназа
2. В некоторых бактериях ген, кодирующий фермент, обеспечивающий резистентность к колистину, переносится в плазмиду и таким образом, становится геном mcr (Mobile colistin resistance). На данный момент уже известно 9 типов данного гена у разных бактерий. Перед вами участки выравнивания нуклеотидных последовательностей. Ваша задача: разработать тест-систему для выявления данных генов у бактерий с помощью ПЦР. Какой из участков вы выберете для дизайна праймеров. Ответ поясните.



3. В случае если результат положительный, то вам потребуется определить, какой из генов представлен. Какой участок вы выберете для дизайна праймеров в этом случае? Ответ поясните.

4. В разработанную вами тест-систему дополнительно вводится зонд, для возможности фиксации результатов в реальном времени. В качестве контрольного образца вы используете плазмиду с геном *msc*. При использовании плазмиды с известной концентрацией вы получили следующие значения:

Well	Fluor	Target Content	Sample	Cq	SQ (пг)
D01	SYBR	Std-1	8,87	1,000E+06	
D02	SYBR	Std-2	12,43	1,000E+05	
D03	SYBR	Std-3	15,11	1,000E+04	
D04	SYBR	Std-4	17,52	1,000E+03	
D05	SYBR	Std-5	19,78	1,000E+02	

Постройте калибровочную кривую (зависимость порогового цикла от логарифма концентрации)

5. Вы тестируете образцы сточных вод с птицефабрик. Полученные результаты представлены в таблице. Какие выводы вы можете сделать?

E02	SYBR	Unkn	13,53	2,839E+04
E05	SYBR	Unkn	20,37	8,120E+01
F02	SYBR	Unkn	34,26	5,559E-04
F03	SYBR	Unkn	32,32	2,935E-03
F04	SYBR	Unkn	32,34	2,875E-03

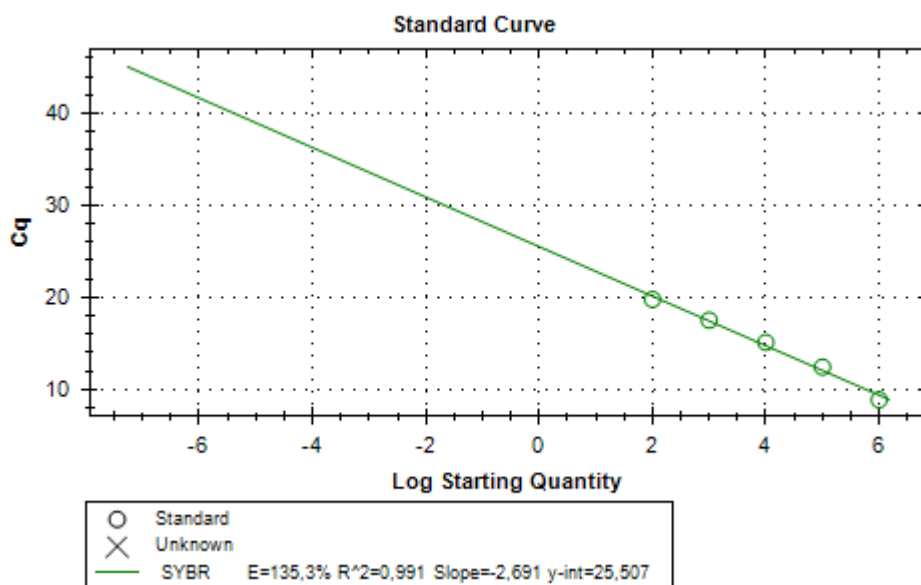
Критерии оценивания:

- Из приведенного списка выберите гены, модификация которых наиболее вероятно приведет к возникновению устойчивости:
 - фосфоэтанолламин-липид А трансфераза (**верно**)
 - уридин-5-дифосфат глюкурозилтрансфераза (**неверно**)
 - Фосфоглюконатдегидрогеназа (**неверно**)
 - Фенилаланин-4-монооксигеназа (**неверно**)

(4 балла)

За каждый дополнительный неправильный ответ снимается 2 балла.
(минимальное количество баллов за этот пункт - 0 баллов)

- А – меньше всего возможных вариантов. **(4 балла)**
При наличии только правильной буквы - 2 балла. За каждую дополнительную букву вычитается 2 балла (минимальное количество баллов за этот пункт - 0 баллов). При наличии правильного объяснения, но неправильной буквы, ставится 0 баллов. За грубые биологические ошибки в объяснении могли снять от 1 до 2 баллов.
- Г – больше всего вариантов **(4 балла)** см. п. 2.
- График должен получиться примерно таким **(4 балла)**



За правильный график зависимости десятичного логарифма концентрации от порогового цикла (вне зависимости, построен он на листе для построений или в бланке ответов) ставится 4 балла. Баллы снимались за:

- Перепутанные/неправильно подписанные оси
- Отсутствие значений на осях
- Неправильно построенный график (значения в неправильном порядке и т.д.)
- Если после соединения точек не было обнаружено линейной зависимости
- Неадекватные интервалы между значениями на оси

5. В образцах F нет ДНК *msc* (4 балла). За развернутый ответ (правильный вывод с пояснениями о наличии/отсутствии гена в одних пробах относительно других, конкретное указание номеров проб) ставится 4 балла. За наличие вывода об использовании колистина на птицефабриках давали +1 балл (максимальное количество баллов - 4). За грубые биологические ошибки, отсутствие указаний на конкретные пробы и неумение читать задание могли снять от 1 до 3 баллов.

Задача 5. Дигибридное скрещивание (20 баллов)

Ген F определяет окраску венчика цветка (F-красная, f- белая), а ген T определяет окраску семенной кожуры (T – желтые семена, t- зеленые семена). В результате скрещивания двух дигетерозиготных по этим генам растений наблюдается следующее расщепление среди потомков.

Родители	Красные цветки/желтые семена (<i>FfTt</i>) × Красные цветки/желтые семена (<i>FfTt</i>)			
Фенотипы F ₁	Красные цветы / желтые семена	Белые цветы / желтые семена	Красные цветы / зеленые семена	Белые цветы / зеленые семена
Частота потомков F ₁	0,54	0,21	0,21	0,04

1. О каком из вариантов (независимом или сцепленном наследовании генов F и T) свидетельствует подобное расщепление? Обоснуйте свой ответ. Какую статистику следует использовать, чтобы опровергнуть нулевую гипотезу?
2. На основании расщепления определите генетическую дистанцию между генами F и T? Свой ответ подтвердите расчетами.
3. Установите какие из фенотипических классов потомков F1 будут заключать в себя несколько разных классов генотипов. Предложите схему скрещивания для получения родительских растений из чистых линий.

Критерии оценивания:

1. Указание на сцепленное наследование генов F и T **(1 балл)**,
Обоснование: поскольку приведены частоты потомков не соответствующие расщеплению 9:3:3:1, то можно говорить о сцепленном наследовании. **(2 балла)**
Поскольку даны именно частоты, а не количество потомков, то можно полагать что проведена серия экспериментов и частоты представляют именно генеральную совокупность. Утверждение, что частоты различаются от расщепления 9:3:3:1 незначительно не является верным, поскольку силу различий с помощью критерия Хи-квадрат можно зафиксировать лишь при наличии количеств потомков, но не частот. **(1 балл)**
2. Указание трех возможных вариантов скрещиваний ((1)две цис-дигетерозиготы FT//ft, (2)две транс-дигетерозиготы Ft//fT и (3)цис-дигетерозигота с транс-дигетерозиготой FT//ft × Ft//fT) **(3 балла)**
Расчет частоты аллеля A для каждого из трех вариантов **(3 балла)**, строился на анализе частоты рецессивных дигомозигот. Если принять частоту кроссинговера между генами за 2d то частота гаметы ft может составить d (в случае если родитель транс-дигетерозигота) или 0,5-d (в случае если родитель цис-дигетерозигота).
Соответственно, для трех различных моделей получаем три уравнения: (1) $(0,5-d)^2=0,04$, (2) $d^2=0,04$, (3) $d(0,5-d)=0,04$.
Решая получаем: (1) $d=0,3$, (2) $d=0,2$, (3) $d=0,1$.
Проверка на адекватность модели и расчет расщепления в F1 для каждого из варианта **(6 баллов)**. Вариант (1) должен быть отброшен, в силу того что частота кроссинговера не может превысить 50%, для вариантов (2) и (3) можно рассчитать распределение по классам и сравнить с исходной таблицей. Для примера рассчитаем класс ffT-. Для (2) $0,5(0,5-d)+d(0,5-d)=0,5^2-d^2=0,25-0,04=0,21$. Для (3): $0,5d+(0,5-d)^2=0,05+0,16=0,21$. Указание, на два верных варианта ответа $q(A)=0,2$ (скрещивание транс-транс) и $q(A)=0,4$ (скрещивание транс- цис)
3. Указание фенотипических классов, указание генотипов, которые входят в них **(2 балла)**
Указание генотипов родителей для обеих ситуаций (транс-транс скрещивание и цис-транс скрещивание) **(2 балла)**