

**ЗАДАНИЯ**  
**практического тура заключительного этапа**  
**XXXIV Всероссийской олимпиады школьников по биологии.**  
**2017-2018 уч. год, 11 класс**  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, ГЕНЕТИКА И ЭВОЛЮЦИЯ**  
*Максимум 40 баллов, время выполнения задания 50 минут*

**Межвидовая гибридизация** – один из механизмов видообразования эукариот. При этом полиплоидия характерна для многих групп животных и растений, в том числе позвоночных, однако не была обнаружена у млекопитающих. Для обнаружения случаев межвидовой гибридизации и полиплоидизации не обязательно секвенировать геномы, в полевых условиях гибридов можно находить при помощи амплификации видоспецифичной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле.

Вам нужно провести электрофорез в агарозном геле продуктов ПЦР с использованием ДНК трех известных видов животных: А, В и С, и животного Х, которое предположительно является межвидовым гибридом, а также ответить на вопросы, связанные с методами гель-электрофореза и ПЦР и биологией межвидовых гибридов и полиплоидных организмов.

**Тщательно следуйте инструкции по подготовке образцов к электрофорезу, приведенной ниже! Заполненный образцами гель передайте преподавателю для проведения электрофореза, в обмен Вы получите фотографию готового геля с теми же образцами. Качество Вашего геля будет оценивать преподаватель.**

**Все ответы пишите на Листе Ответов!**

**Инструкция по подготовке образцов к электрофорезу**

Уважаемый участник, на Вашем рабочем месте находится штатив с микропробирками, содержащими результаты ПЦР с видоспецифическими праймерами известных видов животных А, В, С и анализируемого вида Х, микропробирка с четырёхкратным окрашенным буфером для нанесения ДНК в гель (обозначена буквой Б), и микропробирка с окрашенным маркером молекулярных масс ДНК (обозначена буквой М). Кроме этого, Вам выданы чашка Петри, содержащая пронумерованный фрагмент агарозного геля, штатив с наконечниками для автоматической пипетки и автоматическая пипетка.

Выставленный рабочий объём пипетки виден в индикаторном окошке в верхней части пипетки и может изменяться от 2,0 до 20,0 микролитров. Рукоятка поршня пипетки имеет три положения: 1) ожидание (максимально выдвинута, в это положение пипетка переходит сама после того как Вы перестанете давить на рукоятку), 2) первый упор – набор/слив заданного рабочего значения (в первый упор пипетка переходит, если рукоятку аккуратно нажать пальцем), 3) второй упор – полный слив – выдувание объема, немного большего, чем заданный рабочий объём. Для того, что бы отмерить и перенести с помощью пипетки рабочий объём жидкости, выставьте этот объём регуляторным колёсиком, наденьте наконечник, нажмите рукоятку до первого упора, удерживая рукоятку в этом положении, погрузите кончик наконечника в отбираемую жидкость, отпустите рукоятку до положения ожидания. Рабочий объём жидкость войдёт в наконечник. Поместите кончик наконечника туда, куда вы хотите перенести жидкость, нажмите рукоятку до первого упора и удерживайте ее, пока жидкость не выйдет из наконечника. Поднимите пипетку так, чтобы кончик наконечника оказался в воздухе, отпустите рукоятку – в наконечник войдет воздух. Если отпустить рукоятку, не отрывая кончик наконечника от капли жидкости, жидкость снова войдет в наконечник. Этот приём можно использовать для перемешивания жидкости (так называемое пипетирование).

Напишите номер Вашего геля на Листе ответов в графе «Рабочее место (гель)». Возьмите пипетку в руку. Выставьте пипетку на рабочий объем 2 микролитра, вращая свободной рукой регуляторное колесико с резьбой в верхней части пипетки. Наденьте на пипетку наконечник, возьмите микропробирку с буфером для нанесения ДНК в гель, и нанесите на дно чашки Петри четыре капли буфера для нанесения, по 2 микролитра каждая, на расстоянии примерно 1 см друг от друга. Сбросьте наконечник из-под буфера в крышку от чашки Петри (мусорная зона).

Переведите пипетку на рабочий объем 6 микролитров, наденьте новый наконечник, отберите 6 микролитров окрашенного маркера молекулярных масс и внесите этот объём в первую лунку Вашего

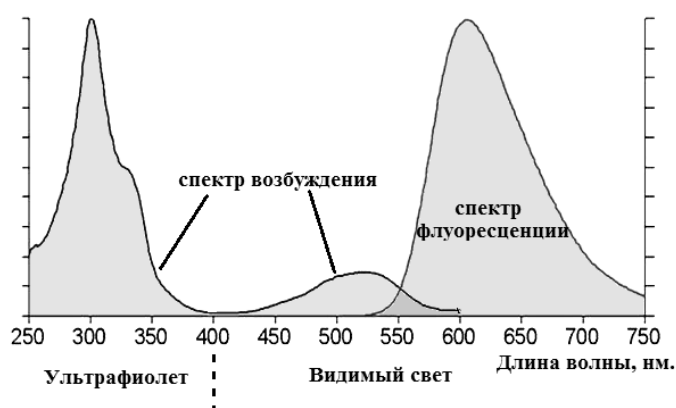
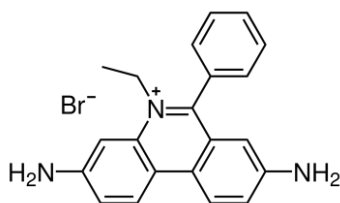
геля (верхняя левая, направление движения ДНК в геле сверху вниз). Сбросьте наконечник из-под маркера в крышку от чашки Петри.

Наденьте новый наконечник, отберите 6 микролитров реакционной смеси ПЦР образца А, добавьте в первую каплю буфера для нанесения, перемешайте жидкости, пипетируя их 4-5 раз до первого упора, переведите пипетку на рабочий объем 8 микролитров, осторожно вылейте реакционную смесь А вместе с буфером для нанесения во вторую лунку Вашего геля. Сбросьте наконечник из-под образца А в крышку от чашки Петри.

Повторите описанную выше процедуру для образца В (вторая капля, вносится в третью лунку), С (третья капля, в четвертую лунку) и Х (четвертая капля, в пятую лунку). Готовый гель отдайте преподавателю, получите у него фото геля после электрофореза. Переходите к теоретическим заданиям.

### Пояснения по поводу метода детекции ДНК в геле бромистым этидием

Рассмотрите формулу и спектры возбуждения и флуоресценции ДНК-связывающего красителя бромистого этидия, которым обычно окрашивают гели для визуализации результатов электрофореза. Как вы считаете, с какими химическими группами в ДНК связывается этидий и каков механизм стабилизации комплексов ДНК-этидий? Свет каких «цветов» подходит для проявки окрашенных этидием гелей?



### Пояснения по поводу метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является по сути искусственной репликаций определенной последовательности ДНК *in vitro*. В отличие от обычной репликации для проведения ПЦР не нужны природные РНК-затравки (праймеры), а используются заранее химически синтезированные ДНК-олигонуклеотиды, которые определяют границы реплицируемой последовательности. Обычно используется два таких олигонуклеотида-праймера, называемые «прямой» и «обратный», для репликации одной и другой нитей ДНК соответственно. Для денатурации двойной спирали используется нагрев до 95<sup>0</sup>С. Это влияет на выбор ферментов для репликации – белки обычных организмов в этих условиях денатурировали бы, поэтому используются белки термофильных архей и зубактерий. Оптимальная температура для обычно используемой при ПЦР Taq-полимеразы составляет 72<sup>0</sup>С. Ещё одна температура, используемая в трёхшаговом цикле ПЦР, зависит от температуры диссоциации праймеров от матрицы ДНК и обычно составляет 55-60<sup>0</sup>С. В ходе одного цикла ПЦР последовательно происходит денатурация двойной спирали, связывание праймеров с матрицей (отжиг), и достройка новых нитей ДНК. Затем три этих шага повторяют (происходит следующий цикл), по итогам 30-40 циклов количество амплифицируемой ДНК в реакционной смеси возрастает на несколько порядков. Кроме праймеров и ферментов репликации в реакционной смеси должны находиться 5'-нуклеозидтрифосфаты для синтеза ДНК, буферизующие рН соли и соли катионов, стабилизирующих двунитевую структуру ДНК-матрица/праймер.

Шифр	Номер геля	Сумма баллов
------	------------	--------------

## ЛИСТ ОТВЕТОВ

### Задание 1. Электрофорез. 13 баллов.

Электрофорез  (оценивается преподавателем, максимум 6 баллов)

Укажите стрелкой направление движения ДНК в форезной камере (1б.)

Катод	Анод
-------	------

Этидий связывается с молекулой ДНК \_\_\_\_\_ (1 б.)

Исходя из спектров возбуждения и флуоресценции бромистого этидия, для проявки ДНК, окрашенной этидием, необходим источник света с длиной волны в \_\_\_\_\_, либо \_\_\_\_\_ части спектра (2 б.)

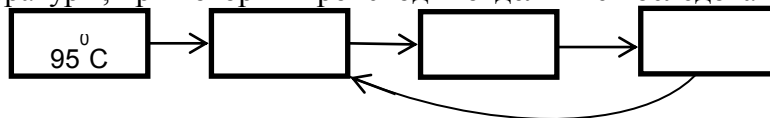
Размер ПЦР-продукта вида А составляет примерно \_\_\_\_\_ п.н. (1 б.)

Размер ПЦР-продукта вида В составляет примерно \_\_\_\_\_ п.н. (1 б.)

Размер ПЦР-продукта вида С составляет примерно \_\_\_\_\_ п.н. (1 б.)

### Задание 2. ПЦР. 11 баллов.

Укажите температуры, при которых происходят отдельные последовательные этапы ПЦР (3 б.)



Подчеркните в приведенной ниже последовательности ДНК нуклеотиды, соответствующие прямому (синим цветом) и обратному (красным цветом) праймерам для амплификации этой самой последовательности (2 б.)

5' ATGGAGACCCCGT CACAGCGGC GCGCCACCCGCAAGTGGGGCGCAGGCCAGC . . . GGGCTGCGCCTTCGCATCACTGAGTCTGAAGAGGTGGTCAGCCGA 3'  
 3' TACCTCTGGGGCAGTGTGCGCGCGCGGTGGGCGTCAACCCGCGTCCGGTCCG . . . CCCGACGCGGAAGCGTAGTGACTCAGACTTCTCCACCAGTCGGCT 5'

В определенный момент времени в реакционной смеси ПЦР находилось 10 миллионов молекул одонитевой ДНК ПЦР-продукта. Сколько двунитевых молекул ДНК образуется, если провести еще 5 циклов ПЦР, а потом охладить реакционную смесь (2б.)? \_\_\_\_\_

Из перечисленных ниже реактивов выберите и обведите в кружок номера тех четырех реактивов, что должны входить в состав реакционной смеси для ПЦР (4 б.)

- |                    |                  |                                 |
|--------------------|------------------|---------------------------------|
| 1) Рибо-АТФ        | 5) хлорид железа | 9) термофильная ДНК-полимераза  |
| 2) Дезоксирибо-АТФ | 6) хлорид магния | 10) термофильная РНК-полимераза |
| 3) Дезоксирибо-УТФ | 7) ЭДТА          | 11) термофильная ревертаза      |
| 4) Дезоксирибо-ЦТФ | 8) глюкоза       | 12) термофильная хеликаза       |

### Задание 3. Биология полиплоидов и межвидовых гибридов. 16 баллов.

Исходя из анализа данных электрофореза, является ли вид X межвидовым гибридом? Если да, то каким образом Вы это определили? \_\_\_\_\_ (1 б.)

Исходя из анализа данных электрофореза, является ли вид X полиплоидом? Если да, то каким образом Вы это определили? \_\_\_\_\_ (1 б.)

Как называется полиплоид, образующий сбалансированные гаметы и несущий геномы трех родителей? \_\_\_\_\_ (1 б.)

Как называется полиплоид, образовавшийся в результате межвидовой гибридизации и последующего удвоения числа хромосом? \_\_\_\_\_ (1 б.)

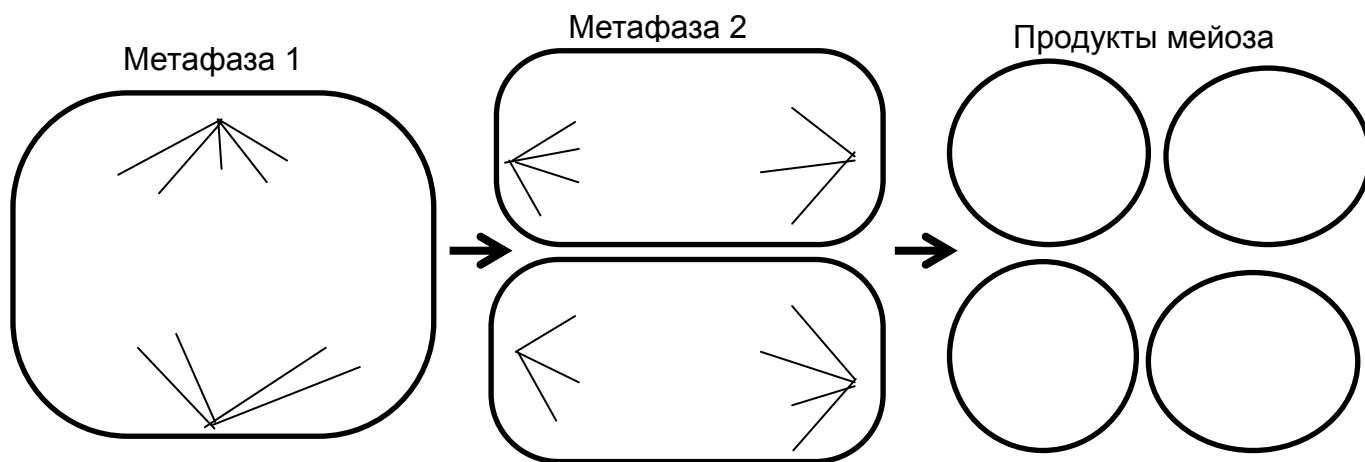
Как называется полиплоид, образовавшийся в результате удвоения числа хромосом в соматических клетках особи? \_\_\_\_\_ (1 б.)

Какой растительный алкалоид используют для нарушения веретена деления клеток и последующей полиплоидизации? \_\_\_\_\_ (1б.)

Секвенирование ДНК вискашевой крысы *Tupaia cristata*, которую по причине большого числа хромосом и крупного размера генома долгое время считали тетраплоидом, показало, что это нормальное диплоидное млекопитающее. Объясните, какая особенность регуляции работы генов млекопитающих по-видимому не позволяет выжить полиплоидам?

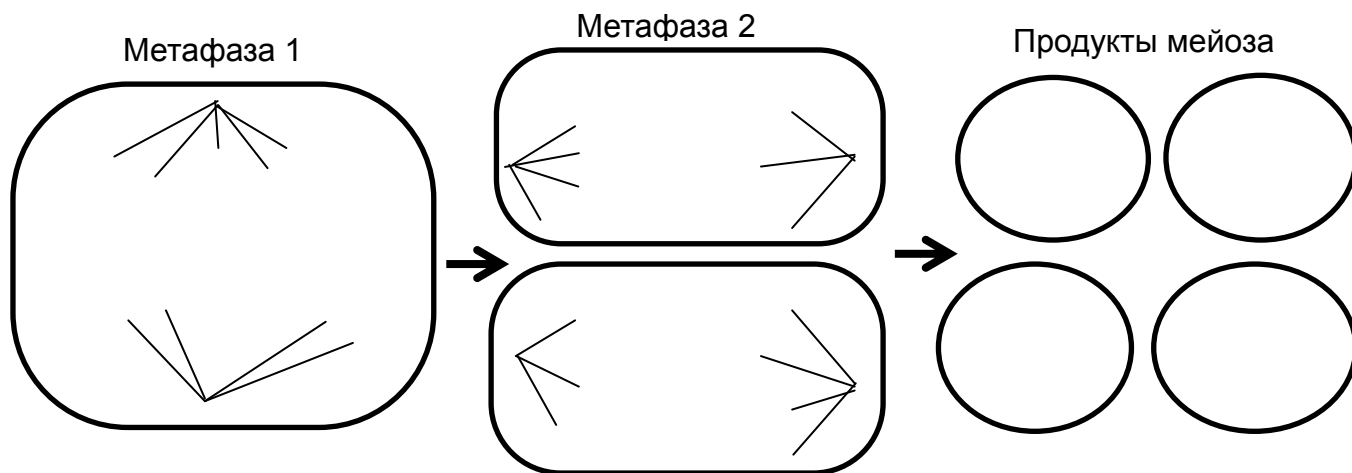
\_\_\_\_\_ (1б.)

Используя карандаши четырёх разных цветов для четырёх разных гомологичных хромосом и обозначение А<sub>о</sub> для одной хроматиды с аллелью гена *A* и центромерой (о), нарисуйте на схеме мейоза этапы расхождения хромосом для тетраплоида *AAAA*, если у него НЕ БЫЛО кроссинговера между геном *A* и центромерой (3 б.)



Какие гаметы и в каком соотношении мы будем ожидать от тетраплоида *AAAA* без кроссинговера? (1б.) \_\_\_\_\_

Используя карандаши четырёх разных цветов для четырёх разных гомологичных хромосом и обозначение А<sub>о</sub> для одной хроматиды с аллелью гена *A* и центромерой, нарисуйте на схеме мейоза этапы расхождения хромосом для тетраплоида *AAAA*, если у него в обеих парах гомологичных хромосом БЫЛ кроссинговер между геном *A* и центромерой (3 б.)



Какие гаметы и в каком соотношении мы будем ожидать от тетраплоида *AAAA* с полным кроссинговером между геном и центромерой? (1б.) \_\_\_\_\_

От чего будет зависеть соотношение реально продуцируемых тетраплоидом гамет для разных генов? (1 б.) \_\_\_\_\_

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>
<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>
<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>40</b>	<b>41</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>47</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>50</b>	<b>51</b>
<b>52</b>	<b>53</b>	<b>54</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	<b>57</b>	<b>58</b>	<b>59</b>	<b>60</b>	<b>61</b>	<b>62</b>	<b>63</b>	<b>64</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	<b>67</b>	<b>68</b>
<b>69</b>	<b>70</b>	<b>71</b>	<b>72</b>	<b>73</b>	<b>74</b>	<b>75</b>	<b>76</b>	<b>77</b>	<b>78</b>	<b>79</b>	<b>80</b>	<b>81</b>	<b>82</b>	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>85</b>

