



Шифр _____

Перед началом практического тура убедитесь, что у вас на рабочем месте находится автоматическая пипетка 2-20 с соответствующими наконечниками и следующие эппендорфы в штативе для эппендорфов:

- 1) геномная ДНК пациента (подпись DNA);
- 2) ПЦР-смесь (подпись PCR);
- 3) олиго-смесь (подпись 590 или 481);
- 4) деионизованная вода (MQ);
- 5) рестриктаза BamHI (подпись H);
- 6) рестриктаза KpnI (подпись K);
- 7) рестриктаза TaqI (подпись T);
- 8) буфер B;
- 9) буфер Y;
- 10) буфер R;
- 11) ПЦР-продукт для рестрикции (подпись X).

Остальное оборудование, необходимое для выполнения заданий практического тура, может использоваться только в присутствии преподавателя и будет дополнительно озвучено в ходе начального инструктажа.

Задание 1 (2 балла).

Вам необходимо приготовить в отдельном эппендорфе образец для ПЦР в реальном времени (real time PCR). Для этого сначала заполните пустые ячейки таблицы, если известно, что ПЦР-смесь, а также олиго-смесь в 5 раз более концентрированы, чем должны быть в итоговом образце для ПЦР:

Реагент	Объём
геномная ДНК (подпись DNA)	5 мкл
ПЦР-смесь (подпись PCR)	
олиго-смесь (подпись 590 или 481)	
деионизованная вода (MQ)	
Общий объём	25 мкл

После расчёта объёмов всех необходимых реагентов смешайте их в эппендорфе для ПЦР в реальном времени (стенки такого эппендорфа пропускают флуоресценцию). Такой эппендорф необходимо попросить у преподавателя, находящегося в аудитории проведения практического тура.

После смешения всех необходимых реагентов отдайте эппендорф преподавателю, **показав номер своей ячейки**, преподаватель поместит эппендорф в амплификатор, а затем через 1,5 часа отдаст вам распечатанные результаты ПЦР. Во время прохождения ПЦР решайте другие задания.

Задание 2.

ПЦР в реальном времени вы используете для определения наличия или отсутствия в геномной ДНК пациента определённого однонуклеотидного полиморфизма (SNP). SNP – это замена одного нуклеотида в основном аллельном варианте какого-либо геномного локуса на другой нуклеотид.

2.1(2 балла). К каким последствиям может привести однонуклеотидная замена в промоторе белок-кодирующего гена?



Шифр _____

- а) повышению уровня экспрессии белка, кодируемого обсуждаемым геном
 - б) снижению уровня экспрессии этого белка
 - в) появлению в клетке дефектного варианта обсуждаемого белка
 - г) появлению более длинного варианта обсуждаемого белка
 - д) однонуклеотидная замена в промоторе может не привести ни к каким последствиям
- 2.2(2 балла).** К каким последствиям может привести однонуклеотидная замена в кодирующем участке белок-кодирующего гена?
- а) замене определённой аминокислоты в обсуждаемом белке
 - б) повышению уровня экспрессии белка, кодируемого обсуждаемым геном
 - в) появлению в клетке дефектного варианта обсуждаемого белка
 - г) появлению более короткого варианта обсуждаемого белка
 - д) однонуклеотидная замена в кодирующем участке может не привести ни к каким последствиям

В нашем задании вы исследуете несколько полиморфизмов в кодирующих участках гена NAT2, ответственного за синтез фермента N-ацетилтрансферазы 2. Данный фермент участвует в метаболизме некоторых лекарственных средств, поэтому привлекает внимание медиков и фармакологов.

ПЦР в реальном времени – это разновидность полимеразной цепной реакции, при которой благодаря накоплению флуоресцентного сигнала можно следить в реальном времени за накоплением ПЦР-продукта. Данный метод не требует следующего за классической ПЦР электрофореза для детекции ПЦР-продукта. Помимо этого, ПЦР в реальном времени сильно более чувствительна, чем классическая ПЦР, поэтому может быть использована для анализа проб, содержащих очень маленькие количества матричной ДНК.

Для детекции SNP используют две модификации ПЦР в реальном времени:

- 1) метод с использованием разных аллель-специфических зондов;
- 2) метод с использованием одного аллель-специфического зонда.

В первом методе подбирают небольшие последовательности ДНК (зонды), комплементарные участку гена, где может быть полиморфизм. Для каждого полиморфизма существует свой зонд, последовательность нуклеотидов которого полностью комплементарна какому-то из полиморфных вариантов. Если по полиморфному локусу встречается только два полиморфных варианта, то нужно два специфических зонда. Каждый из этих зондов несёт на себе ковалентно присоединённую флуоресцентную метку (флуорофор F), флуоресцирующую конкретным светом (например, как на рисунке, розовым либо голубым).

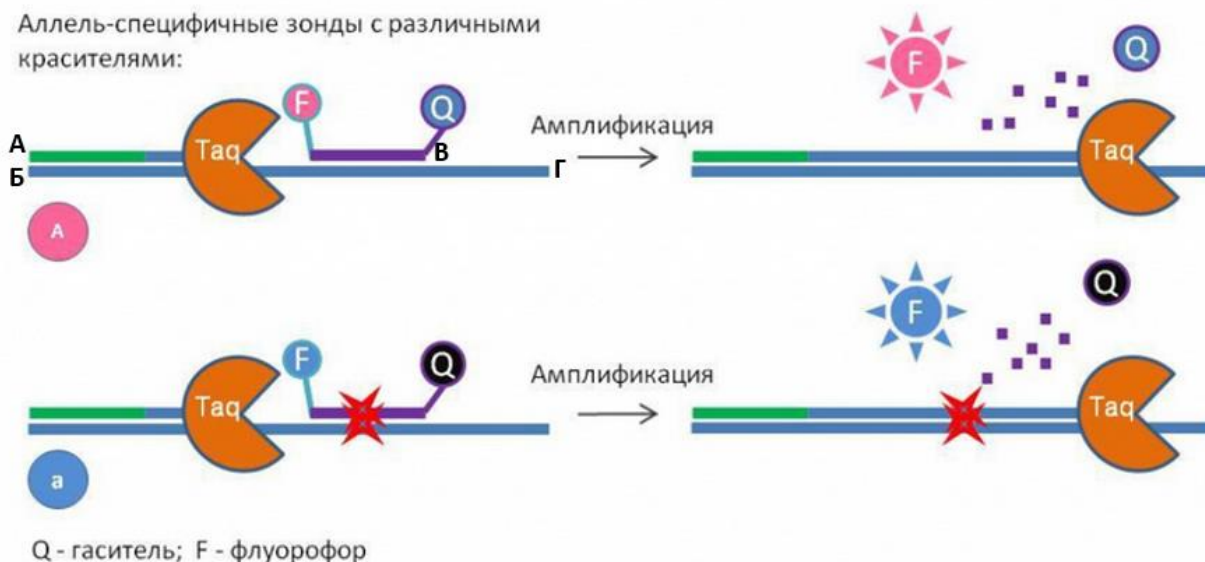
Если зонд, благодаря своей полной комплементарности, гибридизуется с исследуемым локусом генома, то такая конструкция не флуоресцирует, так как к зонду, помимо флуорофора, присоединён ковалентно ещё и гаситель флуоресценции Q – вещество, блокирующее флуоресценцию от флуорофора, если флуорофор и гаситель находятся достаточно близко друг к другу. Свободный зонд в растворе также не флуоресцирует, так как соединён и с флуорофором, и с гасителем.

Благодаря наличию в ПЦР-смеси праймеров (на рисунке показаны зелёным) и Taq-полимеразы (показана оранжевым) начинается синтез комплементарных цепей ДНК. Как только полимеразы доходит до места нахождения зонда, она, из-за своей 5'-3'-экзонуклеазной активности, расщепляет зонд на отдельные нуклеотиды, в результате чего флуорофор освобождается от гасителя, свободно диффундирует в раствор и начинает



Шифр _____

флуоресцировать. Таким образом, уровень флуоресценции раствора будет расти вместе с накоплением определённых ПЦР-продуктов. Если в ДНК пациента не встречается конкретный полиморфный вариант исследуемого локуса, то соответствующий зонд не будет гибридизоваться с ДНК и, как следствие, не будет расщепляться ДНК-полимеразой, поэтому его флуоресценцию в пробе мы не увидим.

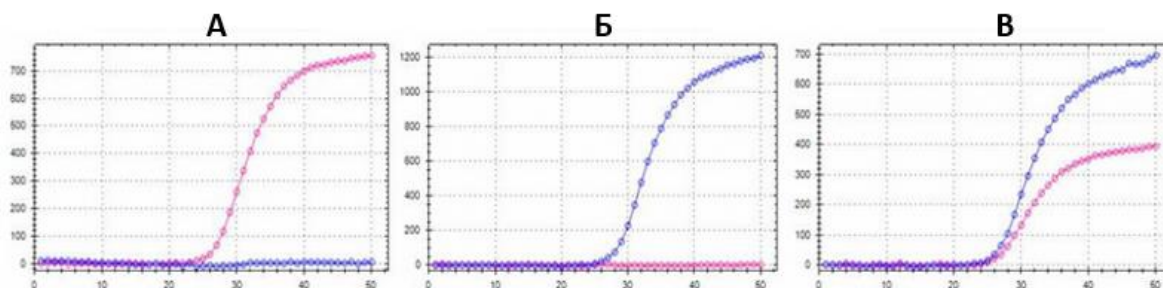


Задание 2.3(2 балла). На рисунке буквами А, Б, В, Г обозначены определённые концы цепей ДНК, подпишите, какой конец находится на месте каждой буквы.

Задание 2.4(1 балл). Какие связи разрушает ДНК-полимераза в процессе уничтожения зонда?

- а) N-гликозидные
- б) O-гликозидные
- в) фосфоэфирные
- г) фосфоангидридные

Задание 2.5(1 балл). Кривые накопления флуоресценции при использовании метода ПЦР в реальном времени с разными аллель-специфическими зондами выглядят как показано на рисунке ниже. Для каждого из графиков А-В подпишите, какому пациенту (гетерозиготному/гомозиготному по исследуемому полиморфизму) он принадлежит.



Задание 2.6(3 балла). Подбор флуорофоров и гасителей флуоресценции для ПЦР в реальном времени составляет отдельную задачу в процессе планирования эксперимента. Вам представлены таблицы с данными по самым часто используемым флуорофорам и гасителям. Согласно этим таблицам, напишите, какие гасители можно использовать с каждым из упомянутых флуорофоров.



Шифр _____

Флуорофор	Длина волны максимума в спектре поглощения, нм	Длина волны максимума в спектре флуоресценции, нм
FAM	490	520
R6G	520	550
TAMRA	550	580
ROX	580	610
Cy5	645	670
Cy5.5	680	705

Гаситель	Длина волны максимума поглощения, нм	Диапазон гашения, нм
RTQ-1	520	470-570
BHQ-1	535	480-580
BHQ-2	575	550-650
RTQ-2	625	580-670
BHQ-3	670	620-730

Флуорофор	Гасители, которые можно с ним использовать
FAM	
R6G	
TAMRA	
ROX	
Cy5	
Cy5.5	

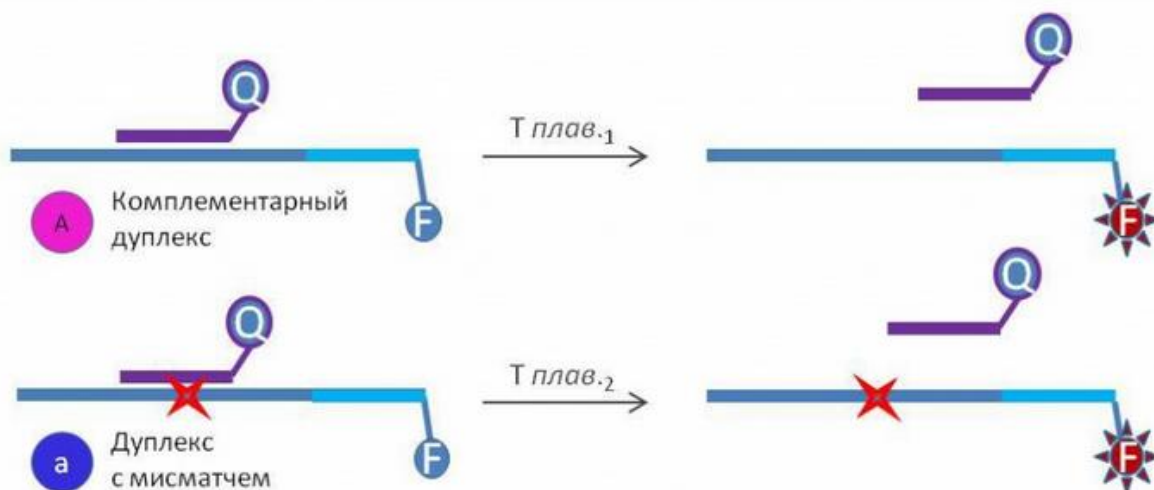
Задание 2.7(5 баллов). Метод с использованием одного аллель-специфического зонда к полиморфному участку исследуемого локуса по-другому называется метод плавления дуплексов. Один используемый зонд полностью комплементарен основному варианту и, соответственно, неполностью комплементарен полиморфным вариантам.

В начале такого эксперимента проводят асимметричную ПЦР, то есть ПЦР с избытком одного из двух концевых праймеров к исследуемому участку. Далее под действием высокой температуры полученные дуплексы ДНК денатурируют, после чего при понижении температуры одноцепочечные молекулы ДНК могут гибридизоваться с зондом. Так как в данном случае зонд один, с ним гибридизуются все полиморфные варианты исследуемого локуса, однако, некоторые варианты неполностью комплементарны и содержат так называемый мисматч (mismatch), то есть не Уотсон-Криковскую (не АТ и не ГЦ) пару нуклеотидов. Затем температуру в ПЦР-пробирке постепенно очень медленно повышают и анализируют кривую плавления дуплекса ДНК с зондом. Так как для разных полиморфных вариантов при гибридизации с зондом образуется разное количество комплементарных пар оснований, температура плавления этих гибридных молекул будет разной. Температуру плавления определяют как максимум/минимум на кривой плавления.



Шифр _____

В данном методе кривую плавления строят по сигналу накопления флуоресценции от флуорофора, полностью или частично комплементарно присоединённого к зонду. Рассмотрите схему метода и объясните, флуоресцирует ли в данном случае отдельный зонд, гибридная молекула зонда и целевой ДНК, почему накапливается флуоресценция в процессе эксперимента?



Задание 2.8 (6 баллов). После прохождения ПЦР в реальном времени, которую вы поставили в задании 1, преподаватель распечатает вашу кривую плавления, а также кривые плавления двух контрольных пациентов (ПЦР для них поставил преподаватель). Контрольные пациенты – это, соответственно, гомозигота по основному варианту исследуемого локуса и гомозигота по конкретному полиморфизму. Используя кривые, принесённые преподавателем, определите генотип (гомозигота/гетерозигота) пациента, для которого вы ставили ПЦР.



Шифр _____

Задание 3 (2 балла). Для выявления полиморфизмов также можно использовать метод рестрикции, если в районе полиморфизма находится специфический сайт определённой эндонуклеазы рестрикции. Однуклеотидная замена приводит к изменению сайта рестрикции, в результате эндонуклеаза уже не может внести разрез в этом месте.

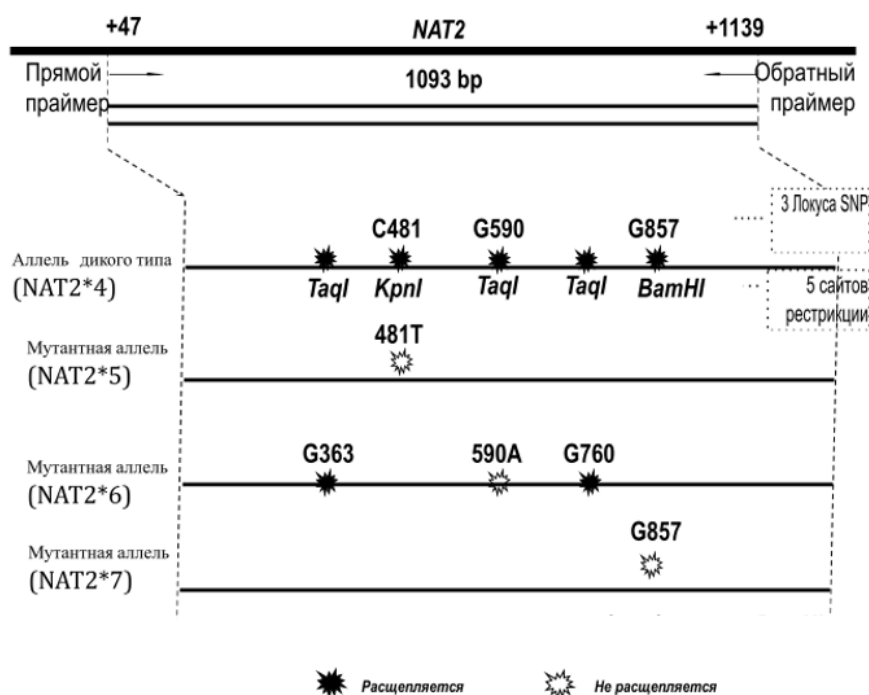
Вам предлагается поставить рестрикцию белок-кодирующего участка гена NAT2. Этот участок был заранее получен при помощи классической ПЦР преподавателем. Необходимо поставить три отдельные пробирки с рестриктивными смесями: для рестриктазы BamHI, KpnI и TaqI. В состав каждой рестриктивной смеси входит ПЦР-продукт, рестрикцию которого необходимо провести, буфер для работы рестриктазы (свой для каждой рестриктазы), эндонуклеаза рестрикции и вода. Зная, что буфер для работы рестриктазы в 10 раз более концентрирован, чем должен быть в итоговой рестриктивной смеси, заполните пустые ячейки в таблице.

Реагент	Объём
ПЦР-продукт для рестрикции (подпись X)	3 мкл
буфер	
рестриктаза	0,5 мкл
деионизованная вода (MQ)	
Общий объём	15 мкл

После заполнения таблицы смешайте в трёх пробирках рестриктивные смеси для трёх рестриктаз и оставьте их на 40 минут в термостате при 37 градусах. Соответствие буфера и рестриктазы спрашивайте у преподавателя.

Во время прохождения рестрикции выполняйте следующие задания.

На схеме показано положение концевых праймеров, использованных преподавателем для амплификации гена NAT2, а также расположение сайтов рестрикции для трёх используемых рестриктаз.





Шифр _____

Полиморфный вариант NAT2*5 содержит замену С в 481 позиции на Т, полиморфный вариант NAT2*6 – замену G в 590 позиции на А, а вариант NAT2*7 – замену G в 857 позиции на А.

Задание 4.1(1 балл). Напишите, использование какой эндонуклеазы рестрикции позволит выявить каждый из трёх полиморфных вариантов.

Полиморфный вариант	Эндонуклеаза рестрикции
NAT2*5	
NAT2*6	
NAT2*7	

Задание 4.2(12 баллов). Напишите, сколько продуктов рестрикции и какого размера вы ожидаете получить при рестрикции аллели дикого типа и рестрикции каждой из трёх полиморфных аллелей разными рестриктазами. Общие размеры ПЦР-продукта, использованного для рестрикции, вы можете рассчитать, исходя из положения праймеров на схеме. Для расчёта размеров продуктов рестрикции можно упрощённо считать, что разрыв вносится рестриктазой симметрично перед нуклеотидом, отмеченным соответствующей звёздочкой на схеме.

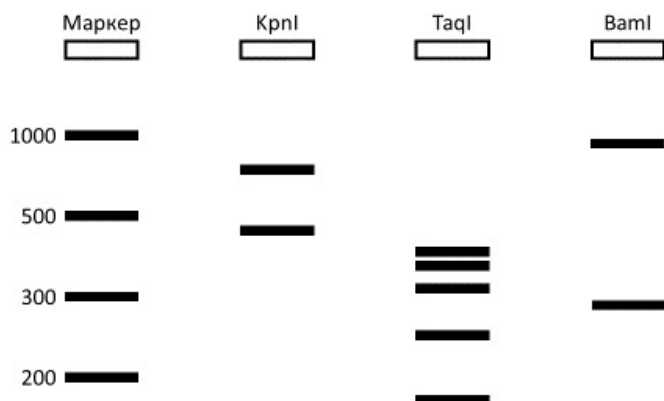
Рестриктаза	VamHI	KpnI	TaqI
Аллель NAT2*4			
NAT2*5			
NAT2*6			
NAT2*7			

Задание 4.3(2 балла). Скорость работы фермента NAT2 влияет на ацетилирование лекарства от туберкулёза изониазида. Если это лекарство не ацетируется, то накапливается в печени и оказывает вред её клеткам. Если пациент является гомозиготой по аллели NAT2*4, то активность NAT2 высокая, изониазид не токсичен. Если пациент имеет только один из показанных выше полиморфных вариантов и является гетерозиготой по этому полиморфному варианту, активность NAT2 средняя. Если пациент имеет более одного полиморфного варианта или является гомозиготой хотя бы по одному из обсуждаемых полиморфных вариантов, то активность NAT2 низкая, изониазид токсичен. В связи с описанной ситуацией, определение генотипа пациентов относительно гена ацетилтрансферазы 2, очень важно для установления оптимальной дозировки изониазида. Предположим, что вы получили результаты электрофореза после проведения рестрикции гена NAT2 определённого пациента. Определите генотип этого пациента относительно всех



Шифр _____

исследуемых полиморфных локусов, свой ответ поясните. На электрофореграмме, представленной ниже, есть дорожка с маркером молекулярных масс (массы молекул ДНК подписаны сбоку), а также три дорожки – для каждой из используемых рестриктаз.



Задание 4.4(1 балл). Какова активность NAT2(высокая/средняя/низкая) у пациента из предыдущего задания?

Задание 4.5(1 балл). Исследования динамики приёма изониазида разными пациентами позволили выявить эмпирическую формулу для определения концентрации изониазида в сыворотке спустя 2 часа после приёма 300 мг.

Концентрация изониазида в сыворотке (мг/л) = $13.821 - 0.1 \times (\text{вес тела, кг}) - 2.273 \times n$, где $n = 2$ у пациентов с высокой активностью NAT2, 1 у пациентов со средней активностью и 0 у пациентов с низкой активностью.

Вычислите по этой формуле концентрацию изониазида у пациента из задания 4.3 спустя 2 часа после приёма 300 мг препарата, если его масса тела составляет 70 кг.

Задание 4.6(1 балл). В результате исследований также было выяснено, что оптимальная для противотуберкулёзного воздействия и в то же время не токсичная для печени концентрация изониазида в сыворотке спустя определённое время после приёма составляет от 3 до 6 мг/л. В одной таблетке содержится 100 мг изониазида.

Какое минимальное и какое максимальное количество таблеток можно принимать этому пациенту за один приём, чтобы лечение было эффективным и не было токсичности для печени?

Задание 4.7(6 баллов).

После окончания поставленной вами в задании 3 рестриктной реакции, смешайте каждый образец с буфером для нанесения на электрофорез (пробирка с подписью LD). Считайте, что буфер в 4 раза более концентрированный, чем должен быть при нанесении в лунку геля. Объём каждой рестриктной смеси из задания 3 составляет 15 мкл. Каким тогда должен быть объём LD, добавляемый к каждому образцу?

После смешения образцов с LD, обратитесь к преподавателю и в его присутствии наносите свои образцы на гель электрофореза. Не забудьте в отдельную лунку нанести маркер молекулярных масс в объёме 5 мкл.