

**ОЛИМПИАДА ПО БИОЛОГИИ**  
республиканский тур, 24 – 27 марта 2023 года

**ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ**

*Время работы: 240 минут*

*Желаем успехов!*

Уважаемые участники! Практический тур содержит четыре лабораторные работы.

Для каждой лаборатории отводится 60 минут. После истечения отведенного времени, вы будете переведены наблюдателями в следующую лабораторию.

Каждый вопрос оценивается определенным количеством баллов. Общее количество баллов равно 200. Напишите ответы в работе. Работа заполняется **только ручкой с синей пастой и не должна содержать никаких дополнительных заметок!** Работы, которые не будут соответствовать требованиям, могут быть отклонены Жюри.

**В последней лаборатории сдайте работу наблюдателю и распишитесь в ведомости.**

**Лабораторная работа 1 (430)**

**БИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ (50 баллов)**

**I. Анатомия растений (22 балла)**

1. Приготовьте временный препарат из предложенного материала и изучите его под микроскопом (2 п.).
2. Выберите, из предложенных ниже рисунков А, В, С, соответствующий изученному препарату и впишите соответствующую букву в отведенное место (5 п.).

**Рисунок А**

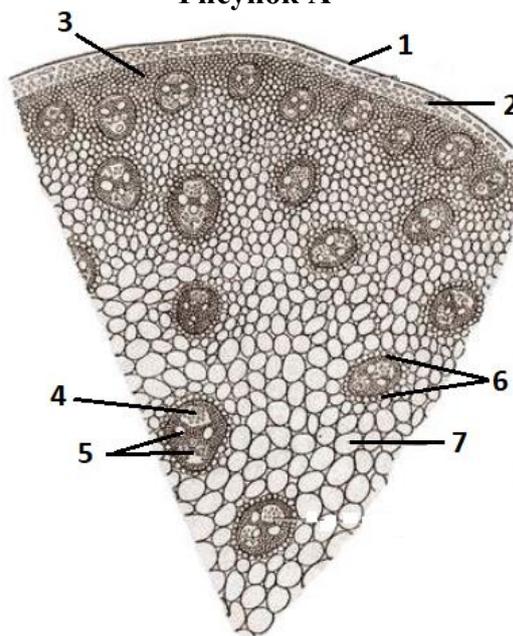


Рисунок В

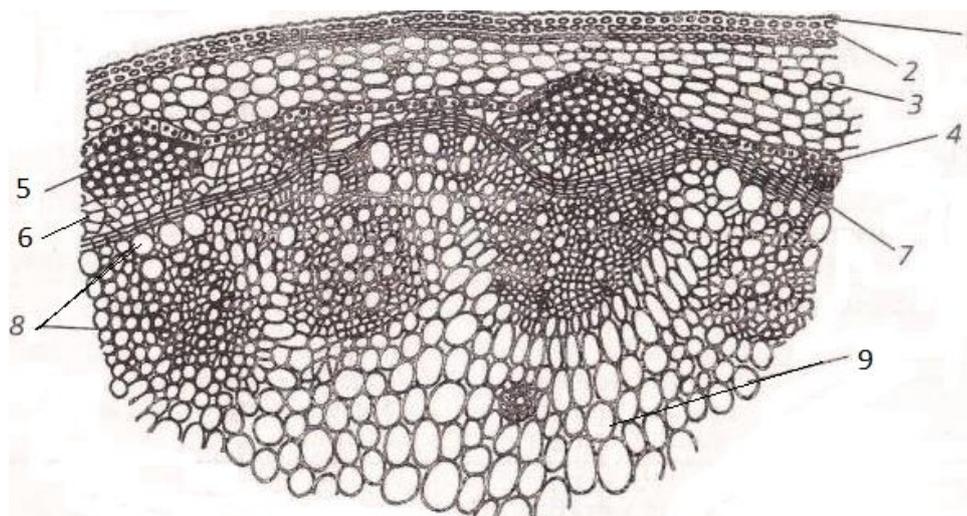
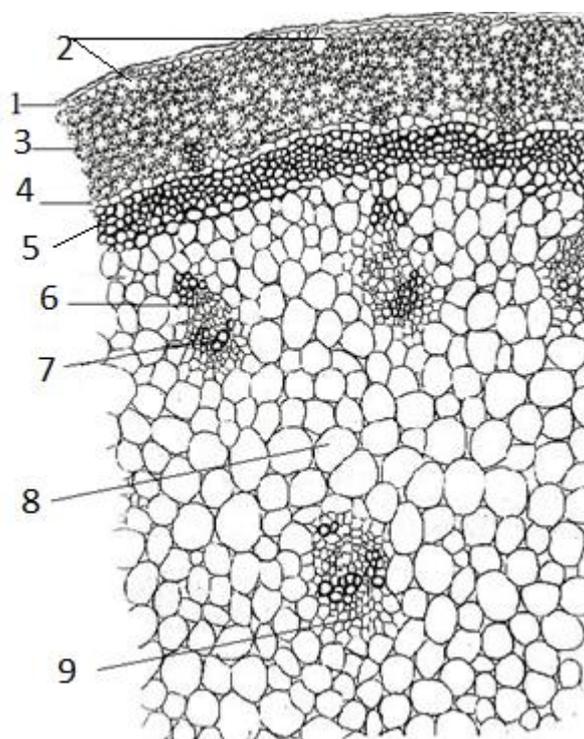


Рисунок С



Препарату соответствует Рисунок \_\_\_\_\_

3. Назовите препарат, заполнив пропуски в тексте соответствующими буквами из предложенных ниже вариантов (5 п.).

Название препарата: \_\_\_\_\_ срез \_\_\_\_\_ вида \_\_\_\_\_, из семейства \_\_\_\_\_ класса \_\_\_\_\_

А – *Poaceae*, М - продольный, Е - *Liliopsida* (однодольные), G - *Helianthus annuus* (подсолнечник), J – *Liliaceae*, В - корня, F - *Iris germanica* (ирис), I – *Magnoliopsida* (двудольные), D - стебля, R – *Iridaceae*, С – *Zea mays* (кукуруза), N - поперечный, О – *Cucurbita pepo* (тыква), P – *Asteraceae*.

4. Объясните структуру органа, выбрав правильные варианты, из предложенных ниже. Заполните таблицу соответствующими буквами из предложенных ниже вариантов (9 п.).

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.

**Структура органа:** А – эндодерма, В – хлоренхима, С – основная паренхима, D – эпидермис, E – склеренхима перицикла, F - флоэма, G – паренхима перицикла, H – пучковый камбий, K – ксилема, L – колленхима, M – перидерма, N – межпучковый камбий, O – склеренхима проводящего пучка, P - устьица.

5. Назовите тип проводящего пучка вписав в отведенное место соответствующую букву из предложенных ниже вариантов. (1 п.)

\_\_\_\_\_

M - коллатеральный открытый, N - коллатеральный закрытый, R - биколлатеральный открытый.

## II. Систематика и морфология растений (28 баллов)

Изучите предложенные плоды и заполните таблицу, используя соответствующие цифры и буквы из предложенных ниже вариантов. По 0,5 пункта за каждый правильный ответ (28 п.):

№. плода	Тип плода	Особые признаки плода		Растение, к которому относится этот плод
		по количеству семян	по консистенции околоплодника	
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				

**ТИП ПЛОДА:**

многолистовка - **A**, орех - **B**, костянка - **C**, боб - **D**, ягода - **E**, жёлудь - **F**, стручѐк - **G**, ложный плод яблоко - **H**, коробочка - **M**, померанец (гесперидий) - **N**, крылатка - **O**, зерновка - **L**, тыква - **K**, многокостянка - **V**, семянка - **X**, стручѐчек - **P**.

**ОСОБЫЕ ПРИЗНАКИ ПЛОДА:**

- по количеству семян: односемянный - **M**, многосемянный - **P**.
- по консистенции околоплодника: сочный - **C**, сухой - **U**.

**РАСТЕНИЕ, К КОТОРОМУ ОТНОСИТСЯ ЭТОТ ПЛОД:**

**1** - Лещина, **2** – Айва, **3** – Лунник, **4** - Лимон, **5** - Подсолнечник, **6** - Грецкий орех, **7** - Магнолия, **8** - Киви, **9** - Кабачок, **10** - Ясень, **11** – Гледичия трехколючковая, **12** – Хлопчатник, **13** – Зизифус (ююба, унаби), **14** – Кукуруза.

**Лабораторная работа 2 (432)  
Экология и Этология (50 баллов)**

**1. ETOLOGIE**

Atenției Dumneavoastră se propune un videoclip în care sunt reprezentate diferite interrelații dintre organisme. Vizualizați videoclipul. Înscrieți în tabelul pentru răspunsuri – la subdiviziunea ”Cifrele secvențelor din videoclip” doar cifrele ce corespund secvențelor respective. **Pentru fiecare răspuns corect se acordă câte 1 punct.**

La subdiviziunea ”Tipul interrelațiilor (0 / + / -)” – înscrieți combinațiile respective de simboluri ce determină interrelația respectivă. **Pentru fiecare combinație corectă de simboluri se acordă câte 1 punct.**

**Total – 25 puncte.**

Вашему вниманию предлагается посмотреть видеоклип, в котором продемонстрированы различные взаимоотношения между организмами. Просмотрите видео. Внесите в таблицу для ответов - в подраздел "Номера эпизодов из видеоклипа" только те цифры, которые соответствуют последовательностям из видеоклипа. **За каждый правильный ответ начисляется 1 балл.**

В подразделе «Характер взаимоотношений (0 / + / -)» введите соответствующие комбинации символов, определяющие соответствующую взаимосвязь. **За каждую правильную комбинацию символов начисляется 1 балл.**

*(Для уточнений просмотрите презентацию PowerPoint на экране компьютера!)*

**Всего – 25 баллов.**

**Indici pentru completarea foii cu răspunsuri / Указания по заполнению листа ответов**

<p align="center"><b>Video</b></p>		<p align="center"><b>Cifrele secvențelor din videoclip Номера эпизодов из видеоклипа</b></p> <p>Fiecare secvență din videoclip este numerotată. Cifrele (1, 2, 3 ...) se înscriu în celule separate. Каждая последовательность в видео пронумерована. Числа (1, 2, 3 ...) вводятся в отдельные ячейки.</p> <p align="center"><b>Câte un punct pentru fiecare răspuns По одному баллу за каждый ответ</b></p>	<p align="center"><b>Caracterul interrelațiilor Характер взаимоотношений (0 / + / -)</b></p> <p>Fiecare interrelație poate fi reprezentată prin combinații de simboluri "+, -, 0". Inserați combinația respectivă în celulele de mai jos. Каждая взаимосвязь может быть представлена комбинациями символов «+, -, 0». Вставьте соответствующую комбинацию в ячейки.</p> <p align="center"><b>Câte un punct pentru fiecare combinație По одному баллу за каждую комбинацию</b></p>																					
<p align="center"><b>Interrelații / Взаимоотношения</b></p> <p><b>A</b> Mutualism / Мутуализм</p> <p><b>B</b> Protocooperare / Протокооперация</p> <p><b>C</b> Comensualism / Комменсализм</p>		<table border="1"> <tr> <td>1</td> <td>2</td> <td>5</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>13</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1	2	5			9	13				4					<table border="1"> <tr> <td>-</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>+</td> <td>0</td> </tr> </table>	-	+	0	+	+	0
1	2	5																						
9	13																							
4																								
-	+																							
0	+																							
+	0																							

**Foaia pentru răspunsuri / Лист для ответов**

	<b>Interrelații Взаимоотношения</b>	<b>Cifrele secvențelor din videoclip Номера эпизодов из видеоклипа</b>	<b>Tipul interrelațiilor Характер взаимоотношений (0 / + / -)</b>
<b>A</b>	<b>Mutualism / Мутуализм</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>B</b>	<b>Protocooperare / Протокооперация</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>C</b>	<b>Comensualism / Комменсализм</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>D</b>	<b>Entoikia / Энтойкия</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>E</b>	<b>Epioikia / Эпийокия</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>F</b>	<b>Paroikia / Паройкия</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>G</b>	<b>Predatorie / Хищничество</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>H</b>	<b>Parazitism / Паразитизм</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
<b>I</b>	<b>Concurență / Конкуренция</b>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>

**2. ECOLOGIE (25 баллов)**

**1.** В пахотной почве число дождевых червей, обнаруженных на 6 учетных площадках размером 50 см на 50 см каждая, составило 70 экземпляров. После применения гербицида для борьбы с сорняками, сделали учеты на 9 таких же по площади площадках и обнаружили в сумме 30 червей. Какова плотность популяции в расчете на квадратный метр до и после использования гербицидов? (*Внимание!!! Необходимо представить расчеты, на основании которых вы получили результаты*).

**1.1.** *Расчет плотности популяции до применения гербицидов (3 балла)*

---



---



---



---

**1.2.** *Расчет плотности популяции после применения гербицидов (3 балла)*

---



---



---



---

2. На рисунке ниже представлена кривая роста двух популяций водорослей. На основании представленных результатов рассчитайте скорость изменения популяции в каждый интервал времени и дайте краткую характеристику этим популяциям (скорость изменения популяции рассчитывается по формуле  $dN/dt$ , где  $dN$  - количество особей (тыс.), а  $dt$  – интервал анализируемого время). (*Внимание!!! Необходимо представить расчеты, на основании которых вы получили результаты*).

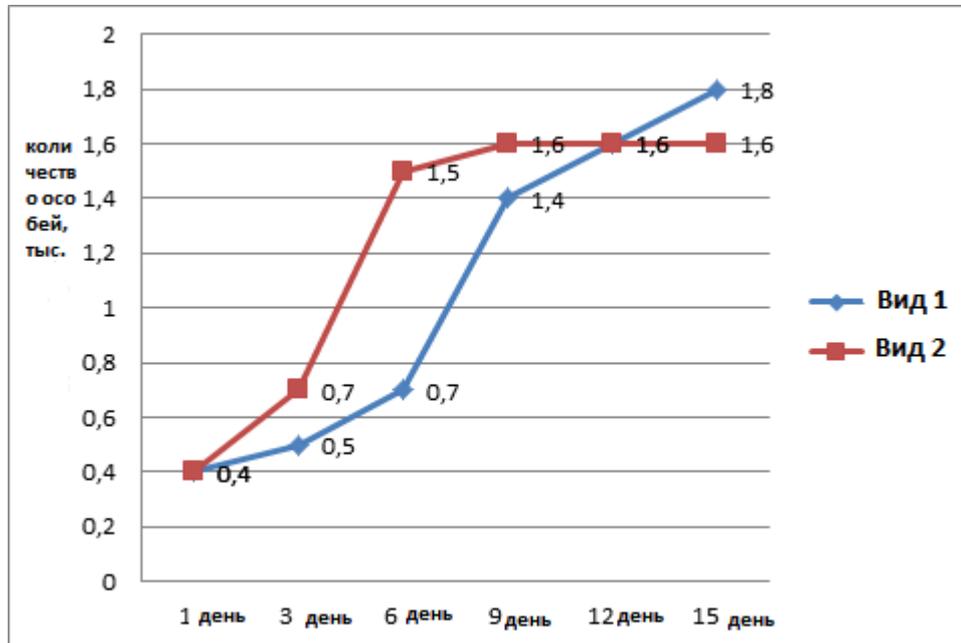


Fig. Кривая роста двух популяций водорослей

2.1. *Расчет скорости изменения популяции для указанных интервалов времени.*  
(15 баллов)

Виды	Анализируемый период				
	1-3-й день	3-6-й день	6-9-й день	9-12-й день	12-15-й день
Скорость изменения популяции для Вида нр. 1					
Скорость изменения популяции для Вида нр. 2					

**2.2. Характеристика видов по особенностям кривых роста. (4 балла)**

Характеристика кривой роста популяции пг. 1:

---

---

---

Характеристика кривой роста популяции пг. 2:

---

---

---

## Lucrarea de laborator 3 (525)

### BIOCHIMIA ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ (50 puncte)

#### I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ГОРМОНОВ (25 баллов)

**Гормонами** (греч. *hormon* = возбуждать) называются вещества, секретируемые в малых количествах **эндокринными железами** (секреторные железы) (*endo*= внутри, *crine* = выделять), выделяются в кровь или лимфу и выполняют регуляторную функцию в „**клетках мишенях**” других тканей и органов позвоночных. Нервная и эндокринная системы действуют координированно: поддерживают гомеостаз внутренней среды и регулируют связи между различными органами, обеспечивая целостность в действии организма.

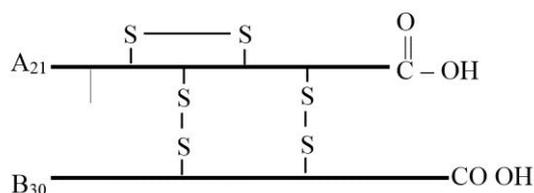
Гормоны классифицируются по типу эндокринных желез, которые их производят, по физиологическому действию и по химической структуре.

По химической структуре выделяют:

- ❖ *Протео-пептидные гормоны*,
- ❖ *Стероидные гормоны*
- ❖ *Гормоны производные некоторых аминокислот*

#### **Протео-пептидные гормоны.**

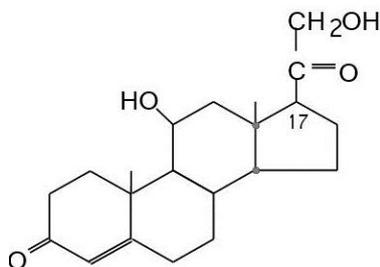
Инсулин синтезируется в поджелудочной железе определёнными клетками **островков Лангерганса** (*insula* = остров). Этот гормон регулирует использование организмом глюкозы путем активации **гексокиназы**, которая катализирует фосфорилирование глюкозы в G-1-P, процесс необходимый для включения глюкозы в гликоген и торможения процесса **глюконогенеза**.



#### **Стероидные гормоны**

Название кортикостероидных гормонов указывает на локализацию их синтеза (*cortico* = периферический слой) в надпочечниках и их стероидную химическую природу..

Все кортикостероидные гормоны содержат в положении 17 кетогруппу, которая обладает высокой восстановительной способностью, сама окисляясь в карбоксильную группу.

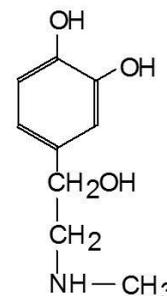


Выделяют: **глюкокортикоиды** – регулируют потребление глюкозы, белков и липидов, **минералокортикоиды** – воды и минеральных солей.

#### **Гормоны производные некоторых аминокислот**

Адреналин синтезируется в мозговом слое **надпочечников** (*ad* = над, *renum* = почки).

При секреции адреналина наблюдается сокращение капилляров кожи, слизистых оболочек и кишечника, рост артериального давления. Сосуды сердца, напротив, под влиянием адреналина расширяются и их активность растет. Адреналин вызывает расслабление мышц бронхов и кишечника, расширение зрачка. Адреналин легко окисляется, даже в присутствии кислорода воздуха.



Химическую природу этих гормонов можно определить посредством следующих реакций.

### 1. Реакция указывающая на белковую природу инсулина

К 10 каплям раствора инсулина (содержимое растворенной ампулы 1:100 в H<sub>2</sub>O) добавляют 5 капель раствора NaOH 10% и каплю CuSO<sub>4</sub> 1%. Взбалтывают. Раствор инсулина **окрашивается в сине-фиолетовый цвет**, что указывает на наличие пептидных связей.

### 2. Реакция идентификации кортикостероидных гормонов

К 5 каплям раствора *Fehling I* добавляют 5 капель раствора *Fehling II*, доводят до кипения и добавляют 10 капель спиртового раствора кортикостероидного гормона (*кортизон ацетат* 20 µg/ml в этаноле). Образуется **оранжево-красный осадок**.

### 3. Реакция идентификации адреналина

К 3 каплям раствора адреналина (содержимое растворимой ампулы 1:100) добавляют 1 каплю раствора FeCl<sub>3</sub> 10%. Появляется **изумрудно-зеленый цвет**, который после непродолжительного времени переходит в желтый. При добавлении капли раствора концентрированного NH<sub>4</sub>OH или NaOH 10%, свет быстро переходит **в вишнево-красный, затем коричневый**. Реакция определяется наличием пирокатехинового ядра [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>] который образует с ионами Fe<sup>3+</sup> соединения типа фенолатов железа.

## Задание:

Предложено 3 раствора, содержащие гормоны (раствор нр. 1; раствор нр. 2; раствор нр.3). Отберите аликвоты и проводите реакции по определению химической природы гормонов (описанные выше) для выявления типа гормонов в каждом из растворов.

Проведите представленные ниже эксперименты и представьте по окончании каждого эксперимента заключение согласно предложенной модели.

**Выводы:** В растворе нр.1 выявлен гормон \_\_\_\_\_;  
в растворе нр.2 выявлен гормон \_\_\_\_\_;  
в растворе нр.3 выявлен гормон \_\_\_\_\_.

## Ход работы:

Вам предложено 3 раствора (раствор нр. 1; раствор нр. 2; раствор нр.3).

### а) *Определение адреналина*(12 баллов)

Берут 3 пробирки 3. В пробирке I капают 10 капель раствора нр. 1, в пробирке II – 10 капель раствора нр.2; в пробирке а III – 10 капель раствора нр.3 и со всеми тремя пробирками проводят реакцию по идентификации адреналина.

Во всех 3 пробирках добавляют 1 каплю раствора FeCl<sub>3</sub> 10%. Появляется изумрудно-зеленая окраска, которая после непродолжительного времени переходит в желтый цвет. При добавлении капли концентрированного раствора NH<sub>4</sub>OH или NaOH 10%, окраска быстро переходит в вишнево-красный цвет, затем в коричневый.

Таким образом, раствор который окрасится в вишнево-красный цвет, затем в коричневый цвет содержит адреналин.

**Вывод:** В растворе nr \_\_ определили гормон адреналин.

**б) Определение кортикостероидов (8 баллов)**

Берут 2 пробирки. Нумеруются каждая пробирка номерами тех пробирок, которые не были еще идентифицированы (*не работают с пробиркой которая содержала адреналин!!!*) В отобранных пробирках (X и Y) капают, соответственно, 10 капель раствора X, в пробирку X и 10 капель раствора Y в пробирку Y. С содержимым этих пробирок проводят реакцию идентификации кортикостероидных гормонов. В обеих пробирках добавляют 5 капель раствора *Fehling I* и 5 капель раствора *Fehling II*, доводят до кипения. Образуется оранжево-красный осадок.

Таким образом, раствор в котором образуется оранжево-красный осадок содержит кортикостероидный гормон.

**Вывод:** В растворе nr \_\_ выявлен кортикостероидный гормон.

**с) Определение инсулина (5 баллов)**

Берут оставшуюся последнюю пробирку, в которой добавляют 10 капель неопределенного раствора. С содержимым пробирки проводят реакцию идентификации инсулина. В пробирку добавляют 5 капель раствора NaOH 10% и каплю CuSO<sub>4</sub> 1%. Взбалтывают. Раствор инсулина окрашивается сине-фиолетовый цвет.

**Вывод:** В растворе nr \_\_ выявили гормон инсулин.

**Внимание! После окончания экспериментов пригласите ассистента для принятия вашей работы!**

**II. РЕШЕНИЕ ЗАДАЧ (25 баллов)**

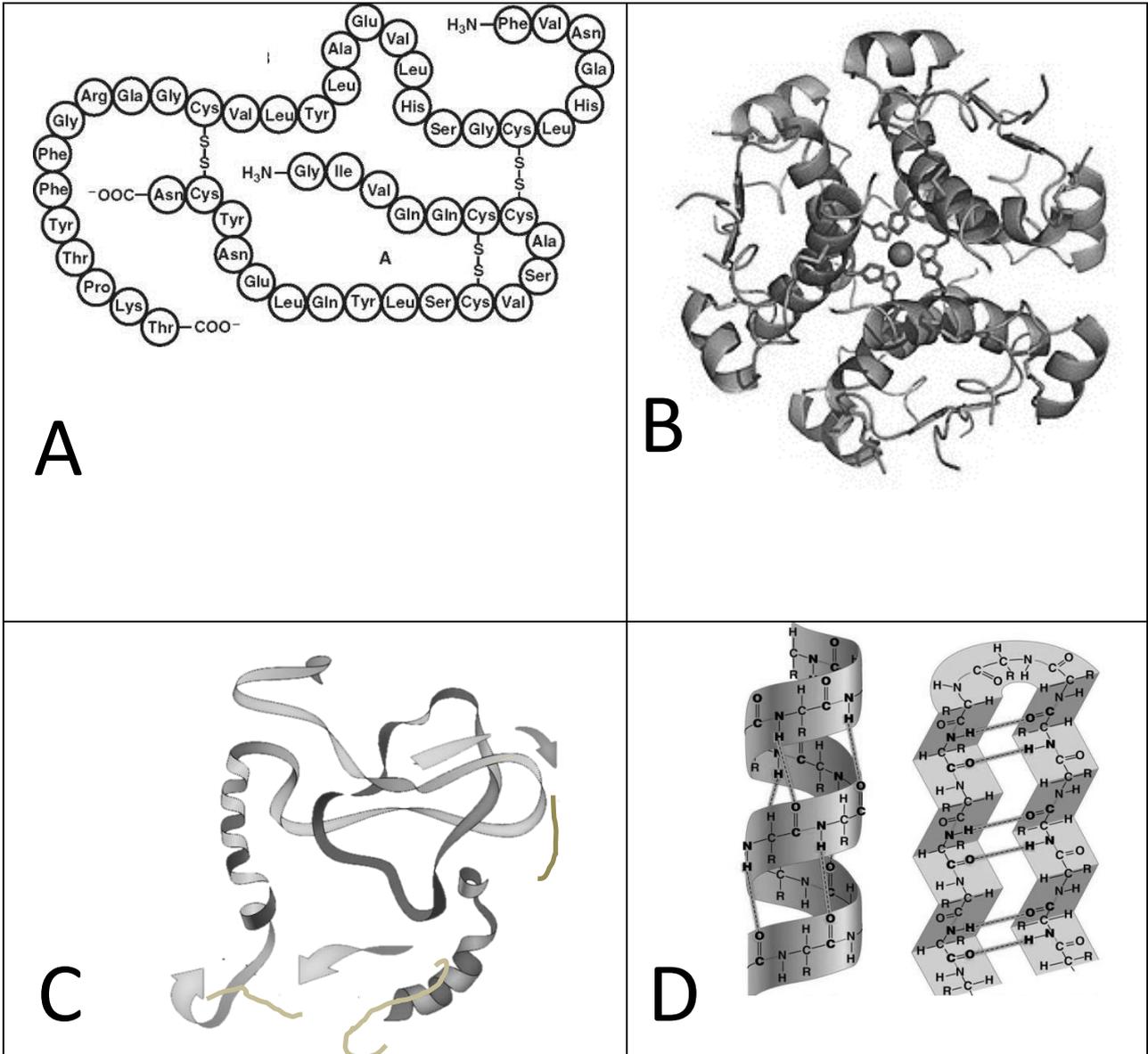
**1.1. (4 балла) Определите тип структуры белка на каждом изображении и напишите соответствующую римскую цифру в отведенных ниже рисунков месте.**

**I** - первичная структура

**II** – вторичная структура

**III** – третичная структура

**IV** – четвертичная структура



A \_\_\_\_\_ B \_\_\_\_\_ C \_\_\_\_\_ D \_\_\_\_\_

- 1.2. (2 балла) Какой тип структуры характерен для представленных в таблице белков? Напишите соответствующую римскую цифру (I, II, III, или IV) в отведенных для этого местах.

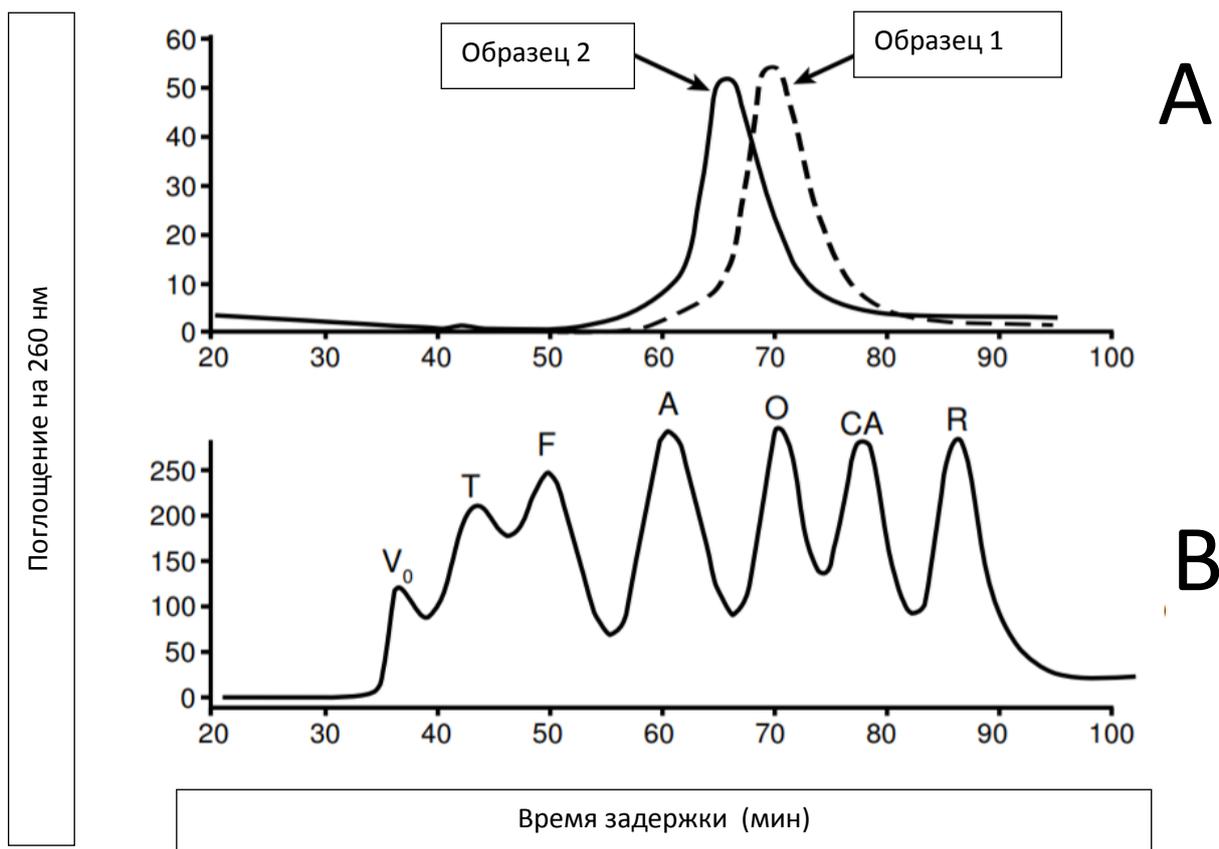
1. Фиброин (секретируемый шелкопрядами)	
2. Гемоглобин	

2. (4 балла) Пять внутриклеточных молекул, А, В, С, D и E в нормальном состоянии синтезируются с постоянной скоростью 1000 молекул / секунду, а период жизни каждой из молекул отличается. Период жизни молекулы А = 300 с, В = 200 с, С = 100 с, D = 50 с и E = 10 с. Наличие сигнала X увеличивает в 10 раз скорость синтеза всех пяти молекул без того, чтобы менять период их жизни.

Проанализируйте представленные ниже утверждения и впишите в отведенных для этого местах букву "А", если высказывание верное, или букву "F", если оно ложное.

Утверждения	А или F
1. У молекулы E самая большая внутриклеточная концентрация в состоянии равновесия.	
2. Количество молекул В в состоянии равновесия равно 200000.	
3. Через секунду после сигнала X, молекула А будет обладать самым большим увеличением концентрации.	
4. Через секунду после сигнала X, количество E будет в два раза меньше, чем в состоянии равновесия.	

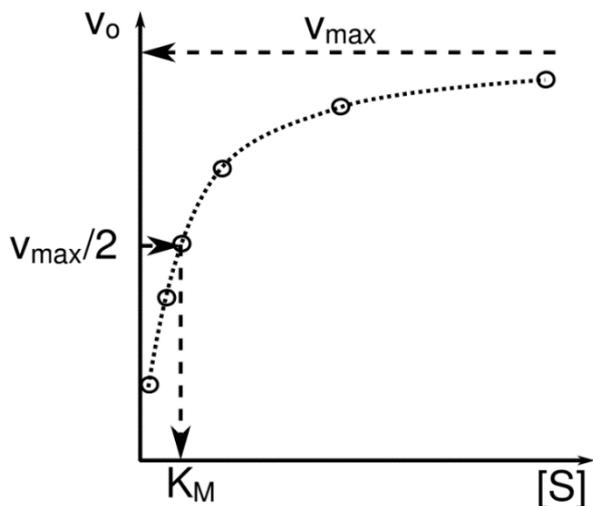
3. (5 баллов) Гель-хроматография представляет метод разделения молекул, которые отличаются по форме и размерам. Метод может быть использован для определения приблизительной молекулярной массы белков и полипептидов. Матрицей для гель – фильтрации служат гели с коммерческим названием Sephadex, которые обладают порами с размерами, которые соответствуют марке Sephadex-а (G-10, G-15, ... G-200). Маленькие молекулы входят внутрь пор матрицы, в то время, как степень вхождения в поры больших молекул лимитируется как размерами пор, так и собственными размерами. Хроматограмма представляет график элюции компонентов. Каждая молекула обладает временем задержки в хроматографической колонке.



А – хроматограмма для Образца 1 и Образца 2

В – хроматограмма эталонных молекул

Сравните молекулярную массу белка из Образца 1 (P1) и белка из Образца 2 (P2).  
 Напишите один из знаков “<”, “>” или “=” в отведенном месте.



4. 1. (8 баллов) Вам представлен график Михаэлиса – Ментен (графическое представление кинетических данных) касаемо начальной скорости реакции ( $V_0$ ) относительно концентрации субстрата  $[S]$ .  $K_m$  это концентрация субстрата, при которой достигается половина от максимальной скорости реакции.  $V_{max}$  это максимальная скорость реакции в которой  $[S]$  насыщена.

Существует как минимум 4 типа переносчиков глюкозы. GLUT1 и GLUT3 локализованы в большинстве тканей, в том числе в мозге и эритроцитах. Эти

переносчики очень быстро переносят глюкозу из крови в клетки, но  $V_{max}$  у них самый низкий. GLUT2 обнаруживается в печени и поджелудочной железе. GLUT2 имеет сниженное родство к глюкозе и самый высокий  $V_{max}$ . GLUT4 встречается в скелетной и жировой ткани. Этот переносчик не является активным, пока не будет активирован инсулином. Один студент хочет использовать для своего эксперимента переносчик с самой низкой  $K_m$ .

Что он может использовать? Поставьте знак  $\checkmark$  в соответствующие ячейки или ячейку в отведенных для этого местах.

GLUT1

GLUT2

GLUT3

GLUT4

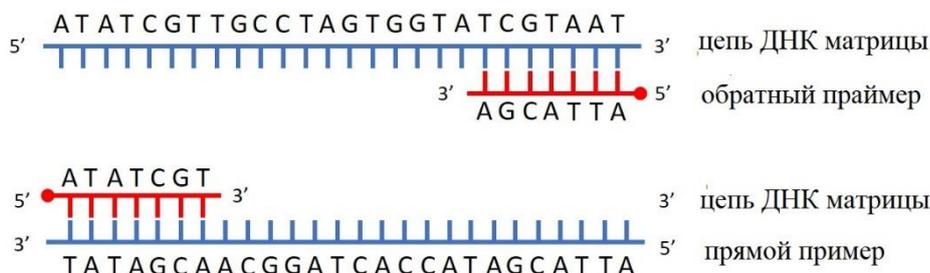
4.2. (2 балла) Запишите в отведенном месте в представленном ниже утверждении знак  $<$  («меньшее») или знак  $>$  («большее») так, чтобы утверждение было верным.

Низкая  $K_m$  означает, что ферменту необходимо \_\_\_\_\_ количество субстрата, чтобы быть насыщенным.

**ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4 (503)**  
**БИОИНФОРМАТИКА (50 баллов)**  
**«Дизайн праймеров для реакции ПЦР»**

Полимеразная цепная реакция (сокращенно ПЦР) — это лабораторный метод быстрого производства (амплификации) от миллионов до миллиардов копий определенного сегмента ДНК, который затем можно изучить более подробно. Например, продукт ПЦР, полученный в результате реакции амплификации, можно секвенировать, расшифровав таким образом последовательность нуклеотидов, визуализировать с помощью гель-электрофореза или клонировать в плазмиду для дальнейших экспериментов. Реакция ПЦР используется во многих областях биологии и медицины, в том числе при исследовании биологических механизмов на молекулярном уровне, в медицинской диагностике и даже в некоторых разделах экологии.

ПЦР подразумевает использование коротких фрагментов синтетической ДНК, называемых праймерами, для выбора сегмента генома для амплификации. Обычно в каждой реакции ПЦР используются 2 праймера, называемые парой праймеров: *прямой праймер* (*Forward primer*) и *обратный праймер* (*Reverse primer*). Два праймера предназначены для фланкирования области-мишени (области, которая должна быть скопирована). Праймеры комплементарны 2 цепям молекулы ДНК-матрицы (рис. 1).



**Fig. 1. Схематическая презентация расположения праймеров**

**Цель работы:**

В этом практическом приложении вы разработаете пару праймеров для специфической амплификации более короткой области митохондриального гена COI (ген штрих-кода, используемый для идентификации животных организмов) для определенных видов жесткокрылых.

**Общие правила дизайна праймеров для ПЦР.**

1. Рекомендуемая длина праймеров 18-24 нуклеотида.
2. Расчетная температура плавления ( $T_m$ ) должна быть в пределах от 50 до 65 °C. Температура плавления отражает количество тепла, необходимое для отделения половины праймеров от матрицы ДНК. Рассчитать температуру плавления можно разными способами. В этой лабораторной работе используемое приложение автоматически рассчитает эту температуру.
3. Температура плавления двух праймеров не должна отличаться более чем на 4 °C.
4. Содержание азотистых оснований С и G должно быть от 30 до 70%. Лучшими считаются праймеры с содержанием С и G  $\geq 50\%$ .
5. Праймеры должны иметь низкую самокомплементарность, чтобы избежать образования димеров или петель ДНК во время реакции ПЦР.
6. Праймеры должны заканчиваться (3') на CC, CG, GC или GG или иметь 2 из последних 5 нуклеотидов С или G.

**Необходимые инструменты:** приложение MEGA; приложение BioEdit; Интернет.

## ХОД РАБОТЫ:

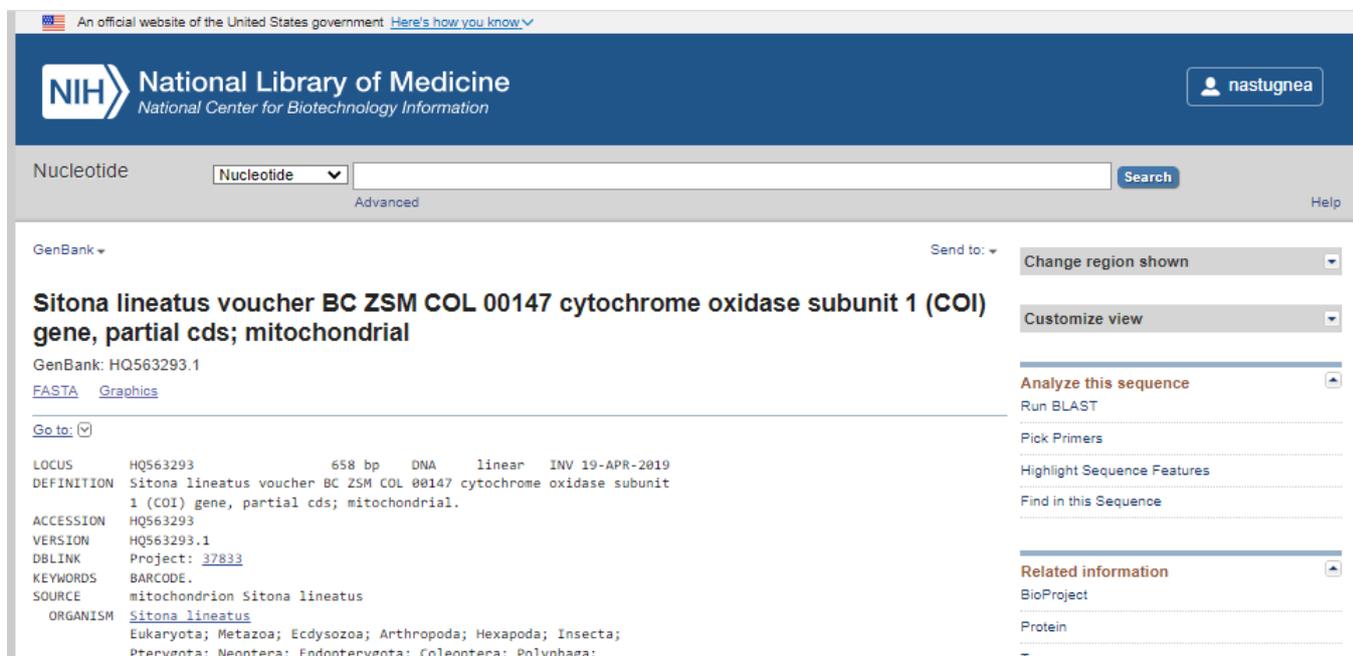
1. Создайте на рабочем столе папку, которую назовете своим именем и фамилией Фамилия\_Имя используя латинский алфавит (Все файлы, которые вы будете создавать в процессе работы, вы будете размещать в этой папке).

**N.B.!** Не используйте знаки **ş, ț, ă, î, â**.

2. Перейдите на страницу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
3. Из раскрывающегося списка выберите базу данных нуклеотидов **Nucleotide**.



4. В поле поиска введите следующий код доступа **HQ563293**. Щелкните левой кнопкой мыши на **Search**.
5. Вы увидите страницу:



GenBank

Send to: Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

BioProject

Protein

Taxonomy

GenBank: HQ563293.1

FASTA Graphics

Go to: ☑

LOCUS HQ563293 658 bp DNA linear INV 19-APR-2019

DEFINITION Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION HQ563293

VERSION HQ563293.1

DBLINK Project: 37833

KEYWORDS BARCODE.

SOURCE mitochondrion Sitona lineatus

ORGANISM Sitona lineatus

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga;

**N.B.!** Каждая последовательность ДНК имеет уникальный идентификатор в базе данных, называемый кодом доступа. Для последовательности на изображении выше это **HQ563293**.

6. Щелкните левой кнопкой мыши кнопку **Send to** в правом углу информационной страницы. Выберите параметр «**File**» и в разделе «**Format**» выберите **FASTA** из списка.

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

**NIH** National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide   Advanced

GenBank

### Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: HQ563293.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS HQ563293 658 bp DNA linear INV 19-APR-2019  
DEFINITION Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial.  
ACCESSION HQ563293  
VERSION HQ563293.1  
DBLINK Project: [37833](#)  
KEYWORDS BARCODE.  
SOURCE mitochondrion Sitona lineatus  
ORGANISM [Sitona lineatus](#)  
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga; [mitochondrion](#); [Cytochrome oxidase subunit 1](#)

Complete Record

Coding Sequences

Gene Features

Choose Destination

File  Clipboard

Collections  Analysis Tool

Download 1 item.

Format

Show GI

7. Щелкните левой кнопкой мыши кнопку **Create File**. Файл в формате fasta будет сохранен в папке «Загрузки» (Downloads) на вашем компьютере под именем *sequence*. Найдите этот файл и переименуйте его, используя код доступа, соответствующий последовательности ДНК, загруженной из базы данных. Например: **HQ563293**.

**N.B.!** В некоторых случаях при загрузке файла с веб-страницы есть возможность сразу указать папку, в которой сохранить файл с нужным именем. Если у вас есть этот вариант, используйте его!

8. Перенесите файл из папки «Загрузки» (Downloads) в папку на рабочем столе, названную в соответствии с вашим личным именем.

9. Проанализируйте информацию на странице и в *Таблице №. 1* из *n.1 Листа ответов*.

10. Заполните *Таблицу № 1* на стр. 1 *Листа для ответов*.

11. Повторите шаги 4–10 для следующих кодов доступа последовательностей ДНК из базы данных NCBI Genbank: **KC784200**, **KC784208**, **KM846028**, **KU919001**.

12. Запустите приложение **MEGA**. Двойной щелчок левой кнопкой мыши по значку  на рабочем столе.

Molecular Evolutionary Genetics Analysis

File Analysis Help

ALIGN DATA MODELS DISTANCE DIVERSITY PHYLOGENY USER TREE ANCESTORS SELECTION RATES CLOCKS DISEASE

TIMETREE

DATA MONKEY

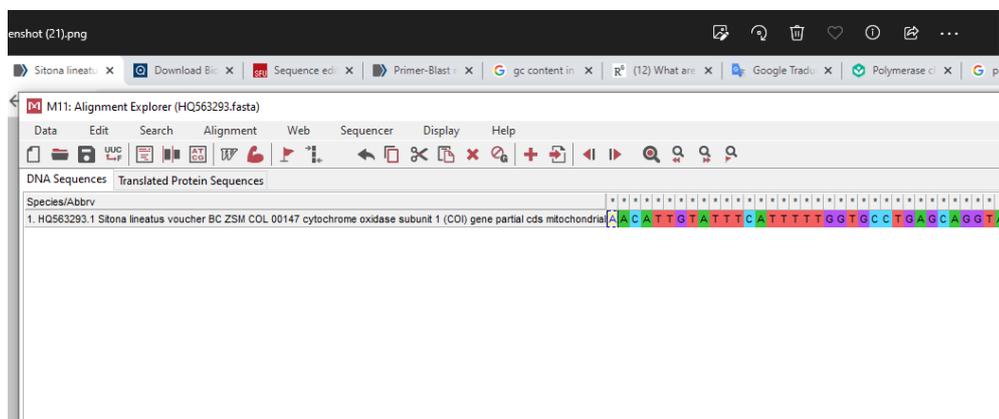
RECENT PUBLICATIONS

HELP DOCS EXAMPLES CITATION REPORT BUG UPDATES MEGA LINKS TOOLBAR PREFERENCES

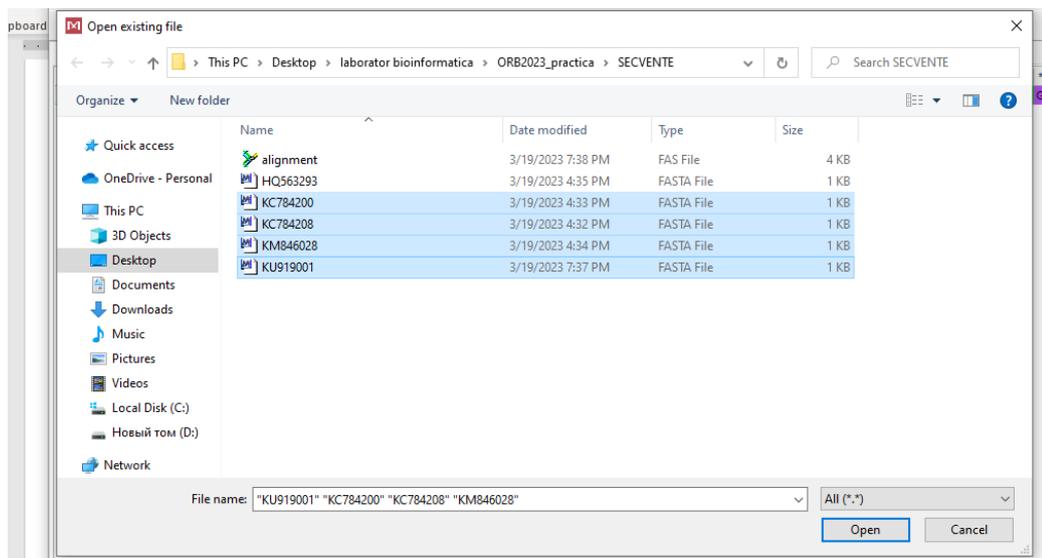
ANALYZE PROTOTYPE



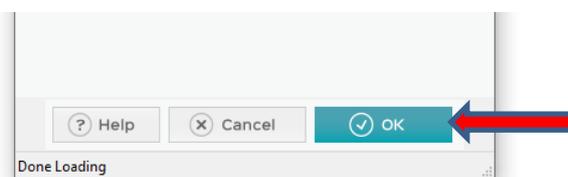
13. Откройте меню **File**, щелкнув левой кнопкой мыши. Выберите щелкнув **Open a file/session**, найдите папку с вашим именем и выберите файл с названием **HQ563293**, щелкнув левой кнопкой мыши. Щелкните левой кнопкой мыши на **Open** (Открыть).
14. На вопрос Align or Analyze щелкнув левой кнопкой мыши ответьте **Align** (выровнять).
15. Откроется следующая страница приложения MEGA:



16. Войдите в меню **Edit** в строке меню, выберите команду **Insert Sequence from File** «Вставить последовательность из файла», затем выберите из папки другие файлы **KC784200**, **KC784208**, **KM846028**, **KU919001**. Вы можете выбрать одну последовательность или все сразу, удерживая левую кнопку мыши. и перемещая курсор по нужным файлам для выделения.

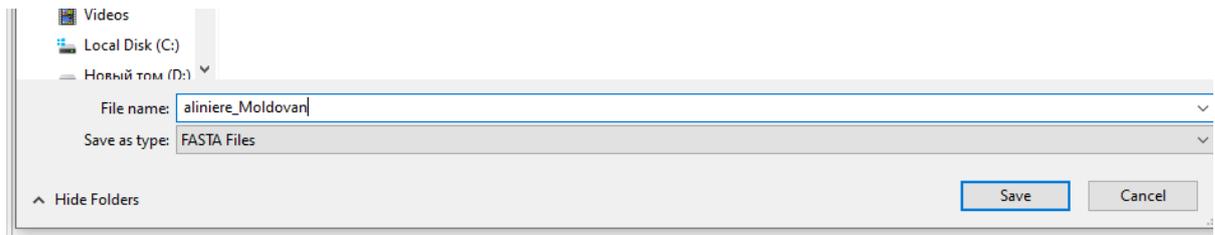


17. Щелкните левой кнопкой мыши на кнопке **Open**.
18. Меню **Edit** → щелкните левой кнопкой мыши на **Select All** (выделить все).
19. Меню **Alignment** (выравнивание) → щелкните левой кнопкой мыши на **Align by ClustaW** → **OK**.

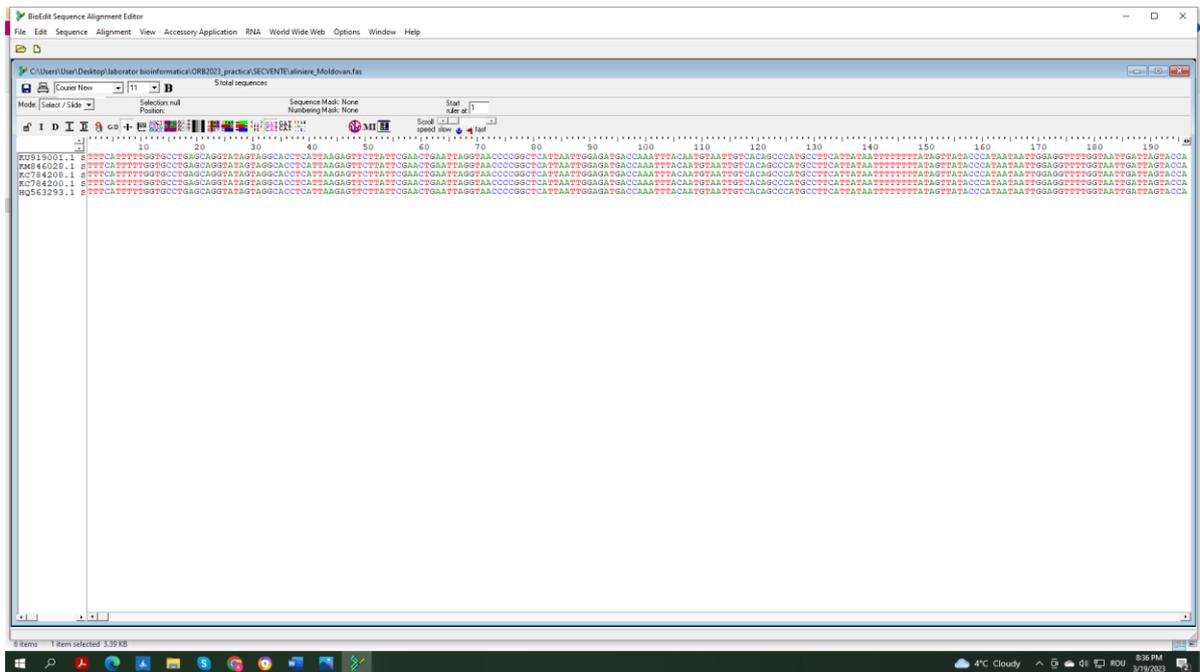


20. В результате этого шага вы получили **выровненные последовательности**.





32. В рабочей папке щелкните правой кнопкой мыши на файле **aliniere\_Фамилия**, выберите **Open with** (откройте его с помощью) и из списка приложений выберите **BioEdit**. Запустится окно приложения.



33. Меню **Edit**→**Select All Sequences**.

34. Меню **Accessory Application**→**ClustalW Multiple Alignment** →**Run ClustalW**→ **OK**.

35. Меню **Alignment**→**Create Consensus Sequence** (создать консенсус сиквенс).

36. В окне приложения щелкните левой кнопкой мыши на слове **Consensus**, затем перейдите в меню **Edit**→**Copy sequences to clipboard (fasta format)** (Копировать последовательности в буфер обмена (формат fasta)).



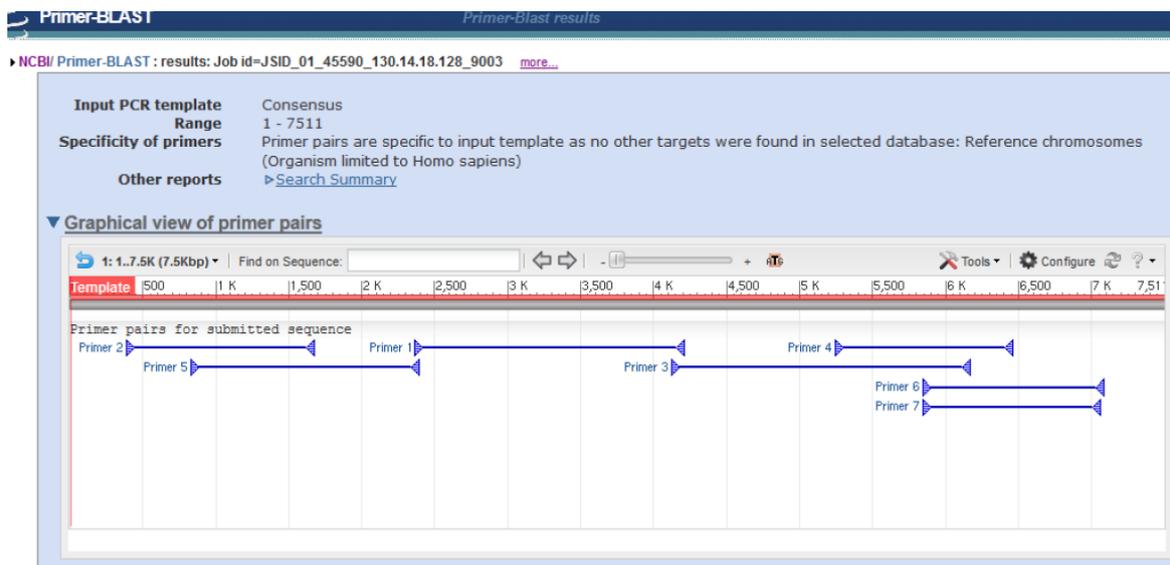
37. Перейдите на веб-страницу Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

38. В поле **PCR template** (матрица для ПЦР) вставьте консенсусную последовательность, скопированную в буфер обмена. Щелкните правой кнопкой мыши +Paste (Вставить) или сочетание клавиш Ctrl+V.

39. В поле **Primer Parameters** (параметры праймеров), **PCR product size** (длина продукта ПЦР) измените настройки так, чтобы длина находилась в диапазоне 200-400 п.н., **Primer melting temperatures** (температуры плавления праймеров) (Tm) укажите в соответствии с общими правилами дизайна праймеров.

40. Оставьте другие параметры неизменными и запустите приложение, щелкнув левой кнопкой мыши **Get Primers**.

41. Визуализация продукта ПЦР (последовательности ДНК, которые можно амплифицировать на основе анализируемой последовательности ДНК), который можно получить с помощью разных пар праймеров, выглядит следующим образом:



42. Таблица содержащая данные о предлагаемых парах праймеров для ПЦР выглядит так:

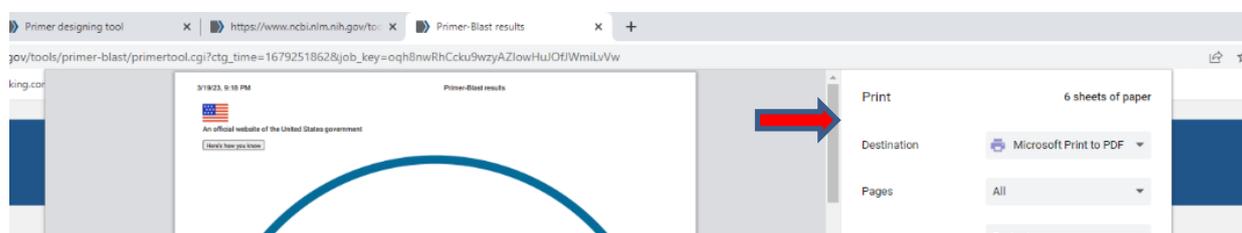
**Detailed primer reports**

Primer pair 1									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGCGCCAGAATCAGGTA	Plus	20	2396	2415	60.11	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	ATTAGCCTCCGAATGCTCG	Minus	20	4177	4158	59.97	55.00	6.00	2.00
Product length	1782								
Primer pair 2									
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCCTGTATGTTGAGCGAGGT	Plus	20	424	443	60.11	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	GTCCCATAGGACGACCTCT	Minus	20	1637	1618	60.11	60.00	8.00	2.00
Product length	1214								
Primer pair 3									

Где :

Sequence (5'->3') - последовательность в направлении (5'->3'), Template strand – копируемая цепь ДНК, Length – длина примера, Start – сайт матрицы ДНК, с которого начинается амплификация, Stop – где заканчивается, Tm – температура плавления, GC, % - содержание С и G, Self-complementarity – самокомплементарность, product length – длина ПЦР продукта.

43. Сохраните информацию на этой веб-странице. Введите комбинацию Ctrl+P. Появится окно. В раскрывающемся списке выберите параметр **Print to PDF** «Печать в PDF». Нажмите кнопку **Print** «Печать» и сохраните файл PDF под именем **rezultat\_Фамилия** в своей папке.



44. Представьте, что вы хотите подобрать наилучшую пару праймеров, которые будут амплифицировать определенный участок исследуемого фрагмента гена **ближе к 3'-концу** кодирующей цепи. Проанализируйте результаты анализа Primer Blast, выберите лучшую пару праймеров и запишите номер пары праймеров в *п. 3 Листа ответов*.
45. Заполните **Таблицу 2 п. 4** в *Листе ответов*.
46. Выполните задания из *Листа ответов*.
47. Прежде чем закрыть приложение **BioEdit**, сохраните результат в виде текстового файла, **File** → **Save as**, расширение **.txt** под именем **aliniere\_Фамилия** (используя латинский алфавит) в вашей папке. Нажмите «ОК» для подтверждения. После сохранения закройте все окна и ответьте «нет» на любые вопросы.
48. **Перед уходом с рабочего места вызовите ассистента для проверки вашей папки и подписания *Листа ответов*.**

## ЛИСТ ОТВЕТОВ

### Лабораторная работа №4. БИОИНФОРМАТИКА

1. Заполните таблицу 1 (по 0,3 б. за каждую правильно заполненную ячейку). 6 б

Таблица 1

Код доступа GenBank (GenBank Accession Number)	Вид	Семейство	Отряд	Длина последовательности, п.н.
HQ563293				
KC784200				
KC784208				
KM846028				
KU919001				

2. Site (сайт): \_\_\_\_\_ 6 б

3. Наилучшей парой праймеров является пара с номером \_\_\_\_\_ 4 б

4. Заполните Таблицу 2 (по 0,5 балла за каждую правильно заполненную клетку. Частичная оценка: 0,25 балла за каждую правильно заполненную клетку, соответствующую выбору в п.3). 9 б

Таблица 2

	Последовательность (5'→3')	Цепь ДНК	Длина примера	старт	стоп	Tm, °C	GC %	самокомплементарность	3' самокомплементарность
<i>Столбец</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
Прямой праймер									
Обратный праймер									

5. Длина продукта ПЦР, амплифицированного с выбранной парой праймеров: \_\_\_\_\_

6. Какая информация в Таблице 2 больше всего повлияла на решение относительно наилучшей пары праймеров? Введите число, соответствующее столбцу \_\_\_\_\_ 6 б
7. Впишите в отведенное место букву А, если считаете утверждение верным, и букву F, если считаете утверждение ложным (по 2 б.): 12 б

В реакции ПЦР используется принцип транскрипции ДНК.	
В стандартной реакции ПЦР используются праймеры, поскольку ДНК-полимераза обладает свойством инициировать синтез цепи ДНК <i>de novo</i> .	
В стандартной реакции ПЦР используются прямой и обратный праймеры, поскольку ДНК-полимераза может катализировать только присоединение нуклеотида к свободному 3'-ОН-концу пентозы.	
Предложенная в результате лабораторной работы пара праймеров специфична на видовом уровне.	
Предложенная пара праймеров может быть использована для выявления особей родственных видов одного рода	
Праймеры должны заканчиваться (3') на CC, CG, GC или GG или иметь 2 из последних 5 нуклеотидов C или G, чтобы обеспечить стабильность связи праймер-ДНК-полимераза	

8. Попросите ассистента проверить вашу папку и расписаться в таблице 3 (по 2 б.). 6 б

Таблица 3

Файл aliniere_Фамилия .fasta	
Файл aliniere_Фамилия .txt	
Файл rezultat_Фамилия .pdf	

*Спасибо за проделанную работу!*