

ОЛИМПИАДА ПО БИОЛОГИИ
республиканский тур, 20 – 23 марта 2026

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 замечок!** Работы, которые не будут соответствовать требованиям, могут быть отклонены Жюри.

По окончании каждой лаборатории сдайте работу наблюдателю и распишитесь в ведомости.

Лабораторная работа 1 (525)
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ (50 баллов)

ОСНОВНЫЕ ИНСТРУКЦИИ

- Если вы готовы поместить пробирки с реакционной смесью в термостат, поднимите желтую карточку. Лаборант заберёт пробирки и поместит их в термостат.
- Если время инкубации истекло и вы хотите забрать пробирки из термостата, поднимите желтую карточку. Лаборант принесет ваши пробирки.
- Если вы готовы пойти в зону электрофореза, поднимите зеленую карточку.
- Если вы столкнулись с трудностью, для решения которой вам необходима помощь, поднимите красную карточку.
- Если вы хотите выйти в туалет, поднимите синюю карточку, в этом случае вас будет сопровождать лаборант.
- Вы будете выполнять работу разделившись на 2 группы, участники с номерами 1-7 представляют первую группу, участники с номерами 8-15 представляют группу №2. Схема организации работы в лаборатории представлена в таблице ниже:

Интервал времени	Группа	Действие
0-5 мин.	1+2	Общие инструкции, проверка наличия указанных материалов.
6-15 мин.	1	Выполнение части 1, шагов 1-5 в приоритетном порядке, затем другие шаги или задачи.
6-15 мин.	2	Выполнение задач 4-10 Листа ответов.
15-24 мин.	1	Выполнение части 1, шагов 6-11.
15-24 мин.	2	Выполнение части 1, шагов 1-5 в приоритетном порядке, затем другие шаги или задачи.
25-40 мин.	1	Выполнение части 2 и задач в Листе ответов.
25-40 мин.	2	Выполнение части 1, шагов 6-11.
40-55 мин.	1	Выполнение задач в Листе ответов.
40-55 мин.	2	Выполнение части 2 и задач в Листе ответов.
55-60 мин.	1+2	Выполнение заданий, подготовка к переходу в следующую лабораторию.

РУКОВОДСТВО ПО ЭКСПЛУАТАЦИИ ДОЗИРУЮЩЕЙ ПИПЕТКИ

- ✓ **Регулировка объёма** - Чтобы установить нужный объём, поверните регулировочное кольцо, расположенное в верхней части микропипетки. Поворачивайте кольцо вправо или влево для уменьшения или увеличения объёма. **НЕ УСТАНАВЛИВАЙТЕ ОБЪЁМ НИЖЕ ИЛИ ВЫШЕ ДОПУСТИМЫХ ПРЕДЕЛОВ ВАШЕЙ МИКРОПИПЕТКИ.**
- ✓ **Набор жидкости** - Прежде чем набирать и переносить жидкость, убедитесь, что вы правильно установили объём и надели наконечник. Удерживая пипетку вертикально, нажмите поршень до первого упора. Погрузите наконечник микропипетки в раствор на глубину примерно 3 мм. Медленно отпустите поршень, позволяя ему вернуться в исходное положение. Жидкость начнёт подниматься в наконечник. Не отпускайте поршень слишком быстро, чтобы избежать образования пузырьков и попадания жидкости в корпус пипетки на нестерильный стержень. Выньте наконечник из раствора. Набранная жидкость теперь находится внутри наконечника.
- ✓ **Примечание:** Наиболее серьёзной и распространенной ошибкой является нажатие поршня до второго упора перед набором жидкости. Избегайте этой ошибки.
- ✓ **Выпуск жидкости.** Заполнив наконечник жидкостью, удерживая пипетку вертикально, введите наконечник в сосуд, в который необходимо перелить жидкость. Не выпускайте жидкость в воздух. Аккуратно нажмите на поршень до первого упора, сделайте паузу, затем продолжайте нажимать до второго упора. Бóльшая часть содержимого высвобождается при нажатии до первого упора; нажатие до второго упора обеспечивает выпуск последней капли.

Удерживая пипетку вертикально, выньте наконечник из приёмного сосуда и верните поршень в исходное положение. Сбросьте наконечник, нажав кнопку сброса над контейнером для отходов.

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ

Бактериофаги - это вирусы, инфицирующие бактерии. С целью размножения бактериофаги (или фаги) захватывают контроль над молекулярным аппаратом бактериальной клетки-хозяина. Они могут размножаться внутри бактерии и, в результате, разрушать её (литический цикл), либо их ДНК может интегрироваться в бактериальную хромосому и длительное время оставаться в латентном состоянии (лизогенный цикл). Примером является бактериофаг бактерии *Escherichia coli* — фаг λ (Лямбда).

В 1962 году исследователи обнаружили, что бактерии обладают примитивной иммунной системой, которая препятствует репликации вирусной ДНК в инфицированной бактериальной клетке. Позднее было показано, что данный иммунный ответ опосредован ферментами, которые расщепляют вирусную ДНК и тем самым ограничивают размножение вирусов. Благодаря этой функции данные ферменты были названы рестриктазами. Будучи ферментами класса гидролаз с эндонуклеазной активностью, рестриктазы распознают определённую нуклеотидную последовательность (сайт рестрикции) и специфически гидролизуют двухцепочечные молекулы ДНК, образуя фрагменты рестрикции различной длины.

Рестриктазы широко используются в генной инженерии, особенно в клонировании. Некоторые ферменты расщепляют обе цепи ДНК точно на одной оси симметрии, образуя фрагменты с прямыми концами (*blunt ends*). Другие расщепляют каждую цепь в соответствующих позициях по обе стороны оси симметрии, формируя „липкие” концы (*sticky ends*) - короткие одноцепочечные участки на концах фрагментов ДНК.

Каждый фермент рестрикции получает название по бактерии, из которой он был выделен. Первая буква указывает на род бактерии. Следующие две буквы обозначают вид бактерии. Четвёртая буква указывает на штамм. Римская цифра в конце названия показывает порядок, в котором фермент был выделен из данного бактериального штамма.

Например, рестриктаза HindIII была третьим ферментом рестрикции, выделенным из клеток бактерии *Haemophilus influenzae* серотипа d.

ДНК бактериофага λ (Лямбда) используется для оценки активности рестрикционных ферментов благодаря хорошо изученной последовательности, оптимальному размеру и наличию большого количества сайтов распознавания для различных ферментов.

РАЗДЕЛЕНИЕ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Электрофорез - это метод, используемый для разделения смешанных популяций макромолекул, таких как ДНК, РНК или белки. Электрофорез в агарозном геле позволяет анализировать фрагменты ДНК, полученные в результате расщепления рестриктазами. Фрагменты рестрикции мигрируют в матрице геля с различной скоростью в зависимости от их размера, что обеспечивает их разделение.

Для визуализации ДНК гель обрабатывают интеркалирующими соединениями (бромистый этидий или SYBR Green). В результате разделённые фрагменты становятся видимыми на геле в виде полос. Для определения длины фрагментов вместе с экспериментальными пробами загружают молекулярный маркер длины (Ladder), который содержит молекулы известного размера. Он мигрирует вместе с экспериментальными пробами. Длина неизвестного фрагмента ДНК оценивается на основе калибровочной кривой, построенной с использованием данных о расстоянии миграции полос маркера.

НЕОБХОДИМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ:

- ✓ ДНК фага λ в пробирке, обозначенной **ADN λ**
- ✓ Буферный раствор 10X FastDigest Buffer в пробирке, обозначенной **buffer**

- ✓ Фермент FastDigest EcoRI в пробирке, обозначенной **EcoRI**
- ✓ Фермент FastDigest BamHI в пробирке, обозначенной **BamHI**
- ✓ Деионизированная вода без нуклеаз в пробирке, обозначенной **H₂O_d**
- ✓ Микропробирки (пробирки Ерпендорф) – 3 шт. и штатив для пробирок – 1 шт.
- ✓ Самоклеящиеся этикетки
- ✓ Перманентный маркер, 1 шт.
- ✓ Дозирующая пипетка и наконечники
- ✓ Парафильм
- ✓ Электрофоретическая камера и агарозный гель в ней
- ✓ Термостат инкубатор
- ✓ Фотография, содержащая изображение электрофоретического геля, визуализированного с помощью трансиллюминатора.

ХОД РАБОТЫ:

I. Рестрикционный анализ. Ферментативное расщепление ДНК фага λ.

1. Определите местоположение пробирок, содержащих ферменты, ДНК и буфер. Храните пробирки с растворами на льду.
2. Возьмите 2 микропробирки (пробирки Эрпендорфа) и промаркируйте их следующим образом:
 - ✓ **B \underline{Nn}** - Ферментативное расщепление BamHI
 - ✓ **E \underline{Nn}** - Ферментативное расщепление EcoRI

Где **N** - цифра/число, соответствующее месту за столом, которое вы занимаете, а **n** –номер, соответствующий порядку выполнения лабораторной работы по Молекулярной биологии.

!Например,** если вы сидите за столом № 8 и выполняете первую из 4 лабораторных работ, лабораторную работу по Молекулярной биологии, у вас будут следующие записи на микропробирках. **B81, E81.

3. В каждой из промаркированных пробирок приготовьте реакционные смеси в конечном объеме **20 мкл** для ферментативного расщепления ДНК фага λ при комнатной температуре в соответствии с **Таблицей 1.**

Таблица 1

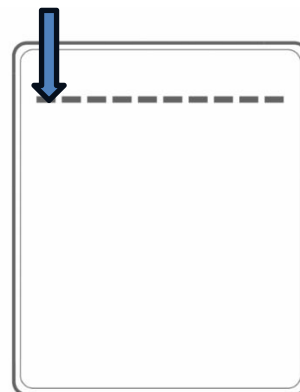
Микропробирки	H ₂ O _d , мкл	ADN λ, мкл	10X FastDigest Buffer, мкл	FastDigest BamHI, мкл	FastDigest EcoRI, мкл
B	14	3	2	1	-
E	14	3	2	-	1

4. Добавьте каждый из растворов по очереди в порядке, указанном в таблице, слева направо, в микропробирку, обозначенную буквой **B**.
 - ✓ *Всегда меняйте наконечник пипетки перед добавлением нового раствора.*
 - ✓ *Пипетируйте каждый раствор в пробирку на дно и добавьте его в предыдущий раствор.*
 - ✓ *Когда реакционная смесь будет готова, плотно закройте пробирку и несколько раз осторожно встряхните ее.*
 - ✓ *Поместите пробирку на лед.*
5. Повторите пункт 4 для второй реакционной смеси.
6. Когда вы захотите поместить микропробирки для инкубации, поднимите соответствующую карточку, чтобы попросить помощи у ассистента.
7. Попросите лаборанта проверить ваши микропробирки и расписаться в **п. 1. ЛИСТА ОТВЕТОВ.**

8. Микропробирки следует поместить при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ на **10 минут**.
9. Отмерьте 10 минут с момента помещения микропробирок в термостатический инкубатор.
10. По истечении 10 минут поднимите желтую карточку, чтобы попросить принести вам пробирки. Более длительное время инкубации (несколько минут) не окажет существенного влияния на результат.
11. Пока вы ждете, вы можете выполнить задания **4-9 ЛИСТА ОТВЕТОВ**.

II. Разделение и визуализация рестрикционных фрагментов методом электрофореза

1. Электрофоретическая камера была собрана лаборантами. Для электрофореза будет использоваться 1% агарозный гель. Используемым буферным раствором является TAE 1X (трис-ацетат-ЭДТА, 40 mM трис-основания, 20 mM уксусной кислоты, 1 mM ЭДТА). Лунки, **представляют собой свободные места в агарозном геле**. В одной из лунок уже размещен маркер длины, называемый «Ladder», а также ДНК фага λ , не подвергшаяся расщеплению. Кроме того, на геле могут уже быть образцы, исследованные другими конкурентами. Лаборант точно укажет, куда вам следует поместить свой образец. Рядом со станцией электрофореза будет находиться таблица с распределением образцов на геле. После получения необходимых инструкций вас попросят расписаться в таблице, чтобы подтвердить местонахождение вашего образца.
2. Если вы хотите загрузить образец в гель, возьмите соответствующую карточку и обратитесь за помощью к ассистенту. Вы можете сделать это только в сроки, указанные для вашей группы.
3. Чтобы загрузить образец в гель, выполните следующие действия:
 - ✓ В сопровождении ассистента вы подходите к рабочему месту, имея при себе образец, обозначенный как **VN₁**, и **ЛИСТЫ ОТВЕТОВ**.
 - ✓ Попросите ассистента указать, в какую лунку загрузить образец. Заполните таблицу п.2 Листа Ответов, указав код лунки, в которую был помещен образец.
 - ✓ Подпишитесь в таблице, чтобы подтвердить размещение вашего образца.
 - ✓ Установите пипетку на 16 мкл. Наденьте чистый наконечник.
 - ✓ Загрузите образцы в гель, как показано на рисунке. Держите пипетку вертикально. Вставьте наконечник на 2 мм в лунку и нажмите на поршень до первого упора. Удерживая поршень, извлеките наконечник из лунки и из жидкости. Расслабьте поршень. Выбросьте наконечник.



4. По окончании попросите лаборанта подписать **п. 2 в ЛИСТЕ ОТВЕТОВ**.
5. Вернитесь на свое рабочее место и выполните задание **10 ЛИСТА ДЛЯ ОТВЕТОВ**.

ЛИСТ ОТВЕТОВ

Лаборатория №1. *МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ*

РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ.

1. Обратитесь к ассистенту лаборатории с просьбой проверить ваши микропробирки и расписаться в таблице ниже. (4 б)

Критерий	Общий балл		Частичный балл	
Маркировка		2 б		1 б
Пипетирование		2 б		1 б

2. Запишите в отведённом месте код вашей пробы в соответствии с указанной лункой и попросите ассистента расписаться в таблице.

Код лунки, в которую был загружен Ваш образец		
---	--	--

Загрузите образец в агарозный гель. Обратитесь к ассистенту лаборатории с просьбой расписаться в таблице. (4 б)

Общий балл, 4 б	Частичный балл, 2 б

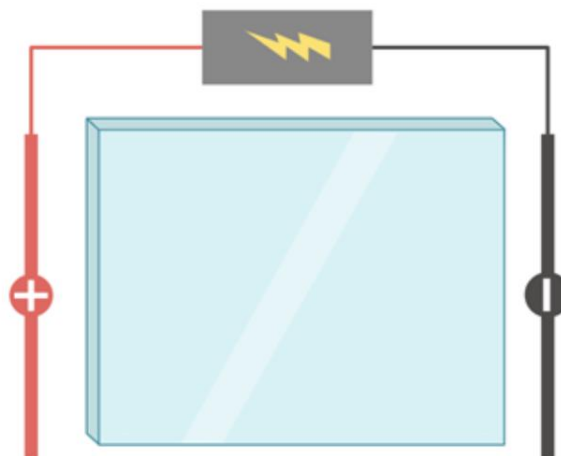
3. Оценка выполнения ферментативной реакции.

(4 б)

Место, предназначенное для прикрепления изображения, полученного с трансиллюминатора, на котором представлены ваши образцы после 45 минут миграции в 1% агарозном геле, в буферном растворе TAE 1X при напряжённости 7 В/см.

4. Во время электрофореза нуклеиновые кислоты мигрируют в геле под воздействием электрического поля. Проанализируйте схематическое изображение расположения электродов в электрофоретической камере. Укажите стрелкой в каком направлении мигрируют фрагменты ДНК.

(1 б)

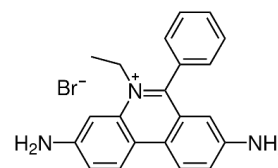


5. Гели для электрофореза различаются по количеству агарозы, используемой для их приготовления. Проанализируйте утверждения и заполните таблицу ниже, проставив в соответствующем поле знак “+”, если вы согласны с утверждением, и “-”, если не согласны с ним:

(4 б)

Утверждение	Вывод
Чем выше содержание агарозы, тем более плотным является гель.	
Плотность агарозного геля влияет на скорость миграции фрагментов ДНК.	
Разделение коротких фрагментов ДНК проводится в гелях с низким содержанием агарозы.	
Длинные фрагменты ДНК мигрируют с большей скоростью.	

6. Для визуализации фрагментов нуклеиновых кислот в агарозном геле используется вещество бромистый этидий. Проанализируйте приведённые ниже утверждения. В таблице отметьте букву “А”, если считаете утверждение верным, и “F”, если считаете его ложным.



(3 б)

Бромистый этидий

Утверждение	А/Ф
Бромистый этидий взаимодействует с ДНК и излучает флуоресцентный сигнал при облучении ультрафиолетовыми лучами.	
Агарозный гель можно обработать бромистым этидием после завершения электрофореза, чтобы обеспечить визуализацию фрагментов ДНК.	
С помощью бромистого этидия можно визуализировать как двухцепочечные, так и одноцепочечные фрагменты нуклеиновых кислот.	

7. Выявление и устранение проблем является важным аспектом работы в лаборатории. Представьте, что после проведения электрофореза фрагментов рестрикции вы получили неудовлетворительные результаты. Проанализируйте приведённые утверждения и сопоставьте наблюдаемые проблемы в результатах электрофореза из колонки А с возможными причинами их возникновения из колонки В. Впишите буквы (а–е) напротив цифр в выделенном поле перед колонкой А:

(5 б)

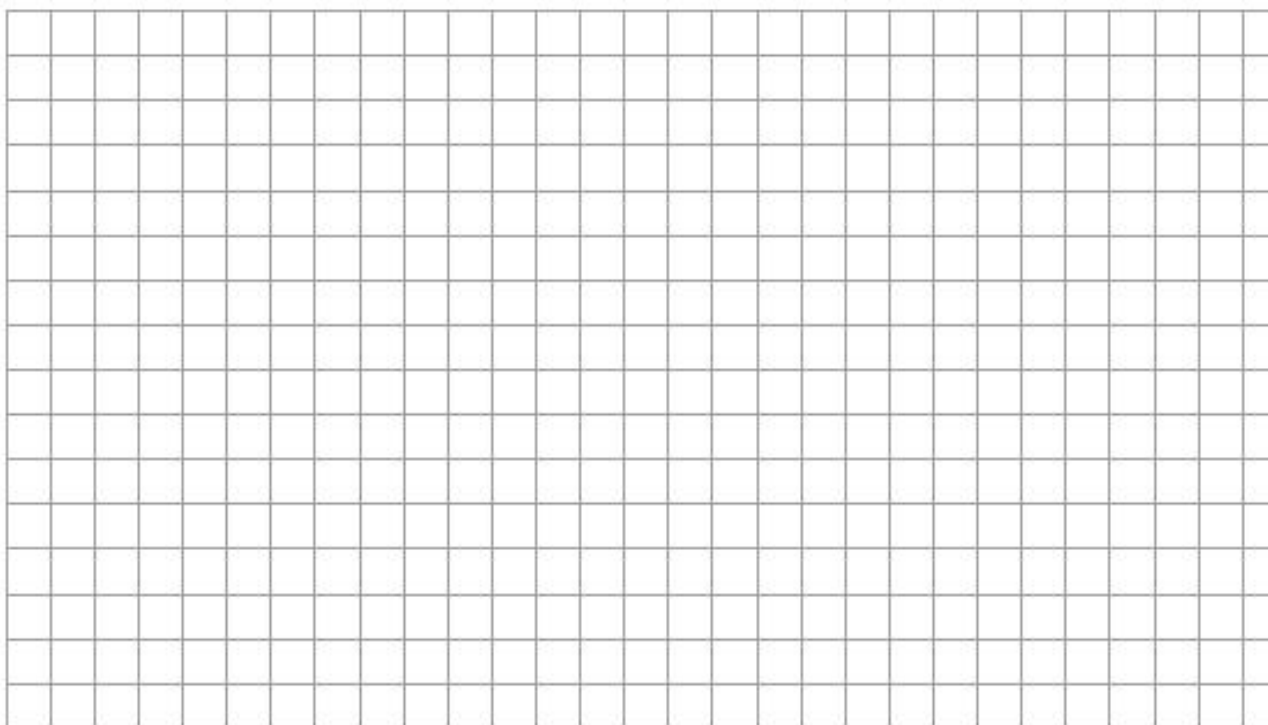
А. Проблема	В. Возможная причина
_____ 1. Полосы разделены недостаточно	а) Гребёнка извлечена до того, как гель затвердел
_____ 2. Появление дополнительных неспецифичных полос	б) Избыток фермента рестрикции
_____ 3. Появление волнистых полос	в) Недостаточное время миграции в геле
_____ 4. Полосы слабо видны	д) Неполное расщепление ДНК
_____ 5. Исчезновение полос, соответствующих маленьким фрагментам	е) Длительная миграция в геле

8. Согласно данным из специализированной литературы, линейная ДНК бактериофага λ (лямбда) имеет длину 48502 пары оснований. Карта рестрикции фермента BamHI приведена ниже. Каждое число указывает расстояние в парах оснований от конца линейной молекулы ДНК λ до соответствующего сайта рестрикции. (6 б)



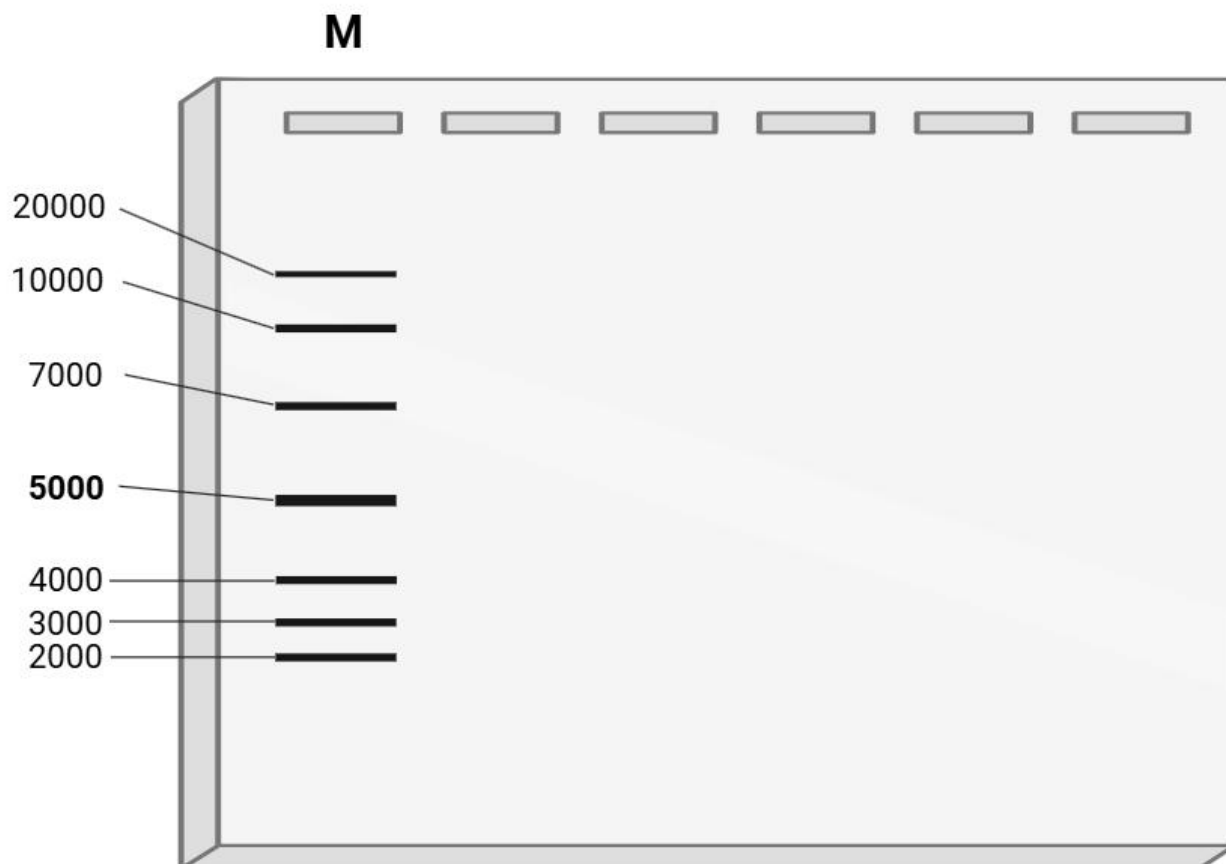
- а. В таблице ниже укажите длину в парах оснований отдельных фрагментов, образованных в результате ферментативного расщепления ферментом. В отведённом ниже пространстве покажите, как вы определяли длину фрагментов. (3 р)

Фрагмент	Длина	Максимальный балл	Частичный балл
a		0,5 б	0,25 б
b		0,5 б	0,25 б
c		0,5 б	0,25 б
d		0,5 б	0,25 б
e		0,5 б	0,25 б
f		0,5 б	0,25 б



- б. На рисунке, представленном ниже, укажите фрагменты рестрикции в соответствии с их длинами и распределением на геле.

36



9. В зависимости от целей исследования, ДНК может подвергаться расщеплению одновременно двумя ферментами в одной реакции, что позволяет получить уникальные фрагменты рестрикции. Ответьте на вопросы ниже, указав Ваш ответ “ДА” или “НЕТ” в соответствующих полях таблицы. (3 б)

Вопрос	Ответ	Балл
1 Может ли использование двух разных рестрикционных ферментов облегчить направленное клонирование фрагмента ДНК в плазмидный вектор?		1 б
2 Если у двух рестрикционных ферментов разные оптимальные температуры, возможно ли осуществить последовательный гидролиз ДНК, начав с фермента с более низкой оптимальной температурой и деактивировав его перед добавлением второго фермента?		1 б
3 Метилирование ДНК является частью природного механизма защиты бактериальной клетки от экзогенной ДНК. Может ли данная эпигенетическая модификация препятствовать гидролизу геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции в случае перекрывания их сайтов узнавания с метилированными последовательностями?		1 б

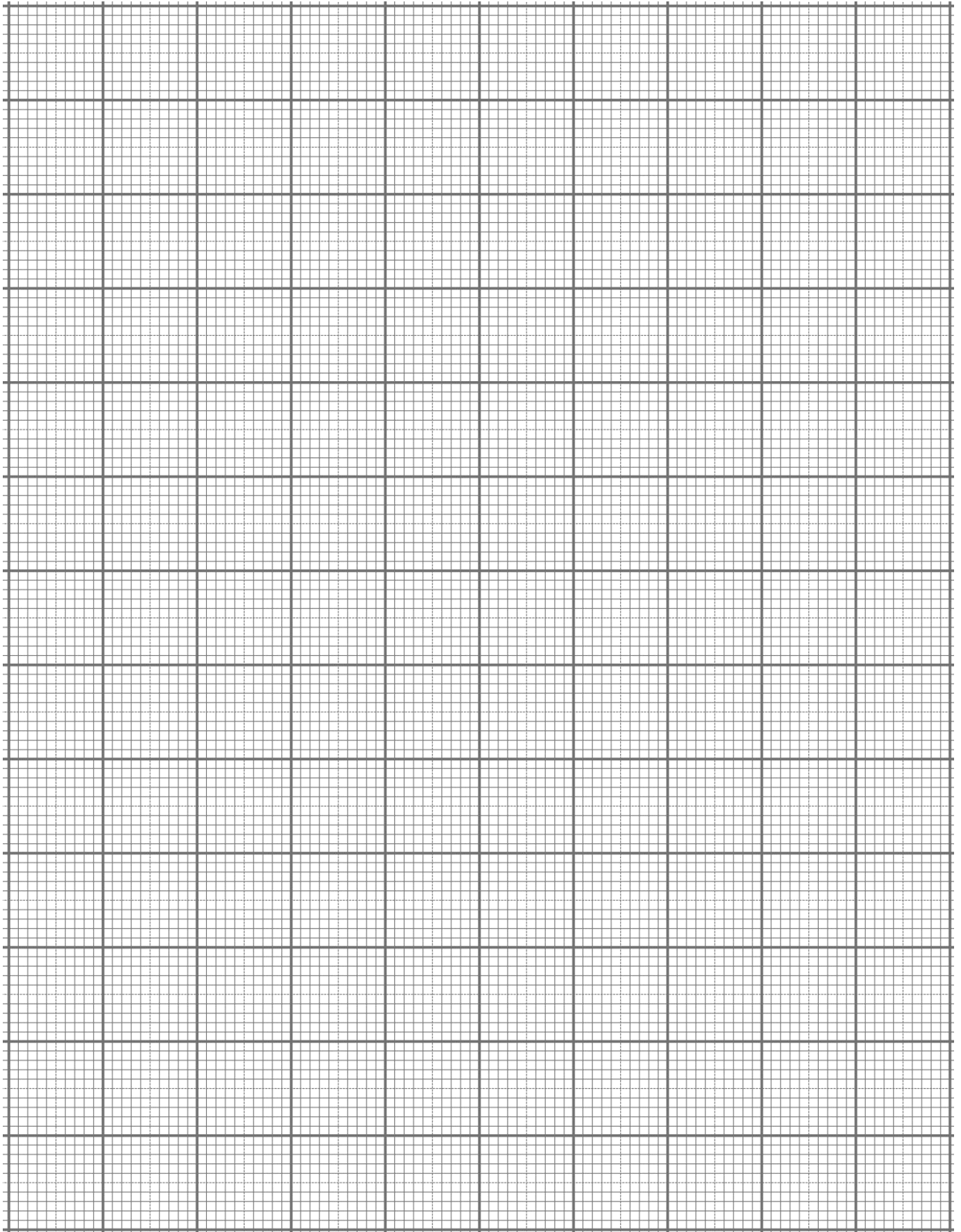
10. Электрофорез ферментативно расщепленной ДНК фага λ занимает приблизительно один час. Во время выполнения этого задания вы не сможете проанализировать свой образец. Проанализируйте изображение электрофореза в 1% агарозном геле ДНК фага λ , которая была ферментативно расщеплена точно следуя инструкциям в предоставленном Вам для выполнения задания протоколе (Приложение). Образцы загружались в лунки в следующем порядке: Маркер длин (ladder) (M), ДНК λ , ДНК расщепленная EcoRI (E), ДНК расщепленная BamHI (B). (16 б)

- а. Укажите количество видимых фрагментов ДНК, полученных при ферментативном расщеплении с помощью фермента BamHI, и определите длину фрагментов, обозначенных на изображении цифрами 1 и 2. Запишите ответы в таблицу ниже. В отведённом месте покажите, как вы определяли длину фрагментов ДНК.

11 б

Ферментативное расщепление ДНК фага λ с BamHI

Количество видимых фрагментов ДНК на фотографии геля	Длина фрагмента, отмеченного цифрой 1, pb	Длина фрагмента, отмеченного цифрой 2, pb
1 б	1 б	1 б



б. Ответьте на вопросы ниже, указав Ваш ответ “ДА” или “НЕТ” в соответствующих полях таблицы. **2 б**

Вопрос		Ответ	Балл
1	Количество полученных фрагментов совпадает с прогнозируемым согласно данным из специализированной литературы?		1 б
2	Длина фрагментов, отмеченных цифрами 1 и 2, совпадает с прогнозируемой согласно данным из специализированной литературы?		1 б

с. Если на вопрос 2 пункта б вы ответили “НЕТ”, каково могло бы быть возможное объяснение? Проанализируйте возможные объяснения, представленные в таблице ниже. В таблице отметьте букву “А”, если вы считаете, что объяснение является Верным, и “F”, если считаете объяснение Ложным. **3 б**

Возможное объяснение	A/F	Балл
Размер фрагментов ДНК определяется с помощью стандартной калибровочной кривой. Неточное измерение расстояния, пройденного полосами на геле, приводит к ошибочному определению длины фрагмента.		1 б
Фрагменты ДНК соединяются путем образования водородных связей на основе комплементарности на липких концах, образующихся в результате расщепления ферментом BamHI (5'-GATC...-3'). По сравнению с ковалентными связями, водородные связи образуют гораздо более стабильные структуры ДНК.		1 б
Хранение маркера длин при неподходящих температурных условиях может привести к частичной деградации фрагментов и изменению их свойств. Построение стандартной кривой на основе такого маркера приводит к ошибочным результатам.		1 б

Спасибо за проделанную работу!