

27-ая Международная Биологическая Олимпиада

17-23 июля 2016 года
Ханой, Вьетнам



Практическое задание 4 **МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**

Общее число баллов: 100
Продолжительность: 90 минут

ДОРОГИЕ УЧАСТНИКИ

В этом задании вам предстоит провести комбинированный эксперимент ПЦР-ПДРФ чтобы решить одновременно две задачи:

1. Провести генотипирование по гену NAT2, кодирующему фермент, метаболизирующий лекарства, для определения оптимальной дозировки таблеток для лечения больных туберкулезом (ТВ)
2. Провести идентификацию биопсийных образцов

Эксперимент состоит из пяти заданий:

- Задание 1: Планирование эксперимента ПДРФ (17 баллов)
- Задание 2: Проведение эксперимента ПДРФ (44 балла)
(Примечание: Электрофорез необходимо начать не позже, чем через **75 минут** после начала работы. Позже вам НЕ РАЗРЕШАТ провести электрофорез).
- Задание 3: Идентификация личности по неизвестным биопсийным образцам (9 баллов)
- Задание 4: Определение генотипов пациентов (12 баллов)
- Задание 5: Определение оптимальной дозы лекарства для пациентов с разными генотипами (18 баллов)

Пожалуйста обратите внимание на следующее:

- Не забудьте вписать карандашом свой код студента в соответствующую ячейку на первой странице вашего **Листа ответов**.
- Вписывайте ваши ответы в отдельном **Листе ответов** (используя карандаш и резинку). **Оцениваться** будут только ответы, вписанные в **Лист Ответов**.
- Перед началом теста убедитесь, что вы получили все перечисленные материалы и оборудование. Если что-либо отсутствует, немедленно поднимите **Красную Карточку**, чтобы проинформировать лаборантов.
- Во время работы правильно используйте оборудование. Пролитые реактивы или сломанное оборудование **НЕ будут** заменены. Однако, если оборудование не работает, немедленно поднимите **Красную Карточку**. Лаборант поможет вам и, если нужно, заменит оборудование.
- Прекратите отвечать и отложите карандаш сразу же по звонку об окончании теста. Вложите **Лист Ответов, Лист с Вопросами и распечатанными данными** в предоставленный конверт.
- Запрещается выносить из лаборатории листы и какие-либо материалы

Удачи!

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

Материалы и оборудование	Количество
Камера для горизонтального электрофореза FlashGel™ с кнопкой для подсветки	1 шт
Готовый агарозный гель FlashGel™ (в закрытом пакете)	1 шт
Источник тока для (один на двоих участников, обслуживается лаборантом)	1 шт
Водяная баня 37°C (одна для 4 студентов; находится позади вас)	1 шт
Нагревательный блок (один для 4 студентов; находится позади вас)	1 шт
Микроцентрифуга с адаптерами для пробирок объемом 0,2 / 1,5 мл	1 шт
Микропипетки P200 (до 200 мкл)	1 шт
Микропипетка P20 (до 20 мкл)	1 шт
Стерильные наконечники для микропипеток для P20 в коробке	1 коробка
Стерильные наконечники для микропипеток для P200 в коробке	1 коробка
Коробка со льдом (с крышкой)	1 шт
Штатив для пробирок на 1,5 мл	1 шт
Штатив для пробирок на 0,2 мл	1 шт
Пробирки на 1,5 мл	5 шт
Пробирки на 0,2 мл (ПЦР пробирки)	15 шт
Секундомер (таймер)	1 шт
Плавающий пенапластовый штатив для водяной бани (15 отверстий для пробирок на 0,2 мл)	1 шт
Зеленая карточка (сигнал лаборанту о том, что вы готовы к продолжению эксперимента)	1 шт
Красная карточка (сигнал лаборанту о технических проблемах или о необходимости помощи)	1 шт
Пластиковый стакан с крышкой для использованных наконечников	1 шт
Перчатки одноразовые	3 пары
Перманентный маркер	1 шт
Наклейка с кодом студента (для прикрепления к фотографии фореа)	1 шт
Бумажная салфетка Kimwipe для того, чтобы убрать лишнюю жидкость с геля	1 коробка
Бумажная салфетка (Pussy) для вытирания стола / оборудования (если понадобится)	1 коробка
Защитные очки	1 шт
Промывалка с дионизированной водой (500 мл)	1 бутылка
Ножницы (для вскрытия пакета с гелем)	1 шт

Другие материалы, включая ручной калькулятор, карандаш (2B тип), резинка для карандаша, предоставляются для общего пользования во всех лабораториях

Реагенты	Количество
Продукты ПЦР гена NAT2, полученные от трех пациентов (зеленые пробирки, подписанные P1, P2 и P3)	3 пробирки x 10 мкл
Продукты ПЦР гена NAT2, полученные из трех неизвестных биопсийных образцов (красные пробирки, подписанные X, Y и Z)	3 пробирки x 10 мкл
Рестриктаза KpnI, подписанная RE1 (зеленая наклейка)	1 пробирка x 10 мкл
Рестриктаза BamHI, подписанная RE2 (голубая наклейка)	1 пробирка x 10 мкл
Рестрикционный буфер (10x), подписанный BF (фиолетовая пробирка)	1 пробирка x 50 мкл
Пробирка с водой, подписанная W (белая наклейка на голубой пробирке)	1 пробирка x 200 мкл
Краситель для ДНК, подписанный D (красная наклейка на красной пробирке)	1 пробирка x 50 мкл
ДНК лестница (маркер молекулярного веса), подписанный M (оранжевая наклейка на желтой пробирке)	1 пробирка x 10 мкл

ЗАДАНИЕ 1. ПЛАНИРОВАНИЕ ПЦР-ПДРФ ЭКСПЕРИМЕНТА (17 БАЛЛОВ)

Введение

Изониазид (INH) является основным препаратом для лечения туберкулеза (ТВ). Несмотря на значительные успехи в его применении, иногда он не оказывает терапевтического эффекта или приводит к нежелательным побочным эффектам (чаще всего это поражение печени, иногда приводящие к смертельному исходу). Было установлено, что основной причиной поражения печени является ацетилирование INH.

На **Рисунке 1** показан основной путь ацетилирования INH, который катализируется неиндуцибельным ферментом печени ариламином N-ацетилтрансферазой типа 2 (NAT2). Скорость ацетилирования постоянна у каждого пациента, но различается у разных пациентов. Популяция людей может быть разделена на три разных фенотипические группы, в зависимости от скорости ацетилирования лекарства: медленно-, средне- и быстроацетилирующие. Известно, что индуцируемая INH гепатотоксичность чаще всего развивается у медленно ацетилирующих пациентов. Наоборот, у быстро ацетилирующих лечение бывает неэффективным. Чаще всего быстро ацетилирующими являются пациенты - гомозиготы по аллелям дикого типа во всех трех SNP C481, G590, G857 (SNP - однонуклеотидный полиморфизм). Такая комбинация SNP на хромосоме обозначается NAT2*4. Средне ацетилирующие пациенты являются гетерозиготами по мутантному аллелю одного (любого) из трех SNP. Эти мутации обозначаются следующим образом: NAT2*5 (C481T), NAT2*6 (C590A) or NAT2*7 (G857A) (рисунки 2a и 2b). Быстро ацетилирующие пациенты имеют более одного мутантного аллеля (они могут быть как в одной позиции, т.е. гомозигота по мутации, так и в разных позициях).

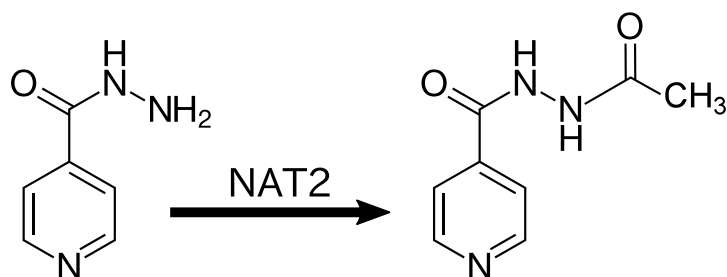


Рисунок 1. Метаболизм изониазида, катализируемый ферментом NAT2 (N-ацетилтрансферазой)

Генотип по гену NAT2 можно определить при помощи ПЦР в комбинации с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Определение концентраций INH в крови пациентов с разными генотипами NAT2, получавших одинаковую дозу INH, показало, что концентрация INH в сыворотке крови медленноацетилирующих пациентов в 2 - 7 раз выше, чем у быстро- и среднеацетилирующих. Таким образом, генотипирование NAT2 позволяет подобрать индивидуальную дозировку INH для каждого пациента.

Q1.1 (12 БАЛЛОВ)

На приведенном в **листе ответов** рисунке геля нарисуйте карандашом бэнды (полоски), которые Вы ожидаете увидеть при полной рестрикции продуктов ПЦР четырех аллелей гена NAT2: NAT2*4 (дикий тип), NAT2*5 (481T), NAT2*6 (590A) и NAT2*7 (857A). В качестве примера приведены результаты рестрикции для гетерозигот.

В этом задании вам нужно провести ПДРФ реакцию в общей сложности в 12 пробирках для генотипирования по аллелю дикого типа и двум мутантным аллелям NAT2*5 (обозначен как a) и NAT2*7 (обозначен как b) трех пациентов P1, P2 и P3, а также их образцов биопсии (X, Y и Z). Во всех случаях используйте 7 мкг ДНК, рестрикционный буфер и, где это необходимо, 1 мкл RE на каждую 0.2 мл микропробирку (ПЦР пробирку).

Q1.2 (5 БАЛЛОВ)

Спланируйте рестрикцию продуктов ПЦР для генотипирования по гену NAT2 пациентов P1-P3 и образцов (X-Z), заполнив таблицу в **листе ответов**. Конечный объем везде должен составлять 10 мкл.

ЗАДАНИЕ 2. ПРОВЕДЕНИЕ ПДРФ ЭКСПЕРИМЕНТА (44 БАЛЛА)

Примечание

1. Для проведения электрофореза вам предоставляется система FlashGel® System, включающая кассету с готовым агарозным гелем на 12+1-лунку (Cassette) и камеру для этой кассеты (Dock) (**Рисунок 3**), тогда как источник тока и система для фотографирования управляются ассистентом. Для получения хороших результатов заполните лунки деионизованной водой перед тем как наносить образцы. Чтобы видеть полосы (бэнды), включите свет (нажмите включатель на камере (Dock)) и оденьте защитные очки.
2. Вы можете попросить вторую кассету с гелем, но вы будете оштрафованы на 20 баллов.
3. Кратко отцентрифугируйте все реагенты в микропробирках до начала работы с ними, чтобы жидкость оказалась на дне. Убедитесь, что центрифуга сбалансирована, для этого помещайте пробирки друг напротив друга. Если у вас только одна пробирка, уравновесьте ее пустой пробиркой.

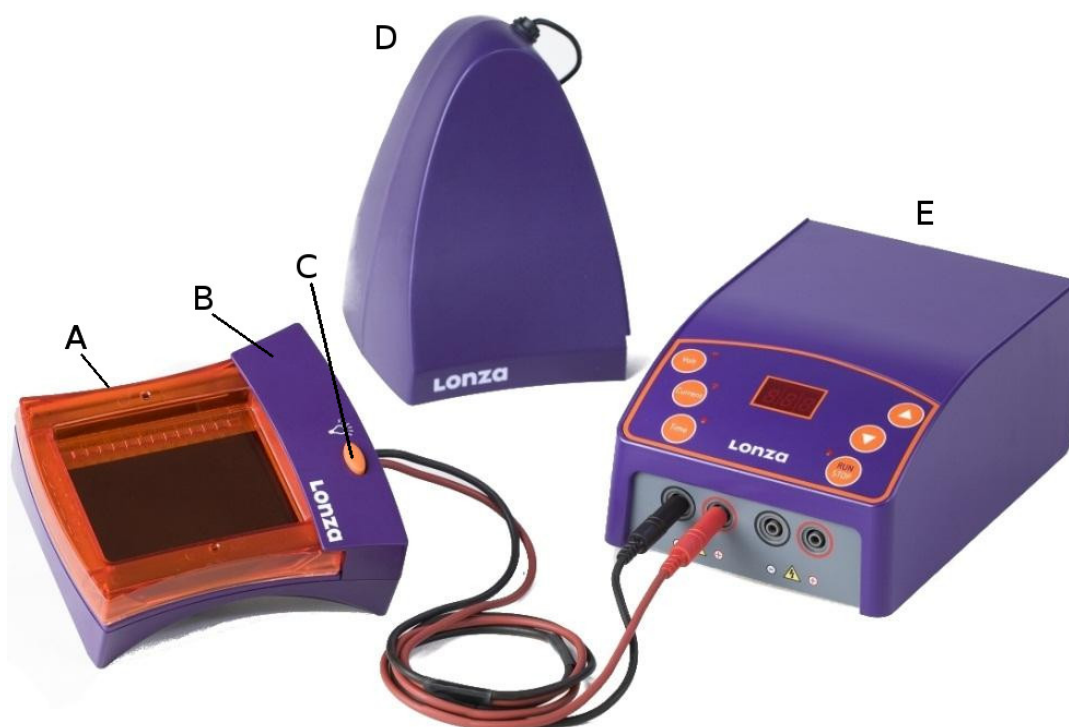


Рисунок 3. Система для горизонтального электрофореза FlashGel®. (A) - Кассета. (B) Камера для кассеты (Dock). (C) - Включатель света. (D) - Система для фотографирования. (E) - Источник тока

Данный протокол включает две стадии: ПЦР-ПДРФ и проведение электрофореза:

Этап 1 (Подготовка микропробирок для проведения рестрикции): подпишите 12 пробирок тонким маркером следующим образом P1a, P1b, P2a, P2b, P3a, P3b, Xa, Xb, Ya, Yb, Za и Zb, чтобы они соответствовали продуктам ПЦР геномной ДНК трех пациентов (P1, P2 и P3) и трех образцов биопсии (X, Y и Z), обработанным *KpnI* или *BamHI*.

Этап 2 (Приготовление рестрикционной смеси): В соответствии с вашим планом рестрикции (**Таблицы 1.2** в вашем **листе ответов**) приготовьте соответствующие смеси для всех пробирок, которые вы подписали на этапе 1. Аккуратно перемешайте реагенты в каждой пробирке, пипетируя их туда-сюда или постучав пальцем по дну пробирки. Не допускайте загрязнения одной пробирки содержимым другой пробирки при приготовлении смесей (для каждого действия используйте новый наконечник). Кратко отцентрифугируйте смеси в микроцентрифуге, чтобы жидкость оказалась на дне. Для этого используйте адаптеры и уравнивайте центрифугу перед включением. Во время приготовления и после центрифугирования пробирки должны находиться на льду.

Этап 3 (инкубирование рестрикционной смеси и подготовка геля). После того, как вы подготовили смесь во всех пробирках, достаньте их из льда, поместите их в ваш плавучий штатив, помеченный соответствующим цветом, и проинкубируйте их в течение 5 минут при 37°C на водяной бане (она находится позади вас). Не забудьте забрать свои образцы после 5 минут инкубации!

Во время инкубации вы можете приготовить кассету с гелем так, как вам рассказывали во время вашего посещения лаборатории день назад:

1. С помощью ножниц отрежьте одну сторону пакета и аккуратно достаньте кассету.
2. Уберите белую защитную пленку (но не убирайте прозрачную пленку с боков).
3. С помощью промывалки заполните ВСЕ лунки деионизированной водой, затем наклоните кассету, чтобы стекла лишняя жидкость, вытрите кассету салфеткой Kimwipе (но не вытирайте сами лунки).
4. Вставьте кассету в камеру (dock) (поднимите красную карточку, если вам понадобится помощь). Теперь ваш гель готов к нанесению образцов.

Этап 4 (Остановка рестрикции путем инактивации RE): По истечении 5 минут рестрикции, достаньте свои пробирки и поместите их в стоящий рядом нагревательный блок на 80 С (если понадобится, вытрите пробирки салфеткой) и проинкубируйте еще 5 минут.

Этап 5 (Окрашивание продуктов ПЦР-ПДРФ). После инкубации при 80 С, кратко отцентрифугируйте пробирки, чтобы жидкость оказалась на дне. Добавьте по 2,5 мкл красителя (обозначен D) в каждую пробирку. Хорошо перемешайте, кратко отцентрифугируйте.

Этап 6 (Нанесение образцов для электрофореза): нанесите в лунки по 5 мкл каждого из 12 образцов (P1a - Zb), а также 100 бр ДНК-лестницы (обозначена M). Внимание: не наносите больше, чем 5 мкл, так как жидкость может перелиться из лунки. Наконечники пипетки нужно располагать над лункой, наносить жидкость в лунки нужно аккуратно, чтобы она не перелилась в соседние лунки. Наносите образцы строго в соответствии с приведенной ниже схемой (начиная с левого края).

P1a	P1b	P2a	P2b	P3a	P3b	M	Xa	Xb	Ya	Yb	Za	Zb
-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	----	----	----	----	----	----

Этап 7 (Проведение электрофореза): после того, как вы нанесли образцы, поднимите **ЗЕЛЕНУЮ КАРТОЧКУ**. Лаборант включит источник тока. Напряжение должно быть выставлено на 200 В. Спустя 7 или 8 минут (после того, как самый легкий фрагмент ДНК в лестнице M прошел 2/3 геля), поднимите снова **ЗЕЛЕНУЮ КАРТОЧКУ**, чтобы попросить лаборанта выключить источник тока.

Этап 8 (Документирование вашего геля). Ассистент отключит прибор от источника тока. Подключите прибор (Dock с кассетой) к сети электричества и включите свет. Оденьте очки и внимательно рассмотрите ваш гель. Нарисуйте карандашом полосы, которые вы увидите в каждой дорожке, в **Рисунке Q.2.1** в **Листе ответов** (Обратите внимание, что положение нарисованных вами полос должно соответствовать заранее нарисованным полосам лестницы (M), и любые дорожки или полосы, которые не соответствуют фотографии геля на следующем этапе, не будут оцениваться).

Этап 9 (Фотографирование вашего геля). После того, как вы все нарисуете, напишите на наклейке ваш номер (**Student ID**) и прикрепите ее к рамке (красная часть) вашей кассеты. Поднимите вашу **ЗЕЛЕНУЮ КАРТОЧКУ** и передайте весь прибор с кассетой ассистенту. Ассистент сфотографирует гель и прикрепит фотографию на **Рисунок Q.2.2** в вашем **Листе ответов**. (Обратите внимание, что полосы, расположенные в неправильных местах по сравнению со схемой заполнения лунок в Шаге 6 оцениваться не будут, но они могут понадобиться вам для ответа на дальнейшие вопросы в этом задании).

Q.2.1. РИСУНОК ГЕЛЯ (18 БАЛЛОВ)

Q.2.2. ФОТО (26 БАЛЛОВ)

ЗАДАНИЕ 3: ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕИЗВЕСТНЫХ ОБРАЗЦОВ (9 БАЛЛОВ)

Q.3.1. (9 БАЛЛОВ)

На основании данных ПЦР-ПДРФ, полученных для пациентов (P1 – P3) и трех образцов биопсии из Задания 2, определите, кому из пациентов принадлежат образцы X, Y и Z и внесите ваши ответы в **Таблицу 3.1** в **Листе ответов**.

Таблица 3.1. Идентификация образцов биопсии пациентов

ПРИМЕЧАНИЕ!

Для ответа на вопросы в Заданиях 4 и 5, если вам не удалось генотипировать кого-либо из пациентов в Задании 2 (P1, P2 и P3), вы можете ответить на вопросы используя данные образцов (X, Y и Z). В этом случае напишите X/Y/Z в колонке “Пациенты”. Однако в этом случае с вас снимут по 1.5 балла за каждую замену.

ЗАДАНИЕ 4: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПАЦИЕНТОВ (12 БАЛЛОВ)

Q.4.1. (9 БАЛЛОВ).

Определите генотипы трех пациентов на основании данных ПЦР-ПДРФ, полученных вами при разрезании рестриктазами *KpnI* (NAT2*5 или C481T) и *VamHI* (NAT2*7 или G857A) и заполните **Таблицу 4.1** в **Листе Ответов**. Генотип локуса NAT2*6 (G590A) на основе данных разрезания *TaqI* для всех трех пациентов уже внесен в таблицу.

Таблица 4.1. Генотипы трех пациентов

Q.4.2. (3 БАЛЛА)

Определите фенотип по скорости ацетилирования трех пациентов на основании их генотипов, которые вы определили в Задании 4.1 поставив знак (✓) в соответствующих клетках **Таблицы 4.2** в **Листе ответов**.

Таблица 4.2. Фенотип ацетилирования трех пациентов

A Пациент P1

B Пациент P2

C Пациент P3

ЗАДАНИЕ 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ С РАЗНЫМИ ГЕНОТИПАМИ (18 БАЛЛОВ)

Введение

Как указано в задании 1, несмотря на достаточно успешное применение INH в лечении туберкулеза, применение INH осложняется полиморфизмом N-ацетилтрансферазы 2 (NAT2). В проведенном Jung AJ (September, 2015) исследовании на 206 пациентах с туберкулезом, которые получали INH в стандартной дозировке (5 мг/кг веса, обычно 300 мг INH ежедневно) было показано, что концентрации INH через 2 часа после приема лекарства были достоверно ниже у быстроацетилирующих пациентов по сравнению с медленноацетилирующими. С помощью многовариантной пошаговой линейной регрессии, которая учитывала разницу в возрасте, поле, весе тела и NAT2-генотипе между пациентами, было установлено, что только генотип NAT2 и вес тела независимо друг от друга влияют на концентрацию INH ($P < 0.001$), тогда как другие переменные не влияют на концентрацию INH ($P > 0.05$). Согласно регрессионному анализу было выведено уравнение, которое наилучшим образом предсказывает концентрацию INH:

Концентрация INH в сыворотке (мг/л) = $13.821 - 0.1 \times (\text{вес тела, kg}) - 2.273 \times (\text{фенотип пациента по скорости ацетилирования, обозначенный как 0, 1 или 2})$ (**Уравнение 1**)

В этом уравнении фенотип пациента по скорости ацетилирования обозначается следующим образом: 0 - медленно-, 1 - средне- и 2 - быстроацетилирующий фенотип.

Наиболее эффективное противотуберкулезное действие при лечении INH было обнаружено в случае, когда через 2 часа после приема 300 мг лекарства его концентрация в крови составляла 3.0 – 6.0 мг/л. На основании концентрации INH данной на этикетке на **Рисунке 4** определите подходящую дозировку для пациентов P1, P2 и P3. Делайте расчет так, как указано в следующих двух пунктах (**вопросы Q5.1 и Q5.2**) и считайте, что все пациенты весят по 70 кг.

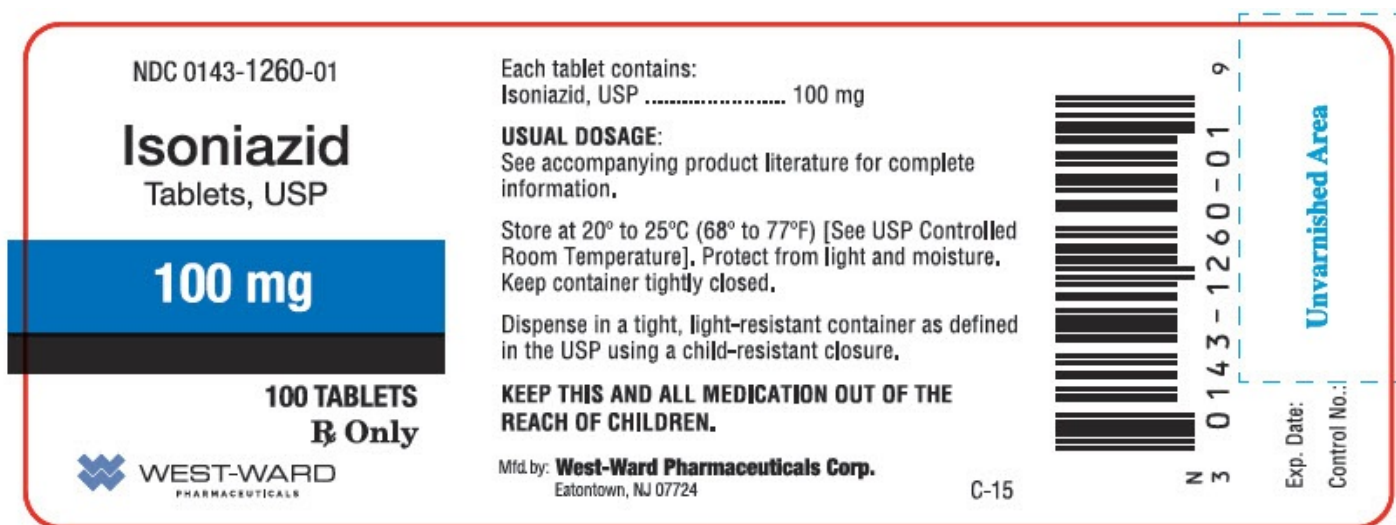


Рисунок 4. Этикетка таблеток изониазида (INH)

Рисунок 4. Этикетка упаковки изониазида (INH)

Q.5.1 (6 БАЛЛОВ)

Рассчитайте концентрацию INH в сыворотке крови пациентов P1, P2 и P3 через 2 часа после приема лекарства, используя Уравнения 1 и генотипы пациентов, которые вы определили, и внесите данные в **Таблицу 5.1 в Листе ответов (ответ дайте до третьего знака после запятой)**. Считайте, что каждый пациент принимал по 300 мг INH в день.

Таблица 5.1. Рассчитанная концентрация INH в сыворотке крови пациентов P1, P2 и P3 через 2 часа после приема лекарства с учетом их генотипов *NAT2*

Q.5.2. (12 БАЛЛОВ)

Для достижения максимального лечебного эффекта, определите минимальное количество таблеток, показанных на **Рисунке 4**, которые должен ежедневно принимать каждый пациент в соответствии с его генотипом *NAT2* (ответ дайте в виде целых чисел). Внесите ответ в **Таблицу 5.2 в Листе ответов**.

Таблица 5.2. Необходимая дозировка INH в соответствии с генотипом *NAT2* пациентов

КОНЕЦ ПРАКТИЧЕСКОГО ЭКЗАМЕНА 4!