

Правила проведения практического тура

1. В аудиторию *запрещается* вносить электронные устройства, шпаргалки и другие вспомогательные материалы. Наличие любых электронных устройств (даже в выключенном состоянии), а также шпаргалок приравнивается к их использованию. Во время Олимпиады запрещается разговаривать и мешать окружающим. В случае нарушения этих правил участник удаляется из аудитории, его работа не проверяется.
2. Работа выполняется только на *бланках*, выданных организатором. В случае необходимости участник может получить дополнительные листы. Для этого участник должен поднять руку и ждать, когда подойдет ответственный по аудитории или волонтер.
3. Работа, включая чертежи, схемы, таблицы и рисунки, должна выполняться ручкой. При этом чистовиком являются страницы со сканируемым куар-кодом, а черновиком – обороты этих страниц. Черновик работы не проверяется. **Посторонние пометки и рисунки в работе не допускаются!**
4. Находясь в аудитории, участник должен выполнять все требования преподавателей, относящиеся к проведению Олимпиады. Если возникает вопрос, участник должен поднять руку и ждать, когда подойдет ответственный по аудитории.
5. Выход участника из аудитории во время написания работы допускается только один раз с разрешения ответственного по аудитории и в сопровождении дежурного.
6. Все ответы должны быть перенесены на БЛАНК ОТВЕТОВ, распечатанный из личного кабинета.

**Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.**

**Заключительный этап. Практический тур.**

**9 класс**

**Перед началом работы**

Все расчеты проводятся исключительно в аудитории, предназначенной для участия в олимпиаде. Перемещение в лабораторию, предназначенную для практической части, возможно только в сопровождении дежурного сотрудника. Осуществление расчетов непосредственно в лаборатории не предусмотрено правилами олимпиады.

Убедитесь, что на вашем столе (в лаборатории) присутствуют все необходимые материалы и оборудование. Таблица (чек-лист) для проверки представлена ниже.

<b>Реактивы и оборудование</b>	<b>Концентрация</b>	<b>Подпись на пробирке</b>	<b>Количество</b>	<b>Отметка о присутствии</b>
ПЦР микс	5x	5x PCR mix	20 мкл	
Праймер прямой	2,5 мкМ	F	16 мкл	
Праймер обратный	2,5 мкМ	R	16 мкл	
Матрица 1		M1	12 мкл	
Матрица 2		M2	12 мкл	
Матрица 3		M3	12 мкл	
Буфер для нанесения проб в агарозный гель	2x	1x LD	20 мкл	
Микропробирки 1,5 мл	-	-	3 шт	
Микропробирки 0,2 мл	-	-	6 шт	
Пипетка-дозатор, 2-20 мкл	-	-	1 пипетка	
Перчатки	-	-	1 пара	

Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.

Заключительный этап. Практический тур.

9 класс

Помимо этого, в процессе работы вам понадобится оборудование, которое используется всеми участниками в аудитории, его местоположение вам покажет волонтер или преподаватель. Включение и выключение данного оборудования производится **ТОЛЬКО волонтерами или преподавателем**. Обратите внимание, что некоторые необходимые реактивы не могут храниться при комнатной температуре.

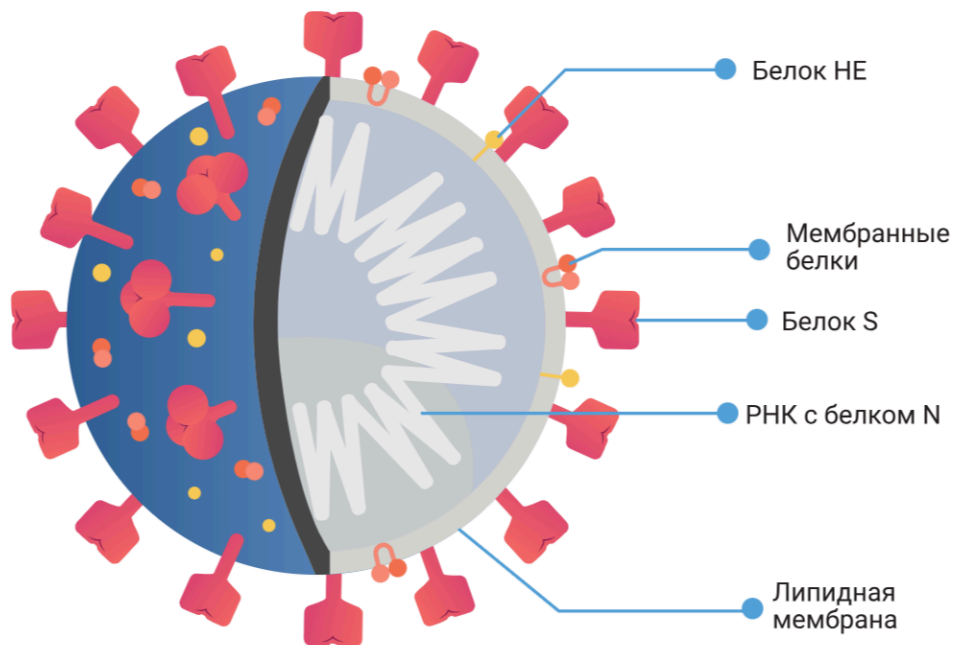
Непосредственно перед их использованием обратитесь к преподавателю, и он выдаст эти реактивы. Список оборудования и реактивов, использовать которые можно только в присутствии волонтеров или преподавателя, представлен в таблице ниже.

Реактивы и оборудование	Концентрация	Конечная концентрация	Подпись на пробирке
Полимераза	2 ед/ мкл	2 ед на реакцию	Pol
Амплификатор/ термоциклер	-	-	-
Камера для проведения горизонтального электрофореза	-	-	-
Лабораторный источник тока	-	-	-

## ВВЕДЕНИЕ

Коронавирус SARS-CoV-2 – представляет из себя оболочечный вирус. Впервые патоген был выявлен в конце 2019 года в городе Ухань , а вызванное им инфекционное заболевание получило название COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). Отличительной особенностью морфологии данного вируса является наличие крупных шиповидных отростков, состоящих из белка S (spike), которые придают ему характерный короноподобный вид при электронной микроскопии.

Ниже представлена схема структуры коронавируса.



### Задание 1. Основы вирусологии

Для систематизации знаний о жизненном цикле вирусов используется классификация, предложенная Дэвидом Балтимором (Нобелевская премия 1975 года), которая основана на типе генетического материала и механизме его репликации. Согласно этой системе, все вирусы разделены на семь классов:

Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.

Заключительный этап. Практический тур.

9 класс

1. **I класс – дцДНК-вирусы**  
Геном: двуцепочечная ДНК.  
Репликация: в ядре клетки, зависит от клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы.  
Репликация: копирование через стадию (-)-РНК
2. **II класс – оцДНК-вирусы**  
Геном: одноцепочечная ДНК  
некомплементарная мРНК.  
Репликация: в ядре, сначала синтезируется комплементарная цепь с образованием дцДНК.
3. **III класс – дцРНК-вирусы**  
Геном: двуцепочечная РНК.  
Репликация: прямое копирование РНК в цитоплазме клетки-хозяина.
4. **IV класс – (+)-оцРНК-вирусы**  
Геном: одноцепочечная РНК, функционирующая как мРНК(используется для синтеза вирусных белков).
5. **V класс – (-)-оцРНК-вирусы**  
Геном: одноцепочечная РНК, комплементарная мРНК.  
Репликация: копирование через стадию (+)-РНК
6. **VI класс – РНК-ретровирусы**  
Геном: одноцепочечная (+)-РНК.  
Репликация: с помощью обратной транскриптазы синтезируется дцДНК, которая встраивается в геном хозяина.
7. **VII класс – дцДНК-ретровирусы**  
Геном: двуцепочечная ДНК  
Репликация: после транскрипции в РНК обратная транскриптаза синтезирует ДНК, которая встраивается в геном.

1.1 Какие ферменты участвующие в репликации РНК-содержащих кодируются в вирусном геноме? (2 балла)

1.2 Какие основные виды вакцин существуют, перечислите их? (3 балла)

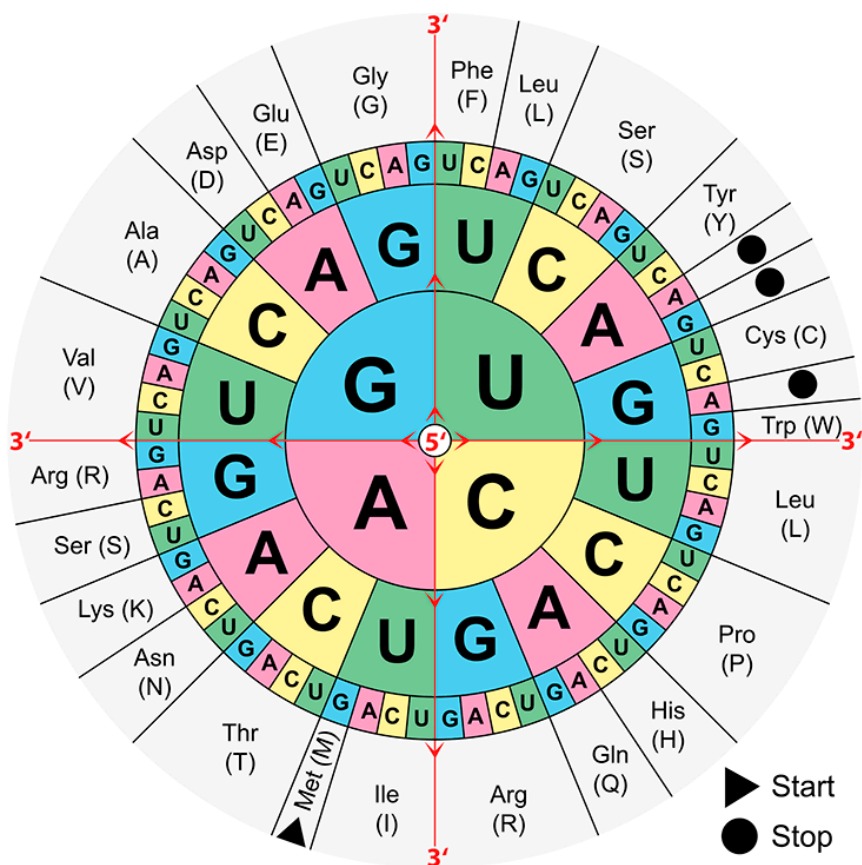
1.3 Какой белок играет ключевую роль для прикрепления коронавируса к клетке? (2 балла)

1.4 Какой элемент вирусной частицы является главной мишенью для создания вакцин? (2 балла)

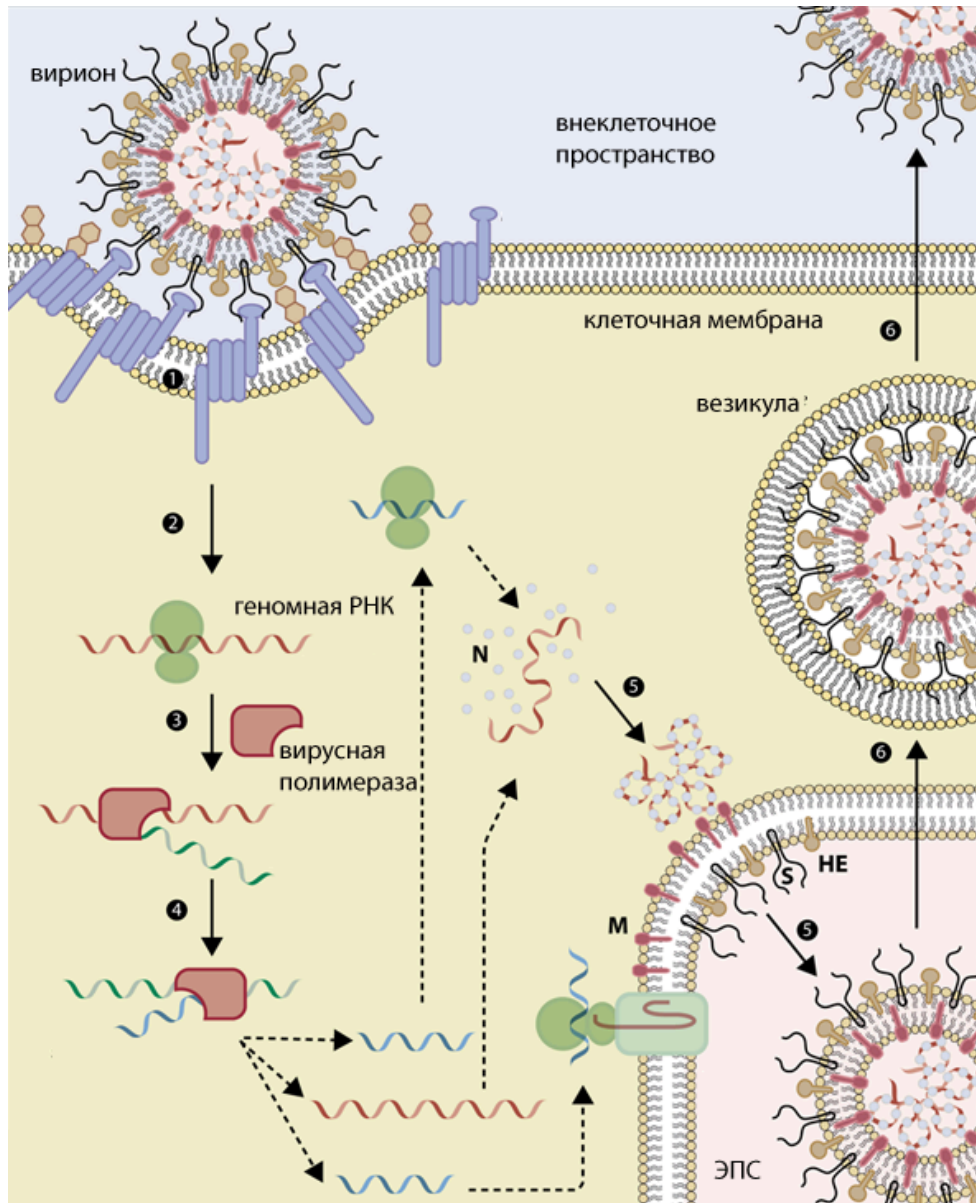
1.5 В чем смысл открытой рамки считывания (ORF) для вирусов? Какой эволюционные смысл она имеет? Некоторые вирусы способны кодировать, например, 500 аминокислотных остатков при длине генома в 1200 п.н.. Поясните механизм этого явления. (5 баллов)

1.6 Используя таблицу генетического кода, определите какую последовательность аминокислот кодирует один и тот же участок геномной нуклеиновой кислоты 5'-GGACGCGAGCGCGAGCGG-3' в разных группах вирусов по Балтимору (3 балла)

Класс по Балтимору	Последовательность аминокислот
II класс	
IV класс	
V класс	



1.7 Изучите жизненный цикл коронавируса и выберите верные утверждения (3 балла)



- A. Оболочка вириона коронавируса формируется из цитоплазматической мембраны клетки-хозяина
- B. Коронавирусы относятся к IV класс по Балтимору
- C. Белки капсида коронавируса синтезируются в цитоплазме
- D. Стадия 4 - синтез (-)-РНК
- E. Капсид коронавируса формируется за счет взаимодействия вирусных белков N, M и S
- F. Одна из стадий жизненного цикла вируса проходит в ядре клетки хозяина

**Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.**

**Заключительный этап. Практический тур.**

**9 класс**

Для определения вирусной инфекции в организме стали широко применять метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для тестирования на ковид используют мазок из носа или ротоглотки. Первый этап исследования – выделение РНК, с последующей амплификации с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для получения комплементарной ДНК (кДНК). Второй этап - проведение ПЦР для специфичных вирусных последовательностей с полученной кДНК и анализ результатов.

Этот метод имеет как свои преимущества, так и ограничения и недостатки. Существует множество факторов, которые могут дать ложноотрицательный результат при тестировании, например слишком ранняя диагностика, использование антисептиков перед взятием мазка, неправильное взятие мазка, малое количество генетического материала, и т.д.

В данной работе вам предстоит выполнить второй этап работы – ПЦР с кДНК.

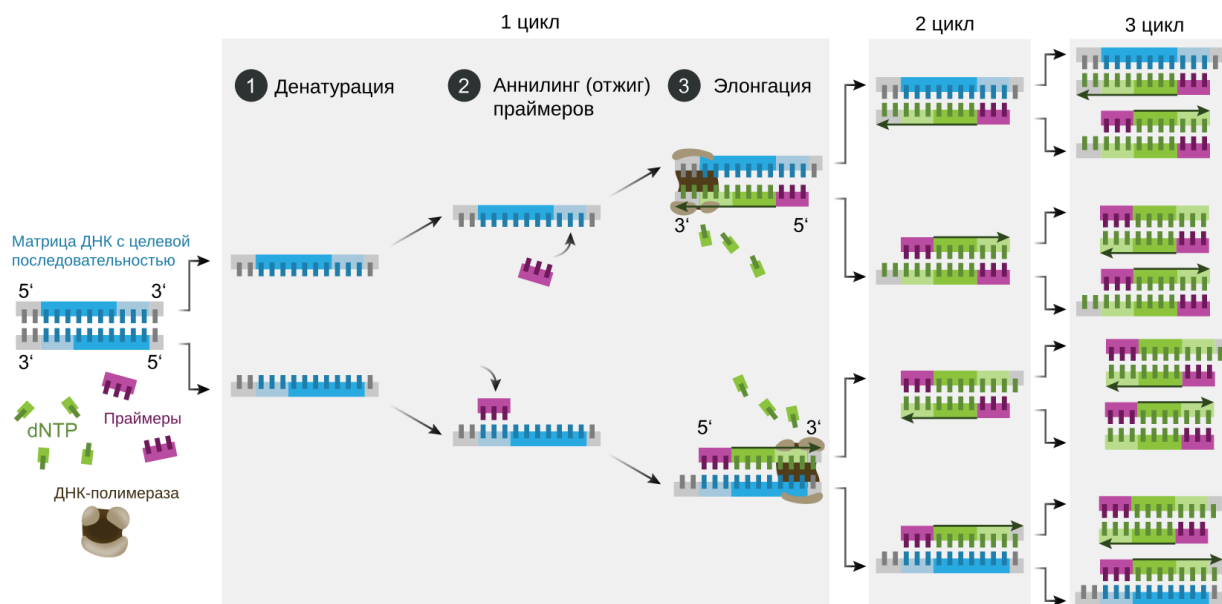
Длина РНК-последовательности SARS-CoV-2 составляет около 30 000 нуклеотидов. Для проведения ПЦР вам необходимо амплифицировать наименее вариабельный участок (размером для лучшего отжига праймеров и детекции вируса.

Чтобы изучить эффективность теста вы исследуете несколько “матриц кДНК” методом ПЦР.

<b>Образец</b>	<b>Название образца</b>
Исследуемая матрица	М2
Положительная матрица	М1
Отрицательная матрица	М3

**Задание №2. Полимеразная Цепная Реакция**

Полимеразная цепная реакция – метод молекулярной биологии, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков.



Метод основан на реакции синтеза ДНК ферментом (ДНК-зависимой-ДНК-полимеразой). ПЦР идет в 3 основных этапа:

– **Денатурация:** разделение цепей исходной ДНК(матрицы) при высокой температуре (~95°C);

– **Отжиг праймеров:** присоединение праймеров к матрице

*Праймер - это искусственно синтезированная короткая цепочка нуклеотидов, комплементарная выбранному участку одной из цепей анализируемой ДНК. Праймеры служат затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы и определяют участок на котором будет происходить копирование. Один из праймеров обычно соответствует началу амплифицируемого отрезка, другой — его концу, но на противоположной цепи.*

– **Элонгация:** копирование цепей ДНК за счет присоединения трифосфат нуклеотидов к 3' концу растущей цепи ДНК(праймера).

## Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.

### Заключительный этап. Практический тур.

#### 9 класс

Эти 3 этапа образуют цикл и многократно повторяются в ходе одной ПЦР, за счет этого количество целевых молекул ДНК в пробирке многократно возрастает.

Для успешной детекции инфекции, необходимо выбрать консервативный участок вируса и подобрать праймеры комплементарные этому фрагменту. Это позволяет амплифицировать (увеличить в количестве) малые количества только вирусной ДНК и впоследствии обнаружить ее с помощью метода электрофореза нуклеиновых кислот.

### 2.1 ПЦР

2.1.1 Рассчитайте необходимое количество реагентов для проведения ПЦР для всех трех исследуемых проб. Обратите внимание, что объем реакционной смеси должен быть 24 мкл. Ответы внесите в бланк.

Компонент	Исходная концентрация	Конечная концентрация/ количество на реакцию	Мкл в реакционной смеси
Матрица	5 нг/мкл	50 нг на реакцию	
ПЦР смесь	5x	1x	
Праймер F	2,5 мкМ	100 нМ	
Праймер R	2,5 мкМ	100 нМ	
Полимераза (если она не сразу в смеси)	2 ед/ мкл	2 ед на реакцию	

2.1.2 После расчета количества всех необходимых компонентов обратитесь к преподавателю для получения реактивов, которые хранятся в холодильнике.

2.1.3 Приготовьте ПЦР смесь согласно вашему плану. Затем перенесите нужный объем ПЦР-премикса и матриц в пробирки для амплификации объемом 0,2 мл и подпишите их.

2.1.4 Обратитесь к преподавателю в аудитории, чтобы он помог вам поставить пробирки в амплификатор. Проследите, что ваши пробирки подписаны, и вы отличите их от чужих.

2.1.5 По окончании времени протекания реакции обратитесь к преподавателю, чтобы он выдал вам ваши пробирки.

### Теоретические задания по полимеразной цепной реакции

2.2 Вам дана нуклеотидная последовательность, к которой необходимо подобрать прямой и обратный праймер. Длина праймера должна составлять 18-20 п.н. Содержание С-G нуклеотидов не более 40%. Разница температуры отжига праймеров должна быть не более 2-4°C. Температуру для расчета отжига праймера для ПЦР представлена ниже. (6 балла)

5'-AAACCCTGTT CCGACTACTG CCTCTCACAT ATCGTCAATC TTCTCGAGGA  
TTGGGGACCC-3'

Формула для расчета  $T_m = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$ .

2.3 Какое количество молекул ДНК теоретически можно получить, если поставить 30 циклов ПЦР используя в качестве матрицы 5 молекул ДНК? (3 балла)

2.4 Для постановки ПЦР используется *Taq*-полимераза выделенная из *Thermus aquaticus* — граммотрицательной палочковидной экстремально-термофильной бактерии. Какие преимущества имеет эта полимеразы в реакции ПЦР? Ответ поясните. (4 балла)

2.5 Любой тест может давать ложно положительные (положительные при отсутствии заболевания) и ложно отрицательные (отрицательные у больного человека). В клинической практике и эпидемиологических исследованиях важно оценить, насколько точно лабораторный тест позволяет выявить заболевание. Для этого используют три ключевые характеристики: чувствительность, специфичность и точность.

- Чувствительность (sensitivity) – это вероятность того, что тест будет положительным, если человек болен.
- Специфичность (specificity) – это вероятность того, что тест будет отрицательным, если человек здоров.

Московская олимпиада школьников по генетике, 22.03.2026.

Заключительный этап. Практический тур.

9 класс

- Точность (ассигасу) – вероятность того что тест выдаст правильный результат.

Используя результаты исследования некоторого ПЦР теста, определите его характеристики. Ответы укажите в процентах. (6 баллов)

Результаты проведенного исследования	
Истинно положительные результаты	Ложно положительные результаты
90	8
Истинно отрицательные результаты	Ложно отрицательные результаты
392	10

**2.6 (8 баллов)** Однако более важным показателем в доказательной медицине считается прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР) - вероятность оказаться больным если был получен положительный результат теста на заболевание. Данный показатель зависит от характеристик теста и распространенности заболевания в популяции. Для расчета ПЦПР можно использовать формулу Байеса:

$$P(A|B) = \frac{P(B|A) P(A)}{P(B)},$$

где,  $P(A|B)$  - вероятность события А при условии наступления события В,  $P(B|A)$  - вероятность события В при условии наступления события А,  $P(A)$  - вероятность события А(вне зависимости от события В),  $P(B)$  - вероятность события В(вне зависимости от события А).

По статистическим оценкам наибольшая доля одновременно болеющих коронавирусом (штамм омикрон) в Москве была зафиксирована в феврале 2022 года и составляла 300 000 человек. Считайте, что всего в Москве проживает 13 миллионов человек. Рассчитайте ПЦПР для теста на коронавирус со следующими характеристиками:

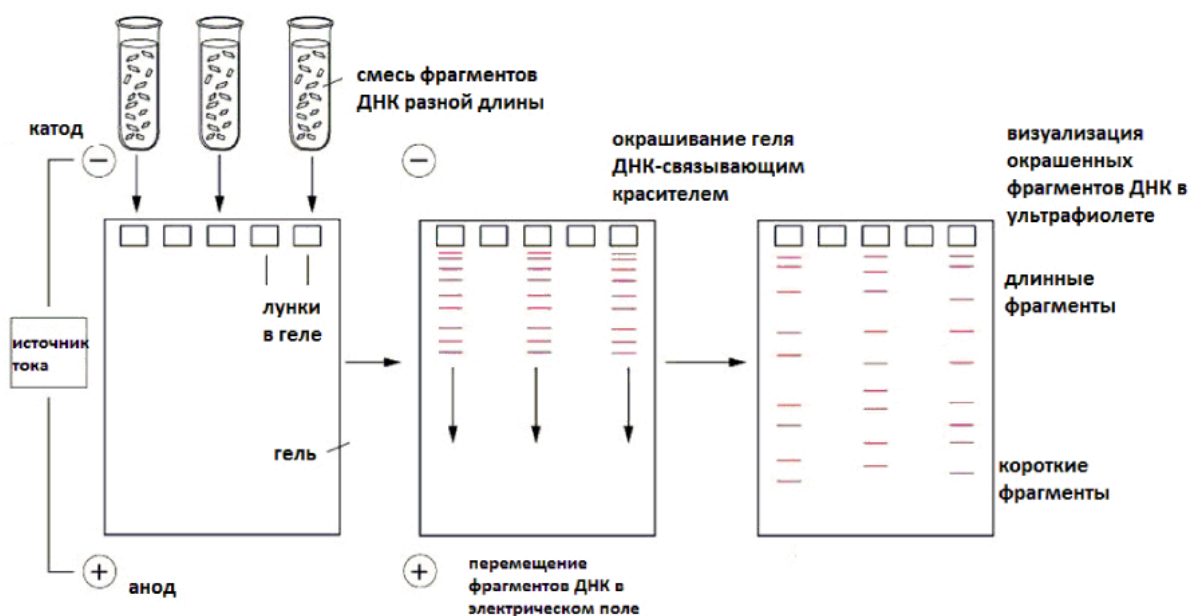
- Чувствительность: 92%
- Специфичность: 95%
- Точность: 93%

Подсказка: ПЦПР можно записать как

$P(\text{быть больным} \mid \text{получить положительный результат теста})$

### Задание 3. Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез — это метод, основанный на разделении молекул в электрическом поле. Молекулы нуклеиновых кислот, благодаря остаткам фосфорной кислоты в их составе, обладают равномерно распределенным отрицательным зарядом. Это придает нуклеиновым кислотам подвижность в электрическом поле. В процессе электрофореза нуклеиновые кислоты погружаются в плотную среду с гомогенной трехмерной структурой — агарозный гель. Скорость движения нуклеиновых кислот в плотной среде пропорциональна их длине. Благодаря этому, электрофорез позволяет разделять фрагменты ДНК, отличающиеся по длине.



1. Смешайте двукратный (2x) буфер для нанесения с образцом в количестве, необходимом для достижения рабочей концентрации буфера (1x). Обратите внимание, что **максимальный** объем нанесения в лунку - 10 мкл. Для большей четкости электрофореграммы мы советуем наносить максимально возможное количество пробы.

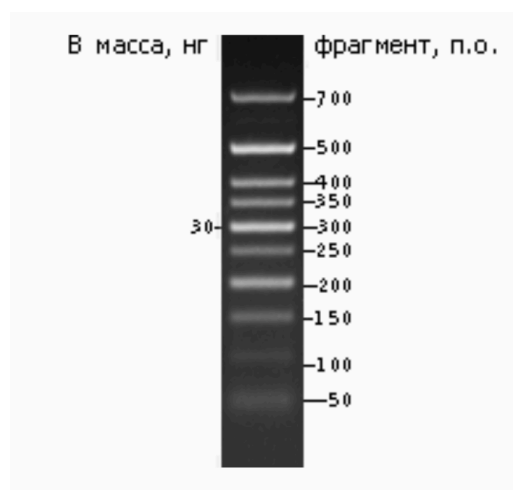
2. Укажите в бланке (3.1), сколько микролитров смеси после рестрикции и буфера вы возьмете для нанесения своего образца. (2 балла)

3. Обратитесь к преподавателю в аудитории и нанесите свои образцы в указанные преподавателем лунки геля.

4. После окончания электрофореза вы получите распечатанную фотографию вашего геля для анализа. Прикрепите фотографию к бланку ответов (3.2). (10 баллов)

### Теоретические задания по электрофорезу

3.3 Изучите полученную электрофореграмму исследуемых образцов, определите приблизительный размер фрагментов, используя референсные значения (см. рисунок справа) для маркера длин. Размер фрагмента укажите в виде диапазона соседних фрагментов маркера длин (например, 300-350 п.н.) (5 баллов)



### Задание 3.4

Отличается ли длина полученных фрагментов в исследуемых пробах (если да, то какой из фрагментов имеет большую длину)? С чем это может быть связано? (5 баллов)

### Задание 3.5

При анализе электрофорезного геля с помощью трансиллюминатора (детекция нуклеиновых кислот с помощью УФ) в лунке К(-) вы можете обнаружить яркий “хвост”. Как можно это объяснить? Как это можно предотвратить, перечислите не менее двух вариантов. (3 балла)