**ТИПОВОЕ КОНКУРСНОЕ ЗАДАНИЕ**

***ДЛЯ РЕГИОНАЛЬНОГО ЧЕМПИОНАТА***

***ЧЕМПИОНАТНОГО ЦИКЛА 2021-2022***

**компетенции**

**«ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ»**

**для основной возрастной категории**

**16 лет – 22 года**

*Конкурсное задание включает в себя следующие разделы:*

1. ****Формы участия в конкурсе.
2. Общее время на выполнение задания.
3. Задание для конкурса.
4. Модули задания и необходимое время.
5. Критерии оценки.
6. **ФОРМЫ УЧАСТИЯ В КОНКУРСЕ:** Индивидуальный конкурс.

2. **ОБЩЕЕ ВРЕМЯ НА ВЫПОЛНЕНИЕ ЗАДАНИЯ:** 15 ч.

3. **ЗАДАНИЕ ДЛЯ КОНКУРСА.**

Содержанием конкурсного задания является демонстрация навыков владения основными методами генной инженерии, такими как работа с бактериальными культурами, работа с биоинформатическими программами, полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, гель-электрофорез.

Конкурсное задание имеет несколько модулей.

Конкурс включает в себя проведение посева клеток *E.coli* из музейной культуры методом истощающего штриха, проверку одиночных колоний клеток *E. coli* на наличие целевой плазмиды (методом ПЦР), проведение рестрикционного анализа выделенной из колоний *E.coli* рекомбинантной плазмиды, а также теоретическую разработку эксперимента по клонированию.

Окончательные аспекты критериев оценки уточняются экспертами. Оценка производиться как в отношении работы модулей, так и в отношении процесса выполнения конкурсного задания. Если участник не выполняет требования техники безопасности, подвергает опасности себя и других конкурсантов, такой участник может быть отстранен от конкурса.

Время и детали конкурсного задания в зависимости от конкурсных условий могут быть изменены членами жюри.

Конкурсное задание должно выполняться помодульно. Оценка так же происходит от модуля к модулю.

4. **МОДУЛИ ЗАДАНИЯ И НЕОБХОДИМОЕ ВРЕМЯ** (Таблица 1)**.**

Таблица 1.

| **Наименование модуля** | | **Соревновательный день (С1, С2, С3)** | **Время на задание** |
| --- | --- | --- | --- |
| A | **Проведение посева клеток *E.coli*** | С1 | 2 часа |
| B | **Планирование эксперимента по клонированию гена** | С1 | 3 часа |
| C | **Анализ образцов на наличие целевого гена методом ПЦР** | С2 | 5 часов |
| D | **Рестрикционный анализ плазмидной ДНК** | С3 | 5 часов |

**Модуль A:****Проведение посева клеток *E.coli****.*

* Описание задания.

Задание состоит в подготовке чашек Петри с агаризованной средой и рассевания музейной культуры *E. coli* методом истощающего штриха. В качестве рекомбинантной плазмидной ДНК, содержащейся в рассеваемых клетках *E. coli,* выступает экспрессионный вектор (плазмида), несущий вставку целевого гена, а также ген устойчивости к антибиотику.

* Алгоритм работы:

1. Подготовить рабочее место, необходимое оборудование, инструменты и расходные материалы;

2. Подготовить чашку Петри с агаризованной средой LB, содержащей соответствующий антибиотик;

3. Провести посев клеток *E. coli* измузейной культуры методом истощающего штриха;

4. Убрать рабочую зону.

* Особенности выполнения задания.

Задание выполняется при соблюдении условий стерильности.

* Возможные ошибки

1. Недостаточно остужена питательная среда, что приводит к разрушению антибиотика;
2. Недостаточно подсушена и неверно размещена чашка Петри, что приводит к скоплению конденсата и разносу бактерий по поверхности среды;
3. Не соблюдена стерильность, что приводит к росту посторонних микроорганизмов.

**Модуль B:****Планирование эксперимента по клонированию гена***.*

* Описание задания.

Используя доступные биоиформационные ресурсы (UGENE) необходимо подобрать олигонуклеотиды для амплификации заданного гена и последующего переноса его в плазмиду, по соответствующим сайтам рестрикции. Обозначить основные параметры режима амплификации (температура отжига, время элонгации). Подобрать рестриктазы, позволяющие подтвердить наличие встройки целевого гена в конечной плазмиде методом рестрикционного анализа.

* Алгоритм работы.

1. Подобрать олигонуклеотиды для ПЦР, с одной стороны - комплементарные заданному гену, с другой стороны - соответствующим липким концам, образующимся после рестрикции целевой плазмидной ДНК;

2. Составить программу амплификации, установить продолжительность всех этапов – денатурации, отжига олигонуклеотидов и элонгации, а также количество циклов;

3. Подобрать рестриктазы, позволяющие отличить исходную плазмиду от рекомбинантной плазмиды, содержащей встройку целевого гена.

* Особенности выполнения задания.

Данное задание является теоретическим, выполняется при помощи доступных биоинформационных программ и ресурсов.

* Возможные ошибки:

1. Подобранные олигонуклеотиды не соответствуют заданным условиям;
2. Подобранные олигонуклеотиды значительно отличаются по температуре плавления;
3. Условия амплификации подобраны без учета длины получаемого фрагмента;
4. Получаемые в ходе рестрикции фрагменты слишком большие или слишком маленькие, что не позволяет увидеть их различие на электрофореграмме.

**Модуль C: Анализ образцов на наличие целевого гена методом ПЦР**

* Описание задания.

Колонии клеток *E. coli* необходимо проверить на наличие целевой плазмиды. В качестве метода детекции в рамках задания используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) с селективными праймерами. Визуализацию ПЦР-продуктов и определение их длины провести методом гель-электрофореза.

* Алгоритм работы:

1. Подготовить рабочее место, необходимое оборудование, инструменты и расходные материалы;

2. Произвести отбор клонов и подготовить матрицу для ПЦР;

3. Приготовить ПЦР-смесь по заданному протоколу;

4. Провести ПЦР-амплификацию по заданной программе;

5. Разложить реактивы по местам с учетом требований к хранению;

6. Визуализировать результат ПЦР-амплификации с помощью гель-электрофореза, сделать фотографию геля;

7. Убрать рабочее место.

* Особенности выполнения задания.

Часть работы выполняется с соблюдением условий стерильности. Работа выполняется в нескольких физически разделенных зонах (зона постановки ПЦР-амплификации и зона проведения гель-электрофореза).

* Возможные ошибки:

1. Не маркированы взятые для анализа клоны и микропробирки для ПЦР.
2. Не соблюдены условия стерильности.
3. Неверно подготовлена смесь для ПЦР.
4. В ПЦР отсутствуют отрицательный и положительный контроли.
5. На гель-электрофорезе отсутствует дорожка с ДНК-маркером.

**Модуль D: Рестрикционный анализ плазмидной ДНК**

* Описание задания:

Провести рестрикционный анализ выделенной из колоний *E.coli* рекомбинантной плазмиды. Проанализировать полученные рестрикционные профили, определить количество сайтов рестрикции и размеры рестрикционных фрагментов.

* Алгоритм работы:

1. Подготовить рабочее место, необходимое оборудование, инструменты и расходные материалы;

2. Провести выделение плазмидной ДНК из осадка бактериальной культуры;

3. Приготовить реакционную смесь и провести реакцию рестрикции в соответствии с протоколом;

4. Визуализировать продукты рестрикции при помощи агарозного гель-электрофореза, сделать фотографию геля;

5. На основании полученных рестрикционных профилей определить количество сайтов рестрикции в плазмиде и длину фрагментов ДНК, образовавшихся после проведения рестрикции;

* Особенности выполнения задания.

Часть работы выполняется с соблюдением условий стерильности. Задания выполняются в разных зонах конкурсной площадки (зона проведения рестрикционного анализа, зона проведения гель-электрофореза).

* Возможные ошибки:

1. Перепутаны осадок и супернатант при выделении плазмидной ДНК, что привело к потере плазмидной ДНК.
2. Резкие манипуляции с раствором ДНК привели к деградации и загрязнению образца.
3. Неверно приготовлена реакционная смесь.
4. На гель-электрофорезе отсутствует маркерная ДНК.
5. Неверно определена длина фрагментов ДНК.

**5. КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ**.

| **Критерий** | | **Баллы** | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **Мнение судей** | **Измеримая** | **Всего** |
| **A** | **Проведение посева клеток *E.coli*** | - | **16** | **16** |
| **B** | **Планирование эксперимента по клонированию гена** | **-** | **19** | **19** |
| **C** | **Анализ образцов на наличие целевого гена методом ПЦР** | - | **34** | **34** |
| **D** | **Рестрикционный анализ плазмидной ДНК** | **-** | **31** | **31** |
| **Всего** | | **-** | **100** | **100** |