

Страна: _____

Код студента: _____

19-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА

13 – 20 июля, 2008

Мумбай, ИНДИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 3

БИОХИМИЯ И БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Общее количество баллов: 43

Продолжительность: 60 минут

Дорогие участники,

- В этом тесте вам предлагается следующее задание:
Задание 1: А: Определение активности β -лактамазы и ее ингибирование (35 баллов)
В: Корреляция между уровнем экспрессии β -лактамазы и устойчивостью бактерий (4 балла)
С: Корреляция между значениями K_i для пестицидов и ростом бактерий (4 балла)
- **Вы должны вписать ваши результаты и ответы в ЛИСТ ОТВЕТОВ. Ответы, записанные в листе заданий, оцениваться не будут.**
- Удостоверьтесь, что вы получили все материалы и оборудование, перечисленные в задании. В случае отсутствия одного из наименований, поднимите, пожалуйста, желтую карточку.
- По окончании теста вложите текст задания и лист с ответами в конверт. Конверты будут собраны наблюдателем.

Удачи Вам!!

Страна: _____

Код страны: _____

Имя: _____

Отчество: _____

Фамилия: _____

Код студента: _____

Задание 1

Часть А (35 баллов)

Определение активности β -лактамазы и ее ингибирование

Материалы и оборудование	Количество
1. Фотоколориметр с набором из 7 кювет	1
2. Пробирки с образцами	8
3. Штатив для пробирок с образцами	1
4. Микропипетка (объем 10 – 100 μ l)	1
5. Микропипетка (объем 100 – 1000 μ l)	1
6. Наконечники для микропипетки (объем 10 – 100 μ l)	20
7. Наконечники для микропипетки (объем 100 – 1000 μ l)	20
8. Фотографии чашек Петри	6
9. Несмывающийся маркер	1
10. Бумажные салфетки	1
11. Бутылка с дистиллированной водой для промывания	1
12. Емкость для промывания и отходов	1
13. Миллиметровая бумага	1

Реактивы (смотрите следующую страницу)

Метка	Реактив	Сосуд
A	Фермент β -лактамаза (1,85 мг/ml)	Пробирка
B	Ингибитор (100 мМ)	Пробирка
C	Пенициллин G (0,54 мМ)	Пробирка с голубой крышечкой
D	Натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 (10 мМ)	Пробирка с голубой крышечкой
E	Реактив CuSO_4 + Неокупроин	Пробирка с голубой крышечкой
F	HCl (2 М)	Пробирка с белой крышечкой

Пользование микропипеткой:



Рисунок 1

Метод установки объема

Желаемый объем устанавливается путем вращения винта плунжера (Рисунок 1). Установленный объем виден на дисплее.

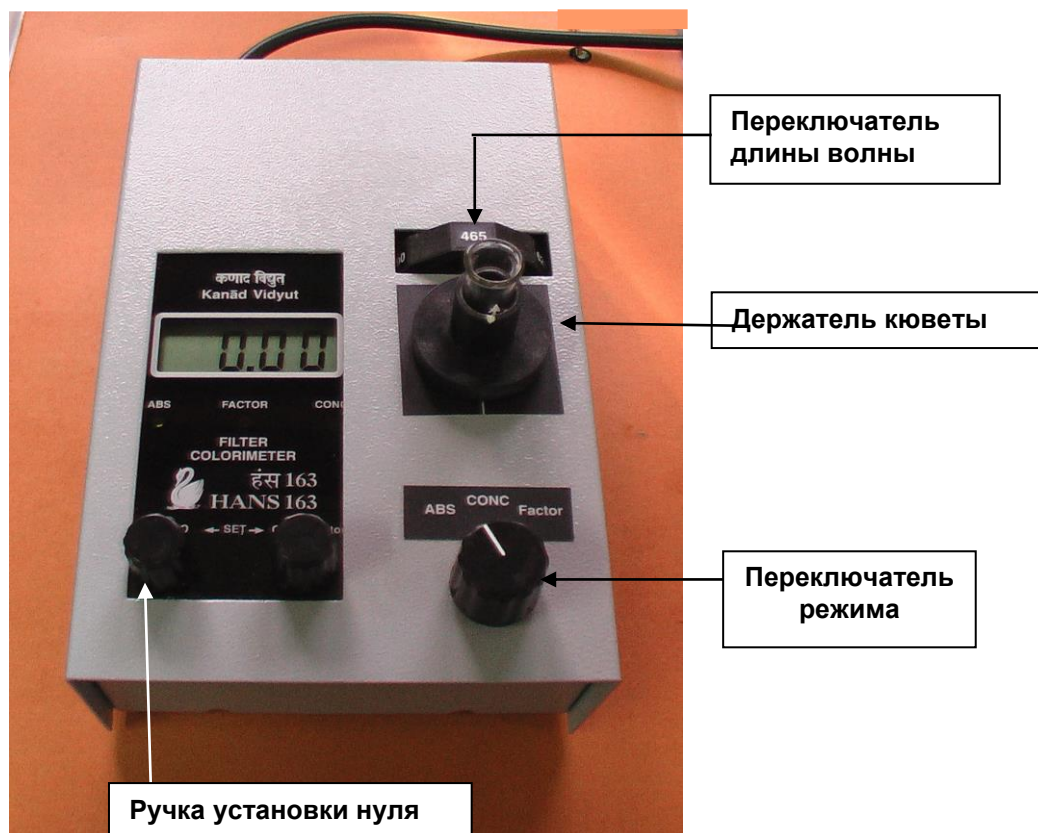
Помните, что каждая микропипетка имеет фиксированные границы объема, которые указаны на ней. НЕ ВЫХОДИТЕ ЗА ЭТИ ГРАНИЦЫ.

Метод использования

Наденьте наконечник на держатель (Рисунок 1). Мягко нажмите плунжер до первой остановки, поднимите и погрузите наконечник вертикально в жидкость на глубину 2 - 4 мм. Медленно отпустите плунжер, дав ему возможность вернуться в исходное положение. Выньте пипетку из жидкости и перенесите содержимое в желаемую пробирку. Для этого приложите наконечник к внутренней стенке пробирки и нажмите плунжер до первой остановки, а затем до конца для полного удаления жидкости из наконечника. Выньте микропипетку из пробирки. Сбросьте наконечник в емкость для отходов нажатием кнопки для сброса наконечников.

Инструкция по пользованию фотоколориметром:

Вид фотоколориметра сверху



Вид фотоколориметра сзади

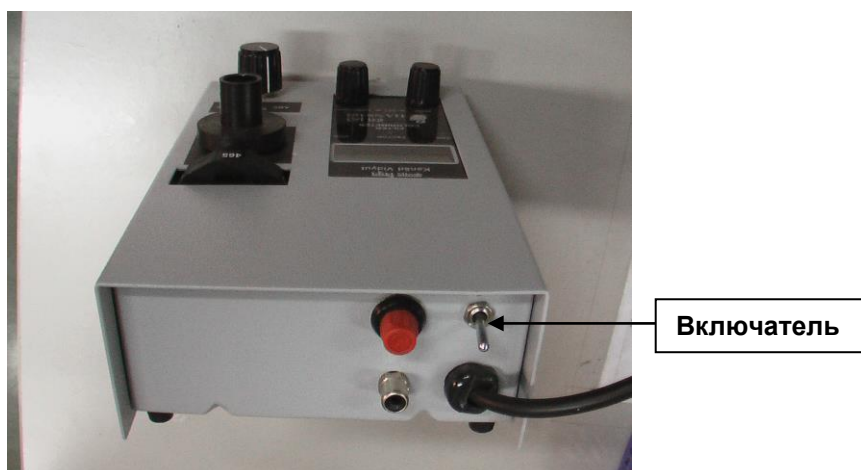


Рисунок 2

- 1) Поверните включатель (Рисунок 2) фотоколориметра в положение ON.
- 2) Поверните переключатель режима в положение абсорбции ("ABS").
- 3) Установите длину волны переключателем длины волны на 465 nm.
- 4) Налейте контрольный раствор в кювету. Вытрите внешнюю поверхность кюветы бумажной салфеткой и введите кювету в держатель. Мягко нажимом опустите кювету до конца.
- 5) Поверните ручку установки нуля до положения нуля. Теперь прибор готов для измерения абсорбции опытных образцов.

Введение

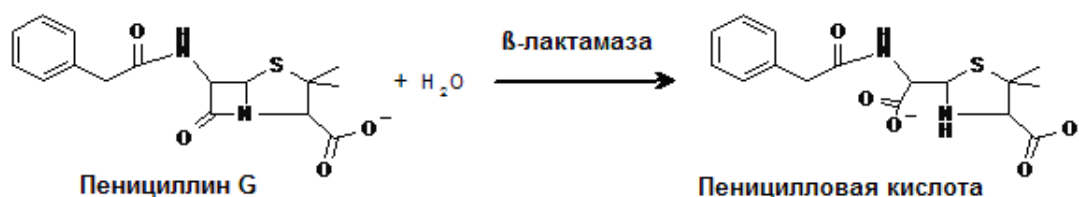
Пенициллины - это антибиотики, содержащие в своей структуре характерное β -лактамовое кольцо. Эти антибиотики угнетают размножение бактерий путем ингибирования синтеза клеточной стенки. Однако некоторые бактерии, синтезирующие фермент β -лактамазу, инактивируют эти антибиотики, поэтому такие бактерии устойчивые (резистентные) к пенициллинам. Исходя из этого, лечение пенициллином пациентов, инфицированных такими резистентными бактериями, является неэффективным. Одним из подходов к преодолению этой проблемы является создание эффективных ингибиторов β -лактамазы.

Эффективность ингибитора β -лактамазы может быть оценена путем определения его показателей IC_{50} и K_i . Показатель IC_{50} ингибитора

выражается концентрацией ингибитора, которая необходима для снижения активности фермента на 50 %. Показатель K_i ингибитора выражает его сродство (афинность) к ферменту.

Принцип метода определения активности β -лактамазы

β -Лактамаза инактивирует пенициллин, катализируя следующую реакцию:



Образующаяся пеницилловая кислота образует в присутствии неocupроина комплекс с CuSO₄. Образующийся при этом окрашенный в желтый цвет продукт можно определить путем измерения его адсорбции при 465 nm при помощи фотоколориметра.

В этом задании вам нужно будет:

- определить величину IC₅₀ для данного ингибитора β -лактамазы путем построения кривой зависимости доза-эффект
- вычислить величину K_i ингибитора.

Кривую доза-эффект для ингибитора можно получить путем измерения активности β -лактамазы в присутствии различных концентраций ингибитора при постоянной концентрации субстрата.

Q. 1.A.1.(18 баллов) Следуйте нижеприведенному руководству и впишите величины адсорбции **в Table 1.A.1. Листа Ответов.**

I. Приготовьте следующие реакционные смеси:

Пробирки с пробами	Натрий фосфатный буфер, pH 7,0	Ингибитор (100 mM)	Фермент β -лактамаза	Дистиллированная вода
1	1,48 мл	-	20 μ l	-
2	1,46 мл	20 μ l	20 μ l	-
3	1,44 мл	40 μ l	20 μ l	-
4	1,42 мл	60 μ l	20 μ l	-
5	1,40 мл	80 μ l	20 μ l	-
6	1,38 мл	100 μ l	20 μ l	-
Контроль	1,43 мл	50 μ l	-	20 μ l

II. Осторожно перемешайте и проинкубируйте при комнатной температуре 5 минут. Для контроля времени можно использовать настенные часы в лаборатории или собственные часы.

III. Добавьте к каждой пробирке по 1 мл раствора пенициллина G (0,54 mM) и осторожно перемешайте. Проинкубируйте при комнатной температуре 10 минут.

IV. Добавьте к каждой пробирке по 1,5 мл реактива CuSO_4 -неокупроина и осторожно перемешайте. Проинкубируйте при комнатной температуре 5 минут.

V. Остановите образование окраски путем добавления к каждой пробирке по 100 μ l **HCl**. Осторожно перемешайте.

VI. Установите на фотоколориметре длину волны 465 nm.

VII. Используйте контроль для установления показателя абсорбции на значении 0.

VIII. Проведите измерение абсорбции в растворах пробирок от 1 до 6 и внесите эти показания в таблицу. **Каждую измеренную вами величину адсорбции необходимо подтвердить подписью наблюдателя. Чтобы позвать наблюдателя, поднимите желтую карточку.**

Table 1.A.1.

Пробирки с пробами	Абсорбция
1	
2	
3	
4	
5	
6	

Анализ результатов и пояснения

Q. 1.A.2. (6 баллов)

I. Вычислите концентрацию (в mM) ингибитора [I] в 2,5 мл реакционной смеси в пробирках от 1 до 6 и внесите эти величины в **Table 1.A.2. Листа**

Ответов.

II. Предположим, что величина абсорбции пропорциональна гидролизу пенициллина G. Определите величину v_i/v_0 , где:

v_0 представляет уровень гидролиза пенициллина G β -лактамазой при отсутствии ингибитора, а v_i представляет уровень гидролиза пенициллина G в его присутствии. Примите во внимание, что для пробирки 1, $v_i = v_0$.

Впишите эти значения (до второго десятичного знака) **в Table 1.A.2.**

Листа Ответов.

Table 1.A.2.

Пробирка	[I] (mM)	v_i/v_0
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Q. 1.A.3. (5 баллов) Постройте график зависимости соотношения v_i/v_0 от [I] на **Листе для Графиков, прилагаемой к Листу Ответов.**

Определение значений IC_{50} и K_i ингибитора

Q. 1.A.4. (3 балла) Определите значение IC_{50} , интерполируя результат на графике. Впишите результат (до второго десятичного знака) в клетку **в**

Лист Ответов.

$IC_{50} = \underline{\hspace{2cm}} \text{ mM}$

Q. 1.A. 5. (3 балла) Вычислите константу диссоциации ингибитора K_i , используя уравнение:

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right),$$

где K_m - это константа Михаэлиса-Ментена фермента β -лактамазы для пенициллина G и $[S]$ - это начальная концентрация субстрата (пенициллина G), присутствующего в реакционной смеси.

Предположим, что K_m β -лактамазы для пенициллина G равна **0,05 mM**.

Впишите свой ответ (до второго десятичного знака) в клетку в **Листе**

Ответов.

$K_i = \underline{\hspace{2cm}} \text{mM}$
--

ЧАСТЬ В (4 балла)

Корреляция между экспрессией β -лактамазы и устойчивостью бактерий

При росте в жидкой питательной среде пенициллин-резистентные бактерии выделяют β -лактамазу в среду. В супернатанте (культуральная жидкость без клеток) такой среды можно обнаружить β -лактамазную активность. Был получен супернатант культур четырех различных организмов (P, Q, R и S), с предполагаемой резистентностью к пенициллину. По 20 μ l каждого из супернатантов были исследованы на наличие β -лактамазной активности. Соответствующие величины абсорбции были измерены при 465 nm и внесены в ниже представленную таблицу.

Организм	Абсорбция
P	0,090
Q	0,450
R	0,075
S	0,220

Эти четыре организма были исследованы на устойчивость к пенициллину G диско-диффузным методом, как описано ниже:

1. Каждый организм отдельно инокулировали в теплую агаризованную питательную среду, которую затем залили в стерильную чашку Петри. После остывания агаризованной среды она становится плотной.

2. Затем диски фильтровальной бумаги, пропитанные растворами пенициллина G с различными концентрациями, были помещены на поверхность плотной среды.
3. Чашки Петри инкубировали, что обеспечило рост организмов и диффузию пенициллина в среду.
4. Организмы, чувствительные к пенициллину, не будут расти вблизи диска антибиотика, поэтому вокруг него образуется прозрачная зона.

Вам представлены фотографии шести чашек Петри I - VI.

Чашка Петри I является контрольной, показывающей однородный рост организма газонем в отсутствие пенициллина G.

Чашка Петри II также является контрольной, показывающей среду, на которой не происходит рост никакого организма.

Чашки от III до VI показывают рост четырех организмов в присутствии пенициллина G. Числа 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5 обозначают количество микрограммов пенициллина G, находящегося в соответствующих дисках.

Q. 1.B.1. (4 балла) Рассмотрите эти чашки и сделайте вывод, какой организм растет на какой чашке. Впишите свои ответы **в Table 1.B.1.**

Листа Ответов.

Table 1.B.1.

Чашки Петри	Организм
III	
IV	

V	
VI	

ЧАСТЬ С (4 балла)

Корреляция между значениями K_i пестицидов и ростом бактерий

Четыре пестицида, обозначенные от P1 до P4 являются обратимыми ингибиторами фермента E, который необходим для роста бактерии B. Значения их K_i представлены в таблице ниже. Каждый из этих четырех пестицидов используется в четырех географически отличающихся регионах, обозначенных от R1 до R4. Остаточные концентрации этих четырех пестицидов в соответствующих регионах также представлены в таблице ниже.

Регион	R1	R2	R3	R4
Пестицид	P1	P2	P3	P4
K_i для фермента E	1 нМ	5 нМ	0,45 μ M	0,55 μ M
Остаточная концентрация	60 нМ	100 пМ	30 нМ	5,5 μ M

Q. 1.C.1. (4 балла) Укажите, будет или не будет бактерия B расти в каждом из четырех географических регионов, поместив галочку (\checkmark) в соответствующие клетки **в Table 1.C.1. Листа Ответов.**

Table 1.C.1.

Регион	R1	R2	R3	R4
Бактерии B растут				
Бактерии B не растут				

***** КОНЕЦ ПРАКТИЧЕСКОГО ТЕСТА 3 *****