

Код студента: \_\_\_\_\_

## 20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



### ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 2

### БИОХИМИЯ

Общее количество баллов: 100

Продолжительность: 90 минут

## Дорогие участники,

- В этом тесте вам предстоит выполнить 2 следующих задания:
  - Задание 1: Определение активности кислой фосфатазы (70 баллов)
  - Задание 2: Определение концентрации белка (30 баллов)
- **Вы должны вписать свои результаты и ответы в ЛИСТ ОТВЕТОВ. Ответы, записанные в Лист с Заданиями, оцениваться не будут.**
- Пожалуйста, проверьте, получили ли Вы все материалы и оборудование, перечисленные в каждом задании. Если, что-нибудь из перечисленного отсутствует, поднимите, пожалуйста, руку.
- По окончании теста вложите Лист Ответов и Лист Вопросов в конверт. Наблюдатель соберет Ваши конверты.

Удачи Вам!

### Как пользоваться спектрофотометром:

1. Дисплей спектрофотометра (Shimadzu UVmini-1240) должен показывать длину волны 400 nm (Рис. 1). Если нет, поднимите руку. Показание поглощения (ABS ) может не быть равным 0,000.
2. Наполните пластиковую микрокювету дистиллированной водой (DW) как минимум до уровня выступов внутри кюветы (Рис. 2)
3. Установите кювету в держатель кюветы прибора таким образом, чтобы прозрачные стороны находились справа и слева (Рис. 3).
4. Закройте крышку (Рис. 4).
5. Нажмите кнопку 'AUTO ZERO' (Рис. 5). При этом прибор установит уровень абсорбции кюветы с находящейся в ней водой на ноль (0.000). Эта проба будет использоваться в качестве нулевой (контрольной) пробы в этом эксперименте.
6. Теперь вы готовы к измерению абсорбции образца.
7. Замените воду раствором исследуемого образца и считайте величину ABS при закрытой крышке. Абсорбция раствора обусловлена поглощением находящихся в нем растворенных веществ.
8. Нет необходимости промывать кювету после каждого измерения, если вы измеряете серию образцов, начиная с менее концентрированного и переходя к более концентрированному образцу.

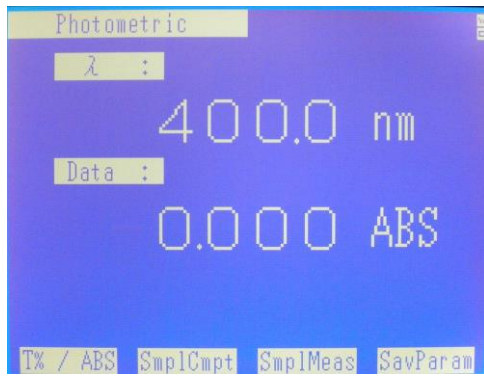


Рис. 1



Рис. 2



Рис. 3

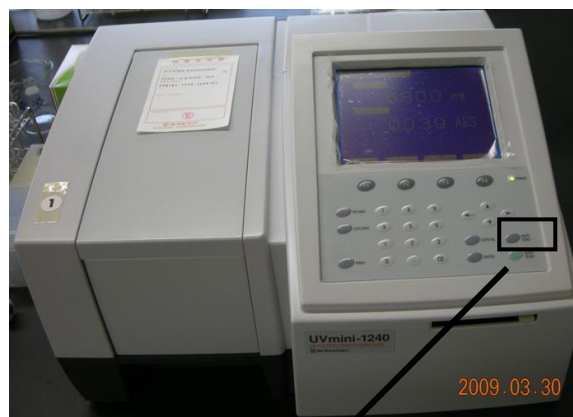


Рис. 4

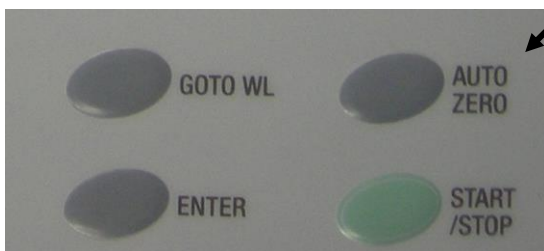


Рис. 5

## Введение

Кислая фосфатаза расщепляет в кислых условиях фосфорилированные молекулы с освобождением фосфата. Целью этого эксперимента является определение специфической (удельной) активности кислой фосфатазы. В Задании 1 Вам будет необходимо измерить активность кислой фосфатазы в неочищенном картофельном экстракте, а в Задании 2 определить концентрацию белка в этом неочищенном экстракте. Специфическую активность, выражаемую в виде активности фермента в единицу времени на единицу веса белка, вам необходимо будет определить из результатов Заданий 1 и 2. Специфическая активность является показателем чистоты фермента, по мере очистки фермента она увеличивается.

## Предостережение

1. Вы будете использовать небольшие количества токсических веществ (*p*-нитрофенол и NaOH). Если хотите, вы можете одеть лабораторные очки и одноразовые перчатки.
2. При расчетах, в которых требуются ответы из предшествующих вопросов, будут присуждаться частичные баллы том случае, если формулы для вычисления были правильными, даже если ответы были неправильными.

## Материалы и оборудование

## Количество

- |   |   |
|---|---|
| 1. Спектрофотометр  | 1 |
| 2. Микропипетка (P1000)   | 2 |
| 3. Микропипетка (P200)  | 1 |
| 4. Наконечники (по одной коробочке для P1000 и P200)              | 2 |
| 5. Пластиковая кювета   | 1 |
| 6. Штатив для пробирок, в котором помещены пробирки от 6-1 до 6-6 | 1 |

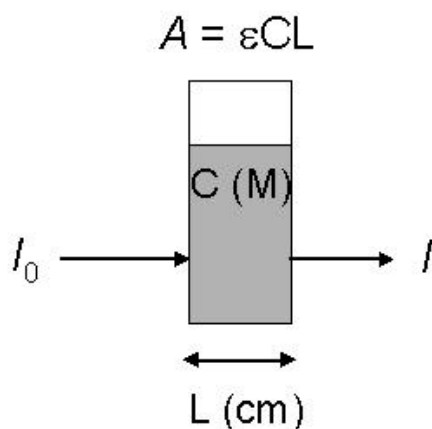
6-1. Неочищенный экстракт кислой фосфатазы (4 мл в 15-мл пластиковой пробирке, которая помечена «1x enzyme»)	1
6-2. 0,5 М Na-ацетатный буфер (рН 5,6) (2 мл в 15-мл пластиковой пробирке)	1
6-3. 5 mM pNPP (8 мл в 15-мл пластиковой пробирке)	1
6-4. 0,5 М NaOH (8 мл в 15-мл пластиковой пробирке)	1
6-5. 3% NaCl (10 мл в 15-мл пластиковой пробирке)	1
6-6. Пробирки для проб (стеклянные)	6

## Задание 1 (70 баллов)

### Определение активности кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы определяется ферментативной реакцией, в которой *p*-нитрофенилфосфат (pNPP) превращается в *p*-нитрофенол (pNP), после отщепления фосфата. Продукт реакции, pNP, поглощает свет при длине волны 400 nm с коэффициентом молярной экстинкции  $\epsilon_{400 \text{ nm}}$ , равным  $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при щелочных значениях pH. Реакционная смесь для кислой фосфатазы является слабо кислой. Поэтому для количественного определения pNP необходимо подщелочить среду. В задании 1 вы должны измерить протекание реакции во времени и получить значение изменения абсорбции за 1 минуту времени, которое обеспечивает 1 мл неочищенного экстракта. Для расчета изменения концентрации из показаний изменения абсорбции необходимо использовать коэффициент  $\epsilon_{400 \text{ nm}}$ . Затем вам необходимо будет рассчитать число молей pNP, образованных в ходе реакции, путем умножения изменения концентрации на объем образца, в котором производилось измерение абсорбции.

Что такое коэффициент молярной экстинкции ?



$A$ , величина абсорбции

$\epsilon$ , коэффициент молрной экстинкции ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$C$ , концентрация ( $M = \text{моль литр}^{-1}$ )

$L$ , длина оптического пути, пройденного светом (см)

$I_0$ , интенсивность падающего света

$I$ , интенсивность проходящего света

Абсорбция ( $A$ ) является физико-химической характеристикой раствора, которая показывает в какой степени растворенное вещество поглощает свет определенной длины волны. Абсорбция пропорциональна концентрации ( $C$ ) и длине оптического пути, пройденного светом ( $L$ ). Константа в этом уравнении является величиной, характерной для растворенного вещества, и она называется коэффициентом молярной экстинкции ( $\epsilon$ ). Таким образом, эту зависимость можно представить в виде  $A = \epsilon C$  ( $M = \text{моль литр}^{-1}$ )  $L$  (см). По величине абсорбции можно определить концентрацию, поскольку  $\epsilon$  известен и  $L$  составляет в этом эксперименте 1 см. Измеряется  $\epsilon$  в  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , поскольку абсорбция является безразмерной величиной без единиц измерения.

В Задании 1 используются две концентрации фермента. Найдите пробирку с пробой, помеченную “1x enzyme“, содержащую неочищенный экстракт кислой фосфатазы. Затем найдите пробирку объемом 15 мл, в которой находится 3% NaCl и удалите из нее 1 мл раствора так, что теперь эта пробирка будет содержать 9 мл 3% NaCl. Добавьте в нее при помощи микропипетки 1 мл раствора ‘1x enzyme’, в результате чего Вы получите раствор ‘0.1x enzyme’. Измените метку на этой пробирке на ‘0.1x’. Затем возьмите 6 пустых стеклянных пробирок. Подпишите каждую пробирку в соответствии с концентрацией фермента и длительностью реакции как показано ниже.

0.1x, 20 min

1x, 20 min

0.1x, 10 min

1x, 10 min

0.1x, 1 min

1x, 1 min



**Q.1.1. (10 баллов)** Вначале в таблице Листа Ответов распишите ход эксперимента для проведения всех реакций, отмечая значком (○) начало и значком (●) конец для каждой реакции. Между началом каждой реакции должна пройти как минимум 1 минута. В таблице Листа Ответов показан пример для реакции "0.1x, 20 min".

**Q.1.2. (15+10 баллов)** Проведите ферментативные реакции соответственно представленному ниже руководству и порядку, подготовленному вами в Q.1.1. При каждом пипетировании используйте новый наконечник. Перемешивайте смесь сразу после каждого добавления путем постукивания по пробирке. После проведения всех реакций проведите измерение абсорбции  $A_{400}$  всех образцов. Впишите полученные величины в таблицу в Листе Ответов и постройте график. Обратите внимание на то, что поскольку в качестве нулевого образца (контроля) использовалась вода, график не будет проходить через 0 (ноль) на оси Y (ордината).

Руководство по определению активности кислой фосфатазы

- 1) Смешайте 0,12 мл 0,5 М Na –ацетатного буфера (pH 5,6) и 0,24 мл 5 mM pNPP в пробирке для измерения активности. Начните реакцию добавлением 0,24 мл раствора фермента.
- 2) После проведения реакции в течение 1, 10 и 20 мин., соответственно, остановите реакцию добавлением 0,6 мл 0,5 М NaOH. NaOH останавливает реакцию и превращает образовавшийся pNP в окрашенную в желтый цвет форму (абсорбирующую при 400 нм) .
- 3) После окончания всех реакций, измерьте  $A_{400}$  образцов.

Состав реакционной смеси для определения активности  
кислой фосфатазы картофеля

0,5 М Na-ацетатный буфер (рН 5,6)	0,12 ml
5 mM pNPP	0,24 ml
Фермент	0,24 ml
0,5 М NaOH	0,6 ml
Сумма	1,2 ml

**Q.1.3. (15 баллов)** При какой концентрации фермента наблюдается наилучшая линейная зависимость между временем реакции и  $A_{400}$ ? Обведите кружком правильный ответ в Листе Ответов. Определите наклон прямой на графике.

**Q.1.4. (5 баллов)** Используя определенный в Q.1.3. наклон кривой, рассчитайте активность в виде изменения значения  $A_{400}$  за одну минуту на 1 мл раствора фермента с концентрацией «1х». Длина оптического пути (L) составляет 1 см. Ваш ответ должен быть внесен в Лист Ответов вместе с вашими вычислениями активности в соответствующих единицах.

**Q.1.5. (5 баллов)** Преобразуйте изменение абсорбции, полученное в задании Q.1.4, в изменение концентрации, используя величину  $\epsilon_{400}$  для pNP ( $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ваш ответ вместе с Вашими вычислениями (в единицах в минуту на 1 мл «1х» раствора фермента) должен быть вписан в Лист Ответов.

**Q.1.6. (5 баллов)** Преобразуйте значение изменения концентрации, полученное в вопросе Q.1.5., в изменение числа молей pNP. Ваш ответ вместе с Вашими вычислениями (в молях в минуту на 1 мл «1х» раствора фермента) должен быть вписан в Лист Ответов.

**Q.1.7. (5 баллов)** Рассчитайте общую активность (в молях в минуту) в 4 мл «1х» раствора фермента, который был Вам выдан.

## Задание 2 (30 баллов)

### Определение концентрации белка

Концентрация белка определяется с использованием стандартного белка, такого как бычий сывороточный альбумин (BSA). В задании 2 вам необходимо будет определить эквивалентную BSA концентрацию раствора фермента «1x enzyme» при помощи метода Брэдфорд. Метод Брэдфорд основан на увеличении абсорбции Кумасси бриллиантового синего при 595 нм при его связывании с белком.

Была сделана серия разведений в два раза (0.4; 0.2; 0.1 и 0.05 мг белка мл<sup>-1</sup>) путем разведения концентрированного раствора BSA (0.4 мг белка мл<sup>-1</sup>) раствором 3% NaCl. Ко всем пробам серии разведений BSA и раствора «0.1x enzyme», который Вы сделали в задании 1, был добавлен краситель при одинаковых условиях. Оптическая плотность (OD<sub>595</sub>) была измерена при 595 нм и данные внесены в таблицу ниже.

Таблица

Образец	[BSA] (mg · ml <sup>-1</sup> )	OD <sub>595</sub>
	0.00	0.000
	0.05	0.070
	0.1	0.143
	0.2	0.261
	0.4	0.521
раствор 0,1x enzyme		0.180

Оптическая плотность или OD, является показателем того, как вещество пропускает свет, или, иначе говоря, показателем «абсорбции» раствора.

**Q.2.1.(10 баллов)** Постройте в Листе Ответов график зависимости  $OD_{595}$  от концентрации BSA в виде прямой линии.

**Q.2.2.(10 баллов)** Определите по графику концентрацию белка в растворе фермента '0,1x enzyme' и концентрацию белка в растворе фермента '1x enzyme'.

**Q.2.3.(10 баллов)** Рассчитайте специфическую (удельную) активность (активность в минуту на мг белка) для раствора фермента '1x enzyme'. Ваш ответ должен быть вписан в Лист Ответов вместе с вашими расчетами (единицы активности в минуту на мг белка).