

Код студента: _____

20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 3

ГЕНЕТИКА

Общее количество баллов: 98

Продолжительность: 90 минут

Дорогие участники,

- Этот тест содержит 5 следующих заданий:

Задание 1: Исследование фенотипов мутантов плодовой мушки (9 баллов)

Задание 2: Наследование признака белые глаза (33 балла)

Задание 3: Разделение пигментов глаз (18 баллов)

Задание 4: Анализ хроматограммы (14 баллов)

Задание 5: Анализ Белого Белка (24 балла)

- **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.
- Эта практическая работа занимает очень много времени. Вы должны быть очень хорошо организованы и работать быстро, чтобы закончить все 5 заданий.

Удачи Вам!

Задание 1 (9 баллов)

Исследование фенотипов мутантов плодовой мушки

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Чашки Петри, пронумерованные (1)-(4) с живыми плодовыми мушками	1 набор
2. Лупа на подставке	1

Введение

Плодовые мушки - это часто используемый объект в генетических исследованиях. В чашке Петри (1) находятся представители дикого типа, а в каждой из чашек Петри под номерами (2)-(4) находятся различные мутанты плодовой мушки. Рассмотрите мушек внимательно при помощи лупы, но не открывайте крышки чашек. Вы можете изменять высоту и угол наклона лупы для ваших наблюдений.

Q.1.1. (9 баллов) Установите для каждого мутанта, каким признаком он отличается от дикого типа? Выберите характерный фенотип мутанта из следующего списка.

- A. цвет глаз B. форма глаз C. форма крыльев D. длина щетинок
E. форма антенн F. форма щетинок G. форма ног H. форма хоботка
I. цвет тела J. длина брюшка

Задание 2 (33 балла)

Наследование признака белые глаза

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. 1,5 мл -пробирки, содержащие анестезированных мушек, обозначенные (5a) и (5b), (6a) и (6b) и (7)	1 набор
2. Пустые чашки Петри	5
3. Белый картон (помещается под чашку Петри для облегчения рассматривания мушек)	1
4. Пинцет	2
5. Лупа на подставке (используемая в Задании 1)	1
6. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл	1

Введение

У особи дикого типа плодовой мушки (WT) красные глаза, тогда как у мутантных мушек (w) белые глаза. w - это рецессивная мутация, локализованная в X хромосоме. В каждой из пробирок (5a) и (5b), (6a) и (6b) отдельно содержатся женские или мужские особи плодовых мушек, полученные в результате двух разных скрещиваний. Пробирка (7) содержит мушек обоих полов, полученных в другом скрещивании. Обратите внимание, что пол мушек можно определить по окраске спинной стороны брюшка, которая у самцов равномерно окрашена в черный цвет.



Самка

Самец

Q.2.1. (8 балла) Поместите мушек из пробирок (5a) и (5b) в разные чашки Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.2. (8 баллов) Поместите мушек из пробирок (6a) и (6b) в разные чашки Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.3. (8 баллов) Поместите мушек из пробирки (7) в чашку Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.4. (снят)

Q.2.5. (снят)

Q.2.6. (9 баллов) Каким скрещиванием были получены мушки в пробирках (5a) и (5b), (6a) и (6b) и (7)? Выберите все возможные варианты и представьте ответ в виде букв.

- A. Гомозиготные самки с красными глазами и гемизиготные самцы с красными глазами
- B. Гомозиготные самки с белыми глазами и гемизиготные самцы с белыми глазами
- C. Гомозиготные самки с красными глазами и гемизиготные самцы с белыми глазами
- D. Гомозиготные самки с белыми глазами и гемизиготные самцы с красными глазами
- E. Гетерозиготные самки и гемизиготные самцы с красными глазами
- F. Гетерозиготные самки и гемизиготные самцы с белыми глазами

Задание 3 (18 баллов)

Разделение пигментов глаз

Материалы и оборудование

Количество

В дополнении к Материалам и оборудованию, использованным в Задании 2, в этом задании вам предоставляется следующий набор оборудования.

- | | |
|---|----------------------------|
| 1. Пробирки объемом 1,5 мл (8) и (9), содержащие раствор
для экстракции пигментов глаз | 1 набор (1 запасной набор) |
| 2. Пустые пробирки объемом 1,5 мл (10) и (11) | 1 набор (1 запасной набор) |
| 3. Микропестики (в 15-мл пробирке) | 2 (1 запасной) |
| 4. Центрифуга | 1 |
| 5. Микропипетка (P20) | 1 |
| 6. Наконечники для пипеток (для P200 и P20) | 1 пакет |
| 7. Пустые пробирки объемом 1,5 мл (без номеров на крышечке) | 2 (2 запасных) |
| 8. Пластинка с нанесенной целлюлозой | 1 (1 запасная) |
| 9. Микропипетка (P2) | 1 |
| 10. Наконечники для пипеток (P2) | 1 пакет |
| 11. Пробирка объемом 50 мл, содержащая растворители | 1 |
| 12. Штатив для пробирки объемом 50 мл | 1 |

Ход работы

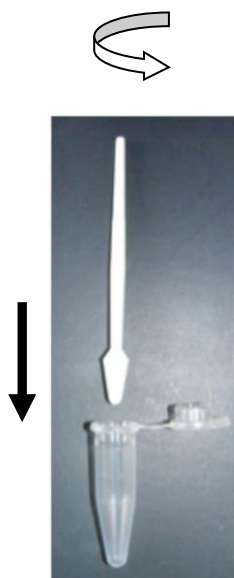
1. Выберите 5 мушек с красными и 5 мушек с белыми глазами, определенными в Задании 2 (пол не имеет значения), и отделите при помощи двух пинцетов их головы от тел.

Убедитесь, что вы не повредили глаза и брюшка мушек!

2. При помощи пинцета перенесите головы мушек с красными глазами в пробирку (8), головы мушек с белыми глазами в пробирку (9), тела мушек с красными глазами в пробирку (10) и тела мушек с белыми глазами в пробирку (11).

Пробирки (10) и (11) будут использованы в Задании 5.

3. Вставьте микропестики в каждую из пробирок (8) и (9) и разотрите головы мушек путем вращения пестика рукой, прижимая его ко дну пробирки. Используйте разные пестики для разных образцов.



4. Отцентрифугируйте пробирки (8) и (9) при 14000 оборотов в течение 3 минут (смотри “Инструкцию по пользованию центрифугой” в конце этого задания на страницах 17-18. При необходимости обратитесь за помощью к наблюдателю.).
5. Перенесите 5μл супернатанта (надосадочной жидкости) из пробирок (8) и (9) в

новые пробирки.

6. Посмотрите на пластинку с нанесенной целлюлозой. Более короткие стороны пластинки представляют собой верх и низ, а матовая сторона, покрытая целлюлозой, будет использоваться в этом эксперименте. Напишите карандашом на верхней стороне (на матовой поверхности с целлюлозой) пластинки Ваш код студента.
7. Вначале, отступив приблизительно 2 см от нижнего и $1/3$ ширины от левого края пластинки, нанесите в виде точки 1 μ л экстракта голов с красными глазами. Не проводите линий при помощи карандаша или маркера, которые могли бы повредить целлюлозное покрытие.
8. Затем нанесите 1 μ л экстракта из голов с белыми глазами на расстоянии $1/3$ от правого края пластинки и на расстоянии около 2 см от ее нижнего края.
9. Когда пятна высохнут, поместите пластинку в пробирку объемом 50 мл таким образом, чтобы нижняя ее часть касалась растворителя, и плотно закройте пробирку. Убедитесь в том, что растворитель не касается пятен. Открывайте и закрывайте крышку пробирки быстро, чтобы избежать испарения растворителя.
10. Во время хроматографии пробирка должна стоять в штативе вертикально. Вы можете продолжить работу с Заданиями 4 и 5 этого теста, а затем вернуться к этому разделу. **Прежде чем вы продолжите работу, прочтите, пожалуйста, следующий пункт (11).**
11. Когда фронт растворителя достигнет на пробирке отметки 30 мл, выньте пластинку из пробирки, оставьте ее для высыхания на кусочке бумажного полотенца и закройте крышку пробирки. Поднимите руку, как только пластинка высохнет.
(Ассистент заберет вашу пластинку для оценки результата.) **(18 баллов)**

Задание 4 (14 баллов)

Анализ хроматограммы

Введение

Несмотря на то, что некоторые пигменты, входящие в состав сложных глаз плодовой мушки, невидимы нашему глазу, их можно визуализировать под ультрафиолетовой лампой. На рисунке 1 показан пример разделения пятен пигментов глаз при помощи тонкослойной хроматографии после регистрации под ультрафиолетовым светом. Обратите внимание, что образцы включают не только WT (дикий тип) и *w* (белые глаза), но и *se* (глаза сепия – желтые), *bw* (коричневые глаза) и *cn* (киноварные глаза – ярко красные).

У плодовой мушки существует два пути биосинтеза пигментов глаз, путь оммохрома и путь птеридина. Цвет глаз дикого типа (темно-красные) образуется в том случае, если все пигменты, синтезированные в обоих путях, одновременно имеются в сложных глазах. Глаза становятся белыми, если и оммохромовые и птеридиновые пигменты отсутствуют. Среди различных пигментов и их предшественников, участвующих в двух путях биосинтеза, в этом эксперименте можно разделить при помощи хроматографии только пигменты птеридинового пути.

Подвижность каждого пигмента при хроматографии определяется химической природой соединения, его растворимостью в растворителе и расстоянием, пройденным растворителем. Расстояние, пройденное каждым пигментом, зависит от длительности проведения хроматографии, но величина R_f , которую можно вычислить по приведенной ниже формуле, постоянна для каждого пигмента.

$$R_f = \frac{\text{Расстояние от линии нанесения до центра пятна}}{\text{Расстояние от линии нанесения до фронта растворителя}}$$

В таблице 1 показаны цвет пятна под УФ-лампой и величина Rf для каждого пигмента, выделенного из сложных глаз плодовой мушки.

Таблица 1. Характеристики птеридиновых пигментов сложных глаз плодовой мушки

Код	Название	Цвет под УФ-лампой	Величина Rf
A	2-амино-4-гидроксиптеридин	синий	0,57
B	биоптерин	синий	0,61
C	дрозоптерин	оранжевый	0,21
D	сепиаптерин	желтый	0,52
E	изоксантоптерин	желтый	0,69
F	ксантоптерин	зелено-синий	0,38
G	изосепиаптерин	фиолетово-синий	0,25

Q.4.1. (5 баллов) Выберите пигмент из Таблицы 1, соответствующий каждому пятну

на хроматограмме, как показано на Рисунке 1. Внесите ответ в таблицу в виде кода.

Чем отличается состав птеридиновых пигментов глаз у мутантов от такового у дикого типа? Определите приблизительное количество каждого пигмента исходя из

хроматограммы на Рисунке 1. Впишите “++”, если пигмента намного больше по

сравнению с диким типом, “+” если пигмент присутствует в том же количестве, как у дикого типа, и “–” если пигмент отсутствует.

Q.4.2. (9 баллов) Исходя из цвета глаз и результатов хроматографии, показанных на Рисунке 1, определите, какое из следующих отклонений имеет мутант *se* (глаза сепия),

bw (коричневые глаза) и *cn* (глаза киноварные)? Впишите соответствующую букву.

- A. Оммохромные пигменты должны отсутствовать.
- B. Все птеридиновые пигменты отсутствуют, но оммохромные пигменты должны присутствовать.
- C. И оммохромные и птеридиновые пигменты отсутствуют.
- D. Компоненты птеридиновых пигментов отличаются от дикого типа.

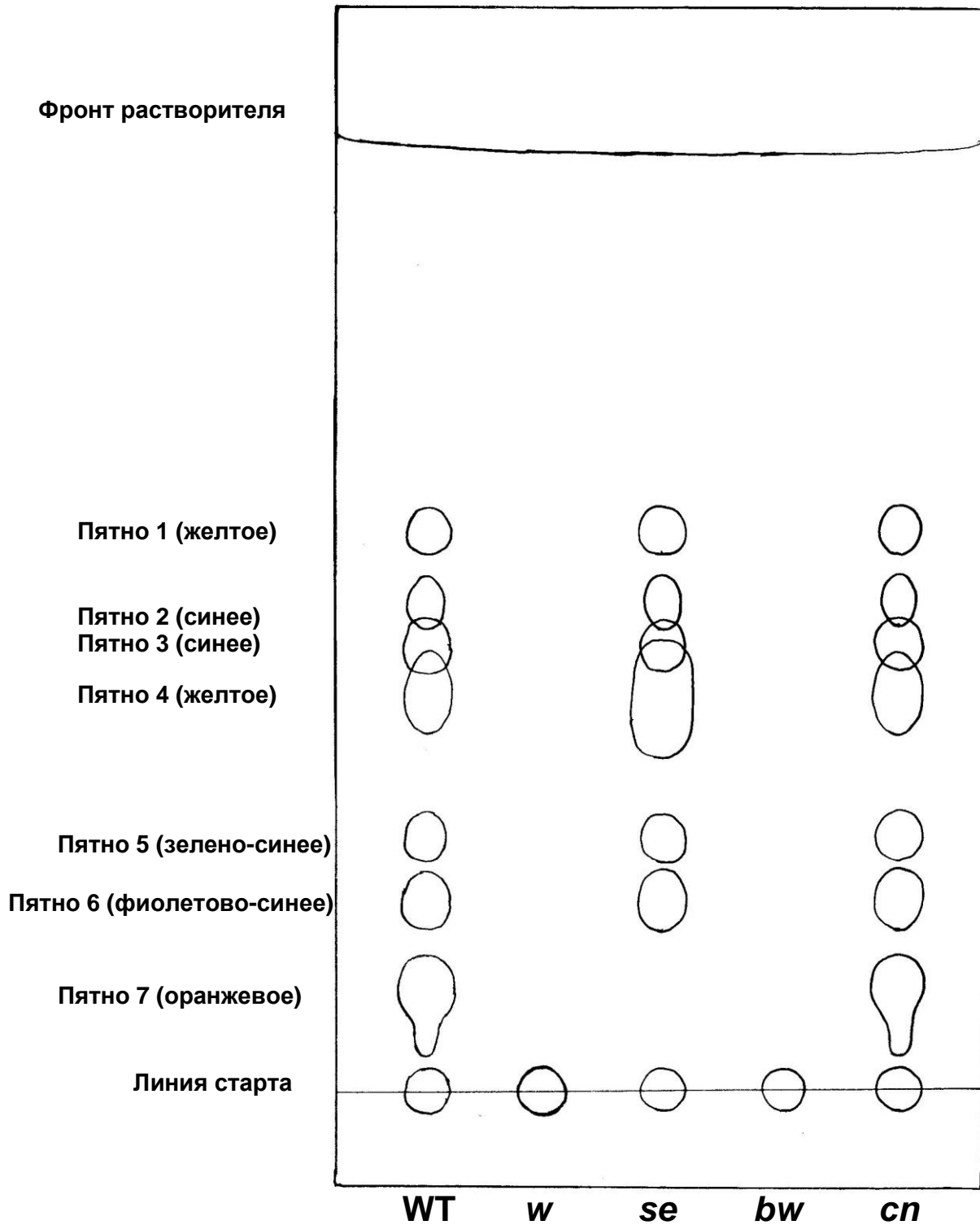


Рисунок 1. Хроматография пигментов глаза дикого типа

и мутантов плодовых мушек

Задание 5 (24 балла)

Анализ Белого Белка

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Пробирка А объемом в 1,5 мл: буфер для экстракции белка	1
2. Пробирки объемом в 1,5 мл (пробирки (10) и (11) из Задания 3)	4
3. Микростеклянные (в 15-мл пробирке)	2 (1 запасной)
4. Прибор для электрофореза с заранее приготовленным полиакриламидным гелем	1
5. Микропипетка (P200)	1
6. Микропипетка (P20)	1
7. Наконечники для пипеток (для P200 и P20)	1 набор
8. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл	1
9. Пробирка С объемом 1,5 мл: Маркеры для электрофореза (белки с известными молекулярными массами)	1

Экстракция белка и проведение электрофореза

1. Добавьте по 50 μ л буфера для экстракции белка (пробирка А) в пробирки (10) (тела мушек с красными глазами) и (11) (тела мушек с белыми глазами), приготовленные в Задании 3. Разотрите тела мушек микропестиком. Используйте разные микропестики для образцов дикого типа и мутанта.
2. Отцентрифугируйте пробирки (10) и (11) при 14000 оборотах в течение 3 мин. и затем перенесите супернатант в новые пробирки объемом 1,5 мл (**прочтите «Инструкцию по пользованию центрифугой» в конце этого задания на страницах 17-18 и при необходимости обратитесь к ассистенту**).
3. Ассистент приготовил для вас гель, который готов для использования. Нанесите по 5 μ л каждого образца в ячейки в центральной части пластинки геля в таком порядке слева направо: маркеры молекулярных масс, экстракт «красные глаза» и экстракт «белые глаза». После окончания нанесения образцов поднимите руку для вызова наблюдателя. Ваш ассистент включит прибор для начала электрофореза.
4. Через 5 мин. поднимите руку для вызова ассистента. Он возьмет нижнюю часть прибора и сделает снимок Вашего геля для оценки. **(18 баллов)**.

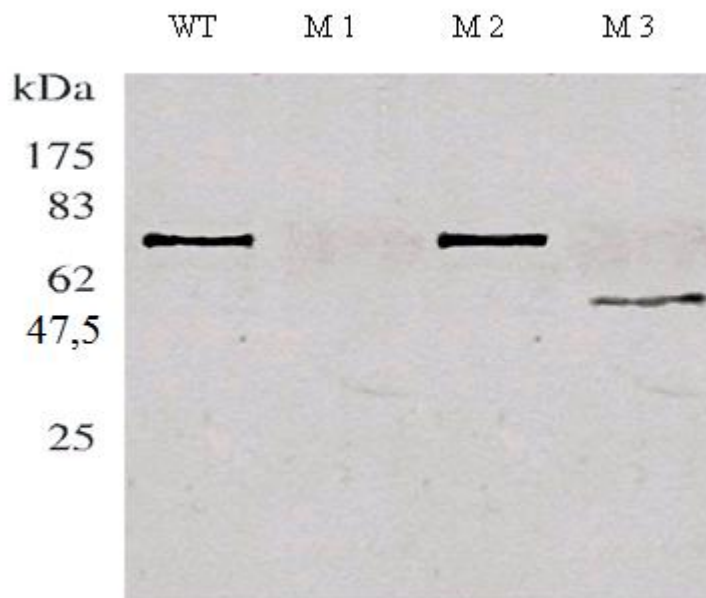
Пожалуйста, проверьте качество снимка на фотоаппарате Вашего ассистента!

Анализ данных электрофореза белка

M1, M2 и M3 – обозначают дорожки, в которые были нанесены образцы из различных мутантных линий (мутации генов, отвечающих за пигментацию глаз).

После разделения белков этих мутантных мушек в содержащем додецилсульфат натрия полиакриламидном геле, эти белки были перенесены на нейлоновый фильтр

для обработки антителом, которое специфически узнает белок, кодируемый геном *white*. При этом были получены следующие результаты.



Q.5.1. (3 балла) Какие из следующих дефектов приводят к результатам, наблюдаемым после электрофореза образцов M1, M2 и M3? Выберите правильный ответ из вариантов А, В и С.

- А. Сайт инициации для синтеза мРНК гена *white* подвергнут делеции и ген не экспрессируется.
- В. Мутация stop codon (стоп-кодон) произошла в кодирующем Белый Белок участке (в рамке считывания), что приводит к завершению трансляции и отсутствию С-концевой последовательности пептида, соответствующей молекулярному весу в 20 kDa.
- С. Несмотря на то, что синтезировался нормальный Белый Белок, гены, принимающие участие в синтезе оммохромовых пигментов, являются дефектными.

Q.5.2. (3 балла) Выберите другой дефект нарушения генов пигментов глаз из вариантов А, В и С, которые привели бы к таким же фенотипам, как у М1, М2 и М3.

- А. Кодирующая последовательность гена *white* слилась с кодирующей последовательностью другого гена путем хромосомной транслокации, что привело к образованию новой последовательности, кодирующей слитый белок, сохранивший антигенные участки для антител, но имеющий на 30% меньший молекулярный вес.
- В. В кодирующем белок участке гена *white* произошла замена одного основания, что изменило аминокислотную последовательность, но способность белка взаимодействовать с антителами не была потеряна.
- С. В определенном участке хромосомы имеется большая делеция, которая включает полностью ген *white*.

Инструкция по пользованию центрифугой

При необходимости обратитесь за помощью к наблюдателю.

1. Для того чтобы открыть крышку центрифуги (2), нажмите кнопку OPEN в правой верхней части панели управления 1 (Рис. 1).
2. Ротор закрыт пластиковой крышкой 3 (Рис. 2). Чтобы ее снять, придержите крышку ротора одной рукой и поверните центральный черный винт (4) другой рукой против часовой стрелки.
3. Внутри ротора находятся 24 гнезда (Рис. 3). Поместите пробирки с образцами для сохранения балансировки симметрично (друг против друга).
4. Закройте ротор крышкой и поверните винт ротора (4) по часовой стрелке для фиксации крышки ротора.

5. Осторожно закройте крышку центрифуги. Вы должны услышать сигнал, обозначающий ее полное закрытие.
6. Скорость вращения центрифуги (140 x 100 оборотов в минуту) и время (3 мин) установлены заблаговременно. Проверьте установку в окошках (5) и (7) нажимая кнопку DISP/CE (6), а затем нажмите кнопку START (8), чтобы начать центрифугирование.
7. По окончании центрифугирования крышка (2) откроется автоматически. Затем полностью откройте крышку (2) и снимите крышку ротора поворотом винта (4) против часовой стрелки, придерживая крышку ротора другой рукой.
8. Во избежание взбалтывания осадка, осторожно выньте пробирки из ротора. Поставьте их в штатив.
9. Закройте крышку ротора (3), поверните винт (4) по часовой стрелке и закройте крышку центрифуги (2).

Рисунок 1

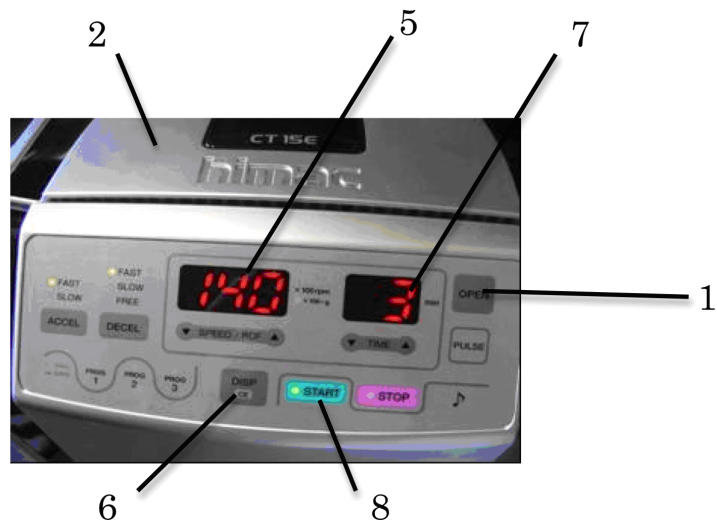


Рисунок 2



Рисунок 3

