

Код студента: \_\_\_\_\_

## 20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 4

ФИЗИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Общее количество баллов: 91

Продолжительность: 90 минут

## Дорогие участники,

- В этом тесте вам предлагаются 2 следующих задания:

Задание 1: Изучение клеточного цикла (61 балл)

Задание 2: Изучение механизма подвижности одноклеточных водорослей  
(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!

## Задание 1 (61 балл)

### Изучение клеточного цикла

#### Введение

При размножении многих одноклеточных организмов удвоение (дупликация) и разделение (сегрегация) генов происходит контролируемым образом во время роста клетки. Если условия окружающей среды, в которых находятся клетки, становятся менее благоприятными или стрессовыми, часто наблюдается генетический обмен путем конъюгации (спаривания) между клетками, имеющими разные типы спаривания. Этот феномен является важным для выживания и контролируется как внутренними, так и внешними условиями. До настоящего времени изучение этих механизмов осуществлялось путем исследования мутантов различных модельных организмов. Например, исследование мутантов дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, размножающихся делением, предоставило бесценную информацию. Клетки дикого типа *S. pombe* размножаются путем повторяющегося удлинения клеток, за которым следует симметричное деление клетки. С другой стороны, в условиях стресса, таких как голодание, рост клеток останавливается на определенной стадии цикла, и для преодоления условий стресса индуцируется образование спор путем конъюгации клеток.

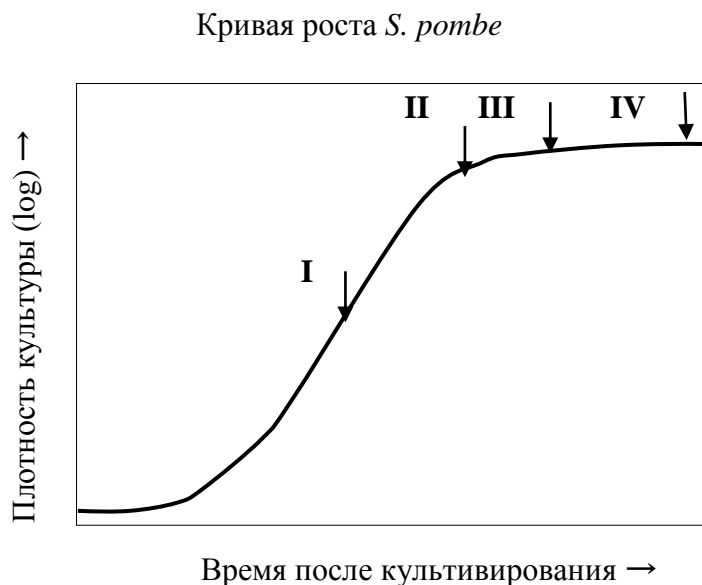
Следующее задание включает изучение размножения клеток на примере *S. pombe*.

---

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Фиксированная культура штамма дикого типа; a	1
2. Фиксированная культура штамма дикого типа; b	1
3. Фиксированная культура штамма дикого типа; c	1
4. Фиксированная культура штамма дикого типа; d	1
5. Штатив для микропробирок	1
6. Микроскоп	1
7. Одноразовая камера для подсчета клеток	1
8. Счетчик	1
9. Микропробирка объемом 1,5 мл	3
10. Коробочка с предметными стеклами	1
11. Коробочка с покрывными стеклами	1
12. Микропипетка Р-20 (емкость 2-20μL)	1
13. Коробочка с наконечниками для пипеток	1
14. Фиксированная культура штамма дикого типа, проинкубированная при 25°C; W25	1
15. Фиксированная культура штамма дикого типа, проинкубированная при 36°C; W36	1
16. Фиксированная культура мутантного штамма <i>cdc25</i> , проинкубированная при 25°C; M25	1
17. Фиксированная культура мутантного штамма <i>cdc25</i> , проинкубированная при 36°C; M36	1
18. Фотография клеток, окрашенных красителями Calcofluor и DAPI	1

## Часть А

Ниже представлена кривая роста гаплоидных клеток ( $n=1$ ) дикого типа *S. pombe*, выращенная при  $25^{\circ}\text{C}$ . Пробы культуральной жидкости были взяты в определенные моменты времени, обозначенные стрелками. Препараты фиксированных культур **a**, **b**, **c** и **d**, находящиеся на столе, приготовлены из образцов, взятых в какой-то из моментов культивирования, обозначенных стрелками I, II, III или IV. Рассмотрите каждый образец под микроскопом и дайте ответы на следующие вопросы. Перед микроскопированием встряхните, пожалуйста, пробирку.

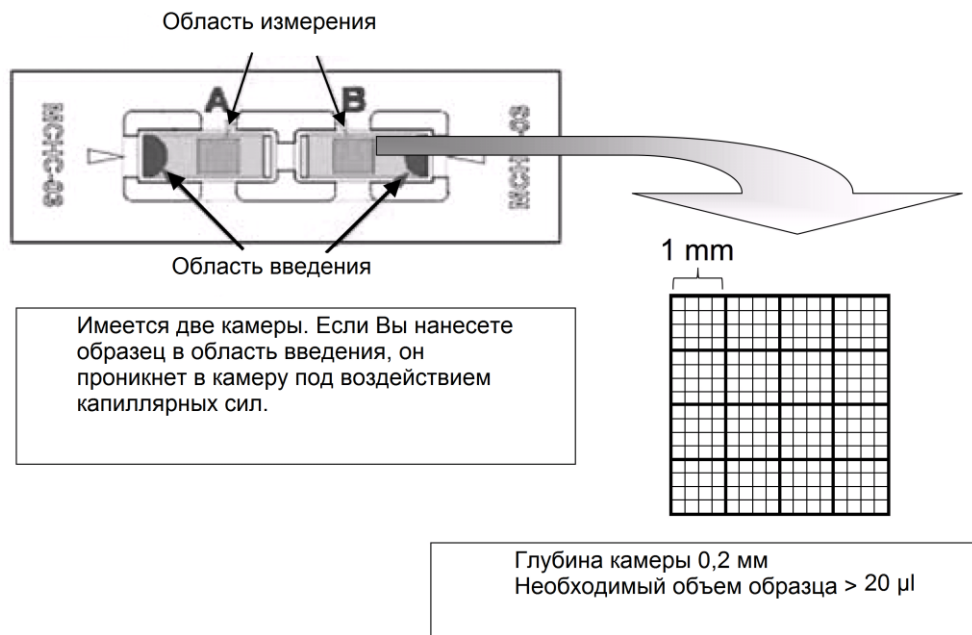


**Q.1.A.1. (2x2 баллов)** Сравните клетки образца **a** с таковыми образца **b** и ответьте на следующие вопросы.

- 1 В каком из образцов клетки более круглые?

- 2 В каком образце популяция клеток, находящихся на стадии цитокинеза, больше? Цитокинезом называется часть клеточного цикла от начала формирования перегородки (септы) до разделения дочерних клеток.

**Q.1.A.2. (6 баллов)** Подсчитайте число клеток в 1 мл культуральной жидкости в образце **a** при помощи счетной камеры как указано ниже. При подсчете учитывайте неотделившиеся дочерные клетки как одну клетку. Запишите ваш результат в Лист Ответов. Обратите внимание, что каждый студент получил одну счетную камеру, но каждая камера имеет два отсека для проведения подсчета. При помощи этой камеры вы можете произвести два подсчета.



**Q.1.A.3. (5 баллов)** Определите процент клеток, находящихся на стадии цитокинеза, в культуральной жидкости образца **a**. Вам необходимо в сумме сосчитать более 100 клеток, произвольно выбирая различные поля зрения. В Лист Ответов вам необходимо

вписать процент клеток, находящихся на стадии цитокинеза, А ТАК ЖЕ общее число подсчитанных вами клеток.

**Q.1.A.4. (4 балла)** Определите время, необходимое для одного оборота (раунда) клеточного цикла клеток в логарифмической фазе роста, учитывая, что от начала цитокинеза до отделения дочерних клеток проходит 25 минут. Запишите формулу для расчета и ваш результат в Лист Ответов.

**Q.1.A.5. (3 балла)** Что правильно описывает клетки в культуральной жидкости **C**?

- A интенсивный рост
- B образование спор
- C конъюгация
- D большинство клеток мертвые
- E находятся в процессе мейоза

**Q.1.A.6. (8 баллов)** Какая культуральная жидкость (I, II, III или IV) соответствует образцам **a, b, c** и **d**, соответственно?

## Часть В

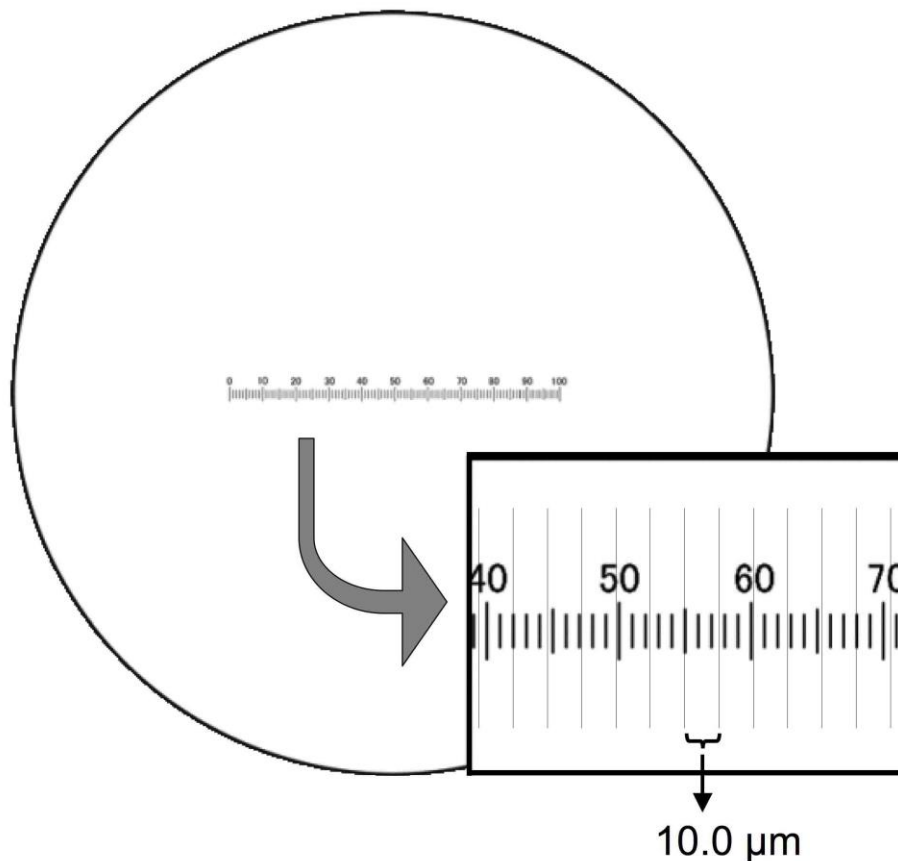
Штамм дикого типа и мутант *cdc25* были проинкубированы при 36°C в течение 4 часов после того, как они прошли фазу логарифмического роста при 25°C.

**Q.1.B.1.(3 балла)** Какое заключение можно сделать, рассмотрев фенотипы клеток в культурах W25, W36, M25 и M36?

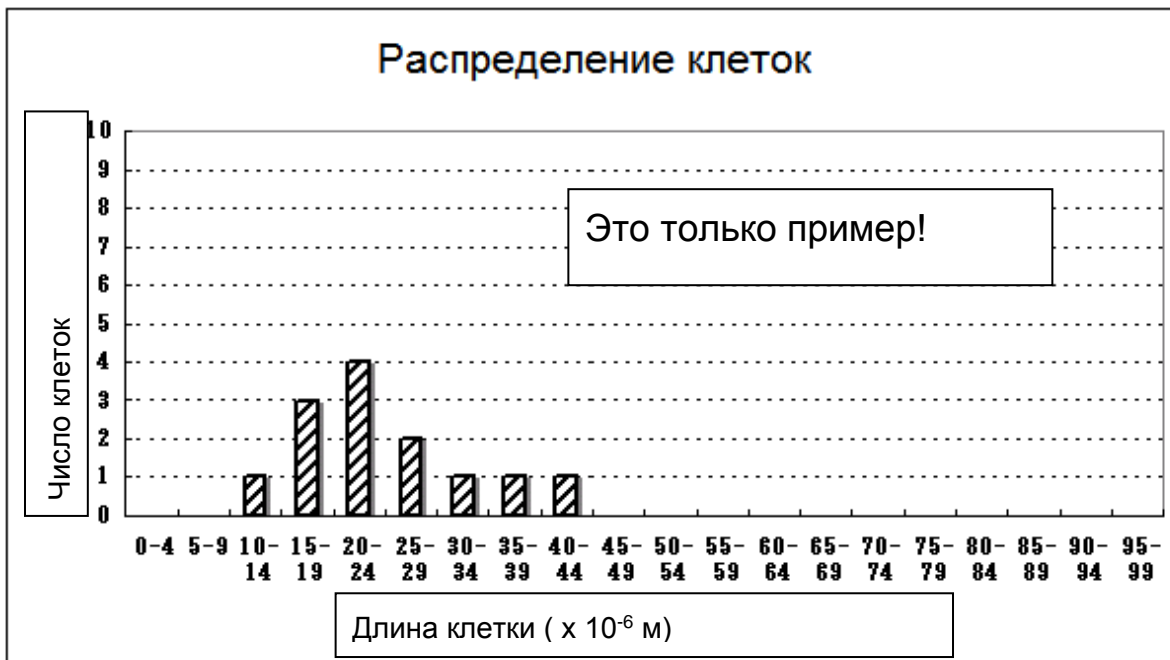
	Условия	Большинство клеток мутанта <i>cdc25</i>	Клетки дикого типа
A	25°C	Не осуществляют цитокинез	Осуществляют цитокинез
B	25°C	Осуществляют цитокинез	Не осуществляют цитокинез
C	36°C	Не осуществляют цитокинез	Осуществляют цитокинез
D	36°C	Осуществляют цитокинез	Не осуществляют цитокинез
E	25°C и 36°C	Нет существенной разницы в отношении цитокинеза между мутантом <i>cdc25</i> и клетками дикого типа	



**Q.1.B.2.(4 балла)** Для измерения длины клетки ваш микроскоп оснащен микрометром, находящимся в окуляре. Для калибровки его шкалы Вам необходим второй, так называемый предметный микрометр, который находится на столике микроскопа. Известно, что расстояние между двумя близлежащими линиями предметного микрометра составляет 10,0 мкм. Путем сведения линий обоих микрометров можно измерить расстояние между двумя линиями микрометра, находящегося в окуляре (определить цену деления). При помощи предоставленного ниже рисунка определите это расстояние в микрометрах с точностью до второго знака после запятой. Ответ внесите в Лист Ответов.



**Q.1.B.3.(12 баллов)** Измерьте длину у более чем 10 клеток, произвольно выбранных в культуральной среде M36. Изобразите ваши результаты в Листе Ответов соответственно образцу, показаному ниже. Считайте, что цена деления микрометра окуляра вашего микроскопа равна 4 мкм. Не забудьте указать единицу длины.



**Q.1.B.4.(2 баллов)** Какое заключение вы можете сделать после наблюдений за каждой культурой?

Клетки *cdc25* длиннее, чем клетки дикого типа :

- A как при 25°C, так и при 36°C. .
- B при 36°C, но не при 25°C.
- C при 25°C, но не при 36°C.
- D Нет существенного различия между длиной клеток у дикого типа и мутанта *cdc25* как при 25°C, так и 36°C.

## Часть С

Следующий эксперимент был проведен с использованием клеток дикого типа и 5 мутантных штаммов (А-Е). Эти мутантные штаммы, так же как и клетки дикого типа, растут при 25°C, но не способны расти при 36°C. Все клетки прошли стадию логарифмического роста при 25°C, после чего они были дополнительно проинкубированы в течение 4 часов при 36°C, после чего были зафиксированы. Фиксированные клетки были окрашены красителями Calcofluor (окрашивает септы) и DAPI (окрашивает ДНК) для наблюдения под флуоресцентным микроскопом ( как показано на **предоставленной на столе фотографии**).

**Q.1.C.1.(10 баллов)** Следующие утверждения описывают фенотипы мутантов, инкубированных при 36°C. Определите, какое из описаний соответствует каждому из мутантных штаммов (А-Е), соответственно.

1. Цитокинез повторялся независимо от протекания клеточного цикла.
2. Клеточный цикл осуществляется, но цитокинез еще не начинался.
3. Клеточный цикл остановлен в интерфазе.
4. Кариокинез сильно нарушен.
5. Завершение цитокинеза подавлено.

## Задание 2 (30 баллов)

### **Изучение механизма подвижности у одноклеточных водорослей**

#### Введение

Некоторые одноклеточные водоросли и зиготы многоклеточных водорослей активно плавают. Такое поведение важно для поиска оптимальных условий роста и для полового размножения. *Chlamydomonas reinhardtii*, одноклеточная зеленая водоросль, передвигается при помощи жгутиков. Жгутики часто отпадают при контакте с некоторыми раздражителями. Некоторые жгутики могут втягиваться в тело клетки на определенных стадиях клеточного цикла.

Это Задание связано с механизмом движения жгутика и регенерации жгутика у *C. reinhardtii*.

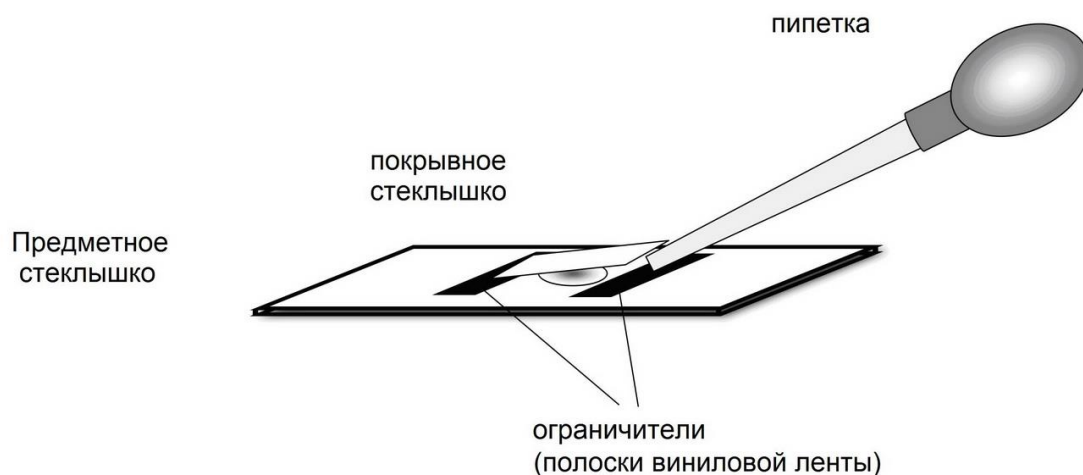
<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Клетки дикого типа <i>C. reinhardtii</i> - (wt)	1
2. Мутант <i>oda1 C. reinhardtii</i> (oda)	1
3. Мутант <i>pf17C. reinhardtii</i> (pf)	1
4. Микроскоп	1
5. Коробочка с предметными стеклами	1
6. Коробочка с покровными стеклами	1
7. Раствор уксусной кислоты (A)	1
8. Нейтрализующий раствор (N)	1

---

9. Одноразовая пипетка (1 мл)	10
10. Микропробирка объемом 1,5 мл	5
11. Виниловая лента	1
12. Ножницы	1

### Предупреждение

Жгутики *C. reinhardtii* часто прилипают к стеклу. Это приводит к нарушению способности клеток к плаванию, поэтому клетки, иммобилизованные на стекле, должны быть исключены из наблюдения за подвижностью клеток. Рекомендуем для наблюдения сделать камеру как показано на рисунке ниже. Две полоски виниловой ленты приклеиваются параллельно на предметное стекло, и после нанесения образца пипеткой, на полоски кладется покрывное стекло. Такая камера обеспечивает клеткам пространство для плавания.



## Часть А

Сравните под микроскопом клетки дикого типа (wt) и мутанта *pf17* (pf). Этот мутант имеет нормальную форму и строение клетки, но не имеет компонентов головки радиальной спицы в его жгутике.

**Q.2.A.1. (6 баллов)** По сравнению с клетками дикого типа клетки мутанта *pf17*:

- A плавают с той же скоростью
- B плавают, но значительно медленнее
- C плавают, но значительно быстрее
- D не плавают вообще

**Q.2.A.2. (2 балла)** Какое заключение можно сделать о функции головки радиальной спицы?

- A важна для движения жгутиков
- B не влияет на движение жгутиков
- C подавляет движение жгутиков
- D координирует движение жгутиков

## Часть В

Сравните под микроскопом дикий тип (wt) и мутант *odal* (od). У этого мутанта в жгутике отсутствует один из видов динеина, в то время как форма и остальные клеточные структуры нормальные.

### **Q.2.B.1. (6 баллов).**

По сравнению с клетками дикого типа клетки мутанта *oda* плавают:

- A таким же образом
- B значительно медленнее и плавнее
- C значительно медленнее и рывками
- D значительно быстрее и плавнее
- E значительно быстрее и рывками

### **Q.2.B.2. (2 балла)**

Какое заключение можно сделать о функции динеина, отсутствующего у мутанта *odal*?

- A важен для движения жгутиков
- B не влияет на движение жгутиков
- C усиливает движение жгутиков
- D координирует движение жгутиков

## Часть С

Изучение влияния уксусной кислоты на жгутики:

(i) Рассчитайте процент (А) клеток дикого типа, внимательно рассмотрев 20 клеток.

(ii) Перенесите одноразовой пипеткой около 1 мл культуры, выбранной вами в пункте(i), в микропробирку объемом 1,5 мл и добавьте одну каплю раствора уксусной кислоты

(iii) Через 30 секунд добавьте одну каплю нейтрализующего раствора

(iv) Рассчитайте процент (В) клеток, имеющих жгутик, среди 20 клеток после обработки

**Q.2.C.1. ( 4 балла x 2 =8 баллов)** Рассчитайте процент клеток, имеющих жгутик, перед обработкой (А) и после обработки (В) образца.



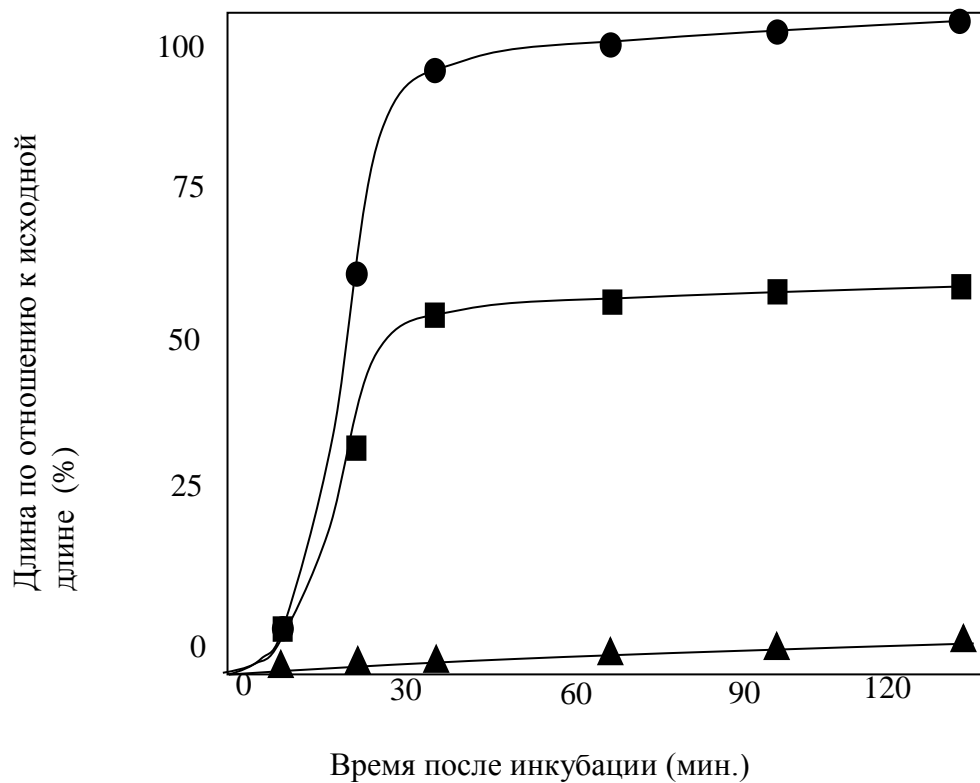
## Часть D

Клетки, у которых были удалены жгутики, инкубировали при разных условиях (i, ii или iii). Следующий график показывает длину жгутиков в процентах от их исходной длины в зависимости от времени.

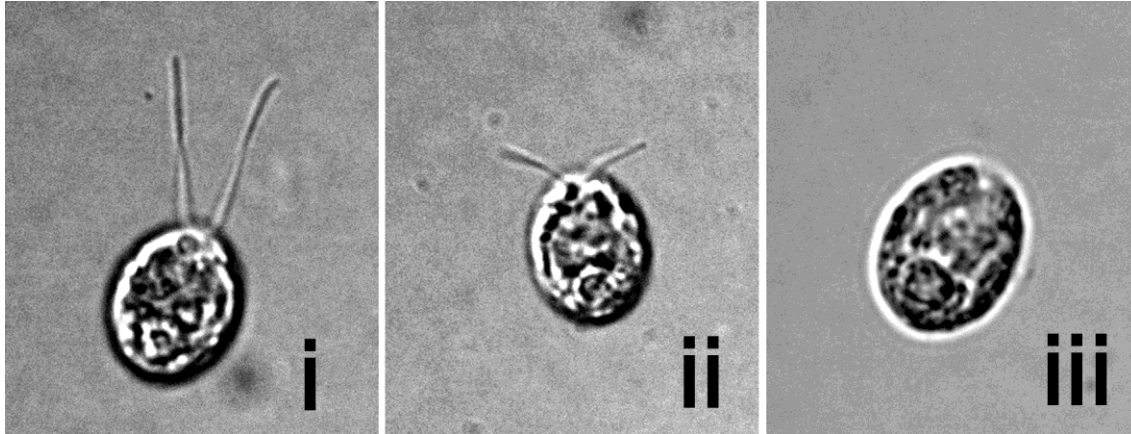
(i) контроль (инкубировались без ингибиторов) (●)

(ii) проинкубированы с циклогексимидом, ингибитором синтеза белка (■)

(iii) проинкубированы с колхицином, ингибитором формирования микротрубочек (▲)



Дополнительно показаны снимки клеток после инкубации в течение 120 минут.



**Q.2.D.1.(4 балла)** Какие из следующих утверждений подтверждаются анализом клеток, проинкубированных с циклогексимидом? Отметьте крестиком (x) соответствующие клетки в листе ответов.

- 1 Все белки, нужные для восстановления жгутиков, синтезируются *de novo*
- 2 Восстановленные жгутики неподвижны из-за отсутствия динеина
- 3 Синтез белка *de novo* необходим для полной регенерации жгутиков
- 4 Синтез белка *de novo* необходим для формирования базального тела жгутиков

**Q.2.D.2.(2 балла)** На основании ваших наблюдений за клетками, проинкубированными с колхицином, укажите, что необходимо для восстановления жгутиков?

- A Полимеризация тубулина
- B Полимеризация актина
- C Полимеризация кератина
- D Деполимеризация тубулина
- E Деполимеризация актина
- F Деполимеризация кератина