

Код студента: \_\_\_\_\_

## **22-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА**

**10 - 17 июля, 2011**

**Тайпей, Тайвань**



### **ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 1**

## **БИОХИМИЯ И КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ**

**Общее количество баллов: 100**

**Продолжительность: 90 минут**

Дорогие участники,

- В этой работе вам даны 3 задания:  
Задание I: Электрофорез белка (35 баллов)  
Задание II: Определение концентрации белка (30 баллов)  
Задание III: Очистка белка (35 баллов)
- Проверьте перед началом работы ваш **Код Студента** на **Листе ответов**.
- Впишите ваши результаты и ответы в **Лист ответов**. **Ответы, вписанные в Текст Заданий, оцениваться не будут.**
- Проверьте наличие всех необходимых для выполнения заданий материалов соответственно списку. При отсутствии какого-либо из перечисленных предметов поднимите вашу **карточку**.
- Используйте только ручку.
- Вы должны эффективно организовать свою работу, однако постарайтесь завершить задание II достаточно рано, что бы получить распечатку данных со спектрофотометра и ответить на вопросы.
- **Немедленно** прекратите выполнять работу после заключительного звонка.
- После работы вложите, пожалуйста, лист ответов, текст задания и распечатку результатов в предоставленный конверт. Ассистент сразу же соберет их.
- Из лаборатории нельзя выносить никакие материалы или бумаги.

**ЖЕЛАЕМ УДАЧИ!!**

### **Приборы общего пользования:**

Камера, спектрофотометр, принтер

### **Оборудование и материалы:**

<u>Оборудование:</u>	<u>Количество</u>
1 Источник тока	1
2 Камера для электрофореза (содержащая гель и буфер )	1
3 Микропипетки P20 и P200	по 1 каждой
4 80-луночный штатив для микроцентрифужных пробирок	1
5 Проволочный штатив с 6 центрифужными пробирками объёмом 15 мл (желтые крышки)	1
6 Четырехгнездный универсальный штатив для пробирок	1
7 Пластиковая пастеровская пипетка в центрифужной пробирке объёмом 15 мл	2
8 Наконечники для микропипеток (для P20 и P200)	по 1 коробке для каждой пипетки
9 Таймер	1
10 96-луночный микропланшет	1
11 Маркер и бумажные этикетки	по 1 штуке
12 Химический стакан объёмом 600 мл для отходов	1
13 Ножницы и линейка	по 1 штуке
14 Наклейки с двумя клейкими сторонами для приклеивания результатов	1
15 Наклейка с Кодом Студента	1
16 Бумажная салфетка	1
17 Миницентрифуга (в случае если возникнет необходимость собрать весь объем образца на дне пробирки)	1

<b><u>Материалы:</u></b>	<b><u>Количество</u></b>
1 Краситель (микроцентрифужная пробирка L) (розовая пробирка с оранжевой меткой)	1
2 Смесь предварительно окрашенных белков-маркеров молекулярного веса (микроцентрифужная пробирка M), (розовая пробирка с оранжевой меткой)	1
3 Образцы предварительно окрашенного неизвестного белка (микроцентрифужные пробирки U1 и U2), (розовая пробирка с оранжевой меткой)	1
4 Реактив CBG в центрифужной пробирке объемом 50-мл	1
5 Раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) для построения стандартной кривой (0,5 мг/мл) в микроцентрифужной пробирке (зеленая пробирка с желтой меткой)	1
6 Фермент E в двух микроцентрифужных пробирках в концентрации X и Y (зеленые пробирки с желтой меткой)	1
7 Дистиллированная вода (в центрифужной пробирке, подписанная ddH <sub>2</sub> O) (зеленая пробирка с желтой меткой)	1
8 Образец белка (микроцентрифужная пробирка C), (голубая пробирка с голубой меткой)	1
9 Ионообменная колонка с анионом на центрифужной пробирке объемом 15 мл	1
10 Анионные буферы A и B (по 5 мл каждого в двух отдельных центрифужных пробирках объемом по 15 мл) (зеленые крышки)	1
11 Реактив Кумасси бриллиантовый синий G-250 (CBG), по 1 мл в каждой из 6 центрифужных пробирок объемом 15 мл (от A1 до A3 и от B1 до B3, красные крышки)	1

## Задание I (35 баллов)

### Электрофорез белка

#### **Введение:**

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) является распространенным методом исследования белков. Он может быть применен для разделения различных белков в зависимости их размера или заряда. Один из видов PAGE, при котором электрофорез белка происходит в присутствии отрицательно заряженного вещества, SDS (додецилсульфата натрия), называется SDS-PAGE. Количество SDS, связывающегося с белком, пропорционально размеру белка, что придает каждому белку одинаковое соотношение заряда к массе, при этом собственный заряд белка становится неважным, как минимум в данном эксперименте. Таким образом, основным фактором, влияющим на движение белка при SDS-PAGE, является молекулярный вес (MW) белка. Относительная подвижность ( $R_f$ ) белка может быть выражена соотношением расстояния, пройденного белком, к расстоянию, пройденному лидирующим красителем. Величина  $R_f$  обратно пропорциональна логарифму молекулярного веса белка.

#### **В поставленном перед вами задании вам необходимо выполнить следующий опыт:**

1. Для проведения SDS-PAGE была приготовлена электродная камера, заполненная буфером, в которой полиакриламидный гель уже находится в камере. Для внесения образцов в верхней части геля имеются 10 лунок. Для внесения образца используйте микропипетку P20 с наконечником, осторожно помещая наконечник на верхушку лунки. При медленном нанесении образца он будет опускаться на дно лунки под действием силы тяжести (**Рисунок 1**).

2. Если вам необходимо потренироваться, наберите микропипеткой P20 с наконечником 10  $\mu$ л красителя из микроцентрифужной пробирки L (розовая пробирка с оранжевой меткой). Внесите образцы в ячейки с 1 по 3 или с 7 по 10.
3. В каждой из микроцентрифужных пробирок M, U1 и U2 (розовая пробирка с оранжевой меткой) содержится соответственно по 15  $\mu$ л белков-маркеров молекулярного веса неизвестного белка U1 и неизвестного белка U2. При помощи микропипетки P20 наберите из каждой пробирки по 10  $\mu$ л раствора и внесите их в лунки с 4 по 6 как показано на **Рисунке 1**.
4. Сразу же после окончания нанесения **поднимите карточку**. Ассистент подсоединит прибор к источнику тока и установит напряжение 200 V. Продолжительность электрофореза 25 минут. Ваш таймер будет установлен на это время ассистентом.
5. После окончания электрофореза **поднимите карточку**. Ассистент отсоединит прибор и вернет вам ваш гель. Промокните поверхность геля бумажной салфеткой насухо и **наклейте на него наклейку с вашим Кодом Студента**. Ассистент сделает фотографию вашего геля. Наклейте фотографию в лист ответов при помощи наклейки с двумя клейкими сторонами (5 баллов).

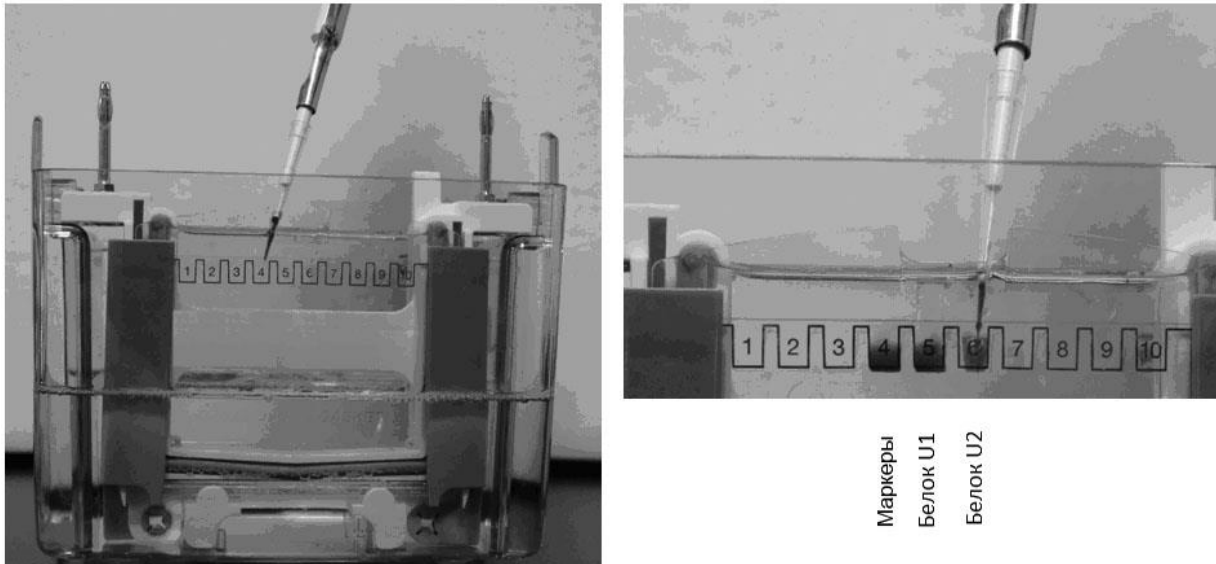
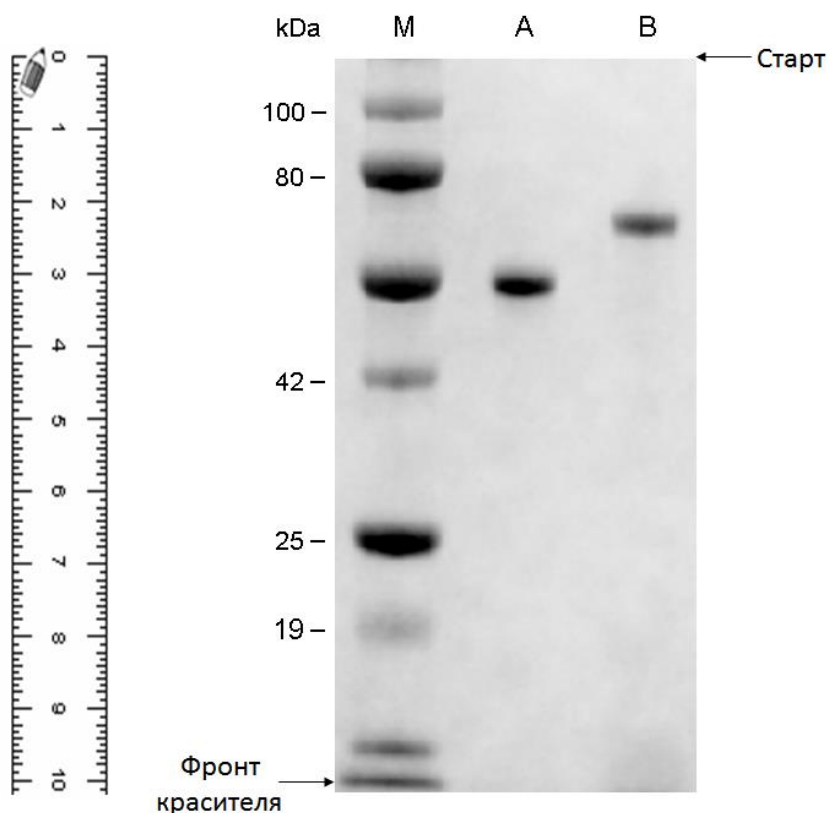


Рисунок 1

**Ответьте на следующие вопросы:**

**Q.1.1. (2 балла)** На **Рисунке 2** показана фотография SDS-PAGE геля. На ней указан старт и фронт красителя. Какая сторона геля должна быть присоединена к аноду (знак +) источника тока? Отметьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов.



**Рисунок 2**

**Q.1.2. (8 баллов)** На основании информации, предоставленной на **Рисунке 2**, постройте график зависимости значений относительной подвижности  $R_f$  от молекулярного веса пяти маркерных белков на листе ответов (4 балла). Используя график, определите молекулярный вес неизвестных белков на полосах А и В (4 балла). Впишите ваш ответ в лист ответов.

**Q.1.3. (5 баллов)** Белковый комплекс, молекулярный вес которого составляет 246 kDa, состоит из нескольких субъединиц, связанных нековалентной связью. После SDS-PAGE были обнаружены две полосы белков весом 57 и 33 kDa. Сколько субъединиц весом 57-kDa и 33-kDa, соответственно, входят в состав белкового комплекса? Впишите ваш ответ в лист ответов.



**Q.1.4. (5 баллов)** Средний молекулярный вес аминокислотного остатка составляет около 110 дальтон. Из скольких аминокислот состоит субъединица белка весом 33-kDa? Сколько нуклеотидов РНК были транслированы в белок? Впишите ваш ответ в лист ответов.

**Q.1.5. (5 баллов)** Предположим, что средний молекулярный вес нуклеотидов составляет 330 дальтон. Исключая интрон и стоп-кодон, каково соотношение массы двухцепочечной dsДНК, кодирующей белок весом 33-kDa, к массе этого белка? Впишите ваш ответ в лист ответов.

**Q.1.6. (5 баллов)** Предположим, что белок Р может связываться с белком Q (молекулярный вес = 1000 дальтон). Связывание может быть обнаружено методом сдвига подвижности в геле. 200 пикомолей белка Р были смешаны с разными количествами (от 0 до 500 нг) белка Q. Эти смеси были разделены электрофорезом в 10% (w/v) полиакриламидном геле. Гель был окрашен Кумасси синим и показан на **Рисунке 3**. Определите молярное соотношение связывания белков Р и Q. Впишите ваш ответ в лист ответов.

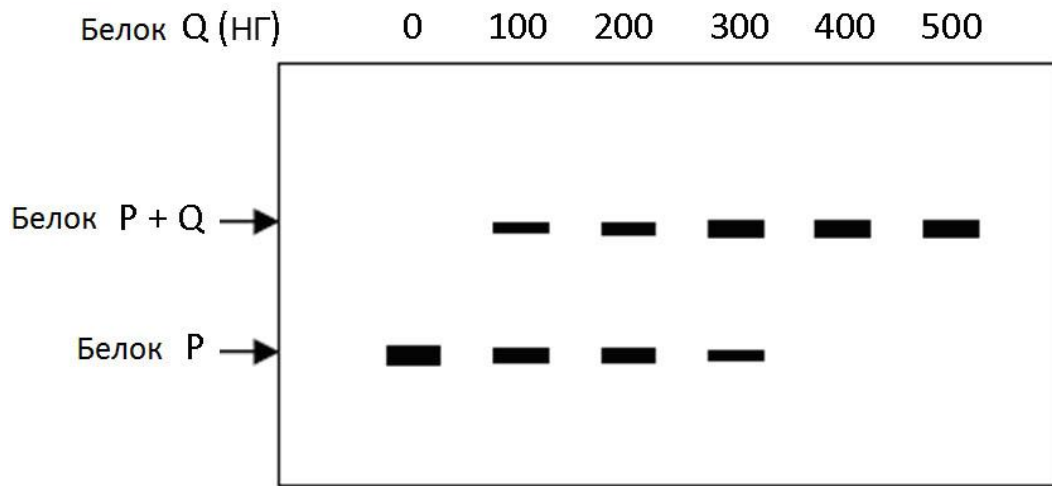


Рисунок 3

## Задание II (30 баллов)

### Определение концентрации белка

#### **Введение:**

Кумасси бриллиантовый синий G-250 (CBG) представляет собой реактив для окраски белков. Его окраска меняется при различных значениях pH. В кислых условиях он красно-коричневого цвета, тогда как при нейтральных или щелочных условиях он становится синим. Так как белки обеспечивают относительно нейтральное микроокружение красителя, CBG, связываясь с белком, приобретает синий цвет, с максимумом поглощения при длине волны 595 нм. Чем больше белка находится в пробе, тем больше CBG связывается с ним и поэтому тем интенсивнее будет синяя окраска. Иными словами, поглощение при 595 нм пропорционально количеству белка в образце. Таким образом, можно определить концентрацию белка путем измерения интенсивности синей окраски образца.

#### **В предлагаемом задании вам необходимо провести следующий эксперимент:**

1. Для приготовления стандартной кривой BSA (**Таблица 1**), влейте по 0, 2, 4, 6, 8 и 10  $\mu$ л раствора BSA (0,5 мг/мл) из пробирки с зеленой крышкой в ячейки с A1 по A6 микропланшета (**Рисунок 4**). Повторите то же самое в ячейках с B1 по B6. Если вы совершили ошибку, вы можете повторить эту процедуру в ячейках с A7 по A12 и/или с B7 по B12. Доведите общий объем каждого раствора BSA до 10  $\mu$ л добавлением необходимого количества воды (**Таблица 1**).
2. Добавьте по 200  $\mu$ л реактива CBG в каждую ячейку с A1 по A6 и с B1 по B6. Аккуратно перемешайте и убедитесь, что окраска изменилась, постукивая по боковой стенке планшета.

- Для определения концентрации X и концентрации Y фермента E добавьте разные количества (2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{l}$ ) раствора из пробирок зеленого цвета со значками X и Y в двух повторностях в пустые ячейки и доведите объём до 10  $\mu\text{l}$  водой.
- Добавьте по 200  $\mu\text{l}$  реактива CBG в каждую ячейку к разведенному раствору фермента E. Аккуратно перемешайте и убедитесь, что окраска изменилась.
- Поднимите карточку.** Ассистент поможет вам измерить абсорбцию вашей пробы при 595 нм при помощи спектрофотометра. Напишите маркером ваш Код Студента на распечатке результатов.
- Вернитесь на свое рабочее место и прикрепите ваш результат к листу ответов при помощи наклейки с двумя клеящими сторонами.

**Таблица 1**

Материалы	Ячейки микропланшета					
	A1 и B1	A2 и B2	A3 и B3	A4 и B4	A5 и B5	A6 и B6
0,5 мг/мл BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	2	4	6	8	10
H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{l}$ )	10	8	6	4	2	0
Концентрация разведенного раствора BSA (мг/мл)	0					

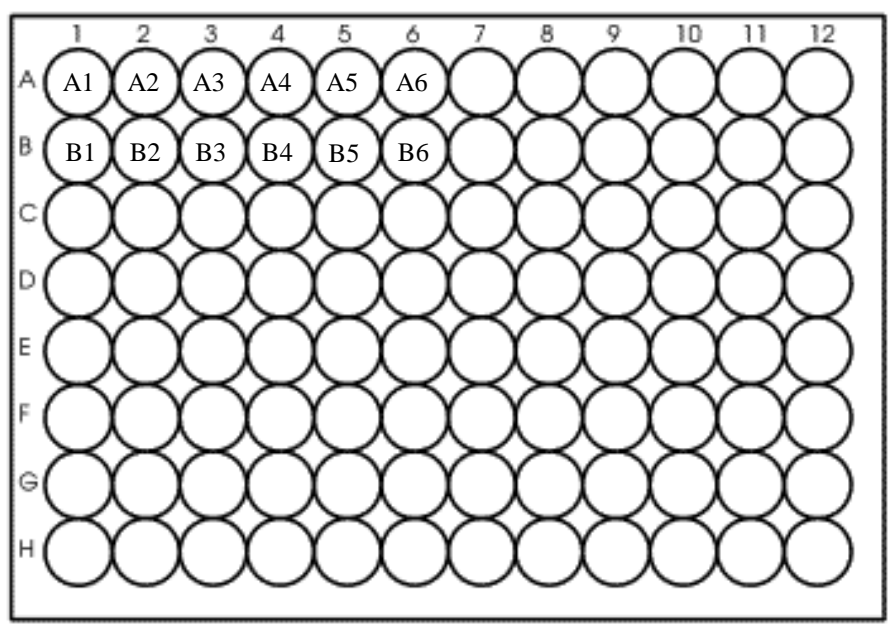


Рисунок 4

**Ответьте на следующие вопросы:**

**Q.2.1. (10 баллов)** Рассчитайте концентрацию BSA в каждом образце (10  $\mu$ л) и внесите ее значение в таблицу в лист ответов (**Q.2.1.1. 5 баллов**). Используя эти значения, постройте в листе ответов калибровочную кривую BSA, в которой на оси X отложите концентрации BSA, а на оси Y усредненное значение двух измерений абсорбции (**Q.2.1.2. 5 баллов**).

**Q.2.2. (12 баллов)**. Выберите наилучшее значение для растворов X и Y фермента E, попадающее в калибровочную кривую, и внесите значение оптической плотности в лист ответов (Таблица Q.2.2.).

**Q.2.3. (8 баллов)** Учитывая разведение этого образца, определите исходную концентрацию белка E в растворах X и Y, используя для этого калибровочную кривую, построенную по BSA. Концентрация должна быть выражена в единицах мг/мл. Впишите ваш ответ в лист ответов.

## Задание III (35 баллов)

### Очистка белка

#### **Введение:**

Колоночная хроматография часто используется для очистки белков. Колонка готовится путем ее заполнения твердым пористым материалом (неподвижная фаза), уравновешенным буфером (подвижная фаза). Раствор разделяемого белка наносится на вершину колонки и проникает в твердую матрицу (неподвижную фазу). Из находящегося на вершине колонки резервуара постоянно поступает элюирующий буфер, протекающий через матрицу и собираемый при выходе из колонки (элюат). Поскольку белки в различной степени взаимодействуют с матрицей в зависимости от их свойств, одни белки двигаются по колонке быстрее, а другие медленнее. Таким образом, собирая элюат в различное время, можно получить очищенные белки (**Рисунок 5**).

Ионообменная хроматография может быть использована для разделения белков, обладающих различными электрическими зарядами при одинаковом значении pH. В случае анионной ионообменной хроматографии отрицательно заряженный белок связывается с положительно заряженной неподвижной фазой. При использовании раствора, содержащего анионы, конкурирующие с белком за связывание с неподвижной матрицей, можно элюировать связанный белок. На практике сначала белки элюируют буфером, содержащим более низкую концентрацию анионов, а затем буфером, содержащим более высокую концентрацию анионов. Поскольку белки с разным зарядом связываются с неподвижной фазой с различной силой, их можно по отдельности элюировать анионными буферами различной концентрации.

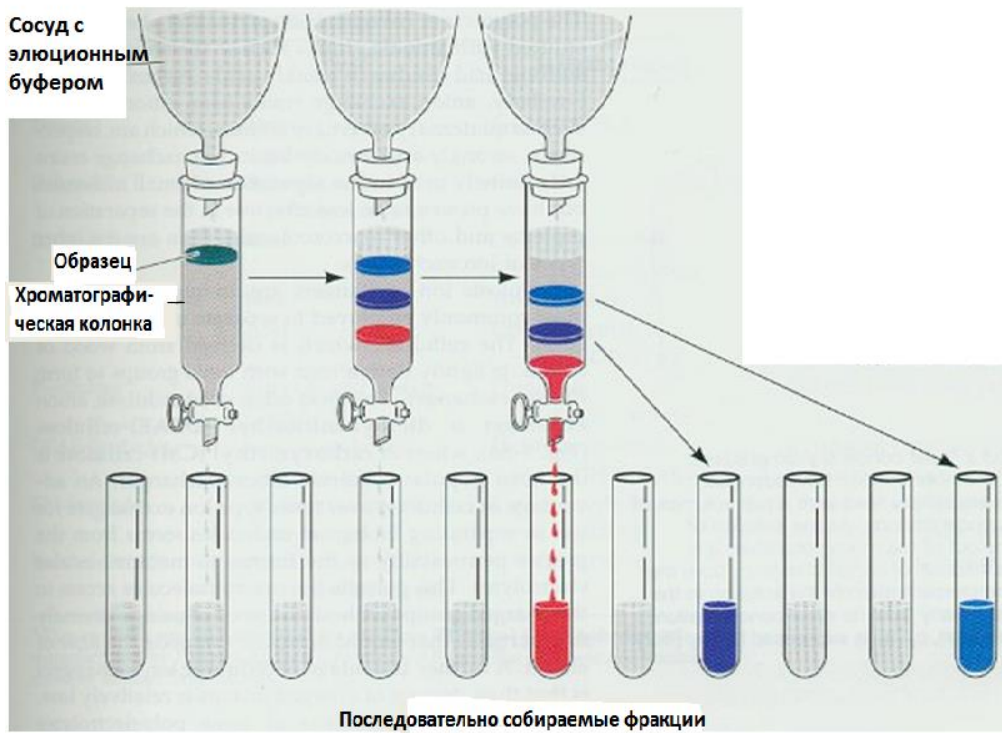


Рисунок 5



**В поставленном перед вами задании вам необходимо провести следующий опыт (5 баллов):**

1. Подпишите маркером шесть центрифужных пробирок с желтыми крышечками объёмом 15 мл соответственно от a1 до a3 и от b1 до b3.
2. Возьмите анионную хроматографическую колонку (**Рисунок 6А**), откройте ее и дайте раствору под влиянием силы тяжести вытечь в ту же центрифужную пробирку. Как только фронт раствора достигнет поверхности диска, немедленно закройте колонку, (**Рисунок 6А**, белая стрелка). Не допускайте пересушивания геля, так как это может сказаться на процессе очистки белка.
3. Наберите 200  $\mu$ л раствора белка из микроцентрифужной пробирки С (голубая пробирка с голубой меткой) при помощи микропипетки Р200, медленно нанесите пробу на хроматографическую колонку, дотрагиваясь наполненным наконечником пипетки до внутренней стенки колонки (**Рисунок 6В**).
4. Откройте колонку и дайте образцу белка впитаться. Затем перенесите колонку в центрифужную пробирку a1 с желтой крышечкой. Наберите пластиковой пастеровской пипеткой 3 мл анионного буфера А (из пробирки с зеленой крышкой) и нанесите раствор на гель, прижав наконечник пипетки к стенке колонки (**Рисунок 6С**).
5. Соберите последовательно по 1 мл элюата в центрифужные пробирки с a1 по a3 (с желтыми крышечками). Это займет около 2-3 минут для каждой пробирки.
6. Дайте содержимому колонки полностью вытечь из колонки и затем перенесите колонку в центрифужную пробирку b1 с желтой крышечкой. Наберите пластиковой пастеровской пипеткой 3 мл анионного буфера В (из пробирки с зеленой крышкой) и нанесите раствор на гель, дотрагиваясь наконечником пипетки до стенки колонки (**Рисунок 6С**).
7. Соберите последовательно по 1 мл элюата в центрифужные пробирки с b1 по b3 с желтыми крышечками. Это займет около 2-3 минут для каждой пробирки.

8. Отберите по 50  $\mu$ л элюата из пробирок a1-a3 и b1-b3 (желтые крышечки) и перенесите их соответственно в центрифужные пробирки A1-A3 и B1-B3 с красными крышечками. Смешайте и рассмотрите изменение цвета. Реактив CBG (см. введение в Задание II) в пробирках A1-A3 и B1-B3 приобретет при реакции с элюированным белком синий цвет.
9. После окончания всех опытов, **поднимите карточку**, ассистент сделает фотографию результатов вашего опыта и поставит штамп на вашем листе ответов. **Без этого штампа ваши ответы на вопросы Q.3.1.1. и Q.3.1.2. оцениваться не будут.**

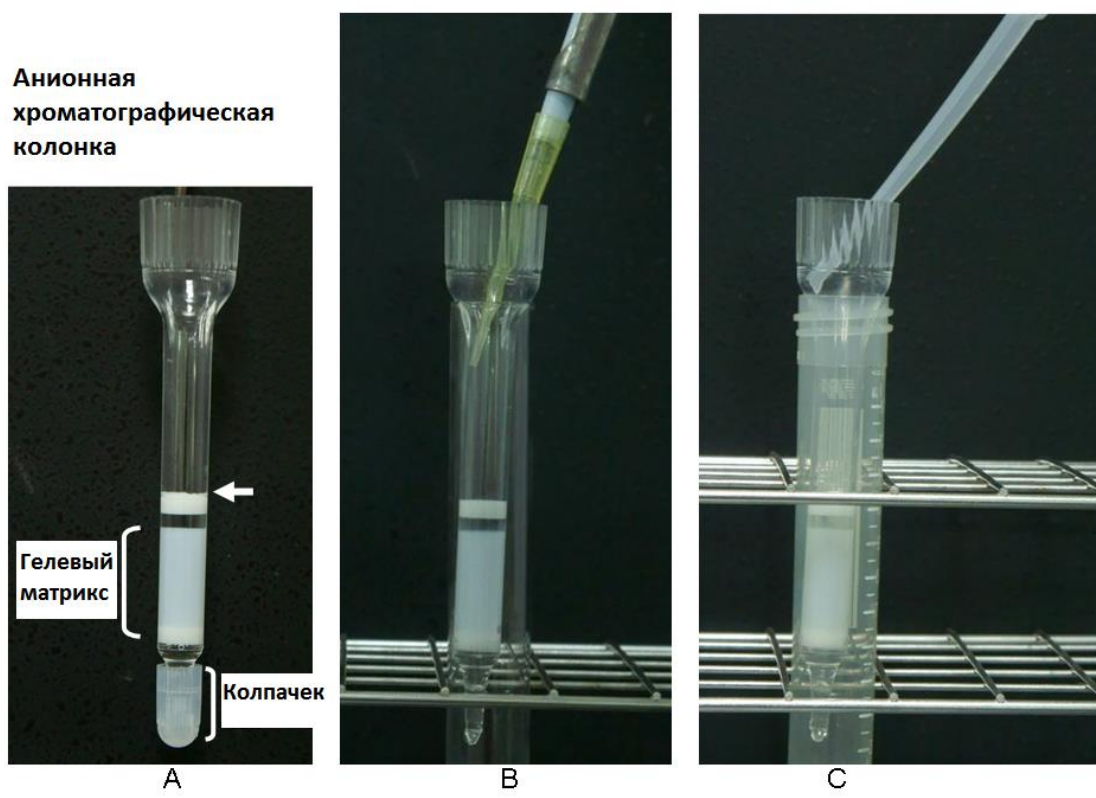


Рисунок 6

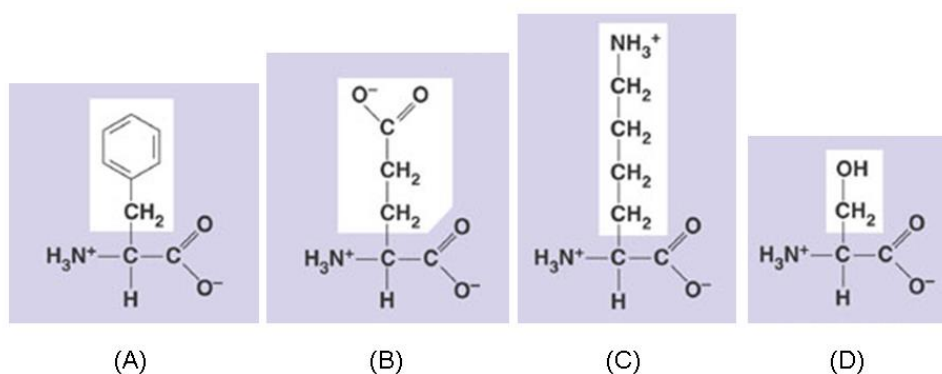
**Q.3.1. (7 баллов)** Отметьте самое сильное изменение окраски (X) в листе ответов (**Q.3.1.1. 5 баллов**). Какой из следующих буферов (буфер А или буфер В) может быть использован для элюирования этого белка? Отметьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов (**Q.3.1.2. 2 балла**).

**Q.3.2. (5 баллов)** Фермент А является белком, на поверхности которого равномерно распределен электрический заряд. Если допустить, что фермент А может быть элюирован при анионной обменной хроматографии высокой концентрацией анионного буфера, то каковыми должны быть свойства фермента А в отношении его электрического заряда?

Отметьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов.

- (A) Высокий суммарный отрицательный заряд
- (B) Низкий суммарный отрицательный заряд
- (C) Нулевой суммарный заряд
- (D) Низкий суммарный положительный заряд
- (E) Высокий суммарный положительный заряд

**Q.3.3. (4 балла)** Различные аминокислоты отличаются по химической структуре радикала R боковой цепи. На **Рисунке 7** показаны четыре аминокислоты А, В, С, и D в их преобладающих ионных формах при pH 7,2, с боковой цепью, выделенной белым прямоугольником. Какая из аминокислот на **Рисунке 7** чаще всего встречается в составе фермента А? Впишите ваш ответ в ЛИСТ ОТВЕТОВ.



**Рисунок 7**

**Q.3.4. (5 баллов)** Гидрофобная хроматография может быть использована для разделения белков на основе их гидрофобности. Перед хроматографическим разделением пробы белка вначале обрабатывались буфером, содержащим высокую концентрацию солей, таких как сульфат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , который удаляет воду с поверхности белка. Это приводит к экспонированию на поверхности белка гидрофобной области. Если таким образом обработанные солями белки подвергнуть хроматографии, они будут абсорбироваться на неподвижной фазе за счет гидрофобных взаимодействий. Чем выше гидрофобность белка, тем сильнее абсорбция. Поскольку концентрация соли может влиять на гидрофобное взаимодействие между белком и стационарной фазой, различные белки могут быть отдельно элюированы при помощи различных концентраций буферных растворов, содержащих соли. Если фермент А проявляет высокую гидрофобность, то какой из следующих буферов должен быть использован для отделения фермента А от других белков

путем хроматографии? Отметьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов.

- (A) Буфер с низкой концентрацией солей
- (B) Буфер с высокой концентрацией солей
- (C) Буфер, не содержащий соли
- (D) Вначале буфер с низкой концентрацией солей, затем буфер с высокой концентрацией солей
- (E) Вначале буфер с высокой концентрацией солей, затем буфер с низкой концентрацией солей

**Q.3.5. (4 балла)** Если фермент А является очень гидрофобным, то какая из аминокислот, представленных на **Рисунке 7**, чаще всего встречается в его составе? Обозначьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов.

**Q.3.6. (5 баллов)** Гель-фильтрация разделяет белки по их размеру. Гель, или стационарная фаза, состоит из поперечно сшитых гранул полимера, между которыми находятся поры определенного размера. Маленькие белки заходят в поры и задерживаются на колонке из-за более сложного пути передвижения. Большие белки не могут проникнуть в поры и таким образом их путь прохождения через колонку в обход шариков сокращается. В **Таблице 2** представлен перечень гелей и их характеристики. Предположим, что и фермент А (весом 22 kDa) и белок В (весом 44 kDa) являются белками, состоящими лишь из одной субъединицы. Необходимо очистить белок А из смеси, содержащей белки А и В, используя гель-фильтрацию. Какой гель лучше всего подходит для этого? Обозначьте ваш ответ знаком «X» в листе ответов.

**Таблица 2**

Тип стационарной фазы	Пределы фракционирования (MW, Da)
G-10	<700
G-15	<1500
G-25	1000-6000
G-50	1500-30000
G-75	3000-70000
G-100	4000-150000
G-150	5000-400000
G-200	5000-800000

**Q.3.7. (5 баллов)** Предположим, что общая концентрация белка в исходном растворе составляет 1 мг/мл и активность фермента А составляет 0,5 единиц в 1 мл образца белка. Общая концентрация белка после очистки составляет 0,1 мг/мл и активность фермента А составляет 1 единицу на 1 мл образца белка. Определите степень очистки (во сколько раз увеличилась чистота) фермента А. Впишите ваш ответ в лист ответов.