

Country: \_\_\_\_\_

Student Code: \_\_\_\_\_

**23-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ОЛИМПИАДА**

8 – 15 июля 2012

СИНГАПУР



**ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 2  
МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ**

Общее количество баллов: **100**

Продолжительность: **90 минут**

## Дорогие участники

- В этом тесте вам предоставлены следующие два задания:

Задание 1: Бактериофаги: эффективные агенты для борьбы с бактериями. (50 баллов)

Часть А: Влияние фага и антибиотика на уничтожение устойчивых к антибиотику клеток *E. coli* (31 балл)

Часть В: Титр фага и множественность инфекции (19 баллов)

Задание 2: Титрование аминокислоты. (50 баллов)

- Для ответа на все вопросы используйте **Лист Ответов**, предоставленный отдельно.
- Ответы, вписанные в текст задания учитываться **НЕ БУДУТ**.
- Пишите ваши ответы чётко.
- Убедитесь, что вам предоставлены все необходимые материалы и оборудование для каждого задания. При отсутствии какого-либо предмета **немедленно** поднимите руку.
- Прекратите отвечать на вопросы и отложите ручку **НЕМЕДЛЕННО** после звонка.
- По окончании работы вложите Листы Ответов и Задания в предоставленный конверт. Наш ассистент заберёт у вас конверт.

Желаем Вам удачи! 😊

---

Материалы и оборудование:

**Для задания I: Бактериофаги: эффективные агенты для борьбы с бактериями**

Материалы и оборудование	Количество	Единица
Наконечники для микропипеток на 10 мкл	1	коробка
Наконечники для микропипеток на 200 мкл	1	коробка
Наконечники для микропипеток на 1000 мкл	1	коробка
Автоматическая микропипетка 1-10 мкл	1	штука
Автоматическая микропипетка 2 -20 мкл	1	штука
Автоматическая микропипетка 20 -200 мкл	1	штука
Автоматическая микропипетка 100 -1000 мкл	1	штука
Штатив для пробирок для микроцентрифуги	1	штука
Штатив для кювет	1	штука
пробирки для микроцентрифуги (в стакане)	много	пробирка
Исходная культура <i>E. coli</i> плотностью $1 \times 10^7$ клеток/мл в питательной среде LB	1	пробирка
среда LB ( в пробирках Falcon объёмом 50 мл)	1	пробирка
стерильная деионизированная вода в микроцентрифужной пробирке	1	пробирка
исходный раствор ампициллина (1 мг/мл) в деионизированной воде	1	пробирка
исходная культура бактериофага в деионизированной воде ( $10^8$ бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл)	1	пробирка
кюветы (в штативе)	4	штука
секундомер	1	штука
плавающий штатив (подписанный кодом вашей страны)	1	штука
водяная баня на 37 °C (предназначенная для использования вами)	1	комплект
UV-VIS спектрофотометр (предназначенный для использования вами)	1	комплект
фотографии чашек с культурой of <i>E. coli</i> (от А до Н)	1	штука

**Для задания II: Титрование аминокислоты**

<b>Материалы и оборудование</b>	<b>Количество</b>	<b>Единица</b>
бюретка объёмом 25 мл	1	штука
пипетка объёмом 25 мл	1	штука
лабораторный стакан объёмом 100 мл	3	штука
магнит для магнитной мешалки	1	штука
магнитная мешалка	1	комплект
pH-метр с электродом	1	набор
груша пипеточная	1	штука
бумажные салфетки	1	коробка
штатив с держателями	1	набор
0,3024 М стандартный раствор NaOH	100	мл
раствор аминокислоты Z неизвестной концентрации	80	мл

## Задание I (50 баллов)

### Бактериофаги: эффективные агенты для борьбы с бактериями

Часть А. Действие фага и антибиотика, направленное на уничтожение устойчивых к антибиотикам клеток *E. coli* (31 балл)

#### Введение

Бактериофаг - это вирус, который инфицирует бактериальные клетки. Некоторые вирусы убивают клетки бактерий путём лизиса. В настоящее время бактериофаги общепризнаны как эффективное средство, уничтожающее патогенные бактерии. Этот метод предоставляет собой альтернативу применению антибиотиков в борьбе с болезнетворными бактериями, которые могут обладать резистентностью к традиционным антибиотикам. Вам необходимо спланировать простой эксперимент с необходимыми контролями для определения эффективности уничтожения фагом клеток *E. coli*, резистентных к ампициллину. Дайте ответы на следующие вопросы **в Листе Ответов** и следуйте инструкции, приведённой ниже.

**Q1.1 (1 балл)** Каким должно быть разведение для приготовления культуры *E. coli* плотностью  $2 \times 10^5$  клеток/мл из культуры плотностью  $1 \times 10^7$  клеток/мл?

**Q1.2 (1 балл)** Конечная концентрация ампициллина в 1 мл культуры *E. coli* плотностью  $2 \times 10^5$  клеток/мл, должна составить 10 мкг/мл. Какой объём (в микролитрах) исходного раствора ампициллина (1 мг/мл) должен быть использован?

**Q1.3 (1 балл)** Конечный титр фага в 1 мл культуры *E. coli* плотностью  $2 \times 10^5$  клеток/мл, должен составить  $10^6$  БОЕ/мл. Какой объём (в микролитрах) исходной культуры фага ( $10^8$  БОЕ/мл) должен быть использован?

---

**Q1.4 (1 балл × 15 = 15 баллов)** Используя вычисленные ранее значения разведений, заполните таблицу **в Листе Ответов** данными для вашего эксперимента. В Таблице для вас приведён пример для пробирки 1. Все объёмы записывайте в микролитрах. Проведите спланированный вами эксперимент, инкубируя четыре пробирки (помещённые в подписанный плавающий штатив) на предназначенной вам водяной бане при 37 °C в течение 40 минут (секундомер вам предоставляется). Передайте ассистенту ваш плавающий штатив для водяной бани.

После завершения инкубации перенесите ваши пробы в кюветы, подписанные от 1 до 4. Для обнаружения разрушения бактериальных клеток измерьте поглощение при длине волны 595 нм. Принесите ваши пробы к спектрофотометру, предназначенному для вас, и отдайте ваши пробы ассистенту. Запишите результаты ваших измерений.

**Q1.5 (0,75 × 2 + 1,5 балла × 6 = 10,5 баллов)** Внесите значения оптической плотности при 595 нм в различных пробирках в таблицу, предоставленную **в Листе Ответов**. Принимая, что 1 единица оптической плотности клеток *E. coli* при 595 нм равна  $1 \times 10^7$  клеток/мл, рассчитайте, какова была плотность клеток *E. coli* в соответствующих пробирках?

**Q1.6 (0,5 балла × 5 = 2,5 балла)** Что из следующего является(ются) правильным(и)? Отметьте правильный(ые) ответ(ы) знаком (✓), а неправильный(ые) ответ(ы) - знаком (×).

- a. Благодаря резистентности к ампициллину, бактериальная клеточная стенка предотвращала лёгкое проникновение антибиотика, но позволяла фагам проникать в клетки *E. coli* и вызывать их лизис.
- b. Резистентность *E. coli* к ампициллину не предотвращает способности фага адсорбироваться на бактериальных клетках.

- c. Вероятно, литический цикл бактериофага длится около 20 - 30 минут, поэтому за короткое время эксперимента можно было наблюдать лизис клеток *E. coli*.
- d. Температура 37 °C не является той температурой, при которой ампициллин убивает клетки *E. coli*.
- e. В среде LB фаги конкурируют с клетками *E. coli* за питательные вещества и бактериальные клетки лизировались из-за недостатка питательных веществ.

Часть В. Титр фага и множественность инфекции (**19 баллов**)

В таблице ниже представлены подписи к фотографиям газонов *E. coli*, необработанных и инфицированных бактериофагом. Использованная культура *E. coli* изначально имела плотность  $0,5 \times 10^4$  клеток/мл. Для инфицирования клеток *E. coli* во всех случаях использовали 0,5 мл фага. Для инфицирования были использованы последовательные разведения фага, как указано ниже. (Фотографии, обозначенные от А до Н, предоставлены в качестве материалов для этого задания).

А = разведение $10^{-6}$	В = разведение $10^{-5}$
С = разведение $10^{-4}$	D = разведение $10^{-3}$
Е = разведение $10^{-2}$	F = разведение $10^{-1}$
G = культура фага	H = необработанная фагом культура <i>E. coli</i>



- Q1.7 (2 балла × 4 = 8 баллов)** Основываясь на количестве бляшек, наблюдаемых на фотографиях, определите количество бляшек, которое образовалось бы при использовании неразведённой культуры фага.
- Q1.8 (3 балла)** Для определения титра культуры фага обычно проводят последовательное разведение исходной культуры, как это показано на фотографиях (от А до Н). Основываясь на количестве бляшек, отметьте (✓) наилучшее разведение для определения титра фага.
- Q1.9 (4 балла × 2 = 8 баллов)** Используя приведённую выше информацию и данные вами ранее ответы, определите:
- Количество бляшкообразующих единиц на миллилитр (БОЕ/мл) используемой культуры фага.
  - Множественность инфекции (определяется как количество фаговых частиц на одну клетку *E. coli*), при самом лучшем разведении, определенном в Q1.8.

## Задание II (50 баллов)

### Титрование аминокислоты

#### Введение

Аминокислоты – это органические молекулы, имеющие и карбоксильную, и аминогруппы. В Таблице 1 показаны 20 аминокислот, которые клетки используют для строительства свойственных им белков. Большинство известных аминокислот несёт два протона, способные к диссоциации: один при аминогруппе, а второй при карбоксильной группе; в боковой цепи R не имеется способных к диссоциации протонов.

Обратите внимание: Для кислоты HA, константа диссоциации для равновесия  $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$  обозначается  $K_a$ . и

$$K_a = [H^+][A^-] / [HA]$$

Более часто сила кислоты выражается обозначением  $pK_a$  кислоты:

$$pK_a = - \log K_a$$

Титрование такой двупротонной аминокислоты будет осуществляться в два этапа, так как вначале более кислая карбоксильная группа (более низкая  $pK_{a1}$ ) и затем менее кислая аминогруппа ( $pK_{a2}$ ) будут последовательно терять свои протоны.

Добавим, что значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю, называется изоэлектрической точкой (pI) молекулы. Эта константа очень важна для характеристики молекул и для их очистки. Используя кривую титрования, значение pI можно определить опытным путём по точке перегиба между значениями  $pK_a$  анионной и катионной форм.

Значения  $pK_a$  для двух этапов диссоциации могут быть определены экстраполяцией из средних точек для каждого этапа. Это может быть описано уравнением Гендерсона - Хассельбаха:

---

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left\{ \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right\}$$

$\text{pK}_{a1}$  ( $\text{pK}_a$  для карбоксильной группы) достигается, когда половина карбоксильной группы будет оттитрована. Поэтому уравнение становится:

$$\text{pH} = \text{pK}_a$$

Подобным образом можно определить  $\text{pK}_{a2}$  ( $\text{pK}_a$  для аминогруппы).

В этом эксперименте вы будете титровать неизвестную аминокислоту и определять её  $\text{pI}$ ,  $\text{pK}_{a1}$  и  $\text{pK}_{a2}$ .

#### Ход работы

1. Заполните бюретку стандартным раствором NaOH. Запишите **в Листе Ответов** точную концентрацию этого стандартного раствора NaOH.
2. Внесите пипеткой 25 мл раствора неизвестной аминокислоты Z в чистый химический стакан объёмом 100 мл.
3. Поместите осторожно электрод pH-метра и магнит в раствор аминокислоты таким образом, чтобы электрод находился в растворе, но не дотрагивался до магнита или до стакана. Зафиксируйте электрод таким образом, чтобы магнит не ударял его при вращении. **НЕ ДОТРАГИВАЙТЕСЬ ДО КНОПКИ CALIBRATION.**
4. Титрование 1  
Ополосните электрод деионизированной водой. Осторожно осушите его поверхность бумажной салфеткой. Определите значение pH раствора аминокислоты Z перед добавлением NaOH. Затем проведите титрование раствора аминокислоты раствором NaOH из бюретки. Добавляйте к раствору аминокислоты каждый раз приблизительно по 1,00 мл NaOH. Записывайте точный объём использованного для титрования раствора и значение pH раствора аминокислоты после каждого добавления 1,00 мл **в Лист Ответов**.  
Продолжайте, пока не добавите около 25 мл NaOH
5. Повторите титрование (Титрование 2)

---

Ополосните электрод деионизированной водой. Осторожно осушите его поверхность бумажной салфеткой. Заполните бюретку повторно стандартным раствором NaOH и повторите шаги 2 – 4.

- Q2.1 (3 балла × 3 = 9 баллов)** В Таблице 1 представлены химические формулы двадцати стандартных аминокислот. Используя их, нарисуйте в виде формул полную диссоциацию глицина, пролина и аспарагина.
- Q2.2 (3 балла × 2 = 6 баллов)** Запишите в Таблицах для двух титрований объёмы NaOH (мл), добавленные при титровании и наблюдаемые значения pH для неизвестной аминокислоты.
- Q2.3 (5 баллов × 2 = 10 баллов)** Используя ваши результаты, постройте график каждого титрования (значение pH против добавленного объёма NaOH (мл)) на Графиках 2 и 3 **в Листе Ответов.**
- Q2.4 (2 points × 2 = 4 points)** Определите на ваших кривых титрования точку pI и отметьте её на каждом графике.
- Q2.4.1 (2 балла)** Каково среднее значение для pI?
- Q2.5 (4 балла × 2 = 8 баллов)** Найдите и отметьте pK<sub>a1</sub> и pK<sub>a2</sub> на каждом графике.
- Q2.5.1 (2 балла × 2 = 4 балла)** Каково среднее значение pK<sub>a1</sub> и pK<sub>a2</sub>?
- Q2.6 (5 баллов)** 0,9210 г неизвестной аминокислоты Z растворили в 80 мл деионизированной воды. Определите молекулярный вес неизвестной аминокислоты Z. Примечание: Для того чтобы начать титрование полностью протонированной кислоты к ней была добавлена HCl. Ее количество эквивалентно 3,2 мл раствора NaOH. Для

---

определения числа молей NaOH, необходимых для достижения рI, вычитите 3,2 мл из объема NaOH, использованного для достижения изоэлектрической точки.

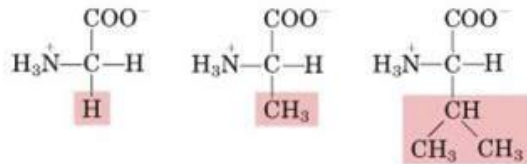
**Q2.7 (2 балла)** Основываясь на данных Таблицы 2, определите аминокислоту Z.

- a. глицин
- b. пролин
- c. аспарагин
- d. тирозин
- e. триптофан

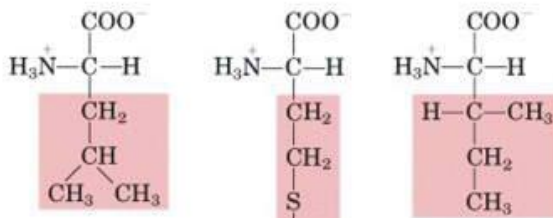
Таблица 1. Структурные формулы 20 стандартных аминокислот.

## Двадцать стандартных аминокислот

### Неполярные, алифатические радикалы

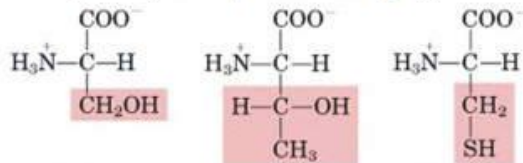


Глицин      Аланин      Валин

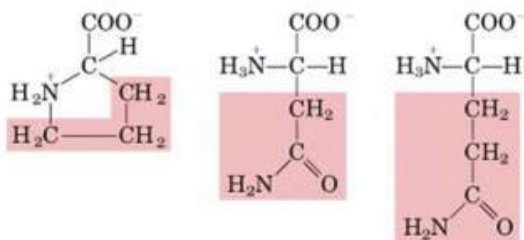


Лейцин      Метионин      Изолейцин

### Полярные, незаряженные радикалы

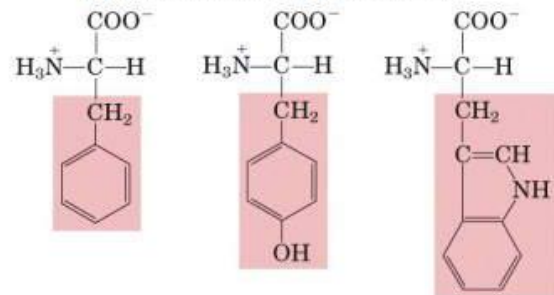


Серин      Треонин      Цистеин



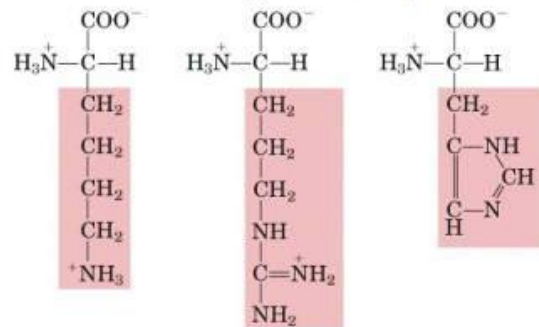
Пролин      Аспарагин      Глутамин

### Ароматические радикалы



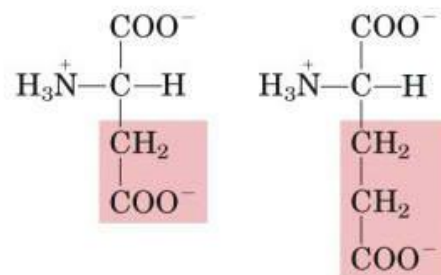
Фенилаланин      Тирозин      Триптофан

### Положительно заряженные радикалы



Лизин      Аргинин      Гистидин

### Отрицательно заряженные радикалы



Аспаргат      Глутамат

Таблица 2. Молекулярные веса некоторых аминокислот.

Аминокислота	Молекулярный вес (г/моль)
Глицин	75
Пролин	115
Аспарагин	132
Тирозин	181
Триптофан	204

**КОНЕЦ ТЕСТА**