

Student Code:

24-я Международная Биологическая Олимпиада

14-21 июля 2013

Берн, Швейцария



BERN 2013 International Biology Olympiad

Практический экзамен 1

Молекулярная биология клетки

Общее число баллов: **100**

Продолжительность: **90 минут**

Дорогие участники,

Эта практическая работа состоит из двух заданий:

Введение [2 балла]	4
Task 1: Наличие β-глюкуронидазы [12 баллов]	5
Part 1.1: Определение наличия β -глюкуронидазы [12 баллов]	5
Task 2: Присутствие белка проциклина [86 баллов]	6
Part 2.1: Как пользоваться счётной камерой [1 балл]	6
Part 2.2: Промывание магнитных бус	7
Part 2.3: Определение плотности трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами [37,5 балла]	7
Part 2.4: Общая плотность трипаносом [25,5 балла]	8
Part 2.5: Эффективность делеции гена проциклина [9 баллов]	8
Part 2.6: Контроль связывания с магнитными бусами [9 баллов]	10
Part 2.7: Интерпретация результатов [4 балла]	10

Пожалуйста, внесите свой код студента в соответствующий квадратик на титульном листе.

Отдельного листа ответов нет. Вносите, пожалуйста, свои ответы в специальные клетки для ответов, выделенные серым цветом. **Оцениваться будут только ответы, внесённые в эти клетки.**

Ответы могут быть даны или значком (✓) или арабскими цифрами. Цифры "1" и "7" очень похожи при написании. Чтобы быть уверенными, что эти две цифры правильно опознаны персоналом МБО при проверке вашей работы, просим (в качестве образца) написать их в серых квадратах так, как вы будете писать в вашей работе:



Когда прозвонит звонок, **НЕМЕДЛЕННО** прекратите отвечать на вопросы и отложите ручку. Вложите задание со всеми ответами в экзаменационный конверт.

Материалы и оборудование

Убедитесь, что вами получены все материалы и оборудование, перечисленные в каждом задании. Если вы не обнаружили чего-то из перечисленного, поднимите руку.

Оборудование

- Водяная баня с температурой 37°C (общего пользования)
- 1 микропипетка P1000
- 1 микропипетка P200
- 1 микропипетка P20
- 1 коробочка для наконечников для пипетки P1000
- 1 коробочка для наконечников для пипеток P200 и P20
- 1 штатив для пробирок Эппендорф
- 1 штатив
- 1 сосуд для твердых отходов
- 1 пробирка для жидких отходов [LW]
- 1 коробка из пенопласта со льдом
- 1 Таймер
- 1 маркер
- 1 микроскоп
- 3 счётные камеры
- 3 предметных стекла
- 3 покрывных стекла
- 21 пробирка Эппендорф
- 1 штатив с магнитом для пробирок Эппендорф
- Чистая бумага для записей и расчетов
- 1 флажок для вызова ассистента
- 1 желтый лист с вашим кодом студента

Реактивы

- 1 пробирка Эппендорф с магнитными бусами [MB]
- 1 пробирка с фосфатным буфером [PBSB]
- 1 пробирка Эппендорф с буфером для фиксации [FB]
- 1 пробирка Эппендорф с субстратным буфером [SB]
- 1 пробирка Эппендорф с субстратом (X-gluc) [S]

Суспензии трипаносом

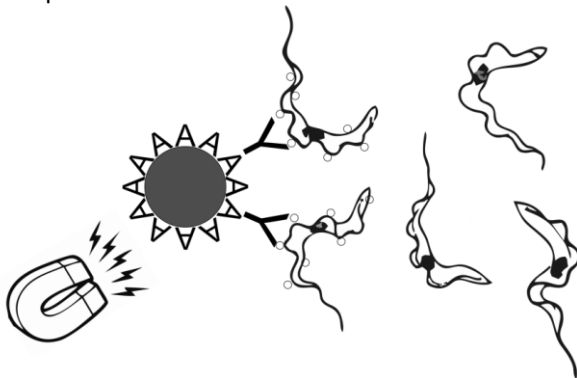
- 1 пробирка Эппендорф с суспензией штамма 1 [T1]
- 1 пробирка Эппендорф с суспензией штамма 2 [T2]
- 1 пробирка Эппендорф с суспензией штамма 3 [T3]

Введение [2 балла]

Trypanosoma brucei – это паразит, вызывающий сонную болезнь у человека и заболевание, называемое нагана, у животных. Заболевание, которое встречается почти исключительно в Африке к югу от Сахары, переносится мухой цеце. Чтобы лучше понять функцию различных белков, участвующих в жизненном цикле и инфекционном пути у *Trypanosoma brucei*, необходимо получить мутанты, потерявшие проциклин, но экспрессирующие другие белки, предоставляющие интерес. Проциклин - это один из поверхностных белков, обнаруженный у *Trypanosoma brucei*, который не встречается у других трипаносом, и который, как предполагают, влияет на инфекционность. Инфекционность различных видов трипаносом зависит от различных поверхностных белков. Например, *T. congolense* зависит от поверхностного белка, называемого GARP.

В этом практическом задании вы будете работать с тремя штаммами подвида *Trypanosoma brucei brucei*, которые могут инфицировать домашних и диких животных, но не опасны для человека. Вначале клетки были либо трансфецированы одной конструкцией, кодирующей оба белка - GARP и β-глюкуронидазу, либо не были трансфецированы, и выращены как чистые штаммы (чистые культуры). β-глюкуронидаза, отсутствующая у дикого вида *Trypanosoma brucei*, является белком, который может превращать X-gluc (синтетический субстрат) в продукт голубого цвета, который можно легко увидеть невооружённым глазом. Таким образом, ген β-глюкуронидазы служит удобным репортерным геном, позволяющим отличить штамм, несущий успешно введённую конструкцию, простым инкубированием штаммов с X-gluc (Задание 1).

Затем три штамма были подвергнуты обработке, для того, чтобы вызвать делецию гена, кодирующего белок проциклин. Это позволило бы установить, важен ли проциклин для инфекционного цикла и может ли GARP компенсировать его функцию. Поскольку эффективность делеции не составляет 100%, вы будете отделять клетки, в которых ген проциклина был успешно удалён, от клеток, в которых делеция не произошла. Чтобы осуществить это, трипаносомы, преинкубированные с антителами, специфическими против проциклина, отделяются с помощью магнитных бус, покрытых белком А, который специфически связывается с участком Fc антител, как это изображено ниже.



Перед началом практической работы, укажите галочкой для каждого из следующих утверждений, является оно верным или неверным. [2 балла]



Q1

	верно	неверно
Если среда, в которой штамм инкубировали с X-gluc, приобретает голубой цвет, ген β-глюкуронидазы был включен успешно.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Вывод об успешном включении гена GARP на основании присутствия гена-репортера (β-глюкуронидазы) может привести к ложно положительному или ложно отрицательному результату, если был успешно введён только один ген из конструкции.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Место внедрения конструкции в геном влияет на уровень экспрессии введенного гена.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Подобный подход с использованием магнитных бус и специфических антител может быть использован для выделения клеток, у которых успешно произошла делеция гена, кодирующего внутриклеточный белок, от клеток, в которых делеция не произошла.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



Task 1: Наличие β -глюкуронидазы [12 баллов]**Part 1.1: Определение наличия β -глюкуронидазы [12 баллов]**

Приготовьте в отдельных пробирках Эппендорф следующую реакцию смесь для каждого из трёх штаммов трипаносом T1, T2 и T3 и перемешайте ее повторным набором и выпусканьем смеси пипеткой:

1. 20 μ l суспензии трипаносом. Поскольку трипаносомы опускаются на дно пробирки, **перемешайте** содержимое пробирки взбалтыванием перед пипетированием.
2. 100 μ l субстратного буфера (**SB**)
3. 10 μ l субстрата (**S**)

Подпишите каждую пробирку названием штамма, который вы использовали, и трехзначным кодом страны (который указан на вашем бейдже).

Реакционная смесь должна быть проинкубирована как минимум 1 час при 37°C. Поместите ваш флажок в соответствующий держатель на перегородке вашего рабочего места для вызова ассистента, который поместит вашу пробирку в водяную баню. Также используйте ваш флажок, чтобы показать ассистенту, что вы хотите получить ваши пробирки по истечении времени инкубации обратно. Во время инкубации выполняйте другие задания.

Поместите ваши пробирки на желтый лист бумаги с вашим кодом студента, их сфотографируют и оценят.

Укажите галочкой (\checkmark) для каждого из трех штаммов, изменился ли цвет смеси на голубой, или она осталась после инкубации бесцветной. [12 баллов]



Q2

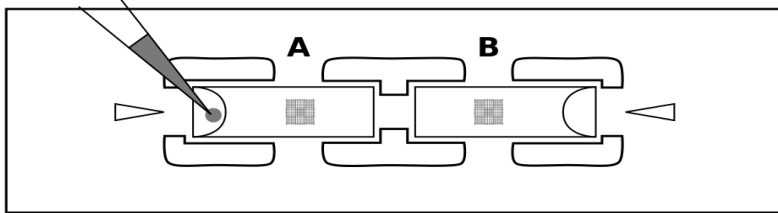
	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Голубая			
Бесцветная			



Task 2: Присутствие белка проциклина [86 баллов]

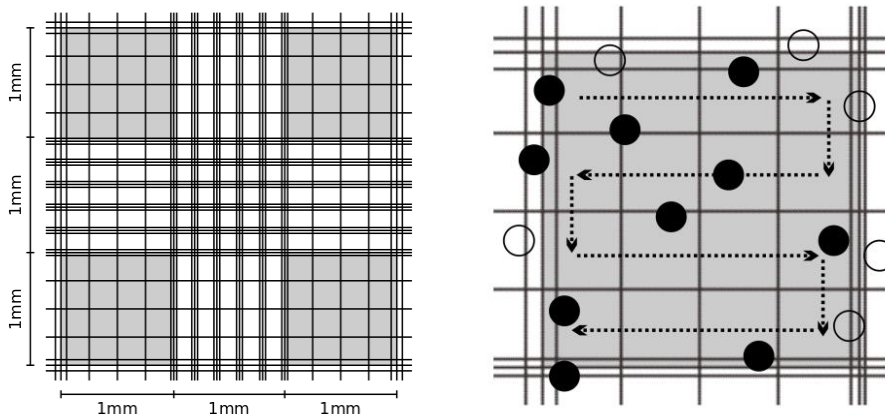
Part 2.1: Как пользоваться счётной камерой [1 балл]

Для определения плотности трипаносом в частях 2.3 и 2.4 вы будете использовать счетную камеру. На одной пластинке находятся две счётные камеры, которые могут быть заполнены индивидуально. **Пожалуйста, имейте в виду, что счетные камеры одноразовые и не могут быть использованы повторно, и что дополнительные камеры не выдаются. Эти камеры не накрываются покровным стеклом.**



Для определения плотности трипаносом в суспензии проведите следующие операции:

1. Внесите пипеткой 10 μl суспензии в счётную камеру.
2. Подождите как минимум 2 минуты, чтобы клетки осели.
3. Поместите пластинку под микроскоп и подсчитайте число трипаносом отдельно в трёх из четырёх больших квадратов, выделенных серым цветом.



Вы можете использовать объектив как с увеличением в 10x так и в 40x раз, какой из них вы предпочтёте. Рекомендуем применить зигзагообразный (змееподобный) путь для прохождения через каждый из маленьких квадратов, чтобы избежать потери ориентации. Во избежание возможных ошибок, считайте трипаносомы внутри квадрата и на границе с левой стороны или снизу (как обозначено черными кружками), но не вне квадрата или на границе справа либо сверху (как обозначено белыми кружками).

Для определения плотности трипаносом, исходя из подсчитанного количества трипаносом, вначале определите объём, в котором были подсчитаны клетки, и впишите его в таблицу ниже. Учтите, что высота счётной камеры составляет точно 0,1мм и каждая счётная ячейка имеет ширину точно 1 мм (как показано на рисунке выше). [1 балл].



Q3

Объем 1 квадрата для подсчёта (мм^3)	
Объем 1 квадрата для подсчёта (мл)	



Part 2.2: Промывание магнитных бус

Промойте магнитные бусы (**MB**) дважды следующим образом:

1. Добавьте 1 мл холодного фосфатного буфера (**PBSB**) в пробирку с магнитными бусами (**MB**) и перемешайте смесь путём набора и выпуска жидкости пипеткой
2. Поместите пробирку Эппендорф в штатив с магнитом. Подождите как минимум 1 минуту, чтобы магнитные бусы осели.
3. Отберите пипеткой супернатант и слейте его в пробирку для жидких отходов (**LW**)

После этого ресуспендируйте магнитные бусы в 35 μ л буфера PBSB и поместите их на лёд.

Part 2.3: Определение плотности трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами [37,5 балла]

Осадите трипаносомы, экспрессирующие проциклин, в образцах каждого из трёх штаммов T1, T2 и T3 следующим образом:

1. Внесите пипеткой 190 μ л суспензии трипаносом в чистую пробирку Эппендорф. Перед пипетированием взболтайте суспензию трипаносом.
2. Добавьте 10 μ л промытых магнитных бус. Взболтайте бусы перед пипетированием.
3. Инкубируйте смесь 30 минут во льду. Перемешивайте **очень осторожно** смесь каждые 3-5 минут **переворачиванием пробирки**. Приступите к выполнению других частей Задания 2 во время этой инкубации.
4. Осадите магнитные бусы при помощи штатива с магнитом.
5. Перенесите весь супернатант из находящейся в штативе с магнитом пробирки в чистую пробирку Эппендорф и поместите ее на лёд.
6. Немедленно **очень осторожно** ресуспендируйте магнитные бусы в 50 μ л фосфатного буфера (PBSB) и поместите их на лёд.
7. Приготовьте в чистой пробирке Эппендорф 100 μ л разведения 1:10 супернатанта в фосфатном буфере (PBSB).
8. Внесите в отдельную пробирку Эппендорф пипеткой 36 μ л этого раствора и добавьте 4 μ л буфера для фиксации (FB). Хорошо перемешайте путём набора и выпуска смеси пипеткой.
9. Проведите подсчёт трипаносом в соответствии с описанием в Части 2.1 и впишите результаты в таблицу ниже.
10. Вычислите среднее количество трипаносом на квадрат (точность: 3 знака после запятой). Вы будете использовать эти данные в Части 2.5. [37,5 баллов]



Q4

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Квадрат 1			
Квадрат 2			
Квадрат 3			
Среднее количество на квадрат			



Part 2.4: Общая плотность трипаносом [25,5 балла]

Для определения общей плотности трипаносом в исходной суспензии проведите следующие операции для каждого штамма трипаносом T1, T2 и T3:

1. Приготовьте 100 µl разведения 1:10 исходной суспензии в фосфатном буфере (PBSB) в чистой пробирке Эппендорф. Перед пипетированием перемешайте содержимое пробирки ее переворачиванием.
2. Внесите в чистую пробирку Эппендорф 36 µl этой разведённой суспензии и 4 µl буфера для фиксации (FB). Хорошо перемешайте содержимое путём набора и выпуска смеси пипеткой.
3. Проведите подсчёт трипаносом согласно описанию в Части 2.1 и внесите результаты в таблицу ниже.
4. Определите среднее значение и стандартное отклонение числа трипаносом на квадрат (точность: 3 знака после запятой). Эти числа вы будете использовать в Части 2.5. **[25,5 баллов]**

Формула для определения стандартного отклонения (SD) указана ниже, где *n* это количество проб, *x_i* значение каждой пробы и \bar{x} среднее значение.

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$



Q5

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Квадрат 1			
Квадрат 2			
Квадрат 3			
Среднее значение на квадрат			
Стандартное отклонение от среднего значения на квадрат			



Part 2.5: Эффективность делеции гена проциклина [9 баллов]

Следующей задачей является подсчёт плотности трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами, и сравнение её с общей плотностью трипаносом в исходной суспензии на основании усредненных результатов. Однако для этого вы сначала должны определить стандартное отклонение среднего значения (*SE_{mean}*) для принятия решения, сколько цифр являются значимыми. Предположив, что величины имеют нормальное распределение, *SE_{mean}* вычисляется по формуле $SE_{mean} = \frac{SD}{\sqrt{n}}$

Вычислите *SE_{mean}* для штамма, для которого вы обнаружили наибольшее стандартное отклонение при подсчёте трипаносом на квадрат в Части 2.4 и внесите результат в таблицу ниже (точность: 3 знака после запятой). **[0,6 балла]**



Q6

<i>SE_{mean}</i>	
--------------------------	--



Значение SE_{mean} покажет вам точность, с которой вы определили среднее значение количества трипаносом на квадрат. Используйте эту величину для определения правильного числа значимых цифр (все цифры, включая первую, которая различается) путем сравнения полученного вами среднего значения плюс SE_{mean} с полученным вами средним значением минус SE_{mean} . Например, если среднее значение составляло 1234,567 и $SE_{mean} = 98,765$, то вы должны сравнивать $1234,567 + 98,765 = 1333,332$ с $1234,567 - 98,765 = 1135,802$. В этом случае имеются две значащие цифры и среднее значение должно быть представлено как $1,2 \times 10^3$. Укажите число значащих цифр, которое вы должны использовать для работы с вашими данными. [1,5 балла]



Число значащих цифр

--



Q7

Внесите в таблицу ниже среднее значение на квадрат до и после осаждения для всех трех штаммов, применив число значащих цифр, определенное вами выше. [0,6 балла]



	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Среднее значение числа трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами, на квадрат (из Part 2.3)			
Среднее значение общего числа трипаносом на квадрат (из Part 2.4)			



Q8

Теперь используйте эти величины для определения плотности трипаносом в разведениях, использованных для подсчёта, и впишите ваши результаты в таблицу ниже с тем же числом значимых цифр. [3,7 балла]



	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Количество трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами /мл, в разведении для подсчёта (из Part 2.3)			
Общее количество трипаносом/ мл в разведении, использованном для подсчёта (из Part 2.4)			



Q9

На заключительном этапе вычислите плотность трипаносом, не связавшихся с магнитными бусами, и общую плотность трипаносом в исходной суспензии и впишите ваши результаты в таблицу ниже с тем же количеством значащих цифр. [1,1 балла]



	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Трипаносомы, не связавшиеся с магнитными бусами, /мл в исходной суспензии (из Part 2.3)			
Общее количество трипаносом / мл в исходной суспензии (из Part 2.4)			



Q10

Для оценки успешности эксперимента по делеции гена, вычислите процент трипаносом, которые не связались с магнитными бусами, для каждого из трёх штаммов. Используйте для ваших расчетов данные для плотностей в исходной суспензии и впишите ваши результаты в таблицу ниже (точность: целое число процентов). [1,5 балла]



Q11

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Процент трипаносом, не связавшихся с бусами			



Part 2.6: Контроль связывания с магнитными бусами [9 баллов]

Теперь вам следует подтвердить под микроскопом, произошло ли действительно снижение числа трипаносом, наблюдаемое после осаждения, из-за связывания трипаносом с магнитными бусами. Для этого проведите следующие операции для каждого из трёх штаммов:

1. Внесите пипеткой 10 µl ресуспандированных бус из Part 2.3, предварительно осторожно перемешав их, на предметное стекло.
2. Накройте каплю покрывным стеклом.

Проведите грубую оценку фракции трипаносом, которые присоединились к магнитным бусам. Хорошим указателем связывания трипаносом с бусами является покачивание бус при движении трипаносом.

Укажите галочкой (✓) в таблице ниже для каждого из трех штаммов, какое описание наилучшим образом соответствует вашим наблюдениям. [9 баллов]



Q12

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
(Практически все) трипаносомы в образце не связаны с бусами			
<50% трипаносом в образце связаны с бусами			
>50% трипаносом в образце связаны с бусами			



Part 2.7: Интерпретация результатов [4 балла]

Укажите для каждого штамма галочкой (✓) утверждение, лучше всего описывающее уменьшение количества трипаносом в супернатанте после осаждения. [3 балла]



Q13

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Уменьшение хотя бы частично произошло из-за связывания с бусами			
Никакого изменения или чисто случайное (стохастическое) изменение			



Укажите галочкой (✓) штамм, у которого возникновение делеции было наиболее эффективным. [1 балл]



Q14

	Штамм T1	Штамм T2	Штамм T3
Наибольшая эффективность делеции			



Конец практической работы