

25th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

5th – 13rd July, 2014

INDONESIA



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 1

БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

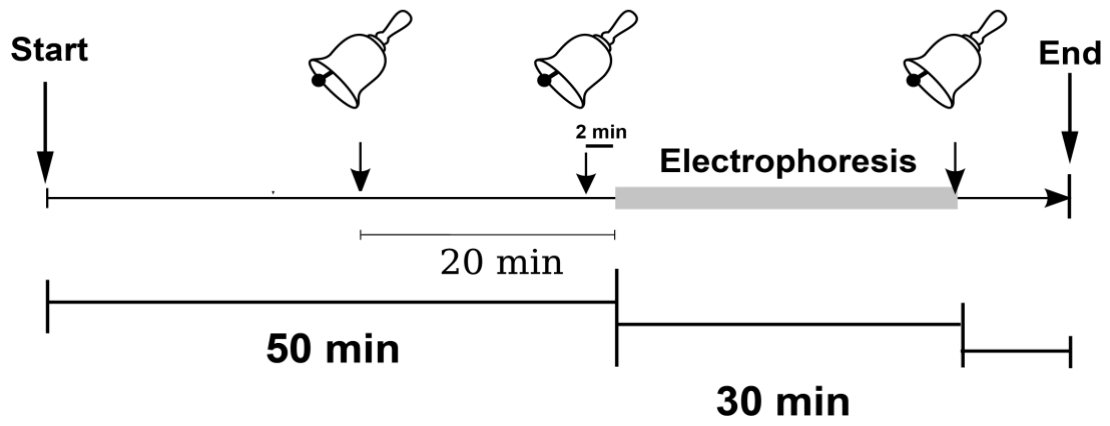
Общее количество баллов: **64,5**

Длительность: 90 минут

СТРАНА:
СТУДЕНТ:

Дорогие участники

- В этом тесте вам будет необходимо выполнить следующие задания:
 - Часть А.** Идентификация плазмид X, Y и Z рестрикционным анализом. (40 баллов)
 - Часть В.** Размножение клеток и анализ теломер у *Paramecium*. (24,5 баллов)
- Для ответа на все вопросы используйте предоставленный вам **Лист Ответов**.
- Ответы, внесённые в **Лист с вопросами**, оцениваться **НЕ будут**.
- Впишите ваши ответы ручкой и чётко.
- Пожалуйста, убедитесь, что вам предоставлены все материалы и приборы, перечисленные в каждом задании. **В случае, если какой-либо из предметов отсутствует, немедленно поднимите руку.**
- Прекратите отвечать на вопросы и отложите ручку **немедленно** после финального звонка.
- По окончании теста вложите Лист Ответов вместе с экзаменационной работой в предоставленный конверт. Ассистент заберёт у вас ваш конверт.
- **Учтите!** Источники тока для проведения электрофореза ДНК будут включены ассистентами одновременно **через 50 минут после начала теста**. Убедитесь, что вы нанесли ваши образцы на агарозный гель соответственно инструкции, предоставленной в Листе с вопросами, до включения прибора. После этого проводить электрофорез не разрешается. Чтобы напомнить вам об этом, ассистент трижды даст сигнал звонком. Первый звонок напомнит вам, что электрофорез начнется через **20 минут**. Второй звонок предупреждает, что электрофорез начнётся через две минуты. Третий звонок означает окончание электрофореза. В это время вам нужно будет вынуть ваш гель и поместить в коробку, предоставленную ассистентом.



Материалы и оборудование

Материалы	Количество	Единица
Эндонуклеаза рестрикции FD EcoRI (хранится на льду)	1 (8 μ l)	пробирка
Эндонуклеаза рестрикции FD HindIII (хранится на льду)	1 (8 μ l)	пробирка
10X Раствор рестриционного буфера (подписан FD Buffer) (хранится на льду)	1 (8 μ l)	пробирка
Плазмиды 1-3 (подписаны Plasmid 1 , Plasmid 2 и Plasmid 3) (хранятся на льду)	3 (5 μ l)	пробирки
Стерильная вода (подписана Deion) в закрытом пакете	1 (100 μ l)	пробирка
Красящий раствор DNA для геля (подписан Gel Red , в черной пробирке) в закрытом пакете	1 (200 μ l)	пробирка
Исходный раствор ДНК-маркера, подписан 1 Kb Ladder , хранится на льду	1 (20 μ l)	пробирка
Готовый агарозный гель	1	штука
Буфер для электрофореза (TAE)	1 (300 мл)	бутылка

Оборудование	Количество	Единица
Индивидуальная камера для электрофореза ДНК	1	набор
Источник тока, общий для 4 участников	1	штука
Микропипетки и наконечники к ним в коробочках (p10, p200)	2	набора
Секундомер	1	штука
Штатив для пробирок	1	штука
Стерильные микропробирки (в закрытом пакете)	6	штук
Пластиковая коробка	1	штука
Плавающий штатив	1	штука
Микроцентрифуга	1	штука
Наклейка	1	лист
Маркер	1	штука
Бумажные салфетки	1	коробка
Перчатки	1	пара

Примечание : Используйте предоставленные реактивы по назначению! Дополнительные реактивы для этого задания выдаваться не будут.

Часть А (40 баллов)

Идентификация плазмид путем рестрикционного анализа

Введение

Исследователь с удивлением обнаружил в морозилке неподписанные пробирки. Эти пробирки, содержащие плазмиды X, Y и Z, были затем произвольно подписаны "Plasmid 1", "Plasmid 2" и "Plasmid 3". Эти плазмиды не различаются при электрофорезе ДНК, так как имеют одинаковую длину 3750 bp. Поскольку эти плазмиды образуют разные фрагменты рестрикции при использовании *EcoRI* и/или *HindIII* (Рисунок 1), для правильной идентификации плазмид вам необходимо будет провести рестрикционный анализ этих трёх плазмид при помощи ферментов.

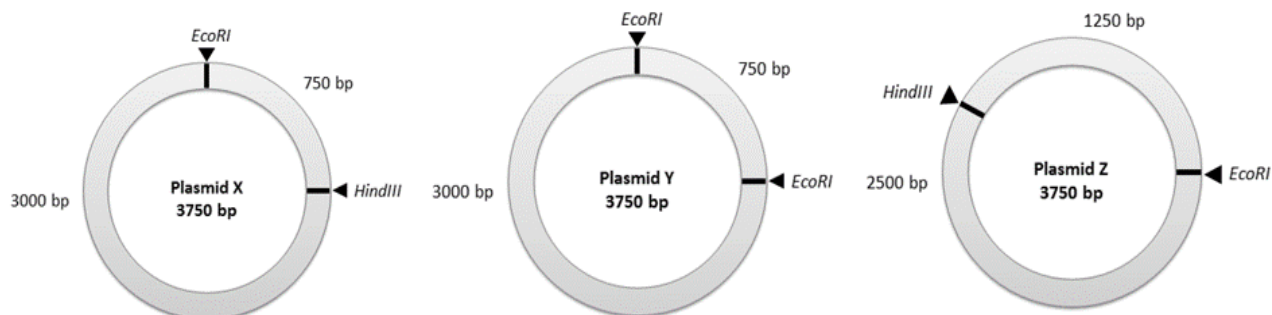


Рисунок 1. Рестрикционные карты плазмид X, Y, Z

В Таблице 1 в Листе Ответов представлена схема эксперимента, который вам надо провести. Эксперимент делится на Серию 1 и Серию 2, которые проводятся одновременно. В каждой серии все три плазмиды разрезаются одним(и) и тем(и) же ферментом(ами) рестрикции. Конечная концентрация рестрикционного буфера должна быть 1X.

Question 1.1. Выясните, как можно использовать эти ферменты рестрикции для идентификации плазмид. Заполните таблицу 1 в Листе Ответов, описав выбранную вами схему эксперимента для каждой серии (8 баллов). Вам нужно выбрать один или два фермента для каждой серии, исходя из информации, приведенной в рисунке 1. Добавьте по 1 мкл каждого фермента, если вы решили использовать его в данной серии.

Question 1.2. На рисунке, приведенном в Листе Ответов, на каждой дорожке нарисуйте полосу(ы), которые вы ожидаете увидеть при полной рестрикции плазмид X, Y и Z соответствующими ферментами в каждой из двух серий. Напишите, какой(ие) фермент(ы) использовались в серии 1 и серии 2 вашего эксперимента (6 баллов, по 1 баллу за каждую дорожку).

Рестрикция плазмид и электрофорез ДНК

Внимание: Электрофорез начнётся через 50 минут после начала работы. После этого проведение электрофореза **НЕ** разрешается.

Внимание: Отцентрифугируйте все реагенты в микропробирках, чтобы на стенках не оставалось капель раствора, перед использованием (пипетированием). Не забудьте уравновесить ротор, поместив пробирки друг напротив друга, даже если вам нужно отцентрифугировать только одну пробирку.

1. Подпишите микропробирки от S1 до S6 и подготовьте реакционную смесь в соответствии с Таблицей I в Листе Ответов. Отцентрифугируйте смесь в микропробирках в микроцентрифуге в течение 10-20 секунд.
2. Поместите пробирки в плавающий штатив, подписанный номером вашего рабочего стола, и проинкубируйте их не менее 10 минут при 37°C на водяной бане, находящейся в конце прохода вашего рабочего стола, направление указано стрелкой.
3. Добавьте **точно по 2 мкл** раствора красителя для DNA в микропробирку, подписанную **1 Kb Ladder**. Отцентрифугируйте смесь в течение 10 секунд.
4. После инкубации поднимите номер вашего рабочего стола и вам возвратят ваши пробирки. Добавьте **только по 1 мкл** раствора красителя, хорошо перемешайте путём набирания и выпуска жидкости пипеткой.
5. Откройте упаковку агарозного геля и поместите его в камеру для электрофореза. Вылейте все содержимое бутылки с TAE -буфером в камеру.

Примечание: электрод чёрного цвета это катод (-), а электрод красного цвета – анод (+).

6. Внесите по 10 µl образцов от S1 до S6 и маркеров молекулярного веса в лунки агарозного геля как показано на **Рисунке 2**.



Рисунок 2

7. Закройте крышку камеры и поднимите руку, давая понять ассистенту, что вы готовы. Ассистент подключит кабель к источнику тока.

Во время электрофореза работайте с Частью В.

8. После окончания электрофореза (когда прозвучит 3 звонок), ассистент отключит ток. Осторожно поместите гель с подставкой в пластиковую коробку, которая предоставляется вам. **Перелейте буфер из камеры в пластиковую коробку.** Закройте коробку, подпишите наклейку вашим идентификационным номером (**Student ID**) и наклейте ее сбоку на коробку. Оставьте коробку на вашем столе. После этого гель будет сфотографирован ассистентом, и фотография будет прикреплена к вашему листу ответов.

Часть В (30 баллов)

Деление клеток и анализ теломер у *Paramecium*

У *Paramecium tetraurelia* наблюдаются два процесса: бинарное деление (бесполое размножение) и конъюгация (обмен генетическим материалом), на которые оказывает влияние обеспеченность среды питательными веществами. На Рисунке 3 показаны две культуры *P. tetraurelia* под микроскопом, выращенные на богатой и бедной питательной среде, соответственно.

Question 2.1. (2 балла) Какие процессы можно видеть у двух культур на Рисунках 3А и 3В?

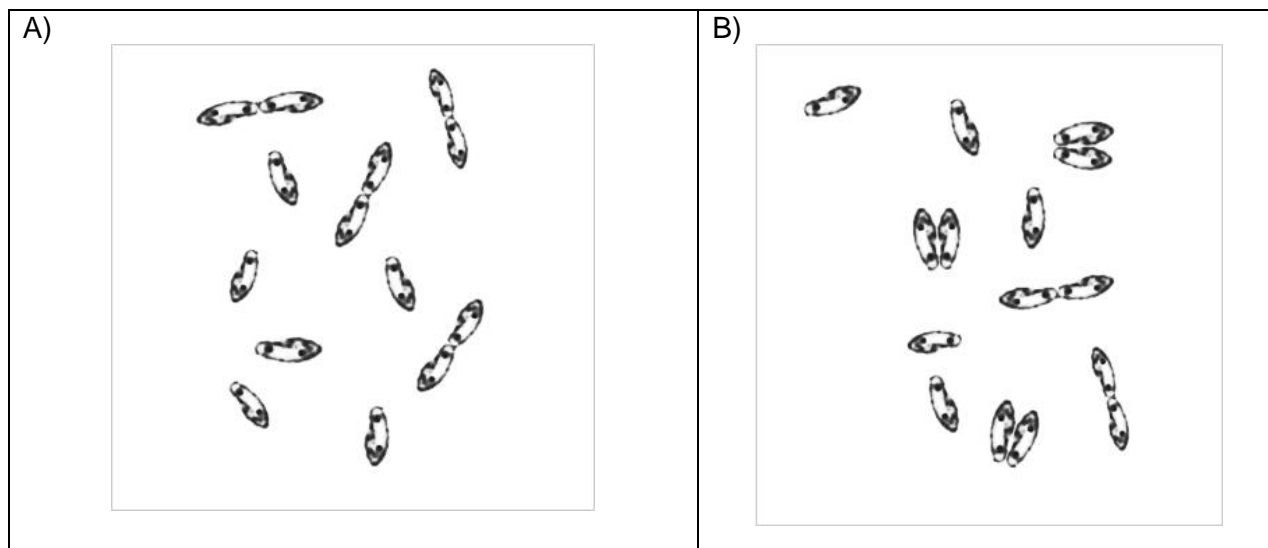


Рисунок 3. Рост *P. tetraurelia* на богатой (А) и бедной (В) среде.

Клетки *Paramecium*, только что прошедшие конъюгацию, продолжают бесполое размножение в питательной среде. В этом случае в течение нескольких делений происходит укорачивание теломер во время фазы логарифмического роста. В **Таблице В-1** приведены данные, описывающие рост штамма *Paramecium* в трех повторах в течение 4 дней. Культура может выращиваться в этих условиях в течение длительного времени без значительного изменения скорости деления.

Таблица В-1. Рост *P. tetraurelia* в первые 4 дня.

День	Концентрация клеток (число клеток/мл)		
	А	В	С
0	1	1	1
1	8	10	16
2	80	120	128
3	640	960	1024
4	5760	7680	10240

Question 2.2. (2,5+8 баллов) Рассчитайте среднюю концентрацию клеток и, используя логарифм этого значения, постройте кривую роста *P. tetraurelia* начиная с дня 0 до дня 4 на в поле для графиков, предоставленном в **Листе Ответов**. (Округлить с точностью до целых).

На **Рисунке 4** приведены результаты Саузерн блоттинга теломер *P. tetraurelia* на протяжении 30 синхронизированных поколений.. ДНК из *P. tetraurelia*, была расщеплена в начале теломерной области, перенесена на мембрану и затем гибридизована с зондом к теломерной ДНК. Теломеры видны как смазанное нечеткое пятно (шмер), центр которого может быть сопоставлен с маркером молекулярного веса для определения средней длины теломер.

Внутренний контроль (internal) – внутренняя часть хромосомной ДНК, которая содержит теломерную последовательность.

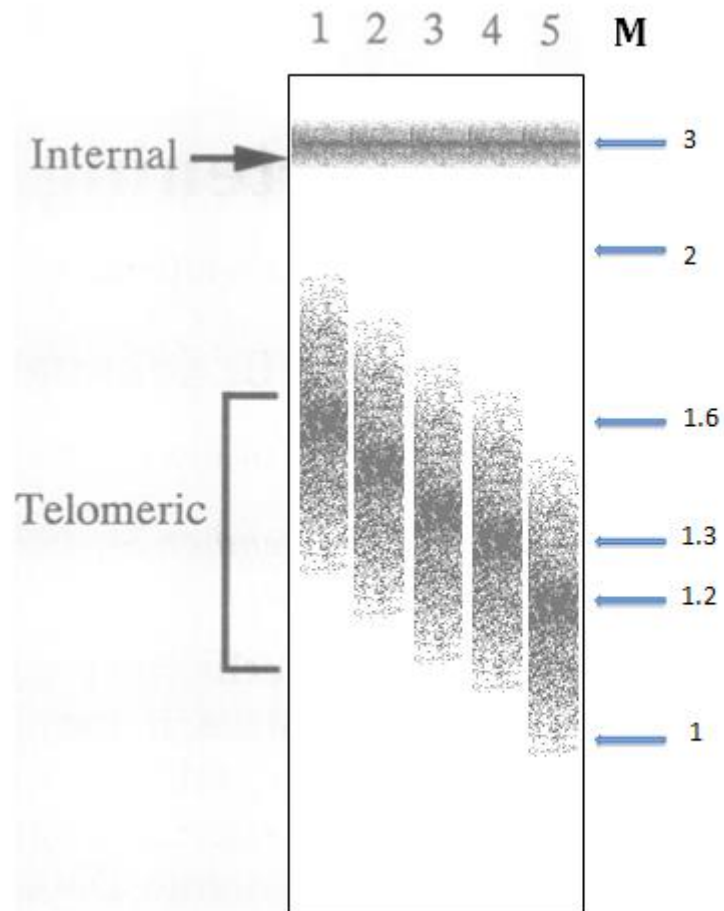


Рисунок 4. Саузерн блоттинг теломер *P. tetraurelia*. Дорожки 1 - 5 показывают теломеры после 4, 7, 17, 23, и 30 поколений, соответственно. Маркер длины ДНК (M) показан рядом с дорожкой 5 (в тысячах пар оснований)

Question 2.3 (12 баллов) Для каждого утверждения отметьте значком (✓), является ли оно **верным или неверным**.

No.	Утверждение
a	Данная питательная среда может поддерживать рост <i>P. tetraurelia</i> до концентрации более чем 10^4 клеток/мл
b	Использованный для Саузерн блоттинга зонд не является специфичным к теломерной последовательности.
c	На основании результатов Саузерн блоттинга можно сказать, что теломеры клеток одного поколения имеют одинаковую длину.
d	Концентрация <i>P. tetraurelia</i> в среде может увеличиться с 10^5 до 10^7 менее чем за три дня, если обеспечить клетки достаточным количеством питательной среды.
e	Исходя из данных о длине теломер, приведенных на дорожках 4 и 5, теломеры укорачиваются на 20-25 пар оснований за поколение.
f	В начале эксперимента (родительское поколение) длина теломер, скорее всего, находилась в диапазоне от 1500 до 1700 пар оснований