

ЗАДАНИЯ
практического тура XXXI Всероссийской
олимпиады школьников по биологии.
2014-15 уч. год. 11 класс

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Задание 1. Совместное использование микроорганизмов в биотехнологии (макс. 10 баллов)

Совместное использование микроорганизмов в биотехнологических процессах связано с разнообразием их метаболизмов. Вам предложены культуры двух микроорганизмов, один из которых традиционно используется на важнейшей стадии хорошо известного микробиологическом производства. Цель работы: исследовать микроорганизмы и предложить схему аналогичного биотехнологического процесса, основанного на их совместном использовании.

Дано: чашки Петри с культурами микроорганизмов №1 и №2 на средах А и Б.

Оборудование: Микроскопы, спиртовки, предметные и покровные стекла, пипетки, микробиологические петли, полоски фильтровальной бумаги, краситель фуксин или метиленовый синий, иммерсионное масло, стаканчик с водопроводной водой, раствор Люголя, 1% H_2O_2 , 3% KOH, универсальный индикатор, ломтик картофеля.

Ход работы:

1. Приготовьте фиксированный окрашенный препарат каждой культуры.
 - 1) Поместите на предметное стекло маленькую каплю воды. С помощью простерилизованной в пламени горелки петли приготовьте мазки культур №1 и №2.
 - 2) Высушите мазки на воздухе досуха (*не грейте препараты над огнем*).
 - 3) Зафиксируйте препараты в пламени горелки (*для этого стекло нужно быстро провести 2-3 раза через верхнюю часть пламени*).
 - 4) Окрасьте препараты фуксином (в течение 1 мин) или метиленовым синим (2 мин).
 - 5) Промойте препараты водой (*над кристаллизатором или другой емкостью*), просушите на воздухе или с помощью фильтровальной бумаги.
 - 6) Поместите на мазок 1 каплю иммерсионного масла.

Техника приготовления препаратов: макс. 1 балл.

- 7) Поместите препарат на столик микроскопа с иммерсионным объективом, сфокусируйте изображение. Покажите преподавателю.

Техника работы с микроскопом: макс. 1 балл.

Примечание. При необходимости можно также приготовить препарат «раздавленная капля». Для этого на предметное стекло поместить каплю воды. С помощью петли, простерилизованной в пламени горелки, внести в воду небольшое количество биомассы микроорганизмов (можно также добавить 1 каплю раствора Люголя), покрыть покровным стеклом. Поместить препарат на столик микроскопа. Сфокусировать изображение с объективом 40X.

2. Зарисуйте препараты культур №1 и №2 на **Листе ответов**, отметьте характерные морфотипы и назовите их (бактерии: кокки, стрептококки, стафилококки, палочки, цепочки клеток,

нитчатые формы, бациллы со спорами, спириллы, мицелиальные формы; эукариоты: одноклеточные, почкующиеся, мицелиальные и т.д.).

Техника рисунков и описание морфотипов: макс. 2 балла.

3. Охарактеризуйте состав сред А и Б, на которых росли культуры №1 и №2. Для этого, используя имеющиеся реактивы, проведите химические реакции, которые Вы считаете необходимыми (Учтите, что часть выданных Вам реактивов может оказаться избыточной). В чем состоит различие между средами? Исходя из полученных результатов, выскажите предположения о различии в метаболизме микроорганизмов №1 и №2. Предложите схему гипотетического микробиологического производства, основанного на последовательном использовании предложенных Вам культур и имеющегося на столе субстрата. Опишите результаты опытов и схему производства на **Листе ответов. Оценка: макс. 4 балла.**

4. Напишите на **Листе ответов**, какие организмы или вещества используются вместо микроорганизма №2 в аналогичных реально существующих биотехнологических процессах с участием микроорганизма №1. **Оценка макс. 1 балл.**

5. Напишите в **листе ответов**, в каких еще производствах используются исследованные Вами микроорганизмы. **Оценка: макс. 1 балл.**

Задание 2. Биотехнология и генетика микроорганизмов (макс. 10 баллов)

При культивировании бактерий, применяемых в биотехнологических процессах, большое значение имеет стерильность культуры и её устойчивость к бактериофагам. Прочитайте нижеследующий текст и ответьте на Листе ответов на вопросы, связанные с защитой прокариот от вирусов.

Устойчивость бактерий к вирусам связана с работой различных защитных систем, направленных на идентификацию и расщепление нуклеиновых кислот, которые бактериофаг инъецирует в зараженную клетку. К этим защитным системам относятся системы рестрикции-модификации ДНК, система CRISPR-cas, а также ряд других. Ответьте на Листе ответов ряд вопросов, связанных с работой этих систем.

2.1. Оперон *prf* кишечной палочки участвует в защите от штаммов бактериофага T4, не имеющих РНК-лигазы. При этом ген *prfC* кодирует нуклеазу, разрезающую антикодovou петлю лизиновой тРНК *E. coli*, а ген кодирует белок *prfB*, связывающий белок TAF бактериофага T4. Ответьте на вопросы, посвященные системе *prf*, на Листе ответов (**макс. 3 балла**).

2.2. Система рестрикции модификации состоит из двух основных компонентов: эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) – ферментов, которые узнают специфические последовательности (сайты рестрикции) и вносят в ДНК двунитевые (как правило) разрывы, и метилтрансфераз (метилаз), которые узнают те же специфические последовательности и метилируют в них азотистые основания.

Например, рестриктаза системы EcoRI узнает последовательность $\frac{5'GAATTC3'}{3'CTTAAG5'}$, а

метилаза этой системы метилирует в этой последовательности 3 и 4 остатки аденина. Если ДНК сайта рестрикции не метилирована, то она расщепляется рестриктазой, если метилирована – не расщепляется. Метилаза может метилировать вторую нить ДНК в сайте рестрикции, если уже прометилована первая, а иногда – две нити сразу *de novo*. Рестриктазы делятся на 3 класса, в зависимости от субъединичного состава, механизма работы и того, на каком расстоянии от сайта узнавания происходит разрезание ДНК. В биотехнологии и генетической инженерии используются рестриктазы 2-го класса, которые вносят разрыв ДНК внутри самого сайта узнавания. Ответьте на вопросы, посвященные системе рестрикции-модификации, на Листе ответов (макс. 4 балла).

2.3. Пожалуй, даже более важного значения для генетической инженерии и биотехнологии по сравнению с системой рестрикции-модификации в настоящее время приобретает система CRISPR-cas. Её механизм работы был открыт в 2007 году компанией Danisco на культуре микроорганизма *Streptococcus thermophilus*, используемой в производстве йогуртовых заквасок. Оказалось, что выжившие после заражения определенным фагом (например, φ4241) стрептококки приобретают устойчивость к повторному заражению этим же вирусом. Эта устойчивость связана с встраиванием фрагментов генома фага в локус CRISPR, который представляет собой по сути коллекцию чужеродного генетического материала, которую бактерия использует для выявления потенциально опасных нуклеиновых кислот. Кассету CRISPR обслуживают различные белки cas, гены которых тесно сцеплены с CRISPR. Принцип работы системы показан на рисунке ниже:



Для работы некоторых вариантов системы CRISPR-cas достаточно одного белка cas9, который сравнивает последовательности ДНК с последовательностью определенной короткой РНК (так называемой «гидовой РНК», гРНК) и делает в ДНК-мишени двунитевой разрыв в случае комплементарного связывания её и гРНК. Ответьте на вопросы, посвященные системе CRISPR-cas, на Листе ответов (макс. 3 балла).

Фамилия _____
Имя _____
Регион _____
Шифр _____

Шифр _____
Рабочее место _____
Итого: _____

ЛИСТ ОТВЕТОВ

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Задание 1. (в сумме 10 баллов)

Препараты	Культура №1	Культура №2
1. Техника приготовления препарата и работа с микроскопом. <i>Макс. 1 балл за оба препарата и 1 балл за микроскопирование.</i>	Подпись преподавателя	Подпись преподавателя
2. Рисунок клеток микроорганизмов. Обязательно укажите морфотипы. <i>Макс. 1 балл за каждый рисунок, в сумме – 2 балла.</i>		
3. Какими реакциями Вы исследовали состав сред А и Б? <i>Макс. 1 балл</i>		
4. Опишите найденные различия между средами А и Б. <i>Макс. 1 балл</i>		
5. Сделайте вывод об особенностях метаболизма микроорганизмов №1 и №2. <i>Макс. 1 балл</i>		
6. Опишите схему биотехнологического производства с участием микроорганизмов №1 и №2. Зачем в ней нужен микроорганизм №1 и зачем - №2? <i>Макс. 1 балл</i>		
7. Какие аналоги (вещества или микроорганизмы) Вы можете предложить в этой схеме для микроорганизма №2? <i>Макс. 1 балл</i>		
8. В каких других биотехнологических процессах можно использовать микроорганизмы №1 и №2 (по отдельности или вместе с другими микроорганизмами)? <i>Макс. 1 балл</i>		

Задание 2. (в сумме 10 баллов)

2.1 Отметьте символами *wt* для нормальных генов и *mut* для мутаций «потеря функции», комбинацию аллелей, обеспечивающую устойчивость штамма *E. coli* к штамму T4.

T4: *Rnl* (РНК-лигаза) _____ *TAF* _____ *E. coli*: *prpB* _____ *prpC* _____ (1 балл).

Штамм фага T4, имеющий нормальную активность РНК-лигазы, преодолевает *prp*-систему, потому что _____

_____ (1 балл).

Бактерия, устойчивая к T4, после заражения фагом активно делится/прекращает трансляцию/подвергается лизису (выберите правильный вариант), потому что _____

_____ (1 балл).

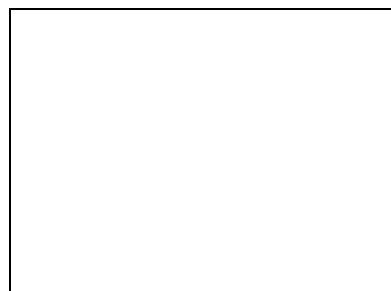
2.2 Когда определенный штамм бактериофага выращивают на определенном штамме бактерий, заражение клеток фагом идет с высокой эффективностью, однако если этим же фагом инфицировать другой штамм, эффективность заражения падает на несколько порядков. Кратко объясните, почему. _____

_____ (1 балл).

Если бактерия получит мутацию типа «потеря функции» в гене рестриктазы, то эта бактерия _____, а если в гене

соответствующей метилазы, то _____ (1 балл).

Нарисуйте в прямоугольнике справа модифицированное основание 6-метиладенин (метилирование по аминогруппе), которое образуется у бактерий под действием некоторых ДНК-метилаз (1 балл).



Оцените, сколько сайтов рестрикции для *EcoRI* с наибольшей вероятностью содержится в плазмиде размером 4100 п.н., если последовательность плазмиды близка к случайной? (Свой расчет поясните.) _____ сайтов рестрикции, потому что _____ (1 балл).

2.3 Компания Danisco запатентовала технологию получения культуры йогуртовых заквасок, обладающей множественной устойчивостью к различным фагам. Кратко опишите её суть. _____

_____ (1 балл).

Что произойдет с геном-мишенью млекопитающего, если в яйцеклетку млекопитающего ввести плазмиду с геном *cas9* и гРНК, комплементарной части этого гена мишени? _____

_____ (1 балл)

Будет ли работать система CRISPR-cas после утраты части одного из *cas*-генов, например *cas9*, или после утраты части локуса CRISPR, и если да, то что произойдет с её специфичностью? _____

_____ (1 балл)