

Использование автоматических пипеток:



Устройство автоматической пипетки

Для эксперимента Вам предоставляются пипетки объемом 1000мкл. Нужный объем устанавливается путем вращения **поршня**. Цифры в окошечке показывают выбранный объем в микролитрах. Наденьте на пипетку наконечник, нажмите поршень до первой остановки и погрузите наконечник в набираемую жидкость. Медленно отпустите поршень до достижения полной остановки для набора образца. Затем поместите наконечник с жидкостью в нужную пробирку и медленно нажмите поршень до первой остановки, пока вся жидкость полностью не выйдет из наконечника. Для выдувания остатков жидкости из наконечника нажмите поршень сильнее, до второй остановки. Снимите использованный наконечник, нажав кнопку сброса, и положите его на место.

Аккуратно используйте наконечники!!! **Один наконечник нельзя погружать в разные растворы!** Однако если Вы отбираете одну и ту же жидкость – пользуйтесь одним наконечником.

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

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Животную ткань гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе в буферном растворе, гомогенат профильтровали через марлю и провели центрифугирование при $600 \times g$ в течение 10 минут для удаления обломков клеток и ядер. После этого провели центрифугирование супернатанта при $10000 \times g$ в течение 15 минут. Полученный осадок суспендировали в буферном растворе и суспензию нанесли на градиент плотности сахарозы ($1,0 - 1,3 \text{ г/см}^3$). После проведения центрифугирования были получены три фракции мембранных органоидов с плавучей плотностью около $1,12 \text{ г/см}^3$ (**Фракция А**), $1,18 \text{ г/см}^3$ (**Фракция В**) и $1,23 \text{ г/см}^3$ (**Фракция С**). Все фракции были разведены буферным раствором до **концентрации белка 0,01 мг/мл**.

Для идентификации полученных фракций путем определения активностей маркерных ферментов были приготовлены три субстратные смеси, которые содержат буферные растворы, соли и необходимые субстраты в нужных концентрациях:

Смесь 1 содержит янтарную кислоту, феназинметасульфат и нитросиний тетразолий;

Смесь 2 содержит крахмал и раствор Люголя;

Смесь 3 содержит перекись водорода и 3,5-диокситолуол.

Для определения ферментативной активности к **1 мл субстратной смеси** необходимо добавить **0,5 мл фракции мембранного органоида** и провести инкубацию при комнатной температуре в течение 3-5 минут.

Задание 1 (9 баллов). Спланируйте и проведите эксперимент, с помощью которого Вы сможете идентифицировать клеточные органоиды во **Фракциях А, В и С**, проведя **минимальное** количество опытов. По ходу эксперимента заполняйте **Таблицу 1** в **Листе ответов**. По окончании эксперимента продемонстрируйте Ваши результаты преподавателю.

Задание 2 (6 баллов). На основании результатов Вашего эксперимента идентифицируйте органоиды во **Фракциях А, В и С** и ответьте на вопросы в **Таблице 2** в **Листе ответов**.

Задание 3 (5 баллов). Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера оптическая плотность раствора зависит от концентрации растворенного вещества следующим образом: $D = \epsilon \times l \times C$, где **D** – это оптическая плотность раствора при определенной длине волны, **ϵ** – коэффициент молярной экстинкции данного вещества (оптическая плотность раствора с концентрацией 1 М), **l** – длина оптического пути в см, а **C** – молярная концентрация данного вещества.

Коэффициент молярной экстинкции окрашенного продукта ферментативной реакции в одной из полученных фракций при длине волны « λ » равен $15000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Длина оптического пути в спектрофотометрической кювете при измерении оптической плотности составляет 1 см. Условия проведения опыта совпадали с условиями, предложенными Вам в **Задании 1**. Оптическая плотность раствора при данной длине волны « λ » в начале реакции равнялась 0,05 единиц оптической плотности, а через 5 минут инкубации составила 0,8 единиц оптической плотности. Рассчитайте концентрацию окрашенного продукта в начале и в конце реакции (**2 балла**) и значение удельной активности фермента (в мкмоль/мин на 1 мг белка) (**3 балла**). Ответы внесите в **Лист ответов**.

Шифр _____ Итого: _____

ЛИСТ ОТВЕТОВ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Задание 1. (9 баллов)

№№ опытов	Смесь №	Фракция	Результат, наблюдаемые изменения, протекающая реакция
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Задание 2 (6 баллов)

	Фракция А – это _____	Фракция В – это _____	Фракция С – это _____
Маркерный фермент, определяемый в Вашем эксперименте			
Другие ферменты, присутствующие в данном органоиде			
Большинство белков данного органоида синтезируется в цитоплазме (да/нет)			
Функции, выполняемые данным органоидом			

Задание 3 (5 баллов).

Концентрация продукта реакции в начале эксперимента составляет

_____ мкМ, а в конце эксперимента _____ мкМ (2 балла)

Удельная активность фермента составляет:

_____ мкмоль/мин на 1 мг белка (3 балла)