

Фамилия \_\_\_\_\_  
Имя \_\_\_\_\_  
Регион \_\_\_\_\_  
Шифр \_\_\_\_\_

Шифр \_\_\_\_\_  
Рабочее место № \_\_\_\_\_  
Итого баллов \_\_\_\_\_

**ЗАДАНИЕ**  
**практического тура заключительного этапа**  
**XXXI Всероссийской олимпиады школьников по биологии 2015 г.**  
**г. Саранск**

**АНАТОМИЯ, ЭВОЛЮЦИЯ И СИСТЕМАТИКА РАСТЕНИЙ**

**Цель работы:** изучить строение стелы на поперечных срезах растительных объектов, назвать их типы и выявить наиболее эволюционно продвинутый вариант развития стелы.

**Оборудование и объекты исследования:** микроскоп, предметные и покровные стекла, лезвие, препаровальные иглы, раствор флороглюцина, концентрированная соляная кислота, фильтровальная бумага, кусочки пенопласта, стакан с водой, растительный объект для приготовления временного препарата (А) и постоянные препараты (Б,В,Г).

**Ход работы:**

1. Сделайте поперечный срез предложенного из Вам объекта (А). Приготовьте временный микропрепарат, соблюдая правильную методику приготовления среза и технику работы с микроскопом (вашу работу оценивают!).

2. Окрасьте препарат флороглюцином. Качество приготовления среза проконтролируйте с помощью микроскопа. Когда препарат будет готов, поднимите руку для оценивания качества приготовленного Вами среза.

Техника приготовления среза – 2 балла

Качество среза – 3 балла

3. Зарисуйте временный препарат ( А) и обозначьте его структуры, соединив линией название структурного элемента с его местонахождением на срезе.

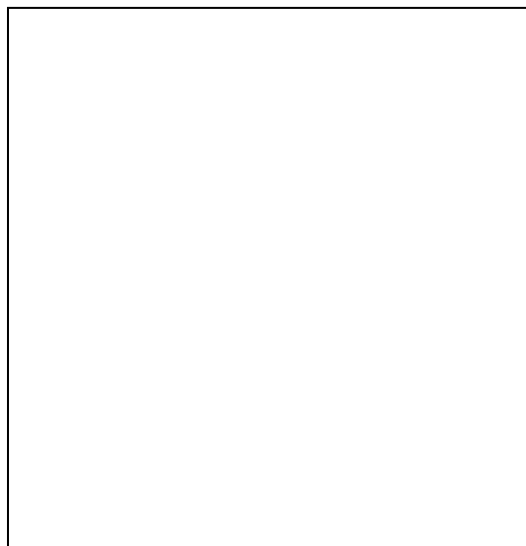
Протоксилома

Первичная ксилема

Метаксилема

Вторичная флоэма

Эпидермис



Эндодерма

Перицикл

Вторичная ксилема

Паренхима клеток коры

Качество рисунка и обозначения – 4 балла

4. На основе анализа анатомической структуры назовите тип стелы (в зависимости от взаимного расположения ксилемы и флоэмы, характерной для данного растения), используя для этого схему возможных эволюционных взаимоотношений стелы (см. рис. на обороте). Выпишите название типа стелы и укажите соответствующих № по рисунку.

Тип стелы (временный препарат А): \_\_\_\_\_ № на рис.

1 балл

5. Определите систематическое положение растения. - 1 балл

Отдел \_\_\_\_\_

6. Рассмотрите готовые препараты (БВГ), определите тип стелы каждого из объектов и их систематическое положение. 6 баллов

Тип стелы (постоянный препарат Б) - \_\_\_\_\_ № на рис.

Отдел \_\_\_\_\_

Тип стелы (постоянный препарат В)- \_\_\_\_\_ № на рис.

Отдел \_\_\_\_\_

Тип стелы (постоянный препарат Г) \_\_\_\_\_ № на рис.

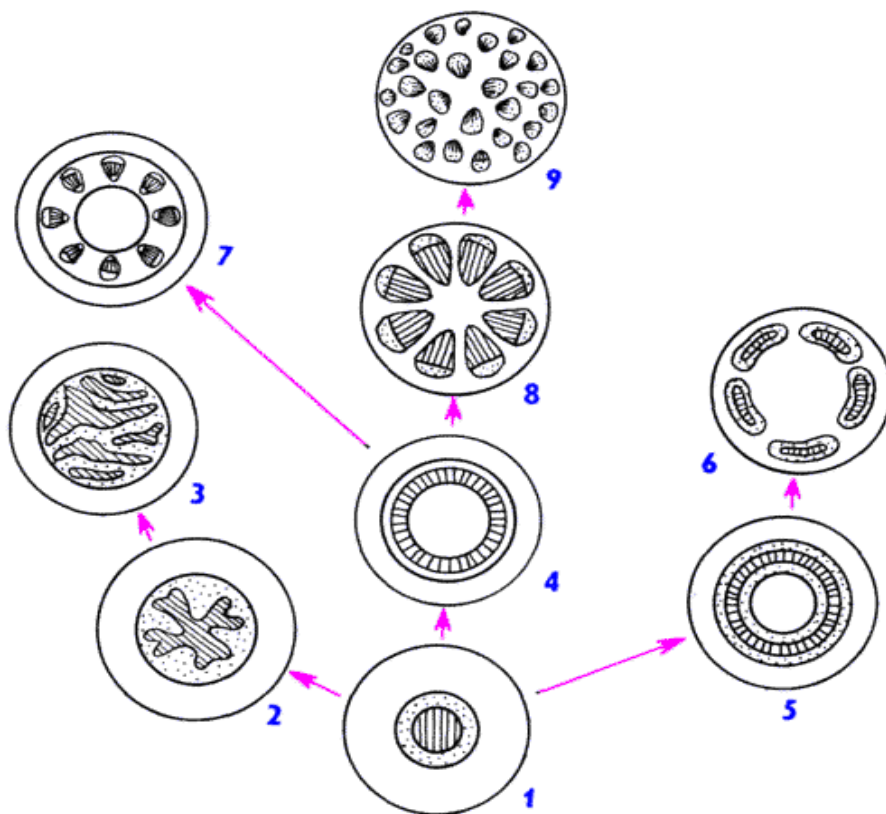
Отдел \_\_\_\_\_

7. Сравните временный препарат А с готовыми препаратами Б, В, Г. Решите, какой вариант/ты развития стелы является наиболее эволюционного продвинутым в схеме Тахтаджяна. Ответ обоснуйте (3 балла).

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**Схема эволюции стелы (по Тахтаджяну)**

Штриховкой показана ксилема, точками - флоэма

1 – Протостела (Псилотовые, на ранних стадиях – у других групп); 2 – Актиностела (Псилотовые, Плауновидные); 3 – Плектостела (Плауновидные); 4 – Эктофлойная сифоностела (на ранних стадиях – Папоротникообразные); 5 – Амфифлойная сифоностела (у некоторых Папоротникообразных); 6 – Диктиостела (на поздних стадиях – Папоротникообразные); 7 – Артостела (Хвощевидные); 8 – Эустела (Двудольные); 9 – Атактостела (Однодольные).

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

**ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ**

Синаптическая передача – центральное явление в функционировании нервной системы, включает в себя целый каскад событий, запускаемый деполяризацией на пресинаптическом окончании, приводящих к возникновению локального постсинаптического потенциала (ПСП) на постсинаптической клетке. В случае химической передачи сигнала ключевым событием является экзоцитоз везикул с медиатором, запускаемый повышением концентрации кальция в цитозоле пресинапса. В этом задании Вам предстоит изучить некоторые из этих процессов.

**Задание 1. Изменение внутриклеточной концентрации кальция. (7 баллов)**

Кальций – важнейший вторичный посредник, участвующий в экзоцитозе, мышечном сокращении, апоптозе и многих других процессах. Для внутриклеточной регистрации концентрации кальция используются различные методы. Ранее популярным был пэтч-кламп с кальций-чувствительным электродом, однако, в последнее время, его вытеснили кальций-чувствительные флуоресцентные зонды, к которым относятся производные ВАРТА, флуоресцина и родамина, а также пептидные сенсоры (GCaMP). Вашему вниманию предлагаются 6 фильмов, в которых происходила электрическая стимуляция возбудимых клеток, предварительно загруженных производным флуоресцина – Fluo-5F.

Видеофайл 1a. Культура нейронов гиппокампа мыши.

Видеофайл 1b. Культура нейронов гиппокампа мыши после нанесения раствора нифедипина (избирательный блокатор Са-каналов L-типа).

Видеофайл 1c. Кардиомиоцит мыши. Электрическая стимуляция.

Видеофайл 1d. Кардиомиоцит мыши после нанесения раствора нифедипина (избирательный блокатор Са-каналов L-типа). Электрическая стимуляция.

Видеофайл 1e. Кардиомиоцит мыши без электрической стимуляции.

Видеофайл 1f. Три кардиомиоцита мыши.

Просмотрите видеофайлы **1a – 1d** и ответьте на вопросы **1.2 – 1.4**.

**1.1. Какие белки участвуют в увеличении концентрации кальция в цитозоле нервной клетки? (1,6 балла)**

А. Кальциевые каналы плазматической мембраны.

Б. Кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума.

В. Кальциевый насос плазматической мембраны.

Г. Кальциевый насос эндоплазматического ретикулума.

Д. Кальциевый насос мембраны митохондрии.

Е. Натрий/кальциевый антипортер плазматической мембраны.

Ж. Натрий/кальциевый антипортер эндоплазматического ретикулума.

З. Натрий/кальциевый антипортер мембраны митохондрии.

**1.2. Какие белки участвуют в понижении концентрации кальция в цитозоле нервной клетки? (1,6 балла)**

- А. Кальциевые каналы плазматической мембраны.
- Б. Кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума.
- В. Кальциевый насос плазматической мембраны.
- Г. Кальциевый насос эндоплазматического ретикулума.
- Д. Кальциевый насос мембраны митохондрии.
- Е. Натрий/кальциевый антипортер плазматической мембраны.
- Ж. Натрий/кальциевый антипортер эндоплазматического ретикулума.
- З. Натрий/кальциевый антипортер мембраны митохондрии.

**1.3. Для приведенных экспериментов (1а – 1ф) к суспензии клеток был добавлен ацетометоксиэфир Fluo-5F (Fluo-5F AM, см Приложение). Клетки инкубировали с ним в течение 30 минут, после чего их промыли раствором Рингера и микроскопировали. В приложении Вам предлагается формула Fluo-5F и Fluo-5F AM. Эфирные связи в цитозоле могут быть расщеплены эстеразами. Какие из приведенных относительно этого эксперимента утверждений являются верными? (1,2 балла)**

- А. Мембрана клеток проницаема для Fluo-5F.
- Б. Интенсивность флуоресцентного сигнала в клетке в покое зависит только от концентрации кальция в цитозоле.
- В. Интенсивность флуоресцентного сигнала в клетке в покое в основном зависит от активности эстераз.
- Г. Fluo-5F преимущественно накапливается в эндоплазматическом ретикулуме.
- Д. Если бы к клеткам был добавлен хелатор кальция ВАРТА AM, который не флуоресцирует в видимой области спектра, то интенсивность флуоресцентного сигнала была бы ниже.
- Е. Если бы не проводили отмывку, то в эксперименте была бы высокая интенсивность флуоресценции вне клеток.

**1.4. Какие выводы можно сделать, исходя из результатов этого эксперимента? (1,6 балла)**

- А. В нейронах присутствуют Ca-каналы L-типа.
- Б. В нейронах отсутствуют Ca-каналы L-типа.
- В. В кардиомиоцитах присутствуют Ca-каналы L-типа.
- Г. В кардиомиоцитах отсутствуют Ca-каналы L-типа.
- Д. В нейронах присутствуют Ca-каналы, отличные от L-типа.
- Е. В нейронах отсутствуют Ca-каналы, отличные от L-типа.
- Ж. В кардиомиоцитах присутствуют Ca-каналы, отличные от L-типа.
- З. В кардиомиоцитах отсутствуют Ca-каналы, отличные от L-типа.

**1.5. Просмотрите видеофайла 1е и 1ф. Какие выводы можно сделать исходя из этих наблюдений? (1 балл)**

- А. Кардиомиоциты способны самостоятельно генерировать потенциалы действия.
- Б. Кардиомиоциты в культуре способны формировать синапсы.
- В. Только небольшой участок мембраны/цитоплазмы способен генерировать локальные кальциевые волны.
- Г. Наблюдаемые вами локальные кальциевые волны обладают всеми свойствами потенциала действия.
- Д. В данном эксперименте анализировали клеточную суспензию кардиомиоцитов.

## Задание 2. Изучение экзоцитоза синаптических везикул. (8 баллов)

Синаптобревин – трансмембранный везикулярный белок. В этом эксперименте клетки гиппокампа мыши, растущие в культуре, трансфицировали плазмидой, содержащей ген синаптобревина, конъюгированного с флуорин (pHluogin) – pH-чувствительным флуоресцентным белком. При pH 5,5 и ниже флуорин не флуоресцирует, а при pH 6 и выше – начинает интенсивно флуоресцировать в зеленой области спектра. Первичная структура синаптобревина приведена на рисунке ниже:



### 2.1. Какие утверждения о синаптобревин-флуорине верны? (1,2 балла)

А. Если конъюгировать флуорин с N-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция будет расти.

Б. Если конъюгировать флуорин с N-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция будет уменьшаться.

В. Если конъюгировать флуорин с N-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция не изменится.

Г. Если конъюгировать флуорин с C-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция будет расти.

Д. Если конъюгировать флуорин с C-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция будет уменьшаться.

Е. Если конъюгировать флуорин с C-концом синаптобревина, то при экзоцитозе флуоресценция не изменится.

В видеофайле 2 содержится запись эксперимента, в котором клетки, описанные выше, подвергались электрической стимуляции. После этого в клеткам был добавлен хлорид аммония. В финальной части эксперимента добавлялся MES-буфер (pH-5.0).

### 2.2. Какие из приведенных относительно этого эксперимента утверждений являются верными? (0,8 балла)

А. Электрическая стимуляция приводит к слиянию незначительной доли синаптических везикул.

Б. Компенсаторный эндоцитоз осуществляется в течение 100 – 200 мсек.

В. Хлорид аммония стимулирует экзоцитоз синаптических везикул.

Г. MES-буфер стимулирует компенсаторный эндоцитоз.

2.3. Как изменилась бы интенсивность флуоресценции в эксперименте, если бы к клеткам добавили 300 мМ раствор хлорида калия? Ответ поясните. (2 балла)

2.4. На рисунке 2.4. в листе ответов изображена интенсивность флуоресценции отдельного взятого региона в ходе эксперимента. Отметьте на графике суммарную флуоресценцию всего синаптобревина в клетке (СС), поверхностного пула синаптобревина (ПС) и внутриклеточного синаптобревина (ВС). (2 балла).

2.5. Изобразите, как бы выглядел график интенсивности флуоресценции, если бы схожий эксперимент проходил в бескальциевом растворе. (2 балла)

### **Задание 3. Разнообразие строения синапсов. (5 баллов)**

На рисунке 2 (см. Приложение) изображены электронные микрофотографии препаратов гиппокампа и сердца, содержащие синапсы.

#### **3.1. На каких картинках изображены синапсы кардиомиоцита? (0,8 балла)**

#### **3.2. По каким характерным признакам синапсов кардиомиоцитов вы это определили? (1,4 балла)**

- А. Более широкая синаптическая щель в химическом синапсе.
- Б. Варикозные расширения пресинаптической мембраны.
- В. Наличие везикул.
- Г. Уплотнение постсинаптической мембраны.
- Д. Большая площадь контакта в электрическом синапсе.
- Е. Наличие астроцитов.
- Ж. Наличие сквозных межклеточных каналов, окруженных мембраной (синцития)

#### **3.3. С какими свойствами кардиомиоцита связаны данные особенности их синапсов? (1,8 балла)**

- А.  $Ca^{2+}$  для активации сократительного аппарата выделяется только из саркоплазматического ретикулума.
- Б. Потенциал действия приводит к деполяризации мембраны саркоплазматического ретикулума и к выходу из него  $Ca^{2+}$
- В. Т-трубочки развиты слабо, поэтому дигидропиридиновые рецепторы расположены в основном в саркоплазматическом ретикулуме.
- Г. В нейроне электромеханическое сопряжение быстро нарушается при удалении  $Ca^{2+}$  из наружной среды, а в сердечной сравнительно устойчиво к такому воздействию.
- Д. В кардиомиоцитах основной мишенью  $Ca^{2+}$  является белок кальмодулин.
- Е. Скорость передачи возбуждения с нерва на кардиомиоцит ниже.
- Ж. Длительность нахождения медиатора в щели больше.
- З. Передача осуществляется через рецепторы канального типа.
- И. Для осуществления эффекта аксон может иннервировать не все кардиомиоциты.

#### **3.4. Какие белки можно обнаружить в классическом электрическом синапсе кардиомиоцита? (1 балл)**

- А. Синаптобrevин.
- Б. Коннексин.
- В. Никотиновый холинорецептор.
- Г. Переносчик глутамата.
- Д. Клатрин.

*Желаем удачи!!!*

Шифр \_\_\_\_\_

Рабочее место \_\_\_\_\_

Итого: \_\_\_\_\_

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

**ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ**

**ЛИСТ ОТВЕТОВ**

**ЗАДАНИЕ 1. (7 БАЛЛОВ)**

--

1.1.	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
1.2.	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
1.3.	А	Б	В	Г	Д	Е		
1.4.	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
1.5.	А	Б	В	Г	Д			

**ЗАДАНИЕ 2. (8 БАЛЛОВ)**

--

2.1.	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З
2.2.	А	Б	В	Г				

**2.3.**

--

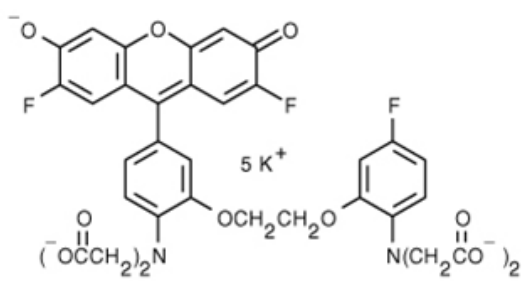




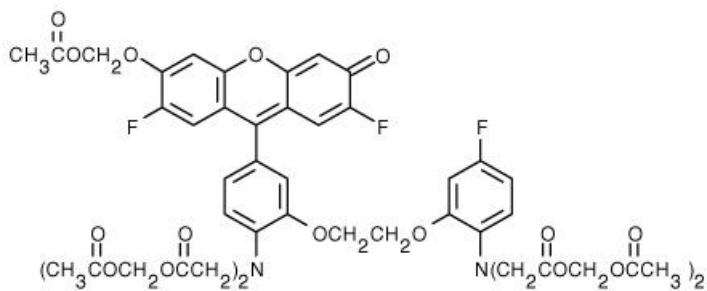
# ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Рисунок 1

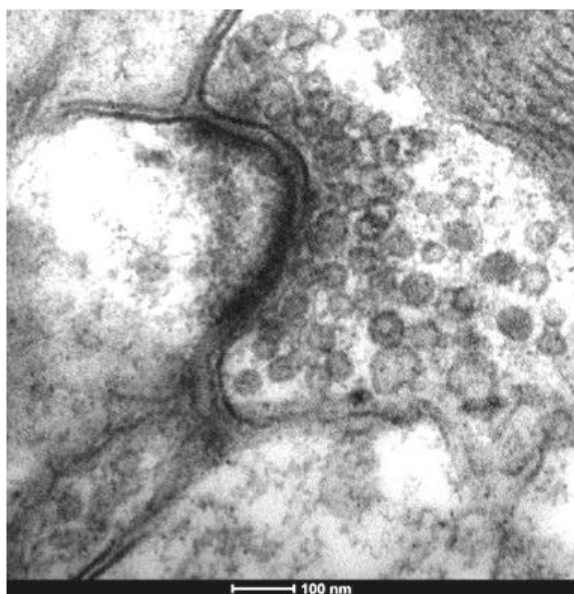


Fluo-5F

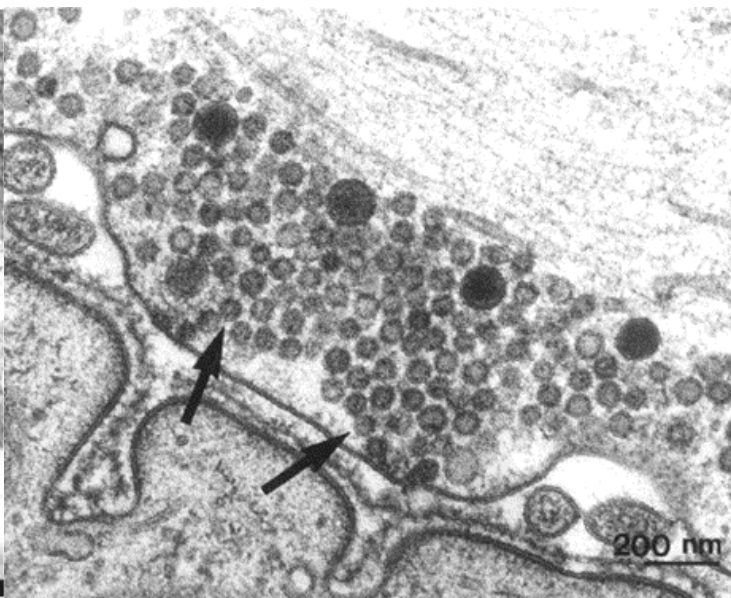


Fluo-5F AM

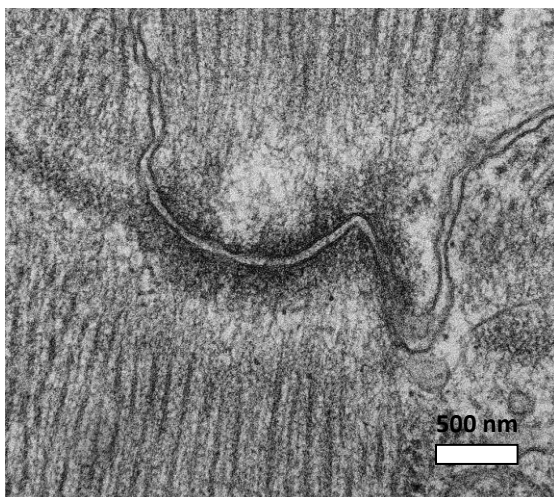
### Рисунок 2



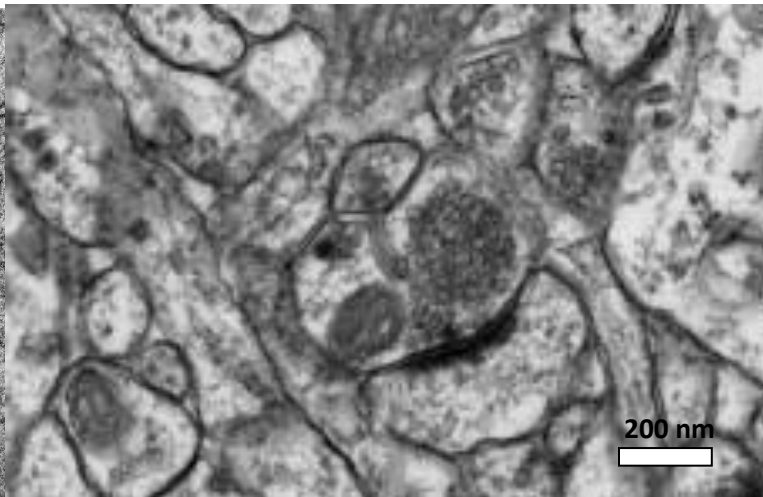
А



Б



В



Г

**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,  **$\epsilon$**  – 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 « $\lambda$ » 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 « $\lambda$ » 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)**

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

**Задание 2 (6 баллов)**

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

**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)

**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 *prr* кишечной палочки участвует в защите от штаммов бактериофага T4, не имеющих РНК-лигазы. При этом ген *prrC* кодирует нуклеазу, разрезающую антикодovou петлю лизиновой тРНК *E. coli*, а ген кодирует белок *prrB*, связывающий белок TAF бактериофага T4. Ответьте на вопросы, посвященные системе *prr*, 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 важное 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).

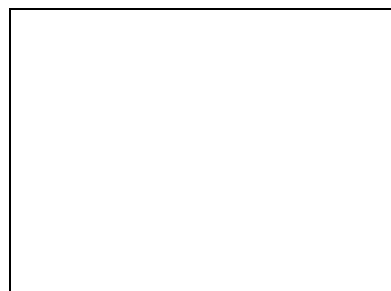
2.2 Когда определенный штамм бактериофага выращивают на определенном штамме бактерий, заражение клеток фагом идет с высокой эффективностью, однако если этим же фагом инфицировать другой штамм, эффективность заражения падает на несколько порядков. Кратко объясните, почему. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (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)