

Country Code: _____

Student Code: _____

21 МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

11 – 18 июля 2010 года

Чангвон, КОРЕЯ



Практический тест 3
ГЕНЕТИКА И БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Общее число баллов: 50

Продолжительность: 90 минут

Дорогие участники,

- ☺ В этом тесте вам предоставляются следующие 2 задания:

Задание I (35 баллов)

- 1) **Изучение зависимой от промотора регуляции экспрессии гена.** (20 баллов)
- 2) **Генетическая характеристика взаимоотношения генотипа и фенотипа.** (15 баллов).

Задание II: Наблюдение мейотических клеток в фиксированных пыльниках ржи. (15 баллов)

- ☺ Вписывайте ваши результаты и ответы в **Лист Ответов. Ответы, вписанные в текст задания с вопросами, рассматриваться не будут.**
- ☺ Убедитесь, пожалуйста, что вам предоставлены все необходимые материалы для каждого задания. При отсутствии какого-либо предмета поднимите, пожалуйста, руку.
- ☺ Прекратите давать ответы и отложите ваш карандаш **немедленно** после заключительного звонка. Наблюдатель соберет задания с вопросами и Лист Ответов.

Желаем успеха!!

ГЕНЕТИКА И БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Этот практический тест состоит из 2 заданий

Задание I. (35 баллов)

(1) Изучение зависимой от промотора регуляции экспрессии гена

(2) Генетическая характеристика взаимоотношения генотипа и фенотипа

Это задание состоит из 2 частей.

Материалы и Оборудование

На каждом столе находятся

1. Флюороспектрофотометр
2. Микроцентрифужные пробирки (Эппендорфы), содержащие по 50 $\mu\text{л}$ каждого из девяти растительных экстрактов, подписанных по-разному. Для каждого типа экстрактов предоставляется по две идентичные пробирки ($2 \times 9 = 18$ пробирок). Прозрачные пробирки используются для измерения концентрации белка, а черные для измерения флюоресценции.

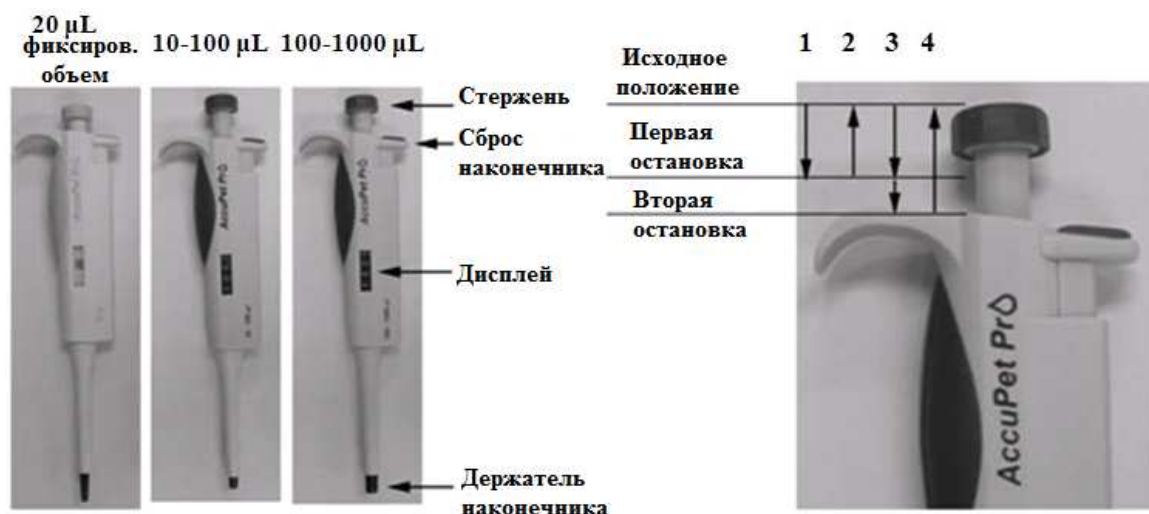
Этикетка	Обработка	Этикетка	Обработка
WT-0 контроль	Растение WT + дистиллированная вода		
WT-1	Растение WT + 1 μM гормона Н	WT-100	Растение WT + 100 μM гормона Н
dA-1	Растение dA + 1 μM гормона Н	dA-100	Растение dA + 100 μM гормона Н
dAB-1	Растение dAB + 1 μM гормона Н	dAB-100	Растение dAB + 100 μM гормона Н
dABC-1	Растение dABC + 1 μM гормона Н	dABC-100	Растение dABC + 100 μM гормона Н

3. 12 мл реактива Брэдфорд в пластиковой пробирке объемом 15 мл (Реактив Брэдфорд используется для определения концентрации белка)
4. 1 мл 1 mM MUG (флуоресцентный субстрат для определения активности GUS) в микроцентрифужной пробирке
5. 12 мл стоп-раствора для GUS - фермента β -глюкуронидазы, превращающей MUG в MU) в пластиковой пробирке объемом 15 мл
6. Две пробирки с маркерами размера ДНК (подписанные M, по 50 μ л каждая) и восемь пробирок, содержащих ДНК, разрезанную рестриктазой *EcoRI* (подписанные P1~P8, по 50 μ л каждая)
7. Две микроцентрифужные пробирки, подписанные GUS BL и Pro BL, соответственно.
8. Три микропипетки (по одной для объемов 10-100 μ л и 100-1000 μ л, и одна с фиксированным объемом 20 μ л)
9. Коробка с желтыми наконечниками для микропипеток объемом 20 μ л и 10-100 μ л.
10. Коробка с голубыми наконечниками для микропипетки объемом 100-1000 μ л.
11. Аппарат для электрофореза ДНК, оснащенный 1% агарозным гелем в 1X TAE электрофорезном буфере. Если ваш гель поврежден, поднимите руку и позовите ассистента.
12. Контейнер для отработанных наконечников
13. Резиновые перчатки
14. 25 кювет для флюороспектрофотометра
15. Калькулятор
16. Таймер
17. Клейкая лента
18. Ведерко для льда, наполненное льдом
19. Штатив для микроцентрифужных пробирок
20. Зеленая карточка

На общем столе находится

1. Система для документации геля, оснащенная источником УФ- света

Обращение с микропипетками



Установка объема:

Поверните стержень для установления необходимого объема, который виден в окошке дисплея. Помните, что каждая пипетка предназначена для определенного объема, как указано на ней. Не выходите за границы этого объема.

Применение:

- 1) Наденьте наконечник на пипетку. Мягко нажмите поршень до первой остановки.
- 2) Опустите наконечник в раствор на глубину 2~4 мм. Медленно отпустите поршень и дайте ему вернуться в начальное положение.
- 3) Выньте пипетку из жидкости и перенесите ее содержимое в нужную вам пробирку. Нажмите поршень до первой остановки, а затем до второй остановки для полного выхода жидкости из наконечника.
- 4) Выньте пипетку из пробирки и освободите поршень. Сбросьте использованный наконечник в контейнер для отходов, нажимая на стержень сбрасывания наконечника.



Инструкция по пользованию флюороспектрофотометром (измеряет флюоресценцию MU и абсорбцию белков при 595 нм)





- A: держатель кюветы для измерения белка
B: держатель кюветы для измерения флуоресценции MU
FCT: выбор функции
BL: установка нуля
TS: измерение пробы
PWR: включение/выключение

Проведение измерения:

Важно: не дотрагивайтесь до светопропускающих поверхностей кюветы

- 1) Нажмите кнопку PWR (⏻) для включения прибора. Окошко дисплея включается после звукового сигнала.
- 2) Для установления нуля, вставьте кювету с контрольным раствором (см. Примечание) в соответствующую ячейку (для измерения концентрации белка используйте держатель кювет А, а для измерения флуоресценции (активности GUS) держатель кювет В). Индикатор кювет будет показывать соответственно значки  для держателя А и  для держателя В.

Примечание: Вам предоставляется два контрольных раствора в микроцентрифужных пробирках, подписанных GUS BL и Pro BL, соответственно для установки нуля прибора при измерении активности GUS и содержания белка, соответственно.

- 3) Нажмите кнопку BL и после появления на дисплее цифр 0.0 загорится контрольный значок ().
- 4) Для измерения образца, вставьте кювету с образцом в тот же держатель и нажмите кнопку TS. Результат высветится через 5-10 секунд, а в окошке дисплея появиться значок ().
- 5) Для выключения прибора нажмите и не отпускайте кнопку PWR до появления звукового сигнала.

Инструкция пользования аппаратом для гель-электрофореза ДНК

- 1) Внесите образцы пипеткой объемом 20 μ л в лунки для образцов.



- 2) Убедившись, что прибор выключен (выключатель находится в положении OFF), закройте крышку камеры.



Сделайте это следующим образом:

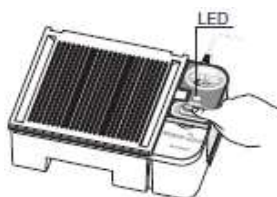
- (1) Вначале вставьте выступы крышки в соответствующие отверстия камеры для электрофореза.
(2) Затем для закрытия крышки поверните ее на себя.



- 3) Установите напряжение на “Half”, используя переключатель.



- 4) Нажмите кнопку включения для начала электрофореза.

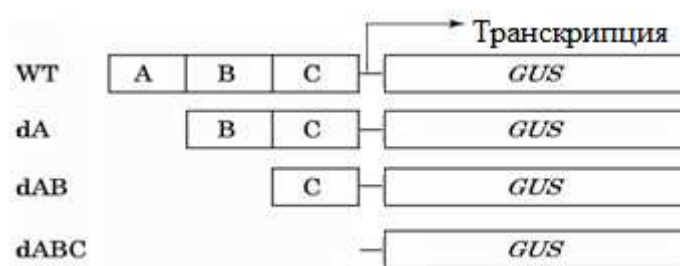


- 5) В этом эксперименте время проведения электрофореза должно составить 30 минут.
После окончания электрофореза выключите прибор (положение OFF).

Часть I. (20 баллов) Использование репортерного гена GUS, слитого с промотором гена X, для анализа влияния гормона на экспрессию гена и характеристика чувствительных к гормону элементов промотора.

Растения отвечают на действие гормонов путем регуляции гормон-чувствительных генов. Внутри промотора гена специфическая последовательность(и) ДНК, т.н. *cis*-элемент, определяет нужное время и уровень экспрессии гена. Регуляция в первую очередь контролируется гормон-чувствительным фактором(ами) транскрипции, который(е) специфически связывается с этим участком, приводя либо к активации, либо к подавлению экспрессии гена.

В этом задании вы будете исследовать гормональную регуляцию гормон-чувствительного гена X растения *Arabidopsis*. Для обнаружения участков, гормон-чувствительных участков (*cis*-элемента(ов)) в промоторе и для понимания механизма гормональной регуляции экспрессии гена X, промотор гена X был разделен на домены A~C (каждый из этих доменов может функционировать как энхансер, сайленсер или минимальный промотор.) Кроме того, были созданы разнообразные трансгенные растения *Arabidopsis*, экспрессирующие репортерный ген GUS (β -глюкуронидазы) под контролем различных участков промотора, как показано на диаграмме ниже. GUS образуется в том случае, если промотор гена X активирован. Фермент GUS превращает MUG в MU и его активность может быть измерена количественным определением MU при помощи флюороспектрофотометра.



< Четыре трансгенных растения *Arabidopsis*, несущие различные репортерные конструкции >

Q1. В первом эксперименте вы должны решить две задачи: (1) обнаружить участок промотора, содержащий чувствительный к гормону *cis*-элемент и (2) исследовать эффект различных концентраций гормона Н на экспрессию репортерного гена. Все трансгенные растения (WT, dA, dAB, и dABC) были обработаны либо 1 μ M, либо 100 μ M гормона Н. Для оценки уровня экспрессии GUS были приготовлены экстракты из обработанных растений (см. таблицу в разделе Материалы и Оборудование).

При помощи метода, описанного в следующем разделе, измерьте уровень флюоресценции и поглощение при 595 нм каждого из растительных экстрактов объемом 50 μ л. Основываясь на этих измерениях, определите содержание MU (в нмолях MU/50 μ л растительного экстракта), количество белка (в μ г/50 μ л растительного экстракта) и рассчитайте активность GUS (в нмолях MU/ μ г белка в мин) для каждого экстракта. Запишите ваши результаты в <Таблицу 1> в листе ответов для получения ответов на вопросы Q1.1, Q1.2 и Q1.3.

Измерение флюоресценции и определение содержания MU

- 1)-1. Включите флюороспектрофотометр и установите нуль, внося в кювету 500 μ л контрольного раствора, подписанного GUS BL.
- 1)-2. Добавьте ко всем растительным экстрактам, находящимся в микроцентрифужных пробирках (каждая пробирка содержит 50 μ л экстракта), приготовленных из контрольного(WT0) и обработанных гормоном трансгенных растений, по 50 μ л 1 мМ раствора MUG и **тщательно перемешайте** путем легкого постукивания. Начинайте с пробирки, помеченной WT-0, и продолжайте в порядке, представленном в таблице Материалы и оборудование.
- 1)-3. Проинкубируйте реакционную смесь при комнатной температуре в течение 10 минут.
- 1)-4. Остановите реакцию добавлением 900 μ л стоп-раствора (1М карбоната натрия в буфере для экстракции GUS) в каждые 100 μ л реакционной смеси в таком же порядке, что и при добавлении MUG.

Смешайте постукиванием.

- 1)-5. Возьмите по 500 μ л получившейся смеси из каждой пробирки и измерьте флюоресценцию при помощи флюороспектрофотометра.

- 1)-6. Определите содержание MU в образце, используя приведенную ниже формулу. Запишите значение флуоресценции и внесите содержание MU в Таблицу 1 в листе ответов. Это количество образуется в каждом из 50 μL растительных экстрактов.

$$Y = 0,04 X + 2,5$$

Y: количество MU (нмоль/ 50 μL экстракта растения).

X: измеренная флуоресценция [из шага 1)-5]

Измерение поглощение при 595 нм и определение содержания белка

- 2)-1. Включите флюороспектрофотометр и выставьте нуль, внося в кювету 500 μL контрольного раствора, подписанного Pro BL.
- 2)-2. Возьмите микроцентрифужную пробирку с экстрактом (каждая пробирка содержит 50 μL экстракта), приготовленным из каждого трансгенного растения, обработанного гормоном, и тщательно смешайте с 950 μL реактива Брэдфорд. Проинкубируйте смесь при комнатной температуре 5 минут.
- 2)-3. Возьмите 500 μL п смеслуженной из каждой пробирки и измерьте абсорбцию при 595 нм при помощи флюороспектрофотометра.
- 2)-4. Определите количество белка по формуле, предоставленной ниже. Запишите значение абсорбции при 595 нм и рассчитайте содержание белка в Таблице 1 в листе ответов. Это количество белка находится в каждом растительном экстракте объемом 50 μL .

$$Y = 98X + 2,8$$

Y: содержание белка ($\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ экстракта растения).

X: измеренное значение абсорбции при 595 нм в растворе [из этапа 2)-3].

Определение активности GUS

- 3)-1. Учитывая, что реакция фермента GUS проводилась в течение 10 минут [сравните с 1)-3], рассчитайте активность GUS в нмолях MU/μг белка в мин и запишите величину в Таблицу 1 в листе ответов.

Таблица 1 будет оценена в 9 баллов.

- Q1.1.** (4 балла) Основываясь на ваших результатах из <Таблицы 1>, внесите знак (✓) в соответствующую клетку для каждого растения в Таблице Q1.1 в листе ответов.

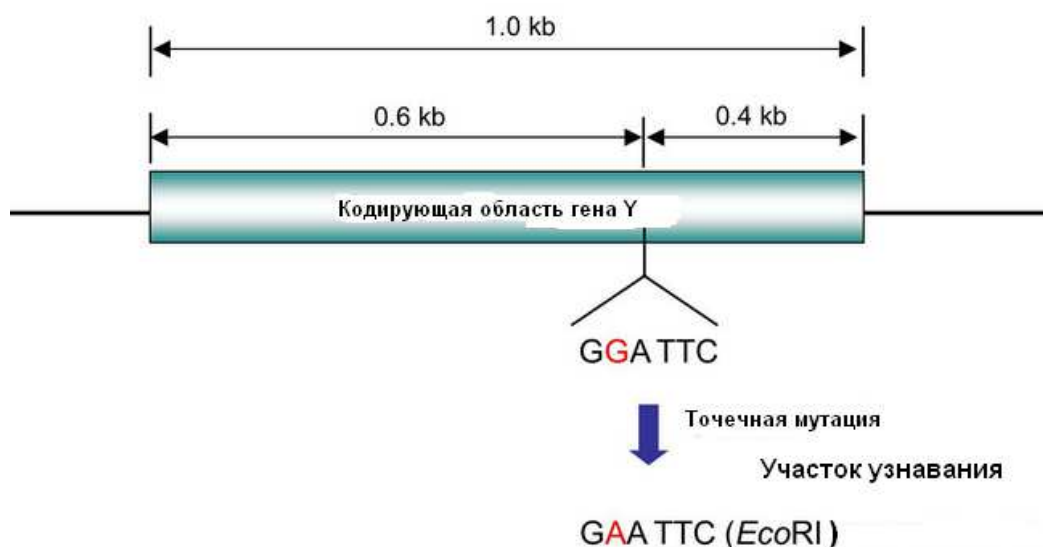
Примечание: - стимуляция: возрастание экспрессии гена X более чем в **3 раза**
- нет влияния: возрастание экспрессии гена X менее чем в **3 раза**

- Q1.2.** (6 баллов = 2×3) На основании сделанных вами ранее выводов в вопросе Q1.1 определите регуляторную функцию (энхансер, сайленсер или минимальный промотор) каждого *cis*-элемента (A~C). Отметьте знаком (✓) соответствующую клетку в Таблице Q1.2 в листе ответов.

- Q1.3.** (1 балл) Каким образом гормон H в концентрации 100 μM регулирует экспрессию гена X? Основываясь на результатах из <Таблицы 1>, определите образ действия гормона H. Внесите знак (✓) в соответствующую клетку в Таблице Q1.3 в листе ответов.

Часть II. (15 баллов) Анализа взаимосвязи между генотипом и фенотипом и предсказание частоты аллелей гена с использованием уравнения Харди-Вайнберга.

Q2. Ген *Y* кодирует белок, регулирующий рост растения. На представленной ниже схеме изображен кодирующий участка гена *Y* и происшедшая внутри него точечная мутация.



Имеется восемь растений как с гомозиготным (*YY* или *yy*) так и гетерозиготным (*Yy*) генотипом, проявляющих как дикий, так и карликовый (низкорослый) фенотипы (*Y*: аллель дикого типа, *y*: мутантный аллель. Эти обозначения *Y* и *y* не указывают на то, какой из аллелей не является доминантным.). Для анализа генотипа этих растений кодирующий участок гена *Y* величиной 1 kb был амплифицирован при помощи ПЦР. Затем этот фрагмент был обработан рестрикционным ферментом *EcoRI*, который разрезает узнаваемую последовательность GAATTC. В гене *Y* нет других сайтов узнавания рестриктазой *EcoRI*, кроме сайта, который появился в результате этой мутации. Проведите по предоставленному ниже протоколу гель-электрофорез продуктов ПЦР, обработанных *EcoRI*. Е

Генотипирование гена *Y* при помощи электрофореза

Примечание: Во время этого эксперимента работайте только в перчатках !!!

- (1) Вам предоставляется десять пробирок для микроцентрифуги: две пробирки с маркерами размера ДНК (М) и восемь пробирок, содержащих обработанные *EcoRI* продукты ПЦР из растений 1~8 (Р1~Р8, соответственно). Двигаясь слева направо в порядке М, Р1-Р8, и снова М, внесите по 20 μ л из 50 μ л раствора ДНК из каждой пробирки в каждую лунку в готовом агарозном геле в приборе для электрофореза. Используйте микропипетку объемом 20 μ л. Используйте для каждой пробы новый наконечник.

Раствор с маркерами размера ДНК содержит фрагменты ДНК длиной 0,4; 0,6 и 1,0 kb. Буфер для нанесения ДНК и краситель для ДНК уже находятся в каждой пробирке.

- (2) Следуйте инструкции по пользованию прибором для гель-электрофореза ДНК для закрывания прибора, включения прибора и проведения электрофореза.

Начиная электрофорез, убедитесь, что прибор включен (индикатор LED горит) и на платиновых электродах образуются пузырьки газа.

- (3) Проводите электрофорез в течение 30 минут при напряжении "Half".

* ВНИМАНИЕ: Во время хода электрофореза выполняйте ЗАДАНИЕ II !!!
--

- (4) Выключите прибор. Затем поднимите зеленую карточку для того, чтобы была сделана фотография агарозного геля.

**Ассистент предоставит вам коробку для переноса геля. Убедитесь, что она подписана вашим кодом студента.

- (5) Когда вы получите фотографию агарозного геля, прикрепите ее в соответствующее место Q2.1 в листе ответов при помощи клейкой ленты. Подпишите номера каждого растения (Р1- Р8) над каждой дорожкой фотографии геля.
- (6) В Таблице Q2.2 в листе ответов поставьте знаки (\checkmark) для обозначения размера фрагментов ДНК и генотипов каждого растения.

- Q2.1.** (3 балла) Прикрепите рисунок агарозного геля не здесь, а в соответствующем месте в листе ответов. Подпишите номер каждого растения P1-P8 над каждой дорожкой снимка агарозного геля
- Q2.2.** (4 балла = 0.5×8) Определите размер фрагментов ДНК и генотипы (YY, Yy или yy) каждого растения. Поставьте знак (✓) в соответствующей клетке в Таблице Q2.2 в листе ответов.
- Q2.3.** (2 балла) Основываясь на генотипе и фенотипе каждого растения, данного в Q2.2, предположите характер мутации. Внесите знак (✓) соответствующую клетку в Таблице Q2.3 в листе ответов.
- Q2.4.** (2 балла) Если скрестить Растение 1 с Растением 3 (из Q2.2), какова вероятность (%), что в потомстве будут карликовые растения? Запишите ваш ответ в лист ответов.
- Q2.5.** (4 балла = 2×2) Восемь растений из Q2.2 представляют собой популяцию. Если эта популяция в следующем поколении образует 10,000 растений, какого количества гетерозиготного и карликового потомства можно ожидать, соответственно? (Считайте, что эта популяция удовлетворяет условиям применимости формулы Харди-Вайнберга.)

ЗАДАНИЕ II. (15 баллов) Наблюдение мейотических клеток в фиксированных пыльниках ржи

< Материалы и инструменты>	Количество
1. Световой микроскоп с объективами 4X, 10X, 40X и 100X	1
2. Фиксированные пыльники ржи в пузырьке	2
3. Набор препаровальных игл	1
4. Предметное и покровное стекла	по 5 каждого
5. Фильтровальная бумага (диаметром 7 см)	3
6. Пинцет	1
7. Керамическая плитка	1
8. Чашка Петри (диаметром 6 см)	1
9. Капельница с раствором ацетокармина	1
10. Карандаш	1
11. Ластик	1
12. Одноразовая пластиковая пипетка	1
13. Красная карточка	

< Объяснение>

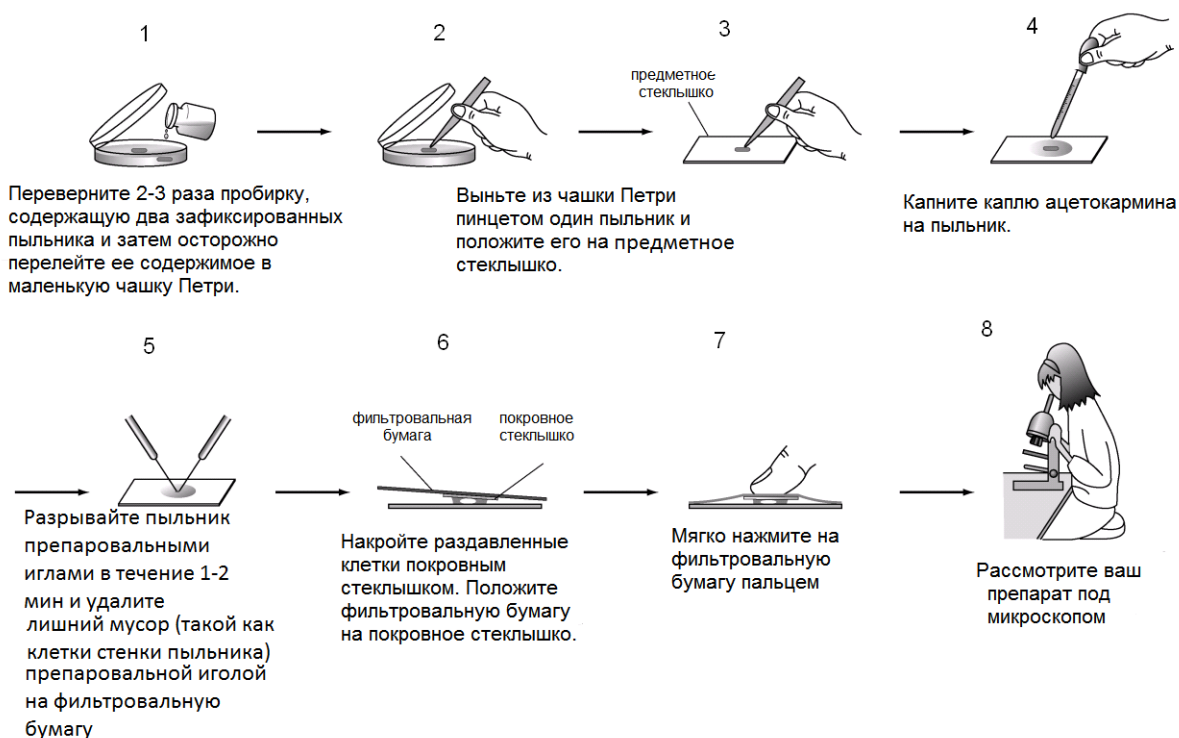
Вы будете наблюдать при помощи светового микроскопа мейотические клетки в фиксированных пыльниках ржи. Пыльники были выбраны на определенной фазе мейоза и зафиксированы 70% этанолом.

< Задание- Предварительный обзор >

- (1) Найдите при помощи микроскопа клетки пыльника, в которых происходит мейоз. На отведенном для этого месте в листе ответов нарисуйте мейотическую клетку, наблюдаемую вами при увеличении в 400 раз (Q3.2)

< Ход работы>

- (1) Убедитесь перед началом работы, что в пузырьке находятся два маленьких зафиксированных пыльника.
- (2) Возьмите с подноса керамическую плитку и положите на нее предметное стекло.
- (3) Далее следуйте указаниям, приведенным на картинке ниже. Рассмотрите полученный препарат под микроскопом при увеличении в 100 раз и найдите по крайней мере одну клетку, находящуюся на одной из стадий мейоза. Затем рассмотрите эту клетку при увеличении в 400 раз и сделайте зарисовку на предоставленном пространстве в листе ответов (Q3.2). Убедитесь, что эта клетка находится в центре поля зрения микроскопа. После того как вы закончите рисовать, поднимите красную карточку. К вам подойдет ассистент и сделает фотографию вашего препарата под микроскопом.



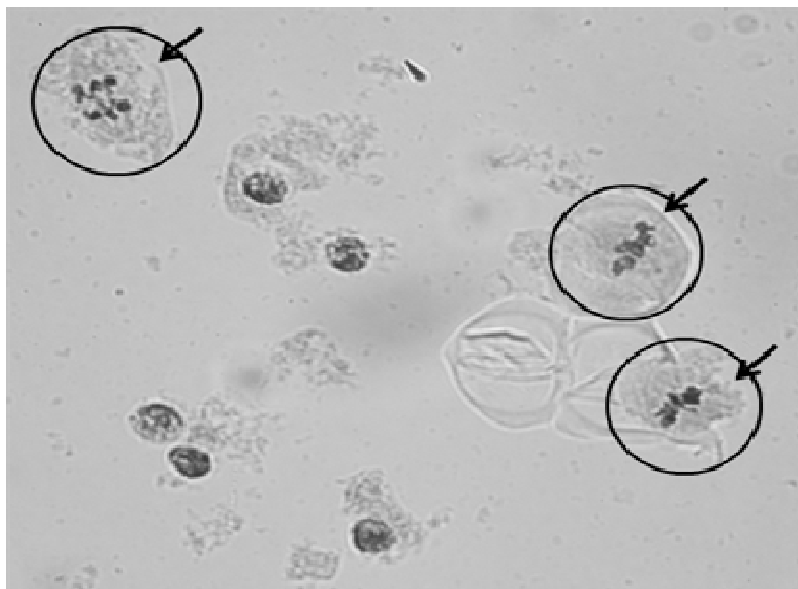
< Процедура получения препарата и наблюдения мейотических клеток в фиксированных пыльниках >

Примечания:

1. На стадии (1) если вам не удалось вылить пыльники в чашку Петри, верните часть раствора в сосуд с помощью одноразовой пластиковой пипетки и повторите стадию (1).
2. Будьте внимательны, чтобы не разрушить пыльцевой мешок на стадии (2).
3. Для удаления избытка 70% спирта на стадии (3) вы можете использовать фильтровальную бумагу.
4. На стадии (7) не нажимайте на покровное стеклышко слишком сильно, чтобы не раздавить клетки и/или покровное стеклышко.
5. Вам дается два пыльника для приготовления вашего препарата. Если вам не удалось сделать хороший препарат с первым пыльником, повторите пожалуйста процедуру, используя второй пыльник. Однако имейте в виду, что время для вашего эксперимента ограничено.

Q3. Ответьте на следующие вопросы.

***Важно:** Вы увидите под микроскопом два типа клеток, как показано на Рисунке Q3. Обозначенные кружком клетки осуществляют мейоз, в то время как остальные клетки являются клетками стенок пыльника.



400X

Рисунок Q3. Примеры клеток, осуществляющих мейоз,
наблюдаемых под микроскопом

Q3.1. (1 балл) В каких клетках осуществляется мейоз? Отметьте знаком (✓) правильную клетку в листе ответов.

Q3.2. (8 баллов) Нарисуйте одну клетку, осуществляющую мейоз при увеличении в 400 раз, в листе ответов. Не делайте подписей к рисунку.

Важно: эта клетка должна находиться во время зарисовки в центре поля зрения микроскопа.

Q3.3. (4 балла) На какой стадии мейоза находятся клетки? Отметьте знаком (✓) правильную клетку в листе ответов.

Q3.4. (2 балла) Какое количество ДНК находится в клетках, осуществляющих мейоз, которые вы наблюдали под микроскопом, и в клетках стенки пыльника, соответственно? Отметьте знаком (✓) правильную клетку в листе ответов.