

ЗАДАНИЯ
практического тура XXVIII Всероссийской олимпиады школьников
по биологии. Оренбург – 2012 год. 11 класс

ЛАБОРАТОРИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

Обратите внимание, что все Ваши ответы нужно вносить на
Лист Ответов, рисунки к заданиям в цветном исполнении приведены
отдельно на Листе Рисунков.

Задание 1. Приготовление и анализ препарата хромосом из слюнных желез личинки хирономиды.

Поместите на первое предметное стекло каплю физраствора. Достаньте с помощью препаровальных игл из чашки Петри личинку хирономиды и поместите её в каплю физраствора на предметное стекло. Осторожно отделите голову личинки препаровальной иглой, придерживая личинку другой иглой за туловище. Вслед за головой должны отделиться парные полупрозрачные округлые органы – слюнные железы, прикрепленные к глотке. Если слюнные железы выделить не удалось, возьмите другую личинку. Капните на второе предметное стекло каплю 2% ацетоорсеина. Выделенные слюнные железы перенесите на второе стекло в каплю ацетоорсеина. Оставьте слюнные железы окрашиваться в течение 5-6 минут и приступайте к решению следующих заданий. По истечении 5-6 минут протрите первое стекло марлей, капните на него каплю 45% уксусной кислоты и перенесите в неё окрасившиеся слюнные железы. Накройте покровным стеклом. Добавьте с одного края покровного стекла еще одну-две капли уксусной кислоты, убирая с противоположной стороны избыток полоской фильтровальной бумаги. Таким образом вы промываете препарат от избыточного ацетоорсеина. Расплющите слюнные железы, аккуратно прокатывая препаровальной иглой по покровному стеклу или постукивая по стеклу тупым концом иглы. Перенесите препарат под микроскоп. Рассмотрите препарат при увеличении 4х, найдите хромосомы, переведите на 40х и покажите преподавателю. Он оценит качество вашего препарата и поставит отметки на Листе Ответов. Схематически зарисуйте фрагмент хромосомы, подпишите видимые на нем элементы структуры. Ответьте на вопросы о типе организации и функциональных причинах такой особенности этих хромосом.

Задание 2. Морфология внутриклеточных структур.

Помимо электронной микроскопии, мощным инструментом для изучения строения и функции отдельных клеточных компартментов и структур является флуоресцентная микроскопия в комплексе с иммуноцитохимией. Её принцип действия состоит в том, что клетки фиксируют, а затем окрашивают флуоресцентными красителями и их производными. Обычно используются флуоресцентные красители, связывающиеся с ДНК и окрашивающие клеточное ядро, в сочетании с соединенными с молекулой флуорофора антителами, специфическими к определенному белку. Молекулы антител связываются с молекулами внутриклеточных белков-мишеней и иммобилизуют флуорофоры на распознаваемых антителами структурах. После чего препарат фиксированных клеток облучают светом с одной длиной волны и наблюдают спектр флуоресценции на другой длине волны. Если белок, к которому были специфичны антитела с флуорофором, содержался в определенной органелле, структуре или компартменте клетки, то можно наблюдать ее морфологию и функциональное состояние.

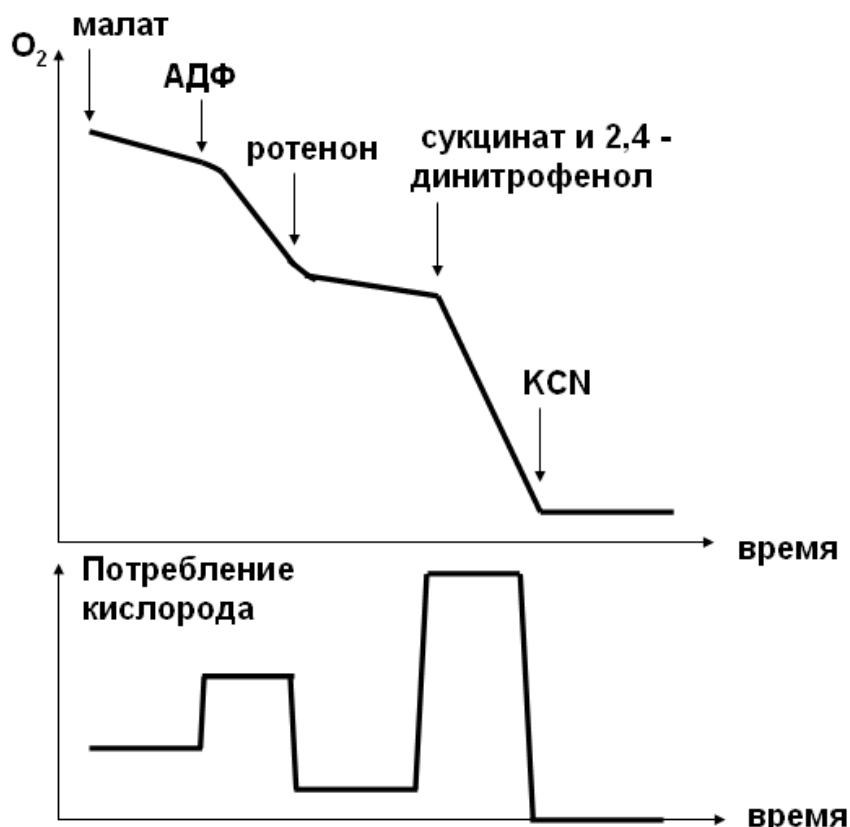
На Листе Рисунков представлены 4 фотографии клеточных линий человека, окрашенных различными антителами. На всех фотографиях использовались антитела к β -тубулину (красный цвет). На первой фотографии никакого другого окрашивания не применяли, на следующих фотографиях в дополнение к антителам против тубулина использовали другие антитела (зеленый цвет), а ядерную ДНК окрашивали красителем DAPI (синий цвет). На второй фотографии использовались антитела к фибрилларину, на третьей – антитела к кальретикулину, на четвертой – антитела к синтаксину 6. Проанализируйте морфологию структур, окрашенных специфичными к белкам-мишеням антителами, и назовите их на Листе Ответов.

Задание 3. Молекулярные основы биоэнергетики клетки.

Дыхательная цепь состоит из четырех белковых комплексов во внутренней мембране митохондрий, обозначаемых римскими цифрами, которые передают друг другу электроны от восстановительных субстратов. Конечным акцептором электронов является молекула кислорода, восстанавливаемая до двух молекул воды. При этом комплексы I, III и IV перекачивают протоны (ионы гидроксония) из матрикса митохондрии в межмембранное пространство. Протоны затем могут вернуться в матрикс через 1) АТФ-синтетазу, которая при этом синтезирует АТФ, 2) транспортер фосфата, который вводит в матрикс фосфат-ион и ион гидроксония, 3) внутреннюю мембрану митохондрии, если что-либо нарушит ее непроницаемость для протонов. При термогенезе протоны интенсивно возвращаются в матрикс, минуя АТФ-синтетазу, разобщая окисление и фосфорилирование. Тот же эффект дают специальные вещества - разобщители окисления и фосфорилирования. Кроме того, транспортер ANT обменивает готовый АТФ на АДФ. Схема дыхательной цепи приведена на Листе Рисунков.

Проанализируйте эксперимент с ингибиторами и субстратами дыхательной цепи.

На рисунке справа приведено содержание кислорода и скорость его поглощения в герметичной камере, содержащей суспензию митохондрий. К митохондриям добавляли перечисленные вещества, меняющие скорость потребления кислорода. Объясните результаты на Листе Ответов. При полном окислении одной молекулы пирувата в матриксе митохондрии



образуется 1 молекула ГТФ, 4 молекулы NADH и 1 молекула $FADH_2$. Сколько молекул АТФ можно получить при окислении молекулы пирувата, если допустить, что не происходит «протекания» протонов через внутреннюю мембрану, то есть они все возвращаются через АТФ-синтетазу и переносчик фосфата? Сколько молекул АТФ можно

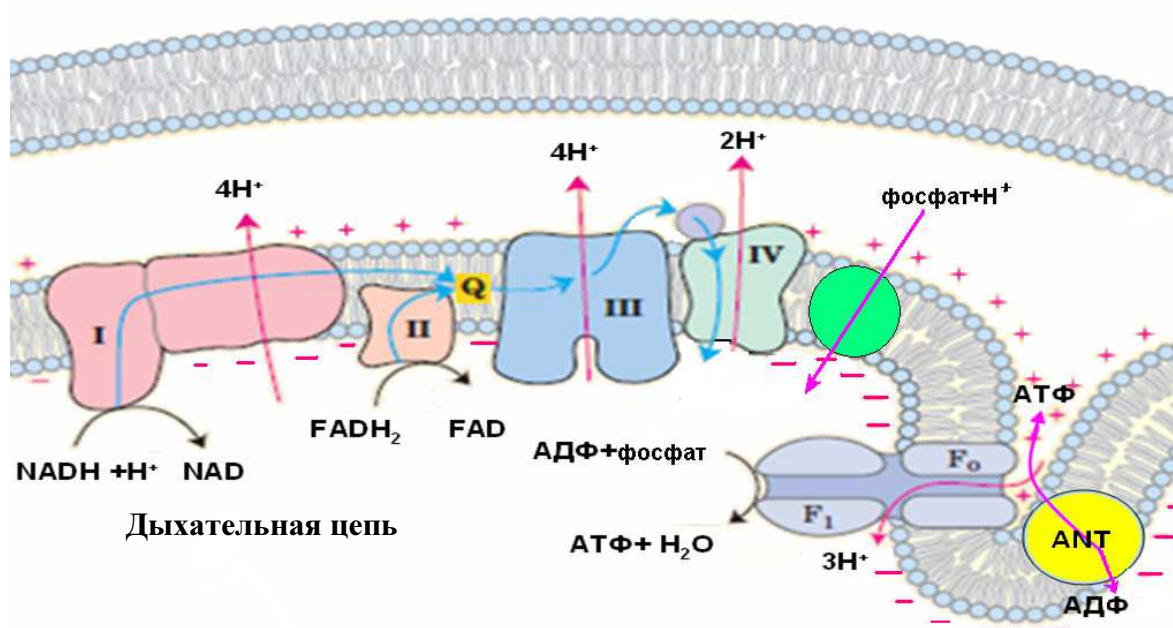
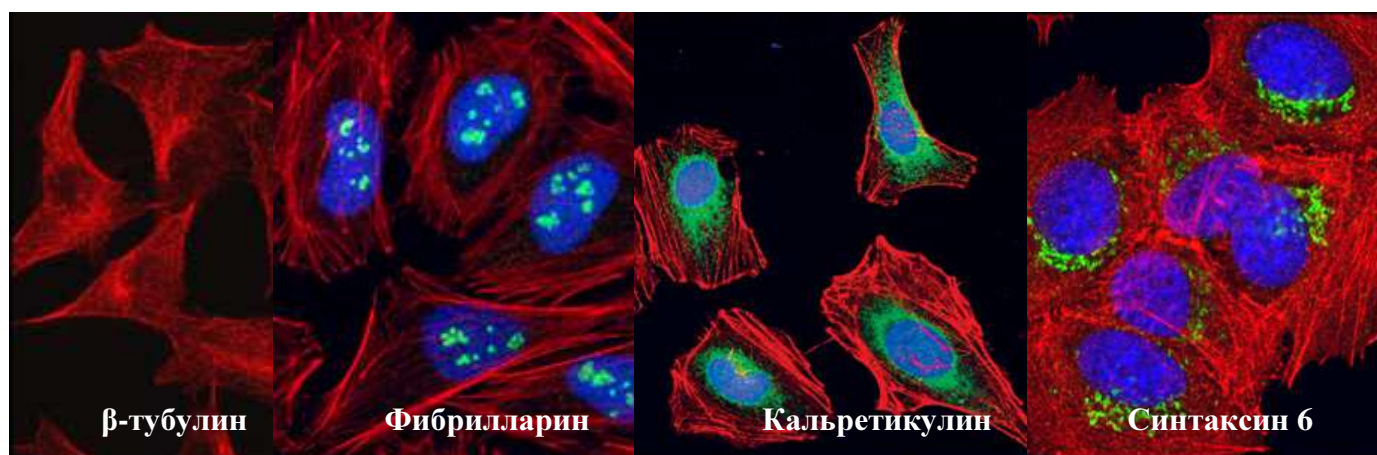
получить при полном окислении 1 молекулы глюкозы? (ГТФ при данном допущении надо считать как АТФ, затрачиваемые в гликолизе АТФ надо вычесть из итоговой суммы).

Задание 4. Изучение процесса программируемой клеточной гибели.

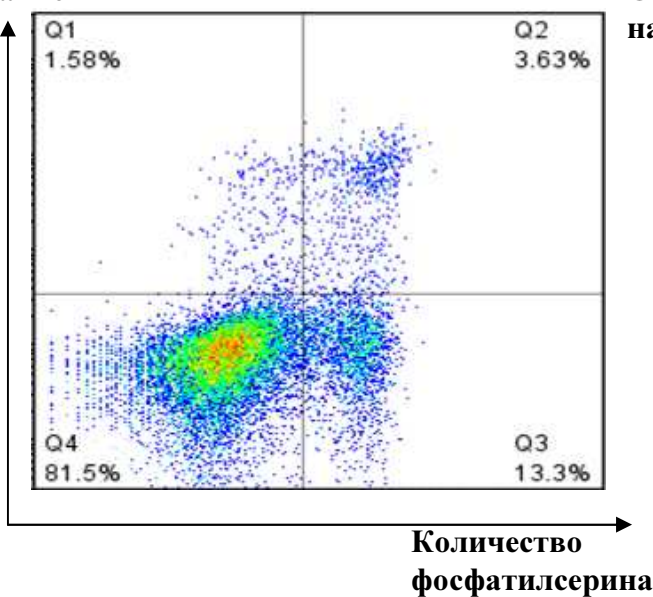
Наиболее хорошо изученной разновидностью программируемой клеточной гибели является апоптоз. Этот процесс запускается либо извне клетки – рецепторами специальных сигнальных молекул, либо изнутри – сенсорами множественных дефектов генетического материала и нарушения биоэнергетики клетки. Апоптоз сопровождается активацией специфических цистеиновых протеаз – каспаз, которые работают каскадным образом: одна каспаза расщепляет предшественник другой, тем самым активируя ее. В ходе апоптоза ядерная ДНК нарезается специальной нуклеазой CAD на кусочки, кратные примерно 200 парам нуклеотидов. Результатом апоптоза являются апоптотические тельца – небольшие окруженные неповрежденной плазматической мембраной фрагменты клеток, содержащие остатки цитоскелета, ядра, митохондрий и других органелл. Они несут на своей поверхности сигналы «съешь меня», которые заставляют макрофаги фагоцитировать и переваривать апоптотические тельца. Одним из этих сигналов является липид фосфатидилсерин, количество которого во внешнем монослое плазмалеммы резко увеличивается. Для определения числа апоптотических клеток можно использовать такие их особенности, как фосфотидилсерин на поверхности клеток (аннексиновое окрашивание), фрагментацию ДНК (TUNEL-окрашивание) и другие. При этом одновременно проводят окрашивание иодидом пропидия на ДНК. Этот краситель проходит в клетки с нарушенной плазмалеммой и количественно связывается с ДНК. Для аннексинового окрашивания использует свежесобранные клетки, причем пропидий иодид проникает только в уже мертвые клетки с поврежденной мембраной; для TUNEL-окрашивания клетки фиксируют, поэтому пропидий иодид количественно связывается с ДНК во всех клетках. На Листе Рисунков приведены две точковые диаграммы (дот-плоты, одна точка соответствует данным, определенным для одной клетки), относящиеся к этим двум методами, с помощью которого измеряли долю апоптотических клеток через несколько часов после применения стауроспорина - вызывающего апоптоз ингибитора клеточных киназ. Ответьте на Листе Ответов на вопросы, связанные с этими рисунками и методами детекции апоптоза.

Поздравляем с прохождением лаборатории молекулярной и клеточной биологии! Желаем успехов на следующих станциях практического тура олимпиады!

ЛИСТ РИСУНКОВ

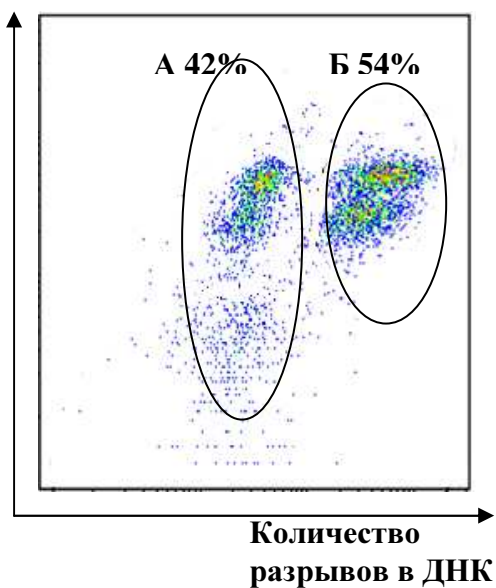


Окрашивание
на ДНК



Аннексиновое окрашивание

Окрашивание
на ДНК



TUNEL-окрашивание

Фамилия _____
Имя _____
Регион _____
Шифр _____

Шифр _____

Рабочее место _____

Лист ответов.

Задание 1. (6,5 баллов)

Препарирование хирономиды (1 б)

Окрашивание препарата (1 б)

Настройка микроскопа, выбор места (1б)

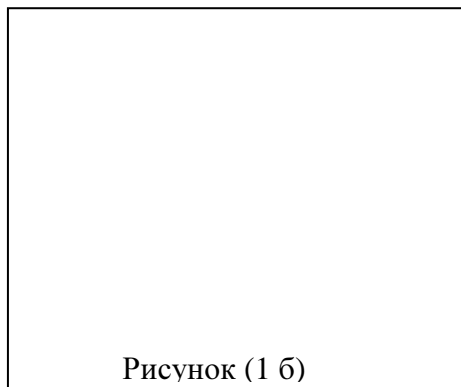


Рисунок (1 б)



Подпись члена жюри

Подписи к рисунку (1 б)

Хромосомы из слюнных желез личинок комара являются _____

(0,5 б), что представляет собой адаптацию для _____

_____ (16)

Задание 2. (4 балла)

Белок β -тубулин содержится в _____ (16)

Белок фибрилларин содержится в _____ (16)

Белок кальретикулин содержится в _____ (16)

Белок синтаксин 6 содержится в _____ (16)

Задание 3. (5 баллов)

Малат обеспечивает субстратом _____ комплекс дыхательной цепи. (0,5 б)

Сукцинат является субстратом _____ комплекса дыхательной цепи. (0,5 б)

Ротенон несколько снижает потребление кислорода, так он подавляет работу _____ комплекса дыхательной цепи. (0,5 б)

2,4-динитрофенол усиливает потребление кислорода, потому что он _____ (1 б)

Цианид калия практически полностью снижает потребление кислорода, так он подавляет работу _____ комплекса дыхательной цепи. (0,5 б)

При окислении 1 молекулы пирувата получится _____ молекул АТФ. (1 б)

При окислении 1 молекулы глюкозы получится _____ молекул АТФ. (1 б)

Задание 4. (4,5 балла)

Доля клеток, подвергающихся процессу апоптоза, на рисунке с аннексиновым окрашиванием - _____% (учтите, что часть клеток к этому моменту уже подвергалась некрозу), доля живых клеток, не подвергнувшихся ни апоптозу, ни некрозу, там же - _____%, доля клеток в состоянии апоптоза на рисунке с TUNEL-окрашиванием - _____% (1,5 б)

Апоптотическая нуклеаза CAD разрезает ДНК на фрагменты, кратные 200 п. н., потому что _____

_____ (1 б)

На рисунке с TUNEL-окрашиванием видны двойные «облака» клеток, отличающиеся по содержанию ДНК. Клеточная культура не синхронна, поэтому в верхнем «полуоблаке» содержатся клетки _____, а в нижнем _____ (1б)

Фосфатидилсерин, которого в плазматической мембране может содержаться до 15%, не является сигналом «съешь меня» для нормальных не апоптотических клеток, потому что _____

_____ (1 б)