

Код студента: _____

20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 3

ГЕНЕТИКА

Общее количество баллов: 98

Продолжительность: 90 минут

Дорогие участники,

- Этот тест содержит 5 следующих заданий:

Задание 1: Исследование фенотипов мутантов плодовой мушки (9 баллов)

Задание 2: Наследование признака белые глаза (33 балла)

Задание 3: Разделение пигментов глаз (18 баллов)

Задание 4: Анализ хроматограммы (14 баллов)

Задание 5: Анализ Белого Белка (24 балла)

- **Вы должны вписать свои результаты и ответы в ЛИСТ ОТВЕТОВ.**
Ответы, записанные в Лист с Заданиями, оцениваться НЕ БУДУТ.
- Пожалуйста, проверьте, получили ли Вы все материалы и оборудование, перечисленные в каждом задании. Если, что-нибудь из перечисленного отсутствует, поднимите, пожалуйста, руку.
- По окончании теста вложите Лист Ответов и Лист Вопросов в конверт. Наблюдатель соберет ваши конверты.
- Эта практическая работа занимает очень много времени. Вы должны быть очень хорошо организованы и работать быстро, чтобы закончить все 5 заданий.

Удачи Вам!

Задание 1 (9 баллов)

Исследование фенотипов мутантов плодовой мушки

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Чашки Петри, пронумерованные (1)-(4) с живыми плодовыми мушками	1 набор
2. Лупа на подставке	1

Введение

Плодовые мушки - это часто используемый объект в генетических исследованиях. В чашке Петри (1) находятся представители дикого типа, а в каждой из чашек Петри под номерами (2)-(4) находятся различные мутанты плодовой мушки. Рассмотрите мушек внимательно при помощи лупы, но не открывайте крышки чашек. Вы можете изменять высоту и угол наклона лупы для ваших наблюдений.

Q.1.1. (9 баллов) Установите для каждого мутанта, каким признаком он отличается от дикого типа? Выберите характерный фенотип мутанта из следующего списка.

- A. цвет глаз B. форма глаз C. форма крыльев D. длина щетинок
E. форма антенн F. форма щетинок G. форма ног H. форма хоботка
I. цвет тела J. длина брюшка

Задание 2 (33 балла)

Наследование признака белые глаза

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. 1,5 мл -пробирки, содержащие анестезированных мушек, обозначенные (5a) и (5b), (6a) и (6b) и (7)	1 набор
2. Пустые чашки Петри	5
3. Белый картон (помещается под чашку Петри для облегчения рассматривания мушек)	1
4. Пинцет	2
5. Лупа на подставке (используемая в Задании 1)	1
6. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл	1

Введение

У особи дикого типа плодовой мушки (WT) красные глаза, тогда как у мутантных мушек (w) белые глаза. w - это рецессивная мутация, локализованная в X хромосоме. В каждой из пробирок (5a) и (5b), (6a) и (6b) отдельно содержатся женские или мужские особи плодовых мушек, полученные в результате двух разных скрещиваний. Пробирка (7) содержит мушек обоих полов, полученных в другом скрещивании. Обратите внимание, что пол мушек можно определить по окраске спинной стороны брюшка, которая у самцов равномерно окрашена в черный цвет.



Самка



Самец

Q.2.1. (8 балла) Поместите мушек из пробирок (5a) и (5b) в разные чашки Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.2. (8 баллов) Поместите мушек из пробирок (6a) и (6b) в разные чашки Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.3. (8 баллов) Поместите мушек из пробирки (7) в чашку Петри и рассмотрите их при помощи лупы. Определите пол и цвет глаз, и заполните все ячейки таблицы, внося в них цифры, включая цифру «0».

Q.2.4. (снят)

Q.2.5. (снят)

Q.2.6. (9 баллов) Каким скрещиванием были получены мушки в пробирках (5a) и (5b),

(6a) и (6b) и (7)? Выберите все возможные варианты и представьте ответ в виде букв.

A. Гомозиготные самки с красными глазами и гемизиготные самцы с красными глазами

B. Гомозиготные самки с белыми глазами и гемизиготные самцы с белыми глазами

C. Гомозиготные самки с красными глазами и гемизиготные самцы с белыми глазами

D. Гомозиготные самки с белыми глазами и гемизиготные самцы с красными глазами

E. Гетерозиготные самки и гемизиготные самцы с красными глазами

F. Гетерозиготные самки и гемизиготные самцы с белыми глазами

Задание 3 (18 баллов)

Разделение пигментов глаз

Материалы и оборудование

Количество

В дополнении к Материалам и оборудованию, использованным в Задании 2, в этом задании вам предоставляется следующий набор оборудования.

- | | |
|---|----------------------------|
| 1. Пробирки объемом 1,5 мл (8) и (9), содержащие раствор
для экстракции пигментов глаз | 1 набор (1 запасной набор) |
| 2. Пустые пробирки объемом 1,5 мл (10) и (11) | 1 набор (1 запасной набор) |
| 3. Микропестики (в 15-мл пробирке) | 2 (1 запасной) |
| 4. Центрифуга | 1 |
| 5. Микропипетка (P20) | 1 |
| 6. Наконечники для пипеток (для P200 и P20) | 1 пакет |
| 7. Пустые пробирки объемом 1,5 мл (без номеров на крышечке) | 2 (2 запасных) |
| 8. Пластинка с нанесенной целлюлозой | 1 (1 запасная) |
| 9. Микропипетка (P2) | 1 |
| 10. Наконечники для пипеток (P2) | 1 пакет |
| 11. Пробирка объемом 50 мл, содержащая растворители | 1 |
| 12. Штатив для пробирки объемом 50 мл | 1 |

Ход работы

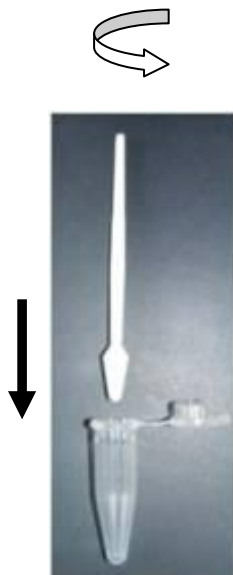
1. Выберите 5 мушек с красными и 5 мушек с белыми глазами, определенными в Задании 2 (пол не имеет значения), и отделите при помощи двух пинцетов их головы от тел.

Убедитесь, что вы не повредили глаза и брюшка мушек!

2. При помощи пинцета перенесите головы мушек с красными глазами в пробирку (8), головы мушек с белыми глазами в пробирку (9), тела мушек с красными глазами в пробирку (10) и тела мушек с белыми глазами в пробирку (11).

Пробирки (10) и (11) будут использованы в Задании 5.

3. Вставьте микропестики в каждую из пробирок (8) и (9) и разотрите головы мушек путем вращения пестика рукой, прижимая его ко дну пробирки. Используйте разные пестики для разных образцов.



4. Отцентрифугируйте пробирки (8) и (9) при 14000 оборотов в течение 3 минут (смотри “Инструкцию по пользованию центрифугой” в конце этого задания на страницах 17-18. При необходимости обратитесь за помощью к наблюдателю.)
5. Перенесите 5μл супернатанта (надосадочной жидкости) из пробирок (8) и (9) в

новые пробирки.

6. Посмотрите на пластинку с нанесенной целлюлозой. Более короткие стороны пластинки представляют собой верх и низ, а матовая сторона, покрытая целлюлозой, будет использоваться в этом эксперименте. Напишите карандашом на верхней стороне (на матовой поверхности с целлюлозой) пластинки Ваш код студента.
7. Вначале, отступив приблизительно 2 см от нижнего и 1/3 ширины от левого края пластинки, нанесите в виде точки 1 μ л экстракта голов с красными глазами. Не проводите линий при помощи карандаша или маркера, которые могли бы повредить целлюлозное покрытие.
8. Затем нанесите 1 μ л экстракта из голов с белыми глазами на расстоянии 1/3 от правого края пластинки и на расстоянии около 2 см от ее нижнего края.
9. Когда пятна высохнут, поместите пластинку в пробирку объемом 50 мл таким образом, чтобы нижняя ее часть касалась растворителя, и плотно закройте пробирку. Убедитесь в том, что растворитель не касается пятен. Открывайте и закрывайте крышку пробирки быстро, чтобы избежать испарения растворителя.
10. Во время хроматографии пробирка должна стоять в штативе вертикально. Вы можете продолжить работу с Заданиями 4 и 5 этого теста, а затем вернуться к этому разделу. **Прежде чем вы продолжите работу , прочтите, пожалуйста, следующий пункт (11).**
11. Когда фронт растворителя достигнет на пробирке отметки 30 мл, выньте пластинку из пробирки, оставьте ее для высыхания на кусочке бумажного полотенца и закройте крышку пробирки. Поднимите руку, как только пластинка высохнет. (Ассистент заберет вашу пластинку для оценки результата.) **(18 баллов)**

Задание 4 (14 баллов)

Анализ хроматограммы

Введение

Несмотря на то, что некоторые пигменты, входящие в состав сложных глаз плодовой мушки, невидимы нашему глазу, их можно визуализировать под ультрафиолетовой лампой. На рисунке 1 показан пример разделения пятен пигментов глаз при помощи тонкослойной хроматографии после регистрации под ультрафиолетовым светом. Обратите внимание, что образцы включают не только WT (дикий тип) и *w* (белые глаза), но и *se* (глаза сепия – желтые), *bw* (коричневые глаза) и *cn* (киноварные глаза – ярко красные).

У плодовой мушки существует два пути биосинтеза пигментов глаз, путь оммохрома и путь птеридина. Цвет глаз дикого типа (темно-красные) образуется в том случае, если все пигменты, синтезированные в обоих путях, одновременно имеются в сложных глазах. Глаза становятся белыми, если и оммохромовые и птеридиновые пигменты отсутствуют. Среди различных пигментов и их предшественников, участвующих в двух путях биосинтеза, в этом эксперименте можно разделить при помощи хроматографии только пигменты птеридинового пути.

Подвижность каждого пигмента при хроматографии определяется химической природой соединения, его растворимостью в растворителе и расстоянием, пройденным растворителем. Расстояние, пройденное каждым пигментом, зависит от длительности проведения хроматографии, но величина R_f , которую можно вычислить по приведенной ниже формуле, постоянна для каждого пигмента.

$$R_f = \frac{\text{Расстояние от линии нанесения до центра пятна}}{\text{Расстояние от линии нанесения до фронта растворителя}}$$

В таблице 1 показаны цвет пятна под УФ-лампой и величина Rf для каждого пигмента, выделенного из сложных глаз плодовой мушки.

Таблица 1. Характеристики птеридиновых пигментов сложных глаз плодовой мушки

Код	Название	Цвет под УФ-лампой	Величина Rf
A	2-амино-4-гидроксицеридин	синий	0,57
B	биоцеридин	синий	0,61
C	дрозоцеридин	оранжевый	0,21
D	сепиоцеридин	желтый	0,52
E	изоксантоцеридин	желтый	0,69
F	ксантоцеридин	зелено-синий	0,38
G	изосепиоцеридин	фиолетово-синий	0,25

Q.4.1. (5 баллов) Выберите пигмент из Таблицы 1, соответствующий каждому пятну

на хроматограмме, как показано на Рисунке 1. Внесите ответ в таблицу в виде кода.

Чем отличается состав птеридиновых пигментов глаз у мутантов от такового у дикого

типа? Определите приблизительное количество каждого пигмента исходя из

хроматограммы на Рисунке 1. Впишите “++”, если пигмента намного больше по

сравнению с диким типом, “+” если пигмент присутствует в том же количестве, как у

дикого типа, и “–” если пигмент отсутствует.

Q.4.2. (9 баллов) Исходя из цвета глаз и результатов хроматографии, показанных на

Рисунке 1, определите, какое из следующих отклонений имеет мутант *se* (глаза сепия),

bw (коричневые глаза) и *cn* (глаза киноварные)? Впишите соответствующую букву.

- A. Оммохромные пигменты должны отсутствовать.
- B. Все птеридиновые пигменты отсутствуют, но оммохромные пигменты должны присутствовать.
- C. И оммохромные и птеридиновые пигменты отсутствуют.
- D. Компоненты птеридиновых пигментов отличаются от дикого типа.

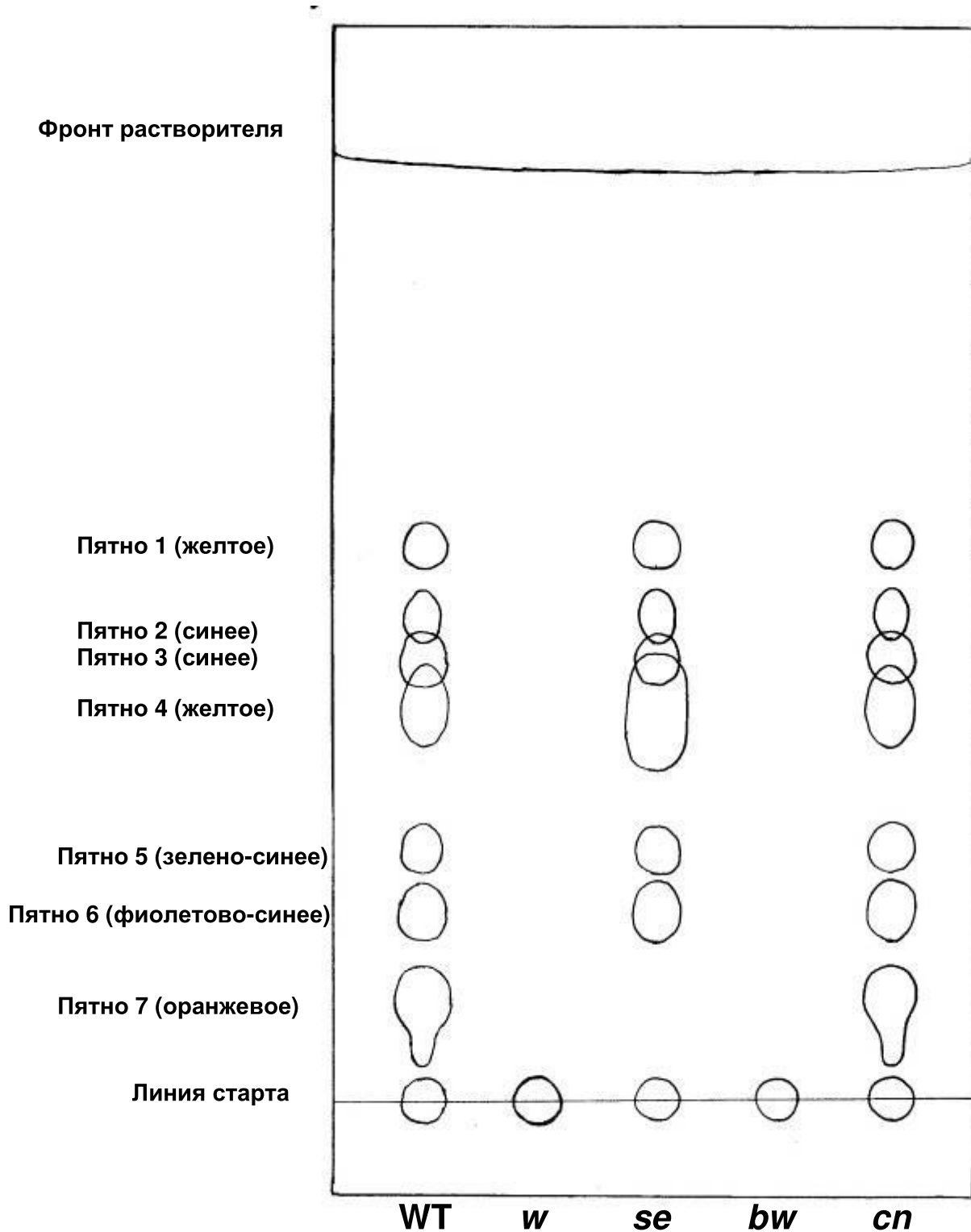


Рисунок 1. Хроматография пигментов глаза дикого типа

и мутантов плодовых мушек

Задание 5 (24 балла)

Анализ Белого Белка

<u>Материалы и оборудование</u>	Количество
1. Пробирка А объемом в 1,5 мл: буфер для экстракции белка	1
2. Пробирки объемом в 1,5 мл (пробирки (10) и (11) из Задания 3)	4
3. Микростеклянные (в 15-мл пробирке)	2 (1 запасной)
4. Прибор для электрофореза с заранее приготовленным полиакриламидным гелем	1
5. Микропипетка (P200)	1
6. Микропипетка (P20)	1
7. Наконечники для пипеток (для P200 и P20)	1 набор
8. Штатив для пробирок объемом 1,5 мл	1
9. Пробирка С объемом 1,5 мл: Маркеры для электрофореза (белки с известными молекулярными массами)	1

Экстракция белка и проведение электрофореза

1. Добавьте по 50 μ л буфера для экстракции белка (пробирка А) в пробирки (10) (тела мушек с красными глазами) и (11) (тела мушек с белыми глазами), приготовленные в Задании 3. Разотрите тела мушек микропестиком. Используйте разные микропестики для образцов дикого типа и мутанта.
2. Отцентрифугируйте пробирки (10) и (11) при 14000 оборотах в течение 3 мин. и затем перенесите супернатант в новые пробирки объемом 1,5 мл (**прочтите «Инструкцию по пользованию центрифугой» в конце этого задания на страницах 17-18 и при необходимости обратитесь к ассистенту**).
3. Ассистент приготовил для вас гель, который готов для использования. Нанесите по 5 μ л каждого образца в ячейки в центральной части пластинки геля в таком порядке слева направо: маркеры молекулярных масс, экстракт «красные глаза» и экстракт «белые глаза». После окончания нанесения образцов поднимите руку для вызова наблюдателя. Ваш ассистент включит прибор для начала электрофореза.
4. Через 5 мин. поднимите руку для вызова ассистента. Он возьмет нижнюю часть прибора и сделает снимок Вашего геля для оценки. (**18 баллов**).

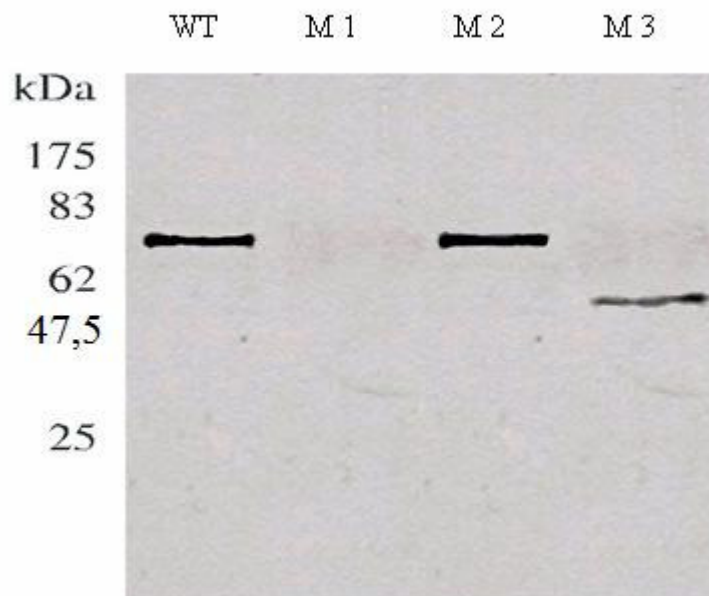
Пожалуйста, проверьте качество снимка на фотоаппарате Вашего ассистента!

Анализ данных электрофореза белка

M1, M2 и M3 – обозначают дорожки, в которые были нанесены образцы из различных мутантных линий (мутации генов, отвечающих за пигментацию глаз).

После разделения белков этих мутантных мушек в содержащем додецилсульфат натрия полиакриламидном геле, эти белки были перенесены на нейлоновый фильтр

для обработки антителом, которое специфически узнает белок, кодируемый геном *white*. При этом были получены следующие результаты.



Q.5.1. (3 балла) Какие из следующих дефектов приводят к результатам, наблюдаемым после электрофореза образцов M1, M2 и M3? Выберите правильный ответ из вариантов А, В и С.

- А. Сайт инициации для синтеза мРНК гена *white* подвергнут делеции и ген не экспрессируется.
- В. Мутация stop codon (стоп-кодон) произошла в кодирующем Белый Белок участке (в рамке считывания), что приводит к завершению трансляции и отсутствию С-концевой последовательности пептида, соответствующей молекулярному весу в 20 kDa.
- С. Несмотря на то, что синтезировался нормальный Белый Белок, гены, принимающие участие в синтезе оммохромовых пигментов, являются дефектными.

Q.5.2. (3 балла) Выберите другой дефект нарушения генов пигментов глаз из вариантов А, В и С, которые привели бы к таким же фенотипам, как у М1, М2 и М3.

- А. Кодирующая последовательность гена *white* слилась с кодирующей последовательностью другого гена путем хромосомной транслокации, что привело к образованию новой последовательности, кодирующей слитый белок, сохранивший антигенные участки для антител, но имеющий на 30% меньший молекулярный вес.
- В. В кодирующем белок участке гена *white* произошла замена одного основания, что изменило аминокислотную последовательность, но способность белка взаимодействовать с антителами не была потеряна.
- С. В определенном участке хромосомы имеется большая делеция, которая включает полностью ген *white*.

Инструкция по пользованию центрифугой

При необходимости обратитесь за помощью к наблюдателю.

1. Для того чтобы открыть крышку центрифуги (2), нажмите кнопку OPEN в правой верхней части панели управления 1 (Рис. 1).
2. Ротор закрыт пластиковой крышкой 3 (Рис. 2). Чтобы ее снять, придержите крышку ротора одной рукой и поверните центральный черный винт (4) другой рукой против часовой стрелки.
3. Внутри ротора находятся 24 гнезда (Рис. 3). Поместите пробирки с образцами для сохранения балансировки симметрично (друг против друга).
4. Закройте ротор крышкой и поверните винт ротора (4) по часовой стрелке для фиксации крышки ротора.

5. Осторожно закройте крышку центрифуги. Вы должны услышать сигнал, обозначающий ее полное закрытие.
6. Скорость вращения центрифуги (140 x 100 оборотов в минуту) и время (3 мин) установлены заблаговременно. Проверьте установку в окошках (5) и (7) нажимая кнопку DISP/CE (6), а затем нажмите кнопку START (8), чтобы начать центрифугирование.
7. По окончании центрифугирования крышка (2) откроется автоматически. Затем полностью откройте крышку (2) и снимите крышку ротора поворотом винта (4) против часовой стрелки, придерживая крышку ротора другой рукой.
8. Во избежание взбалтывания осадка, осторожно выньте пробирки из ротора. Поставьте их в штатив.
9. Закройте крышку ротора (3), поверните винт (4) по часовой стрелке и закройте крышку центрифуги (2).

Рисунок 1

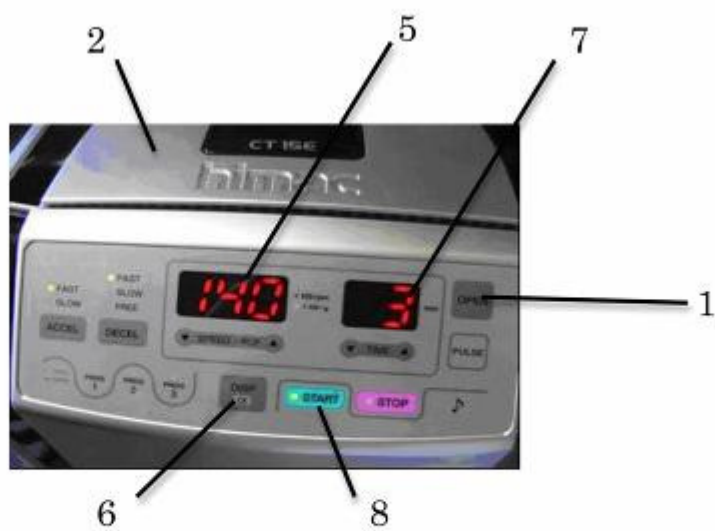


Рисунок 2



Рисунок 3



КОД СТУДЕНТА:

Код студента: _____

20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 3

ГЕНЕТИКА

Общее количество баллов: 98

Продолжительность: 90 минут

ЛИСТ ОТВЕТОВ

Q.1.1. (9 баллов)

(2)	
(3)	
(4)	

Q.2.1.(8 баллов)

	Красноглазые самки	Белоглазые самки	Красноглазые самцы	Белоглазые самцы
(5a)				
(5b)				

Q.2.2. (8 баллов)

	Красноглазые самки	Белоглазые самки	Красноглазые самцы	Белоглазые самцы
(6a)				
(6b)				

Q.2.3. (8 баллов)

	Красноглазые самки	Белоглазые самки	Красноглазые самцы	Белоглазые самцы
(7)				

Q.2.4.(снят)

Q.2.5.(снят)

Q.2.6. (9 баллов)

(5a) и (5b)	
(6a) и (6b)	
(7)	

Задание 3 (18 баллов) Оценка результатов хроматограммы

Q.4.1. (5 баллов)

Пятно No.	Пигмент (A-G)	WT	<i>w</i>	<i>se</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>
1		+				
2		+				
3		+				
4		+				
5		+				
6		+				
7		+				

Q.4.2. (9 баллов)

<i>se</i>	
<i>bw</i>	
<i>cn</i>	

Фотография геля (18 баллов)

Q.5.1. (3 балла)

M1	M2	M3

Q.5.2. (3 балла)

M1	M2	M3

***** КОНЕЦ ПРАКТИЧЕСКОГО ТЕСТА 3 *****

STUDENT CODE:

Student Code: _____

20th INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

12th – 19th July, 2009

Tsukuba, JAPAN



PRACTICAL TEST 3

GENETICS

Total Points: 100

Duration: 90 minutes

ANSWER KEYS AND CRITERIA

Q.1.1. (9 points) 各 3 点

(2)	C
(3)	B
(4)	I

Q.2.1.(8 points) Four points for complete row
 Four points for complete row

Four points for each complete row.
 Two points if other numbers for “10” is written.
 No points if other numbers for “0” is written.

	red females	white females	red males	white males
(5a)	10	0	0	0
(5b)	0	0	10	0

Q.2.2.(8 points)

Four points for each complete row.
 Two points if other numbers for “10” is written.
 No points if other numbers for “0” is written.

	red females	white females	red males	white males
(6a)	10	0	0	0
(6b)	0	0	0	10

Q.2.3.(8 points)

Two points for each box.
 For “red females”, one point for the numbers 8, 9, 11 or 12.
 For “white females”, only zero is acceptable and other numbers receive no point.
 For “red males” and “white males”, one point for 4 or 6.

	red females	white females	red males	white males
(7)	10	0	5	5

Q.2.4.(1 point)

D

Q.2.5.(1 point)

E

Q.2.6. (9 points) _____

Three points for each.

For “(5a) and (5b)”, one point if only one answer is chosen.

(5a) and (5b)	A, C
(6a) and (6b)	D
(7)	E

Task 3 (18 points)

Criteria

1. At least one sample spot is confirmed on the sheet. 4 points
2. Solvent front is moved as specified (~3 cm) 4 points
3. Pigments are migrated in near straight line. 4 points
4. At least two pigment spots are separated. 6 points

Q.4.1. (5 points)

One point for each column with correct answers for all

Spot No.	Pigment (A-G)	WT	<i>w</i>	<i>se</i>	<i>bw</i>	<i>cn</i>
1	E	+	-	+	-	+
2	B	+	-	+	-	+
3	A	+	-	+	-	+
4	D	+	-	++	-	+
5	F	+	-	+	-	+
6	G	+	-	+	-	+
7	C	+	-	-	-	+

Q.4.2. (9 points)

3 points for each

<i>se</i>	D
<i>bw</i>	B
<i>cn</i>	A

Photograph of the gel (18 points)

Criteria

1. Loading of the molecular weight marker and two samples 3 x 3 points
2. Separation of the molecular weight marker with several bands visible.
3 points
3. BPB dye bands are well migrated for the two samples 2 x 3 points

Q.5.1. (3 points)

3 points only when all answers are correct. No partial points.

M1	M2	M3
A	C	B

Q.5.2. (3 points)

3 points only when all answers are correct. No partial points.

M1	M2	M3
C	B	A

***** END OF PRACTICAL TEST 3 *****