

**Задания практического тура заключительного этапа
XLII Всероссийской олимпиады школьников по биологии.
2025-26 уч. год. 11 класс.**

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ. Максимум 50 баллов.

Оборудование: автоматическая пипетка (1-10 мкл), автоматическая пипетка (20-200 мкл), наконечники для автоматических пипеток (на 10 и 200 мкл) в штативах, 96-луночный планшет с номером, штатив с 18 эппендорфами (“3.0”, “4.0”, “5.0”, “6.0”, “7.0”, “8.0”, “9.0”, “10.0”, “11.0”, “12.0”, “БСА”, “Ф”, “H₂O”, “БР”, “Э”, “О”, “NaOH”, “К”), урна для сброса наконечников, калькулятор, белый лист бумаги.

ВВЕДЕНИЕ

ДНКаза I секретируется для разрушения экзогенной ДНК, которая образуется при гибели клеток. ДНКаза I также переваривает нуклеиновые кислоты, поступающие в организм с пищей. Активность ДНКазы I можно определять по количеству разрывов ДНК, которые вносит один миллиграмм фермента за одну минуту. Каждый разрыв полинуклеотидной цепи приводит к образованию нового остатка вторичного фосфата, проявляющего кислотные свойства. Количество вторичных фосфатов в смеси можно измерить методом кислотно-основного титрования. Сначала ДНК обрабатывают ферментом (в отсутствие буферных систем), затем фермент ингибируют добавлением SDS. С помощью щелочи значение pH раствора доводят до 5.0, чтобы избежать влияния остатков цитозина на титрование (фосфаты при этом остаются в однозамещенном состоянии). Далее образец титруют стандартным раствором NaOH до pH 8.0 (**Рис. 1**). Аналогичные процедуры проводят с контрольным образцом ДНК, который не инкубировали с ферментом. Из количества затраченных эквивалентов щелочи в случае опытного образца вычитают количество затраченных эквивалентов щелочи в случае контроля. В описанных условиях полученное значение соответствует количеству оттитрованных вторичных фосфатных групп, образовавшихся при расщеплении ДНК ферментом.

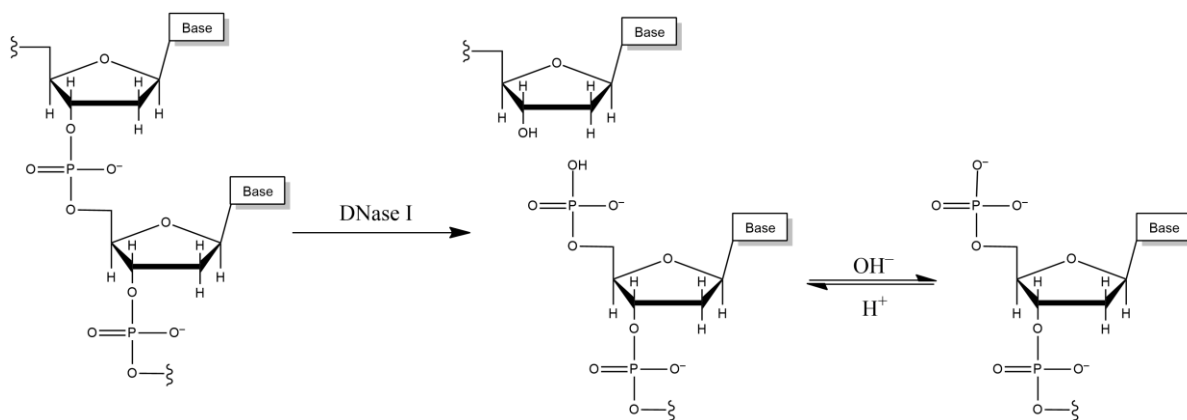


Рисунок 1. Схема определения активности ДНКазы I при помощи кислотно-основного титрования.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Конечная цель экспериментальной работы – определить активность ДНКазы I в исследуемом препарате. Эксперимент был поставлен следующим образом: 50 мл 0.5% раствора ДНК в 50 мМ NaCl разделили на опытный образец и контроль (по 25 мл). В первую часть добавили 100 мкл препарата фермента (эппендорф “Ф”), затем обе пробирки инкубировали один час при 37°C, после чего реакцию остановили добавлением SDS и довели pH раствора до 5.0. В ходе последующего титрования в качестве кислотно-основного индикатора вы будете использовать антоцианы, содержащиеся в экстракте краснокочанной капусты, поэтому вам потребуется предварительно изучить зависимость их окраски от pH раствора. **Во время работы один и тот же раствор раскапываете одним наконечником.**

Задание 1. Определение концентрации ДНКазы I биуретовым методом. Сначала заполните все пустые клетки в **Таблице 1** в Листе ответов. Финальный объем проб белка (бычьего сывороточного альбумина (БСА) и ДНКазы I) в лунке перед добавлением биуретового реактива должен составлять 50 мкл.

Затем в соответствии с таблицей заполните лунки 96-луночного планшета. В лунки **A1-A6** вносите раствор 10 мг/мл БСА (эппендорф «БСА») для построения калибровочного ряда. В лунки **A7, A8** и **A9** – препарат фермента ДНКазы (эппендорф «Ф»). Доведите объем во всех лунках до нужного значения водой (эппендорф «H₂O»), после этого добавьте во все лунки по 200 мкл биуретового реактива (эппендорф «БР»). Реакционные смеси можно не пипетировать. Через 10 минут определите на глаз, какой точке стандартного ряда соответствует образец фермента, рассчитайте концентрацию фермента (в эппендорфе «Ф») и запишите ее в Листе ответов.

Задание 2. Приготовление стандартного рН-ряда. Внесите в лунки **B1-10** планшета по 20 мкл экстракта краснокочанной капусты (эппендорф «Э»). Затем внесите 200 мкл стандартных буферных растворов со значениями рН от 3.0 до 12.0 (эппендорфы с числами **3.0-12.0**, соответствующими значениям рН) и аккуратно перемешайте путем пипетирования.

Задание 3. Титрование экспериментального образца. В 4 лунки **ряда С** планшета внесите по 100 мкл опытного образца ДНК, обработанного ферментом (эппендорф «О»), затем добавьте по 20 мкл экстракта краснокочанной капусты (эппендорф «Э»). Проведите пристрелочное титрование. Для этого в первую лунку добавляйте по 10 мкл 10 мМ NaOH (эппендорф «NaOH»), пока не достигните окраски индикатора, соответствующей значению **рН 8.0**. Тщательно пипетируйте и перемешивайте раствор в лунке после каждой добавки. По достижении нужного результата запишите в Листе ответов в **Таблице 2** затраченный объем щелочи. Во вторую лунку внесите на 5 мкл меньше подобранного объема щелочи, в третью – предполагаемый необходимый объем щелочи, в четвертую – на 5 мкл больше. Выберите объем щелочи, который на ваш взгляд **в наилучшей мере** соответствует требуемой финальной точке титрования (рН 8.0). Запишите его в Листе ответов в **Таблице 2**.

Задание 4. Титрование контрольного образца. В 4 лунки **ряда D** планшета внесите по 100 мкл контрольного образца ДНК (эппендорф «К»), затем добавьте по 20 мкл экстракта краснокочанной капусты (эппендорф «Э»). Проведите пристрелочное титрование. Для этого в первую лунку добавляйте по 3 мкл 10 мМ NaOH (эппендорф «NaOH»), пока не достигните окраски индикатора, соответствующей значению **рН 8.0**. Тщательно пипетируйте и перемешивайте раствор в лунке после каждой добавки. По достижении нужного результата запишите в Листе ответов в **Таблице 2** затраченный объем щелочи. Во вторую лунку внесите на 1.5 мкл меньше подобранного объема щелочи, в третью – предполагаемый необходимый объем щелочи, в четвертую – на 1.5 мкл больше. Выберите объем щелочи, который на ваш взгляд **в наилучшей мере** соответствует требуемой финальной точке титрования (рН 8.0). Запишите его в Листе ответов в **Таблице 2**.

После завершения работы с планшетом сдайте его члену жюри на оценку (пригласите его поднятием руки). Впишите номер планшета в шапку Листа ответов.

Исходя из полученных результатов титрования рассчитайте концентрацию вторичных фосфатов в опытном и контрольном образцах. Полученные значения округлите до одного знака после запятой и внесите их в **Таблицу 2** Листа ответов.

Задание 5. Расчет активности ДНКазы I. С учетом концентрации белка и концентрации выделившихся в ходе реакции вторичных фосфатов, рассчитайте активность ДНКазы I в препарате фермента в мкмольях разорванных связей/мин на 1 мг белка. В Листе ответов укажите не только финальное значение, но и приведите свои расчеты. Полученные значения округлите до одного знака после запятой и внесите их в **Таблицу 2** Листа ответов.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Задание 6. На **Рисунке 2** приведены 4 структурные формулы (A-D), соответствующие молекулам антоцианов краснокочанной капусты при разных значениях рН среды, а также их спектральные свойства. Рассмотрите картинку, после чего заполните **Таблицу 3** в листе ответов. В столбце, соответствующем цвету, укажите следующие варианты: **“красный”, “желтый”, “синий”, “фиолетовый”**.

Задание 7. ДНКазу I активно используют для исследования взаимодействия белков с ДНК. В одном из экспериментов ученые изучали взаимодействие РНК-полимеразы, транскрипционного фактора ОхуR (дикого типа или содержащего мутации) и промоторного региона охуS (содержал радиоактивную метку на одном из концов, см. **Рис. 3**). Инкубировали смеси разного состава, после чего обрабатывали их ДНКазой I и проводили электрофорез образцов. Электрофореграммы проявляли при помощи автордиографии. Учтите, что ОхуR легко окисляется воздухом, что можно предотвратить при помощи DTT (дителиотреитол, восстанавливающий агент). Рассмотрите рисунок, после чего ответьте на следующие вопросы в Листе ответов:

- 1) как окислительный статус (белок окислен или восстановлен) ОхуR влияет на его способность связываться с ДНК?
- 2) как ОхуR дикого типа влияет на связывание РНК-полимеразы с промотором *охуS*?
- 3) какой эффект замена цистеина на серин (**мутация C199S**) оказывает на функцию ОхуR?
- 4) какой эффект замена гистидина на аргинин (**мутация H198R**) оказывает на функцию ОхуR?

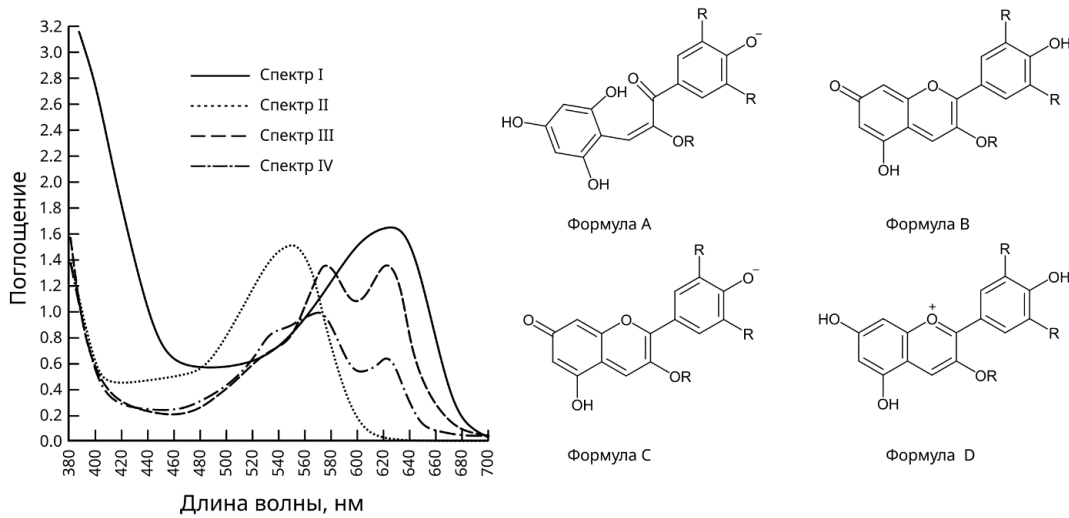


Рисунок 2. Спектры поглощения и структурные формулы и разных форм антоцианов.

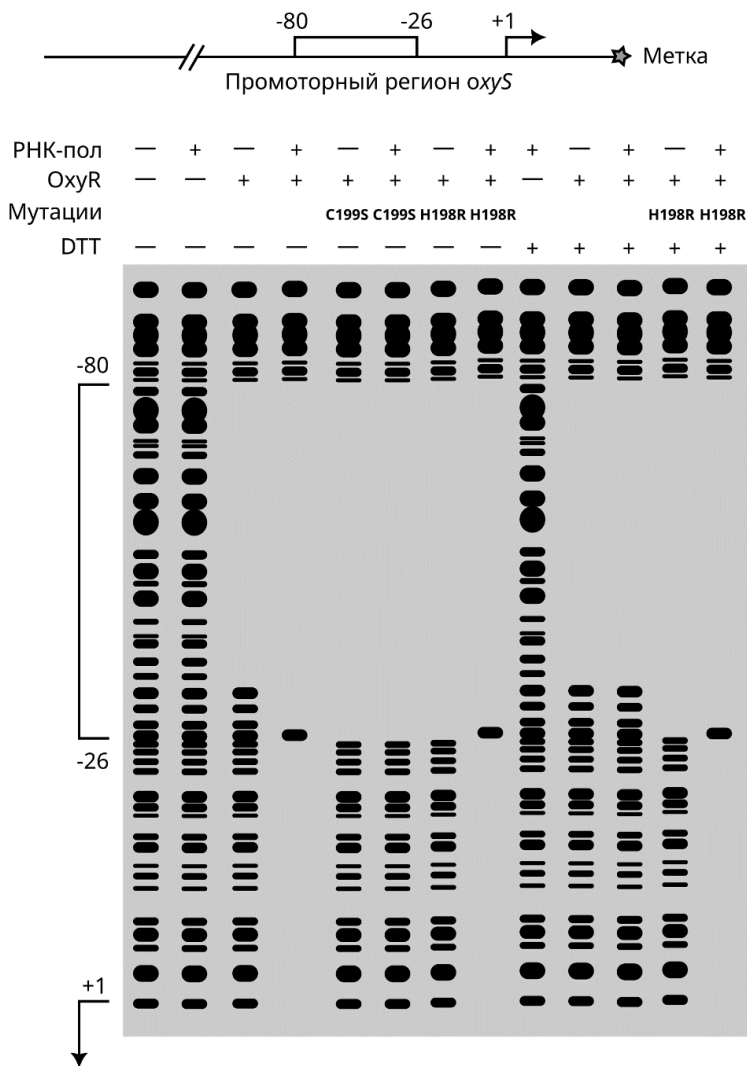


Рисунок 3. Эксперимент для исследования взаимодействия РНК-полимеразы, транскрипционного фактора ОхуR и промоторного региона *охуS*. (РНК-пол – РНК-полимераза). Числа на картинке соответствуют номерам нуклеотидов от начала старта транскрипции.

Шифр _____ Рабочее место _____ Номер планшета _____ Сумма баллов _____

ЛИСТ ОТВЕТОВ “МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ” (50 БАЛЛОВ)

Задание 1 (14 баллов). Таблица 1. План определения концентрации белка.

| Номера лунок | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7, A8, A9 | Отметка о сдаче планшета |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|--------------------------|
| БСА, мкг | 0 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | | |
| БСА, мкл | | | | | | | | |
| H ₂ O, мкл | | | | | | | | Оценка планшета |
| ДНКазы, мкл | | | | | | | 50 | |
| Реактив, мкл | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | |

Концентрация фермента (мг/мл): _____

Задания 3-4 (11 баллов). Таблица 2. Результаты титрования.

| Титрование | Опытный образец | Контрольный образец |
|---|-----------------|---------------------|
| Пристрелочное титрование, мкл | | |
| Финальное титрование, мкл | | |
| Концентрация вторичных фосфатов в образцах, мМ | | |
| Изменение концентрации вторичных фосфатов за счет работы ДНКазы I, мМ | | |

Задание 5 (5 баллов). Активность фермента (мкмоль/мин на 1 мг белка): _____

Место для расчета активности (укажите все вычислительные шаги и размерности величин)

Задание 6 (12 баллов). Таблица 3. Свойства антоцианов.

| рН | Цвет | Формула (A-D) | Спектр (I-IV) |
|---------|------|---------------|---------------|
| 3.0 | | | |
| 6.0 | | | |
| 7.0-8.0 | | | |
| 12.0 | | | |

Задание 7 (8 баллов).

7.1. Как окислительный статус (белок окислен или восстановлен) OxyR влияет на его способность связываться с ДНК?

7.2. Как OxyR дикого типа влияет на связывание РНК-полимеразы с промотором oxyS?

7.3. Какой эффект замена цистеина на серин (мутация C199S) оказывает на функцию OxyR?

7.4. Какой эффект замена гистидина на аргинин (мутация H198R) оказывает на функцию OxyR?

В каждой из ячеек запишите соответствующую цифру, чтобы при проверке члены жюри ориентировались на особенности вашего почерка.

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| | | | | | | | | | |