

14 АПРЕЛЬ, 2022



Olympiad League

НАЦИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ПО БИОЛОГИИ НВО-4 2022

4-Этап Практика – Молекулярная биология Часть-2

OLYMPIAD LEAGUE

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

Эксперимент 1 – Определение межвидового гибрида

Межвидовая гибридизация – один из механизмов видообразования эукариот. При этом полиплоидия характерна для многих групп животных и растений, в том числе позвоночных, однако не была обнаружена у млекопитающих. Для обнаружения случаев межвидовой гибридизации и полиплоидизации не обязательно секвенировать геномы, в полевых условиях гибридов можно находить при помощи амплификации видоспецифичной ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и электрофореза продуктов ПЦР в агарозном геле.

Вам нужно провести электрофорез в агарозном геле продуктов ПЦР с использованием ДНК трех известных видов животных: А, В и С, и животного Х, которое предположительно является межвидовым гибридом, а также ответить на вопросы, связанные с методами гель-электрофореза и ПЦР

Тщательно следуйте инструкции по подготовке образцов к электрофорезу, приведенной ниже! Заполненный образцами гель передайте преподавателю для проведения электрофореза, в обмен Вы получите фотографию готового геля с теми же образцами. Качество Вашего геля будет оценивать жюри.

Все ответы пишите на Листе Ответов!

Инструкция по подготовке образцов к электрофорезу

Уважаемый участник, на Вашем рабочем месте находится штатив с микропробирками, содержащими результаты ПЦР с видоспецифическими праймерами известных видов животных А, В, С и анализируемого вида Х, микропробирка с четырёхкратным окрашенным буфером для нанесения ДНК в гель (обозначена буквой Б), и микропробирка с окрашенным маркером молекулярных масс ДНК (обозначена буквой М). Кроме этого, Вам выданы чашка Петри, содержащая пронумерованный фрагмент агарозного геля, штатив с наконечниками для автоматической пипетки и автоматическая пипетка.

Выставленный рабочий объем пипетки виден в индикаторном окошке в верхней части пипетки и может изменяться от 2,0 до 20,0 микролитров. Рукоятка поршня пипетки имеет три положения: 1) ожидание (максимально выдвинута, в это положение пипетка переходит сама после того как Вы перестанете давить на рукоятку), 2) первый упор – набор/слив заданного рабочего значения (в первый упор пипетка переходит, если рукоятку аккуратно нажать пальцем), 3) второй упор – полный слив – выдувание объема, немного большего, чем заданный рабочий объем. Для того, чтобы отмерить и перенести с помощью пипетки рабочий объем жидкости, выставьте этот объем регуляторным колёсиком, наденьте наконечник, нажмите рукоятку до первого упора, удерживая рукоятку в этом положении, погрузите кончик наконечника в отбираемую жидкость, отпустите рукоятку до положения ожидания. Рабочий объем жидкости войдет в наконечник. Поместите кончик наконечника туда, куда вы хотите перенести жидкость, нажмите рукоятку до первого упора и удерживайте ее, пока жидкость не выйдет из наконечника. Поднимите пипетку так, чтобы кончик наконечника оказался в воздухе, отпустите рукоятку – в наконечник войдет воздух. Если отпустить рукоятку, не отрывая кончик наконечника от капли жидкости, жидкость снова войдет в наконечник. Этот приём можно использовать для перемешивания жидкости (так называемое пипетирование).

Напишите номер Вашего геля на Листе ответов в графе «Рабочее место (гель)». Возьмите пипетку в руку. Выставьте пипетку на рабочий объем 2 микролитра, вращая свободной рукой регуляторное колесико с резьбой в верхней части пипетки. Наденьте на пипетку наконечник, возьмите микропробирку с буфером для нанесения ДНК в гель, и нанесите на дно чашки Петри четыре капли буфера для нанесения, по 2 микролитра каждая, на расстоянии примерно 1 см друг от друга. Сбросьте наконечник из-под буфера в крышку от чашки Петри (мусорная зона).

Переведите пипетку на рабочий объем 6 микролитров, наденьте новый наконечник, отберите 6 микролитров окрашенного маркера молекулярных масс и внесите этот объем в первую лунку Вашего

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

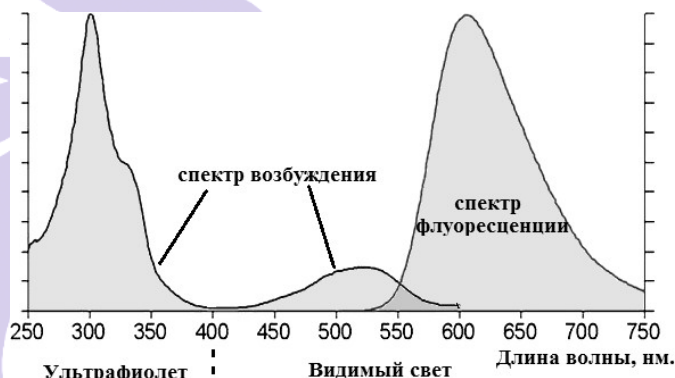
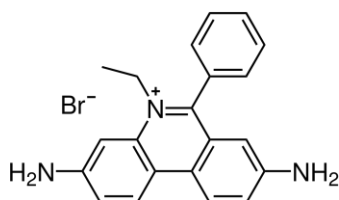
геля (верхняя левая, направление движения ДНК в геле сверху вниз). Сбросьте наконечник из-под маркера в крышку от чашки Петри.

Наденьте новый наконечник, отберите 6 микролитров реакционной смеси ПЦР образца А, добавьте в первую каплю буфера для нанесения, перемешайте жидкости, пипетируя их 4-5 раз до первого упора, переведите пипетку на рабочий объем 8 микролитров, осторожно вылейте реакционную смесь А вместе с буфером для нанесения во вторую лунку Вашего геля. Сбросьте наконечник из-под образца А в крышку от чашки Петри.

Повторите описанную выше процедуру для образца В (вторая капля, вносится в третью лунку), С (третья капля, в четвертую лунку) и Х (четвертая капля, в пятую лунку). Готовый гель отдайте преподавателю, получите у него фото геля после электрофореза. Переходите к теоретическим заданиям.

Пояснения по поводу метода детекции ДНК в геле бромистым этидием

Рассмотрите формулу и спектры возбуждения и флуоресценции ДНК-связывающего красителя бромистого этидия, которым обычно окрашивают гели для визуализации результатов электрофореза. Как вы считаете, с какими химическими группами в ДНК связывается этидий и каков механизм стабилизации комплексов ДНК-этидий? Свет каких «цветов» подходит для проявки окрашенных этидием гелей?



Пояснения по поводу метода ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является по сути искусственной репликаций определенной последовательности ДНК *in vitro*. В отличие от обычной репликации для проведения ПЦР не нужны природные РНК-затравки (праймеры), а используются заранее химически синтезированные ДНК-олигонуклеотиды, которые определяют границы реплицируемой последовательности. Обычно используется два таких олигонуклеотида-праймера, называемые

«прямой» и «обратный», для репликации одной и другой нитей ДНК соответственно. Для денатурации двойной спирали используется нагрев до 95°C. Это влияет на выбор ферментов для репликации – белки обычных организмов в этих условиях денатурировали бы, поэтому используются белки термофильных архей и эубактерий. Оптимальная температура для обычно используемой при ПЦР Taq-полимеразы составляет 72°C. Ещё одна температура, используемая в трёхшаговом цикле ПЦР, зависит от температуры диссоциации праймеров от матрицы ДНК и обычно составляет 55-60°C. В ходе одного цикла ПЦР последовательно происходит денатурация двойной спирали, связывание праймеров с матрицей (отжиг), и достройка новых нитей ДНК. Затем три этих шага повторяют (происходит следующий цикл), по итогам 30-40 циклов количество амплифицируемой ДНК в реакционной смеси возрастает на несколько порядков. Кроме праймеров и ферментов репликации в реакционной смеси должны находиться 5'-нуклеозидтрифосфаты для синтеза ДНК, буферизующие рН соли и соли катионов, стабилизирующих двунитевую структуру ДНК-матрица/праймер.

Вопросы смотрите в бланке для ответов

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

Эксперимент 2 - Антиоксидантная активность экстракта кофе

	Материалы
1	Микропланшет на 96 лунок
2	Пробирка с 300 µl раствора аскорбиновой кислоты (1 мг/мл) (АА)
3	Пробирка с 300 µl экстракта кофе (5 мг/мл) (СС)
4	Пробирка с 10 мл раствора DPPH (0,2 мМ) (DPPH)
5	Автоматическая пипетка
6	Наконечники для микропипетки
7	Деионизованная вода (dH ₂ O)
8	Круглый пластиковый контейнер для жидких отходов
9	Квадратный пластиковый контейнер для твердых отходов
10	Бумажные салфетки

Биологическое окисление приводит к возникновению активных радикалов кислорода, которые могут вызывать серьезные поражения клеток. Антиоксиданты — это молекулы, способные связывать радикалы и ингибировать реакции окисления. В эту группу входят такие вещества, как тиолы, аскорбиновая кислота и полифенолы. Кофе, приготовленный из поджаренных кофейных зерен, является потенциальным источником антиоксидантов.

В этом эксперименте был проведен анализ антиоксидантной активности 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH), в котором это соединение восстанавливается, что сопровождается потерей розовой окраски. Для описания антиоксидантной активности применяется коэффициент SC₅₀, который представляет собой концентрацию образца, которая связывает 50% радикалов DPPH. Поглощение раствора DPPH измеряется при 517 нм.

Поглощением растворителя можно пренебречь. Поглощение контрольного образца (в отсутствие антиоксиданта, A_c) и опытного образца (A_s) используется для расчета процента ингибирования (SC%) для каждой концентрации образца по следующей формуле:

$$SC\% = (A_c - A_s) \times 100 / A_c,$$

На основании логарифмов концентраций серии образцов и соответствующего процента ингибирующего действия антиоксиданта строится график, по которому будет определяться величина SC₅₀.

В этом опыте исследовалась антиоксидантная активность зерен вьетнамской разновидности кофе (*Coffea canephora*). Порошок кофейных зерен (1г) суспендировали в деионизированной воде и инкубировали при 80 °С в течение 30 минут, затем профильтровали и довели объем водой для получения 200 мл экстракта.

Ход работы и вопросы

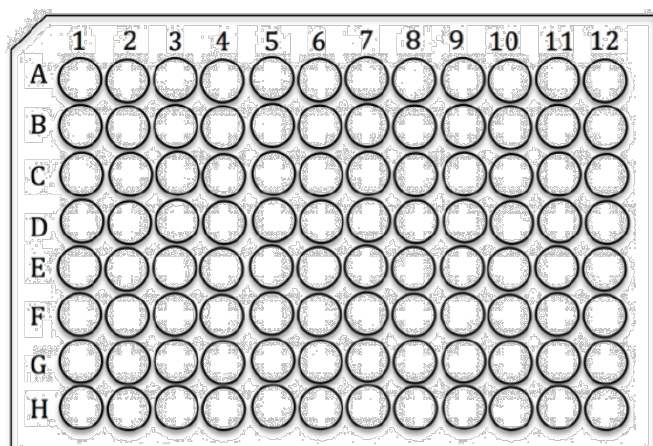


Рис.2.1.

96-луночный микропланшет

Микропланшет с 96-лунками может быть использован для серийного разведения. Положение лунок по вертикали на микропланшете обозначено номерами (1–12), тогда как буквы (A–H) указывают на ряды по горизонтали

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

1. Приготовьте при помощи микропипетки 4 раствора аскорбиновой кислоты (AA1 - AA4 в лунках A1 - A4 96-луночного микропланшета) и 4 раствора экстракта кофе (CC1 - CC4 в лунках A6 - A9 96-луночного микропланшета), последовательно разводя растворы в 2 раза.
2. Необходимо сделать минимальные концентрации аскорбиновой кислоты и экстракта кофе равными 0.025 мг/мл и 0.625 мг/мл, соответственно. Объем каждого раствора должен составлять 200 μ л перед началом следующего разведения. Обратите внимание, что, если вы сделаете ошибку в любом из этих разведений, используйте лунки H1 - H4 для растворов аскорбиновой кислоты AA1 - AA4 и/или лунки H6 - H9 для растворов экстракта кофе.

1) Впишите в таблицу в Листе ответов ваши расчеты для приготовления разведений аскорбиновой кислоты и экстракта кофе.

Разводимый раствор	AA1	AA2	AA3	AA4	CC1	CC2	CC3	CC4
Раствор (μ л) для приготовления разведения								
Объем добавляемой воды H ₂ O (μ л)								
Концентрация (мг/мл)				0.025				0.625

2. Наберите пипеткой по 20 мкл растворов аскорбиновой кислоты и/или экстракта кофе из лунок в ряду А перенесите их в соответствующие лунки в рядах В, С и D. Если на этой стадии вы сделаете ошибку, действие можно повторить, используя соответствующие лунки в рядах E, F и G.
 3. Внесите пипеткой 20 μ л H₂O в лунки B11, C11 и D11.
 4. Внесите пипеткой по 180 μ л раствора DPPH в каждую из лунок, приготовленных в шагах 2 и 3.
 5. Закройте микропланшет крышкой и оставьте при комнатной температуре на 1 минут. Включите таймер.
- После завершения этого шага поднимите зеленую карточку, чтобы ассистент измерил поглощение на спектрофотометре и вернул вам распечатку результатов.

2)

Рассчитайте логарифмы концентраций (\log_{10}) растворов аскорбиновой кислоты и экстракта кофе и внесите их в таблицу в Листе ответов (с точностью до двух знаков после запятой). Используйте калькулятор для вычисления логарифма следующим образом;

Раствор	Контроль	AA1	AA2	AA3	AA4	CC1	CC2	CC3	CC4
Log ₁₀ Концентрации (мг/мл)									
Строка В микропланшета	0,92	Результаты спектрофотометра будут выданы после того как вы дали заполненные микропланшеты для измерения к лаборанту							
Строка С микропланшета	0,91								
Строка D микропланшета	0,87								
Среднее значение поглощения									
SC%									

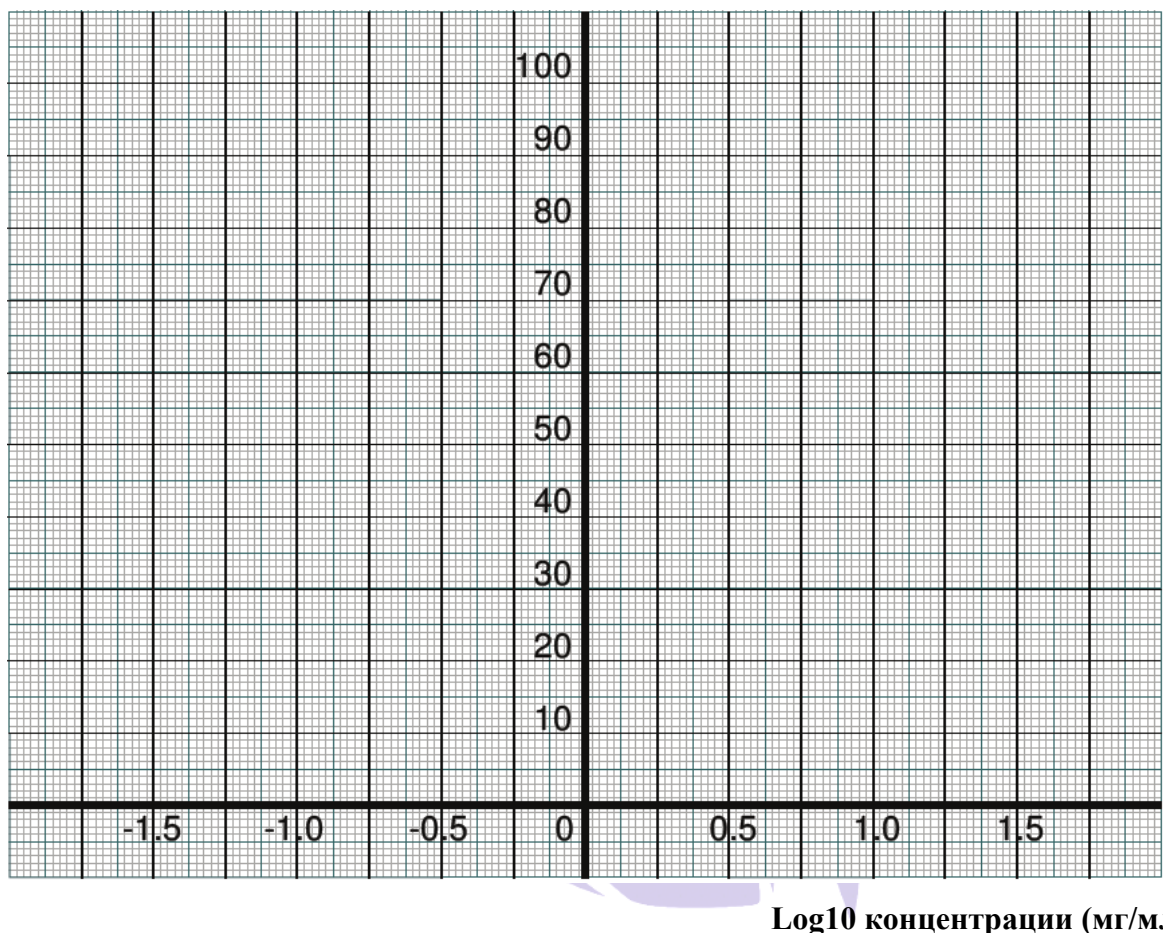
Нажмите клавишу ON для включения калькулятора
 Нажмите клавишу log, Введите число, Нажмите клавишу =

Рассчитайте средние значения поглощения для каждого разведения и внесите данные в таблицу в Листе ответов.

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

3) Используя рассчитанные вами значения, постройте график зависимости процента ингибирования от логарифма концентрации (\log_{10}) аскорбиновой кислоты на бумаге для графиков в Листе ответов.

Процент ингибирования SC (%)



4) Рассчитайте значения SC50 для аскорбиновой кислоты и экстракта кофе и внесите ответы в таблицу в Листе ответов. (Вы можете нарисовать соответствующий график для экстракта кофе на координатной бумаге, предоставленной в Q.2.3, но этот график не будет оцениваться).

Аскорбиновая кислота:

Экстракт кофе:

5)

С использованием такого же метода были определены следующие значения SC50 экстрактов некоторых разновидностей кофе:

Экстракт кофе	SC50
X	3,8 мг/мл
Y	2,6 мг/мл

Сравните антиоксидантную активность разных сортов кофе, включая данные вашего опыта (Z), и расположите сорта кофе в порядке убывания антиоксидантной активности от самого сильного до самого слабого и внесите результаты в соответствующие клетки в Листе ответов.

() > () > ()

4 – Этап Практика по Молекулярной Биологии

6)

Будем считать, что в вашем эксперименте поглощение всех смесей растворов различных разведенных экстрактов кофе и DPPH было одинаковым и незначительным. Укажите, является ли каждое из приведенных ниже утверждений правильным или неправильным. Для каждого утверждения отметьте значком (✓) в Листе ответов, является ли оно Правильным или Неправильным.

() – А) Антиоксидантная активность разведенных экстрактов кофе является незначительной.

() – В) Для более точного определения антиоксидантной активности необходимо провести другой опыт с более высокой концентрацией образцов.

() – С) Полученные результаты объясняются активностью антиокислительных ферментов в экстрактах кофе.

() – D) Если бы в лунки был добавлен NADH, полученные значения поглощения не изменились бы.

7)

Студент определил антиоксидантную активность по той же методике, как вы (Протокол А) и по видоизмененной методике (Протокол А*). Результаты представлены в таблице ниже.

Протокол А	Протокол А*
SC50 (мг/мл)	1,95
	3,9

Какие из следующих изменений могли бы привести к более высокому значению SC50? Для каждого утверждения обозначьте знаком (✓) в Листе ответов, Правильное оно или Неправильное.

() – А) В Протоколе А* студент использовал 0.1 мМ раствор DPPH.

() – В) В Протоколе А* студент вносил в каждую лунку по 10 мл образца.

() – С) После добавления DPPH студент инкубировал микропланшет более короткое время, чем в Протоколе А.

() – D) Студент использовал более хороший растворитель для антиоксидантов.

Olympiad League