УТВЕРЖДЕНО
Заместитель председателя
организационного комитета заключительного этапа
республиканской олимпиады, заместитель Министра
образования Республики Беларусь

Р.С.Сидоренко

«_____» марта 2015 г.

Место для баллов:	**Код:**

Заключительный этап республиканской олимпиады по «Биологии» (2014-2015)

Кабинет 2 (40 баллов). «Молекулярная биология и биохимия»

ЗАДАНИЕ 1 (20 баллов). Изучение мембранного белка RsnB

Материалы и оборудование: 12 пробирок с образцами микросом (1, 1А, 1Б, 1В, 2, 2А, 2Б, 2В, 3, 3А, 3Б, 3В); 1 пробирка с раствором X-Gal; пипетки, 12 пустых пробирок; маркер.

Вы изучаете новый белок RsnB *Saccharomyces cerevisiae*, предположительно локализованный в мембране эндоплазматического ретикулюма. Известно, что график гидропатии аминокислотных остатков (график Кейта-Дуллиттла) можно использовать для идентификации вероятных трансмембранных сегментов в белках. На рисунке 1 представлен график гидропатии исследуемого белка RsnB.

Рисунок 1. График гидропатии белка RsnB.

Для экспериментального изучения расположения RsnB в мембране Вы создали три генетические конструкции кодирующие гибридные белки, состоящие из полноразмерного белка RsnB (или его фрагментов) и фермента β-галактозидазы на С-конце. Строение полученных гибридных белков схематично изображено на рисунке 2.

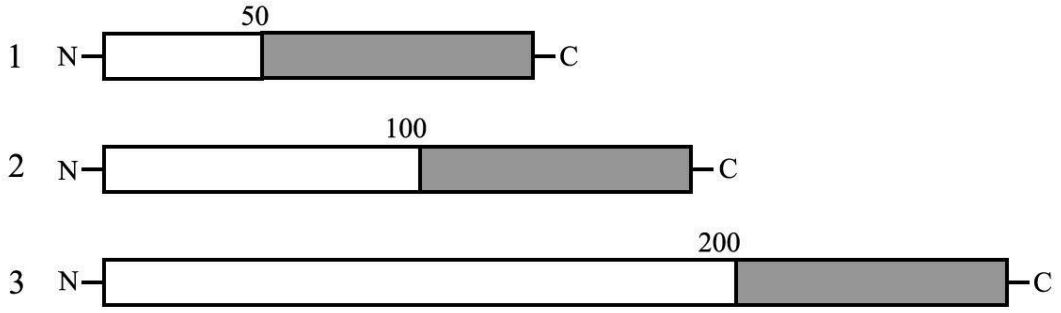


Рисунок 2. Три варианта гибридных белков для изучения мембранной топологии RsnB. Неокрашенные прямоугольники соответствуют белку RsnB или его фрагментам. Окрашенные прямоугольники соответствуют β-галактозидазе. Цифры над рямоугольниками соответствуют количеству аминокислотных остатков белка RsnB, использованных для создания гибридных белков.

Затем созданные генетические конструкции 1, 2 и 3 Вы трансформируете в клетки дрожжей, а затем из клеток трансформантов выделяете фракцию ЭПР (микросомы). **Пробирки 1, 2** и **3** на Вашем столе содержат полученные суспензии микросом. Кроме того, часть выделенных микросом Вы подвергаете обработке протеиназой К (**пробирки 1А, 2А, 3А**); детергентом Triton X-100 (**Пробирки 1Б, 2Б, 3Б**); протеиназой К и детергентом Triton X-100 (**1В, 2В, 3В**). Осталось совсем немного работы – измерить активность β-галактозидазы в полученных образцах и сделать правильный вывод.

<u>1.1 (6 баллов)</u>. В пустые пробирки перенесите по 2 капли исследуемых препаратов микросом. Затем в эти же пробирки внесите равное количество раствора X-Gal (5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактопиранозид). X-Gal является субстратом для β-галактозидазы, который в ходе ферментативной реакции расщепляется до галактозы и 5-бромо-4-хлоро-3-гидроксииндола. Последний быстро окисляется в 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-индиго, имеющий синюю окраску.

ВНИМАНИЕ! Меняйте пипетки, перед тем как набирать новый раствор!

Отметьте изменение окраски и данные внесите в таблицу 1.

Таблица 1

	Фракция 1	**Фракция 2**	**Фракция 3**
Микросомы			
Микросомы + протеиназа К			
Микросомы + Triton X-100			
Микросомы + протеиназа К + Triton X-100			

<u>1.2 (14 баллов)</u>. На основании графика гидропатичности и результатов экспериментальной работы определите расположение белка RsnB в мембране эндоплазматического ретикулюма. Ответ изобразите в пустом квадрате, используя в качестве примера Рисунок 3.

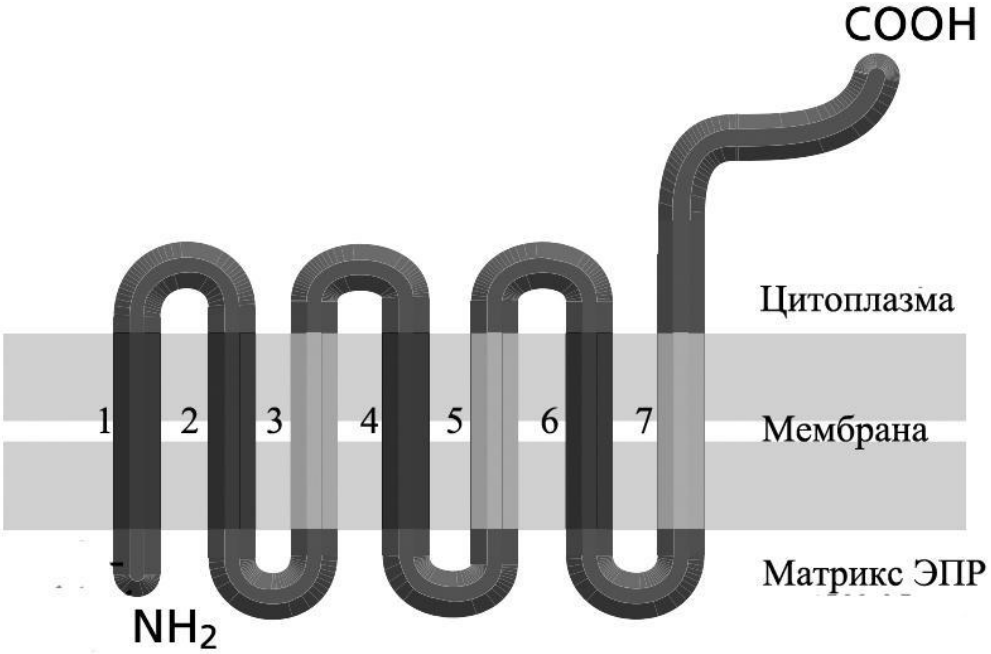


Рисунок 3. Расположение в мембране белка родопсина, содержащего 7 трансмембранных участков.

ЗАДАНИЕ 2 (20 баллов). Рестрикционное картирование

Аспирант Вася провел следующий эксперимент. Он обработал хромосомную ДНК из клеток печени мыши рестриктазой *Nde*I. Полученные фрагменты он лигировал в плазмидный вектор pLA13, предварительно разрезанный той же рестриктазой. Одна из полученных рекомбинантных плазмид, несущих вставку неизвестного размера была названа pVasya.

Затем ДНК pVasya и вектора pLA13 разрезалась рестриктазами *Nde*I, *Eco*RI или двумя этими рестриктазами одновременно. Образовавшиеся в результате фрагменты ДНК Вася разделял электрофорезом в агарозном геле. Результаты элктрофореза схематично изображены на рисунке 4.

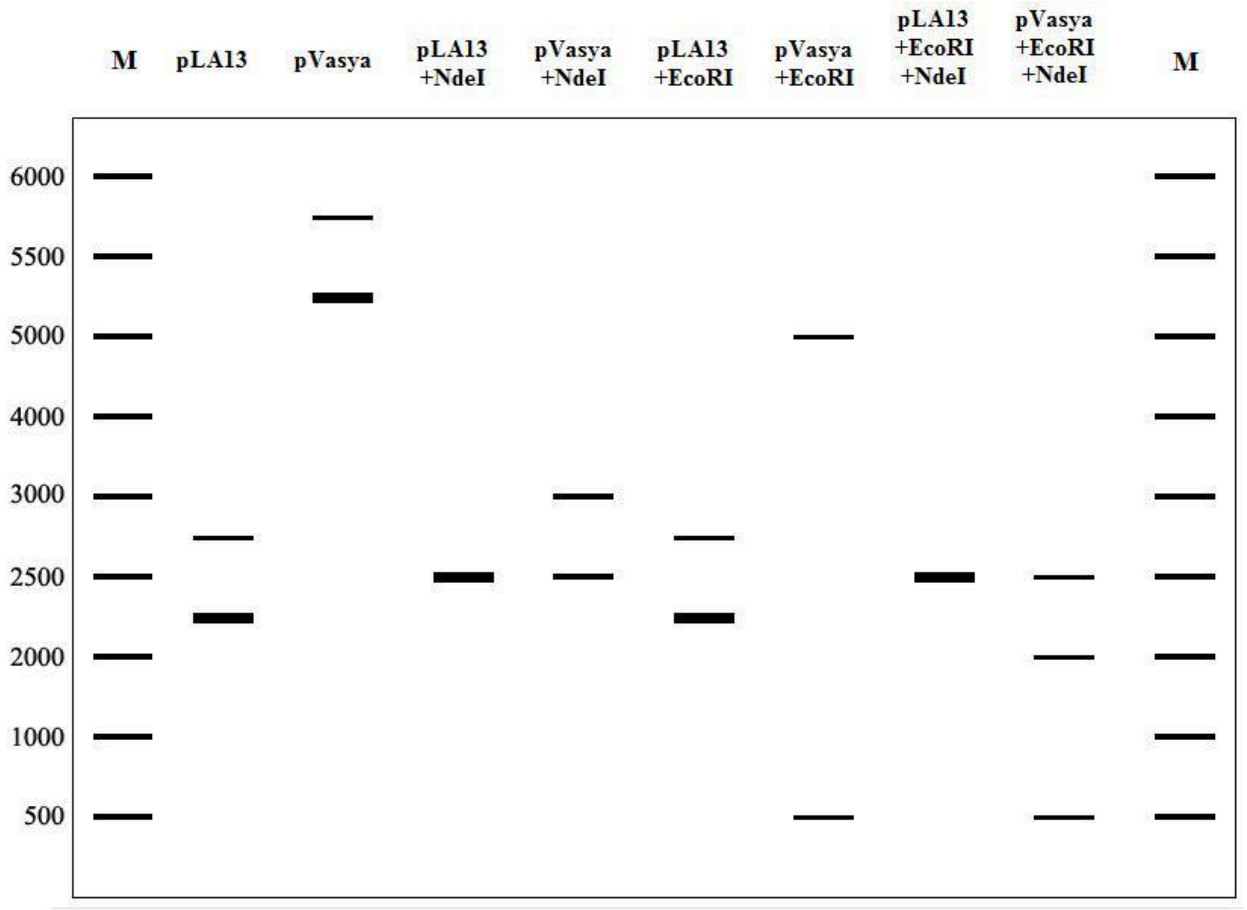
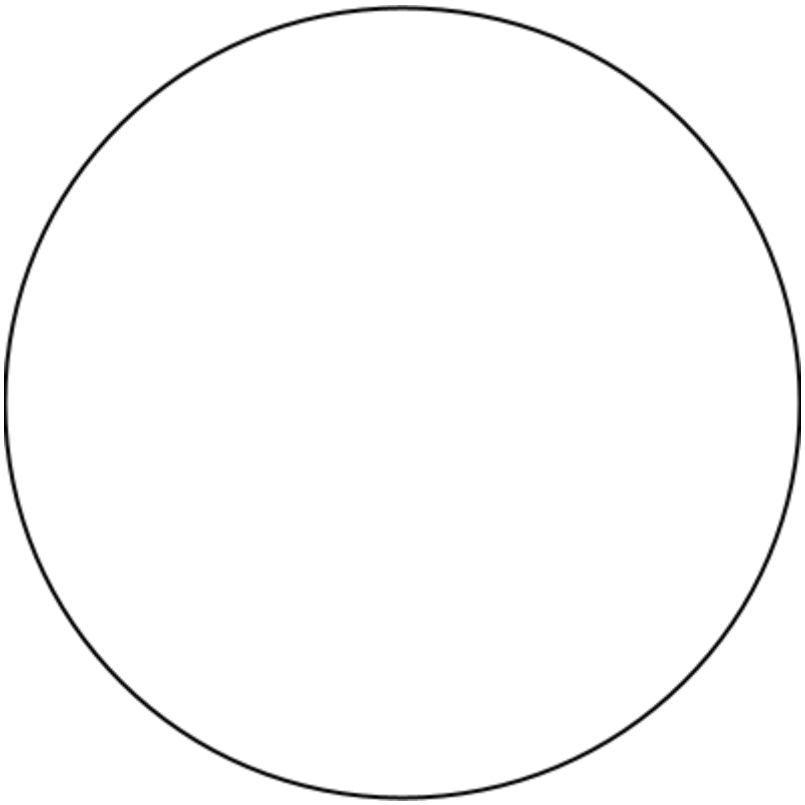


Рисунок 4. Схематичное изображение электрофореграммы продуктов рестрикции плазмид pVasya и pLA13.

<u>Задание 2.1 (5 баллов)</u> Помогите Василию разобраться с результатами рестрикции. Ответы на вопросы впишите в соответствующие ячейки таблицы 2.

Таблица 2.

Вопрос	Ответ
Каков размер вектора pLA13 (т.п.н.)?	
Какой размер вставки (т.п.н.)?	
Сколько сайтов рестрикции *Eco*RI содержится в плазмиде pVasya?	
Сколько сайтов рестрикции *Nde*I содержится в плазмиде pVasya?	
Сколько сайтов рестрикции *Eco*RI содержится в плазмиде pLA13.	

<u>Задание 2.2 (15 баллов)</u> Постройте рестрикционную карту плазмиды pVasya используя окружность, нарисованную ниже.