Место для баллов:	Код:

Республиканская олимпиада школьников 2018

КАБИНЕТ 3. Клеточная биология и биохимия (*30 баллов*).

Перед выполнением заданий убедитесь, что на Вашем рабочем столе присутствуют все позиции из перечня «Материалы и оборудование».
Если что-то из перечисленного отсутствует, немедленно поднимите руку и позовите дежурного преподавателя!

Материалы и оборудование

РАЗДЕЛ 1. Клеточная биология

Задание 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ КРАХМАЛА В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ БАНАНА МЕТОДОМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ.

1.	Исследовательский микроскоп	1 шт.
2.	Предметное стекло	2 шт.
3.	Покровное стекло	4-5 шт.
4.	Чашка Петри с образцами растений	1 шт.
5.	Салфетки бумажные	4-5 шт.
6.	Препаровальная игла	2 шт.
7.	Флакон с физиологическим раствором	1 шт.
8.	Глазная пипетка	1 шт.

Задание 2. УСТАНОВЛЕНИЕ ГЕНОТИПА КУЛЬТУРНОГО БАНАНА И ЕГО РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГИБРИДОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА. (*Лабораторный штатив для пробирок, маркированный* «**ГЕНЕТИКА**»)

1.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* с массовой долей крахмала 1%.	образец № 1
2.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* с массовой долей крахмала 2%.	образец № 2
3.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* с массовой долей крахмала 3%.	образец № 3
4.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* с массовой долей крахмала 4%.	образец № 4
5.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* с массовой долей крахмала 5%.	образец № 5
6.	Раствор крахмала из паренхимы плодов триплоидного гибрида $\mathbf{F_1}$.	образец № 6
7.	Раствор крахмала из паренхимы плодов тетраплоидных бананов *Musa x paradisiaca* неизвестного происхождения.	образец № 7

8.	Реактив для определения содержания крахмала в образце	реактив
9.	Деревянные зубочистки	7 шт.
10.	Пипетки Пастера или глазные пипетки	8 шт.
11.	Прозрачный файл со вставленным белым листом бумаги	1 шт.
12.	Салфетки бумажные	3-4 шт.
13.	Перманентный маркер (стеклограф)	1 шт.

Задание 3. ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ БАНАНА. (*Лабораторный штатив для пробирок, маркированный* «**МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**»)

1.	Белки ЭПР из клеток с генетической конструкцией 1.	образец № 1
2.	Белки ЦП из клеток с генетической конструкцией 1.	образец № 2
3.	Белки ПС из клеток с генетической конструкцией 1.	образец № 3
4.	Белки ЭПР из клеток с генетической конструкцией 2.	образец № 4
5.	Белки ЦП из клеток с генетической конструкцией 2.	образец № 5
6.	Белки ПС из клеток с генетической конструкцией 2.	образец № 6
7.	Белки ЭПР из клеток с генетической конструкцией 3.	образец № 7
8.	Белки ЦП из клеток с генетической конструкцией 3.	образец № 8
9.	Белки ПС из клеток с генетической конструкцией 3.	образец № 9
10.	Белки ЭПР из клеток с генетической конструкцией 4.	образец № 10
11.	Белки ЦП из клеток с генетической конструкцией 4.	образец № 11
12.	Белки ПС из клеток с генетической конструкцией 4.	образец № 12
13.	Раствор крахмала	Реактив 1
14.	Реактив для определения содержания крахмала в образце	Реактив 2
15.	Лист бумаги А4 в файле	1 шт.
16.	Пипетки Пастера	14 шт.
17.	Деревянные зубочистки	13 шт.
18.	Салфетки бумажные	3-4 шт.

РАЗДЕЛ 2. Биохимия

(*Лабораторный штатив для пробирок, маркированный* «**БИОХИМИЯ**»)

РАЗДЕЛ 1. Клеточная биология (*22 балла*)

АНАЛИЗ НАСЛЕДОВАНИЯ ПРИЗНАКА «УРОВЕНЬ ЗАПАСНОГО ПИТАТЕЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА КРАХМАЛА» У КУЛЬТУРНОГО БАНАНА (род *Musa*).

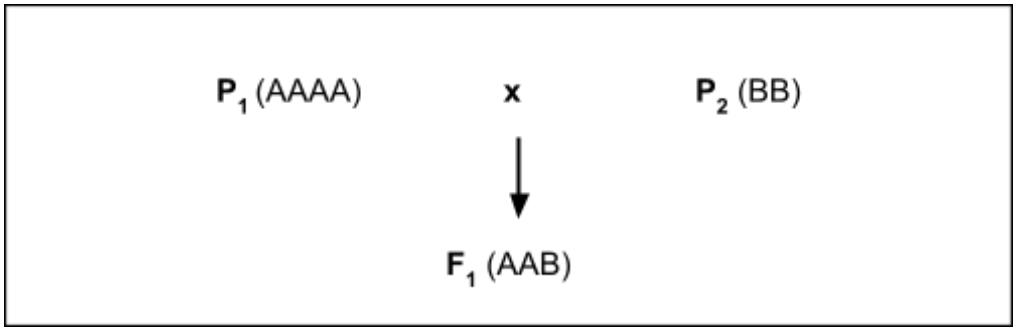
Банан – распространенная пищевая культура, возделываемая в тропических странах. Большинство выращиваемых в настоящее время сортов бананов являются производными одного культигена созданного человеком – *Musa x paradisiaca*, который является гибридом банана заострённого (*Musa acuminata*), банана Бальбиса (*Musa balbisiana*) и реже банана Маклая (*Musa maclayi*). В настоящее время известно около 500 культивируемых сортов этого растения, но генетики-селекционеры постоянно продолжают создавать новые формы с улучшенными пищевыми качествами и повышенной устойчивостью к патогенам. Для того чтобы вести целенаправленную работу по созданию сортов банана с более высокими пищевыми характеристиками необходимо знать об особенностях наследования такого признака как «уровень запасного питательного вещества крахмала» в клетках плодов этого растения.

Целью Вашей работы будет являться определение особенностей наследования признака «уровень запасного питательного вещества крахмала» у банана *Musa x paradisiaca*.

В предварительных экспериментах было установлено, что при скрещивании одной из форм (**СОРТ!!!**) культурного банана *Musa **x** paradisiaca* (P_1) и сортовой формы банана Бальбиса *Musa balbisiana* (P_2) у гибридов (F_1) наблюдается повышенный уровень запасного питательного вещества крахмала в паренхиме клеток плодов. У исходных родительских форм $\mathbf{P_1}$ и $\mathbf{P_2}$ крахмала в клетках накапливается мало, и **эти растения фактически не отличаются между собой по уровню этого запасного питательного вещества**.

Использованная в этом скрещивании форма культурного банана *Musa **x** paradisiaca* (P_1) является тетраплоидом и ее гаплоидный хромосомный набор принято обозначать **буквой А**. Банан Бальбиса *Musa balbisiana* (P_2) – это диплоид, и его гаплоидный набор хромосом в специальной литературе принято обозначать **буквой В**. Полученные в результате такого скрещивания гибриды (F_1) являются триплоидами (см. схему опыта).

Схема опыта.



При выполнении заданий первого раздела Вам необходимо решить следующие задачи:

- методом световой микроскопии определить уровень крахмала в клетках банана;
- по результатам гибридологического анализа определить генотипы исходных родительских форм (P_1 и P_2), гибридов первого поколения F_1 , и других гибридных форм по признаку уровень крахмала;
- определить локализацию альфа-амилазы в клетках запасающей паренхимы плодов растений культурного банана, и подобрать условия для успешной амплификации этого гена методом ПЦР.

ЗАДАНИЕ 1 (7,0 БАЛЛОВ). ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ КРАХМАЛА В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ БАНАНА МЕТОДОМ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ.

Вам даны образцы запасающей паренхимы плодов, взятых от трех растений банана – **P_1**, **P_2** и **F_1** (см. выше схему опыта). Они находятся в чашке Петри с обозначениями «образец №1», «образец №2» и «образец №3». Используя приведенную выше информацию об этих растениях Вам необходимо приготовить препараты клеток запасающей паренхимы для микроскопического анализа и определить уровень запасного питательного вещества крахмала.

Задание 1.1 (3,0 балла). Определение содержания крахмала в образцах 1-3.

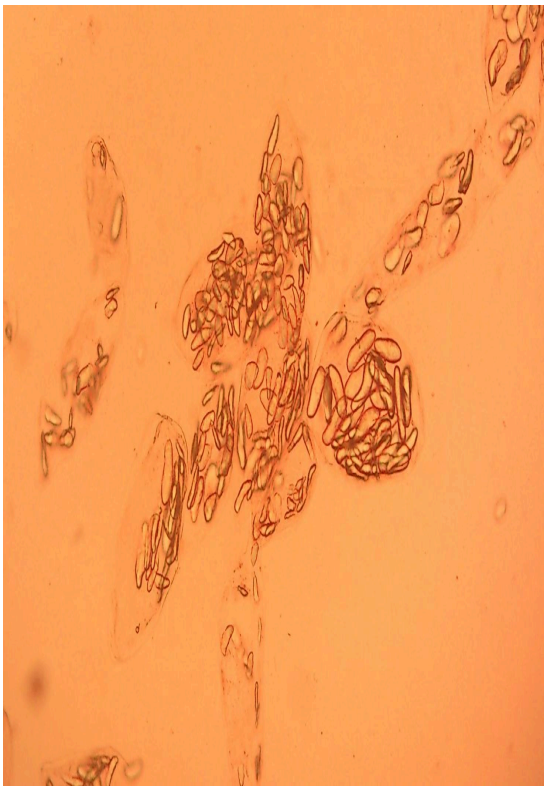
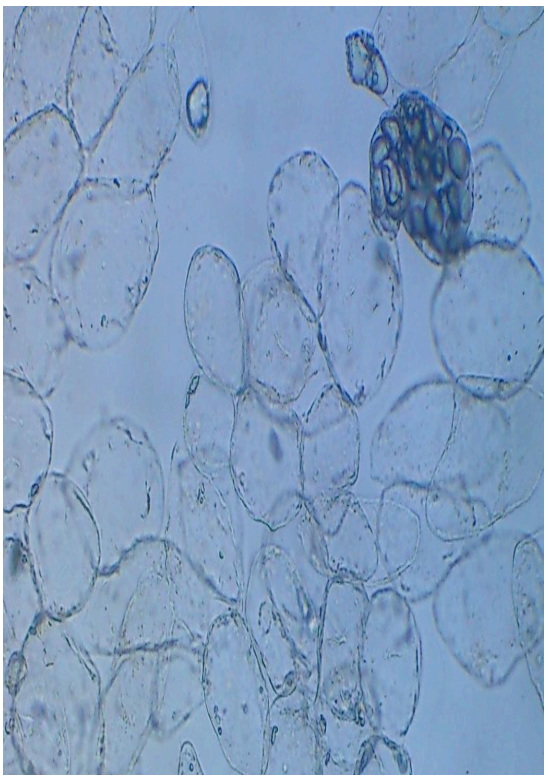
Методика приготовления цитологических препаратов (ход работы)

1. Отделите препаровальной иглой небольшой фрагмент ткани образца и перенесите на поверхность предметного стекла.
2. Перенесенный образец ткани слегка разомните препаровальной иглой.
3. Нанесите на фрагмент ткани каплю физиологического раствора из флакона. Если жидкости не достаточно, добавьте еще. **ВНИМАНИЕ!!!** *Не касайтесь пипеткой растительных клеток, что бы не загрязнить ими имеющийся флакон с физиологическим раствором.*
4. Накройте образец ткани покровным стеклом и слегка придавите его тупым концом препаровальной иглы. Нажим не должен быть сильным. Клетки должны распределится под поверхностью покровного стекла в один слой, но не быть разрушенными или лежать комками.
5. Рассмотрите приготовленный препарат с помощью светового микроскопа.

Приготовив как было описано выше цитологические препараты из трех предоставленных Вам образцов и, изучив их с помощью микроскопа, **определите в клетках каждого из них уровень запасного питательного вещества крахмала.** Ответы запишите в таблицу 2, указав их знаком (**V**) в соответствующей ячейке.

Таблица 1 (1,5 балла).

СОДЕРЖАНИЕ КРАХМАЛА	образец №1	образец №2	образец №3
ВЫСОКОЕ		V	
НИЗКОЕ	V		V

	
МНОГО крахмала (увеличение объектива х10)	**МАЛО крахмала (увеличение объектива х10)**

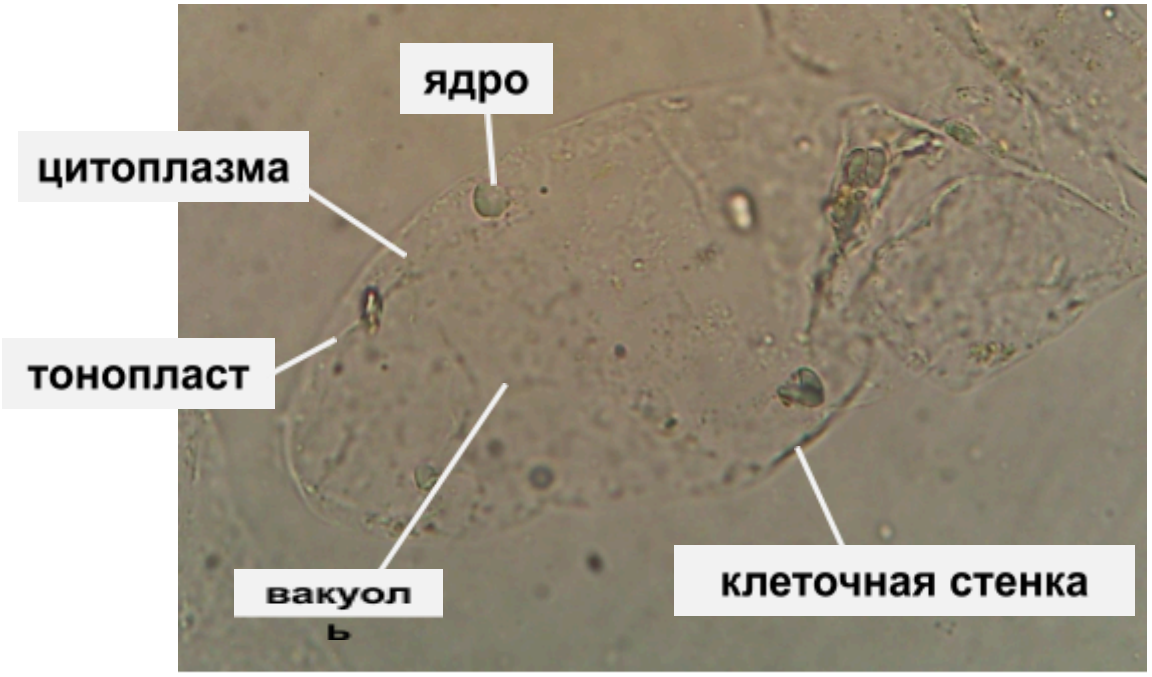
Проанализировав полученные с помощью световой микроскопии результаты (таблица 1) определите, вероятную принадлежность (растение P_1, P_2 или F_1, см. схему опыта) предоставленных Вам растительных образцов. Ответы запишите в таблицу 2, указав их знаком (V) в соответствующей ячейке.

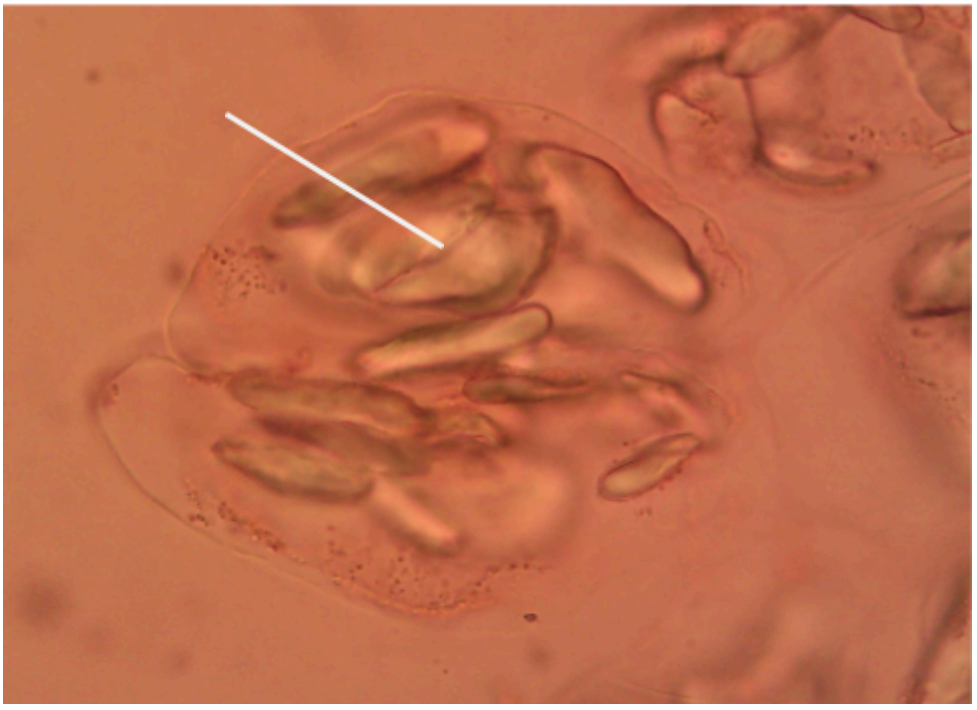
Таблица 2 (1,5 балла).

НОМЕР ПРОБЫ	**образец №1**	**образец №2**	**образец №3**
P_1	V		V
P_2	V		V
F_1		V	

<u>Задание 1.2 (2,0 балла). Зарисуйте клетку запасающей паренхимы банана</u> указав на рисунке следующие структуры:

- **цитоплазма;**
- **ядро;**
- **клеточная стенка;**
- **тонопласт**
- **вакуоль;**
- **запасное питательное вещество – крахмал.**





Оценка за рисунок _____.

ЗАДАНИЕ 2 (7,0 БАЛЛОВ). УСТАНОВЛЕНИЕ ГЕНОТИПА КУЛЬТУРНОГО БАНАНА И ЕГО РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ ПО ПРИЗНАКУ «УРОВЕНЬ ЗАПАСНОГО ПИТАТЕЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА КРАХМАЛА» ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ГИБРИДОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА.

Количество крахмала, содержащиеся в запасающей паренхиме плодов банана контролируется несколькими генами, которые мы условно обозначим как гены **D** и **E.** Доминантный аллель гена **D** обеспечивает повышенное содержание крахмала в клетке, причем для этого явления показана строгая линейная зависимость: чем больше доминантных аллелей представлено в генотипе, тем большее количество крахмала потенциально может быть накоплено клеткой. Эффективность работы гена **D** контролируется геном **E**, который и является геном-ингибитором гена **D**, однако ингибирующее действие оказывает только его рецессивный аллель **e**: у гомозиготной по этому аллелю особи содержание крахмала соответствует минимальному значению физиологической нормы.

Т.е. для тетраплоидных форм усредненный показатель количества крахмала в запасающей паренхиме плодов банана может варьировать от 1 до 5 г на 100 г паренхимы, а для диплоидных форм, соответственно от 1 до 3 г на 100 г.

На предварительном этапе Вам необходимо решить следующую задачу:

- ❑ определить содержание крахмала в представленных образцах
- ❑ если это возможно, то определить генотип (число доминантных аллелей) растений, из которых приготовлены эти образцы.

Задание 2.1 (1,0 балл). Приготовление калибровочного ряда.

Вам даны 5 контрольных образцов водного раствора крахмала (образцы 1-5), моделирующие таковые, полученные из паренхимы плодов тетраплоидных бананов ***Musa x paradisiaca*** гомозиготных по гену E, и имеющих различные генотипы по гену D:

№	образец 1	образец 2	образец 3	образец 4	образец 5
Генотип	dddd	Dddd	DDdd	DDDd	DDDD
Фенотип	1 г	2 г	3 г	4 г	5 г

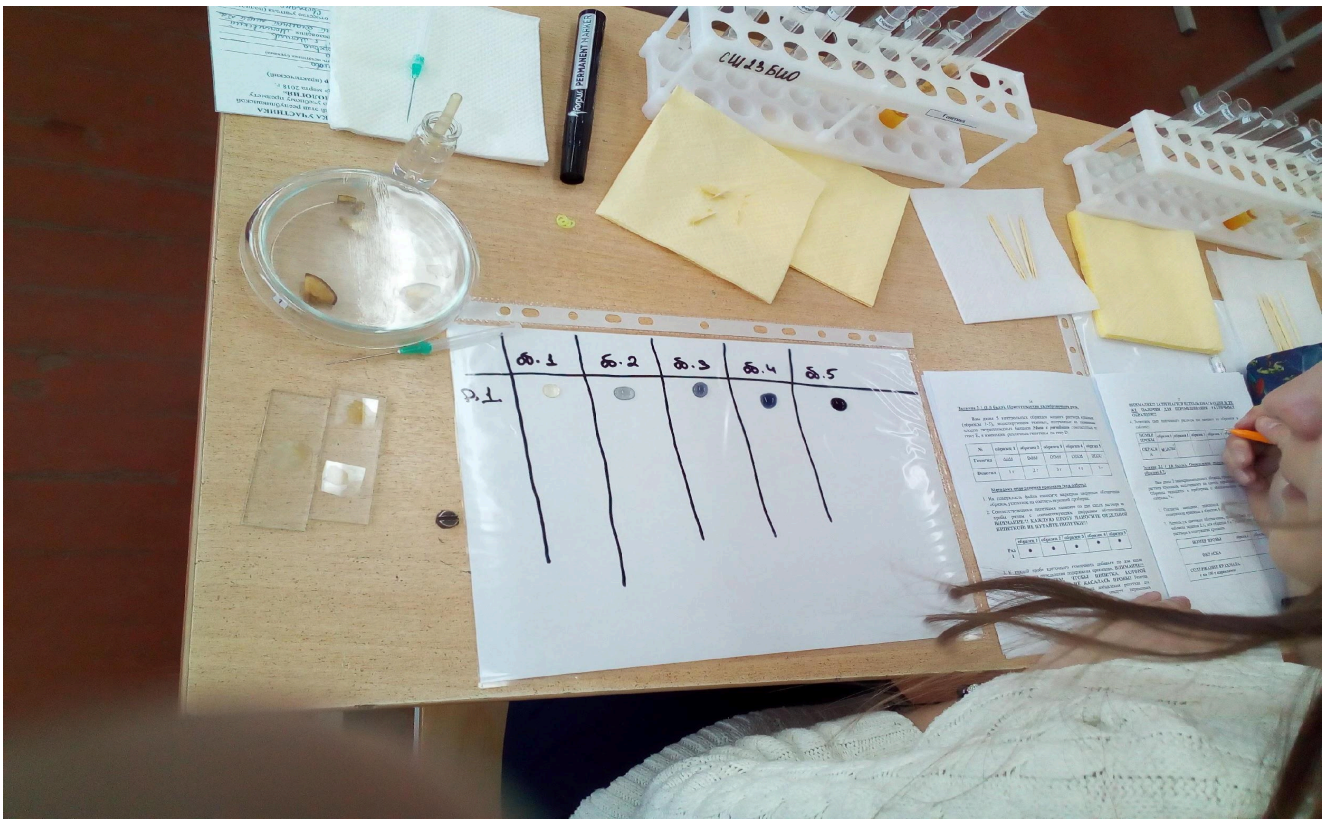
Методика определения крахмала (ход работы)

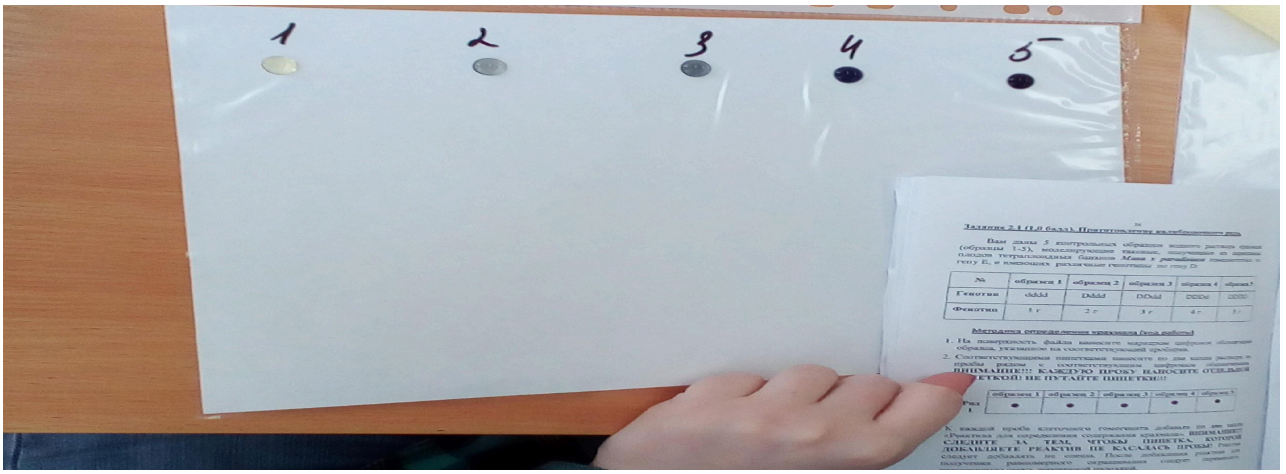
1. На поверхность файла нанесите маркером цифровое обозначение образца, указанное на соответствующей пробирке.
2. Соответствующими пипетками нанесите по две капли раствора из пробы рядом с соответствующим цифровым обозначением. **ВНИМАНИЕ!!! КАЖДУЮ ПРОБУ НАНОСИТЕ ОТДЕЛЬНОЙ ПИПЕТКОЙ! НЕ ПУТАЙТЕ ПИПЕТКИ!!!**

	образец 1	образец 2	образец 3	образец 4	образец 5
Ряд 1	□	□	□	□	□

3. К каждой пробе клеточного гомогената добавьте по **две** капли «Реактива для определения содержания крахмала». **ВНИМАНИЕ!!! СЛЕДИТЕ ЗА ТЕМ, ЧТОБЫ ПИПЕТКА, КОТОРОЙ ДОБАВЛЯЕТЕ РЕАКТИВ НЕ КАСАЛАСЬ ПРОБЫ!** Реактив следует добавлять не спеша. После добавления реактива для получения равномерного окрашивания следует перемешать реакционную смесь деревянной палочкой.

   ВНИМАНИЕ!!! ЗАПРЕЩАЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ <u>ОДНИ И ТЕ ЖЕ</u> ПАЛОЧКИ ДЛЯ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ!!!
4. Запишите цвет полученного раствора для каждого из образцов в таблицу:





НОМЕР ПРОБЫ	образец 1	образец 2	образец 3	образец 4	образец 5
ОКРАСКА	Желтый, Бесцветный, Неокрашеный, Прозрачный, Белый	Градация оттенков, серого, синего, фиолетового и т.д.			

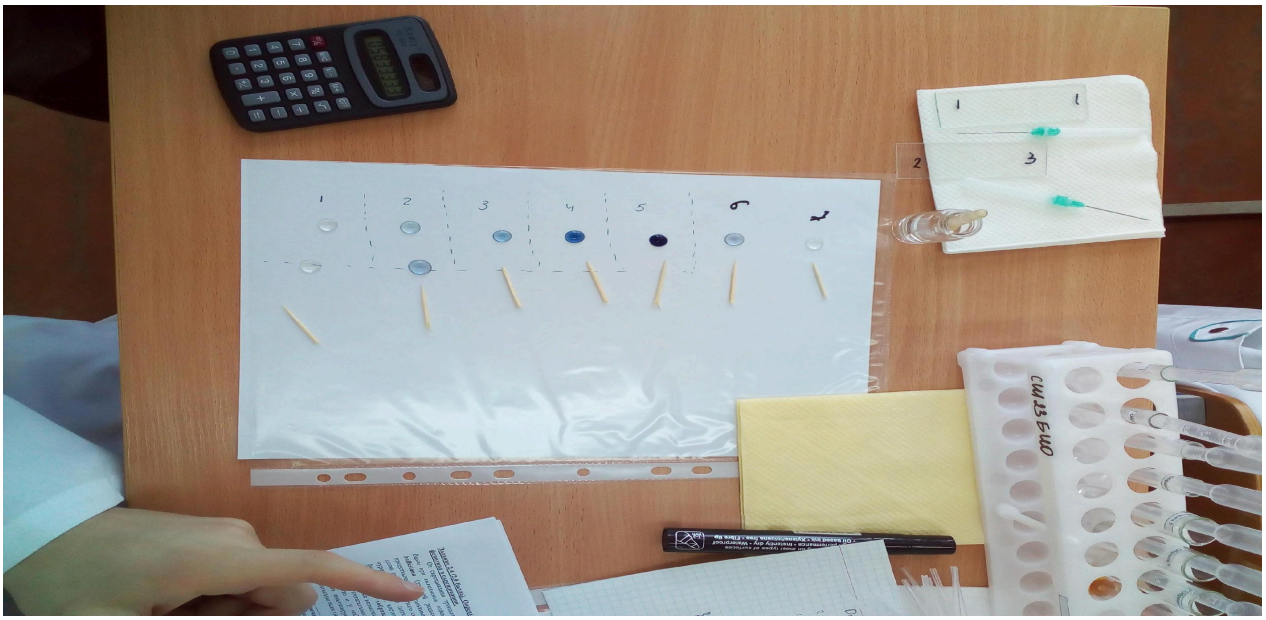
0,2 за ячейку **Градация оттенков, серого, синего, фиолетового и т.д.**

Задание 2.2 (1,0 балла). Определение содержания крахмала в образцах 6-7.

Вам даны 2 экспериментальных образца, представляющие водный раствор крахмала, выделенного из клеток паренхимы плодов банана. Образцы находятся в пробирках с обозначениями «образец 6» и «образец 7».

1. Согласно методике, описанной в задании 1.2.1, определите содержание крахмала в образцах 6 и 7.

2. Используя цветовые обозначения, принятые Вами при заполнении таблицы задания 2.1, для образцов 6 и 7 укажите цвет полученного раствора и содержание крахмала.



НОМЕР ПРОБЫ	образец 6	образец 7
ОКРАСКА	Как у образца 2	Как у образца 1
СОДЕРЖАНИЕ КРАХМАЛА, г на 100 г паренхимы	2	1

Задание 2.3 (3,0 балла). Определение генотипа гибрида F_1 и его родительских форм по генам, контролирующим признак «уровень запасного питательного вещества крахмала».

Повторите схему опыта, изложенную в **задании 1**.

Вам необходимо, используя принятые обозначения генов **D** и **E**, определить генотипы исходных родительских форм ***Musa x paradisiaca*** **(P_1),** ***Musa balbisiana*** **(P_2)** и полученного триплоидного гибрида F_1, если известно, что:

1) У исходных родительских форм P_1 и P_2 содержание крахмала соответствует минимальной физиологической норме и равно 1 г на 100 г паренхимы.
2) Содержание крахмала у полученного триплоидного гибрида F_1 определено Вами при выполнении задания 2.2 и **составляет 2 г** на 100 г паренхимы.
3) Полученные гибриды F_1 являются строгими партенокарпиками.

Партенокарпия (от греч. *parthenos* — «девственница» и *karpos* — плод; дословно — «девственный плод») — частный случай партеногенеза,

образование на растении плодов без оплодотворения. Плоды, образующиеся при партенокапии бессемянные или содержат семена без зародышей. Различают вегетативную или автономную партенокапию, когда плоды завязываются и развиваются без опыления, и стимулятивную - когда для образования плода требуется раздражение рыльца цветка чужеродной пыльцой (напр., пыльца яблони способна вызвать партенокарпию у груши, пыльца томата — у баклажана и т. д.). Искусственно вызываемая стимулятивная партенокарпия (механическими, химическими, тепловыми раздражениями) имеет хозяйственное значение, т. к. получаемые при этом плоды отличаются обилием, сочностью, мясистостью и хорошими вкусовыми качествами.

4) При скрещивании триплоидного гибрида **F_1** с различными сортовыми формами ***Musa balbisiana*** результаты скрещиваний различались как по числу фенотипических классов так и по их частоте встречаемости. В зависимости от генотипа сорта было получено потомство, среди которого были характерны следующие расщепления.

Если генотип ***Musa balbisiana*** был DDee, то среди полученного потомства наблюдалось следующее расщепление по признаку «уровень запасного питательного вещества крахмала»: у 22% - 3г, у 45% - 2г, у 33% - 1г.

Если же генотип у ***Musa balbisiana*** был ddEE, то полученное потомство по признаку «уровень запасного питательного вещества крахмала» можно было разделить только на два фенотипических класса в следующем соотношении: у 67% особей - 1г, у 33% - 2г.

Определить генотипы исходных родительских форм: *Musa x paradisiaca* (P_1), *Musa balbisiana* (P_2) и полученного триплоидного гибрида F_1. Заполните таблицу, используя принятые обозначения генов **D** и **E**.

РАСТЕНИЕ	**P_1** ***Musa x paradisiaca*** (тетраплоид)	**P_2** ***Musa balbisiana*** (диплоид)	**F_1** **гибрид** (триплоид)
ГЕНОТИП	**ddddEEEE**	**DDee**	**DddEEe**

1 балл за ячейку

<u>Задание 2.4 (2,0 балла). Определение доли потомков определенного фенотипа в скрещивании.</u>

От скрещивании триплоидного гибрида **F_1** (*генотип определен Вами при выполнении задания 2.3*) с диплоидной формой ***Musa balbisiana*** (двойной рециссив ddee) было получено потомство, представленное несколькими фенотипическими классами. Определите долю потомков от этого скрещивания, фенотип которых по признаку «уровень запасного питательного вещества крахмала» совпадает с фенотипом особи, клеточный гомогенат которой

использовался для приготовления «**образца 7**». В анализируемом скрещивании определите все возможные генотипы потомства, у которых количество запасного питательного вещества крахмала ожидается на таком же уровне, что и у «образца 7»). Для каждого генетического класса потомков анализируемого фенотипа укажите частоту встречаемости относительно всех потомков. Результаты внесите в таблицу.

Частота встречаемости особей с фенотипом «образец 7» среди полученного потомства	**7/9 или 77,78%**			
Возможный генотип	**Ddee**	**ddEe**	**ddee**	
Частота встречаемости генотипа среди полученного потомства	**1/9 или 11,11 %**	**4/9 или 44,44 %**	**2/9 или 22,22 %**	

0,25 балла за ячейку

P ddee x DddEEe

	D	**d**	**d**
E	**DE**	**dE**	
E			
e	**eD**	**ed**	

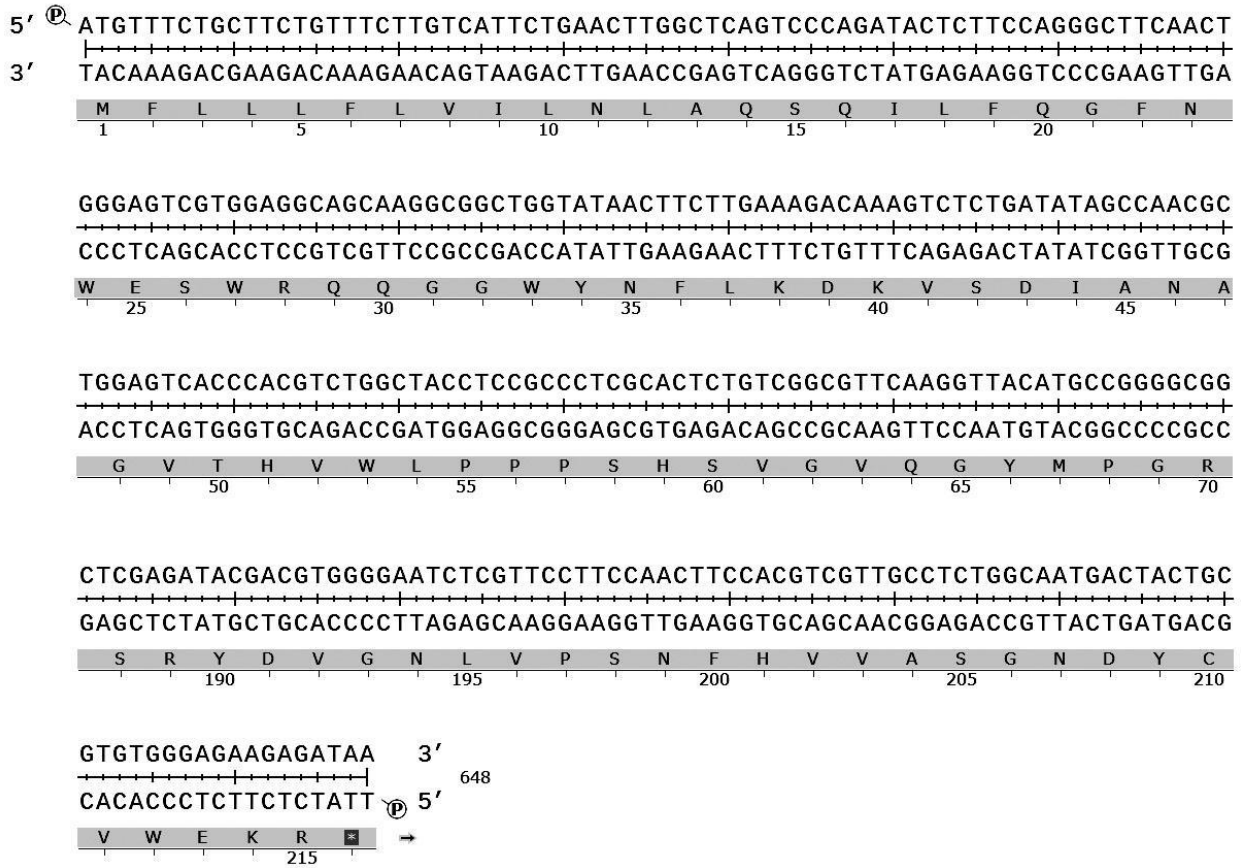
G de

2	**DE / de**	**2g**	**2/9**	**или**	**22,22%**	
	De / de	**1g**	**1/9**	**или**	**11,11%**	**7/9 или 77,78 %**
4	**dE / de**	**1g**	**4/9**	**или**	**44,44 %**	
2	**de / de**	**1g**	**2/9**	**или**	**22,22%**	

ЗАДАНИЕ 3 (8,0 БАЛЛОВ) ИЗУЧЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ БАНАНА.

Фермент α-Амилаза (1,4-α-D-глюкан-глюканогидролаза) является кальций-зависимой гликозил-гидролазой, расщепляющий крахмал до олигосахаридов. Именно активность этого фермента отвечает за сладкий вкус зрелых плодов банана. Ферменты этого семейства найдены у животных, растений, грибов (аскомицеты и базидиомицеты) и бактерий (Bacillus).

Для изучения локализации α-амилазы, Вы создали генетические конструкции, обеспечивающие сверхэкспрессиию соответствующего гена в клетках банана. **Первая конструкция** обеспечивала экспрессию нативного белка α-амилазы и содержала последовательность, представленную на рисунке (приведена последовательность первых 70 и последних 29 кодонов гена α-амилазы и соответствующие им аминокислоты, полный размер открытой рамки считывания – 648 п.н.).



Вторая генетическая конструкция содержала открытую рамку считывания гена α-амилазы с делецией нуклеотидов с 4 по 45 включительно. **Третья конструкция** содержала открытую рамку считывания гена α-амилазы, в которой были удалены нуклеотиды с 4 по 45 включительно, но перед стоп-кодоном были добавлены нуклеотиды 5’-AGCAAGCTC-3’. **Четвертая конструкция** содержала открытую рамку считывания гена α-амилазы без делеций, но с добавлением последовательности 5’-AGCAAGCTC-3’ перед стоп-кодоном.

Полученные конструкции были введены в клетки банана специальных линий (с делецией всех хромосомных генов α-амилазы). После инкубации клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию α-амилазы, из них были выделены три фракции белков – белки эндоплазматического ретикулюма (ЭПР), цитоплазматические белки (ЦП) и белки пероксисом (ПС). Пробирки (1-12) на Вашем столе содержат эти фракции. Пробирки 1, 2 и 3 содержат соответственно фракции белков ЭПР, ЦП и ПС из клеток с генетической конструкцией 1. Пробирки 4, 5, 6 содержат соответственно фракции белков ЭПР, ЦП и ПС из клеток с генетической конструкцией 2. Пробирки 7, 8, 9 содержат соответственно фракции белков ЭПР, ЦП и ПС из клеток с генетической конструкцией 3. Пробирки 10, 11, 12 содержат соответственно фракции белков ЭПР, ЦП и ПС из клеток с генетической конструкцией 4. Осталось совсем немного работы – измерить активность α-амилазы в полученных образцах и сделать правильный вывод.

ЗАДАНИЕ 3.1 (6 БАЛЛОВ). ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ В ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦАХ

Вам даны 12 образцов, содержащих белки эндоплазматического ретикулюма (ЭПР), цитоплазматические белки (ЦП) или белки пероксисом (ПС).

На предварительном этапе Вам необходимо решить следующую задачу:

- ❑ изучить наличие активности α-амилазы в представленных образцах.

Задание 3.1.1 (2,4 балла). Определение активности α-амилазы в образцах 1-12.

Методика определения крахмала (ход работы)

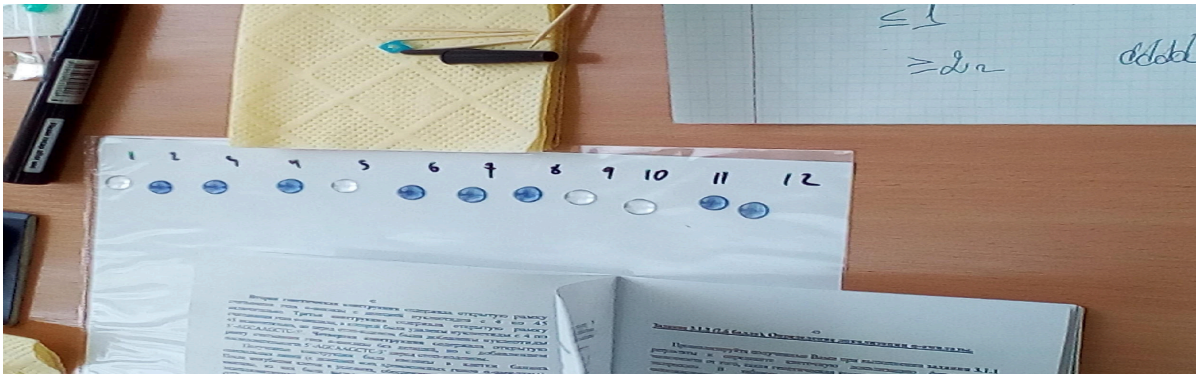
1. На поверхность файла нанесите маркером цифровое обозначение образца, указанное на соответствующей пробирке.

   Соответствующими пипетками нанесите по **две** капли препарата белков из пробы рядом с соответствующим цифровым обозначением**. ВНИМАНИЕ!!! КАЖДУЮ ПРОБУ ГОМОГЕНАТА НАНОСИТЕ ОТДЕЛЬНОЙ ПИПЕТКОЙ! НЕ ПУТАЙТЕ ПИПЕТКИ!!!**

2. К каждой пробе добавьте по **одной** капле «Реактива 1» (раствор крахмала) отдельной пипеткой.
3. К каждой пробе добавьте по **одной** капле «Реактива 2» (реактив для определения крахмала) отдельной пипеткой. **ВНИМАНИЕ!!! СЛЕДИТЕ ЗА ТЕМ, ЧТОБЫ ПИПЕТКА, КОТОРОЙ ДОБАВЛЯЕТЕ РЕАКТИВ НЕ КАСАЛАСЬ ПРОБЫ!** Реактив следует добавлять не спеша, перемешивая реакционную смесь деревянной палочкой.

ВНИМАНИЕ!!! ЗАПРЕЩАЕТСЯ ИСПОЛЬЗОВАТЬ <u>ОДНИ И ТЕ ЖЕ</u> ПАЛОЧКИ ДЛЯ ПЕРЕМЕШИВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ!!!

4. Исходя из результатов эксперимента заполните таблицу. В соответствующие ячейки запишите цвет пробы после добавления реактива для определения крахмала, наличие активности α-амилазы (знак **V**).



№ образца	Цвет раствора после реакции	Наличие активности α-амилазы
1	бесцветная	V
2	синяя*	нет
3	синяя*	нет
4	синяя*	нет
5	бесцветная	V
6	синяя*	нет
7	синяя*	нет
8	синяя*	нет
9	бесцветная	V
10	бесцветная	V
11	синяя*	нет
12	синяя*	нет

0,1 балла за ячейку

Любые оттенки серого, синего, фиолетового и т.д,

Задание 3.1.2 (2,6 балла). Определение локализации α-амилазы.

Проанализируйте полученные Вами при выполнении **задания 3.1.1** результаты и определите клеточную локализацию фермента в зависимости от того, какая генетическая конструкция обеспечивает его экспрессию. В таблицу также запишите предполагаемые аминокислотные сигнальные последовательности, обеспечивающие локализацию соответствующих вариантов α-амилаз. При необходимости, воспользуйтесь таблицей генетического кода, прилагаемой к заданию.

Номер генетической конструкции	Локализация (ЭПР/ЦП/ПС)	Сигнальная последовательность.
1	ЭПР	Первые 15 аминокислот с N-конца
2	ЦП	нет
3	ПС	SKL с С-конца
4	ЭПР	Первые 15 аминокислот с N-конца / SKL с С-конца
	0,25 ячейка	0,4 ячейка (0,2 если нуклеотидная)

Задание 3.1.3 (1,0 балл). Определение локализации α-амилазы.

Объясните, почему вариант α-амилазы, синтез которой обеспечивает генетическая конструкция 4, имеет выявленную Вами клеточную локализацию. Краткий ответ (1-2 предложения), запишите в строчки ниже:

_____
_____
_____
_____
_____

КОТРАНСЛЯЦИОННЫЙ ТРАНСПОРТ В ЭПР

ЗАДАНИЕ 3.2 (2,0 БАЛЛА). ДИЗАЙН ПРАЙМЕРОВ И РАСЧЕТ ПАРАМЕТРОВ ПЦР ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНА АЛЬФА-АМИЛАЗЫ РАСТЕНИЙ БАНАНА.

Задание 3.2.1 (1,0 балл). Дизайн праймеров для ПЦР

Используя кодирующую последовательность гена α-амилазы, приведенную в начале задания, напишите последовательности праймеров длиной 15 нуклеотидов, с помощью которых можно амплифицировать полноразмерную открытую рамку считывания гена (включая старт и стоп кодоны). Последовательности праймеров впишите в соответствующие ячейки таблицы от 5’ конца к 3’ концу.

Праймер 1 (прямой)	**5’ ATG TTT CTG CTT CTG 3’**
Праймер 2 (обратный)	**5’ TTA TCT CTT CTC CCA 3’**

0,5 за праймер

Задание 3.2.2 (1,0 балл). Расчет параметров ПЦР

Вы планируете осуществить амплификацию кодирующей последовательности гена α-амилазы, используя праймеры, разработанные в предыдущем задании. Для успешной ПЦР необходимо подобрать правильные время и температуру денатурации, отжига праймеров и элонгации. Заполните пустые ячейки в таблице ниже, учитывая, что Вы используете в ПЦР Taq-полимеразу (скорость синтеза составляет 1000 нуклеотидов в минуту). Для расчета температуры плавления воспользуйтесь формулой Tm=2x(A+T)+4x(G+C). Температуру отжига выбирайте ниже Tm на пять градусов Цельсия.

В каждом праймере

A+T = 9 9 x 2 = 18

C+G = 6 6 x 4 =24

Итого 42, вспоминаем про понижение на 5 градусов и в табличку вносим 37

Элонгация:
648/1000 x 60 = 38,88

Стадия ПЦР	Время, секунды	Температура, градусы Цельсия
Денатурация	30	94
Отжиг праймеров	30	**37**
Элонгация	**<38 0,0** **38-60 0,5** **60-120 0,25** **>120 0,0**	72

Максимум 0,5 за параметр

Таблица генетического кода

ПЕРВЫЙ НУКЛЕОТИД	ВТОРОЙ НУКЛЕОТИД U			C			A			G			ТРЕТИЙ НУКЛЕОТИД
U	UUU	Phe	F	UCU	Ser	S	UAU	Tyr	O	UGU	Cys	C	U
	UUC	Phe		UCC			UAC	Tyr		UGC	Cys		C
	UUA	Leu	L	UCA			UAA	Term		UGA	Term		A
	UUG	Leu		UCG			UAG	Term		UGG	Trp	W	G
C	CUU			CCU			CAU	His	H	CGU			U
	CUC	Leu	L	CCC	Pro	P	CAC	His		CGC	Arg	R	C
	CUA			CCA			CAA	Gln	Q	CGA			A
	CUG			CCG			CAG	Gln		CGG			G
A	AUU	Ile		ACU			AAU	Asn	N	AGU	Ser	S	U
	AUC	Ile	I	ACC	Thr	T	AAC	Asn		AGC	Ser		C
	AUA	Ile		ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R	A
	AUG	Met	M	ACG			AAG	Lys		AGG	Arg		G
G	GUU			GCU			GAU	Asp	D	GGU			U
	GUC	Val	V	GCC	Ala	A	GAC	Asp		GGC	Gly	G	C
	GUA			GCA			GAA	Glu	E	GGA			A
	GUG			GCG			GAG	Glu		GGG			G

РАЗДЕЛ 2. Биохимия (8 *баллов*)