

ЗАДАНИЯ
практического тура заключительного этапа XXXI Всероссийской
олимпиады школьников по биологии. 2014-15 уч. год. 11 класс

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Животную ткань гомогенизировали в ножевом гомогенизаторе в буферном растворе, гомогенат профильтровали через марлю и провели центрифугирование при $600 \times g$ в течение 10 минут для удаления обломков клеток и ядер. После этого провели центрифугирование супернатанта при $10000 \times g$ в течение 15 минут. Полученный осадок суспендировали в буферном растворе и суспензию нанесли на градиент плотности сахарозы ($1,0 - 1,3 \text{ г/см}^3$). После проведения центрифугирования были получены три фракции мембранных органоидов с плавучей плотностью около $1,12 \text{ г/см}^3$ (**Фракция А**), $1,18 \text{ г/см}^3$ (**Фракция В**) и $1,23 \text{ г/см}^3$ (**Фракция С**). Все фракции были разведены буферным раствором до **концентрации белка 0,01 мг/мл**.

Для идентификации полученных фракций путем определения активностей маркерных ферментов были приготовлены три субстратные смеси, которые содержат буферные растворы, соли и необходимые субстраты в нужных концентрациях:

Смесь 1 содержит янтарную кислоту, феназинметасульфат и нитросиний тетразолий;

Смесь 2 содержит крахмал и раствор Люголя;

Смесь 3 содержит перекись водорода и 3,5-диокситолуол.

Для определения ферментативной активности к **1 мл субстратной смеси** необходимо добавить **0,5 мл фракции мембранного органоида** и провести инкубацию при комнатной температуре в течение 3-5 минут.

Задание 1 (9 баллов). Спланируйте и проведите эксперимент, с помощью которого Вы сможете идентифицировать клеточные органоиды во **Фракциях А, В и С**, проведя **минимальное** количество опытов. По ходу эксперимента заполняйте **Таблицу 1** в **Листе ответов**. По окончании эксперимента продемонстрируйте Ваши результаты преподавателю.

Задание 2 (6 баллов). На основании результатов Вашего эксперимента идентифицируйте органоиды во **Фракциях А, В и С** и ответьте на вопросы в **Таблице 2** в **Листе ответов**.

Задание 3 (5 баллов). Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера оптическая плотность раствора зависит от концентрации растворенного вещества следующим образом: $D = \epsilon \times l \times C$, где **D** – это оптическая плотность раствора при определенной длине волны, **ϵ** – коэффициент молярной экстинкции данного вещества (оптическая плотность раствора с концентрацией 1 М), **l** – длина оптического пути в см, а **C** – молярная концентрация данного вещества.

Коэффициент молярной экстинкции окрашенного продукта ферментативной реакции в одной из полученных фракций при длине волны « λ » равен $15000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$. Длина оптического пути в спектрофотометрической кювете при измерении оптической плотности составляет 1 см. Условия проведения опыта совпадали с условиями, предложенными Вам в **Задании 1**. Оптическая плотность раствора при данной длине волны « λ » в начале реакции равнялась 0,05 единиц оптической плотности, а через 5 минут инкубации составила 0,8 единиц оптической плотности. Рассчитайте концентрацию окрашенного продукта в начале и в конце реакции (**2 балла**) и значение удельной активности фермента (в мкмоль/мин на 1 мг белка) (**3 балла**). Ответы внесите в **Лист ответов**.