

**18-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА**  
**15 – 22 июля 2007 года**



**ПРАКТИЧЕСКИЙ ЭКЗАМЕН 3**

**Биология клетки/Биохимия**

<b>ЗАДАНИЕ А.</b>	<b>Измерение тиоцианата в цветной капусте</b>	<b>29 баллов</b>
<b>ЗАДАНИЕ В.</b>	<b>Определение количества цветной капусты, употребление которого приводит к проявлению токсичности</b>	<b>5 баллов</b>
<b>ЗАДАНИЕ С.</b>	<b>Регуляция экспрессии генов</b>	<b>10 баллов</b>

**Предоставляемое время: 90 минут**

**ВСЕ ОТВЕТЫ ВПИСЫВАЙТЕ В ЭКЗАМЕНАЦИОННУЮ РАБОТУ**

**ВПИШИТЕ ВАШ ЧЕТЫРЁХЗНАЧНЫЙ КОД УЧАСТНИКА В КЛЕТКУ ВНИЗУ И ВВЕРХУ КАЖДОЙ СТРАНИЦЫ ЭТОЙ РАБОТЫ**

<b>КОД УЧАСТНИКА</b>	
----------------------	--

### Введение

Представители семейства крестоцветных содержат класс соединений, известных как глюкозинолаты. Некоторые глюкозинолаты, такие как глюкорафанин, обладают способностью предотвращать рак, тогда как иные соединения, такие как глюкозиноальбин, образуют токсические метаболиты.

Одним из продуктов токсических глюкозинолатов является ион тиоцианата ( $\text{SCN}^-$ ).  $\text{SCN}^-$  нарушает метаболизм йода, что приводит к недостаточности гормона щитовидной железы. Употребление в пищу крестоцветных растений, таких как цветная капуста, приводит к образованию незначительных количеств иона тиоцианата из таких глюкозинолатов, как глюкозиноальбин.

Глюкорафанин метаболизируется до сульфорафана, который является индуктором белков фазы 2. Одним из следствий индукции белков фазы 2 является возрастание способности клеток обезвреживать свободные радикалы и другие оксиданты. Следствием снижения уровня оксидантов является более низкая вероятность активации путей, ведущих к воспалительным процессам. Один из таких путей осуществляется через активацию белкового комплекса NF $\kappa$ ppaB.

**ЗАДАНИЕ А. Определить спектрофотометрическим методом количество иона тиоцианата, выделенного из цветной капусты. (29 баллов)**

**ЦЕЛЬ:** Использование спектрофотометра для определения количества иона тиоцианата, выделенного из цветной капусты. Этот метод основан на том, что в кислой среде ион тиоцианата взаимодействует с ионами  $\text{Fe}^{3+}$  с образованием стабильного, окрашенного в красный цвет, комплекса  $\text{Fe}^{2+}\text{-SCN}$ , максимум абсорбции которого соответствует 447 нм.

### Материалы:

- Автоматическая пипетка Эппендорф объемом 20-200 микролитров, выставленная на 100 мкл.
- Наконечники для пипетки Эппендорф.
- Кюветы для спектрофотометра, содержащие 900 мкл нитратного реагента, содержащего трехвалентное железо. Этот реагент проявляет сильные кислотные свойства.

**ВНИМАНИЕ:** Раствор нитратного реагента, содержащего трехвалентное железо, который вы будете использовать, растворен в 1,0 М азотной кислоте. Перед началом эксперимента наденьте перчатки и защитные очки.

- Пробирки со стандартными растворами тиоцианата следующей концентрации: 0 микромоля/мл (ваш контроль); 0,5 микромоля/мл; 1,0 микромоля/мл; 2,0 микромоля /мл и 4,0 микромоля /мл.

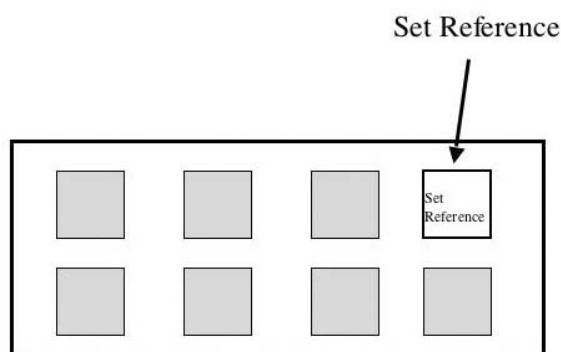
- Пробирка с фильтратом гомогената цветной капусты. Для этого 1,0 г цветной капусты был гомогенизирован и гомогенат был разведен водой до конечного объема 4,0 мл. Этот раствор является вашим неизвестным, в котором вам необходимо будет определить количество микромолей тиоцианата, находящихся в одном миллилитре этого гомогената.
- Используйте маркерный карандаш для нанесения меток на **матовую стенку кювет**. Помните, что свет спектрофотометра длиной 447 нм должен проходить через прозрачные стенки кювет.
- Перчатки и защитные очки.
- Находящийся на вашем столе спектрофотометр установлен на абсорбцию света при 447 нм.

**ЗАМЕЧАНИЕ:** Перед началом задания удостоверьтесь в наличии всех материалов, перечисленных выше. Об отсутствии чего-либо немедленно поставьте в известность ассистента лаборатории, подняв руку.

### Ход работы

1. Наденьте перчатки и защитные очки.
2. К каждой кювете, содержащий нитратный реагент, добавьте по 100 микролитров стандартных растворов тиоцианата. Стандарты содержат: 0; 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 микромоля/мл тиоцианата и перемешайте наконечником. Во всех кюветах за исключением стандартного раствора, содержащего 0 микромолей тиоцианата, служащего для вас контролем, должна проявиться цветная реакция. Проверьте маркировку кювет с матовой стороны. Не забывайте менять наконечники.
3. В каждую из оставшихся 3 кювет добавьте по 100 микролитров гомогената цветной капусты.
4. Осторожно поднесите кюветы к спектрофотометру, который установлен на абсорбцию света при 447 нм. Откройте крышку световой камеры спектрофотометра и поместите кювету с 0 микромолями тиоцианата (контроль). Стрелки указывают путь луча света. Убедитесь в том, что свет проходит через прозрачные стенки кюветы находились в направлении стрелок-индикаторов камеры спектрофотометра. Закройте крышку и нажмите кнопку "Set Reference" в верхней правой части спектрофотометра, как представлено на рисунке ниже.

**Не притрагивайтесь ни к какой другой кнопке!**



5. Вставьте каждую из стандартных кювет в спектрофотометр и запишите показания. Затем поместите каждую из кювет, содержащих раствор неизвестной концентрации, и запишите показания. Оставьте кюветы около спектрофотометра. Ассистент лаборатории позаботится о них.

**Показания спектрофотометра (абсорбция) для каждого стандарта:** (10 баллов)

0,5 микромоля/мл тиоцианата: \_\_\_\_\_

1,0 микромоля/мл тиоцианата: \_\_\_\_\_

2,0 микромоля/мл тиоцианата: \_\_\_\_\_

4,0 микромоля/мл тиоцианата: \_\_\_\_\_

**Показания спектрофотометра (абсорбция) для раствора неизвестной концентрации:**

1. \_\_\_\_\_, 2. \_\_\_\_\_, 3. \_\_\_\_\_ (3 балла)

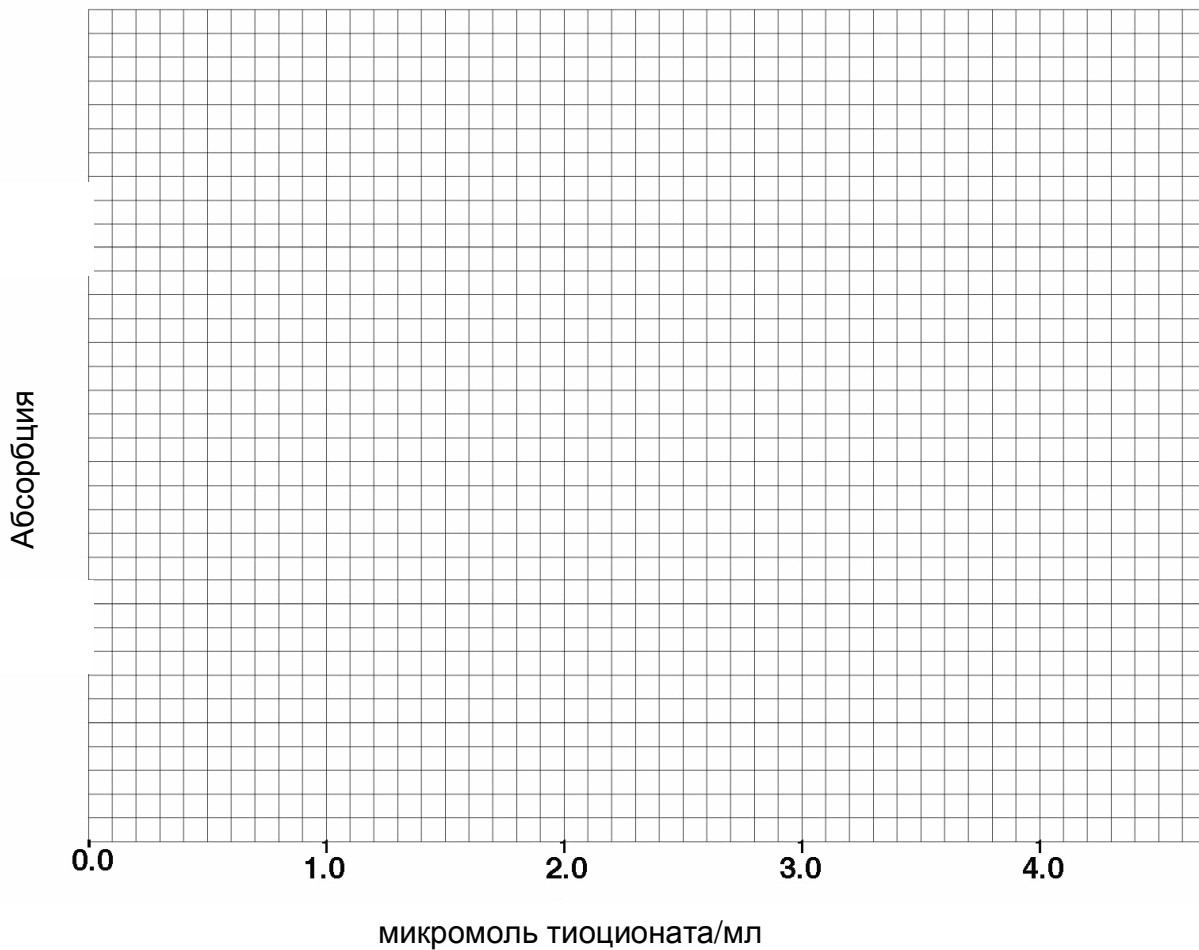
6. На бумаге для графиков (страница 5) постройте график зависимости абсорбции от концентрации стандартных растворов тиоцианата (микромоль/мл). (6 баллов)

7. Определите среднюю величину абсорбции гомогената цветной капусты и, применив построенный вами ранее график, определите концентрацию иона тиоцианата в гомогенате. (5 баллов)
- \_\_\_\_\_

8. Какова концентрация тиоцианата в самой цветной капусте? Укажите единицы измерения. \_\_\_\_\_ (3 баллов)

9. Чему равно стандартное отклонение поглощения неизвестного образца? (2 балла)
- \_\_\_\_\_

Всего 29 баллов.



**ЗАДАНИЕ В. Определение количества цветной капусты, употребление которого приводит к токсическому эффекту, обусловленному присутствием тиоцианата (5 баллов)**

**ВВЕДЕНИЕ**

$LD_{50}$  – это токсикологический термин, обозначающий дозу (концентрация токсина на килограмм веса животного) вещества, при которой погибают 50% животных. Для крыс  $LD_{50}$  тиоцианата составляет 9 миллимолей/кг. Используя результаты эксперимента только что проведенного вами, высчитайте, сколько цветной капусты должна съесть за короткий период крыса весом 500 г, чтобы доза тиоцианата достигла  $LD_{50}$ .

**Ход работы**

Обведите кружком букву уровня, наилучшим образом соответствующего вашему подсчету.

Делайте ваш расчет на этой странице. При необходимости, продолжайте на обороте листа.

- (a) от 1 г до 5 г
- (b) от 50 г до 250 г
- (c) от 500 г до 1 кг
- (d) от 1,5 кг до 14 кг
- (e) от 15 кг до 25 кг

**ЗАДАНИЕ С. Анализ регуляции экспрессии генов.**

(12 баллов)

**Введение**

Глюкорафанин метаболизируется до сульфорафана, который является индуктором белков фазы 2. Одним из следствий индукции белков фазы 2 является возрастание способности клеток обезвреживать свободные радикалы и другие оксиданты. Следствием снижения уровня оксидантов является более низкая вероятность активации путей, ведущих к воспалительным процессам. Один из таких путей осуществляется через активацию белкового комплекса NFκappaB.

NFκappaB является фактором транскрипции, состоящим из двух белков (белки p50 и p65), связанных с третьим белком, известным как IκappaB, который обычно присутствует в цитоплазме. Активация NFκappaB включает деградацию IκappaB, что приводит к перемещению гетеродимера p50/p65 в ядро, где он связывается со специфическими промотерными элементами, увеличивая транскрипцию провоспалительных генов, таких как ген индуцибельной синтазы окиси азота (iNOS). Одним из показателей активации NFκappaB служит увеличение соотношения белка p65 к белку IκappaB.

Одним из последствий возрастания активности iNOS является увеличение образования свободного радикала окиси азота (NO<sup>•</sup>). Окись азота реагирует с супероксид-анионом (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) с образованием пероксиазотистой кислоты, которая является очень сильным окислителем.

Возросший уровень оксидантов часто приводит к активации NFκappaB, тогда как пониженный уровень оксидантов приводит к снижению активации NFκappaB и, поэтому, к сниженному уровню экспрессии провоспалительных генов. Окись азота, которая выделяется эндотелиальными клетками, проникает в клетки гладких мышц сосудов, что приводит к их расслаблению. Поэтому окись азота является главным регулятором кровяного давления.

**Ход работы**

1. Рассмотрите рисунки, представленные в каждом из следующих разделов.
2. Используя представленные данные, определите, какой набор данных описывает животных, находящихся на диете с высоким содержанием глюкорафанина, и обоснуйте ваш ответ.

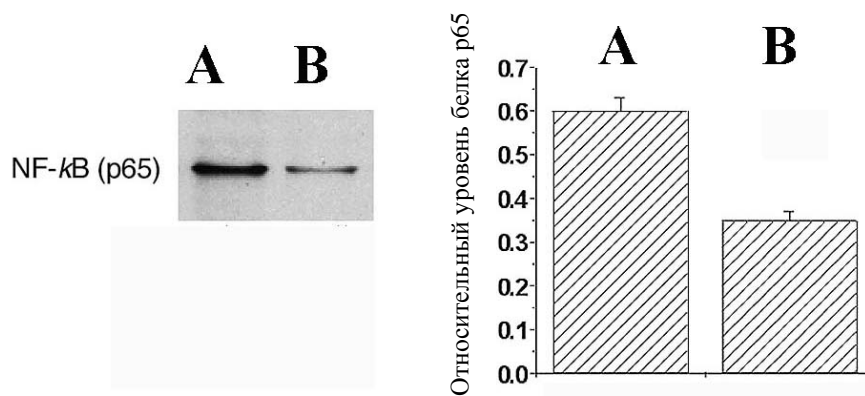
**РАЗДЕЛ А.**

(5 баллов)

Ниже находится рисунок, представляющий данные по активации NFκappaB у самцов крыс (SHRsp) с самопроизвольно высоким давлением, которые находились на одной из двух диет: контрольной диете или экспериментальной диете, содержащей глюкорафанин. При экспериментальной диете животные съедали 10 микромолей глюкорафанина на килограмм веса.

После нескольких месяцев такой диеты животные были усыплены, из клеток их почек были изолированы ядра и подготовлены для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). После разделения белков в геле они были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану и обработаны антителами к белку NFκB p65 для его выявления.

Ниже показан образец Вестерн-блота (слева), а рядом с ним график, отражающий количественный анализ блота у 5 различных животных из каждой диетной группы.



Ответьте на следующие вопросы:

1. Какая группа животных (А или В) находилась на глюкозафин-содержащей диете?

(1 балл)

ОТВЕТ: \_\_\_\_\_

2. Какое из следующих утверждений дает наилучшее объяснение вашего ответа? Обведите кружком букву этого утверждения. (4 балла)

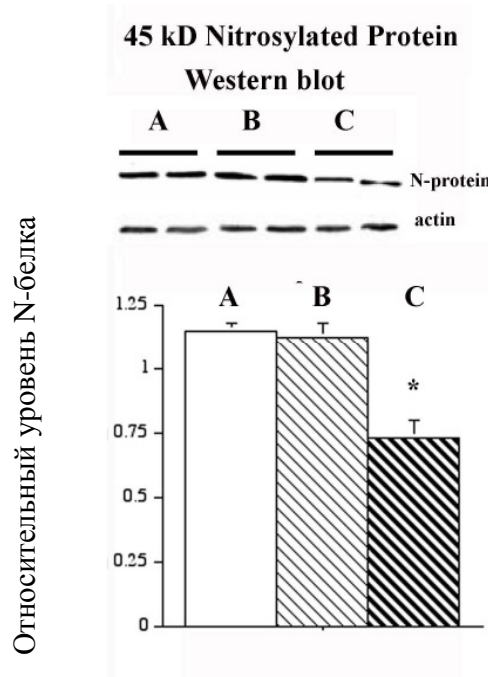
- (a) Меньший окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB и поэтому к меньшему содержанию p65 в ядре.
- (b) Меньший окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB и поэтому к большему содержанию p65 в ядре.
- (c) Большой окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB и поэтому к меньшему содержанию p65 в ядре.
- (d) Большой окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB и поэтому к большему содержанию p65 в ядре.
- (e) Большой окислительный стресс приводит к большей активации NFκB и поэтому к меньшему содержанию p65 в ядре.



**РАЗДЕЛ В.**

(5 баллов)

На рисунке ниже приведены данные вестерн-блотта, касающиеся нитрозилированного белка (N-protein) молекулярной массой 45 kD в почках самцов крыс SHRsp, которые находились на одной из трех различных диет: диете, содержащей глюкорафанин, и двух различных контрольных диетах.



В верхней части рисунка представлен образец Вестерн-блота, тогда как в нижней части рисунка представлен количественный анализ Вестерн-блота из 5 различных животных из каждой диетной группы.

Ответьте на следующие вопросы:

- Какая из групп А, В или С, представляет животных, находящихся на диете, содержащей глюкорафанин?

ОТВЕТ: \_\_\_\_\_

(1 балл)

- Обведите кружком букву утверждения, представленного ниже, которое наилучшим образом объясняет ваш ответ.

(4 балла)

- Большой окислительный стресс приводит к большей активации NFκB, что приводит к большей экспрессии iNOS и большему образованию пероксиазотистой кислоты и поэтому большему нитрозилированию белков.

- 
- (b) Большой окислительный стресс приводит к большей активации NFκB, что приводит к большей экспрессии iNOS и большему образованию пероксиазотистой кислоты, но меньшему нитрозилированию белков.
  - (c) Меньший окислительный стресс приводит к большей активации NFκB, что приводит к большей экспрессии iNOS, но меньшему образованию пероксиазотистой кислоты и поэтому меньшему нитрозилированию белков.
  - (d) Большой окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB, но приводит к меньшей экспрессии iNOS и меньшему образованию пероксиазотистой кислоты и поэтому меньшему нитрозилированию белков.
  - (e) Меньший окислительный стресс приводит к меньшей активации NFκB, что приводит к меньшей экспрессии iNOS и меньшему образованию пероксиазотистой кислоты и поэтому меньшему нитрозилированию белков.

**- КОНЕЦ –**

**ПРОВЕРЬТЕ, ВПИСАЛИ ЛИ ВЫ ВАШ КОД УЧАСТНИКА НА ПЕРВОЙ СТРАНИЦЕ ЭТОЙ РАБОТЫ И ВВЕРХУ КАЖДОЙ СЛЕДУЮЩЕЙ СТРАНИЦЫ**