

Код студента: \_\_\_\_\_

## 20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



### ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 2

### БИОХИМИЯ

Общее количество баллов: 100

Продолжительность: 90 минут

## Дорогие участники,

- В этом тесте вам предстоит выполнить 2 следующих задания:
  - Задание 1: Определение активности кислой фосфатазы (70 баллов)
  - Задание 2: Определение концентрации белка (30 баллов)
- **Вы должны вписать свои результаты и ответы в ЛИСТ ОТВЕТОВ. Ответы, записанные в Лист с Заданиями, оцениваться не будут.**
- Пожалуйста, проверьте, получили ли Вы все материалы и оборудование, перечисленные в каждом задании. Если, что-нибудь из перечисленного отсутствует, поднимите, пожалуйста, руку.
- По окончании теста вложите Лист Ответов и Лист Вопросов в конверт. Наблюдатель соберет Ваши конверты.

Удачи Вам!

### Как пользоваться спектрофотометром:

1. Дисплей спектрофотометра (Shimadzu UVmini-1240) должен показывать длину волны 400 nm (Рис. 1). Если нет, поднимите руку. Показание поглощения (ABS ) может не быть равным 0,000.
2. Наполните пластиковую микрокювету дистиллированной водой (DW) как минимум до уровня выступов внутри кюветы (Рис. 2)
3. Установите кювету в держатель кюветы прибора таким образом, чтобы прозрачные стороны находились справа и слева (Рис. 3).
4. Закройте крышку (Рис. 4).
5. Нажмите кнопку 'AUTO ZERO' (Рис. 5). При этом прибор установит уровень абсорбции кюветы с находящейся в ней водой на ноль (0.000). Эта проба будет использоваться в качестве нулевой (контрольной) пробы в этом эксперименте.
6. Теперь вы готовы к измерению абсорбции образца.
7. Замените воду раствором исследуемого образца и считайте величину ABS при закрытой крышке. Абсорбция раствора обусловлена поглощением находящихся в нем растворенных веществ.
8. Нет необходимости промывать кювету после каждого измерения, если вы измеряете серию образцов, начиная с менее концентрированного и переходя к более концентрированному образцу.

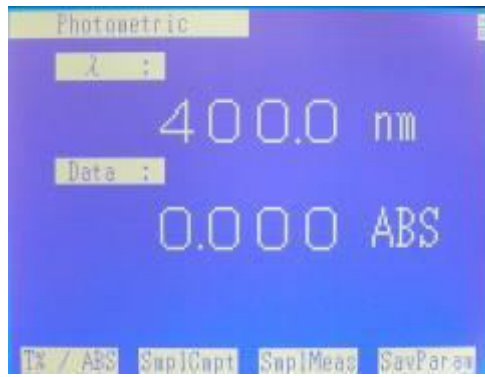


Рис. 1



Рис. 2



Рис. 3



Рис. 4



Рис. 5

## Введение

Кислая фосфатаза расщепляет в кислых условиях фосфорилированные молекулы с освобождением фосфата. Целью этого эксперимента является определение специфической (удельной) активности кислой фосфатазы. В Задании 1 Вам будет необходимо измерить активность кислой фосфатазы в неочищенном картофельном экстракте, а в Задании 2 определить концентрацию белка в этом неочищенном экстракте. Специфическую активность, выражаемую в виде активности фермента в единицу времени на единицу веса белка, вам необходимо будет определить из результатов Заданий 1 и 2. Специфическая активность является показателем чистоты фермента, по мере очистки фермента она увеличивается.

## Предостережение

1. Вы будете использовать небольшие количества токсических веществ (*p*-нитрофенол и NaOH). Если хотите, вы можете одеть лабораторные очки и одноразовые перчатки.
2. При расчетах, в которых требуются ответы из предшествующих вопросов, будут присуждаться частичные баллы том случае, если формулы для вычисления были правильными, даже если ответы были неправильными.

## Материалы и оборудование

## Количество

|   |   |
|---|---|
| 1. Спектрофотометр  | 1 |
| 2. Микропипетка (P1000)   | 2 |
| 3. Микропипетка (P200)  | 1 |
| 4. Наконечники (по одной коробочке для P1000 и P200)              | 2 |
| 5. Пластиковая кювета   | 1 |
| 6. Штатив для пробирок, в котором помещены пробирки от 6-1 до 6-6 | 1 |

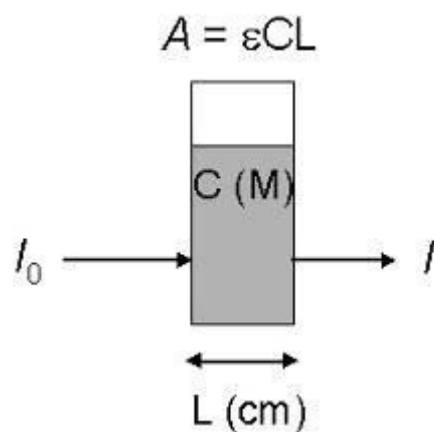
|  |   |
|--|---|
| 6-1. Неочищенный экстракт кислой фосфатазы (4 мл в 15-мл пластиковой пробирке, которая помечена «1x enzyme») | 1 |
| 6-2. 0,5 М Na-ацетатный буфер (рН 5,6) (2 мл в 15-мл пластиковой пробирке)                                   | 1 |
| 6-3. 5 mM pNPP (8 мл в 15-мл пластиковой пробирке)   | 1 |
| 6-4. 0,5 М NaOH (8 мл в 15-мл пластиковой пробирке)  | 1 |
| 6-5. 3% NaCl (10 мл в 15-мл пластиковой пробирке)  | 1 |
| 6-6. Пробирки для проб (стеклянные)  | 6 |

## Задание 1 (70 баллов)

### Определение активности кислой фосфатазы

Активность кислой фосфатазы определяется ферментативной реакцией, в которой *p*-нитрофенилфосфат (pNPP) превращается в *p*-нитрофенол (pNP), после отщепления фосфата. Продукт реакции, pNP, поглощает свет при длине волны 400 nm с коэффициентом молярной экстинкции \* ( $\epsilon_{400 \text{ nm}}$ ), равным  $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  при щелочных значениях рН. Реакционная смесь для кислой фосфатазы является слабо кислой. Поэтому для количественного определения pNP необходимо подщелочить среду. В задании 1 вы должны измерить протекание реакции во времени и получить значение изменения абсорбции за 1 минуту времени, которое обеспечивает 1 мл неочищенного экстракта. Для расчета изменения концентрации из показаний изменения абсорбции необходимо использовать коэффициент  $\epsilon_{400 \text{ nm}}$ . Затем вам необходимо будет рассчитать число молей pNP, образованных в ходе реакции, путем умножения изменения концентрации на объем образца, в котором производилось измерение абсорбции.

Что такое коэффициент молярной экстинкции ?



$A$ , величина абсорбции

$\epsilon$ , коэффициент молярной экстинкции ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$C$ , концентрация ( $\text{M} = \text{моль литр}^{-1}$ )

$L$ , длина оптического пути, пройденного светом (см)

$I_0$ , интенсивность падающего света

$I$ , интенсивность проходящего света

Абсорбция ( $A$ ) является физико-химической характеристикой раствора, которая показывает в какой степени растворенное вещество поглощает свет определенной длины волны. Абсорбция пропорциональна концентрации ( $C$ ) и длине оптического пути, пройденного светом ( $L$ ). Константа в этом уравнении является величиной, характерной для растворенного вещества, и она называется коэффициентом молярной экстинкции ( $\epsilon$ ). Таким образом, эту зависимость можно представить в виде  $A = \epsilon C$  ( $\text{M} = \text{моль литр}^{-1}$ )  $L$  (см). По величине абсорбции можно определить концентрацию,

поскольку  $\epsilon$  известен и  $L$  составляет в этом эксперименте 1 см. Измеряется  $\epsilon$  в  $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , поскольку абсорбция является безразмерной величиной без единиц измерения.

В Задании 1 используются две концентрации фермента. Найдите пробирку с пробой, помеченную “1x enzyme“, содержащую неочищенный экстракт кислой фосфатазы. Затем найдите пробирку объемом 15 мл, в которой находится 3% NaCl и удалите из нее 1 мл раствора так, что теперь эта пробирка будет содержать 9 мл 3% NaCl. Добавьте в нее при помощи микропипетки 1 мл раствора ‘1x enzyme’, в результате чего Вы получите раствор ‘0.1x enzyme’. Измените метку на этой пробирке на ‘0.1x’. Затем возьмите 6 пустых стеклянных пробирок. Подпишите каждую пробирку в соответствии с концентрацией фермента и длительностью реакции как показано ниже.

0.1x, 20 min

1x, 20 min

0.1x, 10 min

1x, 10 min

0.1x, 1 min

1x, 1 min



**Q.1.1. (10 баллов)** Вначале в таблице Листа Ответов распишите ход эксперимента для проведения всех реакций, отмечая значком (○) начало и значком (●) конец для каждой реакции. Между началом каждой реакции должна пройти как минимум 1 минута. В таблице Листа Ответов показан пример для реакции "0.1x, 20 min".

**Q.1.2. (15+10 баллов)** Проведите ферментативные реакции соответственно представленному ниже руководству и порядку, подготовленному вами в Q.1.1. При каждом пипетировании используйте новый наконечник. Перемешивайте смесь сразу после каждого добавления путем постукивания по пробирке. После проведения всех реакций проведите измерение абсорбции  $A_{400}$  всех образцов. Впишите полученные величины в таблицу в Листе Ответов и постройте график. Обратите внимание на то, что поскольку в качестве нулевого образца (контроля) использовалась вода, график не будет проходить через 0 (ноль) на оси Y (ордината).

#### Руководство по определению активности кислой фосфатазы

- 1) Смешайте 0,12 мл 0,5 М Na –ацетатного буфера (pH 5,6) и 0,24 мл 5 mM pNPP в пробирке для измерения активности. Начните реакцию добавлением 0,24 мл раствора фермента.
- 2) После проведения реакции в течение 1, 10 и 20 мин., соответственно, остановите реакцию добавлением 0,6 мл 0,5 М NaOH. NaOH останавливает реакцию и превращает образовавшийся pNP в окрашенную в желтый цвет форму (абсорбирующую при 400 нм) .
- 3) После окончания всех реакций, измерьте  $A_{400}$  образцов.

Состав реакционной смеси для определения активности  
кислой фосфатазы картофеля

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| 0,5 М Na-ацетатный буфер<br>(рН 5,6) | 0,12 ml |
| 5 mM pNPP                            | 0,24 ml |
| Фермент                              | 0,24 ml |
| 0,5 М NaOH                           | 0,6 ml  |
| Сумма                                | 1,2 ml  |

**Q.1.3. (15 баллов)** При какой концентрации фермента наблюдается наилучшая линейная зависимость между временем реакции и  $A_{400}$ ? Обведите кружком правильный ответ в Листе Ответов. Определите наклон прямой на графике.

**Q.1.4. (5 баллов)** Используя определенный в Q.1.3. наклон кривой, рассчитайте активность в виде изменения значения  $A_{400}$  за одну минуту на 1 мл раствора фермента с концентрацией «1х». Длина оптического пути (L) составляет 1 см. Ваш ответ должен быть внесен в Лист Ответов вместе с вашими вычислениями активности в соответствующих единицах.

**Q.1.5. (5 баллов)** Преобразуйте изменение абсорбции, полученное в задании Q.1.4, в изменение концентрации, используя величину  $\epsilon_{400}$  для pNP ( $19000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ваш ответ вместе с Вашими вычислениями (в единицах в минуту на 1 мл «1х» раствора фермента) должен быть вписан в Лист Ответов.

**Q.1.6. (5 баллов)** Преобразуйте значение изменения концентрации, полученное в вопросе Q.1.5., в изменение числа молей pNP. Ваш ответ вместе с Вашими вычислениями (в молях в минуту на 1 мл «1х» раствора фермента) должен быть вписан в Лист Ответов.

**Q.1.7. (5 баллов)** Рассчитайте общую активность (в молях в минуту) в 4 мл «1х» раствора фермента, который был Вам выдан.

## Задание 2 (30 баллов)

### Определение концентрации белка

Концентрация белка определяется с использованием стандартного белка, такого как бычий сывороточный альбумин (BSA). В задании 2 вам необходимо будет определить эквивалентную BSA концентрацию раствора фермента «1x enzyme» при помощи метода Брэдфорд. Метод Брэдфорд основан на увеличении абсорбции Кумасси бриллиантового синего при 595 нм при его связывании с белком.

Была сделана серия разведений в два раза (0.4; 0.2; 0.1 и 0.05 мг белка мл<sup>-1</sup>) путем разведения концентрированного раствора BSA (0.4 мг белка мл<sup>-1</sup>) раствором 3% NaCl. Ко всем пробам серии разведений BSA и раствора «0.1x enzyme», который Вы сделали в задании 1, был добавлен краситель при одинаковых условиях. Оптическая плотность (OD<sub>595</sub>) была измерена при 595 нм и данные внесены в таблицу ниже.

Таблица

| Образец             | [BSA]<br>(mg .ml <sup>-1</sup> ) | OD <sub>595</sub> |
|---------------------|----------------------------------|-------------------|
|                     | 0.00                             | 0.000             |
|                     | 0.05                             | 0.070             |
|                     | 0.1                              | 0.143             |
|                     | 0.2                              | 0.261             |
|                     | 0.4                              | 0.521             |
| раствор 0,1x enzyme |                                  | 0.180             |

Оптическая плотность или OD, является показателем того, как вещество пропускает свет, или, иначе говоря, показателем «абсорбции» раствора.

**Q.2.1.(10 баллов)** Постройте в Листе Ответов график зависимости  $OD_{595}$  от концентрации BSA в виде прямой линии.

**Q.2.2.(10 баллов)** Определите по графику концентрацию белка в растворе фермента '0,1x enzyme' и концентрацию белка в растворе фермента '1x enzyme'.

**Q.2.3.(10 баллов)** Рассчитайте специфическую (удельную) активность (активность в минуту на мг белка) для раствора фермента '1x enzyme'. Ваш ответ должен быть вписан в Лист Ответов вместе с вашими расчетами (единицы активности в минуту на мг белка).

КОД СТУДЕНТА

Код студента: \_\_\_\_\_

20-я МЕЖДУНАРОДНАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ОЛИМПИАДА

12 – 19 июля 2009

Тсукуба, ЯПОНИЯ



ПРАКТИЧЕСКИЙ ТЕСТ 2

БИОХИМИЯ

Общее количество баллов: 100

Продолжительность: 90 минут

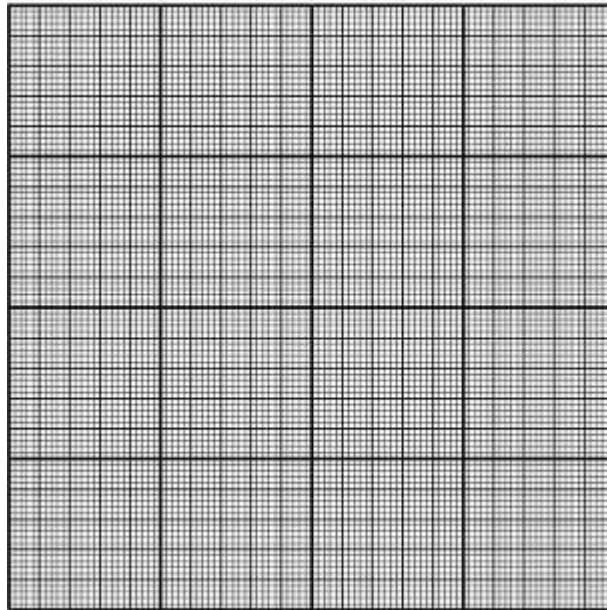
ЛИСТ ОТВЕТОВ

Q.1.1. (10 баллов)

| Конц. фермента<br>Время (в минутах) | 0,1х<br>20 | 1х<br>20 | 0,1х<br>10 | 1х<br>10 | 0,1х<br>1 | 1х<br>1 |
|-------------------------------------|------------|----------|------------|----------|-----------|---------|
| 0                                   |            |          |            |          |           |         |
| 1                                   | ○          |          |            |          |           |         |
| 2                                   |            |          |            |          |           |         |
| 3                                   |            |          |            |          |           |         |
| 4                                   |            |          |            |          |           |         |
| 5                                   |            |          |            |          |           |         |
| 6                                   |            |          |            |          |           |         |
| 7                                   |            |          |            |          |           |         |
| 8                                   |            |          |            |          |           |         |
| 9                                   |            |          |            |          |           |         |
| 10                                  |            |          |            |          |           |         |
| 11                                  |            |          |            |          |           |         |
| 12                                  |            |          |            |          |           |         |
| 13                                  |            |          |            |          |           |         |
| 14                                  |            |          |            |          |           |         |
| 15                                  |            |          |            |          |           |         |
| 16                                  |            |          |            |          |           |         |
| 17                                  |            |          |            |          |           |         |
| 18                                  |            |          |            |          |           |         |
| 19                                  |            |          |            |          |           |         |
| 20                                  |            |          |            |          |           |         |
| 21                                  | ●          |          |            |          |           |         |
| 22                                  |            |          |            |          |           |         |
| 23                                  |            |          |            |          |           |         |

Q.1.2. (15+10 баллов)

| Время<br>(мин.) | Концентрация фермента |       |
|-----------------|-----------------------|-------|
|                 | 1 х                   | 0,1 х |
| 1               |                       |       |
| 10              |                       |       |
| 20              |                       |       |



Q.1.3. (15 баллов)

Линейная зависимость :  $1x$   $0,1x$

A large empty rectangular box with a black border, intended for drawing or writing the answer to Q.1.3.

Q.1.4. (5 баллов)

A large empty rectangular box with a black border, intended for drawing or writing the answer to Q.1.4.

---

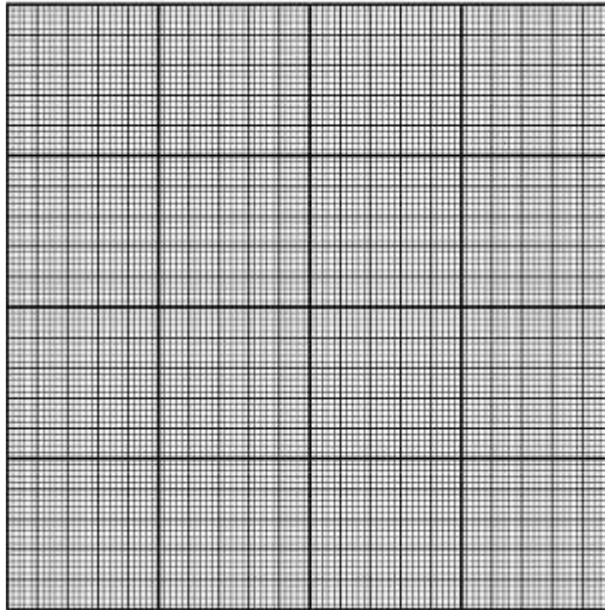
Q.1.5. (5 баллов)

Q.1.6. (5 баллов)

Q.1.7. (5 баллов)



Q.2.1. (10 баллов)



Q.2.2. (10 баллов)

Blank rectangular box for the answer to Q.2.2.

Q.2.3. (10 баллов)

Blank rectangular box for the answer to Q.2.3.

\*\*\*\*\* КОНЕЦ ПРАКТИЧЕСКОГО ТЕСТА 2 \*\*\*\*\*

STUDENT CODE:

Country Code: \_\_\_\_\_  
Country: \_\_\_\_\_

Student Code: \_\_\_\_\_  
Name: \_\_\_\_\_

## 20<sup>th</sup> INTERNATIONAL BIOLOGY OLYMPIAD

12<sup>th</sup> – 19<sup>th</sup> July 2009

Tsukuba, JAPAN



PRACTICAL TEST 2

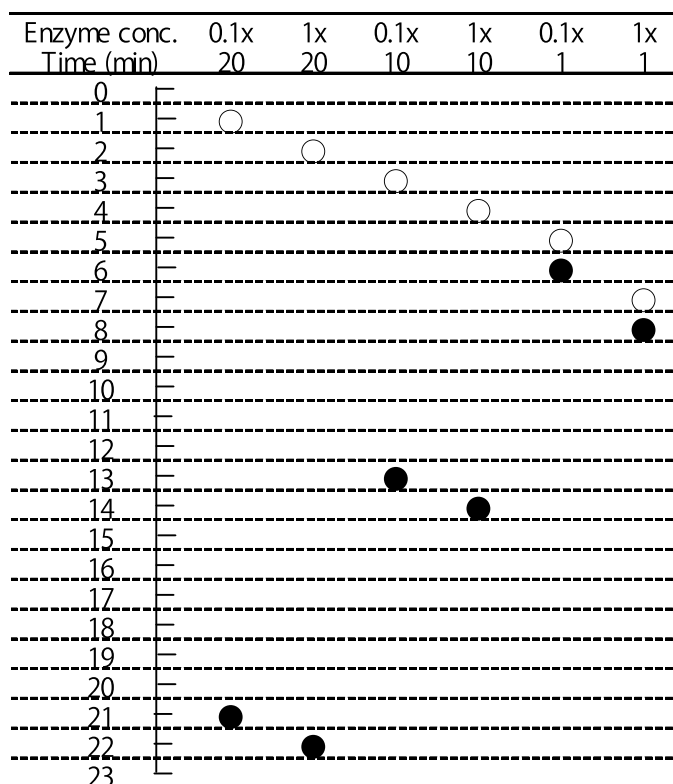
BIOCHEMISTRY

Total Points: 100

Duration: 90 minutes

ANSWER KEY

Q.1.1. (10 points)

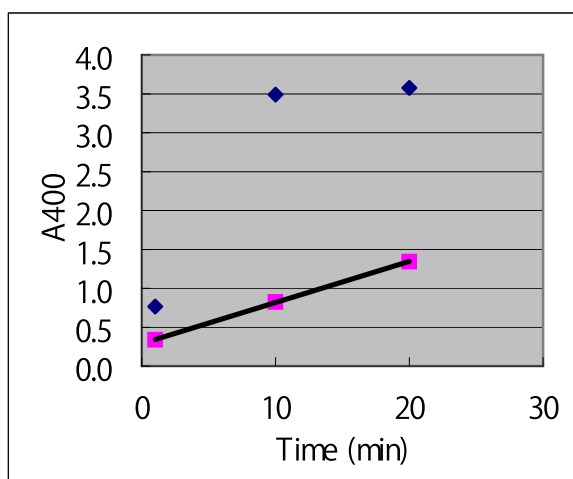


Taking a time course of enzymatic reactions is time-consuming if individual reactions are performed in series. Thus, this kind of time schedule is necessary to save time. The key points are that the 1-min reactions are done within the time of a 10-min reaction and the 10-min reactions are done within the time of a 20-min reaction.

Q.1.2. (15+10 points)

| Time<br>(min) | Enzyme concentration |       |
|---------------|----------------------|-------|
|               | 1x                   | 0.1x  |
| 1             | 0.766                | 0.338 |
| 10            | 3.491                | 0.825 |
| 20            | 3.578                | 1.342 |

When new samples are tested for an enzymatic reaction, it is necessary to perform the reaction at different enzyme concentrations. In the case of Q.1.2., one cannot estimate the initial rate of the reaction from the data of 1x enzyme; one cannot linearly link the 1-min point and the 10-min point, because the 20-min point is not on the line projected from the 1-min and 10-min points. The saturation of absorbance observed with 1x enzyme is due to inability of spectrophotometers towards too much concentrated samples. The reaction with 0.1x enzyme proceeded linearly within the time range, and the initial rate of the reaction is calculated from these data.



In this case, time is the independent variable, which must be plotted on the X-axis, while absorbance is dependent variable, which must be plotted on the Y-axis. Principally, both axes should be labeled with unit, but absorbance is an absolute number having no units.

Q.1.3. (15 points)

Linearity : 1x

0.1x

$$\begin{aligned} \text{Slope} &= (1.342 - 0.338) / (20 - 1) \\ &= 0.053 \text{ min}^{-1} \end{aligned}$$

The slope is calculated from the data point as described in the above box or directly read from the graph.

Q.1.4. (5 points)

$$\begin{aligned} \Delta A &= \text{Ans(Q. 1.3.)} * (1/0.24) * 10 \\ &= 0.053 * 4.17 * 10 \\ &= 2.2 \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1} \end{aligned}$$

The slope obtained with 0.24 ml of 0.1x enzyme is proportionally converted to what would be obtained with 1 ml of 1x enzyme solution.

Q.1.5. (5 points)

$$\Delta C = \Delta A / \epsilon L = \text{Ans(Q.1.4.)} / \epsilon = 2.2 / 19000 = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$$

The rate obtained as the absorbance change per min per ml of 1x enzyme is converted to a concentration change by using the absorption coefficient of pNP, 19000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Note that L is 1 cm, as described in the box in the Question paper.

Q.1.6. (5 points)

$$\Delta N = \Delta C \times 0.0012 \text{ (L)} = \text{Ans(Q.1.5.)} \times 0.0012 = 1.4 \times 10^{-7} \text{ (mol min}^{-1} \text{ ml}^{-1})$$

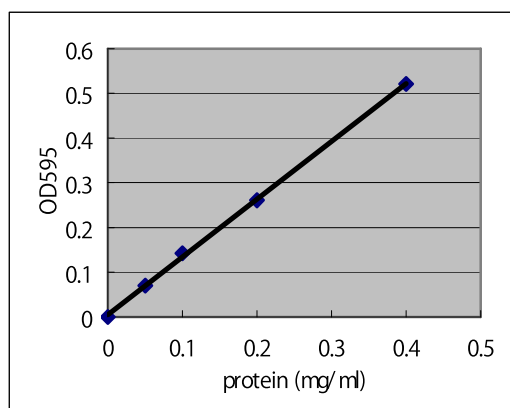
Mol number is calculated by multiplying the concentration change by the volume of mixture that was subjected to the measurement of absorbance, that is 1.2 ml. Remember that M (molar) is mol/liter, and the unit of the volume must be liter, not milliliter.

Q.1.7. (5 points)

$$\text{Total activity} = \text{Ans(Q.1.6.)} \times 4 = 5.6 \times 10^{-7} \text{ (mol min}^{-1})$$

Total activity is calculated by multiplying the activity per ml of 1x enzyme solution by the volume of 1x enzyme solution.

Q.2.1. (10 points)



Optical density is the ‘absorbance’ of suspension, and can be treated like absorbance in Task 2\*. Protein concentration is the independent variable, which must be plotted on the X-axis, while optical density is the dependent variable, which must be plotted on the Y-axis. Both axes should be labeled with unit, but optical density is an absolute number having no units like absorbance.

\*Absorbance is a term for solutions, but cannot be used for suspensions. In the Bradford method, mixing of soluble proteins with the Bradford dye yields insoluble materials that absorb 595-nm light and are precipitated by low speed centrifugation.

Q.2.2. (10 points)

Concentration of 0.1x enzyme solution =  $0.135 \text{ mg ml}^{-1}$

Concentration of 1x enzyme solution =  $1.35 \text{ mg ml}^{-1}$

The plot of 5 point gives a straight line. The intersection of the straight line and an OD=0.18 line shows that the concentration of 0.1x enzyme is  $0.135 \text{ mg ml}^{-1}$ . The concentration of 1x enzyme solution can be obtained by multiplying the concentration of 0.1x enzyme by 10.

Q.2.3. (10 points)

Specific activity =  $\text{Ans(Q.1.6.)} / \text{Ans(Q.2.2.)}$   
 $= 1.4 \times 10^{-7} (\text{mol min}^{-1}) (1.35 \text{ mg protein})^{-1}$   
 $= 1.0 \times 10^{-7} (\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein})$

---

Specific activity is the activity per unit weight (mg) of protein. The 1x enzyme solution has the activity of  $1.4 \times 10^{-7}$  ( $\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ ) and the protein concentration of  $1.35 \text{ mg ml}^{-1}$ . Thus, the specific activity is calculated by dividing the former by the latter.