

**МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ
ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ**
Заключительный этап
Технологический сектор
Практика «ХимБиоТех»
Командно-практическое задание

Критерии оценивания командного практического задания

Работа с объектом		
1	Охарактеризован фермент пероксидаза: класс фермента, катализируемая реакция, нахождение в природе.	30 баллов
2	Проведен анализ экстрактов растений на наличие пероксидазной активности.	30 баллов
3	Верно определен экстракт с наибольшей пероксидазной активностью.	30 баллов
4	Проведена реакция Бредфорда с выбранным экстрактом.	30 баллов
5	Рассчитана концентрация белка в выбранном экстракте по калибровочному уравнению.	30 баллов
Параметры процесса		
1	Рассмотрено, к какой группе бактерий относится <i>Escherichia coli</i> по типу метаболизма и потребности в питательных веществах.	30 баллов
2	Рассмотрено, к какой группе бактерий относится <i>Escherichia coli</i> по типу оптимальной температуре роста и оптимальному pH культуральной среды.	30 баллов
3	Рассмотрено, к какой группе бактерий относится <i>Escherichia coli</i> по типу дыхания.	30 баллов
4	Предложены условия, в которых будет проводиться культивирование рекомбинантной бактерии <i>Escherichia coli</i> (температура и pH).	30 баллов
5	Предложена питательная среда, в которой будет проводиться культивирование рекомбинантной бактерии <i>Escherichia coli</i> .	30 баллов
Технологическая схема		
1	Указаны этапы получения рекомбинантной пероксидазы в клетках <i>E. coli</i> .	30 баллов
2	Указаны этапы выделения и очистки рекомбинантной пероксидазы.	30 баллов
3	Указано оборудование, которое используется для проведения каждой стадии.	30 баллов

**МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ
ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ**
Заключительный этап
Технологический сектор
Практика «ХимБиоТех»
Командно-практическое задание

4	Приведена технологическая схема лабораторного получения фермента.	30 баллов
5	На технологической схеме указаны основные условия – температура, реагенты, микроорганизмы и пр.	30 баллов
Оценка эффективности технологической схемы		
1	Рассмотрены преимущества и недостатки использования рекомбинантного продуцента для получения пероксидазы.	30 баллов
2	Приведено не менее двух примеров применения пероксидазы.	30 баллов
3	Проведено сравнение содержания пероксидазы в растительных тканях и в бактериальной биомассе.	30 баллов
Представление решения		
1	Качество презентационных материалов: постер оформлен аккуратно, содержит требуемые разделы.	20 баллов
2	Качество выступления (читают, подсматривают, рассказывают).	20 баллов
3	Ответы на вопросы	20 баллов

МОСКОВСКАЯ ПРЕДПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОЛИМПИАДА ШКОЛЬНИКОВ

Заключительный этап Технологический сектор Практика «ХимБиоТех»

Решение командно-практического задания

1. Работа с объектом.

а. Охарактеризуйте фермент пероксидазу: к какому классу ферментов она относится, какие реакции катализирует, где встречается в природе.

Пероксидаза относится к классу окислительно-восстановительных ферментов (оксидоредуктаз).

Пероксидазы катализируют окисление различных органических и неорганических субстратов перекисью водорода (H_2O_2) или другими органическими гидропероксидами.

Пероксидазы являются гемсодержащими ферментами, содержащими гем (Fe^{3+} -порфириновый комплекс).

Пероксидазы встречаются в:

Растениях – в корнях, листьях, семенах, особенно в хрене и сое.

Животных – в плазме крови, лейкоцитах, молоке.

Микроорганизмах – у грибов, бактерий.

Биологическое значение:

Защита от окислительного стресса – разложение пероксидов.

Окисление токсичных соединений (фенолов, анилина).

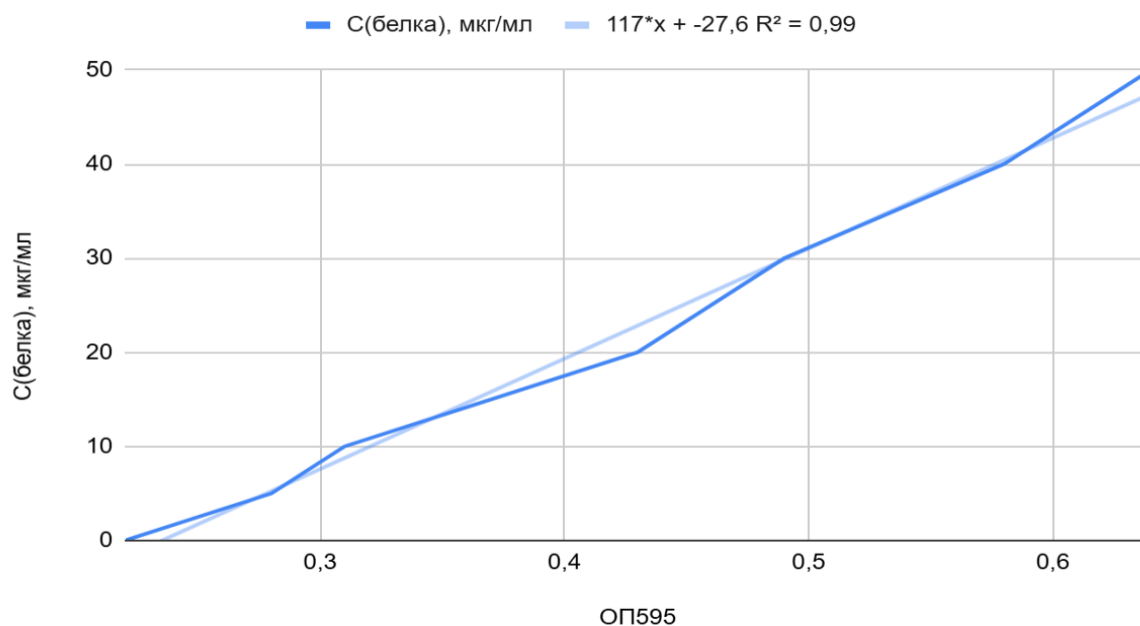
б. Проведите анализ белковых экстрактов растений на наличие пероксидазной активности (приложение 1).

Пробирка	Образец	Наблюдения за ходом реакции
1	вода (отрицательный контроль)	нет изменений окраски
2	соя	раствор стал ярко оранжевым
3	береза	раствор стал оранжевым, окраска слабая
4	одуванчик	нет изменений окраски
5	хрен (положительный контроль)	раствор стал ярко оранжевым

с. На основе полученных данных определите, какое растение может служить источником гена пероксидазы помимо хрена. – соя

д. Определите концентрацию белков в экстракте выбранного растения (приложение 2).

Калибровочная зависимость:



пробирка	растение	ОП(595)	С белка, мкг/мл
1	вода	0,199	0
2	соя	0,474	28
3	береза	0,405	20
4	одуванчик	0,192	0
5	хрен	0,511	32

Концентрация белка в экстракте с наибольшей активностью пероксидазы 28 (20-35 мкг/мл)

2. Параметры процесса.

а. Опишите бактерию *Escherichia coli*, в которой будет проводиться экспрессия гена растительной пероксидазы, — к какой группе бактерий относится данный организм по типу метаболизма и потребности в питательных веществах, оптимальной температуре роста, по типу дыхания, по оптимальному pH культуральной среды.

Escherichia coli — гетеротрофная бактерия, факультативный анаэроб, оптимум роста 37 °С, оптимальный pH среды нейтральный.

б. Определите условия, в которых будет проводиться культивирование рекомбинантной бактерии *Escherichia coli*, несущей ген пероксидазы (питательная среда, температура и pH).

Например: питательная среда LB (или другая среда для *Escherichia coli*), культивирование в колбах при перемешивании при 37 °С.

3. Технологическая схема.

а. Укажите, какие стадии включает получение и очистка рекомбинантной пероксидазы в условиях лаборатории. Технологическая схема должна начинаться со штамма микроорганизма и плазмиды, содержащей ген целевого белка, и заканчиваться очищенным раствором белка.

Получение штамма-продуцента: Плазмиду, с геном пероксидазы, выделенным из ДНК растения, вводят в клетки *E. coli* с помощью трансформации, получая рекомбинантный штамм, способный синтезировать пероксидазу.

Культивирование продуцента и выделение биомассы: рекомбинантный штамм культивируют в питательной среде при оптимальных условиях (температура, аэрация, pH). После достижения достаточной плотности культуры биомассу собирают центрифугированием.

Выделение фермента и анализ его активности: проводят лизис клеток (ультразвук, термическая обработка, ферментативная обработка) с последующей очисткой белка с помощью хроматографии. Количество фермента определяют спектрофотометрически, а активность – с помощью ферментативных тестов, измеряя скорость окисления субстрата (например, люминола или гваякола) в присутствии H_2O_2 .

б. Рассмотрите оборудование, которое используется для проведения каждой стадии.

Получение штамма-продуцента: шейкер-инкубатор, оборудование для электропорации.

Культивирование продуцента и выделение биомассы: автоклав, термостат, шейкер-инкубатор, денситометр, центрифуга.

Выделение и очистка фермента: термостаты, ультразвуковой дезинтегратор, центрифуга, хроматограф (например, для гель-фильтрации и обращенной фазовой хроматографии).

Анализ активности фермента: спектрофотометр

в. Составьте технологическую схему получения продуцента рекомбинантной пероксидазы, культивирования продуцента и выделения и очистки белка из биомассы.



4. Оценка эффективности технологической схемы

а. Проанализируйте преимущества и недостатки использования рекомбинантного продуцента для получения пероксидазы.

Недостатки: отсутствие посттрансляционных модификаций белка, характерных для эукариот, высокая стоимость разработки методики, возможны иммуногенные примеси бактериальных белков в получаемом продукте.

Преимущества: стандартизация всех этапов производства, возможность получать модифицированный белок, высокая скорость процесса и его масштабируемость, отсутствие зависимости от климатических условий (что актуально для получения белков растительного происхождения).

б. Перечислите области, в которых может использоваться данный белок. Приведите конкретные примеры применения в каждой из областей.

Медицина: иммуноферментный анализ (пероксидазой метят антитела для получения цветной реакции), тест-полоски для глюкометров, окрашивание тканей в гистологии для выявления опухолевых маркеров.

Пищевая промышленность: добавление пероксидазы в тесто для укрепления клейковины и увеличения объема выпечки.

Биотехнология: в составе биосенсоров, для биоремедиации (окисления органических загрязнителей).

с. Методом Бредфорда вы определили концентрацию белков в экстракте растительных тканей, содержащем пероксидазу. Пусть общий объем данного экстракта составлял 10 мл, и единственным белком в экстракте была пероксидаза, а экстракция проводилась из 100 мг растительных тканей. Сравните содержание пероксидазы в растительных тканях и в бактериальной биомассе при получении пероксидазы рекомбинантным методом, если из 100 мг бактериальной биомассы выделили пероксидазу методом, аналогичным методу для растительного сырья. Объем экстракта составил 10 мл, а при определении концентрации белков по Брэдфорду оптическая плотность ОП₅₉₅ экстракта составила 0,64.

Масса пероксидазы в растительном экстракте (соя, образец 2): $28 \text{ мкг/мл} \cdot 10 \text{ мл} = 280 \text{ мкг}$

Концентрация пероксидазы в экстракте бактериальной биомассы по калибровочной зависимости: 50 мкг/мл

Масса пероксидазы в экстракте бактериальной биомассы: $50 \text{ мкг/мл} \cdot 10 \text{ мл} = 500 \text{ мкг}$

$500/280 = 1,79$. В 1,79 раз получение рекомбинантного фермента эффективнее, чем выделение из растительных тканей.

Подарёныши

Состав: Гук Константин Филиппович, ГАОУ Школа № 548
 Плещикова Мария Александровна, ГАОУ Школа № 548
 Астафьев Антон Антенович, ГАОУ Школа № 548
 Нам Нина Викторовна, ГАОУ Школа № 548
 Плещикова Мария Викторовна, ГАОУ Школа № 548

Работа с объектом.

1. Пероксидаза-ферменты класса оксидоредуктаз, катализируют окисление различных соединений и встречаются преимущественно в растениях.

2. Таблица 1. Определение пероксидазной активности растительных экстрактов.

Пробирка	Образец	Наблюдения за ходом реакции
1	Вода	Изменения цвета не произошло
2	Экстракт сои	Изменение цвета произошло на желто-коричневый
3	Экстракт орехи	Изменение цвета произошло на желто-коричневый
4	Экстракт овчарника	Изменения цвета не произошло
5	Экстракт хрена	Изменение цвета произошло на желто-коричневый

3,4. Таблица 2. Результат количественного определения белка методом Бредфорда.

Исследуемый экстракт	Соя
Лунка планшета	8В
ОП ₅₅₅	0,538

На основе результатов, полученных в ходе эксперимента, было выяснено, что соя может служить источником гена пероксидазы.

Технологическая схема

Кодирующий ген с помощью ПЦР выделяют из природного источника

Ген встраивают в плазмидный вектор

Плазмиду вводят в E.coli, получая рекомбинантный штамм.

Рекомбинантный штамм культивируют в питательной среде.

Биомассу собирают центрифугированием, очищают и фильтруют

Материалы и оборудование

- Штатив
- Экстракты растительных белков
- Пипетки пастера
- Планшет 96-луночный с плоским дном
- Пробирки типа Эппендорф
- Пипетка автоматическая на 200 мкл с наконечниками
- Фотометр планшетный
- Маркер

Параметры процесса.

1. Escheria coli - метаболически универсальная бактерия, способная расти как в присутствии O₂, так и в его отсутствие. Для штамма используют пиктовую биохимию, в которой сарбитовое дыхание предпочтительнее анаэробного, которое в свою очередь, предпочтительнее ферментации. Температурный режим. Аэробный метаболизм более предпочтительней, чем анаэробный и ферментация. Оптимальная t для жизнедеятельности и размножения = 37°C (310 K)

2. Оптимальное значение pH = 6,5-7,5

Условие для культивирования: Питательная среда: Среда LB (LB - lysogeny broth - лизогенная среда); t = 37°C (310 K) pH = 7,2 ± 0,1

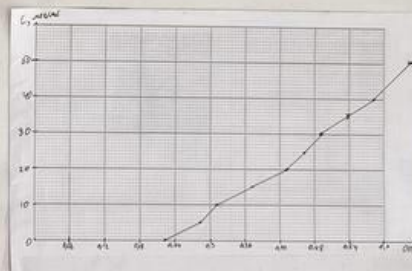


Таблица 3. Калибровочная кривая по методу Бредфорда.

Анализ эффективности технологической схемы

1. Возмжно простое получение производств. Высокая скорость производства. Низкая стоимость производства.

Очень сложная цепочка производства. Для производства используется дорогое специальное оборудование.

2. Области использования данного белка

- В медицине. Для диагностики заболеваний.
- В анализе целых. Для определения микрочисел пероксида водорода.
- В производстве. Для производства клеев, конъюгированных чипов, детекторов и много другого.
- В селекции растений. Чем выше пероксидазная активность, тем устойчивее растение к инфекциям.

3. Ответ: 1,4 раза