

Задания
практического тура заключительного этапа XXXIV Всероссийской
олимпиады школьников по биологии. 2017-18 уч. год.
11 класс, кабинет БИОХИМИИ

Сначала внимательно прочтите все задание!

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ В ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОМ
ЭКСТРАКТЕ ПЕЧЕНИ по А.Н.Баху и А.И.Опарину

Для определения активности каталазы Вам предоставляются следующие реактивы и материалы:

1. Стандартный раствор перманганата калия (в бюретке) с концентрацией **10 мМ**.
2. Раствор серной кислоты с концентрацией 5%.
3. Исходный раствор перекиси водорода с неизвестной концентрацией (в пробирке № 1).
4. Раствор перекиси водорода с неизвестной концентрацией (в пробирке № 2) после инкубации с экстрактом печени
5. Дистиллированная вода в стаканчике
6. Колбы для титрования (4 штуки).
7. Автоматическая пипетка на 1 мл и наконечники к ней (3 штуки).

Введение. Свежую печень прогомогенизировали в физиологическом растворе. Полученный гомогенат отцентрифугировали при 15000×g в течение 20 минут и полученный супернатант развели до конечной **концентрации белка 10 мкг/мл**. Приготовили исходный раствор субстрата фермента каталазы - перекиси водорода (точная концентрация неизвестна, **пробирка №1**). Для определения активности каталазы к **9 мл** этого раствора перекиси водорода добавили **1 мл** разведенного супернатанта, смесь проинкубировали **5 минут**, остановили реакцию нагреванием, после чего раствор профильтровали (**пробирка №2**). Вам необходимо с помощью титрования определить концентрацию перекиси водорода в пробирках №1 и №2, рассчитать активность каталазы и ответить на предлагаемые вопросы.

Титрование: Внесите в две колбочки для титрования по **1 мл** раствора перекиси из пробирки **№1**. Добавьте в колбочки **дистиллированную воду** (по **20-25 мл**) и по **1 мл** раствора серной кислоты. Перемешайте! Установите уровень раствора перманганата калия в бюретке на произвольную исходную отметку (**запишите значение!**), и аккуратно, по каплям, проведите титрование (при постоянном тщательном перемешивании раствора в колбочке!) в одной из колбочек до появления **устойчивой** розовой окраски. Запишите в Таблицу, **сколько миллилитров перманганата калия** пошло на титрование. **Проведите титрование во второй колбочке.**

Проделайте аналогичную процедуру с раствором из пробирки **№2**.

Результаты внесите в Таблицу. **Покажите Ваши колбы преподавателю!**

Задание 1 (20 баллов).

Номер пробирки	Объем раствора KMnO_4 , мл	Среднее значение, мл	Место для расчета среднего значения
1			
1			
2			
2			

Задание 2 (2 балла). Напишите уравнение реакции, которую катализирует фермент каталаза:

--

Задание 3 (10 баллов). При титровании раствора перекиси водорода раствором KMnO_4 в присутствии серной кислоты протекает следующая реакция:



Исходя из уравнения реакции и результатов Вашего титрования, рассчитайте концентрацию перекиси водорода в **мМ** (ммоль/л) в пробирках №1 и №2. Результаты внесите в Таблицу.

Номер пробирки	Расчет концентрации H_2O_2 (8 баллов)	Концентрация H_2O_2 , мМ (2 балла)
1		
2		

Задание 4 (5 баллов). Исходя из условий эксперимента и полученных результатов, рассчитайте активность каталазы, выразив её в международных единицах активности ферментов (**мкмоль H_2O_2 /мин на 1 мг белка**).

Расчет активности каталазы (4 балла)	Активность каталазы, мкмоль H_2O_2 /мин на 1 мг белка (1 балл)

Задание 5 (3 балла). Известно, что зависимость активности каталазы V от концентрации перекиси водорода $[S]$ описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

где V_0 – скорость ферментативной реакции при концентрации субстрата $[S]$, V_{\max} – максимальная скорость ферментативной реакции при бесконечно большой концентрации субстрата, и K_m – константа Михаэлиса. Значение K_m каталазы печени составляет 50 мкМ. **При какой концентрации H_2O_2 скорость ферментативной реакции составит 75% от максимальной скорости?**

Расчет концентрации H_2O_2 (2 балла)	Концентрация H_2O_2 , мкМ (1 балл)

Закончив работу, заполненные листы Задания сдайте преподавателю, который примет Вашу работу.

Все расчеты записывать ТОЛЬКО в отведенных для этого местах.

В качестве черновика можно использовать свободное место на обратной стороне листов задания.

ЧЕРНОВИКИ НЕ ОЦЕНИВАЮТСЯ!!!

ИНСТРУКЦИЯ ПО РАБОТЕ С АВТОМАТИЧЕСКОЙ ПИПЕТКОЙ



Устройство автоматической пипетки

Для эксперимента Вам предоставляются пипетки объемом от 100 до 1000 мкл. Нужный объем устанавливается путем вращения **поршня**. Цифры в окошечке показывают **выбранный объем** в **микролитрах**. Наденьте на пипетку **наконечник**, нажмите **поршень** до первой остановки и погрузите наконечник в набираемую жидкость. Медленно отпустите поршень до достижения полной остановки для набора образца. Затем поместите наконечник с жидкостью в нужную пробирку и медленно нажмите поршень до первой остановки, пока вся жидкость полностью не выйдет из наконечника. Для выдувания остатков жидкости из наконечника нажмите поршень сильнее, до второй остановки. Снимите использованный наконечник, нажав кнопку сброса, и положите его на место.

Аккуратно используйте наконечники!!!

Один наконечник нельзя погружать в разные растворы! Если Вы отбираете одну и ту же жидкость – пользуйтесь одним наконечником!