

Задания
практического тура заключительного этапа
XXXVIII Всероссийской олимпиады школьников по биологии
2021-22 уч. год. 11 класс

БИОХИМИЯ (максимум 50 баллов)
Сначала внимательно прочтите все задания!

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ В ПРЕПАРАТЕ ФЕРМЕНТА

Для определения активности липазы в препарате фермента, выделенного и частично очищенного из поджелудочной железы голого землекопа, исследователи приготовили эмульсию, растворив 10 г нейтрального жира (триацилглицерида) в 1000 мл 0,1% водного раствора дезоксихолата натрия. К 500 мл этой эмульсии добавили 250 мкл полученного препарата липазы (добавленным объемом можно пренебречь) и инкубировали смесь при 25°C. Через 5 мин (Проба 1) и через 10 мин (Проба 2) из инкубационной смеси были отобраны аликвоты, в которых реакция была остановлена нагреванием. Для расчета активности фермента Вам необходимо определить концентрацию белка в исходном препарате липазы биуретовым методом и оттитровать образовавшуюся в процессе реакции кислоту в Пробе 1 и в Пробе 2.

Реактивы и оборудование. 96-луночный планшет. Стандартный раствор бычьего сывороточного альбумина (**БСА**) с концентрацией 10 мг/мл и препарат липазы (фермент, **Ф**) в Эррендорфах в фиолетовом штативе. Аликвоты инкубационной смеси из пробы 1 (**П1**) и из пробы 2 (**П2**), биуретовый реактив (**Биурет**) и дистиллированная вода (**H₂O**) в пробирках в белом штативе. Бюретка с раствором 5 мМ NaOH, капельница с раствором фенолфталеина, 4 колбы для титрования, промывалка с водой, автоматические пипетки на 200 мкл и 1 мл и наконечниками к ним в чашке Петри.

Задание 1 (15 баллов). Заполните все пустые клетки в Таблице 1 в ЛИСТЕ ОТВЕТОВ. Объем пробы белка (БСА и липазы) в лунке перед добавлением биуретового реактива должен составлять **50 мкл**.

Номера лунок	A1, B1	A2, B2	A3, B3	A4, B4	A5, B5	A6, B6	A7, B7	A8, B8
БСА, мкг	0	100	200	300	400	500		
БСА, мкл								
Вода, мкл								
Липаза (Ф), мкл							25	50
Биуретовый реактив, мкл	200	200	200	200	200	200	200	200

В соответствии с Таблицей составьте пробы в лунках 96-луночного планшета. В лунки A1-A6 и B1-B6 вносится раствор **БСА**, в лунки A7, B7 и A8, B8 – раствор липазы (**Ф**). Специального перемешивания растворов в лунках не требуется, перемешивание происходит при добавлении 200 мкл биуретового реактива. После завершения Задания 1 поднимите руку и передайте Ваш 96-луночный планшет дежурному по лаборатории, который измерит оптическую плотность при 540 нм, а Вам выдаст распечатку с результатами измерения.

Задание 2 (15 баллов). По полученным результатам на выданном Вам **ЛИСТЕ ОТВЕТОВ** постройте калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания белка в лунке планшета (для графика возьмите средние значения для двух повторов) и определите концентрацию белка в препарате фермента в **мг/мл**.

Задание 3 (10 баллов). Для определения активности липазы в 2 колбы для титрования внесите по 1 мл Пробы 1 (П1), а в две другие – по 1 мл Пробы 2 (П2). В каждую колбу добавьте примерно по 20 мл воды и 2-3 капли раствора фенолфталеина. Оттитруйте их **5 мМ** раствором **NaOH**. В Таблице 2 в **ЛИСТЕ ОТВЕТОВ** укажите, сколько миллилитров раствора NaOH пошло на титрование. Исходя из объема щелочи, затраченной на титрование (среднее для двух проб, с точностью до 1 знака после запятой), рассчитайте **концентрацию кислоты**, образовавшейся при гидролизе липида. Результаты внесите в **Таблицу 2 в ЛИСТЕ ОТВЕТОВ** (результат округлите до 1 знака после запятой).

Таблица №2

№ пробы	Объем раствора NaOH, мл	Среднее значение, мл	Концентрация кислоты, мМ
Проба 1			
Проба 1			
Проба 2			
Проба 2			

Задание 4 (5 баллов). Исходя из полученных результатов (при измерении концентрации белка и при титровании образовавшейся кислоты), рассчитайте активность липазы в препарате фермента в мкмольх нейтрального жира/мин на 1 мг белка.

Задание 5 (5 баллов). Навеску используемого в данной работе нейтрального жира массой 1,21 г подвергли полному щелочному гидролизу, прокипятив её в 100 мл 100 мМ NaOH (с обратным холодильником). После завершения гидролиза определили титрованием концентрацию непрореагировавшего NaOH, которая составила 55 мМ. Рассчитайте молекулярную массу данного жира.

Все ответы из Задания перенесите в ЛИСТЫ ОТВЕТОВ.

Все расчеты делайте в ЛИСТАХ ОТВЕТОВ.

Закончив работу, листы Задания и ЛИСТЫ ОТВЕТОВ (не забудьте написать Ваш шифр!) сдайте преподавателю, который примет Вашу работу.

ПРОВЕРЯЕТСЯ ТОЛЬКО ЛИСТ ОТВЕТОВ!

ЧЕРНОВИКИ НЕ ОЦЕНИВАЮТСЯ!!!