

53 Olimpiada Biologiczna – Pracownia 221D

Imię i nazwisko	Grupa				Nr
	CZER	NIEB	ZIEL	ZOLT	

Zaznacz znakiem X swoją grupę

Czas: 90 min.

Łączna liczba punktów do zdobycia: 30

Drodzy uczestnicy!

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:
Część A jest zadaniem praktycznym, którego celem jest identyfikacja związków biologicznych w mieszaninach (**16 pkt**),
Część B jest zadaniem praktyczno-teoretycznym, którego celem jest analiza barwników fotosyntetycznych w produktach spożywczych (**14 pkt**).
- Przed przystąpieniem do rozwiązywania zadań należy przeczytać wszystkie dostarczone materiały (**11 numerowanych stron**).
- Odpowiedzi należy udzielać jedynie na **karcie odpowiedzi (2 strony)**.
- Uzyskane wyniki eksperymentów należy umieścić na **karcie wyników laboratoryjnych (1 strona formatu A5)**
- Odpowiedzi umieszczone w arkuszu zadań nie będą oceniane.
- Kartę odpowiedzi wypełniaj za pomocą czarnego długopisu czytelnym pismem (drukowanymi literami). Dokładnie zaczerpnij pola na karcie odpowiedzi. Wartości liczbowe i tekstowe należy wpisać w odpowiednie pola – egzaminator oceni odpowiedzi i zakoduje na karcie liczbę przyznaną punktów.
- Upewnij się, że otrzymałeś wszystkie niezbędne materiały i odczynniki do wykonania zadań znajdujące się na załączonej liście. Jeżeli brakuje jakiegokolwiek pozycji, podnieś rękę.
- **Używaj dostarczonych odczynników wg instrukcji. Dodatkowe odczynniki nie będą udostępniane bez względu na okoliczności.**
- Używaj rękawiczek ochronnych.
- Zakończ udzielanie odpowiedzi i odłóż długopis natychmiast po zakończeniu egzaminu.

Materiały i sprzęt

Materiał	Opis na etykiecie	Ilość	Jednostka
1% Ninhydryna	Ninhydryna	1 (400 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Odczynnik Bradforda	Bradford	2 (2000 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
1% kwas dinitrosalicylowy (DNS) w 0,4 M NaOH	DNS	1 (400 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Próbka 1	P1	1 (150 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Próbka 2	P2	1 (150 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Próbka 3	P3	1 (150 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Ekstrakt 1	E1	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Ekstrakt 2	E2	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Ekstrakt 3	E3	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Ekstrakt 4	E4	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Woda dejonizowana	Woda	1 (20 ml)	butelka
Wszystkie odczynniki w probówkach typu Eppendorf są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami.			

Sprzęt	Ilość	Jednostka
Pipety automatyczne 0,5–10 µl, 10–100 µl i 100–1000 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Blok grzejny na próbówki typu Eppendorf	1 urządzenie na 4 uczestników	
Wstrząsarka typu vortex	1	sztuka
Płytki wielodołkowa i folia samoprzylepna (w torebce)	1	sztuka
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	12	sztuka
Statyw na próbówki typu Eppendorf	1	sztuka
Płytki chromatograficzna (w torebce)	1	sztuka
Komora chromatograficzna (słoik) z eluentem	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	1	sztuka
Ołówek	1	sztuka
Linijka	1	sztuka
Pojemnik na odpady	1	sztuka
Ręczniki papierowe	kilka	„listek”
Rękawiczki*	1	para
Stoper	1	sztuka

* uczestnicy otrzymają rękawiczki przed rozpoczęciem pracowni. Zapasowe rękawiczki będą dostępne na sali.

Część A. Identyfikacja związków biologicznych w mieszaninach (16 pkt)

Wprowadzenie

W trzech próbkach: P1, P2 i P3, znajdują się mieszaniny: α -aminokwasu, białka oraz cukru heksozy. Każda z próbek zawiera dwa wymienione składniki. **Twoim zadaniem jest zidentyfikować zawartość każdej z próbek.** Do dyspozycji masz następujące odczynniki: kwas dinitrosalicylowy, odczynnik Bradforda i ninhydrynę. Kwas dinitrosalicylowy w środowisku zasadowym w reakcji z cukrami redukującymi tworzy czerwono-brązowe zabarwienie. Odczynnik Bradforda tworzy z białkami kompleksy o barwie niebieskiej. Natomiast ninhydryna w reakcji z α -aminokwasami tworzy zabarwienie od purpurowego do fioletowego w zależności od aminokwasu. Ninhydryna może również reagować z aminami oraz z białkami.

Zadanie A.1 (14 pkt)

Zaprojektuj i wykonaj eksperyment umożliwiający identyfikację składników mieszanin P1, P2 i P3. Objętości poszczególnych odczynników wymaganych do konkretnej reakcji barwnej znajdziesz w instrukcji poniżej. Pamiętaj o wykonaniu próby ślepej dla każdej z reakcji barwnych. Wykorzystaj wszystkie 12 próbek. Jeżeli nie dodajesz jakiegoś roztworu, wpisz do odpowiedniej komórki tabeli znak „—”.

Instrukcja do części A.1

1. Ponumeruj 12 plastikowych próbek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml od 1 do 12.
2. Uzpełnij tabelę 1. (na następnej stronie), a następnie dodaj do każdej z próbek odczynniki wg uzupełnionej tabeli 1.

A. Reakcja z kwasem dinitrosalicylowym

I. do próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodaj:

- a) 500 μ l wody dejonizowanej
- b) 50 μ l badanej próbki
- c) 100 μ l kwasu dinitrosalicylowego (DNS).

II. zamknij próbki i wymieszaj na wstrząsarce typu vortex.

III. umieść próbki w bloku grzejnym (100 °C) na 10 minut.

B. Reakcja z odczynnikiem Bradforda

I. do próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodaj:

- a) 50 μ l badanej próbki
- b) 500 μ l odczynnika Bradforda.

II. zamknij próbki i wymieszaj na wstrząsarce typu vortex.

III. zostaw próbki w temperaturze pokojowej na 10 minut.

C. Reakcja z ninhydryną

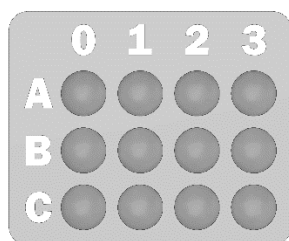
I. do próbki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml dodaj:

- a) 500 μ l wody dejonizowanej
- b) 50 μ l badanej próbki
- c) 100 μ l roztworu ninhydryny.

II. zamknij próbki i wymieszaj na wstrząsarce typu vortex.

III. umieść próbki w bloku grzejnym (100 °C) na 10 minut.

- Po zakończeniu inkubacji wyjmij probówki z bloku grzejnego.
- Po ostygnięciu próbek (około 10 minut) przenieś po 30 μl każdej z próbek do odpowiednich dołków na płytce wielodołkowej.



- Rząd A: wykrywanie cukrów
- Rząd B: wykrywanie białek
- Rząd C: wykrywanie aminokwasów
- Kolumna 0: ślepa próba
- Kolumny 1–3: próbki P1–P3

Rys. 1. Schemat płytki wielodołkowej.

- Na karcie wyników laboratoryjnych odklej folię z taśmy samoprzylepnej i połóż na niej płytkę wielodołkową. Następnie zaklej delikatnie płytkę folią samoprzylepną. Odłóż kartę wyników laboratoryjnych w bezpieczne miejsce.

Zadanie A.1.1. (1 pkt)

Tabela 1. Skład mieszanin reakcyjnych															
	Nr probówki	Objętość w μl dodawanego roztworu													
		woda		DNS		Bradford		Ninhydrina		P1		P2		P3	
Wykrywanie cukrów (A)	1	1A		1B		1C		1D		1E		1F		1G	
	2	2A		2B		2C		2D		2E		2F		2G	
	3	3A		3B		3C		3D		3E		3F		3G	
	4	4A		4B		4C		4D		4E		4F		4G	
Wykrywanie białek (B)	5	5A		5B		5C		5D		5E		5F		5G	
	6	6A		6B		6C		6D		6E		6F		6G	
	7	7A		7B		7C		7D		7E		7F		7G	
	8	8A		8B		8C		8D		8E		8F		8G	
Wykrywanie aminokwasów (C)	9	9A		9B		9C		9D		9E		9F		9G	
	10	10A		10B		10C		10D		10E		10F		10G	
	11	11A		11B		11C		11D		11E		11F		11G	
	12	12A		12B		12C		12D		12E		12F		12G	

UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.

Zadanie A.1.2. (1 pkt)

Podaj, w których probówkach 1–12 znajdują się ślepe próby

Odp.	Ślepa próba w próbce (wpisz nr próbki)
X	
Y	
Z	

UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.

Zadanie A.1.3. (6 pkt)

Wypełnij tabelę 2., zaznaczając, dla których próbek uzyskano pozytywne reakcje barwne.

Tabela 2. Wyniki reakcji barwnych								
	Pozytywna reakcja barwna:							
	0 (próba ślepa)		1 (próbka P1)		2 (próbka P2)		3 (próbka P3)	
A (wykrywanie cukrów)	I	TAK <input type="checkbox"/>	IV	TAK <input type="checkbox"/>	VII	TAK <input type="checkbox"/>	X	TAK <input type="checkbox"/>
B (wykrywanie białek)	II	TAK <input type="checkbox"/>	V	TAK <input type="checkbox"/>	VIII	TAK <input type="checkbox"/>	XI	TAK <input type="checkbox"/>
C (wykrywanie aminokwasów)	III	TAK <input type="checkbox"/>	VI	TAK <input type="checkbox"/>	IX	TAK <input type="checkbox"/>	XII	TAK <input type="checkbox"/>

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.

Zadanie A.1.4. (6 pkt)

Na podstawie obserwacji zanotowanych w tabeli 2. wskaż, jakie związki biologiczne znajdowały się próbkach P1, P2 i P3.

Próbka	Zawartość próbki:
P1	P1 A. Cukier <input type="checkbox"/> / B. Białko <input type="checkbox"/> / C. Aminokwas <input type="checkbox"/>
P2	P2 A. Cukier <input type="checkbox"/> / B. Białko <input type="checkbox"/> / C. Aminokwas <input type="checkbox"/>
P3	P3 A. Cukier <input type="checkbox"/> / B. Białko <input type="checkbox"/> / C. Aminokwas <input type="checkbox"/>

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.

Zadanie A.2. (2 pkt)

Stosowanie reakcji barwnych wg metod: Bradforda, Lowrego, biuretowej i innych, to nie jedyna możliwość określenia stężenia białka. W tym celu można wykorzystywać bezpośredni pomiar absorbancji roztworu białka w zakresie ultrafioletu. Wykonaj poniższe zadanie.

Jakie jest stężenie procentowe (w/v) roztworu białka, jeżeli absorbancja przy 280 nm tego roztworu w kuwecie o drodze promienia świetlnego 1 cm wynosi 0,636 jednostki? Molowy współczynnik absorpcji tego białka jest równy $18700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (dla 280 nm), a masa molowa 29387,6 g/mol. Wyniki podaj z dokładnością do trzech miejsc po przecinku.

Tabela 3. Stężenie białka w roztworze wynosi:			
stężenie molowe		stężenie procentowe (w/v)	
wartość	jednostka	wartość	jednostka
α		β	
	mM		%

UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.

Miejsce na obliczenia:

Część B. Analiza barwników fotosyntetycznych w produktach spożywczych (14 pkt).

Wprowadzenie.

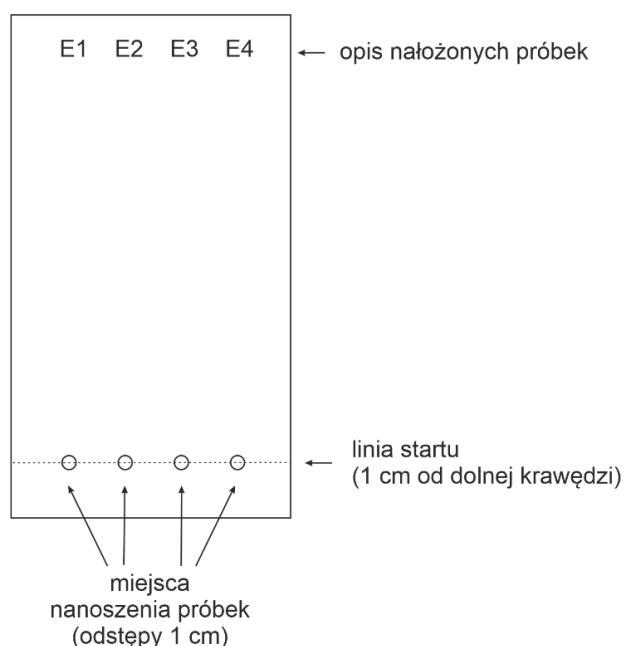
W czterech probówkach podpisanych E1–E4 znajdują się ekstrakty barwników uzyskanych z produktów spożywczych pozyskanych z różnych organizmów fotosyntetyzujących. Ekstrakty wykonano z: a) spiruliny w proszku, b) chlorelli w proszku, c) owocu papryki, d) liści szpinaku. Twoim zadaniem jest m.in. przyporządkowanie ekstraktów do produktów spożywczych. Do dyspozycji masz zestaw do cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej (TLC) oraz zdjęcia mikroskopowe TEM (transmisyjna mikroskopia elektronowa) obrazujące struktury komórkowe/subkomórkowe organizmów, z których pozyskano ww. produkty spożywcze.

Zadanie B.1. (4 pkt)

Wykonaj chromatografię cienkowarstwową ekstraktów E1–E4 wg instrukcji poniżej.

Instrukcja do części B.1.

1. Wyjmij płytkę chromatograficzną z woreczka. Narysuj za pomocą ołówka linię startu w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki (po płytce należy pisać bardzo delikatnie, aby nie spowodować zadrapań). Przy górnej krawędzi płytki podpisz ścieżki E1–E4 (rys. 2.).
2. Za pomocą pipety automatycznej nanieś na płytkę (na linii startu) 3 μ l każdego z ekstraktów E1–E4. Próbkę powinny być umieszczone w takiej samej odległości od siebie oraz 1 cm od bocznych krawędzi płytki (rys. 2.).
4. Po około 2 minutach umieść płytkę w komorze chromatograficznej (słoik). Pokrywkę słoika odkręć tuż przed włożeniem płytki i natychmiast zakręć po jej umieszczeniu w środku.
5. Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego (sam zdecyduj kiedy go zakończyć) wyjmij płytkę ze słoika i natychmiast zakręć wieczko.
6. Zaznacz ołówkiem na płytce wysokość, jaką osiągnęło czoło rozpuszczalnika w momencie zakończenia chromatografii.



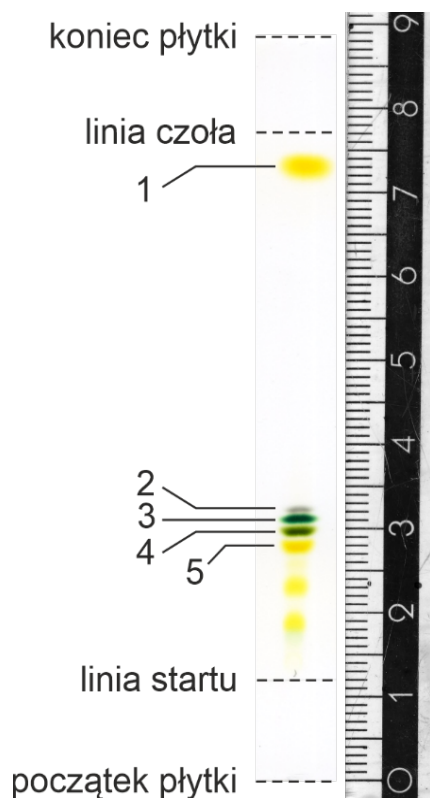
Rys. 2. Schemat nakładania próbek na płytkę TLC.

7. Po wykonaniu wszystkich poleceń do zadań B.1.–B.3. umieść płytkę TLC na karcie wyników laboratoryjnych – odklej folię z taśmy samoprzylepnej i połóż na niej płytkę TLC. Odłóż kartę wyników laboratoryjnych w bezpieczne miejsce.

Zadanie B.2. (2,5 pkt)

Na podstawie podanych w tabeli 4. wartości R_f zidentyfikuj na chromatogramie z rys. 3. rozdzielone barwniki wyizolowane z liści szpinaku.

Tabela 4. Wartości R_f barwników z liści szpinaku dla chromatogramu na rys. 3.	
Barwnik	Współczynnik R_f
chlorofil <i>a</i>	0,29
chlorofil <i>b</i>	0,28
feofityna <i>a</i>	0,31
β -karoten	0,94
luteina	0,25



Rys. 3. Rozdział chromatograficzny ekstraktu barwników z liści szpinaku.

Nr prążka na rys. 3.	Zidentyfikowany barwnik:	
1	1	A. chlorofil <i>a</i> <input type="checkbox"/> / B. chlorofil <i>b</i> <input type="checkbox"/> / C. feofityna <i>a</i> <input type="checkbox"/> / D. β -karoten <input type="checkbox"/> / E. luteina <input type="checkbox"/>
2	2	A. chlorofil <i>a</i> <input type="checkbox"/> / B. chlorofil <i>b</i> <input type="checkbox"/> / C. feofityna <i>a</i> <input type="checkbox"/> / D. β -karoten <input type="checkbox"/> / E. luteina <input type="checkbox"/>
3	3	A. chlorofil <i>a</i> <input type="checkbox"/> / B. chlorofil <i>b</i> <input type="checkbox"/> / C. feofityna <i>a</i> <input type="checkbox"/> / D. β -karoten <input type="checkbox"/> / E. luteina <input type="checkbox"/>
4	4	A. chlorofil <i>a</i> <input type="checkbox"/> / B. chlorofil <i>b</i> <input type="checkbox"/> / C. feofityna <i>a</i> <input type="checkbox"/> / D. β -karoten <input type="checkbox"/> / E. luteina <input type="checkbox"/>
5	5	A. chlorofil <i>a</i> <input type="checkbox"/> / B. chlorofil <i>b</i> <input type="checkbox"/> / C. feofityna <i>a</i> <input type="checkbox"/> / D. β -karoten <input type="checkbox"/> / E. luteina <input type="checkbox"/>

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.

Zadanie B.3. (1,5 pkt)

Przeanalizuj chromatogram z zadania B.1. i odpowiedz na poniższe pytania. Jako odpowiedzi wpisz: E1, E2, E3 lub E4.

Pytanie	Odpowiedź	
W którym ekstrakcie/ekstraktach znajduje się chlorofil <i>b</i> ?	1	
W którym ekstrakcie/ekstraktach znajduje się fikoerytryna?	2	
W którym ekstrakcie/ekstraktach znajduje się β -karoten?	3	

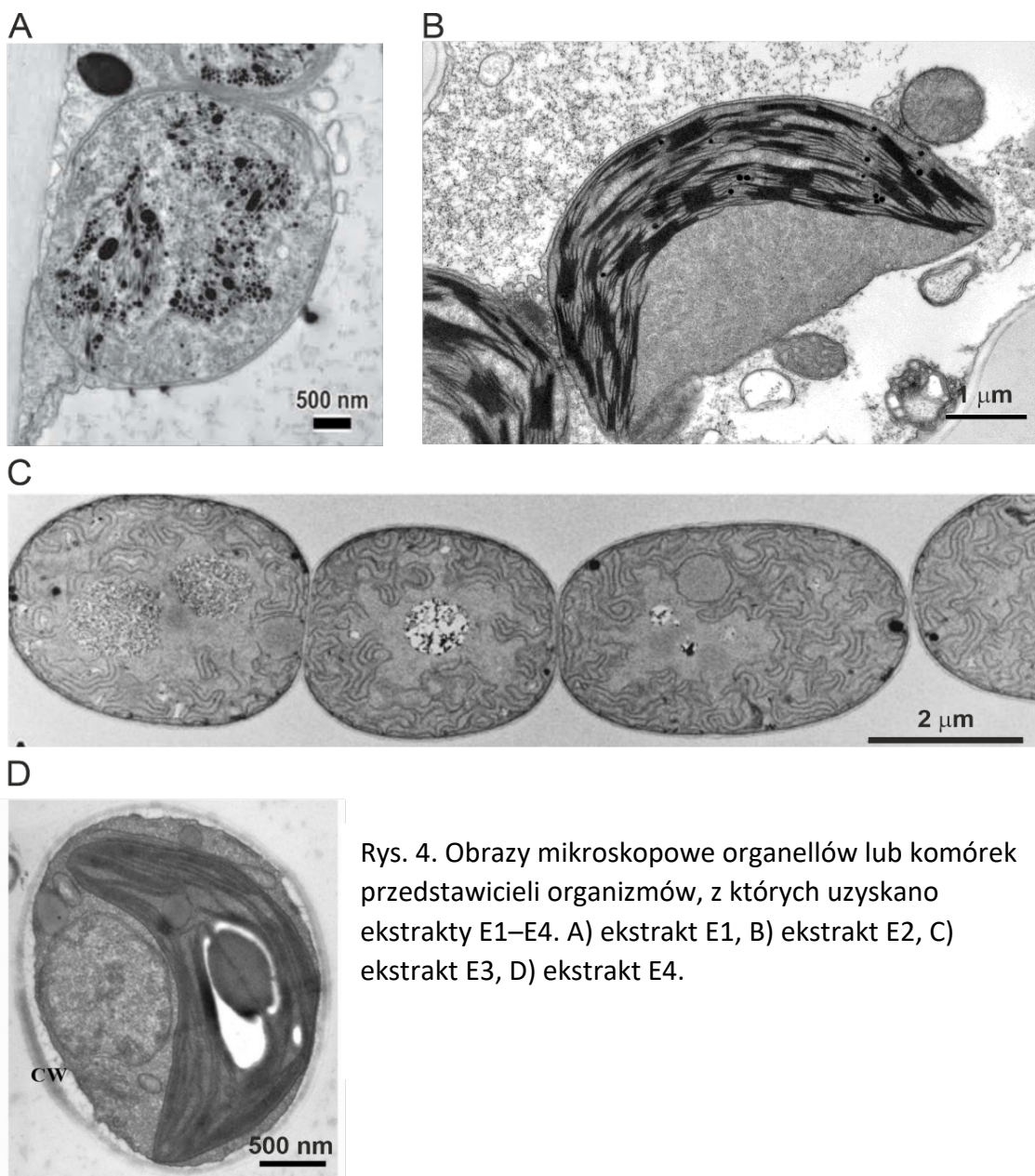
UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.

Zadanie B.4. (2 pkt)

Na rys. 4. znajdują się zdjęcia wykonane techniką TEM przedstawiające komórki lub organella komórkowe przedstawicieli grup organizmów fotosyntetyzujących, z których wykonano ekstrakty E1–E4. Odpowiedz na poniższe pytania **jednym słowem**.

Pytanie	Odpowiedź	
Organellum na rys. 4A to:	1	
Okrągłe, ciemne struktury we wnętrzu chloroplastu na rys. 4B to:	2	
Na rys. 4C znajduje się przedstawiciel: zielenic, sinic, euglenin, okrzemek czy bruzdnic?	3	
Biała struktura we wnętrzu chloroplastu na rys. 4D to:	4	

UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieść na kartę odpowiedzi.



Rys. 4. Obrazy mikroskopowe organellów lub komórek przedstawicieli organizmów, z których uzyskano ekstrakty E1–E4. A) ekstrakt E1, B) ekstrakt E2, C) ekstrakt E3, D) ekstrakt E4.

Zadanie B.5. (4 pkt)

Zidentyfikuj produkt spożywczy, z którego wyizolowano ekstrakty E1–E4.

Ekstrakt	Wyizolowano z:	
E1	1	A. spirulina <input type="checkbox"/> / B. chlorella <input type="checkbox"/> / C. owoc papryki <input type="checkbox"/> / D. liście szpinaku <input type="checkbox"/>
E2	2	A. spirulina <input type="checkbox"/> / B. chlorella <input type="checkbox"/> / C. owoc papryki <input type="checkbox"/> / D. liście szpinaku <input type="checkbox"/>
E3	3	A. spirulina <input type="checkbox"/> / B. chlorella <input type="checkbox"/> / C. owoc papryki <input type="checkbox"/> / D. liście szpinaku <input type="checkbox"/>
E4	4	A. spirulina <input type="checkbox"/> / B. chlorella <input type="checkbox"/> / C. owoc papryki <input type="checkbox"/> / D. liście szpinaku <input type="checkbox"/>

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.