

55 Olimpiada Biologiczna – Pracownia 221D

Imię i nazwisko	Grupa				Nr
	CZER	NIEB	ZIEL	ZOLT	

Zaznacz znakiem X swoją grupę

Czas: 90 min (+ 5 min na sprawdzenie kompletności zestawu egzaminacyjnego).

Łączna liczba punktów do zdobycia: 30

Drodzy uczestnicy!

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:
Część A jest zadaniem praktyczno-teoretycznym, którego celem jest analiza aktywności fotochemicznej izolowanych błon tylakoidów (**16 pkt**),
Część B jest zadaniem praktycznym, którego celem jest wyodrębnienie barwników fotosyntetycznych z błon tylakoidów (**14 pkt**).
- Przed przystąpieniem do rozwiązywania zadań należy przeczytać wszystkie dostarczone materiały (**10 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 przyznanych 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
Bufor reakcyjny	BUFOR	1 (8 ml)	probówka typu falkon (15 ml)
50 mM heksacyjano-żelazian(III) potasu	FE(III)	1 (100 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
25% kwas trifluorooctowy	TCA	1 (800 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Próbka 1	P1	1 (100 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Próbka 2	P2	1 (100 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Próbka T	T	1 (100 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Faza mobilna A	A	1 (10 ml)	probówka typu falkon (15 ml)
Faza mobilna B	B	1 (10 ml)	probówka typu falkon (15 ml)
Faza mobilna C	C	1 (10 ml)	probówka typu falkon (15 ml)
Etanol	ETOH	1 (500 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Mieszanina ekstrakcyjna	ME	1 (200 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Wszystkie odczynniki w probówkach typu Eppendorf są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami. Probówki typu falkon znajdują się w statywie. Próbka 1, Próbka 2 i Próbka T znajdują się w styropianowym pojemniku z lodem			

Sprzęt	Ilość	Jednostka
Pipety automatyczne 0,5–10 µl, 10–100 µl i 100–1000 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Wirówka laboratoryjna	1 urządzenie na 2 uczestników	
Wstrząsarka typu vortex	1	sztuka
Statyw na próbówki	1	sztuka
Statyw na próbówki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na kuwety	1	sztuka
Probówki 10 ml (10 szt.) i korki (6 szt.) (w torebce)	1	zestaw
Lejki	4	sztuka
Sączki bibułowe okrągłe (w torebce)	4	sztuka
Kuwety spektrofotometryczne (w torebce)	4	sztuka
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	5	sztuka
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf z etykietami (w torebce)	3	sztuka
Płytki chromatograficzne (w torebce)	1	sztuka
Komora chromatograficzna (słoik)	1	sztuka
Kartki papieru (w torebce)	4	sztuka
Szpatułka	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 otrzymali rękawiczki przed rozpoczęciem pracowni. Zapasowe rękawiczki są dostępne na sali.

Część A. Analiza aktywności fotochemicznej izolowanych błon tylakoidów (16 pkt)

Zadanie A.1 (11 pkt)

Wprowadzenie

W dwóch próbkach: P1 i P2 znajdują się wyizolowane błony tylakoidów szpinaku o stężeniu 2,8 mg chlorofilu/ml. W trakcie procedury izolacji jednej z próbek popełniono błąd, w efekcie którego tylakoidy utraciły w znacznym stopniu aktywność fotochemiczną (indukowany światłem transport elektronów). **Twoim zadaniem jest zidentyfikowanie próbki, w której znajdują się błony tylakoidów wyizolowane wg prawidłowej procedury.**

Wykonaj eksperyment umożliwiający pomiar aktywności fotochemicznej błon tylakoidów. Ta aktywność będzie mierzona przez redukcję heksacyjanożelazianu(III) potasu $K_3[Fe(CN)_6]$ do heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4[Fe(CN)_6]$ w obecności światła. Stężenie heksacyjanożelazianu(III) potasu można określić spektrofotometrycznie przy długości fali świetlnej 420 nm.

Instrukcja do części A.1

1. Podpisz 2 duże (o pojemności 10 ml) plastikowe próbówki: „reakcja P1” i „reakcja P2”.
2. Podpisz dwa zestawy po 4 duże plastikowe próbówki: P1 0 min, P1 10 min, P2 0 min, P2 10 min.
3. Do jednego z zestawów próbek z pkt. 2. dodaj po 200 μ l 25% kwasu trichlorooctowego.
4. Do dużych próbek podpisanych „reakcja P1” i „reakcja P2” dodaj składniki mieszaniny reakcyjnej (poza próbkami P1 i P2) wg tabeli 1.
5. Wymieszaj zawartość próbek na vorteksie.
6. Rozpocznij reakcję dodaniem tylakoidów z próbek typu Eppendorf podpisanych P1 i P2.
7. Po dodaniu tylakoidów do dużych próbek natychmiast załóż korki, wymieszaj zawartość, a następnie pobierz po 2 ml roztworu i przenieś do odpowiednich próbek zawierających kwas trichlorooctowy.
8. Plastikowe próbówki z mieszaninami reakcyjnymi odstaw do statywu na górnej półce stołu laboratoryjnego na 10 minut (użyj stopera do odmierzenia czasu).
9. Po 10 minutach pobierz po 2 ml roztworu i przenieś do odpowiednich próbek zawierających kwas trichlorooctowy.
10. Zakorkuj wszystkie próbówki i wymieszaj zawartość.
11. Za pomocą lejków i papierowych sączków przesącz zawartość próbek wymienionych w pkt. 10. do nowego zestawu próbek.
12. Zawartość próbek wymienionych w pkt. 11. przenieś do 4 podpisanych w taki sam sposób kuwet spektrofotometrycznych (podpisuj przy górnej krawędzi kuwety). Kuwety umieść w statywie i przekaz asystentowi wraz z kartą wyników laboratoryjnych.
13. Po pomiarze absorbancji przy 420 nm asystent zwróci kartę wyników laboratoryjnych.

Zadanie A.1.1. (1 pkt)

Podaj objętości wszystkich składników mieszanin reakcyjnych P1 i P2. Stężenia początkowe i końcowe podano w Tabeli 1. Kończącą objętość uzyskaj przez dodanie odpowiedniej objętości buforu reakcyjnego.

Tabela 1. Skład mieszanin reakcyjnych.					
Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie końcowe	Reakcja P1		Reakcja P2	
Bufor reakcyjny	-	I	ml	IV	ml
50 mM heksacyjano-żelazian(III) potasu	0,5 mM	II	μ l	V	μ l
Tylakoidy 2,8 mg chlorofilu/ml	50 μ g chlorofilu/ml	III	μ l	VI	μ l
Objętość końcowa		4 ml		4 ml	

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

Zadanie A.1.2. (6 pkt)

Wyniki absorbancji zmierzone przez asystentów zostaną ocenione przez egzaminatora. Upewnij się, że znajdują się one na karcie wyników laboratoryjnych.

Zadanie A.1.3. (2 pkt)

Na podstawie uzyskanych wyników absorbancji określ, w której próbówce znajdowały się tylakoidy wykazujące aktywność fotochemiczną. Odpowiedź uzasadnij.

Tylakoidy wyizolowane wg prawidłowej procedury znajdowały się w próbówce	
Y	
ponieważ (podaj jednozdaniowe uzasadnienie)	
Z	

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

Zadanie A.1.4 (2 pkt)

Wykorzystując prawo Lamberta-Beera, można wyznaczyć stężenie heksacyjanożelazianu(III) potasu, którego milimolowy współczynnik absorpcji przy 420 nm wynosi $1,04 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Zakładając, że heksacyjanożelazian(III) potasu odbiera elektrony wyłącznie od fotosystemu II, oblicz, ile tlenu cząsteczkowego powstało w trakcie 10-minutowego oświetlenia próbki tylakoidów o objętości 10 ml, zawierającej 50 μg chlorofilu. Użyj wartości absorbancji podanych poniżej. Wyniki podaj z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

Wartości absorbancji przy 420 nm zmierzone w kuwetach o długości drogi świetlnej 1 cm:

$$A_{t 0 \text{ min}} = 0,822$$

$$A_{t 10 \text{ min}} = 0,250.$$

Do obliczeń stężenia molowego wykorzystaj prawo Lamberta-Beera:

$$A = \varepsilon Cl$$

A – absorbancja roztworu przy danej długości fali [jednostka bezwymiarowa];

ε – molowy współczynnik absorpcji dla danego związku przy danej długości fali [$\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$];

C – stężenie molowe substancji w badanym roztworze [$\text{mol} \times \text{dm}^{-3}$, M];

l – długość drogi fali świetlnej przechodzącej przez roztwór [cm].

Tabela 2. Podaj liczbę moli:					
Zużyty heksacyjanożelazian(III) potasu			Powstały tlen cząsteczkowy		
wartość		jednostka	wartość		jednostka
α		μmol	β		μmol

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

Miejsce na obliczenia:

Zadanie A.2. (5 pkt)

Wprowadzenie

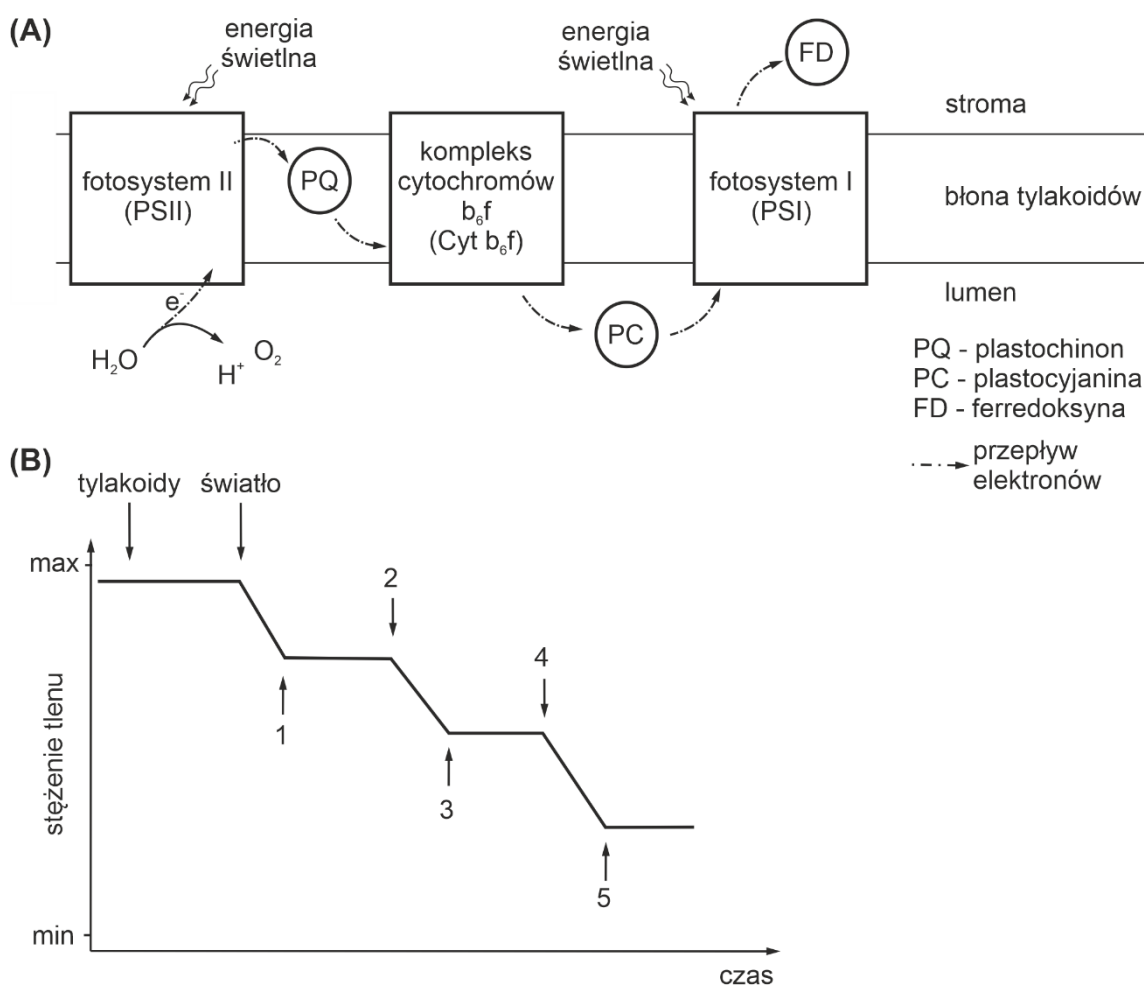
Aktywność fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów w błonach tylakoidów można badać w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem elektrody tlenowej Clarka przez rejestrację zmian stężenia tlenu w komorze reakcyjnej. Stosując odpowiednie akceptory i donory elektronów oraz specyficzne inhibitory, można mierzyć aktywność wybranych fragmentów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów. Jedną z typowych metod jest zastosowanie metylowiologenu – akceptora elektronów z fotosystemu I. Zredukowany

metylowiologen w wyniku reakcji z tlenem rozpuszczonym w mieszaninie reakcyjnej utlenia się, zużywając tlen, zatem spadek stężenia tlenu będzie świadczył o przepływie elektronów. Na rys. 1A przedstawiono schemat przepływu elektronów w fazie jasnej fotosyntezy. Wykorzystaj go do odpowiedzi na poniższe zadanie.

Zadanie A.2.

Do mieszaniny reakcyjnej (roztwór wodny), zawierającej akceptor elektronów dla PSI (metylowiologen) i umieszczonej w komorze pomiarowej elektrody tlenowej Clarka, dodano tylakoidy.

Po rozpoczęciu oświetlania komory pomiarowej zaobserwowano spadek stężenia tlenu. Następnie przez dodawanie kolejno związków chemicznych 1–5, uzyskano wykres zmian stężenia tlenu przedstawiony na rys. 1B. W oparciu o schemat na rys. 1A określ funkcję związków 1–5.



Rys. 1. (A) Schemat przepływu elektronów w fazie jasnej fotosyntezy; (B) zmiany stężenia tlenu podczas pomiaru *in vitro* aktywności fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów.

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.

Nr dodanego związku chemicznego na rys. 1B.	Funkcja dodanego związku chemicznego:	
1	1.	A. inhibitor PSI <input type="checkbox"/> / B. inhibitor PSII <input type="checkbox"/> / C. inhibitor Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/> / D. donor elektronów dla PSI <input type="checkbox"/> / E. donor elektronów dla Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/>
2	2.	A. inhibitor PSI <input type="checkbox"/> / B. inhibitor PSII <input type="checkbox"/> / C. inhibitor Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/> / D. donor elektronów dla PSI <input type="checkbox"/> / E. donor elektronów dla Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/>
3	3.	A. inhibitor PSI <input type="checkbox"/> / B. inhibitor PSII <input type="checkbox"/> / C. inhibitor Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/> / D. donor elektronów dla PSI <input type="checkbox"/> / E. donor elektronów dla Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/>
4	4.	A. inhibitor PSI <input type="checkbox"/> / B. inhibitor PSII <input type="checkbox"/> / C. inhibitor Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/> / D. donor elektronów dla PSI <input type="checkbox"/> / E. donor elektronów dla Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/>
5	5.	A. inhibitor PSI <input type="checkbox"/> / B. inhibitor PSII <input type="checkbox"/> / C. inhibitor Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/> / D. donor elektronów dla PSI <input type="checkbox"/> / E. donor elektronów dla Cyt. b ₆ f <input type="checkbox"/>

Część B. Wyodrębnienie barwników fotosyntetycznych z błon tylakoidów (14 pkt).

Wprowadzenie.

W próbkówce podpisanej T znajdują się błony tylakoidów wyizolowane z liści szpinaku. Twoim zadaniem jest wyekstrahowanie frakcji barwników, a następnie wykonanie cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej (TLC) w celu pozyskania β -karotenu, chlorofilu *a* oraz ksantofili. Do dyspozycji masz zestaw do TLC oraz trzy fazy mobilne: A, B, C.

Musisz wybrać fazę mobilną, której użyjesz do chromatografii. Wykorzystaj poniższe informacje:

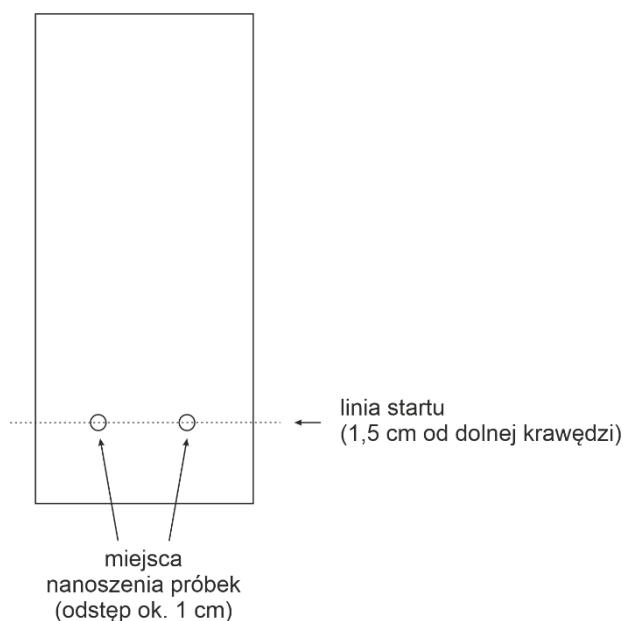
- 1) Optymalny rozdział barwników błon tylakoidów pozwala na rozdzielenie: β -karotenu, feofityny *a*, chlorofilu *a*, chlorofilu *b*, ksantofili. Wymienione związki uszeregowano wg rosnącej polarności.
- 2)

Faza mobilna A	0–0,11
Faza mobilna B	0,78–0,87
Faza mobilna C	1

Instrukcja do części B

1. Do próbkówki typu Eppendorf dodaj 50 μ l próbki T oraz 100 μ l mieszaniny ekstrakcyjnej.
2. Wymieszaj próbkówkę na vorteksie przez około 30–45 sekund.
3. Umieść próbkówkę w wirówce laboratoryjnej i wiruj przez 1 minutę. Nie zmieniaj parametrów wirowania. Przy wirówkach będą pomagać asystenci. Jeżeli w wirówce będzie nieparzysta liczba próbek, użyj przeciwwagi (czarna próbkówka leżąca obok wirówki).
4. Dolną fazę o intensywnie zielonej barwie przenieś do nowej próbkówki typu Eppendorf.
5. Do komory chromatograficznej (słoik) wlej wybraną fazę mobilną: A, B lub C. Natychmiast zakręć słoik oraz pustą próbkówkę.
6. Wyjmij płytkę chromatograficzną z woreczka. Narysuj za pomocą ołówka linię startu w odległości 1,5 cm od dolnej krawędzi płytki (po płytce należy pisać bardzo delikatnie, aby nie doprowadzić do zadrapań) (rys. 2.).
7. Za pomocą pipety automatycznej nanieś na płytkę (na linii startu) 5 μ l uzyskanego ekstraktu. Ekstrakt nanieś w dwóch powtórzeniach. Próbki powinny być umieszczone w takiej samej odległości od siebie oraz 1 cm od bocznych krawędzi płytki (rys. 2.). Po około minucie nanieś drugą warstwę (5 μ l ekstraktu).
8. Po minucie umieść płytkę w komorze chromatograficznej (słoik). Pokrywkę słoika odkręć tuż przed włożeniem płytki i natychmiast zakręć po jej umieszczeniu w środku.
9. Po zakończeniu rozdziału chromatograficznego (sam zdecyduj, kiedy go zakończyć; chromatografię prowadź maksymalnie 10 minut) wyjmij płytkę ze słoika i natychmiast zakręć wieczko.
10. Zaznacz ołówkiem na płytce wysokość, jaką osiągnęło czoło rozpuszczalnika w momencie zakończenia chromatografii.
11. Płytkę odłóż w bezpieczne miejsce na 2–3 minuty, aby wyschła.

12. Za pomocą szpatułki z jednej ścieżki chromatograficznej wydrap na kartki papieru barwne pasma zawierające β -karoten, chlorofil *a* oraz ksantofil (jeden wybrany). Możesz wcześniej obrysować pasma ołówkiem. Jeżeli nie uzyskasz pełnego rozdzielenia, możesz wyodrębnić mniej niż trzy barwniki (w tym ewentualne mieszaniny barwników).
13. Przesyp uzyskany żel krzemionkowy z barwnikami do 3 próbek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml.
14. Do każdej z próbek wymienionych w pkt. 13. dodaj po 100 μ l etanolu i wymieszaj na vorteksie.
15. Umieść próbki w wirówce laboratoryjnej i wiruj przez 1 minutę. Nie zmieniaj parametrów wirowania. Przy wirówkach będą pomagać asystenci. Jeżeli w wirówce będzie nieparzysta liczba próbek, użyj przeciwwagi (czarna próbka leżąca obok wirówki).
16. Po zakończeniu wirowania przenieś supernatant (uwaga, aby nie pobrać osadzonego żelu krzemionkowego) do 3 próbek typu Eppendorf podpisanych numerem uczestnika oraz oznaczeniami B1, B2, B3 (próbki w zestawie są już podpisane).
17. Przekaż próbki asystentowi. W celu identyfikacji asystenci zmierzą widma absorpcyjne wyizolowanych barwników, a wyniki pomiarów zostaną dołączone do kart odpowiedzi po zakończeniu egzaminu.
18. Płytke TLC umieść na karcie wyników laboratoryjnych – odklej folię z taśmy samoprzylepnej i połóż na niej płytke TLC. Odłóż kartę wyników laboratoryjnych w bezpieczne miejsce.



Rys. 2. Schemat nakładania próbek na płytke TLC.

Zadanie B.1.1 (9 pkt)

Wyekstrahuj barwniki z próbki T, a następnie wykonaj chromatografię cienkowarstwową i wyodrębni β -karoten, chlorofil *a* oraz wybrany ksantofil. Wykorzystaj instrukcję do części B.

Zadanie B.1.2 (2pkt)

Do chromatografii cienkowarstwowej wybieram fazę mobilną
A. Faza mobilna A <input type="checkbox"/> / B. Faza mobilna B <input type="checkbox"/> C. Faza mobilna C <input type="checkbox"/>

Zadanie B.1.3 (3 pkt)

Oblicz wartości R_f (podaj z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) dla wyodrębnionych barwników, które umieściłeś w próbkach B1–B3. Jeżeli wyodrębniłeś mniej niż trzy barwniki, w odpowiednich polach Tabeli 4. wstaw znak „–”.

Tabela 4. Wyznaczanie wartości R_f .				
Nazwa pasma	Długość migracji na płytce [mm]		Wartość R_f	
Linia czoła	1			-----
B1	2		5	
B2	3		6	
B3	4		7	

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