

Pracownia 221D – arkusz zadań

Drodzy uczestnicy!

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:
Część A jest zadaniem praktyczno-teoretycznym, którego celem jest identyfikacja plazmidów z wykorzystaniem analizy restrykcyjnej i elektroforezy DNA (**20,5 punktu**),
Część B jest zadaniem teoretycznym, którego celem jest określenie wydajności oczyszczania białka enzymatycznego (**9,5 punktu**).
- Przed przystąpieniem do rozwiązywania zadań należy przeczytać wszystkie dostarczone materiały (**9 numerowanych stron**).
- Odpowiedzi należy udzielać jedynie na **karcie odpowiedzi (2 strony)**.
- Odpowiedzi umieszczone w arkuszu zadań nie będą oceniane.
- Kartę odpowiedzi wypełniaj za pomocą czarnego długopisu czytelnym pismem (drukowanymi literami). Dokładnie zaczerniaj pola na karcie odpowiedzi. Wartości liczbowe 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
Plazmid 1	P1	1 (30 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Plazmid 2	P2	1 (30 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Enzym restrykcyjny DraI	DraI	1 (4 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Enzym restrykcyjny PvuII	PvuII	1 (4 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Standard wielkości DNA	Std. DNA	1 (8 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Bufor reakcyjny dla enzymów (5x stężony)	Bufl. 5x	1 (12 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Barwnik do elektroforezy	Barwnik	1 (30 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Bufor do elektroforezy	BUF. ELFO	1 (30 ml)	probówka typu Falcon (50 ml)
Woda dejonizowana	Woda	1 (1 ml)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Wszystkie odczynniki w probówkach typu Eppendorf są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami.			

Sprzęt	Ilość	Jednostka
Pipety automatyczne 0,5–10 µl i 10–100 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Wirówka na probówki typu Eppendorf	1 urządzenie na 4 lub 6 uczestników	
Żel agarozowy w foliowym woreczku	1	sztuka
Probówki 0,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	6	sztuka
Pipeta Pasteura	1	sztuka
Statyw na probówki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na probówki typu Falcon	1	sztuka
Szalka Petriego	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	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.

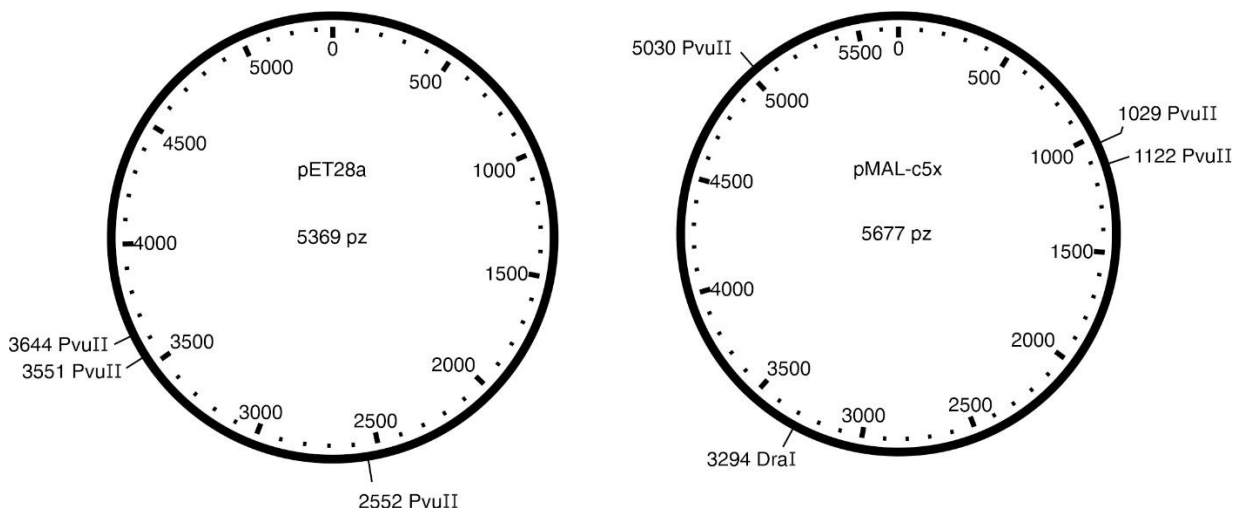
Instrukcja obsługi stopera

Do ustawiania czasu służą dwa przyciski oznaczone MIN i SEC, oznaczające odpowiednio minuty i sekundy. Do uruchomienia i zatrzymania stopera służy przycisk STOP|START. W celu zresetowania stopera należy przy zatrzymanym odliczaniu wcisnąć jednocześnie przyciski MIN i SEC. Stoper może odliczać czas „w górę” i „w dół”. Aby stoper odliczał w górę, należy nacisnąć przycisk STOP|START, gdy na wyświetlaczu znajdują się cyfry 00:00. Stoper będzie liczył czas, aż do jego zatrzymania przyciskiem STOP|START. Do odliczania „w dół” najpierw należy ustawić za pomocą przycisków MIN i SEC czas, a następnie wcisnąć przycisk STOP|START. Stoper będzie odliczał czas do 00:00, a następnie uruchomi sygnał dźwiękowy. Wyłączenie sygnału dźwiękowego odbywa się poprzez naciśnięcie przycisku STOP|START.

Część A. Identyfikacja plazmidów z wykorzystaniem analizy restrykcyjnej i elektroforezy DNA (20,5 pkt)

Wprowadzenie

W dwóch próbkach P1 i P2 znajdują się plazmidy: pET28a o wielkości 5369 pz oraz pMAL-c5x o wielkości 5677 pz. **Twoim zadaniem jest zidentyfikowanie zawartości próbek P1 i P2.** W tym celu wykorzystaj poniższe mapy restrykcyjne.



Ryc. 1. Mapy restrykcyjne plazmidów pET28a i pMAL-c5x.

Zadanie A.1 (10,5 pkt)

Wykonaj analizę restrykcyjną plazmidu 1 i plazmidu 2 oraz przygotuj elektroforezę DNA w żelu agarozowym.

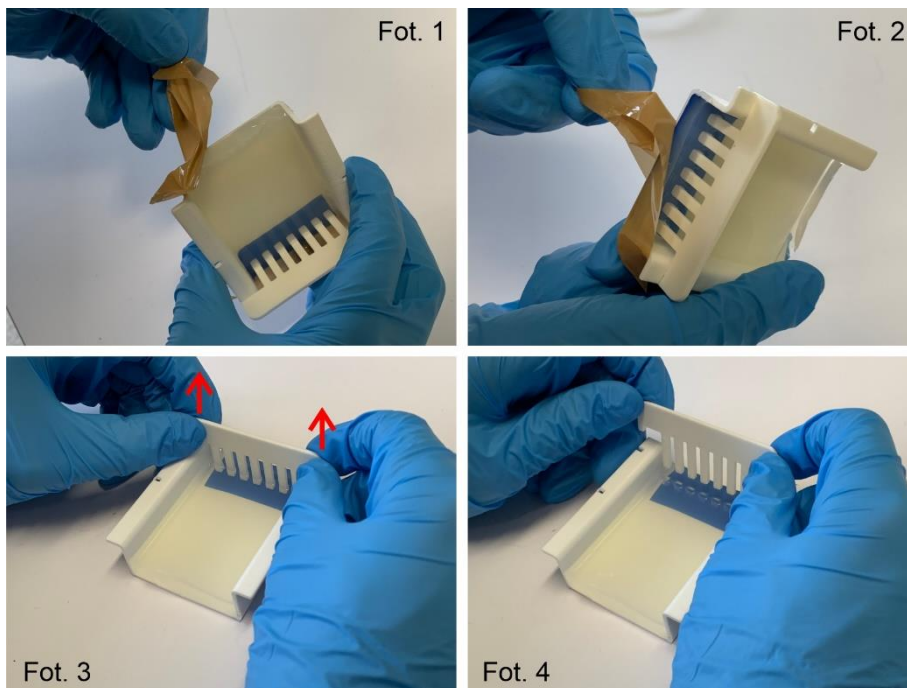
Instrukcja do części A.1

UWAGA. Jeżeli zawartość którejs z próbek rozchlapie się na jej ściankach, skorzystaj z wirówki. Poinformuj o tym asystentów.

1. Podpisz 6 plastikowych próbek typu Eppendorf o pojemności 0,5 ml cyframi od 1 do 6.
2. Dodaj do każdej z próbek odczynniki wg tabeli 1. UWAGA. Roztwory pipetuj tak, aby znalazły się na dnie próbek.

Tabela 1.	Nr próbki					
	1	2	3	4	5	6
Plazmid P1	10 µl	10 µl	10 µl	-	-	-
Plazmid P2	-	-	-	10 µl	10 µl	10 µl
Bufor 5x	-	3 µl	3 µl	-	3 µl	3 µl
Enzym DraI	-	2 µl	-	-	2 µl	-
Enzym PvuII	-	-	2 µl	-	-	2 µl
woda	5 µl	-	-	5 µl	-	-

3. Nastaw pipetę na 10 μ l, a następnie wymieszaj zawartość probówek poprzez kilkukrotne pobranie i wypuszczenie zawartości każdej z probówek.
4. Odstaw probówki na 30 minut.
5. Wyjmij formę z żelem agarozowym z woreczka. Odklej taśmy zabezpieczające (Fot. 1 i 2). Następnie delikatnie wyjmij grzebień, ciągnąc do góry równomiernie z obu stron formy (Fot. 3 i 4).



6. Włóż żel w formie do szalki i zalej buforem do elektroforezy. Jeżeli w kieszonkach żelu znajdują się pęcherzyki powietrza, usuń je, wlewając do nich bufor za pomocą plastikowej pipety Pasteura.
7. Po 30 minutach inkubacji dodaj do próbek 1–6 po 5 μ l barwnika i wymieszaj zawartość poprzez kilkukrotne pobranie i wypuszczenie zawartości.
8. Nanieś próbki 1–6 (20 μ l) oraz standard wielkości (8 μ l) do kieszonek w żelu agarozowym (żel cały czas pozostaje zalany buforem) za pomocą pipety automatycznej wg poniższego schematu. Końcówkę tipsa zanurz delikatnie w kieszonce żelu i powoli naciskaj tłok pipety. Wypuszczanie zawartości tipsa powinno potrwać około 5 sekund. Nie zanurzaj tipsa zbyt głęboko – możesz przebić kieszonkę żelu.

kieszonka 1	kieszonka 2	kieszonka 3	kieszonka 4	kieszonka 5	kieszonka 6	kieszonka 7
Standard wielkości DNA	Probówka 1	Probówka 2	Probówka 3	Probówka 4	Probówka 5	Probówka 6

9. Po naniesieniu wszystkich próbek przykryj szalkę pokrywką i podnieś rękę w celu przekazania żelu asystentowi. Asystenci wykonają elektroforezę oraz dokumentację fotograficzną. Zdjęcie żelu zostanie dołączone do karty odpowiedzi uczestnika po zakończeniu egzaminu.

Zadanie A.2 (5 pkt)

Zadanie A.2.1

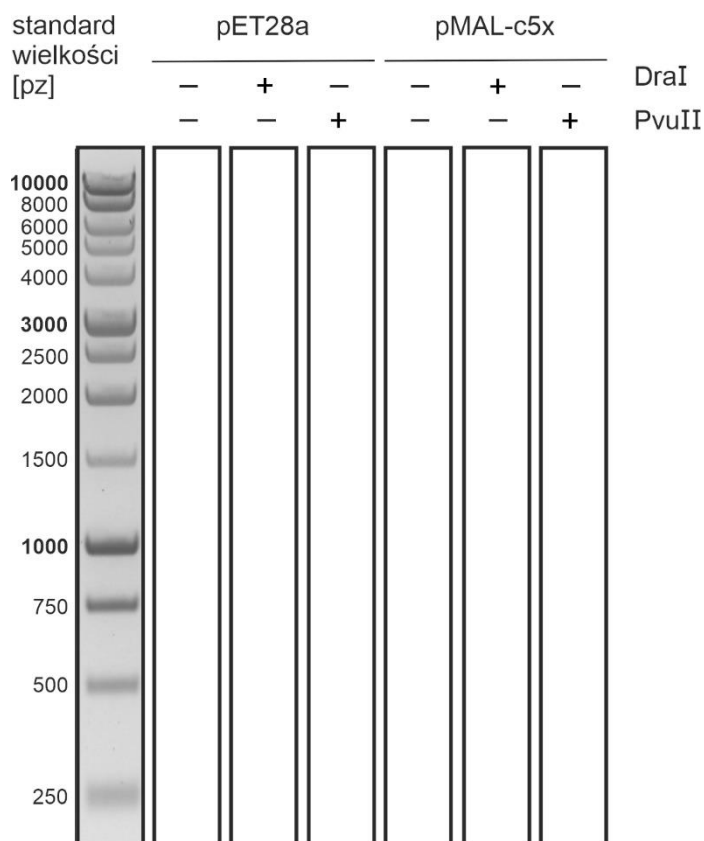
Na podstawie map restrykcyjnych z Ryc. 1, w tabeli 2 wpisz wielkości powstałych fragmentów z dokładnością do 1 nukleotydu (uszereguj je od największych do najmniejszych). Jeżeli uważasz, że któraś z komórek w tabeli 2 powinna pozostać niewypełniona, wstaw w odpowiednie pola znak „—”.

Tabela 2. Wielkości fragmentów DNA powstałych po trawieniu plazmidów pET28a i pMAL-c5x							
pET28a				pMAL-c5x			
DraI		PvuII		DraI		PvuII	
1		5		9		13	
2		6		10		14	
3		7		11		15	
4		8		12		16	

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

Zadanie A.2.2

Na Ryc. 2 naszkicuj oczekiwany rozdział elektroforetyczny fragmentów DNA dla nietrawionych plazmidów pET28a i pMAL-c5x oraz strawionych enzymami DraI i PvuII.

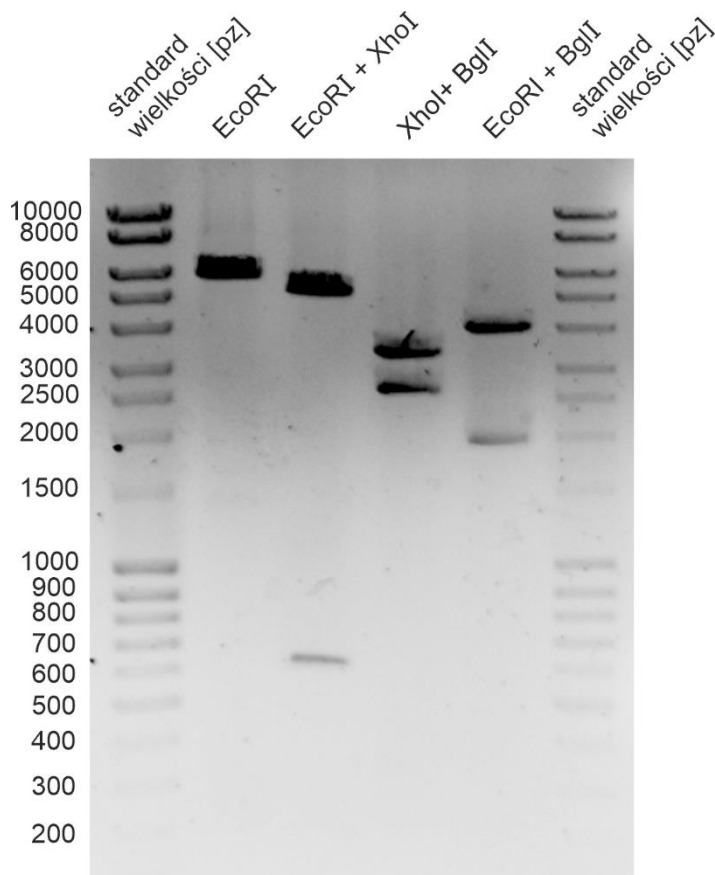


Ryc. 2. Spodziewany wynik elektroforezy plazmidów po trawieniach enzymami.

UWAGA. Wykonany szkic przenieś na kartę odpowiedzi.

Zadanie A.3. (5 pkt)

Poniżej przedstawiono rozdzał elektroforetyczny plazmidu pETNgo506 o wielkości 5962 pz strawionego trzema enzymami restrykcyjnymi: EcoRI, XhoI i BglI w różnych kombinacjach (Ryc. 3). Każdy z tych enzymów trawi plazmid tylko w jednym miejscu. Na podstawie analizy wzorów trawienia wykonaj mapę restrykcyjną plazmidu pETNgo506.



Ryc. 3. Analiza restrykcyjna plazmidu pETNgo506.

Zadanie A.3.1

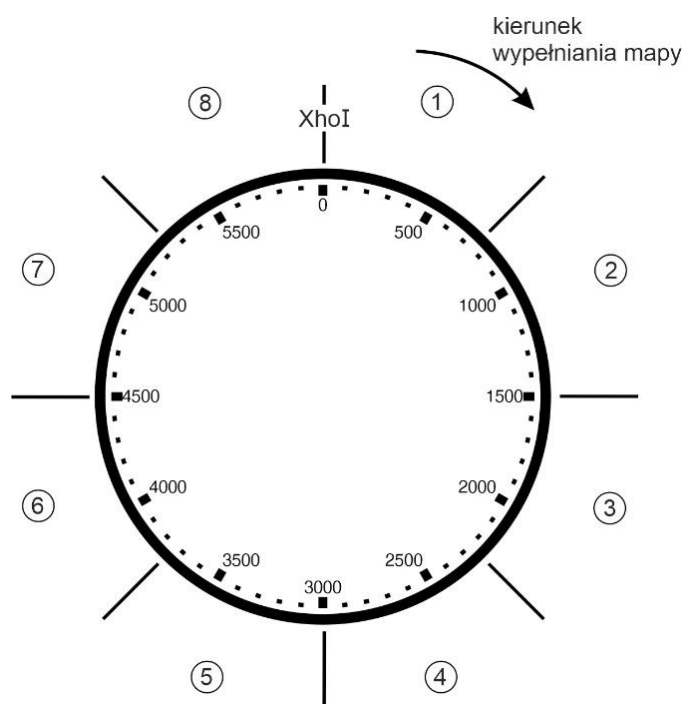
W tabeli 3 wpisz wielkości uzyskanych fragmentów z dokładnością do 100 pz. Wartości uszereguj od największych do najmniejszych. Jeżeli uważasz, że któraś z komórek w tabeli 3 powinna pozostać niewypełniona wstaw w odpowiednie pola znak „—”.

Tabela 3. Wielkości fragmentów DNA powstałych po trawieniu plazmidu pETNgo506							
EcoRI		EcoRI +XhoI		XhoI + BglI		EcoRI + BglI	
1		3		5		7	
2		4		6		8	

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

Zadanie A.3.2

Wskaż, w których sektorach (1–8) znajdują się miejsca cięcia dla enzymów EcoRI i BglI. Pozycja cięcia enzymu XhoI została podana, a pierwszym enzymem po XhoI (biorąc pod uwagę kierunek wypełniania mapy) ma być enzym EcoRI.



Ryc. 4. Schemat plazmidu pETNgo506. Każdy z sektorów liczy 750 pz. Pozycja cięcia enzymu XhoI została podana.

Enzym	Miejsce trawienia enzymu w sektorze:
EcoRI	A. 1 ☐ / B. 2 ☐ / C. 3 ☐ / D. 4 ☐ / E. 5 ☐ / F. 6 ☐ / G. 7 ☐ / H. 8 ☐
BglI	A. 1 ☐ / B. 2 ☐ / C. 3 ☐ / D. 4 ☐ / E. 5 ☐ / F. 6 ☐ / G. 7 ☐ / H. 8 ☐

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.

Część B. Wyznaczenie wydajności oczyszczania białka enzymatycznego (9,5 pkt)

Rozwiązanie poniższego zadania należy rozpocząć po rozpoczęciu inkubacji próbek z Części A.

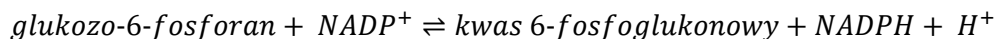
Wprowadzenie.

Aktywność całkowita preparatu odnosi się do aktywności enzymu w całej badanej frakcji i jest wyrażana w jednostkach aktywności enzymatycznej **U**, której wymiarem jest liczba μmoli powstałego produktu w ciągu jednej minuty [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]. Inną wielkością charakteryzującą aktywność enzymatyczną bezpośrednio związaną z czystością preparatu enzymatycznego jest **aktywność właściwa**. Definiuje się ją jako liczbę jednostek aktywności enzymatycznej **U** na 1 mg białka w preparacie enzymatycznym [$\text{U} \times \text{mg}^{-1}$]. Do kontrolowania procesu oczyszczania białek enzymatycznych stosuje się dwa parametry wyznaczone z wartości aktywności całkowitej i aktywności właściwej:

- 1) wydajność oczyszczania to całkowita aktywność frakcji dzielona przez całkowitą aktywność lizatu i wyrażona w wartościach procentowych
- 2) stopień oczyszczenia to aktywność właściwa frakcji dzielona przez aktywność właściwą lizatu.

Wykonano procedurę oczyszczania białka dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej z lizatu komórek drożdżowych z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Na kolumnę nałożono 1 ml lizatu (L), a podczas elucji zebrano trzy frakcje (F1–F3), każda o objętości 2 ml. Dla każdej frakcji zmierzono aktywność enzymu oraz zawartość białka. Twoim zadaniem jest obliczenie aktywności całkowitej i aktywności właściwej dla lizatu i frakcji.

Reakcja katalizowana przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową:



Aktywność enzymu oznaczano, mierząc zmiany absorbancji NADPH w czasie przy 340 nm (Tabela 4). Reakcję wykonano dla 5 μl lizatu lub 20 μl frakcji, a końcowa objętość, w której zachodziła reakcja wynosiła 2 ml. Milimolowy współczynnik absorpcji ϵ dla NADPH wynosi $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a długość drogi fali świetlnej przechodzącej przez roztwór 1 cm. Do obliczeń aktywności wykorzystaj prawo Lamberta-Beera.

$$A = \epsilon Cl$$

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 4. Dane umożliwiające obliczenie aktywności całkowitej i aktywności właściwej				
	Lizat	Frakcja 1	Frakcja 2	Frakcja 3
Zmiana absorbancji na minutę	0,730	0,777	0,622	0,056
Objętość frakcji/lizatu użyta do pomiaru aktywności [μl]	5	20	20	20
Zawartość białka w próbce [μg]	14	60	5	15
Objętość frakcji/lizatu użyta do pomiaru zawartości białka [μl]	2	20	50	50
Całkowita objętość frakcji/lizatu [ml]	1	2	2	2

Zadanie B.1 (8 pkt)

Na podstawie informacji podanych we wprowadzeniu do części B sporządź bilans oczyszczania białka. Wyniki podaj z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Obliczenia pośrednie wykonuj z dokładnością do trzech miejsc po przecinku.

Tabela 5. Bilans oczyszczania białka								
	Lizat		Fracja 1		Fracja 2		Fracja 3	
Aktywność całkowita [U]	1		6		11		16	
Zawartość białka we frakcji [mg]	2		7		12		17	
Aktywność właściwa [$U \times mg^{-1}$]	3		8		13		18	
Wydajność oczyszczania [%]	4		9		14		19	
Stopień oczyszczenia	5		10		15		20	

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

Zadanie B.2 (1,5 pkt)

Na podstawie wykonanych obliczeń odpowiedz na poniższe pytania:

Pytanie	Odpowiedzi do wyboru
1. Która frakcja zawiera najlepiej oczyszczony enzym?	A. Frakcja F1 ☐ / B. Frakcja F2 ☐ / C. Frakcja F3 ☐
2. Czy enzym traci aktywność w trakcie procedury oczyszczania?	A. TAK ☐ / B. NIE ☐
3. W której z frakcji mamy najmniejszą szansę występowania innej aktywności enzymatycznej?	A. Frakcja F1 ☐ / B. Frakcja F2 ☐ / C. Frakcja F3 ☐

UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.