

KONKURS BIOTECHNOLOGICZNY I EDYCJA – ZADANIA

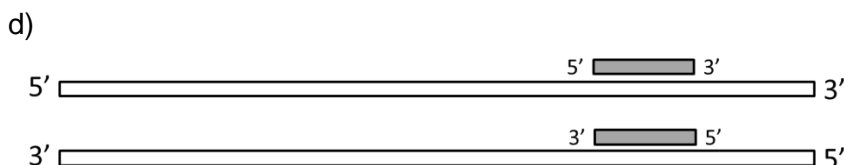
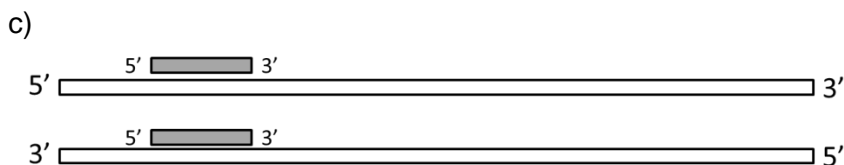
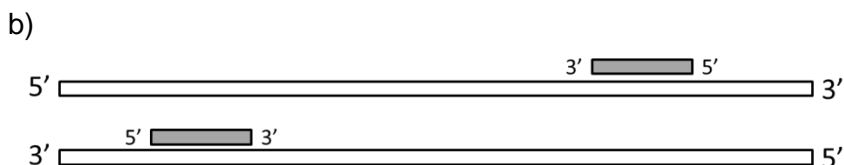
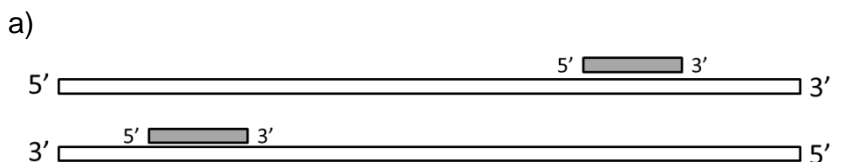
Zadanie 1 (10 pkt.)

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) to technika, za pomocą której można powielić w próbówce materiał genetyczny.

- A. Wyjaśnij na czym polega PCR
- B. Podaj równanie pozwalające na obliczenie liczby kopii (K) DNA uzyskanego w wyniku PCR:

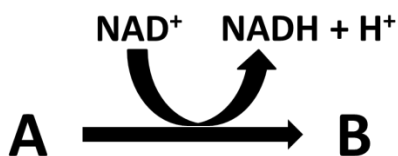
$$K = \dots\dots\dots$$

- C. Objaśnij wyrażenia występujące w powyższym wzorze.
- D. Zaznacz, które rozmieszczenie starterów podczas etapu przyłączania starterów do matrycy pozwoli na uzyskanie produktu PCR i uzasadnij odpowiedź:



Zadanie 2 (5 pkt.)

Dehydrogenazy to enzymy wykorzystujące w reakcjach utlenienia i redukcji różnych substratów kofaktor, dinukleotyd nikotyno-adeninowy (NAD).



Spektrofotometryczne zmierzenie absorpcji przy 340 nm pozwala na oznaczenie w próbce stężenia NADH powstałego w wyniku reakcji.

- A. Z jakiego prawa fizycznego skorzystasz chcąc na podstawie wartości absorbancji obliczyć stężenie molowe NADH? Podaj nazwę tego prawa i wzór.
- B. Wyjaśnij znaczenie wszystkich symboli użytych we wzorze z punktu A.
- C. Zmierzyłeś/zmierzyłaś na spektrofotometrze absorbancję próby, w której zachodziła reakcja pokazana na rysunku. Pomiar prowadziłeś/prowadziłaś w kuwecie o grubości 5 mm. Zmierzona wartość absorbancji wynosiła 0,200. Znajdź w odpowiednich źródłach potrzebną do obliczeń daną i podaj molowe stężenie NADH w mierzonej próbce.

Zadanie 3 (5 pkt.)

Dysponujesz następującymi odczynnikami: NaCl (Mcz = 58 g/mol), 1 M bufor, enzym o stężeniu 5mg/ml i aktywności właściwej 2 jednostki/mg (2 U/mg), 50% (w/v) glicerol i 100 mM EDTA oraz substrat o stężeniu 1 mg/ml.

- A. Opisz sposób przygotowania 10 ml roztworu reakcyjnego, który będzie zawierał wszystkie, oprócz enzymu, wymienione odczynniki w stężeniach: 50 mM bufor, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl i substrat 10 µg/ml – podaj objętości każdego ze składników oraz objętość wody.
- B. Następnie przeprowadzisz reakcję enzymatyczną dodając enzym do 1 ml powyższej mieszaniny. Aktywność końcowa enzymu w mieszaninie powinna wynosić 5 milijednostek/ml (5 mU/ml). Podaj objętość enzymu, którą rozpoczniesz reakcję. Przyjmij, że dodanie enzymu nie zmienia w sposób znaczący całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej, a co za tym idzie – stężeń jej składników.

Zadanie 4 (10 pkt.)

Techniki inżynierii genetycznej pozwalają uzyskać rekombinowany plazmid służący do wydajnej produkcji heterologicznego białka w bakteriach. Nadprodukowane białko może stanowić nawet do 40-50% wszystkich białek syntetyzowanych przez te mikroorganizmy. Wiele wektorów przystosowanych do tego celu jest dostępnych komercyjnie. Przykładem wektorów wykorzystywanych do nadprodukcji obcych białek w bakteriach jest seria pET firmy Novagen. Wektory te są częścią systemu Tabora-Studiera, w którym główną rolę odgrywa polimeraza RNA faga T7.

- A. Na czym polega ekspresja genu i nadprodukcja rekombinowanego białka w systemie Tabora-Studiera?
- B. Objasnij co oznaczają następujące wyrażenia:
- Promotor T7
 - Polimeraza RNA faga T7
 - Metka (znacznik) His-Tag
 - Enzym restrykcyjny
- C. Do czego służą metki (znaczniki) w rekombinowanych białkach? Podaj przykłady takich metek i ich rolę.

Zadanie 5 (5 pkt.)

Bakterie Gram dodatnie w płynnej hodowli okresowej wytwarzają pożądany kwas mlekowy. Bakterie wydzielają ten kwas na zewnątrz komórek do pożywki hodowlanej. Zaproponuj schemat działań, które mogłyby pozwolić na wydzielenie i oczyszczenie kwasu mlekowego z cieczy hodowlanej, po zakończonym bioprocesie.

Zadanie 6 (5 pkt.)

W wielu gałęziach przemysłowych wykorzystywane są enzymy, np. w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym i spożywczym. Szczególnie szerokie zastosowanie mają lipazy, enzymy należące do grupy hydrolaz. Większość lipaz wykorzystywanych w przemyśle jest produkowana przez mikroorganizmy, głównie grzyby mikroskopowe i bakterie. Opisz w jaki sposób można pozyskać nowe drożdże produkujące lipazy:

- A. Zaproponuj z jakich próbek środowiskowych należałoby podjąć próbę izolacji tych drobnoustrojów.
- B. Jakie hodowlane podłoża selekcyjne i metody można byłoby zastosować do uzyskania czystych kultur drożdży?

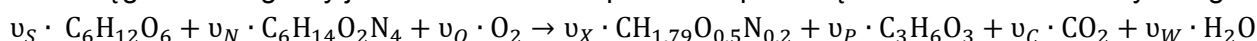
Zadanie 7 (5 pkt.)

Wyłumacz czym jest dziedzina naukowa o nazwie biologia syntetyczna. Jakie jest znaczenie biologii syntetycznej w procesie tworzenia organizmów o nowych pożądanym cechach? Podaj dwa przykłady zastosowania biologii syntetycznej w modyfikacji komórek eukariotycznych i prokariotycznych.

Zadanie 8 (10 pkt.)

Bilans masowy hodowli mikroorganizmów jest ważnym aspektem inżynierskim w projektowaniu danego procesu biotechnologicznego. Jest to matematyczne ujęcie środowiska reaktora za pomocą równań i zależności. Mimo, że stosowane modele są znacznym uproszczeniem zachodzących w rzeczywistości przemian biochemicznych, są one wystarczająco dokładne, pozwalając na prawidłowe przygotowanie i przeprowadzenie procesu. W poniższym zadaniu należy zastosować konwencję węglomola substancji, zanim przystąpi się do dalszych działań.

Pewien proces biotechnologiczny otrzymywania kwasu L-mlekowego ($C_3H_6O_3$) z wykorzystaniem glukozy jako źródła węgla oraz argininy jako źródła azotu zapisano za pomocą równania stechiometrycznego:



Wzór strukturalny węglomola biomasy przyjęto zgodnie z modelem zaproponowanym przez Roelsa ($CH_{1,79}O_{0,5}N_{0,2}$). Zbuduj układ siedmiu równań, który umożliwi obliczenie współczynników bilansowych poszczególnych składników ($v_S, v_N, v_O, v_X, v_P, v_C, v_W$):

- A. Podaj cztery równania bilansu pierwiastków (bez ich dalszego rozwiązywania)
- B. Wymień trzy dodatkowe równania, które niezbędne są do obliczenia współczynników bilansowych poszczególnych składników.

We wszystkich równaniach nazwij zastosowane symbole, których nie było w treści zadania.

Zadanie 9 (5 pkt.)

Żywotność komórek można określić za pomocą hemocytometru poprzez barwienie błękitem trypanu.

- A. W jakim celu określa się żywotność komórek?
- B. Co to jest hemocytometr?
- C. Na czym polega barwienie?
- D. Jak zliczane są komórki?
- E. W jaki sposób policzyć żywotność komórek w hodowli?

Zadanie 10 (5 pkt.)

Substancje semiochemiczne (inaczej substancje komunikacji chemicznej) wydzielane przez jednego osobnika mogą zmieniać zachowanie innego osobnika. Dotyczy to wszystkich żywych organizmów: bakterii, grzybów, roślin i zwierząt.

Oddziaływania mogą zachodzić między roślinami, między roślinami i zwierzętami i między zwierzętami. W środowisku naturalnym te oddziaływania są trudne do śledzenia; często pośredniczą w nich inne osobniki zwłaszcza ze świata mikroorganizmów.

Substancje semiochemiczne dzielimy na oddziałujące międzygatunkowo czyli **allelochemiczne** i oddziałujące wewnątrzgatunkowo. Wśród tych ostatnich największe zainteresowanie budzą **feromony**.

Feromony to substancje produkowane przez osobnika danego gatunku i odbierane przez przedstawicieli tego samego gatunku wywołując u nich specyficzną reakcję, zachowanie lub zmiany fizjologiczne.

Dwa związki z grupy seskwiterpenów: 3,7,11-trimetylo-1,3,6,10-dodekatetraen (nazwa zwyczajowa α -farnezen) i 7,11-dimetylo-3-metyleno-1,6,10-dodekatrien (nazwa zwyczajowa β -farnezen) są produkowane przez rośliny:

- α -farnezen odpowiada za zapach zielonych jabłek, przyciąga owada - szkodnika owocówkę jabłkowieczkę
- β -farnezen występuje w naparze z rumianku
- β -farnezen wytwarzają różne gatunki ziemniaka

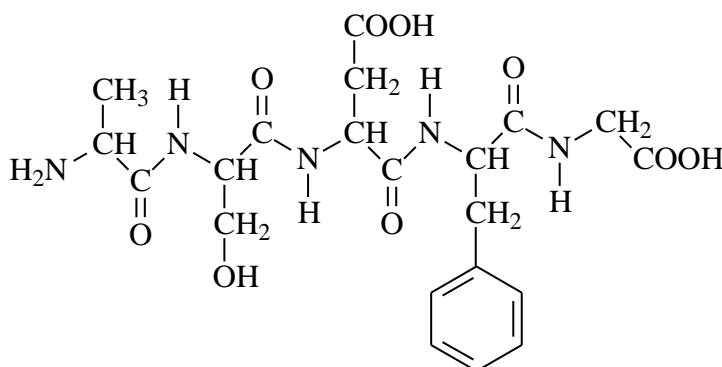
Te same związki produkują niektóre owady:

- α -farnezen to substancja alarmowa termitów
- β -farnezen to substancja alarmowa mszyc wydzielana w przypadku śmierci osobnika

Stwierdzono też, że α -farnezen i β -farnezen występują w moczu samców myszy. W tym przypadku spełniają one rolę sygnalizatorów zniechęcających inne samce do eksplorowania zajętego terytorium.

- Narysuj wzory strukturalne tych związków
- Określ liczbę wiązań σ i π w cząsteczce, określ hybrydyzację wszystkich atomów węgla
- Określ liczbę możliwych izomerów geometrycznych dla obu izomerów konstytucyjnych
- Jak zaklasyfikować te związki, gdy są produkowane przez rośliny a działają na zwierzęta i gdy są produkowane przez zwierzęta i działają w obrębie jednego gatunku.
- Jakie widzisz możliwości praktycznego wykorzystania tych związków.

Zadanie 11 (10 pkt.)



Powyższy rysunek przedstawia pewien peptyd otrzymany w laboratorium metodą zaproponowaną przez Merrifielda z syntetycznych aminokwasów otrzymanych uprzednio metodą Gabriela.

- Zidentyfikuj i nazwij poszczególne aminokwasy wchodzące w skład tego peptydu

- B. Napisz pełną chemiczną nazwę peptydu, napisz wzór peptydu przy pomocy skrótów trzyliterowych. Zastanów się czy jest to związek optycznie czynny.
- C. Zaznacz wiązanie peptydowe i łańcuchy boczne niepolarne oraz zdolne do tworzenia wiązań wodorowych
- D. Wskaż wszystkie węgle chiralne występujące w tej cząsteczce.
- E. Zaproponuj metodę/ metody prowadzące do otrzymania peptydu optycznie czynnego.

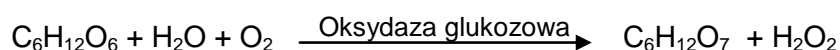
Zadanie 12 (5 pkt.)

Mikroorganizmy ekstremofilne, obejmujące przedstawicieli wszystkich trzech domen życia (archeonów, bakterii i eukariontów) wykształciły w trakcie ewolucji liczne swoiste adaptacje, pozwalające im przeżyć i rozwijać się w surowych warunkach środowiskowych. Wymień zalety i potencjalne zastosowanie organizmów ekstremofilnych, a także białek enzymatycznych przez nie produkowanych (tzw. ekstremozymów) w sektorze chemicznym i biotechnologicznym. Proszę również podać powody dlaczego w szczególności enzymy organizmów psychrofilnych nadają się do stereoselektywnych biotransformacji, zachodzących w środowisku rozpuszczalników organicznych.

Zadanie 13 (10 pkt)

Sensor chemiczny jest urządzeniem umożliwiającym przekształcenie informacji chemicznej, takiej jak stężenie składnika próbki lub jej skład ogólny, na sygnał użyteczny analitycznie. Sensor składa się z części receptorowej, która oddziałuje z analitem, czego efektem jest generowanie sygnału oraz elementu przetwornikowego przekształcającego ten sygnał w końcowy sygnał analityczny. Jednym z rodzajów sensorów są biosensory, których warstwę receptorową stanowią biologicznie aktywne materiały np. enzymy, komórki, fragmenty tkanek, białka, kwasy nukleinowe.

Biosensory znajdują swoje zastosowanie w różnych dziedzinach, w tym w analizie klinicznej. Przykładem takiego urządzenia jest biosensor do wykrywania glukozy. Jego warstwę receptorową może stanowić enzym - oksydaza glukozowa, który katalizuje reakcję utlenienia glukozy do kwasu glukonowego.



Powyzsza reakcja moze byc monitorowana elektrochemicznie (amperometrycznie) poprzez utlenienie nadtlenku wodoru na powierzchni elektrody pracujacej np. platynowej (przetwornika).

W tabeli przedstawiono wyniki pomiarow amperometrycznych dla wzorcowych roztworow glukozy:

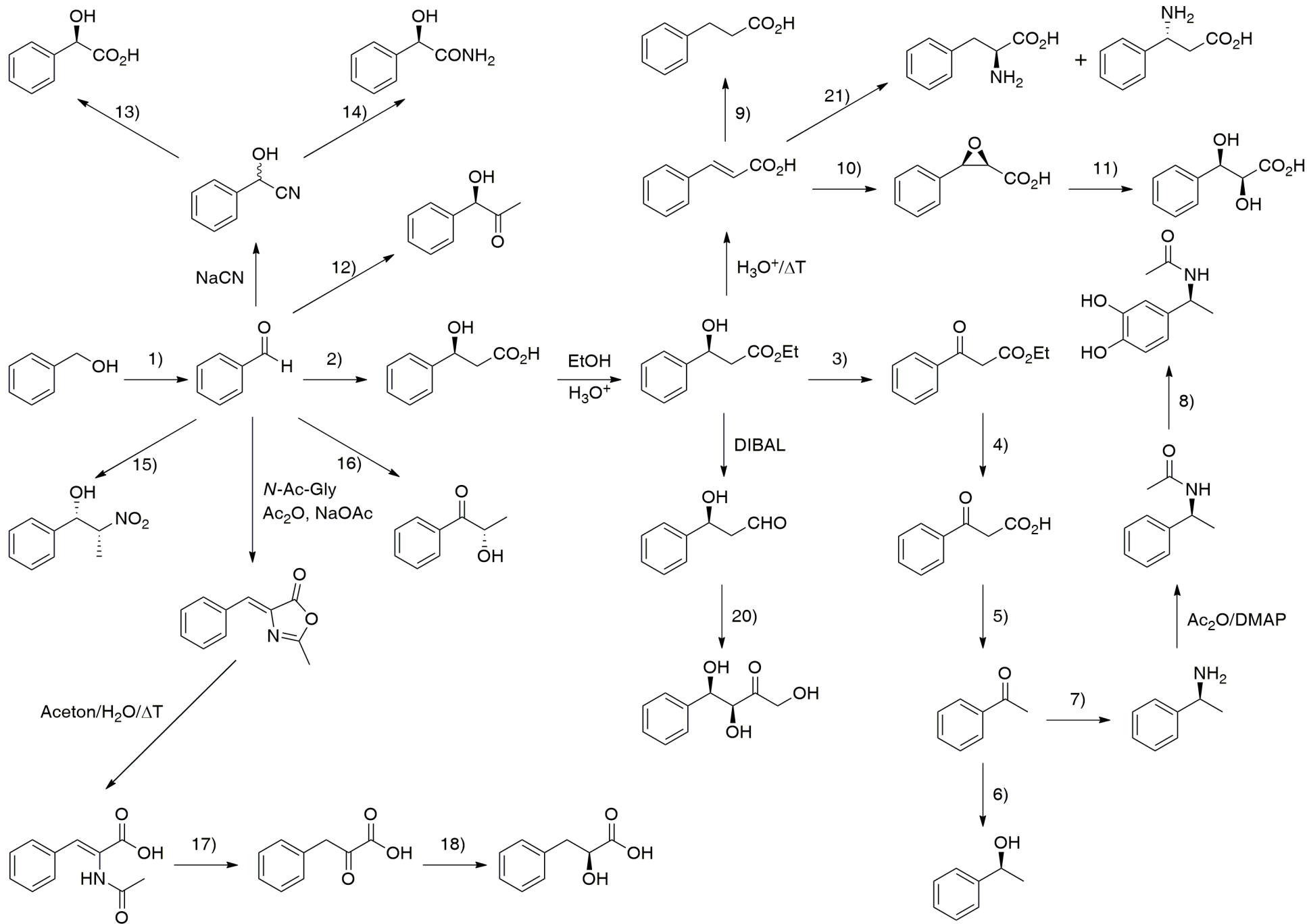
Stężenie glukozy [mmol·L ⁻¹]	Sygnał prądowy [μA]
2	0,3
4	0,8
6	1,1
8	1,6
10	2,0
12	2,5
14	3,0
16	3,4

- A. Na podstawie danych w tabeli wykreśl krzywą kalibracji, podaj równanie prostej oraz współczynnik determinacji. Określ stężenie glukozy w próbce krwi w mg/dL, dla której wartość sygnału prądowego wynosi 1,8 μA . Czy uzyskany wynik wskazuje na możliwość występowania stanu chorobowego (normalne stężenie glukozy we krwi mieści się w zakresie od 70 – 125 mg/dL)?
- B. Do czego prowadzi lokalne wyczerpanie się tlenu w badanej próbce? Czy istnieje możliwość rozwiązania tego problemu?

Zadanie 14 (10 pkt.)

Na schemacie poniżej zaprezentowano „sztuczny metabolizm” z udziałem ksenobiotycznych związków organicznych. Proszę tak zaprojektować kaskadę eksperymentów, aby ścieżka chemoenzymatycznej syntezy była możliwa do wykonania za pomocą 20 wymienionych niżej standardowych systemów enzymatycznych stosowanych w laboratoriach biotechnologicznych. (Uwaga: jeden enzym + warunki proszę dopasować tylko do jednej reakcji; jedna reakcja pozostaje bez dopasowanego biokatalizatora).).

	System enzymatyczny	Numer reakcji
A	Dehydrogenaza / NADH_2 lub drożdże <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
B	Oksydaza / O_2	
C	Nitrylaza / Bufor $\text{pH} < 3,5$	
D	(S)-hydroksynitrylaza + EtNO_2	
E	Lakaza / O_2 / TEMPO	
F	Monooksygenaza styrenowa / O_2 lub chloro peroksydaza / H_2O_2	
G	Dioksygenaza toluenowa	
H	Transketolaza + kwas glikolowy	
I	Lipaza / Bufor $\text{pH} 7,5$	
J	Aminomutazafenyloalaninowa / NH_3 lub amoniakoliza fenyloalaniny (PAL) / NH_3	
K	Hydrataza nitryli / H_2O	
L	Dekarboksylaza pirogronianowa + aldehyd octowy lub <i>S. cerevisiae</i>	
M	Aldolaza + kwas octowy	
N	Dekarboksylaza benzoilomrówczanowa + aldehyd octowy	
O	Proteaza / H_2O	
P	Dekarboksylaza	
R	Hydroksylaza epoksydowa / H_2O	
S	Ene-reduktaza / NADH_2	
T	ω -Transaminaza / NH_3	
U	Reduktaza fenylopirogronianowa / NADH_2	



Zadanie bonusowe (10 pkt) – są to dodatkowe punkty, które będą doliczone do punktów uzyskanych z zadań konkursowych

W procesie tworzenia modelu żywego organizmu *in silico*, powstaje diagram opisujący poszczególne reakcje wchodzące w skład danego modelu. Ten początkowy etap tworzenia modelu, wspomagany jest dzięki oprogramowaniu graficznemu CellDesigner, który jest dostępny za darmo w internecie.

Po zainstalowaniu na komputerze programu Cell Designer 4.4:

- A. Narysuj schemat, w którym w jądrze komórkowym gen ulega ekspresji, a następnie mRNA jest transportowany do cytoplazmy.
- B. Narysuj schemat, w którym białko ulega fosforylacji, a następnie jego ufosforylowana forma jest transportowana do jądra komórkowego z cytoplazmy.
- C. Podaj przykłady białek, które są fosforylowane w jądrze komórkowym i takich, które fosforylowane są w cytoplazmie. Czemu służy modyfikacja białek przez przyłączenie grupy fosforanowej oraz jakie reszty aminokwasowe ulegają modyfikacji?
- D. Wymień trzy przykładowe modyfikacje potranslacyjne (inne niż fosforylacja) i opisz ich znaczenie w biologii komórki.

W przypadku pytań A i B odpowiedzią jest zrzut ekranu.