

Biochemia

Czas: 90 min.

Łączna liczba punktów do zdobycia: 35

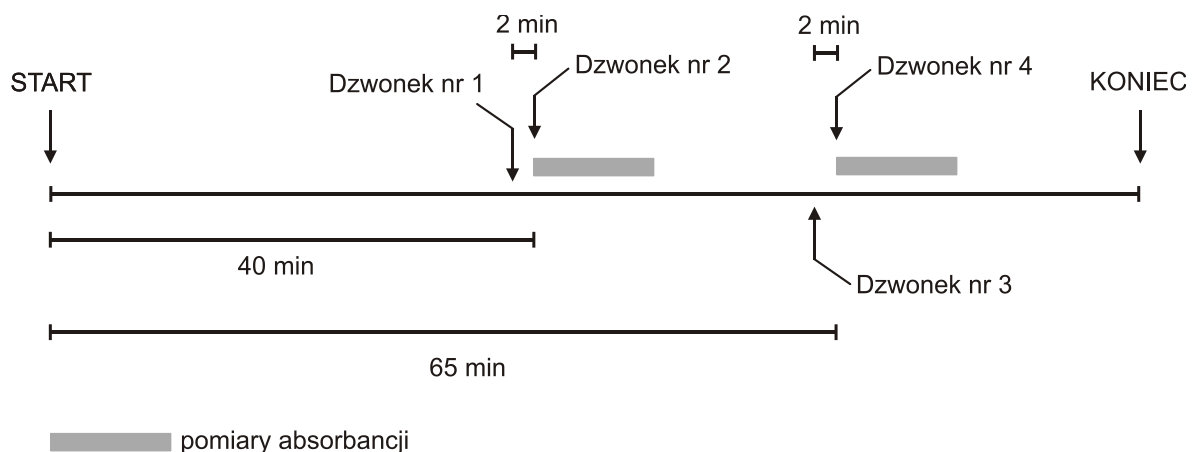
Na tej pracowni wyjątkowo odpowiedzi na zadania należy udzielić na osobnym arkuszu odpowiedzi.

Odpowiedzi zapisz w miejscu na to przeznaczonym na osobnym arkuszu odpowiedzi używając długopisu lub pióra z **czarnym atramentem**.

Drodzy uczestnicy,

- Na pracowni biochemicznej macie dwa zadania do wykonania: w **części A** należy zidentyfikować substrat dla enzymu β -galaktozydazy (11 punktów), w **części B** należy oznaczyć aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy (24 punkty).
- Odpowiedzi należy udzielać jedynie na karcie odpowiedzi.
- Odpowiedzi umieszczone w zbiorze zadań nie będą oceniane.
- Arkusz odpowiedzi wypełniaj za pomocą długopisu lub pióra z **czarnym atramentem**, czytelnym pismem (drukowanymi literami).
- Upewnij się, że otrzymałeś wszystkie niezbędne materiały i odczynniki do wykonania zadań znajdujące się na załączonej liście. Jeżeli brakuje jakiegokolwiek pozycji podnieś rękę.
- Używaj rękawiczek ochronnych.
- Zakończ udzielanie odpowiedzi i odłóż długopis natychmiast po zakończeniu testu.
- W celu zapewnienia zakończenia egzaminu w ciągu 90 minut zostały wyznaczone dwa punkty czasowe, które będą oznaczały ostateczny moment przekazania próbek do pomiaru absorbancji. Pierwszy punkt 40 minut po rozpoczęciu egzaminu (dla części A zadania), drugi punkt 65 minut po rozpoczęciu egzaminu (dla części B zadania). O zbliżaniu się ostatecznego czasu przekazania próbek poinformują asystenci dzwoniąc dwie minuty wcześniej. Po kolejnym dzwonku należy odstawić statywy z kuwetami na krawędź stołu w oznaczonym miejscu.

Poniżej znajduje się schemat sygnałów dźwiękowych w trakcie egzaminu:



Materiały i sprzęt

Materiał	ilość	jednostka
Związek A	1 (150 µl)	probówka
Związek B	1 (150 µl)	probówka
Związek C	1 (150 µl)	probówka
Analog A	1 (1 ml)	probówka
Analog B	1 (1 ml)	probówka
Analog C	1 (1 ml)	probówka
Pięciokrotnie stężony (5X) bufor reakcyjny	2 (1 ml)	probówka
1% kwas 3,5-dinitrosalicylowy w 0,4 M NaOH	1 (1 ml)	probówka
1 M węglan sodu (Na ₂ CO ₃)	1 (1 ml)	probówka
β-galaktozydaza, przechowywać w lodzie	1 (50 µl)	probówka
Woda dejonizowana	1 (20 ml)	butelka

Wszystkie odczynniki w probówkach są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami. Enzym znajduje się w styropianowym pudełku z lodem.

Sprzęt	ilość	jednostka
Wstrząsarka typu vortex	1	sztuka (na 1 lub 2 uczestników)
Łaźnia sucha (termoblok)	1	sztuka (na 2 lub 4 uczestników)
Pipety automatyczne 2-20 µl, 20-200 µl i 100-1000 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Probówka 15 ml typu Falcon	1	sztuka
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	9	sztuka
Kuwety spektrofotometryczne (w torebce)	9	sztuka
Statyw na próbówki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na próbówki typu Falcon	1	sztuka
Statyw na kuwety spektrofotometryczne	1	sztuka
Stoper	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Długopis	1	sztuka
Ołówek	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	1	sztuka
Linijka	1	sztuka
Ręczniki papierowe	1	rolka
Rękawiczki	1	para

Uwaga : Używaj dostarczonych odczynników wg instrukcji! Dodatkowe odczynniki nie będą udostępniane.

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.

Pomiar aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy

Część A. Identyfikacja substratu dla β -galaktozydazy

Wprowadzenie

W probówkach podpisanych A, B, C znajdują się roztwory trzech związków chemicznych. Jednym z nich jest laktoza – substrat β -galaktozydazy, enzymu hydrolizującego laktozę do glukozy i galaktozy. Twoim zadaniem jest zidentyfikowanie próbówki, w której znajduje się laktoza. W tym celu masz do dyspozycji 1% roztwór kwasu 3,5-dinitrosalicylowego w 0,4 M NaOH. Związek ten tworzy barwne kompleksy z cukrami redukującymi, a obecność barwnego produktu można ocenić ilościowo poprzez pomiar spektrofotometryczny.

Zadanie 1.1 (6 pkt)

Wykonaj reakcję barwną z użyciem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego dla związków A, B i C. Uzpełnij Tabelę 1 na karcie odpowiedzi w celu wskazania warunków reakcji. Końcowe stężenie buforu reakcyjnego powinno wynosić 1X. Do reakcji należy dodać po 2,5 μ moła badanych związków (A, B, C), których stężenie w dostarczonych probówkach wynosi 25 mM.

Zadanie 1.2 (2 pkt)

Na podstawie wyników eksperymentu wskaż, w której próbówce znajduje się laktoza.

Zadanie 1.3 (3 pkt)

Czy w pozostałych probówkach mogła znajdować się sacharoza? Odpowiedź uzasadnij.

Część B. Pomiar aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy

Wprowadzenie

Podstawową jednostką aktywności enzymatycznej jest międzynarodowa jednostka aktywności enzymatycznej **U**, której wymiarem jest ilość μ moli powstałego produktu w ciągu jednej minuty [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$] w warunkach optymalnych i przy wysyceniu enzymu substratem. Inną wielkością charakteryzującą aktywność enzymatyczną bezpośrednio związaną z czystością preparatu enzymatycznego jest aktywność właściwa. Definiuje się ją jako liczbę jednostek enzymu U na 1 mg białka [$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$].

W próbówce podpisanej **Enzym** znajduje się roztwór β -galaktozydazy o nieznannej aktywności. Twoim zadaniem jest określenie aktywności enzymatycznej oraz aktywności właściwej tego enzymu. Ponieważ ilościowe określenie zmian zawartości naturalnych substratów i produktów β -galaktozydazy jest czasochłonne, w eksperymencie zostanie użyty bezbarwny analog substratu, który po hydrolizie zmienia barwę na żółtą. Ilość barwnego produktu może być oceniona poprzez pomiar absorbancji roztworu przy charakterystycznej dla danego związku długości fali światła.

Absorbancja jest to wielkość fizyczna równa logarytmowi dziesiętnemu stosunku intensywności światła padającego na badany roztwór do intensywności światła po przejściu przez ten roztwór. Prawo Lamberta-Beera wiąże ze sobą wartości absorbancji i stężenia molowego badanej substancji.

$$A = \epsilon Cl$$

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

ϵ – milimolowy współczynnik absorpcji dla danego związku przy danej długości fali [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]

C – milimolowe stężenie substancji w mierzonym roztworze [mM]

l – długość drogi fali świetlnej przechodzącej przez roztwór [cm]. Jeżeli wartość ta nie jest podana, to domyślnie jest to 1 cm

Zadanie 2.1 (7 pkt)

Zaplanuj i wykonaj pomiar aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy. Uzupełnij Tabelę 2 na karcie odpowiedzi, aby wskazać warunki reakcji. Na każdy ml mieszaniny reakcyjnej należy dodać 10 μl enzymu oraz 200 μl analogu substratu. Dostępny bufor reakcyjny jest pięciokrotnie stężony (5X), a do reakcji należy użyć buforu 1X stężonego. Pamiętaj, aby użyć właściwego analogu substratu wytypowanego w części A zadania. Do zatrzymania reakcji należy stosować 1 M roztwór węgla sodu.

Zadanie 2.2 (17 pkt)

Na podstawie wyników eksperymentu wyznacz aktywność enzymatyczną w jednostkach U oraz aktywność właściwą badanego enzymu.

Instrukcja do części A

Oznaczanie cukrów redukujących metodą chemiczną z użyciem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego

1. Podpisz 4 plastikowe probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml: P0, P1, P2, P3 oraz swoimi inicjałami (lub innym znakiem) i przygotuj mieszaniny reakcyjne wg tabeli nr 1 na karcie odpowiedzi.
2. Wymieszaj zawartość probówki na wstrząsarce typu vortex.
3. Do każdej probówki dodaj 200 μ l 1% roztworu kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, zamknij probówki i ponownie wymieszaj.
4. Umieść probówki w suchej łaźni (termoblok) o temperaturze 100°C na 10 minut. Termobloki znajdują się na krawędziach stołów przy zlewach (jeden termoblok przypada na 2 lub 4 uczestników).
5. Po upływie wymaganego czasu wyjmij probówki z termobloku i odstaw na 2 minuty w celu ochłodzenia próbek.
6. Ostrożnie otwórz probówki i przenieś ich zawartość do podpisanych kuwet spektrofotometrycznych (kuwety podpisujemy tuż poniżej ich górnej krawędzi). Kuwety umieść w podpisanym numerem uczestnika statywie i podnieś rękę w celu przekazania próbek asystentowi.

Asystenci zmierzą wartości absorbancji próbek P1-P3 przy długości fali świetlnej 550 nm wobec próby ślepej P0. Uzyskane wyniki zostaną wklejone w odpowiednim miejscu w karcie odpowiedzi.

Czekając na wyniki pomiarów rozpocznij przygotowywanie części B.

Instrukcja do części B

Pomiar aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy

1. Podpisz 5 plastikowych probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml: S0, S1, S2, S3, S4 i do każdej dodaj 200 μ l 1 M roztworu Na_2CO_3 .
2. Do probówki typu Falcon (komora reakcyjna) o objętości 15 ml dodaj wszystkie wymagane odczynniki (wg tabeli nr 2 na karcie odpowiedzi) poza analogiem substratu. Dokładnie wymieszaj zawartość probówki na wstrząsarce typu vortex. Pozostaw na blacie na dwie minuty.
3. Dodaj do probówki typu Falcon analog substratu w objętości wg tabeli 2 na karcie odpowiedzi. Natychmiast wymieszaj zawartość probówki typu Falcon, od razu pobierz 1 ml mieszaniny i przenieś do probówki typu Eppendorf podpisanej S0 zawierającej 1 M Na_2CO_3 . Wymieszaj zawartość probówki S0 na wstrząsarce typu vortex. **W momencie pobierania 1 ml z probówki typu Falcon włącz stoper.**
4. Po 30 sekundach od pobrania próbki S0 pobierz kolejny 1 ml z probówki typu Falcon i przenieś do probówki typu Eppendorf podpisanej S1. Zawartość probówki typu Eppendorf po zamknięciu natychmiast wymieszaj na wstrząsarce typu vortex.
5. Pobieraj kolejne próbki w odstępach 30 sekundowych do momentu zapelnienia wszystkich probówek typu Eppendorf.
7. Po pobraniu wszystkich próbek zawartość probówek typu Eppendorf przenieś do podpisanych kuwet spektrofotometrycznych (kuwety podpisujemy tuż poniżej ich górnej krawędzi). Kuwety umieść w podpisanym numerem uczestnika statywie i podnieś rękę w celu przekazania próbek asystentowi.

Asystenci zmierzają wartości absorbancji próbek S0-S4 przy długości fali świetlnej 420 nm. Uzyskane wyniki zostaną wklejone w odpowiednim miejscu w karcie odpowiedzi.
8. Po otrzymaniu wyników należy wykreślić wykres zmian absorbancji od czasu, a następnie wyznaczyć początkowy prostoliniowy odcinek reakcji i obliczyć dla tego odcinka zmianę absorbancji na minutę.
9. Znając wartość zmiany absorbancji na minutę należy skorzystać z prawa Lamberta-Beera i obliczyć zmianę stężenia produktu w ciągu jednej minuty. Milimolowy współczynnik absorpcji dla zastosowanego analogu substratu wynosi: $3,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
10. Znając zmianę stężenia produktu na minutę należy obliczyć aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy i wyrazić ją w jednostkach U.
11. Wiedząc, że 1 ml preparatu β -galaktozydazy zawiera **5 μ g białka**, należy wyznaczyć aktywność właściwą preparatu.

PESEL	Imię i nazwisko	Grupa				Nr
		<small>Czerwona</small>	<small>Niebieska</small>	<small>Zielona</small>	<small>Żółta</small>	

Zaznacz znakiem X swoją grupę

Czas: 90 min.

Łączna liczba punktów do zdobycia: 35

Część A. Identyfikacja substratu dla β -galaktozydazy (11 pkt)

Zadanie 1.1 Uzupełnij puste pola w tabeli 1. (6 pkt)

Lp.	Odczynniki	Próba ślepa	Związek A	Związek B	Związek C
		P0	P1	P2	P3
1.	Woda dejonizowana [μ l]				
2.	5X bufor reakcyjny [μ l]				
3.	Badany związek [μ l]				
	Końcowa objętość [ml]	1	1	1	1

Tutaj przyklej wyniki pomiarów absorbancji dla części A.

Zadanie 1.2 W której próbówce znajduje się laktoza? (2 pkt)

Oznaczenie próbówki	A	B	C
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Zadanie 1.3 Czy w którejś z pozostałych próbek mogła znajdować się sacharoza? (1 pkt)

TAK	NIE
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Odpowiedź uzasadnij maksymalnie dwoma zdaniami (odpowiedź proszę wpisać drukowanymi literami). (2 pkt)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Część B. Pomiar aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy (24 pkt)

Zadanie 2.1 Określ analog związku, którego użyjesz w reakcji (wpisz do wiersza 4. w kolumnie "odczynniki") i uzupełnij puste pola w tabeli 2. (7 pkt)

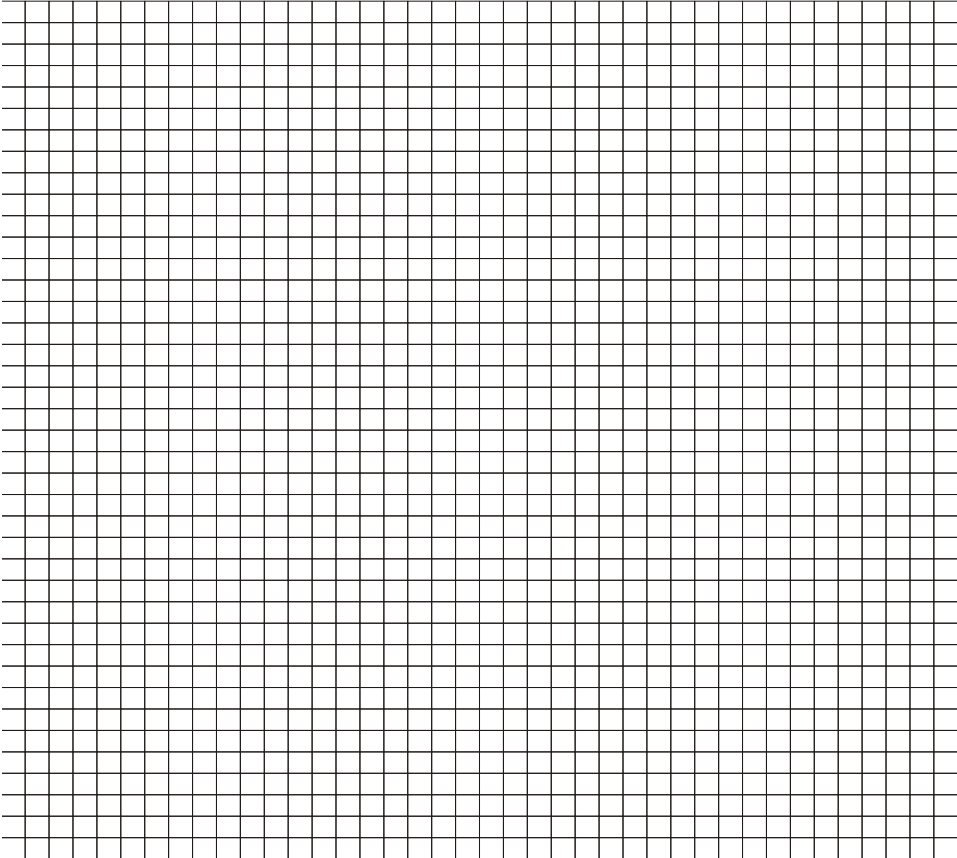
Lp.	Odczynniki	Objętość	Jednostka
1.	Woda dejonizowana		
2.	5X bufor reakcyjny		
3.	β -galaktozydaza		
4.	Analog związku		
	Końcowa objętość	5	ml

* numeracja wierszy oznacza kolejność dodawania odczynników.
** w wierszu nr 4 należy wpisać oznaczenie analogu substratu: A, B lub C.

Tutaj przyklej wyniki pomiarów absorbancji dla części B.

Zadanie 2.2 Narysuj wykres zmian absorbancji w zależności od czasu i oblicz aktywność właściwą β -galaktozydazy. (17 pkt)

Narysuj wykres zmian absorbancji w zależności od czasu. (4,5 pkt)



Uzupełnij puste pola w kolumnie “wartość liczbowa” w niniejszej tabeli i oblicz aktywność właściwą β -galaktozydazy. (12,5 pkt)

Oczekiwana dokładność obliczeń to 3 miejsca po przecinku.

Lp.		Wartość liczbowa	Jednostka
1.	Zmiana absorbancji na minutę w kuwecie		$\Delta \text{ Abs min}^{-1}$
2.	Zmiana stężenia produktu na minutę w kuwecie		$\Delta \text{ mM min}^{-1}$
3.	Zmiana stężenia produktu na minutę w komorze reakcyjnej		$\Delta \text{ mM min}^{-1}$
4.	Aktywność enzymatyczna w komorze reakcyjnej		U [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
5.	Aktywność enzymatyczna w 1 ml preparatu enzymatycznego		U [$\mu\text{mol min}^{-1}$]
6.	Zawartość białka w 1 ml preparatu enzymatycznego	5	μg
7.	Aktywność właściwa preparatu enzymatycznego		U mg^{-1}

Zasady oceniania rozwiązań zadań

Zadanie 1.1 (6pkt)

Schemat doświadczenia do identyfikacji laktozy (1,5 pkt)

- 0,5 pkt – za poprawne uzupełnienie każdego wiersza tabeli.

Prawidłowe rozwiązanie:

Tabela 1. Schemat doświadczenia do identyfikacji laktozy					
Lp.	Odczynniki	Próba ślepa	Związek A	Związek B	Związek C
		P0	P1	P2	P3
1.	Woda dejonizowana [μ l]	800	700	700	700
2.	5X bufor reakcyjny [μ l]	200	200	200	200
3.	Badany związek [μ l]	0	100	100	100
	Końcowa objętość [ml]	1	1	1	1

Pomiary absorbancji (4,5 pkt)

- 1 pkt – za otrzymanie odczytów każdej z czterech wartości absorbancji
- dodatkowo 0,5 pkt – jeżeli próbka z laktozą wykazuje absorbancję, a pozostałe próbki wykazują zerową absorbancję.

Zadanie 1.2 W której probówce znajduje się laktoza? (2 pkt)

- 2 pkt – za wskazanie próbki B

Zadanie 1.3 Czy w którejś z pozostałych probówek mogła znajdować się sacharoza? (3 pkt)

- 1 pkt – za jedynie wybranie odpowiedzi TAK
- 3 pkt – za wybranie odpowiedzi TAK oraz prawidłowe uzasadnienie odnoszące się do braku właściwości redukujących sacharozy lub braku reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym

Przykładowe rozwiązanie:

Tak, ponieważ sacharoza nie jest cukrem redukującym.

UWAGA: jeżeli została zaznaczona odpowiedź NIE, ale uzasadnienie było prawidłowe, to przyznawany był 1 pkt za rozwiązanie zadania.

Zadanie 2.1 (7 pkt)

Schemat doświadczenia do pomiaru aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy (2 pkt)

- 0,5 pkt – za poprawne uzupełnienie każdego wiersza tabeli.

Prawidłowe rozwiązanie:

Lp.	Odczynniki	Objętość	Jednostka
1.	Woda dejonizowana	2,95	ml
2.	5X bufor reakcyjny	1	ml
3.	β -galaktozydaza	50	μl
4.	Analog związku B	1	ml
	Końcowa objętość	5	ml

* numeracja wierszy oznacza kolejność dodawania odczynników.
** w wierszu nr 4 należy wpisać oznaczenie analogu substratu: A, B lub C.

Pomiary absorbancji (5 pkt)

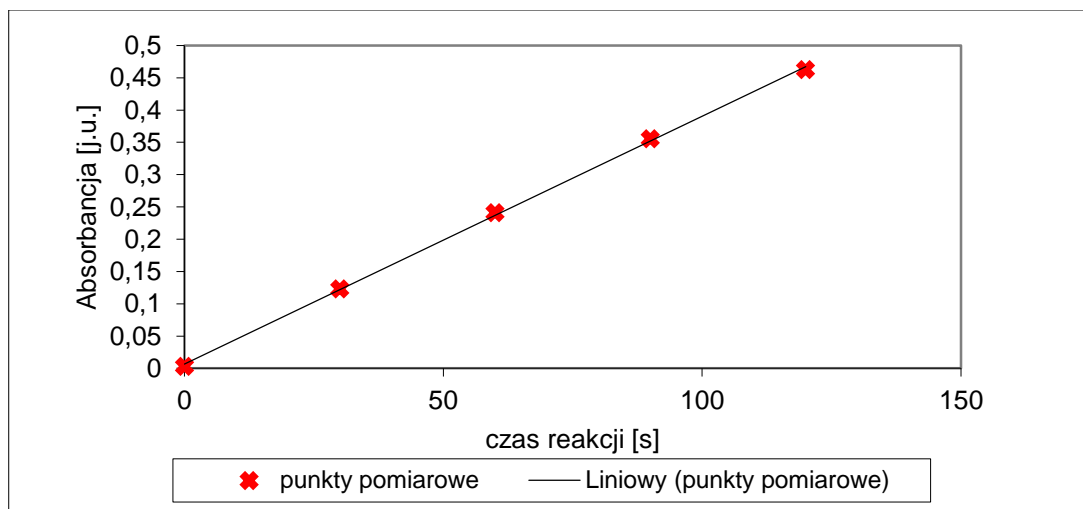
- 0,5 pkt – za otrzymanie odczytów każdej z pięciu wartości absorbancji
- dodatkowo 0,5 pkt – za każdą wartość absorbancji wyższą od poprzedniej
- dodatkowo 0,5 pkt – jeżeli wszystkie wartości absorbancji były wyższe od poprzedzających

Zadanie 2.2 (17 pkt)

Wykres zmian absorbancji w zależności od czasu (4,5 pkt)

- 0,5 pkt – za poprawne opisanie każdej z osi
- 0,5 pkt – za poprawne naniesienie każdego z pięciu punktów pomiarowych
- 1 pkt – za poprawne wykreślenie linii trendu dla początkowego odcinka prostoliniowego

Prawidłowe rozwiązanie:



Obliczenie aktywności enzymatycznej β -galaktozydazy (12,5 pkt)

- 2 pkt – za uzupełnienie każdego wiersza prawidłową wartością obliczoną z dokładnością do trzech miejsc po przecinku
- dodatkowo 0,5 pkt – za poprawne uzupełnienie całej tabeli

UWAGA: (1) gdy wartość liczbowa jest błędna ale schemat obliczeń jest poprawny 1 punkt za wiersz; (2) gdy wartość liczbowa jest błędna, schemat obliczeń poprawny ale występuje błąd w jednostkach 0,5 punktu za wiersz.

Prawidłowe rozwiązanie:

Lp.		Wartość liczbowa	Jednostka
1.	Zmiana absorbancji na minutę w kuwecie	0,238	Δ Abs min ⁻¹
2.	Zmiana stężenia produktu na minutę w kuwecie	0,068	Δ mM min ⁻¹
3.	Zmiana stężenia produktu na minutę w komorze reakcyjnej	0,082	Δ mM min ⁻¹
4.	Aktywność enzymatyczna w komorze reakcyjnej	0,410	U [μ mol min ⁻¹]
5.	Aktywność enzymatyczna w 1 ml preparatu enzymatycznego	8,200	U [μ mol min ⁻¹]
6.	Zawartość białka w 1 ml preparatu enzymatycznego	5	μ g
7.	Aktywność właściwa preparatu enzymatycznego	1640	U mg ⁻¹

1. Zmiana absorbancji na minutę w kuwecie (wartość zmiany absorbancji Δ Abs min⁻¹ była weryfikowana indywidualnie dla każdego uczestnika w oparciu o wyniki absorbancji i wykreślony wykres).
2. Zmiana stężenia produktu na minutę w kuwecie – **wartość 1. podzielona przez milimolowy współczynnik ϵ dla produktu $3,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.**
3. Zmiana stężenia produktu na minutę w komorze reakcyjnej – **wartość 2. pomnożona przez współczynnik rozcieńczenia 1,2** (dodany węglan sodu po pobraniu próbki z komory reakcyjnej).
4. Aktywność enzymatyczna w komorze reakcyjnej – wartość 3. podzielona przez 200 (przejście ze stężenia molowego na liczbę moli w komorze reakcyjnej o objętości 5 ml) oraz pomnożona przez 1000 (zmiana jednostki z mili na mikromole). Podsumowując **wartość 3. pomnożona przez 5.**
5. Aktywność enzymatyczna w 1 ml preparatu enzymatycznego – **wartość 4. pomnożona przez 20** (w komorze reakcyjnej było 50 μ l enzymu).
7. Aktywność właściwa preparatu enzymatycznego – **wartość 5 podzielona przez wartość 6 wyrażoną w miligramach.**

Wszelkie pomyłki uczestników w obliczeniach w tabeli 2 (np. mniejsza ilość enzymu, a więc mniejsza aktywność) były uwzględniane przy ocenie poprawności obliczania aktywności enzymu na korzyść uczestnika.