

Pracownia biochemiczna – arkusz zadań

Drodzy uczestnicy,

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:
Część A jest zadaniem praktycznym, którego celem jest wyznaczenie stężenia białka w dostarczonej próbce z wykorzystaniem metody krzywej wzorcowej (**20 punktów**),
Część B jest zadaniem teoretycznym, którego celem jest określenie liczby bakteriofagów zawartych w ściekach pobranych w oczyszczalni ścieków (**10 punktów**).
- Przed przystąpieniem do rozwiązywania zadań należy przeczytać wszystkie dostarczone materiały.
- Odpowiedzi należy udzielać jedynie na **karcie odpowiedzi**.
- Odpowiedzi umieszczone w arkuszu zadań nie będą oceniane.
- Arkusz odpowiedzi wypełniaj za pomocą czarnego długopisu czytelnym pismem (drukowanymi literami). Dokładnie zacznij 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.
- W celu zapewnienia zakończenia egzaminu w ciągu 90 minut został wyznaczony ostateczny moment przekazania kuwet spektrofotometrycznych do pomiaru. Jest to **80. minuta** od czasu rozpoczęcia egzaminu. **Po przekroczeniu czasu kuwety nie będą przyjmowane.**

Materiały i sprzęt

Materiał	Opis na etykiecie	Ilość	Jednostka
Roztwór białka do analizy	Próbka	1 (200 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Odczynnik Bradforda	Bradford	1 (7 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
Wzorzec białka 1 mg/ml	Wzorzec	1 (700 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Woda dejonizowana	WODA DEJON.	1 (20 ml)	butelka

Wszystkie odczynniki w probówkach są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami lub statywie na próbki typu Falcon.

Sprzęt	Ilość	Jednostka
Pipety automatyczne 10–100 µl i 100–1000 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Wstrząsarka typu vortex	1	sztuka
Probówki 2 ml typu Eppendorf (w torebce)	12	sztuka
Kuwety spektrofotometryczne (w torebce)	7	sztuka
Statyw na próbki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na próbki typu Falcon	1	sztuka
Statyw na kuwety spektrofotometryczne	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	1	sztuka
Pojemnik na odpady	1	sztuka
Ręczniki papierowe	1	rolka
Rękawiczki	1	para
Stoper	1	sztuka

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. Wyznaczanie stężenia białka w roztworze (20 pkt)

Wprowadzenie

Jedną z najczęściej stosowanych metod oznaczania stężenia białka w roztworze jest metoda Bradforda, w której w środowisku kwaśnym białka tworzą barwne kompleksy z błękitem kumasyny. Intensywność barwy jest określana spektrofotometrycznie przy długości fali 595 nm, a stężenie białka wyznaczone za pomocą krzywej wzorcowej. W próbce podpisanej **Próbka** znajduje się roztwór o nieznanym stężeniu białka. **Twoim zadaniem będzie określenie stężenia białka stosując metodę Bradforda.**

Zadanie A.1 (3 pkt). Wykonaj poniższe obliczenia.

Przygotuj rozcieńczenia roztworu wzorcowego białka o stężeniu 1 mg/ml wg tabeli 1. Przygotuj po 1 ml każdego z roztworów.

Tabela 1. Przygotowanie roztworów do wykonania krzywej wzorcowej					
Oznaczenie próbki	Stężenie wzorca [mg/ml]	Objętość (w μ l) wzorca 1 mg/ml (próbówka Wzorzec)		Objętość (w μ l) wody	
W1	0,1	1		2	
W2	0,2	3		4	
W3	0,4	5		6	

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

Zadanie A.2 (2 pkt). Wykonaj poniższe obliczenia.

Przygotuj rozcieńczenia badanej próbki wg tabeli 2. Przygotuj po 200 μ l każdego z roztworów.

Tabela 2. Przygotowanie rozcieńczeń badanej próbki					
Oznaczenie próbki	Rozcieńczenie próbki	Objętość (w μ l) próbki badanej (próbówka Próbka)		Objętość (w μ l) wody	
P1	4x	1		2	
P2	8x	3		4	

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

Zadanie A.3 (10 pkt)

Wykonaj pomiar stężenia białka wykorzystując obliczenia z zadań A.1 i A.2 oraz instrukcję zamieszczoną poniżej.

Instrukcja do części A.3

1. Podpisz 3 plastikowe probówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml: W1, W2, W3 i przygotuj roztwory wzorców białka wg Tabeli 1. Wymieszaj probówki na wstrząsarce typu vortex.
2. Podpisz 2 plastikowe probówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml: P1 oraz P2 i przygotuj rozcieńczenia próbki (probówka podpisana **Próbka**) wg Tabeli 2. Wymieszaj zawartość probówek na wstrząsarce typu vortex.
3. Podpisz 7 plastikowych probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml: 0–6 i umieść w statywie.
4. Do każdej z próbek dodaj po 100 μ l odpowiednich roztworów wg poniższego schematu:

Oznaczenie probówki	roztwór
0	Woda dejonizowana
1	W1
2	W2
3	W3
4	Próbka
5	P1
6	P2

5. Do każdej z probówek dodaj 1 ml odczynnika Bradforda, natychmiast wymieszaj na wstrząsarce typu vortex i odstaw w statywie na 20 minut.
 6. Po upływie wymaganego czasu przenieś zawartość probówek do podpisanych kuwet spektrofotometrycznych (kuwety podpisuje się 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 0–6 przy długości fali świetlnej 595 nm wobec próby 0. Raport z pomiarów absorbancji wraz z przyznaną punktacją zostanie dołączony do karty odpowiedzi uczestnika po zakończeniu egzaminu.

Zadanie A.4 (5 pkt)

Wykonano oznaczenie zawartości białka w trzech roztworach (A, B i C) metodą Bradforda z wykorzystaniem krzywej wzorcowej. Krzywa wzorcowa została przygotowana dla zakresu stężeń białka 0–100 µg/ml i jest opisana równaniem prostej $y=0,0095x$.

Uzyskano następujące wyniki absorbancji:

Próbka	Rozcieńczenie	Absorbancja
A	2×	1,25
B	10×	0,84
C	50×	0,18

Zadanie A.4.1 Dla których próbek można wyznaczyć stężenie białka w oparciu o dostępne dane?

Próbka	Można wyznaczyć stężenie?
1. A	<input type="checkbox"/> tak / <input type="checkbox"/> nie
2. B	<input type="checkbox"/> tak / <input type="checkbox"/> nie
3. C	<input type="checkbox"/> tak / <input type="checkbox"/> nie

UWAGA. Zakoduj odpowiedzi na karcie odpowiedzi.

Zadanie A.4.2 Oblicz stężenia białka w roztworach A, B, C. Wyniki podaj z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Jeżeli uważasz, że dla którejś z próbek oznaczenie stężenia białka jest niemożliwe wpisz w odpowiednie pola znak „—”.

Tabela 3. Przygotowanie rozcieńczeń badanej próbki				
Oznaczenie próbki	Stężenie białka w próbce pomiarowej [µg/ml]		Stężenie białka w roztworze [µg/ml]	
A	1		2	
B	3		4	
C	5		6	

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

Część B. Bakteriofagi w ściekach (10 pkt)

Rozwiązywanie poniższego zadania należy rozpocząć po rozpoczęciu reakcji barwnej z Części A egzaminu.

Liczba bakteriofagów obecnych w wodzie jest jednym ze wskaźników jej czystości. Pobrano wodę z dwóch miejsc w oczyszczalni ścieków. W jednym miejscu były ścieki nieoczyszczone, tzw. ścieki surowe, a w drugim ścieki oczyszczone. W poniższej tabeli zamieszczono wyniki dotyczące liczby łysek powstałych na szalkach służących do badania czystości próbek wody. Szalki te zawierają półtwardą pożywkę wraz z bakteriami, które mogą być zakażane przez bakteriofagi. Wówczas powstają łyseki, które można policzyć na powierzchni pożywki.

Do porcji pożywki półtwardej dodaje się próbkę wody o objętości 10 μ l, rozcieńczoną wcześniej 10 \times albo 100 \times .

W cyklu replikacyjnym niektórych bakteriofagów, ich materiał genetyczny jest narażony na działanie czynników środowiskowych.

Tabela 4. Liczba łysek na szalkach (\varnothing 90 mm) zawierających badane próbki wody.

	Próbka A		Próbka B	
	Rozcieńczenie próbki 10 \times	Rozcieńczenie próbki 100 \times	Rozcieńczenie próbki 10 \times	Rozcieńczenie próbki 100 \times
Pożywka półtwarda bez RNazy	250	18	70	6
Pożywka półtwarda z RNazą	190	11	35	3

Zadanie B.1 (4 pkt)

Uzupełnij w poniższym tekście luki (1.–4.) wyrażeniami z tabeli, wybierając w każdym przypadku jedno z dwóch zaproponowanych.

Aby dokładniej oszacować liczbę bakteriofagów zawartych w próbkach wody, należy obliczyć wartość PFU (ang. *plaque forming unit*) na podstawie liczby łysek na szalkach zawierających (1) rozcieńczoną próbkę wody. Oszacowanie liczby bakteriofagów, których materiałem genetycznym jest RNA, jest możliwe dzięki porównaniu PFU między próbkami (2). Na tej podstawie (3) oszacować liczbę bakteriofagów, których materiałem genetycznym jest DNA. Surowe ścieki były w (4).

Numer luki	Wyrażenie
1.	<input type="checkbox"/> A. mniej / <input type="checkbox"/> B. bardziej
2.	<input type="checkbox"/> A. z różnym rozcieńczeniem pobranej wody / <input type="checkbox"/> B. mającymi kontakt z RNazą i niemającymi kontaktu z RNazą
3.	<input type="checkbox"/> A. można / <input type="checkbox"/> B. nie można
4.	<input type="checkbox"/> A. próbce A / <input type="checkbox"/> B. próbce B

UWAGA. Zakoduj odpowiedzi na karcie odpowiedzi.

Zadanie B.2 (6 pkt)

Podaj liczbę bakteriofagów, których materiałem genetycznym jest RNA, znajdujących się w 1 litrze wody bezpośrednio pobranej w dwóch miejscach w oczyszczalni ścieków. Wynik podaj w liczbach całkowitych.

Tabela 5. Całkowita liczba wszystkich bakteriofagów		
w 1 litrze surowych ścieków	1	
w 1 litrze oczyszczonych ścieków	2	

Tabela 6. Liczba bakteriofagów, których materiałem genetycznym jest RNA		
w 1 litrze surowych ścieków	3	
w 1 litrze oczyszczonych ścieków	4	

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

Część A. Wyznaczanie stężenia białka w roztworze (0-20 pkt)

Zadanie A.1 (0-3 pkt)

Obliczenie objętości potrzebnych do przygotowania roztworów do wykonania krzywej wzorcowej (0-3 pkt)

- 3 pkt za prawidłowe wypełnienie 6 komórek
- 2,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 5 komórek
- 2 pkt za prawidłowe wypełnienie 4 komórek
- 1,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 3 komórek
- 1 pkt za prawidłowe wypełnienie 2 komórek
- 0,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 1 komórki
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

Przykładowe rozwiązanie:

Tabela 1. Przygotowanie roztworów do wykonania krzywej wzorcowej					
Oznaczenie próbki	Stężenie wzorca [mg/ml]	Objętość (w μ l) wzorca 1 mg/ml (próbówka Wzorzec)		Objętość (w μ l) wody	
W1	0,1	1	100	2	900
W2	0,2	3	200	4	800
W3	0,4	5	400	6	600

Zadanie A.2 (0-2 pkt)

Obliczenie objętości potrzebnych do przygotowania rozcieńczeń próbki (0-2 pkt)

- 2 pkt za prawidłowe wypełnienie 4 komórek
- 1,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 3 komórek
- 1 pkt za prawidłowe wypełnienie 2 komórek
- 0,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 1 komórki
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

Przykładowe rozwiązanie:

Tabela 2. Przygotowanie rozcieńczeń badanej próbki					
Oznaczenie próbki	Rozcieńczenie próbki	Objętość (w μ l) próbki badanej (próbówka Próbka)		Objętość (w μ l) wody	
P1	4×	1	50	2	150
P2	8×	3	25	4	175

Zadanie A.3 Pomiar stężenia białka (0-10 pkt)

Pomiary absorbancji (0-3,5 pkt)

- 0,5 pkt za każdą kuwetę spektrofotometryczną przekazaną do pomiaru.

Dokładność wykonania krzywej wzorcowej (0-3 pkt)

- 3 pkt za wartość współczynnika korelacji $R^2 > 0,999$
- 2 pkt za wartość współczynnika korelacji R^2 w przedziale (0,99; 0,999)
- 1 pkt za wartość współczynnika korelacji R^2 w przedziale (0,9; 0,99)
- 0 pkt za wartość współczynnika korelacji $R^2 < 0,9$

Zgodność wartości absorbancji (Abs) badanej próbki z wartościami referencyjnymi (0-1,5 pkt)

- 0,5 pkt za próbkę 4 spełniającą warunek $Abs > 1.000$
- 0,5 pkt za próbkę 5 spełniającą warunek Abs w zakresie $<0,540; 0,660>$
- 0,5 pkt za próbkę 6 spełniającą warunek Abs w zakresie $<0,270; 0,330>$
- 0 pkt za niespełnienie powyższych kryteriów

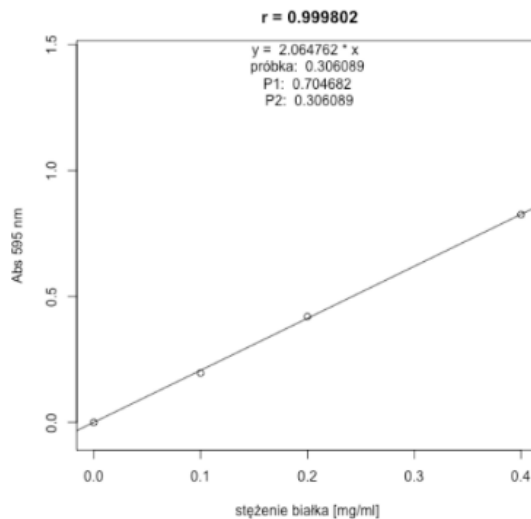
UWAGA. Wartości referencyjne absorbancji zostały ustalone na podstawie wykonanych przez KGOB.

Dokładność rozcieńczania badanej próbki definiowana jako iloraz stężenia białka w próbce 4× rozcieńczonej do stężenia białka w próbce 8× rozcieńczonej (0-2 pkt)

- 2 pkt za iloraz w przedziale $<2,07; 2,53>$
- 1 pkt za iloraz w przedziale $<1,84-2,07>$ lub $(2,53-2,76)>$
- 0 pkt za iloraz w zakresach $<1,84$ lub $>2,76$

UWAGA. Wartość referencyjna 2,3 została ustalona na podstawie mediany wartości dla wszystkich uczestników.

Przykładowe rozwiązanie:



Nr	Opis	Abs 595 nm
0	0 mg/ml (woda dejonizowana)	0.000
1	0.1 mg/ml (wzorzec W1)	0.196
2	0.2 mg/ml (wzorzec W2)	0.420
3	0.4 mg/ml (wzorzec W3)	0.825
4	próbka	1.455
5	P1 (rozcieńczenie 4x)	0.632
6	P2 (rozcieńczenie 8x)	0.306

Zadanie A.4 (0-5 pkt)

Zadanie A.4.1. Wskazane próbek dla których można wyznaczyć stężenia białka w oparciu o dostępne dane (0-1 pkt).

- 1 pkt za prawidłowe zaznaczenie 3 pól
- 0,5 pkt za prawidłowe zaznaczenie 2 pól
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

Przykładowe rozwiązanie:

Dla których próbek można wyznaczyć stężenie białka w oparciu o dostępne dane?

Próbka	Można wyznaczyć stężenie?
1. A	<input type="checkbox"/> tak / <input checked="" type="checkbox"/> nie
2. B	<input checked="" type="checkbox"/> tak / <input type="checkbox"/> nie
3. C	<input checked="" type="checkbox"/> tak / <input type="checkbox"/> nie

Zadanie A.4.2 Wyznaczanie stężeń białka na podstawie dostarczonych danych (0-4 pkt).

- 4 pkt za prawidłowe wypełnienie 4 komórek
- 3 pkt za prawidłowe wypełnienie 3 komórek
- 2 pkt za prawidłowe wypełnienie 2 komórek
- 1 pkt za prawidłowe wypełnienie 1 komórki
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

UWAGA. W ocenie uwzględniane są jedynie komórki 3-6.

Jeżeli w zadaniu A.4.1 dla któregoś z roztworów zaznaczono wybór „nie”, a w zadaniu A.4.2 dla tego roztworu wykonano obliczenia, to obliczenia te nie będą oceniane.

Z uwagi na brak precyzyjnego wskazania co do sposobu zaokrąglania wartości liczbowych dla każdej z komórek, w zadaniu A.1.4 wymienione poniżej odpowiedzi są uznawane jako poprawne:

komórka 3: 88,4

komórka 4: 884, 884,0 i 884,2

komórka 5: 18,9

komórka 6: 945, 945,0 i 947,4

Przykładowe rozwiązanie:

Tabela 3. Przygotowanie rozcieńczeń badanej próbki				
Oznaczenie próbki	Stężenie białka w próbce pomiarowej [$\mu\text{g/ml}$]		Stężenie białka w roztworze [$\mu\text{g/ml}$]	
A	1	–	2	–
B	3	88,4	4	884
C	5	18,9	6	945

Część B. Bakteriofagi w ściekach (0-10 pkt)**Zadanie B.1** Poprawne uzupełnienie w tekście luk (0-4 pkt)

- 4 pkt za prawidłowe uzupełnienie 4 luk
- 3 pkt za prawidłowe uzupełnienie 3 luk
- 2 pkt za prawidłowe uzupełnienie 2 luk
- 1 pkt za prawidłowe uzupełnienie 1 luki
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

Przykładowe rozwiązanie:

Numer luki	Wyrażenie
1.	<input checked="" type="checkbox"/> A. mniej / <input type="checkbox"/> B. bardziej
2.	<input type="checkbox"/> A. z różnym rozcieńczeniem pobranej wody / <input checked="" type="checkbox"/> B. mającymi kontakt z RNazą i niemającymi kontaktu z RNazą
3.	<input checked="" type="checkbox"/> A. można / <input type="checkbox"/> B. nie można
4.	<input checked="" type="checkbox"/> A. próbce A / <input type="checkbox"/> B. próbce B

Zadanie B.2 Podanie liczby bakteriofagów znajdujących się w 1 litrze wody bezpośrednio pobranej w dwóch miejscach w oczyszczalni ścieków. (0-6 pkt)

- 6 pkt za prawidłowe wypełnienie 4 komórek
- 4,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 3 komórek
- 3 pkt za prawidłowe wypełnienie 2 komórek
- 1,5 pkt za prawidłowe wypełnienie 1 komórki
- 0 pkt za odpowiedzi niespełniające powyższych kryteriów lub brak odpowiedzi.

Przykładowe rozwiązanie:

Tabela 5. Całkowita liczba wszystkich bakteriofagów		
w 1 litrze surowych ścieków	1	250 000 000
w 1 litrze oczyszczonych ścieków	2	70 000 000

Tabela 6. Liczba bakteriofagów, których materiałem genetycznym jest RNA		
w 1 litrze surowych ścieków	3	60 000 000
w 1 litrze oczyszczonych ścieków	4	35 000 000

UWAGA. Podanie wyników w notacji wykładniczej jest uznawane za odpowiedź poprawną.