

Odpowiedź do zadania 1

Po otwarciu podanego pliku w ApE należy wybrać w menu ORFs>Find Next, a następnie ORFs>Translate...

Sekwencja aminokwasowa kalmoduliny:

```
MADQLTEEQIAEFKEAFSLFDKDGDTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKD  
TDSEEEIREAFRVFDKDGNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
```

Na stronie bazy danych Pfam należy wybrać zakładkę SEQUENCE SEARCH i wkleić powyższą sekwencję. Okazuje się, że w sekwencji kalmoduliny znajdują się dwie domeny EF-hand 7. Po kliknięciu na nazwę domeny możemy przeczytać, że jest to domena, która znajduje się w białkach wiążących jony wapnia. Na dole strony znajduje się lista białek występujących w organizmie człowieka zawierających tę domenę.

W plikach L_1.apc i P_1.apc znajdują się przykładowe sekwencje starterów, które mogą być wykorzystane do stworzenia konstruktów do wyrażania białka ze znacznikiem na końcu N. Sekwencja konstruktów znajduje się w pliku konstrukt_1.apc. Do klonowania wykorzystano enzymy NdeI i XhoI.

W plikach L_2.apc i P_2.apc znajdują się przykładowe sekwencje starterów, które mogą być wykorzystane do stworzenia konstruktów do wyrażania białka ze znacznikiem na końcu C. Sekwencja konstruktów znajduje się w pliku konstrukt_2.apc. Do klonowania wykorzystano enzymy NcoI i XhoI.

Odpowiedź do zadania 2

Sekwencja aminokwasowa znacznika z wektora pMAL:

```
MKIKTGARILALSALTTMMFSASALAKIEEGKLVIWINGDKGYNGLAIEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAAT  
GDGPDIIIFWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLLIYNKDLLPNPPKTWEEI  
PALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDIKDVGVNAGAKAGLTFVLVLIKNKHMNADTDYS  
IAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLLENYLLTDEGL  
EAVNKDKPLGAVALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDKALKAQTNS  
SNNNNNNNNNLGIEGRISHMSMGRDIVDGEFPAGN
```

Po wejściu na stronę programu BLAST należy wybrać Protein BLAST, aby sekwencją aminokwasową przeszukać bazę danych sekwencji aminokwasowych. Większość spośród 100 najbardziej podobnych do interesującej nas sekwencji jest identyczna na niemal całej długości. Jedyna różnica polega na tym, że nasza sekwencja jest dodatkowo wyposażona w krótki dodatkowy fragment na końcu C. Te sekwencje są opisane jako białko *maltose/maltodextrin ABC transporter substrate-binding protein MalE* z *Escherichia coli*. Po wpisaniu tej frazy do wyszukiwarki UniProtKB odnajdujemy białko o nazwie *Maltose/maltodextrin-binding periplasmic protein* (MBP) kodowane przez *MalE* z *E. coli*. Ma sekwencję niemal identyczną do kodowanej przez gen z wektora pMAL, różni się tylko krótkim fragmentem na końcu C. Z opisu można dowiedzieć się, że białko uczestniczy w transporcie maltozy i maltodekstryny, i że z dużym powinowactwem wiąże maltozę oraz maltotriozę. Ta właściwość może być wykorzystana przy oczyszczaniu białka metodą chromatografii powinowactwa. Białko ze znacznikiem MBP może wiązać się ze złożem z unieruchomioną maltozą (choć w praktyce wykorzystuje się złożo z amylozą), zostać oddzielone od pozostałych białek z komórki bakteryjnej, a następnie poddane elucji buforem zawierającym wysokie stężenie maltozy.

Odpowiedź do zadania 3

Oczywiście odpowiedź na to pytanie zmienia się co miesiąc.

Cząsteczką miesiaca w lutym 2019, kiedy powstawał ten informator, był czynnik inicjujący translację eIF4E. Jest to jeden z elementów tworzących duży kompleks inicjujący translację składający się z mRNA, rybosomów i tRNA. Rolą eIF4E jest rozpoznanie zmodyfikowanej reszty guanidynowej znajdującej się na końcu 5' cząsteczki mRNA, czyli tzw. czapeczki (ang. *cap*) i rozpoczęcie powstawania reszty kompleksu. Może pełnić tę funkcję, ponieważ składa się z dwóch elementów: domeny wiążącej czapeczkę i długiego giętkiego łańcucha, za pomocą którego oddziałuje z równie giętkim fragmentem eIF4G, innym czynnikiem inicjującym translację, do którego następnie przyłączają się kolejne elementy kompleksu.