

Pracownia biochemiczna – arkusz zadań

Drodzy uczestnicy,

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:
Część A jest zadaniem praktycznym, którego celem jest rozdzielanie i identyfikacja aminokwasów (**20 punktów**),
Część B jest zadaniem teoretycznym, którego celem jest identyfikacja typu inhibicji reakcji enzymatycznej (**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.
- Kartę odpowiedzi wypełniaj za pomocą czarnego długopisu 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 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 testu.
- W celu zapewnienia zakończenia egzaminu w ciągu 90 minut został wyznaczony ostateczny moment przekazania płytek do chromatografii. Jest to **55. minuta** od czasu rozpoczęcia egzaminu. Przekazanie płytki po upływie wyznaczonego czasu może skutkować brakiem czasu na wykonanie wszystkich poleceń.

Materiały i sprzęt

Materiał	Opis na etykiecie	Ilość	Jednostka
Mieszania aminokwasów do analizy	Próbka	1 (100 µl)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Roztwór do elucji A, pH 4	A (pH 4)	1 (10 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
Roztwór do elucji B, pH 13	B (pH 13)	1 (10 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
Wzorzec kwasu glutaminowego	Glu	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Wzorzec kwasu asparaginowego	Asp	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Wzorzec lizyny	Lys	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Wzorzec argininy	Arg	1 (10 µl)	probówka typu Eppendorf (0,5 ml)
Woda dejonizowana	WODA DEJON.	1 (20 ml)	butelka

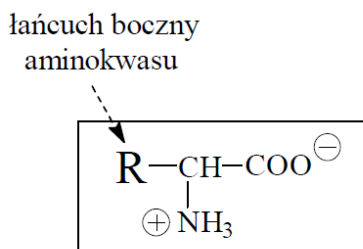
Wszystkie odczynniki w probówkach są umieszczone w plastikowym pudełku z przegródkami lub statywie na próbki typu Falcon.

Sprzęt	Ilość	Jednostka
Statyw z kolumną wypełnioną złożem chromatograficznym	1	zestaw
Pipety automatyczne 0,5-10 µl, 10-100 µl i 100-1000 µl z zestawem końcówek	1	zestaw
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	9	sztuka
Płytki chromatograficzne (w torebce)	1	sztuka
Statyw na próbki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na próbki typu Falcon	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Ołówek typu B	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	1	sztuka
Linijka	1	sztuka
Pojemnik na odpady	1	sztuka
Zlewka 50 ml	1	sztuka
Ręczniki papierowe	1	rolka
Rękawiczki	1	para
Fartuch ochronny	1	sztuka

Część A. Rozdzielanie i identyfikacja aminokwasów (20 pkt)

Wprowadzenie

W budowie aminokwasów występują grupy funkcyjne, które mogą ulegać jonizacji.



W efekcie aminokwasy są obdarzone ładunkiem elektrycznym, którego wypadkowy znak zależy od pH roztworu. Wartością graniczną jest punkt izoelektryczny, w którym wypadkowy ładunek cząsteczki jest równy 0. Wykorzystując powyższe właściwości można rozdzielić mieszaninę aminokwasów stosując technikę chromatografii jonowymiennej.

W próbce podpisanej **Próbka** znajduje się mieszanina dwóch aminokwasów. Jeden z nich to kwas glutaminowy lub kwas asparaginowy, a drugi to lizyna lub arginina. **Twoim zadaniem będzie rozdzielenie mieszaniny aminokwasów i ich identyfikacja z zastosowaniem kolumnowej chromatografii jonowymiennej oraz cienkowarstwowej chromatografii adsorpcyjnej.**

Zadanie A.1 (6 pkt)

Zaplanuj eksperyment pozwalający na rozdzielenie aminokwasów za pomocą kolumnowej chromatografii jonowymiennej. Przy planowaniu wykorzystaj poniższe informacje:

- 1) Możliwe pary aminokwasów to: Asp i Lys; Asp i Arg; Glu i Lys; Glu i Arg
- 2) Punkty izoelektryczne aminokwasów:

Aminokwas	Punkt izoelektryczny [pH]
Kwas asparaginowy (Asp)	2,87
Kwas glutaminowy (Glu)	3,22
Lizyna (Lys)	9,74
Arginina (Arg)	10,76

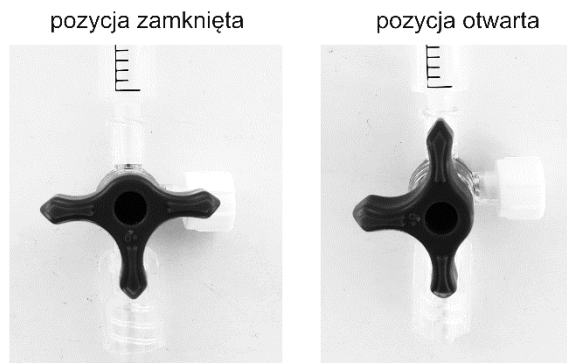
- 3) Złoże chromatograficzne (faza stacjonarna) to DOWEX® 50W X4 – żywica jonowymienna **wiążąca kationy**.
- 4) Do dyspozycji masz dwa roztwory do elucji A (pH 4) i B (pH 13).
- 5) Przed przystąpieniem do właściwego procesu chromatografii należy odpowiednio przygotować złoże chromatograficzne (złoże należy przepłukać wybranym przez uczestnika roztworem do elucji, który zostanie użyty jako pierwszy (patrz instrukcja wykonania)).
- 6) Próbka musi być przygotowana w roztworze do elucji, który został użyty do przepłukania złoża (patrz instrukcja wykonania).

Zadanie A.2 (14 pkt)

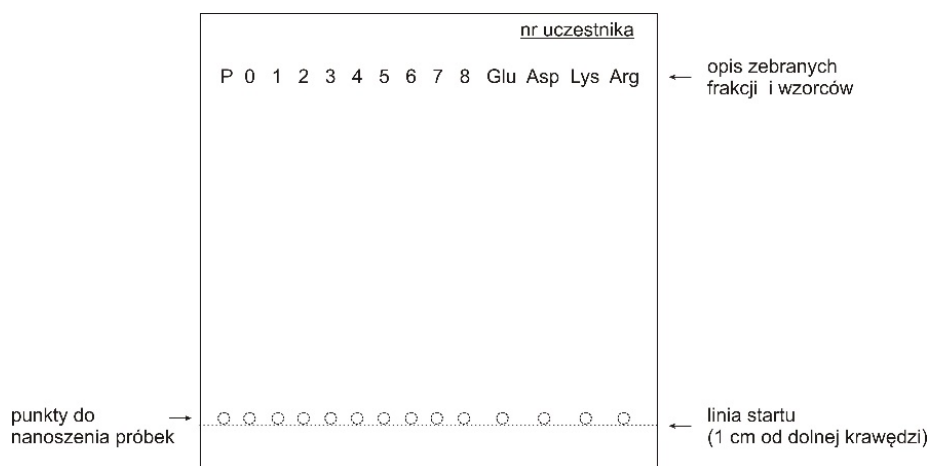
Wykonaj zaplanowany w zadaniu A.1 eksperyment, a następnie określ skład poszczególnych frakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Identyfikacji aminokwasów dokonaj poprzez porównanie z wzorcami (kolejność migracji aminokwasów wg rosnących wartości R_f : Lys, Arg, Asp, Glu).

Instrukcja do części A

1. Podpisz 9 plastikowych probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml: 0-8 i umieść w statywie.
2. Pod wylotem kolumny umieść zlewkę (wyreguluj wysokość zamocowania kolumny wg własnych potrzeb) i odkręć kranik.



3. Przepłucz kolumnę 5 ml, wybranego przez Ciebie, roztworu do elucji A lub B. Wyciek zbieraj do zlewki. Roztwór podawaj powoli za pomocą pipety automatycznej tak, aby jak najmniej wzburzyć powierzchnię złoża. Następnie zakręć kranik kolumny pozostawiając około 1 mm cieczy powyżej powierzchni złoża.
4. Do próbki oznaczonej **Próbka** dodaj 400 μ l wybranego przez Ciebie roztworu do elucji – A lub B. Wymieszaj poprzez kilkukrotne pobranie/wydanie cieczy do próbki.
5. Na powierzchnię złoża nanieś 450 μ l próbki przygotowanej w punkcie 4. instrukcji. Umieść wylot kolumny nad próbką podpisaną 0 i odkręć kranik.
6. Kiedy cała ciecz wypłynie z kolumny ustaw wylot kolumny nad próbką 1 i dodaj do kolumny 1 ml roztworu do elucji A lub B. W analogiczny sposób zbierz frakcje 1-4.
7. Począwszy od frakcji 5 zmień roztwór do elucji na inny i zbierz frakcje 5-8.
8. Po zebraniu wszystkich frakcji zamknij kranik kolumny.
9. Zamknij wszystkie probówki 1,5 ml i wymieszaj zawartość poprzez kilkukrotne obrócenie probówek „góra-dół”.
10. Wyjmij płytkę chromatograficzną z woreczka. Narysuj za pomocą ołówka linię startu w odległości 1 cm od dolnej krawędzi płytki (po płytce należy pisać bardzo delikatnie, aby nie spowodować zadrapań). Przy górnej krawędzi płytki umieść swój nr uczestnika oraz oznaczenia zebranych frakcji i wzorców (rysunek 1).
11. Za pomocą pipety automatycznej nanieś na płytkę (tuż powyżej linii startu): 2 μ l próbki (P), po 2 μ l frakcji 0-8 i po 1 μ l wzorców aminokwasów (rysunek 1)
12. Po zakończeniu nanoszenia podnieś rękę w celu przekazania płytki asystentowi. Asystenci wykonają rozdział aminokwasów metodą chromatografii cienkowsarstwowej, a następnie przeprowadzą reakcję barwną z ninhydryną w celu wizualizacji aminokwasów. Uzyskany chromatogram zostanie umieszczony w odpowiednim miejscu w karcie odpowiedzi.



Rysunek 1. Wzór opisanania płytki chromatograficznej

W trakcie rozdziału chromatograficznego i barwienia płytki ninhydriną (około 25-30 minut) przystąp do rozwiązywania części B egzaminu.

Część B. Identyfikacja typu inhibicji reakcji enzymatycznej (10 pkt)

Rozwiązywanie poniższego zadania należy rozpocząć po przekazaniu asystentom płytki chromatograficznej z Części A egzaminu.

Wprowadzenie

Badano wpływ różnych związków chemicznych na aktywność enzymu. Stwierdzono, że jedna z badanych substancji (X) spowalnia aktywność enzymu. W celu stwierdzenia jakiego typu inhibicję wykazuje substancja X, zmierzono szybkość reakcji enzymatycznej z zastosowaniem różnych stężeń początkowych substratu (0,5 mM, 5 mM, 10 mM) przy braku, jak i w obecności substancji X. Reakcję prowadzono w objętości 2 ml, a postęp reakcji monitorowano poprzez pomiary absorbancji NADH (jeden z substratów reakcji) w czasie przy $\lambda = 340 \text{ nm}$. Dane pomiarowe przedstawiono w tabeli 1. Milimolowy współczynnik absorpcji dla NADH, $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Twoim zadaniem jest analiza danych pomiarowych w celu stwierdzenia jaki typ inhibicji wykazuje substancja X.

Aby poprawnie rozwiązać zadanie, należy wyznaczyć wartości parametrów kinetycznych K_M i V_{max} stosując metodę Lineweavera-Burke'a, będącą przekształceniem równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej (równanie prostej $y = ax + b$).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

gdzie: V_0 – szybkość początkowa reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]; V_{max} – szybkość maksymalna reakcji [$\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$]; $[S]_0$ – stężenie początkowe substratu [mM]; K_M – stała Michaelisa [mM].

Aby wyznaczyć szybkość początkową reakcji (V_0) na podstawie zmian wartości absorbancji, należy skorzystać z prawa Lamberta-Beera, a następnie dokonać odpowiednich przeliczeń w celu określenia szybkości początkowej reakcji w $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$.

Prawo Lamberta-Beera:

$$A = \epsilon Cl$$

gdzie: A – absorbancja roztworu przy danej długości fali [jednostka bezwymiarowa]; ϵ – milimolowy współczynnik absorpcji dla danego związku przy danej długości fali [$\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]; 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 B.1 (4 pkt)

Na podstawie danych z tabeli 1 w arkuszu zadań wyznacz szybkości początkowe (V_0) reakcji enzymatycznej dla różnych stężeń początkowych ($[S]_0$) substratu przy braku, jak i w obecności substancji X. Dokładność obliczeń: trzy miejsca po przecinku.

Zadanie B.2 (3 pkt)

Wykorzystując wyniki z zadania B.1 wykonaj wykresy Lineweavera-Burke'a dla reakcji enzymatycznej przy braku (linia ciągła), jak i w obecności (linia przerywana) substancji X. Dokładność obliczeń: jedno miejsce po przecinku.

Zadanie B.3 (3 pkt)

Wykorzystując wykresy Lineweavera-Burke'a z zadania B.2 wyznacz wartości K_M i V_{max} (z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) dla reakcji enzymatycznej przy braku, jak i w obecności substancji X, a następnie określ rodzaj inhibicji, który wykazuje substancja X.

Tabela 1. Zmiany wartości absorbancji w trakcie reakcji enzymatycznej w nieobecności (A) i z dodatkiem (B) substancji X.

(A) Reakcja bez substancji X

S_0 [mM]	Czas reakcji [min]						
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0,5 mM	0,878	0,851	0,823	0,796	0,769	0,742	0,714
5 mM	0,900	0,794	0,689	0,583	0,478	0,372	0,267
10 mM	0,890	0,755	0,620	0,484	0,349	0,214	0,079

(B) Reakcja w obecności substancji X

S_0 [mM]	Czas reakcji [min]						
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3
0,5 mM	0,800	0,787	0,774	0,760	0,747	0,734	0,721
5 mM	0,890	0,837	0,784	0,732	0,679	0,626	0,573
10 mM	0,920	0,858	0,795	0,733	0,671	0,608	0,546

Część B. Identyfikacja typu inhibicji reakcji enzymatycznej (0-10 pkt)**Zadanie B.1 (0-4 pkt)**

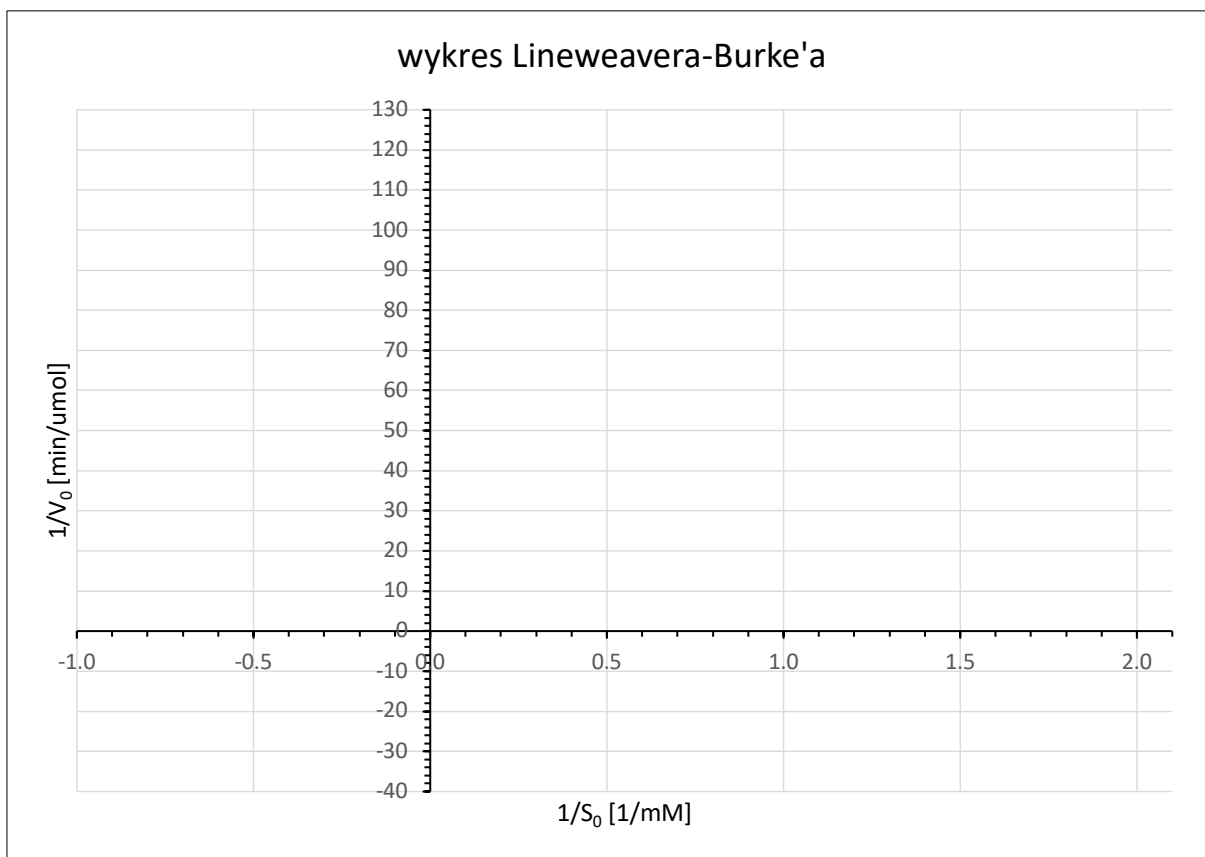
Na podstawie danych z tabeli 1 w arkuszu zadań wyznacz szybkości początkowe (V_0) reakcji enzymatycznej dla różnych stężeń początkowych ($[S]_0$) substratu przy braku, jak i w obecności substancji X. Dokładność obliczeń trzy miejsca po przecinku.

	$[S]_0$ [mM]	Δ Abs/min	V_0 [μ mol/min]
Bez substancji X	0,5		
	5		
	10		
W obecności substancji X	0,5		
	5		
	10		

Zadanie B.2 (0-3 pkt)

Wykorzystując wyniki z zadania B.1 wykonaj wykresy Lineweavera-Burke'a dla reakcji enzymatycznej przy braku (linia ciągła), jak i w obecności (linia przerywana) substancji X. Dokładność obliczeń jedno miejsce po przecinku.

	$[S]_0$ [mM]	$1/[S]_0$ [1/mM]	$1/V_0$ [min/ μ mol]
Bez substancji X	0,5		
	5		
	10		
W obecności substancji X	0,5		
	5		
	10		



Zadanie B.3 (0-3 pkt)

Wykorzystując wykresy Lineweavera-Burke'a z zadania B.2 wyznacz wartości K_M i V_{max} (z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku) dla reakcji enzymatycznej przy braku, jak i w obecności substancji X, a następnie określ rodzaj inhibicji, który wykazuje substancja X.

	Bez substancji X	W obecności substancji X
V_{max}		
K_M		

Substancja X wykazuje inhibicję
 (określ typ inhibicji jednym słowem)

BRUDNOPIS Obliczenia zamieszczone w brudnopisie nie będą oceniane.

