

## 54 Olimpiada Biologiczna

### Pracownia 201/A – arkusz zadań

**Czas trwania: 90 minut**

**Liczba punktów: 30**

Rozwiązując zadania, możesz korzystać z wymienionego poniżej oprogramowania:

- ApE,
- domyślne składniki systemu operacyjnego, np. kalkulator, notatnik.

W każdym zadaniu samodzielnie wybierz odpowiedni program lub programy. Metoda rozwiązania zadania nie będzie oceniana, tzn. liczy się wyłącznie końcowy wynik.

Odpowiedzi **zapisz w pliku „odpowiedzi.txt”**, w pustej linii pod numerem zadania.

#### Uwaga!

- **Nie dodawaj dodatkowych wierszy w pliku i nie dodawaj nowych znaków do niepustych wierszy.**
- **Nie zmieniaj nazwy pliku „odpowiedzi.txt”.**

*Fragment pliku „odpowiedzi.txt” przed udzieleniem odpowiedzi:*

Zadanie 1.1.:

Zadanie 1.2.:

*Fragment pliku „odpowiedzi.txt” po udzieleniu odpowiedzi:*

Zadanie 1.1.:

X

Zadanie 1.2.:

ACGT

W katalogu „sekwencje” znajdują się cztery sekwencje.

nazwa pliku	format	opis
NC_012920.gb	GenBank	całkowita sekwencja nukleotydowa mitochondrialnego DNA <i>Homo sapiens</i>
NG_063119.fasta	Fasta	sekwencja genu <i>TRMT5</i>
NM_020810.fasta	Fasta	sekwencja dojrzałego mRNA kodującego białko Trm5
pUC18.fasta	Fasta	sekwencja nukleotydowa wektora pUC18

Sekwencja mRNA zawiera T (tyminę) zamiast U (uracylu) ze względu na konwencję przyjętą do zapisywania sekwencji nukleotydowych stosowaną w analizach bioinformatycznych.

W Załączniku 1. umieszczono tabelę z aktywnością enzymów restrykcyjnych w zależności od buforu (A–D), w którym zachodzi reakcja.

### Wstęp do zadania 1.

Enzym Trm5 występujący u *Homo sapiens* katalizuje reakcję metylacji guaniny w pozycji 37. w różnych tRNA. Wykazano, że substratem reakcji metylacji jest mitochondrialny tRNA<sup>Pro</sup> – przenoszący prolinę.

Do badania aktywności enzymatycznej Trm5 jest niezbędna produkcja tRNA<sup>Pro</sup> *in vitro*.

Matrycą do transkrypcji *in vitro* jest wektor zawierający dwa elementy: (1) promotor dla polimerazy RNA z faga T7 (promotor T7) oraz (2) sekwencję genu tRNA<sup>Pro</sup>.

Konstrukt genetyczny będzie oparty na wektorze pUC18, którego miejsce ułatwiające klonowanie zostało przedstawione poniżej.

```
...TGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAA...
```

Zamówiono syntezę dwóch oligonukleotydów, które zostaną zmieszane w równym stosunku molowym, podgrzane do 95 °C, a następnie powoli schłodzone do temperatury pokojowej. Poddane hybrydyzacji oligonukleotydy będą promotorem T7 i zostaną wprowadzone do wektora pUC18 uprzednio strawionego enzymami restrykcyjnymi HindIII i PstI.

#### Zadanie 1.1. (2 pkt.)

Określ bufor, w którym **jednoczesne** trawienie wektora pUC18 enzymami HindIII i PstI zachodzi najwydajniej. W odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt” wpisz oznaczenie literowe buforu: A, B, C albo D.

Jeden z zamówionych oligonukleotydów ma następującą sekwencję:

5' AGCTTTAATACGACTCACTATACTGCA 3'

Podkreślono tę część sekwencji, która stanowi promotor T7.

#### Zadanie 1.2. (4 pkt.)

Podaj sekwencję drugiego oligonukleotydu, który został zamówiony. Sekwencję wpisz w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.

W pliku NC\_012920.gb w formacie GenBank znajduje się pełna sekwencja mitochondrialnego DNA. Przeanalizuj ją w programie ApE i znajdź gen tRNA<sup>Pro</sup>. Możesz to zrobić na dwa sposoby:

- W głównym oknie, w którym nad sekwencją nukleotydową znajduje się lista anotacji – w kolumnie „Feature” znajdź „tRNA-Pro”. W kolumnie „Direction” jest wskazany kierunek („>>>” oznacza, że element ten jest zlokalizowany w orientacji 5'→3', a „<<<” oznacza, że ten element leży w odwrotnej orientacji), a w kolumnie „Location” są wskazane pozycje reszt nukleotydowych odpowiadających genowi tRNA<sup>Pro</sup>.

- W menu **Features** → **List Features**. W nowo wyświetlonym oknie w kolumnie „Name” znajdź „tRNA-Pro”. W kolumnie „location” są pozycje reszt nukleotydowych odpowiadających genowi tRNA<sup>Pro</sup>. Jeśli są one opatrzone oznaczeniem „rev:” oznacza to, że element ten leży w odwrotnej orientacji.

Jeśli jest taka potrzeba, użyj funkcji dostępnych w menu **Edit**:

- **Cut, Copy i Paste** to – odpowiednio – „Wytnij”, „Kopiuj” i „Wklej”.
- **Cut Rev-Com, Copy Rev-Com i Paste Rev-Com** to – odpowiednio – „Wytnij”, „Kopiuj” i „Wklej”, które podczas wykonywania tej czynności zmieniają sekwencję na odwrotnie-komplementarną.
- **Reverse-Complement** to funkcja, która zmieni zaznaczoną sekwencję na odwrotnie-komplementarną.

### Zadanie 1.3. (2 pkt.)

**Podaj sekwencję genu tRNA<sup>Pro</sup>. Sekwencję wklej w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.**

Zaprojektuj startery, które umożliwią amplifikację genu tRNA<sup>Pro</sup>. Każdy ze starterów będzie zawierać trzy elementy (w kolejności od końca 5' do końca 3'):

- sekwencję 5' -AGATA-3', dzięki której miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny nie będzie położone bezpośrednio przy końcu startera
- sekwencję rozpozawaną przez enzym restrykcyjny
- sekwencję hybrydującą z matrycowym DNA.

Tzw. lewy starter (ang. *forward*) w całości (ze wszystkimi wymienionymi powyżej elementami) musi mieć długość 35 nukleotydów, a na jego końcu 3' musi być cytozyna.

### Zadanie 1.4. (2 pkt.)

**Podaj sekwencję części hybrydującej z matrycowym DNA lewego startera. Sekwencję wklej w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.**

Różnica temperatur topnienia części hybrydującej z matrycowym DNA lewego i prawego startera (ang. *reverse*) nie może być większa niż 0,5 °C. Temperaturę topnienia należy określić w głównym oknie programu ApE – pod oznaczeniem „Tm” wyświetla się temperatura topnienia sekwencji, która jest zaznaczona. Starter prawy musi mieć na końcu 3' resztę nukleotydową C albo G.

### Zadanie 1.5. (2 pkt.)

**Podaj sekwencję części hybrydującej z matrycowym DNA prawego startera. Sekwencję wklej w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.**

Wybierz dwa różne enzymy restrykcyjne, które będą użyte do przecięcia zarówno wektora zawierającego promotor T7, jak i produktu PCR. Wybrana para enzymów restrykcyjnych musi mieć wydajność trawienia 100% w jednym buforze.

**Zadanie 1.6. (2 pkt.)**

Określ bufor, w którym produkt PCR (zamplifikowany gen tRNA<sup>Pro</sup>) będzie poddany trawieniu enzymami restrykcyjnymi. W odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt” wpisz oznaczenie literowe buforu: A, B, C albo D.

**Zadanie 1.7. (4 pkt.)**

Podaj sekwencję całego lewego startera. Sekwencję wklej w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.

**Zadanie 1.8. (4 pkt.)**

Podaj sekwencję całego prawego startera. Sekwencję wklej w orientacji 5'→3' w odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie litery A, C, G lub T.

Kodon kodujący prolinę w kodzie genetycznym w mitochondrium człowieka to: 5' - CCA - 3'.

**Zadanie 1.9. (2 pkt.)**

Określ lokalizację antykodonu w obrębie cząsteczki tRNA<sup>Pro</sup>. W odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt” wpisz pozycję pierwszej reszty nukleotydowej antykodonu, stosując wyłącznie cyfry arabskie.

Enzym Trm5 jest kodowany przez gen *TRMT5*, zlokalizowany na chromosomie 14. Porównaj sekwencję nukleotydową genu *TRMT5* z sekwencją nukleotydową dojrzałego mRNA.

Przygotowanie przyrównania sekwencji:

1. Otwórz pliki Fasta w programie ApE.
2. Kliknij **Tools** → **Align sequences**.
3. Wybierz sekwencję referencyjną w postaci sekwencji genu *TRMT5* w menu **Reference sequence**.
4. Wybierz sekwencję dojrzałego mRNA w części **Align to Windows**.

*Uwaga: Wykonaj przyrównanie stosując domyślne ustawienia programu ApE.*

**Zadanie 1.10. (2 pkt.)**

Podaj liczbę eksonów genu *TRMT5*. Zapisz odpowiedź w odpowiednim miejscu w pliku „odpowiedzi.txt”, stosując wyłącznie cyfry arabskie.

Białko Trm5 ma masę około 58 kDa i składa się z 509 reszt aminokwasowych. Wykazano, że substytucja Arg291His zmieniająca argininę na histydynę w pozycji 291. sekwencji aminokwasowej Trm5 znacznie obniża aktywność katalityczną tego enzymu.

Znajdywanie otwartej ramki odczytu:

1. Otwórz plik Fasta w programie ApE.
2. Kliknij **ORFs** → **Find Next**.
3. Przyjmij, że najdłuższa otwarta ramka odczytu spośród znalezionych ulega translacji.

Translacja *in silico*:

1. Zaznacz myszką część sekwencji wyświetlonej w programie ApE, która ma być poddana translacji *in silico*.
2. Kliknij **ORFs** → **Translate**.
3. Jeśli chcesz uzyskać tylko sekwencję aminokwasową (bez numerów reszt aminokwasowych oraz sekwencji nukleotydowej) wybierz **None** w opcjach **Line Numbers** oraz **DNA**.

*Uwaga: Upewnij się w menu **Edit** → **Preferences** → **Analysis**, że wybrany kod genetyczny to „The Standard Code”.*

Wyświetlanie tabeli kodu genetycznego:

1. Kliknij **Help** → **Standard Genetic Code**.

#### Zadanie 1.11. (3 pkt.)

Określ lokalizację kodonu kodującego argininę 291 w sekwencji mRNA genu *TRMT5*. W odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt” wpisz pozycję pierwszej reszty nukleotydowej tego kodonu, stosując wyłącznie cyfry arabskie.

#### Zadanie 1.12. (1 pkt.)

Określ pozycję kodonu, która uległa mutacji skutkującej substytucją Arg291His. W odpowiednie miejsce w pliku „odpowiedzi.txt” wpisz pozycję w kodonie – 1, 2 albo 3 – stosując wyłącznie cyfry arabskie.

**Koniec treści arkusza egzaminacyjnego**

Możesz porównać strukturę pliku „odpowiedzi.txt” oraz „odpowiedzi\_przykład.txt”, żeby upewnić się czy plik zawierający Twoje odpowiedzi ma właściwą strukturę.

*Uwaga: Na kolejnej stronie znajduje się załącznik nr 1.*

## Załącznik 1.

nazwa enzymu	sekwencja 5'→3'	aktywność w stosunku do maksymalnej (%)			
		bufor A	bufor B	bufor C	bufor D
BamHI	G/GATCC	75*	100*	100	100*
EcoRI	G/AATTC	25	100*	50	50*
HindIII	A/AGCTT	25	100	50	50
KpnI	GGTAC/C	100	25	<10	100
PstI	CTGCA/G	75	75	100	50*

Oznaczenie \* świadczy o niespecyficznej aktywności enzymu restrykcyjnego względem rozpoznawanej i przecinanej sekwencji nukleotydowej.

Oznaczenie / określa miejsce przecięcia DNA w obrębie rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny palindromicznej sekwencji nukleotydowej.