

Ime Priimek:

Vprašanja: z dvema pravilnima odgovoroma so označena z zvezdico (*); drugače je pravilen samo en odgovor.

1. Po obarjanju proteinov z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lahko:

- a) Proteine v oborini raztopimo in naneseemo na afinitetno kolono.
- b) Proteini pri obarjanju izgubijo encimsko aktivnost, zato tudi, če jih raztopimo, ne moremo nadaljevati s kromatografijami.
- c) Proteine v oborini vedno zavržemo in nadaljujemo postopek izolacije s topnimi proteini.
- d) Proteine vedno raztopimo in dializiramo, nato nadaljujemo s postopkom izolacije.

2. Iz velike količine oborine pri encimskem testu na hemoglobin (Ansonovem testu) lahko sklepaš na:

- a) Premajhno količino saharoze
- b) Premajhno količino dodane trikloroacetne kisline
- c) **Majhno aktivnost encima**
- d) veliko količino peptidov in aminokislin v filtratu
- e) visoko absorbanco po dodatku Fast Garneta

3. Kaj ne vpliva na hitrostpotovanja proteina pri gelski elektroforezi?

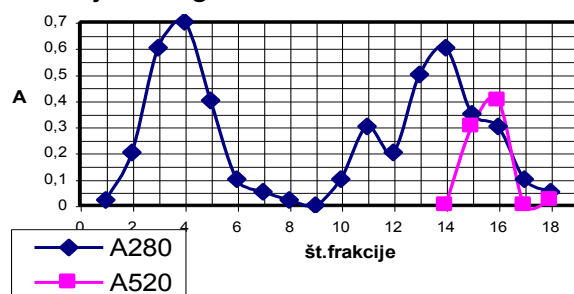
- a) Celokupni naboj proteina
- b) Velikost proteina.
- c) **Koncentracija proteina**
- d) Moč električnega polja
- e) Polarnost medija

4. Po izolaciji katepsina B na kationskem izmenjevalcu v pufru pH 5,0 z gradientno elucijo do 0,5 M NaCl in po encimskem testu vseh frakcij smo dobili sledeče meritve:

Št. Frakcije	Pufer A A ₂₈₀	A ₅₂₀	Št. frakcij e	Gradient A ₂₈₀	A ₅₂₀
1	0,02	0	10	0,1	0
2	0,2	0	11	0,3	0
3	0,6	0	12	0,2	0
4	0,7	0	13	0,5	0
5	0,4	0	14	0,6	0
6	0,1	0	15	0,35	0,3
7	0,05	0	16	0,3	0,4
8	0,02	0	17	0,1	0,1
9	0	0	18	0,05	0,02

Nariši elucijski diagram!

Elucijski diagram



5. Katere frakcije bi uporabili za nadaljevanje izolacije katepsina B?

15, 16, 17; predvsem 15 in 16

6. V katerih primerih lahko na ionskem izmenjevalcu ločimo proteina s pI=2,0 in pI=6,0, če nimamo gradientne posode?

- a) Kationski izmenjevalec, pH 1,0
- b) Anionski izmenjevalec, pH 7,0
- c) Kationski izmenjevalec, pH 8,5
- d) Anionski izmenjevalec, pH 8,5
- e) **Anionski izmenjevalec, pH 4,0**

7. Po agarozni elektroforezi po izolaciji kromosomske DNA iz bakterij smo pod UV svetilko na gelu videli le široko liso pri 200bp. Obkroži pravilni odgovor!

- a) **Zaradi prekratke inkubacije z lizocimom nismo izolirali kromosomske DNA, pač pa le RNA.**
- b) Pred elektroforezo smo v gel pozabili dodati EdBr.
- c) Pred elektroforezo smo v gel pozabili dodati bromfenol modro.
- d) V lizatni pufer smo pozabili dodati Triton X-100.

8. *Supernatant, ki ga dobimo po homogenizaciji goveje vranice in centrifugiranju, naneseemo na nativno PAGE. S katerimi metodami bi v gelu detektirali samo katepsin B?

- a) **Vzorci iz gela prenesemo na membrano, ki jo inkubiramo v raztopini radioaktivno označenih monoklonskih protiteles proti katepsinu B.**
- b) Barvanje s Coomassie Brilliant Blue.
- c) Barvanje s srebrom nitratom.
- d) **Gel inkubiramo v raztopini specifičnega substrata na katepsin B, ki nam da obarvan produkt.**

9. Primerjamo dve separacijski tehniki. Pri katerih dveh tehnikah dobimo zagotovo enako število vrhov oz. črt proteinov, če imamo zmes proteinov z naslednjimi lastnostmi:

pI	M (kDa)
3,0	30
7,0	70
7,0	30
4,8	30
7,0	100

- a) **Izoelektrično fokusiranje in gelska filtracija**
- b) Izoelektrično fokusiranje in NaDS-PAGE, če so proteini sestavljeni iz večih polipeptidnih verig brez disulfidnih vezi.
- c) Gelska filtracija in nativna PAGE.
- d) Nativna PAGE in izoelektrično fokusiranje.
- e) Gelska filtracija in NaDS-PAGE, če so proteini sestavljeni iz večih polipeptidnih verig brez disulfidnih vezi.

10. Kateri postopek bi uporabili za izolacijo jeder iz celic, ki rastejo v kulturi?

- a) Celice spiramo s pufrom in dodamo NaDS.
- b) Celice spiramo, homogeniziramo, centrifugiramo in dodamo NaDS.
- c) **Celice spiramo s pufrom, homogeniziramo, centrifugiramo in zavržemo supernatant.**
- d) Celice spiramo s pufrom, homogeniziramo, centrifugiramo in dodamo NaDS.
- e) Celice speremo s pufrom, homogniziramo, centrifugiramo in zavržemo usedlino.

11. Pri gelski kromatografiji vzorca dobimo dva elucijska vrhova, pri PAGE v prisotnosti NaDS tega vzorca pa vidimo tri lise. Kaj lahko sklepamo o proteinskem vzorcu?
- Imamo en protein iz treh polipeptidnih verig, pri čemer sta dve povezani z disulfidnimi vezmi.
 - Imamo en protein iz treh polipeptidnih verig brez disulfidnih vezi.
 - Imamo dva proteina, pri čemer je eden sestavljen iz dveh polipeptidnih verig.
 - Imamo dva proteina, pri čemer ima eden od obeh dve polipeptidni verigi povezani z disulfidnimi vezmi
 - Pri nativni elektroforezi bi dobili najmanj tri lise.
12. *Imamo mešanico dveh proteinov. Protein A je sestavljen iz treh podenot (vsaka z relativno molekulsko maso ($M_r=40000$), $pI = 6,3$, stabilen pa je pri pH 7-9. Protein B ima štiri podenote. M_r vsake je 30000, pI proteina B je 4,7, stabilen pa je pri pH 4-7,5. Za ločbo lahko uporabimo:
- Gelsko izključitveno kromatografijo;
 - Kationsko izmenjevalno kromatografijo pri pH 7,4;
 - Anionsko izmenjevalno kromatografijo pri pH 7,4;
 - Afinitetno kromatografijo z ligandom na podenoto z M_r 40000.
 - Preparativno izoelektrično fokusiranje pri gradientu pH 8-11
13. Obkroži pravilno trditev!
- Pri liofilizaciji uporabljamo celofansko membrano v obliki črevesa.
 - Dodatek suhega dekstrana v obliki kroglic povzroči dializo.
 - Vakuumska črpalka povzroči ultrafiltracijo.
 - Lizocim homogenizira bakterije.
 - Pri homogenizaciji izhodnega materiala potrebujemo membrano z določeno velikostjo por.
14. Rastopini, v kateri so 4 vrste proteinov (A močno hidrofobni, brez bazičnih aminokislin; B močno hidrofobni, brez tirozina; C močno hidrofilni, brez bazičnih aminokislin; D močno hidrofilni, brez tirozina), povišamo ionsko moč in odcentrifugiramo oborino. Nato proteine iz oborine ločimo z NaDS-PAGE in gel na hitro pobarvamo z Coomassie Brilliant Blue. Katere proteine intenzivno vidimo na gelu?
- A in B
 - C in D
 - A
 - B
 - C
 - D
15. *Kaj velja za afinitetno kromatografijo?
- Za elucijo je najbolj primerno uporabljati pufer z visoko ionsko močjo, ker je vzorec vezan vedno še z elektrostatskimi interakcijami.
 - Najboljšo ločbo dosežemo, če je protein, ki ga želimo izolirati, denaturiran.
 - Ligand je z šibkimi interakcijami vezan na nosilec.
 - Za izolacijo RNA, bi kot ligand lahko uporabili komplementarno nukleinsko kislino.
 - Tvorbo nespecifičnih interakcij navadno preprečimo z rahlo zvišano ionsko močjo.
16. Obkroži pravilno trditev!
- Topnost proteina je v izoelektrični točki največja.
 - Izolovanje je obarvanje proteinov pri visokem pH
 - Kromatografske metode uporabljamo za ločevanje proteinov.
 - Encimske teste uporabljamo za detekcijo encimov po NaDS elektroforezi.
17. S katerim postopkom smo med izolacijo kromosomske DNA iz jeder prekinili interakcije med DNA in histoni?
- suspendiranje odmrznjenih jeder v 15mM citratnem pufru.
 - Centrifugiranje 5 minut pri 5000 obr./min.
 - Suspendiranje usedline v 2 M NaCl.
 - Ekstrakcija v mešanici kloroform/izopropilni alkohol.
 - Dodatek 40 ml ledenomrzlega etanola.
18. Z »dot blot« metodo smo določali goveje IgG v kozjem siru. Pri pozitivni kontroli in vzorcu smo dobili vijolično obarvanje, negativne kontrole nismo naredili. Kaj lahko sklepamo?
- Kozji sir je bil pripravljen iz kravjega mleka.
 - Ker nismo naredili negativne kontrole, ne moremo ničesar trditi.
 - Kozji sir je vseboval vsaj malo govejih IgG.
 - Protitelesa proti govejim IgG so se vezala na vse goveje proteine.
19. Pri koncentraciji govejega pankreasnega tripsina $[E]_{cel} = 2 \times 10^{-6}$ mol/l in koncentraciji substrata BAPNA $[S] = 1 \times 10^{-4}$ mol/l je hitrost encimske reakcije $9,4 \times 10^{-8}$ mol/l. Kakšna je največja možna hitrost encimske reakcije, če je bila polovica maksimalne hitrosti dosežena pri $[S] = 1,5 \times 10^{-3}$ mol/l in $[E]_{cel} = 2 \times 10^{-6}$ mol/l?
- $1,5 \times 10^{-6}$ mol/l s
 - $3,0 \times 10^{-6}$ mol/l s
 - $4,5 \times 10^{-6}$ mol/l s
 - 10×10^{-6} mol/l s
 - 5,0 mol/l s
20. Čemu je enako število vseh purinov v dvoverižni DNA?
- Polovici števila pirimidinov,
 - Vsoti adeninov in timinov,
 - Dvakratnemu številu deoksi riboz,
 - Polovici števila vodikovih vezi med organskimi bazami,
 - Polovici števila fosfatov.