

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

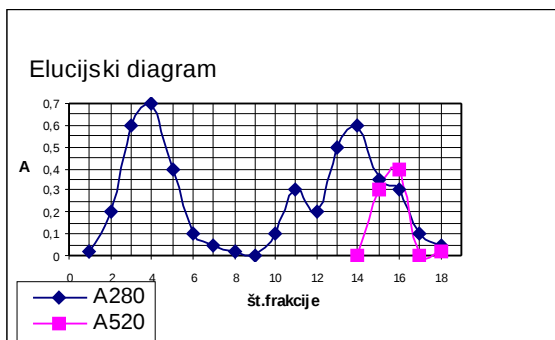
**3. Kaj ne vpliva na hitrostpotovanja proteina pri gelski elektroforezi?**

- 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<br>A <sub>280</sub> | A <sub>520</sub> | Št. frakcije | Gradient<br>A <sub>280</sub> | A <sub>520</sub> |
|--------------|-----------------------------|------------------|--------------|------------------------------|------------------|
| 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!



**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) Vzorce 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 srebrovim 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, homogeniziramo, 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.
  - Izoliranje 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
  - $10 \times 10^{-6}$  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.