

# N-trophy<sup>5</sup>

## Řešení biologie

Tým Maxwelllovo stříbrné kladivo  
Gymnázium, Brno, Vídeňská 47  
Eva Faltýnková; e.faltynkova@gmail.com  
Tereza Kadlecová; berunda.kadlecova@seznam.cz  
Jan Horáček; jan.horacek@seznam.cz

8. února 2015

## 1 Část I. - výstup ze sekvenátoru

### 1.1 Úvod

Při otevření zadání biologie nás po shlédnutí výstupu ze sekvenátoru zalili endorfiny a adrenalin zároveň. Vykoukla na nás část výstupu ze sekvenátoru a my museli rozluštit, jaký konkrétní protein kóduje. Skutečnost, že vyřešením se nám teprve otevře další objemné zadání, nás táhla kupředu a hnala naše mozkové buňky do akce.

### 1.2 Řešení

Náš první krok byl zcela jasný. Museli jsme daný výstup ze sekvenátoru vyjádřit jako sekvenci nukleotidů, čili v podobě písmen **A**, **C**, **G**, a **T** jdoucích za sebou. K tomu jsme využili legendu, které přiřazovala ke každé barvě ze sekvenátoru právě jedno z písmen. Jakožto lidští tvorové náchylní k chybě jsme výsledek několikrát překontrolovali a dospěli k následující sekvenci: **cgttctatagatacgcgatgacggtataccatccgcaaagt**.

Každé písmeno značí dusíkatou bázi (**a** - adenin, **c** - cytosin, **g** - guanin, **t** - thymin). Přítomností thyminu bylo zřejmé, že máme tu čest s DNA sekvencí, nikoliv s RNA, neboť tam bychom hledali uracil.

DNA, nositelka genetické informace, je polymer v podobě řetězce nukleotidů. Každý z nich se skládá z deoxyribózy (cukr), fosfátové skupiny a na ni navázané dusíkaté báze. Právě dusíkaté báze zajišťují spojení s druhým vláknem DNA pomocí vodíkových můstků a vytváří tak dvoušroubovici, kde vlákna DNA jsou navzájem antiparalelní - jedno jde tedy od 5' konce ke 3' konci a druhé od 3' konce k 5' konci.

Jak si ale tuto sekvenci správně vyložit? Jelikož byla zadána pouze část výstupu ze sekvenátoru, netušili jsme, jestli číst zleva či zprava, natož kde začíná nebo končí. Když uvážíme, že triplet, kterým je kódována aminokyselina, nemusí být na začátku hned tripletem, ale může se jednat pouze o jednu nebo dvě báze za sebou, vychází nám z toho 3 možnosti posunu. Dále musíme brát v potaz čtení vlákna zleva doprava a obráceně, tím se naše možnosti zvyšují na šest.

Abychom se neupsali k smrti, využili jsme chytrý translator <http://web.expasy.org/translate/>. Dle našeho očekávání jsme dostali vyhodnocení v podobě 3 čtecích rámců (další tři rámce značí komplementární vlákno k tomu původnímu), viz obrázek 1.

5'3' Frame 1 RSIDTR <b>Stop</b> RYTIRK	3'5' Frame 1 TLR <b>Met</b> VYRHRVSIE
5'3' Frame 2 VL <b>Stop</b> IRDDGIPSAK	3'5' Frame 2 LCGWYTVIAYL <b>Stop</b> N
5'3' Frame 3 FYRYA <b>Met</b> TVYHPQS	3'5' Frame 3 FADGIPSSRIYRT

Obrázek 1: Možné čtecí rámce

Čtecí rámce nám určují, odkud bychom začali tripletu číst. V našem případě hledáme tzv. otevřený čtecí rámec, který je ohraničen specifickými kodony - iniciační a terminační. Přítomnost iniciačního kodonu (methionin), kterým začíná v ribozomu proteosyntéza, zajistí správné přečtení tripletů.

Vybereme tedy jeden z otevřených čtecích rámců (označeny červeně) — je jedno který, vlákna jsou navzájem antiparalelní na základě komplementarity bází, tudíž musí kódovat stejný protein. Písmena představují jednotlivé aminokyseliny, kterými je protein kódován.

Dále do databáze <http://web.expasy.org/blast/> (databáze provozována Švýcarským institutem bioinformatiky) zadáme náš čtecí rámec v *RAW* formátu - *MTVYHPQS* - forma zápisu proteinu (jeho aminokyselin) jen pomocí velkých písmen. No a máme hotovo! Databáze úspěšně vyhodnotila stoprocentní shodu, a to s enzymem *pullulanáza*.

U varianty čtení zprava doleva jsme se shody se záznamy v databázi nedočkali.

Pozn.: Správného řešení se můžeme dovtípit i snadnější cestou. Do některých typů databáze není třeba zadávat již otevřené čtecí rámce, nýbrž celý DNA kód a databáze sama vyhodnotí, jak tripletu číst (např. <http://www.uniprot.org/blast/>).

Pozn.: K datu 6.2.2015 jsme zjistili, že daná databáze z odkazu <http://web.expasy.org/blast/> již pracuje na principu vložení DNA sekvence z nukleotidů a rovnou vyhodnotí výsledek podobně jako <http://www.uniprot.org/blast/>. Nutno tedy podotknout, že k našemu výsledku jsme dospěli již 31.1.2015 a tehdy ještě databáze vyhledávala postupem popsaným výše. Během týdne byla předělávána a nebylo možné v ní vyhledávat. Nyní už nově funguje přímo se zadáním nukleotidové sekvence.

### 1.3 Závěr

I když byl tento úkol v podstatě jen "předúkolem" či klíčem k následujícímu testování vzorků, jeho řešení jsme si užili a něco i přiučili - vyhledávání v proteinových databázích. Zajímavé bylo i zjištění, co vše se o proteinech v databázích můžeme dozvědět.

## 2 Část II. - testování vzorků na amylázu

### 2.1 Odpovědi na zadané otázky

#### 2.1.1 K čemu amyláza slouží? Co je substrátem tohoto enzymu?

Jedná se o enzym, který katalyzuje hydrolytické štěpení  $\alpha$  glykosidových vazeb. Jeho substráty tedy mohou být škrob, glykogen a příbuzné polysacharidy a oligosacharidy. V našem případě jím bude škrob.

#### 2.1.2 Jaký je princip reakce důkazu amylázy za použití povolených pomůcek?

Jak už z předchozí otázky vyplývá, amyláza (ve vzorcích) bude katalyzovat štěpení škrobu a postupně jej rozkládat na kratší řetězce tvořené *D-glukózovými jednotkami* až dostaneme konečný produkt - disacharid *maltosa*.

Pokud tedy smícháme škrob s našimi vzorky, reakce proběhne pouze za přítomnosti amylázy.

Její přítomnost (resp. přítomnost škrobu) ověříme roztokem jódu. Škrob se skládá ze dvou složek - amylopektinu a  $\alpha$ -amylózy, jejíž strukturou je dvoušroubovice. Jód má tu vlastnost, že se dokáže do této dvoušroubovice začlenit a ve výsledku tak barevně indikovat přítomnost škrobu.

O funkci želatiny v zadání jsme dlouho přemýšleli, nakonec jsme došli ke dvěma možnostem jejího využití.

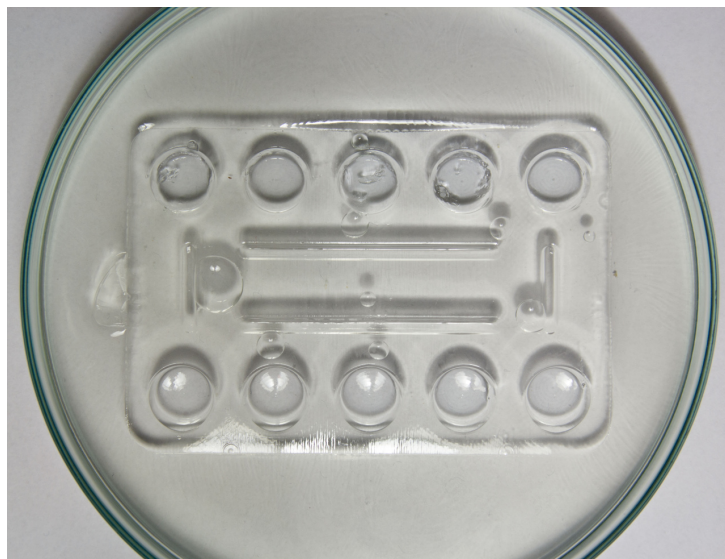
1. Želatinu lze využít jako netečné prostředí, které oddělí jednotlivé vzorky (např. v petriho misce).
2. Želatinu lze využít pro tzv. imobilizaci proteinů. V takovém případě by želatina fungovala jako nosič, jejíž pórovitý materiál dovolí substrátům volně procházet, ale enzym zůstane zachycen. V konečném důsledku dojde ke zvýšení aktivity, selektivity a stability enzymu.

Obě metody jsme vyzkoušeli a došli jsme k závěru, že výsledky vycházejí totožně – efekt imobilizace byl nerozpoznatelný. Pro ostré experimenty jsme se tak rozhodli substráty do želatiny nezalévat, tzn. nevyužít želatinu pro imobilizaci enzymů a to především z toho důvodu, že nám přišla možnost 1) snáze dokumentovatelná.

#### 2.1.3 Jaký postup jste zvolili?

##### 1. Příprava prostředí pro testování

- (a) Pro vytvoření netečného prostředí z želatiny jsme koupili čistou želatinu v prášku na aspiky.
- (b) Dle receptu jsme želatinu "uvařili" a nalili do petriho misek.
- (c) Na ještě neztuhlou želatinu jsme položili plato od tablet lícem dolů a nechali ztuhnout v lednici.
- (d) Po ztuhnutí jsme opatrně plato odejmuli a vytvořily se nám tak "chlívečky", ve kterých jsme vzorky později testovali.



Obrázek 2: Připravená Petriho miska

## 2. Škrobový maz

- (a) Ve 100 *ml* destilované deionizované vody jsme rozpustili 0.5 *g* kuchyňského škrobu (solamyl).
- (b) Roztok jsme zahřáli nad plamenem, kvůli zvětšení plochy škrobu a tudíž zvýšení jeho reaktivnosti. Získali jsme tak škrobový maz.
- (c) Po jeho zchlazení jsme jej otestovali jednou kapkou jodisolu a tmavě modrým zbarvením tak ověřili přítomnost škrobu.

## 3. Příprava vzorků

- (a) Pro zpracování pevných vzorků jsme využili třecí misku.
- (b) Z každého vzorku jsme odměřili 10 *ml* do zkumavky a přidali 2 *ml* škrobového mazu. Záměrně jsme smíchali velké množství vzorku s poměrně malým množstvím škrobu, aby případná amyláza zvládla všechny škrob bezpečně rozštěpit.
- (c) Dle potřeby jsme ke vzorkům přikápli destilovanou vodu, abychom získali dávkovatelný roztok.
- (d) Ve zkumavkách jsme vše řádně promíchali.



Obrázek 3: Vzorky připravené k testování

#### 4. Ohřev vzorků

- Protože amyláza je nejvíce aktivní při  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ale při  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  už se inaktivuje, napustili jsme do Dewarovy nádoby co nejteplejší kohoutkovou vodu ( $50 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Kvůli inaktivaci jsme nechtěli riskovat ohřev nad plamenem.
- Poté jsme do nádoby, která zajistí tepelnou izolaci, vložili na 15 minut vzorky ve zkumavkách.
- Během ohřevu, jsme zkumavky ještě protřepali.



Obrázek 4: Vzorky v Dewarově nádobě

#### 5. Testování

- Do každé petriho misky jsme umístili vlastní nulovací vzorky pro srovnání barev:
  - destilovaná voda + jedna kapka jodisolu

- škrobový maz + jedna kapka jodisolu
- (b) Tekuté vzorky jsme napipetovali, hustější nalili přímo ze zkumavky do "chlívečků" na petriho miskách.
- (c) Každý ze vzorků jsme otestovali jednou kapkou jodisolu a vyhodnotili, zda amylázu obsahuje či nikoliv.
- (d) Fotografie jsme pořizovali před a hned po přidání jodisolu.

#### 2.1.4 Jak jste určili, zda vzorek amylázu obsahuje?

Pokud vzorek amylázu obsahoval, dokázal námi přidaný škrobový maz rozštěpit. Po přidání jódu tedy neindikoval modré zbarvení.

Pokud vzorek amylázu neobsahoval, nemělo námi přidaný škrobový maz co rozštěpit a škrob tak tedy zůstal nezměněn. V tomto případě se jód mohl začlenit do šroubovice jedné ze složek škrobu (viz otázka druhá) a indikovat tak jeho přítomnost tmavě modrým zbarvením.

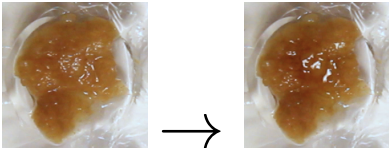

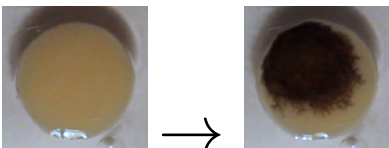
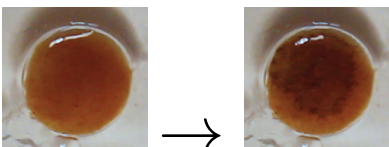
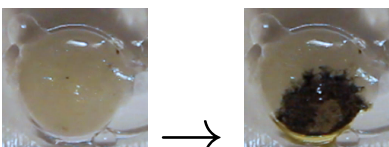
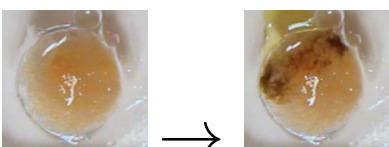
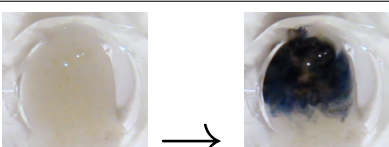
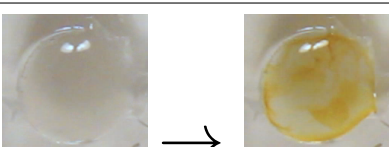
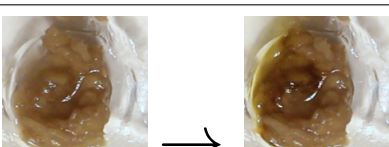

## 2.2 Výsledky měření

Pro srovnání nejprve uvádíme na obrázcích 5b a 5c barvy nulovacích vzorků.



Obrázek 5: Nulovací vzorky pro srovnání barev



Testovaný vzorek	Fotografie	Amyláza
banánová slupka		ano
suchá kukuřice		viz poznámky
dětský piškot		ne
kečup		ne
sušený banán		ne
rajče		ne
chleba		ne
sliny		ano
vnitřní strana slupky brambory		ano
mléko		ano

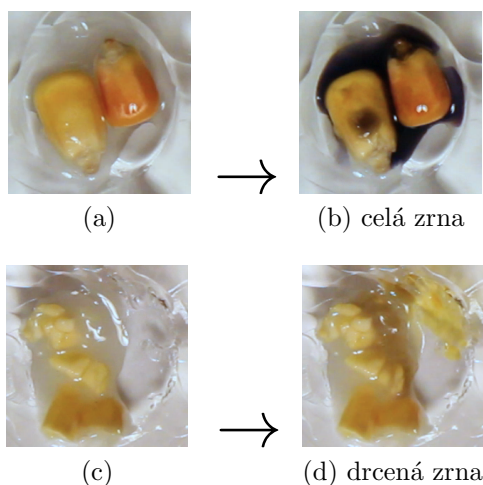
Tabulka 1: Výsledky měření

## 2.3 Poznámky

### 2.3.1 Banánová slupka

- K testování byl použit běžný banán ze supermarketu.

### 2.3.2 Suchá kukuřice



Obrázek 6: Zajímavé výsledky reakce kukuřice

- K testování kukuřice jsme použili suchou kukuřici ze zverimexu, určenou pro spotřebu zvířat.
- Zkoušeli jsme testovat jak celá zrna, tak zrna podrcená. U celých zrn byla nepřítomnost amylázy jasně znatelná (viz fotografie 6b). Naopak u podrcené kukuřice je viditelný výsledek opačný (viz fotografie 6d). Myslíme si tedy, že suchá kukuřice amylázu obsahuje pouze uvnitř, amyláza však není schopná prostoupit přes vnější membránu kukuřice a rozštěpit tak škrob.

### 2.3.3 Dětský piškot

- K experimentu jsme použili klasické dětské piškoty.

### 2.3.4 Kečup

- Jako vzorek jsme použili kečup vlastní výroby (od Honzových prarodičů).
- Méně prokazatelný vzorek, zbarvení není příliš znatelné.

### 2.3.5 Sušený banán

- K ověření amylázy jsme zakoupili pytlík sušených banánů v Albertu.

### 2.3.6 Rajče

- Použili jsme běžná rajčata z Albertu, ze kterých jsme vyrobili roztok. Do roztoku jsme vkládali především dužinu (nikoliv slupku).



### 2.3.7 Chleba

- Jako vzorek jsme použili běžný chleba z Kauflandu.
- Chleba byl před experimentem mražený.
- Jedná se o jeden z nejprůkaznějších vzorků ze série.

### 2.3.8 Sliny

- Jeden z nejprokazatelnějších vzorků, není potřeba další komentář.

### 2.3.9 Vnitřní strana slupky brambory

- Jako vzorek jsme použili běžnou bramboru ze supermarketu.
- Slupky brambory jsme se snažili krájet co nejtenčí, abychom dostali opravdu jen slupku.
- Ve vzorku se mohl objevit škrob z "vnitřku" brambory, tudíž škrob mohl, oproti ostatním vzorkům, v tomto vzorku přebývat. Proto se může zdát, že je vzorek mírně namodralý.

### 2.3.10 Mléko

- K pokusu jsme použili čerstvé mléko z mlékomatu, abychom předešli případné ztrátě funkčnosti amylázy při tepelném procesu pasterizace (inaktivace amylázy při 80 °C).
- Jednoznačně prokazatelný vzorek.

## 3 Závěr

Testování amylázy pro nás bylo více než zajímavé. Při řešení jsme se něco naučili i pobavili a nakonec se i radostně zasmáli a plácli si nad naším hotovým dílem. Třeba když jsme zalévali petriho misky želatinou a poté netrpělivě vyčkávali u ledničky, vypadali jsme jako starostliví rodiče, koukající na své děťátko v inkubátoru. To jste nás měli vidět!

Celá biologická část vyžadovala spoustu nápaditých myšlenek, ale od toho je to přece experiment. Vymyslíš, zkusíš, ověříš. Koneckonců i nás samotné překvapily některé výsledky, např. slupka od banánu či brambory.

## 4 Poděkování

- Blance Loupancové za konzultace.
- Profesorkám Olze Langerové a Aleně Novosadové za zpřístupnění školní chemické laboratoře a později za vypůjčení laboratorních pomůcek.

Na závěr přidáváme společnou fotografii.

