

OLIMPIADA LA BIOLOGIE
etapa republicană, 24 – 27 martie 2023

PROBA PRACTICĂ

Timp de lucru: 240 minute

Mult succes!

Stimați participanți! Proba practică conține patru lucrări de laborator.

Pentru realizarea fiecărei lucrări de laborator veți avea la dispoziție 60 de minute. La expirarea timpului rezervat veți fi transferați de către însoțitori în laboratorul următor.

Fiecare item este apreciat cu un anumit număr de puncte. Numărul total de puncte este de 200. Scrieți răspunsurile solicitate în lucrare. Lucrarea se completează **numai cu pixul cu cerneală albastră sau violetă și nu trebuie să conțină nici un semn auxiliar!** Lucrările ce nu corespund cerințelor pot fi respinse de către Juriu.

În ultimul laborator prezentați lucrarea supraveghetorului și semnați în tabelul de participare.

Lucrarea de laborator 1 (430)

BIOLOGIA VEGETALĂ (50 puncte)

I. Anatomia plantelor (22 puncte)

1. Efectuați un preparat temporar din materialul propus și studiați-l la microscop (2p.)
2. Selectați, din figurile propuse mai jos A, B, C, pe cea corespunzătoare preparatului studiat și scrieți litera respectivă în locul rezervat (5 p.).

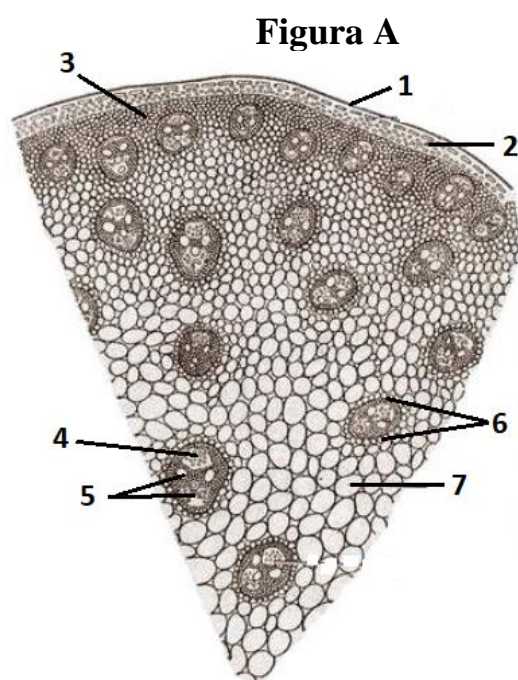


Figura B

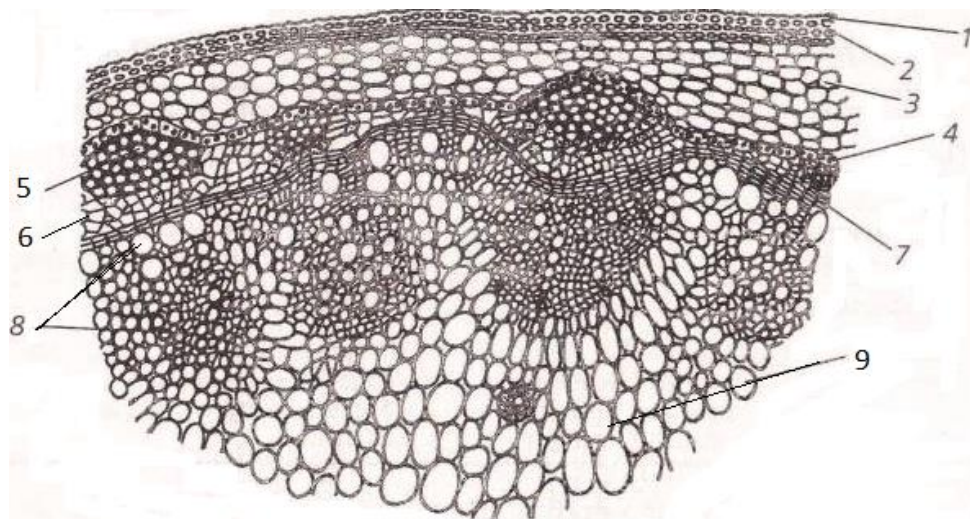
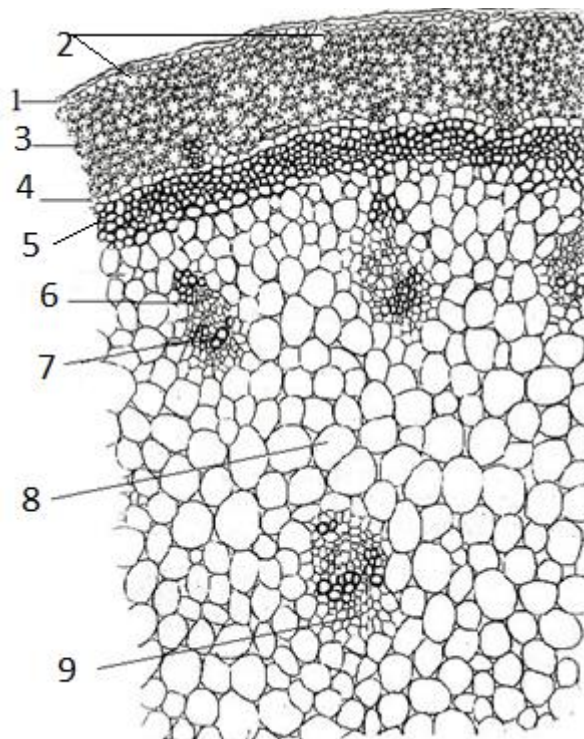


Figura C



Preparatului corespunde Figura _____

3. Prezentați denumirea preparatului, completând lacunele din text cu literele corespunzătoare din variantele propuse mai jos (5 p.)

Denumirea preparatului: Secțiune _____ prin _____ speciei _____, din familia _____, clasa _____

A – Poaceae, M - longitudinală, E - Liliopsida (monocotiledonate), G - Helianthus annuus (floarea soarelui), J – Liliaceae, B - rădăcina, F - Iris germanica (stângenel), I – Magnoliopsida (dicotiledonate), D - tulpina, R – Iridaceae, C – Zea mays (porumb), N - transversală, O – Cucurbita pepo (bostan), P – Asteraceae.

4. Explicați structura organului, alegând variantele corecte din cele propuse mai jos. Completați tabelul cu literele corespunzătoare din variantele propuse mai jos (9 p.).

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.

Structura organului: **A** – endodermă, **B** – clorechimul, **C** – parenchimul fundamental, **D** – epidermă, **E** – sclerenchimul periciclului, **F** – floem, **G** – parenchimul periciclului, **H** - cambiu intrafascicular, **K** – xilem, **L** – colenchim, **M** – periderma, **N** – cambiu interfascicular **O** – teaca sclerinchimatică a fasciculului, **P** – stomate.

5. Numiți tipul fasciculului conducător indicând în locul rezervat litera respectivă din variantele propuse mai jos (1 p.)

M – colateral deschis, **N** – colateral închis, **R** – bicolateral deschis.

II. Sistematica și morfologia plantelor (28 puncte)

Studiați fructele propuse și completați tabelul, folosind cifrele și literele corespunzătoare din seriile de mai jos. Câte 0,5 puncte pentru fiecare răspuns corect (28 p.):

Nr. fructului	Tipul fructului	Caracterele specifice ale fructului		Planta, la care se referă acest fruct
		Numărul de semințe	Consistența pericarpului	
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				
11.				
12.				
13.				
14.				

TIPUL FRUCTULUI:

polifoliculă - **A**, nucleă - **B**, drupă - **C**, păstaie - **D**, bacă - **E**, ghindă - **F**, silicvă - **G**, fructul fals poamă (măr) - **H**, capsulă - **M**, hesperidă - **N**, samară - **O**, cariopsă - **L**, peponidă - **K**, polidrupă - **V**, achenă - **X**, siliculă - **P**.

CARACTERELE SPECIFICE ALE FRUCTULUI:

- după numărul de semințe: monosperm - **M**, polisperm - **P**.

- după consistența pericarpului: cărnos - **C**, uscat - **U**.

PLANTA, LA CARE SE REFERĂ ACEST FRUCT:

1 – Alun obișnuit, 2 - Gutui, 3 – Pana zburătorului, 4 – Lămâi, 5 - Floarea soarelui, 6 – Nuc, 7 – Magnolie, 8 – Kiwi, 9 – Dovleac, 10 – Frasin, 11 – Salcâm boieresc (glădiță), 12 – Bumbacul, 13 – Zizifus (jujuba, curmal chinezesc), 14 – Porumb.

Lucrarea de laborator 2 (432)
Ecologie și Etologie (50 puncte)
1. ETOLOGIE

Atenției Dumneavoastră se propune un videoclip în care sunt reprezentate diferite interrelații dintre organisme. Vizualizați videoclipul. Înscrieți în tabelul pentru răspunsuri – la subdiviziunea ”Cifrele secvențelor din videoclip” doar cifrele ce corespund secvențelor respective. **Pentru fiecare răspuns corect se acordă câte 1 punct.**

La subdiviziunea ”Tipul interrelațiilor (0 / + / -)” – înscrieți combinațiile respective de simboluri ce determină interrelația respectivă. **Pentru fiecare combinație corectă de simboluri se acordă câte 1 punct.**

(Pentru detalii consultați prezentarea PowerPoint de pe ecranul calculatorului!)

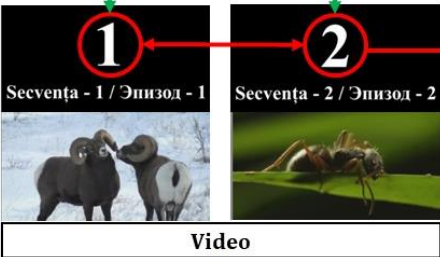
Total – 25 puncte.

Вашему вниманию предлагается просмотреть видеоклип, в котором продемонстрированы различные взаимоотношения между организмами. Просмотрите видео. Внесите в таблицу для ответов - в подраздел "Номера эпизодов из видеоклипа" только те цифры, которые соответствуют последовательностям из видеоклипа. **За каждый правильный ответ начисляется 1 балл.**

В подразделе «Характер взаимоотношений (0 / + / -)» введите соответствующие комбинации символов, определяющие соответствующую взаимосвязь. **За каждую правильную комбинацию символов начисляется 1 балл.**

Всего – 25 баллов.

Indici pentru completarea foii cu răspunsuri / Указания по заполнению листа ответов



1 **2**

Secvența - 1 / Эпизод - 1 Secvența - 2 / Эпизод - 2

Video

Cifrele secvențelor din videoclip
Номера эпизодов из видеоклипа

Fiecare secvență din videoclip este numerotată. Cifrele (1, 2, 3 ...) se înscriu în celule separate. Каждая последовательность в видео пронумерована. Числа (1, 2, 3 ...) вводятся в отдельные ячейки.

Câte un punct pentru fiecare răspuns
По одному баллу за каждый ответ

Caracterul interrelațiilor
Характер взаимоотношений (0 / + / -)

Fiecare interrelație poate fi reprezentată prin combinații de simboluri "+, -, 0". Inserați combinația respectivă în celulele de mai jos. Каждая взаимосвязь может быть представлена комбинациями символов «+, -, 0». Вставьте соответствующую комбинацию в ячейки.

Câte un punct pentru fiecare combinație
По одному баллу за каждую комбинацию

Interrelații / Взаимоотношения							
A	Mutualism / Мутуализм	1	2	5			- +
B	Protocooperare / Протокооперация	9	13				0 +
C	Comensualism / Комменсализм	4					+ 0

Foaia pentru răspunsuri / Лист для ответов

	Interrelații Взаимоотношения	Cifrele secvențelor din videoclip Номера эпизодов из видеоклипа	Tipul interrelațiilor Характер взаимоотношений (0 / + / -)
A	Mutualism / Мутуализм	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
B	Protocooperare / Протокооперация	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
C	Comensualism / Комменсализм	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
D	Entoikia / Энтойкия	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
E	Epioikia / Эпиойкия	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
F	Paroikia / Паройкия	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
G	Predatorie / Хищничество	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
H	Parazitism / Паразитизм	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>
I	Concurență / Конкуренция	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>

2. ECOLOGIE (25 puncte)

1. În solul arabil, numărul de râme depistate pe 6 suprafețe de cercetare, fiecare cu dimensiunea de 50 cm pe 50 cm, a fost de 70 de exemplare. După aplicarea erbicidului pentru combaterea buruienilor, s-au făcut cercetări pe 9 dintre aceleași tip de suprafețe și s-au găsit în total 30 de râme. Care este densitatea populației pe metru pătrat înainte și după aplicarea erbicidului? (Atenție!!! Este necesar să prezentați calculele care au generat răspunsurile Dră)

1.1. Calculul densității populației înainte de administrarea erbicidului (3 puncte)

1.2. Calculul densității populației după administrarea erbicidului (3 puncte)

2. În figura de mai jos se prezintă curba de crește a 2 populații de alge. În baza rezultatelor prezentate calculați viteza de modificare a populației la fiecare interval de timp și dați o caracteristică succintă a acestor populații (viteza de modificarea populației calculați-o folosind formula dN/dt , unde dN -numărul de indivizi (mii), iar dt – intervalul de timp analizat). (Atenție!!! Este necesar să prezentați calculele care au generat răspunsurile Dră)

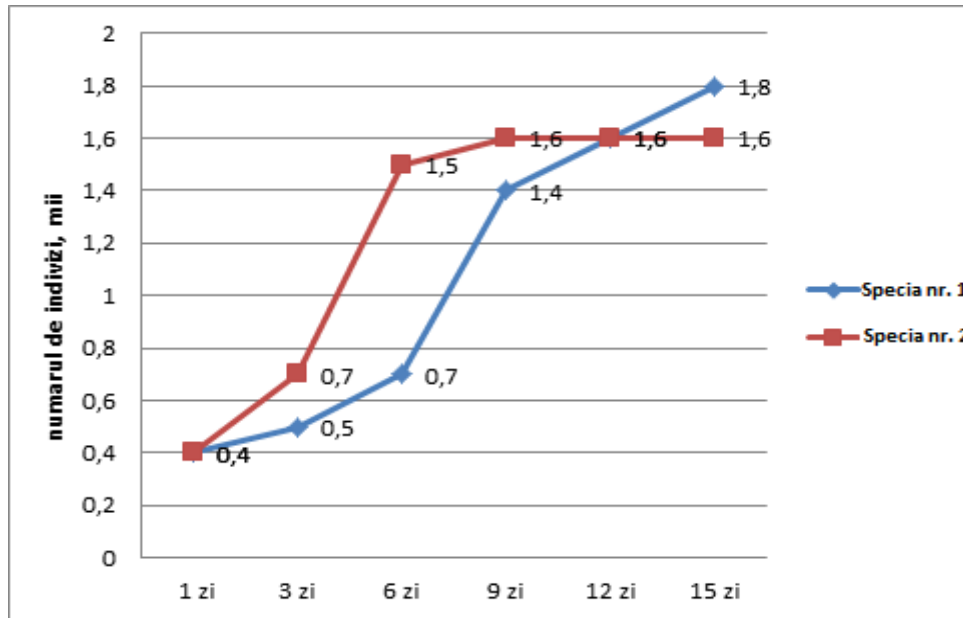


Fig. Curba de crește a 2 populații de alge

2.1. Calcularea vitezei de modificare a populației la intervalele de timp selectate. (15 puncte)

Speciile	Perioada analizată				
	1-3 zi	3-6 zi	6-9 zi	9-12 zi	12-15 zi
Viteza de modificare a populației pentru Specia nr. 1					
Viteza de modificare a populației pentru Specia nr. 2					

2.2. Caracteristica speciilor după particularitățile curbelor de creștere. (4 puncte)

Caracteristica curbei de creștere a populației nr. 1 :

Caracteristica curbei de creștere a populației nr. 2:

Lucrarea de laborator 3 (525)

BIOCHIMIA ȘI BIOLOGIA MOLECULARĂ (50 puncte)

I. DETERMINAREA UNOR HORMONI (25 puncte)

Hormoni (grec. *hormon* = a excita) se numesc substanțe secretate în cantități mici de **glande** (glande secretoare) **endocrine** (*endo*= interior, *crine* = a secreta), sunt deversate în sânge sau limfă și exercită acțiuni reglatoare în „**celulele țintă**” ale altor țesuturi și organe ale vertebratelor. Sistemele nervos și endocrin acționează coordonat: mențin homeostazia mediului intern și reglează legătura reciprocă dintre funcțiile diverselor organe asigurând integritatea și activitatea vitală ale organismului.

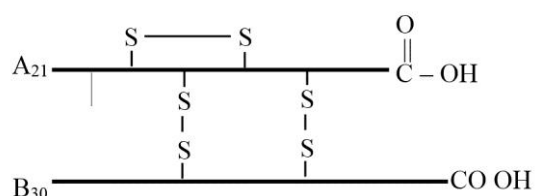
Hormonii se clasifică după glandele endocrine care îi sintetizează, după efectul fiziologic și după structura chimică.

După structura chimică se disting:

- ❖ *hormoni proteo-peptidici*,
- ❖ *hormoni steroidici*
- ❖ *hormoni derivați ai unor aminoacizi*.

Hormoni proteo-peptidici.

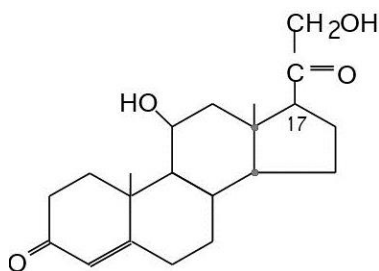
Insulina se sintetizează în pancreas de anumite celule ale **insulelor Lanherhans** (*insula* = insulă). Acest hormon reglează utilizarea glucozei de către organism prin activarea **hexokinazei**, care catalizează fosforilarea glucozei în G-1-P, proces necesar pentru includerea glucozei în glicogen și frânării procesului de **gluconeogeneză**.



Hormoni steroidici.

Denumirea de hormoni corticosteroidici atestă localizarea biosintezei lor (*cortico* = stratul periferic) al suprarenalelor și a naturii chimice – steroidică.

Toți hormonii corticosteroidici în poziția 17 conțin o grupare cetolică, care posedă capacitate înaltă reducătoare, singură oxidându-se în grupare carboxilică.



Se disting: **glucocorticoizi** – reglează utilizarea glucozei, proteinelor și lipidelor, **mineralocorticoizi** – a apei și sărurilor minerale.

Hormoni derivați ai unor aminoacizi.

Adrenalina se sintetizează în celulele stratului medular al **suprarenalelor** (*ad* = **supra**, *renum* = **rinichi**).

Prin administrare de adrenalină are loc contracția capilarelor pielii, a mucoaselor și intestinului și creșterea tensiunii arteriale. Vasele cordului și ai mușchilor sub influența adrenalinei, din contra, se dilată și activitatea lor sporește. Adrenalina provoacă relaxarea mușchilor bronhiilor (se utilizează în astmul bronșic) și ai intestinelor, precum și dilatarea pupilei.

Adrenalina se oxidează ușor chiar și de oxigenul din aer.



Natura chimică a acestor hormoni poate fi identificată prin următoarele reacții.

1. Reacții ce atestă natura proteică a insulinei

La 10 picături soluție de insulină (conținutul fiolei diluat 1:100 cu H₂O) se adaugă 5 picături soluție de NaOH 10% și o picătură de CuSO₄ 1%. Se agită. Soluția de insulină se **colorează în albatru-violet**, ceea ce denotă prezența legăturilor peptidice.

2. Reacția de identificare a hormonilor corticosteroidici.

La 5 picături soluție *Fehling I* se adaugă 5 picături soluție *Fehling II*, se aduce la fierbere și se adaugă 10 picături soluție alcoolică de hormon corticosteroid (*cortizon acetat* 20 μg/ml în etanol). Se formează un **precipitat roșu-portocaliu**.

3. Reacții de identificare a adrenalinei.

La 3 picături soluție de adrenalină (conținutul fiolei diluat de 1:100) se adaugă 1 picătură soluție FeCl₃ 10%. Apare o **colorație verde de smarald**, care după puțin timp trece în galben. La adăugarea unei picături soluție NH₄OH concentrat sau NaOH 10%, colorația repede se transformă în **roșu-vișiniu**, apoi **cafeniu**. Reacția se datorează nucleului pirocatehinic [C₆H₄(OH)₂] care formează cu ionii de Fe³⁺ compuși de tipul fenolaților de fier.

Sarcina de lucru:

Vi se propun 3 soluții, ce conțin hormoni (soluția nr. 1; soluția nr. 2; soluția nr.3). Luați alicote și efectuați reacțiile de identificare a naturii chimice a hormonilor (descrise mai sus) pentru a identifica ce tip de hormon aveți în fiecare din soluții.

Realizați activitățile descrise mai jos și prezentați la finele fiecărui experiment concluziile după modelul propus.

Concluzii: În soluția nr.1 am identificat hormonul _____;
în soluția nr.2 am identificat hormonul _____;
în soluția nr.3 am identificat hormonul _____.

Mod de lucru:

Vi se propun 3 soluții, ce conțin hormoni (soluția nr. 1; soluția nr. 2; soluția nr.3).

a) Determinarea adrenalinei (12 puncte)

Se iau 3 eprubete. În eprubeta I se picură 10 picături de soluție nr. 1, în eprubeta a II – 10 picături de soluție nr.2; în eprubeta a III – 10 picături de soluție nr.3 și cu conținutul tuturor eprubetelor se efectuează reacția de identificarea a adrenalinei.

În toate 3 eprubete se adaugă 1 picătură soluție FeCl₃ 10%. Apare o colorație verde de smarald, care după puțin timp trece în galben. La adăugarea unei picături soluție NH₄OH concentrat sau NaOH 10%, colorația repede se transformă în roșu-vișiniu, apoi cafeniu.

Prin urmare, soluția care se va colora în roșu-vișiniu, apoi cafeniu conține adrenalină.

Concluzie: În soluția nr. __ am identificat hormonul adrenalina.

b) Determinarea corticosteroidelor (8 puncte)

Se iau 2 eprubete. Se numerotează fiecare eprubetă cu numerele eprubetelor ce nu au fost identificate (***nu se lucrează cu eprubeta ce conține adrenalina!!!***) În eprubetele selectate (X și Y) se picură, respectiv, 10 picături de soluție X, în eprubeta X și 10 picături de soluție Y în eprubeta Y. Cu conținutul ambelor eprubete se efectuează reacția de identificare a hormonilor corticosteroidici. În ambele eprubete se adaugă 5 picături soluție *Fehling I* și 5 picături soluție *Fehling II*, se aduce la fierbere. Se formează un precipitat roșu-portocaliu.

Prin urmare, soluția în care se formează precipitat roșu-portocaliu conține hormonul corticosteroid.

Concluzie: În soluția nr __ am identificat hormonul corticosteroid.

c) Determinarea insulinei (5 puncte)

Se ia ultima eprubetă rămasă, în care se picură 10 picături de soluție neidentificată. Cu conținutul eprubetei se efectuează reacția de identificare a insulinei. În eprubetă se adaugă 5 picături soluție de NaOH 10% și o picătură de CuSO₄ 1%. Se agită. Soluția de insulină se colorează în albatru-violet.

Concluzie: În soluția nr __ am identificat hormonul insulina.

**Atenție! La finalizarea experiențelor anunțați asistentul pentru a vă semna
lucrările efectuate!**

II. REZOLVAREA SARCINILOR (25 puncte)

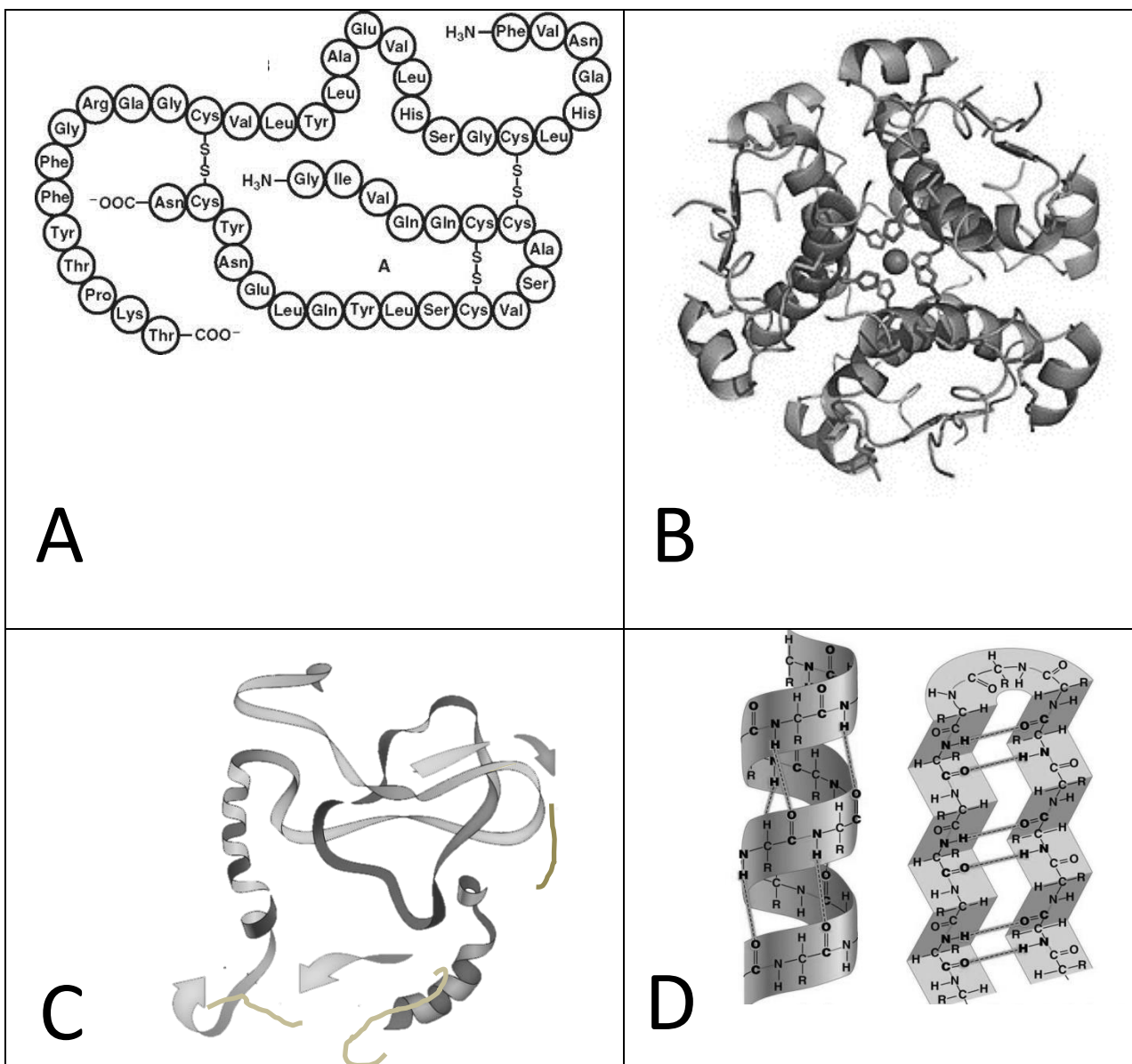
1.1. (4 puncte) Determinați ce tip de structură a proteinei este reprezentat pe fiecare din imaginile prezentate și indicați în locurile rezervate sub desen cifra romană respectivă.

I - structura primară

II – structura secundară

III – structura terțiară

IV – structura cuaternară



A _____ B _____ C _____ D _____

- 1.2. (2 puncte) Ce tip de structură este caracteristic pentru proteinele prezentate în tabel? Indicați cifra romană respectivă (I, II, III, sau IV).

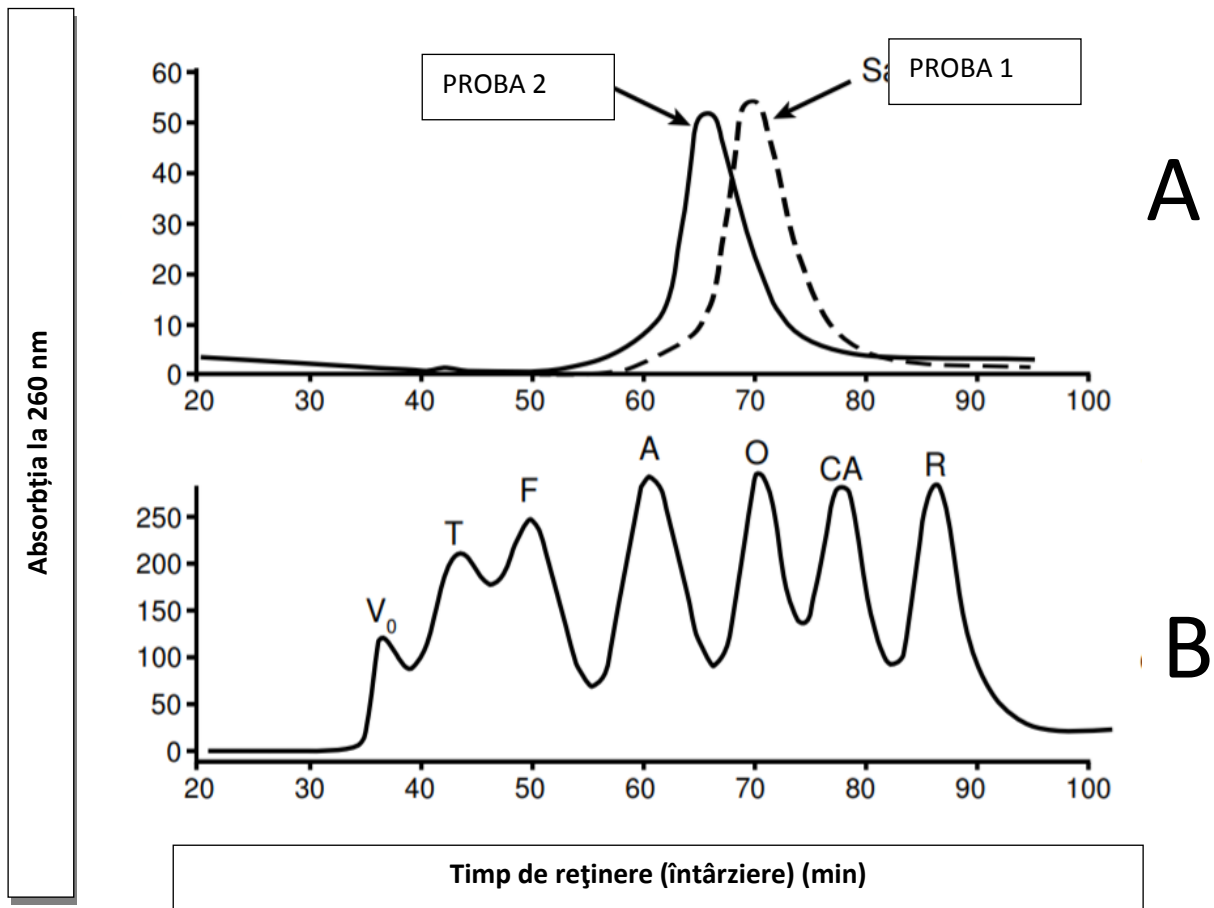
1. Fibroina (secretată de viermele de mătase)	
2. Hemoglobina	

2. (4 puncte) Cinci molecule intracelulare, A, B, C, D și E sunt în mod normal sintetizate la o rată constantă de 1000 molecule/secundă, dar cu durate de viață sau rate de supraviețuire diferite în interiorul celulei. Durata de viață a moleculei A = 300 s, B = 200 s, C = 100 s, D = 50 s și E = 10 s. Prezența unui semnal X crește de 10 ori rata de sinteză a tuturor celor cinci molecule fără a modifica durata lor de viață.

Analizați afirmațiile de mai jos și notați în locurile rezervate litera "A", dacă afirmația este adevărată sau litera "F", dacă afirmația este falsă.

Afirmații	A sau F
1. Molecula E are cea mai mare concentrație intracelulară în starea de echilibru.	
2. Numărul de molecule B în starea de echilibru este 200.000.	
3. La o secundă după semnalizarea de către X, molecula A va avea cea mai mare creștere a concentrației.	
4. La o secundă după semnalizarea de către X, cantitatea de E este mai puțină de două ori decât în starea de echilibru.	

3. (5 puncte) Gel-cromatografia reprezintă o metodă de fracționare a moleculelor care diferă după formă și dimensiuni. Metoda aceasta poate fi utilizată pentru determinarea masei moleculare aproximative a proteinelor și polipeptidelor. În calitate de matrice pentru gel-filtrare sunt gelurile cu denumirea comercială de Sephadex, care posedă pori cu dimensiuni ce corelează cu marca Sephadex-ului (G-10, G-15, ... G-200). Moleculele mici intră în interiorul porilor matricei, în timp ce gradul de intrare a moleculelor mai mari este limitat atât de dimensiunile porilor, cât și de propriile dimensiuni. Cromatograma reprezintă un grafic de eluție a componentelor. Fiecare moleculă se caracterizează prin timpul de reținere (întârziere) în coloană cromatografică.



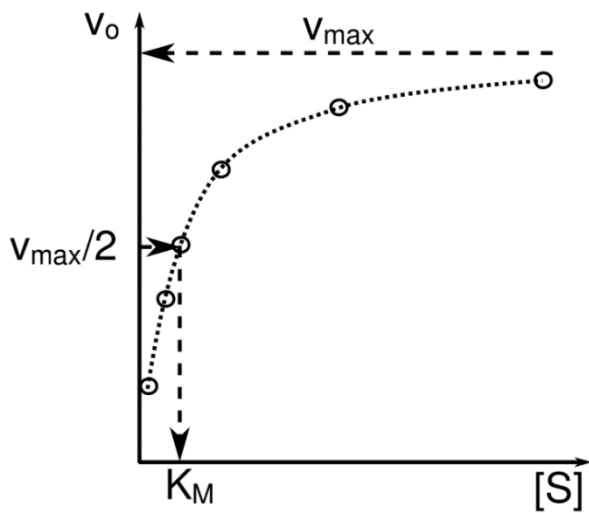
A – cromotograma pentru Proba 1 și Proba 2

B – cromotograma moleculelor de referință

Comparați masa moleculară a proteinei din Proba 1 (P1) și proteinei din Proba 2 (P2). Scrieți unul din semnele “<”, “>” sau “=” în locul rezervat.

P1

P2



4. 1. (8 puncte) Vă este prezentat graficul Michaelis-Menten (reprezentarea grafică a datelor cinetice) privind viteza inițială de reacție (V_0) față de concentrația substratului $[S]$. K_M este concentrația de substrat care dă jumătate din rata maximă de reacție. V_{max} este rata maximă în care $[S]$ este saturată.

Există cel puțin patru tipuri de transportatori de glucoză. GLUT1 și GLUT3 sunt localizați în majoritatea țesuturilor, inclusiv și în creier și eritrocite. Acești transportatori foarte repede transportă glucoză din sânge în celule, ei au V_{max} cea mai scăzută. GLUT2 se găsește în ficat și

pancreas. GLUT2 are afinitate scăzută față de glucoză și are valoarea V_{max} cea mai mare. GLUT4 se întâlnește în țesutul osos și țesutul adipos. Acest transportator nu este activ până ce nu este stimulat de insulină. Un student vrea să utilizeze pentru experimentul său un transportator cu valoarea K_M cea mai mică.

Ce tip el poate să utilizeze? Puneți semnul \surd în caseta sau casetele corespunzătoare în locurile rezervate.

GLUT1

GLUT2

GLUT3

GLUT4

4.2. (2 punct) Notați în locul rezervat din afirmația de mai jos semnul $<$ ("mică") sau semnul $>$ ("mare") care face ca afirmația să fie corectă.

Valoarea K_M scăzută înseamnă că enzima are nevoie de o cantitate _____ de substrat pentru a deveni saturată.

LABORATORUL Nr. 4 (503)

BIOINFORMATICA (50 puncte)

"Design-ul primerilor pentru reacția PCR"

Reacția în lanț a polimerazei (abreviat PCR) este o tehnică de laborator pentru producerea (amplificarea) rapidă a milioane până la miliarde de copii ale unui anumit segment de ADN, care pot fi apoi studiate mai detaliat. Spre exemplu produsul PCR obținut în rezultatul reacției de amplificare poate fi secvențiat descifrând astfel secvența de nucleotide, vizualizat prin electroforeză pe gel sau clonat într-o plasmidă pentru experimente ulterioare. Reacția PCR este utilizată în multe domenii ale biologiei și medicinei, inclusiv în cercetarea mecanismelor biologice la nivel molecular, diagnosticarea medicală și chiar în unele ramuri ale ecologiei.

PCR implică utilizarea unor fragmente scurte de ADN sintetic numite **primeri** pentru a selecta un segment al genomului care urmează să fie amplificat. De obicei sunt utilizați 2 primeri, numiți pereche de primeri, în fiecare reacție PCR, **primerul Forward (direct)** și **primerul Reverse (invers)**. Cei 2 primeri sunt proiectați astfel încât să flancheze regiunea țintă (regiunea care ar trebui copiată). Primerii sunt complementari cu cele 2 catene ale moleculei de ADN țintă (Fig. 1).

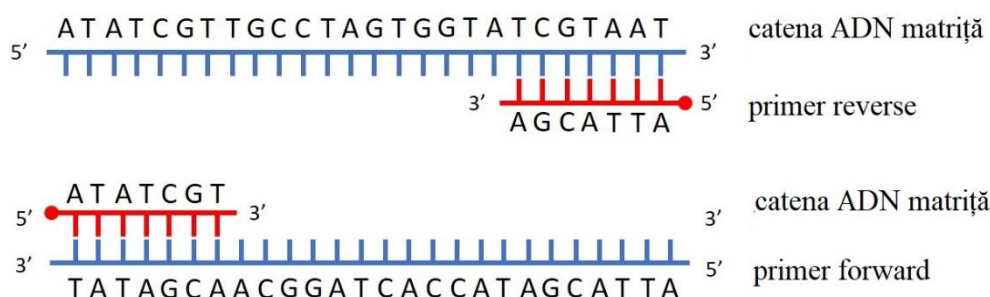


Fig. 1. Reprezentarea schematică a alinierii primerilor

Scopul lucrării:

În această aplicație practică veți realiza design-ul unei perechi de primeri pentru amplificarea specifică a unei regiuni mai scurte din gena COI mitocondrială (genă barcod utilizată în identificarea organismelor animale) pentru anumite specii de coleoptere.

Regulile generale de proiectare a primerilor pentru PCR.

1. Lungimea recomandată pentru primerii este de obicei 18-24 nucleotide.
2. Temperatura de topire calculată (T_m) trebuie să fie cuprinsă între 50 și 65 °C. Temperatura de topire este o reflectare a cantității de căldură necesară pentru a separa jumătate din primeri de catena matriță ADN. Calcularea temperaturii de topire se poate face într-o varietate de moduri. În această lucrare de laborator aplicația utilizată va calcula automat această temperatură.
3. Temperaturile de topire ale celor 2 primeri nu trebuie să difere cu mai mult de 4 °C.
4. Conținutul în bazele azotate C și G ar trebui să fie cuprins între 30 și 70%. Cei mai buni sunt considerați primerii cu conținutul de C și G $\geq 50\%$.
5. Primerii trebuie să aibă o autocomplementaritate mică, astfel încât să se evite formarea de dimeri sau bucle de ADN în timpul reacției PCR.
6. Primerii trebuie fie să se termine (3') în CC, CG, GC sau GG sau să aibă 2 din ultimele 5 nucleotide C sau G.

Instrumente necesare: aplicația MEGA; aplicația BioEdit; internet.

MERSUL LUCRĂRII:

1. Pe masa de lucru creați un folder (dosar) pe care îl veți întitula cu numele și prenumele dvs. Ex. Nume_Prenume. (Toate fișierele pe care le veți crea în proces de lucru le veți plasa în acest folder).

N.B.! Nu utilizați diacritice din limba română ș, ț, ă, î, â.

2. Accesați pagina <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
3. Din lista de rulare selectați baza de date de nucleotide **Nucleotide**.



4. În boxa de căutare introduceți următorul cod de acces **HQ563293**. Click stânga pe **Search**.
5. Veți vizualiza pagina de mai jos.

GenBank

Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: HQ563293.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☑

LOCUS HQ563293 658 bp DNA linear INV 19-APR-2019

DEFINITION Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION HQ563293

VERSION HQ563293.1

DBLINK Project: [37833](#)

KEYWORDS BARCODE.

SOURCE mitochondrion Sitona lineatus

ORGANISM [Sitona lineatus](#)
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta;
Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga;

Change region shown

Customize view

Analyze this sequence

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

Related information

BioProject

Protein

Taxonomy

Send to: ▾

N.B.! Fiecare secvență ADN are un identificator unic în baza de date numit cod de acces. Pentru secvența din imaginea de mai sus acesta este **HQ563293**.

6. Faceți click stânga pe butonul **Send to** din colțul dreapta al paginii informative. Selectați opțiunea **File**, iar la **Format** alegeți din listă **FASTA**.

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

Advanced

GenBank

Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: HQ563293.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS HQ563293 658 bp DNA linear INV 19-APR-2019
DEFINITION Sitona lineatus voucher BC ZSM COL 00147 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION HQ563293
VERSION HQ563293.1
DBLINK Project: [37833](#)
KEYWORDS BARCODE.
SOURCE mitochondrion Sitona lineatus
ORGANISM [Sitona lineatus](#)
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota; Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga; [Gerrhinae](#); [Gerrhinae](#); [Gerrhinae](#); [Gerrhinae](#)

Send to:

- Complete Record
- Coding Sequences
- Gene Features

Choose Destination

- File
- Clipboard
- Collections
- Analysis Tool

Download 1 item.

Format

Show GI

7. Click stânga pe **Create File**. Fișierul format fasta se va salva în mapa Downloads din computer sub numele *sequence*. Găsiți acest fișier și redenumiți-l cu codul de acces corespunzător secvenței ADN descărcate din baza de date. De exemplu: **HQ563293**.


N.B.! În unele cazuri la descărcarea unui fișier de pe o pagină web există posibilitatea de a indica deodată folderul în care să salvați fișierul cu numele dorit. Dacă aveți această opțiune utilizați-o!

8. Transferați fișierul din folderul Downloads în folderul de pe masa de lucru denumit conform numelui Dvs. personal.

9. Analizați informațiile de pe pagina și tabelul nr. 1 de la *p.1 din Foia de răspunsuri*.

10. Completați **Tabelul nr.1** de la *p.1 din Foia de răspunsuri*.

11. **Repetati pașii 4-10** pentru următoarele coduri de acces a secvențelor ADN din baza de date NCBI Genbank : **KC784200, KC784208, KM846028, KU919001**.

12. Lansați aplicația **MEGA**. Dublu click stânga pe pictograma  de pe masa de lucru.

13. Accesați prin click stânga meniul **File** → **Open a file/session**, găsiți folderul intitulat cu



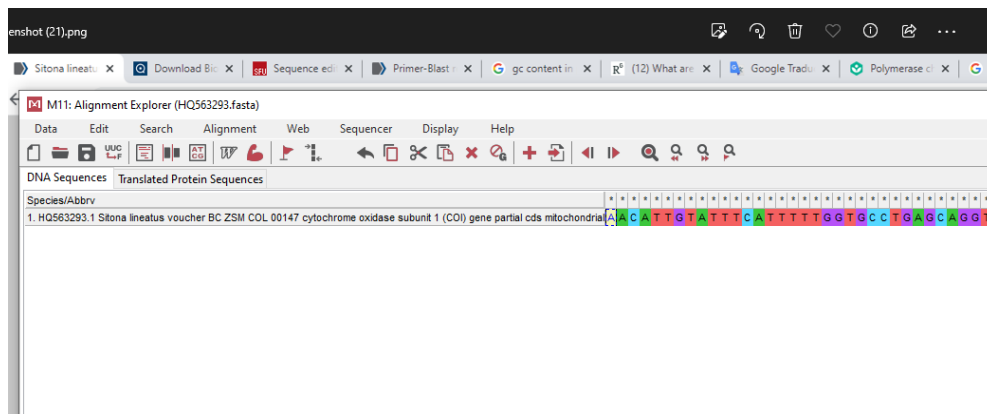
RECENT PUBLICATIONS



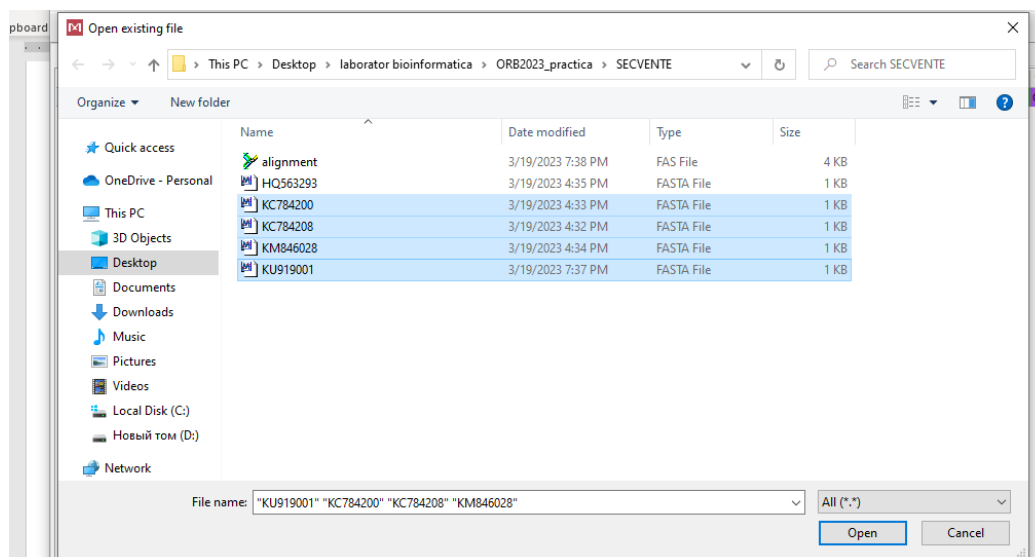
numele Dvs. și selectați prin click stânga fișierul intitulat **HQ563293**. Click stânga pe Open (Deschide).

14. La întrebarea Align or Analyze click stânga pe **Align** (aliniază).

15. Se va deschide următoarea pagină a aplicației MEGA:



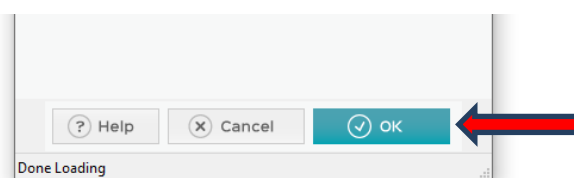
16. Accesați meniul **Edit** din Bara de meniuri, alegeți comanda **Insert Sequence from File** (inserează o secvență dintr-un fișier), după care selectați celelalte fișiere **KC784200**, **KC784208**, **KM846028**, **KU919001** din folderul Dvs. Puteți selecta câte o secvență sau toate deodată ținând click stânga apăsat și deplasând cursorul peste fișierele dorite.



17. Faceți click stânga pe butonul **Open**.

18. Meniul **Edit** → click stânga pe **Select All** (selectează tot).

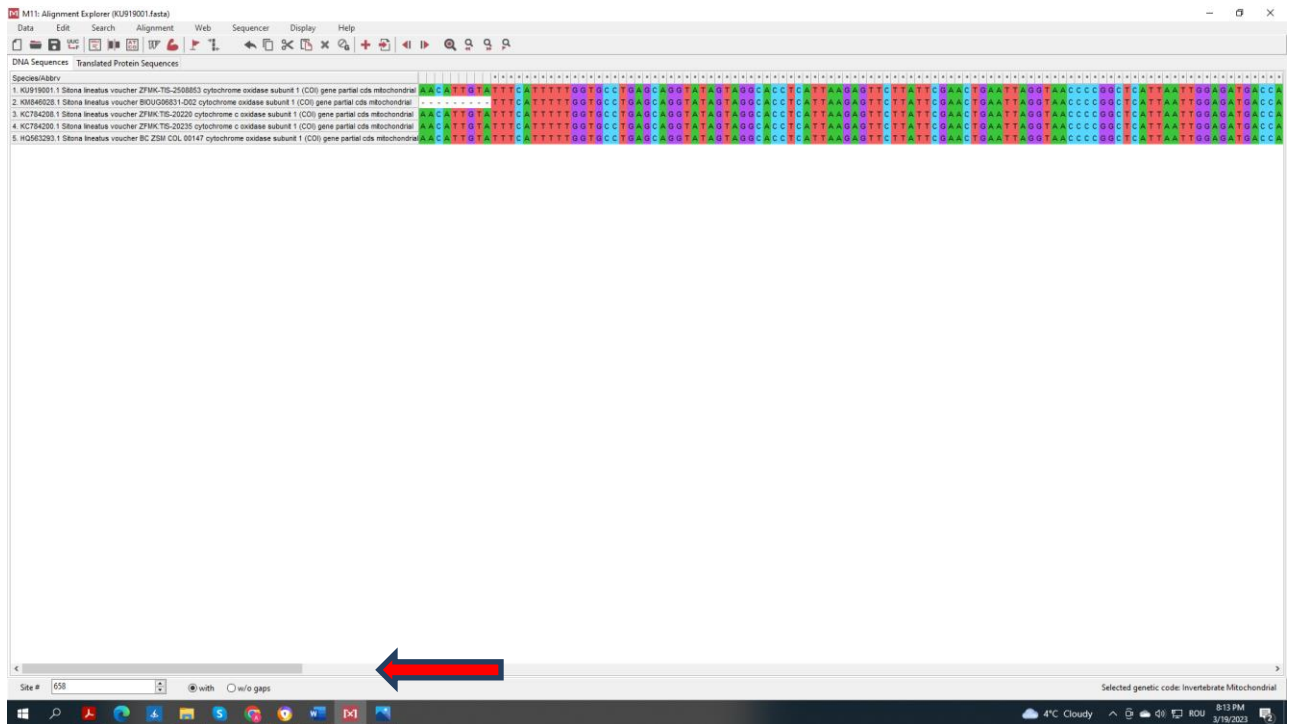
19. Meniul **Alignment** (alinieră) → click stânga pe **Align by ClustaW** → **OK**.



20. În rezultatul acestui pas ați obținut **secvențe aliniate**.

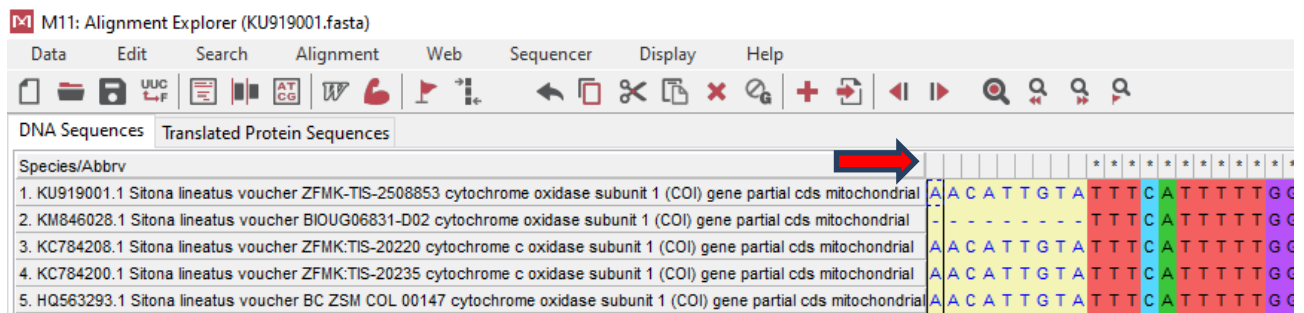
21. Puteți mări fereastra de lucru a aplicației după necesitate cu ajutorul tehnicii trage și lasă plasând cursorul pe unul din colțurile ferestrei. Sau puteți extinde fereastra prin butonul maximize similar cu aplicația Word.

22. Cu ajutorul barei orizontale deplasați-vă la începutul secvențelor aliniate. Bara este indicată cu săgeată.



23. Veți observa că unele secvențe au la început cratime în loc de literele corespunzătoare bazelor azotate. Acest lucru semnifică că secvența dată este mai scurtă decât celelalte. Este necesar să tăiați secvențele astfel încât ele să fie de aceeași lungime.

24. Selectați coloanele cu nucleotide pentru toate secvențele până la prima coloană în care nu sunt cratime. Pentru a selecta coloanele țineți click stânga apăsat și deplasați cursorul peste celulele fără inscripții din primul rând al tabelului.



25. Apăsați tasta DELETE.

26. Repetați procedura deplasându-vă cu ajutorul barei orizontale la sfârșitul secvențelor aliniate și ștergând toate coloanele în care există cratime.

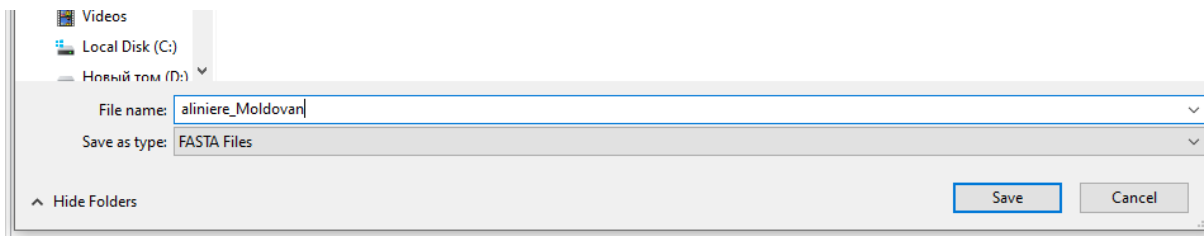
27. Faceți click stânga pe ultima coloană care conține doar litere.

28. Citiți **cifra** din colțul stânga jos a paginii în dreptul cuvântului **Site (situs)**:

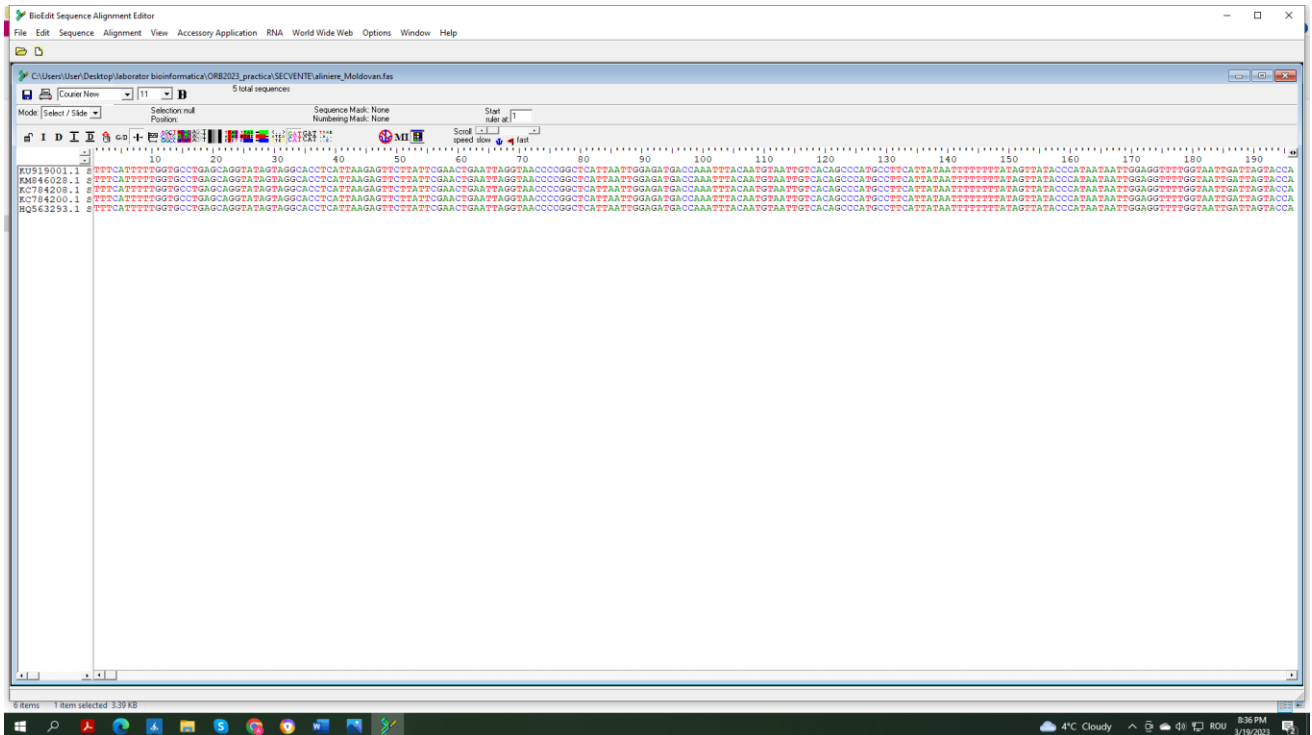
29. Notați cifra la **p. 2 în Foia de Răspunsuri**.

30. Meniul **Data** → **Export Alignment** → **Fasta format**.

31. Salvați fișierul în folderul Dvs. sub nume **alinieere_Nume**.



32. În folderul Dvs. de lucru click dreapta pe fișierul alinier_Nume, **Open with** (deschide cu) și din lista de aplicații selectați **BioEdit**. Se va lansa fereastra aplicației.

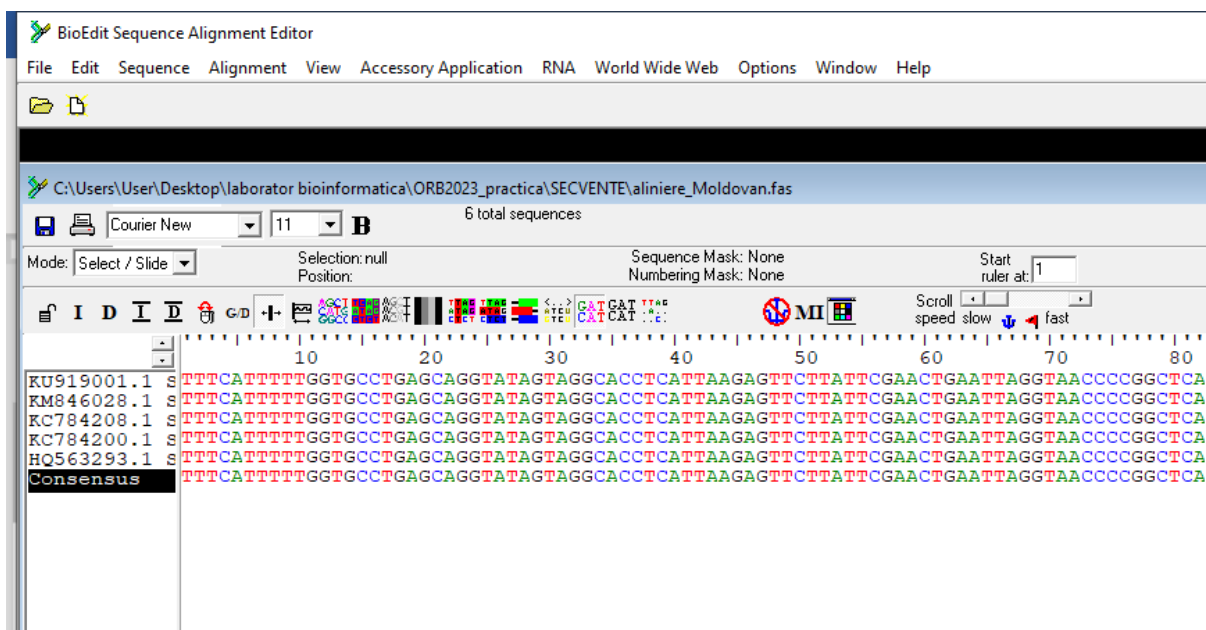


33. Selectați meniul **Edit**→**Select All Sequences**.

34. Meniul **Accessory Application**→**ClustalW Multiple Alignment** →**Run ClustalW**→ **OK**.

35. Meniul **Alignment**→**Create Consensus Sequence** (creează secvența consensus).

36. În fereastra aplicației **Click stânga** pe cuvântul **Consensus**, apoi accesați meniul **Edit**→**Copy sequences to clipboard (fasta format)** (copiază secvența în clipboard).



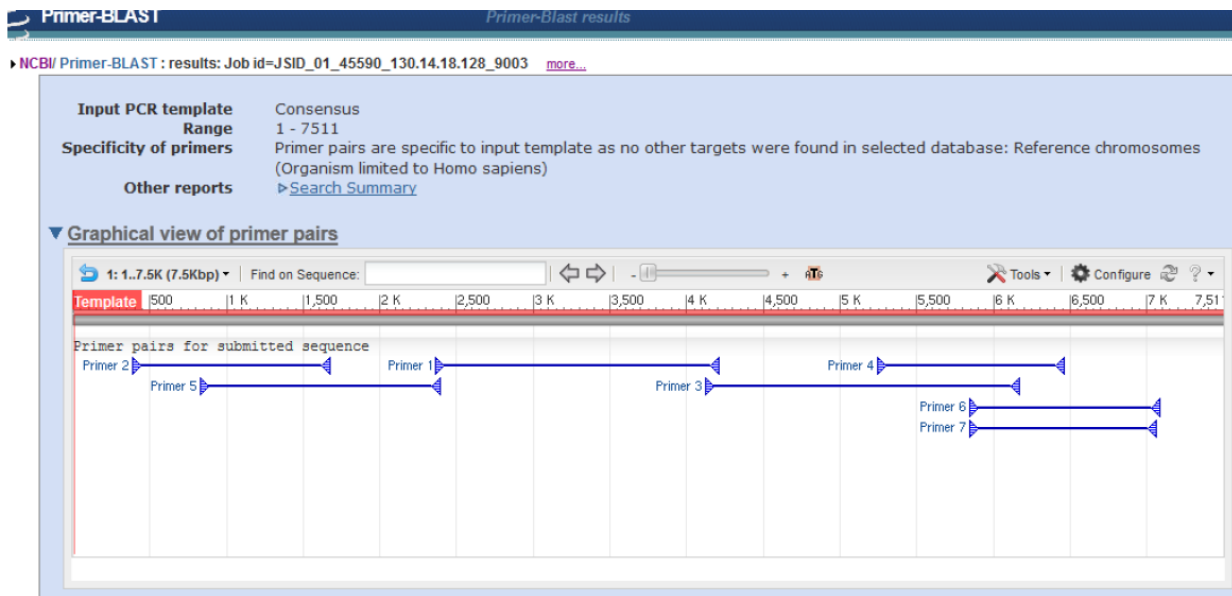
37. Accesați pagina web Primer-BLAST <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

38. La rubrica **PCR template** (matrice pentru PCR) în boxă inserați secvența consensus copiată în clipboard. Click dreapta +Paste (Inserați) sau combinația de taste Ctrl+V.

39. La rubrica **Primer Parameters** (parametrii primerilor), **PCR product size** (lungimea produsului PCR) modificați setările astfel încât lungimea să fie situată în intervalul 200-400 pb, **Primer melting temperatures** – temperaturile de topire a primerilor (Tm) indicați valorile conform regulilor generale de design al primerilor.

40. Lăsați ceilalți parametri nemodificați și lansați lucrul aplicației prin click stânga pe **Get Primers**.

41. Vizualizarea produsului PCR (secvențelor de ADN care pot fi amplificate în baza secvenței de ADN analizate) care poate fi obținut cu ajutorul a diferite perechi de primeri arată astfel:



42. Tabelul cu informațiile despre perechile de primeri PCR propuse arată astfel:

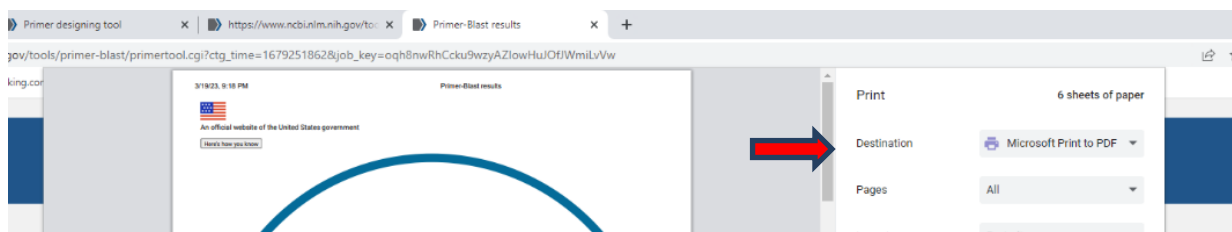
Detailed primer reports

Primer pair	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Primer pair 1									
Forward primer	GTGCGCCAGAATCAGGTACT	Plus	20	2396	2415	60.11	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	ATTAGGCCTCCGAATGCTCG	Minus	20	4177	4158	59.97	55.00	6.00	2.00
Product length	1782								
Primer pair 2									
Forward primer	GCCTGTATGTTGAGCGAGGT	Plus	20	424	443	60.11	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	GTCCCATAGGACGACCCCTCT	Minus	20	1637	1618	60.11	60.00	8.00	2.00
Product length	1214								
Primer pair 3									

Unde:

Sequence (5'->3') - secvență în direcția (5'->3'), Template strand – catena ADN copiată, Length – lungime primer, Start – poziția matriței ADN de unde începe amplificarea, Stop – unde se încheie, Tm – temperatura de topire, GC, % - conținutul de C și G, Self-complementarity – autocomplementaritatea, product length – lungime produs PCR.

43. Salvați informațiile de pe această pagină web. Tastați combinația Ctrl+P. Va apare fereastra. Din lista de rulare selectați opțiunea **Print to PDF** (tipărește ca pdf). **Click pe butonul Print** (tipar) și salvați fișierul PDF cu numele **rezultat_Nume în folderul Dvs.**



44. Imaginați-vă că doriți să selectați cea mai bună pereche de primeri care va amplifica o porțiune specifică din fragmentul de genă investigat **mai aproape de capătul 3'** al catenei codificatoare. Analizați rezultatele analizei Primer Blast, alegeți cea mai bună pereche de primeri și notați numărul perechii la **p. 3 în Foaia de Răspunsuri**.
45. Completați **Tabelul 2** de la **p. 4 în Foaia de Răspunsuri**.
46. **Realizați sarcinile de lucru din Foaia de Răspunsuri**.
47. Înainte de a închide aplicația BioEdit salvați rezultatul ca fișier textual, **File** → **Save as** , extensia **.txt** cu numele aliniere_Nume în folderul Dvs. Cilck pe ok pentru confirmare. După ce ați salvat închideți toate ferestrele și răspundeți nu la oricare întrebări.
48. **Înainte de a părăsi locul de lucru chemați asistentul de laborator să verifice folderul Dvs. și să semneze în Foaia de Răspunsuri**.

FOAIE DE RĂSPUNSURI

Laboratorul nr.4. BIOINFORMATICA

1. Completați Tabelul 1 (*câte 0,3 p pentru fiecare celulă completată corect*). 6 p

Tabelul 1

Număr de acces GenBank (GenBank Accession Number)	Specia	Familia	Ordinul	Lungimea secvenței, pb
HQ563293				
KC784200				
KC784208				
KM846028				
KU919001				

2. Site (situs): _____ 6p

3. Cea mai bună pereche de primeri este perechea cu nr. _____ 4p

4. Completați Tabelul 2 (*câte 0,5 p pentru fiecare celulă completată corect. Punctaj parțial: câte 0,25 p pentru fiecare celulă completată corect corespunzător selecției de la p.3*). 9p

Tabelul 2

	Secvența (5'→3')	Catena ADN copiată	Lungime	Start	Stop	T _m , °C	GC %	auto-complementari-tate	3' auto-complementari-tate
<i>Coloana</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
Primer Forward									
Primer Reverse									

5. Lungimea produsului PCR amplificat cu perechea de primeri selectată: _____ 1p

6. Care din informațiile din Tabelul 2 au influențat cel mai mult decizia privind cea mai bună dintre perechile de primeri? Înscrieți cifra corespunzătoare coloanei _____ 6p

7. Înscrieți în spațiul rezervat litera A dacă considerați afirmația adevărată și litera F dacă considerați afirmația falsă (câte 2 p): 12p

Reacția PCR utilizează principiul transcrierii ADN.	
În reacția PCR standard se utilizează primeri deoarece ADN polimeraza are proprietatea de a iniția sinteza <i>de novo</i> a unei catene de ADN	
În reacția PCR standard se utilizează un primer direct și unul invers deoarece ADN polimeraza poate cataliza doar adăugarea unui nucleotid la un capăt 3' -OH liber al pentozei.	
Perechea de primeri propusă în rezultatul realizării lucrării de laborator este specifică la nivel de specie.	
Perechea de primeri propusă ar putea fi utilizată pentru detecția indivizilor din specii înrudite din același gen.	
Primerii trebuie fie să se termine (3') în CC, CG, GC sau GG sau să aibă 2 din ultimele 5 nucleotide C sau G pentru a asigura stabilitatea legăturii dintre primer și ADN polimerază.	

8. Rugați asistentul de laborator să verifice folderul Dvs. și să semneze în tabelul 3 (câte 2 p). 6p

Tabelul 3

Fișier aliniere_Nume format fasta	
Fișier aliniere_Nume format text	
Fișier rezultat_Nume format pdf	

Vă mulțumim pentru efortul depus!