

OLIMPIADA LA BIOLOGIE
etapa republicană, 20 – 23 martie 2026

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 asistenți 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.

La finalul fiecărui laborator prezentați lucrarea supraveghetorului și semnați în tabelul de participare.

Lucrarea de laborator 1 (525)
BIOLOGIE MOLECULARĂ (50 puncte)

INSTRUCȚIUNI GENERALE

- Dacă sunteți pregătit pentru a plasa microtuburile cu amestecurile de reacție în incubatorul termostatat ridicați în sus cartonașul galben. Un asistent de laborator va prelua eprubetele și le va plasa în incubator.
- Dacă timpul de incubare a expirat și doriți să luați eprubetele din incubatorul termostatat ridicați în sus cartonașul galben. Un asistent de laborator va aduce eprubetele dvs.
- Dacă sunteți pregătit pentru a merge în zona electroforetică ridicați în sus cartonașul verde.
- Dacă întâmpinați o dificultate pentru soluționarea căreia aveți nevoie de asistența unui supraveghetor, ridicați cartonașul roșu.
- Dacă doriți să mergeți la baie ridicați cartonașul albastru, în acest caz un asistent de laborator vă va însoți.
- Veți realiza lucrarea fiind divizați în 2 grupuri, competitorii cu numerele 1-7 reprezintă primul grup, competitorii cu numărul 8-15 reprezintă grupul nr.2. Schema de organizare a activității în laborator este prezentată în tabelul de mai jos:

Interval de timp	Grup	Activitate
0-5 min.	1+2	Instructaj general, verificarea prezenței materialelor indicate.
6-15 min.	1	Realizarea părții 1, Pașii 1-5 în mod prioritar apoi alți pași sau sarcini.
6-15 min.	2	Realizarea sarcinilor de lucru p 4-10 din Foaia de Răspunsuri.
15-24 min.	1	Realizarea părții 1, pașii 6-11
15-24 min.	2	Realizarea părții 1, Pașii 1-5 în mod prioritar apoi alți pași sau sarcini.
25-40 min.	1	Realizarea părții 2 și sarcinile de lucru din Foaia de Răspunsuri
25-40 min.	2	Realizarea părții 1, pașii 6-11
40-55 min.	1	Realizarea sarcinilor de lucru din Foaia de Răspunsuri.
40-55 min.	2	Realizarea părții 2 și sarcinile de lucru din Foaia de Răspunsuri
55-60 min	1+2	Finalizarea activităților, pregătirea pentru deplasarea în următorul laborator.

INSTRUCȚIUNI DE OPERARE A PIPETEI DOZATOR

- ✓ **Reglarea volumului** - Pentru a regla volumul adecvat, rotiți cadranul de reglare a volumului prezent în partea de sus a micropipetei. Poate fi rotit la dreapta sau la stânga pentru a micșora sau crește volumul. **NU SETAȚI VALORI MAI MARI SAU MAI MICI DECÂT DIAPAZONUL DE LUCRU AL PIPETEI INDICAT PE EA!**
- ✓ **Măsurarea volumului unui lichid** - Înainte de a măsura lichidul și de a-l transfera asigurați-vă că ați reglat volumul corect și că ați cuplat un vârf. Ținând pipeta vertical apăsați pistonul de sus până la prima oprire. Cufundați vârful micropipetei în soluție la aproximativ 3 mm adâncime în lichidul eșantionului. Eliberați încet presiunea de pe piston și lăsați-l să ajungă în poziția inițială. Lichidul va începe să intre în vârf. Urmăriți soluția care este trasă în vârf. Nu eliberați pistonul prea repede, deoarece poate provoca formarea de bule în soluție și poate provoca, de asemenea, stropirea soluției pe axul nesteril. Retrageți vârful din soluție. Lichidul va fi acum în vârful micropipetei.
Notă: Cea mai gravă și frecventă eroare este apăsarea pistonului până la a doua oprire înainte de a umple micropipeta. Evitați această eroare.
- ✓ **Transferarea volumului unui lichid** – Încărcați în vârf lichidul, apoi introduceți vertical vârful în recipientul în care lichidul trebuie transferat. Nu distribuiți lichidul în aer. Apăsați ușor pistonul până la prima oprire, apoi faceți o pauză și după aceea, apăsați în continuare pistonul până la a doua oprire. Cea mai mare parte a conținutului este eliberată la prima oprire, a doua oprire asigură că și ultima

picătură de lichid este eliberată. Scoateți vârful vertical din recipient și readuceți pistonul în poziția inițială. Scoateți și aruncați vârful în recipientul pentru deșeuri folosind ejectorul de vârf.

ANALIZA RESTRICȚIONALĂ

Bacteriofagii sunt virusuri care infectează bacteriile. Pentru a se reproduce, bacteriofagii (sau fagii) preiau controlul asupra aparatului molecular al celulei bacteriene gazdă. Ei se pot multiplica în interiorul bacteriei și, ca rezultat, o distrug (ciclul litic) sau ADN-ul lor poate fi integrat în cromozomul bacterian și rămâne latent pe timp îndelungat (ciclul lizogenic). Un exemplu este bacteriofagul speciei bacteriene *Escherichia coli* – fagul λ (Lambda).

În 1962 cercetătorii au descoperit că bacteriile posedă un sistem imunitar primitiv care împiedică replicarea ADN-ului viral în celula bacteriană infectată. Ulterior s-a demonstrat că acest răspuns imun implică enzime, care clivează ADN-ul viral și, astfel, restricționează proliferarea virusurilor. Datorită acestei funcții, enzimele au fost denumite restrictaze. Restrictazele fiind enzime din clasa hidrolazelor cu activitate endonucleazică, recunosc o secvență nucleotidică unică (situsul de restricție) și hidrolizează în mod specific moleculele de ADN dublu catenar cu formarea fragmentelor de restricție de diferite lungimi.

Restrictazele sunt utilizate pe scară largă în ingineria genică, în special pentru clonare. Unele enzime clivează ambele catene ale ADN-ului exact pe aceeași axă de simetrie, generând fragmente cu capete drepte (*blunt ends*). Altele clivează fiecare catenă în poziții corespunzătoare de o parte și de alta a axei de simetrie, formând capete „lipicioase” (*sticky ends*) – porțiuni monocatenare scurte la capetele fragmentelor de ADN.

Fiecare enzimă de restricție este denumită după bacteria din care a fost izolată. Prima literă indică genul bacteriei. Următoarele două litere indică specia bacteriei. Tulpina speciei este indicată prin a patra literă. Cifra romană de la sfârșitul numelui indică ordinea în care enzima a fost izolată din acea tulpină bacteriană.

De exemplu, enzima de restricție HindIII a fost a 3-ea enzimă de restricție izolată din celulele bacteriei *Haemophilus influenzae* cu serotipul d.

ADN-ul bacteriofagului λ (Lambda) este utilizat pentru evaluarea activității enzimelor de restricție datorită secvenței sale bine cunoscute, dimensiunii optime și prezenței numeroaselor situri de recunoaștere pentru diferite enzime.

SEPARAREA ȘI VIZUALIZAREA FRAGMENTELOR DE RESTRICȚIE PRIN ELECTROFOREZĂ

Electroforeza este o metodă utilizată pentru separarea populațiilor mixte de macromolecule, cum ar fi ADN-ul, ARN-ul sau proteinele. Electroforeza în gel de agaroză permite analiza fragmentelor de ADN produse prin digestia cu enzime de restricție. Fragmentele de restricție migrează prin matricea gelului la viteze variabile, în funcție de dimensiunea lor, asigurând separarea lor.

Pentru vizualizarea ADN-ului, gelul este tratat cu compuși intercalanți (bromură de etidiu sau SYBR Green). Ca rezultat, fragmentele separate devin vizibile pe gel sub formă de benzi. Pentru a determina lungimile fragmentelor, un marker de lungime moleculară (Ladder), care conține molecule de dimensiune cunoscută, este încărcat împreună cu probele experimentale. Acesta migrează concomitent cu probele experimentale. Lungimea fragmentului de ADN necunoscut este estimată pe baza unei curbe etalon construite folosind distanța de migrare a benzilor markerului.

MATERIALE ȘI INSTRUMENTE NECESARE:

- ✓ ADN al fagului λ în eprubetă marcată **ADN λ**
- ✓ Soluția tampon pentru încărcare 10X FastDigest Buffer în eprubetă marcată **buffer**

- ✓ Enzima FastDigest EcoRI în eprubetă marcată **EcoRI**
- ✓ Enzima FastDigest BamHI în eprubetă marcată **BamHI**
- ✓ Apă deionizată fără nucleaze în eprubetă marcată **H₂O_d**
- ✓ Microtuburi (tuburi Eppendorf) – 3 un. și suport pentru eprubete – 1 un.
- ✓ Etichete autoadezive
- ✓ Cariocă permanentă, 1 un.
- ✓ Parafilm
- ✓ Pipetă dozator și vârfuri
- ✓ Camera electroforetică cu gelul de agaroză în ea
- ✓ Incubator termostațat
- ✓ Fotografia care conține imaginea gelului electroforetic vizualizată folosind transiluminatorul

MERSUL LUCRĂRII:

I. Analiza restricțională. Clivarea enzimatică a ADN fagului λ

1. Identificați amplasarea eprubetelor ce conțin enzimele, ADN-ul și soluția tampon. Păstrați tuburile cu soluție pe gheață.
2. Luați 2 microtuburi (tuburi Eppendorf) și notați-le în felul următor:
 - ✓ **B_{Nn}** - digestia enzimatică BamHI
 - ✓ **E_{Nn}** - digestia enzimatică EcoRI
 unde **N** - este cifra/numărul corespunzător locului la masă pe care îl ocupați
 iar **n** – este cifra corespunzătoare ordinii în care Dvs. realizați laboratorul de Biologie moleculară.
!De exemplu dacă stați la masa 8 și realizați primul din cele 4 laboratoare, laboratorul de Biologie moleculară. veți avea următoarele notițe pe microtuburi B81, E81.
3. În fiecare dintre eprubetele marcate pregătiți amestecurile de reacție în volum final de **20 μl** pentru clivarea enzimatică a ADN al fagului λ la temperatura camerei conform **Tabelului 1**.

Tabelul 1

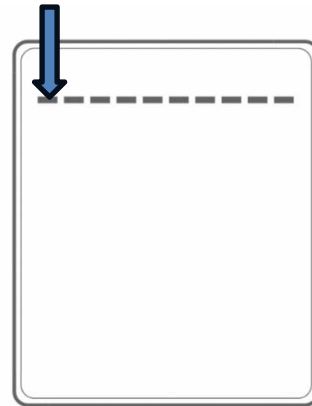
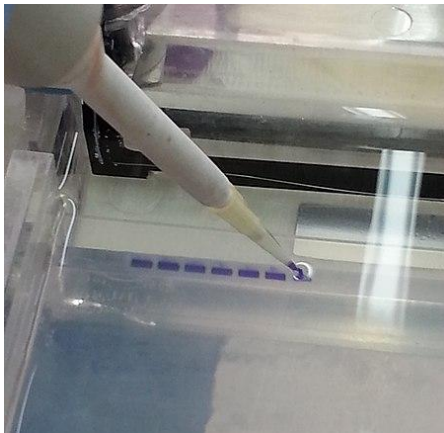
Microtub	H ₂ O _d , μl	ADN λ, μl	10X FastDigest Buffer, μl	FastDigest BamHI, μl	FastDigest EcoRI, μl
B	14	3	2	1	-
E	14	3	2	-	1

4. Adăugați pe rând fiecare dintre soluțiile în ordinea indicată în tabel de la stânga la dreapta în microtubul etichetat **B**.
 - ✓ De fiecare dată schimbați vârful pipetei dozator înainte de adăugarea unei soluții noi.
 - ✓ Pipetați fiecare soluție la fundul microtubului și în soluția anterioară.
 - ✓ La finalizarea pregătirii amestecului de reacție închideți ferm tubul și scuturați atent de câteva ori.
 - ✓ Plasați microtubul pe gheață.
5. Repetați punctul 4 pentru al doilea amestec de reacție.
6. Atunci când doriți să plasați microtuburile Dvs. la incubat ridicați cartonașul corespunzător pentru a solicita ajutorul asistentului.
7. Solicitați asistentului de laborator să verifice microtuburile Dvs. și să semneze în caseta de la **p.1** din **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.
8. Microtuburile urmează a fi plasate la temperatura **+37°C** pentru **10 min.**

9. Cronometrați 10 min. din momentul plasării microtuburilor în incubatorul termostatat.
10. La finalizarea celor 10 min. ridicați cartonașul galben pentru a solicita să vă fie aduse eprubetele. Un timp de incubare mai îndelungat cu câteva min. nu va afecta semnificativ rezultatul.
11. Atât timp cât așteptați puteți să realizați sarcinile **4-9** din **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.

II. Separarea și vizualizarea fragmentelor de restricție prin electroforeză

1. Camera electroforetică a fost asamblată de către asistenții de laborator. Pentru electroforeză va fi folosit un gel de 1% agaroză. Soluția tampon utilizată este TAE 1X (Tris-Acetat-EDTA, 40mM Bază Tris, 20mM acid acetic glacial, 1mM EDTA). Godeurile **reprezintă spațiile libere din gelul de agaroză**. În unul din godeuri deja este plasat markerul de lungime, numit Ladder, de asemenea este plasat ADN al fagului λ nesupus clivării enzimactice. De asemenea pe gel pot fi deja plasate probele cercetate de către alți competitori. Asistentul de laborator va indica unde exact urmează să plasați proba voastră. Un tabel cu repartizarea probelor în gel va fi prezent alături de stația electroforetică. După ce veți primi instrucțiunile necesare veți fi rugat să semnați în tabel pentru a confirma localizarea probei Dvs.
2. Atunci când doriți să încărcați proba Dvs. pe gel ridicați cartonașul corespunzător pentru a solicita ajutorul asistentului. Puteți realiza acest lucru doar în intervalul de timp indicat pentru grupul Dvs.
3. Pentru a încărca probele pe gel urmează să parcurgeți următorii pași:
 - ✓ Fiind însoțit de un asistent vă apropiați la stația de lucru, având cu sine proba etichetată **B λ n** și **FOILE DE RĂSPUNSURI**.
 - ✓ Solicitați asistentului să vă indice în care godeu să încărcați proba dvs., completați tabelul de la p. 2 din Foaia de Răspunsuri indicând codul godeului în care a fost plasată proba.
 - ✓ Semnați în tabel pentru a confirma locul plasării probei dvs.
 - ✓ Setati pipeta la 16 μ l. Îmbrăcați un vârf curat.
 - ✓ Încărcați proba pe gel așa cum este indicat în imaginea de mai jos. Țineți pipeta vertical. Introduceți vârful la 2 mm în godeu și apăsați pe piston până la prima oprire. Ținând pistonul apăsat retrageți vârful din godeu și din lichid. Relaxați pistonul. Aruncați vârful.



4. La finalizarea operației solicitați asistentul de laborator să semneze la **p.2** în **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.
5. Reveniți la locul dvs. și realizați sarcina **10** din **FOAIA DE RĂSPUNSURI**.

FOAIE DE RĂSPUNSURI

Laboratorul Nr. 1. *BIOLOGIE MOLECULARĂ*

ANALIZA RESTRICȚIONALĂ.

1. Solicitați asistentului de laborator să verifice microtuburile Dvs. și să semneze în tabelul de mai jos. (4p)

Criteriu	Punctaj total		Punctaj parțial	
Etichetare		2 p		1 p
Pipetare		2 p		1 p

2. Notați în spațiul rezervat codul probei dvs. conform godeului indicat și rugați asistentul de laborator să semneze.

Codul godeului în care este plasată proba Dvs.		
------------------------------------------------	--	--

Încărcați proba în gelul de agaroză. Solicitați asistentului de laborator să semneze în tabelul de mai jos. (4p)

Punctaj total, 4 p	Punctaj parțial, 2p

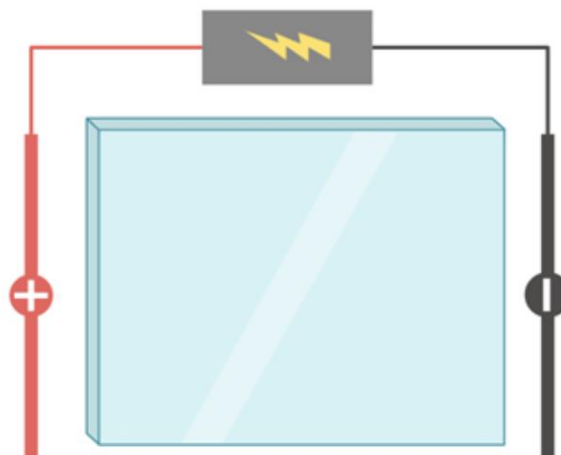
3. Evaluarea realizării reacției enzimatice.

(4 p)

Loc destinat pentru atașarea imaginii preluate de pe transiluminator care prezintă probele dvs. după 45 min. migrare în gel de agaroză de 1%, soluție tampon TAE 1X, la 7 V/cm.

4. În timpul electroforezei acizii nucleici migrează în gel sub acțiunea câmpului electric. Analizați imaginea schematică a localizării electrozilor în camera electroforetică. Indicați cu săgeată în ce direcție migrează fragmentele de ADN.

(1 p)

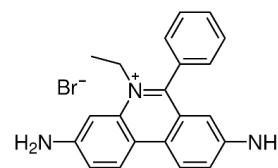


5. Gelurile pentru electroforeză diferă după cantitatea de agaroză utilizată pentru pregătirea acestora. Analizați afirmațiile și completați tabelul de mai jos, înscrind în spațiul rezervat semnele “+”, dacă sunteți de acord cu afirmația, și “-”, dacă nu sunteți de acord cu ea:

(4 p)

Afirmație	Constatare
Cu cât conținutul de agaroză este mai mare, cu atât gelul este mai dens.	
Densitatea gelului de agaroză influențează viteza de migrare a fragmentelor de ADN.	
Separarea fragmentelor de ADN scurte se efectuează în geluri cu conținutul agarozei mic.	
Fragmentele lungi de ADN migrează cu viteza mai mare.	

6. Pentru vizualizarea fragmentelor de acizi nucleici în gel de agaroză se utilizează substanța Bromura de Etidiu. Analizați afirmațiile de mai jos. Notați în tabel litera “A”, dacă considerați afirmația Adevărată, și “F”, dacă considerați afirmația Falsă.



Bromura de Etidiu

(3 p)

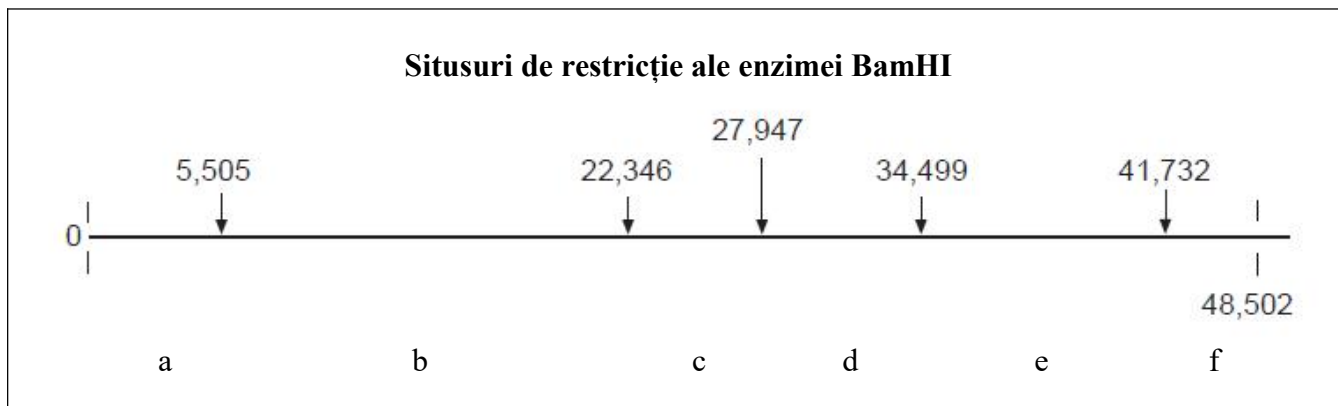
Afirmație	A/F
Bromura de Etidiu interacționează cu ADN și emite un semnal fluorescent când este excitată cu razele ultraviolete.	
Gelul de agaroză poate fi tratat cu bromură de etidiu după finalizarea electroforezei pentru a permite vizualizarea fragmentelor de ADN.	
Cu ajutorul bromurii de etidiu pot fi vizualizate atât fragmentele dublu catenare, cât și cele monocatenare ale acizilor nucleici.	

7. Identificarea și soluționarea problemelor reprezintă un aspect important al activității într-un laborator. Imaginați-vă că, în urma efectuării electroforezei fragmentelor de restricție ați obținut unele rezultate nesatisfăcătoare. Analizați afirmațiile prezentate și corelați problemele observate în rezultatul electroforezei din coloana A cu posibilele cauze ale apariției acestora din coloana B. Înscrieți literele (a-e) în dreptul cifrelor în spațiul rezervat din fața colanei A:

(5 p)

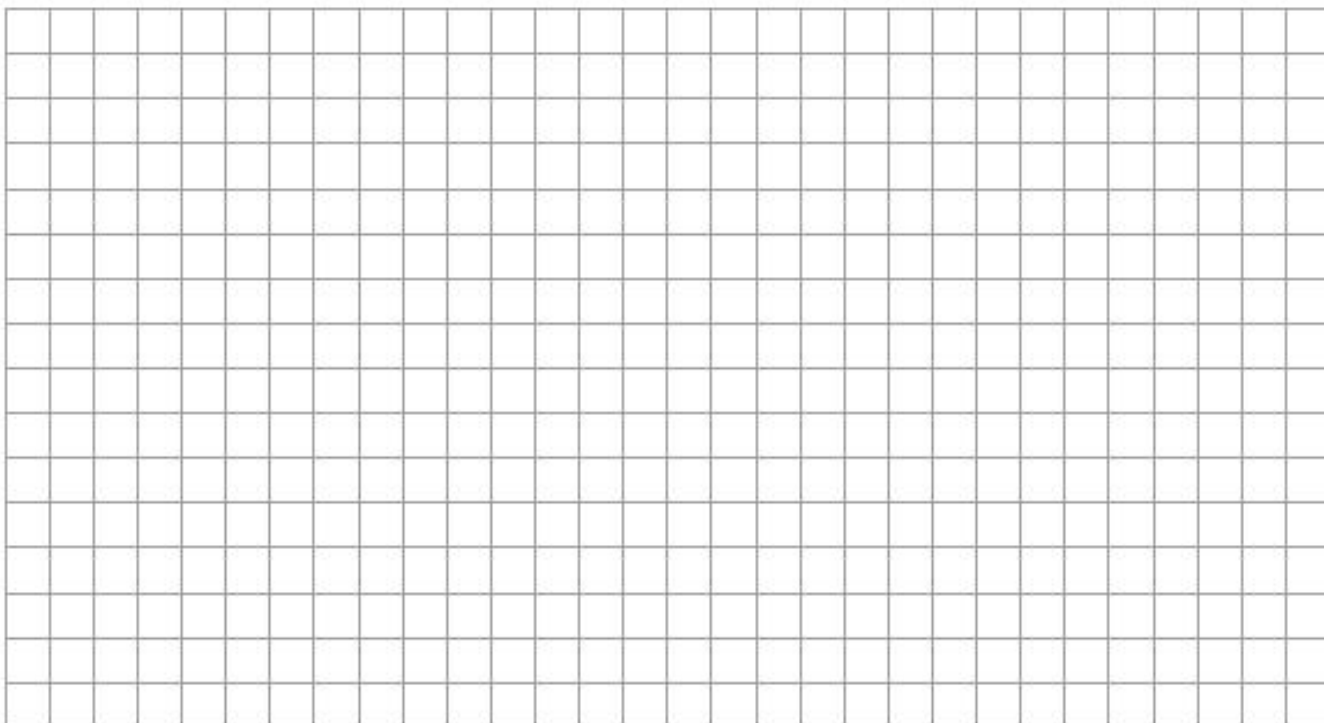
A. Problema	B. Cauza posibilă
_____ 1. Benzile nu sunt separate suficient	a) Pieptene scos înainte de solidificarea gelului
_____ 2. Apariția benzilor suplimentare nespecifice	b) Excesul de enzima de restricție
_____ 3. Apariția benzilor ondulate	c) Durata insuficientă de migrare în gel
_____ 4. Benzile sunt slab vizibile	d) Digestia incompletă a ADN-ului
_____ 5. Dispariția benzilor corespunzătoare fragmentelor mici	e) Migrarea în gel de lungă durată

8. Din datele din literatura de specialitate cunoașteți faptul că ADN-ului linear al fagului λ (Lambda) are lungime de 48502 perechi de baze. Harta de restricție a enzimei BamHI este ilustrată mai jos. Fiecare număr indică distanța, în perechi de baze, la care se află situsul de restricție față de capătul moleculei liniare de ADN λ . (6 p)



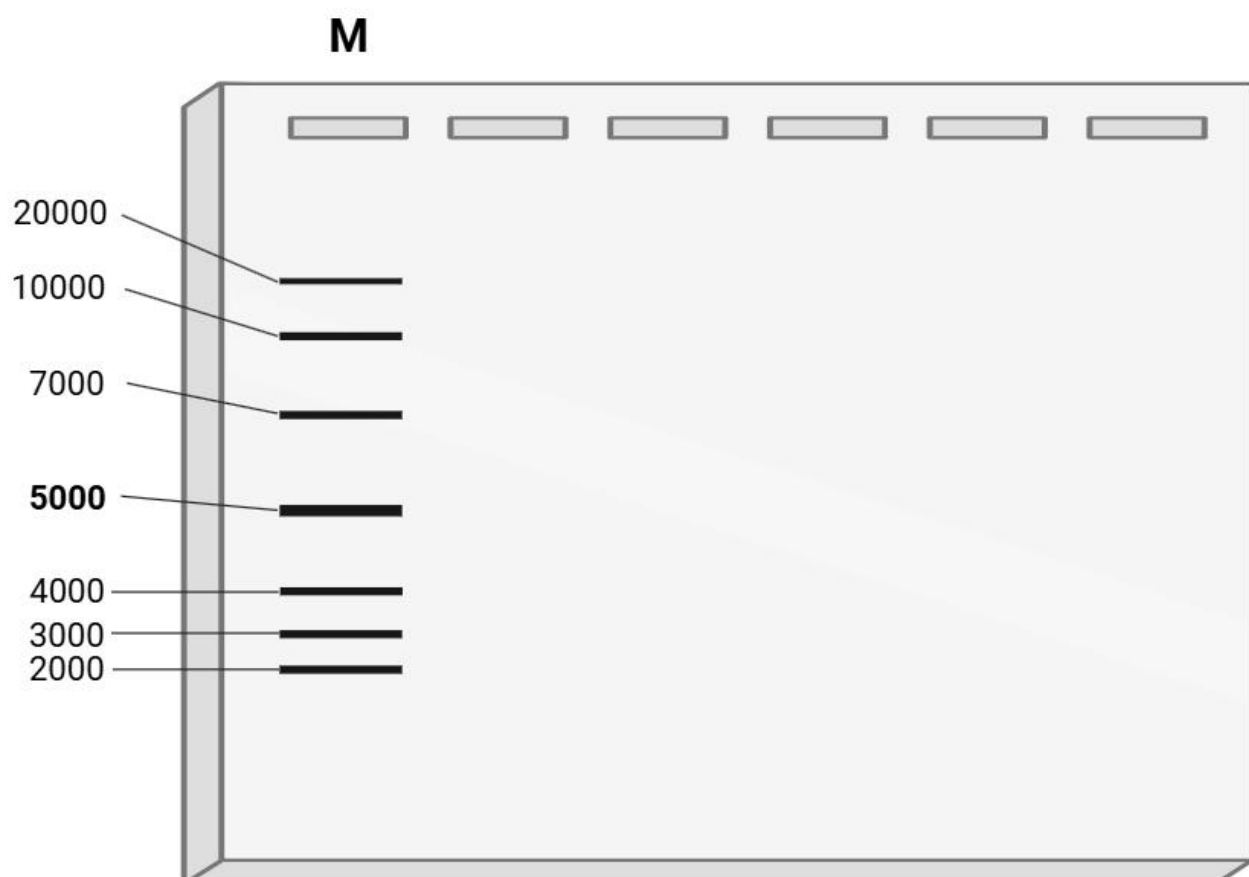
- a. În tabelul de mai jos notați lungimea, în perechi de baze, a fragmentelor individuale produse în rezultatul clivării enzimatic. În spațiul rezervat prezentați cum ați calculat lungimea fragmentelor. 3 p

Fragment	Lungimea	Punctaj maximal	Punctaj parțial
a		0,5 p	0,25 p
b		0,5 p	0,25 p
c		0,5 p	0,25 p
d		0,5 p	0,25 p
e		0,5 p	0,25 p
f		0,5 p	0,25 p



b. Pe desenul de mai jos indicați schematic fragmentele de restricție obținute în conformitate cu lungimile acestora și repartizarea lor pe gel.

3 p



9. În dependența de scopul cercetării, ADN-ul poate fi clivat cu două enzime concomitent într-o singură reacție, ceea ce permite obținerea fragmentelor de restricție unice. Răspundeți la întrebările de mai jos înscriind răspunsul Dvs. “DA” sau “NU” în spațiile corespunzătoare din tabel. (3 p)

Întrebare	Răspuns	Punctaj
1 Poate utilizarea a două enzime de restricție diferite facilita clonarea direcțională a unui fragment de ADN într-un vector plasmidic?		1p
2 Dacă două enzime de restricție au temperaturi optime diferite, este posibil să se efectueze hidroliza ADN-ului secvențial, începând cu enzima cu temperatura optimă mai scăzută și inactivând-o înainte de a adăuga a doua enzimă?		1p
3 Metilarea ADN-ului face parte din mecanismul natural de protecție al celulei bacteriene împotriva ADN-ului exogen. Poate această modificare epigenetică să împiedice hidroliza ADN-ului genomic de către endonucleazele de restricție în cazul suprapunerii situsurilor lor de recunoaștere cu secvențele metilate?		1p

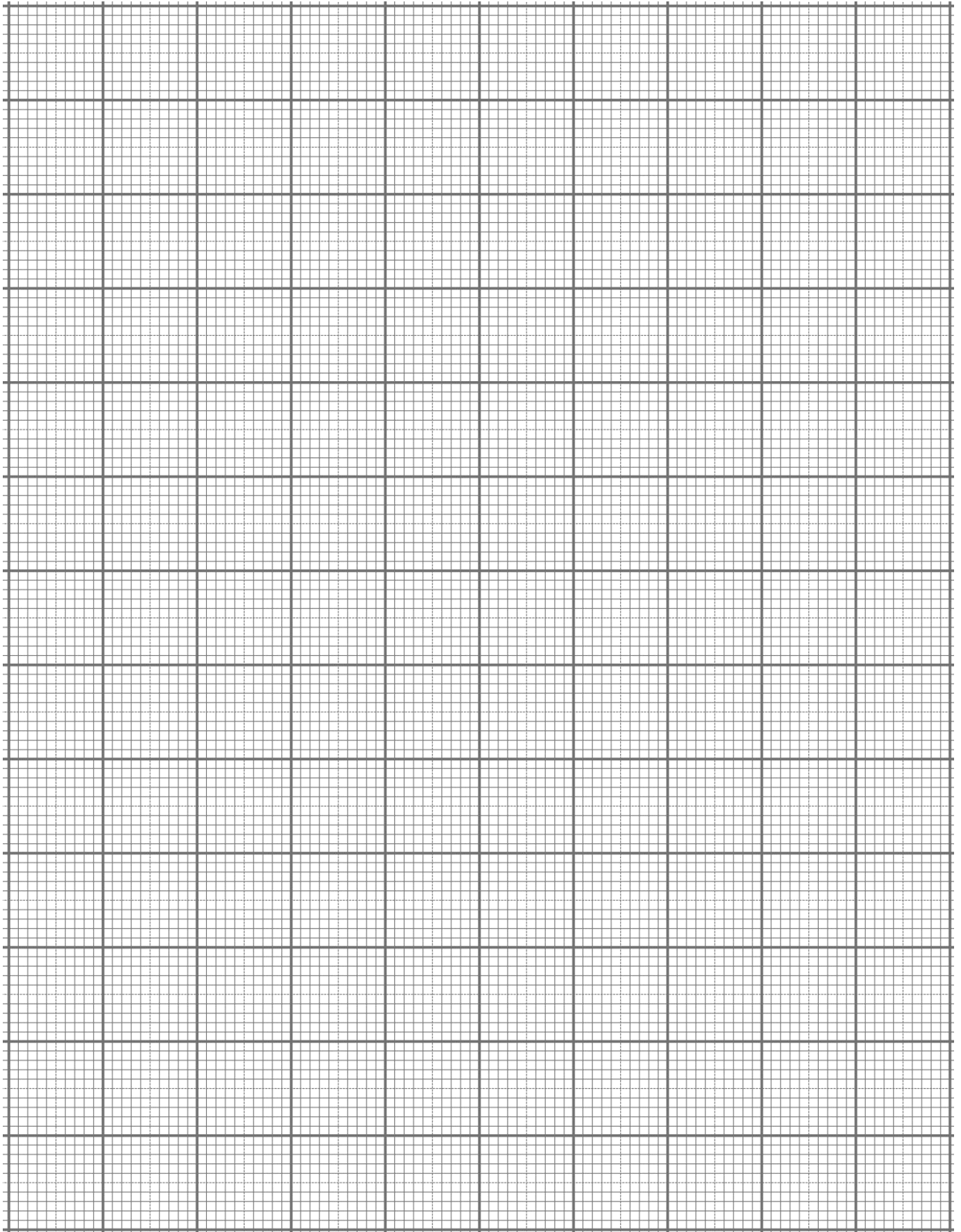
10. Electroforeza ADN al fagului λ clivat enzimatic decurge timp de aproximativ o oră. La această lucrare nu veți reuși să analizați proba Dvs. Analizați imaginea electroforezei în gel de agaroză de 1 % a ADN fagului λ , care a fost clivat enzimatic urmând exact instrucțiunile conform protocolului oferit Dvs. (Anexa). Probele au fost încărcate în godeuri în ordinea următoare: Marker de lungime (ladder) (M), ADN λ , ADN restricționat cu EcoRI (E), ADN restricționat cu BamHI (B). (16 p)

- a. Indicați numărul fragmentelor de ADN vizibile obținute la clivarea enzimatică cu enzima BamHI și determinați lungimea fragmentelor indicate pe imagine cu cifrele 1 și 2. Notați răspunsurile în tabelul de mai jos. În spațiul rezervat prezentați cum ați determinat lungimea fragmentelor.

11 p

Clivarea enzimatică a ADN fagului λ cu BamHI

Numărul de fragmente vizibile pe poza gelului	Lungimea fragmentului notat cu 1, pb	Lungimea fragmentului notat cu 2, pb
1 p	1 p	1 p



- b. Răspundeți la întrebările de mai jos înscriind răspunsul Dvs. “DA” sau “NU” în spațiile corespunzătoare din tabel. 2 p

Întrebare	Răspuns	Punctaj
1 Numărul de fragmente obținute este egal cu cel prognozat conform datelor din literatura de specialitate?		1 p
2 Lungimea fragmentelor determinate notate cu 1 și 2 este identică cu cea prognozată conform datelor din literatura de specialitate?		1 p

- c. Dacă la întrebarea 2 de la punctul b. ați fi răspuns “NU”, care ar fi posibila explicație? Analizați explicațiile posibile prezentate în tabelul de mai jos. Notați în tabel litera “A”, dacă considerați că explicația este Adevărată, și “F”, dacă considerați explicația Falsă. 3 p

Explicația posibilă	A/F	Punctaj
Dimensiunea fragmentelor de ADN este determinată utilizând o curbă etalon. Măsurarea inexactă a distanței parcurse de benzi pe gel duce la determinarea eronată a lungimii fragmentelor.		1 p
Fragmentele de ADN se unesc prin formarea legăturilor de hidrogen pe baza complementarității la capete lipicioase formate în rezultatul clivării cu enzima BamHI (5'-GATC...-3'). În comparație cu legături covalente, legăturile de hidrogen formează structuri de ADN mult mai stabile.		1 p
Stocarea markerului de lungime în condiții de temperatură inadecvate poate duce la degradarea parțială a fragmentelor și schimbarea proprietăților acestora. Construirea curbei etalon pe baza unui astfel de marker duce la obținerea rezultatelor eronate.		1 p

Vă mulțumim pentru efortul depus!