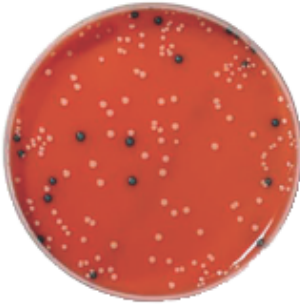


Opgave 1 Listeria

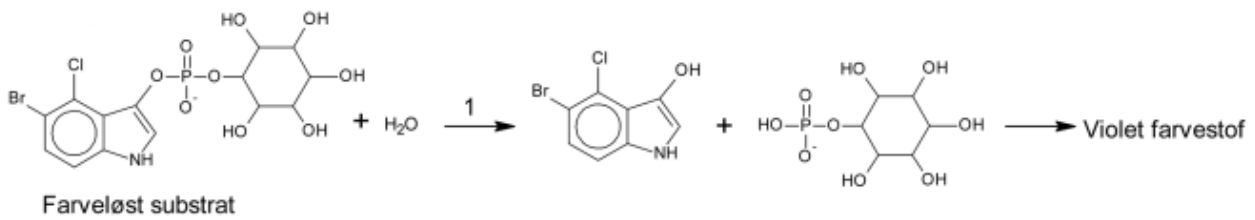
Bakterien *Listeria monocytogenes* kan være sygdomsfremkaldende for personer, der i forvejen er svækkede.

For at identificere *Listeria* kan man anvende indikative agarplader. Her udnyttes det, at *Listeria* producerer enzymet *PI-PLC* (*Phosphatidylinositol phospholipase C*). Når enzymet spalter et farveløst substrat, giver det mørkviolette bakteriekolonier, se figur 1a og b.

a)



b)



Figur 1. a) *Listeria monocytogenes* (mørke kolonier) sammen med andre bakterier på indikativ agarplade. b) Omdannelse af farveløst substrat til violet farvestof. Reaktion 1 katalyseres af enzymet *PI-PLC* (*Phosphatidylinositol phospholipase C*).

1. Angiv reaktionstypen for reaktion 1 vist i figur 1b.

Man mener, at enzymet *PI-PLC* har betydning for bakteriens sygdomsfremkaldende effekt, og derfor har man undersøgt enzymets katalytiske virkning. Resultaterne er vist i *figur 2*.

Substrat [S] (M)	v (M·min ⁻¹)
$2,0 \cdot 10^{-6}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$
$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
$5,0 \cdot 10^{-5}$	$5,4 \cdot 10^{-5}$
$1,0 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$2,0 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$

Figur 2. Samhørende værdier for substratkoncentration og begyndeshastighed for reaktionen katalyseret af enzymet *PI-PLC*.

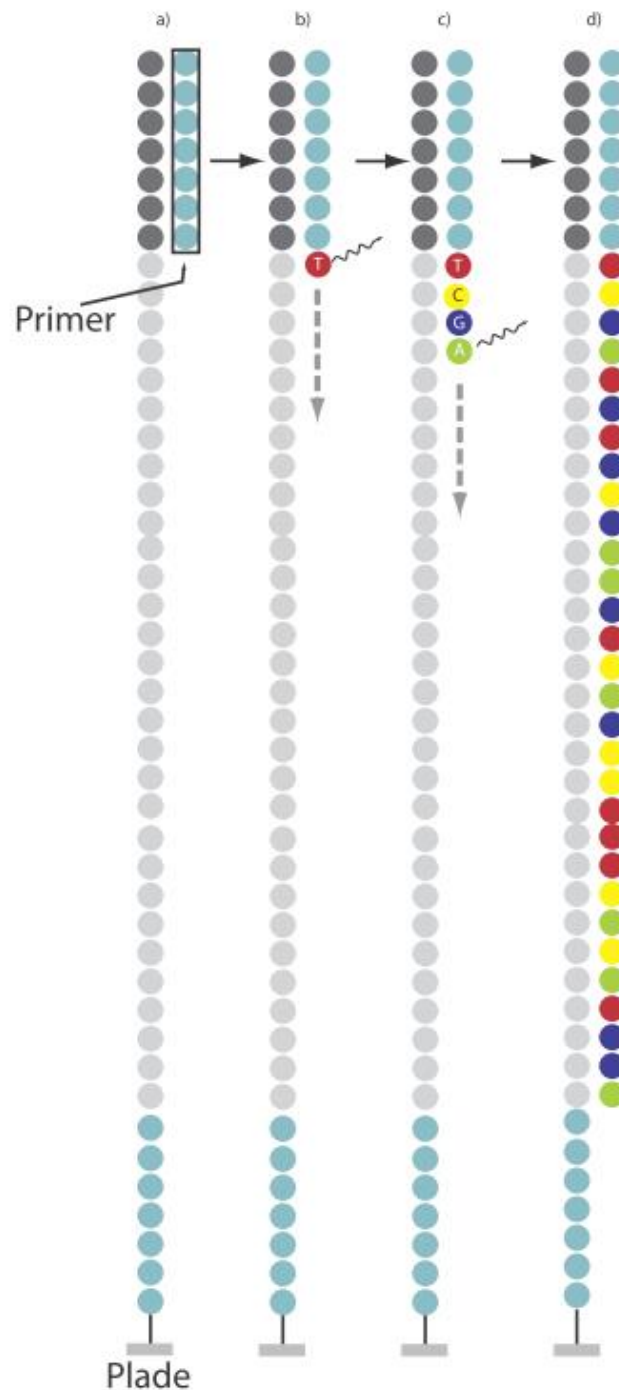
2. Vis, at V_{\max} er $1,2 \cdot 10^{-4}$ M·min⁻¹, og bestem K_M -værdien for enzymet *PI-PLC* ved hjælp af data vist i *figur 2*.

Opgaven fortsættes næste side

Listeria kan også identificeres ved hjælp af DNA-sekventering. Denne metode benyttes i forbindelse med større *Listeria*-udbrud. I disse situationer påviser man *Listeria* ved at sekventere bakteriegenomer både fra syge personer og fra fødevarer, der er under mistanke for at være inficerede.

Ved den anvendte metode klippes bakteriernes DNA i mindre stykker, der fastgøres på en lille plade. Først opformeres DNA-stykkerne ved hjælp af PCR, og derefter gøres de enkeltstrengede ved opvarmning. De enkeltstrengede DNA-stykker er skabeloner for dannelse af nye strenge.

De nye strenge dannes ved hjælp af nucleotider, som man har modificeret, så de er fluorescerende. Hver slags nucleotid har sin egen farve. Basesequensen kan aflæses efterhånden som de farvede nucleotider påsættes de enkelte strenge, se figur 3.



Figur 3. DNA-sekventering. a) Starten af sekventeringen, hvor kun primeren er påsat. b), c) og d) er senere trin i sekventeringen.

3. Forklar funktionen af primeren, vist på *figur 3*.

4. Angiv basesekvensen fra 5'-enden til 3'-enden af bakteriens DNA-stykke, der er fastgjort på pladen, vist på *figur 3*.

5. Giv forslag til, hvorfor det er vigtigt at kunne bestemme DNA-sekvensen i genomet fra *Listeria* i forbindelse med større sygdomsudbrud.