



آزمون عملی بیوشیمی

سوالات

نام دانش پژوه:

کد میز محل کار:

دانش پژوه گرامی :

آزمون تحت سه بخش مجزا تعریف شده است. امتیاز هر بخش و هر سوال مشخص می‌باشد. زمان آزمون ۹۰ دقیقه می‌باشد. ابتدا همه مواد موجود در لیست و همچنین سمپلرهای خود را چک کنید و اگر احیانا ماده و یا وسیله ای موجود نبود با بالا بردن نشانگر قرمز از مسئول آزمایشگاه بخواهید که آن را به شما بدهد. فقط ۱۵ دقیقه اول آزمون مواردی که کم هستند یا مشکل دارند تعویض خواهند شد، بعد از این زمان به هیچ عنوان وسیله و ماده ای در اختیار شما قرار نخواهد گرفت. موضوعات هر سه بخش را حتما مطالعه کنید و مدیریت مواد و زمان خود را در نظر داشته باشید. به سوالات همان طور که خواسته شده در پاسخ نامه پاسخ بدهید. عدم رعایت اصول ایمنی و نظم و ترتیب امتیاز منفی دارد که ایجاد هر گونه اخلاص همراه با ثبت در پاسخنامه خواهد بود و می تواند موجب از دست دادن امتیاز گردد.

در صورت داشتن هر گونه مشکل نشانگر قرمز را بالا ببرید.

بخش اول آزمون: مطالعه آنزیم اوره آز (۳۵ امتیاز)

بخش دوم آزمون: اندازه گیری پروتئین ها (۱۵ امتیاز)

بخش سوم آزمون: تعیین سمیت سالونین (۲۰ امتیاز)

بخش چهارم آزمون:

ماده یا وسیله	ویژگی	
۱ مارکر		
۲ ظرف waste		
۳ سمپلر	۱۰ و ۱۰۰ و ۱۰۰۰	
۴ سر سمپلر	۱۰ و ۱۰۰ و ۱۰۰۰	حتماً صحت سمپلرها را چک کنید.
۵ آب مقطر	داخل پیست	
۶ نشانگر	قرمز-سبز-زرد	
۷ دستمال کاغذی	در داخل پکیج	
۸ فویل	یک تکه	
۹ کووت	7 عدد در داخل پکیج	
۱۰ میکروتیوپ	6 عدد میکروتیوپ 2ml و یک میکروتیوپ ۱,۵ در داخل پکیج	
۱۱ آنزیم اوره آز	ویال 0.5 با لیبل Enzyme	
۱۲ اوره	ویال 1.5 با لیبل Urea	
۱۳ آمونیوم استات	ویال 1.5 با لیبل Std	
۱۴ معرف نسلر	ویال 1.5 با لیبل R	
۱۵ نمونه X	ویال 1.5 با لیبل X	
۱۶ معرف A	ویال 1.5 با لیبل A	
۱۷ معرف S	ویال 1.5 با لیبل S	
۱۸ معرف R	ویال 1.5 با لیبل R	

بخش اول ۴۰ امتیاز

بررسی کینتیکی آنزیم اوره از

مقدمه

اوره از یک آنزیم هیدرولیتیک است که تجزیه اوره به دی اکسید کربن و آمونیاک را تسریع و ممکن می سازد. این واکنش به راحتی در یک روش کالری متری به علت ترکیب آمونیاک تولیدی با معرف مربوط و تولید رنگ قابل بررسی است.

در این تسک شما فعالیت آنزیم اوره از موجود در لوبیا چیتی را محاسبه خواهید کرد. محلول سولفات آمونیوم با غلظت 0.025 میلی گرم در هر میلی لیتر به عنوان استاندارد در اختیار شما قرار گرفته است.

روش کار:

۱- ویال های 2 میلی لیتری را شماره گذاری کنید و حجم ها را مطابق جدول در ویال ها بریزید.

	Blank	Std1	Std2	Std3	Std4	Test
Water	1.00 ml	0.8 ml	0.6 ml	0.4 ml	0.0 ml	0.5 ml
Standard solution (25 $\mu\text{g/ml}$)	0.0 ml	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	1.00 ml	0
Urea (0.1 mg/ml)	0	0	0	0	0	0.5 ml
Reagent N	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml

۲- فقط به ویال تست 0.025 ml آنزیم اضافه کنید و با بالا بردن نشان گر زرد از دستیار آزمون بخواهید نمونه شما را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 55°C قرار دهد.

۳- پس از گذشتن زمان بالا بردن نشان گر از ممتحن بخواهید نمونه را مجدد به شما باز گرداند.

۴- بلافاصله به نمونه آزمایش مقدار 0.1 ml محلول B را اضافه کنید تا واکنش متوقف شود.

۵- نمونه ها به نسبت ۱ به ۵ با آب رقیق کنید و در کووت ها بریزید و با بالا بردن نشانگر سبز از دستیار آزمون وقت برای سنج جذب نمونه ها در ۵۱۴ نانومتر بگیرید.

سوالات:

پاسخ ها در پاسخ نامه وارد شوند.

توجه داشته باشید که فقط برگه پاسخ نامه تصحیح خواهد شد و به هر گونه جواب در برگه سوالات به هیچ عنوان نمره‌ای تعلق نمی گیرد.

- ۱- جذب نمونه های استاندارد را وارد کنید. (۱۴ امتیاز)
- ۲- جذب نمونه تست را وارد کنید. (۴ امتیاز)
- ۳- منحنی استاندارد براساس جذب نمونه‌های استاندارد رسم کنید. (۶ امتیاز)
- ۴- غلظت امونیاک حاصل در نمونه تست را در کل حجم آزمایش محاسبه کنید. (۶ امتیاز)
- ۵- مقدار مول اوره تجزیه شده را محاسبه کنید. (۵ امتیاز) (وزن مولکولی اوره: 545.34)
- ۶- فعالیت آنزیم بر حسب مول در دقیقه حساب کنید. (۵ امتیاز)

تسک دوم ۱۵ امتیاز

مقدار غلظت پروتئین تست قبلی را حساب کنید و بر اساس آن به سوالات پاسخ دهید.

روش کار

مقدار غلظت پروتئین تسک قبلی در یک تست بردفورد سنجیده شده است داده های مربوط به جذب استاندارد و نمونه پروتئینی آنزیم در زیر آمده است:

سوالات:

- ۱- منحنی مربوط به جذب های استاندارد را رسم کنید. (۵ امتیاز)
- ۲- مقدار غلظت پروتئین را حساب کنید. (۵ امتیاز)
- ۳- مقدار فعالیت ویژه آنزیم تسک قبل را حساب کنید. (۵ امتیاز)

تسک سوم

محاسبه میزان سالونین موجود در سیب زمینی

مقدمه

مطالعات نشان دادند که مصرف بیش از حد غده های سیب زمینی جوانه زده مسمومیت حاد، کما و مرگ در انسان را بدنبال خواهد داشت. این اثرات به گلیکوآلکالوئیدهای نظیر سولانین نسبت داده می شوند که به طور طبیعی در تمام سیب زمینی وجود دارند و میزان آن در نتیجه نقل و انتقال و ذخیره سازی نادرست پس از برداشت افزایش می یابد. در این تست شما به بررسی مقدار سالونین می پردازید و به سوالات پاسخ دهید.

روش کار:

- ۱- مقدار $50\mu\text{l}$ از نمونه ی X در ویال 1.5 بریزید.
- ۲- مقدار $500\mu\text{l}$ از ترکیب W در ویال ها بریزید.
- ۳- به مدت ۱۰ دقیقه نمونه را در تاریکی قرار دهید.
- ۴- مقدار $600\mu\text{l}$ از نمونه S در ویال بریزید.
- ۵- سپس مقدار $1000\mu\text{l}$ نمونه R را بریزید.
- ۶- نشان گر زرد را بلند کنید تا نوبت جذب بگیریید.

سوالات:

- ۱- مقدار جذب نمونه را وارد کنید. (۴ امتیاز)
- ۲- با توجه به اینکه ضریب جذب سالونین $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ است، غلظت سالونین را حساب کنید. (۵ امتیاز)
- ۴ مقدار LD 50 به عنوان مقدار غلظتی است که موجب کشته شدن 50% از حیوانات در حال تست می شود. در رت مقدار LD 50 ۲۲ میلی مول در هر کیلوگرم وزن موش است. اگر هر سیب زمینی ۱ میلی گرم سالونین باشد. یک رت ۳۲۰ گرمی باید چند سیب زمینی بخورد تا در کوتاه ترین زمان به LD 50 برسد. (۶ امتیاز)

بخش چهارم ۳۰ امتیاز

خانواده پروتئین هایی به نام FOXO گروهی از فاکتور های رونویسی هستند، که نقش مهمی در تنظیم بیان ژن های درگیر در تکثیر سلولی، مرگ سلولی، تمایز و طول عمر دارند. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که میتواند موجب فعال کردن پروتئین های خانواده FOXO گردد که در ادامه موجب تنظیم تکثیر سلولی و مقاومت به استرس اکسیداتیو می گردند.

یکی از پروتئین های مهم که بیان آن توسط FOXO3a افزایش مییابد آنزیم SOD می باشد که نقش مهمی در کاهش استرس اکسیداتیو و تجزیه گونه های فعال اکسیژنی ROS دارد. همچنین فعال شدن پروتئین FOXO3a پروتئین های درگیر در آپوپتوز و مسیر کاسپاز را فعال می کند که در ادامه افزایش استرس اکسیداتیو و صدمه های فراوان در سلول می تواند موجب مرگ سلولی گردد.

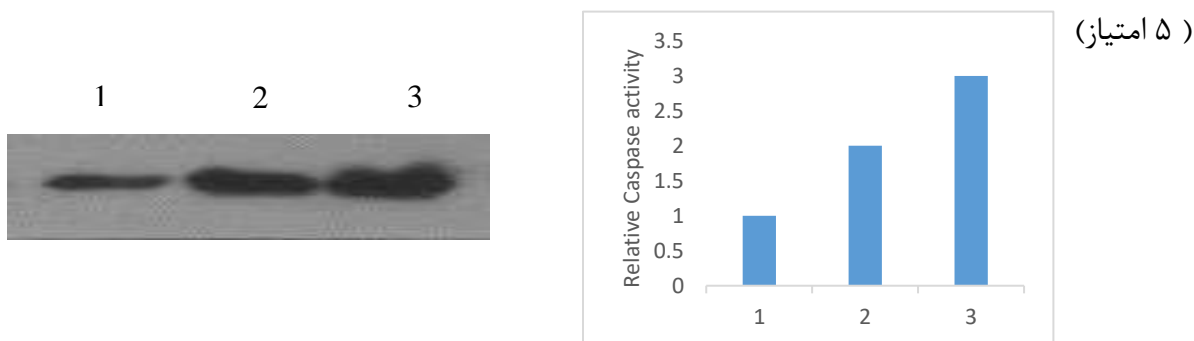
روش انجام کار:

۱- تصاویر و نتایج داده شده را به دقت نگاه کنید.

۲- با توجه به اطلاعات اولیه task و تفسیر داده ها به سوالات پاسخ دهید.

از سه گروه موش های مورد آزمایش دو گروه از موشها در معرض اوزون به عنوان ماده ایجاد کننده ترکیبات فعال اکسیژنی در آزمایشگاه قرار گرفته اند. با این تفاوت که گروه A در رژیم تغذیه ای خود آنتی اکسیدانت دریافت کرده اند و گروه B هیچ گونه آنتی اکسیدانتی دریافت نکردند. گروه C نیز به عنوان کنترل در معرض اوزون نبوده و با آنتی اکسیدانت نیز تیمار نگشته اند. سپس موش ها کشته شده و نمونه کبدی آن ها برای بررسی میزان پروتئین های مد نظر در آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند.

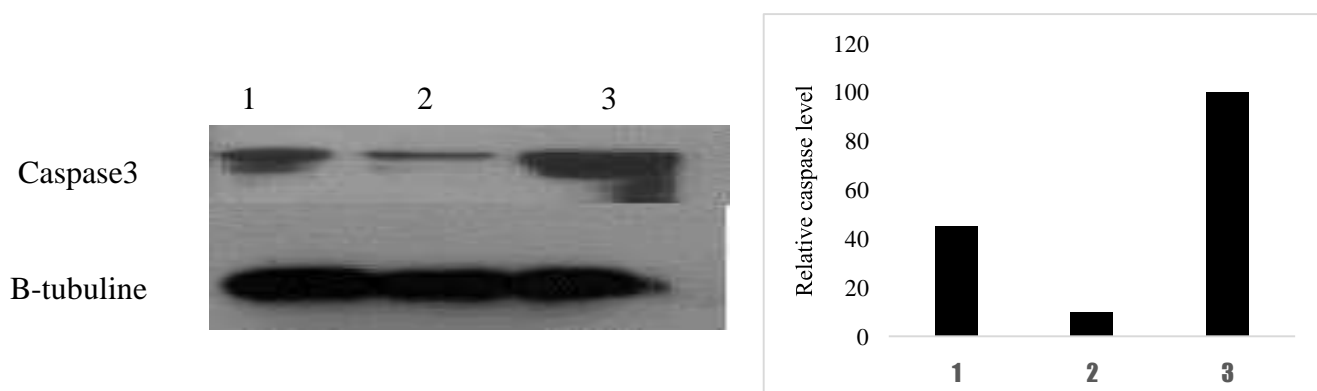
۱ کدام یک از سه باندی که مشاهده می کنید مربوط به گروه B است؟ علت انتخاب پاسخ خود را بنویسید؟



تصویر زیر مربوط به تست وسترن بلات برای آنزیم SOD می باشد.

۲ در ادامه میزان بیان پروتئین caspase3 نیز بررسی گردید. تصویر مربوط به تست وسترن بلات پروتئین در زیر

مشاهده می گردد. با توجه به آن کدام یک از باند ها مربوط به گروه A است؟



سوال ۳- دلیل انتخاب پاسخ خود را بنویسید.

۴- در تصویر بلات مربوط به پروتئین Caspase3 دو باند زیر هم مشاهده می گردد علت چیست؟ (۵ امتیاز)

الف) به علت انجام نامناسب وسترن بلات و عدم شست و شوی مناسب آنتی بادی در ناحیه بیشتری متصل شده و باند اضافه دیده می شود.

ب) در هنگام استخراج پروتئین به علت عدم دقت در حین کار پروتئین شکسته شده اما آنتی بادی هر دو قطعه را تشخیص داده است.

ج) ممکن است فعال شدن پروتئین موجب جدا شدن قطعه ای از آن گردیده باشد اما آنتی بادی هر دو قطعه را تشخیص داده است.

د) پروتئین دارای یک ساختمان دو جرئی است که توسط آنتی بادی تشخیص داده شده است.

۵- چرا تصویر وسترن بلات مربوط به پروتئین B-tubulin نیز نمایش داده شده است؟ (۵ امتیاز)

الف) برای اینکه نشان بدهیم بیان پروتئین Caspase3 مستقل از بیان پروتئین B-tubulin است.

ب) برای مقداری کردن پروتئین Caspase3 نسبت به یک پروتئین که در سلولهای مختلف به صورت یکسان بیان می گردد.

ج) برای اطمینان حاصل کردن از اینکه پروتئین Caspase3 و B-tubulin در موش ها تحت تیمارهای متفاوت با هم برهمکنشی ندارند.

د) تا اطمینان حاصل گردد که سطح بیان پروتئین Caspase3 تحت اثر مقدار آنتی بادی های دیگر نیست. سوال ۶- امتیاز دانشجویی در آزمایشگاه قصد بررسی پروتئین Foxo3a را دارد اما آنتی بادی این پروتئین را در دسترس ندارد. او می تواند بیان پروتئین SOD یا پروتئین های مسیر مرگ سلولی را اندازه بگیرد کدام یک به او در تایید حضور FOXO3a کمک بیشتری می کند و چرا؟ (۵ امتیاز)

الف) SOD، زیرا پروتئین زیردست FOXO 3a می باشد، و بررسی آن می تواند تاییدی بر حضور و عملکرد Foxo3a باشد.

ب) SOD، زیرا پروتئین های مسیر مرگ سلولی از مسیر های دیگر نیز فعال می گردند. و تنها توسط Foxo3 بیان نمی گردد تا تایید کننده آن باشد.

ج) پروتئین های مسیر مرگ سلولی، زیرا زیردست Foxo3a می باشند، و بررسی آن ها می تواند تاییدی بر حضور و عملکرد Foxo3^a باشد.

د) پروتئین های مسیر مرگ سلولی، زیرا پروتئین SOD از مسیر های دیگر نیز فعال می گردد. و تنها توسط Foxo3a بیان نمی گردد تا تایید کننده آن باشد.

