بسم رب الحسین

جمهوری اسلامی ایران

وزارت آموزش و پرورش

مرکز ملّی پرورش استعدادهای درخشان و دانش پژوهان جوان

«و انذرهم یوم الحسرة اذ قضی الأمر و هم فی غفلة و هم لا یؤمنون» «سورة مریم، آیه ۳۹»

پاسخنامهٔ آزمون پایانی آزمایشگاه بیوشیمی دوره تابستانه المپیاد زیست شناسی – پاییز ۱۳۹۹

- **در سوالات مورد بررسی، از واکنش های پیچیدهٔ شیمیایی و سایر عوامل مداخله کننده ای که در سوال بررسی نشده اند صرفنظر کنید. آزمایش ها را عملی و آنزیم های مورد بررسی و واکنش ها را با کارایی بالا در نظر بگیرید مگر آنکه خلاف آن ذکر شود.**
- **کلید با توجه به داده های موجود در سوال ارائه می شود. بدیهیست که می بایست سوالات را با توجه به داده های ارائه شده پاسخ دهید هرچند با واقعیت تفاوت داشته باشد.**
- **تمامی داده های اعشاری را تا سه رقم اعشار وارد نمایید.**
- **تنها استفاده از ماشین حساب مهندسی Casio 82-MS مجاز می باشد. در صورت نیاز به ماشین حساب به مسئول جلسه اطلاع دهید.**
- **همراه داشتن هرگونه کتاب، جزوه، یادداشت و لوازم الکترونیکی نظیر تلفن همراه و لپتاپ ممنوع است. همراه داشتن این قبیل وسایل حتّی اگر از آن استفاده نکنید یا خاموش باشد، تقلّب محسوب خواهد شد.**
- **کلید ارائه شده کلید اولیه است. امکان هرگونه تغییر در این کلید (از جمله اعداد، اندازه بازه های در نظر گرفته شده و...) وجود دارد. لطفا پس از بررسی کلید اعتراضات خود را در موعد مقرر ارسال فرمایید.**

خسته نباشید!

بخش اول : تئوری آزمایشگاه ۱ (۳۹ نمره + نمرهٔ سوال 2.A)

۱- اخیرا گروهی از زیست شناسان به طور تصادفی متوجه کاربرد دارویی نوعی مادهٔ سمی به نام **Amatoxin** شدند که توسط قارچ کلاهک مرگ (**Amanita phalloides**) رشد کرده در جنگل های کالیفرنیا ساخته می شود. از همین رو با احتیاط کامل شروع به استخراج این ماده و بررسی ویژگی های شیمیایی آن کردند و جرم مولی این ماده را **903g/mol** به دست آوردند. آنها پس از تخلیص و جداسازی این ماده، مطابق جدول زیر محلول هایی در حجم نهایی **750µL** با غلظت های مشخص ساختند و درصد عبور نور از این محلول ها را اندازه گیری نمودند. با توجه به این نتایج :

میزان **amatoxin** موجود در محلول (**µM**)	ضریب خاموشی محاسبه شده با هر داده
۲۴.۹۵۳۸۵۷۵	**بدون گرد کردن غلظت : ۴۳۲۴.۱۹۷** با گرد کردن غلظت : ۴۳۱۶.۲۱۶
۵۰.۰۵۵۳۷۰۹۹	**۴۳۱۷.۱۴۸** ۴۳۲۱.۹۲۸
۹۹.۹۶۳۰۸۶۰۱	**۴۳۱۹.۵۷۸** ۴۳۱۷.۹۸۳
۱۵۰.۰۱۸۴۵۷	**۴۳۱۸.۲۵۲** ۴۳۱۸.۷۸۳
۲۰۰.۰۷۳۸۲۸	**۴۳۱۴.۸۰۴** ۴۳۱۶.۳۹۷

A. ضریب خاموشی مولی این ماده را بدست آورید. (۸ نمره – بدون نمره منفی)

ضریب خاموشی مولی : ($M^{-1} . cm^{-1}$)	**با رگرسیون : ۴۳۱۴.۵۹۳** **وارد کردن (0.0) : ۴۳۱۵.۴۵۱** **میانگین داده ها ۱ : ۴۳۱۸.۷۹۶** میانگین داده ها ۲ : ۴۳۱۸.۲۶۱
بازهٔ ۴۳۱۴.۵ تا ۴۳۱۸.۸۹۶ صحیح است	

B. جمعی از محققان ایرانی متوجه حضور این گونه قارچ در جنگل های هیرکانی شدند که سم آن نیز خواصی همانند گونهٔ آمریکایی آن دارد. آن ها پس از نمونه گیری و ایجاد یک محلول از این ماده سمی، مطابق پروتکل های آزمایش پیشین جذب نوری نمونهٔ خودشان را **1.223** به دست آوردند. غلظت نمونهٔ ایرانی این محلول را به دست آورید. (۴ نمره – بدون نمره منفی)

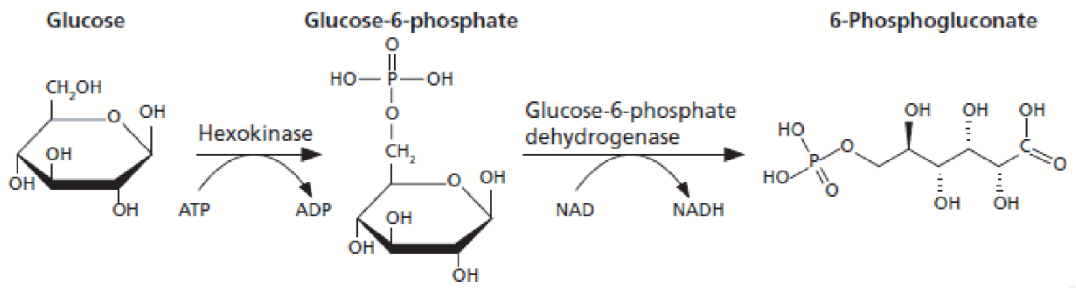
غلظت نمونهٔ ایرانی (**µM**) :	بازهٔ ۲۸۳.۱۸۱ تا ۲۸۳.۵۹۷ صحیح است جواب دقیق با رگرسیون : ۲۸۳.۳۸۹

۲- پروسه آنزیمی کیت گلوکز اکسیداز و سنجش غلظت گلوکز به صورت زیر است :

$$\beta\text{-D Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{گلوکز اکسیداز}} \text{D – Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4- Aminoantipyrine} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{پراکسیداز}} \text{Quinoneimine} + 4\,H_2O$$

همانطور که مشاهده می کنید در این روش با عمل آنزیم پراکسیداز ماده ای رنگی **Quinoneimine** تولید شده که یک ترکیب قرمز رنگ است و در **546nm** حداکثر جذب را دارد. اما نکته آنجاست که گلوکز اکسیداز تنها فرم **β** گلوکز را به عنوان سوبسترا قبول می کند؛ بنابراین از آنجا که در خون ۷۰ درصد از گلوکز خون به فرم **β** و مابقی به فرم **α** می باشد، پس اندازه گیری قند خون بر این مبنا مقدار واقعی از قند خون نمی دهد. از این رو برای اندازه گیری غلظت قند از روشی دیگر هم استفاده می شود که فرایند واکنش های آن به صورت زیر است :



در این روش از تغییرات جذب **NADH** استفاده می شود (λ_{max} = **339nm**) و غلظت این ماده می تواند معیاری از مقدار قند موجود در محلول باشد. با توجه به مفاهیم گفته شده به سوالات زیر پاسخ دهید :

A. در صورتی که در کیت گلوکز اکسیداز، علاوه بر دو آنزیم اصلی گلوکز اکسیداز و پروکسیداز آنزیم کاتالاز هم داشته باشیم در آزمایشات بررسی آنزیمی کدام مورد(موارد) ممکن است اشتباه محاسبه شود؟ با ضربدر مشخص کنید. (هر خانه ۲ نمره – نمره منفی برابر)

V_{max}	K_m	فعالیت	فعالیت ویژه	غلظت یک محلول حاوی سوبسترا
❊		❊	❊	❊

B. در آزمایشی با یک کیت آنزیمی چینی نتایج زیر به عنوان جذب نوری محلول های با غلظت مختلف قند ثبت شد. هنگام رگرسیون گرفتن، به این شک کردیم که شاید ارتباط جذب و غلظت از رابطه ای متفاوت از رابطهٔ خطی تبعیت کنند. به همین دلیل شما چند مدل مختلف را بررسی می کنید تا مدلی که تطابق بهتری با نتایج دارد را بیابیم.

غلظت	جذب نوری
۱.۲	۰.۵۷۱
۲	۰.۸
۵	۱.۲۵
۹	۱.۵
۱۶	۱.۶۸۴

a. داده های خواسته شده را برای هر مدل گزارش کنید. (هرخانه ۲ نمره – بدون نمره منفی)

مدل	$Abs = ab^x$	$Abs = ax^b$	$Abs = \frac{a.x}{b+x}$	$Abs = a.\log x + b$	$Abs = a\sqrt{x} + b$	$Abs = ax+b$
a	۰.۶۹۹±۰.۰۱	۰.۵۷۵±۰.۰۱	۲.۰۰۱±۰.۰۱	۱.۰۱۲±۰.۰۱	۰.۳۸۴±۰.۰۱	۰.۰۷۱±۰.۰۱
b	82MS : ۰.۰۶۵±۰.۰۱ ~~991ES : ۱.۰۶۷~~	۰.۴۲۰±۰.۰۱	۳.۰۰۴±۰.۰۱	۰.۵۰۶±۰.۰۱	۰.۲۶۰±۰.۰۱	۰.۶۹۰±۰.۰۱

پی نوشت: مطابق پایلوت انجام شده با دو نوع ماشین حساب، متوجه وجود تفاوت در عدد گزارش شدهٔ این دو ماشین حساب شدیم. درصورت حصول اطمینان کامل از این مسئله، نوشتن عدد ۱.۰۶۷ نشان دهندهٔ استفاده از ماشین حساب غیرمجاز بوده، تقلب محسوب شده و نمرهٔ سوال ۲.B بخش اول صفر در نظر گرفته می‌شود.

b. از مدل های بالا سه مدلی که بیشترین تطابق با داده های ما را دارند به ترتیب از راست به چپ در جدول زیر وارد کنید. (هر خانه ۱ نمره)

$Abs = \frac{a.x}{b+x}$	< $Abs = a.\log x + b$	< $Abs = ax^b$

بخش دوم : تئوری آزمایشگاه ۲ – تسک Gloc-1 (۷۷ نمره + نمره سوال 3.D)

تولید آنزیمی ارزان و با کارایی بالا برای واکنش های خاص از آرزوهایی بوده است که امروزه بشر در حال تحقق بخشیدن به آن است. اکنون در مرزهای علم تولید پروتئین ها و آنزیم ها به صورت De novo بررسی می شود. در سنتز De novo آنزیم، زیست شناسان با بررسی توالی پروتئین و آنالیز ساختار سه بعدی احتمالی آن، تولید آنزیمی جدید که تاکنون در طبیعت وجود نداشته را پیش می برند که می تواند درهای جدیدی را در دنیای گسترده واکنش ها به روی ما بگشاید. از این رو زیست شناسان ایرانی نیز تماشاچی ننشسته و در این مسیر قدم گذاشته اند. شرکت YazdiGen که اخیرا به یکی از شرکت های پیشگام در این عرصه تبدیل شده است، امروزه بر روی کیت تعیین غلظت قند جدیدی متفاوت از گلوکز اکسیداز به نام Gloc-1 کار می کند. روش کارآنزیم های موجود در بازار که بر مبنای جذب NADH عمل می کنند در سوال ۲ بخش اول توضیح داده شد. اما این آنزیم به جای عمل در دو مرحله، در یک مرحله با مصرف ATP و NAD گلوکز را به 6-Phosphogluconate تبدیل می کند و درواقع دو مرحله واکنش را در یک گام پیش می برد.

۱. حال شرکت YazdiGen از شما به عنوان یک آزمایش کننده ماهر درخواست کرده که آنزیم Gloc-1 را چک کنید تا عملکرد آن صحت سنجی شود. شما هم با کمال میل قبول کرده و مراحل زیر را برای اجرای آزمایش انجام می دهید :

- ۱۰ کووت لیبل شده در اختیار شما قرار گرفته است (از هر کووت دوتا دارید. مثلا A_1 و A_2). مطابق جدول زیر (داده ها برحسب µL)، مقادیری از سوبسترا و بافر را در کووت می ریزید به طوری که حجم نهایی هر کووت به 2mL برسد:

لیبل کووت	سوبسترا (گلوکز 5mg/mL)	بافر	آنزیم
A	۲۰۰	۰	۱۸۰۰
B	۱۵۰	۵۰	۱۸۰۰
C	۱۰۰	۱۰۰	۱۸۰۰
D	۵۰	۱۵۰	۱۸۰۰
E	۲۵	۱۷۵	۱۸۰۰

- به تمامی کووت های A تا E آنزیم را اضافه می کنیم. جذب کووت های $A_1,B_1,...,E_1$ را پس از ۳۰ ثانیه در طول موج 339nm اندازه گیری می کنیم. در کووت های $A_2,B_2,...,E_2$ پس از ۱۵ دقیقه، 500µL محلول Stop می ریزیم و با ریختن این محلول واکنش بلافاصله متوقف می شود. سپس جذب آنها را اندازه گیری می نماییم. پس از اندازه گیری جذب ها و استاندارد کردن داده ها (کم کردن جذب بلنک از آنها) نتایج زیر ثبت شد :

لیبل کووت	جذب گروه ۱	غلظت اولیه گروه ۱	جذب گروه ۲	غلظت اولیه گروه ۲
A	۰.۱۳۷	۰.۵	۲.۱۰۹	۰.۴
B	۰.۱۲۳	۰.۳۷۵	۱.۵۸۲	۰.۳
C	۰.۱۰۳	۰.۲۵	۱.۰۵۵	۰.۲
D	۰.۰۶۸	۰.۱۲۵	۰.۵۲۷	۰.۱
E	۰.۰۴۱	۰.۰۶۲۵	۰.۲۶۳	۰.۰۵

A. با در نظر گرفتن اینکه در مدت ۱۵ دقیقه، واکنش به صورت کامل انجام می شود، منحنی استاندارد جذب برحسب غلظت های مختلف(mg/L) سوبسترا را واحد گذاری و رسم کرده (۷ نمره – بدون نمره منفی ، توجه داشته باشید که نقاط باید دقیق رسم شده و غلظت های صحیح را نمایش دهند.) و معادلهٔ خط حاصل از آن را در کادر وارد نمایید. (۳ نمره – بدون نمره منفی)

By data

معادله خط:

$Y = (۵.۲۷۴ \times ۱۰^{-۳})x - ۳.۹۶۳ \times ۱۰^{-۴}$

منحنی استاندارد هم به صورت $\frac{1}{V}$ و $\frac{1}{S}$ و هم به صورت V و S نمره‌دهی می‌شود. شرط لازم برای دریافت نمره کامل صحت اعداد و مقیاس‌بندی صحیح است. (هر نقطه ۱ نمره
مقیاس‌بندی و تعیین خط ۲ نمره)

B. در کووت دیگری علاوه بر کووت های بالا **200µL** محلول گلوکز **Alpha** با غلظت نامشخص و **1800µL** آنزیم ریختیم و پس از ۲۰ دقیقه جذب آن را ۱.۴۳۴ به دست آوردیم. غلظت قند محلول **Alpha** را به دست آورید.
(۵ نمره – بدون نمره منفی)

غلظت قند برحسب g/L :	۲.۷۲۰±۰.۰۱

C. موارد خواسته شده در جدول زیر را تکمیل نمایید. (هر خانه ۱ نمره – بدون نمره منفی، جرم مولی گلوکز 180g/mol)

	نمونهٔ A	نمونهٔ B	نمونهٔ C	نمونهٔ D	نمونهٔ E
غلظت در ابتدای واکنش (μM)	۲۷۷۷.۷۷۸±۱۰	۲۰۸۳.۳۳۳±۱۰	۱۳۸۸.۸۸۹±۱۰	۶۹۴.۴۴۴±۵	۳۴۷.۲۲۲±۵
غلظت پس از ۳۰ ثانیه (μM)	۲۶۳۳.۰۵۴±۱۰	۱۹۵۳.۳۵۶±۱۰	۱۲۷۹.۹۷۸±۱۰	۶۲۲.۴۰۰±۵	۳۰۳.۶۱۸±۵
سرعت واکنش در ۳۰ ثانیهٔ ابتدایی (μM/min)	۲۸۹.۴۴۸±۵	۲۵۹.۹۵۵±۵	۲۱۷.۸۲۱±۵	۱۴۴.۰۸۸±۵	۸۷.۲۰۸±۵

D. منحنی معادلهٔ لینویور-برک را برای سرعت در زمان ۳۰ ثانیه آنزیم Gloc-1 رسم کرده (۷ نمره – بدون نمره منفی) و Km و Vmax را محاسبه نمایید. (هرکدام ۵ نمره – بدون نمره منفی)

در این جدول نقاط و معادلات
برحسب داده‌های جدول بالا
نمره‌دهی می‌شود.

By data

: Km (mM)	۱.۳۷۹±۰.۰۱
: V_{max} (µM/min)	۴۳۲.۲۴۴±۵

۲. برای اطمینان از داده های به دست آمده، شما بر آن می شوید که داده هایی که به دست آورده اید را با سایر دانش پژوهان IrBO 23 که آزمایش مشابه را انجام داده اند مقایسه کنید؛ اما در کمال تعجب متوجه تفاوت در جذب های به دست آمدهٔ بقیه می شوید! با بررسی های بیشتر در می یابید که علاوه بر قند نوعی مولکول دیگر در استوک سوبسترای شما وجود دارد که باعث این تفاوت شده است. داده های سایر دانش پژوهان را در جدول زیر مشاهده می نمایید :

لیبل کووت	جذب گروه ۱
A	۰.۱۱۷
B	۰.۱۰۷
C	۰.۰۹۱
D	۰.۰۶۳
E	۰.۰۳۹

A. صحت گزاره ی زیر را مشخص نمایید. (۱ نمره – نمره منفی برابر)

۱) تفاوت در جذب ها می تواند به این علت باشد که سایر دانش آموزان جذب محلول بلنک را از داده های خود کم نکرده اند.

صحیح	غلط
	❊

B. شما با بررسی احتمالات مختلف به این نکته بر می خورید که ممکن است این تفاوت به علت وجود یک مهارکننده در محلول باشد. از این رو محاسبات مربوط به آن را انجام داده و در صورت صحت فرضیهٔ خود، نوع مهارکننده در جدول زیر مشخص کنید. در صورت عدم صحت فرضیه «مهارکننده نیست» را انتخاب نمایید. (۸ نمره – نمره منفی نصف)

نوع مهارکننده	
رقابتی	
نارقابتی	❊
مختلط	
مهارکننده نیست	

۳. پس از موفقیت در انجام آزمایش های قبلی، اعتماد مسئولین شرکت **YazdiGen** به شما جلب می شود و اکنون از شما می خواهند که فعالیت ویژه آنزیم جدیدشان را نیز به دست آورید. از این رو شما برای پیدا کردن مقدار آنزیم استفاده شده از تست بردفورد استفاده می کنید. برای انجام این تست موارد زیر را در اختیار دارید :

- ✓ محلول **BSA** (**2 mg/mL**)
- ✓ **ویال حاوی آنزیم استفاده شده در آزمایش ۱ – –** (اگر نمی دانید ویال چیست آن را معادل ظرف در نظر بگیرید)
- ✓ **محلول بردفورد**
- ✓ **ویال W (آب) –** (اگر نمی دانید ویال چیست آن را معادل ظرف در نظر بگیرید)
- ✓ **میکروپلیت ۹۶ چاهکی**

روش کار :

- **چاهک های میکروپلیت را مطابق جدول زیر پر می کنید.**

	1	2	3	4	5	6	7
A	10µL BSA + 40µL W	8µL BSA + 42µL W	6µL BSA + 44µL W	4µL BSA + 46µL W	2µL BSA + 48µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
B	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
C	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-

- **به هریک از چاهک های پر شده 150µL محلول بردفورد اضافه کرده و سپس میکروپلیت خود را برای خواندن جذب ها به مسئول آزمایشگاه ارائه می دهید. جدول زیر نتایج جذب های شما را نشان می دهد :**

	1	2	3	4	5	6	7
غلظت	**0.1mg/ml**	**0.08mg/ml**	**0.06mg/ml**	**0.04mg/ml**	**0.02mg/ml**	**?? mg/ml**	**0 mg/ml**
میانگین	**0.863**	**0.691**	**0.515**	**0.352**	**0.181**	**0.433**	**0.086**
بعد استانداردسازی	**0.777**	**0.605**	**0.429**	**0.266**	**0.095**	**0.347**	

A. غلظت آنزیم موجود در ویال E چند $\frac{\mu g}{mL}$ است؟ (۵ نمره – بدون نمره منفی)

B. فعالیت ویژهٔ ($\frac{\text{واحد آنزیمی}}{mg}$) آنزیم استفاده شده کووت A_1 سوال ۱ را گزارش کنید. (۶ نمره – بدون نمره منفی)

A	۴۹.۷۳۶±۱
B	بازهٔ ۹.۵۲ تا ۹.۷۷ صحیح است

میلی‌گرم آنزیم در کووت E : ۰٫۰۸۹۵
میزان آنزیم موجود در کووت E : ۰٫۰۱ ± ۰٫۸۶۴

C. یکی از دوستان شما با مشکلی مواجه شده است. او اذعان می دارد که حواسش پرت شده و در ابتدای آزمایش ها استوک آنزیمش را با BSA قاطی کرده است. در این صورت دوست شما : (هر گزاره ۲ نمره – نمره منفی نصف)

۱) Vmax آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) Vmax ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۲) Km آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) Km ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۳) فعالیت آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) فعالیتی ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۴) فعالیت ویژهٔ آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) فعالیت ویژه ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۵) غلظت محلول آلفا (سوال 1.B) را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) غلظت محلول آلفایی که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

	کمتر از	بدون تفاوت با	بیشتر از
۱)	❊		
۲)		❊	
۳)	❊		
۴)	❊		
۵)	❊		

D. پس از بررسی مشخص شد ادعای دوست شما درست بوده و در ویال حاوی 4mL آنزیم اولیه، 1mL از محلول BSA ریخته است. نکته جالب تر این بوده که جذب های دوست شما در آزمایش ها دقیقا با نتایج شما یکی شده است! (و البته این به معنای خطای آزمایش شما نیست.) اگر پارامترهایی را در بالا مشخص کرده اید که متفاوت گزارش می شوند، مقادیر صحیح آنها (در حالتی که آنزیم با BSA مخلوط نمی شد) را محاسبه کنید. بدیهیست که در صورت عدم تغییر نیازی به پر کردن جدول زیر نیست. (هر پاسخ عددی ۳ نمره – بدون نمره منفی)

غلظت قند در ویال سوبسترا (سوال 1.B)	فعالیت ویژه (سوال 3.B)	فعالیت (واحد آنزیمی)	Km (mM) (سوال 1.D)	Vmax (μM/min) (سوال 1.D)
۰.۸÷ پاسخ 1.B	$\frac{\text{فعالیت جدید}}{\text{پاسخ 3.A} - ۴۰۰} \times ۱٫۸$ / ۸۰۰	Vmax سوال 1.D × ۰.۰۰۲۵	–	0.8 ÷ 1.D سوال Vmax

کلید بخش تیتراسیون

شماره سوال	جواب		
1	الف)6.70	ب) 0.90	ج) 2.05
2	$1.20 * 10^{-1}$		
3	2.02		
4	1.23		
5	$-3.34 * 10^{1}$		
6	9.60		
7	$8.42 * 10^{1}$		