آزمون بیوشیمی و سلولی مولکولی دوره طلا 24 21 اسفند 1400

مدت زمان آزمون: 210 دقیقه

توضیحات:

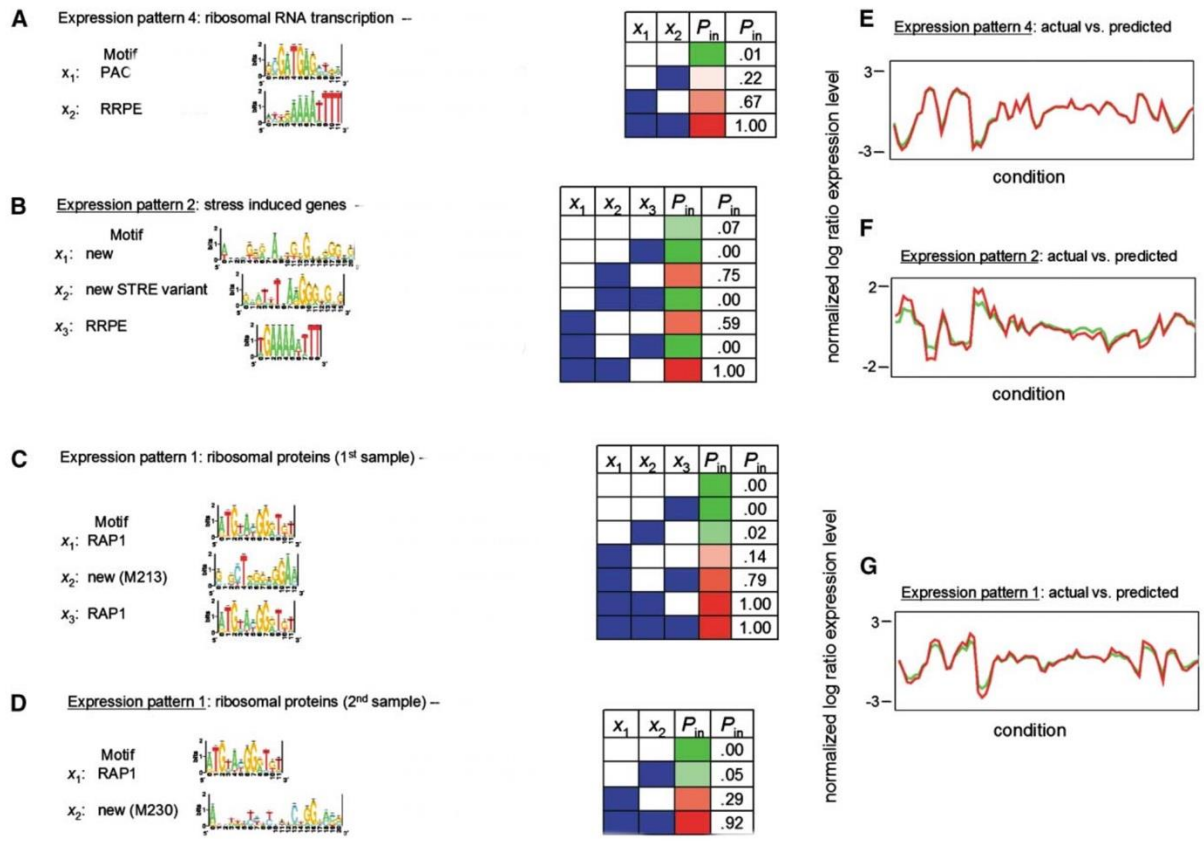
- آزمون از دو بخش تشکیل شده است: بخش اول شامل سوالات سلولی و مولکولی و بخش دوم شامل سوالات تیتراسیون می باشد.
- بخش اول مجموعا 80 نمره و بخش دوم مجموعا 20 نمره دارد.
- در تمامی سوالات صحیح غلط هر گزاره دارای یک نمره، و نمره منفی گزاره برابر با نمره آن میباشند. نمره سوالات پاسخ کوتاه در کنار سوالات ذکر شده است.
- به فایل پیوست ضمیمه شده توجه کنید.

بخش اول:

سوال یک:

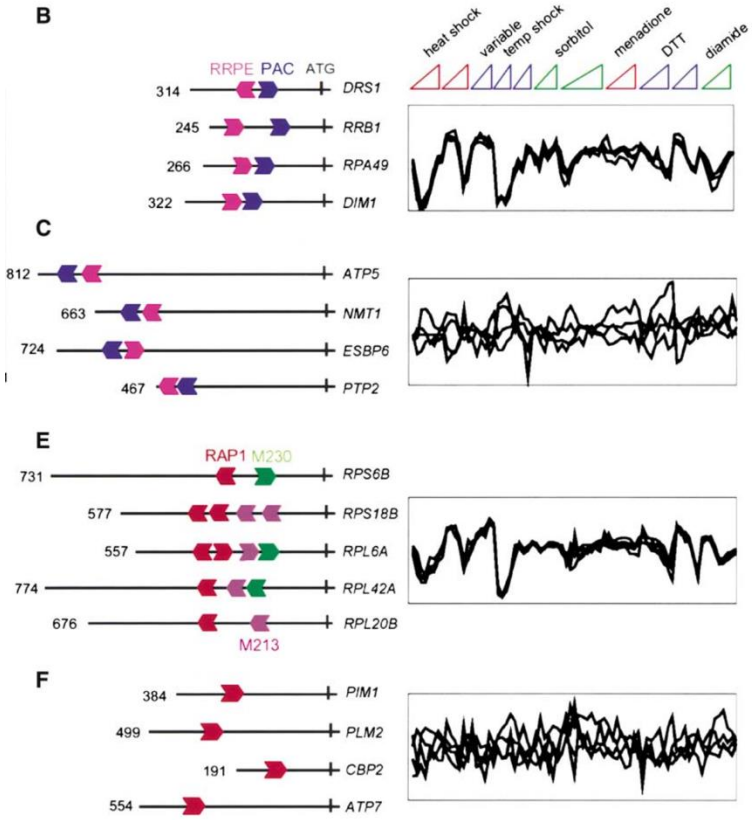
به منظور پیش بینی بیان ژن بر اساس توالی های کنترلی پروکسیمال، میزان بیان تمامی ژن های باکتریِ E.coli تحت اثر انواع استرس محیطی سنجیده شد. بر اساس نتایج ژن ها به ۴۹ گروه با پترن بیان مخصوص به خود تقسیم شدند. با مقایسه توالی DNA اطراف ژن ها و پترن های بیان شناسایی شده، قطعات کنترلی کلیدی برای هر پترن شناسایی شده و نتایج بدست امده برای چهار گروه را در شکل زیر مشاهده میکنید.

شکل یک : برای هر پترن بیان ژن، نواحی کاندید برای کنترل بیان ژن و توالی ان ها داده شده است، در جدول های داده شده، رنگ آبی به معنای حضور قطعه کنترلی در توالی و رنگ سفید به معنای عدم حضور است، P in نشان دهنده احتمال آن است که ژنی با ترکیب قطعات کنترلی داده شده، در پترن بیان ژن مورد بررسی وجود داشته باشد یا نه. (به طور مثال برای پترن بیان ژن ۴ : ribosomal RNA transcription ، به احتمال ٪۶۷ ژنی که تنها قطعه کنترلی pac را دارا میباشد در گروه شناخته شده با پترن بیان ژن ۴ قرار میگیرد)



در ازمایش بعدی برای فهمیدن اهمیت جایگاه و ترتیب قرارگیری این قطعات بر بیان ژن، قطعات دی ان ای سنتزی برای گروه های 4 , 1 expression pattern ساخته شد و میزان mRNA تولید شده برای تمامی ژن های قرار گرفته در هر گروه ازمایش در شرایط استرس های مختلف محیطی سنجیده شد.

شکل دو: در این شکل قطات دی ان ای ازمایش شده نشان داده شده است. در نمودار های سمت چپ،محور y نشان دهنده ی log ratio expression level میباشد و محور ایکس استرس های محیطی مختلف است. در هر قسمت این نمودار برای هر یک از ژن های ازمایش شده رسم شده است.



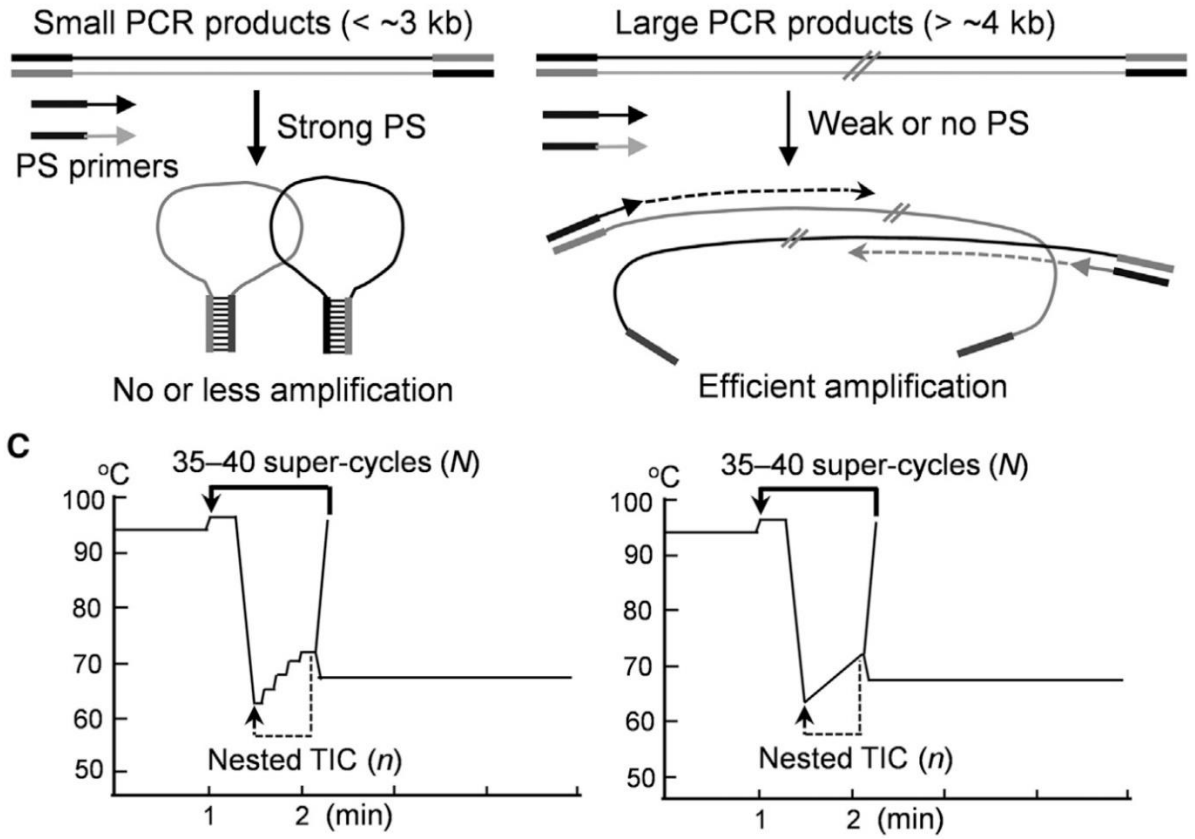
با توجه به اطلاعات داده شده صحت گزاره های زیر را بررسی کنید: در صورت عدم وجود اطلاعات کافی برای اثبات صحت گزاره، آن گزاره غلط در نظر گرفته میشود.

شکل دو: در این شکل قطات دی ان ای ازمایش شده نشان داده شده است. در نمودار های سمت چپ،محور y نشان دهنده log ratio expression level میباشد و محور ایکس استرس های محیطی مختلف است. در هر قسمت این نمودار برای هر یک از ژن های ازمایش شده رسم شده است.

الف) در هر چهار پترن بیان ژن داده شده، حداقل رابطه دو قطعه کنترلی بر روی بیان ژن با گیت AND توجیه میشود.
ب) با جایگزین کردن M230 به جای M213، بیان ژن به طرز معنا داری تغییر خواهد کرد.
ج) میتوان فرض کرد قطعه RRPE دارای توالی ای با تمایل بالا به پروتیین های مهارکننده بیان ژن میباشد.
د) اثر دو قطعه PAC و RREF تنها وابسته به فاصله قرارگرفتن آنها از پروموتر است و ترتیب قرارگیری اهمیتی ندارد.
ه) بر اساس ازمایش دوم بیان توالی ای که در آن قطعه M230 در فرادست RAP1 قرار گرفته باشد، در اثر قرار گرفتن در معرض شوک گرمایی به طرز معناداری کاهش می یابد.

سوال دو:

از مشکلات عمده PCR کاهش efficiency در همانندسازی قطعات طویل دی ان ای می باشد. یکی از دلایل عمده این پدیده همانندسازی ناقص قطعات میباشد که منجر به تولید دی ان ای های غیر اختصاصی و کوتاه تر شده و از انجا که همانندسازی قطعات کوچک تر با کارایی بالاتری صورت میگیرد این قطعات با قطعه هدف طویل برای همانندسازی رقابت میکنند. مشکل دوم در پی سی ار قطعات طویل، عدم توزیع یکسان نوکلئوتید های گوانین و سیتوزین در طول ژنوم بوده که باعث تنوع Tm در طول قطعه میشود. بخش های low GC content دارای Tm پایینی بوده و در نتیجه از پایداری کمی در مرحله extents با دمای 68-72 برخوردار هستند و این دما برای همانندسازی بخش های high GC content بهینه است. به منظور حل این دو مشکل میتوان از روش جدیدی به نام STI-PCR استفاده کرد. خلاصه ای از این روش را در شکل مشاهده میکنید:



به منظور جلوگیری از همانندسازی قطعات کوچک تر از پرایمر هایی میشود که انتهای 3' و 5' انها مکمل یکدیگر هستند و در نتیجه قطعات همانندسازی شده کوتاه یک لوپ تشکیل داده و از همانندسازی حذف میشوند. به این پدیده PCR suppression PS)) گفته میشود.همچنین در مرحله extension دما به طرز تدریجی (پلکانی یا با شیب یکسان) افزایش داده میشود.

صحت گزاره های زیر را تعیین کنید:

الف) انتهای مکمل پرایمر ها باید به گونه ای طراحی شود که Tm بالاتر از بقیه بخش های دورشته نداشته باشد.

ب) قطعات بلند مورد نظر نیز تحت تاثیر PS قرار میگیرند اما به علت فاصله زیاد بین دو انتهای مکمل احتمال تشکیل لوپ کمتر است.

ج) دانش اموزی تصمیم میگیرد به منظور رفع مشکل تفاوت درصد GC در طی طویل سازی، به جای افزایش تدریجی دما، این مرحله را در دمای ثابت اما پایین تر انجام دهد. احتمال تولید قطعات غیر اختصاصی در این روش بیشتر از زمانی است که دما به صورت تدریجی افزایش می یابد.

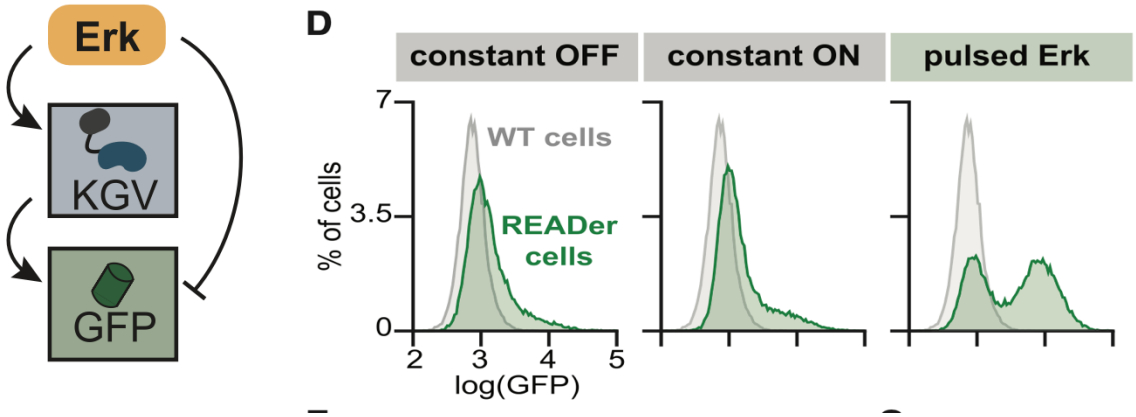
د) با کاهش غلظت پرایمر استفاده شده، اثر PS بر روی قطعات کوچک تر افزایش می یابد.

ه) از دیگر روش های افزایش کارایی پی سی ار برای قطعات بلند، اضافه کردن قابلیت proof reading به انزیم استفاده شده میباشد.

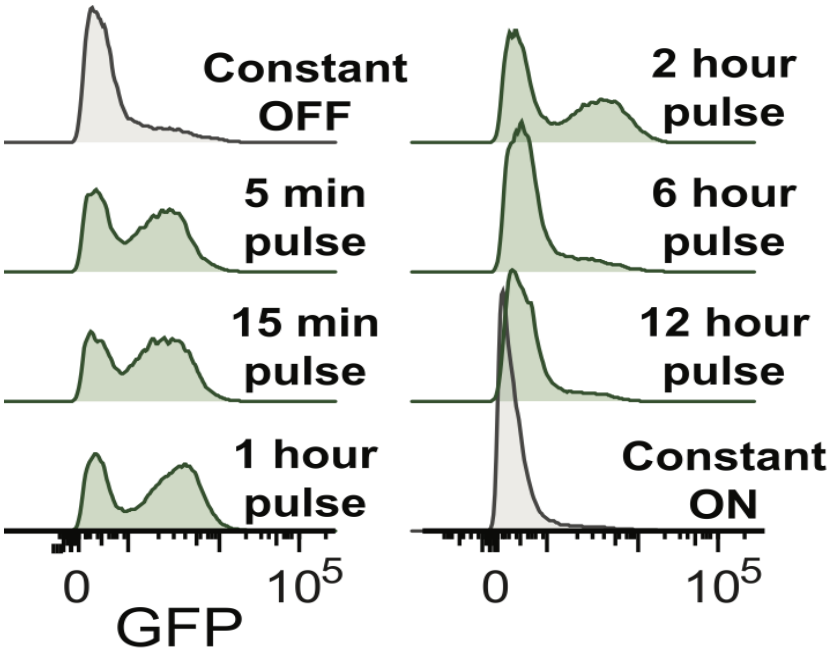
سوال سه:

در ازمایشی مدار طراحی شده READer که در مقابل مشاهده میکنید به سلول ها اضافه شده و سپس میزان بیان هر دو ژن KGV و GFP در حضور ممتد یا پالس دار سیگنال فعال کننده Erk بررسی شد. نتایج را در شکل مشاهده میکنید:

در ابتدا با استفاده از فلوسایتومتری میزان بیان GFP در شرایط محتلف سنجیده شد:



در مرحله بعد به منظور یافتن زمان بهینه حضور سیگنال، سلول ها در معرض پالس هایی با مدت زمان متغیر از پنج دقیقه تا دوازده ساعت قراره گرفته و سپس میزان بیان GFP نوسط سلول ها بررسی شد.

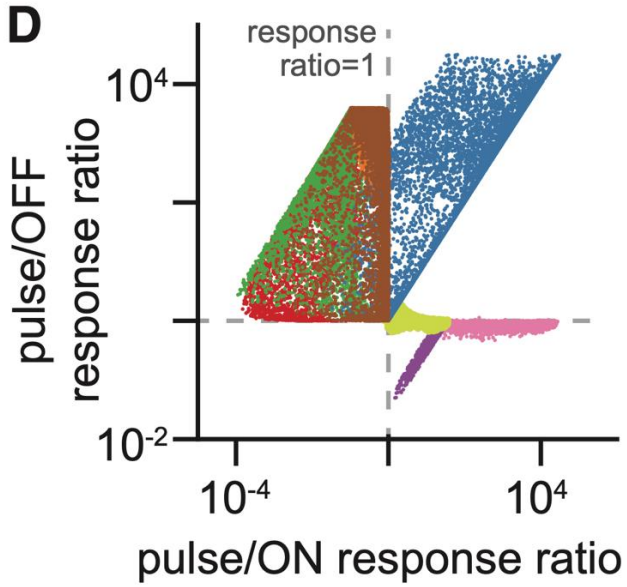


با توجه به نتایج صحت گزاره های زیر را بررسی کنید:

الف) با توجه به نتایج ازمایش دوم میتوان گفت در مدت زمان پنج دقیقه، غلظت پروتیین KGV به حداستانه موردنیاز برای تاثیر گذاشتن بر روی بیان ژن GFP می رسد.

ب) با توجه به اینکه سیستم از FFL incoherent type 3 پیروی میکند، برای اینکه سیستم تنها در شرایط حضور پالسی سیگنال بیان GFP داشته باشد، باید فرض کرد اثر مهاری Erk از طریق مسیر مستقیم قوی تر از اثر تحریکی غیر مستقیم آن است.

برای سه گزاره زیر شکل مقابل را در نظر بگیرید:



ج) در نمودار مقابل میزان بیان ژن در تمامی FFL ها بر اساس نسبت حضوز سیگنال به صورت pulse/off ویا pulse/on نشان داده شده است، بر اساس نتایج بدست امده میتوان گفت رنگ ابی نشان دهنده FFL incoherent type 3 میباشد.

د) صرف نظر از مقایسه قدرت مسیر مستقیم و غیرمستقیم، رنگ سبز پررنگ همواره میتواند نشان دهنده FFL coherent type 1 , 4 باشد.

ه) اگر رنگ قهوه ای نشان دهنده FFL incoherent 4 باشد، میتوان گفت قدرت مسیر غیرمستقیم بیشتر از مسیر مستقیم فرض شده است.

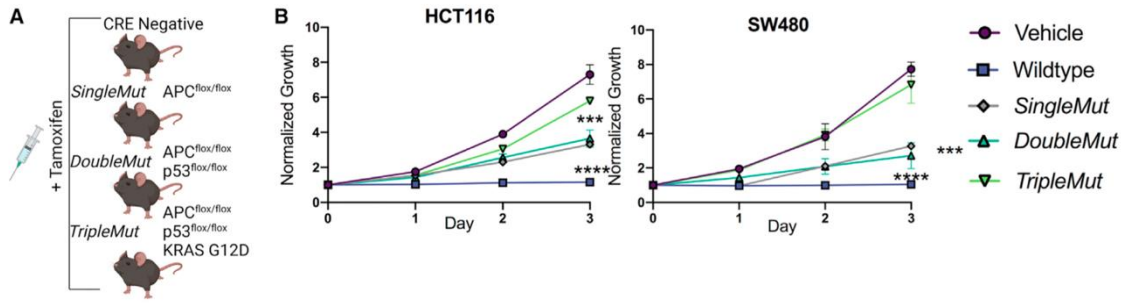
سوال چهار: 8 نمره

برای مدار داده شده در سوال قبل یک مدل پیشنهادی بنویسید و نکات زیر را رعایت کنید: (فرضیات تنها برای مدل میباشد و در صحت گزاره ها اثری ندارد)

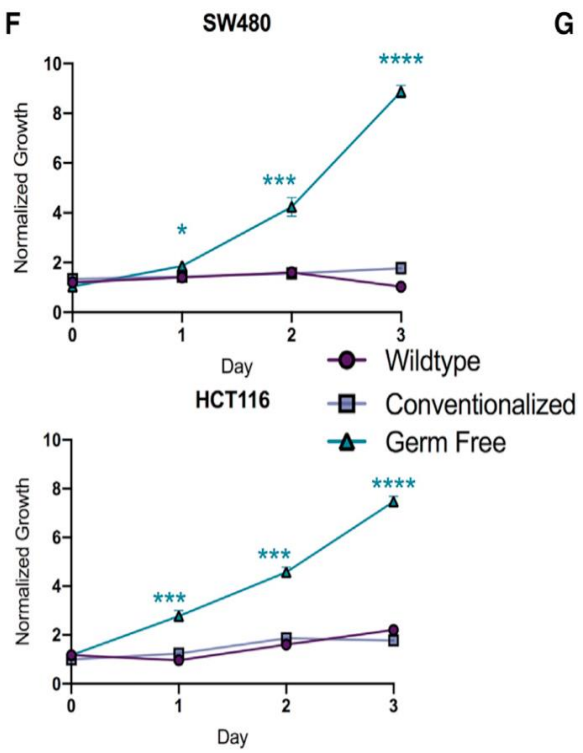
1. نسبت تغییرات KGV و GFP بر حسب زمان را پیدا کنید .
2. اثر Erk بر روی KGV و GFPو همچنین اثر KGV بر روی GFP را تعاونی در نظر بگیرید .
3. فرض کنید که دو پروتیین Erk و KGVبه صورت گیت AND بر روی پروموتر GFP عمل‌میکنند .

سوال پنج:

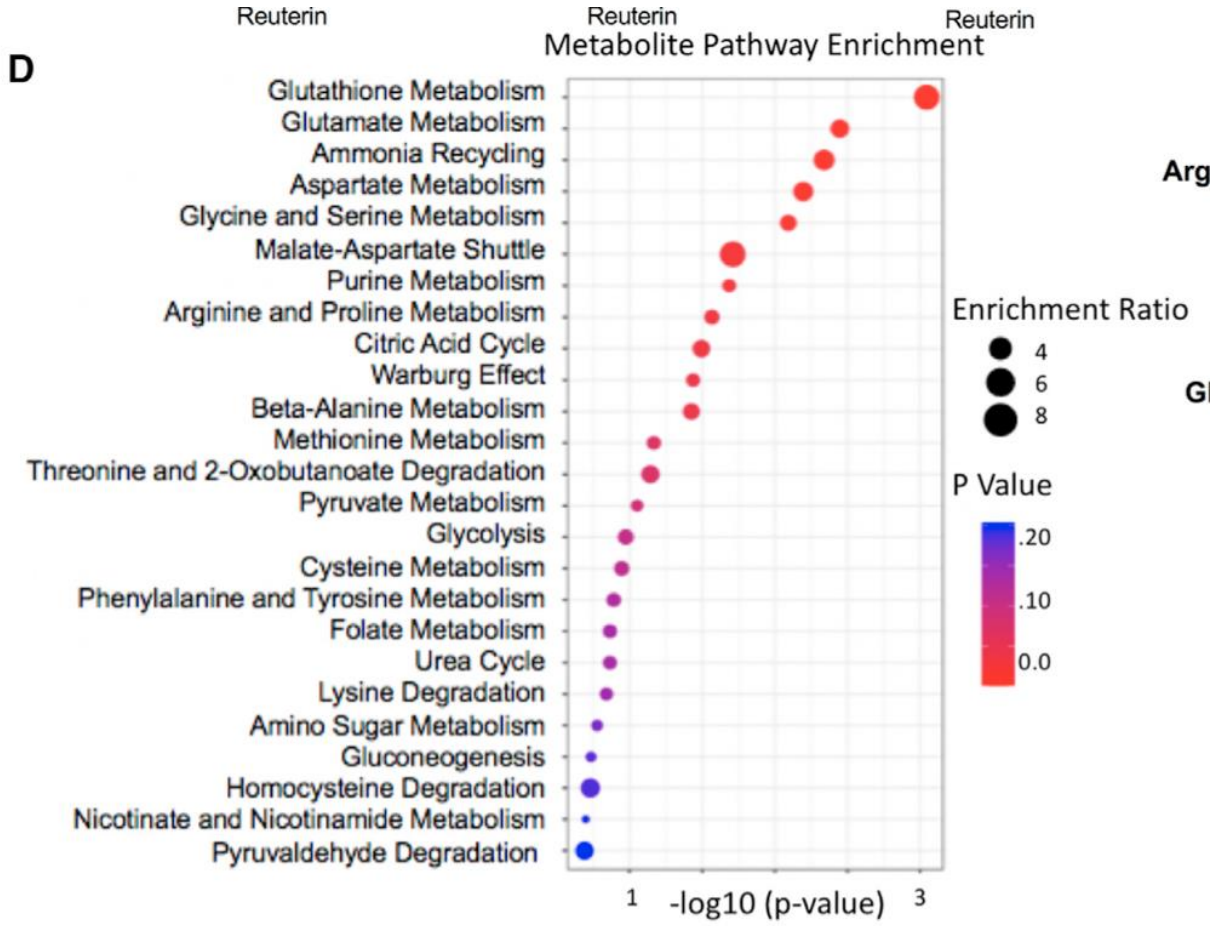
از مارکر های مهم تشخیص سرطان کورولکتال تغییرات مایکروبیوم میباشد. تغییرات متابولیت های تولیدشده توسط این میکروب ها به عنوان معیاری برای تشخیص سرطان استفاده میشود اما اثر این متابولیت ها بر روی سلول های سرطانی ناشناخته است. در ازمایشی سلول های روده موش را با تاموکسیفن تیمار کرده و سلول های سرطانی با یک تا سه جهش ایجاد کردیم. در مرحله بعد متابولیت های تولید شده توسط مایکروبیوم ساکن در روده هر یک از موش های تیمار شده، موش سالم و موش با سرطان کولورکتال پیشرفته (vehicle) را استخراج کردیم و دو رده سلولی سرطانی HCT116 و SW480 را با آن تیمار کرده و میزان رشد را بررسی کردیم ، نتایج را در شکل B مشاهده میکنید.



در شکل F، ازمایش دوباره تکرار شد با این تفاوت که متابولیت ها از موش سالم، موش فاقد مایکروبیوم روده و موشی که یکبار مایکروبیوم ان تخلیه و سپس دوباره کلونیزه شده است، استخراج کرده ایم.



با بررسی متابولیت های مختلف، ماده ای به نام reuterin شناسایی شده و به طور اختصاصی اثر روترین را بر رپی بیان ژن رده سلولی HCT 116 بررسی کردیم.



با توجه به اطلاعات داده شده تا این مرحله از ازمایش صحت گزاره ها را بررسی کنید:

الف) اضافه کردن میکروب های ساکن روده به بافت روده بیماری با سرطان کورولکتال پیشرفته اثری بر روی درمان نخواهد گذاشت.

ب) اولین مسیر متابولیسمی که با کمترین p-value قابل قبول، به طرز معناداری تحت تاثیر روترین قرار گرفته است، مسیر beta-alanine metabolism میباشد.

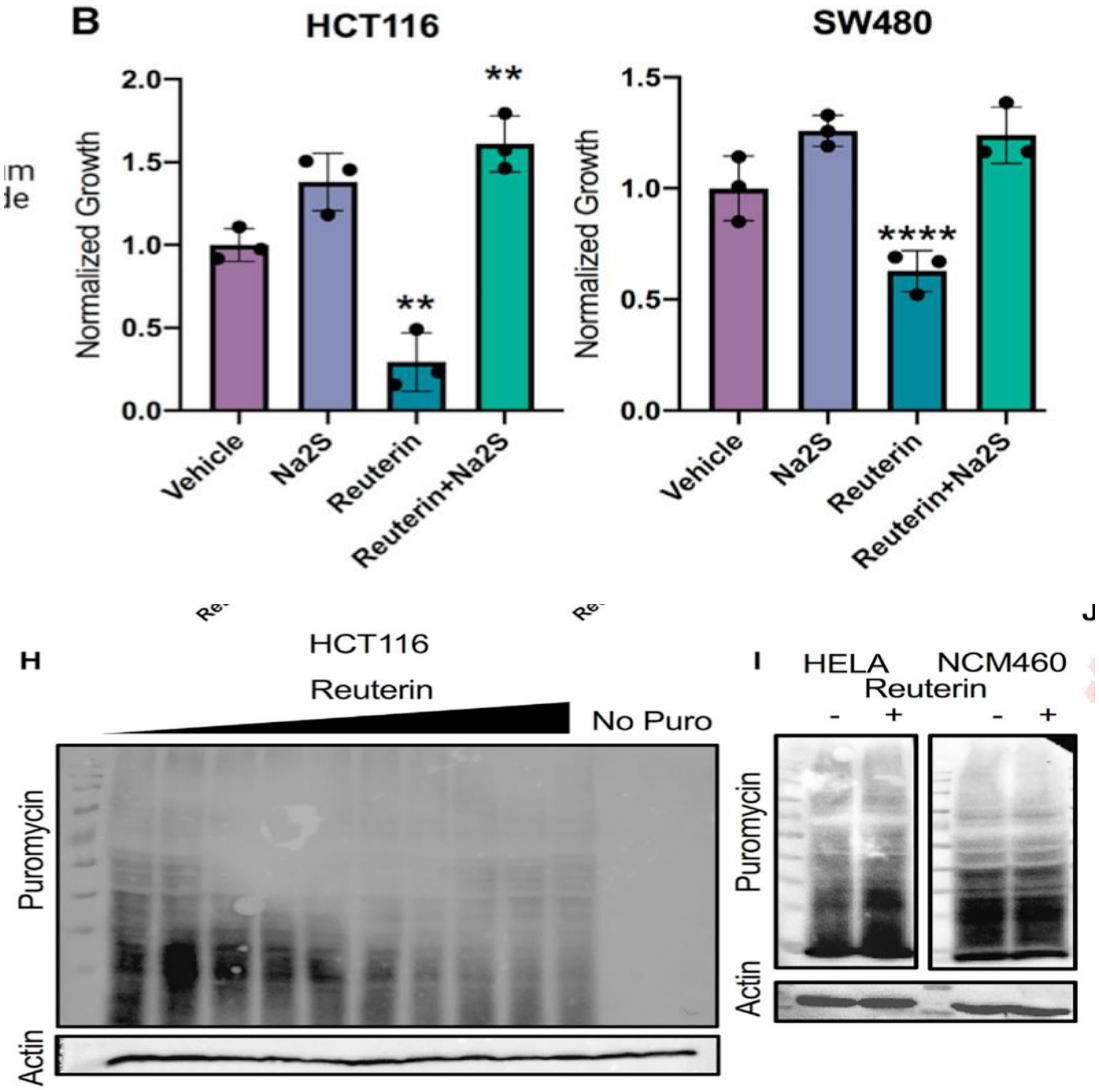
ج) با توجه به اثر روترین، محتمل ترین مکانیسم برای نحوه عملکرد روترین ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول میباشد.

د) اگر تنها مقدار اندکی از متابولیت های استخراج شده از singleMut در اختیار داشته باشیم (مقدار کافی تنها برای یک تیمار)، تیمار سلول های SW480 کارامد تر از تیمار رده HCT116 خواهد بود.

ه) با توجه بدست امده روترین احتمالا اثر مستقیم بر روی متابولیسم سلول، گلیکولیز و TCA منجر به کاهش انرژی سلول ها و مرگ انها میگردد.

سوال شش:

در ادامه هر دو رده سرطانی مورد بررسی با متابولیت های استخراج شده از vehicle، روترین ، سدیم سولفید و یا هر دو تیمار شده و میزان رشد بررسی شد. همچنین برای فهمیدن اثر روترین بر روی بیان ژن، میزان تمامی پروتیین های حاضر در سلول در حضور puromycin (مهارکننده ترنسلیشن) و حضور روترین HCT116, HELA و NCM460 بررسی شده و نتایج را مشاهده میکنید. صحت گزاره های زیر را بررسی کنید:



الف) توقع داریم پروتیین های دارای پیوند دی سولفید در حضور سدیم سولفید denatured شده باشند.

ب) استفاده از Li2S به جای Na2S تغییری در نتایج ایجاد نخواهد کرد.

ج) رده سلولی NCM460میتواند نشان دهنده سلول های سالم یا سرطانی باشد.

د) با توجه به نتایج توانایی تولید روترین در مایکروبیوم رده vehicle صفر میباشد.

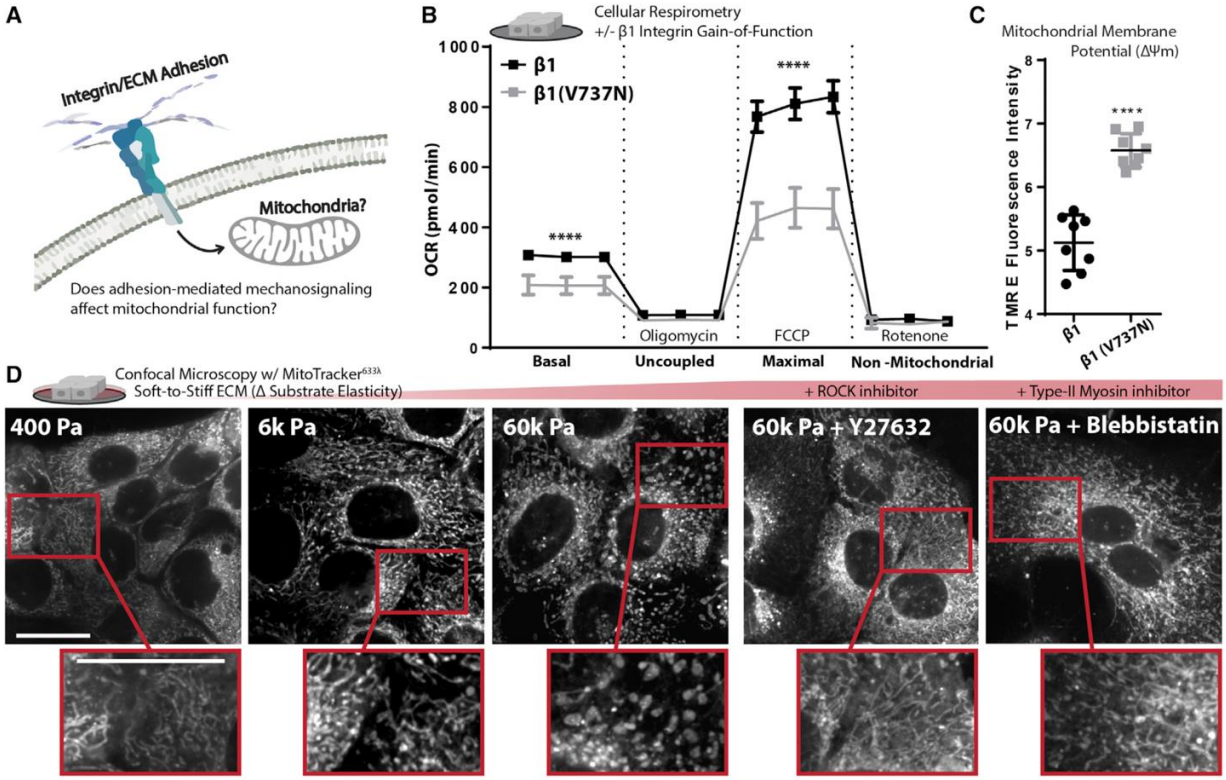
ه) اگر تمامی پروتیین های سلول تا قبل از اضافه کردن روترین را با GFPمارک کنیم، و سپس روترین را اضافه کنیم و پروتیین های تازه سنتز شده همگی با YFP مارک شده باشند، توقع داریم پس از گذشت زمان کافی تنها رنگ سبز مشاهده شود.

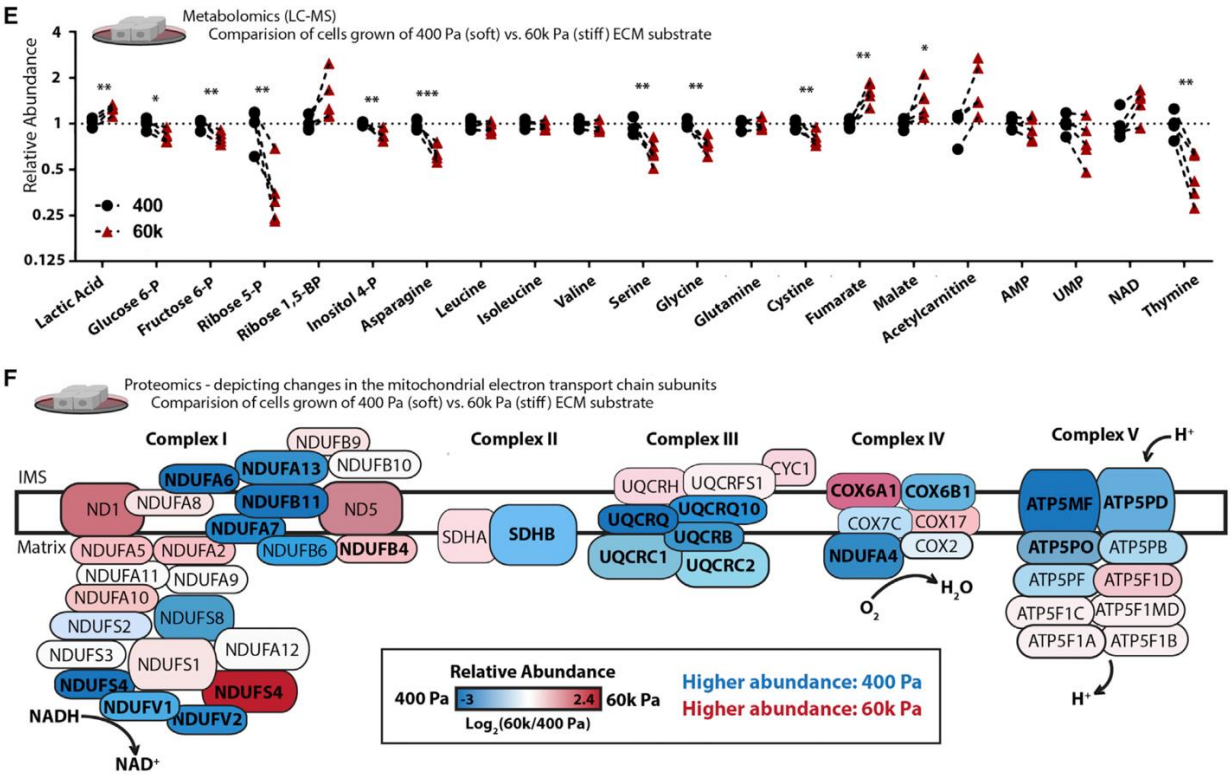
سوال هفت:

تغییرات در ماتریس خارج سلولی از رخداد های شایع و تاثیرگذار در فرایند پیری و یا سرطان میباشد. در فرضیه ای، cellular adhesion از طریق مکانوسیگنالینگ میتواند بر روی سختار و عملکرد میتوکندری ها و در نتیجه متابولیسم سلول اثر بگذارد. به این منظور جهش gain of function پروتیین بتا اینتگرین در سلول های mammary epithelial cells (MECs) ایجاد گردید. گروهی از سلول ها دارای بتا اینتگرین جهش یافته B1(V737N) بودند که باعث افزایش adhesion میگردد. در مرحله اول میزان oxygen consumption rate را پس از اضافه کردن الیگومایسین، FCCP و روتنون سنجیده و همچنین پتانسیل غشا برای سلول های دارای اینتگرین و اینتگرین جهش یافته با هم مقایسه شد. نتایج را مشاهده میکنید:

در مرحله بعدی ساختار میتوکندری در سلول های عادی (فشار ماتریس خارج سلولی = 400 pa) و سلول های تومور (فشار خارج سلولی بین 6 تا 60 pa) و در حضور پروتیین Y27632 (مهارکننده کیناز ROCK) و یا میوزین تایپ ۲ به همراه پروتیین مهارکننده اش یعنی blebbistain بررسی شد.

در مرحله آخر میزان متابولیت های مرتبط با تنفس سلولی (مثلث های قرمز مربوط به فشار بالای خارج سلولی هستند) و میزان پروتیین های حاضر در زنجیره انتقال الکترون در هر دو حالت فشار بالا یا پایین سنجیده شد.





با توجه به اطلاعات داده شده صحت گزاره ها را بررسی کنید:

الف) با توجه به نتایج میتوان گفت علت کاهش مصرف اکسیژن و افزایش پتانسیل غشا در سلول های حاوی B1(V737N)، نفوذپذیری کمتر غشای داخلی به پروتون می باشد.

ب) انتظار میرود قطر میتوکندری ها در صورتی که فشار ECM برابر با سی پاسکال باشد، بیشتر از زمانی که فشار برابر ده پاسکال است، باشد.

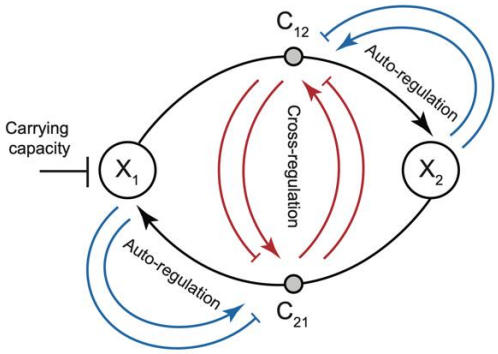
ج) افزایش خروج متابولیت ها از مسیر پنتوز فسفات و مسیر گلیکولیتیک بالادست میتواند توجیه کننده کاهش متابولیت هایی مانندGlc-6P ,Ribose-5P , Fructose-6P باشد.

د) احتمالا پروتیین های NDUFS4، ND1 و ND5 منجر به کاهش انتقال الکترون ها از NADH به کمپلکس یک میشوند.

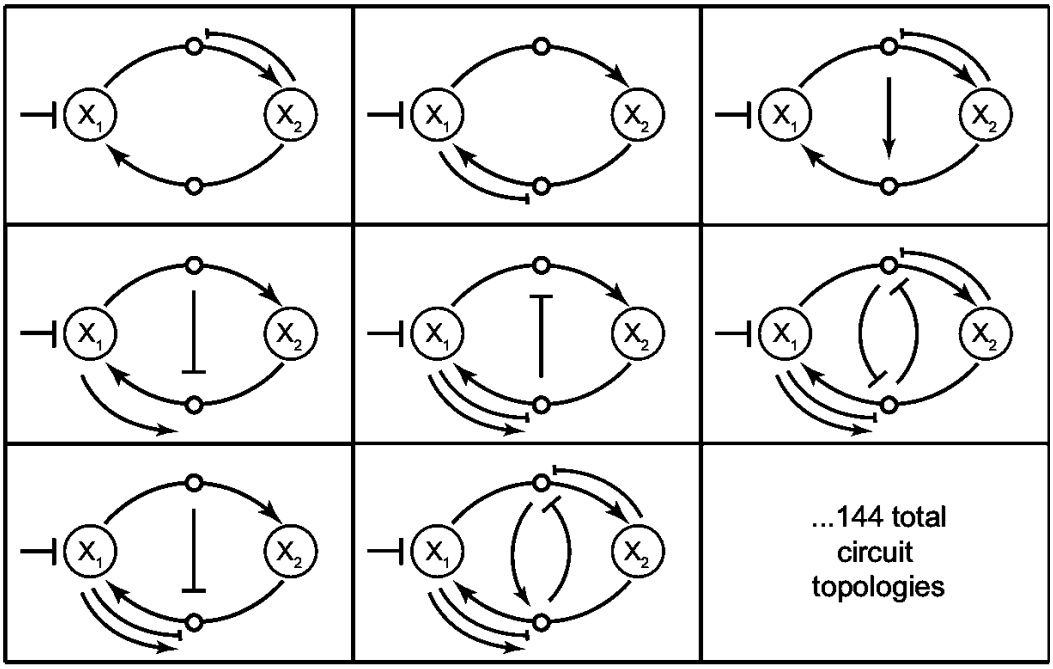
ه) افزایش فشار خارج سلولی از طریق مسیر مکانوسیگنالینگ منجر به کاهش عملکرد حداقل دو کمپلکس از چهارکمپلکس حاضر در زنجیره انتقال الکترون میشود.

سوال هشت:

روابط ممکن دو سلول X1 و X2 بر روی یکدیگر را میتوان در شکل مقابل مشاهده کرد، C12 فاکتور رشدی است که توسط X1 ترشح شده و روی X2 تاثیر میگذارد و C21 توسط X2 ترشح شده و بر روی X1 عمل میکند. با فرض اینکه غلظت X1 توسط ظرفیت محیطی محدود میشود ولی محدودیتی برای غلظت X2 وجودندارد، به سوالات زیر پاسخ دهید: (برای مسیر Auto-regulation دو مکانیسم وجود دارد، فلش داخلی تر مربوط به receptor internalization و فلش خارجی تر مربوط به GF concentration می باشد)



الف) تعیین کنید هر یک از مدل های داده شده میتوانند دارای تعادل پایدار برای X1 و X2 باشند یا خیر؟ به ترتیب از چپ به راست شماره گذاری شده است: هر مدل 1 نمره



ب) صحت گزاره ها را بررسی کنید:

الف) در صورتی که برای هیچ کدام از دو پروتیین X1 و X2 ظرفیت محیطی در نظر گرفته نشود، و با فرض اینکه اثر C12 و C21 قوی تر از اثر مهاری سایر مسیر ها باشد، امکان دستیابی به تعادل پایدار وجود نخواهد داشت.

ب) برای دستیابی به تعادل پایدار در مدل های داده شده بالا، قطعا نیاز به حداقل یک مسیر مهار کننده X2 وجود دارد.

ج) غلظت X2 در مدل ۳ در حالت تعادل بیشتر از مدل شماره ۶ می باشد.

د) اگر برای X2 هم ظرفیت محیطی در نظر گرفته شود و هیچ گونه cross regulation و یا Auto regulation وجود نداشته باشد، سیستم میتواند یک یا دو تعادل پایدار داشته باشد.

سوال نه: هر بخش 3 نمره

ژن X دارای اثر مهاری بر روی خود می باشد، با فرض اینکه تنها در صورت کمتر بودن غلظت X از K، نرخ تولید برابر با B بوده و در غیر این صورت صفر است. برای چه مقادیری از a, B و Xst سیستم در برابر تغییرات a , B , K دارای robustness میباشد؟ با رسم نمودار rate بر حسب غلظت X توضیح دهید.

الف) تغییرات a :

ب) تغییرات B :

ج) تغییرات K :

سوال ده:

با در نظر گرفتن معادله زیر که نشان دهنده تغییرات غلظت mRNA و پروتیین است، نمودار nullcline مناسب را رسم کنید: 5 نمره

$$\frac{dm}{dt} = \frac{\beta}{K + p} - m$$

$$\frac{dp}{dt} = r(m - p)$$

غلظت پروتیین در نقطه تعادل را بر حسب K و B و m بنویسید: 3 نمره

سوال یازده: هر حالت 2 نمره

الف) در مقایسه با simple regulation کدام یک از حالات زیر میتوانند منجر به کاهش زمان مورد نیاز برای افزایش غلظت پروتیین تا رسیدن به سطح تعادل غیر صفر شوند؟ (برای FFL ها، نیاز به مشخص کردن تایپ مشخص نیست.)

1 . افزایش سرعت تقسیم سلول
2 . افزایش نرخ تجزیه پروتیین
3 . فیدبک مثبت
4 . فیدبک منفی
5 . Coherent FFL
6 . Incoherent FFL

ب) کدام حالات منجر به کاهش زمان مورد نیاز برای کاهش غلظت پروتیین تا سطح صفر میشوند؟

1 . افزایش سرعت تقسیم سلول
2 . افزایش نرخ تجزیه پروتیین
3 . فیدبک مثبت
4 . فیدبک منفی
5 . Coherent FFL
6 . Incoherent FFL

بخش دوم:

1- موازنه بار را برای محلولی حاوی $AgCl$ با توجه به تعادلات زیر بنویسید.(3 نمره)

$$AgCl_{(s)} \rightleftharpoons Ag^{+} + Cl^{-} \quad K_1$$

$$Ag^{+} + Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_{(aq)} \quad K_2$$

$$AgCl_{(aq)} + Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_2^{-} \quad K_3$$

$$AgCl_2^{-} + Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_3^{2-} \quad K_4$$

$$AgCl_3^{2-} + Cl^{-} \rightleftharpoons AgCl_4^{3-} \quad K_5$$

$$Ag^{+} + H_2O \rightleftharpoons AgOH_{(aq)} + H^{+} \quad K_6$$

2- درصد $PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, H_2PO_4^{-}, H_3PO_4$ را در محلولی با $pH = 7$ را بیابید. (3 نمره)

$pKa_{1,2,3} = 2.1, 7.2, 12$

3- pH محلول های زیر را بدست آورید. (از pKa سوال قبل استفاده کنید.) (4 نمره)

الف) $0.02M \quad NaOH + 0.01M \quad H_3PO_4$

ب) $0.025M \quad NaOH + 0.01M \quad H_3PO_4$

ج) $0.03M \quad NaOH + 0.01M \quad H_3PO_4$

4- می خواهیم محلولی با pH=4.5 از استیک اسید با حجم 2.5 Lit داشته باشیم. چه مقدار از محلول HOAC 0.2M و NaOAC 0.3M نیاز است؟ (3 نمره)

$pK_a HOAC = 4.74$

5- pH یک محلول 3٪ اسید فرمیک (HCOOH) با چگالی $1.004 \, g/cm^3$ برابر 1.97 است .حجم این محلول را چند برابر کنیم تا درجه یونش آن ده مرتبه افزایش یابد؟ درجه یونش به معنای مقدار اسید تفکیک شده به روی غلظت اولیه اسید می باشد.(3 نمره)

6- 50 میلی لیتر محلول 0.05 M از HCl را با محلول 0.1 M از NaOH تیتر می کنیم. pH محلول را در اثر اضافه کردن حجم های زیر از تیترانت به دست آورید. (4 نمره)

الف) 15

ب)24.9

ج)25.01