تسک اول بررسی مقدار فاکتور hsCRP (22 نمره)

تسک دوم بررسی غلظت پروتئین (۲۵ نمره)

محاسبات تا سه رقم اعشار حساب شود.
همه محاسبات را یادداشت نمایید. به آن نمره تعلق می گیرد.
فقط در ۱۰ دقیقه اول اگر ماده و یا وسیله ای مشکل داشت تعویض می گردد.
لیست مواد

نام ماده/ وسیله	لیبل روی ماده و یا مقدار
سرسمپلر ۱۰ سمپلر مربوطه	
سرسمپلر ۱۰۰ سمپلر مربوطه	
سرسمپلر ۱۰۰۰ سمپلر مربوطه	
پلیت ۹۶ تایی	
چاهک پلیت مخصوص الایزا	
پوشش سر چاهک	۲ عدد
فویل آلومینیومی	۱ عدد
محلولهای استاندارد	**ST1-St6 (ویال ۵/۰ با لیل سبز)**
کنترل	**Cont(ویال ۵/۰ با لیل سبز)**
نمونه	**Sample (ویال ۵/۰ با لیل سبز)**
Assay buffer	**A(ویال ۵/۱با لیل مشکی)**
محلول شستشو	**W (فالکون ۵۰)**
Conjugated Enzyme	**CE (ویال ۵/۱با لیل مشکی)**
محلول رنگزا	**B (ویال ۵/۱با لیل مشکی)**
محلول متوقف کننده	**S (ویال ۲با لیل مشکی)**
لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با پلاسمید حاوی UB3A	**X1(ویال ۵/۰ با لیل آبی)**
لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با پلاسمید فاقد ژن لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با پلاسمید S505	**X2 (ویال ۵/۰ با لیل آبی)**
لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با پلاسمید E502p	**X3 (ویال ۵/۰ با لیل آبی)**
پروتئین معلوم با غلظت 50mg/ml	**STD Protein (ویال ۵/۰ با لیل آبی)**
محلول بردفورد	**Bradford (فالکون ۱۵)**

تسک اول (۲۲ نمره)

➢ مقدمه:

فردی با علائم تب، سردرد، قرمزی بیش از حد پوست و درد مفاصل به پزشک مراجعه می کند. پزشک احتمال ابتلا به التهاب را برای او در نظر می گیرد.

نمونه پلاسما فرد در اختیار شما قرار گرفته تا با انجام الایزا به بررسی مقدار hsCRP (High sensitive C reactive protein) بپردازید و با توجه به داده های بعدی امکان ابتلا فرد به التهاب را مشخص کنید.

➢ روش‌انجام‌آزمایش

Well's Name	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Cont	Sample
STDs	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl		
Control Serum(cont)							50µl	
Sample								50µl
Assay buffer (A)	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl

موارد زیر را در چاهک ها بریزید.

Well's Name	St1	St2	St3	St4	St5	St6
Concentrations(ngr/ml)	0	0.5	1	2.5	5	10

2. پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهکها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده وبه مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.
3. مقدار 50µl از آنزیم کنژوگه شده (با علامت CE مشخص شده) به تمام چاهکها اضافه کنید روی چاهک ها را با برچسپ بپوشانید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید و در فویل قرار دهید.
4. محتویات چاهکها را خالی کنید و چاهکهارا ۵ بار با ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی آماده (W) شستشو دهید. سپس چاهکها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید.
5. ۱۰۰µl از سوبسترای آماده مصرف(با علامت B مشخص شده) به تمام چاهکها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید و در فویل قرار دهید.
6. مقدار ۱۰۰µl از محلول متوقف کننده (با علامت S مشخص شده) به تمام چاهکها اضافه کنید. نشانگر زرد را بالا ببرید و برای خواندن جذب وقت بگیرید. (از داده های شما عکس گرفته میشود و ملاک نمره‌ی عملی شما قرار می‌گیرد. ولی سوالات تئوری براساس داده هایی که در جدول وارد کرده اید تصحیح خواهد شد.)

➢ سوالات بخش اول (۲۲ نمره)

1. جذب هر چاهک را یادداشت کنید(16 نمره).

	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Cont	Sample
جذب								

2. منحنی استاندارد را رسم کنید. (همه جذب ها را از ST1 کم کنید) (۲ نمره)

3. کدامیک از معادلات زیر رابطه غلظت سوبسترا و جذب را بهتر توجیه میکند؟ برای هر کدام از موارد معادله را خطی کرده، رگرسیون بگیرید، و جدول را پر کنید: (۳ نمره)

$$1: \frac{1}{Abs} = ax + b \qquad 2: \mathrm{Abs} = \mathrm{a}e^{\mathrm{bx}}$$

	معادله ۱	معادله ۲
a		
b		
r^2		

۴- معادله ای که تطابق بهتری دارد را انتخاب کنید و غلظت نمونه مجهول را بر اساس آن بدست آورید. (۱ نمره)

تسک دوم تعیین غلظت پروتئین (۲۳.۵ نمره)

➢ **مقدمه:**

سندرم آنجلمن (Angel man Syndrome) یک بیماری شدید عصبی ژنتیکی است. این بیماری به علت عدم حضور ژن *UB3A* و یا جهش های نقطه ای موثر در ژن فوق ایجاد می گردد. بررسی ها نشان می دهد فعالیت آنزیم پروتئین UB3A در پاتولوژی بیماران سندرم انجلمن موثر است. به نظر می رسد پروتئین UB3A با ساب یونیت S5a از کمپلکس proteasomal degradation بر هم کنش می کند. هر نوع جهش و یا تغییر در پروتئین UB3A موجب تاثیرات مهاری بر فعالیت پروتئولیتیک پروتئازوم می گردد.(پروتئازوم یک کمپلکس پروتئینی است که پروتئین های غیر مورد نیاز و اسیب دیده را طی یک فرایند آنزیمی می شکند و از بین می برد.)

در این آزمایش سلولهای Hek293 (سلول طبیعی) با ۱. پلاسمید های حاوی ژن ۲ UB3A. پلاسمید های حاوی ژن با جهش نقطه ای در ژن UB3A به نام ۳ L502E. پلاسمید های بدون ژن به عنوان کنترل، ترنسفکت شدند و پس از ۲۴ ساعت سلولها لیز شده و پروتئین تام. به عنوان اولین تست حضور پروتئین UB3A توسط تست وسترن بلات در نمونه ها تایید گشت. سپس مقدار 20 µl از پروتئین تام استخراج شده از لیزات سلولی با غلظت100ng/ml از هر نمونه برای بررسی فعالیت پروتئازوم استفاده شده. فعالیت پروتئازوم توسط کیت مخصوص بررسی شد، که براساس آن مقدار AMC آزاد شده در طی زمان، رابطه مستقیم با فعالیت پروتئازوم دارد.

شما در این آزمایش شما به بررسی غلظت سه پروتئین لیز شده به روش بردفورد طبق روش کار بپردازید و به سوالات پاسخ دهید.

➢ **روش انجام آزمایش**

1. برای رسم منحنی استاندارد مقادیر 0, 2, 4, 6, 8, 10 µl از پروتئین استاندارد (BSA) با غلظت 0,5 mg/ml را در چاهک های A1-F1 ریخته (0 µl نمونه St0 و 10 µl نمونه St5 نام دارد.) همین مقادیر را در

چاهک های A2- F2 تکرار کنید. (در صورت هر گونه اشتباه از چاهک های A5-F5 و A6-F6 استفاده کنید.) حجم نهایی هر چاهک را مطابق میزان حجم پروتئین استاندارد به10µl برسانید.

2. برای سه پروتئین مورد آزمایش نیز 5µl از نمونه هایX3, X2, X1 در چاهک های A3-C3 ریخته و 5µl آب به هر چاهک اضافه کنید (مقدار 10µl از هر نمونه را در ستون ۶ ام تکرار کنید.)

3. مقدار 200 µl از معرف برادفورد به هر چاهک اضافه کنید.

4. نشانگر زرد خود را بالا برده و با اجازه مسئول امتحان جذب های هر چاهک را بخوانید. مقادیر را یادداشت نمایید. همچنین مقادیر جذب خود را در برگه کنار دستگاه به همراه نام و کد دانش آموزی خود وارد نمایید.

5. به میز خود بازگردید و داده های را در جدول پاسخ نامه وارد نمایید. (از داده های شما عکس گرفته میشود و ملاک نمره‌ی عملی شما قرار می‌گیرد. ولی سوالات تئوری براساس داده هایی که در جدول وارد کرده اید تصحیح خواهد شد.)

➢ سوالات بخش دوم

1. غلظت های پروتئین ها را در هر چاهک بر اساس حجم (10µl) محاسبه نمایید و در جدول موجود را تکمیل کنید. (13.5 نمره).

	St0	St1	St2	St3	St4	St5	X1	X2	X3
میانگین جذب									

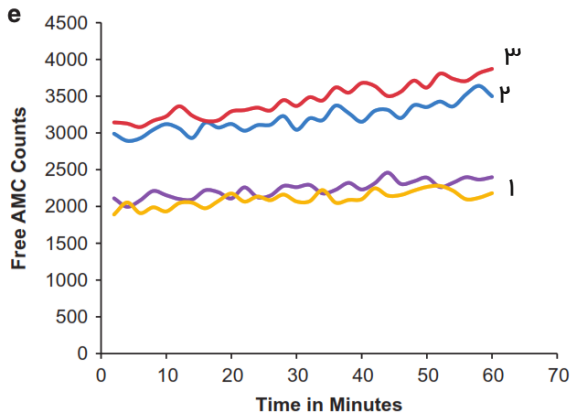
2. منحنی استاندارد را رسم نمایید(جذب ها را از جذب A6 کم کنید)(2 نمره).

1. غلظت پروتئین های مجهول را محاسبه کنید. تمامی محاسبات را یادداشت نمایید(۳.۵ نمره). (معادله خط را نیز بنویسید)

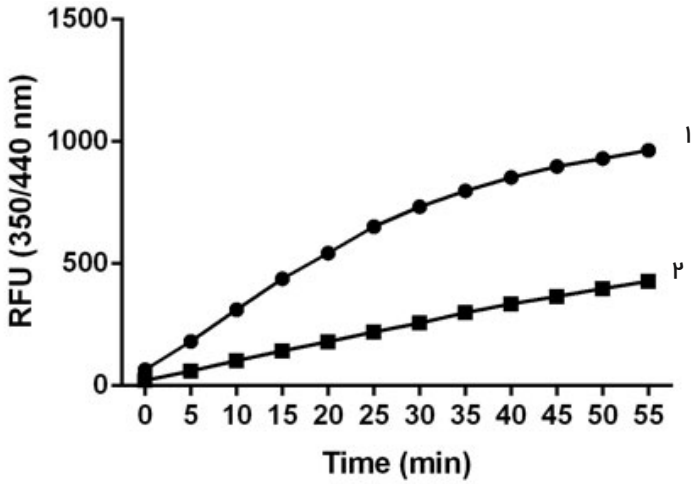
2. برای بدست انجام تست بررسی فعالیت پروتئازوم روی هریک از نمونه های X1 تا X3 به چه حجمی از آنها نیاز است؟ (۳نمره)

X1:	X2:	X3:

3. کدام یک از نمودار های فوق مرتبط به پلاسمید های حاوی ژن با جهش نقطه ای (E502p) و کدام یک مربوط به سلول ترنسفکت شده با UB3A است(۲نمره).؟



سلول ترنسفکت شده با UB3A:.....

پلاسمید های حاوی ژن با جهش نقطه ای(E502p).....

4. در حین تست های تجزیه پروتئازومی یکی از کنترل های مهم در طی کار این است که نمونه در حضور و عدم حضور یک مهارکننده پروتئازوم ویژه تیمار گردد و فعالیت بررسی شود. در نمودار در اختیار شما دو منحنی موجود است. یکی نمونه های تیمار شده با مهارکننده پروتئازومی اختصاصی و دیگری همان نمونه بدون تیمار است. کدام یک از نمونه های ۱و۲ با مهار کننده پروتئازومی ویژه تیمار شده اند (۱ نمره)؟