به نام پروردگار

آزمون عملی زیست شناسی سلولی و مولکولی و بیوشیمی

انتخابی تیم اعزامی به المپیاد جهانی ۲۰۱۹ مجارستان

برگه سوالات

زمان آزمون: ۱۲۰ دقیقه

واپسین روز های زمستان ۱۳۹۷

با بهترین آرزو ها

مواد و ابزار ارائه شده به هر شرکت کننده:

بخش ۱:

مواد و ابزار	مقدار یا تعداد
آنزیم برشی (BamHI) (روی یخ نگهداری شود)	۶ میکرولیتر
آنزیم برشی (HindIII) (روی یخ نگهداری شود)	۶ میکرولیتر
آنزیم برشی (XhoI) (روی یخ نگهداری شود)	۶ میکرولیتر
نمونه DNA در بافر آنزیم های برشی (با لیبل DNA (T)) (روی یخ نگهداری شود)	۹۰ میکرولیتر
آب miliQ (با لیبل DW)	۱۰۰ میکرولیتر
تانک ژل الکتروفورز به همراه ژل	۱
سمپلر و تیپ های p10 و p100	۱ ست
کرنومتر	۱
مارکر سایز DNA (با لیبل M)	۵ میکرولیتر
رنگ بارگذاری (loading dye)	۸۰ میکرولیتر
رک میکروتیوب به همراه لیبل اسم شرکت کننده	۱ ست
مارکر	۱ عدد

بخش ۲و ۳:

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 ۰/۵ با لیل سبز)**
کنترل	**Cont(ویال ۰/۵ با لیل سبز)**
نمونه	**Sample (ویال ۰/۵ با لیل سبز)**
Assay buffer	**A(ویال ۱/۵با لیل مشکی)**
محلول شستشو	**W (فالکون ۵۰)**
Conjugated Enzyme	**CE (ویال ۱/۵با لیل مشکی)**
محلول رنگزا	**B (ویال ۱/۵با لیل مشکی)**
محلول متوقف کننده	**S (ویال ۲با لیل مشکی)**
لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با با پلاسمید حاوی UB3A	**X1(ویال ۰/۵ 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 ۰/۵ با لیل آبی)**
لیزات حاصل از سلول های ترنسفکت شده با پلاسمید E502p	**X3 (ویال ۰/۵ با لیل آبی)**
پروتئین معلوم با غلظت 50mg/ml	**STD Protein (ویال ۰/۵ با لیل آبی)**
محلول بردفورد	**Bradford (فالکون ۱۵)**

آزمون از ۳ بخش تشکیل شده است:

بخش ۱: نقشه برداری ژن (gene mapping) از طریق هضم آنزیمی DNA با استفاده از آنزیم های محدود کننده (۵۰ نمره)

بخش ۲: بررسی مقدار فاکتور hsCRP (۲۲ نمره)

بخش ۳: بررسی غلظت پروتئین (۲۵ نمره)

تمامی اعداد را تا ۳ رقم اعشار بنویسید.(به جز اندازه قطعات DNA که نیازی به اعشار ندارد)

در بخش ۲ و ۳ 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.

بخش ۱: نقشه برداری ژن (gene mapping) از طریق هضم آنزیمی DNA با استفاده از آنزیم های محدود کننده و تایید وجود یک یا چند قطعه DNA انسانی در یک وکتور کلونینگ

مقدمه:

نقشه برداری ژنتیکی به طور معمول در تجزیه و تحلیل ترتیب و هویت قطعات DNA استفاده می شود. این تکنیک بر اساس پروفایل منحصر به فرد قطعات DNA تولید شده پس از هضم DNA با ترکیب خاصی از آنزیم‌های برشی محدود کننده restriction (RE) endonucleases و نمایش توسط ژل الکتروفورز DNA است. این تکنیک برای کلونینگ ژن، مطالعه عملکرد و تنظیم ژن ها، یافتن ژن های مسئول در بیماری‌ها و تشخیص آن‌ها و همچنین به عنوان ابزاری در پزشکی قانونی بسیار قدرتمند است.

با استفاده از این تکنیک، شما موظفید که وجود قطعه یا قطعاتی از DNA انسانی در یک پلاسمید کلونینگ یا وکتور "V" (حلقه ای و اندازه تقریبی ۵۴۳۰ جفت نوکلئوتید) را تایید کنید. بدین منظور شما نیاز به انجام هضم DNA با انکوبه کردن "T" DNA با استفاده از آنزیم‌های برشی محدود کننده با پیروی از پروتکل داده شده (در ادامه جزئیات شرح داده و مقادیر در جدول ارائه شده است) دارید. پس از الکتروفورز ژل، نتایج شما عکس برداری و پرینت گرفته خواهد شد (این کار توسط تکنسین های آزمایشگاهی انجام می شود).

پروتکل و روش:

۱- با استفاده از جدول زیر، هضم DNA خود را شروع کنید (تعداد ۸ تیوب شماره گذاری شده در یک رک در اختیار شما قرار داده شده است). (تمامی مقادیر به میکرولیتر است)

Tube NO.	DNA (T)	BamHI	HindIII	XhoI	H_2O (DW)
1	10	1	-	-	**9**
2	10	-	1	-	**9**
3	10	-	-	1	**9**
4	10	1	-	1	**8**
5	10	1	1	-	**8**
6	10	-	1	1	**8**
7	10	1	1	1	**7**
8	10	-	-	-	**10**

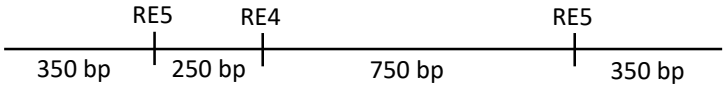
۲- مخلوط ها را با مقادیر مناسب واکنش دهنده ها آماده کنید و به آرامی با پیپتاژ کردن آنها را به طور کامل مخلوط کنید. هنگام تهیه مخلوط هر تیوب، یک نمونه را با دیگری آلوده نکنید.

۳- بعد از اینکه تمام تیوب ها آماده شده اند، آنها را از یخ برداشته و آنها را در رک دارای برچسب اسم خودتان قرار دهید و آنها را به مدت حداقل ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در یا انکوباتور اختصاص داده شده به آنها بگذارید. (برای گذاشتن نمونه در انکوباتور و بازپسگیری آن با استفاده از ساین مسئولین آزمایشگاه را فرا بخوانید.)

۴- در طول مدت انکوباسیون، به ادامه سوالات در پاسخنامه پاسخ دهید:

۱-۱- (۷ امتیاز) سناریوی زیر را در نظر بگیرید: یک قطعه DNA انسانی خطی (۲۰۰۰ جفت نوکلئوتید) توسط یک آنزیم RE4 هضم شده و به ۳ قسمت ۹۵۰، ۶۵۰ و ۴۰۰ جفت نوکلئوتیدی تبدیل می شود. همان قطعه DNA 2kbp با یک آنزیم RE5 دیگر هضم شد و دو قسمت ۸۰۰ و ۱۲۰۰ جفت نوکلئوتیدی ایجاد شد. و هنگامی که این DNA ۲۰۰۰ جفت نوکلئوتیدی همزمان با هر دو آنزیم RE4 و RE5 هضم شده بود، ۴ قطعه DNA تولید شد: ۶۵۰ ، ۲۵۰ ، ۱۵۰ و ۹۵۰جفت نوکلئوتیدی.

نقشه خطی این قطعه DNA را با نشان دادن موقعیت RE4 و RE5 در هضم ارائه دهید. یک نمونه از این طرح در زیر به عنوان راهنمایی ارائه شده است.



۲- پس از اتمام مدت زمان ۶۰ دقیقه از هضم آنزیم‌ها، تیوب ها را از انکوباتور خارج کنید.

۳- ۵ میکرولیتر از loading-dye (آبی رنگ) به هر تیوب اضافه و با به آرامی پیپتاژ کردن به طور کامل مخلوط کنید.

۴- ۱۰ میکرولیتر از مخلوط نمونه DNA هضم شده با loading dye را به "چاهک" ژل آگارز انتقال دهید. ۵ میکرولیتر از مارکر سایز DNA را به یک چاهک جداگانه انتقال دهید. نمونه های خود را با توجه به طرح زیر و از چپ به راست ژل به چاهک ها انتقال دهید.

چاهک ۱	چاهک ۲	چاهک ۳	چاهک ۴	چاهک ۵	چاهک ۶	چاهک ۷	چاهک ۸	چاهک ۹
مارکر سایز DNA	تیوب ۱	تیوب ۲	تیوب ۳	تیوب ۴	تیوب ۵	تیوب ۶	تیوب ۷	تیوب ۸

۵- درب تانک ژل را گذاشته و دکمه پاور را بزنید تا چراغ سبز آن روشن شود. لطفا مراقب باشید هیچ بخشی از الکترود را لمس نکنید. اگر به کمک تکنسین ها نیاز دارید لطفا اطلاع دهید.

۶- در مدت زمان ران شدن ژل (۲۰ تا ۳۰ دقیقه)، به پرسش های زیر در پاسخنامه پاسخ دهید:

1-2- (۷ امتیاز) دانشپژوهان ژلی را طراحی کرده اند که سرعت حرکت DNA روی آن در ژل (V) از الگوی زیر تبعیت میکند:

$$\frac{1}{V} = \log(x) * \frac{a}{\log(x) + b}$$

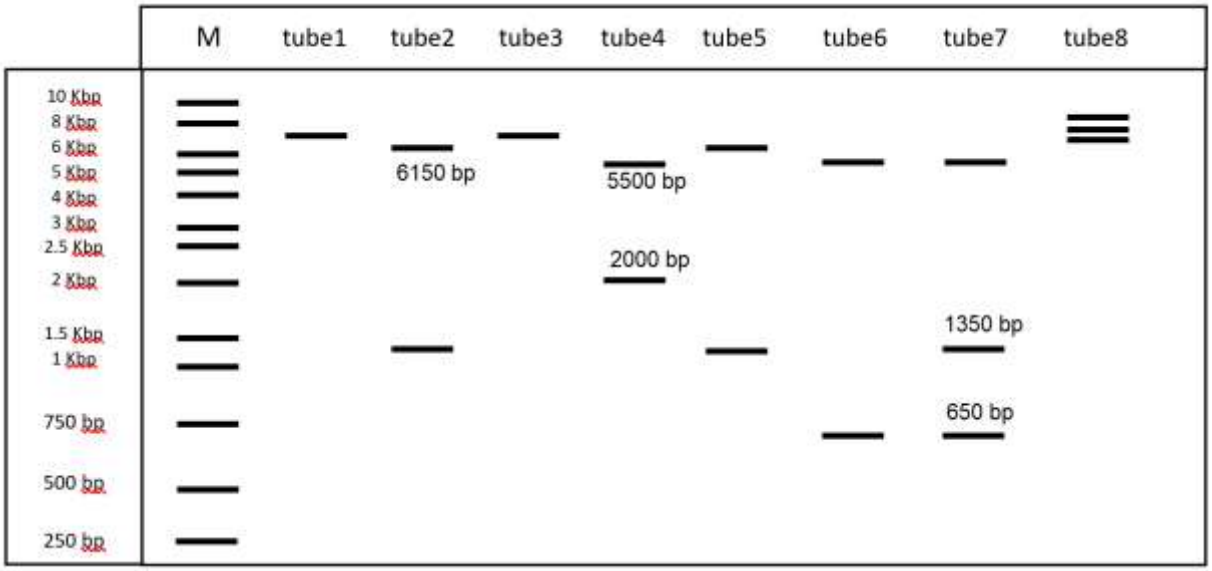
در جدول زیر سایز چند قطعه استاندارد و rf مربوط به آنها داده شده است. داده ها را خطی کنید و با رگرسیون، a و b را بدست آورید. سپس سایز قطعه با سایز نامعلوم را مشخص کنید: (rf قطعه مجهول ۰٫۶۵ می‌باشد.)

سایز قطعه	rf
5500	0.77499
2000	0.822865
1000	0.863764
500	0.913787
200	1

۷- پس از اتمام ران شدن ژل از تکنسین بخواهید از ژل شما عکس بگیرد.

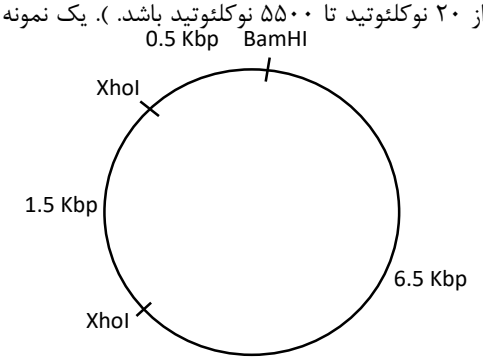
۳-۱- (۲۵ امتیاز) مهارت شما در ران شدن ژل با کیفیت ژل ارزیابی می شود.

۸- به علت محدودیت زمان بر اساس تصویر ژل ارائه شده در زیر که حاصل هضم آنزیمی پلاسمید (DNA T) با همین سه آنزیم (بر اساس جدول داده شده و با همان ترتیب)، در پاسخنامه به سوالات زیر پاسخ دهید:



۴-۱-(۱ امتیاز) اندازه تخمینی نمونه DNA (T) را بنویسید؟ (پاسخ با استفاده از عکس ژل بالا)

۵-۱-(۱۰ امتیاز) نقشه یا نقشه های احتمالی برای DNA "T" را با نشان دادن موقعیت نسبی HindIII، BamHI و XhoI و فاصله بین آنها را در پاسخنامه رسم کنید (فاصله ها میتواند از ۲۰ نوکلئوتید تا ۵۵۰۰ نوکلئوتید باشد.). یک نمونه از چنین نقشه ای به عنوان راهنمایی ارائه شده است.



بخش دوم:

➢ 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

1- موارد زیر را در چاهک ها بریزید.

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

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 5 بار با **۲۰۰** میکرولیتر بافر شستشوی آماده (W) شستشو دهید. سپس چاهکها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید.

5- 100µl از سوبسترای آماده مصرف(با علامت B مشخص شده) به تمام چاهکها اضافه کنید و به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید و در فویل قرار دهید.

6- مقدار100µl 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.)

بخش سوم: تعیین غلظت پروتئین

- **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 UB3A ۲. پلاسمید های حاوی ژن با جهش نقطه ای در ژن UB3A به نام L502E ۳. 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 غلظت 100ng/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.)

موفق باشید!