آزمایشگاه سنجشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

آزمایشگاه بیوشیمی

آزمون نهایی

شامل ۳ + ۱ بخش

زمان آزمایش: ۱۲۰ دقیقه

این فایل به منظور آموزش عملی دانش‌پژوهان المپیاد زیست‌شناسی ایران گردآوری شده است.

لیست مواد

ردیف	نام ماده	نشانی
	کلیات	
۱	سمپلر	ست سمپلر
۲	رک سر سمپلر	آبی، زرد، کریستالی
۳	رک	جای فالکون
۴	ماژیک	-
۵	مداد	-
۶	خط کش	-
۷	تانک کروماتوگرافی	بشر با فویل آلومینیوم
۸	دستمال کاغذی	-
۹	فویل آلومینیومی	
۱۰	آب مقطر	بشر 50
۱۱	رک کووت	
۱۲	فویل آلومینیومی	
	تسک اول	
۱۳	پروتئین X	ویال 5 سی سی با لیبل پروتئین X
۱۴	بافر	ویال 5 سی سی با لیبل buffer
۱۵	سوبسترا	ویال 5 سی سی با لیبل پروتئین S
۱۶	محلول استاپ واکنش	ویال 5 سی سی با لیبل پروتئین ST
۱۷	کووت	9 عدد
	تسک دوم	
۱۸	محلولA	ویال 5/1 سی سی با لیبل پروتئین B
۱۹	محلول B	ویال 5/0 سی سی با لیبل پروتئین B
۲۰	محلول C	ویال 5 سی سی با لیبل پروتئین C
۲۱	پروتئین استاندارد	ویال 5/1 سی سی با لیبل BSA
۲۲	پروتئین هیدرولیز شده	ویال 5 سی سی با لیبل H Pro
۲۳	پلیت 96 تایی	--
۲۴	سود	ویال 5/1 سی سی با لیبل سود
۲۵	محلول F	ویال 5/1 سی سی با لیبل F
۲۶	محلول G	ویال 2 سی سی با لیبل G
۲۷	اسید سولفوریک	ویال 5/1 سی سی با لیبل AS
	تسک سوم	
۲۸	کاغذ TLC	-

۲۹	محلول حاوی اسیدآمینه Glutainne	ویال 5/0 سی سی با لیبل پروتئین Glu
۳۰	محلول حاوی اسیدآمینه Aspargine	ویال 5/0 سی سی با لیبل پروتئین Asp
۳۱	محلول حاوی اسیدآمینه Serine	ویال 5/0 سی سی با لیبل پروتئین Ser
۳۲	ستون کروماتوگرافی در ارلن	حواستان به ستون باشد تا ستون خشک و خالی از بافر نشده باشد.
۳۳	محلول شناساگر	ویال 5/1 سی سی با لیبل پروتئین Ser
۳۴	حلال	فالکون با لیبل CH

تمامی وسایل و مواد موجود در این لیست در اختیار اینجانب..... قرار داده شده است. و هیچ گونه اعتراضی ندارم.

توضیحات اولیه.

در گونه‌ی (*Trypanosoma grayi*) یک پروتئین جدید با خاصیت آنزیمی کشف شده است. در این سه تسک شما به بررسی برخی از خصوصیات این پروتئین خواهد کرد.

تسک اول بررسی ویژگی‌های آنزیمی (۳۰ امتیاز)

تسک دوم شناخت برخی از اسیدهای آمینه (۳۰ امتیاز)

تسک سوم بررسی وزن کروماتوگرافیک پروتئین (۲۳ امتیاز)

تسک اول. بررسی ویژگی‌های آنزیمی (۳۰ امتیاز)

مقدمه:

یک روش آنزیمی برای بررسی خصوصیات آنزیم مدنظر پیدا شده است. این پروتوکل آنزیمی را اجرا کنید و به سوالات پاسخ دهید.

روش کار:

۱. ۸ کووت در اختیار شما قرار داده شده است.کووت ها را حتما لیبل کنید.

۲. به روش رقیق سازی سریالی در ۴ کووت ۴ غلظت متفاوت از سوبسترا (20mM) را بسازید. به طوری که حجم نهایی هر کووت 250µM باشد. برای رقیق سازی از بافر (buffer) استفاده کنید.

۳. مطابق جدول ۱ را در کووت ها موارد زیر را بریزید. (حجم‌ها به µl است)

جدول ۱

	1	2	3	4
Buffer	125	125	125	125
Enzyme	250	250	250	250

۴. پس از ریختن آنزیم زمان بگیرید و پس از ۵ دقیقه مقدار 250µl از محلول S را در کووت ها بریزید. تا واکنش متوقف شود. ۲ دقیقه پس از ریختن محلول S واکنش کاملا متوقف می شود.

۵. سپس در چهار کووت دیگر مجدد مراحل ۴-۲ را تکرار کنید. با این تفاوت که این بار پس از **۲۵ دقیقه** که واکنش تمام می شود. ترکیب S را به کووت ها اضافه کنید. پس از ۵ دقیقه نشان آبی را بلند کنید تا برای خواندن جذب ها وقت بگیرید.

۶. برای ساختن بلنک طبق جدول مقابل عمل کنید

جدول ۲

Blank	Buffer	S	Stop solution
Volume (µl)	500	250	250

سوال ۱.۱ جذب های خود را صفحه ای که مسئول آزمون در اختیار شما قرار می دهد وارد کنید (۱۶ امتیاز)

سوال ۱.۲ با توجه به اینکه ۲۵ دقیقه زمان کامل شده واکنش بوده برای زمان ۲۵ دقیقه منحنی استاندارد تغییرات جذب بر مبنای تغییرات غلظت رسم کنید. رگرسیون خط را محاسبه نمایید و معادله خط را یادداشت کنید. (۳ امتیاز)

معادله خط:

سوال ۱.۳ ازروی معادله خط سوال ۲-۱ و با توجه به جذب های زمان ۵ دقیقه جدول ۳ در زیر را کامل کنید. (۴ امتیاز)

جدول ۳

	1	2	3	4
X1 غلظت در ابتدای واکنش				
X2 غلظت در زمان 5 دقیقه				
V سرعت در زمان 5 دقیقه				

سوال ۱.۴ منحنی لینویور برگ را یاداشت کنید. و مقادیر Km و Vmax را گزارش نمایید. (۵ امتیاز)

Km	
Vmax	

سوال ۱.۵ اگر غلظت پروتئین X استخراج شده در این فعالیت ۳۵ng/mL باشد. فعالیت ویژه آنزیم را مشخص کنید. محاسبات خود را یادداشت نمایید. (۲امتیاز)

تسک دوم بررسی هیدرولیز پروتئین (۳۰ امتیاز)

مقدمه.

در این جا از آن جا که تکنیک هایی هم چون کریستالوگرافی و طیف سنجی جرمی در دسترس نبوده و ما احتیاج به یک سری اطلاعات سریع از پروتئین داشتیم. پروتئین را هیدرولیز کردیم تا اسیدآمینه های موجود در پروتئین را مشخص کنیم. دو روش هیدرولیز اسیدی و قلیایی برای پروتئین ها در دسترس است البته هر کدام از این تست ها می توانند منجر به از دست رفتن برخی از اسیدهای آمینه پروتئین شوند. به طور مثال در هیدرلیز قلیایی اسید آمینه آرژنین و در هیدرولیز اسیدی اسیدهای آمینه تریپتوفان و تا حدودی سرین و ترئونین از دست می روند ولی با این حال اطلاعات قابل توجهی را می توان به دست آورد. در اینجا پروتئین X با درصد خلوص بالا تر و حجم کم در ویال 0.5 و همان پروتئین پروتئین پس از انجام فرایند هیدرولیز در اختیار شما قرار گرفته است و در این تسک شما باید دو تست در مورد پروتئین X و هیدرولیز شده، انجام دهید.

تست اول. تعیین درصد هیدرولیز

در این بخش شما غلظت با انجام تست لوری بر روی دو پروتئین در اختیار شما قبل و بعد از هیدرولیز درصد هیدرولیز پروتئین را تعیین می کنید.

۱. برای رسم منحنی استاندارد از پروتئین استاندارد BSA(با غلظت 5mg/mL) استفاده کنید و شما حق دارید ۴ غلظت استاندارد به انتخاب خود را در چاهک های A1-F1 بسازید و همین مقادیر را در چاهک های A2 -F2 و A3 -F3 تکرار کنید. در صورت هر گونه اشتباه از چاهک های A12-F12 و A11-F11 و A10-F10 استفاده کنید.(حجم نهایی هر چاهک مطابق میزان حجم پروتئین استاندارد به 50µl است.)

۲. در مورد نمونه‌های پروتئینی X و هیدرولیز شده نیز ابتدا در چاهکهای G1-H1و در ستون متناظر H2-G2 و H3-G3، ۴۵ µl آب بریزید و سپس ۵µl از نمونه های مجهول اضافه کنید.

۳. مقدار 45µl از محلول A به هر چاهک اضافه کنید. سپس نشانگر سبز خود را بالا ببرید تا مسئول امتحان به مدت 10 دقیقه نمونه‌ها را در دمای 50 ˚C انکوبه کنید. پس از گذشت زمان 10 دقیقه با بالا بردن نشانگر سبز نمونه خود خود را برای ادامه کار بگیرید.

۴. مقدار ۵µl از محلول B به هر چاهک اضافه کنید. پلیت را مدت 10 دقیقه در فویل بپوشانید تا نور نبیند و در دمای اتاق انکوبه گردد.

۵. در ویال C، 250µl فولین وجود دارد. شما با اضافه کرد3750µl آب به آن ترکیب را رقیق کنید.

۶. مقدار 150µl از محلول C اماده شده را به هر چاهک اضافه کنید. سپس نشانگر سبز خود را بالا ببرید تا مسئول امتحان به مدت 10 دقیقه نمونه شما را در دمای 50 ˚C انکوبه کنید. پس از گذشت زمان 10 دقیقه با بالا بردن نشانگر سبز نمونه خود خود را برای ادامه کار بگیرید. با بالا بردن نشان گر زرد وقت برای جذب بگیرید

با اجازه مسئول امتحان جذب های هر چاهک را در طول موج 490nm بخوانید. مقادیر را یادداشت نمایید. به میز خود بازگردید و داده های را در جدول پاسخ نامه وارد نمایید.

سوال ۲.۱ جدول زیر را براساس غلظت های مورد استفاده خود و حجم هایی که استفاده نموده اید، پر کنید. (۴ امتیاز)

جدول ۴

	A	B	C	D	E	F
پروتئین استانداردBSA						
آب						
غلظت						

سوال ۲.۲ جذب های خود را در در این محل چسبانید. (۱۶ امتیاز)

سوال ۲.۳ منحنی استاندارد BSA را در پاسخ نامه رسم کنید. (۵/۲ امتیاز)

سوال ۲.۴ غلظت پروتئین قبل و بعد از هیدرولیز را حساب کنید.. (۲ امتیاز)

سوال ۲.۵ درصد هیدرولیز پروتئین را تعیین کنید. (0.5 امتیاز)

تست دوم. تعیین نوع هیدرولیز

دراین مرحله شما باید دو تست تشخیصی ساکاکوچی (تست تشخیص آرژنین) و هاپکینزکول (تست تشخیص تریپتوفان) را طبق پروتوکل انجام دهید.

۴ لوله دراختیار شما قرار دارد از ۲ لوله برای تست هاپکینز کول و ۲ لوله برای تست ساکاکوچی استفاده نمایید.

A. تست ساکاکوچی: دو لوله بردارید در یک لوله یک سی سی آب به عنوان شاهد و در لوله دیگر ۱ سی سی از نمونه پروتئین هیدرولیز شده بریزید. به هر لوله 500 mL سود و 100µl محلولF اضافه کنید. رنگ قرمز نشانه وجود آرژنین است.

B. تست هاپکینزکول: دو لوله بردارید در یک لوله 500µl آب به عنوان شاهد و در لوله دیگر 500µl از نمونه پروتئین هیدرولیز شده بریزید. مقدار 900µl گلي اگزالیك به هر لوله اضافه کنید. لوله را کج کرده و به آرامي قطره قطره اسید سولفوریك (ویال با لیبل AS) اضافه کنید. تشکیل حلقه رنگی جواب مثبت است.

هشدار: لوله ها را تا انتهای مراحل امتحان و بررسی توسط مسئول امتحان دور نریزید. در صورت ریخته شدن و نداشتن لوله ها نمره این مرحله برای شما منظور نخواهد شد و هیچ بهانه ای قابل پذیرش نمی باشد. (۴ امتیاز)

سوال ۲.۷ نوع هیدرولیز را مشخص کنید. سوال دارای نمره منفی نیز می‌باشد؟ (۱امتیاز)

تسک سوم کروماتوگرافی پروتئین X (۲۳امتیاز)

تست اول. انجام TLC

سه اسیدآمینه معلوم در اختیار شما قرار دارد طبق پروتوکل برای این سه اسید آمینه و نمونه پروتئین هیدرولیز شده تست TLC را انجام داده و به سوالات پاسخ دهید.

۱. بر روی کاغذ TLC با مداد یک خط بکشید
۲. ۲ میکرولیتر از هر نمونه (Ser ,Asp ,Glu و پروتئین هیدرولیز شده) را با فاصله مناسب بر روی کاغذ قرار دهید.
۳. پس از خشک شدن نقاط کاغذ را در تانک قرار دهید.
۴. پس از اینکه تا قسمت های بالایی کاغذ حلال بالا آمد. کاغذ را خارج نمایید. محل بالا آمدن را با مداد مشخص کنیدو اجازه دهید خشک شود.
۵. اجازه دهید کاغذ خشک شود.
۶. پس از ۵ دقیقه با بالا بردن مجدد نشان سبز کاغذ را پس بگیرید. (مسئولیت گرفتن زمان با خود شماست.
۷. **کاغذ را باید در انتهای آزمون تحویل دهید. (۵ امتیاز)**

سوال ۳.۱ مقدار RF سه اسیدآمینه را تا بالا ترین نقطه حرکت اسیدآمینه محاسبه کنید. (۳ امتیاز)

سوال ۳.۲ حضور کدام اسیدهای آمینه در آنزیم هیدرولیز شده طبق اطلاعات این تست انجام شده محتمل است. (سوال دارای امتیاز منفی نیز می‌باشد) (۲امتیاز)

سوال ۳-۳ با توجه به داده های بدست آمده در این تسک و تسک های قبلی پروتئین X متعلق به کدام گروه از آنزیم های زیر می‌تواند باشد. (سوال دارای امتیاز منفی نیز می‌باشد) (۱ امتیاز)

۱. کاسپازها که آسپارژین پروتئاز هستند.
۲. انیدرازها که متالوپروتئیناز هستند.
۳. پپسین‌ها که سرین پروتئاز هستند.
۴. دارای دو ناحیه فعال آنزیمی با دو اسیدآمینه موثر می‌باشد.

تست دوم. تعیین وزن مولکولی پروتئین مجهول

در این تسک شما با انجام کروماتوگرافی Size Exclusion وزن مولکولی پروتئین را تعیین می‌کنید.

روش انجام کار:

۱. ۹۰۰µl از ترکیب IN را در ارلن زیر ستون بریزید.
۲. ستون کروماتوگرافی در اختیار شما قرار گرفته است. درب بالایی ستون را بردارید تا بافر خارج شود.
۳. ۱۰۰µl از پروتئین X را در ویال حاوی نشانگر بریزید.
۴. درب پایینی ستون را بردارید تا محلول خارج شود.
۵. حال ۱۰۰µl از ترکیب پروتئین X و نشانگر را در ستون بریزید. (نوک تیپز را به رزین ستون نزدیک نمایید اما در آن فرو نبرید.)
۶. حال ۲۰۰µl از حلال را درستون بریزید . تا از ستون خارج شود. به آهستگی کار کنید.(این مرحله را تا آبی شدن ترکیب ارلن ادامه دهید)
۷. تمام مدت حواستان به ستون باشد تا ستون خشک و خالی از بافر نشود.

سوال ۳.۵ حجمی که برای خروج پروتئین استفاده شده چقدر بود؟ (۴امتیاز)

سوال ۳.۵ حجم مورد استفاده برای خروج پروتئین های استاندارد در اختیار شما قرار داده شده است و نمودار حجم مورد استفاده بر اساس تغییرات وزن مولکولی را رسم نمایید. جدول ۶ را پر کنید. (۶ امتیاز)

جدول ۵

Protein Name	Molecular weight (Da)	Used Volume (ml)
Thyroglobulin	669000	2.8
Ferritin	440000	2.35
Aldolase	158000	2.1
Ovalbumin	43000	1.6
Cytochrome	12500	1.09
Gastrin	2126	0.32

جدول ۶

	1. y:ax+b	2. Y:alogx+b
R^2		
a		
b		

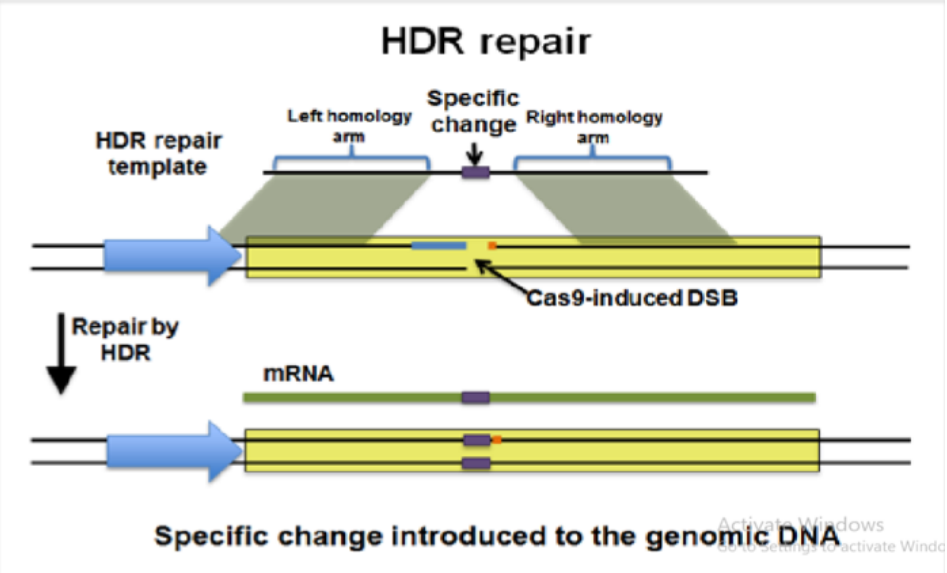
سوال ۳.۶ وزن مولکولی پروتئین را تعیین کنید (۲ امتیاز)

بخش سوالات مولکولی

در دهه اخیر ، دانشمندان روشی قدرتمند برای ویرایش ژن در موجودات زنده توسعه داده اند که باعث پیشرفت های سریعی در مهندس ژنتیک شده است.

پروتیین cas۹ ،یک پروتئین باکتریایی است که به باکتری ها در دفاع در برابر باکتریوفاژ ها کمک می کند.در سلول های باکتریایی ، پروتئین cas۹ به همراه یک RNA راهنما (guide RNA) که از ناحیه CRISPR در ژنوم باکتری رونویسی می شود، در دفاع عمل می کند.CAS۹ یک نوکلئاز است که DNA دو رشته ای را برش می دهد. بر خلاف انزیم های برش دهنده (Restriction Enzyme) که فقط یک جایگاه خاص در DNA را برش می دهند، یک پروتیین CAS۹می تواند هر جایگاهی در DNA که به سمت آن هدف دهی شده است را برش دهد. هدف دهی cas۹ توسط guide RNA رخ می دهد به این شکل که CAS۹ جایگاهی در ژنوم را که توالی مکمل با guide RNA دارد شناسایی و DNA را برش میدهد.guide RNA ها از ناحیه CRISPR در ژنوم رو نویسی می شوند ،هر چه باکتری با فاژ های بیشتری تماس داشته ، ناحیه CRISPR ان دارای guide RNA های مربوط به فاژهای بیشتری است.

در سلول های یوکاریوتی هنگامی که CAS۹ ،DNA را برش میدهد،انتها های شکسته شده DNAمکانیسم های ترمیمی را به راه میاندازند.Homology directed repair (HDR)یکی از مکانیسم های ترمیمی است که ترمیم قطعه اسیب دیده را به کمک یک توالی هومولوگ با قطعه اسیب دیده انجام میدهد. به کمک روش (HDR) میتوان قطعات دلخواهی را به ژنوم وارد کرد.



۴.۱. درستی یا نادرستی گزاره های زیر را تعیین کنید. (هر گزاره ۰.۵ نمره مثبت ۰.۲۵ نمره منفی)

آ. مقاومتی که به صورت طبیعی توسط سیستم CRISPR CAS ایجاد می شود ، در تمام طول عمر باقی می ماند اما به زادگان انتقال داده نمی شود.

ب. سیستم CRISPR CAS در ارکی باکتری های نیز یافت می شود.

ج. در سیستم های زنده و طبیعی نیز حتما باید قطعه ای که توسط CAS برش داده شده با یک قطعه هومولوگ ترمیم گردد.

د. رو نویسی از ناحیه CRISPR نیز توسط پروتیین CAS۹ انجام می شود.

در یکی از پروژه های تحقیقاتی که بر روی دیابت صورت گرفته بود، دانشمندان متوجه شدند که با کاهش بیان یکی از کانال های انتقال دهنده ATP به نام VADC۱ در سلول های بتای پانکراس که ATP را از سلول خارج می کند، می توان تا حد خوبی این بیماری را درمان کرد.

برای کاهش بیان این ژن سعی شد یک پروموتور ضعیف به بالا دست ژن منتقل شود.به خاطر اینکه وجود این ژن و فراورده آن برای فعالیت سلول حیاتی است ، نمی توان به راحتی ژن را knockout کرد.

برای بررسی اینکه کدام یک از پروموتور های موجود باعث کاهش بیشتری در بیان ژن مورد نظر در سلول های مورد ازمایش ما می شود دانشمندان می توانند با استفاده از همان روش CRISPR و HDRپروموتور های مختلف را به جایگاه مورد نظر وارد کنند.

به این ترتیب که در ابتدا پروموتور قبلی توسط CAS۹ برش داده می شود.

سپس قطعه ای که هم دارای توالی هومولوگ با ناحیه برش داده شده،و هم دارای پروموتور دلخواه ما به عنوان قطعه جدید هست به سلول ها ارائه می شود و ترمیم به کمک این قطعه که نقش الگو را دارد، انجام می شود و قطعه جدید مورد نظر ما به ژنوم وارد می شود .

دانشمندان برای ارائه این قطعه به سلول از یک پلاسمید استفاده می کنند.

همچنین برای برسی میزان بیان ژن ، یکreporter gene نیز به همراه پروموتور به بالا دست ژن اضافه می شود. وجود حداقل یک پروموتور در بالا دست reporter gene برای بیان reporter کافی است.

درادامه مراحل کار برای وارد کردن پروموتور به صورت جزئی تری بیان شده است:

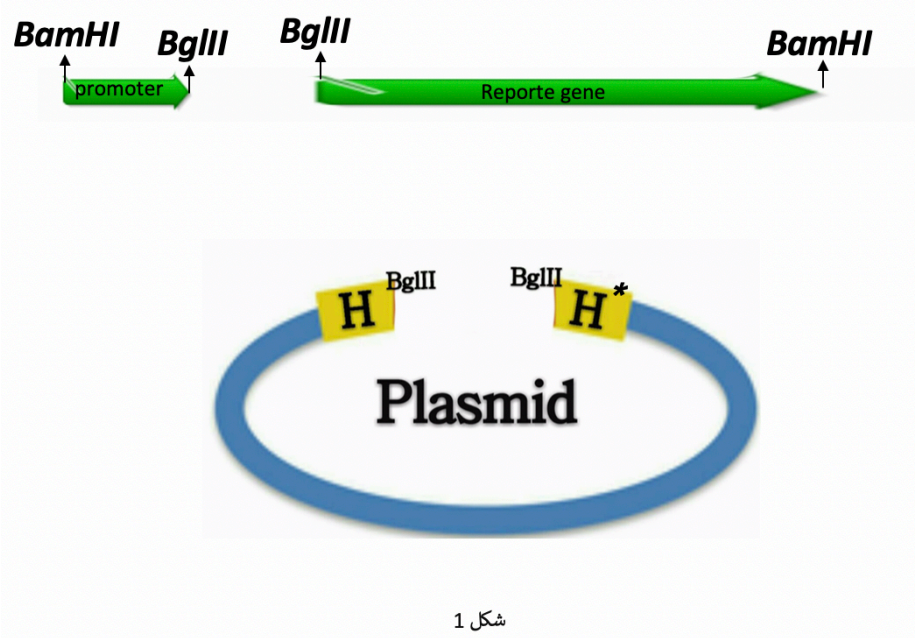
جدول زیر اطلاعاتی در مورد پروموتور ها و reporter gene به ما میدهد.

Promoter	Size(bp)
A	100
B	200
C	50

Reporter Gene	Size(bp)	X
YFP(yellow fluorscent protein)	700	300-600

X نشان دهنده فاصله جایگاه برش NcoI (5′-C*CATGG-3′) از ابتدای ۵′ reporter gene است. در ریپورتر ژن YFP دو عدد جایگاه برش NcoI وجود دارد که فاصله انها از سر ۵′ ژن مشخص شده است.

پروموتور ها و reporter gene هر دو در دو سر خود جایگاه برش انزیم های BglII (5′-G*GATCC-3′), BamHI (5′-A*GATCT-3′)را دارند (شکل۱) و توسط این انزیم ها برش داده شده و به همراه پلاسمیدی که ان نیز با آنزیم BglII برش داده شده بود در شرایط مناسب با انزیم لیگاز تیمار شدند.

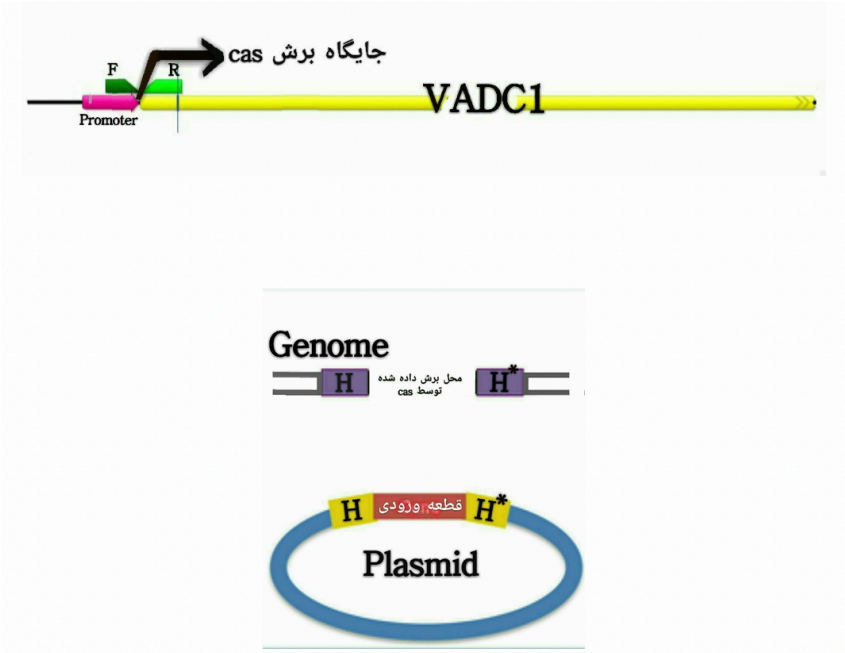


شکل 1

وکتورهایی که در مرحله قبل اماده شده بود به علاوه پروتیین CAS ۹ به جمعیت سلول های مورد بررسی معرفی شدند. Cas دقیقا ناحیه بین پروموتور و ژن را میبرد. وکتور به کمک قطعات هومولوگ خود که مطابق دو طرف ناحیه برش خورده هستند به سمت ناحیه برش خورده هدف دهی می شود.

پروموتور قبلی به خاطر ورود قطعات جدید دیگر عملکردی ندارد و در عملکرد پروموتور جدید نیز تاثیری نمی گذارد.

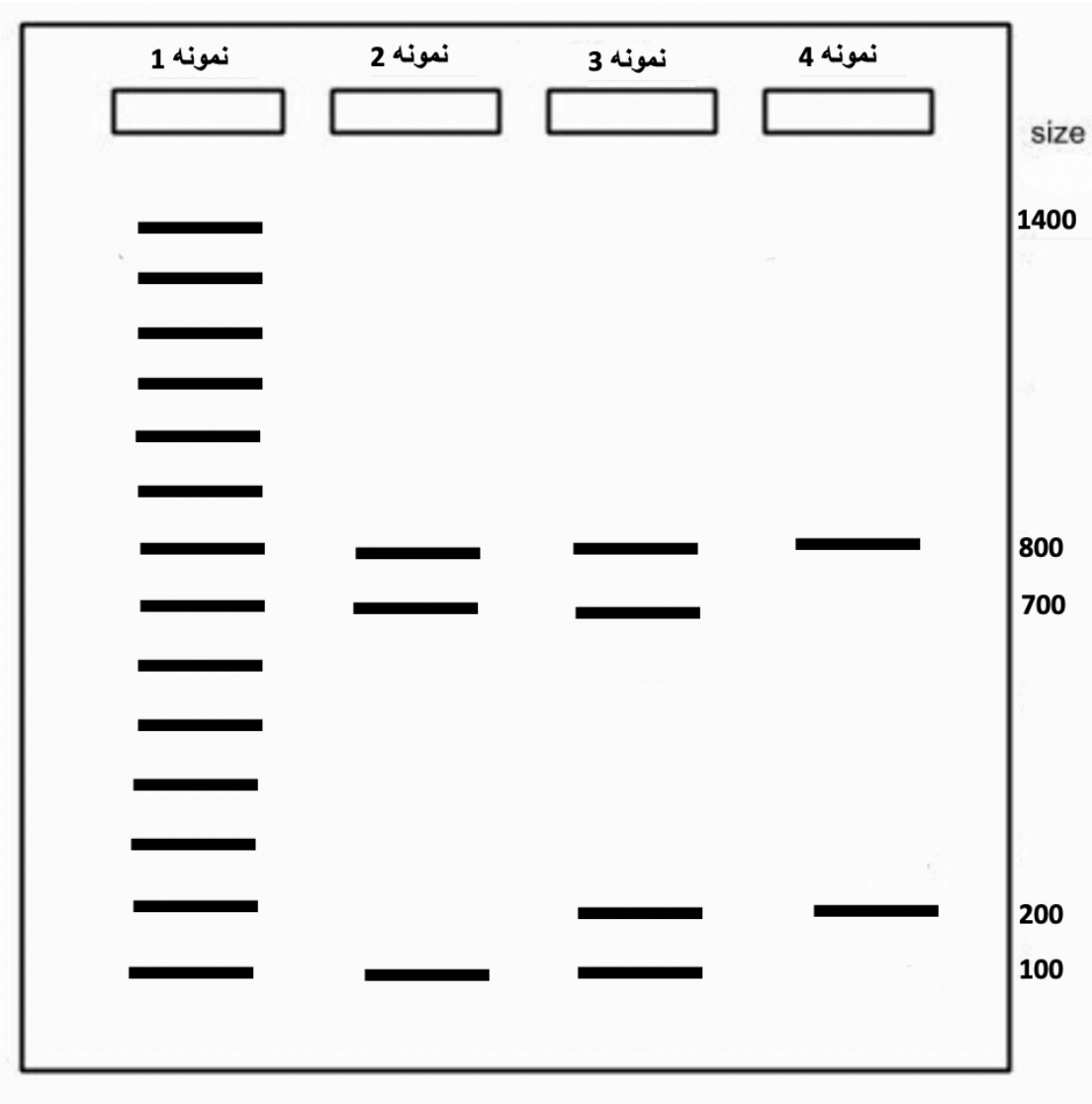
برای تایید ورود قطعه مورد نظر به سلول از روش pcr استفاده شد. به این شکل که با استفادع از دو پرایمر شناخته شده در دو سر جایگاهی که قرار است توالی وارد شودpcr صورت می گیرد و سپس محصولات روی ژل الکتروفورز بررسی می شوند(شکل۲).



شکل2. F:forward primer ,R :reverse primer

۴.۲. با توجه به اینکه ما جمعیت سلولی بزرگی داریم که هر کدام از انها ممکن است قطعه ورودی متفاوتی داشته باشند یا اصلا قطعه ورودی نداشته باشند باند ها و الگو های متفاوتی دیده خواهد شد.کدام یک از شکل های زیر نشان دهنده الگوی حاصل از محصولات pcr است با فرض اینکه ازپروموتر A استفاده شده باشد؟ (۰.۵ نمره)

(اگر محصول pcr از ۱۰۰ کوچکتر و از ۱۴۰۰ برگتر باشد، در ژل چیزی دیده نمی شود.)



شکل 3

برای برسی ها بیشتر **باند اصلی** (باندی که اندازه ای برابر طول پروموتور و ریپورتر ژن دارد، در مثال ما ۱۰۰+۷۰۰=۸۰۰) از ژل قبلی جدا می شود و توسط انزیم های NcoI (۵'-C*CATGG-۳') و BglII (۵'-A*GATCT-۳') برش داده شده و الگوی قطعات حاصل از برش بر روی ژل الکتروفورز تفسیر می شود. .

۴.۳. با توجه به اینکه کدام یک از پروموتور استفاده شده باشد، بعد از هضم قطه اصلی (گرفته شده از باند اصلی) با دو انزیم (۵′-C*CATGG-۳′) NcoI و (۵′-A*GATCT-۳′) BglII قطعات متفاوتی دیده می شود. تعداد باند هایی که در هر یک از شرایط زیر دیده می شود را بنویسید. (هر کدام ۰.۵ نمره)

پروموتور B: ☐

پروموتور A: ☐

پروموتور C: ☐

از بین سلول های مورد بررسی انهایی که دارای **قطعه اصلی** بودند را جدا کردیم، برخی از سلول ها هیچ فلوئورسنتی نداشتند و برخی از سلول ها نیز مستقل از اینکه فلوئورسنت داشتند یا نه بعد از مدتی با مرگ مواجه می شدند.

۴.۴. درستی یا نادرستی گزینه های زیر را تعیین کنید. (هر گزاره ۰.۵ نمره مثبت ۰.۲۵ نمره منفی)

آ. وارد نشدن پروموتور به بعضی از سلول ها ، سبب کاهش فلوئورسنت شده است.

ب. به خاطر جهش در ریپورتر ژن بعضی از سلول ها فلوئورسنتی از خود بروز نمی دهند.

ج. پروتیین ریپورتر در عملکرد سلول ها تداخل ایجاد کرده و باعث مرگ برخی از سلول ها میشود.

د. در برخی سلول ها پروموتور در هنگام ورود به ژنوم جهت گیری اشتباهی داشته است .

ه. در برخی از سلول ها هیچ ریپورتر ژنی وارد نشده که هم اکنون فلوئورسنتی دیده شود.

۴.۵. برای اینکه بتوانیم سلول هایی که پروموتور و یا ریپورتر ژن انها در جهت درست یا برخلاف جهت درست به ژنوم وارد شده اند را شناسایی کنیم باید الگو قطعات حاصل از برش قطعه اصلی انها با دو انزیم BglII , BamHI را در ژل برسی کنیم. اندازه باند های حاصل از برش قطعه اصلی با دو انزیم BamHI , BglII را برای سلول خواسته شده در هر یک از شرایط زیر تعیین کنید. (هر کدام ۰.۵ نمره)

سلول هایی که هم فلوئورسنت ایجاد نمی کنند ولی زنده می مانند:

آ)پروموتور: A ☐

ب)پروموتور: C ☐

ج)پروموتور: B ☐

سلول هایی که هم فلوئورسنت ایجاد می کنند و زنده می مانند.

د)پروموتور: A ☐

سلول هایی که فلوئورسنت ایجاد نمی کنند و زنده نمی مانند.

ه)پروموتور: C ☐

سلول هایی که فلوئورسنت ایجاد می کنند ولی زنده نمی مانند.

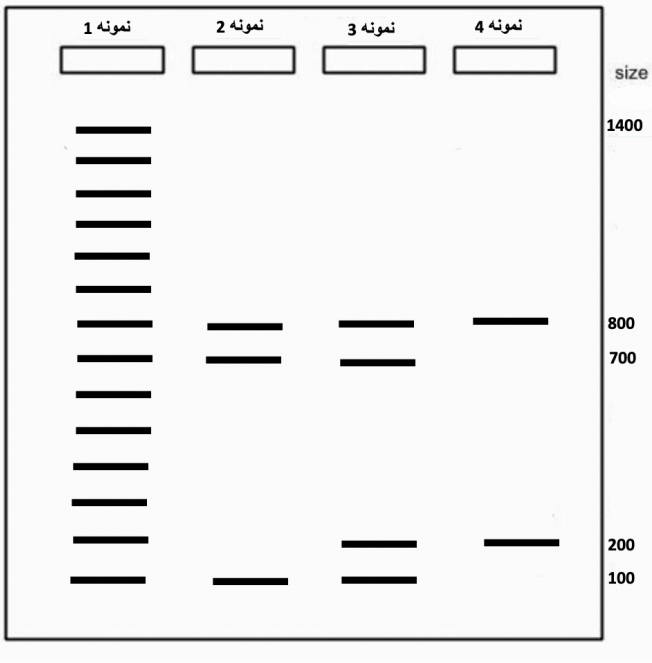
و)پروموتور: B

۴.۶. درستی یا نا درستی گزاره های زیر زیر را تعیین کنید. (هر گزاره ۰.۵ نمره مثبت ۰.۲۵ نمره منفی)

آ. با هضم قطعه اصلی با دو انزیم BglII (۵'-A*TCTGA-۳'), BamHI (۵'-G*ATCCC-۳') به راحتی می توان سلول هایی که دارای قطعات با جهت گیری مناسب هستند را شناسایی کرد.

ب. سلول هایی که پروموتور A دارند و هضم قطعه اصلی انها با دو انزیم BglII, BamHI مشابه حالت ت در سوال قبل است ، همگی زنده خواهند ماند.

۴.۷. مشخص کیند هر کدام از ژل ها که نشان دهنده برش قطعه اصلی با دو انزیم BglII, BamHI است مربوط به کدام نوع سلول هاست؟ (دارای کدام نوع پروموتوراست؟ / زنده می ماند یا زنده نمی ماند یا نمی توان تعیین کرد؟ / فلوئورسنت دارد یا ندارد یا نمی توان تعیین کرد؟) (هر نمونه در صورتی که هر ۳ معیار درست باشد ۰.۵ نمره)



شکل 3

	نمونه ۴	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱
پروموتور				
زنده / مرده / نمی توان تعیین کرد				
فلوعورسنت دارد / ندارد / نمی توان تعیین کرد				