آزمایشگاه آموزشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

نیمه‌سنجشی

بیوشیمی.

روز هفتم
۹۸/۵/۱۵

اندازه‌گیری غلظت کلسترول | الایزا | تعیین غلظت پروتئین

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

اندازه‌گیری غلظت کلسترول

در این قسمت غلظت کلسترول را با روش زاک بدست بیاورید.

روش کار

۱. موارد زیر را در چاهک‌ها به صورت ستونی بریزید و سه بار تکرار کنید. (ترکیب S حلال کلسترول است و به منظور رقیق‌سازی استفاده می‌شود). حجم‌ها به میکرولیتر است.

	۱	۲	۳	۴	blank	sample
سمپل X	۰	۰	۰	۰	۰	۵
کلسترول (۱۰mg/ml)	۵	۲.۵	۱.۲	۰.۶	۰	۰
محلول S		۲.۵	۳.۸	۴.۴	۰	۰
محلول A	۱۰	۱۰۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
محلول B	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰
محلول C	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

۲. به مدت ۱۰ دقیقه در فویل بپوشانید سپس برای خواندن جذب با **نشانگر زرد** وقت بگیرید.

پرینت جذب را در صفحه انتهایی بچسبانید. (۱۴نمره)

منحنی استاندارد را رسم کنید. همه جذب ها را از 1ST کم نکنید. (۴ نمره)

غلظت کلسترول مجهول را حساب کنید. (۲ نمره)

الایزا

فردی با علائم تب، سردرد، قرمزی بیش از حد پوست و درد مفاصل به پزشک مراجعه می‌کند. پزشک احتمال ابتلا به التهاب را برای او در نظر می‌گیرد. نمونه پلاسما فرد در اختیار شما قرار گرفته تا با انجام الایزا به بررسی hsCRP (high sensitive C Reactive Protein) بپردازید.

الایزا (enzyme-linked immunosorbent assay) یک تکنیک بیوشیمیایی است که به طور عمده در ایمنی‌شناسی برای شناسایی وجود یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن در نمونه استفاده می‌شود. در این نوع الایزا ابتدا آنتی‌بادی capture antibody علیه آنتی‌ژن مورد نظر روی سطح پلیت پوشانده می‌شود.

سپس اتصالات غیراختصاصی توسط شست‌وشو حذف، و مکان‌های خالی توسط بلاکر پر می‌شود. با افزودن نمونه حاوی آنتی‌ژن و شست‌وشوی پس از آن، تنها اتصالات اختصاصی آنتی‌بادی – آنتی‌ژن باقی می‌مانند. حال با اعمال آنتی‌بادی اولیه اختصاصی و نشان‌دار (متصل به آنزیم) علیه آنتی‌ژن، شست‌وشوی آنتی‌بادی‌های اضافه و به کار بردن سوبسترایی که توسط آنزیم به رنگ، فلورسانت یا سیگنال الکتروشیمیایی تبدیل می‌شود، می‌توان میزان و یا وجود هر یک از آنتی‌بادی‌های متصل به آنتی‌ژن و نیز خود آنتی‌ژن را بررسی نمود.

روش کار

دو چاهک در اختیار شما قرار داده شده است که با آنتی‌بادی پوشانده شده است.

۱. موارد زیر را در چاهک‌ها بریزید.

Well Name	Serum
Serum	۵۰µL
Assay Buffer (AB)	۵۰µL

۲. پلیت را به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی تکان دهید و سپس درب چاهک‌ها را با برچسب مخصوص پلیت پوشانده وبه مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۳. مقدار ۵۰µl از آنزیم کنژوگه شده با علامت (CE) مشخص شده به تمام چاهک‌ها اضافه کنید. روی چاهک‌ها را مجدد با همان برچسپ بپوشانید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید و در فویل قرار دهید.

۴. محتویات چاهک‌ها را خالی کنید و به چاهک‌ها **۲۰۰** میکرولیتر بافر شستشوی آماده (W) شستشو دهید. سپس چاهک‌ها را وارونه کنید و همراه با تکان دادن خالی کنید. این مرحله را ۵ مرتبه تکرار کنید.

۵. ۱۰۰µl از از سوبسترای آماده مصرف (با علامت CS مشخص شده) به تمام چاهک‌ها اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه کنید و در فویل قرار دهید.

۶. مقدار ۱۰۰µl از محلول متوقف کننده (با علامت ST مشخص شده) به تمام چاهک‌ها اضافه کنید.

نشانگر **زرد** را بالا ببرید و برای خواندن جذب وقت بگیرید.

پرینت جذب را در صفحه انتهایی بچسبانید. (۴ نمره)

مقادیر جذب‌های استاندارد به شرح زیر است:

	غلظت(ng/ml)	جذب
St1	0.0	2.266
St2	0.5	1.350
St3	1.0	0.819
St4	2.5	0.424
St5	5.0	0.255
St6	10.0	0.160

منحنی استاندارد را رسم کنید. همه جذب‌ها را از 1ST کم نکنید. (۴ نمره)

کدام یک از 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)

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

	معادله ۱	معادله ۲
a		
b		
$r2$		

معادله‌ای که تطابق بهتری دارد را انتخاب کنید. معادله منتخب ذکر شود و غلظت نمونه مجهول را بر اساس آن بدست آورید (۲ نمره).

تعیین غلظت پروتئین

سندرم آنجلمن (Angel man Syndrome) یک بیماری شدید عصبی ژنتیکی است. این بیماری به علت عدم حضور ژن *UB3A* و یا جهش‌های نقطه‌ای مؤثر در ژن فوق ایجاد می‌گردد. بررسی‌ها نشان می‌دهد فعالیت آنزیم پروتئین UB3A در پاتولوژی بیماران سندرم انجلمن مؤثر است. به نظر می‌رسد پروتئین UB3A با ساب‌یونیت S5a از کمپلکس proteasomal degradation برهم‌کنش می‌کند. هر نوع جهش و یا تغییر در پروتئین UB3A موجب تأثیرات مهاری بر فعالیت پروتئولیتیک پروتئازوم می گردد (پروتئازوم یک کمپلکس پروتئینی است که پروتئین‌هایی که مورد نیاز نیستند یا آسیب‌دیده‌اند را طی یک فرایند آنزیمی می‌شکنند و از بین می‌برد).

در این آزمایش سلول‌های 293Hek (سلول طبیعی) با ۱. پلاسمیدهای حاوی ژن UB3A، ۲. پلاسمیدهای حاوی ژن با جهش نقطه ای در ژن UB3A به نام L502E، ۳. پلاسمیدهای 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 نمونه‌ها تأیید گشت. سپس مقدار ۲۰µl از پروتئین تام استخراج شده از لیزات سلولی با غلظت ۱۰۰ ng/mL از هر نمونه برای بررسی فعالیت پروتئازوم استفاده شده است. 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 غلظت سه پروتئین لیز شده به روش بردفورد را محاسبه کرده و به سوالات پاسخ دهید.

جدول مرتبط با انجام تست بردفورد:

	1	2	3	4	5	6	X1	X2	X3
آب	10	8	6	4	2	0	0	0	0
BSA (0.5 mg/mL)	0	2	4	6	8	10	0	0	0
X1	0	0	0	0	0	0	10	0	0
X2	0	0	0	0	0	0	0	10	0
X3	0	0	0	0	0	0	0	0	10
OD1	0.298	0.393	0.449	0.476	0.538	0.552	0.411	0.588	0.334
OD2	0.299	0.362	0.422	0.488	0.514	0.558	0.416	0.542	0.328
OD3	0.290	0.353	0.438	0.518	0.574	0.598	0.403	0.518	0.332

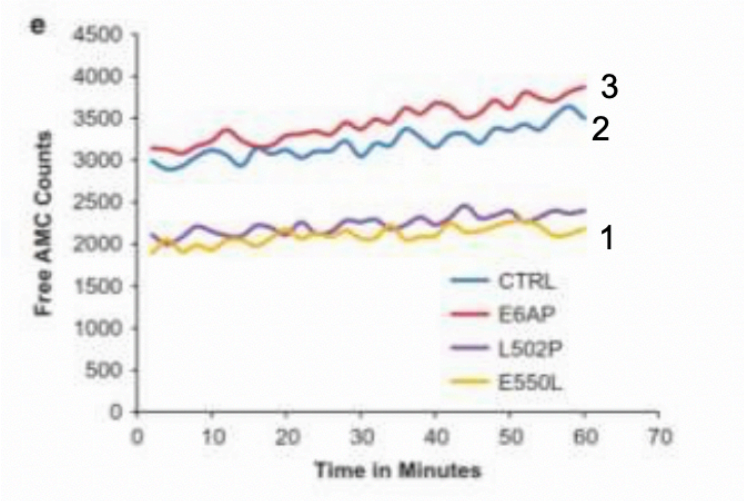
منحنی استاندارد را رسم کنید. جذب‌ها را از جذب ۱ کم کنید. (۴ نمره)

غلظت پروتئین‌های مجهول را محاسبه کنید. تمامی محاسبات را یادداشت نمایید (۵ نمره) . معادله خط را نیز بنویسید.

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

X1:	X2:	X3:

کدام یک از نمودارهای 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 ترنسفکت‌شده با UB3A

پلاسمیدهای حاوی ژن با جهش نقطه‌ای (E502P)