آزمون آزمایشگاه بیوشیمی و تیتراسیون

امتحانات دوره تابستان المپیاد زیست شناسی 1399

مدت آزمون

150 دقیقه

تاریخ برگزاری

9 آبان 1399

ساعت برگزاری

16:00 – 18:30

نکات خاص آزمون

این آزمون شامل دو بخش می باشد:

بخش اول: بیوشیمی 70 درصد از نمره آزمون

بخش دوم: تیتراسیون 30 درصد از نمره آزمون

نمره درون هر بخش بر اساس نمره جلوی سوال تقسیم می شود.

توضیحات مربوط به هر بخش در ابتدا آن آورده شده است.

فضای مناسب برای پاسخ در هر سوال قرار داده شده است.

در این کادر چیزی ننویسید	تصحیح اول	تصحیح دوم	تجدید نظر

کد دانش پژوه (در این بخش چیزی ننویسید): [ ]

بسم رب الحسین

جمهوری اسلامی ایران

وزارت آموزش و پرورش

مرکز ملّی پرورش استعدادهای درخشان و دانش پژوهان جوان

مبارزه ی علمی برای جوانان، زنده کردن روح جست‌وجو و کشف واقعیت‌هاست. «امام خمینی(ره)»

آزمون پایانی آزمایشگاه بیوشیمی

دوره تابستانه المپیاد زیست شناسی

پاییز ۱۳۹۹

- **پس از شروع آزمون دفترچهٔ سوالات خود را چک کنید. در صورت نقص در تعداد صفحات یا هرگونه مشکل دیگر در ۵ دقیقه ابتدایی مسئول جلسه را مطلع نمایید.**
- **در سوالات مورد بررسی، از واکنش های پیچیدهٔ شیمیایی و سایر عوامل مداخله کننده ای که در سوال بررسی نشده اند صرفنظر کنید. آزمایش ها را عملی و آنزیم های مورد بررسی و واکنش ها را با کارایی بالا در نظر بگیرید مگر آنکه خلاف آن ذکر شود.**
- **کلید با توجه به داده های موجود در سوال ارائه می شود. بدیهیست که می بایست سوالات را با توجه به داده های ارائه شده پاسخ دهید هرچند با واقعیت تفاوت داشته باشد.**
- **تمامی داده های اعشاری را تا سه رقم اعشار وارد نمایید.**
- **تنها استفاده از ماشین حساب مهندسی Casio 82-MS مجاز می باشد. در صورت نیاز به ماشین حساب به مسئول جلسه اطلاع دهید.**
- **همراه داشتن هرگونه کتاب، جزوه، یادداشت و لوازم الکترونیکی نظیر تلفن همراه و لپتاپ ممنوع است. همراه داشتن این قبیل وسایل حتّی اگر از آن استفاده نکنید یا خاموش باشد، تقلّب محسوب خواهد شد.**

مدت زمان آزمون : ۸۰ دقیقه

موفق باشید!

بخش اول : تئوری آزمایشگاه ۱ (۴۹ نمره)

۱- اخیرا گروهی از زیست شناسان به طور تصادفی متوجه کاربرد دارویی نوعی مادهٔ سمی به نام **Amatoxin** شدند که توسط قارچ کلاهک مرگ (**Amanita phalloides**) رشد کرده در جنگل های کالیفرنیا ساخته می شود. از همین رو با احتیاط کامل شروع به استخراج این ماده و بررسی ویژگی های شیمیایی آن کردند و جرم مولی این ماده را **903g/mol** به دست آوردند. آنها پس از تخلیص و جداسازی این ماده، مطابق جدول زیر محلول هایی در حجم نهایی **750µL** با غلظت های مشخص ساختند و درصد عبور نور از این محلول ها را اندازه گیری نمودند. با توجه به این نتایج :

میزان **amatoxin** موجود در محلول (**mg**)	درصد عبور نور
۰.۰۱۶۹	۷۸٪
۰.۰۳۳۹	۶۰.۸٪
۰.۰۶۷۷	۳۷٪
۰.۱۰۱۶	۲۲.۵٪
۰.۱۳۵۵	۱۳.۷٪

A. ضریب خاموشی مولی این ماده را بدست آورید. (۸ نمره – بدون نمره منفی)

ضریب خاموشی مولی : ($M^{-1} . cm^{-1}$)	

B. جمعی از محققان ایرانی متوجه حضور این گونه قارچ در جنگل های هیرکانی شدند که سم آن نیز خواصی همانند گونهٔ آمریکایی آن دارد. آن ها پس از نمونه گیری و ایجاد یک محلول از این ماده سمی، مطابق پروتکل های آزمایش پیشین جذب نوری نمونهٔ خودشان را **1.223** به دست آوردند. غلظت نمونهٔ ایرانی این محلول را به دست آورید. (۴ نمره – بدون نمره منفی)

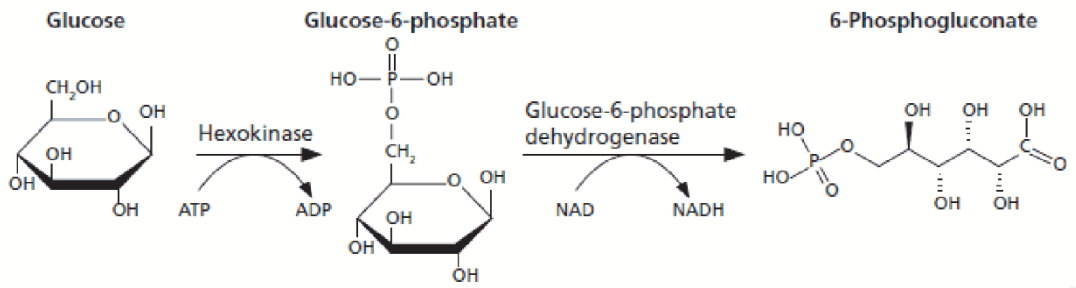
غلظت نمونهٔ ایرانی (**µM**) :	

۲- پروسه آنزیمی کیت گلوکز اکسیداز و سنجش غلظت گلوکز به صورت زیر است :

$$\beta\text{-D Glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{گلوکز اکسیداز}} \text{D – Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4- Aminoantipyrine} + \text{phenol} \xrightarrow{\text{پراکسیداز}} \text{Quinoneimine} + 4\,H_2O$$

همانطور که مشاهده می کنید در این روش با عمل آنزیم پراکسیداز ماده ای رنگی **Quinoneimine** تولید شده که یک ترکیب قرمز رنگ است و در **546nm** حداکثر جذب را دارد. اما نکته آنجاست که گلوکز اکسیداز تنها فرم **β** گلوکز را به عنوان سوبسترا قبول می کند؛ بنابراین از آنجا که در خون ۷۰ درصد از گلوکز خون به فرم **β** و مابقی به فرم **α** می باشد، پس اندازه گیری قند خون بر این مبنا مقدار واقعی از قند خون نمی دهد. از این رو برای اندازه گیری غلظت قند از روشی دیگر هم استفاده می شود که فرایند واکنش های آن به صورت زیر است :



در این روش از تغییرات جذب **NADH** استفاده می شود (λ_{max} = **339nm**) و غلظت این ماده می تواند معیاری از مقدار قند موجود در محلول باشد. با توجه به مفاهیم گفته شده به سوالات زیر پاسخ دهید :

A. در صورتی که در کیت گلوکز اکسیداز، علاوه بر دو آنزیم اصلی گلوکز اکسیداز و پروکسیداز آنزیم کاتالاز هم داشته باشیم در آزمایشات بررسی آنزیمی کدام مورد(موارد) ممکن است اشتباه محاسبه شود؟ با ضربدر مشخص کنید. (هر خانه ۲ نمره – نمره منفی برابر)

غلظت یک محلول حاوی سوبسترا	فعالیت ویژه	فعالیت	K_m	V_{max}

B. در آزمایشی با یک کیت آنزیمی چینی نتایج زیر به عنوان جذب نوری محلول های با غلظت مختلف قند ثبت شد. هنگام رگرسیون گرفتن، به این شک کردیم که شاید ارتباط جذب و غلظت از رابطه ای متفاوت از رابطهٔ خطی تبعیت کنند. به همین دلیل شما چند مدل مختلف را بررسی می کنید تا مدلی که تطابق بهتری با نتایج دارد را بیابیم.

غلظت	جذب نوری
۱.۲	۰.۵۷۱
۲	۰.۸
۵	۱.۲۵
۹	۱.۵
۱۶	۱.۶۸۴

a. داده های خواسته شده را برای هر مدل گزارش کنید. (هرخانه ۲ نمره – بدون نمره منفی)

مدل	$Abs = ab^x$	$Abs = ax^b$	$Abs = \frac{a.x}{b+x}$	$Abs = a. \log x + b$	$Abs = a\sqrt{x} + b$	$Abs = ax+b$
a						
b						

b. از مدل های بالا سه مدلی که بیشترین تطابق با داده های ما را دارند به ترتیب از راست به چپ در جدول زیر وارد کنید. (هر خانه ۱ نمره)

	<	<

بخش دوم : تئوری آزمایشگاه ۲ – تسک Gloc-1 (۷۷ نمره + نمره سوال 3.D)

تولید آنزیمی ارزان و با کارایی بالا برای واکنش های خاص از آرزوهایی بوده است که امروزه بشر در حال تحقق بخشیدن به آن است. اکنون در مرزهای علم تولید پروتئین ها و آنزیم ها به صورت **De novo** بررسی می شود. در سنتز **De novo** آنزیم، زیست شناسان با بررسی توالی پروتئین و آنالیز ساختار سه بعدی احتمالی آن، تولید آنزیمی جدید که تاکنون در طبیعت وجود نداشته را پیش می برند که می تواند درهای جدیدی را در دنیای گسترده واکنش ها به روی ما بگشاید. از این رو زیست شناسان ایرانی نیز تماشاچی ننشسته و در این مسیر قدم گذاشته اند. شرکت **YazdiGen** که اخیرا به یکی از شرکت های پیشگام در این عرصه تبدیل شده است، امروزه بر روی کیت تعیین غلظت قند جدیدی متفاوت از گلوکز اکسیداز به نام **Gloc-1** کار می کند. روش کارآنزیم های موجود در بازار که بر مبنای جذب **NADH** عمل می کنند در سوال ۲ بخش اول توضیح داده شد. اما این آنزیم به جای عمل در دو مرحله، در یک مرحله با مصرف **ATP** و **NAD** گلوکز را به **6-Phosphogluconate** تبدیل می کند و درواقع دو مرحله واکنش را در یک گام پیش می برد.

۱. حال شرکت YazdiGen از شما به عنوان یک آزمایش کننده ماهر درخواست کرده که آنزیم Gloc-1 را چک کنید تا عملکرد آن صحت سنجی شود. شما هم با کمال میل قبول کرده و مراحل زیر را برای اجرای آزمایش انجام می دهید :

- ۱۰ کووت لیبل شده در اختیار شما قرار گرفته است (از هر کووت دوتا دارید. مثلا A_1 و A_2). مطابق جدول زیر (داده ها برحسب µL)، مقادیری از سوبسترا و بافر را در کووت می ریزید به طوری که حجم نهایی هر کووت به 2mL برسد:

لیبل کووت	سوبسترا (گلوکز 5mg/mL)	بافر	آنزیم
A	۲۰۰	۰	۱۸۰۰
B	۱۵۰	۵۰	۱۸۰۰
C	۱۰۰	۱۰۰	۱۸۰۰
D	۵۰	۱۵۰	۱۸۰۰
E	۲۵	۱۷۵	۱۸۰۰

- به تمامی کووت های A تا E آنزیم را اضافه می کنیم. جذب کووت های $A_1,B_1,...,E_1$ را پس از ۳۰ ثانیه در طول موج 339nm اندازه گیری می کنیم. در کووت های $A_2,B_2,...,E_2$ پس از ۱۵ دقیقه، 500µL محلول Stop می ریزیم و با ریختن این محلول واکنش بلافاصله متوقف می شود. سپس جذب آنها را اندازه گیری می نماییم. پس از اندازه گیری جذب ها و استاندارد کردن داده ها (کم کردن جذب بلنک از آنها) نتایج زیر ثبت شد :

لیبل کووت	جذب گروه ۱	جذب گروه ۲
A	۲.۱۰۹	۰.۱۳۷
B	۱.۵۸۲	۰.۱۲۳
C	۱.۰۵۵	۰.۱۰۳
D	۰.۵۲۷	۰.۰۶۸
E	۰.۲۶۳	۰.۰۴۱

A. با در نظر گرفتن اینکه در مدت ۱۵ دقیقه، واکنش به صورت کامل انجام می شود، منحنی استاندارد جذب برحسب غلظت های مختلف(mg/L) سوبسترا را واحد گذاری و رسم کرده (۷ نمره – بدون نمره منفی ، توجه داشته باشید که نقاط باید دقیق رسم شده و غلظت های صحیح را نمایش دهند.) و معادلهٔ خط حاصل از آن را در کادر وارد نمایید. (۳ نمره – بدون نمره منفی)

معادله خط:

B. در کووت دیگری علاوه بر کووت های بالا **200µL** محلول گلوکز **Alpha** با غلظت نامشخص و **1800µL** آنزیم ریختیم و پس از ۲۰ دقیقه جذب آن را ۱.۴۳۴ به دست آوردیم. غلظت قند محلول **Alpha** را به دست آورید.
(۵ نمره – بدون نمره منفی)

غلظت قند برحسب **g/L** :	

C. موارد خواسته شده در جدول زیر را تکمیل نمایید. (هر خانه ۱ نمره – بدون نمره منفی، جرم مولی گلوکز (180g/mol

	نمونهٔ A	نمونهٔ B	نمونهٔ C	نمونهٔ D	نمونهٔ E
غلظت در ابتدای واکنش (µM)					
غلظت پس از ۳۰ ثانیه (µM)					
سرعت واکنش در ۳۰ ثانیهٔ ابتدایی (µM/min)					

D. منحنی معادلهٔ لینویور-برک را برای سرعت در زمان ۳۰ ثانیه آنزیم Gloc-1 رسم کرده (۷ نمره – بدون نمره منفی) و Km و Vmax را محاسبه نمایید. (هرکدام ۵ نمره – بدون نمره منفی)

: Km (mM)	
: V_{max} (µM/min)	

۲. برای اطمینان از داده های به دست آمده، شما بر آن می شوید که داده هایی که به دست آورده اید را با سایر دانش پژوهان IrBO 23 که آزمایش مشابه را انجام داده اند مقایسه کنید؛ اما در کمال تعجب متوجه تفاوت در جذب های به دست آمدهٔ بقیه می شوید! با بررسی های بیشتر در می یابید که علاوه بر قند نوعی مولکول دیگر در استوک سوبسترای شما وجود دارد که باعث این تفاوت شده است. داده های سایر دانش پژوهان را در جدول زیر مشاهده می نمایید :

لیبل کووت	جذب گروه ۱
A	۰.۱۱۷
B	۰.۱۰۷
C	۰.۰۹۱
D	۰.۰۶۳
E	۰.۰۳۹

A. صحت گزاره ی زیر را مشخص نمایید. (۱ نمره – نمره منفی برابر)

۱) تفاوت در جذب ها می تواند به این علت باشد که سایر دانش آموزان جذب محلول بلنک را از داده های خود کم نکرده اند.

صحیح	غلط

B. شما با بررسی احتمالات مختلف به این نکته بر می خورید که ممکن است این تفاوت به علت وجود یک مهارکننده در محلول باشد. از این رو محاسبات مربوط به آن را انجام داده و در صورت صحت فرضیهٔ خود، نوع مهارکننده در جدول زیر مشخص کنید. در صورت عدم صحت فرضیه «مهارکننده نیست» را انتخاب نمایید. (۸ نمره – نمره منفی نصف)

نوع مهارکننده	
رقابتی	
نارقابتی	
مختلط	
مهارکننده نیست	

۳. پس از موفقیت در انجام آزمایش های قبلی، اعتماد مسئولین شرکت **YazdiGen** به شما جلب می شود و اکنون از شما می خواهند که فعالیت ویژه آنزیم جدیدشان را نیز به دست آورید. از این رو شما برای پیدا کردن مقدار آنزیم استفاده شده از تست بردفورد استفاده می کنید. برای انجام این تست موارد زیر را در اختیار دارید :

- ✓ محلول **BSA** (**2 mg/mL**)
- ✓ **ویال حاوی آنزیم استفاده شده در آزمایش ۱ – –** (اگر نمی دانید ویال چیست آن را معادل ظرف در نظر بگیرید)
- ✓ **محلول بردفورد**
- ✓ **ویال W (آب) –** (اگر نمی دانید ویال چیست آن را معادل ظرف در نظر بگیرید)
- ✓ **میکروپلیت ۹۶ چاهکی**

روش کار :

- **چاهک های میکروپلیت را مطابق جدول زیر پر می کنید.**

	1	2	3	4	5	6	7
A	10µL BSA + 40µL W	8µL BSA + 42µL W	6µL BSA + 44µL W	4µL BSA + 46µL W	2µL BSA + 48µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
B	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
C	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL BSA + 40µL W	10µL E + 40µL W	50µL W
D	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-

- **به هریک از چاهک های پر شده 150µL محلول بردفورد اضافه کرده و سپس میکروپلیت خود را برای خواندن جذب ها به مسئول آزمایشگاه ارائه می دهید. جدول زیر نتایج جذب های شما را نشان می دهد :**

	1	2	3	4	5	6	7
A	۰.۸۶۲	۰.۶۹۰	۰.۵۲۰	۰.۳۴۹	۰.۱۸۱	۰.۴۲۲	۰.۰۸۸
B	۰.۸۵۶	۰.۶۸۴	۰.۵۱۲	۰.۳۶۱	۰.۱۸۸	۰.۴۴۱	۰.۰۸۴
C	۰.۸۷۱	۰.۶۹۹	۰.۵۱۴	۰.۳۴۵	۰.۱۷۳	۰.۴۳۶	۰.۲۷۲

A. غلظت آنزیم موجود در ویال E چند $\frac{\mu g}{mL}$ است؟ (۵ نمره – بدون نمره منفی)

B. فعالیت ویژهٔ ($\frac{\text{واحد آنزیمی}}{mg}$) آنزیم استفاده شده کووت A_1 سوال ۱ را گزارش کنید. (۶ نمره – بدون نمره منفی)

A	
B	

C. یکی از دوستان شما با مشکلی مواجه شده است. او اذعان می دارد که حواسش پرت شده و در ابتدای آزمایش ها استوک آنزیمش را با BSA قاطی کرده است. در این صورت دوست شما : (هر گزاره ۲ نمره – نمره منفی نصف)

۱) Vmax آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) Vmax ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۲) Km آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) Km ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۳) فعالیت آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) فعالیتی ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۴) فعالیت ویژهٔ آنزیم را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) فعالیت ویژه ای که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

۵) غلظت استوک سوبسترا (آزمایش اول) را (کمتر از / بدون تفاوت با / بیشتر از) غلظت استوک سوبسترایی که شما محاسبه کرده اید گزارش می کند.

	کمتر از	بدون تفاوت با	بیشتر از
۱)			
۲)			
۳)			
۴)			
۵)			

D. پس از بررسی مشخص شد ادعای دوست شما درست بوده و در ویال حاوی 4mL آنزیم اولیه، 1mL از محلول BSA ریخته است. نکته جالب تر این بوده که جذب های دوست شما در آزمایش ها دقیقا با نتایج شما یکی شده است! (و البته این به معنای خطای آزمایش شما نیست.) اگر پارامترهایی را در بالا مشخص کرده اید که متفاوت گزارش می شوند، مقادیر صحیح آنها (در حالتی که آنزیم با BSA مخلوط نمی شد) را محاسبه کنید. بدیهیست که در صورت عدم تغییر نیازی به پر کردن جدول زیر نیست. (هر پاسخ عددی ۳ نمره – بدون نمره منفی)

غلظت قند در ویال سوبسترا (سوال 1.B)	فعالیت ویژه (سوال 3.B)	فعالیت (واحد آنزیمی)	Km (mM) (سوال 1.D)	Vmax (μM/min) (سوال 1.D)

به نام خدا

آزمون شیمی تجزیه زمان آزمون:70 دقیقه

در تمامی سوال ها فقط جواب آخر نمره دارد و هیچ نمره ای به راه حل تعلق نمی گیرد.

همه ی پاسخ ها به صورت عدد علمی و با 2 رقم اعشار گزارش شود. (در جواب های مربوط به محاسبه pH عدد علمی لازم نیست)

سوال های pH، بازه ی $pH \pm 0.01$ صحیح می باشد و بقیه سوال ها خطای 1% صحیح می باشد و خارج از این بازه به جواب نمره ای تعلق نمی گیرد.

1- pH محلول های زیر را به دست آورید.(3 نمره)

الف) 1.5×10^{-7} M HCl	
ب) 0.2 M $H_2SO_4 + 0.1$ M Na_2SO_4	
ج) 0.1 M HF+ 10^{-3} M NaOH	

$pKa(HSO_4^-) = 1.92$
$PKa(HF) = 3$

2- محلولی از کلرو استیک اسید را 10 مرتبه رقیق می کنیم (حجم آن ده برابر می شود) و محلول رقیق شده $pH = 2$ دارد. غلظت اولیه اسید را در محلول غلیظ به دست آورید.(1.5 نمره)

$pKa(CH_2ClCOOH) = 1.3$

3-محلولی حاوی $0.1M$ از فرمیک اسید ($HCOOH$) و $0.05M$ از هیدروکلریک اسید (HCl) می باشد. محلول را چند مرتبه رقیق کنیم (حجم آن چند برابر شود) تا درصد تفکیک فرمیک اسید دوبرابر شود؟ (3 نمره)

$pKa(HCOOH) = 3.75$

$$\frac{[HCOO^-]}{[HCOO^-] + [HCOOH]} \times 100 = \text{درصد تفکیک}$$

4- pH محلول $0.05\ \mathrm{M}$ پتاسیم بی فتالات (KHA) برابر 4.5 می باشد. pH محلول $0.05\ \mathrm{M}$ پتاسیم فتالات (K_2A) برابر 10.1 می باشد. pH محلول $0.1\ \mathrm{M}$ فتالیک اسید (H_2A) را بیابید.(4 نمره)

5- محلول $0.1\ \mathrm{M}\ HBO_2$ توسط محلول سود $0.1\ \mathrm{M}$ تیتر می شود. اگر شناساگری که انتخاب می کنیم در $pH = 9.5$ تغییر دهد. خطای تیتراسیون چند درصد می باشد؟(3 نمره)

$pKa(HBO_2) = 9.2$

6- pH نقطه ی هم ارزی دوم را در تیتراسیون محلول $0.1\,\mathrm{M}$ فسفریک اسید با محلول $0.05\,\mathrm{M}$ سدیم هیدروکسید حساب کنید.(1.5 نمره)

$pKa(H_3PO_4) = 2.1, 7.2, 12.3$

7- محلول های $0.5\,\mathrm{M}\ \mathrm{NaOH}$ و $0.1\,\mathrm{M}\ \mathrm{H_2}CO_3$ را به صورت جداگانه در دسترس داریم. آن ها را با هم مخلوط می کنیم تا $400ml$ بافر با $pH = 10$ به دست آید. چه حجمی از محلول سدیم هیدروکسید(برحسب میلی لیتر) مصرف کرده ایم؟(4 نمره)

$pKa(H_2CO_3) = 6.4, 10.3$