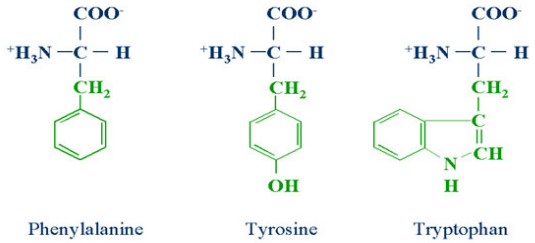
(5)
البروتينات -2-
proteins

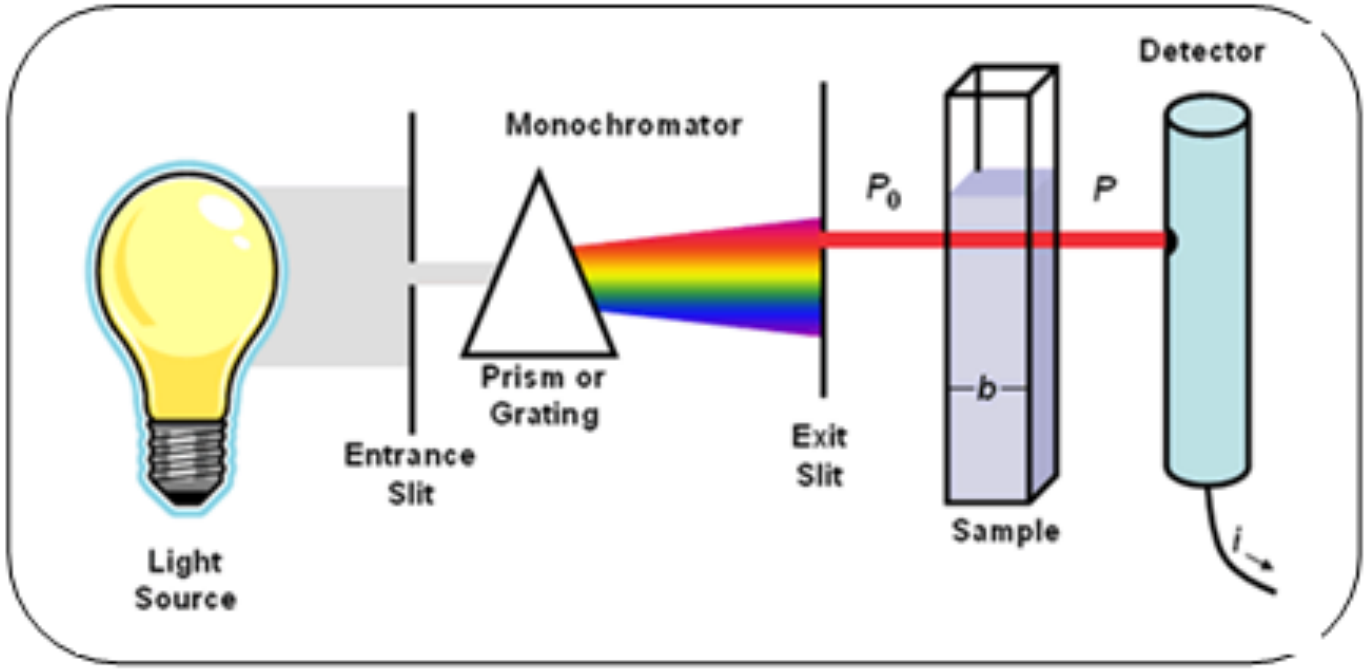
التقدير الكمي للبروتين:

- **الأهمية:** تقدير البروتينات كمياً يساعد على معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة كما أن له دلالات تشخيصية عند ارتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي، وله أهمية في معرفة المحتوى البروتيني للعينات الغذائية.

- تعتبر مقدرة الجزيئات على امتصاص أطياف الضوء من أكثر الطرق الكيموحيوية المستخدمة في تقدير كميات الجزيئات في محاليلها، ومن هذه الجزيئات المهمة على مستوى الخلية الحية هي البروتينات التي لها القدرة على الإمتصاص الضوئي لوجود بعض الأحماض الأمينية الحلقية العطرية (فينيل ألانين - تيروسين – تربتوفان).

- هناك أجهزة خاصة لقياس امتصاص الطيف الضوئي تسمى سبكتروفوتوميتر(spectrophotometer) يمكن من خلالها البروتينات عند طول موجي معين.




Detector
Monochromator
P_0
P
Prism or
Grating
Entrance
Slit
Exit
Slit
b
Sample
Light
Source
i

طريقة بيوريت لتقدير تركيز البروتين (Biuret method) :

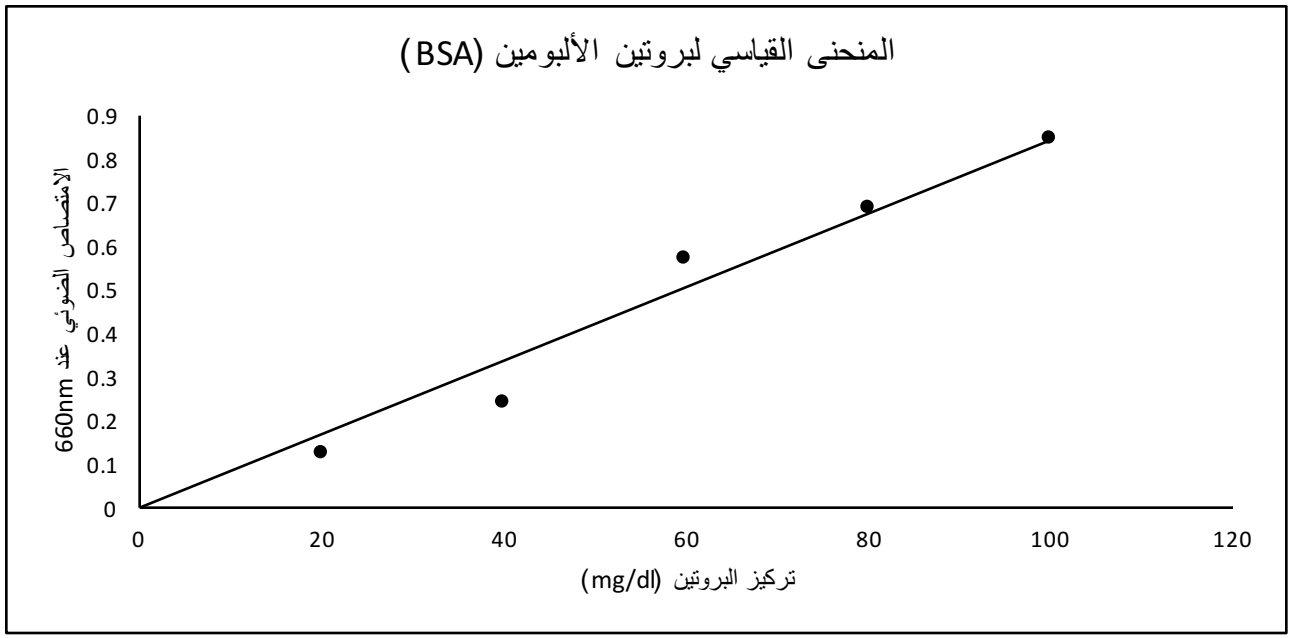
- إختبار عام على البروتينات، يهدف هذا الاختبار للكشف عن وجود البروتينات في العينة ويمكن استخدامه كاختبار كمي أونوعي للبروتينات.

النظرية العلمية للاختبار:

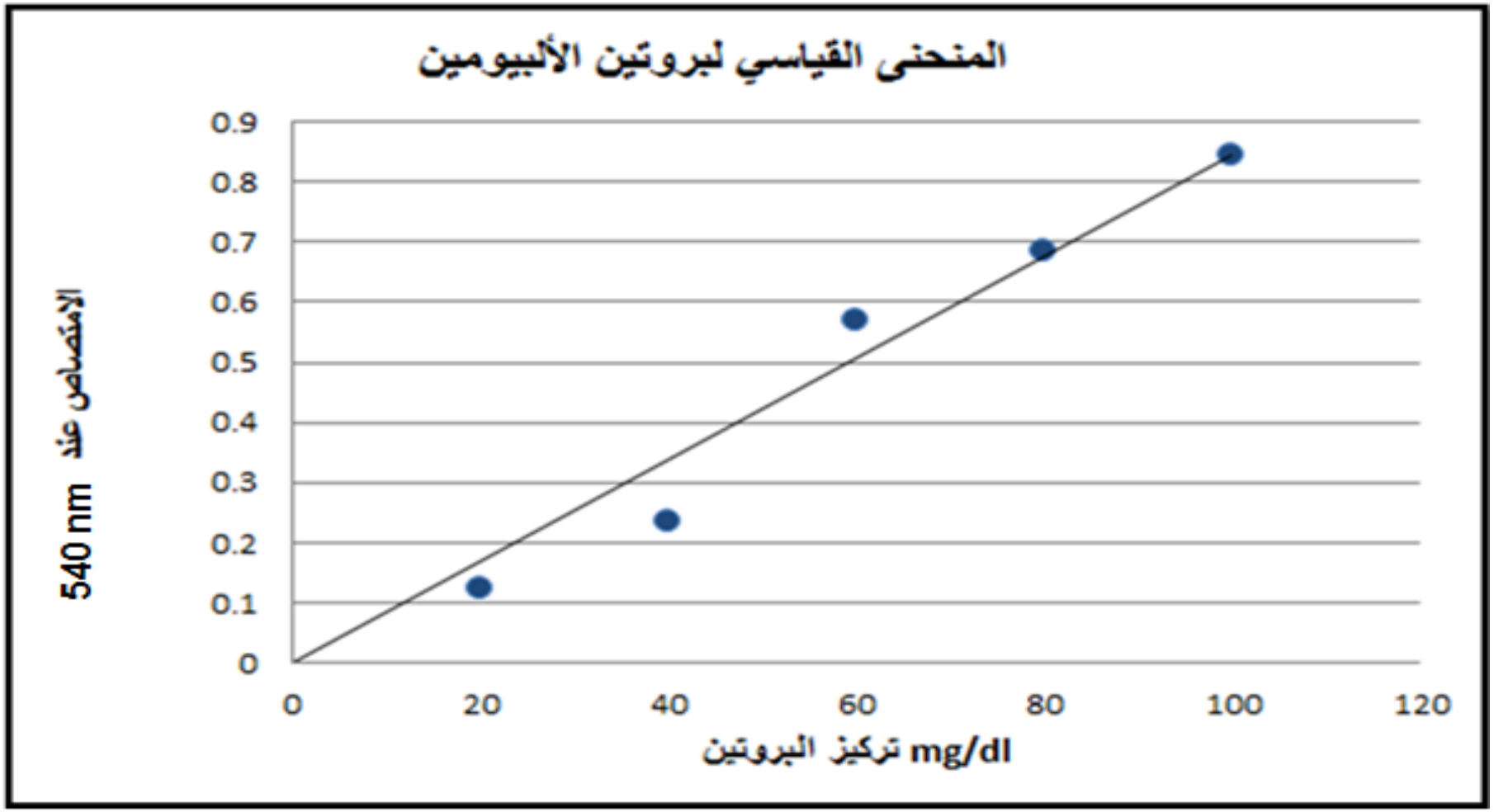
تتفاعل كبريتات النحاس في المحلول القلوي مع المركبات التي تحتوي على رابطتين أو أكثر من الروابط الببتيدية (البروتين في هذا المعمل مثلا) ويتكون اللون البنفسجي. وتعتمد شدة اللون على تركيز البروتين في العينه.

كلما كان تركيز البروتين في العينة عالٍ، كلما كان اللون البنفسجي المتكون أغمق، والعكس صحيح.

- **المنحنى القياسي للتراكيز :** هو منحنى يعكس العلاقة بين **تراكيز معلومة** لمادة (بروتين) و **الامتصاص** الضوئي لهذه التراكيز عند طول موجي معين.
- يجب إجراء **منحنى قياسي** (standard curve) لبروتينات معلومة التراكيز وذلك لإستخدامه في تقدير البروتينات **مجهولة** التراكيز.
- يمكن من المنحنى القياسي حساب تركيز البروتينات المجهولة بمعرفة مقدار الإمتصاص الضوئي لها .



يظهر المنحنى علاقة طردية (خطية) بين تركيز البروتين و الامتصاص الضوئي.
-كلما زاد التركيز ، كلما زاد الامتصاص-



ملاحظة:

العينات ذات التركيز العالية ← تمتلك قيمة امتصاص عالية ← اللون الأغمق

الجزء العملي

1- طريقة تقدير تركيز البروتين (BIURET METHOD).

طريقة العمل:

ضعي مجموعة من أنابيب الاختبار وأتبعي الجدول التالي :

رقم الأنبوبة	ماء مقطر (مل)	المحلول القياسي (٥ جرام /لتر)	العينة ذات التركيز المجهول (مل)	كاشف بيوريت (مل)		التركيز النهائي جرام /لتر
Blank	2	-	-	3 ml	Incubate for 10 mins.	0
1	1.6	0.4	-			1
2	1.2	0.8	-			2
3	1	1	-			2.5
4	0.8	1.2	-			3
5	0.6	1.4	-			3.5
6	0.4	1.6	-			4
العينة ذات التركيز المجهول	-	-	٢			??

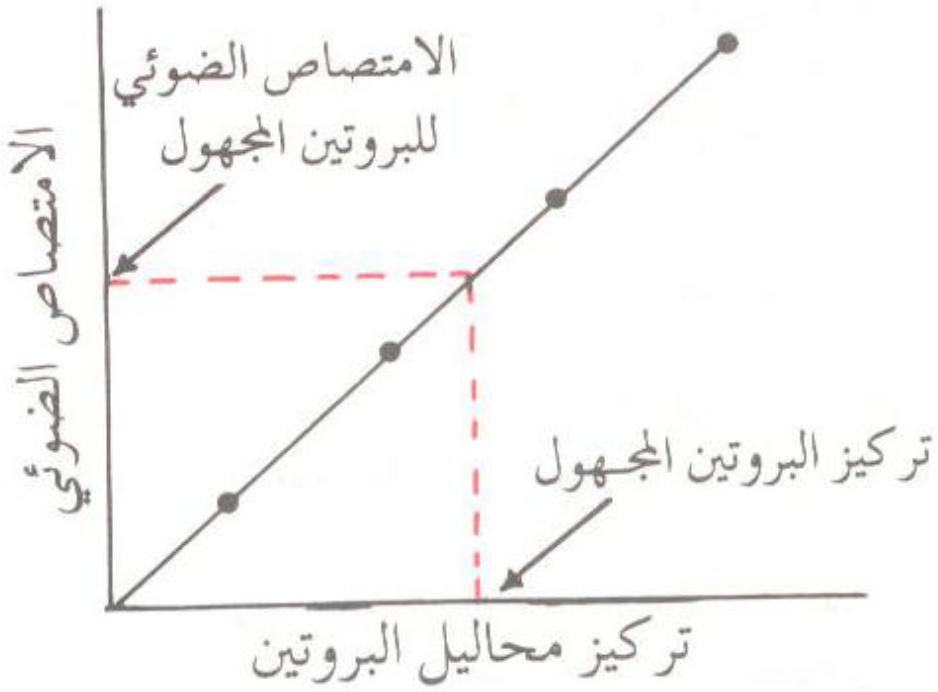
- دعي الأنابيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقيقة.
- قيسي الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 540nm
- ارسمي المنحنى باستخدام التراكيز المعلومة من عينات البروتين على المحور السيني، و قيم الامتصاص على المحور الصادي

الأقل تركيز

الأعلى تركيز

النتائج:

- ارسمي منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (على المحور الأفقي) و الإمتصاص الضوئي (على المحور الرأسي) وذلك على ورقة رسم بياني.
- استنتجي من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الامتصاص الضوئي له.



رقم الانبوبة	قيم الامتصاص عند 540 nm	التركيز النهائي جرام /لتر
1		1
2		2
3		2.5
4		3
5		3.5
6		4
العينة ذات التركيز المجهول		.....?

ملاحظة:

- إذا لم يرد عمل منحنى قياسي (وهي طريقة غير دقيقة) نكتفي بتحضير محلول بروتيني قياسي واحد فقط ثم نستخدم المعادلة الحسابية التالية لحساب تركيز محلول بروتيني مجهول:

- **مثال:**

نفرض أن المحلول القياسي تركيزه (50 g/l) وامتصاصه الضوئي 1.5 والامتصاص الضوئي للعينة المجهولة 0.9 ، كم تركيز العينة المجهولة ؟

50 g/l ⟶ 1.5

? g/l ⟶ 0.9

تركيز العينة المجهولة = $\frac{50 \times 0.9}{1.5}$ = **30 g/l**

الأسئلة:

1- ما نوع العلاقة بين تركيز البروتين و الإمتصاص الضوئي له ؟

2- قارني بين قيمة تركيز البروتين المجهول المستنتجة بواسطة المنحنى القياسي و المعادلة الحسابية؟ و أيهما أدق في النتيجة؟ ولماذا؟

....انتهى بحمد الله