الكيمياء الحيوية العامة (كيح ١٠١)

المعمل (٤): البروتينات (٢) Proteins

Emtenan Alkhudair

Office: Building 5, 3rd floor, Office No. 269

E.mail: Ealkhudair@ksu.edu.sa

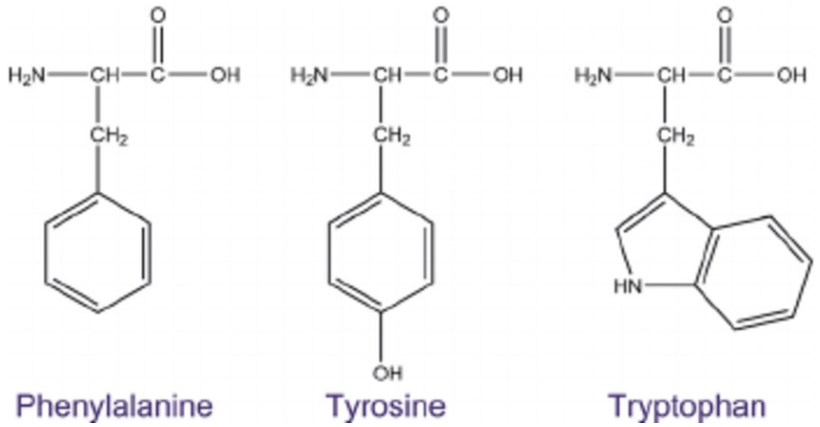
Website: Http://fac.ksu.edu.sa/ealkhudair

التقدير الكمي للبروتين (Quantitative Estimation of Proteins)

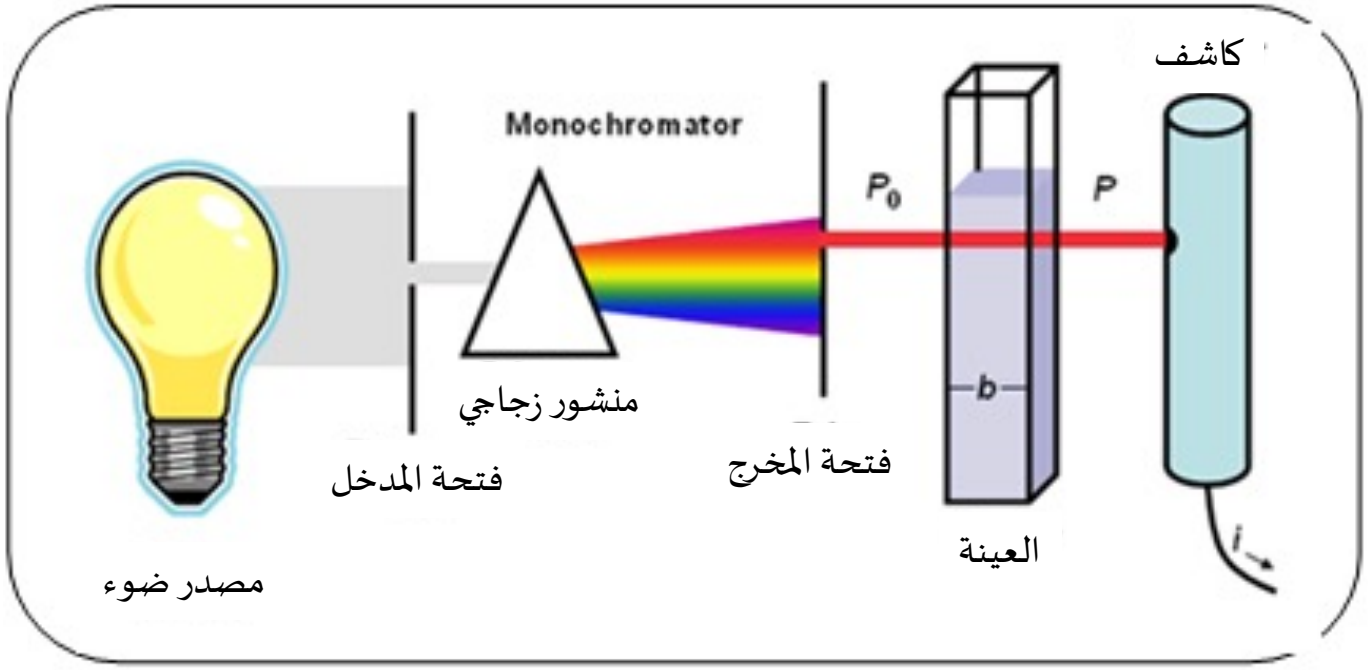
تقدير البروتينات كمياً يساعد على:

١- معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة
٢- له دلالات تشخيصية عند ارتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي
٣- له 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.
- من هذه الجزيئات المهمة على مستوى الخلية الحية هي البروتينات التي لها القدرة على الامتصاص الضوئي لوجود بعض الأحماض الأمينية الحلقية العطرية *(فينايل ألانين - تيروسين – تربتوفان).*
- هناك أجهزة خاصة لقياس امتصاص الطيف الضوئي تسمى سبكتروفوتوميتر(*spectrophotometer*) يمكن من خلالها تقدير امتصاص البروتينات عند طول موجي معين.



جهاز سبكتروفوتوميتر(spectrophotometer)



طريقة بيوريت لتقدير تركيز البروتين (Biuret Test)

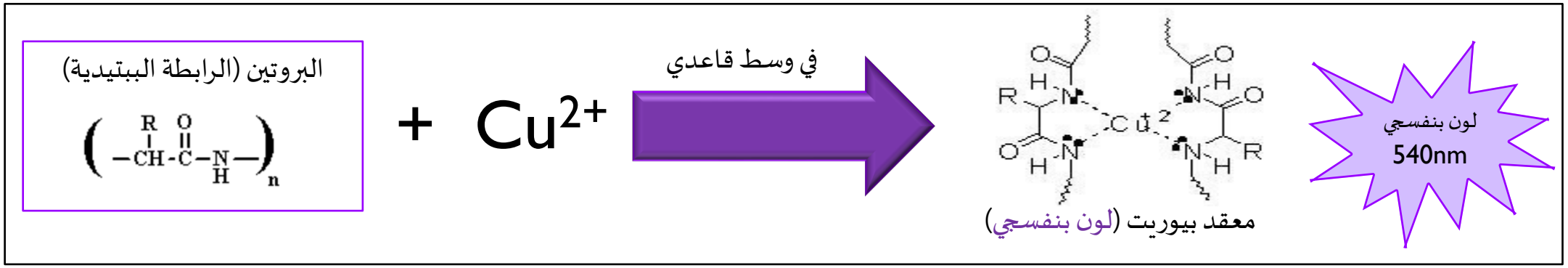
- اختبار عام على البروتينات، يهدف هذا الاختبار للكشف عن وجود البروتينات في العينة ويمكن استخدامه كاختبار كمي أو نوعي للبروتينات.

النظرية العلمية للاختبار:

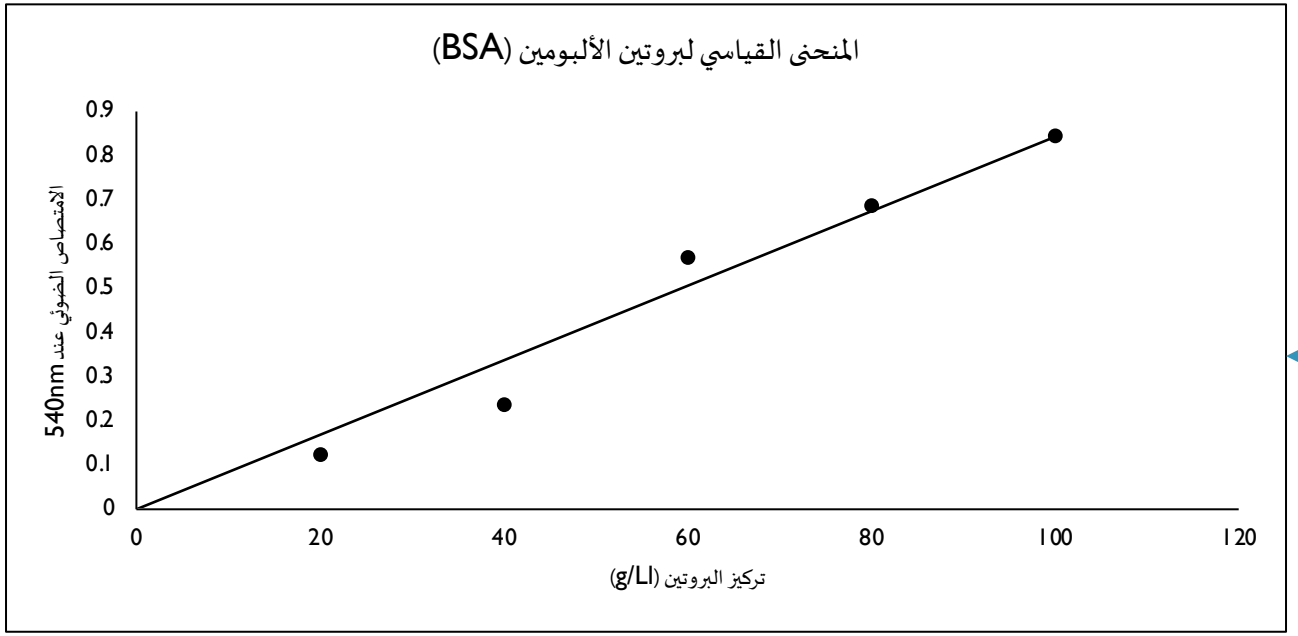
عند معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس **في وسط قاعدي** فإن أيون النحاسيك يكون معقداً بنفسجياً مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد **بيوريت** و يمكن قياس الامتصاص الضوئي له عند 540nm.

ملاحظة:

كلما زاد تركيز العينة ← زادت كثافة اللون ← قيمة امتصاص عالية. (ما نوع العلاقة؟)



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



يظهر المنحنى علاقة **طردية (خطية)** بين تركيز البروتين و الامتصاص الضوئي.
(كلما زاد التركيز ← كلما زاد الامتصاص)
(لماذا؟)

الجزء العملي

الأهداف:

1. التقدير الكمي للبروتينات باستخدام اختبار بيوريت.
2. إيجاد تركيز عينة مجهولة باستخدام المنحنى القياسي للتراكيز (بدلالة قيمة الامتصاص).

تخفيفات لبروتين تركيزه (5g/L)

طريقة العمل:

جهزي 8 أنابيب اختبار واتبعي الجدول التالي :

رقم الانبوبة	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 في الحامل لمدة عشر دقائق عند درجة حرارة الغرفة.

اقرئي الامتصاص عند 540 nm .

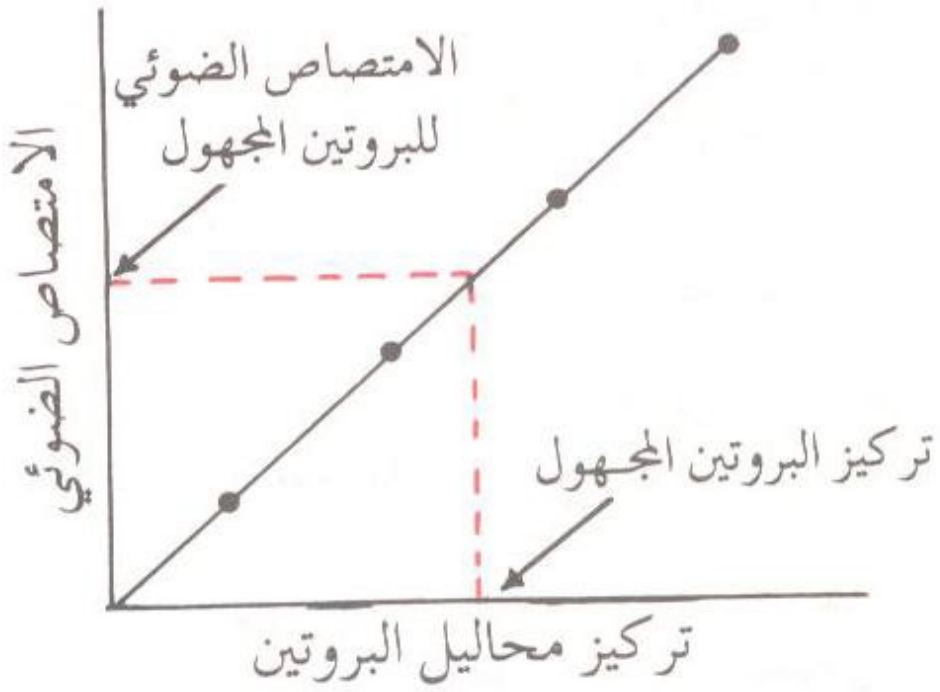
-ارسمي منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (المحور السيني) و الامتصاص الضوئي (المحور الصادي) من خلال برنامج الإكسيل.

تدرج الألوان يبتدأ من اللون الأخف (التركيز الأقل) وينتهي باللون الغامق (التركيز الأعلى)

التركيز الأعلى ← التركيز الأقل

النتائج:

- استنتجي من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الامتصاص الضوئي له.



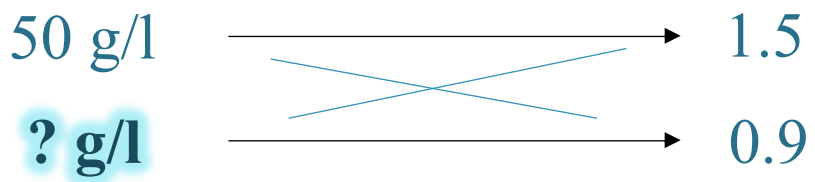
رقم الانبوبة	قيم الامتصاص عند 540 nm	التركيز النهائي جرام /لتر
1		1
2		2
3		2.5
4		3
5		3.5
6		4
العينة ذات التركيز المجهول		.....?

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 ؟



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

الأسئلة:

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

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

تم بحمد الله ....🦋