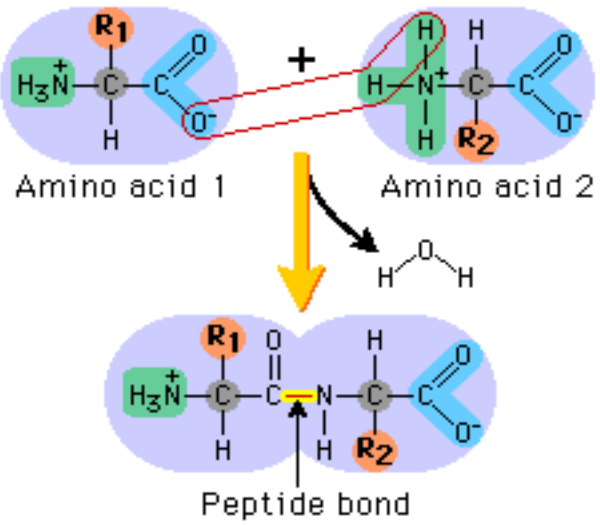
البروتينات

التركيب الكيميائي للبروتيات

- البروتينات مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية كبيرة و هي عبارة عن سلاسل من الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها بروابط ببتيدية.
- تلعب البروتينات دوراً هاماً في جسم الكائن الحي حيث تدخل في تركيب العديد من المواد البيولوجية المتخصصة مثل الأجسام المضادة و الإنزيمات و بعض الهرمونات، كما تساعد في نقل السيالات العصبية والتحكم في التعبير الجيني و هي المكون الأساسي للأنسجة الحية.
- يتكون البروتين من سلسلة من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط بيبتيدية و فيها ترتبط مجموعة الكربوكسيل في حمض أميني مع مجموعة الأمين في حمض أميني آخر مع
- إزالة جزئ ماء.



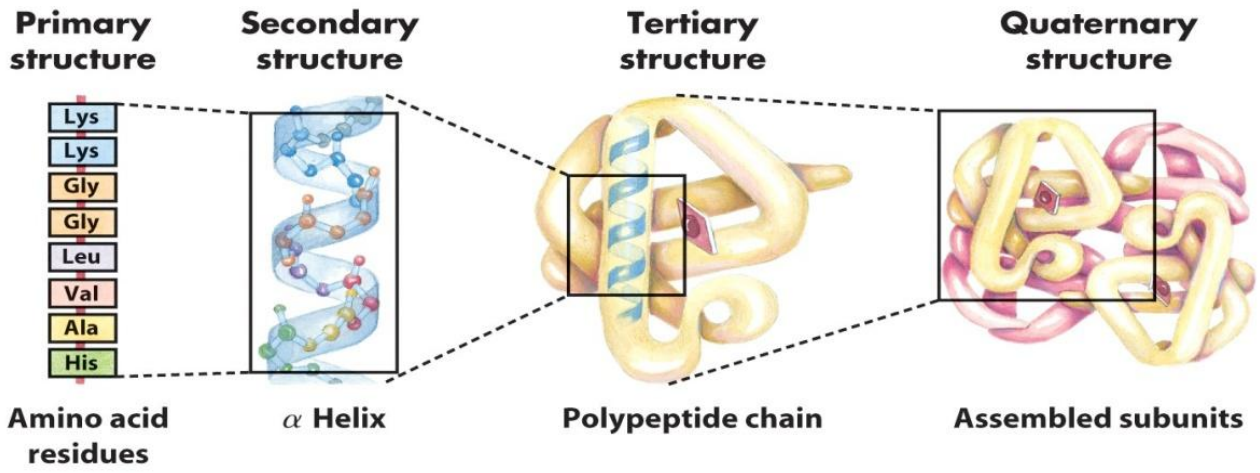
تختلف البروتينات عن بعضها البعض في بنائها الكيميائي تبعاً لعدة عوامل:

- **عدد ونوع الأحماض الأمينية** المكونة لسلاسلها البيبتيدية .
- **ترتيب** وتتابع الأحماض الأمينية.
- إرتباط البروتين مع **جزيئات أخرى غير بروتينية**.

الأشكال البنائية للبروتين :

- تأخذ السلاسل الببتيدية المكونة للبروتين أشكالاً فراغية ناتجة عن إلتفاف تلك السلاسل معطيةً **أربعة** تراكيب بنائية.
- **التركيب البنائي الأولي Primary structure**: يعبر عن تسلسل وتتابع الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها البعض بروابط ببتيدية.
- **التركيب البنائي الثانوي Secondary structure**: ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية مع بعضها البعض مما يتسبب في إلتفاف والتواء السلسلة الببتيدية مكونة إما شكل الصفيحة المطوية B-sheet او الشكل الحلزونيalpha helix

- التركيب البنائي الثلاثي Tertiary structure: ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية البعيدة عن بعضها مكونة الشكل الثلاثي الأبعاد.
- التركيب الرباعي Quaternary structure. وفيه ترتبط وحدات مختلفة أو متشابهة من السلاسل الببتيدية (subunits) مع بعضها البعض لتكون الشكل الرباعي الأبعاد للبروتين. مثال جزئ الهيموجلوبين المتكون من أربعة وحدات مرتبطة معاً.



خواص البروتينات

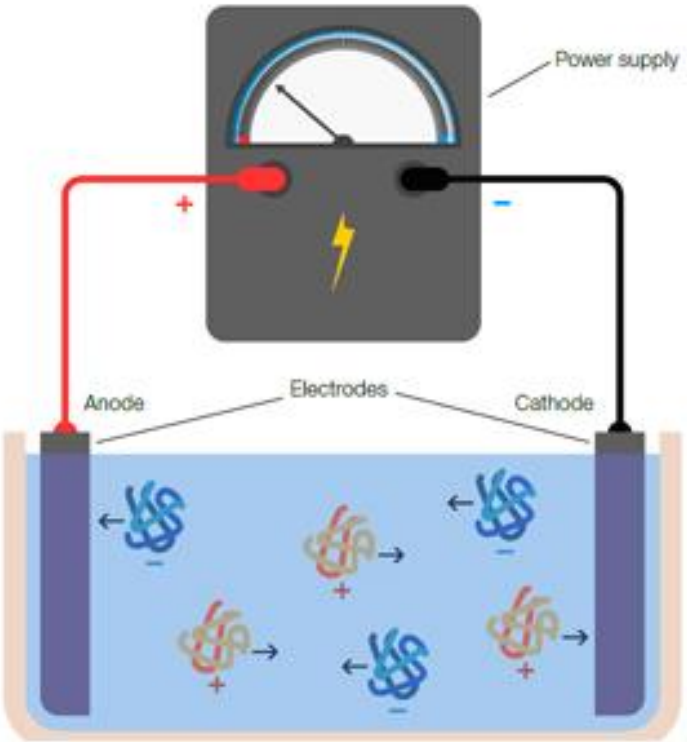
والبروتينات في هذا التركيب تصبح قادرة على أداء وظائف بيولوجية. وتشبه البروتينات في خصائصها الفيزيائية والكيميائية تلك الخصائص التي تتميز بها الأحماض الأمينية المكونة لها، لذا فللبروتينات **خاصية أمفوتيرية** في تفاعلها مع الأحماض فتحمل شحنة موجبة بينما مع القواعد نجد أنها تكتسب شحنة سالبة، ولذا فإن حركتها في المجال الكهربي تعتمد على قيمة الأس الهيدروجيني للوسط.

تبتدأ السلسلة الببتيدية المكونة للبروتينات بالطرف الأميني الحر البروتينات وتنتهي بالطرف الكربوكسيلي.

نقطة التعادل الكهربي للبروتين :

Isoelectric point PI

- هي الأس الهيدروجيني pH التي يكون عندها محصلة الشحنات على الجزئ تساوي صفر. نتيجة لتساوي الشحنات الموجبة والسالبة على جزئ البروتين وعند هذه النقطة يصبح البروتين أقل كثافة وأقل ذوبانية فيسهل ترسيبه، وتختلف نقطة التعادل الكهربي من بروتين إلى آخر حسب
- الأحماض الأمينية المكونة له.



I)الاختبارات الوصفية للبروتينات
(Qualitative tests of proteins)

١- ذوبان البروتينات
(solubility of proteins)

٢-إختبار البيوريت
(Biuret test)

٢-أثر الأملاح على ذوبانية البروتين
(effect of Salt on of proteins solubility)

٤-الترسيب بالأحماض القوية
(precipitation of proteins with strong acids)

II)التقدير الكمي للبروتينات
Quantitative Proteins Estimation

١- ذوبان البروتينات
(solubility of proteins)

البروتينات الليفية مثل الكيراتينات غير قابلة للذوبان بينما البروتينات الكروية تمثل القسم الأعظم و قابلة للذوبان في المذيبات القطبية و الأحماض و القلويات بدرجات مختلفة.

تكون البروتينات مع الماء محاليل غروية نظراً لكبر حجم جزيئات البروتين، بينما في الوسط الحمضي فغالباً ما تكتسب الجزيئات الشحنة الموجبة فتتنافر، أما في الوسط القاعدي فتكتسب جزيئات البروتين الشحنة السالبة فتصبح أيضاً قابلة للذوبان

الهدف من الاختبار: إختبار السلوك الأمفوتيري و الخاصية القطبية لجزيئات البروتين.

المواد و الأدوات:

محاليل بروتينات:

البيومين (2%albumin) ، و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).

محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1% NaOH).

أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

- اختبري ذوبان الالبيومين في كل من الماء البارد و الماء الحار و محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1% NaOH).
- سجلي قابلية ذوبان في جدول النتائج .
- دوني ملاحظاتك وناقش ما لاحظته

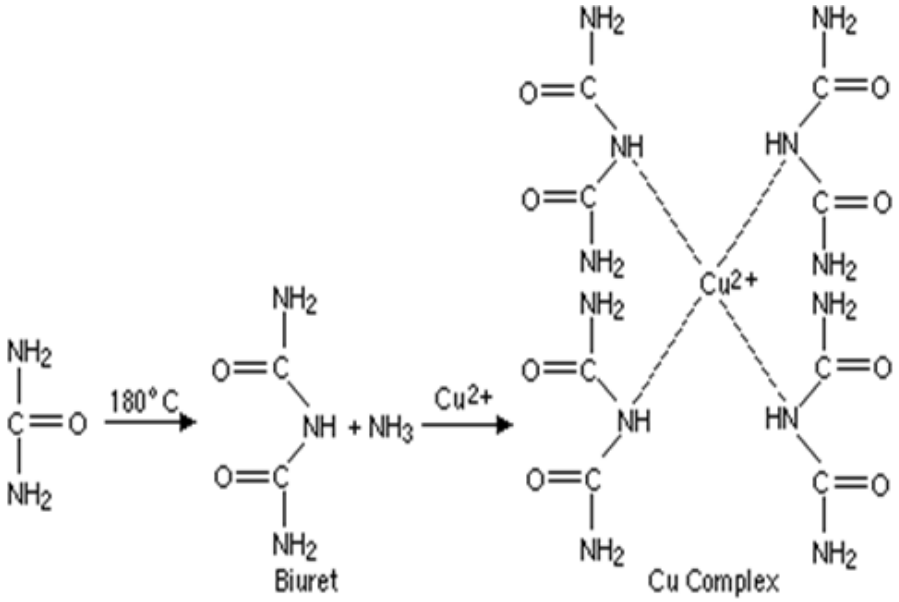
البروتين	نوع البروتين	قابلية الذوبان في الماء البارد	قابلية الذوبان في الماء الحار	قابلية الذوبان في1%NaOH
البيومين	بسيط			
كازين	مرتبط			
جيلاتين	مشتق			

٢-إختبار البيوريت
(Biuret test)

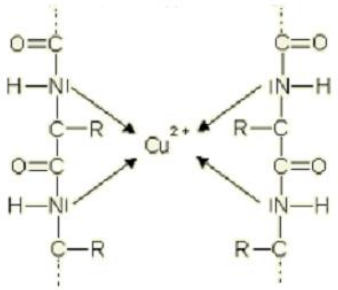
- إختبار عام على البروتينات الذائبة و الصلبة. يهدف هذا الاختبار التعرف على البروتينات وتمييزها عن بقية المواد كالكربوهيدرات و الليبيدات.

النظرية العلمية للاختبار:

- يتفاعل البروتين مع محلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فيعطي نتيجة إيجابية فقط عند وجود رابطتين ببتيديتين فأكثر في جزئ االبروتين. فيتفاعل أيون النحاسيك مع مجموعتي (-CO , -NH) في الرابطة البيبتيدية مكوناً متراكباً



بنفسجي اللون و قد تم تسمية هذا المركب بإسم مركب بيوريت لأن البيوريت هو المركب غير البروتيني الوحيد الذي يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار.



المواد و الأدوات:

- البيومين (albumin)
- كبريتات النحاس ($CuSO_4$).
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

- ضعي في كل أنبوبة ١مل من محلول البروتين.
- أضيفي ٢مل من هيدروكسيد الصوديوم و رجي جيداً.
- أضيفي ٠,٥ مل من كبريتات النحاس و رجي جيداً.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
البيومين		
كازين		

٢-أثر الأملاح على ذوبانية البروتين
(effect of Salt on of proteins solubility)

يتم ترسيب البروتينات بإستخدام المحاليل المركزة للأملاح و يتميز كل بروتين بتركيز معين للملح يترسب عنده فيتم فصله عن البروتينات الأخرى في المحلول و تسمى هذه العملية بـ salting out

الهدف من الاختبار: بيان أن التراكيز القليلة من الملح قد تساعد على ذوبان البروتينات بينما التراكيز العالية تسبب ترسيب البروتين.

النظرية العلمية للاختبار:

التراكيز **المنخفضة** من الملح تساعد على **إستقرار** جزيئات البروتين و إذابته **نتيجة للتجاذب بين أيونات الملح و المجموعات الفعالة في البروتين.** بينما في التراكيز **العالية** فإن أيونات الملح **تنافس** جزيئات البروتين على الإرتباط بجزيئات الماء فيقل إستقرار البروتين مما يؤدي الى ترسيبه. وبالرغم من ترسيب البروتينات إلا أنها تحافظ على خصائصها ونشاطها بعد إذابتها وبالتالي فإن هذه الطريقة تستخدم لتنقية البروتينات من محاليلها.

المواد و الأدوات المطلوبة:

البيومين (albumin)

محلول كلوريد الصوديوم (NaCl).

ماء مقطر.

محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم أو ملح كبريتات أمونيوم (صلب).

طريقة العمل:

أضيفي محلول كلوريد الصوديوم على عينة البروتين

أضيفي على انبوبة اخرى محلول مشبع أو الملح الصلب لكبريتات الأمونيوم بكميات مختلفة.

دوني النتائج في الجدول.

البروتين	البيومين+٣٠٠ مل ماء	يفصل بالطرد المركزي	إضافة محلول كبريتات أمونيوم مشبع	إضافة كبريتات الصوديوم
ألبيومين				
جلوبيولين				

٣- ترسيب البروتينات بأملاح المعادن الثقيلة
(precipitation of proteins by salts of heavy metals)

تستخدم هذه الطريقة لفصل البروتينات و التخلص منها دون الاهتمام بنشاطها الحيوي .

الهدف من الاختبار:

التعرف على تأثير أملاح الفضة و الزئبق على طبيعة تركيب البروتينات و نشاطها الحيوي.

التطبيقات:

إيضاح خطورة التسمم بالرصاص، وإيضاح إمكانية إستخدام البروتينات (الألبيومين) كعلاج في حالات التسمم بالزئبق و الرصاص.

المواد و الأدوات المطلوبة:

محاليل بروتينات:

البيومين (2%albumin).

نترات الفضة ($AgNO_3$ Silver nitrate).

كلوريد الزئبق ($HgCl_2$ mercury chloride).

أنابيب إختبار نظيفة.

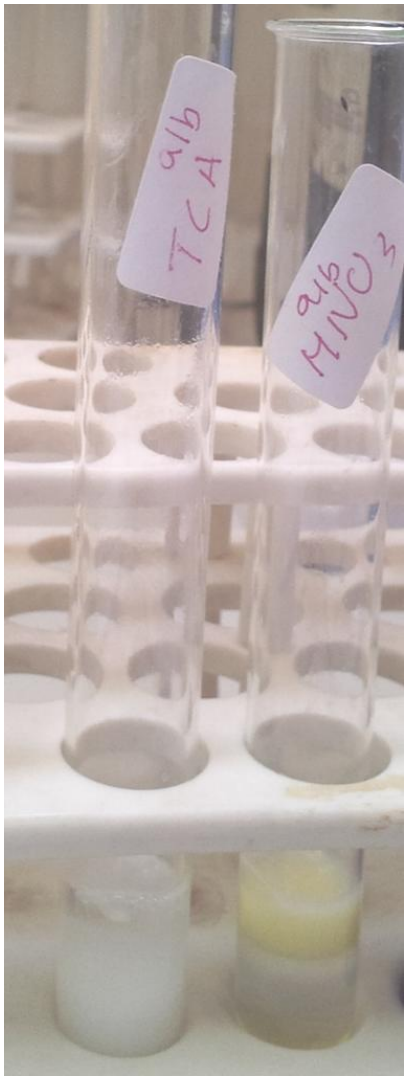
طريقة العمل :

- ضع في كل أنبوب ١مل من محلول الالبيومين.
- أضف ٠,٥ مل من نترات الفضة.
- كرر الخطوات السابقة مع إستبدال نترات الفضة بكلوريد الزئبق و نقارن

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
البيومين+$AgNO_3$		
البيومين+$HgCl_2$		

٣-الترسيب بالأحماض القوية
(precipitation of proteins with strong acids)



الهدف من التجربة:

الكشف عن البروتين في البول بواسطة حمض النيتريك المركز.

فصل البروتين في محلول ما.

لإيقاف النشاط الإنزيمي.

النظرية العلمية للاختبار:

تواجد البروتينات في وسط حمضي يكسبها شحنة موجبة فتجذب جزيئات البروتين إلى أيونات الحمض (NO_3) و تعمل على ترسيبها.

المواد و الأدوات المستخدمة:

البيومين

حمض نيتريك مركز.

ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA).

طريقة العمل:

في الأنبوبة الأولى ضعيي ٢ مل من حمض النيتريك المركز في أنبوب اختبار مع المحافظة على وضع الأنبوبة بشكل مائل

أضيفي محلول الألبيومين قطرة قطرة على جدار الأنبوبة ولاحظ تكون الراسب.

أضيفي زيادة من الحمض ولاحظ التغيرات في الراسب.

في الأنبوبة الثانية أضيفي ٢ مل من محلول البيومين مع المحافظة على وضع الأنبوبة بشكل مائل،

أضيفي ثلاثي كلوريد حمض الخليك قطرة قطرة على جدار الأنبوبة ولاحظ تكون الراسب.

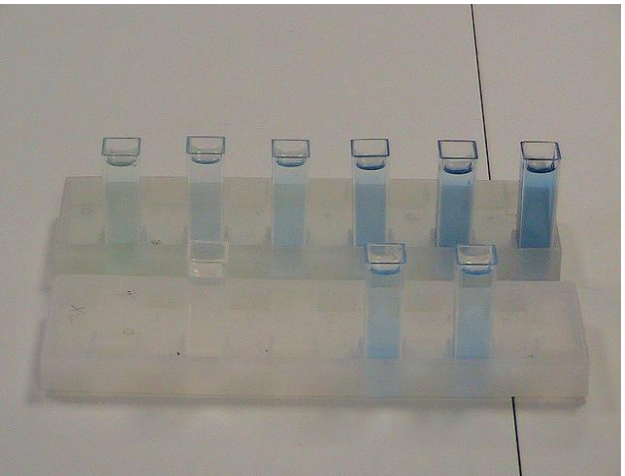
أضيفي زيادة من الحمض و لاحظ تغيرات الراسب.

	النتيجة	الإستنتاج
الالبيومين+حمض النيتريك		
الالبيومين +ثلاثي كلوريد حمض الخليك		

التقدير الكمي للبروتينات

Quantitative Proteins Estimation

- تقدير البروتينات كمياً يساعد على معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة كما أن له دلالات تشخيصية عند إرتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي، وله أهمية في معرفة المحتوى البروتيني للعينات الحيوية و 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 العطرية (تربتوفان – فينيل ألانين - تيروسين).**
- هناك أجهزة لقياس امتصاص الطيف الضوئي تسمى (spectrophotometer) يمكن من خلالها تقدير البروتينات عند طول موجي معين.



طريقة لاوري لتقدير تركيز البروتين
Protein estimation by Lowry method

تقدير البروتينات بطريقة لاوري هي من الطرق الشائعة و ذلك لسهولتها و سرعة إجرائها و كذلك لحساسيتها العالية فهي تستخدم في تقدير البروتينات المخففة عندما يكون تركيزها منخفض.

و تعتبر طريقة لاوري تطوير و مشتقة من طريقة بيوريت للكشف عن البروتبنات.

النظرية العلمية للاختبار:

عند معاملة **البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي** فإن أيون النحاسيك يكون معقد مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد بيوريت، وهذا المعقد يختزل محلول فولن (الذي يتكون من أملاح معقدة من تنجستنات فوسفومليبيدات) ليعطي لون أزرق يمكن قياس الإمتصاص الضوئي له عند طول موجي 750nm.

يجب إعداد 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.

المواد و الأدوات المطلوبة:

محاليل البيومين معلومة التراكيز، تحضر بتراكيز (50, 100, 150, 200, 25ug/ml)

محلول بروتين مجهول التركيز

<u>محلول (a)</u>

يحتوي على كربونات الصوديوم ($2\%Na_2Co_3$)، وهيدروكسيد الصوديوم (0.1 M NaOH).

<u>محلول (b)</u>

يحتوي على كبريتات النحاسيك ($0.5\%CuSO_4$) و طرطرات الصوديوم و البوتاسيوم (1% sodium potassium tartarate).

<u>محلول (c)</u>

محلول كبريتات النحاس القاعدية، وينتج عن خلط ٥٠مل من محلول (a) من ١مل من محلول (b) ويجب أم يتم الخلط بين المحلولين قبل إجراء التجربة مباشرة.

<u>محلول فولن</u>، يجب تخفيف المحلول التجاري بالماء المقطر بنسبة ١:١ قبل الإستعمال.

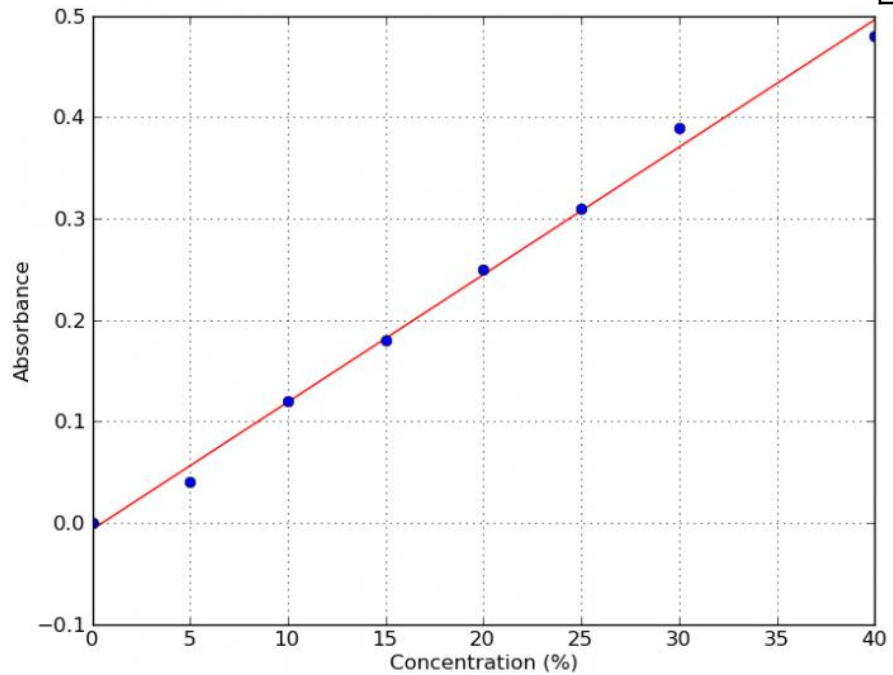
- جهاز سبكتروفوتوميتر و يضبط على طول موجي **750 nm** .
- ماصات أتوماتيكية
- أنابيب إختبار نظيفة عدد ٨ أنابيب.

المحلول	رقم الأنبوبة							
	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨
ماء مقطر	١ مل							
البروتين القياسي 50 ug/ml		١ مل						
البروتين القياسي 100 ug/ml			١ مل					
البروتين القياسي 150 ug/ml				١ مل				
البروتين القياسي 200 ug/ml					١ مل			
البروتين القياسي 250 ug/ml						١ مل		
العينة المجهولة A							١ مل	
العينة المجهولةB								١ مل
محلول C	٥مل							
رجي الأنابيب لمزج محتوياتها فور الاضافة لكل انبوبة								
كاشف فولن	٠,٥ مل							
رجي الأنابيب لمزج محتوياتها و ننتظر ٣٥دقيقة/ ثم قيسي الإمتصاص الضوئي عند طول موجي 750 nm								

النتائج :

الأنبوبة	تركيز البروتين ug/ml	الإمتصاص الضوئي عند 750nm
١	٠	
٢	٥٠	
٣	١٠٠	
٤	١٥٠	
٥	٢٠٠	
٦	٢٥٠	
A	بروتين مجهول A	
B	بروتين مجهول B	

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



ملاحظة: إذا لم يرد عمل منحنى قياسي نكتفي بتحضير محلول بروتيني قياسي واحد فقط ثم نستخدم المعادلة الحسابية التالية لحساب تركيز محلول بروتيني مجهول:

تركيزمحلول البروتين المجهول =

مقدار الإمتصاص الضوئي لمحلول البروتين المجهول التركيز X تركيز محلول البروتين القياسي

مقدار الإمتصاص الضوئي لمحلول البروتين القياسي

Thank You