(4)
التقدير الكمي للبروتينات
Quantitative estimation of proteins

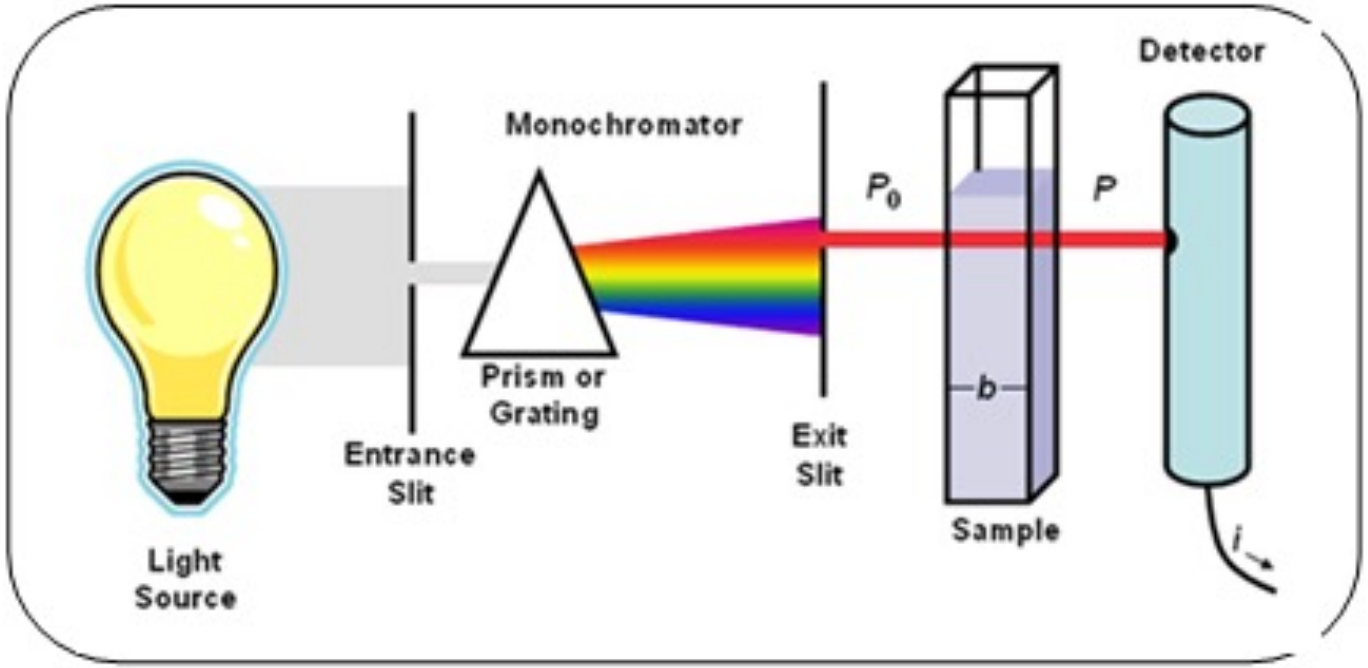
التقدير الكمي للبروتين (Quantitative estimation of proteins) :

- 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 (فينايل ألانين - تيروسين – تربتوفان).**

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

جهاز المطياف الضوئي (spectrophotometer)



الجزء العملي

طريقة بيوريت لتقدير تركيز البروتين (Biuret test) :

- اختبار عام يهدف للكشف عن وجود البروتينات في العينة ويمكن استخدامه كاختبار **كمي أو نوعي** للبروتينات.

النظرية العلمية للاختبار:

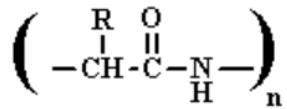
عند معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس **في وسط قاعدي** فإن أيون النحاسيك يكون معقداً بنفسجياً مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد بيوريت و يمكن قياس الإمتصاص الضوئي له عند 540 nm .

ملاحظة:

العينات ذات التراكيز الأعلى ← **اللون الأغمق (زيادة كثافة اللون)** ← تمتلك قيمة امتصاص الأعلى.

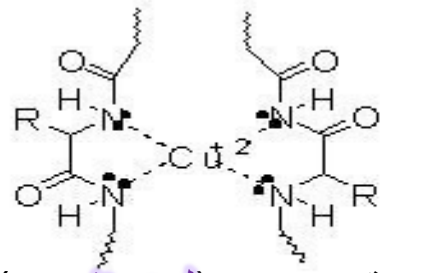
(علاقة طردية بين تركيز البروتين واللون البنفسجي وقيمة الامتصاص)

البروتين (الرابطة الببتيدية)



+ Cu^{2+}

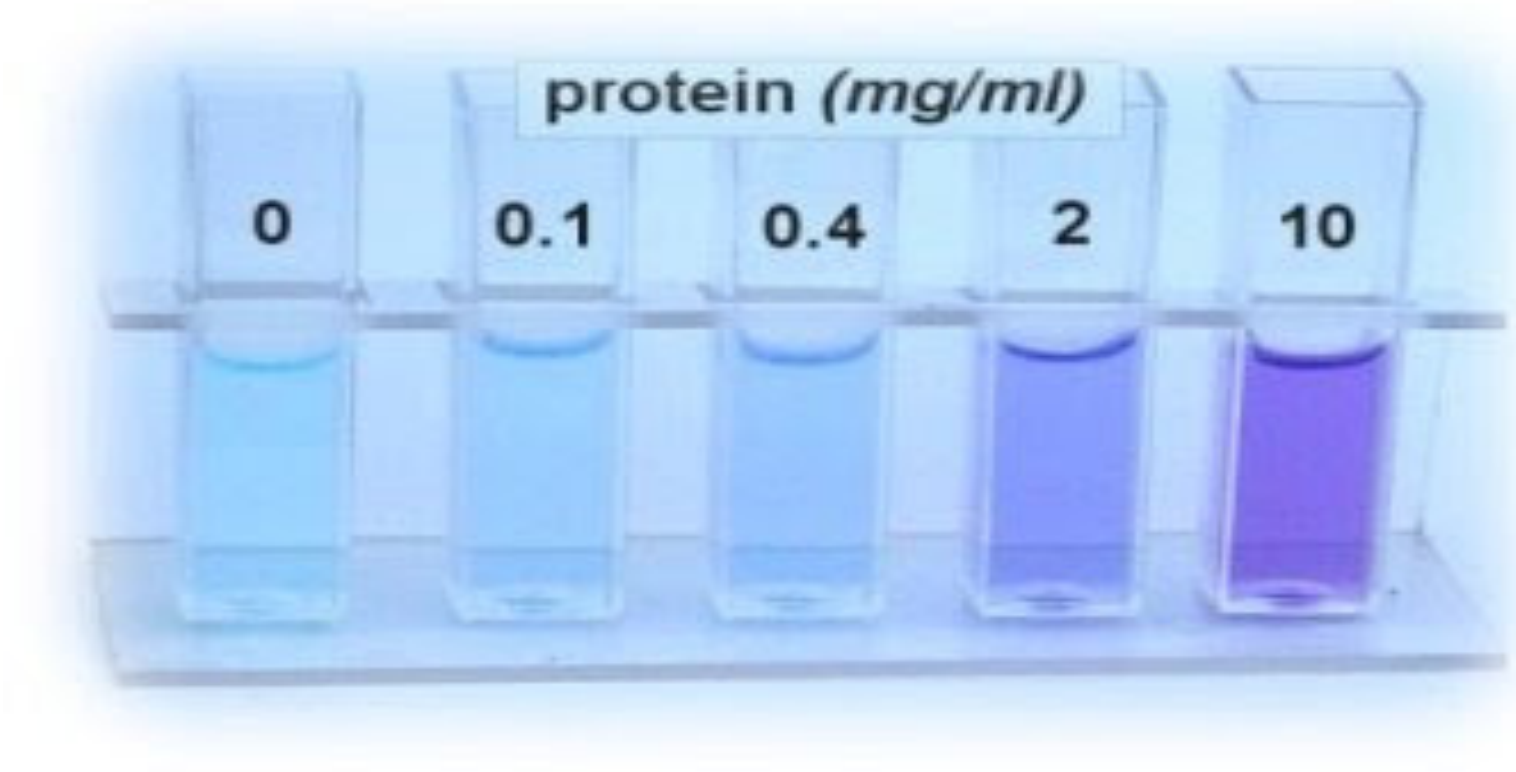
في وسط قاعدي



معقد بيوريت (لون بنفسجي)

لون بنفسجي
540nm

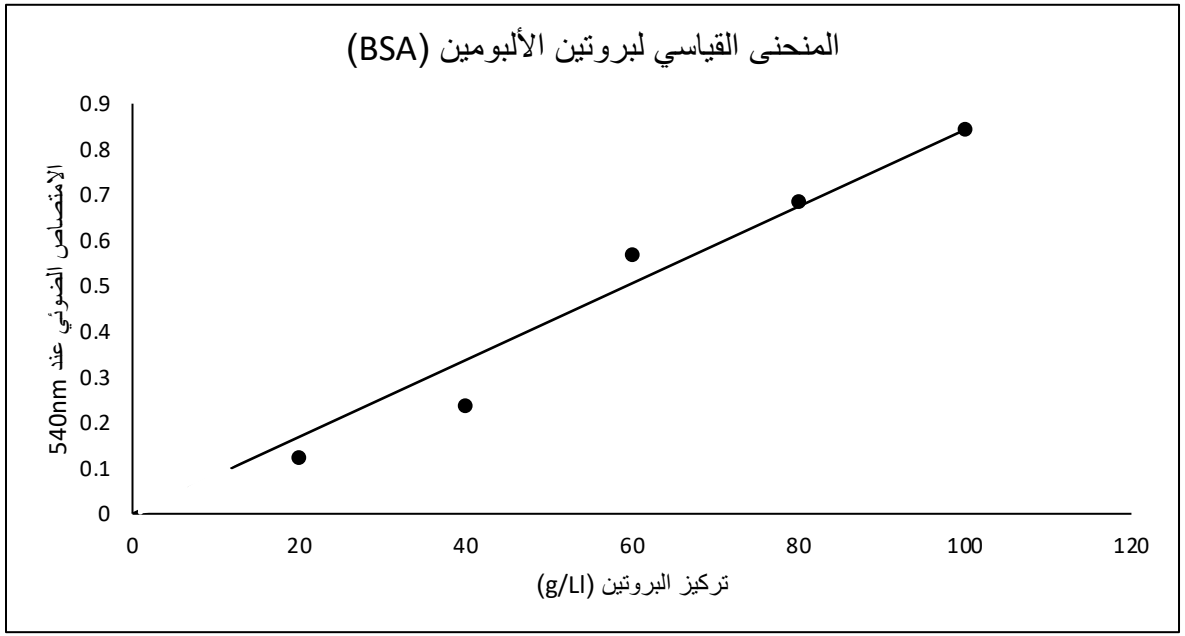
تدرج الألوان يبتدأ من اللون الأخف (التركيز الأقل) وينتهي باللون الأغمق (التركيز الأعلى)



التركيز الأقل ← التركيز الأعلى

تزداد قيمة الامتصاص

- و لتقدير البروتينات **مجهولة** التراكيز، يجب إجراء **منحنى قياسي** (standard curve) لبروتينات معلومة التراكيز (محاليل قياسية).
- **المنحنى القياسي :** هو منحنى يعكس العلاقة بين **تراكيز معلومة** لمادة (البروتين) و **الامتصاص** الضوئي لهذه التراكيز عند طول موجي معين.
- يمكن من المنحنى القياسي حساب تركيز البروتينات المجهولة بمعرفة مقدار الامتصاص الضوئي لها (عملية الاسقاط).



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

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:

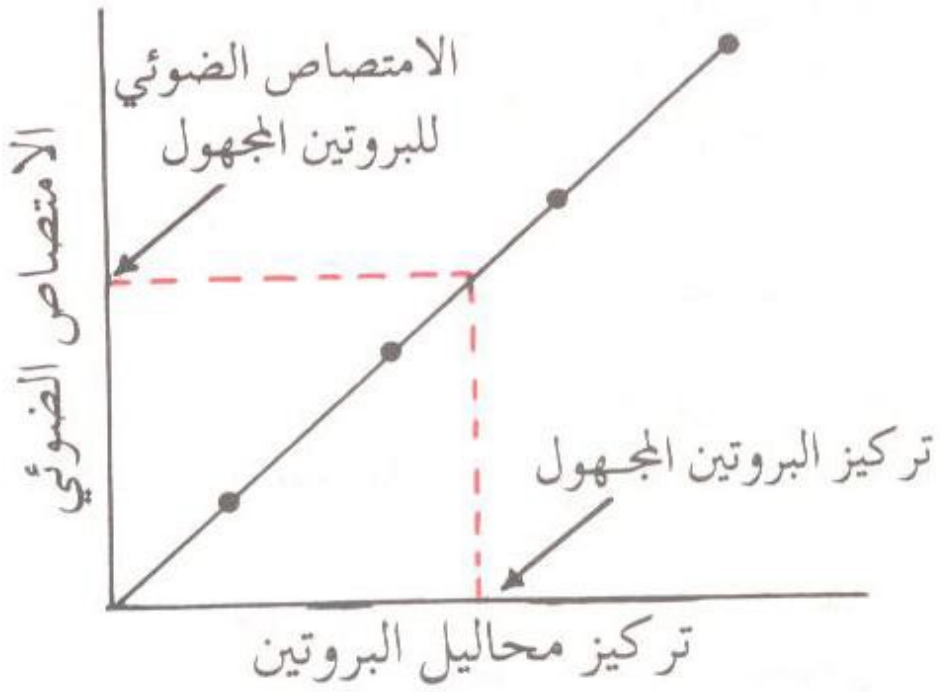
جهزي 8 أنابيب اختبار واتبعي الجدول التالي :

الأنبوبة	حجم المحلول القياسي (الألبومين) (مل) (5g/L)	ماء مقطر (مل)	حجم العينة المجهولة (مل)	كاشف بيوريت (مل)
Blank	-	2	-	3 ml
1	0.4	1.6	-	
2	0.8	1.2	-	
3	1	1	-	
4	1.2	0.8	-	
5	1.4	0.6	-	
6	1.6	0.4	-	
العينة ذات التركيز المجهول	-	-	2	

- دعي الأنابيب في الحامل لمدة عشر دقائق.
- اقرئي الامتصاص عند 540 nm .

النتائج:

- ارسمي منحنى قياسي باستخدام برنامج اكسل يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (المحور السيني) و الامتصاص الضوئي (المحور الصادي).
- أوجدي من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الامتصاص الضوئي له.



الأنبوبة	الامتصاص الضوئي عند 540nm	تركيز البروتين (g/l)
1		C1 X V1 = C2 X V2 5 x 0.4 = ? x 2 ?= 1
2		2
3		2.5
4		3
5		3.5
6		4
العينة المجهولة		؟