التقدير الكمي للبروتينات

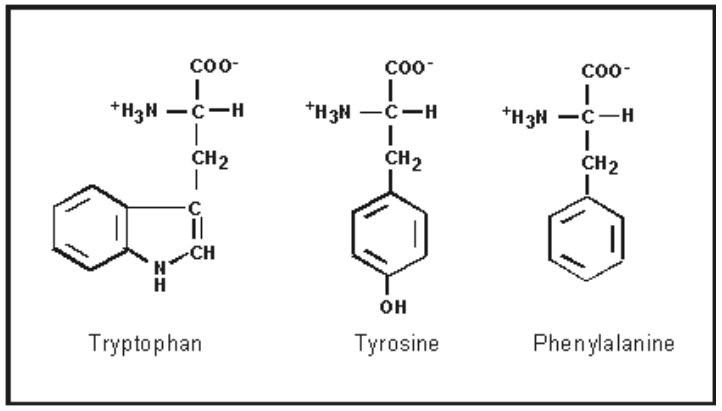
Quantitative Proteins Estimation

التقدير الكمي للبروتينات (Quantitative Proteins Estimation)

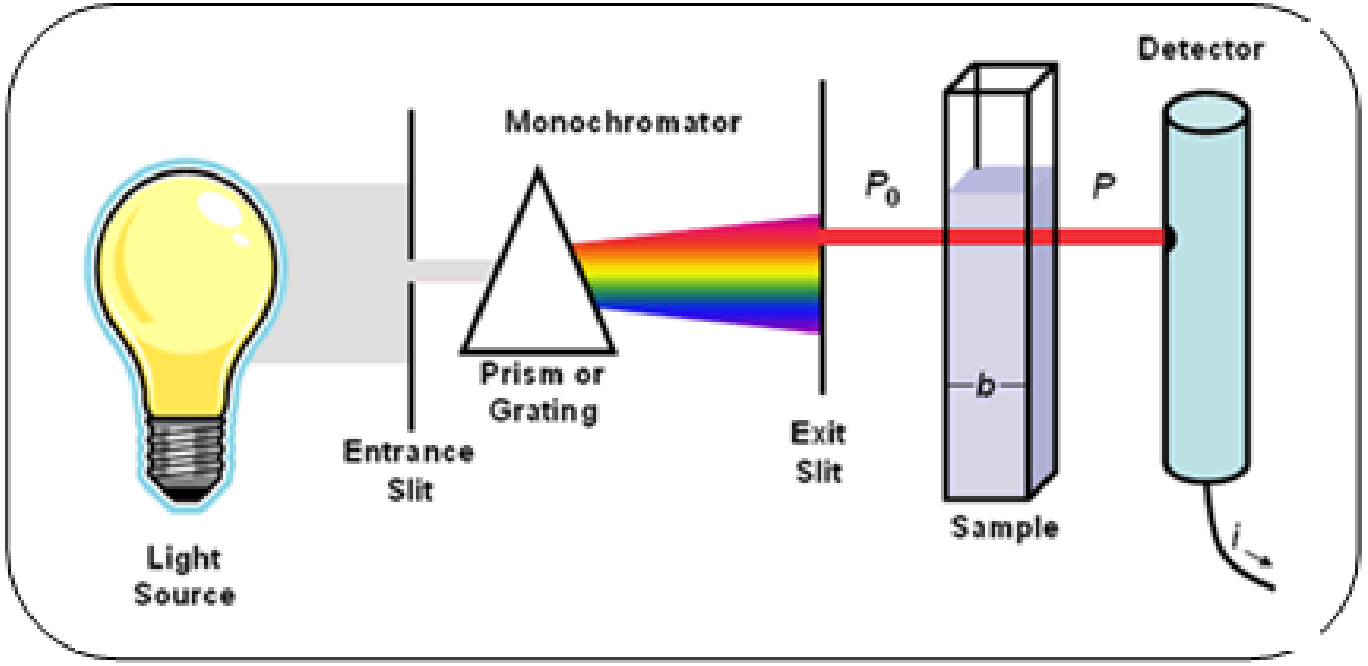
- تقدير البروتينات كمياً يساعد على معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة كما أن له دلالات تشخيصية عند إرتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي, وله أهمية في معرفة المحتوى البروتيني للعينات الحيوية و الغذائية.

- 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 الحلقية العطرية (تربتوفان – فينيل ألانين – تيروسين).

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



جهاز سبكتروفوتوميتر (spectrophotometer):

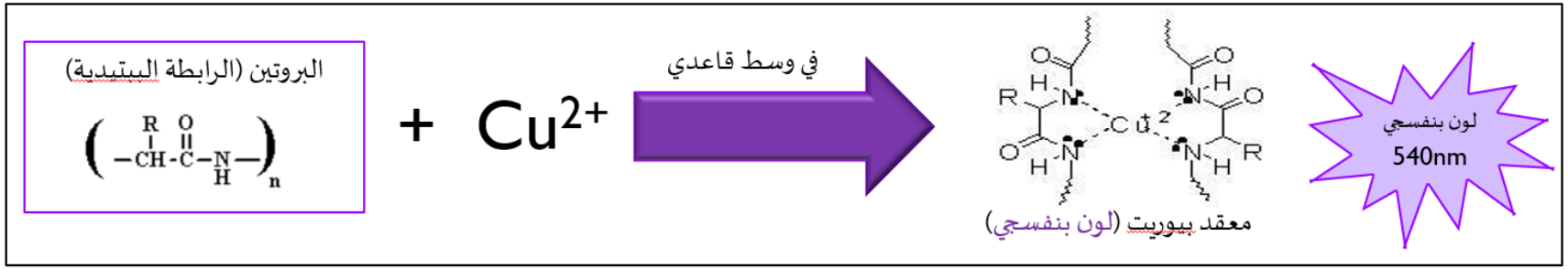


طريقة بيوريت لتقدير تركيز البروتين (Biuret Test):

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

النظرية العلمية للاختبار:

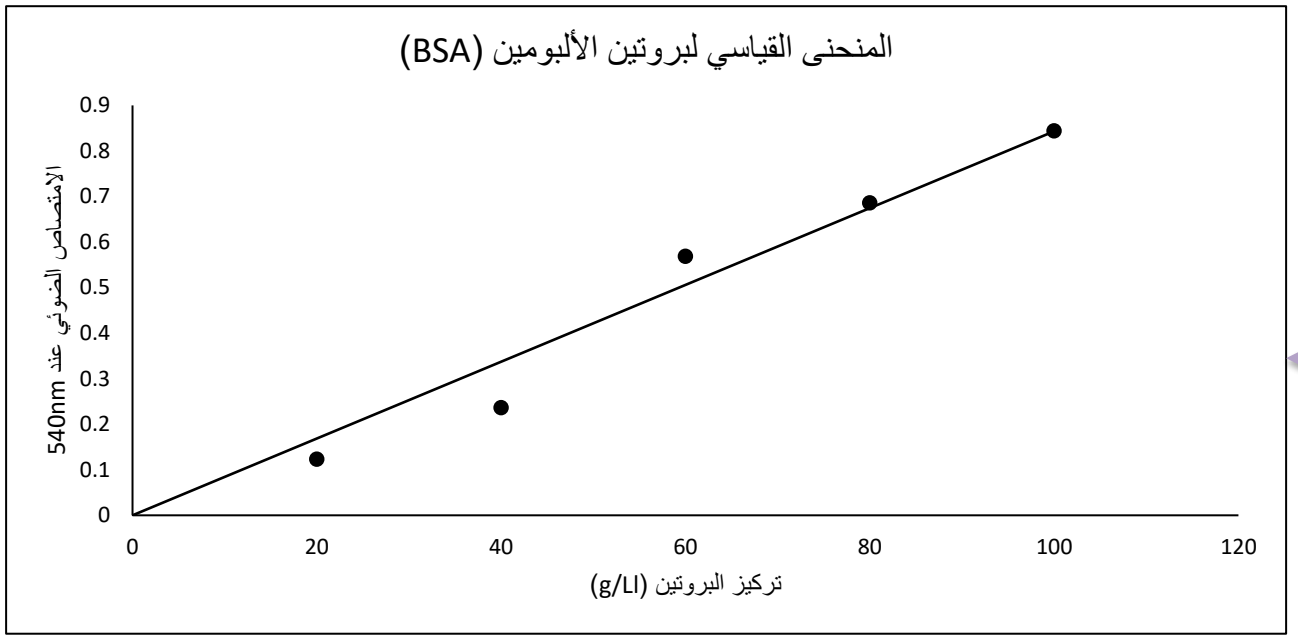
عند معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فإن أيون النحاسيك يكون معقداً بنفسجياً مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد بيوريت و يمكن قياس الامتصاص الضوئي له عند 540 nm.



ملاحظة:

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

- **المنحنى القياسي :** 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 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-

الجزء العملي

الأهداف:

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

الطريقة :

1-جهزي 8 أنابيب اختبار واتبعي 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			??

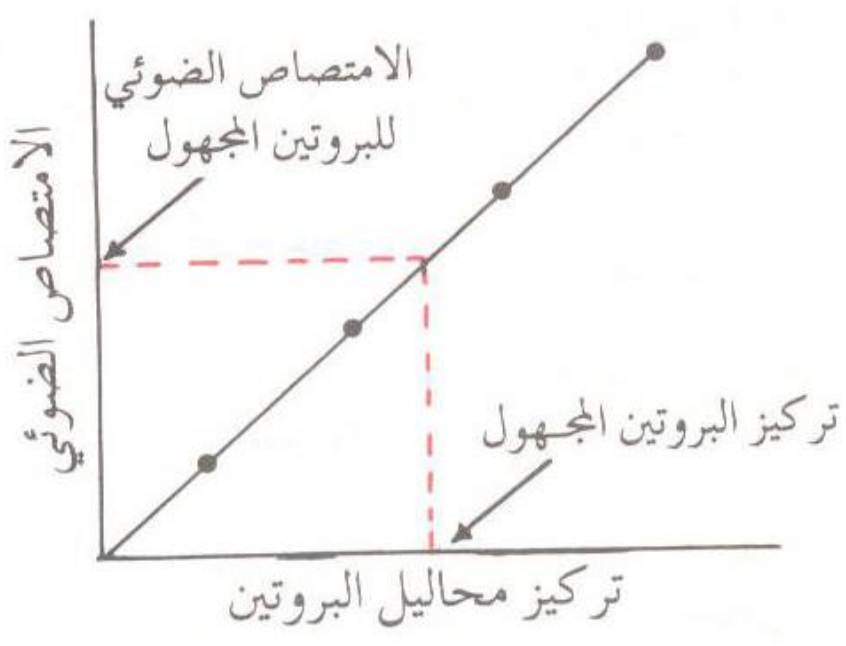
2- دعي الأنابيب في الحامل لمدة عشر دقائق عند درجة حرارة الغرفة.

3- اقرئي الامتصاص عند – 540 nm .

4- ارسمي منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (المحور السيني) و الامتصاص الضوئي (المحور الصادي) وذلك على ورقة رسم بياني.

النتـــائج :

- إستنتجي من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الإمتصاص 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		.....?

تدرج بالألوان يبتدأ من اللون الأخف (التركيز الأقل) و ينتهي باللون الغامق (التركيز الأعلى).

العينة ذات التركيز الأعلى ← تمتلك أعلى قيمة امتصاص ← و اللون الأغمق

ملاحظـة:

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

مثـــــال:

نفرض ان المحلول القياسي تركيزه ٥٠ µg/ml وامتصاصه الضوئي =١.٣٣
، والامتصاص الضوئي للعينة المجهوله = ٢.٤٠، كم تركيز العينه المجهوله؟

١.٣٣ ⟵ ٥٠ µg/ml

٢.٤٠ ⟵ العينه المجهوله كم تركيزها بـ µg/ml

$$\text{تركيز العينة المجهولة} = \frac{٥٠ \times ٢.٤٠}{١.٣٣} = ٩٠.٢٢ \mu g/ml$$