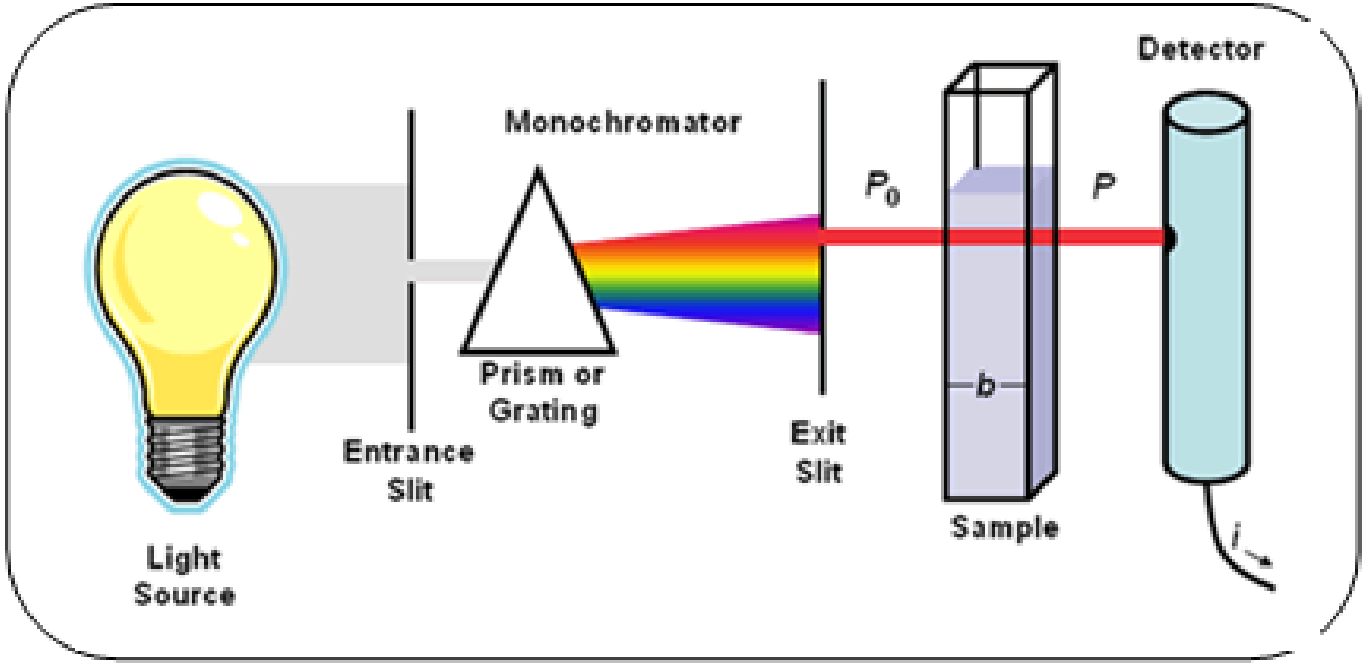
التقدير الكمي للبروتين (Quantitative Estimation of Proteins)

- 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 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 سبکتروفوتومیتر(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.

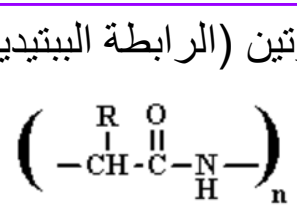
النظرية العلمية للاختبار:

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:

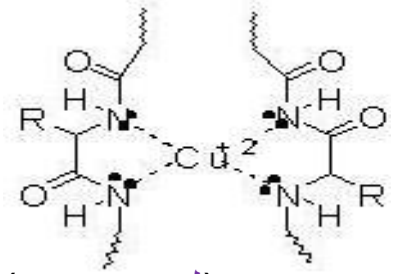
كلما زاد تركيز العينة ← **زادت كثافة اللون** ← قيمة امتصاص عالية. **(ما نوع العلاقة؟)**

البروتين (الرابطة الببتيدية)



\+ Cu^{2+}

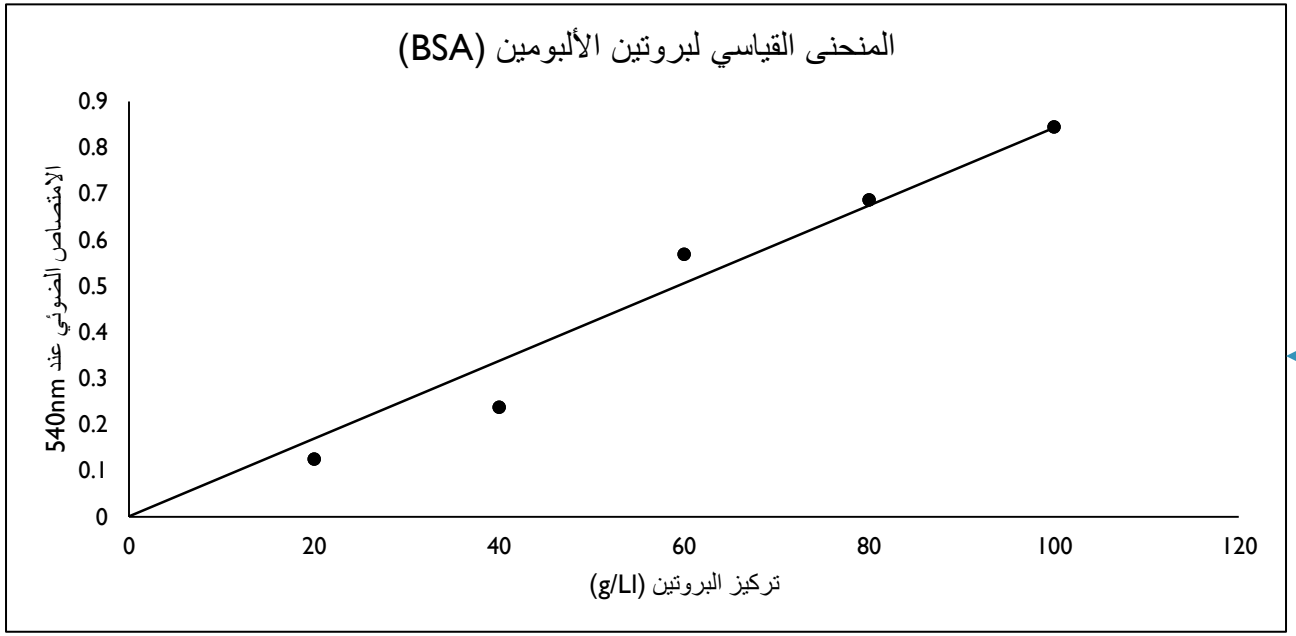
في وسط قاعدي



معقد بيوريت (لون بنفسجي)

لون بنفسجي
540nm

- **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:

١. التقدير الكمي للبروتينات باستخدام اختبار بيوريت.

٢. إيجاد تركيز عينة مجهولة باستخدام المنحنى القياسي للتراكيز (بدلالة قيمة الامتصاص).

تخفيفات لبروتين تركيزه (5g/L)

طريقة العمل:

جهزي ٨ 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 ٥٤٠ nm .

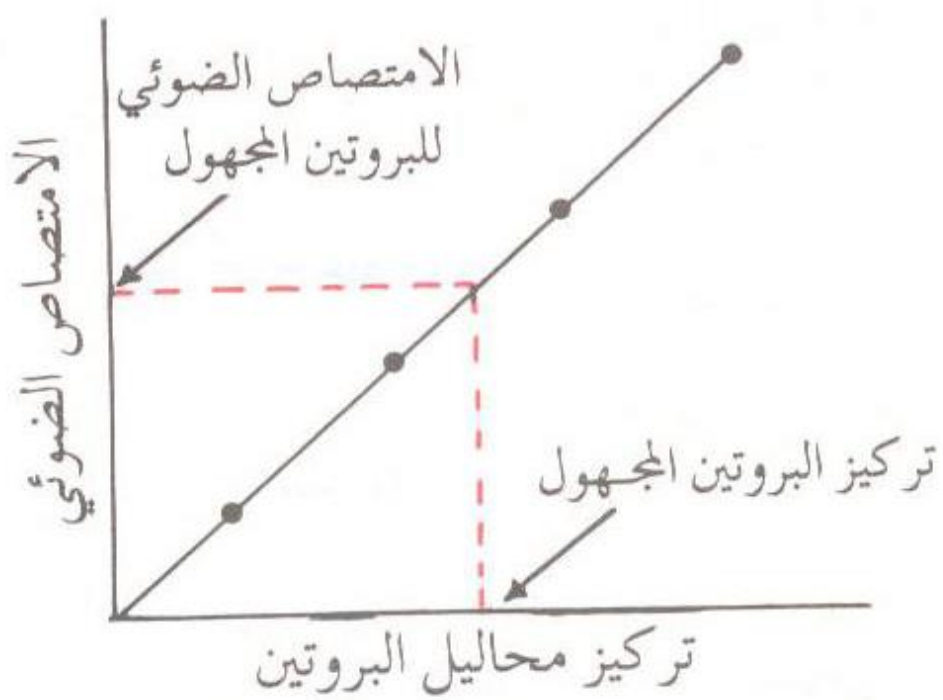
-ارسمي منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (المحور السيني) و الامتصاص الضوئي (المحور الصادي) وذلك على ورقة رسم بياني

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 ١.٥ والامتصاص الضوئي للعينة المجهولة ٠.٩ ، 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:

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

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

تم بحمد الله ....