آزمایشگاه آموزشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

بیوشیمی

مقدمات. قند.

روز اول
۹۸/۴/۲۵

اهداف آزمایش:

۱. آشنایی با کلیات آزمایشگاه بیوشیمی از جمله اصول کروماتوگرافی، اسپکتروسکوپی و آنزیم‌شناسی

۲. آموزش انجام تست‌های کیفی قندها

۳. کار با میکروپیپت

۴. آموزش اندازه‌گیری غلظت گلوکز با روش آنزیمی

زمان آزمایش: ۱۲۰ دقیقه

طراح آزمایش: الهام پرند

این فایل به منظور آموزش عملی دانش‌پژوهان المپیاد زیست‌شناسی ایران گردآوری شده است.

کروماتوگرافی | اسپکتروسکوپی | آنزیم‌شناسی | تشخیص نقص آنزیمی در مسیر پنتوز فسفات | اندازه‌گیری گلوکز ادرار

هـدف اولیه در تحقیقات بیوشیمی درک طبیعت مـولکول هـای طبیعی اسـت. جـزئیات مـولکولی فـرایندهـای بیولوژیک در صورتی به درستی درک میشوند مولکول های در حال واکنش جداسازی و شناسایی گردند.پس با پیشرفت تکنیک های جداسازی و شناسایی ماکرومولکولها درک مکانیسم های زیستی نیز افزایش مییابد. روش هایی های آزمایشگاهی شامل بخش های جداسازی همچون الکتروفورز و کروماتوگرافی، دیالیز و سانتریفیوز و روش های شناسایی کمی و کیفی است که می توانند به روش های اسپکترومتری وابسته باشد. در اینجا چند تکنیکی که ممکن است با آن روبرو شوید به طور خلاصه توضیح داده شده است.

کروماتوگرافی

یکی از مهمترین تکنیک های جداسازی و تخلیص بیومولکول هااست. میخائیل تسویت در سال ۱۹۰۲ طی جدا جداسازی و شناسایی رنگدانه های کلروپلاست موفق به ساخت اولین ستون کروماتوگرافی جهت جدا سازی شد. در حال حاضر پس از صد سال کروماتوگرافی به عنوان یک روش جداسازی و تخلیص انواع مولکول ها در فرم های مختلف گسترش یافته در عین حال به صورت گسترده به عنوان یک ابزار آنالیتیکی برای اندازگیری ویژگی های بیوفیزیکی و مقداری مولکول ها استفاده می شود.

روشهاي كروماتوگرافی را می‌توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه‌بندي كرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد. بدین ترتیب فرآیند کروماتوگرافی به چهار بخش اصلی تقسیم میشود. هر یک از این بخشها نیز انواع مختلفی دارد:

۱. **کروماتوگرافی مایع ـ جامد**
   - کروماتوگرافی جذب سطحی
   - کروماتوگرافی لایه ي نازک
   - کروماتوگرافی تبادل یونی
   - کروماتوگرافی ژلی
۲. **کروماتوگرافی گاز ـ جامد**
۳. **کروماتوگرافی مایع ـ مایع**
   - کروماتوگرافی تقسیمی
   - کروماتوگرافی کاغذي
۴. **کروماتوگرافی گاز ـ مایع**
   - کروماتوگرافی گاز ـ مایع
   - کروماتوگرافی ستون موئین

کروماتوگرافی گروه گوناگون و مهمی از روشهاي جداسازي را شامل میشود. روشهاي کروماتوگرافی می‌توانند جداسازي‌هایی را که به روشهاي دیگر خیلی مشکل هستند را به انجام برسانند. زیرا اختلاف جزئی موجود در رفتار جزئی اجسام، در جریان عبور آنها از یک سیستمِ کروماتوگرافی چند برابر می‌شود.

هر چه این اختلاف بیشتر شود، قدرت جداسازي بیشتر و براي انجام جداسازي نیاز کمتري به وجود اختلافات دیگر خواهد بود.

- یکی از مزایاي برجستهي روشهاي کروماتوگرافی این است که آنها آرام هستند. به این معنی که احتمال تجزیه‌ي مواد جدا شونده به وسیله‌ي این روشها در مقایسه با سایر روشها کمتر است.
- مزیت دیگر روشهاي کروماتوگرافی این است که تنها مقدار بسیار کمی از مخلوط براي تجزیه لازم است. به این علت، روشهاي تجزیهاي مربوط به جداسازي کروماتوگرافی میتوانند در مقیاس میکرو و نیمه میکرو انجام گیرند.
- روشهاي کروماتوگرافی ساده، سریع و وسایل مورد لزوم آنها ارزان هستند.

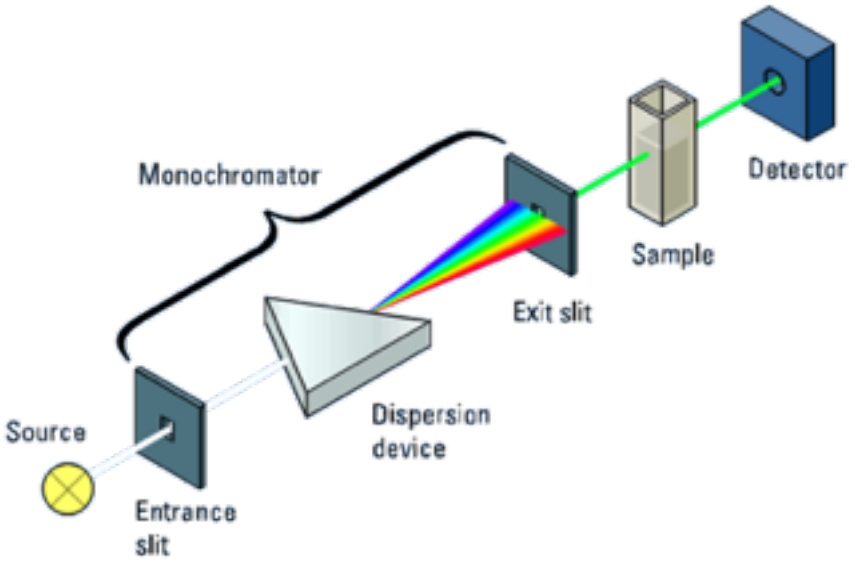
در ابتدا را کروماتوگرافی روش‌هاي ساده‌تري مانند کروماتوگرافی کاغذي و لایه نازک امتحان می‌شوند. در صورتی که با این روشها مستقیما قادر به جداسازي باشند، جداسازي باید به وسیله‌ي آنها صورت گیرد.

اسپکتروسکوپی

علم بررسی اثر متقابل نور با ماده است بدون در نظر گرفتن تغییر شیمیایی حاصل آن است. به طور کلی در طیف سنجیها سه نوع برهم کنش بین ماده و نور است:

۱. جذب (Absorption): مانند IR, visible-UV, CD
۲. نشر (Emission): مانند فلورسانس و وفسفرسانس
۳. پراکندگی (Scattering): مانند DLS

در تمام دستگاههای اسپکترومتر یک شمای کلی معین دارد.



دستگاه UV-Visible

در دستگاه UV-Visible یک لامپ تنگستن برای تامین نور در ناحیه visible (۸۰۰-۴۰۰nm) و لامپ دوتریوم تامین نور UV (۴۰۰-۱۹۰nm) وجود دارد. پس رنج دستگاه UV-Visible (۱۹۰-۸۰۰nm) را اندازگیری می‌کند.

کروموفور در UV-Visible مربوط به انتقالات π→π* است. هر ماده با پیوند π که بتواند با نور در محدوده (۸۰۰-۱۹۰) کروموفور این دستگاه می‌تواند باشد.

جنس سل می تواند کوارتز، شیشه و پلاستیک باشد که نوع آن بسیار مهم است چرا که با جذب یک سری نورها موجب خطا در آزمایش می گردد. بهترین جنس سل کوارتز می باشد چون که نور Visible و نور UV را جذب نمی کند. عامل مهم دیگر در رسیدن نور به جسم ضخامت سل می باشد که می تواند نوری که به دستگاه میرسد را تغییر بدهد. مسئله دیگری که بر جذب تاثیر میگذارد شفافیت محلول است چرا که وجود کدورت و رسوب در محلول میتواند خطا ایجاد کند.

به طور کلی به نمودارهای حاصل از اسپکتروفوتومتریها را طیف spectrum می گویند. به شرط اینکه محور افقی λ و محور عمودی هر پارامتر فیزیکی که دستگاه اندازه گرفته باشد، است.

تعیین رابطه جذب

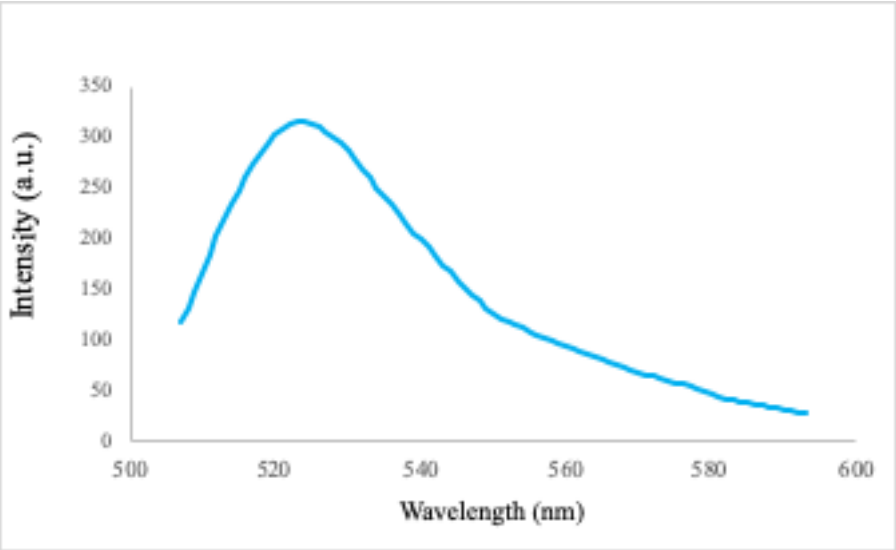
مطابق قانون لامبرت جذب یک نمونه به طور مستقیم به ضخامت (طول مسیر) متناسب است. و مطابق قانون بیر، میزان جذب با غلظت نمونه متناسب است.

از ترکیب این دو، قانون بیر-لامبرت بدست می‌آید که بیانگر ارتباط جذب با ضخامت نمونه و غلظت آن است.

$\varepsilon cl = Abs$

ضریب خاموشی. ضریب جذب مولی ε وجه مشخصه ماده است که به کمک آن می توان مواد را شناسایی کرد و یا صحت سنتز ماده را محاسبه می کنند.

اگر نمودار تغییرات جذب ماده را در طول موج مختلف رسم کنیم منحنی بدست می آید که به آن طیف (spectrum) میگویند در اسپکتروم هر ماده ای یک وجود دارد که مشخصه ذاتی ماده است.



پرسش. برای تعیین ε یک ماده چه باید کرد؟

کاربردهای اسپکترومتری UV-Visible در بیولوژی

شناسایی ماکرومولکول ها (از روی λ_{max} و ε)

تعیین غلظت دقیق مواد. در بیولوژی گاه احتیاج است که محلولی با غلظت کمتر از بسازیم. با داشتن ε ترکیب و از روی جذب می توان غلظت دقیق ماده را مشخص کرد.

مطالعه تغییرات ساختاری در پروتئین به علت تغییر شرایط محیطی. برای بررسی اثرات تغییراتی همچون PH، دما، دارو، دناتورانت می توان طیف جذبی پروتئین را به تنهایی و در حضور شرایط محیطی خاص سنجید و میزان تغییرات را بررسی کرد.

نکات مهم در کار با UV-Visible:

۱. مقدار ماده مورد نیاز برای کار با دستگاه (mM-µM) است پس بسیار مقرون به صرفه است.
۲. رنج غلظت محاسبه شده باید بین ۰.۲-۱ باشد پس اگر جاب کمتر از ۰.۲ باشد احتمال خطا و اثرات محیطی زیاد می شود.
۳. محدوده طول موج انتخابی باید بین (۸۰۰-۱۸۰) باشد
۴. هر گاه داخل کووت مخلوط چندماده داشته باشیم جذب خوانده شده مجموع جذب چند ماده است:

$$Abs = \varepsilon cl + \varepsilon cl + \varepsilon cl + \ldots$$

پرسش. در مخلوطی از پروتئین های کاتالاز و DNA جذب مخلوط در ۲۶۰nm مقدار ۰.۲ و در ۲۸۰nm مقدار ۰.۴ خوانده شده است با فرض داشتن جدول مقابل مطلوب است غلظت کاتالاز و DNA موجود در سل.

	ε_{260}	ε_{280}
کاتالاز	۰.۱	۱۲
DNA	۱۰	۰.۵

آنزیم‌شناسی

یکی از جنبه های مهم مطالعه زیست شناسی بررسی آنزیم ها به عنوان کاتالیزورهای طبیعی است که امکان انجام بسیاری از فرایند های زیست شناسی تحت یک شرایط ملایم سلولی را فراهم میسازند و بخش مهمی از مسیرهای سیگنالینگ و متابولیک سلولی به حساب میآیند. همچنین هرگونه تغییر الگویی آنزیم ها می تواند منجر به بیماریهای زیادی گردد. لذا مطالعه آنزیم اطلاعات بسیارمهمی ما می دهد. مطالعه آنزیم ها به دلایل زیر انجام میپذیرد:

- برای تعیین میزان آنزیم موجود
- برای به دست آوردن اطلاعات در مورد ویژگی های کینتیکی آنزیم مانند V , km
- برای بررسی اثرات دما، PH، مهارکننده بر روی فعالیت آنزیم

روش‌های مطالعه آنزیمی

روش های اسپکترومتریک روش هایی با حساسیت بالا، دقت بالا و ارزان قیمت برای بررسی آنزیم ها هستند. برای این منظور سوبسترا و یا محصول باید دارای یک جذب ماکسیمم باشند تا بتوان آن ها را بررسی نمو. در غیر این صورت می توان واکنش آنزیمی را با یک واکنش دیگری که توانایی تولید محصول با جذب مشخص دارد، همراه کرد.

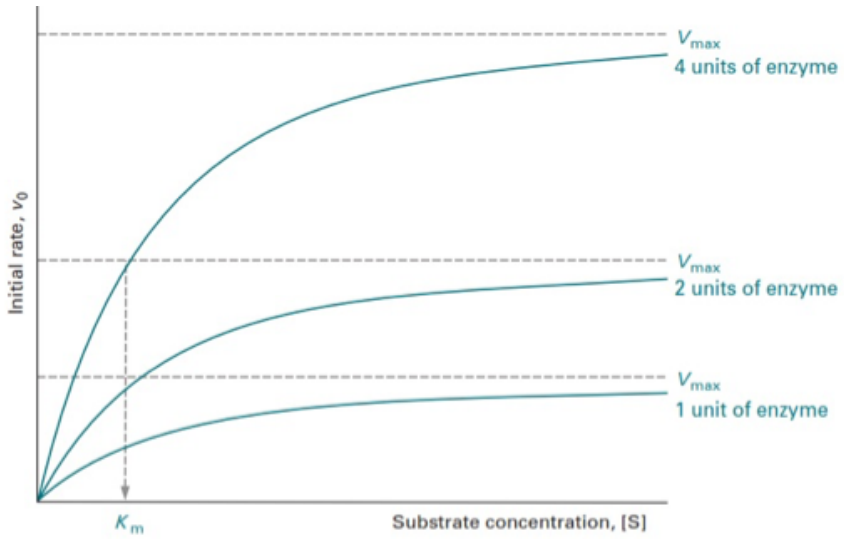
روش های بیولومینسانس یک روش مطالعه برای آنزیم های بسیار حساس است و اصولا برای بررسی واکنش هایی که ATP استفاده می کنند به صورت مکمل استفاده میشوند.

$$\text{luciferin} + \text{ATP} + O_2 \rightleftharpoons \text{oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{PP} + \text{CO2}$$

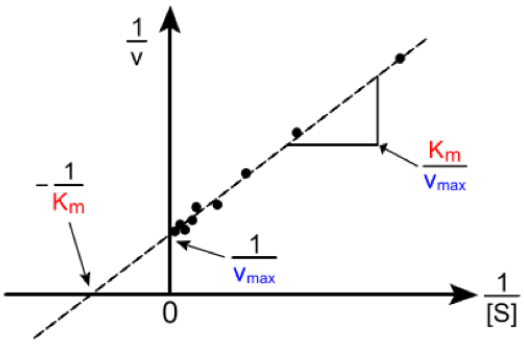
روش های ایمونو شیمی روش های دقیقی هستند که بر مبنای شناسایی آنزیم توسط آنتی بادی مونوکلونال صورت می پذیرد. که در واقع روش هایی بر مبنای روش الایزا هستند که توانایی شناسایی ایزوانزیم ها را هم از هم دارد.

کینتیک آنزیمی

اگر نمودار فعالیت آنزیم نسبت به سرعت را رسم کنیم به معادله فوق می رسیم:

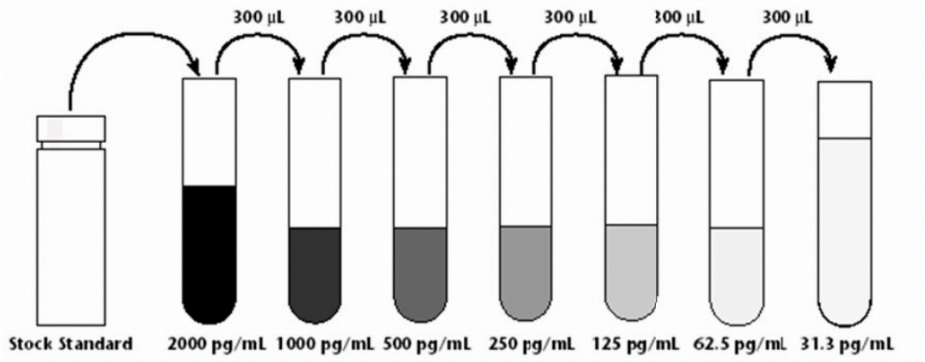


از آن جا که کار با یک نمودار سیگموئیدی کار دشواری است شکل نمودار فوق توسط لینویور-برگ به صورا مقابل نیز اراعه شده است که به صورت خطی می باشد و کار با آن بسیار آسان تر است.

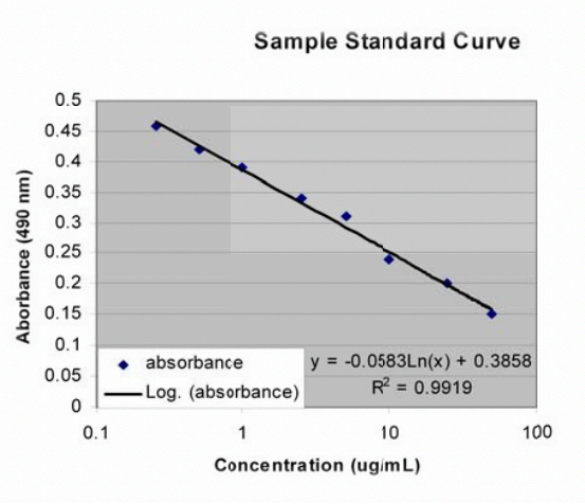


$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

در تعيين كمي غلظت، منحني استانداردي از طريق رقت سريالي غلظت مشخصي از ماده معلومي رسم ميشود. در تهيهي رقت سريالي، چاهك اول بالاترين غلظت و به ترتيب غلظت در هر چاهك كاهش مييابد.

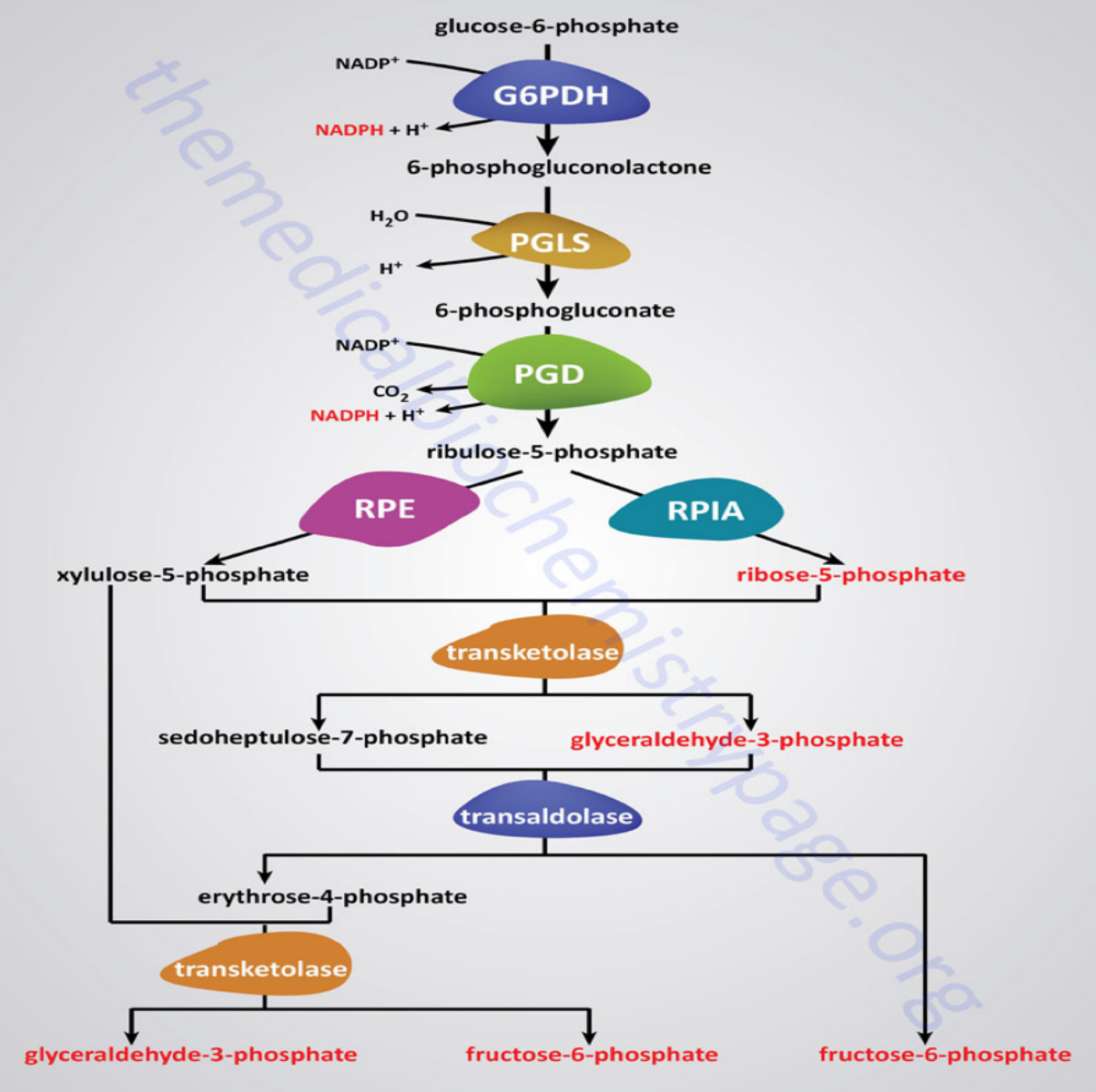


پس از انجام مراحل الايزا و خواندن جذب چاهكها نموداري بر اساس فاكتور رقت و ميزان جذب رسم ميشود، همانطور كه ملاحظه ميشود با كاهش غلظت (افزايش فاكتور رقت) جذب كاهش مييابد سپس جذب نمونه با منحني استاندارد مقايسه ميشود و ميزان غلظت، براساس ميزان جذب مشخص ميشود.



تشخیص نقص آنزیمی در مسیر پنتوزفسفات

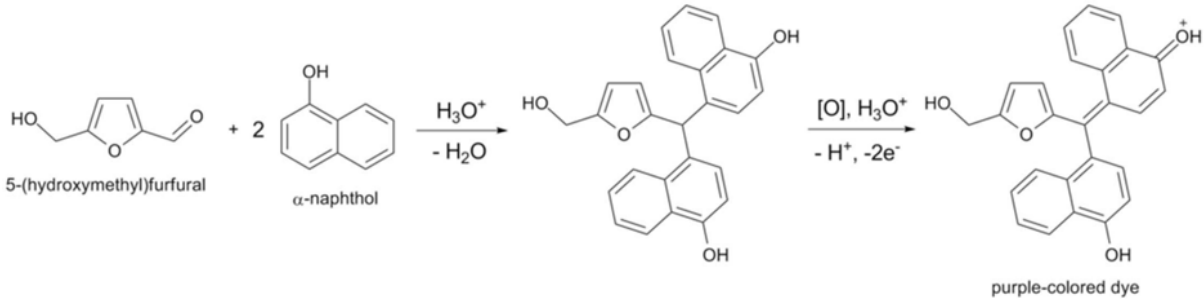
در این تست سرم ۴ فرد مختلف در اختیار شما قرار داده می شود با انجام تست های تشخیصی کیفی قندها و با توجه به نوع قند احتمالی موجود در لوله تشخیص دهید کدام آنزیم مسیر متابولیسم پنتوز فسفات مشکل داشته است.



Reactions of the Pentose Phosphate Pathway: The first three reactions of the PPP are referred to as the oxidative portion and includes the reactions that yield NADPH. The non-oxidative reactions result in the rearrangement of the carbon skeletons of numerous carbohydrates. G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase. PGLS: 6-phosphogluconolactonase. PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase. RPE: ribulose-5-phosphate 3-epimerase. RPIA: ribose-5-phosphate isomerase

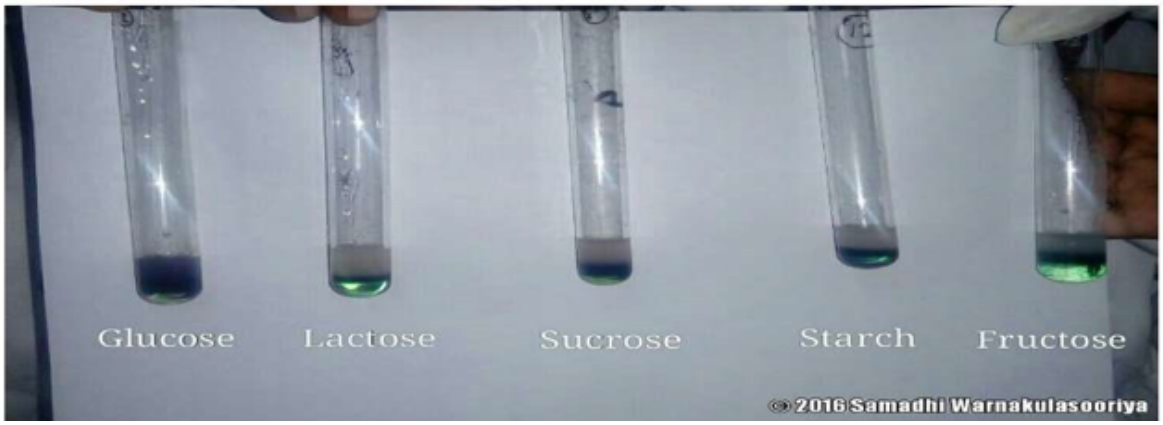
تست موليش (Molisch's Test)

تست موليش يك تست عمومي براي تمام قند ها (General test) است. كربوهيدرات ها در مجاورت با اسيد هاي قوي دهيدراته مي شوند كه سبب به وجود آمدن تركيباتي به نام فورفورال ها (furfural) و مشتقات آن ها مي شود، اين تركيبات با آلفا نفتل كمپلكس رنگي ايجاد مي كنند.



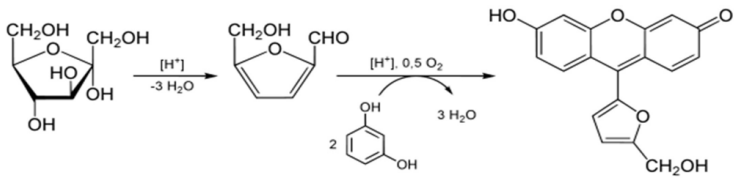
روش انجام كار:

۱. مقدار ۲ml از هر نمونه در لوله هاي آزمايش بريزيد.
۲. مقدار ۵۰۰µl تركيب موليش به هر لوله اضافه كنيد.
۳. مقدار ۲ml اسيد از كناره لوله به آرامي اضافه كنيد.



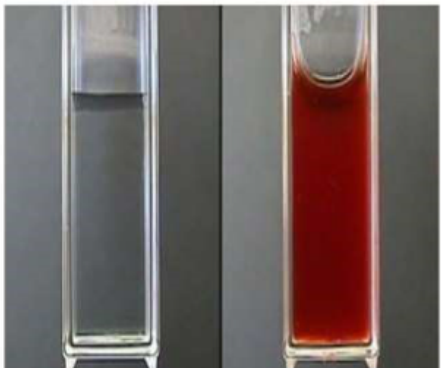
تست سيلوانف (Seliwanoff's Test)

سيلوانوف يك تست تشخيصي آلدوزها از كتوز ها است.كتوزها در مجاوت اسيدهاي رقيق سريع تر دهيدراته مي شوند با توجه به زمان توليد و رنگ و كيفيت آنها از آلدوزها قابل تمييز هستند.



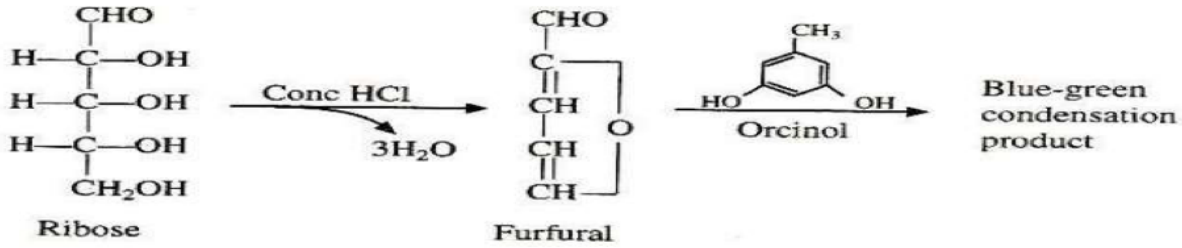
روش انجام کار:

۱. مقدار ۱ml از هر نمونه در لوله هاي آزمايش بريزيد.
۲. مقدار ۲ml ترکیب سیلوانوف به هر لوله اضافه کنید.
۳. به مدت ۱-۲ دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
۴. به رنگ قرمز توجه کنید.



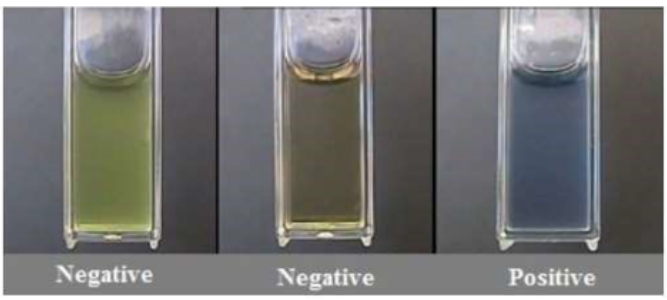
تست بیال (Bial's Test)

تست بيال يك روش مفيد براي تشخيص قندهاي پنتوز از هگزوز است.پنتوزها در اسيد ملايم فورفورال تشكيل مي دهند كه در مجاورت اورنيسول متراكم شده در محيط حاوي يون فريك در محيط الكلي كمپلكس رنگي توليد مي كند.



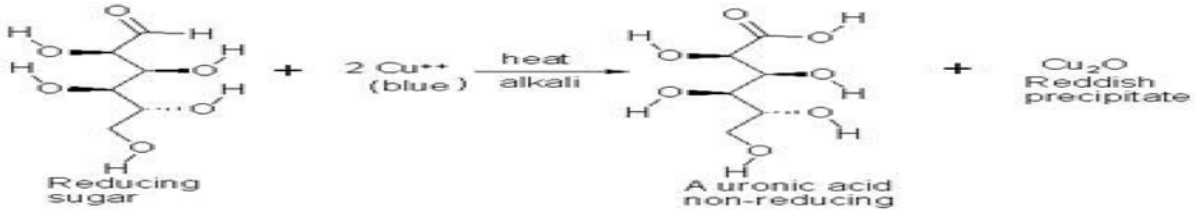
روش کار:

۱. مقدار ۲ml از هر نمونه در لوله هاي آزمايش بريزيد.
۲. مقدار ۲ml معرف بیال به هر لوله اضافه کنید.
۳. در حمام اب جوش قرار دهید.
۴. تا ۲ لايه مجزا و كمپلكس رنگي را ببينيد



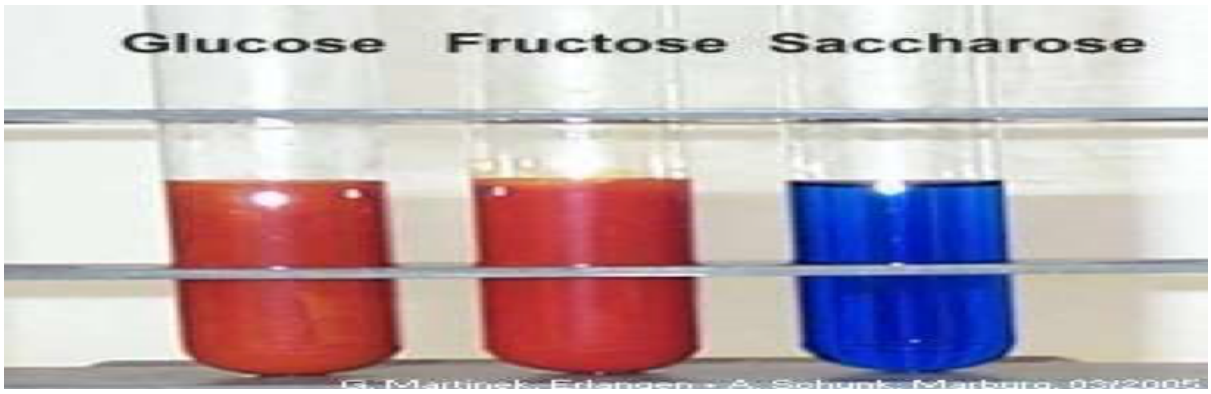
تست بندیکت (Benedict Test)

تست بندیکت براي تشخيص قندهاي احيا كننده صورت مي پذيرد و تنها قندهايي در اين تست جواب مي دهند يكه يك انتهاي احيا كننده داشه باشند. اساس تست حضور یون مس در محیط است که در صورت احیاکننده بودن محیط احیا شده ورنگ یا رسوب ایجاد میکند.



روش کار:

۱. مقدار ۲ml از هر نمونه در لوله هاي آزمايش بريزيد.
۲. مقدار ۲ml معرف بندیکت به هر لوله اضافه کنید.
۳. در حمام اب جوش قرار دهید.



تست بارفورد (Barfored's Test)

این تست جهت تشخیص مونوساکاریدها از سایر قندها استفاده میشود. و اساس آن خاصیت احیا کنندگی مس توسط مونو ساکاریدهاست در حالی که دی ساکاریدها این قدرت را ندارند.

$$RCHO + 2Cu^{2+} + 2H_2O \rightarrow RCOOH + Cu_2O\downarrow + 4H^+$$

روش کار:

۱. مقدار ۱ml از هر نمونه در لوله هاي آزمايش بريزيد.
۲. مقدار ۲ml معرف بارفورد به هر لوله اضافه کنید.
۳. در حمام اب جوش قرار دهید.

جدول را تکمیل کنید.(می تواند بیش از یک جواب داشته باشد)

	آنزیمی که مشکل دارد.
X1	
X2	
X3	
X4	

نمودار درختی برای شناسایی قندها رسم کنید.

اندازه‌گیری گلوکز ادرار

یک نمونه ادرار بیمار در اختیار شما قرار گرفته است. با استفاده از روش آنزیمی مقدار گلوکز موجود در نمونه را اندازه بگیرید. و با توجه به مقادیر جذب استاندارد گلوکز غلظت گلوکز را محاسبه کنید.

روش کار:

مقادیر داده شده در هر ردیف را در یک کووت ریخته و سپس ۲۰ دقیقه منتظر می ایستیم. مقدار جذب را با کمک مسئول ازمایشگاه می خوانید. به عنوان نمونه بلنک به جای گلوکز آب بریزید.

آنزیم	گلوکز
۱۸۰۰	۲۰۰

مقادیر استاندارد:

Glu (mg/ml)	OD
0.00	0.000
0.05	0.070
0.10	0.143
0.20	0.261
0.40	0.521

معادله خط را محاسبه کرده و منحنی استاندارد را رسم کنید و سپس مقدار غلظت گلوکز را مشخص کنید.