

بیوشیمی

اسیدهای آمینه. پروتئین.

روز چهارم
۹۸/۵/۳

اهداف آزمایش:

۱. آشنایی با تست‌های کیفی اسیدهای آمینه و توانایی تشخیص آن‌ها
۲. آشنایی با روش بردفورد برای سنجش غلظت پروتئین

زمان آزمایش: ۹۰ دقیقه

طراح آزمایش: الهام پرند



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

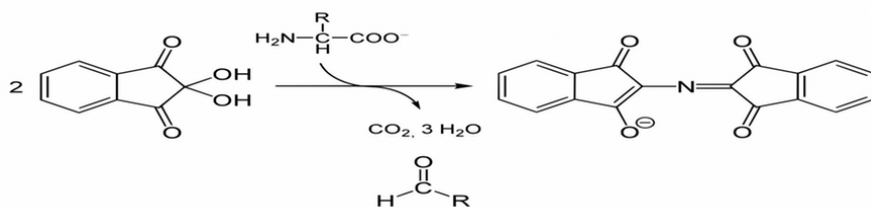
تست‌های کیفی اسیدهای آمینه | تعیین غلظت پروتئین

امروز ۶ نمونه در اختیار شما قرار داده می‌شود. در بخش اول همه تست‌های تشخیص کیفی مربوط به اسیدهای آمینه را طبق پروتوکول انجام می‌دهید و نمونه‌ها را تعیین هویت می‌کنید. و در بخش دوم غلظت نمونه حاوی پروتئین را به روش لوری تعیین می‌کنید.

تست‌های کیفی اسیدهای آمینه

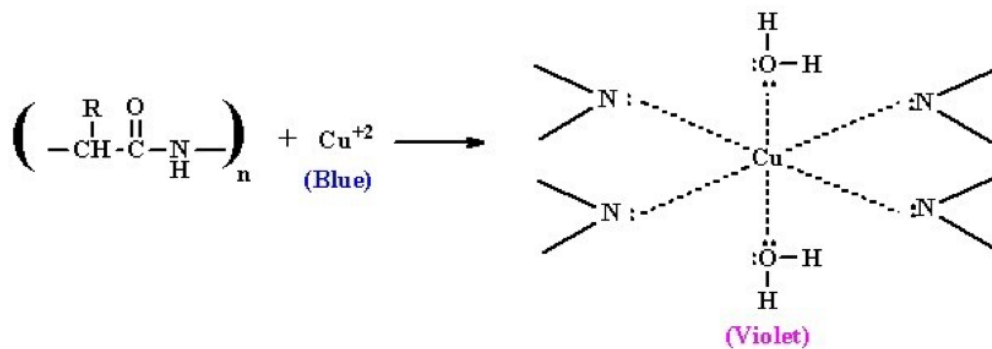
تست نین‌هیدرین

نین‌هیدرین یک تست عمومی برای تشخیص اسیدآمینه‌ها و پروتئین‌ها است. اساس تست نین‌هیدرین طی واکنش‌های زیر موجب دآمین شدن و دکربوکسیله شدن اسیدهای آمینه می‌شود. در نتیجه آلدئیدی که یک کربن کمتر از اسیدآمینه اولیه دارد، تولید می‌کند. نین‌هیدرین اکسید شده در مجاورت آمین تولید شده احیا شده و کمپلکس رنگی تولید می‌کند.



روش کار:

۱. مقدار ۲ml از هر کدام از نمونه‌ها را در لوله‌های آزمایش بریزید.
۲. مقدار ۲ml معرف نین‌هیدرین به هر لوله اضافه کنید.
۳. به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
۴. رنگ بنفش نشانه حضور پروتئین یا اسیدآمینه است.

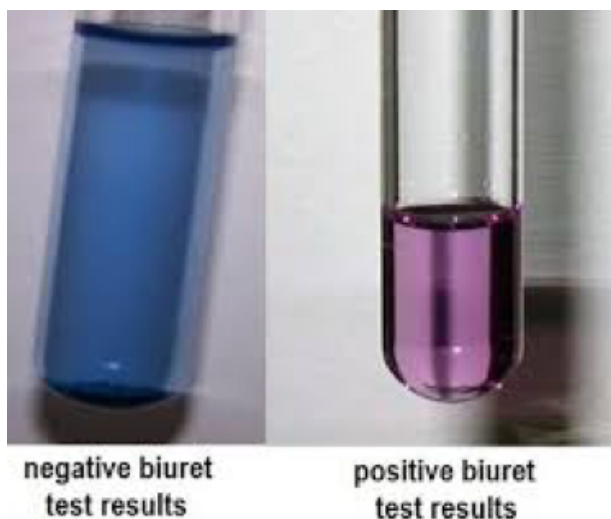


تست بیوره (Biuret Test)

تست بیوره فقط به ترکیباتی که حداقل دارای دو پیوند پپتیدی داشته باشند پاسخ می دهد. از این رو می توان اسیدآمینها را از پروتئین ها تشخیص داد. تشکیل رنگ در این واکنش به دلیل تولید کمپلکس بین یون مس موجود در معرف و نیتروژن در زنجیره پلی پپتیدی است.

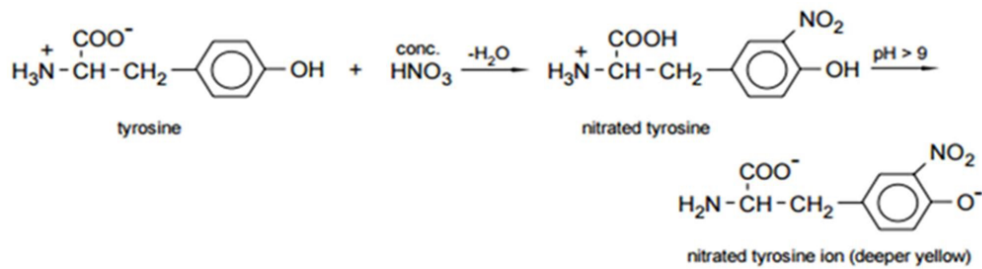
روش کار:

۱. مقدار ۱ml از هر کدام از نمونه ها را در لوله های آزمایش بریزید.
۲. مقدار ۱ml معرف بیوره به هر لوله اضافه کنید.
۳. رنگ بنفش نشانه حضور پروتئین است.



تست زانتوپروتیک (Xanthoproteic Test)

تست زانتوپروتیک یک تست تشخیصی برای اسید آمینه ها آروماتیک است. گروه فنیل موجود در اسید آمینه های آروماتیک با اسید نیتریک غلیظ نیترا ته شده و مشتقات نیترا ته و مشتقات زرد رنگ ایجاد می کنند که در محیط قلیایی به رنگ نارنجی در می آید.



روش کار:

۱. مقدار ۱ml از هر کدام از نمونه ها را در لوله های آزمایش بریزید.
۲. ۵ قطره معرف اسید نیتریک به هر لوله اضافه کنید.
۳. لوله ها را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار دهید.
۴. پس از سرد شدن لوله ها به هر لوله قطره قطره سود ۱۰ نرمال اضافه کنید.
۵. رنگ نارنجی جواب مثبت است.



واکنش تشخیص گوگرد:

گوگرد موجود در اسیدامینه یا پروتئین با سود واکنش داده و در حضور استات سرب رسوب ایجاد می کند.

روش کار:

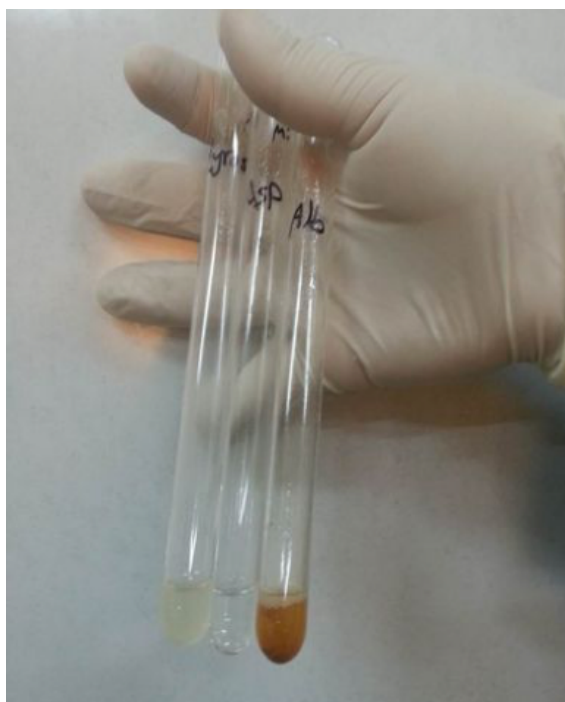
۱. مقدار ۲ml از هر کدام از نمونه ها را در لوله های آزمایش بریزید.
۲. مقدار ۵ml سود به هر لوله اضافه کنید.
۳. لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار دهید.
۴. به هر لوله ۵۰۰μl استات سرب اضافه کنید.

تست میلون (Millon's Test):

تست میلون تست تشخیصی فنیل آلانین از تیروزین است. که طی آن ترکیبات مونو هیدروکسی بنزن نظیر تیروزین با معرف میلون ترکیب صورتی ایجاد می کنند.

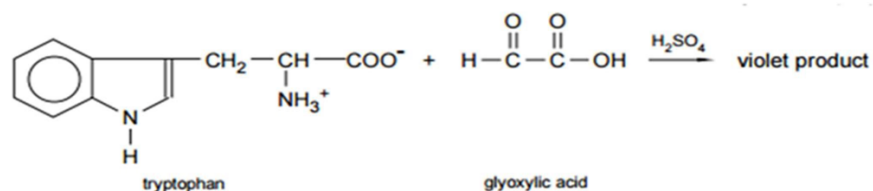
روش کار:

۱. مقدار ۲ml از هر کدام از نمونه ها را در لوله های آزمایش بریزید.
۲. مقدار ۲۵۰μl معرف میلون به هر لوله اضافه کنید.
۳. لوله ها را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار دهید.



تست هاپکینز کول

هاپکینز-کول تست تشخیصی تریپتوفان است. گروه ایندول موجود در تریپتوفان وقتی با آلدئیدهای مختلف در حضور اسید سولفوریک غلیظ قرار می گیرد. کمپلکس رنگی ایجاد می کند. ماهیت واکنش دقیقاً معلوم نیست



روش کار:

۱. مقدار ۱ml از هر نمونه در لوله های آزمایش بریزید.
۲. مقدار ۲ml گلی اگزالیك به هر لوله اضافه کنید.
۳. لوله را کج کرده و به آرامی قطره قطره اسید سولفوریک اضافه کنید.
۴. تشکیل حلقه بنفش جواب مثبت است.



براساس تست ها جدول را تکمیل کنید. هر تست مثبت را تیک بزنید.

شماره لوله	نین هیدرین	بیوره	میلون	گوگرد	هاپکینزکول	زانتوپروتیک
۱						
۲						
۳						
۴						
۵						
۶						

هویت لوله ها را تعیین کنید.

۱		۳		۵	
۲		۴		۶	

تعیین غلظت پروتئین

تعیین غلظت پروتئین یک عمل بسیار روتین در ابتدای آزمایشات بیولوژیک می باشد. تنها روش دقیق برای تعیین غلظت پروتئین هیدرولیز پروتئین در اسید و تعیین تک تک اسیدهای آمینه آن است که بسیار زمان بر است و در زمانی که نمونه های بسیری دارید عملاً امکان پذیر نمی باشد. خوشبختانه روش های بسیار سریع تری برای تعیین غلظت پروتئین وجود دارد. در بسیاری از این روش ها اساس کالریمتری است که مقدار رنگ حاصل از یک واکنش شیمیایی توسط روش های اسپکترومتری اندازه گیری می گردد و غلظت پروتئین بر مبنای منحنی استاندارد یک پروتئین مشخص اندازه گیری می گردد.

پروتئین BSA (bovin serum albumin) به عنوان یک پروتئین ارزان با خلوص بالا و در دسترس در همه آزمایشگاه های بیوشیمی دنیا به عنوان استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده می شود.

امروز از روش بردفورد استفاده خواهیم کرد که یک روش مناسب و دقیق در تعیین غلظت پروتئین می باشد. روش کار:

۱. مطابق جدول مقادیر فوق را در سه ستون پلیت ۹۶ تایی تکرار کنید. غلظت پروتئین BSA دو میلی گرم در میلی لیتر است.

E	D	C	B	A	
۱۰	۸	۵	۲	۰	پروتئین BSA
۰	۲	۵	۸	۱۰	آب

۲. در ردیف F مقدار $10 \mu\text{l}$ در هر سه ستون پروتئین مجهول بریزید.

۳. مقدار $200 \mu\text{l}$ محلول بردفورد را به هر چاهک اضافه کنید.

۴. در این هنگام برای خواندن الایزا وقت بگیرید. و جذب ها را بخوانید.

