العمل التطبيقي الثالث : تقدير البروتين في النبات

مركبات عضوية معقدة التركيب ذات وزن جزيئي عالٍ تتركب من الاحماض الامينية تتواجد في تركيب كل المخلوقات الحية والفيروسات وهي الحجر الأساس في بناء الخلية واستدامة هيكلها ، بالإضافة الى كونها وسائط وظائف الخلية فالعديد من البروتينات تشكل الإنزيمات أو قد تدخل وحدات بروتينية في تركيب بعض الإنزيمات وتضم الخلية آلافا من جزيئات البروتينات المختلفة في خواصها الحيوية و الكيميائية و الفيزيائية.

يتم استخلاص البروتينات من مصادرها ايا كانت لإغراض شتى مثل:-

1- تنقيتها وفصلها كل على انفراد لغرض تشخيصها وتقدير كميتها.

2-دراسة الخواص البيولوجية والكيميائية والفيزيائية للبروتينات لغرض استنباط علاقة التركيب بالوظيفة

3- مقارنة البروتينات المستخلصة من نماذج مختلفة لغرض استنتاج علاقات مفيدة في الاغراض الدراسية المقارنة.

4- استخلاصها للإغراض التجارية حيث تدخل في العديد من الصناعات الدوائية والغذائية.

1- استخلاص البروتين:

1 - زن حوالي 0.5 جم من العينة بدقة في بيشر سعته 50 ملل على ميزان حساس

2 - أضف 10 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0,5ع). أخلط العينة (استخدام قلاب مغناطيسي إن كان ذلك ضرورياً)

3 - اكمل محتوى كأس بيشر الى 25 ملل بالماء المقطر.

4 - رشح المحلول المتحصل عليه على ورقة وطمان رقم02. يمثل الراش مستخلص البروتين

2- تحضير المنحنى القياسي لبروتين مصل البقر BSA:

لدينا محلول الام ذات التركيز 2 مغ /مل

المحلول الاول : 80

المحلول الثاني :40

المحلول الثالث :20

المحلول الرابع :10

المحلول الخامس :0

3– تقدير البروتين بطريقة برادفورد :

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن صبغة الكوماسيبريلينت بلو Coomassie Brilliant Blue 250 توجد بلون أحمر ولكن عند ارتباطها بجزيء البروتين تتحول إلى اللون الأزرق.

1- نقل 0.5 مل من العينة إلى أنابيب اختبار أو من المحاليل القياسية

2 - أضف 2.5 مل من محلول الصبغة واخلط جيداً وسريعاً بواسطة الفورتكس

3- اترك الانابيب ساكنة لمدة 5 د

4- أقرأ الامتصاصية على موجة 595 نانومتر.

5- ارسم المنحنى القياسي (رسم الامتصاصية على التركيز).

المحاليل:

1- الصبغة:

- أذب 0.1جم من صبغة الكوماسبريلينت بلو في 50 مل كحول
- أضف 100 مل من حمض الفوسفوريك (H3PO4) (تركيز 85%)

2- محلول البروتين القياسي (BSA) بتركيز 100ملجم/ 100 مل ماء مقطر.

3- محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5ع)