دانشگاه جیرفت

دستور کار آزمایشگاه بیوشیمی ساختار

گروه زیست شناسی

دکتر عزتی

جلسه اول: محلول سازی

مایع یکنواخت حاصل از حل شدن یک جسم حل شونده (مایع ،گاز و جامد) در یک حلال را محلول گویند و مقدار مولکول گرم از جسم حل شونده در محلول را غلظت آن جسم می خوانند.

هر گاه غلظت جسم حل شونده در محلول کم باشد، محلول را رقیق می نامند و چنانچه محلول دارای غلظت کافی از جسم حل شونده باشد، به طوری در حجم و فشار معین بیش از این مقدار در محلول حل نشود، آن را " محلول اشباع شده" گویند. محلول" فوق اشباع " محلولی است که میزان جسم حل شونده در آن بیش از مقدار لازم برای اشباع است.

انواع محلول ها

محلول نرمال

محلول های نرمال محلولهایی هستند که در هر لیتر آنها یک اکی والان گرم از جسم حل شونده موجود است. اکی والان گرم برابر است با وزن مولکولی جسم بر ظرفیت جسم. محلول یک نرمال اسیدکلریدریک (HCl) برابر با۳۶/۵/۱ گرم و محلول یک نرمال اسید سولفوریک (H_2SO_4) برابر است با۴۹ گرم اسید در هر لیتر. محلولهای 2N, 3N, N/10 , N/2 بترتیب نصف، یک دهم ، ۲ و ۳ برابر اکی والان گرم از آن ماده را در هر لیتر دارد.

N نشان دهنده نرمالیتی محلول است.

برای ساختن نرمالهای ضعیف از محلولهای قویتر، از فرمول زیر استفاده می شود:

$$N_1V_1=N_2V_2$$

N1 , V1 بترتیب نرمالیتی و حجم اولیه N2 , V2 حجم و نرمالیته محلول ثانویه است.

محلول مولار

محلول مولار محلولهایی هستند که در هر لیتر از آنها یک مولکول گرم (مول) از جسم حل شونده وجود دارد. برای ساختن محلول یک مولار سود (NaOH) مقدار ۴۰ گرم آن را در مقدار کمی آب حل می کنیم. و حجم کل را به یک لیتر می رسانیم. برای ساختن محلولهای مولار اسید سولفوریک و اسید کلریدریک بترتیب ۹۸ گرم و ۳۶/۵ گرم از آنها لازم است. اجسام یک ظرفیتی دارای محلولهای نرمال و مولار هم غلظت هستند، اما محلولهای مولار اجسام دوظرفیتی بترتیب دو و سه برابر از محلولهای نرمال آنها قویترند.

محلولهای مولار را با حرف M نشان می دهند.

محلولهای مولال

محلول مولال محلولهایی هستند که در هر هزار گرم آنها یک مولکول گرم از جسم حل شونده وجود دارد به عبارت دیگر، تعداد مول (مولکول گرم) جسم حل شونده در کیلوگرم حلال را مولالیتی گویند. اگر حلال آب باشد، مولاریتی و مولالیتی با هم برابرند. برای نشان دادن مولالیتی حرف m را به کار می برند و برای محاسبه مولالیتی می توان از فرمول زیر استفاده کرد:

$$m = \frac{\text{مولکول گرم}}{\text{کیلوگرم حلال}}$$

برای تعیین مولالیته یک محلول ، ابتدا باید مولکول گرم جسم را با تقسیم کردن عدد گرم جسم بر وزن ملکولی آن بدست آورد، سپس عدد حاصل را به جای خود در فرمول بالا گذاشت و آن را بر کیلوگرم حلال تقسیم کرد.

محلول های درصد

محلول ها بر اساس درصد بر دو سه نوع اند:

۱- محلول درصد وزنی یا وزن در وزن (W/W):

این محلول ها شامل گرم یا میلی گرم از جسم حل شونده هستند، در حالی که وزن کل محلول ۱۰۰ گرم است. مانند محلول ۶ درصدقند که حاوی ۶ گرم قند در ۱۰۰ گرم وزن نهایی محلول است.

۲- محلولهای درصد وزنی/حجمی یا وزن در حجم (W/V):

این محلولها دارای گرم یا میلی گرم از جسم حل شونده اند، در حالی که حجم کل محلول ۱۰۰ میلی لیتر است مانند محلول ۶ گرم قند در حجم نهایی ۱۰۰میلی لیتر محلول.

۳- محلول های درصد حجمی یا حجم در حجم (V/V):

این محلول ها شامل حجم ماده حل شده در ۱۰۰ میلی لیتر محلول نهایی هستند. مثلا محلول حاصل از حل شدن ۱۰ میلی لیتر از یک مایع در ۹۰ میلی لیتر حلال را محلول حجمی ۱۰ درصد گویند. منظور از وزن نهایی یا حجم نهایی محلول این است که مقدار جسم حل شونده در مقداری از حلال حل میکنیم و سپس وزن نهایی یا حجم نهایی محلول را به ۱۰۰ میلی گرم یا گرم یا میلی لیتر می رسانیم.

رقیق کردن محلولها

در آزمایشهای بیوشیمی، به ساختن محلولهای رقیق از محلولهای غلیظ نیاز است. برای تهیه محلول رقیق ، به مقدار معینی از محلول غلیظ آب یا حلال دیگر می افزایند تا محلول رقیق مورد نظر در حجم مناسب بدست می آید .

رقت محلولهارا با علامت ":" نشان میدهند. مثلا نسبت ۱:۱۰ معرف یک حجم از محلول غلیظ با ۹ حجم از حلال است. بنابراین محلول حاصل ۱۰ برابر از محلول اولیه رقیقتر است. برای محاسبه غلظت محلول رقیق، غلظت محلول اولیه را در معکوس رقت ضرب می کنند. و برای محاسبه غلظت محلول رقیقی که چند بار متوالی رقیق شده باشد ، از فرمول زیر استفاده می شود:

....× ضریب رقت سوم × ضریب رقت دوم× ضریب رقت اول

لازم به یادآوری است که برای آزمایشهای مربوط به این تحقیق ابتدا مقدار ماده مورد نظر را با محاسبه بدست می آوریم، سپس مقدار حاصله را ، اگر بر حسب میلی لیتر باشد، به کمک پیپت برداشته در استوانه مدرج به حجم نهایی مورد نظر می رسانیم و اگر بر حسب گرم یا میلی لیتر باشد، به وسیله ترازو وزن کرده و در بشر می ریزیم و مقدار کمی حلال به آن می افزاییم و خوب حل می کنیم و سپس در استوانه مدرج به حجم مورد نظر می رسانیم.

در رابطه با محلولهای درصد، نرمالیته و مولاریته، فرمولهای زیر هم می توانند مورد استفاده قرار گیرند:

گرم درصد×۱۰=گرم در لیتر

$$\text{مولاریته} = \frac{\text{گرم در لیتر}}{\text{وزن مولکولی}}$$

$$\text{مولاریته} = \frac{\text{گرم درصد} \times ۱۰}{\text{وزن مولکولی}}$$

$$\text{نرمالیته} = \frac{\text{گرم در لیتر} \times \text{ظرفیت}}{\text{وزن مولکولی}}$$

$$\text{نرمالیته} = \frac{\text{گرم درصد} \times ۱۰ \times \text{ظرفیت}}{\text{وزن مولکولی}}$$

آزمایش ۱

وسایل مورد نیاز

بشر، کلرورسدیم، ترازو، استوانه مدرج، آب مقطر

روش کار

چگونه می توان ۲۰ میلی لیتر محلول نرمال ار کلرورسدیم تهیه کرد؟

آزمایش ۲

وسایل مورد نیاز

محلول ۵نرمال اسید کلریدریک، پیپت، استوانه مدرج، آب مقطر

روش کار

چند میلی لیتر از محلول ۵ نرمال اسید کلریدریک لازم است تا بتوان ۲۵ میلی لیتر محلول ۰/۲ نرمال از آن تهیه کرد؟

آزمایش ۳

وسایل مورد نیاز

پودر کلرور پتاسیم، بشر، ترازو، استوانه مدرج، آب مقطر

روش کار

چگونه می توان ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولار کلرور پتاسیم تهیه کرد. وزن مولکولی ۵۷/ ۷۴ است.

جلسه دوم: بافرها

pH

قانون اثر جرم

در یک واکنش شیمیایی سرعت واکنش در دو سوی واکنش بستگی به غلظت مواد واکنش دهنده دارد.

$$A+B\leftrightarrow C+D$$

$$R_1=K_1C_AC_B \qquad R_2= K_2C_CC_D$$

R_1: سرعت واکنش رفت

R_2: سرعت واکنش برگشت

K_1 , K_2 ضرایب ثابت واکنش

زمانیکه فعل و انفعالات به حالت تعادل برسد سرعت واکنش رفت و برگشت برابر خواهد شد بنابراین

$$K_1C_AC_B = K_2C_CC_D$$

و یا

Keq عدد ثابت تعادل واکنش است. در حالت تعادل نسبت حاصل ضرب غلظت محصولات واکنش به حاصل ضرب غلظت مواد ادلیه در آغاز واکنش همیشه ثابت و برابر با Keq است. این قانون به قانون اثر جرم معروف است.

یونیزه شدن آب

آب محلول الکترولیت بسیار ضعیفی است و به مقدار ناچیزی به یونهای مثبت و منفی تجزیه می شود

$$H_2O \longrightarrow H^+ + OH^-$$

طبق قانون اثر جرم عدد ثابت تعادل برای آب برابر است با:

$$K1= \frac{[H+][OH-]}{[H2O]}$$

$$K1= 1/8\times10^{-16}$$

غلظت آب در یک لیتر آب خالص برابر است با:

$$C= \frac{100}{18}$$

$C= 55/5$ مول در لیتر

بنابراین

$$1/8\times10^{-16}= \frac{[H^+][OH^-]}{55/5}$$

$[H^+][OH^-] = (1/8\times10^{-16})(55/5)$

از آنجایی که غلظت H^+, OH^- برابر

$[H^+]^2= 1\times10^{-14}$

$[H^+]= 10^{-7}$

لگاریتم عکس غلظت یون هیدروژن یا لگاریتم منفی غلظت هیدروژن را pH گویند.

$pH= -\log[H^+]$

بنابراین pH آب خالص برابر ۷ و pOH آن ۷ می باشد زیرا غلظت هر دو برابر است.

یونیزه شدن اسید ها و بازهای قوی

قدرت محلول اسید ها و بازها به مقدار یون های H^+ و OH^- که عوامل مشخص کننده اسید و باز هستند بستگی دارد. از آنجایی که اسید ها و باز های قوی در محلولهای آبی تقریبا صددرصد یونیزه می شوند بنابراین غلظت یون H در محلول برابر با غلظت اسید و یا غلظت OH در محلول برابر با غلظت باز خواهد بود. مثلا محلول ۰/۰۱ مولار اسید کلریدریک در آب کاملا تجزیه شده و یونهای هیدروژن و کلر تولید می کند. غلظت یون هیدروژن در محلول برابر با ۰/۰۱ مولار بودهو بدین ترتیب pH آن با توجه به آنچه گفته شده برابر است با:

$pH= -\log[H^+] = -\log[10^{-2}]= 2$

یونیزه شدن اسیدها و بازهای ضعیف

اسید ها و بازهای ضعیف در محلولهای آبی به مقدار بسیار کم یونیزه می شوند، یعنی در آب و یا در حلالهای دیگر آبی کاملا به یونها تجزیه نمی شوند و بخش تجزیه نشده با بخش تجزیه شده به حالت تعادل

$$HA \leftrightarrow H^+ + A^-$$

در دمای مشخص طبق قانون اثر جرم، ثابت تفکیک یا عدد ثابت یونیزاسیون برابر است با:

$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

مثلا اگر الکترولیت مورد نظر اسید استیک باشد، می توان چنین نوشت:

$$CH_3COOH \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+$$

$$K1 = \frac{[CH_3COO^+][H^+]}{[CH_3COOH^-]}$$

اگر غلظت اسید استیک ۱ مولار و مقدار اسیدی که یونیزه می شود برابر برابر X باشد، غلظت اسید استیک در حالت تعادل یونیزاسیون برابر با 1-X خواهد بود زیرا:

قبل از یونیزاسیون	در حالت یونیزاسیون
$[CH_3COOH]=1M$	$[CH_3COOH]=1-X$
$[CH_3COO^-]= 0$	$[CH_3COO^-]$
$[H^+]=0$	$[H^+]=X$

$$K_1 = 1/8\times10^{-5} = \frac{[CH_3COO^-][H^+]}{[CH_3COOH]} \qquad \frac{(X)(X)}{(1-X)} = \frac{X^2}{1-X}$$

$$(1/8\times10^{-5}) - (1/8\times10^{-5})\,(X) = X^2$$

$X^2 + (1/8\times10^{-5})\ (X) - (1/8\times10^{-5}) = 0$

بدین ترتیب معادله یک مجهولی درجه دومی بدست می اید که مقدار X مساوی 042 0/0 می شود. و مقدار آن نماینده غلظتهای $[H^+]$و $[CH_3COO^-]$ است .

$pH = -\log[H^+] = -\log[0/0042] = -\log[4/2\times10^{-3}] = 2/38$

معادله هندرسون هاسلباخ

اگر نسبت باز به اسید و pK معلوم باشد،pH به آسانی بدست می آید.

تیتراسیون

غلظت یک اسید یا باز نامشخص را معمولا به وسیله یک محلول استاندارد باز و یا اسید تعیین می کنند و این عمل راتیتره کردن گویند. در طی عمل تیتراسیون، تغییرات pH به وسیله pH سنج اندازه گیری می شود و با قرار دادن تغییرات pH در محور عمودی و قرار دادن مقدار باز یا اسید اضافه شده به محیط در محور افقی منحنی تیتراسیون را بدست آورد. بطور مثال ۱۰۰ میلی لیتر از محلول اسید کلریدریک۰/۱ مولار برداشته و PH آن را حساب می کنیم. سپس مقدار ۱۰ میلی لیتر از محلول سود ۱/۰ مولار به آن می امزاییم و بهد مقدار pH را محاسبه می کنیم. برای بار دوم ۱۰ میلی لیتر دیگر در محلول سود اضافه کرده و pH را اندازه گرفته عمل را ادامه داده تا جمعا ۱۰۰ میلی لیتر سود اضافه گردد.

منحنی بدست آمده خطی است و با افزودن مقدار سود ۰/۱ مولار به تدریج بر pH اضافهه شده تا تمام اسید خنثی گردد. اما منحنی اسید استیک مانند اسید کلریدریک خطی نبوده بلکه شکل S است. زمانی که ۵۰ درصد اسید توسط باز خنثی می گردد pH=pK می شود.که در وسط منحنی است این عدد توسط رابطه هندرسون هسلباخ قابل محاسبه است.

$$\mathrm{pH} = \mathrm{pK}_a + \log\left(\frac{[\mathrm{A}^-]}{[\mathrm{HA}]}\right)$$

A: باز و HA اسید است.

هر گاه اسید مورد نظر دارای چند عامل اسیدی باشد مثل اسید کربنیک و اسید سیتریک دارای چندین نقطه تامپونی می باشد.

بافر یا تامپونها

تامپونها محلولهایی هستند حاوی یک اسید ضعیف و نمک آن که نسبت به افزودن مقادیر کمی از اسید ها و بازها یا به عبارتی نسبت به تغییرات pH مقاومند. مثل تامپونی که از مخلوط کردن اسید استیک و استات سدیم و یا هیدروکسید آمونیوم و و کلرور آمونیوم حاصل می شوند.

چگونگی مقاومت بافرها بدین ترتیب است که:

اگر بر روی بافر استات سود اضافه کنیم این محلول روی استات سدیم اثری ندارد و با اسید استیک ترکیب می شود، و به جای یک باز قوی سود، یک باز ضعیف یعنی آب خواهد بود.

برعکس اگر روی این بافر محلول محلول لسیدی قوی مثل اسید کلریدریک اضافه شود این اسید با استات سدیم ترکیب شده و حاصل آن یک اسید ضعیف اسید استیک است در این صورت تغییرات pH زیاد نیست

ظرفیت تامپونی در نقطه ای که pH=pKa است به حداکثر می رسد زیرا با اضافه کردن باز تغییرات pH در این ناحیه کم است.

قدرت یونی بافر ها

شدت یونیزاسیون را قدرت یونی نامند که با فرمول زیر محاسبه می گردد.

بدین معنی که حاصلضرب غلظت در مجذور بار الکتریکی یونهای سازنده الکترولیتها با هم جمع و سپس نصف می گردد.

آزمایش تهیه تامپون

مواد مورد نیاز

لوله آزمایش، بشر،پیپت، محلول یک دهم نرمال اسید استیک و محلول یک دهم نرمال استات سدیم، محلول یک دهم نرمال اسید کلریدریک و سود، دستگاه PH سنج

روش کار

۱- مطابق جدول محلول ها را اماده نمایید.

محلول	اسید استیکml	استات سدیمml	pH_1	pH_2	pH_3
A	45	5			
B	35	15			
C	25	25			
D	15	35			
E	5	45			
F	0	50			

۲- اکنون pH هریک از محلول های فوق را اندازه بگیرید و در ستون pH_1 وارد نمایید

۳- به ۲۰ میلی لیتر از محلول های فوق ۲ میلی لیتر اسید کلریدریک اضافه کرده و مجدد pH_2 را اندازه بگیرید

۴- به ۲۰ میلی لیتر از محلول های فوق ۲ میلی لیتر سود اضافه کرده و مجدد pH_3 را اندازه بگیرید

۵- تغییرات را تفسیر نمایید.

جلسه سوم: کربوهیدراتها

قندها از مهمترین ترکیبات زیستی به شمار می روند، زیرا قند ها نخستین گروه از فراورده های فتوسنتزی در گیاهان و آخرین ترکیبات مصرفی در تنفس انسان و جانور و گیاه است. قند ها به سه دسته اصلس منو ساکارید ها، الیگو ساکارید ها و پلی ساکارید ها تقسیم می گردد.قند ها با توجه به داشتنن عامل آلدئییدی ، کتونی و یا هیدروکسیل خواص مختلفی را نشان می دهند. از این خواص قند ها در شناسایی آنها استفاده می شود.

واکنش مولیش:

پلی ساکارید ها در مجاورت اسید ها هیدرولیز شده به قند های ساده تبدیل می شوند. قند های ساده نیز در مجاورت اسید های غلیظ آب از دست می دهند و فوفورال را تولید می کنند، از این رو این واکنش به تمام قند ها پاسخ مثبت می د هد. فوفورال در محیط اسیدی با فنل ترکیب شده و ترکیبات رنگی تولید می نماید که برای شناسایی قندها به کار می رود. در مولیش ، فنل مصرف شده از نوع آلفا نفتل است.

آزمایش

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلول۰/۱ مولار چند قند، پیپت، لوله آزمایش، معرف مولیش، قطره چکان، اسید سولفوریک غلیظ

روش کار:

۱- در لوله آزمایش ۲ میلی لینر از نمونه قند بریزید

۲- روی آن چند قطره معرف مولیش اضافه کرده و خوب مخلوط کنید.

۳- از کنار لوله، ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آرامی و طوری وارد کنید که در ته لوله قرار گیرد. حلقه رنگی فورفورال که پس از چند ثانیه تشکیل می شود ، چه رنگی است؟

۴- وجود این رنگ نماینگر چیست؟

تست سیلوانف:

در این آزمایش نیز قندهاییی که دارای عامل کتونی هستند در محیط اسیدی با فنل که از نوع رزورسینول است ترکیبات رنگی فوفورال تشکیل می دهند.

آزمایش سیلوانف

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلولهای ۰/۱ مولار فروکتوز، گلوکز، ساکاروز، پیپت، لوله آزمایش، معرف سیلوانف، بن ماری

روش کار

۱- سه لوله آزمایش انتخاب کنید در هر یک ۱ میلی لیت معرف سیلوانف بریزید

۲- ۱ میلی لیتر از قند های مورد آزمایش را اضافه کنید و آنرا به مدت ۹۰ ثانیه در آب جوش بگذارید. رنگ یا رسوب قرمز دلیل بر وجود کتون است. توجه داشته باشید که اگر مدت گرما بیش از ۹۰ ثانیه باشد حتی ساکارز هم ممکن است بر اثر هیدرولیز پاسخ مثبت بدهد.

۳- از این آزمایش چه نتیجه ای میگیرید؟ کدام یک از قند های نامبرد دارای عامل کتونی است؟

واکنش بیال

در این آزمایش، پنتوزها در محیط اسیدی با فنل که از نوع اورسنول است ترکیبات رنگی ایجاد می کند.

آزمایش بیال

وسایل مورد نیاز

محلول ۰/۱ مولار قند گزیلوز، گلوکز، گالاکتوز، پیپت، لوله آزمایش، معرف بیال، شعله، گیره مخصوص، آب مقطر، الکل امیلیک

روش کار

۱- چهار لوله آزمایش انتخاب کنید در هر ۲ میلی لیتر معرف بیال بریزید.

۲- به هر لوله ۱ میلی لیتر از محلول قندی مشخص بیا فزایید.

۳- لوله ها را با ملایمت گرما دهید تا بجوشد.

۴- آنها را سرد کنید. رنگ آبی تا سبز و وجود پتنوز را مشخص کنید.

۵- اگر رنگ سبز کاملا مشخص نباشد، یک حجم از این مخلوط را با سه برابر حجمش آب مقطر رقیق کرده و ۱ میلی لیتر الکل امیلیم بیافزایید بیافزایید و تکان دهید. رنگ سبز به الکل امیلیک منقل می شود.

۶- کدامیک از قند های فوق الذکر پنتوز است؟

جلسه چهارم: تشکیل بلور اوزازون

واکنش تشکیل بلور اوزازون

گروه کربنیل قندها(-CO-CHOH) با فنیل هیدرازین بلورهای اوزازون را تشکیل می دهد. این بلور ها نه تنها سبب شناسایی قندهای احیا کننده اند بلکه در تشخیص نوع قند نیز به کار برده می شود.

آزمایش بلور اوزازون

وسایل مورد نیاز

محلول۰/۱ مولار قند گزیلوز، گلوکز، گالاکتوز، مالتوز و لاکتوز پیپت، لوله آزمایش، معرف فنیل هیدرازین، بن ماری، میله شیشه ای، لام، لامل، میکروسکوپ

روش کار

۱- ۵ لوله آزمایش انتخاب کرده و در هر یک ۱ میلی لیتر معرف فنیل هیدرازین بریزید.

۲- به هر لوله ۱ میلی لیتر از یکی از قندهای نامبرده اضافه کنید.

۳- به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش قرار دهید

۴- آنها را در دمای آزمایشگاه سرد کنید.

۵- زمان تشکیل هر نوع رسوب یا بلور را مشخص سازید.

۶- سپس با یک میله شیشه ای قطره ای رسوب بعد از سرد شدن ایجاد می شود برداشته روی لام بگذارید و آنرا به آرامی با لامل بپوشانید و زیر میکروسکوپ مشاهده کنید.

۷- شکل رسوبات را بکشید.

۸- بلورها را در زیر میکروسکوپ مشاهده و شناسایی نمایید.

جلسه پنجم: هیدرولیز ساکارز

آزمایش هیدرولیز ساکارز

با آزمایش های بالا متوجه شدید که ساکارز دو قندی غیر احیاء کننهده است ولی اگر هیدرولیز شود می تواند به واکنشهای بالا پاسخ مثبت دهد

وسایل و مواد مورد نیاز

محلول۰/۱ مولار قند ساکارز، کاغذ قرمز کنگو، اسید کلریدریک ۱٪، بن ماری، معرف فهلینگ A ، معرف فهلینگ B، معرف بارفود، معرف سیلوانف، پیپت و لوله آزمایش

روش کار:

۱- به سه میلی لیتر محلول ساکارز در یک لوله آزمایش یک تکه کاغذ قرمز کنگو بیافزایید و قطره قطره اسید کلریدریک ۱٪ اضافه کنید تا کاغذ به رنگ آبی تیره در آید (pH=2-3)

۲- محلول را به مدت ۵ دقیقه بجوشانید

۳- روی این محلول هیدرولیز شده واکنش های فهلینگ، بارفود و سیلوانف را انجام دهید به این ترتیب که محلول هیدرولییز شده را به سه قسمت تقسیم کرده و در سه لوله ؟آزمایش بریزید و هر لوله را برای یک آزمایش ذکر شده بکار ببرید.

۴- ساکارز هیدرولیز شده در واکنشهای فهلینگ، بارفود و سیلوانف چه پاسخی می دهد؟ چه نتیجه ای میگیرید؟

قند / آزمایش	گلوکز	فروکتوز	لاکتوز	ساکارز	مالتوز	گالاکتوز	گزیلوز	آرابینوز
مولیش								
بیال								
سیلوانف								
فهلینگ								

جلسه ششم: اندازه گیری قند احیا شده به روش سوموگیئی- نلسون

در این روش، قند را با محلولی قلیلیی از تارتارات مس گرما می دهند، در نتیجه اکسید کوئیرو تشکیل می شود کسپس با ارسنو مولیبدات واکنش می دهد و مولیبدنم آبی رنگ تشکیل می شود. این رنگ آبیدر کولوریمتر اندازه گیری می شود. به این ترتیب به کمک غلظتهای مختلف یک قند معلوم و مقدار جذب نوری آنها، یک منحنی خطی که اصطلاحا منحنی استاندارد است به دست می آید و غلظت قند محاسبه می گردد.

اسپکتروفتومتری

بر اساس خاصیت جذب نود مواد این دستگاه طراحی گردید. در این روش طول موج هایی که توسط این اجسام جذب می شود اندازه گیری می گردد. در نورسنجی الکتریکی دقت آن به اندازه اسپکتروفومتری نیست. اصول اسپکتروفتومتری بطور خلاصه به شرح زیر است:

هنگامی که پرتو نور به سطح سلول فتو الکتریک تابیده می شود، جریانی برقرار می گردد که شدت آن را می توان با وصل کردن سلول فتوالکتریک به یک گالوانومتر تعیین کرد. درجه انحراف عقربه بستگی به مقدار جریان الکتریکی دارد و هر قدر شدت نور تابیده بیشتر باشد، شدت جریان الکتریکی نیز بیشتر است. حال اگر بین نور تابیده شده و سلول فتوالکتریک محلول رنگین قرار داده شود، مقداری از نور توسط نمونه جذب می گردد و در نتیجه مقدار جریان الکتریکی و انحراف عقربه کمتر می گردد. بنابراین از این روش برای تعیین غلظت مواد استفاده می شود.

قانون بیر: هنگامی که پرتو های اشعه نور یک رنگی از داخل محلولی عبور کند، مقدار نور جذب شده با تعداد مولکولهای جسم محلول که در مسیر پرتو قرار گرفته اند متناسب است.

قانون لامبر:

نسبت نوری که توسط مولکولهای جسم در لایه های مختلف محلول جذبب می شود ثابت بوده و با شدت نور اصلی بستگی ندارد.

آزمایش سنجش مقدار قند به روش اسپکتروفتومتری

وسایل و مواد مورد نیاز:

لوله آزمایش، قند فروکتوز ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر، قند مجهول، معرف کوپریک، بن ماری، معرف رنگی راکتیو، اسپکترو فتومتر

معرف کوپریک:

۴۰ گرم تارتارات سدیم و پتاسیم، ۷۰ گرم فسفات دی سدیک، ۸ گرم سولفات مس متبلور، ۱۸۰ گرم سولفات سدیم و ۱۰۰ میلی لیتر سود نرمال را با هم مخلوط کرده با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید.

معرف راکتیو:

شامل دو محلول A و B می باشد. محلول A :از مخلوط کردن ۲۵ گرم مولیبدات آمونیوم و ۲۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و ۴۵۰ میلی لیتر آب مقطر بدست می آید. محلول B از مخلوط کردن ۳ گرم ارسنات سدیم و ۲۵ میلی لیتر آب مقطر حاصل می شود. سپس این دو محلول A و B را در تاریکی مخلوط کرده مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و بعد در یخچال نگهداری نمایید.

روش کار

۱- ۸ لوله را مطابق جدول زیر آماده سازید:

۲- حجم تمام لوله ها را با آب مقطر به ۲ میلی لیتر برسانید

۳-به هر لوله ۲ میلی لیتر محلول کوپریک اضافه کنید و تکان دهید

۴-۱۲ دقیقه در بن ماری جوشان قرار دهید

۵-در محیط آزمایشگاه سرد کنید

۶-به هر لوله ۲ میلی لیتر معرف راکتیو بیفزایید

۷- حجم تمام لوله ها را به ۱۰ میلی لیتر برسانید

۸- محتویات لوله را کاملا هم بزنید و با طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر بخوانید

۹- با رسم منحنی استاندار غلظت قند مجهول را بدست آورید.

لوله	محلول فروکتوز میلی لیتر	قند مجهول
۱	۰	
۲	۰/۲۵	
۳	۰/۵	
۴	۰/۷۵	
۵	۱	
۶		۰/۲
۷		۰/۵
۸		۱

جلسه هفتم: آزمایشات کیفی لیپید ها

لیپیدها ترکیبات آلی غیر محلول در آب هستند که می توان آنها را بوسیله حلال های غیر قطبی نظیر کلروفرم، اترو بنزن از یاخته ها استخراج کرد . لیپید ها استر های اسید چرب با الکل هستند که اسی چرب آنها ممکن است یک تا چند تا باشد. برخی از لیپید ها در ساختار جدار و غشاء یاخته ای شرکت دارند و برخی دیگر ماده زخیره انرژی زای درو سلول ها را تشکیل می دهد.تا کنون بیش از هفتاد نوع اسیدچرب از بافتهای گونگون جدا کرده اند که همگی دارای زنجیره هیدروکربنی طولانی با یک عامل کربوکسیل انتهایی هستند، بعضی از آنها اشباع شده و برخی دارای یک ، دو یا سه پیوند دوگانه اند و گروهی در زنجیره خود رشته ای جانبی نیز دارند.

انولع مختلف چربیها شامل:

۱- چربیهای خنثی

الکل گلیسرول (گلیسیرین) بیش از سایر الکلها در ساختار لیپید ها یافت می شود، که دارای دو عامل الکلی نوع اول و یک عامل الکلی نوع دوم است. به ترکیب اسیدهای چرب و گلیسرول ، اسیل گلیسرول یا گلیسیرید گویند. بر اساس تعداد اسید چرب شرکت کننده در ساختار آنها به منو، دی و تری گلیسیرید معروفند.

۲- این لیپیدها که به گلیسرول فسفاتید ها معروفند در ساختار غشاء سلول شرکت می کنند. الکل این دسته از چربیها کلیسرول است که یکی از عوامل الکلی نوع اول آن به وسیله اسید فسفریک استری شده است.

به ترکیب دو اسید چرب و اسید فسفریک با گلیسرول را اسید فسفاتیدیک گویند.از آنجایی که دارای یک سر قطبی و دو سر غیر قطبی هستند به آنها لیپیدهای آمفی پاتیک گویند. فراوان ترین فسفو گلیسرید ها، فسفاتیدیل اتانوا آمین و فسفاتیدیل کولین است.

۳- پلاسمالوژنها

یک گروه فرعی از فسفوگلیسیرید ها هستند که در آنها به جای یک مولکول اسیدچرب، یک مولکول آلدئید چرب قرار گرفته که، ضمن جابجا شدن محل اتصال دوگانه، با عامل هیدروکسیل گلیسرول پیوند استری تشکیل داد ه است. پلاسمالوژنها را بطور کلی مشتقات فسفاتیدال گویند. این ترکیبات در غشای یاخته های ماهیچه ای و عصبی فراوانند.

۴- اسفنگولیپیدها و گلیکولیپیدها

خود به چند گروه تقسیم می شود:

الف) اسفنگولیپیدها: در غشاء سلو لهای گیاهی و جانوری در بافتهای عصبی و مغز به مقدار فرائان یافت می شود. در اثر هیدرولیز یک مولکول اسیدچرب و یک مولکول الکل به نام اسفنگوزین ایجاد می شود. ترکیب اسفنگوزین و اسیدچرب را سرامید گویند که در آن اسیدچرب با عامل آمین اسفنگوزین ترکیب شدهاست. اسفنگومیلیلن ترکیب سرامید با فسفوکولین است که فراوانترین اسفنگولیپید است.

ب) گلیکولیپید:این ترکیبات دارای یک انتهای قطبی آب دوست قندی (-Dگالاکتوز و -D گلوکز) هستند.

بعضی شامل اسفنگوزین و برخی دارای گلیسرول هستند.

ج) سربروزید: این ترکیبات را می توان در گروه گلیکولیپیدها و یا اسفنگولیپیدها طبقه بندی کرد، زیرا دارای قند و اسفنگوزین هستند.این دسته لیپیدها بیشتر در غشای یاخته های عصبی، بویژه د غلاف میلین و همچنین در گویچه های سفید و سرخ دیده می شوند.

د) گانگلیوزید: ترکیبات دیگری از دسته، گلیکولیپیدها هستند و در حقیقت نوعی گلیکواسفنگولیپیدند که انتهای قطبی متشکل از قندهای مرکب مانند اوزامین و اسی سیالیک دارند.

۵- مومها

مومها از نظر ساختار و خواص به اسیل گلیسرولها شباهت دارند، یعنی استر های اسیدهای چرب و الکلهایی با زنجیره کربنی درازند که تنها شامل یک عامل الکلی هستند

۶-لیپیدهایی که صابونی نمی شوند

لیپیدهایی که تاکنون بحث گردیدقابلیت صابونی شدن را دارند، یعنی با قلیاییها و بر اثر گرما صابون تولید می کنند. در سلول ها مقدار کمی از چربیهای دیگر وجود دارد که قابلیت صابونی شدن را ندارد

دو گروه اصلی از این لیپیدها استروئیدها و ترپن ها هستند.

الف) استروئیدها مشتقات هسته سیکلوپنتانوپرهیدروفتانترن هستند و مهمترین آنها عبارتاند ارز اسیدهای صفراوی، هورمونهای جنسی، هورمونهای بخش قشری غدههای فوقکلیوی، ویتامین D و کلسترول.

استروئیدها به مقدار بسیار کم در یاخته ها وجود دارند و تنها یک نوع آنها که به طور کلی استرول نامیده می شود بسیار فراوان است. استرول ها شامل یک عامل الکلی روی کربن ۳ و ییک زنجیره کربنی روی کربن ۱۷ هستند.

کلسترول فراوان ترین نوع استرولها در بافتهای جانوری است که بصورت آزاد و استری شده دیده می شود.

ب) ترپن ها به مقدار جزئی در سلولها وجود دارند. در ساختار آنها واحدهای کربور غیر اشباعی به نام ایزوپرن ۲ متیل-۱-۳- بوتادیان مشاهده می شود.

ویتامی A کاروتن ها،بیشتر اسانس ها، ویتامین ,Eو ویتامینK و ترپن ها مشتق می شوند.

آزمایش حلالیت

مواد و وسایل مورد نیاز

پیه گوسفند، روغن زیتون، لوله آزمایش، الکل اتیلیک، اتر و کلروفرم، بن ماری، کاغذ صافی

روش کار

۱- اندکی پیه گوسفند در هر یک از چهار لوله آزمایش بریزید.

۲- در هر کدام بترتیب ۳ میلی لیتر از حلالهای آب، الکل اتیلیک، اتر و کلرفرم بیفزایید و حلالیت را در حلالهای مذکور مشاهده کنید.

۳- لوله حاوی چربی و الکل اتیلیک را گرم کرده و نتیجه را یادداشت کنید.

۴- حلالیت روغن مایع مانند روغن زیتون را در حلالهای نامبرده آزمایش کنید.

۵- یک تا دو قطره از محلولهای اتری پیه گوسفند، روغن زیتون را جداگانه روی یک کاغذ صافی خشک بگذارید. پس از تبخیر اتر، مشخصات لکه را مشاهده کنید.

آزمایش تشخیص گلیسرول

مواد و وسایل مورد نیاز

لوله آزمایش، روغن زیتون، پودر بی سولفات پتاسیم، شعله

روش کار

۱- در لوله ازمایش کاملا خشک یک یا دو قطره روغن زیتون بریزید و سپس قدری پودر بی سولفات پتاسیم به آن بیفزایید و مخلوط را روی شعله گرما دهید. لبتدا بی سولفات پتاسیم به ان بی سولفات پتاسیم ۲۰۰ درجه سانتیگراد ذوب می شود و سپس روغن زیتون بر اثر گرما تجزیه شده و گلیسرول آن آزاد می گردد که دارای بوی مشخصی است و دستگاه تنفسی را تحریک میکند. با توجه به اینکه بی سولفات پتاسیم بشدت آبگیر است، گلیسرول به آکرولئین تیدیل می شود:

جلسه هشتم: شناسایی کلسترول

کلسترول در بافتهای جانوری یافت می شود و به مقدار زیادی در بافت عصبی و صفرا وجود دارد. برای شناسایی آن می توان از روش سالکوفسکی استفاده کرد.

مواد و وسایل مورد نیاز

کلسترول، لوله آزمایش، کلروفرم، اسیدسولفوریک خالص

روش کار

۱- چند گرم از کلسترول در داخل لوله آزمایش کاملا خشک بریزید و در ۳ میلی لیتر کلرفرم حل کنید.

۲- هم حجم آن اسیدسولفوریک خالص اضافه کنید و آن را به آرامی تکان دهید، سپس بگذارید دو لایه محلول از هم جدا شوند.

۳- رنگ ظاهر شده را یادداشت کنید.

۴- لایه کلروفرمی و اسیدی را مشخص کنید.

۵- رنگ لایه اسید سولفوریک چگونه است؟

آزمایش صابونی شدن

مواد و وسایل مورد نیاز

چربی، لوله آزمایش، بن ماری، محلول الکلی سود

روش کار

۱- اندکی چربی را در لوله زمایش بریزید و ۲ میلی لیتر آب به آن بیفزایید.

۲- لوله را د حمام آب جوش قرار دهید تا چربی ذوب شود.

۳- چند میلی لیتر محلول الکلی سود به مخلوط بیفزایید و مجددا لوله را گرم کنید تا چربی ناپدید و محلول یکنواخت شود.

۴- لوله را بشدت تکان دهید و کف تشکیل شده در قسمت بالای محلول را مشاهده کنید.

۵- واکنش انجام شده چه نوع واکنشی است و کف حاصل چیست؟

جلسه هشتم: آزمایش تعیین کلسترول خون

مواد و وسایل مورد نیاز

پنبه، الکل، سوزن، لانست، لوله سانتریفیوژ، سانتریفیوژ، پیپت، مخلوط اتر و الکل، بشر، بن ماری، محلول استاندار کلسترول، کلروفرم، انیدرید اسیتیک، اسید سولفوریک خالص، اسپکتروفتومتر

توجه: کلروفرم ماده بیهوش کننده و بسیار خطر ناک است در زیر هود استفاده شود.

روش کار

۱- برای گرفتن خون مویرگی سرانگشت دست را با پنبه اغشته به الکل ضدعفونی کرده و سپس با یک ضربه آنرا سوراخ کنید.

۲- اولین قطره را پاک کرده و قطرات بعدی را بدرون لوله بدون ماده ضد انعقاد منتقل کنید. و به حال خود بگذارید تا به آرامی منعقد شود.

۳- سپس خون را بمدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ کنید و پس از آن سرم را جمع آوری نمایید.

۴- در یک لوله سانتریفیوژ ۱۰ میلی لیتر مخلوط اتر و الکل بریزید و با دقت ۰/۲ میلی لیتر از سرم جمع آوری شده را به آن بیفزایید.

۵- لوله را در صورتی که دهانه آن بسته شده به مدت ۱ الی ۲ دقیقه بشدت تکان داده و سپس ۱۰ دقیقه به حال خود قرار دهید. سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمایید.

۶- لوله را پس از اتمام سانتریفیوژ بدون آنکه رسوب آن به هم بخورد خارج کرده و محلول بالای را در بشری به نام T بریزید.

۷- بشر را در بن ماری جوشان قرار دهید تا تبخیر شود.

۸- بشر دیگری با علامت S برداشته و ۰/۵ میلی لیتر از محلول استاندارد کلسترول در آن بریزید.

۹- مقدار ۶ میلی لیتر کلروفرم به بشر T و ۵/۵ میلی لیتر کلروفرم به بشر S بیفزایید و با حرکت دورانی ملایم کاملا مخلوط کنید.

۱۰- به هر یک از دو بشر ۲ میلی لیتر انیدرید استیک اضافه کنید و کاملا مخلوط نمایید. سپس به هر کدام ۰/۱ میلی لیتر اسیدسولفوریک خالص بیفزایید و بلافاصله محتوی بشرها را با حرکت دورانی کاملا مخلوط نمایید.

۱۱- بشر ها را مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در محل تاریکی قرار دهید تا رنگ ایجاد شود. ایجاد رنگ به علت انجام واکنش لیبرمان است. این واکنش به عامل زمان و گرما بستگی دارد و در مقابل نور حساس است.

۱۲- در طول موج ۶۶۰ نانومتر مقدار غلظت نمونه ها ثبت می گردد. و شاهد محلول کلروفرم است.

۱۳- روش محاسبه:

$$\text{کلسترول سرم} = \frac{O.D\ T}{O.D\ S} \times 0/5 \times 100/0/2 = T/S \times 250$$

میزان طبیعی کلسترول بین ۱۰۰ تا ۲۸۰ میلی گرم درصد است.

جلسه نهم: اسید های آمینه و واکنشهای شناسایی آن

اسید های آمینه به عنوان واحد های ساختاری پروتئین می باشد که ۲۰ نوع از آن در طبیعت وجود دارد. تمامی ۲۰ نوع آنها دارای گروه آمینی و کربوکسیل و همچنین یک گروه هیدروژن و زنجیره جانبی می باشند که دلیل اختلاف این ۲۰ نوع در زنجیره جانبی آنهاست. زنجیره جانبی بر اساس بار الکتریکی و قطبیت آن باعث القای خواص فیزیکوشیمیایی، حلالیت، آبگریزی را در اسید های آمینه می گردد. بنابراین بر همین اساس اسید های آمینه به چهار گروه اصلی تقسیم می شود.

۱- اسید های آمینه با زنجیره جانبی غیرقطبی

شامل آلانین، لوسین، ایزو لوسین، والین و پرولین و همچنین حلقه های معطر فنیل الانین و تریپتوفان و همچنین متیونین می باشد.این گروه دارای حلالیت کم در آب است.

۲- اسیدهای آمینه با زنجیره جانبی قطبی بدون بار

دارای حلالیت بیشتری نسبت به گروه قبل می باشند که دلیل آن زنجیره های جانبی قطبی بدون بار است که با آب پیوند هیدروژنی تشکیل می دهد.عامل هیدروکسیل در سرین و ترئونین و تیروزین و عامل آمیدی در گلوتامین و آسپارژین و عامل سولفیدریل در سیستئین سبب ایجاد قطبیت می گردد. همچنین گلیسین هم جز این دسته از اسید های آمینه است. سیستئین و تیروزین قطبی ترین گروههای عاملی که شامل گروه تیول و هیدروکسیل فنول که تمایل زیادی به از دست دادن پرتون و یونیزاسیون دارند.

۳- اسید های آمینه با زنجیره جانبی دارای بار مثبت: شامل لیزین و آرژنین و هیستسدین می باشد.

۴- اسید های آمینه با زنجیره جانبی با بار منفی:

شامل اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک. هریک از آنها دارای یک گروه کروکسیل ثانوی است که کاملا یونیزه شده و بار منفی ایجاد می نماید.

تمامی اسید های آمینه بجز گلیسین دارای کربن نامتقارنند و خواص ایزومر نوری را نشان می دهند.

عامل کربوکسیل و آمینی آنها بصورت محلول یونیزه می شوند. اسید های آمینه ب اثر یونیزه شدن می تواند آزاد کننده پروتون باشد و اسید است و در صورت پذیرنده پروتون باز خواهد بود. از جهتی دیگر آنها را آمفوتر بدلیل داشتن بار منفی و مثبت آنها می نامند.

اگر اسید آمینه را در محیط اسیدی قرار دهیم، عامل $COOH$ به حال خود باقی می ماند در صورتی که NH_2 به NH_3^+ تبدیل می شود، پس در این حالت چون هم عامل $COOH$ و هم عامل NH_3^+ هر دو دهنده پرتون هستند لذا اسید آمینه خاصیت اسیدی دارد. اگر اسیدمینه را در محیط بازی قرار دهیم، عامل NH_2 به حال خود باقی می ماند در صورتی که عامل $COOH$ با از

دست دادن پروتون به COO^- تبدیل می شود در این حالت اسیدآمینه خاصیت بازی دارد زیرا هر دو عامل آن گیرنده پروتون هستند. این یونیزاسیون نسبت به pHمحلول متغییر است . برای هر اسید آمینه pHمعینی وجود دارد و در این حالت جمع جبری یونهای آن صفر است که به ایزوالکتریک pH معروف است.

آزمایش کمی و شناسایی اسید های آمینه

تشخیص و تعیین مقدار یک اسید آمینه به وسیله تیتراسیون با فرمل. برای اندازه گیری غلظت یک اسید آمینه به وسیله فرمالدئید، عامل آمینی را مهار کرده سپس جسم حاصل را مثل یک اسید آلی می سنجیم.این آزمایش به سورنسن یا فرمل تیتراسیون معروف است.

مواد و وسایل مورد نیاز:

محلول اسید آمینه با غلظت مجهول، ارلن، بشر، پیپت، بورت، فرمالدئید ، فنل فتالئین ، سود ۰/۱ نرمال

روش کار

۱- در یک ارلن مایر کوچک، ۱۰ میلی لیتر از اسید آمینه را بریزید.

۲- چند قطره فنل نتالئین و سپس چند قطره سود تا رنگ صورتی ظاهر شود.

۳- ۱۰ میلی لیتر فرمالدئید با pHبرابر۹ را به آن بیفزایید تا بیرنگ شود.

۴- سپس توسط بورت قطره قطره سود۰/۱ نرمال اضافه کرده تا رنگ صورتی مجدد ظاهر شود. با توجه به سود مصرفی غلظت اسید آمینه را محاسبه نمایید

۵- فرمول میلی گرم درصد= $\frac{M}{10} \times n \times \frac{۱۰۰}{۱۰}$

جلسه دهم : واکنش بیوره، انعقادی و حرارتی پروتئین

پروتئین ها از تعداد زیادی اسید آمینه ساخته شده اند، این اسید های آمینه توسط پیوند های پپتیدی با یکدیگر اتصال یافته و زنجیره درازی زا تولید می کنند. تمامی پروتئین ها از ۲۰ نوع اسید آمینه تشکیل شده اند تو اختلافشان در ترتیب قرار گرفتن اسیدهای آمینه می باشند. پیوند پپتیدی از ترکیب عامل کربوکسیل یک اسید آمینه و عامل آمینی دیگر با از دست دادن یک مولکول آب به وجود میآید.

بر اساس اعداد اسید های آمینه دی پپتید، تری پپتید، تترا پپتید و.. خواهیم داشت. در صورتی که وزن مولکولی آنها از ۵۰۰۰ دالتون بیشتر باشد یک پلی پپتید است. پروتئین ها با داشتن چهار ساختار دارای خواص متعددی می باشند.

دناتوره کردن و کواگولاسیون پروتئین ها

در اثر دناتوره شدن پروتئین ها خواص زیستی خود را از دست می دهند. برای دناتوره شدن پروتئین ها می توان از گرما استفاده کرد. اگر پروتئینی را در نقطه ایزو الکتریک (دارای بار مثبت و منفی برابر هستند) گرما دهیم، ابتدا فولیکوله شده که همان کواگوله شدن است و در حضور اسید یا باز عمل فولیکولاسیون از بین می رود. بنابراین اولین فرایند در گرما همان دناتوره شدن و در پی آن فولیکولاسیون و کواگولاسیون و تشکیل رسوب می شود.

رسوب دادن پروتئین با نمک فلزات سنگین

پروتئین ها در محیط قلیایی بالاتر از نقطه ایزو الکتریک به علت گرفتن با منفی به صورت انیون در امده و به وسیله کاتیونها نظیر نمک فلزات سنگین مثل آهن، جیوه، روی و سرب جذب می شوند و رسوب می دهند.

آزمایش بیوره

مواد و وسایل مورد نیاز

محلول پروتئینی، لوله آزمایش، پیپت، سود ۱۰٪، سولفات مس ۱٪

روش کار

۱- ۱ میلی لیتر از محلول پروتئینی را در لوله آزمایش بریزید و هم حجم آن سود۱۰٪ بیفزایید.

۲- چند قطره سولفات مس ۱٪ به آرامی به آن اضافه کرده تا دو سطح تشکیل شود.

۳- آیا بین دولایه حلقه رنگی مشاهده شد؟

۴- به چه رنگی است و علت تشکیل چیست؟

آزمایش انعقادی و رسوبی (رسوب با اسید نیتریک غلیظ یا هلر)

در صورت پیوند غیر قابل بازگشت اسید و باز با پروتئین ها ، انعقاد و رسوب شکل می گیرد.

مواد و وسایل مورد نظر

لوله آزمایش، اسید نیتریک غلیظ، پیپت، محلول پروتئینی

روش کار

۱- در یک لوله ۲ میلی لیتر محلول پروتئینی بریزید.

۲- سپس ۲ میلی لیتر اسید نیتریک طوری اضافه کنید تا دو لایه تشکیل شود.

۳- در بین دولایه چه رنگی دیده شد؟

۴- اگر مقدار پروتئین بیشتر شود چه تغییری در حلقه دیده می شود.

انعقاد با گرما

با گرما پروتئین ها در حضور اسید استیک ماهیت خود را از دست داده و گرما هم باعث از بین رفتن پیوند های ضعیف مثل پیوند هیدروژن و پیوند هیدروفوب می شود و در صورت پایین آوردن دما، پروتئین به حالت اولیه خود بر می گردد و ماهیت خود را بدست می آورد ولی اکر دما از حد معینی (که برای پروتئین های مختلف متفاوت است) بیشتر شود، ممکن است در ساختمان اول پروتئین تغییراتی غیر قابل برگشت حاصل گردد.

مواد و وسایل لازم

لوله آزمایش، پیپت،اسید استیک ۱۰٪، محلول پروتئینی، شعله (گرمای مستقیم)

روش کار

۱- ۱۰ میلی لیتر از محلول پروتئینی را در لوله آزمایش بریزید . ۲ قطره اسید استیک ۱۰٪ به آن بیفزایید و بخش بالایی محلول را به ارامی گرما دهید.

۲- چه تغییری در لوله مشاهده شد؟

۳- آیا پروتئین انعقاد یافته دناتوره شده چرا؟

جلسه یازدهم: استخراج DNA

اسیدهای نوکلئیک از تکرار واحد هایی به نام نوکلئوتید به وجود می آیند. هر واحد نوکلئوتید از یک باز نیتروژن دار، یک قند پنتوز و مولکول فسفات تشکیل شده است.باز های نیتروژنداری که در ساختار آنها شرکت می کنند به دو دسته پورین و پیریمیدین تقسیم می گردد.باز های پورین مثل آدنین و گوانین و باز های پیریمیدین مثل سیتوزین و تیمین و اوراسیل می باشد.قند پنتوز بر دو نوع است که شاما دئوکسی ریبوز و ریبوز است.

حاصل ترکیب یک قند و باز را نوکلئوزید گویند . نوکلئوتید ها از استری شدن نوکلئوزید با اسید فسفریک به دست می آید. اسیدهای نوکلئیک بر دو نوع اسید ریبونوکلئیک (RNA) و اسید دزوکسی ریبو نوکلئیک (DNA) تقسیم می شوند.

آزمایش استخراج DNA از مخمر

مخمر ها برای انسان حائز اهمیت هستند ودر پزشکی، صنایع غذاسازی مورد استفاده قرار می گیرند.مخمر هایی که در نانوایی استفاده می شوند از سویه های ساکارومیسس سرویزیه هستند. به دلیلل ساختار ساده آنها داشتن دیواره سیتوپلاسم و اسی نوکلئیک بدون دیواره در علوم آزمایشگاهی استفاده می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

بشر، پیپت، لوله آزمایش، سود ۱٪، مخمر خشک، بن ماری،کاغذ صافی، اسیداستیک ۱نرمال، معرف اونیورسال، مخلوط اسیدکلریدریک و الکل، الکل ۹۶٪

روش کار

۱- در یک بشر ، به ۵ میلی لیتر سود ۱٪ ، ۲۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید.

۲- ۳ گرم مخمر خشک به تدریج در بشر بریزید و آنرا به مدت نیم ساعت درون بن ماری قرار دهید و مخلوط را به هم بزنید.

۳- مخلوط را با کاغذ صافی ، صاف نمایید و محلول صاف شده را خنک کرده و با کمک اسید استیک ۱ نرمال (در مقابل معرف اونیورسال) کمی اسیدی کنید و مجددا صاف نمایید.

۴- محلول صاف شده را گرما دهید تا حجم آن به حدود ۱۰ میلی لیتر برسد.

۵- این محلول را خنک کنید و آنرا در ۲۰ میلی لیتر مخلوط الکل و اسید کلریدریک وارد نمایید و بشدت بهم بزنید (سانتریفیوژ).

۶- مایع بالایی را جدا کنید. رسوب تهنشین شده را دوباره با الکل ۹۶٪ بشویید، به این ترتیب بکه هر بار با ۷ میلی لیتر الکل ریخته و بهم بزنید و بگذارید تا تهنشین شود و محلول رویی را دور بریزید و رسوب را نگهدارید.

جلسه دوازدهم: هیدرولیزDNA

موادو وسایل مورد نیاز

اسید نوکلئیک استخراج شده، لوله آزمایش، پیپت، اسید سولفوریک ۱۰٪،بن ماری جوشان، آمونیاک، کاغذ pH، اسید نیتریک غلیظ- معرف مولیبدات آمونیوم، محلول الکلی آلفانفتل، اسید سولفوریک غلیظ، سود ۱۰٪،معرف فولین

روش کار

۱- مقدار کمی از اسیدنوکلئیک استخراج شده را با ۱۰ میلی لیتر محلول ۱۰٪ اسید سولفوریک به مدت ۱ تا ۲ دقیقه بجوشانید. سپس آن را در سه لوله آزمایش تقسیم کنید.

۲- بر روی محلول لوله اول ، آزمایش فسفاتها را انجام دهید. بدین ترتیب که محیط را با آمونیاک انقدر خنثی کنید تا کاغذ اونیورسال به رنگ سبز دزآید سپس کمی اسید نیتریک غلیظ بیفزایید تا اسیدی شود و یا کاغذ قرمز شود.

۳- ۲ تا ۳ میلی لیتر مولیبدات آمونیوم بیفزایید و کمی گرما دهید تا رسوب زرد ایجاد شود که دلیل بر تشکیل فسفات مولیبدات آمونیوم است.

۴- بر روی لوله دوم، بریا اثبات وجود قند در اسید های نوکلئیک آزمایش مولیش را انجام دهید.

۵- بر روی لوله سوم، آزمایش فولین را برای اثبات باز های آلی انجام دهید. بدین ترتیب که محلول لوله سوم را در مقابل کاغذ اونیورسال با سود قلیایی کنید، سپس قطره قطره اسید فسفوتنگستیک یا فولین به محلول بیفزایید.وجود حلقه پورین با رنگ آبی مشخص می شود.