

ביוכימיה - מצבדה

אנליזה

ספקטרוסקופיה

חומצות

אמיניות

דו"ח מצבדה

[שם המגישים :](#)

מעבדה מס' 1 אנליזה ספקטרופוטומטרית של טירוזין וטריפטופן

[מטרות הניסוי :](#)

1. לימוד שיטה ספקטרופוטומטרית לזיהוי חומרים.
2. קבלת ספקטרום בליעה וקביעת אורך הגל המקסימלי של חומצות אמיניות ארומטיות בתנאים שונים.
3. אימות חוק בר למבר.
4. קביעת קבוע בליעה המולרי- ϵ_M של טירוזין וטריפטופן.

קבלת ספקטרום הבליעה של טירוזין וטריפטופן

חלק א' : קביעת אורך הגל המקסימאלי של טירוזין וטריפטופן בתנאים שונים

- מצורפים גם העתקי הפלט מהספקרומטר (ראה נספחים).

טבלה 4.2. קבלת ספקטרום הבליעה של החומצות האמיניות :

Trp(HCl)		Trp(NaOH)		Tyr(HCl)		Tyr(NaOH)	
λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs
250	0.094	250	0.143	250	0.053	250	1.824
251	0.1	251	0.147	251	0.06	251	1.602
252	0.107	252	0.153	252	0.068	252	1.4
253	0.115	253	0.16	253	0.078	253	1.226
254	0.124	254	0.166	254	0.087	254	1.078
255	0.132	255	0.174	255	0.098	255	0.956
256	0.138	256	0.181	256	0.107	256	0.844
257	0.145	257	0.188	257	0.117	257	0.749
258	0.154	258	0.197	258	0.13	258	0.663
259	0.163	259	0.206	259	0.145	259	0.566
260	0.171	260	0.214	260	0.158	260	0.498
261	0.177	261	0.222	261	0.171	261	0.447
262	0.186	262	0.231	262	0.188	262	0.399
263	0.193	263	0.24	263	0.204	263	0.365
264	0.201	264	0.248	264	0.221	264	0.336
265	0.208	265	0.257	265	0.237	265	0.316
266	0.214	266	0.266	266	0.255	266	0.299
267	0.219	267	0.273	267	0.269	267	0.289
268	0.225	268	0.28	268	0.284	268	0.282
269	0.229	269	0.288	269	0.299	269	0.279
270	0.232	270	0.294	270	0.312	270	0.279
271	0.234	271	0.299	271	0.325	271	0.282
272	0.236	272	0.304	272	0.338	272	0.289
273	0.237	273	0.307	273	0.348	273	0.297
274	0.238	274	0.309	274	0.354	274	0.307
275	0.239	275	0.312	275	0.355	275	0.32
276	0.24	276	0.315	276	0.35	276	0.335
277	0.241	277	0.318	277	0.337	277	0.354
278	0.243	278	0.321	278	0.327	278	0.371
279	0.242	279	0.324	279	0.317	279	0.392
280	0.238	280	0.324	280	0.307	280	0.415
281	0.231	281	0.321	281	0.293	281	0.44

(המשך בדף הבא)

המשך הטבלה :

Trp(HCl)		Trp(NaOH)		Tyr(HCl)		Tyr(NaOH)	
λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs	λ (nm)	Abs
282	0.219	282	0.314	282	0.264	282	0.468
283	0.204	283	0.303	283	0.222	283	0.496
284	0.194	284	0.294	284	0.183	284	0.52
285	0.19	285	0.286	285	0.144	285	0.542
286	0.187	286	0.279	286	0.098	286	0.569
287	0.181	287	0.274	287	0.067	287	0.59
288	0.169	288	0.268	288	0.044	288	0.609
289	0.152	289	0.259	289	0.028	289	0.623
290	0.126	290	0.241	290	0.016	290	0.636
291	0.099	291	0.219	291	0.008	291	0.646
292	0.077	292	0.198	292	0.003	292	0.651
293	0.057	293	0.174	293	-0.001	293	0.652
294	0.041	294	0.154	294	-0.003	294	0.648
295	0.029	295	0.136	295	-0.005	295	0.64
296	0.019	296	0.121	296	-0.006	296	0.626
297	0.009	297	0.106	297	-0.006	297	0.607
298	0.003	298	0.095	298	-0.006	298	0.589
299	-0.001	299	0.084	299	-0.006	299	0.565
300	-0.006	300	0.075	300	-0.006	300	0.64
301	-0.009	301	0.067	301		301	0.505
302	-0.011	302	0.059	302		302	0.463
303	-0.013	303	0.052	303		303	0.422
304	-0.015	304	0.045	304		304	0.374
305	-0.016	305	0.039	305		305	0.333
306	-0.017	306	0.034	306		306	0.295
307	-0.018	307	0.03	307		307	0.252
308	-0.019	308	0.026	308		308	0.218
309	-0.019	309	0.023	309		309	0.18
310	-0.02	310	0.02	310		310	0.151
311	-0.02	311	0.018	311		311	0.124
312	-0.02	312	0.017	312		312	0.103
313	-0.02	313	0.016	313		313	0.082
314	-0.02	314	0.014	314		314	0.065
315	-0.021	315	0.014	315		315	0.053
316	-0.021	316	0.013	316		316	0.042
317	-0.021	317	0.012	317		317	0.033
318	-0.021	318	0.012	318		318	0.026
319	-0.021	319	0.011	319		319	0.021

• מצורפים גם תוצאות קריאת הספקטורופוטומטר (ראה נספח).

אימות חוק בר למבר.

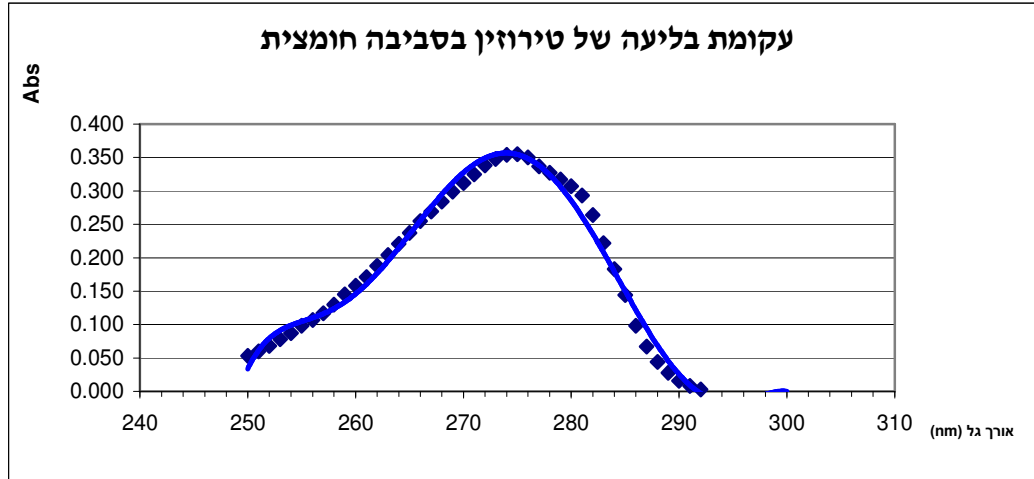
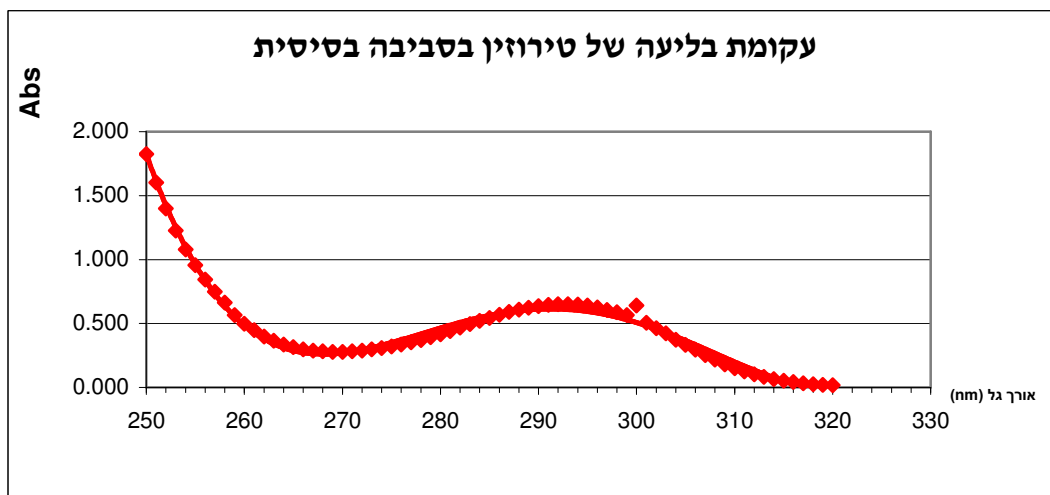
להלן התוצאות שרוכזו בטבלה 4.3 :

O.D בליעה	אורך גל	נפח HCl	נפח NaOH	כמות טירוזין (מ"ל)
0	275	4	0	0
0	275	4	0	0
0.093	275	3.96	0	0.04
0.082	275	3.96	0	0.04
0.155	275	3.92	0	0.08
0.162	275	3.92	0	0.08
0.237	275	3.88	0	0.12
0.245	275	3.88	0	0.12
0.317	275	3.84	0	0.16
0.321	275	3.84	0	0.16
0.404	275	3.8	0	0.2
0.386	275	3.8	0	0.2
0	293	0	4	0
0	293	0	4	0
0.14	293	0	3.96	0.04
0.136	293	0	3.96	0.04
0.251	293	0	3.92	0.08
0.253	293	0	3.92	0.08
0.38	293	0	3.88	0.12
0.383	293	0	3.88	0.12
0.511	293	0	3.84	0.16
0.517	293	0	3.84	0.16
0.65	293	0	3.8	0.2
0.646	293	0	3.8	0.2

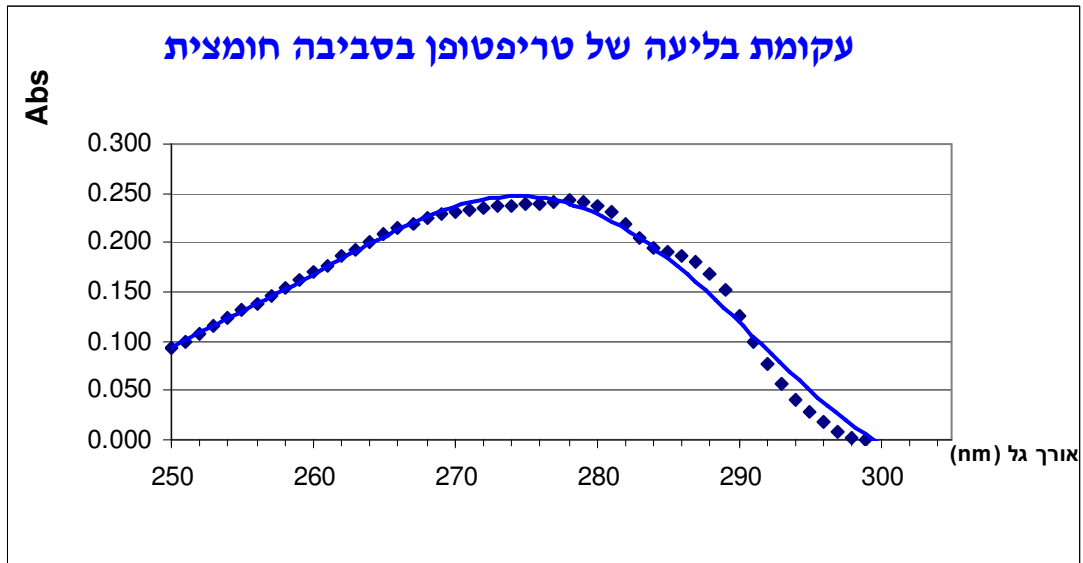
6.1 עיבוד התוצאות

.1

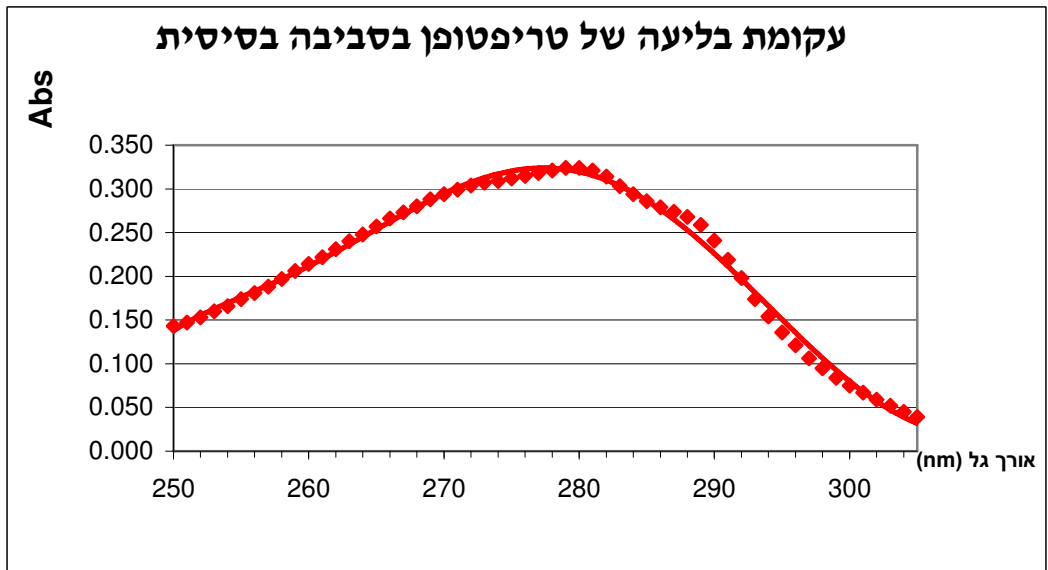
להלן הגרפים שהתקבלו עבור נתוני הטבלה:

גרף 1-עקומת בליעה של טירוזין בסביבה חומצית**גרף 2-עקומת בליעה של טירוזין בסביבה בסיסית**

גרף 3-עקומת בליעה של טריפטופן בסביבה חומצית



גרף 4-עקומת בליעה של טריפטופן בסביבה בסיסית



הערה : בניסוי זה בוצעה רק השיטה הממוחשבת.
2.

טריפטופן		טירוזין		חומצה :
בסיסית	חומצית	בסיסית	חומצית	סביבה
279.5	278.4	292.6	274.6	λ_{max} [nm]
0.324	0.243	0.652	0.355	O.D. max

מנתוני הטבלה אנחנו רואים כי אורכי הגל והצפיפות האופטית המקסימאלית השתנו בעבור חומצה אמינית טירוזין בכל אחת מהבדיקות, משמע לסביבה יש השפעה על שניהם. הסיבה לכך היא שהשיירים הצדדיים של חומצות האמינו החומציות (וגם של טירוזין) מושפעות מ-pH הן עוברות יינון, במקרה שלנו ב $\text{pH} \leq 10$ כלומר בסביבה בסיסית, מה שמגדיל את הצפיפות האופטית והבליעה כפי שאומת בניסוי. לעומת זאת בטריפטופן השייר הצדדי לא עובר יינון ולכן השינוי בצפיפות האופטית והבליעה נובע ככל הנראה מאי דיוק המכשיר או בשגיאה זניחה בריכוז.

3. ניתן לחשב, מתוך נתוני הניסוי, את מקדם הבליעה המולרי של החומצות האמיניות ע"י חישוב ריכוז החומצה באורך הגל המקסימאלי (למשל) וחילוף גודל המקדם מנוסחת בר-למבר:

A – הבליעה של התמיסה, מכונה גם צפיפות אופטית-O.D.
 C – ריכוז התמיסה
 l – הדרך האופטית- רוחב הקיוטה (במקרה שלנו 1 ס"מ).
 תוך ידיעת הנוסחה הנ"ל נוכל לחשב את ϵ_M מתוך הגרף של O.D כתלות בריכוז- זהו בעצם שיפוע הגרף.

$$\epsilon_M = \frac{A}{C \times l} \left[\frac{1}{M \times \text{cm}} \right] : \epsilon_M \text{ המולרי-} \epsilon_M$$

כאשר אורך הקיוטה במקרה שלנו הוא 1 ס"מ, ניתן לחשב את ϵ_M כך:

$$\epsilon_M = \frac{A}{C}$$

4. להלן החישובים שביצענו:

חישוב ϵ_M מקסימלי של טירוזין וטריפטופן בתמיסה חומצית ובסיסית

טירוזין בסביבה חומצית:

נתרגם את הריכוז לריכוז מולרי:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{n_1}{V_2} = \frac{\frac{1_{\text{mg}} \cdot 0.2_{\text{ml}}}{1_{\text{ml}}} \cdot \frac{1}{181.2_{\text{Da}}}}{4 \cdot 10^{-3}_{\text{liter}}} = 2.75 \cdot 10^{-4} M$$

קעת נחשב את המקדם:

$$\epsilon_M = \frac{A_{(\text{max})}}{C \times \ell} = \frac{0.355}{2.75 \cdot 10^{-4} M \cdot 1_{\text{cm}}} = 1290_{\text{cm}^{-1} M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות: $1398_{\text{cm}^{-1} M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית:

$$\delta_{\epsilon_M} = \frac{|1398 - 1290|}{1398} \cdot 100 \cong 7.72\%$$

טירוזין בסביבה בסיסית:

נתרגם את הריכוז לריכוז מולרי:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{n_1}{V_2} = \frac{\frac{1 \cdot 10^{-3} \text{g} \cdot 0.2_{\text{ml}}}{1_{\text{ml}}} \cdot \frac{1}{181.2_{\text{Da}}}}{4 \cdot 10^{-3}_{\text{liter}}} \cong 2.76 \cdot 10^{-4} M$$

כעת נחשב את המקדם :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.652}{2.76 \cdot 10^{-4} M \cdot 1_{cm}} \cong 2370_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $1405_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|2370 - 1405|}{1405} \cdot 100 \cong 68.7\%$$

טריפטופן בסביבה חומצית :

נתרגם את הריכוז לריכוז מולרי :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{n_1}{V_2} = \frac{\frac{0.2 \cdot 10^{-3} g \cdot 0.2_{ml}}{1_{ml}} \cdot \frac{1}{204_{Da}}}{4 \cdot 10^{-3}_{liter}} = 4.9 \cdot 10^{-5} M$$

כעת נחשב את המקדם :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.243}{4.9 \cdot 10^{-5} M \cdot 1_{cm}} = 4957.2_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $5561_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|5561 - 4957|}{5561} \cdot 100 \cong 10.9\%$$

טריפטופן בסביבה בסיסית :

נתרגם את הריכוז לריכוז מולרי :

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2} = \frac{n_1}{V_2} = \frac{\frac{0.2 \cdot 10^{-3} g \cdot 0.2_{ml}}{1_{ml}} \cdot \frac{1}{204_{Da}}}{4 \cdot 10^{-3}_{liter}} = 4.9 \cdot 10^{-5} M$$

כעת נחשב את המקדם :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.324}{4.9 \cdot 10^{-5} M \cdot 1_{cm}} = 6609.49_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $5562_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|5561 - 6609|}{5561} \cdot 100 \cong 18.8\%$$

הערה :

ערכי המקדם נלקחו מאתר האינטרנט של מכון הרפואה בלייזר באורגון :

<http://omlc.ogi.edu/>

5. טבלה מס. 6.1.

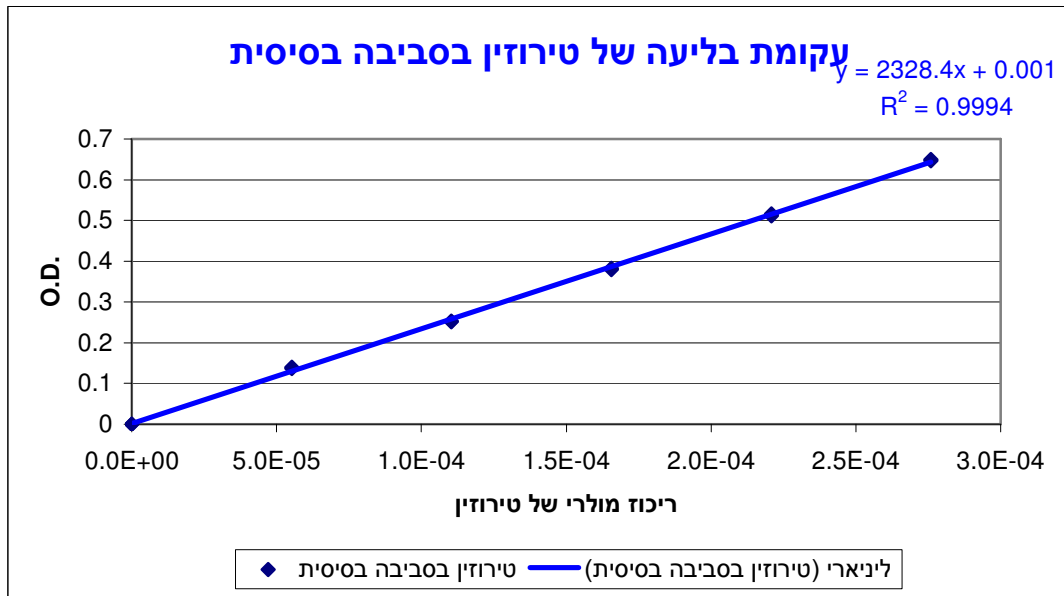
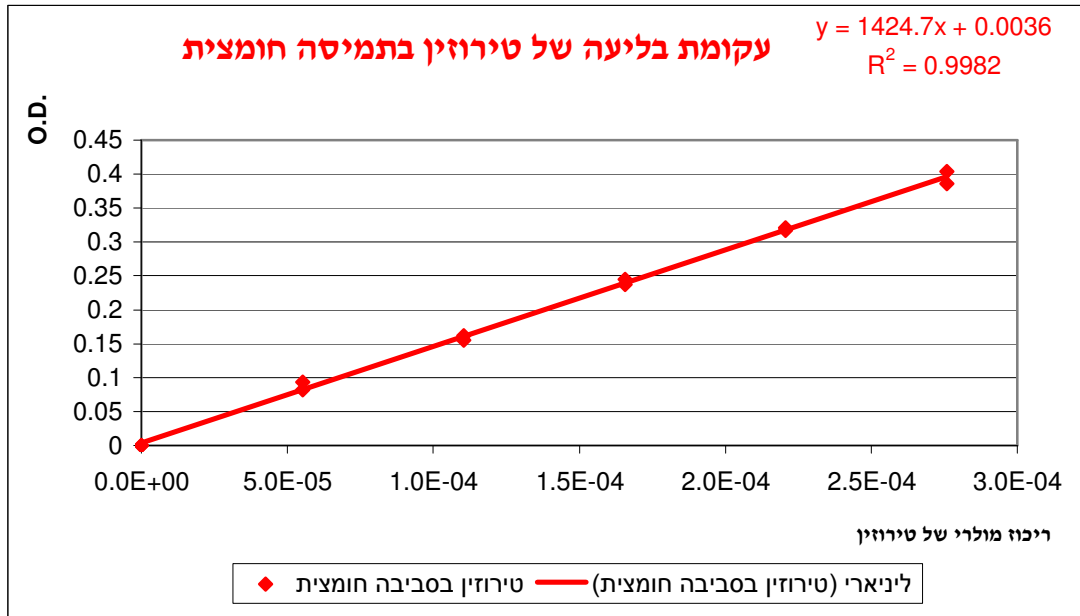
$\epsilon_M [cm^{-1} \cdot M^{-1}]$	O. D max	$\lambda_{max} [nm]$	שם החומצה האמינית
5351	0.355	274.6	טירוזין בסביבה חומצית
2359	0.652	292.6	טירוזין בסביבה בסיסית
4957	0.243	278.4	טריפטופן בסביבה חומצית
6609	0.324	279.5	טריפטופן בסביבה בסיסית

6. חישוב ריכוז החומצה טירוזין במבחנות השונות בוצע ע"י הגיליון האלקטרוני (EXCEL) אך דרך החישוב זהה לחישובי הריכוז שבוצעו בחלקו הקודם של הניסוי.

להלן הטבלה שהתקבלה כולל חישוב הריכוז :

ריכוז מולרי של טירוזין	O.D בליעה	אורך גל	נפח HCl	נפח NaOH	כמות טירוזין (מ"ל)	מס' מבחנה
0	0	275	4	0	0	1
0	0	275	4	0	0	2
5.52E-05	0.093	275	3.96	0	0.04	3
5.52E-05	0.082	275	3.96	0	0.04	4
1.10E-04	0.155	275	3.92	0	0.08	5
1.10E-04	0.162	275	3.92	0	0.08	6
1.66E-04	0.237	275	3.88	0	0.12	7
1.66E-04	0.245	275	3.88	0	0.12	8
2.21E-04	0.317	275	3.84	0	0.16	9
2.21E-04	0.321	275	3.84	0	0.16	10
2.76E-04	0.404	275	3.8	0	0.2	11
2.76E-04	0.386	275	3.8	0	0.2	12
0	0	293	0	4	0	1
0	0	293	0	4	0	2
5.52E-05	0.14	293	0	3.96	0.04	3
5.52E-05	0.136	293	0	3.96	0.04	4
1.10E-04	0.251	293	0	3.92	0.08	5
1.10E-04	0.253	293	0	3.92	0.08	6
1.66E-04	0.38	293	0	3.88	0.12	7
1.66E-04	0.383	293	0	3.88	0.12	8
2.21E-04	0.511	293	0	3.84	0.16	9
2.21E-04	0.517	293	0	3.84	0.16	10
2.76E-04	0.65	293	0	3.8	0.2	11
2.76E-04	0.646	293	0	3.8	0.2	12

7. להלן הגרפים שהתקבלו עבור העקומה של הבליעה כפונקציה של ריכוז החומצה האמינית.



8. קווי המגמה ליניאריים ועוברים דרך ראשית הצירים.

9. משוואות קו המגמה :

א. טירוזין בסביבה חומצית - $y = 1424.7x + 0.0036$

ב. טירוזין בסביבה בסיסית - $y = 2328.4x + 0.001$

10. מקדמי הקורולציה מוצגים בגרפים.

11. קבוע הבליעה המולרי הוא שיפועי הגרפים, ניתן להציג בצורה מתמטית ממשוואות הגרפים, אך הדרך הטובה יותר היא להפעיל בגיליון האלקטרוני את פונקציה ה-LINEST שנותנת את השיפוע המדויק ואת שגיאת המדידה וכן את נקודת החיתוך עם הציר האנכי.

12. להלן חישובי מקדמי הבליעה מהגרפים :

LINEST עבור סביבה חומצית :

חישוב שגיאה עבור טירוזין בסביבה חומצית	
O.D.+ΔO.D.	$\varepsilon+\Delta\varepsilon$
0.003595238	1424.749714
0.003203502	19.17244495

LINEST עבור סביבה בסיסית :

חישוב שגיאה עבור טירוזין בסביבה בסיסית	
O.D.+ΔO.D.	$\varepsilon+\Delta\varepsilon$
0.001	2328.42
0.0030341	18.15878706

תוצאות :

עבור סביבה חומצית :

$$\varepsilon_M = (1420 \pm 20)_{M^{-1} \cdot cm^{-1}}$$

עבור סביבה בסיסית :

$$\varepsilon_M = (2330 \pm 18)_{M^{-1} \cdot cm^{-1}}$$

6.2 דיון

1. מבחנות הביקורת משמשות לצורך כיוול הספקטרופוטומטר בצורה שהוא ייחשב את אחוז בלעיה של החלבון בלבד ללא התמיסה בה הוא נמצא. קובעים את בליעת האפס באורך גל הרצוי ע"פ התמיסה (ללא החלבון) והתוצאה שאנו רואים על המכשיר היא כבר לאחר החסרת הבליעה של התמיסה. (2+3) תכולת המבחנות

- משמשות לכיוול הספקטרופוטומטר
- 2 מבחנת ביקורת: $H_2O + HCl$
 - 3 מבחנת ביקורת: $H_2O + NaOH$
 - 4 טירוזין, $pH < 7$
 - 5 טירוזין, $pH > 7$
 - 6 טריפטופן, $pH < 7$
 - 7 טריפטופן, $pH > 7$

2. שינוי בתנאים הסביבתיים משפיע על אורך הגל המקסימאלי , אך מידת השפעת תנאי הסביבה תלויה בסוג החומר הנבדק, מידת הפעילות האופטית שלו וכמובן בריכוזו, אנו רואים כי בחומצת טירוזין, בגלל שיש לה קבוצה צדדית אמינית שמושפעת בתנאים בסיסיים, טריפטופן היא ניטרלית ואינה מושפעת משינוי pH .
3. השינוי בתנאים הסביבתיים משפיע על ערכי ε_M , ניתן לראות כי בריכוזים שונים ערכו של ε_M משתנה מכיוון שהוא תלוי בריכוז החומר הנבדק.
4. ה-pH אינו משפיע על ליניאריות הגרף , ראינו כי גרף הבליעה של טירוזין בסביבה חומצית ובסיסית נותר ליניארי , אך ה-pH משפיע על ערכו של מקדם הבליעה המולרי, וניתן לראות זאת בחישובינו.
5. השוואת ערכי קבוע הבליעה המולרי בשני הניסויים לקבוע הבליעה המולרי מהספרות :

השוואת ערכי קבוע בחלק א'

טירוזין בסביבה חומצית :

ערך המקדם שחושב :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(max)}}{C \times \ell} = \frac{0.355}{2.75 \cdot 10^{-4} M \cdot 1_{cm}} = 1290_{cm^{-1} M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $1398_{cm^{-1} M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|1398 - 1290|}{1398} \cdot 100 \cong 7.72\%$$

טירוזין בסביבה בסיסית :

ערך המקדם שחושב :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.652}{2.76 \cdot 10^{-4} M \cdot 1_{cm}} \cong 2370_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $1405_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|2370 - 1405|}{1405} \cdot 100 \cong 68.7\%$$

טריפטופן בסביבה חומצית :

ערך המקדם שחושב :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.243}{4.9 \cdot 10^{-5} M \cdot 1_{cm}} = 4957.2_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $5561_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|5561 - 4957|}{5561} \cdot 100 \cong 10.9\%$$

טריפטופן בסביבה בסיסית :

ערך המקדם שחושב :

$$\varepsilon_M = \frac{A_{(\max)}}{C \times \ell} = \frac{0.324}{4.9 \cdot 10^{-5} M \cdot 1_{cm}} = 6609.49_{cm^{-1}M^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $5562_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|5561 - 6609|}{5561} \cdot 100 \cong 18.8\%$$

ניתן לראות כי בסביבה בסיסית, שמשווים את ערך הקבוע של טירוזין לערך שקיבלנו מתקבלת סטייה גדולה, זה אינו מפתיע, כי הטירוזין מושפעת מתנאי pH בסיסיים.

השוואת ערכי קבוע בחלק ב'החומצה שנבדקה : טירוזין

עבור סביבה חומצית :

$$\varepsilon_M = (1420 \pm 20)_{M^{-1} \cdot cm^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $1398_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|1405 - 1420|}{1405} \cdot 100 \cong 1.06\%$$

עבור סביבה בסיסית :

$$\varepsilon_M = (2330 \pm 18)_{M^{-1} \cdot cm^{-1}}$$

ערך לפי הספרות : $1405_{cm^{-1}M^{-1}}$

נחשב סטייה יחסית :

$$\delta_{\varepsilon_M} = \frac{|2330 - 1405|}{1405} \cdot 100 \cong 65.8\%$$

שוב גם כאן סטייה גדולה בגלל השפעת הסביבה הבסיסית על טירוזין

הערה :

ערכי המקדם נלקחו מאתר האינטרנט של מכון הרפואה בלייזר באורגון :

<http://omlc.ogi.edu/>

מסקנות :

1. מטרות הניסוי הושגו
 - א. הכרנו והתנסינו בשיטה ספקטרופוטומטרית לזיהוי ח. אמיניות.
 - ב. התקבל ספקטרום בליעה ונקבע אורך הגל מקסימאלי של טירוזין וטריפטופן בתנאים חומציים ובסיסיים בריכוזים שונים.
2. אימות חוק בר למבר.
 - א. קביעת קבוע בליעה מולרי- ε_M של טירוזין וטריפטופן.
 - ב. אישור נוסחת בר-למבר לנוכח צורת הגרפים וחישובי הסטיות היחסיות.
3. בכל שלב במהלך הניסוי נתנו את הדעת לשאלות שהועלו בחוברת ודננו בהן.
4. נוסף כי הסיבות לשגיאות שקיבלנו יכולות לנבוע ממספר גורמים כאשר הגורם העיקרי הוא אי דיוק בריכוזים.

קיוכיאיה - מצבקה

מיצוי

ואנליזה של

אינפורמציה

מתאמון ביצרה

דו"ח מצבקה



ביוכימיה - מעבדה מס' 3 מיצוי ואנליזה של ליפידים מחלמון הביצה

מטרות הניסוי :

1. מיצוי ליפידים מחלמון ביצה בעזרת FOLCH.
2. קביעת ריכוז כולסטרול בשיטת ILC, ובניית עקומת כיוול.
3. קביעת רמת כלל הליפידים בחלמון ביצה תוך שימוש בונילן סולפטופוספט בשיטה ספקטרוטומטרית.
4. הפרדה וזיהוי מרכיבים של תערובת הליפידים ב-TLC.

ריכוז התוצאות

משקל החלמון – 19.62 ג'
משקל דגימת החלמון שנלקחה להמגון : 2.035 ג'
נפח התמיסה התחתונה (הכלורופורמית) עליה בוצעו הבדיקות הספקטרוסקופיות 9 מ"ל

טבלה מס' 1 :

קביעת ריכוז כולסטרול בחלמון ביצה בשיטת ILC בעזרת עקומת כיוול של כולסטרול

O.D. ממוצע	O.D. $\lambda=623_{nm}$	ריכוז כולסטרול במבחנה (mg/ml)	תכולת המבחנה אפיון	מספר מבחנה
0	0	0	בקורת	1'
	0	0	בקורת	1'
0.042	0.031	0.09	עקומת כיוול	2'
	0.056	0.09	עקומת כיוול	2'
	0.038	0.09	עקומת כיוול	2'
0.143	0.148	0.45	עקומת כיוול	3'
	0.140	0.45	עקומת כיוול	3'
	0.141	0.45	עקומת כיוול	3'
0.343	0.332	0.90	עקומת כיוול	4'
	0.347	0.90	עקומת כיוול	4'
	0.350	0.90	עקומת כיוול	4'
0.474	0.474	1.35	עקומת כיוול	5'
	0.450	1.35	עקומת כיוול	5'
	0.499	1.35	עקומת כיוול	5'
0.655	0.688	1.80	עקומת כיוול	6'
	0.651	1.80	עקומת כיוול	6'
	0.625	1.80	עקומת כיוול	6'
0.541	0.534		מיצוי ליפידים	18
	0.548		מיצוי ליפידים	19

הערה : חישוב ריכוז הכולסטרול יוצג בהמשך.

קביעת ריכוז כלל ליפידים בחלמון ביצה תוך שימוש בונילן סולפוטופוספט בשיטה ספקטרופוטומטרית

טבלה מס' 2 :

תוצאות של קביעת ריכוז כלל ליפידים בחלמון הביצה

ריכוז כלל ליפידים (mg / ml)	O.D. ממוצע	O.D. (520 nm)	מס' מבחנה
	1.289	1.209	1
		1.370	2
12	0.850	0.861	3
		0.840	4
0	0.0015	0.003	5
		0	6

הערה : חישוב ריכוז כלל ליפידים יוצג בהמשך

הפרדת כלל ליפידים בחלמון הביצה ע"י כרומטוגרפיה ברובד דק (TLC)

טבלה מס' 3 :

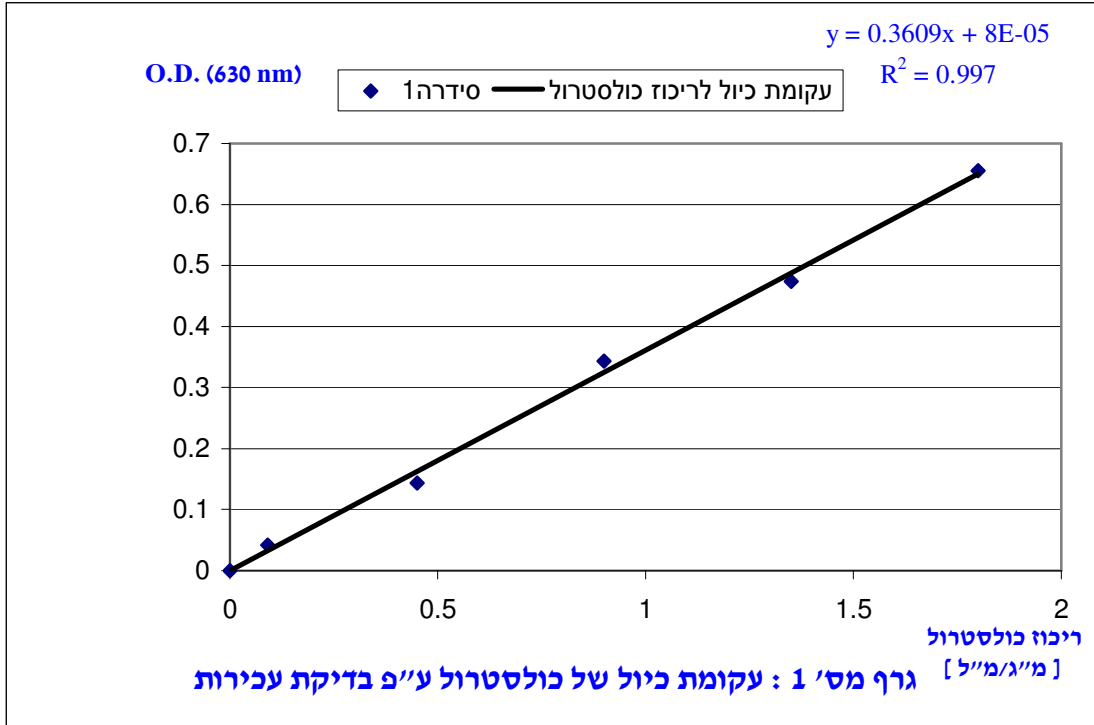
הפרדת הליפידים הידועים בניסוי

Rf	B (ס"מ)	A (ס"מ)	מס' נקודה על הפלטה	מס' פלטה	שם הליפיד
0.95	4	3.8	1	1	כולסטרול מאוסטר
0.125	4	0.5	2	1	כולסטרול חופשי
0.05	4	0.2	3	1	לציטין
0.8	5.5	4.4	5	2	ח.אולאית
0.9	5.5	5	6	2	טריאולאין

עיבוד תוצאות

קביעת ריכוז כולסטרול בשיטת Ilc (שיטה ספקטרופוטומטרית).

להלן עקומת הכיול שהתקבלה :



חישוב ריכוז כולסטרול מדגימת החלמון :

$$y = 0.3609x + 8 \cdot 10^{-5}$$

נוסחת הקו הליניארי המתקבל מהגרף היא :

כלומר הנוסחה למציאת ריכוז החלבון היא :

$$[\text{cholesterol}] = x = \frac{y - 8 \cdot 10^{-5}}{0.3609}$$

נמצא כעת את ריכוז הכולסטרול בדגימה מתוך O.D. ממוצע של מבחנות 18+19 :

$$O.D. = 0.541$$

$$[\text{cholesterol}] = x = \frac{y - 8 \cdot 10^{-5}}{0.3609} = \frac{0.541 - 8 \cdot 10^{-5}}{0.3609} = 1.76 \text{ mg/ml}$$

חישוב נפח חלמון הביצה , כאשר נפח דגימת החלמון היא 9 מ"ל :

$$m_1 = 2.035 \text{ g} \Rightarrow V_1 = 9 \text{ ml}$$

$$m_2 = 19.62 \text{ g} \Rightarrow V_2 = x$$

$$V_2 = \frac{19.62 \text{ g} \cdot 9 \text{ ml}}{2.035 \text{ g}} = 86.77 \text{ ml}$$

חישוב ריכוז כולסטרול מתוך כלל החלמון :

$$Q_{collestrol} = C \cdot V$$

$$Q_{collestrol} = 1.76 \frac{mg}{ml} \times 86.77 ml = 152.71 mg$$

$$Q_{collestrol} \cong 0.15 g$$

הערך הספרותי של כמות כולסטרול בדם היא 200 מ"ג למ"ל, נחשב סטייה בין הערך המחושב מהחלמון לערך הידוע בדם :

$$\delta_Q = \frac{|Q_{known} - Q|}{Q_{known}} \cdot 100 = \frac{|200 - 152.71|}{200} \cdot 100 \cong 23\%$$

חישוב שגיאה :

$$\eta_Q = \frac{152.71}{200} \cdot 100 = 76.35\%$$

הערה : רמת הכולסטרול בדם היא 200 מ"ג **לדציליטר** ולא למיליליטר, כך שהשוואה שלנו לא נכונה ויש לתקן את הנתון **בחוברת המעבדה**.
אך למען הסדר הטוב של הנחיות תדריך המעבדה, ההשוואה בוצעה כנדרש.

קביעת ריכוז כלל ליפידים בחלמון ביצה תוך שימוש בונילין סולפוטופוספט בשיטה ספקטרופוטומטרית

חישוב ריכוז כלל ליפידים עבור מיצוי ליפידים :

$$[collestrol] = \frac{O.D._{sample}}{O.D._{standard}} [trioleine] = \frac{1.289}{0.850} \cdot 12 mg \cong 18.2 \frac{mg_{triolein}}{ml}$$

חישוב ריכוז כלל הליפידים בחלמון הביצה :

$$m_1 = 2.035 g \Rightarrow C_1 = 18.2 \frac{mg}{ml}$$

$$m_2 = 19.62 g \Rightarrow C_2 = x$$

$$C_2 = \frac{19.62 g \cdot 18.2 \frac{mg}{ml}}{2.035 g} \cong 175.5 \frac{mg}{ml}$$

כמות כלל הליפידים בחלמון :

$$Q_{lipids} = C \cdot V = 175.5 \frac{mg}{ml} \cdot 86.77 ml \cong 15.5 g$$

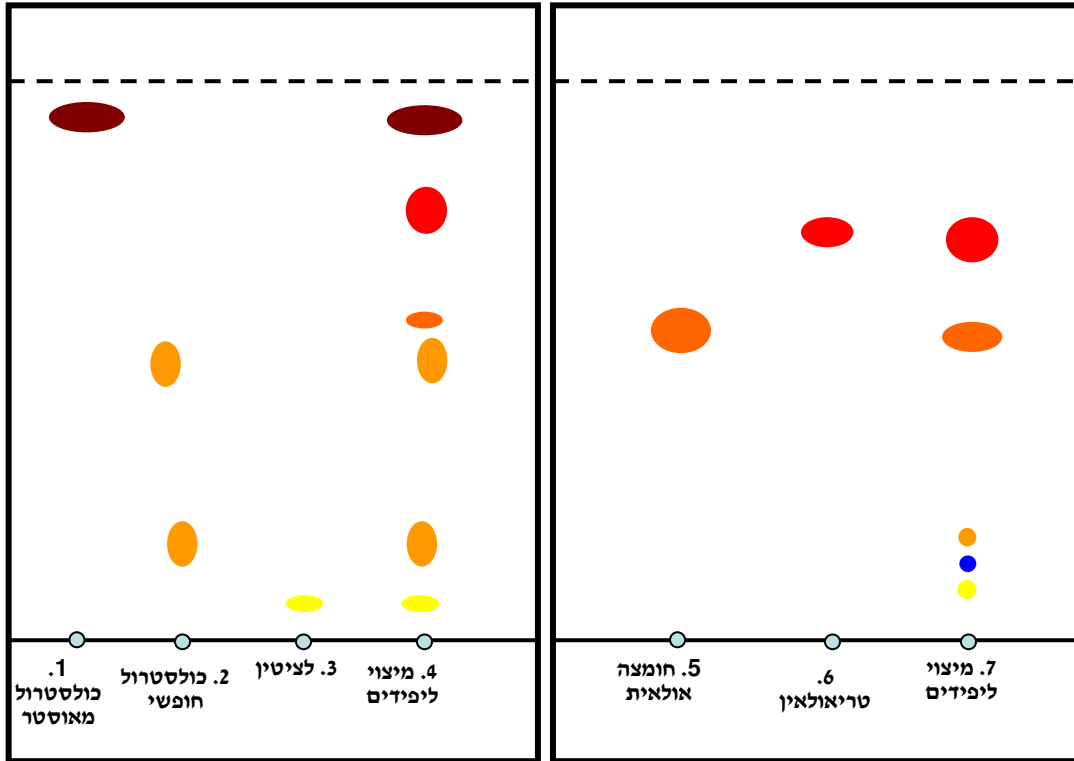
טבלה מס' 4 : ריכוז תוצאות

חלמון	מיצוי	פרמטר מחושב
1.76	1.76	ריכוז כולסטרול [mg/ml]
0.152		כמות כולסטרול [g]
175.5	18.2	ריכוז כלל ליפידים [mg/ml]
15.5		כמות כלל ליפידים [g]

הפרדת ליפידים של חלמון ביצה ע"י כרומטוגרפיה ברובד זק (TLC)

.1

להלן הכרומטוגרמות שנתקבלו :



מקרא :

כולסטרול מאוסטר טריאולאין חומצה אולאית
 כולסטרול חופשי חומר לא ידוע לציטין

.2 דוגמא לחישוב ה- R_f עבור כולסטרול מאוסטר :

$$R_f = \frac{\text{מרחק עד לנק' נמדדת (ס"מ)}}{\text{אורך המריץ מנקודת התחלה (ס"מ)}}$$

$$R_f = \frac{3.8}{4} = 0.95$$

.3 טבלה מס. 5 :

תוצאות הפרדת מיצוי חלמון הביצה

Rf	B (ס"מ)	A (ס"מ)	שם - הליפיד
0.95	4	3.8	כולסטרול מאוסטר
0.125	4	0.5	כולסטרול חופשי
0.05	4	0.2	לציטין
0.8	5.5	4.4	ח.אולאית
0.9	5.5	5	טריאולאין

4. שיטת TLC מאפשרת הפרדה של חומרים בשני ממיסים בו זמנית אחד בעל אופי פולארי והשני א-פולארי, במקרה שלנו השתמשנו במריץ המורכב מממס פולארי ו-א-פולארי בשיווי משקל. ולכן נצפה למצוא את החומרים הידרופוביים יותר קרוב לקו הסיום שכן הם "רצים" עם הממס הא-פולארי עד הסוף ואילו את החומרים הידרופיליים מתמוססים במריץ הפולארי קרוב לנק' ההתחלה. יש לציין, כי ביצענו הרצה נוספת מכיוון בהרצה הראשונה של דגימת החלמון לא קיבלנו הפרדה טובה.

נתייחס לחומרים שהתמוססו בסדר עולה ע"פ מרחקם מנק' ההתחלה ונסביר את הסיבה לסדר הנ"ל:
א. **לציטין**- הינו פוספו-ליפיד בעל אופי אמפיפטי המכילה חלק לפידי שמחובר לחומצה זרחתית, מה שמקנה לו את אופיו ההידרופילי.

ב. **כולסטרול חופשי**- מולקולה גדולה הבנויה ממספר טבעות ושרשרת אליפטית. כמו כן בטבעת הראשונה על פחמן מס' 3 נמצאת קב' OH המקנה לו אפשרות ליצור קשר מימן עם המים ומכאן אופיו הפולארי.

ג. **אולאית**-חומצת שומן בעלת 18 פחמנים. לא מתמוססת טוב בסביבה מימית עקב שרשרת האליפטית הארוכה למרות קב' הקרבוקסיל בקצה ולכן היא יותר הידרופובית.

ד. **טריאולאין**- טריגליצריד הומוגני, הידרופובי, אינו מסיס כלל לכן מופיע אחרי ח. אולאית, אך קטן יותר מכולסטרול ולכן פחות הידרופובי ממנו ולראיה מופיע לפניו.

ה. **כולסטרול מאוסטר**- מולקולה גדולה בעלת מס' טבעות וללא שום אפשרות להתמוסס או ליצור קשרים מסוג כלשהו במים ולכן היא הידרופובית לחלוטין.

5. זיהוי הליפידים מסומן על הכרומטוגרמות.

דיון (בהתאם לשאלות בסוף התדריך)

1. תהליך מיצוי הליפידים טוב במידה מסוימת אך ניתן לשפרו ע"י את שלב הניסוי, ע"י הארכת זמן הצנטריפוגה או חזרה עליה לקבלת ניקיון מקסימאלי.

2. תהליך המיצוי כפי שבוצע, גורם לאחוז שגיאה גדול למדי מכמה סיבות:

- הפרדת הפאזות לאחר הסרכוז אינה מדויקת כלל, ניתן להשיג דיוק ע"י ביצוע הניסוי בנפחים גדולים יותר באם מתאפשר ולהשתמש במשפך מפריד או כלי מתאים בנפח קטן יותר במקום בפיפטה.

- ניתן להמתין זמן רב יותר בתהליך הסינון או לבצעו תוך שימוש במשפך ביכנר לנפחים קטנים מה שיאפשר לנו ניצולת מקסימאלית.

3. השימוש בטריפליקטים מאפשר לנו ביקורת על הניסוי ומקטין משמעותית את אחוז השגיאה.

4. אחוז השגיאה יכול להיות נמוך יותר באם הצעות הייעול שלנו כפי שצוינו בסעיפים בקודמים היו מתקבלות בנוסף לכך ייתכן כי מכיוון שמדובר בנפחים כה קטנים, היה אי דיוק בהרכבת מערכות החומרים הנדרשות, עובדה שהגדילה את השגיאה.

5. ניתן לראות היטב בכרומטוגרמות שקיבלנו כי יש קשר ישיר בין ההפרדה לבין אופי הליפידים במיצוי, הקשר מתבטא בתכונות הכימיות/פיסיקליות של הליפידים כגון:

פולאריות, מסיסות, מידת הידרופוביות, מסה מולקולארית, מטען, pH. התייחסנו לכל חומר שהופרד בנפרד תוך הסבר תכונותיו.

6. נערוך השוואה בין התוצאות עבור רמת הכולסטרול וכלל הליפידים בחלמון שקיבלנו למול ערכים מקובלים:

קביעת ריכוז כולסטרול בשיטת Ilc (שיטה ספקטרופוטומטרית) - השוואה

ע"פ התוצאות שלנו, קיבלנו עבור 19.62 ג' חלמון, 0.15 ג' כולסטרול, נחשב בהתאם עבור 100 ג' חלמון:

$$m_{\text{collestrol}} = 0.15_g \Rightarrow m_{\text{yolk}} = 19.62_g$$

$$m_{\text{collestrol}} = x \Rightarrow m_{\text{yolk}} = 100_g$$

$$m_{\text{collestrol}} = x \frac{0.15_g \cdot 100_g}{19.62_g} = 0.764_g$$

הריכוז בספרות 1.281 ג' כולסטרול ב-100 ג' חלמון, נחשב סטייה יחסית בין הערך ידוע לערך שקיבלנו :

$$\delta_{Q_{\text{collestrol}}} = \frac{|Q_{\text{known}} - Q|}{Q_{\text{known}}} \cdot 100 = \frac{|1.281 - 0.764|}{1.281} \cdot 100 \cong 40\%$$

נחשב שגיאה :

$$\eta_{Q_{\text{collestrol}}} = \frac{0.764}{1.281} \cdot 100 = 59.64\%$$

קביעת ריכוז כלל ליפידים בחלמון ביצה תוך שימוש בונילין סולפוטופוספט בשיטה ספקטרופוטומטרית

ע"פ התוצאות שלנו, קיבלנו עבור 19.62 ג' חלמון, 15.5 ג' ליפידים, נחשב בהתאם עבור 100 ג' חלמון :

$$m_{\text{lipids}} = 15.5_g \Rightarrow m_{\text{yolk}} = 19.62_g$$

$$m_{\text{lipids}} = x \Rightarrow m_{\text{yolk}} = 100_g$$

$$m_{\text{lipids}} = x \frac{15.5_g \cdot 100_g}{19.62_g} = 79_g$$

הריכוז בספרות 32 ג' ליפידים (שומן) ב-100 ג' חלמון, נחשב סטייה יחסית בין הערך ידוע לערך שקיבלנו :

$$\delta_Q(\text{lipids}) = \frac{|Q_{\text{known}} - Q|}{Q_{\text{known}}} \cdot 100 = \frac{|32 - 79|}{32} \cdot 100 \cong 147\%$$

נחשב שגיאה :

$$\eta_{Q_{\text{lipids}}} = \frac{79}{32} \cdot 100 = 246.87\%$$

לנוכח תנאי הניסוי אין זה מפתיע שקיבלנו סטיות מדידה יחסיות גדולות מאוד, ניתן לומר כי כל עוד הערכים שקיבלנו והערכים הידועים הם באותו סדר גודל, אנו מניחים כי הסטייה היא בגדר הנורמה.

הערה, נתונים עבור חלמון וכולסטרול נלקחו מכאן :

<http://he.wikipedia.org/wiki/%D7%97%D7%9C%D7%9E%D7%95%D7%9F>

תיקון טעות בחוברת :

מראה מקום לערכי כולסטרול בדם ביחידות של מ"ג לדציליטר ולא מ"ג למ"ל כפי שרשום בחוברת :

<http://www.infomed.co.il/medTest4.asp?tID=4>

<http://www.ynet.co.il/articles/0,7340,L-2677482,00.html>

כלומר ערך כולסטרול ממוצע בדם ביחידות של מ"ג למ"ל הוא :

$$| \text{collestrol} | = \frac{200_{\text{mg}}}{1_{\text{dl}}} = \frac{200_{\text{mg}}}{100_{\text{ml}}} = \frac{2_{\text{mg}}}{1_{\text{ml}}} = 2_{\text{mg/ml}}$$

ביוכימיה – מעבדה

קביעת פיכוח
חלבון והשפעת
סורפטים שונים על
פחת החלבון
בשיטות שונות

ביוכימיה ניסויית – מעבדה מס' 2
קביעת ריכוז חלבון והשפעת גורמים שונים על רמת החלבון בשיטות השונות

מטרות הניסוי :

1. קביעת רגישות של השיטות השונות לקביעת ריכוז החלבון.
2. בדיקת השפעה של גורמים שונים על קביעת ריכוז החלבון בשיטות שונות.
3. לימוד שיטות קולורימטריות לקביעת ריכוז חלבון.
4. קביעת ריכוז של חלבון לא ידוע.

מהלך הניסוי

קביעת רגישות של השיטות השונות לקביעת ריכוז החלבון

טבלה מס' 1- מיהולים

ריכוז החלבון (מ"ג/מ"ל)	מיהול	מס' מבחנה
0	NaCl בלבד	.1
100	מקור החלבון	.2
10	1:10	.3
1	1:100	.4
0.1	1:1000	.5
0.01	1:10,000	.6

בחלקו הראשון של הניסוי בדקנו קביעת רגישות עבור השיטות :

1. בראדפורד
2. ספקטרומטרית

בחלק השני של הניסוי ביצענו עקומת כיוול , בדיקות ריכוז חלבון ובדיקות השפעות הפרעות על תוצאות ספקטרומטריות עבור השיטות :

1. LOWERY
2. ביורט

חלק א'

טבלה מס' 2- קביעת ריכוז חלבון בשיטות השונות

גודל הבליעה לפי סוגי השיטות				ריכוז חלבון במבחנה מ"ג למ"ל	מס' מבחנה
O.D בשיטת לאורי	O.D בשיטת ביורט	בשיטת ברדפורד	280 nm		
0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1'
3	0.417	0.419	Max	100	2
3	0.484	0.455	Max	100	2'
2.471	0.048	0.344	0.457	10	3
2.64	0.048	0.361	0.509	10	3'
0.69	0.005	0.326	0.041	1	4
0.807	0.004	0.311	0.032	1	4'
0.133	0.001	0.202	0.003	0.1	5
0.136	0	0.196	0	0.1	5'
0.023	0.001	0.027	-0.07	0.01	6
0.23	0	0.036	0	0.01	6'

בעזרת סדרת המיהולים הנ"ל קבענו את הריכוז האידיאלי בעבור כל שיטה. ידוע כי טווח השגיאה המינימלי של הספקטרופוטומטר הוא בעבור צפיפות אופטית של בין 0.8_{nm} - 0.15_{nm} לכן בכל שיטה בחרנו את הריכוזים בהם התקבלה צפיפות בתחום הנ"ל ובו נערוך את המשך הניסוי.

כלומר ע"פ התוצאות שנתקבלו, נסכם ונגיד כי :

שיטה ספקטרוטרית יעילה עד ריכוזים של כ- $1_{mg/ml}$

שיטת ביורט יעילה עד ריכוזים של כ- $1_{mg/ml}$

שיטה LOWERY יעילה עד ריכוזים של כ- $0.1_{mg/ml}$

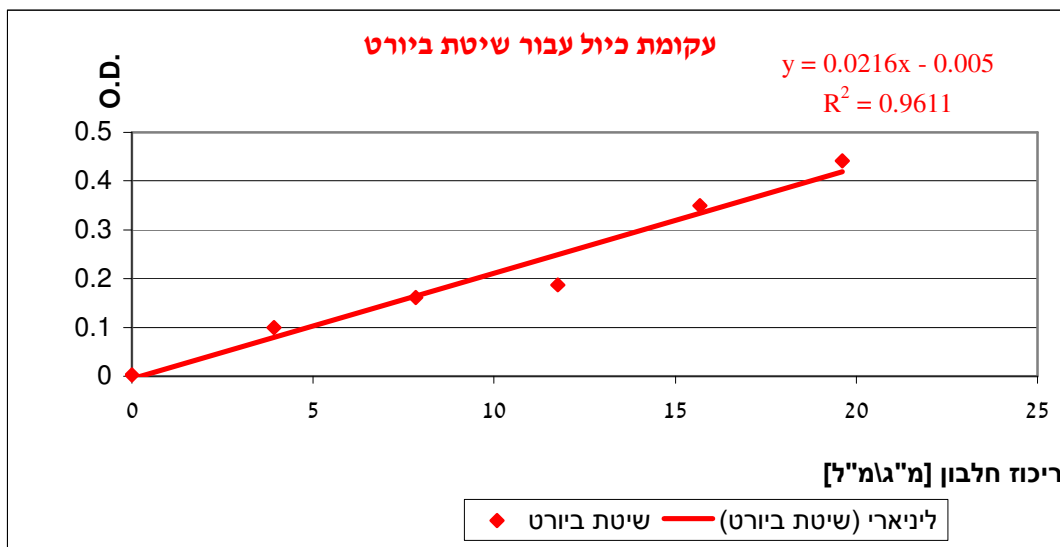
שיטה ברדפורד יעילה עד ריכוזים של כ- $0.01_{mg/ml}$

חלק ב' – קביעת ריכוז חלבון

טבלה מס' 4- מיהול ליצירת עקומת כיוול בשיטת ביורט

מספר מבחנה	תכולת מבחנה	ריכוז התחלתי של חלבון במבחנה מ"ג למ"ל	ריכוז סופי של חלבון במבחנה מ"ג למ"ל	OD 540nm	ערך בליעה ממוצע
1	ביקורת	0	0	0.000	
1'		0	0	0.005	0.0025
2	עקומת כיוול	20	3.92	0.107	
2'		20	3.92	0.093	0.100
3		40	7.84	0.167	
3'		40	7.84	0.155	0.161
4		60	11.76	0.238	
4'		60	11.76	0.136	0.137
5		80	15.69	0.351	
5'		80	15.69	0.349	0.350
6		100	19.61	0.433	
6'		100	19.61	0.448	0.4405

גרף מס' 1- עקומת כיוול של BSA בשיטת ביורט



אנו רואים שקו המגמה ליניארי, ככל שריכוז החלבון עולה, כך קריאת ה-OD עולה, דבר שתואם את הרקע התאורטי, שכן OD בודק צפיפות אופטית לפי כמות החלבון. אנו יכולים לראות שגרף הכיוול עובר דרך ראשית הצירים. קו מגמה של עקומת כיוול חייב לעבור דרך ראשית הצירים מפני שכאשר ריכוז החלבון הוא אפס, כך צריכה להיות קריאת ה-OD מכיוון שנמדדת צפיפות אופטית של החלבון.

טבלה מס' 4.1- השפעת חומרים שונים על ריכוז החלבון

מספר מבחנה	תכולת מבחנה	OD 540 nm	ריכוז סטנדרטי מ"ג/מ"ל	ריכוז חלבון לאחר הפרעה מ"ג/מ"ל	אחוז שגיאה בעקבות גורם משפיע
7	חלבון נעלם	0.005	0.4		
8	חלבון נעלם	0.002	0.4		
9	אמוניום סולפאט 1.5%	0.158	7.84	7.55	3.699
10	בופר טריס M1 PH 7.5	0.296		13.94	77.806
11	DTT 0.25M	0.635		29.63	277.934
12	טריטון 1% X-100	0.165		7.87	0.383
13	KCl	0.155		7.41	5.485
14	גליצין 1.5%	0.158		7.55	3.699
15	תמיסת DNA	0.191		9.07	15.689

חישוב ריכוז החלבון הנעלם:

צפיפות חלבון ממוצעת משני התוצאות שלנו היא 0.0035 nm ולאחר בדיקה בעקומת כיוול, כלומר הצבת ערך הבליעה במשוואת עקום הכיוול, הריכוז הוא 0.393 מ"ג/מ"ל.

החלבון הנבדק שונה מהחלבון לפיו ביצענו את עקומת הכיוול.

דוגמת חישוב ריכוז החלבון הנעלם מעקומת הכיוול:

חישוב הריכוז של החלבון הנעלם נבצע ע"פ משוואת הגרף שהתקבלה מעקומת הכיוול :

$$y = 0.0216x - 0.005 \Rightarrow y = \text{O.D.} = 0.0035 \Rightarrow$$

$$x = \frac{0.005 + 0.0035}{2.16} \cong 0.00393 \text{ mg/ml}$$

ריכוז החלבון הנתון הוא 0.4 מ"ג למ"ל !

נחשב ריכוז חלבון צפוי :

$$\frac{0.4 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot 0.1 \text{ ml}}{0.1 \text{ ml} + 5 \text{ ml}} \cong 0.0784 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

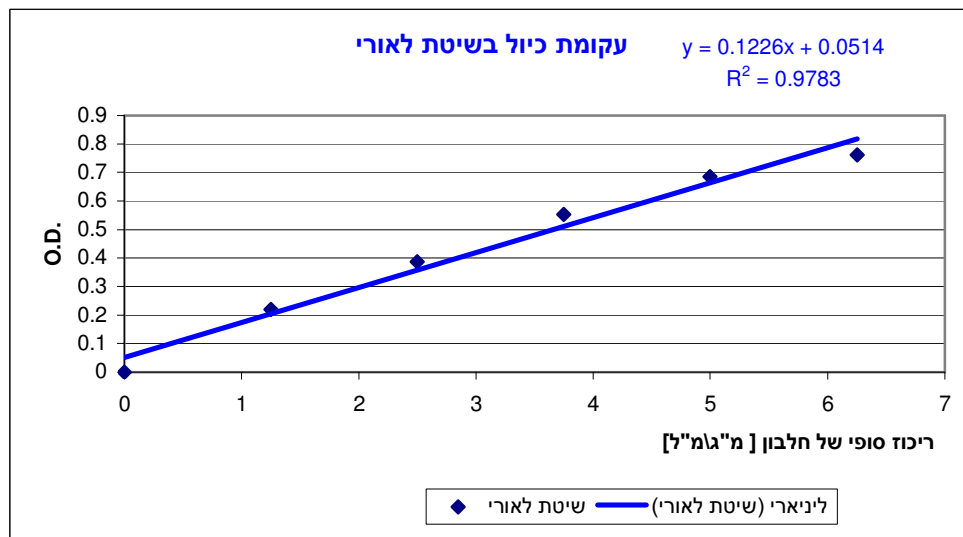
נחשב סטייה :

$$\delta_c = \frac{\left| 0.00784 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} - 0.00393 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right|}{0.00784 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} \cdot 100 = 49\%$$

טבלה מס' 5 - מיהול ליצירת עקומת כיול בשיטת לאורי

ערך ממוצע	OD 750 nm	ריכוז סופי של חלבון למבחנה מ"ג למ"ל	נפח של תמיסה פיסיולוגית	נפח של חלבון למבחנה	ריכוז של חלבון התחלתי מ"ג למ"ל	תכולת מבחנה	מספר מבחנה
	0	0	0.25	0	100.0	ביקורת	1
0.0000	0	0	0.25	0		ביקורת	1'
	0.209	1.33	0.2	0.05		עקומת כיול	2
0.2205	0.232	1.33	0.2	0.05		עקומת כיול	2'
	0.422	2.67	0.15	0.1		עקומת כיול	3
0.388	0.354	2.67	0.15	0.1		עקומת כיול	3'
	0.561	4.00	0.1	0.15		עקומת כיול	4
0.552	0.543	4.00	0.1	0.15		עקומת כיול	4'
	0.7	5.33	0.05	0.2		עקומת כיול	5
0.685	0.67	5.33	0.05	0.2		עקומת כיול	5'
	0.711	6.67	0	0.25		עקומת כיול	6
0.761	0.811	6.67	0	0.25		עקומת כיול	6'

גרף מס' 2 - עקומת כיול של BSA בשיטת לאורי



אנו רואים שקו המגמה ליניארי, ככל שריכוז החלבון עולה, כך קריאת ה-OD עולה, דבר שתואם את הרקע התאורטי, שכן OD בודק צפיפות אופטית לפי כמות החלבון. אנו יכולים לראות שגרף הכיול עובר דרך ראשית הצירים. קו מגמה של עקומת כיול חייב לעבור דרך ראשית הצירים מפני שכאשר ריכוז החלבון הוא אפס, כך צריכה להיות קריאת ה-OD מכיוון שנמדדת צפיפות אופטית של החלבון.

טבלה מס' 5.1- השפעת חומרים שונים על ריכוז החלבון

מספר מבחנה	תכולת מבחנה	OD 750 nm	ריכוז סטנדרטי מ"ג/מ"ל	ריכוז לאחר הפרעה/מיהול מ"ג/מ"ל	חישוב שגיאה באחוזים
7	חלבון נעלם	0.372	0.02667	0.0262	1.94
8	חלבון נעלם	0.368	0.02667	0.0258	3.16
9	אמוניום סולפאט 1.5%	0.386	2.66667	2.73	2.35
10	בופר טריס PH 7.5 1M	0.366	2.66667	2.57	3.77
11	DTT 0.25M	3.000	2.66667	24.05	801.90
12	טריטון X-100 1%	0.678	2.66667	5.11	91.66
13	KCl	-0.032	2.66667	-0.68	125.51
14	גליצין 1.5%	0.404	2.66667	2.88	7.85
15	תמיסת DNA	0.416	2.66667	2.97	11.52

חישוב לדוגמא של ריכוז החלבון הנעלם:

בליעת החלבון הנעלם הממוצעת הינה 0.370 nm ולאחר בדיקה בעקומת כיוול, כלומר הצבת ערך הבליעה בנשוואת עקום הכיוול, הריכוז הוא 0.026 מ"ג/מ"ל בממוצע . ניתן לראות כי ריכוז החלבון נמצא בטווח אופטימלי של הספקטרופוטומטר, כלומר השיטה רגישה במידה מספקת לקביעת ריכוזו של החלבון הנעלם.

דוגמת חישוב ריכוז החלבון הנעלם מעקומת הכיוול:

חישוב הריכוז של החלבון הנעלם נבצע ע"פ משוואת הגרף שהתקבלה מעקומת הכיוול : חישוב של ריכוז צפוי של חלבון נעלם :

$$\frac{0.4 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \cdot 0.25 \text{ ml}}{0.25 \text{ ml} + 3.5 \text{ ml}} \cong 0.026 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

ניתן לראות כי יש **חפיפה** בין התוצאות .

טבלה מס' 6.2 : אחוזי שגיאה בשתי השיטות – חישובי השגיאות בוצעו ע"י הגיליון האלקטרוני **כבר בטבלת הנתונים עצמה** !!!

$$\frac{|C_{\text{measured}} - C_{\text{resulted}}|}{C_{\text{measured}}} \cdot 100\%$$

חישובי השגיאה נעשים כך :

דיון ומסקנות

- במהלך הניסוי התייחסנו לנקודות הקשורות לאותה פעולה ספציפית וכעת נסכם אנו רואים שבעבור אותו החלבון הנעלם קיבלנו ריכוזים שונים בשתי שיטות שונות. כפי שכבר ציינו קודם שיטת ביורט אינה רגישה מספיק ולכן הריכוז שקיבלנו אינו מדוייק , לעומת שיטת לאורי שהערך התקבל בטווח האידיאלי של הספקטרופוטומטר.
- חישוב אחוז שגיאה בין 2 השיטות:

חושב בעיבוד הנתונים !!!

ניתן לראות כי קיימת חפיפה כמעט מושלמת בשיטת לאורי בין הערך הצפוי לערך שהתקבל בעוד שבשיטת ביורט קיבלנו שגיאה של כ-50% .

מה שמלמד אותנו כי שיטת לאורי אכן יותר מדויקת משיטת ביורט, ומתאימה לריכוז החלבון הנמדד.

דיון בהשפעת חומרים שונים על ריכוז החלבון

- **אמוניום סולפאט** - לא נצפה לעלייה בצפיפות האופטית בצורה משמעותית שכן החומר לא גורם לפרוק קשרים בחלבון, במידה והצפיפות בכל זאת הציפות עלתה זה יכול לנבוע מאי דיוק במיהולים.
- **בופר TRIS** – ניתן להבחין כי 2 השיטות מושפעות מהבופר המשנה את עקומת הבליעה.
- **DTT** - חומר המפרק קשרי S-S מה שגורם לעלייה בעוצמת הבליעה במידה ובחלבון ישנן חומצות אמינו המקושרות בקשרים אלו.
- **טריטון** - מפרק את החלבון בתמיסה ע"י פרוק חומצות שומן וגורם לעלייה בעוצמת הבליעה (ניתן לראות בבירור בשיטת לאורי).
- **KCl** - מלח אשר מתפרק ליונים בתמיסה ניתן לראות השפעה, כיוון ששיטת לאורי פועלת על ריכוזים קטנים משיטת ביורט, ניתן לראות השפעה רבה יותר עליה מצד מלח זה.
- **גליצין** - השפעת הגליצין זניחה בשיטות לאורי וביורט.
- **תמיסת DNA** - מכיל חומצות גרעין הבולעות אור בתחום הנראה 260 nm לכן יש להשתמש בפקטור תיקון: $\text{Protein concentration (mg/ml)} = 1/55 A_{280} - 0.76 A_{260}$, אך בשיטות שאנו בדקנו אין לה השפעה רבה והשגיאות קטנות יחסית בהתאם.

סיכום

1. למדנו להכיר שיטות שונות לזיהוי ריכוזי חלבון בתמיסה.
2. למדנו לקבוע ריכוז לא ידוע של חלבון.
3. למדנו להתאים ריכוזי חלבון עבור רגישות של כל שיטה ושיטה.
4. למדנו על השפעות מעכבים וחומרים שונים על נכונות הבדיקה.
5. יש לציין כי בחלק ב' שיטת לאורי לא הצליחה לנו, ככל הנראה בגלל טעות במיהול, אך ע"פ הנחיית המרצה, לקחנו תוצאות מקבוצה אחרת ופעלנו לפיהן.

הצעות ייעול :

כדי לקבל תוצאות מדויקות יותר יש לקחת יותר נקודות ביקורת עבור גרף הכיול, ניתן לעשות זאת ע"י מיהול סידרה של 12 מבחנות שונות ולא 6 זוגות של מבחנות, במצב זה נקבל תמונה יותר רחבה של התנהגות החלבון, ניתן לעשות זאת ע"י מיהול חצי עשרוני.