5

الفصـــل الخامس

البروتينـــــــات

Proeteins

obeikandl.com

obeikandl.com

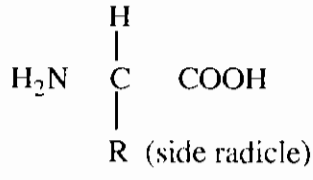
الفصـــل الخامس

البروتينـــــــات

Proeteins

توصف المواد البروتينية بأنها مركبات "بانية للأنسجة " ، ذلك لأنها تتواجد فى جميع الخلايا والأنسجة الجسمية ، حيث تلعب دورا أساسيا فى جميع النواحى التركيبية والوظيفية لها ، وتدخل عناصر الكربون والهيدروچين والأوكسچين والنتروچين بصفة أساسية فى تكوين المركبات البروتينية ، بالإضافة إلى عناصر أخرى فى بعض الأحيان ، مثل الكبريت والفوسفور واليود والحديد . وقد ساعدت الطرق العلمية التى استحدثت خلال الحرب العالمية الثانية وبعدها مثل " الإظهار اللونى Chromatography " ، والفصل الكهربى " Electrophoresis " ، و" الترشيح الجيلاتينى " Gel Filtration فى تفهم أكثر لطبيعة تركيب البروتينات والتى تتميز بتعقيد بالغ فى معظم الأحيان .

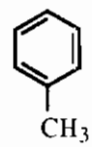
تتكون البروتينات من وحدات بنائية هى " الأحماض الأمينية Amino Acids " وهى أحماض عضوية تتصل فيها ذرة كربون ألفا (المجاورة لمجموعة الكربوكسيل (-COOH) بمجموعة أمينية ($-NH_2$)، كما تتصل ذرة الكربون نفسها بشق جانبى (R) يختلف فى الطرز المختلفة من الأحماض الأمينية .

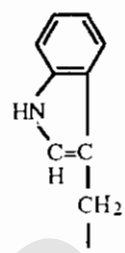


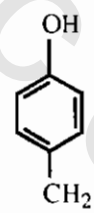
المعادلة العامة للأحماض الأمينية

جدول (١) يوضح تركيب الأحماض الأمينية

Amino acid	Symbol	Side chain
alanine	Ala	CH_3
arginine	Arg	H_2N–C(=$\overset{+}{N}H_2$)–NH–$(CH_2)_3$–
asparagine	Asn	$CONH_2$–CH_2–
aspartic acid	Asp	COO-–CH_2–
Cysteine	Cys	SH–CH2–
glutamic acid	Glu	COO-–$(CH_2)_2$–
glutamic	Gin	CONH2–(CH2)2–
glycin	Gly	H–
histidine	His	
isoleucine	Ile	CH_3 CH_2 CH_3 / CH–
leucine	Leu	CH_3 CH_3 / CH–CH_2–
lysine	Lys	$\overset{+}{N}H_3$–$(CH_2)_4$
methionine	Met	CH_3–S–$(CH_2)_2$
phenyl-alanine	Phe	
proline*	Pro	*
serine	Ser	OH–CH_2
threonine	Thr	OH–CH -- CH_3
tryptophan	Trp	
tyrosine	Tyr	
valine	Val	CH_3 CH_3 / CH







obeikandi.com

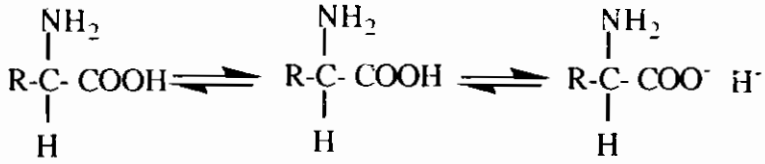
وتتكون البروتينات من سلسلة أو أكثر من الأحماض الأمينية ، مثال ذلك " هرمون الإنسولين " ، الذى توصل سانجر Sanger عام ١٩٦٤ إلى معرفة ترتيب الأحماض الأمينية داخله ، حيث وجد أن الجزىء يتركب من ٥١ حمضا أمينيا مرتبة فى سلسلتين تربط بينهما قناطر ثنائية الكبريتيد .

ويعرف فى الطبيعة عشرون من الأحماض الأمينية التى تدخل فى تركيب البروتينات (انظر الجدول رقم ١) ، فضلا عن أكثر من ثمانية من الأحماض الأمينية غير داخلة فى بناء البروتينات مثل حامض جاما أمينو بيوتريك والسترولين والأورنيثين .

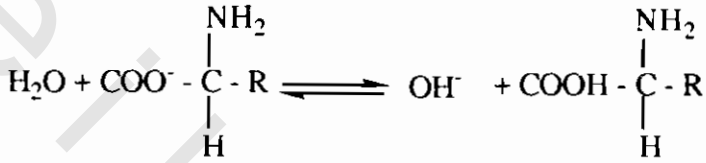
وباستعراض الأحماض الأمينية المختلفة نجد أن بعضها يحتوى على شق جانبى أليفاتى Aliphatic side chain مثل جليسين - الانين - فالين - ليوسين - أيزوليوسين ، كما يحتوى كل من : أرجنين - ليسين على مجموعتى أمين Diamino "، وعلى ذلك فهما قاعديان بينما يحتوى كل من حمض جلوتاميك وحمض أسبارتك على مجموعتى كاربوكسيل ، وعلى ذلك فهما حامضيان . ويحتوى حمضا جلوتامين - أسباراجين على المجموعة الأميدية Amide Group وحمضا ثريونين وسيرين على مجموعة هيدروكسيل ، كما يحتوي حمضا سستايين ، مثيونين علي عنصر الكبريت . ويتميز كل من : فينيل الآنين - تيروسين باحتوائه علي مجموعة أروماتية Aromatic ، أما الأحماض الأمينية : تربتوفان - برولين - هستدسين فإنها تحتوى على حلقات غير البنزين Heterocyclic .

وحيث أن المجموعتين الحامضية (الكربوكسيلية) والمجموعة القاعدية (أمينو) تتواجدان فى نفس الوقت فى جميع الأحماض الأمينية (فيما عدا البرولين الذى يحتوى على المجموعة الأمينية NH بدلا من المجموعة الأمينية NH_2) فإن للحمض الأمينى شحنة موجبة وأخرى سالبة ، وعلى ذلك فإنها كثيرا ما توصف بأنها جزيئات مزدوجة التأين Amphoteric molecules .

وعلى ذلك فالحامض الأمينى يتصرف على أقل مزدوج التأين ، بمعنى أنه يتأين كحامض ، وأيضا يتأين كقاعدة كالاتى :

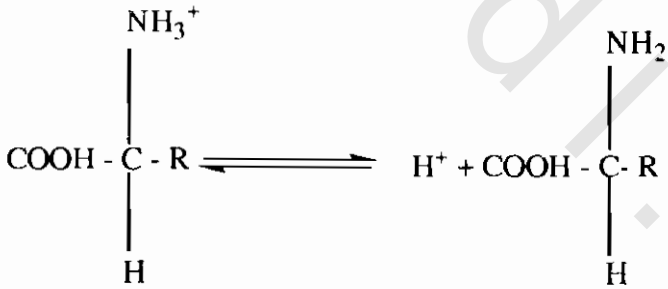


ففى المحاليل القلوية تتصرف كأحماض كالآتى :



وإذا مرر تيار كهربى خلال مثل هذا المحلول فإن أنيون الحامض الأمينى سيهاجر ناحية القطب الموجب Anode .

وعلى العكس من ذلك ، فإن الأحماض الأمينية تتصرف كقواعد فى المحاليل الحامضية كالآتى :



وإذا مرر تيار كهربى خلال المحلول فإن كاتيون الحامض الأمينى سيهاجر إلى القطب السالب Cathode .

وعلى ذلك ، فإن هجرة الأحماض الأمينية فى مجال كهربى يمكن التحكم فيها عن طريق التغيير فى درجة الحموضة أو القلوية لبيئة التفاعل . وتجدر الإشارة إلى أن لكل حامض

obeikandl.com

أمينى تركيزاً معيناً من أيون الهيدروجين . تكون عليه درجة تأين كل من المجاميع الحامضية والمجاميع القاعدية متساوية ، وتسمى بنقطة التعادل الكهربى ، عليه لا يهاجر الحامض الأمينى فى المجال الكهربى الى أى من الاتجاهين السالب أو الموجب .

الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات :

يمكن تقسيم الأحماض الأمينية المكونة للبروتين كما يلى :

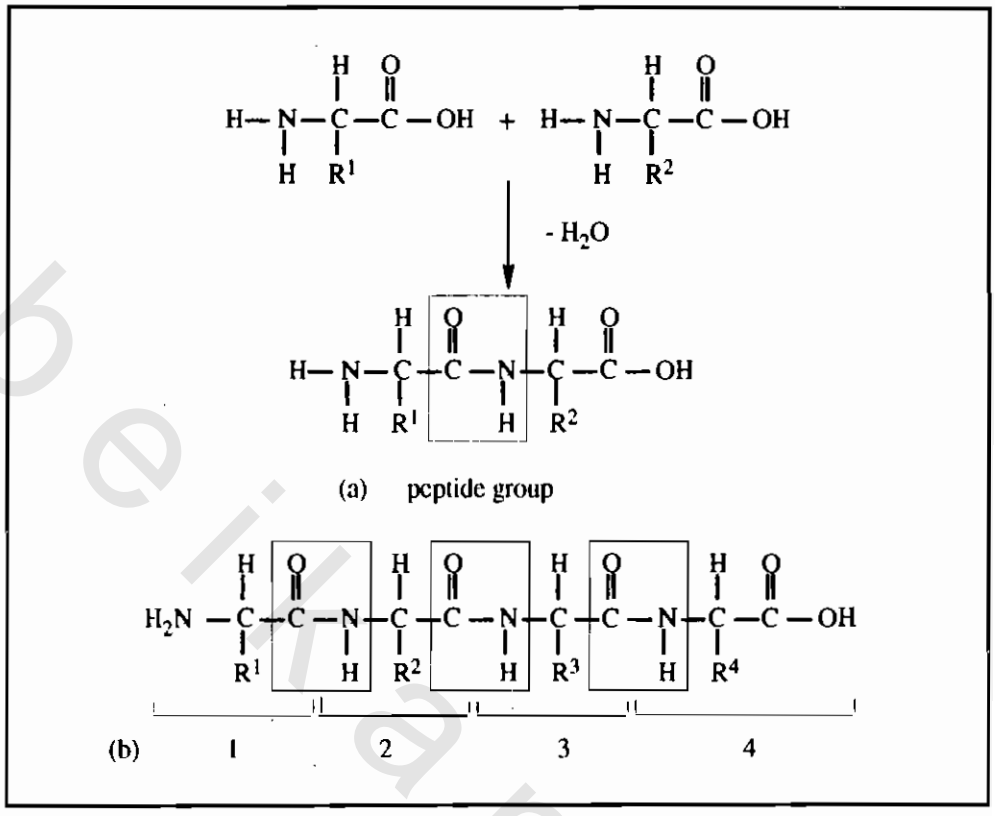
١- أحماض أمينية متعادلة ، أى تحتوى على عدد متساو من مجاميع الأمين ومجاميع الكربوكسيل ، ومن أمثلتها : جليسين - ألانين - فالين - ليوسين - أيزوليوسين - سستايين - مثيونين - سيرين - ثريونين -برولين - فينيل ألانين - تربتوفان - تيروسين - أسباراجين - جلوتامين .

٢- أحماض أمينية حامضية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة كربوكسيل ، ومن أمثلتها : حمض الأسبرتيك وحمض الجلوتاميك .

٣- أحماض أمينية قاعدية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة أمين مثل : ليسين - أرجنين - هستيدين .

ومن ناحية أخرى ، فإن كل الأحماض الأمينية تنوب فى الماء فيما عدا التيروسين الذى ينوب بقلة فى الماء الساخن . كما أن الأحماض الأمينية باستثناء البرولين تنوب فى الكحول والإثير . كما أنها لا تنوب جميعها فى محاليل الأحماض والقواعد القوية .

ويتم تكثف الأحماض الأمينية لتكوين جزىء البروتين عن طريق اتحاد المجموعة الحمضية لحمض أمينى مع المجموعة القاعدية للحمض الأمينى المجاور ، مع فقد جزىء من الماء ، وتسمى الرابطة بين - CO - NH - بالرابطة الببتيدية Peptide bond ، ويحتفظ الجزىء المتكون بخاصية التأين المزدوج ، حيث تتواجد مجموعة حامضية عند أحد طرفيه ، وتتواجد مجموعة قاعدية عند الطرف الآخر ، بالإضافة إلى وجود شق جانبى Radicle قد يكون قاعديا أو حامضيا . على ذلك فإن البروتين يعتبر مادة مجمعة أو " بوليمر Polymer " وحدته هى الحمض الأمينى .



تكوين ثنائى الببتيد وعديد الببتيد وخروج جزيئات الماء لتكوين الروابط الببتيدية

(جدول ٢) الوزن الجزيئى لبعض البروتينات :

البروتيـــن	الوزن الجزيئى
الانسولين	١٢,٠٠٠
تربسين	٢٣,٨٠٠
ببسين	٣٥,٥٠٠
البيومين المصل البقرى	٦٨,٠٠٠
الهيموجلوبين البشرى	٦٧,٠٠٠
جاما جلوبيولين البشرى	١٠٠,٠٠٠
ثيروجلوبيولين الخنزير	٦٥٠,٠٠٠
بيروفيت ديهيدروجينيز (كلية الأبقار)	٧,٠٠٠,٠٠٠
فيروس الطباق	٤٠,٠٠٠,٠٠٠

ويطلق على المركب المتكون من حمضين أمينيين اسم " ثنائى الببتيد Dipeptide ، كما أن المركب الناتج عن اتحاد عدد قليل من الأحماض الأمينية يوصف بأنه " قليل الببتيد Oligopeptide ، أما اذا اتحد عدد كبير من الأحماض الأمينية ، فان المركب الناتج يسمى "عديد الببتيد Polypeptide "

وتتكون المادة البروتينية من سلسسلة أو عدة سلاسل من عديد البيتيد ، وهناك عدة آلاف من الطرز المختلفة للبروتينات ، وهى تختلف فيما بينها من عدة وجوه ، منها العدد الكلى للأحماض الأمينية المشتركة فى تكوينها ، وطرز هذه الأحماض الأمينية ، وكذلك نظام ترتيبها فى جزىء البروتين ، كما ينفرد كل منها بتركيب "ثلاثى الأبعاد " Tridimentional structure " ولعل هذا التنوع العظيم للمواد البروتينية هو الذى يمكنها من القيام بآلاف العمليات الوظيفية المتباينة ، وتتميز معظم البروتينات بأنها ذات أوزان جزيئية كبيرة .

وفيما يلي موجز يوضح طرز البروتينات من الناحية الوظيفية :

١- تعتبر الإنزيمات موادا بروتينية ذات طبيعة خاصة تعمل كعوامل مساعدة فى التفاعلات الكيمائية التى تحدث داخل الجسم . فاذا أخذ فى الاعتبار آلاف التفاعلات الكيميائية التى تحدث فى جميع خلايا وسوائل الجسم وتراكيبه المختلفة لضمان الأداء الوظيفى لمختلف الأنشطة البيولوجية ، لأدركنا الأهمية القصوى لدور الإنزيمات . ويزيد عدد الإنزيمات المعروفة عن ألفى إنزيم . ومن أمثلة الإنزيمات "السيتوكرومات" Cytochromes التى تلعب دورا هاما فى نقل الالكترونات ، "ح د ن بوليميريز "DNA polymerase الذى يساعد فى عملية تضاعف وإصلاح حمض ح د ن ، هكسوكاينيز Hexokinase اللازم لفسفرة الجلوكوز .

٢- البروتينات التركيبية : The Structural Proteins

من أمثلة البروتينات التركيبية " ألفا كيراتين α – keratin " الذى يدخل فى تركيب الجلد وريش الطيور والأظافر والحوافر ، وكذلك الإلاستين "Elastin" والكولاچين " Collagen اللذان يدخلان فى تكوين الأنسجة الضامة ، وكذلك مادة " سكليروتين Sclerotin التى تدخل فى تكوين الهيكل الخارجى للحشرات ، ومادة فيبروين Fibroin التى تدخل فى تكوين شرانق الحشرات وغزل العناكب .

٣- البروتينات الواقية : Protective Proteins

توجدالبروتينات الواقية ذات الطبيعة البروتينية فى دم الفقاريات وذلك مثل الأجسام المضادة Antibodies التى تحمى الجسم من الجراثيم وإفرازاتها ، والفيبرينوجين Fibriongen وهو المادة الأولية للفيرين الذى يساعد على تجلط الدم عند النزف ، الثرومبين Thrombin اللازم لحدوث تجلط الدم أيضا .

٤- الهرمونات : The hormones

معظم الهرمونات بروتينية التركيب ، وتلعب الهرمونات دورا هاما فى تنظيم الكثير من العلميات البيولوجية ، ومن أمثلتها " الإنسولين " الذى تفرزه خلايا بيتا فى جزر لانجرهان فى البنكرياس الذى ينظم أيض السكر " وهرمون النمو " الذى تفرزه الغدة النخامية الذى ينظم نمو العظام .

٥- البروتينات الانقباضية : The Contractile Proteins

ومن أمثلها " الميوسين " و "الأكتين " Myosin and Actin والتى تكون الليفات العضلية ، وكذلك بروتين " داينين " الذى يدخل فى تركيب الأهداب والأسواط .

٦- برتينات النقل : Transport Proteins

وهى البروتينات الموكل إليها نقل بعض المركبات أو العناصر من مكان الى آخر فى الجسم وفقا لما يتطلبه النظام الفسيولوجى . ومن أمثلة ذلك " الهيموجلوبين " الذى يقوم بنقل الأكسجين فى دم الفقاريات ، و"الهيموسيانين " الذى يتولى عملية نقل الأكسجين فى بعض اللافقاريات ، الميوجلوبين " الذى يقوم بنقل الأكسجين فى الخلايا العضلية .

٧- السموم : The Toxins

تكون بعض الكائنات الحية مواد سامة ذات طبيعة بروتينية ، ومن أمثلة ذلك سموم الثعابين والسموم البكترية وسم " جوسيبين" Gossypin فى بذور القطن .

٨- البروتينات المختزنة : The Storage Proteins

قد يتم أحيانا تخزين المواد البروتينية ، مثال ذلك بروتين " البيومن (بياض) البيض Egg-white Protein "" كازين" اللبن Casein ، " الفريتين " Ferritin الذى يختزن من خلاله

الحديد فى الطحال ، " زين Zein " المختزن فى بذور نبات الذرة .

وتجدر الإشارة إلى أن عملية تخليق البروتينات تتحكم فيها الجينات الواقعة على حمض ح د ن DNA والتى يتم نسخها فى حمض ح ر ن الرسول Messenger-RNA على صورة شفرات معينة يتراوح عددها بين شفره واحدة إلى ست شفرات لكل حمض أمينى . ويتحكم حمض ح ر ن الرسول فى حجم البروتين المخلق ونوعية الأحماض الامينية الداخلة فى تكوينه وكذلك فى نظام ترتيبها . وقد وجد أن هذه الآلية لتخليق البروتينات آلية عامة ، بمعنى أنها واحدة فى كافة المخلوقات فيما عدا الڤيروسات التى لها آلية تختلف عن ذلك فى بعض التفصيلات ، ويتضح . مما سبق أن البروتينات هى المرآة التى يظهر فيها الدور الوظيفى للجينات ، ولاتقف أهمية البروتينات عند حدود وظائفها المباشرة ، بل تتعدى ذلك إلى التحكم فى تخليق ووظائف المكونات الأخرى للخلايا والأنسجة كالمواد الكربوهيدراتية والمواد الدهنية . ومن ناحية أخرى فقد وجد أن البروتينات المتناظرة فى أنواع الحيوانات المتقاربة تكون أكثر شبها لبعضها فى التركيب عن نظائرها فى الحيوانات المتباعدة تصنيفيا . ولهذا فإن تتابع الأحماض الأمينية فى جزىء البروتين له أهمية فى الدراسات التطورية والتصنيفية .

بنيان الجزيئات البروتينية :

تتباين طريقة بناء جزىء البروتين تباينا كبيرا ، ويؤثر نمط هذا البناء على الأداء الوظيفى للجزىء . وقد اوضحت الدراسات المتعددة على طريقة "انعطاف أو حيود أشعة X " X-ray diffraction بصورة أساسية أن هناك اربعة مستويات لبناء جزىء البروتين ، نوجزها فيما يلى :

أ- البناء الأولي : The Primary Structure

يقصد بذلك تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة الببتيديه التى تكون جزىء البروتين ، ويكون للسلسلة بذلك نهايتان ؛ الأولى تحمل مجموعة NH_2 حرة وتسمى " النهاية الأمينية Amino or N-terminal والثانية تحمل مجموعة COOH- حرة وتسمى النهاية الكربوكسيلية "Carboxyl or C- terminal "

ب – البناء الثانوي : The Secondary Structure

وهو نمط ثنى وامتداد السلسلة الببتيدية في اتجاه واحد ، ويؤدى هذا الثنى إلى قصرها إلى حد كبير ، ويمكن تمييز طرازين للبناء الثانوى :

١ – طراز الحلزون الفا The α - helix :

وفيه تلتف سلسلة عديد الببتيد فى مدار اهليلجى لتكون شكلاً اسطوانيًا ، ترتبط فيه كل مجموعة ببتدية برابطة هيدروجينية مع مجموعتين أخريين تسبقه إحداهما بثلاث وحدات ، والثانية تليها بثلاث وحدات اخرى . ويبلغ قطر المقطع الاهليلجى ٢٣ر٠ نانوميتر ، ويحتوى على ٦ر٣ حمض أمينى لكل لفة . وتمتد السلاسل الجانبية Radicles إلى الخارج من الشكل الاسطوانى حيث أنها لا تلعب دورا فى ثباته ، بينما يضمن هذا الثبات الروابط الهيدروجينية سالفة الذكر والواقعة بين الهيدروجين المرتبط مع النيتروجين فى حامض أمينى وبين الأكسجين المرتبط مع الكربون فى الحامض الأمينى الاخر . ويتميز البروتين المكون من السلاسل من طراز الحلزون الفا (هلكس) بأنه يكون جامدا Rigid وليفيا Fibrous . ويوجد هذا الطراز فى الفا كيراتين والميوسين وجزئيا فى الهيموجلوبين .

٢ – طراز بيتا B- Structure :

ويكون فيه الجزىء ممتدا تماما ويربط بين سلاسل الببتيد المتجاورة روابط هيدروجينية وقد يتكون البروتين من سلسلتين متوازيتين parallel عندما يبدأ طرفا N- terminal فى الجهة نفسها وينتهى طرفا الـ C-terminal معاً فى الجهة الأخرى . اما اذا كان الطرف N-terminal لسلسلة واقعا فى نفس جهة الطرف C-terminal للسلسلة الأخرى فان السلسلتين تكونان متعاكستى التوازى Antiparallel وكثيرا ما يتكون البروتين من عدد السلاسل متعاكسة التوازى تكون معا صفيحة Sheet ، وقد تتراص عدة طبقات فوق بعضها وترتبط معا بروابط كارهة للماء Hydrophobic ، ويطلق على التركيب عندئذ مايسمى " صفائح بيتا " B-sheets ويوجد هذا الطراز فى الياف الحرير وبيتا كيراتين الموجود فى الريش و الاظافر .

وتجدر الإشارة إلى قلة البروتينات ذات البناء الثانوى (فقط) وهى بروتينات تركيبية عموما ومن امثلتها الياف الكولاچين .

جـ - البناء الثلاثي : The Tertiary structure

يقصد بالبناء الثلاثى التركيب ثلاثى الأبعاد لجزىء البروتين . والمعروف ان لكثير من البروتينات تركيبًا عالى الاندماج Compact حيث تكون أشكالا كرية أو بيضاوية ويطلق البروتينات الكرية Globular Proteins . ويحتوى جزىء البروتين على مناطق طاوية للجزىء بطريقة غير منتظمة وذلك بصفة أساسية ، وهذه تتبادل مع مناطق قصيرة تحوى طراز حلزون الفا (هلكس) وطراز بيتا . وتوفر المناطق الطاوية ومناطق تراكيب بيتا المرونة للجزىء بينما تمثل المناطق الحاوية على تراكيب الفا هلكس الاجزاء الجامدة منه . ويربط اجزاء الجزىء بعضها ببعض روابط معينه (انظرالشكل ٤) :

* الروابط الأيونية Ionic bonds بين المجموعات متضادة الشحنة فى الاحماض الأمينيه المتقابلة مثل الليسين موجب الشحنة مع حمض الجلوتاميك سالب الشحنة .

$$- NH_3^+ \text{ ..... } {}^-OOC -$$

* الروابط الهيدروجينية Hydrogen bonds بين مجموعة هيدروكسيل Hydroxyl فى التيروسين مثلا ومجموعة كربوكسيل متأينه فى حمض اسبارتك أوحمض جلوتامك .

$$- OH \text{ ..... } {}^-OOC$$

* تفاعلات كارهة للماء Hydrophobic interactions بين السلاسل الهيدروكربونية فى الفنيل آلانين ، ليوسين، أيزوليوسين ، فالين .

* روابط ثنائية الكبريت (قناطر) Disulphide bonds (bridges) بين مركبات السستايين Cysteine ، وهى روابط تساهمية Covalent وعلى ذلك فهى تمثل أقوى الروابط الموجودة .

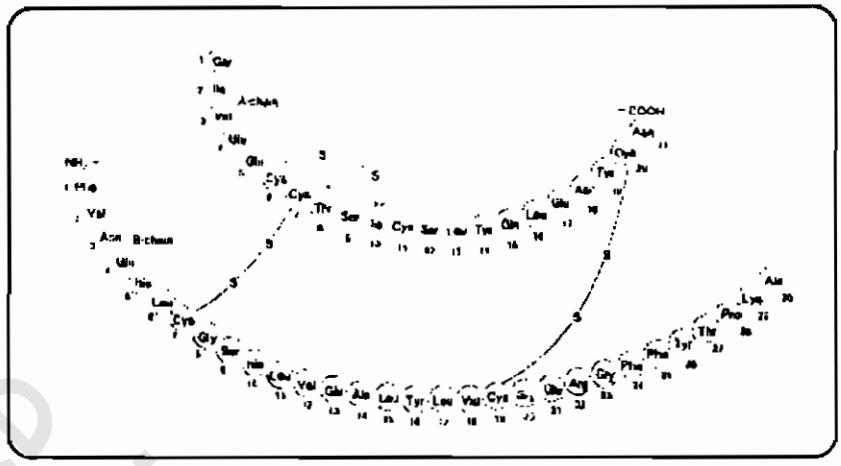
وتكون المناطق الطاوية للجزىء ومناطق تراكيب الفا هلكس وبيتا بالإضافة إلى الروابط سالفة الذكر ما يطلق عليه البناء الثلاثى لجزىء البروتين . ويعزى ثبات الجزىء ونشاط البيولوجى إلى وجود هذه الروابط .كما أن هذه الروابط تؤمن أو تؤكد تشابك أحماض أمينية بعيدة عن بعضها اذا نظرنا اليها حسب البناء الأولى لسلسلة عديد الببتيد .

obeikandl.com

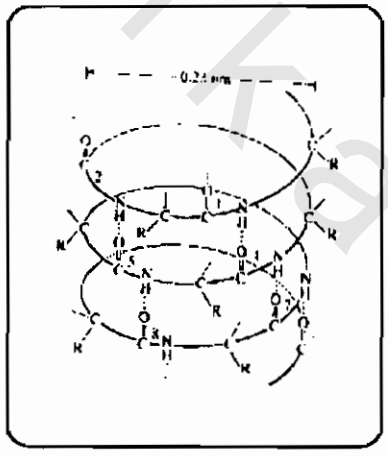
ومن أمثلة البروتينات ذات البناء الثلاثى الأجسام المضادة و البروتينات التنظيمية Regulatory proteins مثل الإنزيمات ، وهى تكون ما يسمى " البروتينات الكرية " Globular proteins ويمكن إفقاد تماسك Denaturation البناء الثلاثى لجزىء البروتين بطرق معينة ،ومثال ذلك تجارب Anfinsen Christian على إنزيم " ريبونيوكليز " RNAase. والبناء الأولى لهذا الإنزيم يوضح أنه يتكون من ١٢٤ حمضا أمينيا منها ثمانية من الحمض الأميني سستايين Cysteine يتفاعل كل اثنين منهما لتكوين اربع روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bridges ، ويتضح من ذلك أن البناء الأولى يحدد الشكل ثلاثي الأبعاد لجزىء البروتين (انظر الشكل ٥) ، وعند معاملة الإنزيم باليوريا وبيتا " ميركابتو ايثانول " B- mercaptoethanol فإن البناء الثلاثى للجزىء يختفى وينتج لدينا شريط ذو بناء عشوائى Random coil نتيجة تكسر الروابط ثنائية الكبريتيد سالفة الذكر، ويصاحب ذلك فقدان الجزىء لنشاطه البيولوجى أى فقدان قدرته الانزيمية (انظر الشكل ٦) ويؤدى التطرف فى درجة الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة العالية عادة إلى فقد تماسك الكثير من البروتينات . كما يمكن إعادة التماسك Renaturation فى بعض الحالات .

د - البناء الرباعي : Quaternary Structure

يتكون الكثير من البروتينات من أكثر من سلسلة من عديد الببتيد ، وهى تكون بذلك بناءً ارباعيا ، ولهذا البناء درجة كبيرة جدا من التنوع فى البروتينات المختلفة . ومن هذا التنوع " البلمرة Polymerization عندما يشترك فى البلمرة سلستان من عديد الببتيد ينتج لدينا " دايمر Dimer " وكثيرا ما تشترك ثلاث سلاسل أو أربع أوخمس أو ست أو أكثر مكونة البوليمر Polymer فعندما تنثنى سلسلة عديدالببتيد فإن ذلك يتم بجعل الجوانب الكارهة للماء Hydrophobic , nonpolar بعيدة عن السطح (داخلية) ، وعادة ما يتم ذلك باستثناء قدر صغير من الجزىء تظل جوانبه الكارهة للماء معرضة للخارج ، مكونه بقعة تسمى " بقعة كارهة للماء " Hydrophobic patch ، ويتم الاتحاد عند هذه البقعة فى كل سلسلة فيتكون بذلك Dimer اذا تم الاتحاد بين سلسلتين فقط (شكل ٧) . ويلاحظ أن الهيموجلوبين مثلا ذو تركيب رباعى من طراز " تترامیریك "Tetrameric" حيث أنه يتكون من تحت وحدتى الفا two alpha Subunits ، وتحت وحدتى بيتا two beta Subunits وترتبط كل واحدة من تحت الوحدات الاربع بمجموعة الهيم haem (انظر شكل ٨) ، وتحتوى كل سلسلة على حوالى ١٤٠ حمضاً أمينياً .

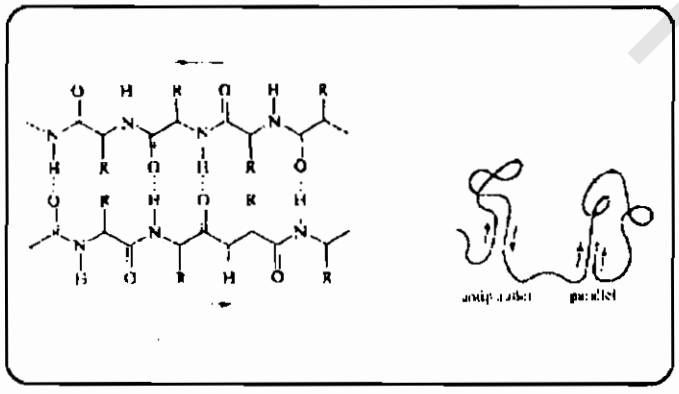


شكل (1) : الانسولين البشرى .

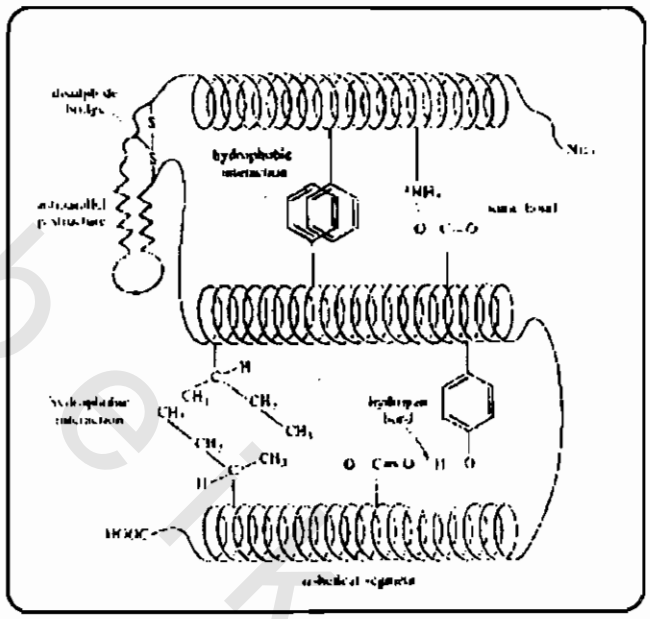


شكل (٢) : الطراز التركيبى ألفا هلكس :
لاحظ أن المجموعة الببتيدية رقم ٤ تتصل بكل من المجموعة رقم ١ والمجموعة رقم ٧ .

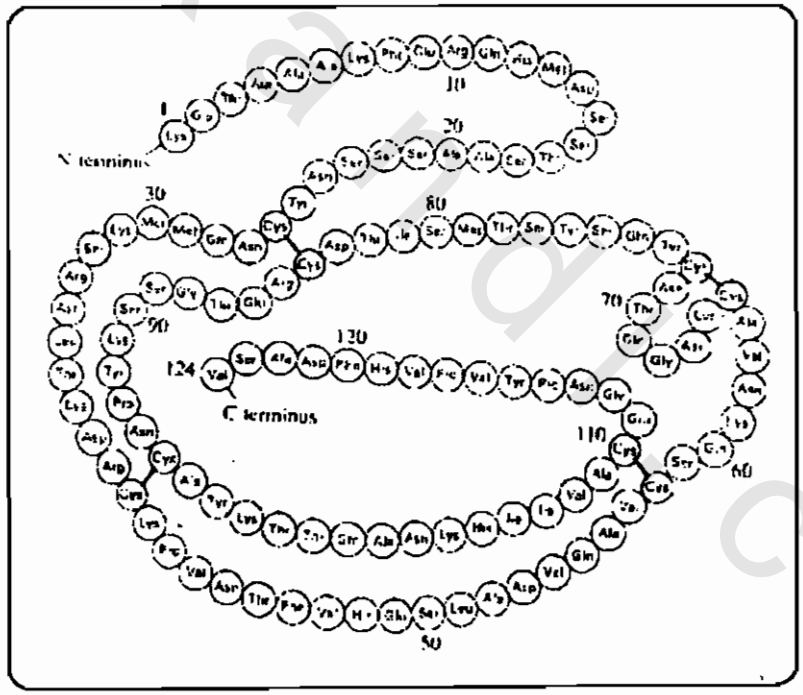
(أ) (ب)



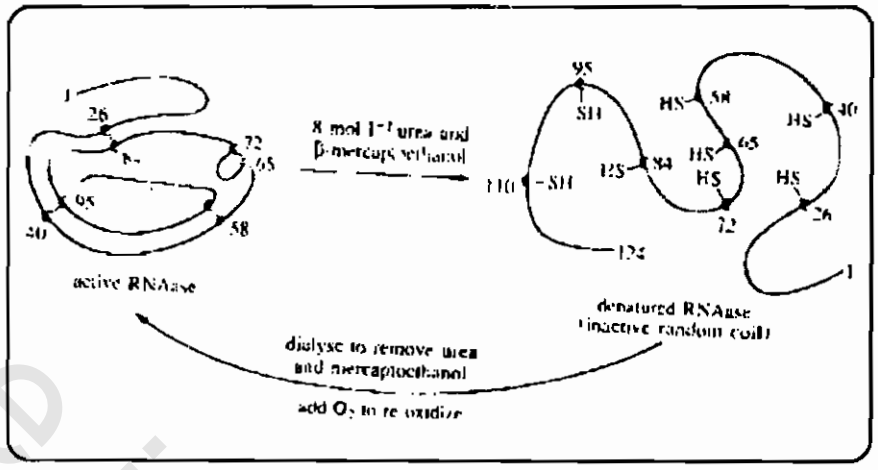
شكل (٣) : الطراز التركيبى بيتا
(أ) اتصـــال سلسلتين ممتدتين ومتوازتين عكسياً بروابط هيدروجينية .
(ب) جـــزىء واحـــد يلاحظ أن بعض أجزائه تكون متوازية وبعضـها الآخـر غيـر متوازية. لاحظ أن الأسهم تشـيـــر الى اتجـاه C-terminal.



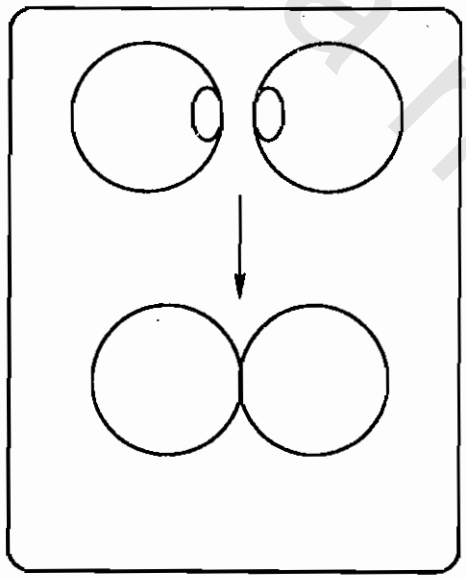
شكل (٤) :
التركيب الرباعى لبروتين كرى .
لاحظ أن النسب بين الأجزاء فى
الرسم غير مرعية.



شكل (٥) : التركيب الأولى لإنزيم ريبونيوكليز RAN-ase يوضح تتابع ١٢٤ حمضاً أمينياً . لاحظ تفاعل أربعة ازواج من السستايين لتكون اربع قناطر ثنائية الكبريتيد.

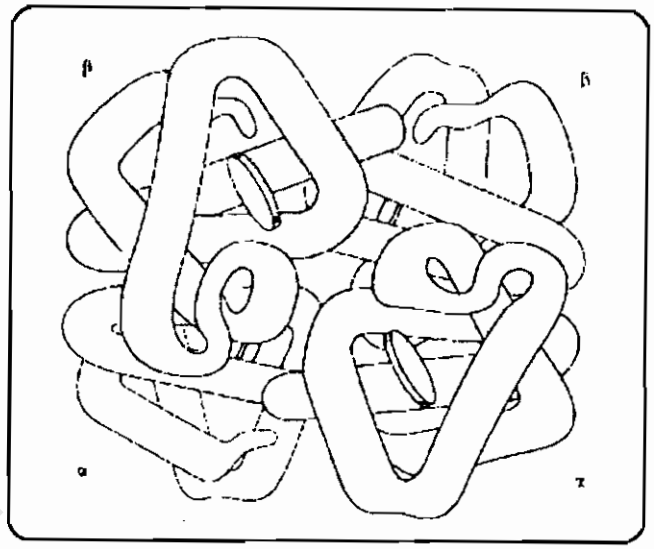


شكل (٦) : فقد تماسك إنزيم ريبونيوكليز RNA-ase ثم اعادة تماسكه .



شكل (٧) :

رسم مبسط يمثل تكوين الدايمر وذلك باتحاد البقعتين الكارهتين للماء فى سلسلتين متشيتين من عديد الببتيد



شكل (٨) : التركيب الرباعى للهيموجلوبين يتكون من وحيدتين الفا ، ووحيدتين بيتا ، الاقراص بالرسم توضح مجموعات الهيم .

تصنيف البروتينات : Classification of Proteins

يمكن تصنيف البروتينات على اسس متعددة ولا يوجد تصنيف واحد يرسم خطوطا فاصلة تماما بين المجموعات المختلفة ، والتصنيف التالى هو أكثر المتفق عليه بين المشتغلين بعلم كيمياء الأنسجة :

أولا : البروتينات البسيطة : Simple proteins

وهى تلك التى تعطى عند تحللها أحماضا أمينية أو مشتقاتها فقط . وهذه يمكن تمييزها الى مجموعتين :

١ - البروتينات الليفية : Fibrous proteins

وفيها تترتب سلاسل عديد الببتيد فى الفا هلكس أو طراز بيتا " على هيئة صفائح وهى تشمل " الكولاجين Collagen ، "و الريتكيولين Reticulin " و"الكيراتين" Keratin، "والميوسين Myosin ، و"الإلاستين " ، Elastin ، " الفيبرينوجين" Fibrinogen و"الفيبرين" Fibrin . وهذه كلها مواد تركيبية جامدة Rigid Structural materials لا تذوب فى الماء أو المحاليل الملحية المختلفة ، فيما عدا الميوسين والفيبرينوجين فهما يذوبان فى المحاليل المائية.

٢ – البروتينات الكرية : Gloubular poreins

وهى ذات بناء ثلاثى أو رباعى مكونة أشكالا كروية أو بيضاوية .

وهى تشمل "البروتامينات" Protamines و"الالبيومينات" Albumins و"الجلوبيولينات" Globulins و"الجلوبينات" Globins و" الهستونات " Histones . وهذه كلهـا تذوب فى المحاليل المائية وتمر بسهولة من الأغشية الحيوانية . ومما يذكر أن كثيرا من البروتينات الكرية التى كان يعتقد أنها بسيطة ثبت أنها تحتوى على مواد كربوهيدراتية فى تركيبها ، ومن ثم رؤى اعتبارها من البروتينات المرتبطة .

وقد وجد أنه من الممكن تحويل بعض البروتينات الكرية إلى ليفية تحت ظروف معينة ، فالإنسولين مثلا – وهو من البروتينات الكرية – يمكن تحويله إلى الطراز الليفى اذا عرض إلى درجات حرارة معينة وأس هيدروجينى محدد . وبتغيير هذه الظروف المحيطة يمكن إعادته إلى حالته الأولى .

ثانيا : البروتينات المرتبطة : Conjugated Proteins

وقد يطلق عليها البروتينات المركبة ، وهى تحتوي علي جزيء أو أكثر من مكونات اخرى تسمى المجموعة المرتبطة Prosthetic group

ويوضح (جدول ٣) أمثلة لبعض من البروتينات المرتبطة

obeikandl.com

وفيما يلي نبذة عن بعض طرز البروتينات :

Class	*Prosthetic group components*
Nucleoprotein systems	
Ribosomes	RNA
Tobacco mosaic Virus	RNA
Lipoproteins	Phpspholipid , cholesterol , neutral lipid
Plasma β_1 - lipoproteins	
Glycoproteins	Hexosamine , galactose , mannose, sialic acid
γ - Globulin	
Plasma orosomucoid	Galactose , mannose , N- acetylgalactosamine N- acetylneuraminic acid
Phosphoproteins	Phospliate esterified to serine residues
Casein (milk)	
Hemoproteins	Iron protoporphyrin
Hemoglobin	Iron protoporphyrin
Cytochrome c	Iron protoporphyrin
Catalase	
Flavoproteins	Flavin adenine dinucleotide
Succinate dehydrogenase	Flavin adenine dinucleotide
D - Amino acid oxidase	
Metalloproteins	$Fe(OH)_3$
Ferritin	Fe and Cu
Cytochrome oxidase	Zn
Alcohol dehydrogenase	Mo and Fe
Xanthine oxidase	

جدول (٣) : نماذج للبروتينات المرتبطة ومجموعاتها المميزة .

obeikandl.com

الكولاچـــين : Collagen

الكولاچين بروتين ليفى وهو أوفر البروتينات في جسم الانسان ، حيث يكوّن حوالى ٣٠٪ من الوزن الجاف له كما أنه أوفر البروتينات في المملكة الحيوانية بصورة عامة . ويتميز الكولاچين بأنه يكون مادة جيلاتينية في الماء المغلى . ويتكون الكولاچين من أحماض امينية ، أكثرها شيوعا هو الجليسين والبرولين والهيدروكسى برولين والهيدروكسى ليسين ، ولا يوجد الأخيران إلا في الكولاچين ، وهما يتكونان من اضافة مجموعة الهيدروكسيل (OH) إلي كل من البرولين والليسين في سلسلة عديد الببتيل بعد تخليقها في الشبكة إلاندوبلازمية للخلايا المنتجة للكولاجين . ويعرف الان عدة انـواع من الكولاچين يرمز لها بالارقام الرومانية I, II, III, ... , .. وهكذا.

وقد لقى الكولاچين اهتماما كثيرا من الدراسات التي استخدمت فيها طرق التحليل الكيميائى و"حيود اشعة اكس " X - ray diffraction والمجهر الالكترونى ودراسات الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringence وكيمياء الانسجة . وقد كان أول من قام بدراسة الكولاچين ، اولئك المهتمون بالابحاث المتعلقة باستخدام جلود الحيوانات في الصناعة.

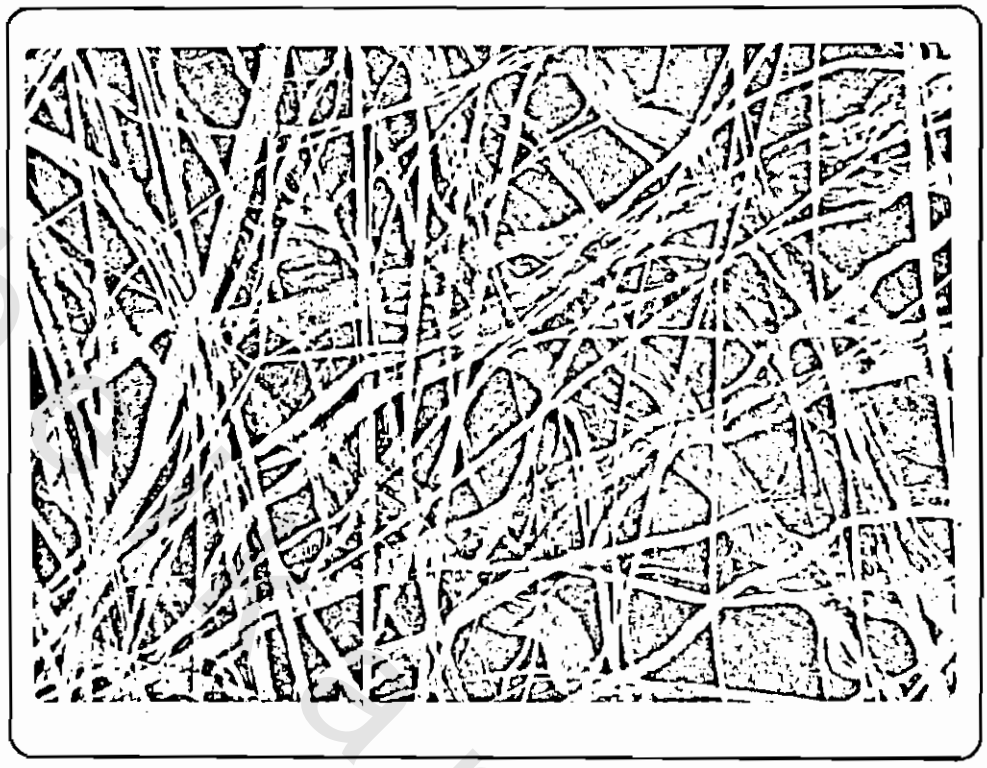
ويمكن مشاهدة الكولاچين في تحضير مفرود لغشاء المساريقا ، حيث يرى الكولاچين على هيئة ألياف متماوجة مختلفة السمك (انظر الشكل ٩) والألياف الفرادى عديمة اللون ولكنها عند تجمعها تبدو بيضاء اللون . والياف الكولاچين حامضية الصباغة فهى تصبغ باللـون الاحمر في طريقة "فـان جيسون " Van Gieson التي يستخدم فيها "الفوكسين الحامضى وحمض البكريك" كما تصبغ باللون القرنفلى Pink بواسطة "الإيوسين " ، وباللون الأزرق باستخدام "صبغ مالورى ثلاثى الكروم " ، وباللون الأخضر مع "صبغ ماسون ثلاثي الكروم " وباللون الأحمر مع صبغ " سيروس" Sirius

وألياف الكولاجين عالية المرونة Flexible ، ولكنها غير مطاطة inelastic ، وهى تتميز بتحملها الفائق للشد بدرجة تفوق مادة الصلب ، فقد قدر أن السنتيمتر المربع الواحد يستطيع تحمل الضغط الناشيء من ثقل عدة مئات من الكيلوجرامات .

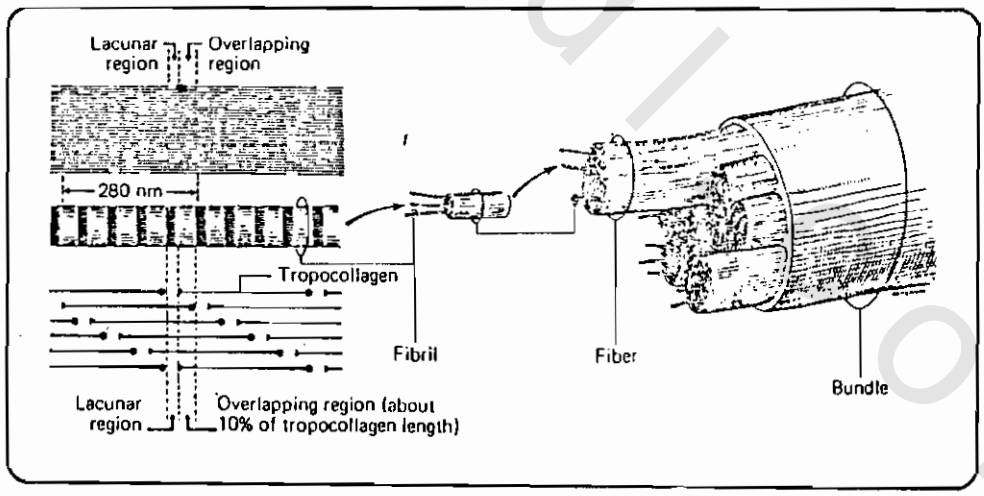
وكثيرا ما تساهم ألياف الكولاچين في تكوين محافظ أو أغطية لبعض أعضاء الجسم مثل الكلى وغدد جار الكلى والعقد اللمفاوية والخصيات وغيرها . وتتكون الأوتار العضلية أساسا من حزم من ألياف الكولاچين ، وفي هذه الحالات تتكون كل حزمة من ألياف Fibers، وهذه بدورها تتكون من ليفات Fibrils يبلغ متوسط أقطارها في الثدييات حوالى ٧٥ نانوميتر (انظر شكل ١٠) . وعند فحص هذه الليفات بالمجهر الالكترونى أو بواسطة ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي ترى مخططة عرضيا علي مسافات ٦٤ نانوميتر . (انظر شكل ١١) ، وتتكون الليفات من وحدات بنائيه طولها ٢٨٠ نانوميتر ويطلق عليها اسم "تروبوكولاجين Tropocollagen" وهي تترتب بطريقة خاصة يعزى إليها ظهور التخطيط العرضى في الليفات . وقد وجد أن جزيء "التروبوكولاجين" يتكون من ثلاث سلاسل من عديد "ببتيد ، يطلق علي اثنين منها اسم الفا (١) Alpha1 والثالثة اسم الفا (٢) Alpha2 وتتوالى الأحماض الامينية في سلسلة الفا وفقا للترتيب الآتي : (Gly - x - Pro) ، حيث يمثل (Gly) الجليسين ، (Pro) يمثل البرولين أو الهيدروكسى برولين ، ويمثل (X) أي حمض امينى بما في ذلك البرولين . وتلتف السلاسل الثلاث حول بعضها حلزونيا في شكل ضفيره ، كما ترتبط السلاسل الثلاث بعضها لبعض بواسطة روابط هيدروجينية واتحادات كارهه للماء Hydrophobic interactions وفيما عدا نوع الكولاجين I , II ، فإن السلاسل الثلاث تربطها أيضا روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bonds ويبلغ امتداد اللفة الكاملة في الحلزون ٨,٦ نانوميتر (انظر شكل ١٢) .

وقد اوضحت الدراسات الحديثة أن الكولاجين يمثل مجموعة من مركبات بروتينية تختلف فيما بينها في عدد من الاعتبارات ، منها : الخلايا التي تقوم بتخليقها ، أماكن تواجدها في الجسم ودرجة تعضيها ، وغير ذلك من العوامل المختلفة (انظر شكل ٤).

وقد أظهرت الدراسات التي أجريت علي الكولاجين باستخدام ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي " Polarizing Microscope أنه ايجابى ثنائية الانكسار الضوئي . Positive birefringence

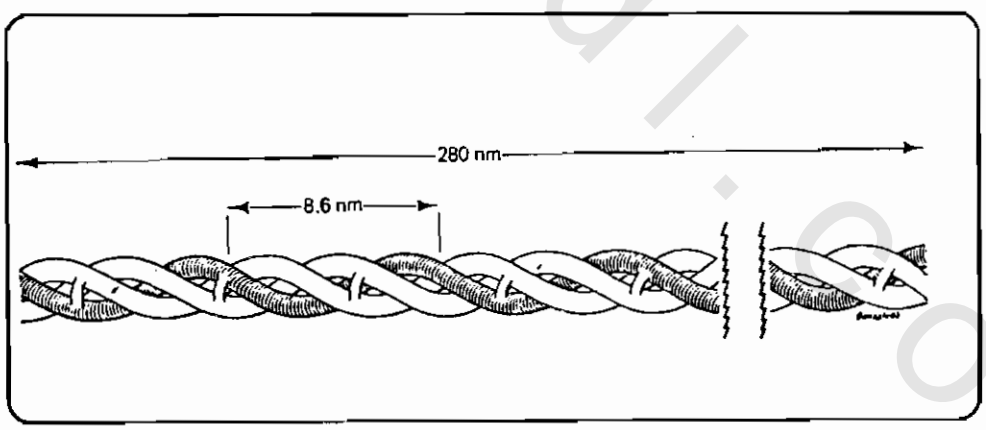


شكل (٩)


Lacunar region
Overlapping region
280 nm
Tropocollagen
Fibril
Fiber
Bundle
Lacunar region
Overlapping region (about 10% of tropocollagen length)

شكل (١٠)

شكل (١١)



شكل (١٢)

الطراز	اماكن تواجده بالجسم	الخلايا التي تقوم بتخليقه	درجة التعضى
I	الأدمه - العظام - الأوتار - الدنتين الصفاق - صلبة العين - محافظ اعضاء الجسم - الغضروف الليفى .	فيبروبلاست Fibroblasts اوستيوبلاست Osteoblasts أودنتوبلاست Odontoblasts كوندروبلاست Chondroblasts	يكون الياف كولاجين وهذه تتجمع لتكون حزماً .
II	الغضروف الزجاجى - الغضروف المرن	كوندروبلاست	من ليفات
III	العضلات الملساء - الدعامة الداخلية للعصب - الشرايين - الرحم - الكبد - الطحال - الكلى - الرئات .	العضلات الملساء فيبروبلاست الخلايا الشبكية خلايا شفان الخلايا الكبدية	
IV	الأغشية القاعدية للخلايا الطلائية	الخلايا الطلائية	جزئيات تروبوكولاجين
V	الأغشية القاعدية للمشيمة	غير معروفة	جزئيات تروبوكولاجين

جدول (٤) : يوضح الطرز المختلفة للكولاجين وخصائصه .

وجدير بالذكر ان عملية تخليق الكولاچين تحدث في خطوات معقدة تحتاج إلي كثير من الإنزيمات والعوامل المساعدة ، ويطلق علي الجزئيات الحلزونية ثلاثية السلاسل اسم "بروكولاچين Procollagen " وهي الصورة التي يتم عليها الافراز الي خارج الخلايا .

وفي الحيزات بين الخلوية تتحول هذه الجزئيات إلي كولاچين بعد استقطاع القطع الطرفيه الحاوية علي النهايات الكربوكسيلية والأمينية N,and C terminal segments .

ومن المعروف أن الخلل الذي يحدث في الكولاچين أو عمليات تخليقه يسبب كثيرا من الأمراض المزمنة التي يصعب علاجها (Kivirikko and Risteli,1976 Minor,1980) .

الرتكـــيولين : Reticulin

الرتكيولين بروتين ليفى ، تتميز اليافه برقتها ، حيث تتراوح أقطارها بين ١/٢ – ٢ ميكرون ، وهى عادة تكون شكبة كثيفة داخل بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والكلى والطحال والعقد الليفيه ونخاع العظم فتدعم بذلك بناءها الخلوى ومن ثم تعرف الالياف باسم " الالياف الشبكية " .

ومن الجدير بالذكر أن هذه ألالياف لا ترى في التحضيرات الروتينية المصبوغة بالهيماتوكسيلين والايوسين ، ولكنها تشاهد بوضوح في التحضيرات المعاملة بأملاح الفضة ، ولهذا تسمى أيضا :ألياف محبة للفضة Argyrophilic Fibres ويعتقد البعض أن الألياف الشبكية هى الياف كولاچين غير تامة التكوين .

وقد وجد أن الألياف الشبكية تتكون أساسا من مادة كولاچين III ، وذلك علي عكس ألياف الكولاچين التي تتكون من مادة كولاچين I .

وتتكون الألياف الشبكية من ليفات منتظمة عشوائيا (قطرها حوالى ٤٥ نانوميتر) ترتبط مع بعضها البعض بوصلات bridges من مواد جليكوبروتينية Glycoproteins ، ومواد بروتيوجليكانية Proteoglycans وتحتوى الالياف الشبكية علي قدر يتراوح بين ٦ – ١٢٪ من السكريات السداسيه مقارنة بقدر ١٪ فقط في الياف الكولاجين .

ومن الجدير بالذكر أن الالياف الشبكية تعطى تفاعلا موجبا في تفاعل "كاشف شف"

ب أ س PAS ، كما أنها لا تكون جيلاتينا بالغليان . وقد وجد أن الرتكيولين يحتوى على نسبة من الحمض الدهنى (هيدرستيك) Myristic acid .

وقد كان بعض العلماء ، ومنهم العالم الإنجليزى بيرس A.G.E.Pearse يظنون ان الرتكيولين ليس له خاصة ثنائية الانكسار الضوئي birefringence في الضوء المستقطب ، إلا ان الدراسات القديمة التي قام بها Mollendroff, والعالم Brewer, أوضحت انه ، مثل الكولاجين ، ايجابى ثنائية الانكسار الضوئي ، ولكنه يختلف عنه في خواص بصرية أخري في الضوء المستقطب . ويتفق العلماء حاليا علي صحة هذه الدراسات .

الألاستين : The Elastin

الإيلاستين بروتين ليفى يطلق على اليافه اسم : الألياف المرنة Elastic fibres و هى تتميز بأنها أقل سمكا من الياف الكولاجين ، كما تتفرع وتتحد مع بعضها خلال مسارها ، ويمكنها أن تتمدد تحت تأثير ميكانيكى إلي اكثر من طولها الأصلى بمقدار مرة ونصف المرة ، ثم ترجع إلى حالتها الأولى بعد زوال المؤثر . وتميز الألياف أيضاً بلونها الأصفر ومن ثم يطلق عليها اسم "الالياف الصفراء" Yellow fibres . وهى تتواجد في جدر الشرايين وجدر الحويصلات الهوائية والأنسجة الضامة .

ولا يتأثر الإيلاستين بالغليان او الأحماض والقلويات المخففة ، كما أنه لا يهضم بالتربسين ، ولكنه يهضم ببطء بواسطة الببسين عند أس هيدروجينى (٢) ويهضم بسهولة بواسطة إنزيم إلا ستيز " Elastase البنكرياسى .

ويحتوى الإبلاستين علي كميات اكبر من الأحماض الأمينية "فالين " Valine "الآنين " Alanine مما هو في الكولاجين ، كما يحتوي علي الجليسين و"البرولين " . وبالإضافة إلي ذلك يحتوى الإيلاستين علي أحماض امينية لا تتوجد إلا فيه ، وهى "الدزموسين " Desmosine ، "أيزودزموسين " Isodesmosine

وقد وجد أنه في الجلد والاوتاريتم تخليق الايلاستين عن طريق الخلايا الليفية "الفيبروبلاست" Fibroblasts ، وفي جدر الشرايين بواسطة الخلايا العضلية الملساء ،

smooth muscle cells

ويبدى الإيلاستين خاصية ثنائية الانكسار الضوئي بصورة ضعيفة ، (Romhanyi 1964) ولكنها تزيد كثيرا عندما يعامل بالبرمنجنات ، ثم بالبايسلفيت ثم صبغ باستخدام "التلويدين الأزرق" (Fischer, 1979) .

وتعترى الالياف الصفراء تغيرات واضحة مع تقدم العمر حيث تتشقق طوليا وتنكسر ثم تتفتت في النهاية إلي حبيبات ، ويصاحب ذلك تغيرات كيمياوية أهمها زيادة في بعض الأحماض الأمينية مثل حمض الجلوتامك وحمض الأسبرتك ، كما تزيد الدهون وأملاح الكالسيوم .

ويصبغ الايلاستين بطريقة " جوموري " المستخدم فيها الألدهيدفوكسين ، وقد اقترحت طرق متعددة أخرى ، ولازالت آلية صباغة الإيلاستين بالاصباغ المختلفة محل خلاف بين الباحثين .

الكـــيراتين : Keratin

الكيراتين بروتين ليفى ، يتواجد بصفة أساسية في خلايا البشرة في الزواحف والطيور والثدييات ، وكذلك في الزوائد الجلدية مثل الشعر والريش ، والكيراتين خواص تجعله يوفر كبيرا من الحماية الميكانيكية والكيميائية للانسجة الواقعة أسفله .

الكيراتين له خاصية ثنائية الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringent ، وهو يقاوم الهضم بالبيسين والتربسين ولا يذوب في الماء والاحماض والقواعد المخففة . ويتميز بأنه غنى بالكبريت ، ويتكون من نسبة عالية من السستين Cystine ، بالاضافة إلي الأحماض الامينية القاعدية : ارجنين – ليسين – هستدين ، وأيضا الحمضية مثل : حمض الجلوتامك وحمض الاسبرتك ، وعلى ذلك فان للكيتين قابلية قوية لكلا الاصباغ القاعدية والحمضية .

ويتكون الكيراتين من خيوط كيراتينية (قطرها حوالى ٨٠ انجستروم ، وطولها حوالى ٣٠ ميكرون)، وينتظم البناء التركيبى لهذه الخيوط على شكل سلاسل عديد الببتيد من طراز "الفاهلكس" α - helix .

وعند دراسة مراحل تكوين الكيراتين في بشرة الجلد يتضح أن "الطبقة القرنية " Stratum corneum تتكون من خلايا تحتوي علي وفرة من الكيراتين . ويبدو الكيراتين – وهو الغنى بالروابط ثنائية الكبريت – مكونا من خيوط مجمعة في حزم سمكها ١٠ نانوميتر يحيط بها وسط مكون من مادة كثيفة عديمة الشكل يطلق عليها اسم " المادة بين الخيطية " Interfilamentous matrix ويلاحظ في هذه الخلايا غياب كثير من العضيات والتراكيب السيتوبلازمية المعروفة تحت تأثير تكون الأجسام " الابتلاعية أو البلعمية الذاتية " Autophagosomes الغنية بإنزيمات التحليل الليزوسومية Lysosomal hydrolytic enzymes .

والواقع أن بداية تخليق الكيراتين في البشرة تحدث في الخلايا العميقة منه وتستمر وتزداد هذه العملية كلما اقتربنا من سطح الجلد ، حيث تزيد كمية الكيراتين إلي اقصى حد لها في الخلايا القرنية . وتشمل عملية تكوين الكيراتين تأكسد الروابط الهيدروكبريتية (SH Sulfhydry) في الحمض الأميني " سستاييسن Cysteine إلي روابط ثنائية الكبريتيد (SS disulphide) متكونا بذلك السستين Cysteine. ويلاحظ في خلايا الطبقة " المحببة " Stratum granulosum في البشرة تواجد حبيبات قاعدية غير محاطة بأغشية وتحتوى علي بروتين غنى بالحمض الأميني هستدين " ، والواقع أن هذه الحبيبات هى المادة التي تتكون منها المادة بين الخيطية للكيراتين سالفة الذكر . ويطلق على هذه الحبيبات اسم " الحبيبات الكيراتوزجاجية " Keratohyaline granules ، والواقع ان التركيب الكيميائي لهذه الحبيبات لايزال غير معروف علي وجه الدقة .

والمعروف أن الشعر يتكون أساسا من الكيراتين . وقد وجد العالم بونتنج Bonting عام ١٩٥٠ ان السستين يتناقص في البشرة خلال فترة التحول من الصبى الى البلوغ . وقد عزا ذلك إلي انتقال السستين من البشرة إلي الشعر النامي خلال هذه الفترة .

وقد وجد الباحثان " صن وجرين " Sun and Green عام ١٩٧٨ ان الكيراتين يختلف تركيبه في المراحل المختلفة من تميز الجلد ، كما وجد الباحث "لى" Lee ومساعدوه عام ١٩٧٩ ان الكيراتين يختلف تركيبه ايضا في الأنسجة المختلفة لنفس الحيوان . وكان "كمب "

Kemp قد أعلن عام ١٩٧٥ انه في الطيور تختلف كيراتين الريش عن كيراتين البشرة .

وقد استطاع فوكس وجرين Fuchs and Green عام ١٩٧٩ أن يفصلا جزءًا معينًا من حمض ح ر ن الرسول ؛ m - RNA أمكن بواسطته تخليق الكيراتين في الآنية الزجاجية in vitro .

ويمكن تمييز طرازين من الكيراتين : هما كيراتين الفا α - Keratin وكيراتين بيتا β- Keratin . ويوجد كيراتين الفا في القرون والاظافر ، وهذا يكون اكثر صلابة وقابل للكسر ويحتوى علي نسبة عالية (حتى ٢٢٪) من الحمض الأميني سستين . ويتواجد كيراتين ألفا ايضا في الجلد والشعر والصوف في صورة اكثر ليونة وقابلة للثنى حيث يحتوى علي ١٠ – ١٤٪ سستين . أماكيراتين بيتا فهو يكون غزل العنكبوت وديدان القز وفي الحراشيف والمخالب ومناقير الزواحف والطيور وهولا يحتوى علي سستين او سستايين ولكنه غنى بالاحماض الامينية ذات السلاسل الجانبية القصيرة خاصة الجليسين والالانين والسيرين . ويتميز كيراتين الفا بقدرته علي التمدد بالتسخين ، ومثال ذلك استرسال الشعر عند تعريضه لبخار الماء ، اما كيراتين بيتا فانه لا يتم فرده تحت هذه الظروف .

الهستونات : Histones

الهستونات بروتينات بسيطة كروية Globular ، تحتوى علي كميات كبيرة من الأحماض الامينية القاعدية خاصة الأرجنين والليسين ، والهستيدين . وتتواجد الهستونات بصفة اساسية في انوية الخلايا متحدة مع حمض ح د ن لتكون الكروماتين والكروموسومات في الأيوكاريوتات Eukaryotes أي حقيقيات الأنوية .

وتتواجد الهستونات في أنوية الايوكاريوتات علي صور أربع يرمز اليها بالحروف، H_2A ، H_2B ، H_3 ، H_4 يمكن فصلها باستخدام الفصل الكهربائي علي جيلاتين بولى اكريلاميد Polyacrylamide gels يحتوى علي كبريتات دودسيل الصوديوم Sodum dodecyl sulphate ولا توجد الهستونات في البروكاريوتات Prokaryotes

وتذوب الهستونات في الماء الأحماض والقلويات المخففه ولكنها لا تذوب في محاليل الامونيا المخففة .

البروتامينـــات : Protamines

البروتامينات قاعدية بسيطة وكروية Globular وقد تم اكتشافها لأول مرة في الحيوانات المنوية الناضجة في الأسماك . وتشبه البروتامينات مجموعة الهستونات في كونها تنوب في الماء وفي الأحماض المخففة .

البروتينات فى الخلايا الحيوانية :

جدير بالذكر أن طبيعة المواد البروتينية تتباين في خلايا الأعضاء والانسجة المختلفة ، ويعتمد هذا إلي حد كبير علي وظائف هذه الخلايا ، فالبروتينات في الخلايا الكاسية Goblet cells المفرزة للمخاط Mucus تختلف عنها في خلايا بيتا في جزر لانجرهانز التي تفرز الإنسولين ، وكذلك عن تلك في الخلايا العصبية التي تفرز العصبية Neurotransmitters، أو في الخلايا الهضمية Peptic cells التي تفرز انزيم الببسين .

فمن المعروف مثلا أن الخلايا المنوية والحيوانات المنوية في الثدييات تحتوي علي كميات عالية من الهستونات الغنى بالارجنين .. وهكذا .

ومن المفترض ان الجينات المتوافرة في كل خلايا جسم الفرد واحدة ، ولكن ما يكون منها نشطا في خلايا معينة هو مميز لهذه الخلايا ، وهذا يعنى أنه ليست كل الجينات نشطة في أي طراز من طرز خلايا الجسم . ويستتبع ذلك أن البناء البروتينى (وما يترتب عليه) لكل طراز من الخلايا يختلف عنه في الطرز الاخري .

وبصفة عامة يتأثر المحتوى البروتينى للخلايا في حالات التعرض لبعض المؤثرات الطبيعية والكيميائية ونقص التغذية . كما أن طبيعة المواد البروتينية تتغير في الطراز الخلوى الواحد اثناء عملية التكوين .

الأميلويـدات The Amyloids

هناك اتفاق بصفة عامة على أن الأميلويدات تتركب من جليكوبروتينات ومبوكوبروتينات ومواد كربوهيدراتية . وتكثر الاميلويدات في بعض أعضاء الجسم مثل القلب دون ظواهر

مرضية ، ويطلق علي الحالة عندئذ "الأميلويد الأولى Primary Amyloid " أما الأميلويد الثانوى Secondary Amyloid فينتج مع بعض الأمراض المزمنة حيث تترسب الاميلويدات بصورة غير طبيعية في بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والطحال والكلى وغدد الكظر وجدر الأوعية الدموية بها وينتج بذلك ما يعرف باسم (تفسخ أميلويدى Amyloid degeneration) وتعتبر زيادة الاميلويدات مؤشرا لاضطرابات في التحول الغذائي للمواد البروتينية يلعب فيها الجهاز المناعى بصفة عامة وخلايا البلازما بصفة خاصة دورا أساسيا وترجع زيادة الأميلويدات إلي خلل في الآلية التي تتحكم في ضبط تخليقها . وقد وجد أن مصدر معظم الاميلويدات المترسبة في هذه الأعضاء هو الدم . وأن طبيعة بروتينات مصل الدم تتغير في هذه الحالة . وتلقى الاميلويدات أهمية كبيرة لدى المشتغلين بعلم الأمراض لأهميتها في كثير من الحالات المرضية مثل الروماتويد . وقد أمكن تجريبيا زيادة الاميلويدات في بعض الحيوانات باستخدام عدد من المواد مثل الكازين Casein ومن المعروف أن فيرشو Virchow هو أول من أعطى (في عام ١٨٥١) لفظ Amyolid لهذه المواد عندما لاحظ أن تفاعلها مع اليود يشبه تفاعل النشا معه ، إلا أنه اتضح بعد ذلك أن تركيب الاميلويدات بعيدا عن طبيعة تركيب النشا .

الاسس الهستوكيميائية لبعض الطرق المستخدمة للكشف عن المواد البروتينية

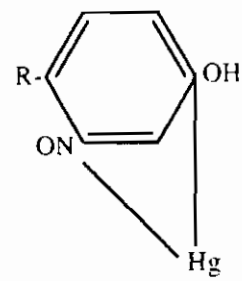
فيما يلى الأسس الهستوكيميائية لبعض الطرق المستعملة للكشف عن المواد البروتينية.

١ - تفاعل ميلون : Millon's Reaction

يعتمد هذا التفاعل علي "كشاف ميلون" الذي يتكون من نترات الزئبقوز في حامض النيتريك . وقد اقترح هذا التفاعل ميلون في عام ١٨٤٩ للكشف عن البروتينات المحتوية علي "مجموعة فينولية " Phenolic group (وهى أساسا الداخل فيها التيروسين المحتوى علي هيدوكسى فينول) ، وقد طورت هذه الطريقة علي يد بنسلى وجرش Bensley and Gersh عام ١٩٣٣ وسيرا Serra عام ١٩٤٦ وبيكر Baker عام ١٩٥٦ .

ويتم التفاعل في هذه الطريقة على مرحلتين ؛ ففى المرحلة الأولى ينتج "نيتروفينول " Nitrophenol باحلال مجموعة NO محل الهيدروجين الموجود في الموقع أورثو بالنسبة لهيدروكسيل الفينول .

وفي المرحلة الثانية يدخل الزئبق في حلقة جديدة تحتوى علي نيتروجين مجموعة النيتروز ويتكون بذلك مركبا أحمر اللون .



٢ - طريقة الزئبق برومفينول الأزرق :

The Mercury - Bromphenol Blue Method (HgBpB)

يحضر محلول الصبغ من كلوريد الزئبقوز وصبغ البرومفينول الأزرق ، حيث تصبغ البروتينات باللون الازرق الداكن .

وقد ابتدع هذه الطريقة "درم " Durrum عام ١٩٥٠ ، ثم طورها مازيا وبروير والفيرت Mazia , Brewer , Alfert في عام ١٩٥٣ وبونهاج Bonhag عام ١٩٥٦ . وقد استخدمها هاريس ومازيا عام ١٩٥٩ مع عينات فحصت بالمجهر الالكترونى .

وقد أعلن " مازيا " وزملاؤه أن درجة كثافة الصبغ في النسيج تتناسب طرديا مع كمية البروتينات - علي كافة صورها - المتواجدة فيه .

وقد لوحظ في بعض الحالات أن الصباغة تعطى لونا يميل إلي الحمرة . وقد اختلف الباحثون في تفسير ذلك ، فقد أعلن رامالنجام ورافندوراناث Ramalingam and Ravindranath (عام ١٩٧٢) أن ذلك يرجع إلي الصبغة مخالفة التلوين

Metachromatic ، بينما من رأي تشابمان Chapman (عام ١٩٧٥) أن ذلك يرجع الي ان الصبغة ثنائية اللون Dichromatic

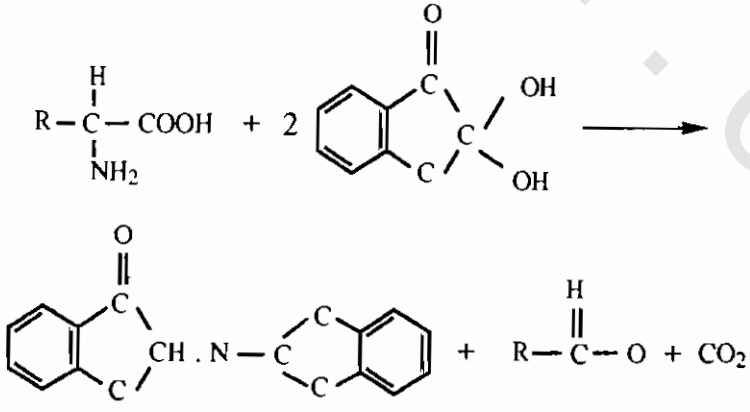
٣ – طريقة أكرولين شف : The Acrolein - Schiff Method

اقترح هذه الطريقة فان دوجن Van Duijn عام ١٩٦١ ، وهى تصبغ البروتينات بصفة عامة ويعتمد التفاعل على معامله القطاعات بالاكرولين ($H_2C = CHCHO$) حيث تتفاعل الرابطة المزدوجة في الاكرولين مع NH_2 , NH , SH الاليفاتية ، والاميدوزولات Imidazoles تاركة الالدهيدات الحرة لتتفاعل مع محلول شف Shciff's reagent لتعطى لونا أرجوانيًا محمر .

٤ – طريقة ننهيدرين شف : Ninhydrin - Schiff Method

اقترح هذه الطريقة " ياسوما واتشيكاوا " Yasuma and Ichikawa (١٩٥٢ , ١٩٥٣) للكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات امين نشطة ، حيث تعامل القطاعات بمحلول النهيدرين الذي يتفاعل مع مجموعات الامين الحرة في الاحماض الامينية ، فينتج مركب نو لون أزرق وثاني اكسيد الكربون بالاضافة الي مركب يحتوي على مجموعة الدهيد . تغسل القطاعات بالماء ثم توضع في محلول شف الذى يتفاعل مع مركب الالدهيد لينتج لونا أحمر أرجوانيًا .

وأحيانا يستخدم الالوكسان Alloxan بدلا من النهدرين ، الا أن العالم الانجليزى بيرس Pearse قرر أن اللون الناتج عند استخدام النهيدرين كان أكثر وضوحا .

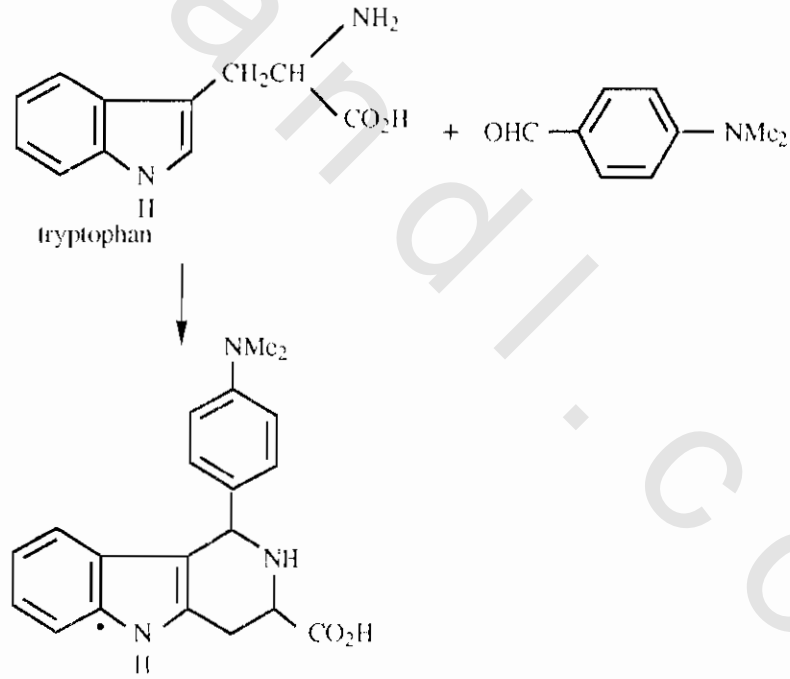


٥ – طريقة د م أ ب – نيتريت للكشف عن التربتوفان :

The D M A B -Nitrite Method for Tryptophane

اقترحت طرق الكشف عن التربتوفان منذ الثلاثينيات من هذا القرن ، وقد تم تطويرها بعد ذلك بطرق مختلفة بواسطة الكثير من الباحثين ، وتعتبر الطريقة التي أوصى بها آدمز Adams في عام ١٩٥٧ هى أفضل الطرق .

وتعتمد هذه الطريقة على معاملة القطاعات بمحلول من مادة بارا داى ميثيل امينو بنزالدهيد (D M A B) P - dimethylamino - benzaldehyde فينتج بذلك مركبا يسمى بيتاكاربولين β-Carboline تتم اكسدته باستخدام نيتريت الصوديوم Sodium nitrite لكى يتكون مركب ذو لون أزرق ، يسمى كاربولين الازرق Carboline blue ، تركيبه الكيميائي غير معروف علي وجه الدقة .



substituted tetrahydro - β - carboline carboxylic acid

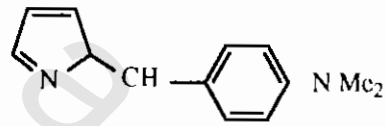
obeikandl.com

٦ - طريقة تفاعل روزيندول للاندولات (البروتينات المحتوية على التربتوفان) .

The Rosindole Reaction for Tryptophane-Containing Proteins

اقترح هذه الطريقة جلنر عام ١٩٥٧ ، وهي تشبه طريقة آدمز . وفي الطريقة الحالية يذاب الألدهيد P - dimethylamino - benzaldehyde (DMAB) في خليط من حمض الخليك - وحمض فوق الكلوريك مع كمية قليلة من حمض الهيدروكلوريك المركز . كما أن نيتريت الصوديوم تذاب في حمض الخليك وحمض الهيدروكلوريك معا .

تعامل القطاعات بالالدهيد ، فيتحد جزيء من التربتوفان مع جزيء من الالدهيد فيتكون مركب phenylindolyl-methane .



ثم تعامل القطاعات بمحلول نيتريت الصوديوم المؤكسد فيتكون صبغ روزيندول Rosindole الاحمر اللون .

٧ - طريقة ٣ - هيدروكسي - ٢ - نفثالدهيد للكشف عن البروتينات المحتوية علي مجموعات امين NH_2 نشطة :

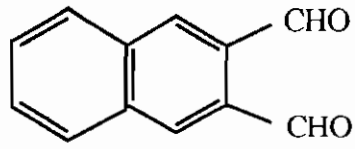
3- Hydroxy - 2- Naphthaldehyde Method for Active NH_2 groups:

تعتمد هذه الطريقة علي معاملة القطاعات بمحلول ٣ - هيدروكسى -٢- نفثالدهيد المذاب في الاسيتون والمضاف اليه محلول منظم عند أس هيدروجين ٨,٥ ثم تعامل القطاعات بمادة Tetrazotised diorthoanisidine المذابة في محلول منظم أسه الهيدروجينى ٧,٤.

وتوضح هذه الطريقة التراكيب الغنية بمجموعات الامين النشطة باللون الازرق . وبصفة عامة ينصح بعدم استخدام الفورمالين في عملية التثبيت .

obeikandi.com

وقد اقترح هذه الطريقة وايز – تسو – سلجمان Weiss , Tsou , Seligman في عام ١٩٥٤، كما أوصى باستخدامها بيرسى Pearse .



٣ – هيدروكسى ٢ – نفثاليدهيد

٨– تفاعل حمض فوق الفورميك – شف للكشف عن السستين :

Performic acid - Schiff (PFA) Reaction for Cystine :

في هذه الطريقة تعامل القطاعات بفوق أكسيد الفورميك Performic acid الذي يؤكسد السستين Cystine في النسيج وينتج عن ذلك جواز تحرر ثلاث مجموعات كيميائية (بيرسى ١٩٥١) هي :

Sulphonic So_3 H

Sulphinic So_2 H

Aldehyde CHO

وعند معاملة القطاعات بكاشف شف Schiff's reagent فان مجموعات Sulphinic & Aldehyde تتفاعل معه لتعطى لونا قرنفليا مميزا .

وقد دلت إحدى الدراسات علي إمكانية ان تعطى مجموعات Sulphonic نفس اللون بتفاعلها مع كاشف شف .

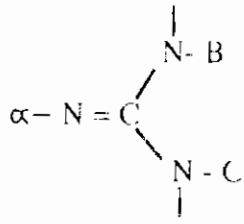
٩ – طريقة ساكاجوتشي للكشف عن الارجنين :

The Sakaguchi Reaction for Arginine

قدم " ساكاجوتشى " هذه الطريقة عام ١٩٢٥ وقد طورها كل من بيكر Baker

(١٩٤٤) وسيرا Serra (١٩٤٤) ، وثوماس Thomas (١٩٤٦) .

وقد توصل بيكر الي ان هذه التفاعل يعطي نتيجة ايجابية مع المركبات المحتوية علي التركيب العام الآتي :



حيث B , ∝ يمثلا اما ذرة هيدروجين أو المجموعة CH_3 . وعلي ذلك فإن هذا التركيب يمكن أن يمثل بالاحماض الأمينية Galegine , Agmatine , Arginine والتي لا يوجد منها في الأنسجة البشرية سوى " الارجنين " .

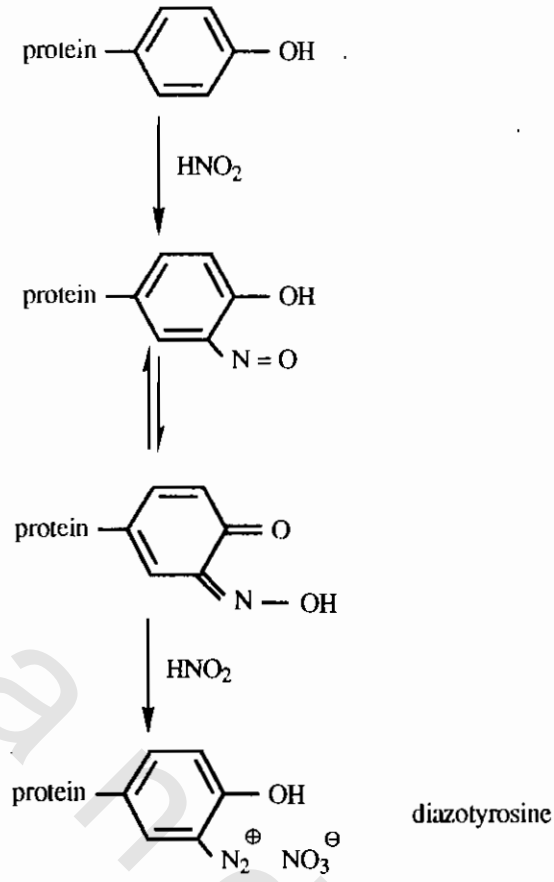
وفي هذا التفاعل ينتج لونا احمر - برتقاليا - من تفاعل الارجنين علي ألفانافثول هيبوكالوريت .

١٠ -طريقة النترتة - الازدواجية للكشف عن التيروسين :

Diazotisation - Coupling Method for Tyrosine :

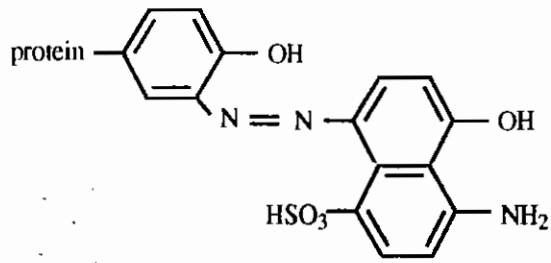
اقترح هذه الطريقة للى Lillie عام ١٩٥٧ ثم طورها جلنر وللى Glenner and Lillie (١٩٥٩) . وهى تعتمد على نترتة قطاعات شمعية مثبتة في الفورمالين أو خليط ساخن من الكلوروفورم والميثانول . وتجرى عملية النترتة باستخدام HNO_2 (الناتج من نيتريت الصوديوم وحمض الخليك في الماء المقطر) وذلك لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة عند درجة حرارة منخفضة (٣ °م) وبعيداً عن الضوء . يؤدى الي سلسلة من التفاعلات الكيميائية بين التيروسين ، و HNO_2 تنتهي بتكوين نيترات الديازونيم وفقا لما يلى :

obeikandl.com



diazotyrosine

ثم تعامل القطاعات فى وسط قلوى ودرجة حرارة منخفضة بعادة 8 - amino - 1 - naphthol - 5 - sulphonic Acid (S - acid) التى تكون مع نيترات الديازونيم مركب ازدواجات نيتروجينية ذو لون أحمر قرنفلى .



pinkish red compound

obeikandl.com

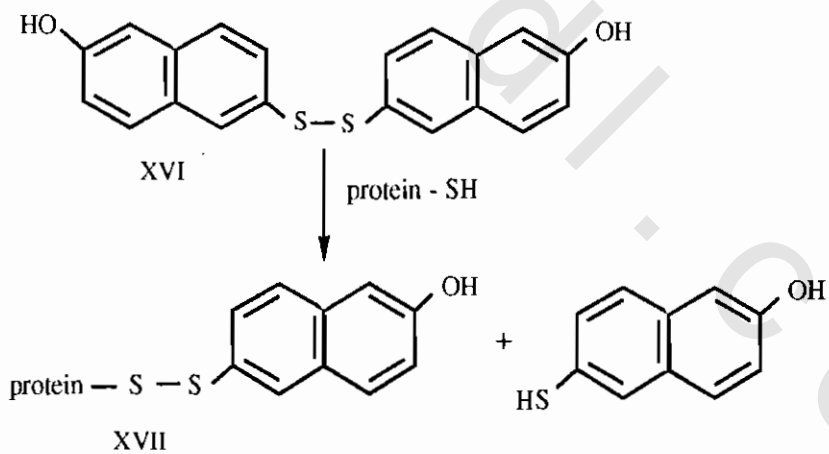
١١- طريقة داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد - (د . د. د.) للكشف عن مجموعات السلفهيدريل

The Dihydróxy - Dinphthly - Disulphide (DDD) Method for SH - Groups:

فى هذه الطريقة تستخدم مادة كيمائية خاصة لهذا الغرض هى داى هيدروكسى - داى نافثيل - داى سلفيد(د . د . د .2,2 Dihydroxyl-6-6- dinaphthyl). وتقوم الداى سلفيد فى هذا المركب باختزال مجموعة السلفهيدريل فى البروتين حيث ينشق المركب (د . د . د .) الى قسمين أحدهما هو (بروتين نافثيل داى سلفيد) والثانى (نافثيل ميركابتان) كمايلى :

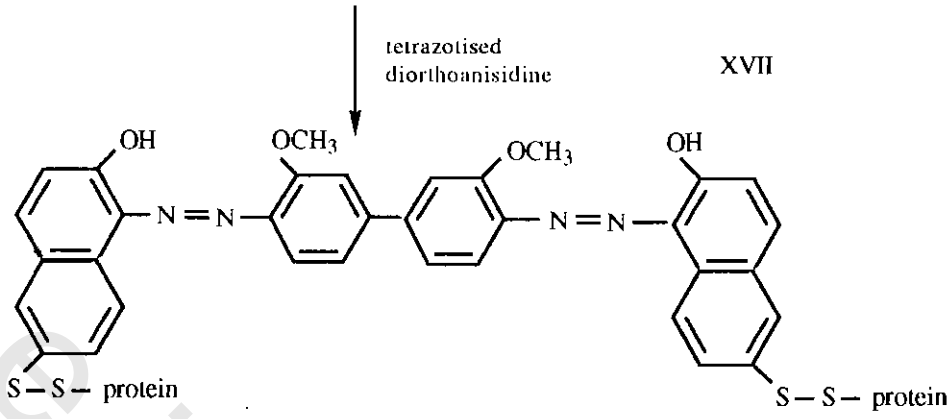
تغسل الشرائح بعد ذلك لإزالة مركب نافثيل ميركابتان وأيضا الزيادة من مركب (د. د. د.) وذلك باستخدام الكحول .

لإنتاج اللون تعامل القطاعات بملح ديازونيم (مثل فاست الأزرق ب Fast Blue B) الذى يتحد مع مركب (بروتين - نافثيل داى سلفيد) المتكون ، لينتج فى النهاية آزو داى Azo dye أزرق اللون .



XVI

XVII



وقد اقترح هذه الطريقة بارنت وسلجمان Barrnett and Seligman فى عام ١٩٥٢ .

ولإجراء تجارب ضابطة فإن هذا التفاعل يعطى نتيجة سلبية إذا سبقته أكسدة لمجموعات السلفهيدريل بإستخدام اليود أو بإستخدام أيودوأستيت Iodoacetate أو (ن - اثيل ماليميد N-ethyl maleimide) .

طرق الكشف الهستوكسيميائى عن البروتينات

- الصباغة بطريقة فان جيسون لصباغة ألياف الكولاجين

Van Gieson Method for the Collagen Fibers

الغرض منها :

صباغة ألياف الكولاجين (البيضاء) بطريقة مميزة .

الخطوات :

١- ثبت العينة فى أى مثبت يحتوى على كلوريد الزئبقيك .

٢- نفذ الخطوات من ٢ - ١٥ فى طريقة مالورى الثلاثية .

٣- اصبغ الأنوية بمحلول صبغ فيجرت أيرن هيماتوكسلين أو محلول صبغ سلستين

Weigert's iron hematoxylin or celesein blue بلو

٤- اغسل القطاعات جيدا فى ماء الصنبور .

٥- اغمس القطاعات فى الماء المقطر .

٦- اصبغ القطاعات فى محلول صبغ فان جيسون لمدة ٢-٥ دقائق (١٠٠ سم٣ من محلول مائى مشبع فى حمض البكريك + ٥ -١٠ سم٣ من ١٪ فوكسين حامضى فى الماء المقطر) .

٧- اغمس القطاعات فى الماء المقطر .

٨- انزع الماء من القطاعات فى ٩٥ - ١٠٠٪ كحول .

٩- روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى كندا بلسم .

النتائـــج

الكولاچين يصبغ باللون الأحمر .

العضلات وكرات الدم الحمراء وستوبلازم الخلايا باللون الأصفر .

أنوية الخلايا بلون بين البنى والأسود .

طريقة ثنائية الانكسار الضوئى باستخدام بكروسيرياس لفحص الكولاچين (جنكورا وآخرين ١٩٧٩) .

Picro- Sirius - Birefringence for Collagen after Junqueira et al , 1979

١ - جهز قطاعات شمعية بسمك ٥ ميكرون لعينات مثبتة فى الفورمالين أو البوان .

٢ - مرر القطاعات حتى الماء

٣ - اصبغ القطاعات لمدة ستين دقيقة فى ١,٠٪ سيرياس الأحمر Sirius red F 3BA فى محلول مائى مشبع (أسه الهيدروجينى ٢) .

٤ - اغسل مرتين لمدة دقيقة واحدة فى ١٠,٠ عيارى من حمض يدكل .

* انظر أيضاً كتاب التقنية المجهرية تأليف البنهاوى والجنزورى ، اصدار دار المعارف عام ١٩٨٩ .

obeikandl.com

٥ – انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، ثم روق وغط بالبالسم .

واذا كانت القطاعات فى غضروف ، فإنها تعالج أولا لمدة ٩٠ دقيقة باستخدام ٠,٥ ٪ (بابان) Papin(IVF VIII Difco) فى ٠,٠٢ مولار منظم فوسفات عند أس هيدروجينى ٧,٤ وتحتوى على ٠,٠٠٥ مولار ثانى كبريتيد الصوديوم ، ٠,٠٠٥ مولار إ د ت أ (EDTA) ثم أغسل القطاعات بالماء المقطر .

النتائج :

عند فحص القطاعات فى الضوء المستقطب يبدو الكولاجين ثنائى الانكسار Birefringent يصبغ الكولاجين من الطرز I ، II ، III وكذلك حبيبات الكيراتوزجاجية Keratohyaline granules باللون الأحمر .

– الصباغة بطريقة فايجرت ريزورسين فوكسين لصباغة الألياف المرنة .

Weigert's Resorcin- Fuchsin Method for Elestic Fibers

الغرض منها :

صباغة الألياف المرنة (الصفراء) بطريقة مميزة .

الخطوات :

١– ثبت العينة فى ١٠٪ فورمالين أو زنكراسيتيك

٢– نفذ عملية إزالة الزائد من المثبت من العينة

٣– اجر الخطوات من ٣–١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية .

٤– ضع القطاعات فى محلول فايجرت أيرن هيماتوكسيلين Weigert's iron haematoxylin لمدة ١–٣ دقائق (صباغة أنوية الخلايا)

٥– اغسل الشرائح فى الماء .

٦- اصبغ القطاعات فى محلول ريزورسين فوكسين لمدة ١-٣ ساعات . راجع درجة صباغة الألياف المرنة بالميكروسكوب ويراعى أن اقتضيت الحالة زيادة وقت الصباغة حتى تصبغ الألياف المرنة باللون الأسود .

٧- أزل الزائد من الصبغ بغسل الشرائح فى ٩٥٪ كحول .

٨- أغسل الشرائح فى محلول صبغ فان جيسون لمدة دقيقة واحدة وذلك لصباغة ألياف الكولاجين .

١٠- ضع الشرائح فى ٩٥٪ كحول (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق) ثم استكمل نزع الماء بوضع الشرائح فى الكحول المطلق (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق) .

١١- روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى كندا بلسم .

النتـائـــج :

- الألياف المرنة (الصفراء) زرقاء مسودة أو سوداء
- الأنوية زرقاء إلى سوداء
- ألياف الكولاجين (البيضاء) حمراء إلى قرنفلية .
- العناصر الأخرى بالنسيج صفراء .

طريقة أزرق ١٥٢ المباشرة لصباغة الالياف المرنة

(هوروبن وچيمس ١٩٧٠)

Direct blue 152 method for elastic fibres

(Horobin and James , 1970)

تحضير محلول الصبغ :

أضف ٢٥ سم٣ من فيرونال الصوديوم أو أى محلول منظم آخر (أسه الهيدروجينى ٩) إلى ٢٥ سم٣ من محلول الازرق ١٥٢ فى داى مثيل سلفواكسيد Direct blue 152 in

obeikandi.com

. dimethylsulphoxide

ويستخدم هذا المحلول فى مدى سبعة أيام من تاريخ تحضيره .

الطريقـــة :

١- جهز قطاعات شمعية لعينات مثبتة فى ١٠٪ فورمالين متعادل .

٢- مرر القطاعات حتى الماء

٣- اصبغ القطاعات لمدة ٨ -١٠ ساعات .

٤- اغسل القطاعات فى ماء الصنبور .

٥- انزع الماء فى سلسلة متصاعدة التركيز من الايثانول ثم روق فى الزيلول وغط بصمغ تخليقى مناسب .

الصباغة بطريقة هورتيجا للكشف عن أليفا الرتكيولين

del Rio-Hortega Method for Reticulin

الغرض منها :

صباغة الياف الرتكيولين بطريقة مميزة .

الخطوات :

١- ثبت العينة فى أى مثبت عام ثم أزل الزائد من المثبت إن تطلب الأمر ذلك .

٢- نفذ الخطوات من ٣-١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية .

٣- ضع القطاعات فى محلول ٢ . ٠٪ برمنجات البوتاسيوم لمدة ٣ دقائق .

٤- اغسل القطاعات فى الماء المقطر لمدة دقيقتين .

٥- ضع القطاعات فى محلول ٥٪ حمض الأوكساليك لمدة ٣ دقائق .

٦- اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر (عدة تغيرات لمدة ١٠ دقائق) .

obeikandl.com

٧- ضع القطاعات فى كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal silver carbonate فى درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٥-٣٠ . دقيقة - لاتعرض المحلول لضوء شديد - كذلك احذر ملامسة أية أدوات معملية للمحلول .

٨- اغمس القطاعات بسرعة فى ماء مقطر .

٩- ضع القطاعات فى محلول مائى ٢٠ ٪ فورمالين لمدة ٣ دقائق ثم اغسل فى الماء المقطر لمدة ٣ دقائق .

١٠ - ضع القطاعات فى محلول كلوريد الذهب Gold Chloride (١٢.٥ سم٣ ١٪ كلوريد ذهب + ٥٠ سم٣ ماء مقطر) حتى يتحول لون المحلول من الأصفر إلى الرمادى المائل الى البنفسجى .

١١- اغمس فى الماء المقطر لفترة وجيزة .

١٢- ضع القطاعات فى ٥٪ نيوكبرتيتات الصوديوم Sodium thiosulphate (hypo) لمدة ٣ دقائق.

١٣- اغسل القطاعات فى الماء الجارى لمدة ٥ دقائق .

١٤- (اختيارية) يمكنك صباغة أنوية الخلايا بفيجرت هيماتوكسلين وصباغة ألياف الكولاجين بواسطة بكروبونكو .

١٥- انزع الماء من العينة بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول (٧٠٪ ، ٨٠٪ ، ٩٥٪) ثم فى تغييرتين فى الكحول المطلق (٥ دقائق لكل تغييرة) .

١٦- روق القطاعات فى تغييرتين من الزيلول (٥ دقائق لكل تغييرة) ثم حمل القطاعات فى كندا بلسم .

النتائــــج :-

الرتكيولين .... أسود

الكولاجين .... أحمر

الأنوية .... سوداء - زرقاء أو بنى

السيتوبلازم ..... أصفر رمادى

العضلات والألياف المرنة ..... أصفر فاتح

تحضير محلول كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal Silver Carbonate

- أضف ١٠ سم٣ من محلول مائى مشبع من كربونات اللثيوم الى ١٠ سم٣ من محلول نيترات الفضة .
- رج ثم اسمح للراسب بالتجمع - رشح - ثم اغسل الراسب بالماء المقطر خمس مرات
- أضف ٢٥ سم٣ من الماء المقطر ثم أضف محلول الأمونيا قطرة قطرة لتذيب الراسب مع الرج (الامونيا ٢٨٪) مع استبقاء عدد قليل من الحبيبات مترسبة .
- أضف ٩٥٪ كحول حتى تصل الكمية إلى ١٠٠ سم٣ ثم رشح .
- سخن مع عدم التغطية عند ٥٠ م لمدة عشرين دقيقة . احتفظ بالناتج فى زجاجة بنية اللون مع العلم بأنه صالح للاستعمال ويستعمل عدة مرات بشرط التسخين عند ٥٠م والترشيح قبل كل استعمال .

(طريقة ميلون (١٨٤٩) ، للكشف عن البروتينات المحتوية علي التيروسين (محورة عن بيكر - ١٩٥٦)

Milon Reaction (1984) for Tyrosine-containing Proteins)

(Baker Modification 1956)

تحضير الكاشف :

١- أضف ١٠ جم كبريتات الزئبق $HgSO_4$ إلى ١٠٠ سم٣ من ١٠٠٪ حمض كبريتيك وسخن حتى ينوب الملح ، ثم أضف ماء حتى يصل الحجم الكلى إلى ٢٠٠ سم٣ .

٢- لكل ٥٠ سم٣ من هذا المحلول ، أضف ٥ سم٣ من ٠,٢٥٪ نيتريت صوديوم .

obeikandl.com

خطوات العمل :

١- ثبت العينات فى الفورمالين وجهز قطاعات شمعية .

٢- ضع القطاعات فى كأس زجاجى صغير يحتوى على الكاشف وسخن حتى الغليان برفق لمدة دقيقتين .

٣- اترك الكأس ليبرد حتى تصل حرارته إلى درجة حرارة الغرفة .

٤- اغسل القطاعات ثلاث مرت بالماء المقطر لمدة دقيقتين فى كل مرة .

٥- غط باستخدام الجلسرين جيللى أو انزع الماء بسلسة من الكحولات ثم روق وغط باستخدام أحد الاصماغ .

النتيجـــة : تظهر البروتينات المحتوية على التيروسين بلون أحمر إلى قرنفلى أو أحمر يميل للصفرة .

طريقة البرومفينول الأزرق الزئبقي Mercuric Bromphenol Blue Method

(عن بوناج عام ١٩٥٥ - After Bonhag)

تحضير محلول الصباغة :

يحضر محلول الصبغ بإحدى الطريقتين الآتيتين :

١- ١٪ برومفينول الازرق Bromphenol blue فى الكحول ثم يضاف إليه كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$ حتى درجة التشبع .

٢- ٢٪ حمض خليك مائى يحتوى على ١٪ كلوريد زئبقور ٠,٠٥٪ برومفينول الأزرق .

خطـوات العمـل :

١- ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين أو أى مثبت عادى متجنبًا المثبتات المحتوية على حمض الأوزميك .

obeikandl.com

٢- الصق القطاعات الشمعية على شرائح غير معاملة بلاصق يحتوى على بياض البيض .

٣- مرر القطاعات فى الزيلول لازالة الشمع ثم فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تصل إلى الماء .

٤- اصبغ القطاعات فى أحد محلولى الصبغ لمدة ساعتين فى درجة حرارة الغرفة .

٥- ضع الشرائح لمدة خمس دقائق فى ٠,٥٪ حمض خليك .

٦- انقل القطاعات إلى كحول بيوتايل رباعى Tertiary butyl alcohol وبذلك يتحول الأس الهيدروجينى الحامضى للقطاعات الى نقطة التعادل .

٧- روق القطاعات فى الزيلول وغط بصبغ مناسب .

النتائـــج : تصبغ البروتينات بلون أزرق داكن .

طريقـــة آكـــرولين - شـــف للبروتينـــات

Acrolein Schiff Method For Proteins

(فان دوجن Van Duijn, 1961 - 1961)

١ - ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين .

٢ - أزل الشمع من القطاعات ثم مرر فى الكحول المطلق الإثيلى ثم ٩٥٪ كحول إيثيلى.

٣ - ضع القطاعات لمدة ١٥-٦٠ دقيقة فى محلول طازج من ٥٪ أكرولين Acrolein فى ٩٥٪ كحول اثيلى .

٤ - مرر القطاعات فى ثلاثة تغييرات من الكحول الاثيلى المطلق ، خمس دقائق لكل تغييرة ثم مرر الى الماء .

٥ - ضع القطاعات فى محلول شف لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة .

٦ - اغسل القطاعات فى الماء .

٧- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق وغط باستخدام كندا بلسم .

النتيجة : تصبغ البروتينات بلون أرجوانى محمر .

طريقة ننهدرين - شف للبروتينات الحاوية علي مجموعات أمين نشطة

Ninhydrin - Schiff Method for Protein - bound NH_2

(ياسوما وإتشيكاوا ١٩٥٣ Yasuma & Itchikawa)

١- ثبت العينات فى محلول زنكر أو كارنوى .

٢- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .

٣- ضع القطاعات فى ٠,٥٪ تنهيدرين Ninhydrin فى كحول مطلق لمدة ١٦-٢٠ ساعة عند درجة حرارة ٣٧° م .

٤- اغسل القطاعات فى ماء جار لمدة ثلاث دقائق .

٥- ضع لقطاعات فى محلول شف Schiff's reagent لمدة ٢٥ دقيقة .

٦- اغسل بالماء الجارى لمدة عشرة دقائق .

٧- اصبغ الانوية - إذا أردت - باستخدام محلول ماير هيم ألم Mayer's Haemalum ثم ميز باستخدام ١٪ كحول محمض .

٨- مرر القطاعات بسلسة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق الزيلول وغط باستخدام كندا بلسم .

النتائج : تصبغ البروتينات الحاوية على مجموعة أمين نشطة باللون الأحمر القرنفلى .

طريقة د م أ ب - نيتريت للكشف عن التريتوفان (عن آدمز - ١٩٥٧)

The D M A B - Nitrite method for Tryptophan (After Adams, 1957)

١- ثبت لمدة تتروح من ٦-٢٤ ساعة فى فورمالين متعادل .

٢- حمل القطاعات على شرائح معاملة بالالبيومين .

obeikandl.com

٣- مرر القطاعات الى الكحول المطلق ثم جففها فى الهواء . واغمسها بسرعة فى محلول ٥٪ بارداى مثيل أمينو بنز الدهيد P-dimethylamino benzaldehyde فى حمض ايدروكلوريك كثافته النوعية ١٨ . ١ لمدة دقيقة واحدة .

٤- انقل الشرائح الى ١٪ نيتريت الصوديوم فى حمض هيدروكلوريك مركز واتركها لمدة دقيقة واحدة .

٥- اغسل لمدة ٣٠ ثانية فى ماء الصنبور .

٦- اغمس القطاعات فى ١٪ كحول محمض .

٧- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول لنزع الماء ثم روق وغط القطاعات .

النتائج : تظهر البروتينات المحتوية على التربتوفان بلون أزرق ويبدو التفاعل قويا فى بعض خلايا المعدة والأمعاء وخلايا الجيوب البنكرياسية والعضلات .

تفاعل "روزيندول للاندولات" (عن جلنر ١٩٥٧)

The Rosindol Reaction for Indoles (Clenner 1957)

١ - ثبت العينات فى محلول ١٠٪ خلات الكالسيوم فى الفورمالين لمدة ٣ -٦ ساعات .

٢ - ازل الشمع من القطاعات ثم ضعها فى كحول مطلق .

٣ - جفف الشرائح فى الهواء لمدة ٣٠ ثانية .

٤ - ضع القطاعات لمدة ثلاث دقائق فى درجة ٢٥° م فى المحلول الآتى :

حمض فوق الكلور	Perchloric Acid	٦٠ سم٣
حمض خليك	Acetic Acid	٣٤ سم٣
حمض هيدروكلوريك مركز	Hydrochloric Acid	١سم٣
بارادى مثيل أمينو بنزالدهيد		١ جم

obeikandl.com

٥ – ضع القطاعات لمدة دقيقة واحدة فى محلول يحضر قبل الاستعمال مباشرة يحتوى على :

حمض خليك	Acetic Acid	٣٥ سم٣
حمض ايدروكلوريك	Hydrochloric Acid	٥ سم٣
نيتريت الصوديوم	Sodium nitrite	٠,٥ ٪ جم

٦– اغسل القطاعات ثلاث مرات فى حمض الخليك ثم فى محلول حمض خليك وزيلول بنسبة ١:١ ثم فى محلول الزيلول .

٧ – غط القطاعات باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الاندولات بلون أزرق داكن .

الكشف عن البروتينات المحتوية علي مجموعات الأمين النشطة بطريقة هيدروكسي نافثالدهيد وايز – تسو وسلجمان – ١٩٥٤) .

Hydroxy naphthaldehyde method for active NH_2 groups (Weiss, Tsou and Seligman 1954)

إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة فى السيتوبلازم يوصى بإجراء التثبيت فى محلول كارنوى أما إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة فى أنوية الخلايا فيوصى باستخدام محلول زنكر مع مراعاة عدم معاملة العينات أو القطاعات بمحاليل الثيوكبريتات أو اليود فى هذه الحالة .

١– مرر القطاعات الى الماء عبر سلسلة متناقصة التركيز من الكحول .

٢– ضع القطاعات لمدة ساعة فى محلول طازج التحضير ، يحضر بالطريقة الآتية :

٣– هيدروكسى –٢ نفثالدهيد	3hydroxy -2naphthaldehyde	٢٠ ملجم
أسيتون	Acetone	٢٠ سم٣

ثم أضف ٣٠سم٣ من منظم ٠,٠١ محلول جزئى فيرونال– خلات .

(0.I m-veronal acetate buffer) أسه الهيدروجينى ٨,٥ .

٣– اغسل القطاعات فى ثلاث تغييرات من الماء المقطر لمدة خمس دقائق لكل تغييره

obeikan.com

٤- ضع القطاعات فى منظم (٠,١) محلول جزئى - خلات

(0.I m-veronal acetate buffer) أسة الهيدروجينى ٧.٤

أضف إلى سطح المحلول ٢٥ ملجم ثنائى أورثو أنيسيدين تترازوتيزيد Tetrazotized diorthoanisidne (ملح فاست بلو " ب " Fast blue B Salt) هز المحلول .

٥ - بعد خمس دقائق اغسل القطاعات بماء صنبور جارى لمدة خمس دقائق أخرى

٦- مرر القطاعات بسلسة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط فى كندا بلسم .

النتائج : تصبغ التراكيب الغنية بمجموعات الأمين النشطة باللون الازرق بينما تصبغ باللون الاحمر القرنفلى التراكيب التى تحتوى على قليل من هذه المجموعات الكيماوية .

طريقة حمض بيرفورمك - شف للكشف عن البروتينات الغنية في مجموعات ثنائي الكبريت - ستين (بيرسي ١٩٥١)

The Performic Acid-Schiff Method (PFA)for SS groups (Pearse, 1951)

تحضير المحاليل :

محلول حمض فوق الفورميك Performic Acid

أضف ٤ سم^{٣} من ٣٠٪ ماء أوكسجين ١/٢سم^{٣} من حمض كبرتيك مركز الى ٤٠سم^{٣} من ٩٨٪ حمض فورميك . استخدم المحلول فى الفترة الواقعة بين مرور ساعة واحدة ،٢٤ ساعة من تحضير لاحظ ألا تستخدم ماء أوكسيجين فتحت زجاجته منذ مدة أكثر من ٣ أسابيع .

كاشف شف Schiff's Reagent

الطريقة :

١- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .

٢- ضع القطاعات لمدة ١٠-٣٠ دقيقة فى حمض فوق الفورميك .

obeikandl.com

٣- اغسل القطاعات فى الماء لمدة ٢-٥ دقائق .

٤- ضع القطاعات فى محلول شف لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة .

٥- اغسل فى ماء جارى دافىء لمدة ١٠ دقائق .

٦- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق الزيلول وغط فى دى بى اكس . D . P . X

النتائج : البروتينات المحتوية على ثنائى الكبريت مثل الكيراتين تأخذ لونا قرنفليا الى الأحمر الأرجوانى .

طريقة ساكاجوتشي (١٩٢٥) للكشف عن "الأرجنين"

(محورة عن بيكر ١٩٤٧)

١ - ثبت العينات فى زنكر - بوان - سوزا أوفورمال سبلمت .

٢ - أزل الشمع من القطاعات ثم مرر القطاعات فى كحول مطلق ثم خليط من الكحول المطلق والآثير .

٣ - ضع الشرائح فى محلول ١٪ سيللودين لمدة دقيقتين ثم أترك الشرائح تجف فى الهواء

٤ - مرر القطاعات فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحولات حتى الماء .

٥ - حرك الشريحة فى الهواء حتى تجف .

٦- ضع على القطاعات قطرات من محلول ألفا نافثول هيبوكلوريت α- Naphthol hypochlorite واتركه لمدة ١٥ دقيقة .

٧ - صفى الشريحة وجفف القطاع بورقة ترشيح .

٨ - ضع الشريحه فى خليط من أجزاء متساوية من البيريدين والكلوروفورم .

٩ - غط القطاع بخليط من البيريدين والكلورفورم

النتائج : البروتينات الحاوية على الارجنين تاخذ لونا برتقاليا محمرا .

طريقة النترته - الازدواجية للكشف عن التيروسين

Diazotisation - Coupling Method for Tyrasine

(Glenner and lillie, 1959)

١- جهز قطاعات شمعية مثبتة فى الفورمالين أو خليط ساخن من الكلورفورم والميثانول .

٢- ازل شمع القطاعات وأوصلها حتى الماء .

٣- إجر عملية النترتة فى الظلام بوضع القطاعات لمدة ١٨-٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣° م فى خليط يحتوى على ٦.٩ جم نيتريت الصوديوم ، ٥.٨ سم٣ حمض خليك، ثم أكمل الى ١٠٠ سم٣ بالماء المقطر .

٥ - عامل القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٣°م بخليط يحتوى على ١جم هيدروكسيد البوتاسيوم ، ١جم سلفمات الامونيوم ammonium sulphamate ، ١ جم (8-amino -1-naphthol-5-sulphonic acid)Sacid.

٦ - اغسل القطاعات فى ثلاث تغييرات من $\frac{1}{10}$ عيارى من حمض الهيدروكلوريك ٠.١ N-HCl ، لمدة خمس دقائق لكل تغييرة .

٧ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، روق بالزيلول ثم غط بالصمغ .

النتيجة : تعطى البروتينات المحتوية على التيروسين لونا أحمر قرنفليا .

طريقة داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد (د . د. د.)
للكشف عن مجموعات السلفهيدريل (عن بارنت وسلجمان سنة ١٩٥٢)

The dihydroxyl-dinaphthyl-disulphide (DDD)method for SH groups

(after Barnett and Seligman,1952)

١- ثبت العينات فى الفورمالين أو كارنوى أو بوان أو فى خليط من حمض ترای كلورو أستيك والايثانول .

٢- جهز قطاعات شمعية .

٣- ضع القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٥٠م° فى محلول يحتوى على ٢٥ سم٣ فى ٠,١ مولار فيرونال أستيت 0.1 M Veronal acetate أو فى ٠,١ مولار منظم ترسى 0.1M Tris buffer (الأس الهيدروجينى ٨.٥)، ٢٥سم٣ كحول إثيلى مطلق مذابا فيه مسبقا ٢٥ ملجم من الكاشف (د.د.د.) 2, 2 dihydroxyl- 6, 6 dinaphthyl disuphide (DDD)

٤- برد حتى درجة حرارة الغرفة .

٥- اغسل فى ٥٠٪ منظم كحولى اثيلى لمدة ١٥ دقيقة .

٦- اغسل القطاعات فى ماء مقطر .

٧- ضع القطاعات لمدة دقيقتين فى محلول طازج من ٥٠ ملجم من ملح فاست بلو ب (تترازوتايزد داى أورثو أنزيد) (Tetrazotised diorthoanisidine. Fast blue B salt) فى ٥٠ سم٣ من ٠,١ مولار منظم فوسفاتى عند أس هيدروجينى ٧.٤ .

٨ - اغسل فى ماء صنبور جارى .

٩- انزع الماء بالكحول - روق فى الزيلول ثم غط بالبالسم .

النتيجة : البروتينات المحتوية على مجموعات سلفهيدريل تعطى لونا أزرق .

الكشف عن الامنيلويدات باستخدام مثيل فيوليت (محورة عن بنكوروفت عام ١٩٦٣).

Methyl Violet Method for Amyloid (Modified by Bancroft , 1963)

تحضير المحاليل :

١- ١٪ محلول مائى مثيل فيوليت Methyl violet .

٢- ٢٪ محلول مائى مثيل جرين Methyl green ، مع ملاحظة ضرورة التخلص مما يحتويه من ميثيل فيوليت بالغسيل بواسطة الكلوروفورم (راجع صفحة ١٨٧).

٣- ١٪ حمض خليك .

خطوات العمـل :

١- جهز قطاعات للعينة مثبتة فى الفورمالين وذلك باستخدام الميكرونوم الثلجى أو الكروبوستات

٢ - اغسل القطاعات فى الماء .

٣ - أصبغ القطاعات باستخدام محلول مثيل فيوليت لمدة ١ - ٢ دقيقة .

٤ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة دقيقة واحدة .

٥ - اغمس القطاعات حوالى ١٥ ثانية فى محلول ١ ٪ حمض خليك .

٦ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة دقيقة .

٧ - اصبغ القطاعات فى محلول المثيل جرين لمدة خمس دقائق .

٨ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة ٣٠ ثانية .

٩ - غط باستخدام جلسرين جيللى أو جفف القطاع جيداً بورق ترشيح ثم روق فى الزيلول ثم غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الاميلويدات لبلون قرنفلى إلى أحمر ، بينما تصبغ الأنوية بلون أخضر .

الكشف عن ، الاميلويدات ، باستخدام صبغ كونغورد (محورة عن هايمان عام ١٩٤٦) .

Conogo Red Method for Amyloid (Modified by Highman 1946 .)

محلول الصبغ : Staining Solution

- كونغو رد Congo Red ٥٠٠ ملجم
- كحول مطلق Absolute alcohol ٥٠ سم٣
- ماء مقطر Distilled water ٥٠ سم٣

محلول التمييز : Differentiator .

- هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide ٢٠٠ ملجم
- كحـول مطـــلق Absolute alcohol ٨٠ سم

obeikandl.com

- مـــــاء مــقـطـر   Distilled water   ٢٠ سم ٣

خطوات العمل :

١ – مرر القطاعات حتى الماء .

٢ – اصبغ فى محلول صبغ كونغو رد لمدة ثلاث دقائق .

٣ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٤ – ميز الصبغ بواسطة محلول التمييز الموضح أعلاه ، مع استخدام الميكروسكوب لضبط التمييز .

٥ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٦ – اصبغ الانوية باستخدام صبغ الهيماتوكسيلين .

٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٨ – انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول .

٩ – روق فى الزيلول .

١٠ – غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائـــج :

- الاملويدات .... برتقالية إلى حمراء
- الأنوية .... زرقاء
- الإلاستين .... برتقالية