تركيز محاليل البروتينات

٣- الترسيب بضبط الرقم الهيدروجيني pH

من المعلوم ان كل بروتين له نقطة تعادل كهربائي Isoelectric point وعندما لاتحمل جزيئات البروتين اية شحنة كهربائية خالصة ومن ثم لاتوجد قوة تنافر بين جزيئات البروتين ولذلك تتجمع جزيئات البروتين وتترسب . وعند pH اعلى او اقل من نقطة التعادل الكهربائي تكون جزيئات البروتين محملة بشحنات كهربائية وكل منها يطرد الاخر ويمنع ذلك تجمع جزيئات البروتين وترسيبها وبناءا على هذه الخاصية يمكن فصل البروتينات بالترسيب عند نقطة التعادل الكهربائي وبذلك فعند ضبط محلول البروتين الخليط عند نقطة التعادل الكهربائي لاحد المكونات البروتينية الموجودة في الخليط فان هذا المكون يترسبتاركا باقي البروتينات التي لها نقطة تعادل كهربائي اعلى او اقل من هذه القيمة التي تم ضبط المحلول عندها ذائبة في المحلول وبذلك يسهل التخلص منها بالطرد المركزي واستبعاد المحلول الرائق .

٤- الترسيب بالدنترة Denaturation

تعني الدنترة تدمير البناء الثالث لجزئ البروتين وتكوين سلاسل ببتيدية ذات التواءات عشوائية والتي بدورها تتشابك معا وتتجمع اما فيزيائيا او كيميائيا من خلال تكوين الروابط s-s ويلاحظ ان البروتينات المتغيرة الطبيعية قد تظل ذائبة في المحلول المنخفض في تركيز الاملاح بعيدا عن نقطة التعادل الكهربائي الخاصة بها وتترسب فقط في حالة ضبط درجة pH الى نقطة تعادلها الكهربائي ويرجع هذا الى التنافر بين السلاسل الببتيدية العشوائية المشحونة مما يجعلها تتباعد عن بعضها وعند الاقتراب من نقطة التعادل الكهربائي فانها تتجمع وتترسب . اما في حالة التركيزات العالية من الاملاح فتنعدم قوى التنافر بين السلاسل الببتيدية وبالتالي تحدث عملية التجمع والترسيب

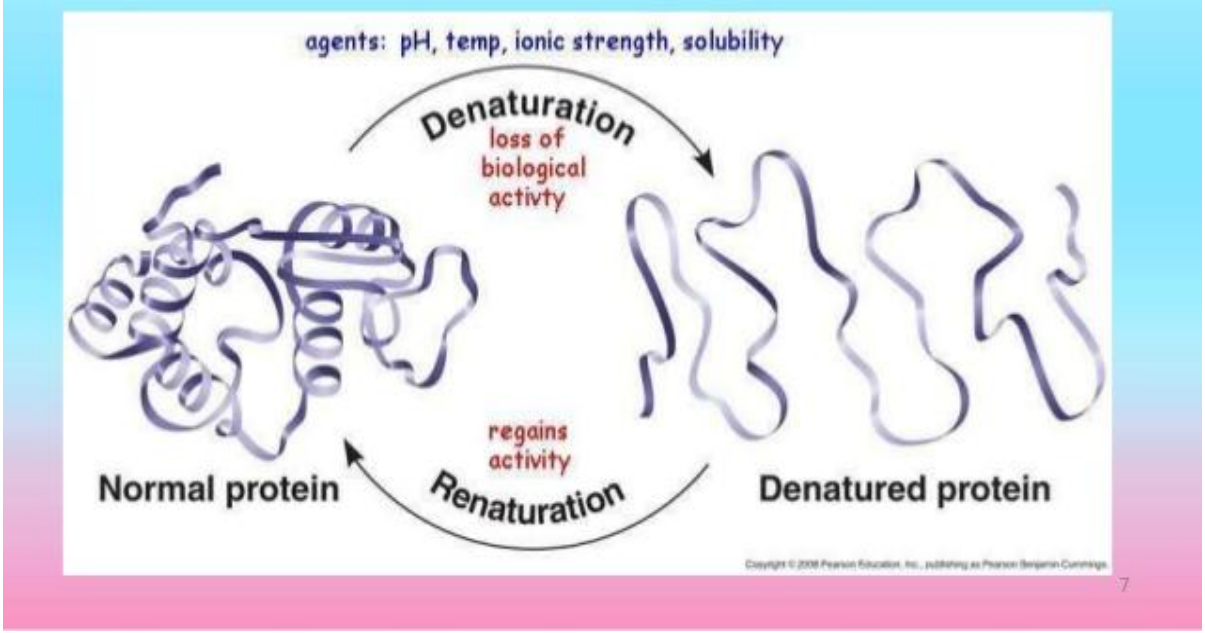
- **الدنترة باستعمال الحرارة**

تعد المعاملة الحرارية مرحلة اولية هامة في تنقية بعض الانزيمات التي تتمتع بثبات حراري معقول وتبدي البروتينات تجاه الدنترة الحرارية تباينا حراريا كبيرا مما يؤدي الى امكانية تحديد درجة الحرارة المغيرة لطبيعة تركيب البروتين بدقة وهذه الدرجة تتفاوت تفاوتا لاباس به من بروتين لاخر ، فيمكن في بعض الاحيان تغيير طبيعة (تخثر) كمية كبيرةمن البروتين غير المرغوب فيه بواسطة تسخين المحلول لمدة زمنية محددة الى درجة حرارة اقل من درجة

الحرارة التي تخرب البروتين محل الاهتمام ، ويمكن عندئذ التخلص من هذا البروتين المتخثر بالطرد المركزي ويفضل عند اجراء عملية التسخين استعمال ثلاثة حمامات مائية يثبت احدها على درجة الحرارة المطلوبة ويثبت الثاني على درجة حرارة اعلى من السابقة ببضع درجات في حين يبقى الثالث باردا . يوضع المحلول في دورق ذي قاع مستدير حيث يملا الى نصفة ويغطس في الحمام المائي الساخن مع رج المحلول داخلة من اجل ان يكون التسخين متجانسا . تراقب درجة الحرارة بواسطة محرار موضوع في المحلول ثم ينقل الدورق عند الوصول الى درجة الحرارة المطلوبة الى الحمام المائي المثبت على هذه الدرجة ويترك لمدة معينة . ينقل الدورق بعدئذ الى الحمام المائي البارد ويبرد المحلول الموجود فيه بسرعة بمقدار بضع درجات مئوية بواسطة الرج ثم يترك حتى يبرد ببطء ويتراوح زمن التسخين عادة بين ١٠-١٥ دقيقة

- **الدنترة باستعمال درجات pH المتطرفة**

يمكن ان تسبب درجات pHالمتطرفة تنافر الكتروستاتيكي داخل جزيء البروتين او فقد هذا الارتباط الالكتروستاتيكي الداخلي internal electrostatic عن طريق تغيير الشحنات الخاصة بالسلاسل الجانبية للاحماض الامينية ، لذا فان جزيء البروتين ينفتح وبالتالي يفقد المذيب المرتبط به ممايؤدي الى الدنترة كما في الشكل التالي



وتعتبر هذه الطريقة في التنقية اكثر فائدة كخطوة اولية في حالة البروتينات المعدلة وراثيا والتي يتم انتاجها بواسطة الكائنات احادية النواة وبصفة عامة فان الكثير من البروتينات يمكن ترسيبها

عن طريق ضبط الpH الى 5 او اقل والقليل منها يترسب عند pH متعادل او قلوي . ويجب مراعاة انه قبل استعمال هذه المعاملة كخطوة تنقية لابد من تحديد درجة ثبات البروتين المستهدف تحت هذه الظروف ، كما يجب تجنب استعمال الاحماض القوية او القواعد القوية في ضبط pH . لذا يفضل استعمال حامض الخليك في حالة ضبط pH الى 4 او اعلى وحامض الشتريك في حالة pH 3 او اعلى بينما يستعمل داي اثيل امين Diethyl aminاو كاربونات الصوديوم Sodium carbonate في حالة pH 8 او اعلى ويلاحظ انه لابد من اجراء تجارب تمهيدية على نطاق صغير لتحديد درجة pH المثلى مع ضرورة تذكير انه عند تحديد الpH الامثل فان التجمعات الناتجة سوف تحتوي على كثير من البروتينات وبعض الجسيمات مثل الريبوسومات وبقايا الغشية لذا فان محتوى هذه التجمعات سوف يعتمد على مكونات المستخلص المستخدم .

- **<u>طريقة العمل</u>**

الترسيب بال Tri chloro acetic acid (TCA)(حامض الخليك ثلاثي الكلور)

الادوات المطلوبة :

١- انابيب اختبار ٢- جهاز فورتكس ٣- جهاز طرد مركزي

الكيمياويات :

١-TCA ١٠٠%

٢- محلول 0.1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم (يحضر باذابة 0.4 غم هيدروكسيد الصوديوم في 80 مل وبعد تمام الذوبان يكمل الى 100 مل

طريقة العمل :

١- يؤخذ ١مل من عينة البروتين ويضاف اليه ١٠٠ميكروليتر من TCA100% ثم الخلط بجهاز الفورتكس

٢-يسمح للبروتين بالترسيب لمدة ٣٠ دقيقة عن طريق وضع الانابيب في حمام ثلجي او في الفريزر لمدة ١٥ دقيقة

٣- يجرى الطرد المركزي بسرعة ١٢٠٠٠دورة /دقيقة

٤- يزال المحلول الرائق ويستبعد مع مراعاة التخلص من اي اثار للسائل الرائق بواسطة الماصة الاوتوماتيكية

٥-يعلق الراسب في ٥٠-١٠٠ ميكروليتر من محلول 0.1 مولاري هيدروكسيد الصوديوم مع الرج بالفورتكس

ملاحظة

في حالة ترسيب عينات بروتين ذات تركيز اقل منى ١ ميكروغرام يجب اطالة مدة التحضين على درجة -20 م لمدة اطول من ساعتين كذلك يجب اجراء الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق على سرعة ٢٧٠٠٠ دورة /دقيقة