University of Isfahan
Biological Science and Technology
Department of Cell and Molecular Biology
Cellular and Molecular Laboratory
Farzaneh Forouharfar

عنوان:
شناسایی کلی کربوهیدرات ها و شناسایی اختصاصی برخی از ترکیبات کربوهیدراتی در سلول به صورت مجزا

مقدمه

کربوهیدرات ها یا مواد قندی از اتم های کربن،هیدروژن و اکسیژن تشکیل شده اند و از انواع مولکول های زیستی هستند که به صورت ساده و پیچیده در سلول می توانند وجود داشته باشند.کربوهیدرات های ساده فقط حاوی یک یا دو نوع قند می باشد که به آن ها مونوساکارید (Monosaccharid) یا دی ساکارید (Disaccharid) می گویند و اغلب بی رنگ،محلول در آب،جامد کریستالی می باشند.کربوهیدرات های پیچیده شامل سه یا بیش از سه نوع قند می باشند و به آن ها پلی ساکارید (Polysaccharid) می گویند.کربوهیدرات ها منابع سریع انرژی در سلول هستند.علاوه بر آن در سلول نقش ساختاری هم می توانند داشته باشند.در این آزمایش ابتدا به شناسایی کربوهیدرات ها به صورت کلی(Total Carbohydrate) و سپس به شناسایی برخی از انواع آن ها به طور مجزا در سلول گیاهی با استفاده از واکنش آن ها به معرف های اختصاصی پرداخته می شود.

مقدمه

جهت شناسایی کربوهیدرات ها به صورت کلی رنگ آمیزی اختصاصی با معرف پریودیکاسید-شیف(Periodic acid-Schiff) انجام می شود.اسید پریودیک موجود در رنگ عامل هیدروکسیل کربوهیدرات را اکسید وتبدیل به اکوییید می کند و سپس تحت تأثیر معرف شیف ترکیبات کربوهیدراتی از هر نوعی که باشند به رنگ قرمز تا ارغوانی در می آیند.بنابراین در مرحله ی اول شناسایی اگر این آزمایش مثبت شد جهت تشخیص دقیق تر نوع کربوهیدرات از معرف های اختصاصی تر جهت تشخیص کالوز،سلولز،همی سلولز،سوبرین،کیتین و نشاسته در سلول گیاهی استفاده می شود.

مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

۱. فنل یا سدیم مرتیولات (Phenol/Sodium Merthiolate)

۲.آب مقطر

۳.معرف شیف (Schiff ‘s reagent)

۴.پودر ژلاتین

۵.اسید پریودیک (Periodic Acid)

۶.لام و لامل

۷.ویال‌های کوچک

۸.قطره چکان

۹.فیکساتیو (فرمالین، الکل، استیک اسید) .F.A.A

۱۰.درجات مختلف الکل اتیلیک از ۳۰ ٪ تا ۹۶ ٪

مواد و وسایل مورد نیاز

۱.شاخه‌های جوان و سبز پرتقال والنسیا

۲.دستگاه میکروتوم (یا تیغ بسیار تیز دو لبه)

۳.کانادا بالزام (Canada Balsam)

۴.آبی آنیلین (Aniline Blue)

۵. محلول کلرید روی ($ZnCl_2$)

۶. ید

۷. یدور پتاسیم (IKI)

۸.گلیسرول
(Glyserol)

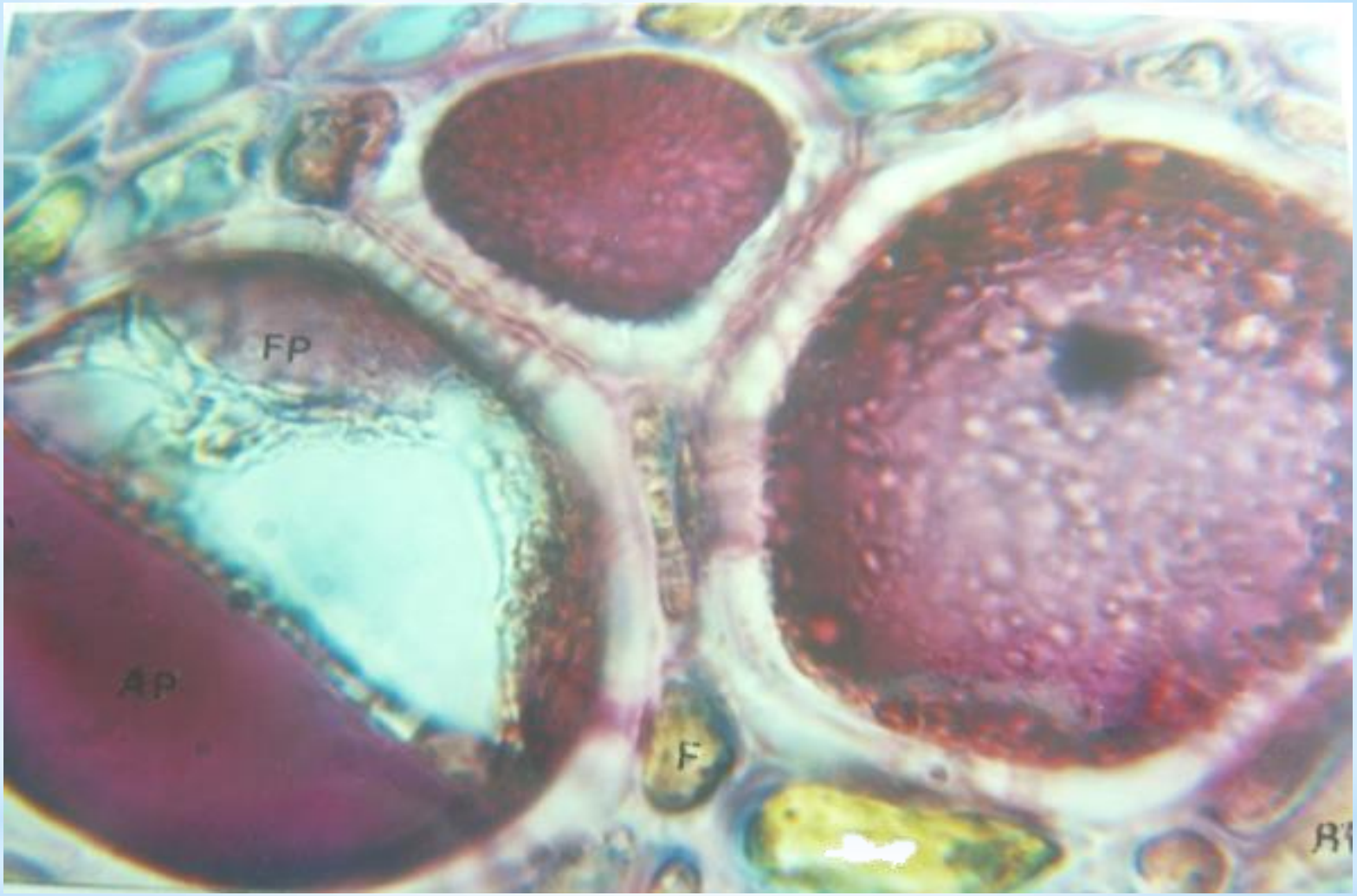
روش کار
شناسایی کربوهیدرات ها به صورت کلی (واکنش پریودیک اسید–معرف شیف)

در این آزمایش از شاخه‌های جوان و سرسبز پرتقال والنسیا جهت شناسایی ترکیبات کربوهیدراتی به صورت کلی یعنی تشخیص وجود یا عدم وجود این ترکیبات در سلول و شناسایی ترکیبات سلولزی،سوبرین ،کیتین، کالوز و به طور جداگانه استفاده می‌شود.

ابتدا شاخه‌های جوان سرسبزپرتقال والنسیا را از درخت مورد نظر جدا کرده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل کنید و با استفاده از تیغ به قطعات بسیار کوچک تبدیل نمایید و در محلول تثبیت کننده (فرمالین، استیک اسید، الکل) به نسبت حجمی مساوی به مدت یک هفته قرار دهید.

سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم لغزشی یا تیغ تیز برش‌های عرضی نازک و ظریف متعددی ازنمونه تهیه کنید و برای انجام مراحل بعدی در محلول تثبیت کنند، نگه دارید.
برش های تهیه شده را ابتدا با آب مقطر شست وشو داده و به مدت ۱۰ دقیقه در اسید پریودیک قرار دهید.پس از شست و شوی مجدد نمونه ها آن ها را به مدت ۲۰دقیقه در معرف شیف گذاشته و مجددا با آب مقطر شست وشو دهید.

سپس آن ها را متوالیا توسط درجات مختلف الکل اتیلیک از ۳۰ تا ۹۶ درصد هر ۱۰ دقیقه یکبارآبگیری کنید.پس از پایان مراحل آبگیری برش ها را روی لام قرار داده و با افزودن کانادا بالزامل لامل گذاری کنید و در زیر میکروسکوپ مشاهده نمایید.



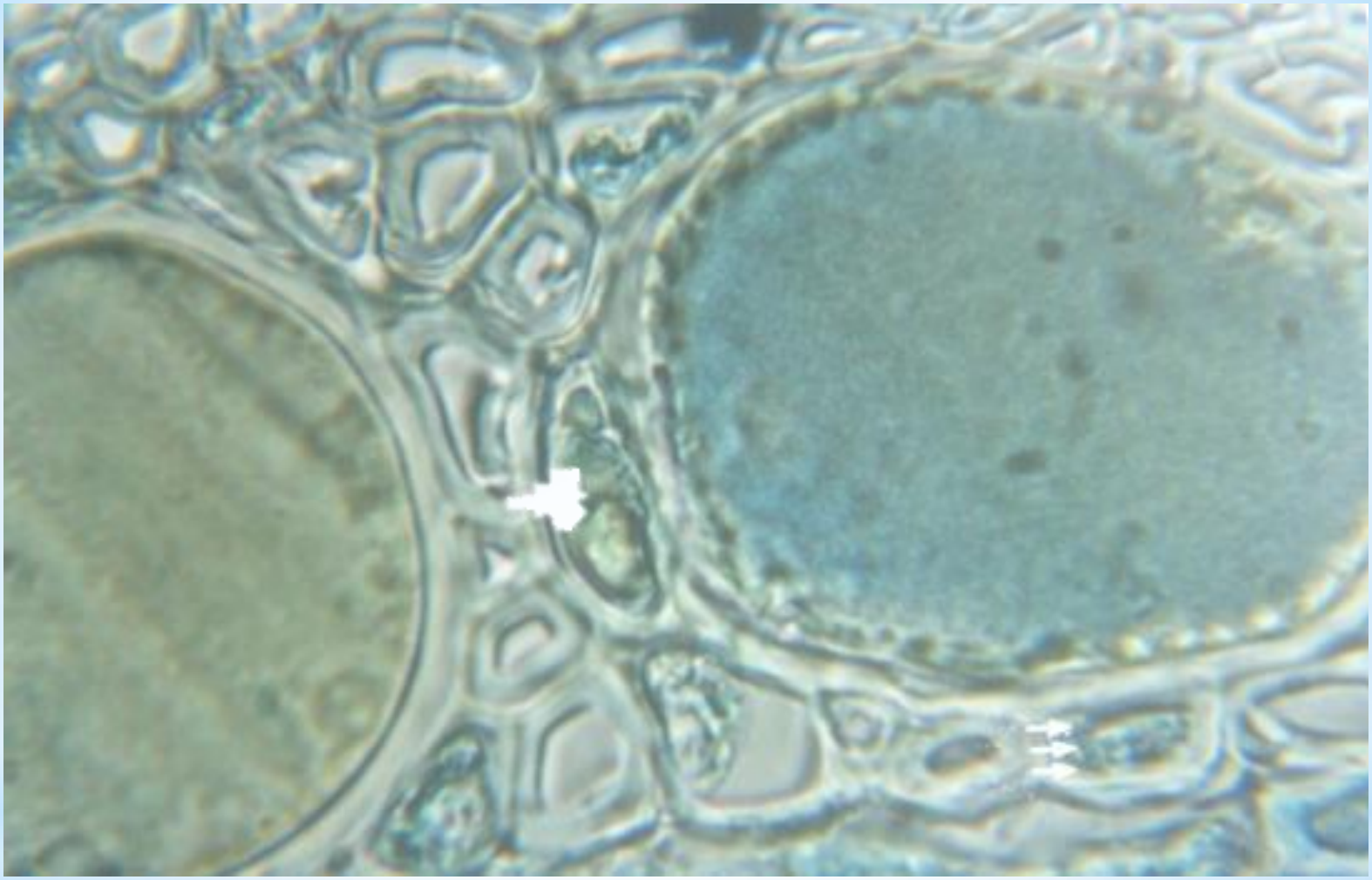
شناسایی کلی ترکیبات کربوهیدراتی در سلول با استفاده از واکنش پریودیک‌اسید-معرف شیف مشاهده توسط لنز ۱۰۰× که به رنگ ارغوانی مشاهده می کنید

شناسایی اختصاصی کالوز (واکنش آنیلین آبی)

تعدادی از برش‌های تهیه شده را پس از تثبیت و شستشو با آب مقطر در محلول ۰/۰۰۵آبی آنیلین در الکل ۵۰ درصد به مدت ۲۴-۲ ساعت قرار دهید و پس از این مدت زمان نمونه‌ها را به دقت فراوان توسط آب مقطر شستشو داده و در محیطر ژلاتینی بر روی لام بچسبانید و لامل‌گذاری کنید.

جهت تهیه چسب ژلاتینی۱۰ گرم پودر ژلاتین را در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و با حرارتدادن آن را حل کنید و به محلول حاصل ۷۰ میلی‌لیتر گلیسرول اضافه نمایید.سپس یک قطره از محلول اشباع شده فنل یا ۱ میلی‌گرم سدیم مرتیولات به عنوان ماده ضد عفونی کننده به آن اضافه کنید. این محلول بایستی در دمای ۴°C نگهداری و قبل از استفاده ذوب و عاری از هرگونه حباب هوا گردد.

پس از تهیه لام نمونه را زیر میکروسکوپ ابتدا با بزرگنمایی ۴۰× و سپس۱۰۰× مشاهده کنید. در صورت وجود کالوز در قسمت‌های مختلف نمونه در مجاورت با معرف فوق، این ترکیب به رنگ آبی روشن در خواهد آمد.



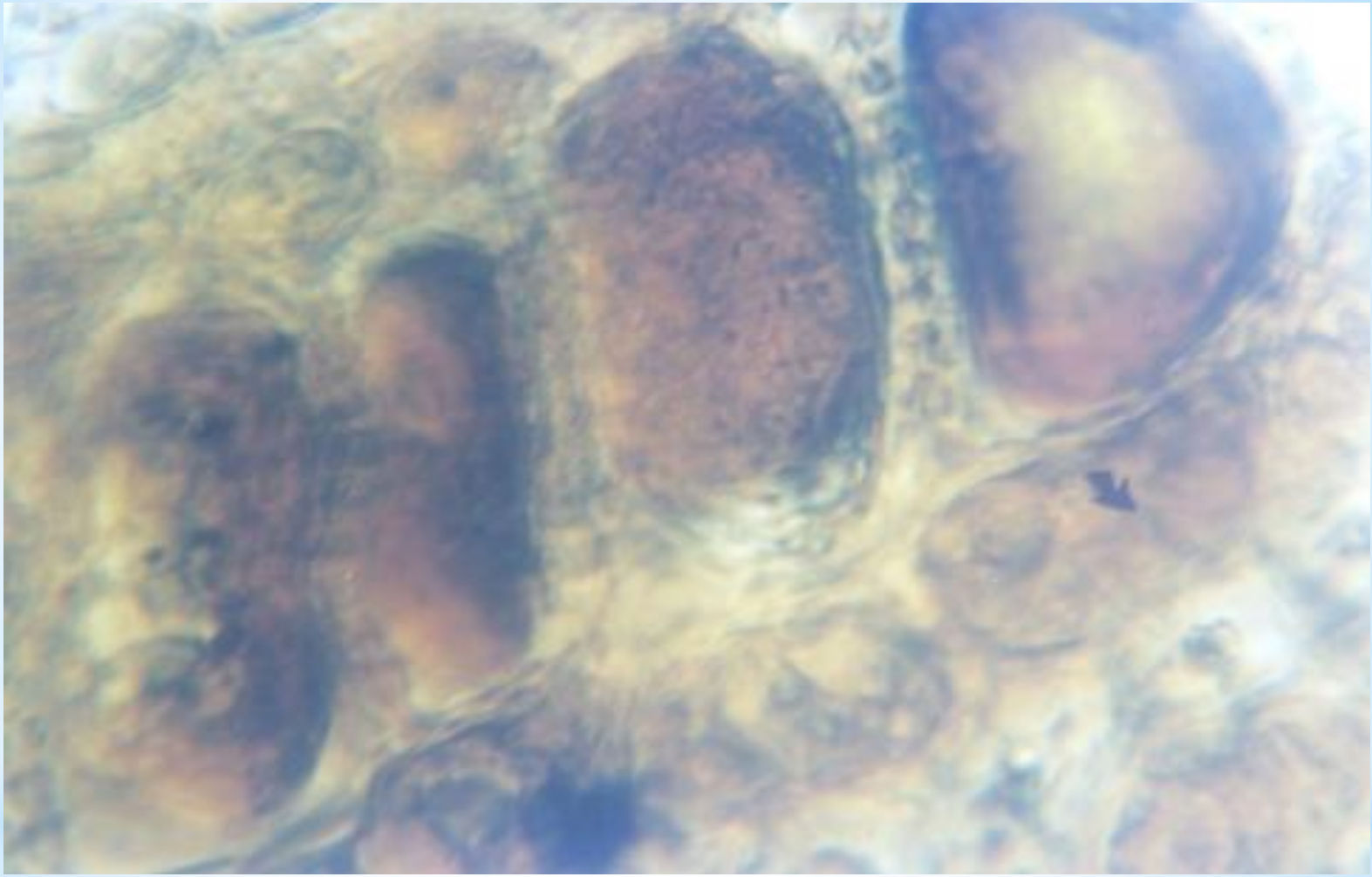
شناسایی ترکیبات کالوزی در سلول با استفاده از واکنش آبی آنیلین مشاهده با بزرگنمایی ۱۰۰×

در سلول سمت راست کالوز وجود دارد و در سلول سمت چپ وجود ندارد

شناسایی اختصاصی سلولز و همی‌سلولز، سوبرین و کیتین (واکنش ید–روی کلرید)

تعدادی از برش‌های تثبیت شده را جهت شناسایی ترکیبات فوق پس از شستشو با آب مقطر به مدت حداقل ۲ ساعت در محلول حاوی روی-کلر-ید قرار دهید. سپس نمونه‌ها را توسط آب مقطر شستشو داده و با کانادا بالزام بر روی لام بچسبانید و در میکروسکوپ تحت بزرگنمایی ۴۰ ×یا ۱۰۰× مشاهده می شوند.

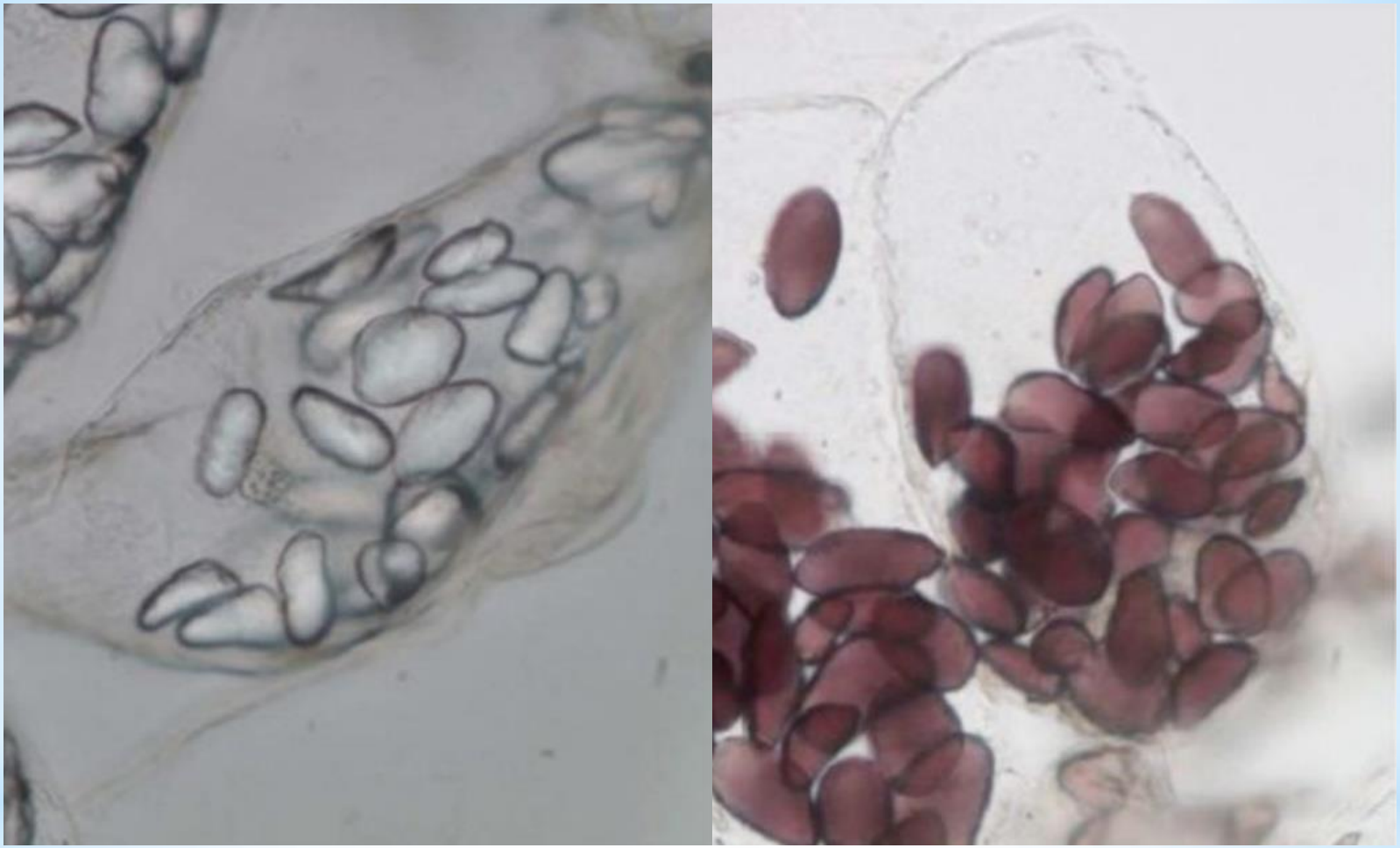
سلولز و همی‌سلولز در صورت وجود آبی رنگ می‌شوند و کیوتین، سوبرین و کیتین تحت تاثیر معرف فوق به رنگ زرد-نارنجی مشاهده می‌شود. جهت تهیه محلول روی-کلر-ید ۵۰ گرم کلرید روی و ۱۶ گرم یدور پتاسیم را در ۱۷ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید و سپس چند بلور ید اضافی به محلول اضافه نمایید. پس از چند روز قسمت شناور روی آب را در قطره چکان تیره ریخته و استفاده کنید.



شناسایی ترکیبات سلولزی و همی‌سلولزی، سوبرین وکیتین در سلول با استفاده از واکنش ید- روی- کلرمشاهده با بزرگنمایی ۱۰۰× ، وجود برخی از ترکیبات کربوهیدراتی در تصویر مشاهده می شود

شناسایی اختصاصی سلولز(واکنش ید–یدورپتاسیم)

تعدادی دیگری از برش‌های تثبیت شده را پس از شستشو با آب مقطر جهت شناسایی نشاسته در محلول ید، یدور پتاسیم (شامل ۲ گرم یدور پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به اضافه ۰/۲گرم ید) به مدت ۱-۲ دقیقه قرار دهید. نمونه‌ها را با آب مقطر شستشو داده و با کانادا بالزام روی لام بچسبانید و تحت بزرگنمایی
۴۰ × مشاهده کنید.
نشاسته در صورت وجود پس از واکنش فوق بر حسب تراکم به رنگ آبی تا سیاه در می‌آید. البته دقت شود که نشاسته‌های تازه ساخته شده در تراکم کمتر ممکن است به رنگ قرمز تا بنفش ظاهر گردند.



شناسایی نشاسته در سلول گیاهی