



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

عنوان:

**شناسایی ترکیبات پروتئینی و ترکیبات فنلی یا تانن‌ها
در سلول**

Cellular and Molecular Lab_FarzanehForouharfar

مقدمه

پروتئین ها مواد مغذی اصلی هر سلول زنده هستند. در ساختمان آنها نه تنها کربن، هیدروژن و اکسیژن وجود دارد، بلکه ازت و گاهی گوگرد نیز موجود می باشد.

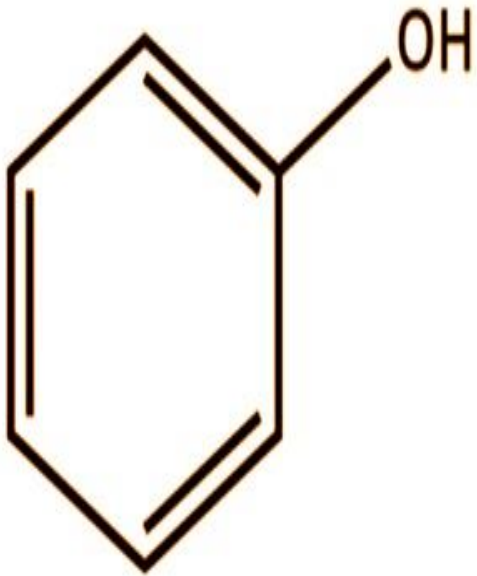
پروتئین ها مسئول انجام اعمال گوناگونی هستند. نقش آنها از تشکیل ماده انقباضی عضلات گرفته تا ساختن بعضی از هورمون ها، آنزیم ها و آنتی کورها، تبدیل انرژی شیمیایی به کار و انتقال اکسیژن و هیدروژن متنوع می باشد.

فنل (Phenol) ترکیبی است که از جایگزینی هیدروژن یک هسته آروماتیک با گروه هیدروکسیل (OH) ایجاد می شود. از این لحاظ، از نظر ساختمان شیمیایی، فنل یک الکل نوع سوم مخصوص می باشد.

مقدمه

فنل اکثراً بنام اسید کاربویک نامیده می‌شود، چون خاصیت اسیدی ضعیفی دارد. فنل به شکل کریستال‌های سوزنی شکل به هم پیچیده یا جدا از هم، یا توده کریستالی بی‌رنگ یا کمی صورتی و با بوی مخصوص وجود دارد. آب به نسبت ۱۰ درصد در فنل حل می‌شود. فنل پایدارترین جسم از دسته فنل‌هاست. در اثر هوا کمی اکسیده می‌شود و به وسیله حرارت می‌تواند استرلیزه شود.

فنل یکی از قدیمیترین آنتی‌سپتیک‌ها است که در سال ۱۸۶۷ در جراحی وارد شد. اثر فنل روی نسوج سمی است و فنل خالص روی پوست اثر خورنده داشته، بسیاری نسوج را ضایع می‌کند. گرچه فنل‌ها از یک نظر می‌توانند به عنوان الکل-های نوع سوم فرض شوند، اما با الکل‌ها این تفاوت را دارند که بطور ضعیف، اسیدی هستند.



Phenol



(Properties, Uses)



Structure of Phenol

ساختار فنول

تانن

اصطلاح تانن برای اولین بار در سال ۱۷۹۶ توسط سیگوین در تشریح مواد استخراج شده از بعضی از گیاهان که می‌توانستند در روند تبدیل پوست حیوانات به چرم، نقش بسزایی داشته باشند به کار گرفته شد.

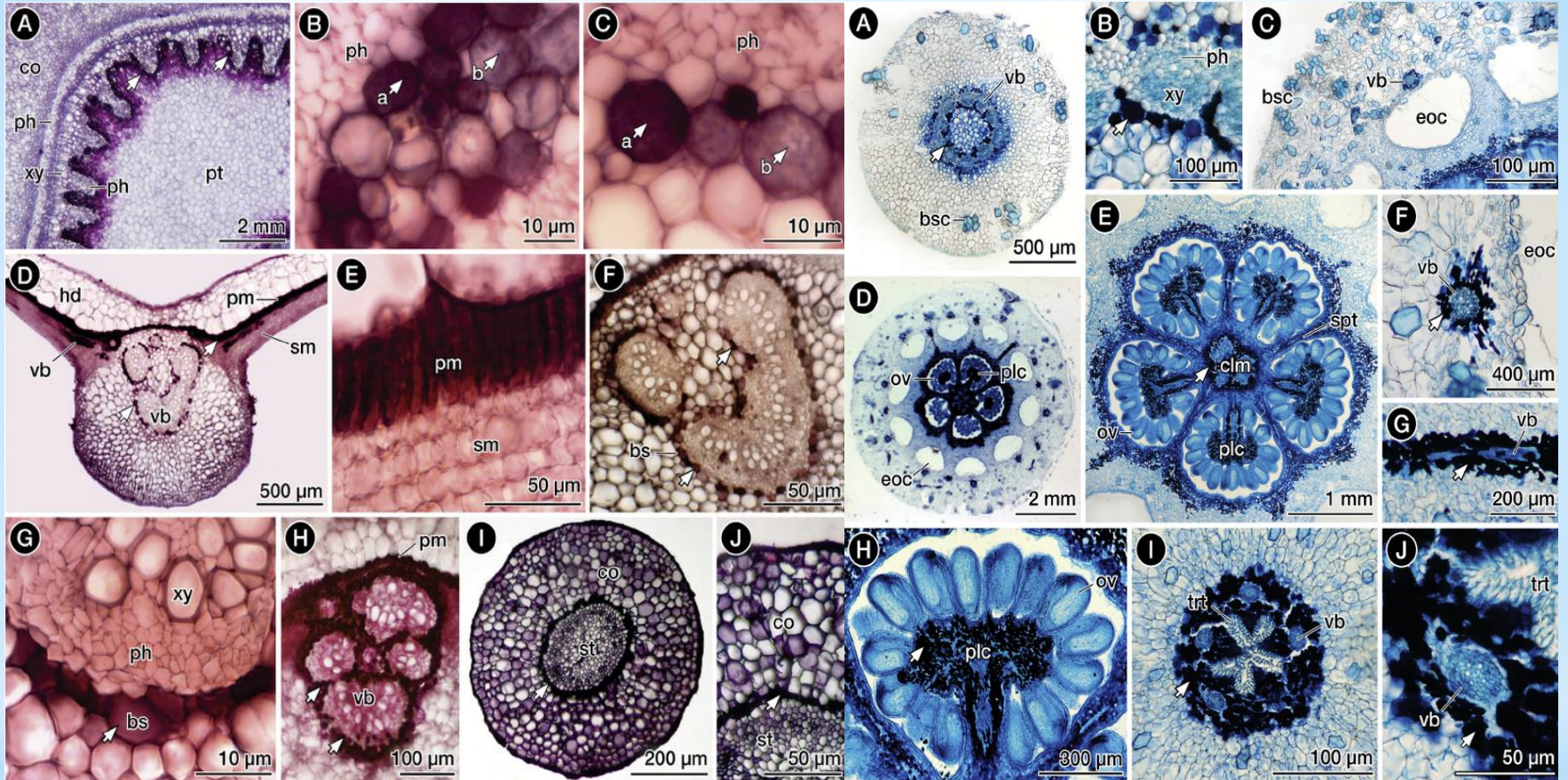
تانن‌ها (فلاوانول‌ها) که به اسم‌های دیگری چون اسید تانیک، گالوتانن و اسید گالوتانیک نیز شناخته شده‌اند، ترکیبات پیچیده طبیعی هستند که از مواد شیمیایی پلی فنلی تشکیل شده‌اند و در پوست، برگ و ریشه اکثر گیاهان از جمله چای، سیب، هلو، غلات و خصوصاً سورگوم به وفور یافت می‌شوند.

این مواد با وزن مولکولی بالا (۵۰۰ تا ۳۰۰۰ دالتون) و دارای تعداد قابل ملاحظه‌ای گروه هیدروکسیل فنلیک (۱ تا ۲ درصد وزن مولکولی) هستند که امکان تشکیل ارتباطات تقاطعی بین پروتئین و سایر ماکرومولکول‌ها را میسر می‌سازد. این مواد همچنین شامل گروهی از فنل‌های غیر پروتئینی سمی هستند که گاهی خاصیت قابض بودن دارند.

همچنین تانن‌ها مواد پلی فنولیک با وزن مولکولی بالایی بوده که مسئول رنگ پوستهٔ بذور و در بعضی از لگوم‌ها می‌باشند.

علت تغییر رنگ برگ درختان در پاییز نیز ناشی از وجود تانن‌هاست. تانن‌ها باز دارندهٔ فعالیت برخی آنزیم‌ها بخصوص تریپسین و آمیلاز بوده که در نهایت قابلیت هضم غذا را کاهش می‌دهند.

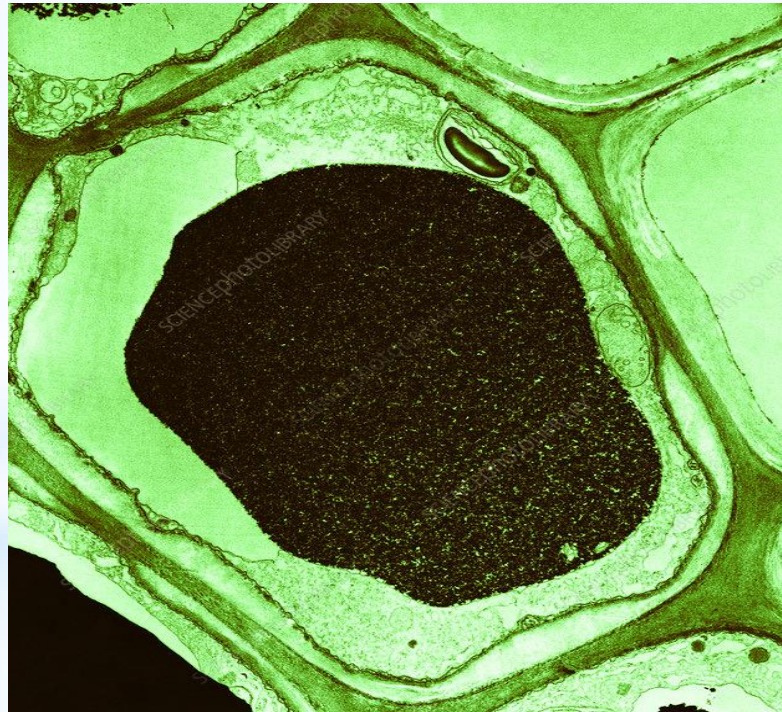
در آزمایش این جلسه از روش شناسایی توسط معرف شیف و ناین هیدرین (Ninhydrine) جهت شناسایی پروتئین‌ها به صورت عمومی در سلول و با استفاده از روش واکنش کلرید آهن ترکیبات فنلی یا تانن‌ها شناسایی می‌شوند.



تانن ها

اهداف مورد بررسی در این آزمایش عبارتند از:

۱. شناسایی ترکیبات پروتئینی به صورت کلی (Total Protein) در سلول
۲. شناسایی ترکیبات فنلی (Phenolic) یا تانن‌ها (Tanin) در سلول



تانن



مواد و وسایل مورد نیاز

مواد و وسایل مورد نیاز

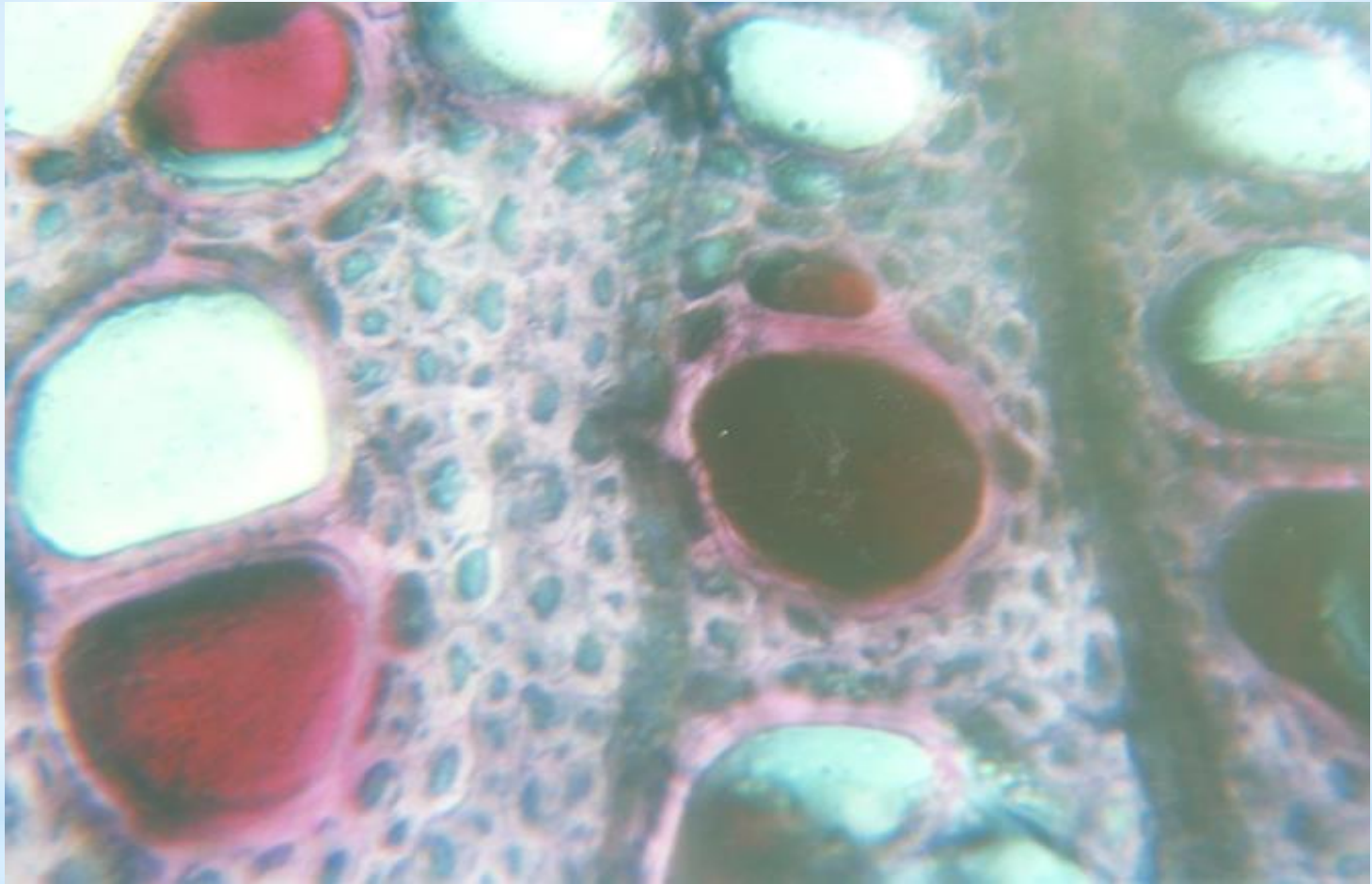
۱. ناین هایدرین
۲. الکل اتیلیک ۱۰۰ درصد
۳. معرف شیف
۴. سدیم بیسولفیت ۲ درصد (Sodium Bisulfate)
۵. نمونه مناسب گیاهی یا جانوری
۶. لام و لامل
۷. ویال های کوچک
۸. قطره چکان
۹. کانادا بالزام
۱۰. میکروسکوپ نوری

روش کار

۱. شناسایی پروتئین‌ها به صورت کلی (توسط واکنش ناین هیدرین-شیف)

مشابه با روش آزمایشات شناسایی ترکیبات درون سلولی در جلسات قبل نمونه مورد آزمایش را پس از برش‌گیری، تثبیت و شستشو در محلول ۵ درصد ناین هایدرین در الکل اتیلیک مطلق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت قرار داده، سپس نمونه‌ها را ۲ بار در ظرف الکل اتیلیک ۱۰۰ درصد و هر بار به مدت چند دقیقه قرار گذاشته و سپس یک تعریض در آب مقطر انجام دهید. پس از شستشوی نمونه‌ها آنها را به مدت حداقل ۱۰ دقیقه و حداکثر ۳۰ دقیقه در معرف شیف قرار دهید. در مرحله بعد نمونه‌ها بایستی در محلول سدیم بیسولفیت ۲ درصد به مدت ۱-۲ دقیقه قرار داده شوند و پس از این زمان به طور دقیق به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه با آب شیر شستشو داد شوند. سپس به دقت و متوالیاً و تدریجاً نمونه‌ها در درجات مختلف الکل اتیلیک از ۳۰ درصد تا ۹۶ درصد آبگیری شوند و بر روی لام توسط کانادا بالزام چسبانده و پس از لامل گذاری در زیر میکروسکوپ در بزرگنمایی ۴۰ یا ۱۰۰ مشاهده شوند.

پروتئین‌ها در این روش شناسایی عموماً به رنگ قرمز متمایل به بنفش در خواهند آمد.



شناسایی ترکیبات پروتئینی در سلول با استفاده از واکنش ناین هیدرین-معرف شیف

۲. شناسایی ترکیبات فنلی یا تانن‌ها (توسط واکنش کلرید آهن)

برش‌های نازک تثبیت و شستشو داده شده را جهت شناسایی ترکیبات فنلی یا تانن‌ها در محلول ۱-۵٪ درصد کلرید آهن در اسید کلریدریک ۱/۰ نرمال به مدت ۱ ساعت قرار دهید و پس از شستشو نمونه‌ها را روی لام قرار داده و با چسب کانادا بالزام چسبانده و لام گذاری کنید و با بزرگنمایی ۴۰ یا ۱۰۰ مشاهده نمایید.

رسوب آبی در سلول، دلالت بر حضور تانن یا ترکیبات فنلی دارد.



شناسایی ترکیبات فنلی یا تانن‌ها در سلول، با استفاده از واکنش کلرید آهن