



آزمایشگاه بیوشیمی

(تئوری و تکنیک‌های مدرن)

نویسنده

رودنی بویز

مترجمین

هیمن مرادی سردره، مهشید محمدیان، اتابک طوفانی میلانی، ممدته

نعمتی، لیلا مصطفوی نیا، اشکان کرباسی، فرید جواندوست

زیر نظر

پروفسور ممدتقی گودرزی



موسسه علمی انتشاراتی سنا



یکی از قسمت‌های مهم، گسترده و ضروری آزمایشگاه بالینی، بخش بیوشیمی می‌باشد. در واقع بیش از نیمی از تست‌های آزمایشگاهی بر عهده بخش بیوشیمی است، به همین دلیل، فراگیری اصول و مبانی این شاخه علمی نقش بسیار مثبتی در ارائه خدمات بهینه تشخیصی و آزمایشگاهی دارد. این کتاب که در دست دارید، شامل تمام بخش‌های پایه آزمایشگاه بیوشیمی مانند آشنایی با آزمایشگاه، ایمنی، الکتروفورز، سانتریفوژ و ... می‌باشد. همچنین سایر تکنیک‌های مرتبط با بیوشیمی شامل کلونینگ، PCR و ... نیز در این کتاب پوشش داده شده است. به همین دلیل پیشنهاد می‌شود که برای دانشجویان علوم آزمایشگاهی و رشته‌های دارای واحد آزمایشگاهی این کتاب در سرفصل‌های اساتید قرار گرفته و از نکات آن استفاده گردد. این کتاب نیز مانند سایر ترجمه‌ها خالی از اشکال نمی‌باشد، اشکالات را با دیده اغماض نگریسته و نقطه نظرات خود را برای ما فرستاده تا در ویرایش‌های بعدی مورد توجه قرار گیرد.

هیمن مرادی سردره

دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

E.mail: hemen.moradi@yahoo.com

فصل اول: آشنایی با آزمایشگاه بیوشیمی.....	۷
ایمنی در آزمایشگاه.....	۸
ثبت داده‌های بدست آمده و به اشتراک گذاشتن نتایج آزمایش‌ها.....	۱۱
استفاده از معرف‌ها و محلول‌های بیوشیمیایی.....	۱۹
انتقال کمی مایعات.....	۲۲
آنالیز آماری داده‌های آزمایش‌ها.....	۲۸
فصل دوم: استفاده از کامپیوتر و اینترنت در تحقیقات بیوشیمی.....	۳۶
تحقیق چیست و چگونه در بیوشیمی صورت می‌گیرد؟.....	۳۶
کاربرد کامپیوتر در بیوشیمی.....	۴۰
وب سایت‌های مفید در بیوشیمی.....	۴۲
فصل سوم: کارها و فرایندهای عمومی در آزمایشگاه.....	۵۰
pH، بافرها، الکترودها و بیوسنسورها.....	۵۰
اندازه‌گیری پروتئین در محلول‌ها.....	۶۴
فصل چهارم: تکنیک‌های سانتریفیوژ در بیوشیمی.....	۸۵
اساس سانتریفیوژ.....	۸۵
دستورالعمل‌های استفاده از سانتریفیوژ.....	۸۹
کاربردهای سانتریفیوژ.....	۹۶
فصل پنجم: تخلیص و آنالیز بیومولکول‌ها توسط کروماتوگرافی.....	۱۰۴
مقدمه‌ای بر کروماتوگرافی.....	۱۰۵
کروماتوگرافی سطحی (کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک).....	۱۰۶
کروماتوگرافی ستونی.....	۱۱۱
کروماتوگرافی تبادل یونی.....	۱۱۵
کروماتوگرافی Gel-Exclusion.....	۱۲۱
کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC).....	۱۲۹
کروماتوگرافی میل ترکیبی و جذب ایمنی.....	۱۳۹
کروماتوگرافی مبتنی بر غشاء.....	۱۴۷
فصل ششم: تعیین و تشخیص پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک با الکتروفورز.....	۱۵۲
تئوری الکتروفورز.....	۱۵۳
روش‌های الکتروفورز.....	۱۵۴

۱۷۵	جنبه‌های عملی الکتروفورز.....
۱۸۸	فصل هفتم: آنالیز طیف‌سنجی بیومولکول‌ها (اسپکتروسکوپیک).....
۱۸۹	طیف‌سنجی جذبی ماورا بنفش- مرئی.....
۲۰۷	طیف‌سنجی فلورسانس.....
۲۱۲	طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای.....
۲۱۷	طیف‌سنجی جرمی.....
۲۱۹	کریستالوگرافی اشعه X.....
۲۲۲	فصل هشتم: میانکنش‌های بیومولکولی: اتصال لیگاند و واکنش‌های آنزیمی.....
۲۲۲	میانکنش‌های لیگاند-ماکرومولکول.....
۲۳۲	کاتالیزورهای زیستی (آنزیم‌ها).....
۲۴۹	فصل نهم: بیولوژی مولکولی I (ساختمان و آنالیز اسیدهای نوکلئیک).....
۲۴۹	مقدمه‌ای بر اسیدهای نوکلئیک.....
۲۵۶	روش‌های آزمایشگاهی برای بررسی RNA و DNA.....
۲۶۸	فصل دهم: بیولوژی مولکولی II.....
۲۶۸	بیوتکنولوژی DNA نو ترکیب.....
۲۷۶	آنزیم‌های مهم در زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی.....
۲۸۲	لکه‌گذاری نوکلئیک اسید (بلاتینگ).....
۲۸۴	فصل یازدهم: تولید، تخلیص و تعیین ویژگی پروتئین‌ها.....
۲۸۵	روش‌های تخلیص پروتئین‌ها.....
۲۹۴	تولید پروتئین‌ها با بیان ژن‌های خارجی.....
۲۹۹	تعیین ویژگی پروتئین‌ها.....
۳۰۰	تعیین ساختار اولیه.....

فصل اول

آشنایی با آزمایشگاه بیوشیمی

ایمنی در آزمایشگاه

ثبت داده‌های بدست آمده و به اشتراک گذاشتن نتایج آزمایشات

استفاده از معرف‌ها و محلول‌های بیوشیمیایی

انتقال کمی مایعات

آنالیز آماری داده‌های آزمایش‌ها

در این کتاب قصد داریم برخی مفاهیم، روش‌ها و وسایل موجود در آزمایشگاه بیوشیمی را به شما معرفی کنیم. بیوشیمی برای شما چه آشنا یا چه غریبه باشد، ما قصد داریم که این حیطه را برای شما جذاب کنیم. تحقیق و پژوهش به طور ساده به معنی تلاش و جستجو برای یافتن حقیقت است. پس از مطالعه این کتاب، اگر اطلاعات خود را با تجربیات آزمایشگاهی قبلی خود مقایسه کنید، تفاوت چشمگیری را درک خواهید کرد، چرا که تفاوت‌هایی با آزمایشگاه‌های شیمی و زیست‌شناسی دارد. مثلاً در آزمایشگاه شیمی آلی شما آزمایشی را انجام می‌دهید، ماده‌ای را خالص می‌کنید تا مقداری در حدود چند میلی‌گرم (یا گرم) بدست آورید، و سپس ویژگی‌های آن ماده را با تکنیک‌هایی مانند اسپکتروسکوپی مادون قرمز، کروماتوگرافی گازی و اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای و اسپکترومتری جرمی و سایر تکنیک‌ها تعیین می‌کنید. در آزمایشگاه بیوشیمی، شما با مقادیر میلی‌گرم و میکروگرم سروکار دارید، غالباً بیومولکول‌ها را از منابع بیولوژیکی و محلول‌ها استخراج می‌کنید و در یک حلال حل می‌کنید، و عملاً شما هرگز مواد مورد مطالعه را نمی‌بینید اما شما تغییرات شیمیایی و بیولوژیکی مداوم بیومولکول‌ها را درک خواهید کرد.

در این فصل شما با دستورالعمل‌ها و توصیه‌هایی آشنا می‌شوید که برای صحت و موفقیت در پروژه‌های بیوشیمی مهم هستند. پیشنهاد می‌شود قبل از شروع به کار در آزمایشگاه، این فصل را حتماً مطالعه کنید. شما این کتاب را به دلایل زیر انتخاب نموده‌اید:

- ۱- این کتاب می‌تواند به عنوان راهنمایی برای انجام آزمایش‌ها در آزمایشگاه‌های آکادمیک و دانشگاهی باشد
- ۲- برای شروع یک کار پژوهشی و تحقیقاتی در بیوشیمی و اطلاع از نظریه‌ها و تکنیک‌های مورد استفاده در آزمایشگاه، مناسب است.
- ۳- حاوی اطلاعات اجمالی و کلی از نظریه‌ها و تکنیک‌ها است که برای شروع به کار ضروری است.

ایمنی در آزمایشگاه

اول ایمنی

تاکید بر ایمنی در آزمایشگاه، هرگز به منزله سخت‌گیری نیست. شاید برای بسیاری از دانشجویان و دانش‌آموزان که سال‌ها درگیر فعالیت‌های آزمایشگاه بیوشیمی بودند هیچ حادثه‌ای در حین کار رخ نداده است، ولی همیشه اولین اصل، احتیاط است و نباید بی‌دقتی کرد. همیشه در ذهن داشته باشید که مواد شیمیایی موجود در آزمایشگاه می‌توانند سمی، تحریک‌کننده و قابل اشتعال باشند. چنین موادی زمانی خطرآفرین هستند که استفاده یا دور ریختن آن‌ها به روش نادرست انجام شود.

تجربه ثابت کرده است اگر فرد با آمادگی ذهنی و درک کاملی از مراحل کار به آزمایشگاه وارد شود، کمترین حادثه رخ خواهد داد.

از آنجایی که حوادث خطرناک و غیر مترقبه خبر نمی‌دهند، شما باید به هشدارهای ایمنی و واکنش و کمک‌های اورژانسی آشنا باشید. زمانی که ما در آزمایشگاه کار می‌کنیم باید به ایمنی سرنگ‌های آزمایشگاه توجه ویژه داشته باشیم. بی‌دقتی یک فرد در آزمایشگاه می‌تواند به سادگی به سایر افراد آسیب برساند.

اطلاعات ایمنی مواد^۱

پروتکل‌های این کتاب بر اساس تاکید بر مسائل ایمنی طراحی و توصیف شده‌اند. البته هر چه در مورد ایمنی توضیح داده شود، نمی‌تواند جایگزینی برای درک کردن، تجربه کردن و درگیر شدن خود دانشجو باشد. تمام موادی که در این کتاب به آن‌ها اشاره می‌شود، باید با احتیاط به کار گرفته شوند. تمام آزمایشگاه‌های فعال U.S، شامل آزمایشگاه‌های آموزشی - دانشگاهی یا تحقیقاتی، از دستور کار^۲ OSHA (ایمنی کار و مدیریت سلامت) پیروی می‌کنند. بر طبق قوانین استاندارد OSHA تمام آزمایشگاه‌ها باید شرایط زیر را رعایت کنند:

- ۱- توسعه برنامه نوشتن هشدارها و خطرات^۲ - حفظ فایل‌های اطلاعات ایمنی مواد (MSDS) بر روی تمام وسایل و مواد شیمیایی به کار رفته در آزمایشگاه^۳ - علامت‌گذاری و برچسب زنی کلیه مواد شیمیایی همراه با درج خواص و ویژگی‌های خطرآفرین و احتیاط‌های الزامی در زمان کار با آن‌ها^۴ - آموزش کارکنان برای استفاده درست از این مواد. فرم واقعی قوانین (MSDS) توضیح کاملی است در خصوص یک ماده شیمیایی، خطرات بالقوه آن بر سلامت انسان، و نکات ایمنی لازم حین استفاده از این ماده. فرم MSDS یک ماده را می‌توانید از مدیر آزمایشگاه یا از

¹Material Safety Data Sheets (MSDS)

²Occupational safety and Health Administration

اینترنت (مثلا سایت www.sigma-aldrich.com) تهیه کنید. فرم MSDS برای یک ماده شیمیایی ممکن است متفاوت باشد، ولی اطلاعات خاص ثابت هستند. شکل ۱-۱ قسمتی از (MSDS) اسید استیک گلاسیال را نشان می‌دهد. تمام شیشه‌ها و بطری‌های حاوی مواد شیمیایی در آزمایشگاه باید برچسب گذاری شوند و مواد شیمیایی خطرناک موجود و احتیاط لازم جهت کار با آن ذکر شود. یکی از سیستم‌های استاندارد بین المللی برای این منظور سیستم HMIS^۱ است که در شکل ۱-۲ نشان داده شده است. برای آگاهی سریع از سلامتی، اشتعال‌پذیری، خطرات فیزیکی و کد حفاظتی مخصوص معرف‌های شیمیایی، بطور خلاصه بر روی شیشه‌ها ثبت شده‌اند.

Material Safety Data Sheet Acetic acid MSDS

Section 1: Chemical Product and Company Identification		
Product Name: Acetic acid		Contact Information:
Catalog Codes: SLA3784, SLA1438, SLA2101, SLA3604, SLA1258		Sciencelab.com, Inc. 14025 Smith Rd. Houston, Texas 77396
CAS#: 64-19-7		US Sales: 1-800-901-7247 International Sales: 1-281-441-4400
RTECS: AF1225000		Order Online: Sciencelab.com
TSCA: TSCA 8(b) inventory: Acetic acid		CHEMTREC (24HR Emergency Telephone), call: 1-800-424-9300
Cl#: Not applicable.		International CHEMTREC, call: 1-703-527-3887
Synonym: Acetic acid; glacial acetic acid		For non-emergency assistance, call: 1-281-441-4400
Chemical Name: Acetic Acid, Glacial		
Chemical Formula: C2-H4-O2		

Section 2: Composition and Information on Ingredients		
Composition:		
Name	CAS #	% by Weight
Acetic acid	64-19-7	100
Toxicological Data on Ingredients: Acetic acid: ORAL (LD50): Acute: 3310 mg/kg [Rat]. 4960 mg/kg [Mouse]. 3530 mg/kg [Rat]. DERMAL (LD50): Acute: 1060 mg/kg [Rabbit]. VAPOR (LC50): Acute: 5620 ppm 1 hours [Mouse].		

شکل ۱-۱: قسمتی از MSDS برای اسید استیک گلاسیال

عملکرد ایمن در آزمایشگاه بیوشیمی

سهل‌انگاری خاصی در آزمایشگاه بیوشیمی رایج است. دانشجویان تصور می‌کنند به دلیل تماس کمتر با مواد شیمیایی و مواجهه بیشتر با بیومولکول‌های طبیعی، نیازی به احتیاط نیست. اما در حقیقت بسیاری از مواد، قابل اشتعال و سمی هستند. به علاوه، وسایلی مانند وسایل شیشه‌ای شکستنی (مانند پیت‌های یکبار مصرف)، اشیای تیز و برنده (سوزن و لبه قیچی)، مواد بیولوژیکی عفونت‌زا (خون، باکتری و ویروس) باید با احتیاط استفاده شده و دور ریخته شوند. برخی وسایل الکتریکی پرکاربرد نیز وجود دارند که می‌توانند خطر آفرین باشند؛ از جمله دستگاه‌های stirrer، hot plate، و منبع برق الکتروفورز.

دفع مناسب تمام زباله‌های شیمیایی، اشیای برنده و عوامل عفونت‌زا نه تنها برای حفظ ایمنی محل کار بلکه برای حفاظت از محیط‌های عمومی و محیط زیست، الزامی است. بعضی از مواد شیمیایی حاصل از آزمایش‌ها نسبتاً

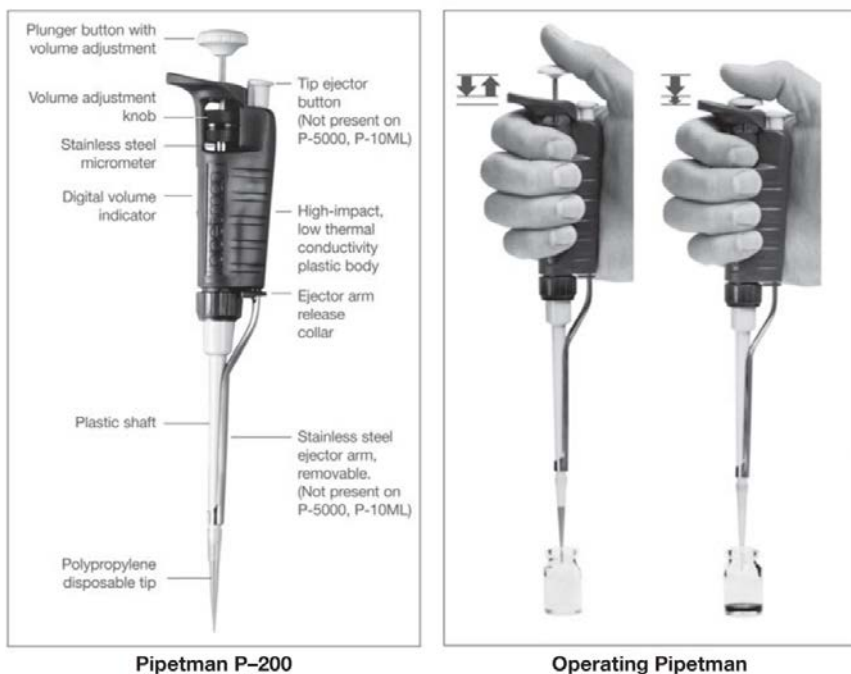
¹Hazardous Materials Identification

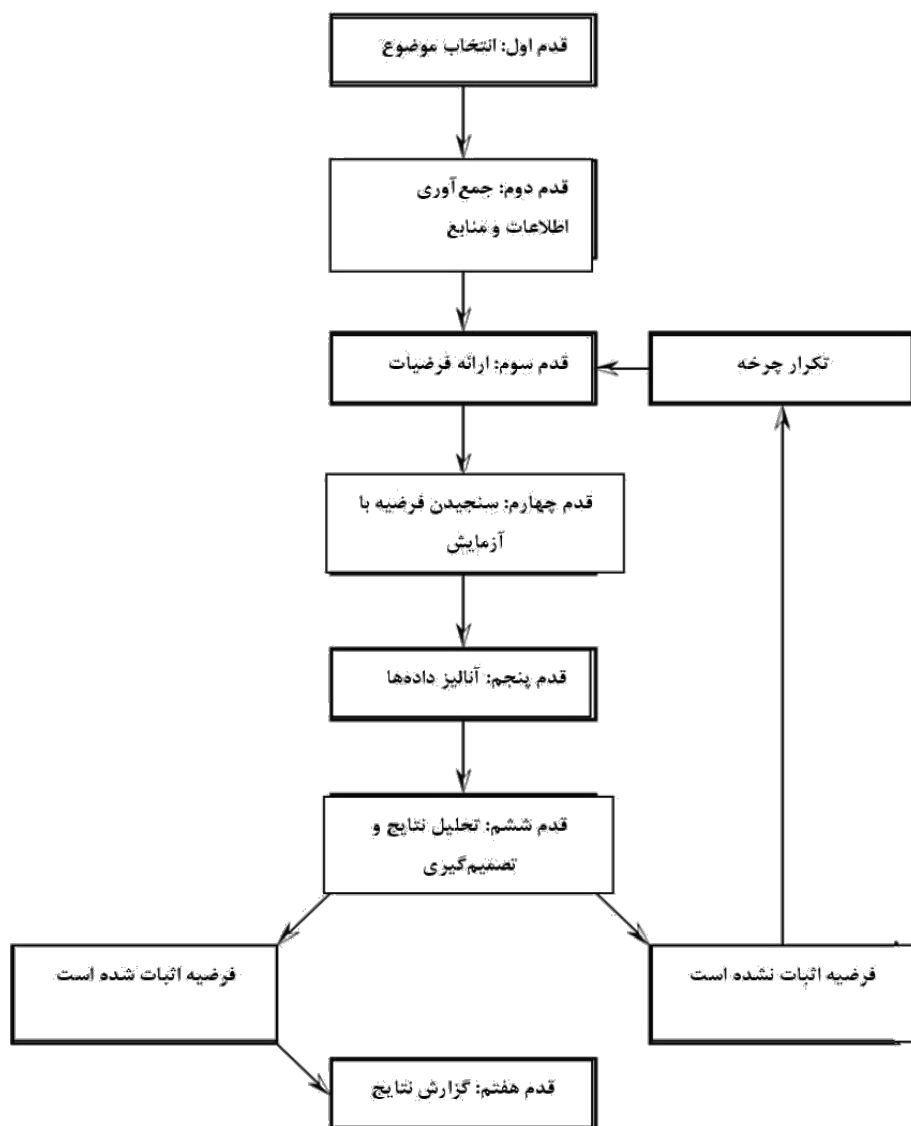
یا محلول شستشو، پیت‌ها را با آب شیر بشوید و سپس در نهایت با آب مقطر، آب بکشید. پیت‌ها را می‌توان در آن خشک نمود.

ابزارهای خودکار پیت کننده

برای اغلب انتقال‌های کمی، خصوصا انتقال پی در پی مقادیر کم، پیتورهای مکانیکال میکرولیتری (انواع Pipetman, Eppendorf و ...) مناسب است. این پیت‌ها حجم‌های معین از بین ۱ تا ۱۰۰۰۰ میکرولیتر (۰/۰۰۱ تا ۱۰ میلی‌لیتر) را با دقت، صحت و سرعت بالا منتقل می‌کنند. دکمه فشار دهنده پیت با یک دست قابل کنترل است و نوک پیت با سرهای جداشدنی پلی پروپیلنی قابل تعویض است (شکل ۹-۱). مزیت نوک‌های پلی پروپیلنی نسبت به نوک‌های شیشه‌ای، باقی ماندن مقدار کمتر مواد در پیت بعد از انتقال است. پیتورهای مکانیکال در اندازه‌های مختلفی در دسترس هستند. در مدل‌های جدیدتر برخلاف مدل‌های قبلی که فقط حجم‌های معینی قابل انتقال بود، امکان انتقال حجم‌های متعدد وجود دارد. پیت‌هایی با کانال‌های چندگانه نیز وجود دارند که چندین چاهک یا ظرف را همزمان پر می‌کند (شکل ۱۰-۱).

برای استفاده از پیتور، یک نوک پلی پروپیلن با اندازه مناسب انتخاب کنید و طبق شکل ۹-۱ به محکمی روی میله پیت متصل کنید. نوک پیت در اندازه مختلف موجود است (ظرفیت‌های ۱-۲۰ و ۲۰-۲۵۰ و ۲۵۰-۱۰۰۰ و ۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ μL). جزئیات طرز کار آن در شکل ۹-۱ قابل مشاهده است. برای انتقال سریع و صحیح حجم‌های بیشتر از ۵ mL، از پیتورهای خودکار تکرارکننده که به صورت تجاری در دسترس هستند استفاده می‌کنند. این دستگاه‌ها معمولا برای انتقال مواد خورنده و خطرناک به کار می‌روند. پیتورها در اندازه‌های مختلف در دسترس هستند. میزان حجم مایع انتقالی به صورت مکانیکی تنظیم می‌شود.





شکل ۱-۲: مراحل که در تحقیقات علمی طی می‌شود. این مراحل بر اساس نکات کلیدی روش علمی قدیمی طراحی شده‌اند

هریک از مراحل ذکر شده در شکل ۱-۲ شامل چندین فعالیت است:

۱ - انتخاب موضوع: موضوعی که انتخاب می‌شود اغلب جذابیت فوق‌العاده‌ای برای محققین دارد و فرد محقق ممکن است آشنایی جزئی با آن داشته باشد. گاهی مطرح نمودن مسئله به صورت سوالی که هنوز جواب آن را نمی‌دانیم، به یافتن جواب کمک می‌کند. مثال‌هایی از موضوعات تحقیقی بیوشیمی، می‌تواند به این صورت باشد:

اسیدها و بازهای ضعیف به صورت کامل در محلول تفکیک نمی‌شوند، اما به شکل مخلوطی در حالت تعادل وجود دارند.



HA نماینده‌ی اسید ضعیف و A^- به عنوان باز مزدوج آن است، k_1 ثابت سرعت برای تفکیک اسید و k_2 ثابت سرعت اتصال یون هیدروژن و باز مزدوج است. ثابت تعادل (K_a) برای اسید ضعیف HA با معادله‌ی ۳-۴ تعریف می‌شود:

$$K_a = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad \text{معادله ۳-۴}$$

که می‌توان برای تعریف $[H^+]$ آن را این گونه نوشت:

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \quad \text{معادله ۳-۵}$$

$[H^+]$ اغلب به صورت pH گزارش می‌شود ($-\log[H^+]$). به طور مشابهی $-\log K_a$ را نیز به صورت pK_a ارائه می‌دهند. معادله‌ی ۳-۵ را می‌توان با اعمال $-\log$ به هر دو طرف، به معادله جدیدی تبدیل کرد.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{معادله ۳-۶}$$

معادله‌ی ۳-۶ به عنوان معادله‌ی هندرسون-هاسلباخ معروف است و به عنوان رابطی بین pH و نسبت غلظت اسید و باز مزدوج، تعریف می‌شود. نمک اسید (A^-) به عنوان پذیرنده‌ی پروتون (A) و اسید (HA) به عنوان دهنده‌ی پروتون (D) نیز مطرح می‌شود. معادله‌ی هندرسون-هاسلباخ ارزش زیادی در شیمی بافر دارد، زیرا در محاسبه‌ی pH یک محلول، در صورت مشخص بودن نسبت مولار یون‌های بافر $\frac{[A^-]}{[HA]}$ و pK_a می‌تواند استفاده شود. همچنین نسبت مولار HA به A^- را که برای تهیه‌ی محلول بافر با pH مخصوص لازم است، می‌توان با مشخص بودن pK_a محاسبه نمود.

یک محلول حاوی HA و A^- دارای توانایی مقاومت در برابر تغییرات pH است و به عنوان بافر عمل می‌کند. اگر اسید (H^+) به محلول بافر افزوده شود، به وسیله‌ی A^- ، محلول خنثی می‌گردد:



اگر باز به محلول بافر اضافه شود، با HA واکنش داده و خنثی می‌گردد.



موثرترین سیستم بافری حاوی غلظت برابر اسید (HA) و باز مزدوج آن (A^-) است. مطابق معادله‌ی هندرسون-هاسلباخ (معادله‌ی ۳-۶) زمانی که $[A^-]$ برابر با $[HA]$ باشد، pH برابر با pK_a است. بنابراین pK_a سیستم اسید-باز ضعیف نشان‌دهنده مرکز محدوده بافری است. موثرترین محدوده‌ی سیستم بافری در pH ± 1 مقدار pK_a است.

$$\text{موثرترین محدوده‌ی pH برای بافر} = pK_a \pm 1 \quad \text{معادله ۳-۹}$$

انتخاب بافر بیوشیمیایی

تقریباً تمام تحقیقات بیوشیمیایی باید در محلول‌های بافری آبی انجام شود. محیط طبیعی پیرامون بیومولکول‌ها و اندامک‌های سلولی تحت کنترل شدید pH است. وقتی این ترکیبات از سلول استخراج می‌شوند، در pH طبیعی خود (معمولاً ۶-۸) پایدارتر از دیگر pHها هستند. یک سیستم بافری مصنوعی (سنتتیک) می‌تواند بهترین جایگزین برای محیط طبیعی سلول باشد. همچنین باید بدانید که اکثر فرایندهای بیوشیمی (مخصوصاً بعضی از فرایندهای

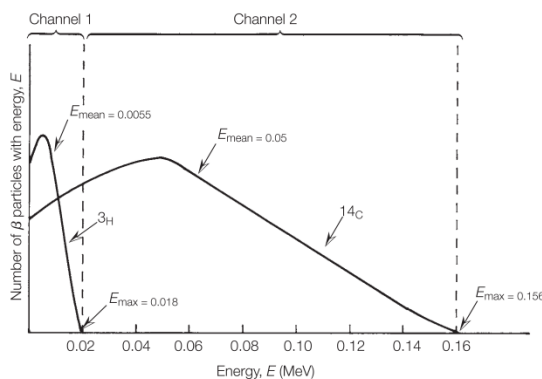
بزرگترین ایراد استفاده از رادیوایزوتوپ‌ها، ایمنی و نگرانی‌های زیست‌محیطی است؛ که باید در هنگام کار با مواد رادیواکتیو مورد توجه قرار گیرد. این نگرانی‌ها، توسعه رادیوایزوتوپ‌ها را با محدودیت مواجه می‌سازد. در برخی کشورها، از جمله آمریکا، طبق قانون تمام افرادی که با مواد رادیواکتیو کار می‌کنند (حتی دانشجویان) باید یک دوره آموزشی کامل در این زمینه را گذرانده باشند. به دلیل خطرات بالقوه و مشکلات مرتبط با استفاده و دور ریختن پسماندهای مواد رادیواکتیو، معمولاً در آزمایشگاه‌های مقاطع اولیه دانشگاهی استفاده نمی‌شود. این مواد در تحقیقات، صنایع بیوتکنولوژی و پزشکی (البته زمانی که تکنیک دیگری برای حل مشکل وجود ندارد)، استفاده می‌شود. کار با آن‌ها باید توسط افراد مجرب صورت گیرد.

مشکلات فراوان و مسئله‌ای ایمنی کاربرد رادیوایزوتوپ‌ها موجب شده تا محققین به دنبال روش‌های دیگری باشند. دو وب‌سایت آخر در میان رفرنس‌های این فصل، جستجو برای تکنیک‌های "بیوشیمی سبز" را توصیف می‌کند که در آن‌ها از رادیوایزوتوپ استفاده نمی‌شود. یکی از رفرنس‌ها نیز طراحی نوعی سنجش پروتئین کیناز را توضیح می‌دهد که در آن از فسفر ۳۲ استفاده نشده است. یکی دیگر از رفرنس‌ها، سنتز پروپ‌هایی را معرفی می‌کند که فاقد رادیوایزوتوپ هستند و برای نشان‌دار کردن پروتئین‌ها و افزایش تمایل آن‌ها به نور استفاده می‌شوند.

منشاء و ویژگی‌های رادیواکتیویته

مقدمه: رادیواکتیویته ناشی از متلاشی شدن خودبه‌خودی هسته‌ی ایزوتوپ‌های ناپایدار است. هسته هیدروژن حاوی یک پروتون است که به صورت ${}^1_1\text{H}$ نشان می‌دهند. دو شکل دیگر هسته‌ی هیدروژن حاوی یک و دو نوترون هستند که به صورت ${}^2_1\text{H}$ و ${}^3_1\text{H}$ نشان داده می‌شود. این ایزوتوپ‌های هیدروژن را معمولاً دوتریوم و تریتیوم می‌گویند. تمام ایزوتوپ‌های هیدروژن تعداد پروتون یکسانی دارند (بار ثابت +1)، اما تعداد نوترون آن‌ها متفاوت است. از این بین فقط تریتیوم رادیواکتیو است.

پایداری یک هسته به نسبت بین نوترون‌ها به پروتون‌ها بستگی دارد. بعضی از هسته‌ها ناپایدار هستند و تحت شرایط خودبه‌خودی دچار تجزیه‌ی هسته‌ای می‌شوند که همراه با نشر ذرات است.



شکل ۱۳-۳: گستره‌ی انرژی برای β ساطع شده از ${}^3\text{H}$ و ${}^{14}\text{C}$ ؛ خط نقطه‌چین نشان‌گر حدود بالا و پایین تفکیک داده‌هاست

m = حجم موثر ذره‌ی قابل رسوب

ω = سرعت زاویه‌ای چرخش با واحد رادیان/ثانیه

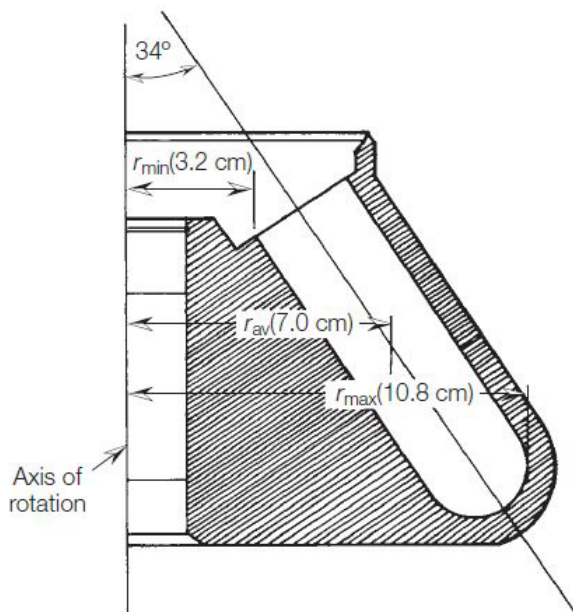
r = فاصله‌ی ذرات مهاجرت کننده از محور مرکزی چرخش

نیرو بر روی ذره‌ی قابل رسوب، با سرعت چرخش و فاصله‌ی ذره از محور چرخش افزایش می‌یابد. سنجش رایج‌تر F با بهره از تعریف نیروی جاذبه‌ی زمین یا g است که نیروی سانتریفیوژ نسبی^۱ RCF نامیده شده و در معادله‌ی ۴-۲ تعریف شده است.

$$RCF = (1/118 \times 10^{-5}) (rpm)^2 (r)$$

معادله‌ی ۴-۲

این معادله، RCF را با تعداد چرخش نمونه در دقیقه (rpm) مرتبط می‌کند. معادله‌ی ۴-۲ نشان می‌دهد که RCF با تغییر r (فاصله‌ی ذرات رسوبی از محور چرخش) تغییر می‌کند (شکل ۴-۱). بهتر است که RCF را با استفاده از نمودگرام موجود در شکل ۴-۲ تعیین کنیم. با توجه به شکل ۴-۱ و ۴-۲ مشخص می‌شود که چون RCF با r تغییر می‌کند، اهمیت دارد که r را برای هر بار آزمایش تعیین کنیم. اغلب یک میانگین از RCF، با استفاده از مقدار r به علاوه نصف فاصله بین سر و ته ظرف نمونه تعیین می‌شود. مقدار RCF به عنوان "تعداد جاذبه‌ی g " گزارش می‌شود.



شکل ۴-۱. نمودار نشان دهنده‌ی تغییر RCF با r فاصله‌ی ذرات قابل رسوب از محور چرخش.

¹ Relative centrifugal force

کروماتوگرافی مایع- جامد (جذب)

HPLC در حالت جذب می‌تواند با ستونهای متشکل از دانه‌های لایه‌ای منفذدار سیلیکا یا آلومینا انجام شود. دانه‌های شیشه‌ای کوچک اغلب برای مرکز بی‌اثر بکار می‌رود. بعضی از بسته‌های به کار برده شده به طور گسترده شامل مواد ذیل هستند:

μ Porasil (Waters Associates), BioSilA (Bio-Rad Laboratories), LiChrosorb Si-100 Partisil, Vydac, ALOX 60D (several suppliers), Supelcosil (Supelco)

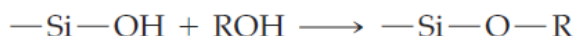
در کروماتوگرافی جذب با فشار بالا، آنالیت‌ها با میل‌های ترکیبی مختلف در محل‌های اتصال در فاز ثابت جامد جذب می‌شوند. جداسازی آنالیت‌ها در مخلوط نمونه روی می‌دهد، زیرا مولکول‌های قطبی، بهتر از مولکول‌های غیرقطبی جذب می‌شوند. از این رو، ترکیبات مختلف در نمونه با زمان ماندگاری متفاوت از ستون شسته می‌شوند. این شکل از HPLC معمولاً فاز نرمال نامیده می‌شود (فاز ثابت قطبی و فاز متحرک غیرقطبی).

کروماتوگرافی مایع - مایع (تفکیکی)

در روزهای اولیه HPLC (۹۸-۱۹۷۰)، بسترهای جامد با فاز ثابت مایع پوشیده می‌شدند. ستون‌ها با این بسترها طول عمر کوتاهی داشتند و کاهش تدریجی در تفکیک روی می‌داد، زیرا کاهش مستمر فاز ثابت مایع با استفاده از ستون رخ می‌داد.

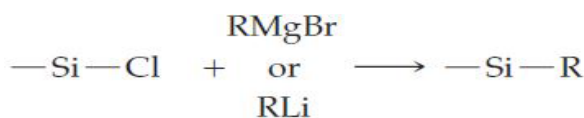
این مسئله توسط کشف روش‌هایی برای پیوند شیمیایی فاز ثابت فعال با بستر بی‌اثر برطرف شد. فازهای ثابت متصل شده با پیوند شیمیایی توسط تغییر کووالانسی در سطح سیلیکا تولید می‌شوند. این سه تغییر در معادله‌ی ۴-۵ و ۵-۶ نشان داده شده است.

استرهای سیلیکات



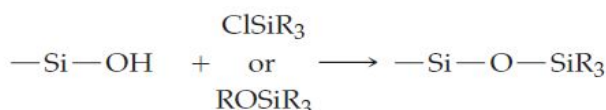
معادله‌ی ۴-۵

کربن-سیلیکا



معادله‌ی ۵-۵

سیلوکسان‌ها



معادله‌ی ۶-۵

مزیت اصلی فاز ثابت پیوندی، ثبات آن است. به دلیل وجود پیوند شیمیایی، فاز ثابت در استفاده کاهش بسیار کمتری خواهد داشت. سیلوکسان‌ها رایج‌ترین بستر سیلیکای بکار برده شده هستند. گروه‌های عاملی که می‌توانند به عنوان سیلوکسان‌ها متصل شوند، آلکیل‌نیتریل‌ها $(-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CN})$ ، فنیل $(-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5)$ ، آلکیل‌آمینها $(-\text{Si}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2)$ و زنجیره‌های جانبی الکیل $(-\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17}; -\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37})$ هستند.

لیگاند تثبیت شده بکار روند. سوبسترای اصلی را نیز می‌توان به عنوان لیگاند به کار برد، اما تنها اگر شرایط ستون را بتوان به گونه‌ای تغییر داد که از تغییر کاتالیتیک مواد متصل، اجتناب گردد. علاوه بر نیازهای مطرح شده تاکنون، لیگاند باید برهمکنش ی قوی، اختصاصی و برگشت‌پذیر با ماکرومولکول مد نظر نشان دهد و باید یک گروه عاملی واکنش‌پذیر برای اتصال به ماتریکس داشته باشد. باید تشخیص دهید که چند نوع لیگاند ممکن است برای تخلیص به روش میل ترکیبی، برای یک ماکرومولکول خاص بکار رود. بدیهی است بعضی لیگاندها بهتر از بقیه کار خواهند کرد و مطالعات تجربی می‌تواند برای انتخاب یک لیگاند مؤثر انجام شود.

اتصال لیگاند به ماتریکس

چند روش برای اتصال کووالانسی لیگاند به ماتریکس به وجود آمده‌اند. تمامی روش‌ها برای ایجاد تغییرات در ژل، در دو مرحله شیمیایی مجزا خلاصه می‌شوند: (۱) فعال‌سازی گروه‌های عاملی بر روی ماتریکس و (۲) اتصال لیگاند به گروه عاملی بر روی ماتریکس. لیگاند باید به گونه‌ای به ماتریکس متصل شود که قادر به اتصال به ماکرومولکول مطلوب باشد. امروزه انواع زیادی از ژل‌های فعال شده بصورت تجاری موجود است. پرکاربردترین آن‌ها در ادامه، توصیف می‌شود.

آگاروز فعال شده با سیانوژن بروماید^۱

این ژل بسیار متنوع است، زیرا تمامی لیگاندهای محتوی گروه‌های آمین نوع اول به آسانی به آگارز متصل می‌شوند. این ژل تحت نام تجاری سفارز 4B فعال شده با CNBr موجود است. به دلیل اینکه این ژل بسیار واکنش‌پذیر است، شرایط بسیار مساعد برای اتصال لیگاند، نیاز است. یک ایراد فعال شدن با CNBr این است که لیگاندهای کوچک بسیار نزدیک به سطح ماتریکس متصل می‌شوند، و بدلیل ممانعت فضایی، ماکرومولکول‌ها قادر به برهمکنش مناسبی با لیگاند نخواهند بود. مراحل فعال‌سازی با CNBr و اتصال لیگاند در شکل A ۱۸-۵ مطرح می‌شود.

آمینوهگزانوئیک اسید (CH) آگارز و ۶و۱-دی‌آمین‌هگزان (AH)-آگاروز

این ژل‌های فعال شده، با قرار دادن یک جداکننده شش کربنی مابین لیگاند و ماتریکس، به تداخل فضایی مطرح شده در بالا غلبه می‌کنند. لیگاندهای دارای گروه‌های آمین نوع اول می‌توانند با پیوند کووالانسی به آگارز CH متصل شوند، در حالی که لیگاندهای دارای کربوکسیل آزاد می‌توانند به آگارز AH متصل شوند. اتصال لیگاندها به ژل‌های AH و CH در شکل ۱۸-۵ مطرح می‌شود.

بسترهای فعال شده با کربنیل دی‌ایمیدازول (CDI)

واکنش با CDI ژل‌هایی تولید می‌کند که محتوی گروه‌های N-آکیل کربامات بدون بار الکتریکی هستند (شکل D ۱۸-۵ را ببینید). آگارز فعال شده با CDI، دکستران و پلی‌وینیل استات، توسط شرکت بیوتکنولوژی Pierce با نام تجاری Reacti-Gel عرضه می‌شوند.

آگاروز فعال شده با اپوکسی

ساختار این ژل در شکل E ۱۸-۵ نشان داده شده است. این ژل، اتصال لیگاندهای محتوی گروه‌های هیدروکسیل، تیول یا آمین را فراهم می‌کند. گروه‌های هیدروکسیل مونو، الیگو و پلی‌ساکاریدها می‌توانند به سادگی به ژل متصل شوند.

¹ cyanogen bromide-activated agarose