



نشر سلول

بیوشیمی عمومی در آزمایشگاه

(برای تمامی دانشجویان گروه علوم پزشکی و دامپزشکی)

مؤلفین (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر اسما خیراللهی

(عضو هیئت علمی دانشگاه تهران)

دکتر اکرم وطن‌نژاد

(عضو هیئت علمی دانشگاه تهران)

دکتر مریم تیموری

(عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود)

دکتر زهرا عرب صادق‌آبادی

(عضو هیئت علمی دانشگاه بوعلی سینا همدان)



بیوشیمی نقش بنیادینی در شناسایی فعل و انفعالات سلولی مختلف داشته و اهمیت ویژه‌ای در علوم پزشکی دارد. اکثر بیماری‌ها اساس بیوشیمیایی دارند. از این‌رو بخش عمده‌ای از تصمیمات پزشکی درخصوص تشخیص، درمان و پیش‌بینی بیماری‌های مختلف بر اساس نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی نمونه بیماران است. به دلیل اهمیت علم بیوشیمی در تمامی علوم پزشکی، دروس بیوشیمی تئوری و عملی برای رشته‌های مختلف علوم پزشکی (علوم آزمایشگاهی، پزشکی، داروسازی، دندانپزشکی، پرستاری و ...) و علوم دامپزشکی ارائه می‌گردد.

در این میان، دروس عملی راهی برای بهبود درک مطالب تئوری و افزایش یادگیری دانشجو از طریق آموزش مشاهده‌ای و مهارتی بوده که این شیوه آموزشی فراتر از خواندن یا شنیدن می‌باشد. دانشجویان در دروس عملی، به دلیل مواجه شدن با کاربردهای مطالب پایه‌ای که در دروس تئوری گذرانده‌اند، انگیزه و علاقه بیشتری را به این درس نشان خواهند داد. اما نیل به این هدف زمانی امکان پذیر است که ارائه دروس عملی همراه با ارائه کاربردهای بالینی و ملموس سازی کاربرد مباحث تئوری باشد. این مسئله برای درس بیوشیمی عمومی اهمیت بیشتری دارد زیرا درک کاربردها و اهمیت درس بیوشیمی عمومی نسبت به بیوشیمی پزشکی و بالینی برای دانشجویان سخت‌تر است. بنابراین در کنار برگزاری کلاس‌های عملی، معرفی و استفاده از یک منبع درسی مناسب و جامع توسط دانشجو راه رسیدن به این هدف مهم را بسیار هموارتر خواهد نمود. همچنین یادگیری موثر و بهره برداری مناسب از روش‌ها و دروس عملی و مهارتی زمانی برای دانشجو امکان پذیر خواهد بود که دانشجو بتواند مکرراً آنها را به صورت مشاهده‌ای تکرار نماید.

آنچه در حال حاضر در خصوص آموزش درس بیوشیمی عملی شاهد هستیم، برگزاری یک جلسه آزمایشگاهی برای هر تست یا تکنیک بیوشیمیایی می‌باشد که غالباً امکان مرور این تست‌های آزمایشگاهی به شیوه مشاهده‌ای و عملی به گونه‌ای که دقیقاً محیط آزمایشگاه را برای دانشجو تداعی کند، وجود ندارد بنابراین بسیار محتمل است که دانشجو نکات عملی و شیوه عملی انجام یک تست آزمایشگاهی را تا زمان آزمون پایان ترم به فراموشی بسپارد. لذا با توجه به مطالب مطرح شده طراحی یک منبع جامع خواندنی- مشاهده‌ای برای درس بیوشیمی عمومی عملی (که دانشجو در ترم‌های اول دانشگاه می‌گذراند)، که هم کاربردهای بالینی مباحث مختلف مطرح شده در بیوشیمی را در برگرد و هم مطابق با سرفصل‌های مطرح شده برای این درس باشد و همچنین امکان مرور روش‌های عملی آزمایش‌ها مختلف را فراتر از خواندن مطلب و به صورت مشاهده‌ای فراهم کند، بسیار ضروری به نظر می‌رسد. برای این هدف، بر آن شدیم یک منبع جامع شامل مطالب نوشتاری و فیلم‌های آموزش از مراحل مختلف انجام یک تست آزمایشگاهی درس بیوشیمی عمومی، طراحی نماییم.

لازم به ذکر است این کتاب توسط دانشگاه علوم پزشکی شاهروود مورد داوری و تایید قرار گرفته است. در انتها، بر خود لازم می‌دانیم از موسسه علمی سنا، شورای انتشارات دانشگاه علوم پزشکی شاهروود، سرکار خانم فرح جدیدی زاده و همه کسانی که ما را در تهیه این اثر یاری کردند مراتب تشکر و قدردانی را به عمل آوریم. این پروژه با حمایت مالی مرکز ملی تحقیقات راهبردی آموزش پزشکی، تهران، ایران، با شماره طرح ۴۰۰۶۸۶ انجام شده است.

صفحه	عنوان
۱۱	فصل اول: ایمنی زیستی
۱۱	مقدمه
۱۱	خطرات زیستی آزمایشگاه
۱۲	خطرات شیمیایی آزمایشگاه
۱۳	آشنایی با اطلاعات و علائم هشداردهنده ایمنی
۱۴	لوزی خطر
۱۵	برگه اطلاعات ایمنی مواد شیمیایی (MSDS)
۱۵	تجهیزات حفاظت فردی
۱۶	اقدامات فوری هنگام مواجهه با خطر در آزمایشگاه
۱۷	زباله‌های آزمایشگاهی
۲۰	فصل دوم: تجهیزات و وسایل آزمایشگاهی
۲۰	مقدمه
۲۰	لوله آزمایش
۲۲	بشرهای آزمایشگاهی
۲۲	ارلن مایر
۲۳	فلاسک حجمی یا بالن حجمی
۲۴	بالن یا فلاسک ته گرد
۲۴	استوانه‌های مدرج
۲۵	پیپت‌های مدرج و پوآرها
۲۸	میکروپیپت یا سمپلر
۳۰	بورت
۳۱	آب فشان یا پیست
۳۲	پارافیلیم
۳۲	تجهیزاتی برای مخلوط کردن مایعات
۳۴	ترازوی آزمایشگاهی
۳۵	تجهیزاتی برای استریل سازی
۳۷	سانتریفیوژها
۳۸	بن ماری
۳۹	هودهای آزمایشگاهی
۴۰	آون آزمایشگاهی یا فور
۴۱	انکوباتور آزمایشگاهی
۴۳	فصل سوم: نمونه‌گیری
۴۳	مقدمه
۴۳	آمادگی قبل از نمونه‌گیری بیمار
۴۴	انواع نمونه‌های زیستی مورد بررسی در آزمایشگاه

۴۴	نمونه خون
۴۴	آماده‌سازی تجهیزات لازم اتاق خونگیری
۴۶	مراحل نمونه‌گیری خون وریدی
۴۸	آماده‌سازی نمونه خون جهت انجام آزمایش‌ها
۴۹	شرایط نگه داری نمونه بعد از نمونه‌گیری
۵۱	فصل چهارم: محلول‌ها و محلول‌سازی
۵۱	مقدمه
۵۲	واحدهای غلظت محلول‌ها
۵۳	مولاریته
۵۴	نرمالیه
۵۵	مولالیه
۵۶	غلظت معمولی
۵۶	واحدها یا محلول‌های درصدی
۵۶	تبدیل محلول‌های درصدی به یکدیگر
۵۷	تبدیل محلول‌های درصدی به مولاریته
۵۷	اصول آماده‌سازی محلول‌ها
۵۸	آگاهی از حلالیت حل‌شونده‌ها
۵۸	ابزار مناسب برای تهیه محلول
۵۸	نحوه افزودن حلال به حل‌شونده
۵۹	مخلوط‌سازی مناسب اجزای محلول
۶۰	نگهداری و ذخیره‌سازی محلول‌ها
۶۳	فصل پنجم: سنجش pH و تیتراسیون اسید-باز
۶۲	مقدمه
۶۳	اهمیت pH
۶۴	روش‌های تعیین pH
۶۴	شناساگرهای pH
۶۶	pH متر یا pH سنج الکتریکی
۶۸	تیتراسیون اسید-باز
۶۹	انتخاب شناساگر pH مناسب برای مشخص کردن نقطه هم‌ارزی
۶۹	روش انجام تیتراسیون اسید-باز برای تعیین غلظت اسید یا باز
۷۰	منحنی تیتراسیون
۷۴	فصل ششم: سنجش کیفی آمینواسیدها و پروتئین‌ها
۷۳	مقدمه
۷۳	سنجش کیفی آمینواسیدها
۷۵	اهمیت بالینی شناسایی و سنجش آمینواسیدها
۷۶	روش‌های سنجش کیفی آمینواسیدها
۸۴	سنجش کیفی پروتئین‌ها

۸۵	کاربردهای بالینی سنجش پروتئین‌های سرم
۸۶	روش‌های سنجش پروتئین‌ها
۸۹	فصل هفتم: سنجش کیفی آنزیم‌ها
۸۹	مقدمه
۸۹	اهمیت آنزیم‌ها در آزمایشگاه و بالین
۹۰	اصول واکنش‌های آنزیمی
۹۰	عوامل موثر بر سرعت واکنش آنزیمی
۹۱	اثر حرارت بر سرعت واکنش
۹۲	اثر غلظت آنزیم بر سرعت واکنش آنزیمی
۹۳	اثر غلظت سوبسترا بر سرعت واکنش آنزیمی
۹۴	اثر pH بر سرعت واکنش آنزیمی
۹۵	اختصاصیت عمل آنزیم‌ها در واکنش‌های آنزیمی
۹۶	اثر مهارکننده‌ها بر سرعت واکنش آنزیمی
۹۹	فصل هشتم: سنجش کیفی قندها
۹۹	مقدمه
۱۰۱	اهمیت بالینی شناسایی و سنجش قندها
۱۰۱	روش‌های سنجش کیفی مونوساکاریدها
۱۰۱	آزمایش مولیش
۱۰۳	آزمایش بندیکت
۱۰۴	آزمایش فهلینگ
۱۰۵	آزمایش بارفود
۱۰۶	آزمایش سلیوانف
۱۰۷	آزمایش بیال
۱۱۱	شناسایی یک قند مجهول
۱۰۸	سنجش کیفی دی ساکاریدها
۱۰۹	آزمایش اسید موسیک
۱۱۰	شناسایی پلی ساکاریدها
۱۱۰	آزمایش ید
۱۱۳	فصل نهم: آنالیز ادرار
۱۱۳	مقدمه
۱۱۳	انواع نمونه ادرار
۱۱۳	ادرار اول صبح
۱۱۴	نمونه ادرار تصادفی
۱۱۴	نمونه ادرار زمان دار
۱۱۵	آماده‌سازی بیمار و نمونه‌گیری
۱۱۶	حمل و نقل و ذخیره‌سازی نمونه
۱۱۶	آنالیز ادرار یا آزمایش کامل ادرار

۱۱۶	آزمایش‌های تعیین خصوصیات فیزیکی ادرار
۱۱۹	آزمایش‌های تعیین خصوصیات شیمیایی ادرار
۱۲۸	آزمایش‌های میکروسکوپی ادرار
۱۳۰	فصل دهم: اسپکتروفتومتری
۱۳۰	مقدمه
۱۳۱	انواع روش‌های اسپکتروفتومتری
۱۳۲	روش اسپکتروفتومتری در ناحیه مرئی
۱۳۲	روش اسپکتروفتومتری در ناحیه فرابنفش - مرئی
۱۳۳	اجزای دستگاه اسپکتروفتومتر
۱۳۳	منبع نور
۱۳۳	روشنه‌ی ورودی
۱۳۴	مونوکروماتور
۱۳۴	کووت
۱۳۵	سلول فتوالکتریک یا آشکار ساز
۱۳۵	صفحه‌ی نمایشگر
۱۳۱	اساس سنجش در دستگاه اسپکتروفتومتری
۱۳۱	قانون بیر و لامبرت
۱۳۵	روش کار با دستگاه اسپکتروفتومتری
۱۳۶	اندازه‌گیری طیف جذبی یک محلول
۱۳۶	بررسی ارتباط غلظت محلول با جذب نوری
۱۳۷	اندازه‌گیری مقدار پروتئین یک محلول
۱۳۸	آزمایش بیوره
۱۴۱	فصل یازدهم: سنجش کمی قند خون
۱۴۱	مقدمه
۱۴۲	اهمیت بالینی سنجش قند خون
۱۴۲	هیپوگلیسمی
۱۴۲	هیپرگلیسمی
۱۴۳	انواع آزمایش‌های قند خون
۱۴۳	گلوکز خون ناشتا
۱۴۳	قندخون تصادفی
۱۴۴	قند ۲ ساعته
۱۴۴	آزمایش تحمل گلوکز خوراکی
۱۴۵	آزمایش HbA1C
۱۴۶	جمع‌آوری نمونه جهت سنجش کمی قند خون
۱۴۷	روش‌های اندازه‌گیری گلوکز خون
۱۴۷	روش‌های شیمیایی
۱۴۷	روش‌های آنزیمی

۱۵۲	فصل دوازدهم: کروماتوگرافی
۱۵۲	مقدمه
۱۵۲	اصول کروماتوگرافی
۱۵۳	اصطلاحات رایج در کروماتوگرافی
۱۵۵	روش‌های کروماتوگرافی
۱۵۵	انواع روش‌های کروماتوگرافی براساس فاز
۱۵۶	انواع روش‌های کروماتوگرافی براساس شکل بستر جداسازی
۱۶۵	روش شناسایی بیوملکول‌ها به روش کروماتوگرافی کاغذی
۱۶۵	شناسایی قندها به روش کروماتوگرافی کاغذی
۱۶۶	شناسایی آمینواسیدها به روش کروماتوگرافی کاغذی
۱۶۸	فصل سیزدهم: الکتروفورز
۱۶۸	مقدمه
۱۶۹	اصول الکتروفورز
۱۷۰	کاربرد بالینی الکتروفورز
۱۷۰	انواع الکتروفورز
۱۷۰	الکتروفورز ژل آگارز
۱۷۱	الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید
۱۷۲	الکتروفورز استات سلولز
۱۷۳	شناسایی پروتئین‌های سرم به روش الکتروفورز استات سلولز
۱۷۴	آنالیز باندهای پروتئینی سرم
۱۷۴	نتایج طبیعی الکتروفورز پروتئین‌های سرم
۱۷۵	نتایج غیرطبیعی الکتروفورز پروتئین‌های سرم
۱۷۸	الگوهای رایج باندهای پروتئین‌های سرم در بیماری‌ها
۱۸۱	فصل چهاردهم: استخراج دئوکسی ریبونوکلیک اسید (DNA)
۱۸۱	مقدمه
۱۸۲	اهمیت استخراج DNA
۱۸۲	مراحل کلی استخراج DNA
۱۸۳	نمونه‌های مورد استفاده برای استخراج DNA انسان
۱۸۳	استخراج DNA از بزاق

فصل اول

ایمنی زیستی

مقدمه

یکی از اصول مهم برای کار کردن در همه آزمایشگاه‌ها از جمله آزمایشگاه بیوشیمی رعایت نکات و پروتکل‌های ایمنی توسط کلیه اساتید، دانشجویان، کارآموزان و مراجعین است. به‌طور بالقوه خطرات مختلف شیمیایی، فیزیکی، مکانیکی و زیستی یک فرد را در آزمایشگاه تهدید می‌کند. به همین دلیل فراگرفتن و رعایت اصول ایمنی برای حفظ سلامتی خود و دیگران در آزمایشگاه حائز اهمیت است.

خطرات زیستی آزمایشگاه

آزمایشگاه‌هایی که بر روی نمونه‌های زیستی مختلف کار می‌کنند با خطر بالقوه آلودگی‌های زیستی همراه هستند. امروزه بسیاری از آزمایشگاه‌ها برای کاهش خطرات از برنامه ایمنی زیستی^۱ آزمایشگاهی که مشتمل بر قوانین و روش‌های حفاظتی است، استفاده می‌کنند. در این برنامه آزمایشگاه‌ها بر اساس احتمال خطر به چهار سطح تقسیم‌بندی می‌شوند که به ترتیب از یک به چهار میزان خطر بیشتر است. هدف این قوانین کاهش موارد مواجهه ناخواسته با عوامل مخاطره‌آمیز و محدود شدن نشت آلودگی است.

۱- سطح یک ایمنی زیستی آزمایشگاهی: این سطح برای آزمایشگاه‌هایی تدوین و عملیاتی می‌شود که برای کار با میکروارگانیسم‌های بی‌خطر یا کم خطر تجهیز شده‌اند. این نوع آزمایشگاه‌ها که عمدتاً برای آموزش‌های عمومی و پژوهش‌های معمولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، تجهیزات ایمنی خاصی نیاز نداشته و دارای میز کار آزاد هستند. از جمله ملزومات این قبیل آزمایشگاه‌ها پیت مکانیکی، هودهای زیستی، اتوکلاو و سایر وسایل موردنیاز برای استریل‌سازی می‌باشد.

¹ Biosafety

۲- سطح دو ایمنی زیستی آزمایشگاهی: آزمایشگاه‌های این سطح برای خدمات اولیه سلامت و پژوهش‌های اولیه تجهیز می‌شوند و بر روی ارگانیسم‌های پاتوژن گروه خطر دو کار می‌شود. پاتوژن‌هایی گروه خطر دو شامل پاتوژن‌هایی می‌شوند که در شرایط عادی، خطر جدی برای فرد نداشته و در معرض این عوامل قرار گرفتن به ندرت منجر به بیماری جدی می‌شود. همچنین درمان مؤثر و واکسن برای پیشگیری از آن نیز وجود دارد. در این آزمایشگاه‌ها، اغلب کارها بر روی میز آزمایشگاه انجام می‌شود اما در شرایطی که امکان ایجاد آئروسول^۱ وجود داشته باشد و یا استریل ماندن نمونه مهم باشد، از هودهای زیستی استفاده می‌شود. این آزمایشگاه‌ها دارای اتوکلاو و دستگاه چشم‌شور هستند. بهتر است در این آزمایشگاه‌ها سیستم کنترل‌کننده تهویه، کابینت‌های ایمنی زیستی و تصفیه فاضلاب در محل وجود داشته باشد.

۳- سطح سه ایمنی زیستی آزمایشگاهی: آزمایشگاه‌های این سطح برای خدمات تخصصی تشخیصی و پژوهش‌های پیشرفته تجهیز شده‌اند و در آن‌ها با میکروارگانیسم‌های گروه خطر سه کار می‌شود. پاتوژن‌های گروه خطر سه شامل پاتوژن‌هایی می‌شوند که به‌طور معمول باعث ایجاد بیماری جدی یا کشنده در انسان می‌شود و برای آن مداخلات درمانی و پیشگیری در دسترس است. کلیه کارها در این نوع آزمایشگاه‌ها باید زیر هود انجام شود. آزمایشگاه به‌صورت جدا و ایزوله از سایر بخش‌های ساختمان قرار می‌گیرد و ورودی آن دو درب است. سیستم‌های کنترل‌کننده تهویه هوا، دوش ایمنی و کابینت‌های ایمنی زیستی در آن وجود دارد. تصفیه فاضلاب در محل انجام می‌شود و دارای اتوکلاو برای استریل‌سازی است. رفت‌وآمد به این آزمایشگاه‌ها باید حداقل باشد و محیط آن به‌طور مرتب ضدعفونی شود.

۴- سطح چهار ایمنی زیستی آزمایشگاهی: آزمایشگاه‌های این سطح بالاترین ایمنی را فراهم می‌کنند. این آزمایشگاه‌ها برای کار با پاتوژن‌های گروه خطر چهار تجهیز شده‌اند. پاتوژن‌های این گروه معمولاً سبب یک بیماری جدی یا کشنده در انسان می‌شوند که برای آن، درمان مؤثر و پیشگیرانه وجود ندارد. علاوه بر ویژگی‌های آزمایشگاه‌های سطح سه، این آزمایشگاه‌ها ضوابط سخت‌گیرانه‌تری دارند. ورود و خروج افراد به این آزمایشگاه‌ها کاملاً کنترل می‌شود. حداقل دو درب قبل از درب اصلی آزمایشگاه وجود دارد. ایمنی کارکنان در این آزمایشگاه‌ها تحت کنترل مداوم قرار دارد. لباس کارکنان این آزمایشگاه‌ها متمایز از سایرین است و از ماسک‌های تنفسی خاصی استفاده می‌کنند.

خطرات شیمیایی آزمایشگاه

یکی از متداول‌ترین خطرات در آزمایشگاه، آسیب‌های شیمیایی است که از طریق چشم، پوست، استنشاق و تزریق ممکن است سلامت فرد را در آزمایشگاه به خطر بیندازد. دستورالعمل‌هایی در این زمینه برای کاهش آسیب‌های شیمیایی وجود دارد که شامل موارد ذیل می‌گردد:

❖ از خوردن و آشامیدن در محیط آزمایشگاه جداً پرهیزید.

¹ Aerosol

- ❖ برای برداشتن محلول‌های شیمیایی - حتی غیرسمی - از پپی‌تور^۱ استفاده کنید.
- ❖ برای حرارت دادن ظروف شیشه‌ای از گیره استفاده کنید. همچنین درب ظرف در حال حرارت را با درپوش نپوشانید.
- ❖ در صورت کار با مواد سوزش‌آور، خورنده، قابل اشتعال و رادپواکتیو از دستکش، ماسک و عینک مناسب استفاده کنید.
- ❖ در محلول‌سازی همیشه اسید را به آب اضافه کنید.
- ❖ در محلول‌سازی برای همزدن محلول از مگنت استیرر^۲ استفاده کنید.
- ❖ استفاده از کفش روباز یا دمپایی در آزمایشگاه ممنوع است.
- ❖ همیشه در آزمایشگاه روپوش به تن داشته باشید.
- ❖ هیچ‌گاه مواد آزمایشگاهی را مستقیماً بو نکنید.
- ❖ درب ظروف حلال‌های فرار همیشه بسته باشد.
- ❖ برای استفاده از محلول‌های شیمیایی سمی، اسیدی و فرار از هود استفاده کنید.
- ❖ اطلاعات مربوط به مواد شیمیایی را بر روی ظروف مربوطه ثبت کنید.
- ❖ حتماً قبل از استفاده از یک ماده شیمیایی به علامت‌ها و اطلاعات درج شده بر روی ظرف آن توجه کنید.

آشنایی با اطلاعات و علائم هشداردهنده ایمنی

علائم هشدار مواد شیمیایی، نمادهایی هستند که توسط سازمان استاندارد جهانی به‌صورت بین‌المللی وضع شده‌اند و اطلاعاتی در مورد ماهیت مواد شیمیایی، خطر مواد شیمیایی، مکان و هر آنچه که در فضای آزمایشگاه در جریان است، در اختیار افرادی که از آن ماده استفاده می‌کنند، قرار می‌دهد تا در هنگام آزمایش و نگهداری مواد شیمیایی از خطرات ماده موردنظر آگاه باشند و نکات ایمنی را رعایت کنند. تصاویری که در شکل ۱-۱ مشاهده می‌کنید مربوط به علائم هشداردهنده‌ای هستند که در آزمایشگاه‌ها به‌صورت متداول از آن‌ها استفاده می‌شود که عبارتند از: اشتعال‌پذیر^۳، خورنده پوست^۴، منفجره^۵، گاز فشرده^۶، اکسید کننده^۷ (به شدت اشتعال‌پذیر)، سمی^۸، خطرات بهداشتی^۹، حساسیت‌زا و التهاب‌آور، خطرناک برای محیط‌زیست.

¹ Pipettor
² Magnetic stirrer
³ Flammable
⁴ Corrosive

⁵ Explosive
⁶ Compressed gas
⁷ Oxidizing
⁸ Toxic
⁹ Health hazards

سرعت چرخش سانتریفیوژها اغلب، به صورت دور در دقیقه^۱ (RPM) عنوان می‌شود. با این حال، چون نیروی وارد شده به نمونه نه تنها به مقدار RPM، بلکه به شعاع روتور نیز بستگی دارد، نیروی گریز از مرکز نسبی^۲ (RCF) نیز معیار دیگری برای بیان سرعت چرخش می‌باشد. بنابراین، اگر یک نمونه یکسان با مقادیر RPM برابر در دو سانتریفیوژ با هندسه روتور متفاوت چرخانده شود (شعاع‌های مختلف روتور)، سرعت چرخش، متفاوت خواهد بود. با این حال، اگر مقادیر RCF برابر در دو سانتریفیوژ اعمال شود، نیروهای رسوب یکسان خواهند بود.



شکل ۲۳-۲. الف) یک سانتریفیوژ با روتور مناسب لوله‌های اپندورف که در آن لوله‌ها به صورت متقارن چیده شده‌اند؛ ب) سانتریفیوژ با روتور مناسب لوله‌های فالكون ۱۵ میلی‌لیتری

بن ماری

بن ماری یا حمام آب^۳، ابزار آزمایشگاهی است که از مخزنی برای آب ساخته شده است. اکثر حمام‌های آب دارای رابط دیجیتال یا آنالوگ هستند تا به کاربران امکان تنظیم دمای دلخواه را بدهند. موارد استفاده شامل گرم کردن معرف‌ها و نمونه‌ها در روند آزمایش و ذوب شدن مواد است. این ابزار همچنین برای ایجاد شرایط مطلوب برخی واکنش‌های شیمیایی در دمای مناسب استفاده می‌شود. تقریباً در تمام حمام‌های آب می‌توان دمایی تا $99/9^{\circ}\text{C}$ ایجاد کرد. در بسیاری از موارد، بن ماری دارای یک درپوش می‌باشد. این درپوش برای جلوگیری از تبخیر و کمک به رسیدن به دمای بالا بسته می‌شود (شکل ۲۴-۲). توجه داشته باشید که استفاده از حمام آب برای واکنش‌های حساس به رطوبت توصیه نمی‌شود. سطح آب باید مرتباً کنترل شود و فقط با آب مقطر پر شود. این امر برای جلوگیری از رسوب نمک‌ها در محفظه بن ماری ضروری است.

¹ Revolutions per minute

² Relative centrifugal force

³ Water bath

جدول ۱-۴. واحدهای اندازه‌گیری وزن و حجم

واحد اندازه‌گیری وزن	
1 gram (g)	= 1000 milligrams (mg)
1 kilogram (kg)	= 1000 grams
واحد اندازه‌گیری حجم	
1 liter (L)	= 1000 milliliter (mL)
1 deciliter (dL)	= 1/10 liter

واحدهای غلظت محلول‌ها

محلول‌ها را معمولاً بر اساس غلظت^۱ بیان می‌کنند. غلظت کمیّتی است که برای سنجش میزان حل شدن یک حل شونده در مقدار مشخصی حلال به کار می‌رود. خواص یک محلول به مقدار ماده حل شده در حلال بستگی دارد، بنابراین در انجام آزمایش‌های مختلف که بر پایه محلول‌ها هستند باید غلظت محلول را مشخص نمود. غلظت یک محلول را می‌توان به صورت کیفی با واژه‌های رقیق (حاوی مقادیر کمی حل شونده در مقدار مشخصی حلال) و غلیظ (حاوی مقادیر زیادی حل شونده در مقدار مشخصی حلال) مشخص نمود. اما در آزمایش‌های کمیّتی نیاز به مشخص بودن کمیّتی غلظت محلول‌ها می‌باشد. چندین کمیّتی به عنوان واحدهای غلظت برای مشخص نمودن کمیّتی غلظت محلول‌ها معرفی شده‌اند، که به طور خلاصه در جدول ۲-۴ نشان داده شده‌اند و در ادامه به طور مفصل به آن‌ها پرداخته خواهد شد.

جدول ۲-۴. واحدهای مختلف غلظت و تعریف آن‌ها

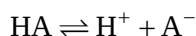
واحد	تعریف
مولاریته (M)	مول حل شونده لیتر محلول
نرمالیه (N)	اکی والان گرم حل شونده لیتر محلول
مولالیه (m)	مول حل شونده کیلوگرم حلال
درصد جرمی (w/w%)	جرم حل شونده جرم محلول
درصد حجمی (v/v%)	حجم حل شونده حجم محلول
درصد جرمی - حجمی (w/v%)	جرم حل شونده میلی لیتر محلول

¹ Concentration

اهمیت pH

موجودات زنده سیستم‌های مبتنی بر آب هستند، به این معنی که بستگی زیادی به تعادل‌های آبی، به ویژه تعادل‌های اسید باز دارند. بنابراین، از آنجایی که بیوشیمی، شیمی حیات می‌باشد، تمام مفاهیم اسید و باز و pH اهمیت بسیار زیادی در بیوشیمی دارند به طوری که pH محیط سلول همیشه به کمک سیستم‌های بافری مختلف در حدود ۷ قرار دارد.

درست مانند سایر سیستم‌های اسید باز، ماکرومولکول‌های زیستی با اهدا و پذیرش پروتون‌ها به عنوان اسید و باز ضعیف عمل می‌کنند. با این تفاوت که ماکرومولکول‌ها، دارای چندین گروه مختلف اهدا کننده یا پذیرنده پروتون (گروه قابل یونیزاسیون) هستند که میزان تفکیک و یا تجزیه این گروه‌ها به دو فاکتور بستگی دارد: (۱) pH سیستم یا محیط، (۲) pK_a گروه قابل یونیزاسیون. محاسبه pK_a یک اسید ضعیف به شرح ذیل می‌باشد:



$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a$$

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

pK_a معیاری برای نشان دادن قدرت اسیدیته می‌باشد. به طور کلی، بیان کمی قدرت نسبی اسیدها و بازهای ضعیف توسط ثابت تفکیک (K) آن‌ها صورت می‌پذیرد که تمایل آن‌ها به یونیزاسیون را نشان می‌دهد که به دلیل مقادیر عددی کوچک، بهتر است از منفی لگاریتم آن استفاده شود. در مقادیر pH برابر pK_a اشکال پروتونه و دیپروتونه یک گروه قابل یونیزه برابر هستند، اما با افزایش و کاهش pH به مقادیر بیشتر یا کمتر از pK_a ، به ترتیب اشکال دیپروتونه و پروتونه در سیستم بیشتر می‌شوند. بنابراین، تغییر در pH اطراف ماکرومولکول مشخص خواهد کرد که چه گروه‌هایی پروتونه می‌شوند و چه گروه‌هایی دیپروتونه، که به نوبه خود خصوصیات مولکول را تعیین می‌کند. این امر به ویژه برای آنزیم‌ها بسیار مهم است. بیشتر آنزیم‌ها فقط در یک محدوده pH مشخص کار می‌کنند. به عنوان مثال، آنزیمی را با یک گروه کربوکسیل در نظر بگیرید. ساختار آن گروه به pH بستگی دارد (به صورت $COOH$ باشد یا COO^-). اگر آنزیم برای فعال شدن نیاز به پروتون داشته باشد، آنزیم فقط در محدوده‌ای از pH کار می‌کند که در آن گروه کربوکسیل اکثر مولکول‌های آنزیم به صورت پروتونه باشد. به این ترتیب، pH محیط تعیین می‌کند کدام آنزیم‌ها فعال باشند و بنابراین چه واکنش‌های بیوشیمیایی رخ دهد.

از طرف دیگر، از آنجایی که خصوصیات محلول‌ها و ترکیبات مختلف تحت تأثیر pH آن‌ها می‌باشد بنابراین در آزمایشگاه بیوشیمی بسیاری از محلول‌ها و بافرها باید در یک pH مشخص تنظیم شوند تا خواص شیمیایی آن‌ها برای انجام آزمایش‌های مختلف حفظ شود. علاوه بر این آزمایش‌هایی از قبیل سنجش‌های آنزیمی، بسیار تحت تأثیر pH سیستم بوده و نیاز به pH معینی دارند.

روش کار:

- ❖ ۲ میلی‌لیتر از نمونه مجهول یا مخلوط آمینواسیدی را در یک لوله آزمایش بریزید.
- ❖ ۲ میلی‌لیتر معرف هاپکینز کول به لوله اضافه نمایید و مخلوط کنید.
- ❖ حدود ۱-۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آرامی و از جدار لوله اضافه نمایید.
- ❖ حلقه بنفش حاصل، دلیل بر وجود تریپتوفان است.

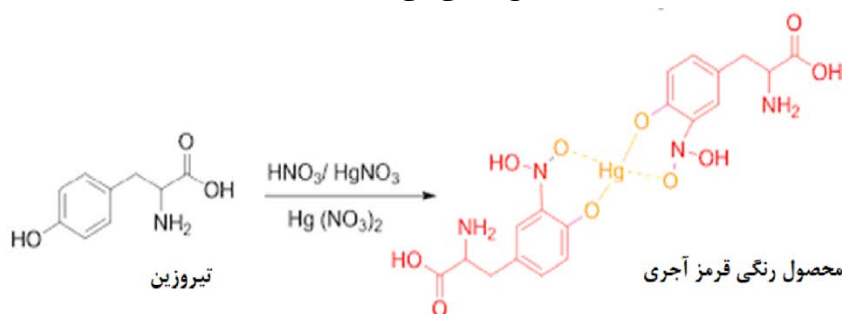
نکته: نیتريت‌ها، کلرات‌ها، نیترات‌ها و کلريد‌هاى اضافى از بروز واکنش جلوگیری می‌کنند.

احتیاط: اسید سولفوریک غلیظ می‌تواند باعث سوختگی شدید پوست و آسیب جدی به چشم شود و همچنین استنشاق آن ممکن است منجر به تحریک تنفسی شود. از تماس چشم، پوست و لباس با آن و همچنین از استنشاق بخارات آن خودداری کنید. استفاده از دستکش و عینک ایمنی یک امر ضروری است. آزمایش باید در هود انجام شود.

آزمایش میلون^۱

هدف: این آزمایش مخصوص شناسایی تیروزین در نمونه است. تیروزین تنها آمینواسید حاوی یک گروه فنل (یک گروه هیدروکسیل متصل به حلقه بنزن) است.

اساس: در آزمایش میلون، گروه فنل تیروزین ابتدا توسط اسید نیتریک موجود در محلول آزمایش نیتراته می‌شود. سپس تیروزین نیتراته یون‌های جیوه را در محلول مجتمع می‌کند و یک محلول قرمز آجری تشکیل می‌دهد (شکل ۹-۶). لازم به ذکر است که تمام فنل‌ها (ترکیبی که دارای حلقه بنزن و OH متصل به آن است) در آزمایش میلون نتایج مثبتی می‌دهند.



شکل ۹-۶. اساس آزمایش میلون

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش: نمونه مجهول یا محلول حاوی آمینواسید تیروزین، معرف میلون (۱۰۰ گرم از محلول HgNO_3 را با نسبت (۲:۱) با آب مقطر رقیق نمایید)، بن ماری آب جوش و لوله آزمایش

¹ Millon test

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش: لوله آزمایش، بن ماری، آنزیم رنین ۰/۷ درصد، شیر و آب مقطر خالص

روش کار:

- ❖ ۶ لوله آزمایش تمیز را آماده کرده و از ۱ تا ۶ شماره گذاری نمایید.
 - ❖ به لوله های ۱ تا ۳، ۲ میلی لیتر شیر و به لوله های ۴-۶، نیم میلی لیتر آنزیم رنین اضافه نمایید.
 - ❖ لوله های شماره ۱ و ۴ را در حرارت آزمایشگاه، لوله های شماره ۲ و ۵ را در دمای 37°C و لوله های شماره ۳ و ۶ را در دمای 80°C قرار دهید.
 - ❖ بعد از مدت زمان یک دقیقه، رنین هر دما را به شیر همان دما اضافه و مخلوط نموده و مجدداً به همان دما برگردانید.
- ضمن یادداشت زمان برای هر دما به طور جداگانه، سرعت تشکیل انعقاد یا رسوب پروتئین شیر را در سه شرایط فوق بررسی و بهترین دما را نتیجه گیری نمایید

اثر غلظت آنزیم بر سرعت واکنش آنزیمی

به شرط وجود مقادیر مازاد مولکول های سوبسترا، در شرایط مطلوب، افزودن مولکول های آنزیم بیشتر به مخلوط واکنش، باعث افزایش غلظت کمپلکس ES و در نتیجه سرعت کلی واکنش می شود. به طور کلی، سرعت واکنش متناسب با غلظت آنزیم موجود در مخلوط واکنش است. این موضوع، اساس تعیین کمی آنزیم ها از طریق اندازه گیری سرعت واکنش است. برای این منظور سایر عوامل مؤثر بر سرعت واکنش در حد مطلوب نگه داشته می شوند تا سرعت واکنش دقیقاً متناسب و بیانگر غلظت آنزیم باشد. به عنوان مثال برای تعیین فعالیت آمینوترانسفرازها، نمونه مجهول (به طور مثال سرم) به یک سیستمی حاوی غلظت مازاد سوبسترا و دارای شرایط مطلوب از نظر دما، pH، کوفاکتورها و غیره افزوده می شود و سپس سرعت واکنش بر اساس تغییرات غلظت سوبسترا یا محصول در واحد زمان سنجش می شود. این سرعت متناسب با غلظت آنزیم موجود در نمونه است.

بررسی آزمایشگاهی اثر غلظت آنزیم بر سرعت واکنش آنزیمی

اساس: آنزیم رنین، کازئین محلول شیر را به کازئین نامحلول تبدیل می کند که باعث دلمه بستن شیر شده و در نهایت پنیر شکل می گیرد. غلظت های مختلف آنزیم اثر متفاوتی بر سرعت واکنش دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش: لوله آزمایش، بن ماری، آنزیم رنین ۰/۷ درصد، شیر و آب مقطر خالص

روش کار:

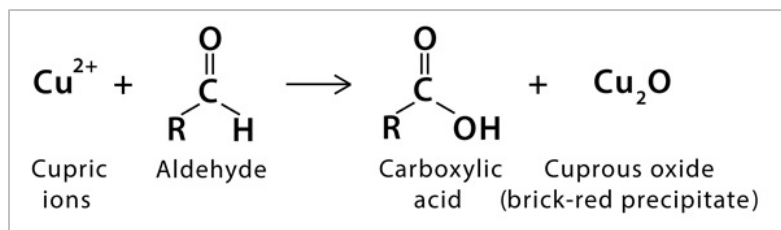
- ❖ ۶ لوله آزمایش تمیز را آماده کرده و از ۱ تا ۶ شماره گذاری نمایید.
- ❖ به لوله های ۱ تا ۳، به ترتیب ۱، ۰/۷۵ و ۰/۲۵ میلی لیتر آنزیم رنین اضافه کنید.

احتیاط: اسید سولفوریک غلیظ ماده‌ای سمی و خورنده است که می‌تواند باعث سوختگی شدید و تغییر رنگ پوست شود. از تماس چشم، پوست و لباس با آن و همچنین از استنشاق بخارات آن خودداری کنید. استفاده از دستکش و عینک ایمنی یک امر ضروری است. آزمایش باید در زیر هود انجام شود.

آزمایش بندیکت^۱

هدف: برای شناسایی قندهای احیاکننده در محلول، از آزمایش بندیکت استفاده می‌شود. تمامی مونوساکاریدها و دی ساکاریدها به جز ترهالوز و ساکارز به این آزمایش جواب مثبت می‌دهند. قندهای احیاکننده دارای گروه عاملی کتون یا آلدئیدی آزاد در ساختار شیمیایی خود می‌باشند که قادر به احیای مس موجود در معرف بندیکت و تولید رسوب رنگی می‌باشند.

اساس: مس موجود در معرف بندیک (CuSO₄) در حضور عوامل احیاکننده از وضعیت دو ظرفیتی (Cu²⁺) به تک ظرفیتی (Cu⁺) تبدیل می‌شود. رسوب حاصل یا رنگ تولید شده موید وجود مواد احیاکننده در محیط آزمایش است شکل (۴-۸).



شکل ۴-۸. اساس آزمایش بندیکت

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش: نمونه مجهول یا محلول حاوی قندهای احیاکننده، لوله آزمایش، معرف بندیکت

روش تهیه معرف بندیکت

❖ ۱۷/۳ گرم سیترات سدیم و ۱۰ گرم کربنات سدیم را در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و صاف کنید.

❖ ۱/۷۳ گرم سولفات مس را در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به کمک حرارت حل کرده و سپس به آهستگی به محلول فوق اضافه کنید.

❖ حجم محلول را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

روش کار:

❖ ۸ قطره از نمونه مجهول را در یک لوله آزمایش بریزید.

¹ Benedict's Test

حالت ایزوستنوری^۱ گویند. وزن مخصوص کمتر از ۱/۰۰۷ را هیپوستنوری^۲ گویند که عمدتاً به دنبال مصرف زیاد مایعات یا در شرایط دیابت بی‌مزه مشاهده می‌گردد. ادرار با وزن مخصوص بیش از ۱/۰۱۰ را هیپرستنوری^۳ گویند که عمدتاً به دنبال دهیدراتاسیون یا نارسایی احتقانی قلب (کاهش خون‌رسانی به کلیه) مشاهده می‌گردد.

روش‌های ارزیابی وزن مخصوص ادرار

اگرچه در گذشته از روش اورینومتری^۴ برای سنجش وزن مخصوص ادرار استفاده می‌شده، امروزه نوارهای ادراری و روش رفاکتومتری متداول‌ترین روش‌های سنجش وزن مخصوص ادرار می‌باشند. روش رفاکتومتری با استفاده از دستگاه رفاکتومتر به انجام می‌رسد، در این روش نمونه ادرار بر روی صفحه نوری رفاکتومتر قرار گرفته و بر اساس میزان شکست نوری که توسط نمونه ادرار اتفاق می‌افتد، وزن مخصوص سنجش می‌شود.

در روش نوار ادراری، الکترولیت‌های ادرار با یک معرف شیمیایی واکنش داده و تغییر رنگ حاصل از واکنش، نشانگر میزان وزن مخصوص ادرار خواهد بود. به‌طور کلی صحت روش نوار ادراری، نسبت به روش رفاکتومتری، کمتر است.

باید توجه داشت، اگرچه وجود گلوکز و پروتئین ارتباطی با قدرت تغلیظ ادرار توسط کلیه‌ها ندارد، ولی وجود آن‌ها در ادرار (به‌عنوان مثال در بیماران دیابتی) می‌تواند منجر به افزایش وزن مخصوص ادرار شود. در این موارد سنجش اسمولالیت ادرار به جای وزن مخصوص ادرار توصیه می‌گردد.

حجم ادرار

تعیین صحیح حجم ادرار با استفاده از یک نمونه ادرار زمان‌دار به خصوص ادرار ۲۴ ساعته انجام می‌پذیرد. میزان طبیعی دفع ادرار با توجه به سن فرد متفاوت است. به طور طبیعی یک فرد بالغ در طی ۲۴ ساعت، حدود ۱۲۰۰ تا ۱۵۰۰ میلی‌لیتر ادرار تولید می‌کند. به‌طور کلی بازه طبیعی حجم ادرار ۶۰۰ تا ۲۰۰۰ میلی‌لیتر در نظر گرفته می‌شود.

افزایش غیرطبیعی حجم ادرار، پلی‌وری^۵ یا پر ادراری نامیده می‌شود، در این شرایط حجم ادرار فرد بالغ بیش از ۲۵۰۰ میلی‌لیتر در ۲۴ ساعت است. پرادراری به طور فیزیولوژیک به دنبال مصرف زیاد مایعات یا ترکیباتی مثل کافئین، نمک یا رژیم غذایی پرپروتئین مشاهده می‌شود. شرایط پاتولوژیکی همچون دیابت قندی، دیابت بی‌مزه و نقص در باز جذب کلیوی آب و نمک نیز منجر به پلی‌وری می‌گردند.

¹ Isosthenuria

² Hyposthenuria

³ Hypersthenuria

^۴ اورینومتر یک جسم شناور شیشه‌ای که شامل دو قسمت بدنه پهن و ساقه باریک و مندرج می‌باشد، این وسیله وارد نمونه ادرار می‌شود و بخش بدنه به طور کامل

در نمونه قرار می‌گیرد اما قسمت ساقه بسته به میزان وزن مخصوص ادرار در ادرار فرو می‌رود. بر اساس درجه‌بندی در قسمت ساقه، وزن مخصوص تعیین می‌شود.

⁵ Polyuria

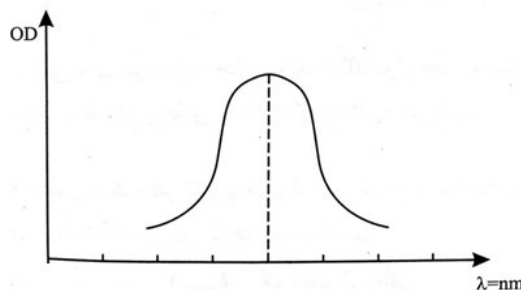
۶- نمونه‌ی آزمایش را به کووت (کووت جدید یا کووتی که با آب مقطر شسته و خشک شده است) منتقل نموده و جذب نوری را بخوانید.

۷- پس از اتمام کار، کووت را خارج کرده و دستگاه را خاموش کنید.

اندازه‌گیری طیف جذبی یک محلول

هدف: تعیین طول موج ماکزیمم (λ_{max}) یک محلول رنگی می‌باشد که برای سنجش‌های بعدی توسط دستگاه اسپکتروفتومتری بکار گرفته خواهد شد.

❖ اولین مرحله برای اندازه‌گیری غلظت یک ماده، تعیین طول موج ماکزیمم برای ماده‌ی موردنظر می‌باشد. طول موج ماکزیمم، طول موجی است که در آن میزان جذب نور حداکثر است. طول موج ماکزیمم هر محلول متفاوت می‌باشد (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰. طیف جذبی محلول

روش کار: جهت اندازه‌گیری طول موج ماکزیمم از محلول رنگی برومو فنل بلو با غلظت ۱۰ mg/l استفاده می‌شود. این محلول را در معرض تابش نور با طول موج‌های مختلف قرار داده و OD قرائت شده برای هر طول موج را یادداشت کنید. سپس منحنی تغییرات OD را برحسب طول موج‌های مختلف روی کاغذ رسم کرده و نقطه‌ی ماکزیمم جذب را تعیین کنید. لازم به ذکر است که قبل از اندازه‌گیری مقدار OD، عدد OD باید با استفاده از محلول بلانک در دستگاه صفر شود (جدول ۱-۱۰).

جدول ۱-۱۰. تعیین طول موج ماکزیمم برومو فنل بلو (λ_{max})

طول موج	۶۲۰	۶۰۰	۵۸۰	۵۶۰	۵۴۰	۵۲۰	۵۰۰	۴۸۰
nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
جذب نوری (OD)								

بررسی ارتباط غلظت محلول با جذب نوری

هدف: بررسی ارتباط غلظت محلول با جذب نوری بر اساس قانون بیر-لامبرت

اضافه به منظور شکستن دیواره سلولی نیز انجام شود. به این منظور می‌توان از روش هضم آنزیمی دیواره سلولی و یا روش‌های فیزیکی مثل خورد کردن و مخلوط کردن استفاده کرد. امروزه برای استخراج DNA از منابع مختلف نظیر سلول‌های خونی، گیاهی و باکتری کیت‌های تجاری متنوعی در دسترس محققان است. به‌طور کلی، اساس به کار گرفته شده در این کیت‌ها لیز کردن سلول‌ها و آزاد کردن DNA و سپس جداسازی آن از سایر اجزای سلولی است. در مراحل بعدی با اضافه کردن بافرهای نمکی به این محلول و با استفاده از فیلترهای مخصوص، DNA را جمع‌آوری و سایر مواد شسته و دفع می‌شوند. در انتها، DNA با استفاده از الکل شسته و رسوب داده می‌شود.

نمونه‌های مورد استفاده برای استخراج DNA انسان

برای آزمایش DNA در انسان از سلول‌های مختلفی مثل سلولی‌های خونی، مو و بزاق می‌توان استفاده کرد. خونگیری، نمونه‌گیری با استفاده از سوآپ دهانی و جمع‌آوری نمونه بزاق راه‌های متداول برای بدست آوردن نمونه DNA هستند. برای نمونه‌گیری با استفاده از یک سوآپ استریل، از سلول‌های داخل دهان در نواحی داخل گونه و اطراف آن نمونه‌گیری می‌شود. خونگیری نیز می‌تواند به روش متداول از رگ‌های ناحیه ساعد انجام شود و یا در مواردی مثل نوزادان تازه متولد شده از پاشنه‌ی پای نوزاد نمونه خون تهیه گردد. آمینوسنتز، نمونه‌گیری از پرزهای جفتی و اسپیراسیون سوزنی نیز سایر روش‌های تهیه نمونه برای آزمایش‌های DNA هستند. تهیه نمونه بزاق نسبت به سایر نمونه‌ها به دلیل سهولت و غیرتهاجمی بودن برتری دارد. برای تسهیل تولید بزاق بیشتر، فرد می‌تواند ۱/۴ قاشق چای‌خوری شکر سفید را روی زبان خود قرار دهد. همچنین بوئیدن موادی نظیر لیموترش و سرکه نیز در تحریک تولید بزاق مؤثر است. در ادامه قصد داریم با یک روش ساده از نمونه بزاق، DNA فرد را استخراج کنیم.

استخراج DNA از بزاق

هدف: هدف از این آزمایش، استخراج کلاف قابل مشاهده‌ی DNA و آشنایی با برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی DNA می‌باشد.

لازم به ذکر است DNA استخراج شده و قابل مشاهده طی این فرآیند ناخالص است و با مواد دیگری مانند پروتئین و قطعات سلول همراه است. مراحل اضافی می‌تواند برای از بین بردن پروتئین‌ها و بقایای سلولی و در نتیجه خالص‌سازی بهتر DNA جدا شده، انجام شود. به‌منظور تخلیص نهایی DNA از روش‌هایی نظیر رسوب، دیالیز و سانتریفوز با دور بالا می‌توان استفاده کرد. میزان خلوص DNA به نوع استفاده از آن بستگی دارد.

مواد و وسایل مورد نیاز آزمایش

آب، محلول صابون مایع ۲۵ درصد، محلول کلرید سدیم ۸ درصد، اتانول سرد، لوله فالکون ۵۰ میلی لیتری، لیوان یک‌بار مصرف، پیپت پلاستیکی حباب‌دار، بن ماری 56°C ، سانتریفیوژ