

الفصل الخامس

البروتينات

Proteins

5

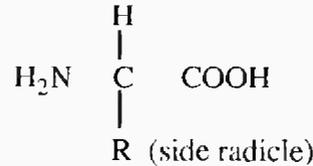
الفصل الخامس

البروتينات

Proteins

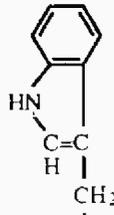
توصف المواد البروتينية بأنها مركبات "بانية للأنسجة" ، ذلك لأنها تتواجد في جميع الخلايا والأنسجة الجسمية ، حيث تلعب دورا أساسيا في جميع النواحي التركيبية والوظيفية لها ، وتدخل عناصر الكربون والهيدروجين والأكسجين والنتروجين بصفة أساسية في تكوين المركبات البروتينية ، بالإضافة إلى عناصر أخرى في بعض الأحيان ، مثل الكبريت والفوسفور واليود والحديد . وقد ساعدت الطرق العلمية التي استحدثت خلال الحرب العالمية الثانية وبعدها مثل " الإظهار اللوني Chromatography " ، والفصل الكهربى " Electrophoresis " ، و" الترشيح الجيلاتينى " Gel Filtration في تفهم أكثر لطبيعة تركيب البروتينات والتي تتميز بتعقيد بالغ في معظم الأحيان .

تتكون البروتينات من وحدات بنائية هي " الأحماض الأمينية Amino Acids " وهي أحماض عضوية تتصل فيها ذرة كربون ألفا (المجاورة لمجموعة الكربوكسيل) بمجموعة أمينية ($-NH_2$) ، كما تتصل ذرة الكربون نفسها بشق جانبي (R) يختلف في الطرز المختلفة من الأحماض الأمينية .



المعادلة العامة للأحماض الأمينية

جدول (١) يوضح تركيب الأحماض الأمينية

Amino acid	Symbol	Side chain	Amino acid	Symbol	Side chain
alanine	Ala	CH ₃	lysine	Lys	$\begin{array}{c} + \\ \text{NH}_3 \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \end{array}$
arginine	Arg	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{NH}_2^+ \\ \\ \text{NH} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \end{array}$	methionine	Met	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{S} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \end{array}$
asparagine	Asn	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	phenyl- alanine	Phe	
aspartic acid	Asp	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	proline*	Pro	*
Cysteine	Cys	$\begin{array}{c} \text{SH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	serine	Ser	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$
glutamic acid	Glu	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \end{array}$	threonine	Thr	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \end{array}$
glutamic	Gln	$\begin{array}{c} \text{CONH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \end{array}$	tryptophan	Trp	
glycin	Gly	H	tyrosine	Tyr	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$
histidine	His	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HN} \quad \text{NH}^+ \\ \quad \quad \\ \text{HC} = \text{C} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	valine	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$
isoleucine	Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \end{array}$			
leucine	Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$			

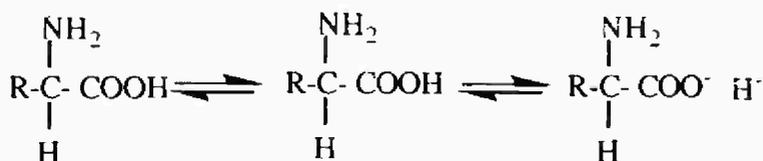
وتتكون البروتينات من سلسلة أو أكثر من الأحماض الأمينية ، مثال ذلك " هرمون الإنسولين " ، الذي توصل سانجر Sanger عام ١٩٦٤ إلى معرفة ترتيب الأحماض الأمينية داخله ، حيث وجد أن الجزيء يتركب من ٥١ حمضا أمينيا مرتبة في سلسلتين تربط بينهما قناطر ثنائية الكبريتيد .

ويعرف في الطبيعة عشرون من الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب البروتينات (انظر الجدول رقم ١) ، فضلا عن أكثر من ثمانية من الأحماض الأمينية غير داخلة في بناء البروتينات مثل حامض جاما أمينو بيوتريك والسترولين والأورنيثين .

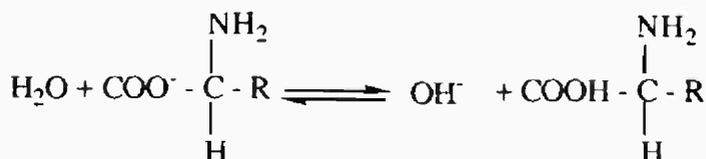
وباستعراض الأحماض الأمينية المختلفة نجد أن بعضها يحتوى على شق جانبي ليفاتي Aliphatic side chain مثل جليسين - الالين - فالين - ليوسين - أيزوليوسين ، كما يحتوى كل من : أرجنين - ليسين على مجموعتي أمين Diamino ، وعلى ذلك فهما قاعدان بينما يحتوى كل من حمض جلوتاميك وحمض أسبارتك على مجموعتي كاربوكسيل ، وعلى ذلك فهما حامضيان . ويحتوى حمضا جلوتامين - أسباراجين على المجموعة الأميدية Amide Group وحمضا ثريونين وسيرين على مجموعة هيدروكسيل ، كما يحتوى حمضا سستائين ، ميثيونين على عنصر الكبريت ، ويتميز كل من : فينيل الأنين - تيروسين باحتوائه على مجموعة أروماتية Aromatic ، أما الأحماض الأمينية : تربتوفان - برولين - هستدسين فإنها تحتوى على حلقات غير البنزين Heterocyclic .

وحيث أن المجموعتين الحامضية (الكربوكسيلية) والمجموعة القاعدية (أمينو) تتواجدان في نفس الوقت في جميع الأحماض الأمينية (فيما عدا البرولين الذي يحتوى على المجموعة الأمينية NH بدلا من المجموعة الأمينية NH_2) فإن للحمض الأميني شحنة موجبة وأخرى سالبة ، وعلى ذلك فإنها كثيرا ما توصف بأنها جزيئات مزدوجة التآين Amphoteric molecules .

وعلى ذلك فالحمض الأميني يتصرف على أقل مزوج التآين ، بمعنى أنه يتآين كحامض ، وأيضا يتآين كقاعدة كالآتي :

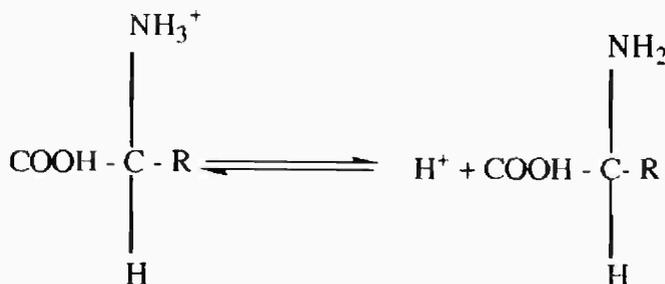


ففي المحاليل القلوية تتصرف كأحماض كالاتي :



وإذا مرر تيار كهربى خلال مثل هذا المحلول فإن أنيون الحامض الأمينى سيهاجر
ناحية القطب الموجب Anode .

وعلى العكس من ذلك ، فإن الأحماض الأمينية تتصرف كقواعد في المحاليل الحامضية
كالاتى :



وإذا مرر تيار كهربى خلال المحلول فإن كاتيون الحامض الأمينى سيهاجر إلى
القطب السالب Cathode .

وعلى ذلك ، فإن هجرة الأحماض الأمينية في مجال كهربى يمكن التحكم فيها عن
طريق التغيير في درجة الحموضة أو القلوية لبيئة التفاعل . وتجدر الإشارة إلى أن لكل حامض

أمينى تركيزاً معيناً من أيون الهيدروجين . تكون عليه درجة تأين كل من المجاميع الحامضية والمجاميع القاعدية متساوية ، وتسمى بنقطة التعادل الكهربى ، عليه لا يهاجر الحامض الأمينى فى المجال الكهربى الى أى من الاتجاهين السائب أو الموجب .

الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات :

يمكن تقسيم الأحماض الأمينية المكونة للبروتين كما يلى :

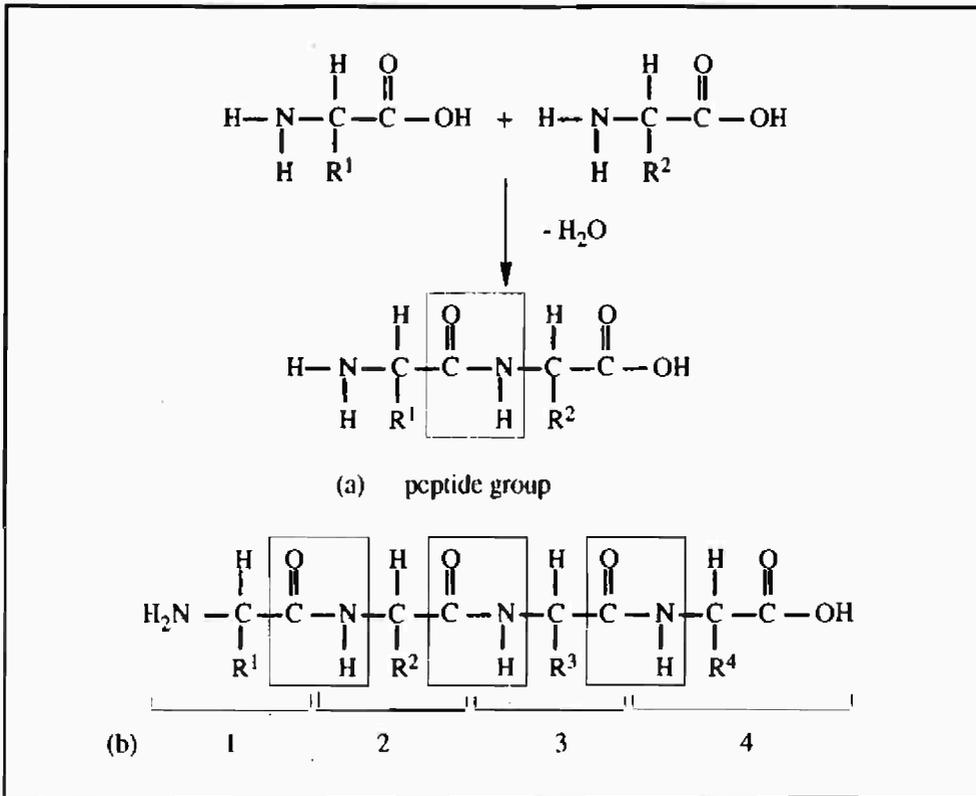
١- أحماض أمينية متعادلة ، أى تحتوى على عدد متساو من مجاميع الأمين ومجاميع الكربوكسيل ، ومن أمثلتها : جليسين - ألانين - فالين - ليوسين - أيزوليوسين - سستائين - ميثيونين - سيرين - ثريونين - برولين - فينيل ألانين - تربتوفان - تيروسين - أسباراجين - جلوتامين .

٢- أحماض أمينية حامضية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة كربوكسيل ، ومن أمثلتها : حمض الأسبرتيك وحمض الجلوتاميك .

٣- أحماض أمينية قاعدية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة أمين مثل : ليسين - أرجنين - هستيدين .

ومن ناحية أخرى ، فإن كل الأحماض الأمينية تنوب فى الماء فيما عدا التيروسين الذى ينوب بقلة فى الماء الساخن . كما أن الأحماض الأمينية باستثناء البرولين تنوب فى الكحول والإثير ، كما أنها لا تنوب جميعها فى محاليل الأحماض والقواعد القوية .

ويتم تكلف الأحماض الأمينية لتكوين جزئ البروتين عن طريق اتحاد المجموعة الحامضية لحمض أمينى مع المجموعة القاعدية للحمض الأمينى المجاور ، مع فقد جزئ من الماء ، وتسمى الرابطة بين - NH - CO - بالرابطة الببتيدية Peptide bond ، ويحتفظ الجزئ المتكون بخاصية التأين المزدوج ، حيث تتواجد مجموعة حامضية عند أحد طرفيه ، وتتواجد مجموعة قاعدية عند الطرف الآخر ، بالإضافة إلى وجود شق جانبى Radicle قد يكون قاعدياً أو حامضياً . على ذلك فإن البروتين يعتبر مادة مجمعة أو " بوليمر Polymer " وحدته هى الحمض الأمينى .



تكوين ثنائي الببتيد وعديد الببتيد وخروج جزيئات الماء لتكوين الروابط الببتيدية

(جدول ٢) الوزن الجزيئي لبعض البروتينات :

الوزن الجزيئي	البروتين
١٢,٠٠٠	الانسولين
٢٣,٨٠٠	تريسين
٢٥,٥٠٠	بيسين
٦٨,٠٠٠	الببومين المصل البقري
٦٧,٠٠٠	الهيموجلوبين البشري
١٠٠,٠٠٠	جاما جلوبيولين البشري
٦٥٠,٠٠٠	ثيروجلوبيولين الخنزير
٧,٠٠٠,٠٠٠	بيروفيت ديهيدروجينيز (كلية الأبقار)
٤٠,٠٠٠,٠٠٠	فيروس الطباقي

ويطلق على المركب المتكون من حمضين أميين اسم "ثنائي الببتيد Dipeptide ، كما أن المركب الناتج عن اتحاد عدد قليل من الأحماض الأمينية يوصف بأنه " قليل الببتيد Oligopeptide ، أما إذا اتحد عدد كبير من الأحماض الأمينية ، فإن المركب الناتج يسمى "عديد الببتيد Polypeptide "

وتتكون المادة البروتينية من سلسلة أو عدة سلاسل من عديد الببتيد ، وهناك عدة آلاف من الطرز المختلفة للبروتينات ، وهي تختلف فيما بينها من عدة وجوه ، منها العدد الكلي للأحماض الأمينية المشتركة في تكوينها ، وطرز هذه الأحماض الأمينية ، وكذلك نظام ترتيبها في جزيء البروتين ، كما ينفرد كل منها بتركيب "ثلاثي الأبعاد Tridimensional structure " ولعل هذا التنوع العظيم للمواد البروتينية هو الذي يمكنها من القيام بالآلاف العمليات الوظيفية المتباينة ، وتتميز معظم البروتينات بأنها ذات أوزان جزيئية كبيرة .

وفيما يلي موجز يوضح طرز البروتينات من الناحية الوظيفية :

١- تعتبر الإنزيمات مواداً بروتينية ذات طبيعة خاصة تعمل كعوامل مساعدة في التفاعلات الكيميائية التي تحدث داخل الجسم . فإذا أخذ في الاعتبار آلاف التفاعلات الكيميائية التي تحدث في جميع خلايا وسوائل الجسم وتراكيبه المختلفة لضمان الأداء الوظيفي لمختلف الأنشطة البيولوجية ، لأدركنا الأهمية القصوى لنور الإنزيمات . ويزيد عدد الإنزيمات المعروفة عن ألفي إنزيم . ومن أمثلة الإنزيمات "السيتوكرومات" Cytochromes التي تلعب دوراً هاماً في نقل الإلكترونات ، "ح د ن بوليميريز" DNA polymerase الذي يساعد في عملية تضاعف وإصلاح حمض ح د ن ، هكسوكاينيز Hexokinase اللزوم لفسفرة الجلوكوز .

٢- البروتينات التركيبية : The Structural Proteins

من أمثلة البروتينات التركيبية " ألفا كيراتين α - keratin " الذي يدخل في تركيب الجلد وريش الطيور والأظافر والحوافر ، وكذلك الإلاستين "Elastin" والكولاجين " Collagen اللذان يدخلان في تكوين الأنسجة الضامة ، وكذلك مادة " سكليروتين Sclerotin التي تدخل في تكوين الهيكل الخارجى للحشرات ، ومادة فيبروين Fibroin التي تدخل في تكوين شرائق الحشرات وغزل العناكب .

٣- البروتينات الواقية : Protective Proteins :

توجد البروتينات الواقية ذات الطبيعة البروتينية في دم الفقاريات وذلك مثل الأجسام المضادة Antibodies التي تحمي الجسم من الجراثيم وإفرازاتها ، والفيرونيوجين Fibrinogen وهو المادة الأولية للفيرين الذي يساعد على تجلط الدم عند النزف ، الثرومبين Thrombin اللازم لحدوث تجلط الدم أيضا .

٤- الهرمونات : The hormones :

معظم الهرمونات بروتينية التركيب ، وتلعب الهرمونات دورا هاما في تنظيم الكثير من العمليات البيولوجية ، ومن أمثلتها " الإنسولين " الذي تفرزه خلايا بيتا في جزر لانجرهان في البنكرياس الذي ينظم أيض السكر " وهرمون النمو " الذي تفرزه الغدة النخامية الذي ينظم نمو العظام .

٥- البروتينات الانقباضية : The Contractile Proteins :

ومن أمثلها " الميوسين " و " الأكتين " Myosin and Actin والتي تكون اللييفات العضلية ، وكذلك بروتين " داينين " الذي يدخل في تركيب الأهداب والأسواط .

٦- بروتينات النقل : Transport Proteins :

وهي البروتينات الموكلة إليها نقل بعض المركبات أو العناصر من مكان إلى آخر في الجسم وفقا لما يتطلبه النظام الفسيولوجي . ومن أمثلة ذلك " الهيموجلوبين " الذي يقوم بنقل الأكسجين في دم الفقاريات ، و "الهيموسيانين " الذي يتولى عملية نقل الأكسجين في بعض اللافقاريات ، الميوجلوبين " الذي يقوم بنقل الأكسجين في الخلايا العضلية .

٧- السموم : The Toxins :

تكون بعض الكائنات الحية مواد سامة ذات طبيعة بروتينية ، ومن أمثلة ذلك سموم الثعابين والسموم البكتيرية وسم " جوسيبين " Gossypin في بنور القطن .

٨- البروتينات المختزنة : The Storage Proteins :

قد يتم أحيانا تخزين المواد البروتينية ، مثال ذلك بروتين " البيومن (بياض) البيض Egg-white Protein " كازين اللبن Casein ، " الفريتين " Ferritin الذي يختزن من خلاله

الحديد في الطحال ، " زين Zein " المخترن في بنور نبات الذرة .

وتجدر الإشارة إلى أن عملية تخليق البروتينات تتحكم فيها الجينات الواقعة على حمض ح د ن DNA والتي يتم نسخها في حمض ح ر ن الرسول Messenger-RNA على صورة شفرات معينة يتراوح عددها بين شفره واحدة إلى ست شفرات لكل حمض أميني . ويتحكم حمض ح ر ن الرسول في حجم البروتين المخلوق ونوعية الأحماض الامينية الداخلة في تكوينه وكذلك في نظام ترتيبها . وقد وجد أن هذه الآلية لتخليق البروتينات آلية عامة ، بمعنى أنها واحدة في كافة المخلوقات فيما عدا الفيروسات التي لها آلية تختلف عن ذلك في بعض التفصيلات ، ويتضح ، مما سبق أن البروتينات هي المرآة التي يظهر فيها الدور الوظيفي للجينات ، ولاتقف أهمية البروتينات عند حدود وظائفها المباشرة ، بل تتعدى ذلك إلى التحكم في تخليق ووظائف المكونات الأخرى للخلايا والأنسجة كالمواد الكربوهيدراتية والمواد الدهنية . ومن ناحية أخرى فقد وجد أن البروتينات المتناظرة في أنواع الحيوانات المتقاربة تكون أكثر شبيها لبعضها في التركيب عن نظائرها في الحيوانات المتباعدة تصنيفيا . ولهذا فإن تتابع الأحماض الأمينية في جزيء البروتين له أهمية في الدراسات التطورية والتصنيفية .

بنيان الجزيئات البروتينية :

تتباين طريقة بناء جزيء البروتين تباينا كبيرا ، ويؤثر نمط هذا البناء على الأداء الوظيفي للجزيء . وقد اوضحت الدراسات المتعددة على طريقة "انعطاف أو حيود أشعة X " X-ray diffraction بصورة أساسية أن هناك اربعة مستويات لبناء جزيء البروتين ، نوجزها فيما يلي :

أ- البناء الأولي : The Primary Structure

يقصد بذلك تتابع الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية التي تكون جزيء البروتين ، ويكون للسلسلة بذلك نهايتان ؛ الأولى تحمل مجموعة NH_2 حرة وتسمى " النهاية الامينية Amino or N-terminal " والثانية تحمل مجموعة $COOH$ - حرة وتسمى " النهاية الكربوكسيلية " Carboxyl or C- terminal "

ب - البناء الثانوي : The Secondary Structure

وهو نمط ثنى وامتداد السلسلة الببتيدية في اتجاه واحد ، ويؤدى هذا الثنى إلى قصرها إلى حد كبير ، ويمكن تمييز طرازين للبناء الثانوي :

١ - طراز الحلزون الفا The α - helix :

وفيه تلتف سلسلة عديد الببتيد في مدار اهليلجى لتكون شكلاً اسطوانياً ، ترتبط فيه كل مجموعة ببتيديّة برابطة هيدروجينية مع مجموعتين أخريين تسبقه إحداهما بثلاث وحدات ، والثانية تليها بثلاث وحدات أخرى . ويبلغ قطر المقطع الاهليلجى ٢٣ر٠ نانوميتر ، ويحتوى على ٣٦ حمض أميني لكل لفة . وتمتد السلاسل الجانبية Radicles إلى الخارج من الشكل الاسطوانى حيث أنها لا تلعب دوراً في ثباته ، بينما يضمن هذا الثبات الروابط الهيدروجينية سالفة الذكر والواقعة بين الهيدروجين المرتبط مع النيتروجين في حامض أميني وبين الأكسجين المرتبط مع الكربون في الحامض الأميني الآخر . ويتميز البروتين المكون من السلاسل من طراز الحلزون الفا (هلكس) بأنه يكون جامداً Rigid وليفياً Fibrous . ويوجد هذا الطراز في الفا كيراتين والميوسين وجزئياً في الهيموجلوبين .

٢ - طراز بيتا B- Structure :

ويكون فيه الجزئ ممتداً تماماً ويربط بين سلاسل الببتيد المتجاورة روابط هيدروجينية وقد يتكون البروتين من سلسلتين متوازيتين parallel عندما يبدأ طرفاً N-terminal في الجهة نفسها وينتهى طرفاً الـ C-terminal معاً في الجهة الأخرى . أما إذا كان الطرف N-terminal لسلسلة واقفاً في نفس جهة الطرف C-terminal للسلسلة الأخرى فإن السلسلتين تكونان متعاكستى التوازي Antiparallel وكثيراً ما يتكون البروتين من عدد السلاسل متعاكسة التوازي تكون معاً صفيحة Sheet ، وقد تتراص عدة طبقات فوق بعضها وترتبط معاً بروابط كارهة للماء Hydrophobic ، ويطلق على التركيب عندئذ ما يسمى " صفائح بيتا " B-sheets ويوجد هذا الطراز في الياف الحرير وبيتا كيراتين الموجود في الريش و الاظافر .

وتجدر الإشارة إلى قلة البروتينات ذات البناء الثانوي (فقط) وهى بروتينات تركيبية عموماً ومن أمثلتها الياف الكولاجين .

ج - البناء الثلاثي : The Tertiary structure :

يقصد بالبناء الثلاثي التركيب ثلاثي الأبعاد لجزء البروتين . والمعروف ان لكثير من البروتينات تركيباً عالى الاندماج Compact حيث تكون أشكالا كرية أو بيضاوية ويطلق البروتينات الكرية Globular Proteins . ويحتوى جزء البروتين على مناطق طافية للجزء بطريقة غير منتظمة وذلك بصفة أساسية ، وهذه تتبادل مع مناطق قصيرة تحوى طراز حلزون الفا (هلكس) وطراز بيتا . وتوفر المناطق الطافية ومناطق تراكيب بيتا المرونة للجزء بينما تمثل المناطق الحاوية على تراكيب الفا هلكس الاجزاء الجامدة منه . ويربط اجزاء الجزء بعضها ببعض روابط معينة (انظر الشكل ٤) :

* الروابط الأيونية Ionic bonds بين المجموعات متضادة الشحنة فى الاحماض الامينية المتقابلة مثل الليسين موجب الشحنة مع حمض الجلوتاميك سالب الشحنة .



* الروابط الهيدروجينية Hydrogen bonds بين مجموعة هيدروكسيل Hydroxyl فى التيروسين مثلا ومجموعة كربوكسيل متأينه فى حمض اسبارتك أو حمض جلوتامك .



* تفاعلات كارمة للماء Hydrophobic interactions بين السلاسل الهيدروكربوتية فى الفينيل آلانين ، ليوسين ، أيزوليوسين ، فالين .

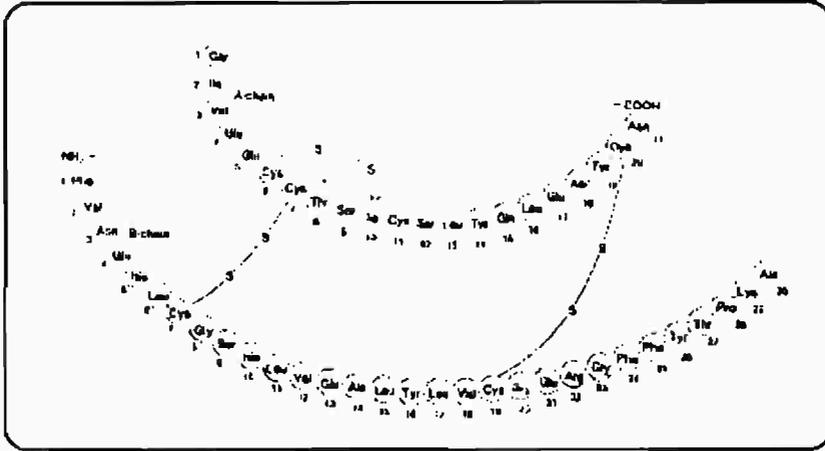
* روابط ثنائية الكبريت (قناطر) (Disulphide bonds (bridges) بين مركبات السستايين Cysteine ، وهى روابط تساهمية Covalent وعلى ذلك فهى تمثل أقوى الروابط الموجودة .

وتكون المناطق الطافية للجزء ومناطق تراكيب الفا هلكس وبيتا بالإضافة إلى الروابط سالفة الذكر ما يطلق عليه البناء الثلاثي لجزء البروتين . ويعزى ثبات الجزء ونشاط البيولوجى إلى وجود هذه الروابط . كما أن هذه الروابط تؤمن أو تؤكد تشابك أحماض أمينية بعيدة عن بعضها اذا نظرنا إليها حسب البناء الأولى لسلسلة عديد الببتيد .

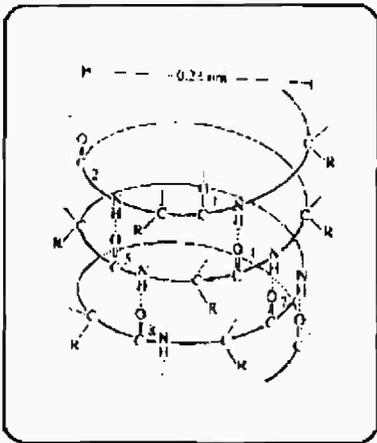
ومن أمثلة البروتينات ذات البناء الثلاثي الأجسام المضادة و البروتينات التنظيمية Regulatory proteins مثل الإنزيمات ، وهي تكون ما يسمى " البروتينات الكرية " Globular proteins ويمكن إفقاد تماسك Denaturation البناء الثلاثي لجزء البروتين بطرق معينة ، ومثال ذلك تجارب Anfinsen Christian على إنزيم " ريبونوكلييز " RNAase. والبناء الأولي لهذا الإنزيم يوضح أنه يتكون من ١٢٤ حمضا أمينيا منها ثمانية من الحمض الأميني سستائين Cysteine يتفاعل كل اثنين منهما لتكوين اربع روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bridges ، ويتضح من ذلك أن البناء الأولي يحدد الشكل ثلاثي الأبعاد لجزء البروتين (انظر الشكل ٥) ، وعند معالجة الإنزيم باليوريا وبيتا " ميركابتو ايثانول " B- mercaptoethanol فإن البناء الثلاثي للجزء يختفى وينتج لدينا شريط ذو بناء عشوائي Random coil نتيجة تكسر الروابط ثنائية الكبريتيد سالفة الذكر، ويصاحب ذلك فقدان الجزء لنشاطه البيولوجي أى فقدان قدرته الانزيمية (انظر الشكل ٦) ويؤدي التطرف في درجة الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة العالية عادة إلى فقد تماسك الكثير من البروتينات . كما يمكن إعادة التماسك Renaturation في بعض الحالات .

د - البناء الرباعي : Quaternary Structure

يتكون الكثير من البروتينات من أكثر من سلسلة من عديد الببتيد ، وهي تكون بذلك بناءً ارباعيا ، ولهذا البناء درجة كبيرة جدا من التنوع في البروتينات المختلفة . ومن هذا التنوع " البلمرة Polymerization عندما يشترك في البلمرة سلسلتان من عديد الببتيد ينتج لدينا " دايمر Dimer " وكثيرا ما تشترك ثلاث سلاسل أو أربع أو خمس أو ست أو أكثر مكونة البوليمر Polymer فعندما تنثنى سلسلة عديد الببتيد فإن ذلك يتم بجعل الجوانب الكارهة للماء Hydrophobic , nonpolar بعيدة عن السطح (داخلية) ، وعادة ما يتم ذلك باستثناء قدر صغير من الجزء تظل جوانبه الكارهة للماء معرضة للخارج ، مكونة بقعة تسمى " بقعة كارهة للماء " Hydrophobic patch ، ويتم الاتحاد عند هذه البقعة في كل سلسلة فيتكون بذلك Dimer اذا تم الاتحاد بين سلسلتين فقط (شكل ٧) . ويلاحظ أن الهيموجلوبين مثلا ذو تركيب رباعي من طراز " تتراميريك " Tetrameric حيث أنه يتكون من تحت وحدتي الفا two alpha Subunits ، وتحت وحدتي بيتا two beta Subunits وترتبط كل واحدة من تحت الوحدات الاربع بمجموعة الهيم haem (انظر شكل ٨) ، وتحتوي كل سلسلة على حوالي ١٤٠ حمضا أمينيا .

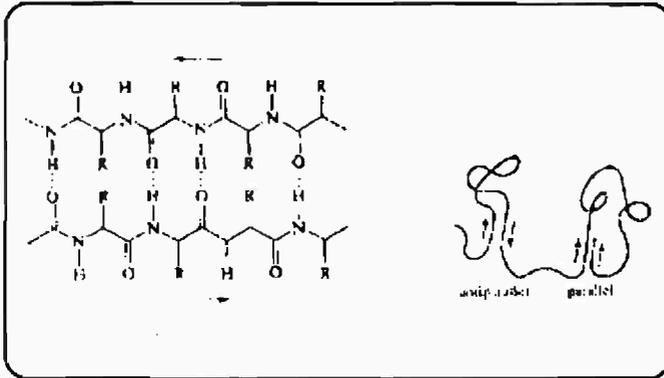


شكل (1) : الانسولين البشري .



شكل (٢) : الطراز التركيبي ألفا ملكس :

لاحظ أن المجموعة الببتيدية رقم ٤ تتصل بكل من المجموعة رقم ١ والمجموعة رقم ٧ .



شكل (٣) : الطراز التركيبي بيتا

(١) اتصال سلسلتين

ممتدتين ومتوازتين عكسياً

بروابط هيدروجينية .

(ب) جزئ واحد يلاحظ أن

بعض أجزائه تكون متوازية

وبعضها الآخر غير

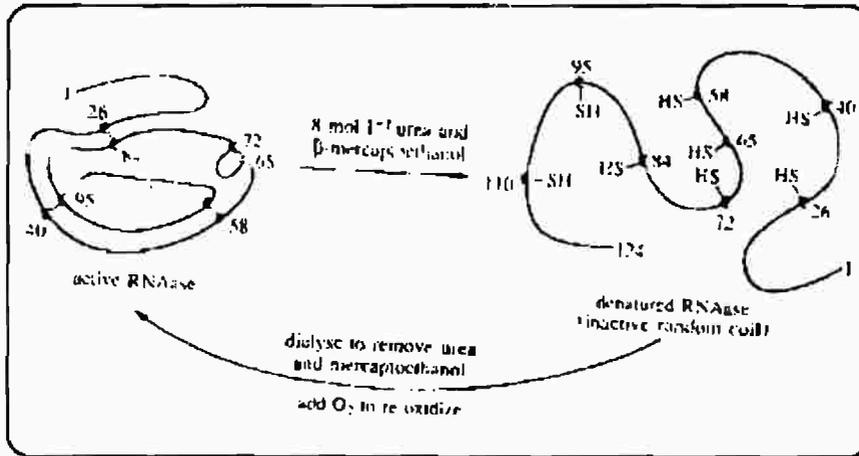
متوازية. لاحظ أن الأسهم

تشير الى اتجاه C-

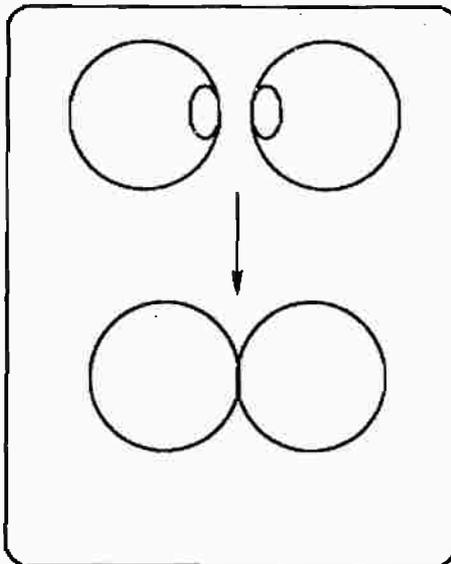
terminal.

(١)

(ب)

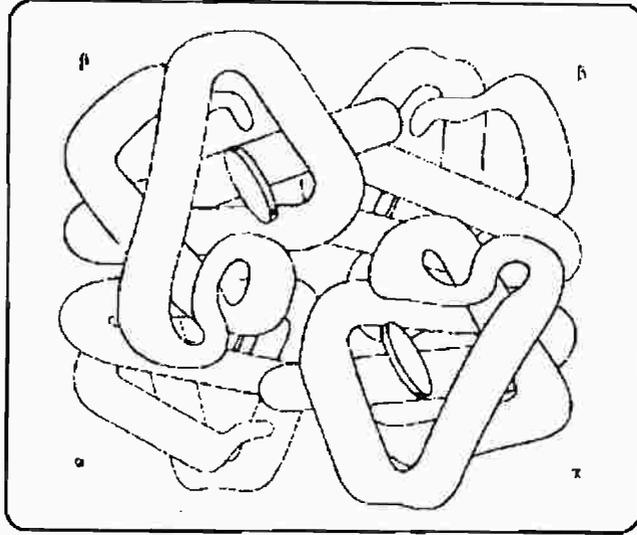


شكل (٦) : فقد تماسك إنزيم ريبونوكليز RNA-ase ثم إعادة تماسكه .



شكل (٧) :

رسم مبسط يمثل تكوين الدايمر وذلك باتحاد البقعتين الكارهتين للماء في سلسلتين متثنيتين من عديد الببتيد



شكل (٨) : التركيب الرباعي
للهموجلوبين يتكون من وحدتين
الفا ، ووحدتين بيتا ، الاقراص
بالرسم توضح مجموعات الهيم .

تصنيف البروتينات : Classification of Proteins

يمكن تصنيف البروتينات على اسس متعددة ولا يوجد تصنيف واحد يرسم خطوطا
فاصلة تماما بين المجموعات المختلفة ، والتصنيف التالي هو أكثر المتفق عليه بين المشتغلين
بعلم كيمياء الأنسجة :

أولا : البروتينات البسيطة : Simple proteins

وهي تلك التي تعطى عند تحليلها أحماضا أمينية أو مشتقاتها فقط . وهذه يمكن
تمييزها الى مجموعتين :

١- البروتينات الليفية : Fibrous proteins

وفيها تترتب سلاسل عديد الببتيد في الفا هلكس أو طراز بيتا " على هيئة صفائح
وهي تشمل " الكولاجين Collagen ، " و الريتيكولين Reticulin " و " الكيراتين " Keratin ،
" والميوسين Myosin ، و "الإلاستين " ، Elastin ، " الفيبرونوجين " Fibrinogen و "الفيبرين"
Fibrin . وهذه كلها مواد تركيبية جامدة Rigid Structural materials لا تنوب في الماء
أو المحاليل الملحية المختلفة ، فيما عدا الميوسين والفيبرونوجين فهما ينوبان في المحاليل
المائية.

٢ - البروتينات الكرية : Gloubular poreins

وهي ذات بناء ثلاثى أو رباعى مكونة أشكالا كروية أو بيضاوية .

وهي تشمل "البروتامينات" Protamines و"الاليومينات" Albumins و"الجلوبيولينات" Globulins و"الجلوبيينات" Globins و"الهستونات" Histones . وهذه كلها تنوب فى المحاليل المائية وتمر بسهولة من الأغشية الحيوانية ، ومما يذكر أن كثيرا من البروتينات الكرية التى كان يعتقد أنها بسيطة ثبت أنها تحتوى على مواد كربوهيدراتية فى تركيبها ، ومن ثم رؤى اعتبارها من البروتينات المرتبطة .

وقد وجد أنه من الممكن تحويل بعض البروتينات الكرية إلى ليفية تحت ظروف معينة ، فالإنسولين مثلا - وهو من البروتينات الكرية - يمكن تحويله إلى الطراز الليفى اذا عرض إلى درجات حرارة معينة وأس هيدروجينى محدد . ويتغير هذه الظروف المحيطة يمكن إعادته إلى حالته الأولى .

ثانيا : البروتينات المرتبطة : Conjugated Proteins

وقد يطلق عليها البروتينات المركبة ، وهي تحتوى على جزيء أو أكثر من مكونات اخرى

تسمى المجموعة المرتبطة Prosthetic group

ويوضح (جدول ٣) أمثلة لبعض من البروتينات المرتبطة

وفيما يلي نبذة عن بعض طرز البروتينات :

<i>Class</i>	<i>Prosthetic group components</i>
Nucleoprotein systems Ribosomes Tobacco mosaic Virus	RNA RNA
Lipoproteins Plasma β_1 - lipoproteins	Phospholipid , cholesterol , neutral lipid
Glycoproteins γ - Globulin Plasma orosomucoid	Hexosamine , galactose , mannose , sialic acid Galactose , mannose , N- acetylgalactosamine N- acetylneuraminic acid
Phosphoproteins Casein (milk)	Phosphate esterified to serine residues
Hemoproteins Hemoglobin Cytochrome c Catalase	Iron protoporphyrin Iron protoporphyrin Iron protoporphyrin
Flavoproteins Succinate dehydrogenase D - Amino acid oxidase	Flavin adenine dinucleotide Flavin adenine dinucleotide
Metalloproteins Ferritin Cytochrome oxidase Alcohol dehydrogenase Xanthine oxidase	Fe (OH) ₃ Fe and Cu Zn Mo and Fe

جدول (٢) : نماذج للبروتينات المرتبطة ومجموعاتها المميزة .

الكولاجين : Collagen

الكولاجين بروتين ليفي وهو أوفر البروتينات في جسم الانسان ، حيث يكون حوالي ٣٠٪ من الوزن الجاف له كما أنه أوفر البروتينات في المملكة الحيوانية بصورة عامة . ويتميز الكولاجين بأنه يكون مادة جيلاتينية في الماء المغلي . ويتكون الكولاجين من أحماض امينية ، أكثرها شيوعا هو الجليسين والبرولين والهيدروكسي برولين والهيدروكسي ليسين ، ولا يوجد الاخيران إلا في الكولاجين ، وهما يتكونان من اضافة مجموعة الهيدروكسيل (OH) إلي كل من البرولين والليسين في سلسلة عديد الببتيل بعد تخليقها في الشبكة الإندوبلازمية للخلايا المنتجة للكولاجين . ويعرف الان عدة انواع من الكولاجين يرمز لها بالارقام الرومانية I, II, III, ... وهكذا.

وقد لقي الكولاجين اهتماما كثيرا من الدراسات التي استخدمت فيها طرق التحليل الكيميائي و"حيود اشعة اكس" X - ray diffraction والمجهر الالكتروني ودراسات الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringence وكيمياء الانسجة . وقد كان أول من قام بدراسة الكولاجين ، اولئك المهتمون بالابحاث المتعلقة باستخدام جلود الحيوانات في الصناعة.

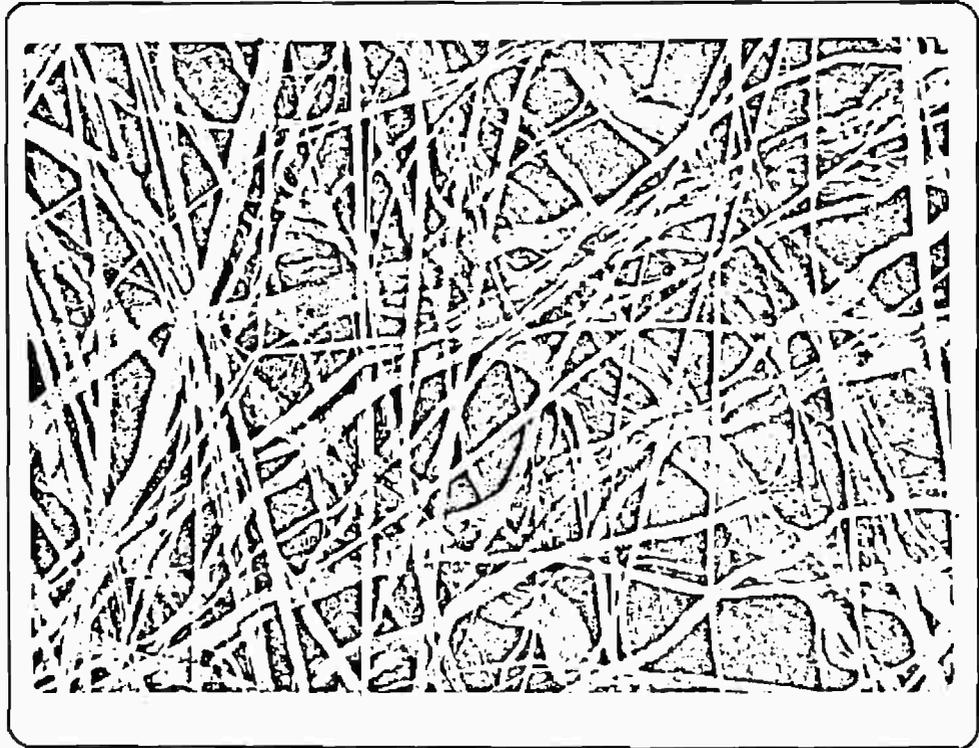
ويمكن مشاهدة الكولاجين في تحضير مفرد لغشاء المساريقا ، حيث يرى الكولاجين على هيئة ألياف متماوجة مختلفة السمك (انظر الشكل ٩) والألياف الفرادي عديمة اللون ولكنها عند تجمعها تبنى بيضاء اللون . والألياف الكولاجين حامضية الصبغة فهي تصبغ باللون الاحمر في طريقة "فان جيسون" Van Gieson التي يستخدم فيها "الفوكسين الحامض وحامض البكريك" كما تصبغ باللون القرنفلي Pink بواسطة "الإيوسين" ، وباللون الأزرق باستخدام "صبغ مالوري ثلاثي الكروم" ، وباللون الأخضر مع "صبغ ماسون ثلاثي الكروم" وباللون الأحمر مع صبغ "سيروس" Sirius

وألياف الكولاجين عالية المرونة Flexible ، ولكنها غير مطاطة inelastic ، وهي تتميز بتحملها الفائق للشد بدرجة تفوق مادة الصلب ، فقد قدر أن السننيمتر المربع الواحد يستطيع تحمل الضغط الناشء من ثقل عدة مئات من الكيلوجرامات .

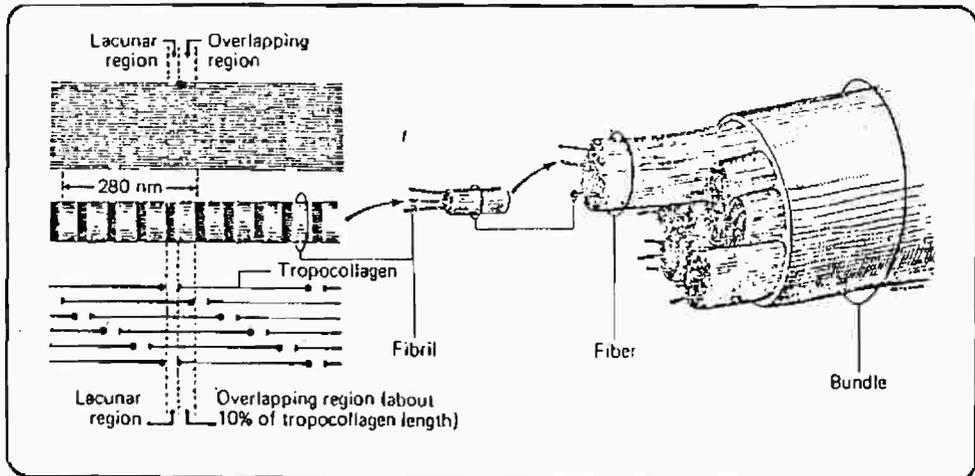
وكثيرا ما تساهم ألياف الكولاجين في تكوين محافظ أو أغطية لبعض أعضاء الجسم مثل الكلى وغدد جار الكلى والعقد اللمفاوية والخصيات وغيرها . وتتكون الأوتار العضلية أساسا من حزم من ألياف الكولاجين ، وفي هذه الحالات تتكون كل حزمة من ألياف Fibers. وهذه بدورها تتكون من ليفيات Fibrils يبلغ متوسط أقطارها في الثدييات حوالي ٧٥ نانوميتر (انظر شكل ١٠) . وعند فحص هذه الليفيات بالمجهر الإلكتروني أو بواسطة ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي ترى مخططة عرضيا علي مسافات ٦٤ نانوميتر . (انظر شكل ١١) ، وتتكون الليفيات من وحدات بنائية طولها ٢٨٠ نانوميتر ويطلق عليها اسم "تروبوكولاجين" Tropocollagen وهي تترتب بطريقة خاصة يعزى إليها ظهور التخطيط العرضي في الليفيات . وقد وجد أن جزيء "التروبوكولاجين" يتكون من ثلاث سلاسل من عديد الببتيد ، يطلق علي اثنين منها اسم الفا (١) Alpha1 والثالثة اسم الفا (٢) Alpha2 وتتوالى الأحماض الامينية في سلسلة الفا وفقا للترتيب الآتي : (Gly - x - Pro) ، حيث يمثل (Gly) الجليسين ، (Pro) يمثل البرولين أو الهيدروكسي برولين ، ويمثل (X) أي حمض اميني بما في ذلك البرولين . وتلتف السلاسل الثلاث حول بعضها حلزونيا في شكل ضفيره ، كما ترتبط السلاسل الثلاث بعضها لبعض بواسطة روابط هيدروجينية واتحادات كارهه للماء Hydrophobic interactions وفيما عدا نوع الكولاجين I ، II ، فإن السلاسل الثلاث تربطها أيضا روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bonds ويبلغ امتداد اللفة الكاملة في الحلزون ٨,٦ نانوميتر (انظر شكل ١٢) .

وقد اوضحت الدراسات الحديثة أن الكولاجين يمثل مجموعة من مركبات بروتينية تختلف فيما بينها في عدد من الاعتبارات ، منها : الخلايا التي تقوم بتخليقها ، أماكن تواجدها في الجسم ودرجة تعضيها ، وغير ذلك من العوامل المختلفة (انظر شكل ٤).

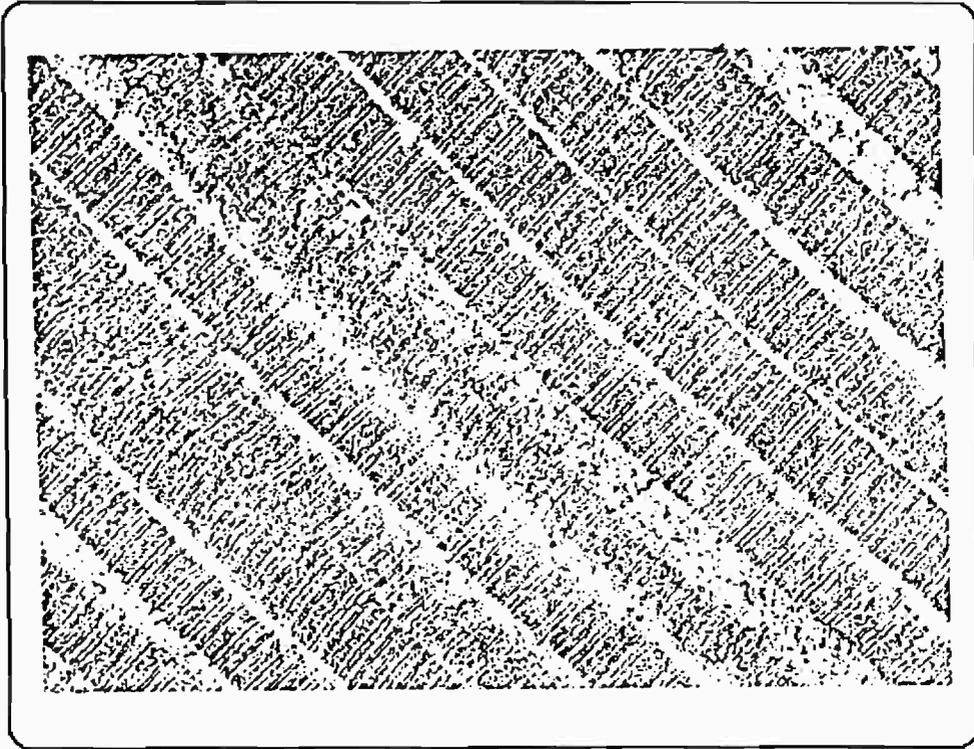
وقد أظهرت الدراسات التي أجريت علي الكولاجين باستخدام ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي " Polarizing Microscope أنه ايجابي ثنائية الانكسار الضوئي Positive birefringence .



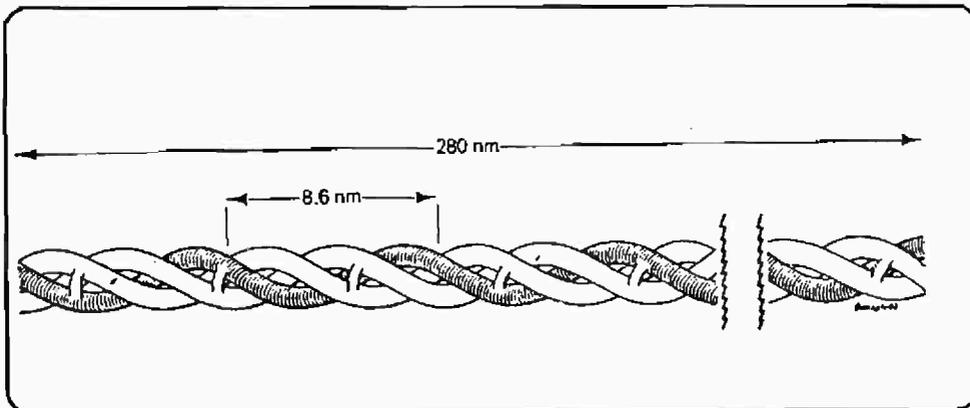
شكل (٩)



شكل (١٠)



شكل (١١)



شكل (١٢)

الطرز	اماكن تواجده بالجسم	الخلايا التي تقوم بتخليقه	درجة التعضي
I	الأمه - العظام - الأوتار - الذنتين الصفاق - صلبة العين - محافظة اعضاء الجسم - الغضروف الليفي .	فيبروبلاست Fibroblasts اوستيوبلاست Osteoblasts أودنتوبلاست Odontoblasts كوندروبلات Chondroblasts	يكون الياف كولاجين وهذه تتجمع لتكون حزماً .
II	الغضروف الزجاجي - الغضروف المرن	كوندروبلات	من ليفيات
III	العضلات الملساء - الدعامة الداخلية للعصب - الشرايين - الرحم - الكبد - الطحال - الكلى - الرئات .	العضلات الملساء فيبروبلاست الخلايا الشبكية خلايا شفان الخلايا الكبدية	
IV	الأغشية القاعدية للخلايا الطلانية	الخلايا الطلانية	جزئيات تروبوكولاجين
V	الأغشية القاعدية للمشيمة	غير معروفة	جزئيات تروبوكولاجين

جدول (٤) : يوضح الطرز المختلفة للكولاجين وخصائصه .

وجدير بالذكر ان عملية تخليق الكولاجين تحدث في خطوات معقدة تحتاج إلي كثير من الإنزيمات والعوامل المساعدة ، ويطلق علي الجزئيات الحلزونية ثلاثية السلاسل اسم "بروكولاجين Procollagen" وهي الصورة التي يتم عليها الافراز الي خارج الخلايا .

وفي الحيزات بين الخلوية تتحول هذه الجزئيات إلي كولاجين بعد استقطاع القطع الطرفية الحاوية علي النهايات الكربوكسيلية والأمينية N, and C terminal segments .
ومن المعروف أن الخلل الذي يحدث في الكولاجين أو عمليات تخليقه يسبب كثيرا من الأمراض المزمنة التي يصعب علاجها (Kivirikko and Risteli, 1976 Minor, 1980) .

الرتكـيولين : Reticulin

الرتكـيولين بروتين ليفي ، تتميز اليافه برقتها ، حيث تتراوح أقطارها بين ٢/٨ - ٢ ميكرون ، وهي عادة تكون شبكة كثيفة داخل بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والكلى والطحال والعقد الليفية ونخاع العظم فتدعم بذلك بناعها الخلوى ومن ثم تعرف الاليف باسم " الاليف الشبكية " .

ومن الجدير بالذكر أن هذه أاليف لا ترى في التحضيرات الروتينية المصبوغة بالهيماتوكسيلين والايوسين ، ولكنها تشاهد بوضوح في التحضيرات المعاملة بأملاح الفضة ، ولهذا تسمى أيضا :أاليف محبة للفضة Argyrophilic Fibres ويعتقد البعض أن الألياف الشبكية هي الياف كولاجين غير تامة التكوين .

وقد وجد أن الألياف الشبكية تتكون أساسا من مادة كولاجين III ، وذلك علي عكس ألياف الكولاجين التي تتكون من مادة كولاجين I .

وتتكون الألياف الشبكية من لبيفات منتظمة عشوائيا (قطرها حوالي ٤٥ نانوميتر) ترتبط مع بعضها البعض بوصلات bridges من مواد جليكوبروتينية Glycoproteins ، ومواد بروتيوجليكانية Proteoglycans وتحتوى الاليف الشبكية علي قدر يتراوح بين ٦ - ١٢٪ من السكريات السداسيه مقارنة بقدر ٨٪ فقط في الياف الكولاجين .

ومن الجدير بالذكر أن الاليف الشبكية تعطى تفاعلا موجبا في تفاعل "كاشف شف"

ب أ س PAS ، كما أنها لا تكون جيلاتينا بالغليان . وقد وجد أن الرتيكولين يحتوى على نسبة من الحمض الدهنى (هيدرستيك) Myristic acid .

وقد كان بعض العلماء ، ومنهم العالم الإنجليزي بيرس A.G.E.Pearse يظنون ان الرتيكولين ليس له خاصية ثنائية الانكسار الضوئي birefringence في الضوء المستقطب ، إلا ان الدراسات القديمة التي قام بها Mollendroff ، والعالم Brewer أوضحت انه ، مثل الكولاجين ، ايجابى ثنائية الانكسار الضوئي ، ولكنه يختلف عنه في خواص بصرية أخرى في الضوء المستقطب . ويتفق العلماء حالياً على صحة هذه الدراسات .

الألاستين : The Elastin

الإيلاستين بروتين ليفي يطلق على اليافه اسم : الألياف المرنة Elastic fibres و هي تتميز بأنها أقل سمكا من الياف الكولاجين ، كما تتفرع وتتحد مع بعضها خلال مسارها ، ويمكنها أن تتمدد تحت تأثير ميكانيكى إلى اكثر من طولها الأصلي بمقدار مرة ونصف المرة ، ثم ترجع إلى حالتها الأولى بعد زوال المؤثر . وتميز الألياف أيضاً بلونها الأصفر ومن ثم يطلق عليها اسم "الألياف الصفراء" Yellow fibres . وهي تتواجد في جدر الشرايين وجدر الحويصلات الهوائية والنسجة الضامة .

ولا يتأثر الإيلاستين بالغليان او الأحماض والقلويات المخففة ، كما أنه لا يهضم بالتربسين ، ولكنه يهضم ببطء بواسطة البيسين عند أس هيدروجينى (٢) ويهضم بسهولة بواسطة إنزيم إلاستيز " Elastase البنكرياسى .

ويحتوى إلابلاستين على كميات اكبر من الأحماض الأمينية "فالين " Valine "الآنين " Alanine مما هو في الكولاجين ، كما يحتوى على الجليسين و"البرولين " . وبالإضافة إلى ذلك يحتوى الإيلاستين على أحماض امينية لا تتوجد إلا فيه ، وهي "الدموسين " Desmosine ، "أيزودموسين " Isodesmosine

وقد وجد أنه في الجلد والواتار يتم تخليق الإيلاستين عن طريق الخلايا الليفية "الفيبروبلاست" Fibroblasts ، وفي جدر الشرايين بواسطة الخلايا العضلية الملساء ،

smooth muscle cells

ويبدى الإيلاستين خاصية ثنائية الانكسار الضوئي بصورة ضعيفة . (Romhanyi
(1964 ولكنها تزيد كثيرا عندما يعامل بالبرمجات ، ثم بالبايسلفيت ثم صينغ باستخدام
"التلويدين الأزرق" (Fischer, 1979) .

وتعترى الالياف الصفراء تغيرات واضحة مع تقدم العمر حيث تتشقق طوليا وتنكسر ثم
تتفتت في النهاية إلي حبيبات ، ويصاحب ذلك تغيرات كيميائية أهمها زيادة في بعض
الأحماض الأمينية مثل حمض الجلوتامك وحمض الأسبرتك ، كما تزيد الدهون وأملاح
الكالسيوم .

ويصبنغ الإيلاستين بطريقة " جومورى " المستخدم فيها الأدهيدفوكسين ، وقد اقترحت
طرق متعددة أخرى ، ولازالت آلية صبغة الإيلاستين بالاصباغ المختلفة محل خلاف بين
الباحثين .

الكيراتين : Keratin

الكيراتين بروتين ليفي ، يتواجد بصفة أساسية في خلايا البشرة في الزواحف والطيور
والثدييات ، وكذلك في الزوائد الجلدية مثل الشعر والريش ، والكيراتين خواص تجعله يوفر
كبيرا من الحماية الميكانيكية والكيميائية للانسجة الواقعة أسفله .

الكيراتين له خاصية ثنائية الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringent ،
وهو يقاوم الهضم بالبيسين والتريسين ولا ينوب في الماء والأحماض والقواعد المخففة . ويتميز
بأنه غنى بالكبريت ، ويتكون من نسبة عالية من السستين Cystine ، بالإضافة إلي الأحماض
الأمينية القاعدية : أرجنين - ليسين - هستدين ، وأيضا الحمضية مثل : حمض الجلوتامك
وحمض الاسبرتك ، وعلى ذلك فان للكيتين قابلية قوية لكلا الاصباغ القاعدية والحمضية .

ويتكون الكيراتين من خيوط كيراتينية (قطرها حوالى ٨٠ انجستروم ، وطولها حوالى
٣٠ ميكرون) ، وينتظم البناء التركيبى لهذه الخيوط على شكل سلاسل عديد الببتيد من طراز
"الفاهلكس" α - helix .

وعند دراسة مراحل تكوين الكيراتين في بشرة الجلد يتضح أن "الطبقة القرنية" Stratum corneum تتكون من خلايا تحتوي علي وفرة من الكيراتين . ويبدو الكيراتين - وهو الغنى بالروابط ثنائية الكبريت - مكونا من خيوط مجمعة في حزم سمكها ١٠ نانوميتر يحيط بها وسط مكون من مادة كثيفة عديمة الشكل يطلق عليها اسم " المادة بين الخيطية " Interfilamentous matrix . ويلاحظ في هذه الخلايا غياب كثير من العضيات والتراكيب السيتوبلازمية المعروفة تحت تأثير تكون الأجسام " الابتلاعية أو البلعمية الذاتية " Autophagosomes الغنية بإنزيمات التحليل الليزوسومية Lysosomal hydrolytic enzymes .

والواقع أن بداية تخليق الكيراتين في البشرة تحدث في الخلايا العميقة منه وتستمر وتزداد هذه العملية كلما اقتربنا من سطح الجلد ، حيث تزيد كمية الكيراتين إلي اقصى حد لها في الخلايا القرنية . وتشمل عملية تكوين الكيراتين تأكسد الروابط الهيدروكبريتية (SH Sulfhydryl في الحمض الأميني " سستايسن Cysteine إلي روابط ثنائية الكبريتيد (SS disulphide) متكونا بذلك السستين Cysteine . ويلاحظ في خلايا الطبقة " المحببة " Stratum granulosum في البشرة تواجد حبيبات قاعدية غير محاطة بأغشية وتحتوي علي بروتين غني بالحمض الأميني هستدين " ، والواقع أن هذه الحبيبات هي المادة التي تتكون منها المادة بين الخيطية للكيراتين سالفة الذكر . ويطلق على هذه الحبيبات اسم " الحبيبات الكيراتوزجاجية " Keratohyaline granules ، والواقع ان التركيب الكيميائي لهذه الحبيبات لا يزال غير معروف علي وجه الدقة .

والمعروف أن الشعر يتكون أساسا من الكيراتين . وقد وجد العالم بونتنج Bonting عام ١٩٥٠ ان السستين يتناقص في البشرة خلال فترة التحول من الصبي الي البلوغ . وقد عزا ذلك إلي انتقال السستين من البشرة إلي الشعر النامي خلال هذه الفترة .

وقد وجد الباحثان " صن وجرين " Sun and Green عام ١٩٧٨ ان الكيراتين يختلف تركيبه في المراحل المختلفة من تميز الجلد ، كما وجد الباحث "لي" Lee ومساعدوه عام ١٩٧٩ ان الكيراتين يختلف تركيبه ايضا في الأنسجة المختلفة لنفس الحيوان . وكان "كمب" "

Kemp قد أعلن عام ١٩٧٥ انه في الطيور تختلف كيراتين الريش عن كيراتين البشرة .
وقد استطاع فوكس وجرين Fuchs and Green عام ١٩٧٩ أن يفصلا جزءاً معيناً
من حمض ح ر ن الرسول ؛ m - RNA أمكن بواسطته تخليق الكيراتين في الأنوية الزجاجية
. in vitro

ويمكن تمييز طرازين من الكيراتين : هما كيراتين الفا Keratin - α وكيراتين بيتا β -
Keratin . ويوجد كيراتين الفا في القرون والاطافر ، وهذا يكون أكثر صلابة وقابل للكسر
ويحتوى علي نسبة عالية (حتى ٢٢٪) من الحمض الأميني سستين . ويتواجد كيراتين ألفا
ايضا في الجلد والشعر والصوف في صورة أكثر ليونة وقابلة للثنى حيث يحتوى علي ١٠ -
١٤٪ سستين . أما كيراتين بيتا فهو يكون غزل العنكبوت وديدان القز وفي الحراشيف والمخالب
ومناقير الزواحف والطيور وهولا يحتوى علي سستين او سستايين ولكنه غنى بالاحماض
الامينية ذات السلاسل الجانبية القصيرة خاصة الجليسين والالانين والسيرين . ويتميز كيراتين
الفا بقدرته علي التمدد بالتسخين ، ومثال ذلك استرسال الشعر عند تعريضه لبخار الماء ، اما
كيراتين بيتا فانه لا يتم فرده تحت هذه الظروف .

الهستونات : Histones

الهستونات بروتينات بسيطة كروية Globular ، تحتوى علي كميات كبيرة من
الاحماض الامينية القاعدية خاصة الأرجين والليسين ، والهستيدين . وتتواجد الهستونات
بصفة اساسية في انوية الخلايا متحدة مع حمض ح د ن لتكون الكروماتين والكروموسومات
في الايوكاريوتات Eukaryotes أي حقيقيات الأنوية .

ويتواجد الهستونات في أنوية الايوكاريوتات علي صور أربع يرمز اليها بالحروف، H_2A
 H_2B ، H_3 ، H_4 يمكن فصلها باستخدام الفصل الكهربائي علي جيلاتين بولى اكريلاميد
Polyacrylamide gels يحتوى علي كبريتات بودسيل الصوديوم Sodium dodecyl
sulphate ولا توجد الهستونات في البروكاريوتات Prokaryotes

وتنوب الهستونات في الماء الأحماض والقلويات المخففه ولكنها لا تنوب في محاليل
الامونيا المخففة .

البروتامينات : Protamines

البروتامينات قاعدية بسيطة وكروية Globular وقد تم اكتشافها لأول مرة في الحيوانات المنوية الناضجة في الأسماك . وتشبه البروتامينات مجموعة الهستونات في كونها تنوب في الماء وفي الأحماض المخففة .

البروتينات في الخلايا الحيوانية :

جدير بالذكر أن طبيعة المواد البروتينية تتباين في خلايا الأعضاء والأنسجة المختلفة ، ويعتمد هذا إلى حد كبير على وظائف هذه الخلايا ، فالبروتينات في الخلايا الكاسية Goblet cells المفرزة للمخاط Mucus تختلف عنها في خلايا بيتا في جزر لانجرهانز التي تفرز الإنسولين ، وكذلك عن تلك في الخلايا العصبية التي تفرز العصبية Neurotransmitters، أو في الخلايا الهضمية Peptic cells التي تفرز إنزيم البيسين .

فمن المعروف مثلا أن الخلايا المنوية والحيوانات المنوية في الثدييات تحتوي على كميات عالية من الهستونات الغنى بالارجنين .. وهكذا .

ومن المفترض ان الجينات المتوافرة في كل خلايا جسم الفرد واحدة ، ولكن ما يكون منها نشطا في خلايا معينة هو مميز لهذه الخلايا ، وهذا يعني أنه ليست كل الجينات نشطة في أي طراز من طرز خلايا الجسم . ويستتبع ذلك أن البناء البروتيني (وما يترتب عليه) لكل طراز من الخلايا يختلف عنه في الطرز الأخرى .

وبصفة عامة يتأثر المحتوى البروتيني للخلايا في حالات التعرض لبعض المؤثرات الطبيعية والكيميائية ونقص التغذية . كما أن طبيعة المواد البروتينية تتغير في الطراز الخلوي الواحد أثناء عملية التكوين .

الأميلويدات The Amyloids

هناك اتفاق بصفة عامة على أن الأميلويدات تتركب من جليكوبروتينات وميوكوبروتينات ومواد كربوهيدراتية . وتكثر الأميلويدات في بعض أعضاء الجسم مثل القلب دون ظواهر

مرضية ، ويطلق علي الحالة عندئذ "الأميلويد الأولى Primary Amyloid " أما الأميلويد الثانوي Secondary Amyloid فينتج مع بعض الأمراض المزمنة حيث تترسب الأميلويدات بصورة غير طبيعية في بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والطحال والكلى وغدد الكظر وجدر الأوعية الدموية بها وينتج بذلك ما يعرف باسم (تفسخ أميلويدي Amyloid degeneration) وتعتبر زيادة الأميلويدات مؤشرا لاضطرابات في التحول الغذائي للمواد البروتينية يلعب فيها الجهاز المناعي بصفة عامة وخلايا البلازما بصفة خاصة دورا أساسيا وترجع زيادة الأميلويدات إلي خلل في الآلية التي تتحكم في ضبط تخليقها . وقد وجد أن مصدر معظم الأميلويدات المترسبة في هذه الأعضاء هو الدم . وأن طبيعة بروتينات مصل الدم تتغير في هذه الحالة . وتلقى الأميلويدات أهمية كبيرة لدى المشتغلين بعلم الأمراض لأهميتها في كثير من الحالات المرضية مثل الروماتويد . وقد أمكن تجريبيا زيادة الأميلويدات في بعض الحيوانات باستخدام عدد من المواد مثل الكازين Casein ومن المعروف أن فيرشو Virchow هو أول من أعطى (في عام ١٨٥١) لفظ Amyloid لهذه المواد عندما لاحظ أن تفاعلها مع اليود يشبه تفاعل النشا معه ، إلا أنه اتضح بعد ذلك أن تركيب الأميلويدات بعيدا عن طبيعة تركيب النشا .

الاسس الهستوكيميائية لبعض الطرق

المستخدمة للكشف عن المواد البروتينية

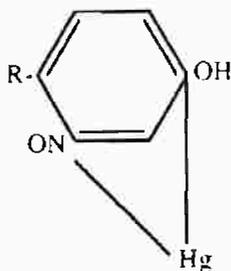
فيما يلي الاسس الهستوكيميائية لبعض الطرق المستعملة للكشف عن المواد البروتينية.

١ - تفاعل ميلون : Millon's Reaction :

يعتمد هذا التفاعل علي "كشاف ميلون" الذي يتكون من نترات الزنيقوز في حامض النيتريك . وقد اقترح هذا التفاعل ميلون في عام ١٨٤٩ للكشف عن البروتينات المحتوية علي "مجموعة فينولية" Phenolic group (وهي أساسا الداخل فيها التيروسين المحتوي علي هيدوكسي فينول) ، وقد طورت هذه الطريقة علي يد بنسلي وجرش Bensley and Gersh عام ١٩٣٣ وسيرا Serra عام ١٩٤٦ وببكر Baker عام ١٩٥٦ .

ويتم التفاعل في هذه الطريقة على مرحلتين : ففي المرحلة الأولى ينتج "نيتروفينول" Nitrophenol باحلال مجموعة NO محل الهيدروجين الموجود في الموقع أورثو بالنسبة لهيدروكسيل الفينول .

وفي المرحلة الثانية يدخل الزئبق في حلقة جديدة تحتوى علي نيتروجين مجموعة النيتروز ويتكون بذلك مركبا أحمر اللون .



٢ - طريقة الزئبق برومفينول الأزرق :

The Mercury - Bromphenol Blue Method (HgBpB)

يحضر محلول الصبغ من كلوريد الزئبقوز وصبغ البرومفينول الأزرق ، حيث تصبغ البروتينات باللون الأزرق الداكن .

وقد ابتدع هذه الطريقة "درم" Durrum عام ١٩٥٠ ، ثم طورها مازيا وبروير والفيرت Mazia , Brewer , Alfert في عام ١٩٥٢ ويونهاج Bonhag عام ١٩٥٦ . وقد استخدمها هاريس ومازيا عام ١٩٥٩ مع عينات فحصت بالمجهر الإلكتروني .

وقد أعلن "مازيا" وزملاؤه أن درجة كثافة الصبغ في النسيج تتناسب طرديا مع كمية البروتينات - علي كافة صورها - المتواجدة فيه .

وقد لوحظ في بعض الحالات أن الصباغة تعطى لونا يميل إلي الحمرة . وقد اختلف الباحثون في تفسير ذلك ، فقد أعلن رامالنجام ورافندوراناث Ramalingam and Ravindranath (عام ١٩٧٢) أن ذلك يرجع إلي الصبغة مخالفة التلوين

Metachromatic ، بينما من رأي تشابمان Chapman (عام ١٩٧٥) أن ذلك يرجع الي ان الصبغة ثنائية اللون Dichromatic

٣ - طريقة أكرولين شيف : The Acrolein - Schiff Method

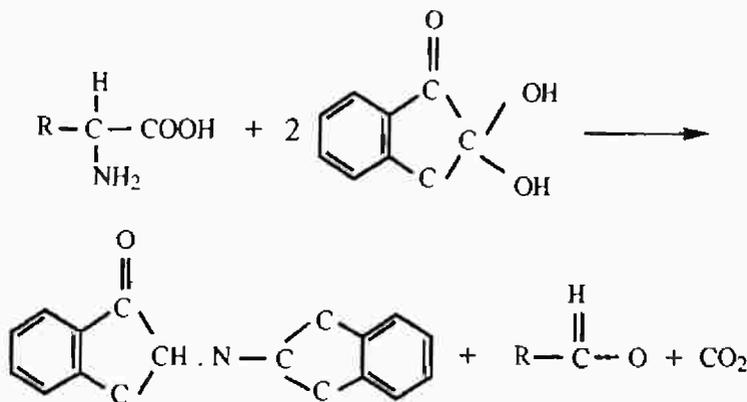
اقترح هذه الطريقة فان بوجن Van Duijn عام ١٩٦١ ، وهي تصبغ البروتينات بصفة عامة ويعتمد التفاعل على معاملة القطاعات بالاكرولين (H₂C = CHCHO) حيث تتفاعل الرابطة المزدوجة في الاكرولين مع NH₂ , NH , SH الاليفاتية ، والاميدوزولات Imidazoles تاركة الالدهيدات الحرة لتتفاعل مع محلول شيف Schiff's reagent لتعطي لونا أرجوانياً محمر .

٤ - طريقة ننهيدرين شيف : Ninhydrin - Schiff Method

اقترح هذه الطريقة " ياسوما واتشيكاوا " Yasuma and Ichikawa (١٩٥٢، ١٩٥٣) للكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات امين نشطة ، حيث تعامل القطاعات بمحلول الننهيدرين الذي يتفاعل مع مجموعات الامين الحرة في الاحماض الامينية ، فينتج مركب نو لون أزرق وثاني اكسيد الكربون بالاضافة الي مركب يحتوي على مجموعة الدهيد . تغسل القطاعات بالماء ثم توضع في محلول شيف الذي يتفاعل مع مركب الالدهيد لينتج لونا أحمر أرجوانياً .

وأحيانا يستخدم الالوكسان Alloxan بدلا من الننهيدرين ، الا أن العالم الانجليزي

بيرس Pearse قرر أن اللون الناتج عند استخدام الننهيدرين كان أكثر وضوحا .

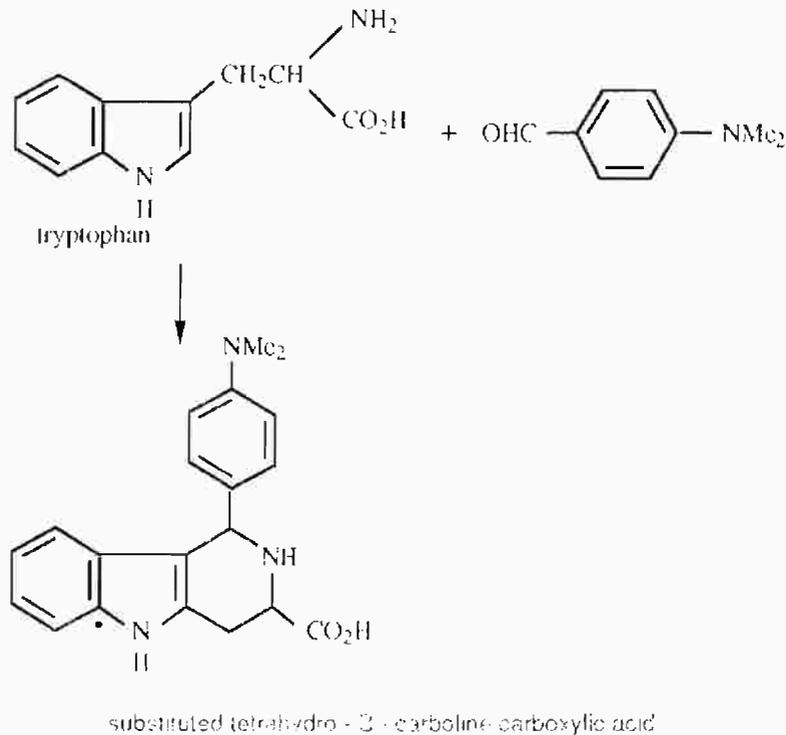


٥ - طريقة د م أ ب - نيتريت للكشف عن التربتوفان :

The D M A B -Nitrite Method for Tryptophane

اقترحت طرق الكشف عن التربتوفان منذ الثلاثينيات من هذا القرن ، وقد تم تطويرها بعد ذلك بطرق مختلفة بواسطة الكثير من الباحثين ، وتعتبر الطريقة التي أوصى بها آدمز Adams في عام ١٩٥٧ هي أفضل الطرق .

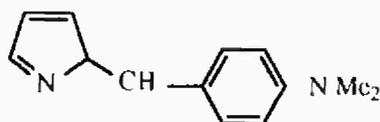
وتعتمد هذه الطريقة على معاملة القطاعات بمحلول من مادة بارا داي ميثيل امينو بنزالدهيد (D M A B) P - dimethylamino - benzaldehyde .
 مركبا يسمى بيتاكاربولين β -Carboline يتم اكسدته باستخدام نيتريت الصوديوم Sodium nitrite لكي يتكون مركب ذو لون أزرق ، يسمى كاربولين الأزرق Carboline blue ، تركيبه الكيميائي غير معروف علي وجه الدقة .



٦ - طريقة تفاعل روزيندول للاندولات (البروتينات المحتوية على التربتوفان) .

The Rosindole Reaction for Tryptophane-Containing Proteins

اقترح هذه الطريقة جلنر عام ١٩٥٧ ، وهي تشبه طريقة آدمز . وفي الطريقة الحالية يذاب الألاهيد (DMAB) P - dimethylamino - benzaldehyde في خليط من حمض الخليك - وحمض فوق الكلوريك مع كمية قليلة من حمض الهيدروكلوريك المركز . كما أن نيتريت الصوديوم تذاب في حمض الخليك وحمض الهيدروكلوريك معا . تعامل القطاعات بالألاهيد ، فيتحد جزيء من التربتوفان مع جزيء من الألاهيد فيتكون مركب phenylindolyl-methane .



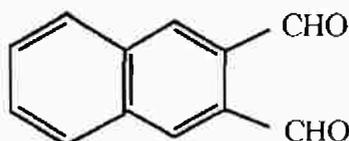
ثم تعامل القطاعات بمحلول نيتريت الصوديوم المؤكسد فيتكون صبغ روزيندول Rosindole الاحمر اللون .

٧ - طريقة ٣ - هيدروكسي - ٢ - نفتالدهيد للكشف عن البروتينات المحتوية على مجموعات امين NH_2 نشطة :

3- Hydroxy - 2- Naphthaldehyde Method for Active NH_2 groups:

تعتمد هذه الطريقة علي معاملة القطاعات بمحلول ٣ - هيدروكسي - ٢- نفتالدهيد المذاب في الاسيتون والمضاف اليه محلول منظم عند أس هيدروجين ٨,٥ ثم تعامل القطاعات بعادة Tetrazotised diorthoanisidine المذابة في محلول منظم أسه الهيدروجيني ٧,٤ . وتوضح هذه الطريقة التراكيب الغنية بمجموعات الامين النشطة باللون الازرق . وبصفة عامة ينصح بعدم استخدام الفورمالين في عملية التثبيت .

وقد اقترح هذه الطريقة وايز - تسو - سلجمان Weiss , Tsou , Seligman في عام ١٩٥٤ ، كما أوصى باستخدامها بيرسي Pearse .



٢ - نفتاليديد ٣ - هيدروكسي

٨- تفاعل حمض فوق الفورميك - شف للكشف عن السستين :

Performic acid - Schiff (PFA) Reaction for Cystine :

في هذه الطريقة تعامل القطاعات بفوق أكسيد الفورميك Performic acid الذي يؤكسد السستين Cystine في النسيج وينتج عن ذلك جواز تحزر ثلاث مجموعات كيميائية (بيرسي ١٩٥١) هي :

Sulphonic $SO_3 H$

Sulphinic $SO_2 H$

Aldehyde CHO

وعند معالجة القطاعات بكاشف شف Schiff's reagent فان مجموعات Sulphinic & Aldehyde تتفاعل معه لتعطي لونا قرنفليا مميزا .

وقد دلت إحدى الدراسات علي إمكانية ان تعطي مجموعات Sulphonic نفس اللون بتفاعلها مع كاشف شف .

٩ - طريقة ساكاجوتشي للكشف عن الارجنين :

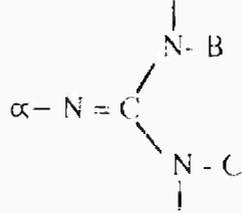
The Sakaguchi Reaction for Arginine

قدم " ساكاجوتشي " هذه الطريقة عام ١٩٢٥ وقد طورها كل من بيكر Baker

(١٩٤٤) وسيرا Serra (١٩٤٤) ، وThomas (١٩٤٦) .

وفقد توصل بيكر الي ان هذه التفاعل يعطي نتيجة ايجابية مع المركبات المحتوية علي

التركيب العام الآتي :



حيث B ، ∞ يمثلأما ذرة هيدروجين أو المجموعة CH₃ . وعلي ذلك فإن هذا التركيب
يمكن أن يمثل بالاحماض الأمينية Arginine , Agmatine , Galegine والتي لا يوجد منها
في الأنسجة البشرية سوى "الارجنين" .

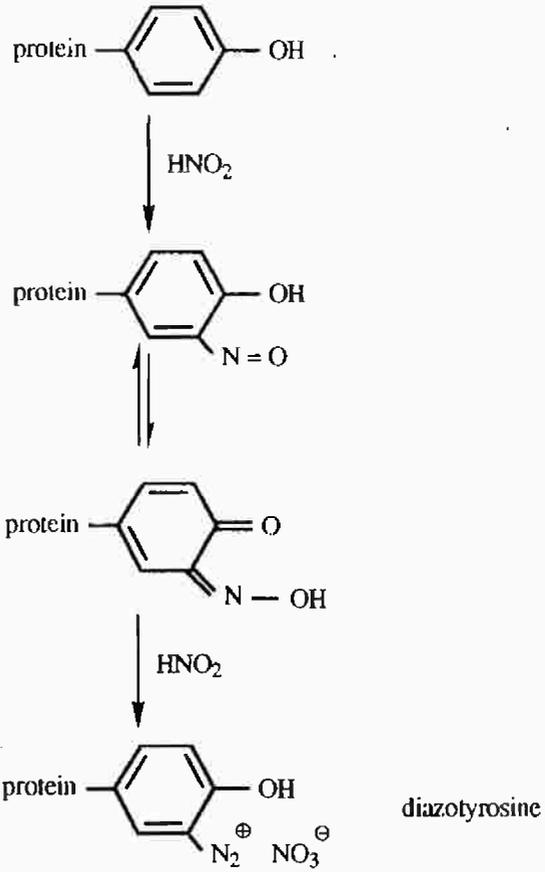
وفي هذا التفاعل ينتج لونا احمر - برتقاليا - من تفاعل الارجنين علي ألفانافثول

فيبيوكالوريت .

١٠ - طريقة النترنة - الازدواجية للكشف عن التيروسين :

Diazotisation - Coupling Method for Tyrosine :

اقترح هذه الطريقة للي Lillie عام ١٩٥٧ ثم طورها جلنر والي Glenner and Lillie
(١٩٥٩) . وهي تعتمد علي نترنة قطاعات شمعية مثبتة في الفورمالين أو خليط ساخن من
الكلوروفورم واثيثانول . وتجرى عملية النترنة باستخدام HNO₂ (الناتج من نيتريت،
النسرينيوم وحمض الخليك في الماء المقطر) وذلك لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة عند درجة حرارة
منخفضة (٢ °م) وبعيداً عن الضوء . يؤدي الي سلسلة من التفاعلات الكيميائية بين
التيروسين ، و HNO₂ تنتهي بتكوين نيترات الديازونيم وفقاً لما يلي :



ثم تعامل القطاعات في وسط قلوي ودرجة حرارة منخفضة بمادة 1 - amino - 8 - naphthol - 5 - sulphonic Acid (S - acid) التي تكون مع نيترات الديازونيم مركب ازواجات نيتروجينية ذو لون أحمر قرنفلي .



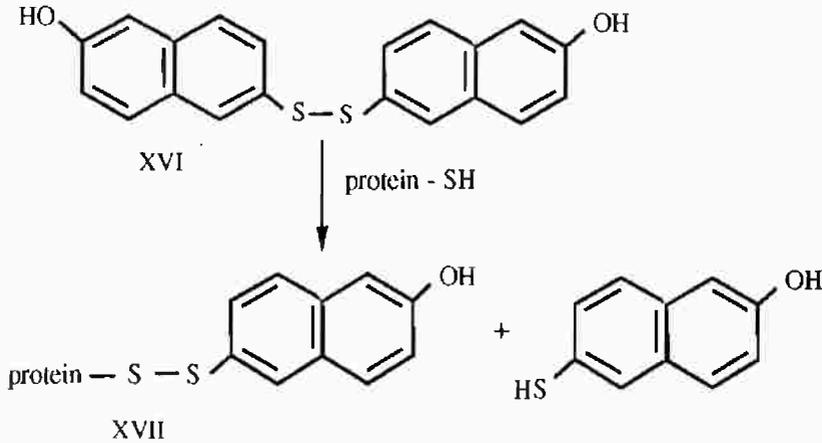
١١- طريقة داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد (د . د . د) للكشف عن مجموعات السلفهيدريل

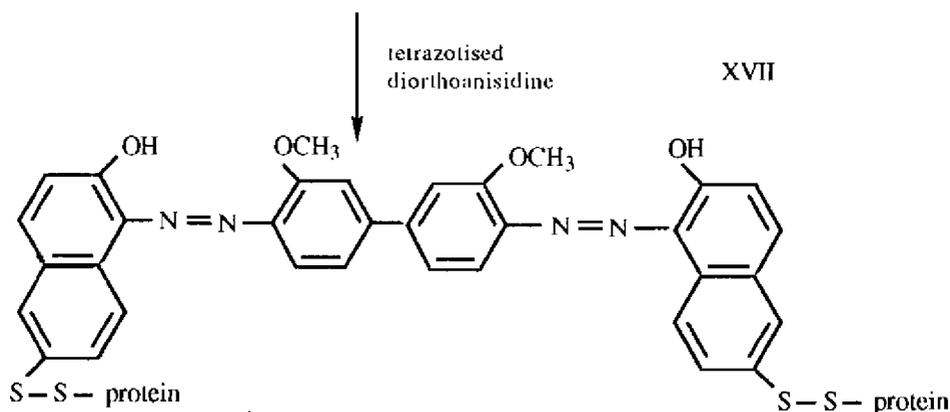
The Dihydroxy - Dinphthly - Disulphide (DDD) Method for SH - Groups:

في هذه الطريقة تستخدم مادة كيميائية خاصة لهذا الغرض هي داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد (2,2 Dihydroxyl-6-6- dinaphthyl. د . د . د). وتقوم الداي سلفيد في هذا المركب باختزال مجموعة السلفهيدريل في البروتين حيث ينشق المركب (د . د . د) الى قسمين أحدهما هو (بروتين نافثيل داي سلفيد) والثاني (نافثيل ميركابتان) كمايلي :

تغسل الشرائح بعد ذلك لإزالة مركب نافثيل ميركابتان وأيضا الزيادة من مركب (د . د . د) وذلك باستخدام الكحول .

لإنتاج اللون تعامل القطاعات بملح ديازونيوم (مثل فاست الأزرق ب Fast Blue B) الذي يتحد مع مركب (بروتين - نافثيل داي سلفيد) المتكون ، لينتج في النهاية أزوداي Azo dye أزرق اللون .





وقد اقترح هذه الطريقة بارنت وسلجمان Barnett and Seligman في عام ١٩٥٢ .
 وإجراء تجارب ضابطة فإن هذا التفاعل يعطى نتيجة سلبية إذا سبقته
 أكسدة لمجموعات السلفهيدريل باستخدام اليود أو باستخدام أيودوأستيت Iodoacetate
 أو (ن - اثيل ماليميد N-ethyl maleimide) .

طرق الكشف الهستوكيميائي عن البروتينات

- الصباغة بطريقة فان جيسون لصباغة ألياف الكولاجين

Van Gieson Method for the Collagen Fibers

الغرض منها :

صباغة ألياف الكولاجين (البيضاء) بطريقة مميزة .

الخطوات :

- ١- ثبت العينة في أي مثبت يحتوى على كلوريد الزئبقيك .
- ٢- نفذ الخطوات من ٢ - ١٥ في طريقة مالورى الثلاثية .
- ٣- اصبغ الأنوية بمحلول صبغ فيجرت أيرن هيماتوكسلين أو محلول صبغ سلسنتين

Weigert's iron hematoxylin or celesein blue بلو

- ٤- اغسل القطاعات جيدا في ماء الصنبور .
- ٥- اغمس القطاعات في الماء المقطر .
- ٦- اصبغ القطاعات في محلول صبغ فان جيسون لمدة ٢-٥ دقائق (١٠٠ سم^٣ من محلول مائي مشبع في حمض البكريك + ٥ - ١٠ سم^٣ من ١٪ فوكسين هامضي في الماء المقطر) .
- ٧- اغمس القطاعات في الماء المقطر .
- ٨- انزع الماء من القطاعات في ٩٥ - ١٠٠٪ كحول .
- ٩- روق القطاعات في الزيلول ثم حمل في كندا بلسم .

النتائج

- الكولاجين يصبغ باللون الأحمر .
- العضلات وكرات الدم الحمراء وستويلازم الخلايا باللون الأصفر .
- أنوية الخلايا بلون بين البني والأسود .

طريقة ثنائية الانكسار الضوئي باستخدام بروسيرياس

الفحص الكولاجين (جنكورا وآخرين ١٩٧٩) .

Picro- Sirius - Birefringence for Collagen after Junqueira et al , 1979

- ١ - جهز قطاعات شمعية بسمك ٥ ميكرون لعينات مثبتة في الفورمالين أو البوان .
- ٢ - مرر القطاعات حتى الماء
- ٣ - اصبغ القطاعات لمدة ستين دقيقة في ١٪ سيرياس الأحمر Sirius red F 3BA في محلول مائي مشبع (أسه الهيدروجيني ٢) .
- ٤ - اغسل مرتين لمدة دقيقة واحدة في ٠.١ و.٠ عيارى من حمض يدكل .

* انظر أيضاً كتاب التقنية المجهرية تأليف البنهاوى والجنزورى ، اصدار دار المعارف عام ١٩٨٩ .

هـ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، ثم روق وغط بالبالم .
 وإذا كانت القطاعات في غضروف ، فإنها تعالج أولاً لمدة ٩٠ دقيقة باستخدام ٠.٥ ٪
 (بابان) Papin (IVF VIII Difco) في ٠.٢ مولار منظم فوسفات عند أس هيدروجيني
 ٤.٧ وتحتوى على ٠.٠٠٥ مولار ثانى كبريتيد الصوديوم ، ٠.٠٠٥ مولار إ د ت أ
 (EDTA) ثم أغسل القطاعات بالماء المقطر .

النتائج :

عند فحص القطاعات فى الضوء المستقطب يبدو الكولاجين ثنائى
 الانكسار Birefringent يصيغ الكولاجين من الطرز I ، II ، III وكذلك حبيبات
 الكيراتوزاجية Keratohyaline granules باللون الأحمر .

- الصباغة بطريقة فايجرت ريزورسين فوكسين لصباغة الألياف المرنة .

Weigert's Resorcin- Fuchsin Method for Elastic Fibers

الغرض منها :

صباغة الألياف المرنة (الصفراء) بطريقة مميزة .

الخطوات :

- ١- ثبت العينة فى ١٠ ٪ فورمالين أو زنكراستيتيك
- ٢- نفذ عملية إزالة الزائد من المثبت من العينة
- ٣- اجر الخطوات من ٢-١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية .
- ٤- ضع القطاعات فى محلول فايجرت أيرن هيماتوكسيلين Weigert's iron
 haematoxylin لمدة ١-٢ دقائق (صباغة أنوية الخلايا)
- ٥- اغسل الشرائح فى الماء .

٦- اصبغ القطاعات فى محلول ريزورسين فوكسين لمدة ١-٣ ساعات . راجع درجة صباغة الألياف المرنة بالميكروسكوب وبراعى أن اقتضيت الحالة زيادة وقت الصباغة حتى تصبغ الألياف المرنة باللون الأسود .

٧- أزل الزائد من الصبغ بغسل الشرائح فى ٩٥٪ كحول .

٨- أغسل الشرائح فى محلول صبغ فان جيسون لمدة دقيقة واحدة وذلك لصباغة ألياف الكولاجين .

٩- ضع الشرائح فى ٩٥٪ كحول (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق) ثم استكمل نزع الماء بوضع الشرائح فى الكحول المطلق (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق) .

١١- روق القطاعات فى الزيول ثم حمل فى كندا بلسم .

النتائج :

- الألياف المرنة (الصفراء) زرقاء مسودة أو سوداء

- الأنوية زرقاء إلى سوداء

- ألياف الكولاجين (البيضاء) حمراء إلى قرنفلية .

- العناصر الأخرى بالنسيج صفراء .

طريقة أزرق ١٥٢ المباشرة لصباغة الألياف المرنة

(هوروبين وجميس ١٩٧٠)

Direct blue 152 method for elastic fibres

(Horobin and James , 1970)

تحضير محلول الصبغ :

أضف ٢٥ سم^٣ من فيروئال الصوديوم أو أى محلول منظم آخر (أسه الهيدروجيني

٩) إلى ٢٥ سم^٣ من محلول الأزرق ١٥٢ فى داي مثيل سلفواكسيد Direct blue 152 in

dimethylsulphoxide .

ويستخدم هذا المحلول في مدى سبعة أيام من تاريخ تحضيره .

الطريقة :

- ١- جهز قطاعات شمعية لعينات مثبتة في ١٠٪ فورمالين متعادل .
- ٢- مرر القطاعات حتى الماء
- ٣- اصبغ القطاعات لمدة ٨ - ١٠ ساعات .
- ٤- اغسل القطاعات في ماء الصنبور .
- ٥- انزع الماء في سلسلة متصاعدة التركيز من الايثانول ثم رقق في الزيلول وغط بصمغ تخليقي مناسب .

الصباغة بطريقة هورتيجا للكشف عن ألياف الريبولين

del Rio-Hortega Method for Reticulin

الغرض منها :

صباغة الياف الريبولين بطريقة مميزة .

الخطوات :

- ١- ثبت العينة في أى مثبت عام ثم أزل الزائد من المثبت إن تطلب الأمر ذلك .
- ٢- نفذ الخطوات من ٣-١٤ في طريقة مالورى الثلاثية .
- ٣- ضع القطاعات في محلول ٠.٢٪ برمنجات البوتاسيوم لمدة ٣ دقائق .
- ٤- اغسل القطاعات في الماء المقطر لمدة دقيقتين .
- ٥- ضع القطاعات في محلول ٥٪ حمض الأوكساليك لمدة ٣ دقائق .
- ٦- اغسل القطاعات جيدا في الماء المقطر (عدة تغيرات لمدة ١٠ دقائق) .

- ٧- ضع القطاعات فى كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal silver carbonate فى درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٥-٣٠ دقيقة - لاتعرض المحلول لضوء شديد - كذلك احذر ملامسة أية أدوات معملية للمحلول .
- ٨- اغمس القطاعات بسرعة فى ماء مقطر .
- ٩- ضع القطاعات فى محلول مائى ٢٠ ٪ فورمالين لمدة ٣ دقائق ثم اغسل فى الماء المقطر لمدة ٣ دقائق .
- ١٠ - ضع القطاعات فى محلول كلوريد الذهب Gold Chloride (٥ ٪ ، ١٢ سم^٢ / ٨ ٪ كلوريد ذهب + ٥٠ سم^٣ ماء مقطر) حتى يتحول لون المحلول من الأصفر إلى الرمادى المائل الى البنفسجى .
- ١١- اغمس فى الماء المقطر لفترة وجيزة .
- ١٢- ضع القطاعات فى ٥ ٪ نيوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulphate (hypo) لمدة ٣ دقائق .
- ١٣- اغسل القطاعات فى الماء الجارى لمدة ٥ دقائق .
- ١٤- (اختيارية) يمكنك صبغة أنوية الخلايا بفيجرت هيماتوكسلين وصبغة ألياف الكولاجين بواسطة بكاربونكو .
- ١٥- انزع الماء من العينة بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول (٧٠ ٪ ، ٨٠ ٪ ، ٩٥ ٪) ثم فى تغييرتين فى الكحول المطلق (٥ دقائق لكل تغييرة) .
- ١٦- روق القطاعات فى تغييرتين من الزيلول (٥ دقائق لكل تغييرة) ثم حمل القطاعات فى كندا بلسم .

النتائج :-

- الرتكيولين أسود
- الكولاجين أحمر
- الأنوية سوداء - زرقاء أو بنى

السيئوبلازم أصفر رمادى
العضلات والألياف المرنة أصفر فاتح

تحضير محلول كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal Silver Carbonate

- أضف ١٠ سم^٣ من محلول مائى مشبع من كربونات اللثيوم الى ١٠ سم^٣ من محلول نيترات الفضة .
- رج ثم اسمح للراسب بالتجمع - رشح - ثم اغسل الراسب بالماء المقطر خمس مرات
- أضف ٢٥ سم^٣ من الماء المقطر ثم أضف محلول الأمونيا قطرة قطرة لتذيب الراسب مع الرج (الأمونيا ٢٨٪) مع استبقاء عدد قليل من الحبيبات مترسبة .
- أضف ٩٥٪ كحول حتى تصل الكمية إلى ١٠٠ سم^٣ ثم رشح .
- سخن مع عدم التغطية عند ٥٠ م لمدة عشرين دقيقة . احتفظ بالناتج فى زجاجة بنية اللون مع العلم بأنه صالح للاستعمال ويستعمل عدة مرات بشرط التسخين عند ٥٠ م والترشيح قبل كل استعمال .

(طريقة ميلون (١٨٤٩) ، للكشف عن البروتينات المحتوية على التيروسين
(محورة عن بيكر - ١٩٥٦)

Milon Reaction (1984) for Tyrosine-containing Proteins)

(Baker Modification 1956)

تحضير الكاشف :

- ١- أضف ١٠ جم كبريتات الزئبق $HgSO_4$ إلى ١٠٠ سم^٣ من ١٠٠٪ حمض كبريتيك وسخن حتى ينوب الملح ، ثم أضف ماء حتى يصل الحجم الكلى إلى ٢٠٠ سم^٣ .
- ٢- لكل ٥٠ سم^٣ من هذا المحلول ، أضف ٥ سم^٣ من ٠,٢٥٪ نيتريت صوديوم .

خطوات العمل :

- ١- ثبت العينات فى الفورمالين وجهز قطاعات شمعية .
- ٢- ضع القطاعات فى كأس زجاجى صغير يحتوى على الكاشف وسخن حتى الغليان برفق لمدة دقيقتين .
- ٣- اترك الكأس ليبرد حتى تصل حرارته إلى درجة حرارة الغرفة .
- ٤- اغسل القطاعات ثلاث مرات بالماء المقطر لمدة دقيقتين فى كل مرة .
- ٥- غط باستخدام الجلسرين جيللى أو انزع الماء بسلسلة من الكحولات ثم روق وغط باستخدام أحد الاصماغ .

النتيجة : تظهر البروتينات المحتوية على التيروسين بلون أحمر إلى قرنفلى أو أحمر يميل للصفرة .

طريقة البرومفينول الأزرق الزئبقى Mercuric Bromphenol Blue Method

(عن بوناغ عام ١٩٥٥ - After Bonhag)

تحضير محلول الصباغة :

يحضر محلول الصبغ بإحدى الطريقتين الآتيتين :

- ١- ١٪ برومفينول الأزرق Bromphenol blue فى الكحول ثم يضاف إليه كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$ حتى درجة التشبع .
- ٢- ٢٪ حمض خليك مائى يحتوى على ١٪ كلوريد زئبقوز ٠.٠٥٪ برومفينول الأزرق

خطوات العمل :

- ١- ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين أو أى مثبت عادى متجنباً المثبتات المحتوية على حمض الأوزميك .

- ٢- الصق القطاعات الشمعية على شرائح غير معاملة بلاصق يحتوى على بياض البيض .
 - ٣- مرر القطاعات فى الزيولول لازالة الشمع ثم فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تصل إلى الماء .
 - ٤- اصبغ القطاعات فى أحد محلولى الصبغ لمدة ساعتين فى درجة حرارة الغرفة .
 - ٥- ضع الشرائح لمدة خمس دقائق فى ٠.٥% حمض خليك .
 - ٦- انقل القطاعات إلى كحول بيوتايلى رباعى Tertiary butyl alcohol وبذلك يتحول الأس الهيدروجينى الحامضى للقطاعات الى نقطة التعادل .
 - ٧- روق القطاعات فى الزيولول وغط بصبغ مناهب .
- النتائج :** تصبغ البروتينات بلون أزرق داكن .

طريقة آكرولين - شف للبروتينات

Acrolein Schiff Method For Proteins

(فان دويجن 1961 - 1961 Van Duijn)

- ١ - ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين .
- ٢ - أزل الشمع من القطاعات ثم مرر فى الكحول المطلق الإيثيلى ثم ٩٥% كحول إيثيلى.
- ٣ - ضع القطاعات لمدة ١٥-٦٠ دقيقة فى محلول طازج من ٥% أكرولين Acrolein فى ٩٥% كحول ائيلي .
- ٤ - مرر القطاعات فى ثلاثة تغييرات من الكحول الايثيلى المطلق ، خمس دقائق لكل تغييرة ثم مرر الى الماء .
- ٥ - ضع القطاعات فى محلول شف لمدة ١٠ - ٢٠ دقيقة .
- ٦ - اغسل القطاعات فى الماء .

٧- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق وغط باستخدام كندا بلسم .

النتيجة : تصبغ البروتينات بلون أرجوانى محمر .

طريقة نهديرين - شف للبروتينات الحاوية على مجموعات أمين نشطة

Ninhydrin - Schiff Method for Protein - bound NH₂

(ياسوما وإتشيكافا ١٩٥٢ Yasuma & Itchikawa)

- ١- ثبت العينات فى محلول زنكر أو كارنوى .
- ٢- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .
- ٣- ضع القطاعات فى ٠.٥٪ تنهيدرين Ninhydrin فى كحول مطلق لمدة ١٦-٢٠ ساعة عند درجة حرارة ٢٧° م .
- ٤- اغسل القطاعات فى ماء جار لمدة ثلاث دقائق .
- ٥- ضع لقطاعات فى محلول شف Schiff's reagent لمدة ٢٥ دقيقة .
- ٦- اغسل بالماء الجارى لمدة عشرة دقائق .
- ٧- اصبغ الانوية - إذا أردت - باستخدام محلول ماير هيم ألم Mayer's Haemalum ثم ميز باستخدام ١٪ كحول حمض .
- ٨- مرر القطاعات بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق الزيول وغط باستخدام كندا بلسم .

النتائج : تصبغ البروتينات الحاوية على مجموعة أمين نشطة باللون الأحمر القرنفلى .

طريقة د م أ ب - نيتريت للكشف عن التربتوفان (عن آدمز - ١٩٥٧)

The D M A B - Nitrite method for Tryptophan (After Adams, 1957)

- ١- ثبت لمدة تتراوح من ٦-٢٤ ساعة فى فورمالين متعادل .
- ٢- حمل القطاعات على شرائح معاملة بالالبيومين .

٢- مرر القطاعات الى الكحول المطلق ثم جففها في الهواء . واغمسها بسرعة في محلول ٥٪ بارادى مثيل أمينو بنز الدهيد P-dimethylamino benzaldehyde في حمض ايدروكلوريك كثافته النوعية ١.١٨ لمدة دقيقة واحدة .

٤- انقل الشرائح الى ٨٪ نيتريت الصوديوم في حمض هيدروكلوريك مركز واتركها لمدة دقيقة واحدة .

٥- اغسل لمدة ٣٠ ثانية في ماء الصنبور .

٦- اغمس القطاعات في ٨٪ كحول محمض .

٧- مرر القطاعات في سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول لنزع الماء ثم روق وغط القطاعات .

النتائج : تظهر البروتينات المحتوية على التربتوفان بلون أزرق ويبين التفاعل قويا في بعض خلايا المعدة والأمعاء وخلايا الجيوب البنكرياسية والعضلات .

تفاعل " روزيندول لاندولات " (عن جلنر ١٩٥٧)

The Rosindol Reaction for Indoles (Clenner 1957)

١ - ثبت العينات في محلول ١٠٪ خلات الكالسيوم في الفورمالين لمدة ٢ - ٦ ساعات .

٢ - ازل الشمع من القطاعات ثم ضعها في كحول مطلق .

٣ - جفف الشرائح في الهواء لمدة ٣٠ ثانية .

٤ - ضع القطاعات لمدة ثلاث دقائق في درجة ٢٥° م في المحلول الآتي :

٦٠ سم^٢ Perchloric Acid حمض فوق الكلور

٣٤ سم^٢ Acetic Acid حمض خليك

١ سم^٢ Hydrochloric Acid حمض هيدروكلوريك مركز

بارادى مثيل أمينو بنزالدهيد ١ جم

٥ - ضع القطاعات لمدة دقيقة واحدة في محلول يحضر قبل الاستعمال مباشرة يحتوى على :

حمض خليك Acetic Acid ٣٥ سم^٣

حمض ايدروكلوريك Hydrochloric Acid ٥ سم^٣

نيتريت الصوديوم Sodium nitrite ٥, ٠٪ جم

٦- اغسل القطاعات ثلاث مرات في حمض الخليك ثم في محلول حمض خليك وزيلول بنسبة ١:١ ثم في محلول الزيلول .

٧ - غط القطاعات باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الاندولات بلون أزرق داكن .

الكشف عن البروتينات المحتوية على مجموعات الأمين النشطة بطريقة

هيدروكسي نافتالدهيد وايز - تسو وسلجمان - (١٩٥٤) .

Hydroxy naphthaldehyde method for active NH₂ groups (Weiss, Tsou and Seligman 1954)

إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة في السيتوبلازم يوصى بإجراء التثبيت في محلول كارنوي أما إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة في أنوية الخلايا فيوصى باستخدام محلول زنكر مع مراعاة عدم معاملة العينات أو القطاعات بمحاليل الثيوكبريتات أو اليود في هذه الحالة .

١- مرر القطاعات الى الماء عبر سلسلة متناقصة التركيز من الكحول .

٢- ضع القطاعات لمدة ساعة في محلول طازج التحضير ، يحضر بالطريقة الآتية :

٢- هيدروكسي ٢- نفتالدهيد 3hydroxy -2naphthaldehyde ٢٠ ملجم

أسيتون Acetone ٢٠ سم^٣

ثم أضف ٣٠ سم^٣ من منظم ٠,١ محلول جزئي فيرونال- خلات .

(0.1 m-veronal acetate buffer) أسه الهيدروجيني ٨,٥ .

٣- اغسل القطاعات في ثلاث تغييرات من الماء المقطر لمدة خمس دقائق لكل تغييره

٤- ضع القطاعات فى منظم (٠.١) محلول جزئى - خلاص

(0.1 m-veronal acetate buffer) أسة الهيدروجينى ٧.٤

أضف إلى سطح المحلول ٢٥ ملجم ثنائى أورثو أنيسيدىن تترازوتيزيد Tetrazotized

diorthoanisidine (ملح فاست بلو " ب " Fast blue B Salt) هز المحلول .

٥ - بعد خمس دقائق اغسل القطاعات بماء صنبور جارى لمدة خمس دقائق أخرى

٦- مرر القطاعات بسلسة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط فى

كندا بلسم .

النتائج : تصبغ التراكيب الغنية بمجموعات الأمين النشطة باللون الازرق بينما تصبغ

باللون الاحمر القرنفلى التراكيب التى تحتوى على قليل من هذه المجموعات

الكيمائية .

طريقة حمض بيرفورمك - شف للكشف عن البروتينات الغنية فى

مجموعات ثنائى الكبريت - ستين (بيرسى ١٩٥١)

The Performic Acid-Schiff Method (PFA)for SS groups (Pearse, 1951)

تحضير المحاليل :

محلول حمض فوق الفورميك Performic Acid

أضف ٤ سم^٣ من ٣٠٪ ماء أوكسجين ١/٢ سم^٣ من حمض كبريتك مركز الى ٤٠ سم^٣

من ٩٨٪ حمض فورميك . استخدم المحلول فى الفترة الواقعة بين مرور ساعة واحدة ٢٤.

ساعة من تحضير لاحظ ألا تستخدم ماء أوكسيجين فتحت زجاجته منذ مدة أكثر من ٣

أسابيع .

كاشف شف Schiff's Reagent

الطريقة :

١- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .

٢- ضع القطاعات لمدة ١٠-٣٠ دقيقة فى حمض فوق الفورميك .

- ٢- اغسل القطاعات في الماء لمدة ٢-٥ دقائق .
 - ٤- ضع القطاعات في محلول شف لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة .
 - ٥- اغسل في ماء جارى دافىء لمدة ١٠ دقائق .
 - ٦- مرر القطاعات في سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق الزيلول وغط في دى بى اكس . D . P . X
- النتائج :** البروتينات المحتوية على ثنائى الكبريت مثل الكيراتين تأخذ لونا قرنفليا الى الأحمر الأرجوانى .

طريقة ساكاجوتشى (١٩٢٥) للكشف عن "الأرجنين"
(محورة عن بيكر ١٩٤٧)

- ١ - ثبت العينات في زنكر - بوان - سوزا أوفورمال سبلت .
 - ٢ - أزل الشمع من القطاعات ثم مرر القطاعات في كحول مطلق ثم خليط من الكحول المطلق والآثير .
 - ٣ - ضع الشرائح في محلول ٨٪ سيللودين لمدة دقيقتين ثم أترك الشرائح تجف في الهواء
 - ٤ - مرر القطاعات في سلسلة متناقصة التركيز من الكحولات حتى الماء .
 - ٥ - حرك الشريحة في الهواء حتى تجف .
 - ٦ - ضع على القطاعات قطرات من محلول ألفا نافثول هيبوكلوريت α -Naphthol hypochlorite واتركه لمدة ١٥ دقيقة .
 - ٧ - صفى الشريحة وجفف القطاع بورقة ترشيح .
 - ٨ - ضع الشريحة في خليط من أجزاء متساوية من البيريدين والكلوروفورم .
 - ٩ - غط القطاع بخليط من البيريدين والكلوروفورم
- الفتائج :** البروتينات الحاوية على الارجنين تأخذ لونا برتقاليا محمرا .

طريقة النترته - الازدواجية للكشف عن التيروسين

Diazotisation - Coupling Method for Tyrosine

(Glenner and lillie, 1959)

١- جهز قطاعات شمعية مثبتة في الفورمالين أو خليط ساخن من الكلورفورم والميثانول .

٢- ازل شمع القطاعات وأوصلها حتى الماء .

٣- إجر عملية النترته في الظلام بوضع القطاعات لمدة ١٨-٢٤ ساعة عند درجة حرارة 30°C في خليط يحتوى على ٦.٩ جم نيتريت الصوديوم ، ٥.٨ سم^٢ حمض خليك، ثم أكمل الى ١٠٠ سم^٢ بالماء المقطر .

٥ - عامل القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة 30°C م بخليط يحتوى على ١ جم هيدروكسيد البوتاسيوم ، ١ جم سلفمات الامونيوم ammonium sulphamate ، ١ جم (8-amino -1-naphthol-5-sulphonic acid) .

٦ - اغسل القطاعات في ثلاث تغييرات من $\frac{1}{10}$ عيارى من حمض الهيدروكلوريك ٠.١ N-HCl ، لمدة خمس دقائق لكل تغييرة .

٧ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، روق بالزيتول ثم غط بالصمغ .

النتيجة : تعطى البروتينات المحتوية على التيروسين لونا أحمر قرنفليا .

طريقة داي هيدروكسي - داي نافتيل - داي سلفيد (د . د . د .)

للكشف عن مجموعات السلفهيدريل (عن بارت وسليمان سنة ١٩٥٢)

The dihydroxyl-dinaphthyl-disulphide (DDD)method for SH groups

(after Barnett and Seligman,1952)

١- ثبت العينات في الفورمالين أو كارنوى أو بوان أو في خليط من حمض ترائى كلورو أستيك والايثانول .

٢- جهز قطاعات شمعية .

٢- ضع القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٥٠ م° في محلول يحتوى على ٢٥ سم^٢ في ٠,١ مولار فيرونال أستيت 0.1 M Veronal acetate أو في ٠,١ مولار منظم ترسي 0.1M Tris buffer (الأس الهيدروجيني ٨.٥)، ٢٥ سم^٢ كحول إثيلي مطلق مذابا فيه مسبقا ٢٥ ملجم من الكاشف (د.د.د.) 2, 2 dihydroxyl- 6, 6 dinaphthyl disuphide (DDD)

٤- برد حتى درجة حرارة الغرفة .

٥- اغسل في ٥٠٪ منظم كحولى إثيلي لمدة ١٥ دقيقة .

٦- اغسل القطاعات في ماء مقطر .

٧- ضع القطاعات لمدة دقيقتين في محلول طازج من ٥٠ ملجم من ملح فاست بلو ب (Tetrazotised diorthoanisidine, Fast blue (تترازوتايزد داى أورثو أنزيد)

(B salt) في ٥٠ سم^٢ من ٠,١ مولار منظم فوسفاتى عند أس هيدروجينى ٧.٤ .

٨ - اغسل في ماء صنبور جارى .

٩- انزع الماء بالكحول - روق في الزيولول ثم غط بالبالسم .

النتيجة : البروتينات المحتوية على مجموعات سلفهيدريل تعطى لونا أزرق .

الكشف عن الاميلويدات باستخدام مثيل فيوليت

(محورة عن بنكروفت عام ١٩٦٣)

Methyl Violet Method for Amyloid (Modified by Bancroft , 1963)

تحضير المحاليل :

١- ١٪ محلول مائى مثيل فيوليت Methyl violet .

٢- ٢٪ محلول مائى مثيل جرين Methyl green ، مع ملاحظة ضرورة التخلص مما يحتويه من ميثيل فيوليت بالفسيل بواسطة الكلوروفورم (راجع صفحة ١٨٧) .

٣- ١٪ حمض خليك .

خطوات العمل :

١ - جهز قطاعات للعينة مثبتة في الفورمالين وذلك باستخدام الميكرونوم الثلجى أو الكرويوستات

٢ - اغسل القطاعات في الماء .

٣ - أصبغ القطاعات باستخدام محلول مثيل فيوليت لمدة ١ - ٢ دقيقة .

٤ - اغسل القطاعات في ماء صنبور لمدة دقيقة واحدة .

٥ - اغمس القطاعات حوالي ١٥ ثانية في محلول ١٪ حمض خليك .

٦ - اغسل القطاعات في ماء صنبور لمدة دقيقة .

٧ - اصبغ القطاعات في محلول المثيل جرين لمدة خمس دقائق .

٨ - اغسل القطاعات في ماء صنبور لمدة ٣٠ ثانية .

٩ - غط باستخدام جلسرين جيللى أو جفف القطاع جيداً بودق ترشيح ثم روق في الزيلول ثم غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الاميلويدات لبلون قرنفلى إلى أحمر ، بينما تصبغ الأنوية بلون أخضر .

الكشف عن ، الاميلويدات ، باستخدام صبغ كونغورد (محورة عن هايمان عام ١٩٤٦) .

(. Conogo Red Method for Amyloid (Modified by Highman 1946))

محلول الصبغ : Staining Solution

كونغورد - Congo Red ٥٠٠ ملجم

كحول مطلق - Absolute alcohol ٥٠ سم^٢

ماء مقطر - Distilled water ٥٠ سم^٢

محلول التمييز : Differentiator .

هيدروكسيد البوتاسيوم - Potassium hydroxide ٢٠٠ ملجم

كحول مطلق - Absolute alcohol ٨٠ سم

- ماء مقطر Distilled water ٢٠ سم^٢

خطوات العمل :

- ١ - مرر القطاعات حتى الماء .
- ٢ - اصبغ في محلول صبغ كونغورد لمدة ثلاث دقائق .
- ٣ - اغسل القطاعات في ماء صنبور .
- ٤ - ميز الصبغ بواسطة محلول التمييز الموضح أعلاه ، مع استخدام الميكروسكوب لضبط التمييز .
- ٥ - اغسل القطاعات في ماء صنبور .
- ٦ - اصبغ الأنوية باستخدام صبغ الهيماتوكسيلين .
- ٧ - اغسل القطاعات في ماء صنبور .
- ٨ - انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول .
- ٩ - روق في الزيلول .
- ١٠ - غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائج :

- الاملويديات برتقالية إلى حمراء
- الأنوية زرقاء
- الإلاستين برتقالية