

# نمایش تشکیل کمپلکس ویتامین- پروتئین با استفاده از فرونشانی فلوروسانس

دانا چتلیر و هارولد وایت

که در حشره کشتهای نوری مورد استفاده قرار می گیرد، کارساز خواهد بود.)

پی پت پاستور و حباب  
میله همزن مغناطیسی  
موتور همزن مغناطیسی  
جداکننده تخم مرغ  
پاکتهای پلاستیکی یک بار مصرف

## آزمایش

تخم مرغها را بشکنید وزردهها را از سفیدهها جدا کنید و سفیدهها را در یک بشر ۸۰۰ mL بریزید. پوستهها وزردهها را دور بریزید و بگذارید تا حضار رنگ سفیده تخم مرغها را در برابر یک زمینه سفید تعیین کنند. ۵۰۰ mL آب مقطر به بشر بیفزایید و چند دقیقه با همزن مغناطیسی هم بزنید تا سفیده تخم مرغ ژلاتینی پراکنده شود و یک تعلیق لخته ای به دست آید. (کدوری موجود در این لحظه بر روی آزمایش اثر نمی گذارد.) مادامی که محلول سفیده تخم مرغ هم می خورد، ۵۰۰ mL آب مقطر در بشر ۸۰۰ mL دیگر بریزید تا به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گیرد. بایک پی پت پاستور حدود ۱ mL محلول ریوفلاوین بدان بیفزایید تا رنگ ریوفلاوین به تنهایی نشان داده شود. سپس اتاق را تاریک کنید و محلول ریوفلاوین را تابش دهید تا فلوروسانس زرد تند آن مشاهده شود. به طریق مشابه، تعلیق سفیده تخم مرغ را که فلوروسانس نخواهد بود، تابش دهید. بایک پی پت پاستور، محلول ریوفلاوین را در حجمهای تقریباً ۱ mL به تعلیق سفیده تخم مرغ بیفزایید تا یک تابش زرد فلوروسانس پایدار بماند (معمولاً حدود ۱۲-۸ mL از محلول لازم است؛ ماکسیمم نشر فلوروسانس در ۵۳۰ nm اتفاق می افتد.)  
خطرات: از نگاه کردن مستقیم به تابش لامپ فرابنفش خودداری کنید. موقعی که لامپ مورد استفاده قرار نمی گیرد باید خاموش شود. دور ریختن مواد: پوسته های تخم مرغ و زرده ها در هر کیسه زباله پلاستیکی می توانند دور ریخته شوند. محلولها باید در دستشویی ریخته شوند.

«سفیده» تخم مرغ به علت داشتن مقدار قابل توجهی ریوفلاوین (ویتامین B<sub>۲</sub>) رنگ زرد شفافی دارد.

ریوفلاوین به تنهایی، زمانی که به وسیله نور فرابنفش نزدیک برانگیخته می شود، یک مولکول شدیداً فلوروسانس است؛ اما، فلوروسانس آن در سفیده تخم مرغ به وسیله پروتئین خاصی بانام اختصاری\* (RfBP) که به آن محکم اتصال می یابد ( $K_D \approx 1 \text{ nM}$ ) فرونشانه می شود. سفیده تخم مرغ محتوی مقدار اضافی RfBP نامرئی است که وجود آن را می توان به وسیله تیترا کردن با ریوفلاوین (معادله ۱) نشان داد. نقطه پایانی آن با پدیدار شدن خاصیت فلوروسانس معلوم می شود.



نمایش این واکنش ساده و ارزان تمام می شود و می تواند برای روشن ساختن مفاهیم متنوعی، از طبیعت تحقیق علمی گرفته تا مباحث پیشرفته در زیست شیمی، شیمی تجزیه و تغذیه مورد استفاده قرار گیرد. چون در نمایش از مواد آشنا و متداول استفاده می شود، لذا می توان آنرا در کلاسهای علمی مقدماتی، و همچنین در سمینارهای دوره کارشناسی ارشد نشان داد.

## مواد لازم

اتاقی که بتوان آنرا تاریک کرد.

سه عدد تخم مرغ

۲۰ mL محلول ریوفلاوین آبی ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) در یک بطری قهوه ای رنگ یا وسیله دیگری که از نور محافظت شود (ریوفلاوین در مقابل نور ناپایدار است). یک لیتر آب مقطر (از آب شیر در صورتی که بر اثر نور فرا بنفش نور فلوروسانس نشر نکند می توان استفاده کرد).

دو بشر ۸۰۰ میلی لیتری

منبع نور فرا بنفش (هر منبع نور UV با طول موج بلند از نوعی

\* RfBP مخفف riboflavin-binding protein

به ریوفلاوین نیستند، تخمهایی می گذارند که ریوفلاوین ناچیزی دارند؛ سفیده این تخم مرغها زرد نیست. چنین در این تخم مرغها در اثر کمبود ریوفلاوین می میرد. برای نجات جنین، قبل از جوجه کشی، ریوفلاوین و یا یکی از اشکال کوآنزیمی آن را به تخم مرغ، تزریق می کنند.

۴) شیمی تجزیه - پروتئین متصل به ریوفلاوین، ویژگی قابل ملاحظه و میل ترکیبی شدیدی نسبت به لیگاند خود نشان می دهد. این خصوصیات، به همراه خاصیت فرونشانی فلئورسانس ریوفلاوین، آن را یک واکنشگر مفید برای سنجش ریوفلاوین، می سازند. برای نمونه، در تعیین محتوی ریوفلاوین ادرار به کار رفته است. در چنین کاربردهایی به خالص کردن پروتئین نیازی نیست؛ سفیده تخم مرغ رقیق شده کافی است. به نظر می رسد که روش فوق می تواند اصلاح شود و برای اندازه گیری محتوی ریوفلاوین قرصهای ویتامین به کار رود.

۵) تفاوت گونه ها - پرندهای بسیاری (برای مثال، اردکها) در سفیده تخم خود پروتئین متصل به ریوفلاوین را دارند اما تقریباً هیچ ریوفلاوینی ندارند. در نتیجه، سفیده تخم آنها زرد نیست. وقتی تخم اردک یا تخم اصلاح یافته در دسترس باشند، آزمایشهای پیچیده تری توصیه می شوند.

۶) ساختار و عمل پروتئینها - پروتئین متصل به ریوفلاوین یک گلیکوفسفو پروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۰۰۰۰ دالتون است و یک مول ریوفلاوین (دالتون = ۳۷۶ MW) را به یک مول پروتئین متصل می سازد. پروتئین فوق به طور فوق العاده پایدار است و نقطه ایزوالکتریک پایینی دارد. این خواص به همراه سادگی سنجش و فراوانی آن در سفیده تخم مرغ (۰.۸٪ کل پروتئین)، آن را یک هدف ایده آل برای خالص سازی، در یک آزمایشگاه دوره کارشناسی می سازد. توالی آمینواسید معلوم است و موقعیت ۹ پیوند دی سولفید تعیین گردیده است. گروههای فسفریل آن به وسیله NMR  $^{31}P$  و بمباران سریع اتمی طیف سنجی جرمی مطالعه شده است.

۷) سایر پروتئینهای سفیده تخم مرغ - در سفیده تخم مرغ پروتئینهای نسبتاً متفاوتی وجود داشته و اکثر آنها فعالیت ضد میکروبی دارند. یکی از اینها «او ترانس فرین»<sup>۱</sup> است که آهن و سایر یونهای فازی را محکم نگاه می دارد. در تیتراژ کردن این پروتئین با یون فرو یا یون کوپریک، به ترتیب کمپلکسهای عنابی روشن و زرد رنگ تشکیل می شوند. نقاط پایانی این تیتراسیونها باید از طریق طیف نورسنجی تعیین شوند.

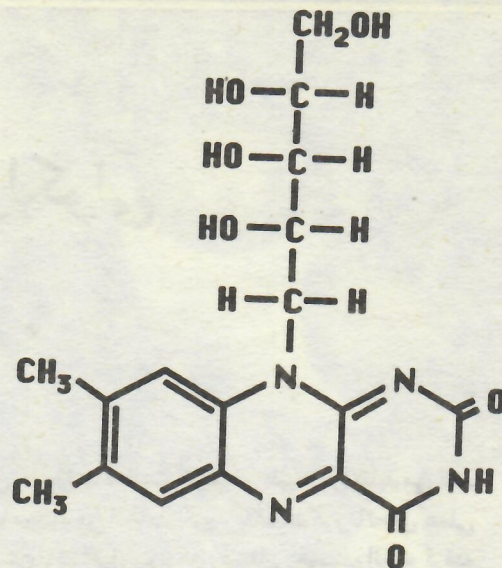
ترجمه فرشته رشتچی

• What Color Is Egg White? A Biochemical Demonstration of the Formation of a Vitamin-Protein Complex Using Fluorescence Quenching

Dana S. Chatellier & Harold B. White

Journal of Chemical Education, September 1988

1. ovotransferrin



ساختار شیمیایی ریوفلاوین

### بحث

نمایش به آسانی اجرا می شود و مواد لازم، ارزان هستند. یکی از جنبه های جذاب این نمایش این است که از چند موضوع بحث می کند. بحث درباره عناوین متعدد متفاوت به سهولت از این نمایش نتیجه می شود.

### مثالها

۱) طبیعت پژوهش علمی - در واقع همه، سفیده تخم مرغ را دیده اند. اما کمتر کسی دقت کرده که به طور قابل توجهی زرد است. یک راه مناسب برای شروع نمایش در هر سطحی این است که از حضار پرسیده شود، «سفیده تخم مرغ به چه رنگ است؟» و جوابها روی یک تخته سیاه جدول بندی شوند. سپس، به منظور نشان دادن طبیعت تجربی علوم، می توان تخم مرغها را شکست و سفیده های آنها را مورد آزمایش قرار داد.

۲) فلئورسانس و پدیده فرونشانی - مولکولهای ریوفلاوین چه به پروتئین RfBP متصل شده باشند چه در محلول آزاد باشند، تفاوتی نمی کنند با این حال فقط در حالت دوم خاصیت فلئورسانس دارد. این پدیده می تواند به بحث درباره اینکه چگونه ممکن است پروتئین، فلئورسانس را فرونشاند و راههایی که حالات برانگیخته می توانند انرژی شان را از آن طریق از دست بدهند، منجر شود. پروتئین متصل به ریوفلاوین، چنانچه pH محلول سفیده تخم مرغ تا ۳.۵ کاهش یابد، تجزیه می شود. این عمل ریوفلاوین را آزاد می سازد که تحت اثر نور فلابنش، فلئورسانس خود را نشان می دهند.

۳) تغذیه و ژنتیک - ریوفلاوین ویتامینی است که مورد نیاز هر موجود زنده عالی است. وظیفه پروتئین متصل به ریوفلاوین این است که به عنوان یک واسطه، ریوفلاوین را در تخم مرغ برای استفاده بعدی به وسیله جنین، ذخیره کند. سوبیه جهش یافته ای از جوجه ها که از لحاظ ژنتیکی قادر به ساختن پروتئین متصل