آزمایشگاه آموزشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

بیوشیمی

چربی. فعالیت آنتی‌اکسیدانی قهوه

روز سوم
۹۸/۴/۳۱

اهداف آزمایش:

۱. آشنایی با روش‌های شناسایی و تشخیص انواع چربی‌ها
۲. کار با میکروپلیت و دستگاه الایزا
۳. آشنایی با روش serial dilution

زمان آزمایش: ۹۰ دقیقه

طراح آزمایش: الهام پرند

این فایل به منظور آموزش عملی دانش‌پژوهان المپیاد زیست‌شناسی ایران گردآوری شده است.

جداسازی چربی‌های مغز

مغز موش در محلول فسفات سالین هموژنایز شده و سپس توسط کلرفرم-متانول گانگلیوزیدها از سایر چربی های مغز جدا شده اند و این چربی ها در اختیار شما قرار داده شده است. از این محلول می توان برای شناخت لیپیدهای مغزی استفاده کرد. هدف اصلی انجام تست TLC است فقط کلسترول به عنوان یکی از گزینه های در دسترس موجود را در کنار مغز بررسی کنید.

روش کار:

۱. بر روی کاغذ با مداد با یک فاصله ۱cm خط بکشید.
۲. توسط سمپلر ۱µl از نمونه و همین مقدار کلسترول بر روی خط قرار دهید.
۳. کاغذ را در بشر حاوی حلال قرار دهید.
۴. پس از بالا آمدن بافر تا نزدیک به انتها کاغذ را بردارید. آخرین محلی که حلال تا آنجا بالا آمده را مشخص کنید.

توسط تکنیکی که برایتان توضیح داده می شود شناسایی لیپیدها را انجام دهید.

تشخیص اسید چرب اشباع از غیراشباع

از بین رفتن رنگ پرمنگنات به علت اکسید شده چربی های غیر اشباع است.

روش کار:

در لوله A که حاوی چند میلی لیتر سدیم کربنات است چند قطره روغن زیتون بریزید و حل کنید محلول شیری به دست می آید قطره قطره محلول پتاسیم پرمنگنات رقیق به آن اضافه کنید مشاهده خواهید کرد رنگ پرمنگنات از بین می رود. پس از افزودن چند قطره بیشتر دیگر رنگ از بین نمی‌رود. از بین رفتن رنگ به معنای حضور چربی های غیر اشباع است.

تست تشخیص کلسترول

اساس این تست بر پایه واکنش اسید سولفوریک در حضور انیدرید استیک و ایجاد رنگ است که به صورت زیر است.

۱. بی‌آب شدن
۲. متراکم شدن
۳. ایزومریزاسیون
۴. تولید رنگ

رنگ قرمز معرف حضور کلسترول است.

روش کار:

۱. شما دو لوله ۱ و ۲ در اختیار دارید. از هر کدام مقدار ۲ml به یک لوله خشک انتقال دهید.
۲. لوله ها را حتما لیبل کنید.
۳. به هر لوله مقدار ۲ml معرف اضافه کنید.

کدام لوله حاوی کلسترول است؟

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره قهوه

اکسیداسیون زیستی رادیکال های آزاد اکسیژن فعالی تولید می کند که می توانند مسبب آسیب های جدی به سلول ها شوند. آنتی اکسیدان ها مولکول هایی هستند که می تواند رادیکال ها را پاکسازی می کنند پس فعالیت اکسیداتیو را مهار می کنند. آنتی اکسیدان ها شامل ترکیبات احیا کننده (reducing agent) مانند ترکیبات تیولی، اسید آسکوربیک و فینولیک هستند. قهوه تهیه شده از دانه های قهوه داغ شده یک منبع بالقوه آنتی اکسیدان هاست.

در این آزمایش, یک سنجش پاکسازی رادیکال آزاد (scavenging assay) با رادیکال آزاد ۲,۲-diphenyl-۱-picrylhydrazyl (DPPH) انجام می شود که در آن DPPH احیا شده و رنگ بنفش خود را از دست می دهد.

مقدار (scavenging capacity) $SC_{۵۰}$ معمولا برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی استفاده می شود. این مقدار معادل غلظتی از نمونه است که ۵۰% رادیکال های DPPH را **پاکسازی** میکند. جذب DPPH در طول موج ۵۱۷nm اندازه گیری می شود. میزان جذب نمونه بلنک blank ناچیز فرض میشود. جذب محلول کنترل (Ac ,without scavenger) و نمونه (As) برای محاسبه درصد پاکسازی برای هر غلظتی ازنمونه مطابق فرمول زیر به دست می آید:

$$SC\% = (Ac - As) \times ۱۰۰ / Ac$$

نموداری بر اساس لگاریتم concentration series نمونه ها و درصد پاکسازی (scavenging percentage) تهیه می شود، که بر اساس آن مقادیر $SC_{۵۰}$ محاسبه خواهد شد.

در این پژوهش، دانه هایی از واریته Vietnamese coffee (*Coffea canephora*) برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بررسی خواهند شد. پودر دانه‌های قهوه (۱ گرم) را در deionized water هشتاد درجه سانتیگراد برای ۳۰ دقیقه حل کردیم، سپس فیلتر شد و آب به میزانی به آن اضافه گردید که حجم نهایی به ۲۰۰ میلی لیتر محلول عصاره برسد.

روند آزمایش و سوالات

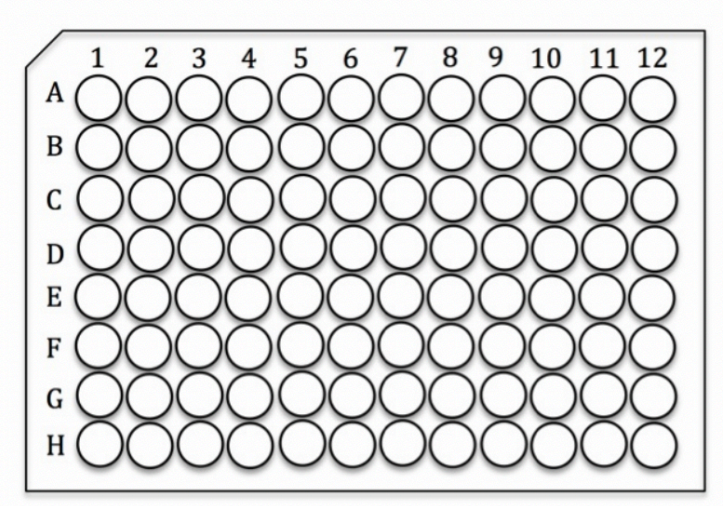

Fig 2.1. 96-well microplate

میکروپلیت ۹۶ چاهکی فوق برای یک serial dilution به کار می رود. همان طور که میدانید محل هر چاهک باحروف A تا H برای ردیف ها و اعداد ۱ تا ۱۲ برای ستون ها مشخص می شود.

۱. با استفاده از سمپلر ۴ محلول آسکوربیک اسید (AA۱ - AA۴ در خانه های A۱ تا A۴ میکروپلیت ۹۶ تایی) و ۴ محلول عصاره قهوه (CC۱ -CC۴ در خانه های A۶ تا A۹ در میکروپلیت ۹۶ تایی) با serial dilution با ضریب رقت ۲، درست می کنیم تا به ترتیب به حداقل رقت های ۰.۰۲۵ ml/mg و mg/ ۰.۶۲۵ ml برسیم.

- حجم هر محلول قبل از فراهم کردن رقت بعدی باید ۲۰۰ میکرولیتر باشد.
- دقت کنید اگر مشکلی در لود کردن هریک از این خانه های (well) گفته شده پیش آمد، از خانه های H۱ -H۴ برای محلول آسکوربیک اسید AA۱ - AA۴ و یا اگر در لود کردن عصاره قهوه مشکلی پیش آمد ازخانه های H۶-H۹ برای محلول های CC۱ -CC۴ استفاده نمایید.

این جدول را در پاسخنامه با مقادیری که برای آماده سازی محلول های اسکوربیک اسید و عصاره قهوه پر کنید.

۲. ۲۰ میکرولیتر از محلول های ردیف A (که اسکوربیک اسید یا/و عصاره قهوه است) را به چاهک های متناظر در ردیف های B و C و D انتقال دهید. (اگر هر کدام از ردیف ها را خراب کردید می توانید ازردیف های E یا F یا G استفاده کنید.)

۳. به هر کدام از چاهک های B۱۱ و C۱۱ و D۱۱ بیست میکرولیتر آب اضافه کنید.

۴. مقدار ۱۸۰ میکرولیتر DPPH را به همه چاهک هایی که در مراحل ۲ و ۳ آماده کرده اید اضافه کنید.

۵. درب میکروپلیت را گذاشته و برای ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید.

۶. پس از پایان این مرحله، دست خود را بالا بگیرید تا مسئول آزمایشگاه به شما کمک کند تا جذب را در الایزا ریدر اندازه گیری کنید.

سوالات

۱. لگاریتم ($\log_{10}$) غلظت اسکوربیک اسید و عصاره قهوه را محاسبه کنید و در جدول وارد کنید. (توجه داشته باشید که اعداد خود را تا دو رقم اعشار رند کنید.)

۲. با استفاده از مقادیر محاسبه شده، نمودار خطی scavenging percentage بر اساس لگاریتم ($\log_{10}$) غلظت آسکوربیک اسید رابکشید.

۳. مقدار SC_{50} را برای اسکوربیک اسید و عصاره قهوه محاسبه کنید.

۴. با استفاده از پروتوکل مشابهی، مقادیر $SC_{۵۰}$ عصاره چند واریته قهوه به صورت زیر محاسبه شد:

Coffee extract	SC_{50}
X	3.8 mg/mL
Y	2.6 mg/mL

فعالیت آنتی اکسیدانی انواع متفاوت دانه های قهوه و همچنین دانه موجود در پژوهش (Z) را مقایسه کرده و مقادیر آن را از قوی ترین به ضعیف ترین مرتب کنید.