فسلجة نبات العملي - المحاضرة التاسعة

استخلاص وفصل الصبغات النباتية بواسطة الكروماتوكرا في الورقي :-

1ـــ اسحق اغم (1gm) من الاجزاء الخضرية لا وراق النبات (السلق او السبانغ) وضع النموذج في هاون خزفي .

2ـــ اضف كمية قليلة جداً من كاربونات الكالسيوم caco3(لمعادلة الحامضيه في الخلايا ولمنع ازالة المغنيسوم من نواة الكلوروفيل)
3- اسحق جيداً مع اضافة 5-6 cm3 من الاسيتون 85%
4ـ باستعمال قطارة دقيقة انقل السائل الى قمع الفصل الذي يحوي على 10cm3 اثير اثيلي .
5ـ اسحق نسيج الورقة مع كمية اخرى من الاسيتون 85% وانقل السائل الى القمع ، اضف بعد ذلك حجمين متساويين من الاسيتون النقي والايثر الاثيلي الى النسيج واسحقه مره ثالثة
6- انقل السائل الى القمع
7ـــ بعد ذلك استعمل الايثر الاثيلي لوحده واسحق النسيج في الهاون الخزفي ثم انقل السائل مره اخرى الى القمع واضف 100 cm3 ماء مقطر الى القمع بهدوء (لمنع تكون مستحلب) ثم حرك القمع دائرياً بدون رج لنقل الاسيتون والمواد المذابة فيه الى طبقة الماء وبعد تكون طبقتين تزال طبقة الاســـيتون . كرر العملية أي عملية الغســـل بالماء ثلاثة مرات لازالة الاسيتون
8- انقل الايثر والصبغات الى قنينة حجمية او اسطوانية قياس واكمل الحجم الى10cm3 اذا كان الحجم اكثر فاترك قسم من الايثر يتبخر
9ـــــ انقل الســائل الى قنينة ذات غطاء واضــف له 2gm(2غم) من كبريتات الصــوديوم اللامائية لامتصــاص الماء المتبقي مع الايثر وبعد اســتقرار المحلول يلاحظ ترســب الملح الى الاسفل
10- حضر ورقة ترشيح واقطعها بشكل مربع او مستطيل وارسم خط بقلم رصاص على بعد 10 cm من احدى الحافات
11- ضع مسطرة تحت الحافه لكي لا تلامس الورقة سطح المنضدة
12ـــــــ باستعمال انبوب زجاجي شعري انقل السائل وارسم خط على الخط المرسوم في الورقة حتى تجف او جففها بواسطة تيار هواء ساخن قليلاً ثم ارسم خط اخر ويجف ايضاً كرر العملية حتى يتكون خط اخضــر غامق مع ملاحظة جفاف الخط في كل مره قبل رسم الخط الاخر
13ـــــــ ضع في قنينة ذات غطاء محكم كمية في رابع كلوريد الكاربون ccl_4 الى ارتفاع نصف الى واحد سم (1/2 - 1)سم وكمية من كبريتات الصوديوم اللامائية ثم اثني الورقة

لتكون بشكل اسطوانه ثبتها بالدبابيس و ادخلها بالقنينة واغلقها باحكام .عند وصول المذيب قبل نهاية الورقة العلوية اخرجها ولاحظ الصبغات التي تكون فيها من الاعلى الى الاسفل.

1- الكاروتين:-اصفر برتقالي(اصفر غامق) برتقالي

2- الزانثوفيل:- اصفر ذات لون بني

3- الكلوروفيل a:-اخضر مزرق

4- الكلورفيل b:-اخضر مصفر(اخضر فاتح)

- يمكن استخلاص الصبغات باستعمال اسيتون 85% واستعمال الايثر الايثلي كمذيب بدلاً من رابع كلوريد الكاربون وكبريتات الصوديوم اللامائية.

استخلاص وفصل الصبغات النباتية بالطرق الكيمياوية:-

طريقة العمل :-

1- خذ 4 غرام (4gm)من الاوراق الجافة المطحونة كاوراق السبانغ واضف اليها 40ml اسيتون تركيز 80% حرك الخليط لمدة دقيقة او دقيقتين ثم رشح المحلول.
2- ضع المستخلص في قمع فصل واضف اليه(50ml)ايثر بترولي ورج الخليط جيداً ثم اضف اليه (70ml)ماء مقطر ورجة جيداً ، اتركه بعد ذلك ليهدأ نلاحظ تكون طبقتين العليا عبارة عن الايثر البترولي يحوي على الاصباغ النباتية ولونه اخضر غامق والسفلى طبقة من الاسيتون والماء .
3- اسكب الطبقة السفلى واحتفظ بالعليا في قمع الفصل.
4- اضف الى القمع (50ml)ماء مقطر ورج الخليط جيداً ثم اتركه ليهدأ تتكون طبقتان مرة ثانية السفلى منها مائية اسكبها اما العلوية فلونها اخضر غامق احتفظ بها وأغسلها بالماء مجدداً مرتين متتاليتين باستعمال (50ml)ماء مقطر في كل مره بهذه الطريقة تحصل على الطبقة العليا ذات لون اخضر غامق.المتكون من الايثر البترولي مذابة به الاصباغ النباتية وخالية من الشوائب.
5- اضف الى المحلول المتبقي في القمع (5ml)كحولاً مثيلياً تركيز 92% رج الخليط جيداً و اتركه يهدأ تحصل مره ثالثة على طبقتين ،الطبقة العليا أيثر بترولي فيه كلوروفيل a و كاروتين والسفلى كحوليه فيها كلوروفيل b وزانثوفيل (انقل كل طبقة الى دورق وتجنب بخار الكحول المثيلي السام).

تحضير صبغة الانثوسيانين(Anthocyanin)

والتحضير البلوري لكلوريد الانثوسيانين.

طريقة العمل:- أ\تحضير الصبغة .

1- خذ بضع شرائح من شونذر وضعها في قدح زجاجي يحوي ماء مقطر سخنة بعد مدة ستشاهد خروج صيفة حمراء اللون هي صبغة الانثوسيانين حجم الدورق (50- 100 ml).

2- خذ اجزاء من محلول الصبغة اعلاه واضف اليه قاعدة لاحظ تغير لون الصبغة من الاحمر الى الاصفر.

3- اضف قليلاً من الحامض الى المحلول في (2) اعلاه تلاحظ رجوع اللون.

4- خذ بضع شرائح من الشونذر وضعها في قدح زجاجي صغير ثم اضف اليها كمية من الكحول الاثيلي وسخن الدورق في حمام مائي وذلك بغية استخلاص الصبغة بشكل اسرع.

ب\ **التحضير البلوري لكلوريد الانثوسيانين.**

1- خذ (6ml)من المحلول المحضر في دورق (4) واضف اليه قليلاً من حامض الهيدروكلوريك المركز بنسبة حوالي نصف حجم المحلول (3ml)ثم اتركه فترة من الزمن ليبرد ثم اضف غبار الزنك مع حامض الهيدروكلوريك (0.1N)فيتحررH_2 الذي يقوم باختزال الاصباغ النباتية.
2- رشح المحلول في الفقرة(1) اعلاه وعرض الراشح للضوء تلاحظ رجوع اللون الاحمر وذلك لان الاوكسجين الجوي يتحد مع الهيدروجين الذي تسبب اختزال لون البلورات ويتكون الماء من اتحادهما.

تقدير الكمي لصبغات الكلوروفيل

استخلاص الكلورفيل

تجربة استخلاص الكلوروفيل chlorophyll

1- ضع(1gm)من الوزن الطري لقطع صغيره من اوراق السبانغ في هاون خزفي (يمكنك من استخدام أي نبات اخر فيه الكيوتكل قليل)
2- ضع (40 ml) من الاسيتون 80% على الاوراق بصوره تدريجية اثناء السحق في هاون خزفي لمدة (3) دقائق للحصول على محلول متجانس (مستخلص اخضر).
3- انقل المستخلص الاخضر الى قمع حاوي على ورقة ترشيح واجري عملية الترشيح واجمع الراشح في بيكرجاف ونظيف.

4- اعد المواد المتبقية على ورقة الترشيح الى الهاون الخزفي واسحقها مع (30ml) اسيتون 80% مرة ثانية ورشحها ثانية بواسطة (قمع الفصل) واضف الراشح المتكون الى الراشح الاول (المستحصل عليه في خطوة رقم 3 اعلاه).
5- استمر في استخلاص صبغة الكلورفيل من النسيج المتبقي فوق ورق الترشيح مستعملاً 20ml من الاسيتون بتركيز 80% الى ان يزول اللون الاخضر من النسيج وفي كل حالة يضاف الراشح المتكون الى الراشح الاول في الدورق .
6- اغسل الهاون وقمع الفصل بواسطة 10ml من الاسيتون لاسترجاع الكلوروفيل الملتصق على الهاون والمدقة والقمع لتقدير كمية الكلوروفيل بدقة.
7- اكمل الحجم النهائي للراشح (المستخلص) الى 100ml وذلك باضافة الاسيتون 80%. تحتاج التجربة الى 200 ml اسيتون 80%.

تفاعل Hill

سنة 1937 وجد العالم الانكليزي Hill انه عند تعرض البلاستيدات الخضراء المعزولة عن النبات الى الضوء فإنها تحرر غاز الاوكسجين من الماء عندما تتوفر أملاح الحديد كعا مل مساعد (مستلما للهيدروجين)كما يمكن اجراء تفاعل Hill باستعمال الصبغة(2,6-DCPIP)(2,6-Dichlorophenol Indo phenol) كعامل مؤكسد.ولاجله يجب عزل البلاسيتدات بالطريقة التالية :-

1- تجربة (1)عزل الكلوروبلاست (البلاستيدات الخضراء).
2- اسحق حوالي20gmمن اوراق السبانغ في 10mlمن محلول Nacl(0,35M) لمدة 30 ثانية .
3- رشح من خلال اربعة طبقات من قماش cheese cloths
4- اجر الطرد المركزي centeri fuge على الراشح لمدة2دقيقة وبقوة (200xg) اترك الراسب واستعمل السائل وضعه في انبوبة اختبار ثانية واجري عملية الطرد المركزي لمدة 7 دقائق بقوى (1000xg) واهمل السائل.
5- خذ الراسب لاحتوائه على البلاستيدات الخضراء وامزجه مع 35mlمن محلول Nacl (0,35M) واجري عملية الطرد المركزي للمرة الثالثة وبقوة (1000xg).
6- خذ الراسب وامزجه باعتناء مع 100mlمن ال phosphate buffer(0.05M) وال PH يعادل 65 ويحتوي ال Bufferعلى Kcl (0,08M) وان هذا المعلق يحتوي على الكلوروبلاست.
7- يحفظ هذا المعلق في مكان يحتوي على جريش الثلج للاحتفاظ به الى التجربة اللاحقة لهذا التفاعل وللمحافظة علية من التبخر.

تفاعلHill تجربة رقم (2):-

1- حضـــر (5) انابيب اختبار (4) انابيب منها اضـــف اليها 9ml من الفوســـفيت بفر phosphate buffer (0.05M,وال ph=6.5) الى كـل انبوبـة 1m من معلق الكلوروبلاسـت يضـاف الى كل انبوبة ايضـاً ، كذلك الانبوبة رقم(5) يضـاف اليها نفس المحتويات اعلاه مع مراعاة غلي معلق الكلوروبلاست.
2- اضف الى جميع الانابيب الاختبارية اثار قليلة من فيتامين C لماذا لانه يقوم باختزال صبغهDCPIP 2,6 حيث ان هذه الصبغة لا تختزل بالظلام.
3- امزج جيداً محتويات الانابيب في الفقرة (2) اعلاه.
4- غط احد الانابيب الاربعة بغطاء من الالمنيوم لمنع وصول الضوء اليها .
5- ضـــع الاربعة انابيب (باســـتثناء المغطاء بالالمنيوم) امام مصـــباح بقوة 100 واط وتخلص من الحرارة بواســطة فصــل الانابيب عن المصــباح بمرشــح مائي (اناء زجاجي ابعاد 30×30×30سم).
6- في بداية العمل اضـــف0.3ml من محلول الصـــبغة اعلاه(1%) الى جميع الانابيب باستثناء المغطاء(تعتبرBlank).
7- امزج ثم اقرأ (O.D)الكثافة الضـــوئية لكل مخلوط في طول موجي 600nm من خلال جهاز المطياف spectro photometer بعد وضـــع المخلوط في (cuvete اسم).
8- ارجع المحاليل الى الانابيب الاختبارية الاصلية وضعها الان معرضه للضوء ثم اقرا ال O.D بطول موجه600nm بعد تعرض احدى الانـابيب لمدة عشـــرة دقـائق والاخرى لمدة (30 دقيقة والاخرى لمدة (50دقيقة)الى الضـــوء مع ملاحظة رج محتويات كل انبوبة قبل قراءة ال O.D لها.