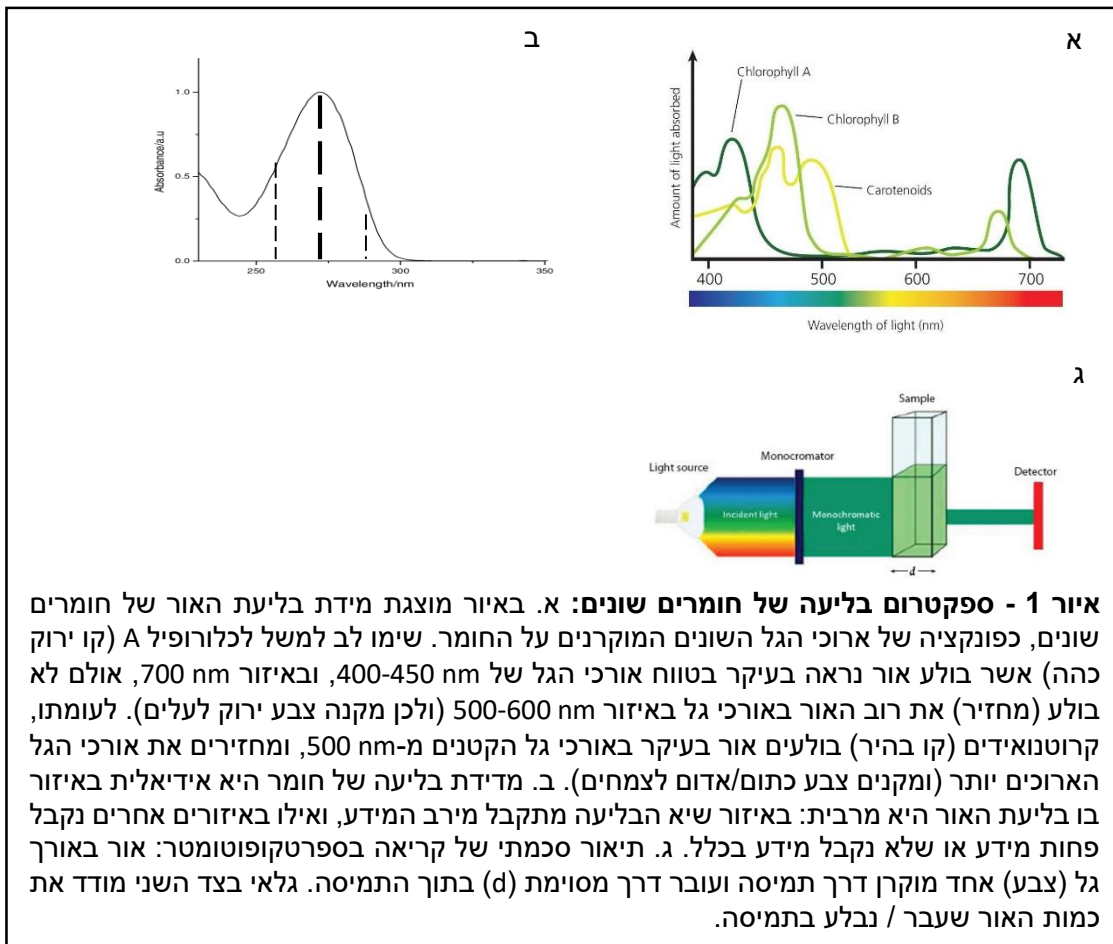


## מדידה בספקטרופוטומטר

ספקטרופוטומטריה (ספקטרום = קשת/טווח ערכים; פוטון = חלקיק אור; מטריה = מדידה) היא שיטה המאפשרת למדוד את כמות האור שנבלע כשהוא עובר דרך חומר מסוים. כאשר קרינה אלקטרומגנטית פוגעת בחומר, בחלק מהמקרים נוצרת אינטראקציה בין הקרינה לחומר, וחלק מהאור ומהאנרגיה נקלט/נבלע" על ידי החומר. האנרגיה העודפת יכולה להיפלט בחזרה בדרכים שונות, כמו הגדלת קצב התנועה של המולקולות ועליית הטמפרטורה של החומר.

אם נקרין על חומר מסוים קרינה באורכי גל שונים (לרוב ספקטרום מסוים), נמצא כי לכל חומר יש 'ספקטרום בליעה' אופייני – מעין 'טביעת אצבע' שמתארת באיזו מידה הוא בולע כל אורך גל של אור, כמתואר באיור 1א'. בנוסף, ניתן לנצל תכונה זו כאשר נדרשת קביעה כמותית לגבי החומר, ואז נקרין על החומר את אורך גל בו הבליעה שלו היא מרבית: באורך גל זה נקבל את מרבית ה'מידע' מהחומר (איור 1ב') וכך נקנה לבדיקה רגישות מרבית ונקטין שגיאות הנובעת כתוצאה מסטיות שונות בעבודת המעבדה. במדידות ספקטרופוטומטר צריך למצוא (או להכיר) את אורך הגל שבו הבליעה של החומר היא מיטבית, ואז להכניס מבחנה עם תמיסה של החומר מול מקור אור. המכשיר משגר קרן אור דרך התמיסה ומודד את כמות האור שעבר / נבלע בעזרת גלאי שנמצא מהעבר השני (איור 1ג').

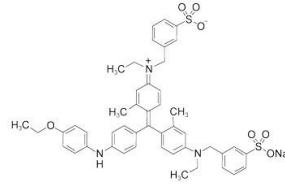


קיים קשר מתמטי ישיר בין ריכוז החומר הבולע והדרך שהאור עובר לבין כמות הבליעה שנמדדת. לפי חוק בר-למבר (Beer-Lambert) הבליעה (A; absorbance) שווה למכפלה של ריכוז החומר (C; concentration), של הדרך שהאורך עובר בתמיסה (l; length), ושל מקדם הבליעה הייחודי של החומר ( $\epsilon$ ; extinction coefficient):  $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ . את ערכי הבליעה מקובל גם לציין בראשי התיבות (O.D (optical density)).

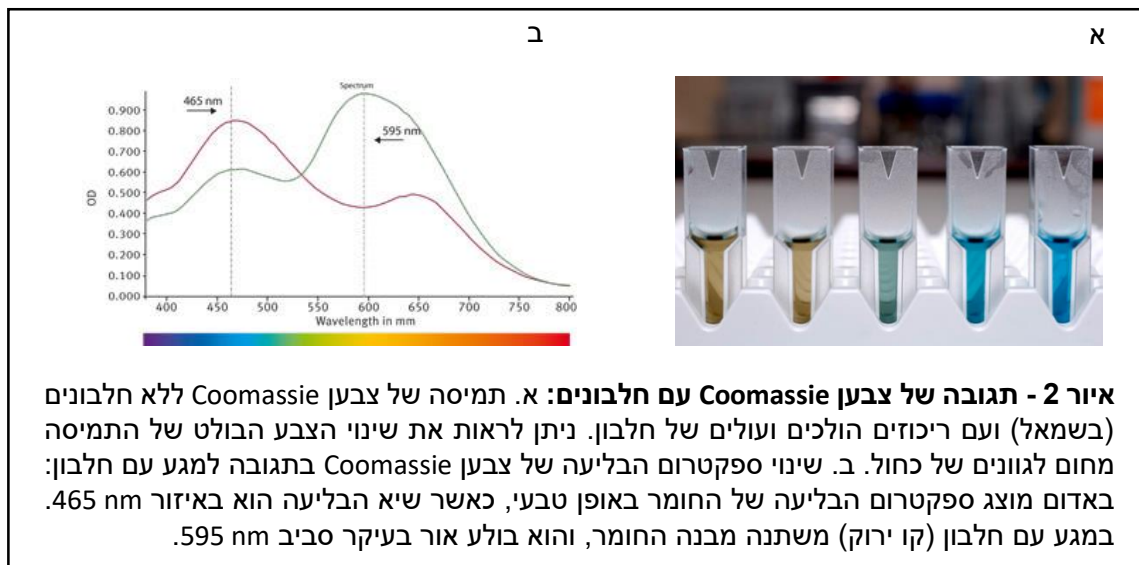
ממשוואה זו ניתן לראות כי ככל שתמיסת החומר מרוכזת יותר, פחות אור מצליח לעבור וחלק גדול ממנו נבלע בחומר. בד בבד, ככל שהאור עובר דרך ארוכה יותר בנוזל - אחוז גדול יותר ממנו ייבלע ולא יגיע אל הגלאי. לבסוף, אם ידוע לנו מקדם הבליעה של החומר ( $\epsilon$ ) וידוע לנו גודל המבחנה (כלומר אורך הדרך שהאור יעבור בנוזל), ערכי בליעת האור יכולים לתת לנו ממד כמותי לגבי ריכוז החומר בתמיסה.

חשוב לציין כי היחס הישיר בין ריכוז החומר לבליעת האור (במבחנה בעלת אורך נתון) אינו נשמר תמיד: בערכי בליעה שמתקרבים ל-2=A מפסיק להתקיים יחס ישר, כי התמיסה מרוכזת מדי ואל הגלאי מגיעה כמות אור קטנה מאוד. בשלב זה המדידה שלנו מפסיקה להיות רגישה ולא ניתן להקיש על ריכוז החומר לפי ערכי הבליעה. כדי להתגבר על בעיה זו אפשר לנקוט בשתי גישות: להעביר את התמיסה למבחנות (קיווטות; Cuvette) קטנות יותר כך שהדרך שהאור יעבור תהיה קטנה יותר (נקטין את l) וכך נקבל ערכי A קטנים וטובים יותר. דרך פשוטה יותר (ומקובלת יותר) היא למהול את התמיסה: ע"י מיהול של התמיסה (בניח, פי שניים) אפשר לקבל ערך בליעה טוב שייתן מדד אמין לגבי הריכוז – אך חשוב לזכור ולהכפיל את הריכוז בחזרה (פי שניים, במקרה זה) כדי לדעת מהו ריכוז התמיסה המקורית.

## שיטת ברדפורד



שיטת ברדפורד (Bradford) היא שיטה לזיהוי ולכימות של חלבונים. השיטה מבוססת על החומר Coomassie Brilliant Blue אשר במגע עם חלבונים משנה צבעו מחום-אדום (שיא בליעה באיזור 465 nm) לכחול (שיא בליעה ב-595 nm), כמודגם באיורים 2' ו-2ב'.



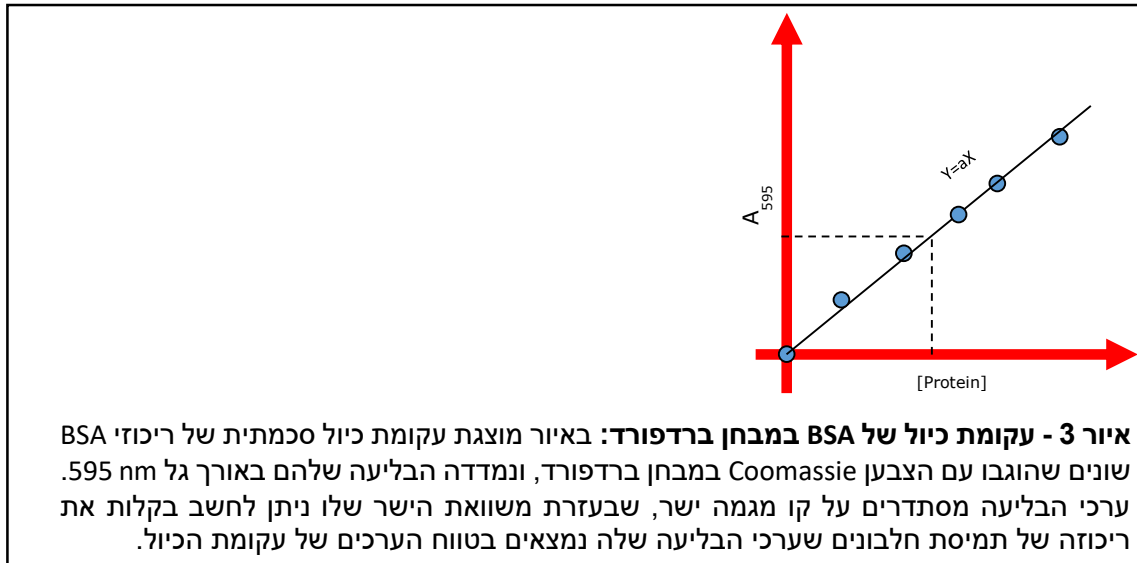
**איור 2 - תגובה של צבען Coomassie עם חלבונים:** א. תמיסה של צבען Coomassie ללא חלבונים (בשמאל) ועם ריכוזים הולכים ועולים של חלבון. ניתן לראות את שינוי הצבע הבולט של התמיסה מחום לגוונים של כחול. ב. שינוי ספקטרום הבליעה של צבען Coomassie בתגובה למגע עם חלבון: באדום מוצג ספקטרום הבליעה של החומר באופן טבעי, כאשר שיא הבליעה הוא באיזור 465 nm. במגע עם חלבון (קו ירוק) משתנה מבנה החומר, והוא בולע אור בעיקר סביב 595 nm.

באופן ספציפי, שינוי הצבע של החומר מתרחש בעיקר במגע עם חומצות האמינו בעלות השייר הארומטי (טריפטופן, טירוזין ופנילאלנין) ועם חומצות האמינו הטעונות-חיובית (ליזין, ארגינין והיסטידין). עובדה זו מגבילה את היכולת להשוות בין תמיסות של חלבונים שונים בבדיקה זו: אם לחלבון א' יש שיעור גבוה של חומצות אמינו ארומטיות ולחלבון ב' אין כמעט כלל חומצות אמינו ארומטיות, חלבון א' ייתן קריאה גבוהה יותר במבחן ברדפורד בהשוואה לחלבון ב' שאילו הצבען ייקשר רק במידה מועטה, גם אם ריכוזי החלבון דומים. מסיבה זו מקובל לבחון בשיטת ברדפורד רק **תערובות** של חלבונים, כשההנחה היא שבאוכלוסייה גדולה ומגוונת של חלבונים נקבל שיעור יחסית קבוע של חומצות אמינו ארומטיות וחיוביות.

על מנת לקבל מידע כמותי על ריכוז תערובת החלבונים בתמיסה יש צורך בעקומת כיוול – סטנדרט ידוע של ריכוזי חלבון שונים שנגיב במבחן ברדפורד, ואת צבעי התמיסות של עקומת הכיוול (או יותר נכון: את ערכי הבליעה שלה) נשווה לתמיסה בעלת ריכוז לא ידוע. נמצא שלחלבון BSA (אלבוּמין מסרום של בקר; bovine serum albumin) יש שיעור דומה של חומצות אמינו ארומטיות/חיוביות כמו לתערובת חלבונים כללית – כלומר ניתן לומר יחסית בביטחון ש-

BSA בריכוז של 0.1 mg/ml יגיב במבחן ברדפורד כמו תמיסת חלבון כללית בריכוז של 0.1 mg/ml.

כדי ליצור עקומת כיוול, מוהלים תמיסה של BSA לריכוזים ידועים (כולל תמיסה בה אין כלל חלבון), מבצעים עליה את מבחן ברדפורד, ומתעדים את ערכי הבליעה של המבחנות השונות באורך הגל המתאים. כל עוד ריכוזי החלבון בטווח מתאים, נקבל בליעה הקטנה מערכי  $A=2$  ונוכל להשתמש בעקומת הכיוול. לרוב מתקבלת עקומה ישירה כמתואר באיור 3.



מכיוון שגם לצבען במצבו הטבעי יש בליעה מסויימת באורך גל של 595 nm, מקובל לחסר את ערכי הבליעה של המבחנה ללא החלבון (ריכוז חלבון = 0) מכל המבחנות השונות, שכן הערך שמתקבל שם מייצג בליעה שאינה ספציפית לנוכחות חלבון. באופן זה גם מתקבלת עקומה שמתחילה בנקודה (0,0) ומתקבלת משוואת ישר פשוטה מהטיפוס של  $Y=aX$ .

במידה ותמיסת החלבון שבדקנו חורגת מערכי הבליעה של עקומת הכיוול, לא ניתן להשתמש במשוואת הישר של עקומת הכיוול כדי לחשב את ריכוז תמיסת החלבון: יכולת הניבוי של עקומת הכיוול תקפה רק לטווח הערכים שנבדק – וככל שהערך הנמדד חורג מהטווח הזה גדל הסיכוי שנטעה בחיזוי הריכוז של התמיסה. לכן, במצבים כאלה, יש צורך למהול את תמיסת החלבון כך שקריאת הבליעה שלה במבחן ברדפורד ייתן ערך שמתאים לעקומת הכיוול. גם כאן, חשוב לזכור ולהכפיל בחזרה את ריכוז החלבון כדי לדעת מהו ריכוז התמיסה המקורית.

## צביעת פהלינג (Fehling) ומבחן בנדיקט (Benedict)

צביעת פהלינג היא תגובה כימית המשמשת, בין השאר, לאיתור סוכרים מחזרים. מולקולות חד-סוכר כמו גלוקוז מסוגלות בסביבה בסיסית ליצור תגובת חמצון-חיזור עם מולקולות שכנות ולכן הן מוגדרות כ'סוכרים מחזרים' (לדוגמה: גלוקוז, פרוקטוז וגלקטוז). בתגובת פהלינג כלולים נחושת גופרתית ( $\text{CuSO}_4$ ) וחומר בסיסי היוצר קומפלקס עם יוני הנחושת ( $\text{Cu}^{2+}$ ). בסביבה זו, נוכחות של סוכר מחזר כמו גלוקוז תהפוך את הנחושת ליון  $\text{Cu}^+$  שיוצר תחמוצת של נחושת ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) בעלת גוון אדמדם (כמתואר באיור 5א), ששוקעת לבסוף מכיוון שאינה מסיסה במים. לרוב תגובה זו מצריכה חימום קל כדי שתתרחש בזמן קצר יותר.

יצוין כי בעיקרון תגובה זו יכולה גם לאתר דיסכרידים (דו-סוכרים) ופוליסכרידים (רב-סוכרים) מסויימים, כתלות במבנה הכימי שלהם.

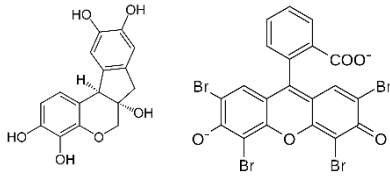
למבחן זה יש גם גרסאות נוספות, כמו מבחן בנדיקט, הפועלת באותם עקרונות אך עושות שימוש במרכיבים מעט שונים. התמיסה המקורית של מבחן בנדיקט היא כחולה-צלולה בשל נוכחות יוני נחושת, וכתלות בכמויות הסוכרים המחזרים מציגה קשת של צבעים, שנעים בין ירוק, דרך צהוב-כתום, ועד לאדום שמציג ריכוזים גבוהים של סוכרים, כמתואר באיור 5ב.



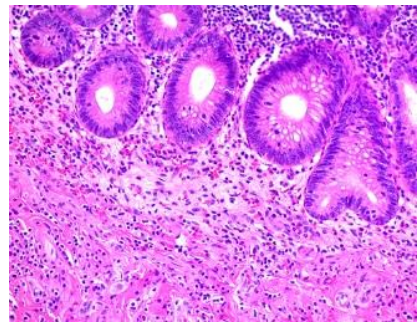
Blue solution	Green / yellow ppt	Orange red ppt	Brick-red ppt
None	Traces of reducing sugar	Moderate	Large amount of reducing sugar

**איור 5 – מבחנים לאיתור חד-סוכרים:** א. תמיסת פהלינג מכילה יוני נחושת בגוון כחול, אבל בתגובת חמצון-חיזור עם גלוקוז (מבחנה משמאל) מתקבלת תחמוצת נחושת בגוון חום-אדמדם. ב. תמיסת בנדיקט מכילה יוני נחושת שמקנים לתמיסה גוון כחול צלול. בנוכחות סוכרים מחזרים צבע התמיסה משתנה כתלות בריכוז הסוכרים: גוון ירוק לריכוז נמוך, גוון כתום לריכוז בינוני של סוכרים, וגוון אדום עמוק לריכוזים גבוהים של סוכרים.

## צביעת המטוקסילין ואאוזין (hematoxylin-eosin, H&E)



צביעת המטוקסילין ואאוזין (H&E) היא אחת הצביעות הנפוצות ביותר של רקמות. הצבען אאוזין הוא צבען ורוד וטעון-שלילית שנקשר בצורה לא ספציפית לחלבונים שונים הטעונים-חיובית, בעיקר בציטופלזמה של תאים. המטוקסילין הוא צבען שהצורה המחומצנת שלו היא חיובית ונקשרת לחומצות הגרעין הטעונות-שלילית (גדילי דנ"א ורנ"א), וצובעת אותן בגווני סגול וכחול כהה (ראו איור 9).



**איור 9 - צביעת המטוקסילין-אאוזין:** בחתך הרקמה ניתן לזהות את גרעיני התאים המכילים דנ"א ונצבעים ע"י המטוקסילין בסגול, וציטופלזמה של תאים בגווני ורוד.

מכיוון שלמבנים שונים בתאים יש משיכה שונה לאאוזין, יתכנו גוונים שונים של צביעות אאוזין: רקמות עתירות קולגן (כמו העור) ורקמות שריר יתנו צביעה של ורוד כהה יותר, ותאי דם אדומים ייצבעו בגוון הקרוב יותר לאדום, ואילו רקמות הידרופוביות כמו תאי שומן נוטות שלא להיצבע כלל באאוזין.

לצביעת H&E שימושים רבים במחקר ובקליניקה, והיא עוזרת למשל לזהות שינויים במבנה הרקמה או הסתננות של צברי תאים לתוך הרקמה.

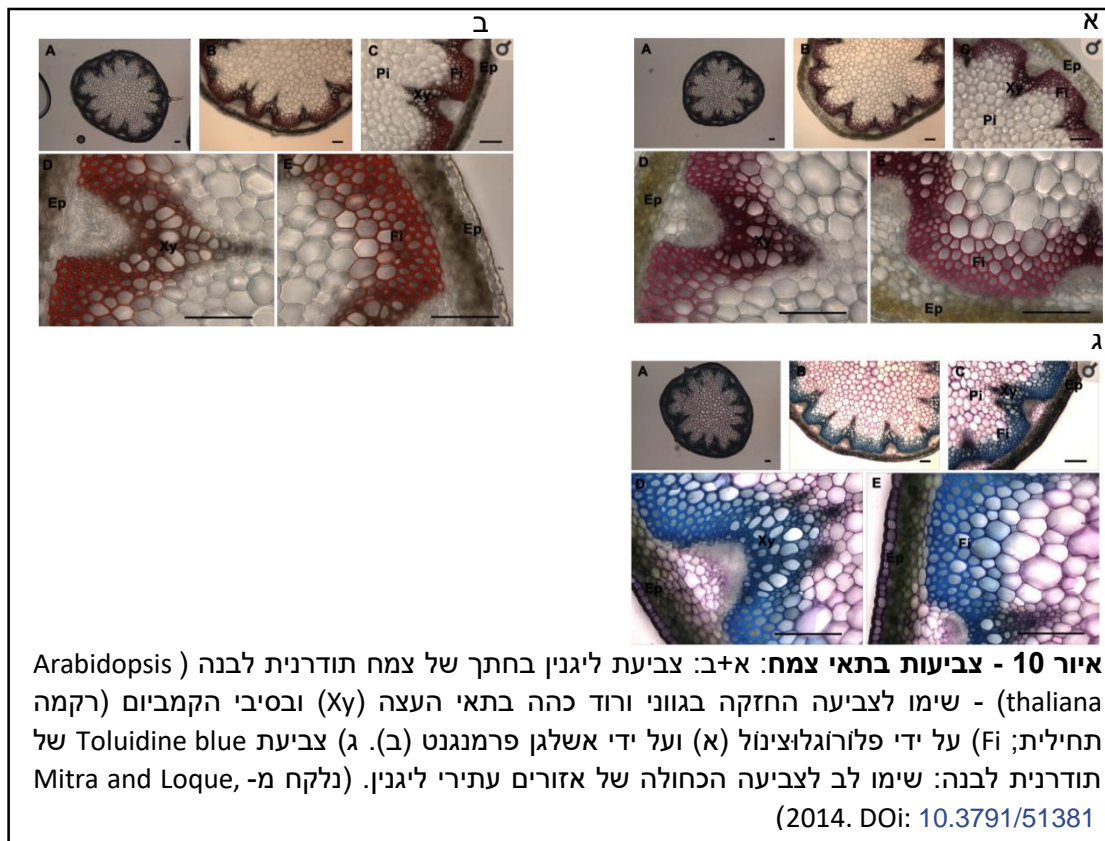
## צביעות בתאי צמח

ליגנין (לֶיְגֵן) הוא פולימר נפוץ בדופן התאים בממלכת הצומח, ומעניק תמיכה מבנית לתאים – בעיקר בצמחים וסקולריים. ליגנין הוא פולימר הטרוגני הנוצר מצילוב (crosslink) בין מולקולות אורגניות פשוטות יותר, כאשר הרכב אבני הבניין קובע את חוזק הליגנין: ליגנין של עצים עשיר יותר במונומרים מסוג מסוים ההופכים את הליגנין לקשה וחזק יותר, ואילו דשא עשיר במונומרים מסוג אחר ההופכים את הליגנין שלו לרך יותר. צביעה של ליגנין היא כלי בסיסי בבוטניקה, ומאפשרת לראות בקלות רקמות הובלה כמו עצה ושיפה בצמחים וסקולריים.

א. צביעת ויסנר (Wiesner) – בצביעה זו משתמשים במולקולה פלורוגלוצינול (phloroglucinol), אשר בסביבה חומצית נקשר לקצוות של פולימרים של ליגנין ומייצר גוונים ורודים כהים (איור 10א').

ב. צביעת Mäule - בצביעה זו משתמשים באשלגן פרמנגנט ( $KMnO_4$ ) שלאחר שטיפה עם חומצה חזקה וניטרול עם בסיס משאיר צביעה אדומה-סגולה של מולקולות ליגנין מסוגים מסויימים (איור 10ב').

ג. צביעת Toluidine Blue – בצביעה זו משתמשים בצבען הטעון-חיובית טולואידין בלו אשר נקשר באופן שונה לרכיבים שונים בתא (טעונים-שלילית), ומייצר צבעים שונים בהתאם לחומר אליהם הוא נקשר: פוליסכרידים כמו pectic acid (נגזרת של פקטין, רב סוכר בדופן התא) נצבעים בוורוד, מולקולות כמו ליגנין נצבעות בגווני כחול, וחומצות גרעין נצבעות בצבעי כחול-ירוק (איור 10ג').



## אלקטרופורזה בג'ל

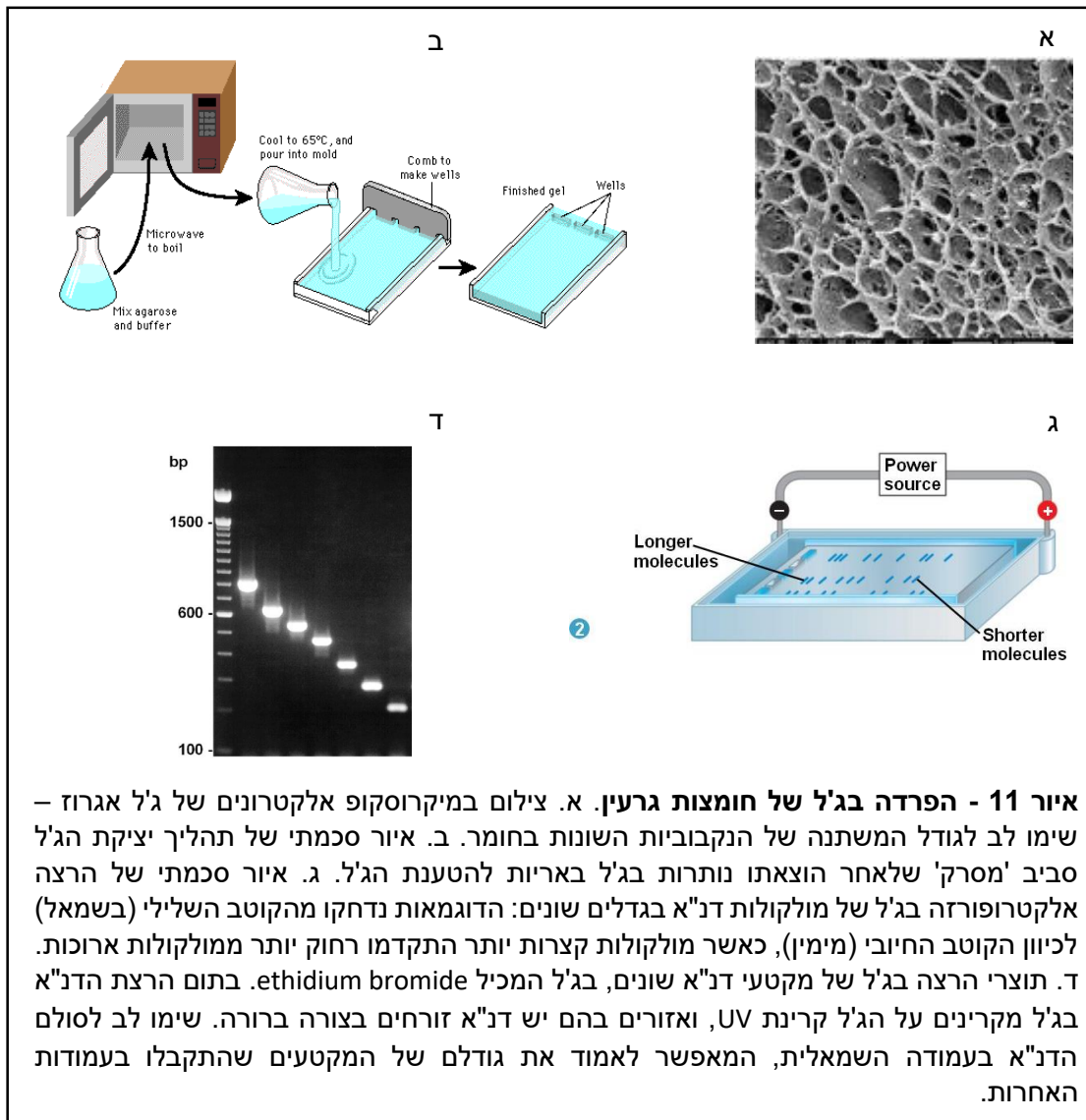
אלקטרופורזה בג'ל היא שיטה להפרדה של מולקולות ביולוגיות כמו דנ"א, רנ"א וחלבון, על סמך גודלן ומטענן החשמלי.

### הפרדת דנ"א ורנ"א

קבוצות הפוספט בשלד של שרשראות נוקלאוטידים טעונות באופן שלילי, ולכן כל מולקולות הדנ"א והרנ"א טעונות במטען שלילי אחיד. על מנת להפריד בין המולקולות על פי גודלן מטעינים אותן לתוך ג'ל המורכב מפולימרים של אגרוז (רב-סוכר המופק מאצות). כדי להכין את הג'ל מחממים אבקת אגרוז בנוזל, וכאשר נותנים לו להתקרר נוצר ג'ל עם נקבוביות לא אחידות, כמתואר באיור 11א'. כאשר יוצקים את הג'ל משאירים בתוכו 'מסרק' שהג'ל מתמצק מסביבו, וכאשר מוציאים את המסרק נותרות בג'ל 'באריות' שלתוכן ניתן להטעין את הדוגמאות (איור 11ב'). לאחר שדוגמאות הדנ"א מוטענות בבאריות, מפעילים מתח חשמלי והדוגמאות נדחקות מהקוטב השלילי לכיוון הקוטב החיובי: מקטעי דנ"א קטנים מצליחים להשתחל בצורה טובה בתוך סבך הנקבוביות ולכן מתקדמים מהר, ואילו מקטעי דנ"א גדולים יותר מסתבכים והתקדמותם מתעכבת, כמתואר באיור 11ג'. על מנת שניתן יהיה לצפות במולקולות הדנ"א מוסיפים לג'ל (לתמיסה הנוזלית, לפני היציקה) מולקולות שנקשרות לדנ"א כמו ethidium bromide. במפגש של מולקולות כאלו עם דנ"א המבנה שלהן משתנה והן זורחות כאשר מקרינים עליהן אור על-סגול (UV), ומאפשרות לזהות בקלות צברים של דנ"א – מולקולות בעלות אורך דומה שסיימו את הנדידה באותו המקום. לבסוף, כדי לאמוד את אורכן של שרשראות הדנ"א מקובל להטעין בג'ל גם סולם (ladder) המכיל מקטעי דנ"א באורכים ידועים, כך שניתן להשוות בין מרחקי הריצה של גדלים ידועים לבין מרחקי הריצה של מקטעי הדנ"א שהתקבלו בדוגמאות השונות (איור 11ד').

שני גורמים עיקריים משפיעים על ההרצה של דנ"א בג'ל: משך ההרצה וריכוז האגרוז. ככל שהרצה תימשך לזמן ארוך יותר, תיווצר הפרדה גדולה יותר בין מקטעי דנ"א השונים. במקביל, ככל שנעלה את ריכוז האגרוז בג'ל נקבל נקבוביות קטנות וצפופות יותר, שיעזרו טוב יותר להפריד בין מקטעים דומים-יחסית באורכם, אך מנגד ההרצה תימשך זמן רב יותר, כי לכל המולקולות יהיה קשה יותר להתקדם.





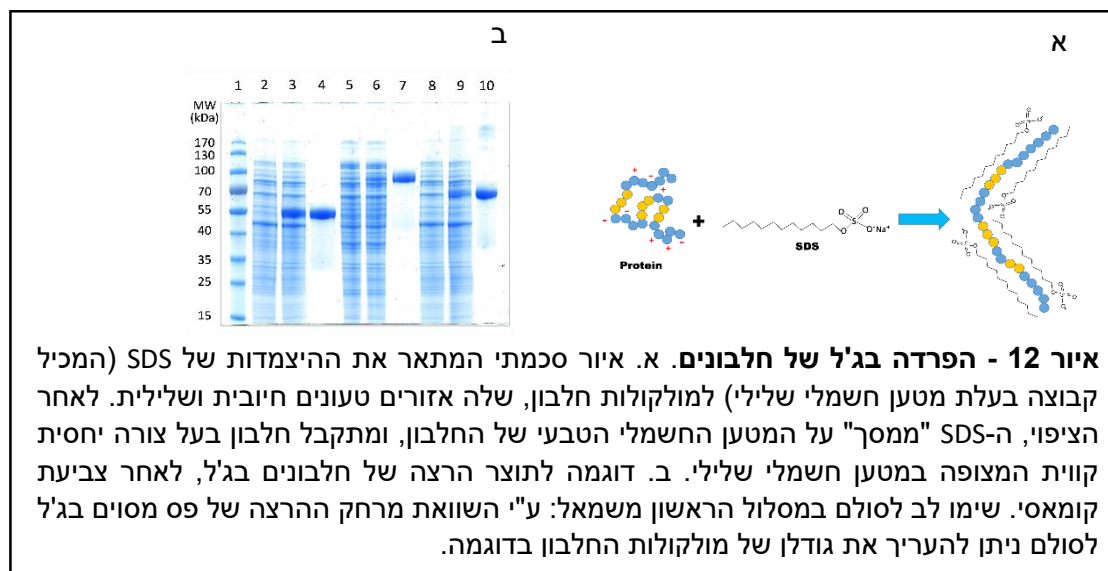
**איור 11 - הפרדה בג'ל של חומצות גרעין.** א. צילום במיקרוסקופ אלקטרוני של ג'ל אגרוז – שימו לב לגודל המשתנה של הנקבוביות השונות בחומר. ב. איור סכמתי של תהליך יציקת הג'ל סביב 'מסרק' שלאחר הוצאתו נותרות בג'ל באריות להטענת הג'ל. ג. איור סכמתי של הרצה אלקטרופורזה בג'ל של מולקולות דנ"א בגדלים שונים: הדוגמאות נדחקו מהקוטב השלילי (בשמאל) לכיוון הקוטב החיובי (מימין), כאשר מולקולות קצרות יותר התקדמו רחוק יותר ממולקולות ארוכות. ד. תוצרי הרצה בג'ל של מקטעי דנ"א שונים, בג'ל המכיל ethidium bromide. בתום הרצת הדנ"א בג'ל מקרינים על הג'ל קרינת UV, ואזורים בהם יש דנ"א זורחים בצורה ברורה. שימו לב לסולם הדנ"א בעמודה השמאלית, המאפשר לאמוד את גודלם של המקטעים שהתקבלו בעמודות האחרות.

### הפרדת חלבונים

הפרדת חלבונים שונה מהפרדת חומצות גרעין בשל התכונות המבניות השונות של חלבונים: חלבונים מורכבים מחומצות אמינו שלהן מטענים חשמליים שונים - רובן נייטרליות, חלקן טעונות במטען שלילי, וחלקן במטען חיובי. מכיוון שחלבונים שונים מורכבים מצירופים שונים של חומצות אמינו – לחלבונים שונים יש מטען חשמלי שונה, והמטענים גם אינם מפוזרים באופן אחיד על פני החלבון. בנוסף, לחלבונים ישנם במקרים רבים מבנים שניוניים ושלישוניים מורכבים, שיגבילו מאוד את יכולתם לנוע בג'ל נקבובי. על מנת להתגבר על מגבלות אלה מקובל לגרום לחלבונים דנטורציה (הרס המבנה המרחבי) בעזרת חימום וחיזור של קשרי גופרית (בעזרת חומרים כמו  $\beta$ -mercaptoethanol). בסופו של תהליך החלבונים בתמיסה מקבלים תצורה קווית פשוטה יותר, דמוית ספגטי.

על מנת להשוות בין המטענים של החלבונים שונים, מקובל לצפות אותם ב-SDS (sodium dodecyl sulfate), פחמימן בעל מטען שלילי הנוטה להיצמד לחומצות אמינו ו"מצפה" את החלבון במטען שלילי אחיד, כמתואר באיור 12א'.

את דוגמאות החלבון לאחר הדנטורציה והציפוי ב-SDS מקובל להריץ בג'ל המורכב מפוליאקרילאמיד (פולימר פחמימני), היוצר ג'ל אחיד יחסית. כאשר מופעל מתח חשמלי על הג'ל, החלבונים המצופים ב-SDS מתקדמים לכיוון הקוטב החיובי לפי גודלם – מולקולות קטנות מתקדמות מהר ורחוק יחסית, ומולקולות ארוכות מסתבכות בדרך ומתעכבות. לצורכי קיצור, מקובל לתאר את השיטה בתור SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis). דהיינו 'אלקטרופורזה בג'ל פוליאקרילאמיד של (חלבונים המצופים ב-SDS'. גם במקרה זה, כמו בהרצה של דנ"א בג'ל, מקובל להטעין בג'ל דוגמה של 'סולם' המכילה חלבונים בגדלים ידועים, לצורך השוואה. לבסוף, כדי לראות את החלבונים השונים בג'ל, מקובל להוסיף צבענים הנקשרים לחלבונים, כמו צביעת קומאסי (Coomassie; הרכיב הפעיל בצביעת ברדפורד), כמתואר באיור 12ב'.



גם כאן, למשך ההרצה ולריכוז הג'ל יש תפקיד חשוב בהפרדה בין המולקולות: הרצה למשך זמן ארוך יותר תיצור הפרדה גדולה יותר בין מקטעי החלבון השונים. במקביל, ככל שנעלה את ריכוז הפוליאקרילאמיד בג'ל נקבל נקבוביות קטנות וצפופות יותר, שיעזרו טוב יותר להפריד בין מקטעים דומים-יחסית באורכם, אך ההרצה תימשך זמן רב יותר, כי לכל המולקולות יהיה קשה יותר להתקדם.

יצוין כי קיימות גם שיטות להרצה של חלבונים במצבם הנטיבי (הטבעי), הלוקחות בחשבון את המטען והמבנה המרחבי הטבעיים של החלבונים השונים. בשיטה זו ניתן להפריד בין אוכלוסיות חלבונים שונים לא רק על סמך אורכן, אלא גם על סמך היחס בין המטען החשמלי שלהם למאסה שלהם.