

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

[zapisz się](#)



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Reakcje wykorzystywane do wykrywania wybranych aminokwasów i białek



Aminokwasy zaliczane są do najpopularniejszych związków naturalnych, a to ze względu na ich obecność we wszystkich białkach. Ponadto, związki te wchodzi w skład innych związków biologicznie czynnych, w tym np. neuroprzekazników

oraz alkaloidów. W syntezie białek wykorzystywanych jest jedynie 23 aminokwasy- są to tzw. aminokwasy kodowane, tj. takie, które są rozpoznawane przez kod genetyczny. Znanych jest kilka rodzajów aminokwasów, w tym np. aminokwasy aromatyczne. Co ważne, w zależności od składu pierwiastkowego oraz od budowy, różne aminokwasy ulegają różnym reakcjom, dzięki czemu możliwe jest ich łatwe wykrywanie i różnicowanie [3].

Słowa kluczowe: *aminokwasy, białka, denaturacja, koagulacja, aminokwasy siarkowe, aminokwasy aromatyczne, próba ksantoproteinowa, grupa tiolowa.*

Metody analizy, identyfikacji, a także oczyszczania i biofizycznej charakterystyki białek ewoluowały wraz z rozwojem wiedzy na ich temat, a także z pojawieniem się nowych celów badawczych, w których zakładano wykorzystanie tych specyficznych cząsteczek.

Pod wpływem działania podwyższonej temperatury, białka mogą ulec nieodwracalnej denaturacji. Dochodzi wówczas do zmiany struktury białek, w wyniku czego stają się one nieaktywne biologicznie. Zjawisko to zachodzi w wyniku utraty trzeciorzędowej lub czwartorzędowej struktury, jednak dochodzi do tego powyżej pewnej temperatury. Ponadto, denaturację białek mogą wywoływać sole metali ciężkich, mocne kwasy i zasady, a także niskocząsteczkowe alkohole, aldehydy oraz napromieniowanie. Białka proste stanowią pewien wyjątek, a to dlatego, że mogą one ulec procesowi odwrotnemu do denaturacji tj. denaturacji, jednak tylko wtedy kiedy zostanie usunięty czynnik denaturujący.

Niektóre białka pod wpływem zwiększonego stężenia soli w roztworze, mogą ulec nieodwracalnej denaturacji, jednakże proces wysalania białek w większości przypadków jest całkowicie odwracalny. Tak więc, zjawisko wysalania może być z powodzeniem wykorzystywane do izolowania lub rozdzielania białek, jednak przy większych stężeniach soli może dojść do uszkodzenia otoczki solwatacyjnej [4].

Pod wpływem ciepła dochodzi do zrywania w cząsteczkach wiązań wodorowych, co w konsekwencji prowadzi do nieodwracalnej denaturacji białek. Cały proces denaturacji zależy od rodzaju białka, na który działa określona temperatura, zazwyczaj denaturacja rozpoczyna się w przedziale 40°C-100°C. Niektóre białka wytrzymują krótkie gotowanie, wśród nich jest żelatyna, rybonukleaza. Białko, które jest denaturowane w punkcie izoelektrycznym jest nierozpuszczalne [2].

Ciepła denaturacja i koagulacja białka

Do probówek należy odmierzyć po 2 ml 1% roztworu białka (jaja kurzego), a następnie dodać:

- 0,2 ml 0,01M roztworu HCl (o pH=3)- do pierwszej probówki
- 0,2 ml buforu octanowego (o pH=4,7)- do drugiej probówki
- 0,2 ml 0,01M roztworu NaOH (pH=11)- do trzeciej probówki

Wszystkie probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na ok. 15 minut, po inkubacji próbki oziębć. Następnie, do probówek nr 1 i 3 dodać po 2 ml 0,01 M buforu octanowego (o pH=4,7). W próbkach tych powinna wytrącić się denaturowana albumina, z kolei w probówce nr 2 pojawia się osad, który jest denaturowaną i skoagulowaną albuminą [2].

Reakcja Libermannna

Reakcją charakterystyczną (służącą do identyfikacji) glikoprotein jest tzw. reakcja Libermannna. W trakcie jej przebiegu, podczas ogrzewania ze stężonym roztworem HCl dochodzi do hydrolizy

białka, zaś z cukrów (jednocześnie) powstają pochodne furfuralowe. Te z kolei, z uwolnionymi w czasie hydrolizy fenolami, dają fioletowo zabarwione połączenia.

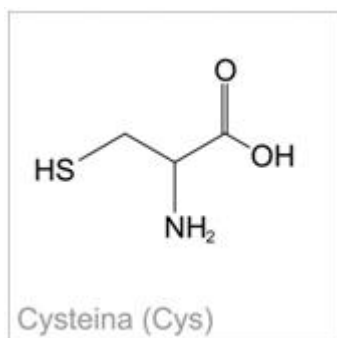
Wykonanie:

Do 1 ml surowicy (2x rozcieńczonej 0,9% roztworem NaCl) należy dodać 3 ml stężonego HCl, próbkę ogrzewać przez kilka minut.

Wyniki: W trakcie ogrzewania roztwór stopniowo zabarwia się na kolor fioletowy [2].

Wykrywanie siarki cystyny i cysteiny w aminokwasach

Aminokwasy, które w swojej budowie zawierają grupy siarkowe -SH lub -S-S- występujące w stanie wolnym lub związanym w białkach (tzw. aminokwasy siarkowe), podczas ogrzewania w środowisku silnie alkalicznym, ulegają przekształceniu do kwasu pirogronowego. Wtedy też dochodzi do uwolnienia siarki w postaci jonów siarczkowych. Następnie, jony te reagują z jonami ołowiu (II), w wyniku czego powstaje czarny osad (PbS). Dodatkowym produktem powstającym w czasie tej reakcji jest amoniak. Należy zaznaczyć, że metionina nie daje dodatniego wyniku tej reakcji [6].



Zdjęcie: Cysteina, http://portalwiedzy.onet.pl/80958,1,,,cysteina_wzor_strukturalny,haslo.html

Reakcja cystynowa:

W trakcie ogrzewania białek z ługiem dochodzi do ich hydrolizy, zaś zawarta w cystynie i cysteinie siarka ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które to z jonami Pb²⁺ dają czarny osad PbS. Metionina (inny aminokwas siarkowy) nie daje dodatniego wyniku przedstawionej reakcji [2].

1) Do 1 ml surowicy (rozcieńczonej 10 x za pomocą 0,9% roztworu NaCl) należy dodać kilka kropli

1% roztworu $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, a także 2 ml 30% roztworu NaOH. Próbkę wstawić do wrzącej łaźni wodnej.

Wyniki: Po kilkunastu minutach gotowania pojawia się czarny osad [2].

2) Do 3 probówek należy kolejno odmierzyć po 0,5 ml :

- 1% roztworu cystyny lub cysteiny- do pierwszej probówki

- 1% roztworu metioniny - do drugiej probówki

- 1% roztworu białka jaja kurzego, albuminy, żelatyny, lub rozcieńczonej 10x surowicy- do trzeciej probówki

Następnie, do wszystkich probówek dodać po 1 kropli 0,25M roztworu octanu ołowiu (II). Probki wymieszać, po czym dodać do nich 2 ml 20% roztworu NaOH. Wymieszane próbki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 2-3 minuty. Po tym czasie porównać i zinterpretować wyniki (jak wyżej) [6].

Cystyna podczas ogrzewania w stężonym roztworze NaOH, ulega częściowej mineralizacji, tj. rozkładowi do związków nieorganicznych. Wolne jony S^{2-} , które są obecne w mieszaninie poreakcyjnej, reagują z jonami Pb^{2+} , w wyniku czego powstaje czarny osad (siarczek ołowiu)

Do 1 cm³ roztworu cysteiny należy dodać 2 cm³ 20% NaOH, po czym próbkę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Po inkubacji, do próbki dodać kilka kropli 2% $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, po czym próbkę ponownie ogrzewać. W trakcie ogrzewania pojawia się czarny osad [5].

Reakcja z nitroprusydkiem sodu- wykrywanie grup tiolowych w cysteinie

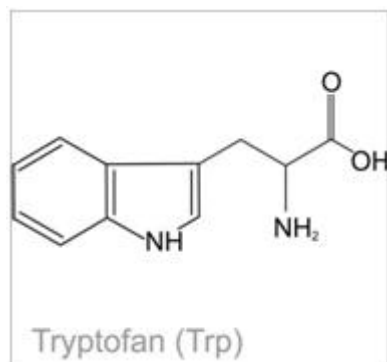
Związki, które zawierają w swej budowie ugrupowania tiolowe, tj. SH, w reakcji z nitroprusydkiem sodu tworzą kompleksowe połączenia, o czerwono-fioletowym zabarwieniu.

Do 1 cm³ roztworu cysteiny należy dodać 1 cm³ 1% roztworu nitroprusydku sodu. Próbkę nasycić siarczanem amonu in substantia, po czym próbkę zalkalizować za pomocą amoniaku. W wyniku zachodzących reakcji pojawia się czerwono-fioletowe zabarwienie świadczące o obecności grup tiolowych w próbce [5].

Próba ksantoproteinowa- wykrywanie ugrupowania aromatycznego w aminokwasach aromatycznych

Aminokwasy aromatyczne, do których zalicza się fenyloalaninę, tyrozynę i tryptofan, występujące zarówno w formie wolnej jak i związanej w białku, pod wpływem stężonego kwasu HNO_3 (reakcja nitrowania), tworzą nitrowe pochodne o barwie żółtej. Dodatek NaOH powoduje pogłębienie barwy do pomarańczowej (skutkiem utworzenia odpowiedniej soli w wyniku zachodzącej reakcji) [6], [5].

Sporadycznie można nitować związki aromatyczne za pomocą stężonego kwasu azotowego (V). Reakcja ta udaje się np. w przypadku związków posiadających skondensowane pierścienie (np. antracen), a także w przypadku tyrozyny i tryptofanu. W reakcjach nitrowania innych związków aromatycznych (także fenyloalaniny), do najczęściej wykorzystywanych azotowych elektrofilów zalicza się kation nitroniowy (NO_2^+). Jon ten powstaje z kwasu azotowego (V) pod wpływem katalizującego protonu, który dostarczany jest przez kwas siarkowy. W wyniku reakcji uprotonowany kwas azotowy (po odłączeniu cząsteczki wody), przechodzi w postać jonu nitroniowego. W praktyce, w celu przeprowadzenia reakcji nitrowania stosuje się tzw. mieszaninę nitrującą, w której skład wchodzi stężony kwas azotowy (V) i stężony kwas siarkowy (zmieszane w stosunku 1:3 v/v) [6].



Zdjęcie: Tryptofan, http://portalwiedzy.onet.pl/81707,1,,,tryptofan_wzor_strukturalny,haslo.html

Wykonanie próby ksantoproteinowej:

1). Należy przygotować trzy próbki, po czym odmierzyć do nich po 1 ml:

- 1% roztworu tyrozyny - do pierwszej próbki,
- 1% roztworu glicyny - do drugiej próbki,
- 1% roztworu białka (albuminy, owoalbuminy lub żelatyny albo rozcieńczonej surowicy)- do trzeciej próbki.

Następnie, do wszystkich próbek należy dodać po 1 ml stężonego kwasu azotowego (V), próbki ogrzewać przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po tym czasie zaobserwować, w których próbkach roztwór zabarwił się na kolor żółty. Następnie wszystkie próbki należy oziębic pod bieżącą wodą i dodać do nich po 4 ml 20% roztworu NaOH (jest to reakcja silnie egzotermiczna!).

W ostatnim etapie doświadczenia, zaobserwować, w których próbkach roztwór zabarwi się na kolor żółto-pomarańczowy [6].

2). Do 1 cm³ roztworu aminokwasu aromatycznego należy dodać 0,5 cm³ stężonego kwasu HNO₃. Próbkę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Zaobserwować pojawienie się żółtego zabarwienia. Następnie, po oziębieniu próbki dodać do niej 4 cm³ 20% NaOH, wtedy to barwa roztworu staje się bardziej intensywna [5].

Histydyna

Histydyna jest aminokwasem, który posiada bardzo duże powinowactwo do tlenu singletowego. Ponadto, ma ona zdolność wiązania się z jonami metali przejściowych m.in. z miedzią, cynkiem, niklem czy żelazem, gdzie w takich połączeniach aminokwas ten stanowi kluczowy pod względem czynnościowym składnik białek (o właściwościach enzymatycznych). W mięśniach i mózgu ssaków

z zimną wodą, po czym do próby dodać 0,5ml 0,5% roztworu NaNO₂, całość dokładnie wymieszać. Otrzymany roztwór zalkalizować, za pomocą roztworu Na₂CO₃ in subst.- odczyn (pH) mieszaniny sprawdzić za pomocą papierka wskaźnikowego.

Następnie, do przygotowanych wcześniej 3 probówek (z przygotowanymi roztworami aminokwasów lub białka), należy oddać zalkalizowany roztwór soli diazoniowej, całość wymieszać.

Wyniki: Pojawienie się w próbówce pomarańczowego zabarwienia świadczy o dodatnim wyniku próby na obecność histydyny [6].

2) Do 5 cm³ 0,5% roztworu kwasu sulfanilowego należy dodać 0,5 cm³ 0,5% roztworu NaNO₂-chłodząc próbkę w zimnej wodzie. Powstały w ten sposób roztwór soli diazoniowej należy zalkalizować za pomocą roztworu Na₂CO₃ in substantia. Odczyn roztworu sprawdzić za pomocą papierka wskaźnikowego. Następnie, do próbki zawierającej 1 cm³ roztworu histydyny wlać roztwór soli diazoniowej.

Wyniki: Powstaje pomarańczowo-czerwone zabarwienie (jak wyżej) [5].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

[1]. Gawiński Ł., Wierzba T.H., 2006. Effect of histidine on heart rate variability in the rat. Ann. Acad. Med. Gedan., 2006, 36, 53-61.

[2]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 242-243, 246.

[3]. Kołodziejczyk A., 2006. Aminokwasy i peptydy, <http://tczew.net.pl/~mgrmisiak/Technologia%20Chemiczna/A%20M%20I%20N%20O%20K%20W%20A%20S%20Y%20%20i%20%20P%20E%20P%20T%20Y%20D%20Y.pdf>

[4]. <http://fundacjarozejnauki.pl/res/Tom1/Nauka%20swiatowa%20i%20polska%5B1%5D.Rozdzial%2003.pdf>

[5]. <http://www.am.lublin.pl/upload/jednostkiam/Chemia%20Medyczna/aminokwasy.pdf>

[6]. <http://biochigen.slam.katowice.pl/praktikum/011.pdf>

<http://laboratoria.net/artukul/14248.html>

Informacje dnia: [Drżące nanorurki Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA Testy na obecność HPV Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku Drżące nanorurki Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA Testy na obecność HPV Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku Drżące nanorurki Naukowcy znaleźli sposób na recykling betonu ADHD zdiagnozowano u co dziewiątego dziecka w USA Testy na obecność HPV Do środowiska trafiło ponad 1 mld komarów GMO Może to owady uratują nas przed zwałami plastiku](#)

Partnerzy