

[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 próbek 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 próbki
- 0,2 ml buforu octanowego (o pH=4,7)- do drugiej próbki
- 0,2 ml 0,01M roztworu NaOH (pH=11)- do trzeciej próbki

Wszystkie próbki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na ok. 15 minut, po inkubacji próbki oziębć. Następnie, do próbek 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 próbce nr 2 pojawia się osad, który jest denaturowaną i skoagulowaną albuminą [2].

Reakcja Libermann

Reakcją charakterystyczną (służącą do identyfikacji) glikoprotein jest tzw. reakcja Libermann. 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

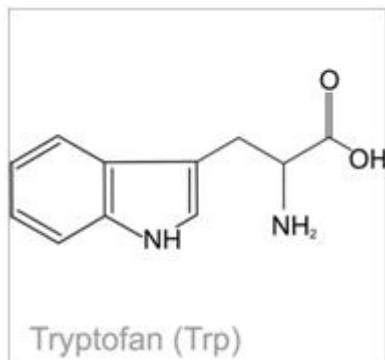
Związki, które zawierają w swej budowie ugrupowania tiolowe, tj. SH, w reakcji z nitroprusydkiem sodu tworzą kompleksowe połączenia, o czerwono-fioletowym zabarwieniu.

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].

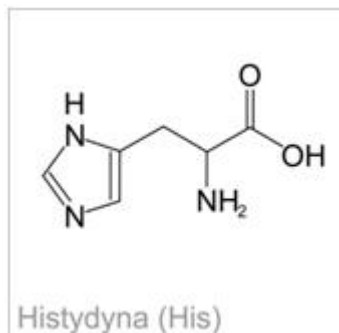
2). Do 1 cm³ roztworu aminokwasu aromatycznego należy dodać 0,5 cm³ stężonego kwasu HNO₃. Próbkę ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 10 minut. Zaobserwować pojawienie się żółtego zabarwienia. Następnie, po oziębieniu próbki dodać do niej 4 cm³ 20% NaOH, wtedy to barwa roztworu staje się bardziej intensywna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

występują wysokie (milimolowe) stężenia dipeptydów, których jednym ze składników jest histydyna (np. an seryna czy karnozyna). Dipeptydy te mają właściwości antyoksydacyjne, co wynika między innymi z ich zdolności do wiązania jonów miedzi [1].

Przeprowadzone badania doświadczalne ujawniły, że histydyna jest aminokwasem, który zapobiega rozwojowi dysfunkcji skurczowej oraz uszkodzeniom ultrastrukturalnym. Ponadto, histydyna wykazuje właściwości antyarytmiczne. Tak więc, ze względu na właściwości kardioprotekcyjne, histydyna znalazła zastosowanie jako składnik niektórych płynów kardioplegicznych (płyny podawane pod ciśnieniem do aorty) [1].



Zdjęcie: *Wzór* *histydyny,*
http://portalwiedzy.onet.pl/81789,1,,,histydyna_wzor_strukturalny,haslo.html

Reakcja (próba) Pauly'ego- wykrywanie pierścienia imidazolowego w histydynie [5], [6].

W środowisku zasadowym pierścień imidazolowy obecny w histydynie, ulega reakcji sprzęgania z jonem p-sulfobenzenodiazoniowym.

Wyniki: Produktem tej reakcji jest pomarańczowy barwnik, tzw. barwnik azowy [5], [6].

Wykonanie:

- 1) Należy przygotować 3 probówki, do każdej odmierzyć po 0,5 ml:
 - 0,5% roztworu histydyny- do pierwszej probówki
 - 1% roztworu glicyny- do drugiej probówki
 - 1% roztworu białka np. jaja kurzego, albuminy lub żelatyny- do trzeciej probówki.Otrzymywanie roztworu soli diazoniowej:

Do probówki odmierzyć 5 ml 0,5% roztworu kwasu sulfanilowego. Probówkę umieścić w zlewce

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%20%20i%20%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/arttykul/14248.html>

Informacje dnia: [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#) [Jak otworzyć laboratorium? Dziękujemy za odwiedziny na targach Labs Expo W przyszłości będziemy jedli mięso z drukarki Ruszył nabór na wspólne projekty przedsiębiorców i naukowców; w puli 66 mln zł Błonica - choroba groźna także dla dorosłych 87% internautów uważa hejt za poważny problem społeczny](#)

Partnerzy