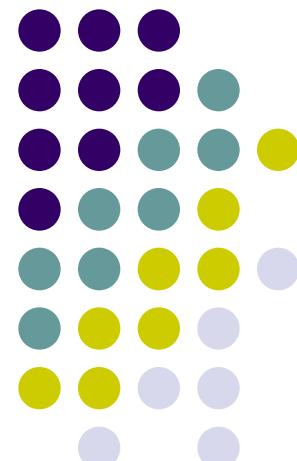


ОПРЕДЕЛЕНИЕ белков

Качественные реакции на
остатки аминокислот





Указатель реакций

- Биуретовая
 - a) Уравнение реакции
 - b) Проведение опыта
- Нингидриновая
- Ксантопротеиновая
 - a) Уравнение реакции
 - b) Проведение опыта
- Миллона
- Гопкинса-Коле
- Диазореакция Паули

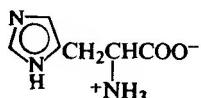
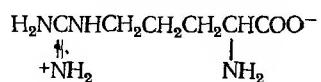
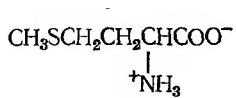
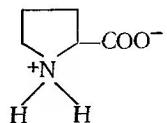
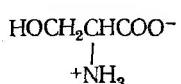
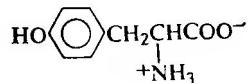
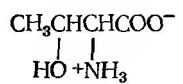
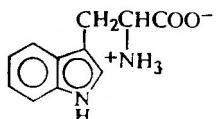
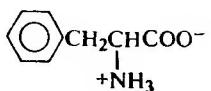
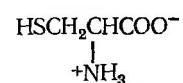
Функция качественных реакций



- Для аминокислот, постоянно встречающихся в составе белков, разработано множество цветных (в том числе именных) реакций. Многие из них высокоспецифичны, что позволяет определять ничтожные количества той или иной аминокислоты.
- Надо помнить, что все качественные реакции – это реакции не собственно на белки, а на определенные аминокислоты, входящие в их состав.



Аминокислоты



- Основной структурной единицей белков служат а-аминокислоты. В состав большинства природных белков входит около 20 а-аминокислот.
- Качественные реакции служат как для определения принадлежности вещества к классу белков, так и для идентификации входящих в его состав аминокислот

Наиболее распространенные аминокислоты см. таблицу



АМИНОКИСЛОТЫ

Наиболее распространенные α -аминокислоты

Название (сокращение)	R	Тем- пе- ра- тура плав- ления, °C	Изо- элек- тричес- кая точка (pI)	pK_a
1	2	3	4	5
<i>Алифатические аминокислоты</i>				
Глицин (гли)	—H	293	5,97	2,34; 9,60
Аланин (ала)	—CH ₃	297	6,02	2,35; 9,69
Валин (вал)	—CH(CH ₃) ₂	315	5,97	2,32; 9,62
Лейцин (лей)	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	337	5,98	2,36; 9,60
Изолейцин (илей)	—CH—CH ₂ —CH ₃ CH ₃	284	6,02	2,36; 9,68
<i>Оксигаминокислоты</i>				
Серин (сер)	—CH ₂ OH	228	5,68	2,21; 9,15
Тreonин (тре)	—CH—CH ₃ OH	253	6,53	2,63; 10,43
<i>Дикарбоновые аминокислоты и их альды</i>				
Аспарагин- овая кислота (асп)	—CH ₂ COOH	270	2,97	2,09 (α -COOH), 3,86 (β -COOH); 9,82
Аспарагин (аспн)	—CH ₂ CONH ₂	236	5,41	2,02; 8,80
Глутамино- вая кислота (глу)	—CH ₂ CH ₂ COOH	249	3,22	2,19 (α -COOH), 4,25 (γ -COOH); 9,67
Глутамин (глун)	—CH ₂ CH ₂ CONH ₂	185	5,65	2,17; 9,13
<i>Двухосновные аминокислоты</i>				
Лизин (лиз)	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂	224	9,74	2,18; 8,95 (α -NH ₂), 10,53 (ϵ -NH ₂)
Аргинин (арг)	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ NHCNHNH ₂	238	10,76	2,17; 9,04 (α -NH ₂), 12,48 (ион гуанидиния)

1	2	3	4	5
Гистидин (гис)		277	7,58	1,82; 6,0 (имидазол), 9,17
<i>Ароматические аминокислоты</i>				
Фенилаланин (фен)	—CH ₂ C ₆ H ₅	275	5,98	1,83; 9,13
Тирозин (тир)	—CH ₂ —	344	5,65	2,20; 9,11 (α -NH ₂), 10,07 (-OH)
Триптофан (три)		282	5,88	2,38; 9,39
<i>Серосодержащие аминокислоты</i>				
Цистеин (цис-SH)	—CH ₂ SH	178 (хлор- гид- рат)	5,02	1,71; 8,33 (-SH), 10,78 (α -NH ₂)
Цистин (цис-S-S-цис)	—CH ₂ —S—S—CH ₂ —	260	5,06	1,65, 2,26 (COOH); 7,85, 9,85 (α -NH ₂)
Метионин (мет)	—CH ₂ CH ₂ —S—CH ₃	283	5,75	2,38; 9,39
<i>Иминокислоты</i>				
Пролин (про)		222	6,10	1,99; 10,60
Оксипролин (опро)		270	5,83	1,92; 9,73

[Вернуться](#)



Биуретовая реакция

- Определяет наличие пептидной связи в растворе исследуемого соединения.

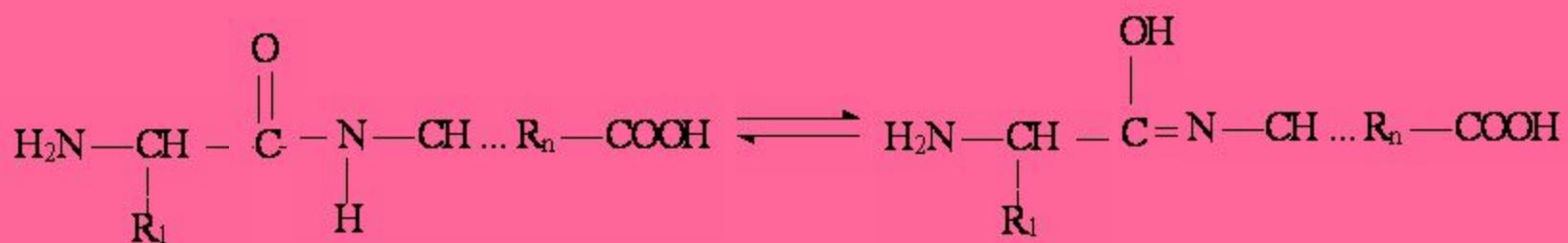


пептидная связь



Биуретовая реакция

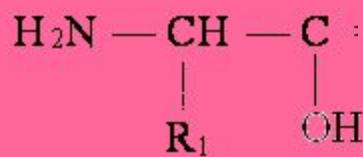
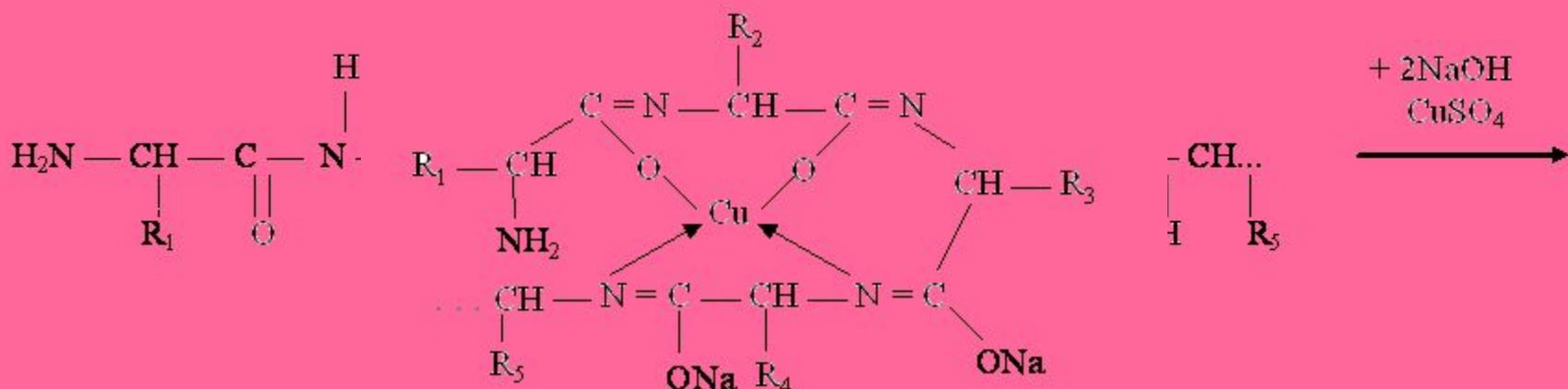
- Реакция обусловлена образованием биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка.
- В пептидах и белках пептидная связь обычно находится в амидной форме (или кетоформе), но в щелочной среде она переходит в иминольную (енольную):





Биуретовая реакция

- Биуретовая реакция протекает так:



Биуретовый медный комплекс
фиолетового цвета

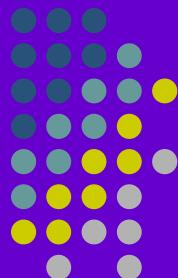
иминольная форма полипептида

[Вернуться](#)



Биуретовая реакция

[Вернуться](#)

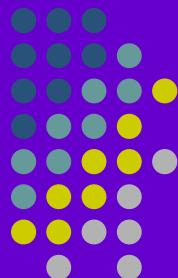


Нингидриновая реакция

Качественная реакция на α -аминокислоты

- Аминокислота с нингидрином образует продукт конденсации типа азометина





Нингидриновая реакция

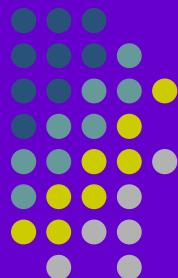
- путем перегруппировки



- и гидролиза

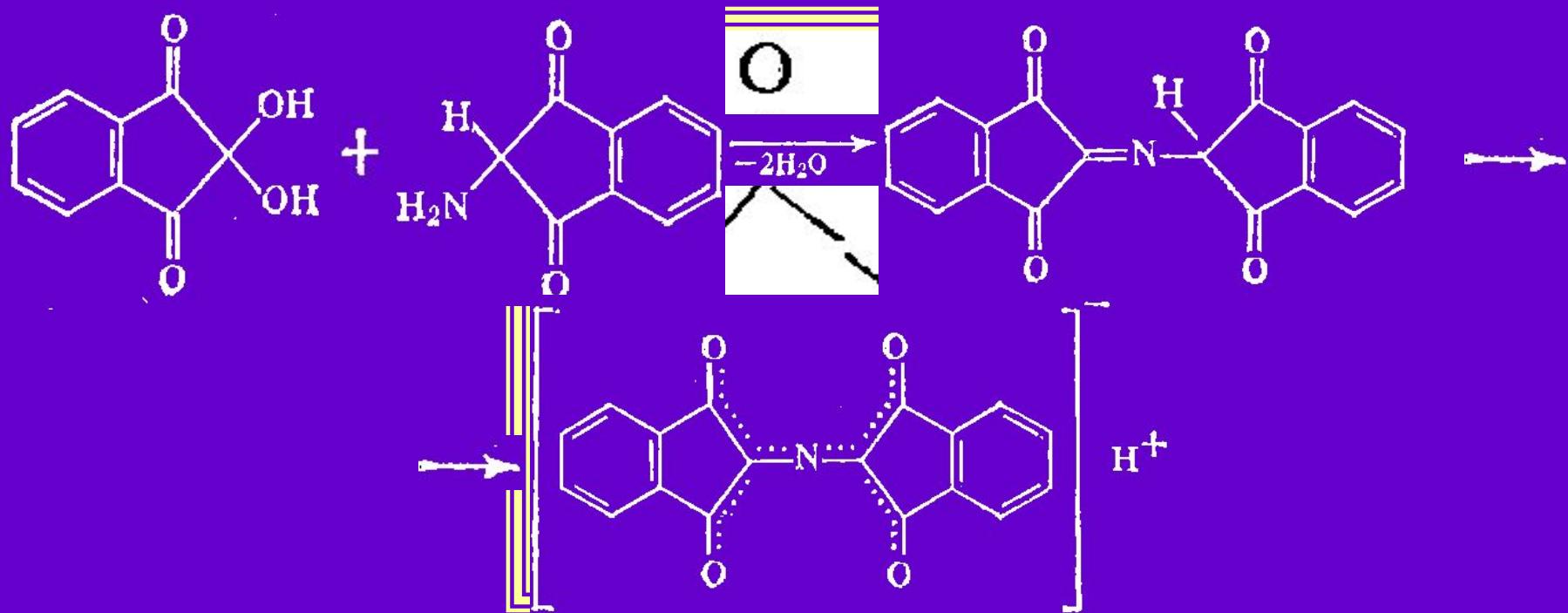


образуется 2-аминоиндандинон

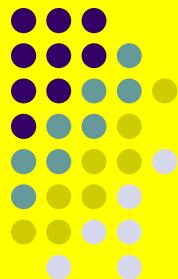


Нингидриновая реакция

- 2-аминоиндандион реагирует с нингидрином и дает краситель.



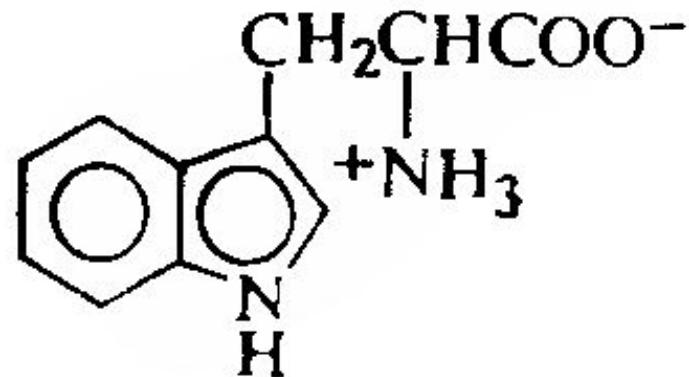
[Вернуться](#)

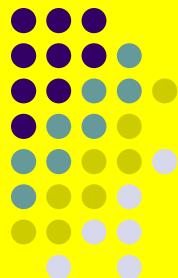


Ксантопротеиновая реакция

Определяет присутствие в белке ароматических и гетероциклических α - аминокислот :

- триптофана,
- фенилаланина,
- тирозина,
- гистидина.

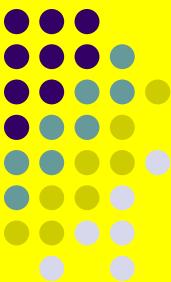




Ксантопротеиновая реакция



[Вернуться](#)

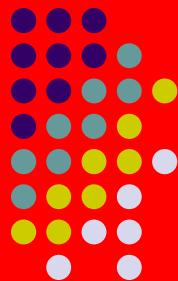


Ксантопротеиновая реакция

- При действии концентрированной HNO_3 на раствор белка образуется нитросоединение, окрашенное в желтый цвет.

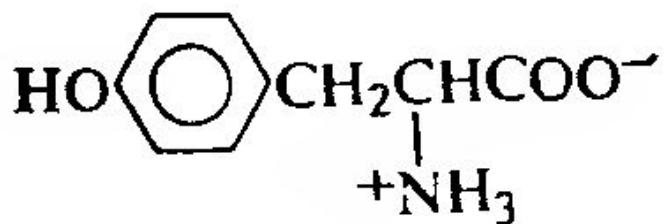


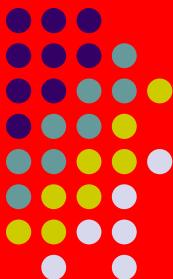
[Вернуться](#)



Реакция Миллона

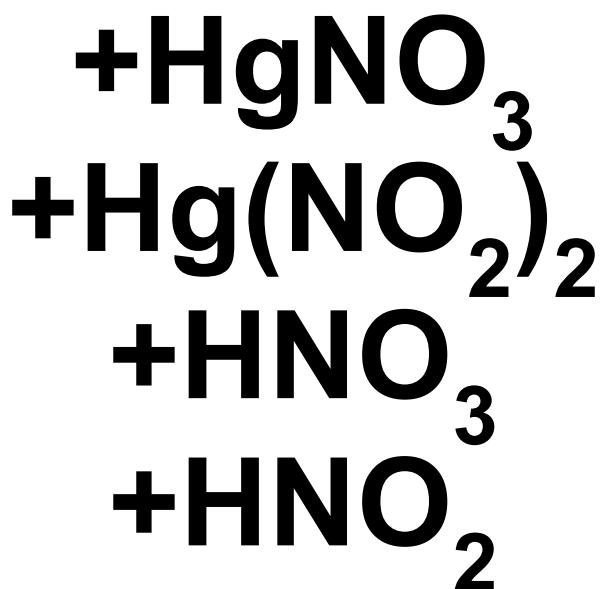
- Это реакция на аминокислоту тирозин





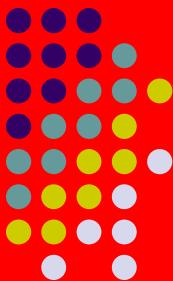
Реакция Миллона

- Реактив Миллона (раствор NaNO_3 и $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$ в разбавленном HNO_2) взаимодействует с аминами, образуя рутные соли нитропроизводных тирозина, окрашенных в розовато-красный цвет.



ей примесь
ном с
рашенной в

Рутные соли
нитропроизводного
тироцина.

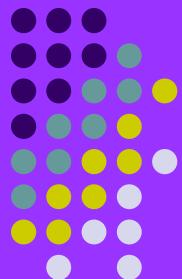


Рекомендации к проведению опыта

- К 2 мл концентрированного раствора тирозина прибавляют ~1 мл реактива Миллона
- встряхивают
- осторожно нагревают пробирки на пламени спиртовки.

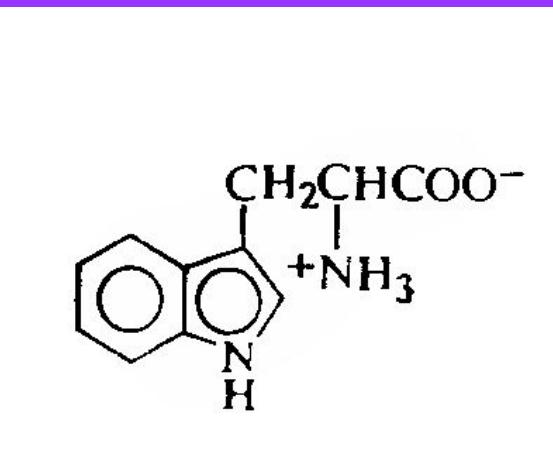
Образуется красное окрашивание.

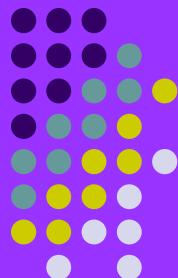




Реакция Гопкинса–Коле

- Эта реакция определяет аминокислоту триптофан.

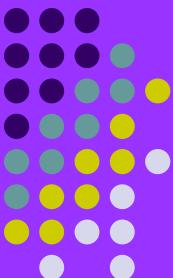




Реакция Гопкинса–Коле

- Из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты сначала получается формальдегид:



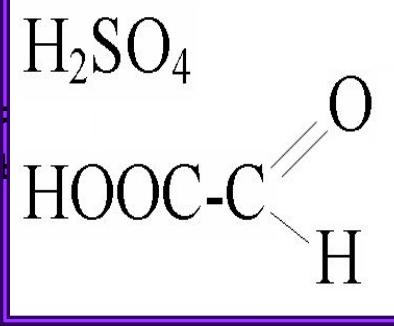


Реакция Гопкинса–Коле

- формальдегид затем конденсируется с триптофаном:



• Продукт конденсации окисляется, который в присутствии минералов окрашенные в сине-фиолетовый

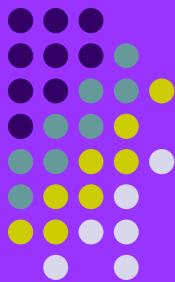


офанилкарбинола,
взует соли,



[Вернуться](#)

Рекомендации к проведению опыта

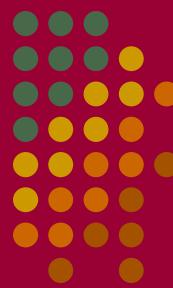


- Охладить до 0 °С насыщенного раствора щавелевой кислоты
- К 2 г порошка магния (слегка увлажненного) добавить щавелевую кислоту
- Полученный осадок оксалата магния отфильтровать и декантировать небольшим количеством воды.
- Фильтрат подкислить уксусной кислотой и довести до объема 200 мл (полученный раствор хранить в холодильнике!). Это и есть глиоксиловая кислота.
- 1 мл 0,005%-го раствора триптофана смешать с равным объемом глиоксиловой кислоты и к смеси прибавляют 10 капель раствора сульфата меди(II).
- Небольшими порциями добавляют 2–3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку после приливания очередной порции кислоты током холодной воды (или в ванночке со льдом).
- Полученную смесь оставляют на 10 мин при комнатной температуре, после чего ставят на 5 мин в кипящую водяную баню.

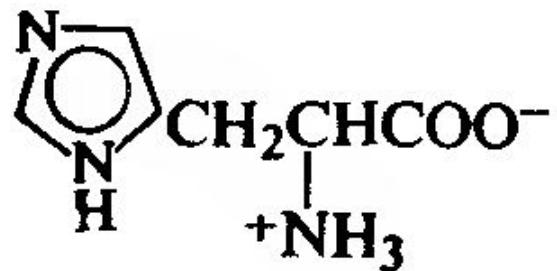
Наблюдается образование сине-фиолетового окрашивания

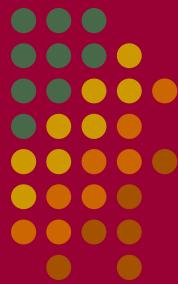


Реакция Паули (Диазореакция Паули)



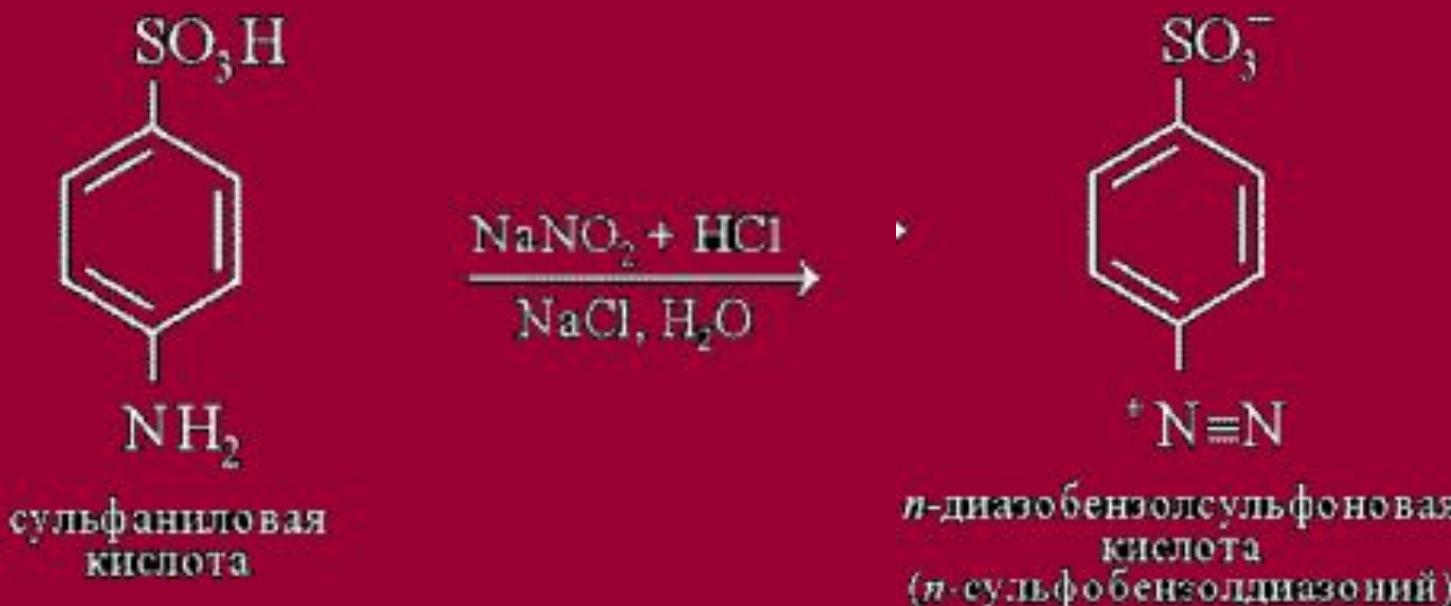
Эта реакция
аминокислоту
гистидин.

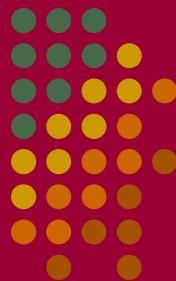




Реакция Паули (Диазореакция Паули)

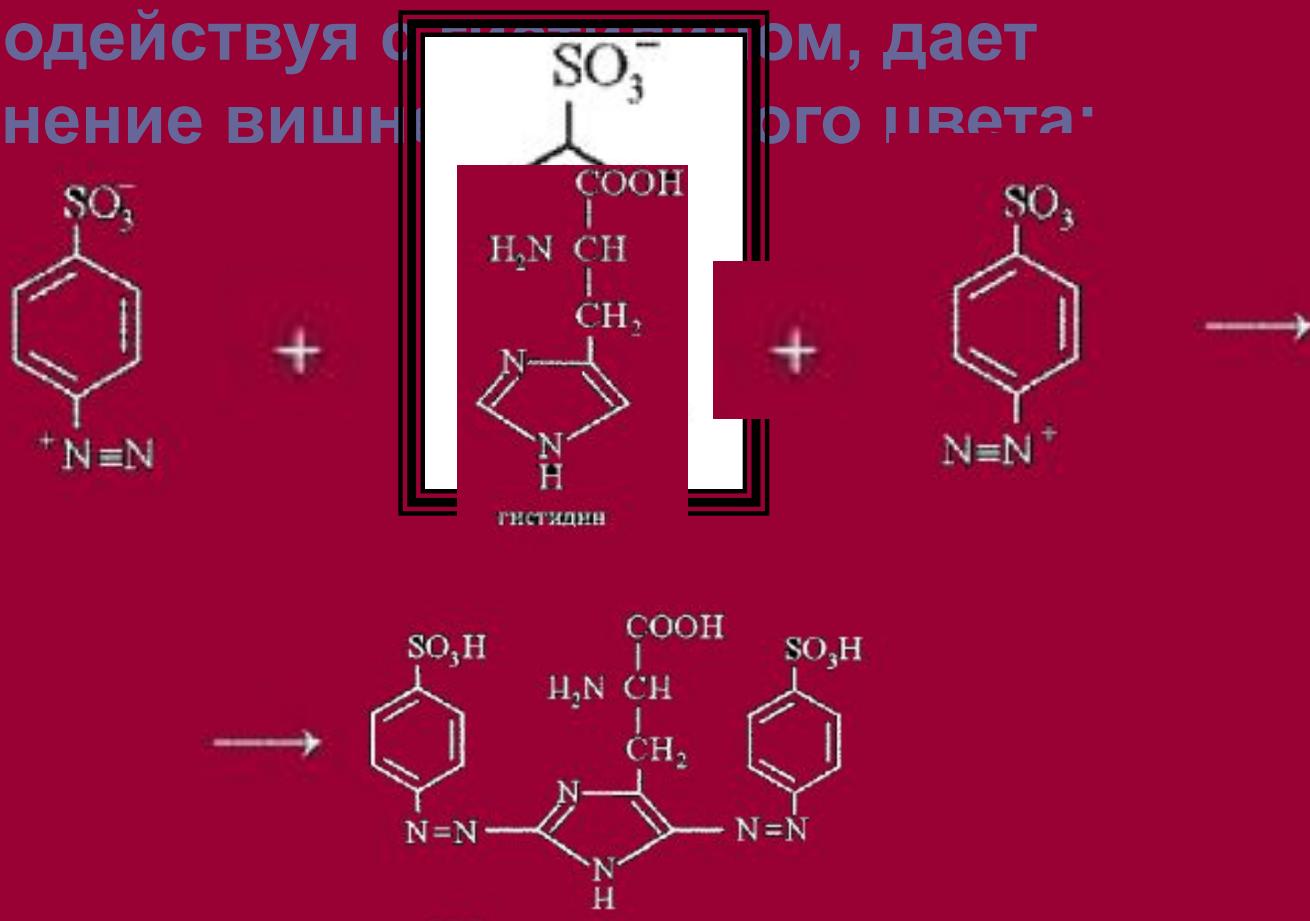
- при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия образуется диазобензолсульфоновая кислота:





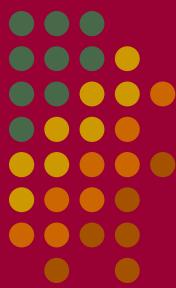
Реакция Паули (Диазореакция Паули)

- Диазобензолсульфоновая кислота, взаимодействуя с гистидином, дает соединение вишнево-красного цвета.



[Вернуться](#)

Рекомендации к проведению опыта



- В пробирку наливают 1 мл 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5%-м растворе соляной кислоты.
 - Прибавляют 2 мл 0,5%-го раствора нитрита натрия
 - Сильно встряхивают
 - Немедленно приливают 2 мл 0,01%-го раствора гистидина
 - После перемешивания содержимого пробирки сразу приливают 6 мл 10%-го раствора соды.
- Появляется интенсивная вишнево-красная окраска.

