Цветные реакции белков

Качественные реакции на остатки аминокислот

Указатель реакций

- Биуретовая

a) Уравнение реакции

b) Проведение опыта

- Нингидриновая
- Ксантопротеиновая

a) Уравнение реакции

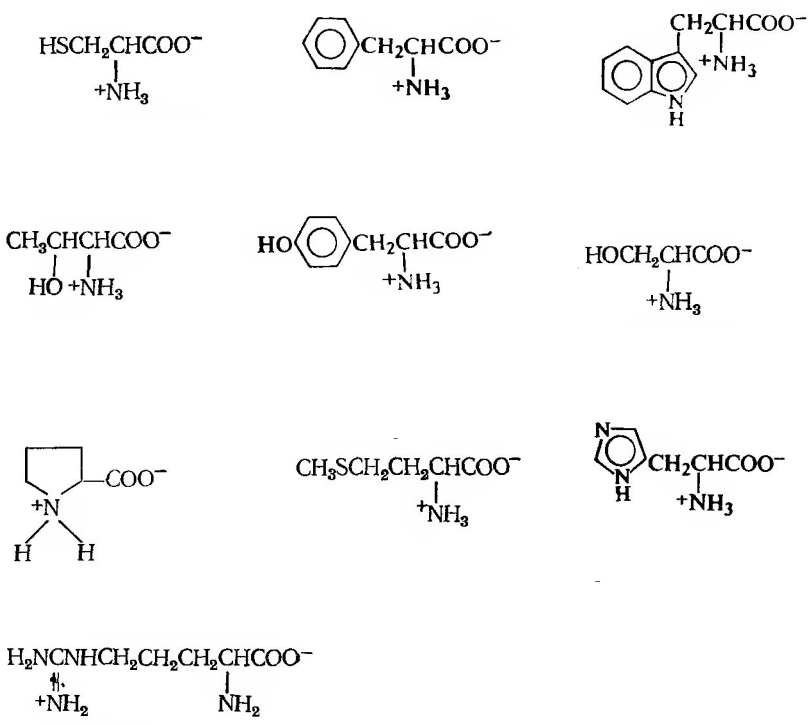
b) Проведение опыта

- 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

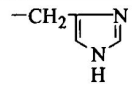
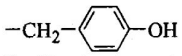
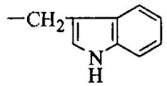
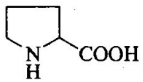
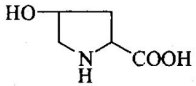


- Основной структурной единицей белков служат а-аминокислоты. В состав большинства природных белков входит около 20 а-аминокислот.
- Качественные реакции служат как для определения принадлежности вещества к классу белков, так и для идентификации входящих в его состав аминокислот

Наиболее распространенные аминокислоты см. таблицу

Аминокислоты

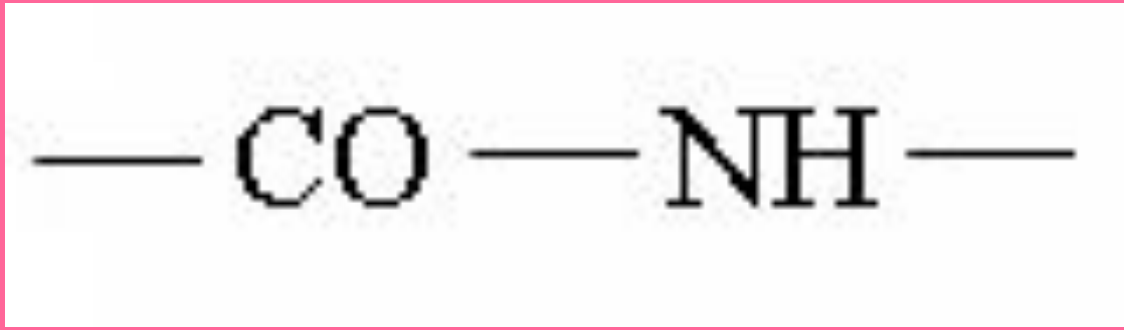
Наиболее распространенные α-аминокислоты

Название (сокращение)	R	Температура плавления, °C	Изоэлектрическая точка (pI)	pK_a
1	2	3	4	5
Алифатические аминокислоты				
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)	$-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	284	6,02	2,36; 9,68
Оксиаминокислоты				
Серин (сер)	$-CH_2OH$	228	5,68	2,21; 9,15
Треонин (тре)	$-CH(OH)-CH_3$	253	6,53	2,63; 10,43
Дикарбоновые аминокислоты и их амиды				
Аспарагиновая кислота (асп)	$-CH_2COOH$	270	2,97	2,09 (α-COOH), 3,86 (β-COOH); 9,82
Аспарагин (аспн)	$-CH_2CONH_2$	236	5,41	2,02; 8,80
Глутаминовая кислота (глу)	$-CH_2CH_2COOH$	249	3,22	2,19 (α-COOH), 4,25 (γ-COOH); 9,67
Глутамин (глун)	$-CH_2CH_2CONH_2$	185	5,65	2,17; 9,13
Двухосновные аминокислоты				
Лизин (лиз)	$-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$	224	9,74	2,18; 8,95 (α-NH_2), 10,53 (ε-NH_2)
Аргинин (арг)	$-CH_2CH_2CH_2NHC(=NH)NH_2$	238	10,76	2,17; 9,04 (α-NH_2), 12,48 (ион гуанидиния)
Гистидин (гис)		277	7,58	1,82; 6,0 (имидазол), 9,17
Ароматические аминокислоты				
Фенилаланин (фен)	$-CH_2C_6H_5$	275	5,98	1,83; 9,13
Тирозин (тир)		344	5,65	2,20; 9,11 (α-NH_2), 10,07 (–OH)
Триптофан (три)		282	5,88	2,38; 9,39
Серосодержащие аминокислоты				
Цистеин (цис-SH)	$-CH_2SH$	178 (хлоргидрат)	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)	$-CH_2CH_2-S-CH_3$	283	5,75	2,38; 9,39
Иминокислоты				
Пролин (про)		222	6,10	1,99; 10,60
Оксипролин (опро)		270	5,83	1,92; 9,73

Вернуться

Биуретовая реакция

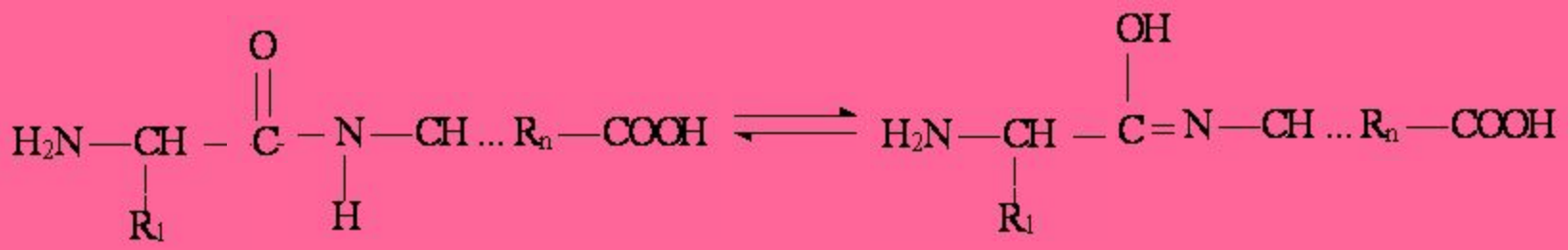
- **Определяет наличие пептидной связи в растворе исследуемого соединения.**



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:**

Вернуться

Биуретовая реакция

Вернуться

Нингидриновая реакция

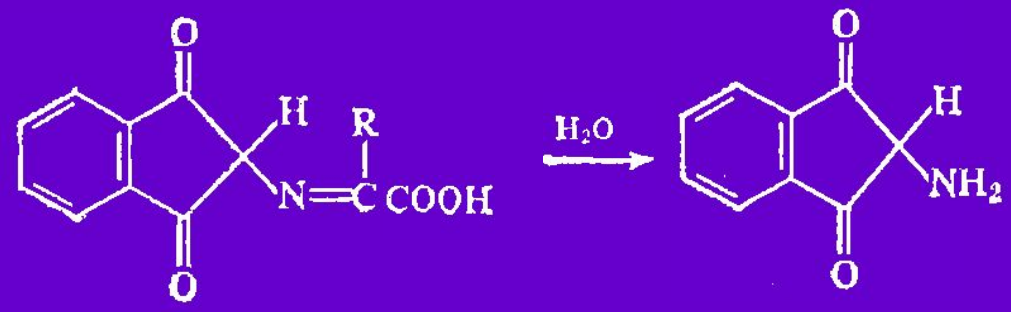
Качественная реакция на α -аминокислоты

- **Аминокислота с нингидрином образует продукт конденсации типа азометина**

Нингидриновая реакция

- путем перегруппировки

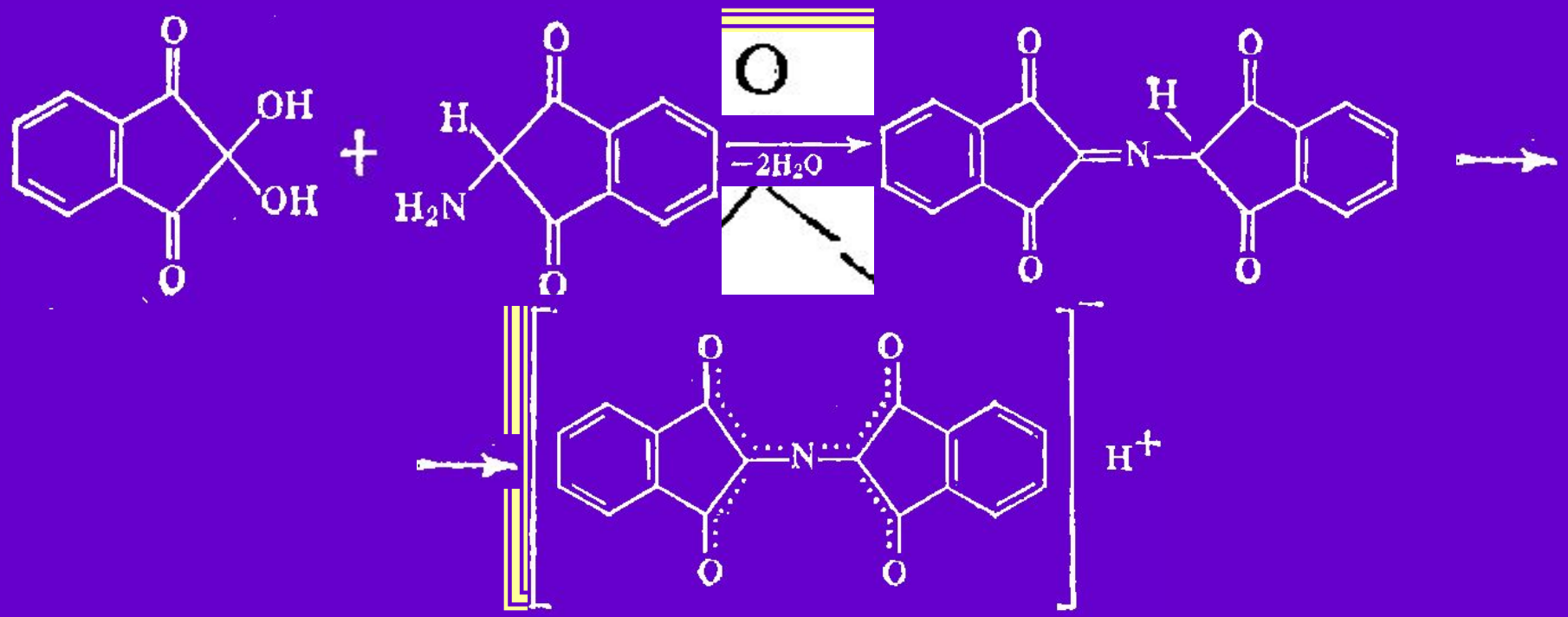
- и гидролиза



образуется 2-аминоиндандион

Нингидриновая реакция

- 2-аминоиндандион реагирует с нингидрином и дает краситель.

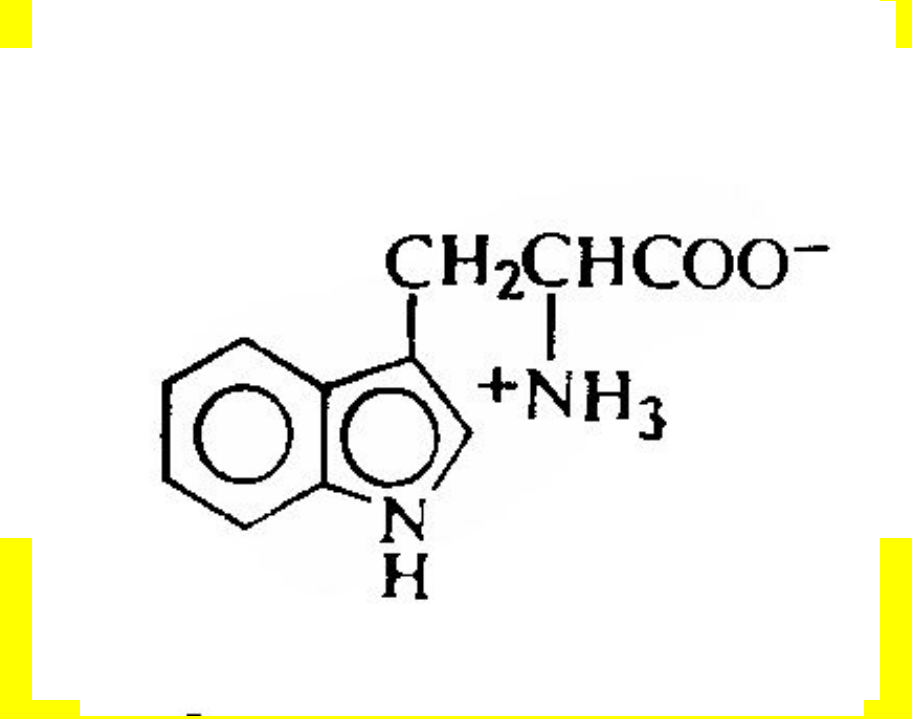


Вернуться

Ксантопротеиновая реакция

Определяет присутствие в белке ароматических и гетероциклических α - аминокислот :

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



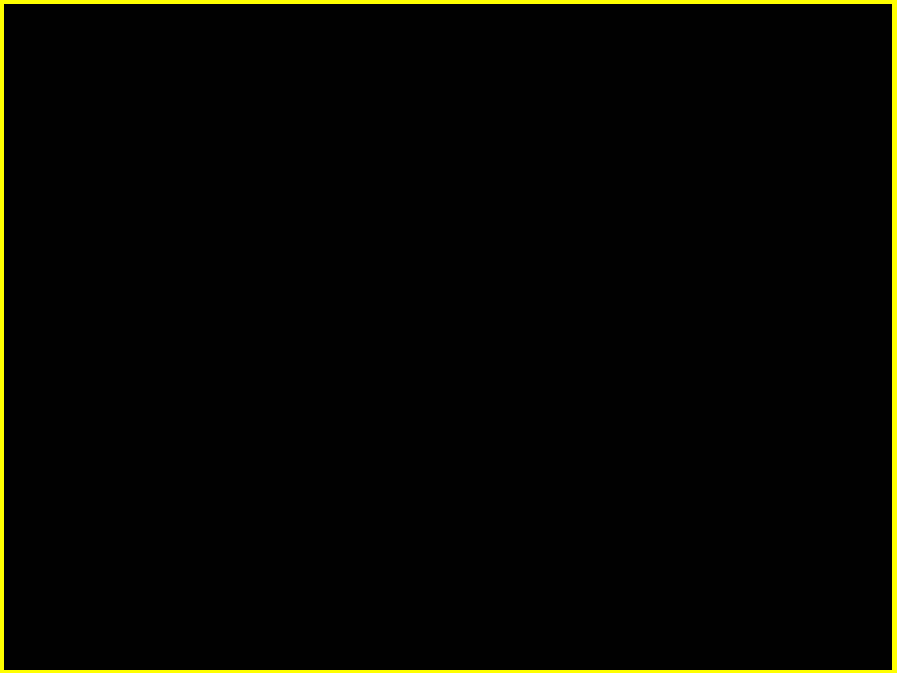
Ксантопротеиновая реакция

$+HNO_3$

Вернуться

Ксантопротеиновая реакция

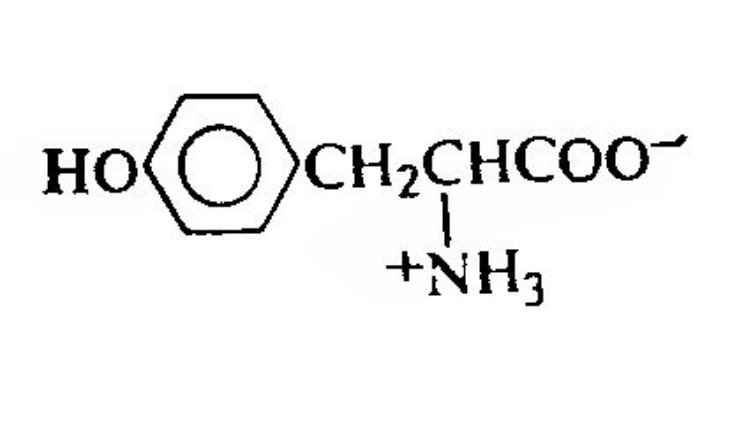
- При действии концентрированной HNO_3 на раствор белка образуется нитросоединение, окрашенное в желтый цвет.



Вернуться

Реакция Миллона

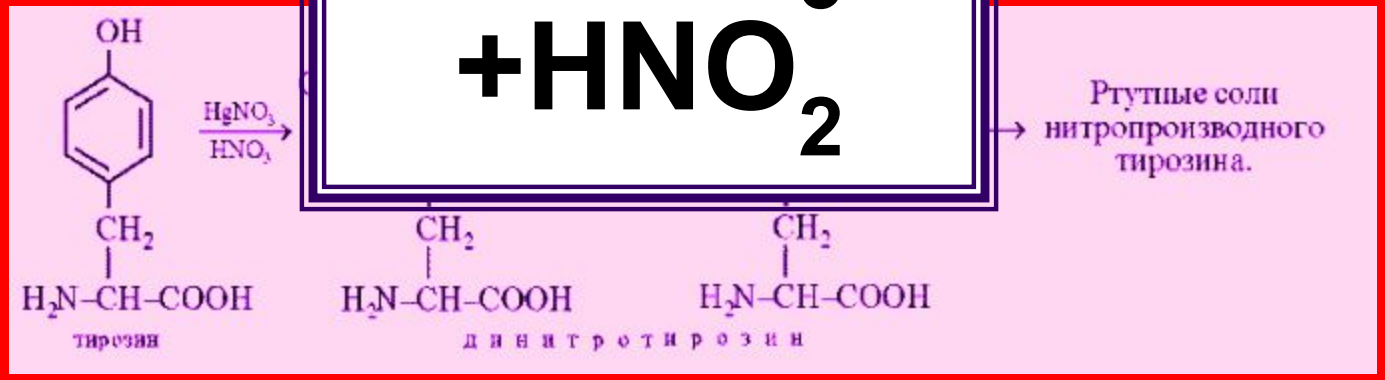
- **Это реакция на аминокислоту тирозин**



Реакция Миллона

- Реактив Миллона (раствор HgNO3 и Hg(NO2)2 в разбавленн ей примесь HNO2) взаимо ном с образование нитропроизво рашенной в розовато-кра

$$+HgNO_3$$
$$+Hg(NO_2)_2$$
$$+HNO_3$$
$$+HNO_2$$



Вернуться

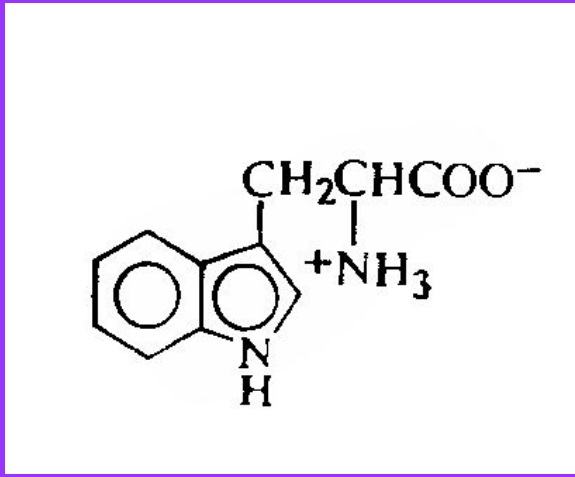
Рекомендации к проведению опыта

- 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.**



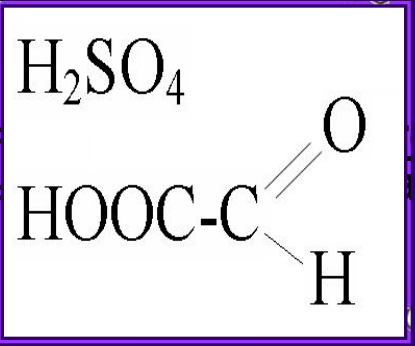
Реакция Гопкинса–Коле

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

Реакция Гопкинса–Коле

- формальдегид затем конденсируется с триптофаном:

H_2SO_4



- Продукт конденсации окисляется [illegible] **<u>офанилкарбинола</u>**, который в присутствии минерал[illegible] **зует соли, окрашенные в сине-фиолетовый**

Вернуться

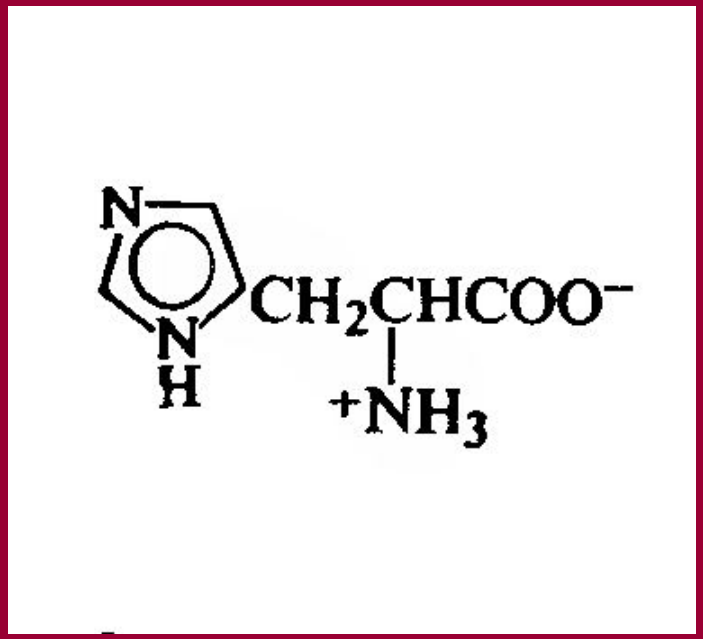
Рекомендации к проведению опыта

- 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

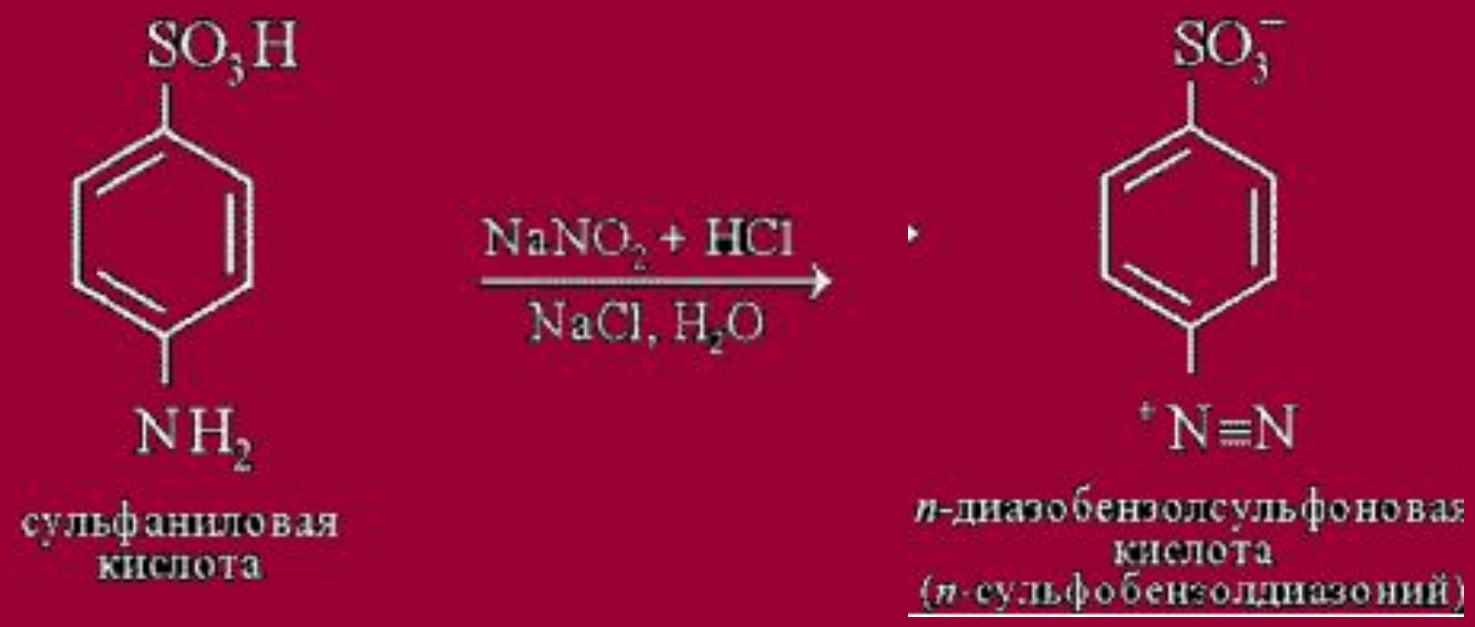
Реакция Паули (Диазореакция Паули)

Эта реакция аминокислоту гистидин.



Реакция Паули (Диазореакция Паули)

- при взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом натрия образуется <u>диазобензолсульфоновая</u> кислота:



Реакция Паули (Диазореакция Паули)

- <u>Диазобензолсульфоновая</u> кислота, взаимодействуя с гистидином, дает соединение вишнёвого 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.