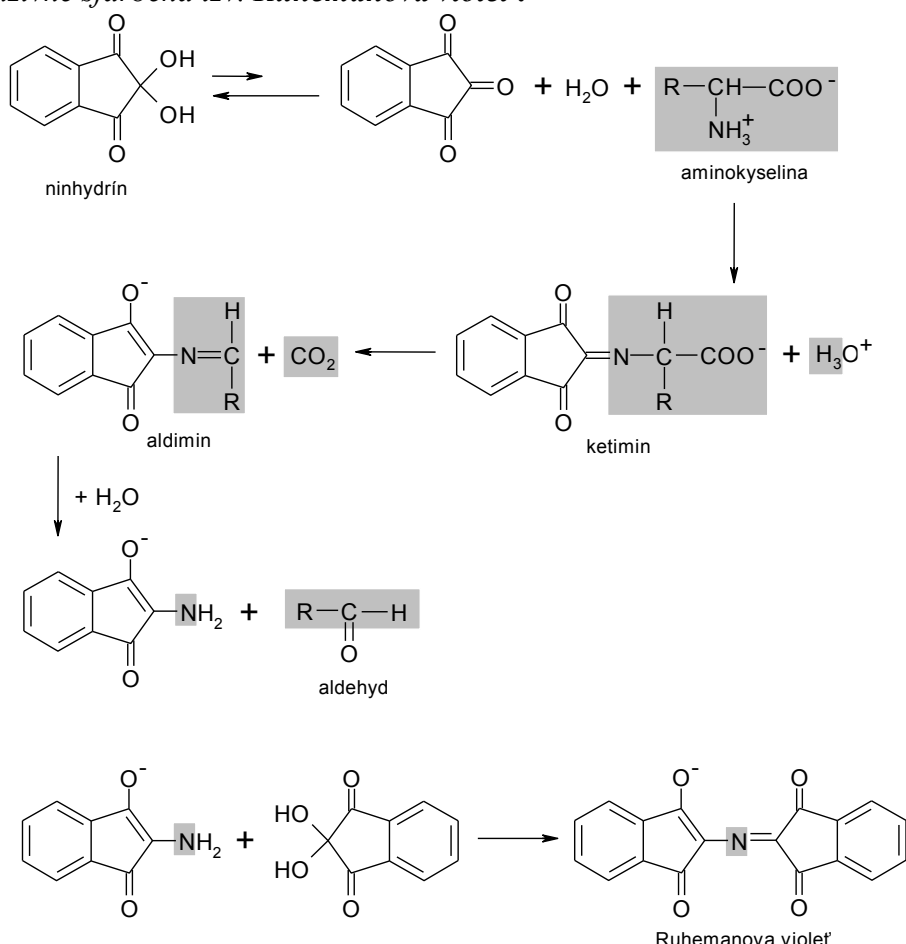
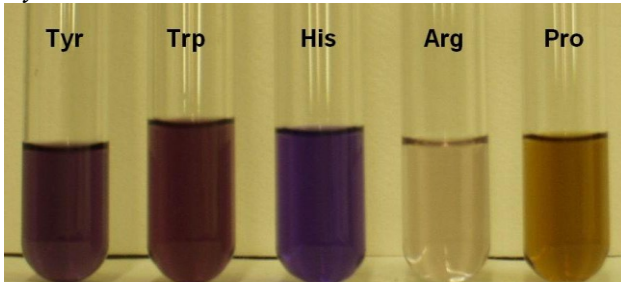
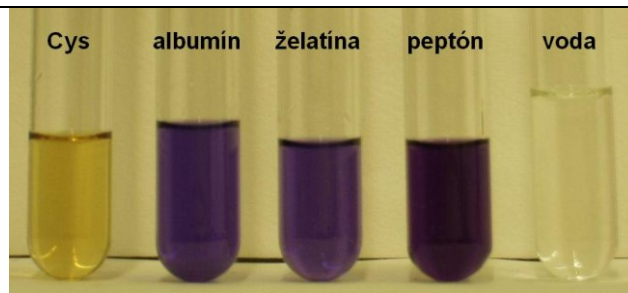


TÉMA	BIELKOVINY
Úloha 1:	Reakcie na dôkaz aminokyselín a bielkovín
	1. Ninhydrínová reakcia
Princíp:	<p>Reakcia, ktorá slúži na dôkaz $-NH_2$ (amino) skupín aminokyselín, peptidov a bielkovín. V prvej fáze reakcie sa vytvorí Schiffova báza (ketimin), ktorá sa potom oxidačne dekarboxyluje za vzniku aldiminu. Ten hydrolyzuje na nestálu formu amínu, ktorá reaguje s ďalšou molekulou ninhydrínu a vzniká (zvyčajne) intenzívne sfarbená tzv. Ruhemanova violet':</p>  <p>The reaction scheme illustrates the following steps:</p> <ol style="list-style-type: none"> Ninhydrin (a cyclic imide) reacts with an amino acid (represented as $R-CH(NH_3^+)COO^-$) to form ketimin, water, and the amino acid residue. The amino acid residue is highlighted in grey. Ketimin undergoes oxidative decarboxylation, releasing CO_2 and H_3O^+ to form aldimin. The ketimin structure is highlighted in grey. Aldimin reacts with water to form an unstable amine intermediate and an aldehyde ($R-C(=O)H$). The aldehyde is highlighted in grey. The unstable amine intermediate reacts with a second molecule of ninhydrin to form Ruhemanova violet', a highly colored product. The amine intermediate is highlighted in grey. <p>* šedou farbou sú zvýraznené tie atómy a molekuly, ktoré pochádzajú z pôvodnej aminokyseliny.</p> <p>Prehľad farebných produktov v závislosti od použitej aminokyseliny a bielkoviny je znázornený na obrázku 1.6.</p> 

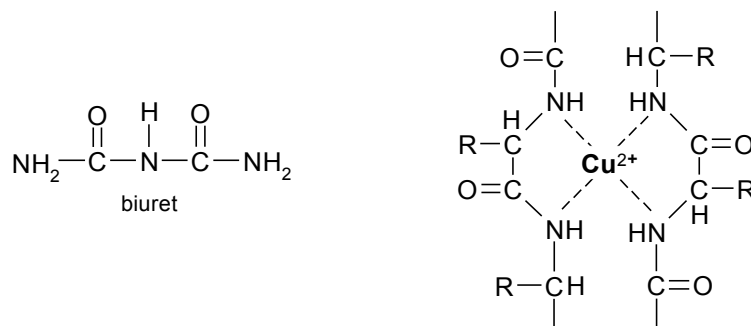


Obrázok 1.6 Ninhydrínová reakcia (nešpecifická reakcia na aminokyseliny, peptidy a bielkoviny)

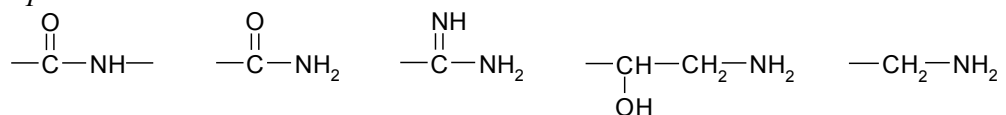
2. Biuretova reakcia

Princíp:

Biuretova reakcia je všeobecný test na dôkaz peptidov a bielkovín, teda látok obsahujúcich peptidové väzby ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Je pomenovaná podľa zlúčeniny biuret, ktorá dáva rovnaké fialové sfarbenie ako bielkoviny a peptidy. Fialová farba je dôsledkom vzniku komplexnej zlúčeniny medzi mednatými iónmi a amidovými skupinami v peptidoch a bielkovinách:

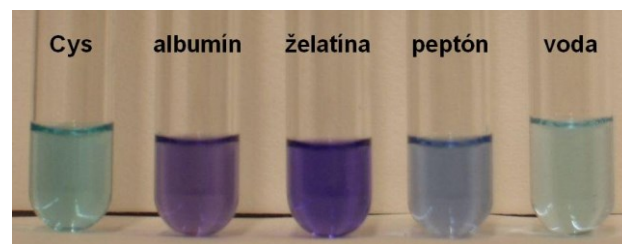


Podobné sfarbenie dávajú aj zlúčeniny, ktoré obsahujú dve alebo viac z týchto skupín:



Z toho je zrejmé, že aj roztoky aminokyselín obsahujúcich niektorú z uvedených skupín môžu dávať pozitívnu reakciu.

Farebné produkty v závislosti od skúmanej látky sú znázornené na obrázku 1.7, kde pozitívnu reakciu dávajú albumín, želatína a peptón (reakcia s Cys a vodou je negatívna).

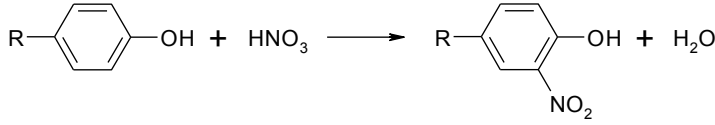
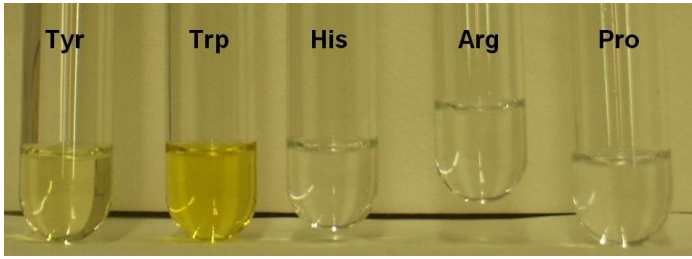
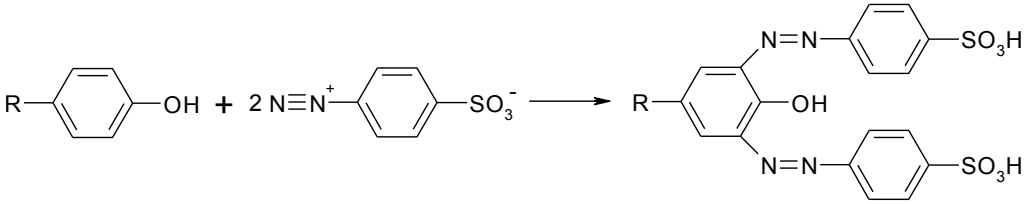
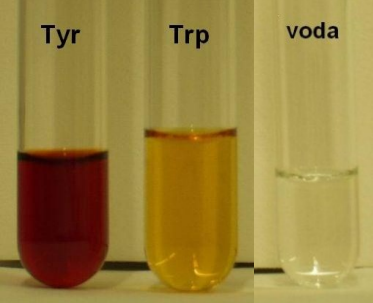
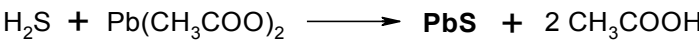
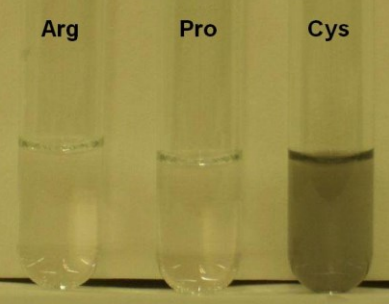


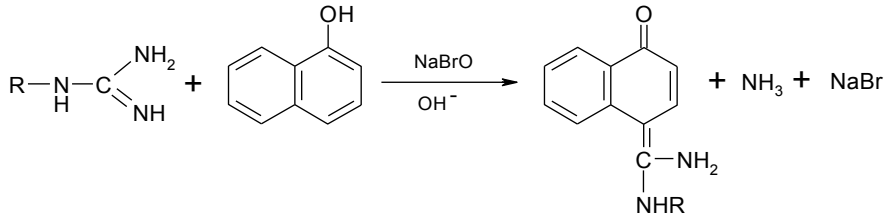
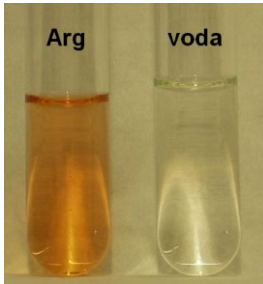
Obrázok 1.7 Biuretova reakcia

3. Precipitačné reakcie bielkovín

Princíp:

Bielkoviny môžu precipitovať (zrážať sa) účinkom **tepla, alkoholu, anorganických kyselín alebo solí ťažkých kovov**. Pri tomto procese prechádzajú z tzv. natívneho stavu (funkčná forma bielkoviny s charakteristickou sekundárnou a terciárnou štruktúrou) do denaturovaného stavu, kedy dochádza k porušeniu nekovalentných interakcií, ktoré stabilizujú sekundárnu a terciárnu štruktúru bielkoviny. V mnohých prípadoch takéto denaturované bielkoviny v dôsledku

	<i>zmeny rozpustnosti precipitujú.</i>
	4. Xanthoproteínová reakcia
Princíp:	<p>Nitráciou aromatických aminokyselín (Phe, Tyr, Trp) koncentrovanou kyselinou dusičnou vznikajú žlté sfarbené produkty (gréč. xanthos = žltý).</p> $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} + \text{HNO}_3 \longrightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{NO}_2) + \text{H}_2\text{O}$   <p>Obrázok 1.8 Xanthoproteínová reakcia</p>
	5. Ehrlichova reakcia
Princíp:	<p>Látky s imidazolovou alebo fenolovou skupinou (His, Tyr, histamín, tyramín, adrenalín) sa vyznačujú kopuláciou s diazotovanou kyselinou sulfanilovou za vzniku červeného diazofarbiva:</p> $\text{R}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} + 2 \text{N} \equiv \text{N}^+ - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SO}_3^- \longrightarrow \text{R}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})(\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{H})_2$   <p>Obrázok 1.9 Ehrlichova reakcia</p>
	6. S–Pb reakcia
Princíp:	<p>Cys a bielkoviny obsahujúce Cys uvoľňujú pôsobením hydroxidov za tepla sírovodík, ktorý možno dokázať reakciou s octanom olovnatým, pričom vzniká čierna zrazenina sulfidu olovnateho:</p> $\text{H}_2\text{S} + \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \longrightarrow \text{PbS} + 2 \text{CH}_3\text{COOH}$   <p>Obrázok 1.10 S–Pb reakcia</p>

7. Sakaguchiho reakcia	
Princíp:	<p><i>Guanidínové deriváty (Arg, metylguanidín, agmatín) sa oxidujú brómnanom sodným v prítomnosti α-naftolu za vzniku ružovo príp. červeno sfarbeného produktu:</i></p> $\text{R}-\text{N}(\text{H})-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH} + \text{C}_6\text{H}_4(\text{OH}) \xrightarrow[\text{OH}^-]{\text{NaBrO}} \text{C}_6\text{H}_4(\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NHR}) + \text{NH}_3 + \text{NaBr}$   <p style="text-align: center;">Obrázok 1.11 Sakaguchiho reakcia</p>
Reagencie:	<ol style="list-style-type: none"> 1. 0,1 % roztoky aminokyselín Arg, Cys, Pro, Trp, Tyr 2. 1 % roztok ľudského albumínu 3. 1 % roztok želatíny (tepelne upravená forma kolagénu) 4. 1 % ninhydrínové činidlo (2 g ninhydrínu rozpustíme v 20 ml 96 % etanolu a doplníme destilovanou vodou na objem 200 ml) 5. biuretové činidlo (9 g vínanu sodnodraselného rozpustíme v 40 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného, pridáme 1 g CuSO_4 a 1 g KI. Roztok doplníme roztokom hydroxidu sodného na objem 200 ml.) 6. koncentrovaná kyselina dusičná 7. 0,5 % roztok kyseliny sulfanilovej v 2 % kyseline chlorovodíkovej 8. 0,5 % roztok dusitanu sodného 9. 10 % roztok hydroxidu sodného 10. 5 % roztok octanu olovnatého 11. brómová voda 12. 0,02 % etanolový roztok α-naftolu
Materiál:	sada hrubostenných skúmaviek, stojan na skúmavky, mikropipety, vodný kúpeľ (hrniec s vodou), varič, laboratórna trepačka
Postup:	<p>Každá z ôsmich očíslovaných skúmaviek v stojane obsahuje zásobný roztok jednej z nasledujúcich látok: Arg, Cys, Pro, Trp, Tyr, albumín, želatína a destilovaná voda.</p> <p>Do prvých ôsmich prázdnych skúmaviek (nezabudneme si ich očíslovať) napipetujeme po 2 ml z uvedených zásobných roztokov. Do každého z nich pridáme 0,5 ml ninhydrínového činidla. Roztoky v skúmavkách premiešame (opatrným pretrepaním pomocou laboratórnej trepačky) a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. Po vybratí a vychladnutí skúmaviek zaznamenáme jednotlivé zafarbenia roztokov. Výsledkom ninhydrínovej reakcie je vznik farebného produktu, a to v širokom rozmedzí farieb od žltej cez hnedú až po fialovú v závislosti od skúmanej látky. Ninhydrínová reakcia je negatívna pre vodu, ktorú možno týmto spôsobom odlišiť od ostatných roztokov.</p> <p>Do ďalších ôsmich skúmaviek znova napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov skúmaných látok. Do každej z nich pridáme 1 ml biuretového činidla,</p>

	<p>premiešame a zaznamenáme zafarbenia roztokov. Biuretovou reakciou odlišíme roztok albumínu a želatíny od roztokov aminokyselín.</p> <p>Na jednoznačné odlišenie albumínu (bielkovina s natívnou štruktúrou) od želatíny (hydrolyzovaná bielkovina kolagén) využijeme test na precipitáciu bielkoviny účinkom vysokej teploty. Do dvoch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré boli pozitívne na biuretovú reakciu a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. V roztoku s albumínom pozorujeme bielu zrazeninu. Roztok želatíny zostáva číry.</p> <p>Do ďalších piatich skúmaviek napipetujeme po 2 ml z roztokov, ktoré zatiaľ neboli priradené. Do každého z nich pridáme 0,5 ml koncentrovanej HNO₃, zamiešame a zaznamenáme farebné zmeny. V prípade, že nedochádza k žiadnej farebnej zmene, ponoríme skúmavky na 2 – 4 min do vodného kúpeľa. Pozitívnu xanthoproteínovú reakciu dávajú aminokyseliny Tyr a Trp.</p> <p>Ich dôkaz nám potvrdí Ehrlichova reakcia. Do dvoch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré boli pozitívne na xanthoproteínovú reakciu. Do osobitnej skúmavky napipetujeme 2 ml 0,5 % kyseliny sulfanilovej a 2 ml 0,5 % dusitanu sodného. Roztok dobre premiešame a odpipetujeme po 1 ml do pripravených dvoch skúmaviek s aminokyselinami. Obe skúmavky premiešame a pridáme po 1 ml 10 % NaOH. V skúmavke s Tyr pozorujeme vznik červeno sfarbeného produktu. Roztok s Trp sa sfarbí na žlté až oranžovo. Ak ani v jednej zo skúmaviek nevzniká červené sfarbenie, pridáme do oboch ešte po 1 ml 10 % NaOH.</p> <p>Na dôkaz Cys využijeme S–Pb reakciu. Do troch skúmaviek napipetujeme po 1 ml zo zásobných roztokov, ktoré zatiaľ neboli určené. Do každej z nich pridáme po 2 ml 10 % NaOH a 2 – 4 kvapky 5 % octanu olovnatého. Premiešame a ponoríme na 5 – 10 min do horúceho vodného kúpeľa. Pozorujeme vznik sivého produktu v jednom z roztokov, čo dokazuje prítomnosť Cys.</p> <p>Na rozlíšenie Arg od Pro využijeme Sakaguchiho reakciu. Do dvoch skúmaviek odpipetujeme po 2 ml z posledných dvoch neurčených zásobných roztokov a pridáme k nim po 0,5 ml 10 % NaOH, 4 – 6 kvapiek α-naftolu a 2 – 4 kvapky brómovej vody. Roztok s Arg sa sfarbí na ružovo.</p>
Pozorovanie:	Zaznamenáme zafarbenia roztokov v závislosti od použitej reakcie.
Záver:	Ku každej očíslovanej skúmavke s príslušným roztokom priradíme aminokyselinu, resp. bielkovinu.