

7

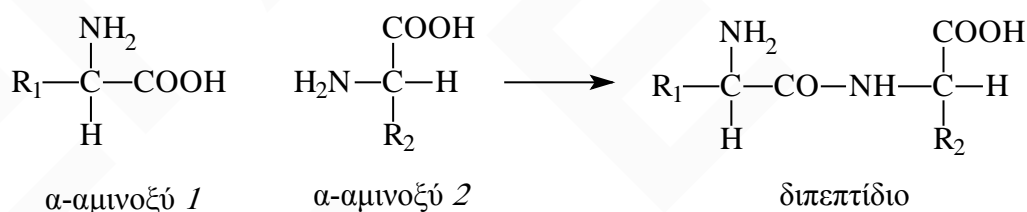
Χαρακτηριστικές χημικές αντιδράσεις των πρωτεϊνών

Στόχος της άσκησης: Κατανόηση της χημικής σύστασης των πρωτεϊνών. Η εξοικείωση με σημαντικές ιδιότητες των πρωτεϊνών και αμινοξέων: παρουσία των ιοντικών μορφών και οπτική στροφική ικανότητα. Η εξοικείωση με απλά τεστ-χημικές αντιδράσεις μέσω των οποίων ανιχνεύεται η παρουσία πρωτεϊνικών υλικών σε ένα δείγμα

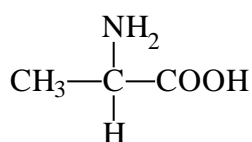
1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Οι πρωτεΐνες είναι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και βρίσκονται παντού στο ζωικό και φυτικό βασίλειο. Ο ρόλος τους σχετίζεται τόσο με τη δομή, όσο και με τη δράση στο περιβάλλον των κυττάρων όπου ανήκουν. Στα κύτταρα έχουν την ευθύνη της ακεραιότητας και της λειτουργίας των οργanelλών. Άλλοτε πάλι, ως ένζυμα, καταλύουν συγκεκριμένες βιοχημικές αντιδράσεις. Πολλά υλικά όπως το αυγό και η ζωική κόλλα, αλλά και μεγάλο πλήθος αντικειμένων με τα οποία ασχολείται ένας συντηρητής, όπως τα οστά και το δέρμα, είναι πρωτεϊνικής φύσεως.

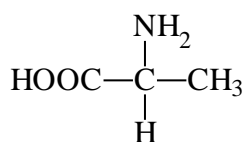
Οι πρωτεΐνες σχηματίζονται από τη συνένωση απλούστερων μορίων, των α-αμινοξέων, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διπεπτιδίου. Με μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων σχηματίζονται τα ολιγοπεπτίδια. Οι πρωτεΐνες μπορούν να οριστούν ως τα πεπτίδια μεγάλου μοριακού βάρους (μερικών χιλιάδων) που απαντούν στην φύση



Το κεντρικό άτομο άνθρακα κάθε α-αμινοξέος (εκτός από την περίπτωση που R=H) περιβάλλεται από τέσσερις διαφορετικούς υποκατάστατες, δηλαδή είναι *ασύμμετρο*. Οι ενώσεις που έχουν ασύμμετρα άτομα άνθρακα ονομάζονται και *οπτικά ενεργές*, επειδή έχουν την ικανότητα να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός κατά μια συγκεκριμένη γωνία. Όλες οι οπτικά ενεργές ενώσεις, και συνεπώς και τα α-αμινοξέα, μπορούν να υπάρχουν με τη μορφή δυο οπτικών αντίποδων οι οποίοι στερεοχημικά έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου, και χαρακτηρίζονται ως **L** ή **R**. Από τους αντίποδες αυτούς, ο ένας είναι αριστερόστροφος (-) και ο άλλος δεξιόστροφος (+). Για παράδειγμα η αλανίνη, θα βρίσκεται με τις δυο παρακάτω μορφές (οπτικούς αντίποδες):



L(-)-α-αλανίνη

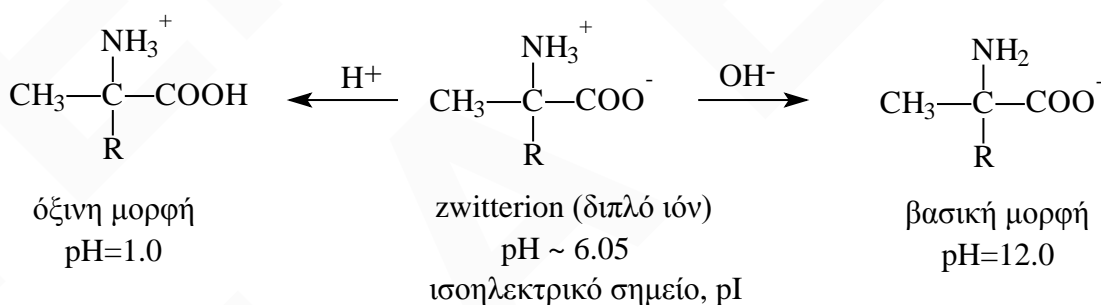


D(+)-α-αλανίνη

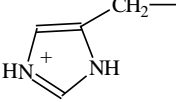
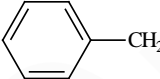
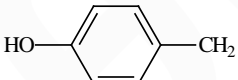
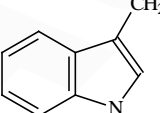
Οι δύο οπτικοί αντίποδες ενός αμινοξέος έχουν την ίδια ακριβώς χημική συμπεριφορά. Διαφέρουν όμως μεταξύ τους ως προς ορισμένες φυσικές ιδιότητες και στην βιοχημική τους συμπεριφορά. Εκμεταλλευόμενοι την τελευταία αυτή ιδιότητά τους, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις μπορούμε να τις διακρίνουμε, αφού συχνά ο ένας μόνο από τους δύο αντίποδες δίνει κάποιο προϊόν.

Μεταβάλλοντας την ομάδα R, μπορούμε να πάρουμε ένα πλήθος α-αμινοξέων. Η συμπεριφορά των πρωτεϊνών μέσα σε διάλυμα, οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην φύση των αμινοξέων που την αποτελούν, και πιο συγκεκριμένα στις πλευρικές ομάδες R και στον πεπτιδικό δεσμό. Όμως, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη φύση σχηματίζονται από είκοσι μόνο αμινοξέα των οποίων η αλληλουχία μέσα στην αλυσίδα μιας πρωτεΐνης δίνει πρακτικά απεριόριστους συνδυασμούς. Η αλληλουχία αυτή ευθύνεται για το είδος της πρωτεΐνης, για την μορφή (σχήμα) του μορίου της, καθώς και για τις ιδιότητές της.

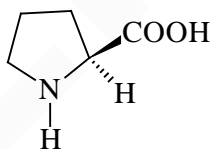
Τα αμινοξέα σε υδατικό διάλυμα απαντούν με τη μορφή του διπλού ιόντος (zwitterion) όπου τόσο η αμινομάδα όσο και το οξύ είναι φορτισμένα. Το συνολικό όμως φορτίο είναι μηδέν. Ανάλογα με την ύπαρξη πρωτονίων (όξινο pH) ή υδροξυλιόντων (αλκαλικό pH) στο διάλυμα, τα αμινοξέα σχηματίζουν την όξινη ή την βασική μορφή τους αντίστοιχα. Το pH στο οποίο σχηματίζεται το διπλό ιόν (ουδέτερη μορφή) ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI).



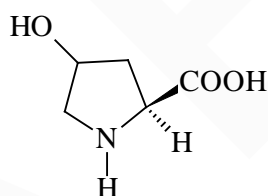
ΠΙΝΑΚΑΣ Α: Τα είκοσι βασικά αμινοξέα			$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ \text{R}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{H} \end{array}$
Όνομα	Σύμβολο	R =	pI
Γλυκίνη	Gly	H	5.97
Αλανίνη	Ala	CH ₃	6.02
Βαλίνη	Val	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5.97
Λευκίνη	Leu	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5.98
Ισολευκίνη	Ile	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH}- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	6.02
Σερίνη	Ser	HOCH ₂ —	5.68
Θρεονίνη	Thr	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}- \\ \end{array}$	5.60
Κυστεΐνη	Cys	SHCH ₂ —	5.02
Κυστίνη	Cs	$\begin{array}{c} \text{S}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{S}-\text{CH}_2- \end{array}$	5.06
Μεθιονίνη	Met	CH ₃ SCH ₂ CH ₂ —	5.06
Ασπαρτικό οξύ	Asp	HOOCCH ₂ —	2.98
Γλουταμινικό οξύ	Glu	HOOCCH ₂ CH ₂ —	3.22
Ασπαραγίνη	Asn	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{NCCH}_2- \end{array}$	5.41
Γλουταμίνη	Gln	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{NCCH}_2\text{CH}_2- \end{array}$	5.70

Λυσίνη	Lys	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}$	9.74
Υδροξυ-λυσίνη	Hyl	$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}$	9.15
Ιστιδίνη	His		7.59
Αργινίνη	Arg	$\text{H}_2\text{N}^+\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{—}$	10.76
Φαινυλαλανίνη	Phe		5.48
Τυροσίνη	Tyr		5.67
Τρυπτοφάνη	Trp		5.88

ΠΙΝΑΚΑΣ Β. Τα δύο συχνότερα ιμινοξέα



προλίνη



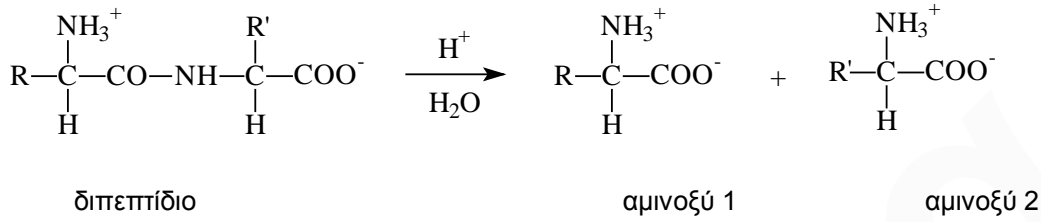
υδροξυπρολίνη

2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Στη συνέχεια θα εξεταστούν μερικές βασικές αντιδράσεις των αμινοξέων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών που χρησιμεύουν στην ανίχνευσή τους μέσα σε διάλυμα.

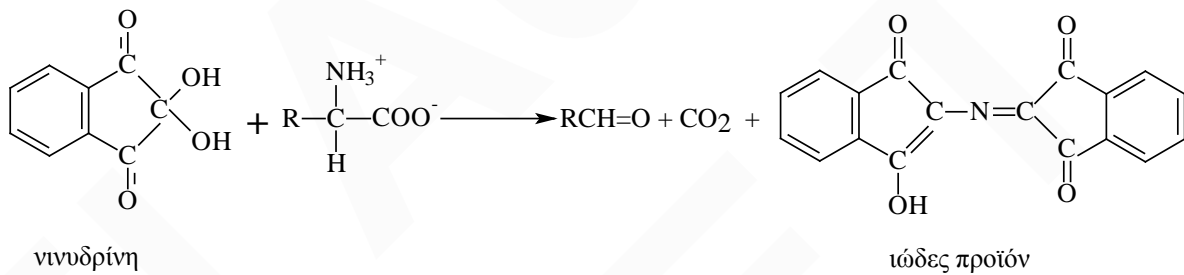
Α. Ώξινη υδρόλυση των πρωτεϊνών. Με την επίδραση οξέος οι πρωτεΐνες υδρολύονται, δηλ. διασπάται ο πεπτιδικός δεσμός και παράγονται ελεύθερα τα αμινοξέα της αλυσίδας τους. Συνήθως χρησιμοποιείται υδροχλωρικό οξύ 6N σε 110° C, σε ατμόσφαιρα αζώτου επί 20 ώρες. Κάτω από αυτές τις σχετικά δραστικές συνθήκες, τα αμινοξέα που ελευθερώνονται, πλην της ασπαραγίνης,

γλουταμίνης, σερίνης, τρυπτοφάνης, κυστεΐνης και θρεονίνης, είναι σταθερά και δεν αλλοιώνονται περαιτέρω.



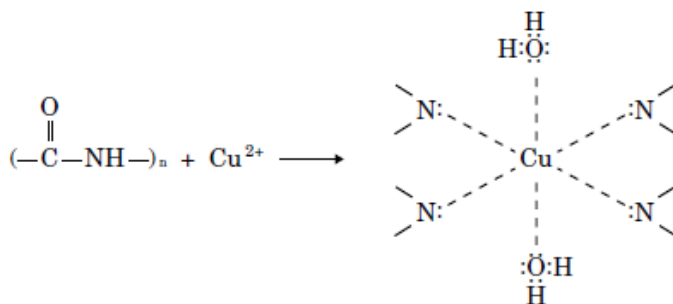
Η αντίδραση αυτή αποτελεί μια βασική και χρήσιμη τεχνική για να εξακριβωθεί η σύσταση των πρωτεϊνών, δηλαδή από ποια αμινοξέα αποτελούνται. Δεν δίνει όμως απάντηση στο ερώτημα που αφορά την διαδοχή (αλληλουχία) των αμινοξέων μέσα στην αλυσίδα τους.

Β. Η αντίδραση της νινυδρίνης (δικετο-υδρινθενίου) είναι χαρακτηριστική για τα αμινοξέα, τα πεπτιδία και τις πρωτεΐνες και μετά από θέρμανση δίνει προϊόν μπλε-ιώδους χρώματος ($\lambda_{\text{abs}}=570 \text{ nm}$). Πρόκειται για μια σύνθετη αντίδραση με αρκετά ενδιάμεσα στάδια, η οποία συνοπτικά αποδίδεται ως εξής:

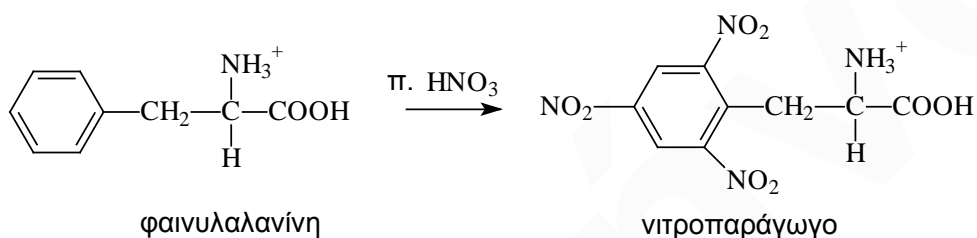


Το ιώδες τελικό προϊόν οφείλεται στην συνένωση δύο μορίων νινυδρίνης και την απόσπαση του αζώτου της αμινομάδας του αμινοξέος, πεπτιδίου ή πρωτεΐνης.

Γ. Αντίδραση διουρίας (biuret test): Η προσθήκη αραιού διαλύματος θειικού χαλκού II ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{SO}_4$) σε ελαφρά *αλκαλικό διάλυμα* πρωτεϊνών σχηματίζει ένα σύμπλοκο ερυθρο-ιώδους χρώματος:



Δ. Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση. Περιλαμβάνει την προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος σε αμινοξύ ή πρωτεΐνη που περιέχει ένα τουλάχιστον από τα αμινοξέα με αρωματικό πυρήνα, (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη). Όλες οι αρωματικές ενώσεις προσβάλλονται από το πυκνό νιτρικό οξύ και δίνουν νιτροπαράγωγα. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης μετά από θέρμανση, είναι ένα κίτρινο προϊόν, που οφείλεται στην νίτρωση του αρωματικού δακτυλίου.



3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

διάρκεια 2 ώρες

Η κάθε ομάδα με την αρχή του εργαστηριακού μαθήματος έχει αναμμένο μπροστά της ένα λύχο Bunsen και ένα ποτήρι ζέσεως με νερό (υδατόλουτρο) που θα έλθει στο σημείο βρασμού. Θα χρησιμοποιηθούν ογκομετρικοί σωλήνες, φρουκτόζη, γλυκόζη, (σε στερεά μορφή) και άμυλο (έτοιμο, σε διάλυμα), καθώς και διάλυμα γάλακτος (50% περίπου) και γλυκίνη (σε στερεά μορφή). Ως αντιδραστήρια θα χρησιμοποιηθούν πυκνό νιτρικό και θειικό οξύ, καυστικό νάτριο 10%, διάλυμα νινυδρίνης, α-ναφθόλης (10% σε αλκοόλη) και διάλυμα ιωδίου.

3.A. Αντιδράσεις πρωτεϊνών

Απαιτείται διάλυμα γάλακτος σε νερό 1:1 και διάλυμα γλυκίνης 0.1 g/ml. Πυκνό νιτρικό οξύ, διάλυμα καυστικού νατρίου 5%, διάλυμα νινυδρίνης.

(α) Αντίδραση νινυδρίνης. Σε δύο ογκομετρικούς κυλίνδρους που περιέχουν από 1 ml διαλύματος γάλακτος και γλυκίνης αντίστοιχα, προσθέτουμε μια σταγόνα νινυδρίνης (με προσοχή, ώστε να μην έλθει σε επαφή με τα χέρια καθ' ότι είναι τοξική). Μένουν οι σωλήνες στο υδρόλουτρο επί 4-5 λεπτά μέχρι να παρατηρηθεί αλλαγή.

(β) Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση. Σε δύο ογκομετρικούς κυλίνδρους που περιέχουν από 2 ml διαλύματος γάλακτος και γλυκίνης αντίστοιχα, προσθέτουμε πυκνό νιτρικό οξύ (μέσα στους απαγωγούς, με πολλή προσοχή!). Τους τοποθετούμε στο υδρόλουτρο για 5 λεπτά, και σημειώνουμε τυχόν αλλαγή. Εμφάνιση κίτρινου χρώματος σημαίνει θετικό τεστ. Στη συνέχεια εξουδετερώνουμε το διάλυμα με καυστικό νάτριο 10% (προσθέτουμε σημαντική ποσότητα, ανάλογα με το πόσο νιτρικό οξύ είχε προηγουμένως προστεθεί) μέχρι να σχηματισθεί πορτοκαλί ίζημα.

(γ) αντίδραση διουρίας: μια μικρή ποσότητα (10mg) από τα διαλύματα γάλακτος και γλυκίνης αντίστοιχα διαλύεται σε 1 ml απιονισμένου νερού και προσθέτουμε 5 σταγόνες NaOH 10% και 2 σταγόνες αραιού διαλύματος CuSO_4 υπό συνεχή ανάδευση. Η παρατήρηση πορφυρο-ιώδους προϊόντος υποδηλώνει την παρουσία πρωτεΐνης.

4. ΦΥΛΛΟ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τίτλος άσκησης:

Όνοματεπώνυμο:

ημερομηνία

Αρ. μητρώου:

Εξάμηνο:

4.A. Χημικές αντιδράσεις πρωτεϊνών

δοκιμασία	παρατηρήσεις		συμπεράσματα
	διάλυμα γάλακτος	γλυκίνη	
Αντίδραση νινυδρίνης			
Ξανθοπρωτεϊνική αντίδραση (προσθήκη πυκνού νιτρικού οξέος)			
Αντίδραση διουρίας			

Ερωτήσεις

- Έχουμε ένα διάλυμα D-αλανίνης και ένα L-αλανίνης. Μπορούμε με κάποιο από τα πιο πάνω τεστ να διακρίνουμε τα δυο διαλύματα; Εξηγείστε.
- Έχουμε δυο διαλύματα που περιέχουν τα αμινοξέα Tyr και Ser. Με ποιά χαρακτηριστική αντίδραση μπορούμε να τα διακρίνουμε;
- Γράψτε την αντίδραση όξινης υδρόλυσης του πεπτιδίου Ala-Tyr-Phe-Glu. Χρησιμοποιήστε τους πλήρεις χημικούς τύπους των αμινοξέων.