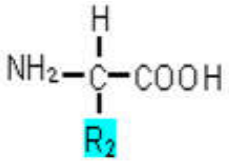
فصل پنجم: اسیدهای آمینه :

اهداف کلی :

پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه از ترکیبات آلی مهم خون هستند. شناسایی و اندازه‌گیری این ترکیبات در مایعات بیولوژیکی از نظر کمی و کیفی برای تشخیص بیماری‌ها و پی بردن به سلامت افراد بسیار مهم است و برای اندازه‌گیری آن‌ها از خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها استفاده می‌شود.

تئوری :

پروتئین‌ها ، زنجیره‌های خطی یا پلیمرهایی هستند که از ترکیب اسیدهای آمینه حاصل می‌شوند. تمامی ۲۰ اسیدآمینه متداول، اسیدهای α- آمینه هستند .آنها یک گروه آمینی (NH_2) و یک گروه کربوکسیل (COOH) دارند که به یک اتم کربن مشترک (یعنی کربن α) متصل‌اند . فرمول عمومی اسیدهای آمینه به شکل زیر است :



شکل : فرمول کلی یک اسید آمینه

درتمام اسیدهای آمینه متداول به جز گلیسین چهار گروه مختلف به کربن α متصل‌اند. به این ترتیب ، اتم کربن α، یک مرکز کایرال (نامتقارن) است و دارای فعالیت نوری هستند که می‌تواند ایزومرهای D و L داشته باشد.

۲۰ نوع اسیدآمینه اصلی که در ساختمان پروتئین شرکت دارند به استثنای پرولین همگی اینها از نوع α- آمینو اسیدها هستند . پرولین یک α- ایمینو اسید است .

اسیدهای آمینه را می‌توان بر اساس گروه R طبقه بندی کرد:

۱.گروهای R غیرقطبی :

شامل والین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، پرولین (خطی) ، فنیل آلانین، تریپتوفان (حلقوی) و یک اسید گوگرددار به نام متیونین

۲. قطبی :

اسید آمینه که بسیار آبدوست بوده و تولید پیوند هیدروژنی می کند (در آب حل می شود) شامل :گلایسین ، سرین ، ترئونین ، سیستئین ، تیروزین ، آسپاراژین ، گلوتامین

۳. اسیدی : اسید های آمینه که ریشه ی اسیدی دارند مانند : اسید آسپارتیک ، اسید گلوتامیک

۴. بازی : اسیدهای آمینه‌ای که ریشه‌ی آنها بازی است مانند: لیزین ، آرژنین و هیستیدین

تقسیم بندی آیوپاک اسیدهای آمینه :

۱. منو اسید آمینه گلایسین ، آلانین ، والین ، لوسین ، ایزو لوسین

۲. اسید های آمینه الکل دار سرین ، ترئونین

آزمایشگاه بررسی ساختار نیری‌پور

۳. اسید های آمینه گوگرددار سیستین ، متیونین

۴. دی اسید منوآمینه مانند :اسید آسپارتیک ، اسید گلوتامیک

۵. اسید های آمینه حاوی آمید بر روی ریشه عامل آمیدی وجود دارد . در انتقال آمونیاک و سنتز پروتئین بسیار مهم هستند شامل گلوتامین و آسپارتین

۶. اسید های آمینه دی آمینه حاوی عامل آمینی اضافی هستند شامل لیزین و آرژنین

۷. اسید های آمینه حلقوی آروماتیک: فنیل آلانین ، تیروزین ، تریپتوفان

آزمایش‌های کیفی اسیدهای آمینه :

آزمایش ۱ : حلالیت

وسایل و مواد مورد نیاز :

پودر اسیدهای آمینهٔ گلیسین و تیروزین ، لوله آزمایش ، ترازو ، آب مقطر ، پیپت و پوآر

روش کار :

۵۰ میلی گرم از اسیدهای آمینهٔ گلیسین و تیروزین را در دو لولهٔ آزمایش جداگانه ریخته و به هریک ۱۰میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و خوب تکان دهید.

حلالیت این دو اسیدآمینه در آب چگونه است؟

چرا حلالیت اسیهای آمینه در آب متفاوت است؟

آزمایشگاه پوشیمی ساختار

آزمایش۲ : واکنش گزانتوپروتئیک

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلول اسیدهای آمینهٔ گلیسین ، تیروزین ، لوله آزمایش ، اسید نیتریک غلیظ ، بن ماری ، پیپت و پوآر

روش کار:

یک میلی لیتر از اسیدهای آمینهٔ گلیسین و تیروزین را در دو لولهٔ جداگانه بریزید ، سپس یک میلی لیتر اسیدنیتریک غلیظ به آن اضافه کرده و بجوشانید .

سوال؟

۱.محتوای کدام‌یک از لوله‌ها تغییر رنگ داده و چه رنگی را از خود نشان می‌دهد؟

۲.رنگ فوق به چه علت ایجاد می‌شود؟

آزمایش۳ : واکنش نین هیدرین

کلیهٔ اسیدهای آمینه آلفا و پروتئین‌هایی که دارای عامل‌های آمین و کربوکسیل آزاد هستند (به استثنای پرولین و هیدروکسی پرولین) با نین هیدرین، ضمن آزاد کردن انیدرید کربنیک و آمونیاک، یک کمپلکس رنگی ایجادمی‌کنند.

وسایل و مواد مورد نیاز:

یک یا چند اسیدآمینه، لولهٔ آزمایش، معرف نین هیدرین، بن ماری.

روش کار :

۲ میلی‌لیتر از اسیدهای آمینه را در لوله‌های آزمایش بریزید سپس ۰/۵ میلی لیتر از معرف نین هیدرین به آن اضافه نموده و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار دهید.

۱.چه رنگی ایجاد می‌شود؟

آزمایش‌های کمی اسیدهای آمینه

تیتراسیون اسیدهای آمینه:

برای اندازه‌گیری غلظت یک اسیدآمینه به وسیله فرمل (فرمالدئید یا آلدئید فرمیک)، عامل آمینی را مهار کرده، سپس جسم حاصل را مثل یک اسید آلی می‌سنجیم. این آزمایش، روش سورنسن یا فرمل تیتراسیون نامیده می‌شود.

آزمایش ۱: تشخیص و تعیین مقدار یک اسیدآمینه به وسیله تیتراسیون با فرمل

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلول اسیدآمینه، ارلن، بشر، پیپت و پوآر، بورت، فرمالدئید، فنل فتالئین، سود ۰/۱ نرمال

روش کار:

در یک ارلن مایر کوچک، ۱۰ میلی‌لیتر از اسیدآمینه مورد آزمایش ریخته و پس از افزودن چند قطره فنل فتالئین بر روی آن، چند قطره سود ۰/۱ نرمال اضافه کرده تا رنگ صورتی کم‌رنگ ایجاد شود، حال ۱۰ میلی‌لیتر فرمل که PH آن حدود ۹ است به محتوای ارلن اضافه کرده تا بی‌رنگ شود. سپس به وسیله بورت قطره قطره سود ۰/۱ نرمال اضافه کنید تا رنگ صورتی کم‌رنگ مجدداً ظاهر گردد. اگر n مقدار میلی‌لیتر سود مصرفی باشد، مقدار اسیدآمینه از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

M: وزن مولکولی اسید آمینه میلی‌گرم درصد = $M/10 \times n \times 100/10$

آزمایش‌های پروتئین‌ها :

واکنش‌هایی که برای اسیدهای آمینه مثبت می‌باشند، تا حدودی نیز به پروتئین‌ها پاسخ می‌دهند ولی شدت رنگ به آن اندازه که در اسیدهای آمینه ایجاد می‌شود در اینجا دیده نمی‌شود لذا برای پروتئین‌ها آزمایش‌های اختصاصی‌تری در نظر گرفته شده است.

خواص فیزیکی ـ شیمیایی پروتئین‌ها :

۱- حلالیت :

بیشتر پروتئین‌ها در آب محلولند .این حلالیت بستگی به ترکیب یونی، قدرت یونی و PH محیط دارد. بعضی از پروتئین‌ها بدون وجود اندکی نمک در آب محلول نمی‌باشند. لذا حل شدن این پروتئین‌ها را در حضور یک نمک (Salting in) می‌نامند .

ولی وقتی قدرت یونی در محلول زیاد گردد بیشتر پروتئین‌ها رسوب می‌کنند چون بین مولکول‌های پروتئین و یون‌های نمکی برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی با آب رقابتی برقرار می‌گردد و چون دیگر پروتئین‌ها قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی با آب نمی‌باشد، رسوب می‌نمایند. این پدیده را جدا کردن به وسیله نمک Salting (out) می‌نامند .

حلالیت پروتئین بستگی به PH محیط دارد. در PHهای اسیدی و قلیایی حلالیت پروتئین بالا است ولی در PH ایزوالکتریک مینیمم حلالیت را نشان می‌دهند .

۲- خواص آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی :

اگر یک پروتئین خارجی وارد بدن شود بدن شروع به ساختن پروتئین جدیدی می‌کند که این پروتئین‌های خارجی را آنتی‌ژن و پروتئین ساخته شده را آنتی‌بادی گویند . مطالعه واکنش‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی پایه ومبنای دانش ایمنی‌شناسی است .

۳- دگرگونی پروتئین‌ها :

تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله حرارت ، اسید و بازها و موادآلی ، ساختمان طبیعی سه بعدی پروتئینی از بین می‌رود و دیگر پروتئین قادر به انجام عملش نخواهد بود که اصطلاحاً این دگرگونی پروتئین‌ها را دناتوره شدن پروتئین گویند .در بعضی موارد اگر عامل خارجی را برداریم دوباره به حالت اولیه بر می‌گردد و برگشت‌پذیرمی‌باشد که به این حالت Renaturation گویند. ولی در بعضی موارد غیربرگشت‌پذیر می‌باشند در دناتوراسیون فقط ساختمان اول پروتئین پایدار باقی می‌ماند . اگر مواد آلی پیوند سست با پروتئین ایجاد کند

برگشت‌پذیر و اگر پیوند کوالانسی قوی ایجاد کند غیربرگشت‌پذیر می‌باشد.

گرمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد معمولاً اکثر پروتئین‌ها را دناتوره می‌کند. حرارت باعث گسسته شدن پیوندهای ضعیف در مولکول پروتئین و در نتیجه تغییراتی در ساختمان دوم و سوم پروتئین‌ها گردیده که در نهایت آرایش بار الکتریکی پروتئین بهم خورده و ساختمان اصطلاحاً باز می‌شود. با بهم نزدیک شدن بارهای مخالف بر روی رشته‌های پلی پپتیدی در محیط، پروتئین‌ها بهم متصل شده و رسوب می‌کنند.

۱. آزمایش بیوره :

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلول پروتئینی، لولهٔ آزمایش، پیپت و پوآر، سود ۱۰٪ ، سولفات مس۱٪

روش کار:

۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئینی را در لولهٔ آزمایش بریزید و هم حجم آن سود ۱۰٪ بیافزائید سپس چند قطره سولفات مس ۱٪ به آرامی بر روی آن ریخته به طوری که مخلوط نشود تا دو سطح یا به عبارت بهتر، دو لایه تشکیل شود.

سوال؟

۱.آیا در حدفاصل دو لایه حلقهٔ رنگی مشاهده می‌کنید؟

۲.حلقه تشکیل شده به چه رنگی است و علت تشکیل آن چیست؟

آزمایش ۲ : رسوب با اسید نیتریک غلیظ (آزمایش هلر)

وسایل و مواد مورد نیاز:

محلول پروتئینی، لولهٔ آزمایش، پیپت و پوآر، اسیدنیتریک غلیظ

روش کار:

در یک لولهٔ آزمایش ۲ میلی‌لیتر محلول پروتئینی بریزید ، سپس در حدود ۲ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ طوری به ته لوله وارد کنید که دو سطح یا لایهٔ متمایز تشکیل گردد.

آزمایشگاه بیوشیمی ساختار
نبی‌پور

۱. در فصل مشترک این دو لایه چه رنگی مشاهده می‌شود؟

۲. اگر مقدار محلول پروتئینی بیشتری در این آزمایش به کار ببرید، آیا تغییری در حلقه مشاهده می‌کنید؟

آزمایش ۳: اثر حرارت بر پروتئین:

وسایل و مواد مورد نیاز:

آلبومین ۲ درصد ، لوله آزمایش ، چراغ الکلی، بن ماری، محلول ۰.۹ درصد نمک طعام ، پیپت و پوآر

روش کار:

۲ میلی لیتر محلول آلبومین را در لوله آزمایش بریزید و به آرامی در شعله مستقیم حرارت دهید . در لوله دیگر همان مقدار محلول آلبومین ریخته و در بن‌ماری قرار دهید .پس از چند دقیقه لوله ها را خارج کنید و پس از سرد شدن بررسی نمایید . حال به هر دو لوله ۲ میلی لیتر محلول ۰.۹ درصد نمک طعام اضافه کنید و نتیجه را مشاهده کنید.

سوال:

۱.در کدام یک از لوله ها رسوب آلبومین حل می شود و به حالت اولیه خود بر می گردد ؟

PH ایزوالکتریک:

PHای که در آن یک اسیدآمینه به شکل زویترون خود یعنی دارای بارهای مثبت و منفی برابر بوده بنابراین فاقد بار الکتریکی می‌باشند از این رو، در این PH، که نقطه ایزوالکتریک نامیده می‌شود، اگر در میدان الکتریکی قرار گیرند، به طرف هیچ‌یک از قطب‌ها حرکت نخواهند کرد و در نقطه ایزوالکتریک حلالیت پروتئین‌ها و اسیدهای امینه به حداقل می‌رسد

آزمایش ۴: اندازه‌گیری PH ایزوالکتریک کازئین

وسایل و مواد مورد نیاز:

لوله آزمایش، پیپت و پوآر، محلول‌های اسید استیک N ۰/۰۱، N ۰/۱ و N، محلول کازئین

روش کار:

۹ لوله آزمایش انتخاب کرده و محلول‌های لازم را طبق جدول زیر در هر یک بریزید.

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
اسیداستیکN۰/۰۱	۰/۶۲	۱/۲۵	-	-	-	-	-	-	-
اسید استیک N۰/۱	-	-	۰/۲۵	۰/۵	۱	۲	۴	۸	-
اسید استیک N	-	-	-	-	-	-	-	-	۱/۶
آب مقطر ml	۸/۳۸	۷/۷۵	۸/۷۵	۸/۵	۸	۷	۵	۱	۷/۴
حدود PH	۵/۹	۵/۶	۵/۳	۵	۴/۷	۴/۴	۴/۱	۳/۸	۳/۵

سپس به هریک از لوله‌ها ۱ میلی‌لیتر از محلول کازئین اضافه کرده و لوله‌ها را بلافاصله تکان دهید. کدورت حاصله را بعد از ۱۰ و ۳۰ دقیقه ملاحظه کرده و نتیجه را یادداشت کنید.

سوال:

۱.در کدام لوله رسوب بیشتر ایجاد شده است؟

۲. آیا PH نقطه ایزوالکتریک با میزان رسوب آن ارتباط دارد؟

آزمایشگاه بیوشیمی ساختار نبی‌پور