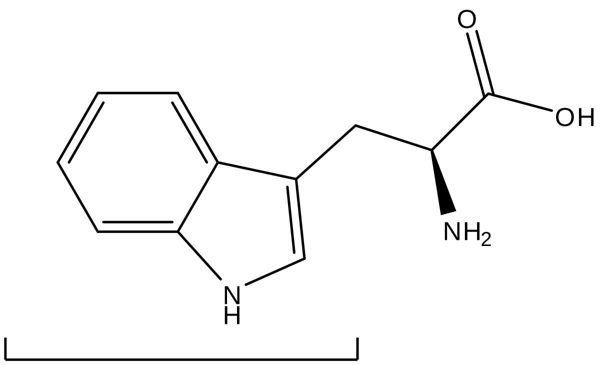
الجامعة	الانبار
الكلية	التربية للبنات
القسم	الكيمياء
المرحلة	الرابعة
اسم المادة باللغة العربية	Practical Biochemistry
اسم المادة باللغة الانكليزية	الكيمياء الحياتية العملي
اسم التدريسي	م.م. بيداء حسين عيدة
عنوان المحاضرة باللغة العربية	كشف هوبكنز
عنوان المحاضرة باللغة الانكليزية	Hopkins-col Test
رقم المحاضرة	8
المصادر والمراجع	كتاب الكيمياء الحياتية العملي

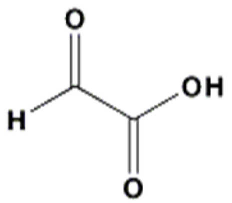
Hopkins-col Test <u>ثالثاً/ كشف هوبكنز كول الخاص بالتربتوفان:</u>

ان حلقة الاندول الموجودة في الحامض الاميني التربتوفان تتفاعل مع حامض الكلايوكسيلك(Glyoxylic acid) بوجود حامض قوي مثل حامض الكبريتيك المركز لتعطي حلقة بنفسجية وهذا دليل على احتواء البروتين على الحامض الاميني التربتوفان.**اذن فهذا الكشف مميز للتربتوفان, لاحتوائه على جذر الاندول**.



Indol Ring

Tryptophan



<u>**Glyoxylic acid**</u>

<u>Procedure:</u>اضف(2مل) من كاشف هوبكنز كول الى (2مل) من محلول البروتين.امزج جيداً ثم اضف باحتراس حوالي (5مل)من حامض الكبريتيك المركز بحيث ينزلق على جدران الانبوبة الداخلية ولاحظ تكون حلقة وردية او بنفسجية عند سطح الانفصال..

رابعاً /كشف ميلون: Millon's Test (Tyrosine)

يعتمدهذا الكشف على وجود مجموعة الفينول في الحامض الاميني. وبما أن التايروسين هو الحامض الاميني الوحيد الذي يمتلك هذه المجموعة ، لذا يعتبر هذا الكشف خاصاً بالتايروسين.

Procedure:اضف بضع قطرات من محلول ميلون (حديث التحضير) الى (2مل)من محلول البروتين ، ثم سخن في حمام مائي مغلي ولاحظ ظهور اللون الوردي.

خامساً /كشف زاكاكوجي : sakaguchi Reaction

هو تفاعل خاص بجذر الكوانيدين guanidine الموجود في الحامض الاميني Arginine وجميع البروتينات اللتي تحتوي عليهِ ،حيث ان الكوانيدين في المحلول القاعدي يعطي لون احمر زاهِ عند معاملته مع α -naphthol و هايبوبروميت او هايبوكلوريت الصوديوم.

Procedure: اضف بضع قطرات من محلول(NaOH (% 10 مع بضع قطرات من α–naphthol واخيرا قطرات من(10 %)Sodium hypochlorite الى (1 مل)من محلول البروتين حتى يتكون لون احمر زاهٍ.

ملاحظة:هذا الكشف من الدقه والحساسية بحيث يمكن اعتباره كشفاً عاماً لجميع البروتينات؟؟

لان جميع البروتينات المعروفة تحتوي على الحامض الاميني الارجنين والحاوي على جذر الكوانيدين بالقدر الكافي لاعطاء كشف موجب.

سادساً /كشف الكبريت غير المستقر قلويا(تفاعل الاحماض الامينية الكبريتية):

يعتمد هذا الكشف على حقيقة أن غلي محلول البروتين مع (40% NaOH)يؤدي الى ان الكبريت العضوي الموجود في الحامض الاميني السستين (Cystine)والسستائين(Cysteine) يتفاعل معNaOH مكوناً كبريتيد الصوديوم(Na_2S){تحول الكبريت الى كبريت لاعضوي} والذي يتفاعل بدوره مع خلات الرصاص$(CH_3COO)_2Pb$مكونا كبريتيد الرصاص الاسود اللون.

$$R\text{-}SH + 2NaOH \longrightarrow Na_2S + R\text{-}OH + H_2O$$

$$Na_2S + (CH_3COO)_2Pb \longrightarrow PbS\downarrow + 2CH_3COONa$$

راسب اسود اللون
من كبريتيد الرصاص

وعليه يمكن القول بان الكبريت الموجود في الحامضين الامينيين السستين والسستائين هوكبريت **غير** مستقر قلويا

اما الكبريت الموجود في الحامض الاميني الميثونين (Methionine) فهو كبريت مستقر قلويا **ولا** يعطي راسب اسود من كبريتيد الرصاص مع NaOH

:Procedure

امزج قليلاً من محلول البروتين(1مل) مع (1مل)من 40%NaOH.اغلي المحلول ثم برده وأضف اليه حامض الخليك (10 قطرات) ثم أضف قليلا من محلول خلات الرصاص , ولاحظ تكون راسب اسود، دلاله على ان البروتينات تحتوي في تركيبها على احماض امينية حاوية على كبريت غير مستقر قلوياً

سابعاً/ كشف بايوريت: **Biuret Test for peptide bonds**

هذا الكشف خاص بوجود الاتصالات او الاواصر الببتيدية(جميع المركبات التي تحتوي على آصرتين من الاواصر الببتيدية على الاقل) , وعليه يعطي هذا الكشف نتيجة ايجابية (لون بنفسجي) مع جميع البروتينات ونواتج تحللها المائي (الببتيدات) وحتى مرحلة الببتيدات الثلاثية (Tri peptides)، اما الببتيدات الثنائية (Dipeptides) والاحماض الامينية فلا تعطي كشفاً موجبالاحتواء الاولى على آصرة واحدة وعدم وجود هذه الاصرة في الحامض الاميني .ويعزى كشف بايوريت الى قوة عمل الاواصر التناسقية لمركب معقد من (Cu^{+2}) واربعة ذرات نتروجين ببتيدية مكونا مايسمى بمعقد النحاس التناسقيCopper coordination complex

Procedure: اضف الى (1مل) من زلال البيض في (T.T) بضع قطرات من NaOH(%10)ثم اضف قطرة واحدة من كبريتات النحاس (1%) ولاحظ ظهور اللون البنفسجي .

ترسيب البروتينات Protein's Precipitation

ان قابلية ذوبان البروتينات تعتمد على عاملين:

1-وجود الشحنة التي يتحكم بها الPH .

2-وجود الماء، مع قليل من التسخين في اغلب الاحيان.

وبدون احدهما لايمكن للبروتين ان يكون بصورة ذائبة او مستحلبة .

نقطة التعادل الكهربائي: Iso Electric Point(I EP)

هي عبارة عن الP^H التي يكون فيها البروتين حاملا لعدد متساوي من الشحنات الموجبة والسالبة. وعليه فالبروتينات في نقطة تعادلها الكهربائي لاتتحد مع الحامض او القاعدة.اما فوق(-) او تحت(+)نقطة التعادل الكهربائي فالبروتينات تكون غير متعادلة (مشحونه)ولذلك فهي تتحد مع الايونات المعاكسة لها مكونة املاح يكون كثير منها غير ذائب(راسب)مع البروتين.

مماتقدم فان البروتين يكون غير ذائب في نقطة التعادل الكهربائي(راسب).

طرق ترسيب البروتينات:

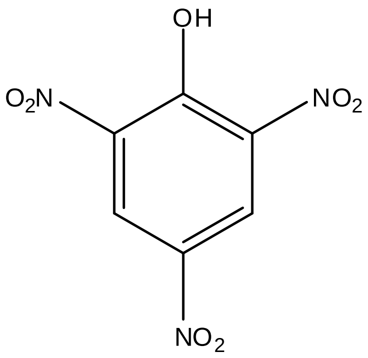
اولا/ الترسيب بواسطة املاح الفلزات الثقيلة {الايونات الموجبة (+)}:

تعتمد فكرة الترسيب على اضافة محلول فلز ثقيل مثل(Pb^{+2},Zn^{+2},Hg^{+2},Fe^{+3},Ag^{+})الى محلول البروتين الحامل لشحنة سالبة(نتيجة معاملته بالقاعدة) وترسيبه على شكل بروتينات الفلز (Metal Protein) , حيث يُعادل الايون الموجب الشحنة السالبة على جزيئة البروتين فيرسبها.

Procedure: يوضع (3مل) من محلول زلال البيض في انبوبة اختبار ونضيف قطرة من محلول NaOH.ثم نضيف(1مل) من احد املاح الايونات الموجبة($FeCl_3$) ثم نكرر التجربة مع كل من $AgNO_3$,$(CH_3COO)_2Pb$,$CuSO_4$,$HgCl_2$.ونسجل ونلاحظ تكون الراسب ولونه في كل مرة

ثانياً /ترسيب البروتينات بواسطة الكواشف القلويدية{الايونات السالبة (-)}:

بالامكان ترسيب البروتينات عندما تحمل شحنة موجبة بواسطة الايونات السالبةAn ions لبعض الحوامض مثل TCA,Picric Acid وتعرف هذه الحوامض بالكواشف القلويدية لانها استخدمت اصلا في ترسيب مجموعة من المركبات العضوية التي تعرف بالقلويدات alkaloids. هذه الطريقة تجد استعمالا واسع النطاق في ازالة البروتينات Deproteinization من الدم قبل اجراء بعض التحاليل عليه. وتعتبر هذه الطريقة اساس للكشف عن البروتينات في الادرار والتقدير الكمي لها في المصل Serum وفي الادرار Urine.



picric acid

$Na^+WO^-_4$ CCl_3COOH

Sodium Tungstate TCA(**T**ri **C**hloro **A**cetic acid)

Procedure: يُحمض زلال البيض بقطرات من حامض الخليك ويضاف اليه(1مل) من الايونات السالبة المذكورة في اعلاه ويلاحظ لون الراسب المتكون في كل مرة.سجل ملاحظاتك....