# EXPERIMENT 4
# QUALITATIVE DETERMINATION OF PROTEINS AND AMINO ACIDS

Dr. Iman Mansi

بهاي التجربة ح نعرف نميز البروتين عن ال amino acids بداخل ال solution

# PROTEINS

- Proteins are one of the main constituents of the cell. Cells contain more than 3000 different proteins that play a variety of structural and functional roles in the cell.
- They are high molecular weight biopolymers of amino acids.
- The linkage that bind these amino acids is called a peptide bond and is formed by the condensation of the α-carboxyl group of one amino acid and an α-amino group of another

أول شي بنعرف إنه البروتين بتشكل ما نسبته ٥٠٪ من مكونات الخلية الصلبة ، بحيث إنه بكون عندي أكتر من ٣٠٠٠ بروتين في الخلية منهم بكون حسب structure ومنه بكون حسب ال function متل receptors، enzymes, actin and myosin,...

حكينا إنه البروتين هي عبارة عن Biopolymers مكونة بشي أساسي من الأحماض الأمينية وهالشي مشترك بين كل البروتينات ومعروف إنه البروتين بتكون إله ال molecular weight عالية جدًا وبنقسيها بالكيلو دالتون

هلأ البروتين عبارة عن amino acids مرتبطين مع بعض بب Peptide linkage من alpha carboxylic group with alpha amino group

# DETECTION OF PROTEINS:

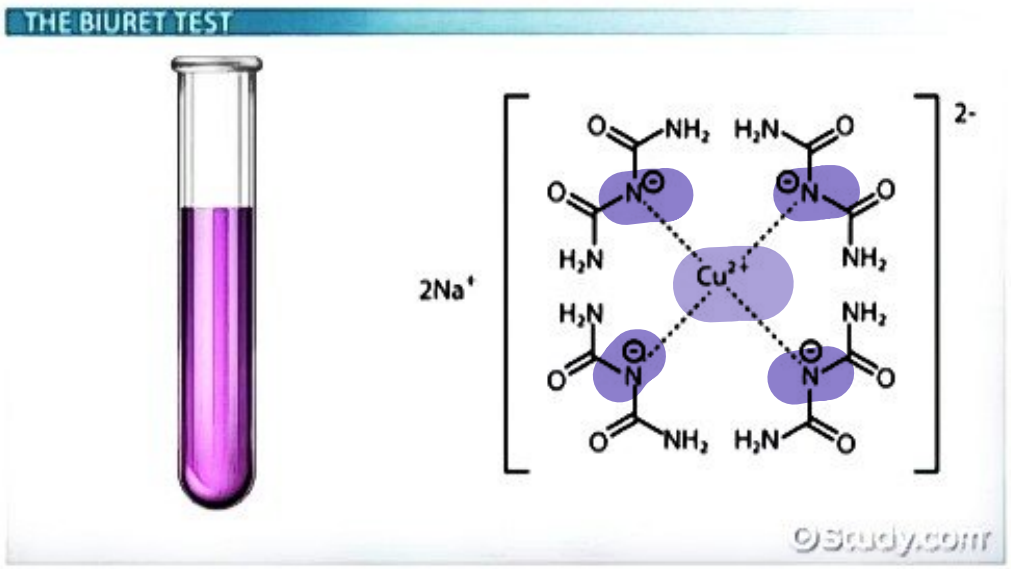
- Detection based on the following: Presence of peptide bond: Biuret reaction The nature of protein (coagulation by heating, precipitation by strong acid and heavy metals) Presence of certain amino acids
- Color reactions of amino acids
- Biuret test: Compounds containing one or two peptide bonds give a characteristic purple color when treated with dilute copper sulphate in alkaline solution. The positive reaction of Biuret reagent is formed by a complex of copper atom and four nitrogen atoms, two from each of two peptide chains.

كيف ممكن نعمل detection of protein? بحكيلنا اعتمادًا على ال presence of Peptide bonds ، بكون عنا nature of protein بنقدر نعمللها Denaturation بواسطة ال Heat أو بعمل precipitation بواسطة حمض قوي أو heavy metal

في عنا مجموعة من الفحوصات الخاصة بال amino acids وإلّي بتميزلي البروتين بما فيه من الأحماض هاي بنسميها color reaction

أول فحص هو Biuret test (general of protein) ، بهاد التيست رح ترتبط ٤ ذرات نيتروجين من ال Peptide linkage مع copper sulfate بداخل alkaline solution وبعطينا purple color متل ما رح تشوفوا بالسلايد إلّي بعده

بنشوف بالصورة إنه صار عندي complexation بين ٤ ذرات نيتروجين وبين copper sulfate ونتج ال purple color ك positive result




- **Procedure:**
- **Place 15 drops of protein test solution in a test tube and 5 drops of 20% NaOH and mix. Add 2 drops of 0.2% CuSO4 solution, warm if necessary Repeat with any amino acid instead of protein and write your notes.**

ال procedure لهاي التجربة سهلة بحيث إني بجيب ١٥ drop من البروتين تيست سوليوشن وبحطهم ب test tube وبضيف ٥ drop من NaOH%20 لأنه حكينا لازم يكون عندي alkaline solution وبعدها بضيف ٢ drop من ال copper sulfate (0.2% CuSO4) وأحيانًا بنحتاج إنه تعمل تسخين بسيط لحتى ينتج هاللون

# HEAT DENATURATION:

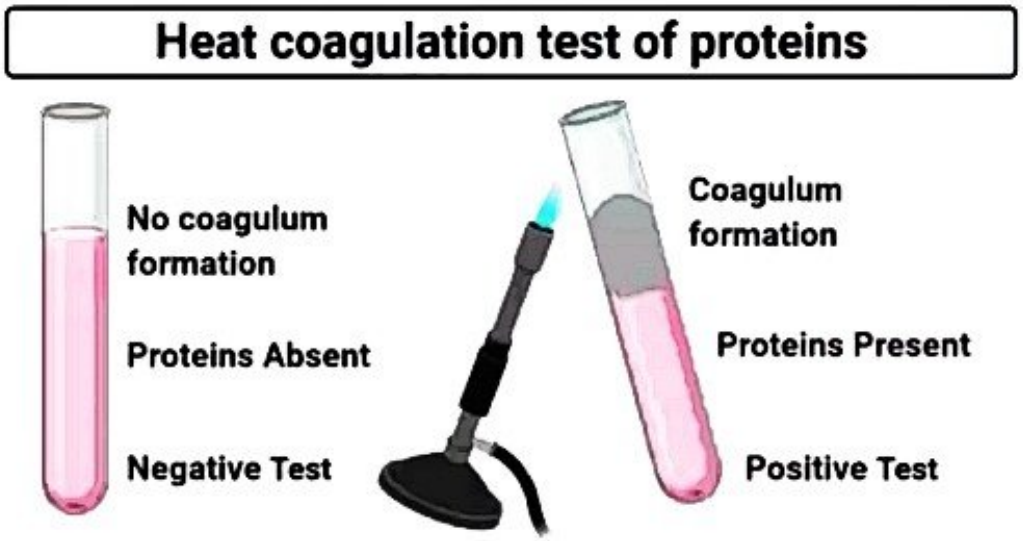
- Proteins are unequally stable when heated in aqueous solution, fractionation can be achieved by controlling heating.
- The presence of a substrate, a product, or an inhibitor often stabilizes a protein against heat denaturation.
- Denaturation consists of the unfolding polypeptide chain and loss of the compact structure. It is usually irreversible and can result from the application of heat, extremes of pH or the action of detergent.
- Denaturation therefore frequently causes

precipitation of the protein

- Procedure:
- Take 5 ml of protein solution in a test tube,

heat to boiling, repeat using any amino acid

instead of protein. What do you observe



تاني تيست للبروتين هو ال heat Denaturation
بنعرف إنه البروتين هو unequally stable بداخل السوليووشن ف منهم بعمل Coagulation ومنهم لأ ، يعني في منها لما اغليها بالمي بصيرلها Denaturation, Coagulation ف بتغير ال form إله ، بينما مثلاً الحليب لما أغليه بصيرله شي ؟ لأ
ف بنستنتج إنه البروتينات بتختلف حسب ال Stability of the heat

وكمان هاي البروتينات وقت أضيفلها ال substrate , product, inhibitor رح يساعد هالإشي بزيادة ال stabilizes a protein against heat Denaturation ف بالتالي بقلل من نسبة إنه يصيرله Denaturation

شو يعني Denaturation ؟ حكينا بالمادة النظرية إنه البروتين بمر بأربع مراحل تكوين ، ف لما يصير Denaturation يعني صار unfolding polypeptide chain ف بكون رجعت البروتين من ال tertiary structure and quaternary structure لشو ؟ لل primary structure ف بالتالي بفقد وظيفته وبخرب البروتين وبنلاقيه اترسب وعمل Coagulation بداخل السوليووشن
شو في أشياء تانية غير ال Heat وبتأثر عالبروتين ؟ حكينا إنه Urea, Extreme PH, Severe cold, organic solvent, detergent

ال procedure إنه بجيب ٢ أو ٣ مل من البروتين وبعمللهم heat ف إذا اتشكّلت Coagulation معناته هاد هو البروتين

# AMINO ACIDS:

- Amino acids are the main building blocks of proteins.
- They are relatively small molecules that characterized by presence of α-amino group, carboxylic group and a unique R group.
- Although they share the general structure, they differ in the polarity, size, solubility and electrical charge.

حكينا عن ال amino acids إنهم الوحدة البنائية المكوّنة للبروتين (building blocks of protein) وكلهم بتشتركوا ب structure أساسي وهو ال Carboxylic group. مع amino group وفي unique R group وسميتها unique لإنها بتميّزلي ال amino acids عن بعض ف الإختلاف بهاد الچروب بخلي ال amino acids تختلف كمان بال
polarity, size, solubility, electrical charge
يعني اشتركوا بال general structure واختلفوا بهاي الأربع أشياء

# NINHYDRIN TEST:

- Ninhydrin is a powerful oxidizing agent, it reacts with α-amino acid to decarboxylate the amino acid yielding an intensely colored blue-purple product, CO2, water and the corresponding aldehydes.
- Ninhydrin yields a similar blue-purple reaction upon reaction with primary amines and ammonia. The reagent also reacts with amino acids such as proline to yield a yellow to red product. Under controlled conditions the color development is quantitative. Several other color reactions are generally specific to individual amino acids.
- These are particularly useful for locating specific amino acids, or peptides containing these amino acids on paper chromatograms. Amino acid residues for which good color tests have been achieved are arginine, cysteine, proline, hydroxyproline, tryptophan and tyrosine.

أول تيست لل amino acids هو Ninhydrin test
هو يُعتبر strong oxidizing agent بسحب ال amino acids وبعمل decarboxylate the amino acids
ف بطلّع ال CO2 والماء والألديهايد
بهمني إنه هاي ال amino group إلّي سحبها بتتفاعل مع molecule's 2 من هاد ال Ninhydrin وبعطينا ال
blue - purple color

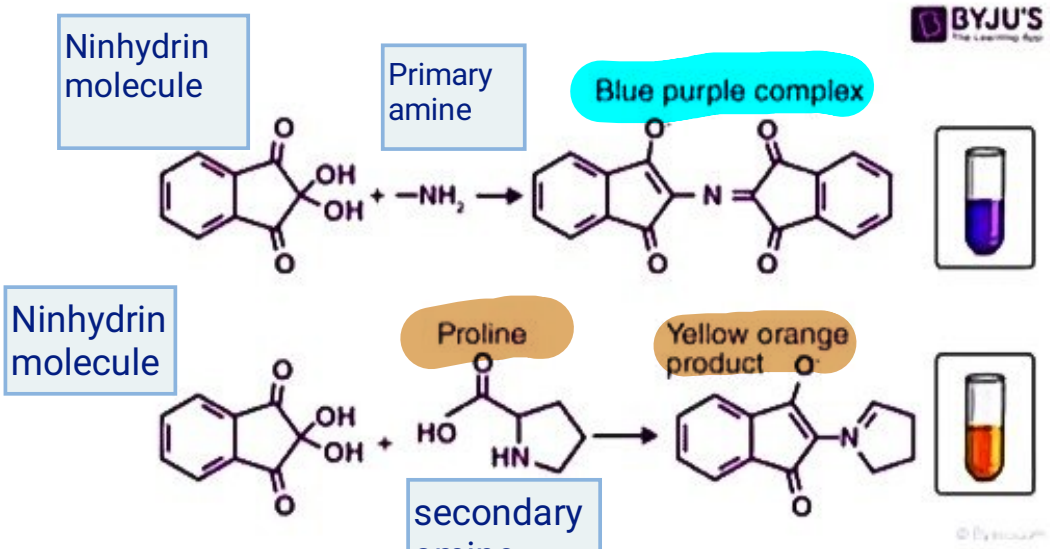
طبعاً هاد ال reaction بكون لل primary amine's and ammonia
أما بخصوص ال secondary amine's متل ال proline إلّي بحتوي على imino group, رح يعطينا
yellow -red color

وممكن أعمل control لل condition إلّي بصير فيه التفاعل وأحصّل على quantitative analysis of amino
acids ف بقدر أحسب قدييه ال concentration لل amino acids وهكذا

طبعًا درسوا ال amino acids وشافوا التغييرات إلّي بتصير باللون بكل reaction ف وجدوا إنه هاد التفاعل كان
بعطينا أحسن نتائج مع ال :
Arginine, Cysteine, Proline, Hydroxyproline, tryptophan, tyrosine

ف بقدر مثلاً لو فصلت ال amino acids بال paper chromatography ( وهاي بتفصل ال amino acids
حسب ال polarity وال solubility الهم في ال solvent) وبس ينفصلوا بحط عليهم من ال Ninhydrin ف
بطلع عندي اللون

# NINHYDRIN TEST:

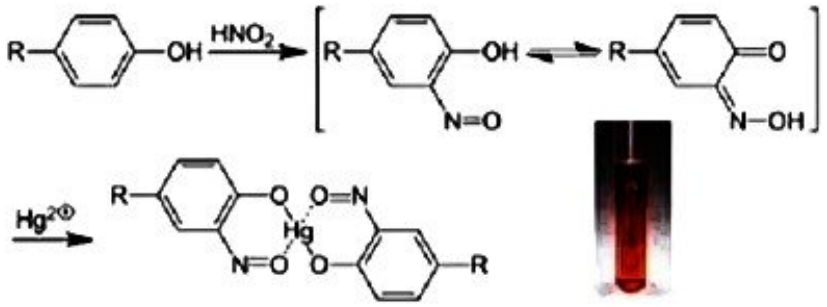



Proline:

- **Procedure:**
- **In different test tubes containing 15 drops different amino acids and protein, add 0.5 ml of 0.1% ninhydrin, heat to boil for 1-2 minutes, allow cooling Repeat with ammonia instead of protein.**

# MILLON'S REACTION:

- Specific for tyrosine and proteins containing it.
- Millon's reagent is a mixture of mercurous and mercuric nitrates in nitric acid which reacts with the phenolic ring of tyrosine to form red mercury phenolate.
- Inorganic salts in large amounts interfere with the reagent by precipitating mercury.




- Procedure:
- In a test tube, add 6-8 drops of millon's reagent to 2 ml of tyrosine solution. A white precipitate may form (HNO3Hg++) Heat the tube to the boiling point, if a brick red color developed add 2-3 drops of the reagent and heat again. Write your observation

تاني تيست هو Millons reaction
هو مخصص أو specific لل tyrosine وللبروتينات إلّي بتحتوي على ال tyrosine

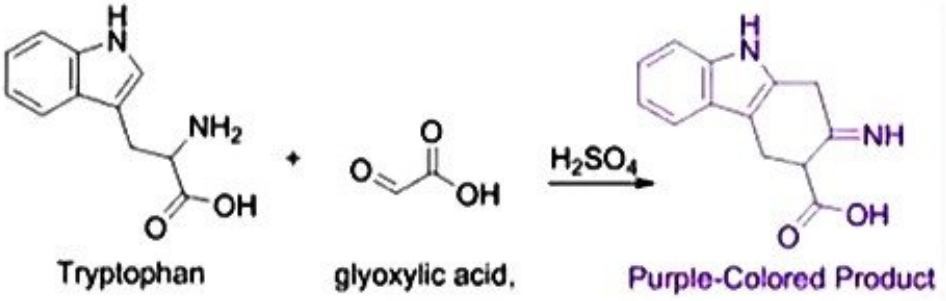
ال million's هو عبارة عن mercurous and mercuric nitrate يعني (heavy metal ) بتتفاعل مع ال tyrosine وبشكّل Mercury phenolate وبعطينا red brick color.

بتيجي هاي ال nitrates وبترتبط بال meta position وبعدها بشكل complex متل ما شايفين بالمعادلة وبعطينا اللون ك positive result

هون لازم أعمل ال test للبروتين والحمض الأميني ، لأنه ممكن لو كان بروتين يعطينا اللون هاد ! مع إنه هاد فحص أو تيست لل amino acids بس ليش أعطانا اللون ؟ لأنه ممكن هاد البروتين بتحتوي على tyrosine

# HOPKINS-COLE REACTION:

- The test is specific for proteins containing tryptophan due to the interaction of an aldehyde of glyoxylic acid with indole nucleous.
- Glyoxylic acid is prepared from glacial acetic acid by being exposed to sunlight




Tryptophan glyoxylic acid, Purple-Colored Product

- Procedure:
- Mix 3 ml of tryptophan solution with an equal volume of Hopkins-Cole reagent in a test tube, gently add 3-5 ml of conc H2SO4 along the side of the tube(DON'T MIX) Notes the result

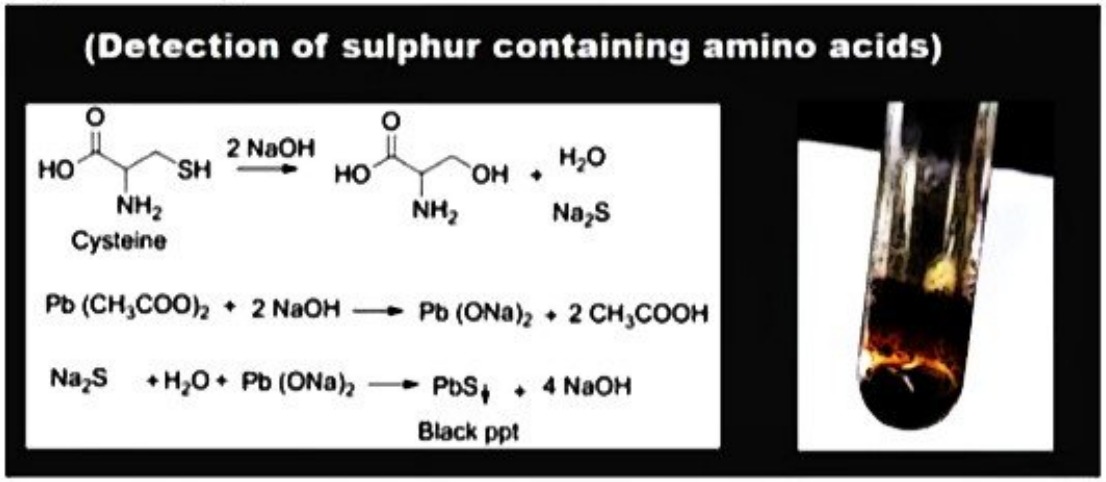
تالت تيست هو Hopkins -cole
بكون specific لل tryptophan وللبروتينات إلّي بتحتوي على tryptophan
هو عبارة عن interaction من ال aldehyde of glyoxylic acid مع ال indole of tryptophan

شو هو ال glyoxylic acid ؟ عبارة عن glacial acetic acid مُعرّض للشمس ( عبارة عن حمض الخل المركّز )
واللون الناتج purple
والمعلومة الأهم إنه هالتفاعل لحتى يصير بتطلّب وجود H2SO4

شوفوا المعادلة الموجودة بالسلايد

# SULFUR REACTION:

- Sulfur containing amino acids on heating with KOH, a black lead sulphide precipitate is formed by reacting with lead acetate




- Procedure:
- In two separate test tubes, place 2ml of cysteine solution, add 2ml of 10%KOH and mix. Add 2 drops of 1% lead acetate solution, boil the mixture of the tube The color will deepen into black if sufficient sulfur is present.

آخر تيست هو Sulfur reaction

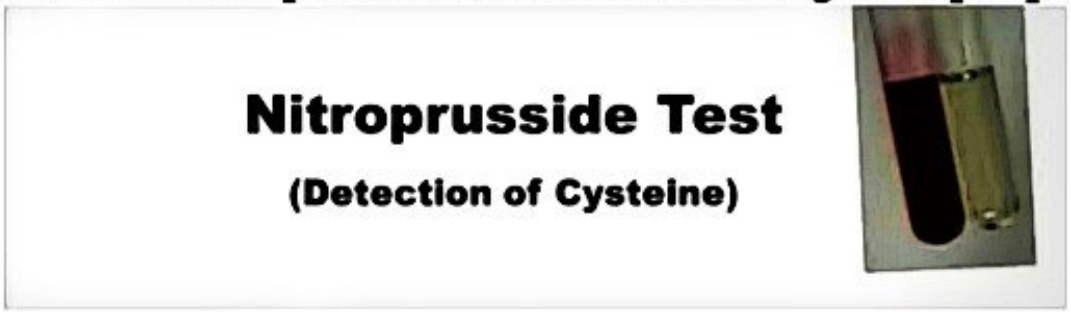
و إلّي بكون specific of sulfur containing amino acids متل ال Cysteine إلّي بحتوي على sulfhydryl group

ف بوجود ال KOH أو NaOH مع تسخين رح يطلع عنا ال sulfhydryl group من ال Cysteine على شكل Na2S

وبعد هيك مع ال lead وال NaOH رح يطلع عنا reagent بتفاعل مع Na2S ويعطينا lead Sulfide بكون على شكل black ppt

# NITROPRUSSIDE TEST:

- It is specific for cysteine, the only amino acid contains sulfhydryl group (SH) which reacts with sodium nitroprusside in the presence of ammonia to give a purple color




$$Na_2(CN)_5Fe(NO)_2H_2O + HS\text{-}CH_2CHNH_2COOH \xrightarrow{NH_4OH} \text{Red complex}$$

Na-Nitroprosside Cys

- Procedure:
- In two separate test tubes, place 2 ml of solution (cysteine or cystine). Add 2ml of 20% NaOH Add 5-6 drops of 2% Na nitroprusside solution What do you observe

آخر تيست مهم جدًا وهو Nitroprusside test
بكون specific لل cysteine لأنه هو الوحيد إلّي بحتوي على sulfhydryl group

بتفاعل مع sodium Nitroprusside وبعطينا purple color ك positive result

وبضيف عليه ammonia hydroxide
وممكن أستخدمه لل cysteine and cystine

بس بال cystine بضيفوا عليه sodium sianid لحتى يصيرله reduction
ويعطينا اللون لأنه ال cystine ما بتفاعل مع ال Nitroprusside لحاله