

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
ФГБОУ ВО «ВГУ»

М.И. Фалалеева, А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
РОЛЬ АМИНОКИСЛОТ, ПЕПТИДОВ И
БЕЛКОВ**

Учебное пособие для студентов вузов

Издательско-полиграфический центр
Воронежского государственного университета

2015

УДК 577

Фалалеева М.И., Епринцев А.Т., Федорин Д.Н.

Структурная роль аминокислот, пептидов и белков: учебное пособие для студентов вузов / М.И. Фалалеева, А.Т. Епринцев, Д.Н. Федорин. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2015. – 77 с.

В учебном пособии изложен материал по структурной биохимии от просто устроенных аминокислот до полифункциональных белковых молекул, обеспечивающих протекание разнообразных специфических процессов; содержится также краткое описание основных методов выделения и очистки белков. В учебном материале приводятся разнообразные задачи и тестовые задания, позволяющие читателю провести самотестирование усвоения полученных знаний.

Рекомендовано научно-методическим советом биолого-почвенного факультета Воронежского государственного университета в качестве учебного пособия для бакалавров вузов биологических специальностей.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ	6
1.1. Структура и классификация аминокислот	6
1.2. Нестандартные аминокислоты	9
1.3. Оптические свойства аминокислот	9
1.4. Кислотно-основные свойства аминокислот	10
1.5. Биологические функции аминокислот	15
1.6. Пептиды: общие сведения	15
1.7. Биологическая роль пептидов	17
1.8. Медицинское значение пептидов	19
Вопросы и задания	19
2. БЕЛКИ	28
2.1. Типы связей между аминокислотами в молекуле белка	28
2.2. Пространственная структура белковой молекулы	31
2.3. Физико-химические свойства белков	36
2.4. Классификация белков	41
2.4.1. Классификация белков по составу	41
2.4.2. Классификация белков по функциям	45
2.4.3. Классификация белков по форме молекулы	46
2.4.3.1. Фибриллярные белки	47
2.4.3.2. Глобулярные белки	50
2.5. Выделение и очистка белков	51
2.5.1. Разрушение клеток и экстракция	52
2.5.2. Концентрирование	53
2.5.3. Диализ	54
2.4.4. Тепловая денатурация	54
2.4.5. Осаждение белков	55
2.4.6. Осаждение белков органическими растворителями	56
2.4.7. Гель-фильтрация	57
2.4.8. Хроматографические методы	60
2.4.8.1. Ионообменная хроматография	60
2.4.8.2. Аффинная хроматография	62
2.4.8.3. Гидрофобная хроматография	64
2.4.8.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ,	64

HPLC)	
2.4.9. Электрофорез	65
2.4.10. Кристаллизация белков	72
Вопросы и задания	74
ЛИТЕРАТУРА	77

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия – наука о химическом составе живой материи и о химических процессах, происходящих в живых организмах и лежащих в основе их жизнедеятельности. В учебных целях биохимию принято делить на структурную и метаболическую. Структурная биохимия изучает природу и свойства веществ, образующих живой организм, динамическая биохимия – все химические превращения вещества, происходящие в процессе жизнедеятельности организмов, и сопровождающие эти превращения изменения энергии. Структурная и метаболическая биохимии тесно связаны между собой – нельзя понять биохимические процессы, идущие в живом организме, не зная его состава и химической природы образующих его веществ.

Ежегодно в научной литературе появляются многочисленные публикации по данной дисциплине, однако использование подобного материала в учебном процессе вызывает затруднения из-за сложности и большого объема информации. В нашем учебном пособии представлен материал по биохимии, касающийся строения и функций аминокислот, пептидов и белков; содержится краткое описание основных методов очистки белков.

Учебное пособие «Аминокислоты, пептиды и белки» предназначено для бакалавров, изучающих общий курс «Биохимия», для расширения знаний по данной дисциплине. Особый интерес материалы данного издания представляют для студентов и аспирантов, специализирующихся по биохимии, физиологии растений, микробиологии.

1. АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ

1.1. Структура и классификация аминокислот

Белки в количественном отношении занимают первое место среди всех содержащихся в живой клетке макромолекул. В одной клетке можно обнаружить сотни различных видов этих макромолекул. Белки выполняют многообразные биологические функции, поскольку они служат молекулярными инструментами, с помощью которых генетическая информация находит свое реальное воплощение. Для построения всех белков используется один и тот же набор аминокислот, ковалентно связанных между собой в определенной последовательности.

Протеиногенными называются 20 аминокислот, которые кодируются генетическим кодом и включаются в белки в процессе *трансляции*.

Каждая из 20 аминокислот (рис.1) содержит α -карбоксильную группу, α -аминную группу и специфическую для данной аминокислоты R-группу, замещающую водород при α -атоме углерода. R-группы аминокислот могут отличаться по:

- растворимости в воде;
- электрическому заряду;
- структуре.

Классификация аминокислот на основе их R-групп:

- неполярные (гидрофобные);
- полярные, но незаряженные;
- отрицательно заряженные;
- положительно заряженные

К неполярным аминокислотам относятся *глицин, аланин, валин, лейцин* и *изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин*. R-группы этого класса аминокислот представляют собой углеводороды, и, следовательно,

они гидрообны. К данному классу относятся 5 аминокислот с алифатическими R-группами, две аминокислоты с ароматическими кольцами, одна аминокислота, содержащая серу (метионин). Особо необходимо выделить пролин. Боковая цепь пролина состоит из пятичленного цикла, включающего α -углеродный атом и α -аминогруппу. Поэтому пролин, строго говоря, является не аминокислотой, а иминокислотой. Атом азота в кольце является слабым основанием и не протонируется при физиологических значениях pH. Благодаря циклической структуре пролин вызывает *изгибы полипептидной цепи*, что очень существенно для структуры коллагена.

К полярным, но незаряженным аминокислотам относятся серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин. Эти аминокислоты лучше растворимы в воде, то есть они более гидрофильны, чем неполярные аминокислоты. Их функциональные группы образуют водородные связи с молекулами воды. Эти аминокислоты содержат гидроксильные (*серин, треонин*) или карбоксамидные группы (*аспарагин, глутамин*). Хотя амидные группы неионогенны, молекулы аспарагина и глутамина высоко полярны. Полярность цистеина обусловлена его тиоловой группой. Благодаря образованию дисульфидных мостиков, цистеин выполняет важную функцию стабилизации пространственной структуры белков. Аминокислота *цистин* состоит из двух остатков цистеина, соединенных дисульфидным мостиком.

Карбоксильные группы боковых цепей кислых аминокислот — *аспарагиновой* и *глутаминовой* — полностью ионизированы во всем диапазоне физиологических значений pH.

Три аминокислоты содержат положительно заряженные радикалы (аргинин, лизин, гистидин). Эти аминокислоты при pH7 несут суммарный положительный заряд. Сильно основной, а, следовательно, очень полярной аминокислотой, является аргинин, содержащий гуанидиновую группировку.

Лизин имеет вторую аминогруппу, прикрепленную к алифатической цепи в ε-положении. Гистидин содержит имидазольное кольцо.

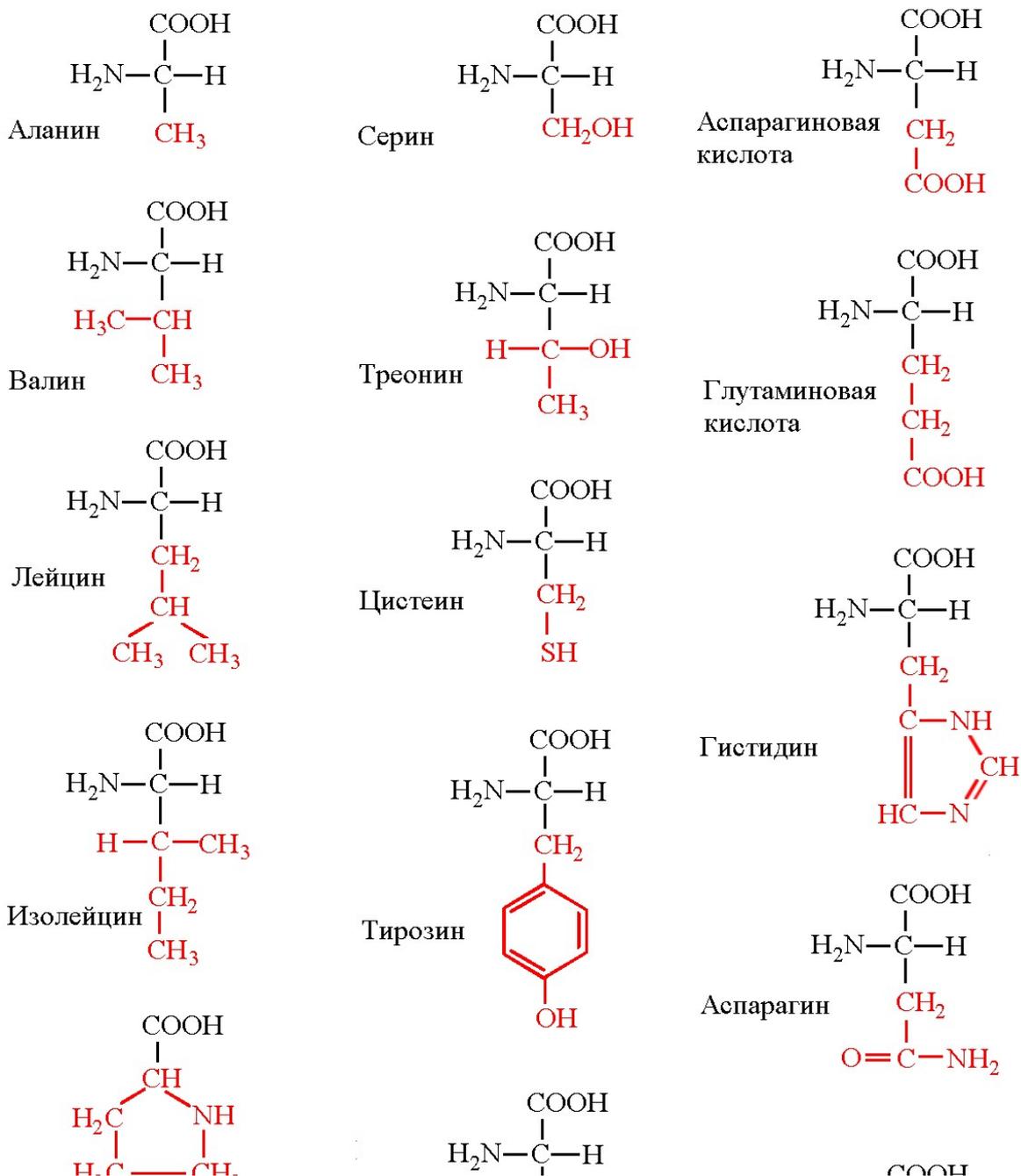


Рис. 1. Структурные формулы аминокислот

Некоторые из перечисленных аминокислот являются незаменимыми (аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин), так как не могут синтезироваться в организме человека и должны поступать вместе с пищей.

1.2. Нестандартные аминокислоты

Кроме 20 стандартных аминокислот, встречающихся почти во всех белках, существуют нестандартные аминокислоты, которые являются компонентами лишь некоторых типов белков, пептидов или выполняют регуляторную функцию. Нестандартные аминокислоты являются лишь производными обычных аминокислот.

5-Гидроксилизин и гидроксипролин – обе эти аминокислоты входят в состав коллагена – фибриллярного белка соединительной ткани. Гамма-карбоксиглутаминовая кислота обнаружена в протромбине – белке, который отвечает за свертывание крови (протромбин при выполнении своей функции связывает ионы кальция). В глутатионпероксидазе открыт селеноцистеин, в котором ОН-группа серина заменена на селен. Десмозин – аминокислота, производная лизина. Десмозин содержится в белке эластине. Благодаря своей разветвленной структуре одна молекула десмозина может входить одновременно в четыре пептидные цепи. Этим самым она скрепляет различные нити эластина и придает этому белку эластичность. Дийодтирозин является основой структуры гормонов щитовидной железы.

1.3. Оптические свойства аминокислот

Природные аминокислоты являются *2-аминокарбоновыми кислотами* (или α -аминокислотами, в отличие от β -аминокислот, таких, как β -аланин и таурин). У α -аминокислот при атоме С-2 (C_{α}) имеются четыре различных заместителя: карбоксильная группа, аминогруппа, водородный атом и боковая цепь R. Таким образом, все α -аминокислоты, кроме глицина, имеют *асимметрический* (хиральный) α -углеродный атом и существуют в виде двух энантиомеров (L- и D-аминокислот) (рис. 2).

Оптические изомеры аланина

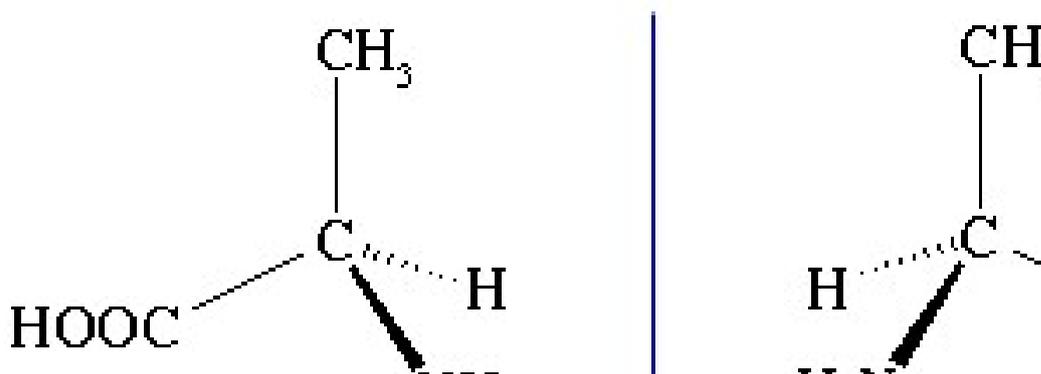


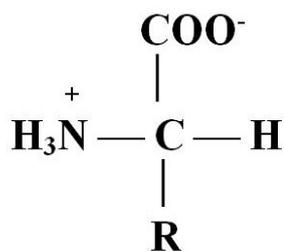
Рис. 2. Оптические свойства аминокислот

На плоскости хиральные центры принято изображать с помощью проекционных формул, предложенных Фишером.

Протеиногенные аминокислоты относятся к L-ряду. D-Аминокислоты встречаются в бактериях, например, в составе муреинов, и в пептидных антибиотиках. Способность синтезировать только L-формы аминокислот является уникальной особенностью живых систем, так как при химическом синтезе образуется равное количество D- и L.

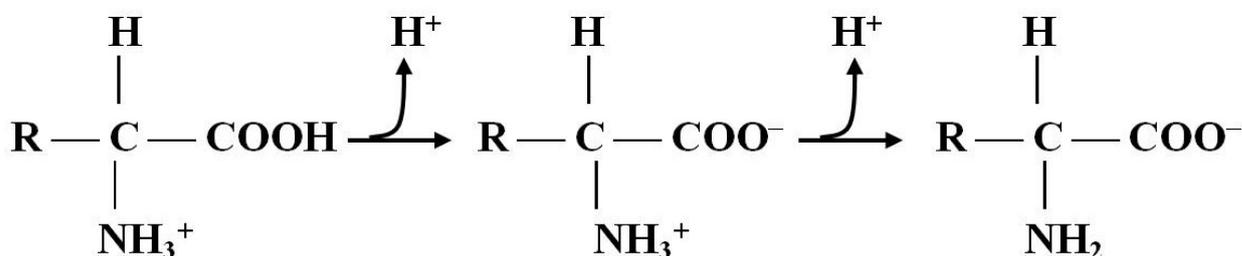
1.4. Кислотно-основные свойства аминокислот

При растворении в воде аминокислоты ионизируются и ведут себя как кислоты и основания. α -Аминокислоты, содержащие одну аминогруппу и одну карбоксильную группу, кристаллизуются из нейтральных водных растворов в виде полностью ионизированных молекул, которые называются биполярными ионами или цвиттерионами. Хотя такие ионы и несут на своих "полюсах" электрические заряды противоположного знака, в целом они электрически нейтральны и поэтому не смещаются под действием электрического поля.



**Биполярная форма
(цвиттерион)**

В водном растворе аминокислоты, например, аланин существуют в форме биполярных ионов, которые функционируют либо как кислоты, либо как основания. Вещества с такими двойственными свойствами называются амфотерными. Простая моноаминомонокарбоновая α -аминокислота, такая как аланин, представляет собой по существу двухосновную кислоту, когда она находится в полностью протонированной форме, то есть, когда протоны присоединены и к аминогруппе и к карбоксильной группе. В этой форме она имеет 2 группы, от которых в процессе диссоциации отщепляются 2 протона, согласно следующему уравнению:



Способность кислоты отдавать свой протон, характеризуется ее константой диссоциации

$$\left(K' = \frac{[\text{H}^+][\text{HA}^-]}{[\text{HA}]} \right),$$

или величиной pK' , определяемой как $-\lg K'$.

pK' - это величина pH , при котором функциональная группа ионизирована на 50%, то есть представляет собой смесь в соотношении 50:50.

Величины pK' ионизируемых групп некоторых аминокислот при 25°

Аминокислота	pK'_1 (-COOH)	pK'_2 (-NH ₃ ⁺)	pK' R-группы
Глицин	2,34	9,60	
Аланин	2,34	9,69	
Лейцин	2,36	9,60	
Серин	2,21	9,15	
Треонин	2,63	10,43	
Глутамин	2,17	9,13	
Аспарагиновая кислота	2,09	9,82	3,86
Глутаминовая кислота	2,19	9,67	4,25
Гистидин	1,82	9,17	6,00
Лизин	2,18	8,95	10,53
Аргинин	2,17	9,04	12,48

На рисунке 3 дана кривая титрования аланина, находящегося вначале в полностью протонированной форме. Титрование проходит через две стадии, каждой из которых соответствует отщепление одного протона.

Первая стадия титрования:

I. В самом начале титрования аланина, его молекула находится в полностью протонированной форме, и в растворе преобладают ионы $^+NH_3-CHR-COOH$.

II. В следующей точке участка кривой происходит отщепление протона от карбоксильной группы, в среде присутствуют эквимольные концентрации донора ($^+NH_3-CHR-COOH$) и акцептора ($^+NH_3-CHR-COO^-$) протонов. Этой средней точке соответствует значение pH, численно равное величине pK' титруемой группы (pH 2,34).

III. Продолжением титрования достигается следующая важная точка, отвечающая pH 6,02, - точки перегиба кривой. В этот момент заканчивается стадия отщепления первого протона и начинается стадия отщепления второго протона. При этом значение pH аланин находится преимущественно в форме биполярного иона $^+NH_3-CHR-COO^-$.

Вторая стадия титрования:

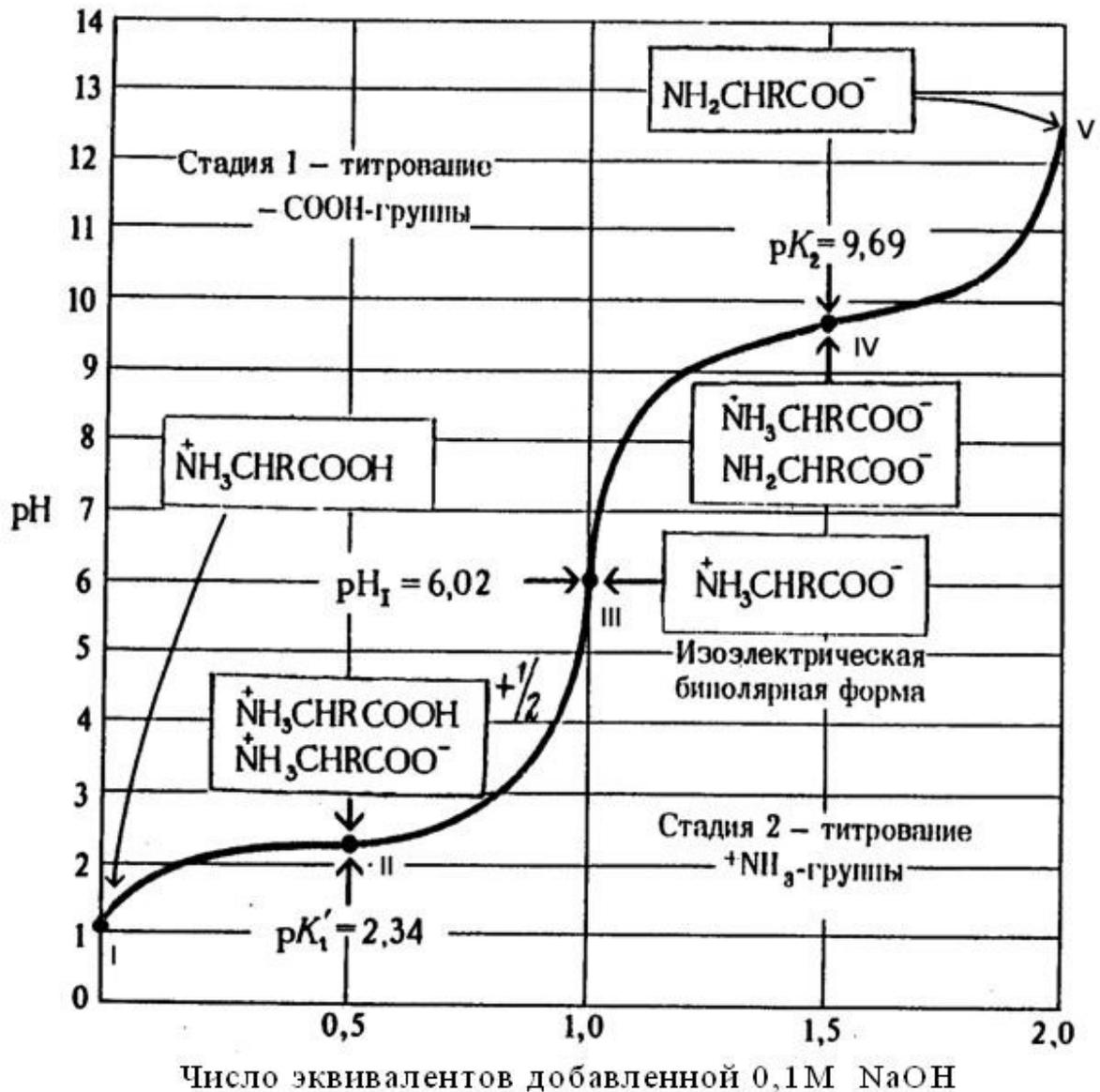


Рис. 3. Кривая титрования 0.1 М аланина 0.1М раствором NaOH.

На второй стадии титрования происходит отщепление протона от NH_3^+ -группы аланина.

IV. Эта точка соответствует эквимолярным концентрациям ионов $NH_3^+-CHR-COO^-$ и $+NH_2-CHR-COO^-$. Значение pH в этой точке равно 9,69, такое же значение имеет и pK' NH_3^+ -группы аланина. V. Титрование завершается приблизительно при pH 12, когда аланин находится преимущественно в форме полностью депротонированных ионов $+NH_2-CHR-COO^-$.

Из кривой титрования аланина можно извлечь ряд ценных сведений. Прежде всего, она дает нам количественную информацию о величинах pK' каждой из двух ионизируемых групп: карбоксильная группа имеет pK' 2,34, а замещенная аммонийная группа pK' 9,69. Из кривой титрования аланина можно узнать еще об одном важном факте: эта аминокислота проявляет буферные свойства в двух областях pH . Одна буферная зона расположена между значениями pH 2 и 3, а другая зона расположена между значениями pH 8,7 и 10,7. Из кривых титрования аминокислот следует также, что между pH раствора и суммарным электрическим зарядом аминокислоты существует определенное соотношение. При pH 6,02, соответствующем точке перегиба кривой титрования, где одна стадия титрования переходит в другую, аланин находится в форме биполярного иона (цвиттериона), который полностью ионизирован, но не имеет суммарного электрического заряда. При этом значении pH молекула аланина электрически нейтральна и не смещается в электрическом поле. Это значение pH называется изоэлектрической точкой (pH_I). Изоэлектрическая точка представляет собой среднее арифметическое двух величин pK' .

$$pH_I = 1/2 (pK'_1 + pK'_2);$$

отсюда изоэлектрическая точка аланина равна

$$pH_I = 1/2 (2,34 + 9,69) = 6,02.$$

При любом значении pH , превышающем изоэлектрическую точку, аланин имеет суммарный отрицательный заряд и движется в электрическом поле в сторону положительного электрода (анода). При любом значении pH ниже электрической точки аланин несет суммарный положительный заряд и движется в электрическом поле в сторону отрицательного электрода (катода).

1.5. Биологические функции аминокислот

В живых организмах аминокислоты выполняют множество функций.

1. Структурные элементы пептидов и белков. В состав белков входят 20 *протеиногенных аминокислот*, которые кодируются генетическим кодом и постоянно обнаруживаются в белках.
2. Структурные элементы других природных соединений. Аминокислоты и их производные входят в состав коферментов, желчных кислот, антибиотиков.
3. Переносчики сигналов. Некоторые из аминокислот являются нейромедиаторами или предшественниками нейромедиаторов, медиаторов или гормонов.

Глицин, например, являясь нейромедиатором, обеспечивает процессы защитного торможения в центральной нервной системе.

Биогенные амины (гистамин, серотонин, мелатонин) и катехоламины (дофа, дофамин, норадреналин и адреналин) образуются путем декарбоксилирования аминокислот.

4. Метаболиты. Аминокислоты — важнейшие, а многие из них жизненно важные компоненты питания. Некоторые аминокислоты принимают участие в обмене веществ, например, служат донорами азота в синтезе азотистых оснований. Непротеиногенные аминокислоты образуются в качестве промежуточных продуктов при биосинтезе и деградации протеиногенных аминокислот.

1.6. Пептиды: общие сведения

Остатки аминокислот при образовании пептидов объединяются посредством пептидной связи с α -карбоксильной и α -аминогруппой (рис. 4). Цепь повторяющихся групп —NH—CH—CO— называется пептидным остовом. На этом стержне располагаются радикалы аминокислот. Пептидная цепь имеет одно направление и два разных конца — N-конец, несущий

свободную аминогруппу первой аминокислоты, и С-конец, несущий карбоксильную группу последней аминокислоты (рис. 5).

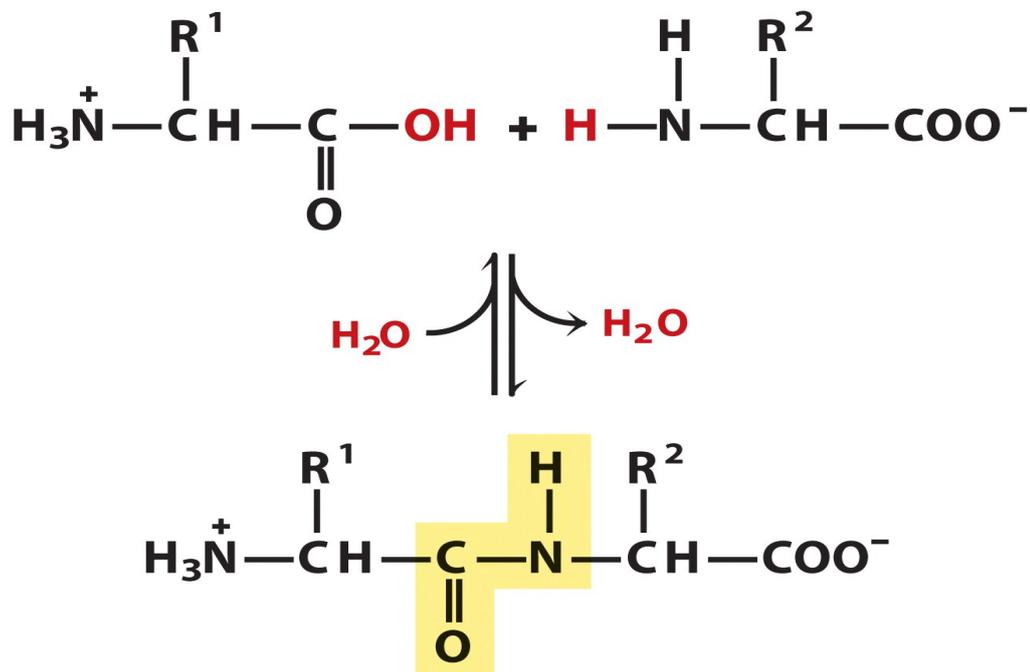


Рис. 4. Образование пептидной связи

Полипептиды млекопитающих содержат пептидные связи, образованные между альфа-аминогруппой и альфа карбоксильной группой протеиногенных аминокислот. Однако в состав некоторых полипептидов могут входить и нестандартные аминокислоты или производные протеиногенных аминокислот. Для того чтобы назвать конкретный пептид, достаточно перечислить (начиная с N-конца) последовательность входящих в его состав аминокислотных остатков в трехбуквенном или однобуквенном коде. При названии пептидов к сокращенному названию аминокислоты добавляют суффикс -ил, за исключением последней С-концевой аминокислоты.

Пептиды, содержащие менее, чем 10 аминокислотных остатков, называются олигопептидами. Пептиды, содержащие более, чем 10 аминокислотных остатков, называются полипептидами. Количество аминокислотных остатков - не более 50. Столько же аминокислот могут

содержать и некоторые небольшие белки. Условная граница между полипептидами и белками лежит в области молекулярной массы 6000.

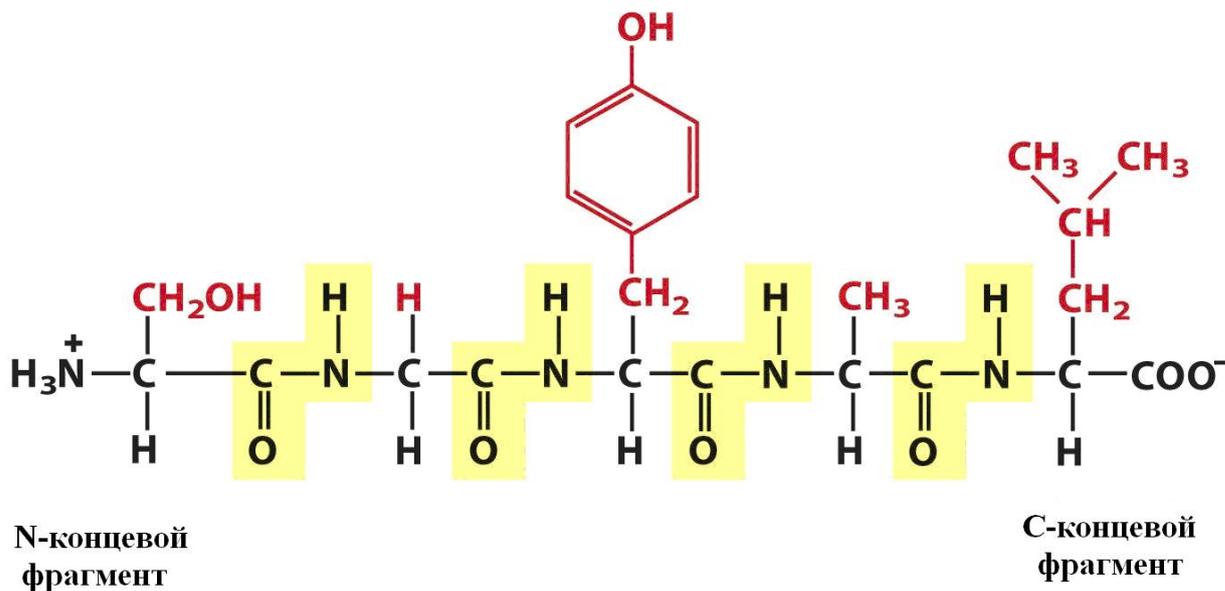


Рис.5. Строение пептида

Для большинства пептидов свойственна высокая активность. Физико-химические свойства пептидов определяются свойствами входящих в него кислот.

Свойства пептидной связи:

- 1) полуторная;
- 2) плоская;
- 3) жесткая.

Связь C-N является частично кратной из-за взаимодействия неподеленной пары электронов атома N с π -электронами карбонильной группы C=O (p- π сопряжение). Это приводит к затрудненному свободному вращению вокруг связи C-N (барьер вращения 63-84 кДж/моль).

1.7. Биологическая роль пептидов

1. Пептидами являются многие важнейшие гормоны человека, например, глюкагон, окситоцин, вазопрессин. Например, инсулин -

вырабатывается β -клетками поджелудочной железы, стимулирует способность клеток использовать глюкозу в качестве энергетического топлива; глюкагон – действует как антагонист инсулина; кортикотропин – вырабатывается передней долей гипофиза, стимулирует функционирование надпочечников.

2. Пептиды, регулирующие процессы пищеварения, например, гастрин, холецистокинин.

3. Пептиды, регулирующие тонус сосудов и артериальное давление, например, ангиотензин II, брадикинин.

4. Пептиды, регулирующие аппетит, например, лептин, β -эндорфины.

5. Пептиды, обладающие обезболивающим действием, например, опиоидные пептиды (энкефалины и эндорфины). Связывание энкефалинов со специфическими рецепторами некоторых клеток мозга приводит к ослаблению болевых ощущений. Энкефалины представляют собой наркотики, вырабатываемые самим организмом. Они связываются с теми же участками, что и героин и другие наркотики.

6. Пептиды, участвующие в регуляции высшей нервной деятельности, в биохимических процессах, связанных с механизмами сна, памяти, обучения и т.д.

7. Трипептид глутатион выполняет функцию защиты клетки от окислительных повреждений свободными радикалами.

8. Дипептиды карнозин и ансерин постоянно присутствуют в мышечных волокнах, стабилизируя уровень pH.

9. К пептидам относят и очень токсичные вещества, содержащиеся в грибах, а также многие антибиотики. Это своего рода «химическое оружие», производимое одними микроорганизмами в борьбе с другими микроорганизмами.

1.8. Медицинское значение пептидов

Пептиды используются в качестве лекарственных препаратов, например, пептидами являются некоторые антибиотики, противоопухолевые препараты.

В процессе распада эндогенных белков образуются среднемолекулярные пептиды (СМП). Основная часть СМП представлена полипептидами с молекулярной массой 300—5000 Д. СМП обладают разнообразной биологической активностью. В физиологических условиях 95% среднемолекулярных пептидов удаляются главным образом путем гломерулярной фильтрации.

Ослабление экскреторной функции почек и неполный распад белков (протеолиз) приводят к увеличению концентрации СМП в плазме (сыворотке) крови. Причем концентрация средних молекул в сыворотке больного может в 8—10 раз превышать норму.

Накопление СМП приводит к нарушению микроциркуляции, а также транспорта ионов натрия и калия через мембраны, подавлению иммунного ответа организма, угнетению активности ряда ферментов. В клинической практике СМП определяют как критерий интоксикации.

Вопросы и задания

1. Связь между кривой титрования и кислотно-основными свойствами аланина. 0,1 молярный раствор (рН 1,7) аланина был оттитрован 2 молярным раствором NaOH. В ходе титрования производилась регистрация рН, полученные данные были отложены на графике, представленном на рисунке 1. Наиболее важные точки на графике обозначены римскими цифрами от I до V. Какую из этих 5 точек на кривой титрования следует указать, отвечая на поставленные ниже вопросы:

а) Какая точка соответствует рН, при котором в 0,1 М растворе аланина эта аминокислота существует в форме ионов $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$?

- б) В какой точке средний суммарный заряд молекулы аланина равен $+1/2$?
- в) В какой точке аминокруппы ионизированы у половины молекул аланина?
- г) В какой точке значение pH равно величине pK' ионизации карбоксильной группы аланина?
- д) В какой точке значение pH равно величине pK' ионизации протонированной аминокруппы аланина?
- е) В какой точке аланин обладает максимальной буферной емкостью?
- ж) В какой точке средний суммарный заряд аланина равен 0?
- з) В какой точке карбоксильная группа аланина оказывается полностью оттитрованной?
- и) В какой точке ионизирована половина карбоксильных групп?
- к) В какой точке аланин полностью оттитрован?
- л) В какой точке молекулы аланина превращаются на 50% в ионы $H_3N^+-CH_2-COO^-$ и на 50% в ионы $H_2N-CH_2-COO^-$?
- м) В какой точке суммарный заряд молекулы равен 1?
- н) Какой точке соответствует конец титрования?

2. Электрофорез аминокислот на бумаге. Каплю раствора, содержащего смесь глицина, аланина, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина и гистидина, нанесли на середину полоски бумаги и дали ей высохнуть. Затем бумагу смочили буфером с pH 6 и к концам полоски приложили электрическое напряжение.

- а) Какая аминокислота будет двигаться к аноду?
- б) Какая аминокислота будет двигаться к катоду?
- в) Какая аминокислота останется на стартовой точке или вблизи нее?

3. При каком значении pH наиболее целесообразно электрофоретическое фракционирование следующих белковых смесей:

- а) уреазы и гемоглобина (ИЭТ 5,0 и 6,8 соответственно);
- б) цитохрома С и гемоглобина (ИЭТ 10,65 и 6,8 соответственно).

4. Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии.

Небольшое количество смеси вносят в верхнюю часть колонки, заполненной частицами полистирола, содержащими остатки сульфоновой кислоты. Затем через колонку пропускают буферный раствор.

Аминокислоты проходят через колонку с разными скоростями, поскольку их движение тормозят два фактора: 1) электростатическое притяжение между отрицательно заряженными остатками сульфоновой кислоты и положительно заряженными функциональными группами аминокислот; 2) гидрофобное взаимодействие между боковыми цепями аминокислот и сильным гидрофобным остовом полистирольной смолы.

Для каждой из выписанных ниже пар аминокислот определите, какая аминокислота данной пары будет сходить с колонки первая при пропускании через колонку буфера с рН 7:

- а) Аспарагиновая кислота и лизин;
- б) Аргинин и метионин;
- в) Глутаминовая кислота и валин;
- г) Глицин и лейцин;
- д) Серин и аланин.

5. Суммарный электрический заряд полипептидов. Полипептид, выделенный из мозга, имеет последовательность: глутаминовая кислота - гистидин - триптофан - серин - тирозин - глицин - лейцин - аргинин - пролин - глицин. Определите суммарный заряд молекулы при рН 3.

Какой ее суммарный заряд при рН 5,5, при рН 8 и при рН 11?

6. Изоэлектрическая точка пепсина. Пепсин желудочного сока имеет изоэлектрическую точку около 1, т.е. намного ниже, чем другие белки. Какие функциональные группы должны присутствовать в пепсине в относительно большом количестве, чтобы этот фермент мог иметь такую низкую изоэлектрическую точку. Какие аминокислоты имеют эти группы в своем составе?

7. Растворимость полипептидов. Растворимость крупных полипептидов в воде зависит от степени полярности их R-групп. Особенно от числа ионизируемых групп. Чем больше ионизируемых групп, тем выше растворимость полипептида. Какой полипептид из каждой пары нижеприведенных полипептидов более растворим в указанных условиях?

- а) (Глицин)₂₀ или (Глутаминовая кислота)₂₀ при рН 7;
- б) (лизин-аланин)₃ или (фенилаланин-метионин)₃ при рН 7;
- в) (аланин-серин-глицин)₅ или (аспарагин-серин-гистидин)₅ при рН 9.

8. Каков будет суммарный заряд глутаминовой кислоты, если рН среды:

- а) 1,0; б) 2,7; в) 4,0. Следует указать "+", "-" или 0.

9. Аминокислоты аланин, лизин, глутаминовая кислота соединены пептидной связью. Какой заряд приобретает этот пептид в нейтральной, кислой и щелочной среде?

10. Растворимость: высаливание. Чистые белки большей частью нерастворимы в дистиллированной воде, но разбавляются в разбавленных солевых растворах. Однако, при добавлении к водному раствору белка нейтральных солей высокой концентрации, белок выпадает в осадок. Это явление называют высаливанием. Объясните на молекулярном уровне, почему добавление солей высокой концентрации приводит к понижению растворимости белка.

11. Реакция, являющаяся характерной для всех α -аминокислот:

- 1. Биуретовая
- 2. Реакция с нингидрином
- 3. Реакция Сакагучи
- 4. Реакция Паули
- 5. Реакция Адамкевича.

12. Количественный набор аминокислот, содержащихся в природных белках:

- 1. 50
- 2. 15
- 3. 30

4. 25

5. 20

13. Найдите аминокислоту среди перечисленных соединений:

1. Серин

2. Креатин

3. Этаноламин

4. Тирозин

5. Треонин

14. Аминокислоты, имеющие основной характер:

1. Лизин

2. Аргинин

3. Аланин

4. Фенилаланин

5. Глицин

15. Аминокислоты, имеющие кислый характер:

1. Аланин

2. Лейцин

3. Глутаминовая кислота

4. Лизин

5. Аспарагиновая кислота

16. Функциональная группа, обуславливающая кислый характер аминокислоты:

1. $-\text{NH}_2$

2. $-\text{OH}$

3. $-\text{COOH}$

4. $-\text{CH}_3$

5. $-\text{Cl}$

17. Аминокислоты, передвигающиеся к аноду при электрофорезе при $\text{pH } 7,0$:

1. Лизин

2. Глутаминовая кислота

3. Аспарагиновая кислота
 4. Аргинин
 5. Гистидин
18. Аминокислоты, передвигающиеся к катоду при электрофорезе при рН 7,0:
1. Треонин
 2. Лизин
 3. Аргинин
 4. Глутаминовая кислота
 5. Аланин
19. . Изоэлектрическая точка белка:
1. Определенная величина рН раствора, при которой белковая молекула электронейтральна
 2. Определяется первичной структурой белка
 3. Зависит от молекулярной массы белка
 4. Зависит от конформации белковой молекулы
 5. Может изменяться в зависимости от рН раствора
20. Способность белка к растворению в воде зависит от:
1. Наличия полярных незаряженных аминокислот в структуре белка
 2. Наличия положительно и отрицательно заряженных аминокислот в белке
 3. Наличия неполярных аминокислот в структуре белка
 4. Количества аминокислот, входящих в состав белка
 5. Величины рН раствора
21. В кислой среде нейтральные белки:
1. Приобретают положительный заряд
 2. Приобретают отрицательный заряд
 3. Электронейтральны
 4. Передвигаются к отрицательно заряженному электроду при электрофорезе

5. Передвигаются к положительно заряженному электроду при электрофорезе

22. В щелочной среде нейтральные белки:

1. Приобретают положительный заряд
2. Приобретают отрицательный заряд
3. Электронеутральны

4. Передвигаются к отрицательно заряженному электроду при электрофорезе

5. Передвигаются к положительно заряженному электроду при электрофорезе

23. В процессе денатурации разрушаются:

1. Водородные связи, образующие между радикалами аминокислот
2. Пептидные связи
3. Все связи, характерные для нативной белковой молекулы
4. Ионные связи
5. Водородные связи между пептидными группами.

24. Под первичной структурой белка подразумевают:

1. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи
2. Взаимное пространственное расположение протомеров
3. Способ укладки отдельной полипептидной цепи в определенном

объеме

4. α -спираль
5. β -структуру

25. Под вторичной структурой белка подразумевают:

1. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи
2. Конфигурацию полипептидных цепи, обусловленную

способностью аминокислотных остатков к образованию водородных связей

3. β -структуру
4. α -спираль

5. Взаимное пространственное расположение протомеров
26. Формирование α -спирали в молекуле белка обусловлено:
1. Способностью аминокислотных остатков к образованию внутрицепочечных водородных связей
 2. L-аминокислотным составом природных белков
 3. Гидрофобными взаимодействиями между боковыми группами аминокислотных остатков
 4. Дисульфидными связями
 5. Аминокислотным составом и последовательностью аминокислот в полипептидной цепи
27. Под третичной структурой белка подразумевают:
1. α -спираль
 2. Способ укладки полипептидной цепи в определенном объеме
 3. Ассоциация субъединиц
 4. β -структуру
 5. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи
28. Третичную структуру белка стабилизируют:
1. Дисульфидные связи
 2. Водородные связи
 3. Электростатические взаимодействия заряженных групп
 4. Диполь-дипольные взаимодействия
 5. Гидрофобные взаимодействия
29. Под четвертичной структурой белка подразумевают:
1. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи
 2. α -спираль
 3. β -структуру
 4. Ассоциацию в пространстве отдельных субъединиц
 5. Способ укладки в пространстве отдельной полипептидной цепи.

30. Образование дисульфидных связей в молекуле белка происходит благодаря присутствию аминокислотных остатков:

1. Серина
2. Метионина
3. Аланина
4. Цистеина
5. Валина

31. Образование водородных связей в молекуле белка возможно между боковыми радикалами аминокислотных остатков:

1. Валина и аланина
2. Глутаминовой кислоты и тирозина
3. Серина и глутаминовой кислоты
4. Треонина и аспарагиновой кислоты
5. Изолейцина и фенилаланина

32. Образование электростатических связей в молекуле белка возможно между боковыми радикалами аминокислотных остатков:

1. Аспарагиновой кислоты и лизина
2. Аланина и глутаминовой кислоты
3. Глутамин и изолейцина
4. Аргинина и глутаминовой кислоты
5. Валина и цистеина

2. БЕЛКИ

Белки – природные высокомолекулярные полимеры, состоящие из остатков α -аминокарбоновых кислот, связанных амидной (пептидной) связью. Характерны неразветвленные пептидные связи и высокая молекулярная масса (количество аминокислотных остатков в белках 50 – 1000).

Всего в природе насчитывается несколько миллиардов различных белков.

2.1. Типы связей между аминокислотами в молекуле белка

В стабилизации пространственной структуры белка участвуют ковалентные и нековалентные типы связей, возникающие между аминокислотами остатками. К ковалентным связям относятся пептидные, псевдопептидные, дисульфидные и эфирные связи.

Пептидная связь в молекуле белка формируется только за счет альфа-аминогруппы и соседней карбоксильной группы общего для всех аминокислот фрагмента молекулы (рис.6).



Рис. 6. Пептидная связь в белковой молекуле

Если карбоксильные и аминогруппы входят в состав радикала, то они могут участвовать в формировании псевдопептидной связи в молекуле белка.

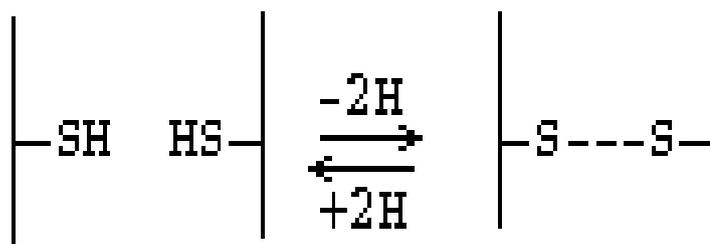


Рис. 7. Образование дисульфидной связи в молекуле белка

Дисульфидная связь (рис.7) образуется между радикалами двух молекул цистеина. Эта связь гораздо менее устойчива, чем пептидная связь, так как в организме интенсивно протекают окислительно-восстановительные процессы. Дисульфидная связь может возникать между разными участками одной и той же полипептидной цепи, тогда она удерживает эту цепь в изогнутом состоянии. Если дисульфидная связь образуется между двумя полипептидами, то она объединяет их в одну молекулу.

Эфирная связь в молекуле белка может возникать между аминокислотным остатком, содержащим гидроксильную группу и аминокислотным остатком, в состав радикала которого входит карбоксильная группа.

К нековалентным (слабым) типам связей относятся водородные, электростатические связи, а также гидрофобные взаимодействия. Слабые типы связей в десятки раз слабее ковалентных связей. Они очень чувствительны к изменениям условий среды (температуры, рН среды, ионной силы раствора и так далее).

Водородная связь возникает между двумя электроотрицательными атомами за счет атома водорода, который соединен с одним из электроотрицательных атомов ковалентно (рис. 8).

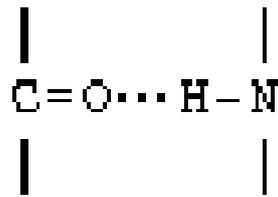


Рис. 8 Водородная связь в белковой молекуле

Водородная связь примерно в 10 раз слабее, чем ковалентная. Если водородные связи повторяются многократно, то они удерживают полипептидные цепочки с высокой прочностью. Водородные связи очень чувствительны к условиям внешней среды и присутствию в ней веществ, которые сами способны образовывать такие связи (например, мочевины).

Электростатическая связь возникает между положительно и отрицательно заряженными группировками (дополнительные карбоксильные и аминогруппы), которые встречаются в радикалах лизина, аргинина, гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

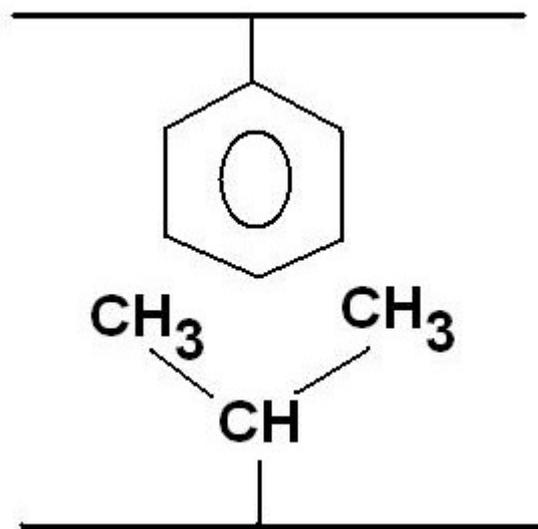


Рис. 9. Гидрофобные взаимодействия в белке

Гидрофобное взаимодействие - неспецифическое притяжение, возникающее в молекуле белка между радикалами гидрофобных аминокислот (рис. 9).

2.2. Пространственная структура белковой молекулы

Полипептидная цепь нативного белка (белка, сохранившего структуру присущую ему в живой клетке) в нормальных биологических условиях - обычная температура и нейтральные значения рН имеет, как правило, одну конформацию, называемую нативной (натуральной, естественной). Эта нативная конформация достаточно устойчива. Существуют первичная, вторичная, третичная и, введенная в 1958 г. Берналом, четвертичная структура белковой молекулы.

Первичная структура - это число и последовательность расположения аминокислотных остатков, образующих полипептидную цепь белковой молекулы. Для первичной структуры характерны только ковалентные связи и поэтому ее обозначают как ковалентную структуру.

Белки отличаются друг от друга по первичной структуре. Соединяя аминокислоты в различном порядке, можно получить почти бесконечное число последовательностей и, значит, почти бесконечное множество разнообразных белков. Следовательно, первичная структура гомологичных белков может быть применена в качестве критерия для установления родства между отдельными видами живых существ.

Первичная структура белков - основа для определения более высоких уровней их пространственной организации.

Вторичная структура - это упорядоченное строение полипептидных цепей, обусловленное водородными связями между группами С=О и N-H разных аминокислот. Эта структура является способом укладки остова (стержня) полипептидной цепи без учета укладки радикалов.

Вторичная структура формируется из первичной за счет образования упорядоченных участков полипептидной цепи: α -спирали, β -складчатости; кроме того, возникают неупорядоченные структуры.

Для белков характерна правозакрученная α -спираль. У всех пептидов, уложенных в такую спираль, эта спираль абсолютно одинакова. Она стабилизирована водородными связями, образованными между находящимися поблизости CO - и NH -группами пептидных связей данной полипептидной цепи. При этом кислород каждой CO -группы образует водородную связь с водородом четвертой по ходу цепи NH -группой. Благодаря α -спирали белковая молекула напоминает растянутую пружину. Один виток спирали включает 3,6 остатка аминокислот (11 атомов полипептидной цепи), высота одного витка по оси (шаг спирали) равна $\approx 0,54$ нм.

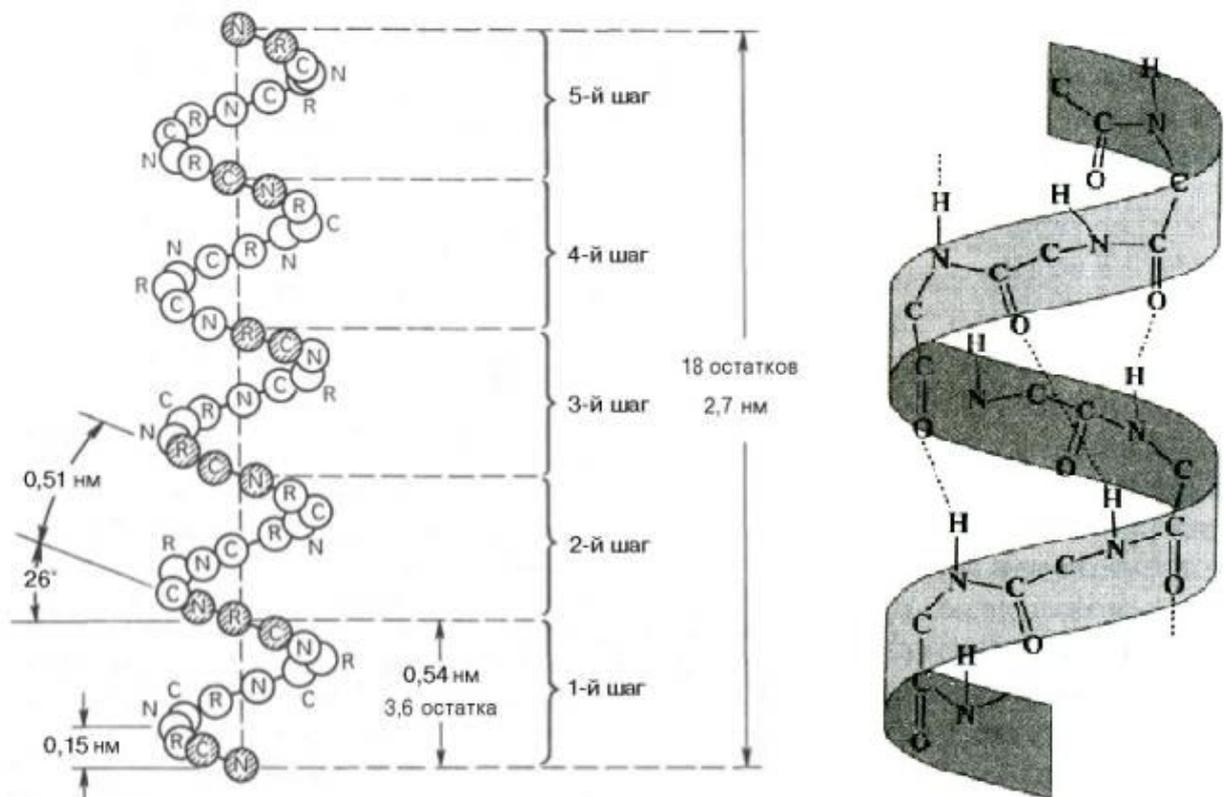


Рис. 10. Структура α -спирали

Другой тип вторичной структуры - β -структура (или структура складчатого листа) стабилизирован водородными связями, возникающими между CO- и NH-группами прилегающих друг к другу различных полипептидных цепей или различных участков одной и той же полипептидной цепи.

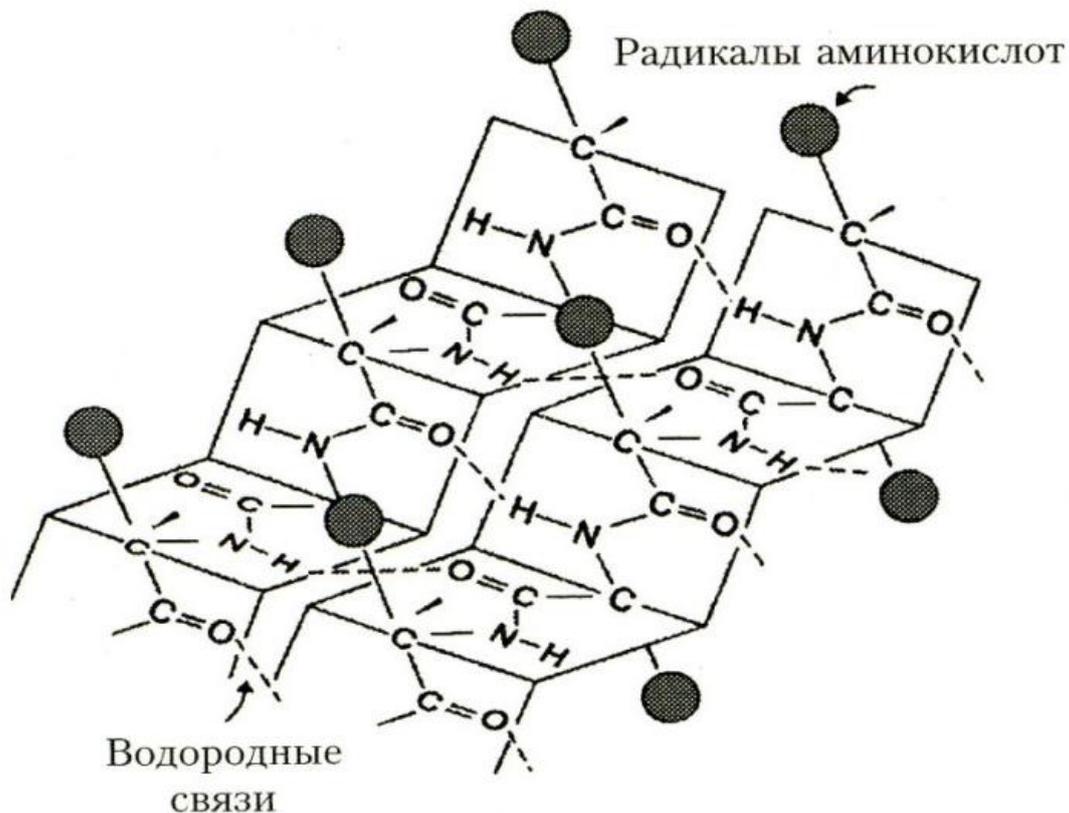


Рис. 11. Структура складчатого листа.

В пространственном представлении β -структура обнаруживает “плиссированность” (складчатость), причем радикалы аминокислотных остатков стоят попеременно с разных сторон складчатого листа (рис. 11). В зависимости от взаимного положения атомов в разных цепях или участках одной цепи возможно существование двух типов складчатого листа. Если обе цепи направлены в одну сторону, такое расположение называют параллельным, если цепи направлены в противоположные стороны -

антипараллельным. Связи, образующиеся в пределах одного пептида, всегда антипараллельны, если же связи образуются между разными полипептидами - параллельны.

Нерегулярная структура (синонимы: беспорядочный клубок, аморфные области) - тип вторичной структуры, в котором расположение различных участков полипептидной цепи относительно друг друга не имеет регулярного (постоянного) характера, поэтому нерегулярные структуры могут иметь различную конформацию (рис.12).

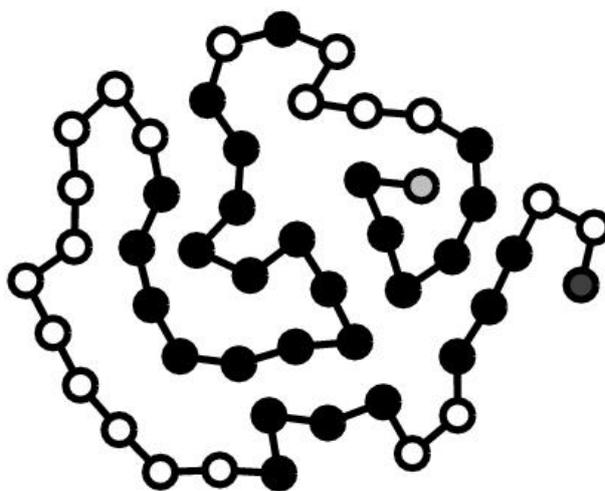


Рис. 12. Нерегулярная структура белка.

Третичная структура - это способ компактного расположения в пространстве всех атомов и групп полипептидной цепи, имеющей вторичную структуру (рис. 13). Эта структура трехмерна и характеризует конформацию молекулы белка в целом. В стабилизации третичной структуры участвуют различные типы связей между аминокислотными остатками: водородные связи, как между пептидными группами, так и между полярными (гидрофильными) R-группами аминокислотных остатков, электростатические силы притяжения между R-группами, несущими противоположно заряженные ионогенные группы (ионные связи), гидрофобные взаимодействия, ковалентные связи. Дисульфидные связи повышают

стабильность третичной структуры, но не всегда являются обязательными для правильного скручивания молекулы. В ряде белков они могут вообще отсутствовать (рис.14).

Важное значение в формировании третичной структуры белковой молекулы имеют последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи, размер, форма и полярность радикалов аминокислотных остатков.

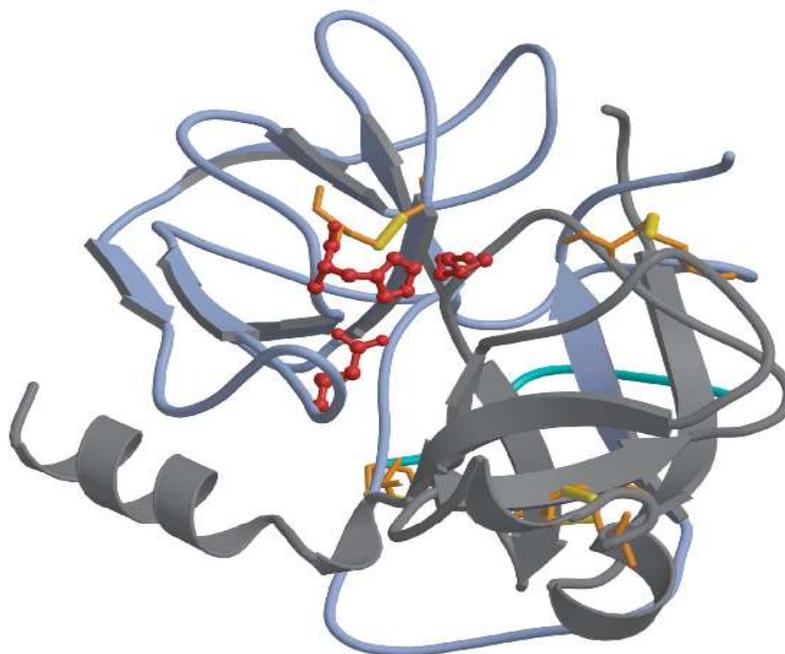


Рис. 13. Третичная структура белка

При формировании третичной структуры большая часть гидрофобных радикалов располагается внутри белковой молекулы; полярные (гидрофильные) радикалы находятся на ее поверхности, т.е. поверхность молекулы белка преимущественно гидрофильна.

Четвертичная структура – ассоциация в пространстве отдельных субъединиц. Многие белки имеют в своем составе несколько полипептидных цепей. Такие белки называют **олигомерными**, а отдельные цепи — **протомерами**. Протомеры в олигомерном белке соединены множеством слабых, нековалентных связей (гидрофобных, ионных, водородных).

Взаимодействие протомеров осуществляется благодаря комплементарности их контактирующих поверхностей. Количество протомеров в белках может сильно варьировать. Гемоглобин (Hb) — сложный олигомерный белок, содержащийся в эритроцитах. Гемоглобин содержит 4 протомера, соединенных нековалентными связями. Каждый протомер гемоглобина в белке связан с небелковой частью — гемом и 3 другими протомерами. Следовательно, белки с четвертичной структурой могут иметь очень большую молекулярную массу.

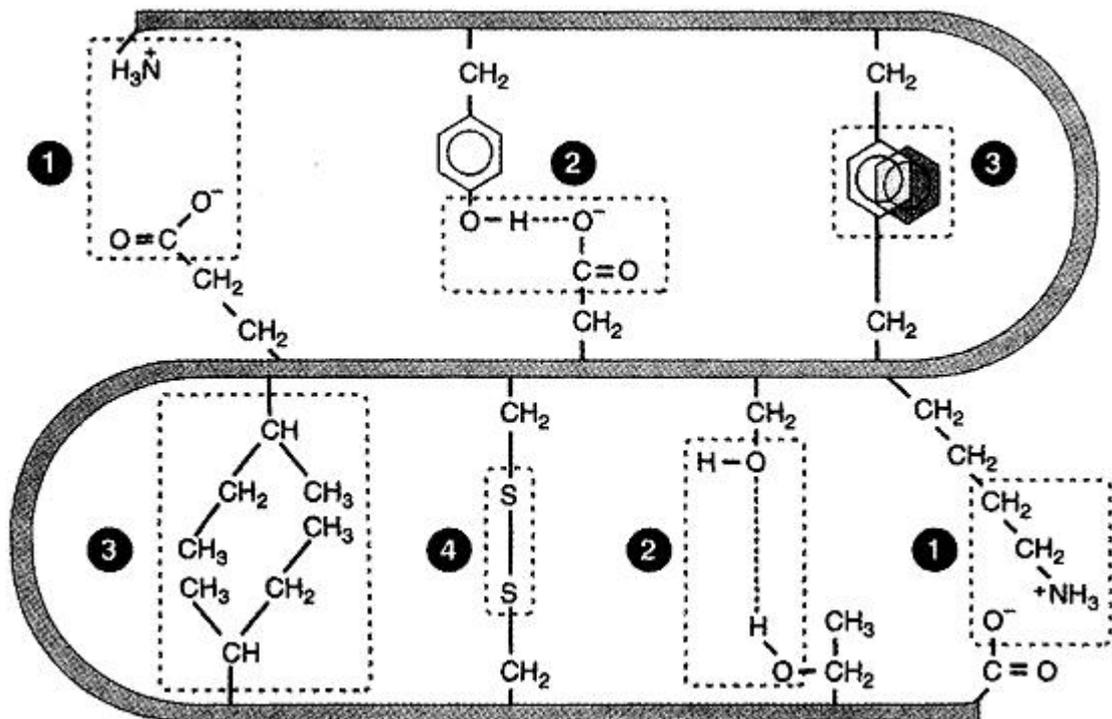


Рис. 14. Связи, стабилизирующие третичную структуру: 1 – ионные связи; 2 – водородные связи; 3 – гидрофобные связи; 4 – дисульфидные связи.

2.3. Физико-химические свойства белков

Индивидуальные белки различаются по физико-химическим свойствам: форме молекул, молекулярной массе, суммарному заряду, соотношению

полярных и неполярных радикалов аминокислот на поверхности молекул, степени устойчивости к воздействию различных денатурирующих агентов.

В молекуле белка присутствуют катионообразующие и анионообразующие группы. Знак заряда молекулы зависит от количества свободных групп. Если преобладают карбоксильные группы то заряд молекулы отрицательный (проявляются свойства слабой кислоты), если аминокислотные – то положительный (основные свойства). Заряд белка также зависит от pH среды. В кислой среде молекула приобретает положительный заряд, в щелочной – отрицательный. Растворы белков обладают буферными свойствами за счет их амфотерности.

Несмотря на большую величину, многие белковые молекулы не осаждаются в водных растворах. Осаждению белковых молекул препятствуют факторы стабилизации белкового раствора: наличие гидратной оболочки и заряд на поверхности белковой молекулы. Гидратная оболочка - это слой молекул воды, определенным образом ориентированных на поверхности белковой молекулы. Поверхность большинства белковых молекул заряжена отрицательно, и диполи молекул воды притягиваются к ней своими положительно заряженными полюсами.

Чем больше гидрофильных свойств у белковой молекулы, чем больше в ее составе и на ее поверхности аминокислот с полярными (гидрофильными) радикалами, тем сильнее выражена и прочнее удерживается гидратная оболочка и тем больше в ней слоев. Вода гидратной оболочки обладает особыми свойствами: она не является свободной, а связана с белковой молекулой. Это - “связанная” вода. Она принадлежит белку, и поэтому имеет особые свойства.

Окружая каждую молекулу белка, гидратная оболочка не дает этим белковым молекулам сблизиться, соединиться и выпасть в осадок.

При удалении гидратной оболочки белков происходит коагуляция, т.е. склеивание белковых частиц и выпадение их в осадок. Для этого достаточно

изменить структуру частицы белка, так, чтобы ее гидрофильные группы, которые связывают воду растворителя, оказались внутри частицы.

Вторым фактором стабилизации белкового раствора является наличие на поверхности белковой молекулы как положительно, так и отрицательно заряженных радикалов аминокислот. Количество этих групп, а следовательно, и суммарный заряд белков зависят от рН среды. Значение рН, при котором белок имеет суммарный нулевой заряд, называется изоэлектрической точкой (ИЭТ). В ИЭТ количество положительно и отрицательно заряженных групп одинаково, т.е. белок находится в изоэлектрическом состоянии. Величина заряда белков — один из факторов, увеличивающий их растворимость. При потере заряда в изоэлектрической точке белки легче агрегируют и выпадают в осадок. Это особенно характерно для денатурированных белков, у которых на поверхности появляются гидрофобные радикалы аминокислот.

Денатурация белков — это разрушение их нативной конформации, вызванное разрывом слабых связей, стабилизирующих пространственные структуры, при действии денатурирующих агентов. Денатурация сопровождается потерей биологической активности белка (рис.15).

1. Уникальная трехмерная структура каждого белка разрушается, и все молекулы одного белка приобретают случайную конформацию, т.е. отличную от других таких же молекул.
2. Радикалы аминокислот, формирующие активный центр белка, оказываются пространственно удаленными друг от друга, т.е. разрушается специфический центр связывания белка с лигандом.
3. Гидрофобные радикалы, обычно находящиеся в гидрофобном ядре глобулярных белков, при денатурации оказываются на поверхности молекулы, тем самым создаются условия для агрегации белков. Агрегаты белков выпадают в осадок. При денатурации белков не происходит разрушения их первичной структуры.

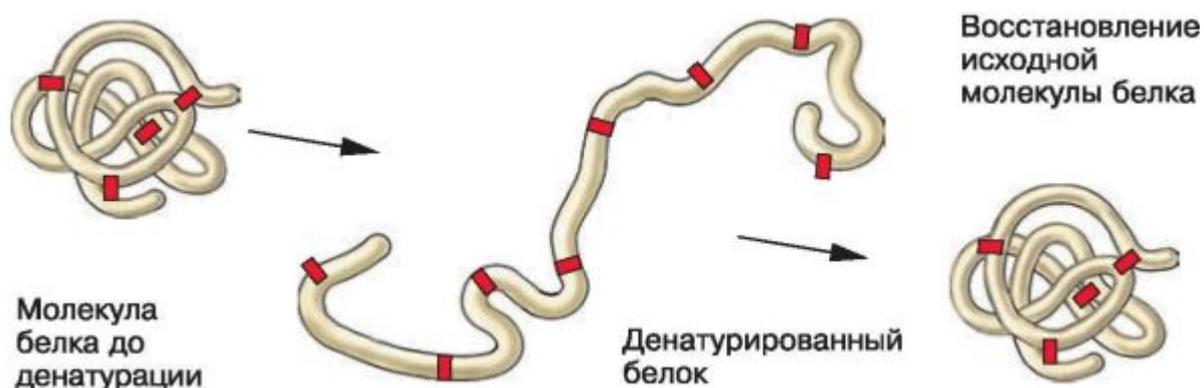


Рис. 15. Денатурация и ренатурация белка.

Из химических соединений денатурацию вызывают кислоты и щелочи (при рН ниже 3 и выше 10-11), этанол и ацетон при продолжительном воздействии, мочевины, гуанидинхлорид, ионы тяжелых металлов, йода, тиоцианата, поверхностно-активные вещества (додецилсульфат), дубильные вещества (танин) и др.

Из физических факторов денатурацию вызывают сильное перемешивание или встряхивание, высокое давление - 500-1000 Мпа, высушивание, нагревание, активное вспенивание растворов белка, ультрафиолетовое, рентгеновское и радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и др. Наиболее распространенным фактором денатурации является нагревание. Этот прием широко используют в пищевой промышленности.

При переработке сырья животного и растительного происхождения в продукт в одних случаях необходимо создать условия, способствующие денатурации белков, в других - предотвратить этот процесс. Денатурация белков имеет важное значение при изготовлении консервов, выделке кожи и меха, выпечке хлеба и кондитерских изделий, при сушке макарон и овощей, приготовлении пищи и т.п. При получении биологически активных препаратов (ферментов, гормонов и т.п.) процесс денатурации необходимо предотвратить.

Воздействие факторами денатурации применяют для стерилизации оборудования и инструментов, а также как антисептики (фенол и его производные), лекарственные препараты (например, березовый деготь входит в состав мази Вишневского, ляпис, коллоидное серебро – колларгол)

Удаление денатурирующих агентов диализом приводит к восстановлению конформации и функции белка, т.е. к **ренатурации**.

В пробирке (*in vitro*) чаще всего это – необратимый процесс. Если же денатурированный белок поместить в условия, близкие к нативным, то он может ренатурировать, но очень медленно, и такое явление характерно не для всех белков.

In vivo, в организме возможна быстрая ренатурация. Это связано с выработкой в живом организме специфических белков, которые «узнают» структуру денатурированного белка, присоединяются к нему с помощью слабых типов связи и создают оптимальные условия для ренатурации. Такие специфические белки известны как «шапероны».

Белки-шапероны обладают способностью связываться с частично денатурированными, находящимися в неустойчивом, склонном к агрегации состоянии белками и восстанавливать их нативную конформацию. Шапероны образуют комплекс, внутри которого находится полость. Белок, имеющий на своей поверхности фрагменты, обогащенные гидрофобными аминокислотными остатками, попадает в полость шаперонинового комплекса. В этой полости в условиях изолированности от других молекул цитозоля клетки выбор возможных конформаций белка происходит до тех пор, пока не будет найдена энергетически наиболее выгодная конформация. Шаперонзависимое формирование нативной конформаций связано с расходом значительного количества энергии, источником которой служит АТФ.

Растворы белков обладают свойствами как истинных, так и коллоидных растворов. Это связано с тем, что белки в растворе

диспергированы до единичных молекул, но, вследствие большой молекулярной массы и связанного с ней большого размера частиц (1 - 100 нм), растворы белков имеют коллоидный характер.

Растворы белка, в связи с коллоидным характером, рассеивают свет (явление Тиндаля), характеризуются высокой вязкостью, при определенных условиях могут терять текучесть и образовывать гели, или студни (студни, сформированные из молекул белков, рассматривают как частную форму гелей).

2.4. Классификация белков

В основу классификации белков положено несколько подходов, а именно различие в форме их молекул, различия в функциях, структуре, химическом составе.

2.4.1. Классификация белков по составу

Все белки делятся на простые и сложные. Простые белки (неконъюгированные) при гидролизе дают только аминокислоты. Сложные белки (конъюгированные) при гидролизе дают помимо аминокислот небелковую часть.

К простым белкам относятся гистоны, альбумины, глобулины, глютелины и другие белки.

Гистоны представляют собой основные белки с молекулярной массой от 12000 до 20000, содержащие в составе молекулы 20-30% аминокислот с положительно заряженными радикалами (обычно аргинин и лизин). Гистоны не содержат триптофана, растворимы в разбавленных кислотах (0,2М HCl), имеют изоэлектрическую точку при pH 8,5.

Гистоны содержатся главным образом в ядрах клеток животных и растений, где играют важную роль в структуре хроматина (нитевидного комплекса ДНК, гистонов и др. белков).

Альбумины относятся к белкам, широко распространенным в животных и растительных организмах. Содержатся эти белки в сыворотке крови, белке яиц, мышцах, молоке, семенах, листьях, стеблях и корнях растений.

Альбумины растворяются в воде, из водных растворов высаливаются сульфатом аммония при полном насыщении, при кипячении выпадают в осадок в виде сгустков денатурированного белка.

Глобулины - белки, нерастворимые в воде, но растворимые в разбавленных растворах нейтральных солей (4-10%); осаждаются из раствора при полунасыщении сульфатом аммония, а также при полном удалении солей, например посредством диализа. Представителями этой группы белков являются глобулины сыворотки крови, глобулины молока, яичный глобулин, фазеолин семян фасоли, и др.

В животных организмах глобулины выполняют защитную, транспортную и некоторые другие функции; в семенах растений они являются в основном запасными белками, но среди них имеются белки, выполняющие каталитические функции.

Глютелины хорошо растворяются в слабых растворах щелочей (0,1-0,2%), но не растворимы в воде, растворах этанола и нейтральных солей. Эта группа белков, содержится в семенах злаков и других культур, а также в зеленых частях растений. Глютелины входят в состав клейковины. Глютелины содержат до 45% глутаминовой кислоты.

В состав сложных белков входит белковая часть и какая-либо небелковая группа. В зависимости от химической природы небелковой группы различают: хромопротеины, фосфопротеины, липопротеины, гликопротеины, металлопротеины, нуклеопротеины.

Хромопротеины состоят из простого белка, связанного с каким-либо окрашенным соединением небелкового характера. Эти белки обладают высокой биологической активностью. Одни из них участвуют в

окислительно-восстановительных реакциях, другие - в процессе фотосинтеза, третьи - в переносе кислорода и диоксида углерода и т.д.

Окрашенными небелковыми компонентами хромопротеинов могут быть производные каротина, изоаллоксазина, порфиринов и др.

Гемоглобин - белок, играющий важную роль в дыхательной функции крови теплокровных (транспорт кислорода и диоксида углерода). Молекула гемоглобина состоит из белка глобина и небелковой группы гема. Видовая специфичность гемоглобина человека и животного обусловлена глобином; гем у всех гемоглобинов имеет одинаковое строение.

Фосфопротеины - белки, содержащие в своем составе ортофосфорную кислоту, присоединенную сложноэфирной связью к остаткам серина, реже треонина.

Фосфопротеины содержат в своем составе ортофосфорную кислоту, присоединенную сложноэфирной связью к остаткам серина, реже треонина. Эти белки играют важную роль в питании как зародышей животных, так и молодого, растущего животного организма. Важными представителями этой группы белков являются казеин - главный белок молока, вителлин и фосфовитин - белки яичного желтка, ихтулин, выделенный из икры рыб и некоторые другие.

Липопротеины - это соединения, состоящие из липидов и специфических белков, связанных между собой посредством гидрофобных и электростатических взаимодействий. Из липидов в составе липопротеинов обнаружены ацилглицерины, жирные кислоты, фосфолипиды, холестерин и его эфиры.

Среди липопротеинов различают структурные (нерастворимые) и свободные (растворимые в воде). Структурные липопротеины входят в состав мембран клетки и ее структурных образований, оболочки нервных волокон и пластид растительной клетки (хлоропластов) и др. Структурные липопротеины обеспечивают проницаемость мембран.

Свободные липопротеины содержатся в плазме крови, молоке, желтке яиц и др. Они занимают ключевое место в транспорте и обмене липидов. Наиболее изученными являются липопротеины крови.

Гликопротеины - белки, содержащие в качестве небелковой группы углеводы и их производные (галактозу, маннозу, аминсахара, олигосахариды, гетерополисахариды и др.) Углеводный и белковый компоненты в гликопротеинах соединены O- или N-гликозидными связями. В образовании O-гликозидных связей между углеводным компонентом и белком участвуют остатки серина, треонина, гидроксизина и гидроксипролина. В образовании N-гликозидной углевод-белковой связи могут участвовать глюкозамины (или N-ацетилглюкозамины) и амидная группа аспарагина пептидной цепи. Углеводная часть в молекуле гликопротеина может составлять менее 1%, а может достигать 30% и более.

Металлопротеины - сложные белки, в состав которых входят ионы какого-либо одного или нескольких металлов, соединенные с белковой частью посредством комплексной связи. Ионы металлов в металлопротеинах можно отделить от белка только при энергичном воздействии. К металлопротеинам относятся ферритин, содержащий железо, полифенолоксидаза, содержащая медь, амилаза, содержащая кальций и др.

Некоторые металлопротеины, особенно из группы ферментов, содержат в качестве простетической группы несколько различных веществ. Так, например, в сукцинатдегидрогеназе, наряду с производным флавина, содержится железо, ксантиноксидаза содержит производное флавина и молибден, алкогольдегидрогеназа - производные пиридина и цинк и т.д.

Нуклеопротеины - это комплексы нуклеиновых кислот с белками. Они содержатся в каждой клетке и выполняют важнейшие специфические функции, связанные с хранением и реализацией генетической информации. Белковой составляющей нуклеопротеинов могут быть гистоны, протамины и так называемые негистоновые белки. Из нуклеиновых кислот в состав

нуклеопротеинов входят дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) или рибонуклеиновая кислота (РНК). Нуклеопротеины, содержащие ДНК называют дезоксирибонуклеопротеинами (ДНП), а содержащие РНК - рибонуклеопротеинами (РНП).

К нуклеопротеинам относят вирусы - паразиты, способные проникать в клетку специфического хозяина и, размножаясь, вызывать заболевание. Вирусы в виде чистых препаратов (вне клетки хозяина) не способны к самовоспроизведению.

2.4.2. Классификация белков по функциям

В любом живом организме содержатся тысячи белков, выполняющих разнообразные функции. Функции, выполняемые белками, распределяются примерно следующим образом.

Структурообразующие функции. Структурные белки отвечают за поддержание *формы и стабильности клеток и тканей*. К структурным белкам относятся коллаген, кератины, гистоны. Функцией гистонов является организация укладки ДНК в хроматине. Структурные единицы хроматина состоят из октамерного комплекса гистонов, на который навита молекула ДНК.

Транспортные функции. Транспортным белком является **гемоглобин** эритроцитов, ответственный за перенос кислорода и диоксида углерода между легкими и тканями. В плазме крови содержатся множество других белков, выполняющих транспортные функции. Так, **преальбумин** переносит гормоны щитовидной железы — тироксин и трийодтиронин. **Ионные каналы** и другие интегральные мембранные белки осуществляют транспорт ионов и метаболитов через биологические мембраны.

Защитные функции. Иммунная система защищает организм от возбудителей болезней и чужеродных веществ. Ключевым компонентом этой

системы является иммуноглобулин G, который на эритроцитах образует комплекс с мембранными гликолипидами.

Регуляторные функции. В биохимических сигнальных цепях белки осуществляют функции сигнальных веществ (гормонов) и гормональных рецепторов. В регуляции обмена веществ и процессов дифференцировки принимают решающее участие ДНК-ассоциированные белки. Особенно детально изучено строение и функции белков-активаторов катаболизма и других бактериальных факторов транскрипции.

Катализ. Многочисленную группу белков составляют *ферменты*. Самые низкомолекулярные из них имеют молекулярную массу 10-15 кДа. Белки среднего размера, как, например, алкогольдегидрогеназа, имеют молекулярную массу 100-200 кДа. Молекулярная масса высокомолекулярных ферментов, к которым относится глутаминсинтетаза, построенная из 12 мономеров, может достигать 500 кДа.

Двигательные функции. Взаимодействие актина с миозином ответственно за мышечное сокращение и другие формы биологической подвижности. Гексамер *миозина* (слева) длиной 150 нм — один из наиболее крупных белков. Нитевидный актин (F-актин) образуется путем полимеризации относительно небольших молекул глобулярного актина (G-актин).

Запасные функции. В растениях содержатся **запасные белки**, являющиеся ценными пищевыми веществами. В организмах животных *мышечные белки* служат резервными питательными веществами, которые мобилизуются при крайней необходимости.

2.4.3. Классификация белков по форме молекулы

В зависимости от формы молекул белки делят на глобулярные (шаровидные) и фибриллярные (нитевидные) (рис. 16).

2.4.3.1. Фибриллярные белки

Фибриллярные белки - устойчивые, нерастворимые в воде и разбавленных растворах нейтральных солей, вещества. Для этих белков наиболее характерной является вторичная структура; третичная почти или полностью не выражена. Полипептидные цепи, располагаясь параллельно друг другу вдоль одной оси, образуют длинные волокна (фибриллы) или слои. Отношение длинной оси к короткой в молекулах этих белков составляет несколько десятков, сотен и даже тысяч единиц. Фибриллярные белки являются основными элементами сухожилий, костей, хрящей, волос, перьев, рогов, паутины и т.п.

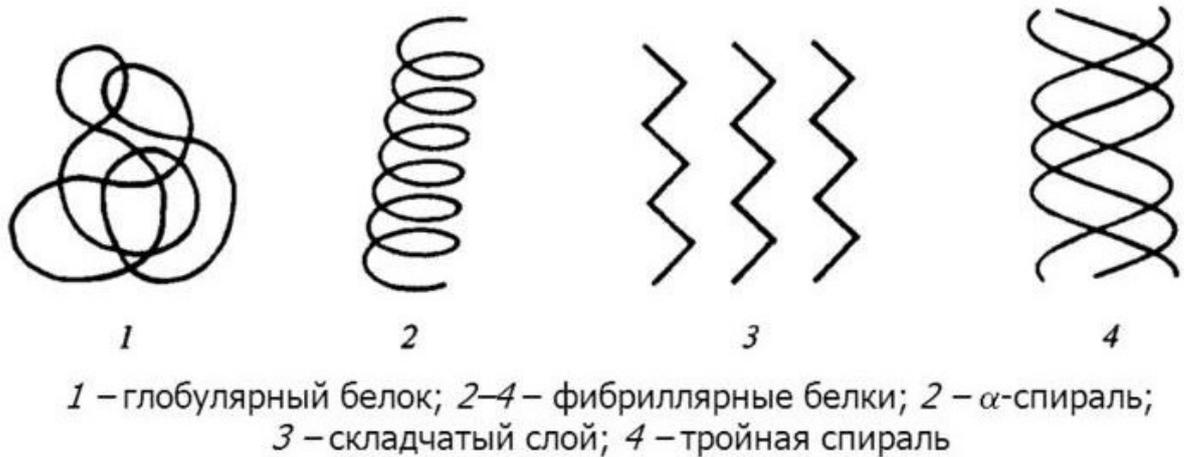


Рис. 16. Строение глобулярных и фибриллярных белков.

Одним из первых фибриллярных белков был выделен и изучен α -кератин. Волосы (шерсть), перья, иглы, когти и копыта животных состоят главным образом из кератина. Оказалось, что в α -кератине полипептидные цепи имеют форму вытянутой α -спирали. Рентгеноструктурный анализ показывает, что фибриллы α -кератина имеют период повторяемости около 0,54нм, что их полипептидные цепи скручены в спираль. В α -кератинах много поперечных связей между соседними цепями, в образовании которых принимают участие остатки цистеина. Волосы (шерсть), перья, иглы, когти и копыта животных состоят главным образом из кератина. В кератинах

большая часть пептидной цепи свернута в правую α -спираль. Представляет интерес конформация α -кератина, входящего в состав волос. Полипептидные цепи в форме α -спиралей прочно соединены друг с другом при помощи дисульфидных связей. Три α -спирали образуют суперспираль, затем 11 суперспиралей составляет микрофибриллу, которая, в свою очередь, входит в состав макрофибриллы. Макрофибриллы являются основой кутикулы – главного компонента клеток волос. При химической завивке происходят следующие процессы: вначале путем восстановления тиолами разрушаются дисульфидные мостики, а затем для придания волосам необходимой формы их высушивают при нагревании. При этом за счет окисления кислородом воздуха образуются новые дисульфидные мостики, которые сохраняют форму прически.

β -Кератины, в частности фиброин (белок шелка и паутины), тоже принадлежит к категории нитевидных нерастворимых белков; они более гибкие, но с трудом поддаются растяжению. Они отличаются от α -кератинов тем, что имеют другую периодичность структуры, элементы которой повторяются через каждые 0,70 нм. При обработке α -кератина волос паром его можно растянуть почти вдвое по сравнению с исходной длиной. Это связано с тем, что при растяжении α -кератин волос утрачивает α -спиральную конформацию и его полипептидная цепь приобретает вытянутую конформацию. Это происходит потому, что в обработанном паром волосе разрываются водородные связи, стабилизирующие α -спираль, витки спирали распрямляются и принимают более вытянутую конформацию. Для β -кератинов характерно отсутствие внутрицепочечных водородных связей. Вместо них образуются межцепочечные связи между пептидными группами соседних полипептидных цепей. В образовании таких межцепочечных водородных связей участвуют все пептидные группы β -кератина. Радикалы выступают по обе стороны зигзагообразной структуры. Существуют еще два различия между α и β -кератинами. Во-первых, в β -кератинах нет поперечных

цистиновых связей между соседними цепями, и, во-вторых, соседние полипептидные цепи в β -кератинах обычно направлены в противоположные стороны. Основной белок шелка, фиброин, (рис. 17) обладает структурой антипараллельного *складчатого листа*, причем сами листы располагаются параллельно друг другу, образуя многочисленные пласты. Так как в складчатых структурах боковые цепи аминокислотных остатков ориентированы вертикально вверх и вниз, в промежутках между отдельными слоями могут поместиться лишь компактные группировки. Фактически фиброин состоит на 80% из глицина, аланина и серина, т.е. из трех аминокислот, характеризующихся минимальными размерами боковых цепей. Молекула фиброина содержит типичный повторяющийся фрагмент $(Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n$. Установлено, что в фиброине промежуток между складчатыми слоями составляет 0,35 и 0,57 нм. В первом случае в промежуток ориентирован глицин ($R = H$). Промежуток 0,57 нм создается за счет боковых цепей серина и аланина.

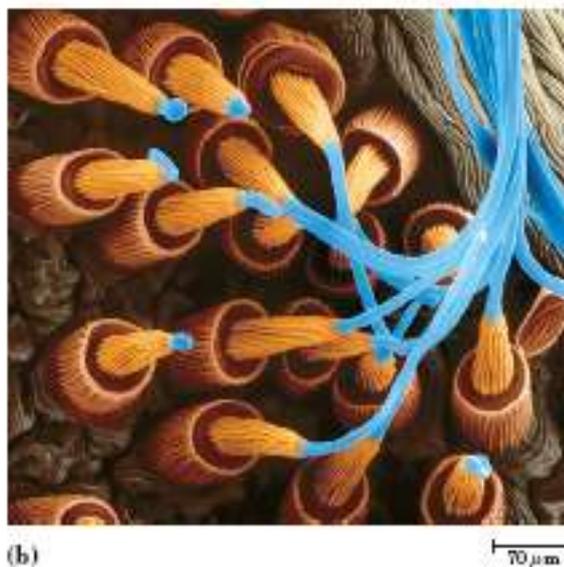


Рис. 17. “Производство” белка-фиброина пауком.

В организме млекопитающих **коллаген** — преобладающий в количественном отношении белок: он составляет 25% общего белка.

Коллаген присутствует в различных формах прежде всего в соединительной ткани: в сухожилиях, кровеносных сосудах, костях, хрящах. В составе этого белка преобладают такие аминокислоты как глицин, пролин, гидроксипролин, гидроксизин. Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путем *посттрансляционной модификации*. В структуре коллагена постоянно повторяется *триплет Gly-X-Y*, причем положение X часто занимает пролин, а Y — гидроксизин. В связи с присутствием в цепи большого количества пролина и гидроксипролина, цепи коллагена имеют жесткую изогнутую форму. Имеются веские основания тому, что коллаген повсеместно присутствует в виде **правой тройной спирали**, скрученной из трех первичных левых спиралей. В тройной спирали каждый третий остаток оказывается в центре, где по стерическим причинам помещается только глицин. Вся молекула коллагена имеет длину около 300 нм.

2.4.3.2. Глобулярные белки

В глобулярных белках полипептидная цепь свернута в компактную глобулу, то есть их молекулы по своей форме приближаются к шару или эллипсоиду вращения. Отношение длинной оси к короткой (степень асимметрии) в молекулах этих белков наиболее часто колеблется в пределах от 3 до 6 (1 бывает редко). В некоторых случаях степень асимметрии может достигать 11 - 20 и даже более. В общем, одни из глобулярных белков могут иметь шарообразную форму, другие - форму сигары, третьи - форму эллипсоида вращения.

Белки этого класса значительно более сложные по конформации, чем фибриллярные. Почти все гидрофобные радикалы скрыты внутри молекулы. Большинство поверхностных R-групп находится в гидратированном состоянии и обладают высокой реакционной способностью.

Для глобулярных белков наиболее типична третичная структура, они растворимы в воде и разбавленных растворах нейтральных солей. Третичная

структура свернутой полипептидной цепи стабилизируется целым рядом нековалентных взаимодействий и дисульфидными мостиками.

Длинные полипептидные цепи часто складываются в несколько компактных, относительно независимых областей, называемых доменами. Впервые супервторичные структуры белков были постулированы и затем обнаружены Л. Полингом и Р. Кори. Чаще суперспирализованные структуры включают в себя как α -спирали, так и β -складчатые слои. Домены имеют самостоятельную третичную структуру, напоминающую таковую глобулярных белков. Они представляют собой обособленные глобулярные участки, соединенные друг с другом короткими так называемыми шарнирными участками полипептидной цепи. Благодаря доменной структуре белков легче формируется их трехмерная структура. Центры связывания белка с лигандом часто располагаются между доменами. Разные домены в белке могут перемещаться относительно друг друга при взаимодействии с лигандом. В некоторых белках домены выполняют самостоятельные функции, связываясь с различными лигандами. Такие белки называются **многофункциональными**. Доменная организация характерна для многих белков. В этих белках, как правило, находится несколько структурных доменов, каждый из которых содержит до 200 аминокислотных остатков.

К глобулярным белкам относятся все ферменты и, за исключением структурных, большинство других белков животных и растительных организмов.

2.5. Выделение и очистка белков

Получение белка в гомогенном состоянии является достаточно сложной задачей. Как правило, биологический материал, являющийся источником выделения, содержит большое число белков, их комплексов друг с другом и другими биополимерами. Близкие свойства компонентов этой

смеси требуют при выделении индивидуальных белков использования разнообразных методов и различных их сочетаний. Так как многие белки, и в особенности глобулярные, высоколабильны, выделение проводят с помощью предельно мягких методов и при пониженной температуре (0-5°C).

Получение высокоочищенных препаратов необходимо для исследования строения и функций белков. Препараты высокоочищенных белков находят разнообразное применение в научных исследованиях, медицине и биотехнологии.

2.5.1. Разрушение клеток и экстракция

Большая часть белков и ферментов, изученных в ранний период развития белковой химии, были внеклеточными. Причина этого в том, что такие белки сравнительно легко выделялись, внеклеточные белки более стабильны (часто имеют в своей структуре дисульфидные мостики), обладают небольшой молекулярной массой. Именно для этих белков первыми были установлены структуры: для лизоцима, рибонуклеазы, химотрипсина. Однако большинство белков локализовано внутри клеток. Как показала практика, они менее стабильны, часто не содержат дисульфидных связей. После того, как выбран источник выделения белка, следующим шагом является экстракция его из ткани, то есть перевод фермента в раствор. Вначале необходимо разрушить клетки и органеллы, что достигается измельчением в гомогенизаторе с последующей экстракцией буфером. Животные ткани различаются по своей прочности: легко разрушаются эритроциты, а в кровеносных сосудах, напротив, содержится жесткий коллагеносодержащий материал. Успешным является замораживание ткани в жидком азоте и измельчение ее в замороженном состоянии. Ряд белков можно извлечь из тканей после обработки их ацетоном или другими органическими растворителями. Растительные клетки труднее разрушаются, так как содержат целлюлозную оболочку, поэтому в качестве эффективных

способов используют гомогенизацию или растирание с помощью абразива. Некоторые бактерии легко разрушаются под действием осмотического шока, а более устойчивые с толстой клеточной стенкой требуют механического воздействия, например ультразвуком.

Выбор раствора для экстракции зависит от особенностей белка. Для растворимого белка используют буферные растворы. Обычно объем раствора в 2-3 раза превышает объем ткани. После экстракции белка массу центрифугируют при 10.000-20.000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Смесь до центрифугирования называют гомогенатом. Жидкая фаза после осаждения нерастворимого материала (надосадочная жидкость или супернатант) носит название «экстракт». Экстракция белков, связанных с мембраной представляет особую проблему. Иногда выделение таких комплексов удается провести с использованием детергентов, в состав которых входят липофильные (алифатические или ароматические) цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка и вытесняющие его из комплекса с нормальной мембраной. Из детергентов наиболее широко применяются дезоксихолат, додецилсульфат натрия (анионный детергент), тритон X-100 и др.

2.5.2. Концентрирование

Концентрирование можно проводить путем осаждения белка с последующим растворением осадка в меньшем объеме. Обычно при этом используют сульфат аммония или ацетон. Концентрация белка в исходном растворе должна быть не меньше 1 мг/мл. Можно использовать адсорбцию белков из очень разбавленных растворов на ионообменнике с последующей элюцией небольшим объемом солевого раствора. Для быстрого концентрирования небольших объемов белковых растворов можно использовать сухой гельфильтрующий носитель (например, сефадекс), полиэтиленгликоль или высокозамещенную КМ-целлюлозу как

водоотнимающие средства. Образец помещают в диализный мешок, который погружают в порошок, поглощающий воду. Наиболее продуктивным методом концентрирования является ультрафильтрация. Метод основан на применении полупроницаемых мембран с определенными размерами пор, при этом вода и малые молекулы проходят через мембрану, а по другую сторону мембраны остается концентрированный раствор белка. Это достигается в специальных ячейках (объемом до 1 л) с перемешиванием раствора и с применением сжатого инертного газа. Этот же принцип лежит в основе ультрафильтрации на полых волокнах, используемых для концентрирования больших объемов растворов.

2.5.3. Диализ

Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют диализ. Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через **полупроницаемые мембраны**, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина рН и др.) будет тот же, что и в окружающем растворе.

Традиционным является способ диализа через целлофановую пленку. В продаже имеются диализные трубки различного диаметра, обычно они не пропускают молекулы крупнее 15000-20000 Да. Диализ является длительной процедурой, ставят его обычно на ночь.

2.4.4. Тепловая денатурация

На начальном этапе очистки для разделения белков иногда используют тепловую обработку. Она эффективна, если белок относительно устойчив в условиях нагревания, в то время как сопутствующие белки денатурируют.

При этом варьируют рН раствора, продолжительность обработки и температуру. Для выбора оптимальных условий предварительно проводят серию небольших опытов.

После проведения первых этапов очистки белки далеки от гомогенного состояния. В полученной смеси белки отличаются друг от друга растворимостью, молекулярной массой, величиной суммарного заряда молекулы, относительной стабильностью и т.д. Эти различия и могут быть положены в основу методов дальнейшего разделения белков. Очистка белка – процесс многоступенчатый и на каждой ступени мы получаем фракцию более богатую выделяемым белком, чем на предыдущей стадии. Такой процесс часто называют фракционированием.

2.4.5. Осаждение белков

Разделение белков на основе их различной растворимости является классическим методом. Так фракционирование солями (рис. 18)

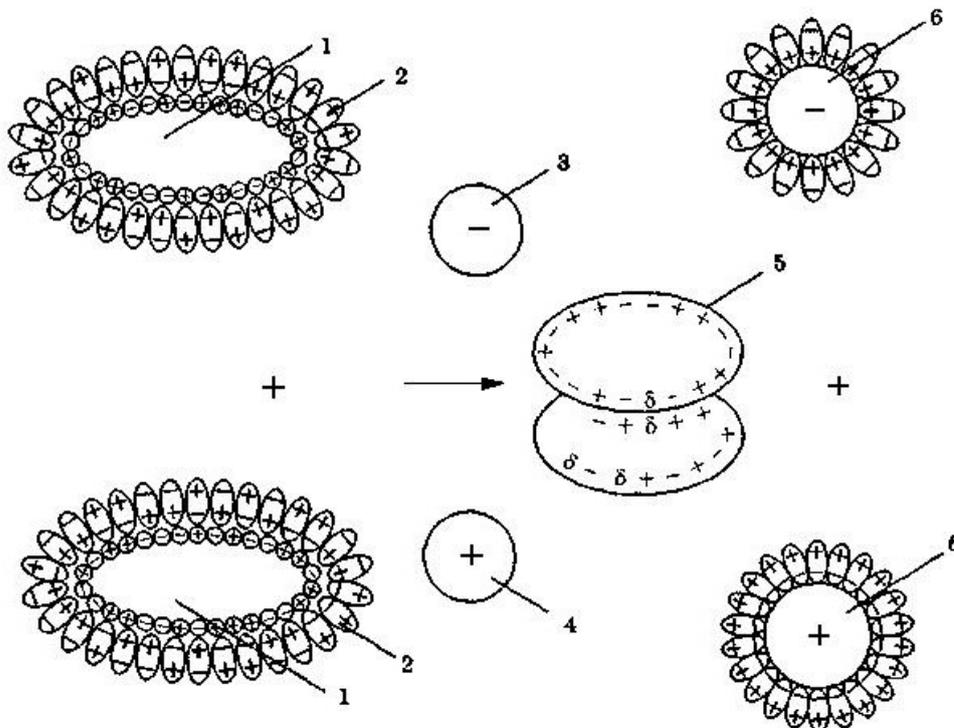


Рис.18 Фракционирование белков солями. 1 – гидратированная белковая молекула, 2 – диполи воды, 3,4 – ионы нейтральной соли, 5 – агрегаты белка, 6 – гидратированные ионы.

основывается на избирательном разделении белков вследствие их различной растворимости в растворах солей.

Соль подбирается в соответствии со следующими требованиями: она должна обладать достаточной растворимостью, которая не меняется значительно в зависимости от температуры, при добавлении соли не должен заметно меняться рН раствора, она легко отделяется от белка и не оказывает денатурирующего действия. Наиболее часто употребляемой солью для фракционирования белков является сульфат аммония. Обычно проводят фракционное осаждение белков возрастающими концентрациями сульфата аммония. При описании методов выделения количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения. Обычно пользуются специальной таблицей, с помощью которой можно определить количество соли, необходимое для перехода от одной степени насыщения к другой, или расчетными таблицами. Высаливание при добавлении необходимого количества сульфата аммония для осаждения всех белков является эффективным способом концентрирования – при условии, что образец, который нужно сконцентрировать, не слишком разбавлен.

2.4.6. Осаждение белков органическими растворителями

Это один из старых методов. Он играет важную роль при очистке белков в промышленных масштабах. Чаще всего используют такие растворители как этанол и ацетон, реже – изопропанол, метанол, диоксан. Основной механизм процесса: по мере возрастания концентрации органического растворителя снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул фермента. Происходит снижение растворимости белков до уровня, при котором начинается агрегация и осаждение. Важным параметром, влияющим на осаждение, является размер молекулы белка. Чем больше молекула, тем ниже концентрация

органического растворителя, вызывающая осаждение белка. Используемый растворитель должен полностью смешиваться с водой, не реагировать с белками и обладать хорошим осаждающим действием. Одно из преимуществ фракционирования с помощью органических растворителей заключается в том, что его можно проводить при температуре ниже нуля, так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже 0°C. Это очень важное свойство, так как в ходе фракционирования необходимо поддерживать низкую температуру. Наиболее часто для осаждения белков используется ацетон. Он обладает меньшим денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при минусовой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

2.4.7. Гель-фильтрация

Гель-фильтрация позволяет разделять белки в соответствии с их размерами. Разделение проводят в *хроматографических колонках*, заполненных сферическими частицами набухшего геля (размером 10-500 мкм) из полимерных материалов. Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. Смесь белков вносят в колонку с гелем и *элюируют* буферным раствором. На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций. Гель состоит из поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) (рис. 19) для удобства наполнения колонок. Так сефадексы - это поперечносшитые декстраны (α -1 \rightarrow 6-глюканы микробного происхождения) с заданными размерами пор. Сшиты цепи декстрана трехуглеродными мостиками с помощью эпихлоргидрина.

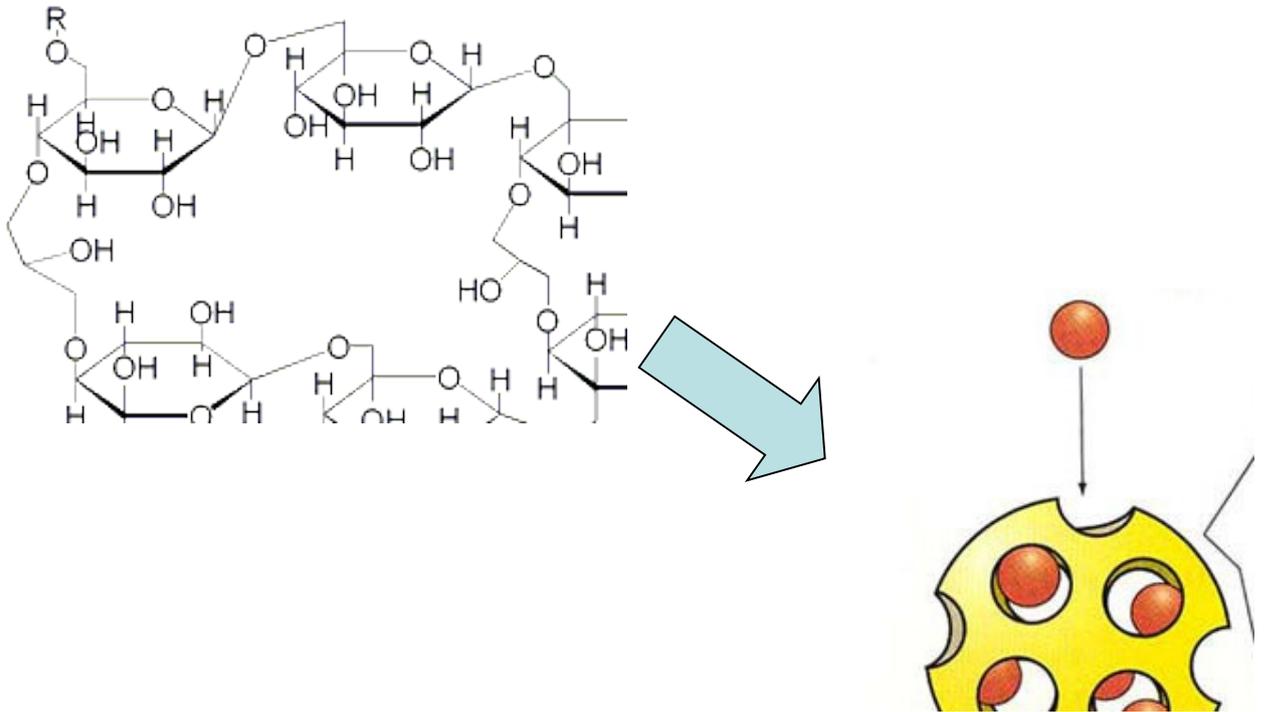


Рис. 19. Строение сефадекса.

Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размеры отверстий. Полученный таким образом гель играет роль молекулярного сита. При пропускании раствора смеси веществ через колонку, наполненную набухшими гранулами сефадекса, крупные частицы, размер которых превышает размер пор сефадекса, будут двигаться быстро. Мелкие молекулы, например, соли, будут двигаться медленно, поскольку в процессе движения они проникают внутрь гранул (рис. 20).

Существуют различные марки сефадексов, отличающиеся размером пор, обозначаемые как G-10, 15, 25, 50, 75 и т.д. Чем меньше номер, тем больше число поперечных сшивок содержит молекула, тем меньше воды поглощает гранула при набухании.

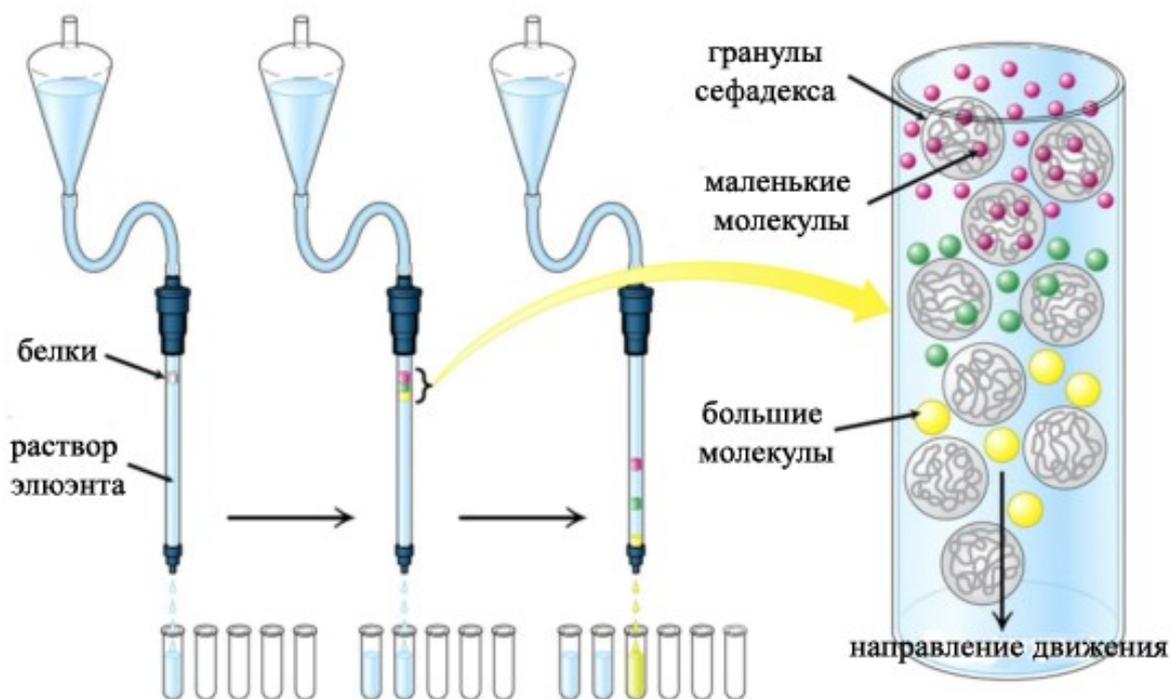


Рис. 20. Гель-фильтрация белков через сефадекс.

Таблица.

Характеристики некоторых сефадексов

Сефадекс	Диаметр гранул, мкм	Интервал фракционирования, кДа
G-25	10 - 80	1.5 - 30
G-50	40 - 120	3 - 80
G-200	40 - 120	5 - 600

С ростом номера марки сефадекса растут поры гранул и увеличиваются границы молекулярной массы веществ, способных проникать внутрь гранул, а, следовательно, и способных к разделению. Каждая марка сефадекса выпускается с различной величиной частиц: сверхтонкий, тонкий, средний и грубый. Как правило, в аналитической работе используются сверхтонкий и тонкий, а в препаративной - средний и грубый. Кроме сефадексов для

гельфльтрации белков используют сополимеры акриламида с бисакриламидом, получившие название биогелей (Р-2, Р-4, Р-6 и т.д.), и сефарозу – поперечно-сшитую агарозу (агароза - это нейтральный компонент агара). Все они делят белки по размеру молекул, как и сефадексы. Размеры колонки должны в 30-100 раз превышать объем наносимого образца, концентрация белка в образце - составлять 10-20 мг/мл, длина колонки - в 20-40 раз превышать ее диаметр.

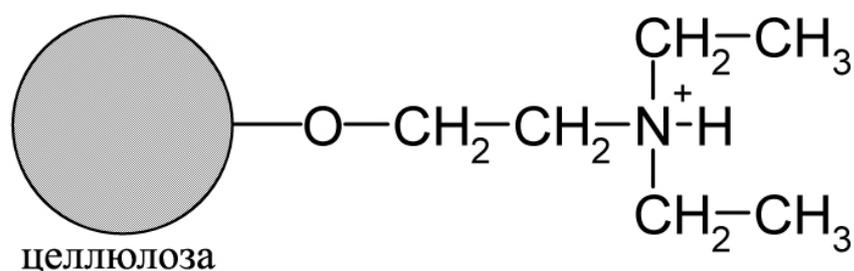
2.4.8. Разделение белков путем адсорбции

Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых различных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко используются для разделения белков. Применение этих методов позволяет получить наибольшую степень очистки белков. Важнейшими адсорбентами белков являются ионообменники, фосфат кальция (гидроксилапатит) и разнообразные аффинные сорбенты.

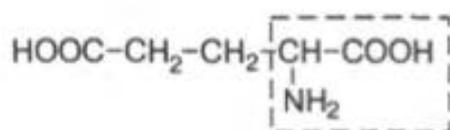
2.4.8.1. Ионообменная хроматография

В отличие от низкомолекулярных веществ, белки предъявляют к сорбентам особые требования. Главное из них – это “рыхлость” структуры сорбента, чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров связывания. Кроме того, материал сорбента не должен взаимодействовать с белком. Этим требованиям не отвечают полистирольные смолы, и для разделения белков используют ионообменники на основе целлюлозы, декстранов и агароз. Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике. Заряды нейтрализованы противоионами, такими как ионы металлов, хлорид - ионы и ионы буфера. Белок должен вытеснить противоионы, отсюда происходит термин “ионный обмен”. Количество белка, которое может связать ионообменник в расчете

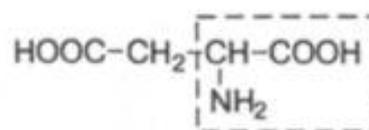
на единицу объема, может быть очень большим. У ионообменников на основе целлюлозы это количество зависит в основном от размеров белковых молекул, – чем мельче молекулы белка, тем в большей степени он адсорбируется. Наиболее известный анионообменник – ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламиноэтилцеллюлоза) (рис. 21).



Отрицательно заряженные аминокислоты



L-глутаминовая кислота



L-аспарагиновая кислота

Рис. 21. Структура ДЭАЭ-целлюлозы и некоторых ионогенных групп.

Ионообменники на основе сефадекса и сефарозы комбинируют ионный обмен с эффектом молекулярного сита.

Имеется в виду, что при значениях pH буфера ниже изоэлектрической точки, белок имеет положительный заряд и адсорбируется на катионообменнике и наоборот (рис. 22). В ионообменной хроматографии применяют короткие и толстые колонки, длина которых в 4-5 раз превышает их диаметр. Никогда не следует наносить образец, в котором есть осадок, его надо сначала отделить центрифугированием. Осадок может привести к закупорке колонки.

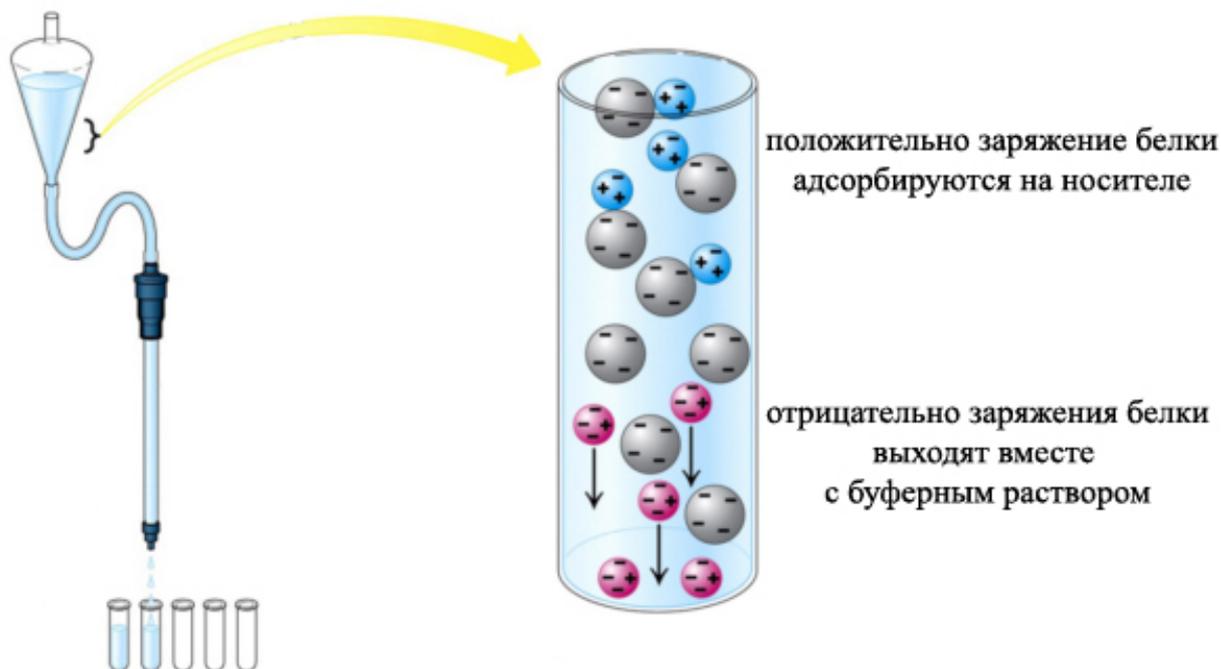


Рис. 22. Схема проведения ионообменной хроматографии.

Существуют два способа элюции белков.

1) Изменение pH буфера до величины, при которой связывание белка с адсорбентом ослабевает; для анионообменников используют более низкие значения pH, а для катионообменников – более высокие.

2) Повышение ионной силы, что вызывает ослабление электростатического взаимодействия между белком и адсорбентом. Способы элюции белков – солевые градиенты (ступенчатые и линейные). Обычно используют хлориды калия или натрия. Линейный градиент создают при помощи простого смесителя, работающего на принципе сообщающихся сосудов.

2.4.8.2. Аффинная хроматография

Под аффинной хроматографией понимают использование иммобилизованного на адсорбенте лиганда, осуществляющего специфический отбор белков, которые связываются с этим лигандом. После адсорбции фермент может быть элюирован либо неспецифическим образом,

например, повышением концентрации соли, либо специфическим в результате замещения белка лигандом из раствора (рис. 23). Следовательно, аффинная хроматография включает две специфические стадии – “аффинную адсорбцию” и “аффинную элюцию”.

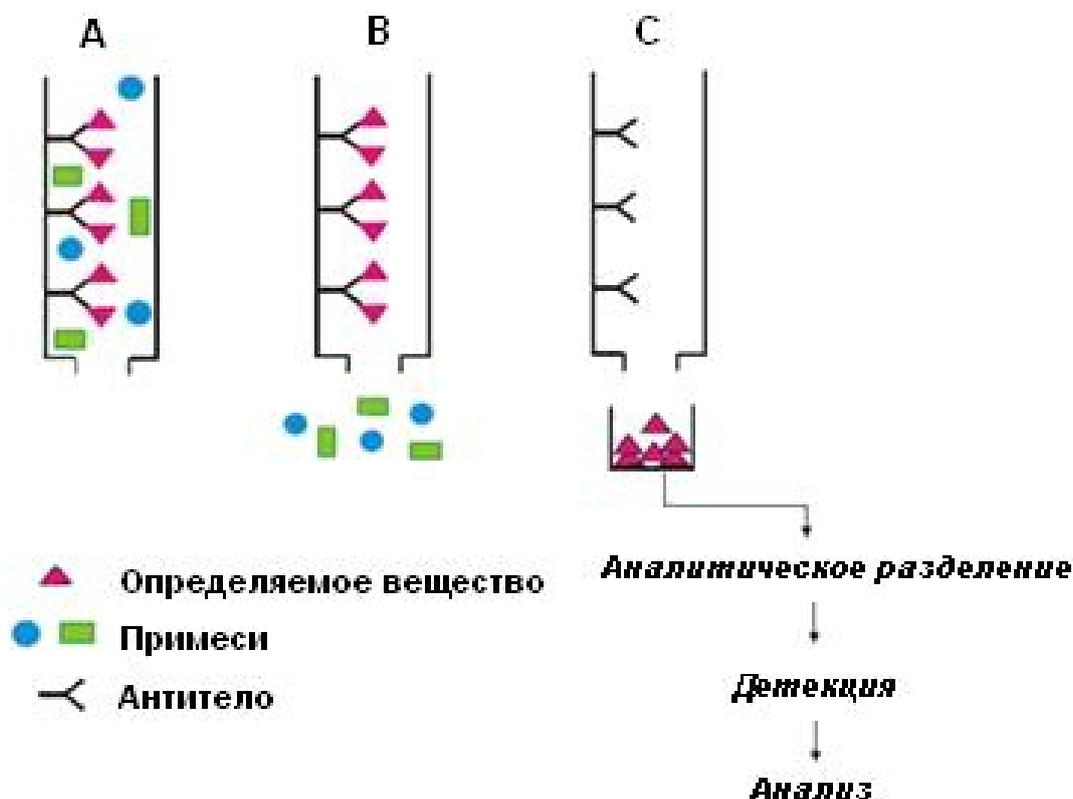


Рис.23 Схема проведения аффинной хроматографии: А – сорбция лиганда с антителом (матрицей), В – отмывка несвязанных компонентов, С – элюция лиганда и его анализ.

Основные требования к аффинной адсорбции:

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.
2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду.
3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы сопутствующие белки не могли связаться с адсорбентом.

4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях хроматографии и в процессе регенерации адсорбента.

Следует заметить, что аффинная адсорбционная хроматография является исключительным методом, если вся процедура уже тщательно отработана, однако создание необходимых адсорбентов может быть очень трудоемким процессом.

2.4.8.3. Гидрофобная хроматография

Метод гидрофобной хроматографии основан на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белковой глобулы. Гидрофобные взаимодействия усиливаются с повышением концентрации соли. Максимальное усиление вызывают соли, проявляющие наибольшую активность при высаливании, такие как сульфат аммония. Это объясняется тем, что в основе обоих процессов лежат одинаковые механизмы. При высаливании основной причиной агрегации является усиление гидрофобных взаимодействий между белками. Следовательно, при высоких концентрациях соли большинство белков будут адсорбироваться на гидрофобных группах, связанных с матрицей. Элюцию проводят понижающимся градиентом концентрации соли. Белки, которые прочно адсорбируются обычно удаляют с колонки, добавляя в элюирующий раствор этиленгликоль.

2.4.8.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, HPLC)

Интерес к колоночной хроматографии с подвижной жидкой фазой резко возрос с появлением аппаратуры для жидкостной хроматографии при высоких давлениях. Отличительной особенностью этого метода является наличие в аппаратуре специальных насосов, позволяющих с достаточно большой скоростью продавливать жидкую фазу через колонку, имеющей

диаметр частиц от 3 до 15 мкм, а также наличие чувствительных детекторов для обнаружения разделенных веществ.

Хроматографы для ВЭЖХ (HPLC) включают несколько блоков: дегазатор (для удаления растворенного кислорода из растворителей), насос, термостат (где помещается колонка), детектор (УФ, рефрактометр, амперометрический, кондуктометрический и другие). На хроматограф могут быть установлены различные колонки: ионообменные, гельфилтрационные, гидрофобные и т.д.

2.4.9. Электрофорез

Метод основан на свойстве заряженных частиц (молекул) перемещаться под действием электрического поля. Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда. Физический принцип метода электрофореза заключается в следующем. Молекула белка в растворе при любом рН, отличающемся от её изоэлектрической точки, имеет некий средний заряд. Это приводит к тому, что белок движется в электрическом поле. Движущая сила определяется величиной напряженности электрического поля E умноженной на суммарный заряд частицы z . Этой силе противостоят силы вязкости среды, пропорциональные коэффициенту вязкости η , радиусу частицы r (стоксовскому радиусу) и скорости v .

$$E \cdot z = 6\pi\eta r v$$

Удельная подвижность $u=v/E$ может быть выражена как $u = z / 6\pi\eta r$. Таким образом, молекулы приобретают разные скорости в зависимости от величины заряда и размеров, и в этом - сущность процесса электрофореза.

Первым вариантом электрофореза был электрофорез с подвижной границей (в свободном растворе) в специальном аппарате Тизелиуса. Этот вариант требовал десятки мг белка, позволял различать не более 8 компонентов даже при разделении очень сложных смесей, что обусловлено

диффузией, приводящей к перекрытию белковых зон. Он требовал много усилий и внимания. Затем был разработан электрофорез на бумаге и других целлюлозных материалах. Уменьшилось количество белка, упростилось оборудование. Обычно электрофорез проводят при нейтральных или слабощелочных рН, когда большинство белков мигрирует к аноду. Смитис впервые применил в качестве поддерживающей среды крахмальный гель, увеличив степень разрешения. Несколькими годами позже Орнстейн предложил синтетическую гелевую среду – поперечно-сшитый полиакриламид (ПААГ).

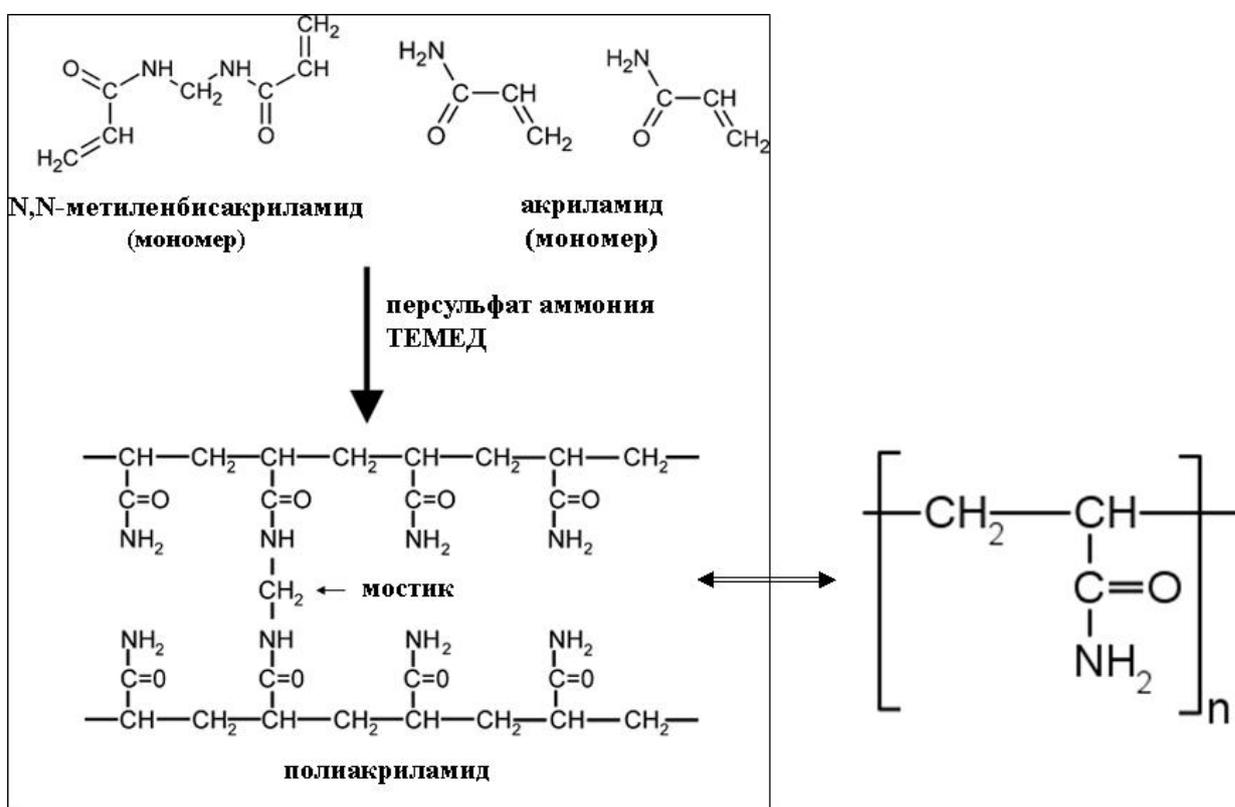


Рис. 24. Структура полиакриламидного геля.

Применение этого материала позволило получать более контролируемые, чем у крахмального геля, размеры пор. Размеры пор варьируют концентрацией метиленбисакриламида. Обычно используют 7-15% ПААГ (рис. 24).

Ступенчатый электрофорез (Disc-Electrophoresis) был предложен Орнстейном Дэвисом еще в самом начале становления метода электрофореза в полиакриламидном геле. Для проведения дискэлектрофореза необходимо контролировать 4 параметра:

- структуру геля
- рН буфера геля
- ионную силу буфера
- природу ионов в геле и в электродном буфере

Сущность метода состоит в использовании двух гелей концентрирующего (с крупными порами) и разделяющего (с более мелкими порами). Использование такой системы позволяет концентрировать препарат белка до входа его в разделяющий гель, тем самым улучшается разрешение электрофореза.

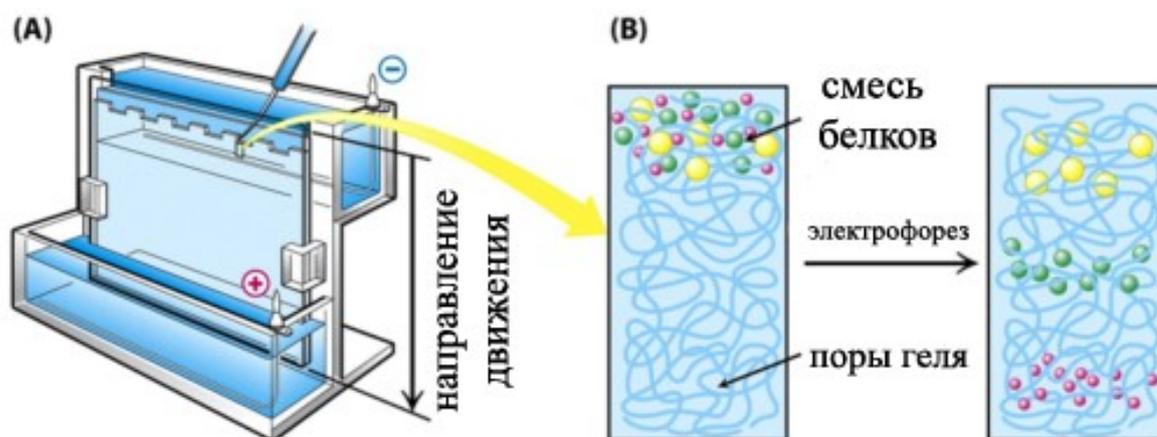


Рис. 25. Схема проведения электрофореза. А – устройство электрофоретической камеры, В – принцип разделения белков в геле в зависимости от их размера.

Электрофорез белков в простой системе удобно использовать для их разделения, но не для характеристики. Электрофоретическая подвижность каждого белка в простой системе зависит одновременно и от его суммарного

заряда, и от молекулярной массы, и от конфигурации полипептидной цепи. Для установления строгой количественной корреляции между одним из этих параметров и электрофоретической подвижностью белка нужно исключить влияние всех остальных. Электрофорез в ПААГ в присутствии анионного детергента додецилсульфата натрия (ДДС-Na) позволяет фракционировать белки в зависимости от значений только одного параметра – их молекулярной массы (рис. 25). Такая система была разработана Лэммли. Для этого белки обрабатывают трехкратным избытком ДДС-Na. За счет гидрофобных взаимодействий детергент примерно одинаково связывается с большинством белков. Каждая молекула ДДС-Na несет отрицательный заряд, и огромный избыток их превосходит собственный суммарный заряд белка. Денатурированный неразветвленный полипептид в этих условиях представляет собой стержень с сильным отрицательным зарядом. Соотношение размер/заряд в присутствии ДДС-Na становится практически одинаковым для любого белка, и деление происходит по молекулярной массе, так как поры геля работают как молекулярные сита.

В последнее время стали применять электрофорез в градиенте пористости ПААГ, т.е. в гелях с изменяющимися вдоль направления миграции белков размерами пор. Он сходен с электрофорезом в присутствии ДДС-Na в том отношении, что разделение идет по размерам молекул, а не по заряду. Концентрация акриламида изменяется по длине пластинки от 30% в нижней части, до 3% в верхней части. Рабочий буфер имеет высокое значение pH, поэтому белки мигрируют к аноду до тех пор, пока из-за размеров пор геля он не сможет двигаться дальше. Размеры молекул в этом варианте метода – нативные, а не субъединичные, как в предыдущем.

В ходе электрофореза зоны растворенного белка остаются невидимыми. Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут заряд того же знака, что и молекулы белка, но не взаимодействуют с ним. Скорость миграции красителя

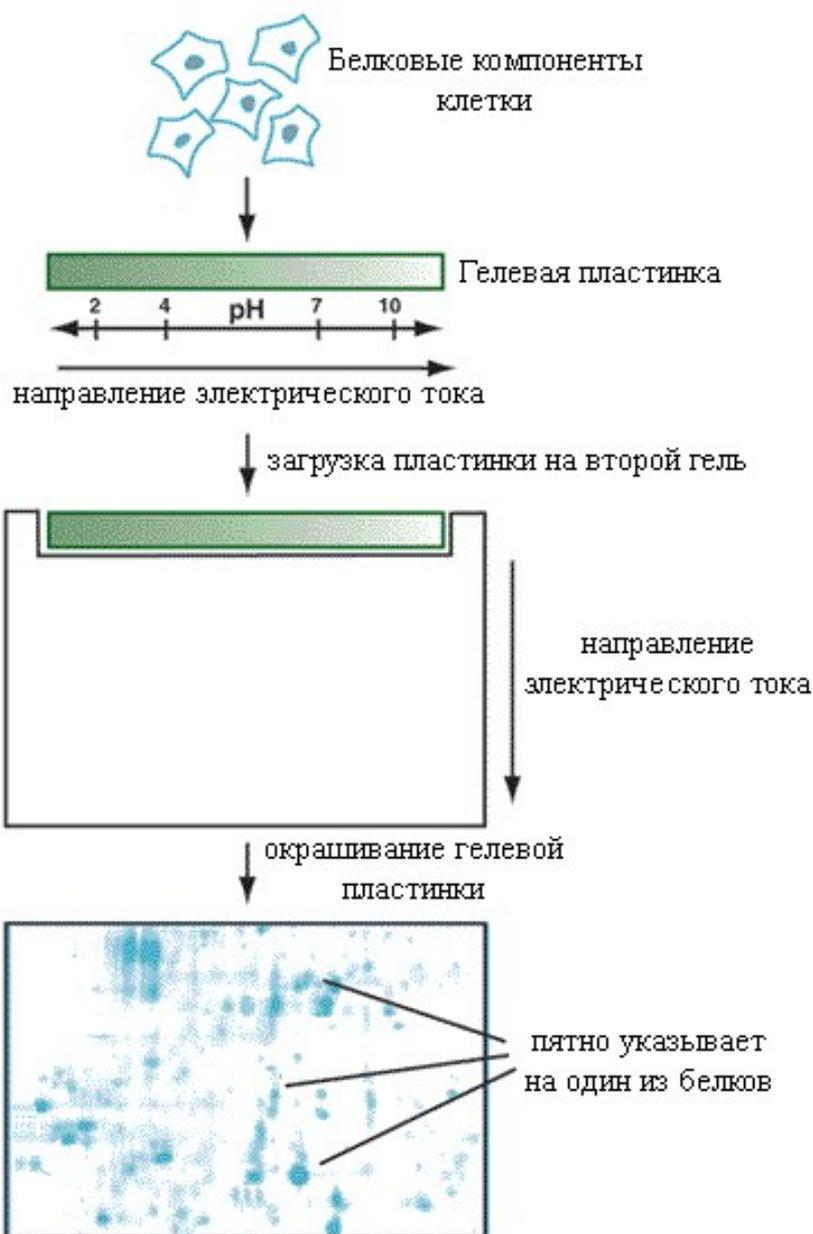


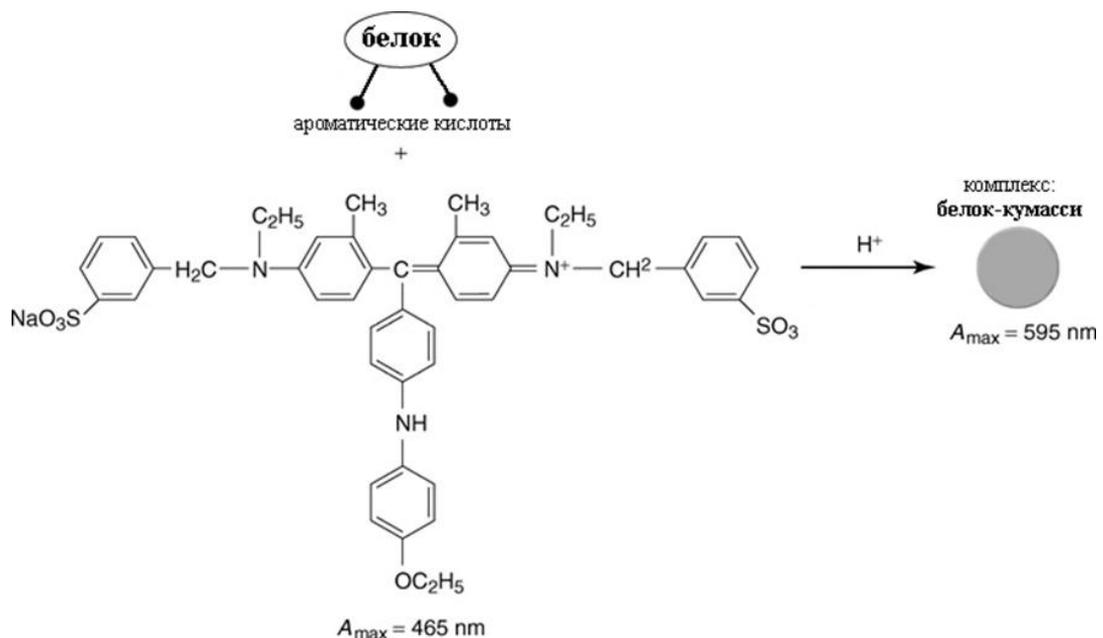
Рис. 26. Схема проведения двумерного электрофореза.

несколько выше, поэтому, когда окрашенная зона доходит до конца геля, электрофорез прекращают. Разделившиеся зоны белков фиксируют в смеси уксусной кислоты с этанолом, чтобы избежать диффузии. После фиксации проводят окрашивание белковых полос (рис. 26). Красители обладают высокой чувствительностью, и окраска полос происходит пропорционально количеству белка в зоне (рис. 27). Используют такие красители как кумасси синий (G-250, R-250) (рис. 28), амидочерный.

- ↓ чувствительность
- Кумасси R-250
 - Нитрат серебра
 - Антитела

Рис. 27 Красители, используемые при окрашивании электрофоретических геле и их чувствительность.

Длительной является процедура отмывки геля водой для удаления излишка красителя. Иногда делят белки, заранее меченные хромофором (например, флуорескамином, SYPRO), и обнаруживают их по флуоресценции в УФ-области спектра.



Чувствительность метода составляет до 2мкг

Рис. 28. Структура и принцип окраски с использованием кумасси R-250.

Очень чувствительным является способ окрашивания белков нитратом серебра. Серебро связывается с белками, затем следуют этапы восстановления и усиления окраски (рис.29).

Ионы серебра взаимодействуют строго с функциональными группами аминокислот:

- Карбоксильные группы - (Asp и Glu),
- Имидазольные группы - (His),
- Сульфгидрильные группы - (Cys),
- Амино группы - (Lys).

Чувствительность метода составляет 0,5нг.

Рис. 29. Принцип окраски с использованием нитрата серебра.

Используют также и радиоактивную метку (радиоактивным углеродом или йодом). Регистрацию полос в этом случае проводят методом автордиографии с помощью рентгеновской пленки. Это самый чувствительный метод регистрации белковых полос. Специфическое окрашивание ферментов возможно, только когда электрофорез проводится в неденатурирующих условиях, при которых фермент сохраняет свою активность.

Электрофорез как в нативных, так и в денатурирующих условиях, является эффективным методом для того, чтобы выяснить содержит ли конечный продукт один или большее число белков, и обнаружить в нем примеси, даже если они присутствуют в очень малых количествах.

Эффективным методом разделения белков является изоэлектрическое фокусирование. Изоэлектрическая точка – это значение рН, при котором суммарный заряд вещества равен нулю. Амфолиты (амфотерные электролиты) – это соединения, обладающие как кислотными, так и основными свойствами. В зависимости от рН среды их суммарный заряд приобретает положительное, отрицательное или нулевое значение. С помощью изоэлектрофокусирования можно фракционировать только вещества с амфотерными свойствами. Таковыми являются белки. Кроме

амфолитов-образцов существуют амфолиты-носители, которые создают градиент рН. Если обычный электрофорез основан на разделении белков по их подвижности при данном значении рН, то изоэлектрическое фокусирование заключается в том, что создается система с градиентом рН. Белки, движущиеся в электрическом поле, достигают в этой системе такой области, в которой значение рН равно их изоэлектрической точки. При этом значении суммарный заряд белка равен 0, и он не способен перемещаться в электрическом поле. Синтетические амфолиты - носители (иногда их называют амфолинами) представляют собой гетерогенную смесь различных полиаминополикарбоновых кислот довольно низкой молекулярной массы. Аминогруппа может быть первичной, вторичной и третичной. Условия синтеза направлены на образование множества гомологов и изомеров. Этот ряд соединений обладает непрерывным спектром изоточек от рН 3 до рН 10. Состав смеси, от которого зависит интервал значений рН, можно регулировать фракционированием. Для создания градиента рН смесь амфолитов помещают в стабилизированную среду и подают напряжение. При аналитическом изоэлектрофокусировании распространенным стабилизатором является полиакриламидный или агарозный гель. Препаративное изоэлектрическое фокусирование чаще всего проводят в вертикальной колонке, стабилизация которой осуществляется с помощью градиента сахарозы.

2.4.10. Кристаллизация белков

Кристаллизация белков используется: а) как завершающая стадия очистки, б) для доказательства гомогенности белка, в) как метод стабилизации при хранении (многие фирмы продают чистые ферменты в виде суспензии кристаллов, помещенных в раствор сульфата аммония), г) для определения третичной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа. Кристаллы растут из пересыщенных растворов вследствие агрегации

высокоупорядоченным образом. Выращивание кристаллов занимает много времени, особенно чтоб получить более крупные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа. Чаще всего в таблице, отражающей ход очистки белка, кристаллизация представлена в качестве последнего этапа. Это указывает на то, что фермент получен в достаточно чистом состоянии, и такой кристаллический препарат пригоден для длительного хранения. Но кристаллы могут образовываться и в очень разнородных смесях белков. Если примеси не находятся в перенасыщенном состоянии, то агрегировать будет тот белок, который присутствует в этом состоянии, и могут образоваться его кристаллы. Чтобы началась кристаллизация, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для этой цели используют осадители (вещества, уменьшающие растворимость): сульфат аммония, полиэтиленгликоль, органические растворители. Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка: рН, концентрации буфера и осадителя, ионов металлов.

Вопросы и задания

1. Биологические функции белков.

Построенные из *одних и тех же* 20 аминокислот, белки имеют *разные*, иногда противоположные функции в живом организме. Например, пептид аманитин – сильнейший токсин, а антитела (тоже пептидной природы) – это «противоядие» (нейтрализуют антигены). Объясните, чем определяется функция белка. Поясните удивительный факт: «одинаковые 20 аминокислотных остатков, но разные функции белка».

Ниже приведены названия 21 природного белка и 7 функций, которые они выполняют в организме. Назовите функцию, которую выполняет каждый из перечисленных белков. Результаты представьте в виде таблицы.

Функции

I. Ферменты, **II.** Транспортные белки, **III.** Пищевые и запасные белки, **IV.** Сократительные и двигательные белки, **V.** Структурные белки, **VI.** Защитные белки, **VII.** Регуляторные белки.

Белки

- | | |
|--------------------------|------------------------|
| 1. Антитела | 12. Липопротеины крови |
| 2. Гемоглобин | 13. Тромбин |
| 3. Актин | 14. Гормон роста |
| 4. Сывороточный альбумин | 15. Коллаген |
| 5. Дифтерийный токсин | 16. Миозин |
| 6. Инсулин | 17. Яичный альбумин |
| 7. Казеин (молоко) | 18. Эластин |
| 8. Кератин | 19. Губулин |
| 9. Ботулинический токсин | 20. Глюкагон |
| 10. Ферритин | 21. Пепсин |
| 11. Трипсин | |

2. Фибриллярные белки: α - и β -кератины.

Ниже перечислены основные характеристики фибриллярных белков α - и β -кератинов – важнейших структурных белков организма. Определите, какие из них относятся к α -кератином, какие – к β -кератином, а какие – к обеим группам. Представьте результаты в виде таблицы.

1. Это основной тип фибриллярных белков, из которых состоят защитные покровы организма: волосы, шерсть, перья, ногти, панцирь черепахи, значительная часть наружного слоя кожи.
2. Примером является фиброин – белок шёлка и паутины.
3. Имеют конформацию α -спирали.
4. Периодичность вторичной структуры составляет 0,54 нм, или 3,6 аминокислотных остатка.
5. Структура стабилизирована водородными связями.
6. Периодичность вторичной структуры составляет 0,70 нм.
7. Практически нерастяжимы.
8. Не могут содержать аминокислотные остатки пролина.
9. Имеют конформацию β -складчатого слоя.
10. Богаты аминокислотными остатками цистеина.
11. Структура стабилизирована межцепочечными водородными связями (между соседними полипептидными цепями).
12. В структуре отсутствуют дисульфидные мостики.
13. Не растворимы в воде вследствие многочисленных аминокислотных остатков с неполярными радикалами.
14. Можно растянуть с помощью пара почти вдвое.
15. Структура стабилизирована внутрицепочечными водородными связями.
16. Представляют собой мягкие и гибкие нити.

3. Задачи.

- а) Неопытный исследователь ввёл кролику внутривенно 10%-раствор сульфата аммония. Животное тут же погибло. Что случилось с кровью, и почему погиб кролик?
- б) Вы выделили из клеток человека белок, который имеет в своём составе 80% таких аминокислотных остатков, как фенилаланин, валин, изолейцин, лейцин и аланин. Предположите, в какой части клетки находится этот белок, и объясните Вашу идею.
- в) Почему свежее молоко не свёртывается при кипячении, а подкисшее свёртывается? Что можно сделать, чтобы избежать сворачивания подкисшего молока?
- г) При мутации вместо аминокислоты фенилаланин в белковую молекулу встроилась глутаминовая кислота. Может ли такая замена изменить третичную структуру белка, его растворимость в воде и стать причиной болезни?
- д) Ожоги кожи, вызванные кислотами или щелочами заживают медленнее, чем механические повреждения кожи. Объясните возможные причины данного отличия.
- е) При химической завивке волос вначале восстанавливают (первый флакон - восстановитель), а затем окисляют (второй флакон - окислитель) тиоловые группы белка волос α -кератина. Исходя из особенностей пространственного строения α -кератина, объясните причину изменения формы волос.
- ж) Объясните, почему биуретовым методом можно определить содержание белков, а не аминокислот в растворе. Как можно определить концентрацию аминокислот? Дадут ли одинаковую окраску с биуретовым реактивом 1000 молекул альбумина и 1000 молекул гамма-глобулина? Обоснуйте Ваш ответ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Комов В.П. Биохимия: учеб. / В.П. Комов, В.Н. Шведова. – М. : Дрофа, 2004. – 639с.
2. Биохимия / под ред. Е.С. Северина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2014. – ISBN 978-5-9704-2786-6.
<URL:<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970427866.html> >
3. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т.1-3.
4. Алабовский В.В. Сборника ситуационных задач по биохимии / В.В. Алабовского. – Воронеж. – 2003. – 158с.
5. Северин Е.С. Биохимия с упражнениями и задачами : гриф УМО по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России / Е.С. Северин, А.И. Глухов, В.А. Голенченко [и др.] ; под ред. Е.С. Северина. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – ISBN 978-5-9704-1736-2.
<URL:<http://www.studmedlib.ru/book/ISBN9785970417362.html> >
6. Жеребцов Н.А. Биохимия: учеб. / Н.А. Жеребцов, Т.Н. Попова, В.Г. Артюхов. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. – 696с.
7. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Изд-во Наука, 1981. 536 с.
8. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Изд-во Наука, 1985. 536 с.
9. Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле: Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 60 с.
<URL:https://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf>