

В.А. СМЕРНОВ, Ю.Н. КЛИМОЧКИН

АМИНОКИСЛОТЫ И ПОЛИПЕПТИДЫ

Учебное пособие

Часть I

Самара
Самарский государственный технический университет
2007



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

В.А. СМИРНОВ, Ю.Н. КЛИМОЧКИН

АМИНОКИСЛОТЫ И ПОЛИПЕПТИДЫ

*Утверждено Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного пособия*

Самара
Самарский государственный технический университет
2007

УДК 571.1. + 577.1

С 50

Р е ц е н з е н т канд. мед. наук С. А. Т у м а к о в

Смирнов В.А.

С 50 Аминокислоты и полипептиды: учеб. пособ. Ч. I./ В.А. Смирнов, Ю.Н. Климочкин. – Самара. Самар. гос. техн. ун-т., 2007. – 110 с.: ил.

ISBN 978-5-7964-1057-4

Рассмотрены классификация, номенклатура, строение, физико-химические свойства, методы качественного и количественного анализа аминокислот и полипептидов. Приведены методики качественного и количественного титриметрического и спектрального анализа аминокислот и белков.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальностям 020101, 260202, 260204, 260401, 240901.

УДК 571.1. + 577.1

С 50

ISBN 978-5-7964-1057-4

© Смирнов В.А., Климочкин Ю.Н., 2007

© Самарский государственный
технический университет, 2007

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Биохимия» входит в цикл общепрофессиональных дисциплин для студентов химико-технологического факультета, обучающихся по специальности «Химия» по направлению «Фармацевтическая химия», и факультета пищевых производств Самарского государственного технического университета.

За последние 20-25 лет, благодаря успехам молекулярной биологии и широкому внедрению разнообразных современных методов исследования (спектральных, хроматографических и др.), значительно возрос уровень биохимических исследований как в теоретическом, так и в методическом отношении. Исследования проводятся на различных уровнях организации организмов: молекулярном, субклеточном, клеточном, межклеточном, тканевом, органном. В отличие от традиционно изучаемой медиками и биологами дисциплины «Общая биохимия» настоящее учебное пособие по биохимии ставит своей задачей ознакомить студентов с основами и современными аспектами химии живой материи на уровне клетки и не включает в себя биохимию органов и систем организмов.

Основное внимание уделено физико-химическим свойствам и методам анализа веществ биологического происхождения. Это обусловлено спецификой деятельности специалистов в области фармацевтической химии и переработки пищевых продуктов.

В ассортимент современных лекарственных средств входит значительная группа препаратов биологического происхождения: антибиотики, ферментные препараты, гормоны и др. Эффективная разработка и совершенствование лекарственных средств немыслимы без понимания биохимических процессов в организмах.

Все пищевые предприятия перерабатывают сырье биологического происхождения, поэтому курс биохимии является теоретической базой любой пищевой технологии.

Целями настоящего учебного пособия являются следующие:

1) ознакомить студентов с биологически активными молекулами природного происхождения, такими, как аминокислоты, белки, ферменты, углеводы, липиды, витамины, гормоны и др., и основными путями обмена веществ на уровне клетки;

2) обучить их основным приемам и навыкам, необходимым для профессионального овладения процессами переработки сырья биологического происхождения, методами оценки его качества и качества препаратов биологического происхождения.

1. ВНЕАУДИТОРНАЯ ПОДГОТОВКА

1.1. АМИНОКИСЛОТЫ

1.1.1. СТРОЕНИЕ, КЛАССИФИКАЦИЯ, НОМЕНКЛАТУРА

Аминокислоты – это органические кислоты, содержащие одну или несколько аминогрупп. В зависимости от природы кислотной функции аминокислоты подразделяют на аминокарбоновые, например $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$, аминосульфоновые, например $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_2\text{OH}$, аминофосфоновые и т.д. В живых организмах встречаются, главным образом, аминокарбоновые кислоты (в дальнейшем просто аминокислоты), хотя и редко, но встречаются и аминосульфоновые кислоты, например $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{OH}$ (таурин – конечный продукт метаболизма цистеина).

Классифицируют аминокислоты по разным признакам: по химическому строению, по участию в синтезе белка *in vivo*, по кислотно-основным свойствам, по потребности организмов в данной аминокислоте.

По химическому строению аминокарбоновые аминокислоты делятся на аминокислоты ароматического ряда и аминокислоты алифатического ряда. Аминокислоты ароматического ряда составляют лишь весьма небольшой круг веществ, встречающихся в организмах, например пара-аминобензойная кислота (фактор роста микроорга-

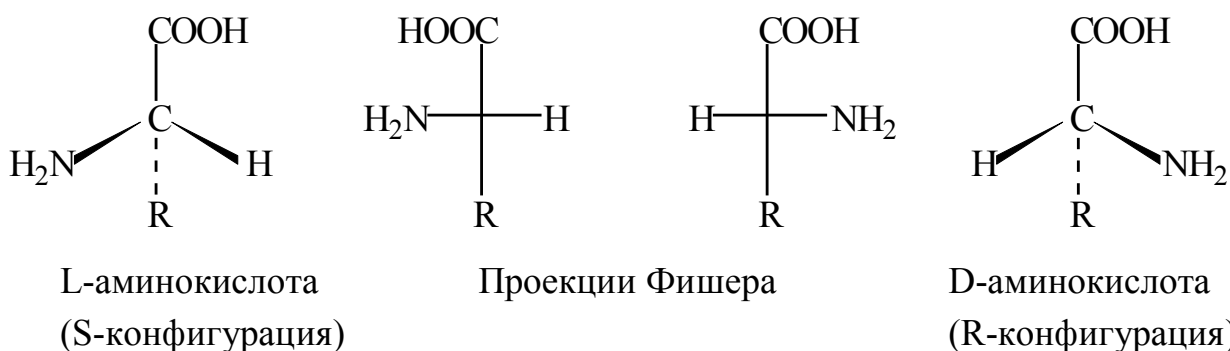
низмов). Основная масса аминокислот, выделенных из разных организмов, относится к классу *алифатических аминокислот*, т.е. таких аминокислот, в которых амино– и карбоксильная группы связаны с алифатическим атомом углерода.

Алифатические аминокислоты делятся в зависимости от относительного положения амино– и карбоксильной групп на α -, β -, γ -аминокислоты и т.д., например:

$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
α -Аминоуксусная кислота (глицин)	β -Аминопропионовая кислота (β -аланин)	γ -Аминомасляная кислота (ГАМК)

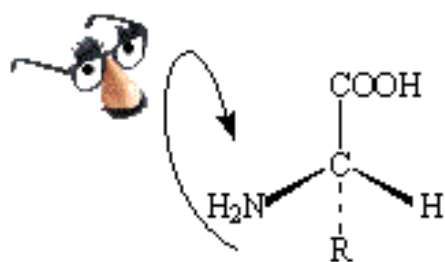
Основная масса природных аминокислот представлена α -изомерами, а β - и γ -аминокислоты в живых системах представлены единичными случаями. Здесь можно упомянуть нейромедиатор ЦНС млекопитающих γ -аминомасляную кислоту (ГАМК) и β -аланин, являющийся фрагментом кофермента А. *α -Аминокислоты* чрезвычайно широко распространены в живых организмах любого типа: в растениях, в микроорганизмах, в животных, в морских организмах. Они найдены также в некоторых метеоритах, при этом это такие же аминокислоты, какие входят в состав белков земных организмов.

Все α -аминокислоты, кроме глицина, имеют асимметрический (хиральный) α -углеродный атом и существуют в виде двух *энантиомеров* (L– и D-аминокислот):



Необходимо отметить, что в случае аминокислот символы L и D приняты для обозначения конфигурации α -углеродного атома, а не

знака оптического вращения (для указания последнего используются символы + и –). Например, L-цистеин в нейтральном водном растворе является левовращающим (–), напротив, L-аланин – правовращающим (+), хотя также принадлежит к L-ряду. На знак оптического вращения оказывает влияние среда, в которой проводится определение. Так, L-серин в нейтральной среде является лево-, а в кислой – правовращающим.



Абсолютные конфигурации устанавливаются с помощью *правила последовательности* Куна, Ингольда, Прелога*. Для определения конфигурации асимметрического центра Cabdf сначала определяют старшинство групп abdf. Чем больше

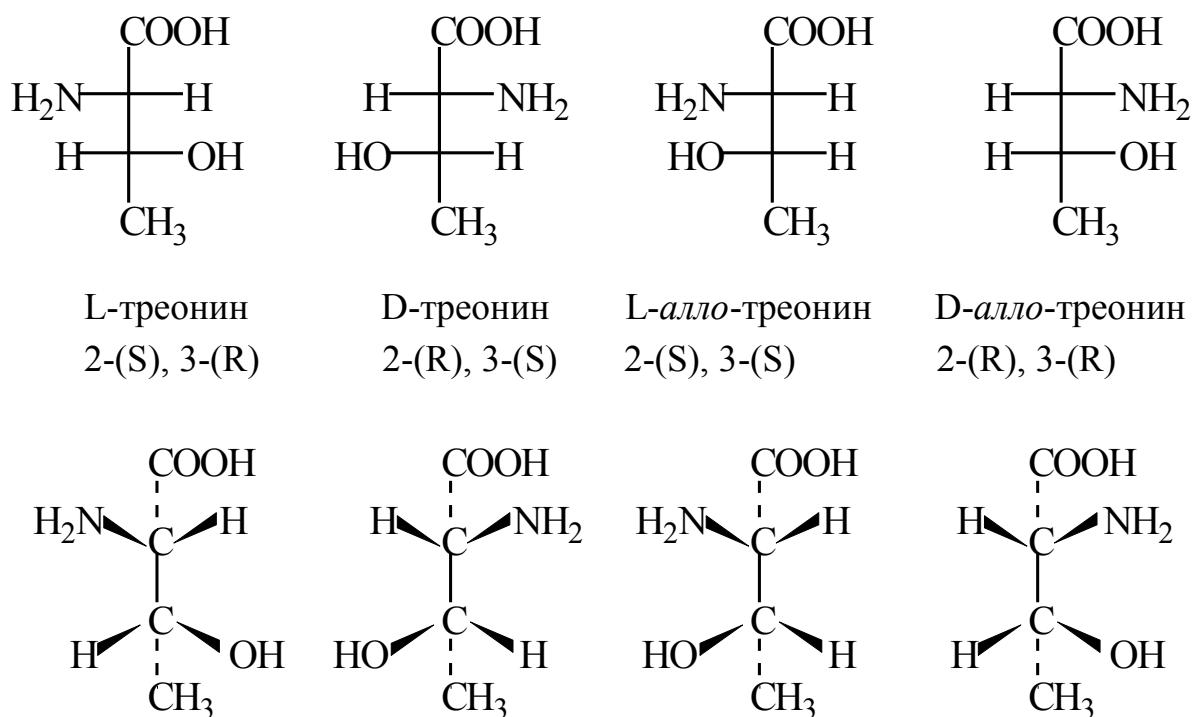
атомный номер первого атома группы, тем она старше; если они одинаковы, сравнивают атомные номера вторых атомов группы и т.д. Так, в случае α-аминокислот последовательность, соответствующая уменьшению старшинства групп, такова: H₂N, COOH, R, H.

Далее нужно смотреть на тетраэдр со стороны, противоположной младшей группе, и если при этом обход оставшихся трех заместителей от старшего к среднему и затем к младшему соответствует движению по часовой стрелке, конфигурация описывается как R (rectus – правая), а если против часовой, то как S (sinister – левая). На вышеприведенных рисунках символ  обозначает, что заместитель расположен над плоскостью, --- – за плоскостью, а — — в плоскости бумаги. S-Конфигурация при α-углеродном атоме имеет место у всех α-аминокислот L-ряда, соответственно R-конфигурация присуща D-α-аминокислотам.

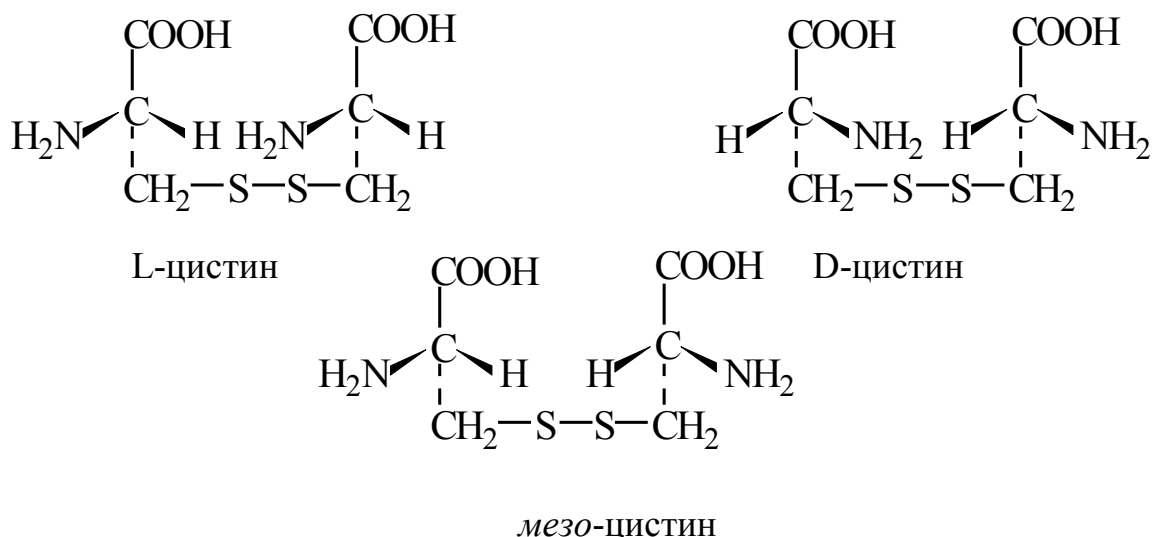
* Рихард Кун – немецкий биохимик Основные работы посвящены исследованиям каротиноидов и витаминов. Нобелевская премия (1938 г). Кристофер Ингольд -английский химик. Основные работы посвящены физической органической химии, основателем которой он является. Ввел представление об электро- и нуклеофильных реагентах и реакциях, о хиральности. Владимир Прелог – швейцарский химик. Основные работы посвящены стереохимии, синтезу и исследованию органических соединений, в том числе антибиотиков. Нобелевская премия (1975 г).

Все *протеиногенные* аминокислоты (определение термина см. далее) относятся к L-ряду. Однако за последнее время появилось много данных о наличии D-аминокислот как в свободном состоянии, так и в составе пептидов, главным образом среди продуктов метаболизма микроорганизмов. Остатки D-аминокислот входят в состав многих антибиотиков, например, полимиксин D содержит фрагмент D-серина, грамицидин А – D-лейцина, актиномицин С – D-валина.

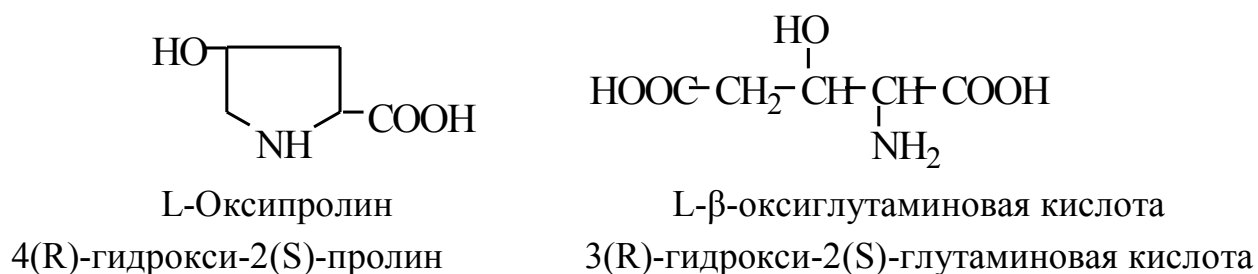
Некоторые природные α-аминокислоты (изолейцин, треонин) имеют два асимметрических атома углерода и соответственно существуют в виде двух пар диастереомеров. Эти аминокислоты, встречающиеся в природных белках, относят к нормальному ряду, а соответствующие им стереоизомеры, полученные синтетическим путем, обозначают как *алло-аминокислоты*:



Симметричная аминокислота цистин может существовать в трех формах: L-, D- и внутренне компенсированной оптически неактивной – *мезо*-форме. Природный L-цистин образуется в организме при окислении цистеина, что играет большую роль в формировании нативной структуры белка при его посттрансляционном созревании:



По участию в синтезе белка *in vivo* аминокислоты делятся на протеиногенные и непротеиногенные. Протеиногенными называют аминокислоты, которые включаются в состав белков в ходе биосинтеза в рибосомах под генетическим контролем информационной РНК. Их ровно 20, и все они относятся к L-ряду (табл.1.1). В то же время из природных белков выделено к настоящему времени около 30 аминокислот, например L-оксипролин, L-цистин, L-β-оксиглутаминовая кислота и др.:



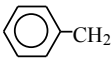
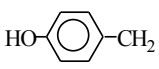
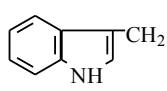
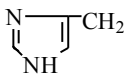
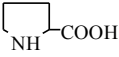
Этот факт объясняется тем, что линейная немодифицированная полипептидная цепь превращается в полноценный функциональный белок в результате многостадийного процесса (созревание), который начинается сразу же после начала трансляции. В процессе созревания белка осуществляются различные ферментативные реакции, такие, как окисление, фосфорилирование, N-гликозилирование, взаимодействие с белками связывания (шапероны – белки, направляющие процесс свертывания цепи). В результате процесса созревания образуются характерные для данного белка вторичная и третичная структуры.

Например, предшественник коллагена – линейный проколлаген – прежде чем превратиться в коллаген, вступает в ряд ферментативных реакций. Он подвергается окислению, которое заключается в гидроксилировании остатков пролина и лизина, а также в образовании дисульфидных мостиков между остатками цистеина. Эти процессы обеспечивают правильное скручивание полипептидных цепей в тройную спираль коллагена.



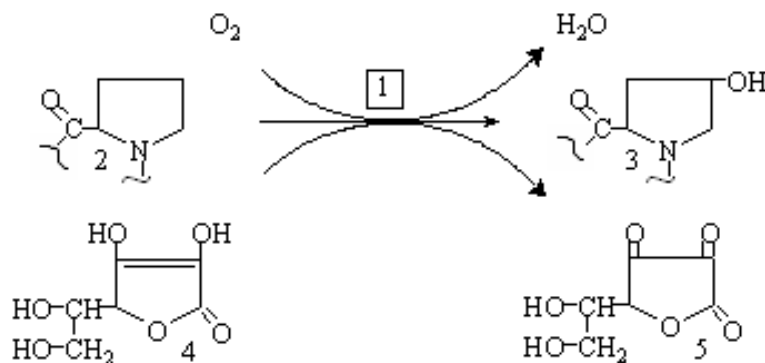
Таблица 1.1

– Протеиногенные аминокислоты

№ п/п	R	Название	Сокращенные обозначения
1	H	Глицин	Gly, (G)
2	CH ₃	Аланин	Ala, (A)
3	HOCH ₂	Серин	Ser, (S)
4	HSCH ₂	Цистеин	Cys, (C)
5	HOOCCH ₂	Аспарагиновая кислота	Asp, (D)
6	H ₂ NOCCH ₂	Аспарагин	Asn, (N)
7		Фенилаланин**	Phe, (F)
8		Тирозин	Tyr, (Y)
9		Триптофан **	Trp, (W)
10		Гистидин	His, (H)
11	(CH ₃) ₂ CH	Валин **	Val, (V)
12	CH ₃ HOCH	Треонин **	Thr, (T)
13	CH ₃ SCH ₂ CH ₂	Метионин **	Met, (M)
14	HOOCCH ₂ CH ₂	Глутаминовая кислота	Glu, (E)
15	H ₂ NOCCH ₂ CH ₂	Глутамин	Gln, (Q)
16	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Лейцин **	Leu, (L)
17	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Изолейцин **	Ile, (I)
18	(H ₂ N)HN=CNH(CH ₂) ₂ CH ₂	Аргинин	Arg, (R)
19	H ₂ N(CH ₂) ₃ CH ₂	Лизин **	Lys, (K)
20*		Пролин	Pro, (P)

* Приведена формула пролина; ** Незаменимые аминокислоты.

Коферментом, участвующим в процессе окисления остатков L-пролина в проколлагене, является аскорбиновая кислота, дефицит которой вызывает торможение процесса образования коллагена из проколлагена (заболевание – цинга, рис.1.1).



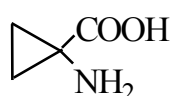
Р и с.1.1. Гидроксилирование остатка пролина в проколлагене:

- 1 – фермент – проколлагенпролин-4-диоксигеназа-[аскорбат];
- 2 – остаток L-пролина; 3 – остаток -4-гидрокси-L-пролина (оксипролина);
- 4 – аскорбиновая кислота; 5 – дегидроаскорбиновая кислота

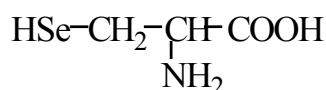
Кроме протеиногенных и образующихся из них аминокислот, входящих в состав белка, но не являющихся протеиногенными, в организмах обнаружено большое количество непротеиногенных аминокислот, которые не входят в состав белков. Только в растениях и микроорганизмах обнаружено более 200 аминокислот алифатического ряда. Приведем лишь несколько примеров, иллюстрирующих большое разнообразие непротеиногенных аминокислот (рис.1.2). Среди них обнаружены соединения и с различными циклами, в том числе гетероциклами, и с непредельными связями, и с такими элементами, как хлор, бром, йод, селен, и аналоги протеиногенных аминокислот с D-конфигурацией. Что касается D-энантиомеров протеиногенных аминокислот, таких, как D-аланин, D-валин, D-цистеин, D-фенилаланин, D-глутамин и другие, то такие аминокислоты часто входят в состав полипептидных антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, и являются компонентами клеточных стенок многих бактерий.

По кислотно-основным свойствам аминокислоты делятся на кислые, нейтральные и основные. Нейтральные аминокислоты содержат в своей структуре одинаковое количество основных и кислот-

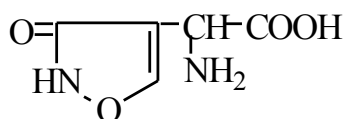
ных групп. В структуре кислых аминокислот количество кислотных групп превышает количество основных, а структуре основных наоборот – количество основных групп превышает количество кислотных. Из протеиногенных аминокислот кислым характером обладают аспарагиновая и глутаминовая кислоты, основным – гистидин, аргинин и лизин, а остальные 15 аминокислот имеет кислотно-основные свойства близкие к нейтральным. Количественной интегральной мерой кислотно-основных свойств является величина pI – изоэлектрическая точка (о pI см. табл. 1.3 в п. 1.1.3).



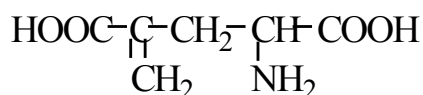
1-Аминоциклопропанкарбоновая кислота
(биогенный источник этилена в растениях)



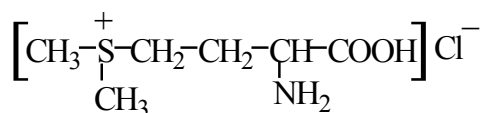
Селеноцистеин (активный центр
глутатионпероксидазы)



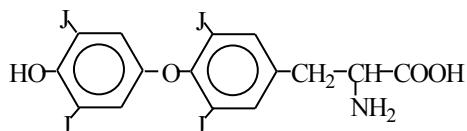
Иботеновая кислота (яд мухомора)



γ -Метилен-L-глутаминовая
кислота (арахис, тюльпаны)



Витамин U (капуста)



Тироксин (гормон щитовидной
железы)

Р и с.1.2. Некоторые непротеиногенные аминокислоты

По потребности организма человека в аминокислотах их делят на заменимые и незаменимые. 8 из 20 протеиногенных аминокислот не синтезируются в организме человека и должны поступать вместе с пищей. Эти аминокислоты называют незаменимыми (отмечены ** в табл. 1.1).

Номенклатура природных аминокислот характеризуется широким распространением тривиальных названий. По мере открытия аминокислот, выделяемых из продуктов гидролиза различных белков, они получали название в зависимости от своих характерных свойств или происхождения белка. Например, аспарагин (от греч. asparagus – спаржа), глицин (гликокол, от греч. glucos – сладкий). Названия, составленные по систематической номенклатуре, малоупотребительны из-за своей громоздкости. Например, триптофан по систематической номенклатуре называется α -амино- β -индолилпропионовая кислота. Но даже более короткие тривиальные названия являются слишком длинными при обозначении аминокислотной последовательности полипептидов. В связи с этим приняты международные сокращенные трехбуквенные обозначения аминокислот, а в 1968 г. комиссией IUPAC-IUB рекомендовано при написании аминокислотных последовательностей белков использовать однобуквенные обозначения аминокислот (см. табл.1.1).

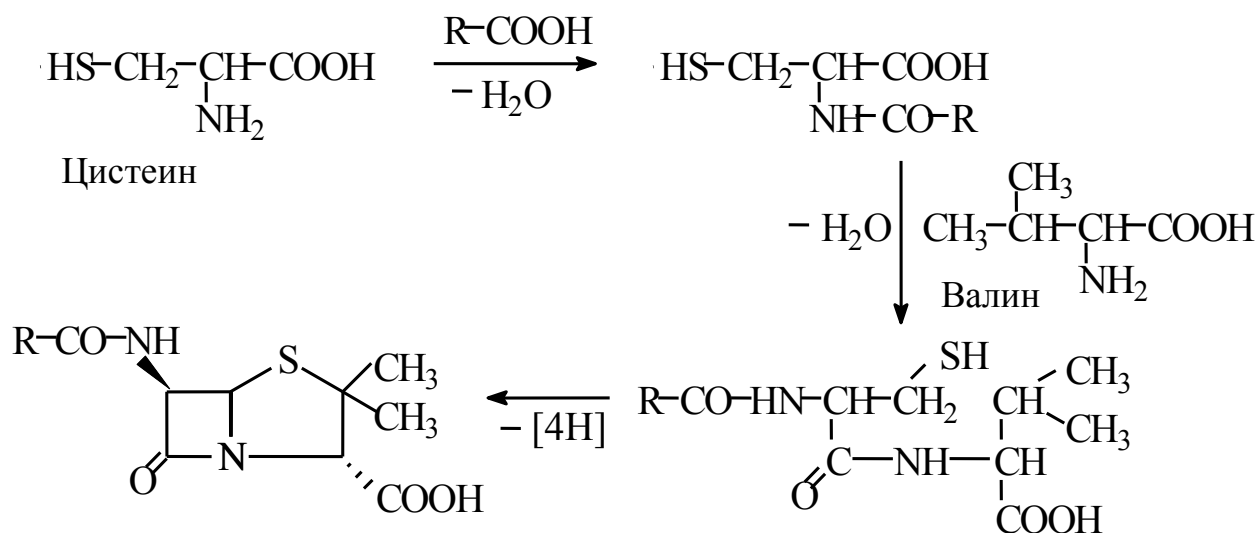
1.1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

В живых организмах аминокислоты выполняют ряд функций, важнейшими из которых являются следующие:

- структурные элементы белков;
- структурные элементы других природных соединений;
- исходные соединения для образования в организмах биогенных аминов и родственных соединений;
- нейромедиаторы и медиаторы;
- метаболиты.

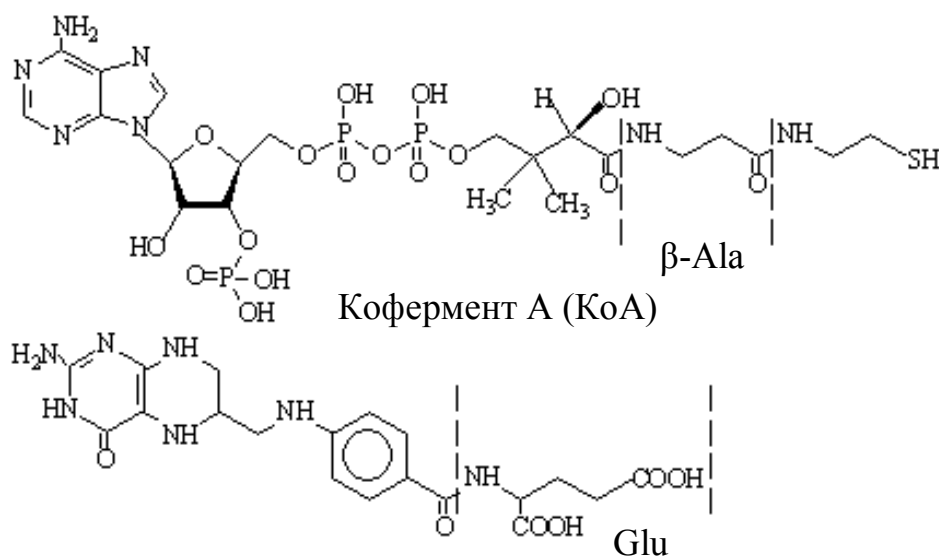
Структурные элементы белков. В состав белков входят 20 протеиногенных аминокислот (см. табл. 1.1), последовательность которых кодируется генетическим кодом и которые постоянно обнаруживаются в белках. Некоторые из них подвергаются посттрансляционной модификации, т.е. могут быть фосфорилированы, ацилированы, гидроксильированы (см. рис. 1.1) и др.

Структурные элементы других природных соединений. Изучение биосинтеза пенициллина с использованием меченых атомов показало, что в образовании молекулы этого антибиотика принимают участие аминокислоты цистеин и валин (рис. 1.3).



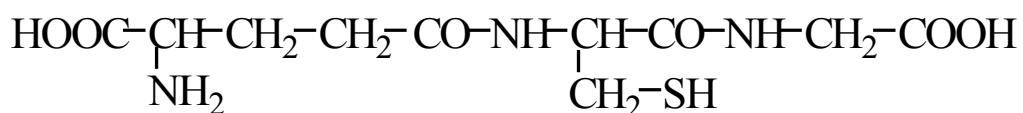
Р и с.1.3. Биосинтез пенициллина

Аминокислоты и их производные входят в состав различных азотистых соединений, коферментов, антибиотиков, пептидов и др. Например, фрагмент аминокислоты β-аланина (β-Ala) входит в структуру кофермента А (КоА), а глутаминовой кислоты – в структуру тетрагидрофелевой кислоты (кофермент THF):



Тетрагидрофелевая кислота (кофермент THF)

В живых организмах различных типов, и в особенности в животных, широко представлены пептиды. Среди них обнаружены соединения с разнообразными биологическими функциями (см. гл. 2 «Полипептиды»). Все пептиды, так же, как и белки, образуются из аминокислот, но в отличие от последних могут включать в себя не только протеиногенные аминокислоты, но и непротеиногенные, связанные друг с другом не только пептидными связями, но, например, сложноэфирными и др. В качестве примера приведем формулу простого линейного трипептида – глутатиона. Он присутствует во всех живых организмах и находится обычно в межклеточном пространстве в достаточно высокой концентрации:



γ -L-Глутамил-L-цистеинил-глицин – глутатион (G-SH)

Так как он был выделен почти 80 лет назад, его физиологические функции изучены достаточно хорошо: он защищает тиольные группы белков, инактивирует радикальные частицы, разрушает перекисные соединения, выполняет роль кофермента метилглиоксилазы.

Исходные соединения для образования в организмах биогенных аминов и родственных соединений. Биогенные амины образуются в организме главным образом из протеиногенных аминокислот. В табл. 1.2 приведены некоторые протеиногенные аминокислоты и биогенные амины, образующиеся из них в результате реакции декарбоксилирования, а также последующих трансформаций:

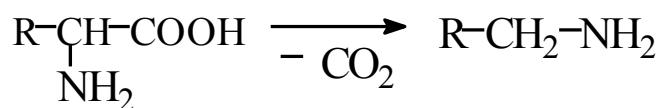
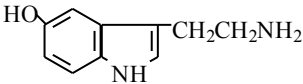
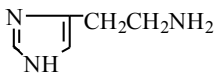
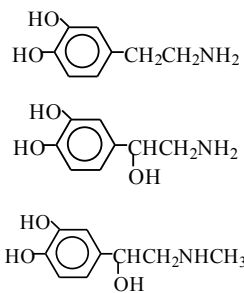


Таблица 1.2

Некоторые аминокислоты и биогенные амины, образующиеся из них

Аминокислоты и образующиеся из них биогенные амины	Формула биогенного амина	Функции биогенных аминов в организме
Серин ↓ Коламин ↓ Холин ↓ Ацетилхолин	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$	Входит в состав кефалина Входит в состав лецитина Медиатор, нейромедиатор
Цистеин ↓ Цистеамин	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Структурный элемент КоА и пантотеина
Аспарагиновая кислота ↓ β-Аланин	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Структурный элемент КоА
Триптофан ↓ 5-Окситриптофан ↓ Серотонин		Медиатор, нейромедиатор
Гистидин ↓ Гистамин		Медиатор
Тирозин ↓ 3,4-Диоксифенил аланин (ДОФА) ↓ Дофамин ↓ Норадреналин ↓ Адреналин		Нейромедиатор Медиатор, нейромедиатор гормон Медиатор, нейромедиатор гормон
Треонин ↓ Аминопропанол	$\text{CH}_3\text{CHONCH}_2\text{NH}_2$	Составная часть витамина B ₁₂
Глутаминовая кислота ↓ (ГАМК)	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Нейромедиатор
Аргинин ↓ Агматин ↓ Путресцин ↓ Спермидин ↓ Спермин	$\text{HN}^+\text{C}(\text{H}_2\text{N})\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ $\text{HN}^+\text{C}(\text{H}_2\text{N})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Компонент рибосом Компонент рибосом, трупный яд Компонент рибосом Компонент рибосом
Лизин ↓ Кадаверин	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Компонент рибосом, трупный яд

Нейромедиаторы и медиаторы. Термином *медиатор* обозначают вещества, передающие нервное возбуждение через синаптическую щель от одной клетки *периферической нервной системы* к соседней. *Нейромедиаторы* – это вещества, воздействующие на постсинаптическую мембрану синапса *центральной нервной системы* и вызывающие ее деполяризацию (передача нервного импульса) или, напротив, гиперполяризацию (торможение передачи нервного импульса). К нейромедиаторам относятся некоторые аминокислоты, а также пептиды, белки и биогенные амины (см. табл. 1.2).

В связи с этим в клетках головного мозга идет активный метаболизм аминокислот. В головном мозге концентрация аминокислот, в особенности выполняющих функции нейромедиаторов, в 7-8 раз выше, чем в плазме крови. Наиболее высоким является уровень глутаминовой и аспарагиновой аминокислот (5-10 ммоль и 2-3 ммоль соответственно).

К аминокислотам, выполняющим функции нейромедиаторов, относятся глицин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, ГАМК и ДОФА.

Метаболиты. Углеродные скелеты 20 протеиногенных аминокислот превращаются в процессе метаболизма *в семь различных продуктов деградации*.

- | | |
|--|---|
| 1. Пировиноградная кислота
(пируват) | – глицин, аланин, серин, цистеин, треонин, триптофан, метионин. |
| 2. Щавелево-уксусная кислота
(оксалоацетат) | – аспарагин, аспарагиновая кислота. |
| 3. Фумаровая кислота
(фумарат) | – фенилаланина, тирозин. |
| 4. Сукцинил-КоА | – изолейцин, Валин. |
| 5. 2-Оксоглутаровая кислота
(2-оксоглутарат) | – глутаминовая кислота, глутамин, гистидин, аргинин, пролин. |
| 6. Ацетил-КоА | – лейцин, лизин; изолейцин. |
| 7. Ацетоуксусная кислота
(ацетоацетат) | – лейцин, лизин, фенилаланин, тирозин, триптофан. |

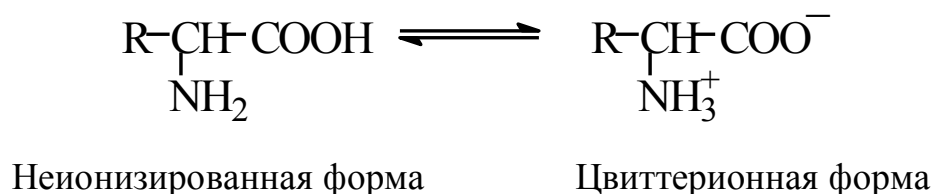
Пять метаболитов (пируват, оксалоацетат, фумарат, сукцинил-КоА, 2-оксоглутарат) являются предшественниками в процессе синтеза глюкозы (глюконеогенез). Аминокислоты, деградация которых дает один из пяти указанных выше метаболитов, называются *глюкогенными аминокислотами*. За исключением лейцина и лизина все остальные 18 протеиногенных аминокислот являются глюкогенными.

Ацетил-КоА и ацетоацетат не могут включаться в глюконеогенез. Они используются организмами для синтеза жирных кислот, изопреноидов и кетонowych тел (ацетон, ацетоуксусная кислота, 3-гидроксимасляная кислота). Аминокислоты, которые образуют ацетил-КоА или ацетоацетат, называют *кетогенными аминокислотами*. Фактически только кетогенными являются лейцин и лизин, а такие аминокислоты, как изолейцин, фенилаланин, тирозин и триптофан, могут быть и глюкогенами и кетогенами.

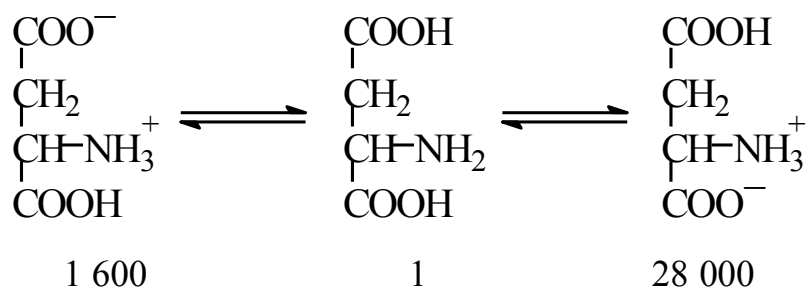
1.1.3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

В кристаллическом состоянии аминокислоты находятся в виде биполярных ионов (цвиттерионов). Вследствие этого они имеют высокие температуры плавления и большинство из них растворимы в воде лучше, чем в спирте (табл.1.3).

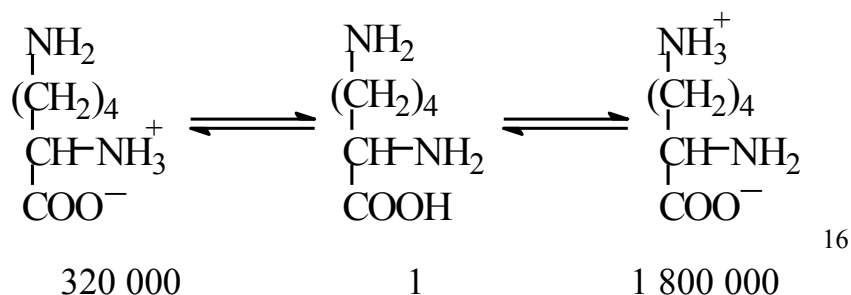
В водном растворе аминокислоты также присутствуют, главным образом, в виде цвиттерионов, которые находятся в равновесии с неионизированной формой, например, для глицина соотношение равновесных концентраций неионизированной и цвиттерионной форм равно 1:260000:



Дикарбоновые аминокислоты и диаминокарбоновые кислоты существуют в водных растворах в виде смесей неионизированных и различно заряженных форм. Например, аспарагиновая кислота существует в виде следующих форм с соотношением концентраций:



В случае лизина устанавливается следующее равновесие:

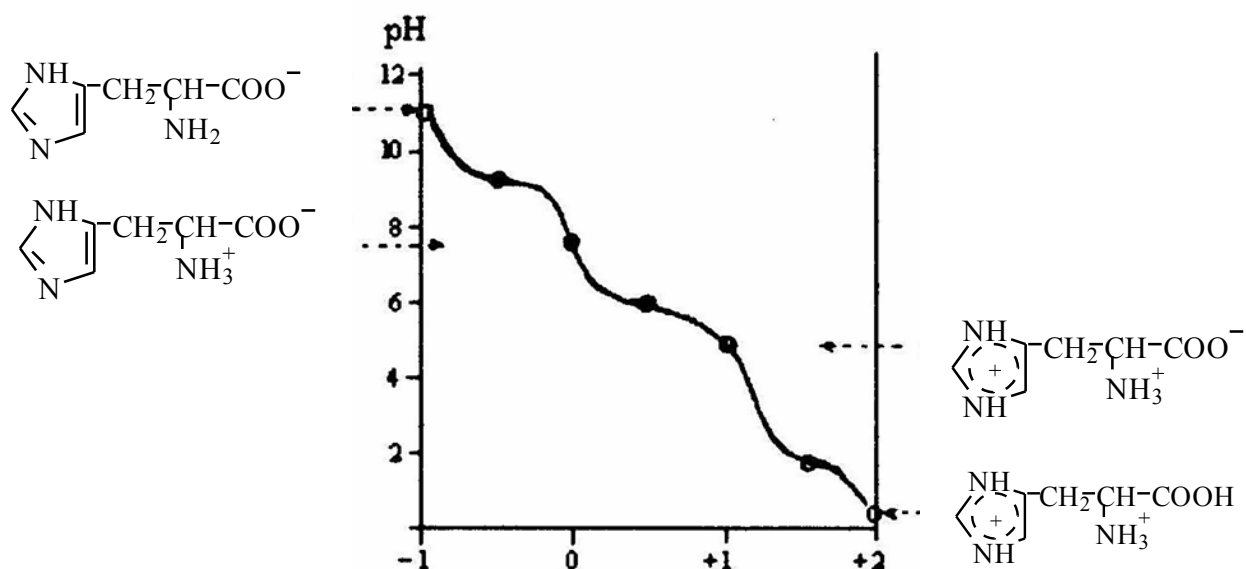


Аминокислоты гораздо лучше растворимы в водных растворах кислот и щелочей, чем в воде, что обусловлено их амфотерностью.

В кислой среде аминокислота ведет себя как основание с константой диссоциации сопряженной кислоты K_a ($\alpha\text{-NH}_2$) и заряжается положительно, а в щелочной – как кислота с константой диссоциации K_a ($\alpha\text{-COOH}$) и заряжается отрицательно:



Поскольку в аминокислотах содержатся как минимум две ионогенные группы, суммарный заряд молекул зависит от pH среды. Проиллюстрируем зависимость заряда аминокислоты от pH на примере гистидина, содержащего три ионогенные группы. На рис. 1.4 приведена кривая титрования гистидина сильной кислотой и щелочью, на которой отмечаются три точки перегиба, соответствующие трем ионизирующимся группировкам (COOH , NH_2 , имидазольное кольцо).



Р и с.1.4. Кривая титрования гистидина сильной кислотой и щелочью

Таблица 1.3

Физические свойства L-аминокислот

L-Аминокислота	Растворимость, г/100 мл, вода, 25°C	$[\alpha]_D^{25}$, вода	$T_{пл}$, (с разл.), °C
Глицин	24,99	-	232-236
Аланин	16,54	+1,8°	315-316
Серин	5,02	-7,5	228
Цистеин	-	-16,5	178**
Аспарагиновая кислота	0,50	+5,0	270
Аспарагин	3,11	-5,6	233
Фенилаланин	2,97	-34,5	283
Тирозин	0,05	-10,0*	290-295
Триптофан	1,14	-33,7	293-295
Гистидин	4,29	-38,5	287-288
Валин	8,85	+5,6	315
Треонин	20,50	-28,5	253
Метионин	3,35	-9,8	280-282
Глутаминовая кислота	0,84	+12,6	247-249
Глутамин	3,60	+6,3	~184
Лейцин	2,19	-11,0	293-295
Изолейцин	4,12	+12,4	285-286
Аргинин	Очень хорошая	+12,5	244
Лизин	Очень хорошая	+13,5	224
Пролин	162,30	-86,2	220-222

* в 5M HCl; ** $T_{пл}$ гидрохлорида (с разл.).

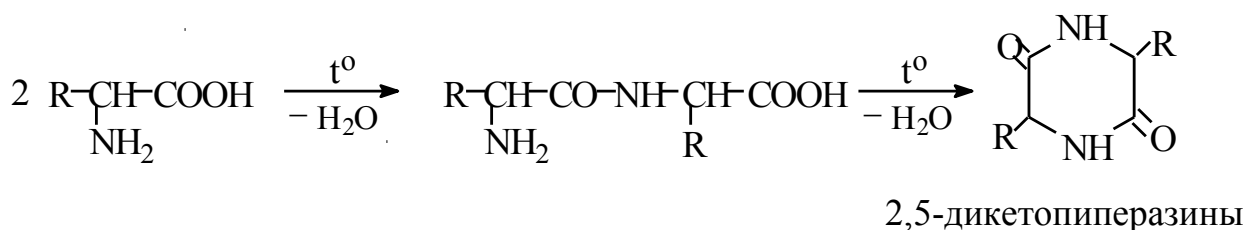
Как видно из рис. 1.4, заряд молекулы гистидина изменяется при изменении рН от -1 ($\text{pH} > 11,2$) до $+2$ ($\text{pH} < 0,2$). Точка с рН 9,20 соответствует pK_a α -аминогруппы, с рН 6,00 – pK_a имидазольного кольца, с рН 1,77 – pK_a карбоксильной группы (табл. 1.4). При рН 7,60 гистидин находится в растворе только в форме цвиттериона, и общий заряд каждой из молекул гистидина равен 0.

Значение рН, при котором аминокислота электронейтральна, называется изоэлектрической точкой (pI). При этом значении рН (его иногда обозначают pH_i) молекула аминокислоты представляет собой биполярный ион. Если через водный раствор аминокислоты пропустить постоянный электрический ток, то при значениях рН, более низких, чем pI , аминокислота будет двигаться к катоду, при более высоких рН – к аноду, и в изоэлектрической точке не будет перемещаться. Поскольку изоэлектрические точки различных аминокислот отличаются друг от друга (см. табл.1.4), то таким путем возможно осуществление разделения смеси аминокислот. На этих особенностях поведения аминокислот в постоянном электрическом поле основан метод электрофореза.

Как уже отмечалось выше, по величине pI можно судить о преобладании кислых или основных свойств у данной аминокислоты. Чем меньше величина pI , тем более кислыми свойствами она обладает, и наоборот, чем больше – тем более основными. Аминокислоты с величиной pI меньше 5 принято относить к кислым, больше 7 – к основным, в зоне 5-7 – к нейтральным.

Рассмотрим возможность использования физико-химических свойств аминокислот для их идентификации и количественного анализа.

α -Аминокислоты не имеют четких температур плавления или разложения, вследствие чего эти константы представляют ограниченную ценность для их идентификации. Это обусловлено тем, что при их нагревании происходят реакции конденсации с отщеплением воды и образованием смеси пептидов и 2,5-дикетопиперазинов:



Все протеиногенные аминокислоты, за исключением глицина, оптически активны и могут быть идентифицированы по величине удельного вращения ($[\alpha]_D^{25}$). Однако при этом следует иметь в виду, что величина удельного вращения и даже её знак сильно зависят от pH раствора. Например, сравните величины $[\alpha]_D^{25}$ для аланина, фенилаланина и метионина, приведенные в табл. 1.3, с величинами $[\alpha]_D^{25}$ для этих же аминокислот, измеренные в растворах хлористоводородной кислоты – +14,7 (1М HCl), -7,1 (5,4М HCl) и +21,2 (0,2М HCl) соответственно. В связи с этим этот метод приемлем лишь для идентификации индивидуальных аминокислот и неприемлем для анализа смесей аминокислот.

Таблица 1.4

Кислотно-основные свойства протеиногенных аминокислот

L-Аминокислота	pK _a			pI
	α-COOH	α-NH ₂	Другие группы	
Глицин	2,34	9,60	-	5,97
Аланин	2,34	9,60	-	6,00
Серин	2,21	9,15	-	5,68
Цистеин	1,71	8,33		5,07
Аспарагиновая кислота	1,88	9,60	3,65 (β-COOH)	2,77
Аспарагин	2,02	8,80	-	5,41
Фенилаланин	2,58	9,24	-	5,91
Тирозин	2,20	9,11		5,63
Триптофан	2,38	9,39	-	5,89
Гистидин	1,77	9,20	6,00 (имидазол)	7,60
Валин	2,32	9,69	-	5,96
Треонин	2,71	9,62	-	6,16
Метионин	2,28	9,21	-	5,74
Глутаминовая кислота	2,19	9,67	4,25 (γ-COOH)	3,08
Глутамин	2,17	9,13	-	5,65
Лейцин	2,36	9,60	-	6,04
Изолейцин	2,32	9,76	-	6,02
Аргинин	2,18	9,08	13,2 (гуанидин)	10,76
Лизин	2,18	8,95	10,5 (ε-NH ₂)	9,74
Пролин	1,99	10,60	-	6,30

Таким образом, для идентификации и количественного анализа аминокислот определение температуры плавления и удельного вращения позволяет получить лишь ориентировочные данные.

Существенный прогресс в идентификации и количественном анализе сложных смесей аминокислот, образующихся при гидролизе белков, достигнут благодаря работам Мура и Стайна*. Разработанный ими аминокислотный анализатор, в основе которого лежит метод ионообменной хроматографии, позволяет легко проводить качественный и количественный анализ и инструментальное детектирование этих соединений. Химической основой работы аминокислотного анализатора является реакция аминокислот с нингидрином, которая будет описана в п. 1.4.. Для идентификации аминокислот очень удобны также распределительная хроматография фенилизотиоцианатных производных аминокислот, тонкослойная хроматография и хроматография на бумаге.

ИК-, ПМР-спектроскопия и масс-спектрометрия также могут быть использованы для идентификации индивидуальных аминокислот. Масс-спектральный анализ аминокислот ограничен их низкой летучестью, и их обычно переводят в более летучие производные (эфиры, ацетамиды и др.).

1.1.4. ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АМИНОКИСЛОТ

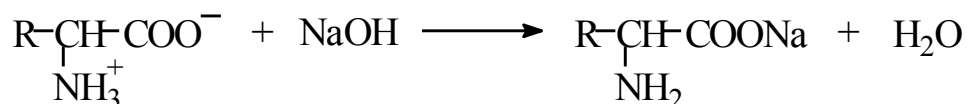
Химические свойства аминокислот определяются в первую очередь наличием в геминальном положении amino- и карбоксильной групп. Специфика бокового радикала аминокислоты (ароматические и гетероциклические циклы, дополнительные amino- и карбоксильные группы, OH- и SH-группы) определяет различия в реакционной способности при типичных превращениях, а также возможность осуществления специфических реакций. В связи с этим целесообразно химические свойства аминокислот классифицировать следующим об-

* Станфорд Мур и Уильям Хоуард Стайн – американские биохимики. Разработали автоматический аминокислотный анализатор. Установили первичную структуру рибонуклеазы. Нобелевская премия (1972 г.).

разом: реакции с участием карбоксильной группы, с участием аминок- группы, с одновременным участием карбоксильной и аминок- групп, специфические реакции отдельных аминокислот.

1.1.4.1. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КАРБОКСИЛЬНОЙ ГРУППЫ

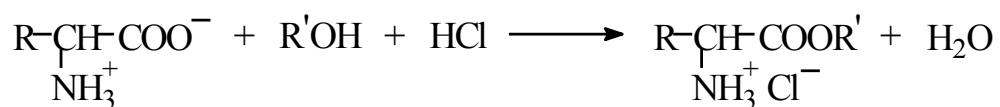
Образование солей. При pH , большем, чем pI , аминокислоты образуют с основаниями соли, легко растворимые в воде:



Поскольку кислые свойства аминокислот, за исключением аспарагиновой и глутаминовой кислот, выражены слабо, их нельзя титровать щелочами в водной среде. Аспарагиновую и глутаминовую кислоты можно титровать в водной среде щелочами по одной карбоксильной группе с индикатором фенолфталеин. Все аминокислоты, а также полипептиды можно титровать в среде 95%-ного спирта водным или лучше спиртовым раствором КОН с индикатором тимолфталеин.

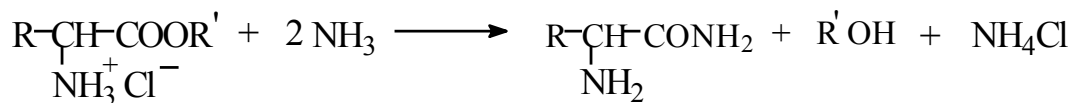
Смеси аминокислот с их натриевыми или калиевыми солями широко применяются в биохимии для приготовления буферных растворов.

Образование эфиров. Метилловые и этиловые эфиры аминокислот получают обработкой суспензии аминокислоты в абсолютном метиловом или этиловом спирте током сухого хлористого водорода:

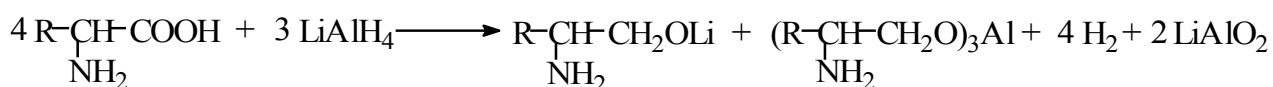


Эфиры аминокислот более реакционноспособны, чем свободные аминокислоты, поэтому они служат промежуточными веществами при получении амидов, гидроксамовых кислот, гидразидов, ацилазидов и других производных аминокислот, применяющихся в пептидном синтезе и использующихся для идентификации. В пептидном синтезе и для идентификации широко применяются бензиловые, *n*-нитробензиловые, *трет*-бутиловые, *n*-нитрофениловые, N-оксисукцинимидные и другие эфиры.

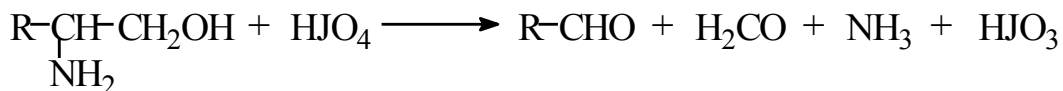
Эфиры аминокислот легко омыляются щелочами, а при обработке аммиаком образуют амиды:



Восстановление карбоксильной группы. Свободная карбоксильная группа восстанавливается до спиртовой группы под действием лития алюмогидрида (LiAlH_4). Но поскольку LiAlH_4 мгновенно реагирует с водой, спиртами и другими соединениями, содержащими активный водород с выделением 4 молей водорода, восстановление аминокислот проводят в апротонных растворителях, не взаимодействующих с ним, например в тетрагидрофуране (ТГФ). При этом 0,25 моля LiAlH_4 расходуется на образование солей аминокислоты и еще 0,5 моля собственно на восстановление. Общее уравнение реакции приведено ниже. После обработки реакционной смеси водой или кислотой выделяют α -аминоспирт:

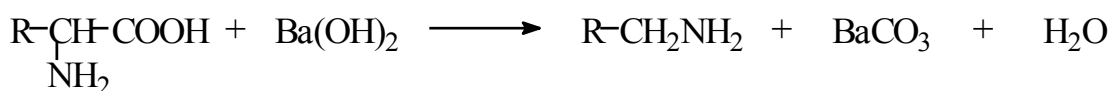


α -Аминоспирты легко окисляются йодной кислотой до альдегидов:



Эти две последние реакции используются для установления строения новых аминокислот, а также для идентификации и количественного анализа уже известных.

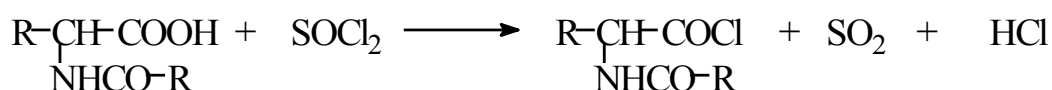
Декарбоксилирование. При нагревании аминокислот в твердом состоянии в высококипящих растворителях или с раствором гидроксида бария образуются соответствующие амины:



В живых организмах из аминокислот под действием ферментов декарбоксилаз образуются биогенные амины. Например, в клетках мозга из глутаминовой кислоты образуется важный нейромедиатор ГАМК. Кроме того, декарбоксилирование имеет место при гнилост-

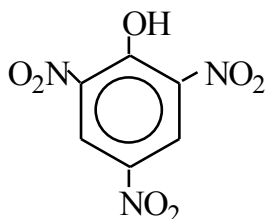
ном расщеплении белков под действием ферментов, выделяемых микроорганизмами.

Другие реакции, характерные для карбоновых кислот, а именно образование ангидридов и галогенангидридов, в ряду аминокислот не характерны из-за мешающего влияния аминогруппы. Однако ациламинокислоты легко можно превратить как в симметричные, так и в смешанные ангидриды. Например:

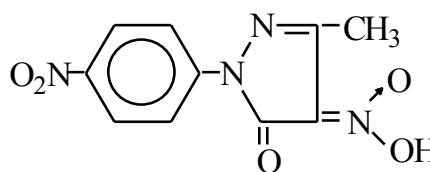


1.1.4.2. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ АМИНОГРУППЫ

Образование солей. Соли аминокислот с минеральными кислотами (хлористоводородной, серной и азотной), как правило, лучше растворимы в воде, чем свободные аминокислоты. Напротив, соли с такими кислотами, как пикриновая и пикролоновая, труднорастворимы, в связи с чем эти соли используются для идентификации и разделения аминокислот:



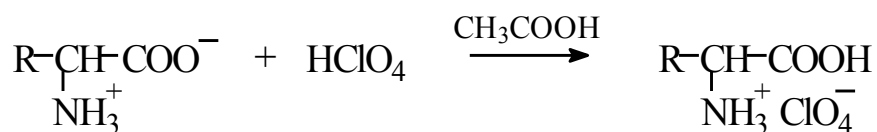
Пикриновая кислота



Пикролоновая кислота

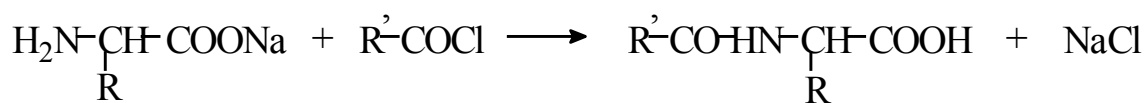
Причем, желтые или красные соли аминокислот с пикролоновой кислотой обычно менее растворимы, чем пикраты, и хорошо кристаллизуются из водных растворов.

Поскольку основные свойства аминокислот выражены слабо, их нельзя титровать кислотами в водной среде, за исключением лизина и аргинина, однако другие аминокислоты можно титровать по аминогруппе хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты:

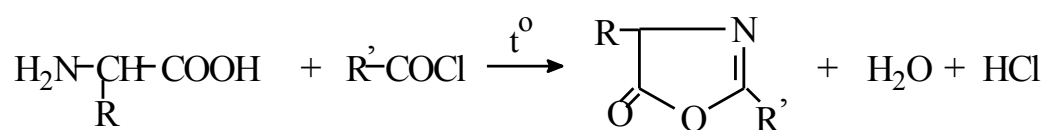


Поскольку вода мешает этому определению, этот метод применим лишь для количественного анализа твердых сухих образцов.

N-Ацилирование. Аминокислоты легко реагируют с ангидридами и хлорангидридами кислот в щелочной среде (метод Шоттена – Баумана*) с образованием ациламинокислот:

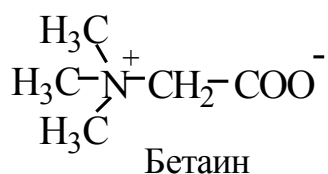
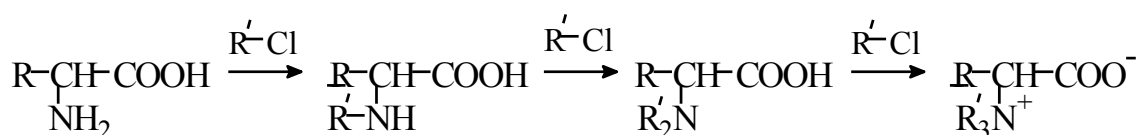


При простом нагревании аминокислот с ангидридами или хлорангидридами кислот образуются азлактоны:



Ацильные производные аминокислот (карбобензоксильные, *para*-нитрофенилсульфенильные, *трет*-бутилоксикарбонильные, формильные, 5-диметиламинонафтилсульфонильные (дансильные), трифторацетильные и др.) широко используются в синтезе пептидов и при изучении последовательностей аминокислот в белках.

N-Алкилирование. При действии галоидных алкилов на аминокислоты в щелочной среде могут быть получены моно-, ди- и триалкилпроизводные:

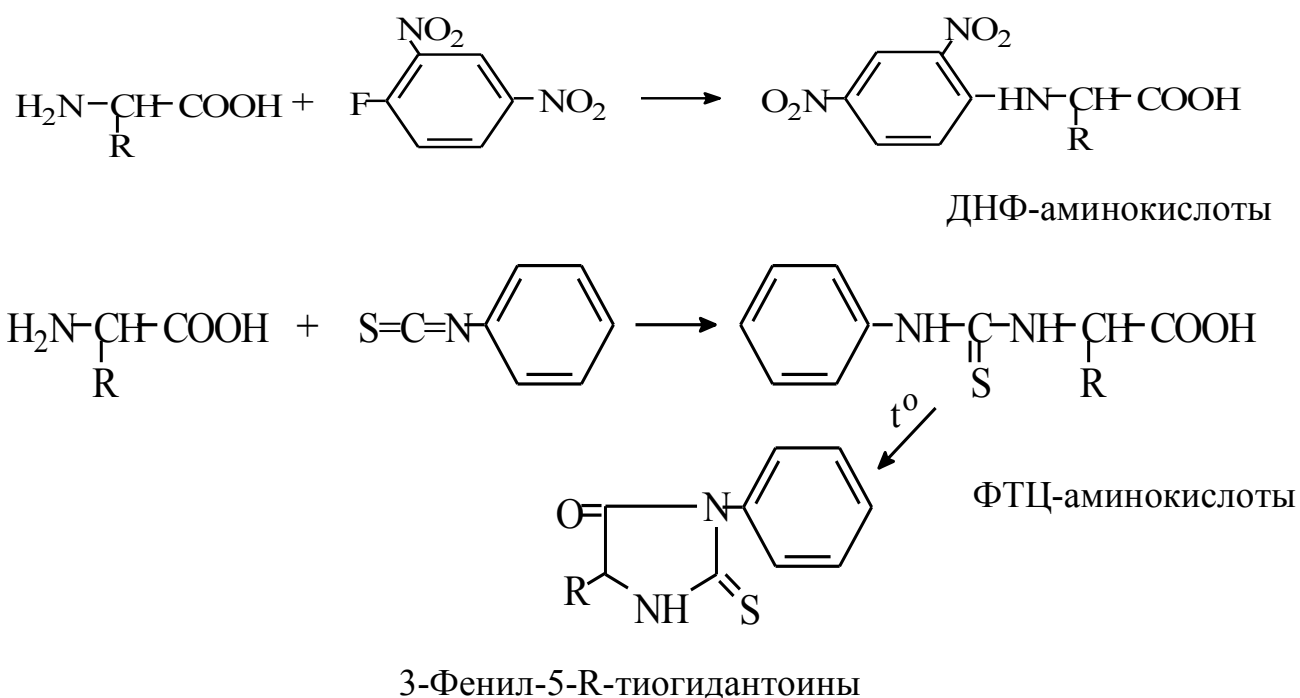


Триалкилпроизводные аминокислот представляют собой четвертичные аммониевые основания, внутренние соли которых называются бетаинами (термин происходит от названия «бетаин» – природное соединение, содержащееся в клетках животных организмов).

* К. Шоттен – немецкий химик – органик. Разработал метод ацилирования аминов в водно-щелочной среде (1844 г.).

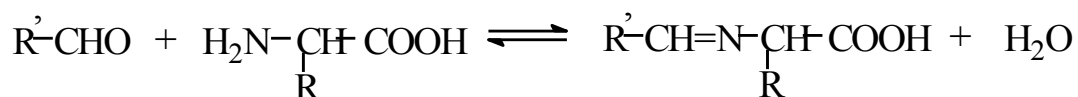
Эйген Бауман – немецкий химик – органик и биохимик. Открыл реакцию ацилирования спиртов в водно-щелочном растворе. Впервые получил тиомочевину, установил формулу цистина и обнаружил в ткани щитовидной железы йод.

N-2,4-Динитрофениламино кислоты (ДНФ-аминокислоты), а также упомянутые выше фенилизотиоцианатные производные аминокислот (ФТЦ-аминокислоты) нашли широкое применение при изучении первичной структуры белков и в синтезе пептидов. Они получают при взаимодействии 2,4-динитрофторбензола и фенилизотиоцианата соответственно с аминокислотами в присутствии оснований:



Следует иметь в виду, что при нагревании ФТЦ-аминокислот, особенно в присутствии кислот, они легко циклизуются с отщеплением воды и образованием 3-фенил-5-R-тиогидантоинов.

Конденсация с карбонильными соединениями. Аминокислоты, подобно первичным аминам, взаимодействуют с альдегидами и кетонами с образованием азометинов – альдиминов и кетиминов соответственно (эта реакция обратима):



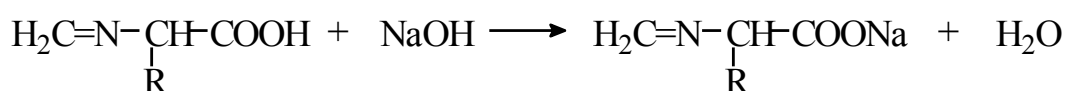
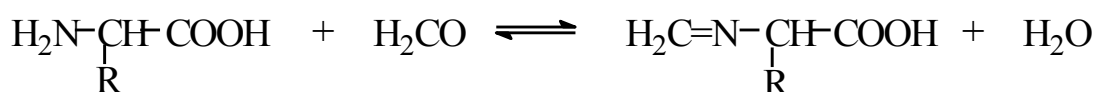
Азометины, или основания Шиффа, обладают гораздо меньшими основными свойствами, чем соответствующие амины (они не образуют солей даже с сильными кислотами в водной среде). В том случае, если азометиновая группа ($>\text{C}=\text{N}-$) сопряжена с ароматическим

кольцом со стороны атома углерода или азота, то такие основания Шиффа*, как правило, окрашены. Основания Шиффа на основе α -аминокислот, в отличие от обычных азометинов, способны к изомеризации:



Эти свойства оснований Шиффа широко используется в синтезе, качественном и количественном анализе аминокислот. На основе реакции конденсации аминокислот с карбонильными соединениями разработаны следующие методы анализа аминокислот.

1. Титрование аминокислот водным раствором щелочи в избытке формалина (формольное титрование аминокислот, метод Сёренсена**) основано на следующих реакциях:

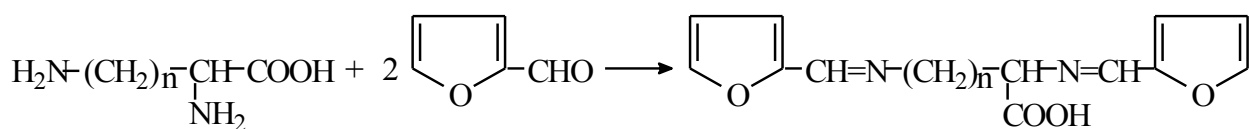


Метод Сёренсена позволяет определять аминокислоты с первичными аминогруппами и неприемлем для определения пролина и оксипролина, содержащих вторичную аминогруппу. Тример формальдегида (1,3,5-триоксан) реагирует специфично с оксипролином, давая окрашенное соединение с максимумом поглощения при 492-494 нм, что является специфической реакцией на оксипролин.

2. При взаимодействии аминокислот с фурфуролом в ледяной уксусной кислоте образуются окрашенные соединения с максимумом поглощения при 360-380 нм. Диаминокислоты лизин и орнитин дают при этом второй максимум поглощения при 515-530 нм, что позволяет идентифицировать их в присутствии других аминокислот:

* Хуго Йозеф Шифф – итальянский химик-органик. Открыл реакцию конденсации первичных аминов с альдегидами и изучил продукты этой реакции (1864 г.).

** Сёрен Петер Сёренсен – датский биохимик разработал метод количественного определения аминокислот в водных растворах. Ввел понятие pH (1909 г.).



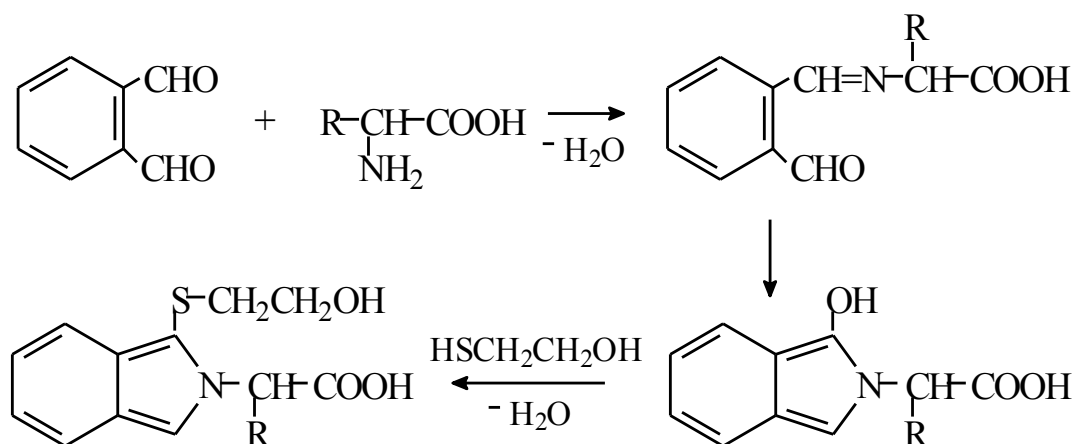
Фурфурол

$n = 3$ – орнитин;

$n = 4$ – лизин

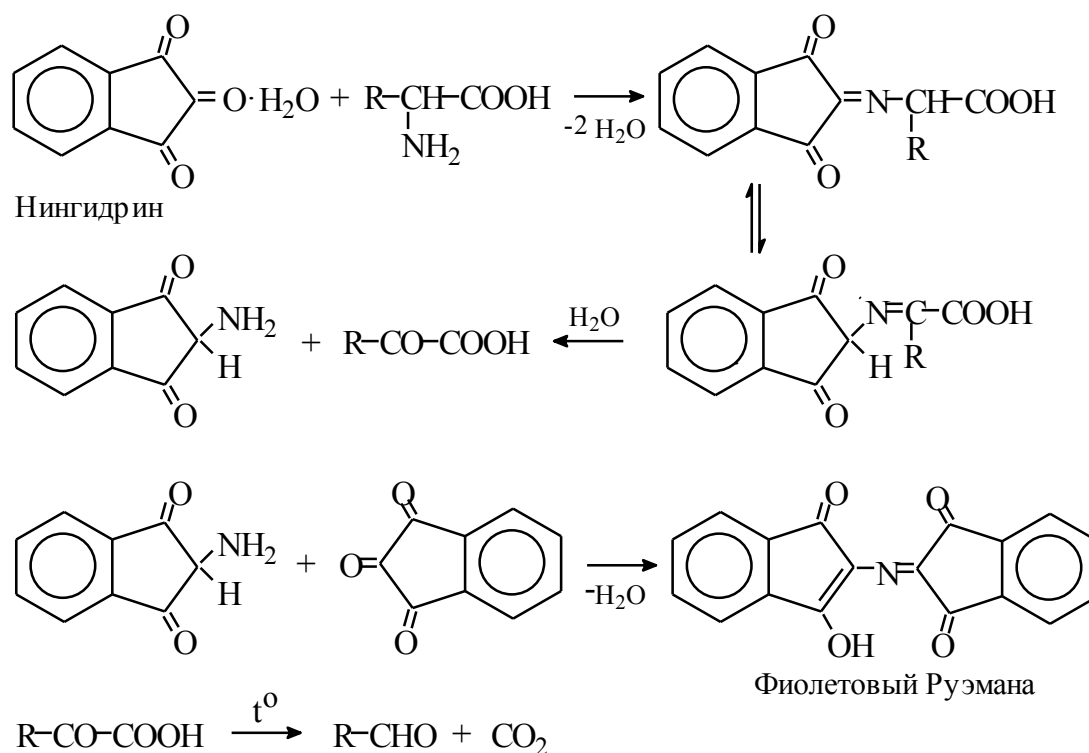
Таким образом, реакции с фурфуролом и тримером формальдегида позволяют качественно определять лизин, орнитин и оксипролин, как в виде индивидуальных соединений, так и в смеси с любыми другими аминокислотами.

3. В настоящее время интенсивно развивается наиболее чувствительный и высокоспецифический метод флюоресцентного количественного анализа аминокислот, позволяющий определять их не только в гидролизатах белков, но и непосредственно в различных жидкостях организма (кровь, моча и др.). Метод основан на реакции α -аминокислот с *o*-фталевым диальдегидом в присутствии меркаптоэтанола с образованием флюоресцирующих продуктов (реакция Циммермана):



4. Реакция α -аминокислот с нингидрином – основная групповая реакция на аминокислоты.

При нагревании α -аминокислот с нингидрином в водном растворе во всех случаях образуется один и тот же краситель фиолетового цвета. Без нагревания окраска тоже развивается, но гораздо медленнее.



С точки зрения авторов образование красителя становится возможным в результате изомеризации получающегося на первой стадии реакции основания Шиффа гидролиза продукта изомеризации с образованием кетокислоты и 2-аминоиндандиона-1,3, который конденсируется с нингидрином с образованием красителя – фиолетового Руэмана.

Поскольку реакция обычно осуществляется при нагревании раствора, образующиеся α -кетокислоты легко отщепляют углекислый газ и дают соответствующие альдегиды.

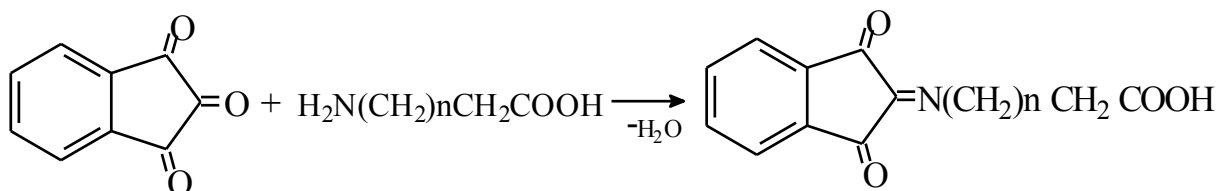
Реакцию с нингидрином обычно проводят в нейтральной среде. В присутствии ионов металлов, способных к комплексообразованию с α -аминокислотами, чувствительность реакции сильно уменьшается.

Для проведения реакции с окрашенными жидкостями, например коричневыми гидролизатами, в качестве экстрагента используют амиловый спирт.

Реакция с нингидрином имеет большое значение для обнаружения аминокислот на хроматограммах, электрофореграммах, а также при количественном аминокислотном анализе белковых гидролизатов. Фиолетовый Руэмана имеет максимум поглощения при 570 нм. При этом, как установили Мур и Стайн, оптическая плотность раствора пропорциональна молярной концентрации α -аминокислотных

групп, что позволяет осуществлять количественное фотометрическое определение различных α -аминокислот.

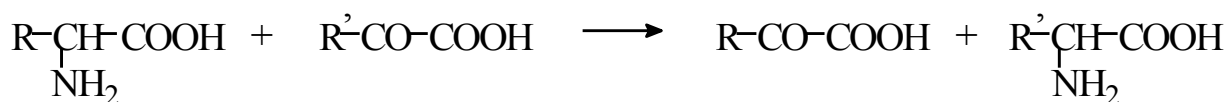
β - и γ -Аминокислоты, например β -аланин, ГАМК с нингидрином, дают растворы желто-оранжевого цвета. При этом образуются лишь соответствующие основания Шиффа:



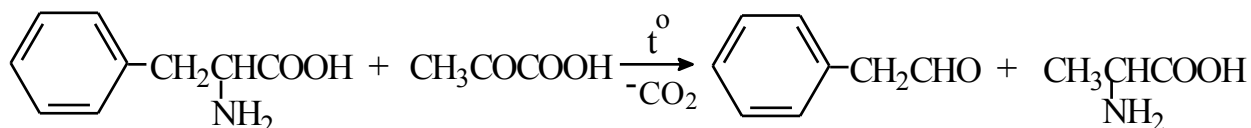
При взаимодействии пролина и оксипролина с нингидрином возникает ярко-желтая окраска с максимумом поглощения при 440 нм.

С нингидрином реагируют не только аминокислоты, но и многие аминосоединения: аминосахара, пептиды, белки, мочевины, креатин, аммиак и др. В связи с этим в помещении, где проводится анализ, не должно быть следов аммиака.

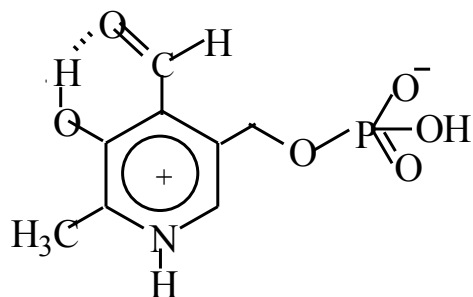
Из синтетических методов, в основе которых лежит конденсация α -аминокислот с карбонильными соединениями, следует отметить реакции трансаминирования (переаминирования). При кипячении водных растворов α -аминокислот с α -кетокислотами происходит переход α -аминогруппы от аминокислоты к α -кетокислоте:



Трансаминирование, так же, как и реакция с нингидрином, включает в себя стадию конденсации с образованием основания Шиффа, изомеризацию последнего, его гидролиз и обычно сопровождается декарбоксилированием. Эта реакция используется для препаративного получения альдегидов или α -аминокислот. Например, при взаимодействии фенилаланина с пировиноградной кислотой с хорошими выходами образуются фенилуксусный альдегид и аланин:



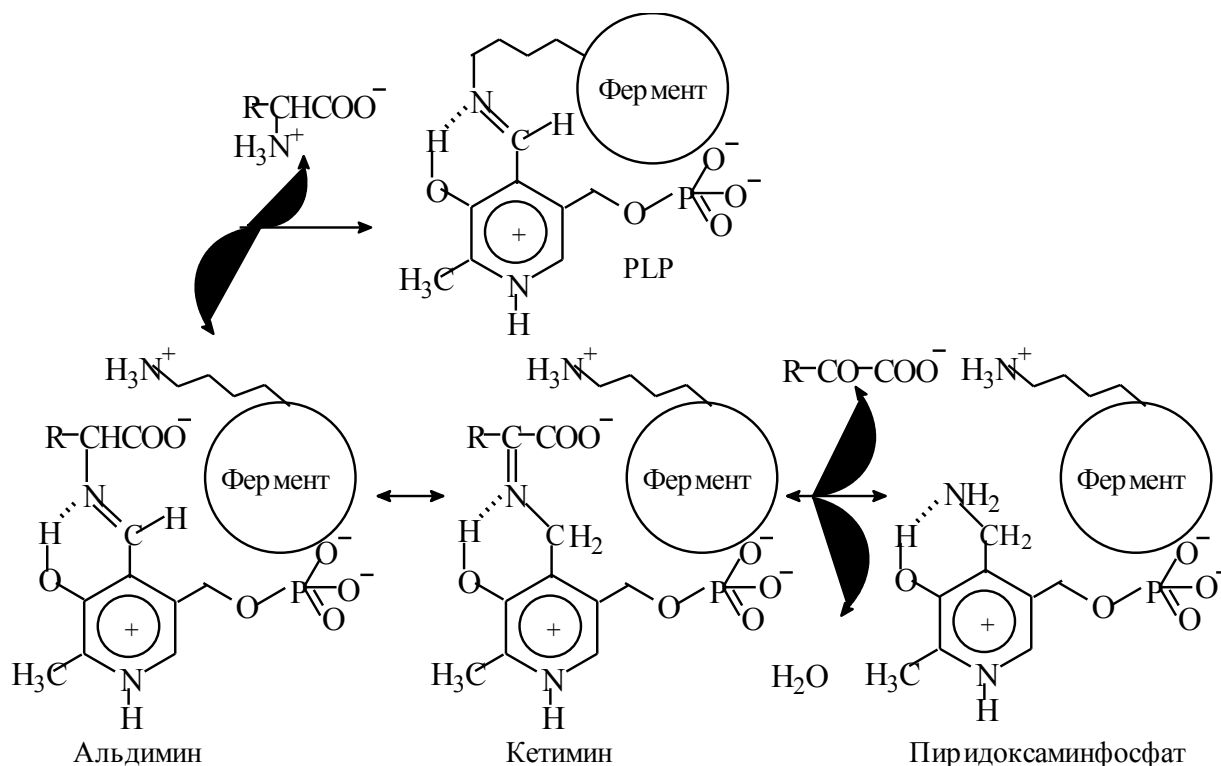
Реакции трансаминирования являются важнейшими в метаболизме аминокислот. Реакции трансаминирования осуществляются как в катаболических, так и в анаболических процессах с участием α -аминокислот. Они осуществляются под действием ферментов трансаминаз, коферментом которых является пиридоксальфосфат (PLP).



Пиридоксальфосфат

Представленная здесь альдегидная форма кофермента в свободном виде в организмах не встречается. В отсутствие субстратов альдегидная группа пиридоксальфосфата ковалентно связана с аминогруппой остатка лизина трансаминазы.

Механизм реакций трансаминирования заключается в следующем (рис.1.5). Во время реакции аминокислота вытесняет остаток лизина, при этом образуется альдимин. Затем альдимин изомеризуется в кетимин. Полученный кетимин гидролизуется до 2-кетокрбоновой кислоты и пиридоксаминфосфата.



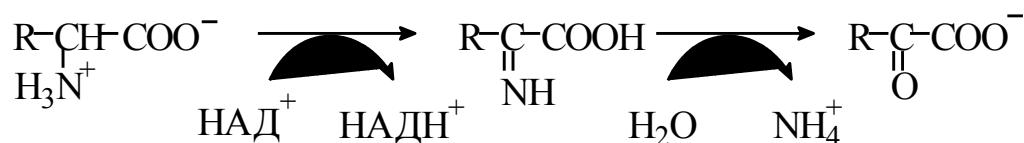
Р и с.1.5. Механизм ферментативной реакции трансаминирования

Вторая часть реакции включает те же три стадии процесса, проте-

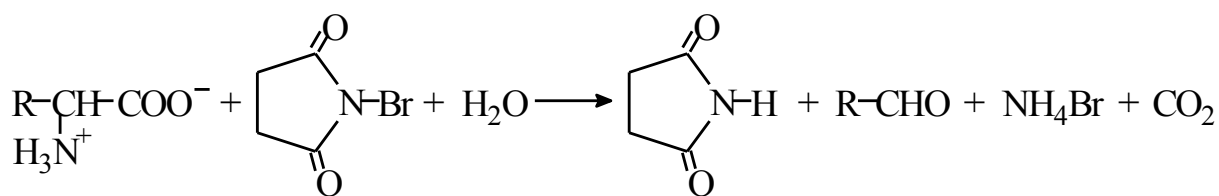
кающие в противоположном направлении. Пиридоксаминфосфат и вторая 2-кетокислота образуют кетимин, который изомеризуется в альдимин. Наконец, отщепляется вторая аминокислота и регенерируется кофермент.

В результате трансаминирования в организме человека из 2-кетокислот образуются следующие аминокислоты: аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты и их амиды – аспарагин и глутамин.

Окислительное дезаминирование и окисление. Окислительным дезаминированием называют реакции α -аминокислот, приводящие к образованию аммиака (т.е. степень окисления азота в ходе реакции не меняется). Эти реакции занимают важное место в метаболизме аминокислот. В этих реакциях аминогруппа вначале окисляется до иминогруппы. При этом восстановительные эквиваленты переносятся либо на НАД^+ , либо на НАДФ^+ , а образовавшаяся иминокислота неферментативно гидролизуется до аммиака и 2-кетокислоты:

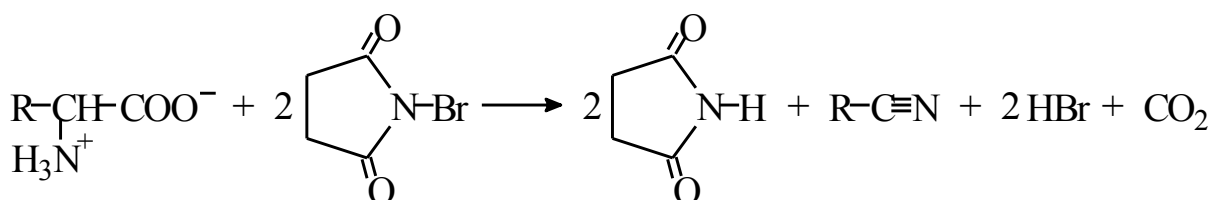


Окислительное дезаминирование можно осуществить и препаративным путем. Например, при обработке водных растворов α -аминокислот N-бромсукцинимидом (NBS) происходит количественное декарбоксилирование аминокислот и образование соответствующего альдегида:

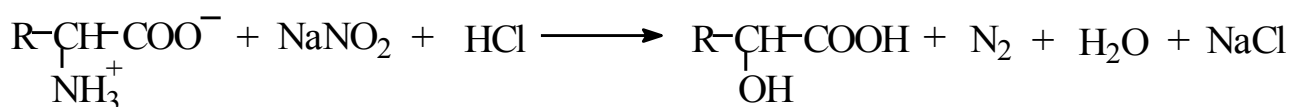


N-Бромсукцинимид

Интересно отметить, что при избытке NBS наблюдается образование нитрила (степень окисления азота не меняется), содержащего на один атом углерода меньше, чем исходные аминокислоты:



Собственно окисление аминокислот приводит к образованию соединений азота с более высокой степенью окисления чем в исходной аминокислоте. Важнейшей реакцией такого типа является взаимодействие аминокислот с азотистой кислотой, приводящее к образованию азота и оксикислот:

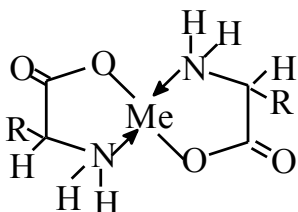


Азотистой кислотой окисляются первичные алифатические аминокислоты, находящиеся не только в α -положении, но и в любом другом. Например, при окислении моля лизина выделяется два моля азота.

Эта реакция лежит в основе количественного газометрического метода анализа аминокислот (метод ван-Слайка*), а также используется как общая групповая качественная реакция. Пролин этой реакции не дает, потому что не содержит в своей молекуле первичной аминокислотной группы.

1.1.4.3. РЕАКЦИИ С ОДНОВРЕМЕННЫМ УЧАСТИЕМ КАРБОКСИЛЬНОЙ И АМИНОГРУПП

Образование комплексов с ионами металлов. Все α -аминокислоты образуют прочные хелатные комплексы с ионами двухвалентных металлов. Их водные растворы в отличие



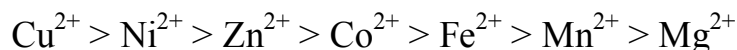
от растворов соответствующих солей щелочных металлов обладают очень низкой электропроводностью. Это обусловлено тем, что хелатные комплексы с ионами двухвалентных металлов электроней-

тральны.

* Дональд Декстер ван-Слайк – американский биохимик. Основные работы посвящены разработке методов анализа в области биохимии и клинической медицины.

Этим же обусловлена их хорошая растворимость в полярных растворителях, несмешивающихся с водой, например в амиловом и бутиловом спиртах.

Устойчивость комплексов изменяется в следующей последовательности:

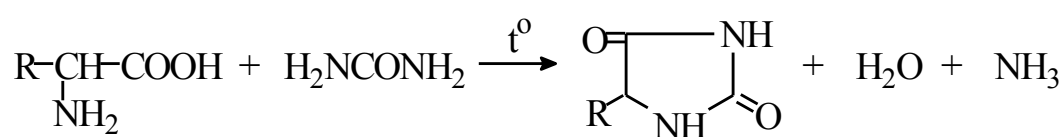


Способность к комплексообразованию обеспечивает всасывание микроэлементов, таких, как Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} и др., из кишечника в кровь.

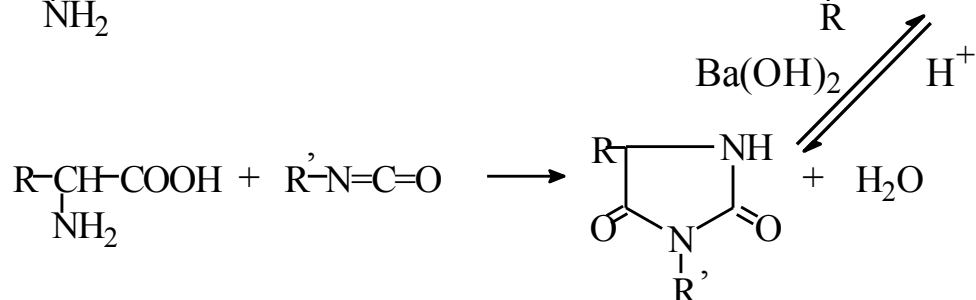
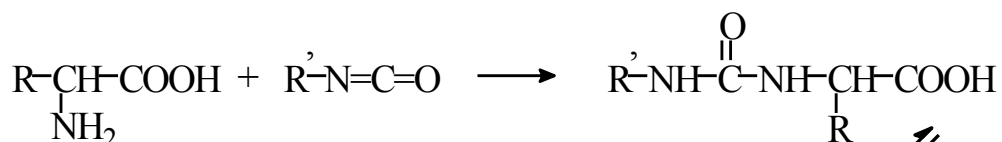
Комплексные соединения с α -аминокислотами образуют и соли железа (III). При прибавлении к водному раствору α -аминокислоты водного раствора FeCl_3 появляется красная окраска, исчезающая при прибавлении минеральной кислоты.

Медные комплексы α -аминокислот, окрашенные в синий цвет, используют для качественного и количественного анализа, а также для очистки α -аминокислот. Количественный анализ α -аминокислот можно осуществлять фотоэлектроколориметрическим и йодометрическим методами, основанными на реакции α -аминокислот с солями меди. Быстро развивается лигандообменный хроматографический анализ аминокислот и пептидов на колонках с силикагелем в присутствии ионов меди.

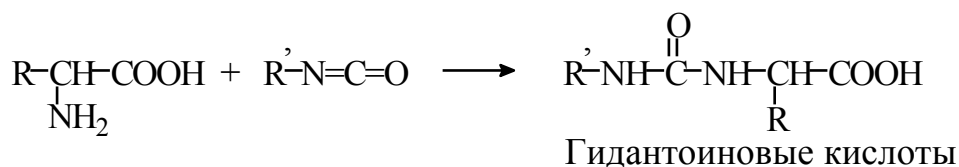
Образование гидантоинов. При нагревании α -аминокислот с мочевиной без растворителя образуются гидантоины. При обработке водных или неводных растворов α -аминокислот изоцианатами в зависимости от условий могут быть получены гидантоиновые кислоты или гидантоины:



Гидантоины



Гидантоины



Гидантоины часто используют для идентификации α-аминокислот, поскольку они легко кристаллизуются и имеют четкие температуры плавления в отличие от аминокислот.

Образование дикетопиперазинов. Как было описано ранее, α-аминокислоты, а ещё легче их эфиры, циклизуются с образованием 2,5-дикетопиперазинов. Например, простым нагреванием глицина в этиленгликоле при 174-176°C с выходом 62% был получен 2,5-дикетопиперазин, а метиловый и этиловый эфиры глицина спонтанно переходят в 2,5-дикетопиперазин в водном растворе при 15-20°C.

Рассмотренные ранее реакции образования из α-аминокислот азлактонов, тиогидантоинов и реакции α-аминокислот с нингидрином и N-бромсукцинимидом также идут с участием и амино- и карбоксильной групп. Однако авторам представлялось более логичным рассмотреть их в п. 1.1.4.2, поскольку начинаются они с участия аминогруппы, а заканчиваться могут в зависимости от условий и без участия карбоксильной группы. Правка отсюда!

1.1.4.4. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Аминокислоты, содержащие реакционноспособные боковые цепи, могут принимать участие в реакциях, специфических для этих цепей. Специфические реакции представляют интерес по двум причинам. Во-первых, реакции, сопровождающиеся характерными проявлениями, широко используются для идентификации и количественного определения пептидов, белков и индивидуальных аминокислот. Во-вторых, реакции, характерные для боковых цепей аминокислот, часто используются для химической модификации пептидов и белков.

Рассмотрим специфические реакции аминокислот, имеющие аналитическое значение (табл.1.5).

Ксантопротеиновая реакция. Аминокислоты с ароматическими кольцами в боковой цепи, а также пептиды и белки, в состав которых входят такие аминокислоты, при нагревании с концентрированной азотной кислотой дают желтое окрашивание, которое обусловлено образованием нитросоединений. Нитросоединения тирозина и трип-

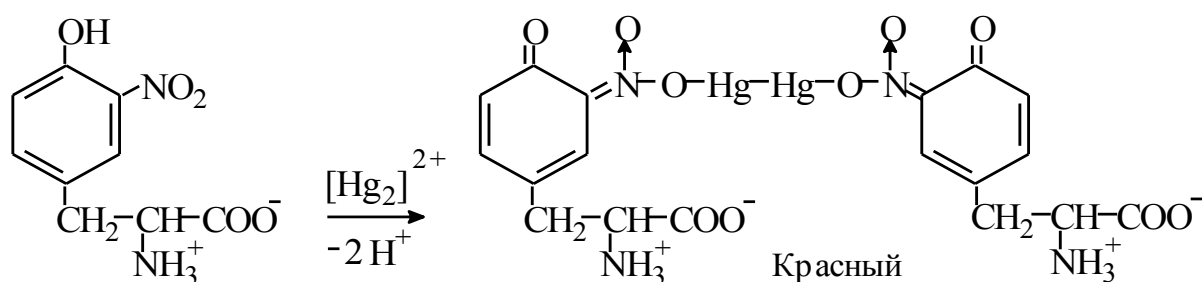
$$\begin{array}{ccccc}
 \text{OH} & & \text{OH} & & \text{O} \\
 | & & | & & || \\
 \text{C}_6\text{H}_4 & \xrightarrow[\text{-H}_2\text{O}]{\text{HNO}_3} & \text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2 & \xrightarrow[\text{-2H}_2\text{O}]{2\text{OH}^-} & \text{C}_6\text{H}_3\text{NO}_2 \\
 | & & | & & | \\
 \text{CH}_2\text{-CH-COO}^- & & \text{CH}_2\text{-CH-COO}^- & & \text{CH}_2\text{-CH-COO}^- \\
 | & & | & & | \\
 \text{NH}_3^+ & & \text{NH}_3^+ & & \text{NH}_2 \\
 \text{Бесцветный} & & \text{Желтый} & & \text{Оранжево-красный}
 \end{array}$$

Специфические реакции, используемые для идентификации и количественного анализа α -аминокислот и белков

37

Как видно из сущности ксантопротеиновой реакции, определению тирозина, триптофана и фенилаланина мешают ароматические соединения, и прежде всего фенолы и ароматические амины.

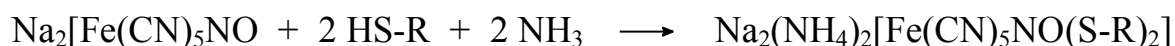
Реакция Миллона. Этот метод определения тирозина основан на том, что, во-первых, тирозин в отличие от триптофана и фенилаланина нитруется даже разбавленной азотной кислотой, а во-вторых, образующийся нитротирозин дает красную, нерастворимую в кислой среде *аци*-нитросоль с ионом $[\text{Hg}_2]^{2+}$:



При низкой концентрации тирозина возникает красное окрашивание, при высокой – выпадает красный осадок.

Эта реакция положительна также для фенольных соединений.

Нитропруссид натрия – $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ дает с меркаптанами в щелочной среде характерную красную или красно-фиолетовую окраску вследствие образования комплексных соединений следующего типа:



Цистеин дает положительную реакцию в разбавленном растворе аммиака, а цистин и метионин – отрицательную. Аммиак, а не щелочь, как обычно, используется потому, чтобы исключить возможность образования меркаптанов из цистина и метионина, меркаптаны дают положительную реакцию с нитропруссидом натрия.

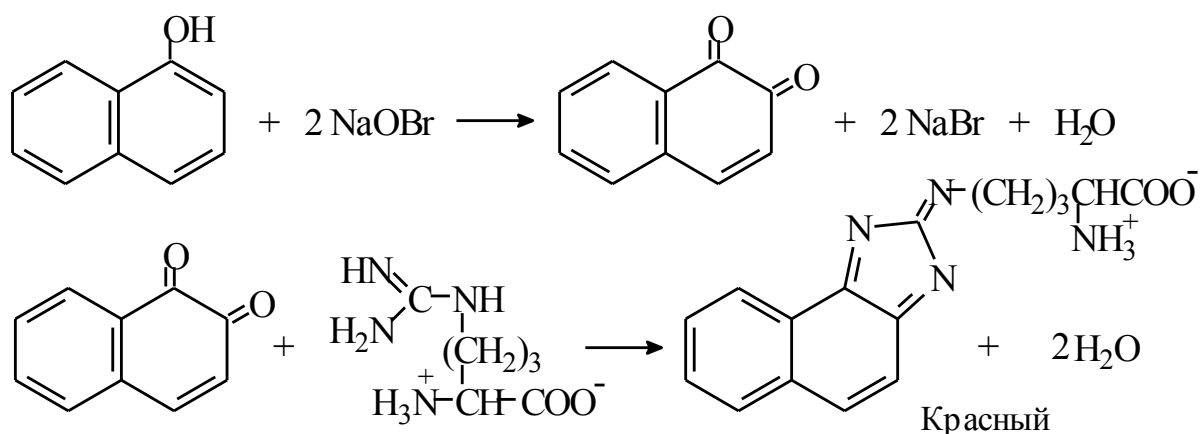
Реакция Фоля. Метод Фоля позволяет определять наличие серы в меркаптанах и сульфидах. Метод заключается в кипячении раствора препарата с щелочным раствором плюмбита натрия; при этом образуется черный осадок сульфида свинца. Положительную реакцию Фоля дают не только цистеин, цистин и метионин, но и пептиды и белки, содержащие эти аминокислоты:



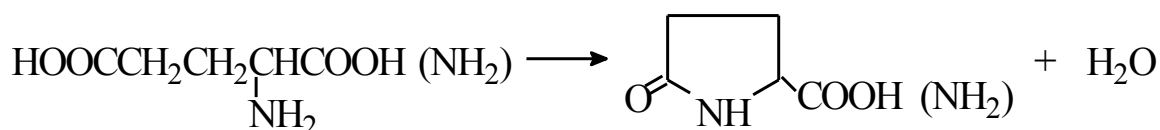
Определению серосодержащих аминокислот мешают соединения, содержащие в своей молекуле сульфидную или меркаптановую функциональные группы, например антибиотик пенициллин.

Реакция Сакагучи. Аргинин легко конденсируется с α -дикетонами с образованием имидазольного цикла, что используется в пептидном синтезе для защиты гуанидиновой группы аргинина. В реакции Сакагучи происходит аналогичная конденсация с 1,2-нафтохиноном, который образуется при окислении α -нафтола гипобромитом или гипохлоритом натрия.

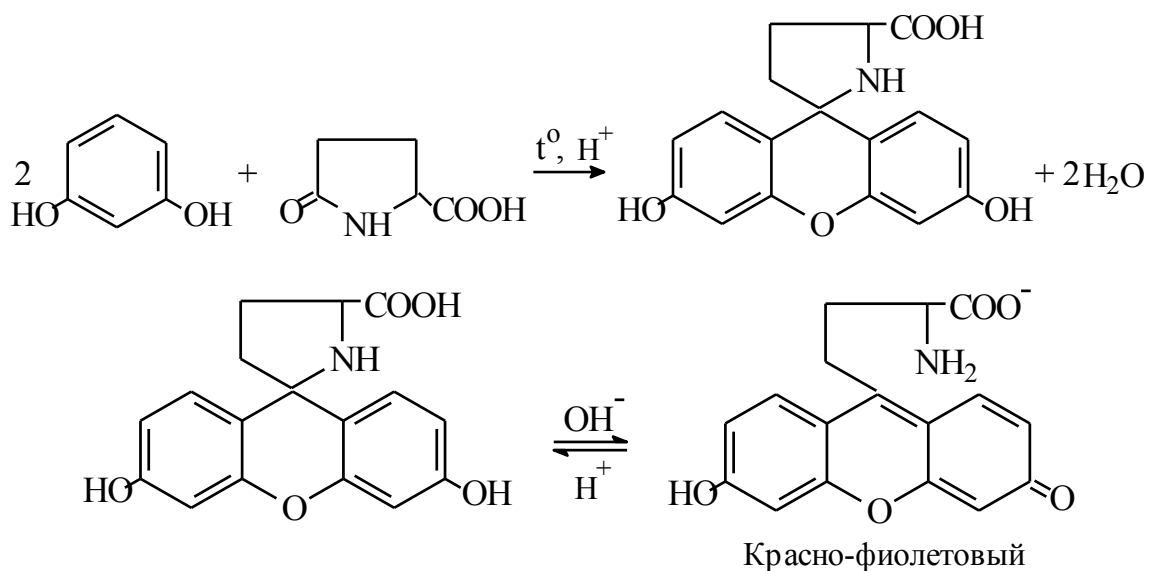
Реакция Сакагучи является общей для любых производных гуанидина. Так, например, антибиотик стрептомицин также дает положительную реакцию Сакагучи, поскольку содержит в своей молекуле гуанидиновый остаток ((H₂N)HN=C-NH-):



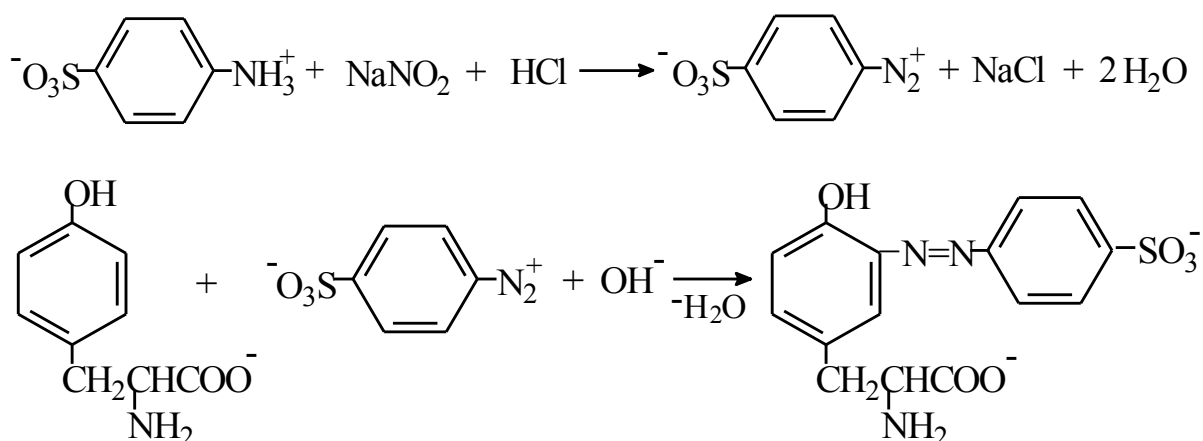
Открытие глутаминовой кислоты и глутамина. При нагревании глутаминовой кислоты или глутамина они циклизируются с отщеплением воды и образованием пирролидонкарбоновой кислоты (пироглутаминовая кислота) или ее амида соответственно:



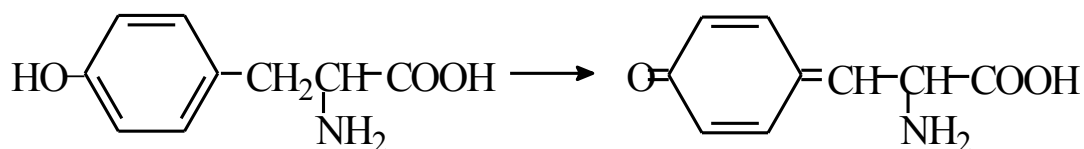
Пироглутаминовая кислота при нагревании с резорцином в присутствии концентрированной серной кислоты образует краситель, приобретающий в щелочной среде красно-фиолетовый цвет:



Реакция Паули. Эта реакция основана на азосочетании активированных ароматических соединений с солями диазония, в результате которой образуются азокрасители. Соль диазония готовят из сульфаниловой кислоты:



Реакция Фолина-Чиокалтеу. Среди протеиногенных аминокислот тирозин является самым сильным восстановителем. На использовании этого свойства и основана реакция Фолина-Чиокалтеу. Из всех протеиногенных аминокислот реактив Фолина-Чиокалтеу, представляющий собой фосфолибдодвольфрамическую кислоту, окисляет лишь тирозин по схеме



При этом фосфомолибдодвольфрамовая кислота восстанавливается до фосфомолибдодвольфрамовой гетерополисини – вещества непостоянного состава синего цвета.

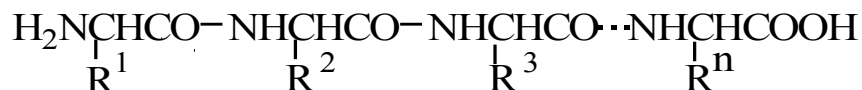
1.2. ПОЛИПЕПТИДЫ

1.2.1. ПРИРОДА ПЕПТИДНОЙ СВЯЗИ

«Я предложил название «полипептид» для продуктов, образуемых при соединении аминокислот связями амидного типа. Простейшим представителем этого класса соединений является гликоколь, так называемый глицилглицин, $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}-\text{NHCH}_2\text{COOH}$. По количеству аминокислот, входящих в состав пептида, различают ди-, три-, тетрапептиды и т.д.».

Так Эмиль Фишер* определил пептидную связь как амидную связь между аминокислотами (E. Fischer, Ber., Bd. 39, S. 530-610, 1906 г.).

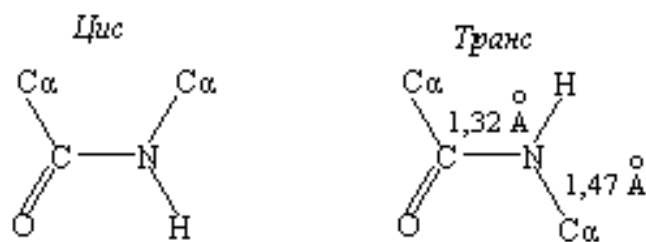
Основная структурная особенность полипептидов – наличие цепей, составленных из аминокислотных остатков, связанных между собой α -амидными связями:



В биохимии эти связи принято называть пептидными.

Фундаментальная концепция, принятая еще в 60-х гг. прошлого века во всех работах, посвященных изучению конформации полипептидов, заключается в планарности *транс*- и *цис*-пептидной групп. Этот факт указывает на наличие n - π сопряжения между неподеленной парой электронов атома азота (n) и π -электронами карбонильной группы, что подтверждается также меньшей длиной связи между атомом азота и атомом углерода карбонильной группы ($\text{C}-\text{N} = 1,32 \text{ \AA}$) по сравнению с длиной связи между этим же атомом азота и α -углеродным атомом ($\text{N}-\text{C}_\alpha = 1,47 \text{ \AA}$):

* Эмиль Герман Фишер – немецкий химик-органик. Основные работы посвящены химии белков, углеводов, пуриновых соединений. Нобелевская премия (1902 г.).



Вследствие n - π сопряжения вращение вокруг связи C–N затруднено. Поворот вокруг этой связи обозначается торсионным углом ω . Обычно угол ω равен 180° (*транс*-пептидная связь), однако изучение конформаций полипептидов показало что в некоторых случаях наблюдается искажение планарной формы отдельных пептидных звеньев (так называемая «пирамидальность») в пределах $\pm 15^\circ$. Например, в кристаллической структуре гидрохлорида глицил-L-аланина отклонение от плоскости составляет $+10,2^\circ$, а для глицил-L-лейцина $-11,4^\circ$.

В отличие от этого вращение вокруг связей C α –C и N–C α осуществляется свободно и характеризуется двугранными торсионными углами ψ и ϕ соответственно, однако это не значит, что торсионные углы ψ и ϕ могут принимать какие угодно значения.

Для каждого конкретного сочетания определенных аминокислотных остатков ввиду стерических ограничений разрешены определенные комбинации торсионных углов ϕ и ψ .

Для углов ϕ и ψ остаются разрешенными сочетания, лежащие в пределах определенных дискретных областей. Информацию о связи между торсионными углами ϕ и ψ в каждом пептидном звене представляют графически с помощью конформационной ϕ/ψ -карты (карты Рамачандрана).

На рис.1.6 представлена карта, отражающая возможные энергетически выгодные, энергетически невыгодные, но возможные, и запрещенные сочетания торсионных углов ϕ и ψ .

Как видно из рис. 1.6, в полипептидах реализуются весьма ограниченные соотношения торсионных углов ϕ и ψ . Определенные возможные сочетания углов, как правило, соответствуют определенным упорядоченным конформациям участков полипептидной цепи (подробнее о структурной организации полипептидов см. п. 1.2.2.3.1). На рис. 1.6 цифрами отмечены области углов ϕ и ψ , характерные для разных типов вторичной структуры белков.

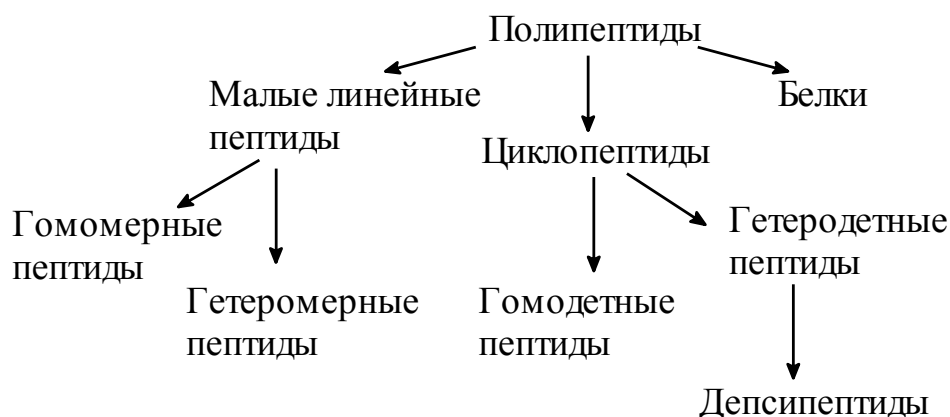


Р и с.1.6. Конформационная ϕ/ψ – карта полипептидной цепи

1.2.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДОВ, ОТДЕЛЬНЫЕ ПРЕДСТАВИЛИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

С развитием биохимии термин «полипептиды», введенный Э.Фишером, приобрел более широкое значение. В настоящее время под полипептидами понимают соединения, состоящие из аминокислот, связанных между собой не только пептидными связями, но и связями других типов, а также содержащие в своей структуре не только протеиногенные аминокислоты, но и не встречающиеся в белках.

Все полипептиды по химическому строению делятся на следующие группы:



1.2.2.1. МАЛЫЕ ЛИНЕЙНЫЕ ПЕПТИДЫ

К этой группе относятся полипептиды, содержащие до 50 аминокислотных остатков и имеющие молекулярную массу не более 5000 Да. Малые линейные пептиды делятся на низкомолекулярные (до 10-12 аминокислотных остатков в цепи) и высокомолекулярные (12-50 аминокислотных остатков в цепи).

Крупные полипептиды на основе α -аминокислот, связанных между собой пептидными связями, с молекулярной массой более 5000 Да называют **белками**. Естественно, что четкой границы между высокомолекулярными пептидами и белками нет. Малые линейные пептиды подразделяют на *гомомерные* и *гетеромерные*.

Гомомерные линейные пептиды построены исключительно из α -L-аминокислот и содержат только α -пептидную связь (белковоподобные пептиды). Малые гомомерные линейные пептиды в природе встречаются так же часто, как и белки, и прежде всего в организмах животных. В качестве примера рассмотрим важнейшие представители этой группы.

По биологическим свойствам эта группа пептидов делится на три основные группы: нейромедиаторы, пептидные гормоны, нейротоксины некоторых животных.

Нейромедиаторы. В 1975 г. из мозга млекопитающих были выделены два природных опиоидных пентапептида – [Met⁵]-энкефалин и .[Leu⁵]-энкефалин, воздействующие на опиатные рецепторы, но в отличие от морфина, не обладающие эффектом привыкания:

Tyr– Gly–Gly–Phe–Met – [Met⁵]-энкефалин

Tyr– Gly–Gly–Phe–Leu – .[Leu⁵]-энкефалин

Впоследствии из тканей гипофиза и гипоталамуса млекопитающих были выделены и другие полипептиды с аналогичной биологической активностью. Такие полипептиды, как природные, так и синтетические, получили название опиоидные полипептиды. Все они характеризуются присутствием остатка [Met⁵]-энкефалина в конце цепи

(выделен жирным шрифтом). Их действие обусловлено способностью связываться с опиатными рецепторами вследствие сходности пространственного строения энкефалинового фрагмента и морфина. Общее название эндогенных полипептидов, обладающих опиоидной активностью, – эндорфины. Ниже приведены формулы выделенных и охарактеризованных эндорфинов человека:

α -эндорфин – **Tyr-Gly-Gly-Phe-Met**-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr

γ -эндорфин – **Tyr-Gly-Gly-Phe-Met**-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu

δ -эндорфин – **Tyr-Gly-Gly-Phe-Met**-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr

β -эндорфин – **Tyr-Gly-Gly-Phe-Met**-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Gln –

Энкефалины и эндорфины блокируют передачу нервных импульсов, поступающих от внутренних органов в подсознание, из подсознания – в сознание. Именно поэтому здоровый человек не ощущает пульсацию внутренних органов в том случае, если уровень поступающих от них импульсов не превышает определенную норму.

Морфин и другие наркотики, воздействуя на опиатные рецепторы, выполняют ту же функцию, что и природные эндорфины и энкефалины, однако при этом развивается привыкание, биохимическая основа которого заключается в том, что организм перестает вырабатывать природные эндорфины, и поэтому нуждается в постоянном приеме наркотика. Попытка прекратить прием наркотика вызывает состояние «ломки», когда импульсы, поступающие в подсознание от всех внутренних органов, беспрепятственно поступают и в сознание, что ощущается как чувство сильнейшей боли, ведь выработка природных эндорфинов и энкефалинов организмом прекращена.

Все было бы не так страшно, если бы наркотики не дезорганизовывали работу внутренних органов. Вот почему наркоманы долго не живут. Чтобы излечиться от наркомании, необходимо восстановить

продукцию естественных энкефалинов и эндорфинов, которые, по-видимому, образуются в центральной нервной системе из специфического белка под действием специфических пептидаз. Процесс этот длительный и далеко не комфортный, вот почему так трудно избавиться от наркотической зависимости.

Пептидные гормоны. Гормоны животных (от греч. hormao – приводить в движение, побуждать), вещества, вырабатываемые специализированными клетками и железами внутренней секреции и регулирующие обмен веществ в отдельных органах и всем организме в целом. Органы, в которых вырабатываются пептидные гормоны животных, – это поджелудочная железа, желудок, гипофиз, почки, кровь.

Ниже приведены формулы некоторых не очень больших гомомерных линейных пептидных гормонов, а в табл. 1.6 – краткие сведения об их биологическом действии.

Ангиотензин I – Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

Ангиотензин II – – Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe

Брадикинин – Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Глюкагон – His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Try-Leu-Met-Asn-Thr

Меланофорстимулирующий

гормон – β -MCTG – Ala-Glu-Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tre-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp

В табл. 1.6 представлены не только гомомерные линейные пептидные гормоны, но и представители других типов пептидных гормонов – гетеромерные и гетеродетные пептидные гормоны.

Нейротоксины животных. Нервные яды пресмыкающихся, ядовитых насекомых, морских червей и других животных представляют собой главным образом белки. Однако известны и гомомерные пептидные яды. Например, яды пчел и ос представляют собой сложные смеси полипептидов, основным компонентом которых является гомомерный пептид – мелиттин (его содержание достигает 50%):

Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly Leu-Pro-Ala-Leu-Ile Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Glu-Glu

Молекула мелиттина состоит из 28 аминокислотных остатков. Примечательно, что молекула мелиттина является гомомерной и не содержит цистеина, в отличие от нейротоксинов змей, скорпионов, ядовитых пауков, которые являются гетеродетными пептидами и, как правило, содержат несколько дисульфидных мостиков.

Таблица 1.6

Пептидные гормоны

Место образования	Гормон	Биологическое действие	Тип пептида и число Аминокислотных остатков
Кровь	Ангиотензин I	Сильное и резкое повышение кровяного давления	Гомомерный, 10
	Ангиотензин II		Гомомерный, 8
	Брадикинин	Расширение кровеносных сосудов	Гомомерный, 9
Гипофиз	Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Стимулирование гормональной деятельности надпочечников	Гомомерный, 39
	Меланофостимулирующие гормоны (α -МСГ, β -МСГ)	Распределение пигментов (меланофоров)	Гомомерные, 22
	Окситоцин	Сокращение матки	Гетеродетный, 9
	Вазопрессин	Антидиуретическое действие	Гетеродетный, 9
Поджелудочная Железа	Глюкагон	Повышение уровня глюкозы в крови	Гомомерный, 29
	Инсулин	Понижение уровня глюкозы в крови	2-е цепи А и В, А – гетеродетный, 21, В – гомомерный, 30, Цепи А и В связаны 2-мя -S-S- мостами
Желудок	Гастрин I	Регуляция секреции желудочного сока	Гетеромерный, 17
	Гастрин II		Гетеромерный, 17

Гетеромерные линейные пептиды. К гетеромерным пептидам относятся любые линейные пептиды, строение которых отличается от строения гомомерных пептидов. Для иллюстрации этой группы полипептидов рассмотрим важные в биологическом отношении представители. При написании формул этих полипептидов используются те же трехбук-

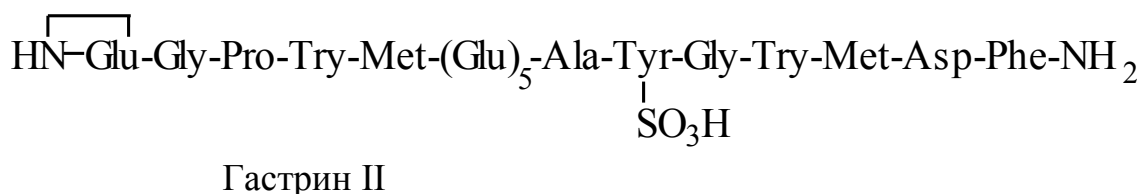
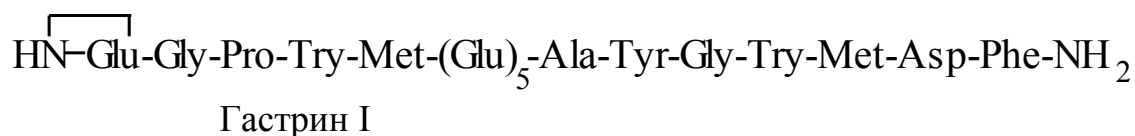
венные символы протеиногенных аминокислот с указанием тех или иных изменений в их структуре или в строении полипептидной цепи.

Так, например, формула рассмотренного ранее трипептида глутатиона в трехбуквенном коде записывается следующим образом:

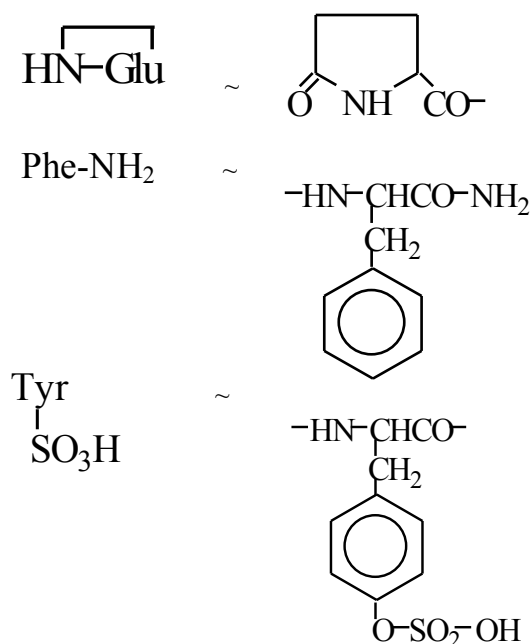


Здесь символ γ указывает, что амидная связь образуется между аминогруппой цистеина и γ -карбоксильной группой глутаминовой кислоты.

Приведенные в табл. 1.6 гормоны слизистой оболочки желудка - гастрин I и гастрин II – имеют следующее строение:

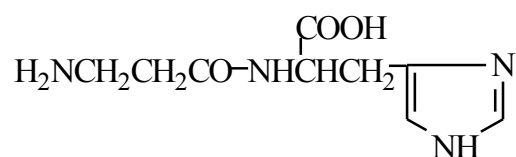


Использованные здесь символы означают, что N-концевой остаток глутаминовой кислоты замкнут в пирролидоновое кольцо, C-концевой фенилаланин находится в виде амида, тирозин присутствует в виде сернокислого эфира:

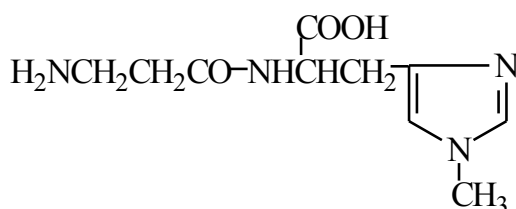


Появление различных аминокислот небелковой природы в составе полипептидов – явление весьма распространенное в живой природе, особенно среди микроорганизмов. Образование гетеромерных пептидов возможно в результате распада белков после посттрансляционной модификации или путем биосинтеза. Приведем еще несколько примеров.

В мышцах обнаружены и выделены в чистом виде В.С. Гулевичем с сотрудниками близкие по структуре дипептиды – карнозин и ансерин:



Карнозин (β-Ala-His)

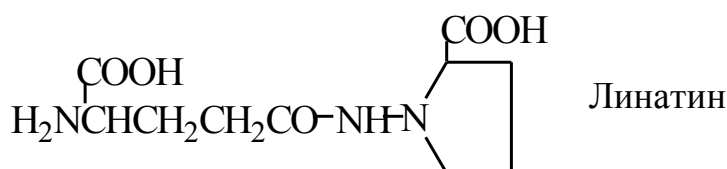


Ансерин (β-Ala-His-N₁-CH₃)

Карнозин и ансерин содержатся в различных количественных соотношениях во всех мышцах млекопитающих и птиц. Карнозин стимулирует синтез АТФ и является предшественником ансерина, который обладает антидиуретическим действием. Недостаток ансерина в организме приводит к развитию несахарного диабета.

Из микроорганизмов выделен эффективный ингибитор трансаминаз – линатин (γ-Glu-1-NH-D-Pro).

В состав линатина входит остаток 1-амино-D-пролина:



Следует отметить, что полипептиды – антибиотики часто содержат в своей структуре остатки D-аминокислот. Например, линейные грамицидины А, В, С:

OHC-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-
Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NHCH₂CH₂OH – грамицидин А

OHC-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-
-Trp-D-Leu-Phe-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NHCH₂CH₂OH – грамицидин В

OHC-Val-Gly-Ala-D-Leu-Ala-D-Val-Val-D-Val-
-Trp-D-Leu-Tyr-D-Leu-Trp-D-Leu-Trp-NHCH₂CH₂OH – грамицидин С

Как видно, в состав этих линейных 15-членных пептидов входят 4 остатка D-лейцина и 2 остатка D-валина наряду с 2 остатками L-валина. Строение грамицидинов отличается лишь природой аминокислоты в положении 11 (помечены цифрой).

1.2.2.2. ЦИКЛОПЕПТИДЫ

Циклопептидами называют полипептиды, пептидная цепь которых замкнута в кольцо. По количеству аминокислотных остатков, входящих в цикл, циклические пептиды делят на ди-, три-, тетра- и т.д.-циклопептиды. Циклодипептиды обычно называют 2,5-дикетопиперазинами, рассматривая их как производные 6-членного гетероцикла пиперазина. Циклотрипептиды пока в организмах не найдены. Циклотетрапептиды очень редки в природе. Циклопептиды, содержащие в цикле 5 и более остатков аминокислот, широко распространены в различных организмах.

В зависимости от типов связей, участвующих в образовании кольца, циклические пептиды делятся на *гомодетные* и *гетеродетные*. *Гомодетные пептиды* содержат в цикле лишь пептидные (CO-NH) группы и >CHR структурные фрагменты. *Гетеродетные пептиды*, наряду с этими структурными элементами, содержат дисульфидные мостики, амидные связи небелковой природы, сложноэфирные связи и т.д. *Гетеродетные пептиды*, содержащие пептидные и сложноэфирные связи, называются *депсипептидами*. В состав циклопептидов часто входят не только остатки протеиногенных аминокислот, но модифицированных α-L-аминокислот и α-D-аминокислот. Циклопептиды весьма разнообразны по биологической активности – это

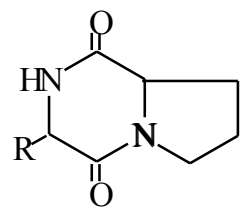
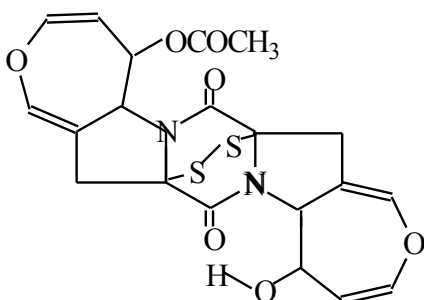
гормоны, ингибиторы ферментов, антибиотики, токсины, ионофоры – каналообразующие соединения.

Авторы считают целесообразным рассмотреть отдельно дикетопиперазины, а остальные циклопептиды, как гомодетные, так и гетеродетные, классифицировать и рассмотреть в зависимости от их биологической активности.

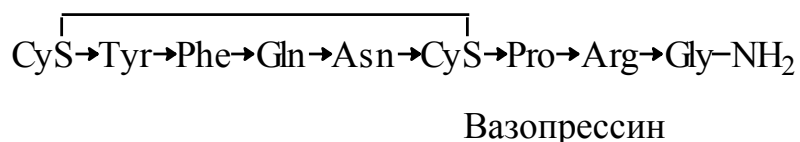
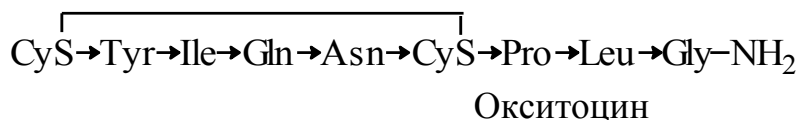
2,5-Дикетопиперазины. 2,5-Дикетопиперазины весьма широко распространены в природе. Достаточно много таких соединений выделено из различных микроорганизмов и морских организмов. Интересно, что среди этих циклопептидов имеется значительное количество производных L-пролина. Среди дикетопиперазинов немало примеров включения в цикл небелковых аминокислот, в том числе и D-конфигурации. Открыты 2,5-дикетопиперазины с дисульфидным мостиком. В организмах животных дикетопиперазины встречаются редко. Строение дикетопиперазинов изображают обычными структурными формулами и называют их как обычные гетероциклические соединения (трехбуквенный код обычно не используется).

Некоторые представители дисульфидных 2,5-дикетопиперазинов обладают разнообразной биологической активностью: антибактериальной, противовирусной, фунгицидной и противоопухолевой.

2,5-Дикетопиперазины
на основе L-пролина:

	R	Источник
	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$	Морская звезда Aspergillus ochraceus
	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	Rosellima necatrix
	$-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}$	Дрожжи
	Аранотин	Arachnoidus aureus

Пептидные гормоны. В табл. 1.6 приведены три гетеродетных циклопептидных гормона – окситоцин, вазопрессин и инсулин, формулы которых приведены ниже (стрелка указывает направление от N-конца к С-концу):



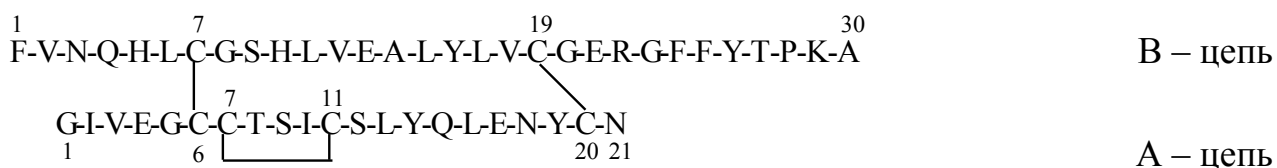
Как видно из сравнения формул, окситоцин и вазопрессин имеют весьма близкое строение. Отличие заключается лишь в различии двух аминокислотных остатков. Однако биологическая активность этих гормонов резко различается. Вазопрессин оказывает антидиуретическое действие и как следствие вызывает повышение кровяного давления.

Окситоцин вызывает сокращение матки, выделение молока из молочных желез млекопитающих, а также понижение кровяного давления. Общим у этих гипофизарных гормонов является то, что в присутствии восстановителей активность исчезает. Это указывает на то, что восстановление дисульфидного мостика и как следствие разрушение кольца приводит к утрате биологической активности.

Как уже отмечалось выше, строение инсулина было установлено Ф.Сенгером. Затем независимо в трех лабораториях строение его было подтверждено синтезом.

В настоящее время инсулин для медицинской практики получают методами генной инженерии, а также методом твердофазного синтеза.

Первичная структура инсулина в однобуквенном коде записывается следующим образом:



— Дисульфидные мостики

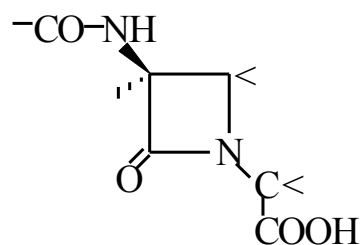
Инсулин обеспечивает проникновение глюкозы из крови через клеточные мембраны. В клетках глюкоза в результате аэробного гликолиза метаболизируется до углекислого газа и воды, обеспечивая их энергетические потребности. Особенно в глюкозе нуждаются клетки центральной нервной системы (ЦНС) и печени. При недостатке инсулина глюкоза накапливается в крови, так как она не может свободно диффундировать внутрь клеток (инсулинозависимый сахарный диабет).

Пептидные антибиотики и токсины. Антибиотики – вещества, продуцируемые микроорганизмами, и продукты химической модификации этих веществ, избирательно подавляющие рост патогенных микроорганизмов, низших грибов, а также некоторых вирусов и клеток злокачественных новообразований. Первым открытым и внедренным в медицинскую практику был антибиотик пенициллин*.

Антибиотики составляют весьма обширную группу биологически активных веществ разнообразного строения. Рассмотрим лишь циклопептидные антибиотики. К настоящему времени известны следующие группы циклопептидных антибиотиков: *β-лактамы, актиномицины, аманитины, грамицидин S, полимиксины, тироцидины*

β-Лактамы. Все антибиотики этой группы содержат в молекуле β-лактамы. Кроме упомянутых пенициллинов в эту группу входят цефалоспорины, карбапенемы, оксапенемы, нокардицины и монобактамы. Необходимым элементом структуры всех этих антибиотиков, обуславливающим антибактериальное действие и его общность у всех представителей группы, является фрагмент молекулы, имеющий стерическое подобие концевому D-Ala-D-Ala- фрагменту бактериального линейного пептидогликана.

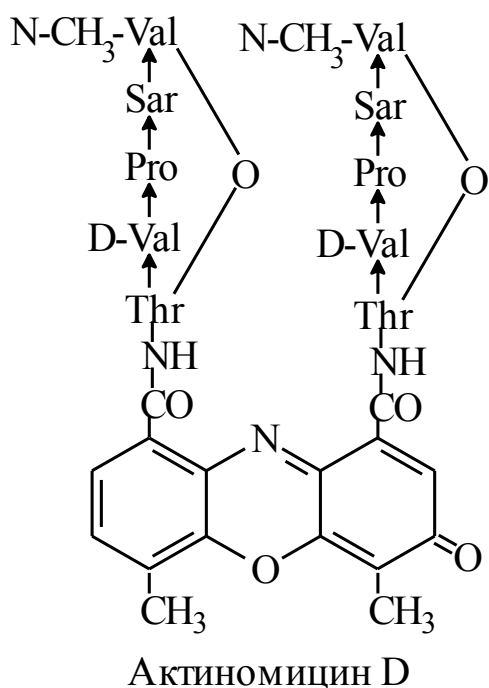
Как установлено, механизм действия β-лактамов состоит в блокирова-



* За открытие пенициллина и его терапевтического эффекта в 1945 г. была присуждена Нобелевская премия английским биохимикам Александру Флемингу, Эрнсту Чейну и Хоуарду Флори.

нии фермента транспептидазы, осуществляющего «сшивку» линейных пептидогликанов в трехмерную структуру в процессе формирования бактериальной стенки. D-Ala-D-Ala-концевой фрагмент пептидогликана связывается в процессе формирования бактериальной стенки с активным центром транспептидазы. Указанный фрагмент β -лактамов стерически подобен D-Ala-D-Ala-фрагменту и обеспечивает необратимое связывание антибиотика с транспептидазой, вследствие чего блокируется процесс формирования бактериальной стенки.

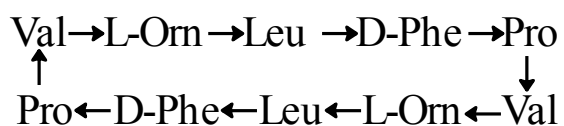
Актиномицины. Актиномицины являются хромопептидами (окрашенными пептидами). Они, кроме циклопептидных фрагментов, содержат хромофорную группировку – остаток 1,8-диметил-3-аминофенаксазон-2-дикарбоновой-4,5-кислоты. Пептидная часть представлена двумя одинаковыми циклопентапептидными группировками.



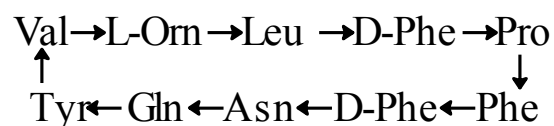
В состав циклопентапептидной группы входят треонин, D-валин, пролин, саркозин (N-метилглицин – Sar) и N-метилвалин (N-CH₃-Val). В цикл входит сложноэфирная связь между гидроксильной группой треонина и карбоксильной группой N-метилвалина. Различные актиномицины различаются природой D-аминокислоты. Здесь приведена формула актиномицина D – наиболее широко используемого препарата из семейства актиномицинов. Актиномицин D ингибирует ДНК-зависимую РНК-полимеразу.

Оказывает мощное противоопухолевое действие.

Грамицидин S. В группу грамицидинов входят линейные грамицидины A, B и C, рассмотренные ранее, а также циклодекапептид – грамицидин S, в молекулу, которого входят непротеиногенные аминокислоты – 2 остатка D-фенилаланина и 2 остатка L-орнитина (2,5-диаминопентановая кислота – L-Orn):



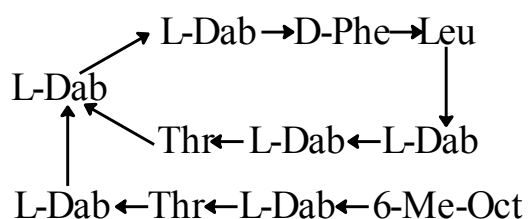
Грамицидин S



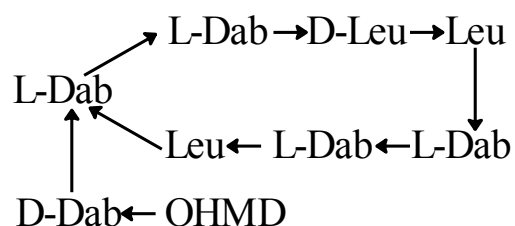
Тироцидин A

По механизму антимикробного действия грамицидин S резко отличается от линейных грамицидинов, которые являются каналобразующими антибиотиками, т.е. делают мембраны проницаемыми для протонов и катионов щелочных металлов. В отличие от этого грамицидин S разобщает окислительное фосфорилирование в митохондриях. По структуре и механизму действия сходен с антибиотиком *тироцидином*.

Полимиксины и октапептины. Семейство полимиксинов включает в себя 7 декапептидов. Все они характеризуются присутствием в молекуле нескольких остатков 2,4-L-диаминомасляной кислоты (L-Dab) и наличием на конце трипептидной цепочки L-Dab, ацилированной по α-аминогруппе 6-метилоктановой кислотой (6-Me-Oct). Близкое строение и аналогичные биологические свойства имеют *октапептины*. Боковая цепочка октапептинов содержит только одну аминокислоту 2,4-D-диаминомасляную (D-Dab), которая ацилирована по α-аминогруппе 3-гидрокси-8-метилдекановой кислотой (OHMD):



Полимиксин B₁



Октапептин A₁

Как видно из структуры этих антибиотиков, они обладают выраженными основными свойствами (полимиксины содержат 5 свободных аминогрупп в молекуле, октапептины – 4). Такая химическая структура придает этим антибиотикам свойства поверхностно-активных веществ и обуславливает их взаимодействие с фосфолипидами мембран бактерий. Вследствие этого нарушается нормальная проницаемость мембран для малых молекул, и таким образом ингибируется рост микроорганизмов.

Причем октапептины в 3-10 раз более эффективны против грамположительных бактерий, чем полимиксины.



Аманитины. Эта группа токсинов продуцируется грибом *Amanita phalloides*. Чрезвычайно ядовитое вещество – работа требует особых

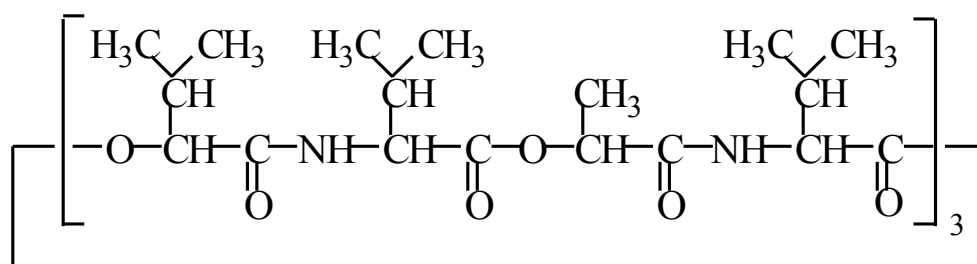
мер предосторожности. Токсичен при попадании на кожу и при вдыхании. Ингибирует РНК-полимеразу. В медицинской практике не применяется, используется в биохимических исследованиях.

Ионофоры. Ионофоры – органические вещества, осуществляющие перенос катионов щелочных и щелочно-земельных металлов, а также ионов аммония через биологические мембраны. К ионофорам относятся многие антибиотики, в том числе и циклопептидные, например депсипептиды энниатин и валиномицин. В основе действия лежит их способность образовывать комплексы с транспортируемыми катионами.

Ионофор формирует молекулярную полость, в которой катион удерживается координационными связями с участием атомов кислорода полярных групп, выстилающих поверхность полости. Комплекс формируется так, что полость занимает катион и полярные группировки ионофора, а периферийная часть становится заполненной преимущественно гидрофобными радикалами. Это обеспечивает растворимость комплекса ионофора с катионом в липидах.

Валиномицин представляет собой додекадепсипептид. В состав 12-членного цикла валиномицина входят остатки 3 молекул α-гидрокси-изовалериановой кислоты, 6 молекул валина и 3 молекул молочной кислоты.

Валиномицин является нейтральным ионофором, полость кото-



Валиномицин

рого сформирована 12 атомами кислорода карбонильных групп. Размер полости оптимален для размещения в ней K^+ . Устойчивость комплекса с K^+ в 10^4 раз выше, чем комплекса с Na^+ . Валиномицин индуцирует K^+ -проводимость в клеточных мембранах. Энниатин имеет 6-членный цикл, полость которого гораздо меньше, чем у валиномицина, поэтому крупный ион K^+ в неё не входит, а ионы аммония и натрия образуют устойчивые комплексы.

В связи с высокой токсичностью ионофорные антибиотики в медицине не применяются. Их применяют в биохимических исследованиях для регуляции ионного транспорта через мембраны, в химии – для экстракции ионов и мембранного катализа, в технике – для создания ионселективных электродов.

1.2.2.3. БЕЛКИ

Первые работы по выделению и изучению белков были проделаны еще в XVIII в. Это были работы описательного характера. В начале XIX в. были выполнены первые анализы элементного состава белков (Ж. Гей-Люссак, Л. Тенар, 1810 г.), положившие начало систематическим аналитическим исследованиям, в результате которых было установлено, что все белки близки не только по внешним признакам и свойствам, но и по элементному составу. Важное следствие этих работ – создание первой теории строения белков (Г.Я. Мульдер, 1836 г.), согласно которой все белки содержат общий радикал – протеин.

Создание теории протеина совпало по времени с формированием представлений о функциях белков в организме. Вскоре были открыты первые протеолитические ферменты – пепсин (Т. Шванн, 1836 г.) и трипсин (Л. Корвизар, 1856 г.). К середине XIX в. было доказано, что под действием протеолитических ферментов белки распадаются на близкие по свойствам фрагменты, получившие название пептоны (К. Леман, 1850 г.). К концу XIX в. было изучено большинство аминокислот, входящих в состав белков

В начале XX в. значительный вклад в изучение белков внес Э. Фишер, доказавший, что белки построены из остатков α -аминокислот, связанных амидной (пептидной) связью. Он также выполнил первые аминокислотные анализы белков.

В 20-е – 40-е гг. прошлого века седиментационными и диффузионными методами были определены молекулярные массы многих белков, получены данные о сферической форме молекул глобулярных белков (Т. Сведберг, 1926 г.), выполнены первые рентгеноструктурные анализы аминокислот и пептидов (Дж. Бернал, 1931 г.), разработаны хроматографические методы анализа (А. Мартин, Р. Синг, 1944 г.).

Существенно расширились представления о функциональной роли белков: был выделен первый белковый гормон – инсулин (Ф. Бантинг, 1922 г.); антитела были идентифицированы как фракция глобулинов; открыта ферментативная функция мышечного миозина (В. Энгельгардт, М. Любимова, 1939 г.). В кристаллической форме были получены первые ферменты: уреаза (Дж. Самнер, 1926 г.), пепсин (Дж. Нортроп, 1929 г.), лизоцим (Э. Абрахам, Р. Робинсон, 1937 г.).

В середине прошлого века была выдвинута идея о трех уровнях организации молекул белка (К. Линдерстрём-Ланг, 1952 г.); определены первичные структуры инсулина (Ф. Сенгер, 1953 г.) и рибонуклеазы (К. Анфинсен, С. Мур, К. Хёрс, У. Стайн, 1960 г.). По данным рентгеноструктурного анализа были построены трехмерные модели миоглобина (Дж. Кендрю, 1958 г.) и гемоглобина (М. Перуц, 1958 г.).

В последние 50 лет интенсивно развивались синтетическое и аналитическое направления в химии белка. Были синтезированы инсулин (Х. Цан, 1963 г.; П. Кацюянис, 1964 г.; Ю. Ван и др., 1965 г.), рибонуклеаза А (Б. Меррифилд, 1969 г.) и многие простые полипептиды.

В области анализа стал широко использоваться автоматический аминокислотный анализатор, созданный С. Муром и У. Стайном в 1958 г.; до высокой степени совершенства доведен рентгеноструктурный анализ; сконструирован автоматический прибор для определения последовательности аминокислотных остатков в белках – секвенатор (П. Эдман, Г. Бэгг, 1967 г.). За эти годы была определена структура нескольких сотен белков.

В последние годы значительные успехи достигнуты в изучении сложных белков: сократительных, транспортных, защитных, мембранных, рецепторных и регуляторов матричного синтеза биополимеров.

Широкое применение нашли новые методы разделения белков и пептидов (жидкостная хроматография высокого давления, биоспецифическая хроматография). В связи с разработкой эффективных методов

анализа нуклеотидной последовательности ДНК (А. Максам, У. Гилберт, Ф. Сенгер) стало возможным использовать полученную при таком анализе информацию и при определении первичной структуры белков.

В результате установлена структура ряда труднодоступных белков: интерферона, ацетилхолинового рецептора и многих других, содержащих около или более тысячи аминокислотных остатков.

1.2.2.3.1. УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ

Рассмотрим уровни структурной организации белков как наиболее сложных по строению полипептидов. Чрезвычайная сложность структуры белков определяется уже самими размерами их молекул. Различают несколько уровней структурной организации белков, а именно *первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры*. Эти уровни отличаются друг от друга природой взаимодействий, необходимых для поддержания структуры.

Первичная структура белка. Под первичной структурой белка понимается *число и последовательность аминокислотных остатков*, соединенных между собой ковалентными пептидными связями.

Первичную структуру белка можно охарактеризовать обычной структурной формулой. Поскольку пептидная цепь неразветвлена, она имеет два разных конца – *N-конец* со свободной α -аминогруппой первой аминокислоты и *C-конец*, несущий α -карбоксильную группу последней аминокислоты. В биохимии формулы полипептидов принято писать, начиная с N-конца.

Для того чтобы назвать конкретный полипептид, достаточно перечислить (начиная с N-конца) последовательность входящих в его состав аминокислотных остатков в трехбуквенном или однобуквенном коде. Например, аминокислотная последовательность (первичная структура) пептидного гормона ангиотензина II читается следующим образом: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe или соответственно DRVYIHPF.

Определение первичной структуры белков – отнюдь не простая задача. Лишь в 1955 г. Ф.Сенгеру* с сотрудниками удалось полно-

* Фредерик Сенгер – английский биохимик. Основные работы посвящены химии белка. Разработал динитрофторбензольный метод определения N-концевых аминокислот, с помощью которого расшифровал строение инсулина. Установил, что инсулин состоит из двух цепей –

стью расшифровать первичную структуру одного из белков – гормона инсулина, имеющего молекулярную массу около 6000 Да.

В задачу авторов не входит подробное рассмотрение методов исследования первичной структуры белка, поэтому ограничимся лишь перечислением основных этапов этой работы.

1. Определение молекулярной массы и аминокислотного состава белка.
2. Определение числа отдельных полипептидных цепей, входящих в молекулу белка.
3. Расщепление связей между этими полипептидными цепями и выделение отдельных цепей.
4. Специфическое расщепление по определенным пептидным связям цепи на фрагменты удобной для исследования величины.
5. Определение аминокислотной последовательности в каждом из фрагментов.
6. Определение порядка расположения фрагментов в цепи и установление таким образом первичной структуры каждой из цепей нативного белка.
7. Установление мест и характера связывания пептидных цепей в белке.

Изучение первичной структуры белков показало, что, в отличие от других классов полипептидов, все аминокислоты, встречающиеся в белках всех организмов, принадлежат к L-ряду и связи между остатками аминокислот в белковой цепи исключительно пептидные.

Хотя в белках между остатками цистеина, входящих в одну и ту же или в разные цепи, может быть ковалентная дисульфидная связь ($-S-S-$), которая образуется при окислении сульфгидрильной группы (SH) цистеина, она не рассматривается как элемент первичной структуры белка. Эти факты указывают на то, что механизм синтеза белка во всех организмах одинаков.

Вторичная структура белка. Одной из удивительных характеристик пептидной цепи является способность спонтанно укладывать-

цепи А, содержащей 21 аминокислотный остаток, и цепи В, содержащей 30 аминокислотных остатков. Предложил метод расшифровки первичной структуры ДНК. Нобелевские премии (1958 г., 1980 г.).

ся в сложные трехмерные структуры, характерные для белков в нативном (естественном, природном) состоянии. Вторичные, третичные и четвертичные структуры многих белков образуются в растворе самопроизвольно в течение нескольких минут. Этот процесс называется *свертыванием белков*. Тем не менее в клетке имеются специальные белки – шапероны, функция которых – обеспечивать правильное свертывание вновь синтезируемых белков.

Потеря нативной конформации – *денатурация* – наступает под действием различных факторов и агентов: тепла, ультрафиолетового излучения, органических растворителей, мочевины, минеральных кислот и щелочей, бромистого лития, сульфата аммония и т.д. Различают *обратимую и необратимую денатурацию*. Например, денатурация под действием тепла часто является необратимой, а под действием мочевины обычно обратима – при удалении мочевины нативная форма белка восстанавливается. Явление обратимой денатурации указывает на то, что информация относительно нативной конформации полипептидной цепи закодирована в аминокислотной последовательности.

Выяснение закономерностей свертывания полипептидных цепей является одной из важнейших задач биохимии. Возможность предсказания нативной структуры белка с учетом первичной структуры и свойств окружающей среды позволила бы получать белки с заданными свойствами.

Существенный прогресс в решении этой задачи был достигнут благодаря замечательным работам Полинга*, Кори и Бренсона, которые ввели понятие о вторичной структуре белка и её типах, а также сформулировали ряд требований, которым должны удовлетворять наиболее стабильные типы вторичных структур.

Под вторичной структурой понимают *участки полипептидной цепи с упорядоченной конформацией, стабилизированной водородными связями между пептидными фрагментами*.

* Лайнус Карл Полинг – американский физик и химик. Основные работы посвящены изучению строения молекул и природы химической связи. Разработал представления о вторичной структуре полипептидной цепи в белках. Впервые дал описание полипептидной α -спирали (1951 г., совместно с американским биохимиком Р.Кори). Нобелевская премия (1954 г.).

Среди многих возможных типов вторичных структур, теоретически рассмотренных Полингом, Кори, Бренсоном и другими исследователями, экспериментальное подтверждение о своем существовании нашли следующие типы: α -спираль, спираль коллагена, складчатые структуры и β -петля. На рис.1.7 приведены типы вторичных структур полипептидной цепи, экспериментально обнаруженные в белках.

Спиральной считается структура, у которой все однотипные атомы лежат на одной винтовой линии. При этом спираль считается правой, если при наблюдении вдоль оси спирали она удаляется от наблюдателя при вращении по часовой стрелке, и левой, если она удаляется против часовой стрелки. При этом не важно, с какой стороны ее рассматривать.

Наиболее распространенным типом вторичной структуры является *правая α -Спираль* (α_R). Согласно модели Полинга для идеальной α -спирали на один виток α -спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, а шаг спирали равен 5,4 Å. При переходе от остатка к остатку смещение вдоль оси спирали (трансляция) равно $5,4/3,6 = 1,5$ Å, а угол поворота плоскости пептидного фрагмента к плоскости предыдущего пептидного фрагмента составляет $360^\circ/3,6 = 100^\circ$. Торсионные углы при этом равны $\omega = 180^\circ$ (*транс*-пептидная связь), $\phi = -57^\circ$, $\psi = -47^\circ$. Заместители при α -углеродном атоме ориентированы в направлении от центральной оси α -спирали.

Эта структура стабилизируется водородными связи между атомом водорода группы N-H каждого пептидного фрагмента и атомом кислорода группы O=C четвертого вдоль цепи пептидного фрагмента (водородная связь 1 $\rightarrow$ 4). Водородные связи в α -спирали направлены вдоль центральной оси спирали.

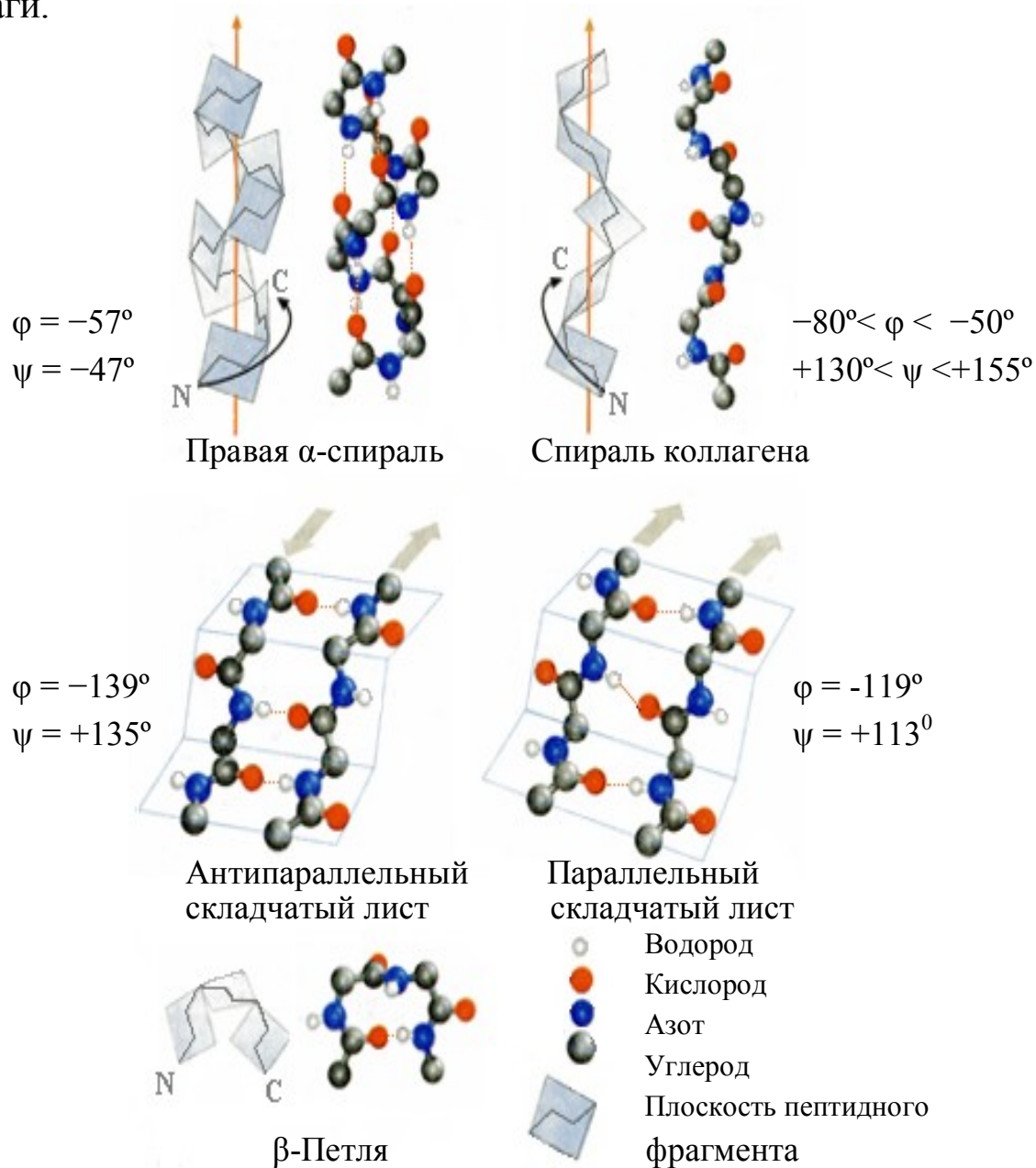
На рис.1.6 область, отмеченная цифрой 1, соответствует реальным белкам, в структуре которых экспериментально обнаружены правые α -спиральные участки полипептидной цепи.

Левая α -спираль встречается в природе крайне редко, хотя энергетически возможна. Она является зеркальным отражением правой α -спирали (на рис.1.7 не показана). Белки со структурой α -спирали могут быть либо глобулярными, либо фибриллярными.

Другая форма спирали присутствует в коллагене – важнейшей составной части соединительной ткани. *Спираль коллагена* – левая

спираль с шагом 9,6 Å, содержащая 3,3 аминокислотных остатка на один виток спирали. В отличие от α-спирали образование внутримолекулярных водородных связей здесь невозможно. Спираль коллагена стабилизируется за счет скручивания трех полипептидных цепей в в правую тройную спираль.

Две следующие конформации полипептидной цепи (см. рис.1.7) называются *складчатым листом*, так как плоскости пептидных фрагментов расположены в пространстве подобно равномерным складкам листа бумаги.



Р и с.1.7. Типы вторичных структур белков

Известны два типа складчатых структур: антипараллельный складчатый лист (β_a) и параллельный складчатый лист (β_p). В антипараллельном складчатом слое N-концевые группы всех расположенных рядом цепей направлены в противоположные стороны, а в параллельном – в одну и ту же сторону. Складчатый лист может содержать не только две цепочки (тяжи), как показано на рис.1.7, но и более.

Оба типа складчатых структур стабилизируются за счет межмолекулярных водородных связей между пептидными фрагментами соседних цепей. Складчатые структуры характерны для фибриллярных белков, но встречаются и в глобулярных.

В тех участках, где полипептидная цепь круто изгибается на угол около 180° , находится β -петля. Это короткий фрагмент, включающий в себя три аминокислотных остатка. β -Петля стабилизируется водородной связью между 1 и 3 аминокислотными остатками (водородная связь $1 \rightarrow 3$) (см.рис.1.7).

Следует отметить, что в том случае, если по стерическим причинам регулярная вторичная структура не может сформироваться на определенном участке полипептидной цепи, то на этом участке формируется хаотичная неупорядоченная структура – так называемый *статистический клубок*.

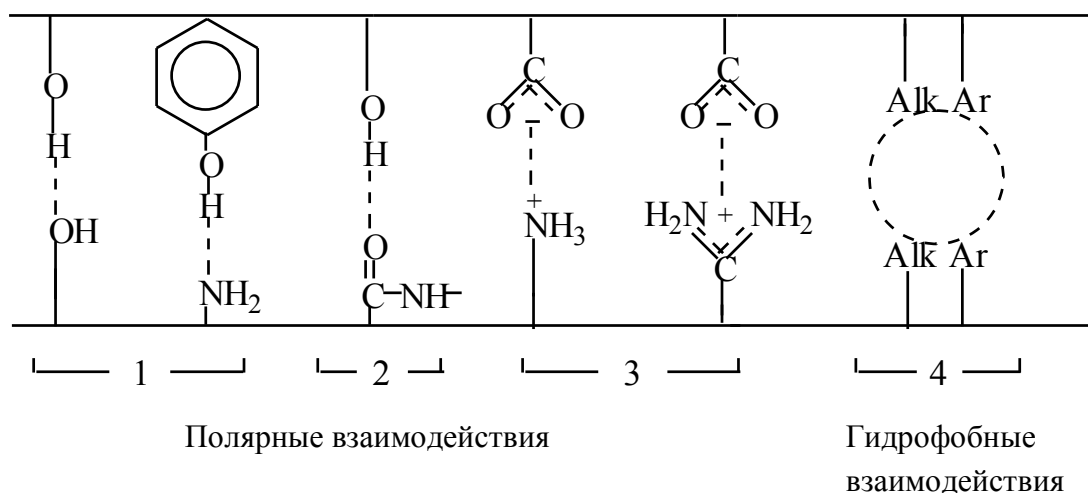
Почти все белки в том или ином соотношении имеют в своей структуре рассмотренные выше элементы вторичной структуры: спирализованные участки, складчатые слои, петли и статистические клубки. Например, вторичная структура инсулина включает в себя 57% α -спирали, 6% складчатого листа, 10% β -петли и 27% неупорядоченной структуры.

Третичная структура белка. Под этим термином понимают *полную укладку в пространстве всей полипептидной цепи, т.е. трехмерную функционально активную конформацию белка.*

Давно установлено, что большинство белков в нативном состоянии имеет весьма компактную свернутую структуру. Эта трехмерная структура белка высокоспецифична и уникальна. Это заключение непосредственно следует из того факта, что биологическая активность

белков, в частности ферментативная активность, крайне чувствительна к любым изменениям в третичной структуре белка. Какие же силы участвуют в самопроизвольном формировании третичной структуры белка и стабилизируют её?

Можно выделить четыре типа внутримолекулярных взаимодействий, характерных для всех белков, ответственных за поддержание третичной структуры белка: 1) водородные связи между боковыми цепями аминокислотных остатков; 2) водородные связи между боковыми цепями и пептидными группами; 3) ионные связи; 4) гидрофобные взаимодействия (рис.1.8).

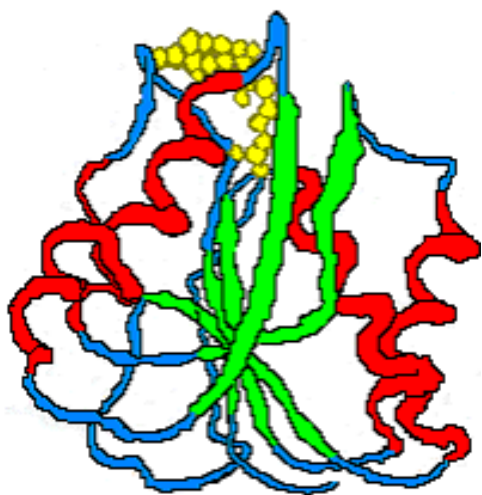


Р и с.1.8. Некоторые типы внутримолекулярных взаимодействий, ответственных за поддержание третичной структуры белка

Взаимодействия типа 1-3 (см. рис.1.8) относятся к полярным, а гидрофобные взаимодействия (см. тип 4 рис.8) между алкильными или арильными группами – к неполярным. Следует отметить, что из общего числа полярных взаимодействий реализуется лишь малая доля. В большинстве случаев полярные группы связаны с растворителем.

Кроме указанных на рис. 1.8 общих типов внутримолекулярных взаимодействий к факторам, стабилизирующим третичную структуру отдельных белков, относятся также дисульфидные мостики и комплексообразование с ионами металлов.

Важнейшими силами, обеспечивающими поддержание третичной структуры белка, являются гидрофобные взаимодействия. Полипептидная цепь в водной среде самопроизвольно свертывается так, чтобы



Р и с. 1.9. Третичная структура флаводоксина

как можно больше неполярных боковых групп аминокислотных остатков были бы спрятаны внутри глобулы, тогда как полярные группы контактируют с водой. В качестве примера рассмотрим третичную структуру небольшого флавопротеина – флаводоксина. Вторичная структура флаводоксина состоит из 5 складчатых листов, каждый из которых сформирован из пяти параллельных тяжей, 4 правых α -спиралей и нескольких β -петель. Этот белок содержит также простетическую группу – флавинмононуклеотид (ФМН). Свертывание

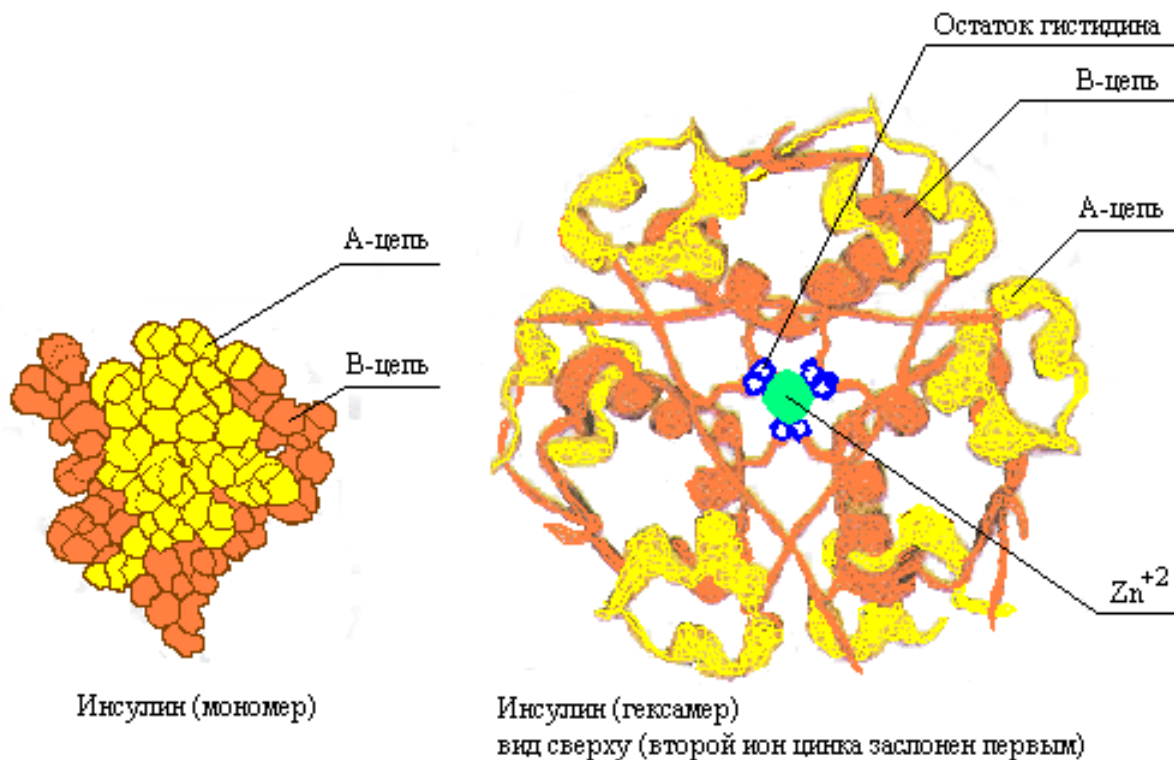
полипептидной цепи этого белка происходит так, что в центре молекулы веером располагаются 5 складчатых листов (показаны зеленым цветом), а 4 спиральных участка (показаны красным цветом) окружают ядро молекулы снаружи. Простетическая группа показана желтым цветом, а неупорядоченные структуры цепи – синим (рис. 1.9).

Четвертичная структура белка. Молекулы многих белков состоят из нескольких индивидуальных полипептидных цепей, не связанных одна с другой ковалентными связями. При этом каждая из индивидуальных цепей может иметь как одинаковые первичную, вторичную и третичную структуры, так и разные. Одинаковые полипептидные цепи часто образуют симметрично построенные комплексы, стабилизированные за счет нековалентных взаимодействий. Симметрично построенные комплексы называются *олигомерами*. Составные единицы белковых комплексов называются *мономерами* или *субъединицами*.

К таким белкам относится, например, гемоглобин, молекула которого состоит из четырех полипептидных цепей – двух α - и двух β -субъединиц с молекулярными массами около 16 кДа каждая.

Инсулин, хотя и называется мономером, также имеет четвертичную структуру, поскольку состоит из двух цепей – цепи А и цепи В, связанных друг с другом двумя дисульфидными мостиками (рис. 1.10). Кроме того, инсулин – мономер образует димеры и гексамеры. В крови инсулин присутствует в виде мономера и частично в виде димера. До поступления в кровь инсулин накапливается β -клетками в

островках Лангерганса (поджелудочная железа) в виде гексамера инсулина, стабилизированного двумя ионами Zn^{2+} . Каждый ион Zn^{2+} образует октаэдрический комплекс с участием 3 остатков гистидина в положении 10 цепи В и 3 молекул воды (см. рис. 1.10).



Р и с. 1.10. Четвертичные структуры инсулина мономера и гексамера

С возникновением четвертичной структуры белков много общего имеет образование *мультиферментных комплексов*. Достаточно подробно изучен пируватдегидрогеназный комплекс бактерии *Escherichia coli* (ПДГ-комплекс). Он состоит из 60 полипептидов, а именно: 24 молекулы полипептида E_2 в виде 8 тримеров образуют ядро комплекса кубической формы. Каждая из 6 граней этого куба занята димерами полипептида E_3 , а на 12 ребрах куба лежат димеры полипептида E_1 . ПДГ-комплекс имеет молекулярную массу около $5,3 \cdot 10^6$ Да и размер превышающий размер рибосомы.

Четвертичная структура белков имеет, по-видимому, отношение и к существованию *изоферментов*. Изоферментами называются ферменты, встречающиеся у одного и того же биологического вида в разных структурных формах. Существование изоферментов возмож-

но только в том случае, если ферментный комплекс состоит из нескольких различных субъединиц.

В качестве примера рассмотрим фермент лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Активной формой лактатдегидрогеназы является тетрамер из четырех субъединиц. В тетрамере субъединицы занимают эквивалентные положения; каждый мономер содержит активный центр.

В организме млекопитающих имеются два различных типа субъединиц ЛДГ (Н и М), незначительно различающихся по первичной структуре. Они могут случайным образом участвовать в образовании тетрамера. Известно 5 различных изоферментов ЛДГ, а именно НННН, МННН, ММНН, МММН и ММММ. В мышцах сердца содержатся тетрамеры ЛДГ, преимущественно состоящие из Н-субъединиц, а в печени и скелетных мышцах – из М-мономеров.

1.2.2.3.2. КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

На долю белков приходится не менее 50% сухой массы органических соединений животной клетки. Количество выделенных и охарактеризованных белков достигает нескольких тысяч, однако разнообразие их молекул настолько велико, что можно полагать, что к настоящему времени изучена лишь малая часть этих природных соединений. Известные в настоящее время белки классифицируют по следующим признакам: *составу, растворимости, форме молекулы и биологическим функциям.*

По составу белки делят на *простые (протеины)*, состоящие только из α -аминокислотных остатков, и *сложные (протеиды)*, содержащие кроме аминокислот небелковую часть – так называемую *простетическую группу.*

Протеины за неимением других классификационных признаков делят на семь групп по растворимости (рис.1.11).

1. *Альбумины* – растворимы в воде, выпадают в осадок при насыщении раствора сульфатом аммония, легко подвергаются денатурации при нагревании.

2. *Глобулины* – нерастворимы в воде, но растворяются в разбавленных растворах солей, выпадают в осадок при насыщении раствора сульфатом аммония, коагулируют при нагревании.

3. *Глутелины* – растительные белки, нерастворимы в воде, но растворимы в разбавленных растворах кислот и щелочей.

4. *Проламины* – растительные белки, нерастворимы в воде, растворах солей и абсолютном спирте, но растворимы в 70-80%-ном водном этиловом спирте.

5. *Склеропротеины* – животные белки, нерастворимы в воде. растворах солей, разбавленных растворах кислот и щелочей и спирте.



Р и с.1.11. Классификация белков по составу и растворимости

Протамины – белки с высоким содержанием аргинина, проявляющие основные свойства, очень хорошо растворимы в воде, нерастворимы в разбавленных растворах аммиака, не коагулируют при нагревании.

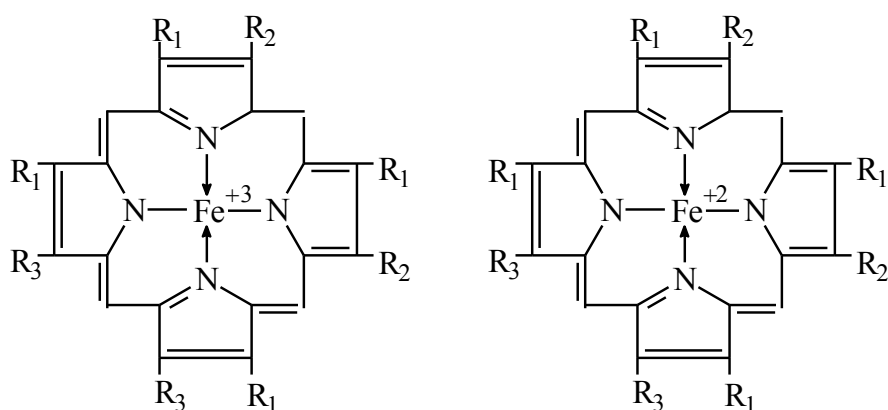
6. *Гистоны* – растворимы в воде, нерастворимы в разбавленном аммиаке, не денатурируют при нагревании

Классификация белков по растворимости сложилась в самом начале их исследования, но в последнее время теряет свое значение, хотя рассмотренные эмпирические названия употребляются и в настоящее время.

Сложные белки делятся на шесть основных групп.

1. *Фосфопротеиды* – белки, в состав которых входит остаток фосфорной кислоты, которая освобождается при гидролизе наряду с аминокислотами. Фосфорная кислота обычно связана сложноэфирной связью с гидроксильной группой либо серина, либо треонина. Кроме указанных на рис.1.11 примеров в качестве важнейших фосфопротеидов следует отметить такие ферменты, как фосфоглюкомутаза, фосфоорилаза, пепсин.

2. *Хромопротеиды* – это белки, включающие окрашенные (греч. chroma – краска) простетические группы. Хромопротеиды делятся на гемсодержащие и флавопротеиды. Простетическая группа гема содержит металл – железо или медь. Таким образом, гемсодержащие белки относятся также к металлопротеидам.



$R_1 = \text{CH}_3$
 $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{--S--R}$
 $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
 $\text{R} = \text{Остаток цистеина белка}$

Гем в цитохроме с

$R_1 = \text{CH}_3$
 $R_2 = \text{CH=CH}_2$
 $R_3 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

Гем в гемоглобине и миоглобине

Р и с.1.12. Структура гема в окислительно-восстановительных ферментах и транспортных белках

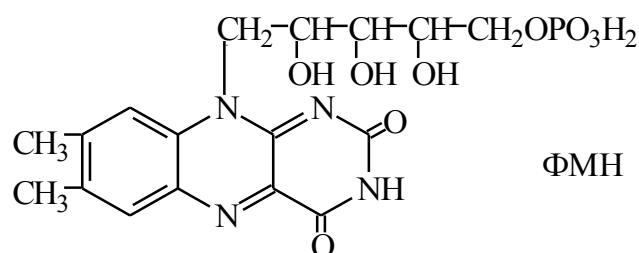
Среди гемсодержащих хромопротеидов особо важное место занимают транспортные белки – гемоглобин и миоглобин. Гемоглобин является тетрамером, состоящим из двух α - и двух β -субъединиц с молекулярными массами примерно 16 кДа. Каждая субъединица несет группу гема (рис.1.12) с ионом двухвалентного железа в центре. Гем связан с белком – глобином координационной связью между ионом двухвалентного железа и остатком гистидина. Шестая координационная связь железа занята молекулой кислорода в оксигемоглобине и соответственно H_2O в дезоксигемоглобине.

Миоглобин – хромопротеид мышц выполняет те же функции, что и гемоглобин, но не идентичен с ним. Молекулярная масса белкового компонента миоглобина равна 17 кДа, и его молекула содержит одну молекулу гемма, идентичного гему гемоглобина. Миоглобин, обеспечивая резерв кислорода в мышцах, предохраняет органы животных от временного кислородного голодания.

В крови ракообразных имеются медьсодержащие хромопротеиды – гемоцианины (синего цвета). Протопорфириновое ядро (это то, что остается от гема, если убрать железо) в них включает ион двухвалентной меди. Гемоцианины выполняют ту же функцию, что и гемоглобин и миоглобин.

К гемсодержащим белкам относятся также такие окислительно-восстановительные ферменты, как каталаза, пероксидаза и цитохромы. В этих белках гем связан с белковой молекулой ковалентной связью, возникающей при взаимодействии винильной группы гема с сульфгидрильной группой остатка цистеина. В отличие от гемоглобина степень окисления железа в геме окислительно-восстановительных ферментов меняется от +2 (восстановленная форма) до +3 (окисленная форма).

К флавопротеидам относятся белки, окрашенные в желтый цвет, не содержащие металла. Их окраска обусловлена наличием простетической группы – рибофлавинмононуклеотида (ФМН):

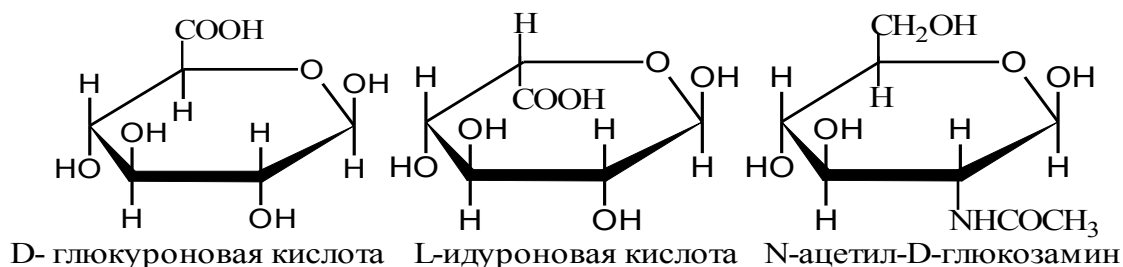


Светочувствительный хромопептид – родопсин представляет собой продукт конденсации 11-*цис*-ретинала (витамин А₂) по аминогруппе остатка лизина белка опсина:



3. *Металлопротеиды* – это белки, в состав которых входят металлы, связанные с белком координационными связями. К этой группе относятся уже рассмотренные гемсодержащие белки, а также олигомеры, стабилизированные ионами переходных металлов, например гексамер инсулина, стабилизированный двумя ионами Zn^{+2} .

4. *Гликопротеиды* – это белки, простетические группы которых представляют собой остатки углеводов, полисахаридов, производных углеводов – глюкуроновой кислоты, идуроновой кислоты, гексозаминов:



Главными представителями гликопротеидов, встречающимися в различных тканях, особенно в хрящах, костной ткани, роговице глаза, а также в составе пищеварительных жидкостей, являются муцины и мукоиды. Гликопротеиды могут содержать до 50% углеводов, но, как правило, в молекуле преобладает белковая часть.

В отличие от этого протеогликаны, также включающие в свою молекулу белковую и углеводную части, содержат около 95% углеводов и лишь около 5% белка. Протеогликаны, структурными компонентами углеводной части которых являются указанные выше углеводы, составляют основное вещество межклеточного матрикса.

5. *Липопротеиды* – это белки, простетические группы которых представлены холестерином, фосфатидами, жирами. В отличие от липидов липопротеиды растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях.

Липопротеиды чрезвычайно широко распространены. Они встречаются в составе протоплазмы клеток, в плазме крови, в составе различных тканей и форменных элементов клетки. Наиболее хорошо изучены липопротеиды плазмы крови. Липопротеиды плазмы подразделяются на две группы: 1) белки, связанные с липидами ковалентными связями; 2) белки, связанные с липидами нековалентными связями.

Липиды, ковалентно связанные с белком, служат якорем, с помощью которого белки прикрепляются к липидным мембранам.

Липопротеины второй группы не имеют строго определенного состава. Они представляют собой шаровидные комплексы, в ядре которых находятся липиды, а оболочка построена из белка. С помощью этих комплексов осуществляется транспорт нерастворимых в воде липидов с током крови к клеткам организма.

6. *Нуклеопротеиды* – сложные белки, открытые в 1869 г. Ф. Мишером* в ядрах клеток. Отсюда и название – протеиды ядер. Он же показал, что нуклеопротеиды состоят из белка и простетической группы, которую он назвал нуклеином (в настоящее время нуклеиновые кислоты). С химической точки зрения нуклеопротеиды представляют собой солеобразные соединения между основными белками гистонами или протаминами и кислыми нуклеиновыми кислотами.

По форме молекулы белки подразделяют на *глобулярные* и *фибриллярные*. Молекулы глобулярных белков свернуты в компактные глобулы сферической или эллипсоидной формы. Молекулы фибриллярных белков образуют длинные волокна (фибриллы) и обладают высокой симметрией. Большинство глобулярных белков, в отличие от фибриллярных, растворимы в воде. Особую группу составляют мем-

* Фридрих Мишер – швейцарский врач. Основные работы посвящены изучению химического состава и обмена веществ в клетке. Выделил нуклеиновую кислоту и белок протамин.

бренные (*амфипатические*) белки, характеризующиеся неравномерным распределением гидрофильных и липофильных участков в молекуле. Погруженная в фосфолипидную мембрану часть молекулы белка содержит преимущественно липофильные аминокислотные остатки, а выступающая из мембраны в водную среду – гидрофильные.

По биологическим функциям белки делятся на следующие.

1. *Ферменты* – высокоспецифические биокатализаторы биохимических реакций, лежащих в основе обмена веществ, мышечного сокращения, нервной проводимости и жизни клетки в целом. В настоящее время известно более двух тысяч ферментов.

2. *Структурные белки* – основа костной и соединительной тканей, шерсти и роговых образований. Они же формируют остов клеточных органелл, например *коллаген, гликопротеиды*.

3. *Сократительные белки* – белки, по единому механизму обеспечивающие работу мышц, движение жгутиков, расхождение хромосом при делении клетки, например *актин, миозин*.

4. *Регуляторные белки* делятся на две группы: 1) *гормоны* – вещества, которые секретируются эндокринными железами и осуществляют регуляцию биохимических и биофизических процессов в клетках и организме в целом, например *пролактин, соматотропин*; 2) *регуляторы биосинтеза белков и нуклеиновых кислот*.

5. *Рецепторные белки* располагаются на наружной поверхности плазматической мембраны и воспринимают действие различных сигналов внешней среды (5 органов чувств), а также регуляторные сигналы организма, в том числе гормональные, генерируя при этом электрический импульс.

Эти белки играют важную роль в передаче нервного возбуждения и в хемотаксисе (ориентированное движение клеток).

6. *Транспортные белки* делятся на две группы: 1) *системные транспортные белки* – переносчики различных нерастворимых в воде веществ с током крови, например, гемоглобин осуществляет перенос кислорода, альбумин перенос липидов; 2) *мембранные белки* – *переносчики простых веществ и ионов (ионные каналы)* осуществляют перенос через клеточные мембраны.

7. Белки биоэнергетической системы осуществляют преобразование и утилизацию энергии, поступающей в организм с пищей, а также энергии солнечного излучения, например цитохромы, родопсин.

8. Иммуноглобулины отвечают за иммунитет и обеспечивают защиту высших организмов от действия болезнетворных факторов.

9. Белки системы свертывания крови, например тромбин, фибрин.

10. Пищевые и запасные белки обеспечивают развитие и функционирование организмов, например казеин, проламины.

1.2.2.3.3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Физико-химические свойства белков определяются их высокомолекулярной природой, компактностью укладки полипептидных цепей и взаимным расположением остатков аминокислот. Молекулярная масса белков варьирует от $5 \cdot 10^3$ Да до 10^6 Да. Максимум поглощения белков в УФ-области спектра, обусловленный наличием ароматических аминокислот, находится вблизи 280 нм. Максимум поглощения, обусловленный наличием атома азота пептидной группы, лежит в зоне 185-240 нм. В ИК-спектрах белков наблюдаются полосы поглощения около 1600 и в зоне 3100-3300 см^{-1} .

В растворах белки амфотерны. Изоэлектрические точки белков могут иметь значения от $<1,0$ (у пепсина) до 10,6 (у цитохрома с) и выше.

Боковые группы аминокислотных остатков способны вступать во многие реакции, характерные для аминокислот. Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или химических группировок. К важнейшим из них относятся *биуретовая реакция* (пептидная связь), *ксантопротеиновая реакция* (ароматические ядра остатков тирозина, триптофана, фенилаланина), *Миллона реакция* и *Фолина-Чиокалтеу реакция* (фенольный радикал тирозина), *Паули реакция* (имидазольное кольцо гистидина), *Сакагучи реакция* (гуанидиновая группа аргинина) и *нингидриновая реакция* (аминогруппа). Сущность всех этих реакций рассмотрена в разделе «Химические свойства аминокислот».

Следует заметить, что реакция с сульфатом меди, характерная как для белков, так и для α -аминокислот, дает разные проявления: белки дают

с биуретовым реактивом фиолетовое окрашивание, а α -аминокислоты – синее. Это различие в окраске комплексов обусловлено различием в их строении. Медные комплексы с аминокислотами имеют хелатное строение. Медные комплексы с белками образуются путем замены атома водорода, образующего водородную связь между пептидными фрагментами.

1.2.2.3.4. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Первым этапом выделения белков является получение соответствующих органелл (рибосом, митохондрий, ядер, цитоплазматических мембран), что осуществляется с помощью дифференциального центрифугирования. Далее белки переводят в раствор путем экстракции буферными растворами солей и детергентов, иногда – 70-80%-ным спиртом. Затем осуществляют фракционное осаждение белков неорганическими солями (обычно $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), этанолом, ацетоном или путем изменения pH, ионной силы, температуры раствора. Для предотвращения денатурации работу проводят при пониженной температуре (обычно около 4°C). С целью исключения протеолиза используют ингибиторы протеаз. Иногда белки стабилизируют многоатомными спиртами, например глицерином, сахарозой и др. Дальнейшую очистку выделенных продуктов проводят по схемам, специально разработанным для отдельных белков.

Наиболее распространенными методами разделения являются гель-хроматография, ионообменная и адсорбционная хроматография. Наиболее эффективными методами разделения в настоящее время являются жидкостная хроматография высокого давления и аффинная хроматография.

Критерием чистоты белка является гомогенность при электрофорезе, хроматографии и ультрацентрифугировании.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ, ЗАДАЧИ И УПРАЖНЕНИЯ

1. Сколько оптических изомеров имеет треонин? Напишите их проекционные формулы и назовите их по R,S системе.
2. Назовите L-аланин по R,S системе.

3. Обладает ли оптической активностью природный цистин?
4. Известно, что удельное вращение α -аминокислот в кислой среде с течением времени изменяется. Как вы это объясните?
5. Удельное вращение аминокислот зависит от pH среды. Как это можно объяснить?
6. Почему температура плавления не дает достоверной информации ни о природе, ни о чистоте аминокислоты?
7. УФ-спектры глицина и аланина практически одинаковы, а УФ-спектр фенилаланина существенно отличается от их спектров. Как это объясняется?
8. Можно ли методом ПМР-спектроскопии отличить глицин от аланина? Поясните, в чем будет заключаться отличие.
9. Изолейцин и фенилаланин, которые имеют практически одинаковые температуры плавления, можно различить спектральными методами. Укажите отличительные признаки этих аминокислот (характеристические частоты, максимум поглощения, химические сдвиги, мультиплетность сигналов), по которым они отличаются в ИК-, УФ- и ПМР-спектрах.
10. Какая из аминокислот проявляет более кислые свойства – глутаминовая кислота или глутамин?
11. Какая из аминокислот проявляет более основные свойства – лизин или лейцин?
12. Определить изоэлектрическую точку аланина, если известно: pK_a аланина = 2,35; 9,87.
13. Определить, при каком значении pH растворимость аспарагина в воде минимальна, если pK_a аспарагина = 2,14; 8,72.
14. Можно ли глутамин и глутаминовую кислоту определять алкалиметрически в водной среде?
15. В пробирки, содержащие равные объемы формалина и 1%-ного раствора глицина, добавляют по 1 капле раствора индикатора метилового красного – оба раствора приобретают одинаковую желтую окраску. Затем растворы смешивают – окраска смеси становится красной. Объясните полученный результат.
16. Можно ли аминокислоты разделить методом гель-фильтрации?
17. Какие методы и реакции лежат в основе работы аминокислотного анализатора?
18. Что представляет собой ДЭАЭ-целлюлоза и для чего она используется?
19. В одной из двух пробирок находится раствор глутаминовой кислоты, в другой – пролина. В обе пробирки добавили уксусную кислоту и затем рас-

твор нитрита натрия. Что при этом будет наблюдаться? Можно с помощью этой пробы отличить пролин от глутаминовой кислоты?

20. Можно ли с помощью реактивов (меди сульфат и натрия гидроксид) отличить раствор аминокислот от раствора белка?
21. Как с помощью реактивов (азотная кислота и едкий натр) отличить тирозин от фенилаланина?
22. Можно ли с помощью реакции Фоля отличить цистеин от метионина?
23. Есть ли химические методы, позволяющие отличить цистеин от цистина?
24. С помощью каких реакций можно доказать наличие в глутатионе остатка глутаминовой кислоты?
25. Какое значение pH у водного раствора глутатиона – больше или меньше 7?
26. Реактив Эрлиха реагирует со всеми первичными алифатическими и ароматическими аминами, в том числе и со всеми аминокислотами, давая обычно желтые или оранжевые окраски; только с триптофаном он дает яркое пурпурно-синее окрашивание. Предложите химическую интерпретацию этой реакции.
27. Реактив Паули для открытия гистидина используют свежеприготовленный и охлажденный. С чем это связано?
28. Дает ли триптофан положительную реакцию с реактивом Паули?
29. В реакции Сакагучи в качестве реагента используются α -нафтол и гипобромид натрия. Можно ли вместо α -нафтола использовать β -нафтол, или 8-оксихинолин, а вместо гипобромида – гипохлорид?
30. На каких свойствах тирозина основана реакция его открытия с помощью реактива Фолина-Чиокалтеу?
31. Объясните, почему торсионный угол ω в большинстве полипептидов равен 180° или близок к нему, в то время как торсионные углы ψ и ϕ могут изменяться в широком диапазоне.
32. Почему правая α -спираль энергетически более выгодна, чем левая α -спираль, ведь они являются зеркальным отражением друг друга?
33. Какие процессы происходят при денатурации белков?
34. Почему необратимо денатурированные белки не растворяются в воде?
35. Что понимается под обратимой денатурацией и как она используется для выделения белков?
36. При ферментативном гидролизе неизвестного тетрапептида в продуктах его гидролиза были обнаружены 3 дипептида: Ala-Phe, Met-Ala и Phe-Gly. Определите первичную структуру тетрапептида.

37. Навеску полипептида 0,384 г оттитровали 0,1М раствором едкого натра в водно-спиртовой среде. На титрование пошло 10,55 мл титранта. Молекулярная масса полипептида – 1820 Да. Определить количество свободных карбоксильных групп в молекуле полипептида.
38. Какие методы количественного анализа белков известны? Дайте их сравнительную характеристику.
39. Что понимают под термином глюкогенные аминокислоты?
40. Какие белки называют неполноценными? Какие пути повышения пищевой ценности белковых продуктов вам известны?

2. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

2.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

2.1.1. ОБЩИЕ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Термины «общие качественные реакции» и «специфические качественные реакции» приемлемы в отношении аминокислот. Общие реакции характерны для всех аминокислот, а специфические – только для отдельных. В то же время специфические реакции для аминокислот являются общими для многих, хотя и не для всех белков, потому что в их состав входит широкий круг аминокислот. Например, все белки, содержащие тирозин, можно определить специфической реакцией Фолина-Чиокалтеу на тирозин. Большинство белков содержит аминокислоты с ароматическими ядрами, поэтому практически все белки будут давать положительную ксантопротеиновую реакцию. В то же время общие реакции на белок являются специфическими в отношении других классов природных веществ – липидов, углеводов и т.д.

Опыт 1. Реакция с азотистой кислотой. В две пробирки помещают по 1 мл 1%-ных растворов глицина и альбумина. В каждую пробирку добавляют по 1 мл 5%-ного раствора нитрита натрия, затем по 0,5 мл уксусной кислоты и осторожно встряхивают. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнение реакции глицина с нитритом натрия и уксусной кислотой.
2. В основе какого метода количественного анализа аминокислот лежит эта реакция? Можно ли этот метод использовать для анализа белка?
3. Реагирует ли нитрит натрия с уксусной кислотой с выделением газа? Можно ли вместо уксусной кислоты использовать HCl или H_2SO_4 ?
4. Почему при действии нитрита натрия и уксусной кислоты на раствор белка той же концентрации, что и раствор аминокислоты, газовыделение гораздо меньше?

Опыт 2. Биуретовая реакция. В две пробирки помещают по 1 мл 1%-ных растворов глицина и альбумина. В каждую пробирку добавляют по 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и по стенке добавляют 4-5 капель 2%-ного раствора сульфата меди. В пробирке с аминокислотой появляется синее окрашивание, а с белком – фиолетовое. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций глицина и биурета с сульфатом меди в щелочной среде.
2. В основе каких методов количественного анализа аминокислот и белков лежит биуретовая реакция?
3. Реагирует ли сульфат меди с едким натром в отсутствие аминокислоты или белка? Какое проявление при этом наблюдается?
4. Почему белки дают более глубокое окрашивание, чем аминокислоты, при реакции с солями меди?
5. Дают ли пептиды такое же окрашивание, что и белки?
6. Какова роль едкого натра в этой реакции? Реагируют ли аминокислоты и белки с CuSO_4 , CuCO_3 без добавления едкого натра?

Опыт 3. Реакция с нингидрином. В три пробирки помещают по 1 мл 1%-ных растворов глицина, γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) и альбумина. В каждую пробирку добавляют 2 капли 1%-ного водного раствора нингидрина. Пробирки нагревают почти до кипения в течение 1-2 мин. Во всех пробирках появляется окрашивание, но не везде одинаковое. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций глицина и ГАМК с нингидрином.
2. В основе каких методов количественного анализа аминокислот и белков лежит реакция с нингидрином?

3. В чем заключается химическая сущность работы аминокислотного анализатора?
4. Появится ли окраска при проведении реакции нингидрина с глицином в кислой или щелочной среде?
5. При попадании раствора нингидрина на кожу через некоторое время появляются несмываемые сине-фиолетовые пятна. Как это объяснить?
6. Все ли аминокислоты дают с нингидрином сине-фиолетовое окрашивание?

Опыт 4. Реакция с формальдегидом. В две пробирки помещают по 2 мл 1%-ных водных растворов глицина и альбумина, в третью пробирку помещают 4 мл формалина. В каждую из пробирок добавляют по одной капле раствора индикатора метилового красного. Во все пробирках появится желтое окрашивание. Затем желтый раствор формалина из третьей пробирки разделите поровну и каждую половину добавьте к желтым растворам глицина и альбумина. В пробирке с глицином смесь окрасится в красный цвет. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнение реакции глицина с формальдегидом.
2. Какими кислотно-основными свойствами обладает продукт реакции глицина с формальдегидом?
3. Почему окраска в пробирке с раствором альбумина практически не изменилась?
4. Можно ли эту реакцию использовать для количественного определения аминокислот алкалимитрическим методом в водной среде?
5. Чему равна молярная масса эквивалента глутаминовой кислоты при определении её методом формольного титрования по Сёренсену?

2.1.2. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Опыт 5. Ксантопротеиновая реакция. В четыре пробирки помещают по 1 мл 1%-ных водных растворов глицина, фенилаланина и альбумина и 1%-ного раствора тирозина в 1М серной кислоте*. В каждую пробирку добавляют 4 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают на кипящей водяной бане 1-2 мин до

* Тирозин растворяют в 1М растворе серной кислоты, поскольку он мало растворим в воде (см. табл.1.3).

появления окрашивания. Охлаждают под струей водопроводной воды. Зарегистрируйте произошедшие на этом этапе изменения (появление окрашивания, осадка, отсутствие изменений). Сначала в пробирку с тирозином добавляют 10%-ный раствор едкого натра ~ 1,5 мл до изменения окраски. Затем такой же объем щелочи добавляют в остальные пробирки. Зарегистрируйте произошедшие изменения и объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций тирозина и фенилаланина с азотной кислотой.
2. Напишите уравнение реакции нитротирозина с едким натром.
3. Будет ли ксантопротеиновая реакция положительной для таких пептидов, как глутатион и ангиотензин I?
4. Какие природные соединения мешают определению белка этим методом?
5. Почему при попадании азотной кислоты на кожу на ней появляются несмываемые желтые пятна?
6. Можно ли с помощью этого метода отличить фенилаланин от тирозина и тирозин от триптофана?

Опыт 6. Реакция Миллона. В три пробирки помещают по 1 мл 1%-ных водных растворов фенилаланина и альбумина и 0,05%-ного водного раствора тирозина. В каждую пробирку добавляют по 3 капли реактива Миллона и смесь медленно нагревают до начинающегося кипения. Охлаждают и через 10 мин регистрируют появившиеся изменения. Объясните наблюдаемые явления.

* Приготовление реактива Миллона. Растворяют 1 вес.ч. ртути в 2 вес. ч. Концентрированной азотной кислоты (ρ 1,42) сначала на холоду, затем при нагревании. Раствор разбавляют двукратным количеством воды и через несколько часов фильтруют.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций тирозина с компонентами реактива Миллона.
2. Можно ли с помощью этого метода отличить фенилаланин от тирозина?
3. Какие природные соединения мешают определению тирозина этим методом?
4. Предложите альтернативный способ приготовления реактива Миллона.

Опыт 7. Реакция с реактивом Эрлиха. В три пробирки помещают по 1 мл 1%-ных водных растворов глицина, триптофана и гидрохлорида анилина. В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 2%-

ного раствора *n*-диметиламинобензальдегида в 5%-ной хлористоводородной кислоте и выдерживают при комнатной температуре несколько минут или слегка нагревают теплой водой до появления окрасок. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций глицина и анилина с *n*-диметиламинобензальдегидом.
2. Предложите объяснение возникновения более глубокой окраски при взаимодействии реактива Эрлиха с триптофаном по сравнению с другими аминокислотами.
3. Можно ли эту реакцию использовать для открытия остатка триптофана в белке?

Опыт 8. Реакция Сакагучи. В четыре пробирки помещают по 1 мл 1%-ных водных растворов глицина, стрептомицина сульфата, аргинина и альбумина. В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл свежеприготовленного 0,2%-ного раствора α -нафтола в 10%-ном растворе едкого натра, перемешивают и затем добавляют 1 мл раствора гипобромида натрия*. В некоторых пробирках появляется оранжево-красное окрашивание. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнение реакции аргинина с α -нафтолом в присутствии едкого натра и гипобромида натрия.
2. Можно ли вместо α -нафтола в этой реакции использовать, например, 8-оксихинолин или другие фенолы?
3. Какая функциональная группа молекулы аргинина обуславливает реакцию Сакагучи?
4. Объясните, почему стрептомицина сульфат, не являющийся аминокислотой, дает положительную реакцию Сакагучи, а аминокислота глицин – нет.
5. Можно ли в реакции Сакагучи использовать другие окислители вместо гипобромида, и если можно, то какие?

Опыт 9. Реакция с нитропруссидом натрия. В две пробирки помещают по 10-20 мг цистина и цистеина и по 1 мл 1М раствора едкого натра, а в третью – 1 мл 1%-ного водного раствора альбумина. В

* Приготовление раствора гипобромида натрия. 15 г гидроксида натрия растворяют в 50 мл воды, охлаждают и добавляют 1 мл брома (работу проводить под тягой). Раствор при хранении в темной склянке пригоден в течение 3 месяцев.

каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора нитропруссид натрия^{**}, перемешивают и наблюдают появление окрасок. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнение реакции цистеина с нитропруssidом натрия.
2. В связи с чем для создания щелочной среды в этой реакции используется аммиак, а не раствор едкого натра?
3. Можно ли с помощью этой реакции установить, в какой форме находится глутатион – окисленной или восстановленной?
4. Будет ли положительной нитропруссидная реакция на метионин и цистин, если их щелочные растворы предварительно прокипятить?
5. Какие вещества мешают определению цистеина с помощью этой реакции?

Опыт 10. Реакция Фоля. В пробирку помещают 0,5 мл 5%-ного раствора ацетата свинца и по каплям прибавляют 30%-ный раствор гидроксида натрия до растворения первоначально образующегося осадка. Затем к полученному раствору добавляют 0,5 мл исследуемого раствора белка с концентрацией 1-10 мг/мл и кипятят 1-2 мин. Появляется темное окрашивание или осадок. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Остатки каких аминокислот в молекуле белка обуславливают положительную реакцию Фоля?
2. Напишите уравнения реакций, происходящих при открытии белка по методу Фоля.
3. Можно ли в этой реакции использовать аммиак вместо едкого натра?
4. Можно ли с помощью реакции Фоля отличить цистеин от цистина и метионина?

Опыт 11. Реакция Паули. В две пробирки помещают по 1 мл 1%-ных водных растворов гистидина и альбумина и добавляют в каждую по 1 мл 1М раствора едкого натра. Затем в пробирки добавляют по 0,5 мл

^{**} Приготовление раствора нитропруссид натрия. 1,5 г нитропруссид натрия добавляют к 5 мл 1М серной кислоты, перемешивают и затем добавляют 95 мл воды (лучше использовать метанол) и 10 мл концентрированного раствора. Раствор фильтруют и хранят в закрытой темной склянке.

свежеприготовленного реактива Паули* и перемешивают. Сразу же появляется красная окраска. Объясните наблюдаемые явления.

* Приготовление раствора Паули. Готовят 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты в 1М HCl и 5%-ный водный раствор нитрита натрия и выдерживают их в холодильнике. Равные объёмы этих растворов смешивают непосредственно перед применением (смешанный раствор – реактив Паули – годен лишь несколько часов даже при хранении в холодильнике).

Контрольные вопросы

1. Какое действующее вещество реактива Паули?
2. Реактив Паули нестойк. Что с ним происходит при хранении?
3. Напишите уравнение реакции гистидина с реактивом Паули.
4. На наличие остатков каких аминокислот в молекуле белка указывает положительная реакция Паули?
5. Дает ли тирозин положительную реакцию Паули?
6. Мешают ли определению гистидина катехоламины, например адреналин?
7. Можно ли с помощью реакции Паули отличить гистидин от гистамина?

Опыт 12. Реакция с резорцином на глютаминовую кислоту и глютамин. В небольшую фарфоровую чашечку помещают 10-15 мг глютаминовой кислоты (если исследуется раствор, то его упаривают в этой же чашечке) и 10-15 мг резорцина. К смеси добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты и, перемешивая стеклянной палочкой, осторожно нагревают до образования плава красного цвета (под тягой). Охлаждают и подщелачивают раствором аммиака. Плав растворяется, и раствор приобретает красно-фиолетовую окраску. Объясните наблюдаемые явления.

Контрольные вопросы

1. Напишите уравнения реакций, происходящих при сплавлении глютаминовой кислоты с резорцином в присутствии серной кислоты.
2. Почему при подщелачивании плава происходит углубление окраски? Можно ли вместо аммиака использовать для подщелачивания раствор едкого натра?
3. Дают ли такую же реакцию близкие по строению к глютаминовой кислоте и глютамину аспарагиновая кислота и аспарагин?

4. Можно ли с помощью этой реакции открыть глутаминовую кислоту, входящую в состав белка?
5. При нагревании α -аминокислот они образуют дикетопиперазины. А что происходит при нагревании глутаминовой кислоты?

2.1.3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Хроматография – один из современных методов разделения, очистки, выделения и идентификации аминокислот, пептидов и белков. Метод основан на различном распределении веществ между двумя фазами: неподвижной, которая может быть твердой или жидкой, и подвижной фазой – потоком жидкости или газа, несущим анализируемую смесь веществ. Хроматографические методы классифицируются по характеру взаимодействий, лежащих в основе разделения, по агрегатному состоянию фаз, по технике выполнения анализа и аппаратурному оформлению.

По принципу разделения хроматографические методы делятся на *адсорбционные, распределительные, ионообменные и гелефильтрацию*.

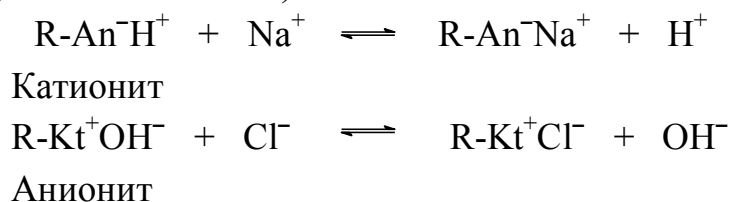
В основе адсорбционных методов лежит явление адсорбции на поверхности твердых тел, и поэтому основными параметрами, определяющими эффективность разделения веществ, являются *коэффициент адсорбции* и в меньшей степени растворимость в подвижной фазе. В распределительных методах хроматографии фактором, определяющим эффективность разделения, является *константа распределения* вещества между фазами; в ионообменных – константа диссоциации вещества, заряд молекулы и ее ионный диаметр; в гелефильтрации – *эффективный диаметр молекулы*.

По агрегатному состоянию фаз, технике анализа и его аппаратурному оформлению различают *адсорбционную газовую, газожидкостную (ГЖГ), высокоэффективную жидкостную (ВЭЖХ), бумажную (БХ), тонкослойную (ТСХ), колоночную* и другие виды хроматографии.

В анализе аминокислот и полипептидов, включая белки, наибольшее распространение получили методы БХ, ТСХ, ВЭЖХ и гелефильтрации. Для анализа аминокислот и низкомолекулярных пептидов широко применяются БХ и ТСХ на стандартных пластинках «Silufol»,

вследствие достаточно высокой эффективности разделения, простоты аппаратного оформления и анализа. Из приборных методов анализа аминокислот основным является метод ионообменной хроматографии, лежащий в основе работы аминокислотного анализатора. Для анализа белков и крупных пептидов широко используется гель-фильтрация.

Ионообменная хроматография. Основу этого метода составляет ионное взаимодействие между веществом и неподвижной фазой. В качестве неподвижной фазы используются ионообменные смолы, нерастворимые в воде и органических растворителях. В зависимости от того, с какими ионами взаимодействует ионообменная смола, различают катиониты (взаимодействуют с катионами) и аниониты (взаимодействуют с анионами):

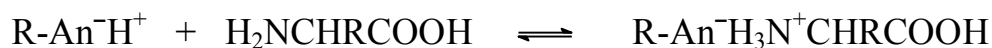


Разделение веществ происходит потому, что константы равновесия в указанных процессах для разных веществ разные.

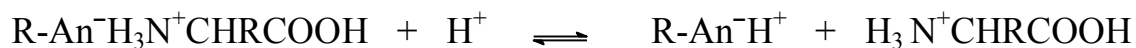
Наиболее распространенными ионизированными группами катионитов являются сульфо- и карбоксильная группы. Аниониты в качестве ионизированной группы содержат первичную, вторичную, третичную или четвертичную аммонийные группы. Полимерным каркасом ионитов часто служат «сшитые» сополимеры стирола и дивинилбензола. В биохимической практике широко используются иониты на основе простых эфиров целлюлозы – карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза), в которых ионогенными группами являются $-\text{CH}_2\text{COOH}$ и $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^+\text{OH}^-$ группы соответственно.

Этот метод осуществляется обычно в колоночном варианте. Он прочно вошел в арсенал аналитических методов биохимии. Типичным примером использования метода является разделение сложных смесей аминокислот, получаемых в результате гидролиза белков, на катионитах. Аминокислоты, связанные с катионитом, элюируют (вымывают из колонки) хлористоводородной кислотой. При этом аминокис-

кислоты выходят из колонки в определенной последовательности в зависимости от их кислотно-основных свойств:



связывание аминокислоты с катионитом



элюирование аминокислоты

На этом принципе основана работа автоматического аминокислотного анализатора. Элюирование в этом приборе осуществляется растворами с изменяющимся по определенной программе значением pH, что позволяет разделить смеси всех белковых аминокислот на одной колонке за один раз.

На рис. 2.1 приведена хроматограмма продуктов гидролиза рибонуклеазы, полученная на аминокислотном анализаторе.



Р и с.2.1. Хроматограмма продуктов гидролиза рибонуклеазы

Гель-хроматография (гель-фильтрация). Этот метод применяется главным образом в химии природных соединений и биохимических исследованиях. Он основан на диффузионных свойствах гелей, образуемых некоторыми полимерами – декстранами или полиакриламидом (сефадексы и биогели). При пропускании через слой геля смеси веществ с различной молекулярной массой, следовательно, различающихся по размеру молекул, более мелкие молекулы проникают в гранулы геля, а более крупные свободно проходят с растворителем мимо гранул. В результате первыми элюируются наиболее

крупные молекулы и далее – по мере уменьшения их размера. Поскольку размер пор в гранулах не может быть идеально стандартизирован, то удовлетворительные результаты этот метод дает только при разделении веществ, отличающихся по молекулярной массе не менее, чем на 300-400 единиц. Именно поэтому этот метод применяется для разделения крупных веществ, например полисахаридов, пептидов, белков, полинуклеотидов.

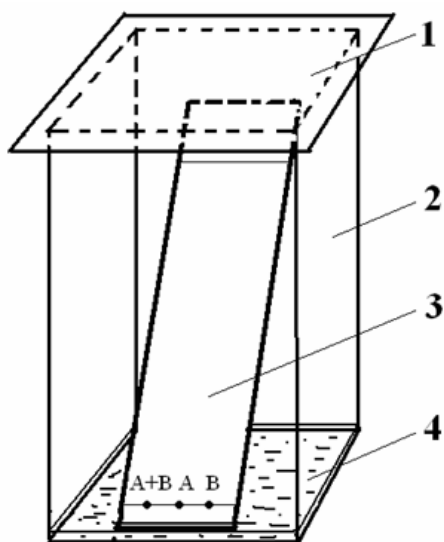
Тонкослойная хроматография (ТСХ). Этот метод относится к адсорбционным и является одним из самых быстрых, простых и доступных методов хроматографического анализа. Хроматографирование осуществляется на пластинке, равномерно покрытой слоем адсорбента. Выпускаются готовые стандартные пластинки для тонкослойной хроматографии марки «Силуфол» из алюминиевой фольги, покрытой закрепленным слоем силикагеля.

Нанесение пробы. Анализируемую пробу раствора наносят с помощью микрокапилляра на пластинку на расстоянии 6-8 мм от ее края. Если проба представляет собой сухую смесь, то её растворяют полностью желательно в неполярном и легко испаряющемся растворителе. Если такого растворителя нет, растворяют в любом подходящем кроме растворов минеральных кислот и щелочей. В любом случае после нанесения пробы необходимо пластинку выдержать некоторое время до полного испарения растворителя.

Для получения качественных хроматограмм с выраженными пятнами необходимо соблюдать ряд правил: размер пятна в диаметре не должен превышать 2-3 мм; количество вещества в пятне не должно быть слишком большим (обычно для анализа достаточно 1-20 мкг). При несоблюдении этих правил получаются слишком большие вытянутые в длину пятна (пятна с «хвостами»), и вещества с близкими значениями R_f сольются в одно пятно. Именно поэтому для нанесения пятен используют микрокапилляры, которые можно сделать самостоятельно из капилляров для определения температуры плавления на спиртовке. Ширина и высота хроматографической пластинки, которую необходимо отрезать от продажной пластинки, выбираются с

учетом поставленной задачи. Например, если на пластинку необходимо нанести сразу три пятна, то ширина пластинки должна составлять 20-25 мм, а если одно – 10-12 мм.

Высота пластинки для анализа смесей, содержащих не более 3 компонентов, достаточна 7-8 см. Линию старта и линию финиша целесообразно отметить тонким твердым графитовым карандашом.



Р и с. 2.2. Хроматографическая камера:

- 1 – крышка; 2 – батарейный стакан;
- 3 – пластинка;
- 4 – элюент

Хроматографирование. Перед началом хроматографирования камера должна быть подготовлена (рис. 2.2). Большую часть стенок камеры обкладывают фильтровальной бумагой, оставляя свободную часть для наблюдения за пластинкой. Фильтровальную бумагу смачивают элюентом и наливают слой элюента высотой 3-4 мм. Камеру закрывают крышкой. Высушенную хроматографическую пластинку с нанесенными образцами аккуратно пинцетом помещают в хроматографическую камеру и закрывают ее пришлифованной крышкой. При помещении пластинки в камеру нанесенные пробы не

должны оказаться ниже уровня жидкости. Наблюдают за поднятием фронта растворителя и, когда он достигнет линии финиша, пластинку вынимают из камеры и подсушивают. В качестве элюентов для эффективного разделения аминокислот применяется ряд общепринятых систем (табл. 2.1).

Проявление хроматограмм. При хроматографировании бесцветных веществ их пятна необходимо обнаружить на хроматограмме. Это делается либо просмотром пластинки под ультрафиолетовой лампой, либо химическими методами. Самым общеупотребительным реагентом для проявления хроматограмм различных веществ является йод, который помещают в йодную камеру (обычно эксикатор). Пластинку помещают на 10 -20 с в йодную камеру, вынимают и карандашом отмечают быстро исчезающие коричневые пятна. Если йод

приемлем для проявления хроматограмм широкого круга веществ, то нингидрин применяют лишь для проявления пятен аминокислот и пептидов. Однако используется не водный раствор, а ацетоновый с концентрацией 0,25% (масс./об.), поскольку вода может смыть пятна. Пластинку лучше быстро окунуть в раствор, но можно и опрыскивать аккуратно под тягой, чтобы не попасть на руки. После этого пластинку нагревают при 100°C в течение 5 мин. Аминокислоты дают пурпурные пятна; гистидин и глицин – красно-серые; фенилаланин, тирозин и аспарагиновая кислота – синие; триптофан – коричневые; аспарагин – грязно-желтые; пролин – желтые. Чувствительность метода варьирует в диапазоне от 0,2 мкг для глицина до 2 мкг для гистидина.

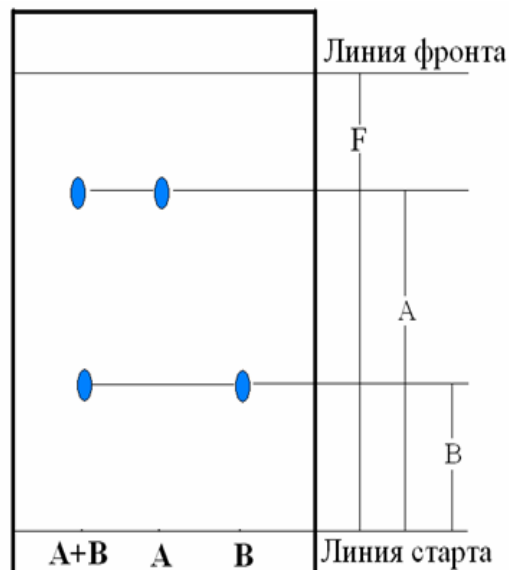
Таблица 2.1

R_F для аминокислот при разделении методом хроматографии на бумаге

L-Аминокислота	R _F	
	н-Бутанол – 12 Уксусная кислота – 3 Вода – 5	н-Бутанол – 1* пиридин – 1 вода – 1
Глицин	0,23	0,29
Аланин	0,30	0,37
Серин	0,22	0,33
Цистеин	0,08	0,14
Аспарагиновая к-та	0,23	0,20
Аспарагин	0,12	0,20
Фенилаланин	0,60	0,63
Тирозин	0,45	0,60
Триптофан	0,50	0,62
Гистидин	0,23	0,29
Валин	0,51	0,48
Треонин	0,26	0,36
Метионин	0,50	0,53
Глутаминовая к-та	0,28	0,20
Глутамин	0,17	0,23
Лейцин	0,70	0,60
Изолейцин	0,67	0,56
Аргинин	0,15	0,15
Лизин	0,12	0,13
Пролин	0,34	0,34

* Указаны объёмные части.

После проявления хроматограмм рассчитывают хроматографические константы R_F (от англ. ratio of fronts – отношение фронтов, рис. 2.3). При четком выполнении рекомендованных условий они могут применяться для идентификации.



Р и с. 2.3. Пластинка после проявления

R_F вещества А рассчитывают как отношение длины пробега от линии старта до центра пятна А к фронту растворителя, т.е. $R_{FA} = A/F$. Аналогично $R_F B = B/F$ (см. рис. 2.3). Полученные величины R_F сравнивают с табличными. Однако такая идентификация весьма ненадежна, поскольку R_F весьма переменна и зависит от многих факторов. Если исследуется препарат, в котором предполагается наличие определенных аминокислот, то на пластинку необходимо нанести свидетели, т.е. растворы предполагаемых веществ. Это увеличивает достоверность анализа.

Бумажная хроматография (БХ) широко применяется для анализа аминокислот и других полярных соединений: высших карбоновых кислот, высших спиртов, фенольных соединений и др. Носителем неподвижной фазы служит хроматографическая бумага – особый тип фильтровальной бумаги высокой чистоты и равномерной плотности. В зависимости от плотности бумага подразделяется на медленную, среднюю и быструю.

Неподвижной фазой, если бумага специально не обработана, является вода, находящаяся в порах целлюлозы (около 14-20% в воздушно-сухой целлюлозе). По технике выполнения нет принципиального отличия от ТСХ, если фронт растворителя движется снизу вверх (восходящая БХ). Однако лист бумаги не прислоняют к стенке камеры как пластинку, а всегда подвешивают в хроматографической камере вертикально. Для этого по диаметру стакана натягивают и приклеивают к наружным стенкам камеры тонкую нитку. Длина бумажной полоски равна расстоянию

от дна стакана до верхнего края плюс еще 1 см. На бумаге делают сгиб и за этот сгиб подвешивают ее на нить так, чтобы ее нижний конец лишь касался дна, и закрывают крышку.

Опыт 13. Идентификация аминокислот методом ТСХ и БХ. На бумажную полоску наносят пятно исследуемого раствора аминокислоты, как описано выше, высушивают и хроматографируют в одной из систем, приведенных в табл. 2.1. Бумагу высушивают, смачивают 0,25%-ным раствором нингидрина в ацетоне и после испарения ацетона нагревают 5 мин в сушильном шкафу при 100°C. Вычисляют R_F и, сопоставляя его с данными табл. 2.1, делают заключение о подлинности препарата.

**ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ
АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ ХИМИЧЕСКИМИ
И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

Задание. Каждый студент получает 10 мл раствора, содержащего неизвестное количество неизвестных аминокислот. Раствор может также содержать белок.

Цель работы – определить, какие аминокислоты содержатся в исследуемом растворе и есть ли в нем белок.

Алгоритм выполнения:

1. Установить, есть ли в растворе белок.
2. Если есть белок, удалить его, а оставшийся раствор продолжать исследовать.
3. Хроматографировать исследуемый раствор на бумаге в любой из систем, приведенных в табл. 2.1.
4. Сделать предварительное заключение о наличии возможных аминокислот, отбросив явно неподходящие.
5. Провести специфические реакции на предполагаемые аминокислоты
6. Если химическими методами будут обнаружены какие-либо аминокислоты, провести БХ с использованием свидетелей.
7. Если не все ингредиенты раствора после этого будут идентифицированы, провести БХ и ТСХ в двух системах с использованием свидетелей.
8. Все этапы работы запротоколировать и сделать мотивированное заключение.

2.2. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

2.2.1. ТИТРИМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ

Как видно из данных табл. 1.4, аминокислоты нельзя титровать ни кислотами, ни щелочами в водной среде, однако их можно определять методами неводного титрования – титрованием хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты или титрованием этилатом натрия в диметилформамиде. Эти методы приемлемы лишь для анализа сухих образцов и непригодны для определения аминокислот в водных растворах, поэтому их применение в биохимии не представляет интереса. Из всех протеиногенных аминокислот лишь аспарагиновую и глутаминовую аминокислоты можно определять алкалиметрически в водной среде, поскольку их кислые свойства выражены достаточно сильно за счет наличия в их молекулах двух карбоксильных групп.

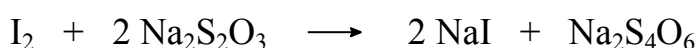
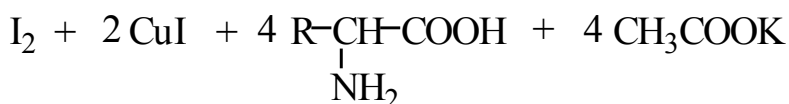
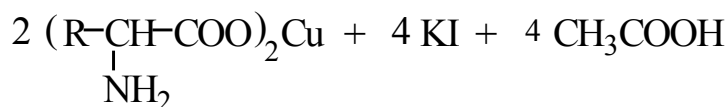
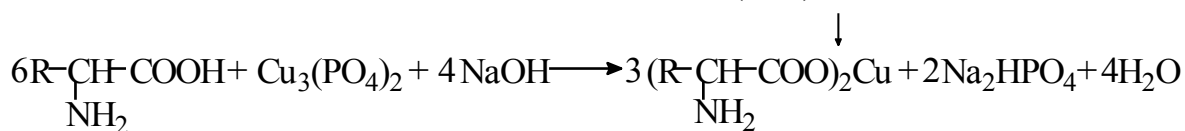
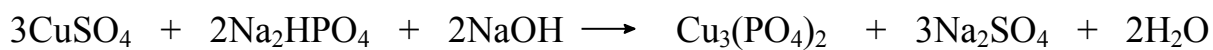
Тем не менее есть два общих метода алкалиметрического титрования, которые позволяют проводить анализ водных растворов любых аминокислот.

Первый метод разработан еще в 20-х гг. прошлого века биохимиком Сёренсеном в период его работы в Баварской пивной компании, когда перед ним встала задача определения аминокислот в пиве. Сущность метода рассмотрена ранее.

Второй метод заключается в титровании водного раствора аминокислоты, разбавленного в 10 раз 96%-ным этиловым спиртом, 0,1М водным раствором КОН с индикатором тимолфталейном. По этому методу определяют содержание карбоксильных групп в небольших полипептидах, которые не осаждаются спиртом, и в белковых гидролизатах, предварительно обработанных катионитами.

Еще одним общим методом титриметрического анализа аминокислот является йодометрический метод, который приемлем для анализа кислых белковых гидролизатов. Метод основан на следующих реакциях и операциях:

Сначала получают суспензию ортофосфата меди и обрабатывают этой суспензией, взятой в избытке, в присутствии боратного буфера исследуемый раствор аминокислоты.



При этом образуется растворимая комплексная медная соль аминокислоты, которую отфильтровывают от избытка ортофосфата меди. Аликвотную часть фильтрата обрабатывают избытком йодида калия в присутствии уксусной кислоты и выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом натрия. Молярная масса эквивалента аминокислоты равна двум молекулярным массам аминокислоты ($\text{Э}_{\text{аминокислоты}} = 2\text{M}_{\text{аминокислоты}}$), соответственно эквивалент аминокислотного азота равен двум его атомным массам ($\text{Э}_\text{N} = 2\text{A}_\text{N} = 28,01$). Следует отметить, что этим методом определяется не любой азот, а только α -аминокислотный.

Опыт 14. Определение аминокислот методом формольного титрования. К раствору, содержащему около 1 мэкв аминокислоты, добавляют равный объем предварительно нейтрализованного по фенолфталеину формалина* и титруют 0,1М раствором NaOH до появления розоватого окрашивания.

* К 100 мл формалина (~ 38%-ный водный раствор формальдегида) добавляют 8-10 капель раствора фенолфталеина и прикапывают 0,1М раствор NaOH до появления розоватого окрашивания (этот объем щелочи замерять не надо).

1 мл 0,1М раствора NaOH соответствует 0,001401 г аминокислотного азота или 0,1мэкв г аминокислоты.

Контрольные вопросы

1. Какую массу имеет 1 мэкв глутаминовой кислоты в этом методе?

2. Какую массу имеет 1 мэкв аланина в этом методе?
3. Почему кислые белковые гидролизаты нельзя анализировать этим методом?
4. В какой форме должен находиться катионит, чтобы его можно было использовать для удаления минеральных кислот из кислых белковых гидролизатов?

Опыт 15. Определение карбоксильных групп методом титрования в этиловом спирте. К 5 мл водного раствора гидролизата белка, содержащего около 1 мэкв карбоксильных групп, добавляют 50 мл 96%-ного этилового спирта, предварительно нейтрализованного по тимолфталейну*, и титруют 0,1М раствором КОН до появления синего окрашивания.

* К 100 мл 96%-ного этилового спирта добавляют 8-10 капель раствора тимолфталейна и прикапывают 0,1М раствор КОН до появления синего окрашивания (этот объем щелочи замерять не надо).

1 мл 0,1М раствора КОН соответствует 0,004502 г карбоксильных групп.

Если известна молекулярная масса полипептида или аминокислоты, то можно определить число карбоксильных групп, содержащихся в молекуле, по формуле

$$N = M \cdot V / A \cdot 10000,$$

где N – число карбоксильных групп в молекуле;

V – объем 0,1М раствора КОН, пошедший на титрование, мл;

A – сухая навеска полипептида или аминокислоты, г;

M – молекулярная масса полипептида или аминокислоты, Да;

10^4 – пересчетный коэффициент для 0,1М раствора КОН.

Примечание. Метод неприемлем для анализа кислых белковых гидролизатов.

Контрольные вопросы

1. Сколько мл 0,1М раствора КОН пойдет на титрование 0,147 г глутаминовой кислоты в этом методе?
2. Какую массу имеет 1 мэкв аланина в этом методе?
3. Как определяется пересчетный коэффициент в вышеприведенной формуле? Рассчитайте его для 0,02М раствора КОН.

Опыт 16. Определение аминокислотного азота в кислых белковых гидролизатах йодометрическим методом. 2 мл кислого гид-

ролизата белка, содержащего около 1% суммы аминокислот, помещают в мерную колбу емкостью 25 мл, добавляют 1 каплю раствора тимолфталейна и по каплям добавляют 1М раствор NaOH до появления голубоватого окрашивания. Затем в колбу добавляют 10 мл суспензии ортофосфата меди*, тщательно перемешивают в течение 2 мин и доводят до метки водой. Полученную суспензию фильтруют через плотный фильтр. Первые 5-6 мл фильтрата отбрасывают. 10 мл фильтрата помещают в колбу для титрования, добавляют 2 мл 10% (масс./об.) раствора KI и 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, перемешивают и титруют выделившийся йод 0,02М раствором тиосульфата натрия до слабой окраски йода, добавляют 4 капли раствора крахмала и продолжают титрование до исчезновения синего окрашивания.

* Приготовление суспензии ортофосфата меди. Предварительно готовят 3 раствора.

1. Раствор А – 50,0 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 1 л воды.
2. Раствор Б – 64,3 г Na_2HPO_4 и 7,2 г NaOH растворяют в 1 л воды.
3. Раствор В – 28,6 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 800 мл воды, добавляют 50 мл 1М раствора HCl и доводят до 1 л водой.

Суспензия ортофосфата меди – к 100 мл раствора Б добавляют порциями при перемешивании 50 мл раствора А и затем добавляют 100 мл раствора В. Перед употреблением суспензии её тщательно взбалтывают и отбирают на анализ цилиндром. Срок годности 1 день.

1 мл 0,02М раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,5602 мг аминокислотного азота.

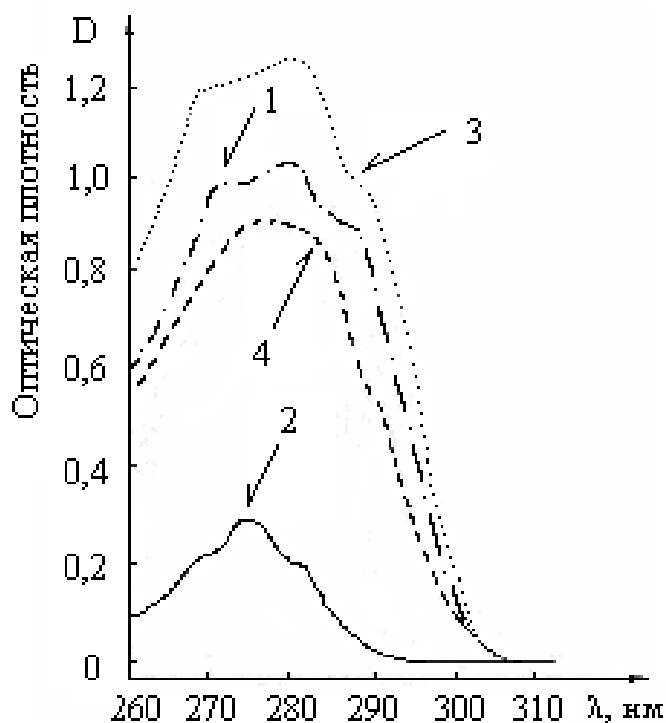
Контрольные вопросы

1. Опираясь на реакции, лежащие в основе метода, рассчитайте титр аминокислотного азота по 0,02М раствору $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.
2. Приведите формулу для расчета содержания аминокислотного азота в размерности мг/100 мл с учетом приведенной выше методики.
3. Суспензия ортофосфата меди должна для анализа браться в избытке. Проверьте, действительно ли это так.
4. Можно ли в этом методе использовать вместо сульфата меди хлорид меди ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и, если да, то сколько граммов его надо взять для приготовления раствора А?

5. Зная содержание аминокислотного азота, можно рассчитать, сколько белка подверглось полному гидролизу, и определить содержание суммы аминокислот, образовавшихся при этом. Рассчитайте необходимые для этого пересчетные коэффициенты, если известно, что все белки, согласно Г.Мульдеру (1836 г.), содержат общий гипотетический радикал – «протеин», имеющий эмпирическую формулу $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$.

2.2.2. СПЕКТРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

Для количественного определения белка в водных растворах широко используются методы УФ-спектроскопии, спектроскопии в видимой области и фотоэлектроколориметрии.



Р и с. 2.4. УФ-спектры некоторых белков:

1 – лизоцим, 2 – рибонуклеаза; 3 – химотрипсиноген; 4 – трипсиноген $C-2,5 \cdot 10^{-5} M$, рН 6,5 (фосфатный буфер)

Количественный анализ белков в ближней УФ-области электронного спектра заключается в измерении собственного поглощения. Типичные УФ-спектры белков в ближней (кварцевой) области (200-350 нм) представлены на рис. 2.4. Максимум поглощения вблизи 280 нм обусловлен наличием в их структуре остатков ароматических аминокислот (Phe, Tyr, Trp, His). Резкое увеличение поглощения в направлении от 240 нм к 200 нм с максимумом в вакуумной области около 180 нм (на рисунке не показано) обусловлено возбуждением электронов атома азота пептидной группы ($n \rightarrow \pi^*$ переход).

Поглощение в УФ-области количественно описывается законом Бера – Ламберта – Бугера:

$$D = -\lg I/I_0 = \varepsilon LC,$$

где D – оптическая плотность; I – интенсивность света, прошедшего через образец; I_0 – интенсивность падающего на образец света; ε – молярный коэффициент поглощения, л/моль·см; L – толщина слоя, см; C – концентрация, моль/л. В том случае, если концентрация используется в размерности г/100 мл, коэффициент пропорциональности называется удельным коэффициентом поглощения и обозначается символом $E^{1\%}_{1\text{ см}}$.

Аналитической полосой при определении концентрации белка обычно является $\lambda_{280\text{ нм}}$, соответствующая максимуму поглощения. Исследуемый раствор готовят так, чтобы оптическая плотность фотометрируемого раствора лежала в зоне 0,1-1,0. Значения D_{280} для большинства белков при концентрации 1 мг/мл находятся в диапазоне 0,5-2,0, хотя известно также довольно много белков, для которых D_{280} не попадает в указанный диапазон. Молярный коэффициент поглощения тем больше, чем больше доля остатков аминокислот с ароматическими ядрами в молекуле белка. Для определения концентрации используются несколько методических приемов.

1. Расчет с использованием известного значения коэффициента поглощения:

$$C = D/\varepsilon \cdot L.$$

Это самый простой метод, однако применение его весьма ограничено по следующим причинам. Как видно из рис. 2.4, коэффициенты поглощения разных белков весьма отличаются друг от друга, иногда в несколько раз (сравни спектры рибонуклеазы и химотрипсина), поэтому рассматриваемый метод приемлем только для определения концентрации белка с известным значением ε в растворах, не содержащих других белков и аминокислот с ароматическими заместителями. Анализ раствора неизвестного белка или раствора, содержащего несколько белков, таким методом не возможен.

2. *Расчеты в методах с использованием стандартных образцов.* Использование стандартного образца исключает необходимость использования величины ε . Различают несколько методических подходов к определению концентрации с использованием стандартных об-

разцов: *метод стандартов, метод градуировочного графика и метод добавок.*

Метод стандартов состоит в измерении оптической плотности раствора стандартного белка ($D_{\text{ст.}}$) известной концентрации ($C_{\text{ст.}}$) и измерении оптической плотности ($D_{\text{ис.}}$) исследуемого раствора белка в кюветах одинаковой толщины. В этих условиях имеем

$$D_{\text{ис.}} = \varepsilon L C_{\text{ис.}}; \quad D_{\text{ст.}} = \varepsilon L C_{\text{ст.}}$$

Поделив одно уравнение на другое, после преобразования имеем

$$C_{\text{ис.}} = D_{\text{ис.}} \cdot C_{\text{ст.}} / D_{\text{ст.}}$$

Метод градуировочного графика состоит в измерении оптических плотностей серии стандартных растворов (обычно 5-6) известной концентрации и построении градуировочного графика в координатах «оптическая плотность – концентрация белка в исследуемом растворе». Этот метод удобен при серийных испытаниях.

Метод добавок заключается в измерении оптической плотности исследуемого раствора, к которому после этого добавляют известное количество стандартного образца белка и вновь измеряют оптическую плотность.

Очевидно, что $C_{\text{ис.}} = D_{\text{ис.}} \cdot C_{\text{ст.}} / D_{\text{ис.+ст.}} - D_{\text{ис.}}$

Итак, анализ возможностей определения концентрации белка в растворах путем измерения непосредственного поглощения белка при одной аналитической длине волны в УФ-области показывает, что он приемлем лишь для анализа растворов индивидуальных известных белков.

Лучшим методом определения концентрации белка по его непосредственному поглощению является метод Варбурга* и Кристиана, основанный на измерении оптической плотности при двух длинах

* Отто Генрих Варбург – немецкий биохимик. Основные работы посвящены изучению окислительно-восстановительных процессов в живой клетке преимущественно методами спектроскопии. Спектральным методом открыл дыхательные ферменты – цитохромы. Совместно со своим сотрудником Вальтером Кристианом открыл также дыхательный фермент желтого цвета – флавин. Нобелевская премия (1931 г.).

волн – 280 и 260 нм. При этом не требуется использование стандартного образца и знание значения коэффициента поглощения. Метод базируется на том, что отношение D_{280}/D_{260} для различных белков – величина маловариабельная и равна 1,75 (сравни с рис.2.4). Это позволяет определять общую концентрацию белка при анализе смесей белков.

Расчет при этом проводится по простой формуле

$$C_{\text{белка (мг/мл)}} = 1,55D_{280} - 0,76D_{260}.$$

Более того, метод позволяет определять белок в присутствии нуклеиновых кислот. При этом используются пересчетный множитель f (табл. 2.2). В этом случае расчет производится по формуле

$$C_{\text{белка (мг/мл)}} = D_{280} \cdot f.$$

Таблица 2.2

Множители f для вычисления концентрации белка

D_{280}/D_{260}	Содержание нуклеиновой кислоты*, %	f	D_{280}/D_{260}	Содержание нуклеиновой кислоты*, %	f
1,75	0	1,118	0,86	5,2	0,671
1,60	0,30	1,078	0,84	5,6	0,650
1,50	0,56	1,047	0,82	6,1	0,628
1,40	0,87	1,011	0,80	6,6	0,605
1,30	1,26	0,969	0,78	7,1	0,581
1,25	1,49	0,946	0,76	7,8	0,555
1,20	1,75	0,921	0,74	8,5	0,528
1,15	2,05	0,893	0,72	9,3	0,500
1,10	2,40	0,863	0,70	10,3	0,470
1,05	2,80	0,831	0,68	11,4	0,438
1,00	3,3	0,794	0,66	12,8	0,404
0,96	3,7	0,763	0,64	14,5	0,368
0,92	4,3	0,728	0,62	16,6	0,330
0,90	4,6	0,710	0,60	19,2	0,289
0,88	4,9	0,691			

* Содержание нуклеиновой кислоты относительно суммы концентраций белка и нуклеиновой кислоты.

Коэффициенты для расчета концентрации белка (1,55 и 0,76) и значения пересчетного множителя f получены путем измерения поглощения кристаллической дрожжевой енолазы (при концентрации 1 мг/мл – $D_{260} = 0,512$, $D_{280} = 0,894$) и очищенной дрожжевой нуклеиновой кислоты (при концентрации 1 мг/мл – $D_{260} = 22,1$, $D_{280} = 10,8$).

При этом по данным табл. 2.2 можно рассчитать не только значение множителя f , но и определить содержание нуклеиновой кислоты в исследуемом растворе.

Опыт 17. Количественное определение суммы белков в яичном белке и яичном желтке методом Варбурга и Кристиана. В предварительно взвешенную мерную колбу емкостью 100 мл помещают около 5 г яичного белка, предварительно отделенного от желтка, и взвешивают (по разности определяют точную навеску белка). Белок растворяют в 60-80 мл фосфатного буфера с pH 6,5 и доводят до метки водой. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят до метки водой. Полученный раствор помещают в кварцевую кювету толщиной 1 см и определяют оптическую плотность раствора при 260 нм и 280 нм. Вычисляют отношение D_{280}/D_{260} . По данным табл. 2.2 определяют значение множителя f и содержание нуклеиновой кислоты в белке.

В том случае, если нуклеиновая кислота отсутствует, расчет можно проводить по любой из приведенных выше формул. При наличии нуклеиновой кислоты расчет концентрации белка проводят по второй формуле.

Определив содержание белка в фотометрируемом растворе в размерности мг/мл, рассчитывают содержание нуклеиновой кислоты в той же размерности по формуле

$$C_{\text{нук. (мг/мл)}} = C_{\text{белка (мг/мл)}} \cdot C_{\text{нук, \%}} / 100 - C_{\text{нук, \%}},$$

где $C_{\text{нук. (мг/мл)}}$ – содержание нуклеиновой кислоты в фотометрируемом растворе, мг/мл; $C_{\text{нук, \%}}$ – содержание нуклеиновой кислоты, взятое из табл. 2.2, в % от общей массы белка и нуклеиновой кислоты.

Расчет концентрации белка и нуклеиновой кислоты в исходном материале (яичный белок) в размерности г/100 г проводят по однотипным формулам, учитывающим разведение исходного белка:

$$C_{г/100 г} = C_{мг/мл} \cdot V_{к1} \cdot V_{к2} \cdot 100 / V_{п} \cdot 1000 \cdot a = C_{мг/мл} \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 / 5 \cdot 1000 \cdot a = C_{мг/мл} \cdot 100 / a,$$

где a – навеска белка, г; $C_{мг/мл}$ – концентрация белка или нуклеиновой кислоты; $V_{к1}$ и $V_{к2}$ – объемы мерных колб, мл; $V_{п}$ – объем пипетки, мл; 1000 – множитель пересчета массы из мг в г; 100 – масса объекта, в которой содержится C г белка или нуклеиновой кислоты.

Определение белка в яичном желтке проводится аналогично.

Контрольные вопросы

1. Определите методом интерполяции значение множителя f для соотношения $D_{280}/D_{260} = 1,53$, используя данные табл. 2.2.
2. Определите, сколько процентов белка содержит яичный белок, если известно, что оптические плотности фотометрируемого раствора, приготовленного по приведенной выше методике из яичного белка массой 5,026 г, равны $D_{280} = 0,962$ и $D_{260} = 0,621$.
3. Какие соединения мешают определению белка методом Варбурга и Кристиана?
4. В чем преимущества и недостатки метода Варбурга и Кристиана по сравнению с другими методами определения белка по поглощению в УФ-области?

Спектроскопия в видимой области и фотоэлектроколориметрия основаны на измерении поглощения окрашенных продуктов реакции белка с теми или иными реагентами.

Реакции, которые используются для получения окрашенных продуктов с белком, должны удовлетворять ряду требований: 1) оптимальным является взаимодействие реагента с пептидным фрагментом молекулы, поскольку его мольная доля по сравнению с другими частями молекулы белка максимальна и мало зависит от его природы, что позволяет определять различные белки, используя в качестве стандарта подходящий белок; 2) реакция должна протекать количественно; 3) окраска продукта реакции должна быть стабильна во времени, 4) желательно, чтобы развитие окраски не зависело от температуры.

Для измерения поглощения окрашенного продукта реакции можно использовать как фотоэлектроколориметр, так и УФ-спектрофотометр, однако предпочтение следует отдать последнему.

Перечисленным выше требованиям прежде всего удовлетворяет биуретовая реакция на белок. В количественном анализе, в отличие от качественного, используется не просто раствор сульфата меди и едкого натра, а так называемый биуретовый реактив, представляющий собой водный раствор сульфата меди, натрия-калия тартрата (для предотвращения образования гидроксида меди(II)), едкого натра и йодида калия (для предотвращения образования гидроксида меди (I)). Биуретовая реакция лежит в основе метода Лоури и нескольких его модификаций.

Биуретовый метод по Ярош отличается от метода Лоури добавлением к раствору белка мочевины с целью стабилизации окраски. Метод Лоури – Фолина характеризуется тем, что после проведения биуретовой реакции к раствору добавляют реактив Фолина – Чиокалтеу, который с остатком тирозина дает синее окрашивание, что приводит к увеличению чувствительности метода в несколько раз (1-10 мг в 1 мл и 50-500 мкг в 1 мл соответственно).

Перечисленным требованиям удовлетворяет и метод, основанный на связывании красителей белком. Связывание красителей с белком осуществляется за счет образования водородных связей, поэтому природа белка во многом нивелируется. Наибольшее применение для окрашивания белка имеет краситель кумасси бриллиантовый синий G-250. Следует иметь в виду, что в принципе различные белки могут обладать и различной способностью связывать данный краситель. В частности, бычий сывороточный альбумин по этой причине не может использоваться в качестве общего стандартного белка в этом методе.

Во всех этих методах требуется стандартный образец белка (обычно яичный альбумин). При серийных испытаниях концентрацию белка обычно определяют по градуировочному графику.

Опыт 18. Количественное определение белка методом Лоури

Реагент. В 500 мл воды растворяют 1,5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 6 г

натрия-калия тартрата ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). При интенсивном перемешивании добавляют 300 мл 10%-ного (масс./об.) раствора едкого натра и 1 г йодида калия. Объем смеси доводят до 1 л водой. Раствор хранят в пластиковой бутылке.

Методика. Смешивают 4,0 мл биуретового реагента и 1,0 мл раствора белка, разбавленного в случае необходимости до концентрации 1:10 мг/мл белка; выдерживают смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Определяют оптическую плотность раствора при длине волны между 540 и 560 нм. Концентрацию белка определяют с помощью градуировочного графика, построенного с использованием 5 растворов яичного альбумина с концентрациями 2, 4, 6, 8 и 10 мг/мл

Определению белка этим методом мешают пептиды, сахароза, желчные пигменты, которые дают окраску в биуретовой реакции; соли аммония, трис и глицерин, которые оказывают влияние на окраску, даваемую белками; липиды и детергенты, которые могут вызвать помутнение.

Опыт 19. Количественное определение белка методом Лоури - Фолина

Реагенты

Раствор А – 2%-ный раствор Na_2CO_3 в 0,1 М NaOH.

Раствор Б – 0,5%-ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1%-ном растворе $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Раствор В – смешивают 50 мл раствора А с 1 мл раствора Б перед применением.

Раствор Г – Коммерческий или приготовленный стандартный реагент Фолина – Чиокалтеу*, разбавленный водой вдвое.

* Методика приготовления реагента Фолина – Чиокалтеу.

Метод А. 100 г вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и 25 г молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) растворяют в 700 мл воды, добавляют 50 мл 85%-ной фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной хлористоводородной кислоты. Смесь дефлегмируют 10 ч (вытяжной

шкаф), слегка охлаждают, убирают обратный холодильник, добавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и 5 капель бромной воды. Смесь нагревают до кипения и кипятят 15 мин до удаления брома. Охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в мерную колбу емкостью 1 л и доводят водой до метки. При необходимости раствор фильтруют.

Метод Б. В круглодонную колбу помещают 70 мл воды, 10 г вольфрамата натрия, 2,5 г фосфорномолибденовой кислоты ($\text{H}_7\text{P}(\text{Mo}_2\text{O}_7)_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 5 мл 85%-ной фосфорной кислоты, кипятят с обратным холодильником 2 ч, охлаждают, разбавляют водой до 100 мл, хорошо перемешивают и при необходимости фильтруют.

В темной склянке с притертой пробкой раствор может храниться в холодильнике длительное время. Внешний вид качественного реактива – прозрачный раствор ярко-желтого цвета.

Методика. Смешивают К 1,0 мл раствора белка, разбавленного в случае необходимости до концентрации 50 – 500 мкг/мл белка; добавляют 5,0 мл раствора В, хорошо перемешивают и выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре. Быстро при постоянном перемешивании добавляют 0,5 мл раствора Г, выдерживают 30 мин при комнатной температуре, а затем измеряют оптическую плотность раствора при 750 нм.

Концентрацию белка определяют по градуировочному графику, построенному с помощью яичного альбумина.

Определению белка этим методом мешают вещества, перечисленные выше в методе Лоури, а также тирозин, триптофан, фенольные, тиольные соединения и другие восстановители.

Опыт 20. Количественное определение белка методом связывания с красителем. Метод Бредфорда

Реагент. 100 мг кумасси бриллиантового синего G-250 растворяют в 50 мл 95%-ного этилового спирта в мерной колбе емкостью 1 л, добавляют 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты, 700-800 мл воды, перемешивают и доводят водой до метки.

Методика. Для анализа используется раствор, разбавленный до концентрации 100-1000 мкг/мл. К 0,1 мл подготовленного раствора до-

бавляют 5 мл реагента и хорошо перемешивают. Оптическую плотность измеряют при 595 нм не ранее, чем через 5 мин, и не позднее, чем через 1 ч после приготовления раствора, относительно раствора реагента.

Концентрацию белка определяют по градуировочному графику, на оси оптических плотностей которого откладывают соответствующие разности между оптической плотностью раствора белка, обработанного реагентом и оптической плотностью чистого реагента

Определению белка этим методом мешают сильнощелочные буферы и детергенты.

Контрольные вопросы

1. Объясните, почему в методах, основанных на проведении цветных реакций на белок, нецелесообразно использовать такие реакции, как ксантопротеиновая, Фоля, Миллона и другие реакции, являющиеся общими для белков, но в то же время специфическими для отдельных аминокислот.
2. Спланируйте методику приготовления из яичного белка фотометрируемого раствора для анализа его методом Лоури, если известно, что содержание белка в яичном белке около 20%.

ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНТРОЛЬНАЯ РАБОТА ПО КОЛИЧЕСТВЕННОМУ АНАЛИЗУ АМИНОКИСЛОТ И БЕЛКОВ

Задание. Каждый студент получает 10 мл раствора, содержащего неизвестное количество аминокислот и белка.

Цель работы – определить содержание суммы аминокислот и содержание белка в исследуемом растворе.

Алгоритм выполнения

1. Установить, есть ли в растворе белок.
2. Если есть белок, удалить его нагреванием.
3. В оставшемся растворе определить содержание суммы аминокислот и пересчитать его на исходный раствор.
4. Определить количественное содержание белка в исходном растворе методом Лоури и методом Варбурга и Кристиана.
5. Все этапы работы запротоколировать и сделать мотивированное заключение о содержании белка и суммы аминокислот в исследуемом растворе.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Гринштейн Дж., Винниц М.* Химия аминокислот и пептидов: Пер. с англ. – М.: Мир, 1965. – 822 с.
2. *Фердман Д.Л.* Биохимия: Учебник для вузов. – М.: Высш. шк., 1966. – 644 с.
3. *Малер Г., Кордес Ю.* Основы биологической химии: Пер с англ. – М.: Мир, 1970. – 567 с.
4. Химия биологически активных природных соединений / Под ред. *Н.А. Преображенского*. – М.: Химия, 1970. – 512 с.
5. Современные методы в биохимии. / Под ред. *В.Н. Ореховича*. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
6. Пептиды: Пер. с англ. / Под ред. *Э. Гросса, И. Майенхофера*. – М.: Мир, 1983. – 422 с.
7. *Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д.* и др. Идентификация органических соединений: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – 703 с.
8. Химическая энциклопедия: В 5 т. Т.1. – М., 1988. – 623 с
9. *Досон Р., Элиот Д., Элиот У.* и др. Справочник биохимика: Пер с англ. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
10. Практикум по биохимии: Учеб. пособ. / Л.М. Пустовалова. – Ростов н/Д: Феникс, 1999. – 544 с.
11. *Кольман Я., Рем К.-Г.* Наглядная биохимия: Пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
12. Биохимия: Краткий курс с упражнениями и заданиями: Учеб. пособ. для вузов / Под ред. *Е.С. Северина, А.Я. Николаева*. Сер. XXI век. М., 2001. – 448 с.
13. Практикум по биохимии: Учеб. пособ. / *А.А. Чиркин*. – Минск: Новое знание, 2002. – 512 с.
14. *Жеребцов Н.А., Попова Т.Н., Артюхов В.Г.* Биохимия: Учебник для вузов. – Воронеж: Гос. ун-т, 2002. – 693 с.
15. *Кнорре Д.Г., Мызина С.Д.* Биологическая химия: Учебник для вузов. – М.: Высш. шк., 2002. – 479 с.
16. Энциклопедия биологической химии: В 4 т. Т.4. М., 2004. – 503 с.
17. *Комов В.П., Шведова В.Н.* Биохимия: Учебник для вузов. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
18. Биохимические основы жизнедеятельности человека: Учеб. пособ. / *Ю.Б. Филиппович, А.С. Коничев* и др. – М.: ВЛАДОС, 2005. – 407 с.
19. *Тумаков С.А., Темирбулатов Р.А., Савченко Р.П.* Методы количественного определения белков: теоретические основы, дифференцированный подход и практическое использование: Учеб. пособ. – Самара-Пенза, 2006. – 85 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
1. Внеаудиторная подготовка	4
1.1. Аминокислоты	4
1.1.1. Строение, классификация, номенклатура	4
1.1.2. Биологические функции аминокислот	12
1.1.3. Физико-химические свойства аминокислот	17
1.1.4. Химические свойства аминокислот	22
1.1.4.1. Реакции с участием карбоксильной группы	23
1.1.4.2. Реакции с участием аминогруппы	25
1.1.4.3. Реакции с одновременным участием карбоксильной и аминогрупп	34
1.1.4.4. Специфические реакции аминокислот	36
1.2. Полипептиды	41
1.2.1. Природа пептидной связи	41
1.2.2. Классификация полипептидов, отдельные представители и их биологическая роль	43
1.2.2.1. Малые линейные пептиды	44
1.2.2.2. Циклопептиды	50
1.2.2.3. Белки	57
1.2.2.3.1. Уровни структурной организации белков	59
1.2.2.3.2. Классификация белков	68
1.2.2.3.3. Физико-химические свойства белков	75
1.2.2.3.4. Выделение белков	76
2. Лабораторный практикум	79
2.1. Идентификация аминокислот и белков	79
2.1.1. Общие качественные реакции аминокислот	79
2.1.2. Специфические качественные реакции аминокислот	81
2.1.3. Хроматографические методы разделения и идентификации аминокислот и белков	86
2.2. Количественный анализ аминокислот и белков	94
2.2.1. Титриметрические методы анализа аминокислот	94
2.2.2. Спектральные методы количественного определения белка	98
Библиографический список	108

Учебное издание

*СМИРНОВ Виктор Александрович,
КЛИМОЧКИН Юрий Николаевич*

Аминокислоты и полипептиды

Редактор *С.И. Костерина*
Технический редактор *В.Ф. Елисеева*
Компьютерная верстка *Е.Э. Парсаданян*

Подп. в печать 10.01.08.
Формат 60х84 ¹/₁₆. Бумага офсетная.

Печать офсетная.

Усл. п. л. 6,51. Уч.-изд. л. 6,38.

Тираж 100 экз. Рег. № 405.

Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Самарский государственный технический университет»
443100. г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244. Главный корпус

Отпечатано в типографии
Самарского государственного технического университета
443100. г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244. Корпус №8

