


Военно-медицинская академия

**Кафедра клинической биохимии и лабораторной
диагностики**

Потапенко А.А.

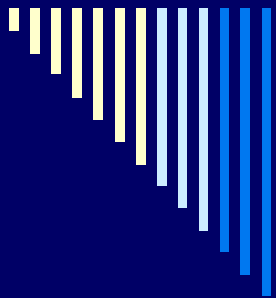
Лекция по теме:

«Физико-химические свойства белков»



Физико-химические свойства белков

- Молекулярная масса;
 - Амфотерность;
 - Наличие заряда, электрофорез;
 - Растворимость, свойства белковых растворов
 - Денатурация
-



ИЭТ – тот рН среды, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии. Заряд равен 0.

ИЭТ (рJ) – паспортная характеристика, индивидуальная для каждого белка, зависит от первичной структуры.

А – 4,8; Г – 6,8; пепсин – 1,0; химотрипсин – 8,1; клупеин – 12,0

	рJ		
рН > рJ (-)	8,0	рН 7,2	+
рН < рJ (+)	6,8		-
рН = рJ (0)	4,0		--






~~Знание ИЭТ важно для понимания особенностей первичной структуры, для понимания стабильности белка в растворе (рJ – Б.↓.)~~



Методы разделения белков по заряду

1. Электрофорез – движение заряженных частиц в электрическом поле.

Скорость движения зависит от:

-  Разности потенциалов;
-  Молекулярной массы;
-  Формы белковой молекулы;
-  Взаимодействия со средой движения;
-  рН и состава буфера.

Зональный ЭФ на носителях: (бумаге, агар-агаре, крахмале, ПААГ)

Белки плазмы крови:

Бумага – 5 (6)

Крахмал – 10

ПААГ – 15 – 20

2. Ионообменная хроматография

Ионообменники

Катионообменники (-)
Карбоксиметил –
целлюлоза (КМЦ)

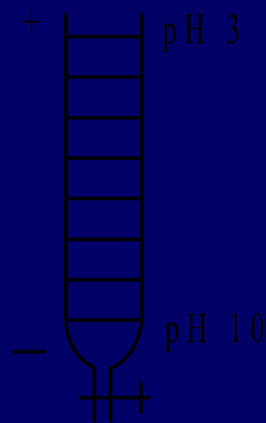
Анионообменники
ДЭАЭ – целлюлоза
ДЭАЭ – сефадекс

А) связывание по заряду

Б) элюция (снятие) раствором с другим рН

3. Изоэлектрическое фокусирование (электрофокусирование, изотахофорез)

О.Вестерберг амфолины (полиаминополикарбоновые кислоты)



R или H или $(\text{CH}_2)_x-\text{CO}$

x = 2 – 3

М.М, 300 – 1000




Градиент pH 3 – 10

pH = pI остановка движения



Молекулярная масса белков

Зависит от:

-  **Особенностей первичной структуры;**
-  **Наличия четверичной структуры;**
-  **Массы небелковой части (простой белок или сложный)**

Молекулярные массы некоторых белков:

Инсулин 5 733

Миоглобин кашалота 17 600

Пепсин 35 000

Альбумин яичный 46 000

Гемоглобин лошади 68 000

γ – глобулин человека 160 000

Каталаза 250 000

Фибриноген человека 450 000

Глутаматдегидрогеназа 1 000 000

Гемоцианин улитки 6 000 000

~~Вирус табачной мозаики 40 000 000~~



Методы определения молекулярной массы белков

- Расчетные
 - Вискозиметрические
 - Осмометрические
 - Оптические
 - Гравиметрические (ультрацентрифугирование)
 - Гельфильтрация
 - Электрофорез (ЭФ)
 - Ультрафильтрация
-



Методы определения (разделения) белков по массе

1. **Ультрацентрифугирование** – гравиметрический метод

1913г. - Думанский, 1923г. – Сведберг

Фактор разделения – относительное центробежное ускорение

Константа седиментации – 10^{-13} с = сведберг

R – газовая постоянная

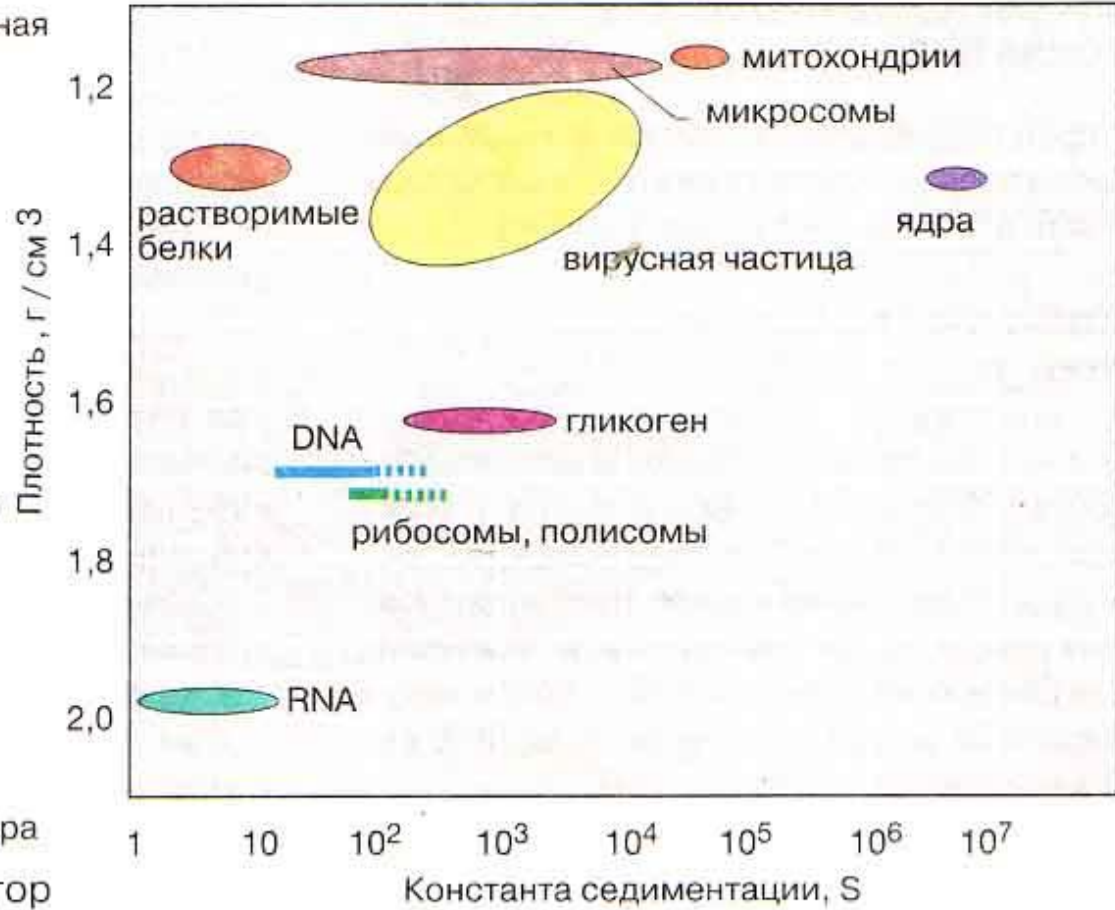
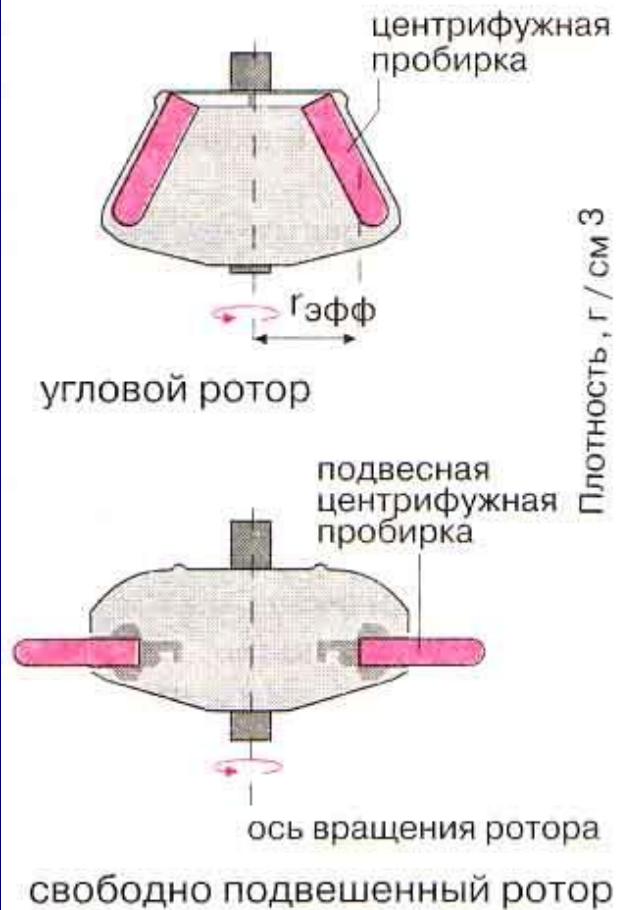
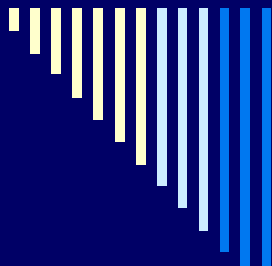
$$M := \frac{RTS}{D \cdot \left(1 - \frac{\rho}{\sigma}\right)}$$

T – температура по Кельвину

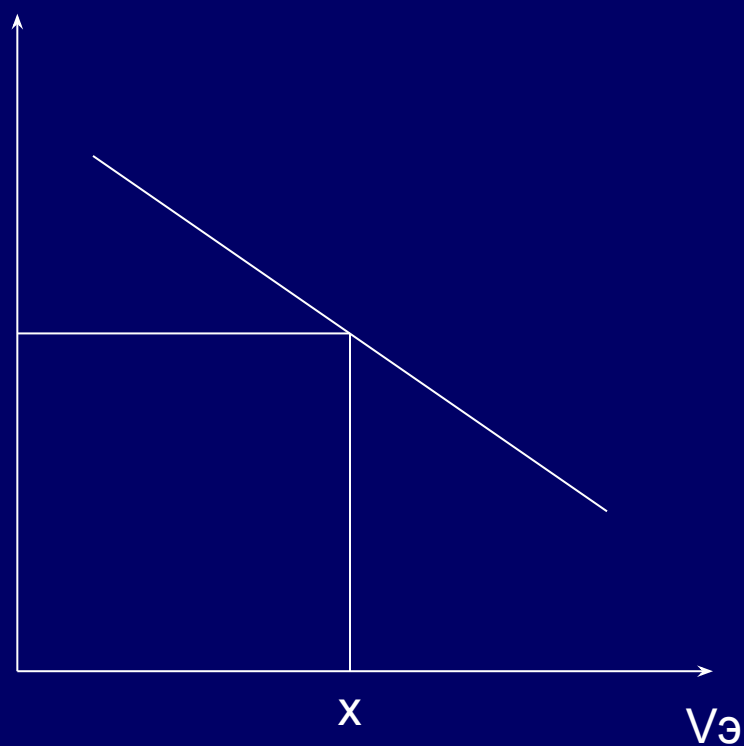
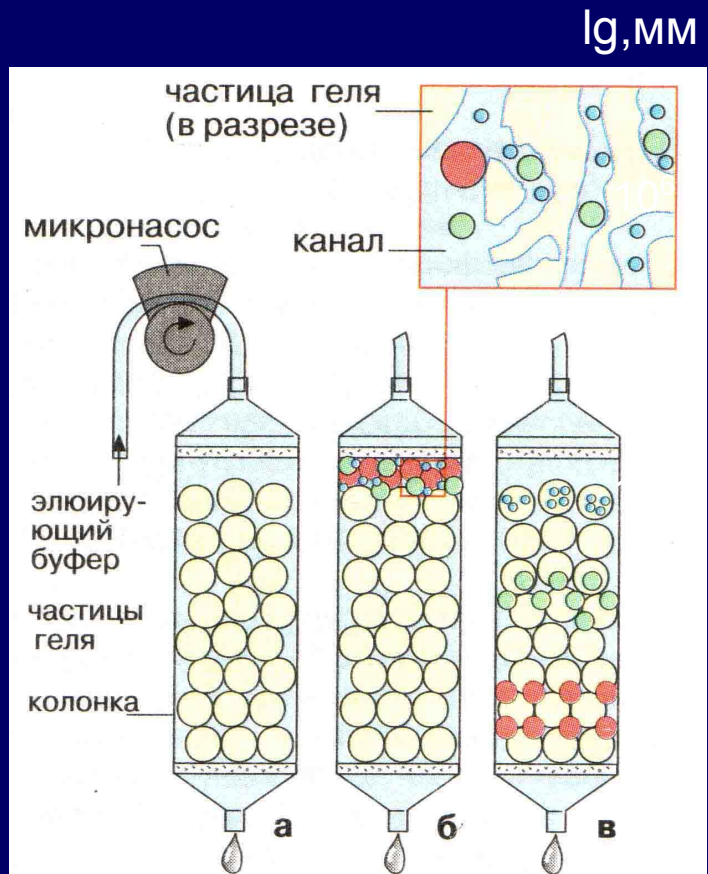
D – коэффициент диффузии

ρ – плотность растворителя

σ – плотность белковых частиц



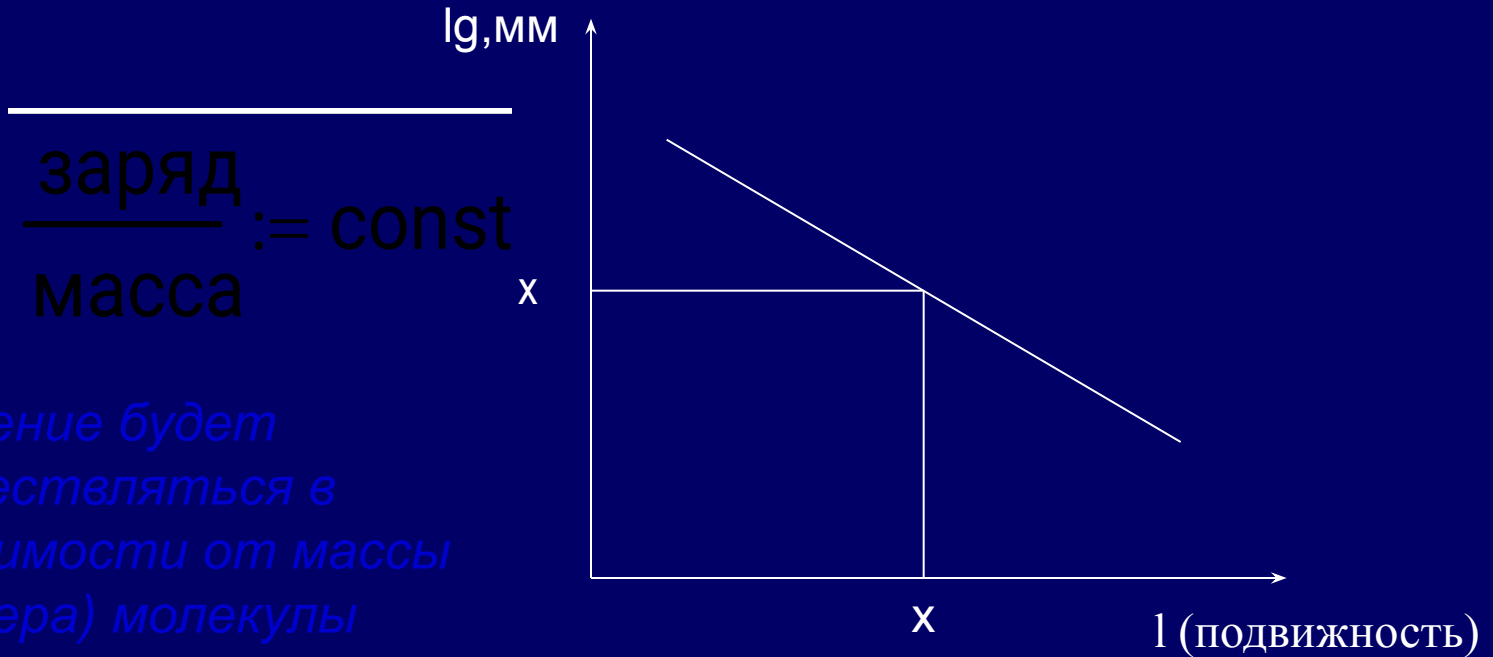
2. Гельхроматография (гельфилтрация)



Принцип антисита (медленно – мелкие, быстро – крупные молекулы)

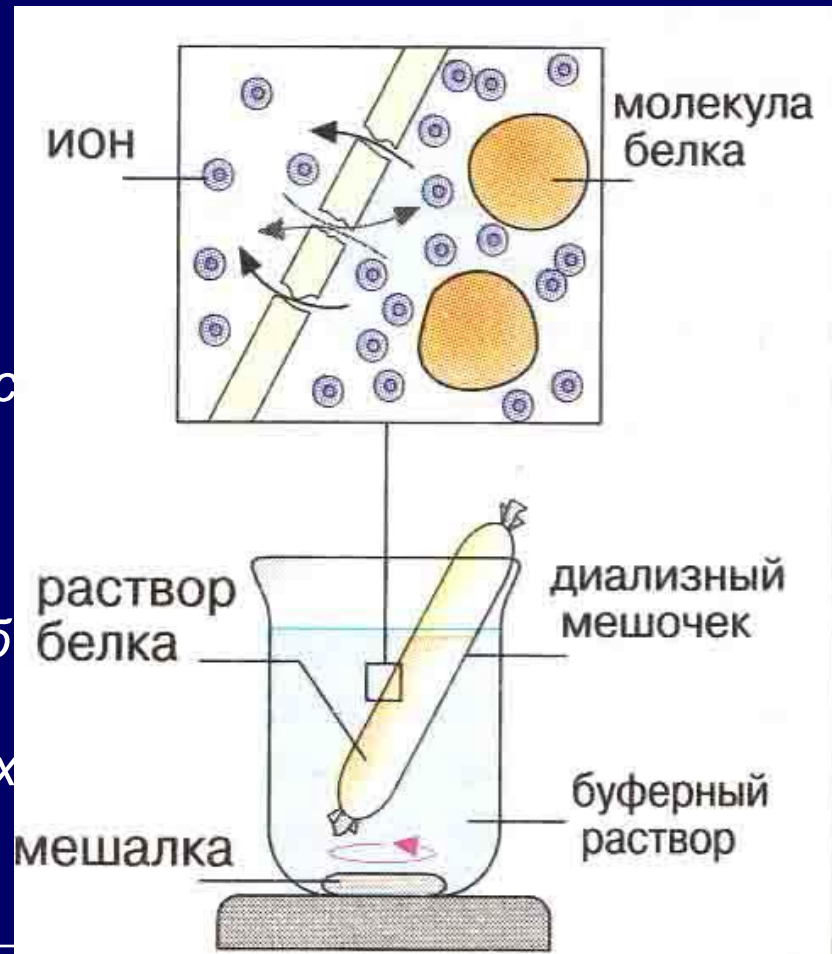
3. Диск-электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН (додецилсульфат Na)

Чем > мол. масса, тем. > пептидных связей > отрицательный заряд



4. ультрафильтрация (молекулярные фильтры)

Диализ – неспособность молекул белка проходить через полупроницаемые мембраны – способ очистки белка от низкомолекулярных соединений.



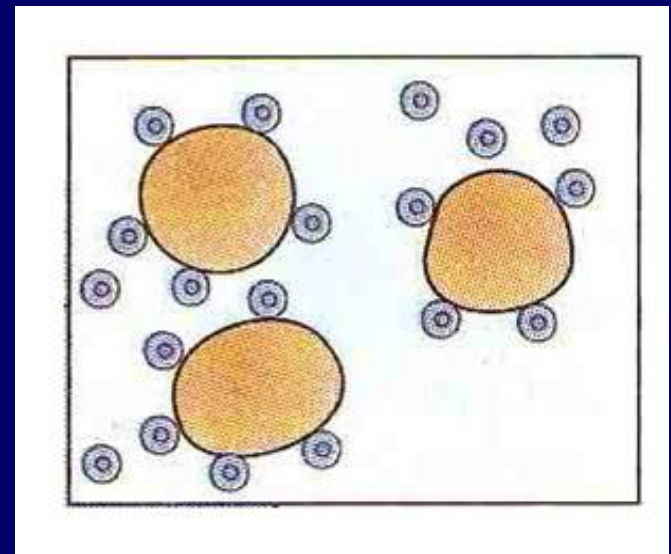
Растворимость

Зависит от:

- АК состава (чем больше полярных групп, тем больше растворимость)
- Особенности организации молекулы ($\Gamma > \Phi$)
- Свойств растворителя

Стабильность придают:

- Заряд белковой молекулы
- Наличие гидратной оболочки





Влияет на растворимость:

1. Концентрация нейтральных солей

Ионная сила раствора:

$$\mu = \frac{\sum c \cdot b^2}{2}$$

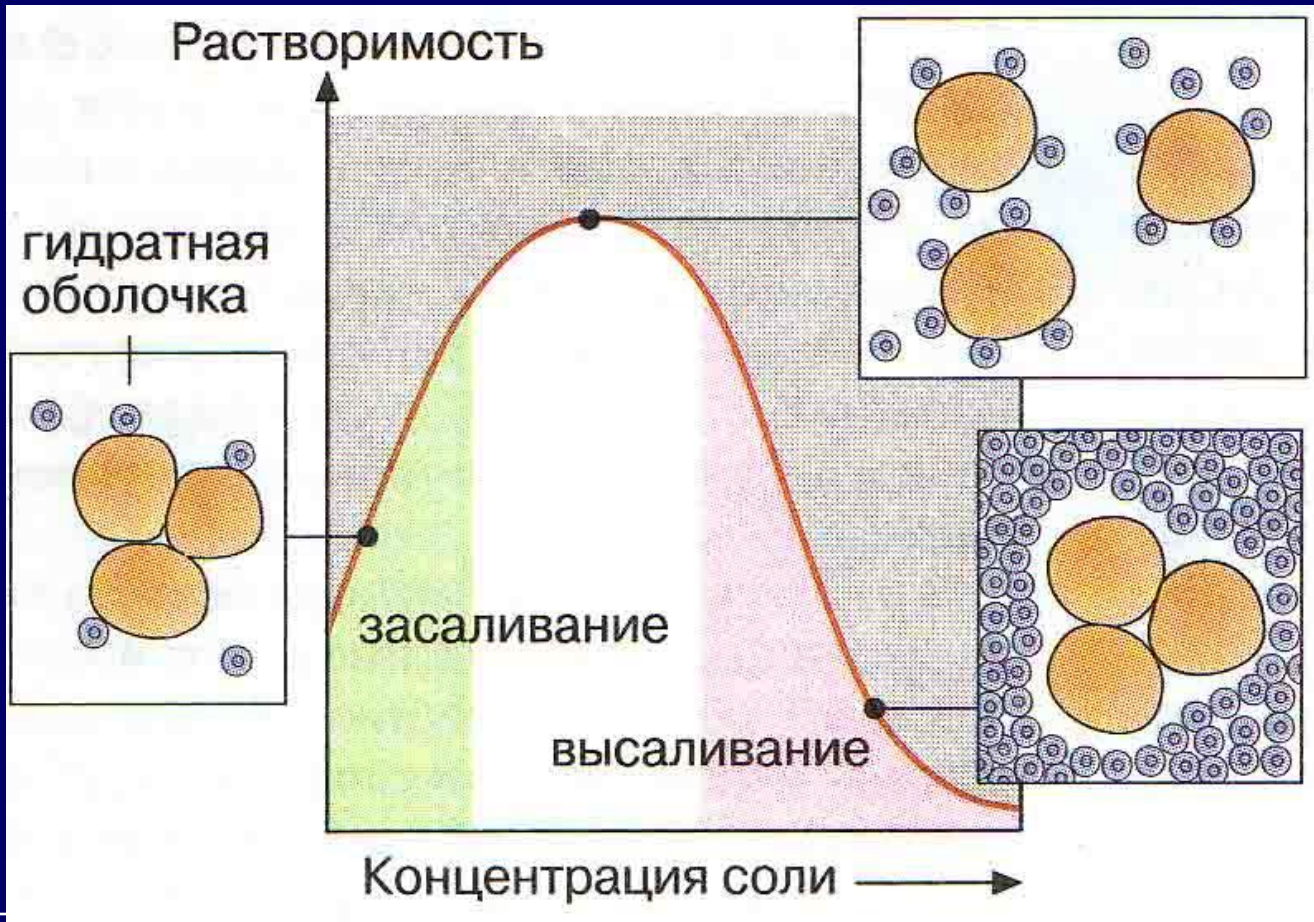
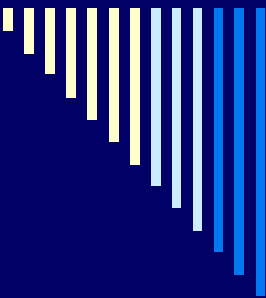
C – концентрация

b - валентность

Высаливание – осаждение белка из раствора солями щелочных и щелочноземельных металлов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4

Процесс обратимый.

Каждый белок высаливается при определенной ионной силе (концентрации соли) А – 100%, Г – 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$





2. Температура





3. рН

рН = рJ (0) изоэлектрическое осаждение


Методы фракционирования по растворимости:

- Изоэлектрическое осаждение
- Высаливание
- Осаждение водоотнимающими средствами (спирт, ацетон на холоду по Кону)



Свойства белков в растворе

- Медленно диффундируют
- Не проходят через полупроницаемые мембраны
- Опалесцируют
- Рассеивают свет
- Способны к набуханию
- Характеризуются высокой вязкостью
- Обладают низким $P_{осм}$ и высоким $P_{онк}$
- Поглощают УФ $\lambda=280\text{нм}$



Денатурация – любое негидролитическое изменение структуры белка, приводящие к изменению его биологических и физико-химических свойств

Нативный белок – белок с неизменной структурой и свойствами.

Факторы денатурации:

- Физические (t, давление, УЗ)
- Химические (кислоты, щелочи, тяжелые металлы)
- Биологические (протеолитические ферменты)

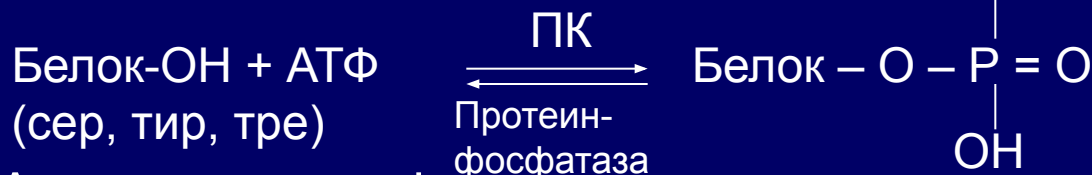
Признаки денатурации:

- Потеря биологической активности;
 - Изменение конформации белковой молекулы;
 - Увеличение числа функциональных групп (появляются гидрофобные);
 - Уменьшение растворимости и осаждение;
 - Изменение вязкости, оптической активности, прозрачности растворов белка;
 - Изменение окрашиваемости (гистология);
 - Большая доступность действию протеолитических ферментов.
-

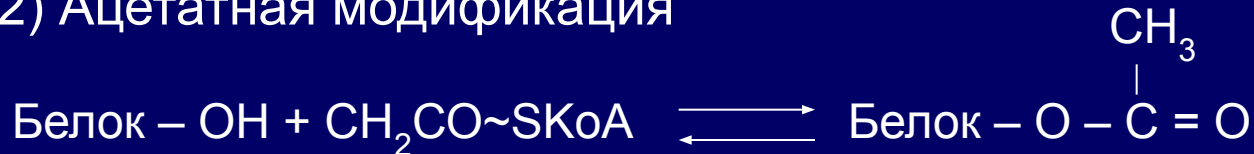


Химическая (ковалентная) модификация

1) Фосфатная модификация



2) Ацетатная модификация



3) Метилирование

4) Аминирование

5) АДФ-рибозилирование

Химическая модификация – способ регуляции функциональной активности белка *in vivo*



Выделение и очистка белка

- Гомогенизация – разрушение ткани, клеток
 - Экстракция – извлечение белка различными растворителями (вода, слабые солевые растворы)
 - Разделение экстракта на индивидуальные белки (высаливание, рJ-осаждение, дифференциальное центрифугирование)
 - Различные виды хроматографии (ионообменная, аффинная, ЭФ, гельфльтрация)
 - Очистка (диализ, гельфльтрация, кристаллизация-высаливание, установка гомогенности)
-



Классификация белков

- По форме (Г и Ф)
 - По степени сложности (простые и сложные)
 - По растворимости (и другим физико-химическим свойствам)
 - По функциям
 - По вторичной и третичной структуре (α , β , $\alpha+\beta$, α/β)
 - По месту локализации
-



Белки

Простые (протеины)

Альбумины 60т рJ-4,7
Глобулины 160т рJ-6.8
Растительные:
Глютелины
Проламины
Ядерные:
Протамины 5-10т рJ-11,0
Гистоны 10-20т рJ-9,5
Кислые белки рJ-4,5
Другие:
Протеиноиды

Сложные (протеиды)

Хромо-
Нуклео-
Глюко-
Фосфо-
Металло-
Липо-

протеины



А – Н₂О и крепкие солевые растворы >50%, 100% уменш.

Г – н/р Н₂О растворимы в солевых растворах до 50%, 50% уменш.

Проламины – 60° – 80° спирт

Глютелины – разбавленные щелочи

Протамины (80% арг лиз) и гистоны (30% арг лиз) – белки основного характера

В основе классификации гистонов арг/лиз, 5 классов: Н, Н2а, Н2в, Н3, Н4

Гистоны – небелковая часть нуклеопротеидов (структурная и регуляторная функции)



Сложные белки

Хромопротеиды - окрашенные белки (chroma – краска)

Гемопротеиды – Hb, миоглобин, каталаза, пероксидаза, цитохромы

Простетическая часть – ГЕМ – металлопорфириновый комплекс

Hb = 96% глобин + 4% гем (глобин + 4 гема)

Глобин – белок с четверичной структурой, состоит из 4-х полипептидных цепочек

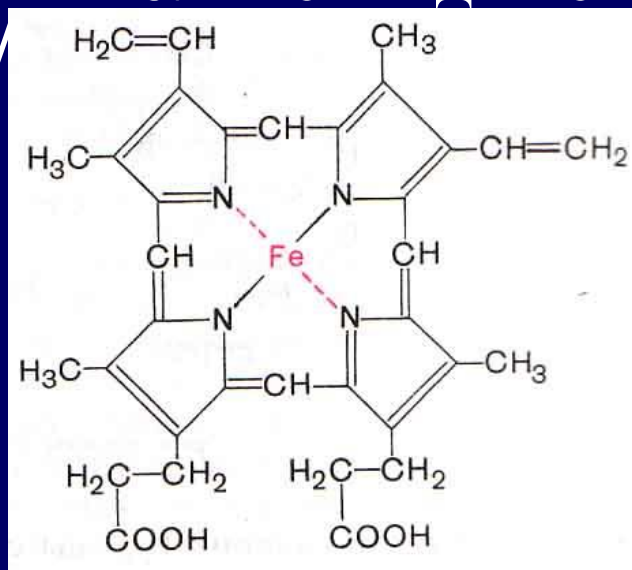
Hb A (взрослый) $\alpha_2\beta_2$ $\alpha - 141\text{AK} \cdot 2$
 $\beta - 574\text{AK}$

$\gamma - 146\text{AK} \cdot 2$

Первичная структура

ГЕМ – α – полипептидные цепочки
ГЕМ – β – полипептидные цепочки

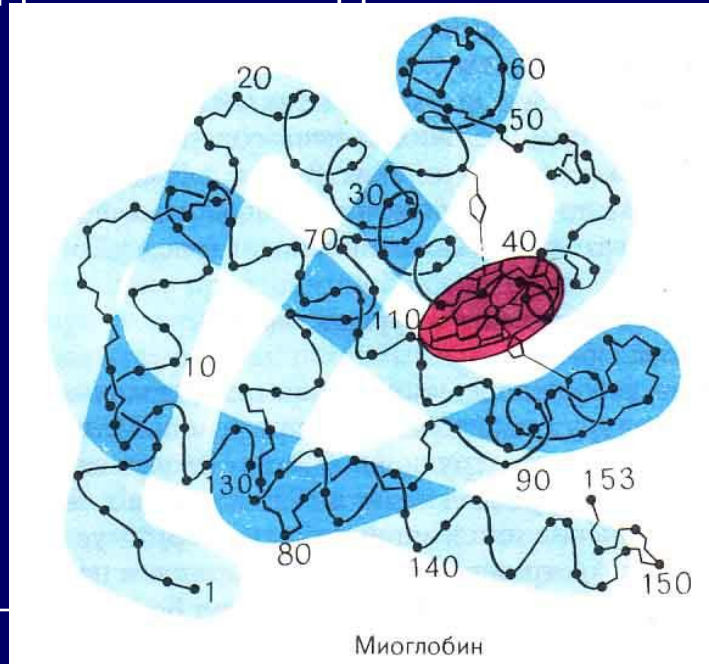
2



- Вторичная структура – спирализованные сегменты разной длины, соединенные неспирализованными (α – 7%, β – 8%)

Третичная структура

Третичная структура – формирование субъединиц, внутри каждой образуется «гидрофобный» карман, в котором располагается Гем, который удерживается силами Ван дер Ваальса между неполярными участками Гема и гидрофобными радикалами АК. Кроме этого железо Гема 5-координационной связью с имидазольным радикалом гистидина в глубине.



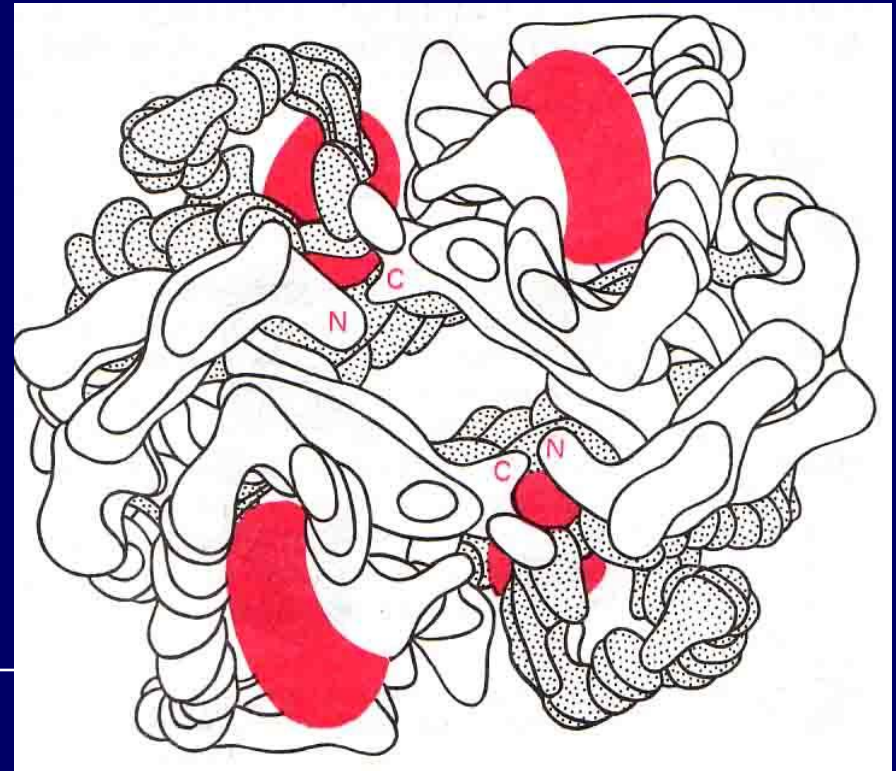
Четвертичная структура

Четверичная структура – похожа на тетраэдр, субъединицы расположены попарно

Между β и γ – силы Ван дер Ваальса

Между субъединицами одного типа:

- Ионные
- Солевые



— Модель гемоглобина (по Перутцу) —

Производные гемоглобина

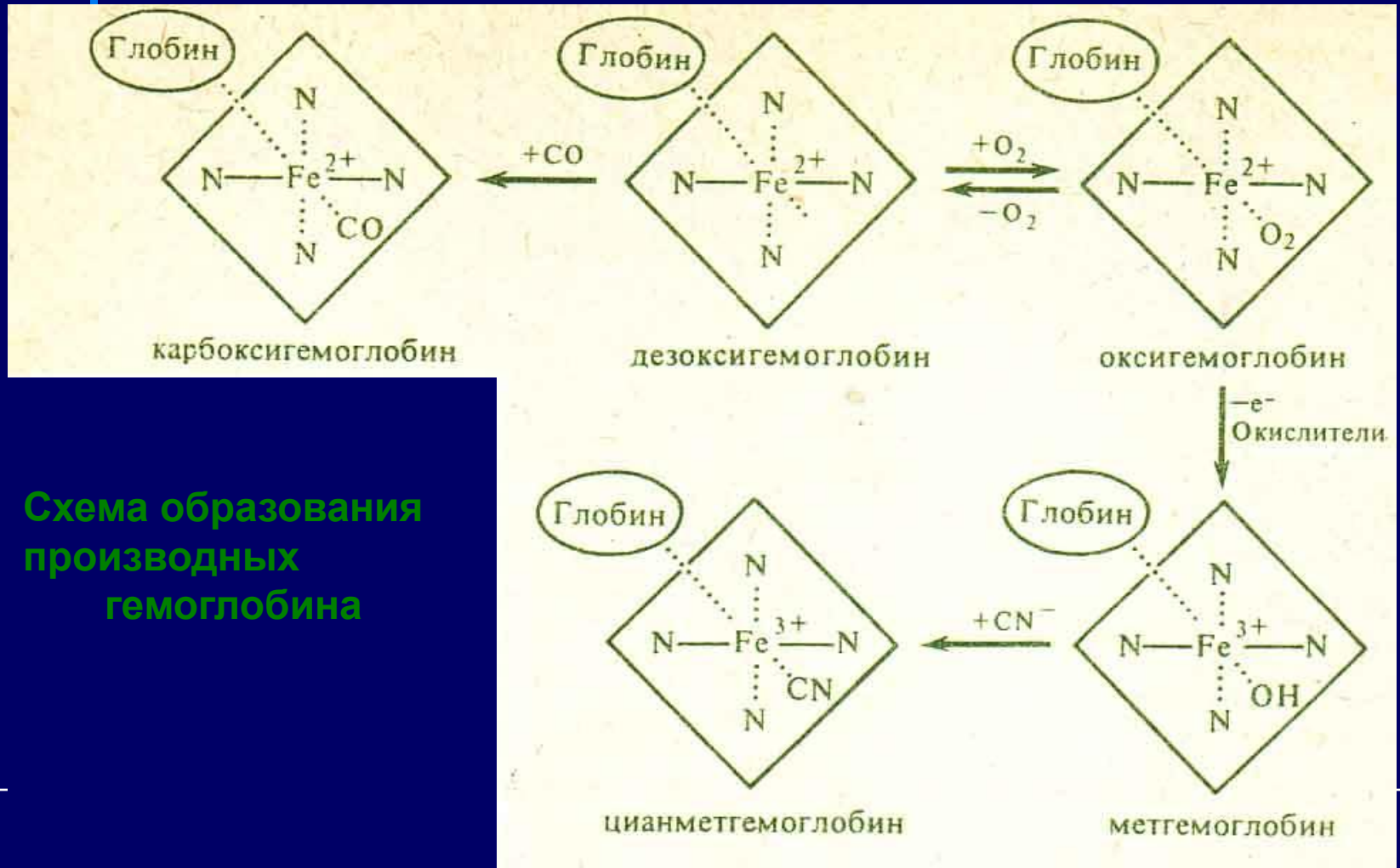
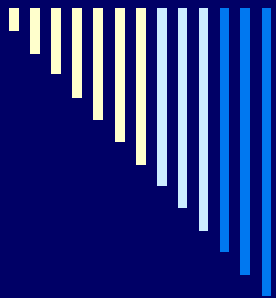


Схема образования производных гемоглобина



Типы гемоглобинов

Физиологические

НвР (примитивный)
эмбриональный



Говер-I Говер-II

НвF (фетальный) у плода – 70%



НвA1 взрослый



Аномальные

Нв H – ν_4

НвБарта – γ_4

Нв S – ν в цепи глу(ν) ? вал

Нв M – остатки гис \square тир = Fe^{+3} \square мет Нв



Кровь взрослого человека

HbA₁ - 95 – 96% HbA₂ – 2-3% HbF – 0,1 – 2%

Мутации генов, кодирующих α и β цепи могут существенным образом сказываться на биологических функциях Hb. Известно более 100 мутантных Hb.

***Гемоглобинопатия** – патологическое состояние характеризующиеся изменением биологической функции Hb вследствие мутации – наследственного изменения структуры какой-либо цепи нормального Hb (молекулярная болезнь)*

***Талассемия** – аномалия Hb, связанная с понижением скорости синтеза α цепи Hb (α -талассемия) или β цепи (β -талассемия).*



Фосфопротеиды

Небелковая часть – фосфорная кислота

Постоянный фосфопротеид – казеин молока

Временные фосфопротеиды – фосфатные модификации белка

Фосфорилированный белок \leftrightarrow дефосфорилированный белок
(сложный) (простой)

Металлопротеиды

Содержат ионы одного или нескольких металлов

Fe^{+2} ферритин, трансферрин, гемосидерин

Zn^{+2} карбоангидраза, карбоксипептидаза

Cu^{+2} цитохромоксидаза

Mg^{+2} фосфотрансферазы (киназы)

Mn^{+2} аргиназа



Гликопротеиды

Простетические группы представлены углеводами и их производными

Глюкоза, манноза, галактоза, ксилоза, арабиноза, глюкуроновая, нейтральная, сиаловая кислоты

Гликозаминогликаны: гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты

В структуре соединительной ткани, много среди белков плазмы крови, в структуре рецепторов.

Выполняют: информативную функцию, защищают структуру белков от действия протеиназ, участвуют в иммунологических реакциях, ионном обмене, явлениях клеточной адгезии.