



ОМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

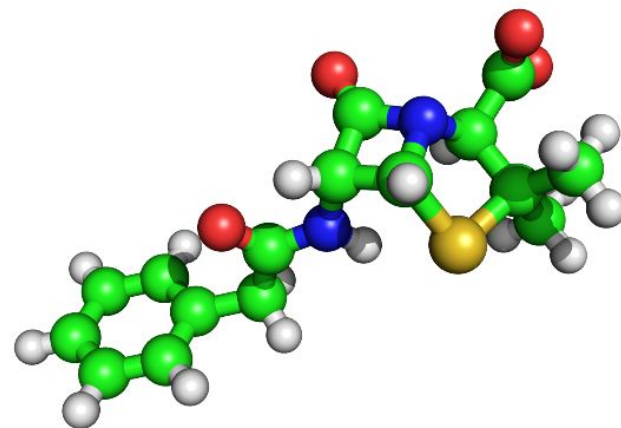
КАФЕДРА ХИМИИ

"Повсюду, где мы встречаем жизнь, мы находим, что она связана с каким-либо белковым телом и повсюду, где мы встречаем какое-либо белковое тело, которое не находится в процессе разложения, мы без исключения встречаем и явления жизни»

Ф.Энгельс

Лекция Пептиды. Белки.

Лектор: кандидат биологических наук,
доцент
Атавина Ольга Васильевна



Цели лекции:

1. **Обучающая** - Сформировать знания о строении пептидов и белков и их биологической роли.
2. **Развивающая** – Расширить кругозор обучающихся на основе интеграции знаний; развивать логическое мышление.
3. **Воспитательная** – Содействовать формированию у обучающихся устойчивого интереса к изучению дисциплины «Органическая химия»

План

1. Классификация пептидов и белков.
Основные функции белков.
2. Пространственное строение пептидов и белков.
3. Физико-химические свойства белков и пептидов.
4. Пептидный синтез.
5. Методы выделения и очистки белка.

1. Классификация пептидов и белков

Классификация пептидов и
белков.

Белки и пептиды- полимерные азотсодержащие органические вещества состоящие из остатков аминокислот, соединенные пептидными связями, имеющие сложную структурную организацию.

- **Пептиды** содержат в молекуле **ДО 100** ($M < 10\ 000$), а **белки** **>100** аминокислотных остатков ($M > 10\ 000$).

В отличие от белков, пептиды имеют более разнородный аминокислотный состав, в т.ч. могут включать аминокислотные остатки D-ряда. В структурном отношении они также разнообразны: содержат циклические фрагменты, разветвленные цепи и т.д.

1. В зависимости от формы молекул белки подразделяются на фибриллярные и глобулярные.

Молекулы фибриллярных белков вытянуты в длину, нитеобразны, группируются одна подле другой. Образуют за счёт многочисленных межмолекулярных водородных связей суперспирали. Межмолекулярные водородные связи не могут быть преодолены молекулами растворителя, поэтому фибриллярные белки нерастворимы в воде.

Глобулярные белки сложены в компактные глобулы. Водородные связи являются в основном внутримолекулярными, межмолекулярные силы относительно слабы и разрушаются молекулами растворителя. Вследствие этого глобулярные белки растворимы в воде с образованием коллоидных растворов.

Классификация пептидов и белков

Строение белков определяет те функции, которые они выполняют в живых организмах. Фибриллярные белки нерастворимы, склонны к образованию волокон и потому служат основным строительным материалом животных клеток. К числу фибриллярных белков относятся кератин (в коже, волосах, рогах, ногтях, перьях), коллаген (в сухожилиях), миозин (в мышцах).

Глобулярные белки выполняют функции, требующие подвижности и, следовательно, растворимости. Они участвуют в регуляции жизненных процессов: гемоглобин переносит кислород из лёгких в ткани, ферменты катализируют многочисленные химические реакции, протекающие в организме, антитела обеспечивают защиту от чужеродных организмов и т.д.

II. II. По составу белки делят на простые (неконъюгированные) и сложные (конъюгированные).

По ряду характерных свойств простые белки можно разделить на несколько подгрупп: альбумины, глобулины, гистоны, протамины, проламины, склеропротеины. Сложные белки состоят из белковой и небелковой (простетической) группы. К сложным белкам относятся фосфопротеины, нуклеопротеины, хромопротеины, гликопротеины, липопротеины.

Классификация пептидов и белков.

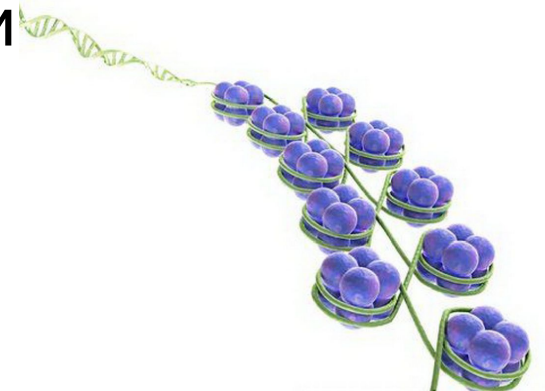
Простые белки:



1) **Альбумины** – растворимы в воде, не растворимы в конц. растворах солей. $pI = 4,6-4,7$. Существуют альбумины молока, яиц, сыворотки крови.

2) **Глобулины** - не растворимы в воде, растворимы в солевых растворах. Примером служат иммуноглобулины.

3) **Гистоны** - растворимы в воде, в слабоконцентрированных кислотах. Обладают выраженными основными свойствами белки, они связ

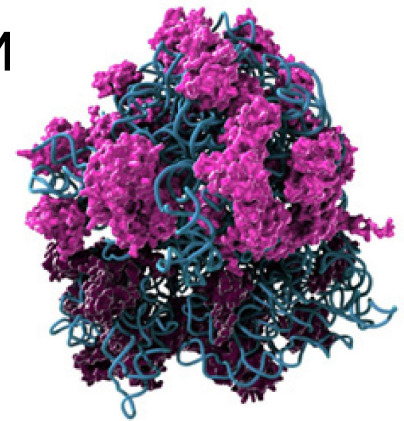


4) **Склеропротеины** - белки опорных тканей (хрящей, костей), шерсти, волос. Не растворимы в воде, слабых кислотах и щелочах. Повышено содержание **глу, ала,**



- **проплагены** - фибриллярные белки соединительной ткани. При длительном кипячении они растворяются в воде и при застудневании образуется желатин.
- **эластины** - белки связок и сухожилий. По свойствам похожи на коллагены, но подвергаются гидролизу под действием ферментов пищеварительного сока;
- **кератин** - входит в состав волос, перьев, копыт;
- **фиброин** - белок шелка, в своем составе содержит много серина;

- 1) **Нуклеопротеины** - содержат нуклеиновые кислоты. Наиболее изученными являются рибосомы, состоящие из нескольких молекул РНК и рибосомных белков, и хроматин - основной нуклеопротеид эукариотических клеток, состоящий из ДНК и структурообразующих белков - гистонов (содержатся в клеточном ядре и ми



с).

2) **Гемопротейины** - небелковый компонент этих протеидов - гем, построен из четырех пиррольных колец, с ними связан ион двухвалентного железа (через атомы азота). К таким белкам относятся: гемоглобин, миоглобин, цитохромы. Этот класс белков еще называют хромопротеиды, поскольку гем является окрашенным соединением.

Гемоглобин - транспорт кислорода.

Миоглобин - запасание кислорода в мышцах.

Цитохромы (ферменты) - катализ окислительно-восстановительных реакций и электронный транспорт в дыхательной цепи.

3) Металлопротеины - в состав простетической группы входят металлы.

Хлорофилл - содержит гем, но вместо железа - магний. Цитохром а содержит медь, сукцинатдегидрогеназа и др. ферменты содержат негеминовое железо (ферродоксин).

4) Липопротеины - содержат липиды, входят в состав клеточных мембран

5) Фосфопротеины - содержат остаток фосфорной кислоты

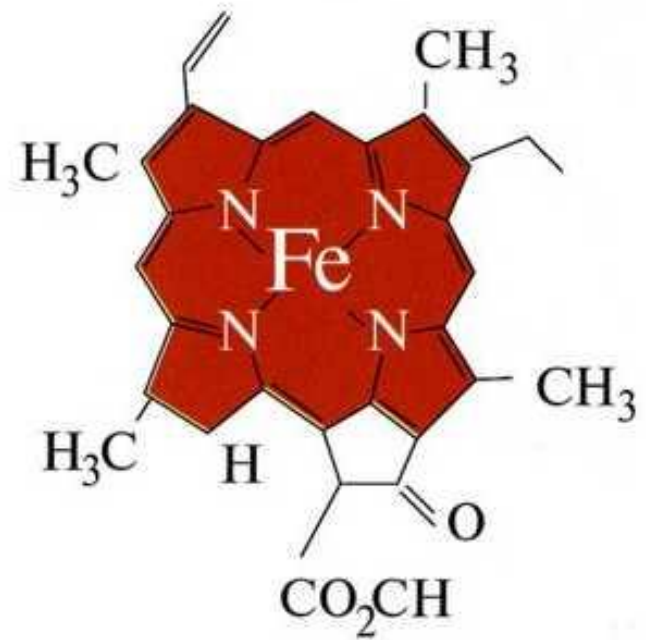
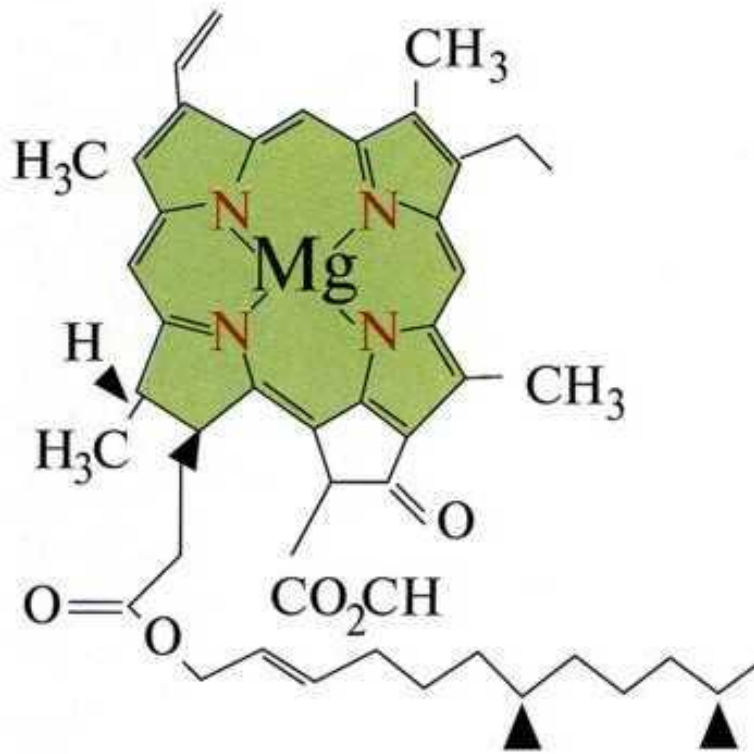
6) Глюкопротеины - содержат сахара

Классификация пептидов и белков.

Сравните

хлорофилл

гемоглобин



Функции белков

- Ферментативная функция
- Структурная функция.
- Питательная функция.
- Защитная функция.
- Транспортная функция.
- Регуляторная функция.
- Запасающая функция.
- Двигательная функция.

2. Пространственное строение пептидов и белков

Среди большого числа гипотез о строении молекулы белка лишь одна выдержала испытание временем: **полипептидная теория строения белковой молекулы**, предложенная **Э.Фишером(1902)**. Эта теория лишь дополнилась данными, полученными на основе электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа

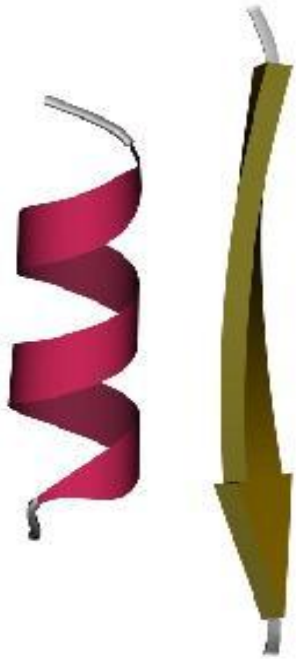


- В 1902 г. Э. Фишер предложил пептидную теорию строения белка.

Уровни структурной организации белка

- **первичная структура** – аминокислотная последовательность
- **вторичная структура** – локальные высокоупорядоченные конформации белковой цепи (α -спираль, β -структура)
- **третичная структура** – форма белковой молекулы; трёхмерная структура белка.
- **четвертичная структура** – агрегат из нескольких молекул белка

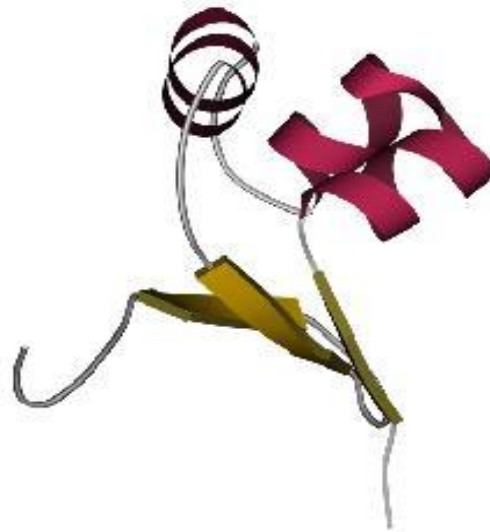
Primary ...- *Gly-Val-Tyr-Gln-Ser-Ala-Ile-Asn*-...



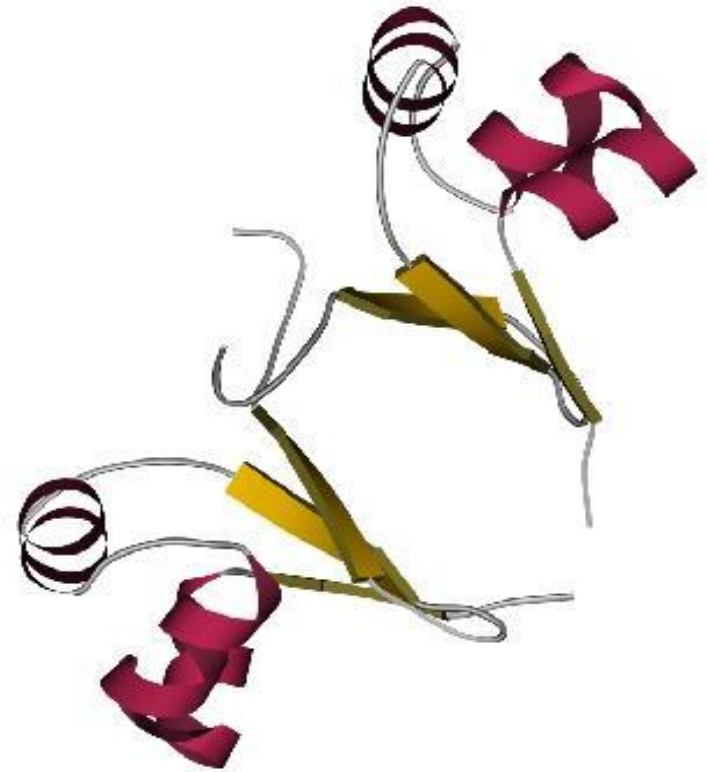
α

β

Secondary

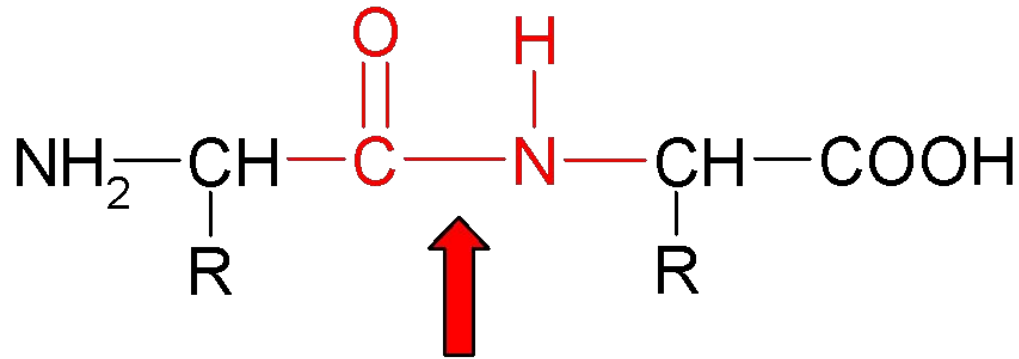
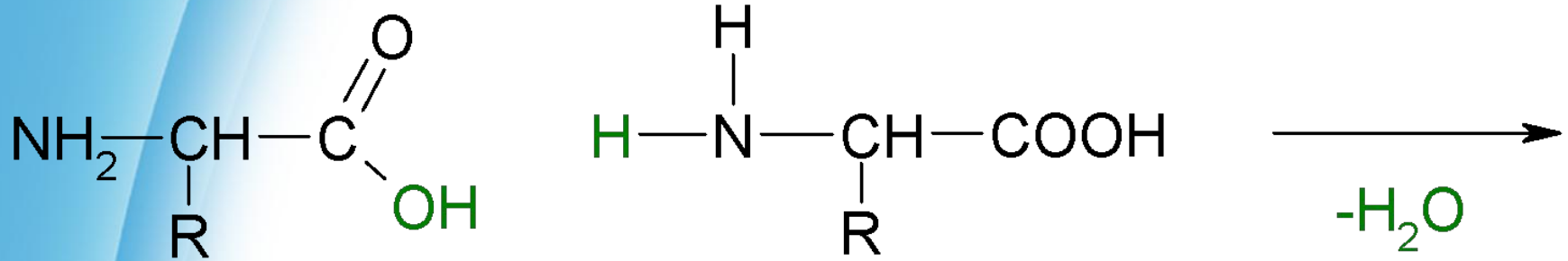


Tertiary



Quaternary

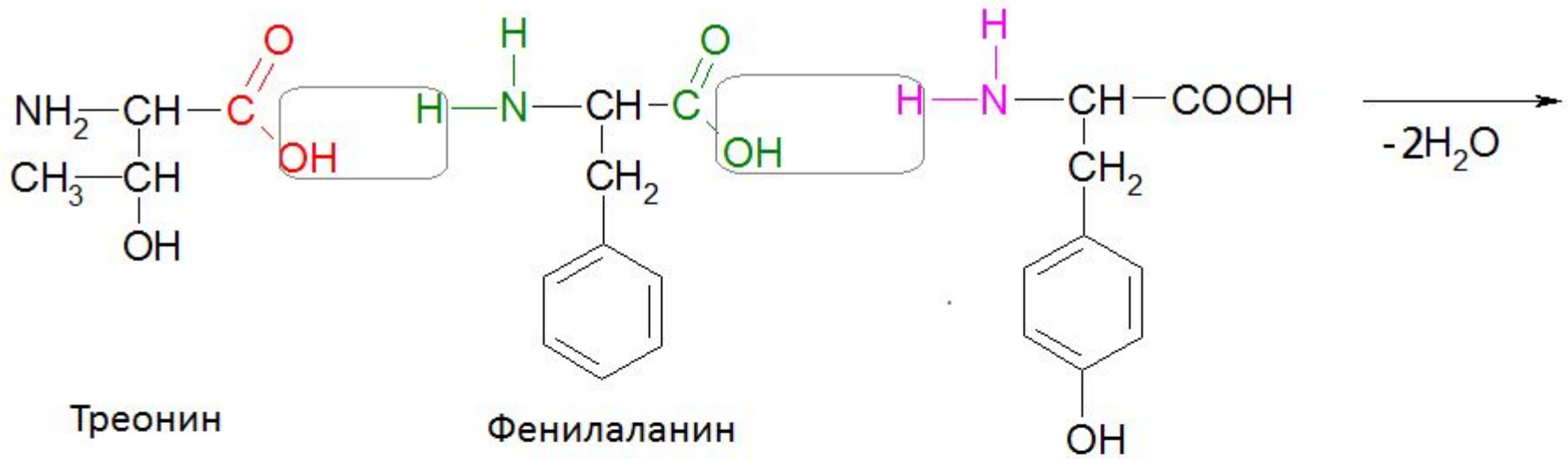
Пространственное строение пептидов и белков



← дипептид

Пептидная
связь

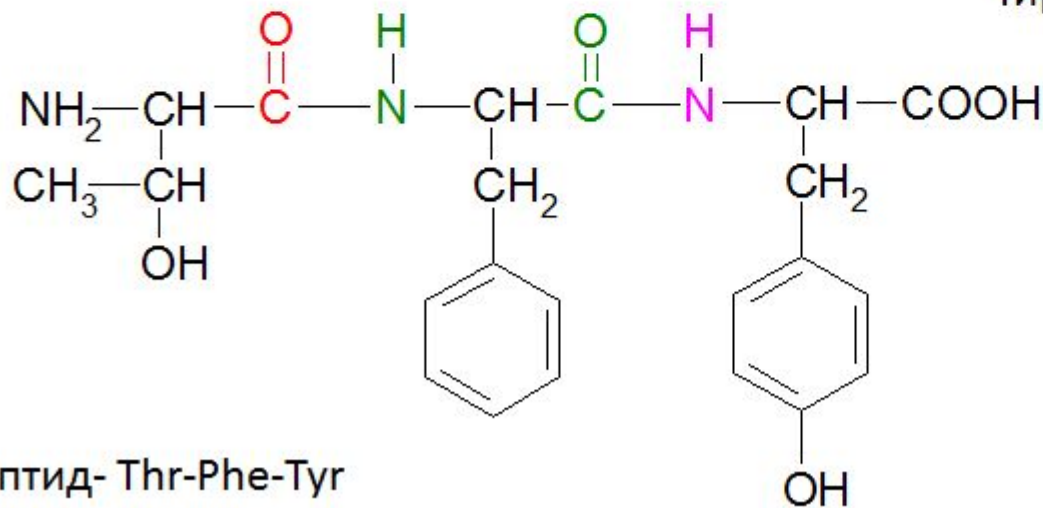
Пространственное строение пептидов и белков



Треонин

Фенилаланин

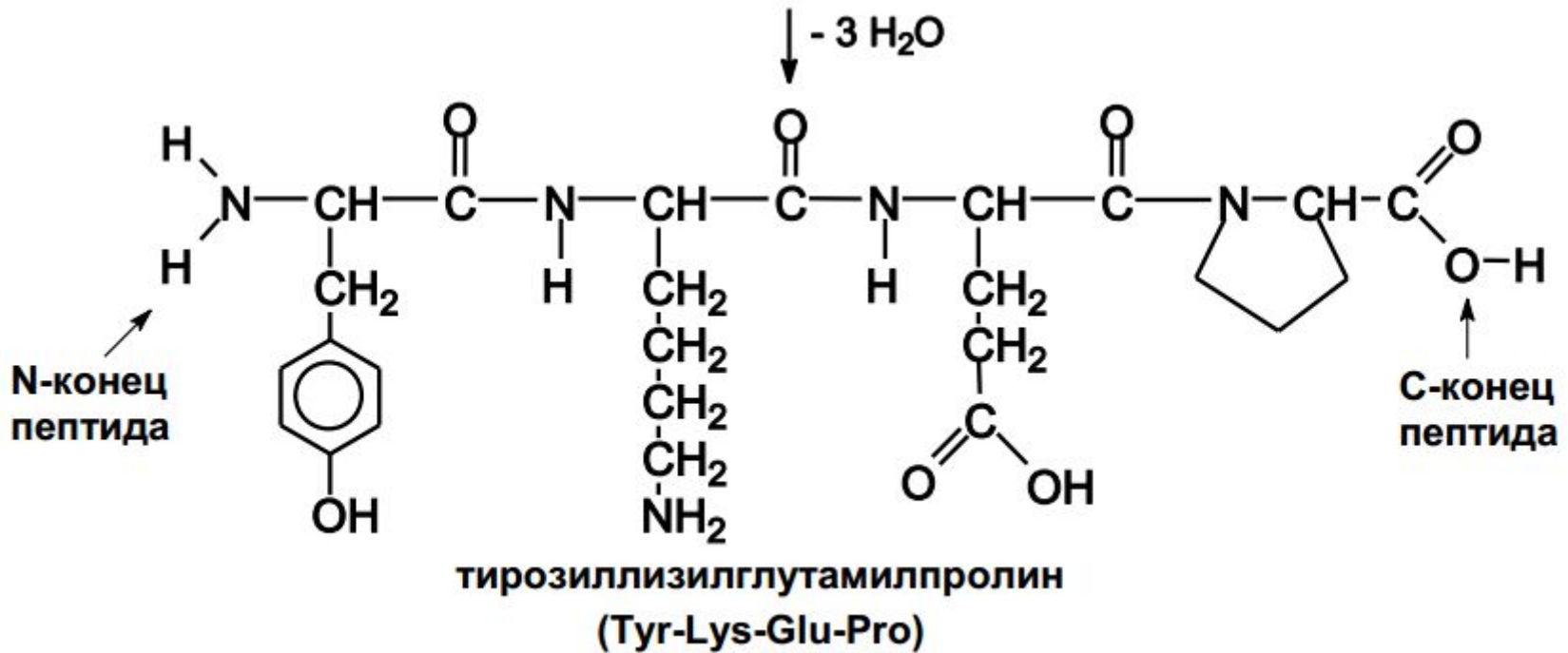
Тирозин



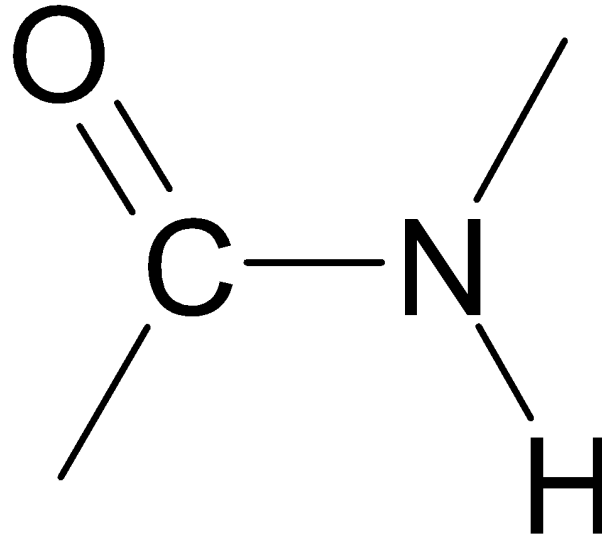
Трипептид- Thr-Phe-Tyr

Треонил-Фенилаланил-Тирозин

Пространственное строение пептидов и белков



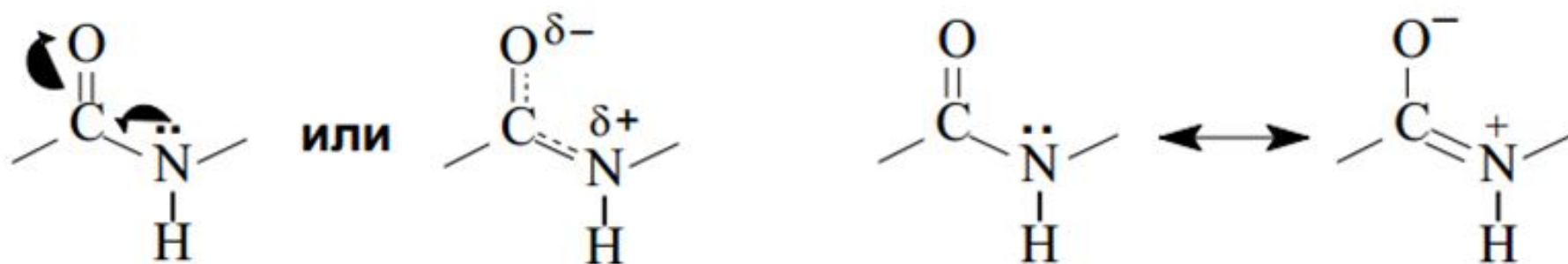
Строение пептидной (амидной) группы



В пептидной (амидной) группе $-\text{CONH}$ атом углерода находится в состоянии Sp^2 гибридизации.

Неподеленная пара электронов атома азота вступает в сопряжение с π -электронами двойной связи $\text{C}=\text{O}$.

Пространственное строение пептидов и белков



С позиций электронного строения пептидная группа представляет собой трехцентровую, p, π -сопряженную систему, электронная плотность в которой смещена в сторону более электроотрицательного атома кислорода.

Атомы С, О и N, образующие сопряженную систему, находятся в одной плоскости.

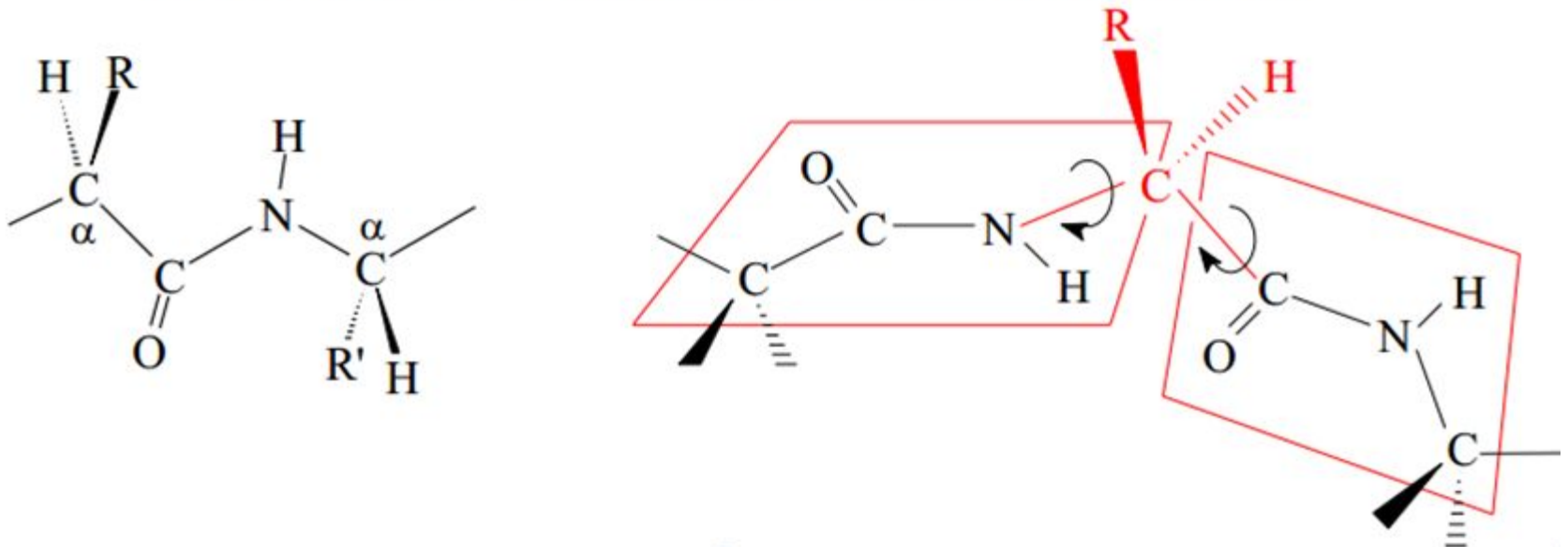
В результате сопряжения происходит некоторое выравнивание длин связей (удлинение С=О и укорочение С-N)

Пространственное строение пептидов и

белков

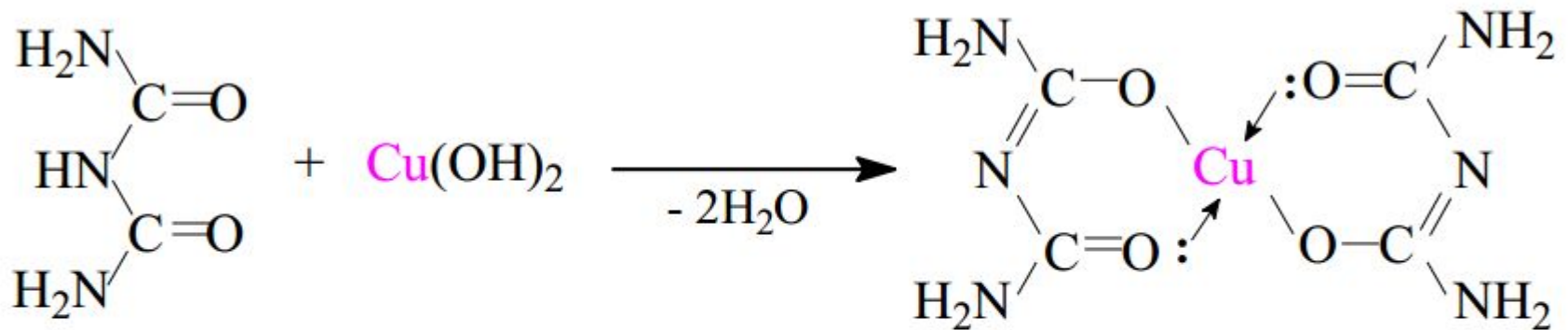
Наличие плоской сопряженной системы в пептидной группе является причиной затруднения вращения вокруг связи C-N, а углеродные атомы аминокислотных остатков(α) располагаются в плоскости пептидной группы по разные стороны от связи C-N, т. е. в более выгодном *транс* -положении: боковые радикалы R аминокислотных остатков в этом случае будут наиболее удалены друг от друга в пр

жесткая плоская структура пептидной группы



Качественные реакции

- Биуретовая реакция



- ❖ **Общая реакция для соединений, содержащих не менее двух амидных группировок (применяется для обнаружения пептидов и белков).**

Изоэлектрическая точка пептидов и белков

Как и аминокислоты, пептиды и белки являются амфотерными соединениями, содержащими и кислотные группы (COOH) и основные группы (NH₂).

ИЭТ (pI) зависит от их количества: если больше -COOH, чем -NH₂, то ИЭТ меньше 5-6, если наоборот, то больше.

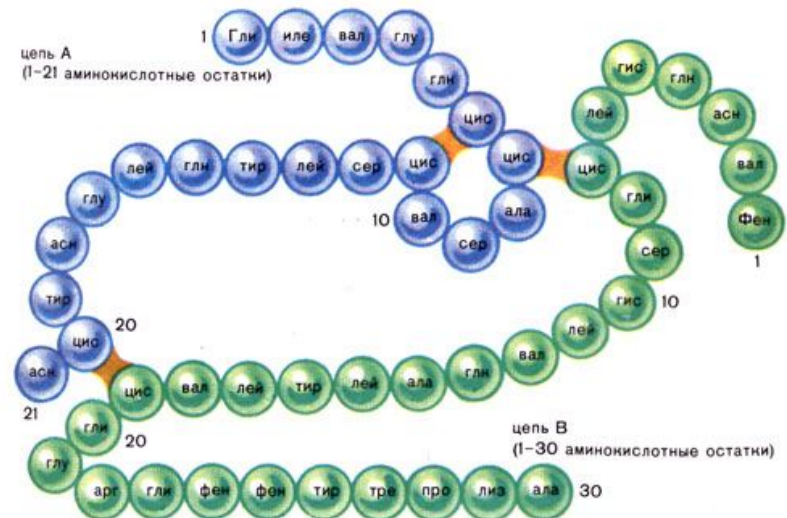
Пептид: **Тре-Фен-Тир.** → Содержит одну COOH и одну NH₂
ИЭТ будет равна 5-6 (pI≈7).

Пептид: **Гли-Лиз-Тир.** → Содержит одну COOH и две NH₂
ИЭТ будет равна 8-11 (pI>7).

Пептид: **Глу-Ала-Цис.** → Содержит две COOH и одну NH₂
ИЭТ будет равна 3 (pI<7).

Аминокислотная последовательность белков

Первые исследования по выяснению аминокислотной последовательной белков были выполнены в Кембрижском университете Ф.Сенгером, который был дважды удостоен Нобелевской премии. Ф.Сенгер в течение 10 лет изучал аминокислотную последовательность гормона инсулина. Он выявил, что инсулин состоит из 51 аминокислоты, которые образуют две полипептидные



Пространственное строение пептидов и
белков

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеинов

ых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

Пространственное строение пептидов и
белков

Секвенирование ДНК

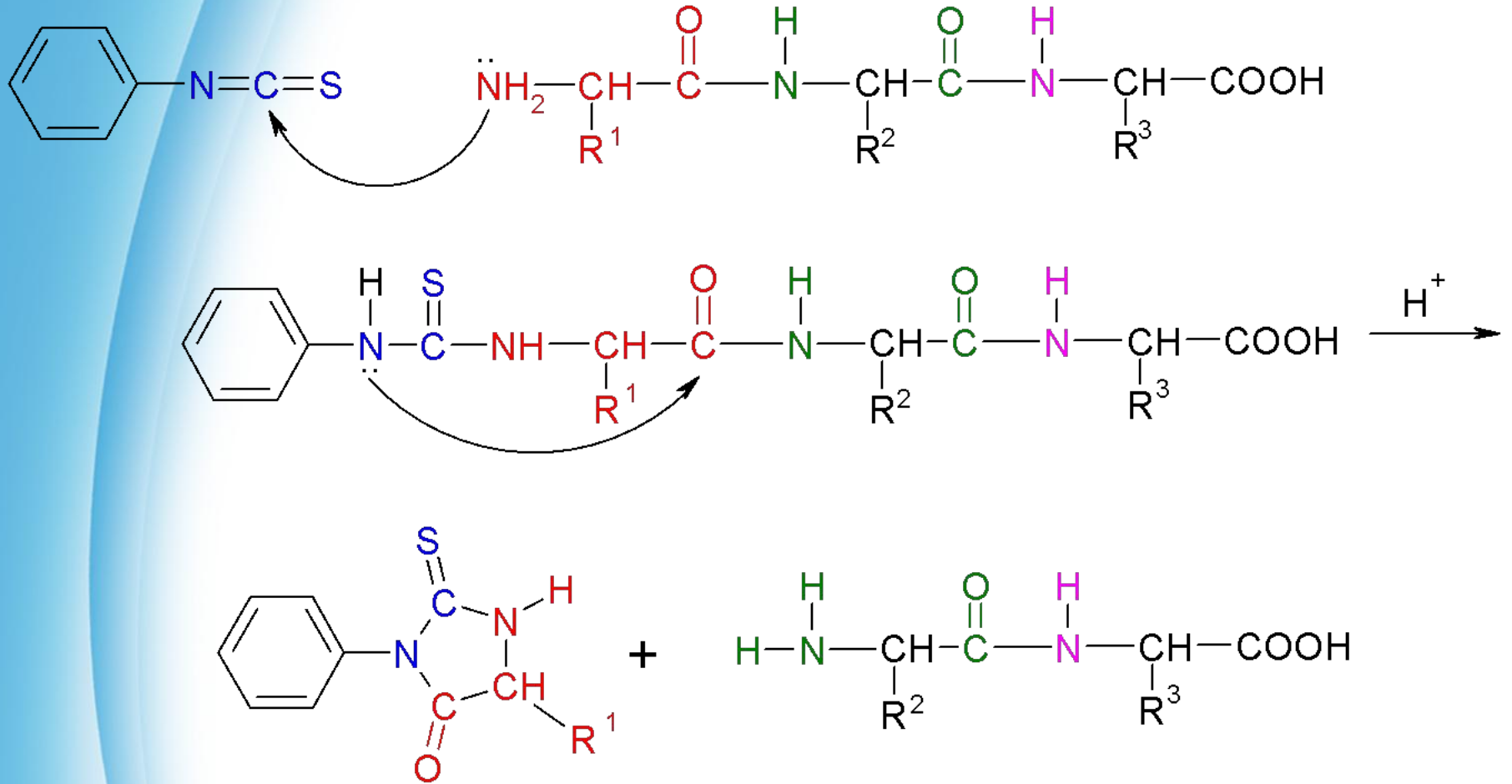
Первичная структура любой белковой молекулы напрямую зависит от структуры ДНК-генома. Поэтому сначала выделяют ген, в котором закодирована структура белка. Далее определяют последовательность азотистых оснований в ДНК. Каждая аминокислота в белковой молекуле закодирована сочетанием трех азотистых оснований - триплетом (кодоном) в молекуле ДНК. Это дает возможность получить информацию о первичной структуре белковой молекулы, а, значит, прогнозировать строение всей молекулы в целом, поскольку именно первичная структура определяет строение всех высших уровней организации - и вторичной, и третичной, а, иногда и четвертичной структур.

Пространственное строение пептидов и
белков

Анализ первичной структуры пептидов Метод Эдмана

Используя фенилизотиоцианат (Ph-NCS) последовательно отщепляют АК с N-конца и определяют образующиеся фенилтиогидантоиновые производные.

Пространственное строение пептидов и белков



Фенилтиогидантоиновое
производное
N-концевой АК

Пептид укороченный на 1
АК

Пространственное строение пептидов и
белков

Вторичная структура белка возникает за счет водородных связей между пептидными связями, что приводит к упорядоченному расположению полипептидных цепей в виде α -спирали или складчатой структуры.

α -спираль

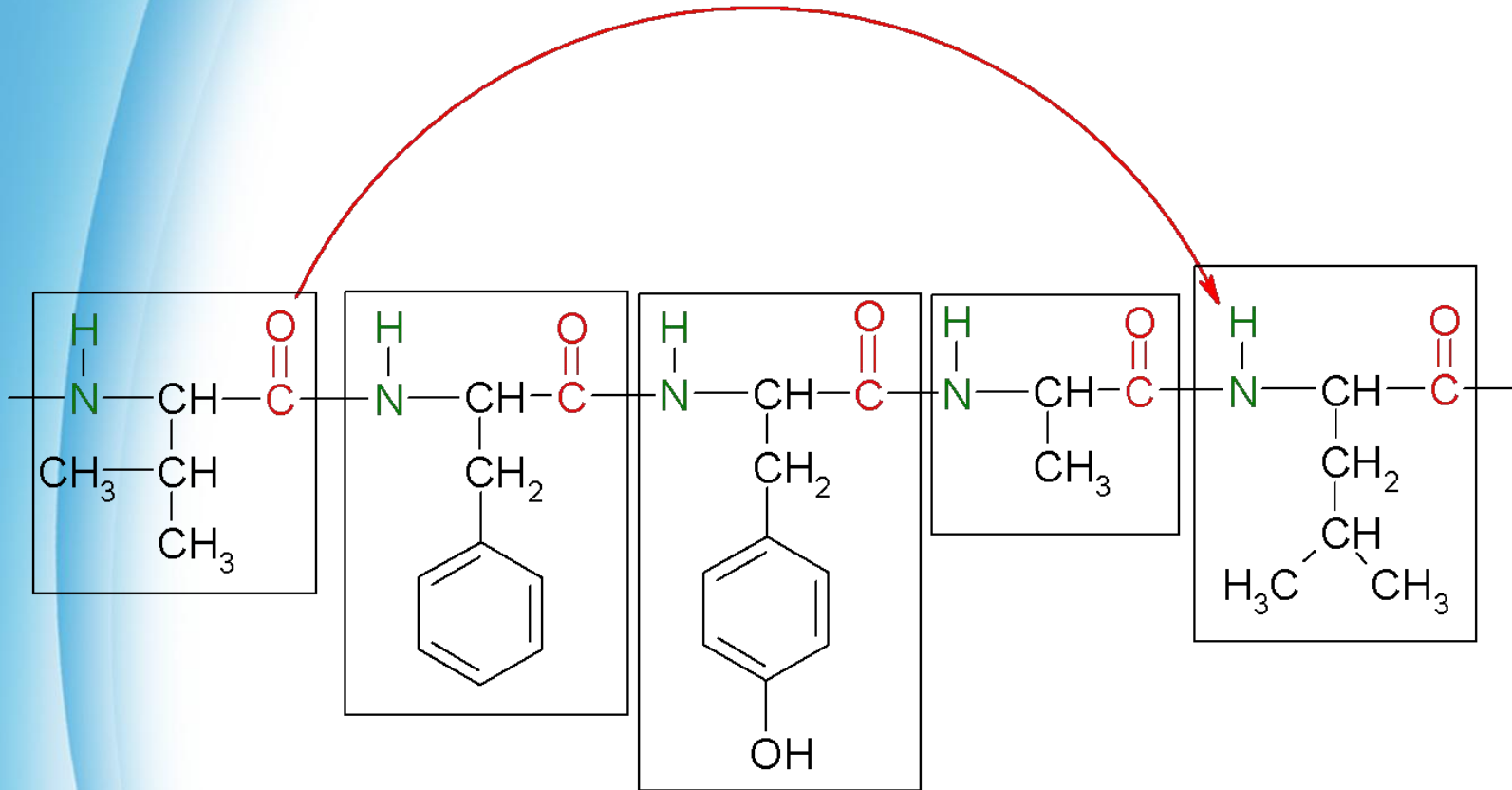
Представляет собой полипептидную цепь расположенную в виде правозакрученной спирали. Внешне она похожа на слегка растянутую спираль электрической плитки. Высота одного витка 0,54 нм; в него входит 3,6 аминокислотных остатка ; ее диаметр 0,5 нм.

Основную роль в стабилизации такой конформации цепи играют водородные связи, которые образуются между карбонильным атомом кислорода и атомом водорода NH-групп каждого пятого из аминокислотных остатков. Такая структура характерна для глобулярных белков: гемоглобина, инсулина и т.д.

Пространственное строение пептидов и белков

Водородные связи в α -спиральных

-Вал-Фен-Тир-Ала-Лей-



Остатки

Первый

Второй

Третий

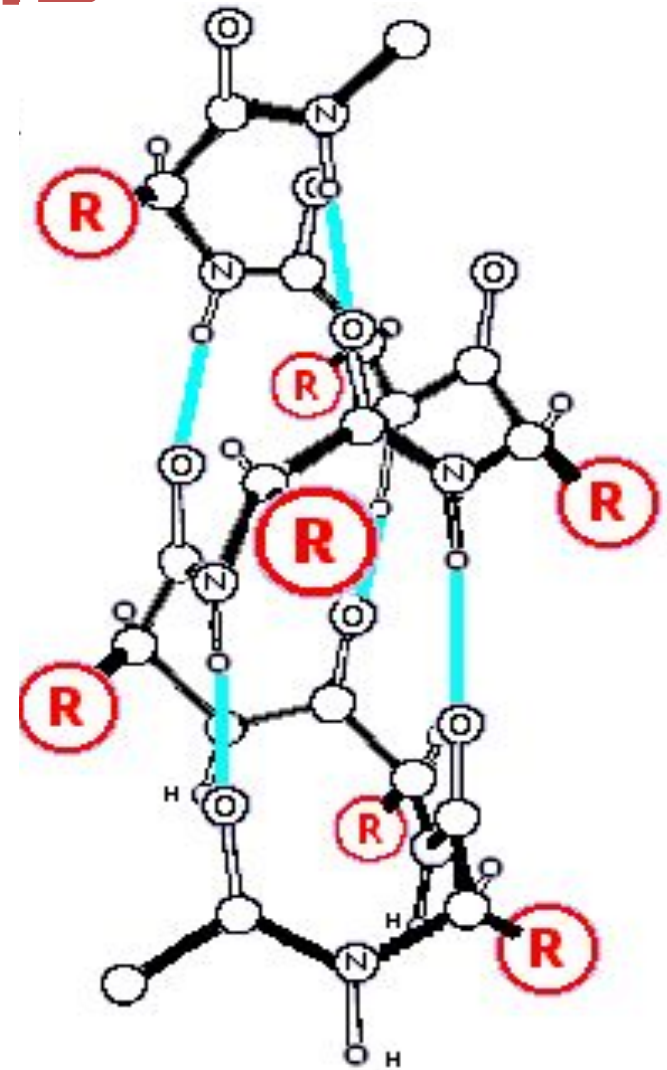
АК:

Четвёртый

α -спираль – 4₁₃ спираль: остаток АК образует водородную связь с четвёртым по цепи остатком АК; в образующемся цикле 13 атомов.

α -спираль

Правые α -спирали в полипептидной цепи стабилизируются водородными связями, где C=O группы связаны с лежащими от них в направлении С-конца цепи H-N группами

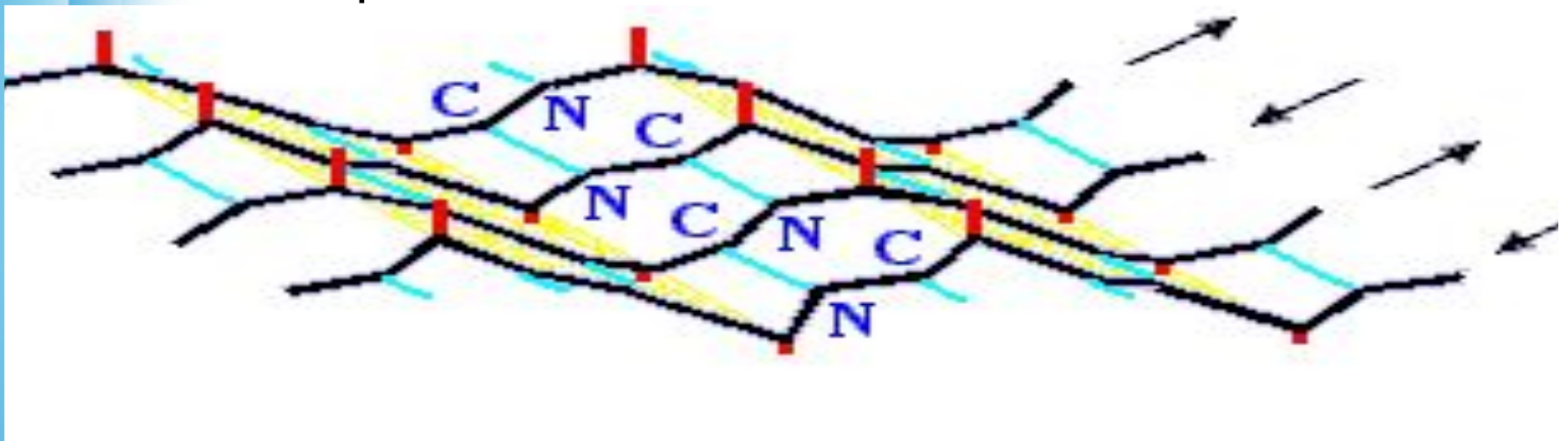


Пространственное строение пептидов и белков

β -слой

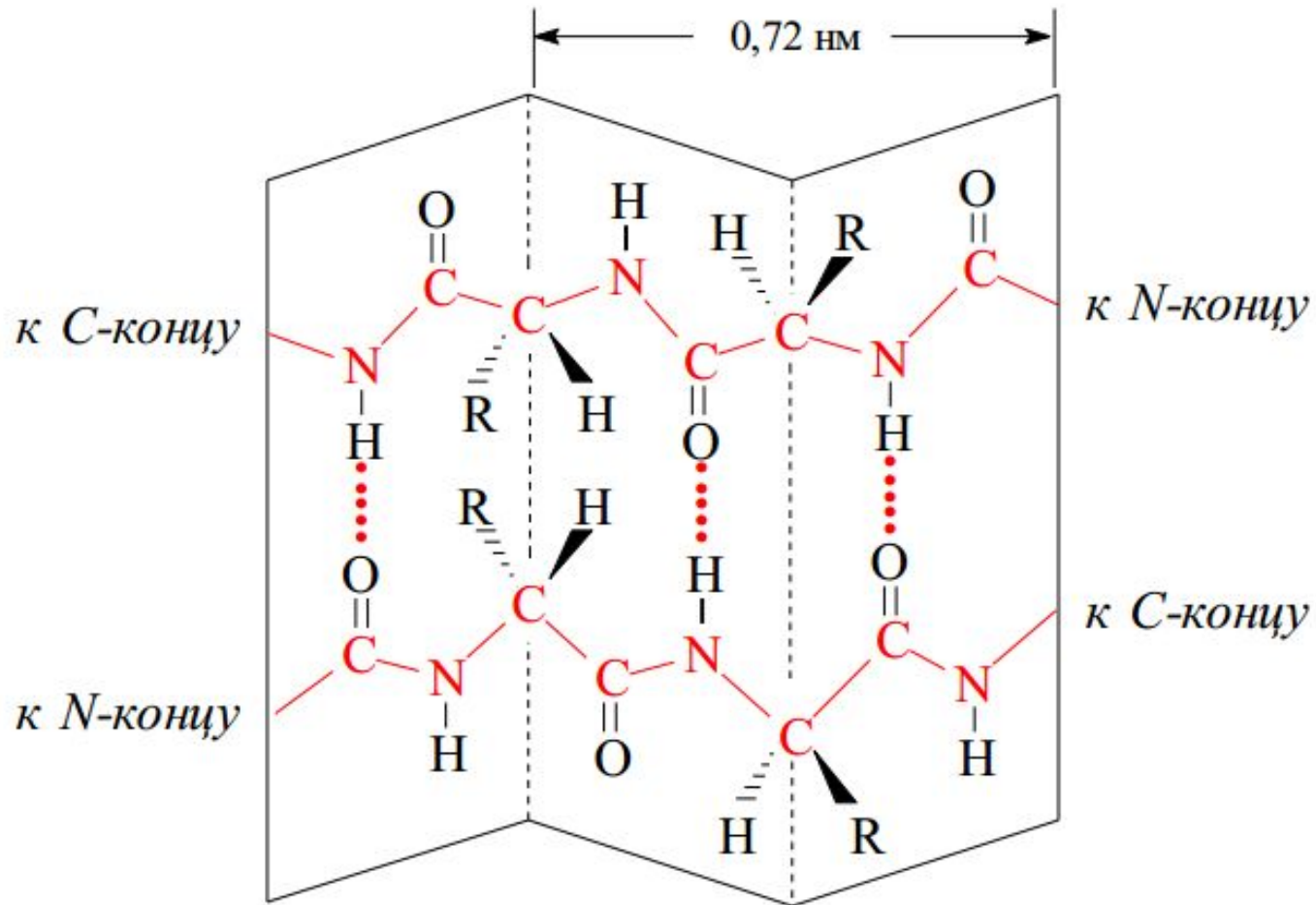
Представляет собой вытянутые полипептидные цепи, уложенные в "складчатые листы", связываемые множеством водородных связей между пептидными группами этих цепей. В большинстве случаев "складчатый лист" включает более 6 полипептидных цепей.

Такая структура характерна для фибриллярных белков: кератина, коллагена.



Пространственное строение пептидов и белков

• β -Структура (складчатый лист)

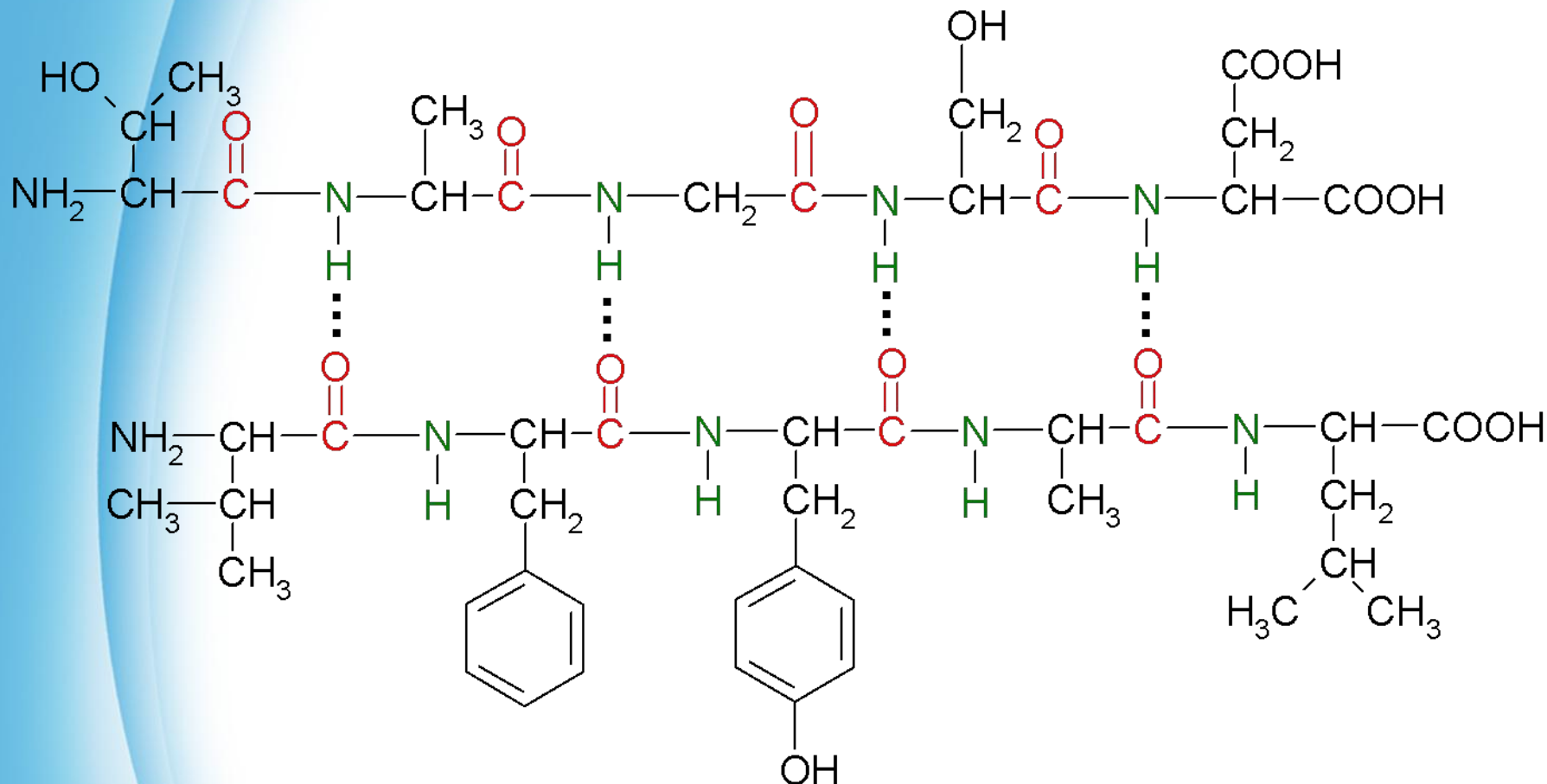


H-Связи между пептидными группами различных цепей

Пространственное строение пептидов и белков

Структура β -складчатых слоев

водородные связи



Тре-Ала-Гли-Сер-
Асп

Вал-Фен-Тир-Ала-

Пространственное строение пептидов и
белков

Третичная структура белка возникает в

результате взаимодействия между радикалами
аминокислотных остатков полипептидных цепей.

К таким взаимодействиям относятся водородные
связи, Ван-дер-Ваальсовы силы, менее характерными
являются дисульфидные связи и ионные связи.

Выделяют ^{белков} два общих типа третичной структуры:

- 1) В Фибриллярных белках (например, коллаген, эластин) молекулы которых имеют вытянутую форму и обычно формируют волокнистые структуры тканей, третичная структура представлена либо **тройной альфа-спиралью** (например, в коллагене), либо **бета-складчатыми структурами**.
- 2) В глобулярных белках, молекулы которых имеют форму шара или эллипса (латинское название: *GLOBULA* - шар), встречается сочетание всех трех типов структур: всегда **есть нерегулярные участки**, есть **бета-складчатые структуры** и **альфа-спирали**.

Пространственное строение пептидов и белков



Укладка α -спиралей и β -структуры с образованием глобулы

Пространственное строение пептидов и

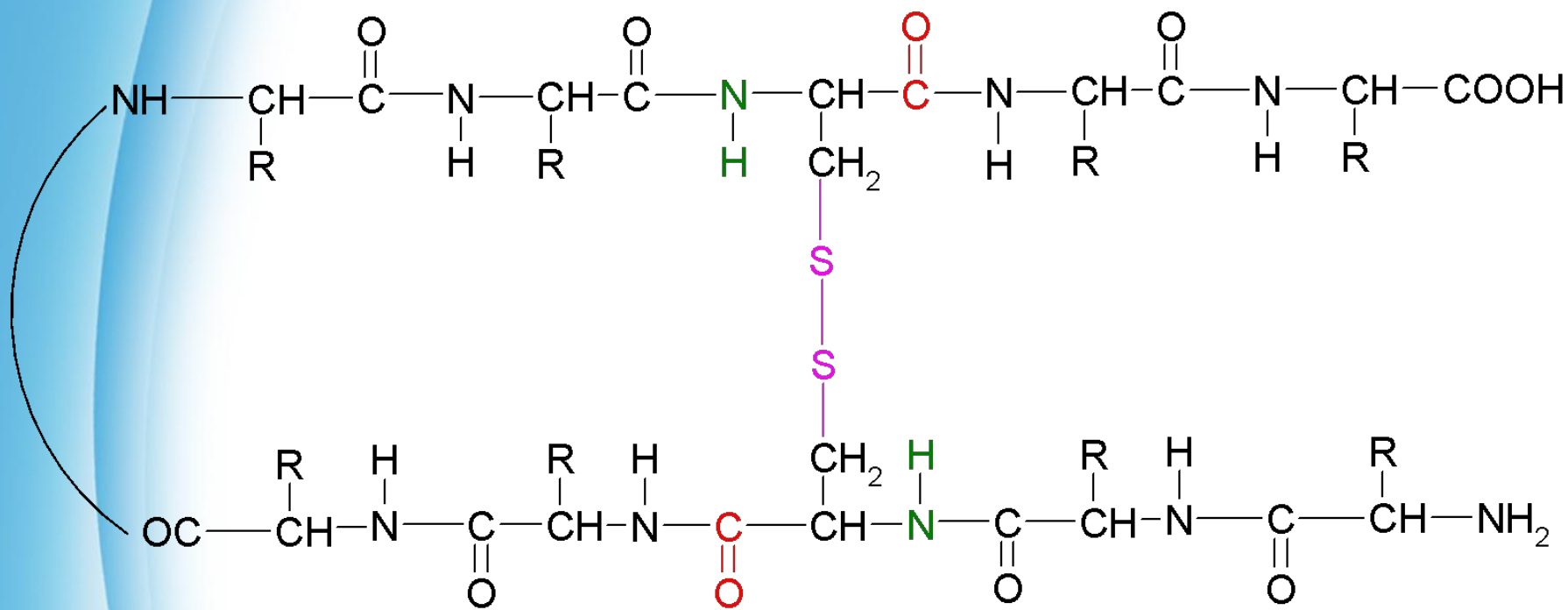
Взаимодействия остатков АК в третичной структуре белков

АК в белковой глобуле взаимодействуют за счёт:

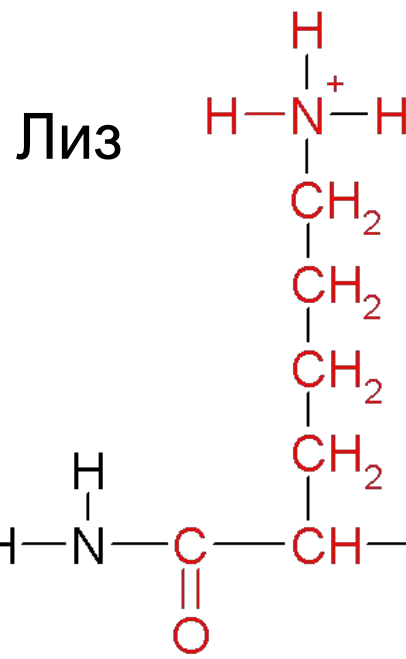
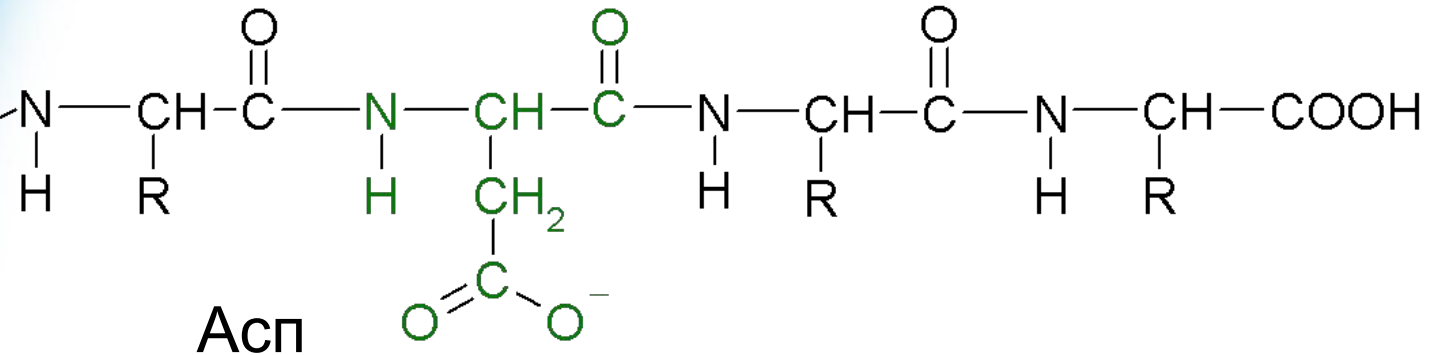
- **Ковалентных связей**
(дисульфидные $-S-S-$ связи в цистине)
- **Ионных связей**
(Глу- COO^- H_3N^+ -Лиз)
- **Водородных связей**
(Глу- $COO^- \dots HO$ -Тир)
- **Гидрофобных взаимодействий**
(Вал, Лей, Иле, Фен)

Пространственное строение пептидов и белков

Дисульфидные связи в цистине

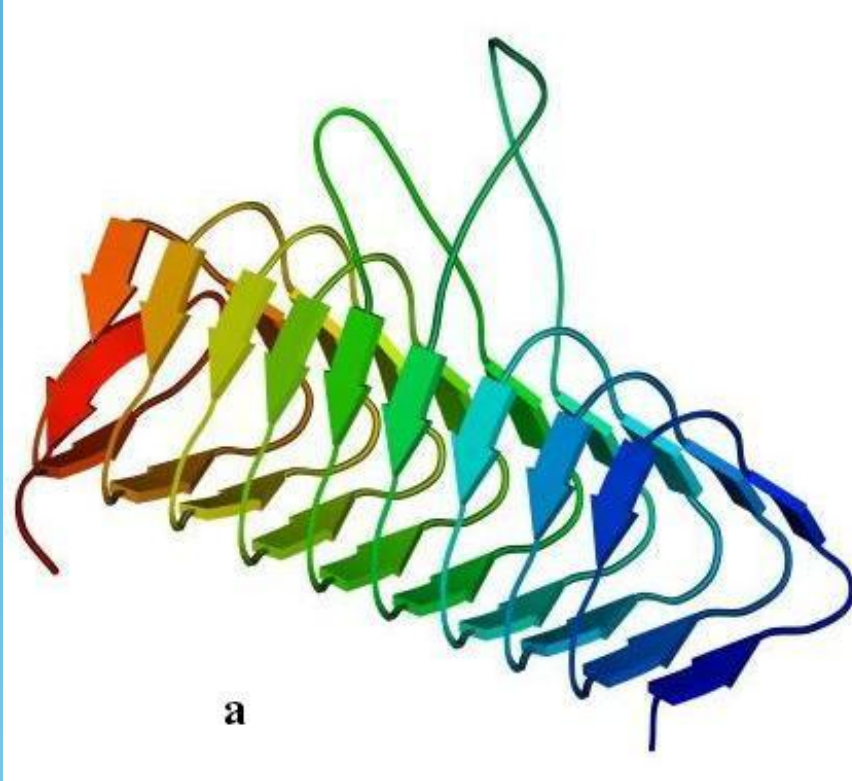


Пространственное строение пептидов и белков
Ионные связи

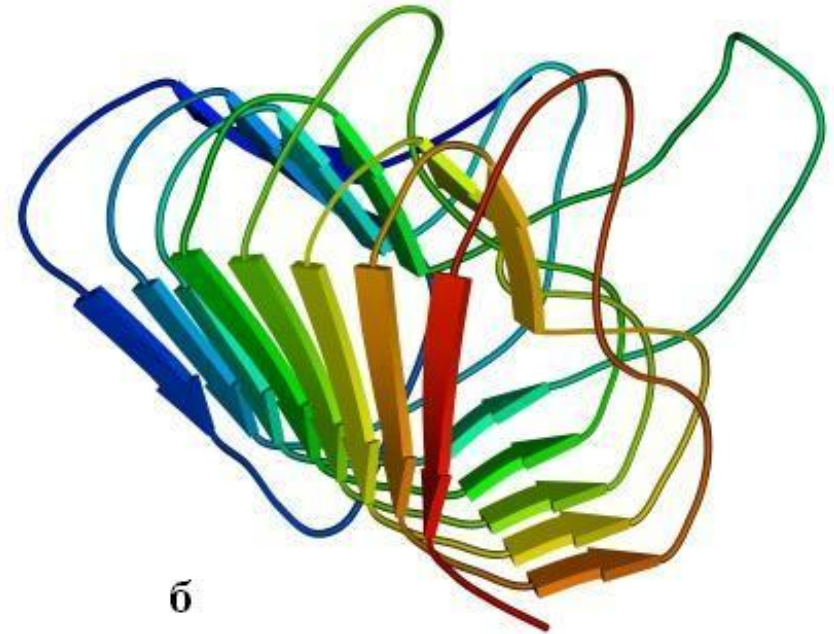


Пространственное строение пептидов и
белков

Третичная структура



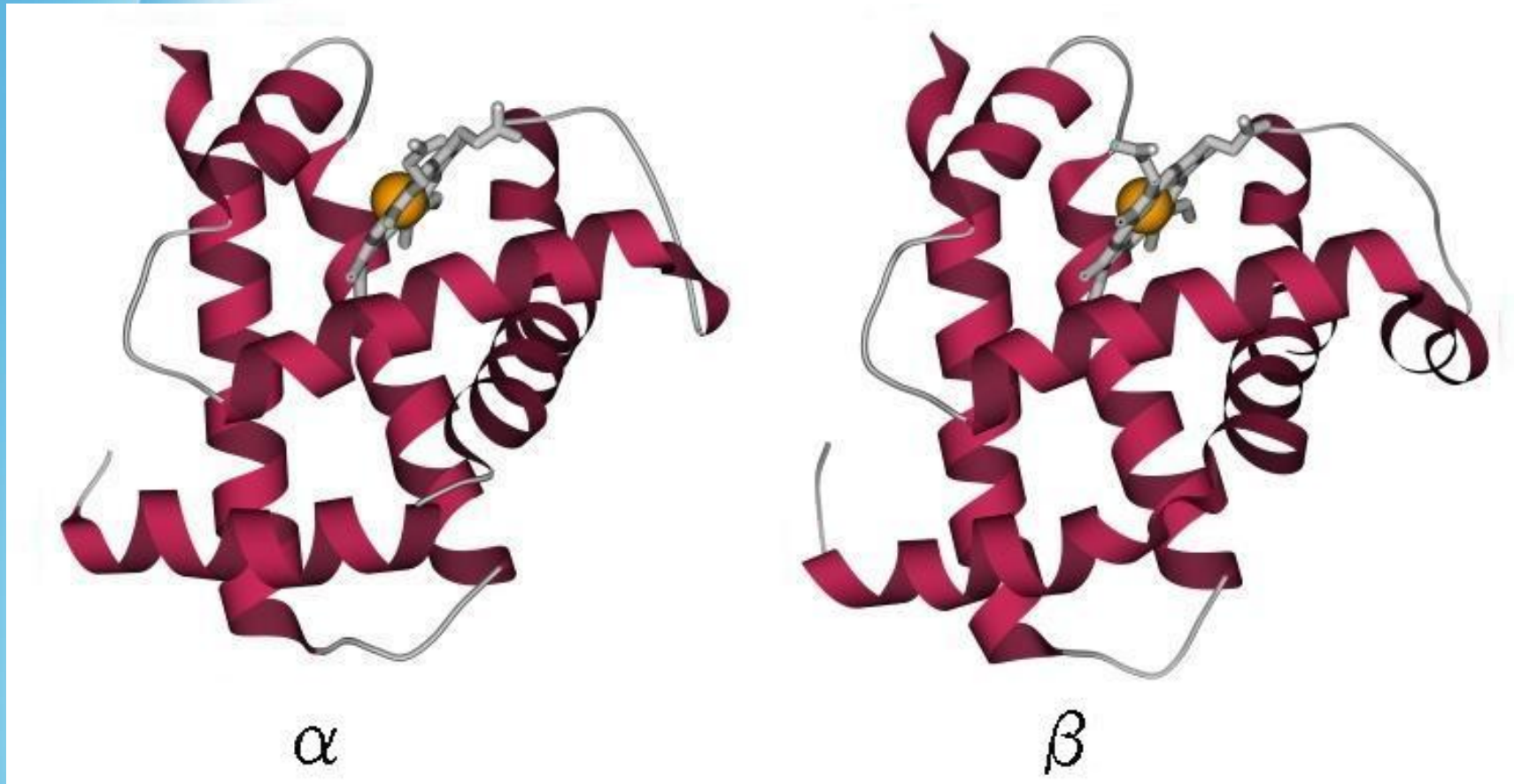
ацилтрансфераза



пектинлиаза С

Пространственное строение пептидов и белков

Третичная структура



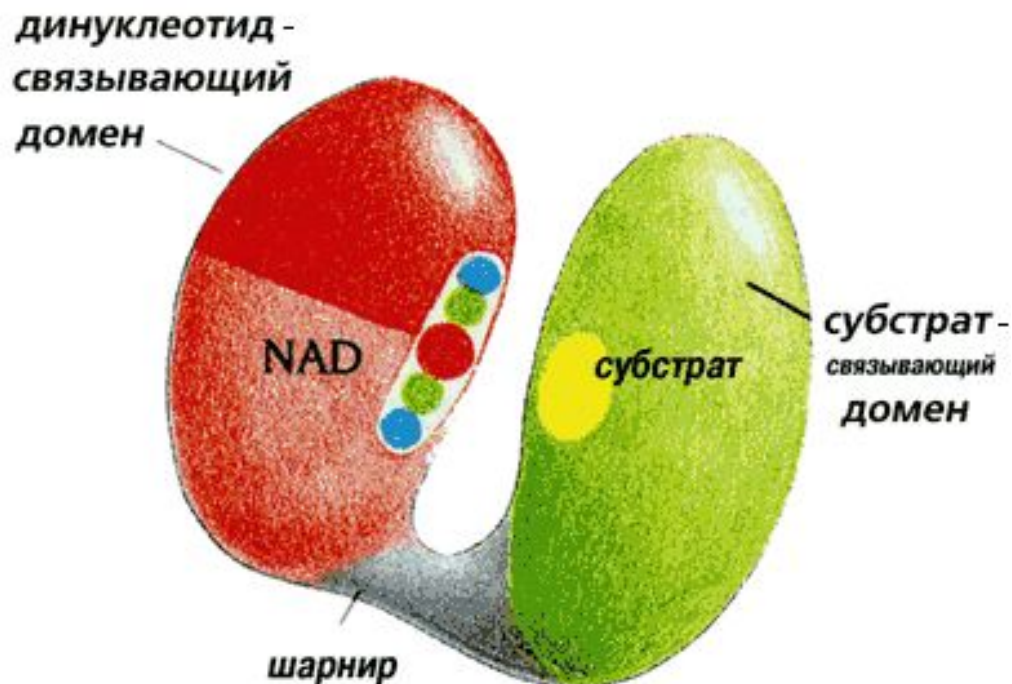
α и β цепи гемоглобина лошади

Пространственное строение пептидов и белков

Домены

Домены – глобулярные области в пределах одной белковой молекулы

Домены соединены шарнирным участком



Доменная структура NAD⁺-зависимой дегидрогеназы

Четвертичная структура

Четвертичная структура - способ укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей, обладающих одинаковой первичной, вторичной, третичной структурой и формирование единого макромолекулярного комплекса.

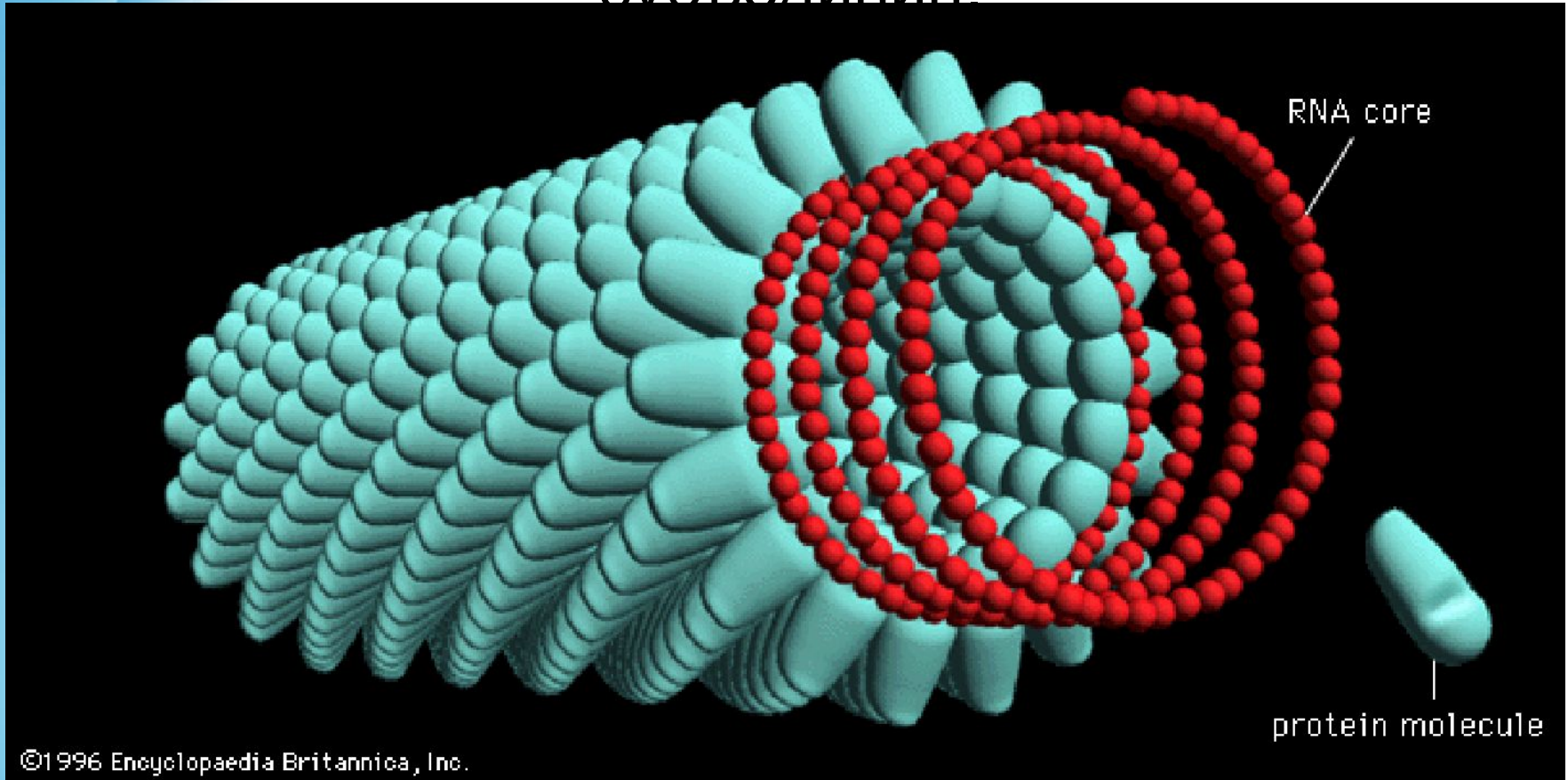
Встречается не у всех белков, а только у тех, которые состоят из двух или более полипептидных цепей. Каждая такая цепь называется **СУБЪЕДИНИЦЕЙ** данной молекулы (или **ПРОТОМЕРОМ**). Поэтому белки, обладающие четвертичной структурой, называют **ОЛИГОМЕРНЫМИ** белками.

В состав белковой молекулы могут входить одинаковые или разные субъединицы. Например, молекула гемоглобина «А» состоит из двух субъединиц одного типа и двух субъединиц другого типа, то есть является тетрамером.

Фиксируются четвертичные структуры белков всеми типами слабых связей, а иногда еще и дисульфидными

Пространственное строение пептидов и белков

Уникальным примером является капсида вируса табачной мозаики состоящую из 2130 белковых субъединиц.



2130 одинаковых молекул белка расположены вокруг РНК

ВИРУС

3. Физико-химические свойства пептидов и белков

Образуют коллоидные растворы.

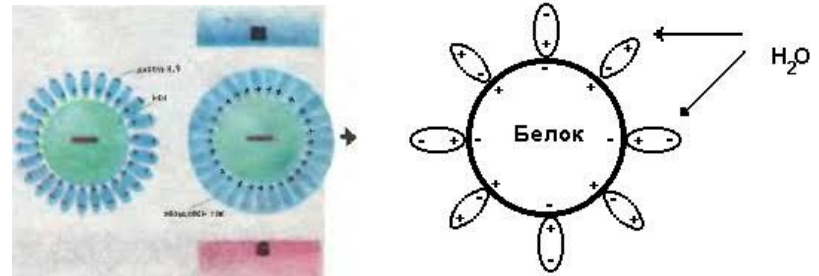
Большинство белков гидрофильны. Однако белковые молекулы имеют очень большие размеры, поэтому белки не могут образовывать истинных растворов, а только коллоидные. Внешнее проявление этого - это эффект Тиндаля (или конус Тиндаля). Эффект Тиндаля вызывается рассеянием тонкого пучка света при прохождении через белковый раствор.

**Несмотря на большую величину,
многие белковые молекулы не осаждаются
в водных растворах.**

Осаждению белковых молекул
препятствуют факторы стабилизации
белкового раствора.

ФАКТОРЫ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКА В РАСТВОРЕ

- **ГИДРАТНАЯ ОБОЛОЧКА** - это слой молекул воды, определенным образом ориентированных на поверхности белковой молекулы. Поверхность большинства белковых молекул заряжена отрицательно, и диполи молекул воды притягиваются к ней своими положительно заряженными полюсами.



- **ЗАРЯД БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ.**

Поверхность большинства белковых молекул заряжена за счет свободных COO^- и NH_3^+ групп. Изоэлектрическая точка (ИЭТ) большинства белков организма находится в слабокислой среде. Это означает, что у таких белков количество кислотных ($-\text{COOH}$) групп больше количества основных групп ($-\text{NH}_2$). рН плазмы крови около 7,36 - это выше ИЭТ большинства белков, поэтому в плазме крови белки

Осаждение нативных белков

1. ВЫСАЛИВАНИЕ - это осаждение белков высокими концентрациями нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов.

Такие соли очень гидрофильны и обладают в высоких концентрациях водоотнимающими свойствами. Чаще это NaCl , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCl_2 . По мере их добавления к раствору белка они сначала растворяются в свободной воде, а затем, при дальнейшем повышении концентрации соли, конкурируют с белком за обладание водой, которая входит в состав гидратных оболочек.

Белки ~~менее~~ более гидрофильные, которые плохо удерживают воду гидратной оболочки, теряют ее раньше. Более гидрофильные белки требуют большей концентрации соли для высаливания.

Поэтому с помощью высаливания можно разделить белки с разной степенью гидрофильности. Таким способом, например, можно разделить альбумины и глобулины плазмы крови.

При высаливании сохраняется нативность белковых молекул. Если осадить белки с помощью высаливания, а затем уменьшить концентрацию солей, например, методом диализа, то белок опять растворится.

2. ПРИМЕНЕНИЕ ВОДООТНИМАЮЩИХ СРЕДСТВ.

Таковыми средствами являются растворители, которые смешиваются с водой в любых соотношениях. Чаще всего это ацетон, этиловый спирт.

Эти вещества отнимают гидратные оболочки белков, и белки выпадают в осадок, если они лишены заряда. Но, в отличие от высаливания, осадок сразу (немедленно!) должен быть отделен от растворителя. Если растворитель и белок будут длительно находиться в контакте, то могут произойти необратимые изменения структуры белковой молекулы (денатурация).

ДЕНАТУРАЦИЯ - это лишение белка его природных, нативных свойств, сопровождающееся разрушением четвертичной (если она была), третичной, а иногда и вторичной структуры белковой молекулы, которое возникает при разрушении дисульфидных и слабых типов связей, участвующих в образовании этих структур.

Первичная структура при этом сохраняется, потому что она сформирована прочными ковалентными связями. Разрушение первичной структуры может произойти только в результате гидролиза белковой молекулы длительным кипячением в растворе кислоты или щелочи.

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ДЕНАТУРАЦИЮ БЕЛКОВ

Физико-химические свойства пептидов и белков

Физические Факторы

1. Высокие температуры. Для разных белков характерна различная чувствительность к тепловому воздействию. Часть белков подвергается денатурации уже при 40-50°C. Такие белки называют термолабильными. Другие белки денатурируют при гораздо более высоких температурах, они являются термостабильными.
2. Ультрафиолетовое облучение
3. Рентгеновское и радиоактивное облучение
4. Ультразвук
5. Механическое воздействие (например, вибрация).

Химические Факторы

1. Концентрированные кислоты и щелочи. Например, трихлоруксусная кислота (органическая), азотная кислота (неорганическая).
2. Соли тяжелых металлов (например, CuSO_4).
3. Органические растворители (этиловый спирт, ацетон)
4. Растительные алкалоиды.
5. Мочевина в высоких концентрациях

ДЕЙСТВИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ. ^{белков} образуют соединения с SH-группами белков. Ядовиты для человека и животных. В медицинской практике применяются способы детоксикации при отравлениях тяжелыми металлами. В этих случаях для обезвреживания этих металлов дают внутрь молоко или другие белковые растворы.

КИПЯЧЕНИЕ (или просто нагревание до высоких температур) - усиливается тепловое движение молекул, ослабляются слабые типы связей, теряется нативность, белковая молекула "разворачивается", гидрофобные структуры выходят наружу. Это приводит к потере гидратной оболочки, молекулы сближаются и взаимодействуют друг с другом. Это приводит к тому, что белок выпадает в осадок. При охлаждении нативность не восстанавливается.

белков Обратимость денатурации

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

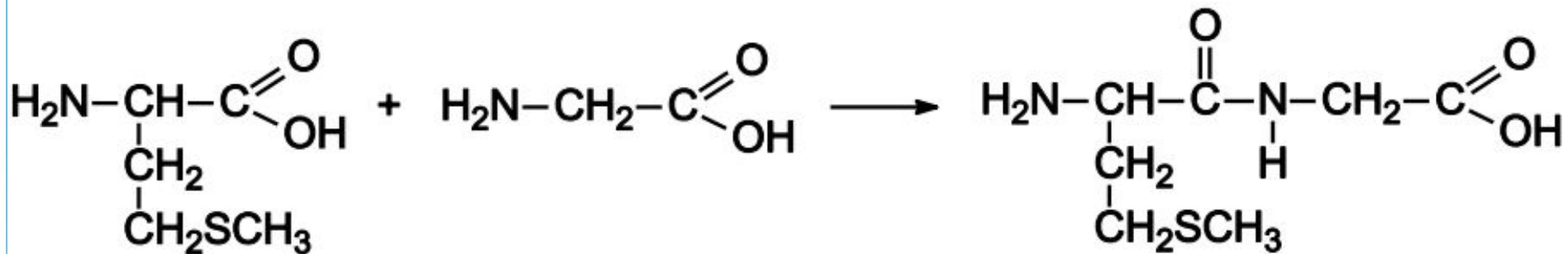
In vivo, в организме, возможна быстрая ренатурация. Это связано с выработкой в живом организме специфических белков, которые «узнают» структуру денатурированного белка, присоединяются к нему с помощью слабых типов связи и создают оптимальные условия для ренатурации. Такие специфические белки известны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

4. Пептидный синтез

Чтобы соединить две аминокислоты пептидной связью, например получить метионилглицин, необходимо:

- 1) **закрыть (защитить) аминогруппу метионина и карбоксильную группу глицина**, чтобы не произошло нежелательных реакций по этим группам;
- 2) **активизировать карбоксильную группу метионина;**
- 3) **образовать пептидную связь;**
- 4) **снять защитные группы.** Защитные группы должны надежно закрывать аминную и карбоксильную группы в процессе синтеза и потом легко сниматься без разрушения пептидной связи.

Принцип пептидного синтеза

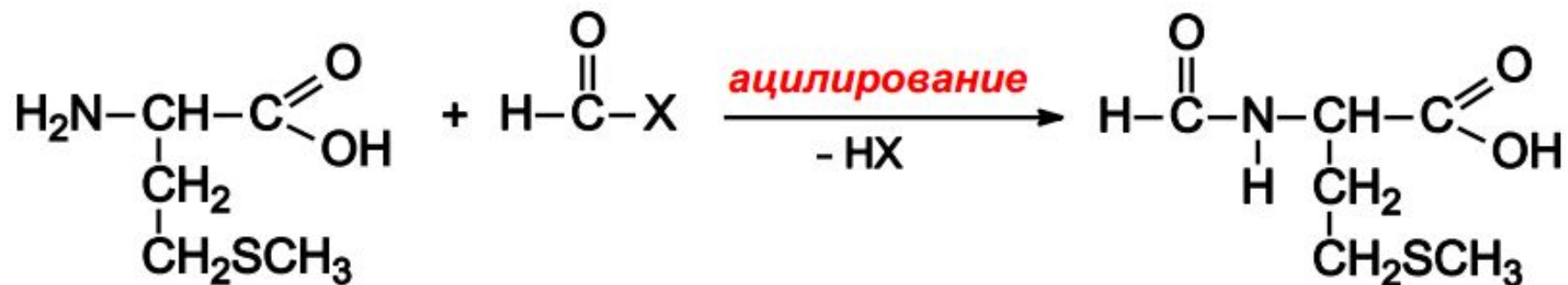


(не считая дикетопиперазинов)

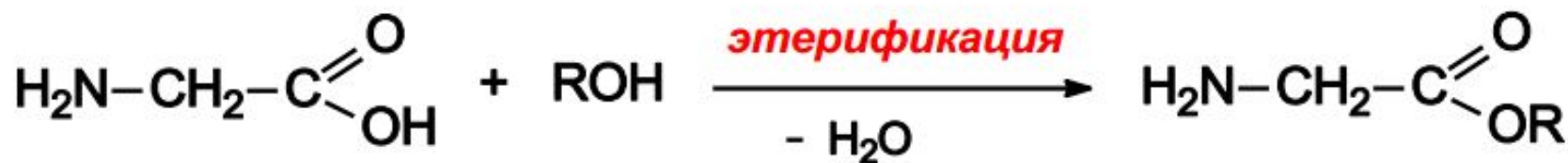
Основные этапы пептидного синтеза

1. Защита «ненужных» функциональных групп

– защита NH₂-группы

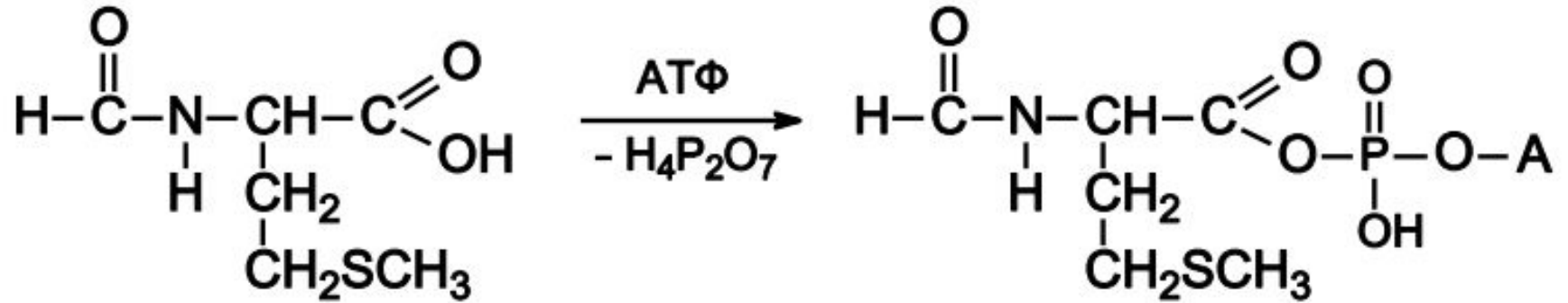


– защита COOH-группы

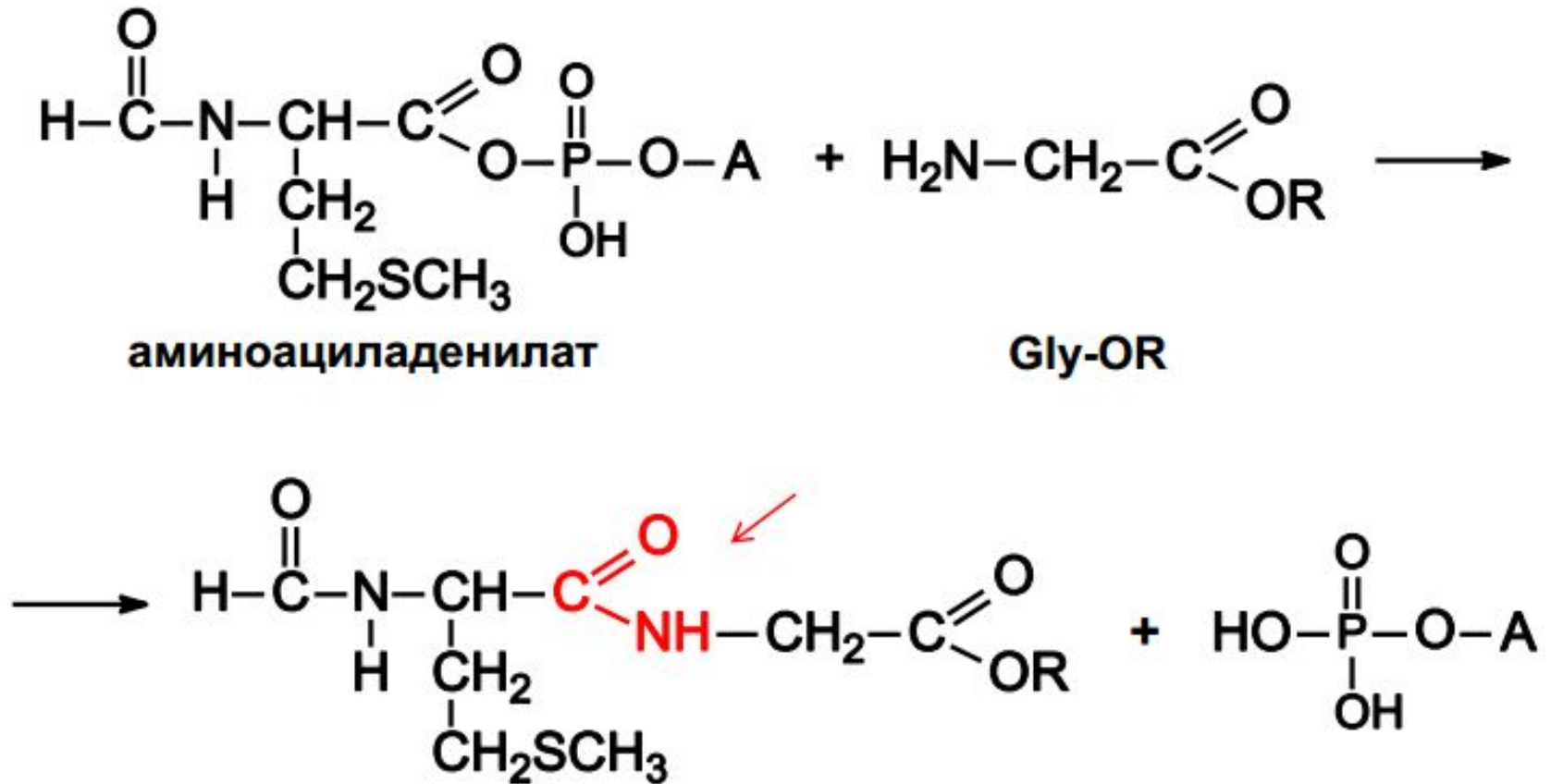


2. Активация карбоксильной группы

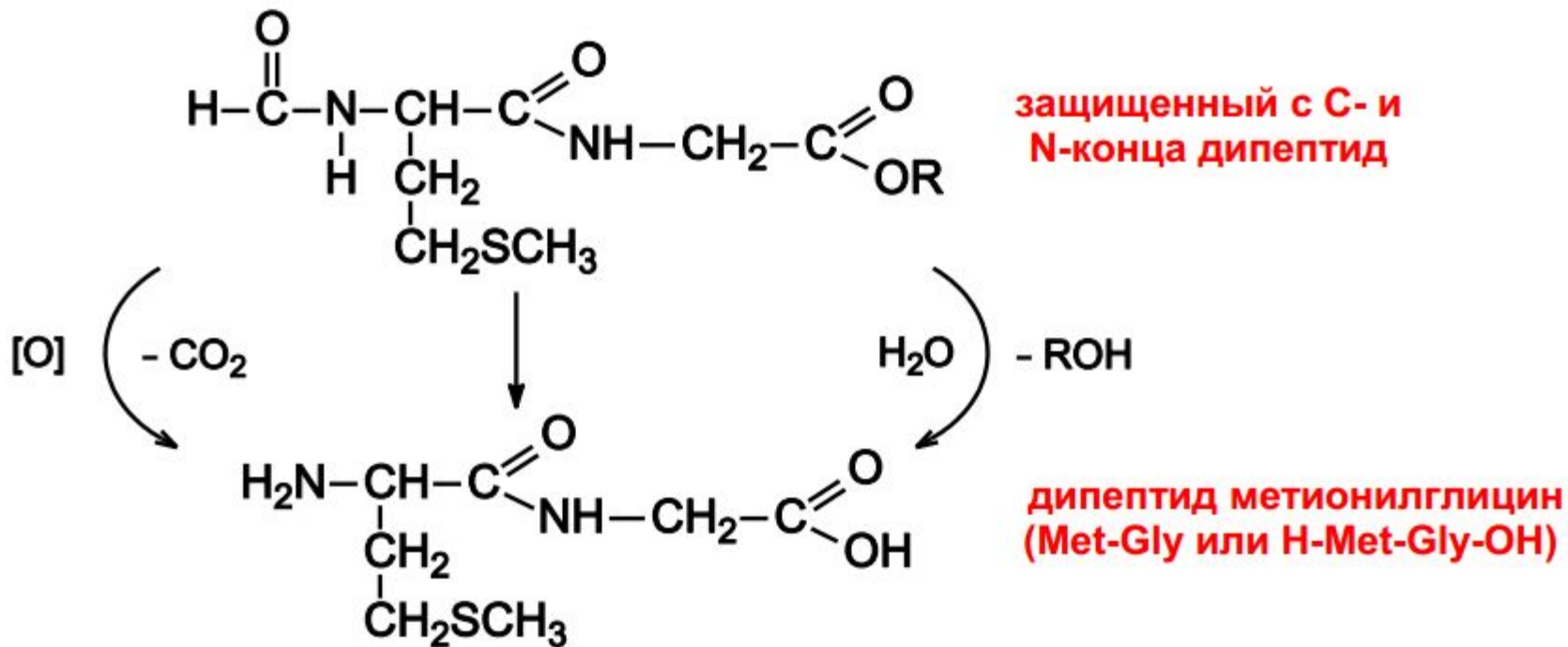
– метод смешанных ангидридов



3. Образование пептидной связи



4. Снятие защитных групп

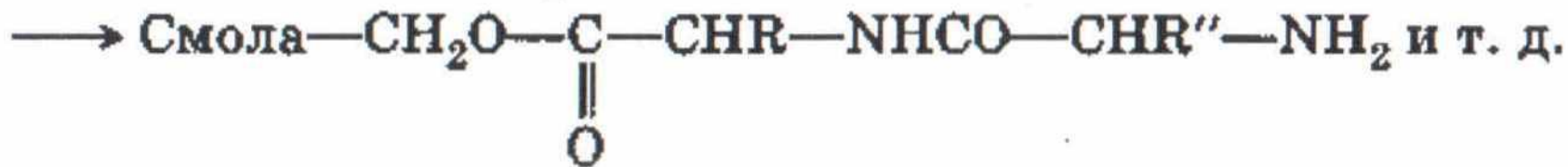
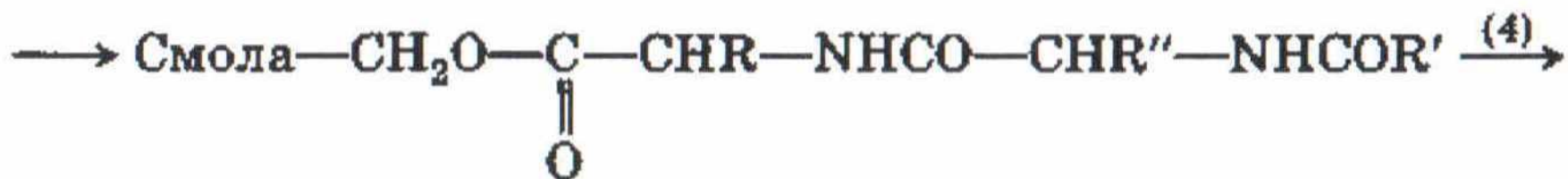
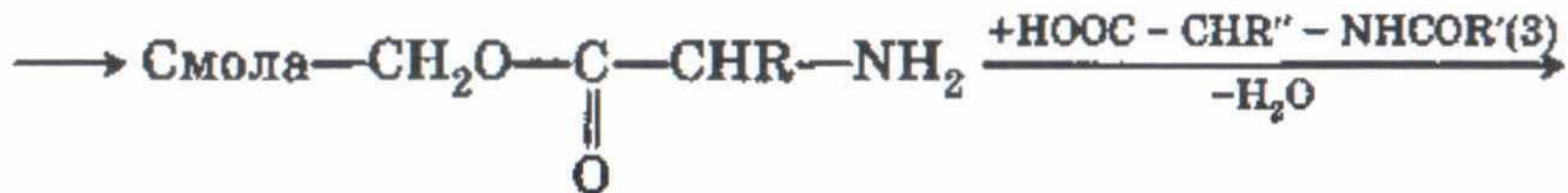
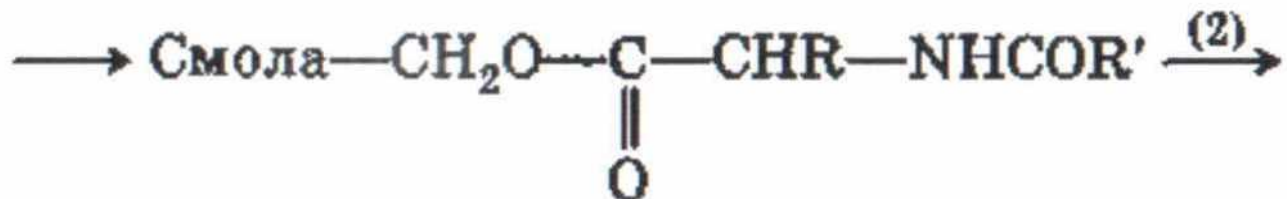
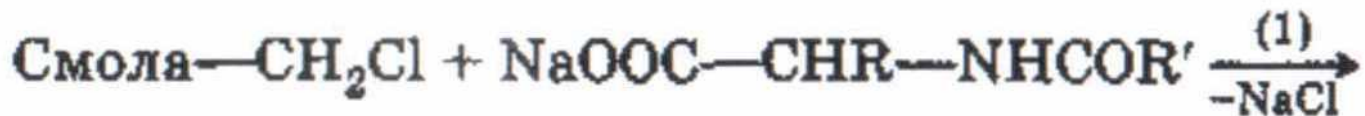


- первые примеры синтеза биологически активных пептидов — синтез гормонов **окситоцина** и **вазопрессина** (1953–1955);
- синтез **инсулина** (1963–1965), 223 реакции, выход 0.02–0.07%;
- твердофазный синтез, Б.Мэррифилд, 1962, использование «якорных» ClCH_2 -групп (фиксирование С-конца), *синтезаторы*.

Очень перспективный метод синтеза пептидных связей предложил в 1960 г. **Меррифилд (США) метод твердофазного синтеза пептидов.**

- (1-я стадия). Первая аминокислота с защищенной аминогруппой присоединяется к твердому носителю ионообменной смолы, содержащей первоначально группы $-CH_2Cl$ с образованием так называемой якорной связи.
- (2-я стадия). Затем наращивают пептидную цепь, пропуская через смолу растворы соответствующих реагентов. Для этого сначала убирают группу, защищающую конечную NH_2 -группу
- (3-я стадия). Пропуская через смолу раствор другой аминокислоты с защищенной аминогруппой в присутствии водоотнимающих реагентов, образуют пептидную связь между первой и второй аминокислотой.
- (4-я стадия). Если затем убрать защитную группу синтез пептида можно вести далее. После наращивания пептидной цепи до нужной величины гидролизуют «якорную» сложноэфирную связь и смывают полипептид со смолы

Пептидный синтез

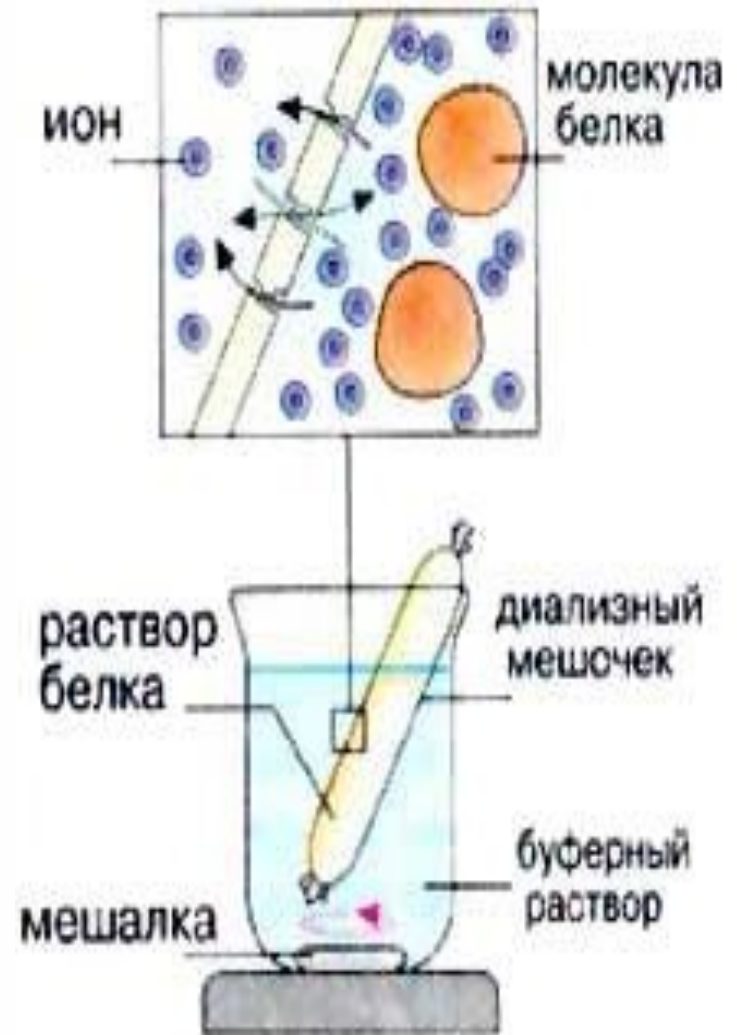


5. Методы выделения и очистки белка

Диализ

Диализ используют для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды.

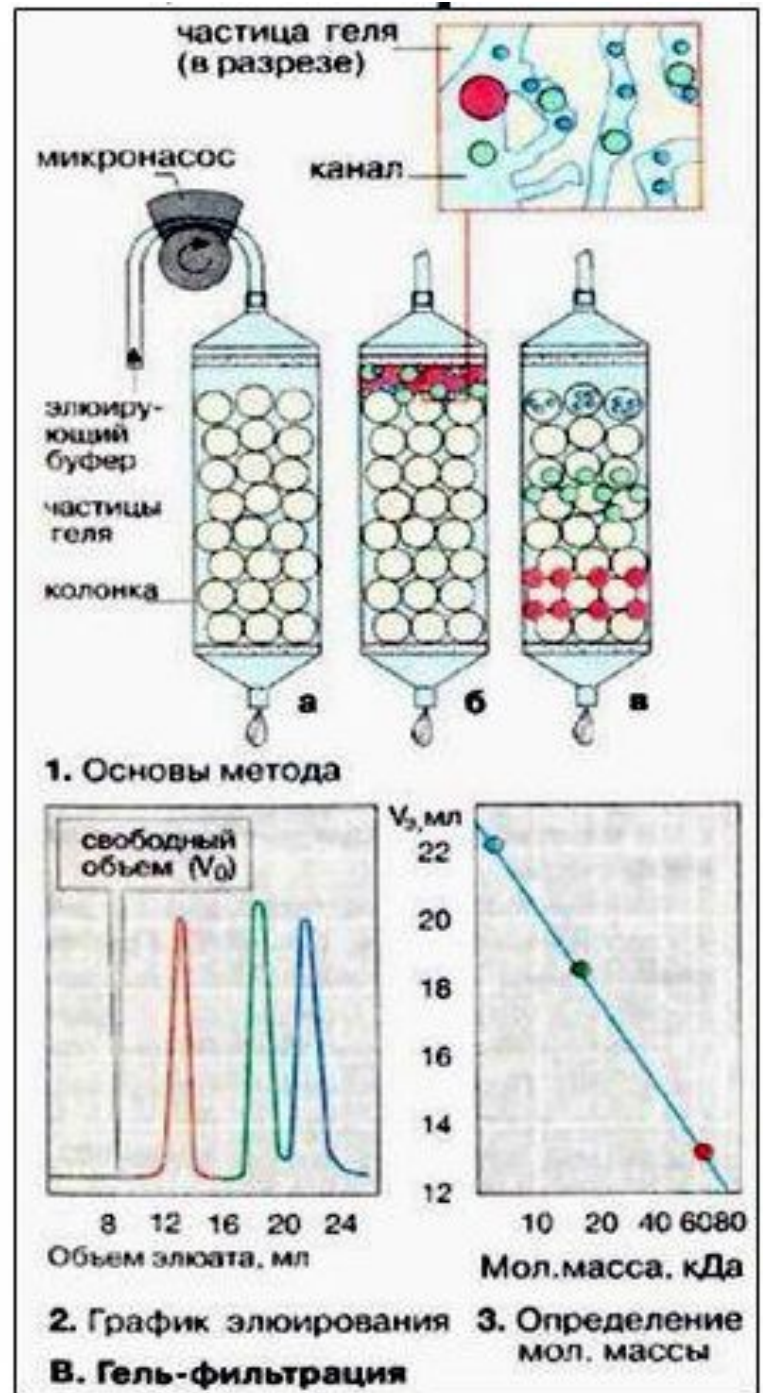
Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через **полупроницаемые мембраны**, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора, состав среды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



Гель-фильтрация

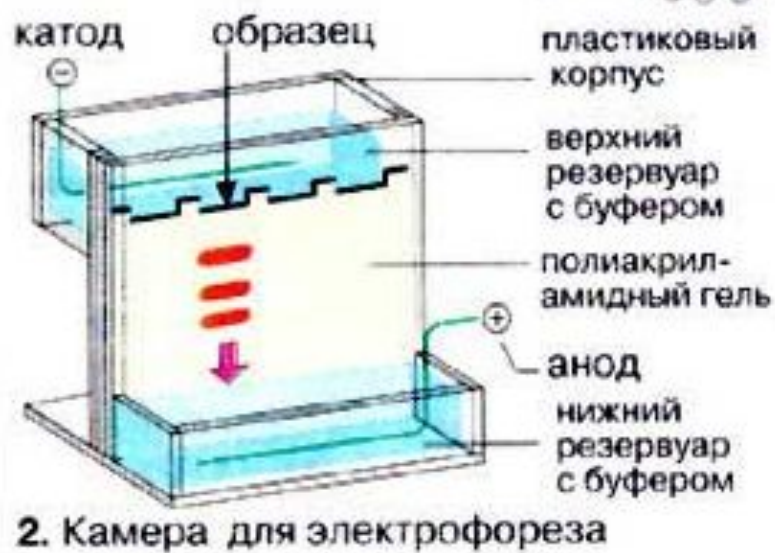
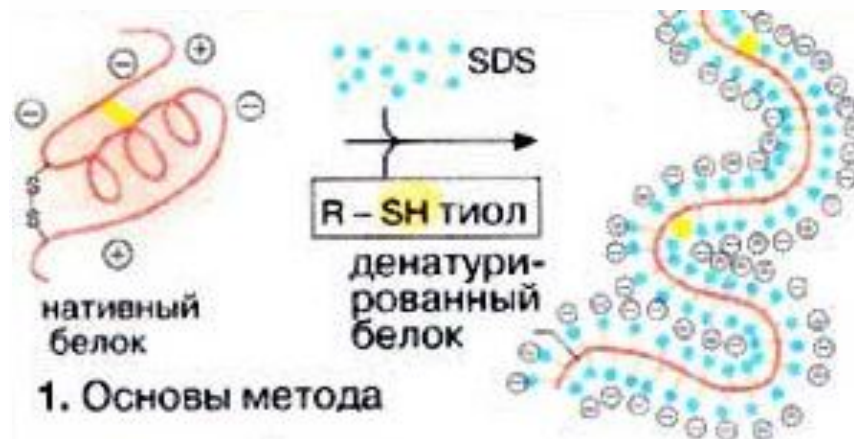
Позволяет разделять белки по величине и форме молекул.

Разделение проводят в *хроматографических колонках*, заполненных сферическими *частицами набухшего геля* из полимерных материалов. Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. Смесь белков вносят в колонку с гелем и *элюируют* буферным раствором. Белковые молекулы, не способные проникать в гранулы геля, будут перемещаться с высокой скоростью. Средние и небольшие белки будут в той или иной степени удерживаться гранулами геля. На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций. Объем выхода того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы.



Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

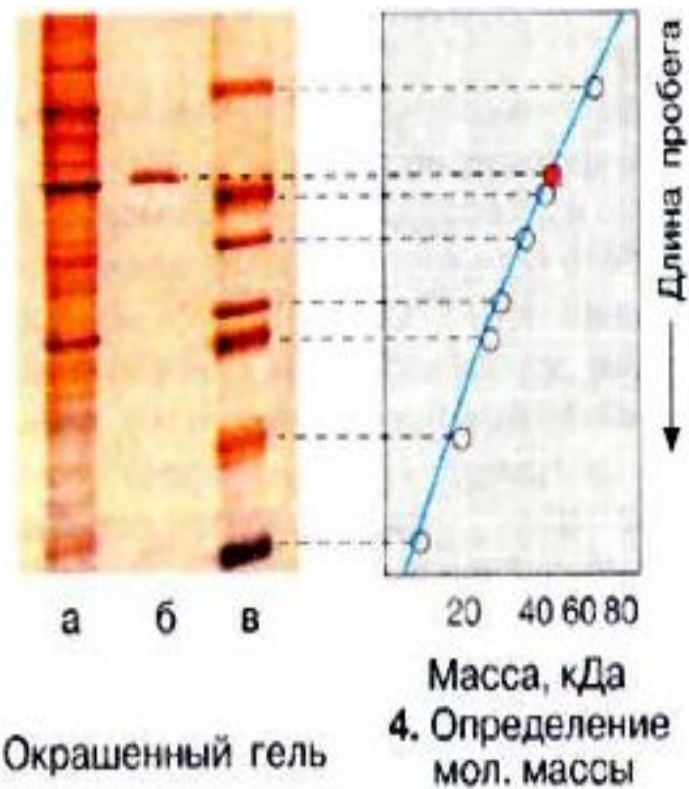
Является общепринятым методом определения гомогенности белковых препаратов. Метод основан на свойстве заряженных частиц (молекул) перемещаться под действием электрического поля. Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда. Поэтому предварительно белки денатурируют с тем, чтобы скорость миграции зависела только от молекулярной массы. Для этого анализируемую смесь обрабатывают ДСН, который представляет собой **детергент** с




Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Развернутые полипептидные цепи связывают ДСН (примерно 0,4 г/г белка) и приобретают отрицательный заряд. Для полной денатурации в среду добавляют тиолы, которые расщепляют дисульфидные мостики.

Электрофорез проводят в тонком слое полиакриламида. После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.

В качестве примера на схеме 3 приведена электрофореграмма трех препаратов: клеточного экстракта, содержащего сотни белков (а); выделенного из экстракта гомогенного белка (б); контрольной смеси белков с





**Спасибо
за
Ваше внимание!**