

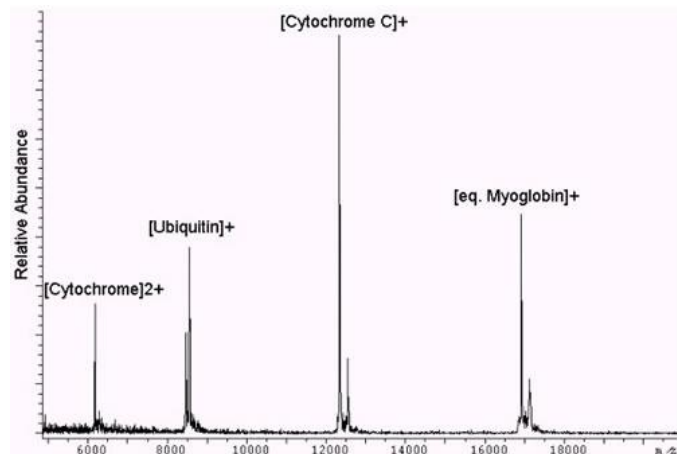
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

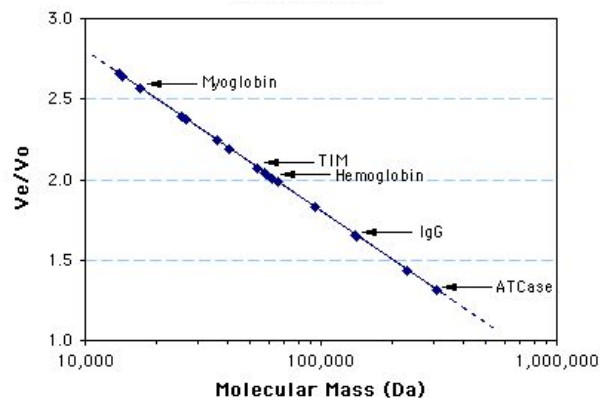
- 1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ**
- 2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА
(АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ)**
- 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ N- И C-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ
ОСТАТКОВ**
- 4. ХИМИЧЕСКОЕ ИЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ
ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ**
- 5. ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА И
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
(СЕКВЕНИРОВАНИЕ)**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

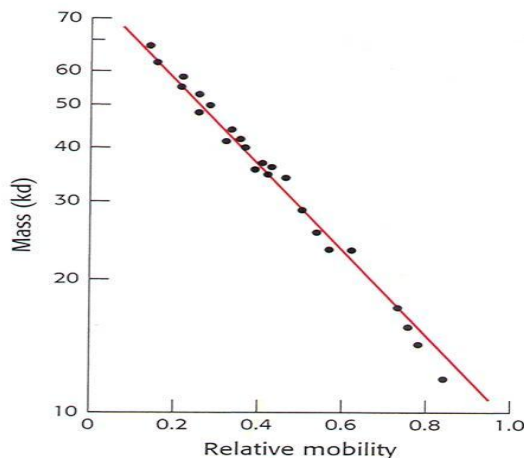
1. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



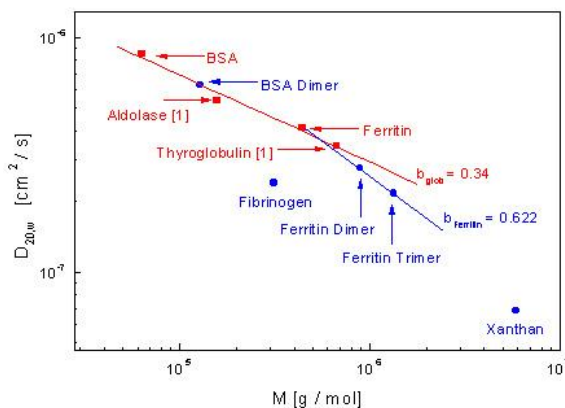
3. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ



2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

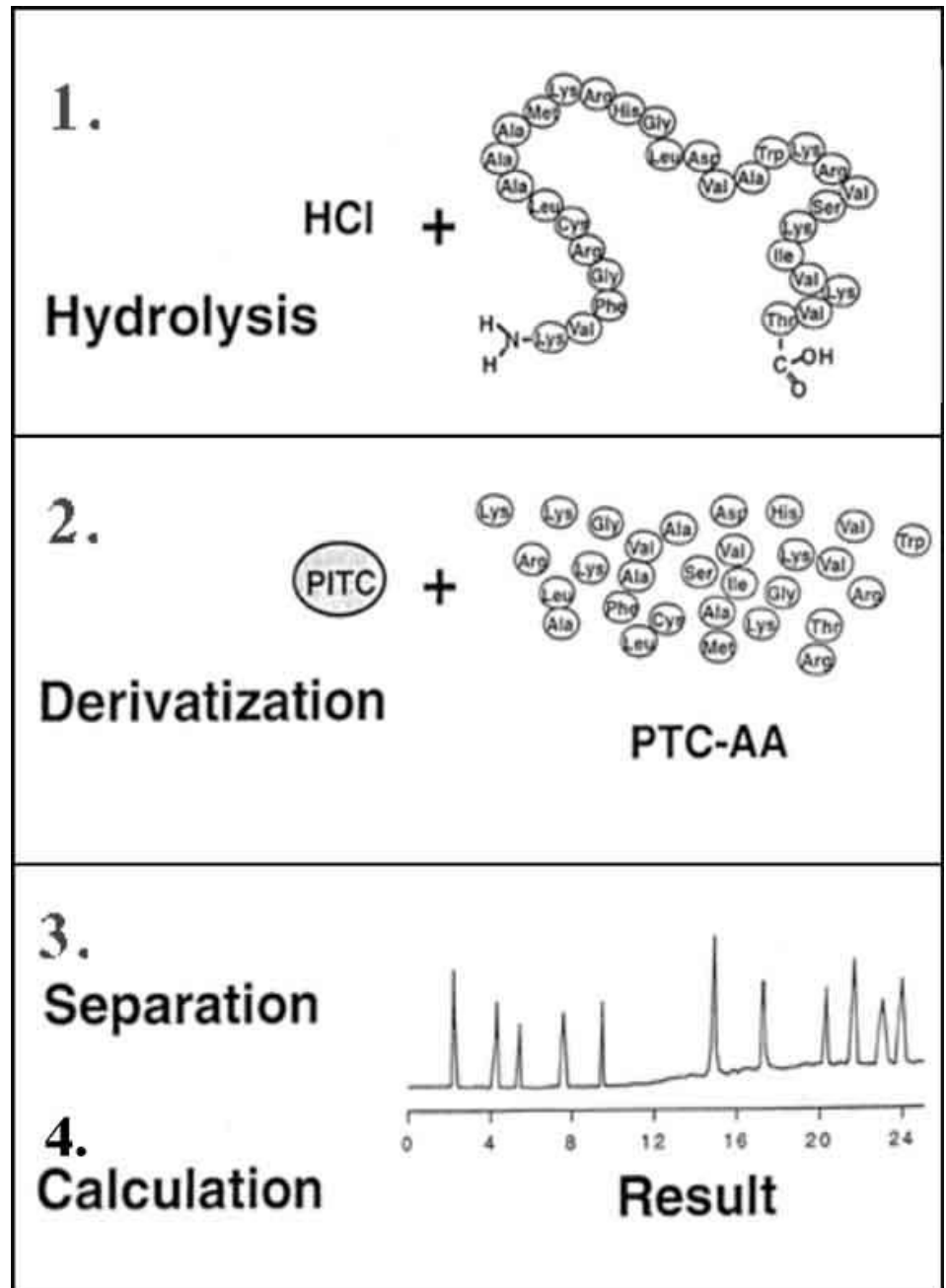


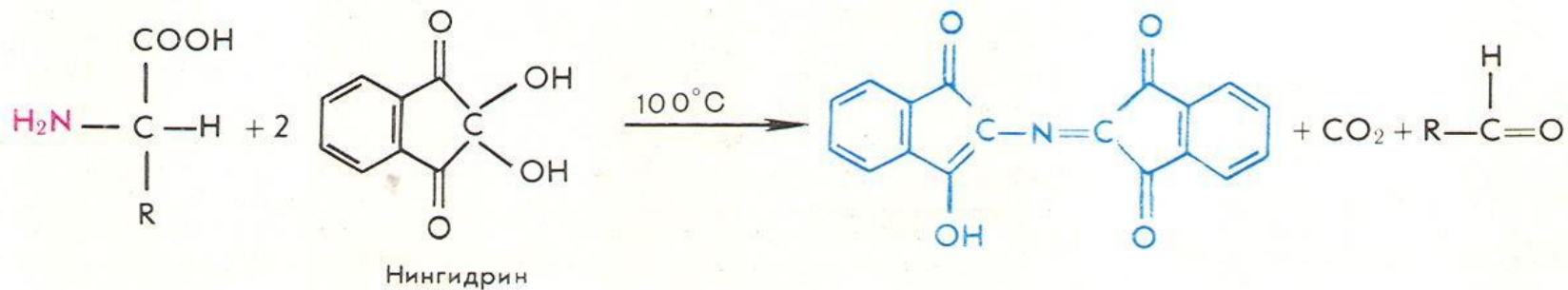
4. УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ



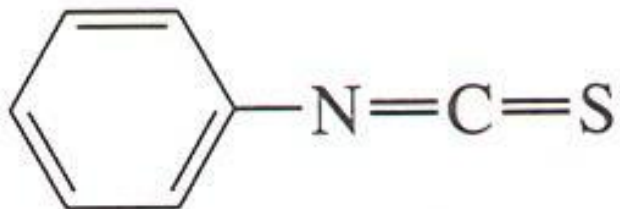
Принцип аминокислотного анализа

Гидролиз в 5,7н HCl
при 110⁰С в вакууме
в течение 24-96 часов





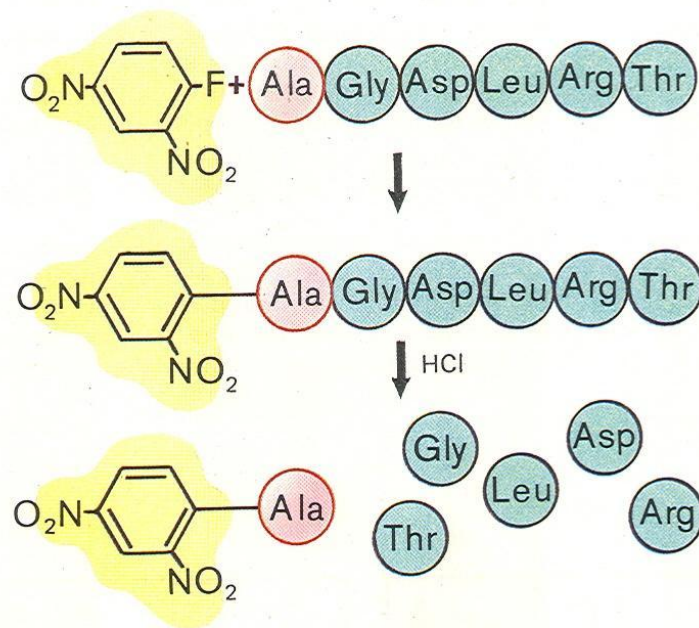
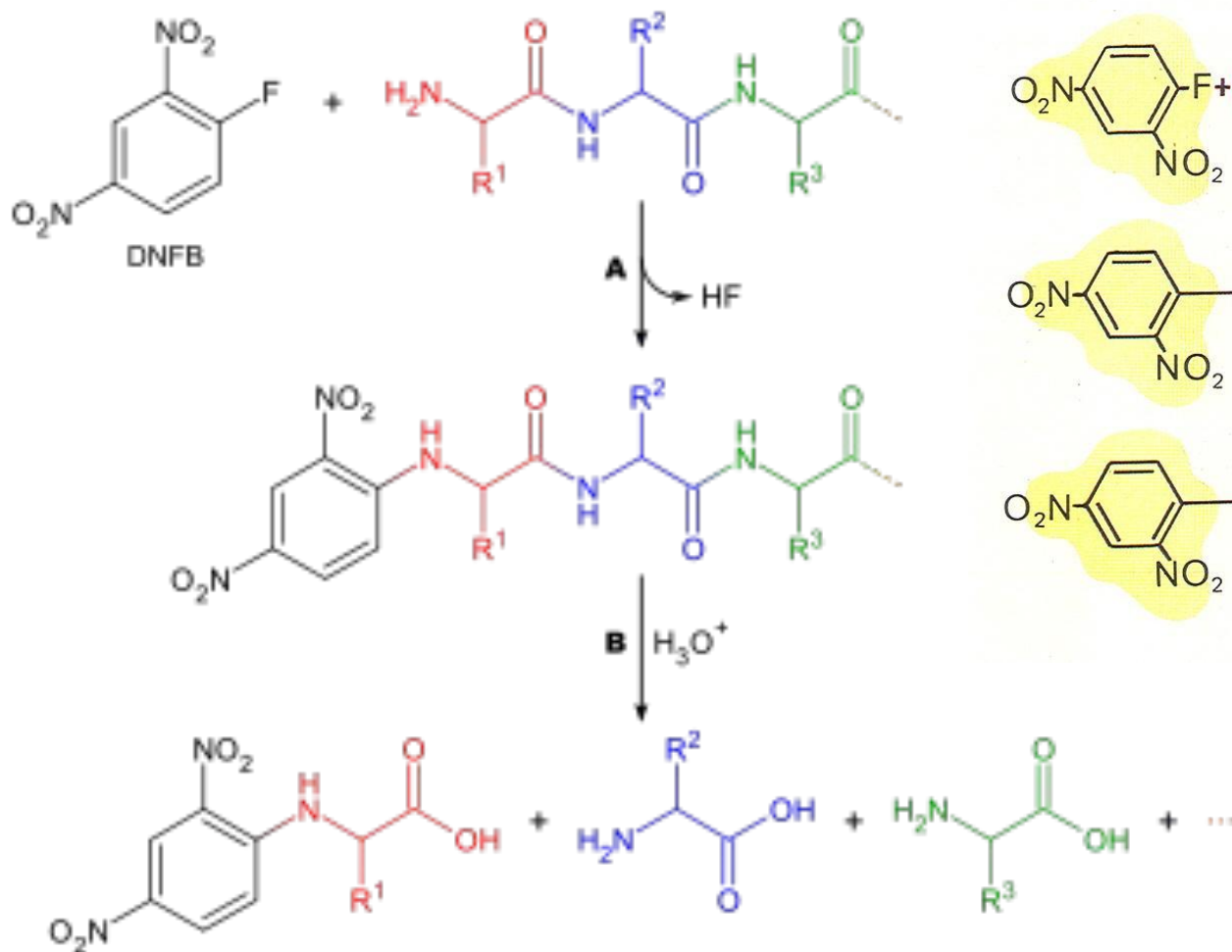
НИНГИДРИН (ТРИКЕТОГИДРИНДЕНГИДРАТ)



ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТ (ФИТЦ, РИТС)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

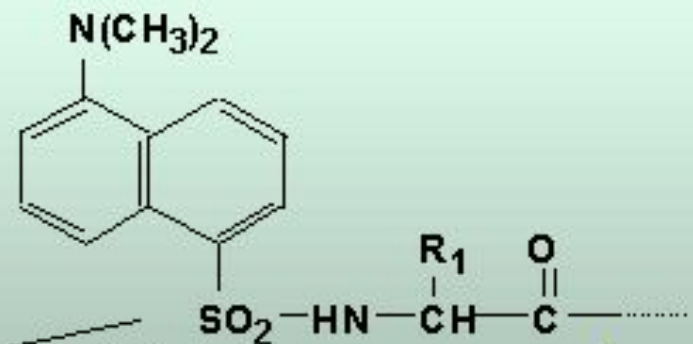
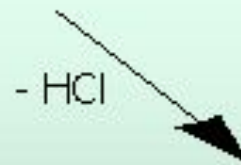
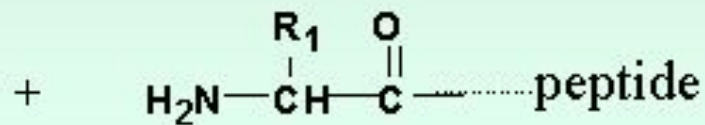
1. МЕТОД Ф.СЕНГЕРА (1945 г.)



2. ДАНСИЛЬНЫЙ МЕТОД (В.Р.ГРЕЙ, Б.С.ХАРТЛИ, 1963 г.)

N-terminal determination, using dansyl chloride

dansyl
chloride

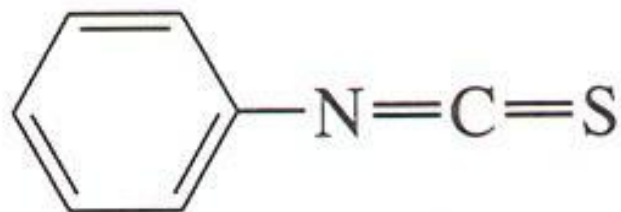


Fluorescent amino acid derivative can be identified chromatographically

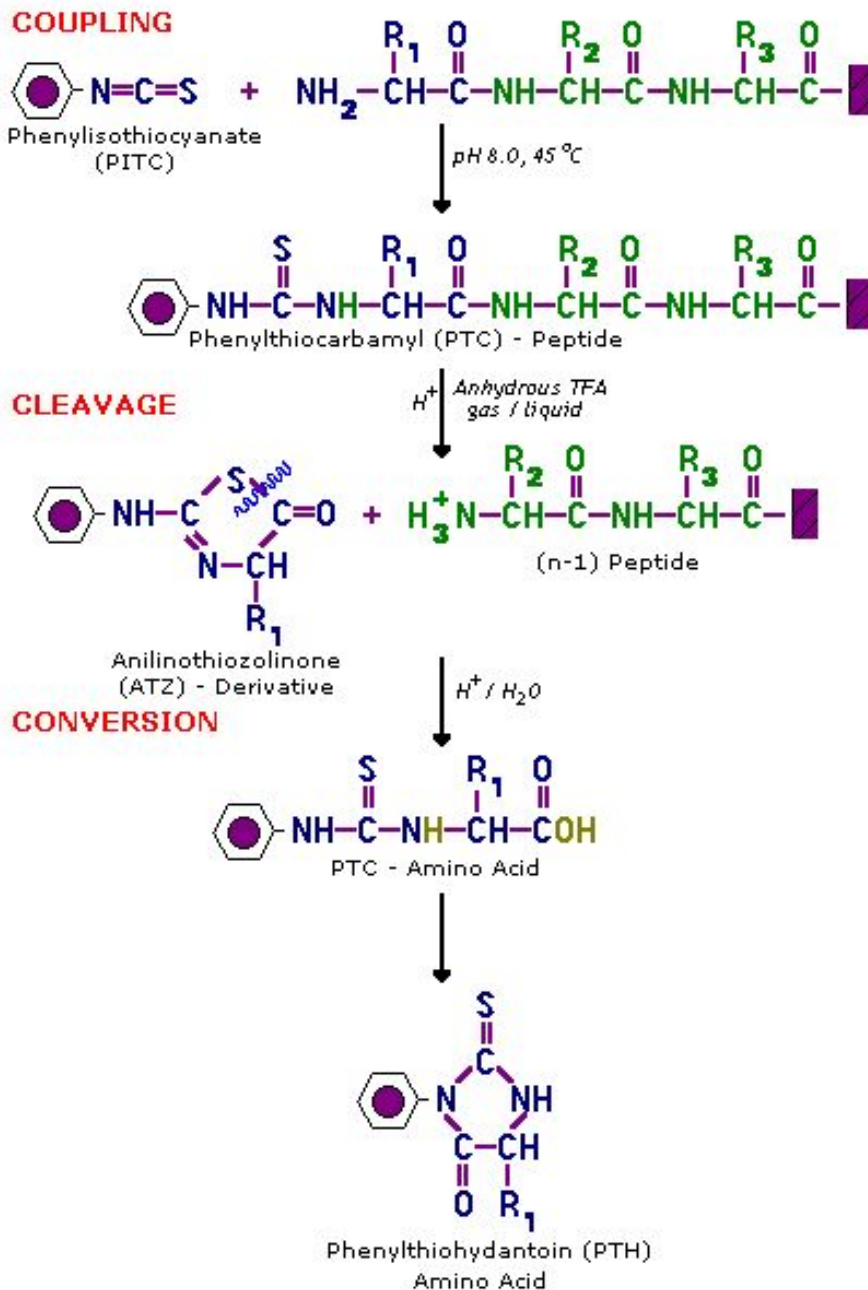
Acid hydrolysis



3. МЕТОД ЭДМАНА (1956 г.)



**ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТ
(ФИТЦ, РИТС,
РЕАГЕНТ ЭДМАНА)**

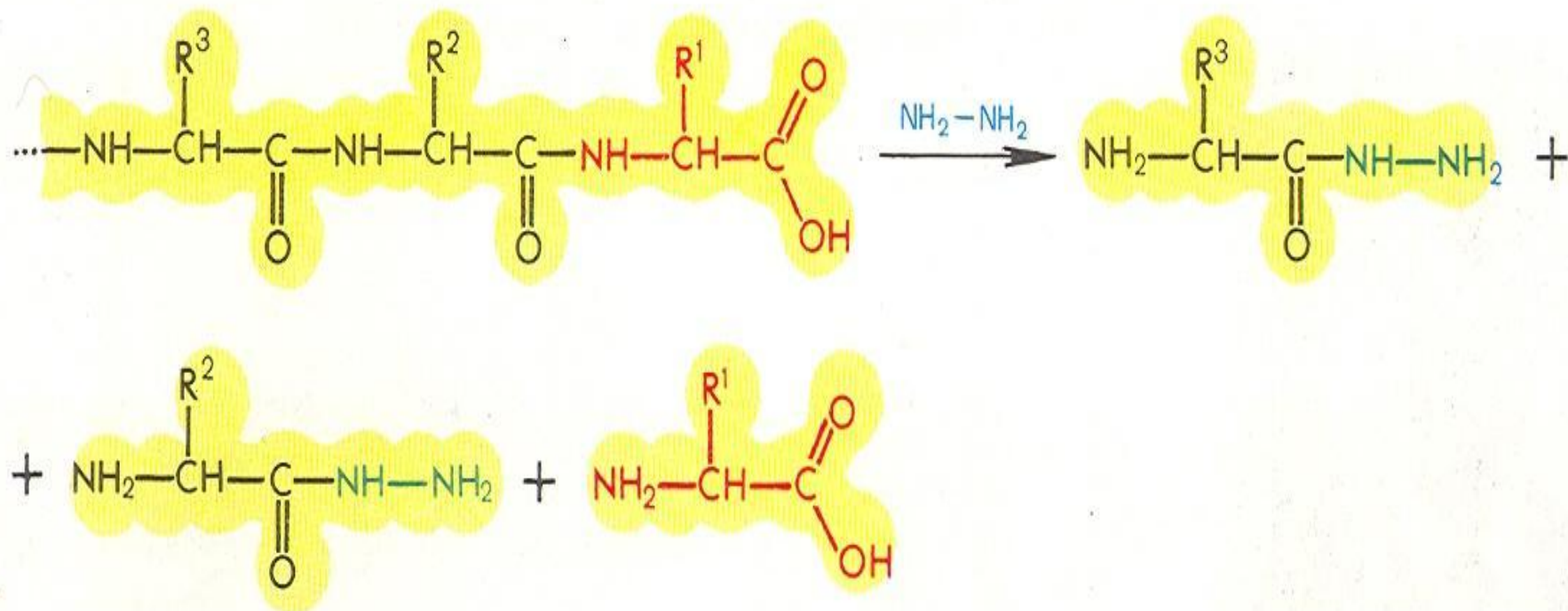


4. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ АМИНОПЕПТИДАЗАМИ

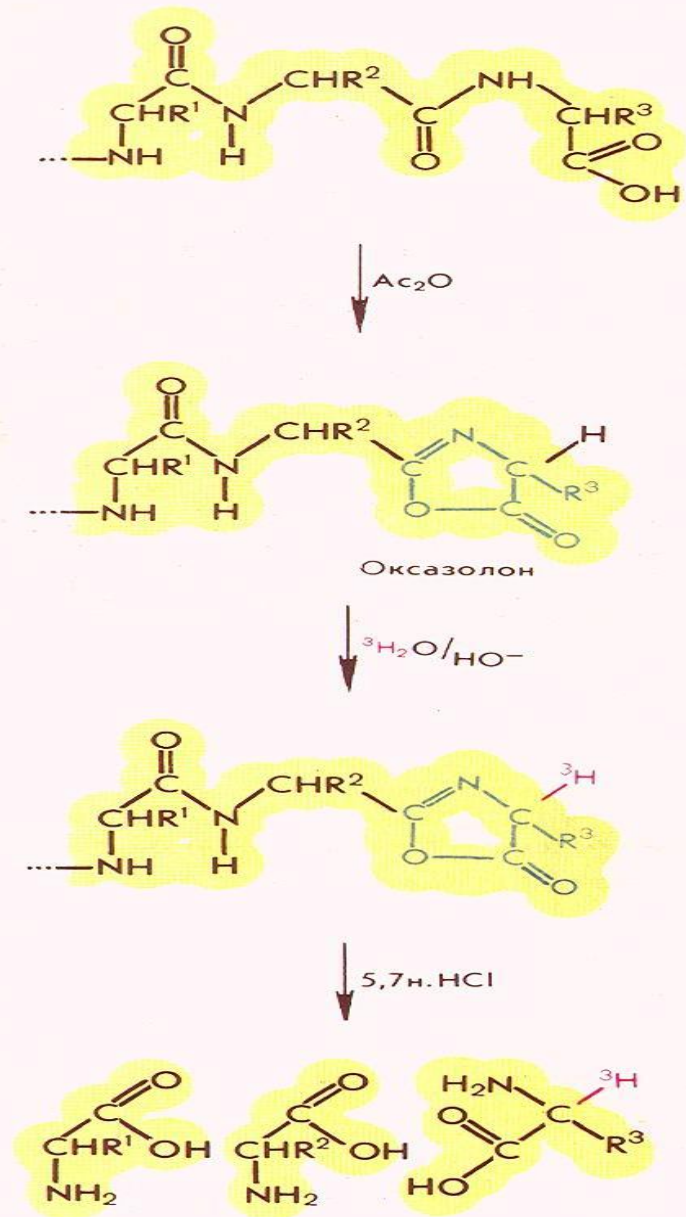
- **ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗА (С НАИБОЛЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ ГИДРОЛИЗУЕТ СВЯЗИ Leu, Ile, Val)**
- **АМИНОПЕПТИДАЗА М (ГИДРОЛИЗУЕТ ВСЕ СВЯЗИ, КРОМЕ Pro-X и X-Pro)**
- **ДИПЕПТИДИЛАМИНОПЕПТИДАЗА I ИЛИ КАТЕПСИН С (ОТЩЕПЛЯЕТ N-КОНЦЕВОЙ ДИПЕПТИД)**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

1. МЕТОД ГИДРАЗИНОЛИЗА (Сиро АКАБОРИ, 1952 г.) Безводный $\text{NH}_2\text{-NH}_2$, 120°C , 10 час

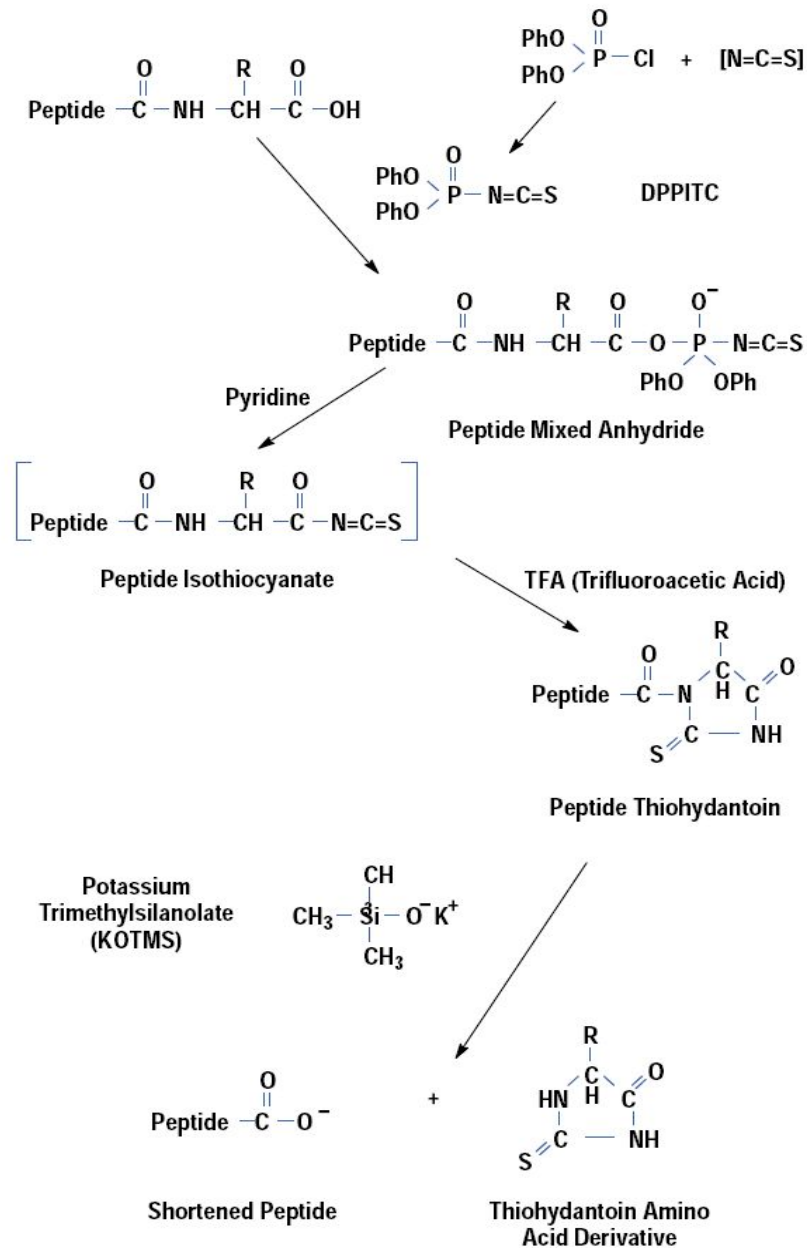
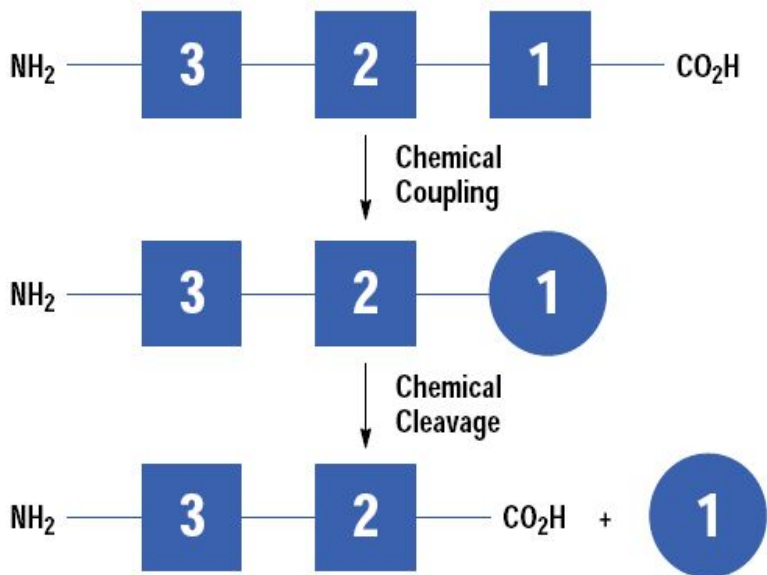


2. ОКСАЗОЛОНОВЫЙ МЕТОД ПО МАТСУО ИЛИ МЕТОД ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ (Hisayuki MATSUO, 1965 г.)



3. С-КОНЦЕВОЕ АВТОМАТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ С-КОНЦЕВЫХ ОСТАТКОВ В ВИДЕ ТИОГИДАНТОИНОВ

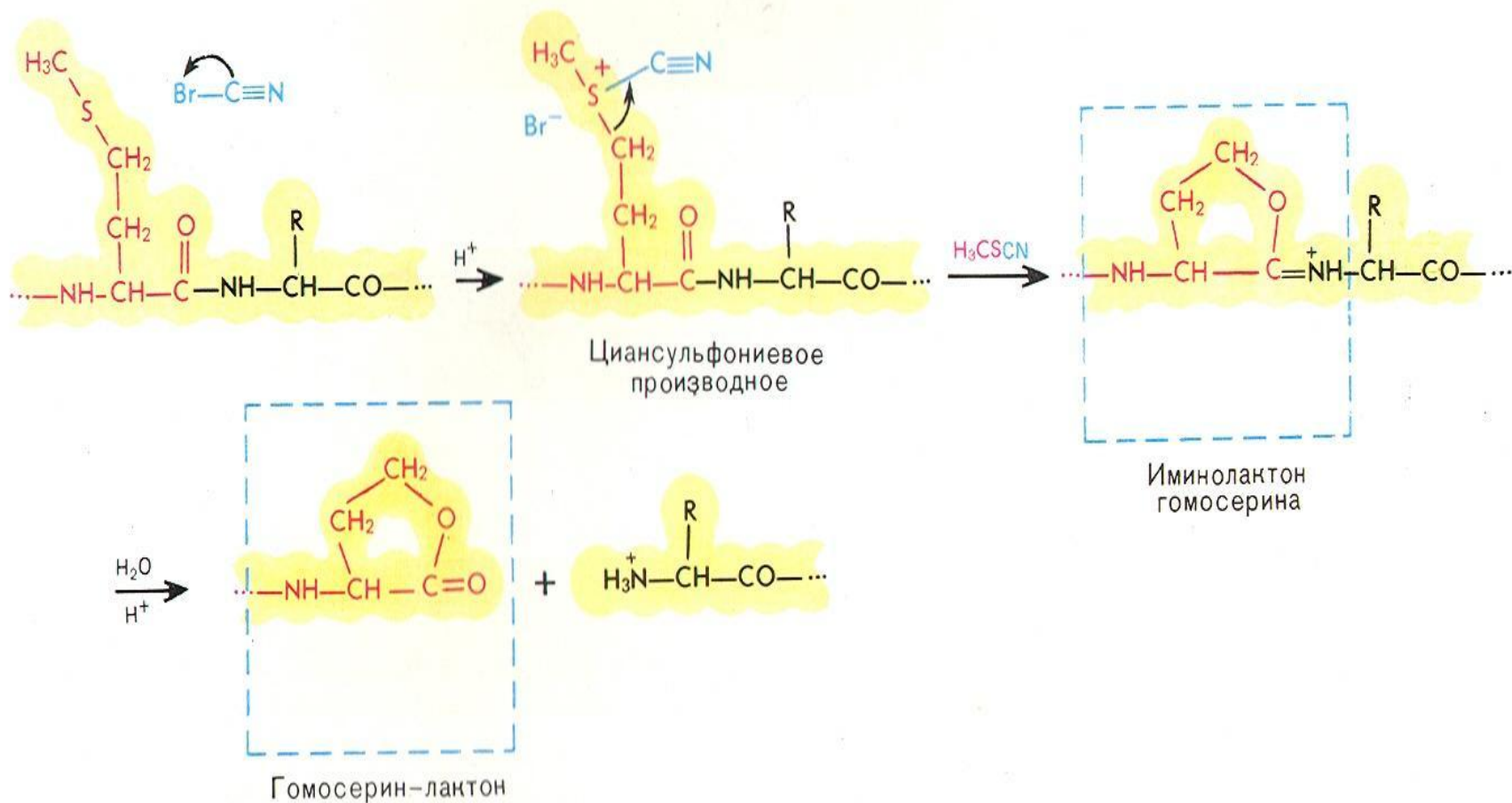


4. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КАРБОКСИПЕПТИДАЗАМИ

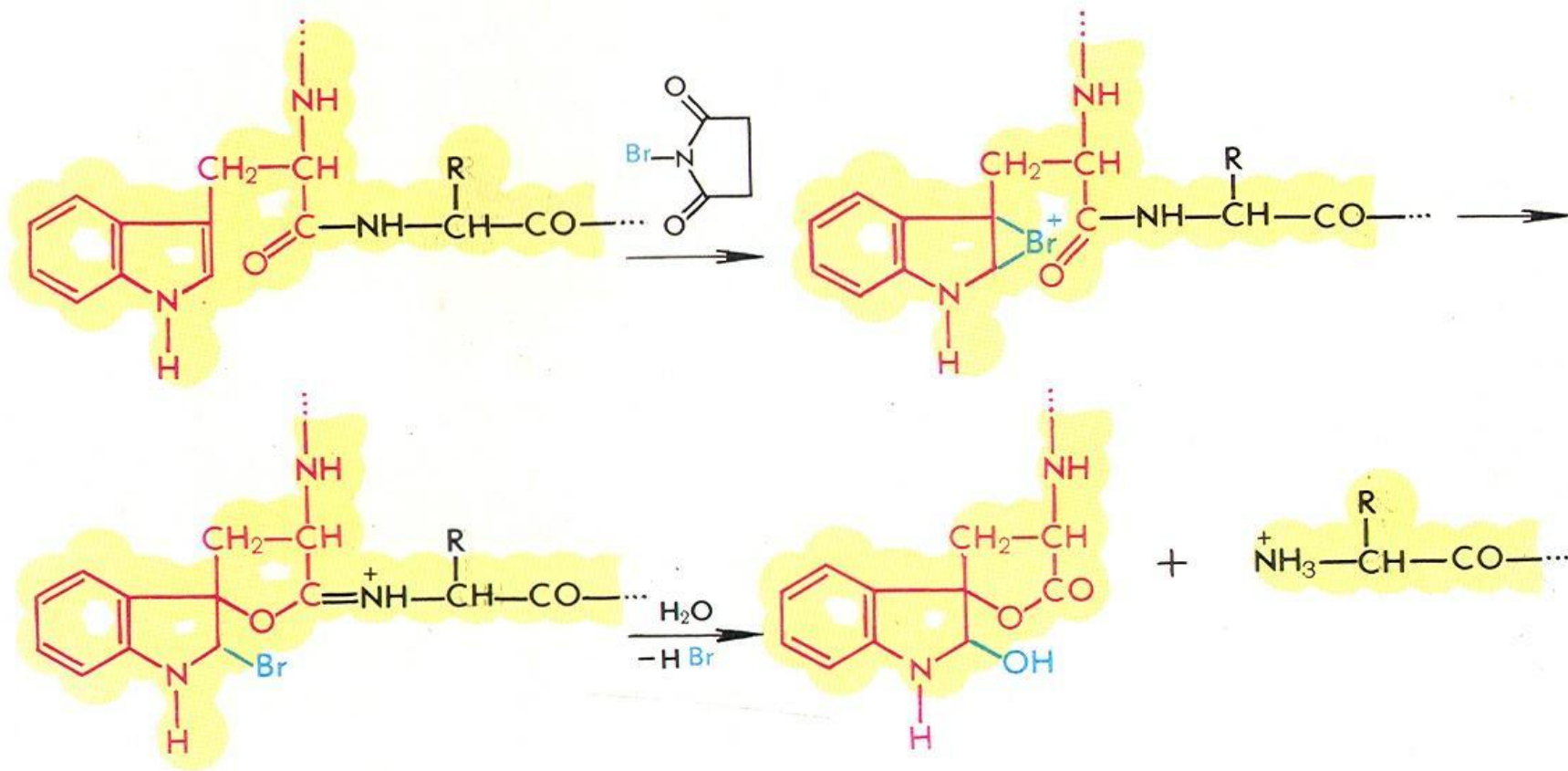
КАРБОКСИ-ПЕПТИДАЗА	А	С	Р
ИСТОЧНИК	Поджелудочная железа быка	Цитрусовые, фасоль	<i>Penicillium, Aspergillus</i>
ОПТИМУМ pH	7,0-9,0	5,5	2,5
БЫСТРОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, Ala, Met, Thr, Gln, His	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His
МЕДЛЕННОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Asn, Ser, Lys	Ser, Thr, Met, Ala, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Pro	Ser, Thr, Met, Ala, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Pro
ОЧЕНЬ МЕДЛЕННОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Glu, Asp, Gly	Gly	Gly
НЕ ОТЩЕПЛЯЮТСЯ	Pro, HyPro, Arg	HyPro	HyPro

ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ

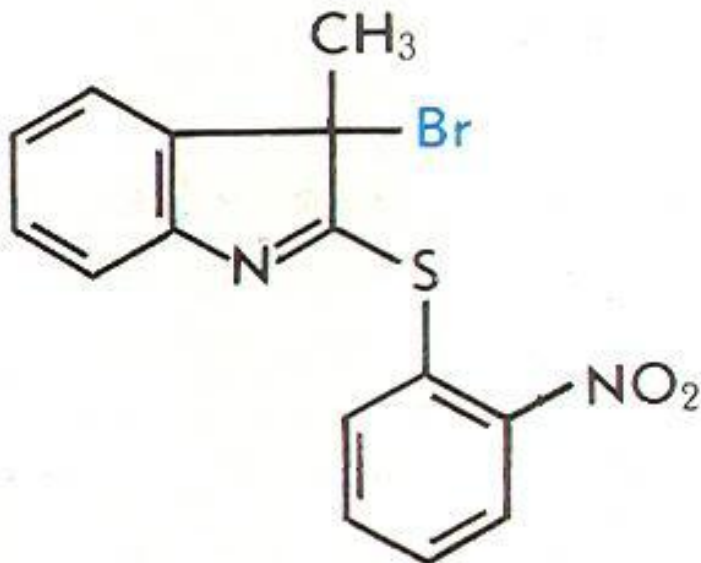
1. Расщепление по остаткам Met (Эрхард ГРОСС, Бернارد ВИТКОП, 1962 г.)



2. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКУ Trp ПО МЕТОДУ А. ФОНТАНА (1970 г.)



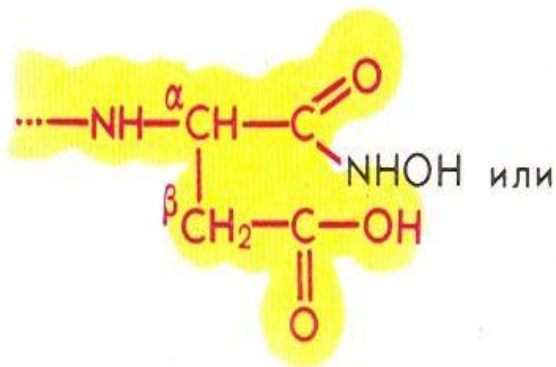
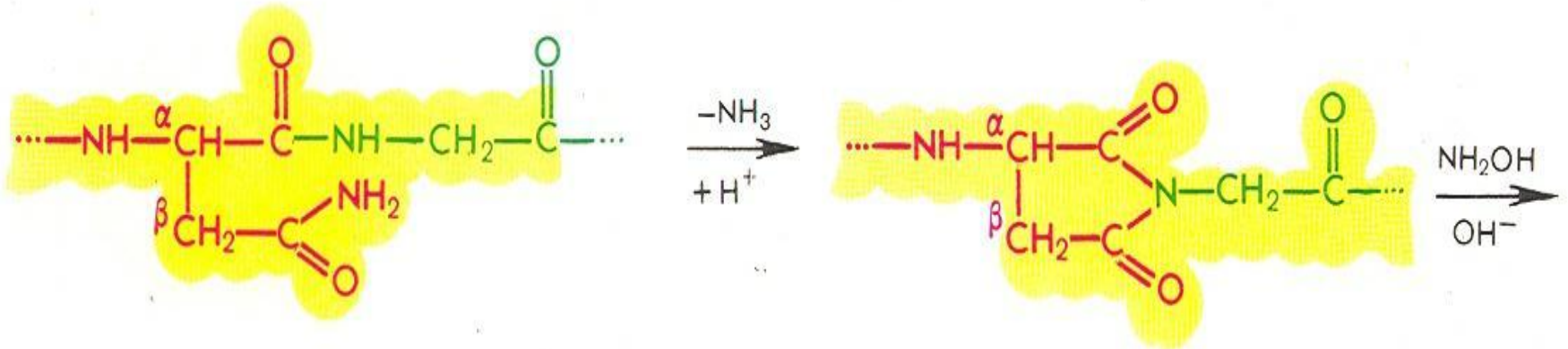
2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3-броминдол



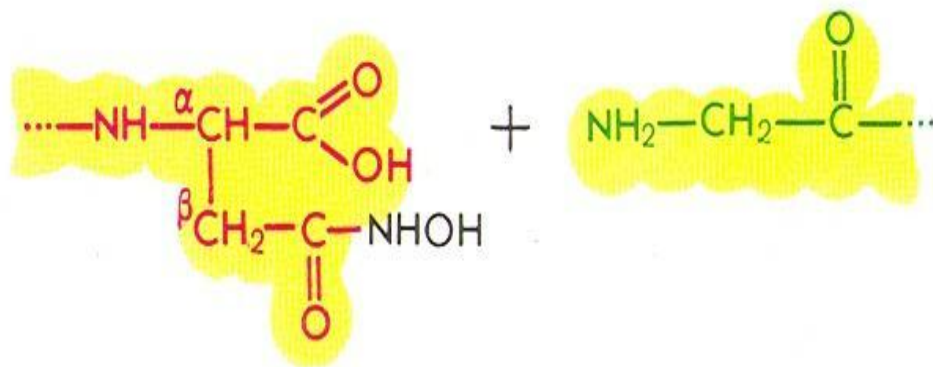
BNPS-скатол

(скатол = 3-метилиндол)

3. РАСЩЕПЛЕНИЕ СВЯЗИ Asn-Gly

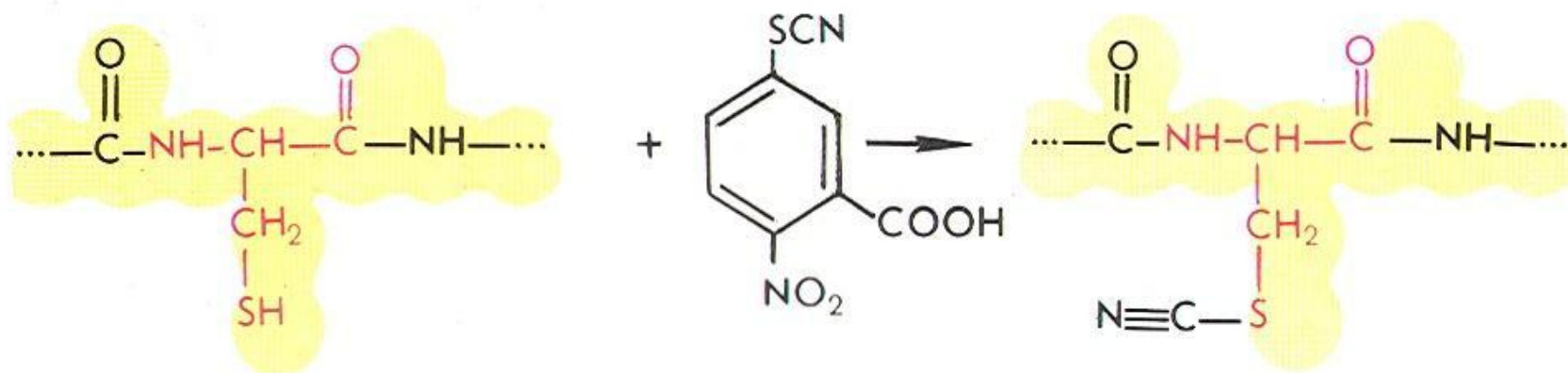


α -Аспартилгидроксамаг

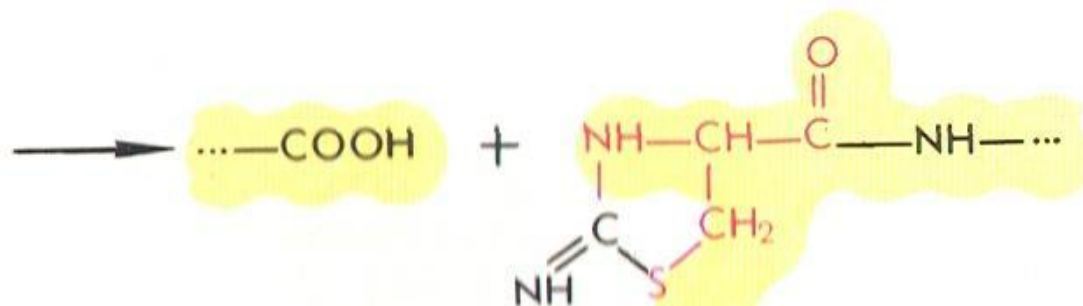


β -Аспартилгидроксамаг

5. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ Cys (А. ПАТЧОРНИК, 1974 г.)



2-нитро-5-тиоцианатбензойная кислота



2-иминотиозолидинкарбоновая кислота

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ФРАГМЕНТАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

ВЫСОКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

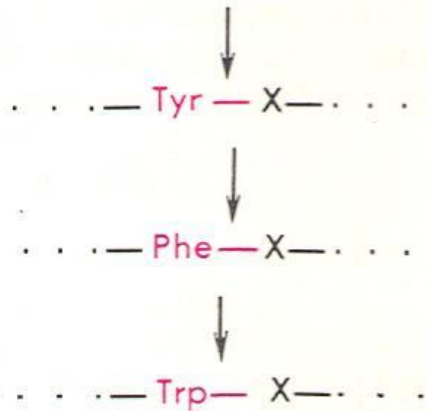
1. Трипсин pH 7,0-9,0
Lys↓X Arg↓X
Lys*Pro Arg*Pro
2. Протеаза из *St. aureus*
pH 4,0 pH 7,8
Glu↓X Asp↓Leu
Y*Pro
3. Лизин-специфическая протеаза
pH 8,0 X↓Lys
4. Клострипаин
pH 7,7 Arg↓X Lys↓X
5. Тромбин pH 8,0
Arg↓X
X=Gly, Ala, Val, Arg, Asp, His, Cys
6. Протеаза из подчелюстной железы мышей pH 7,5-8,0
Arg↓X Arg*Val Arg*Arg
7. Протеаза из почек ягненка
pH 7,5-8,0 Pro↓X Pro*Pro

НИЗКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

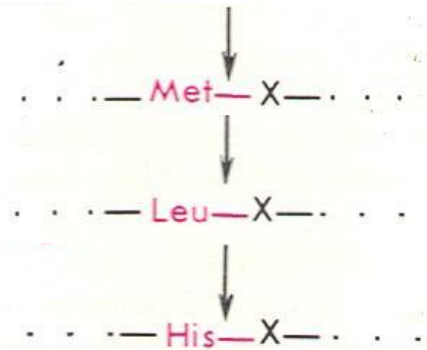
1. Химотрипсин pH 7,8-9,0
Tyr↓X Phe↓X Trp↓X
Leu↓X Met↓X His↓X с меньшей скоростью;
X*Pro
2. Термолизин pH 7,0-9,0
X↓Ile X↓Leu X↓Val
X↓Phe X↓Tyr X↓Trp
X↓Ala X↓Met
X*Y-Pro
3. Пепсин pH 2,0
связи ароматических и объемных алифатических аминокислот, Glu
4. Папаин pH 5,0-7,5
широкая специфичность
5. Эластаза pH 7,0-9,0
Ser↓X Gly↓X
Ala↓X Val↓X Leu↓X

ХИМОТРИПСИН

pH 7,8 – 9,0

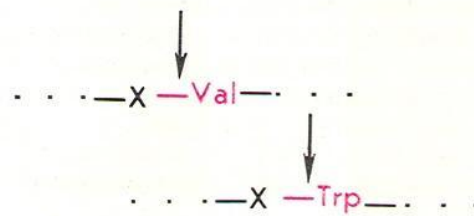
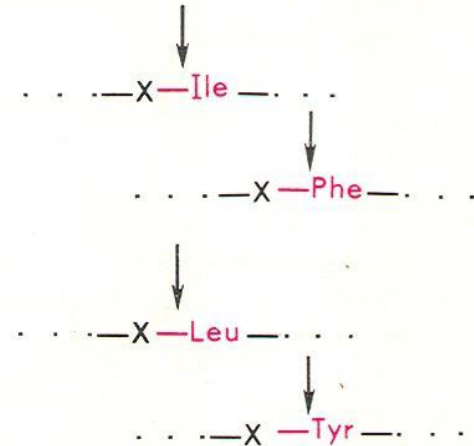


С МЕНЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ

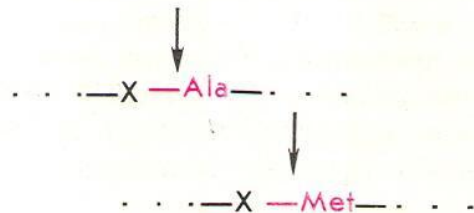


ТЕРМОЛИЗИН

pH 7,0 – 9,0

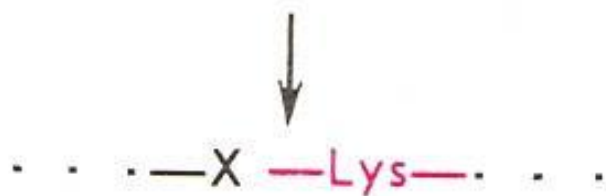


С МЕНЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ



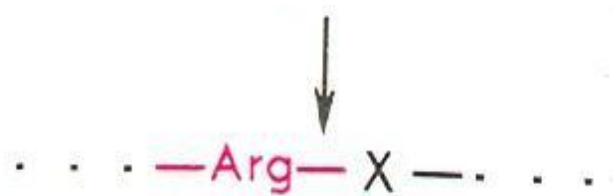
**ЛИЗИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ
ПРОТЕАЗА ИЗ *Armillaria mellea***

pH 8,0



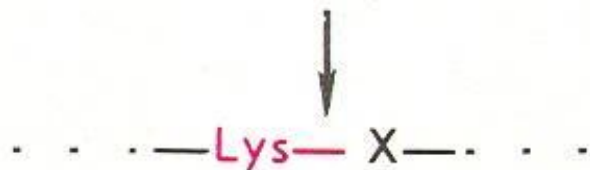
**КЛОСТРИПАИН
ИЗ *Clostridium histolyticum***

pH 7,7



**ЭНДОПРОТЕИНАЗА Lys-C ИЗ
*Lysobacter ensymogenes***

pH 7,7



**ЭНДОПРОТЕИНАЗА Arg-C ИЗ
ПОДЧЕЛЮСТНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ**

pH 7,5 – 8,0

