

Лекция №2

Простые белки: строение, физико-химические свойства, значение, классификация, характеристика отдельных классов простых белков.

План:

1. Белки: определение, значение, функции, методы выделения и очистки, методы качественного и количественного определения белков.
2. Физико – химические свойства и состав белков,
 - типы химических связей в белках,
 - структура белковой молекулы,
 - денатурация белков,
 - классификация простых белков,

ПРОСТЫЕ БЕЛКИ – это биополимеры, которые построены из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидной связью.

Наука которая изучает строение и функции белков называет **протеомикой**.

Функции белков. Белки выполняют в организме большинство функций и с ними связаны практически все проявления жизни. Белки делят на такие группы:

1. **Каталитические белки.** Это специализованный класс белков – ферменты.
2. **Сократительные белки.** Выполняют функцию движения (актин и миозин).
3. **Защитные белки** (антитела, другие антимикробные факторы; защита от кровопотери – фибриноген, факторы свертывания крови т.д.)
4. **Регуляторные белки.** Сигнальные белки и олигопептиды, гормоны, рецепторы и т.д.
5. **Транспортные белки** (транспорт веществ в крови, через мембраны). Сейчас известно свыше 6 тысяч транспортных белков.
6. **Структурные белки** – мембранные, соединительной ткани (коллаген, эластин т.д.), волос (α -кератин) т.д.
7. **Пищевые** – содержатся в продуктах питания.
8. **Запасные** и т.д.

Методы выделения и очистки белков.

Выделение белков:

<u>Из ткани:</u> гомогенизация (разрушение тканей и клеточных структур)	<u>Из плазмы крови, мочи и др. биологических жидкостей</u> гомогенизация не нужна
---	---

- осаждение белков (солями, спиртом или дегидратирующими растворами)
- фракционирование белков (ионообменная или гель-проникающая хроматография)

Очистка. Существует много методов, рассмотрим детально гельфильтрацию и диализ.

Разделение белков по молекулярной массе (метод молекулярных сит) или отделение белков от низкомолекулярных веществ обычно ведут при помощи гель-фильтрации. При гель-фильтрации первыми из колонки выходят белки (или вещества) с большей молекулярной массой, которые не заходят в середину гранул, а позже из колонки выходят вещества с небольшой молекулярной массой, которые застревают в порах геля.

Диализ – это метод очистки белков от низкомолекулярных примесей. Маленькие молекулы проходят через полупроницаемую мембрану, а белки, имеющие большую молекулярную массу не проходят через нее.

Количественное определение белков. Количество белка можно определять: 1) по содержанию в них азота (для этого белковый препарат сначала подвергают минерализации, а затем определяют содержание азоту по реакции Несслера); 2) биуретовый метод – основан на образовании окрашенных в сине-фиолетовый цвет комплексов между ионами меди и пептидными связями белков; 3) метод Лоури, который основан на способности медных комплексов белков восстанавливать реактив Фолина; 4) метод Бредфорда, который основан на способности белков связывать красители – бромфеноловый синий, кумасси голубой; 5) на кафедре разработан метод определения белков по их взаимодействию с коллоидным раствором высокодисперсного кремнезема.

Качественное определение белков - используются осадочные пробы с органическими кислотами (трихлоруксусная, сульфосалициловая кислоты), цветные реакции на определенные аминокислоты в составе белка (реакция Фоля, ксантопротеиновая реакции и др).

2. Физико – химические свойства белков.

2.1. Молекулярная масса. Молекулярная масса белков превышает 6000 Да (до сотен тысяч и даже несколько миллионов) , - например – альбумины – ок.70000, глобулины - 150000. Полимеры аминокислот с массой менее 6000 называют пептидами.

Методы определения молекулярной массы белков: ультрацентрифугирование, гельфильтрация, аминокислотный анализ.

2.2. Амфотерность. В составе боковых цепей белковой молекулы имеется много групп – COOH и –NH₂, которые обеспечивают возникновение положительных и отрицательных зарядов. Поэтому белки являются полиамфионами. Большинство белков заряжены отрицательно (-), потому что в их составе преобладают остатки кислых аминокислот Глу и Асп. Катионными (положительно заряженными) являются белки ядра клетки, например, гистоны и протамины, в их составе преобладают аминокислоты Лиз и Арг.

2.3. Изoeлектрическая точка (ИЭТ) – это такое значение рН, при котором белок является электронейтральным. Для кислых белков изoeлектрическая точка лежит в кислой среде (рН<7), а для основных (катионных) – в щелочной среде (рН>7). Белки в таком состоянии быстро выпадают в осадок.

Электрофорез белков основан на их способности двигаться в электрическом поле (чем меньше масса и больше заряд тем их подвижность выше), это свойство используется для разделения сложных по белковому составу биологических жидкостей - сыворотки крови и т.д.

3.4. Гидрофильность, гидрофобность, растворимость.

Большинство белков – гидрофильны и водорастворимы, что связано с наличием гидрофильных (полярных – заряженных и незаряженных групп в составе аминокислот). Эти группы притягивают диполи воды и вокруг молекулы белка образуется “водяная оболочка” (шуба), которая удерживает белковую молекулу в растворе.

Белки как коллоиды - белковые молекулы имеют размеры коллоидных частиц (10⁻⁵ – 10⁻⁷см), поэтому растворы белков обладают свойствами коллоидных растворов (конус Тиндаля и т.д.).

3. Классификация белков.

1. По структуре белки делят на простые и сложные.

Простые белки состоят только из аминокислот. В состав сложных белков входит небелковый компонент, название которого включается в название сложного белка. Это нуклеопротеины, липопротеины, гликопротеины, металопротеины, фосфопротеины, хромопротеины (окрашенные белки), дикомпонентные ферменты.

2. По физико – химическим свойствам:

а) - фибрилярные белки. Имеют упорядоченную, регулярную структуру (повторяемость в пространстве одинаковых участков молекулы). Они образуют огромной величины и молекулярной массы агрегаты (фибриллы). Например, коллаген, масса которого составляет около 30% от общего количества тканевых белков. Коллаген основной белок межклеточного пространства, хрящей, сухожилий, костей, зубов (в пищевом отношении это неполноценный белок, поскольку содержит мало незаменимых аминокислот). Коллаген отличается высоким содержанием глицина (35%), аланина (11%), пролина и оксипролина (21%). Белок имеет трехцепочечную спиральную структуру, обладает большой механической прочностью (у тропоколлагена – прочность такая же как и у стальной проволоки).

б) - глобулярные белки – имеют глобулярную структуру, водорастворимые, гидрофильные. Структура этих белков наименее регулярная (повторяемая).

в) - мембранные белки – “живут” в мембранах, они частично либо полностью гидрофобные, обладают в большей или меньшей степени регулярной структурой.

3. По функциям (см. выше)

4. По генам, которые отвечают за структуру белков. Это наиболее современная классификация белков. В таблице приведена классификация белков – цитохромов P-450 по классификации соответствующих генов - суперсемейство генов цитохрома P-450.

Суперсемейство P 450			
Семейство	1	2	3 ... 51
Подсемейство	1A, 1B...	2A, 2B, 2C, 2D, 2E и др.	3A, 3B, 4A, 7, 11, 17...51
Отдельные белки	1A1, 1B1 1A2,	2A1 2B1 2C9 2A2 2B6 2C19	3A1 3A4

Альбумины: обнаружены во многих тканях (главным образом в цитоплазме клеток, в мышцах – миоальбумины; в молоке – лактальбумины; нервная ткань – содержит нейроальбумины, высокое содержание в сыворотке крови – 40-50г/л), имеют сходные свойства. Молекулярная масса – до 70000, это кислые белки, ИЭТ около 4,7, содержат много глутаминовой кислоты, имеют глобулярную структуру, растворимы в воде. Альбумины крови синтезируются в печени, обуславливают онкотическое давление крови (при снижении альбуминов возникают отеки). Альбумины крови это основные транспортные белки в организме, они обеспечивают транспорт водо- и жирорастворимых витаминов, билирубина, лекарств.

Глобулины – имеют большую массу (выше 150000 Да), плохо растворимы в воде и легче альбуминов, осаждаются солями, электрофорезе глобулины крови разделяются на несколько фракций (α-, β- и γ-глобулины), в которых обнаруживаются такие белки как – протромбин, церуллоплазмин, иммуноглобулины.

Протамины и гистоны: ядерные белки (в ядре клетки связаны с нуклеиновыми кислотами), содержат много аргинина и лизина (гистоны до 30%, а протамины до 60%), которые обуславливают положительный заряд этих белков (катионные белки), ИЭТ в щелочной среде.

Проламины и глутелины – растительного происхождения белки (глутелин – белок пшеницы, зеин – выделен из кукурузы), содержат недостаточные количества незаменимых аминокислот, поэтому в пищевом отношении это неполноценные белки

Пептиды – выделяют несколько групп пептидов (нейропептиды - эндорфины, энкефалины), пептиды кининовой системы и др.

Простые (однокомпонентные) ферменты – пепсин, трипсин.

Сократительные белки - актин, миозин.

Белковоподобные вещества (склеропротеины)

4. Белки – состав и типы химических связей в белках.

Белки – наиболее важный компонент живой материи, это – биополимеры, построенные из остатков α-аминокислот, соединенных между собой пептидной (-CO-NH-) связью.

4.1. Элементарный состав белков.

- а) С (углерод) – 50-55%; О (кислород) – 21-24%; N (азот) – 15-17% (≈ 16%);
H (водород) – 6-8%; S (сера)– 0-2%.

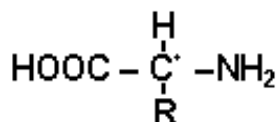
Азот - это постоянный компонент белков и по его количеству можно определить содержание белка в тканях.

б) содержание белков в органах человека составляет в среднем 18-20% сырой массы ткани. В пересчете на сухой остаток - мышцы – до 80%, сердце – 60%, печень – 72%, легкие, селезенка – 82 – 84%.

4.2. Аминокислоты белков и их характеристика

В состав белков входят 20 стандартных аминокислот, т.е. аминокислоты, включение которых в молекулу белка кодируется на генетическом уровне.

Общая формула аминокислот: (у глицина R=H)



Все аминокислоты относятся к α – ряду, они имеют ассиметричный атом углерода (кроме глицина) и поэтому обладают оптической активностью. Возможна рацемизация аминокислот - взаимное превращение L– и D–форм, что приводит к изменению оптической активности и накоплению D–форм аминокислот. Это явление используется в судебной медицине для определения возраста человека по количеству D–изомера аспарагиновой кислоты в дентине, где отсутствует обмен белков. Скорость рацемизации L–асп в D–асп составляет 0,1% в год (1% за десять лет, 5% за 50 лет и т.д.)

Большое значение имеет радикал (R) аминокислот, который может быть гидрофильным или гидрофобным (неполярным), что обеспечивает как пространственную структуру и так и функцию белков.

Аминокислоты с неполярными группами

ала
мет
вал
лей
иле
фен
три
про

незаряженные полярные

гли
сер
цис
тре
асн
гли
тир

Аминокислоты с полярными группами

заряженные полярные

арг (+)
лиз (+)
гис (+)
глу (-)
асп (-)

(+) –положительно заряженные
(-) – отрицательно заряженные

Белки, которые содержат большое количество неполярных аминокислот, (например α –кератин волос) нерастворимы в воде, а альбумин крови содержит много аминокислот с полярными группами и хорошо растворяется в воде. В α –кератинах гидрофобные группы находятся на поверхности фибрилл, а у альбумина гидрофобные группы в основном “спрятаны” в середине молекулы, а на поверхности молекулы преобладают гидрофильные группы, которые и обеспечивают высокую растворимость альбуминов.

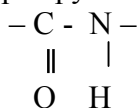
Нестандартные аминокислоты – те, которые образуются после окончания синтеза белка. Например, пролин окисляется до оксипролина, более детально об этом в разделе „посттрансляционные изменения белков”.

4.3 Типы химических связей в молекулах белков.

Выделяют ковалентные и нековалентные связи.

Ковалентные:

а) пептидная связь - образуется между α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты, таким образом аминокислоты соединяются между собой в полипептидную цепь (формируется первичная структура белка)



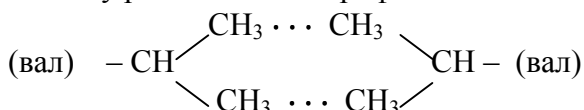
б) дисульфидные связи образуются между SH- группами двух близко расположенных остатков аминокислоты цистеина (цис–S–S–цис), стабилизируют вторичную структуру белка (α -спираль)

Нековалентные: (способствуют стабилизации вторичной, третичной, четвертичной структуры белков)

а) водородные - образуются между водородом и электроотрицательным элементом (азот, фосфор, кислород) $H \dots O = C-$

б) ионные - образуются между разноименными зарядами остатков аминокислот (отрицательно и положительно заряженных) $COO^- \dots NH^{3+}$.

в) гидрофобные – возникают между радикалами гидрофобных аминокислот



5. Структура белковой молекулы.

Различают первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.

5.1. **Первичная структура** – это последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Первичная структура белка кодируется на генетическом уровне, остальные структуры образуются произвольно при взаимодействии между собой остатков аминокислот. Изменение хотя бы одной аминокислоты в аминокислотной последовательности белка может вызвать изменения структуры белка и его физико-химических свойств, а это может привести к возникновению болезни (например: замена ГЛУ в 6-положении β-цепи на ВАЛ вызывает снижение растворимости гемоглобина и возникновение серповидноклеточной анемии).

Сенджер разработал динитрофторбензолный метод определения первичной структуры белков и впервые определил последовательность аминокислот в молекуле инсулина (Нобелевская премия 1958г.). Позже Эдман разработал более совершенный метод определения первичной структуры белка основанный на использовании фенолтиоизоцианата (ФИТЦ). Эти методы позволяют анализировать структуру белка с его N-конца. В настоящее время первичную структуру белков можно очень быстро определять масс-спектрометрически не прибегая к химической модификации белковой молекулы.

Как пример рассмотрим первичную структуру рибонуклеазы – фермента, который гидролизует РНК. Этот белок состоит из 124 аминокислот (каждая имеет свой номер):

1 2 3 122 123 124

H₂N – лиз – глу – тре – – ала – сер – вал – COOH

Как видно, полипептидная цепь имеет два неоднаковых конца: - первая аминокислота содержит свободную α-аминогруппу (N-конец); последняя аминокислота имеет свободную карбоксигруппу (C-конец), а аминокислоты соединены между собой пептидными связями. Поэтому первичную структуру можно представить себе как последовательность (чередование) пептидных связей и α-углеродных атомов аминокислот, а радикалы аминокислот находятся сбоку от этой цепочки.

В настоящее время установлена аминокислотная последовательность более 2000 тысяч белков, процесс определения первичной структуры уже автоматизирован, главным условием является наличие образца очищенного белка.

Некоторые белки находятся в организме в очень низких количествах и поэтому его выделение в достаточном для анализа количестве очень сложно. Поэтому используют другой способ: выделяют соответствующий ген, размножают его и далее синтезируют необходимое количество белка в клеточной или в бесклеточной системе.

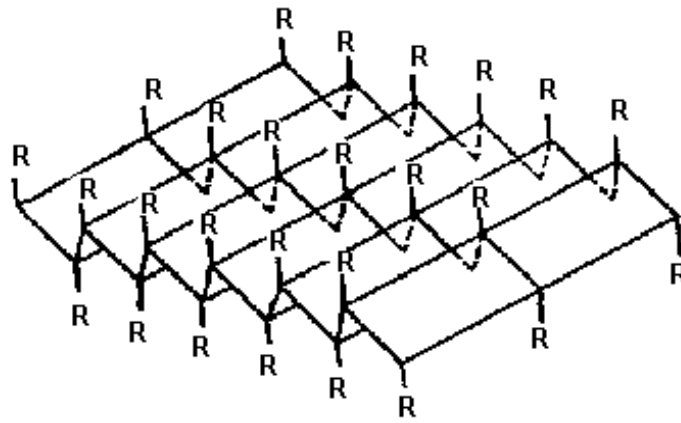
5.2. **Вторичная структура белка** – это размещение в пространстве отдельных участков полипептидной цепи, эти участки могут быть упорядоченными (α-спираль и β-структура) и неупорядоченными.

α-спираль открыта в 30-ых годах XX века Л.Полингом. Закручивание молекулы белка (как и других молекул полимеров) в спираль (правозакрученная) выгодно энергетически, так как способствует более плотной упаковке молекулы в пространстве и уменьшению ее свободной энергии (2-ой закон термодинамики). α-спираль стабилизируется в пространстве благодаря образованию дисульфидных и большого количества водородных связей между аминокислотами полипептидной цепи. На 1 шаг спирали приходится 3,6 остатка аминокислот, длина шага 5,44нм, радиус спирали 0,25 нм.

Некоторые белки спирализованы на 100%, другие вовсе лишены спиралей. Факторы, которые мешают образованию α-спиралей: расположение подряд нескольких одноименно заряженных аминокислот (взаимное отталкивание), или аминокислот с большими радикалами (пространственное несоответствие). Нарушает α-спираль аминокислота пролин, которая является фактически иминокислотой и резко меняет направление полипептидной цепи.

β – структуры представлены складчатым слоем, в котором полипептидные цепи соединены между собой с помощью водородных связей. Подобную структуру имеют фибриллярные белки (коллаген).

Неупорядоченные структуры - это неупорядоченное расположение белковой цепи в пространстве.



5.3. Третичная структура – это способ размещения в пространстве всей полипептидной цепи. Глобулярные белки имеют шарообразную (круглую) форму, фибриллярные – вытянутую форму, существуют промежуточные варианты (эллипс и т.д.)

5.4. Четвертичная структура возникает у белков, которые состоят из нескольких полипептидных цепей (субъединиц, протомеров), при объединении третичных структур этих субъединиц. Например, молекула гемоглобина состоит из 4 субъединиц - двух α - цепей и двух β -цепей. Четвертичную структуру имеют надмолекулярные образования-мультиферментные комплексы, которые состоят из нескольких молекул ферментов и коферментов (пируватдегидрогеназа), и изоферменты (лактатдегидрогеназа - ЛДГ, креатинфосфокиназа –КФК).

5.5. Доменная структура.

Некоторые полипептидные цепи содержат участки которые имеют подобную аминокислотную последовательность (повторы) – домены. Домены возникли в процессе эволюции вследствие удвоения генов с дальнейшими изменениями структуры белковму эти участки могут выполнять разные функции в одном и том же белке. Доменную структуру имеют некоторые ферменты и все иммуноглобулины.

6. Денатурация белков.

Денатурация белков – это потеря белками их биологических свойств (каталитических, транспортных и т.д.) вследствие изменения структуры белковой молекулы. Денатурацию вызывают физические факторы (высокая температура, ионизирующее излучение), химические факторы (концентрированные кислоты, щелочи, реакционно-активные соединения, тяжелые металлы).

Денатурация белка

1. Обратимая – после устранения воздействия денатурирующего агента белок восстанавливает свою активность (произошла ренатурация).
2. Необратимая денатурация (происходит необратимое нарушение первичной структуры белка).

