Первичная структура белков и пептидов

Структурная организация белков и пептидов. N- и С-концевой анализ. Первичная структура белков и пептидов. Методы установления первичной структуры пептидов и белков.

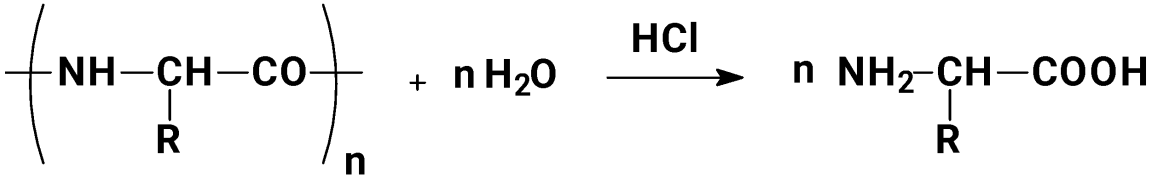
Белки. Классификация и свойства белков.

Аминокислотный состав и аминокислотная последовательность

- Понятие о различных уровнях структурной организации пептидов и белков ввел **Кай Линдстрем-Ланг**, датский химик. Он предложил описывать строение пептидов и белков, пользуясь понятиями **первичной**, **вторичной** и **третичной** структуры.
- При единообразно построенной полиамидной цепи специфичность пептидов и белков определяется двумя важнейшими характеристиками: **аминокислотным составом** и **аминокислотной последовательностью**.
- **Аминокислотный состав** пептидов и белков - это природа и количественное соотношение входящих в них аминокислот

Определение аминокислотного состава

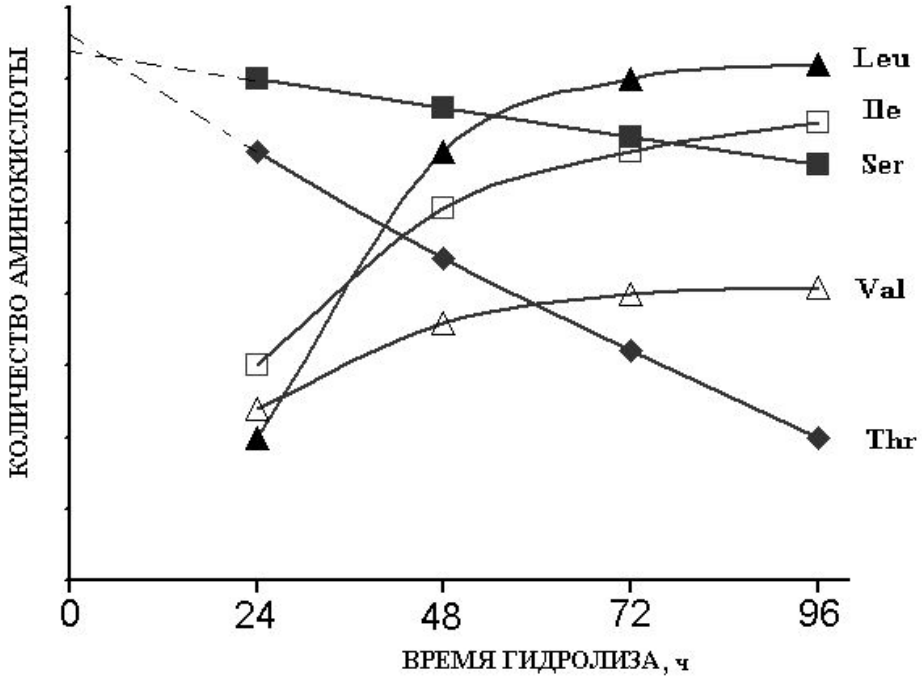
- ✔ Анализ аминокислотного состава включает полный кислотный гидролиз исследуемого белка или пептида с помощью 5,7н HCl и количественное определение всех аминокислот в гидролизате.
- ✔ Гидролиз образца проводится в запаянных ампулах в вакууме при 110 ^{0}C в течение 24 часов.



- ✔ Полностью разрушается Trp и частично Ser, Thr, Cys, а Gln и Asn превращаются в Glu и Asp соответственно.
- ✔ Пептидные связи, образованные аминокислотными остатками с разветвленной боковой цепью (Val, Ile, Leu), из-за стерических препятствий гидролизуются частично. Особенно стабильны связи Val-Val, Ile-Ile, Val-Ile, Ile-Val и т.п.

Asn и Asp определяют как Asn + Asp
Gln и Glu определяют как Gln + Glu
Trp - разрушается /гидролиз 4 N CH_3-SO_3H/
Cys = ½ Cystin или CM-Cys

Определение АК состава



Для определения аминокислотного состава белка проводится параллельный гидролиз в течение 24, 48, 72 и 96 часов, и все пробы далее количественно анализируются. Для Val, Leu и Ile берутся максимальные значения, а для Ser и Thr полученные значения экстраполируются к нулевому времени.

- Количественное определение аминокислот в гидролизате белка или пептида проводится с помощью **аминокислотного анализатора** - прибора, разработанного в 1958 году С.Муром и У.Стенном.
- Смесь аминокислот разделяется методом жидкостной хроматографии на колонке, заполненной твердым носителем. Колонка промывается буферными растворами с последовательным повышением их pH и молярности. Время удерживания каждой аминокислоты строго определенно и зависит от степени ее ионизации.
- **Постколоночная модификация:**

- нингидрин (570 нм, 440 нм для пролина и оксипролина)

- флуорескамин

- о-фталевый альдегид (ОФА), кроме пролина и вторичных аминов

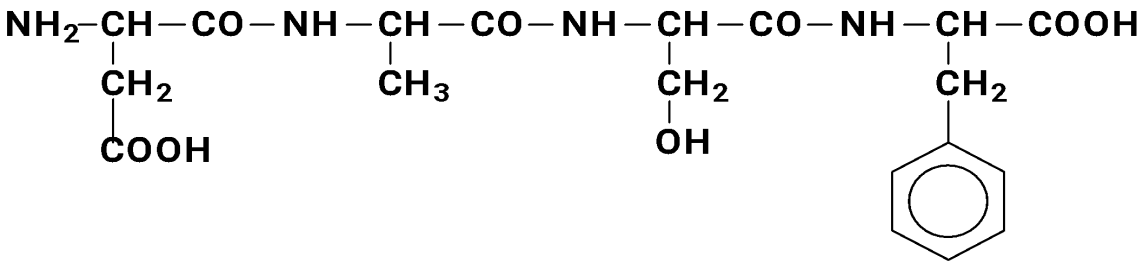
Идентификация – ионообменная ВЭЖХ

- **Предколоночная модификация:**

- образование фенилтиокарбамильных (ФТК) производных используется для количественного определения аминокислот в гидролизате белка в PICO-TAG-анализаторе (Waters).

Идентификация - ВЭЖХ на обращенной фазе

- **Аминокислотная последовательность** - это порядок чередования аминокислотных остатков в молекуле пептида или белка.
- Аминокислотная последовательность составляет **первичную структуру** пептида или белка.



Методы определения первичной структуры:

- **Метод Эдмана (Эдмана-Грэя)/секвенаторы**
- **при помощи пептидаз**

а) с N-концевых остатков при помощи аминопептидаз (хроматографическая идентификация и кинетика накопления соответствующих АК)

б) с С-концов при помощи карбоксипептидаз .

- **метод «перекрывающихся блоков»**
- **масс-спектрометрический метод**
- **вывод АК последовательности белка на основе нуклеотидной последовательности кодирующего его гена.**

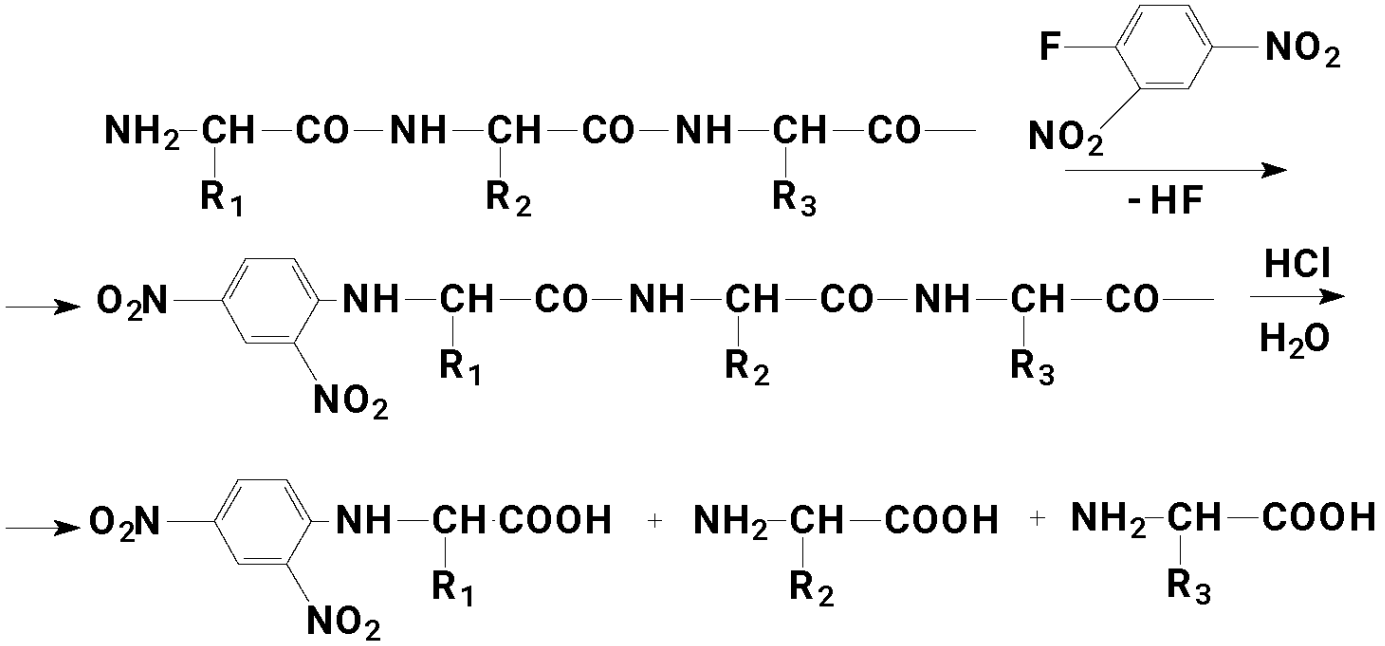
Критерии чистоты белковых препаратов

- **аналитическое ультрацентрифугирование;**
- **электрофорез в нативных или денатурирующих условиях;**
- **иммунохимические методы;**
- **определение N- и C- концевых аминокислотных остатков**

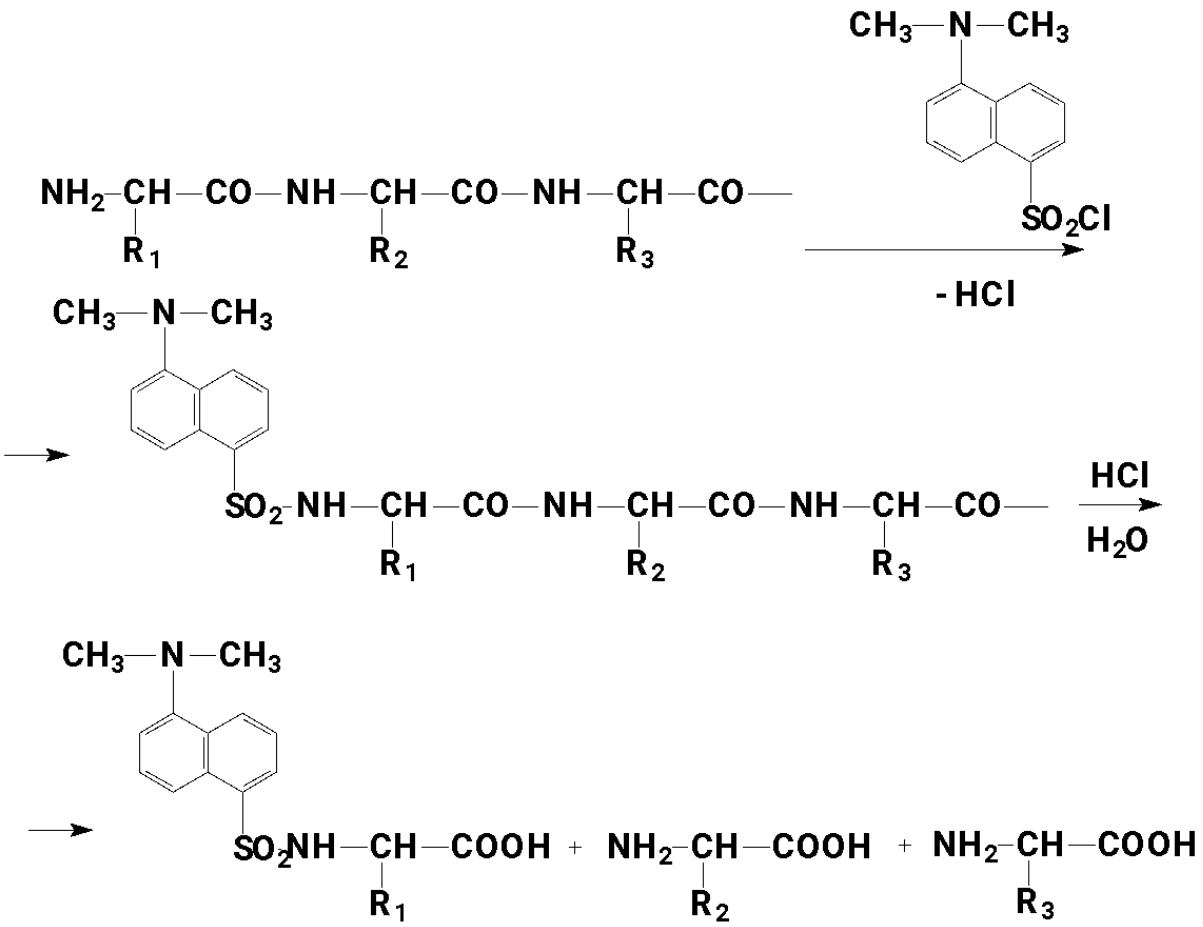
Определение первичной структуры белка требует предварительного проведения ряда операций. Белок должен быть тщательно очищен, чистота материала должна быть подтверждена как минимум двумя независимыми методами.

Определение N- и С- концевого аминокислотного остатка

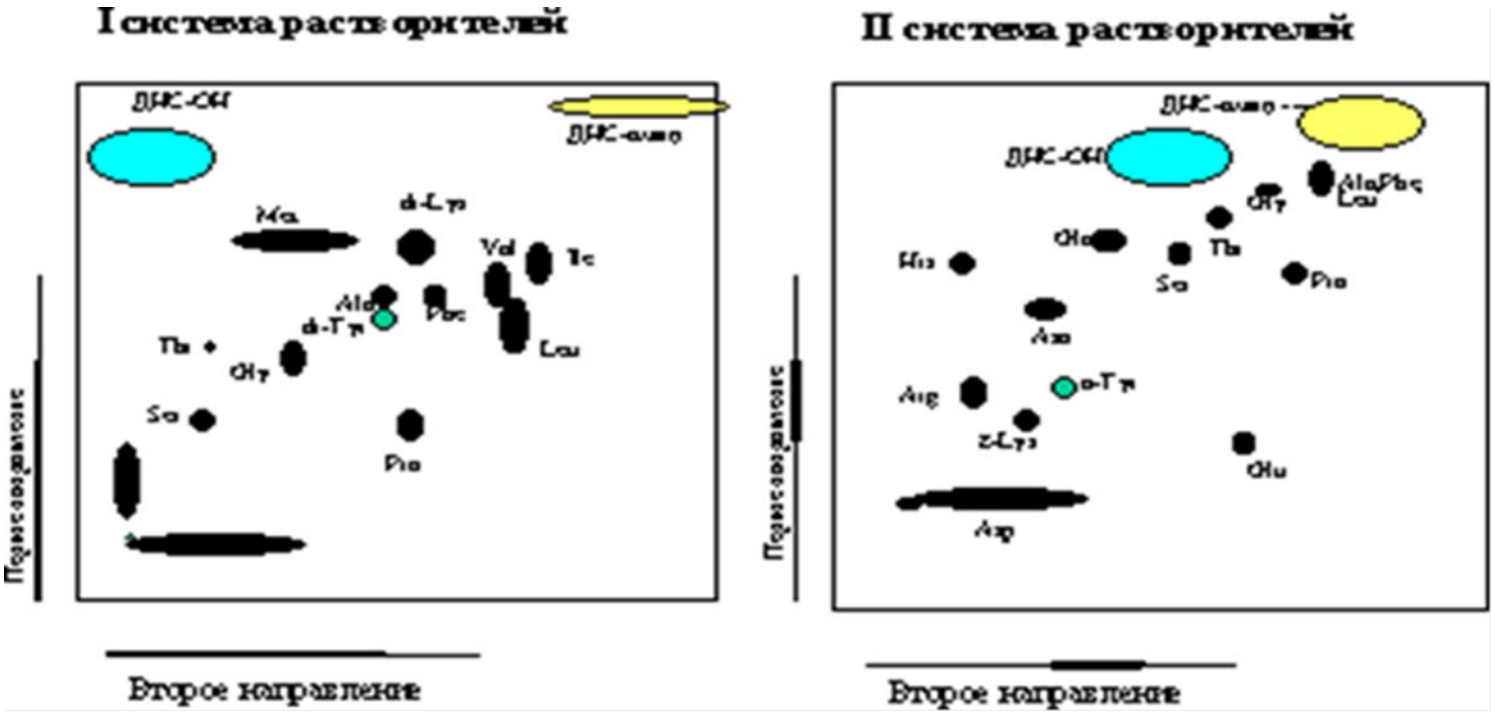
Определение N-концевой аминокислоты. Метод Сэнгера



Определение N-концевой аминокислоты. Метод Грэя-Хартли



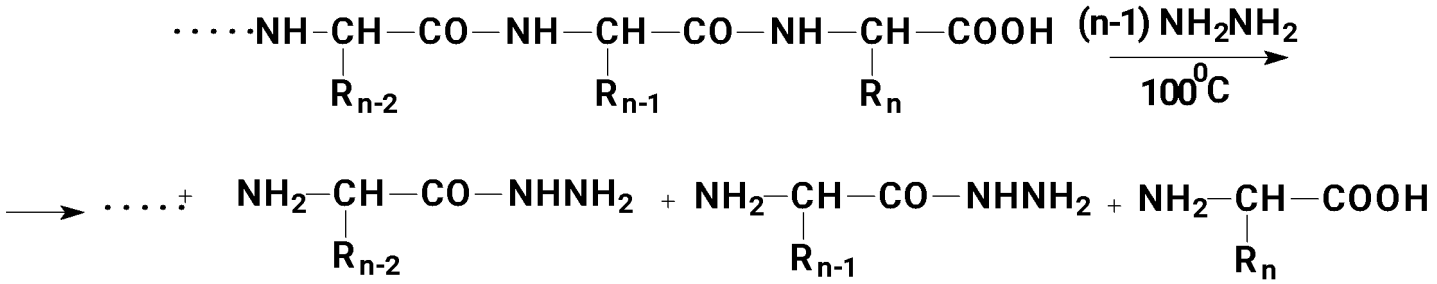
Высокоэффективная двумерная тонкослойная хроматография



В условиях жесткого кислотного гидролиза полностью разрушаются ДНС-триптофан и происходит дезаминирование остатков дикарбоновых кислот, которые превращаются соответственно в ДНС-апарагиновую и ДНС-глутаминовую аминокислоту. Степень разрушения ДНС-пролина, ДНС-серина и ДНС-треонина возрастает по мере увеличения времени гидролиза.

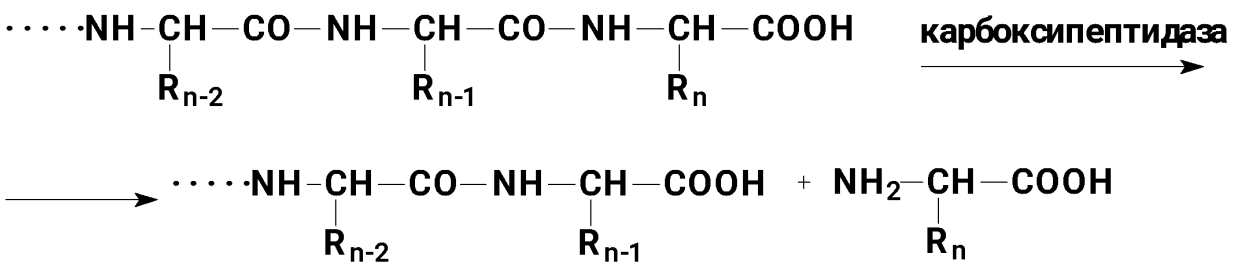
Определение С-концевой аминокислоты

- **Гидразинолиз**



Метод предложен Акабори в 1952 г. Белок нагревают с гидразином (безводным) в запаянной ампуле при 100 - 120 ^{0}C в течение 8 - 10 часов. При этом происходит расщепление белка -гидразинолиз, в результате чего все аминокислоты, кроме С-концевой, образуют гидразиды. Обработкой бензальдегидом гидразиды аминокислот переводят в нерастворимые производные, которые удаляют фильтрованием. Свободные С-концевые аминокислоты определяют хроматографически

Определение С-концевой аминокислоты с помощью карбоксипептидаз (энзиматический гидролиз)



- **Карбоксипептидаза А** - отщепляет аминокислоты с ароматической и длинной алифатической боковой цепью: Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Met,Val.
- **Карбоксипептидаза В** - отщепляет основные аминокислоты - Lys, Arg, орнитин и не отщепляет С-концевой Pro.
- **Карбоксипептидаза С (Р)** - соединяет в себе специфичность карбоксипептидаз А и В и в то же время может отщеплять С-концевой Pro.
- **Карбоксипептидаза Y** - отщепляет практически все аминокислоты, включая Pro.

Определение аминокислотной последовательности

Определение аминокислотной (N-концевой) последовательности белков с помощью метода Эдмана

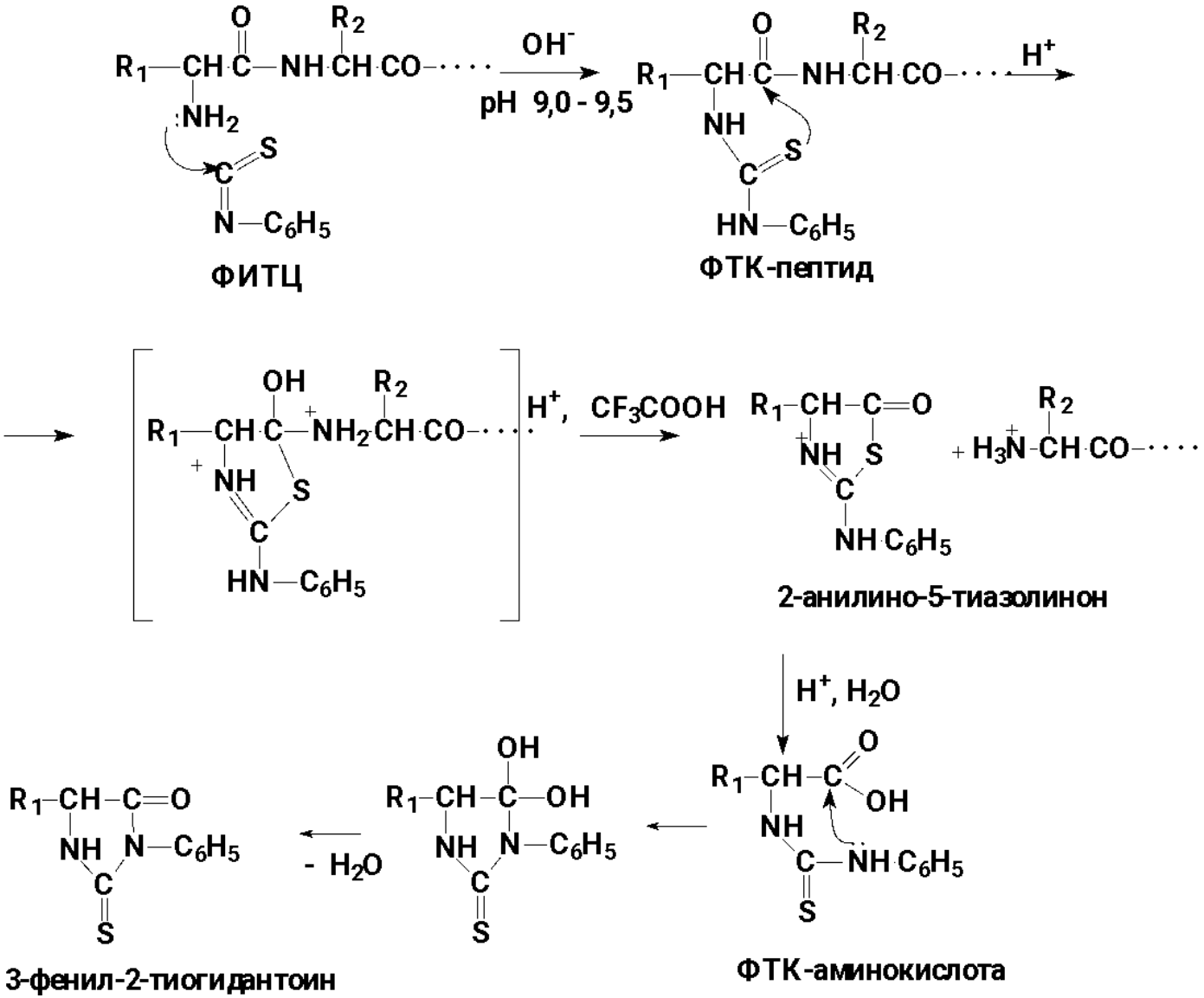
- ✔ Основным методом определения аминокислотной последовательности является метод деградации полипептидной цепи белка с помощью фенилизотиоцианата (ФИТЦ), разработанный П. Эдманом в 1950-1956г.г.
- ✔ Метод Эдмана позволяет последовательно отщеплять N-концевые аминокислотные остатки в виде фенилтиогидантоинов (ФТГ) аминокислот.

Каждый цикл деградации включает три стадии:

I. Конденсация, образование фенилтиокарбамил пептида (ФТК-пептид);

II. Циклизация, отщепление N-концевого остатка аминокислоты и его циклизация в 2-анилино-5-тиазолинон;

III. Изомеризация, 2-анилино-5-тиазолинон N-концевого остатка аминокислоты изомеризуется в фенилтиогидантоин, который в дальнейшем идентифицируется (265-270 нм).

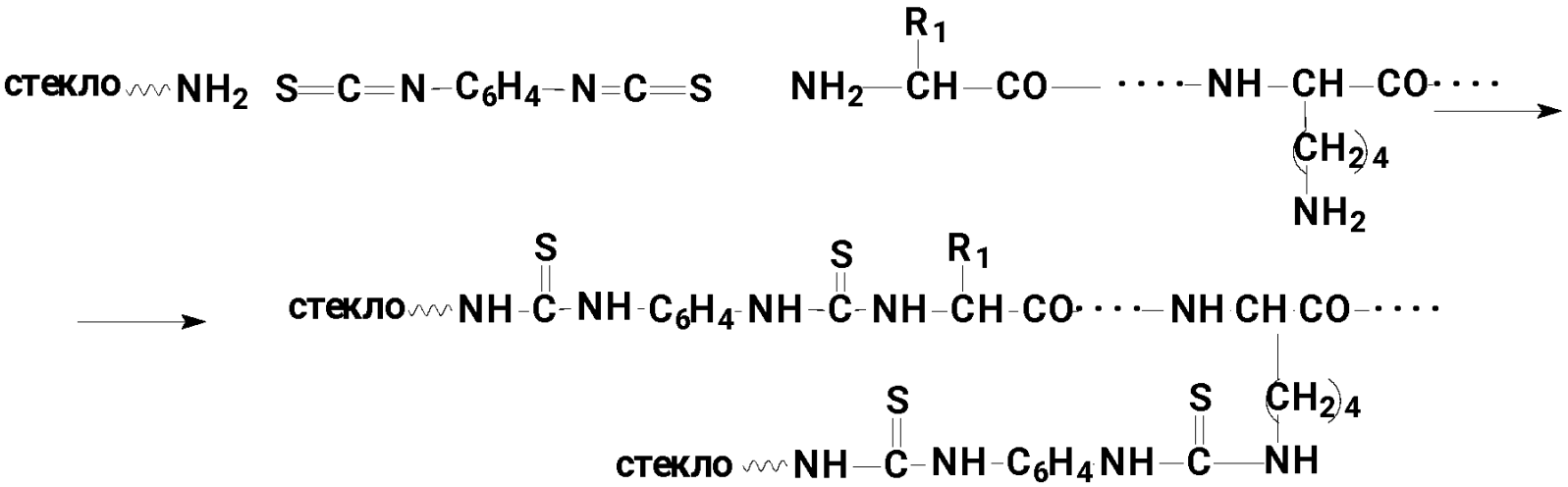

OH⁻
pH 9,0 - 9,5
H⁺
ФИТЦ
ФТК-пептид
H⁺, CF₃COOH
2-анилино-5-тиазолинон
H⁺, H₂O
- H₂O
3-фенил-2-тиогидантоин
ФТК-аминокислота

Метод Эдмана-Грея

- В 1972 г. В.Греем было предложено использовать метод Эдмана в сочетании с реакцией дансилирования (ДНС-Эдман).
- После каждого цикла отщепления по Эдману отбирается небольшая проба образца (аликвота) и анализируется N-концевой остаток укороченного пептида с помощью реакции дансилирования.
- Этот подход выгодно отличается от «прямого» Эдмана, так как при этом отсутствует стадия промывки (экстракции), удаляющая избыток реагентов и побочных продуктов, образовавшихся в процессе реакции конденсации, что позволяет исключить возможные потери пептидов (особенно неполярных) за счет их растворения в органическом растворителе.
- Постепенное уменьшение количества анализируемого материала (в результате отбора аликвот) компенсируется более высокой чувствительностью определения флуоресцирующих производных аминокислот.

Автоматическое секвенирование

Иммобилизация белка по лизину:



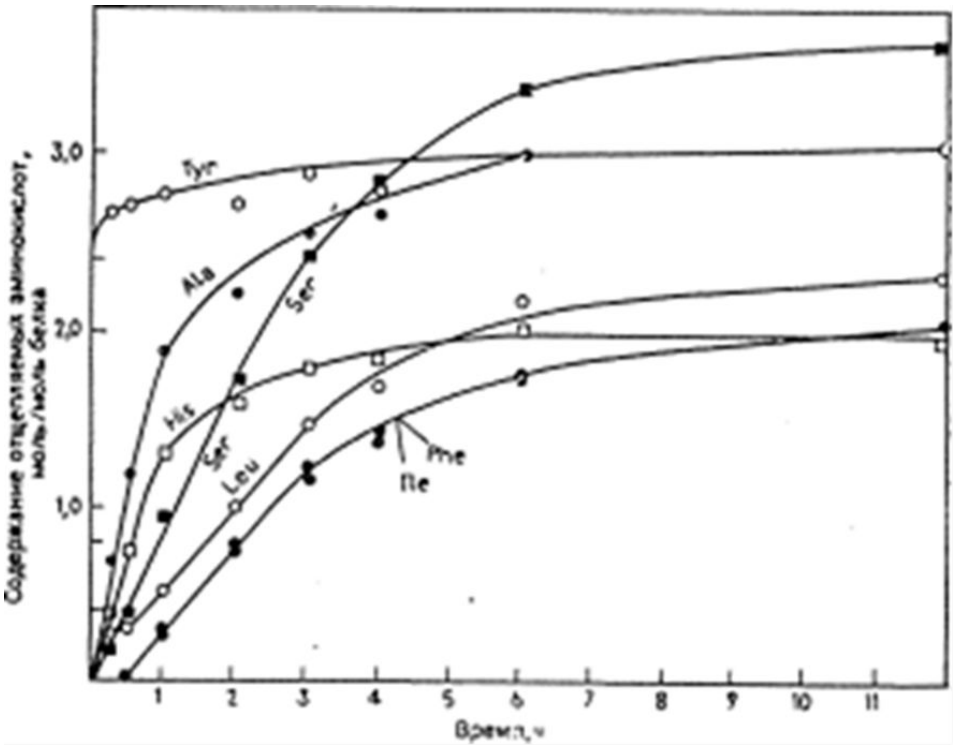
После кислотной обработки N-концевая АК отщепляется и остается связанной со стеклом. Далее проводят секвенирование с последующим отщеплением АК, остатки лизина «пропускаются».

N-концевые секвенаторы – до 40 АК остатков (15 циклов в сутки)

Определения С-концевой последовательности белков с помощью карбоксипептидаз

- Изучая кинетику отщепления аминокислот карбоксипептидазами, можно получить информацию о последовательности расположения их на С-концевом участке молекулы белка или пептида. Скорость появления освобождающихся аминокислот во времени позволяет сделать вывод о С-концевой последовательности белка.

Отщепление аминокислот альдолазы мышцы кролика карбоксипсптидазой А



Ser-Leu-Phe-Ile-Ser-Asn-His-Ala-Tyr-OH

При работе с карбоксипептидазами необходимо учитывать следующие основные проблемы:

1) многие препараты ферментов А и В содержат эндонуклеазы (трипсин, химотрипсин), которые следует инактивировать добавлением диизопропилфторфосфата(DIPF);

2) следует учитывать различие в скоростях отщепления отдельных аминокислот, зависящее как от природы боковой цепи у отщепляемого остатка, так и от природы аминокислоты расположенной в соседнем положении. Отщепление С-концевой аминокислоты значительно ускоряется, если перед ней находится остаток с ароматической или алифатической боковой цепью. Напротив, если в соседнем положении находится глицин, пролин, глутаминовая кислота, то скорость гидролиза снижается;

3) возникают осложнения и в случае, когда в С-концевой последовательности стоят подряд несколько остатков одной и той же аминокислоты.

Поэтому при использовании карбоксипептидаз надежно удается вывести последовательность не более чем трех-пяти аминокислотных остатков, расположенных в белке в С-концевом положении.

С-концевые секвенаторы – до 40 АК остатков

Определение АК последовательности методом «перекрывающихся блоков»

1. **Определение АК состава, N- и C-концевых АК (при необходимости)**
2. **Восстановление дисульфидных связей с защитой сульфгидрильной группы**
3. **Анализ АК состава, выбор реагентов для расщепления:**

- эндопептидазы:

Трипсин: Lys – X, Arg – X, кроме X=Pro

Химотрипсин: после ароматических АК

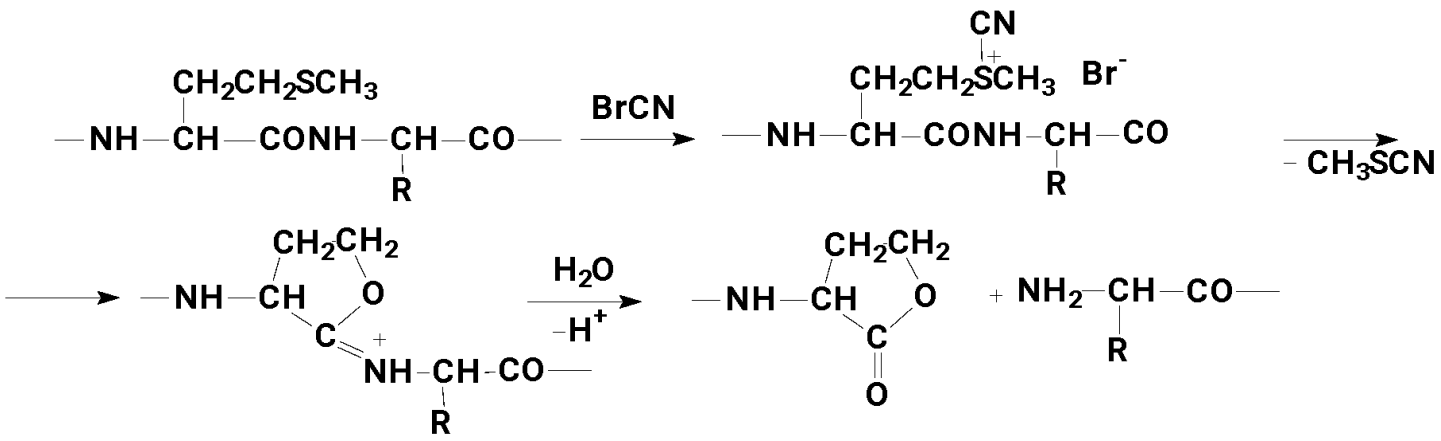
Пепсин между гидрофобными АК

Глутаминовая протеаза: Glu - X

- химическое расщепление:

Частичный гидролиз (10% уксусная к-та): лабильны связи, образованные Asp и Pro

Расщепление BrCN по остаткам метионина:



4. Селективное расщепление пептидных связей -1
4.1. Разделение смеси, выделение индивидуальных пептидов
4.2. Анализ этих пептидов: определение АК состава, N- и С-концевых АК (при необходимости)
4.3. Секвенирование пептидов (любым методом) + сиквенс N –концевой последовательности
5. Селективное расщепление пептидных связей -2 (выделение, анализ, секвенирование)
6. Установление полной АК последовательности (по перекрыванию фрагментов пептидов)

G-W-V-R /A- F-V-K /C-E-C-D триптические пептиды
G-W /V-R-A-F /V-K-C-E-C-D химотриптические пептиды

Бромциановые пептиды:

Asn-Phe-Arg-Ser-Glu-Val
Tyr-Asn-Lys-Val-Ile-Gly-Ser-Met(Ser)
Ala-Val-Met(Ser)

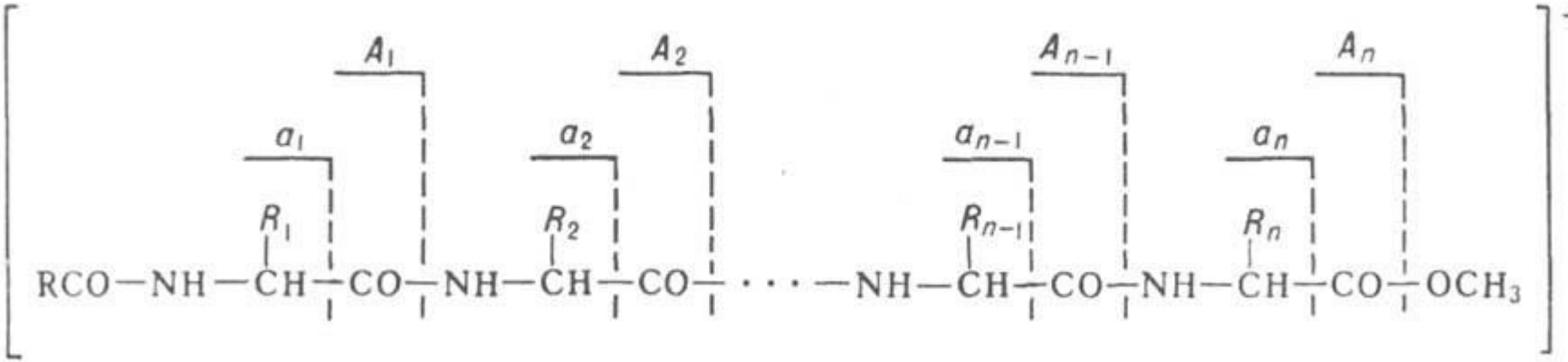
Триптические пептиды:

Ala-Val-Met-Tyr-Asn-Lys
Ser-Glu-Val
Val-Ile-Gly-Ser-Met-Asn-Phe-Arg

Ala-Val-Met-Tyr-Asn-Lys-Val-Ile-Gly-Ser-Met-Asn-Phe-Arg-Ser-Glu-Val

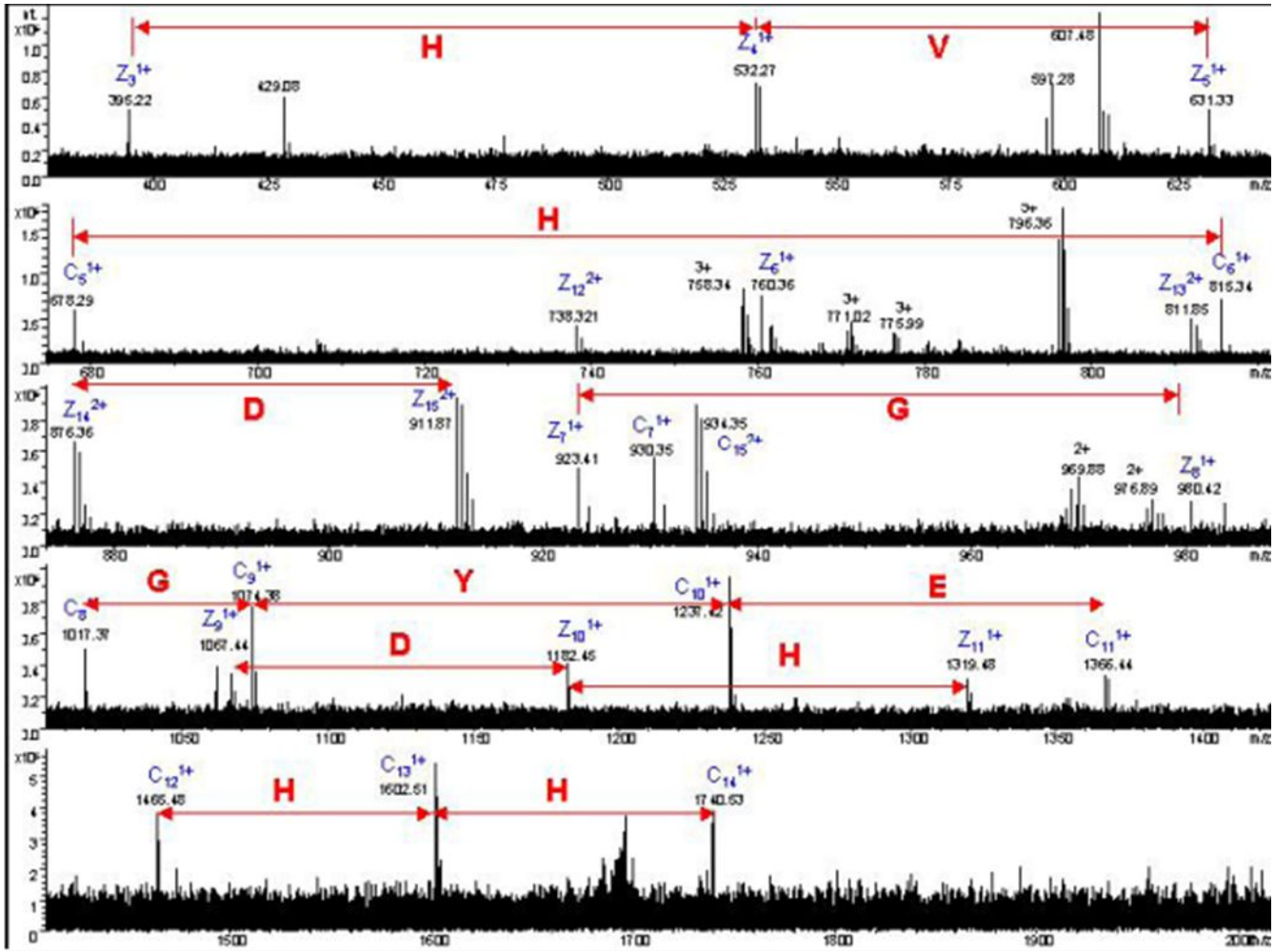
ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПЕПТИДОВ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

- **Используется способность ионизированных молекул пептидов распадаться по так называемому аминокислотному типу фрагментации, заключающемуся в разрыве CO—NH или CH—CO связей.**

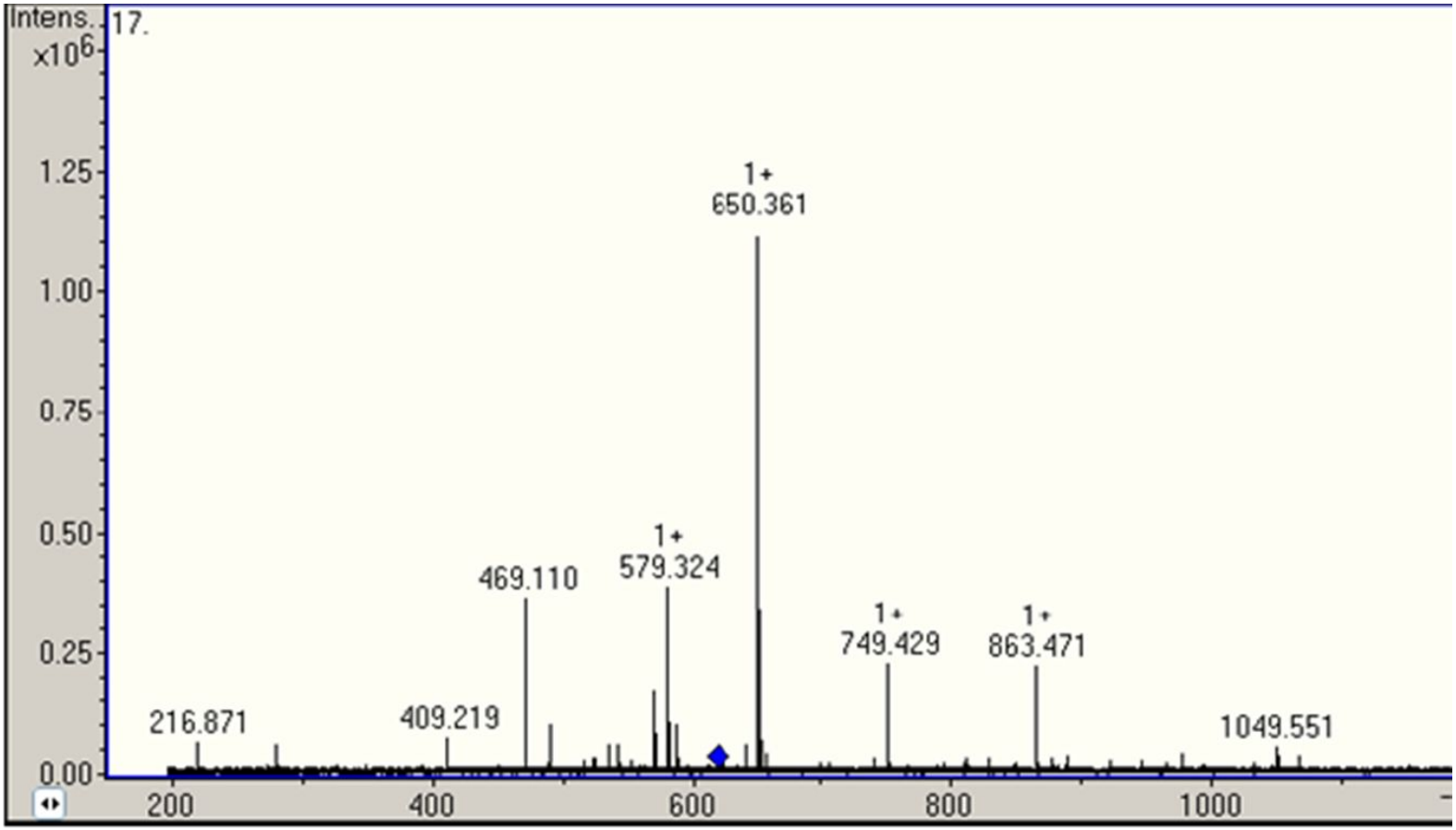


- **Идентификация в масс-спектре пиков, соответствующих фрагментам A1...An или a1...an, дает информацию о строении пептида.**

Сиквенс *deNovo*



Метод «пептидных отпечатков» / «пептидный метод отпечатков пальцев» (Peptide Mass FingerPrint)



Установление АК последовательности белка на основе нуклеотидной последовательности кодирующего его гена

- **Развитие методов анализа последовательности ДНК сделало возможным на основе генетического кода выводить соответствующие аминокислотные последовательности, исходя из установленных нуклеотидных:**

ДНК: **5’- ATG GCA TCC GGA CCA ACG TAA -3’**

Белок: **N- Met Ala Ser Gly Pro Thr Stop -C**

При реализации такого подхода следует, однако, иметь в виду целый ряд ограничений и возможные источники ошибок:

- **Во-первых, выведенная из нуклеотидной аминокислотная последовательность может не соответствовать реальной, вследствие процессинга, который часто происходит как на уровне информационной РНК, так и при превращении белка-предшественника в конечный белок.**
- **Во-вторых, лишь одна ошибка в определении последовательности ДНК (пропуск или вставка) приводит к выведению совершенно неправильной аминокислотной последовательности белка.**

Таким образом, установление первичной структуры ДНК не всегда может заменить непосредственное исследование аминокислотной последовательности кодируемого ею белка. В то же время параллельное изучение первичных структур белка и ДНК чрезвычайно эффективно. Установление нуклеотидной последовательности дает возможность расположить изученные пептидные фрагменты в непрерывную полипептидную цепь, позволяя решать, таким образом, наиболее сложную задачу структурного анализа белка. С другой стороны, данные по аминокислотной последовательности пептидов упрощают и уточняют анализ нуклеотидной последовательности.

Белки

28

Определение белков. Классификация и свойства белков.

Белки – это полипептиды, способные самопроизвольно формировать и сохранять определенную пространственную структуру

Ренактивация РНК-азы:

- **Пространственное строение предопределяется первичной структурой белка**
- **Функция белка предопределяется его пространственной структурой**

Белок может функционировать, т. е. выступать в качестве фермента, структурного или транспортного белка, регулятора, токсина, ингибитора только потому, что он обладает вполне определенным пространственным строением.

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

Протеины (простые белки)

- **Альбумины** (хорошо растворяются в воде. Содержатся в молоке, яичном белке и крови)
- **Глобулины** (в воде не растворяются, но растворимы в разбавленных растворах солей. К глобулинам принадлежат глобулины крови и мышечный белок миозин)
- **Глутелины** (растворяются только в разбавленных растворах щелочей. Встречаются в растениях)
- **Склеропротеины** (нерастворимые белки. К склеропротеинам относятся кератины, белок кожи и соединительных тканей коллаген, белок натурального шелка фиброин)

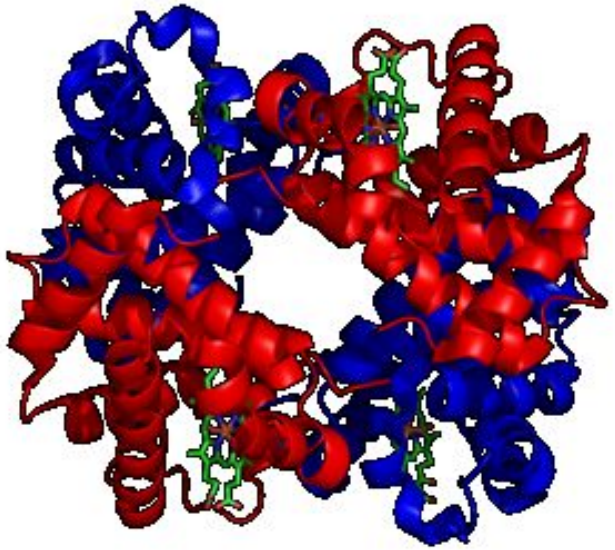
Протеиды (сложные белки)

- **Нуклеопротеиды** (составные части клеточных ядер. Нуклеопротеиды являются важнейшей составной частью вирусов — возбудителей многих болезней)
- **Фосфопротеиды** (вителлин—белок, содержащийся в яичном желтке, белок молока казеин)
- **Хромопротеиды** (содержат молекулу окрашенного вещества, обычно типа порфина. Гемоглобин — переносчик кислорода, окрашивающий красные кровяные тельца)
- **Гликопротеиды** (входят в состав хрящей, рогов, слюны)
- **Металлопротеиды** (некоторые ферменты)

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

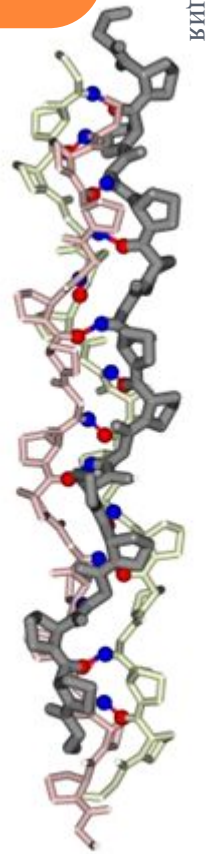
Глобулярные белки́ — белки, в молекулах которых полипептидные цепи плотно свёрнуты в компактные шарообразные структуры (глобулы)

Фибриллярные белки -белки, имеющие вытянутую нитевидную структуру, в которой соотношение продольной и поперечной осей более 1:10

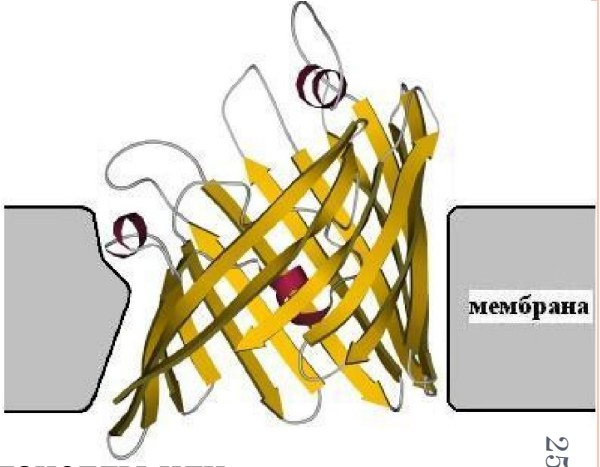


Трехмерная структура молекулы **гемоглобина** — глобулярного белка

Коллаген - главный опорный белок



КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ



Мембранные белки – это белки, которые встроены в клеточную мембрану или мембрану клеточной органеллы или ассоциированы с таковой.

- **Интегральные мембранные белки** прочно встроены в мембрану и могут быть извлечены из липидного окружения только с помощью детергентов или неполярных растворителей. По отношению к липидному бислою интегральные белки могут быть трансмембранными **политопическими** или интегральными **монотопическими**.
- **Периферические мембранные белки** являются **монотопическими** белками. Они либо связаны слабыми связями с липидной мембраной, либо ассоциируют с интегральными белками за счёт гидрофобных, электростатических или других нековалентных сил. Они диссоциируют от мембраны при обработке соответствующим водным раствором (например, с низким или высоким pH, с высокой концентрацией соли или под действием хаотропного агента). Эта диссоциация не требует разрушения мембраны.