

Практическое занятие № 1

Физико-химические свойства белков. Количественные (колориметрические) методы определения концентрации белка

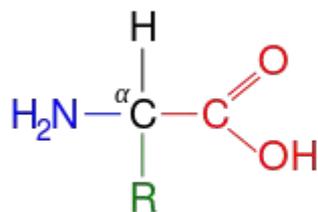
Анна Дидио

Кафедра биохимии
2016

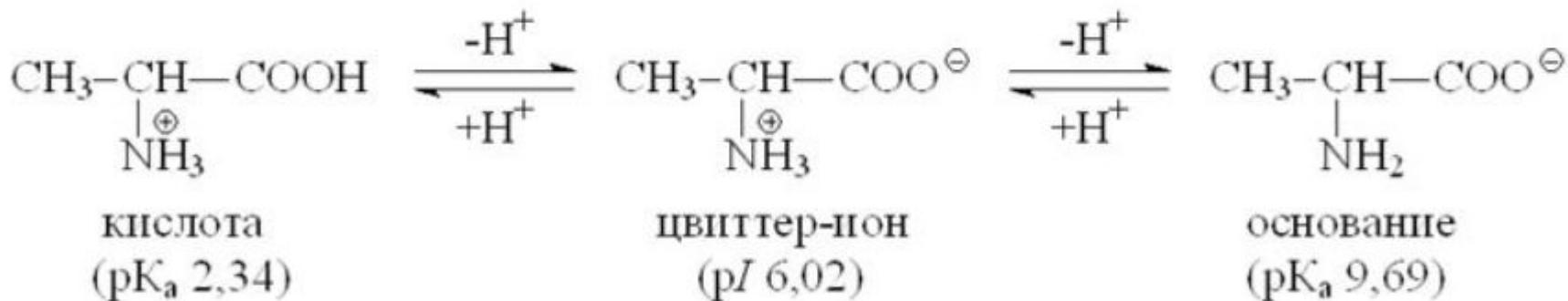
Химические свойства аминокислот. Реакции α-карбоксильной и α-аминогрупп; реакции боковых радикалов. Цветные реакции на аминокислоты и белки.

Неионизованная и цвитеринная форма

①



②



биполярный ион

Изоэлектрическая точка

Величина изоэлектрической точки амфотерной молекулы определяется величинами констант диссоциации кислотной и основной фракций:

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

Изоэлектрическое фокусирование — технология разделения молекул по разнице в их изоэлектрических точках. Это разновидность зонального электрофореза, которую обычно проводят в геле.

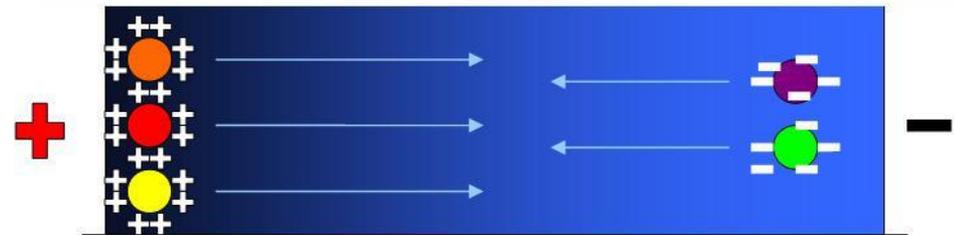
Метод применяют для изучения белков, которые отличаются значениями изоэлектрической точки, то есть соотношением остатков кислых и основных аминокислот.

Stable pH gradient

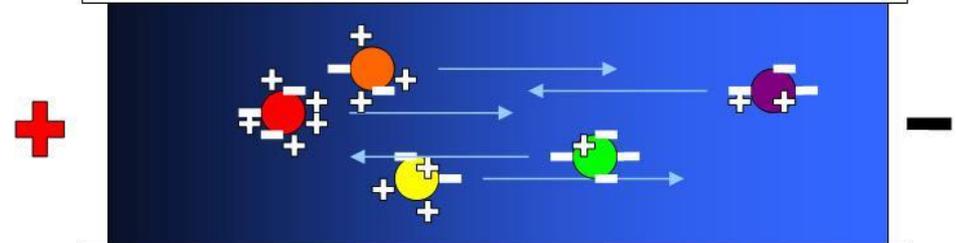


Изоэлектрофокусирование

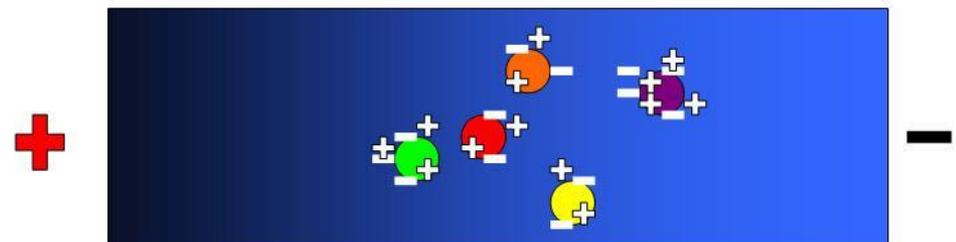
- = Isoelectric point at pH 7.5
- = Isoelectric point at pH 6.8
- = Isoelectric point at pH 8.5
- = Isoelectric point at pH 10.1
- = Isoelectric point at pH 5.6



At low pH, most proteins have a positive charge while at high pH, most proteins have a negative charge.



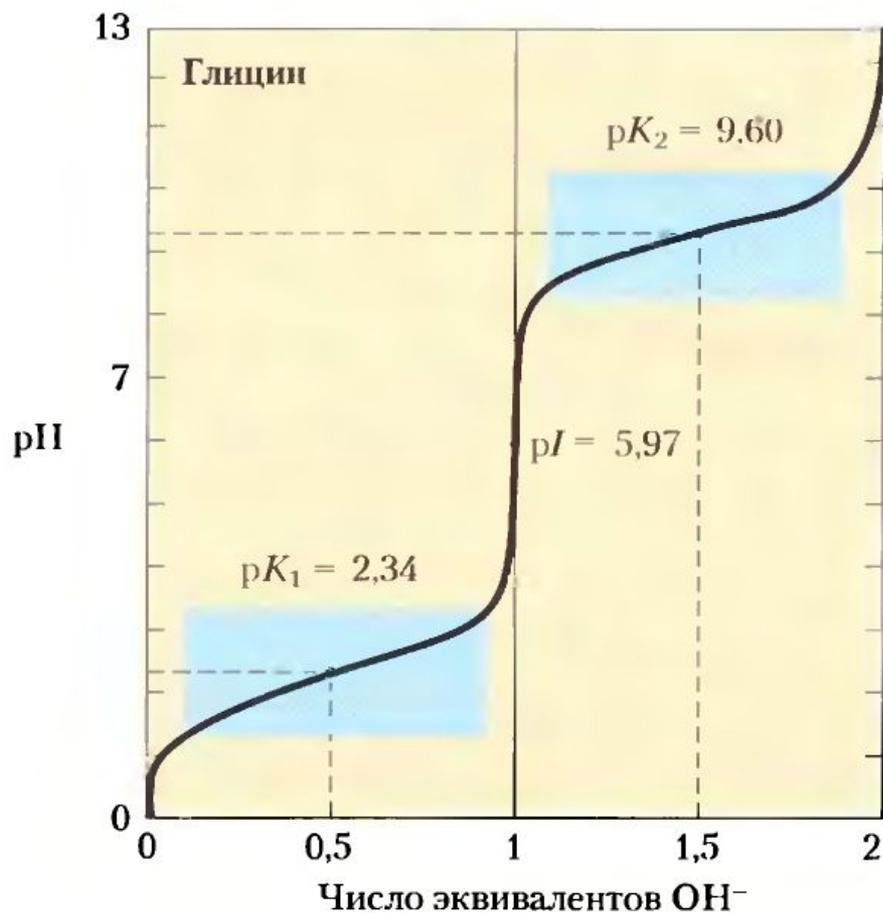
When an electric field is present, the cathode and anode ends pull the proteins to their isoelectric point where each individual protein possesses a neutral charge.



The proteins stopped migrating because they've reached their isoelectric point at a unique pH level.

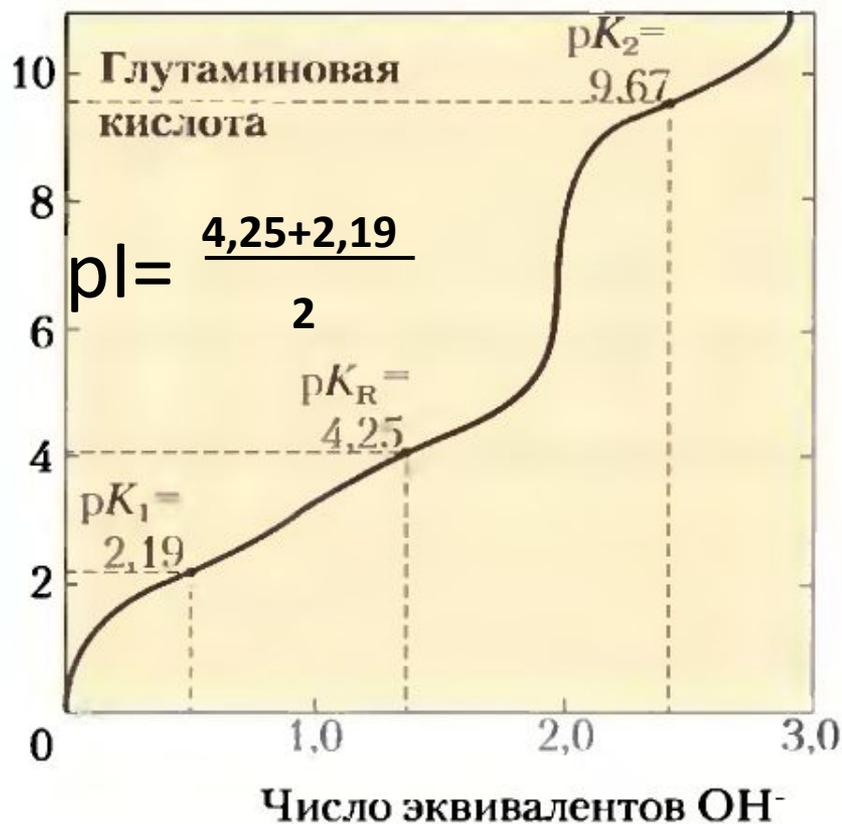
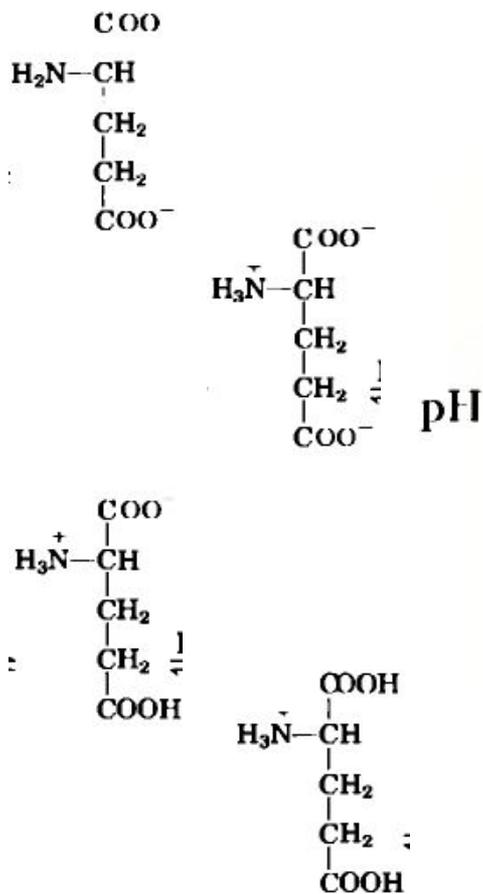
Титрование аминокислот Нейтральные аминокислоты

метод количественного/массового анализа, используемый в аналитической химии, основанный на измерении объёма раствора реактива точно известной концентрации, расходуемого для реакции с определяемым веществом

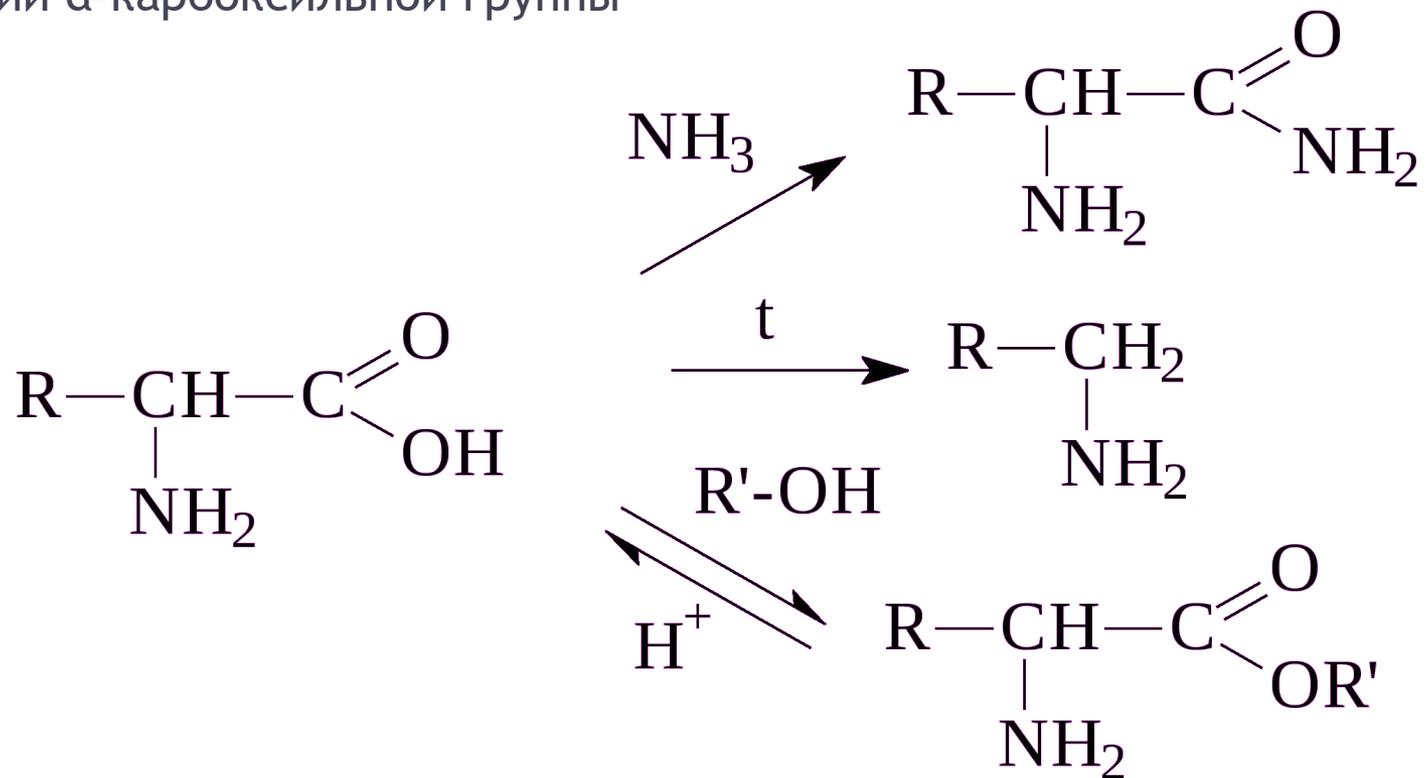


Титрование аминокислот

Отрицательно заряженные аминокислоты



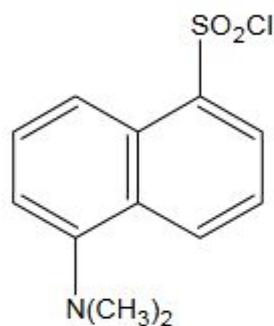
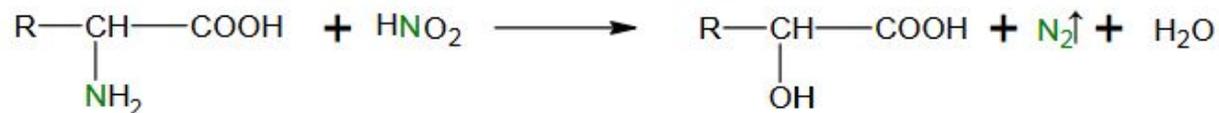
Химические свойства аминокислот
Реакции α-карбоксильной группы



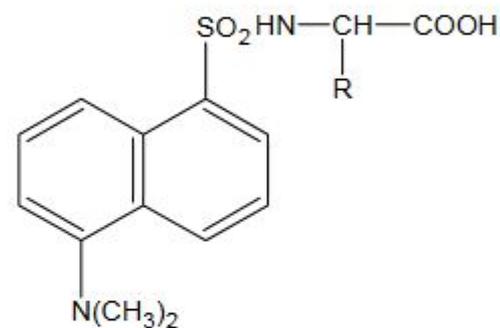
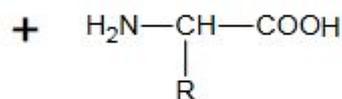
Химические свойства аминокислот

Реакции α-аминогруппы

Дезаминирование азотистой кислотой (метод Ван Слайка, 1910). Количественное определение аминокислот по объему выделившегося азота - историческое значение



дансилхлорид



N-дансиламинокислота

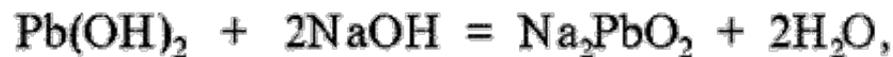
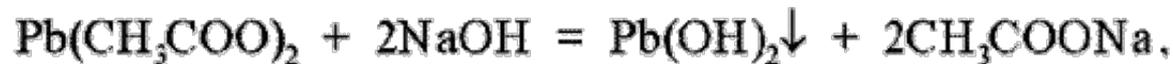
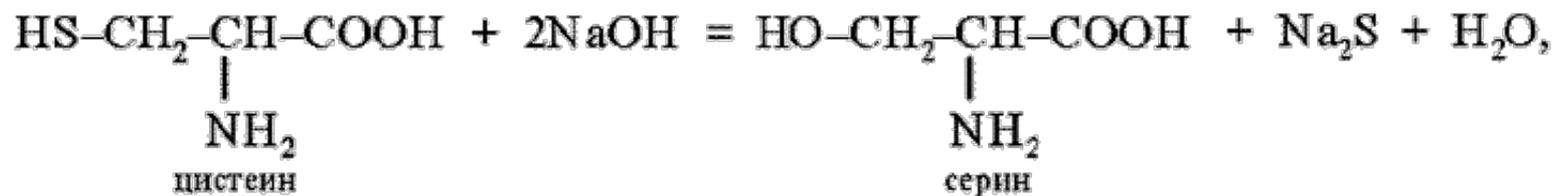
N-дансиламинокислоты обладают интенсивной флуоресценцией в УФ-области спектра, что позволяет обнаруживать их в количестве до 10^{-11} моль (~ 0,001 мкг)

Химические свойства аминокислот

Реакции боковых радикалов

- **Реакция Фоля**

(Качественная реакция на цистин и аминокислоту цистеин)



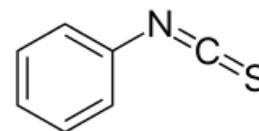
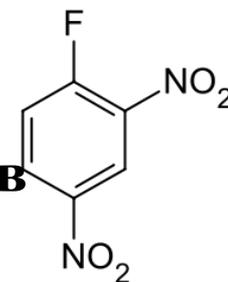
Определение аминокислотной последовательности белков

Методы основанные на последовательном отщеплении концевых аминокислот

С N-конца

Реагенты:

- Дансил хлорид или 1-фтор-2,4-динитробензол (реактив Сенджера)
- Фенилизотиоцианат (Реактив Эдмана)
- Аминопептидаза



С С-конца

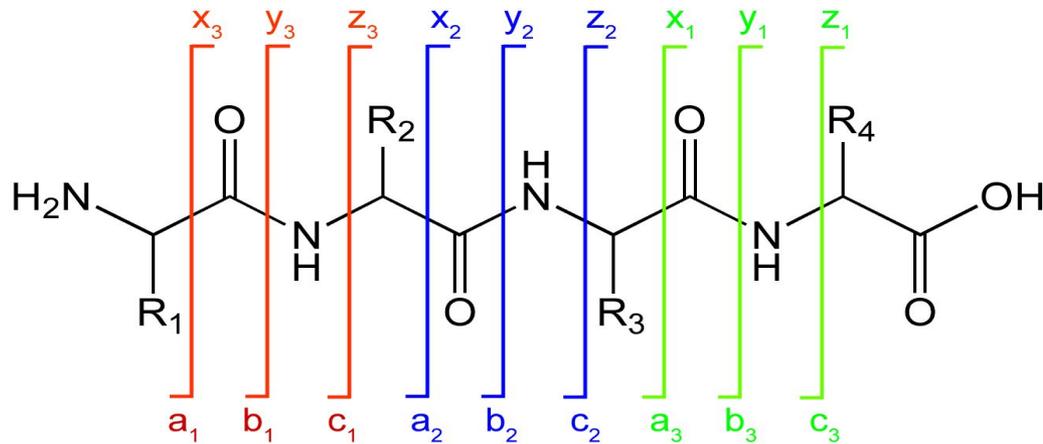
- Карбоксипептидаза

Современные подходы к определению аминокислотной последовательности белков (протеомные технологии)

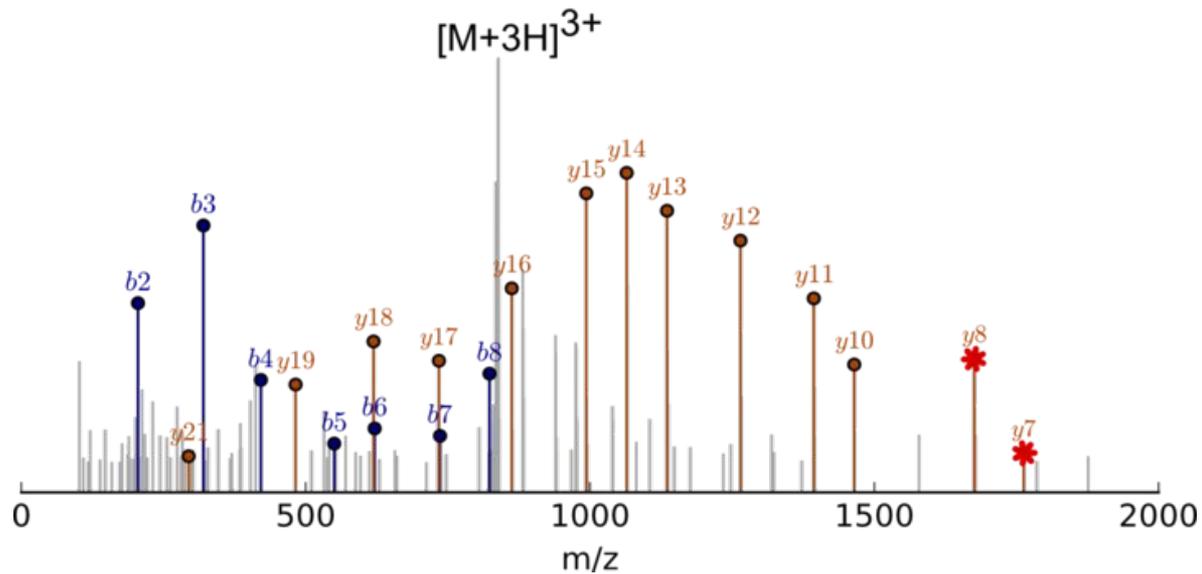
Масс-спектрометрия



Масс-спектрометрия

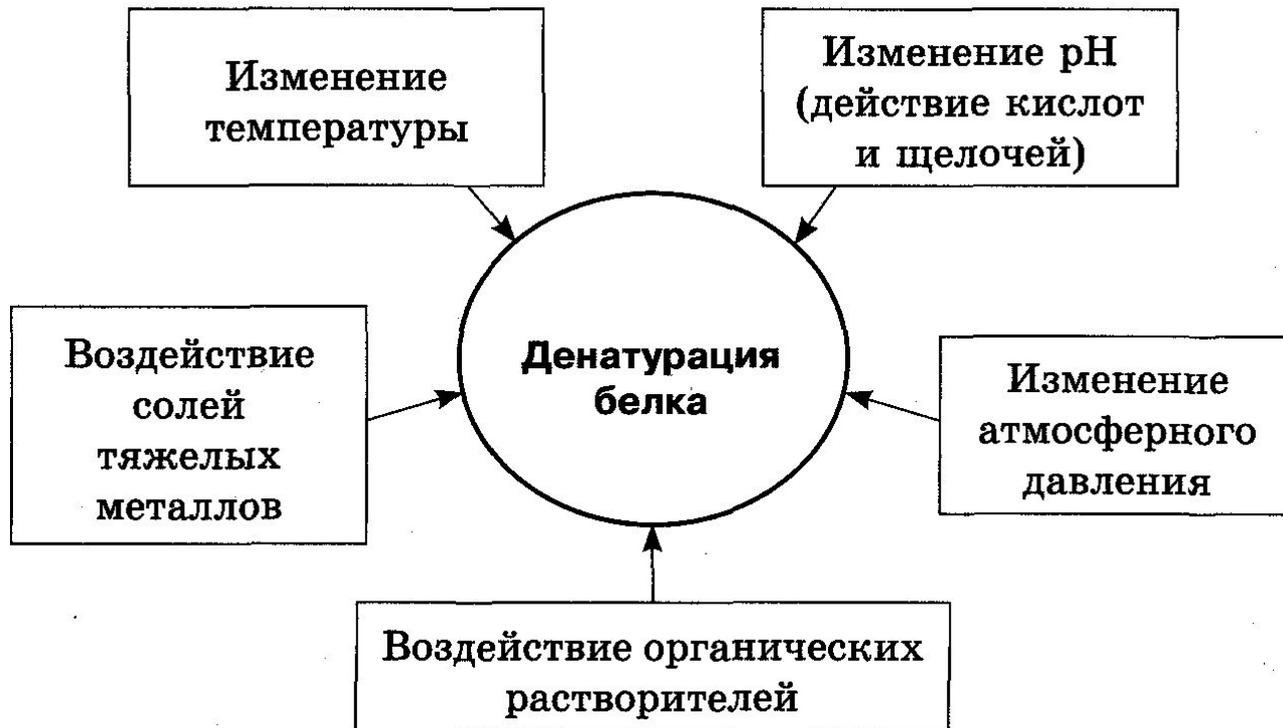


FGDTEADSPNAEEAAMQDHSTFK



Денатурация белков

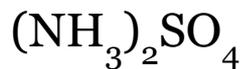
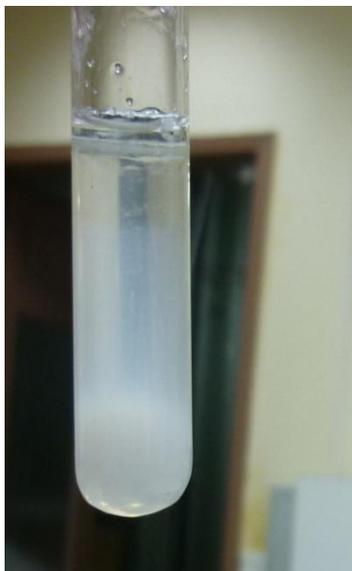
Нарушение трёхмерной структуры белка, способное повлечь за собой потерю его функции



Денатурация белков

Обратимая

Нейтральные соли

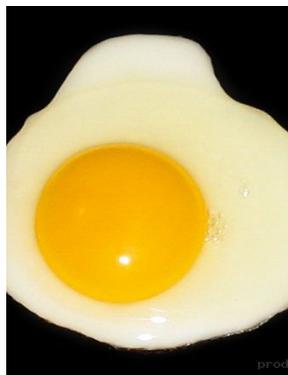


Необратимая

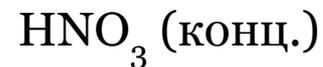
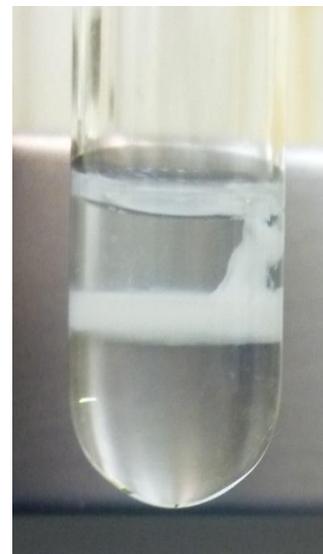
Температурные воздействия

Минеральные кислоты

Органические растворители

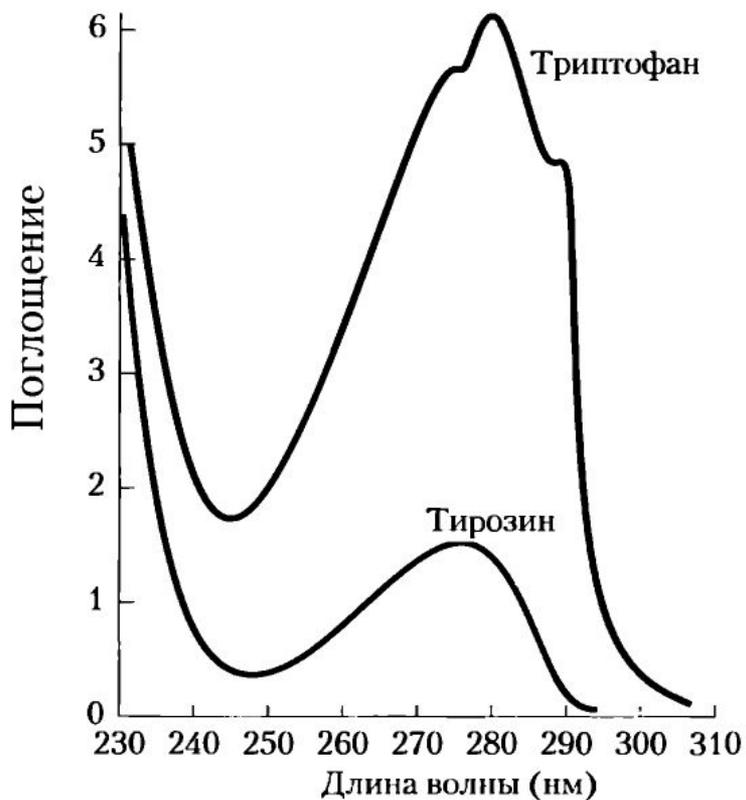


Нагревание



ацетон

Оптические свойства аминокислот



В области видимого спектра растворы аминокислот практически не поглощают, а в УФ-области поглощают растворы только тех аминокислот, которые содержат в молекуле бензоидные фрагменты или гетероциклические ядра ароматического характера - фенилаланин, тирозин, гистидин, триптофан. Относительно интенсивное поглощение при $\lambda = 260-290$ нм характерно для тирозина и триптофана. Поглощение тирозина при 280 нм используется для определения содержания белка в растворах.

Закон Бугера-Ламберта-Бера

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$$

D — оптическая плотность раствора;
 ε — молярный коэффициент поглощения;
 c — концентрация вещества, поглощающего свет, моль/л;
 l — толщина слоя раствора, поглощающего свет, см.

I_0 — интенсивность падающего на образец света

I — интенсивность света после прохода через образец

ε — величина поглощения 1М раствора изучаемого вещества в кювете с длиной оптического пути 1 см

Методы количественного определения белков. Спектрофотометрические и колориметрические методы определения концентрации белков.

Колориметрия — физический метод химического анализа, основанный на определении концентрации вещества по интенсивности окраски растворов

Спектрофотометрия — физико-химический метод исследования растворов и твёрдых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200—400 нм), видимой (400—760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра

Колориметрические методы

Биуретовый метод – образование в щелочной среде комплекса пептидных связей с ионами меди. 540нм

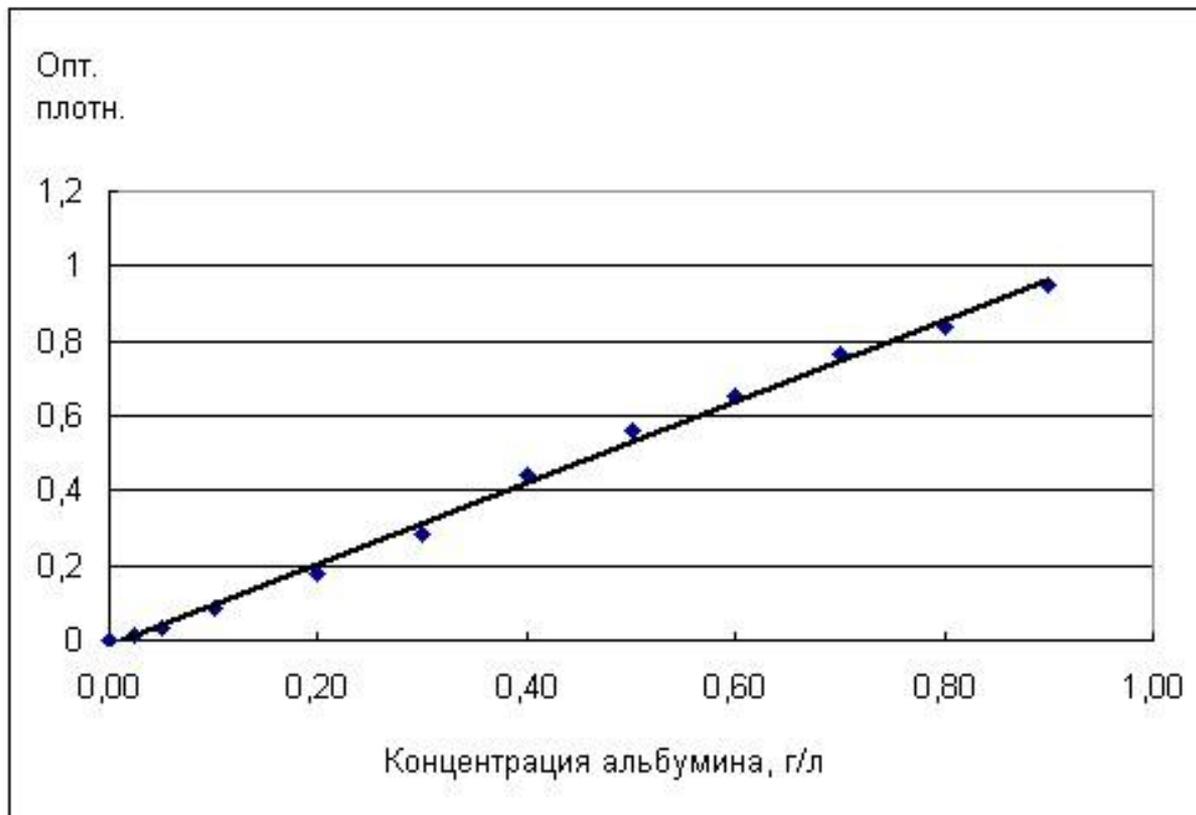
Метод Лоури – Образование комплекса ароматических АК с реактивом Фолина + биуретовая реакция. 750 нм

Метод Брэдфорд – основан на связывании с белками красителя кумасси синего, спектр поглощения которого при этом меняется. 595 нм.

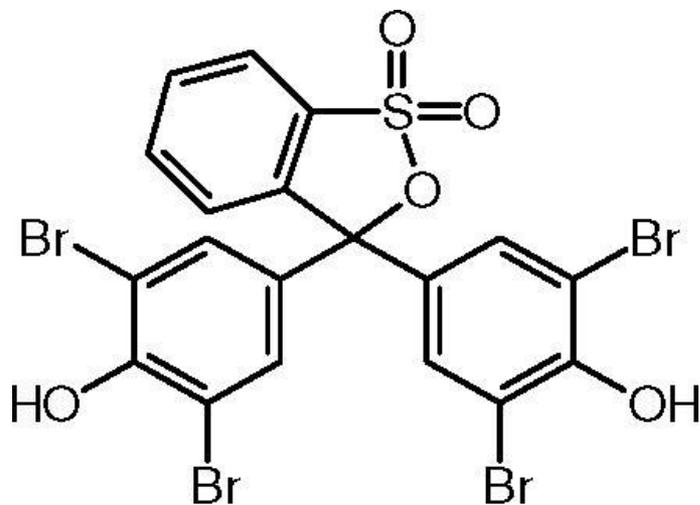
Спектрофотометрический метод.

Основан на способности ароматических АК поглощать УФ свет 280нм. Этот метод используется и для определения концентрации нуклеиновых кислот.

Калибровочная кривая



Определение концентрации белка с помощью красителя бромфенолового синего



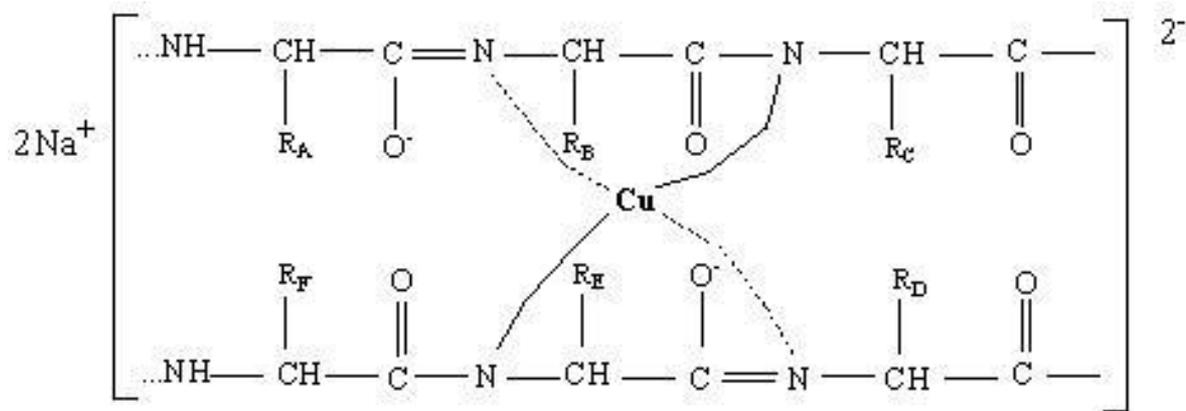
Бромфеноловый синий

Чувствительность метода:
10 мкг/мл

Метод основан на связывании красителя бромфенолового синего с белками в кислой среде. При этом образуется окрашенный комплекс синего цвета с максимум поглощения при длине волны 610 нм.

Биуретовый метод определения концентрации белка

Образование в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белков с ионами двухвалентной меди



Чувствительность метода:

от 2 до 10 мг белка в пробе; микрометод - от 0,1 до 2 мг

Определение концентрации белка по методу Лоури с применением реактива Фолина-Чокальтеу

В щелочной среде ионы Cu^{+2} образуют комплекс с пептидными связями, переходя в Cu^+ .

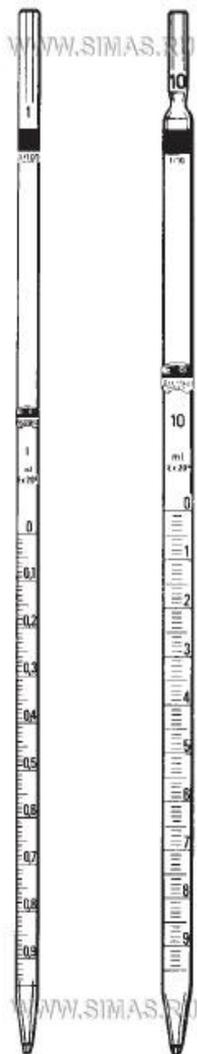
Одновалентные ионы меди реагируют с реактивом Фолина (фосфомолибденовая кислота с фенолом), образуя нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь, с максимумом адсорбции при 750 нм



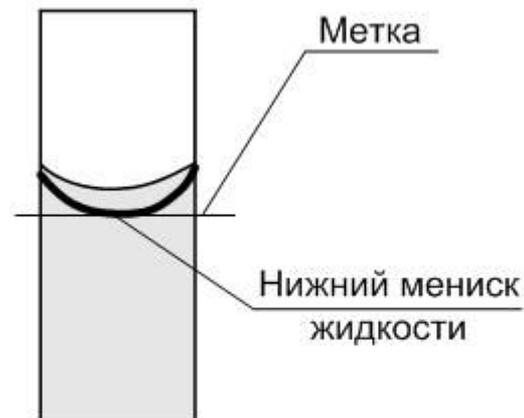
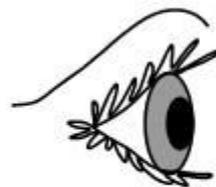
Чувствительность метода:
10-100 мкг белка

Работа в лаборатории

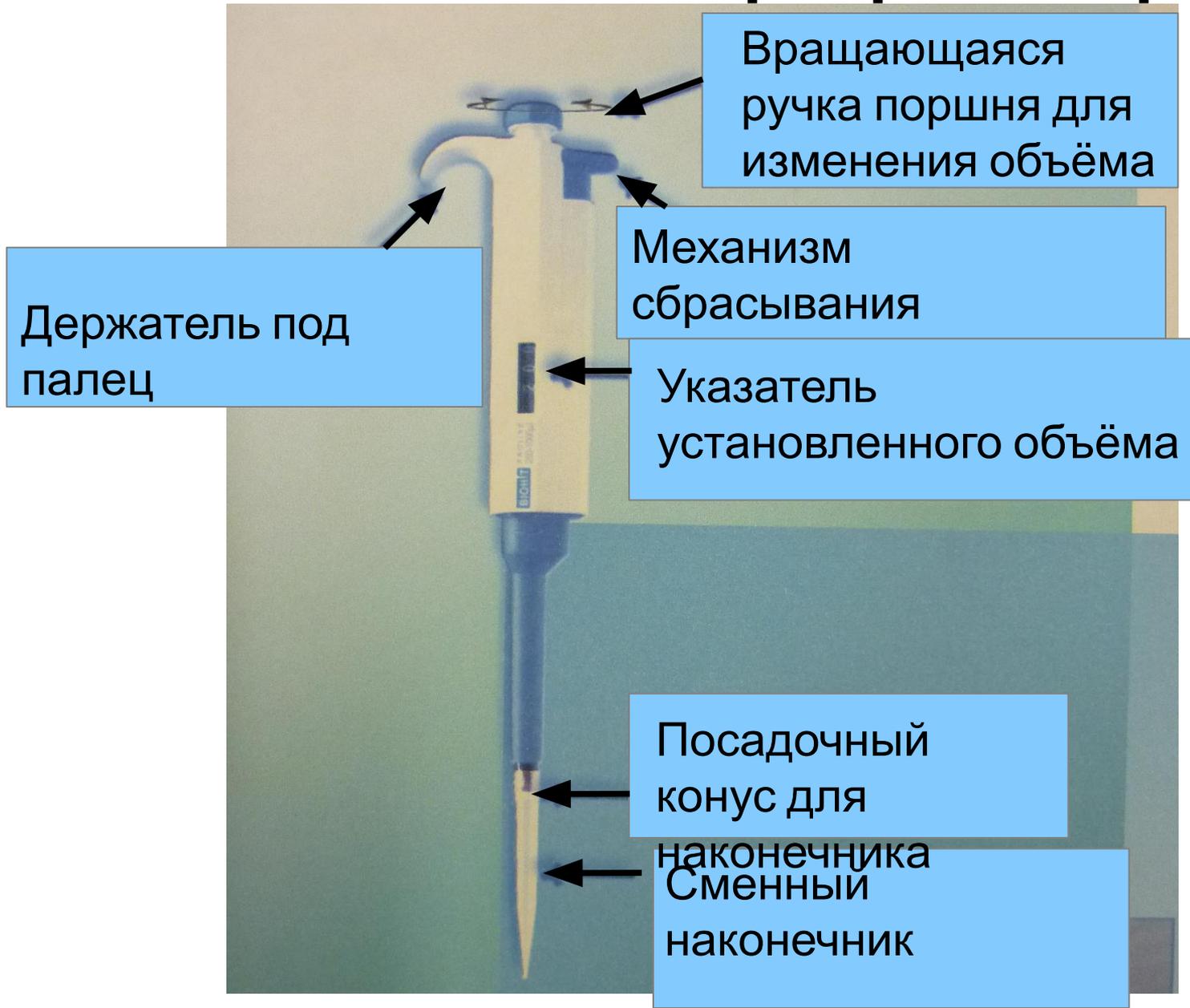
Стеклянные градуированные пипетки



а



Механический дозатор: правила работы



Механический дозатор: правила работы

1. Держите дозатор вертикально в течении всей работы
2. Установите наконечник на посадочный конус
3. Нажмите ручку поршня до первого упора (рис. А)
4. Погрузите наконечник в дозируемую жидкость
5. Не менее чем на 5 мм
6. Для набора жидкости медленно отпустите ручку поршня до верхнего положения (рис. В)
7. Расположите дозатор над пробиркой
8. Произведите плавно слив дозируемой жидкости, нажав ручку поршня до второго упора (рис. С)

