

Лекция-6
Биомакромолекулы
Белки -3 часть

Термодинамические потенциалы

- **Энтальпия (теплосодержание)** — термодинамический потенциал, характеризующий состояние системы в термодинамическом равновесии при выборе в качестве независимых переменных давления, энтропии и числа частиц. Является функцией состояния.
- **Энтальпия** — это энергия, которая доступна для преобразования в теплоту при определённом постоянном давлении.
- Изменение энтальпии не зависит от пути процесса, определяясь только начальным и конечным состоянием системы.

- **Энтропия** - функция состояния термодинамической системы, определяющая меру необратимого рассеивания энергии. В статистической физике энтропия характеризует вероятность осуществления какого-либо макроскопического состояния.
- **Энтропия** - мера неупорядоченности или хаотичности системы: чем меньше элементы системы подчинены какому-либо порядку, тем выше энтропия.

Термодинамические потенциалы

- **Свободная энергия Гиббса** — это величина, изменение которой в ходе химической реакции равно изменению внутренней энергии системы.
- **Энергия Гиббса** показывает, какая часть от полной внутренней энергии системы может быть использована для химических превращений или получена в их результате в заданных условиях и позволяет установить принципиальную возможность протекания химической реакции в заданных условиях.
- Энергию Гиббса можно понимать как полную потенциальную химическую энергию системы (кристалла, жидкости и т. д.)
- Самопроизвольное протекание изобарно-изотермического процесса определяется двумя факторами: энтальпийным, связанным с уменьшением энтальпии системы (ΔH), и энтропийным $T\Delta S$, обусловленным увеличением беспорядка в системе вследствие роста её энтропии. Разность этих термодинамических факторов является функцией состояния системы, называемой изобарно-изотермическим потенциалом или свободной энергией Гиббса (G , кДж)/

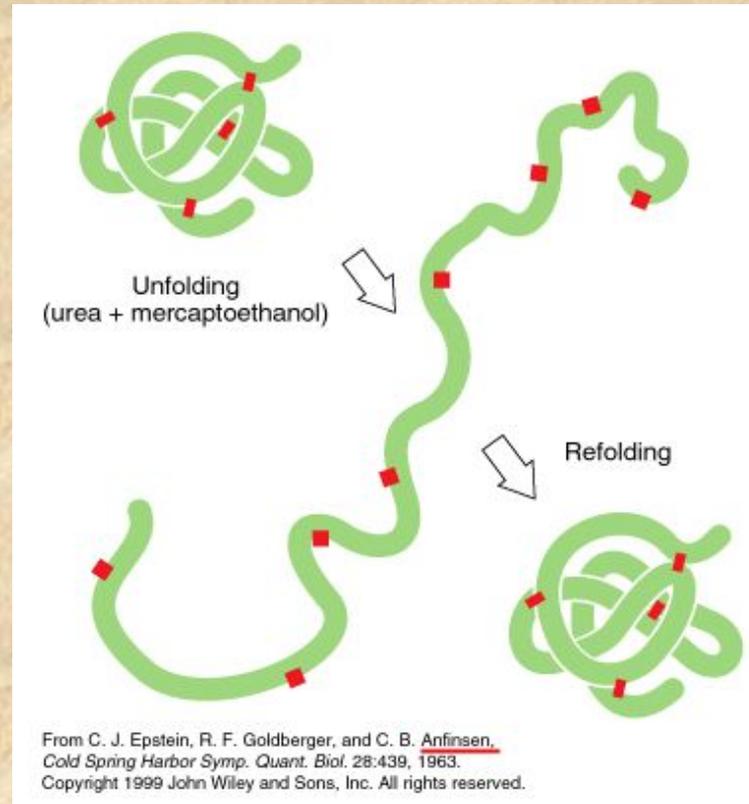
Денатурация белка

- Разрушение четвертичной, третичной и вторичной структур белка

Физическое воздействие: температура, удар, облучение

Химическое воздействие: изменение pH, восстанавливающие и хаотропные агенты (вещества, разрушающие трехмерную структуру клеточных макромолекул (гуанидин-тиоцианат))

Хаотропные агенты (способствующие хаосу) Они повышают энтропию раствора. Для хаотропных соединений характерна очень высокая растворимость при положительной энталпий процесс (тепло поглощается) $\Delta G = \Delta H - \Delta ST$, значит энтропия этого процесса должна быть существенно выше 0, иначе растворимость будет очень мала. О механизмах повышения энтропии раствора можно считать, что хаотропы разрушают те крошечные квази кристаллы воды, которые образуются в обычных водных растворах.



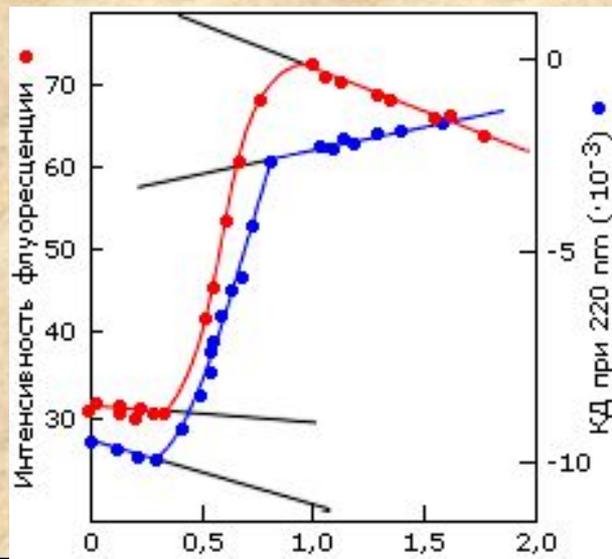
Обратимая и необратимая денатурация

белков *in vitro*

— объект интенсивных исследований, интерес к которым поддерживается их связью с проблемой самоорганизации

белка

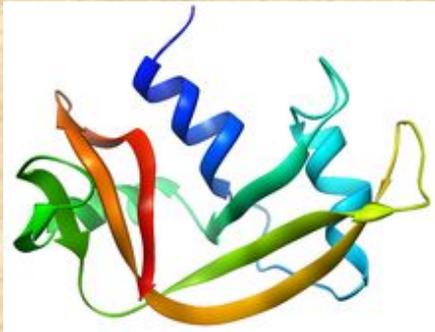
Твердо установлено, что денатурация малых белков является кооперативным переходом с одновременным и резким, "S-образным" изменением многих (хотя порой и не всех) характеристик молекулы. S-образность экспериментальных кривых показывает, что соответствующие характеристики молекулы меняются от тех, что характерны для нативного белка, до тех, что характерны для белка денатурированного; а узость этих S-образных кривых свидетельствует о кооперативности перехода, т.е. о том, что он охватывает сразу много аминокислотных остатков.



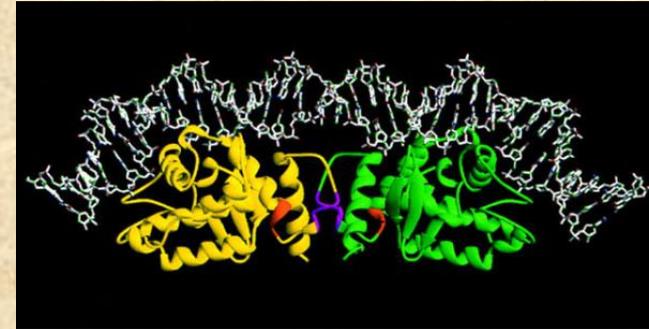
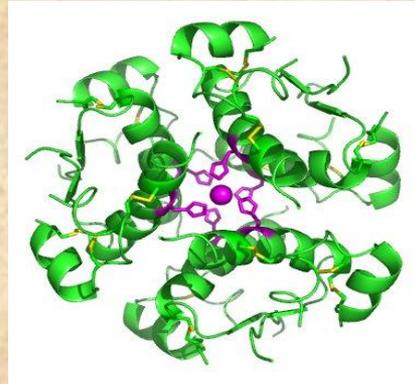
- **Дальтон (Да)** – единица массы, практически равная массе атома водорода (т.е. 1,0000 по шкале атомных масс). Терминами «дальтон» и «молекулярная масса» пользуются как взаимозаменяемыми: например, белок в 20000 дальтон имеет молекулярную массу 20000. Наименование дано в честь Джона Дальтона, разработавшего атомарную теорию строения материи. Килодальтон (кДа) – единица массы, равная 1000 дальтон. Масса большинства белков лежит в пределах от 10 до 100 кДа.
- **Дальтón**, он же **атомная единица массы** (русское обозначение: а.е.м.; международное: u), он же **углеродная единица** — внесистемная единица массы, применяемая для масс молекул, атомов, атомных ядер и элементарных частиц. Атомная единица массы определяется как $\frac{1}{12}$ массы свободного покоящегося атома углерода ^{12}C , находящегося в основном состоянии.

Физические свойства белков

- **Размер** – в среднем 300-500 а/к.
 - Инсулин мол. масса 5733Да , 51А/к



Рибонуклеаза А (мол. вес 13683) 124 аминокислоты



Тайтин (коннектин) 38138 а/к.
 $C_{132983}H_{211861}N_{36149}O_{40883}S_{693}$
приблизительно
2 993 442.763 а. е. м.

Молекулярная масса белков колеблется в очень широких пределах – от 10 000 до десятков миллионов.

Например, гормон инсулин имеет молекулярную массу 5733, фермент рибонуклеаза – 13700, альбумин человека — 68500, белок крови гемоглобин – 64500, фибриноген крови – 400.000, белки вирусов – 50.000.000.

Белки не имеют **температуры плавления и кипения**, так как большинство из них при нагревании сворачиваются. При высокой температуре все белки сгорают.

Белки — кристаллические вещества белого цвета, в растворе – бесцветные вещества, если они не несут какой-нибудь хромофорной (окрашенной) группы, как, например, гемоглобин. Кристаллические твердые белки – это запасные соединения.

РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКОВ

Белки делят на **глобулярные** (растворимые в воде) и **фибрилярные** (нерастворимые в воде).

Белковые вещества как высокомолекулярные соединения в водной среде дают коллоидные растворы. Каждая коллоидная частица вступает во взаимодействие с водой, в результате чего вокруг неё образуется водная или сольватная оболочка. В водной среде белковые соединения обладают электрическим зарядом благодаря наличию в аминокислотах полярных групп.

Белки, обладающие фибриллярной четвертичной структурой в воде не растворяются.

ОСАЖДАЕМОСТЬ БЕЛКОВ В растворах белки крайне не устойчивы и легко выпадают в осадок от прибавления различных солей и водоотнимающих средств. Белки можно осадить спиртом, ацетоном, растворами сернокислого аммония, крепкой соляной кислотой, трихлоруксусной и пикриновыми кислотами, танином и многими другими реактивами.

Растворимость в воде изменяется также в зависимости от pH и от концентрации солей в растворе, так что можно подобрать условия, при которых один какой-нибудь белок будет избирательно осаждаться в присутствии других белков.

Гидратация

Процесс гидратации означает связывание белками воды, при этом они проявляют гидрофильные свойства: набухают, их масса и объём увеличиваются. Набухание белка сопровождается его частичным растворением. Гидрофильность отдельных белков зависит от их строения. Имеющиеся в составе и расположенные на поверхности белковой макромолекулы гидрофильные амидные (CO-NH-, пептидная связь), аминные (NH₂) и карбоксильные (COOH) группы притягивают к себе молекулы воды, строго ориентируя их на поверхности молекулы. Окружающая белковые глобулы гидратная (водная) оболочка препятствует агрегации и осаждению, а следовательно способствует устойчивости раствора белка.

При ограниченном набухании концентрированные белковые растворы образуют сложные системы, называемые *студнями*. Студни не текучи, упруги, обладают пластичностью, определенной механической прочностью, способны сохранять свою форму. Глобулярные белки могут полностью гидратироваться, растворяясь в воде (например, белки молока), образуя растворы с невысокой концентрацией.

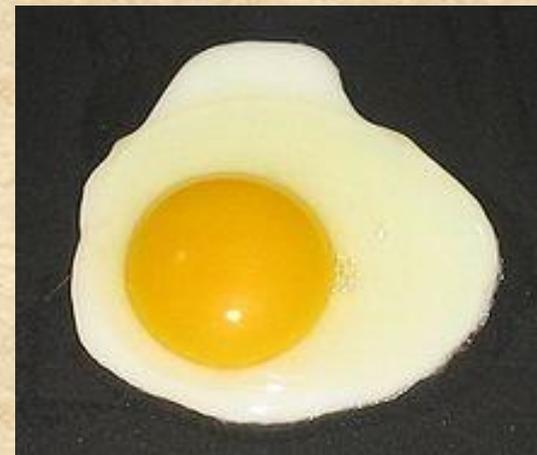
Гидрофильность белков зерна и муки играет большую роль при хранении и переработке зерна, в хлебопечении. Тесто, которое получают в хлебопекарном производстве, представляет собой набухший в воде белок, концентрированный студень, содержащий зёрна крахмала.

Денатурация белков

Денатурация белка – это внутримолекулярная перегруппировка его молекулы, нарушение нативной конформации, не сопровождающиеся расщеплением пептидной связи. Аминокислотная последовательность белка не изменяется. В результате денатурации происходит нарушение вторичной, третичной и четвертичной структур белка, образованных нековалентными связями, и биологическая активность белка утрачивается полностью или частично, обратимо или необратимо в зависимости от денатурирующих агентов, интенсивности и продолжительности их действия. Первичная структура, а следовательно и химический состав белка не меняются. Изменяются физические свойства: снижается растворимость, способность к гидратации, теряется биологическая активность. Меняется форма белковой макромолекулы, происходит агрегирование. В то же время увеличивается активность некоторых химических групп, облегчается воздействие на белки протеолитических ферментов, а следовательно белки легче гидролизуются.

В пищевой технологии особое практическое значение имеет тепловая денатурация белков, степень которой зависит от температуры, продолжительности нагревания и влажности.

Денатурация белков может вызываться и механическим воздействием (**давлением, растиранием, встряхиванием, ультразвуком**). Наконец, к денатурации белков приводит действие химических реагентов (**кислот, щелочей, спирта, ацетона**). Все эти приёмы широко используются в пищевой промышленности и в биотехнологии.

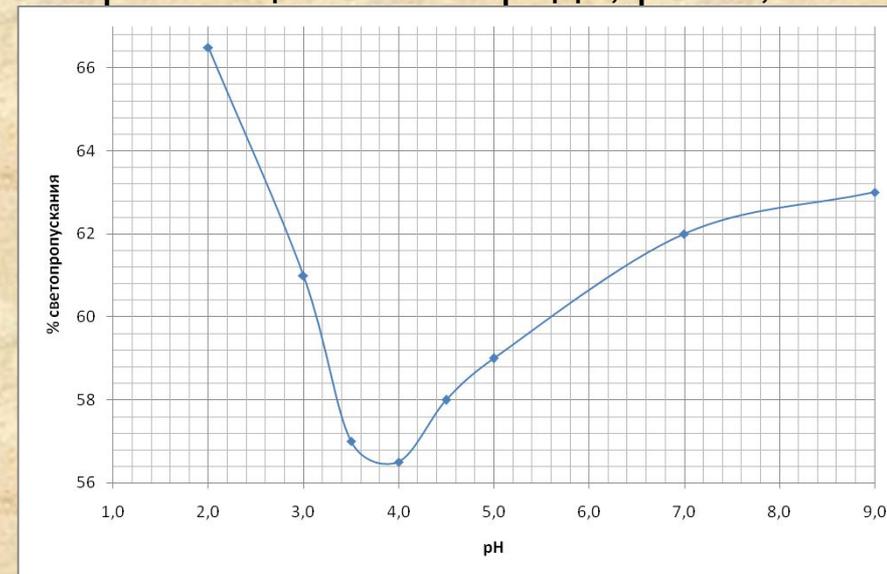


Необратимая денатурация белка куриного яйца под воздействием высокой температуры

Изоэлектрическая точка белковой молекулы

Белки имеют **электрический заряд**, изменяющийся в зависимости от структуры белка и реакции среды.

- **Изоэлектрической точкой** называют такую концентрацию водородных ионов, т.е. такое значение pI , при котором имеется равновесная концентрация положительных и отрицательных зарядов у белковой молекулы.
 - При изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна и не передвигается в электрическом поле.
 - В таком состоянии молекулы белка легко могут выпасть в осадок, чем и пользуются при разделении белковых веществ при их совместном присутствии.
 - Большинство белков имеют изоэлектрическую точку при pI от 4 до 8. Изоэлектрическая точка фермента желудочного сока пепсина находится в резко кислой среде, $pI = 1,0$, а цитохрома N - в резко щелочной среде, $pI = 10,65$.
- Белковые вещества в водной среде проявляют свойства амфотерности, т.е. они ведут себя и как кислоты, имея карбоксильные группы, и как основания, благодаря наличию аминных групп. Но если раствор белка подкислять, то его кислотная диссоциация будет подавляться, и белок будет заряжаться положительно - образуется катион белка. Если добавлять щёлочь, то щёлочная диссоциация белка будет подавляться, белок будет заряжаться отрицательно, появится анион белка.



Изоэлектрическая точка желатины

Изоэлектрическая точка белков

Таблица 2

Белки	Изоэлектрическая точка (pH)	Белки	Изоэлектрическая точка (pH)
Пепсин	~1,0	Инсулин	5,3
Муцин	2,7	Миозин	5,5
Миоальбумин	3,3	γ-Глобулин сывороточный (быка)	5,8
Пепсиноген	3,7	Миоген	6,5
Альбумин сывороточный	4,6	Оксигемоглобин	6,8
Альбумин яичный	4,6	Миоглобин	7,0
Желатин	4,7	Гистоны	8,5
Казеин	4,7	Протамины	10—12
α Глобулин сывороточный (быка)	5,0		
Глобулин X	5,2		

•**Оптические свойства.** Растворы белка преломляют световой поток, и чем больше концентрация белка, тем сильнее преломление. Пользуясь этим свойством, можно определить содержание белка в растворе. В виде сухих пленок белки поглощают инфракрасные лучи. Они поглощаются пептидными группами. Максимум поглощения белков, в УФ-области спектра, обусловленный наличием ароматических аминокислот, находится вблизи 280 нм.

После очистки многие белки способны кристаллизоваться.

Белки горят с образованием азота, углекислого газа и воды, а также некоторых других веществ. Горение сопровождается характерным запахом жжёных перьев.

Химические свойства

- **Денатурация.** Свертывание белка под воздействием высоких температур, сильных кислот или щелочей. При денатурации сохраняется только первичная структура, а все биологические свойства белков теряются.
- **Гидролиз.** В результате его образуются простые белки и аминокислоты, потому что происходит разрушение первичной структуры. Он является основой процесса пищеварения.
Качественные реакции на определение белка. Их всего две, а третья нужна для того, чтобы обнаружить серу в данных соединениях.
Биуретовая реакция. На белки воздействуют осадком гидроксида меди. В итоге происходит окрашивание в фиолетовый цвет.
Ксантопротеиновая реакция. Воздействие осуществляется при помощи концентрированной азотной кислоты. В результате этой реакции получается белый осадок, который при нагревании становится желтым. А если добавить водный аммиачный раствор, то появляется оранжевый цвет.
- **Определение серы в белках.** Когда происходит горение белков, то начинает ощущаться запах "жженого рога". Это явление объясняется тем, что в них содержится сера

Химические свойства

1) **Амфотерность** связана с наличием в молекуле белка катионообразующих групп – аминогрупп и анионообразующих – карбоксильных групп. Знак заряда молекулы зависит от количества свободных групп. Если преобладают карбоксильные группы то заряд молекулы отрицательный (проявляются свойства слабой кислоты), если аминогруппы – то положительный (основные свойства).

Химические свойства

2) Денатурация. Утрата белком природной (нативной) конформации, сопровождающаяся обычно потерей его биологической функции, называется денатурацией. С точки зрения структуры белка – это разрушение вторичной и третичной структур белка, обусловленное воздействием кислот, щелочей, нагревания, радиации и т.д.

При действии органических растворителей, продуктов жизнедеятельности некоторых бактерий (молочнокислое брожение) или при повышении температуры происходит разрушение вторичных и третичных структур без повреждения его первичной структуры, в результате белок теряет растворимость и утрачивает биологическую активность.

Химические свойства

Первичная структура белка при денатурации сохраняется.

Денатурация может быть **обратимой** (так называемая, ренатурация) и **необратимой**. Пример необратимой денатурации при тепловом воздействии – свертывание яичного альбумина при варке яиц.

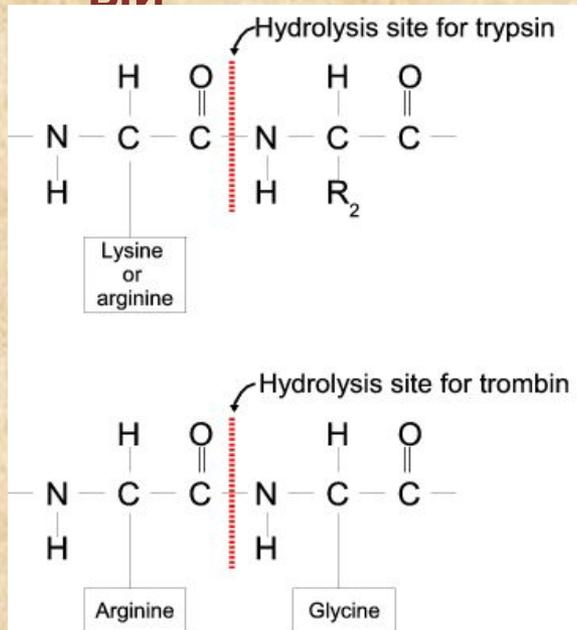


Химические свойства белков.

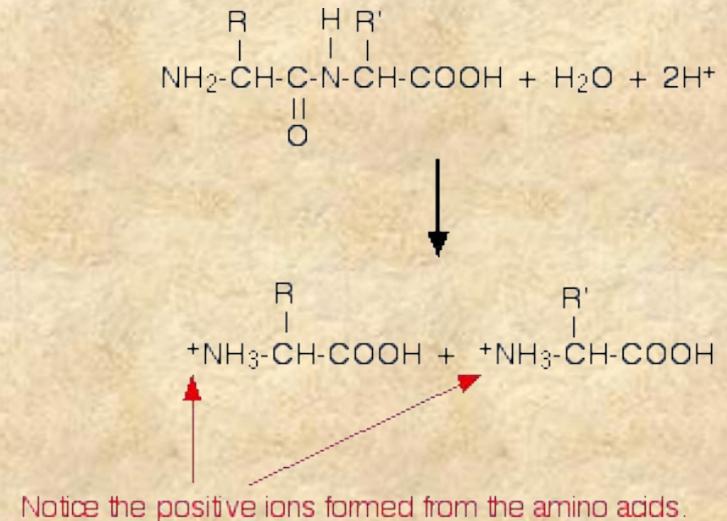
Гидролиз белка

3) **Гидролиз белков** – разрушение первичной структуры белка под действием кислот, щелочей или ферментов, приводящее к образованию α-аминокислот, из которых он был составлен.

ферментативный



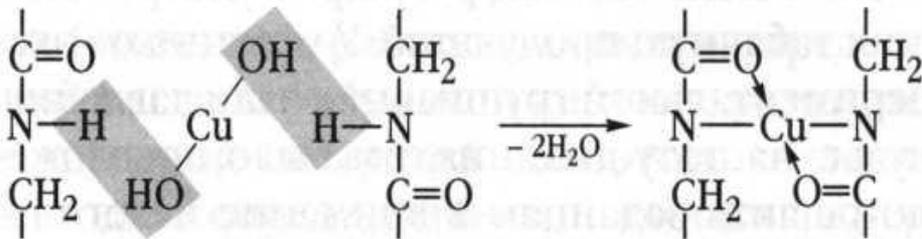
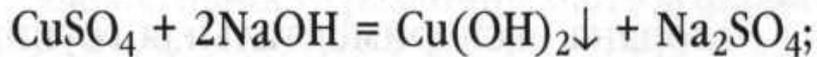
химический



Качественные реакции на белки:

- Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или химических группировок. К важнейшим из них относятся: биуретовая реакция (пептидные связи), ксантопротеиновая реакция (ароматические ядра остатков тирозина, триптофана, фенилаланина), Адамкевича реакция (индольное кольцо триптофана), Миллона реакция (фенольный радикал тирозина), Паули реакция (имидазольное кольцо гистидина), Сакагучи реакция (гуанидиновая группа аргинина) и нингидриновая реакция (аминогруппа).

а) *Биуретовая реакция* – фиолетовое окрашивание при действии солей меди (II) в щелочном растворе. Определяет наличие пептидной связи в растворе исследуемого соединения.



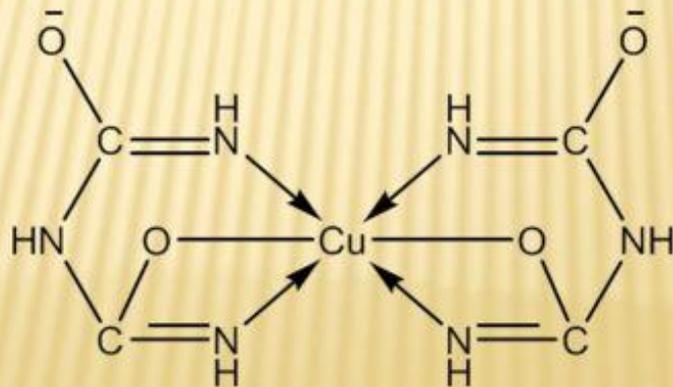
ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКИ

1. Биуретовая реакция

Определяет наличие пептидной связи в растворе исследуемого соединения

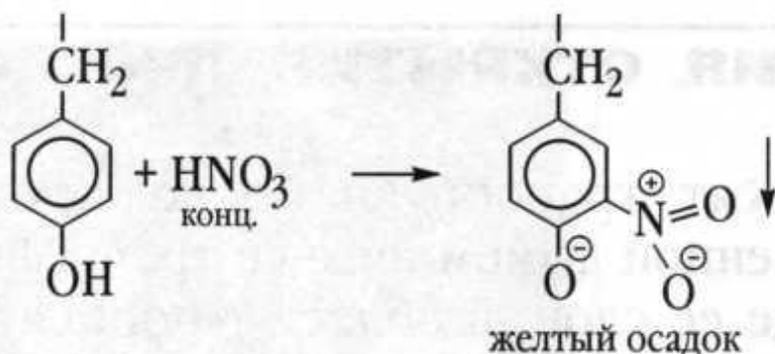
К 1 мл раствора белка добавить 1 мл раствора едкого натра, затем по каплям добавить раствор сернокислой меди (медного купороса)

Аналитический эффект: раствор приобретает фиолетовый цвет.

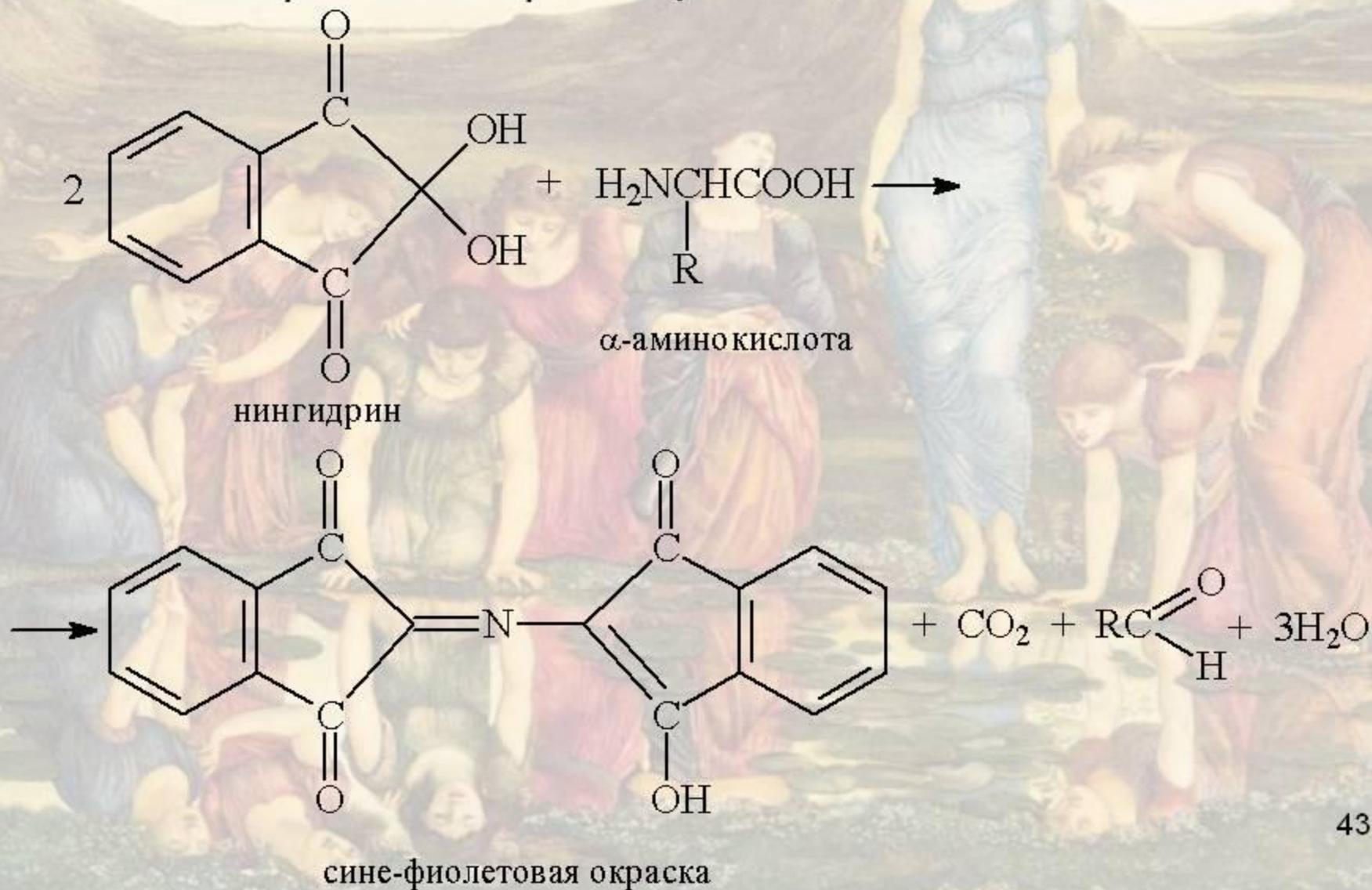


б) *Ксантопротеиновая реакция* –

появление желтого окрашивания при действии концентрированной азотной кислоты на белки, содержащие остатки ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина).

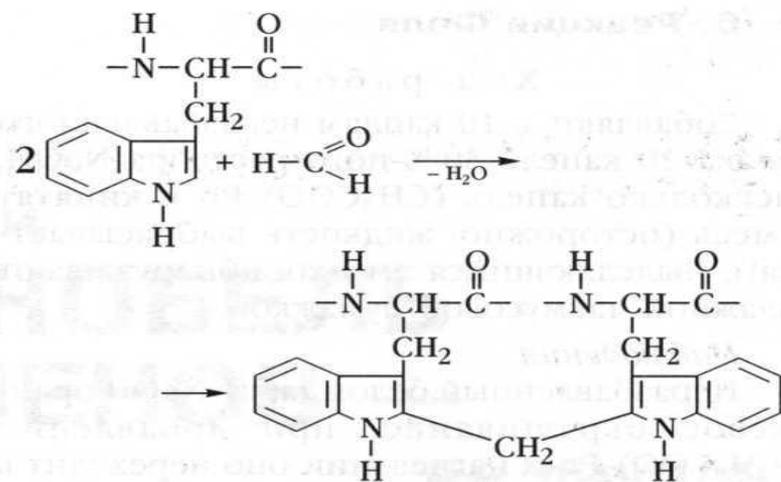
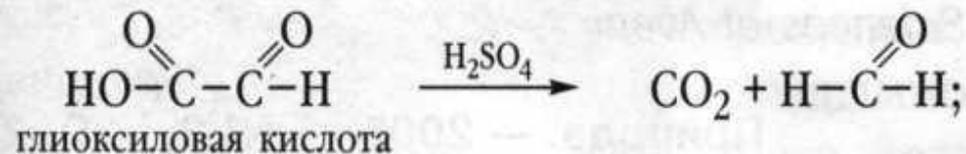


«Нингидриновая реакция»



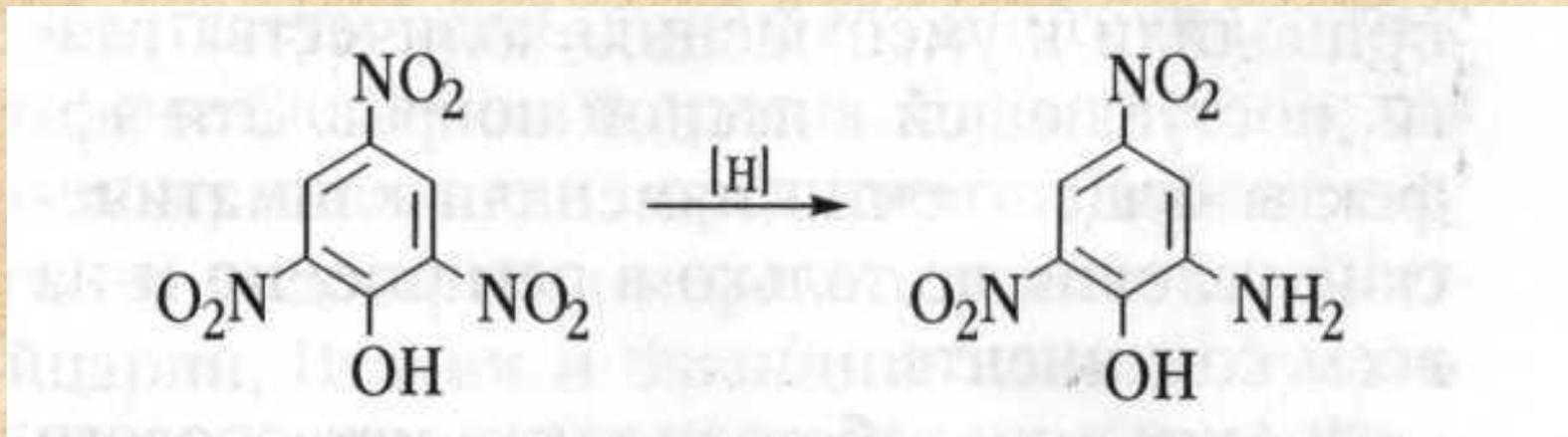
Реакция Адамкевича

- реакция Адамкевича — качественная на триптофан, так как последний в кислой среде взаимодействует с
- глиоксиловой кислотой, присутствующей в CH_3COOH в виде примеси.
- При добавлении в пробирку уксусной кислоты образуется осадок, который при нагревании растворяется.
- При добавлении в пробирку концентрированной серной кислоты на границе двух жидкостей появляется красно-фиолетовая окраска.
- Уравнения:



Реакция с пикриновой кислотой

После добавления пикриновой кислоты раствор окрашивается в желтый цвет, а после нагревания окраска изменяется на красную.



Реакция с пикриновой кислотой позволяет обнаружить соединения, обладающие восстановительной способностью (основана на восстановлении пикриновой кислоты в пикраминовую за счет дикетопиперазиновых группировок).

Классификация белков по составу

- **Простые белки** гидролизуются кислотами или щелочами до аминокислот и не дают при гидролизе других органических и неорганических соединений. Они состоят только из остатков α -аминокислот.
- Классификация простых белков основана на растворимости.
- 1 **Альбумины** – белки, которые растворяются в воде. К этим белкам относятся белок куриного яйца, белки зародыша семян злаковых (однодольных) растений, белки семян двудольных растений.
- 2 **Глобулины** – белки, растворимые в солях. Глобулины составляют большую часть белков семян масличных культур.
- 3 **Проламины** – белки, которые растворяются в 60-80%-ном растворе этилового спирта. Название «проламины» они получили вследствие того, что в их состав входит большое количество аминокислоты пролина. Проламины синтезируются только в семенах злаковых растений
- 4. **Протамины:** низкомолекулярные белки, содержащиеся в ядрах сперматозоидов у рыб и птиц. состоящие на 80% из щелочных аминокислот и не содержащие серу
- 5. **Протеиноиды:** белки животного происхождения, выполняют опорные функции в организмах.
- 6 **Глютелины** – белки, которые извлекаются из растительных тканей разбавленными растворами щелочей (0,2%-ный NaOH).
- 7. **Гистоны** – низкомолекулярные белки также основного характера, содержатся в хромосомах клеточных ядер и играют важную роль в образовании структуры хроматина. Гистоны – настоящие белки, в их состав входят почти все белковые аминокислоты.

Сложные белки

- 2. **Сложные белки** кроме аминокислотных остатков белковой части молекулы содержат также небелковую, или простетическую группу. Простетическая группа может быть представлена химическими веществами различной природы. Сложные белки подразделяются по небелковому компоненту. Полноценными называют белки, содержащие все незаменимые аминокислоты. Белки, не содержащие хотя бы одну незаменимую аминокислоту, называют **неполноценными**.

Сложные протеиды

- Сложные протеиды(содержат аминокислоты и другие соединения)
- ГЛИКОПРОТЕИДЫ: содержат углевод
ЛИПОПРОТЕИДЫ: содержат комплексы белков и липидов
- НУКЛЕОПРОТЕИДЫ: комплексы нуклеиновых кислот и белков
- ФОСФОПРОТЕИДЫ: содержат сложные белки с фосфорильной группой $-PO_3^{2-}$
- ХРОМОПРОТЕИДЫ: содержат окрашенные небелковые группы

Классификация по простетическим группам

- гемапротеины (простетическая группа – гем).
Гемоглобин, цитохром.;
- металлопротеины (простетическая группа – металл(Mg, Mn, Fe)). *Ферритин, алкогольдегидрогеназа;*
- липопротеины (простетическая группа – липид). *β -липопротеин крови;*
- гликопротеины (простетическая группа – углеводная часть). *Рецепторы, γ -глобулины;*
- фосфопротеины (простетическая группа – фосфатная группа). *казеин;*
- нуклеопротеины (простетическая группа – нуклеиновый кислотный остаток). *Рибонуклеопротеины;*
- флавопротеины (простетическая группа – флавин).
Сукцинатдегидрогеназа.

Функции белков

- 1) **Структурная (пластическая)** – белками образованы многие клеточные компоненты, а в комплексе с липидами они входят в состав клеточных мембран.
- 2) **Каталитическая** – все биологические катализаторы – ферменты по своей химической природе являются белками.



3) **Транспортная** – белок гемоглобин транспортирует кислород, ряд других белков образуя комплекс с липидами транспортируют их по крови и лимфе (пример: миоглобин, сывороточный альбумин).

4) **Механохимическая** – мышечная работа и иные формы движения в организме осуществляются при непосредственном участии сократительных белков с использованием энергии макроэргических связей (пример: актин, миозин).



5) **Регуляторная** – ряд гормонов и других биологически активных веществ имеют белковую природу (пр.: инсулин, АКТГ).

6) **Защитная** – антитела (иммуноглобулины) являются белками, кроме того основу кожи составляет белок коллаген, а волос – креатин. Кожа и волосы защищают внутреннюю среду организма от внешних воздействий. В состав слизи и синовиальной жидкости входят мукопротеиды.



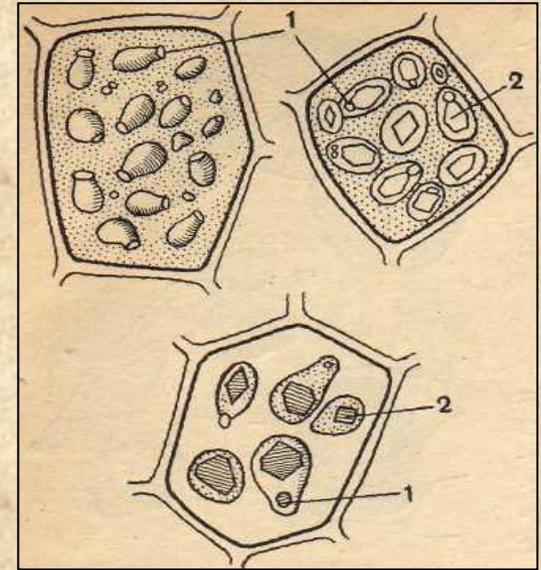
- 7) **Опорная** – сухожилия, поверхности суставов соединения костей образованы в значительной степени белковыми веществами (пр.: коллаген, эластин).
- 8) **Энергетическая** – аминокислоты белков могут поступать на путь гликолиза, который обеспечивает клетку энергией.
- 9) **Рецепторная** – многие белки участвуют в процесса избирательного узнавания(рецепторы).



Белок - запасное вещество.

- Белки – наиболее сложные соединения, откладываются в запас в виде алейроновых зерен. Алейроновые зерна представляют собой высохшие вакуоли. Белковые вещества, находящиеся в клеточном соке в виде растворов, при потере влаги превращаются в твердые зернышки, которые имеют вид небольших комочков (например у злаков) или образуют тельца своеобразного строения.

- У растений, содержащихся в семенах большое количество масла, например у клещевидных, алейроновых зернен, кроме кристаллов белка, содержат круглые включения – глобоиды, состоящие из органических и минеральных веществ.
- Алейроновые зерна встречаются главным образом в семенах.



- 1 – глобоиды
- 2 – кристаллы белка

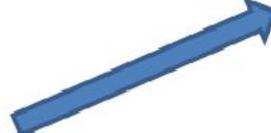
Методы исследования состава клетки

• Неорганические вещества



- Хроматография
- Спектрометрия
- Масс-спектрометрия
- Рентгеноструктурный анализ

• Малые органические молекулы



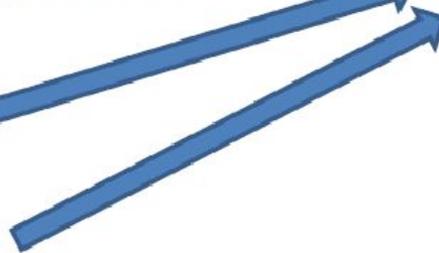
- Хроматография
- Спектрометрия

• Липиды

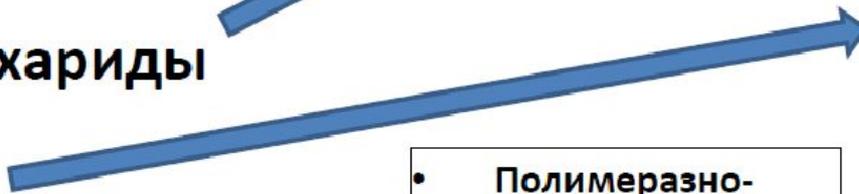


- Хроматография
- Масс-спектрометрия
- Иммунологические
- Секвенирование
- Рентгеноструктурный анализ
- Электрофорез
- Ультрацентрифугирование

• Полисахариды



• Белки



- Полимеразно-цепная реакция
- Секвенирование
- Гибридизация
- Электрофорез
- Ультрацентрифугирование

• Нуклеиновые кислоты



Методы определения молекулярной массы

белков.

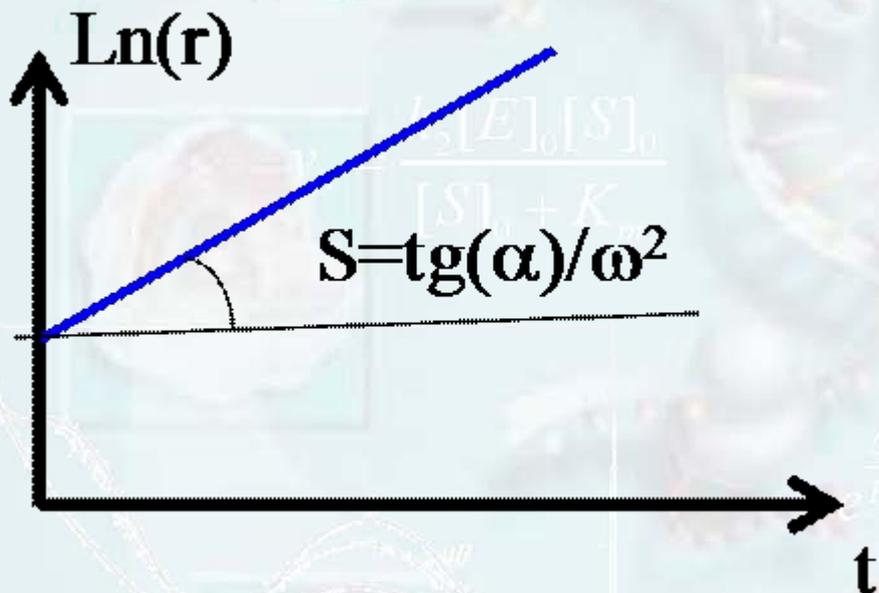
- *вискозиметрический* (неточный метод; определяется вязкость белкового раствора, а по ней рассчитывается молекулярная масса);
- *оптический* (не является универсальным; оценивается светорассеивающая способность белкового раствора);
- *химический* (количественно определяют химический элемент или аминокислоту, содержащуюся в белке в наименьшем количестве; затем производят расчет молекулярной массы, исходя из того, что в молекуле белка не может быть меньше одного атома данного элемента или одного аминокислотного остатка; метод не точен и даёт кратные ошибки, поскольку не учитывается точное число атомов и аминокислотных остатков);
- *гельфилтрационный* (состоит в определении объема элюента, необходимого для выноса белкам из колонки с сефадексом и соотнесении его со свободным объемом колонки; далее результат соотносят с калибровочными графиками для известных белков и определяют молекулярную массу белков);

Гравиметрический метод

- Самым точным способом определения, предложенным еще в 20-е годы прошлого века Т. Сведбергом, является *гравиметрический*. Он основан на ультрацентрифугировании белкового раствора. Белковый раствор окрашивают определенным способом и помещают в небольшую прозрачную для световых лучей ячейку, которую вставляют в специальное гнездо ротора ультрацентрифуги. Ротор начинает вращаться с огромной скоростью, обеспечивая центробежное ускорение в 300 тыс. – 1 млн. 200 тыс. раз превышающее ускорение силы тяжести. Под действием такого ускорения частицы белка достаточно быстро оседают на дно. Фотоприставка к ультрацентрифуге позволяет делать снимки содержимого ячеек через определенные интервалы времени и фиксировать таким образом скорость оседания (седиментации) молекул белка.
- Определение массы белка с помощью ультрацентрифуги ведут двумя способами:
 - – по скорости седиментации молекул;
 - – по седиментационному равновесию.

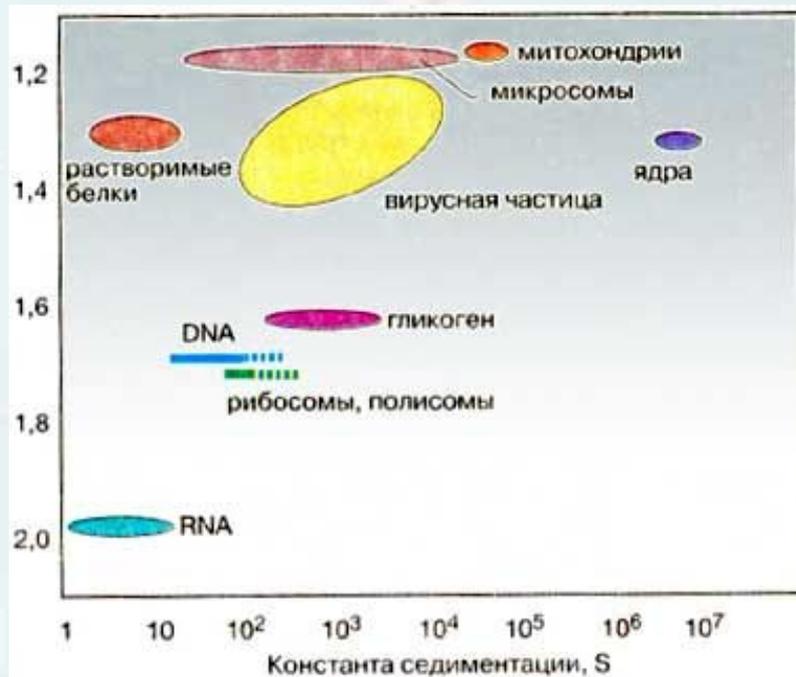
Седиментация. Коэффициент седиментации

Определение константы седиментации из эксперимента:



Зная парциальный объем можно найти молекулярную массу

$$m = \frac{Sf}{(1 - V\rho_0)}$$



$$\text{pH} = -\lg[H^+]$$

1 единица Сведберга равна 10^{-13} с

Центрифугирование.

- Скорость осаждения, или седиментации, зависит от центробежного ускорения (G), прямо пропорционального угловой скорости ротора (ω , в рад/с) и расстоянию между частицей и осью вращения (R , в см): $G = \omega^2 * R$.
- Угловая скорость ротора в оборотах в минуту N (об./мин)
 $\omega = 2\pi N / 60 = \pi N / 30$
- Центробежное ускорение: $G = 4\pi^2(\text{об} * \text{мин}^{-1})^2 r / 3600$
- $G = \pi^2 * N^2 * R / 900$ (об./мин)
- Центробежное ускорение обычно выражают в единицах g , рассчитанных из среднего радиуса вращения ($r_{\text{сред}}$) столбика жидкости в центрифужной пробирке (т.е. расстояния от оси вращения до середины столбика жидкости).
- *Центробежное ускорение обычно выражается в единицах g и называется относительным центробежным, ускорением*
- $ОЦУ = G / 980 = 1,11 * 10^{-5} * N^2 * R$ Что такое g ? Чему равно?

По скорости седиментации

- Константа седиментации это скорость, отнесенная к единице ускорения, имеет размерность времени (ее выражают в секундах).
- Величина константы седиментации, равная $1 \cdot 10^{-13}$ с, условно принята за единицу и названа сведбергом (S).
- Значения констант седиментации большинства белков лежат в пределах 1–50 S, хотя в ряде случаев эти значения превышают 100 S.
- Молекулярный вес молекул определяют по уравнению Сведберга

$$M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

- M — молекулярный вес молекулы, R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, s — коэффициент седиментации молекулы, D — коэффициент диффузии молекулы, \bar{v} — парциальный удельный объем, который можно рассматривать как объем, занимаемый одним граммом растворенного вещества, ρ — плотность растворителя.

Метод седиментационного равновесия

- Ультрацентрифугирование проводят вплоть до достижения частицами равновесия, устанавливающегося под действием центробежных сил, с одной стороны, и диффузионных — с другой, т. е. до тех пор, пока частицы не перестанут перемещаться. Затем по образовавшемуся градиенту концентрации рассчитывают молекулярный вес вещества согласно формуле

$$M = \frac{2RT \ln (c_2/c_1)}{\omega^2 (1 - \bar{v}\rho) (r_2^2 - r_1^2)}$$

- R — газовая постоянная, T — абсолютная температура, ω — угловая скорость, ρ — плотность растворителя, \bar{v} — парциальный удельный объем, c_1 и c_2 — концентрация растворенного вещества на расстояниях r_1 и r_2 от оси вращения
- Недостатком данного метода является то, что для достижения седиментационного равновесия необходимо длительное время — от нескольких дней до нескольких недель при непрерывной работе центрифуги.

Метод приближения к седиментационному равновесию

- Этот метод был разработан для того, чтобы избавиться от недостатков предыдущего метода, связанных с большими затратами времени, необходимого для установления равновесия.
- С помощью него можно определять молекулярные веса, когда центрифугируемый раствор находится в состоянии приближения к равновесию.
- Вначале макромолекулы распределяются по всему объему аналитической ячейки равномерно; затем по мере центрифугирования молекулы оседают, и плотность раствора в области мениска постепенно уменьшается.
- Изменение плотности тщательно регистрируют, а затем путем сложных расчетов, включающих большое число переменных, определяют молекулярный вес данного соединения по формулам.

Определение концентрации белка в растворе

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

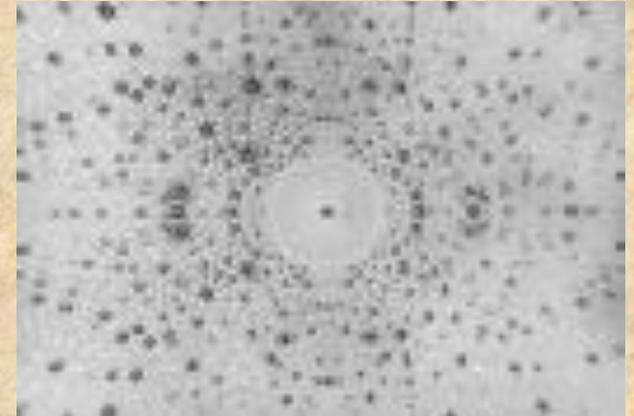
Метод Брэдфорд – основан на связывании с белками красителя кумасси синего, спектр поглощения которого при этом меняется. 595 нм.

Спектрофотометрический метод.

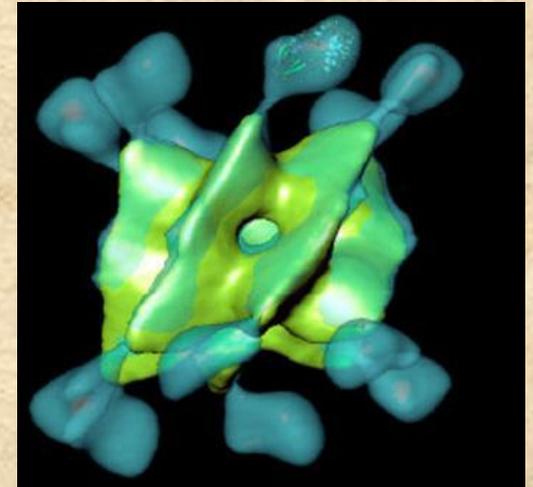
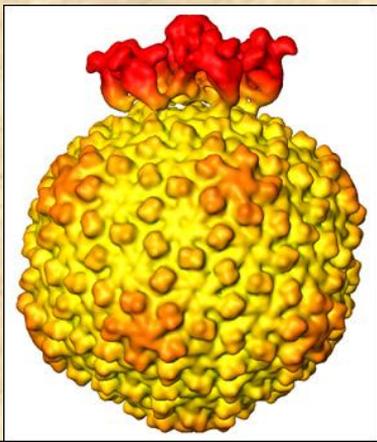
Основан на способности ароматических АК поглощать УФ свет 280нм. Этот метод используется и для определения концентрации нуклеиновых кислот.

Методы анализа белков

- Рентгеноструктурный анализ



Электронная микроскопия



Методы выделения и очистки белков:

-
-
- - гомогенизация — клетки растираются до однородной массы;
- - экстракция белков водными или водно-солевыми растворами;
- - диализ;
- - высаливание;
- - электрофорез;
- - хроматография: адсорбция, расщепление;
- - ультрацентрифугирование.
-

Методы выделения и очистки белков.

1. Фракционирование и концентрирование.
 - Осаждение
 - Ультрафильтрация
2. Разделение и очистка
 - гель-фильтрация
 - Хроматография

Фракционирование и концентрирование белков.

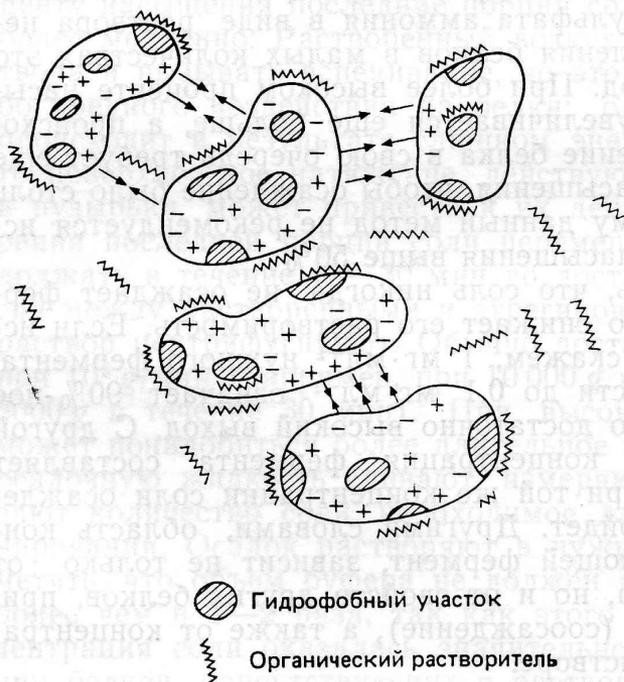
Методы осаждения.

1. Высаливание. Добавление к раствору сульфата аммония до определенной степени насыщения.
2. Осаждение органическими растворителями (ацетоном)
3. Осаждение органическими полимерами (ПЭГ)

Осаждение

Для осаждения необходимо понизить каким-либо способом растворимость белка. Растворимость белка зависит от их способности к гидратации. У глобулярных водорастворимых белков высокий уровень гидратации обеспечивается расположением гидрофильных групп на поверхности. Добавление органических растворителей понижает степень гидратации и приводит к осаждению белка. В качестве таких растворителей используют ацетон. Осаждают белки также с

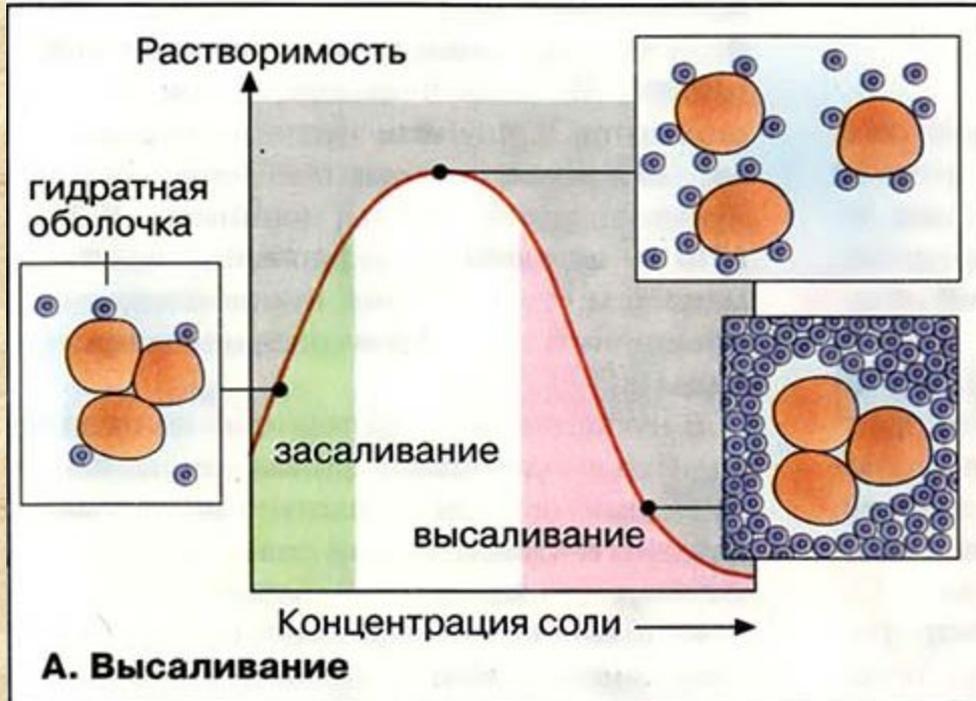
помощью солей, например сульфата аммония. Принцип этого метода основан на том, что при повышении концентрации соли в растворе происходит сжатие ионных атмосфер, образуемых противоположными зарядами белка, что способствует сближению их до критического расстояния, на котором межмолекулярные силы ван-дер-ваальсова притяжения перевешивают кулоновские силы отталкивания противоположных зарядов. Это приводит к слипанию белковых частиц и их выпадению в осадок. Обычно проводят фракционное осаждение белков возрастающими концентрациями сульфата аммония. При описании методов выделения количество сульфата аммония выражают в процентах насыщения и часто употребляют выражения



Осаждение белков органическими растворителями

Методика осаждения состоит в следующем: образец обычно охлаждают до 0°C в ледяной бане со льдом. Концентрация белка может быть 5-30 мг/мл, а концентрация соли не должна быть высокой. Высокая концентрация соли снижает электростатическую агрегацию, и требуются более высокие концентрации растворителя, что увеличивает вероятность денатурации. При низкой концентрации соли может образоваться тонкая взвесь, которую трудно осадить. Оптимальная концентрация соли – 0,05-0,2 М. Растворитель добавляют медленно, чтобы избежать разогрева. Большинство белков осаждается при добавлении 20-50% растворителя (по объему). Следует отметить, что «процентное содержание» не совсем точный термин. Если к 50 мл ацетона добавить 50 мл воды, то общий объем жидкости составит только 95 мл. После уравнивания смеси в течение 10-15 минут осадок отделяют центрифугированием. Затем осадок растворяют в холодном буфере. Обычно объем буфера в 2 раза превышает объем осадка. Небольшие количества органического растворителя (около 10% по объему) не

Высаливан



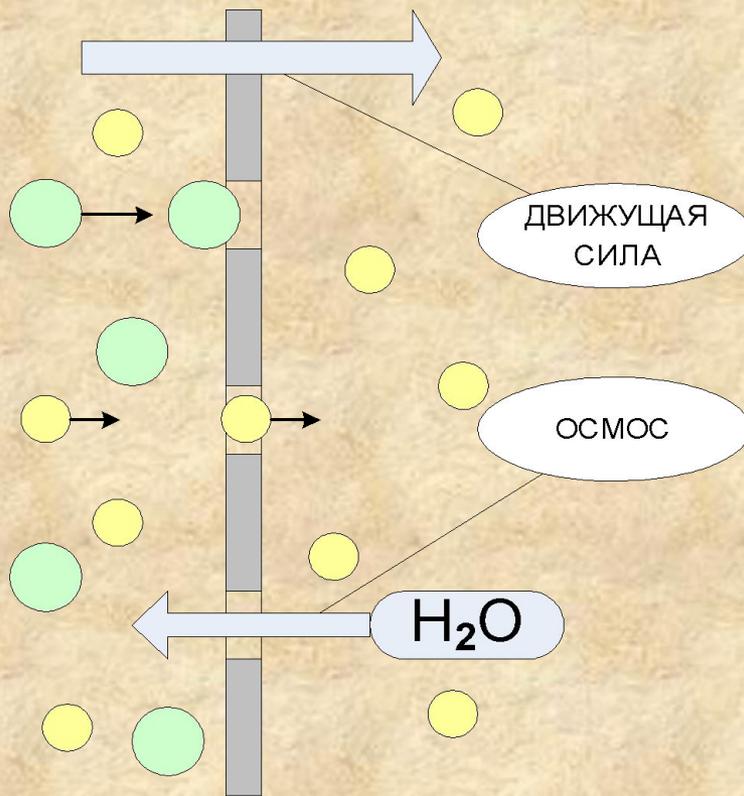
Растворимость белков сильно зависит от концентрации солей (от *ионной силы*). В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются плохо, однако их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы. При этом все большее

количество гидратированных неорганических ионов (светло-синие кружочки) связывается с поверхностью белка и тем самым уменьшается степень его агрегации (**засаливание**). При высокой ионной силе молекулы белков лишаются гидратирующих оболочек, что приводит к агрегации и выпадению белка в осадок (**высаливание**). Используя различие в растворимости, можно с помощью обычных солей, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, разделить (фракционировать) смесь белков.

Изоэлектрическое осаждение

Заряд белков обусловлен в первую очередь остатками аспаратата и глутамата (отрицательный заряд) и остатками лизина и аргинина (положительный заряд). По мере повышения рН различными способами заряд белков проходит от положительных к отрицательным значениям и в изоэлектрической точке оказывается равен нулю. В результате белок лишается своей ионной атмосферы и его частицы слипаются, выпадая в осадок.

Мембранные технологии

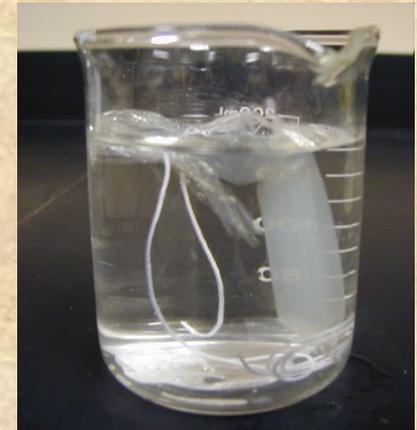
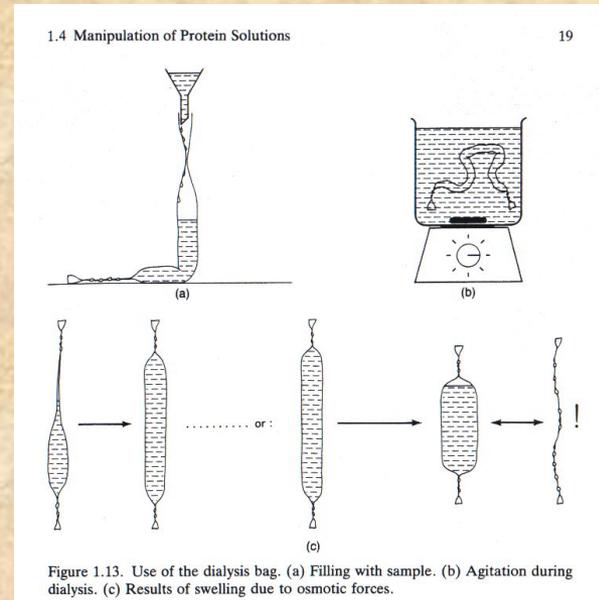
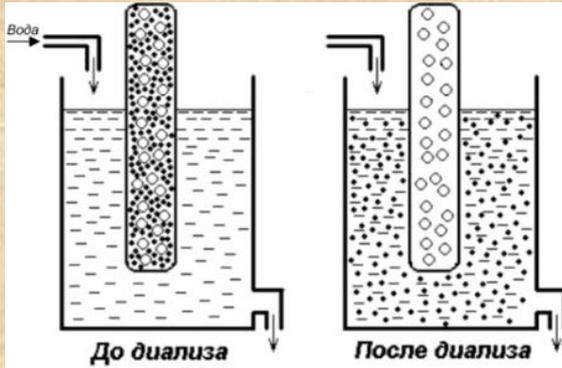


- Мембранные технологии основаны на разделении смесей жидкостей или газов, а также присутствующих в них частиц на составляющие компоненты с использованием частично проницаемых мембран.
- Мембрана позволяет определённым молекулам или ионам проходить через неё благодаря диффузии.
- Скорость прохождения зависит от давления, концентрации и температуры молекулы или растворённых веществ с обеих сторон, а также проницаемости мембраны для каждого раствора.
- Методы мембранных разделений различаются в зависимости от движущей силы, которая обеспечивает протекание процесса.

Мембранные технологии

- Градиент химических потенциалов => ДИАЛИЗ
- Электрическое поле => ЭЛЕКТРОДИАЛИЗ
- Градиент давлений => УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ
- Градиент давлений => ОБРАТНЫЙ ОСМОС

Диализ



Диализ применяют для очистки растворов высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных (например обессоливание) или для замены одних низкомолекулярных веществ на другие (перебуферивание).



- В настоящее время расшифрована первичная структура десятков тысяч различных белков. Первым этапом определения первичной структуры белка является установление аминокислотного состава методами гидролиза. Затем определяют химическую природу концевых аминокислот. Следующий этап - определение последовательности аминокислот в полипептидной цепи, для чего применяют частичный избирательный (ферментативный либо химический) гидролиз.

Секвенирование полипептидов

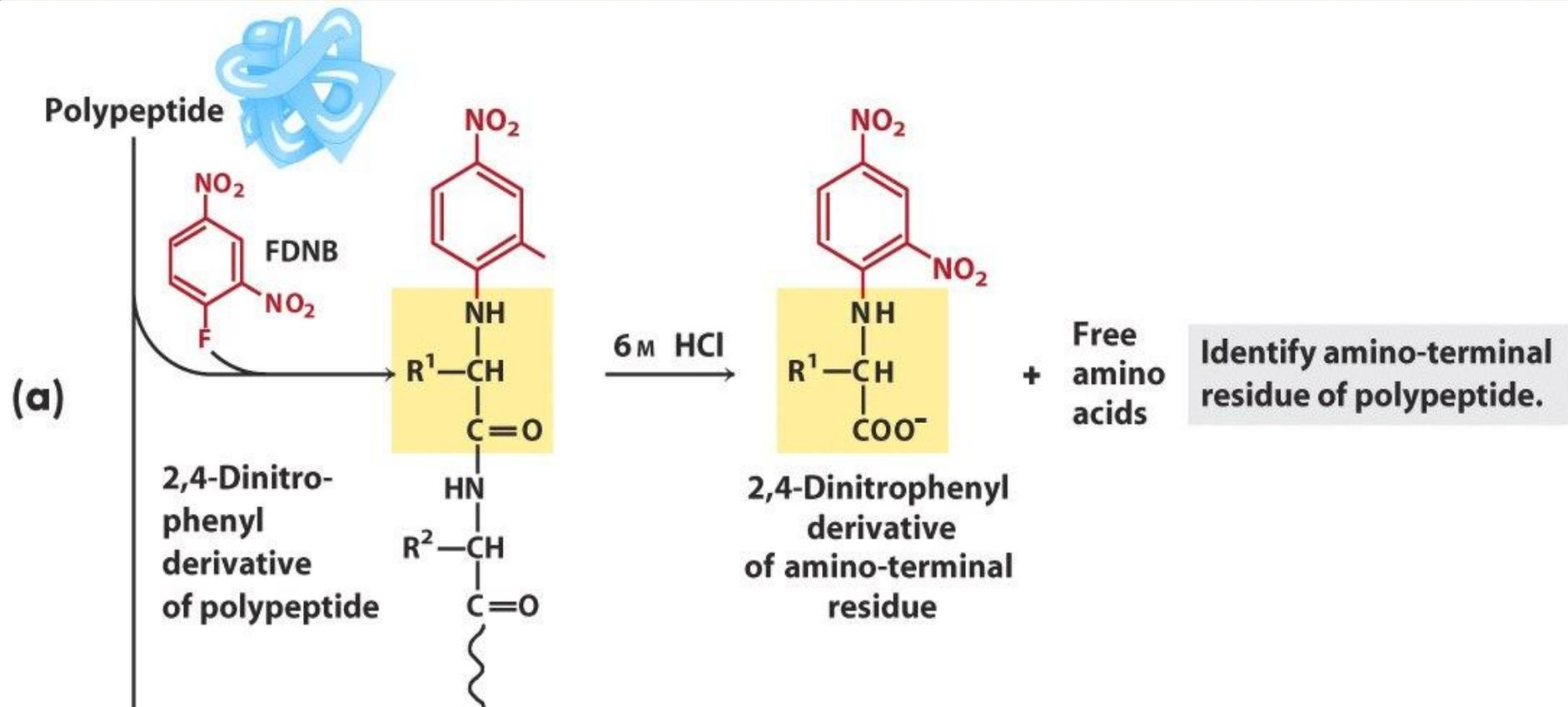
Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде.

- **Основные этапы:**

- 1) Расщепление белка на несколько фрагментов длиной, доступной для секвенирования.
- 2) Секвенирование каждого из полученных фрагментов.
- 3) Сборка полной структуры белка из установленных
- структур
- его фрагментов
- 1) Гидролиз ферментами: трипсин (*Lys-X, Arg-X*);
- *химотрипсин (Phe-X, Tyr-X, Trp-X)*
- Химический гидролиз: бромциан (*Met*)
- 2) Секвенирование по Сэнджеру; по Эдману; масс-спектрометрия
- 3) Метод перекрывающихся фрагментов

- **Методы определения N-концевой аминокислоты**
- **Метод Сэнджера**, основанный на реакции с 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ). Образуется окрашенное в желтый цвет 2,4-динитрофенильное производное N-концевой аминокислоты, которую идентифицируют хроматографически.
- **Фенилтиогидантоиновый метод Эдмана**. Фенилизотиоцианат реагирует со свободной α-аминогруппой N-концевой аминокислоты полипептида. Природу фенилтиогидантоина N-концевой аминокислоты устанавливают хроматографическим методом, а укороченный на одну аминокислоту полипептид анализируют далее. Метод Эдмана осуществляют в специальном приборе - секвенаторе (от англ. sequence – последовательность).
- **Методы определения C-концевой аминокислоты**
- **Ферментативные методы**. Обработка белка карбоксипептидазой приводит к отщеплению C-концевой аминокислоты, которую определяют методом хроматографии.
- **Химический метод Акабори**. Гидразин расщепляет пептидные связи и реагирует со всеми аминокислотами, за исключением C-концевой.

Секвенирование по Сэнджеру (динитрофторбензол)



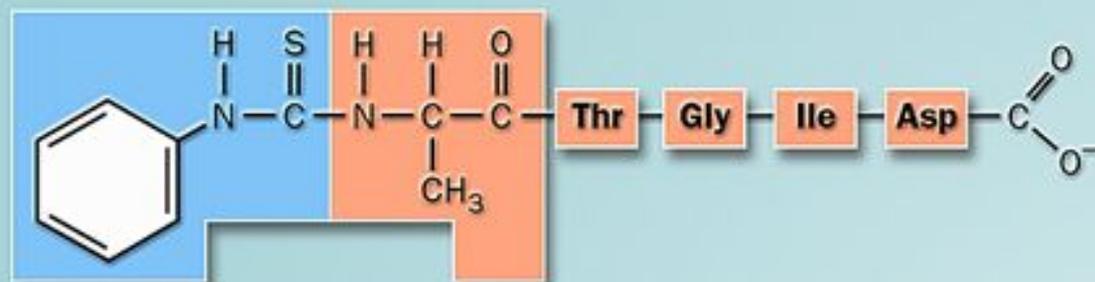
Секвенирование по Эдману

(с использованием фенилизотиоцианата)

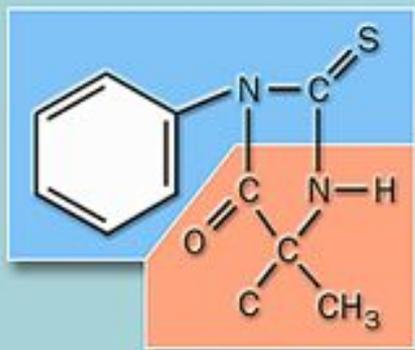
Фенилизотиоцианат
(реактив Эдмана)



+ Слабая щелочь



+ Слабая кислота, нагревание



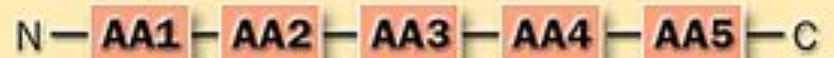
Фенилтиогидантион-ала



Полипептид,
укороченный на 1 а.к.о.

Edman's reagent
(Phenyl isothiocyanate)

Polypeptide chain



Round 1



Label the amino terminus



Release

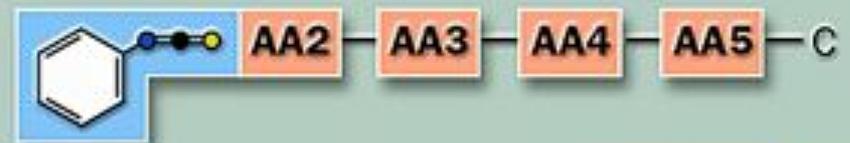


Perform liquid chromatography
to identify amino acid

Round 2



Label N terminus



Release
and identify



Further rounds

- Завершающим этапом установления первичной структуры белка является восстановление порядка, в котором просеквенированные фрагменты располагались в исходном полипептиде. Чаще всего для этой цели используют подход известный как *метод перекрывающихся белков*. Ниже излагается основная идея метода.
- Если установлена структура всех полипептидов, полученных расщеплением исследуемого белка с помощью трипсина (далее такие полипептиды обозначаются буквой Т - от слова “трипсиновые”), то остается определить для каждого из этих пептидов, с какими двумя Т-пептидами он соседствует с N - и С-конца. В структуре просеквенированных Т-пептидов такая информация полностью отсутствует. Однако ее можно частично, а в ряде случаев и полностью восстановить, если располагать аналогичными данными для серии полипептидов, полученных расщеплением того же исследуемого белка по какой-либо другой группе аминокислотных остатков. Для определенности ниже речь будет идти о полипептидах, полученных расщеплением химотрипсином (пептиды группы С, chymotryptic).
- Если два Т-пептида являются соседними в исходной цепи, то существует С-пептид, который либо содержит в своем составе полностью оба или один из рассматриваемых Т-пептидов, либо как минимум содержит С-концевую часть левого и N-концевую часть правого пептида группы Т. этот С-пептид перекрывает два соседних Т-пептида, с чем и связано

Метод блоттинга

- Блоттинг –перенос определённых белков или нуклеиновых кислот из раствора, содержащего множество других молекул, на какой-либо носитель (мембрану из нитроцеллюлозы, PVDF или нейлона) в целях последующего анализа. В одних случаях молекулы предварительно подвергаются гель-электрофорезу, в других — переносятся непосредственно на мембрану, помещают ее в раствор, в котором содержится вещество, способное гибридизоваться с образцом. Места гибридизации видны после специальных методов проявки.
- После блоттинга молекулы визуализируются посредством различных методов:
- Окрашивание (например, окрашивание белков серебром).
- Авторадиографическая визуализация.
- Специфическое маркирование с помощью иммунохимических методов или гибридизации.

Варианты блоттинга

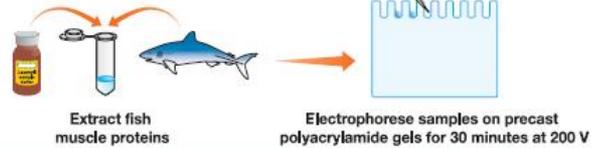
Саузерн-блоттинг : перенос ДНК на фильтр (в дальнейшем возможна гибридизация с меченой ДНК за счет комплементарности □ радиоавтография)

Нозерн-блоттинг: перенос РНК

Вестерн-блоттинг: перенос белков. Обычно проявку белков осуществляют за счет гибридизации белка с антителами. Поэтому этот вид блоттинга называют **иммуноблоттингом**.

Этапы Вестерн-блоттинга:

Extract fish muscle proteins and electrophorese — protein profiler module

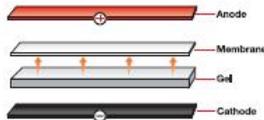


Stain gels with Bio-Safe™ Coomassie stain (optional), or proceed to lab 3, or store unstained gels in precast gel cassettes overnight

Lab 1 & 2

Assemble western blot and transfer muscle proteins to membrane

Electroblot proteins from gel to membrane:
100 V / 30 minutes
or 20 V / 2,5 hours

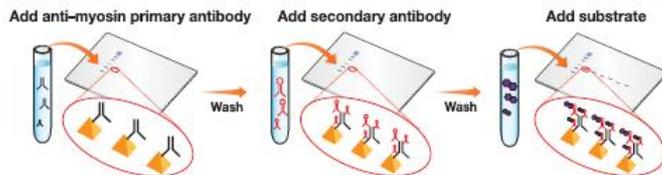


Alternative:
Blot proteins by capillary action from gel to membrane for 48 hours

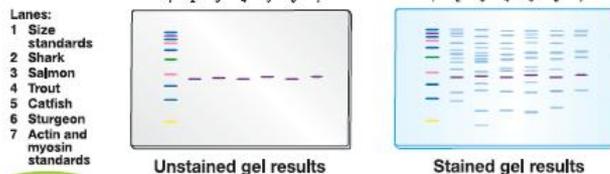
Store blotted membranes in blocking solution

Lab 3

Run immunodetection procedure to detect myosin light chain



Watch for color development

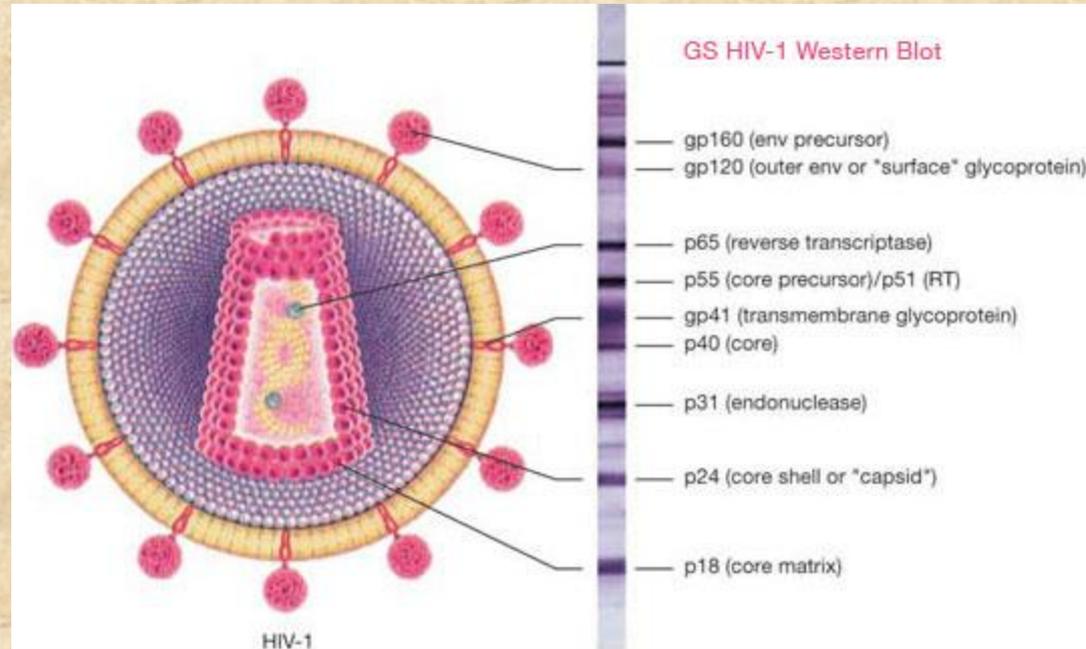


Lab 4

Extension 1: Construct a standard curve from protein standards

Extension 2: Determine sizes of myosin light chains from different species

Extension 3: Compare results with published bioinformatics databases



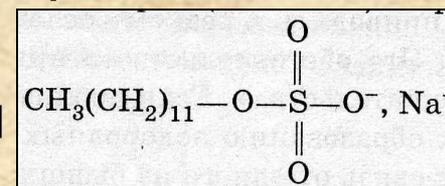
1. Разделение белков методом SDS-PAGE
2. Перенос белков на мембрану
3. Блокирование
4. Детекция

ЭФ в ПААГ в присутствии ДСН

ДСН (додецилсульфат натрия, SDS) – детергентс сильно выраженными амфифильными свойствами.

Связывается с белками за счет гидрофобных взаимодействий и растягивает их.

Сульфокислота ДСН делает все белки ОТРИЦАТЕЛЬНО заряженными.



Таким образом возможно разделение белков только по их размеру.

При этом скорость миграции белка при определенной напряженности электрического поля - величина, зависящая только от размера белка. Ее называют электрофоретической подвижностью

Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют. Развёрнутые 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 (1).

Масс-спектрометрия (МС)

- **Метод МС** - метод исследования и анализа веществ
- **основан** на ионизации атомов и молекул вещества и последующем разделении образующихся ионов в соответствии с их массовым числом m/z - отношением массы иона к его заряду - в электрическом или магнитном поле
- Первые масс-спектры были получены в Великобритании в 1910 г. (Томсон) и 1919 г. (Астон)



Джозеф Джон Томсон
(18.12.1856 – 30.08.1940)

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Общий вопрос - что измеряется?

m/z



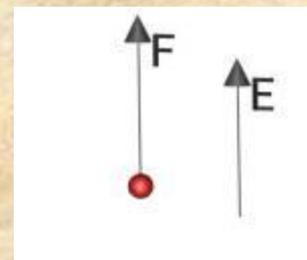
Масс- спектрометрия –
расчет молекулярной массы ионов
по их поведению в электрических и/или магнитных полях

Примеры:

Сила, действующая на ион массы m и заряда z
в однородном электрическом поле:

$$F_q = zeE$$

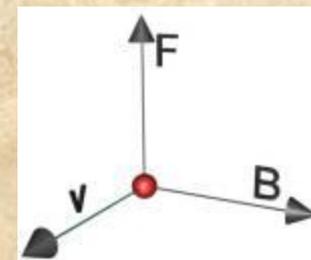
$$a = (z/m)eE$$



Сила, действующая на ион массы m , заряда z , скорости v
в однородном магнитном поле:

$$F_L = ze[v \times B]$$

$$a = (z/m)e[v \times B]$$



Масс-спектрометрия

- **Преимущество метода** в том, что для анализа достаточно очень малое количество вещества, **основной недостаток** – метод является разрушающим, т. е. исследуется не само вещество, а продукты его превращения
- Строго говоря, метод МС не относится к спектроскопическим, поскольку в его основе нет взаимодействия вещества с электромагнитным излучением,
- но **внешний вид** графического распределения ионов по массовым числам - зависимость интенсивности ионного тока от отношения массы к заряду - **напоминает спектр** и получил название масс-спектр, а сам метод - масс-спектрометрия

- Масс-спектрометр — это **вакуумный** прибор, использующий физические законы движения заряженных частиц в магнитных и электрических полях, и необходимый для получения масс-спектра



Блок-схема масс-спектрометра



- 1 – система ввода образца
- 2 – источник ионизации с ускорителем ионов
- 3 – масс-анализатор (устройство для разделения ионов)
- 4 – детектор
- 5 – измерительное или регистрирующее устройство
- Чтобы исключить соударение ионов с другими атомами или молекулами, анализ происходит в вакууме (в ионизаторе давление $10^{-3} - 10^{-4}$ Па, в масс-анализаторе - $10^{-3} - 10^{-8}$ Па)

• Принцип метода

- Пробу вводят в источник ионизации, где молекулы ионизируются
- Образующиеся положительные ионы выводятся из зоны ионизации, ускоряются электрическим полем и одновременно фокусируются в пучок. Нейтральные молекулы удаляются вакуум-насосом
- Поток ускоренных ионов попадает в масс-анализатор, где ионы разделяются по массе
- Разделенные пучки ионов попадают в детектор, где ионный ток преобразуется в электрический сигнал, который усиливается и регистрируется

Система ввода пробы

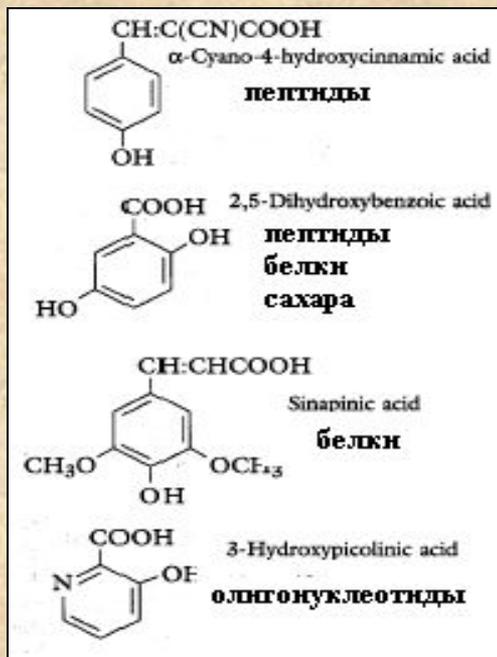
- Количество вводимой пробы не превышает нескольких микромолей, чтобы не нарушить вакуум внутри прибора
- **1. Непрямой способ** - пробу вводят в ионизатор в газообразном состоянии
- Жидкие и твердые пробы испаряют ($\sim 500\text{ }^{\circ}\text{C}$) в вакуумной камере, и пары через специальное отверстие поступают в ионизатор
- **2. Прямой способ** - используется для труднолетучих проб
- Образец непосредственно вводят в ионизатор с помощью штанги через систему шлюзовых камер
- В этом случае потери вещества значительно меньше, масса пробы - несколько нг

- К сожалению, очень многие органические вещества невозможно испарить, то есть перевести в газовую фазу, без разложения, а это значит, что их нельзя ионизовать электронным ударом. Среди таких веществ почти всё, что составляет живую ткань (белки, ДНК и т. д.), физиологически активные вещества, полимеры, то есть всё то, что сегодня представляет особый интерес
- Масс-спектрометрия не стояла на месте и последние годы были разработаны специальные методы ионизации таких органических соединений
- Сегодня используются, в основном, два из них
- 1. **ионизация при атмосферном давлении** и её подвиды –
 - электроспрей (ESI)
 - химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)
 - фотоионизация при атмосферном давлении (APPI)
- 2. **ионизация лазерной десорбцией** (MALDI)
- Форма получаемого масс-спектра сильно зависит от способа ионизации
- Наиболее часто используют ионизацию электронным ударом

MALDI - matrix assisted laser desorption / ionization

лазерная десорбция и ионизация в присутствии
вспомогательного вещества - матрицы

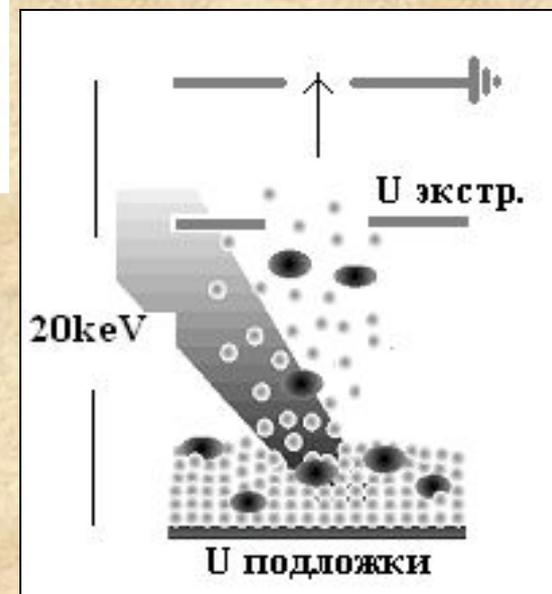
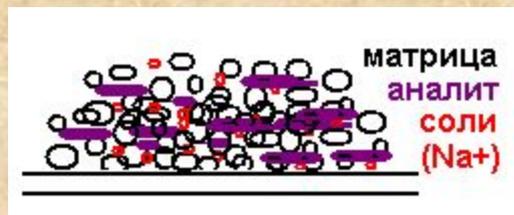
Матрицы для УФ лазера (336нм)



МАТРИЦА:

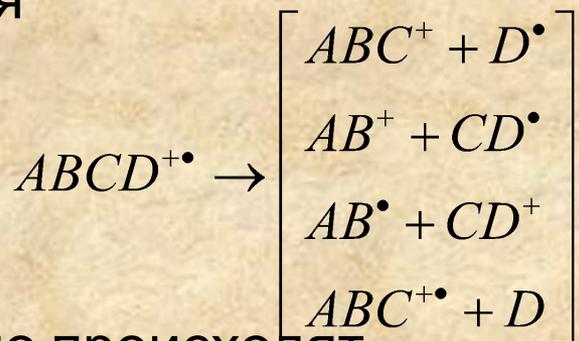
- * Поглощает энергию лазерного излучения, “вскипая”, увлекает в газовую фазу молекулы анализируемого вещества
- * Способствует ионизации

Анализируемое вещество
(раствор 10^{-4} - 10^{-8} М, <1 мкл)
смешивается с матрицей
(раствор 10^{-1} - 10^{-2} М, <1 мкл),
высушивается на подложке,
образуя кристаллоиды

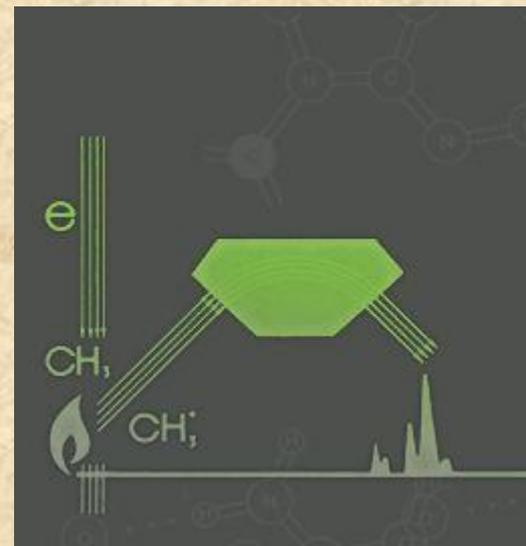
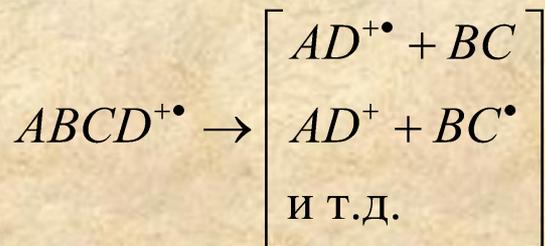


Лазер: 2нс, 50-300 мкДж/имп , 50мкм

- **3. Определение структуры** органических соединений основано на изучении пиков осколочных ионов
- При столкновении электронов с органической молекулой вначале образуется катион-радикал
- $ABCD + e \rightarrow ABCD^{+\cdot} + 2e$
- С увеличением энергии электронов происходит его распад, фрагментация



- Одновременно происходят внутримолекулярные перегруппировки



- Ионизация длится около 10^{-16} с, время прохождения ионом пути до детектора не менее 10^{-5} с . За это время из исходного иона образуется большое число осколков
- Молекулярный ион появляется, если энергия электронов соответствует энергии ионизации молекулы (около 7-13 эВ), обычно энергия электронов составляет около 70 эВ, поэтому масс-спектры достаточно сложные
- Вероятность образования молекулярного иона и его устойчивость зависит от класса соединений

Качественный анализ

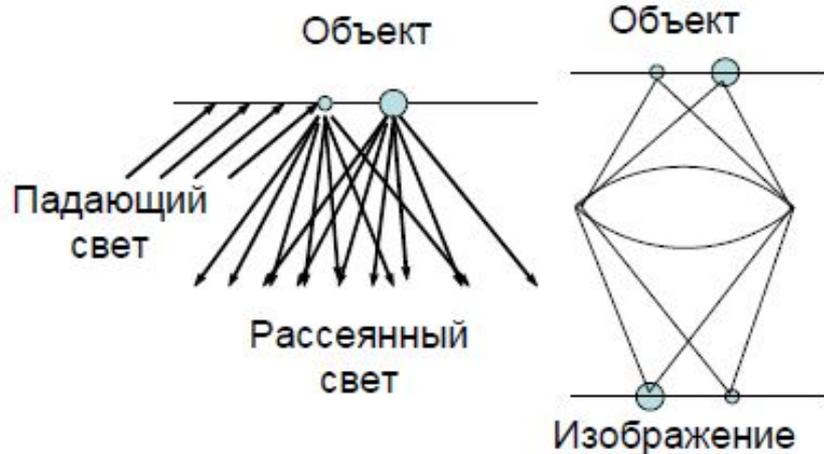
- Наиболее представительные ионы и соответствующие им структуры помещены в таблицы, их используют при интерпретации масс-спектров
- Кроме того сравнивают масс-спектры изучаемого соединения с каталогом спектров (до 150 000 спектров различных соединений)
- При идентификации исходят из того, что характер фрагментации неизвестного вещества и соединения с предполагаемой структурой одинаков, а спектры получены в близких экспериментальных условиях, что не всегда выполняется (например, спектры изомеров не различаются)
- В любом случае вероятность совпадения масс-спектров одного и того же вещества выше, чем масс-спектров разных веществ



Количественный анализ

- Возможны *вещественный* и *элементный* анализ
- Количественный анализ смесей органических соединений часто ограничен сложностью масс-спектра
- Поэтому **метод МС сочетают** с различными видами хроматографии и капиллярного зонного электрофореза
- **1)** Для вещественного анализа используют ГХ
- В ходе хроматографирования регистрируют во времени интенсивность какого-либо пика с определенным массовым числом
- В результате получается зависимость сигнала детектора от времени , как в хроматографии

Рентгеноструктурный анализ



Известно, что есть предел размеров объекта, который можно увидеть в микроскоп, а именно, мы не можем рассмотреть предметы, размер которых заметно меньше длины волны света, который мы используем (*дифракционное ограничение*). Длина волны видимого света лежит в пределах от 400 до 700 нанометров, и поэтому мы можем рассматривать в световом микроскопе эритроцит размером в 10

000 нм, но не можем разглядеть эритроцита, имеющую толщину около 5 нм, или увидеть мембрану диаметром 3 нм. Тем более мы не можем рассмотреть внутреннее строение белковой молекулы, поскольку размеры атомов и расстояния между ними измеряются несколькими ангстремами, т.е. десятыми долями нанометра ($1\text{\AA} = 1 \cdot 10^{-10}$ м; $1\text{ нм} = 1 \cdot 10^{-9}$ м).

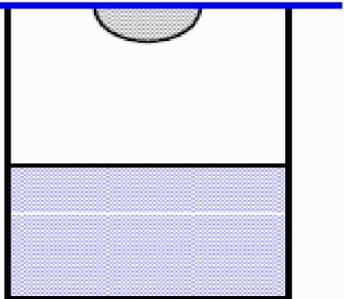
Дифракция рентгеновских лучей - рассеяние рентгеновских лучей кристаллами (или молекулами жидкостей и газов), при котором из начального пучка лучей возникают вторичные отклонённые пучки той же длины волны, появившиеся в результате взаимодействия первичных рентгеновских лучей с электронами вещества;

Основные этапы получения данных белковой структуры

- Выделение и очистка белка. В последнее время все большую роль начинают играть методы белковой инженерии, позволяющие синтезировать большое количество белка с заданными свойствами и высокой степени гомогенности. Для последующего получения белковых кристаллов нужно обычно несколько десятков миллиграмм чистого белка.
- Получение белковых кристаллов.
- Анализ дифракции рентгеновских лучей (денситометрия).
- Расчет параметров элементарной ячейки кристалла и оценка разрешения.
- Анализ изоморфно-замещенных кристаллов, включающий в себя получение кристаллов и анализ интенсивности рефлексов.
- Получение полной информации, содержащейся в рефлексах: нахождение *структурных факторов*.
- Расчет распределения электронной плотности в элементарных ячейках.
- Определение координат атомов, т.е. пространственной

кристаллов

Висячая капля
с белком



Резервуар с
осадителем

В целом процедура получения белковых кристаллов сводится к очень деликатному и длительному осаждению белка из слегка пересыщенного раствора. Исходная концентрация белка при этом обычно берется довольно высокой, порядка 2–50 мг/мл. Постепенное добавление осадителя приводит к образованию пересыщенного раствора белка и выпадению кристаллов. Вся проблема в том, какой именно осадитель окажется наиболее подходящим для каждого конкретного белка и каким образом обеспечить действительно плавное и медленное увеличение

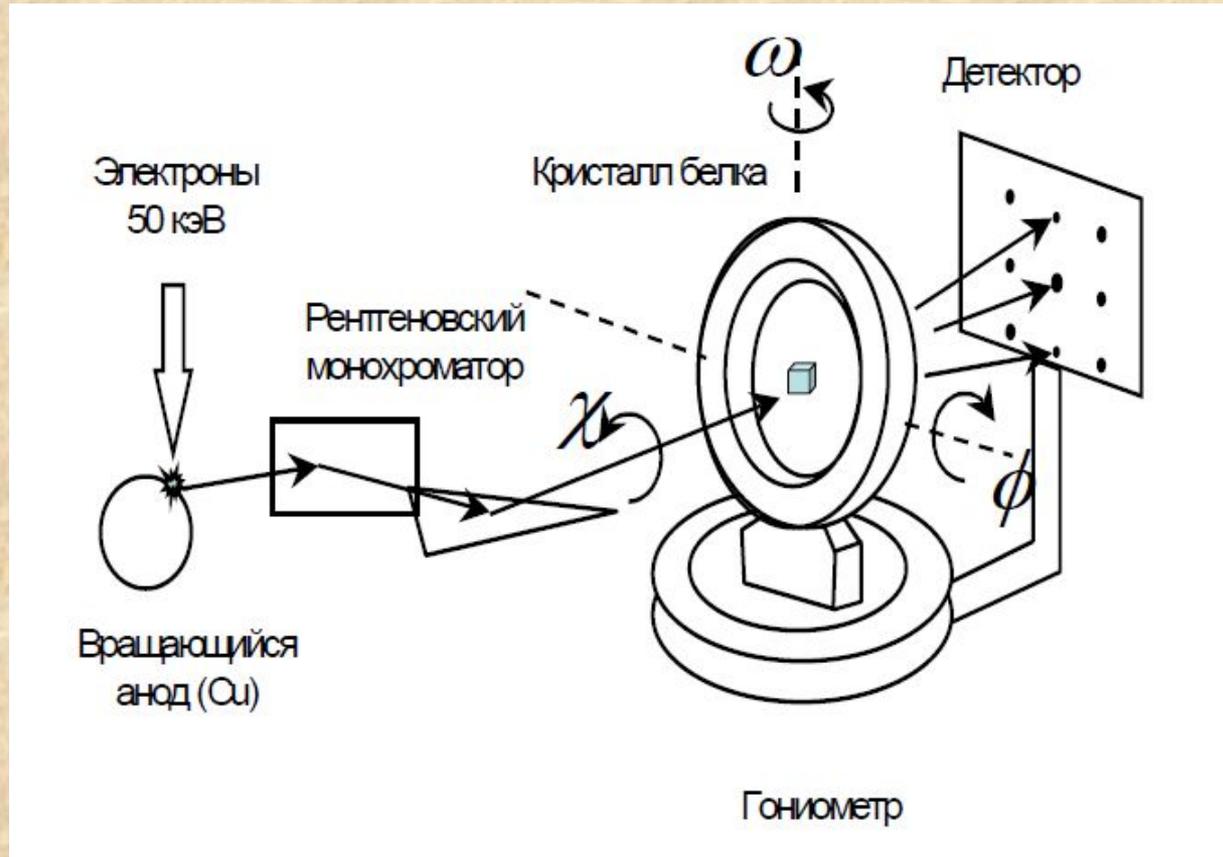


Белковый
кристалл



Молекулы белков и РНК не могут быть кристаллизованы, если их третичная структура развернута, поэтому методы кристаллизации ограничены условиями сохранения нативного состояния таких макромолекул. вещества, способные к самосборки в регулярные структуры, часто склонны

Рентгеновский дифрактометр



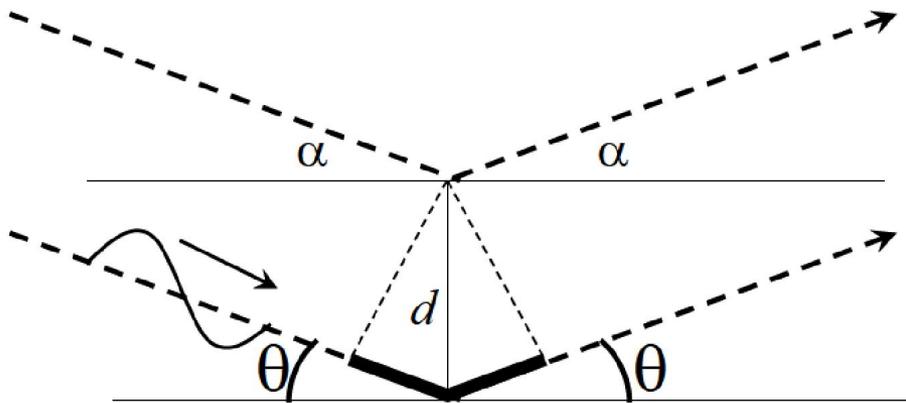
Длина волны рентгеновских лучей, используемых в белковой кристаллографии близка к одному ангстрему (например, равна $1,55\text{\AA}$ для излучения медного электрода), а следовательно лежит в нужном диапазоне длин волн.

Закон Брэгга

- При соблюдении определенных математических условий рентгеновские лучи, отраженные от кристалла, дают четкую дифракционную картину, по которой можно воссоздать структуру кристаллической решетки.

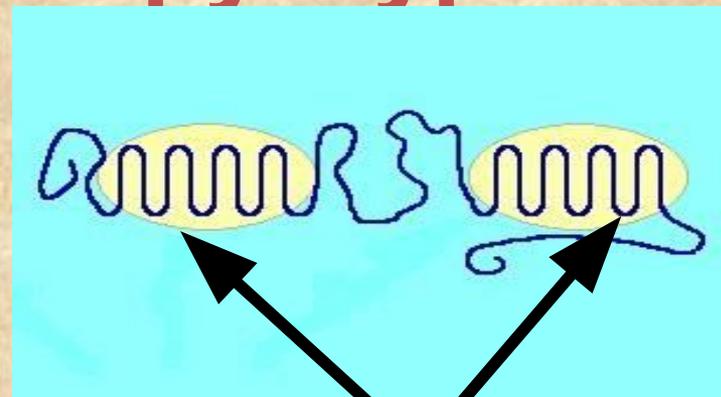
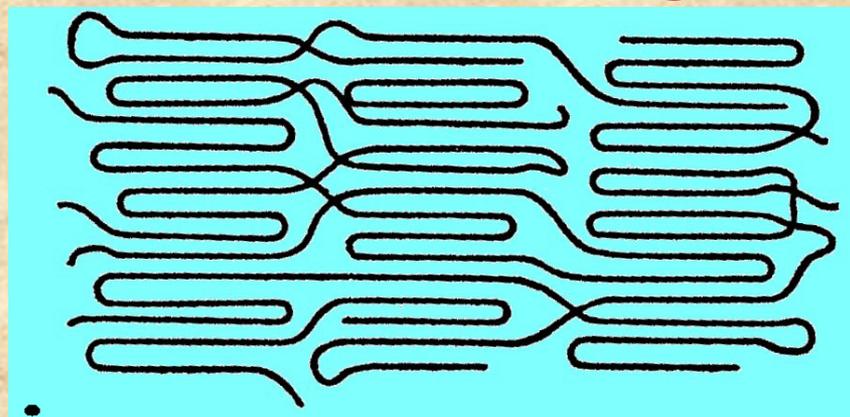
$$2d \sin \theta = n\lambda$$

- d — расстояние между параллельными плоскостями кристаллической решетки,
- θ — угол рассеяния рентгеновских лучей,
- λ — длина волны рентгеновских лучей,
- n — целое число (порядок дифракции).
- При $n = 1$ мы наблюдаем пик взаимного усиления волн дифракции на атомах, удаленных друг от друга на одну длину волны, при $n = 2$ — второй пик дифракции (разность хода составляет две длины волны) и т. д.



Информация, непосредственно считываемая дифрактометром, состоит из координат рефлексов (или, говоря точнее, углов отклонения рассеянного луча от направления луча, падающего на кристалл) и интенсивности соответствующего рефлекса. Грубо говоря, мы получаем таблицу, три столбца которых описывают координату рефлекса, а четвертый — его интенсивность.

Исследование надмолекулярной структуры

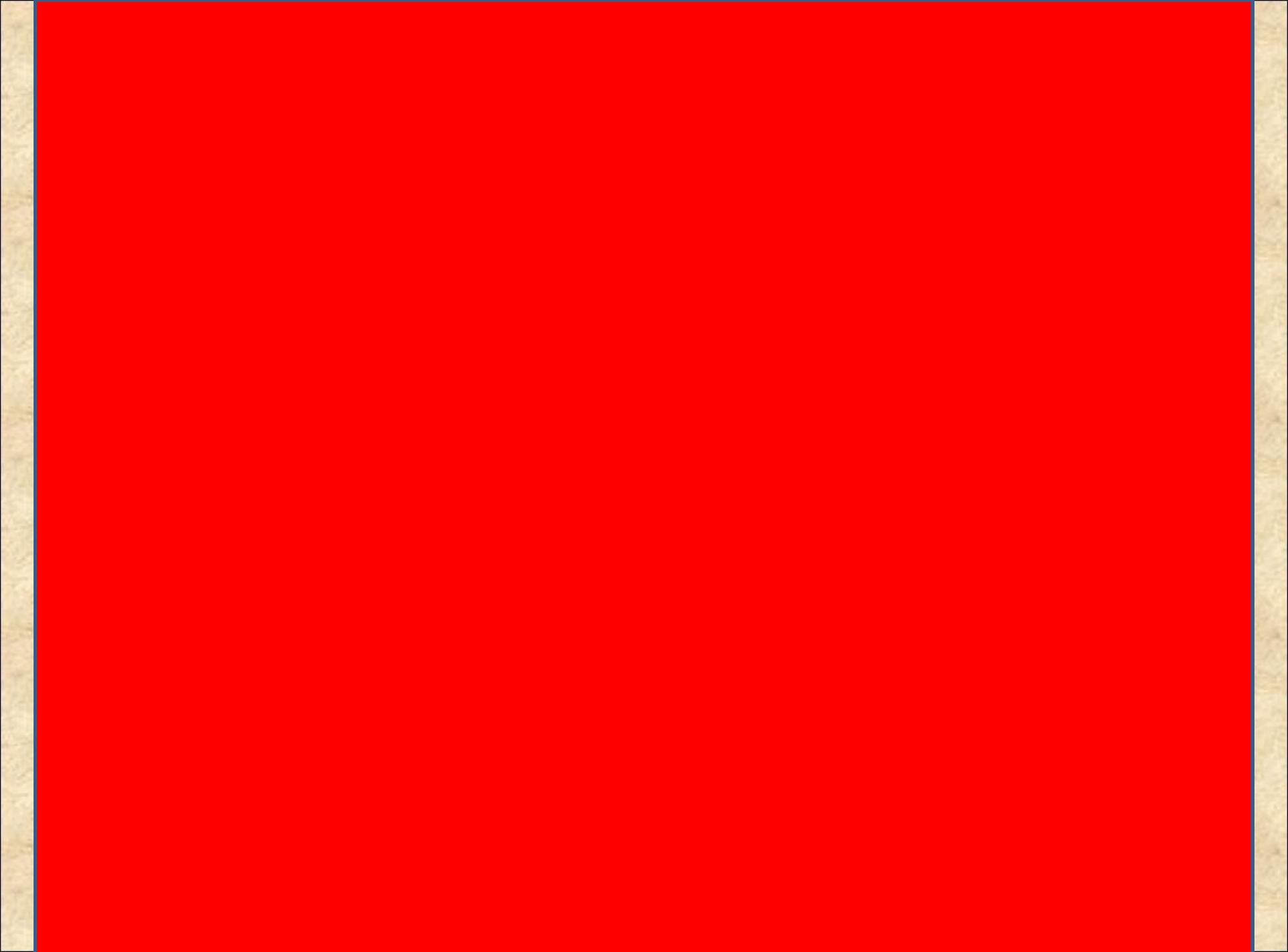


Кристаллические области

Интенсивность, ИМП.







Спектроскопические методы анализа

План лекции:

Оптическая спектроскопия.

Флуоресцентная спектроскопия.

Оптическая активность.

ИК и спектроскопия комбинационного рассеяния.

ЯМР и ЭПР.



$$pH = -\lg[H^+]$$

$$e^{\frac{\Delta G}{RT}} = K = \frac{k_+}{k_-}$$

$$\frac{L}{(\bar{h}^2)^{1/2}} = \sqrt{N}$$

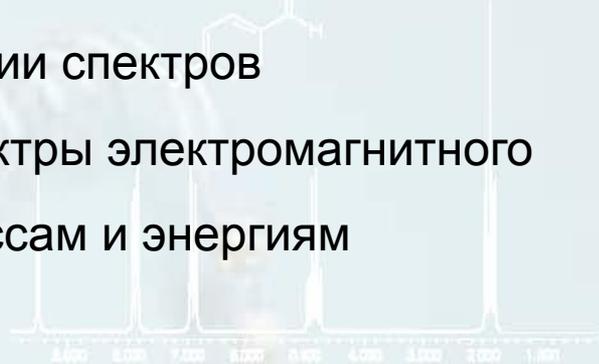
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_1/4)}$$

Оптическая спектроскопия

Спектральный анализ - совокупность методов качественного и количественного определения состава объекта, основанная на изучении спектров взаимодействия материи с излучением, включая спектры электромагнитного излучения, акустических волн, распределения по массам и энергиям элементарных частиц и др.

Оптическая спектроскопия - спектроскопия в оптическом (видимом) диапазоне длин волн с примыкающими к нему ультрафиолетовым и инфракрасным диапазонами (от нескольких сотен нанометров до единиц микрон). Этим методом получено подавляющее большинство информации о том, как устроено вещество на атомном и молекулярном уровне, как атомы и молекулы ведут себя при объединении в конденсированные вещества.



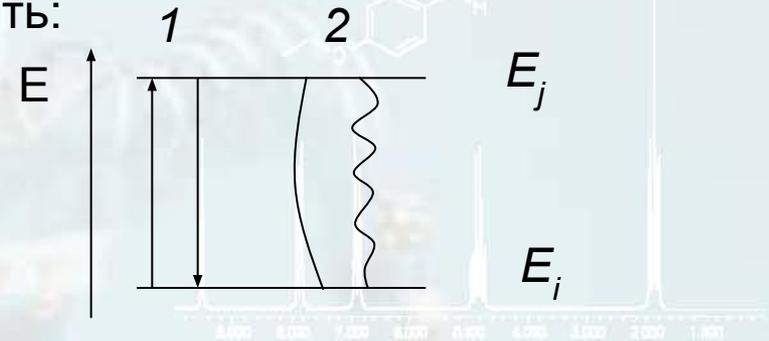
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_1/4)}$$

Спектроскопия

Переход атомарной или молекулярной системы связан с получением или отдачей энергии. Такие переходы могут быть:

- 1) радиационные
- 2) нерadiационные (безизлучательные)



Объекты изучения спектроскопии – преимущественно **радиационные** (излучательные переходы).

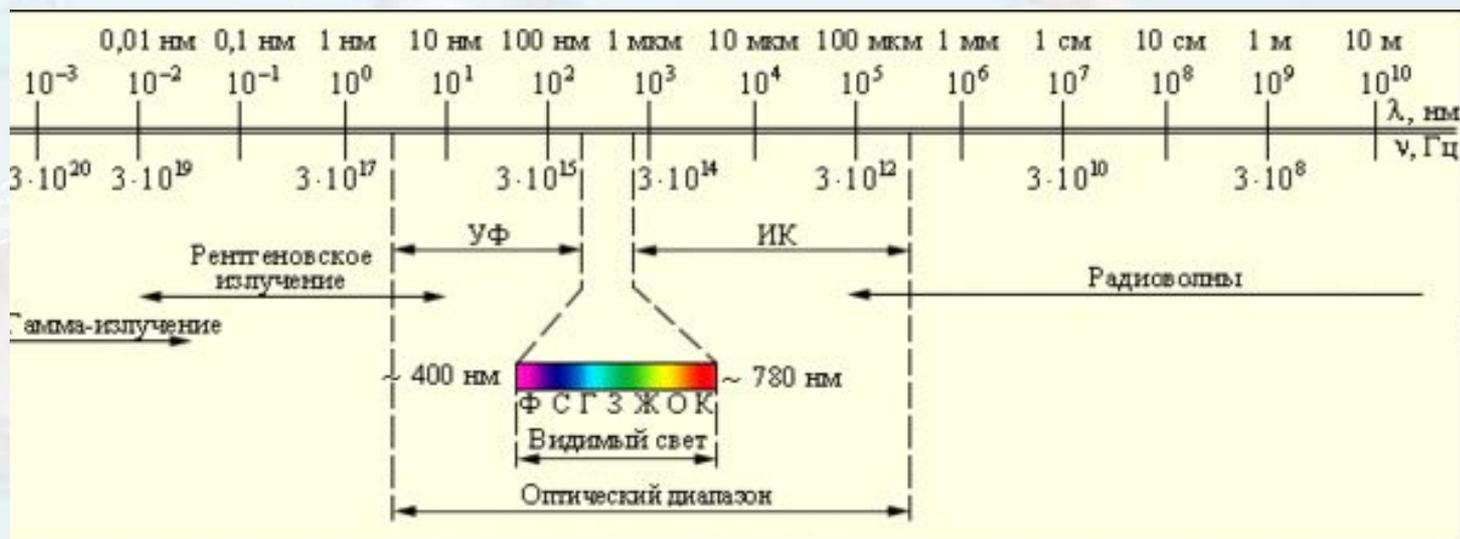
В соответствии со вторым постулатом Бора, частота электромагнитного излучения, связанная с переходом из состояния i в состояние j связанная с энергиями этих стационарных состояний :

$$\nu_{ij} = \frac{E_i - E_j}{h}$$

Таким образом можно найти положение спектральной линии или полосы в шкале энергий переходов

Абсорбционная спектроскопия

- 1) γ – спектроскопия
- 2) Рентгеновская спектроскопия
- 3) Оптическая спектроскопия:
 - УФ-спектроскопия (электронные переходы)
 - Спектроскопия видимого диапазона (электронные переходы)
 - ИК-спектроскопия (колебательные и вращательные переходы)
- 4) Радиочастотная спектроскопия:
 - ЯМР
 - ЭПР



Шкала электромагнитных

волн

$$\Delta S + R \ln(C_1 / C_2)$$

$$pH = -\lg[H^+]$$

Абсорбционная спектроскопия

Характерная длина волны, см	Характерная энергия, ккал · моль ⁻¹	Вид излучения	Метод
10^{-11}	$3 \cdot 10^8$	γ -Излучение	Мёссбауэровская спектроскопия
10^{-8}	$3 \cdot 10^5$	Рентгеновское излучение	Рассеяние и дифракция рентгеновских лучей
10^{-5}	$3 \cdot 10^2$	Вакуумное ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
$3 \cdot 10^{-5}$	10^2	Ближнее ультрафиолетовое излучение	Электронные спектры
$6 \cdot 10^{-5}$	Энергия углерод-углеродной связи $5 \cdot 10^3$	Видимый свет	Электронные спектры
10^{-3}	$3 \cdot 10^0$ <i>RT</i> при комнатной температуре	Инфракрасный свет	Колебательные спектры
10^{-2}	$3 \cdot 10^{-1}$	Свет в дальней инфракрасной области	Колебательные спектры
10^{-1}	$3 \cdot 10^{-2}$	Микроволновое излучение	Вращательные спектры
10^0	$3 \cdot 10^{-3}$	Микроволновое излучение	ЭПР
10	$3 \cdot 10^{-4}$	Излучение в радиочастотном диапазоне	ЯМР



$$\sigma = \sqrt{N}$$

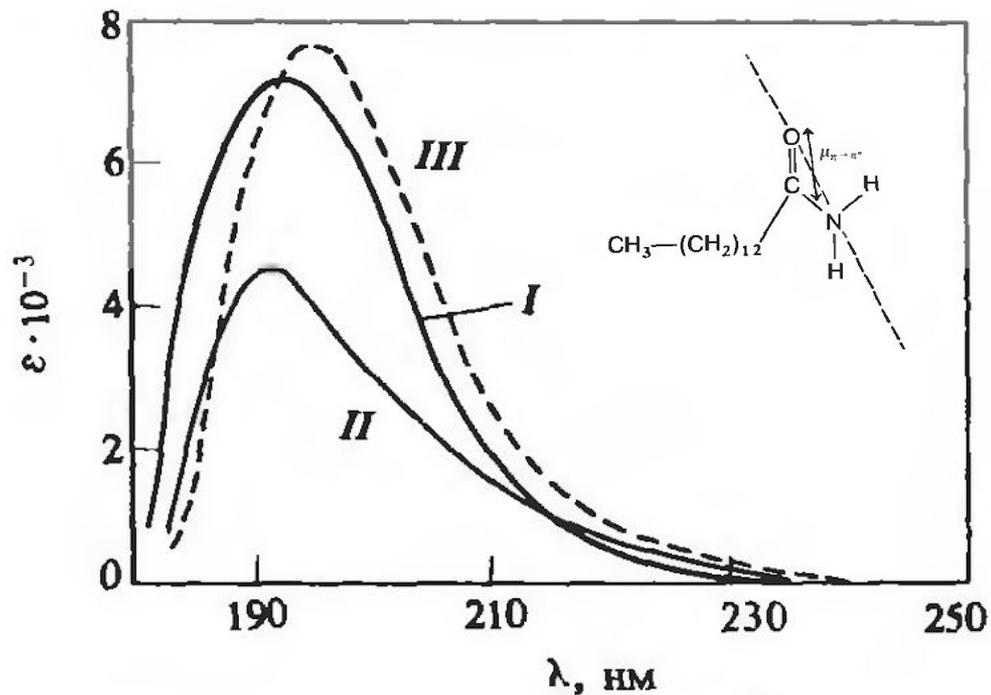
$T \Delta S$

(C, / 4)
BRARY

Спектральные свойства биополимеров. УФ область.

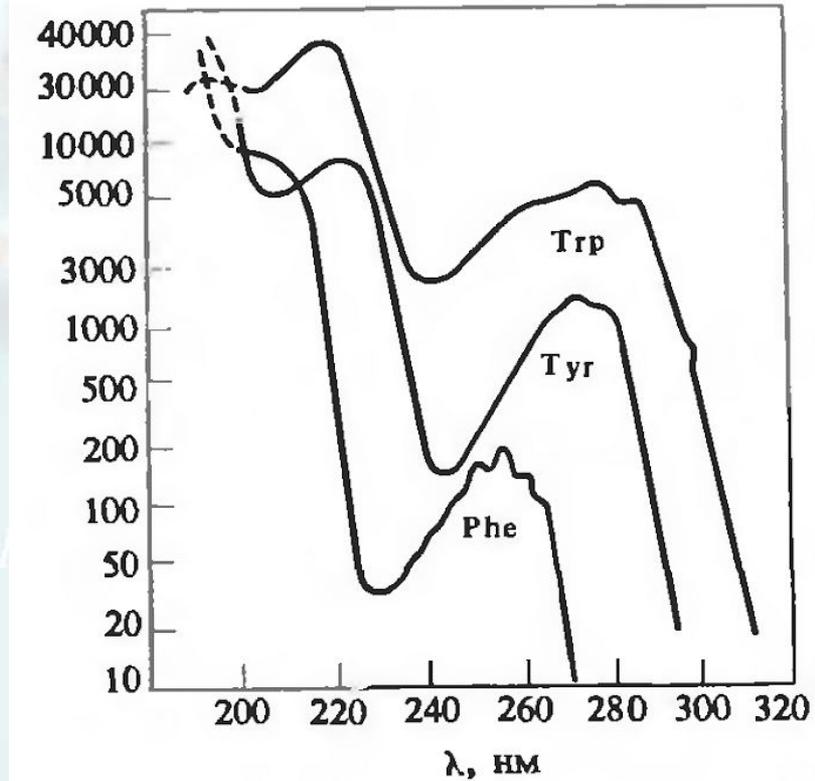
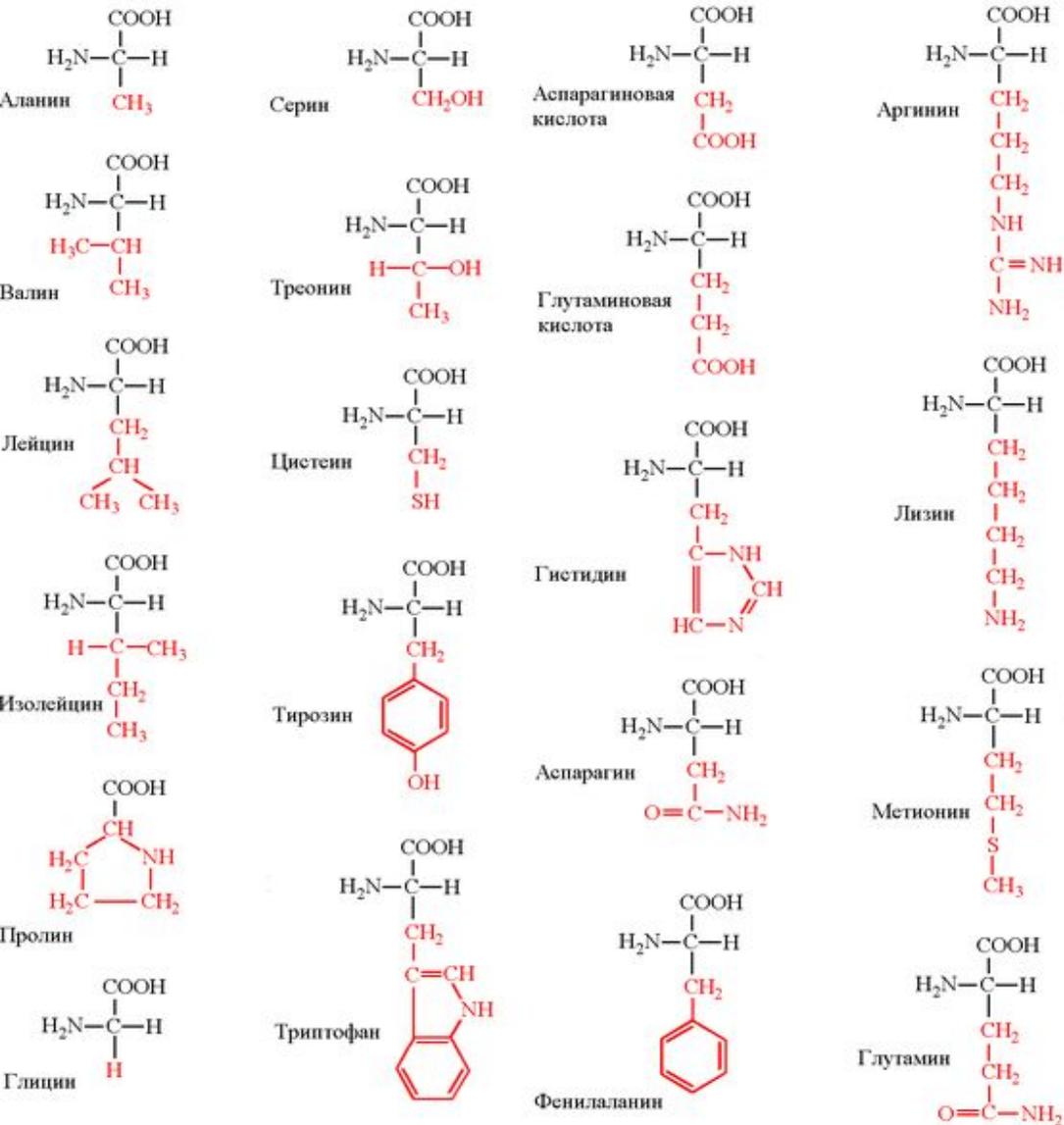
Хромофоры – химические группы, поглощение которых преобладает в данном спектральном диапазоне

Белки: поглощение в дальнем УФ определяется пептидными группами, поглощение в области 230-300 нм соответствует ароматическим аминокислотам



Спектр поли-L-лизина в разных условиях

Спектральные свойства биополимеров. УФ область.

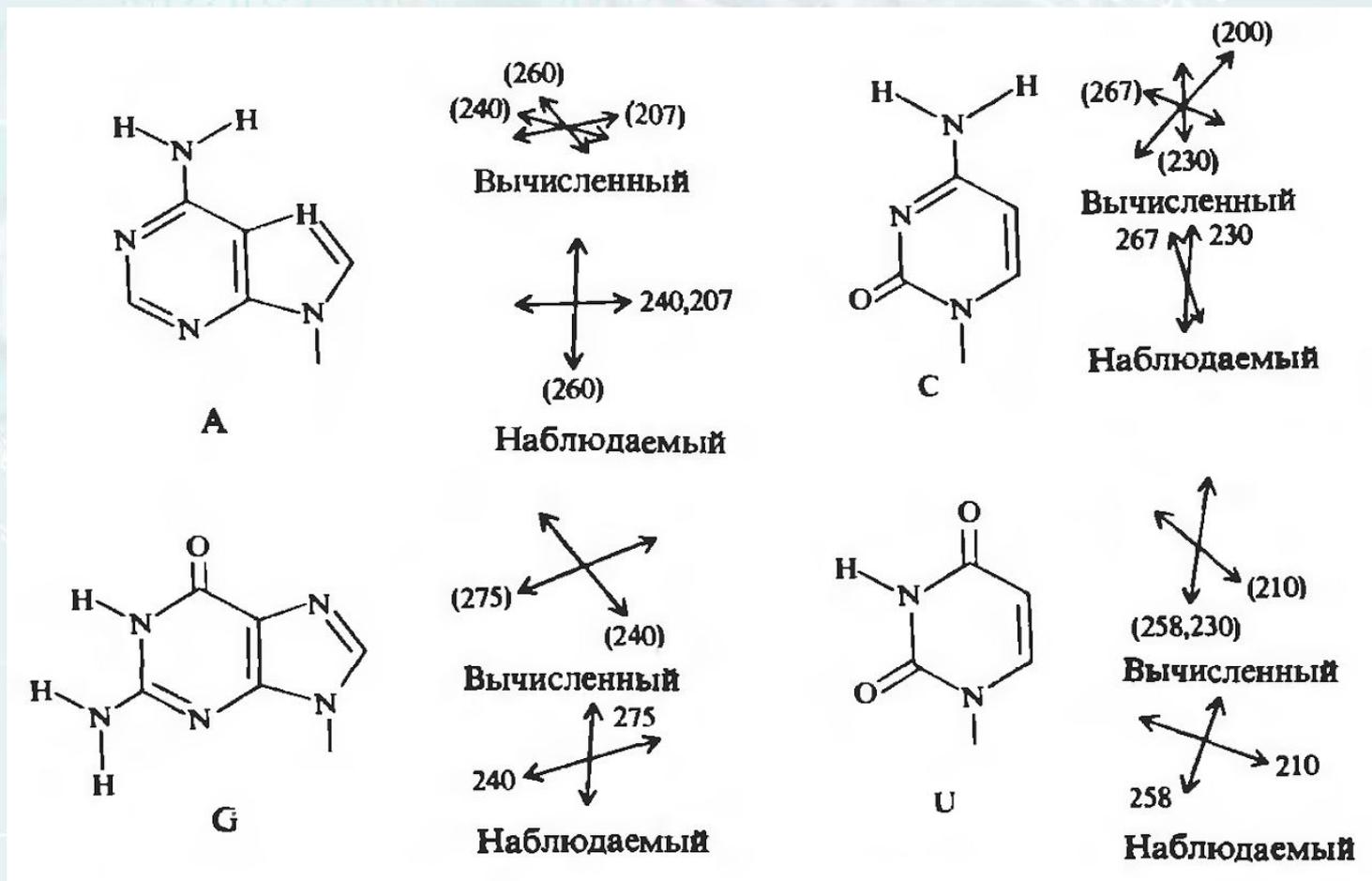


Спектры ароматических АК

$$\Delta G_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_2 / C_1)}$$

Спектральные свойства биополимеров. УФ область.

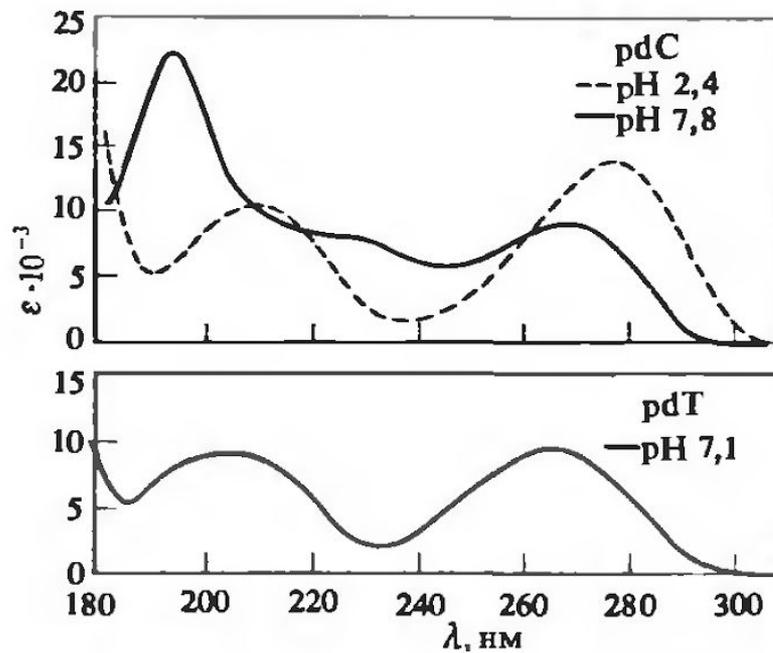
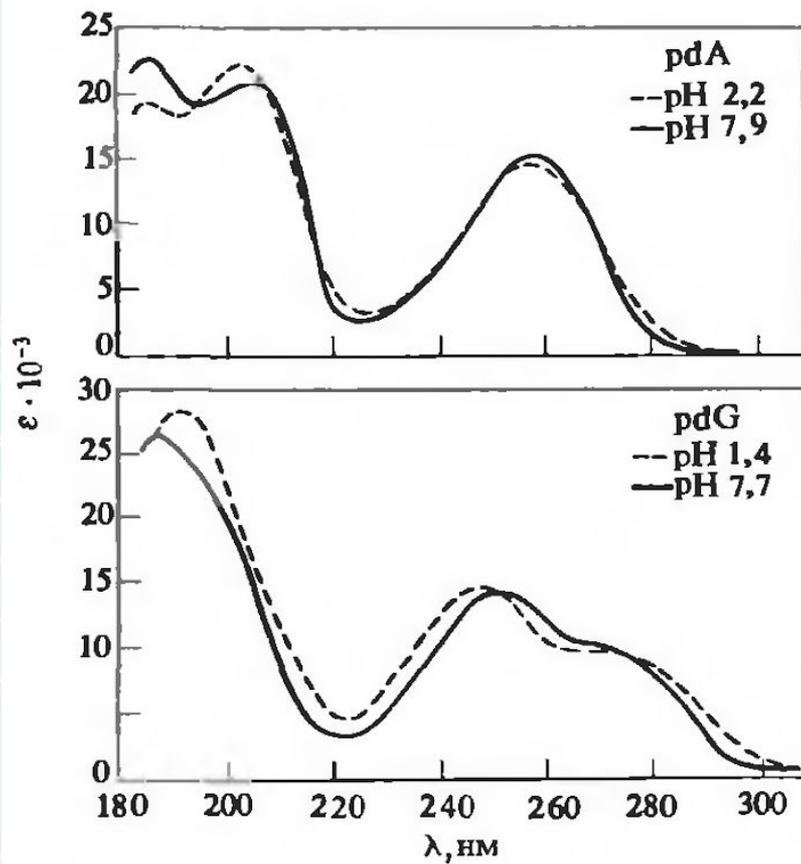
Нуклеиновые кислоты: поглощение в УФ области определяется гетероциклическими основаниями



Вычисленные и наблюдаемые дипольные моменты переходов

Спектральные свойства биополимеров. УФ область.

Спектры нуклеотидов



$$\Delta S + R \ln(C_1 / C_2)$$

Спектральные свойства биополимеров. УФ область.

На спектры биополимеров влияет их **локальное окружение**, например, изменение конформации биополимера, изменение среды в которую они помещены (рН, полярность растворителя и т.д.), взаимодействие с другими хромофорами.

Данные факторы необходимо учитывать при анализе спектров биополимеров.

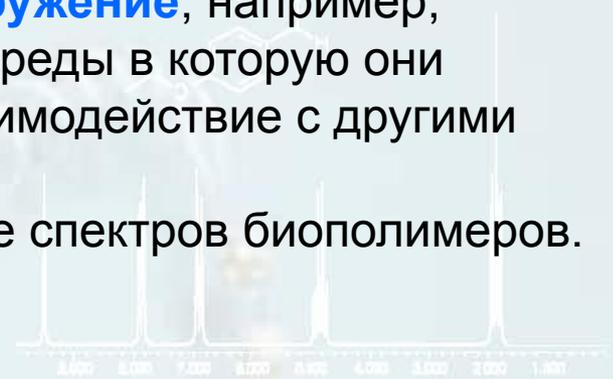
Одно из основных применений УФ-спектроскопии на сегодняшний день – **измерение концентрации биополимеров**.

Для этого используется **закон Бугера-Ламберта-Бера**:

$$D = \varepsilon c_M l$$

как правило коэффициенты экстинкции известны.

$$pH = -\lg[H^+]$$



$$\frac{L}{\sqrt{N}} = \sqrt{N}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C/4)}$$

Спектральные свойства биополимеров. ИК область.

Коэффициенты экстинкции биополимеров в ИК области значительно меньше ($\sim 10^3$), чем в УФ ($\sim 10^4$). Таким образом, необходимо **большее** количество вещества для исследований.

Колебательные полосы поглощения обычно можно отнести определенным группам в составе биополимера

ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНЫХ ИНФРАКРАСНЫХ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ ПЕПТИДНОЙ ГРУППЫ¹⁾

Колебание	$\frac{\partial \mu}{\partial R}$	Структуры с водородными связями				Структуры без водородных связей
		α -спираль		β -слой		частота, см ⁻¹
		частота, см ⁻¹	дихроизм	частота, см ⁻¹	дихроизм	
Растяжение связи N—H	$\text{—N—H—} \leftrightarrow$	3290—3300		3280—3300	⊥	~ 3400
Амид I (растяжение связи C=O)	$\text{—C=O—} \leftrightarrow$	1650—1660		1630	⊥	1680—1700
Амид II	$\begin{array}{c} \\ \text{H} \\ \\ \text{—C—N—} \\ \end{array} \leftrightarrow$	1540—1550	⊥	1520—1525		< 1520?

¹⁾ J.A.Schellman, C.Schellman. In: The Proteins, 2d ed., vol. 2, ed. H.Neurath, New York, Academic Press, 1962, p 1.

Спектральные свойства биополимеров. ИК область.

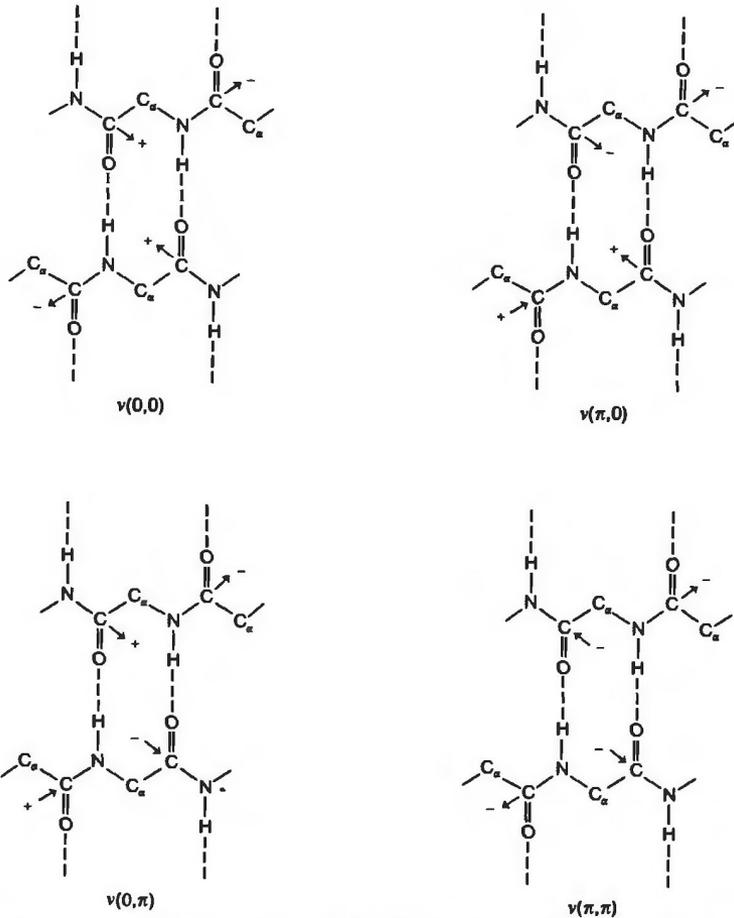
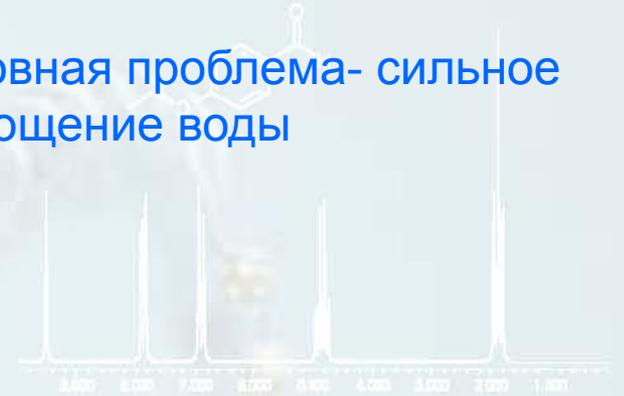


РИС. 8.27. Схематическое представление нормальных колебаний в антипараллельном β-слое. Стрелки обозначают компоненты моментов переходов, лежащие в плоскости рисунка, знаки плюс и минус — компоненты, перпендикулярные плоскости. [Т. Miyazawa, J. Chem. Phys., 32, 1647 (1960).]

Основная проблема- сильное поглощение воды



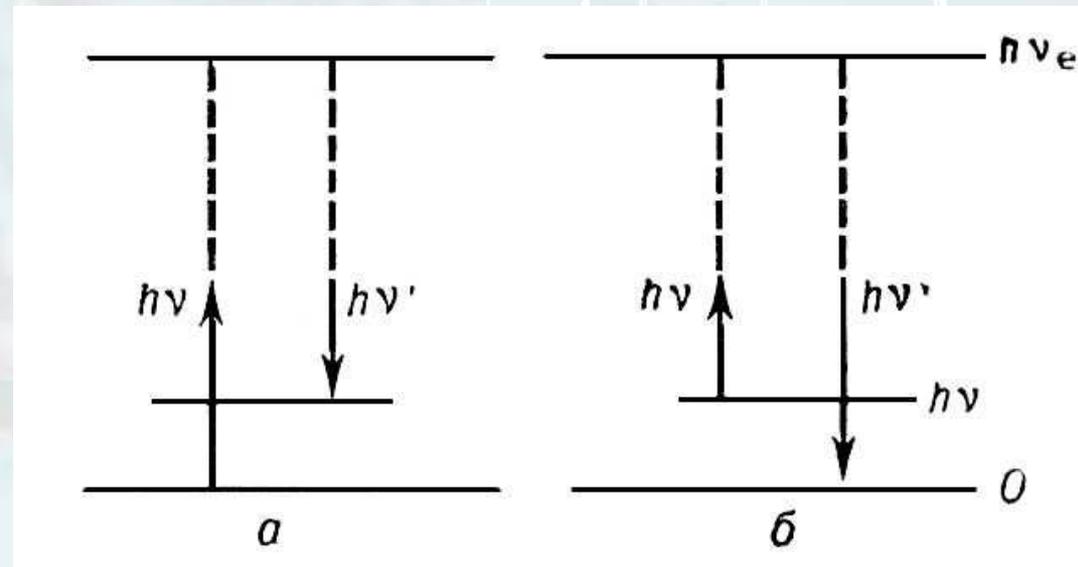
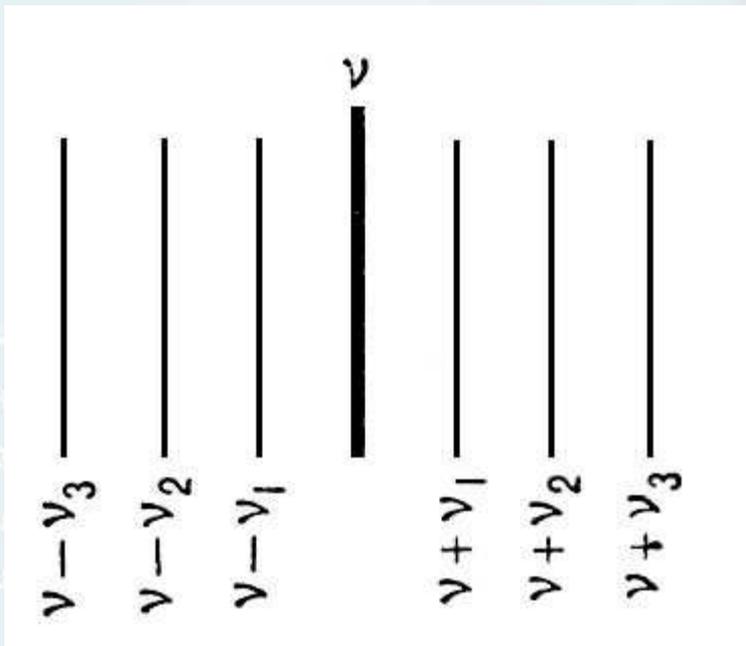
$$K = \frac{k_+}{k_-} \quad \frac{L}{(\hbar^2)^{1/2}} = \sqrt{N}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_2 / 4)}$$

Спектральные свойства биополимеров. ИК область.

Комбинационное рассеяние (Рамановское) - неупругое рассеяние оптического излучения на молекулах вещества, сопровождающееся заметным изменением его частоты.



Находит широкое применение для изучения комплексов белков и НК. В качестве количественной характеристики для характеристики используют: длину волны полосы поглощения, ее ширину, амплитуду, интегральную интенсивность поглощения.

Флуоресцентная спектроскопия

Люминесценция – это испускание фотонов из электронно-возбужденных состояний. Физическая природа люминесценции состоит в *излучательных* переходах электронов из возбуждённого состояния в основное. При этом причиной первоначального возбуждения системы могут служить различные факторы: внешнее излучение, химические реакции и др.

В зависимости от мультиплетности (суммарного спина $M = 2 \sum_{n=1}^N s + 1$) возбужденные состояния делятся на **синглетные** (S) и **триплетные** (T). В общем случае, фотолюминесценция без изменения мультиплетности (с S1 на S0, с T1 на T0) называется **флуоресценцией**, с изменением мультиплетности (с T1 на S0) – **фосфоресценцией**.

Характеристическое время

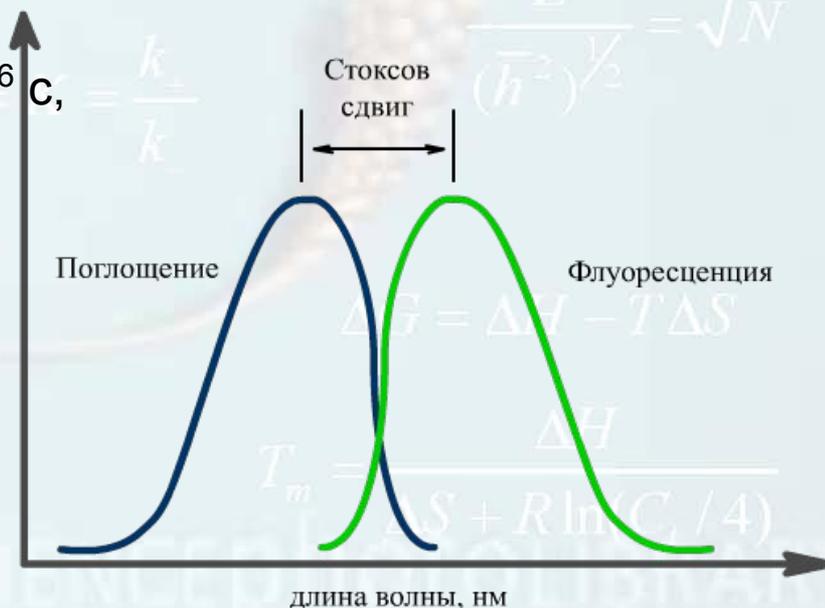
флуоресценции составляет порядка $10^{-10} - 10^{-6}$ с,

фосфоресценции $\sim 10^{-6}$ с

Квантовый выход

флуоресценции показывает, с какой эффективностью проходит данный процесс

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}}$$



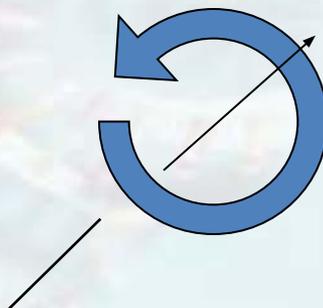
Спектрополяриметрия

Круговой дихроизм (циркулярный дихроизм) оптически активных молекул — зависимость коэффициента поглощения света от направления круговой поляризации.

Схематическое перемещение заряда происходящих под действием света



Поглощение за счет взаимодействия молекулы с **электрической** компонентой света
 $\langle \Psi_0 | \mu | \Psi_a \rangle$



Поглощение за счет взаимодействия молекулы с **магнитной** компонентой света
 $\langle \Psi_0 | \mathbf{m} | \Psi_a \rangle$



Оптическая активность (круговой дихроизм)

$$\langle \Psi_0 | \mathbf{m} | \Psi_a \rangle \langle \Psi_a | \mu | \Psi_0 \rangle \neq 0$$

Для **существования оптической активности** свет должен индуцировать движение заряда по винтовой линии, поэтому молекула должна быть **асимметричной**

Круговой дихроизм биополимеров

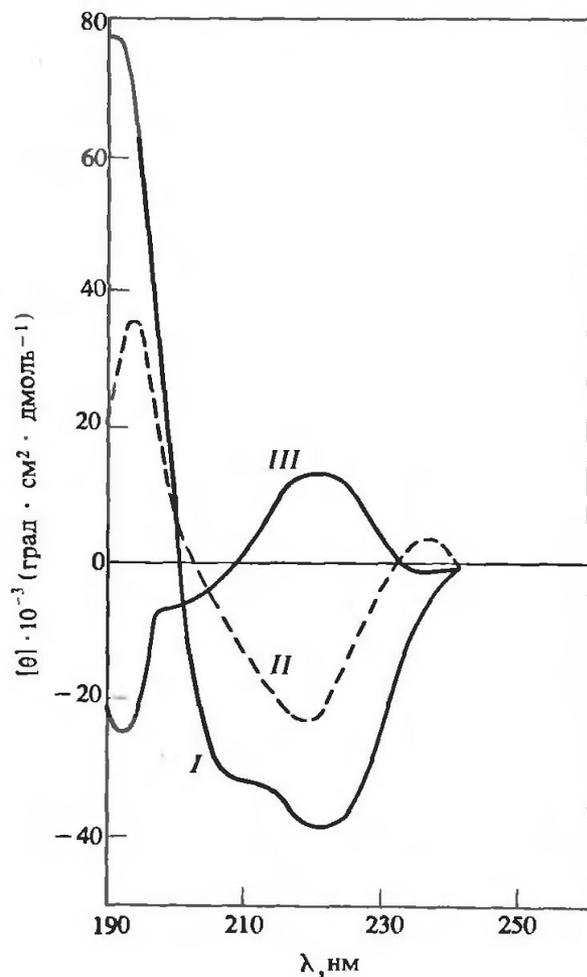
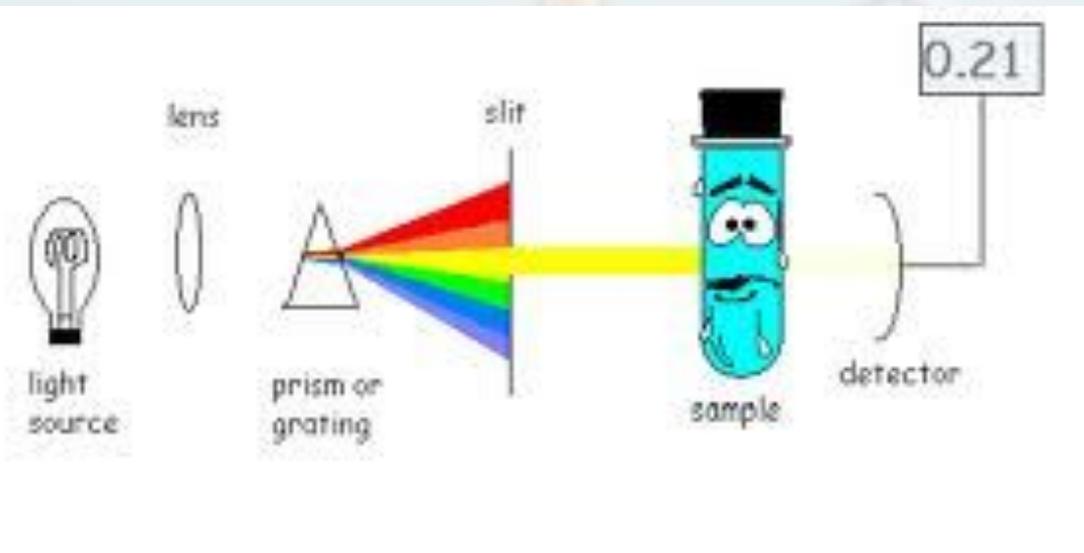


РИС. 8.9. Спектры КД α -спирали (I), β -слоя (II) и беспорядочной структуры (III), полученные на основании спектров белков с известной трехмерной структурой методом Ветлауфера. [V.P.Saxena, D.B.Wetlaufer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 66, 969 (1971).]

Данный метод является чрезвычайно чувствительным к пространственной структуре молекул.

Круговой дихроизм биополимеров

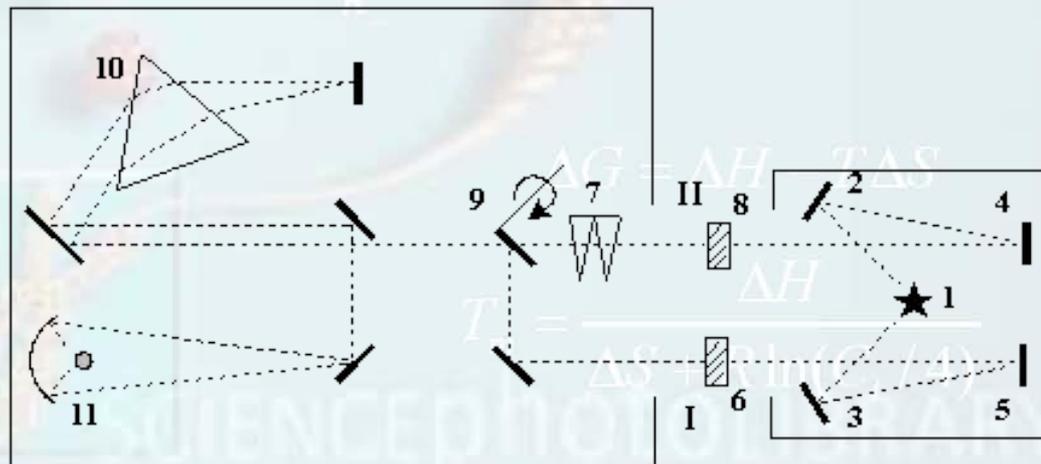


Однолучевая схема



Размеры: 69 x 96 x 193 мм

Двулучевая схема



$$\frac{\Delta G}{RT} = K = \frac{k_+}{k_-}$$

$$\frac{L}{(N_2)^{1/2}} = \sqrt{N}$$

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(Q/N)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

•Спасибо за внимание!