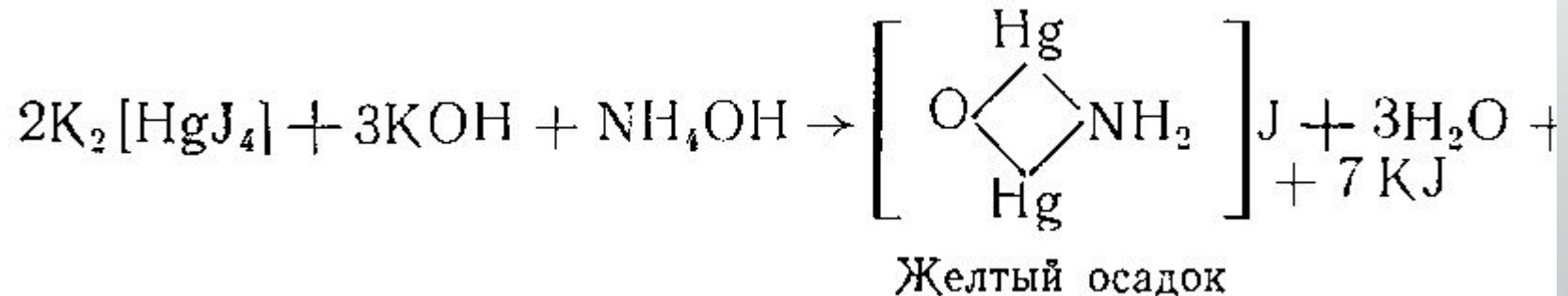




Методы белковой химии

Количественное определение белков

Количество белка можно определять по содержанию в них азота (для этого белковый препарат сначала подвергают минерализации, а затем определяют содержание азоту по реакции Несслера)



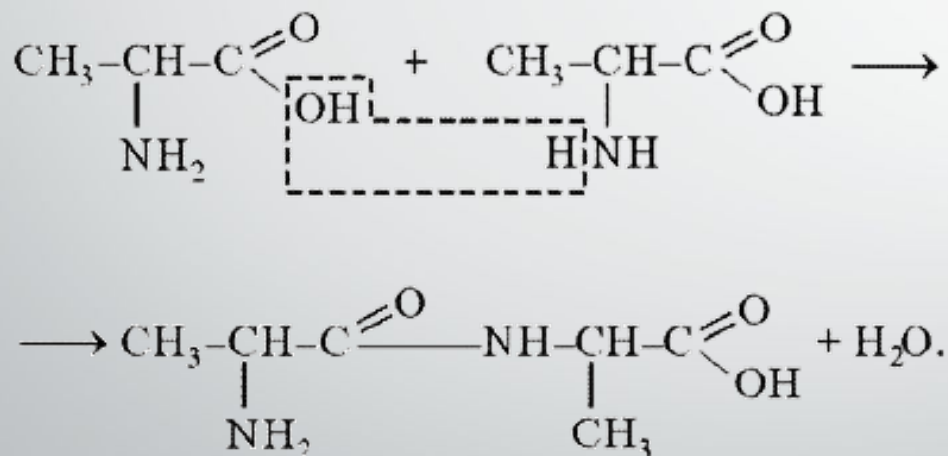
Количество белка можно определять

- биуретовым методом – основан на образовании окрашенных в сине-фиолетовый цвет комплексов между ионами меди и пептидными связями белков.
- методом Лоури, который основан на способности медных комплексов белков восстанавливать реактив Фолина.
- методом Бредфорда, который основан на способности белков связывать красители – бромфеноловый синий, кумасси голубой.

Качественное определение белков

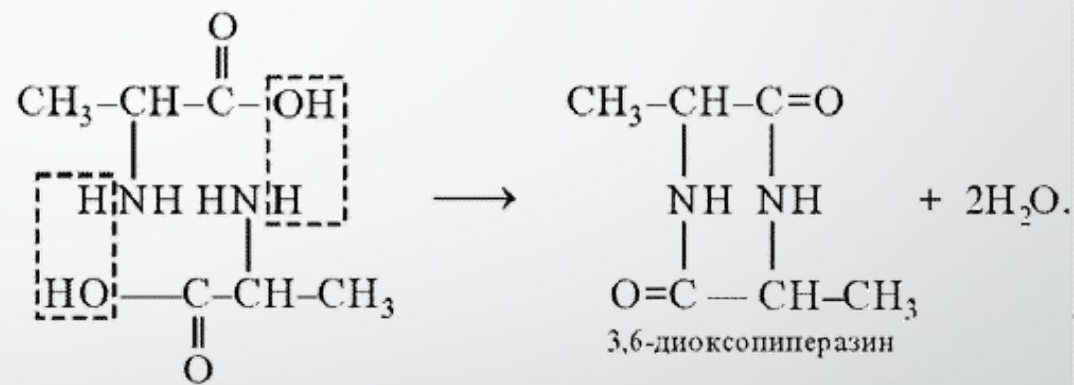
РЕАКЦИЯ ПИОТРОВСКОГО (БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ)

В белках аминокислоты связаны друг с другом по типу полипептидов и дикетопиперазинов. Образование полипептидов из аминокислот происходит путем отщепления молекулы воды от аминогруппы одной молекулы аминокислоты и карбоксильной группы другой молекулы:



Образующаяся группа $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ называется пептидной группой, связь $\text{C}-\text{N}$, соединяющая остатки молекул аминокислот, – пептидной связью.

При взаимодействии дипептида с новой молекулой аминокислоты получается трипептид и т. д. Дикетопиперазины образуются при взаимодействии двух молекул аминокислот с отщеплением двух молекул воды:

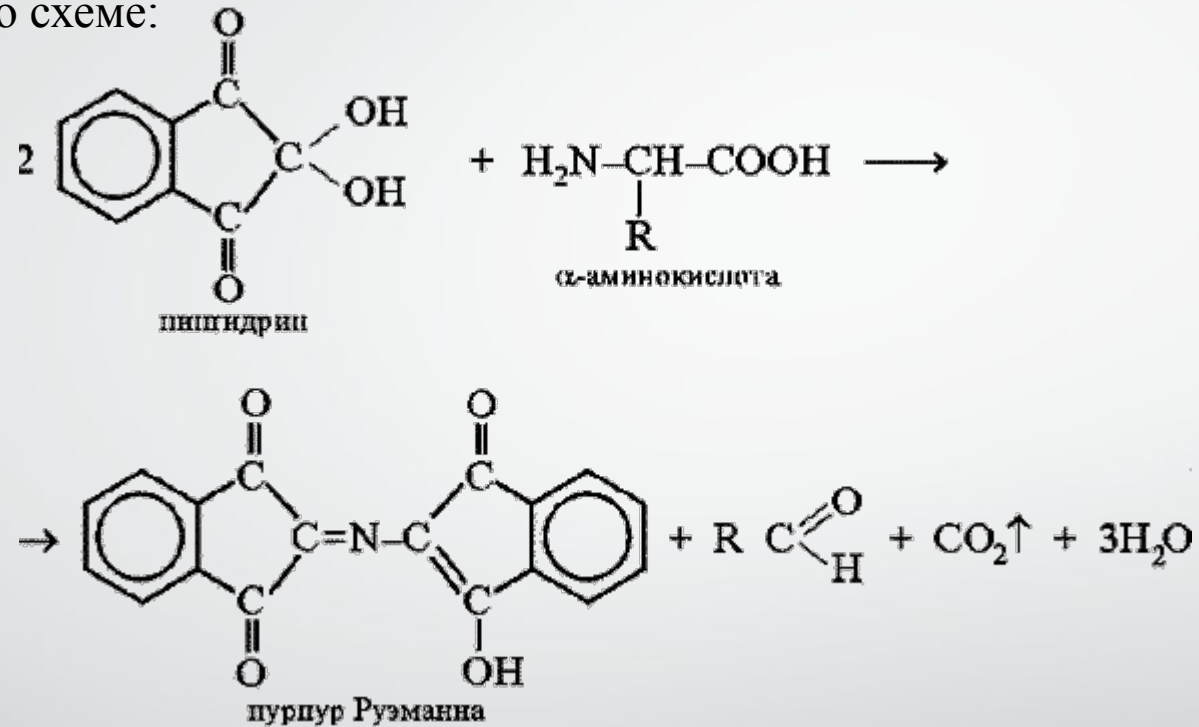


Дикетопиперазины были выделены из белков Н.Д. Зелинским и В.С.Садиковым в 1923 г. Наличие в белке повторяющихся пептидных групп подтверждается тем, что белки дают фиолетовое окрашивание при действии небольшого количества раствора медного купороса в присутствии щелочи (биуретовая реакция).

РЕАКЦИЯ РУЭМАННА (НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (1911))

α -Аминокислоты реагируют с нингидрином, образуя сине-фиолетовый комплекс (пурпур Руэмманна), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

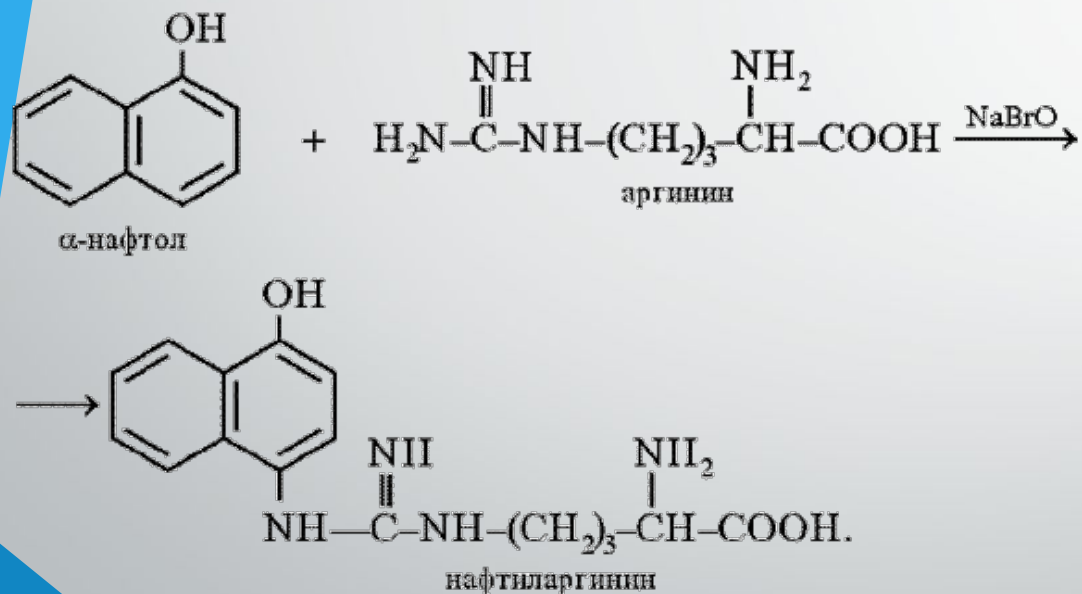
Реакция идет по схеме:



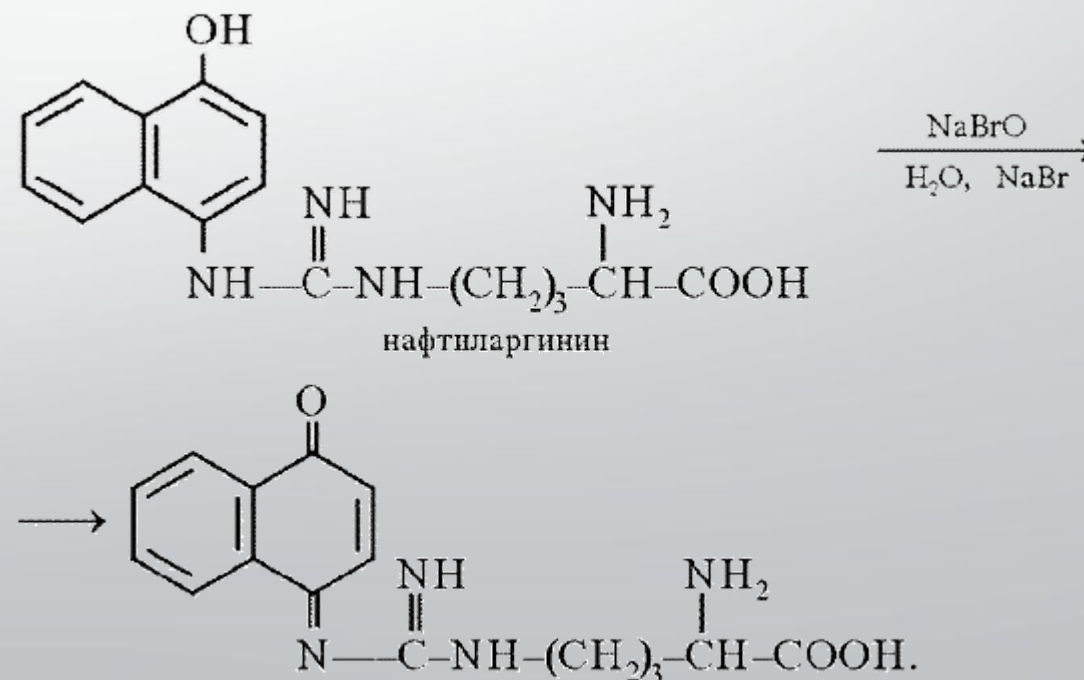
Реакция с нингидрином используется для визуального обнаружения α -аминокислот на хроматограммах (на бумаге, в тонком слое), а также для колориметрического определения концентрации аминокислот по интенсивности окраски продукта реакции.

•Реакция Сакагучи

Эта реакция на аминокислоту аргинин основана на взаимодействии аргинина с α -нафтолом в присутствии окислителя. Ее механизм еще полностью не выяснен. По-видимому, реакция осуществляется по следующему уравнению:

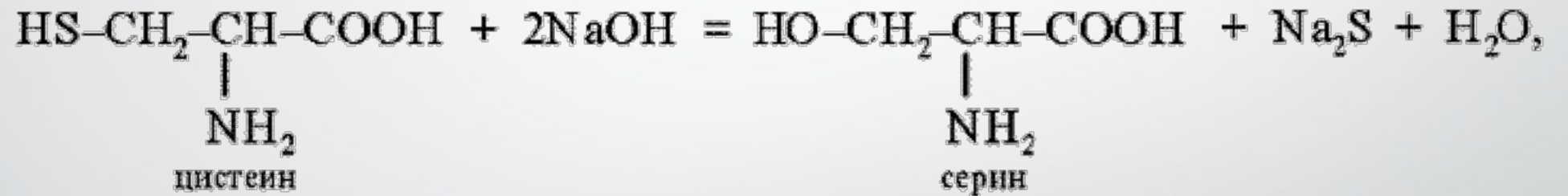


Поскольку производные хинониминов (в данном случае нафтохинона), у которых водород иминогруппы –NH– замещен на алкильный или арильный радикал, всегда окрашены в желто-красные тона, то, по-видимому, оранжево-красный цвет раствора при проведении реакции Сакагучи объясняется возникновением именно производного нафтохинонимина. Не исключена, однако, вероятность образования еще более сложного соединения за счет дальнейшего окисления оставшихся NH-групп аргининового остатка и бензольного ядра α -нафтола:



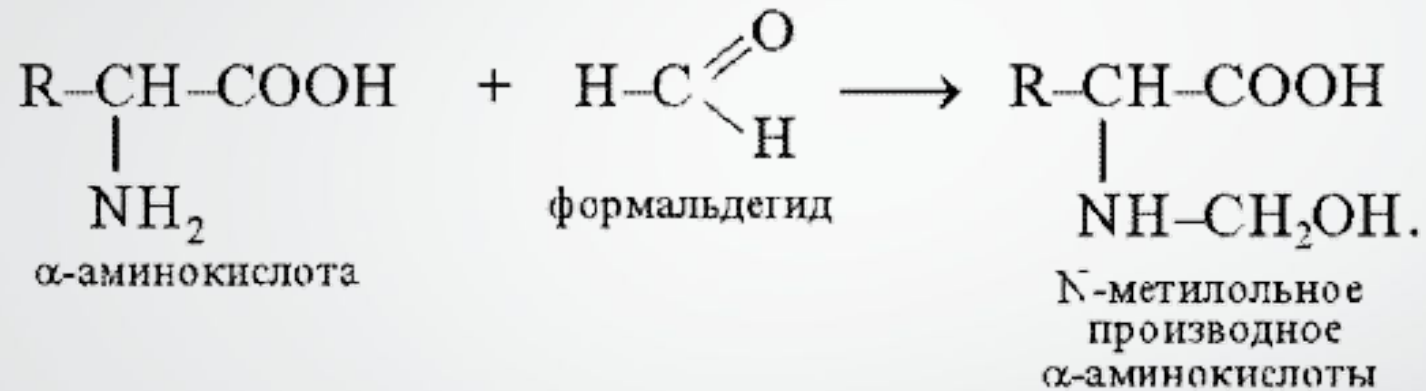
РЕАКЦИЯ ФОЛЯ

Это реакция на цистеин и цистин. При щелочном гидролизе «слабосвязанная сера» в цистеине и цистине достаточно легко отщепляется, в результате чего образуется сероводород, который, реагируя со щелочью, дает сульфиды натрия или калия. При добавлении ацетата свинца(II) образуется осадок сульфида свинца(II) серо-черного цвета. Описание опыта. В пробирку наливают 1 мл раствора цистина, прибавляют 0,5 мл 20%-го раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают до кипения, а затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца(II). Наблюдается выпадение серо-черного осадка сульфида свинца (II):



РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

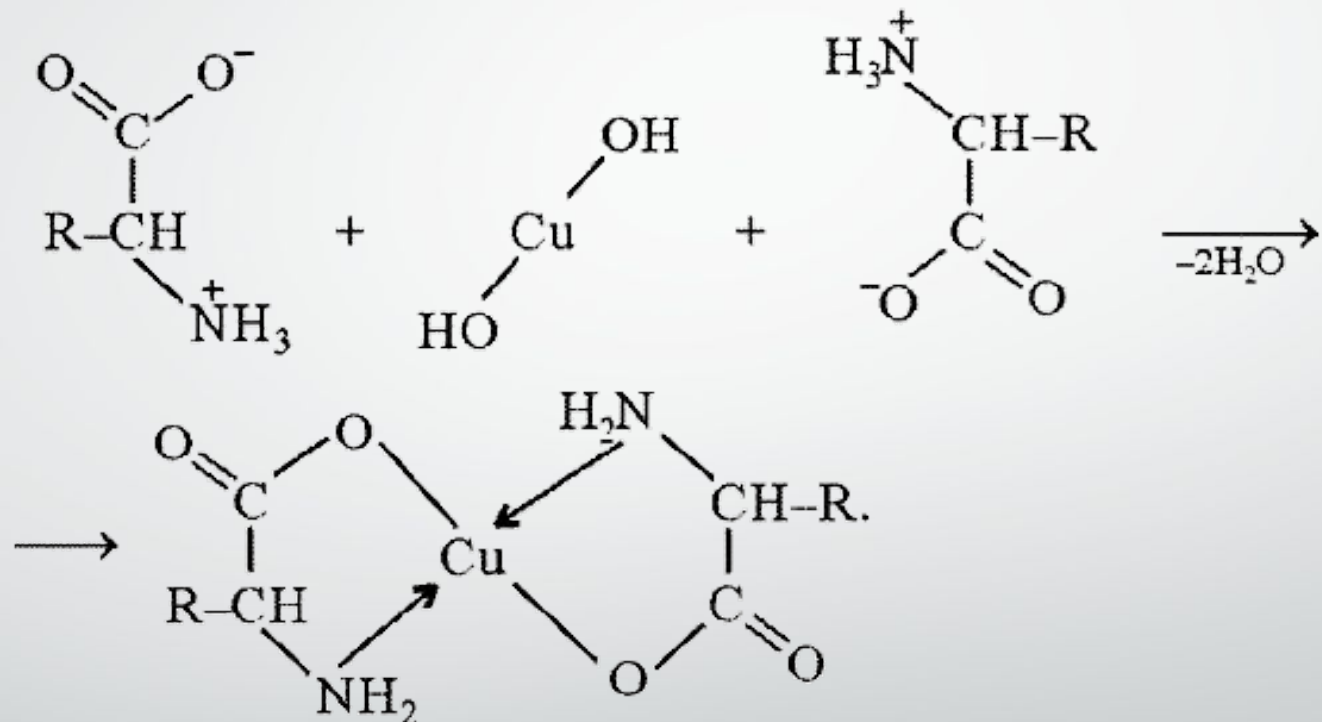
При взаимодействии α -аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



Эта реакция лежит в основе количественного определения α -аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ С МЕТАЛЛАМИ

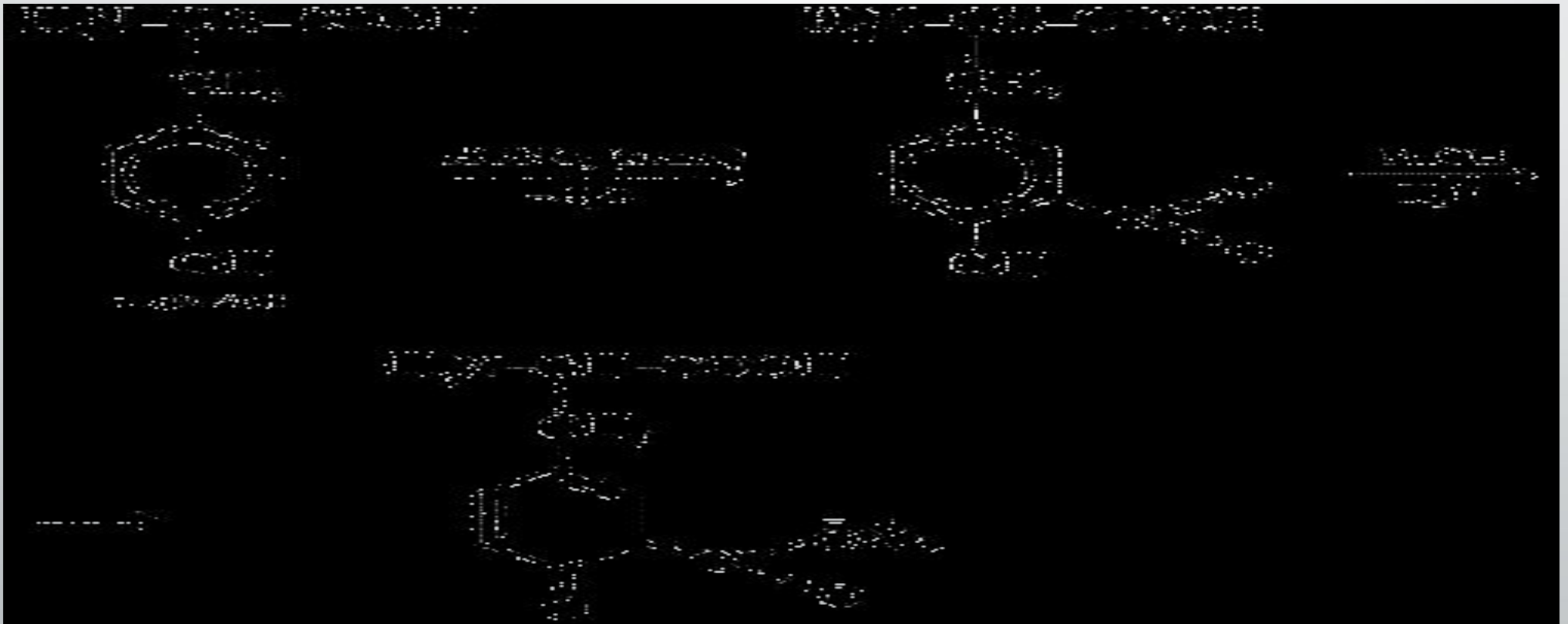
α -Аминокислоты образуют с катионами тяжелых металлов внутрикомплексные соли. Со свежеприготовленным гидроксидом меди(II) все α -аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди(II) синего цвета:



В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами.

•КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ

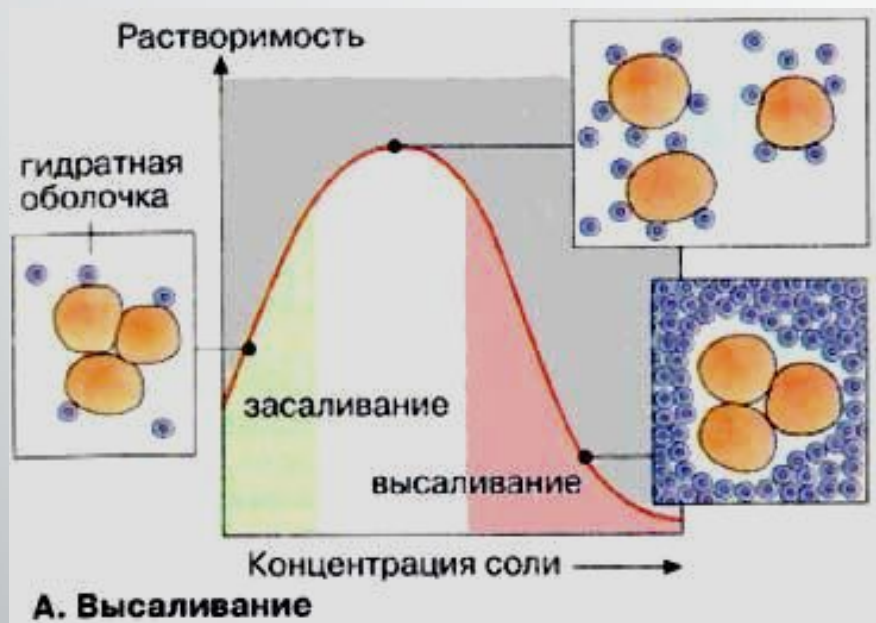
Эта реакция используется для обнаружения α -аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, триптофан, фенилаланин при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, имеющие желтую окраску. В щелочной среде нитропроизводные этих α -аминокислот дают соли, окрашенные в оранжевый цвет.



Определение первичной структуры белков

Так как многие белки, и в особенности глобулярные, высоколабильны, выделение проводят с помощью предельно мягких методов и при пониженной температуре (0-5°C). К таким методам относится **ионообменная хроматография**.

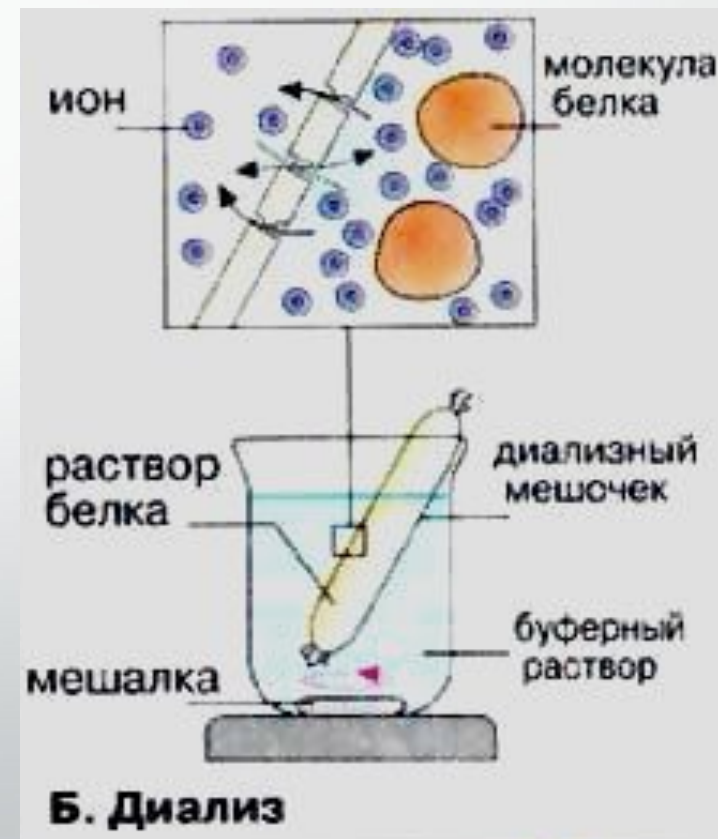
Высаливание

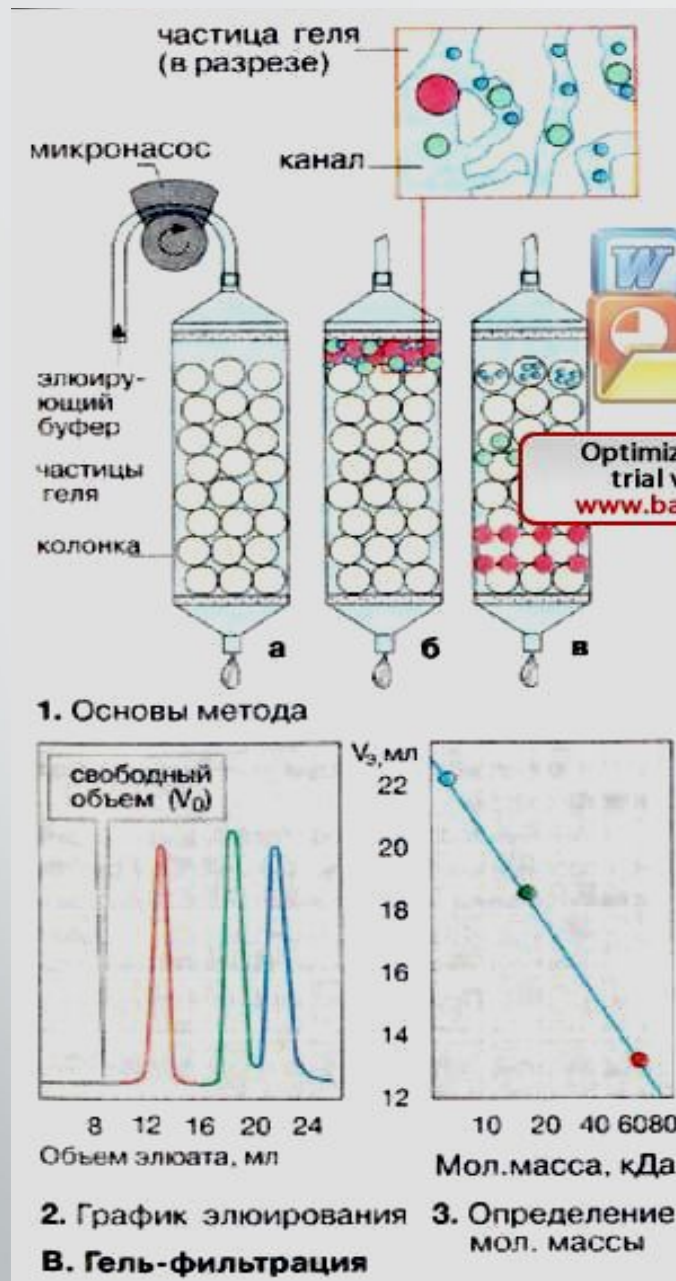


Растворимость белков сильно зависит от концентрации солей (от ионной силы). В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются плохо, однако их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы. При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов (светло-синие кружочки) связывается 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.

Диализ

Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют **диализ**. Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через **полупроницаемые мембраны**, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина pH и др.) будет тот же, что и в окружающем растворе.





Гель-фитрация

Гель-проникающая хроматография (гель-фитрация) позволяет разделить белки по **величине и форме молекул**.

Разделение проводят в хроматографических колонках, заполненных сферическими частицами набухшего полимерного геля (10-500 мкм). Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. Смесь белков вносят в колонку с гелем и элюируют буферным раствором. Белковые молекулы, не способные проникать в гранулы геля (помечены красным цветом), будут перемещаться с высокой скоростью. Средние (зеленого цвета) и небольшие белки (синего цвета) будут в той или иной степени удерживаться гранулами геля. На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций (2). Объем выхода того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы (3).

Электрофореграмма

Электрофорез проводят в тонком слое полиакриламида (2).

После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя. В качестве примера на схеме 3 приведена электрофореграмма трех препаратов: клеточного экстракта, содержащего сотни белков (а); выделенного из экстракта гомогенного белка (б); контрольной смеси белков с известными молекулярными массами (в).

