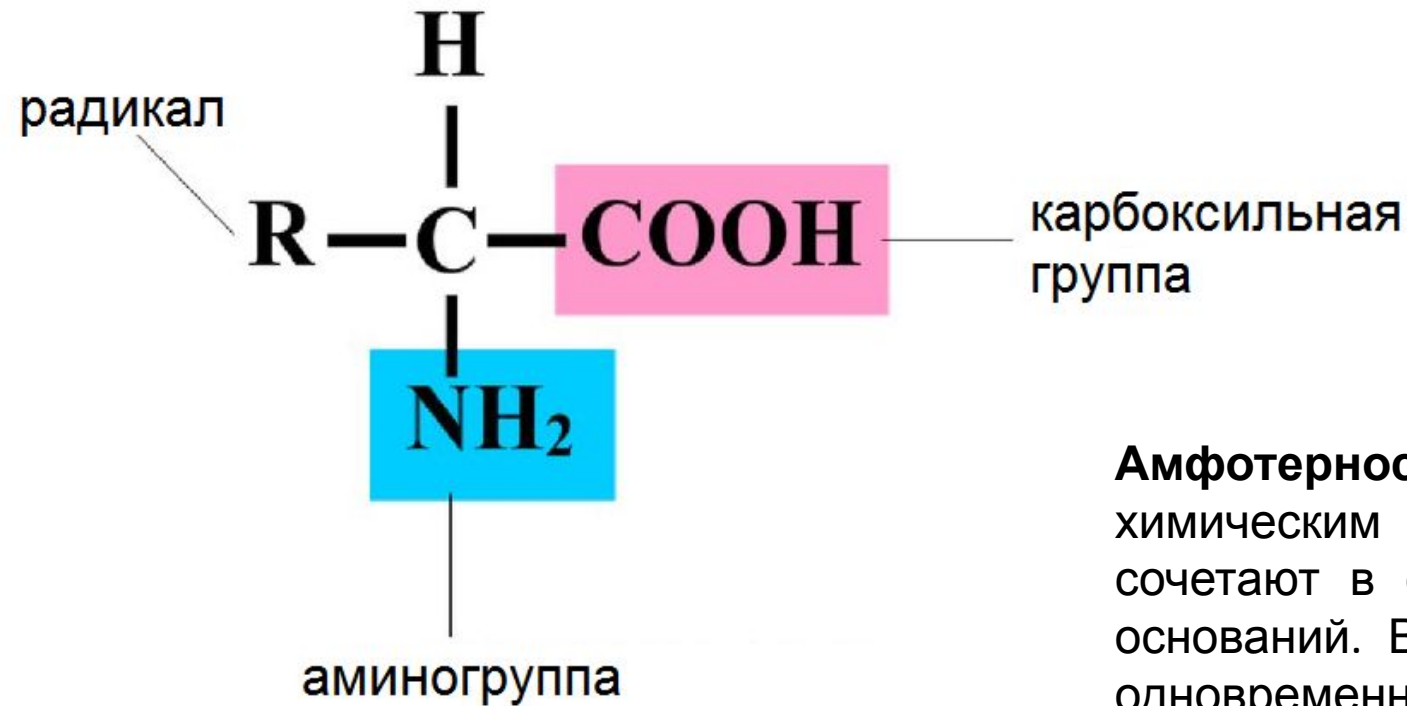


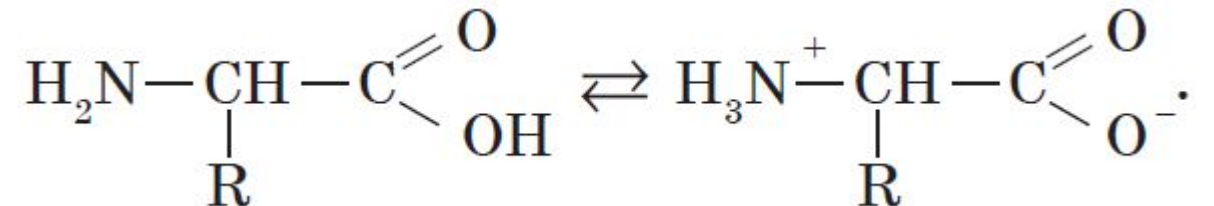
Физико-химические свойства белков. Количественные (колориметрические) методы определения концентрации белка



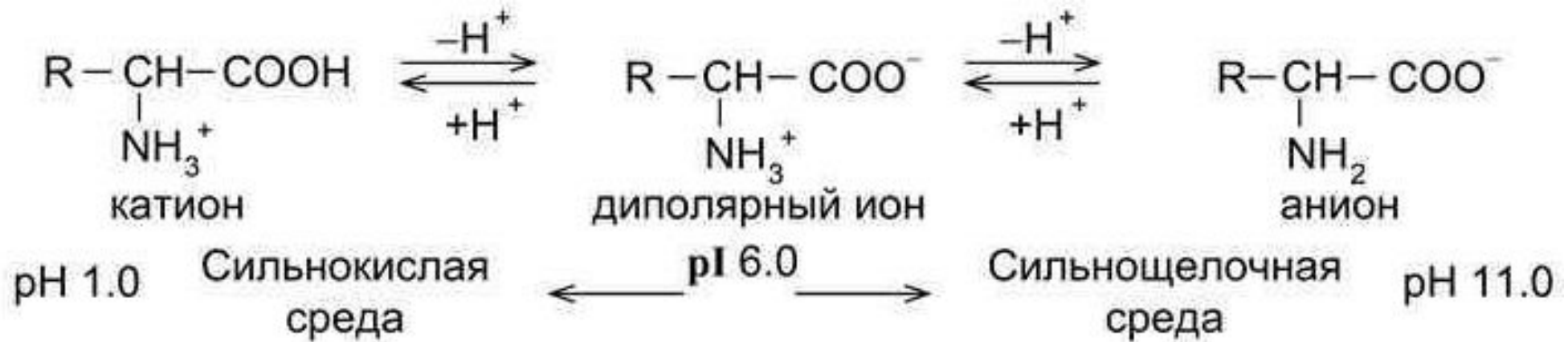
Физико-химические свойства аминокислот



Амфотерность является основным физико-химическим свойством аминокислот, то есть сочетают в себе свойства как кислот, так и оснований. В водном растворе аминокислоты одновременно ведут себя как **кислоты** – доноры протонов и как **основания** – акцепторы протонов.



Кисотно-основные свойства аминокислот



Стандартная аминокислота, содержащая α -карбоксильную и α -аминогруппы, в водном растворе представляет собой **цвиттер-ион**. Такие вещества называют амфотерными. В кислой среде при полном протонировании α -аминокислота является двухосновной кислотой, то есть может отдать два иона водорода.

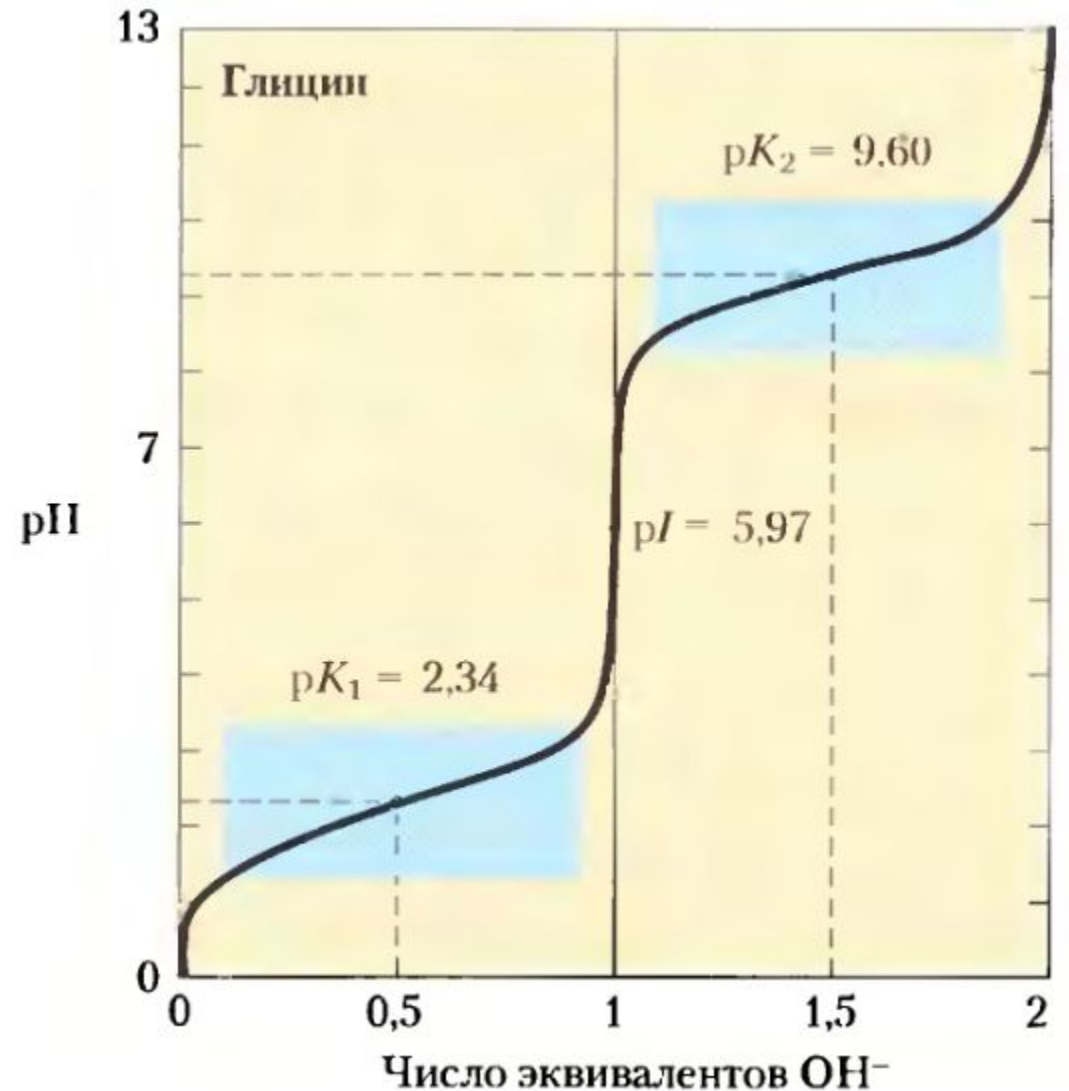
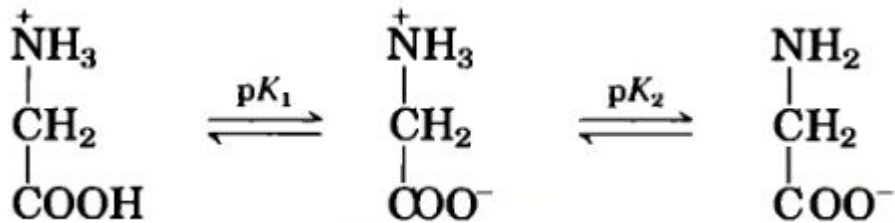
Изоэлектрическая точка – значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю.

Кислотно-основное титрование

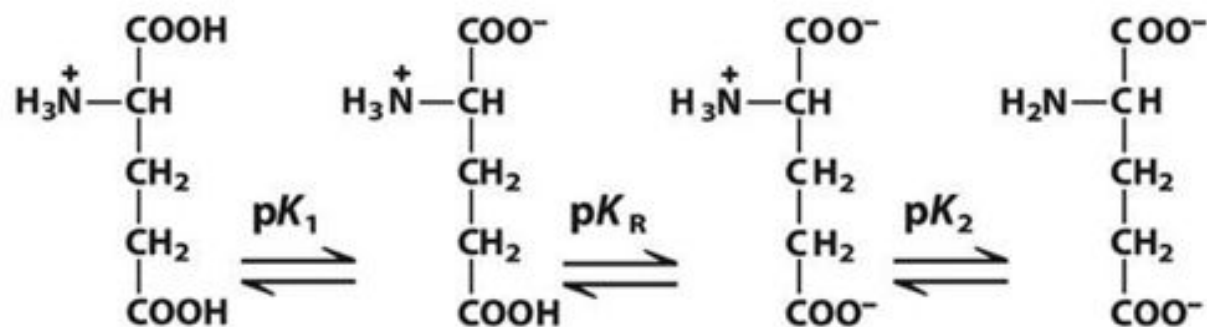
$$\text{pH} = \text{pK}_a - \lg \frac{C(\text{кислоты})}{C(\text{соли})}$$

Изоэлектрическая точка – значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю.

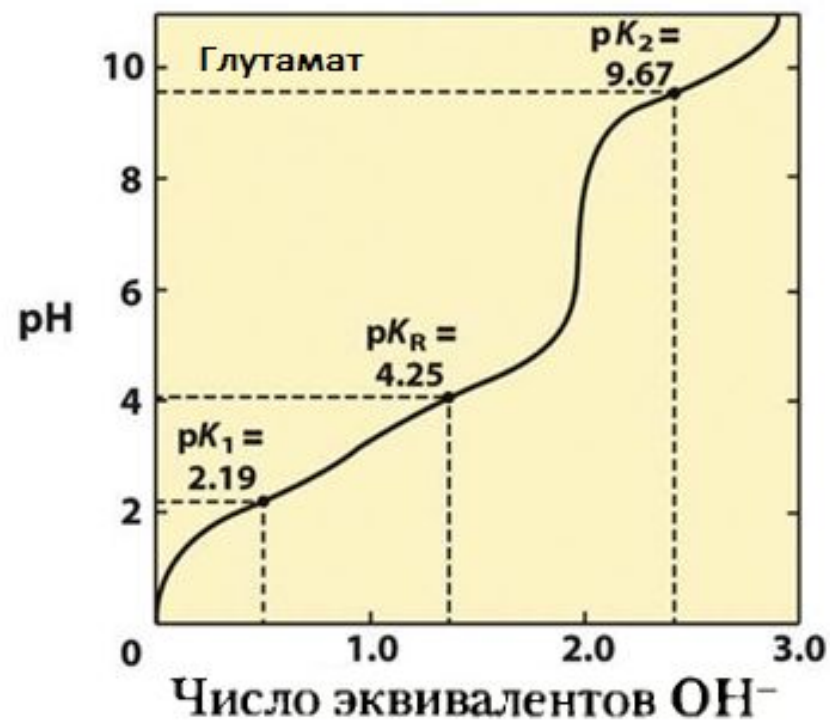
$$\text{pI} = 0,5(\text{pK}_1 + \text{pK}_2) = 0,5(2,34 + 9,60) = 5,97$$



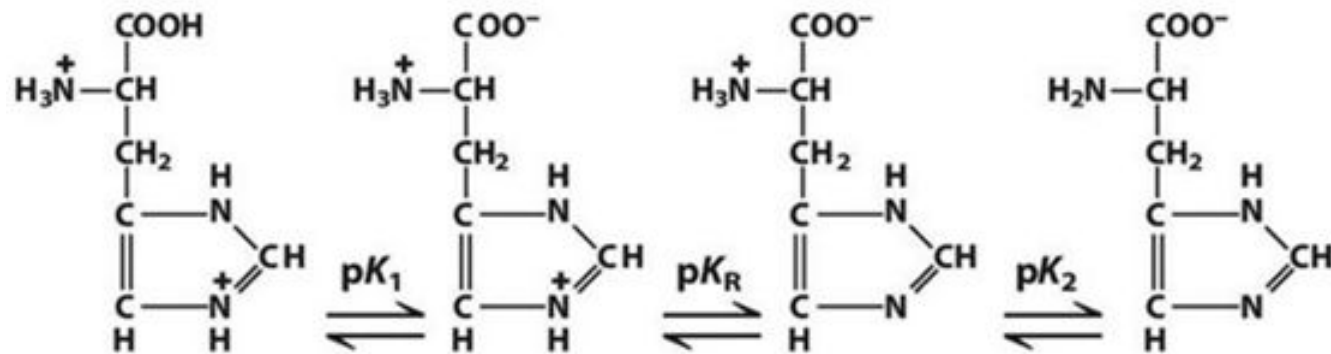
Кисотно-основное титрование кислой аминокислоты



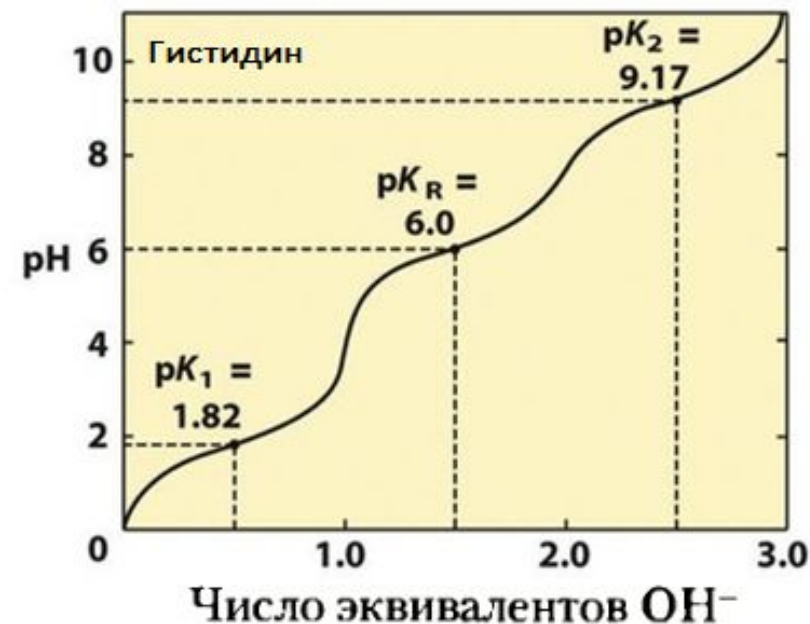
$$pI = 0,5(pK_1 + pK_R) = 0,5(2,19 + 4,25) = 3,22$$



Кисотно-основное титрование основной аминокислоты

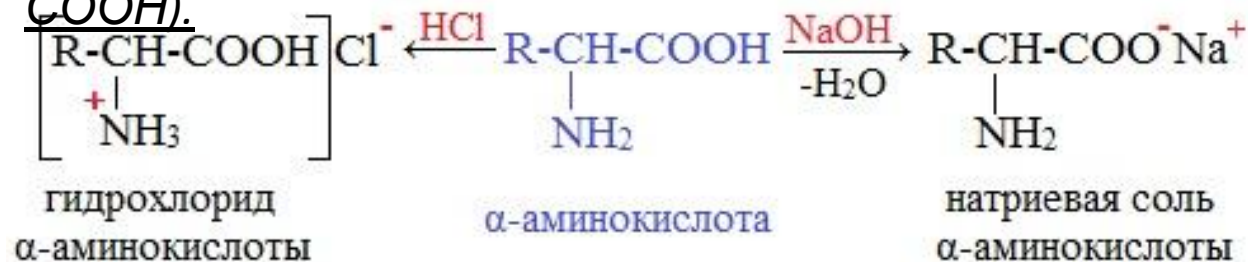


$$pI = 0,5(pK_2 + pK_R) = 0,5(9,17 + 6,0) = 7,59$$

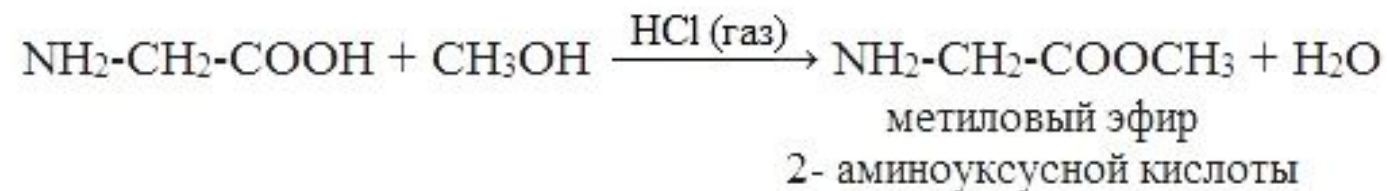


Химические свойства аминокислот

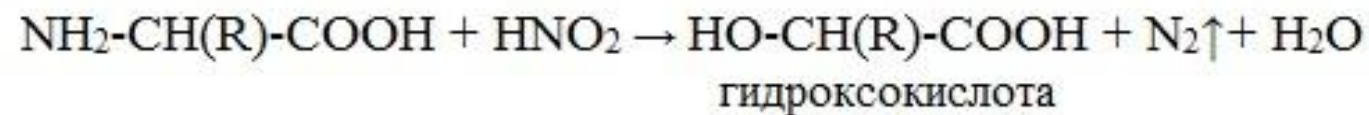
1) Образование солей как с кислотами (по группе NH_2), так и со щелочами (по группе COOH).



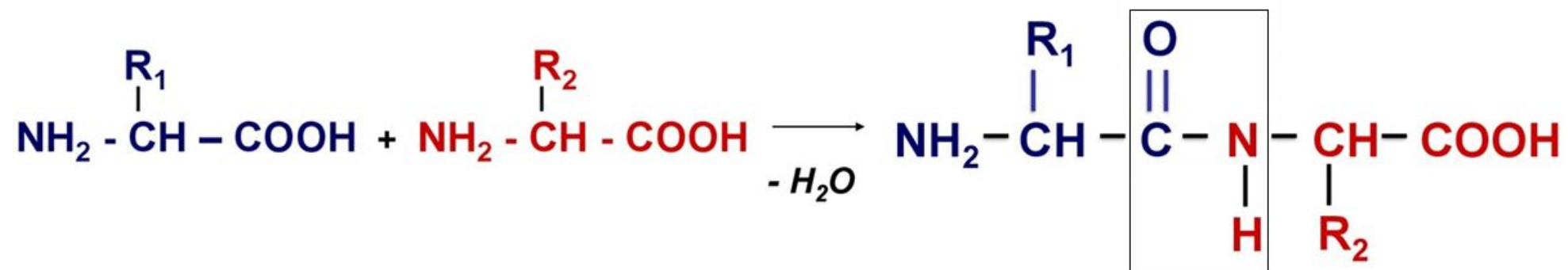
2) Реакция этерификации (образование сложных эфиров).



3) Реакция дезаминирования (метод Ван-Слайка).

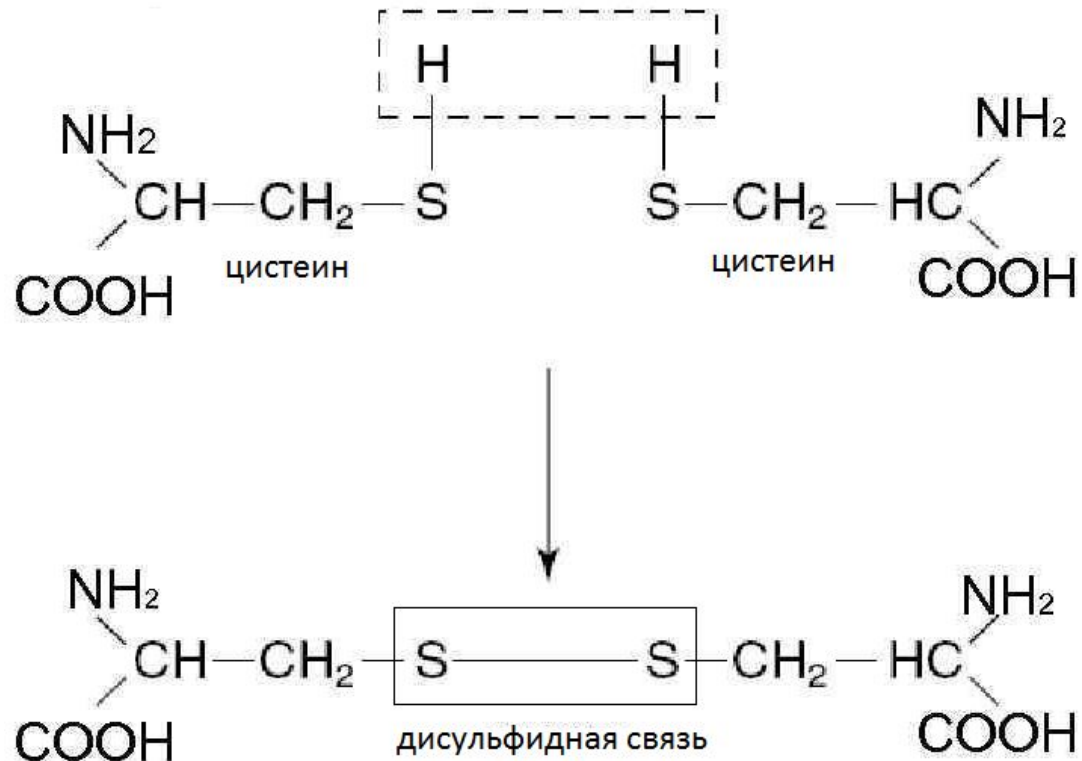


Химические свойства аминокислот

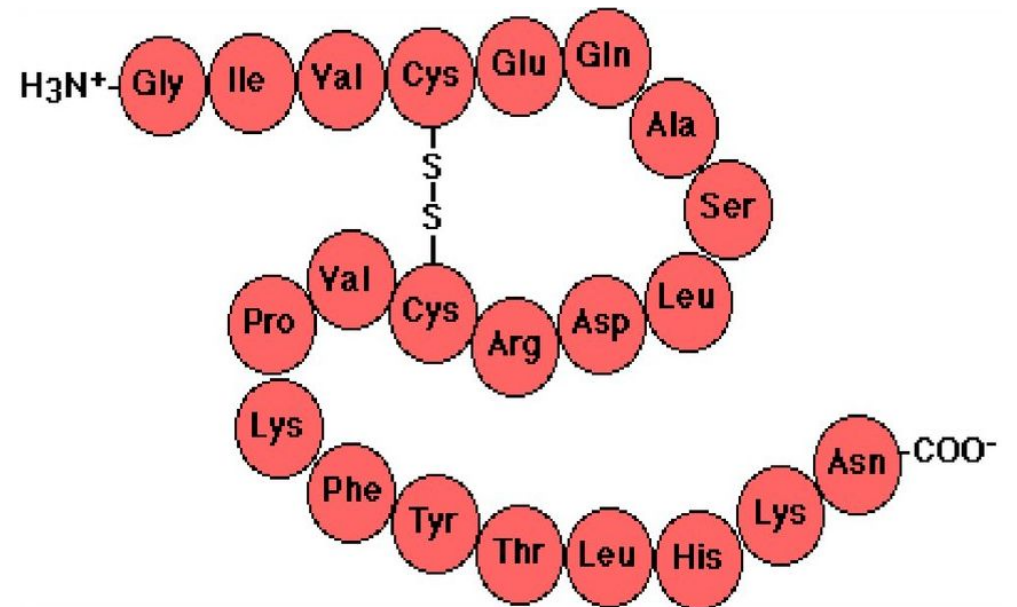


- Все атомы, входящие в пептидную группу находятся в одной плоскости, при этом атомы "Н" и "О" расположены по разные стороны от пептидной связи.
- Радикалы аминокислот по отношению к оси С-Н связи трансориентированы.
- Атомы кислорода и водорода, входящие в пептидную группу, обладают способностью образовывать водородные связи с атомами кислорода и водорода других пептидных групп.
- Длина пептидной связи меньше, чем одинарной связи, она является жесткой структурой, и вращение вокруг нее затруднено.

Образование дисульфидных связей

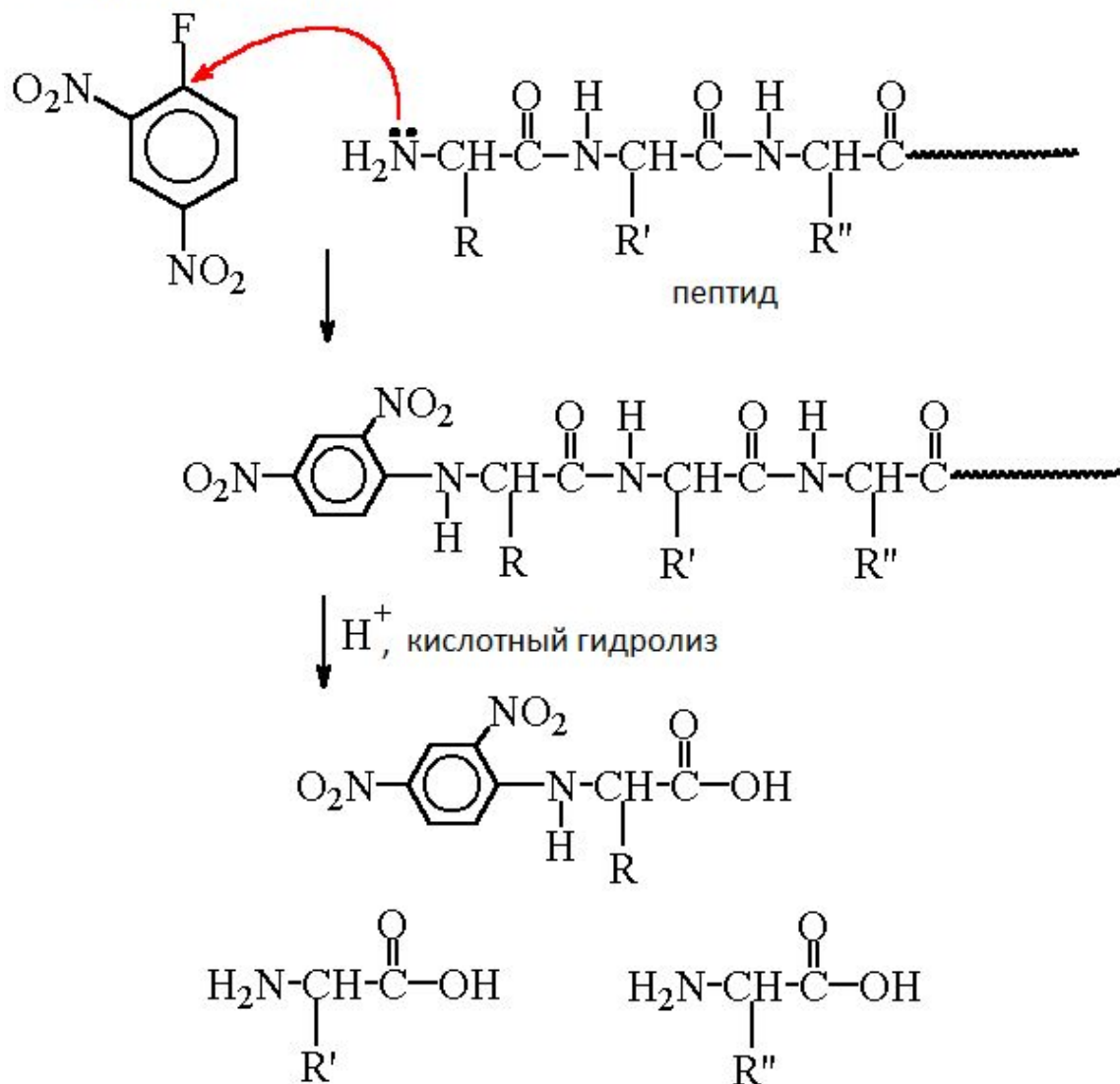


Дисульфидные связи образуются между двумя аминокислотными остатками цистеина, находящимися как в одной, так и в разных полипептидных цепях белка и служат для поддержания третичной и четвертичной структур белка.



Метод Сэнджера

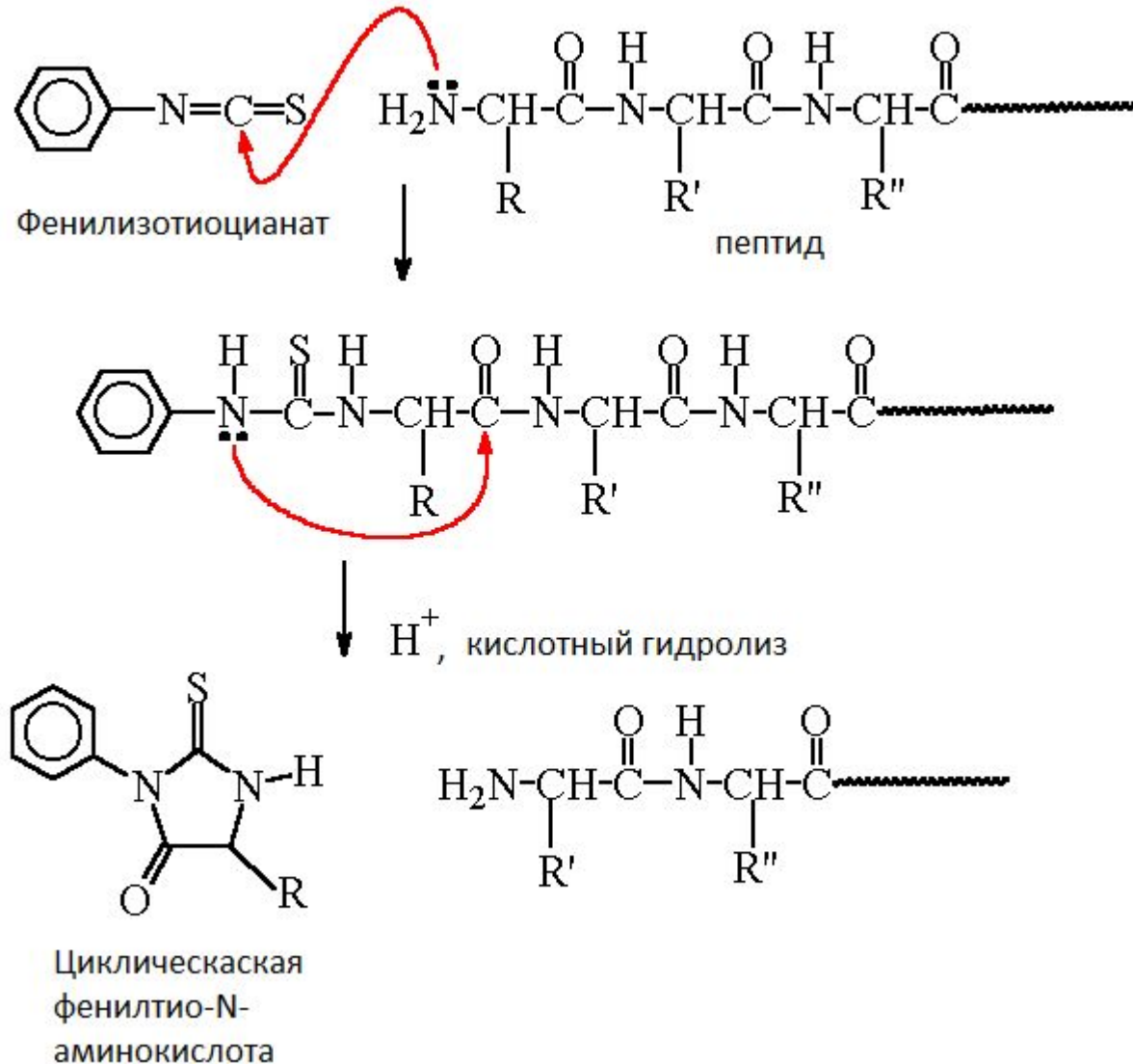
2,4-динитрофторбензол



Метод основан на реакции арилирования N-концевой аминокислоты полипептида 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ), что приводит к образованию окрашенного в желтый цвет 2,4-динитрофенильного производного N-концевой аминокислоты.

После кислотного гидролиза только одна N-концевая аминокислота оказывается связанной с реактивом в виде 2,4-динитрофениламинокислоты. В отличие от других образовавшихся при гидролизе полипептида свободных аминокислот она желтого цвета. Ее идентифицируют методом хроматографии

Метод Эдмана

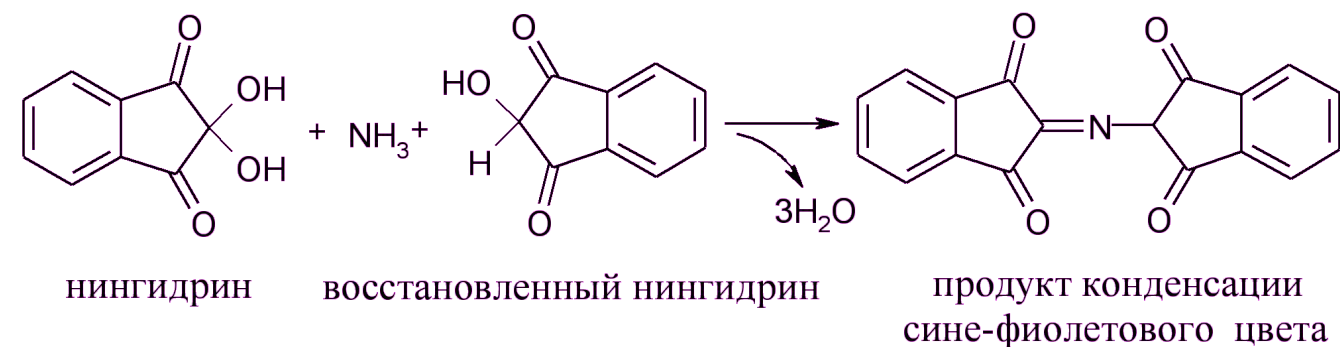
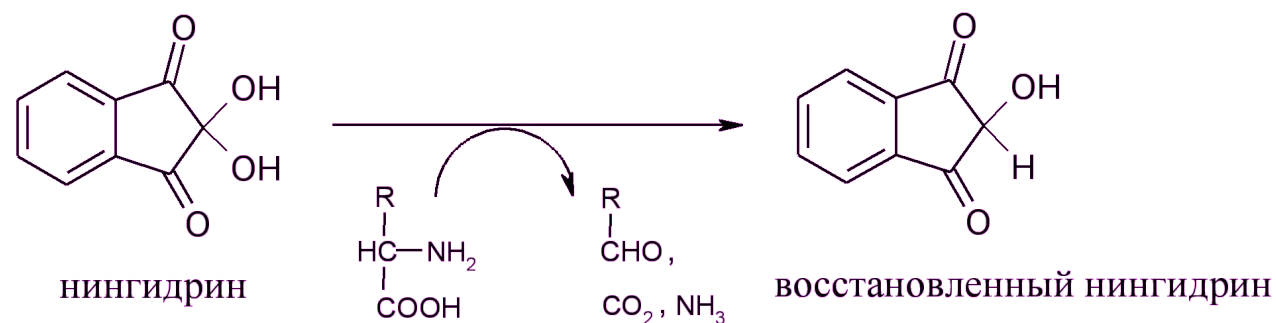


Фенилизотиоцианат реагирует со свободной α - NH_2 -группой N-концевой аминокислоты полипептида с образованием фенилтиокарбамоилпептида.

Укороченный на одну аминокислоту полипептид подвергают дальнейшему анализу. Эту процедуру ступенчатого расщепления пептида с N-конца можно повторять многократно, идентифицируя последовательно одну аминокислоту за другой.

Качественные реакции на аминокислоты

Нингидриновая реакция



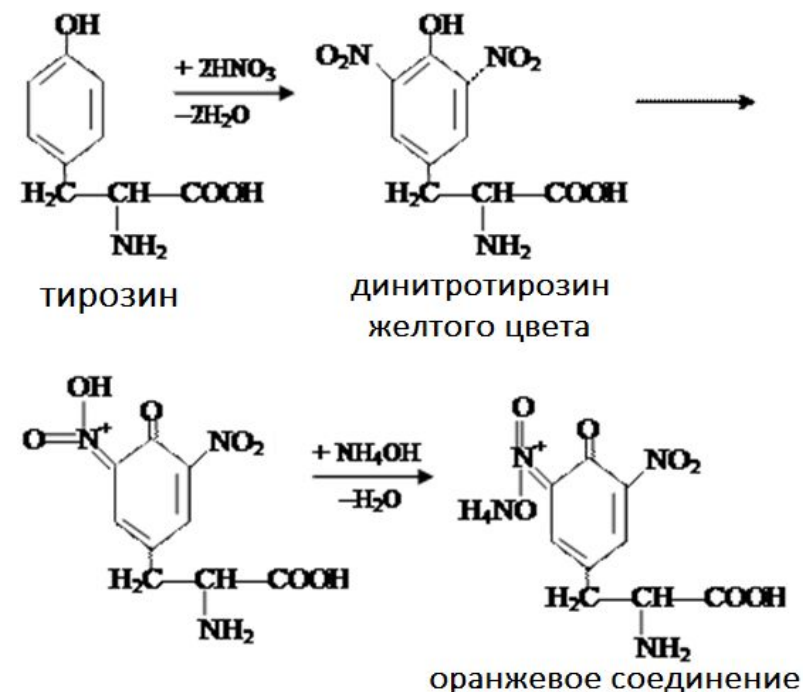
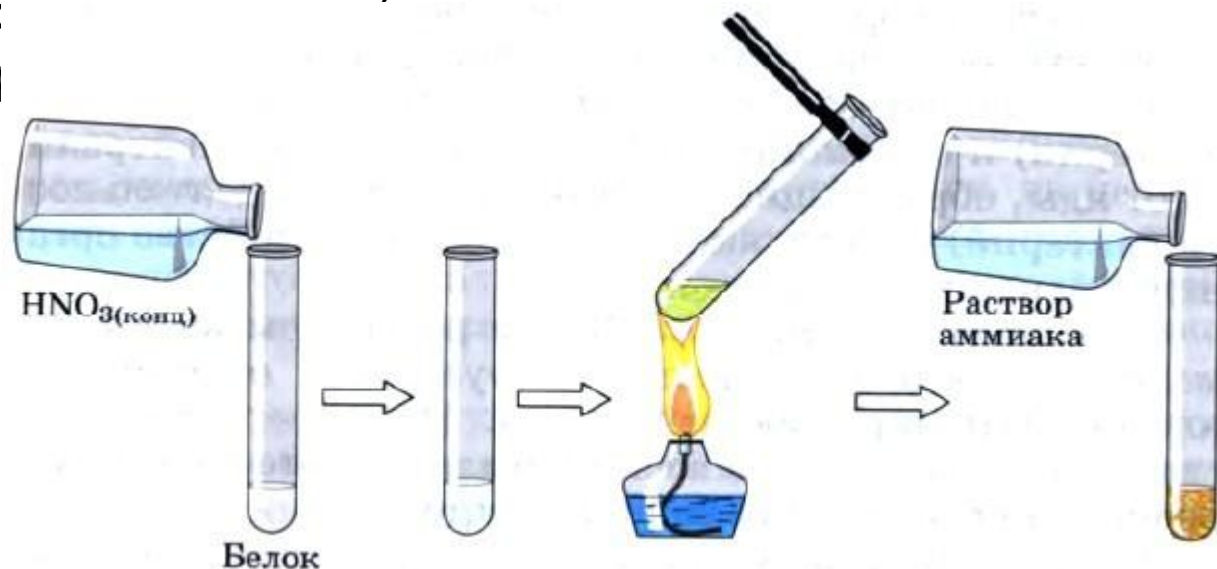
Реакция с нингидрином используется для визуального обнаружения α-аминокислот на хроматограммах, а также для колориметрического определения концентрации аминокислот по интенсивности окраски продукта реакции.



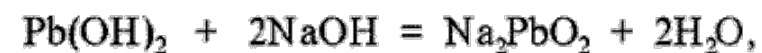
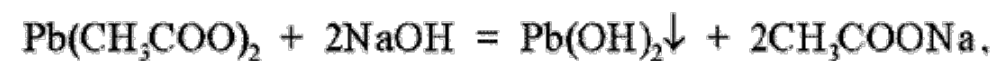
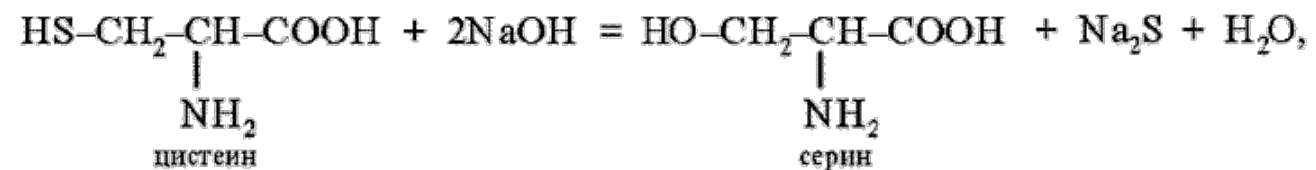
Ксантопротеиновая реакция

Ксантопротеиновая реакция на белки, в которых присутствуют ароматические аминокислоты. Особенностью такой пробы является присоединение нитрогруппы к бензольному кольцу. Результатом такого процесса является образование желтого нитросоединения, которое осаждается. При

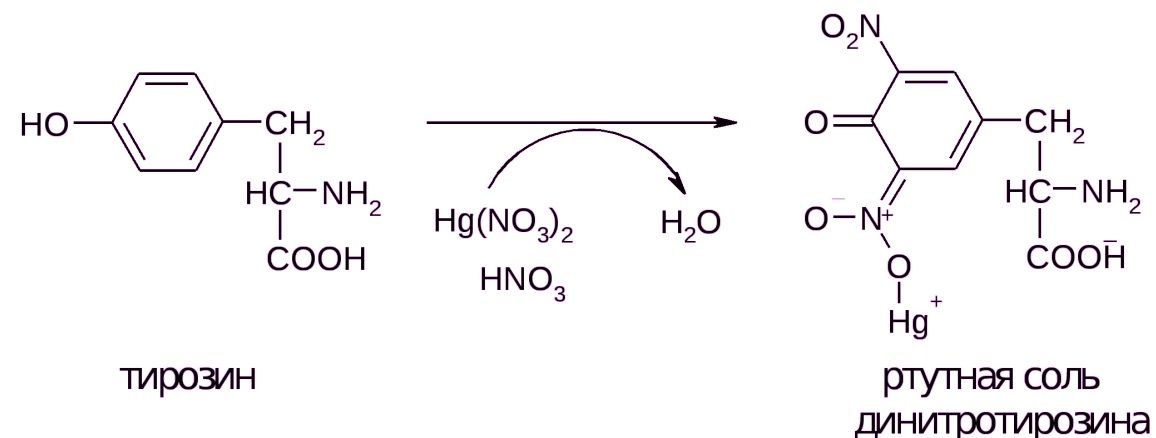
п
о



Реакция Фолы

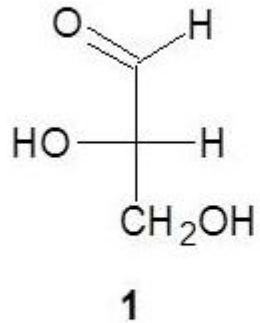


Реакция Миллона

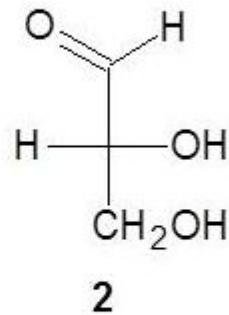


Оптические свойства аминокислот

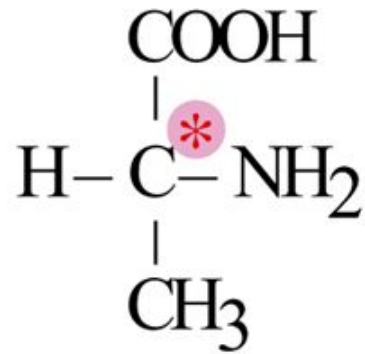
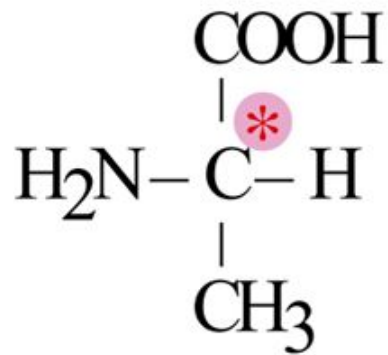
ЭТАЛОН – ГЛИЦЕРИНОВЫЙ АЛЬДЕГИД



L-глицериновый альдегид
(-) – левовращающий изомер



D-глицериновый альдегид
(+) – правовращающий изомер

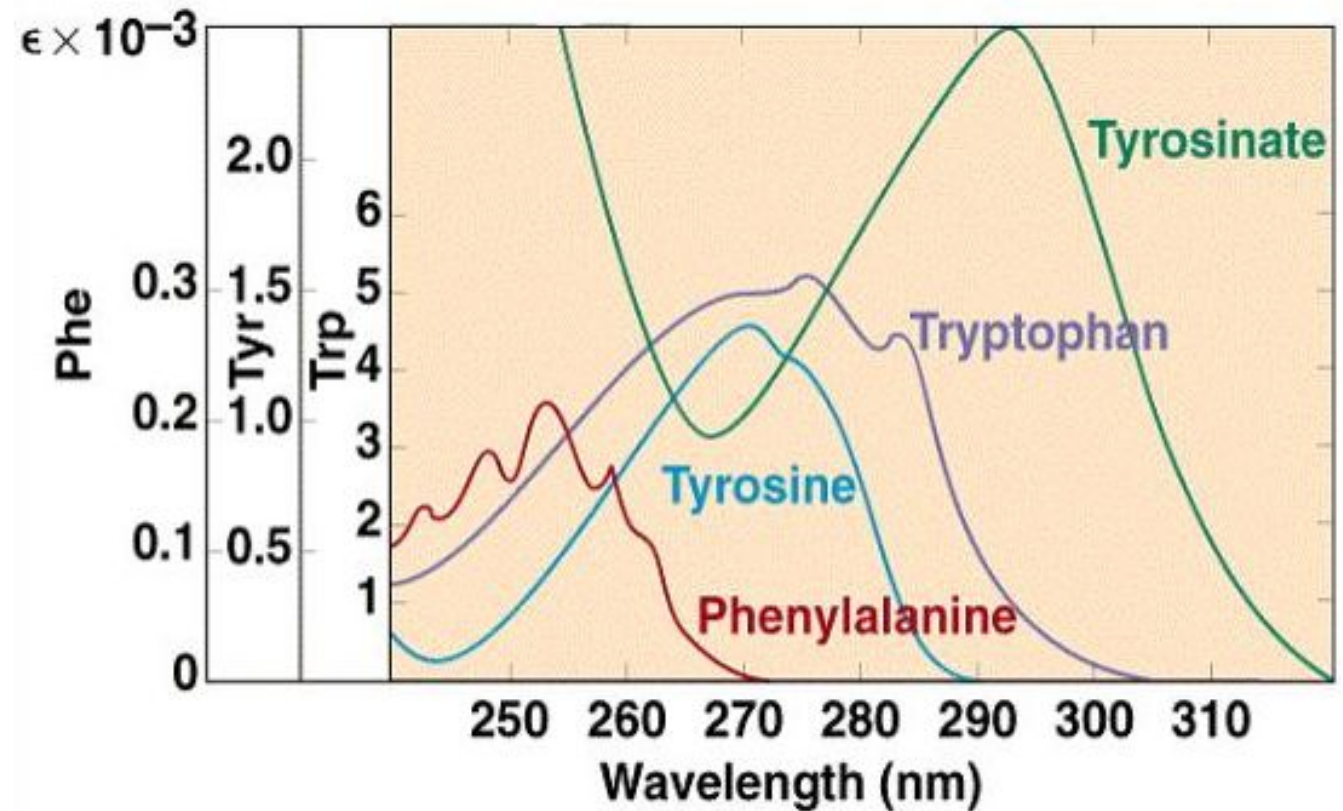


α -аминокислоты имеют асимметричный атом углерода (кроме глицина) и существуют в виде двух стереоизомеров, являющихся зеркальным отражением друг друга.

Почти все природные аминокислоты, получаемые из гидролизатов белков, по конфигурации α -углеродного атома соответствуют L-ряду, то

Оптические свойства аминокислот

Поглощение света белками в области 260-280 нм обусловлено ароматическими аминокислотами: **тирозином** и **триптофаном**. Эти аминокислоты поглощают ультрафиолетовое излучение и разрушаются. Разрушение данных аминокислот приводит к денатурации белков и к инактивации их ферментативной активности.



Методы количественного определения белков



Спектрофотометрические методы

Основаны на способности отдельных химических групп белков и пептидов поглощать лучи света прежде всего в ультрафиолетовой области спектра



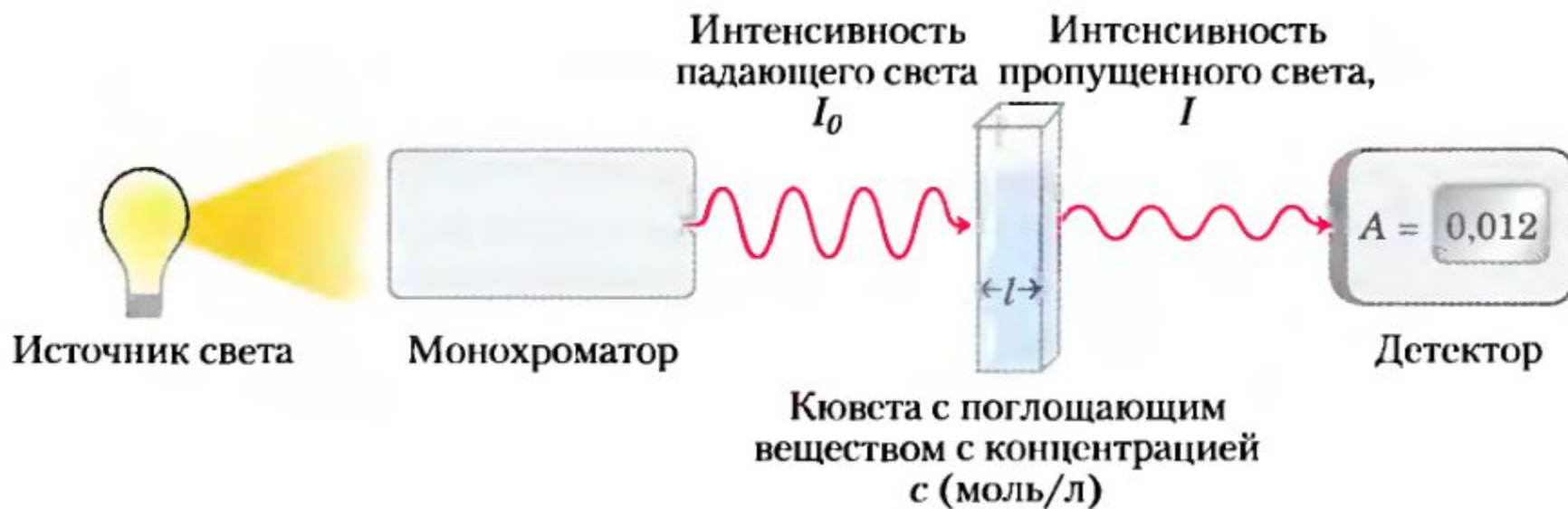
Колориметрические методы

Основаны на образовании окрашенных комплексов с белком, причём интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации белка в растворе

Спектрофотометрический метод определения концентрации белков

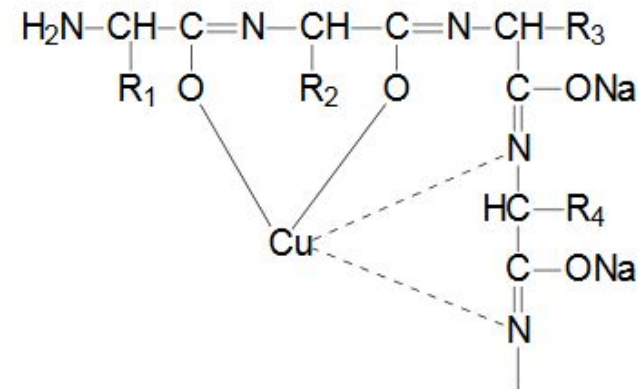
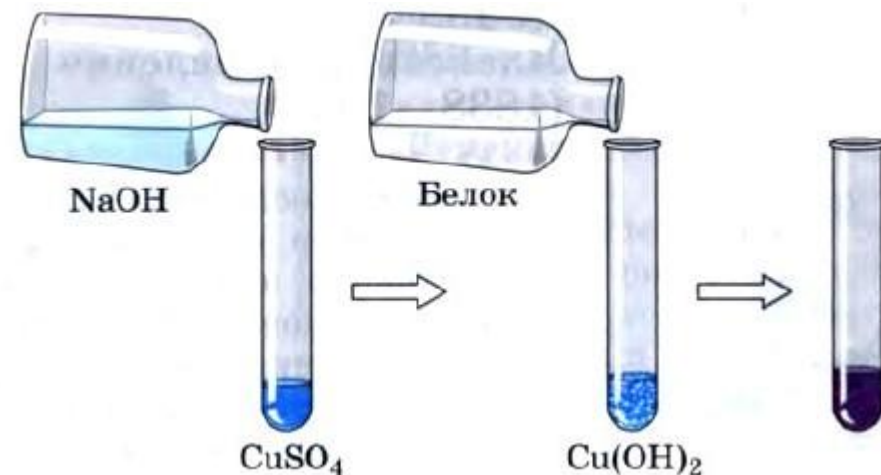
Закон Бугера-Ламберта-Бера

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



Колориметрические методы

Биуретовая реакция – стандартная качественная реакция на пептидную связь в белках. При добавлении к сильно щелочному раствору белка сульфата меди, образуются комплексные соединения меди, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски зависит от длины пептида.



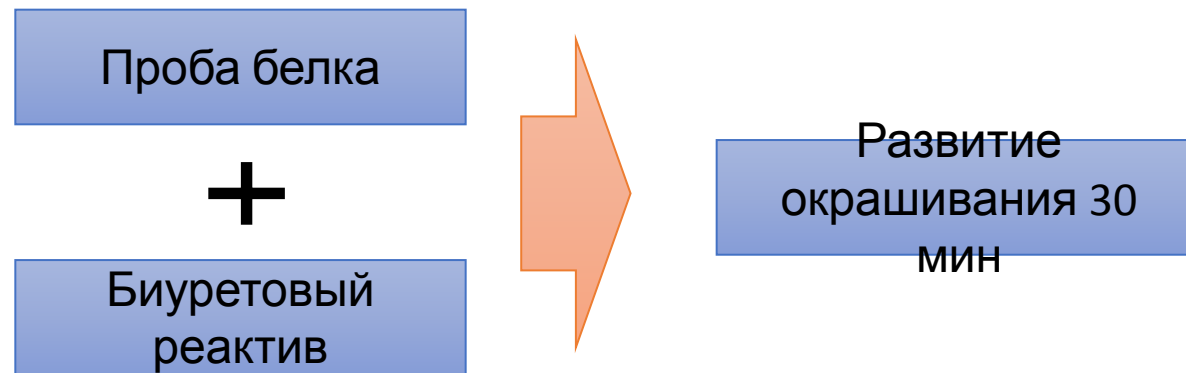
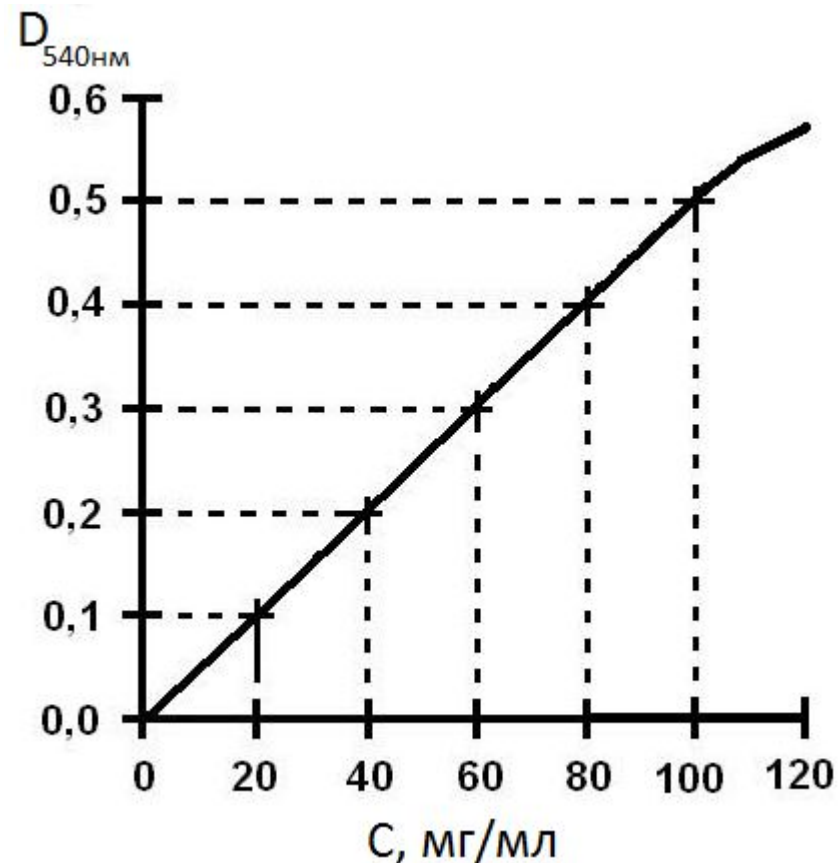
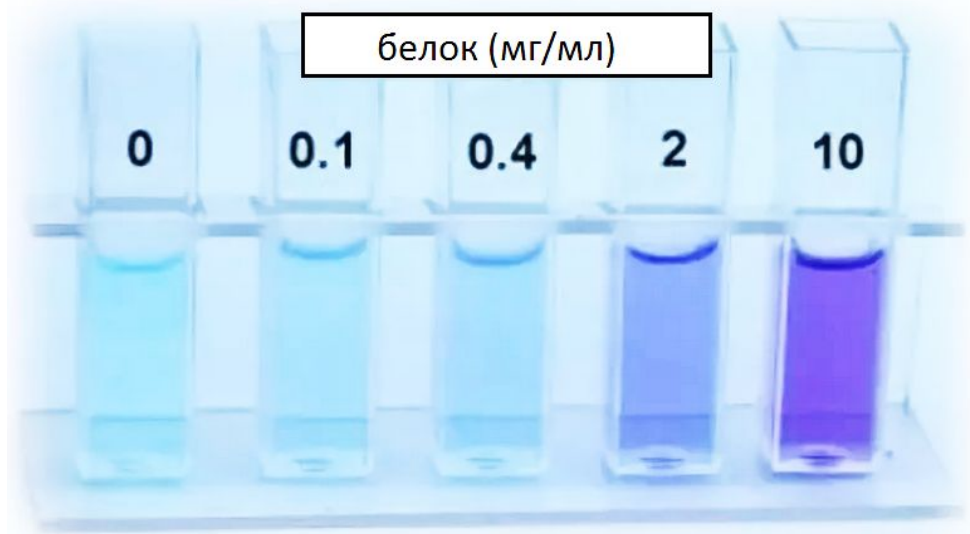
Биуретовый медный
комплекс фиолетового
цвета

Биуретовый метод

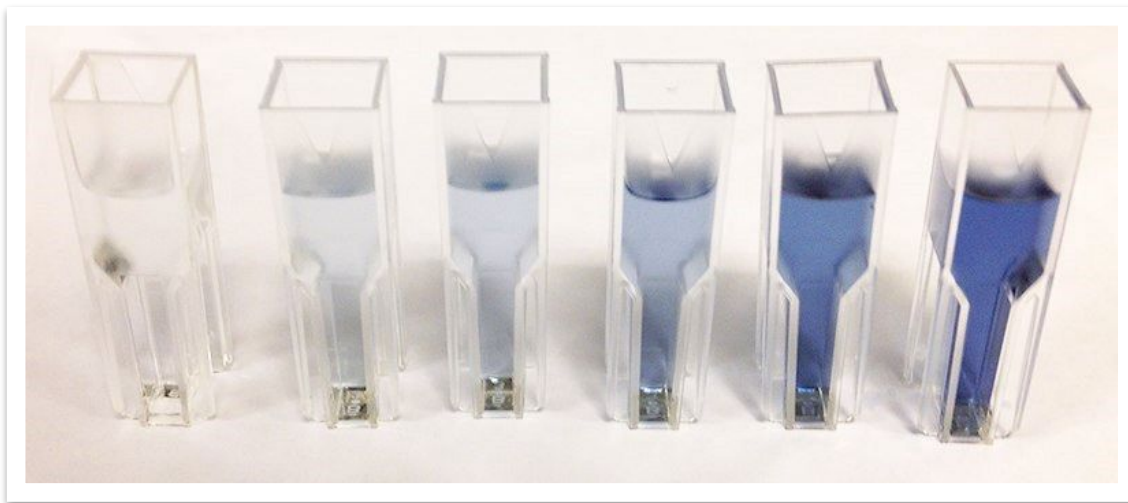
Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса пептидных связей белков с ионами двухвалентной меди.

Чувствительность метода: от 2 до 10 мг белка в пробе.

Колориметрический анализ проводят сравнением поглощения света исследуемым раствором с поглощением проб стандартного ряда. В качестве стандарта используют раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА).



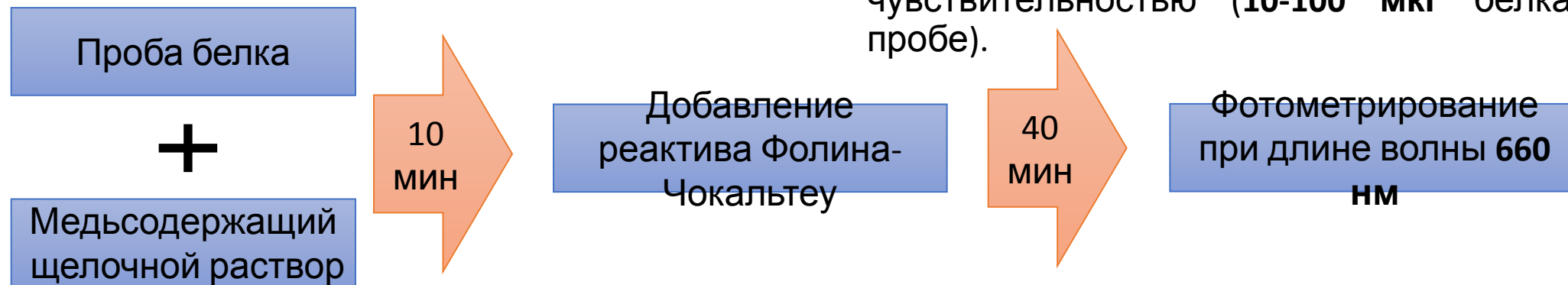
Метод Лоури



В основе метода, как и биуретового, лежит способность ионов двухвалентной меди образовывать окрашенный комплекс с химическими группами пептидных связей.

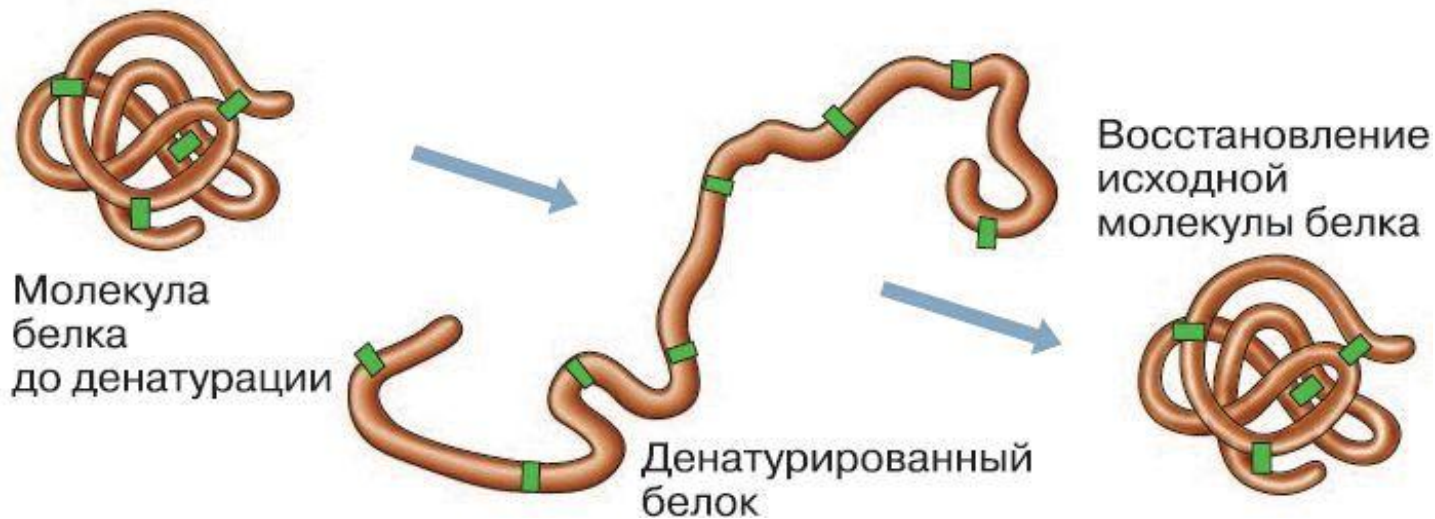
Применение **реактива Фолина-Чокальтеу** (кислый фосфорно-молибденово-фосфорновольфрамный реактив) позволило повысить чувствительность метода благодаря взаимодействию реактива с остатками ароматических аминокислот.

Белки с реактивом Фолина-Чокальтеу в присутствии сернокислой меди и щелочи дают комплексное соединение **синего цвета**. Метод характеризуется высокой чувствительностью (**10-100 мкг** белка в пробе).



Денатурация белков – нарушение трехмерной структуры белка, способное повлечь за собой потерю его функций.

При денатурации происходит разрыв слабых химических, которые стабилизируют четвертичную, третичную и вторичную структуры белковой молекулы. При этом первичная структура белка в процессе денатурации не нарушается, поэтому после раскручивания цепи, белок может снова скручиваться, при этом образуя «случайный клубок», то есть переходит к хаотичному состоянию, отличному от нативной конформации.



Факторы, вызывающие денатурацию:

- высокая температура (более 50 °C);
- интенсивное встряхивание белкового раствора;
- органические вещества (например, этиловый спирт, фенол);
- минеральные кислоты и щелочи;
- соли тяжёлых металлов;
- детергенты — вещества, содержащие гидрофобный углеводородный радикал и гидрофильную функциональную группу (например, мыло).

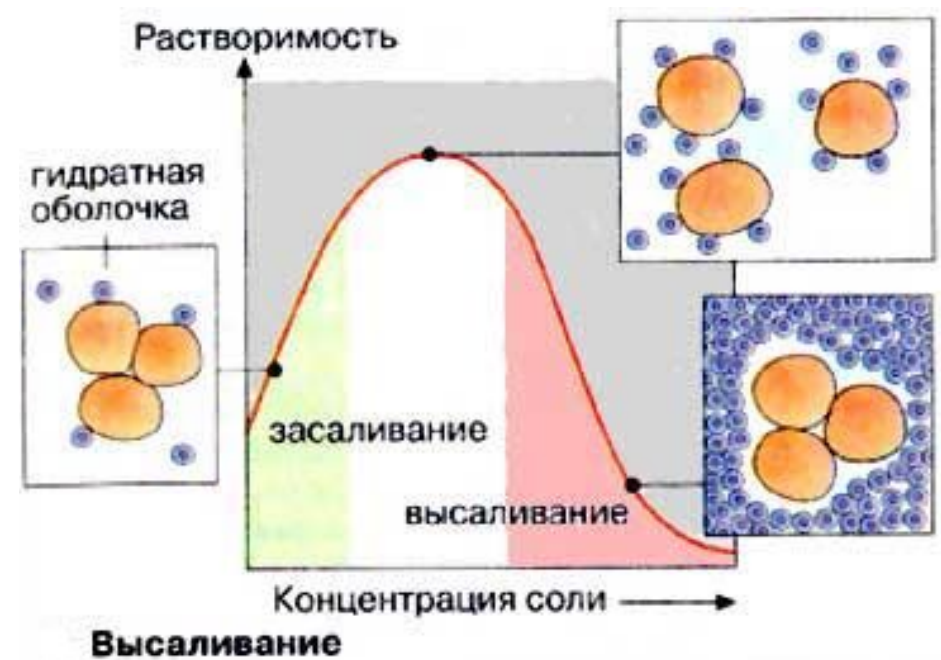
Осаждение белков

Необратимое (использование минеральных и органических кислот)

Это осаждение объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц, так и рядом других причин, например, образованием солей.

Обратимое (высаливание)

В дистиллированной воде белки растворяются плохо, однако их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы. При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов 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**).



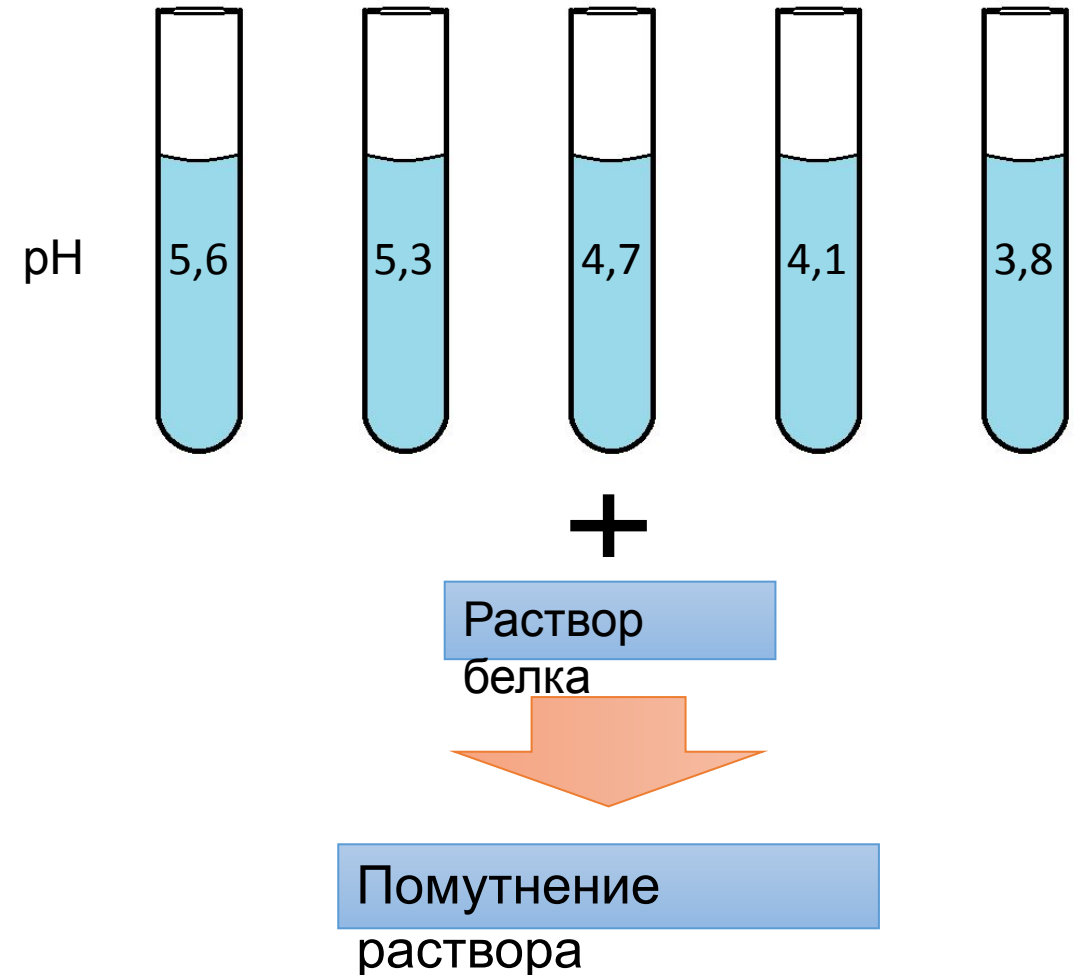
Определение изоэлектрической точки белка

Фактором, определяющим поведение белка как аниона или катиона, является кислотность раствора. При определенном значении pH число положительных и отрицательных зарядов белка сравнивается и в целом заряд белка становится практически равным нулю.

Изоэлектрическая точка белка - значение pH раствора, при котором белок становится электронейтральным.

Растворы белка в изоэлектрической точке наименее устойчивы и выпадают в осадок.

Самый мутный раствор будет содержать наибольшее количество осажденного белка, а значит его pH будет наиболее близок к изоэлектрической точке исследуемого белка



Практическое занятие

Задание 1. Высаливание белков. Обратимость высаливания.

Задание 2. Необратимые реакции осаждения белков (концентрированными минеральными кислотами, органическими кислотами и органическими растворителями – ацетоном).

Задание 3. Определение изоэлектрической точки белка.

Задание 4. Цветные реакции на белки (ксантопротеиновая реакция).

Задание 5. Количественное определение концентрации белка биуретовым методом.

Задание 6. Количественное определение концентрации белка по методу Лоури.

Задание 7. Количественное определение концентрации белка с помощью красителя бромфенолового синего (демонстрационное).