

## ЗАНЯТИЕ 3.4

### БЕЛКИ: СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА. ХАРАКТЕРИСТИКА ВАЖНЕЙШИХ БЕЛКОВ ОРГАНИЗМА

Белки – высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, состоящие из аминокислот, соединенных в полипептидные цепи с помощью пептидных связей. Именно белки являются главным пластическим компонентом клеток и тканей. В мышцах, легких, селезенке, почках на долю белков приходится более 70–80% от сухой массы, а во всем теле человека – 45% от сухой массы.

Белки составляют основу структуры и функции живых организмов. По образному выражению одного из основоположников молекулярной биологии Фрэнсиса Крика, белки важны прежде всего потому, что они могут выполнять самые разнообразные функции, причем с необыкновенной легкостью и изяществом. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены специфичностью объединения этих белков, во многих случаях в виде мультимолекулярных структур, в свою очередь определяющих ультраструктуру клеток и их органелл.

*Цель занятия:* сформировать представление о белках как об уникальных биополимерах, обеспечивающих существование живых организмов.

*Необходимый исходный уровень:* студент должен знать протеиногенные аминокислоты, их классификацию и свойства, образование и характеристики пептидной связи, иметь представление об уровнях организации белковых молекул.

*Основные понятия темы:* белки, протеиногенные аминокислоты, пептидная связь, амфотерность, изоэлектрическое состояние, изоэлектрическая точка, коллоидные свойства, нативная структура белка, фолдинг, высаливание, денатурация.

#### ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Белки - их роль в процессах жизнедеятельности (функции белков).
2. Белки как азотсодержащие биополимеры. Элементный состав белков.
3. Классификация белков: по форме молекулы, по молекулярной массе, по кислотно-основным свойствам, по составу (простые и сложные), по происхождению.
4. Представление об уровнях организации белковой молекулы: первичная, вторичная, третичная, четвертичная структуры (определение, стабилизирующие силы, биологическая роль).
5. Представление о нативной структуре белка и ее формировании (фолдинге).
6. Физико-химические свойства белков: гидрофильность, растворимость, свойства растворов белков, амфотерность, изоэлектрическое

состояние, изоэлектрическая точка, буферные свойства, подвижность в электрическом поле.

7. Факторы устойчивости белков в растворе. Высаливание как обратимое осаждение белков из растворов.

8. Денатурация: определение, денатурирующие агенты, свойства денатурированного белка. Биомедицинское значение явления денатурации.

9. Характеристика некоторых белков: альбумины и глобулины крови, гемоглобин, коллаген, миозин, альфа-кератин, эластин (реферативная работа).

### ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ (домашнее задание)

**Задание 1.** Заполните таблицу в тетради

Типы связей в молекулах белка

Уровень структурной организации белка	Определение структуры	Типы связей, стабилизирующих данную структуру, название и схема
Первичная структура		
Вторичная структура		
Третичная структура		<u>Слабые:</u> 1 2 3 <u>Сильные:</u> 1 2 3
Четвертичная структура		

**Задание 2.** Заполните таблицу в тетради

Сравнительная характеристика видов осаждения белка

Характеристика процесса	Высаливание	Денатурация
Определение		
Факторы, вызывающие эти процессы		

Изменения структурной организации молекулы белка		
Обратимость процессов		
Изменение свойств осажденного белка		

**Задание 3.** Напишите реакцию образования пептида: **тир-асп-лей-лиз**. Назовите пептид, укажите N- и C-край, выделите пептидные связи, укажите незаменимые аминокислоты в его составе. Определите характер пептида. Запишите структуру пептида при  $pH=7,0$ . В какой среде лежит значение его  $pI$ , запишите структуру пептида в изоэлектрическом состоянии. Какая цветная реакция позволяет обнаружить тирозин в составе пептида? Назовите ее и напишите соответствующее уравнение реакции.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### «Исследование физико-химических свойств белков»

#### **Опыт 1. Приготовление яичного белка.**

Неразбавленный белок куриного яйца. Отделяют белок трех куриных яиц от желтков. Считая, что масса белка в одном яйце в среднем =33 г, получают около 100 мл неразбавленного раствора белков куриного яйца. Этот раствор содержит 88% воды, 1% углеводов и 0,5% минеральных веществ; остальное приходится на белок. Таким образом, полученный неразбавленный белок куриного яйца представляет собой примерно 10%-ный раствор белка.

Разбавленный раствор яичного альбумина. Белок одного яйца отделяют от желтка, переносят в колбу и разводят пятикратным объемом воды. Полученный раствор фильтруют через сложенную в два слоя марлю, смоченную водой. На фильтре осаждаются глобулины, в фильтрате содержатся альбумины. Так как, содержание альбуминов в яичном белке составляет =6%, то полученный фильтрат представляет собой =0,5% раствор альбуминов.

#### **Опыт 2. Экстракция белков мышечной ткани**

Характерным компонентом мышечной клетки являются сократительные элементы – миофибриллы. Они содержат сократительные белки - миозин и актин и регуляторные белки тропомиозин и тропонин. Белки миофибрилл не растворяются в воде, но их можно экстрагировать из мышечной ткани солевыми растворами с концентрацией соли 0,5 моль/л. При экстракции мышечной ткани 5%-ным раствором  $KCl$  извлекаются миофибрилярные и саркоплазматические белки.

Для разрушения клеток 2-4 г измельченной ножницами мышечной ткани помещают в ступку, добавляют 2 мл 5%-ного раствора  $KCl$  и растирают до гомогенного состояния. Продолжая экстракцию белков, добавляют еще 8 мл хлорида калия и растирают кашицу в течение 5 мин. По окончании растирания

добавляют еще 10 мл раствора хлорида калия. Полученный экстракт центрифугируют или профильтровывают через два слоя марли.

С полученными растворами альбумина, и экстрактом белков мышечной ткани проводят цветные реакции на пептидные группировки и отдельные аминокислоты. Результаты вносят в таблицу, обозначая интенсивность окраски в крестах:

- +++ (яркая окраска, быстрая скорость развития окраски);
- ++ (выраженная окраска);
- + (слабовыраженная окраска);
- (отсутствие окраски).

### **Опыт 3. Биуретовая реакция на пептидную группировку**

В пробирку вносят 1-2мл раствора белка и прибавляют двойной объем 10%-ного раствора гидроксида натрия, хорошо перемешивают и добавляют 2-3 капли 1%-ного раствора сульфата меди (II). Снова тщательно перемешивают.

### **Опыт 4. Реакция Сакагучи (на аргинин)**

В пробирку наливают 2мл раствора белка, прибавляют 2мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола. Хорошо перемешивают содержимое пробирки, приливают 0,5мл раствора гипобромита натрия и вновь перемешивают. Добавляют 1мл 40%-ного раствора мочевины для стабилизации развивающегося оранжево-красного окрашивания (записать уравнение реакции).

### **Опыт 5. Реакция Паули (на гистидин)**

К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты прибавляют 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита калия, сильно встряхивают и немедленно прибавляют сначала 2мл 0,01%-ного раствора белка, а затем, после перемешивания, 6мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнево-красная окраска вследствие реакции азосочетания гистидина и диазопроизводного сульфаниловой кислоты.

### **Опыт 6. Реакция Фоля ("на слабосвязанную серу" - цистеин)**

В пробирку наливают 0,5-1мл неразбавленного белка, добавляют двойной объем концентрированного раствора щелочи (30%), помещают в пробирку несколько "кипятильников" и осторожно кипятят смесь (жидкость может выбросить!). К горячей щелочной жидкости приливают раствор плюмбита натрия (к 1мл ацетата свинца добавляют по каплям раствор щелочи до растворения образующегося сначала осадка гидроксида свинца), развивается желто-бурое или черное окрашивание.

### **Опыт 7. Ксантопротеиновая реакция (на тирозин)**

К 1мл раствора белка добавляют 5-6 капель концентрированной азотной кислоты до появления белого осадка или мути от свернувшегося белка. Смесь нагревают. При нагревании раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При этом осадок почти полностью растворяется.

*Результат:*

## Сравнительная характеристика аминокислотного состава исследуемых белков

Исследуемый белок	Интенсивность цветной реакции				
	Биуретовая реакция на пептидную связь	Реакция Сакагучи на аргинин	Реакция Паули на гистидин	Реакция Фоля на цистеин	Ксантопротеиновая реакция на тирозин
Яичный альбумин					
Экстракт белков мышечной ткани					

*Вывод об аминокислотном составе белков:*

### **Опыт 8. Исследование денатурации белка**

*Денатурация белка концентрированными минеральными кислотами.*

В три сухие пробирки наливают по 2 мл концентрированной азотной, серной и соляной кислот, затем в каждую пробирку осторожно, держа пробирку под углом 45°, наклоняют 1 мл раствора яичного белка так, чтобы он не смешивался с кислотой. На границе двух слоев жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого белого кольца. При встряхивании осадки растворяются в соляной и серной кислоте (за счет перезарядки денатурированных молекул).

*Денатурация белка органическими кислотами.*

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в одну - несколько капель 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, в другую - несколько капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. В обоих случаях наблюдается выпадение осадка (отметить консистенцию осадка).

*Денатурация белка солями тяжелых металлов.*

Метод основан на связывании ионов тяжелых металлов (ртути, серебра, меди, свинца и других ТМ) с функциональными группами боковых радикалов аминокислот в молекуле белка, после чего разрушается ее пространственная структура и происходит осаждение денатурированного белка. Данное свойство используется в медицинской практике: белки применяются в качестве противоядия при отравлении солями тяжелых металлов.

В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и медленно по каплям при встряхивании прибавляют в одну из них раствор сульфата меди, а в другую - раствор ацетата свинца. При добавлении избытка солей тяжелых металлов (кроме нитрата серебра и хлорида ртути (II)) происходит растворение первоначально образующегося осадка из-за адсорбции иона металла и приобретение вследствие этого белковой молекулой положительного заряда.

*Наблюдение:*

*Вывод:*