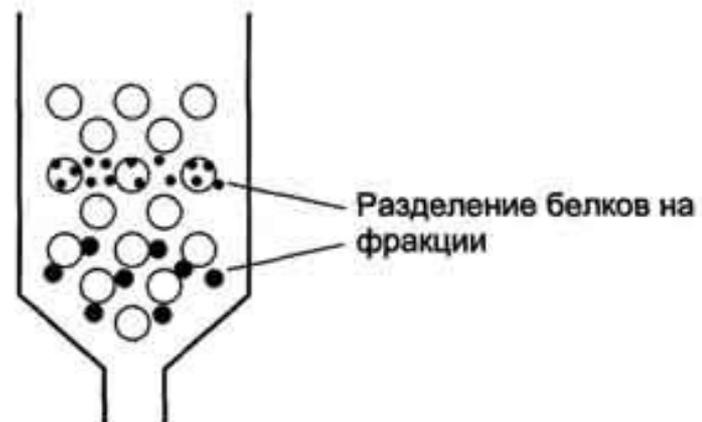
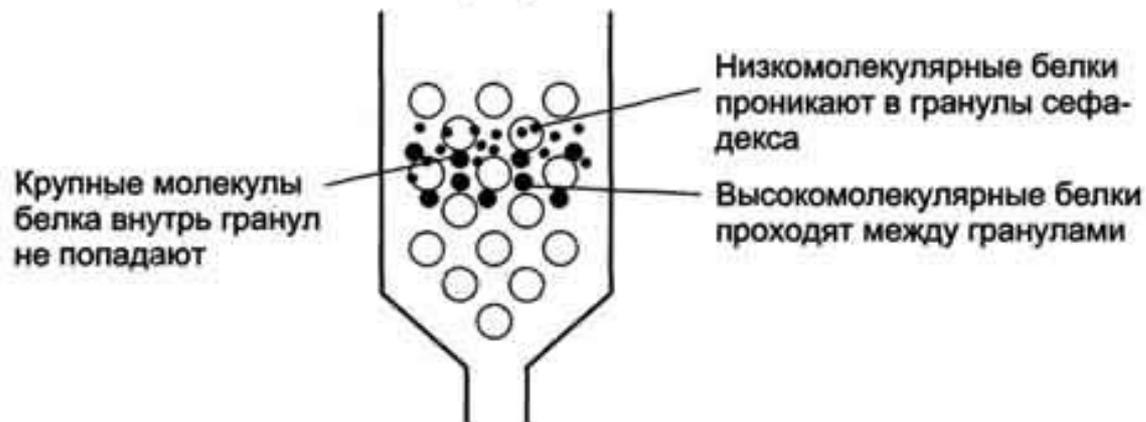
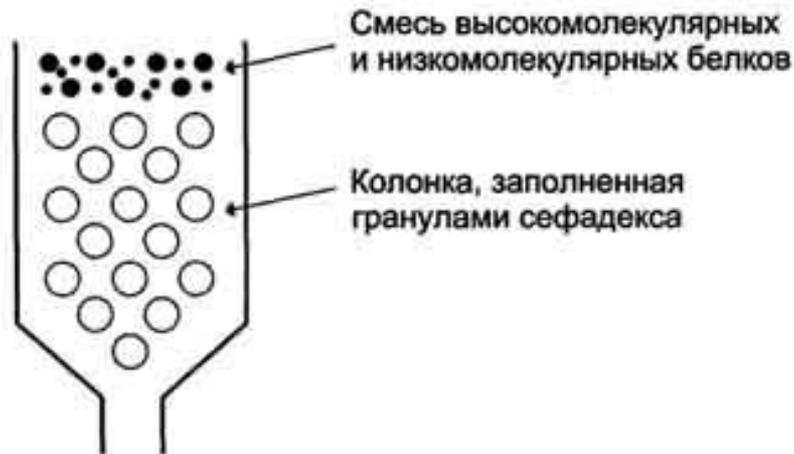
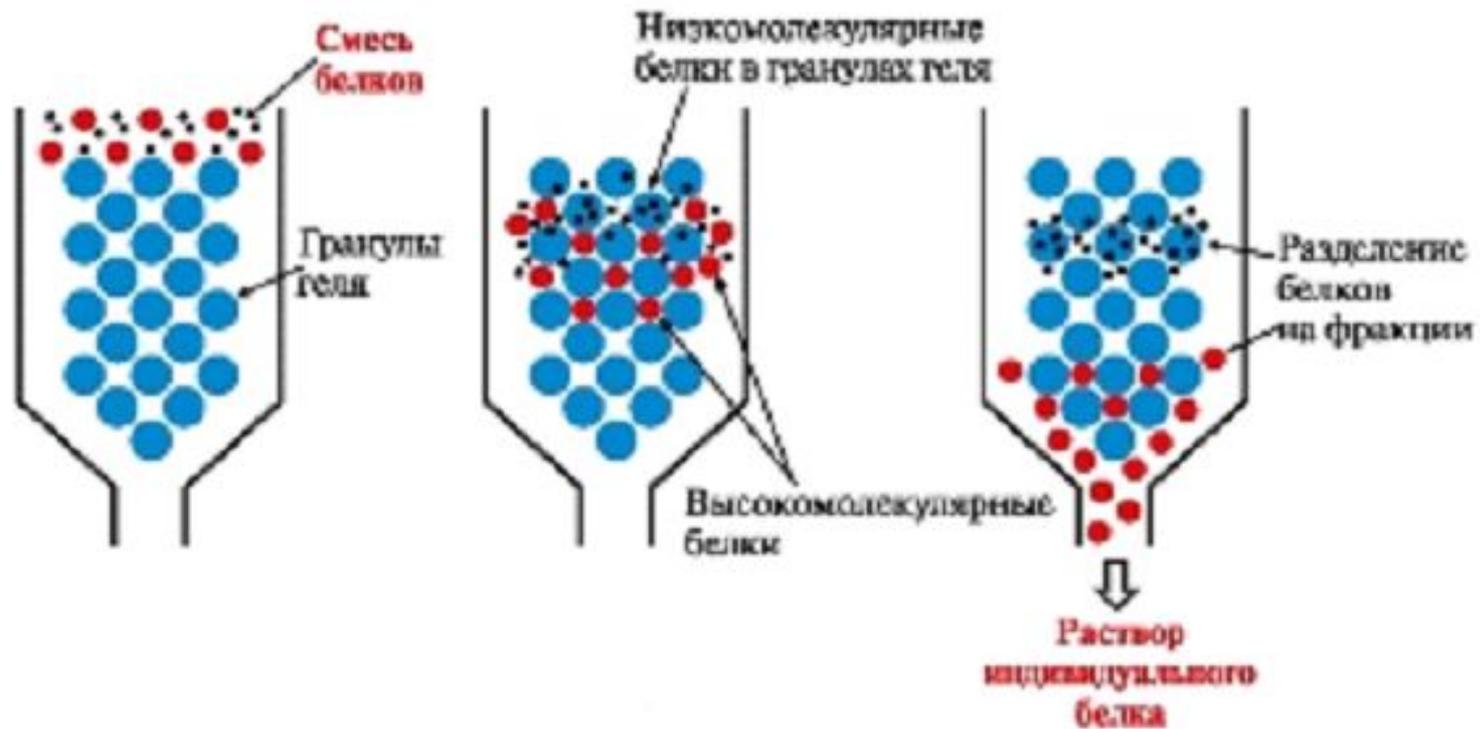


Примеры методов разделения белков (фракционирования)

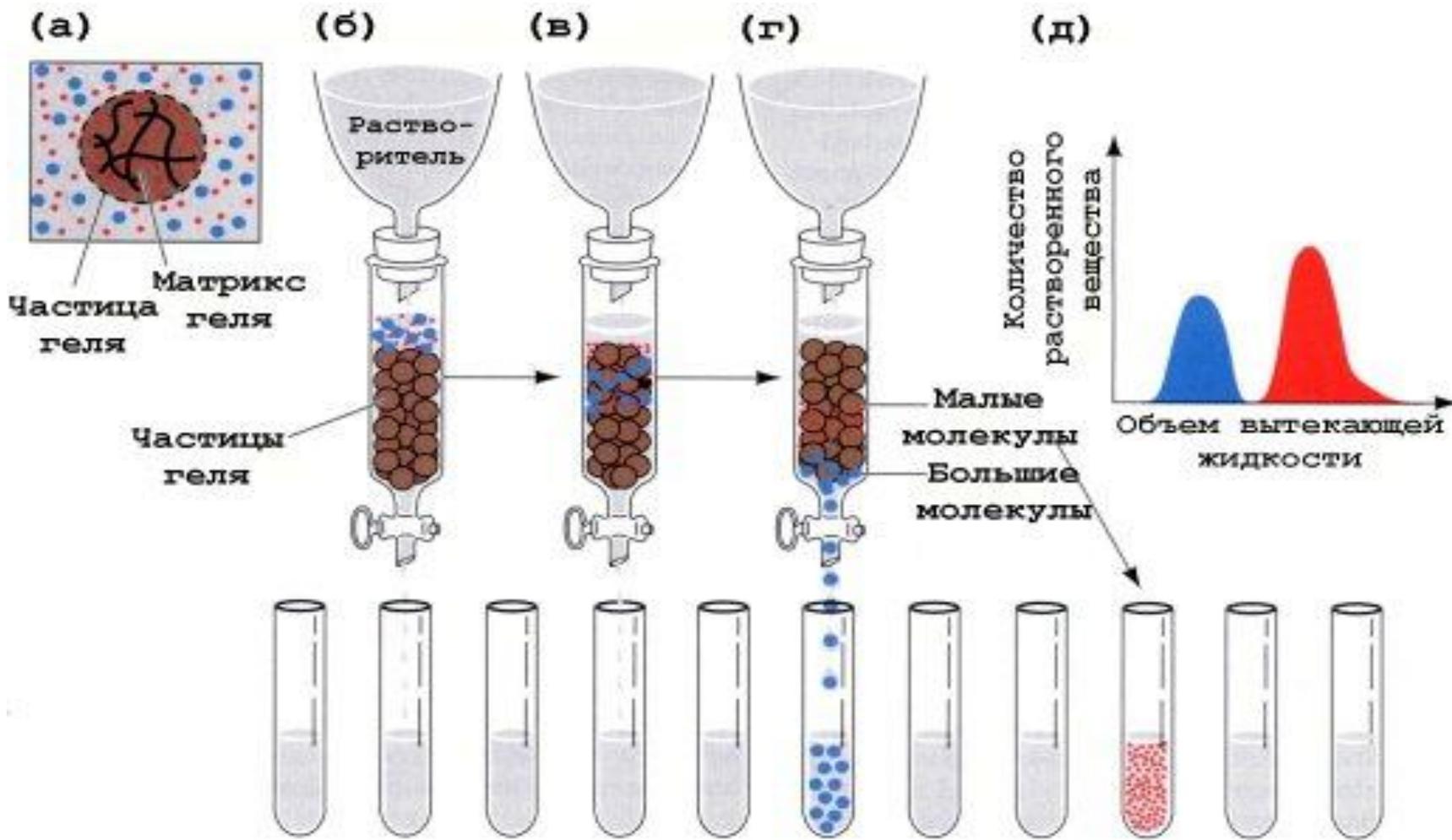
Хроматография – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.



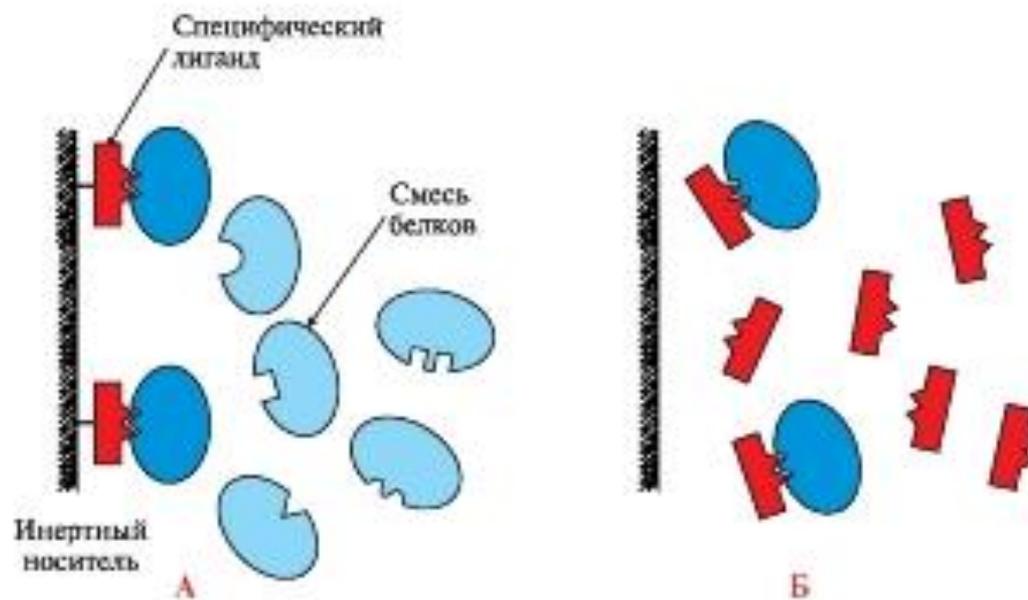
**Разделение смеси белков
методом гель-фильтрации**



Разделение смеси белков методом гель-фильтрации



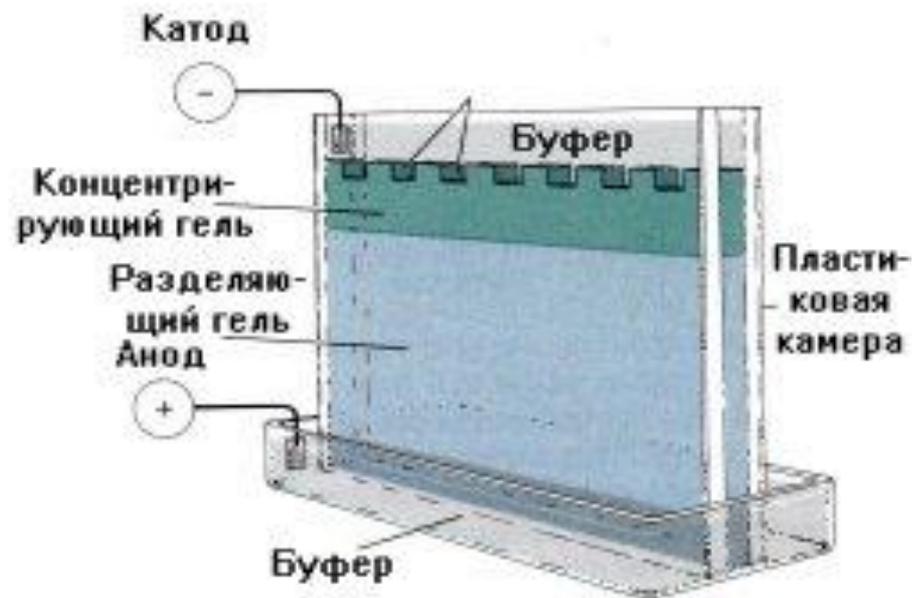
Разделение смеси белков методом гель-фильтрации



Аффинная хроматография



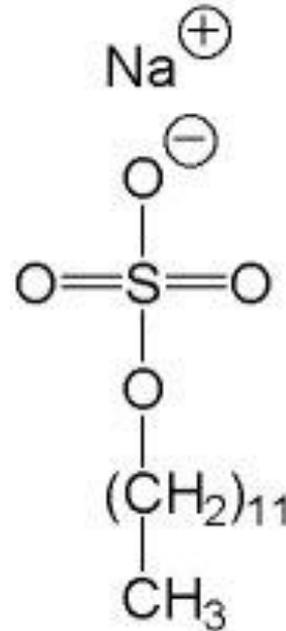
Ультрацентрифугирование



Методом электрофореза можно разделить белки по молекулярной массе. Для этого используют электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na).

ДДС-Na является амфифильным веществом и содержит заряженную группу и гидрофобную. Белки связываются с ДДС-Na своими гидрофобными радикалами и при этом денатурируют. Таким образом, белки выравниваются по форме и заряду. После этого подвижность белка при электрофорезе зависит только от его молекулярной массы.

Додецилсульфат натрия (ДДС-Na)



В клетках в процессе синтеза полипептидных цепей, их транспорта через мембраны в соответствующие отделы клетки, в процессе **фолдинга** (процесс сворачивания полипептидной цепи в правильную пространственную структуру) и при сборке олигомерных белков, а также в период их функционирования в структуре белков возникают промежуточные, склонные к агрегации, нестабильные конформации. Гидрофобные радикалы, в нативной конформации обычно спрятанные внутри белковой молекулы, в нестабильной конформации оказываются на поверхности и стремятся к объединению с такими же плохо растворимыми в воде группами других белков. В клетках всех известных организмов обнаружены специальные белки, которые обеспечивают оптимальный фолдинг белков клетки, стабилизируют их нативную конформацию при функционировании и, что особенно важно, поддерживают структуру и функции внутриклеточных белков при нарушении гомеостаза. Эти белки получили название «шапероны» (**Hsp70**), что в переводе с французского обозначает «няня».

Процессинг белков.

Большинство белков синтезируется в виде предшественников, не обладающих нативной структурой. Процесс превращения белка-предшественника в структурно и функционально зрелый белок называется **созреванием или процессингом**. У разных белков процессинг протекает различно, однако можно выделить отдельные этапы процессинга:

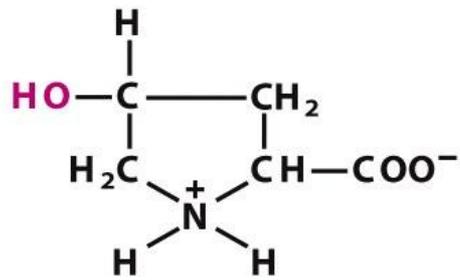
Образование дисульфидных связей между боковыми радикалами остатков цистеина, стоящих на разных участках полипептидной цепи.

Расщепление одной или большего числа определенных пептидных связей и превращение полипептида-предшественника в конечный продукт (ограниченный протполилиз, прицельный протеолиз).

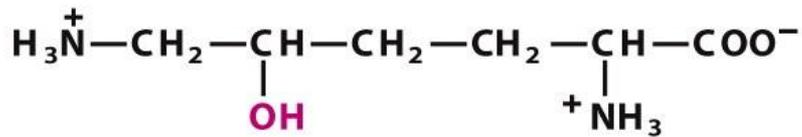
Присоединение **простетических** групп (углеводов, липидов, коферментов и др.), приводящее к образованию **сложных** белков и ферментов.

Химическая модификация боковых радикалов некоторых аминокислотных остатков в определенных белках (фосфорилирование, метилирование, гидроксिलирование, карбоксилирование, йодирование и т.д.).

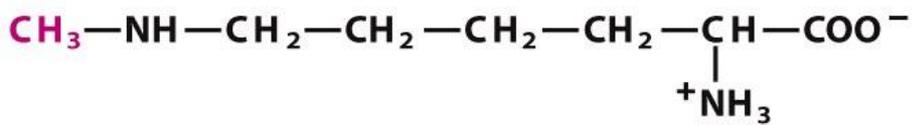
Ассоциация субъединиц как необходимый этап для белков, обладающих четвертичной структурой.



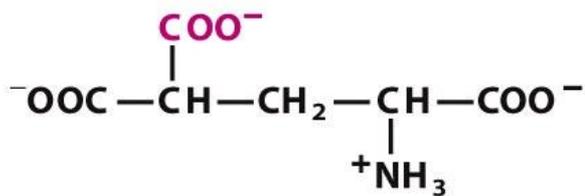
4-Hydroxyproline



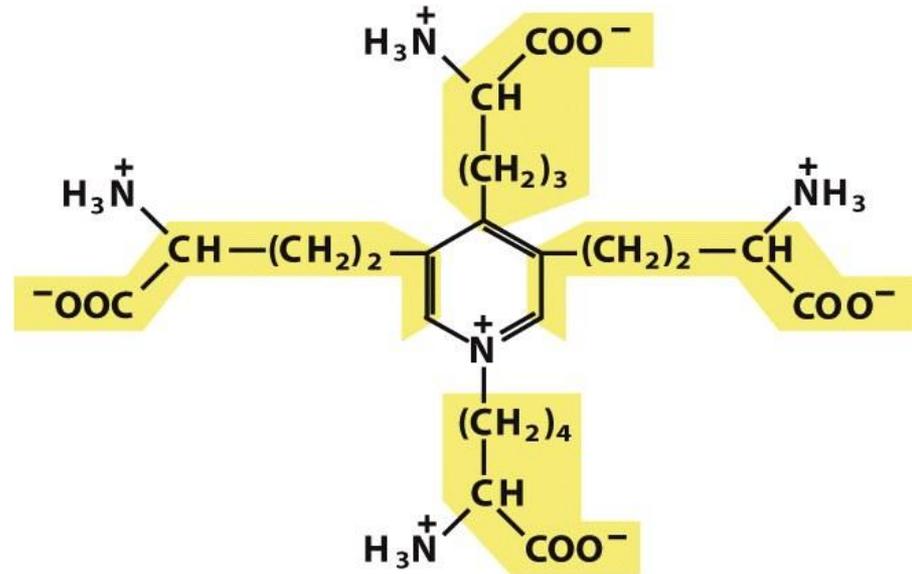
5-Hydroxylysine



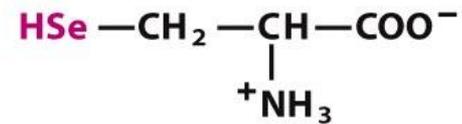
6-N-Methyllysine



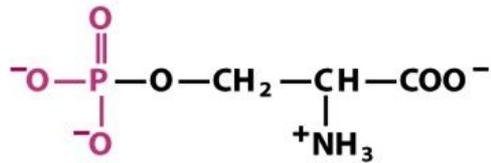
γ -Carboxyglutamate



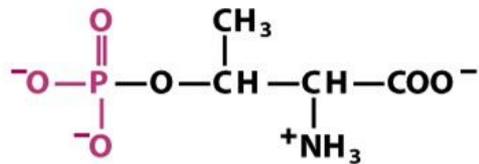
Desmosine



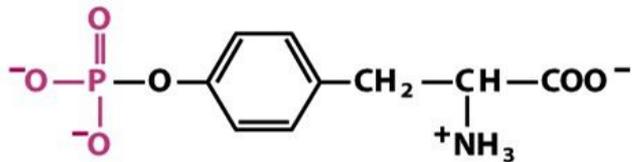
Selenocysteine



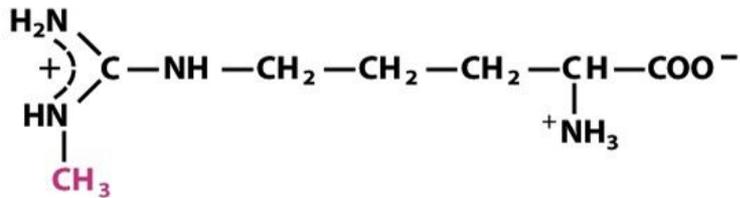
Phosphoserine



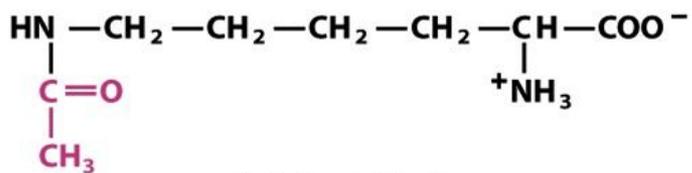
Phosphothreonine



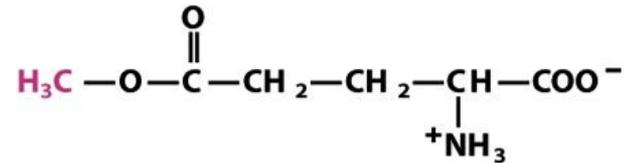
Phosphotyrosine



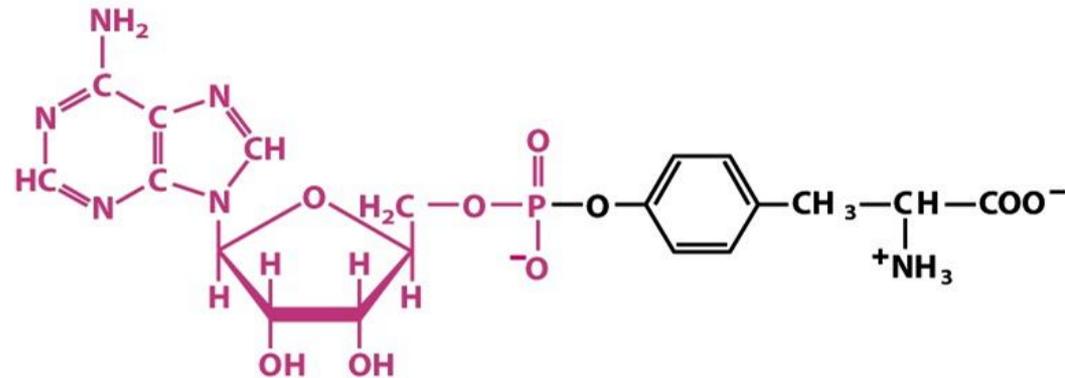
σ -N-Methylarginine



6-N-Acetyllysine



Glutamate methyl ester



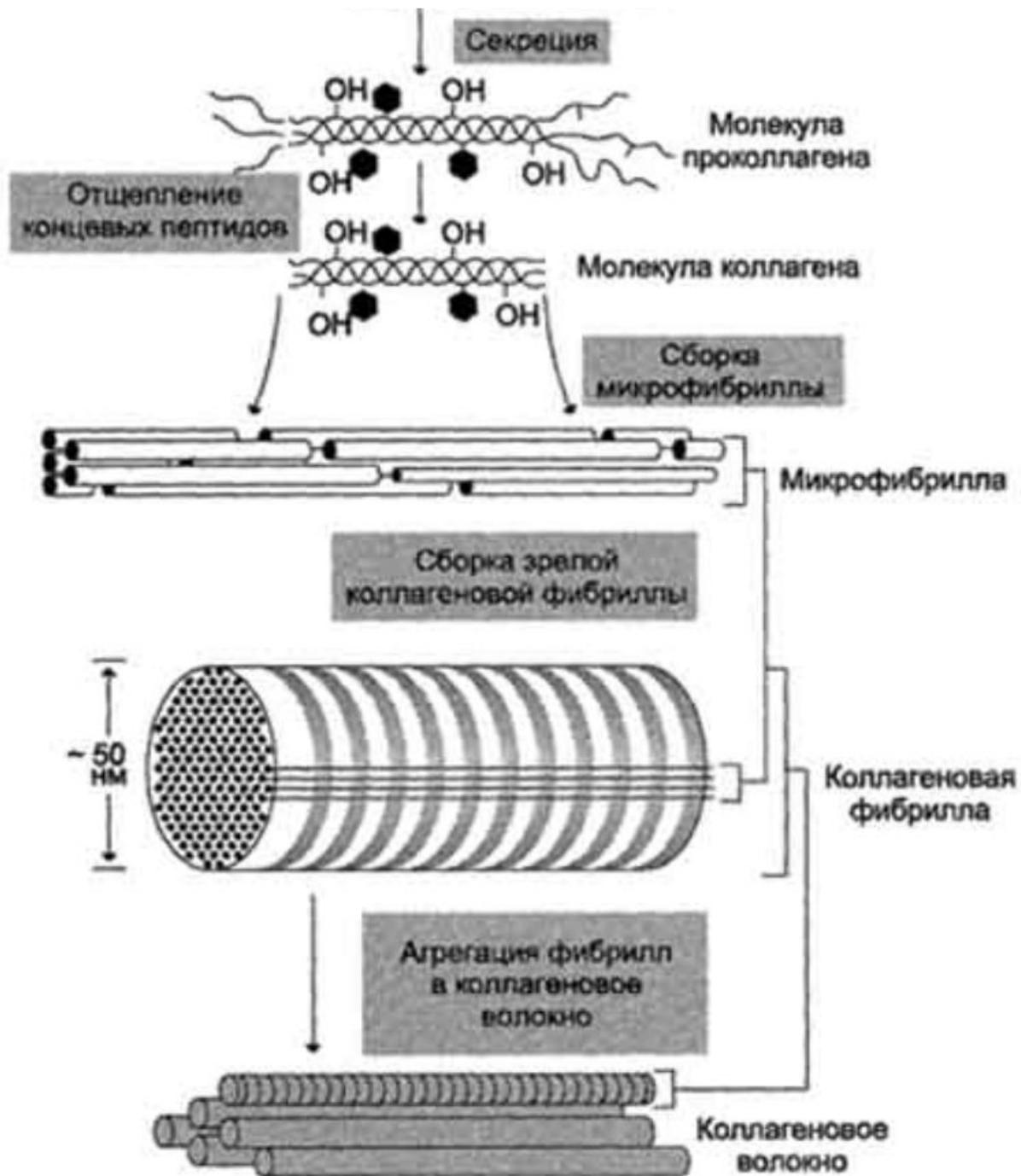
Adenylyltyrosine

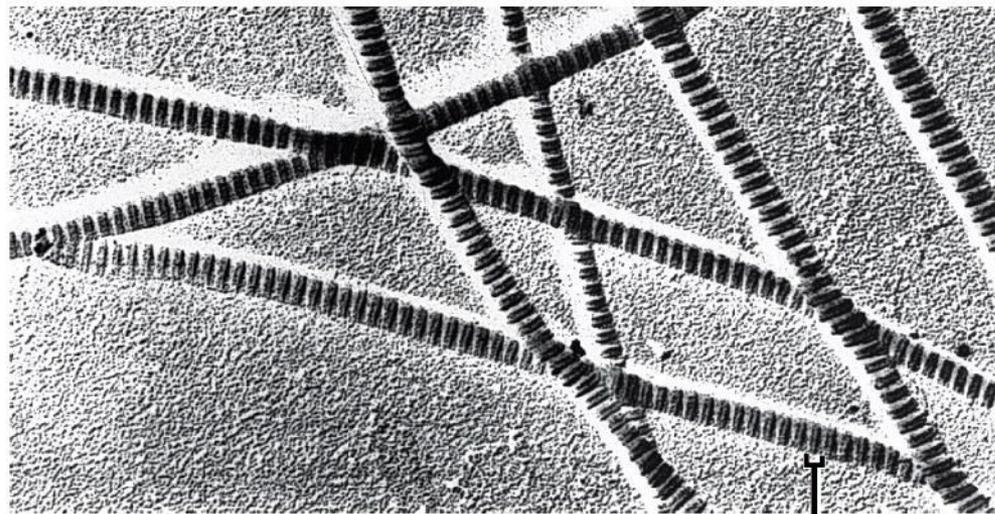
Figure 3-8b

Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company





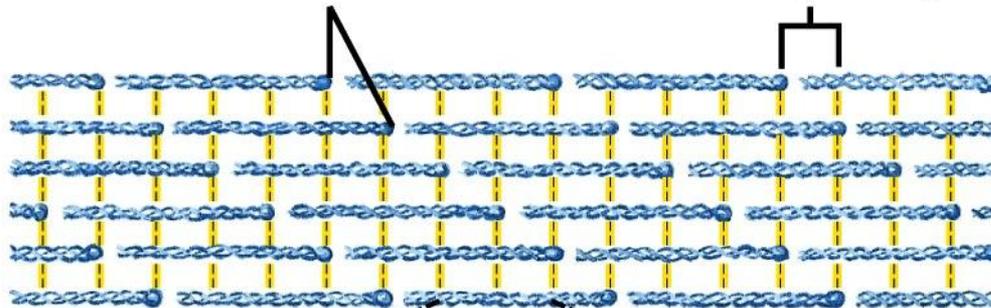


250
nm

**Heads of collagen
molecules**

Cross-striations

640 Å (64 nm)



**Section of
collagen
molecule**



Figure 4-12
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Фотометрический метод анализа основан на способности определяемого вещества поглощать электромагнитное излучение оптического диапазона. Концентрацию поглощающего вещества определяют, измеряя интенсивность поглощения. Поглощение при определенной длине волны является информацией о качественном и количественном составе определяемого вещества и составляет аналитический сигнал.

Спектрофотометрический метод анализа – основан на поглощении монохроматического излучения, т. е. излучения с одной длиной волны в видимой и УФ областях спектра.

Фотоколориметрический метод анализа – основан на поглощении полихроматического (немонохроматического) излучения, т. е. пучка лучей с близкими длинами волны в видимой области спектра. Фотоколориметрию используют в основном для анализа окрашенных растворов. Оба метода основаны на общем принципе – пропорциональной зависимости между светопоглощением и концентрацией определяемых веществ.

Основной закон колориметрии – закон Бугера–Ламберта–Бера записывается следующим образом:

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

где: D – оптическая плотность раствора, иногда обозначается буквой A ;

I_0 и I – интенсивность светового потока, попадающего на раствор (I_0) и прошедшего через раствор (I);

ε – молярный коэффициент светопоглощения или экстинкции (величина, постоянная для данного окрашенного вещества), л/(моль•см);

C – концентрация окрашенного вещества в растворе, моль/л;

l – толщина поглощающего свет слоя раствора (длина оптического пути), см.

Если предмет отражает все цвета, то он виден как белый, а если никаких, то как черный. Если предмет имеет избирательное поглощение, т. е. лучи с различной длиной волны поглощает неодинаково, то он будет цветным, т. е. иметь хроматический цвет.

Цвет непрозрачного предмета обуславливается лучами, которые он отражает, а прозрачного – лучами, которые он пропускает.

Например, если предмет имеет зеленый цвет, то из пучка белого света он поглощает все лучи, кроме зеленых. Зеленые лучи, отраженные от предмета, попадают в наш глаз. **Окрашенный раствор полностью пропускает лучи, обуславливающие его окраску**, а также лучи, близкие по длине волны. Все другие лучи раствор поглощает, но не одинаково. Раствор поглощает преимущественно такие лучи, цвет которых является **дополнительным** к окраске раствора. Поэтому при пропускании через окрашенный раствор белого света, т. е. смеси лучей всех цветов, раствор поглотит только часть его, относительное поглощение света будет очень слабым и измерение неточным. Для получения большего относительного поглощения света и ставят такой светофильтр, который поглощал бы все лучи, кроме тех, которые преимущественно поглощает окрашенный раствор. Окраска такого светофильтра является дополнительной к окраске испытуемого раствора так, для красного раствора берут зеленый светофильтр, для синего – желтый и т.п.

Цвет раствора	Область максимального поглощения , нм	Дополнительный цвет (цвет светофильтра)
Желто-зеленый	400-450	Фиолетовый
Желтый	450-480	Синий
Оранжевый	480-490	Зелено-синий
Красный	490-500	Сине-зеленый
Пурпурный	500-560	Зеленый
Фиолетовый	560-575	Желто-зеленый
Синий	575-590	Желтый
Зелено-синий	590-625	Оранжевый
Сине-зеленый	625-700	Красный

