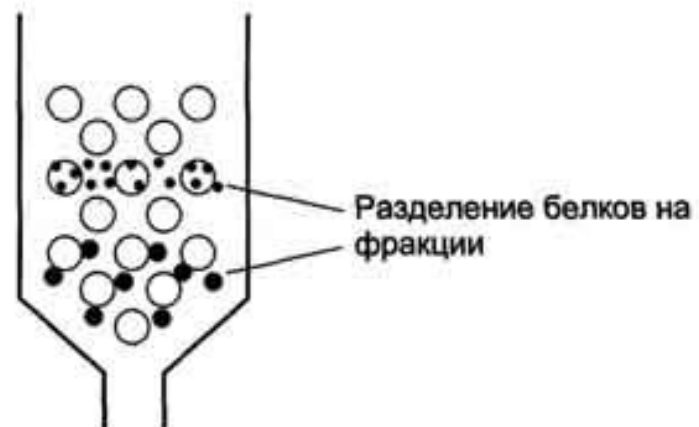
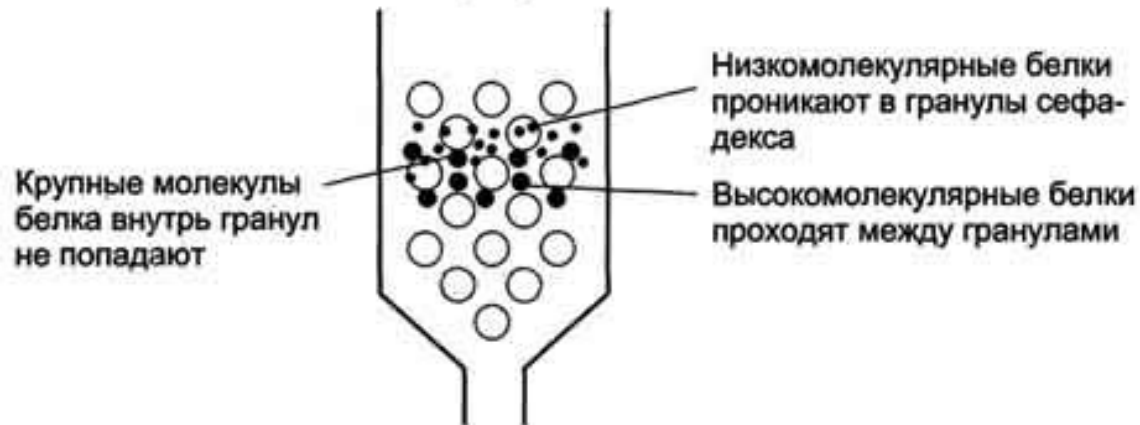
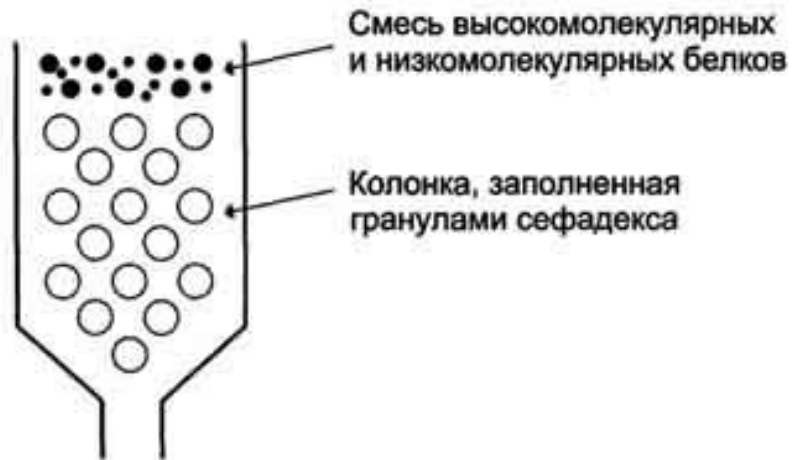
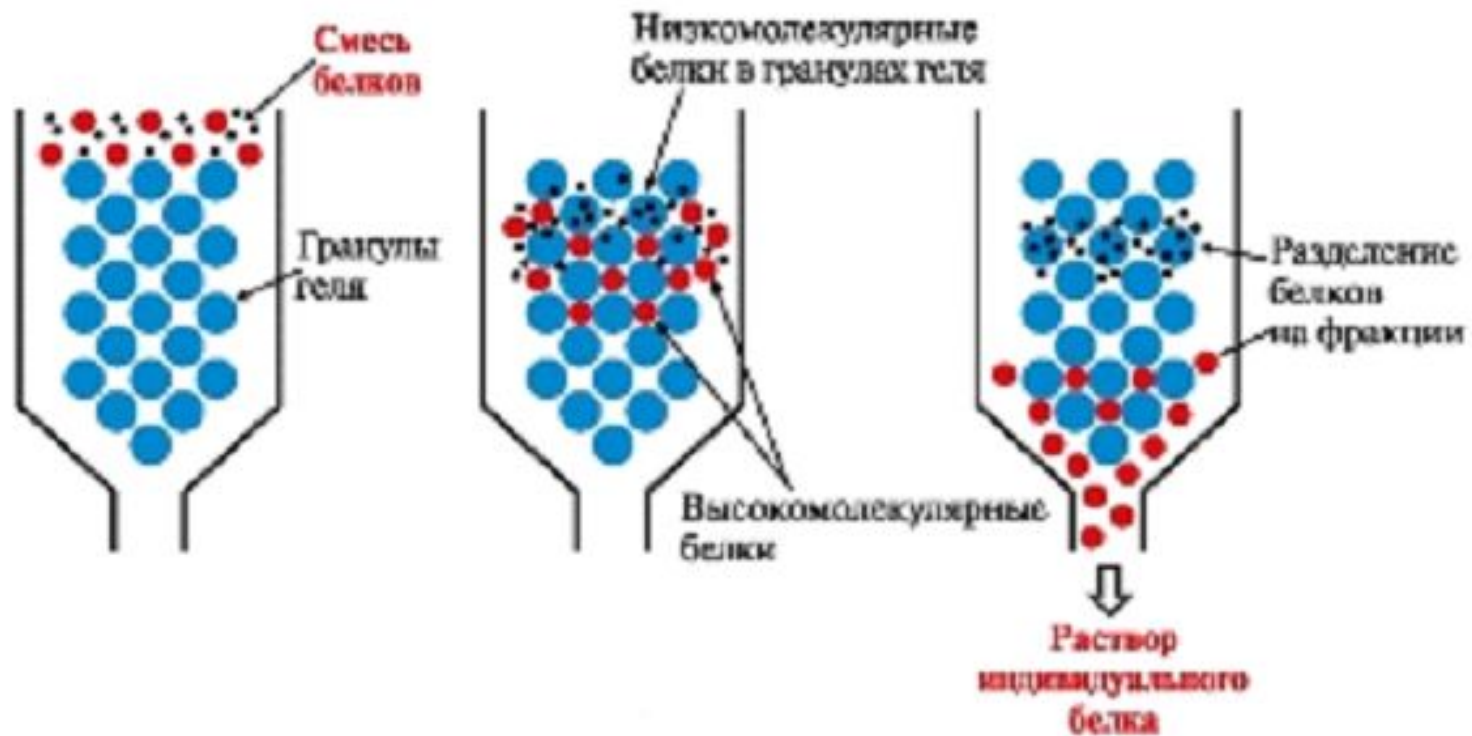


# **Примеры методов разделения белков (фракционирования)**

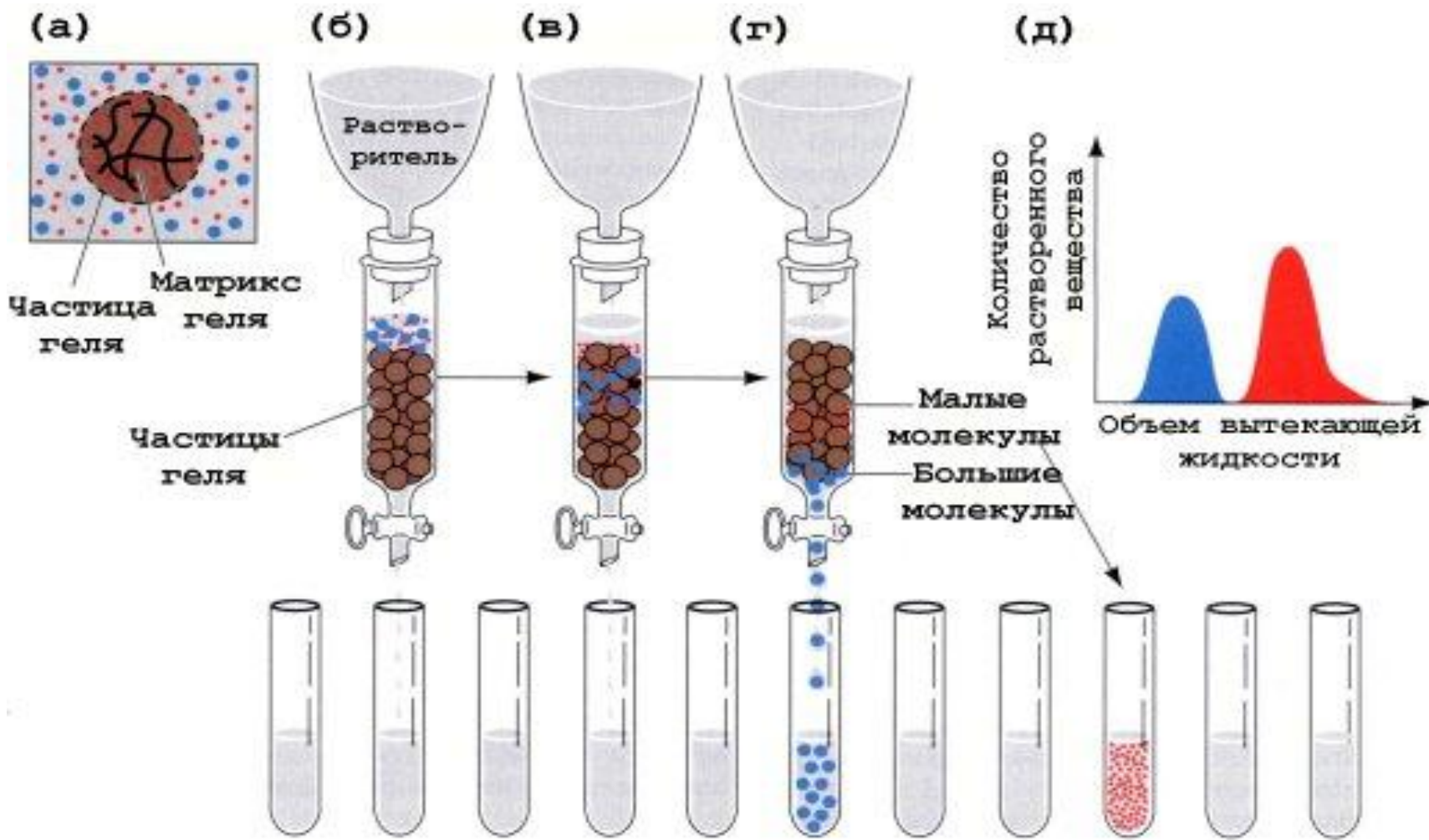
**Хроматография** – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость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



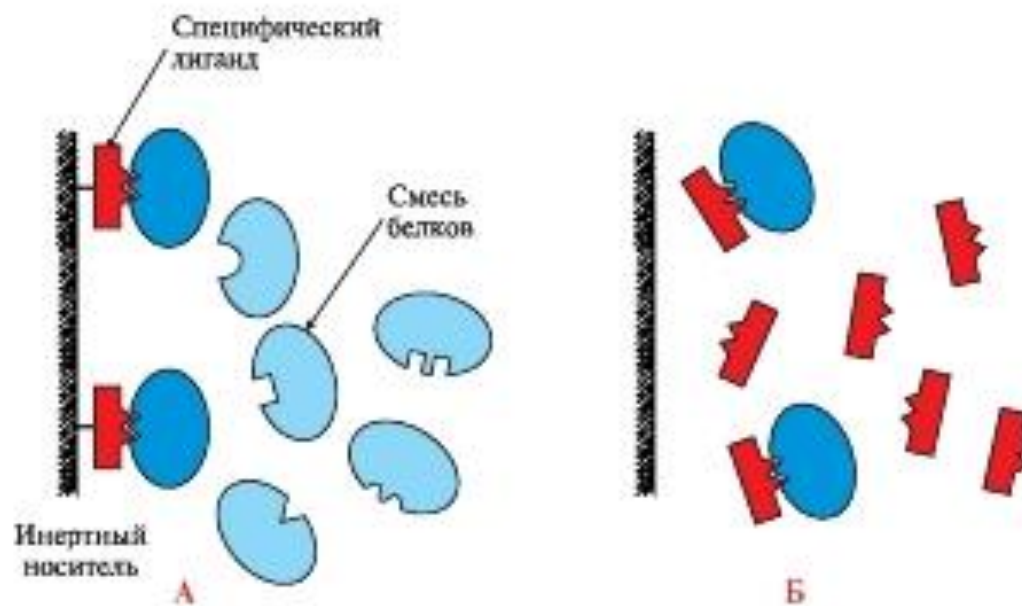
**Разделение смеси белков  
методом гель-фильтрации**



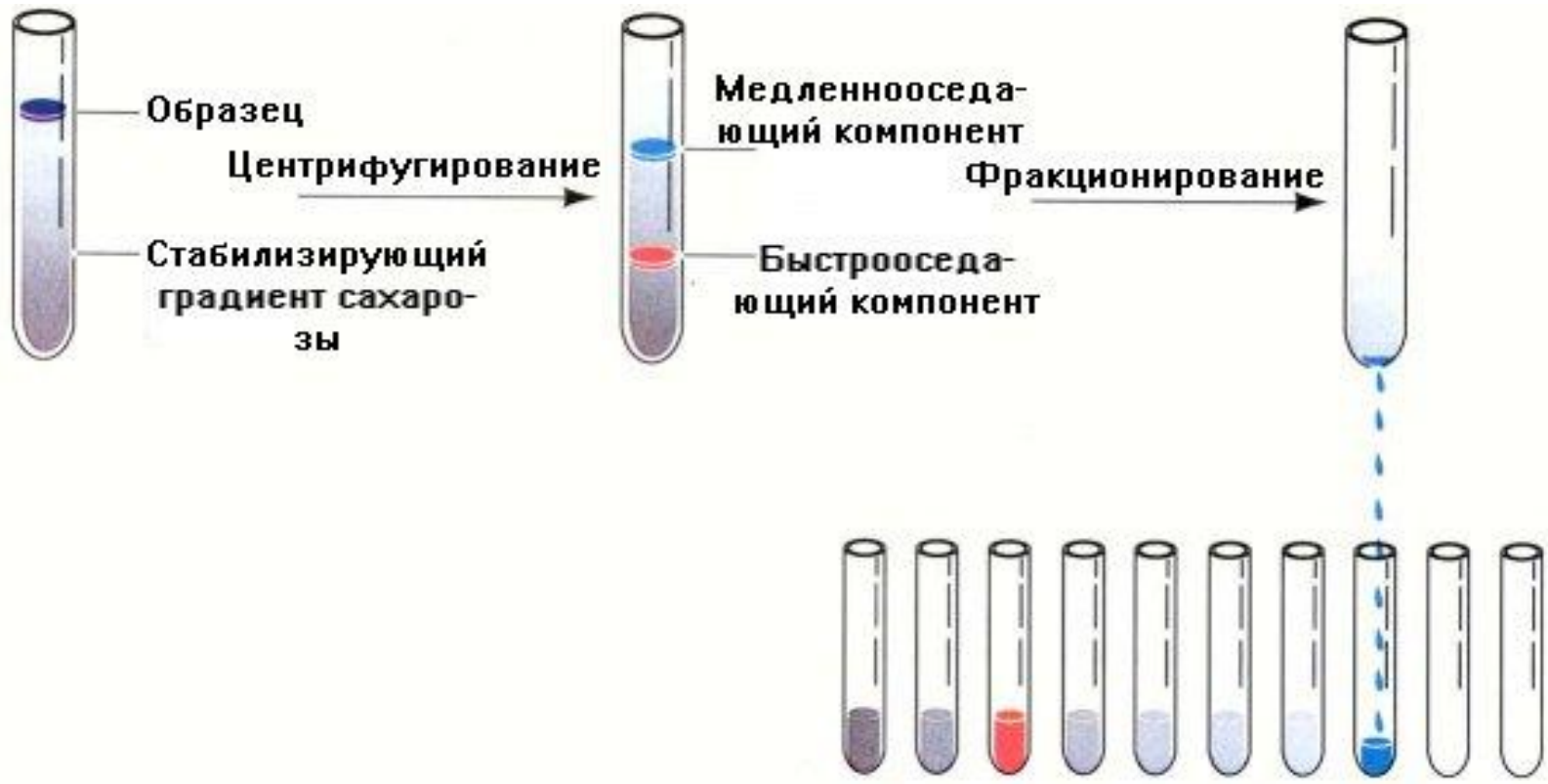
**Разделение смеси белков методом гель-фильтрации**



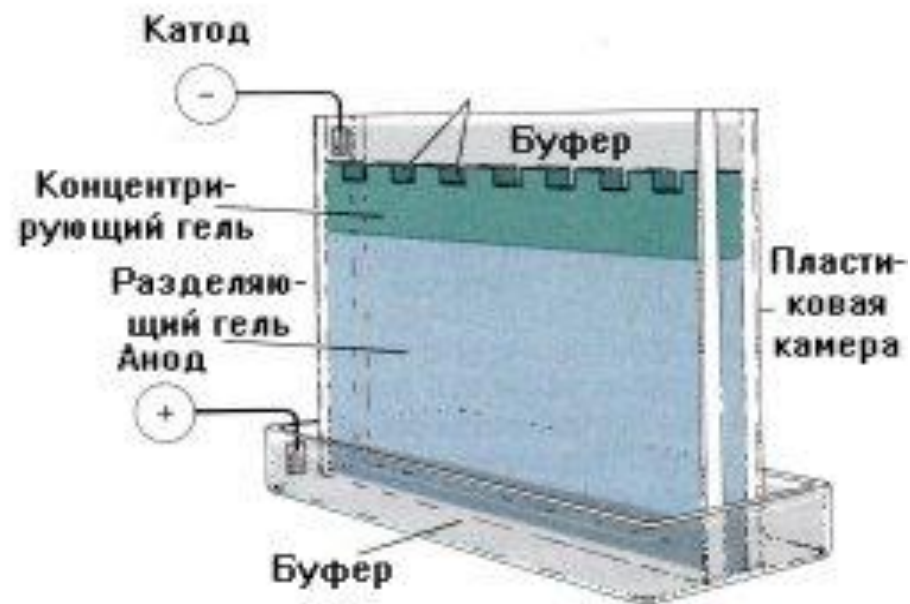
**Разделение смеси белков методом гель-фильтрации**



## Аффинная хроматография



# Ультрацентрифугирование

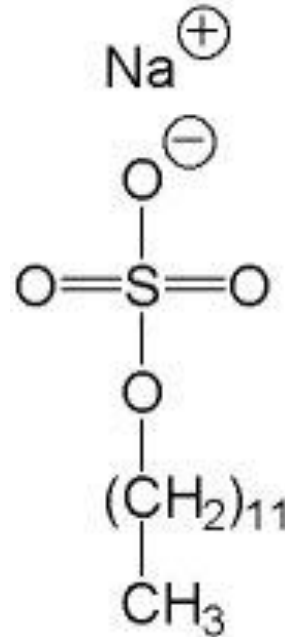


**Методом электрофореза можно разделить белки по молекулярной массе. Для этого используют электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na).**



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:

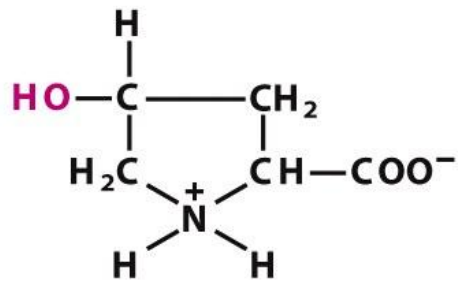
Образование дисульфидных связей между боковыми радикалами остатков цистеина, стоящих на разных участках полипептидной цепи.

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

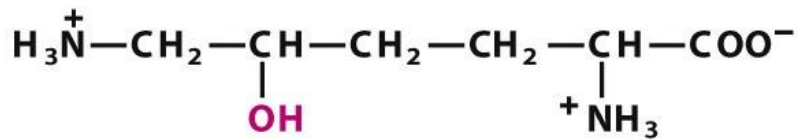
Присоединение **простетических** групп (углеводов, липидов, коферментов и др.), приводящее к образованию **сложных** белков и ферментов.

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

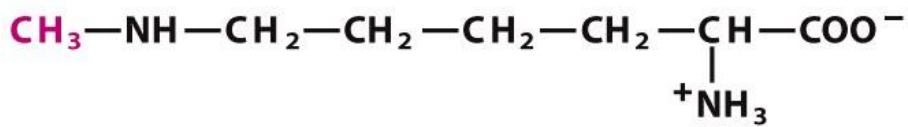
Ассоциация субъединиц как необходимый этап для белков, обладающих четвертичной структурой.



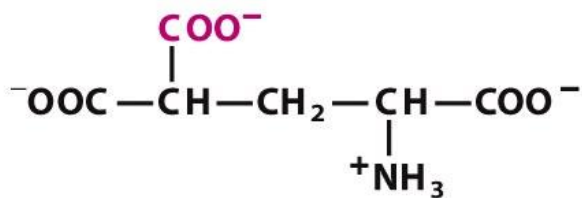
4-Hydroxyproline



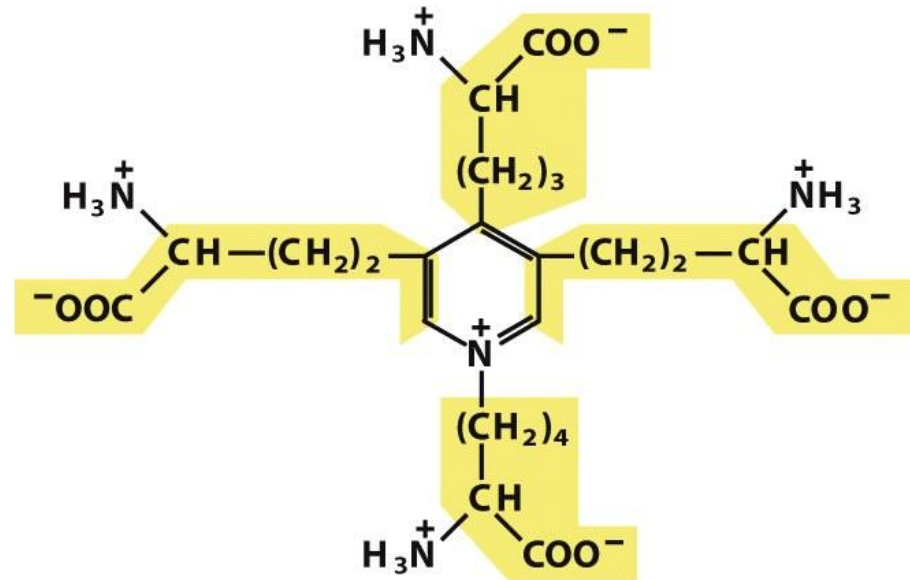
5-Hydroxylysine



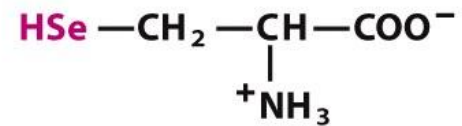
6-N-Methyllysine



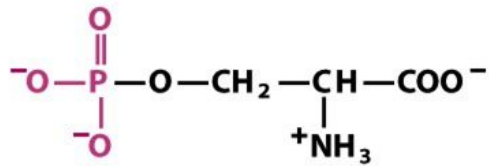
$\gamma$ -Carboxyglutamate



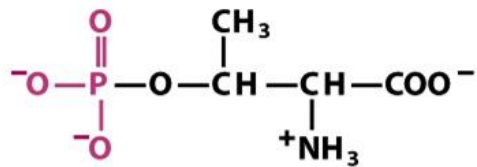
Desmosine



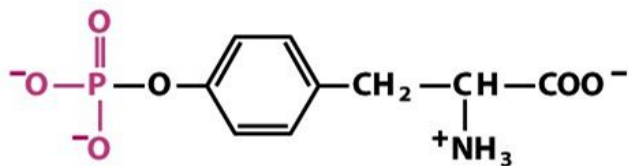
Selenocysteine



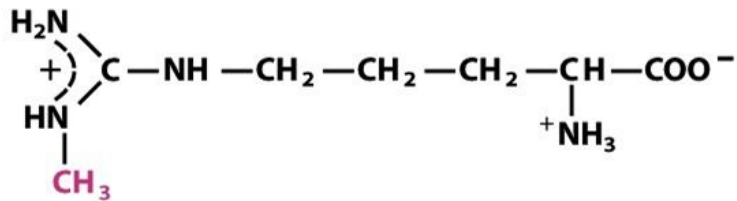
Phosphoserine



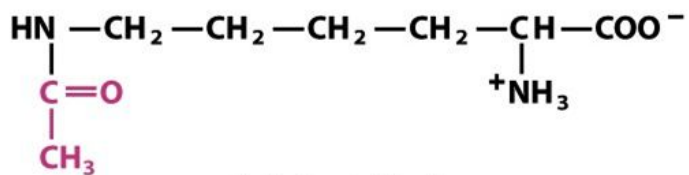
Phosphothreonine



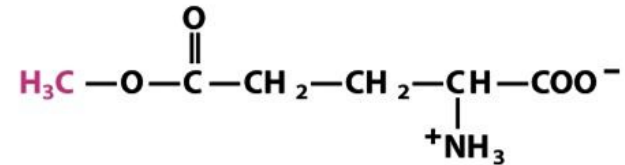
Phosphotyrosine



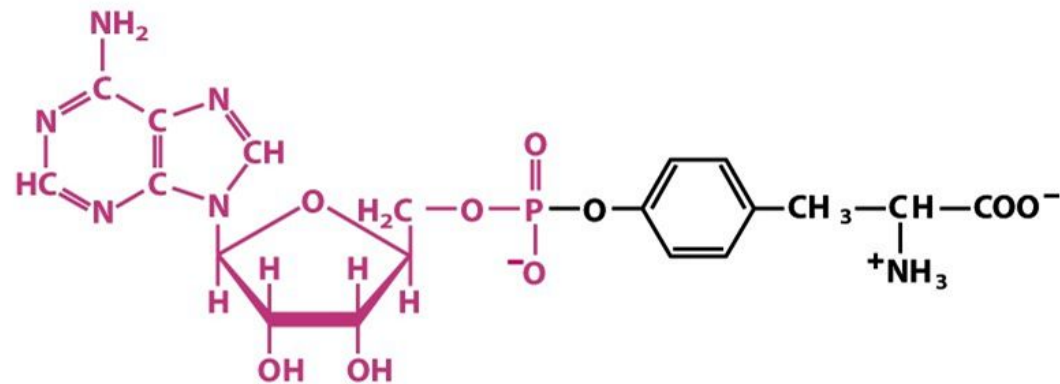
$\sigma$ -N-Methylarginine



6-N-Acetyllysine



Glutamate methyl ester



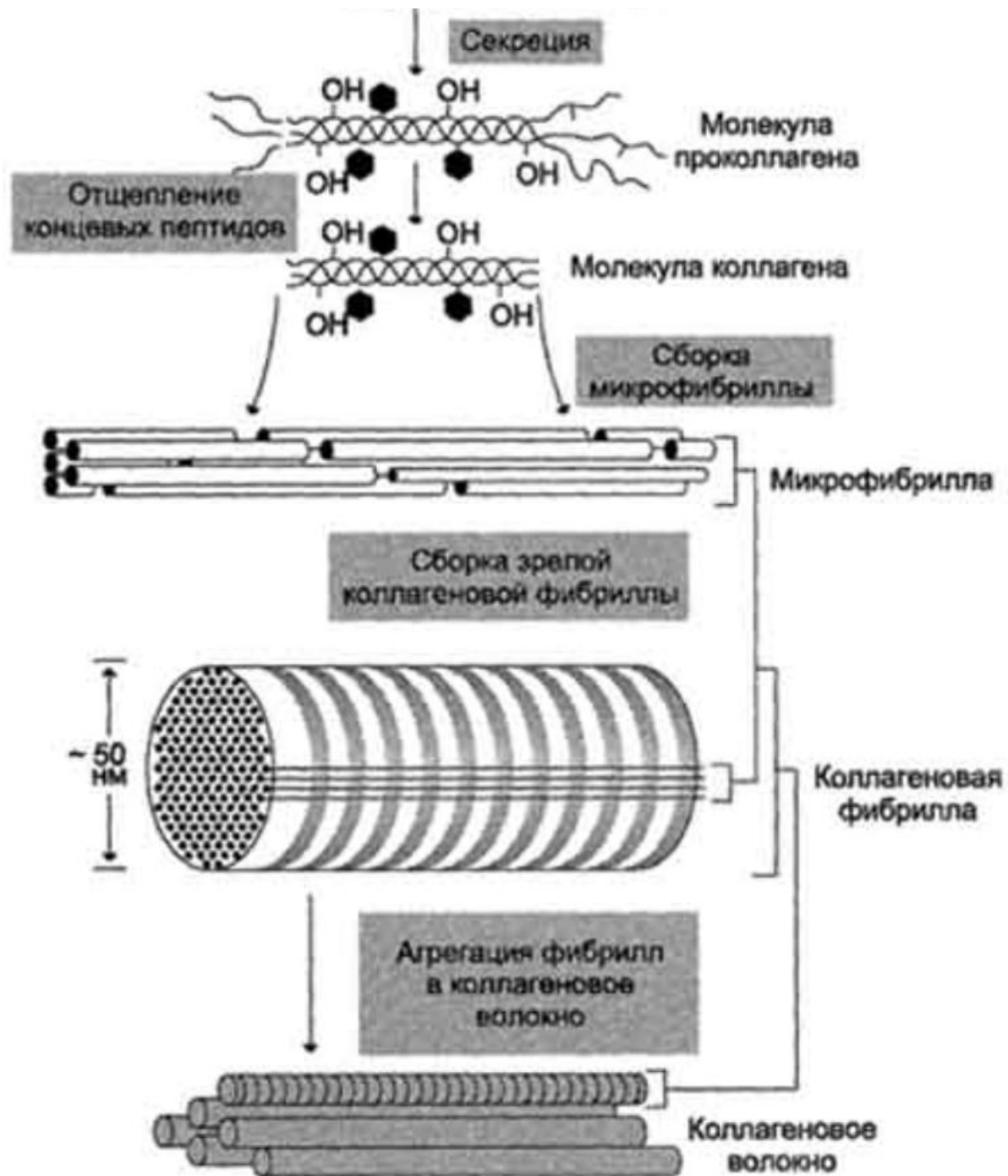
Adenylyltyrosine

Figure 3-8b

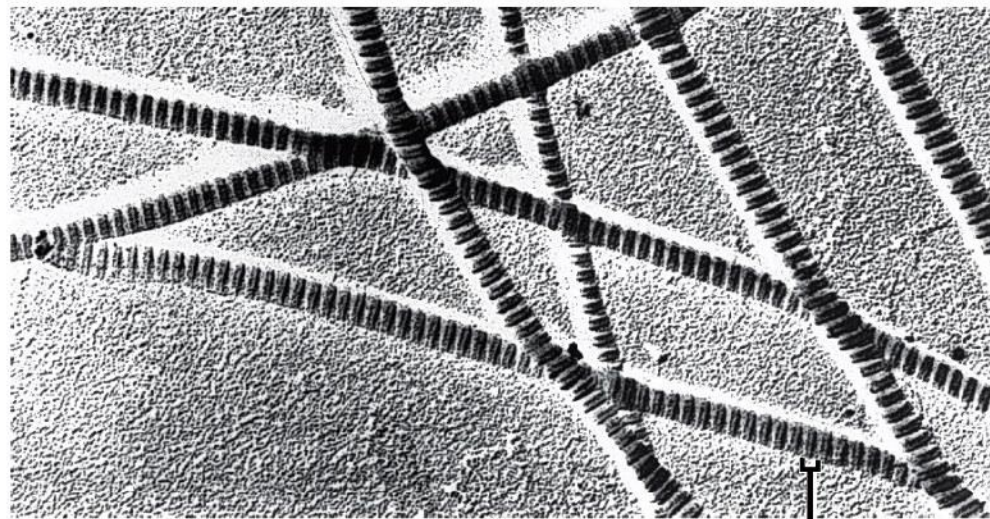
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition

© 2008 W. H. Freeman and Company







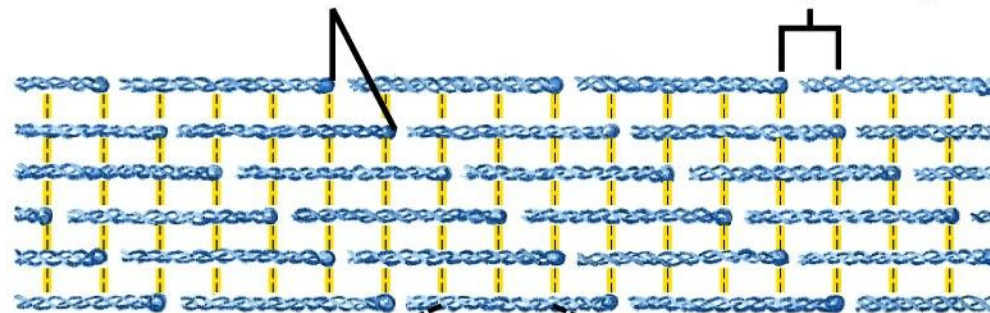


250  
nm

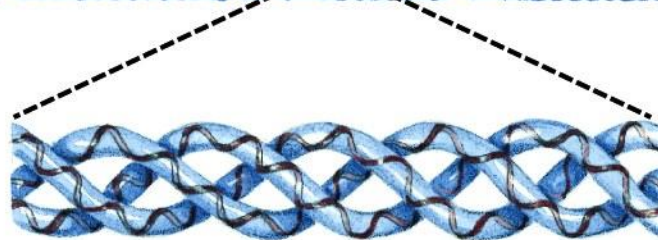
**Heads of collagen  
molecules**

**Cross-striations**

640 Å (64 nm)

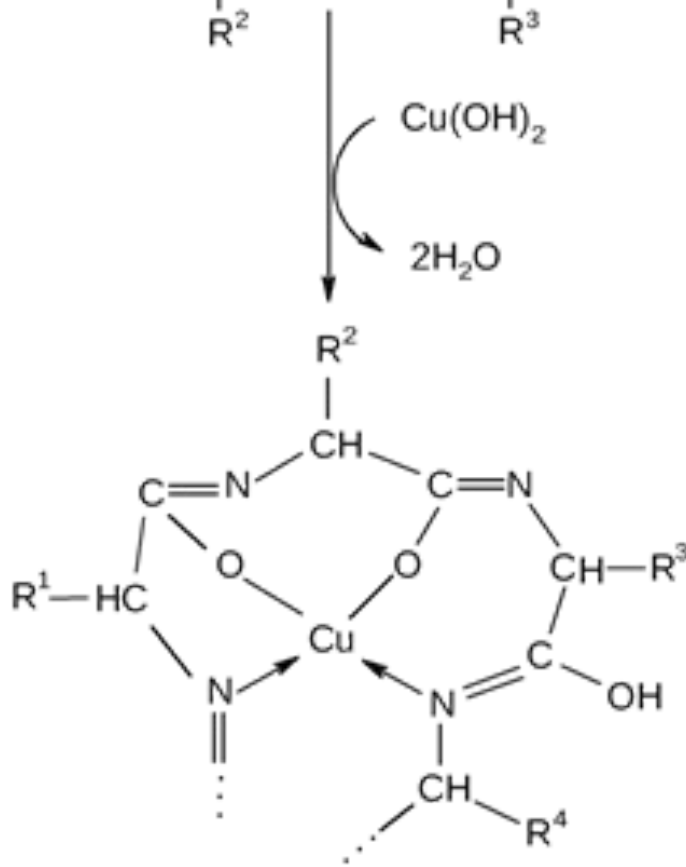
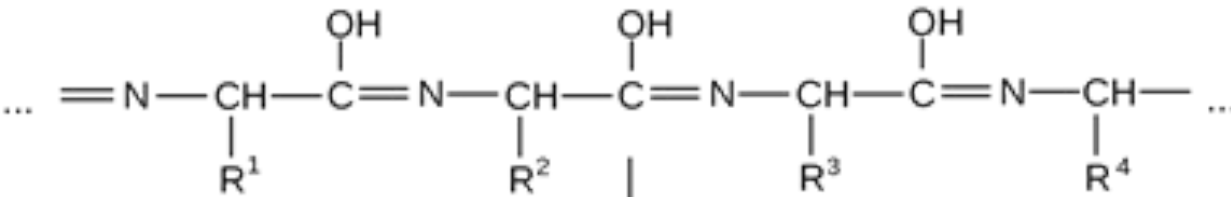


**Section of  
collagen  
molecule**



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





Биуретовый метод основан на образовании окрашенного в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет комплексного соединения ионов двухвалентной меди по месту пептидных связей белка в щелочной среде (биуретовая реакция). Для пептидной группы характерна лактам-лактимная таутомерия. В щелочной среде преобладающая лактимная (енольная) форма полипептида взаимодействует с гидроксидом меди(II) с образованием стабильного окрашенного комплекса.

**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 ( $I$ );

$\varepsilon$  – 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

