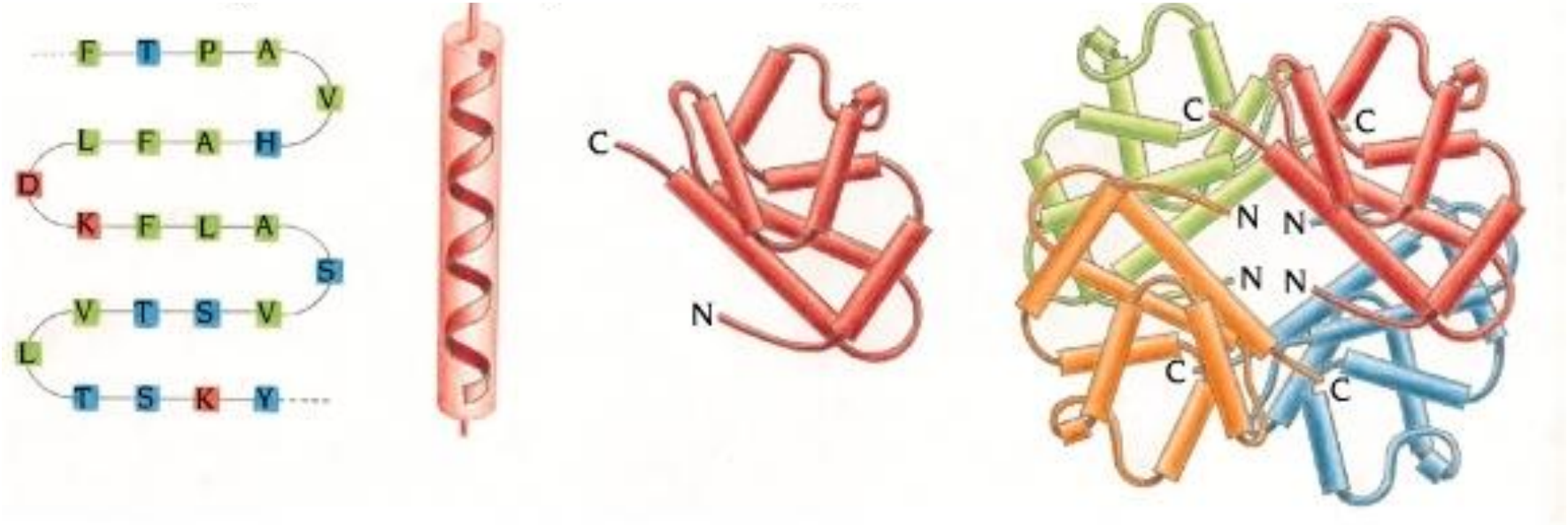
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

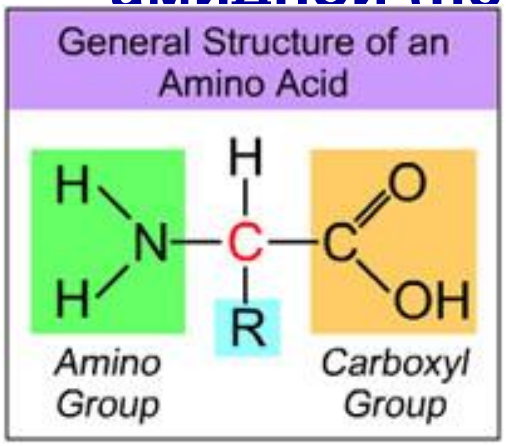
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

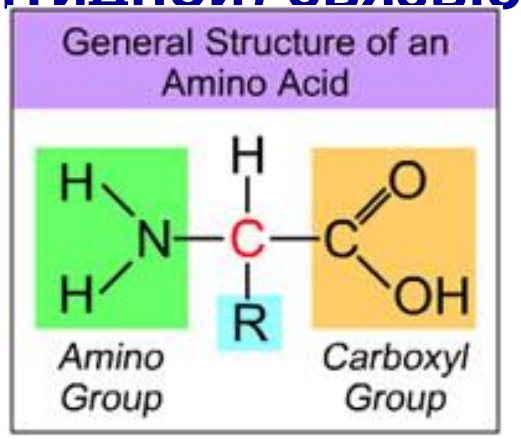
Первичная Вторичная Третичная Четвертичная

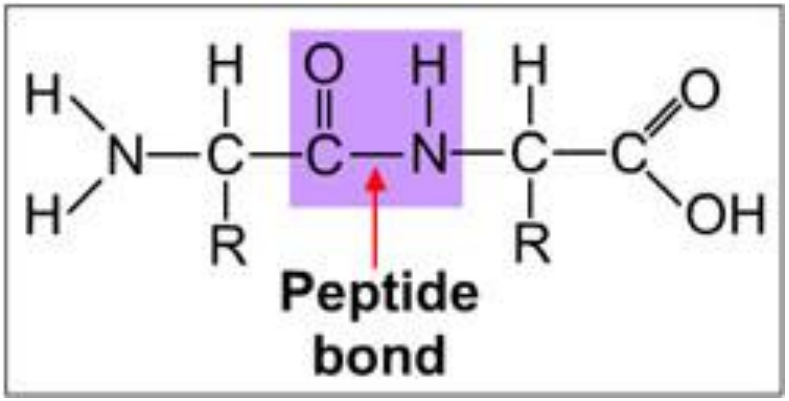


- **Белки** представляют собой высокомолекулярные биополимеры, построенные из аминокислотных остатков.
- Практически все белки построены из 22 аминокислот.
- Аминокислотные остатки соединены между собой амидной (пептидной) связью.
- Полипептидная цепь имеет направление, которое определяется N- и С-концевыми остатками.

Аминокислотные остатки соединены между собой амидной (пептидной) связью







Полипептидная цепь имеет направление, которое определяется N- и C-концевыми остатками

ПРИМЕРЫ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ

Lys: метилирование, ацетилирование
Arg: метилирование, дезаминирование
His: метилирование
Glu: карбоксилирование
Asp: образование сукцинимида
Cys: образование дисульфидной связи, пальмитоилирование
Ser: фосфорилирование, O-гликозилирование
Thr: фосфорилирование, O-гликозилирование
Tyr: фосфорилирование, сульфатирование, иодирование
Asn: дезамидирование, N-гликозилирование
Pro: гидроксилирование
N-концевой остаток: ацетилирование, формилирование, образование пироглутамата, метилирование, N-гликозилирование
C-концевой остаток: амидирование, O-метилирование, убиквитинилирование, сумоилирование

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

1. ***ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ***

2. ***ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА (АМИНОКИСЛОТНЫЙ АНАЛИЗ)***

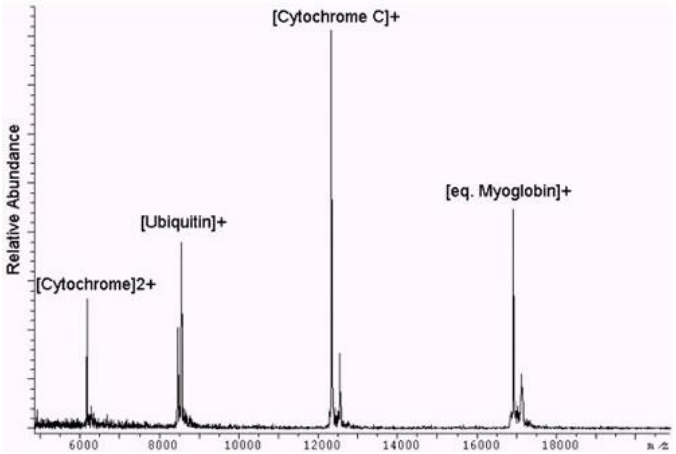
3. ***ОПРЕДЕЛЕНИЕ N- И С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ***

4. ***ХИМИЧЕСКОЕ ИЛИ ФЕРМЕНТАТИВНОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ***

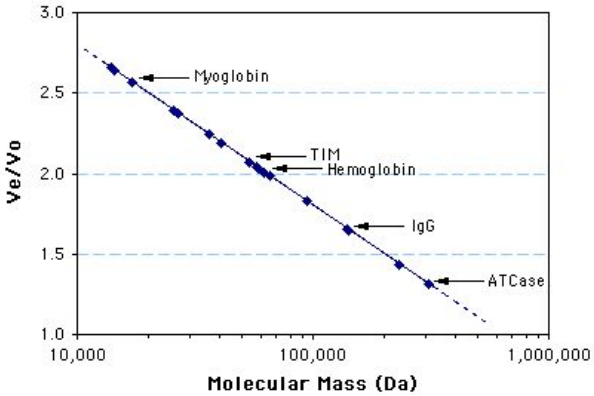
5. ***ВЫДЕЛЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ (СЕКВЕНИРОВАНИЕ)***

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

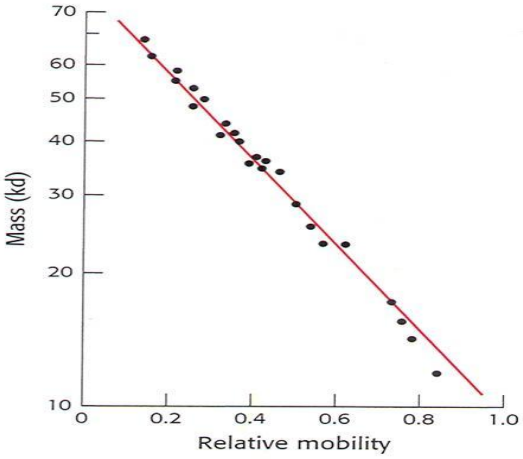
1. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ



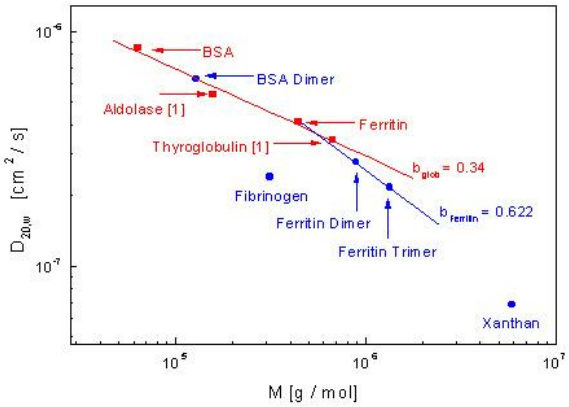
3. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ



2. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ



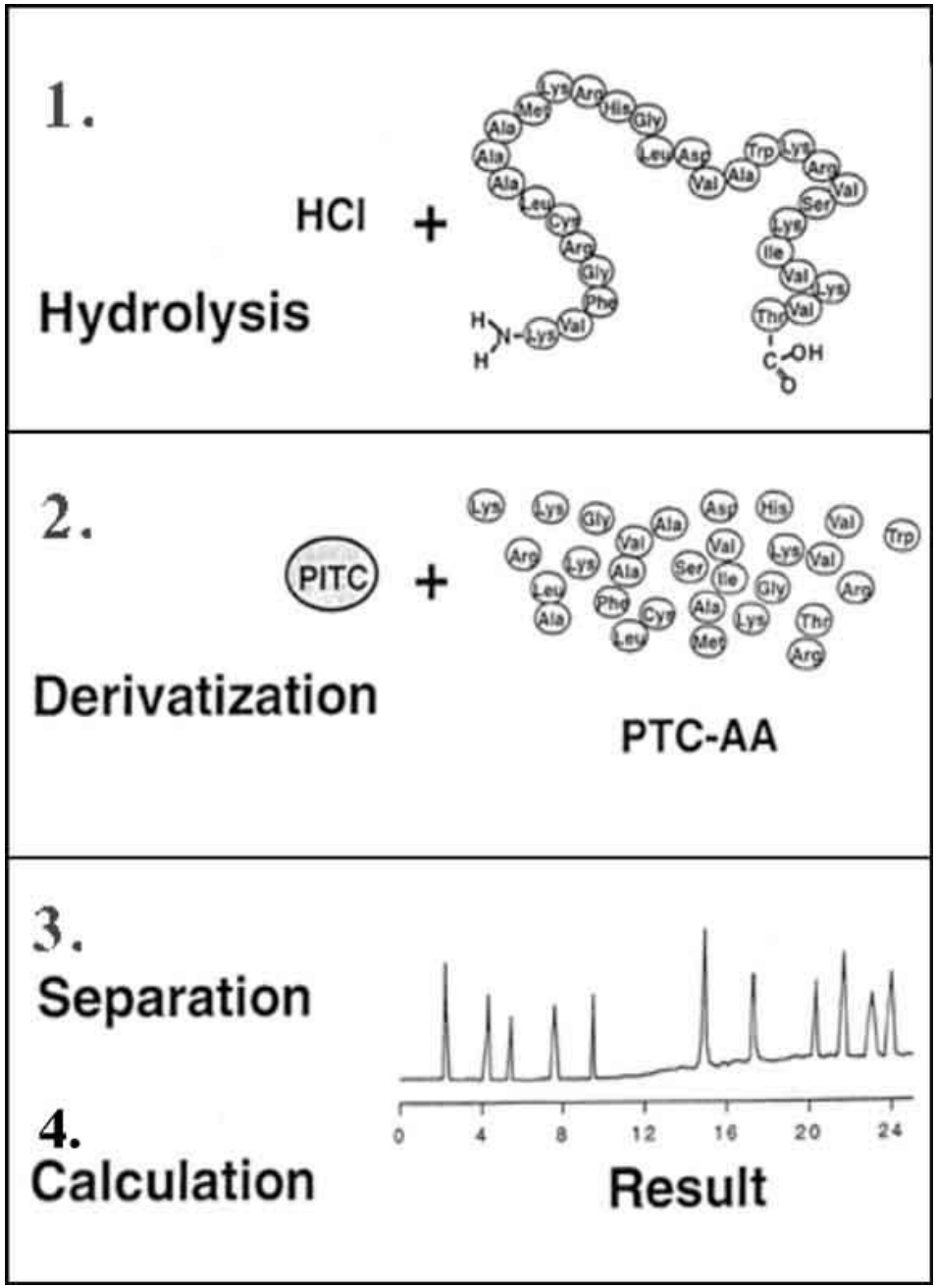
4. УЛЬТРАЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ

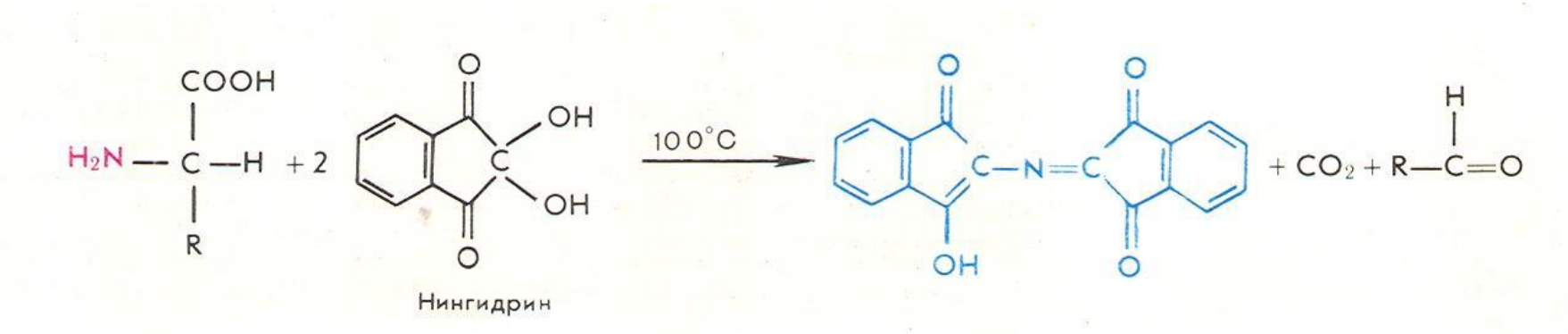


Принцип аминокислотного анализа

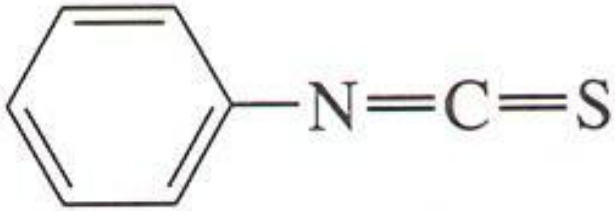
Гидролиз в 5,7н HCl при 110^0C в вакууме

в течение 24-96 часов





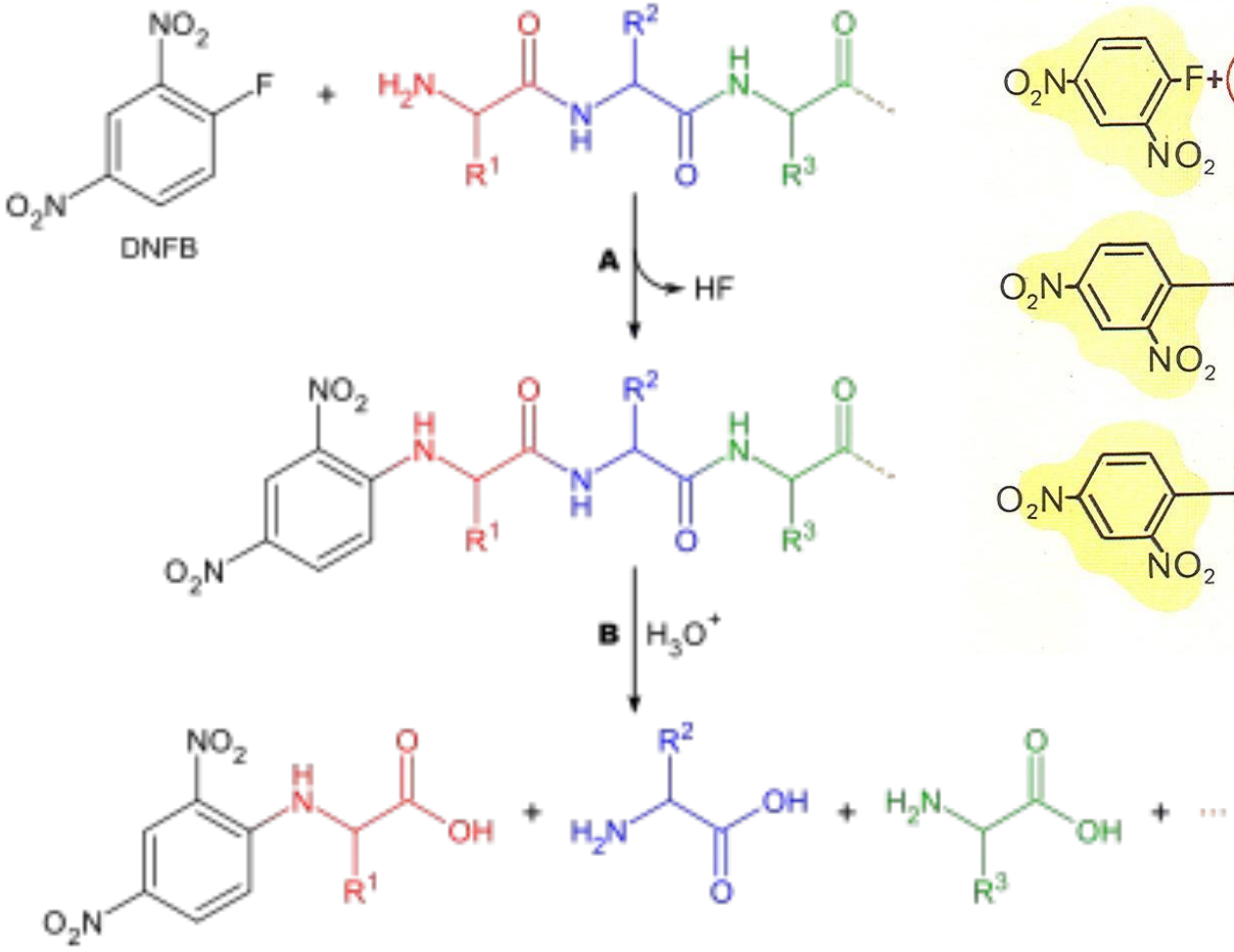
НИНГИДРИН (ТРИКЕТОГИДРИНДЕНГИДРАТ)

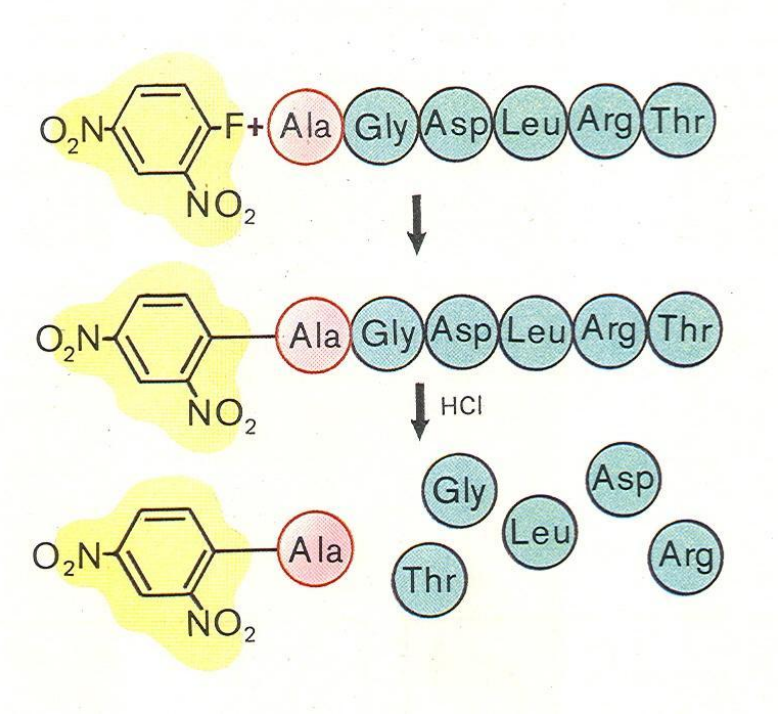


ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТ (ФИТЦ, PITC)

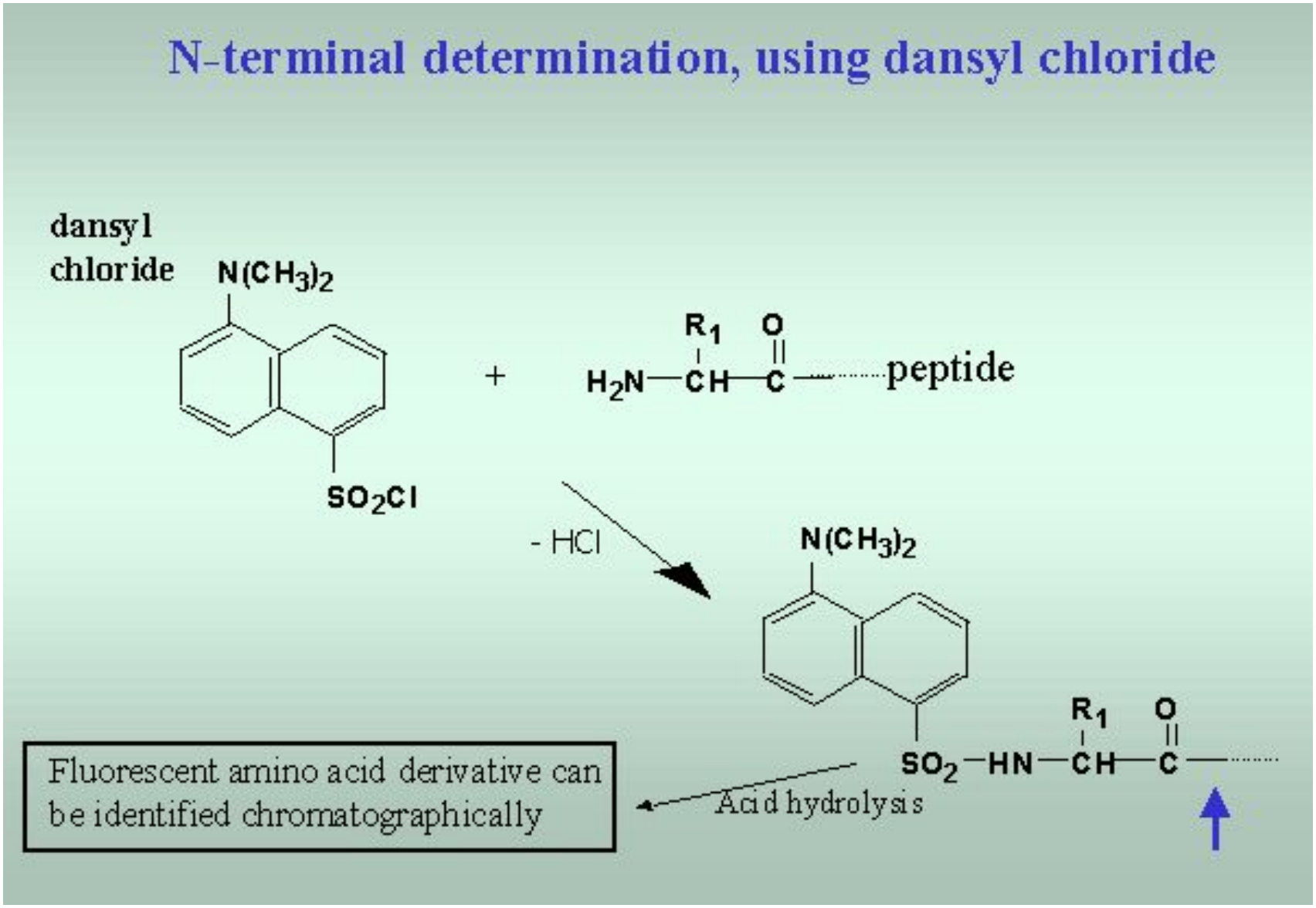
ОПРЕДЕЛЕНИЕ N-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

1. МЕТОД Ф.СЕНГЕРА (1945 г.)

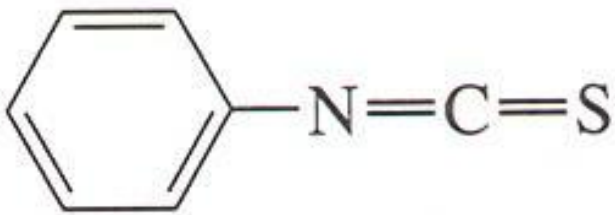




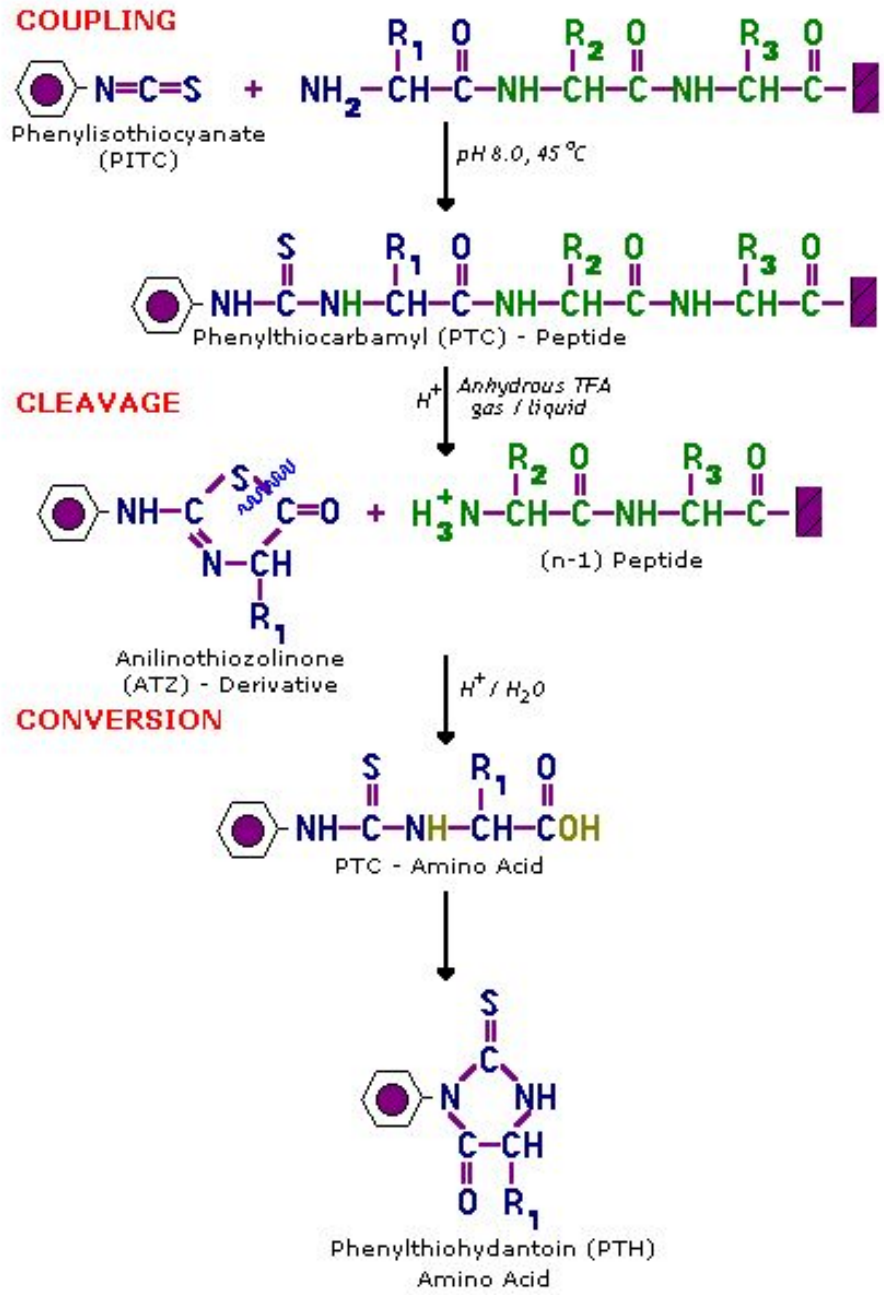
2. ДАНСИЛЬНЫЙ МЕТОД (В.Р.ГРЕЙ, Б.С.ХАРТЛИ, 1963 г.)



3. МЕТОД ЭДМАНА (1956 г.)



ФЕНИЛИЗОТИОЦИАНАТ (ФИТЦ, PITC, РЕАГЕНТ ЭДМАНА)



4. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ АМИНОПЕПТИДАЗАМИ

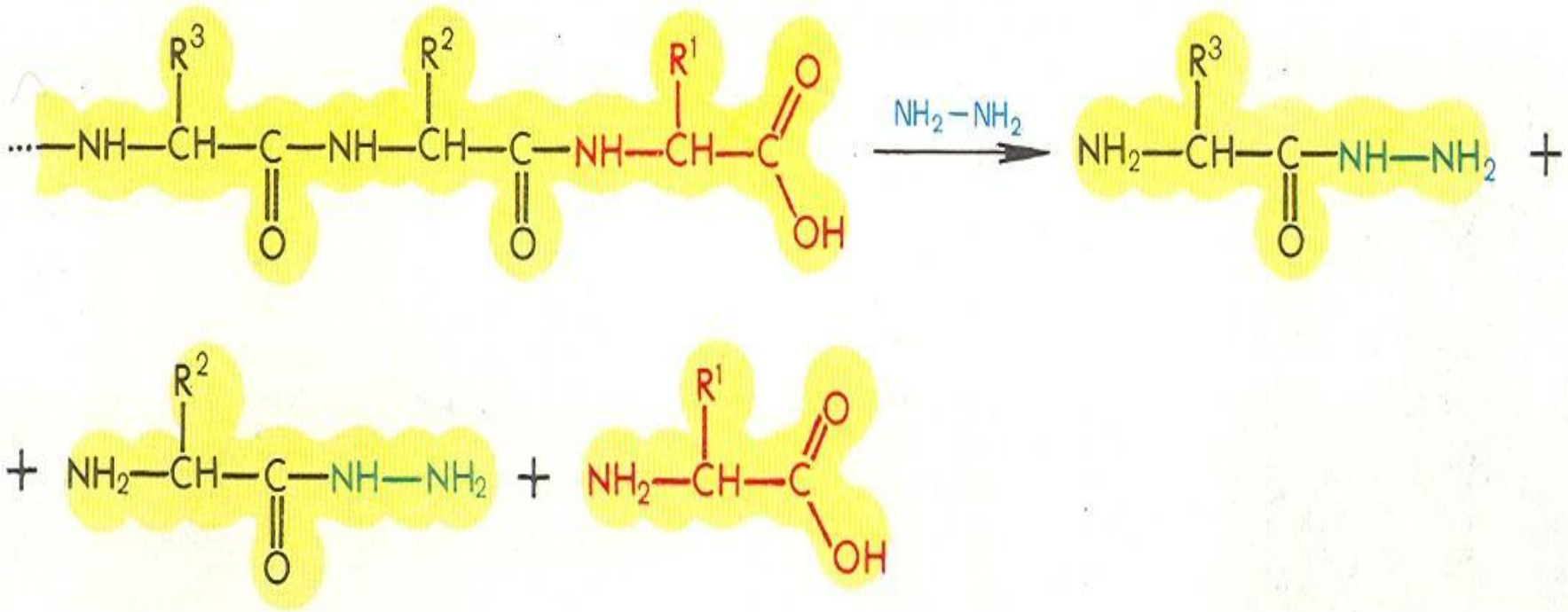
- ***ЛЕЙЦИНАМИНОПЕПТИДАЗА (С НАИБОЛЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ ГИДРОЛИЗУЕТ СВЯЗИ Leu, Ile, Val)***

- ***АМИНОПЕПТИДАЗА M (ГИДРОЛИЗУЕТ ВСЕ СВЯЗИ, КРОМЕ Pro-X и X-Pro)***

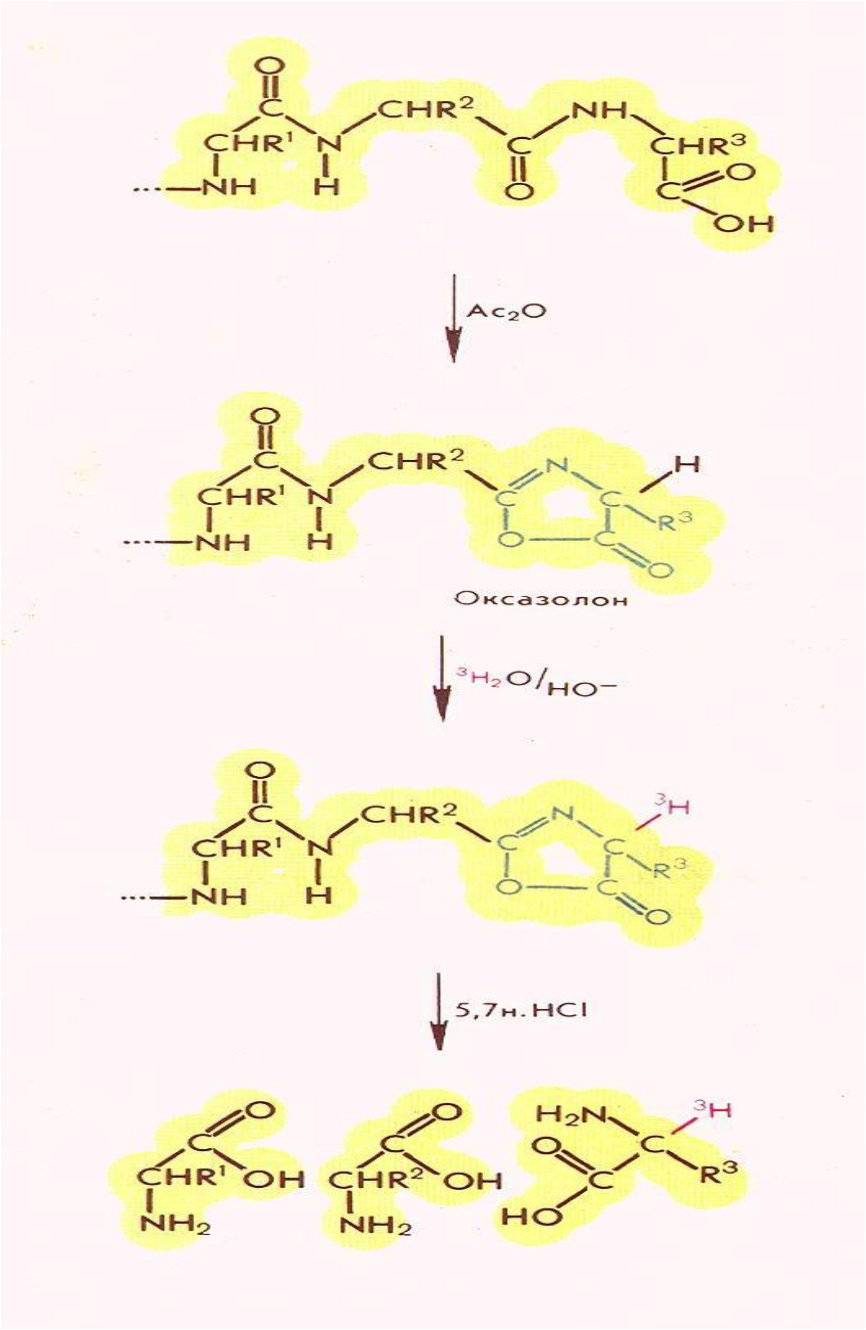
- ***ДИПЕПТИДИЛАМИНОПЕПТИДАЗА I ИЛИ КАТЕПСИН C (ОТЩЕПЛЯЕТ N-КОНЦЕВОЙ ДИПЕПТИД)***

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С-КОНЦЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ

1. **МЕТОД ГИДРАЗИНОЛИЗА (Сиро АКАБОРИ, 1952 г.)**
   Безводный NH_2-NH_2, 120^0С, 10 час

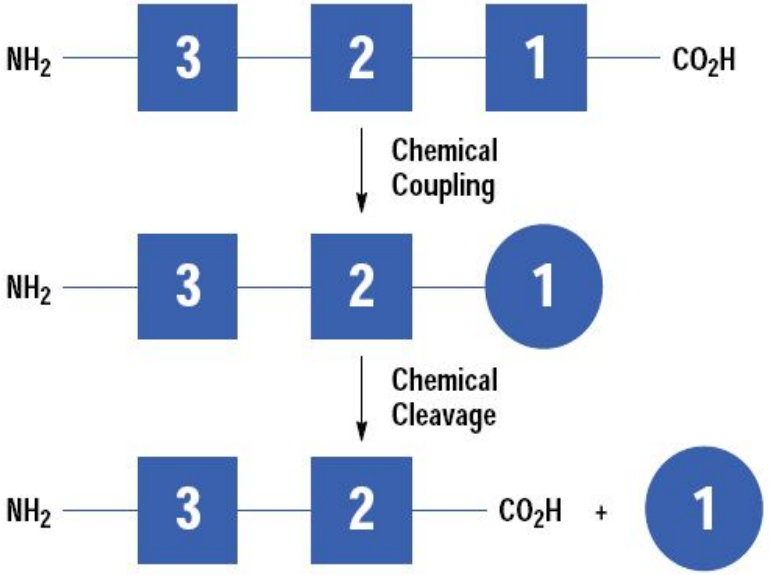


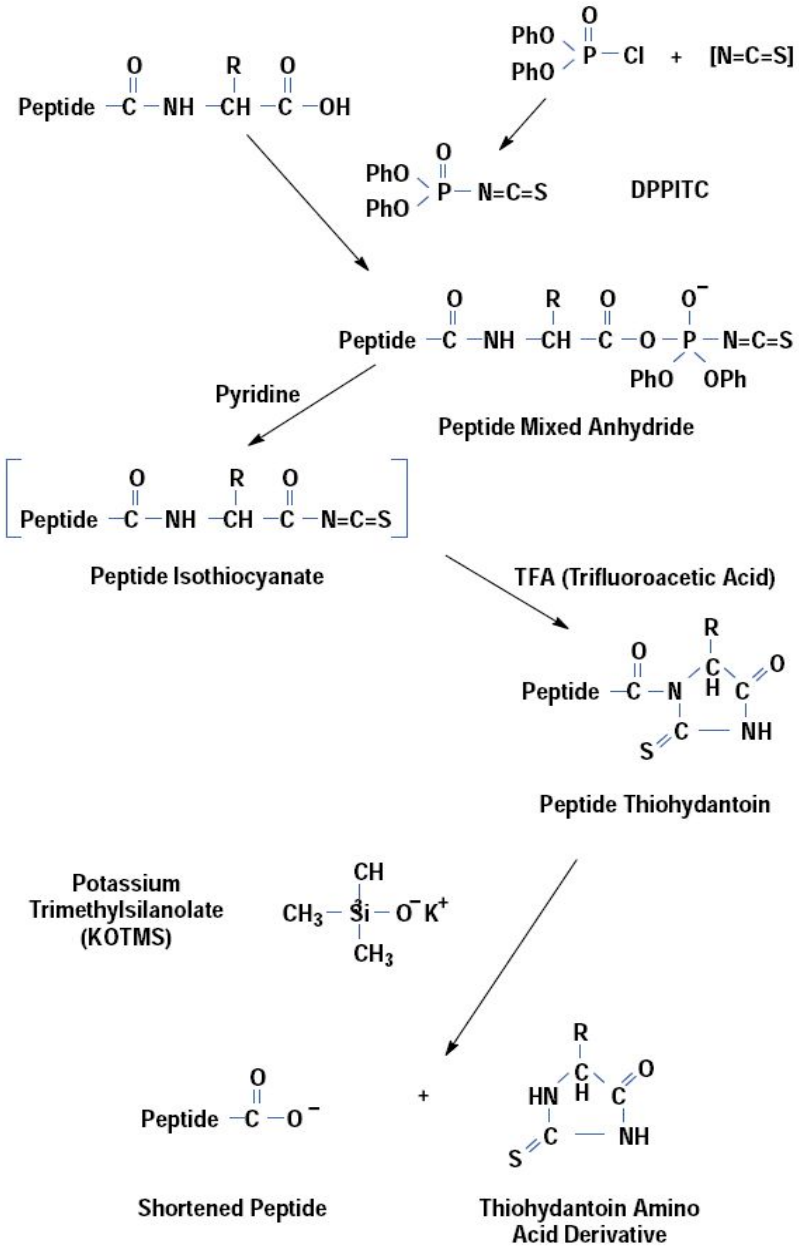
2. ОКСАЗОЛОНОВЫЙ МЕТОД ПО МАТСУО ИЛИ МЕТОД ТРИТИЕВОЙ МЕТКИ (Hisayuki MATSUO, 1965 г.)



3. С-КОНЦЕВОЕ АВТОМАТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ С-КОНЦЕВЫХ ОСТАТКОВ В ВИДЕ ТИОГИДАНТОИНОВ



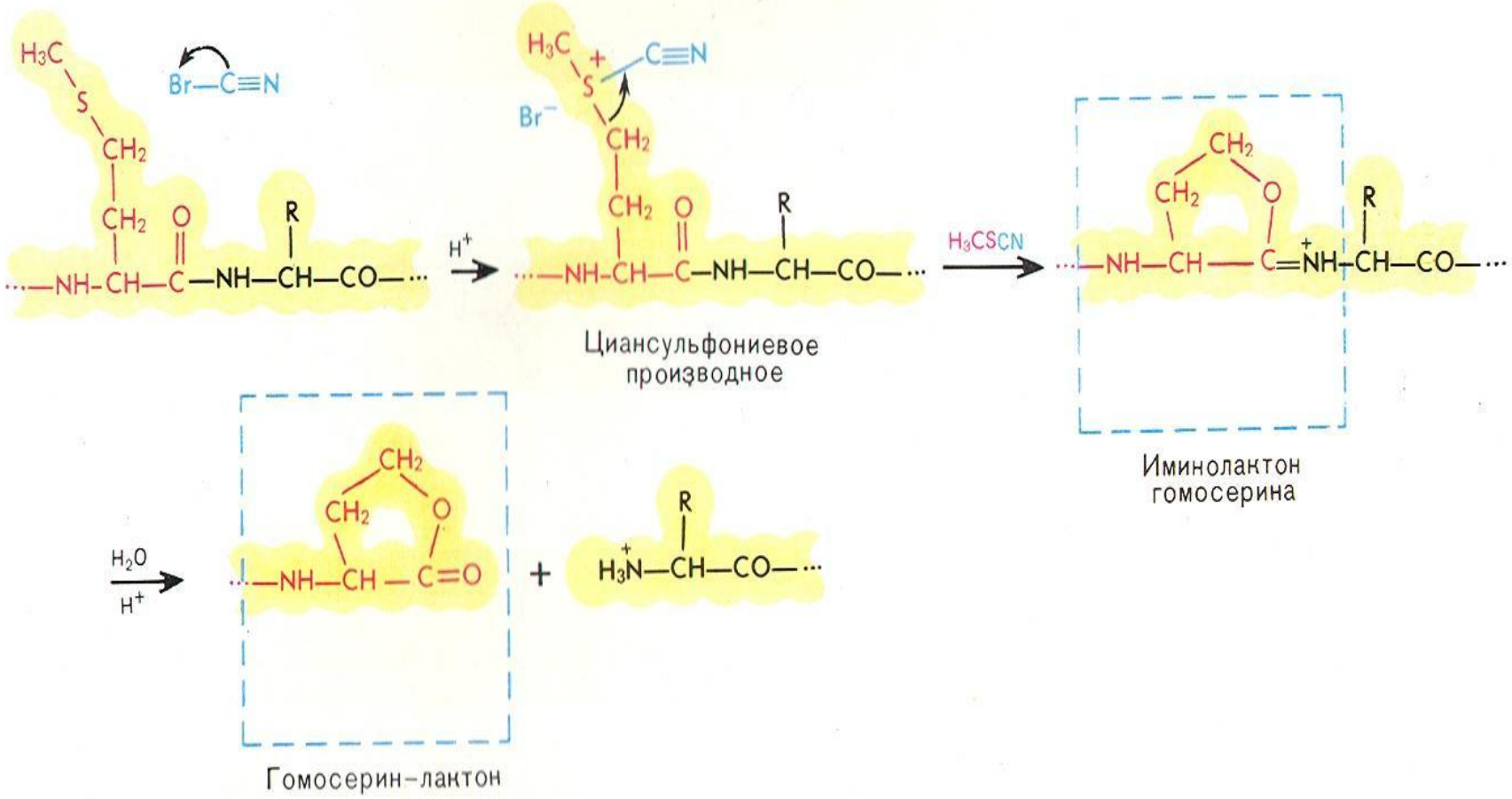


4. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КАРБОКСИПЕПТИДАЗАМИ

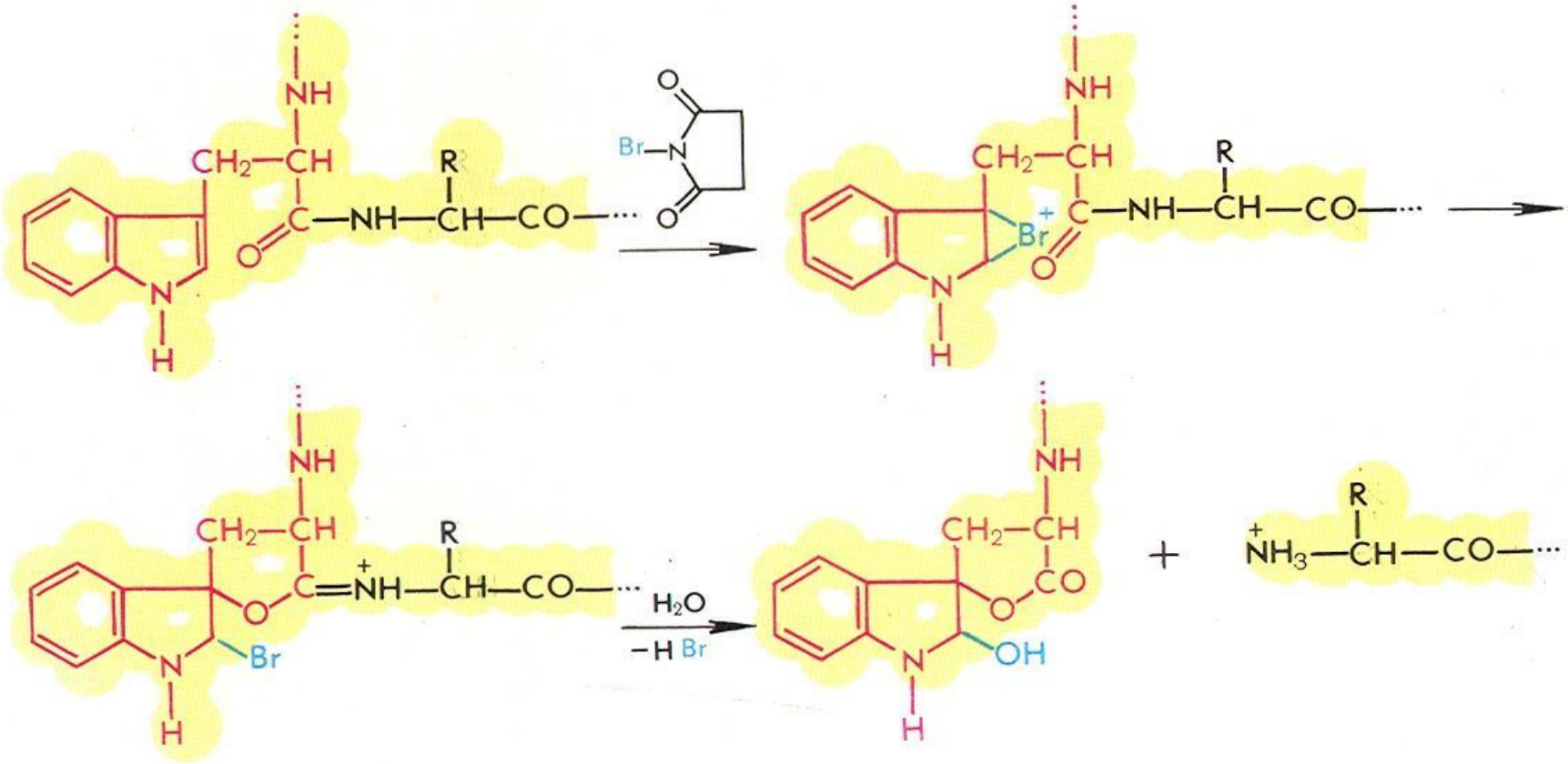
КАРБОКСИ-ПЕПТИДАЗА	A	C	P
ИСТОЧНИК	Поджелудочная железа быка	Цитрусовые, фасоль	*Penicillium, Aspergillus*
ОПТИМУМ pH	7,0-9,0	5,5	2,5
БЫСТРОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, Ala, Met, Thr, Gln, His	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His
МЕДЛЕННОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Asn, Ser, Lys	Ser, Thr, Met, Ala, Asn, Glu,. Gln, Lys, Arg, Pro	Ser, Thr, Met, Ala, Asn, Glu,. Gln, Lys, Arg, Pro
ОЧЕНЬ МЕДЛЕННОЕ ОТЩЕПЛЕНИЕ	Glu, Asp, Gly	Gly	Gly
НЕ ОТЩЕПЛЯЮТСЯ	Pro, HyPro, Arg	HyPro	HyPro

ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ
ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАСЩЕПЛЕНИЯ

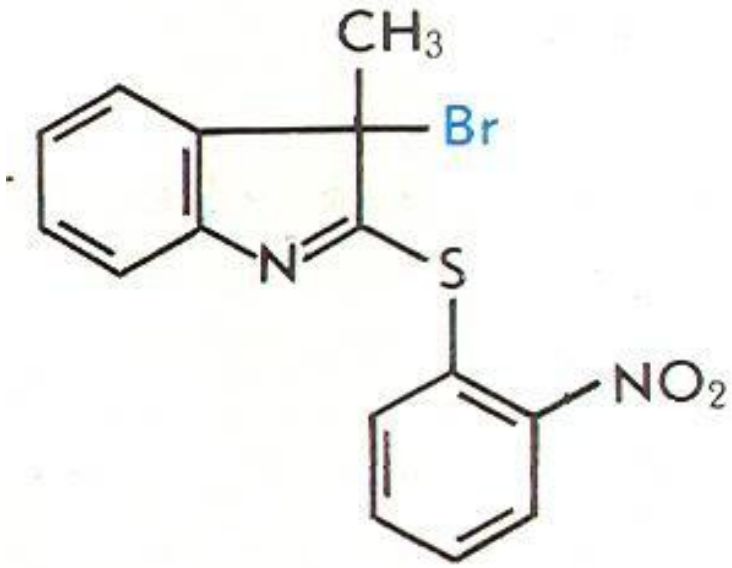
1. **Расщепление по остаткам Met (Эрхард ГРОСС, Бернард ВИТКОП, 1962 г.)**



2. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКУ Trp ПО МЕТОДУ А. ФОНТАНА (1970 г.)



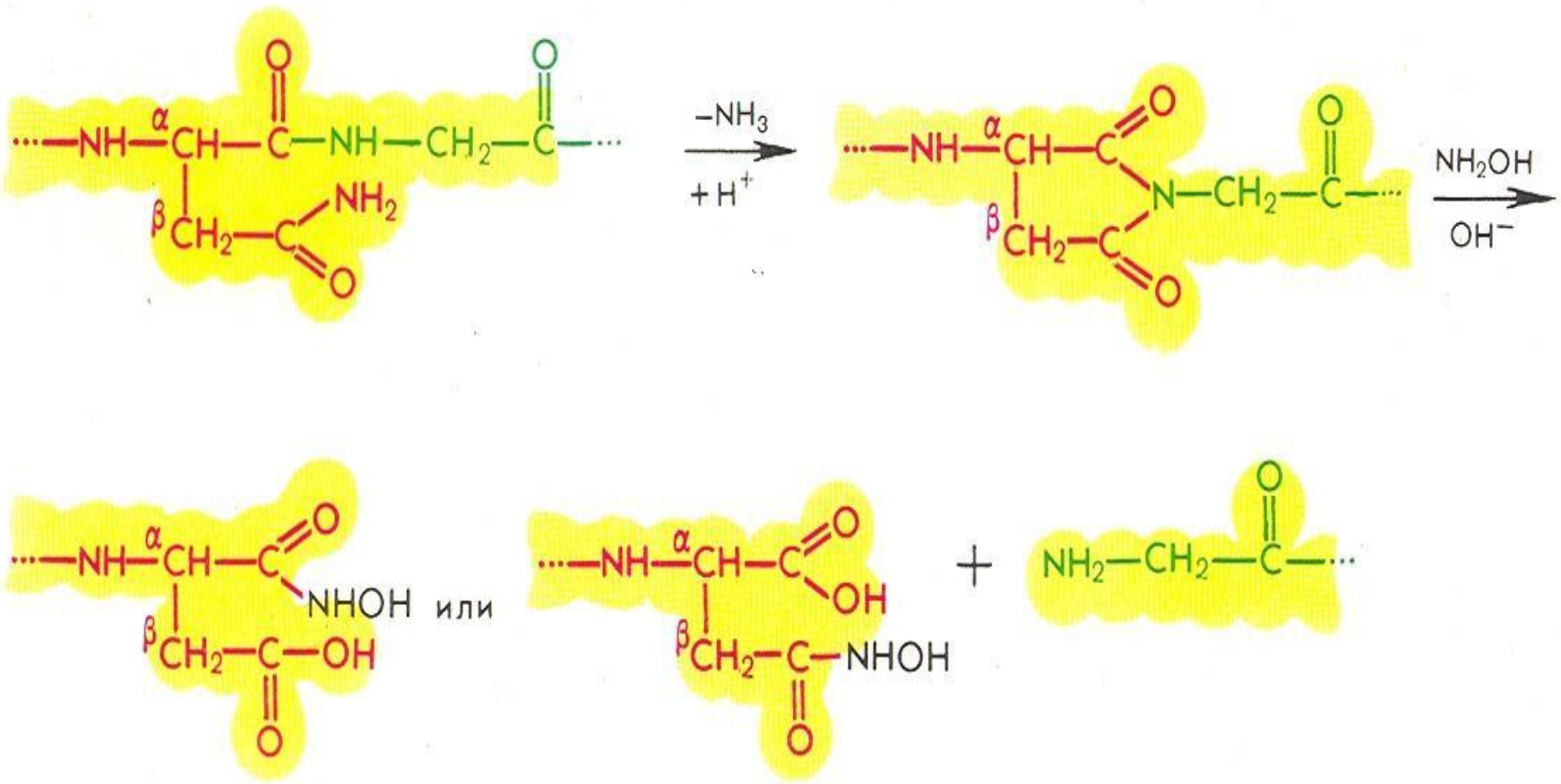
2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3-броминдол



BNPS-скатол

(скатол = 3-метилиндол)

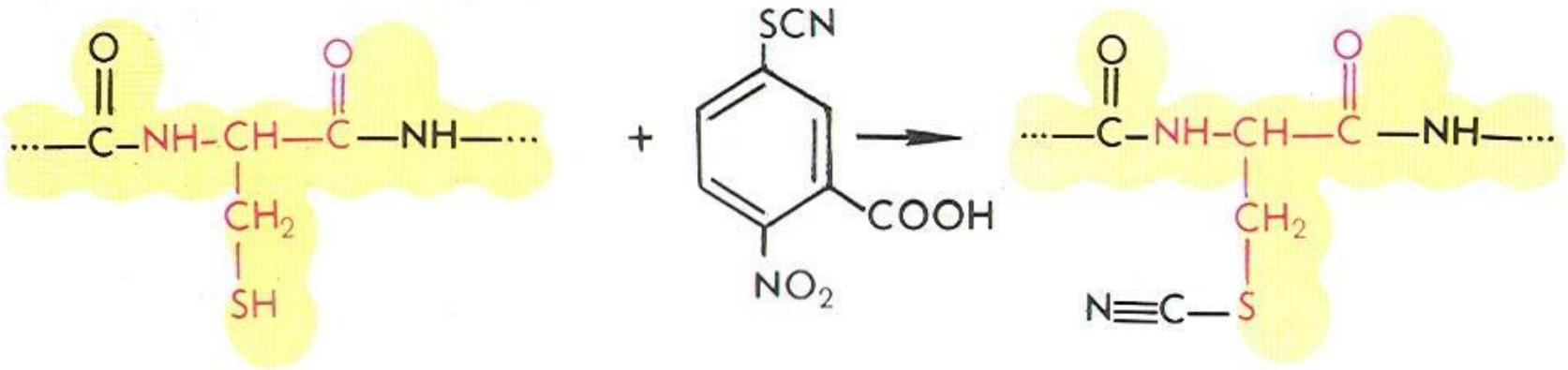
3. РАСЩЕПЛЕНИЕ СВЯЗИ Asn-Gly



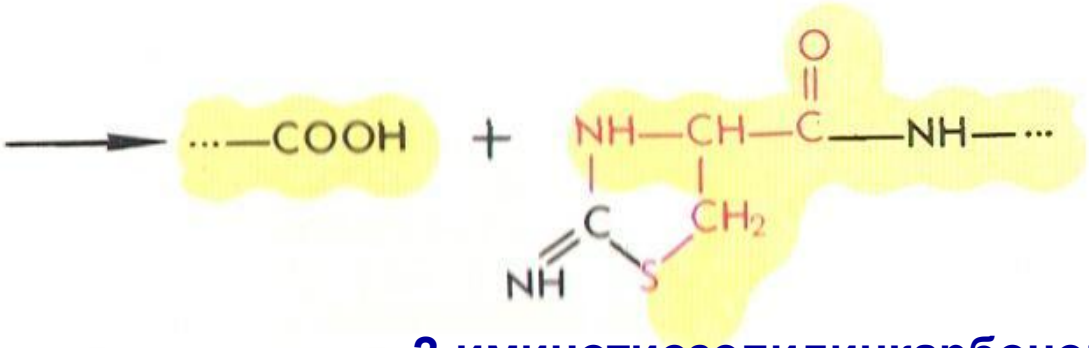
α-Аспартилгидроксамат

β-Аспартилгидроксамат

5. РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ Cys
(А. ПАТЧОРНИК, 1974 г.)



2-нитро-5-тиоцианатбензойная кислота



2-иминотиозолидинкарбоновая кислота

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ФРАГМЕНТАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

ВЫСОКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

1. Трипсин pH 7,0-9,0

   Lys↓—X Arg↓—X

   Lys✳—Pro Arg✳—Pro

2. Протеаза из St. aureus

   pH 4,0 pH 7,8

   Glu—X Asp—Leu

   Y✳—Pro

3. Лизин-специфическая протеаза

   pH 8,0 X—Lys

4. Клострипаин

   pH 7,7 Arg—X Lys—X

5. Тромбин pH 8,0

   Arg—X

   X=Gly, Ala, Val, Arg, Asp, His, Cys

6. Протеаза из подчелюстной железы мышей pH 7,5-8,0

   Arg—X Arg✳—Val Arg✳—Arg

7. Протеаза из почек ягненка

   pH 7,5-8,0 Pro—X Pro✳—Pro

НИЗКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

1. Химотрипсин pH 7,8-9,0

   Tyr↓—X Phe↓—X Trp↓—X

   Leu↓—X Met↓—X His↓—X с меньшей скоростью;

   X✳—Pro

2. Термолизин pH 7,0-9,0

   X—Ile X—Leu X—Val

   X—Phe X—Tyr X—Trp

   X—Ala X—Met

   X✳—Y—Pro

3. Пепсин pH 2,0

   связи ароматических и объемных алифатических аминокислот, Glu

4. Папаин pH 5,0-7,5

   широкая специфичность

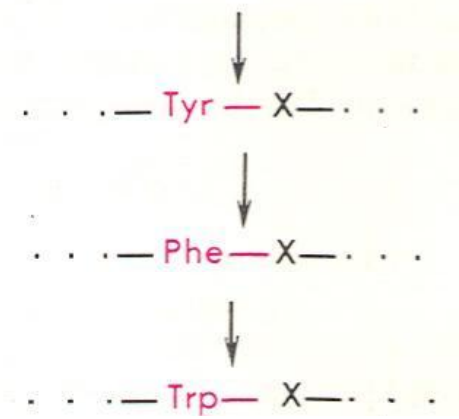
5. Эластаза pH 7,0-9,0

   Ser—X Gly—X

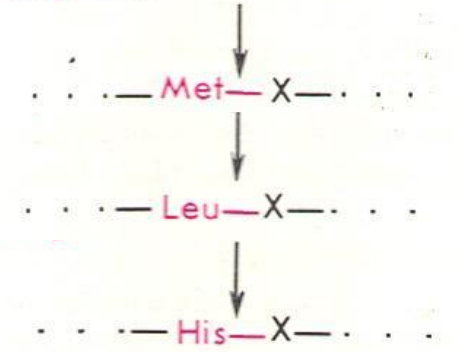
   Ala—X Val—X Leu—X

ХИМОТРИПСИН

pH 7,8 – 9,0

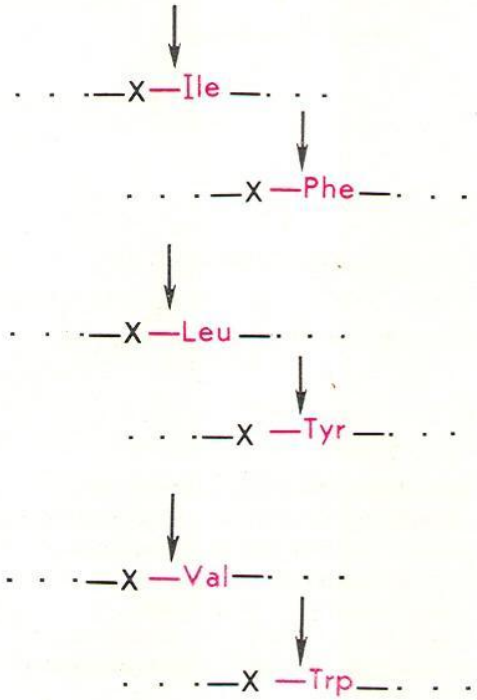


С МЕНЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ

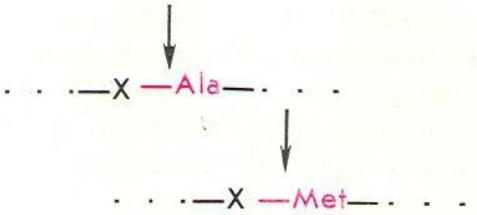


ТЕРМОЛИЗИН

pH 7,0 – 9,0

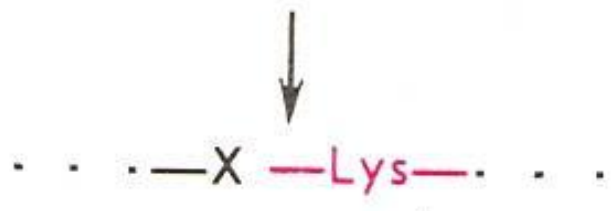


С МЕНЬШЕЙ СКОРОСТЬЮ



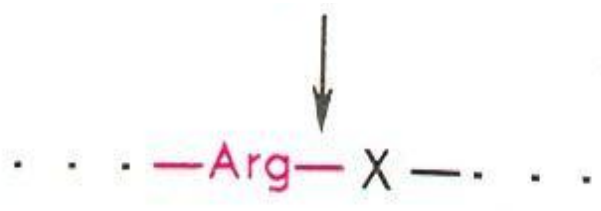
ЛИЗИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТЕАЗА ИЗ *Armillaria mellea*

pH 8,0



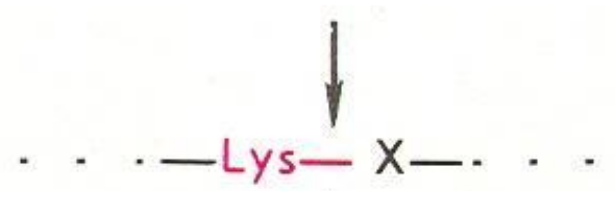
КЛОСТРИПАИН ИЗ *Clostridium histolyticum*

pH 7,7



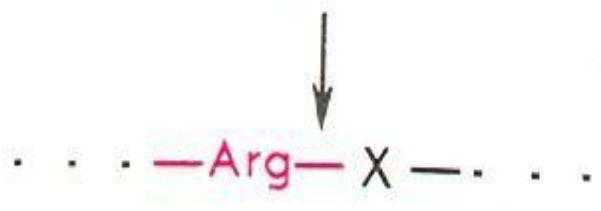
ЭНДОПРОТЕИНАЗА Lys-C ИЗ *Lysobacter ensymogenes*

pH 7,7



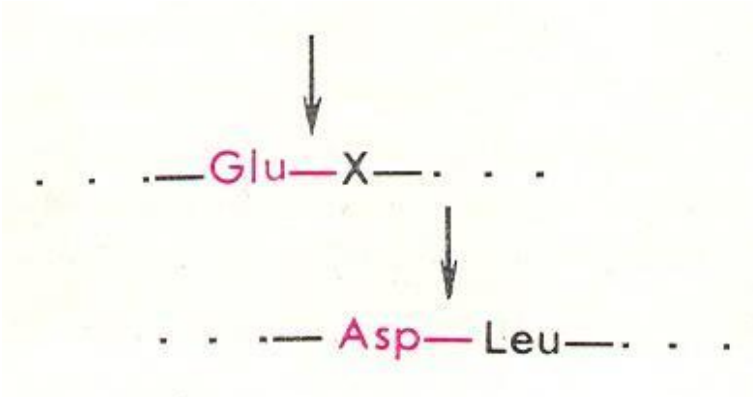
ЭНДОПРОТЕИНАЗА Arg-C ИЗ подчелюстной железы мыши

pH 7,5 – 8,0



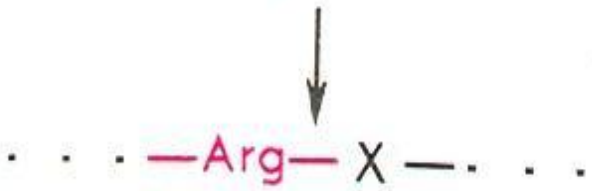
ПРОТЕАЗА ИЗ *St. aureus*
Г.Р.ДРАПЮ, 1972 г.

pH 4,0; pH 7,8

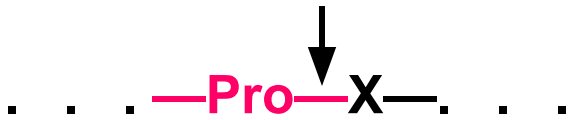


ТРОМБИН

pH 8,0



X = Gly, Ala, Arg, Asp, Cys, Val, His

ПРОЛИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТЕАЗА
из почек ягненка

pH 7,5 - 8,0