

Приемы разделения мембранных липидов на классы



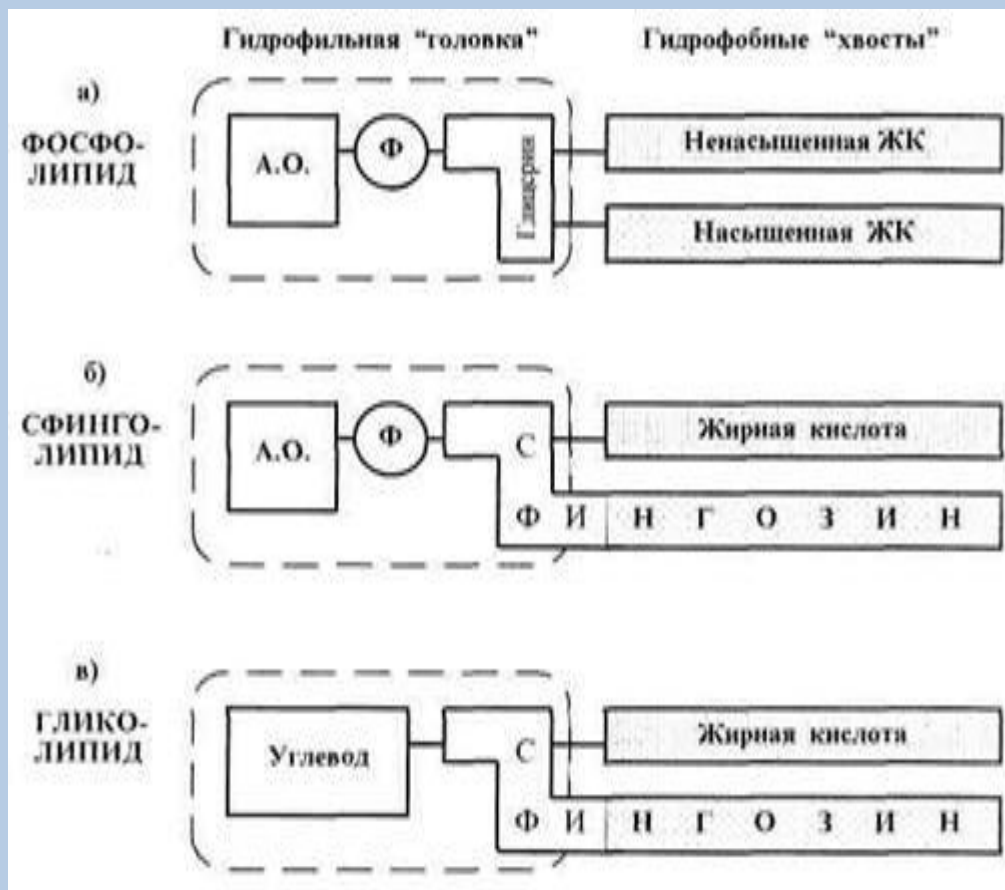
Выполнил: Русланов Ы.Р

группа 4702

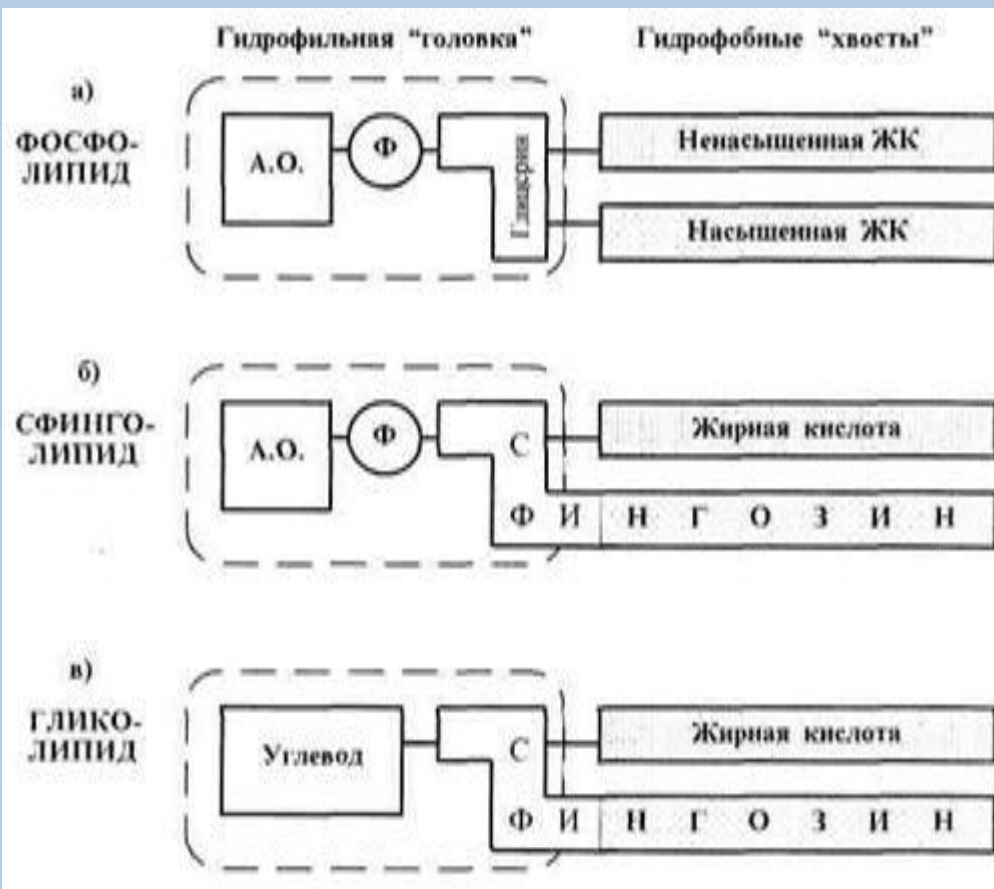
Проверила: Зайцева Т.Н

В состав мембран входят липиды следующих классов:

- 1 - **фосфолипиды (ФЛ),**
- 2- **сфинголипиды (СЛ),**
- 3- **гликолипиды (ГЛ),**
- 4- **стероиды, а именно холестерин (ХС).**



Именно липиды первых трех перечисленных классов имеют то характерное строение (гидрофильная «головка» и два гидрофобных «хвоста»)



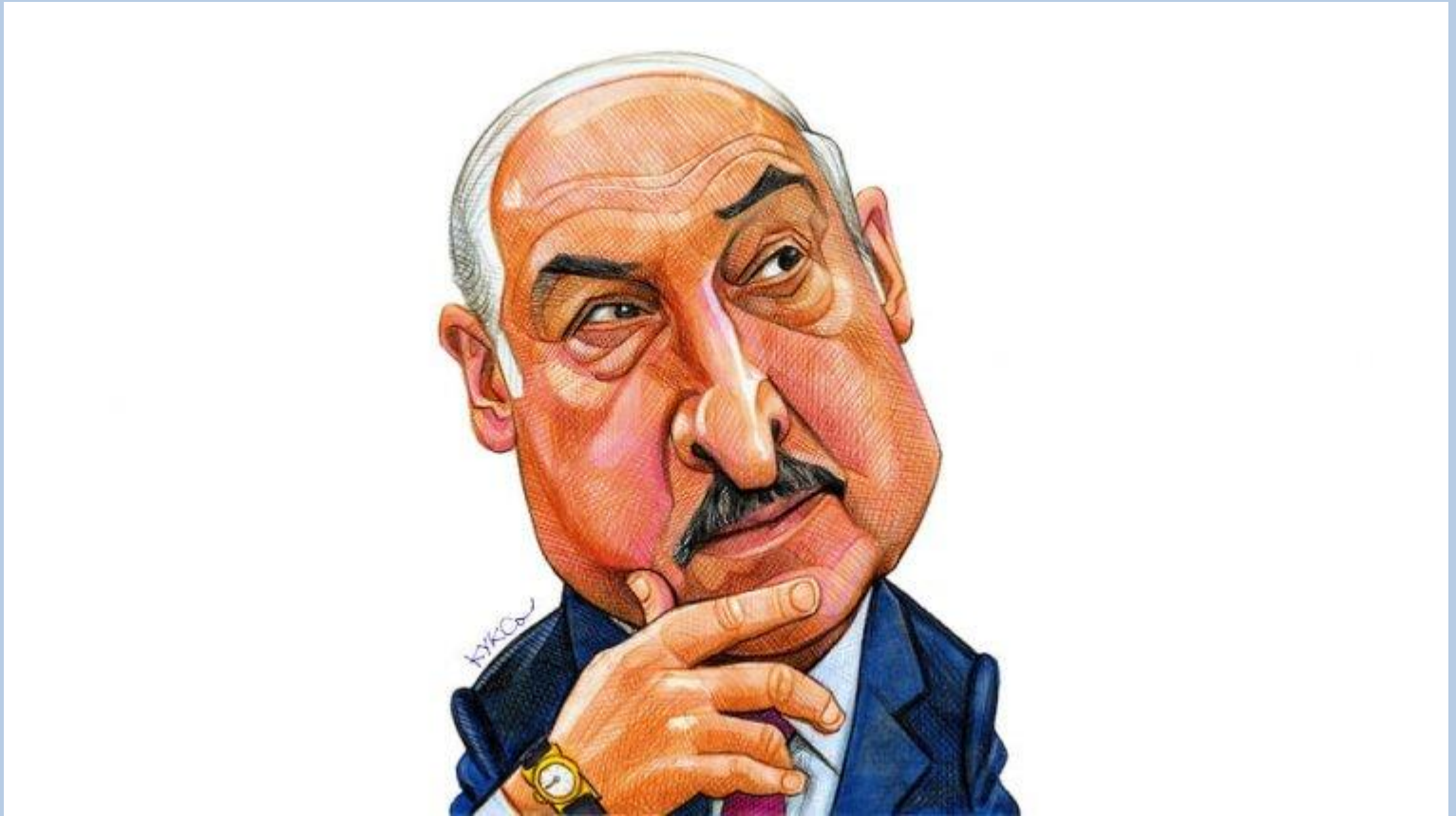
У фосфолипидов (ФЛ) в состав «головки» обычно входят последовательно связанные друг с другом остатки азотсодержащего основания (холина, коламина или серина), фосфатной группы и трехатомного спирта глицерина. Всё это полярные группировки (поскольку содержат много гетероатомов), и потому они являются гидрофильными. Остатки же жирных кислот (ЖК), образующие гидрофобные «хвосты», соединены с глицерином. В качестве насыщенной кислоты часто выступает пальмитиновая кислота, а в качестве ненасыщенной — олеиновая кислота. В месте нахождения двойной связи углеводородная цепь делает изгиб на 40° . Поэтому, несмотря на различие С- атомов в олеиновой и пальмитиновой кислотах, длина обоих «хвостов» оказывается практически одинаковой. Это облегчает образование двойного слоя (бислоя).

Сфинголипиды (СЛ) по сравнению с ФЛ, состоит в том, что вместо глицерина и одной из жирных кислот они включают сфингозин (он же сфингенин) — двухатомный аминокислотный спирт, содержащий 18 С-атомов и 1 двойную связь. Поэтому начальная часть сфингозина входит в гидрофильную «головку» СЛ, а последующая углеводородная цепь служит одним из гидрофобных «хвостов».

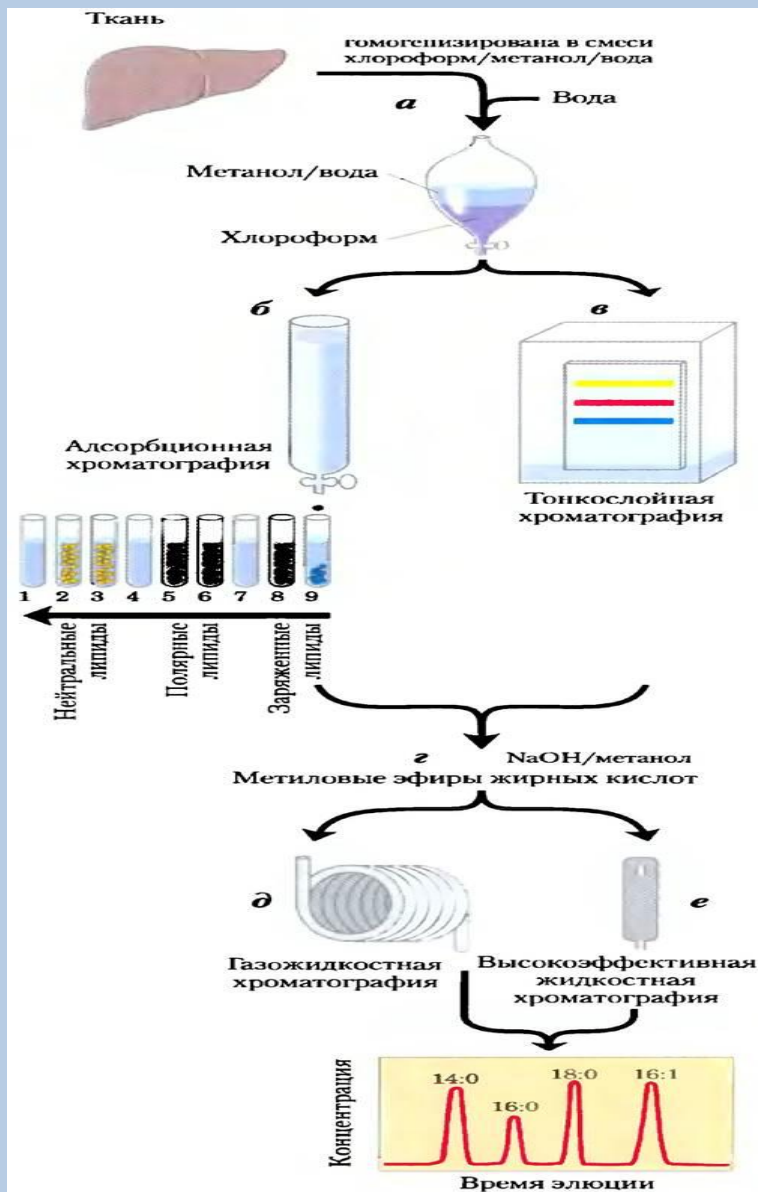
Типичный представитель СЛ — **сфингомиелин**, где в качестве азотсодержащего основания выступает холин.

Гликолипиды (ГЛ) тоже содержат остаток сфингозина. Но в состав гидрофильной «головки» вместо азотсодержащего основания и фосфатной группы входит какой-либо углевод (У). По природе последнего ГЛ подразделяются на две группы: **цереброзиды** (здесь У — галактоза или глюкоза) и ганглиозиды (У — олигосахарид, причем обычно разветвленный). В качестве же ЖК гликолипиды часто содержат особые кислоты — **нервоновую** или **цереброновую**.

Общий подход к разделению сложных смесей липидов основан на различиях в их полярности или растворимости в неполярных растворителях.



Для экстракции липидов требуются органические

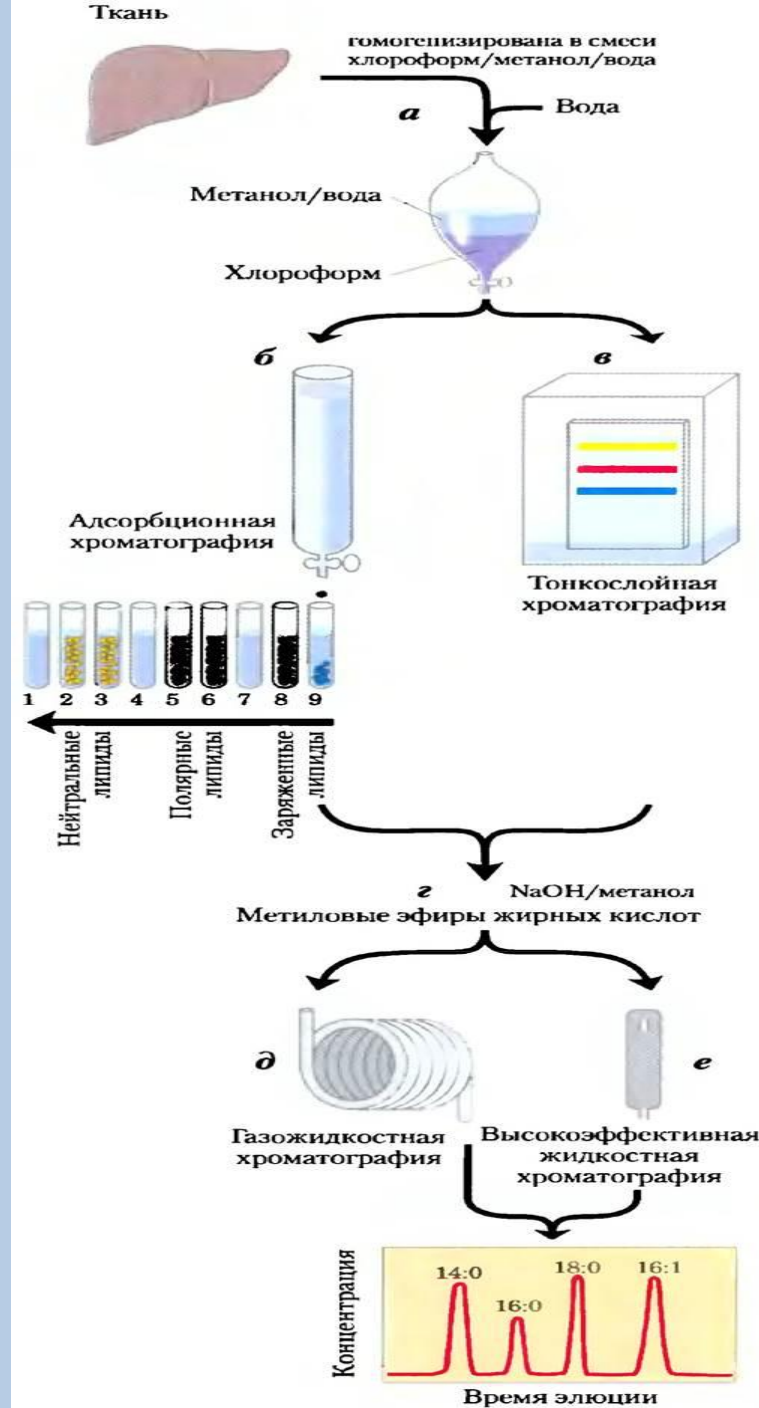


Наиболее часто применяемым экстракционным агентом является смесь хлороформа, метанола и воды в соотношении (1:2:0,8 по объему). В этом соотношении растворители хорошо смешиваются, образуя одну фазу. После того как ткань гомогенизируют в растворителе для экстракции всех липидов, к полученному экстракту добавляют некоторое количество воды, и смесь расслаивается на две фазы — водно-метанольную (верхняя фаза) и хлороформенную (нижняя фаза). Липиды остаются в хлороформенном слое, а более полярные молекулы, такие как белки и сахара, попадают в водно-метанольный слой.

Методом адсорбционной хроматографии разделяют липиды разной полярности

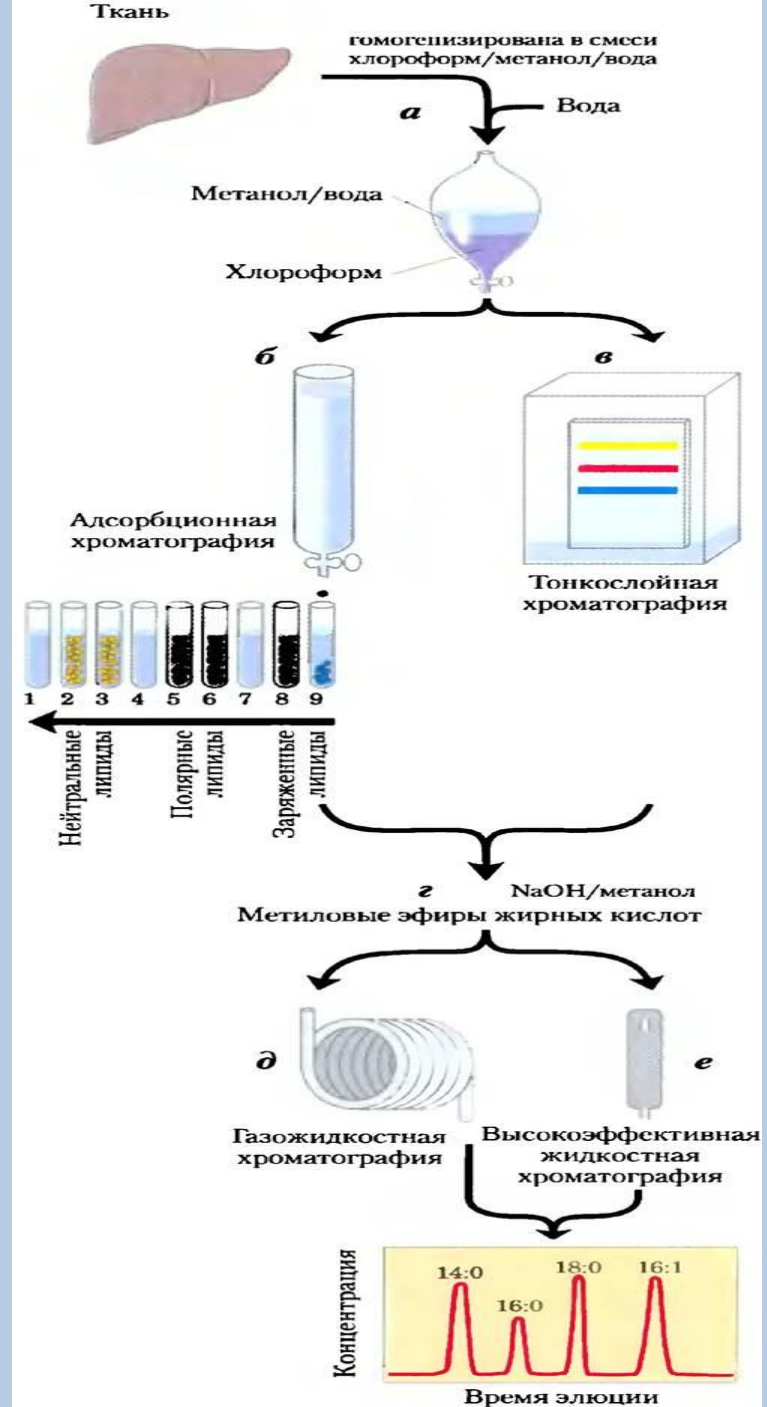
Сложные смеси тканевых липидов можно разделить на фракции с помощью хроматографических методов, основанных на различной полярности липидов разных типов.

В адсорбционной хроматографии (рис.б) нерастворимый полярный материал, такой как силикагель (форма кремниевой кислоты $\text{Si}(\text{OH})_4$), помещают в стеклянную колонку, а смесь липидов (в виде хлороформенного раствора) добавляют в верхнюю часть колонки.



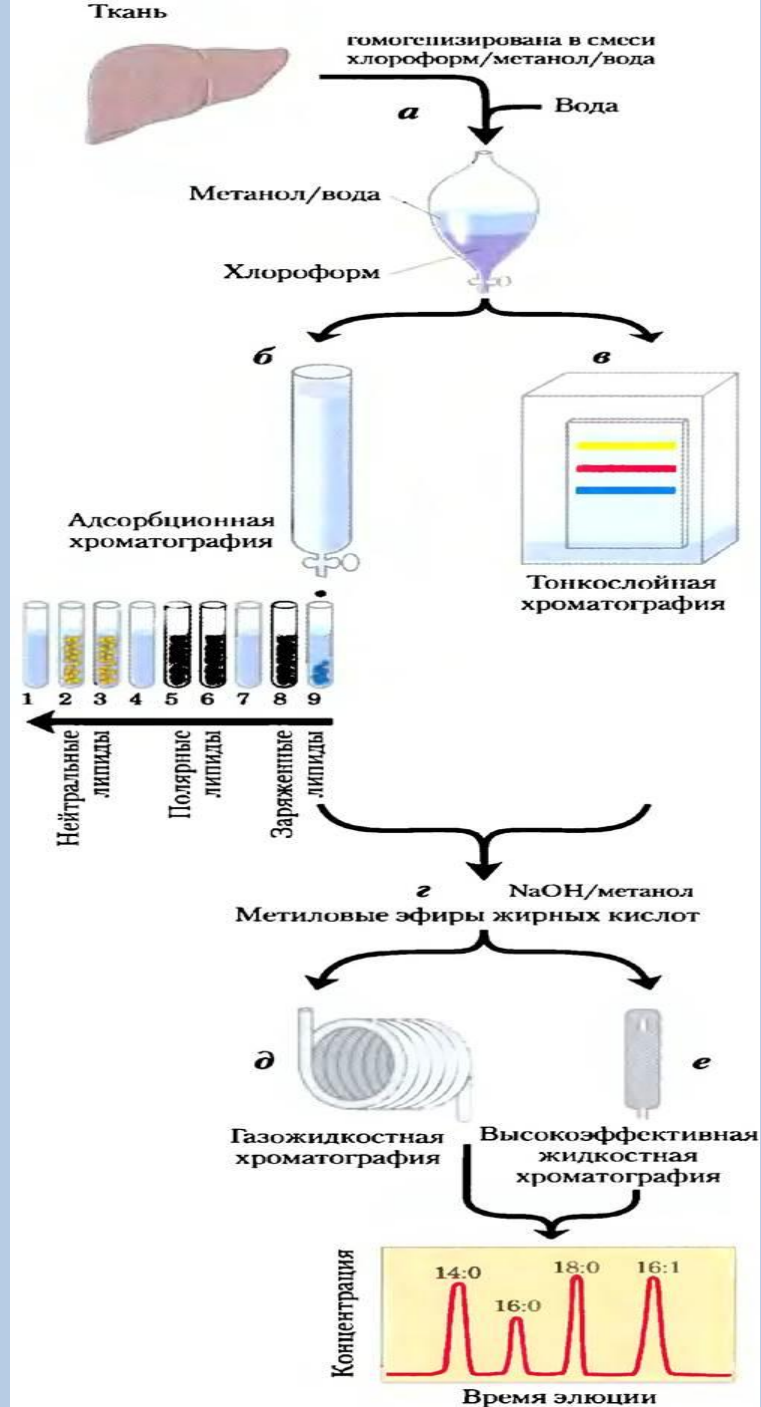
Методом адсорбционной хроматографии разделяют липиды разной полярности

(При высокоэффективной жидкостной хроматографии колонка меньшего диаметра, а растворители продавливаются через колонку под высоким давлением.) Полярные липиды прочно связываются с полярной кремневой кислотой, нейтральные же липиды проходят через колонку и выходят при первой промывке хлороформом. Затем вымываются полярные липиды, они выходят в порядке увеличения полярности при промывании колонки растворителями с постепенно возрастающей полярностью. Незаряженные, но полярные липиды (например, цереброзиды) вымываются ацетоном, а очень полярные или заряженные липиды (такие как глицерофосфолипиды) элюируются метанолом.



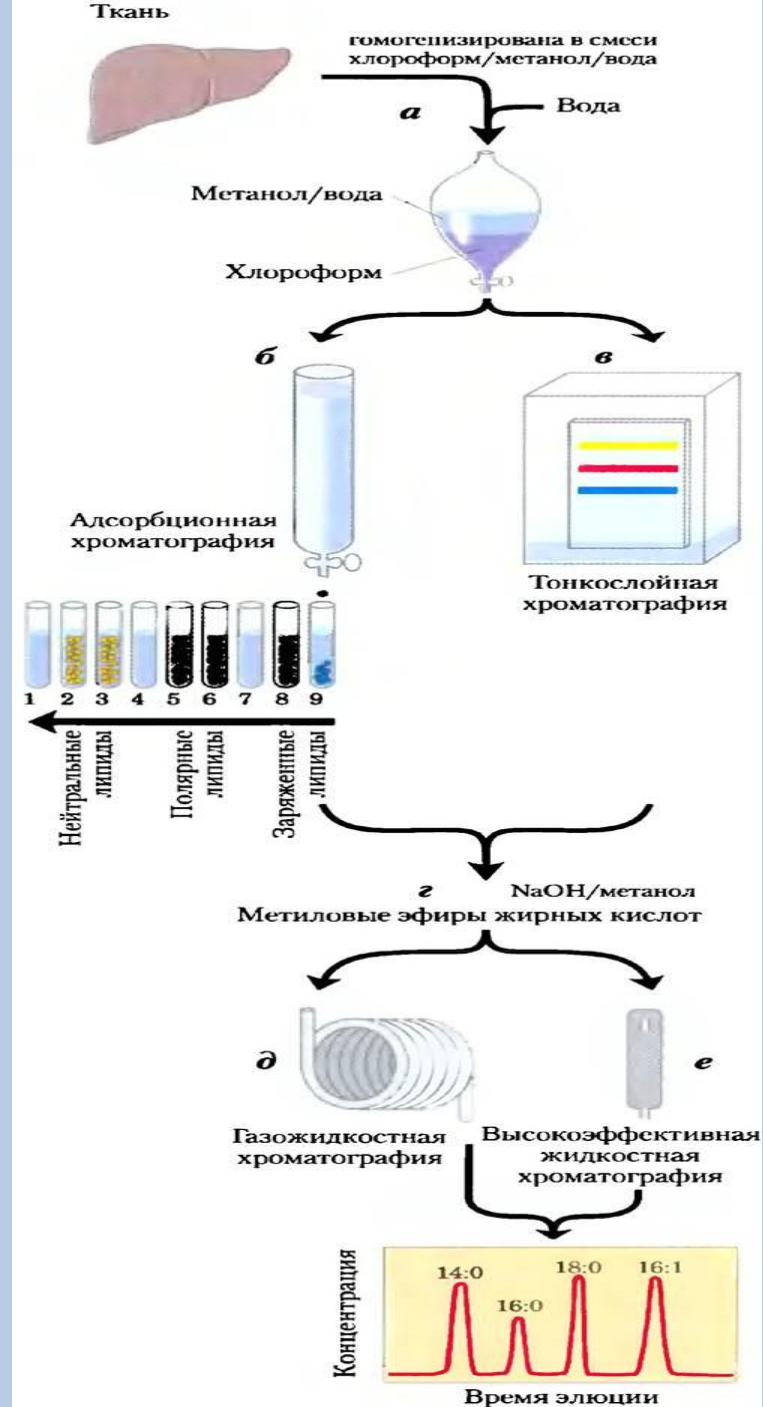
В тонкослойной хроматографии на кремневой кислоте используется тот же принцип (рис. в).

Тонкий слой силикагеля распределен по стеклянной пластинке, к которой он прилипает. Небольшое количество липидов, растворенных в хлороформе, наносят близко к краю пластинки, которую погружают в плоский контейнер с органическим растворителем или смесью растворителей. Все это находится внутри камеры, насыщенной парами растворителя. Поднимаясь по пластинке вследствие капиллярного эффекта, растворитель несет с собой липиды.



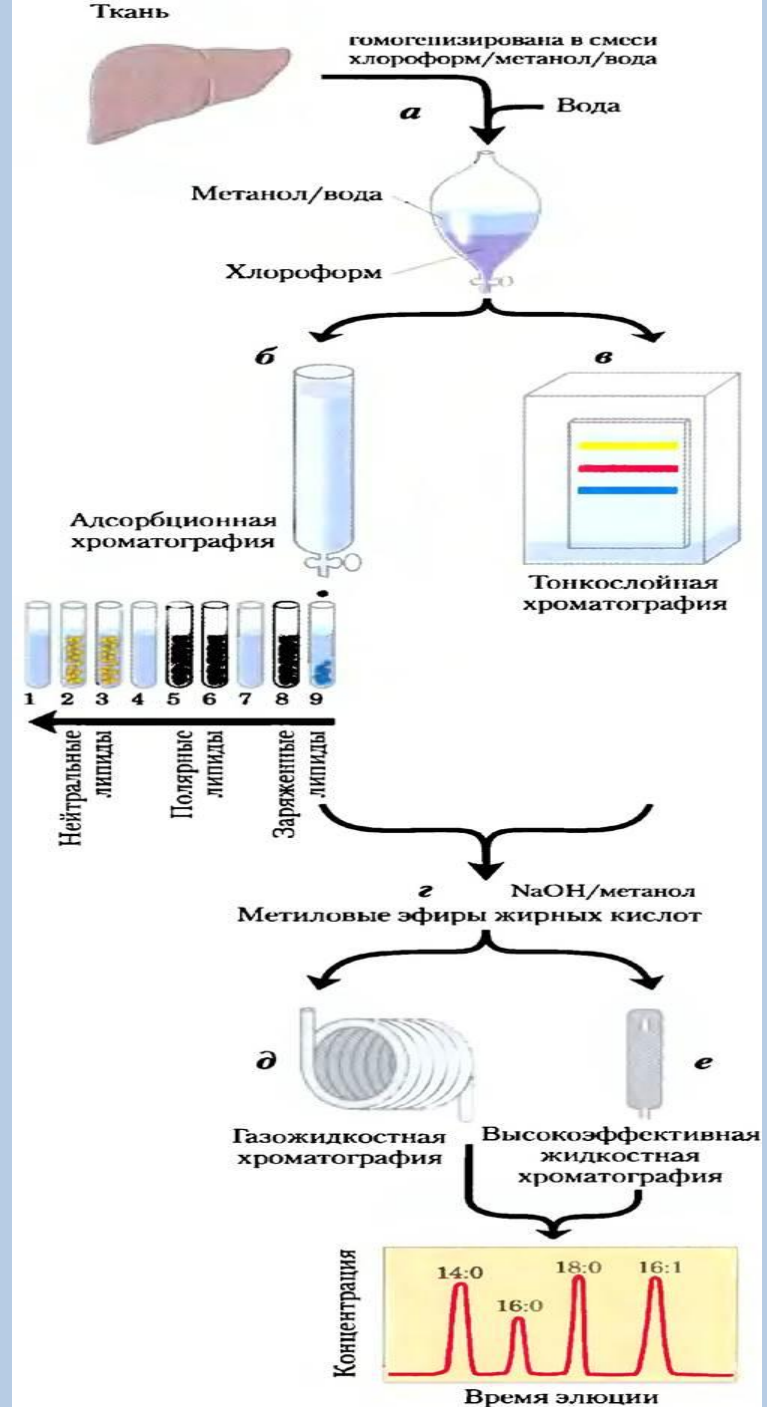
В тонкослойной хроматографии на кремневой кислоте используется тот же принцип (рис. в).

Менее полярные липиды продвигаются дальше, так как они обладают меньшим стремлением к связыванию с кремниевой кислотой. Разделенные липиды можно обнаружить, опрыскивая пластинку красителем (родамином), который флуоресцирует при связывании с липидами, или выдерживая липиды в парах иода. Иод обратимо реагирует с двойными связями в жирных кислотах, так что липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, дают желтую или коричневую окраску. Для обнаружения специфических липидов используется ряд других реагентов. Для последующего анализа участки, содержащие разделенные липиды, соскабливают с пластинки, и вновь экстрагируют липиды органическим растворителем.



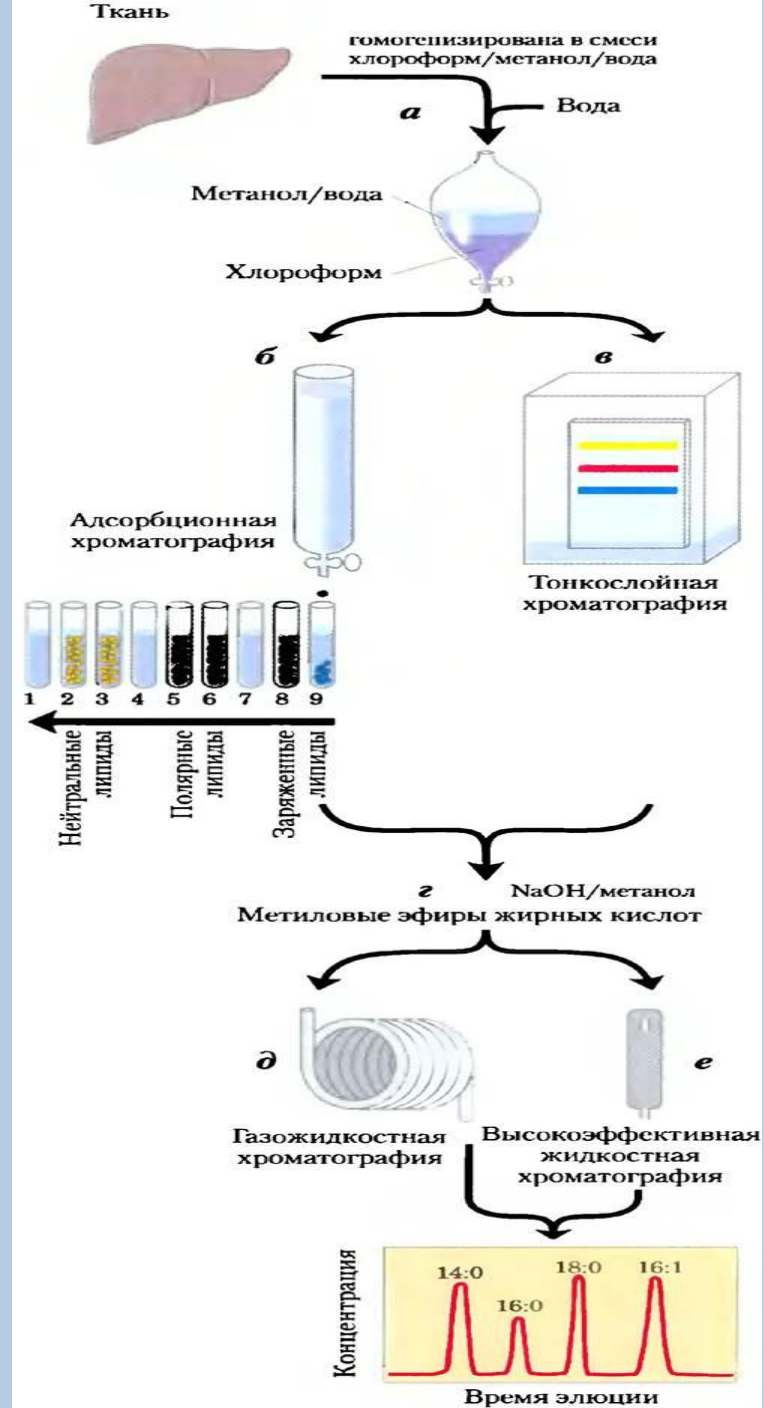
Методом газожидкостной хроматографии разделяют смеси летучих производных липидов

Методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) разделяют летучие компоненты смеси в соответствии с их относительной способностью растворяться в инертном материале, наполняющем хроматографическую колонку, улетучиваться и двигаться через колонку с потоком инертного газа, например, гелия. Некоторые липиды летучи от природы, но большинство приходится сначала подвергать превращению в производные с увеличенной летучестью (т. е. более низкой температурой кипения).



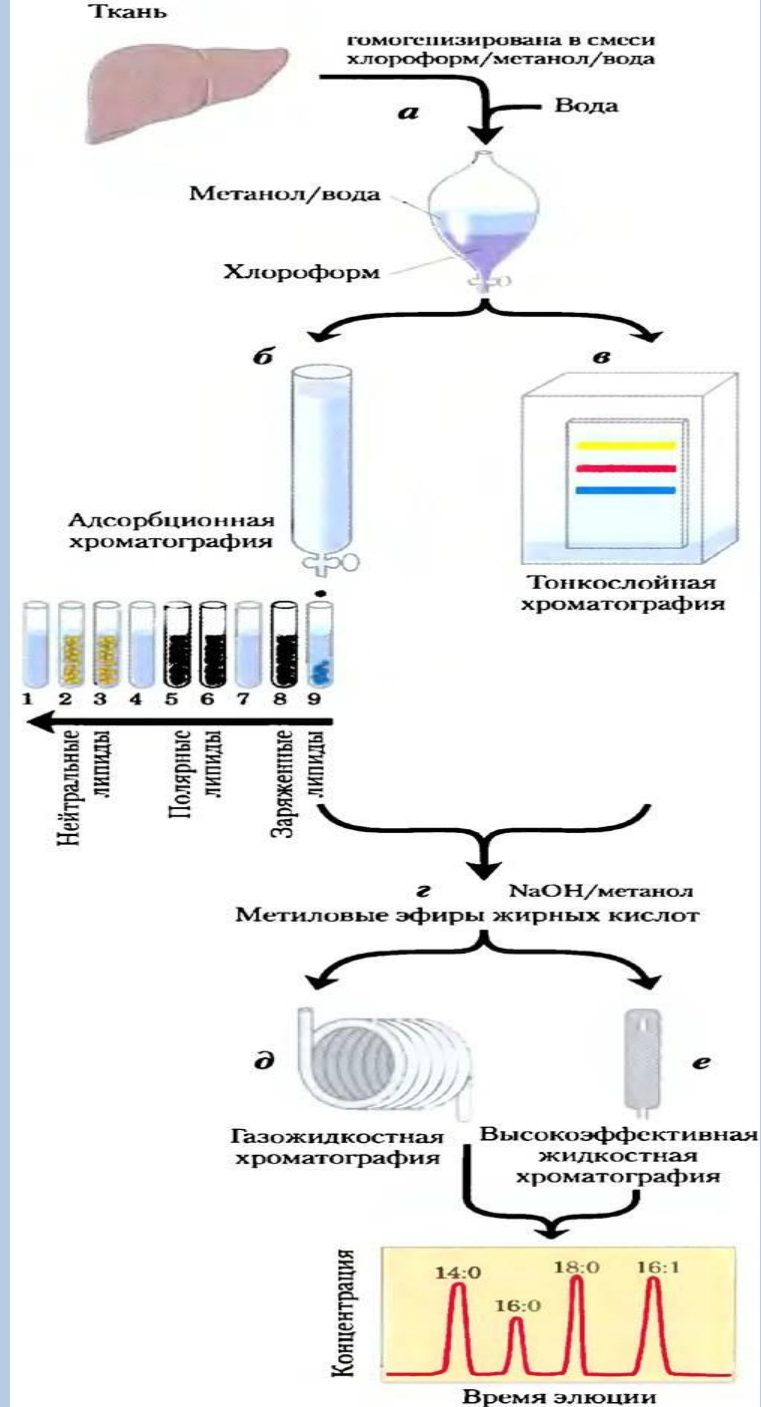
Методом газожидкостной хроматографии разделяют смеси летучих производных липидов

Для анализа жирных кислот образец фосфолипидов сначала нагревают в смеси метанол/НСl или метанол/NaOH, при этом жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью с глицерином, превращаются в метиловые эфиры (происходит переэтерификация; рис. ,г). Эти метиловые эфиры жирных кислот затем загружают в газожидкостную хроматографическую колонку, колонку нагревают, чтобы сделать компоненты летучими. Эфиры жирных кислот, которые лучше растворяются в материале, наполняющем колонку, переходят в раствор; менее растворимые липиды



Методом газожидкостной хроматографии разделяют смеси летучих производных липидов

Порядок элюирования зависит от природы твердого адсорбента в колонке и от температуры кипения компонентов липидной смеси. Таким образом удается полностью разделить на компоненты смеси жирных кислот с различной длиной углеродной цепи и различной степенью ненасыщенности (рис. д).



**Липидомика занимается
классификацией липидов и их
функций**

Категория	Код категории	Примеры
Жирные кислоты	FA	Олеиновая кислота, стероил-СоА, пальмитоилкарнитин
Глицеролипиды	GL	Ди- и триацилглицериды
Глицерофосфолипиды	GP	Фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин
Сфинголипиды	SP	Сфингомиелин, ганглиозид GM2
Липиды-стероиды	ST	Холестерин, прогестерон, желчные кислоты
Липиды-пренолы	PR	Фарнезол, гераниол, ретинол, убихинон
Сахаролипиды	SL	Липополисахариды
Поликетиды	PK	Тетрациклин, афлатоксин В ₁



Спасибо
за
внимание!