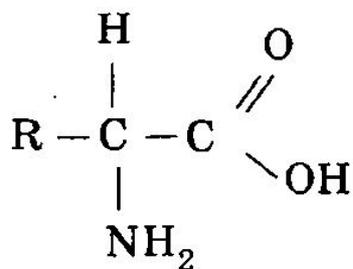


## ЛЕКЦИЯ 6

### Органические вещества клетки. Белки и их роль в клетке

*Белки* — биологические полимеры, мономерами которых являются аминокислоты. В ходе образования белка аминокислоты взаимодействуют между собой, образуя пептидные связи, в результате чего формируется длинная полипептидная цепь. Понятия «белок» и «пептид» близки между собой, однако между ними имеются и различия. Пептидами обычно называют олигопептиды, т. е. те, чья цепь содержит наибольшее число аминокислотных остатков (10-15), а белками называют пептиды, содержащие большое число аминокислотных остатков (до нескольких тысяч) и имеющие определенную компактную пространственную структуру, так как длинная полипептидная цепь является энергетически невыгодным состоянием. Выделяются четыре уровня пространственной организации (структуры) белков. Все структуры формируются в каналах эндоплазматической сети. При воздействии неблагоприятных факторов среды (облучение, повышенная температура, химические вещества) структуры белка могут разрушаться — происходит денатурация. Если этот процесс не затрагивает первичной структуры, он обратим, и по окончании воздействия молекула самопроизвольно восстанавливается. Первичная же структура невосстановима, так как формируется только на рибосомах при участии сложнейшего механизма биосинтеза белков. В зависимости от пространственной структуры белки бывают фибриллярные (в виде волокон) — строительные белки и глобулярные (в виде шара) — ферменты, антитела, некоторые гормоны и др. Роль белков очень многообразна. Это главнейший строительный материал клеток: они входят в состав мембран, рибосом, хромосом, матрикса митохондрий, стромы пластид. Белки являются структурным элементом ферментов — катализаторов, влияющих на процессы метаболизма клеток — ассимиляцию (синтез) и диссимиляцию (расщепление) веществ. Гормоны — регуляторы процессов роста и развития любых организмов — также представляют собой белки. Белки выполняют транспортную (перенос  $O_2$  и  $CO_2$  гемоглобином), двигательную (сократительные белки мышц), защитную (антитела), сигнальную (реакция на раздражение), механическую (прочность различных структур) функции и могут быть источником энергии. При расщеплении 1 г белка освобождается 17,6 кДж энергии, т. е. столько же, сколько при расщеплении 1 г углеводов. В организме каждого человека около 100 тыс. различных белков, отличающихся от белков другого человека. Поэтому при пересадке органов возникает несовместимость и чужой орган отторгается. Переливание крови без учета специфики ее белков приводит к склеиванию эритроцитов. Аналогичный механизм приводит к образованию антител при реакции на чужеродный белок микробов.

*Аминокислоты* — органические вещества, содержащие карбоксильную ( $-COOH$ ) и аминную ( $-NH_2$ ) группы, присоединенные к какому-либо радикалу. У аминокислот, входящих в состав белков, аминогруппа (или одна из аминогрупп, если речь идет об аминокислотах, содержащих две такие группы) всегда находится в  $\alpha$ -положении, т. е. присоединена к атому углерода, ближайшему к карбоксильной группе.



В различных живых организмах встречается около 200 аминокислот; из них лишь 20 участвуют в образовании белка. Восемь из этих двадцати (валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, триптофан, треонин, фенилаланин) называют незаменимыми на том основании, что они не могут синтезироваться человеческим организмом и поэтому должны поступать в него извне с пищей.

---

Суммарный заряд белка определяется соотношением отрицательно и положительно заряженных аминокислот на поверхности белковых молекул, а также величиной рН раствора. Отрицательный заряд могут приобретать в нейтральной и щелочной среде глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в боковых радикалах которых содержатся свободные карбоксильные группы. Лизин, аргинин и гистидин в нейтральной и кислой среде заряжаются положительно благодаря наличию в их боковых радикалах, соответственно, аминогруппы, гуанидиновой группы и имидазольного кольца.

Значение рН, при котором суммарный заряд белка является минимально возможным (нулевым), называется *изоэлектрической точкой* (ИЭТ, pI). В изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна (изоэлектрическое состояние), вследствие чего водный раствор белка при рН, равном pI, наименее устойчив и белок легче выпадает в осадок. Это явление применяется для определения изоэлектрической точки белка. Благодаря наличию заряда белки подвижны в электрическом поле. Метод исследования белков, основанный на различной скорости движения белковых частиц, различающихся величиной заряда при определенном значении рН, называется *электрофорезом*.

---

*Пептидная связь* — ковалентная связь между остатком карбоксильной группы одной аминокислоты и остатком аминогруппы другой аминокислоты.

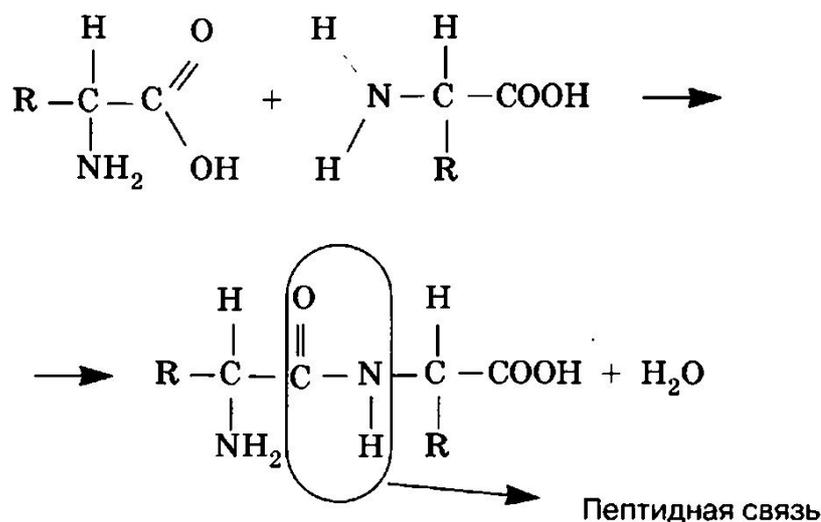


Таблица 13. Образование структур (уровней пространственной организации) белков

Структура	Признаки структуры	Основные типы белков	
		Глобулярные	Фибриллярные
Первичная	Морфологические особенности структуры	Линейная последовательность аминокислот в полипептидной цепи (что в конечном счете предопределяет все другие структуры молекулы)	
	Связи и силы, участвующие в образовании структуры	Ковалентные пептидные связи. (Пептидная связь – это связь между остатком карбоксильной группы одной аминокислоты и остатком аминогруппы другой аминокислоты).	
Вторичная	Морфологические особенности структуры	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -структура или спирали с параметрами, отличными от параметров спиралей глобулярных белков
	Связи и силы, участвующие в образовании структуры	Водородные связи между остатком карбоксильной группы одной аминокислоты и остатком аминогруппы другой аминокислоты, удаленной от первой на четыре аминокислотных остатка	В $\beta$ -структуре – водородные связи между остатками карбоксильных и аминогрупп одной цепи и остатками одноименных групп другой цепи. В спиральных – аналогично $\alpha$ -спиралям, но расстояние между витками иное.
Третичная	Морфологические особенности структуры	Глобула, образующаяся в результате компактной укладки $\alpha$ -спирали	$\beta$ -Структуры, уложенные параллельными слоями, либо суперспираль – несколько спиралей,

			скрученных вместе (наподобие каната)
	Связи и силы, участвующие в образовании структуры	Ионные, водородные, Ковалентные (дисульфидные мостики), Гидрофобные взаимодействия	Между β-структурами - в основном водородные. В суперспиралях - водородные и ковалентные (дисульфидные мостики)
Четвертичная	Морфологические особенности структуры	Агрегат из нескольких глобул. Свойственна лишь белкам с особо сложной структурой	Микрофибриллы, состоящие из соответствующих элементов третичной структуры.
	Связи и силы, участвующие в образовании структуры	В основном силы межмолекулярного притяжения (в меньшей степени — водородные и ионные)	В основном силы межмолекулярного притяжения, а также ковалентные (у белков, обладающих особой механической прочностью), водородные и ионные.

Таблица 14. Основные функции белков и пептидов

Функция	Уровень организации	Примеры
Структурная	Клеточный	Обязательный компонент всех мембран клетки
	Тканевый и органнй	1. Коллаген – компонент соединительной ткани (костной ткани, хрящей и сухожилий) и кожи. 2. Кератин – компонент волос и ногтей. 3. Эластин – эластичный компонент соединительной ткани связок, стенок кровеносных сосудов. 4. Мукопротеины – основа слизистых секретов.
Транспортная	Клеточный	1. Участие в активном транспорте веществ через клеточные мембраны против градиента концентраций (Na-K-АТФаза обеспечивает работу Na-K насоса). 2. Белки-переносчики осуществляют облегченную диффузию веществ через клеточные мембраны.
	Организменный	1. Гемоглобин переносит кислород и углекислый газ в крови. 2. Сывороточный альбумин переносит жирные кислоты. 3. Различные глобулины переносят ионы

		металлов и гормоны.
Двигательная	Клеточный	Тубулины микротрубочек обеспечивают работу веретена деления клетки.
	Организменный	Актин и миозин обеспечивают сокращение волокон поперечнополосатой мускулатуры, за счет чего совершается передвижение тела человека.
Рецепторная	Тканевый	1. Гликопротеины являются компонентами гликокаликса. 2. Гликопротеины – антигены тканевой совместимости – ответственны за распознавание «своих» и «чужих» клеток и тканей.
	Организменный	Опсин – составная часть светочувствительных пигментов родопсина и йодопсина, находящихся в клетках сетчатки глаза.
Защитная	Клеточный	1. Антитела связывают инородные белки, образуя с ними комплексы. 2. Интерфероны – универсальные противовирусные белки (блокируют синтез вирусного белка в инфицированной клетке).
	Тканевый	1. Тромбопластин, протромбин, тромбин и фибриноген предохраняют организм от кровопотери, образуя тромб. 2. Антиоксидантные ферменты (каталаза) препятствуют развитию свободнорадикальных процессов, очень вредных для организма
	Организменный	Кожа, в формировании которой принимают участие различные белки, защищает тело позвоночных.
Ферментативная	Клеточный	Подавляющее большинство ферментов является белками. Они катализируют практически все химические реакции в клетке, поскольку сами по себе эти реакции либо не протекают вовсе, либо идут слишком медленно.
Пищевая	Организменный	1. Белки пищи являются основным источником аминокислот (и единственным источником незаменимых аминокислот) для организма человека. 2. Казеин молока – источник аминокислот для детенышей млекопитающих и человека
Запасающая	Органный	1. Ферритин – запасает железо в печени и селезенке. 2. Миоглобин – содержит запас кислорода в мышцах.
Регуляторная	Организменный	1. Гормоны – белки: инсулин, соматотропин, пролактин, паратгормон. 2. Гормоны - пептиды: окситоцин, вазопрессин, кальцитонин, глюкагон, адренкортикотропный.

		3. Гормоны – гликопротеины: лютеинизирующий, фолликулостимулирующий. 4. Нейропептиды – пептиды, присутствующие в мозге и влияющие на функции центральной нервной системы.
Антибиотики	Организменный	Некоторые антибиотики, обладающие широким спектром антимикробного действия, являются белками, например грамицидин S, актиномицин и др.
Токсины	Организменный	1. Самые сильные микробные токсины являются белками: ботулинический, столбнячный, дифтерийный, холерный. 2. Токсины змей, пауков и скорпионов являются белками. 3. Токсины многих грибов, а также пчел являются пептидами.

### Методы качественного исследования простых белков

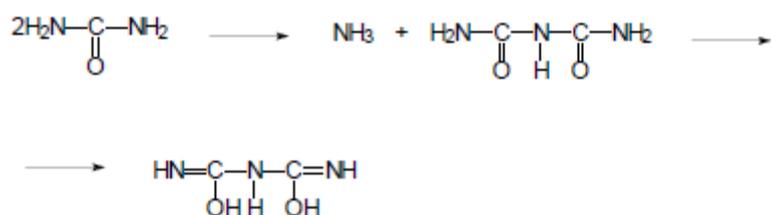
#### Качественные реакции на белки и аминокислоты

Все белки и пептиды дают цветные реакции: биуретовую – на пептидные связи и нингидриновую – на  $\alpha$ -аминокислоты. Аминокислоты, в свою очередь, содержат разнообразные радикалы, способные вступать в специфические реакции. Это дает возможность обнаруживать белки и идентифицировать большинство аминокислот (свободных или в составе пептидов и белков) с помощью цветных реакций. Цветные реакции применяются для качественного и количественного определения белка и аминокислот. Они делятся на универсальные реакции (биуретовая и нингидриновая), которые дают все белки, и специфические, т. е. на отдельные аминокислоты, входящие в состав белковых молекул (ксантопротеиновая, реакции на триптофан, цистеин, тирозин и др.).

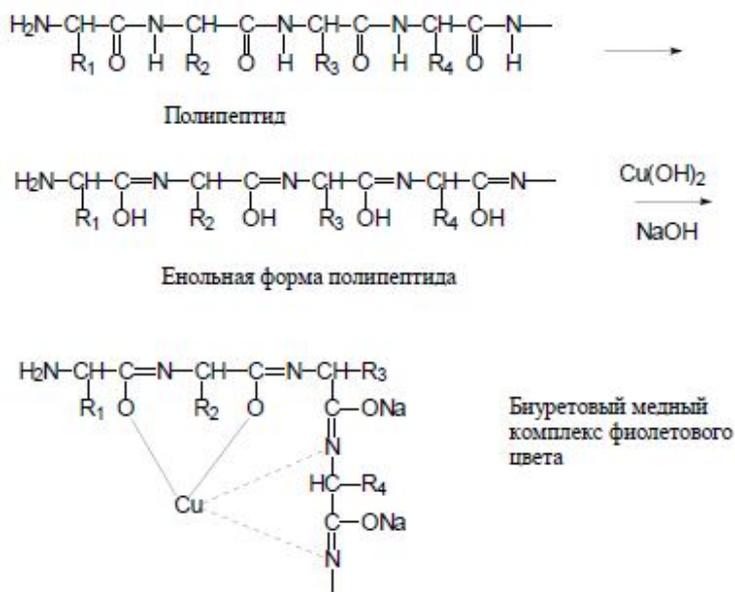
#### Универсальные реакции на белки

##### **Биуретовая реакция.**

Эта реакция открывает в белке пептидную связь ( $-C(=O)-NH-$ ). В результате взаимодействия в щелочной среде пептидных связей белка с ионами меди образуется комплексное соединение, окрашенное в сине-фиолетовый цвет. Биуретовую реакцию способны давать вещества, имеющие не менее двух пептидных связей. Реакция получила свое название от производного мочевины – биурета, молекула которого образуется при нагревании мочевины с отщеплением аммиака. В щелочной среде биурет переходит в енольную форму:



Биуретовая реакция протекает следующим образом:

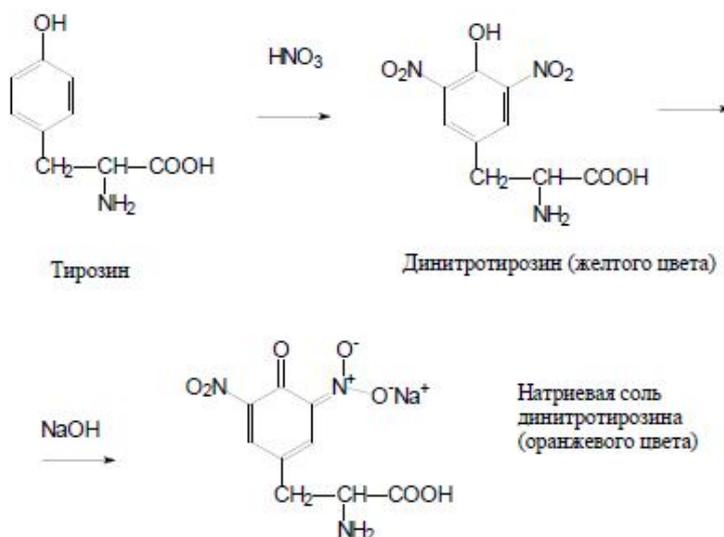


Енольная форма полипептида, образованная в сильнощелочной среде при диссоциации OH-групп, дает отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью, и возникает ковалентная связь.

Кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи. Степень окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

### Специфические реакции на аминокислоты

**Ксантопротеиновая реакция.** Эта реакция основана на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана, фенилаланина) легко нитроваться с образованием соединений, окрашенных в желтый цвет (на греческом языке «ксантос» – желтый). При подщелачивании окраска усиливается. Так, тирозин при нитровании переходит в динитротирозин, который под влиянием щелочи переходит в соль, имеющую хиноидную структуру:





Результат измерения зависит от аминокислотного состава белков, поэтому этот метод используют для прикидочного определения их концентрации или анализа серийных образцов одного и того же белка);

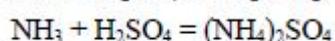
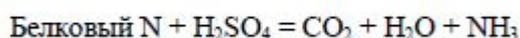
2.2 Спектрофотометрический двухволновый метод Кэлба и Бернлора (В этом методе также проводится измерение оптической плотности  $D$  при двух длинах волн 230 и 260 нм, что позволяет точнее оценивать вклад нуклеиновых кислот и снижает зависимость величины светопоглощения от аминокислотного состава индивидуальных белков);

2.3 Турбидиметрический метод (Метод основан на помутнении белкового раствора при добавлении к нему осаждающего реагента, например, трихлоруксусной кислоты.);

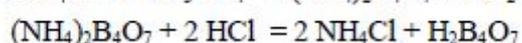
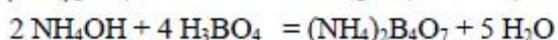
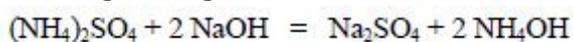
3. Колориметрические методы: Биуретовый метод (Фотоколориметрические методы основаны на образовании белками окрашенных соединений и измерении оптической плотности их растворов. Концентрации искомых соединений обычно находят с помощью градуировочных графиков, построенных по стандартным растворам с известными концентрациями белка);

4. Количественное определение белка по Кьельдалю (Содержание белков в биологическом материале определяют по количеству общего азота

**Принцип метода.** Навеску анализируемого материала минерализуют в растворе концентрированной серной кислоты, при этом все органические вещества окисляются до углекислого газа и воды, а азот превращается в аммиак, который образует с серной кислотой аммонийную соль:



Далее аммонийную соль обрабатывают щелочью. Выделяющийся аммиак связывают борной кислотой (вариант А). Содержание образующегося тетрабората аммония определяют титрованием раствором соляной кислоты:



Аммиак можно связывать серной кислотой (вариант В), избыток которой определяют титрованием раствором гидроксида натрия. Расчет белка по количеству общего азота ведут по формуле, зная, что 1 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора кислоты связывает 0,0014 г азота).