

Белки и аминокислоты

А. А. Чиркин, заведующий кафедрой химии Витебского государственного университета им. П. М. Машерова, доктор биологических наук, профессор;

Е. О. Данченко, профессор кафедры химии Витебского государственного университета им. П. М. Машерова, доктор медицинских наук, доцент

Продолжение. Начало в № 1 за 2010 г.

ДНК содержит информацию в виде генов и определяет генотип организма. Это предмет изучения геномики. Основные успехи были достигнуты в XX веке. Проявиться эта информация может только с помощью многообразных функций белков. Так проявляется фенотип организма. Изучением белков живых организмов занимается протеомика. Эта наука намного обширней и сложнее, чем геномика. Это наука XXI века.

Белки являются наиболее важными органическими молекулами живой материи. Они встречаются в различных частях клетки животных и составляют около 50 % сухого остатка клетки; в растениях содержится меньшее количество белков — 20—35 %. Белки являются структурной и функциональной основой жизни. Термин «protein» (от греч. «proteios») означает «первичный, владеющее первым местом». Й. Я. Берцелиус предложил называть протеинами группу органических веществ, наиболее важных для жизни. Г. Мульдер в 1838 г. использовал термин «протеин» для высокомолекулярных азотсодержащих и наиболее распространённых веществ, присутствующих у животных и в растениях.

Белки являются линейными неразветвлёнными полимерами, построенными из остатков аминокислот. Информация о структуре белка закодирована в ДНК. Все живые организмы используют 20 идентичных аминокислот и за некоторым исключением имеют одинаковый генетический код.

I. Функции белков.

Функции белков могут быть разделены на 2 группы:

- **структурные функции.** Основными структурными белками являются *коллаген*, *эластин* (формируют костный матрикс, сосудистую систему и другие органы) и *α-кератин* (присутствует в эпидермальной ткани);

- **динамические функции.** Эти функции более разнообразны: ферменты, гормоны, факторы свёртывания крови, иммуноглобулины, мембранные рецепторы, резервные белки, сократительные белки, дыхательные белки и др.

II. Элементарный состав белков.

Белки преимущественно состоят из 5 главных элементов: С — 50—55 %, Н — 6—7,3 %, О — 19—24 %, N — 13—19 %, S — 0—4%. Кроме вышеперечисленных белки могут содержать также другие элементы, такие как P, Fe, Cu, I, Mg, Zn и др.

Различные ткани отличаются по содержанию белков. Так, в пересчёте на сухую массу в селезёнке содержится 84 % белков, в лёгких — 82 %, в мышцах — 80 %, в костях — 24—28 %.

III. Молекулярная масса белков.

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 до 1 000 000 Да и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка.

Для определения молекулярной массы белков используют следующие методы.

1. *Химический метод* требует точного знания количественного содержания аминокислоты в белке. Например, в простом белке содержится 0,6 % триптофана с молекулярной массой 204. Тогда молекулярная масса белка равна $204 \cdot \frac{100}{0,6} = 34\,000$ Да.

Применение ограничено.

1 Да (дальтон) весьма близок к массе атома водорода.
1000 Да = 1 кДа (килодальтон)

2. *Метод электронной микроскопии.* Точная навеска окрашивается осмиевой кислотой и подсчитывается количество частиц. Делят навеску на число частиц и находят массу одной молекулы.

3. *Метод ультрацентрифугирования.* В пробирке ультрацентрифуги создаётся центробежное ускорение, превышающее земное до 500 000 раз. По мере перемещения молекул белка в центробежном поле они разделяются по молекулярной массе. При этом образуется граница белок—растворитель. Вначале определяют скорость седиментации белка, которую выражают через константу седиментации (S):

$$s = \frac{v}{\omega^2 \cdot r},$$

где v — скорость перемещения границы белок—растворитель (см/с); ω — угловая скорость ротора (рад/с); r — расстояние от центра ротора до середины пробирки с раствором белка (см). Константа седимен-

тации имеет размерность времени (её выражают в секундах). Величина константы седиментации, равная $1 \cdot 10^{-13}$ с, принята за единицу и названа Сведбергом (S).

Константа седиментации зависит как от массы, так и от формы белковой частицы.

Величина молекулярной массы вычисляется по уравнению Сведберга:

$$M.м. = \frac{R \cdot T \cdot s}{D(1 - \bar{v}\rho)},$$

где R — газовая постоянная, эрг/(моль · град); T — абсолютная температура (по шкале Кельвина); s — константа седиментации; ρ — плотность растворителя; \bar{v} — парциальный удельный объём молекулы белка; D — коэффициент диффузии.

Константа седиментации является универсальной характеристикой молекул и надмолекулярных структур (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Соотношение между величиной константы седиментации (S) и молекулярной массой белков (по Т. Creighton, 1993)

Белок	Константа седиментации (S)	Молекулярная масса
Панкреатический ингибитор трипсина	1	6520
Цитохром С	1,83	12310
Рибонуклеаза А	1,78	13690
Миоглобин	1,97	17800
Трипсин	2,5	23200
Карбоангидраза	3,23	28800
Конканавалин А	3,8	51260
Малатдегидрогеназа	5,76	74900
Лактатдегидрогеназа	7,54	146200



Рис. 1. Плотность и коэффициент седиментации клеточных элементов (L. J. Kleinsmith, V. M. Kish, 1995)

4. *Гель-фильтрация и диск-электрофорез.* Колонку, заполненную стандартными гранулами сефадекса (учитывается расстояние между гранулами и величина пор в гранулах), калибруют белками с известной молекулярной массой (рис. 2). Находят зависимость между элюционным объёмом (V_e) и молекулярной массой. Чем меньше молекулярная масса, тем больше элюционный объём (т. е. объём растворителя, с которым белок выходил из колонки).

Через калиброванную колонку пропускают неизвестный белок, определяют его элюционный объём и по калибровочному графику определяют молекулярную массу.

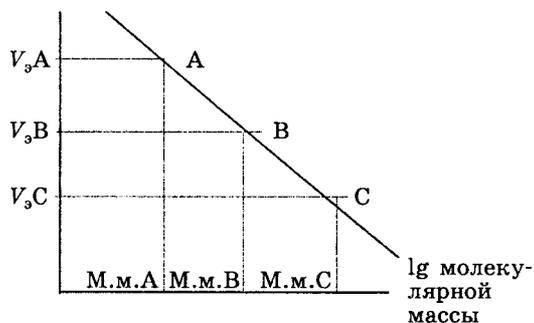


Рис. 2. Калибровка хроматографической колонки

В методе диск-электрофореза сравнивают не элюционные объёмы, а электрофоретическую подвижность белков.

В настоящее время для определения молекулярной массы нативного (находящегося в структурном состоянии для выполнения функции) белка используют методы, гелехроматографии или аналитического ультрацентрифугирования. Сочетание обоих подходов позволяет оценить как молекулярную массу белка, так и его протомеров. Однако эти методы не годны для решения современных задач протеомики.

Точное определение массы белковых молекул осуществляется методом масс-спектрометрии. Анализ белков с помощью масс-спектрометрии казался нереальным в связи с низкой летучестью белковых молекул. Это ограничение было преодолено после введения техники эффективного диспергирования белка или других биомолекул в газовую среду с одновременной их ионизацией. Этот метод был назван MALDI (matrix-assisted laser desorption-ionization, 1988 г.). Основные этапы метода определения молекулярной массы белков:

- 1) образец белка встраивают в подложку (матрикс) и производят ионизацию с помощью лазерного импульса;
- 2) образовавшиеся ионы белка ускоряются в электрическом поле и направляются

к детектору. Чем легче ион, тем быстрее он достигает детектора;

3) ионизирующий лазерный импульс также включает регистратор времени полёта ионов к детектору (time of flight — TOF);

4) на регистраторе отмечается время появления пиков в результате попадания ионов белков в детектор. На оси ординат отмечают интенсивность сигнала, а на оси абсцисс величины отношений масса/заряд.

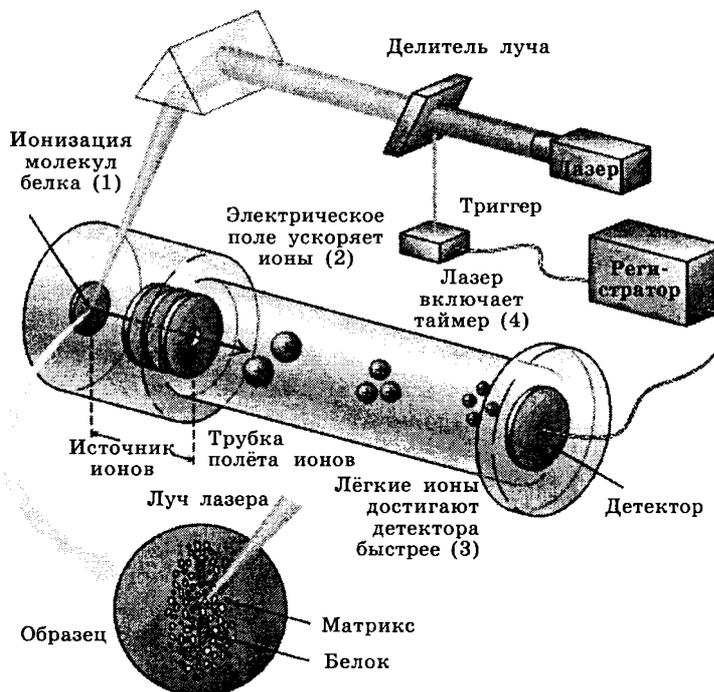


Рис. 3. Масс-спектрометрия MALDI-TOF (J. T. Watson, 1997)

В биологической и медицинской литературе такой подход исследования белков называют MALDI-TOF. С помощью этого метода были определены молекулярные массы инсулина — 5733,9 Да (расчётная величина 5733,5 Да) и β-лактоглобулина 18 364 Да (расчётная величина — 18 388 Да). Для анализа этим методом достаточны концентрации белков в диапазоне пикомоль/мкл—фемтомоль/мкл*. Именно такие концентрации находят в пятнах белков после двумерного электрофореза.

Если удастся получить ионы белков из раствора, то такой метод называется масс-спектрометрия-ESI (1988 г.). Перспективным для клинической биохимии является масс-спектрометрия-SELDI (2001 г.).

* 1 пикомоль (пмоль) = 10⁻¹² моль; 1 фемтомоль (фмоль) = 10⁻¹⁵ моль.

В данном варианте используют для ионизации лазерным импульсом белки, сорбированные на различных поверхностях (в зависимости от специфичности связывания исследуемого белка) — гидрофобной, анионной, катионной, содержащей ионы металлов, антитела, антигены, рецепторы, лиганды, ДНК и др. В лабораторной практике этот анализ называют SELDI ProteinChip-технология. С помощью этого метода недавно была открыта группа белков, позволяющих

с 90%-ной вероятностью диагностировать рак яичников.

IV. Классификация белков.

Различают несколько принципов классификации белков: по функции, химической структуре и растворимости, по биологической (пищевой) ценности.

1. Классификация по функции.

В таблице 2 приведена классификация белков по их основным функциям.

Таблица 2. Классификация белков по функции

Функция 1	Характеристика 2
Ферменты, или катализаторы, активаторы и ингибиторы ферментов	Для белков-ферментов характерна высокая степень структурирования молекулы, благодаря чему возможен катализ химической реакции в области активного центра и регуляция активности фермента через взаимодействие эффекторов с аллостерическим центром. Известны белки-активаторы (<i>апопротеин АI, СII</i>) и ингибиторы (<i>ингибиторы трипсина из поджелудочной железы, соевых бобов; ингибиторы протеиназ из яда гадюки, ингибитор химотрипсина из картофеля</i>)
Гормоны	Как правило, белки (м.м. 20—30 кДа), которые содержат небольшие фрагменты, определяющие гормональную активность, относятся к группе непроникающих в клетку гормонов, на поверхности клеток взаимодействуют с рецепторами, гормональный эффект реализуется через внутриклеточные посредники (<i>гормоны гипоталамуса, гипофиза, поджелудочной железы, паращитовидных желёз, кальцитонин</i>)
Регуляторные белки	<i>Гистоны</i> стабилизируют структуру ДНК и регулируют функционирование генома (проявление матричной активности ДНК при ослаблении связей с гистонами). Гетерогенная группа <i>негистоновых белков</i> (м.м. 5—200 кДа) участвует в формировании нуклеосом и взаимодействии с хроматином гормон-рецепторных комплексов, в регуляции процессов репликации, транскрипции и трансляции, белки теплового шока (стрессовые белки), G-белки регулирующие синтез циклических нуклеотидов, онкобелки и антионкобелки, определяющие малигнизацию клетки
Защитные белки	<i>Антитела (иммуноглобулины)</i> вырабатываются в ответ на введение антигенов. Это белки системы <i>свёртывания крови</i> , белки системы <i>комплемента</i> , ферменты <i>обезвреживания ксенобиотиков</i> , <i>интерфероны</i> , <i>интерлейкины</i> , <i>лизоцимы</i> , <i>белки-антифризы</i> , <i>антивирусные белки растений</i> , <i>антибактериальные белки насекомых</i>
Токсические белки	Высокомолекулярные белковые токсины микроорганизмов и растений представлены тремя типами белков. Мультимерные <i>дифтерийный и холерный токсины</i> , <i>токсин шигеллы (АВ₅ протеины)</i> построены из одной субъединицы типа А (20, 28 и 32 кДа соответственно) и пяти субъединиц типа В (25, 12 и 7,7 кДа соответственно); субъединицы В связываются с клеточной поверхностью, а субъединица А проникает внутрь клетки, где блокирует синтез белков на рибосомах. Аналогично действуют растительные токсины — <i>рицин</i> , <i>абрин</i> , <i>модецин</i> , <i>лектин</i> . <i>Энтеротоксин стафилококка</i> или <i>гемолизин кишечной палочки</i> , встраиваясь в плазматическую мембрану, образуют в ней поры, через которые теряются важные компоненты цито-

1	2
	плазмы клеток. <i>Токсины ядов</i> змей представлены малыми белками — 6,7—7 кДа (примерно 60 аминокислотных остатков). <i>Токсические пептиды</i> ядов скорпиона, пчелы и осы состоят в среднем из 45 аминокислотных остатков. Эти токсины связываются с холинэргическими белками и оказывают нейротоксическое действие
Транспортные белки	<i>Альбумины и глобулины</i> — переносчики различных веществ в плазме крови. <i>Порины</i> образуют в каналах поры для переноса веществ через клеточные мембраны. <i>Транслоказы</i> обеспечивают обмен компонентами различных компартментов клеток
Структурные белки	<i>Структурные белки мембран</i> являются их структурными компонентами, склонны к агрегации и специфическим взаимодействиям (процессы самосборки), содержат в своём составе до 20 % гидрофобных аминокислотных остатков, до 40 % приходится на долю α -спиральных участков. Эти белки легко взаимодействуют с фосфолипидами мембран. Структурные функции выполняют также <i>белки межклеточного матрикса (коллаген, ретикулин, кератин), кристаллины, белки ядерного матрикса, белки цитоплазматического скелета</i>
Сократительные белки	<i>Сократительные белки</i> участвуют в механическом сокращении для осуществления движения (обладают, как правило, аденозинтрифосфатазной активностью): <i>актин и миозин</i> — мышц, <i>белки центральных и периферических фибрилл</i> — жгутиков и ресничек простейших, жгутиков сперматозоидов, <i>тубулин</i> — аппарата движения хромосом в процессе митоза, <i>миксомиозин</i> — нитевидный белок из плазмодия гриба физариума и др.
Рецепторные белки	Во внутренней среде организма <i>рецепторные белки</i> служат для взаимодействия с молекулами-биорегуляторами. Локализуются в мембранных структурах клеток, а также могут быть в растворённом состоянии. Клетка, содержащая рецептор, является клеткой-мишенью для управляющего химического сигнала, а также для взаимодействия с липопротеинами или вирусами. Для восприятия сигналов внешней среды известны <i>фоторецепторные белки (опсин)</i> , для оценки вкуса — <i>сладкочувствительный белок</i> , для восприятия запаха — <i>обонятельный белок</i> , для восприятия звука — <i>холинорецепторные белки</i> . В жизнедеятельности живых организмов важное место занимает рецепция феромонов, аттрактантов, репеллентов, стрессогенных веществ ран

2. Классификация по химической природе и растворимости.

Эта классификация наиболее распространённая. Она основана на аминокислотном составе, структуре, размере и растворимости. Различают две группы: простые и сложные (конъюгированные).

1. *Простые белки* (альбумин, кератин и др.) состоят только из аминокислот и делятся:

а) на *фибрилярные белки* — имеют палочкообразную форму, нерастворимы в воде и физически прочные. Они выполняют структурные и защитные функции;

б) *глобулярные белки* — представляют собой компактные сферические молекулы, водорастворимы. Глобулярные белки вы-

полняют динамические функции (ферменты, иммуноглобулины и транспортные белки гемоглобин и альбумин).

2. *Сложные (конъюгированные)* белки состоят из простого белка, комбинированного с небелковым компонентом. Небелковая часть называется *простетической группой* (или конъюгированной группой). Белок без простетической группы называется *апопротеином*. Белковая часть с простетической группой называется *холопротеином*. Простетическая группа играет ключевую роль в функционировании белка.

В соответствии с действующей классификацией в таблице 3 приведены примеры простых и сложных белков.

Таблица 3. Примеры простых и сложных белков

Белок 1	Характеристика 2
Простые белки (деление по растворимости белков)	
Альбумины	Водорастворимые белки, осаждаются сульфатом аммония при насыщении. В плазме крови человека и животных альбумины составляет 50 % от всех белков. В белке яиц содержится <i>овальбумин</i> (до 50 %), в молоке — <i>лактальбумин</i> . Альбуминоподобными белками богаты растения. Альбумины поддерживают осмотическое давление и осуществляют транспорт многих веществ, включая ксенобиотики
Глобулины	Растворимы в слабых растворах нейтральных солей, осаждаются сульфатом аммония при 50%-ном насыщении. В воде нерастворимы, поэтому выпадают в осадок при очистке от солей диализом. Глобулины составляют большую часть белков семян многих растений, особенно бобовых и масляничных, например <i>легумин</i> семян гороха, <i>фазеолин</i> — фасоли, <i>эдестин</i> — конопли. Отдельные фракции являются специфическими транспортёрами веществ (<i>транскортин</i> переносит глюкокортикоидные гормоны). Концентрация увеличивается при воспалении — <i>белки острой фазы</i> ; участвуют в гуморальном иммунитете — <i>иммуноглобулины</i>
Проламины	Хорошо растворимы в 60—80%-ном этиловом спирте. В их составе много глутаминовой кислоты и пролина и мало лизина, аргинина, глицина. Являются запасными белками злаков: <i>глиадин</i> — зерна пшеницы и ржи, <i>гордеин</i> — ячменя, <i>зеин</i> — кукурузы
Глютелины	Хорошо растворимы в 0,2—2%-ных растворах щелочей. Содержатся в семенах злаков и зелёных частях растений. Комплекс щелочнорастворимых белков семян пшеницы называется <i>глутенином</i> , риса — <i>оризенином</i> . <i>Глиадин</i> + <i>глутенин</i> образуют клейковину, которая определяет качество муки и теста
Гистоны	Щелочные белки (12—30 кДа), 20—30 % приходится на щелочные аминокислоты. Растворимы в слабых кислотах (0,2 % — нормальные растворы), осаждаются аммиаком и спиртом. Не содержат триптофана, а также цистеина и цистина. Входят в состав хроматина, поэтому имеются во всех ядросодержащих клетках. В процессе эволюции — консервативные белки
Протамины	Щелочные белки (12 кДа), 80 % приходится на щелочные аминокислоты. В них в малом количестве содержатся или отсутствуют <i>цис</i> , <i>три</i> , <i>асп</i> , <i>тир</i> , <i>фен</i> . Являясь поливалентным органическим катионом, легко образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами, а также хроматин, в связи с чем представлены во всех ядросодержащих клетках. В большом количестве встречаются в сперме рыб: <i>сальмин</i> — у лососёвых и <i>клупеин</i> — у сельди.
Протеиноиды	Труднорастворимые белки, содержат много серы. Фибриллярные белки — <i>фиброин</i> шёлка, <i>кератины</i> волос, рогов, копыт, <i>коллагены</i> — белки соединительной ткани, <i>спонгин</i> — белок морских губок и др.
Сложные (конъюгированные) белки	
Гликопротеины	Содержат в своём составе гликозидные компоненты различной структуры. <i>Гликопротеинами</i> являются многие структурные белки, ферменты, рецепторы и т. д. Большинство белков, расположенных на внешней поверхности животных клеток, являются гликопротеинами. На долю углеводного компонента приходится от 1—3 % (<i>овальбумин</i>) до 80—90 % (<i>групповые вещества крови</i>). В составе гликопротеинов обнаружено 10 различных моносахаридов: D-галактоза,

1	2
	<p><i>D</i>-манноза, <i>D</i>-глюкоза, <i>N</i>-ацетилглюкозамин и <i>N</i>-ацетилгалактозамин, дезоксисахара (<i>L</i>-фукоза, <i>L</i>-рамноза), <i>D</i>-ксилоза, <i>L</i>-арабиноза. Типичным компонентом гликопротеинов является нейраминная кислота (чаще в форме сиаловых кислот). <i>Протеогликаны</i> состоят из небольшой белковой части, к которой ковалентно присоединяется несколько десятков гетерополисахаридных цепей, содержащих в своих молекулах остатки аминосахаридов и уроновых кислот. Углеводные компоненты — гликозамингликаны — представлены гиалуроновой кислотой, хондроитинсульфатами, гепаринсульфатом, кератинсульфатами</p>
Липопротеины	<p>В качестве небелковой части содержат молекулы липидов. Эти макромолекулы в значительных количествах находятся в митохондриях, из них в основном состоит эндоплазматический ретикулум, их обнаруживают в плазме крови и молоке. Инозитолдифосфатсодержащий липопротеин выделен из белого вещества мозга, в состав липопротеинов серого вещества мозга входят сфинголипиды. У растений значительная часть фосфолипидов в протоплазме находится в форме липопротеинов. <i>Протеолипиды</i> — комплексы липидов и белков, белковая часть которых содержит преимущественно гидрофобные аминокислоты</p>
Нуклеопротеины	<p>Содержат нуклеиновые кислоты — РНК и ДНК — в качестве протетических групп</p>
Металлопротеины	<p>Содержат ионы какого-либо одного или нескольких металлов. К таким белкам принадлежат, например, белки, содержащие негеминовое железо (ферритин, трансферрин и др.). К медьсодержащим белкам относят <i>цитохромоксидазу</i>, <i>пластоцианин</i> (переносчики электронов), белок крови — <i>церулоплазмин</i>; к железосодержащим — <i>лактоферрин</i> (белок молока), <i>трансферрин</i> (белок крови), <i>ферритин</i> и др. Кроме того, известны <i>никелеплазмин</i> (переносчик никеля в плазме крови), <i>селенопротеины</i> (кровь, мышцы), <i>ванадохром</i> (у морских животных переносчик кислорода)</p>
Фосфопротеины	<p>В качестве протетической группы содержат фосфорную кислоту. К фосфопротеинам относят многие питательные белки, например основной белок молока — <i>казеин</i>, белки яичного желтка — <i>вителлин</i> и <i>фосвитин</i>, икры рыб — <i>ихтулин</i>. Они содержат 1—10 % фосфора. Фосфопротеины найдены в мозге. Кратковременное фосфорилирование-дефосфорилирование ферментов является способом регуляции их активности</p>
Хромопротеины	<p>В составе белка имеются окрашенные небелковые компоненты. Наиболее распространёнными представителями хромопротеинов являются <i>флавопротеины</i> и <i>гемопроотеины</i>, красное окрашивание которых обусловлено наличием гема с включённым в него атомом железа. К хромопротеинам относят транспортные белки: <i>гемоцианины</i> (моллюски, ракообразные, паукообразные, мечехвосты), <i>гемэритрины</i> (кольчатые черви), <i>хлорокруорины</i> (многощетинковые черви)</p>

Кроме этого, выделяют группу белков, которая образуется в результате денатурации или деградации простых и конъюгированных белков.

3. Классификация на основе биологической (пищевой) ценности белков.

Пищевая ценность белков определяется наличием незаменимых аминокислот. Согласно этой классификации белки делятся на три группы:

1) *полноценные белки* — содержат 10 незаменимых аминокислот в необходимых пропорциях для обеспечения нормального роста (например, яичный белок, казеин молока);

2) *частично полноценные белки* — содержат сниженное количество одной или более незаменимых аминокислот и могут обеспечивать только умеренный рост (например, белки пшеницы и риса содержат

недостаточное количество лизина и триптофана);

3) *неполноценные белки* — не содержат одну или более незаменимых аминокислот. Не могут обеспечить нормальный рост организма (например, желатин не содержит триптофан).

V. Характеристика аминокислот.

Аминокислоты являются *структурной единицей белков*. Они содержат *аминогруппу* ($-\text{NH}_2$), *карбоксильную группу* ($-\text{COOH}$), *атом водорода и боковую цепь*, связанную с α -углеродным атомом. Одна из 20 аминокислот — пролин — является иминокислотой ($-\text{NH}-$), остальные 19 — α -аминокислотами.

В природе выявлено около 300 аминокислот. Из них 20 являются стандартными (протеиногенными) аминокислотами, которые обнаружены в структуре белков, полученных из организмов животных, растений и микроорганизмов. Это является результатом универсальной природы генетического кода, обеспечивающей включение 20 аминокислот при биосинтезе белков.

VI. Классификация аминокислот.

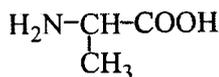
Классификация протеиногенных аминокислот по строению радикала: 1) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин); 2) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); 3) алифатические, содержащие гидроксильную группу (серин, треонин); 4) алифатические, содержащие сульфгидрильную группу (цистеин); 5) основные (лизин, аргинин, гистидин); 6) кислые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); 7) алифатические, содержащие карбоксимидную группу (аспарагин, глутамин).

Аминокислотные остатки в полипептидной цепи имеют сокращённые названия: аланин (ала, A), глицин (гли, G), валин (вал, V), лейцин (лей, L), изолейцин (иле, I), аспарагиновая кислота (асп, D), глутаминовая кислота (глу, E), серин (сер, S), треонин (тре, T), цистеин (цис, C), метионин (мет, M), аргинин (арг, R), лизин (лиз, K), гистидин (гис, H), пролин (про, P), фенилаланин (фен, F), тирозин (тир, Y), триптофан (три, W), аспарагин (асн, N), глутамин (глен, Q).

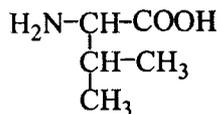
Существует несколько специальных классификаций аминокислот, основанные на структуре и химической природе, заменимости, путях метаболизма и т. д.

1. **Классификация аминокислот по полярности радикалов.**

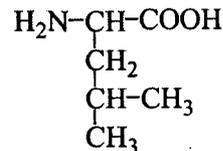
1. *Неполярные аминокислоты* (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин). Эти аминокислоты гидрофобны. Имеют незаряженный радикал:



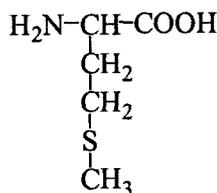
Аланин (ала)



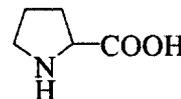
Валин (вал)



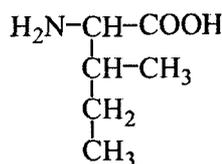
Лейцин (лей)



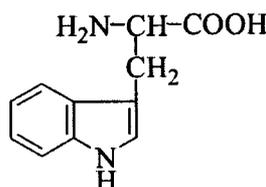
Метионин (мет)



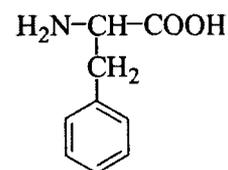
Пролин (про)



Изолейцин (иле)

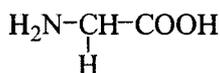


Триптофан (три)

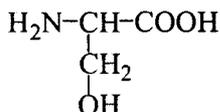


Фенилаланин (фен)

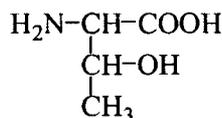
2. Полярные, гидрофильные, незаряженные аминокислоты (глицин, треонин, цистеин, тирозин, серин, аспарагин, глутамин). Содержат такие полярные функциональные группы, как гидроксильная, сульфгидрильная и амидогруппа:



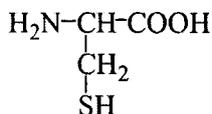
Глицин (гли)



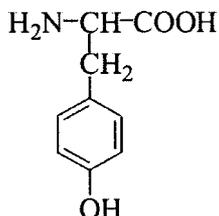
Серин (сер)



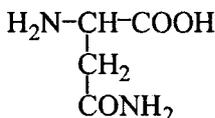
Треонин (тре)



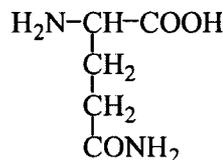
Цистеин (цис)



Тирозин (тир)

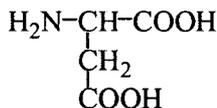


Аспарагин (асн)

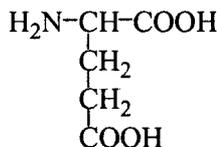


Глутамин (гln)

3. Кислые аминокислоты (отрицательно заряженные аминокислоты) имеют отрицательный заряд (аспартат, глутамат) при pH 7,0:

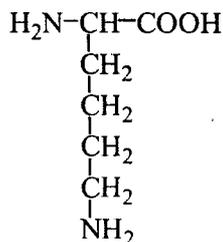


Аспарагиновая кислота (асп)

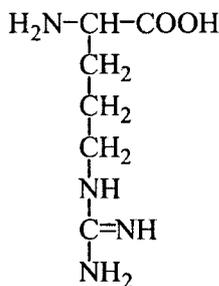


Глутаминовая кислота (гln)

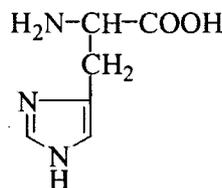
4. Основные аминокислоты (положительно заряженные аминокислоты) имеют положительный заряд при pH 7,0:



Лизин (лиз)



Аргинин (арг)



Гистидин (гис)

2. Классификация по биологической (пищевой) ценности. Аминокислоты классифицируются на заменимые и незаменимые.

Заменимые аминокислоты. Организм может синтезировать около 10 аминокислот для обеспечения биологических потребностей, поэтому поступление их с пищей не обязательно (аланин, аспарагин, аспартат, цистеин, глутамат, глутамин, глицин, пролин, серин, тирозин).

Незаменимые (эссенциальные) аминокислоты не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей. Они

необходимы для обеспечения и поддержания роста: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин.

3. Классификация на основе метаболических превращений.

Углеродный скелет аминокислот является предшественником для синтеза глюкозы или гликогена (гликогенные аминокислоты — аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, метионин, пролин, серин, треонин, валин, цистеин), липидов (кето-

генные аминокислоты — лейцин) или *глюкозы и липидов* (гликогенные и кетогенные аминокислоты — изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан, тирозин).

Кроме 20 стандартных аминокислот, присутствующих в составе белков, существуют аминокислоты, имеющие важное биологическое значение.

Производные аминокислот. 20 стандартных аминокислот могут включаться в белки из-за универсальности генетического кода. Некоторые из них подвергаются специфической модификации после биосинтеза белка. Эти производные аминокислот являются важными для структуры и функции белка. Например, коллаген содержит гидроксипролин и гидроксизин; гистоны —

метилированные, фосфорилированные и ацетилированные аминокислоты.

Непротеиногенные аминокислоты не обнаруживаются в составе белков, но выполняют важные функции в организме. Например, орнитин, цитруллин являются промежуточными метаболитами в биосинтезе мочевины.

D-аминокислоты. Аминокислоты животных и растений являются *L-аминокислотами*. *D-аминокислоты* обнаружены в антибиотиках или в бактериальных стенках.

4. Характеристика отдельных аминокислот.

В таблице 4 представлена функциональная роль стандартных аминокислот.

Таблица 4. Функциональная роль стандартных *L-аминокислот*

Аминокислота 1	Функциональная роль 2
Глицин	Единственная оптически неактивная аминокислота; широко распространена, особенно много в желатине; является предшественником пуринов, гемоподобных структур и коллагена; используется для построения клеточных стенок бактерий; является тормозным медиатором ЦНС
Аланин	Является исходным продуктом для синтеза каротиноидов, каучука, жиров и углеводов
Валин	Радикал способен к гидрофобным взаимодействиям; участвует в синтезе алкалоидов, некоторых циклических пептидов; пантотеновой кислоты, пенициллина
Лейцин, изолейцин	Радикалы способны к гидрофобным взаимодействиям; являются источниками сивушных масел при брожении
Серин	Входит в состав фосфолипидов (фосфатидилсерина), полипептидов брадикинина и каллидина; участвует в построении активного центра сериновых протеиназ, синтезе аминспирта сфингозина. В казеине молока или вителлине яичного желтка содержится в виде серинфосфорной кислоты; у растений образуется из глицина в процессе фотодыхания
Треонин	Участвует в синтезе витамина В ₁₂ , антибиотика актиномицина <i>D</i>
Цистеин	Является источником серы. Входит в состав глутатиона, в виде амина в кофермент А, присутствует в активном центре цистеиновых ферментов. Образует дисульфидные связи, важные для формирования нативной структуры белков. При окислении двух молекул возникает <i>цистин</i> , содержащийся в белках волос, рогов, копыт. Система 2 цистеин ↔ цистин является важнейшей окислительно-восстановительной системой живых организмов, а также формой метаболизирования сероводорода микроорганизмами и растениями
Метионин	Является основным донором метильных групп в биосинтезах (в виде <i>S-аденозилметионина</i>). Из него образуются другие серосодержащие аминокислоты. Его высокое содержание отмечено в молоке. Он является липотропным фактором, необходимым для поддержания функции печени и обмена липидов
Лизин	В большом количестве содержится в протаминах и гистонах (молоки рыб). Является исходным продуктом для синтеза алкалоидов (анабазин, никотин, конинин); участвует ϵ -аминогруппой в образовании комплекса между белковой частью фермента и коферментом (биотин-зависимые ферменты)

1	2
Аргинин	В большом количестве содержится в протаминах и гистонах (молоки рыб). Участвует в синтезе мочевины, креатина. В виде фосфоаргина в мышцах беспозвоночных выполняет функцию, аналогичную функции фосфокреатина у высших животных
Аспарагиновая кислота, аспарагин	В большом количестве содержится в растительных белках; участвует в реакциях трансаминирования и синтезе мочевины, креатина, циклических пептидов. При декарбоксилировании образуются α - или β -аланин, необходимый для синтеза мышечных дипептидов карнозина, ансерина и кофермента А. Амид аспарагиновой кислоты — аспарагин — накапливается при прорастании семян бобовых растений в темноте или при избытке аммиака. У высших животных аспарагиновая кислота и аспарин участвуют в синтезе пуриновых и пиримидиновых оснований, никотиновой кислоты, а у растений являются запасной и транспортной формой азота
Глутаминовая кислота, глутамин	Входит в состав фолиевой кислоты и глутатиона; участвует в реакциях трансаминирования, непрямого дезаминирования и реаминирования. При декарбоксилировании глутаминовой кислоты образуется γ -аминомасляная кислота — тормозной медиатор ЦНС, которая является предшественником в синтезе порфиринов. Глутамин участвует в транспортировке азота у животных и растений, а также является исходным соединением в синтезе пуриновых и пиримидиновых оснований, никотиновой кислоты. Глутамат натрия используется как вкусовая приправа
Фенилаланин	Радикал способен к гидрофобным взаимодействиям. Участвует в биосинтезе флавоноидов, алкалоидов. <i>D</i> -фенилаланин входит в состав антибиотиков грамицидинов и тироцидина
Тирозин	Является исходным веществом для синтеза гормонов (тироксин, адреналин), алкалоидов (морфин, кодеин, папаверин), меланинов (пигмент кожи, волос, перьев)
Триптофан	Отсутствует в спектрах свободных аминокислот растений; служит для синтеза индолилалкиламинов (серотонин), никотиновой кислоты, гетероауксина
Гистидин	В больших количествах содержится в глобине — белковом компоненте гемоглобина; при декарбоксилировании образуется гистамин (воспаление, иммунные реакции). Входит в состав активных центров некоторых протеолитических ферментов
Пролин, оксипролин	В больших количествах содержится в белках семян злаков (проламины), в коллагене, эластине и белках эмали зубов. Входит в состав ряда антибиотиков — циклических пептидов (грамицидины, лихениформин, актиномицин <i>D</i>)

В природе имеется объект — куколка, содержащая биологическую жидкость, между стадиями двух эукариотических организмов — гусеницы и бабочки. Очевидно, что в этой жидкости должен содержаться оптимальный для синтеза белков эукариотического организма спектр аминокислот. По данным нашей лаборатории, общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколки китайского дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, в том числе обнаружены ($M \pm m$, ммоль/л) глутамин ($19,07 \pm 1,886$), аланин ($18,33 \pm 2,601$), глицин ($17,15 \pm 0,907$), серин ($13,13 \pm 1,711$), треонин ($10,28 \pm 0,272$), гистидин ($10,26 \pm 0,367$), лизин ($8,659 \pm 0,586$), валин

($8,162 \pm 0,193$), пролин ($5,586 \pm 0,409$), лейцин ($4,763 \pm 0,133$), аспарагиновая кислота ($4,700 \pm 0,561$), изолейцин ($4,337 \pm 0,145$), тирозин ($2,530 \pm 0,230$), цитрулин ($2,152 \pm 0,141$), фенилаланин ($1,043 \pm 0,070$), таурин ($0,976 \pm 0,112$), глутаминовая кислота ($0,899 \pm 0,081$), метионин ($0,672 \pm 0,083$), бета-аланин ($0,511 \pm 0,029$), этаноламин ($0,227 \pm 0,016$), орнитин ($0,044 \pm 0,004$). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии не выявлены аминокислоты аспарагин, цистеин и триптофан. По сравнению со спектром свободных аминокислот растений в жидком содержимом куколок содержится больше глицина, лизина, гистидина, пролина и глутамина, а также снижено со-

держание глутаминовой кислоты и фенилаланина.

Аминокислоты, связанные пептидной связью, образуют полипептидную цепь, и каждая аминокислота в ней называется аминокислотным остатком. В полипептиде выделяют *N*-конец (терминальная альфа-аминогруппа) и *C*-конец (терминальная альфа-карбоксильная группа). Принято чтение последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи начинать с *N*-конца. Так, в пентапептиде тир-гли-гли-фен-лей (YGGFL) тирозин является *N*-концевым остатком, а лейцин — *C*-концевым остатком аминокислот.

Большинство природных полипептидных цепей, содержащих от 50 до 2000 аминокислотных остатков, называют белками (протеинами). Полипептидные цепи меньшей длины называют олигопептидами, или просто пептидами. Средняя молекулярная масса аминокислотного остатка около 110 Да; молекулярная масса белков находится между 5500—220 000 Да.

В некоторых белках полипептидные цепи связываются поперечными дисульфидными связями, образованными окислением двух остатков цистеина. Связанные дисульфидной связью два остатка цистеина называют цистином. Внеклеточные белки часто содержат дисульфидные связи, а внутриклеточные белки часто утрачивают их. В некоторых белках образуются поперечные связи при взаимодействии радикалов других аминокислотных остатков (коллагена, фибрина).

VII. Физико-химические свойства белков.

1. *Растворимость.* Белки формируют коллоидные растворы, что обусловлено размером частиц (размеры частиц 0,1—0,001 мкм). Для растворов белков характерны следующие характеристики: низкое осмотическое давление, высокая вязкость, низкая способность к диффузии. В лабораторной практике используют два свойства коллоидных растворов белков: нефелометрическое определение количества белка на основе эффекта Тиндаля и диализ — очистка белков от низкомолекулярных примесей.

2. *Амфотерность.* Белки обладают кислотными и основными свойствами из-за присутствия в них карбоксильных и аминогрупп. Изоэлектрическая точка белков *pI* — значение *pH*, при котором суммарный заряд белка равен нулю. В *pI* белок электронейтрален с минимальной растворимостью, мак-

симальной преципитацией и наименьшей буферной способностью. Изоэлектрическая точка определяется количеством NH_2^- и COOH -групп в молекуле белка. Если количества NH_2^- и COOH -групп равны, *pI* лежит в слабокислой среде (ионизация карбоксильных групп несколько выше, чем аминогрупп) при $\text{pH} \leq 7$. Если количество $\text{NH}_2^- > \text{COOH}$, то *pI* лежит в щелочной среде. Если количество $\text{NH}_2^- < \text{COOH}$, то *pI* лежит в кислой среде. При $\text{pH} > \text{pI}$ заряд белка всегда отрицательный, так как карбоксильные группы переходят в форму COO^- , а аминогруппы — в NH_2 . При $\text{pH} < \text{pI}$ заряд белка положительный, так как при уменьшении *pH* всё больше аминогрупп переходит в форму NH_3^+ , а диссоциация карбоксильных групп подавляется.

3. *Способность к осаждению (преципитации).* Белки существуют в коллоидном растворе из-за гидратации полярных групп. Белки могут быть преципитированы путём дегидратации или нейтрализации полярных групп.

Преципитация в pI. Белки мало растворимы в изоэлектрической точке. Например, белок молока — казеин — сворачивается, если молоко кислое. Это объясняется тем, что молочная кислота, образуемая бактериями, снижает *pH*, приближая его к изоэлектрической точке казеина (*pI* 4.6).

Высаливание. Процесс преципитации с добавлением нейтральных солей (сульфата аммония или сульфата натрия) называется высаливанием. Этот процесс объясняется дегидратацией молекул белков солями, что приводит к молекулярной агрегации и преципитации. Количество соли, необходимое для преципитации, зависит от молекулярной массы белка. Чем больше его молекулярная масса, тем меньше соли необходимо для преципитации. Например, глобулины сыворотки осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония, в то время как альбумин — насыщенным раствором. Высаливание используется для разделения белков сыворотки крови.

Добавление незначительного количества нейтральных солей повышает растворимость белков.

Осаждение солями тяжёлых металлов. Ионы тяжёлых металлов (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) вызывают осаждение белков. Металлы имеют положительный заряд и в щелочной среде вызывают преципитацию белков.

Осаждение анионами или алкалоидными реактивами. Белки осаждаются трихлоруксусной, сульфосалициловой, пикриновой, таниновой кислотами. Добавление анионов кислот приводит к образованию комплексов белок—анион.

4. *Электрофорез белков.* В методе электрофореза белков сыворотки используют слабощелочные буферные растворы (т. е. $pH > pI$), чаще $pH = 8,6$. При этом белки заряжаются отрицательно и перемещаются к аноду. *Изоэлектрическое фо-*

кусирование основано на том, что в изоэлектрической точке белок теряет заряд и подвижность в электрическом поле. Трубку с гелем заполняют амфолинами, создающими градиент pH . В электрическом поле белок будет передвигаться до того значения, где он войдёт в своё изоэлектрическое состояние и, потеряв заряд, остановится.

Наибольшее распространение и развитие получил метод электрофореза в полиакриламидном геле.

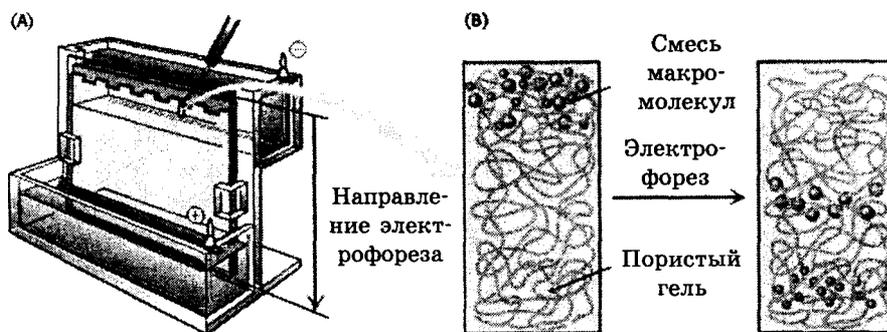


Рис. 4. Электрофорез в полиакриламидном геле. (А) — аппарат для вертикального электрофореза. Верхняя и нижняя камеры заполнены буферным раствором и присоединены к источнику постоянного тока — к катоду и аноду соответственно. Электрический ток протекает через блок полиакриламидного геля, расположенного вертикально. В верхней части блока имеются углубления, в которые наносятся образцы белка объёмом несколько мкл. Для разделения субъединиц к образцу белков добавляют додецил сульфат натрия (SDS) и отрицательно заряженный комплекс SDS-белок (в буферном растворе с $pH 8,6$) мигрирует к аноду (В). Благодаря наличию пор в полиакриламидном геле происходит разделение белков по размеру молекул и их заряду

Наиболее важным этапом метода является приготовление полиакриламидного геля из акриламида и метиленакриламида.

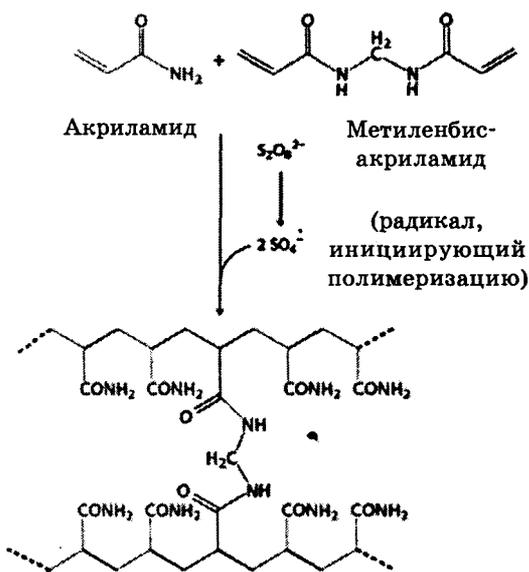


Рис. 5. Образование полиакриламидного геля — образование поперечных сшивков между цепями акриламида

Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) обладает высокой разрешающей способностью, а именно, используя краситель кумасси голубой, можно выявить 0,1 мкг (~2 пмоль) белка, а при серебрении — чувствительность повышается в 5 раз (выявление 0,02 мкг белка). При доступной технике SDS-PAGE удаётся разделить белки, отличающиеся только на 2 % по молекулярной массе (например, белки с молекулярными массами 40 и 41 кДа, имеющие различие только по 10 аминокислотным остаткам полипептидных цепей).

Изоэлектрическое фокусирование позволяет разделить белки, отличающиеся по изоэлектрической точке только на 0,01. Комбинация изоэлектрического фокусирования с SDS-PAGE даёт весьма чувствительный метод разделения белков — двумерный электрофорез (Two-Dimensional Electrophoresis). Этот способ разделения белков использовался при рождении протеомики. По этому способу производят в

горизонтальном направлении разделение белков методом изоэлектрического фокусирования (по pI), а затем в вертикальном направлении — двумерный электрофорез разделившихся белков методом SDS-PAGE (по молекулярной массе). Так удалось выделить более тысячи белков *E.coli*.

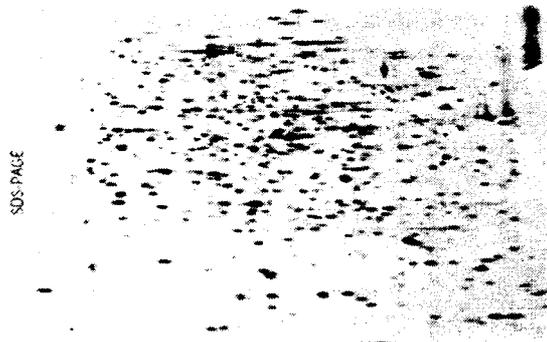


Рис. 6. Препарат белков родоначальника метода двумерного электрофореза доктора Patrick H. O'Farrell

Каждое из пятен может быть изучено методом MALDI-TOF. Это одно из наиболее важных методических направлений, лежащих в основе протеомики (науке о белках живого организма).

Развитие техники исследования последовательности нуклеотидных остатков в составе ДНК привело к расшифровке генома клетки. Оказалось, что круглый червь *Caenorhabditis elegans* имеет в геноме 96

миллионов оснований и около 19 000 генов, кодирующих белки, а геном мушки *drosophila melanogaster* содержит 180 миллионов оснований и около 14 000 генов. Геном человека оказался больше — 3 миллиарда оснований и около 40 000 генов. Однако это статичная информация, похожая на перечень деталей локомотива. Чтобы понять, как движется локомотив, необходимо знать характер взаимодействия всех деталей устройства, т. е. необходимо от статичной информации перейти к функциональной. Такую информацию даёт новая наука протеомика, изучающая продукты экспрессии генов — белки. Если на языке геномики мы говорим о том, что возможно, то язык протеомики демонстрирует, как это происходит. Протеомика в отличие от геномики не является зафиксированной наукой, поскольку она описывает белки, лежащие в основе всех функций клетки. Хорошо известно, что во всех клетках организма содержится идентичная ДНК, но каждая клетка отличается от другой по белковому составу, поскольку экспрессируются разные гены. Протеомика намного больше геномики, так как механизмы альтернативного сплайсинга РНК, посттрансляционной модификации белков, различных механизмов регуляции белкового синтеза и белок-белковых взаимоотношений делают мир белков богаче и многообразнее, чем мир нуклеиновых кислот.

Список использованной литературы

1. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. — М., СПб.: «Агар», «Флинта», 1999.
2. Чиркин, А. А. Биохимия с основами молекулярной биологии. Учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — Витебск: ВГУ, 2006.
3. Berg, J. M., Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N.-Y.: W.H. Freeman and Company, 2002.
4. Ganten, D. Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine / D. Ganten, K. Ruckpaul. — N.-Y.: Springer, 2006.