

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович**

# **БИОХИМИЯ**

## **ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

*Допущено*  
*Министерством образования Республики Беларусь*  
*в качестве учебного пособия для студентов учреждений,*  
*обеспечивающих получение высшего образования*  
*по специальностям «Биотехнология», «Биоэкология»*

Минск 2008

УДК 577.1(076.5) (075.8)

ББК 28.072я73

Л47

Рецензенты:

кафедра биохимии БГУ (заведующий кафедрой доцент,  
кандидат биологических наук *И. В. Семак*);  
ведущий научный сотрудник отдела биохимии и биотехнологии  
растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси  
кандидат биологических наук *Е. В. Спиридович*

*Все права на данное издание защищены. Воспроизведение всей книги или ее части не может быть осуществлено без разрешения учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет».*

**Леонтьев, В. Н.**

Л47 Биохимия. Лабораторный практикум : учеб. пособие для студентов специальностей «Биотехнология», «Биоэкология» / В. Н. Леонтьев, Т. И. Ахрамович. – Минск: БГТУ, 2008. – 216 с.  
ISBN 978-985-434-756-1.

Учебное пособие включает теоретический материал и подробное описание лабораторных работ по основным разделам биохимии: «Белки», «Ферменты», «Липиды», «Углеводы» и «Витамины».

В теоретической части приведены сведения о структуре, свойствах, методах выделения, очистки и анализа биополимеров и других биологически важных структур, а также дано обстоятельное описание методов ферментативной кинетики и ингибиторного анализа.

Издание должно стать полезным для студентов, выполняющих исследовательскую работу с применением биохимических методов выделения, очистки и анализа биологически активных веществ, а также для аспирантов и магистрантов, специализирующихся в области биотехнологии и биоэкологии.

**УДК 577.1(076.5) (075.8)**

**ББК 28.072я73**

**ISBN 978-985-434-756-1**

© УО «Белорусский государственный  
технологический университет», 2008

© Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И., 2008

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Совершенствование подготовки специалистов, переход к инновационному образованию и разработка новых государственных образовательных стандартов являются причиной написания новых учебных пособий.

Авторы настоящего лабораторного практикума видят инновационность образования в создании условий для получения студентами теоретических знаний и практических навыков через исследовательскую деятельность. В связи с этим в учебном пособии представлен ряд лабораторных работ, не встречающихся в других лабораторных практикумах по биохимии, но которые в течение нескольких последних лет были разработаны на кафедре биотехнологии и биоэкологии и апробированы на лабораторных и факультативных занятиях. Вместе с тем лабораторный практикум содержит достаточно глубокие теоретические сведения и подробное описание методик выполнения экспериментов, что позволит студентам квалифицированно и качественно выполнять лабораторные и научно-исследовательские работы. В пособии предусмотрены лабораторные работы разной степени сложности, в том числе и за счет использования современного аналитического оборудования.

Настоящий лабораторный практикум предназначен для студентов специальности «Биотехнология» специализаций «Технология лекарственных препаратов, витаминов и ферментов», «Технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов» и специальности «Биоэкология» и призван дать студентам навыки выделения, очистки и анализа биополимеров и других биологически важных структур, а также исследования некоторых метаболических процессов и влияния факторов внешней среды на биологические объекты. Для этого предлагается использование препаративных методов выделения биологически активных веществ, хроматографических методов их очистки, хроматографических и спектральных методов анализа их структуры и свойств, а также методов ферментативной кинетики и ингибиторного анализа.

Издание включает лабораторные работы по основным разделам биохимии: «Белки», «Ферменты», «Липиды», «Углеводы» и «Витамины». Каждая глава содержит теоретические сведения по теме, перечень реактивов, материалов и оборудования, описание методик выполнения лабораторных работ, а также вопросы для самоконтроля. В главах 4–7 встречается материал, заимствованный из учебного пособия Н. А. Белясовой «Биохимия и молекулярная биология» (Минск, 2002).

## НЕКОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И РАЗМЕРНОСТИ

**Миллиграмм-процент** – количество вещества в миллиграммах (мг) в 100 г раствора (мг-%).

**Миллионная доля** (млн<sup>-1</sup>, ppm):

1 млн<sup>-1</sup> = 1 · 10<sup>-4</sup>%, или 1 млн<sup>-1</sup> = 0,0001%;

1 млн<sup>-1</sup> = 0,1 мг-%;

1 млн<sup>-1</sup> = 1 мкг/мл = 1 мг/л.

**Процентная концентрация** – количество вещества в граммах (г) в 100 г раствора (мас. %) или количество вещества в миллилитрах (мл) в 100 мл раствора (об. %).

**Молярная концентрация (молярность)** – число молей растворенного вещества, содержащегося в 1 л раствора (моль/л или М).

**Нормальная концентрация (нормальность)** – число грамм-эквивалентов (г-экв) растворенного вещества, содержащегося в 1 л раствора (г-экв/л или н.).

**Моляльная концентрация** – число молей растворенного вещества, содержащегося в 1 кг растворителя (моль/кг или Мл).

**Один дальтон (Да)** – единица массы, равная <sup>1</sup>/<sub>12</sub> массы изотопа углерода <sup>12</sup>C. В дальтонах (Да) или килодальтонах (кДа) выражают молекулярную массу биополимеров.

**Активность фермента** – это такое его количество, которое катализирует превращение определенного количества субстрата в продукт за единицу времени. Для выражения активности препаратов ферментов используют две альтернативные единицы – международную (МЕ) и катал (кат).

За **международную единицу** активности фермента принято такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин.

Один **катал** обозначает количество фермента, катализирующее превращение 1 моля субстрата за 1 с.

1 кат = 6 · 10<sup>7</sup> МЕ.

**Удельная активность фермента** – это число единиц активности фермента на 1 мг белка.

**Молекулярная активность фермента (число оборотов фермента)** – число молекул субстрата, подвергающееся превращению одной молекулой фермента за 1 мин при условии полного насыщения фермента субстратом. Она равна числу единиц активности фермента, деленному на количество фермента, выраженное в микромолях. Понятие молекулярной активности применимо только для чистых ферментов.

**Активность каталитического центра** – число молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин в расчете на один активный центр. Это понятие вводится, когда известно количество активных центров в молекуле фермента.

**Кофермент** – функционально замещенное производное водорастворимого витамина, нековалентно связанное с белковой частью фермента и принимающее участие в каталитическом акте превращения субстрата в продукт реакции.

**Простетическая группа** – молекулы органических и неорганических веществ, ковалентно связанные с белковой частью фермента и участвующие в каталитическом акте превращения субстрата в продукт реакции.

## Глава 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Студенты допускаются к работе в лаборатории после прохождения инструктажа на рабочем месте по технике безопасности с последующей регистрацией в журнале.

Все работы в биохимической лаборатории выполняются в халатах. Не разрешается пребывание студентов в лаборатории в верхней одежде и ее хранение.

В процессе работы необходимо соблюдать максимальную осторожность, помня, что неаккуратность, невнимательность, недостаточное знание приборов и свойств веществ, с которыми ведется работа, могут повлечь за собой несчастный случай.

Основными опасными и вредными производственными факторами, действующими на работающих в биохимической лаборатории, являются:

- огнеопасные и легковоспламеняющиеся вещества;
- летучие ядовитые и взрывчатые вещества;
- щелочные металлы;
- концентрированные растворы кислот и щелочей;
- биологический материал;
- лабораторная посуда;
- сосуды, работающие с применением вакуума или давления;
- электроприборы.

В лаборатории никакие вещества нельзя пробовать на вкус. Нюхать химические вещества нужно с большой осторожностью, не вдыхая полной грудью, а направляя к себе пары или газы движением руки.

Для работы следует использовать реактивы, хранящиеся в таре с этикетками или надписями.

Нельзя работать с токсичными и агрессивными веществами без спецодежды и наличия необходимых средств защиты органов дыхания, глаз, кожных покровов.

Не разрешается использовать лабораторную посуду для каких-либо целей, не связанных с проведением эксперимента.

Запрещается покидать рабочее место, оставляя без присмотра зажженные спиртовки, электронагревательные приборы, а также сосуды, работающие с применением вакуума или давления.

Нельзя нагревать посуду из простого химического стекла на открытом пламени. Огнеопасные вещества следует нагревать только на водяной бане, контролируя наличие воды. Запрещается на-

гревать на водяной бане вещества, которые при нагревании, а также при контакте с водой могут взрываться или выделять ядовитые пары или газы.

Все работы, связанные с выделением *вредных паров или газов*, необходимо проводить в вытяжных шкафах, обеспечивающих полное удаление выделяющихся газов и паров.

Все работы с *легковоспламеняющимися и горючими жидкостями* должны выполняться в вытяжном шкафу при работающей вентиляции, выключенных газовых горелках и электронагревательных приборах.

Необходимо осторожно обращаться с *ядовитыми веществами*, не вдыхать их пары, избегать попадания на руки. Если это произошло, следует вымыть руки теплой водой с мылом, а при вдыхании паров – немедленно выйти на свежий воздух.

Запрещается сливать горючие и токсичные вещества в канализацию. Их необходимо собирать в стеклянную тару с крышкой емкостью не менее 3 л для последующего обезвреживания.

При работе с *концентрированными растворами кислот и щелочей* важно соблюдать осторожность, так как в случае попадания на кожу они могут вызвать сильные ожоги, а при попадании в глаза – потерю зрения.

Концентрированные растворы азотной, серной и соляной кислот необходимо хранить в лаборатории в толстостенной стеклянной посуде емкостью не более 2 л на стеклянных или фарфоровых поддонах в вытяжном шкафу.

Разбавлять концентрированные кислоты следует только в термостойкой посуде путем медленного при постоянном перемешивании приливания кислоты к воде, а не наоборот.

Растворять твердые щелочи необходимо путем медленного прибавления их небольшими кусочками к воде при непрерывном перемешивании. Кусочки щелочи необходимо брать щипцами или пинцетом.

Если кислота случайно пролита, вначале ее нужно засыпать песком, затем убрать песок и место, где была разлита кислота, засыпать известью или содой, а после смыть водой и вытереть насухо. Если случайно пролиты концентрированные растворы щелочей или аммиака, их можно засыпать песком или древесными опилками.

При ожогах кислотами и щелочами пораженный участок кожи следует быстро промыть большим количеством воды, а затем наложить на обожженное место примочку: при ожогах кислотой – из 2%-ного раствора питьевой соды, при ожогах щелочью – из 1–2%-ного раствора уксусной или борной кислоты.

При отравлениях пострадавшего надо немедленно вывести (вынести) на свежий воздух, оказать первую помощь, а затем направить в медпункт (ближайшую поликлинику).

Работа с *биологическим материалом* (биологические жидкости, гомогенаты тканей, суспензии микроорганизмов) должна выполняться в медицинских перчатках с помощью специальных инструментов. Преимущественно следует использовать автоматические дозаторы, бюретки и мерные цилиндры. Необходимо следить, чтобы биологический материал не попадал на окружающие предметы, стол, руки. Если это произошло, нужно обработать места попадания этиловым спиртом или 3%-ным раствором хлорамина. После работы с биологическим материалом необходимо вымыть посуду и продезинфицировать ее 3%-ным раствором хлорамина, простерилизовать инструменты и протереть поверхность рабочего стола и руки этиловым спиртом.

При работе со *спиртовкой* следует соблюдать следующие правила: перед зажиганием спиртовки нужно снять колпачок, чтобы удалить пары этанола; не зажигать спиртовку, если в ней находится меньше половины спирта или фитиль не достает до дна; не наливать спирт в зажженную спиртовку и не переносить ее с места на место; не зажигать одну спиртовку от другой; гасить спиртовку следует специальным колпачком, запрещается дуть на пламя.

Не разрешается пользоваться надбитой или треснутой *посудой*. Осколки разбитой лабораторной посуды нельзя собирать незащищенными руками, необходимо использовать для этого щетку и совок.

При порезах рук или других частей тела стеклом необходимо удалить из раны мелкие осколки, после чего промыть ее 2%-ным раствором перманганата калия или 3%-ным раствором перекиси водорода, смазать края раны раствором йода и забинтовать.

Все работы, связанные с применением *вакуума или давления*, необходимо производить в вытяжных шкафах. Для вакуумных работ запрещается использование плоскодонных колб.

*Электроустановки* должны находиться в технически исправном состоянии и быть надежно заземленными. Крышки термостатов, сухожаровых шкафов, центрифуг в рабочем состоянии должны быть закрыты. Распределительный электрический щит, к которому подключены электроприборы, включается только в присутствии и под контролем преподавателя.

В лабораторные центрифуги помещают парное (четное) количество тщательно уравновешенных пробирок друг напротив друга. Перед включением и в процессе работы роторная камера центрифуги должна



быть закрыта. Камера может быть открыта только после полной остановки ротора.

Работу на измерительной аппаратуре необходимо производить в присутствии преподавателя или лаборанта кафедры.

При термических ожогах обожженное место следует присыпать пищевой содой, крахмалом, тальком или сделать примочки из свежеприготовленных 25%-ных растворов пищевой соды, перманганата калия или неразбавленного этилового спирта, а затем наложить сухую стерильную повязку.

В случаях получения травм, обнаружения неисправностей оборудования, приспособлений, инструментов и нарушения технологического процесса необходимо немедленно поставить в известность преподавателя, проводящего занятия (заведующего лабораторией, заведующего кафедрой).

По окончании занятий в лаборатории студенты должны убрать рабочее место, выключить воду, газ, сжатый воздух, электроприборы, вентиляцию, снять средства индивидуальной защиты и тщательно вымыть руки с мылом.

## Глава 2. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

**Белки** – высокомолекулярные биополимеры, построенные из остатков аминокислот. Молекулярная масса белков колеблется в пределах от 6000 до 2 000 000 Да. Этим удивительным по разнообразию полимерам присущи одни из наиболее важных и разносторонних клеточных функций. К *биологическим функциям* белков относятся: каталитическая (ферментативная) и регуляторная (способность регулировать скорость химических реакций в клетке и уровень метаболизма в целом организме), транспортная (транспорт веществ в организме и перенос их через биомембраны), структурная (в составе хромосом, цитоскелета, соединительных, мышечных, опорных тканей), рецепторная (взаимодействие рецепторных молекул с внеклеточными компонентами и инициирование специфического клеточного ответа). Кроме этого, белки выполняют защитные, запасные, токсические, сократительные и другие функции.

Кроме *простых белков*, в состав которых входят только аминокислоты, существуют *сложные белки*, которые помимо аминокислот могут содержать ионы металлов (металлопротеины), молекулы пигментов (хромопротеины), образовывать комплексы с другими молекулами (липо-, нуклео-, гликопротеины), а также ковалентно связывать неорганический фосфат (фосфопротеины).

Мономерными единицами белков являются двадцать  $\alpha$ -аминокислот. Все белки всех видов живых существ содержат одинаковый набор из двадцати аминокислот. Помимо них известно еще более 150 других аминокислот, которые встречаются в различных клетках и тканях в свободном или связанном состоянии, но никогда не обнаруживаются в составе белков. Большая их часть – это производные  $\alpha$ -аминокислот, содержащихся в белках, а также  $\beta$ ,  $\gamma$ - и  $\delta$ -аминокислоты.

Химические и физико-химические свойства белков определяются качественным и количественным составом входящих в них аминокислот.

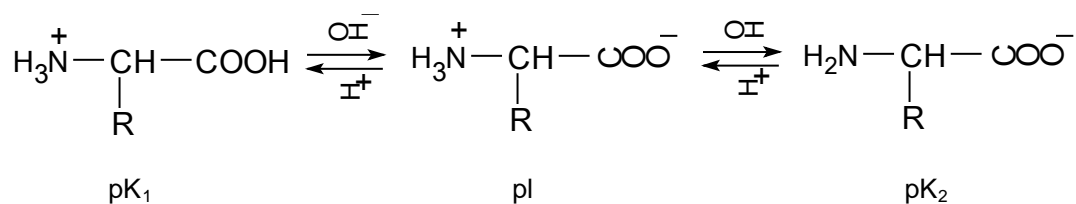
**$\alpha$ -Аминокислоты** – это алифатические, ароматические или гетероциклические соединения, содержащие, по меньшей мере, одну аминогруппу и одну карбоксильную группу, общей формулой:



Аминокислоты различаются по строению, размерам и физико-химическим свойствам радикалов, присоединенных к  $\alpha$ -углеродному атому. Функциональные группы аминокислот определяют особенности свойств разных  $\alpha$ -аминокислот.

Аминокислоты растворимы в воде и в водных растворах с различным значением рН существуют в форме биполярного иона (цвиттериона).

В зависимости от рН среды аминокислоты ведут себя либо как кислоты, либо как основания: в кислых растворах карбоксильная группа находится в неионизированной форме, а аминогруппа ионизирована; в щелочных растворах – наоборот. Кроме этих двух групп, в состав некоторых аминокислот входят и другие функциональные группы, способные к ионизации, например еще одна NH<sub>2</sub>- или COOH-группа, OH-, SH-группы и др.:



В табл. 2.1 приведены значения рК (рК = -lgK, где K – константа диссоциации) двух стадий диссоциации, которые достаточно сильно различаются. При значениях рК<sub>1</sub> в растворе в эквимолярных концентрациях находится два вида ионов – NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CHRCOO<sup>-</sup> и NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CHRCOOH. При значениях рК<sub>2</sub> в эквимолярных концентрациях присутствуют ионы NH<sub>3</sub><sup>+</sup>CHRCOO<sup>-</sup> и NH<sub>2</sub>CHRCOO<sup>-</sup>. Среднее арифметическое значений рК<sub>1</sub> и рК<sub>2</sub> называется *изоэлектрической точкой (pI)*. Это значение рН, при котором положительные и отрицательные заряды аминокислоты полностью скомпенсированы и суммарный заряд молекулы равен нулю.

Таблица 2.1

**Номенклатура, молекулярная масса и значения рК аминокислот**

Название аминокислоты	Обозначение	Молекулярная масса	рК <sub>1</sub> (α-COOH)	рК <sub>2</sub> (α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	рК <sub>R</sub> (R-группы)
Глицин	Gly G	75	2,34	9,60	–
Аланин	Ala A	89	2,34	9,69	–
Валин	Val V	117	2,32	9,62	–
Лейцин	Leu L	131	2,36	9,60	–
Изолейцин	Ile I	131	2,36	9,68	–
Пролин	Pro P	115	1,99	10,96	–
Фенилаланин	Phe F	165	1,83	9,13	–
Тирозин	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07
Триптофан	Trp W	204	2,38	9,39	–
Серин	Ser S	105	2,21	9,15	13,60

Название аминокислоты	Обозначение	Молекулярная масса	pK <sub>1</sub> (α-COOH)	pK <sub>2</sub> (α-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	pK <sub>R</sub> (R-группы)
Треонин	Thr T	119	2,11	9,62	13,60
Цистеин	Cys C	121	1,96	10,78	10,28
Метионин	Met M	149	2,28	9,21	–
Аспарагин	Asn N	132	2,02	8,80	–
Глутамин	Gln Q	146	2,17	9,13	–
Аспарат	Asp D	133	1,88	9,60	3,65
Глутамат	Glu E	147	2,19	9,67	4,25
Лизин	Lys K	146	2,18	8,95	10,53
Аргинин	Arg R	174	2,17	9,04	12,48
Гистидин	His H	155	1,82	9,17	6,00

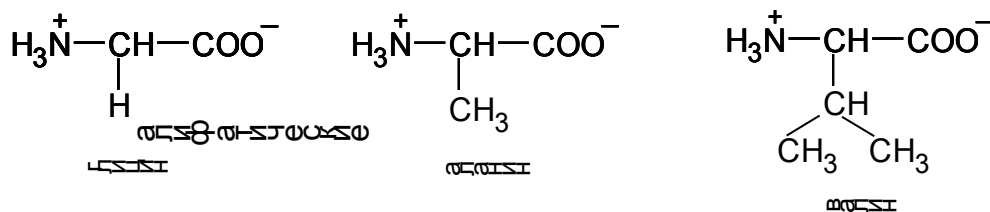
Аминокислоты различаются по их растворимости в воде. Это связано с их цвиттерионным характером, а также со способностью радикалов взаимодействовать с водой (гидратироваться). К гидрофильным относятся радикалы, содержащие катионные, анионные и полярные незаряженные функциональные группы. К гидрофобным – радикалы, содержащие алкильные или арильные группы.

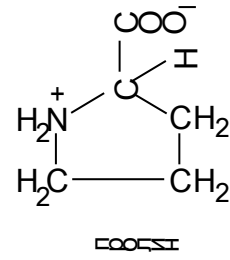
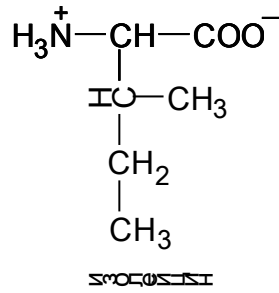
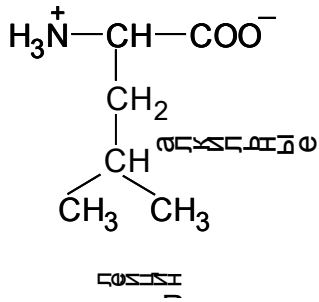
В зависимости от полярности R-групп выделяют четыре класса аминокислот: неполярные, полярные незаряженные, отрицательно заряженные и положительно заряженные.

К **неполярным аминокислотам** относятся: глицин; аминокислоты с алкильными и арильными боковыми цепями – аланин, валин, лейцин, изолейцин; тирозин, триптофан, фенилаланин; иминокислота – пролин. Они стремятся попасть в гидрофобное окружение «внутри» молекулы белка.

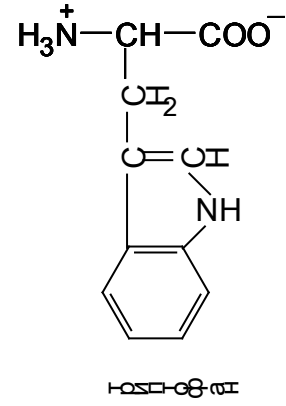
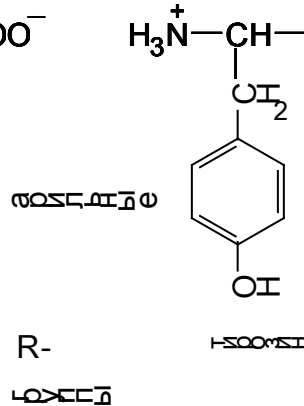
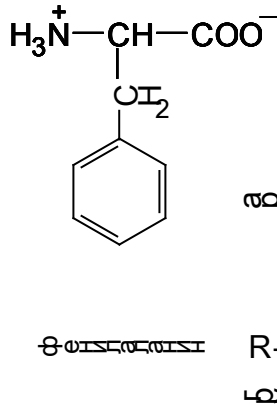
В число **полярных заряженных аминокислот** входят: положительно заряженные аминокислоты – гистидин, лизин, аргинин; отрицательно заряженные аминокислоты – аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Они обычно выступают наружу, в водное окружение белка.

#### Неполярные алифатические (алкильные) R-группы





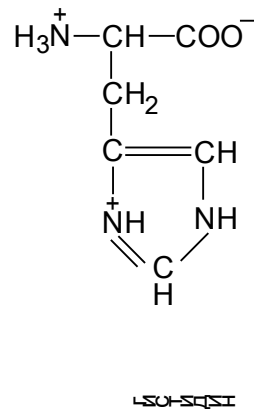
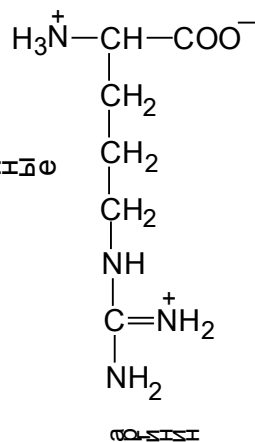
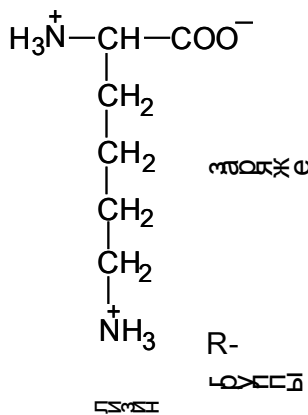
Ароматические (арильные) R-группы



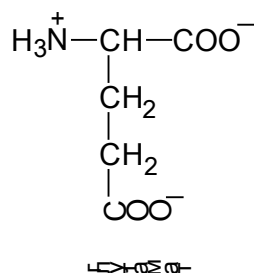
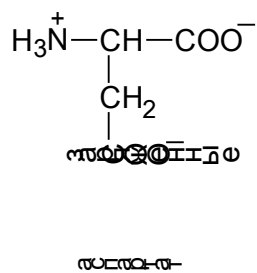
Остальные аминокислоты образуют категорию **полярных незаряженных**: серин и треонин (аминокислоты-спирты); аспарагин и глутамин (амиды аспарагиновой и глутаминовой кислот); цистеин и метионин (серосодержащие аминокислоты).

Поскольку при нейтральном значении pH COOH-группы глутаминовой и аспарагиновой кислот полностью диссоциированы, их принято называть глутаматом и аспартатом независимо от природы присутствующих в среде катионов.

Положительно заряженные R-группы



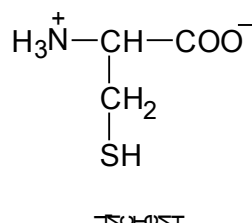
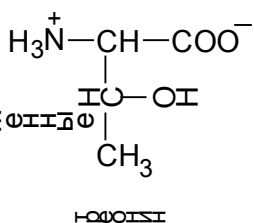
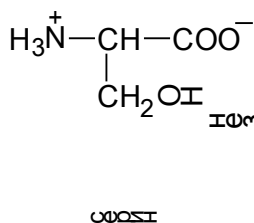
### Отрицательно заряженные R-группы



α-амино-β-кетоглутарат

α-амино-γ-кетоглутарат

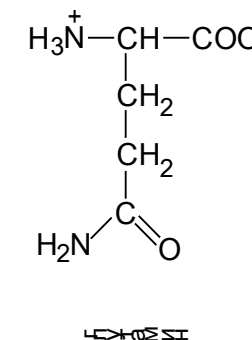
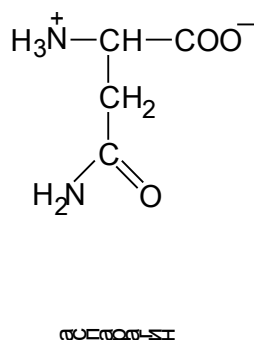
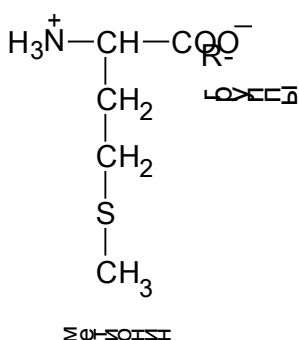
### Полярные незаряженные R-группы



α-амино-β-гидроксипропановая кислота

α-амино-β-гидрокси-α-метилпропановая кислота

α-амино-γ-меркаптопропановая кислота



α-амино-β-метилметионин

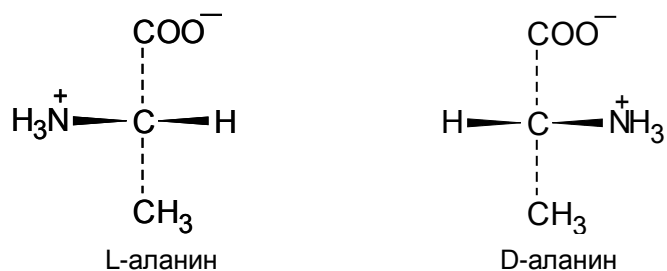
α-амино-β-кетоглутарат

α-амино-β-кетоглутарат

В ряде белков содержатся особые аминокислоты, образующиеся путем модификации обычных аминокислот после их включения в полипептидную цепь, например 4-гидроксипролин, фосфосерин, γ-карбоксиглутаминовая кислота и др.

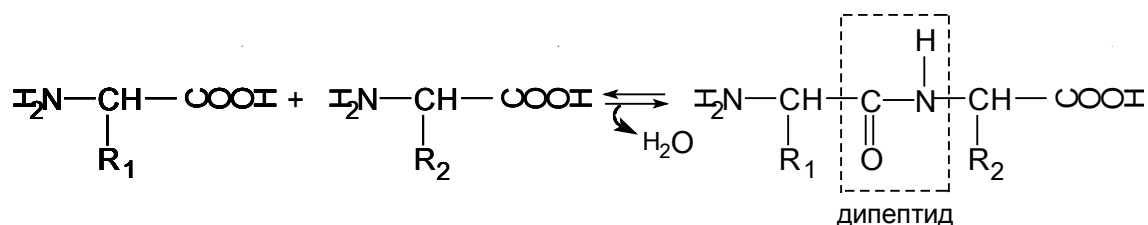
Все аминокислоты, образующиеся при гидролизе белков в достаточно мягких условиях, обнаруживают **оптическую активность**, т. е. способность вращать плоскость поляризованного света (за исключением глицина). Оптической активностью обладают все соединения, способные существовать в двух стереоизомерных формах (L- и D-изомеры). В состав белков входят только L-аминокислоты.

Глицин не имеет асимметрического атома углерода, а треонин и изолейцин содержат по два асимметрических атома углерода. Все остальные аминокислоты содержат один асимметрический атом углерода.



Оптически неактивная форма аминокислоты называется **рацематом**, представляющим собой эквимольную смесь D- и L-изомеров, и обозначается символом DL-.

Мономеры аминокислот, входящих в состав полипептидов, называются **аминокислотными остатками**. Остатки аминокислот соединяются друг с другом **пептидной связью** (рис. 2.1), в формировании которой принимает участие α-карбоксильная группа одной аминокислоты и α-аминогруппа другой:



Равновесие этой реакции сдвинуто в сторону образования свободных аминокислот, а не пептида. Поэтому биосинтез полипептидов требует катализа и затрат энергии.

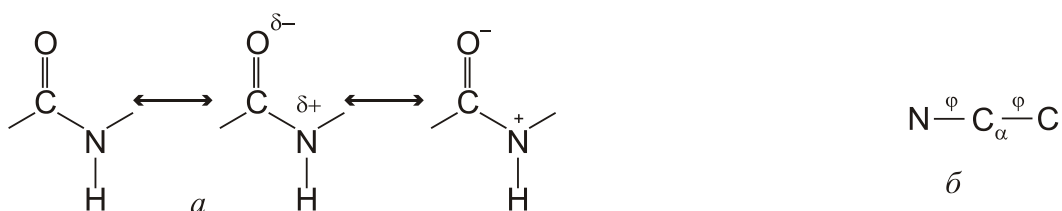


Рис. 2.1. Планарное расположение атомов пептидной связи:  
*а* – таутомерные превращения пептидной связи; *б* – обозначение атомов и связей пептидной группы; *в* – фрагмент полипептидной цепи

Поскольку дипептид содержит реакционноспособные карбоксильную группу и аминогруппу, то к нему с помощью новых пептидных связей могут присоединяться другие аминокислотные остатки, в результате чего образуется *полипептид* – белок.

Полипептидная цепь состоит из регулярно повторяющихся участков – групп  $-\text{NH}-\text{CHR}-\text{CO}-$ , образующих основную цепь (скелет или остов молекулы), и вариабельной части, включающей характерные боковые цепи. R-группы аминокислотных остатков выступают из пептидного остова и формируют в значительной степени поверхность полимера, определяя многие физические и химические свойства белков. Свободное вращение в пептидном остове возможно между атомом азота пептидной группы и соседним  $\alpha$ -углеродным атомом, а также между  $\alpha$ -углеродным атомом и углеродом карбонильной группы. Благодаря этому линейная структура может приобретать более сложную пространственную конформацию.

Аминокислотный остаток, имеющий свободную  $\alpha$ -аминогруппу, называется N-концевым, а имеющий свободную  $\alpha$ -карбоксильную группу – C-концевым (см. рис. 2.1).

Структуру пептидов принято изображать с N-конца.

Иногда концевые  $\alpha$ -аминогруппа и  $\alpha$ -карбоксильная группа связываются одна с другой, образуя циклические пептиды.

Пептиды различаются количеством аминокислот, аминокислотным составом и порядком соединения аминокислот.

Пептидные связи очень прочные, и для их химического гидролиза требуются жесткие условия: высокие температура и давление, кислая среда и длительное время.

В живой клетке пептидные связи могут разрываться с помощью протеолитических ферментов, называемых протеазами, или пептид-гидролазами.

Так же как и аминокислоты, белки являются амфотерными соединениями и в водных растворах заряжены. Для каждого белка существует своя изоэлектрическая точка. При значениях рН выше изоэлектрической точки белок несет отрицательный заряд, а при значениях рН ниже изоэлектрической точки – положительный.

Аминокислотные остатки в пептидной цепи белков чередуются не случайным образом, а расположены в определенном порядке. Линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется *первичной структурой белка*. Она определяет другие уровни организации белков – вторичную, третичную и четвертичную структуры (рис. 2.2).



Первичная структура	Вторичная структура	Третичная структура	Четвертичная структура
------------------------	------------------------	------------------------	---------------------------

Полипептидная цепь	Связанные субъединицы
-----------------------	--------------------------

Рис. 2.2. Уровни структурной организации белков

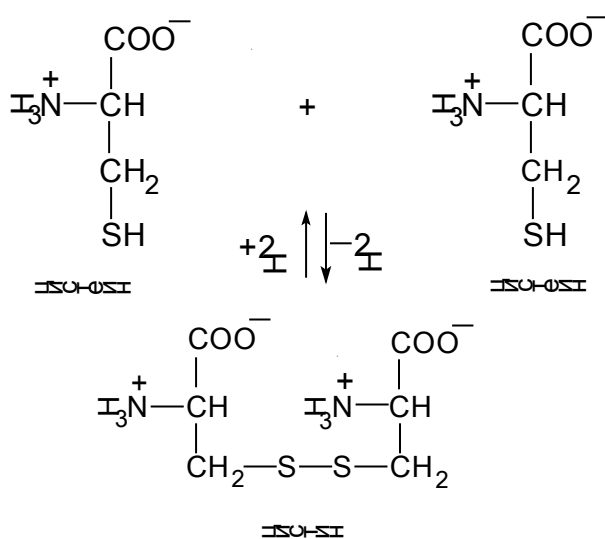
Среди известных белков самые короткие цепи встречаются в некоторых пептидных гормонах, имеющих в своем составе от 25 до 100 аминокислот. Более типичны полипептидные цепи, содержащие от 100 до 500 аминокислотных остатков. Наибольшая из известных полипептидных цепей состоит более чем из 3000 остатков, что характерно для фибриллярных белков.

Последовательность аминокислот в первичной структуре белка является специфической для данного белка, отличающей его от любого другого индивидуального белка. Замена даже одной аминокислоты на другую может привести к полной утрате биологической активности белка.

Первичная структура белка генетически детерминирована и воспроизводится в ходе транскрипции и трансляции.

Первичная структура стабилизируется ковалентными связями – пептидной, а в некоторых белках и *дисульфидной*. Последняя образуется при окислении остатков цистеина между разными участками одной и той же полипептидной цепи. Образующийся при этом дисульфид называется цистином.

Линейные полипептидные цепи индивидуальных белков за счет взаимодействия



функциональных групп аминокислот приобретают определенную пространственную трехмерную структуру, или *конформацию*.

По форме молекул белки делят на две группы: глобулярные и фибриллярные. В *глобулярных белках* полипептидные цепи плотно свернуты в компактные сферические, или глобулярные, структуры. Глобулярные белки растворимы в воде и разбавленных солевых растворах. Все или почти все полярные группы глобулярных белков расположены на поверхности молекулы и гидратированы, а гидрофобные остатки находятся внутри белковой глобулы, что позволяет им избежать контакта с водным окружением. Пептидные группы белков сами достаточно полярны, поэтому они стремятся образовать водородные связи друг с другом и с полярными боковыми группами аминокислот. К глобулярным белкам относятся ферменты, антитела, некоторые гормоны и белки, выполняющие транспортную функцию (например, гемоглобин).

В *фибриллярных белках* полипептидные цепи, располагаясь параллельно друг другу вдоль одной оси, образуют длинные волокна (фибриллы) или слои. Фибриллярные белки нерастворимы в воде и разбавленных солевых растворах. К ним относятся белки соединительной ткани животных (коллаген, кератин).

Некоторые белки принадлежат к промежуточному типу. Подобно фибриллярным белкам они формируют длинные палочковидные структуры и в то же время, как глобулярные белки, растворимы в солевых растворах. К ним относятся миозин и фибриноген.

*Вторичная структура белка* – это пространственная структура, образующаяся в результате взаимодействий между функциональными группами пептидного остова. При этом полипептидная цепь может приобретать регулярные структуры двух типов –  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры.

*$\alpha$ -Спираль* имеет вид стержня. Туго закрученная цепь пептидного остова полипептида создает внутреннюю часть стержня, а боковые цепи аминокислотных остатков направлены наружу от основной цепи, располагаясь по спирали.  $\alpha$ -Спираль стабилизирована водородными связями, которые образуются между атомом кислорода карбонильной группы и водородом амидного азота пептидного остова через 4 аминокислоты. На каждый виток (шаг) спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка. На один аминокислотный остаток спирали приходится 1,5 Å, шаг спирали составляет  $3,6 \cdot 1,5 = 5,4$  Å. Водородные связи параллельны оси спирали и возникают между каждым первым и каждым пятым аминокислотными остатками. Боковые цепи аминокислотных остатков, располагаясь по периферии спирали, не участвуют в образовании водородных связей, формирующих вторичную структуру (рис. 2.3).

Рис. 2.3. Различные типы изображения  $\alpha$ -спирализованного участка полипептидной цепи

Спираль может закручиваться по часовой стрелке (правая спираль) или против (левая спираль). Все исследованные  $\alpha$ -спирали белков относятся к правому типу, что обусловлено строением L-аминокислот.

Большие объемные аминокислотные остатки (например, пролин) или остатки с одинаковыми отталкивающимися зарядами препятствуют формированию  $\alpha$ -спирали.

Содержание  $\alpha$ -спиралей в белках крайне вариабельно. Не все белки могут существовать в  $\alpha$ -спиральной форме, так как способность полипептидной цепи к образованию стабильной  $\alpha$ -спиральной структуры определяется природой боковых цепей аминокислотных остатков.  $\alpha$ -Спирали преобладают в отдельных участках глобулярных белков.

**$\beta$ -Структура** (или  **$\beta$ -складчатый слой**) существенно отличается от  $\alpha$ -спирали, так как имеет плоскую, а не стержневидную форму.  $\beta$ -Структура – это обычная структура участков глобулярных белков (не всех). В ней полипептидные цепи почти полностью вытянуты, а не туго скручены, как в  $\alpha$ -спирали. Две или более линейные полипептидные цепи прочно связываются водородными связями между NH- и CO-группами пептидных связей, перпендикулярными оси молекулы (складчатый  $\beta$ -слой), тогда как в  $\alpha$ -спирали водородные связи между этими группами образуются в пределах одной и той же полипептидной цепи. Боковые цепи аминокислотных остатков находятся по одну или другую сторону зигзагообразных плоскостей  $\beta$ -структуры (рис. 2.4). Причем, если они велики по размеру или имеют одинаковые заряды, то существование  $\beta$ -структуры становится невозможным из-за взаимного отталкивания R-групп боковых цепей аминокислот.

Если межцепочечными водородными связями соединены две полипептидные цепи, идущие в одном направлении от N- к C-концу,

то это *параллельная  $\beta$ -структура*. Если N- и C-концы взаимодействующих полипептидных цепей расположены противоположно, то это *антипараллельная  $\beta$ -структура* (рис. 2.4).

*a*

*б*

Рис. 2.4. Типы организации  $\beta$ -складчатой структуры полипептидной цепи:  
*a* – антипараллельная; *б* – параллельная

Большинство белков имеют компактную глобулярную форму, обусловленную тем, что их полипептидные цепи делают много изгибов, меняющих направление цепи на  $180^\circ$ . Во многих случаях поворот цепи в противоположном направлении осуществляется благодаря наличию одного и того же структурного элемента, называемого  **$\beta$ -изгибом**.

Этот изгиб, имеющий вид шпильки для волос, образуется в результате того, что СО-группа аминокислотного остатка  $n$  в полипептидной цепи присоединяется водородными связями к NH-группе аминокислотного остатка  $(n + 3)$  (рис. 2.5). В результате направление полипептидной цепи меняется на противоположное. Чаще всего такие изгибы обусловлены наличием в структуре белка остатков пролина.

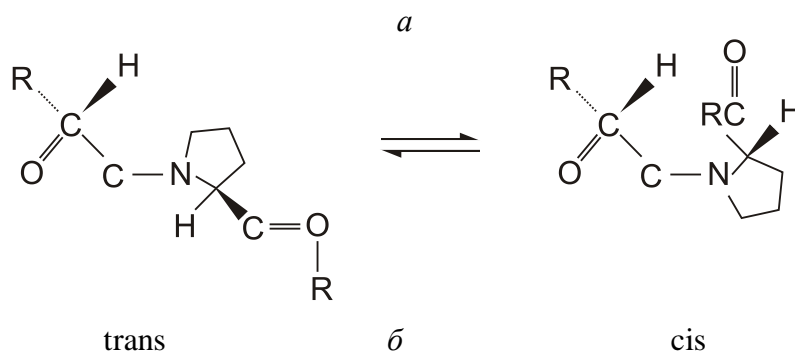


Рис. 2.5.  $\beta$ -Изгиб пептидной связи, образованной остатками пролина:  
*a* – фрагмент полипептидной цепи; *b* – *цис-транс*-изомерия пептидной связи, образованной остатками пролина

В белках, в которых имеются короткие участки  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры, образованию  $\alpha$ -спирали способствуют такие аминокислоты, как аланин, лейцин и глутаминовая кислота. Тогда как метионин, валин и изолейцин чаще встречаются в составе  $\beta$ -структуры, а глицин, пролин и аспарагин обычно расположены в местах изгиба цепи.

Хотя конформация каждого белка уникальна, несколько способов укладки полипептидной цепи постоянно повторяются в отдельных участках макромолекул.

Участки белковой молекулы, которые не относятся к спиральным или складчатым структурам, называются *неупорядоченными*.

**Третичная структура белка** – это трехмерная пространственная структура, образуемая за счет взаимодействий между радикалами аминокислотных остатков, которые располагаются на значительном расстоянии друг от друга в полипептидной цепи. При этом уменьшается свободное вращение связей пептидного остова за счет возникновения ковалентных дисульфидных связей, гидрофобных взаимодействий, ионных и водородных связей между радикалами аминокислот.

Гидрофобные радикалы аминокислот имеют тенденцию к объединению внутри глобулярной структуры белков с помощью так называемых *гидрофобных взаимодействий*, образуя плотное гидрофобное ядро. Гидрофильные ионизированные и неионизированные радикалы аминокислот в основном расположены на поверхности белка и определяют его растворимость в воде.

Гидрофильные аминокислоты, оказавшиеся внутри гидрофобного ядра, могут взаимодействовать друг с другом с помощью *ионных* и *водородных связей*.

Ионные, водородные и гидрофобные связи относятся к числу слабых. Конформация белка поддерживается за счет возникновения множества таких слабых связей. Белки обладают конформационной лабильностью – способностью к небольшим изменениям конформации за счет разрыва одних и образования других слабых связей.

Третичная структура некоторых белков стабилизирована *дисульфидными связями*. Их наличие характерно для секретируемых клеткой белков (например, инсулина, иммуноглобулинов) и не свойственно для большинства внутриклеточных белков.

На характер межрадикальных взаимодействий и третичную структуру белка оказывают влияние особенности вторичной структуры.

По наличию в своем составе  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур глобулярные белки разделяют на четыре *категории*:

- белки, имеющие только  $\alpha$ -спирали (например, миоглобин);
- белки, имеющие только  $\beta$ -структуру (например, иммуноглобулины, фермент супероксиддисмутаза);
- белки, имеющие  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -структуры (например, гемоглобин);
- белки, имеющие лишь незначительное количество  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -структур (например, небольшие богатые цистеином белки или металлопротеины).

Многие белки могут почти беспрепятственно переходить из одной конформации в другую.

Длинные полипептидные цепи часто складываются в несколько компактных, относительно независимых областей, отвечающих за выполнение определенной функции белка. Они имеют самостоятельную третичную структуру и называются *доменами*. Домены – это сравнительно небольшие глобулярные образования, состоящие из участков полипептидной цепи (некоторые стабильные комбинации  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -слоев) длиной 150 аминокислот или менее. Многие глобулярные белки состоят из нескольких различных доменов массой 10–20 кДа.

В белках большой молекулярной массы отдельные домены соединяются между собой относительно гибкими участками полипептидной цепи. Благодаря доменной структуре белков легче формируется их трехмерная структура.

Белки, содержащие несколько полипептидных цепей, обладают еще одним уровнем структурной организации – **четвертичной структурой**. Это способ укладки в пространстве нескольких полипептидных цепей, обладающих первичной, вторичной и третичной структурами, с формированием единого макромолекулярного образования для выполнения определенной функции. Четвертичную структуру имеют белки с молекулярной массой более 50 000 Да.

Белки, состоящие более чем из одной полипептидной цепи, называются *олигомерными белками*, а отдельные полипептидные цепи, из которых они состоят, – *протомерами*, или *субъединицами*. Другими словами, количество и порядок соединения протомеров в олигомерном белке называется четвертичной структурой белка.

Протомеры в олигомерном белке связаны слабыми нековалентными связями – гидрофобными, ионными, водородными. Взаимодействие протомеров осуществляется благодаря комплементарности их контактирующих поверхностей.

Количество протомеров в белках может сильно варьировать: в наиболее мелких олигомерных белках их число колеблется в пределах от 2 до 12, а в более крупных составляет несколько десятков или сотен. Например, гемоглобин содержит 4 протомера, а белок вируса табачной мозаики – 2120 протомеров.

Кроме того, в состав олигомерных белков могут входить одинаковые или разные протомеры. Так, молекула гемоглобина  $A_1$  ( $HbA_1$ ) построена из двух идентичных цепей одного типа ( $\alpha$ -спирали) и двух идентичных цепей другого типа ( $\beta$ -структуры).

Следует отметить, что у олигомерных белков появляется новое по сравнению с одноцепочечными белками свойство – способность к аллостерической регуляции своей активности.

Большинство белковых молекул сохраняют свою биологическую активность только в пределах очень узкой области температуры и pH. *Денатурация белков* – это разрушение их нативной конформации (третичной и частично вторичной структур), вызванное разрывом дисульфидных и слабых нековалентных связей (водородных, ионных, гидрофобных), при действии денатурирующих агентов. Денатурация сопровождается потерей биологической активности белка. При денатурации белков не происходит разрушения их первичной структуры,

однако разрушается уникальная трехмерная структура белка, и белок переходит в разупорядоченное состояние, приобретая случайную конформацию, где уже почти нет ни  $\alpha$ -спиралей, ни  $\beta$ -структур или других типов регулярной структуры.

Денатурацию белков вызывают физические (высокая температура (выше 50–60°C), действие ультразвука, ионизирующих излучений) и химические факторы (сильные кислоты и щелочи, органические растворители, фенол, хлорамин, соли тяжелых металлов, мочевины, додецилсульфат натрия и др.).

Для глобулярных белков проявлением денатурации является уменьшение их растворимости. При этом гидрофобные радикалы, находящиеся в гидрофобном ядре, оказываются на поверхности молекулы, тем самым создаются условия для агрегации белков. Агрегаты белков выпадают в осадок.

Денатурация во многих случаях обратима, т. е. после удаления денатурирующего агента восстанавливается нативная структура белковой молекулы и исходная биологическая активность белка. Это явление называется *ренатурацией белка*.

При необратимой денатурации денатурированный белок не способен восстановить свою нативную структуру и биологические свойства.

Таким образом, нативная конформация белковой молекулы определяется ее аминокислотной последовательностью. Формирование пространственных структур белка осуществляется путем самосборки – самопроизвольного процесса, при котором полипептидная цепь стремится принять в растворе наиболее стабильную конформацию, т. е. с наименьшей свободной энергией.

### **Лабораторная работа** **КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ**

**Цель работы** – освоение методов идентификации и количественного определения аминокислот.

**Реактивы, материалы и оборудование:** 0,1%-ные водные растворы различных аминокислот; 1%-ные растворы гидролизатов белков; 0,2%-ный раствор нингидрина в свежеперегнанном ацетоне; карбонат меди (II); 0,1%-ный раствор  $\alpha$ -нафтола в 50%-ном этаноле (реактив устойчив в течение суток); 10%-ный раствор NaOH; 6 н. раствор NaOH; концентрированная азотная кислота; концентрированная серная кислота; ледяная уксусная кислота; 5%-ный раствор мочевины;



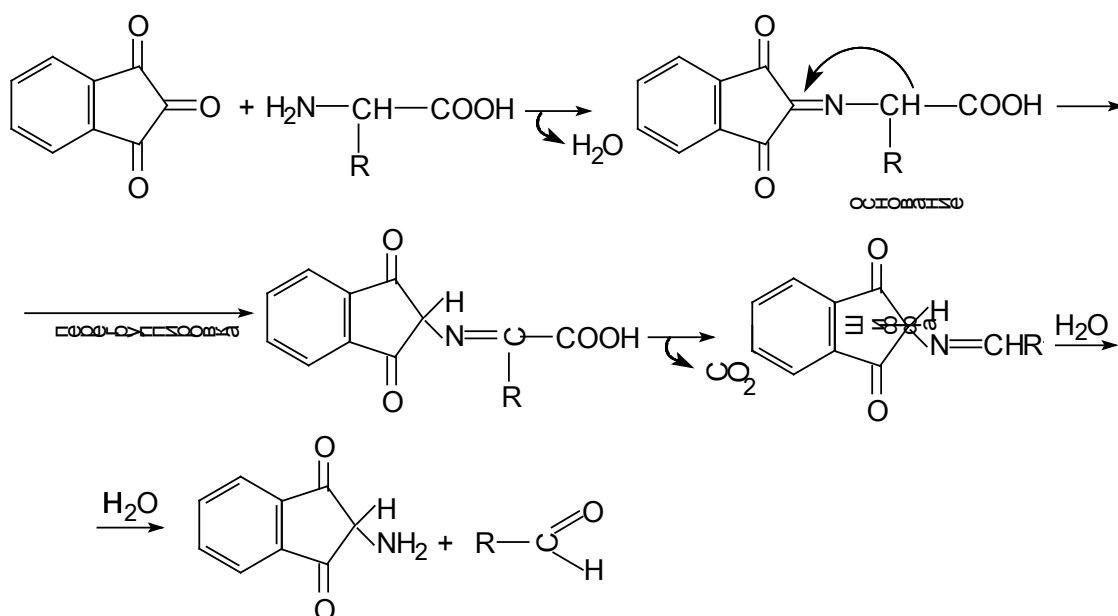
раствор гипобромита натрия (0,64 мл в 100 мл 5%-ного раствора NaOH – раствор устойчив в течение суток); 2%-ный раствор ацетата свинца; 2,5%-ный раствор формальдегида; 0,5%-ный раствор нитрита натрия; хлористый барий; 0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина; насыщенный раствор гидроксида бария; 0,01 М раствор HCl; 0,05 М и 0,1 М растворы KOH; 40%-ный раствор формальдегида; дистиллированная вода; стеклянные пробирки; мерные колбы на 100 мл; конические колбы объемом 100 мл; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; воронки стеклянные; бюретки; шпатели; штативы для пробирок; электронные весы; фильтровальная бумага; спиртовки; лед.

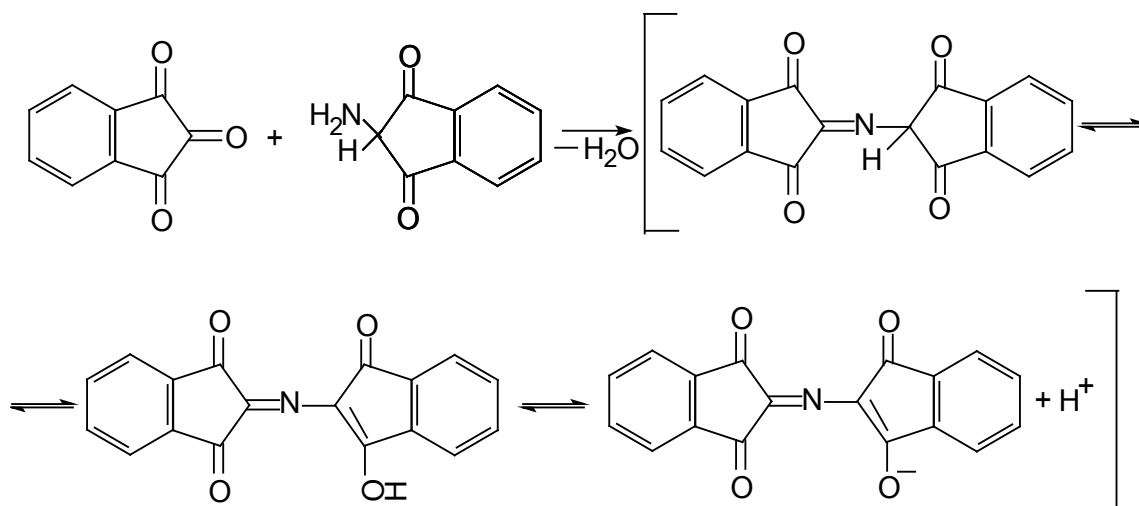
## **Выполнение работы**

### **1. Нингидриновая реакция**

В результате взаимодействия  $\alpha$ -аминокислоты с нингидрином (трикетогидринденгидратом) в слабощелочной среде образуется окрашенное соединение.

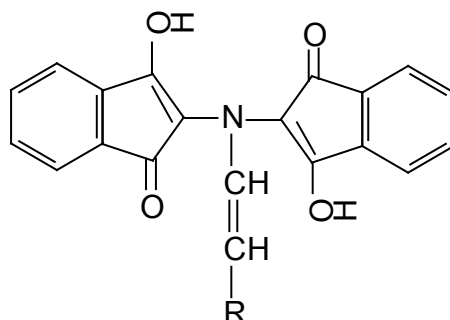
При нагревании  $\alpha$ -аминокислоты окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию с образованием аммиака и декарбоксилированию с образованием альдегида и  $\text{CO}_2$ , а нингидрин восстанавливается. Восстановленный нингидрин, конденсируясь с аммиаком и окисленным нингидрином, образует соединение, которое, енолизируясь, переходит в окрашенную форму, имеющую сине-фиолетовый цвет:





В присутствии органических растворителей (ацетона, этанола), с использованием которых готовят раствор нингидрина, возможно протекание побочной реакции с образованием соединения, содержащего в своем составе радикал (R) аминокислоты.

Наличие радикала аминокислоты в составе этого соединения обуславливает различную окраску (красную, желтую, голубую) продуктов реакции аминокислот с нингидрином:

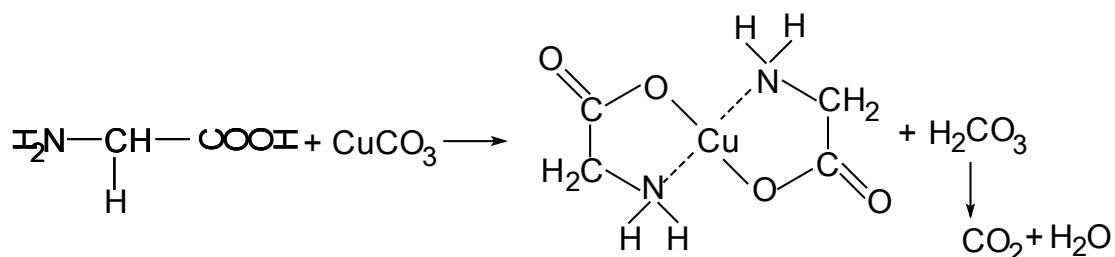


Реакция с нингидрином является специфической для аминокислот, содержащих  $\alpha$ -аминогруппу, и характерна как для алифатических, так и циклических аминокислот. В реакции глицина с нингидрином образуется соединение, имеющее сине-фиолетовую окраску. Аспарагиновая кислота образует с нингидрином продукт синекрасного цвета, а пролин и оксипролин – желтого цвета.

В разные пробирки вносят по 1 мл 0,1%-ных растворов аминокислот и добавляют по 1 мл 0,2%-ного раствора нингидрина. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют на кипящей водяной бане в течение 5 мин. При этом наблюдают за изменением окраски реакционной смеси в зависимости от структуры аминокислоты.

## 2. Образование комплексной соли меди

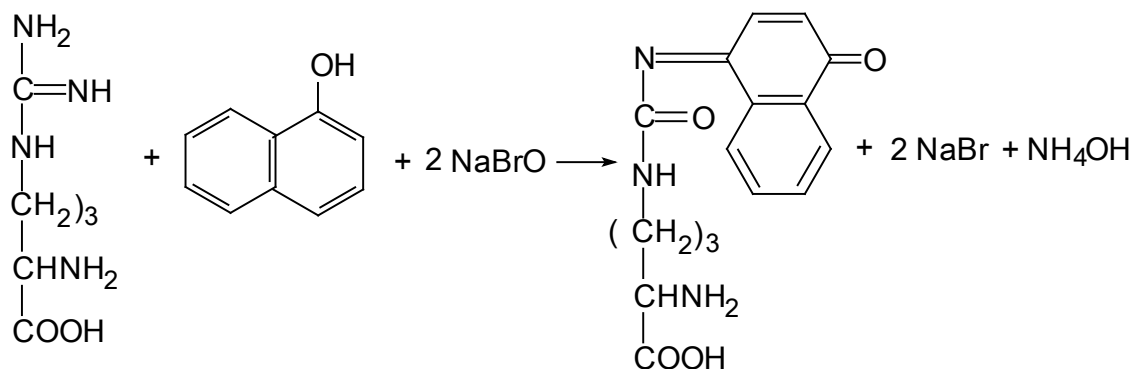
При нагревании аминокислоты с карбонатом меди (II) образуется комплексное соединение меди, имеющее синее окрашивание. В случае использования глицина уравнение реакции имеет следующий вид:



В пробирку вносят 1 мл 0,1%-ного раствора глицина и сухой карбонат меди (II) на кончике шпателя. Смесь нагревают в пламени спиртовки до кипения. При этом раствор окрашивается в синий цвет.

## 3. Реакция Сакагучи на аргинин

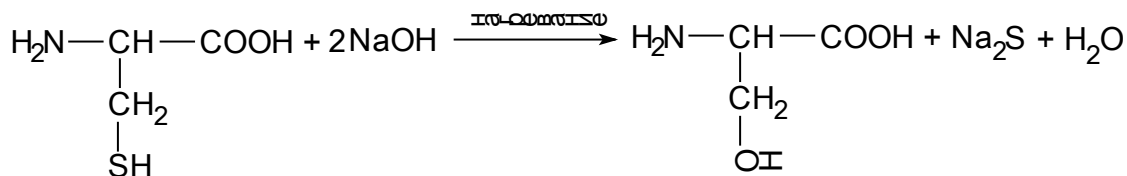
В реакции взаимодействия аргинина, содержащего гуанидиновую группировку, с гипобромитом натрия в щелочной среде происходит образование окисленной формы аргинина, которая при взаимодействии с  $\alpha$ -нафтолом образует соединение красного цвета:



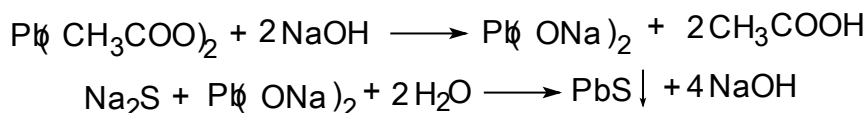
В пробирку вносят 1 мл 0,1%-ного раствора аргинина, последовательно добавляют 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола, 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1 мл 5%-ного раствора мочевины. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и быстро приливают при непрерывном встряхивании 2 мл раствора гипобромита натрия. Пробирку оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем наблюдают за появлением красного окрашивания.

#### 4. Реакция Фоля на «слабосвязанную» серу цистеина и цистина

При кипячении цистеина или цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, который в щелочной среде образует сульфид натрия. Для цистеина уравнение реакции имеет вид



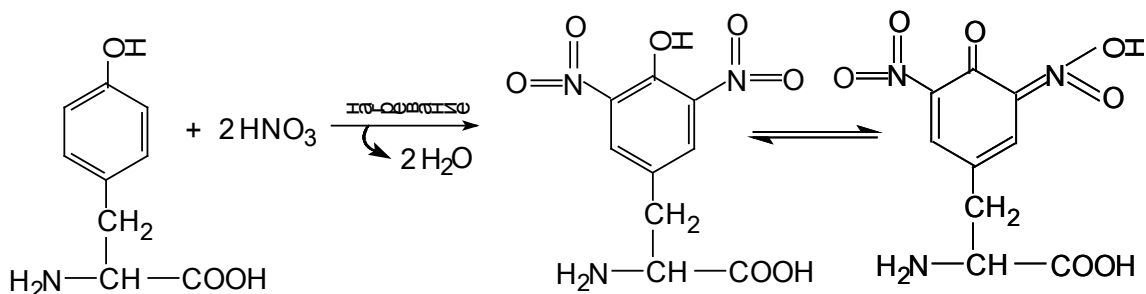
Образование сульфида натрия можно обнаружить с помощью ионов тяжелых металлов, например, ионов свинца, образующих с ионами серы нерастворимый сульфид свинца черного цвета. Для выявления сульфида натрия можно использовать ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия образует плюмбит натрия. Последний, в свою очередь, реагируя с сульфидом натрия, приводит к образованию черного осадка сульфида свинца:



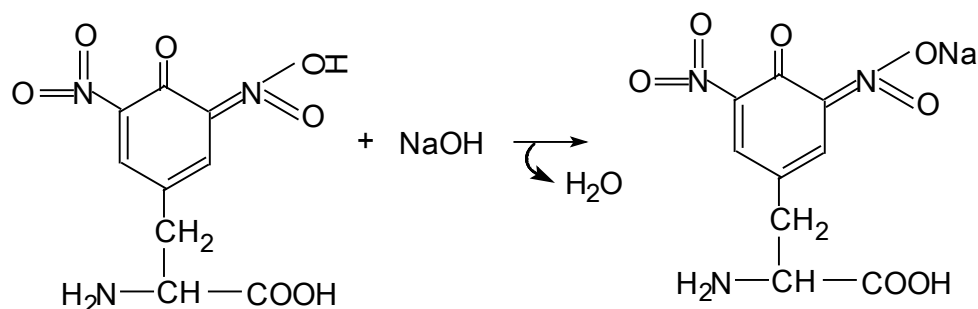
В пробирку вносят 2 мл 0,1%-ного раствора цистеина, добавляют 1 мл 6 н. раствора NaOH и 0,5 мл 2%-ного раствора ацетата свинца. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и инкубируют на кипящей водяной бане в течение 5 мин. При этом наблюдают выпадение бурого или черного осадка сульфида свинца.

#### 5. Ксантопротеиновая реакция на ароматические аминокислоты

В ароматических аминокислотах (фенилаланин, тирозин и триптофан) под действием азотной кислоты происходит реакция нитрования бензольного кольца с образованием окрашенного в желтый цвет нитросоединения. Для тирозина уравнение реакции имеет вид



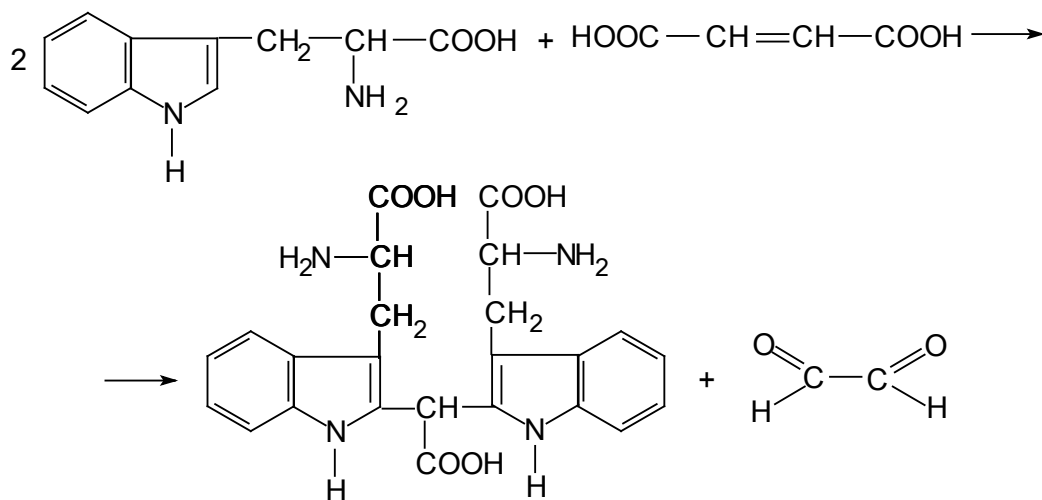
Последующая реакция взаимодействия гидроксида натрия с хиноидной формой динитротирозина приводит к образованию натриевой соли динитротирозина, имеющей оранжевую окраску:



В пробирку вносят по 0,5 мл 0,1%-ных растворов аминокислот и по 1 мл концентрированной азотной кислоты. Смесь осторожно нагревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. Затем пробирки охлаждают и при перемешивании осторожно добавляют 3,5 мл 6 н. раствора NaOH. При этом наблюдают за изменением окраски реакционной смеси.

### 6. Реакция Адамкевича на триптофан

Триптофан в кислой среде вступает в реакцию с глиоксиловой кислотой (альдегидами), образуя при этом окрашенные в красно-фиолетовый цвет продукты конденсации:



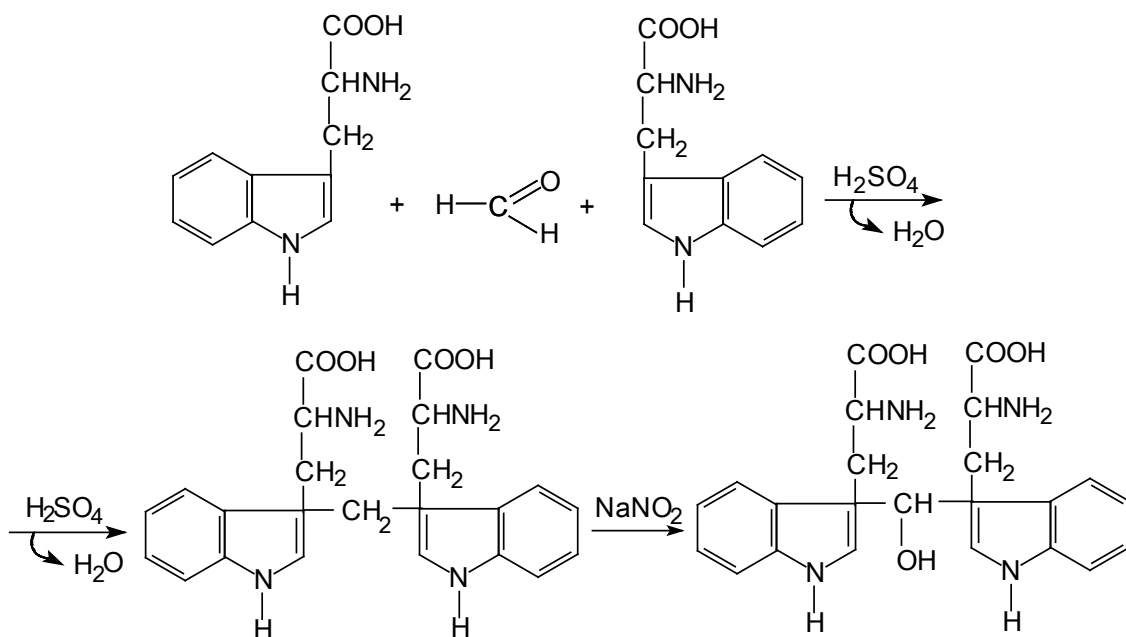
В пробирку вносят 0,5 мл 0,1%-ного раствора триптофана и 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, которая всегда содержит небольшое количество глиоксиловой кислоты. Полученную смесь сначала нагревают на кипящей водяной бане, а затем охлаждают и по стенке пробирки осторожно, по каплям, чтобы жидкости не смешивались, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Через 10 мин на границе раздела фаз двух

жидкостей наблюдается образование красно-фиолетового кольца. Реакцию можно ускорить, поместив пробирку с реагирующей смесью в кипящую водяную баню.

### 7. Реакция Вуазене на триптофан

Триптофан, конденсируясь с формальдегидом, образует окрашенный продукт конденсации *бис*-2-триптофанилметан, который окисляется до *бис*-2-триптофанилкарбинола.

В присутствии минеральных кислот *бис*-2-триптофанилкарбинол образует соли, окрашенные в сине-фиолетовый цвет:



В пробирку вносят 2 мл 0,1%-ного раствора триптофана и добавляют одну каплю 2,5%-ного раствора формальдегида. Смесью перемешивают и осторожно приливают порциями по несколько капель 6 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ледяной бане. Смесью снова перемешивают и дают отстояться в течение 10 мин. Затем при перемешивании в пробирку вносят 10 капель 0,5%-ного раствора нитрита натрия. При этом наблюдают появление сине-фиолетового окрашивания.

Полученные результаты оформляют в виде табл. 2.2.

Таблица 2.2

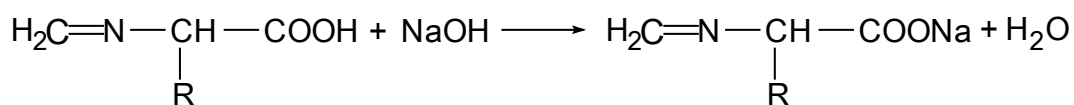
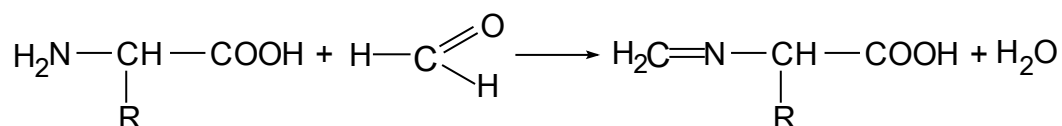
Качественное определение аминокислот

Исследуемый раствор	Выявляющий агент	Название реакции	Наблюдаемая окраска	Выявляемая R-группа
---------------------	------------------	------------------	---------------------	---------------------

**Замечание.** Все вышеперечисленные реакции протекают также с молекулами нативных белков. По результатам этих реакций судят о присутствии данных аминокислот в белках.

## 8. Количественное определение аминокислот формальным титрованием по Сьоренсону

Метод основан на способности аминокислот реагировать с нейтральным раствором формальдегида с образованием метиленаминокислот. Этот метод применяется для определения карбоксильных групп аминокислот, которые титруют раствором щелочи, предварительно блокировав аминогруппы формальдегидом. Во время реакции с формальдегидом аминогруппа аминокислоты теряет основные свойства, при этом образуется метиленаминокислота, которую оттитровывают щелочью:



Определяя количество карбоксильных групп титрованием, можно одновременно определить и количество  $\alpha$ -аминогрупп, так как количество карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных с формальдегидом  $\alpha$ -аминогрупп.

К 25 мл 1%-ного раствора одной аминокислоты или 1%-ного раствора смеси разных аминокислот (гидролизата белка) в мерной колбе объемом 100 мл добавляют 1 г хлористого бария, 10 капель раствора фенолфталеина и перемешивают. Затем к смеси приливают насыщенный раствор гидроксида бария до появления едва заметного розового окрашивания. Колбу закрывают и оставляют на 15 мин. Затем объем в колбе доводят до метки дистиллированной водой и содержимое фильтруют через складчатый бумажный фильтр для отделения фосфорнокислых и углекислых солей бария.

Готовят две колбы объемом 100 мл. В одну из них вносят 40 мл фильтрата, во вторую – 40 мл дистиллированной воды. Затем в обе колбы добавляют по 10 капель раствора фенолфталеина и 0,01 М раствор HCl (осторожно!) до окрашивания опытного

и контрольного растворов в едва заметный розовый цвет. Далее в обе колбы вносят по 10 мл формольной смеси и титруют из бюретки 0,05 М раствором КОН до появления едва заметного розового окрашивания. Цвет опытного и контрольного растворов должен быть одинаковым.

Формольную смесь получают путем добавления к 50 мл 40%-ного раствора формальдегида 10 капель раствора фенолфталеина и 0,1 М раствора КОН (по каплям) до образования слабо-розового окрашивания.

Массовую концентрацию аминокислот рассчитывают по формуле

$$C = \frac{(A - B) f Q}{V},$$

где  $C$  – массовая концентрация аминокислот, мг/мл;  $A, B$  – объемы раствора КОН, затраченные на титрование опытного и контрольного растворов соответственно, мл;  $f$  – коэффициент, учитывающий поправку на титр 0,05 М раствора КОН;  $Q$  – масса аминокислот, эквивалентная 1 мл 0,05 М раствора КОН, мг (0,7 мг);  $V$  – объем раствора аминокислоты, взятого для анализа, мл.

### Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют белки и каковы их биологические функции?
2. Что собой представляют аминокислоты и чем они различаются?
3. Чем обусловлены амфотерные свойства аминокислот и в чем они проявляются?
4. Как классифицируют аминокислоты в зависимости от полярности R-групп? Приведите примеры.
5. Какие функциональные группы аминокислот принимают участие в формировании пептидной связи? Напишите уравнение реакции.
6. Каким образом наличие асимметрического атома углерода влияет на оптические свойства растворов?
7. Дайте определение первичной, вторичной и третичной структур белка. Какие типы связей для них характерны?
8. На каком свойстве белков основано их деление на глобулярные и фибриллярные? Что собой представляют эти белки?
9. Что подразумевают под четвертичной структурой белка? Приведите примеры олигомерных белков.



10. Что такое денатурация белков и чем она сопровождается? Перечислите физические и химические факторы, вызывающие денатурацию белков.

11. Объясните принципы качественных реакций на аминокислоты и белки: нингидриновой, с солями меди (II), на аргинин, цистеин и цистин.

12. Какие реакции используют для обнаружения ароматических аминокислот? Объясните их принципы.

13. На чем основан метод количественного определения аминокислот формальным титрованием по Сьоренсону?

## Глава 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Особенности строения и функционирования организма зависят от набора белков, синтезирующихся в нем. Изучение строения и свойств белков невозможно без их выделения из клетки и очистки от других белков и органических молекул. Нижеописанные методы ориентированы, в первую очередь, на выделение и очистку ферментов.

### 3.1. Физико-химические свойства белков

Индивидуальные белки различаются по физико-химическим свойствам:

- молекулярной массе (набору аминокислот, первичной структуре);
- форме молекул (третичной структуре);
- суммарному заряду, величина которого зависит от соотношения анионных и катионных групп аминокислот;
- соотношению полярных и неполярных радикалов аминокислот;
- степени устойчивости к воздействию различных денатурирующих агентов.

Растворы белков являются молекулярно-дисперсными, или истинными, растворами (размеры частиц – 0,100–0,001 мкм), однако вследствие большого размера растворенных молекул такие растворы имеют некоторые свойства, общие с коллоидными растворами (гидрофобные и гидрофильные свойства, осмотическое давление, вязкость, способность к диффузии, седиментация и др.).

Белки являются амфотерными соединениями и в водных растворах заряжены. Распределение заряженных остатков на поверхности белковой молекулы при определенном значении рН обуславливает ее суммарный заряд. Величина заряда белков – один из факторов, увеличивающих их растворимость. При изменении рН белкового раствора меняется степень диссоциации функциональных групп боковых цепей аминокислот, что приводит к изменению суммарного заряда молекулы и, как следствие, растворимости белка.

В *кислой среде* увеличение концентрации  $H^+$  ведет к подавлению диссоциации карбоксильных групп ( $-COO^- + H^+ \rightarrow -COOH$ ) и уменьшает отрицательный заряд белка. В *щелочной среде* связывание избытка  $OH^-$  с протонами, образующимися при диссоциации аминогрупп ( $-NH_3^+ + OH^- \rightarrow -NH_2 + H_2O$ ) с образованием воды, приводит к

уменьшению положительного заряда белка. При *потере заряда* в изоэлектрической точке белки легче агрегируют и выпадают в осадок.

Распределение гидрофильных и гидрофобных остатков аминокислот на поверхности белковой молекулы также является признаком, определяющим растворимость белка в различных растворителях. Растворение белков в воде связано с образованием вокруг белковой глобулы водных (гидратных) оболочек, состоящих из ориентированных молекул воды. Гидрофобные группы хотя и стремятся сконцентрироваться внутри белковой молекулы, но значительная их часть располагается на поверхности и контактирует с растворителем. Гидрофобным группам на поверхности белковых молекул наряду с заряженными и другими полярными группами принадлежит важная роль в определении поведения белков.

Основным компонентом растворителей белков обычно является вода, поэтому для изменения растворимости белка можно манипулировать свойствами воды как растворителя, изменяя ионную силу, рН, количество добавляемых, смешивающихся с водой, органических растворителей и других веществ, а также комбинируя эти изменения с изменением температуры.

Таким образом, растворимость белков зависит как от вышеперечисленных физико-химических свойств белков, так и от состава и свойств среды, в которой растворяется белок.

### 3.2. Методы выделения и очистки белков

При выделении индивидуальных белков обычно сталкиваются со следующими *трудностями*:

1) низкое содержание белка в исходном материале (часто менее 0,1% от сухой массы);

2) лабильность белков, что не позволяет применять традиционные методы органической химии (нагревание, перегонку, кристаллизацию);

3) связь белков со структурными элементами клеток или наличие их в белково-липидных, белково-углеводных и других комплексах биологических жидкостей;

4) наличие близких физико-химических свойств у разделяемых белков.

*Последовательность* операций по выделению и очистке индивидуальных белков следующая:

- измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация);

- перевод белков в растворенное состояние (солюбилизация, экстракция);
- фракционирование белков и получение обогащенной фракции;
- выделение индивидуального белка из обогащенной фракции;
- определение гомогенности выделенного белка.

Разработаны эффективные методы выделения белков в «мягких» условиях, при низкой температуре (не выше 4°C) для предотвращения тепловой денатурации, с применением щадящих нативную структуру химических реагентов.

### **3.2.1. Измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация)**

Большинство белков, в том числе и ферментов, локализовано внутри клеток. Поэтому перед выделением белков из биологических объектов (органов и тканей животных, клеток микроорганизмов и растений) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния, т. е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры с целью высвобождения клеточного содержимого. Эту процедуру называют *гомогенизацией*. Для разрушения клеток применяют ряд физических методов – гомогенизацию с использованием механических гомогенизаторов различных конструкций, ультразвуковую дезинтеграцию, замораживание-оттаивание и др. При выборе метода разрушения клеток следует учитывать структурные особенности животных, растительных и микробных клеток. Наиболее простым методом является гомогенизация путем растирания клеток с окисью алюминия или абразивным порошком в ступке при помощи пестика. После гомогенизации биологического материала получают гомогенат.

### **3.2.2. Перевод белков в растворенное состояние (солюбилизация, экстракция)**

Гомогенизацию биологического материала обычно сочетают с одновременной *солюбилизацией* или *экстракцией белков* из гомогенатов с целью перевода белков в растворенное состояние.

В качестве экстрагентов используют 8–10%-ные растворы солей (NaCl, KCl), водные растворы глицерина, слабые растворы сахарозы (особенно для солюбилизации мембранных белков), различные буферные растворы, а также органические растворители.

На растворимость белков при их солюбилизации или экстракции большое влияние оказывает рН среды, поэтому в белковой химии ши-

роко применяют буферные растворы с близкими к нейтральным значениями рН.

Чувствительность биологических систем к изменениям рН среды обусловлена рядом причин. Ионы водорода могут выступать в качестве катализатора многих процессов, быть реагентом или продуктом реакции. Кроме того, при изменении рН может измениться проницаемость клеточной мембраны. Подобно другим клеточным структурам мембраны содержат способные к ионизации группы, и в зависимости от степени их ионизации меняется конформация, а следовательно, и биологическая активность молекул, в которые входят эти группы. Это прежде всего касается ферментов.

Благодаря своей химической природе буферные растворы препятствуют изменениям рН, способствуя как растворению, так и стабилизации белков. Буферные растворы – это смеси слабых кислот и сопряженных с ними оснований. Между этими двумя формами реагентов протекают обратимые реакции в состоянии равновесия: кислота является донором протонов, сопряженное основание – акцептором протонов при условии, что оба реагента присутствуют приблизительно в равных концентрациях. Буферный раствор сохраняет постоянное значение рН, связывая протоны, образующиеся в других реакциях, или, наоборот, освобождая их, если они потребляются в каких-то других процессах. Буферное действие раствора оптимально, когда обе эти возможности реализуются в равной степени, т. е. обеспечивается определенная концентрация протонов в данной системе при различных изменениях как внутри нее, так и в сопряженной фазе.

Буферные растворы должны удовлетворять следующим *требованиям*:

- обладать достаточной буферной емкостью в требуемом диапазоне значений рН ( $\pm 1$  ед. рН от значения рК);
- иметь высокую степень чистоты;
- обладать устойчивостью к действию ферментов и гидролизу;
- рН буферных растворов должен в минимальной степени зависеть от их концентрации, температуры и ионного или солевого состава среды;
- не оказывать токсического или ингибирующего действия;
- не поглощать свет при длинах волн более 240 нм.

Клетки содержат разные соли и много заряженных органических соединений – белков, фосфолипидов, нуклеиновых кислот. Ионная сила в цитоплазме типичной клетки колеблется в пределах 0,15–0,20 М. Для того чтобы быть уверенным, что все содержимое клетки перешло в экстракт, нужно использовать буферный раствор с ионной силой

и значением рН, близкими к физиологическим. Особенно широкое распространение получили *трис*-буферные растворы, представляющие собой смесь растворов *трис*-(оксиметил)-аминометана  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$  (сокращенно обозначают «*трис*-») с растворами соляной или других кислот.

Не все белки способны существовать в солюбилизированном состоянии, будучи изолированы от их нормального клеточного окружения. Это относится к белкам, структурно связанным с нерастворимыми компонентами клетки, такими как плазматическая мембрана, митохондрии, хлоропласты, ядерные мембраны и др. Поэтому успех выделения и очистки таких белков зависит от того, насколько полно их можно отделить от других соединений, входящих в состав клеточных структур.

Большинство мембранно-связанных белков можно экстрагировать из мембран в присутствии *детергентов*, разрушающих гидрофобные взаимодействия между белками и липидами либо между белковыми молекулами в составе комплексов белков с молекулами липидов или с другими белками и в конечном счете разрушающих липидный бислой. В структуру детергентов входят липофильные цепи и при встраивании молекул детергента в мембраны они вытесняют молекулы белков из липид-белковых комплексов, т. е. детергенты солюбилизируют компоненты мембран (рис. 3.1).

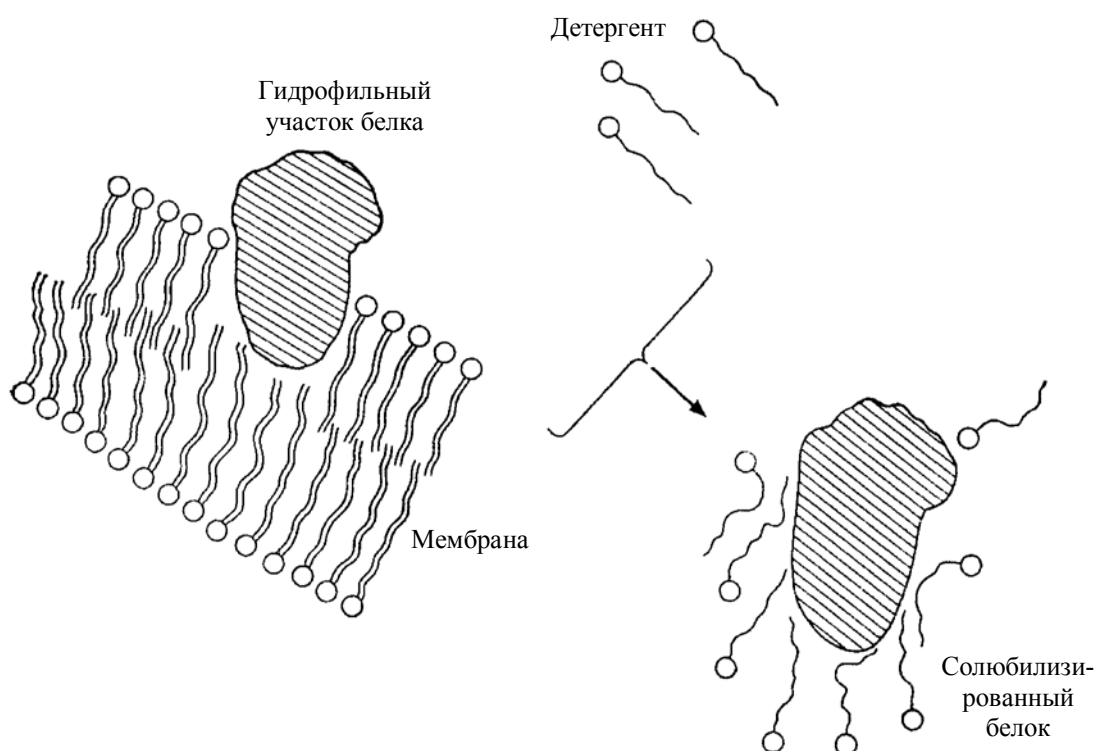


Рис. 3.1. Схема солюбилизации мембранных белков детергентами

В частности, для освобождения белков (ферментов), прочно связанных с биомембранами митохондрий или других субклеточных структур, применяют додецилсульфат натрия, дезоксихолат натрия или тритон X-100. Тритон – это торговое название целой серии неионных детергентов на основе полиэтиленгликоля. Следует отметить, что неионные детергенты, такие как тритон X-100, очень мягки по своему действию, и большинство белков, как мембранно-связанных, так и свободных, выдерживают концентрации тритона X-100 до 1–3%. Напротив, некоторые анионные детергенты (например, додецилсульфат натрия) обладают наряду с солюбилизующими свойствами очень сильным денатурирующим действием, и их нельзя использовать при выделении ферментов.

Следует, однако, иметь в виду, что: 1) детергенты, вызывая разрыв белок-белковых связей, могут разрушать четвертичную структуру белков; 2) избыток детергента может мешать фракционированию белков.

Необходимо отметить, что при выделении ферментов для предотвращения окисления SH-групп остатков цистеина в буферный раствор добавляют такие *тиолы*, как  $\beta$ -меркаптоэтанол или дитиотреитол.

Для предотвращения денатурации и других конформационных изменений белков, выделяемых из плазматической мембраны, в буферные растворы добавляют *глицерин* в концентрации до 20%. Это вещество полностью смешивается с водой и образует с молекулами воды сильные водородные связи, эффективно замедляя движение молекул и тем самым снижая активность воды.

После солюбилизации или экстракции белков полученный экстракт осветляют путем осаждения обломков клеток центрифугированием. Размер частиц является определяющим фактором при выборе скорости и продолжительности центрифугирования.

### **3.2.3. Фракционирование белков и получение обогащенной фракции**

Методы фракционирования белков основаны на их различиях в растворимости в воде, изменении гидродинамического радиуса, подвижности в зависимости от молекулярной массы и степени ионизации белковой молекулы. К ним относятся такие методы, как высаливание, осаждение органическими растворителями и изоэлектрическое осаждение. Как указывалось выше, белковая молекула в растворе удерживается двумя факторами – зарядом и гидратной оболочкой. При устранении этих обоих факторов устойчивости белки осаждаются.

По химическим и физическим свойствам вода, входящая в состав гидратной оболочки, отличается от чистого растворителя. В частности, температура замерзания ее составляет  $-40^{\circ}\text{C}$ . В этой воде хуже растворяются сахара, соли и другие вещества. Растворы белков отличаются крайней неустойчивостью, и под действием разнообразных факторов, нарушающих гидратацию, белки легко выпадают в осадок. Поэтому при добавлении к раствору белка любых водоотнимающих средств (концентрированных растворов нейтральных солей щелочных и щелочно-земельных металлов, органических растворителей) наблюдается дегидратация молекул белка и их выпадение в осадок. На этом принципе основаны методы высаливания и осаждения органическими растворителями.

**Высаливание.** Под действием концентрированных растворов солей щелочных, щелочно-земельных металлов и аммония ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) растворимость белков снижается, и они выпадают в осадок. Этот процесс называют *высаливанием*. Поскольку растворимость белков различна, то и способность к высаливанию зависит от концентрации соли в растворе. Это позволяет фракционировать белки, осаждая их при различных концентрациях солей. Постепенное увеличение концентрации соли дает возможность получить ряд отдельных фракций с преимущественным содержанием в одной из них выделяемого белка. Белки с наименьшей растворимостью выпадают в осадок при небольшой концентрации соли.

Процесс высаливания в основном зависит от гидрофобности белка. Типичная белковая молекула имеет гидрофобные участки, соприкосновение которых с водным растворителем приводит к термодинамически неустойчивому упорядочиванию структуры воды. При внесении высокой концентрации соли происходит сольватация ее ионов, в результате чего остается мало свободных молекул воды. Дальнейшее увеличение концентрации соли ведет к отрыву упорядоченных молекул воды от гидрофобных боковых остатков аминокислот с обнажением неполярных участков белковых молекул, которые стремятся взаимодействовать друг с другом.

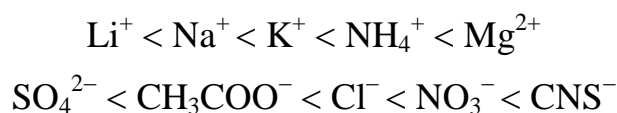
Белки, которые содержат на своей поверхности большое количество гидрофобных аминокислотных остатков, при этом агрегируют и выпадают в осадок. Белки с незначительным содержанием неполярных остатков остаются в растворе даже при его полном насыщении солью.

При высаливании смеси белков часто имеет место их соосаждение. Тем не менее многие ферменты осаждаются из раствора в доста-



точно узком диапазоне концентрации соли, что делает эту процедуру высокоэффективным методом фракционирования белков.

На величину высаливания белков оказывают воздействие не только природа и концентрация соли, но и рН среды и температура. Катионы и анионы нейтральных солей, как правило, по-разному влияют на конформационную стабильность белков. Считают, что главную роль при этом играет валентность ионов соли. Предложены лиотропные ряды катионов и анионов:



Растворимость белков может меняться и при изменении рН. Если самую высокую растворимость в солевых растворах белки имеют при рН 7 (когда они содержат наибольшее число заряженных групп), то наиболее полное осаждение белка происходит вблизи его изоэлектрической точки.

При выборе солей исходят из их растворимости в воде при низких температурах. Чаще всего используют сульфат аммония, так как он обладает несомненными преимуществами перед другими нейтральными солями: он имеет высокую высаливающую способность, не вызывает денатурацию белков, хорошо растворим в воде, при растворении выделяется мало тепла, обладает низкой стоимостью. Кроме того, концентрированные растворы сульфата аммония имеют небольшую вязкость и плотность, что немаловажно, поскольку следующей стадией является центрифугирование.

Таким образом, основной причиной высаливания является дегидратация макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда. К существенным факторам, определяющим растворимость белка, относят также поверхностное натяжение на границе поверхности раздела белок – вода.

Белки, осажденные высаливанием, отделяют от белков, оставшихся в растворе, центрифугированием и вновь растворяют в физиологическом растворе.

**Осаждение белков органическими растворителями.** Из органических растворителей наиболее часто используются ацетон и этанол, которые смешиваются с водой в любых соотношениях. Добавление этих растворителей к водным растворам белков приводит к уменьшению диэлектрической проницаемости растворителя и изменению конформации белковых макромолекул. По мере возрастания концентрации органических растворителей снижается способность воды к сольватации

заряженных гидрофильных молекул белка. Молекулы воды, расположенные упорядоченным образом вокруг гидрофобных участков на поверхности белка, могут быть замещены молекулами органического растворителя. Растворитель связывает воду, вызывая дегидратацию молекул белка и неустойчивость их в растворе. При этом происходит агрегация молекул за счет электростатических взаимодействий между противоположно заряженными участками на поверхности белков, что аналогично осаждению в изоэлектрической точке.

Вблизи изоэлектрической точки белков осаждение происходит при более низкой концентрации органического растворителя.

На осаждение белков под действием органических растворителей влияет также размер молекулы. Как правило, чем ниже молекулярная масса белка, тем выше концентрация органического растворителя, необходимая для его осаждения. Крупные молекулы агрегируют быстрее, чем мелкие.

Осаждение органическими растворителями проводят при пониженной температуре ( $0^{\circ}\text{C}$ ). Низкая температура не только предохраняет белок от денатурации, но и усиливает осаждающее действие растворителя.

При осаждении *этанолом* раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Реакция облегчается присутствием электролита (например, хлористого натрия) вследствие снятия заряда с частиц белка. Реакция осаждения белка этанолом обратима при низких температурах и кратковременном действии.

*Ацетон* обладает меньшим денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при низкой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

Одним из преимуществ фракционирования с помощью органических растворителей является то, что его можно проводить при температуре ниже  $0^{\circ}\text{C}$ , так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже  $0^{\circ}\text{C}$ . Это предотвращает денатурирующее действие органического растворителя, которое становится заметным при температуре выше  $+10^{\circ}\text{C}$ .

**Изоэлектрическое осаждение белков.** Большинство ферментов хорошо растворимо при физиологических концентрациях солей, ионной силе  $0,15\text{--}0,20\text{ M}$  и нейтральном значении pH.

Растворимость можно рассматривать как результат полярного взаимодействия растворенного вещества с водным растворителем и ионных взаимодействий его с присутствующими солями, а также в некоторой степени как результат электростатического отталкивания между одноименно заряженными молекулами или небольшими (растворимыми) агрегатами молекул. В небольших агрегатах сильные разноименные заряды взаимопогашаются. Например, если поверхность глобулы характеризуется высокой гидрофобностью, то это значит, что лишь малая ее часть взаимодействует с растворителем и, соответственно, меньшее число заряженных групп реагирует с солями. Если заряд снижается до нуля, электростатическое отталкивание уменьшается и по мере приближения к изоэлектрической точке молекулы притягиваются друг к другу с образованием крупных агрегатов (рис. 3.2). Этот процесс называется *изоэлектрическим осаждением*. Следовательно, осаждаться из растворов в изоэлектрической точке могут только гидрофильные белки.

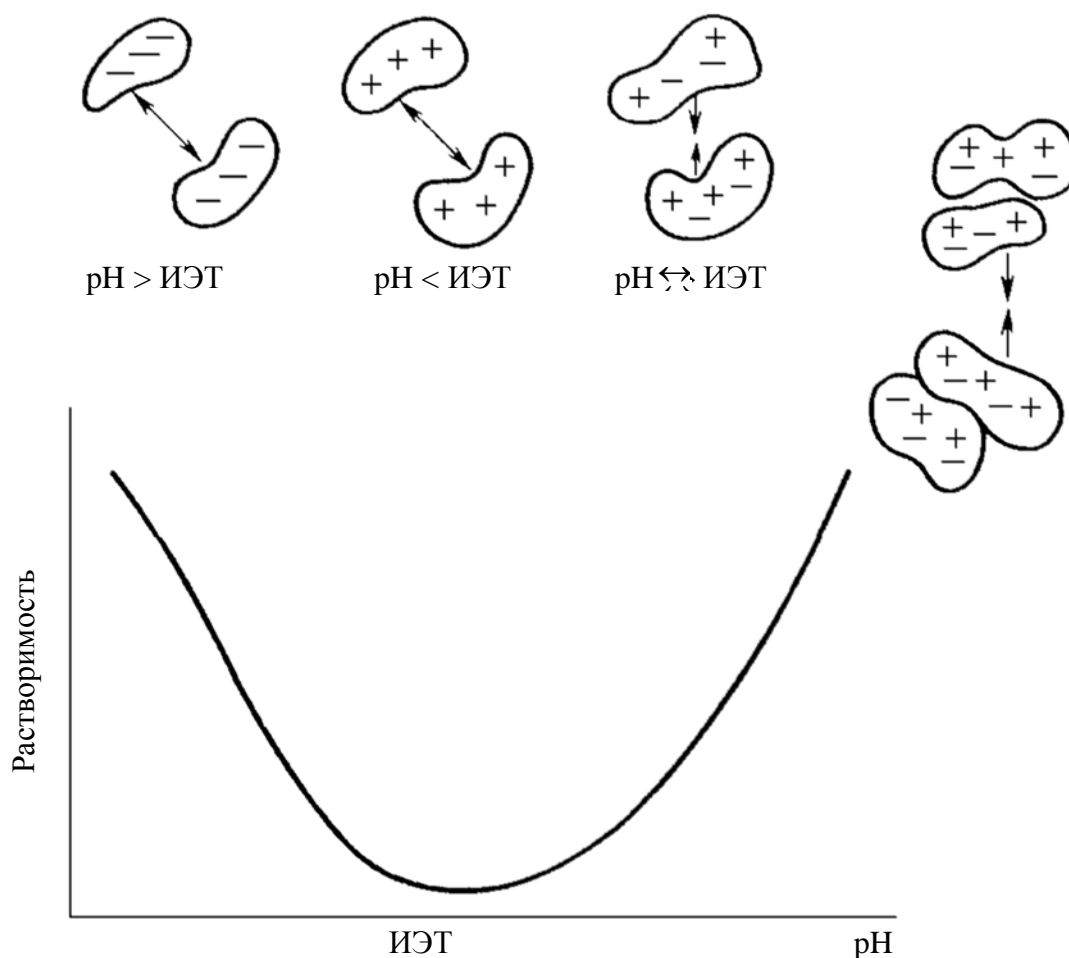


Рис. 3.2. Растворимость белков вблизи изоэлектрической точки

**Изоэлектрическая точка pI** – это значение рН, при котором положительные и отрицательные заряды белка полностью скомпенсированы и суммарный заряд молекулы равен нулю. Изоэлектрические точки у различных белков разные, что обусловлено их первичной структурой. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой среде (рН ~ 5).

В смеси белков ситуация осложняется соосаждением – разные белки со сходными свойствами агрегируют и осаждаются при достижении изоэлектрической точки.

Вышеописанные методы высаливания, осаждения белков органическими растворителями и изоэлектрического осаждения являются *способами обратимого осаждения белков*, при которых белковые молекулы не подвергаются денатурации и их осадки могут быть снова растворены с сохранением своих нативных свойств.

Однако существуют *способы необратимого осаждения белков*, когда происходит глубокая денатурация белка, при которой нековалентные связи в белковой молекуле разрываются и денатурированный белок не способен восстановить свои первоначальные свойства. К ним относятся денатурация под действием температуры и путем изменения рН. Эти методы используются для *избирательной денатурации*, цель которой состоит в создании таких условий, при которых выделяемый белок не денатурирует, тогда как часть ненужных белков осаждается под действием денатурирующих агентов.

В основе тепловой денатурации и денатурации сильными органическими кислотами лежит дегидратация белковых молекул. Для основной массы белков температурный режим находится в области 50–60°C. Важную роль при тепловой денатурации играет ионная сила раствора, рН, его солевой состав и время экспозиции. При нагревании происходит разрыв дисульфидных связей между полипептидными цепями, что приводит к изменению конформации белковых молекул.

При необратимом осаждении белков сильными органическими кислотами чаще используют растворы трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот. Трихлоруксусная кислота способна осаждать только белки и не осаждает продукты их распада. В отличие от нее сульфосалициловая кислота, являясь более сильной кислотой, кроме белков осаждает также продукты их распада – высокомолекулярные пептоны и полипептиды.

Обязательной стадией, предшествующей выделению индивидуального белка из обогащенной фракции, является освобождение белковых растворов от низкомолекулярных соединений (сульфата аммо-

ния, органических растворителей). Для этого используют методы диализа и гель-фильтрации.

**Диализом** называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ с помощью полупроницаемых мембран. При диализе применяют полупроницаемые мембраны (целлофан), диаметр пор которых варьирует в широких пределах. Этот метод основан на неспособности белков проходить через полупроницаемую мембрану, которая легко пропускает низкомолекулярные вещества. Диффузия последних через мембраны обеспечивается разностью концентраций подлежащего удалению вещества в исследуемом растворе и чистом растворителе, находящихся по разные стороны мембраны.

Белковый раствор помещают в целлофановый мешочек, который погружают в чистый растворитель (воду, физиологический или буферный раствор) (рис. 3.3). Низкомолекулярные вещества будут выходить из мешочка в растворитель до тех пор, пока их концентрации по обе стороны мембраны не станут равными. Для ускорения диффузии рекомендуется регулярно менять растворитель.

Если осмотическое давление в белковом растворе и растворителе неодинаково, то по мере выхода из диализного мешочка растворенного вещества молекулы чистого растворителя будут проникать внутрь мешочка (явление осмоса), что приведет к разведению белкового раствора.

Более быстрым и эффективным методом обессоливания белковых растворов служит **гель-фильтрация** (гель-хроматография), которую используют также для выделения индивидуального белка и определения его молекулярной массы. Гель-фильтрацией называется процесс разделения высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ при помощи гелей, основанного на различиях в размере молекул. Принцип метода описан ниже (см. п. 3.2.4).

При обессоливании белковых растворов крупные молекулы белков, минуя гранулы геля, двигаются с наибольшей скоростью и выходят из колонки первыми, а ионы соли, легко проникающие внутрь гранул, задерживаются ими и, двигаясь медленнее, выходят из колонки последними.

Присутствие сульфата аммония выявляют в пробе с хлоридом бария по образованию осадка сульфата бария.

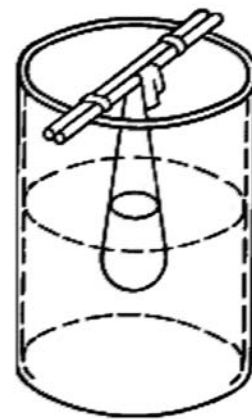


Рис. 3.3. Устройство для диализа

### 3.2.4. Выделение индивидуального белка из обогащенной фракции

Методы выделения индивидуального белка из смеси белков с близкими физико-химическими свойствами основаны на различиях белков: по молекулярной массе (методы ультрацентрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации), заряду (ионообменная хроматография), степени адсорбции белков и их растворимости в соответствующем растворителе (адсорбционная хроматография), способности белков к специфическим взаимодействиям с аффинным лигандом (аффинная хроматография).

**Ультрацентрифугирование.** Ультрацентрифугирование – это высокоскоростное центрифугирование. Разделение веществ с помощью центрифугирования основано на разном поведении частиц в возрастающем центробежном поле. Частицы, имеющие разную плотность, форму или молекулярную массу, осаждаются с разной скоростью. Скорость седиментации частиц зависит от центробежного ускорения  $g$ .

Суспензию белков в центрифужной пробирке помещают в ротор ультрацентрифуги. Ультрацентрифугирование позволяет получить в центрифужных пробирках, вращающихся со скоростью до 85 000 об/мин, центробежное ускорение 30 000–50 000  $g$ . При этом скорость осаждения белков пропорциональна их молекулярной массе.

При выделении индивидуального белка оптимальным считают центрифугирование, при котором получают плотный осадок и прозрачную надосадочную жидкость (супернатант). Хорошо разделяются компоненты с сильно различающимися коэффициентами седиментации. **Коэффициент седиментации** – это скорость осаждения частиц и молекул при ультрацентрифугировании. Его измеряют в единицах Сведберга (S). Одна единица Сведберга равна  $10^{-13}$  с. Численное значение S зависит от молекулярной массы и формы частиц и является величиной, характерной для данной молекулы или надмолекулярной структуры. Например, коэффициент седиментации рибосом прокариот составляет 70 S, а рибосом эукариот – 80 S.

Ультрацентрифуги снабжены холодильной установкой для предотвращения перегрева ротора вследствие трения его о воздух. Центрифужные пробирки и их содержимое должны быть тщательно уравновешены. Уравновешенные пробирки следует располагать в роторе одна против другой.

**Ультрафильтрация.** Данный метод основан на разделении молекул в соответствии с их размерами и заключается в продавлива-

нии растворов белка через специальные мембраны с использованием давления газа. Поры в мембране таковы, что более мелкие молекулы белков проходят через нее, а молекулы большего размера удерживаются и концентрируются по отношению к исходному раствору. Диффузия небольших молекул через мембрану определяется разностью гидростатических давлений по обе стороны мембраны. Раствор диффундирующего через мембрану вещества называется ультрафильтратом.

По своей разделительной способности этот метод хуже, чем гель-фильтрация, так как он позволяет получить только две фракции – более крупные молекулы и более мелкие молекулы. Вместе с тем он дает возможность сконцентрировать раствор выделяемого белка.

Приборы для ультрафильтрации состоят из камеры, в которой создается положительное давление, и снабжены магнитными мешалками (рис. 3.4).

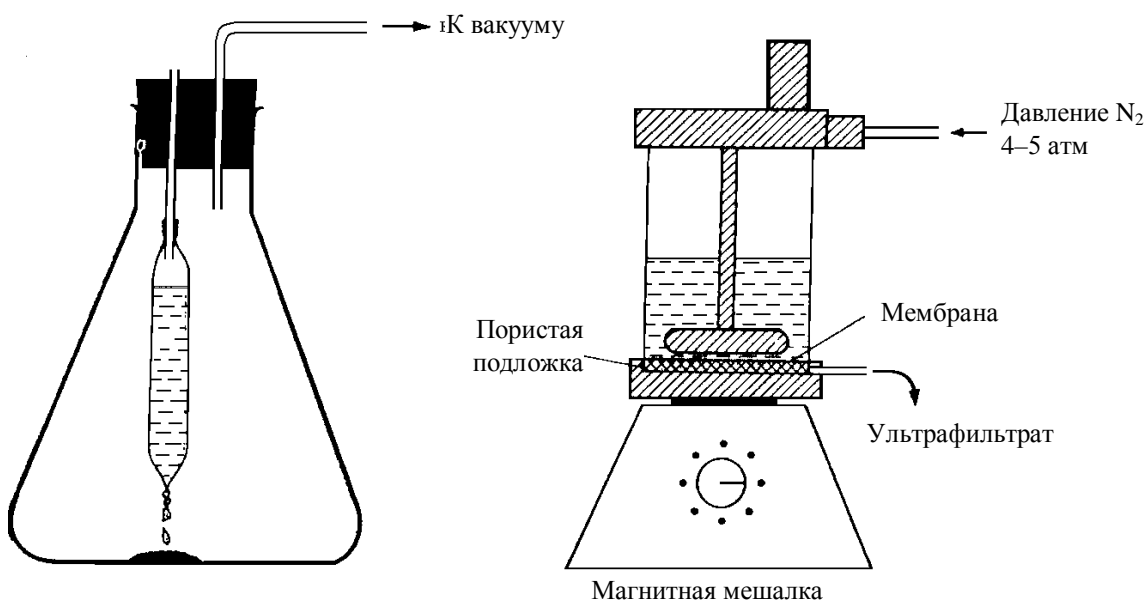


Рис. 3.4. Устройство для ультрафильтрации

**Хроматография** (*chromatos* – цвет, *grapho* – пишу). Это метод разделения, а также качественного и количественного анализа смеси веществ, основанный на перемещении дискретной зоны вещества вдоль слоя сорбента (неподвижной фазы) в потоке подвижной фазы с многократным повторением сорбционных и десорбционных актов. Хроматографический метод был открыт в 1903 г. русским ученым М. С. Цветом.

**П р и н ц и п м е т о д а .** Образец смеси веществ вводят в слой неподвижной фазы, и вместе с потоком подвижной фазы (элюента) компоненты смеси перемещаются вдоль слоя сорбента. При контакте веществ с поверхностью неподвижной фазы каждый из компонентов смеси взаимодействует с ней и распределяется между подвижной и неподвижной фазами в соответствии со своими свойствами и свойствами обеих фаз.

В связи с тем, что подвижная фаза непрерывно движется, лишь часть каждого из компонентов разделяемой смеси успевает взаимодействовать с поверхностью неподвижной фазы. Остальное уносится потоком подвижной фазы и взаимодействует уже с новым участком сорбента. При этом устанавливается динамическое равновесие между веществом, адсорбированным неподвижной фазой и находящимся в подвижной фазе. Участки сорбента с адсорбированным веществом при дальнейшем движении подвижной фазы омываются чистой подвижной фазой, не содержащей анализируемого вещества. При этом равновесие нарушается, происходит десорбция вещества и перенос его подвижной фазой к новому участку сорбента. Следовательно, перенос компонентов смеси вдоль слоя сорбента осуществляется со скоростью, меньшей, чем скорость движения подвижной фазы. Молекулы разных компонентов смеси обладают различной степенью сродства к неподвижной фазе, поэтому компоненты передвигаются с разной скоростью, что при достаточной длине слоя сорбента приводит к полному разделению смеси веществ на индивидуальные компоненты.

Таким образом, в процессе хроматографирования многократно повторяется переход вещества из одной фазы в другую и обратно (сорбция-десорбция) и движение его вдоль слоя сорбента.

Высокую эффективность разделения многокомпонентных смесей веществ, обладающих близкими свойствами, обеспечивают многократное повторение элементарных актов фазовых переходов, большая поверхность раздела фаз и относительно небольшая толщина взаимодействующих слоев фаз.

Каждый компонент занимает некоторый слой (зону) неподвижной фазы. Скорость перемещения вещества и положение его зоны на слое сорбента в какой-либо момент времени определяются скоростью перемещения подвижной фазы и значением коэффициента распределения вещества между неподвижной и подвижной фазами. **Коэффициент распределения  $K$**  – это отношение количества вещества, находящегося в неподвижной фазе, к его количеству в подвижной фазе. Подвижную и неподвижную фазы для хроматографического разделения



выбирают таким образом, чтобы коэффициенты распределения компонентов смеси в них были различными.

Если коэффициент распределения вещества равен единице ( $K = 1$ ), то вещество распределится между подвижной и неподвижной фазами равномерно и его концентрация в обеих фазах будет одинакова. Если коэффициент распределения вещества стремится к нулю ( $K \rightarrow 0$ ), это означает, что вещество практически полностью находится в подвижной фазе. И наоборот, если  $K \rightarrow \infty$ , это свидетельствует о том, что молекулы вещества практически полностью находятся в неподвижной фазе.

**Теория тарелок.** Хроматографируемое вещество проходит слой сорбента порциями, распределяясь между подвижной и неподвижной фазами на отдельных участках слоя сорбента – тарелках. При этом на каждой тарелке устанавливается равновесное распределение вещества. Новая порция подвижной фазы, подаваемая на первую тарелку, приводит к новому распределению вещества между двумя фазами, причем часть вещества с данной тарелки переносится на следующую. На этой тарелке также устанавливается равновесие, а часть вещества переносится на последующие тарелки. Вследствие этого с каждой новой порцией подвижной фазы концентрация вещества на первой тарелке падает, а на последующих возрастает.

В результате такого перемещения и перераспределения хроматографируемое вещество оказывается на нескольких тарелках, причем на средних его концентрация достигает максимума по сравнению с соседними тарелками. Чем больше число уравниваний, тем выше концентрация вещества в определенной части колонки. Число уравниваний, как правило, определяется так называемым *числом теоретических тарелок*  $N$ . На одной хроматографической колонке при одинаковых экспериментальных условиях величина  $N$  должна быть одной и той же для любых веществ, и она не зависит от длины колонки.

Мерой распределения вещества в колонке является величина, называемая *высотой, эквивалентной одной теоретической тарелке* (ВЭТТ). ВЭТТ  $H$  представляет собой высоту слоя сорбента  $L$ , необходимую для установления равновесного распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Она определяется отношением длины слоя сорбента в колонке к числу теоретических тарелок в ней ( $H = L / N$ ).

Таким образом, число теоретических тарелок и ВЭТТ являются величинами, характеризующими эффективность хроматографической

колонки, т. е. чем больше число теоретических тарелок и меньше ВЭТТ при заданной длине колонки, тем выше эффективность колонки.

**Классификация методов хроматографии.** В зависимости от *агрегатного состояния подвижной фазы* выделяют газовую и жидкостную хроматографию. В газовой хроматографии анализируемые вещества должны находиться в газо- или парообразном состоянии, а в жидкостной хроматографии анализируют твердые или жидкие вещества, растворяющиеся в подвижной фазе. В зависимости от *агрегатного состояния неподвижной фазы* (твердое, жидкое или смесь твердой и жидкой фаз) различают варианты газовой и жидкостной хроматографии: газоадсорбционная, газожидкостная, жидкостно-адсорбционная и жидкостно-жидкостная.

Исходя из *природы процесса*, лежащего в основе разделения веществ, выделяют адсорбционную, ионообменную, аффинную и гель-хроматографию (гель-фильтрацию). В адсорбционной хроматографии элементарным актом является адсорбция, и разделение основано на различии в адсорбируемости компонентов смеси на данном адсорбенте. В ионообменной хроматографии элементарным актом является обратимый обмен между ионами анализируемых веществ и ионизированными группами сорбента-ионита, и разделение основано на различии в значениях суммарных зарядов веществ или степени ионного сродства веществ к сорбенту. Аффинная хроматография базируется на биоспецифическом взаимодействии веществ с аффинным лигандом. В методе гель-фильтрации разделение основано на различии в размере молекул и осуществляется путем их прохождения через гели с определенными размерами пор.

Применительно к *способу проведения хроматографического процесса* различают тонкослойную (ТСХ), или хроматографию в тонком слое, колоночную и *batch*-хроматографию (хроматографию в объеме). В тонкослойной хроматографии слой неподвижной фазы наносят на пластинку из стекла или пластика. В колоночной хроматографии неподвижную фазу помещают в стеклянную или металлическую колонку. Вариантом колоночной хроматографии является капиллярная хроматография, когда неподвижную фазу наносят на внутренние стенки капилляра. В *batch*-хроматографии неподвижную фазу вносят в раствор смеси разделяемых компонентов.

В зависимости от *способа элюирования* выделяют восходящую, нисходящую и радиальную хроматографию (применяют в ТСХ). При восходящей хроматографии подвижная фаза поднимается снизу вверх, при нисходящей хроматографии она опускается сверху вниз. При ра-

диальной хроматографии исходный образец наносят в виде пятна в середину горизонтально расположенной пластинки, подвижную фазу медленно вводят в центр образца и элюирование идет радиально от центра, т. е. компоненты образца перемещаются к краям пластинки в виде концентрических колец.

Способ элюирования веществ может быть простым и градиентным. При простом элюировании состав и концентрация подвижной фазы не меняются в ходе хроматографического процесса. Способ градиентного элюирования заключается в постепенном непрерывном изменении состава и концентрации подвижной фазы в сторону возрастания ее элюирующей способности. Возможно также градиентное изменение температуры проведения хроматографического процесса.

Градиентное элюирование, в свою очередь, может быть ступенчатым или непрерывным. При создании ступенчатого градиента пользуются серией элюирующих растворов, пропускаемых через колонку последовательно один за другим. При создании непрерывного градиента состав и концентрацию элюирующего раствора изменяют постепенно, по линейной или нелинейной зависимости этих параметров от объема протекающей жидкости.

В зависимости от *цели проведения хроматографического процесса* различают аналитическую, препаративную и полупрепаративную хроматографию. Аналитическая хроматография предназначена для определения качественного и количественного состава исследуемых смесей, а препаративная и полупрепаративная – для выделения индивидуальных веществ в лабораторных и промышленных условиях.

**Гель-фильтрация (гель-хроматография).** Представляет собой метод разделения веществ при помощи гелей, основанный на различиях в размере молекул. Гель-фильтрация является вариантом жидкостно-жидкостной хроматографии, когда и подвижной, и неподвижной фазами служат разные жидкости. Но в отличие от нее в гель-фильтрации подвижной и неподвижной фазами выступает одна и та же жидкость. При этом та часть жидкости, которая протекает вдоль слоя гранул геля, служит подвижной фазой, а другая часть той же жидкости, проникающая в поры гранул геля, – неподвижной фазой.

Гель-фильтрация осуществляется с помощью молекулярных сит – инертных гидратированных материалов, представляющих собой пористые гранулы. Их получают на основе декстрана (сефадекса – бактериального полисахарида), агарозы (из некоторых

морских водорослей), акриламидных гелей (акрилекса) или полиоксиэтилена (Тоуорpearl).

Сефадексы – это нитевидные молекулы полисахарида декстрана, сшитые через определенные промежутки поперечными связями и свернутые в гранулы. Благодаря этому декстран становится водонерастворимым, сохраняя свои гидрофильные свойства и способность к быстрому набуханию в водной среде. Степень сшивки молекул определяет размер пор.

Агарозные гели, приготовливаемые из агар-агара, используют для разделения крупных белков с молекулярной массой до нескольких миллионов дальтон. Гели на основе декстрана и агарозы стабильны в воде, солевых растворах и органических растворителях, а также в щелочных и слабокислых растворах.

Полиакриламидные гели (ПААГ) получают путем полимеризации акриламида и N,N'-метилена-*бис*-акриламида. Они имеют сходные с сефадексом интервалы фракционирования белков. Основная проблема, связанная с использованием сефадекса и ПААГ, заключается в мягкости их гранул. Даже очень слабое давление и высокая скорость потока вызывают их деформацию. Этому недостатка лишены декстраны, содержащие дополнительные поперечные сшивки, образованные акриламидом (сефакрил).

Гель-фильтрацию проводят на колонках, заполненных гранулами набухшего геля. Неподвижная фаза представлена жидкостью, находящейся внутри пористых гранул, – точно такой же, как и жидкость подвижной фазы, протекающей между ними. Благодаря адгезии с поверхностью пространственной сетки полимера, образующего гранулы, жидкость внутри них остается неподвижной и не увлекается потоком подвижной фазы.

В процессе элюирования молекулы, размер которых превышает размер пор гранул (высокомолекулярные соединения), не проникают в гранулы геля и движутся с высокой скоростью вместе с растворителем только в пространстве между гранулами и первыми выходят из колонки. Молекулы, размер которых меньше размера пор гранул (низкомолекулярные соединения), диффундируют в гранулы и обратно, поэтому их вымывание растворителем (элюирование) из колонки замедляется (рис. 3.5). Поскольку степень диффузии в гранулы геля зависит от размеров молекул, вещества элюируются с колонки в порядке уменьшения их молекулярной массы. Чем меньше молекулярная масса вещества, тем больший объем элюента требуется для вымывания его из колонки.

Рис. 3.5. Принцип гель-фильтрации

Распределение вещества по колонке, заполненной гранулами геля, зависит от общего объема растворителя внутри и снаружи гранул геля. Это распределение определяется коэффициентом распределения  $K_{av}$ , который зависит от размера молекул вещества.

**Коэффициент распределения  $K_{av}$**  (*available* – доступный) характеризует движение хроматографической зоны вещества вдоль колонки при гель-фильтрации и определяет долю пор гранул геля, которую может занимать данный белок.  $K_{av}$  рассчитывается из соотношения

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}, \quad (3.1)$$

где  $K_{av}$  – коэффициент распределения;  $V_e$  – объем элюирования данного белка, мл;  $V_o$  – свободный объем колонки (объем жидкости между гранулами геля), мл;  $V_t$  – объем пустой колонки, мл.

Свободный объем колонки обычно определяют по объему элюирования голубого декстрана 2000 (молекулярная масса  $2 \cdot 10^6$  Да), не проникающего в гранулы геля. Объем пустой колонки вычисляют математически как объем цилиндра, используя ее длину и внутренний диаметр, или экспериментально по объему воды, необходимой для ее заполнения. Для сферических гранул  $V_o$  составляет 30–35%  $V_t$  в зависимости от плотности упаковки материала. Поэтому полезный диапазон  $V_e$  лежит в пределах 80% от объема столбика геля, т. е. составляет

около 55%  $V_t$ . Следовательно, объем элюирования белка всегда меньше или равен объему пустой колонки.

Как видно из соотношения (3.1),  $K_{av}$  прямо пропорционален объему элюирования данного белка. Для крупных молекул,двигающихся по колонке в свободном объеме и отсутствующих в растворителе внутри гранул геля,  $K_{av} = 0$  ( $V_e = V_o$ ). Для мелких молекул, равномерно распределяющихся в растворителе внутри и снаружи гранул геля и требующих большого объема элюирования,  $K_{av} = 1$ . Молекулы средних размеров частично проникают в гранулы геля и для них  $0 < K_{av} < 1$ . Они двигаются вдоль колонки быстрее, чем мелкие молекулы, но медленнее, чем крупные, и для них оказывается доступной только часть объема неподвижной фазы. Следовательно, скорости перемещения отдельных белков по колонке обратно пропорциональны их коэффициентам распределения.

Элюент и параметры матрицы выбирают в соответствии с растворимостью и молекулярной массой исследуемого белка. В зависимости от размеров пор гранул используют ряд сефадексов – G-200, G-100, G-75, G-50, G-25 и др. Кроме того, разные типы сефадексов отличаются величиной гранул. Это позволяет применять их для разделения веществ с различными размерами молекул, а следовательно, и молекулярными массами. Номер марки сефадекса указывает на степень набухания его в воде и определяет десятикратное количество воды, которое может удерживать 1 г сухого сефадекса. Например, 1 г сефадекса G-25 способен поглотить 2,5 мл воды. Для обессоливания белковых растворов используют сефадексы G-25 и G-50. Следует помнить, что белок будет элюироваться с колонки в том растворе, которым она была уравновешена. Поэтому неважно, в каком буферном растворе образец наносится на колонку.

Длина колонки должна в 20–40 раз превышать ее диаметр. Обычно используют колонки диаметром 2–5 см и длиной 50–100 см. Гель подбирают таким образом, чтобы молекулярная масса выделяемого белка приходилась примерно на середину кривой молекулярно-массового распределения белков для данного геля. Концентрация белка в растворе должна быть не выше 30 мг/мл, в противном случае раствор разводят. Поскольку эффективный объем элюирования составляет приблизительно половину объема колонки, четкость разделения обусловлена тем, что образец наносится в малом объеме, который не должен превышать 3% от общего объема колонки.

Сухие гранулы геля выдерживают в выбранном буферном растворе в течение суток (при атмосферном давлении), в результате чего они набухают. Если набухание геля проводить при пониженном давлении, время сокращается до 1–2 ч. Объем суспензии должен не более чем

в 2 раза превышать объем осевшего материала. Колонку заполняют через воронку полученным гелем при открытом выходе нижнего адаптера, добавляя гель порциями и не давая суспензии полностью осесть. Стенки колонки слегка простукивают, что способствует удалению пузырьков воздуха и равномерному заполнению колонки. После заполнения колонки следят за тем, чтобы над слоем сорбента всегда находился слой жидкости. Колонку следует заполнять в один прием при постоянном перемешивании суспензии, чтобы предотвратить разделение гранул по размерам в процессе их оседания. Для уменьшения взмучивания верхнего слоя сорбента над ним помещают кружок фильтровальной бумаги. Колонку закрывают верхним адаптером и присоединяют его к резервуару с элюентом через перистальтический насос для поддержания постоянного давления и сохранения постоянной скорости подачи элюента.

Перед нанесением образца колонку для гель-фильтрации уравнивают буферным раствором. Затем дают буферу впитаться в поверхность геля, закрывают выход из нижнего адаптера и аккуратно наносят образец с помощью пипетки. Когда весь образец будет нанесен, открывают выход из нижнего адаптера и дают образцу впитаться в поверхность геля. Остатки образца со стенок колонки смывают небольшим объемом буферного раствора, затем заливают последний до верха колонки, подсоединяют верхний адаптер и проводят гель-фильтрацию, осуществляя непрерывную подачу элюента с определенной скоростью перистальтическим насосом.

Элюат собирают порциями с помощью коллектора фракций, которые анализируют, используя спектрофотометр при 280 нм (максимум поглощения белков). По полученным данным строят график зависимости  $E^{280}$  от номера фракции или объема элюата (профиль элюирования или хроматограмма). Возможна непрерывная регистрация хроматограмм с помощью УФ-детектора.

По окончании работы колонку промывают тремя объемами буферного раствора, закрывают и оставляют на хранение. В случае длительного хранения колонки для предотвращения развития микроорганизмов в буферный раствор при промывании колонки добавляют азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в концентрации  $10^{-3}$  М.

Объем элюирования индивидуального белка  $V_e$  – это объем элюата, собранного с момента внесения в колонку образца до момента выхода из колонки данного белка. Он соответствует максимуму хроматографического пика на хроматограмме.

При определении молекулярной массы исследуемого белка предварительно проводят калибровку колонки, пропуская через нее белки

с известной молекулярной массой (белки-маркеры) в тех же условиях, и определяют объемы элюирования для каждого из них. На основании этого строят калибровочный график зависимости молекулярной массы (в логарифмической шкале) белков-маркеров от объема элюирования или связанных с ним параметров, например коэффициента распределения белка между подвижной и неподвижной фазами  $K_{av}$  (рис. 3.6). Этот параметр в отличие от объема элюирования более стабилен и не зависит от объема колонки.

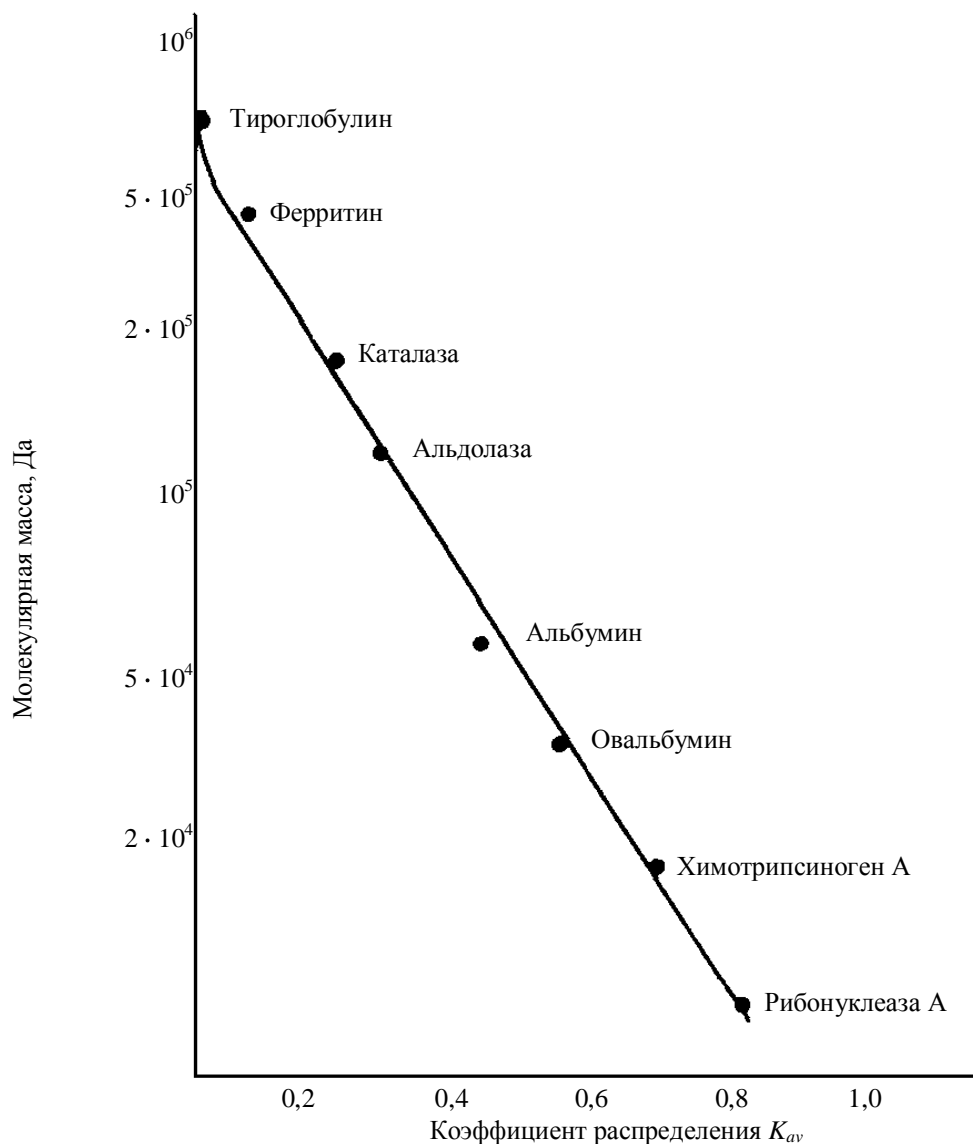


Рис. 3.6. Калибровочный график для колонки с сефадексом G-200

**Адсорбционная хроматография.** Разновидностью жидкостной хроматографии является адсорбционная хроматография, основанная



на избирательной адсорбции веществ на твердых адсорбентах с высоко развитой поверхностью.

В жидкостно-адсорбционной хроматографии разделение происходит за счет установления адсорбционного равновесия между неподвижной твердой и подвижной жидкой фазами. Это определяется процессами адсорбции-десорбции молекул на поверхности носителя. Адсорбция обусловлена совокупностью взаимодействий молекул разделяемых веществ и растворителей с поверхностью адсорбента (дипольных, ионных взаимодействий, водородных связей, ван-дер-ваальсовых сил). В ходе разделения молекулы растворенного вещества и растворителя конкурируют с участками связывания на поверхности адсорбента. Степень адсорбции вещества можно регулировать, меняя либо характеристики распределяемого вещества (например, заряд присутствующих в растворе частиц), либо свойства элюента. В результате этих изменений происходит конкурентное образование (или разрушение) множественных контактов между растворенным веществом, растворителем и адсорбентом.

Эффективность адсорбционной хроматографии зависит от процессов диффузии и массопередачи как в подвижной, так и в неподвижной фазах.

Исследуемую смесь, растворенную в подходящем растворителе, пропускают через колонку, заполненную адсорбентом. При этом компоненты смеси в силу их различий в коэффициентах адсорбции распределяются в колонке ступенчато и перемещаются вдоль слоя адсорбента с потоком подвижной фазы с разными скоростями. **Коэффициент адсорбции** – это отношение массы адсорбированного на поверхности носителя вещества к концентрации вещества в подвижной фазе. В верхней части колонки будет находиться компонент с более высоким коэффициентом адсорбции и низкой скоростью перемещения вдоль колонки, а в нижней части – компонент с более низким коэффициентом адсорбции и высокой скоростью перемещения. Если исследуемые соединения окрашены, то при их разделении можно видеть движение по колонке окрашенных полос.

Для правильного выбора условий хроматографического разделения смеси веществ необходимо знание изотерм адсорбции каждого из компонентов. **Изотерма адсорбции** представляет собой зависимость концентрации растворенного вещества в неподвижной фазе от концентрации его в подвижной фазе при данной температуре. Изотерма адсорбции описывает соотношение между равновесными концентрациями растворенного вещества в неподвижной и подвижной фазах. Выбор хроматографической системы должен проводиться с учетом требования линейности изотерм

адсорбции, когда коэффициент распределения не зависит от концентрации вещества в подвижной фазе. Если состав смеси неизвестен, условия разделения подбирают экспериментальным путем.

При выборе неподвижной фазы необходимо учитывать удельную сорбционную способность адсорбента, которая тем выше, чем мельче частицы (гранулы) адсорбента и пронизывающие их поры. Важными качествами адсорбента являются также его полная нерастворимость в жидком элюенте и химическая инертность.

Из большого числа поверхностно-активных веществ, применяемых в качестве неподвижной фазы в адсорбционной хроматографии, для выделения белков широко используют гели фосфата кальция, в частности гидроксиапатит ( $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ ). Эта форма фосфата кальция устойчива в широкой области pH и обладает большей стабильностью. Гидроксиапатит готовят смешиванием растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Образующийся осадок  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  под действием концентрированной щелочи гидролизует в другую разновидность фосфата кальция – гидроксиапатит.

**Ионообменная хроматография.** Является методом, в основе которого лежит обратимый стехиометрический обмен между ионами анализируемых веществ, находящимися в жидкой подвижной фазе, и ионизированными группами сорбента-ионита, являющегося неподвижной фазой. Разделение базируется на различии в значениях суммарных зарядов веществ или степени ионного сродства веществ к ионообменным центрам сорбента.

Распределение вещества между фазами зависит от силы электростатического взаимодействия ионов или заряженных групп в молекуле вещества с заряженными группами ионообменника. Это взаимодействие определяется как природой самого вещества (и ионообменника), так и свойствами жидкой среды, в которой оно происходит (pH и концентрацией нейтрализующих заряды противоионов).

В качестве твердых сорбентов применяют ионообменные материалы или иониты. Ионообменные материалы – это природные или синтетические нерастворимые полиэлектролиты, имеющие пористую структуру и содержащие ионизированные группы. Они могут поглощать положительно или отрицательно заряженные ионы из контактирующего с ними раствора электролита путем обмена их на эквивалентное количество собственных противоионов, переходящих в раствор.

Каждый ионит способен поглощать лишь определенное количество ионов. Эта величина называется **адсорбционной емкостью ионита** и выражается в миллиграммах (миллиграмм-эквивалентах) сорбируемого иона на единицу объема или массы ионита при значениях pH,

соответствующих его 100%-ной ионизации. Для низкомолекулярных ионов она совпадает с концентрацией ионогенных групп. На емкость ионита влияют рН раствора, размер зерен ионита, число функциональных групп в матрице, размер сорбируемых молекул или ионов.

Существует два типа ионитов – катионо- и анионообменники (катиониты и аниониты). Катиониты содержат отрицательно заряженные группы и способны к обмену катионов, притягивая их из подвижной фазы. Аниониты содержат положительно заряженные группы и способны к обмену анионов. Заряд иониту придают кислые и основные группы атомов, называемые *фиксированными ионами*. К ним относятся: кислые  $-\text{SO}_3\text{H}$ -,  $-\text{COOH}$ - и другие группы в катионитах и основные  $-\text{CH}_2\text{NR}_2$ -,  $-\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}_3$ - и другие группы в анионитах.

Положительный или отрицательный заряд ионита компенсируется зарядом ионов противоположного знака, называемых *противоионами* (ионы водорода, катионы металлов, хлорид-ионы, гидроксид-ионы, иногда ионы буферного раствора). Они исходно подразумеваются в составе ионогенных групп сорбента и обладают в пределах ионита определенной подвижностью, что и обуславливает способность ионита к обмену ионов. Противоионы в растворе взаимодействуют с ионами ионита на расстоянии и связываются с ними электростатическими силами взаимного притяжения.

В сухом виде продажные ионообменники поставляются вместе с противоионами (ионообменные материалы марки Toyopearl выпускаются в виде водных суспензий). Называя их, принято говорить о форме ионообменника. Например, если катионит находится в  $\text{H}^+$ - или  $\text{Na}^+$ -форме, это означает, что его кислые ионогенные группы нейтрализованы соответственно противоионами  $\text{H}^+$  или  $\text{Na}^+$ . Анионообменники производятся в  $\text{OH}^-$ - или  $\text{Cl}^-$ -форме.

В зависимости от типа ионогенных групп ионообменники разделяют на сильные и слабые. Сильные иониты, функциональные группы которых образованы сильными кислотами или основаниями, остаются полностью ионизированными во всем диапазоне рабочих значений рН (3–11), при которых может идти фракционирование биологических молекул. Слабые иониты, функциональные группы которых образованы слабыми кислотами или основаниями, оказываются ионизированными не полностью и лишь в ограниченной области значений рН. Их ионизацией можно управлять путем изменения рН элюента в пределах рабочих значений рН.

Ионный обмен, как правило, происходит очень быстро, поэтому скорость всего процесса в целом лимитируется скоростью диффузии ионов через ионит. Процесс ионного обмена состоит из следующих *этапов*:

- диффузия иона к поверхности ионита;
- диффузия иона внутрь гранул ионита к ионообменному участку (эта стадия является лимитирующей для всего процесса ионного обмена);
- обмен ионов на ионообменном участке (этот процесс является равновесным);
- диффузия обмениваемого иона из гранул ионита к его поверхности;
- десорбция элюентом и диффузия обменявшегося иона в окружающий раствор.

Ионообменные материалы представляют собой типичные гели. Их каркас, или матрица, состоит из высокополимерной пространственной сетки, в которой закреплены фиксированные ионы. Введение фиксированных ионов увеличивает гидрофильные свойства матрицы, в результате чего матрица приобретает способность к набуханию в водных растворах, а ионит превращается в полиэлектролит. Однако способность ионитов к набуханию в водных растворах ограничена благодаря наличию в полимерной молекуле поперечных связей или сшивок.

Для выделения белков используют природные и синтетические ионообменные материалы, обладающие высокой степенью гидрофильности. Белки могут быть разделены как на катионитах, так и на анионитах. Выбор типа ионита определяется устойчивостью белка в определенном диапазоне значений рН. Эффективная адсорбция белков происходит при значениях рН, отстоящих не менее чем на единицу от  $pI$  (изоэлектрической точки). В области  $pH < pI - 1$  (в растворе находится больше положительно заряженных ионов, чем отрицательных) белки можно хроматографировать на катионитах, а в области  $pH > pI + 1$  (в растворе имеется больше отрицательно заряженных ионов, чем положительных) – на анионитах. Изменение рН в направлении к изоэлектрической точке белка (в растворе находится одинаковое число положительно и отрицательно заряженных ионов) способствует десорбции белков.

Для разделения кислых (суммарный заряд белка отрицательный) и нейтральных белков используют аниониты, для разделения основных белков (суммарный заряд белка положительный) – катиониты.

К **природным ионообменникам** относятся ионообменники на основе целлюлозы и декстранов, содержащих чаще всего в качестве ионогенных групп карбоксиметильную и диэтиламиноэтильную.

Для целлюлозы характерны высокая степень гидрофильности и склонность к образованию многочисленных водородных связей между линейными цепями полимеров.

Адсорбционная емкость ионообменников в отношении белков зависит в основном от размеров белковых молекул с позиций легкости их проникновения в поры матрицы ионита и скорости диффузии в жидкой фазе. Чем мельче молекулы белка, тем в большей степени белок адсорбируется. Молекулы небольших белков связываются в количестве более 100 мг/мл, но молекулы крупных белков (с молекулярной массой более  $10^6$  Да) не задерживаются большинством целлюлозных ионообменников. Здесь проявляется практически тот же эффект, что и при гель-фильтрации: крупные молекулы связываются только с поверхностью ионита и не могут пройти внутрь частиц адсорбента, поэтому емкость ионита для них очень низка.

Различают два типа ионообменников на основе модифицированной целлюлозы и декстранов (сефадексов): катионообменники – КМ-целлюлоза и КМ-сефадекс (к ОН-группе присоединена карбоксиметильная группа  $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ); анионообменники – ДЭАЭ-целлюлоза и ДЭАЭ-сефадекс (к ОН-группе присоединена диэтиламиноэтильная группа  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ ). КМ-целлюлоза обладает свойствами слабого катионита и используется для разделения основных и нейтральных белков. ДЭАЭ-целлюлоза – слабый анионит, который используется для разделения кислых и нейтральных белков (см. рис. 3.7).

Модифицированные сефадексы выпускаются на основе только двух типов сефадексов – G-25 и G-50. Размеры пор у модифицированных сефадексов значительно выше, чем у исходных типов матриц.

Иониты на основе целлюлозы имеют меньшую емкость, чем ионообменные сефадексы.

К **синтетическим ионообменникам** относятся ионообменники на основе полиоксиэтилена, содержащего карбоксиметильную и диэтиламиноэтильную группы – КМ- и ДЭАЭ-Toyopearl.

При выборе элюента необходимо учитывать природу, концентрацию, рН и емкость буферного раствора. Поддержание рН в ходе ионообменной хроматографии имеет важное значение, так как ионные взаимодействия сильно зависят от рН, а буферные растворы содержат ионы, которые могут принимать участие в процессе ионного обмена. Рекомендуется работать с буферными растворами, содержащими простые анионы ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) и катионы ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , *H-tris*<sup>+</sup>).

Для подготовки ионообменника к работе сухой ионит выдерживают в выбранном буферном растворе в течение суток (при атмосферном давлении) или 1–2 ч (при пониженном давлении) для набухания.

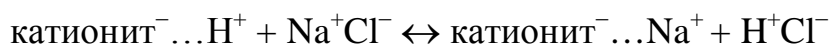
Затем ионит несколько раз переводят из одной формы в другую: катиониты переводят из  $\text{H}^+$ -формы в  $\text{Na}^+$ -форму и наоборот, а аниониты –

из  $\text{OH}^-$ -формы в  $\text{Cl}^-$ -форму и наоборот. В процессе такой обработки стабилизируется структура ионита и его функциональные группы становятся более доступными. Одновременно ионит освобождается от низкомолекулярных примесей. Для этого к аниониту добавляют 15 объемов 0,5 М  $\text{HCl}$ , а к катиониту – такой же объем 0,5 М  $\text{NaOH}$  и тщательно перемешивают. Этим обеспечивается максимальная ионизация их ионогенных групп. Через 30 мин иониты фильтруют или отделяют декантацией и промывают водой до  $\text{pH} \sim 4$  (для анионита) и  $\text{pH} \sim 8$  (для катионита), поскольку ионы  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  из воды будут замещать противоионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , за счет чего будет поддерживаться слабокислое или слабощелочное значение  $\text{pH}$  промывной воды. После промывки водой катионит и анионит переводят соответственно в  $\text{H}^+$ - и  $\text{OH}^-$ -форму: катионит обрабатывают 0,5 М  $\text{HCl}$ , а анионит – 0,5 М  $\text{NaOH}$  в течение 30 мин. Эту операцию повторяют со свежей порцией кислоты или щелочи, а затем промывают ионит водой до нейтрального значения  $\text{pH}$  промывной воды. Вышеописанную процедуру проводят вне колонки, включая начальную стадию уравнивания колонки буферным раствором.

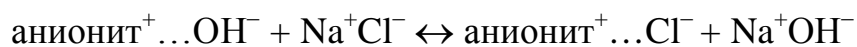
Далее катионит в  $\text{H}^+$ -форме и анионит в  $\text{OH}^-$ -форме переводят в полностью ионизированную солевую форму, насыщенную противоионами – катионами ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) для катионитов и анионами ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) для анионитов, что препятствует изменению  $\text{pH}$ . Для этого через колонку с ионитом пропускают буферный раствор с теми же значениями  $\text{pH}$  и ионной силы, что и буферный раствор, в котором растворены белки.

Ниже представлены реакции ионного обмена на примере взаимодействия катионита и анионита с солевым раствором.

При взаимодействии соли с катионитом в  $\text{H}^+$ -форме происходит обмен катионов:



а при взаимодействии соли с анионитом в  $\text{OH}^-$ -форме происходит обмен анионов:



В ионообменной хроматографии применяют стеклянные колонки цилиндрической формы длиной 40–50 см и диаметром 2–4 см. Заполнение колонки ионитом проводят так же, как и в методе гель-фильтрации. Перед нанесением образца колонку уравнивают элюирующим буферным раствором до тех пор, пока  $\text{pH}$  выходящего из колонки элюата не будет равен  $\text{pH}$  элюента. Объем буферного раствора, необходимого для уравнивания, составляет около 5–7 объемов колонки.

Наносимая на колонку смесь белков должна быть растворена в том же буферном растворе, который использовали для уравнивания

ния колонки. Концентрация адсорбируемого белка в растворе должна составлять не более 5–7 мг/мл. Если исследуемый белок связывается с ионообменником прочно, объем наносимого белкового раствора не имеет значения. Если исследуемый белок связывается с ионообменником слабо, наносимый объем должен быть по возможности небольшим (не более 1–2% от объема колонки).

При нанесении белков на колонку используют буферные растворы с низкой ионной силой и высокой буферной емкостью. Противоионы буферного раствора в низкой концентрации не блокируют заряды ионогенных групп ионита, и, следовательно, последние почти все доступны для взаимодействия с ионогенными функциональными группами белка. При этом белки оказываются связанными с ионитом и практически не продвигаются по колонке.

Нанесение белкового раствора может осуществляться до полного насыщения колонки выделяемым белком вплоть до его появления в элюате.

В процессе ионного обмена противоионы ионита замещаются функциональными группами белков, при этом прочность связывания белка с ионообменником пропорциональна его заряду (рис. 3.7).

Рис. 3.7. Структура ионообменных целлюлоз и общий принцип ионного обмена

Элюирование белков с колонки проводят буферным раствором с линейно повышающейся ионной силой обычно от 0 до 0,6 М за счет

добавления к нему солей KCl или NaCl. При этом среднее число связей, удерживающих белок на ионите, постепенно уменьшается, так как противоионы соли в высокой концентрации блокируют заряды ионогенных групп ионита, и, следовательно, последние недоступны для взаимодействия с ионогенными функциональными группами белка. При этом адсорбируемость белков на ионите снижается, и они выходят из колонки. Белки из колонки элюируются в порядке возрастания суммарного заряда их молекул. Элюирование проводят до тех пор, пока экстинкция элюата не станет равной экстинкции исходного элюента.

Элюат собирают порциями с помощью коллектора фракций и анализируют на содержание белка с помощью спектрофотометра.

Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически по поглощению при 280 нм и строят профиль элюирования. При построении графика используют две оси ординат: на одной оси откладывают поглощение при 280 нм, а на другой – концентрацию KCl (рис. 3.8). Из такого графика легко определить, при какой концентрации KCl элюируется с колонки тот или иной белок. Зная количество белка, нанесенного на колонку, рассчитывают относительное содержание белка (в процентах) в отдельных фракциях.

Рис. 3.8. Типичный профиль элюирования белков с ионообменной колонки линейным градиентом концентрации KCl



Для идентификации белков, элюируемых с колонки, содержащее пробирок, соответствующее отдельным пикам на профиле элюирования, подвергают диализу, исследуют методом электрофореза в полиакриламидном геле и определяют ферментативную активность.

Ионообменники можно использовать многократно, поэтому по окончании работы их следует регенерировать. Очистку ионита от остатков сорбированных веществ осуществляют промывкой его 4–5 объемами 2 М раствора KCl или NaCl. После этого ионит промывают водой и уравновешивают буферным раствором.

Иониты во влажном состоянии хранят в течение непродолжительного времени в солевой форме в присутствии антисептиков – азидата натрия ( $10^{-3}$  М) или хлороформа. Если предусматривается продолжительное хранение ионита (в течение нескольких месяцев), его переводят в сухое состояние. Для этого ионит извлекают из колонки, промывают водой, затем последовательно обрабатывают 30, 50 и 70%-ным этанолом и фильтруют на стеклянном фильтре. Осадок высушивают на воздухе, периодически растирая шпателем образующиеся комки.

**Аффинная хроматография, или хроматография по сродству.** Это особый тип адсорбционной хроматографии и наиболее специфический метод выделения индивидуальных белков, основанный на биоспецифическом взаимодействии молекул белка, находящихся в подвижной фазе, с комплементарными им молекулами веществ (лигандов), «пришитых» к неподвижной фазе. Биоспецифическое взаимодействие отличается исключительной избирательностью по типу «антиген – антитело» или «фермент – субстрат» и др.

Любой из компонентов вышеуказанных и подобных им биоспецифических пар можно закрепить на матрице в качестве так называемого лиганда. С его помощью второй партнер пары может быть извлечен из смеси с другими, не комплементарными лиганду веществами и временно задержан на матрице в составе биоспецифического (аффинного) комплекса. Иногда это может быть не одно, а несколько родственных или схожих по своей структуре веществ, «узнающих» один и тот же лиганд, например изоферменты или различные виды антител к одному и тому же антигену.

К инертному полимеру ковалентно присоединяется соединение (лиганд), обратимо и специфично связывающееся с данным белком. При пропускании через колонку с нерастворимым носителем, связанным с аффинным лигандом, раствора белков за счет комплементарного связывания белка с лигандом в колонке адсорбируется только

специфичный для данного лиганда белок. Другие белки или примеси, не обладающие сродством к данному лиганду, беспрепятственно удаляются с подвижной фазой. Прочность удерживания того или иного белка в колонке зависит от степени его сродства к аффинному лиганду и конкретных условий хроматографирования. Для элюирования адсорбированного белка с помощью элюента, содержащего свободный лиганд, нарушают биоспецифическую связь «пришитого» лиганда с белком, что позволяет быстро вывести последний из колонки.

Нерастворимая матрица (носитель) для аффинной хроматографии должна удовлетворять следующим *требованиям*:

- матрица должна быть пористым гидрофильным полимером, который можно производить в виде частиц нужной формы и размера, что обеспечивает свободный доступ макромолекул к «пришитому» лиганду и отсутствие гидродинамического сопротивления элюенту;
- матрица должна оставаться прочной и химически устойчивой в процессе присоединения аффинных лигандов и в условиях хроматографирования;
- лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало стерических затруднений; иммобилизованный лиганд должен связываться с исследуемым белком легко и достаточно прочно, чтобы обеспечить удаление примесей путем промывки сорбента соответствующим буферным раствором; в то же время связывание должно быть обратимым, чтобы белок можно было легко «снять» с колонки;
- неспецифическая адсорбция должна отсутствовать.

Кроме вышеперечисленных, следует добавить требование наличия в носителе достаточного числа химических групп, позволяющих с помощью несложной химической реакции ковалентно связывать с матрицей различные биологические молекулы – лиганды. Наиболее удобными с этой точки зрения являются ОН-группы полисахаридных матриц – агарозы и сефадексов.

Применительно к аффинной хроматографии белков к вышеназванным требованиям следует добавить необходимость крупных пор у матрицы, что характерно для агарозы (сефарозы – промышленное название сферического геля агарозы). Сферические гранулы этой матрицы имеют поры, доступные для макромолекул с молекулярной массой порядка нескольких миллионов дальтон. Помимо обычных используют химически сшитые матрицы типа сефарозы. Однако следует иметь в виду, что около половины ОН-групп в них заняты поперечными сшивками, поэтому емкость таких сорбентов заметно ниже.

Вместе с тем поперечно-сшитые гранулы агарозы не разрушаются и сохраняют свои размеры как под давлением, так и при смене рН буферного раствора.

Наиболее широко в качестве аффинной матрицы используется «Сефароза 4В» – 4%-ный гель агарозы, предназначенный для фракционирования белков с молекулярной массой  $3 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^6$  Да.

Каждый сорбент характеризуется *эффективной удельной емкостью* – максимальным количеством вещества, например белка, которое может связаться с ним (в расчете на 1 мл) за достаточное для установления равновесия время, так что в жидкой фазе концентрация этого вещества будет практически равна нулю.

В качестве аффинных лигандов используют любые соединения, прочно, специфично и обратимо связывающиеся с выделяемым веществом. Всем им свойственна определенная биоспецифичность – индивидуальная или групповая. Под *индивидуальной биоспецифичностью* понимают строгую взаимную специфичность (сродство) двух молекул (например, антигена и антитела); под *групповой* – такой вид биоспецифического взаимодействия, когда лиганд может связывать целую группу родственных веществ (например, никотинамидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>), взаимодействующий со всеми ферментами, для которых он служит коферментом). Лиганды с групповой специфичностью в некоторых случаях не уступают по избирательности лигандам с индивидуальной специфичностью и имеют явное преимущество в том случае, когда стоит задача разделения нескольких веществ, обладающих сродством к одному и тому же лиганду. Если степень этого сродства не одинакова для разных веществ смеси, то разделение этих веществ может быть осуществлено хроматографически в ходе их поочередного элюирования с сорбента (при использовании различных конкурентных элюентов), что невозможно сделать в случае лиганда с индивидуальной специфичностью.

В качестве аффинных лигандов с групповой специфичностью используют триазиновые красители (торговое название – «проционовые красители»), ингибиторы и кофакторы ферментов. Триазиновые красители обладают очень высоким сродством к дегидрогеназам. Среди кофакторов ферментов универсальными аффинными лигандами служат нуклеозидфосфаты: 5'-аденозинмонофосфат (5'-АМР), 2',5'-аденозиндифосфат (АДР), НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>. Это обусловлено тем, что многие ферменты проявляют свою активность в присутствии этих коферментов. Концентрация аффинных лигандов обычно составляет  $10^{-1}$ – $10^{-3}$  М.

Желательно, чтобы присоединение лиганда к матрице происходило в точке, не совпадающей с областью взаимодействия белка с лигандом. При закреплении лиганда на матрице следует также учитывать необходимость сохранения биологической активности лиганда – аффинного сродства к субстрату.

Для успешного проведения аффинной хроматографии необходимо не только связывание аффинного лиганда, но и полное удаление всего аффинного лиганда, нековалентно связанного с носителем.

В аффинной хроматографии чаще всего применяют стеклянные или полимерные колонки цилиндрической формы длиной до 10 см и диаметром 1–2 см. Заполнение колонки связанной с лигандом матрицей проводят так же, как и в методе гель-фильтрации. Перед нанесением образца колонку уравнивают исходным элюирующим буферным раствором до тех пор, пока рН выходящего из колонки раствора не будет равен исходному. Объем буферного раствора, необходимого для уравнивания, составляет около 2–3 объемов колонки.

Наносимая на колонку смесь белков должна быть растворена в том же буферном растворе, который использовали для уравнивания колонки. Концентрация адсорбируемого белка в растворе должна составлять не более 5–7 мг/мл. Объем наносимого белкового раствора зависит от емкости сорбента.

При нанесении белков на колонку используют буферные растворы, способствующие сохранению нативной структуры выделяемого белка и максимально уменьшающие неспецифическую адсорбцию. Буферный раствор должен иметь такие значения рН и ионной силы, чтобы обеспечивать оптимальные условия для связывания белка с сорбентом.

После этого осуществляют промывку сорбента исходным буферным раствором для удаления неспецифически адсорбированных примесей.

Затем проводят элюирование белка с колонки, используя специфический (конкурентный) или неспецифический варианты элюирования. При **специфическом элюировании** в состав элюента вводят свободный лиганд (тот же, который «пришит» к матрице, или другой), за счет более высокой концентрации которого белок элюируется с колонки (рис. 3.9). При **неспецифическом элюировании** чаще всего изменяют рН элюента, вследствие чего меняется конформация фермента и прочность его взаимодействия с лигандом резко уменьшается, в результате фермент элюируется с колонки.

Рис. 3.9. Принцип аффинного выделения глюкозосвязывающего белка

Элюат собирают порциями с помощью коллектора фракций, анализируют содержание белка во фракциях с помощью спектрофотометра по поглощению при 280 нм, строят профиль элюирования и устанавливают объем элюирования исследуемого белка. Для идентификации белков, элюируемых с колонки, в содержимом пробирок, соответствующем отдельным пикам на профиле элюирования, определяют ферментативную активность.

Адсорбенты можно использовать многократно при условии, что после элюирования белков с колонки их немедленно промывают растворами мочевины или додецилсульфата натрия и хранят в присутствии антисептика.

Основным преимуществом аффинной хроматографии является ее очень высокая избирательность, позволяющая выделять из смеси биологически активных веществ компоненты, присутствующие в ничтожно малых количествах, в одну стадию и с высокой степенью очистки. Вместе с тем сам способ связывания вещества с адсорбентом, несмотря на прочность этой связи, является в отличие от других видов хроматографии идеально мягким и не угрожает нативности молекул. Следует отметить также, что аффинную хроматографию ввиду избирательности адсорбции и очень высокого значения коэффициента распределения адсорбируемого вещества отличает возможность использовать большие объемы исходных веществ и в ходе ступенчатого элюирования осуществлять их очень эффективное концентрирование.

### **3.2.5. Определение гомогенности выделенного белка**

Для характеристики гомогенности выделенного белка используют метод электрофореза. Электрофорез – это метод, в основе которого лежит перемещение белковых молекул в электрическом поле.

Молекула белка в растворе при любом значении рН, отличающемся от изоэлектрической точки данного белка, имеет определенный суммарный заряд, который обусловлен наличием функциональных групп боковых

цепей аминокислотных остатков, способных к электролитической диссоциации. Кроме того, молекулы белков с близкими по величине зарядами, но различающимися молекулярными массами отличаются друг от друга отношением массы к заряду. Под действием внешнего электрического поля заряженные молекулы белка перемещаются к противоположно заряженному полюсу (катоде или аноду) в зависимости от знака их суммарного заряда. Такое явление носит название **электрофореза**. Скорость движения катионов к катоду и анионов к аноду зависит от соотношения между движущей силой электрического поля, действующей на заряженные ионы, и замедляющими движение ионов силами взаимодействия между молекулами и окружающей средой, в основном силами трения и электростатическими силами.

Мерой электрофоретической подвижности белков является скорость их движения (см/с) при напряженности электрического поля 1 В/см. Знак величины электрофоретической подвижности совпадает со знаком суммарного заряда белка.

Электрофоретическая подвижность заряженных молекул зависит от их заряда, молекулярной массы (размера) и формы. Эта величина возрастает с увеличением суммарного заряда молекулы, который зависит от рН среды. Чем крупнее молекулы, тем меньше их подвижность. Это связано с возрастанием сил трения и электростатических взаимодействий крупных молекул с окружающей средой по сравнению с молекулами меньших размеров. Молекулы одинакового размера, но различной формы, например фибриллярные и глобулярные белки, также обладают разной подвижностью, что обусловлено различиями в силе трения и электростатических взаимодействиях.

Электрофорез белков проводят в полиакриламидном геле (ПААГ), в частности в пластинах геля, имеющего поры определенного размера и обладающего свойствами молекулярного сита, которые способствуют разделению смесей заряженных макромолекул с различными молекулярными массами. Гель содержит 80,0–99,5% жидкости (буферного раствора), в котором и мигрируют белковые молекулы. В процессе миграции последние сталкиваются с нитями полимера, образующего сетку геля, что снижает скорость их движения. Препятствия для миграции становятся особенно серьезными, если средний диаметр пространственных ячеек геля оказывается соизмерим с размерами макромолекул. Варьируя концентрации мономера и сшивающего агента, которые используют для образования ПААГ, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Принцип действия молекулярного сита в ПААГ состоит в

том, что крупные молекулы двигаются сквозь него тем медленнее, чем меньше размер пор геля, который определяется числом поперечных шивок в геле.

Использование электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)) позволяет разделять белковые молекулы по величине их молекулярной массы. В случае разделения белков, основанного на различиях в величине отношения молекулярная масса/заряд ( $m/z$ ), применяют электрофорез в ПААГ в неденатурирующих условиях (без ДСН).

Электрофорез в пластинах ПААГ обладает большой разрешающей способностью в связи с тем, что разделение смеси белков происходит не только по величине заряда, но и по размерам и форме молекул. Этот метод имеет ряд *преимуществ*, связанных со свойствами ПААГ:

- химическая стабильность и инертность геля;
- устойчивость к растворителям, изменениям температуры и рН;
- размер пор геля можно варьировать в широких пределах;
- возможность использования различных буферных растворов;
- отсутствие адсорбции разделяемых веществ и электроосмоса;
- быстрота разделения веществ;
- отсутствие поглощения в УФ-области спектра.

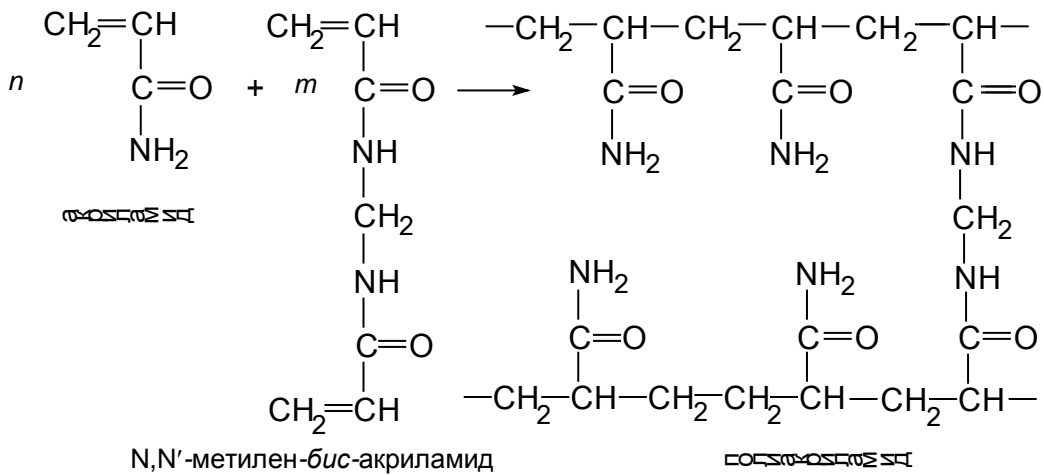
Использование тонких пластин ПААГ облегчает эффективное отведение тепла при электрофорезе; процесс фиксации, окрашивания и обесцвечивания геля занимает значительно меньше времени вследствие быстрой диффузии несвязанного красителя в тонкий слой геля и из него; использование одной пластины позволяет в абсолютно идентичных условиях проводить разделение одновременно нескольких (10–13) образцов белка; на пластины наносится небольшое количество белка (5–50 мкг).

В настоящее время применяют вертикальный электрофорез в пластинах ПААГ, когда насыщенный буферным раствором носитель (гель), на который нанесен образец, располагают в вертикальном положении в специальных камерах.

К факторам, влияющим на электрофоретическую подвижность белков, относятся *характеристики электрического поля*. Скорость перемещения ионов буферного раствора и образца прямо пропорциональна силе тока. Длина пути, пройденного ионами, пропорциональна времени пропускания тока. Следовательно, для максимальной воспроизводимости результатов сила тока в процессе электролиза должна быть постоянной. С силой тока связано напряжение электрического поля. Для разделения белков применяют низкие

напряжения (100–500 В). Скорость движения белков обратно пропорциональна сопротивлению, которое зависит от типа и размеров носителя и ионной силы буферного раствора. При этом следует учитывать изменения сопротивления под действием тепла, выделяющегося в ходе электрофореза.

Для получения полиакриламидного геля используют акриламид и какой-либо агент, образующий поперечные сшивки, – обычно N,N'-метилден-бис-акриламид (сокращенно бис-акриламид). Реакцию проводят в присутствии катализаторов и инициаторов. В ходе нее происходит винильная полимеризация, приводящая к формированию геля с хаотически свернутой структурой. Линейные цепи полиакриламида сшиваются метиленовыми мостиками. Гель обладает ярко выраженными гидрофильными свойствами благодаря наличию в структуре правильно чередующихся амидных групп:



Для характеристики ПААГ указывают процентное содержание мономеров  $T$  и количество сшивающего агента  $C$ , которые существенно влияют на физико-механические свойства геля и его разделительную способность:

$$T = \frac{a+b}{v} 100, \quad C = \frac{b}{a+b} 100, \quad (3.2)$$

где  $T$  – содержание мономеров, %;  $a$  – количество акриламида, г;  $b$  – количество мономера, образующего поперечные сшивки, г;  $v$  – объем буферного раствора, мл;  $C$  – количество сшивающего агента, %.

При получении ПААГ необходимо соблюдать следующее правило: чем выше концентрация акриламида, тем ниже должна быть концентрация бис-акриламида, и наоборот. Одновременное увеличение содержания обоих компонентов приводит к образованию гелей с повышенной



жесткостью и хрупкостью, а одновременное снижение – к возрастанию мягкости и эластичности геля. В общем случае для гелей с концентрацией 5–15%  $T$  рекомендуется выбирать  $C$  в пределах 2–4%.

Для расчета оптимального количества *бис*-акриламида предложена следующая формула:

$$C = 6,5 - 0,3T, \quad (3.3)$$

в соответствии с которой можно получать гели, содержащие 5–20%  $T$ .

В процессе полимеризации *бис*-акриламид действует как терминатор цепи и при более высоких концентрациях он уменьшает максимальный размер пор геля. Приемлемые гели в диапазоне концентраций 2–40%  $T$  можно получить, пользуясь формулой

$$\text{бис-АА} = \frac{\text{const}}{\text{АА}}, \quad (3.4)$$

где *бис*-АА – количество *бис*-акриламида, мг/100 мл геля; const – константа, равная 1300; АА – количество акриламида, г/100 мл геля.

Полимеризацию акриламида можно проводить химическим или фотохимическим методом. Наиболее часто используют систему химических катализаторов «персульфат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  –  $\text{N,N,N',N'}$ -тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)». Процесс полимеризации требует наличия свободных радикалов мономера, которые образуются при основном катализе под действием свободных радикалов кислорода, выделяемых персульфатом аммония. ТЕМЕД захватывает эти свободные радикалы. Молекулярный кислород замедляет или вовсе предотвращает полимеризацию, поэтому его необходимо удалять.

Фотополимеризацию акриламида осуществляют в присутствии рибофлавина и ТЕМЕД. По сравнению с другими красителями рибофлавин обладает уникальным свойством – входящий в его состав рибозный остаток действует как внутренний восстанавливающий агент. В отличие от химической полимеризации фотохимическая реакция требует наличия в среде следов молекулярного кислорода (~1% в газовой смеси). Возбужденный светом краситель в присутствии донора водорода подвергается восстановлению, а молекулярный кислород окисляет эту восстановленную форму рибофлавина, которая в свою очередь участвует в образовании веществ, необходимых для иницирования полимеризации акриламида.

Следует помнить, что **акриламид – нейротоксичный яд! Работу с ним проводят в вытяжном шкафу в перчатках!**

В растворах мономеров могут находиться различные буферные ионы, денатурирующие агенты (мочевина, додецилсульфат натрия) и др. Все эти соединения либо совсем не влияют на образование геля, либо слегка изменяют время его полимеризации.

ПААГ служит при электрофорезе не только поддерживающей средой, но и сам принимает активное участие в процессе разделения макромолекул благодаря так называемому эффекту молекулярного сита. Концентрацию полиакриламида можно варьировать в широких пределах в зависимости от размеров фракционируемых белков. При увеличении концентрации акриламида средний размер пор геля уменьшается, в результате чего перемещение более крупных молекул белков по сравнению с низкомолекулярными белками замедляется и наоборот. Для белков с молекулярной массой до  $10^6$  Да готовят крупнопористый гель, содержащий 3–4% акриламида и 0,1% бис-акриламида. Для низкомолекулярных белков с молекулярной массой  $\sim 10^4$  Да используют гель, содержащий 15% акриламида и 1% бис-акриламида.

Электрофорез проводят в буферном растворе с таким значением рН, при котором разделяемые белки сохраняют стабильность и нативную форму молекул, т. е. значение рН отличается на 3–4 единицы от среднего значения изоэлектрических точек (рI) всех белков смеси.

Для молекул белков, являющихся амфолитами, рН среды определяет степень их ионизации, а следовательно, и их электрофоретическую подвижность, т. е. скорость и направление движения. Для этого необходимо знать зависимость электрофоретической подвижности от рН среды для каждого компонента смеси и выбирать такое значение рН, при котором электрофоретические подвижности компонентов сильно различаются.

Для кислых белков используют буферные растворы с нейтральным или слабощелочным значением рН (белки различаются по величине суммарного отрицательного заряда и мигрируют от катода к аноду), а для основных белков – со слабокислым значением рН (белки различаются по величине суммарного положительного заряда и мигрируют от анода к катоду).

Важное значение имеет и состав буферного раствора, используемого в ходе электрофореза, поскольку ток, протекающий по каналу, в котором происходит разделение, создается ионами буферного раствора. Следует исключить присутствие в буферном растворе очень подвижных ионов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), так как благодаря своей высокой мобильности они несут большой ток, что ведет к нагреву

смеси. Для разделения кислых белков применяют *трис*-HCl, *трис*-глициновый буферные растворы, а для разделения основных белков – ацетатный буферный раствор.

При выборе ионной силы буферного раствора приходится идти на компромисс. Так, при высокой ионной силе буферного раствора ток, обусловленный переносом ионов буферного раствора, возрастает по сравнению с током, вызванным переносом ионов образца. Поэтому скорость движения образца уменьшается. Вместе с тем величина суммарного тока увеличивается, а следовательно, возрастает и количество выделяемого тепла. При низкой ионной силе буферного раствора наблюдается обратная ситуация. Обычно используют буферные растворы с ионной силой 0,05–0,20 М.

Оборудование, необходимое для электрофореза, состоит из источника питания и собственно прибора для электрофореза. Источник питания генерирует постоянный электрический ток и имеет системы стабилизации напряжения или силы тока на выходе. Для работы с низким напряжением применяются источники питания с выходным напряжением до 500 В и силой тока до 150 мА, которые обеспечивают либо постоянное напряжение, либо постоянную силу тока.

Прибор для вертикального электрофореза в пластинах ПААГ состоит из двух электродных камер, расположенных с двух сторон от кассеты с гелем и заполненных буферным раствором, двух электродов и кассеты, заполненной ПААГ. Контакт между электродными камерами осуществляется через пластинку ПААГ, верхний конец которой контактирует с одной электродной камерой, а нижний конец – с другой электродной камерой.

В растворе между электродами ток обусловлен переносом ионов буферного раствора, а в остальной части цепи – электронами. Ток в цепи поддерживается за счет электролиза, происходящего на электродах, каждый из которых погружен в большую электродную камеру. В процессе электролиза на катоде образуются OH<sup>-</sup>-ионы и H<sub>2</sub> ( $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{OH}^- + \text{H}_2$ ), а на аноде – ионы H<sup>+</sup> и O<sub>2</sub> ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{e}^-$ ).

Образующиеся на катоде OH<sup>-</sup>-ионы взаимодействуют с протонами компонента буферного раствора, представляющего собой слабую кислоту (НА), вследствие чего возрастает количество ионов A<sup>-</sup>, проводящих ток к аноду. На аноде ионы A<sup>-</sup> взаимодействуют с протонами, при этом снова образуется НА, а электроны поступают в электрическую цепь.

Если снять электрическое поле до того, как ионы исследуемой смеси достигнут электродов, компоненты смеси распределятся в соответствии

с их электрофоретической подвижностью в виде отчетливых зон, которые легко обнаружить с помощью определенного метода.

**Электрофорез в ПААГ в неденатурирующих условиях.** При вертикальном электрофорезе в пластинах ПААГ гель полимеризуют в специальной кассете. Для этого в кассету из пластика шириной 8–14 см и длиной (в направлении электрофореза) 8–28 см вставляют два стекла, регулируя зазор между ними специальными прокладками толщиной 1, 2 или 3 мм, задающими толщину пластины ПААГ. Стекла плотно вставляют в кассету и герметизируют с помощью прокладок из силиконовой резины. В зазор между стеклами заливают доверху смесь для полимеризации (мономер, катализаторы и буферный раствор) и сразу же между стеклами вставляют специальную гребенку из тефлона. Ее зубцы образуют карманы в геле, в которые впоследствии вносят образцы белка. По окончании полимеризации удаляют одну из герметизирующих прокладок, вынимают из геля гребенку и помещают кассету в прибор для электрофореза. После этого электродные камеры заполняют тем же буферным раствором, который использовали для приготовления ПААГ, а в карманы тонким капилляром, под слой буферного раствора, вносят растворы белков (2–5 мг/мл, в объеме 5–50 мкл) в вышеуказанном буферном растворе с добавлением лидирующего красителя (бромфенолового синего) и глицерина или сахарозы для увеличения плотности (рис. 3.10).

Рис. 3.10. Нанесение образцов на пластину геля для электрофореза

После нанесения образцов белка прибор подключают к источнику тока и проводят электрофорез сначала при силе тока 10–15 мА до входа белковых зон в гель, а затем при силе тока 25–50 мА до завершения электрофореза. После того, как лидирующий краситель достигнет зоны, отстоящей на 1,0–1,5 см от нижней границы пластины, источник питания выключают, сливают электродные буферные растворы и вынимают кассету. Удаляют уплотнительные прокладки, аккуратно отделяют одно стекло от другого и переносят пластину геля в плоскую кювету с раствором для фиксации и окрашивания белков.

Положение белков в геле определяют путем фиксации и окрашивания пластины геля раствором красителя кумасси синего R-250 или G-250 в смеси 50%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты в течение ~30 мин при периодическом встряхивании кюветы для равномерного окрашивания. В процессе фиксации белки денатурируют в том самом месте, где закончилась их миграция в ходе электрофореза. Краситель избирательно окрашивает белки. После окрашивания раствор из кюветы сливают (его можно использовать до 20 раз), а избыток красителя из геля удаляют промыванием смесью 50%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты. В результате гель обесцвечивается, а белковые полосы остаются окрашенными. Пластины геля высушивают между листами целлофана или хранят в 10%-ном растворе уксусной кислоты.

После фиксации и окрашивания геля проводят оценку разделения белков, определяя расстояние, пройденное каждой белковой зоной от стартовой линии. Затем рассчитывают величину относительной (относительно подвижности лидирующего красителя) электрофоретической подвижности  $R_m$  (*relative mobility* – относительная подвижность) белков по формуле

$$R_m = \frac{A}{L}, \quad (3.5)$$

где  $R_m$  – относительная электрофоретическая подвижность белка;  $A$  – расстояние, пройденное белком от стартовой линии, мм;  $L$  – расстояние, пройденное красителем, мм.

**Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях.** Этот метод позволяет исключить влияние собственного заряда белковых молекул на их электрофоретическую подвижность, которая становится зависимой только от размеров молекул (молекулярной массы).

Белки, обработанные анионным детергентом ДСН, в присутствии β-меркаптоэтанола или дитиотреитола диссоциируют на отдельные полипептидные цепи и приобретают избыточный отрицательный заряд

за счет  $\text{SO}_3^-$ -групп молекул ДСН (рис. 3.11). Величина отрицательного заряда комплекса ДСН – полипептид пропорциональна длине полипептидной цепи. Различные белки связывают практически одинаковые количества ДСН на единицу массы (1,4 г/г белка), поэтому отношение  $m/z$  в присутствии ДСН становится фактически одинаковым для всех белков. Электрофоретическая подвижность белков в геле зависит только от их молекулярной массы и не зависит от концентрации ДСН (при условии насыщения ~0,1%), и их разделение происходит благодаря тому, что поры в геле действуют как молекулярные сита. При этом белковые зоны распределяются на электрофоре-

Рис. 3.11. Солюбилизация белков додецилсульфатом натрия

граммах таким образом, что электрофоретическая подвижность белка обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы (рис. 3.12). Данный метод позволяет определять молекулярную массу субъединиц олигомерных белков. Тиолы ( $\beta$ -меркаптоэтанол или дитиотреитол) применяют для восстановления дисульфидных S–S связей белков (как внутри полипептидных цепей, так и между разными цепями), что обеспечивает диссоциацию белков на субъединицы и более полную денатурацию последних под действием ДСН.

При наличии графика зависимости молекулярной массы известных белков (в логарифмической шкале) от величины их электрофоретической подвижности можно определить молекулярную массу исследуемого белка (рис. 3.12).

Электрофоретическое разделение можно проводить двумя методами: методом Вебера и Осборн (непрерывная буферная система в однородном геле) или методом Лэммли (ступенчатая буферная система в однородном геле). В *методе Вебера и Осборн* буферный раствор для приготовления геля и электродный буферный раствор не отличаются друг от друга. В *методе Лэммли* гелевый и электродный буферные растворы отлича-

ются друг от друга по составу и величине рН. Кроме того, в этом методе применяют два типа гелей – концентрирующий (верхний слой) и разделяющий (нижний слой), для приготовления которых также используются различающиеся по составу и величине рН буферные растворы.

Рис. 3.12. Электрофоретическое разделение белков в денатурирующих условиях:  
*a* – электрофореграмма; *б* – калибровочный график

В ступенчатой системе образцы белков предварительно концентрируются в концентрирующем геле, после чего входят в разделяющий гель в виде узких зон. Это способствует более четкому разделению белков. В непрерывной системе предварительное концентрирование исключено и при нанесении образца в большом объеме по завершении электрофореза образуются широкие зоны белков. Однако, если образец наносить в небольшом объеме, результаты в обеих системах будут идентичными.

Подготовку образцов белка осуществляют следующим образом: исследуемые белки растворяют в буферном растворе, затем в растворы белков добавляют додецилсульфат натрия и  $\beta$ -меркаптоэтанол (или дитиотреитол). Образцы выдерживают в течение 5 мин при температуре 90°C. Далее к образцам добавляют глицерин или сахарозу и бромфеноловый синий. Образцы стандартных белков готовят аналогичным образом.

Для приготовления разделяющего геля в зазор между стеклами кассеты сначала заливают раствор мономеров для полимеризации разделяющего геля. На него осторожно наслаивают дистиллированную воду и кассету оставляют в вертикальном положении до полимеризации

геля. Затем воду удаляют шприцем и на поверхность разделяющего геля наносят раствор мономеров для полимеризации концентрирующего геля, в который помещают гребенку. Длина концентрирующего геля обычно составляет 5–10 мм. Дальнейшие операции проводят, как описано в методе электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях, только в электродный буферный раствор катодного отделения добавляют ДСН до концентрации 0,1%. При проведении электрофореза силу тока увеличивают до 25–50 мА после входа белкового препарата в разделяющий гель (метод Лэммли).

Фиксацию и окрашивание геля осуществляют раствором красителя кумасси синего R-250 (G-250) в смеси 50%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты с добавлением 10%-ного изопропанола с двумя сменами раствора через 0,5–1,0 ч. Изопропанол необходим для отмывки геля от ДСН, мешающего связыванию красителя с белками.

Оценку разделения белков проводят путем определения величины относительной электрофоретической подвижности  $R_m$  исследуемых и стандартных белков по формуле (3.5).

При определении молекулярной массы исследуемого белка используют калибровочный график зависимости молекулярной массы (в логарифмической шкале) стандартных белков от величины их относительной электрофоретической подвижности  $R_m$ .

### 3.3. Методы количественного определения белков

Существует много различных методов определения концентрации белка, которые различаются сложностью методик, приборным оснащением и чувствительностью. Среди них выделяют: гравиметрический анализ, метод определения общего азота, аминокислотный анализ, а также колориметрические, спектрофотометрические и флуориметрические методы.

Гравиметрические методы используются редко, поскольку требуют для анализа значительных количеств материала (порядка нескольких десятков миллиграмм).

Аминокислотный анализ предусматривает полный гидролиз исследуемого белка и определение аминокислотного состава гидролизата. Каждая аминокислота может быть легко идентифицирована, если ее количество составляет 5–10 нмоль, а в некоторых случаях – 50–100 пмоль.

Методы аминокислотного анализа и флуориметрии (в белок вводится флуоресцентная метка) являются высокочувствительными методами анализа, однако требуют дорогой аппаратуры. Поэтому наибо-



лее приемлемыми являются метод определения общего азота, а также колориметрические и спектрофотометрические методы.

Определение общего азота по методу Къельдаля основано на том, что удельное содержание азота в большинстве белков практически одинаково (~16%). По количеству определяемого общего азота (общему количеству азотсодержащих соединений), умноженному на пересчетный коэффициент 6,25, находят количество белка в пробе. Органические соединения минерализуют нагреванием с концентрированной серной кислотой в присутствии катализаторов и окислителей, при этом азот переходит в сульфат аммония, который можно определить количественно. Однако этот метод является наименее чувствительным и позволяет установить содержание не истинного белка, а так называемого «сырого протеина».

Наибольшее распространение получили колориметрические и спектрофотометрические методы, а также наиболее чувствительный, но вместе с тем дорогостоящий и трудоемкий аминокислотный анализ.

Колориметрические методы основаны на измерении экстинкции цветных продуктов реакции исследуемого белка с соответствующим реагентом в видимой (340–900 нм) области спектра и сравнении ее с экстинкцией продуктов реакции взаимодействия белка-стандарта с этим же реагентом. Измерения экстинкции проводят в максимуме поглощения цветного продукта реакции с помощью фотоэлектроколориметра или спектрофотометра.

В отличие от колориметрии спектрофотометрические методы позволяют осуществлять измерения экстинкции растворов как в видимой, так и в ультрафиолетовой (200–340 нм) областях спектра с применением монохроматического излучения определенной длины волны. Спектрофотометрические методы определения концентрации белка в УФ-области спектра можно рассматривать как методы неразрушающего контроля.

Колориметрические и спектрофотометрические методы достаточно просты, но ни один из них (особенно колориметрический) не может гарантировать получение корректных результатов для всех белков. Ошибки в результатах чаще всего обусловлены тем, что исследуемый белок по своей природе резко отличается от белка-стандарта. В некоторых случаях сказывается наличие загрязнений (детергентов, липидов и др.), внесенных в белок в процессе его выделения.

При определении концентрации белка на точность анализа могут влиять различные низкомолекулярные примеси или компоненты буферных растворов (органические кислоты и основания, растворите-

ли, некоторые минеральные кислоты, детергенты, соли в высоких концентрациях и т. д.), поэтому, если в растворах белков присутствуют перечисленные вещества, необходима предварительная подготовка проб к анализу. Наиболее простым и дешевым методом подготовки проб является диализ растворов белков.

### 3.3.1. Колориметрия и спектрофотометрия

Свет представляет собой электромагнитные волны, распространяющиеся в вакууме со скоростью  $3 \cdot 10^8$  м/с. Согласно квантовой механике, свет – это поток частиц, называемых *квантами*, или *фотонами*. Энергия каждого кванта определяется длиной волны излучения.

В основном энергетическом состоянии электроны в атоме занимают самые нижние энергетические уровни. При поглощении кванта света электрон переходит из основного состояния в возбужденное, характеризующееся более высоким энергетическим уровнем. При этом энергия кванта света точно соответствует разности определенных энергетических уровней. Переход электрона обратно из возбужденного состояния в основное сопровождается испусканием кванта света соответствующей длины волны (флуоресценция). В молекулах, как и в атомах, переход электрона с одного энергетического уровня на другой сопровождается поглощением или испусканием кванта энергии, которую можно выразить следующим образом:

$$\Delta E = E - E_0 = h\nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (3.6)$$

где  $\Delta E$  – поглощенная или излученная молекулой энергия, Дж;  $E$  – конечная энергия электрона (энергия возбужденного состояния электрона), Дж;  $E_0$  – первоначальная энергия электрона (энергия основного состояния электрона), Дж;  $h$  – постоянная Планка, равная  $6,63 \cdot 10^{-34}$  Дж · с;  $\nu$  – частота колебаний,  $\text{с}^{-1}$ ;  $c$  – скорость света, м/с;  $\lambda$  – длина волны излучения, нм.

Единицей измерения длин волн в ультрафиолетовой и видимой областях спектра служит 1 нм ( $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м}$ ). Для характеристики инфракрасного (ИК) излучения используют волновое число  $\nu'$ , т. е. число волн, проходящих на 1 см длины светового луча:

$$\nu' = \frac{1}{\lambda}, \quad (3.7)$$

где  $\nu'$  – волновое число,  $\text{см}^{-1}$ ;  $\lambda$  – длина волны излучения, нм.

Многие органические соединения (каждое вещество) способны к избирательному поглощению электромагнитного излучения строго определенной частоты. Характер и величина поглощения зависят от природы вещества, его концентрации в растворе и толщины слоя.

При прохождении луча света интенсивностью  $I_0$  через раствор часть света поглощается молекулами растворенного вещества, часть отражается, часть рассеивается. В связи с этим интенсивность света на выходе из раствора  $I$  уменьшается. Соотношение  $I_0$  и  $I$  зависит от длины оптического пути  $l$  и концентрации поглощающего свет раствора  $C$ . Эта линейная зависимость выражается основным законом колориметрии – законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$\lg \frac{I_0}{I} = E = \varepsilon Cl, \quad (3.8)$$

где  $I_0$  – интенсивность падающего света;  $I$  – интенсивность прошедшего света;  $E$  – поглощение или экстинкция раствора;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции поглощающего свет вещества при длине волны  $\lambda$ ,  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ;  $C$  – молярная концентрация раствора,  $M$ ;  $l$  – длина светового пути или толщина слоя раствора (кюветы),  $cm$ .

Экстинкция – величина безразмерная и изменяется в пределах от 0 до  $\infty$ . Наиболее точно величину  $E$  удастся измерить в том случае, если она лежит в интервале от 0,1 до 2,0. При  $E < 0,1$  образец поглощает лишь ничтожную долю падающего света, если же  $E$  превышает 2,0, это означает, что на детектор падает очень мало света.

Физический смысл коэффициента молярной экстинкции состоит в том, что он показывает экстинкцию раствора вещества с концентрацией 1  $M$  в кювете толщиной 1  $cm$  и служит мерой интенсивности поглощения света данным веществом. Коэффициент молярной экстинкции – это характеристика каждого индивидуального вещества, зависящая от природы вещества и длины волны поглощаемого света. Значения  $\varepsilon$  варьируют от 1 до  $10^5 M^{-1} \cdot cm^{-1}$  и более.

Для белков, не содержащих простетических групп (гема, ионов металлов), вместо коэффициента молярной экстинкции пользуются величиной удельной экстинкции  $E^{1\%}$ , представляющей собой поглощение света 1%-ным раствором вещества:

$$E = E^{1\%} C, \quad (3.9)$$

где  $E$  – экстинкция раствора исследуемого белка;  $E^{1\%}$  – экстинкция 1%-ного раствора стандартного белка;  $C$  – концентрация раствора исследуемого белка, %.

Для определения концентрации исследуемого белка в растворе измеряют экстинкцию 1%-ного раствора белка-стандарта и раствора исследуемого белка и находят отношение  $E / E^{1\%}$ .

При измерении поглощения белка при 280 нм основной вклад в это поглощение вносят боковые цепи двух ароматических аминокислот – тирозина и триптофана (при условии, что белки не содержат простетических групп). Поскольку содержание этих двух аминокислот в белках сильно варьирует, то коэффициент экстинкции  $E_{280}^{1\%}$  также изменяется в широких пределах. Для индивидуальных белков он лежит в интервале 0,4–1,5 (в кюветах толщиной 1 см). Но есть и исключения, например парвальбумины и  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки имеют  $E_{280}^{1\%} = 0$ , а для лизоцима –  $E_{280}^{1\%} = 2,7$ . Вместе с тем, если белок выделяют из биологического материала и он представляет собой смесь индивидуальных белков, для них принято считать  $E_{280}^{1\%} = 1,0$ .

Величину  $T = \lg(1/E) = \lg(I/I_0)$  называют пропусканием. Она измеряется в процентах и изменяется в пределах от 0 до 100%. В этом случае  $E = 2 - \lg T$ .

Закон Бугера – Ламберта – Бера применим не для всех систем. Отклонения от него возможны в тех случаях, когда: 1) молекулы могут существовать в различных таутомерных формах (например, в случае кетонольной таутомерии); 2) молекулы вещества взаимодействуют друг с другом или с молекулами растворителя, например, с образованием водородной связи; 3) при очень высоких концентрациях растворов веществ.

Молекулы веществ поглощают свет в широком диапазоне длин волн. **Спектр поглощения** представляет собой зависимость количества поглощенного молекулой вещества света от длины волны излучения. Взаимодействуя с молекулой вещества, свет вызывает возбуждение энергетических уровней, которые сильно различаются по величине энергии. В соответствии с уровнем энергии поглощаемого кванта спектры поглощения делят на вращательные, колебательные и электронные.

Вращательные и колебательные спектры поглощения обусловлены изменением энергии колебательных и вращательных уровней молекулы, связанных с изменением длин связей и углов между атомами. Вращательные спектры находятся в дальней ИК-области ( $\nu' < 100 \text{ см}^{-1}$ ), колебательные – в ИК-области ( $\nu' = 100\text{--}4000 \text{ см}^{-1}$ ).

Электронные спектры поглощения вызваны переходом электронов внешних оболочек атомов с одного энергетического уровня на другой более высокий энергетический уровень при поглощении квантов света (электронными переходами молекул из основного в возбужденное состояние). Поглощение излучения происходит в том случае,

если квант света соответствует разности между двумя энергетическими уровнями. Мерой разности энергий двух состояний служит длина волны света или частота, при которой наблюдается максимальное поглощение. Электронные спектры поглощения, имеющие наибольшую энергию, расположены в УФ-области спектра, в которой поглощают все органические соединения.

Поглощение называется *характеристическим*, если оно вызывается определенной группой атомов в молекуле вещества, причем характер поглощения мало меняется с изменением остальной части молекулы. Такие группы атомов называются *хромофорными*. Структура хромофора определяет энергию поглощаемого кванта. Основными хромофорами, поглощающими в области 200–800 нм, являются сопряженные двойные связи, карбонильные группы, ароматические и гетероциклические системы. Отсутствие в спектре вещества максимума поглощения свидетельствует об отсутствии в его структуре хромофорных групп.

Спектры поглощения собственных хромофорных групп белковых молекул (пептидной связи и боковых радикалов аминокислотных остатков) лежат в УФ-области. В видимой области спектра свет поглощают белки, содержащие простетическую группу (гем, ионы металлов).

Белковую молекулу в спектральном отношении можно рассматривать как сложную систему различных по структуре и свойствам хромофоров. Спектр поглощения белка – это сумма спектров составляющих белок хромофорных групп. Наиболее изучены область поглощения пептидной связи – 190–200 нм (однако в большинстве белков значительный вклад в поглощение белка при этих длинах волн вносят боковые аминокислотные остатки) и область 280 нм, в которой спектр поглощения белка определяется поглощением света ароматическими аминокислотами – тирозином и триптофаном. Последнее свойство используют для количественного определения белка, поскольку никакие другие аминокислоты не дают заметного вклада в поглощение при 280 нм.

Сущность метода *электронной спектрофотометрии* состоит в том, что экстинкцию исследуемых растворов измеряют по отношению к раствору сравнения, в качестве которого используется чистый растворитель с нулевым поглощением, не содержащий исследуемого вещества.

Как указывалось выше, спектры поглощения органических веществ являются характеристическими, так как поглощение определяется только хромофором и его ближайшим окружением. Один и тот же хромофор проявляется практически одинаково в различных молекулах. В зависимости от взаимодействий хромофорной группы с другими группами в молекуле вещества и молекулами растворителя

положение максимума поглощения в спектрах различных соединений может изменяться. Сдвиг максимума поглощения может происходить как в сторону более длинных, так и в сторону более коротких волн.

Для облегчения анализа спектров поглощения используется **дифференциальная, или относительная, спектрофотометрия**. Она применяется при определении высоких концентраций веществ и обладает повышенной точностью анализа по сравнению с обычной спектрофотометрией (величина относительной ошибки снижается до десятых долей процента). Под дифференциальными понимают разностные спектры, получаемые при сравнении двух образцов (автоматическом вычитании одного абсолютного спектра поглощения из другого). Если дифференциальный спектр образуется за счет сдвига спектра поглощения, то в первом приближении форма его соответствует первой производной спектра поглощения, а интенсивность пропорциональна спектральному сдвигу. При этом измерение последнего можно заменить измерением разницы экстинкций в дифференциальном спектре с гораздо большей точностью.

Сущность метода дифференциальной спектрофотометрии состоит в том, что экстинкцию исследуемых (анализируемых) растворов измеряют не по отношению к чистому растворителю с нулевым поглощением, а по отношению к раствору сравнения, содержащему определяемое вещество в концентрации  $C_0$ , близкой к концентрации этого вещества в исследуемом (анализируемом) растворе  $C_x$ . В основе метода дифференциальной спектрофотометрии лежит пропорциональная зависимость разности экстинкций исследуемого раствора  $E_x$  и раствора сравнения  $E_0$  от разности концентраций соответствующих растворов  $C_x - C_0$ . Причем значение относительной экстинкции  $E_{\text{отн}} = E_x - E_0$  может быть как положительным, так и отрицательным: если концентрация раствора сравнения меньше концентрации исследуемого раствора ( $C_0 < C_x$ ), тогда  $E_x > E_0$  и  $E_{\text{отн}} > 0$ , и наоборот. В связи с тем, что на шкале экстинкции нет отрицательных значений, порядок измерений изменяют: нуль прибора устанавливают при прохождении светового потока через исследуемый раствор с концентрацией  $C_x$ , а компенсацию проводят против раствора сравнения с концентрацией  $C_0$ . При этом отсчет по шкале экстинкции производят как обычно, но экстинкцию условно считают отрицательной.

Существует также метод двухстороннего фотометрирования, когда с одним и тем же раствором сравнения производят измерение экстинкций исследуемых растворов с  $C_x > C_0$  и  $C_x < C_0$ . Графически зависимость экстинкции растворов от их концентрации выражается прямой линией, пересекающей ось абсцисс в точке, соответствующей концентрации раствора сравнения  $C_0$ .

В методе дифференциальной спектрофотометрии концентрацию веществ определяют при помощи калибровочного графика ( $E = f(C)$ ) или расчетным путем. Для построения калибровочного графика измеряют значения экстинкции серии стандартных растворов с возрастающей концентрацией по отношению к раствору сравнения с точной концентрацией определяемого вещества  $C_0$ . В случае, когда  $C_0 > C_x$ , анализируемые растворы условно принимают за растворы сравнения, по отношению к которым измеряют экстинкцию раствора сравнения.

Применение дифференциальных спектров при исследовании белков позволяет обнаруживать малые изменения положения полос поглощения, их формы и интенсивности. Типичный дифференциальный спектр белка содержит максимумы, присущие ароматическим аминокислотам – тирозину при 286–289 нм и триптофану при 292–295 нм. Вклад фенилаланина ввиду низкого коэффициента экстинкции заметен в очень редких случаях.

При исследовании ферментов дыхательной цепи термином «дифференциальный спектр» обозначают разностный спектр восстановленных и окисленных форм фермента. Например, разностный спектр цитохрома *c* представляет собой разницу в поглощении его восстановленной и окисленной форм.

Ниже описаны колориметрические (биуретовый метод, методы Лоури, Бредфорда) и спектрофотометрический (метод Варбурга и Христиана) методы количественного определения белка.

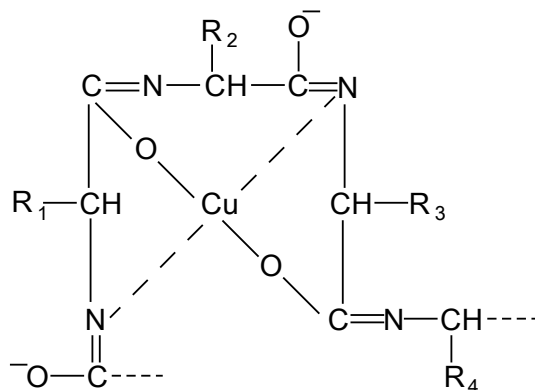
**Колориметрический анализ** проводят путем сравнения экстинкции раствора исследуемого белка с экстинкцией растворов белка-стандарта с возрастающей концентрацией. При этом учитывают границы чувствительности конкретного метода. Для получения точных результатов измерения лучше проводить в интервале значений экстинкции  $\theta_{\text{ДБ}}$  (если нет крайней необходимости работать при поглощении, близком к 1,0). Это связано с тем, что шкала экстинкции логарифмическая. Данное обстоятельство следует учитывать при выборе толщины кюветы.

Результаты колориметрирования растворов белка-стандарта оформляют в виде калибровочного графика зависимости экстинкции растворов от их концентрации  $E = f(C)$ , с помощью которого затем определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

Метод прямого **спектрофотометрического** (в УФ-области спектра) **определения** концентрации белка в растворе основан на линейной зависимости между экстинкцией раствора и концентрацией белка в растворе (уравнение (3.8)).

### 3.3.2. Биуретовый метод

Метод основан на специфической реакции пептидной связи с ионами меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) в щелочной среде. Четыре пептидные связи образуют комплекс с одним атомом меди, окрашенный в сине-фиолетовый цвет. Интенсивность сине-фиолетового окрашивания пропорциональна концентрации белка и зависит от количества пептидных связей в молекуле белка:



В связи с тем, что на биуретовую реакцию не оказывает влияния присутствие ароматических аминокислот и фенолов, метод считается самым специфичным, достаточно точным и отличается легким выполнением.

Существуют две разновидности этого метода.

#### 1. Биуретовый метод.

**Методика.** К 0,3 мл раствора белка добавляют 3 мл биуретового реактива, инкубируют при  $60^\circ\text{C}$  в течение 5 мин и измеряют экстинкцию раствора при 545 нм в кюветах ( $l = 0,5$  см) на фотоэлектрокolorиметре против контрольной пробы (вместо раствора белка берут дистиллированную воду, биуретовый реактив добавляют в том же объеме и смесь выдерживают такое же время). Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Концентрацию белка в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику зависимости экстинкции от концентрации, предварительно построенному для растворов белка-стандарта.

Для построения калибровочного графика готовят растворы белка-стандарта с возрастающей концентрацией. Затем с каждым из растворов проводят цветную реакцию по вышеуказанной методике и измеряют величину экстинкции окрашенных растворов при 545 нм против контрольной пробы. Строят калибровочный график зависимости  $E_{545}$  от концентрации белка в растворе.



Следует помнить, что при каждой смене реактивов необходимо заново строить калибровочный график.

#### Р е а к т и в ы .

1. Биуретовый реактив: растворяют 3,9 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 6,7 г ди-натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты в 700 мл дистиллированной воды, добавляют при постоянном перемешивании 200 мл 20%-ного раствора едкого натра до конечного объема 900 мл.

2. Раствор белка-стандарта: готовят раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 1000 мкг/мл (50 мг БСА растворяют в 50 мл дистиллированной воды), затем проводят разбавление этого раствора, как указано в табл. 3.1.

Таблица 3.1

**Разведение раствора белка-стандарта для биуретового метода**

Номер пробы	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем дистиллированной воды, мл
1	100	0,5	4,50
2	200	0,5	2,00
3	300	1,0	2,33
4	400	1,0	1,50
5	500	1,0	1,00
6	600	1,0	0,67
7	700	2,0	0,86
8	800	2,0	0,50
9	900	2,0	0,22
10	1000	1,0	0,00

#### **2. Микробиуретовый метод.**

**М е т о д и к а .** К 2 мл раствора белка добавляют 1 мл раствора А, содержимое тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 мин. Затем измеряют экстинкцию раствора при 310 нм в четырехкюветной системе в кварцевых кюветах ( $l = 1$  см) на двухлучевом спектрофотометре. При этом готовят следующие смеси:

$X_1$  – 2 мл раствора белка + 1 мл раствора А;

$X_2$  – 2 мл дистиллированной воды + 1 мл раствора А;

$Y_1$  – 2 мл раствора белка + 1 мл раствора В;

$Y_2$  – 2 мл дистиллированной воды + 1 мл раствора В.

В измерительный канал помещают растворы  $X_1$  и  $Y_1$ , а в канал сравнения – растворы  $X_2$  и  $Y_2$ .

Экстинкция белка равна  $(X_1 - X_2) - (Y_1 - Y_2)$ .

Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Концентрацию белка в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику, предварительно построенному для растворов белка-стандарта.

**Р е а к т и в ы .**

1. Раствор А – 0,21%-ный раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 30%-ном растворе  $\text{NaOH}$ . Чтобы предотвратить образование осадка гидроксида меди, этот раствор готовят следующим образом: 21 мл 1%-ного водного раствора  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  добавляют к 75 мл 40%-ного раствора  $\text{NaOH}$ , затем разбавляют водой до 100 мл.

2. Раствор В – 30%-ный раствор  $\text{NaOH}$ .

3. Раствор белка-стандарта: готовят раствор БСА с концентрацией 200 мкг/мл (10 мг БСА растворяют в 50 мл 30%-ного раствора  $\text{NaOH}$ ), затем проводят разбавление этого раствора, как указано в табл. 3.2.

Таблица 3.2

**Разведение раствора белка-стандарта для биуретового метода**

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем 30%-ного раствора $\text{NaOH}$ , мл
1	10	0,5	9,50
2	20	0,5	4,50
3	30	0,5	2,80
4	40	0,5	2,00
5	50	1,0	3,00
6	60	1,0	2,30
7	70	1,0	1,85
8	80	1,0	1,50
9	90	1,0	1,20
10	100	1,0	1,00

### 3.3.3. Метод Лоури

Метод основан на двух реакциях – биуретовой реакции с пептидными связями и реакции ароматических боковых цепей аминокислот с реактивом Фолина – Чикольте (фенольным реагентом). В результате реакции образуются продукты восстановления фосфорномолибденового-фосфорновольфрамового реагента медно-белковым комплексом, окрашенные в сине-фиолетовый цвет. Интенсивность окраски пропорцио-

нальна концентрации белка. Образующееся окрашивание обусловлено присутствием в белке главным образом остатков тирозина, но определенный вклад вносят и остатки триптофана, гистидина и цистеина.

Определению белка данным методом мешают детергенты, соли аммония и большие количества фосфата.

**Методика.** К 0,4 мл раствора белка приливают 3 мл раствора С и оставляют на 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 0,2 мл раствора Е, тщательно перемешивают и через 30 мин измеряют величину экстинкции раствора при 750 нм в кюветах ( $l = 0,5$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы (вместо раствора белка берут 0,1 н. раствор NaOH, остальные растворы вносят в тех же объемах и смесь выдерживают такое же время). Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Концентрацию белка в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику, предварительно построенному для растворов белка-стандарта.

**Р е а к т и в ы .**

1. Раствор А – 2%-ный раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0,1 н. растворе NaOH.

2. Раствор В – 0,5%-ный раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 1%-ном растворе цитрата натрия.

3. Раствор С (готовится непосредственно перед работой): к 50 мл раствора А приливают 1 мл раствора В.

4. Раствор Д – 2 н. реактив Фолина – Чикольте (коммерческий препарат).

5. Раствор Е (готовят перед использованием): 2 н. реактив Фолина – Чикольте разбавляют дистиллированной водой до концентрации 1 н.

6. Раствор белка-стандарта: готовят раствор БСА с концентрацией 200 мкг/мл (10 мг БСА растворяют в 50 мл 0,1 н. раствора NaOH), затем проводят разбавление этого раствора, как указано в табл. 3.3.

Таблица 3.3

**Разведение раствора белка-стандарта для метода Лоури**

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем 0,1 н. раствора NaOH, мл
1	10	0,5	9,50
2	20	0,5	4,50
3	30	0,5	2,80
4	40	0,5	2,00

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем 0,1 н. раствора NaOH, мл
5	50	1,0	3,00
6	60	1,0	2,30
7	70	1,0	1,85
8	80	1,0	1,50
9	90	1,0	1,20
10	100	1,0	1,00

### 3.3.4. Метод Бредфорда

Метод основан на специфическом связывании красителя кумасси бриллиантового голубого G-250 с белком. При этом образуется окрашенный в синий цвет комплекс, имеющий максимум поглощения при 595 нм.

Достоинства метода заключаются в быстроте анализа и хорошей воспроизводимости результатов. Метод Бредфорда неприменим в щелочной среде, но, в отличие от метода Лоури, позволяет использовать фосфатные буферные растворы.

**Методика.** К 0,15 мл раствора белка приливают 2,5 мл раствора красителя и тщательно перемешивают. Измеряют экстинкцию раствора при 595 нм в кюветах ( $l = 0,5$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы (0,15 мл дистиллированной воды + 2,5 мл раствора красителя). Измерения проводят не позднее чем через час после смешивания растворов белка и красителя. Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Концентрацию белка в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику, предварительно построенному для растворов белка-стандарта.

#### Р е а к т и в ы .

1. Раствор красителя: растворяют 50 мг кумасси бриллиантового голубого G-250 в 25 мл 96%-ного этанола, затем к раствору приливают 50 мл 85%-ной  $H_3PO_4$  и доводят объем до 500 мл дистиллированной водой, фильтруют. Раствор хранят в холодильнике, а перед работой нагревают до комнатной температуры и тщательно перемешивают.

2. Раствор белка-стандарта: готовят раствор БСА с концентрацией 200 мкг/мл (10 мг БСА растворяют в 50 мл дистиллированной воды), затем проводят разбавление этого раствора, как указано в табл. 3.4.

Таблица 3.4

**Разведение раствора белка-стандарта для метода Бредфорда**

Номер пробирки	Концентрация белка, мкг/мл	Объем раствора белка-стандарта, мл	Объем дистиллированной воды, мл
1	10	0,5	9,50
2	20	0,5	4,50
3	30	0,5	2,80
4	40	0,5	2,00
5	50	1,0	3,00
6	60	1,0	2,30
7	70	1,0	1,85
8	80	1,0	1,50
9	90	1,0	1,20
10	100	1,0	1,00

**3.3.5. Метод Варбурга и Христиана**

Метод основан на определении соотношения величин поглощения раствора белка при 280 и 260 нм и позволяет определять белок в присутствии нуклеиновых кислот. Большинство белков имеет в спектре максимум поглощения при 280 нм, что обусловлено содержанием в них остатков триптофана и тирозина. Нуклеиновые кислоты, присутствующие часто в виде примесей к белкам, также обладают сильным поглощением при 280 нм, но максимум поглощения этих соединений находится при 260 нм. Поскольку содержание триптофана и тирозина в белках очень сильно варьирует, величина удельной экстинкции  $E_{280}^{1\%}$  (или  $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$ ) также изменяется в значительной степени. У большинства белков величина  $E_{280}^{1 \text{ мг/мл}}$  лежит в интервале 0,4-1,5. А. Варбург и К. Христиан экспериментально определили значения экстинкции различных белков и нуклеиновых кислот при 280 и 260 нм и рассчитали их соотношения (фактор  $F$ ) (табл. 3.5). Это самый простой метод определения концентрации белков.

Таблица 3.5

**Взаимосвязь отношения экстинкции  $E_{280} / E_{260}$  и фактора  $F$  с содержанием нуклеиновых кислот в выделенной из биологического материала белковой фракции**

$E_{280} / E_{260}$	Нуклеиновая кислота, %	$F$
1,750	0,00	1,116
1,630	0,25	1,081
1,520	0,50	1,054
1,400	0,75	1,023

$E_{280} / E_{260}$	Нуклеиновая кислота, %	$F$
1,360	1,00	0,994
1,300	1,25	0,970
1,250	1,50	0,944
1,160	2,00	0,899
1,090	2,50	0,852
1,030	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

**Методика.** Измеряют экстинкцию исследуемого белкового раствора при 280 и 260 нм в кварцевых кюветах ( $l = 1$  см) на спектрофотометре против холостой пробы (дистиллированной воды). Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Вычисляют отношение полученных величин, по табл. 3.5 находят соответствующее значение  $F$  и определяют концентрацию белка по следующей формуле:

$$C_{\text{белка}} = \frac{F}{lE_{280}}, \quad (3.10)$$

где  $C_{\text{белка}}$  – концентрация белка, мг/мл;  $F$  – фактор;  $l$  – толщина кюветы, см;  $E_{280}$  – экстинкция раствора при 280 нм.

При невозможности рассчитать концентрацию белка через фактор  $F$ , используют формулу

$$C_{\text{белка}} E_{280} = 1,55 E_{260} - 0,76 \quad (3.11)$$

где  $C_{\text{белка}}$  – концентрация белка, мг/мл;  $E_{280}$  – экстинкция раствора при 280 нм;  $E_{260}$  – экстинкция раствора при 260 нм.

Сравнительный анализ различных методов количественного определения белка представлен в табл. 3.6.

Таблица 3.6

**Сравнительный анализ методов количественного определения белка**

Название метода, его чувствительность	Влияние химических реагентов	Вариации от белка к белку	Методика выполнения (быстрота, сложность)
Метод Бредфорда (1 мкг/мл)	Незначительное	Существенные	Быстрая, простая (один реагент)
Метод Лоури (1 мкг/мл)	Значительное	»	Средняя, средняя
Биуретовый метод (100 мкг/мл)	Умеренное	Незначительные	Средняя, простая
Метод Къельдаля (1 мкг/мл)	»	»	Медленная, сложная
Метод Варбурга и Христиана (10 мкг/мл)	»	Существенные	Быстрая, простая

### **Лабораторная работа ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ**

**Цель работы** – освоение методов выделения белков из биологического материала и их очистки, а также методов определения количества белка.

**Реактивы, материалы и оборудование:** зеленый горошек; дистиллированная вода; оксид алюминия; 0,01 М *трис*-глициновый буферный раствор (рН 8,3); 0,01 М *трис*-глициновый буферный раствор (рН 8,3), содержащий 0,1% тритона X-100 и  $1 \cdot 10^{-3}$  М дитиотреитола; насыщенный

(100%-ный) раствор сульфата аммония; сульфат аммония; физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl); физиологический раствор, содержащий 0,1% тритона X-100 и  $1 \cdot 10^{-3}$  М дитиотреитола; реактивы для количественного определения белка биуретовым методом, методами Лоури, Бредфорда; шпатели; фильтровальная бумага; ступки; стеклянные палочки; центрифужные пробирки; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; химически чистые пробирки, колбы на 50 мл; мерные цилиндры на 25, 50 мл; целлофан; химический стакан на 1 л; кюветы для фотоэлектроколориметра и спектрофотометра; штативы для пробирок; электронные весы; центрифуга; ультратермостат; фотоэлектроколориметр; спектрофотометр.

### **Выполнение работы**

#### **1. Выделение нативных белков из растительного материала и их очистка от низкомолекулярных соединений**

**Гомогенизация биологического материала и экстракция белков.** Небольшое количество (~5 г) зеленого горошка промывают дистиллированной водой, обсушивают с помощью фильтровальной бумаги, взвешивают и затем растирают в фарфоровой ступке с 3 г окиси алюминия ( $Al_2O_3$ ), добавляя порциями по 10-15 мл 0,01 М *трис*-глицинового буферного раствора (рН 8,3) до консистенции густой сметаны, в течение 10 мин. После этого гомогенат периодически перемешивают на протяжении 30 мин при комнатной температуре. Затем гомогенат центрифугируют при  $5000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 10 мин. Супернатант сливают в колбу, а осадок ресуспендируют в 5 мл 0,01 М *трис*-глицинового буферного раствора, выдерживают 15 мин и центрифугируют при тех же параметрах. Оба супернатанта объединяют и измеряют полученный объем. Это экстракт *легкорастворимых белков*.

Для экстракции *труднорастворимых белков* осадок, полученный после второго центрифугирования, ресуспендируют в 10 мл 0,01 М *трис*-глицинового буферного раствора (рН 8,3), содержащего 0,1% тритона X-100 и  $1 \cdot 10^{-3}$  М дитиотреитола, выдерживают 15 мин и центрифугируют при  $5000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 10 мин. Процедуру повторяют еще раз. Супернатанты объединяют и измеряют полученный объем.

**Высаливание белков.** Экстракты легко- и труднорастворимых белков предварительно охлаждают в холодильнике. 5 мл белкового раствора смешивают с равным объемом насыщенного (100%-ного) рас-



творы сульфата аммония, перемешивают и оставляют на 10 мин. Затем к раствору маленькими порциями при перемешивании добавляют сухой, мелко растертый в ступке порошок сульфата аммония до 80%-ного насыщения (уравнение (3.12) или таблица в приложении), причем каждую последующую порцию вносят после растворения предыдущей. После растворения последней порции сульфата аммония смесь оставляют на 10 мин, после чего осадок белков отделяют центрифугированием при  $12\ 000\ \text{мин}^{-1}$  в течение 20 мин. Супернатант замораживают. Осадок белков растворяют в 25 мл физиологического раствора, с содержащего 0,1% тритона X-100 и  $1 \cdot 10^{-3}$  М дитиотреитола.

Количество сульфата аммония в граммах, которое нужно добавить к 1 л раствора при  $20^\circ\text{C}$ , чтобы из раствора с насыщением  $S_1$  получить раствор с насыщением  $S_2$ , рассчитывают по формуле

$$CA = \frac{533 (S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}, \quad (3.12)$$

где CA – количество сульфата аммония (твердого), г;  $S_2$  – требуемая степень насыщения раствора, %;  $S_1$  – исходная степень насыщения раствора, %.

В данном случае принимают, что раствор сульфата аммония 100%-ного насыщения соответствует 4,05 М раствору.

**Диализ белковых растворов.** Белковые растворы, полученные на предыдущей стадии, переносят в целлофановые мешочки, которые завязывают и помещают в стакан с 1 л физиологического раствора таким образом, чтобы уровни жидкости в мешочках и стакане совпадали. Диализ проводят в холодильнике в течение суток. После этого диализованные белковые растворы замораживают.

## 2. Количественное определение белка в растворах

Растворы белков после диализа, а также супернатанты, оставшиеся после высаливания белков, размораживают, в случае наличия возможного осадка центрифугируют при  $12\ 000\ \text{мин}^{-1}$  в течение 10 мин, затем разбавляют в требуемое количество раз и определяют в них концентрацию белка биуретовым методом, методами Лоури, Бредфорда, Варбурга и Христиана. Сравнивают результаты количественного определения белка разными методами. Делают вывод о степени осаждения белков методом высаливания.

Затем рассчитывают содержание белка в биологическом материале с учетом разведений.

## Вопросы для самоконтроля

1. Чем определяется растворимость белков в различных растворителях? Какие факторы стабилизируют белки в растворе?
2. Перечислите этапы выделения и очистки индивидуальных белков. Какие особенности белков следует при этом учитывать?
3. Для чего предназначена стадия гомогенизации биологического материала?
4. Какие растворы называют буферными и почему их используют для солиubilизации и/или экстракции белков? С какой целью в буферные растворы добавляют детергенты, тиолы и глицерин?
5. Назовите общие принципы осаждения белка из раствора.
6. Какими способами можно осадить белки из раствора, не вызывая их денатурации? Дайте характеристику каждого из способов.
7. Что такое изоэлектрическая точка белка? Как изменяется растворимость белков вблизи изоэлектрической точки?
8. С какой целью используют методы необратимого осаждения белков? Перечислите их.
9. Какие методы применяют для освобождения белковых растворов от низкомолекулярных соединений? На чем они основаны?
10. Расскажите, какие методы используют для выделения индивидуального белка из обогащенной фракции и на различиях каких физико-химических свойств белков они основаны.
11. От чего зависит скорость осаждения белков при ультрацентрифугировании и какой величиной она выражается?
12. Что такое хроматография? Каким образом осуществляется разделение смеси веществ на индивидуальные компоненты, чем обеспечивается эффективность разделения?
13. Приведите классификации хроматографических методов.
14. Объясните принципы гель-фильтрации, адсорбционной, ионообменной и аффинной хроматографии. Что служит неподвижной и подвижной фазами в каждом случае?
15. С помощью какого метода определяют гомогенность выделенного белка? Объясните принцип метода.
16. Перечислите факторы, влияющие на электрофоретическую подвижность белков.
17. Что собой представляет полиакриламидный гель, как его готовят для работы? Каким образом оценивают результаты электрофореза в ПААГ?

18. С помощью каких методов и каким образом можно определить молекулярную массу исследуемого белка?
19. Какие методы применяют для количественного определения белков и чем они различаются?
20. В чем состоит суть основного закона колориметрии?
21. В каких случаях пользуются величиной удельной экстинкции  $E^{1\%}$  и что она собой представляет?
22. Какое поглощение называется характеристическим?
23. Назовите аминокислоты белков, которые имеют максимум поглощения при 280 нм. Как это свойство используется в лабораторной практике?
24. Дайте характеристику методов электронной и дифференциальной спектрофотометрии.
25. Объясните принципы колориметрических методов количественного определения белка.

## Глава 4. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

### 4.1. Особенности организации и функционирования ферментов. Закономерности ферментативного катализа

Реакции, протекающие в живых организмах, подчиняются общим законам химии, однако отличаются высокой специфичностью и отсутствием побочных продуктов. Эта особенность определяется свойствами ферментов. **Ферменты** (энзимы) – это специфические высокоэффективные белковые катализаторы химических реакций. Большинство клеточных реакций осуществляется с участием ферментов. Обмен веществ в клетках был бы невозможен без резкого ускорения химических реакций, без согласования во времени и пространстве множества биохимических процессов, т. е. без участия ферментов. Одна клетка может содержать до 1000 различных ферментов. В настоящее время известны функции более 2000 ферментов, из которых для нескольких сотен определена аминокислотная последовательность и пространственная структура.

**Свойства ферментов.** Как и другие химические катализаторы, ферменты:

- увеличивают скорость реакции, но не расходуются в ходе процесса и не претерпевают необратимых изменений;
- не смещают равновесие химической реакции, ускоряя как прямую, так и обратную реакцию в равной степени;
- повышают скорость реакции, снижая энергию активации, т. е. тот энергетический барьер, который требуется преодолеть для осуществления реакции.

Ферменты отличаются от химических катализаторов следующими *свойствами*:

1) высокой эффективностью действия – ферментативный катализ ускоряет протекание химических реакций в  $10^6$ – $10^{14}$  раз;

2) высокой специфичностью действия – способностью связываться с определенным субстратом и катализировать реакцию определенного типа;

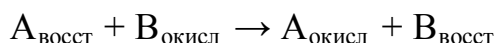
3) «мягкими» условиями протекания ферментативных реакций – нормальное атмосферное давление, температура  $30-40^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} \sim 7$ , водная среда;

4) способностью к регуляции своей активности, которая позволяет клеткам четко координировать осуществление многочисленных

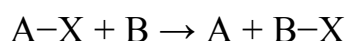
разветвленных метаболических реакций, обеспечивая наиболее высокий и экономный уровень обмена веществ, а также быструю приспособляемость к меняющимся условиям окружающей среды.

**Классификация ферментов.** Поскольку для ферментов характерна специфичность действия, их классифицируют по типу реакции, подвергающейся катализу. Согласно принятой в настоящее время классификации, ферменты группируют в 6 классов.

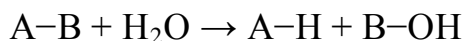
1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции):



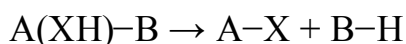
2. Трансферазы (реакции переноса функциональных групп между субстратами):



3. Гидролазы (реакции гидролиза, акцептором переносимой группы является молекула воды):



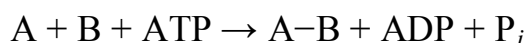
4. Лиазы (реакции отщепления групп от субстрата негидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения групп по двойным связям):



5. Изомеразы (реакции изомеризации):



6. Лигазы или синтетазы (реакции синтеза за счет энергии расщепления нуклеозидтрифосфатов, чаще АТФ):



Номер соответствующего класса фермента закреплен в его кодовой нумерации (шифре). *Шифр фермента* состоит из четырех разделенных точками чисел, обозначающих класс фермента, подкласс, подподкласс и порядковый номер в данном подподклассе.

*Систематические названия ферментов* образуются путем добавления суффикса **-аза** к названию субстрата, на который воздействует данный фермент (в случае бимолекулярной реакции – к названиям двух субстратов, разделенных знаком деления), либо к названию типа катализируемой реакции. Например, аргиназа (катализирует гидролиз аргинина), алкогольдегидрогеназа (катализирует окисление этанола). После названия фермента в скобках указывают

название органа или организма, из которого был выделен данный фермент. Например, алкогольдегидрогеназа (дрожжи) или алкогольдегидрогеназа (печень крыс).

В некоторых случаях до сих пор сохраняются тривиальные названия ферментов с окончанием **-ин**, не несущие химической информации, например пепсин и трипсин (протеолитические ферменты) и др.

Систематические названия ферментов используются тогда, когда необходима точная идентификация фермента. Многие систематические названия очень громоздки и удобнее пользоваться тривиальными названиями. Например, гексокиназа (тривиальное название) – это АТФ:D-гексозо-6-фосфотрансфераза.

**Особенности структуры ферментов.** Молекулы ферментов характеризуются молекулярными массами от 10 до 1000 кДа и выше, однако большинство ферментов представлено глобулярными белками с молекулярной массой в несколько сотен тысяч дальтон, построенными из субъединиц – протомеров. Ферменты функционируют обычно в составе мультиферментных систем, катализирующих определенные последовательности реакций (продукт реакции, полученный при участии одного фермента, является субстратом для второго фермента и т. д.).

Упаковка субъединиц в *мультимерном* (состоящем из нескольких субъединиц) *белке* осуществляется благодаря взаимодействиям того же типа, что и при образовании четвертичной структуры белка. Среди ферментов-мультимеров преобладают димеры и тетрамеры, менее распространены гексамеры и октамеры и очень редко встречаются тримеры и пентамеры. Например, дрожжевая синтетаза жирных кислот, катализирующая синтез жирных кислот из низкомолекулярных предшественников, представляет собой систему из семи разных ферментов, молекулы которых объединены в прочно связанный комплекс.

Мультимерные ферментные белки могут содержать протомеры нескольких типов, катализирующих одну и ту же реакцию, но различающихся первичной структурой, молекулярной массой, субстратной специфичностью и др. От соотношения протомеров разного типа в мультимере зависят некоторые его физические и химические свойства. Такие различающиеся формы мультимерного фермента называются *изоферментами* (изозимами).

Изоферменты являются продуктами экспрессии разных генов. В виде нескольких изоферментов существует ряд ферментов, причем

они могут встречаться у одного и того же организма и даже внутри одной и той же клетки. Один из основных механизмов образования изоферментов включает объединение разных субъединиц в разной комбинации при образовании активного олигомерного фермента. Например, лактатдегидрогеназа, катализирующая в мышцах обратимую реакцию окисления молочной кислоты, состоит из четырех субъединиц (тетрамер) двух типов (Н и М) и представлена пятью изоферментами – НННН, НННМ, ННММ, НМММ, ММММ. Они отличаются друг от друга активностью, молекулярной массой, электрофоретической подвижностью, локализацией в органах и тканях, чувствительностью к регуляторным веществам. Существование изоферментов позволяет организму изменять их соотношение и регулировать таким образом метаболическую активность.

Изучение структуры молекул ферментов дало возможность выявить ряд закономерностей в их организации. Полипептидная цепь, образующая белковую глобулу, свернута довольно сложным образом. Одни участки этой цепи являются  $\alpha$ -спиралями или же  $\beta$ -структурами, другие принимают нерегулярные, но вполне определенные конформации. Эти структуры, тесно прилегая друг к другу и чередуясь, упаковываются в блоки, обладающие функциональной активностью. На поверхности белковой глобулы находятся в основном полярные группы и заряженные атомы, причем между противоположно заряженными группами иногда образуются ионные связи. Внутренние области белковой глобулы представляют собой неполярную среду, гидрофобное ядро образовано неполярными группами, входящими главным образом в состав алифатических и ароматических боковых цепей аланина, валина, лейцина, изолейцина, метионина, фенилаланина и триптофана. Полярные радикалы аминокислот, имеющие функциональное значение, могут быть также ориентированы внутрь глобулы и ассоциированы друг с другом.

Важнейшей частью фермента является *активный центр*, обычно имеющий форму щели или впадины в глобуле фермента и представляющий собой сложную трехмерную структуру (рис. 4.1). Одни ферменты имеют один, другие – два или более активных центров. В активном центре происходит связывание субстрата и превращение его в продукт. Активный центр почти всегда построен из небольшого количества аминокислотных остатков, которые, как правило, значительно удалены друг от друга в полипептидной цепи. При ее свертывании функциональные группы этих аминокислотных остатков сближаются и формируют активный центр.

Рис. 4.1. Связывание субстрата в активном центре фермента

В активном центре выделяют два участка – связывающий и каталитический. Остатки аминокислот, образующие **связывающий участок**, отвечают за специфическое комплементарное связывание субстрата и образование фермент-субстратного комплекса, обеспечивая удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего участка активного центра фермента определяет его комплементарность структуре субстрата. Формирование фермент-субстратного комплекса происходит без образования ковалентных связей, за счет более слабых сил – водородных и электростатических связей, гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий.

В **каталитический участок** фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами, и они чаще всего представлены функциональными группами остатков серина, гистидина, триптофана, аргинина, цистеина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, тирозина. Окончательное формирование каталитического участка у многих ферментов может происходить в момент присоединения субстрата (принцип индуцированного соответствия субстрата и фермента).

Активный центр не может быть очерчен строго определенными границами, поскольку каждый его компонент так или иначе взаимо-



действует с другими участками молекулы фермента. Влияние микроокружения может быть весьма существенным:

- компоненты активного центра, в том числе и кофакторы, взаимодействуют с соседними группами фермента, что изменяет химические свойства функциональных групп, участвующих в катализе;

- в клетке ферменты образуют структурные комплексы как друг с другом, так и с участками клеточных и внутриклеточных мембран, с элементами цитоскелета и/или другими молекулами, что влияет на реакционную способность функциональных групп в активном центре фермента.

Структура активного центра определяет регио- и стереоспецифичность действия ферментов.

Некоторые ферменты проявляют **полифункциональность** – способность катализировать несколько типов реакций. Это явление объясняется тем, что при формировании третичной структуры полипептидные цепи таких ферментов образуют несколько функционально и стерически обособленных глобулярных участков – доменов, каждый из которых характеризуется собственной каталитической активностью.

**Специфичность ферментов.** Одним из удивительных свойств ферментов является их высокая специфичность. Различают субстратную и реакционную специфичность. Большинство ферментов высокоспецифично как к природе, так и к пути превращения субстрата.

**Субстратная специфичность** – это способность фермента катализировать превращение определенного субстрата или нескольких субстратов со схожей химической структурой. Эта специфичность у разных ферментов значительно варьирует: одни ферменты могут катализировать реакцию с участием только одного субстрата (абсолютная специфичность), другие взаимодействуют с несколькими химически родственными веществами (групповая специфичность). Например, формамидаза гидролизует только формамид, а амидаза – любой алифатический амид. В этом случае говорят соответственно об узкой и широкой субстратной специфичности ферментов.

Субстратная специфичность обусловлена комплементарностью структуры связывающего участка фермента структуре субстрата. Между аминокислотными остатками активного центра фермента и субстратом устанавливается геометрическое (по форме) и химическое соответствие (образование гидрофобных, ионных и водородных связей). Связывание субстрата в активном центре фермента происходит многоточечно, с участием нескольких функциональных групп.

В настоящее время получила развитие общепринятая гипотеза Кошланда об *индуцированном соответствии субстрата и фермента*.

Согласно этой гипотезе, пространственное соответствие между структурами активного центра фермента и субстрата создается в момент их взаимодействия друг с другом. При этом в молекуле фермента индуцируются небольшие конформационные изменения, в результате чего в каталитическом участке функционально активные группы ориентируются наиболее благоприятным для протекания реакции образом. В субстрате также возникают конформационные изменения (говорят о возникновении напряжения в субстрате), что делает его более реакционноспособным. Конформационная подвижность крупной молекулы фермента создает, следовательно, дополнительные возможности для усиления его каталитической активности.

Данная гипотеза объясняет то, что молекулы, очень похожие по форме на истинный субстрат, могут связываться с ферментом, но не превращаться в продукт, т. е. действуют как ингибиторы. Кроме того, смысл индуцированных конформационных изменений фермента состоит в том, чтобы обеспечить освобождение продукта(ов) реакции из активного центра, после чего конформация молекулы фермента возвращается в исходное состояние.

**Реакционная специфичность** характеризует способность ферментов катализировать реакции определенного типа (например, окислительно-восстановительные). Если субстрат может существовать в нескольких изомерных формах, то одни и те же химические превращения этих изомеров катализируют разные ферменты (например, оксидазы L-аминокислот и оксидазы D-аминокислот). Исключения составляют изомеразы, которые катализируют взаимопревращения изомеров.

**Закономерности ферментативного катализа.** Ферментативная реакция – это многостадийный процесс. На первой стадии устанавливается индуцированное комплементарное соответствие между ферментом E и субстратом S. В результате образуется *фермент-субстратный комплекс* ES, в котором далее происходит химическое превращение субстрата в продукт(ы). ES-комплекс через переходное состояние ES\* превращается в комплекс фермент-продукт(ы) EP, после чего продукт(ы) превращения отделяется от фермента:



При связывании субстрата с ферментом происходит изменение конформации молекул фермента и субстрата, конформация субстрата фиксируется в активном центре в напряженной конфигурации. Так формируется активированный комплекс, или *переходное состояние* – вы-

сокоэнергетическая промежуточная структура, которая энергетически менее устойчива, чем исходные соединения и продукты (рис. 4.2). Важнейший вклад в суммарный каталитический эффект вносит процесс стабилизации переходного состояния – взаимодействия между аминокислотными остатками белка и субстратом. Разность значений свободной энергии для исходных реагентов и переходного состояния соответствует *свободной энергии активации*  $\Delta G^\ddagger$ . Это количество энергии, необходимое для перевода всех молекул субстрата в активированное состояние. Скорость реакции зависит от величины  $\Delta G^\ddagger$ : чем она меньше, тем больше скорость реакции, и наоборот. По сути  $\Delta G^\ddagger$  представляет собой энергетический барьер, который требуется преодолеть молекулам субстрата для осуществления реакции. Вершина энергетического барьера соответствует переходному состоянию. Стабилизация переходного состояния понижает этот барьер или энергию активации, т. е. ферменты повышают скорость реакций путем снижения активационного барьера и увеличения энергии субстрата при связывании его с ферментом, не влияя при этом на полное изменение свободной энергии (рис. 4.2).

Рис. 4.2. Модели превращения субстрата:  
*a* – неферментативное превращение; *б, в* – ферментативное превращение

Можно выделить несколько *причин* высокой каталитической активности ферментов, которые обеспечивают снижение энергетического барьера реакции.

1. Фермент может связывать молекулы реагирующих субстратов таким образом, что их реакционноспособные группы будут располагаться поблизости друг от друга и от каталитических групп фермента (*эффект сближения*).

2. При образовании фермент-субстратного комплекса достигаются фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация (*эффект ориентации*).

3. Связывание субстрата приводит к удалению его гидратной оболочки (существует для растворенных в воде веществ).

4. Эффект индуцированного соответствия субстрата и фермента.

5. Стабилизация переходного состояния.

6. Определенные группы в молекуле фермента (кофермента) могут обеспечивать кислотно-основной (перенос протонов в субстрате) и нуклеофильный катализ (формирование ковалентных связей между ферментом и субстратом, что ведет к образованию более реакционноспособных структур, чем субстрат). Последний характерен для ферментов, катализирующих реакции нуклеофильного замещения.

**Кофакторы ферментов.** Активность ряда ферментов зависит только от структуры самого белка. Однако во многих случаях (~40%) для осуществления катализа ферменты нуждаются в особых посредниках – кофакторах. **Кофакторы** – это низкомолекулярные соединения небелковой природы (ионы металлов, сложные органические соединения, в основном производные витаминов), которые функционируют на промежуточных стадиях ферментативной реакции (или цикла реакций), но не расходуются в ходе катализа. В большинстве случаев кофакторы регенерируются в неизменном виде по завершении каталитического акта.

Отделение кофактора от белка, обычно связанного с ним нековалентными связями, приводит к образованию неактивного **апофермента**. Каталитически активный комплекс апофермент – кофактор называется **холоферментом**.

Различные по химической природе кофакторы делят на две основные группы – коферменты и простетические группы. **Коферменты** непрочны (нековалентно) связаны с белком и при катализе отделяются от него (например, НАД<sup>+</sup>, КоА). Восстановление их исходной структуры (регенерация) после участия в катализе может катализироваться уже другим ферментом. **Простетические группы** прочно (ковалентно) свя-

заны с апоферментом и при катализе не отделяются от него (например, гем в гемопротеинах, атомы металлов в металлопротеинах).

Каждый кофактор имеет определенную структуру, что делает его специфичным для соответствующего типа реакций. Для участия в реакции кофакторы должны быть связаны с ферментами. При этом комплементарное, точное размещение кофактора в активном центре фермента обеспечивает множество нековалентных контактов с ферментом.

Основные механизмы, согласно которым кофакторы принимают участие в катализе, следующие:

- выполняют функцию переносчиков между ферментами. Взаимодействуя с одним ферментом, переносчик акцептирует часть субстрата, мигрирует к другому ферменту и передает переносимую часть субстрату второго фермента, после чего высвобождается. Такой механизм типичен для большинства коферментов;

- играют роль внутриферментного переносчика, что характерно, в первую очередь, для простетических групп. Простетическая группа присоединяет часть молекулы субстрата и переносит ее на второй субстрат, связанный в активном центре того же фермента. В этом случае простетическую группу рассматривают как часть каталитического участка фермента;

- изменяют конформацию молекулы фермента, взаимодействуя с ней вне активного центра, что может индуцировать переход активного центра в каталитически активную конфигурацию;

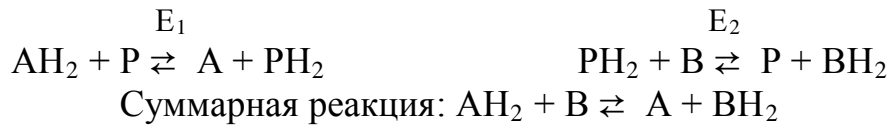
- стабилизируют конформацию фермента, способствующую образованию каталитически активного состояния;

- выполняют функцию матрицы. Например, полимеразы нуклеиновых кислот нуждаются в «программе» – матрице, по которой строится новая молекула;

- играют роль промежуточных соединений. Иногда фермент может использовать в реакции молекулу кофактора, образуя из нее продукт, но при этом одновременно за счет субстрата образовать новую молекулу кофактора.

Обычно кофакторы выполняют функцию промежуточных переносчиков электронов, некоторых атомов или функциональных групп, которые в результате ферментативной реакции переносятся с одного соединения на другое. Наиболее распространены кофакторы, осуществляющие перенос восстановительных эквивалентов, фосфатных, ацильных и карбоксильных групп. Мы ограничимся рассмотрением структуры и механизма функционирования переносчиков восстановительных эквивалентов.

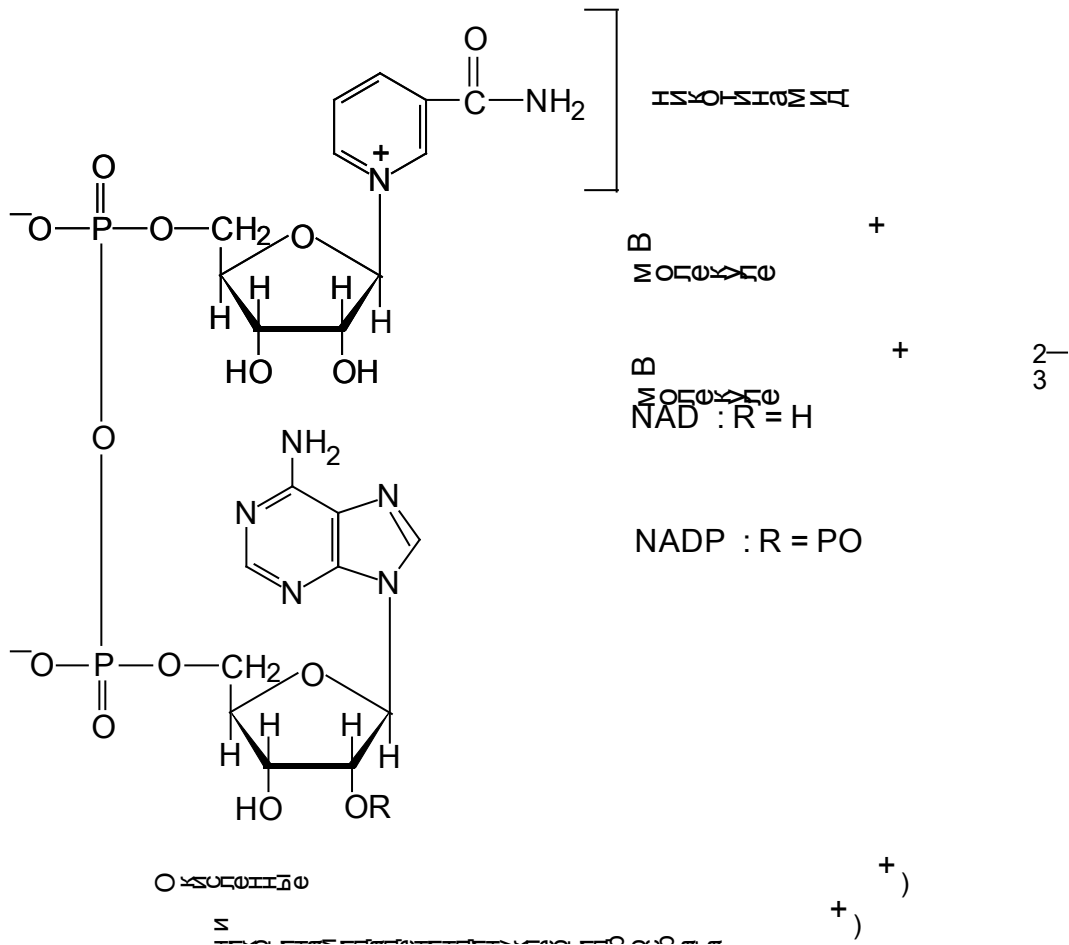
Под **восстановительными эквивалентами** подразумевают обычно атомы Н, электроны или гидрид-ионы. Поскольку их перенос осуществляется в ходе окислительно-восстановительных реакций, соответствующие переносчики называют окислительно-восстановительными кофакторами:



где А, В – окисленные субстраты; Р – переносчик; АН<sub>2</sub>, ВН<sub>2</sub> – восстановленные субстраты; E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> – ферменты (дегидрогеназы).

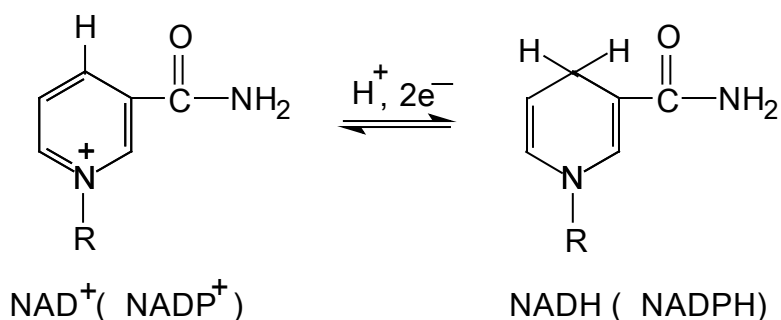
К ним относятся никотинамидные и флавиновые переносчики, цитохромы, хиноны, липоевая и аскорбиновая кислоты, глутатион. Наиболее распространены никотинамидные (НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>) и флавиновые (ФАД и ФМН) коферменты.

**Никотинамидные переносчики восстановительных эквивалентов.** Ими являются никотинамидадениндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>, или NAD<sup>+</sup>) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ<sup>+</sup>, или NADP<sup>+</sup>):

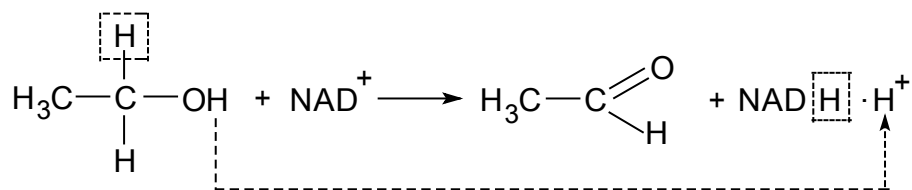


Окисленные формы этих коферментов принято обозначать НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>, подчеркивая присутствие избыточного положительного заряда на атоме азота пиридинового кольца.

Функциональной группой никотинамидных переносчиков восстановительных эквивалентов служит *пиридиновое кольцо*, входящее в состав никотинамида – витамина В<sub>5</sub> (РР). При ферментативном окислении субстрата с участием НАД<sup>+</sup> (НАДФ<sup>+</sup>) никотинамид восстанавливается в ходе присоединения гидрид-иона Н<sup>-</sup> (Н<sup>-</sup> ⇌ Н<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>). При этом дегидрирование субстрата в большинстве случаев сопровождается отщеплением двух атомов водорода, в ходе которого протон (Н<sup>+</sup>) переносится через раствор:



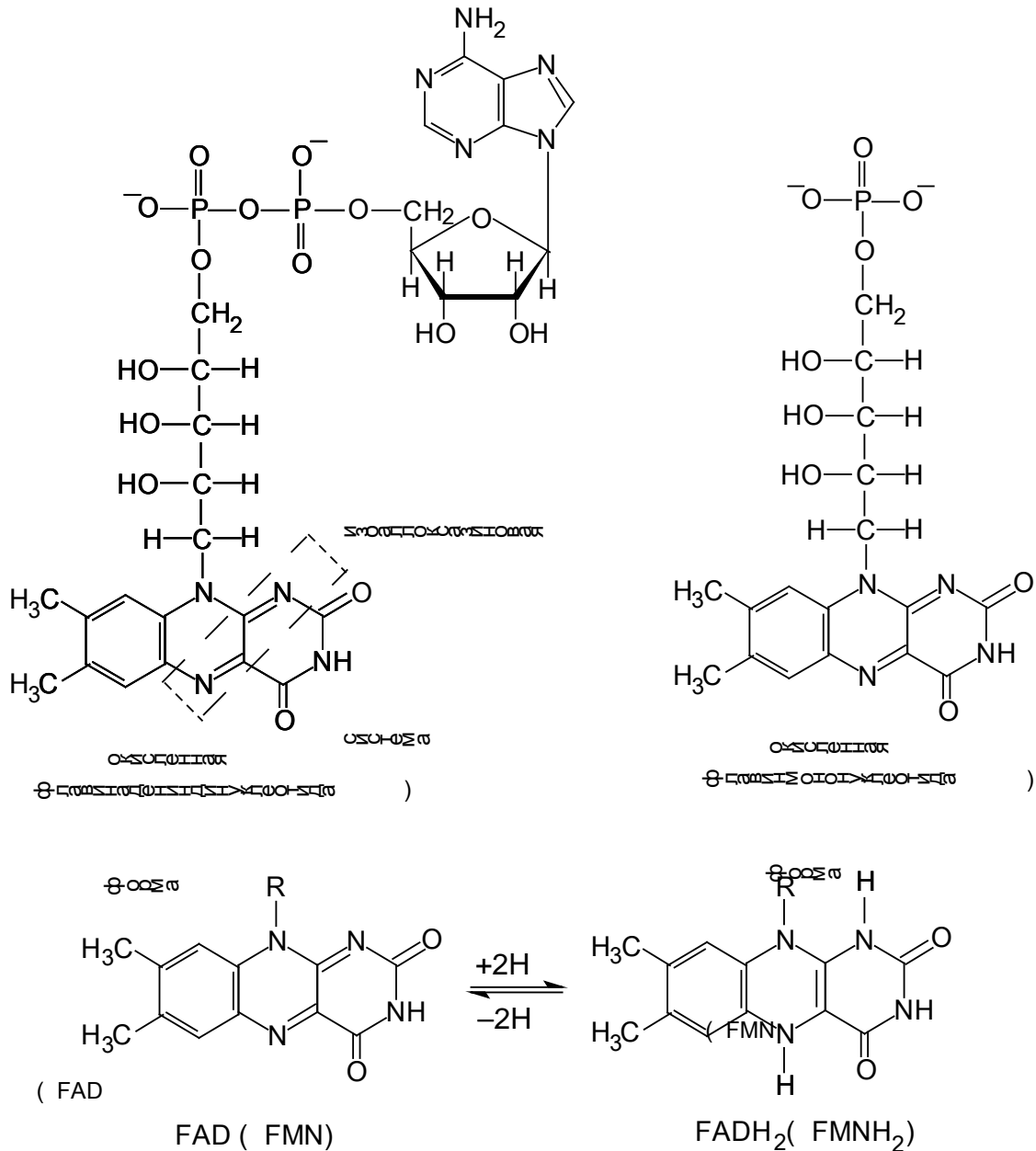
Примером функционирования никотинамидных переносчиков восстановительных эквивалентов может служить окисление этанола в уксусный альдегид, катализируемое алкогольдегидрогеназой (АДГ). Этот фермент осуществляет отщепление двух атомов водорода от молекулы этанола, причем к НАД<sup>+</sup> переносится водород, связанный с углеродом спиртовой группы, а водород, присоединенный к кислороду ОН-группы, высвобождается в среду в виде протона:



Два пиридиновых кофермента участвуют в разных окислительно-восстановительных реакциях при различных окислительно-восстановительных потенциалах: НАД<sup>+</sup> чаще выступает в роли окислительного агента в катаболических путях, а НАДФ<sup>+</sup> восстанавливается до НАДФН · Н<sup>+</sup> и выполняет функцию восстановителя в биосинтетических процессах.

**Флавиновые переносчики восстановительных эквивалентов.** К ним относятся флавинадениндинуклеотид (ФАД, или FAD) и флавиномононуклеотид (ФМН, или FMN).

Реакционноспособной частью ФАД и ФМН служит *изоаллоксазиновая система*, содержащая двойные сопряженные связи. Структура этой системы изменяется при восстановлении. Дегидрирование с участием флавиновых кофакторов сопровождается отщеплением от субстрата двух атомов водорода, но в отличие от никотинамидных коферментов, акцептирующих гидрид-ион, флавиновые кофакторы акцептируют оба атома водорода. Поэтому восстановленные формы ФАД и ФМН обозначаются как ФАДН<sub>2</sub> и ФМНН<sub>2</sub>:



Флавиновые коферменты являются более сильными окислителями, чем никотинамидные, а восстановленные формы никотинамидных



коферментов служат более сильными восстановителями, чем восстановленные флавины.

#### 4.2. Активность ферментов и факторы, на нее влияющие. Принципы ферментативной кинетики

**Активность ферментов.** Под *активностью фермента* понимают такое его количество, которое катализирует превращение определенного количества субстрата в единицу времени. Для выражения активности препаратов ферментов используют две альтернативные единицы: международную (МЕ) и катал (кат). За *международную единицу активности* фермента принято такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных условиях (обычно оптимальных). *Один катал* обозначает количество фермента, катализирующее превращение 1 моля субстрата за 1 с (1 кат =  $6 \cdot 10^7$  МЕ). При бимолекулярной реакции  $A + B = C + D$  за единицу активности фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль А или В, или 2 мкмольей А (если  $B = A$ ), за 1 мин.

Часто ферментные препараты характеризуются удельной активностью, которая отражает степень очистки фермента. *Удельная активность* – это число единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка.

*Молекулярная активность* (число оборотов фермента) – число молекул субстрата, подвергающееся превращению одной молекулой фермента за 1 мин при полном насыщении фермента субстратом. Она равна числу единиц активности фермента, деленному на количество фермента, выраженное в микромолях. Понятие молекулярной активности применимо только для чистых ферментов.

Когда известно количество активных центров в молекуле фермента, вводится понятие *активности каталитического центра*. Она характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин в расчете на один активный центр.

Активность ферментов сильно зависит от внешних условий, среди которых первостепенное значение имеют температура и рН среды. Повышение температуры в интервале  $-50^{\circ}\text{C}$  обычно приводит к плавному увеличению ферментативной активности, что связано с ускорением процессов формирования фермент-субстратного комплекса и всех последующих событий катализа. При повышении температуры на каждые  $10^{\circ}\text{C}$  скорость реакции увеличивается примерно вдвое

(правило Вант-Гоффа). Однако дальнейшее возрастание температуры ( $>50^{\circ}\text{C}$ ) сопровождается повышением количества инактивированного фермента за счет денатурации его белковой части, что выражается в снижении активности. Каждый фермент характеризуется *температурным оптимумом* – значением температуры, при котором регистрируется наибольшая его активность.

Зависимость активности ферментов от значения рН среды имеет сложный характер. Для каждого фермента характерен *оптимум рН среды*, при котором он проявляет максимальную активность. При удалении от этого значения в ту или другую сторону ферментативная активность снижается. Это объясняется изменением состояния активного центра фермента (уменьшением или увеличением ионизации функциональных групп), а также третичной структуры всей белковой молекулы, которая зависит от соотношения в ней катионных и анионных центров. Большинство ферментов имеют оптимум рН в области нейтральных значений. Однако есть ферменты, проявляющие максимальную активность при рН 1,5 (пепсин) или 9,5 (аргиназа). При работе с ферментами необходимо поддерживать рН с помощью соответствующего буферного раствора.

Активность ферментов подвержена значительным колебаниям в зависимости от воздействия *ингибиторов* (веществ, частично или полностью снижающих активность) и *активаторов* (веществ, увеличивающих активность). Их роль выполняют катионы металлов, некоторые анионы, переносчики фосфатных групп, восстановительных эквивалентов, специфические белки, промежуточные и конечные продукты метаболизма и др.

**Принципы ферментативной кинетики.** Суть кинетических исследований состоит в определении максимальной скорости ферментативной реакции  $V_{\max}$  и константы Михаэлиса  $K_M$ . Ферментативная кинетика изучает скорости количественных превращений одних веществ в другие под действием ферментов. Скорость ферментативной реакции измеряют по убыли субстрата или приросту образующегося продукта за единицу времени, либо по изменению концентрации одной из смежных форм кофермента.

Влияние *концентрации фермента* на скорость реакции выражается в следующем: если концентрация субстрата постоянна (при условии избытка субстрата), то скорость реакции пропорциональна концентрации фермента. Для кинетических исследований используют концентрацию фермента  $10^{-8}$  М активных центров. Оптимальное значение концентрации фермента определяют из графика зависимости активности фермента от его концентрации. Оптимальным считается

значение, лежащее на плато полученного графика в области значений активности фермента, мало зависящих от его концентрации (рис. 4.3).

Рис. 4.3. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента

Для изучения влияния *концентрации субстрата* на скорость ферментативной реакции сначала строят кинетическую кривую, отражающую изменение концентрации субстрата  $S_1$  или продукта  $P_1$  во времени (рис. 4.4) и измеряют начальную скорость  $V_1$  реакции как тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке.

Рис. 4.4. Кинетические кривые ферментативной реакции

Построив кинетические кривые для других значений концентрации данного субстрата ( $S_2, S_3, S_4$  и т. д.) или продукта ( $P_2, P_3, P_4$  и т. д.) и определив начальные скорости ( $V_2, V_3, V_4$  и т. д.) реакции, строят график зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (при постоянной концентрации фермента), который имеет вид гиперболы (рис. 4.5).

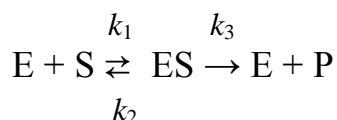
Рис. 4.5. Зависимость начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

Кинетика многих ферментативных реакций описывается уравнением Михаэлиса – Ментен. При постоянной концентрации фермента и *малых значениях концентрации субстрата*  $[S]$  начальная скорость реакции прямо пропорциональна  $[S]$  (рис. 4.5). В этом случае говорят о полунасыщении фермента субстратом, когда половина молекул фермента находится в форме фермент-субстратного комплекса и скорость реакции  $V = 1/2 V_{\max}$ . В отношении субстрата реакция имеет 1-й порядок (скорость реакции прямо пропорциональна концентрации одного реагирующего вещества) или 2-й порядок (скорость реакции пропорциональна произведению концентраций двух реагирующих веществ).

При *высоких значениях концентрации субстрата*  $[S]$  скорость реакции почти не зависит от  $[S]$ : при дальнейшем увеличении  $[S]$  скорость реакции растет все медленнее и в итоге становится постоянной (максимальной) (рис. 4.5). При этом достигается полное насыщение фермента субстратом, когда все молекулы фермента находятся в фор-

ме фермент-субстратного комплекса и  $V = V_{\max}$ . В отношении субстрата реакция имеет 0-й порядок (скорость реакции не зависит от концентрации реагирующих веществ).

В 1913 г. Л. Михаэлис и М. Ментен предложили простую модель, объясняющую такую кинетику. Согласно этой модели, образование специфического фермент-субстратного комплекса является необходимым промежуточным этапом катализа:



Фермент E соединяется с субстратом S, образуя ES-комплекс. Константа скорости этого процесса  $k_1$ . Судьба ES-комплекса складывается двояко: он может либо диссоциировать на фермент E и субстрат S с константой скорости  $k_2$ , либо подвергнуться дальнейшему превращению, образуя продукт P и свободный фермент E, с константой скорости  $k_3$ . При этом постулируется, что продукт реакции не превращается в исходный субстрат. Это условие соблюдается на начальной стадии реакции, пока концентрация продукта невелика.

Скорость катализа определяют в *стационарных условиях*, когда концентрация промежуточных продуктов остается постоянной, тогда как концентрация исходных веществ и конечных продуктов изменяется. Это имеет место в том случае, когда скорость образования ES-комплекса равна скорости его распада.

Можно ввести новую константу  $K_M$ , моль/л, – *константу Михаэлиса*, которая равна

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1}. \quad (4.1)$$

*Уравнение Михаэлиса – Ментен*, выражающее количественное соотношение между скоростью ферментативной реакции и концентрацией субстрата, имеет вид

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}. \quad (4.2)$$

Это уравнение соответствует графику зависимости скорости реакции от концентрации субстрата. При *низких концентрациях субстрата*, когда  $[S]$  намного ниже  $K_M$ ,  $V = V_{\max}[S] / K_M$ , т. е. скорость реакции прямо пропорциональна концентрации субстрата. При *высоких концентрациях субстрата*, когда  $[S]$  намного выше  $K_M$ ,  $V = V_{\max}$ , т. е. скорость реакции максимальна и не зависит от концентрации субстрата.

Если  $[S] = K_M$ , то  $V = V_{\max} / 2$ .

Таким образом,  $K_M$  равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.

Константа Михаэлиса  $K_M$  и максимальная скорость реакции  $V_{\max}$  – важные характеристики скорости при разных концентрациях субстрата.  $V_{\max}$  – величина постоянная для каждого фермента, позволяющая оценить эффективность его действия.

Константа Михаэлиса показывает сродство субстрата к ферменту (в случае, когда  $k_2 \gg k_3$ ): чем меньше  $K_M$ , тем больше сродство и выше скорость реакции, и наоборот. Каждый субстрат характеризуется своей величиной  $K_M$  для данного фермента и по их значениям можно судить о субстратной специфичности фермента. Константа Михаэлиса зависит от природы субстрата, температуры, pH, ионной силы раствора и наличия ингибиторов.

В связи с тем, что определение  $V_{\max}$  и  $K_M$  непосредственно из графической зависимости Михаэлиса – Ментен (см. рис. 4.5) является неоднозначным, прибегают к линейаризации данного уравнения. Для этого его преобразуют в такую форму, чтобы графически оно выражалось прямой. Существует несколько методов линейаризации, среди которых наиболее часто применяют методы Лайнуивера – Бэрка и Эди – Хофсти.

Преобразование *Лайнуивера – Бэрка* имеет вид

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}. \quad (4.3)$$

Строят график зависимости  $1/V = f(1/[S])$  и получают прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину  $1/V_{\max}$ ; отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, дает величину  $-1/K_M$ , а тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс равен  $K_M/V_{\max}$  (рис. 4.6). Этот график позволяет более точно определять  $V_{\max}$ . Как мы увидим ниже, из этого графика можно также извлечь ценную информацию, касающуюся ингибирования активности фермента.

Метод *Эди – Хофсти* основан на преобразовании уравнения Михаэлиса – Ментен путем умножения обеих его частей на  $V_{\max}$ :

$$V = -K_M \frac{V}{[S]} + V_{\max}. \quad (4.4)$$

График в координатах  $V$  и  $V/[S]$  представляет собой прямую линию, пересечение которой с осью ординат дает величину  $V_{\max}$ , а отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, – величину  $V_{\max}/K_M$  (рис. 4.7). Он позволяет очень просто определять  $K_M$  и  $V_{\max}$ , а также выявлять возможные отклонения от линейности, не обнаруживаемые на предыдущем графике.

Рис. 4.6. Метод линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен  
(по Лайнуиверу – Бэрку)

Рис. 4.7. Метод линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен  
(по Эди – Хофсти)

**Ингибирование активности ферментов.** Действие ферментов можно полностью или частично подавить определенными химическими веществами – *ингибиторами*. По характеру своего действия

ингибиторы подразделяются на обратимые и необратимые. В основе такого деления лежит прочность связывания ингибитора с ферментом.

**Обратимые ингибиторы** – это соединения, которые нековалентно взаимодействуют с ферментом и при их удалении активность фермента восстанавливается. Обратимое ингибирование может быть конкурентным, неконкурентным и бесконкурентным.

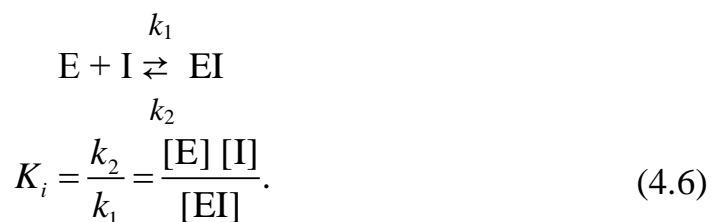
Примером *конкурентного ингибирования* является действие структурных аналогов субстрата, которые могут связываться с активным центром фермента похожим способом, как и субстрат, не превращаясь однако в продукт и препятствуя взаимодействию фермента с истинным субстратом, т. е. имеет место конкуренция между субстратом и ингибитором за связывание с активным центром фермента. В результате образования комплексов фермент-ингибитор (EI) концентрация ES-комплексов уменьшается и, как следствие, падает скорость реакции. Иными словами, конкурентный ингибитор уменьшает скорость катализа путем снижения доли молекул фермента, связавших субстрат.

Измерение скоростей реакций при разных концентрациях субстрата позволяет отличать конкурентное ингибирование от неконкурентного. При конкурентном ингибировании на графике зависимости  $1/V = f(1/[S])$  прямые пересекают ось ординат в одной точке  $1/V_{\max}$  независимо от присутствия ингибитора, но в присутствии ингибитора увеличивается тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс, т. е.  $V_{\max}$  не изменяется, а  $K_M$  увеличивается, что свидетельствует об уменьшении сродства субстрата к ферменту в присутствии ингибитора (рис. 4.8). Следовательно, при достаточно высокой концентрации субстрата в условиях конкуренции за активный центр фермента, когда субстрат вытесняет ингибитор из активного центра, ингибирование может быть устранено, и скорость катализируемой реакции восстанавливается. При этом уравнение Михаэлиса – Ментен имеет следующий вид:

$$\frac{1}{V} = \frac{K}{V_{\max}} + \frac{[I]_M}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{1}{K_i} \right) \frac{1}{[S]}, \quad (4.5)$$

где  $[I]$  – концентрация ингибитора;  $K_i$  – константа ингибирования.

Константа ингибирования характеризует сродство фермента к ингибитору и представляет собой константу диссоциации EI-комплекса:





В присутствии конкурентного ингибитора тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс увеличивается на величину  $(1 + [I] / K_i)$ .

Рис. 4.8. Конкурентное ингибирование:  
*a* – схема; *b* – графическое выражение по Лайнуиверу – Бэрку

При *неконкурентном ингибировании* ингибитор отличается по структуре от субстрата и связывается не с активным, а с аллостерическим центром фермента. Это ведет к изменению конформации активного центра фермента, что сопровождается снижением каталитической активности фермента. Причем ингибитор может связываться не только со свободным ферментом ( $E + I \rightarrow EI$ ), но и с фермент-субстратным комплексом ( $ES + I \rightarrow ESI$ ). Обе формы EI и ESI не активны. Субстрат и ингибитор могут быть одновременно связаны молекулой фермента,

но участки их связывания не перекрываются. Действие неконкурентного ингибитора заключается в уменьшении числа оборотов фермента, а не в снижении доли связавших субстрат молекул фермента. Ингибитор не препятствует образованию ES-комплексов, но тормозит превращение субстрата в продукт. Вследствие этого  $V_{\max}$  уменьшается, т. е. в присутствии ингибитора пересечение прямой с осью ординат произойдет в более высокой точке (рис. 4.9). В той же мере возрастает и тангенс угла наклона прямой к оси абсцисс, равный  $K_M / V_{\max}^1$ .  $K_M$  в отличие от  $V_{\max}$  не изменяется, поэтому неконкурентное ингибирование не может быть устранено увеличением концентрации субстрата.

Рис. 4.9. Неконкурентное ингибирование:  
*a* – схема; *b* – графическое выражение по Лайнуиверу – Бэрку

Максимальная скорость реакции  $V_{\max}^I$  в присутствии неконкурентного ингибитора описывается уравнением

$$V_{\max}^I = \frac{V_{\max}}{1 + [I]/K_i}. \quad (4.7)$$

В частном случае *бесконкурентного ингибирования*, когда ингибитор связывается только с ES-комплексом и не связывается со свободным ферментом, на графике зависимости  $1/V = f(1/[S])$  прямые параллельны друг другу и пересекают оси ординат и абсцисс в разных точках (рис. 4.10).

Рис. 4.10. Бесконкурентное ингибирование:  
*a* – схема; *б* – графическое выражение по Лайнуиверу – Бэрку

**Необратимые ингибиторы** – это высокореакционноспособные соединения различной химической природы, которые могут взаимодействовать с функционально важными группами активного центра, образуя прочные ковалентные связи. Это приводит к безвозвратной потере активности фермента. В связи с этим теория Михаэлиса – Ментен, основанная на предположении, что присоединение ингибитора к ферменту носит обратимый характер, в данном случае неприменима.

Примером необратимого ингибирования служит взаимодействие ферментов с ионами тяжелых металлов, которые присоединяются к сульфгидрильным группам цистеиновых остатков фермента и образуют при этом меркаптиды – практически недиссоциирующие соединения, либо ковалентная модификация фермента под действием алкилирующих агентов.

### **4.3. Методы выделения, очистки и определения активности ферментов**

Будучи выделенными из клетки без повреждения нативной структуры, ферменты сохраняют свою активность, что делает возможным их использование в бесклеточных реакциях. Методы выделения и очистки ферментов описаны в главе 3. Следует отметить, что большинство ферментов являются лабильными белками, поэтому при выделении и очистке ферментов необходимо соблюдать целый ряд условий, предотвращающих их денатурацию и инактивацию под действием различных факторов. Эти условия для разных ферментов различны.

Активность фермента определяют по изменению начальной скорости реакции, измеряемой по количеству превращенного субстрата или образовавшегося продукта за единицу времени. Для этого используют спектрофотометрические, флуориметрические, манометрические, электродные и поляриметрические методы.

Наиболее предпочтительны спектрофотометрические методы вследствие своей простоты и высокой чувствительности. Они основаны на том, что под влиянием специфического действия фермента (кофермента) на субстрат образуется стехиометрическое количество продукта реакции (или уменьшается количество субстрата), обладающего характерным спектром поглощения в видимой или УФ-области спектра. По спектральным изменениям хромофора в ходе ферментативной реакции можно определить количество превращенного субстрата или образовавшегося продукта согласно закону Бугера – Ламберта – Бера:

$$C = \frac{E}{\varepsilon l}, \quad (4.8)$$

где  $C$  – молярная концентрация субстрата (продукта) или кофермента, М;  $E$  – поглощение или экстинкция раствора;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции поглощающего свет вещества при длине волны  $\lambda$ ,  $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $l$  – толщина кюветы, см.

В настоящее время используются спектрофотометры, позволяющие непрерывно регистрировать изменение экстинкции во времени при определенной длине волны. При этом результаты записываются в виде непрерывной кинетической кривой и в автоматическом режиме производится расчет величины начальной скорости реакции – тангенса угла наклона касательной к кривой в нулевой точке.

Методы измерения активности ферментов делят на две группы: периодические и непрерывные. Последние более предпочтительны благодаря их скорости и легкости выполнения, однако для многих ферментов нет таких способов измерений. Периодические методы можно использовать почти для всех ферментов, но они менее удобны.

При *периодическом методе* определения активности фермент инкубируют с субстратом в течение определенного периода времени, затем реакцию останавливают каким-либо способом, который ведет к мгновенной денатурации фермента, и измеряют количество образовавшегося продукта (или израсходованного субстрата). По значениям экстинкции, полученным при разном времени инкубации, строят кинетические кривые.

Возможны два варианта периодического метода: 1) из реакционной среды периодически отбирают пробы в строго фиксированные интервалы времени; 2) готовят серию параллельных проб, останавливая реакцию в них через различные интервалы времени.

*Непрерывные методы* измерения активности ферментов позволяют следить за ходом реакции во времени, не прерывая ее и регистрируя прирост продукта или убыль субстрата непрерывно в виде кинетических кривых.

В тех случаях, когда субстрат, продукт или кофермент не имеют характерных спектральных изменений в ходе ферментативной реакции, используют *сопряженные методы* – методы определения ферментативной активности в системе сопряженных реакций с применением вспомогательных ферментов, которые катализируют превращения продуктов первой ферментативной реакции с образованием соединений, имеющих хромофорные группы.

**Условия проведения ферментативной реакции.** При проведении кинетических исследований необходимо знать:

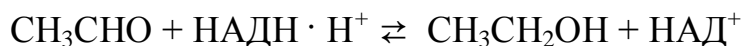
- 1) общую стехиометрию катализируемой реакции;
- 2) возможную потребность в кофакторах;
- 3) зависимость активности фермента от концентраций субстрата и кофермента;
- 4) значение рН, соответствующее максимальной активности фермента;
- 5) область температур, при которых фермент устойчив и сохраняет высокую активность.

Как указывалось выше, скорость ферментативной реакции зависит от многих факторов. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе условий измерения активности фермента. Следует подобрать условия инкубации, при которых обеспечивается постоянство всех параметров, кроме измеряемого. Концентрация субстрата (и кофермента) должна превышать концентрацию насыщения (начальная скорость соответствует 0-му порядку реакции в отношении субстрата), с тем что бы фактором лимитирующим скорость реакции, была концентрация фермента. Начинать реакцию следует внесением фермента или одного из субстратов в минимальном объеме при интенсивном перемешивании реакционной смеси.

Обычно измерение скорости образования продукта реакции может быть проведено с большей точностью, чем измерение скорости исчезновения субстрата, так как для поддержания кинетики 0-го порядка субстрат должен присутствовать в высокой концентрации.

Для контроля степени очистки фермента его активность относят на 1 мг общего белка (удельная активность).

**Определение активности алкогольдегидрогеназы (АДГ).** Алкогольдегидрогеназа (алкоголь:НАД-оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.1) катализирует конечную реакцию спиртового брожения – обратимое восстановление уксусного альдегида в этиловый спирт:



Фермент относится к классу оксидоредуктаз и обнаружен во многих тканях животных и растений, а также у микроорганизмов. АДГ пекарских дрожжей энергично окисляет первичные спирты с неразветвленной цепью и со значительно меньшей скоростью – спирты с разветвленной цепью, вторичные спирты, некоторые оксикислоты, аминокислоты и полиспирты. Молекула фермента (молекулярная масса ~150 кДа) состоит из четырех субъединиц, имеет четыре активных

центра, содержит четыре атома прочно связанного цинка. АДГ является сульфгидрильным ферментом. В *трис*- и пиррофосфатном буферных растворах оптимум рН равен 8,6.

Значения  $K_M$ :

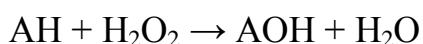
- для  $\text{НАД}^+ - 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ ;  $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+ - 2,3 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ;
- этанола –  $1,6 \cdot 10^{-2} \text{ М}$ ; уксусного альдегида –  $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ .

$E_{280}^{1\%} = 12,6$ .

Активность дегидрогеназ, нуждающихся в присутствии  $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$  и  $\text{НАДФН} \cdot \text{Н}^+$  в качестве коферментов, измеряют с использованием непрерывных спектрофотометрических методов.

Активность АДГ определяют в реакции окисления этанола под действием фермента непосредственно по восстановлению  $\text{НАД}^+$ , что регистрируют спектрофотометрически по увеличению экстинкции реакционной смеси при 340 нм. Коэффициент молярной экстинкции  $\text{НАДН} \cdot \text{Н}^+$  при 340 нм равен  $6,22 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ . При расчетах исходят из того, что при окислении-восстановлении 1 мкмоль кофермента при 340 нм в кювете толщиной 1 см в 1 мл реакционной смеси экстинкция меняется на 6,22 единиц.

**Особенности выделения пероксидазы из биологического материала и определения ее активности.** Среди множества окислительно-восстановительных ферментов пероксидаза привлекает особое внимание исследователей из-за своей полифункциональности и широкой распространенности в различных живых организмах. Пероксидаза – это двухсубстратный фермент, катализирующий реакции окисления субстратов за счет кислорода перекиси водорода:



Фермент обладает широкой субстратной специфичностью. К субстратам, окисляемым пероксидазой в присутствии перекиси водорода, относятся большинство фенолов (производные пирокатехинов, пирогаллолов, гидрохинонов, а также резорцин, гваякол и др.), производные бензидина, анилина, *n*-толуидина, а также адреналин, ароматические кислоты (производные бензойной, салициловой, галловой кислот), аскорбиновая кислота, нитриты, тиолы и ряд других соединений.

Согласно Международной классификации ферментов, **пероксидаза** – это фермент, действующий на перекись водорода в качестве акцептора электронов. Единственный подподкласс (1.11.1) составляют пероксидазы, где под кодовым номером семь стоит истинная пероксидаза – донор: $\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза (КФ 1.11.1.7).

Пероксидаза является гемсодержащим гликопротеином. Считают, что пероксидаза имеет один активный центр, в состав которого входит трехвалентный атом железа гема, не меняющий своей валентности. Однако полифункциональность пероксидазы не исключает возможности наличия и второго каталитического участка на поверхности нативной молекулы белка. Гем, выполняя роль активного центра, участвует в разложении или активации перекиси водорода, в результате чего образуются промежуточные радикалы соответствующих субстратов. Углеводные цепи предохраняют фермент от инактивации радикалами, образующимися в ходе реакций, и увеличивают термическую стабильность пероксидазы.

Пероксидаза характеризуется наличием большого числа изоферментов, что говорит о важной физиологической роли этого фермента в клетках различных организмов. В настоящее время установлено, что активность изоформ пероксидазы сильно зависит от присутствия определенных субстратов, поэтому физиологические функции отдельных изоформ фермента значительно различаются и определяются их субстратной специфичностью.

Для пероксидаз установлены видовые, органогенные и внутриклеточные особенности структуры и локализации изоферментов. Например, присутствие фермента в хлоропластах указывает на его участие в окислительно-восстановительных реакциях в процессе фотосинтеза, а обнаружение пероксидазы в митохондриях – на ее участие в энергетическом обмене клетки. Вместе с тем у растений отмечается наличие как ферментов, общих для всех тканей, так и изоферментов, специфичных только для отдельных органов или образующихся лишь в определенные периоды развития растения. Изоферменты нужны для биосинтеза лигнинов, меланинов и других вторичных метаболитов, необходимых для нормального роста и функционирования растений.

Для экстракции пероксидазы из растительных тканей можно использовать *трис*-ацетатный буферный раствор (рН 7,0), содержащий этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), фенилметилсульфонилфторид (PMSF) и дитиотреитол.

ЭДТА вводится в буферный раствор для связывания ионов тяжелых металлов, которые могут содержаться в применяемых реагентах и приводить к ингибированию активности фермента.

Фенилметилсульфонилфторид является ингибитором протеаз. Он необходим для защиты белков экстракта от действия клеточных протеаз, которые высвобождаются в процессе разрушения клеточных структур.



Дитиотреитол необходим для предотвращения окисления SH-групп белков. С этой же целью возможно применение β-меркаптоэтанол или глутатиона.

Активность изоформ пероксидазы зависит от концентрации белка и субстратов в зоне реакции, а также величины рН. В связи с этим необходим подбор оптимальных условий проведения ферментативной реакции по каждому из этих параметров. Это позволит установить зависимости пероксидазной активности при ферментативном окислении каждого из субстратов в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> от концентрации белка и субстратов, а также величины рН и определить максимальную активность фермента. В качестве субстратов пероксидазного окисления используют *o*-дианизидин, гваякол и конифериловый спирт. Два последних необходимы для биосинтеза лигнинов, а *o*-дианизидин является универсальным субстратом, который окисляется всеми изоформами пероксидаз.

При выборе оптимальной *концентрации перекиси водорода* изучают зависимость активности фермента от концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$  М) при постоянной концентрации второго субстрата  $\sim 1 \cdot 10^{-4}$  М (это обусловлено диапазоном экстинкций спектрофотометра), концентрации белка  $\sim 10^{-7} - 10^{-8}$  М активных центров и нейтральном значении рН. Затем измеряют активность фермента в зависимости от *концентрации второго субстрата* ( $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-3}$  М) при оптимальной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, сохраняя прежними остальные параметры. Определив оптимальную концентрацию второго субстрата, проводят измерение активности фермента в зависимости от *концентрации белка* (0,5–2,0 мг/мл) при оптимальных значениях концентрации обоих субстратов и нейтральном значении рН. После этого аналогичным образом определяют *оптимальную величину рН* (значения рН изменяются в пределах от 5,0 до 9,0 с шагом 0,5).

Оптимальными значениями концентрации каждого из субстратов и величины рН считаются значения, которые соответствуют максимуму пероксидазной активности.

При выборе оптимальной концентрации белка ориентируются на такое значение, при котором не достигается максимум пероксидазной активности, так как работа вблизи максимума приводит к существенной ошибке даже при небольшом отклонении от заданной концентрации. Учитывая малый объем получаемых экстрактов, концентрация белка должна быть как можно ниже при максимально возможном значении пероксидазной активности. На графике зависимости пероксидазной активности от концентрации белка оптимальному значению

концентрации белка соответствует середина плато. На этом участке пероксидазная активность мало зависит от концентрации белка.

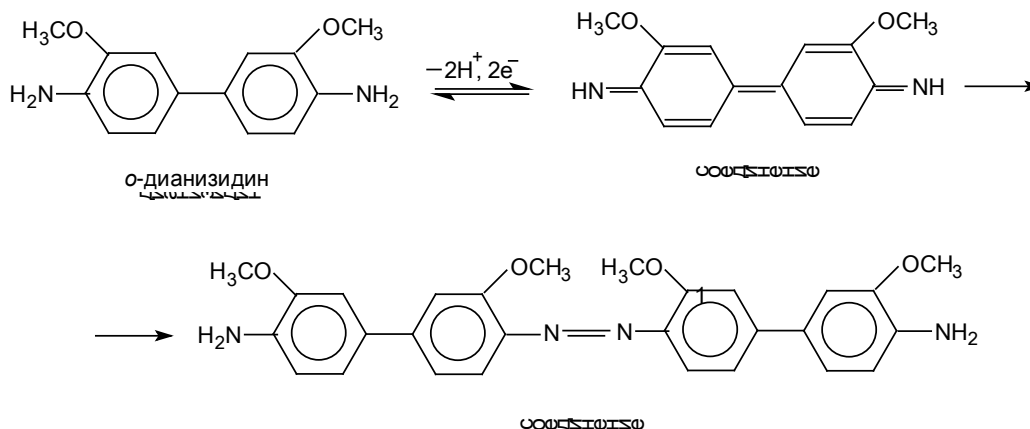
Выбранные оптимальные параметры определения скорости реакций пероксидазного окисления *o*-дианизида, гваякола и кониферилового спирта сводят в таблицу.

Таблица

**Параметры ферментативных реакций  
для определения пероксидазной активности**

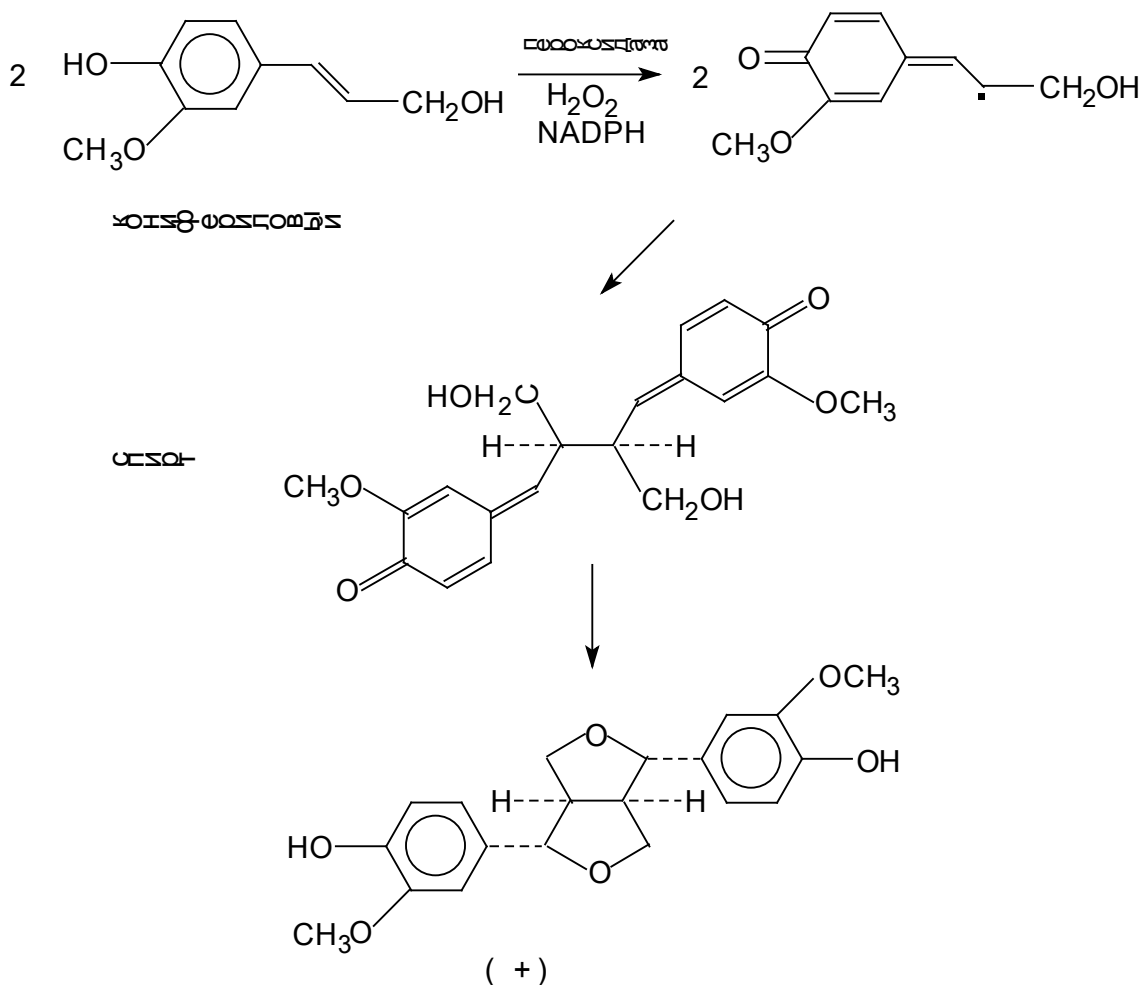
Субстрат пероксидазного окисления	Концентрация перекиси водорода, мМ	Концентрация окисляемого субстрата, мМ	Концентрация белка, мкг/мл	рН
<i>o</i> -Дианизидин				
Гваякол				
Конифериловый спирт				

Реакция пероксидазного окисления *o*-дианизида представлена на схеме:



Как ферментативное, так и неферментативное окисление *o*-дианизида (3,3'-диметоксибензида или 4,4'-диамино-3,3'-диметоксибифенила) при значениях рН, близких к нейтральным, приводит к образованию конечного продукта *бис*-(3,3'-диметокси-4-амино)-азобифенила (соединение 2). Это соединение образуется при конденсации двух молекул 4,4'-диимино-3,3'-диметоксибифенила (соединение 1), который является первичным продуктом окисления *o*-дианизида.

Реакция пероксидазного окисления кониферилового спирта представлена на следующей схеме:



Гваякол в реакции перекисного окисления полимеризуется с образованием тетрагваякола.

### Лабораторная работа № 1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ДРОЖЖЕВЫХ ЭКСТРАКТАХ

**Цель работы** – освоение методов выделения алкогольдегидрогеназы из клеток пекарских дрожжей и определения ее активности; изучение влияния тяжелых металлов на активность фермента.

**Реактивы, материалы и оборудование:** пекарские дрожжи (прессованные, 75%-ной влажности); дистиллированная вода; физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl); физиологический раствор, содержащий 2% глюкозы; 30%-ный раствор  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; оксид алюминия; 2%-ный раствор  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; ацетон; 10 мМ К-фосфатный буферный раствор (pH 7,5); 60 мМ Na-пирофосфатный буферный раствор (pH 8,5); 15 мМ раствор НАД (pH 6,0); 3 М раствор этанола; лед; шпатели;

ступки; стеклянные палочки; центрифужные пробирки; целлофан; химический стакан на 1 л; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; колбы Эрленмейера объемом 250 мл; химически чистые пробирки; конические колбы объемом 50 мл; кюветы для спектрофотометра; штативы для пробирок; электронные весы; установка УВМТ-12-250; ультратермостат; центрифуга; спектрофотометр.

### ***Выполнение работы***

#### **1. Подготовка биологического материала**

5 г пекарских дрожжей (прессованных, 75%-ной влажности) ресуспендируют в 7080 мл физиологического раствора с глюкозой (2%) и инкубируют в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на установке УВМТ-12-250 в условиях аэрации ( $200 \text{ мин}^{-1}$ ) при  $30^\circ\text{C}$  в течение 1,5–2,0 ч для активации клеток. Используют две колбы: контрольную и опытную. Культуральную жидкость центрифугируют ( $5000 \text{ мин}^{-1}$ , 15 мин) и дрожжевую массу дважды отмывают от глюкозы путем последовательного ее ресуспендирования в физиологическом растворе и центрифугирования клеточной суспензии ( $5000 \text{ мин}^{-1}$ , 15 мин).

Затем биомассу дрожжей из контрольной колбы ресуспендируют в 70–80 мл физиологического раствора, а биомассу дрожжей из опытной колбы – в 70–80 мл физиологического раствора, содержащего  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в концентрации 0,5; 1,0; 2,0 или 4,0%. Дрожжи инкубируют в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на установке УВМТ-12-250 в условиях аэрации ( $200 \text{ мин}^{-1}$ ) при  $30^\circ\text{C}$  в течение 1,5–2,0 ч. Культуральную жидкость центрифугируют ( $5000 \text{ мин}^{-1}$ , 15 мин), а дрожжевую массу из опытной колбы дважды отмывают от сульфата меди путем последовательного ее ресуспендирования в физиологическом растворе и центрифугирования клеточной суспензии ( $5000 \text{ мин}^{-1}$ , 15 мин). Сырую биомассу замораживают.

#### **2. Выделение из клеток пекарских дрожжей фракций, обогащенных алкогольдегидрогеназой**

Биомассу дрожжей размораживают, ресуспендируют ее в 20 мл 2%-ного раствора  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  и выдерживают при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 3 ч, периодически перемешивая до получения однородной суспензии. Затем колбу с суспензией помещают в ультратер-

мостат при 55°C на 15-20 мин и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой. После этого суспензию быстро охлаждают в ледяной бане и центрифугируют при 2°C и 15 000 мин<sup>-1</sup> в течение 30 мин.

Осадок выбрасывают, а супернатант обрабатывают охлажденным до -5°C ацетоном из расчета 5 мл на каждые 10 мл дрожжевого экстракта. Полученную суспензию центрифугируют при -5°C и 15 000 мин<sup>-1</sup> на протяжении 5 мин. Осадок выбрасывают, а к супернатанту добавляют еще 5,5 мл охлажденного ацетона на каждые 10 мл дрожжевого экстракта.

Полученную суспензию центрифугируют при -5°C и 15 000 мин<sup>-1</sup> в течение 20 мин, осадок растворяют в 1 мл холодной дистиллированной воды и диализуют против 1 л 10 мМ К-фосфатного буферного раствора (рН 7,5) в течение 12 ч. Диализованные белковые растворы замораживают.

### **3. Определение активности алкогольдегидрогеназы**

Диализованные белковые растворы размораживают, в случае наличия возможного осадка центрифугируют при 12 000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин и после предварительного разбавления определяют в них концентрацию белка одним из описанных в разделе 3.3 методов, а также активность алкогольдегидрогеназы.

В спектрофотометрическую кювету ( $l = 1$  см) помещают реакционную смесь, содержащую:

- 0,3 мл 60 мМ Na-пирофосфатного буферного раствора (рН 8,5);
- 2,5 мл дистиллированной воды;
- 0,1 мл 15 мМ раствора НАД (рН 6,0);
- 0,1 мл 3 М раствора этанола.

Реакцию запускают добавлением 0,05 мл раствора АДГ. Общий объем пробы составляет 3 мл. Содержимое кюветы перемешивают и измеряют увеличение экстинкции раствора при 340 нм в течение 45–60 с на спектрофотометре Specord M-40 с помощью специальной кинетической программы. С помощью программного обеспечения прибора проводится расчет величины начальной скорости реакции – тангенса угла наклона касательной к кинетической кривой в нулевой точке (изменение экстинкции в секунду E/S).

Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение E/S.

Величину удельной активности АДГ вычисляют по формуле

$$A = \frac{E/S \cdot 60 V_1}{C V_2 \varepsilon l \cdot 10^3} = \frac{E/S \cdot 578,8}{C}, \quad (4.9)$$

где  $A$  – удельная активность АДГ, мкмоль/(мин · мг белка);  $E/S$  – изменение экстинкции в единицу времени,  $\text{с}^{-1}$ ; 60 – количество секунд в 1 мин;  $V_1$  – объем инкубационной смеси, мл;  $C$  – концентрация белка, мг/мл;  $V_2$  – объем внесенного раствора АДГ, мл;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции НАДН · Н<sup>+</sup>,  $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $l$  – толщина кюветы, см;  $10^3$  – количество миллилитров в 1 л; 578,8 – коэффициент пересчета, учитывающий известные величины.

Сравнивают величины удельной активности АДГ, выделенной из клеток дрожжей, подвергшихся и не подвергшихся действию сульфата меди (при условии одинаковой концентрации белка), и делают вывод о влиянии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на активность фермента.

## **Лабораторная работа № 2** **ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ** **В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ**

**Цель работы** – освоение методов выделения пероксидазы из растительного материала и определения ее активности.

**Реактивы, материалы и оборудование:** стебли льна-долгунца в фазе быстрого роста; иглица хвойных деревьев; оксид алюминия; 0,02 М трис-ацетатный буферный раствор (рН 7,0), содержащий 2 мМ ЭДТА, 0,1 мМ PMSF, 2 мМ дитио рептола; 1,66 М раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 1%-ные спиртовые растворы *o*-дианизидина, гваякола и кониферилового спирта; жидкий азот; шпатели; ступки; стеклянные палочки; центрифужные пробирки; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; химически чистые пробирки; эппендорфовские пробирки на 1 мл; кюветы для спектрофотометра; штативы для пробирок; электронные весы; рН-метр; центрифуга; спектрофотометр.

### **Выполнение работы**

#### **1. Выделение из растительного материала фракций, обогащенных пероксидазой**

Навеску растительного материала (стебли льна-долгунца в фазе быстрого роста, иглица хвойных деревьев) ~1–3 г измельчают, поме-

щают в фарфоровую ступку и охлаждают жидким азотом. Замороженный материал растирают в порошок и добавляют 0,02 М *трис*-ацетатный буферный раствор (рН 7,0) из расчета 5 мл на 1 г растительного материала. Экстракцию проводят в течение 30 мин при температуре 4°C и периодическом перемешивании.

Гомогенат количественно переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 12 000 мин<sup>-1</sup> на протяжении 10 мин. Супернатант разливают в эппендорфовские пробирки объемом 1 мл и замораживают.

## 2. Определение активности пероксидазы

Экстракты размораживают, в случае наличия возможного осадка центрифугируют при 12 000 мин<sup>-1</sup> в течение 10 мин и после предварительного разбавления определяют в них концентрацию белка одним из описанных в разделе 3.3 методов, а также пероксидазную активность.

В спектрофотометрическую кювету ( $l = 1$  см) помещают реакционную смесь, содержащую:

- 2,3 мл раствора белка;
- 0,1 мл 1%-ного спиртового раствора субстрата.

Реакцию запускают добавлением 0,1 мл 1,66 М раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Общий объем пробы составляет 2,5 мл. Содержимое кюветы перемешивают и измеряют изменение экстинкции раствора в течение 45–60 с на спектрофотометре Specord M-40 с помощью специальной кинетической программы. Измерения проводят при длине волны, которая позволяет регистрировать изменение экстинкции вещества, имеющего хромофорные группы. Такими веществами в реакциях окисления *o*-дианизидина и гваякола являются продукты реакции, а конифериловый спирт сам выступает в роли соединения, обладающего характерным спектром поглощения в УФ-области.

Таким образом, для *o*-дианизидина и гваякола регистрируется скорость образования продукта реакции при длине волны 460 и 470 нм соответственно, а для кониферилового спирта – скорость превращения самого субстрата при длине волны 260 нм. С помощью программного обеспечения прибора проводится расчет величины начальной скорости реакции – тангенса угла наклона касательной к кинетической кривой в нулевой точке (изменение экстинкции в секунду E/S).

Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение  $E/S$ .

Величину удельной пероксидазной активности вычисляют по следующей формуле:

$$AP = \frac{nE/S \cdot 60V_1}{CV_2 \varepsilon l \cdot 10^3} = \frac{nE/S \cdot 65,2 \cdot 10^3}{C\varepsilon}, \quad (4.10)$$

где AP – удельная пероксидазная активность, мкмоль/(мин · мг белка);  $n$  – стехиометрический коэффициент для субстрата в реакции пероксидазного окисления ( $n = 2$  для *o*-дианизидина,  $n = 4$  для гваякола,  $n = 1$  для кониферилового спирта);  $E/S$  – изменение экстинкции в единицу времени,  $s^{-1}$ ; 60 – количество секунд в 1 мин;  $V_1$  – объем инкубационной смеси, мл;  $C$  – концентрация белка, мг/мл;  $V_2$  – объем внесенного раствора белка, мл;  $\varepsilon$  – коэффициент молярной экстинкции продукта или субстрата реакции,  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$  (для реакции с *o*-дианизидином  $\varepsilon = 30\,000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ; для реакции с гваяколом  $\varepsilon = 26\,000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ; для кониферилового спирта  $\varepsilon = 17\,000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ );  $l$  – толщина кюветы, см;  $10^3$  – количество миллилитров в 1 л;  $65,2 \cdot 10^3$  – коэффициент пересчета, учитывающий известные величины.

В связи с тем, что концентрация концентрированной перекиси водорода точно не известна, при ее разбавлении концентрацию раствора определяют спектрофотометрически при 230 нм, используя коэффициент молярной экстинкции, равный  $72,7 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . В 3%-ном растворе  $H_2O_2$  концентрация равна 1,121 M.

### Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют ферменты и какими свойствами они обладают?
2. Приведите классификацию ферментов. Как образуются систематические названия ферментов?
3. Дайте определение понятия «изоферменты». Приведите примеры.
4. Что собой представляет активный центр фермента? Какую функцию он выполняет?
5. Чем обусловлена специфичность ферментов? Перечислите виды специфичности, дайте им характеристику.
6. За счет чего ферменты увеличивают скорость реакций?
7. Объясните причины высокой каталитической активности ферментов.



8. Что такое кофакторы ферментов? Чем отличаются коферменты и простетические группы? Приведите примеры.

9. Перечислите основные механизмы, согласно которым кофакторы принимают участие в катализе.

10. Дайте характеристику переносчикам восстановительных эквивалентов. Приведите примеры реакций, в которых они функционируют.

11. Что понимают под активностью фермента? В каких единицах ее выражают?

12. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении температуры и рН среды?

13. Что изучает ферментативная кинетика? Как измеряют скорость ферментативной реакции?

14. Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции. Каков характер зависимости скорости ферментативной реакции от этих факторов?

15. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции? Какая модель описывает такую кинетику и в чем состоит ее суть?

16. Каков физический смысл константы Михаэлиса  $K_M$ ?

17. Какие методы применяют для линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен?

18. Объясните характер действия обратимых и необратимых ингибиторов на активность ферментов.

19. В результате чего снижается активность ферментов в случае конкурентного, неконкурентного или бесконкурентного ингибирования? Как это выражается графически?

20. Почему для определения активности ферментов наиболее предпочтительны спектрофотометрические методы? На чем они основаны?

21. Охарактеризуйте периодические и непрерывные методы измерения активности ферментов. Что необходимо учитывать при выборе условий измерения активности ферментов?

22. К какому классу ферментов относится алкогольдегидрогеназа, какую реакцию она катализирует, какое вещество является кофактором этого фермента?

23. В чем состоит принцип метода определения активности алкогольдегидрогеназы?

24. Каковы особенности выделения пероксидазы из биологического материала и определения ее активности?

## Глава 5. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

### 5.1. Структура и свойства липидов. Строение биомембран

*Липидами* называют очень большую группу структурно и функционально различных соединений, обладающих общим свойством – гидрофобностью. Они нерастворимы в воде и растворимы в неполярных растворителях (хлороформе, диэтиловом эфире или бензине). Большинство липидов не является высокополимерными соединениями и состоит из нескольких связанных друг с другом молекул. Известно несколько классов липидов, отличающихся друг от друга природой остатков жирных кислот, входящих в состав липида. В молекулах липидов часто присутствуют ионные группы ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ) или полярные углеводные компоненты.

В организме липиды выполняют структурную (в составе биомембран), защитную, транспортную (характерна для липопротеинов, транспортирующих липиды), энергетическую, регуляторную функции. Липиды являются компактной и энергоемкой формой хранения энергии, что обусловлено большим содержанием в их молекулах  $\text{C-H}$  -связей, при окислении которых выделяется большее количество энергии по сравнению с другими органическими молекулами. Некоторые вещества, относимые к липидам, обладают биологической активностью – это витамины и их предшественники, некоторые гормоны. Они участвуют в реакциях биосинтеза, поддерживают оптимальную активность ферментов, регулируют рост клеток и др.

#### 5.1.1. Классификация липидов

По *полярности* различают неполярные и полярные липиды. Такое разделение основано на их растворимости в органических растворителях различной полярности. К *неполярным липидам* относятся свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стерины, воски, углеводороды, которые растворяются в неполярных растворителях (гексане, бензине, диэтиловом эфире). К *полярным липидам* относятся фосфо- и гликолипиды, растворимые в полярных и протонных растворителях (ацетоне и этаноле).

По *взаимодействию со щелочами* липиды разделяют на омыляемые и неомыляемые. *Омыляемые липиды* при взаимодействии со щелочами гидролизуются с отщеплением жирных кислот и образуют соли высших жирных кислот – мыла. К ним относятся триацилглицерины, воски, фосфо- и гликолипиды. *Неомыляемые липиды*

не содержат жирно-кислотных остатков, поэтому при взаимодействии со щелочами не гидролизуются и не образуют мыл. К ним относятся стеринны, терпеноиды, каротиноиды, жирорастворимые витамины и провитамины.

Омыляемые липиды, в свою очередь, делят на простые и сложные. *Простые липиды* состоят только из остатков жирных кислот и одно-, двух или трехатомных спиртов, образующих сложные эфиры. Это триацилглицерины и воски (эфиры высших жирных кислот и одноатомных спиртов). *Сложные липиды* представляют собой сложные эфиры жирных кислот и спиртов с замещенными группами. Это фосфо- и гликолипиды.

**Неполярные липиды. Жирные кислоты.** Жирные кислоты – это алифатические карбоновые кислоты с числом углеродных атомов 4–22. Они входят в состав омыляемых липидов, являются одним из основных источников энергии в клетке («топливные молекулы»). Жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными, содержащими одну или несколько двойных связей (тройные связи встречаются редко). Следовательно, жирные кислоты различаются длиной углеводородной цепи, числом и положением двойных связей (табл. 5.1). Как видно из табл. 5.1, температура плавления жирных кислот повышается с увеличением длины углеводородной цепи.

Жирные кислоты, входящие в состав липидов высших растений и животных, как правило, содержат четное число углеродных атомов (12–22), что связано со способом их синтеза с участием двухуглеродного предшественника ацетил-СоА, и являются неразветвленными. Среди них чаще всего встречаются жирные кислоты с 16-ю и 18-ю углеродными атомами. Жирные кислоты, содержащие 18 атомов углерода (с двумя двойными связями и более), не синтезируются в животном организме и называются *незаменимыми* (эссенциальными), или витаминами F. Поэтому они должны обязательно присутствовать в пище.

В липидах высших организмов двойная связь мононенасыщенных жирных кислот находится в основном между 9-м и 10-м углеродными атомами. В жирных кислотах, содержащих две или более двойных связей, эти связи несопряженные ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ). Двойные связи почти всех природных ненасыщенных жирных кислот имеют *цис*-конфигурацию. Среди насыщенных жирных кислот у высших организмов чаще встречаются пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0) кислоты, а среди ненасыщенных – олеиновая (C18:1), линолевая (C18:2), линоленовая (C18:3), арахидоновая (C20:4) кислоты.

Таблица 5.1

## Состав и свойства жирных кислот

Название кислоты	Число атомов углерода: число двойных связей, положение двойных связей	Температура плавления, °С
Насыщенные жирные кислоты		
Масляная ( <i>n</i> -бутановая)	C4:0	-5,3
Валериановая (пентановая)	C5:0	-34,5
Капроновая (гексановая)	C6:0	-3,2
Каприловая (октановая)	C8:0	+16,5
Каприновая (декановая)	C10:0	+31,6
Лауриновая (додекановая)	C12:0	+44,8
Миристиновая (тетрадекановая)	C14:0	+54,4
Пальмитиновая (гексадекановая)	C16:0	+62,9
Стеариновая (октадекановая)	C18:0	+70,1
Арахидиновая (эйкозановая)	C20:0	+76,1
Бегеновая (докозановая)	C22:0	+80,0
Лигноцериновая (тетракозановая)	C24:0	+84,2
Церотиновая (гексакозановая)	C26:0	+87,8
Монтановая (октакозановая)	C28:0	+90,9
Мелиссовая (триаконтановая)	C30:0	+93,6
Ненасыщенные жирные кислоты		
Пальмитоолеиновая (гексадецен-9-овая)	C16:1, Δ9	<i>цис</i> - +0,5 <i>транс</i> - +31,0
Олеиновая ( <i>цис</i> -октадецен-9-овая)	C18:1, Δ9	+16,0
Линолевая (октадекадиен-9,12-овая)	C18:2, Δ9, 12	<i>цис</i> - -43,0 <i>транс</i> - -13,0
α-Линоленовая (октадекатриен-9,12,15-овая)	C18:3, Δ9, 12, 15 (ω3-ряд)	-75,0
Арахидононовая (эйкозатетраен-5,8,11,14-овая)	C20:4, Δ5, 8, 11, 14 (ω6-ряд)	-75,0
Эруковая (докозен-13-овая)	C22:1, Δ13	<i>цис</i> - +33,5 <i>транс</i> - +60,0

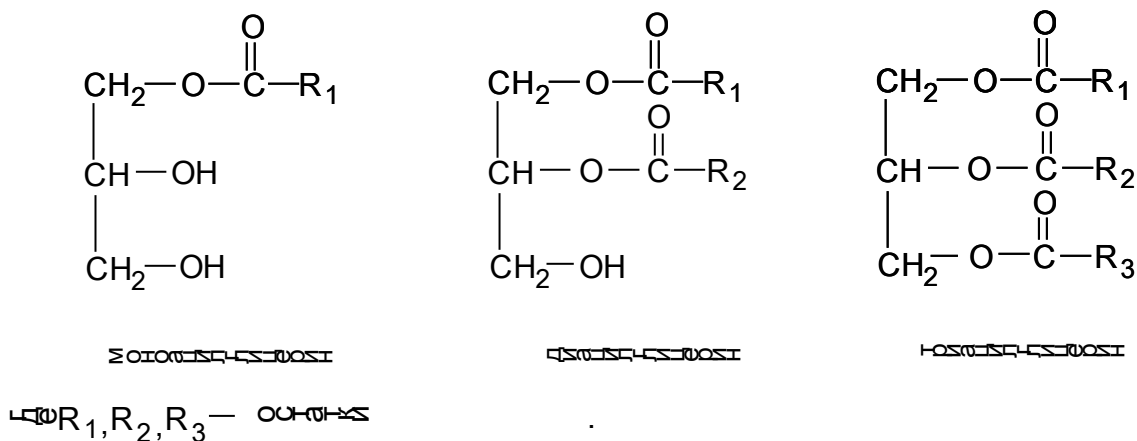
Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты различаются по конфигурации. В насыщенных жирных кислотах углеводородная цепь может принимать множество конформаций вследствие полной свободы вращения вокруг каждой СС-связи. Однако наиболее вероятной является энергетически более выгодная вытянутая конформация.

В ненасыщенных жирных кислотах невозможность вращения вокруг *цис*-двойной связи обуславливает жесткий изгиб углеводородной цепи под углом  $\sim 30^\circ$ . В случае *транс*-двойной связи конформация углеводородной цепи мало отличается от таковой насыщенных жирных кислот. В полиненасыщенных жирных кислотах *цис*-конфигурация двойных связей придает углеводородной цепи изогнутый и укороченный вид. Это имеет существенное значение при формировании биомембран клетки.

В отличие от насыщенных жирных кислот, относительно устойчивых к различным воздействиям, ненасыщенные кислоты легко окисляются кислородом воздуха до альдегидов, кетонов и гидроперекисей, обладающих горьким вкусом и неприятным запахом (прогоркание масла), а также восстанавливаются по месту двойных связей. Причем *цис*-изомеры ненасыщенных жирных кислот менее стабильны, чем *транс*-изомеры. В процессе получения гидрогенизированных масел ненасыщенные жирные кислоты биологически активной, усваиваемой организмом человека *цис*-изомерной формы превращаются в *транс*-изомеры, которые в организме человека включаются в структуру фосфолипидов биомембран, изменяя их свойства и функции. *Транс*-изомеры ненасыщенных жирных кислот выполняют также роль конкурирующих ложных субстратов в синтезе гормонов, простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов, подавляют процесс десатурации жирных кислот, приводят к образованию нежелательных для организма человека соединений и вызывают развитие у человека серьезных сердечно-сосудистых заболеваний.

**Триацилглицерины.** Основным компонентом различных масел и жиров являются сложные эфиры глицерина и жирных кислот – ацилглицерины. Это важнейший класс запасных липидов у растений и большинства животных. Если одна или две –ОН-группы глицерина этерифицированы жирными кислотами, такие соединения называются *моноацил-* и *диацилглицеринами* соответственно. Если все три –ОН-группы глицерина этерифицированы жирными кислотами, такое соединение называется *триацилглицерином*. Они составляют основную массу природных неполярных липидов и различаются природой и расположением жирно-кислотных остатков. Если во

всех трех положениях находятся остатки одной и той же жирной кислоты – это простые триацилглицерины. В случае присутствия в молекуле двух или трех разных остатков жирных кислот, речь идет о смешанных триацилглицеринах. Большинство природных липидов представляет собой сложные смеси простых и смешанных триацилглицеринов. Твердые при обычной температуре и содержащиеся в животных тканях триацилглицерины называются *жирами*, а жидкие триацилглицерины растительного происхождения – *маслами*:



Свойства триацилглицеринов определяются свойствами входящих в их состав жирных кислот, так как второй структурный элемент – глицерин – одинаков для всех триацилглицеринов. Температура плавления триацилглицеринов повышается с увеличением числа и длины цепи остатков насыщенных жирных кислот.

При щелочном или кислотном гидролизе молекулы триацилглицеринов расщепляются по сложноэфирным связям до глицерина и свободных жирных кислот. В результате щелочного гидролиза или омыления образуются глицерин и соли высших жирных кислот – мыла. Аналогично идет гидролиз триацилглицеринов под действием фермента липазы. Так же, как и свободные жирные кислоты, но в меньшей степени триацилглицерины окисляются кислородом воздуха (особенно при повышенных температурах) с образованием перекисных соединений, оксикислот и продуктов полимеризации.

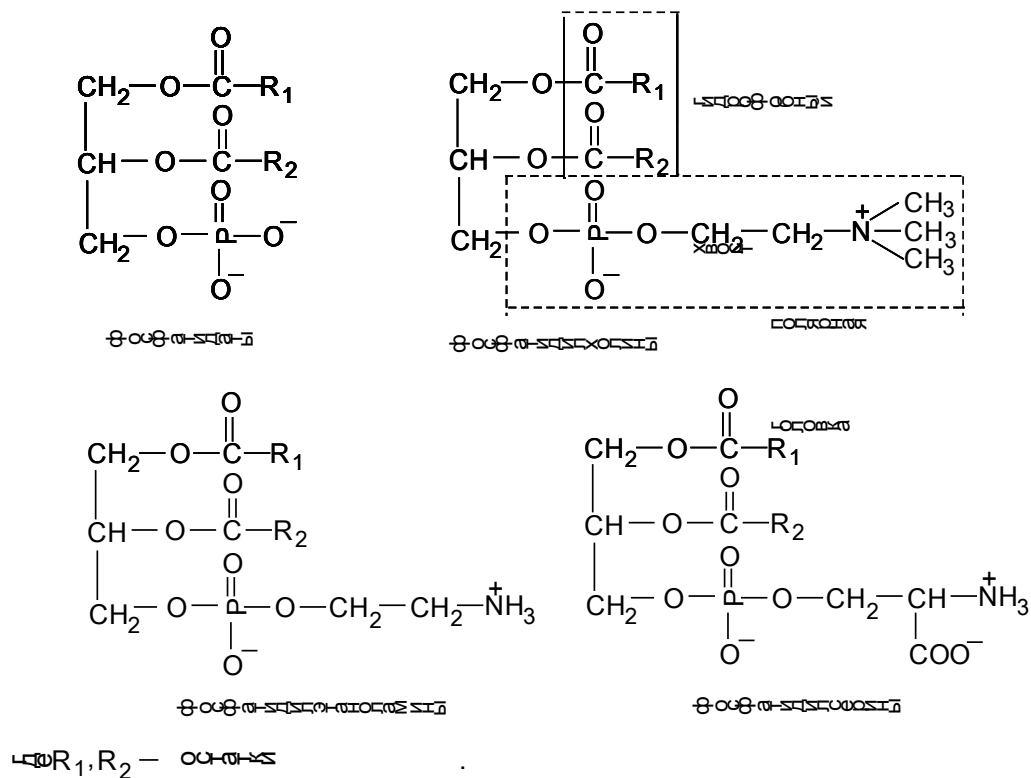
Если к С1- и С3-атомам глицерина присоединяются остатки двух разных жирных кислот, то второй углеродный атом глицерина становится асимметрическим. Природные триацилглицерины, содержащие асимметрический атом углерода, соответствуют L-конфигурации. При описании пространственного строения триацилглицеринов масел и жиров принято считать, что первый углеродный атом глицерина находится на верху цепи и обозначается *sn-1*.



функцией липидов в биомембранах является структурная – липиды формируют бислои, в котором находятся белковые молекулы.

**Фосфолипиды.** Они преобладают в количественном отношении в большинстве биомембран. Наиболее распространены следующие фосфолипиды: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, дифосфатидилглицерин (кардиолипин). Основу молекул фосфолипидов составляет трехатомный спирт – глицерин. Две его OH-группы этерифицированы двумя остатками жирных кислот, а третья – остатком фосфорной кислоты. Образованная в результате молекула представляет собой основной предшественник всех фосфолипидов – *фосфатидную кислоту*, или *фосфатидат*. В результате реакции этерификации фосфатной группы фосфатидата OH-группой одного из спиртов (холина, этаноламина) или аминокислоты (серина) образуются соответствующие фосфолипиды.

Фосфолипиды выполняют в мембранах структурную функцию. Фосфатидилхолин служит основным компонентом мембран животных клеток, фосфатидилэтаноламин встречается в мембранах бактерий. Это сильно амфифильные молекулы, так как содержат в структуре две неравнозначные по свойствам группировки: полярную гидрофильную головку (остаток фосфорной кислоты с присоединенным к нему аминокислотом или аминокислотой) и неполярный гидрофобный хвост (остатки жирных кислот):





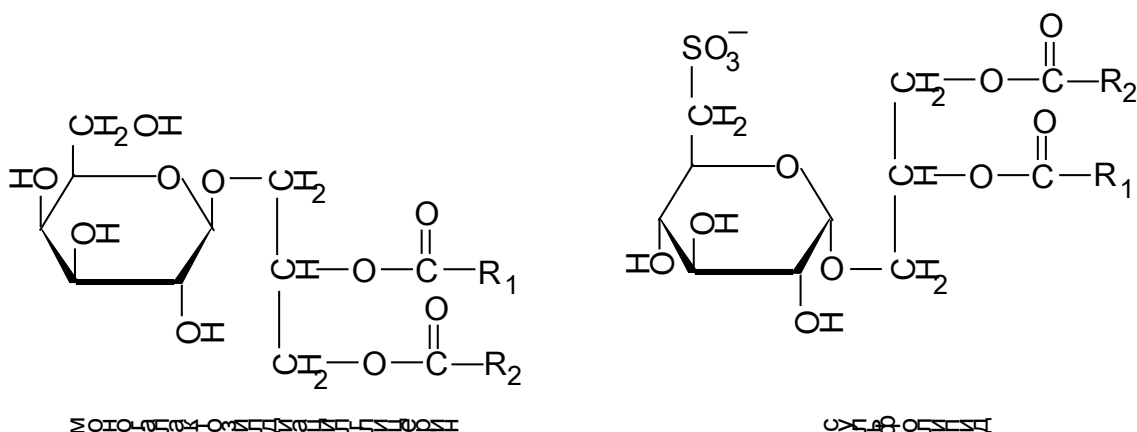


в мембранах животных клеток, выполняя там в основном структурную функцию.

Фосфосфинголипиды служат основными структурными компонентами мембран клеток нервной ткани, формируя миелиновые оболочки нейронов.

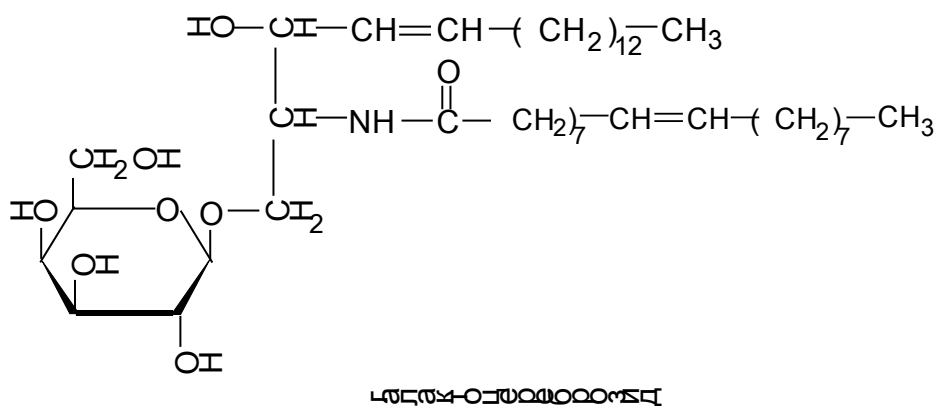
**Гликоглицеролипиды.** Представляют собой полярные липиды, построенные на основе глицерина, у которого ОН-группа у третьего атома углерода участвует в образовании гликозидной связи с каким-либо углеводом. Роль углеводных единиц чаще выполняют остатки галактозы или 6-сульфо-6-дезоксид- $\alpha$ -D-глюкопиранозы, при этом образуются соответственно моногалактозилдиацилглицерин и сульфолипид. Гидроксильные группы двух остальных атомов углерода глицерина в гликоглицеролипидах так же, как в фосфоглицеролипидах, этерифицированы жирными кислотами.

Гликоглицеролипиды выполняют в основном рецепторную функцию. На долю моногалактозилдиацилглицерина приходится до половины всех липидов тилакоидных мембран хлоропластов:



где  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  – остатки жирных кислот.

**Гликофинголипиды.** Построены на основе церамида, к концевой ОН-группе которого с помощью гликозидной связи присоединяются моно- либо олигосахариды. Те гликофинголипиды, у которых углеводная часть представлена моносахаридами, называются *цереброзидами*. Сфинголипиды, у которых углеводная часть представлена коротким кислотным, как правило, разветвленным олигосахаридом, называются *ганглиозидами*. Кислотность этого класса гликолипидов обусловлена присутствием в них в качестве ветвей углеводной цепи моносахарида нейраминовой кислоты или ее N-ацетилпроизводного:



Глико­сфин­го­липиды являются компонентами мембран клеток нервной ткани, участвуют в регуляции клеточного метаболизма (в регуляции роста клеток), выполняют сигнальные функции, воспринимая и передавая сигналы, т. е. являются молекулами-медиаторами. Глико­сфин­го­липиды мембран эритроцитов несут антигены группы крови. Церебро­зиды присутствуют в высоких концентрациях в мозге и нервных тканях млекопитающих.

### 5.1.2. Свойства полярных липидов и их агрегатов

Липиды, формирующие биомембраны, представляют собой амфифильные соединения. Эта особенность организации находит отражение в их свойствах: в водном окружении молекулы полярных липидов спонтанно агрегируют с образованием структур, у которых гидрофобные части молекул упакованы внутрь и защищены гидрофильными головками, обращенными к воде. Такие агрегаты имеют разную форму и структуру, зависящую от строения молекулы липида и соотношения размеров полярной и неполярной ее частей.

Наиболее простые агрегаты амфифильных молекул называются **мицеллами**. В зависимости от природы растворителя липиды могут образовывать либо мицеллы обычного типа, либо «обращенные» мицеллы. В воде формируются обычные мицеллы, у которых гидрофобные углеводородные цепи изолированы от водного окружения гидрофильными полярными головками (рис. 5.1, а).

В неполярных растворителях (бензин, гексан и др.) формируются «обращенные» мицеллы, у которых ориентация липидных молекул противоположная. К мицеллообразующим липидам относятся соли высших жирных кислот и формы липидов, у которых на молекулу приходится всего одна углеводородная цепь, а также многие детергенты. Липидные мицеллы могут иметь цилиндрическую, сферическую, эллипсоидную, дискообразную формы. Особой разновидностью



### 5.1.3. Строение и свойства биомембран

К биомембранам относят плазматические мембраны клеток, ядерную мембрану, мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, мембраны лизосом, пероксисом, митохондрий, хлоропластов, суперкапсиды вирусов, а также некоторые специализированные мембраны отдельных организмов. Все они имеют классическую структуру – липидный бислой с вкраплениями белковых молекул, и можно говорить, что принципиально их структурная организация не различается.

Биомембраны выполняют различные *функции*:

- ограничивающая функция. Биомембраны окружают все про- и эукариотические клетки, обособляя живое от неживого или отдельные клетки в многоклеточном организме, а также содержимое отдельных органелл в эукариотических клетках, что позволяет в каждой из них осуществляться специфическим процессам;

- барьерная функция. Биомембраны – это высокоизбирательный барьер для большинства веществ, стремящихся попасть в клетку (органеллу) или покинуть ее;

- мембраны обуславливают индивидуальность клеточных поверхностей, что особенно важно для многоклеточных животных организмов, лишенных клеточных стенок. Это позволяет клеткам взаимодействовать между собой, формируя органы и ткани;

- только на мембранах осуществляются такие процессы запасания энергии, как окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование;

- многие ферментативные реакции осуществляются только в мембранах, и биомембраны воздействуют на активность многих ферментов;

- только на мембранах осуществляются генерация и перенос нервных импульсов, мембранные структуры обладают рецепторной функцией;

- обязательного участия мембран требуют такие жизненно важные процессы, как синтез белка, репликация ДНК, модификация и секреция белков, регуляция метаболизма, основанная на гормональном ответе.

Биомембраны представляют собой природные пленки толщиной 5–7 нм, состоящие в основном из липидов (фосфо-, гликолипидов и холестерина), которым принадлежит структурная функция, и белков, определяющих разнообразие мембран и уникальность их свойств. Кроме того, в состав мембран входят углеводы, присутствующие там в составе гликолипидов и гликопротеинов. Для объяснения организации

биомембран предложено несколько моделей, из которых общепринятой в настоящее время считается *жидкостно-мозаичная модель* С. Дж. Сингера и Г. Л. Николсона, предложенная в 1971 г. Согласно этой модели, основой мембран служит текучий липидный бислой, в котором остатки жирных кислот фосфолипидов находятся в жидкокристаллическом состоянии. В бислой погружены и встроены молекулы белков, также способные к движению (рис. 5.2).

Рис. 5.2. Жидкостно-мозаичная модель строения цитоплазматической мембраны

**Липидный состав** мембран различен, и содержание того или иного липида, по-видимому, связано с разнообразием функций, которые выполняют эти липиды в мембране. Наличие липидов обуславливает такие свойства биомембран, как высокое электрическое сопротивление, непроницаемость для ионов и других полярных соединений (исключение составляет вода), проницаемость для неполярных соединений.

**Холестерин** является важным компонентом мембран клеток животных, определяющим текучесть мембраны. Его роль заключается в ингибировании фазовых переходов, связанных с изменением температуры, и предотвращении слипания и кристаллизации углеводородных цепей. Кроме того, холестерин увеличивает механическую прочность бислоя. Располагаясь в гидрофобной зоне мембраны между гидрофобными хвостами молекул фосфо- и гликолипидов, молекулы холестерина препятствуют их кристаллизации, а также снижают возможность латерального перемещения липидов и белков и поэтому могут

влиять на функции мембранных белков. Гидроксильная группа холестерина контактирует с гидрофильными головками фосфо- и гликолипидов. С другой стороны, наличие холестерина в мембранах уменьшает подвижность цепей жирных кислот и тем самым снижает текучесть мембран. Благодаря этим противоположным эффектам холестерина текучесть мембран поддерживается на оптимальном уровне.

**Мембранные белки** выполняют следующие функции: обуславливают перенос веществ через мембраны (транспортная функция), осуществляют катализ, обеспечивают процессы фотофосфорилирования и окислительного фосфорилирования, репликацию ДНК, трансляцию и модификацию белков, рецепцию сигналов и передачу нервного импульса и др. Состав мембранных белков варьирует в зависимости от функции мембраны, содержащей данные белки.

Мембранные белки различаются по своему положению в мембране, их делят на две группы: интегральные (пронизывают мембрану насквозь) и периферические (наружные). Критерием такого разделения служит степень прочности связывания белка с мембраной. **Периферические белки** связаны с полярными головками липидов или с другими (интегральными) белками мембраны при помощи слабых электростатических взаимодействий либо с помощью гидрофобных взаимодействий – с неполярными хвостами липидов. **Интегральные белки** – это амфифильные молекулы, которые имеют на своей поверхности большие гидрофобные участки, располагаются между липидами бислоя и пронизывают мембрану насквозь, часто возвышаясь над ее поверхностью. Гидрофобные участки интегральных белков взаимодействуют с гидрофобными хвостами липидных молекул внутри бислоя, а гидрофильные участки обращены к водной среде с обеих сторон мембраны.

Следовательно, периферические и интегральные белки в разной степени поддаются выделению их из мембраны. Периферические белки высвобождаются в раствор при экстракции их буферным раствором с низкой ионной силой, низкими значениями pH, в присутствии хелатирующих агентов (например, этилендиаминотetraацетата (ЭДТА)), связывающих двухвалентные катионы (ионы тяжелых металлов, ингибирующие активность ферментов). Интегральные белки можно выделить только после полного разрушения бислоя с помощью детергентов или органических растворителей.

Способы прикрепления белков к мембране довольно разнообразны.

Липидный бислой является непроницаемым барьером для большинства водорастворимых молекул и ионов, и их перенос через мембраны зависит от деятельности **транспортных белков**. Выделяют два

основных типа транспортных белков: каналы (поры) и переносчики. **Каналы** – это туннели, пересекающие мембрану, в которых места связывания транспортируемых веществ доступны на обеих поверхностях мембраны одновременно. Каналы в процессе транспорта веществ не претерпевают каких-либо конформационных изменений, их конформация меняется только при открывании и закрывании. **Переносчики**, наоборот, в процессе переноса веществ через мембрану изменяют свою конформацию. Причем в каждый конкретный момент времени место связывания переносимого вещества в переносчике доступно только на одной поверхности мембраны.

Каналы, в свою очередь, делят на две группы: потенциалзависимые и регулируемые химически. Примером *потенциалзависимого канала* является  $K^+, Na^+$ -канал, его работа регулируется изменением напряжения электрического поля, т. е. эти каналы открываются и закрываются в ответ на изменение трансмембранного потенциала. *Химически регулируемые каналы* открываются и закрываются в ответ на связывание специфических химических агентов. Термины «пора» и «канал» обычно взаимозаменяемы, но под каналами чаще понимают ионные каналы, а поры представляют собой неселективные структуры, различающие вещества по размеру и пропускающие достаточно малые молекулы.

Переносчики также делят на две группы: пассивные и активные. С помощью *пассивных переносчиков* через мембрану транспортируются вещества одного типа. Пассивные переносчики задействованы в облегченной диффузии и лишь увеличивают поток вещества, осуществляемый по электрохимическому градиенту. *Активные переносчики* транспортируют вещества через мембрану с затратами энергии. Эти транспортные белки накапливают вещества на одной из сторон мембраны, перенося их против электрохимического градиента. Скорость транспорта зависит от типа переносчиков. Часто для обозначения отдельных переносчиков используют термины «пермеаза», «транслоказа», являющиеся синонимами термина «переносчик».

В клеточных мембранах функционирует большое количество различных **ферментов**. Одни из них локализуются в мембране, катализируя превращения гидрофобных соединений; другие располагаются в мембране в строгой очередности, катализируя последовательные стадии жизненно важных процессов; третьи нуждаются в содействии липидов для стабилизации своей конформации и поддержания активности. В биомембранах обнаружены ферменты – представители всех известных классов. Они могут пронизывать мембрану насквозь, присутствовать в ней в растворенной форме или, являясь периферическими



белками, связываться с мембранными поверхностями в ответ на какой-либо сигнал. Выделяют следующие *типы* мембранных ферментов:

1. Трансмембранные ферменты, катализирующие сопряженные реакции на противоположных сторонах мембраны. Они имеют несколько активных центров, расположенных на противоположных сторонах мембраны. К ним относятся компоненты дыхательной цепи или фотосинтетические редокс-центры, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, связанные с транспортом электронов и созданием ионных градиентов на мембране.

2. Трансмембранные ферменты, участвующие в транспорте веществ. Например, транспортные белки, сопрягающие перенос вещества с гидролизом АТФ, обладают каталитической функцией.

3. Ферменты, катализирующие превращение связанных с мембраной субстратов. Они участвуют в метаболизме мембранных компонентов – фосфо-, гликолипидов, стероидов и др.

4. Ферменты, участвующие в превращениях водорастворимых субстратов. С помощью мембран ферменты могут концентрироваться в тех областях мембран, где содержание их субстратов наибольшее. Например, ферменты, гидролизующие белки и крахмал, прикрепляются к мембранам микроворсинок кишечника.

К мембранным белкам относятся также **белки цитоскелета**. *Цитоскелет* – это сложная сеть белковых волокон разного типа, присутствующая только в клетках эукариот. Цитоскелет обеспечивает механическую опору для плазматической мембраны, определяет форму клетки и местоположение органелл. С участием цитоскелета осуществляются эндо- и экзоцитоз, фагоцитоз, амебоидное движение. Таким образом, цитоскелет является динамическим каркасом клетки.

Цитоскелет формируется из волокон трех типов: микрофиламентов, промежуточных филаментов и микротрубочек. Эти структуры пронизывают клетку в разных направлениях и тесно связываются с плазматической мембраной, прикрепляясь к ней в некоторых точках. Эти участки мембраны играют важную роль в межклеточных контактах, трансмембранном распределении липидов и белков в мембранах, с их помощью клетки прикрепляются к субстрату.

**Углеводные компоненты** содержатся в мембранах эукариотических клеток в составе гликопротеинов и гликолипидов – олигосахаридных боковых цепей, ковалентно присоединенных к мембранным белкам и в меньшей степени к липидам. *Гликолипиды* представлены производными сфингозина с одним или более остатками сахара. В мембранных *гликопротеинах* одна или несколько углеводных цепей присоединены

к боковым цепям серина, треонина или аспарагина. Олигосахаридные цепи гликопротеинов и гликолипидов в плазматических мембранах локализованы исключительно на наружной стороне мембраны, так как они обладают ярко выраженными гидрофильными свойствами. Подавляющая часть белков плазматической мембраны, выступающих на поверхности клеток, в том числе рецепторов и транспортных белков, связана с остатками сахаров. Углеводные компоненты гликопротеинов способствуют поддержанию асимметрии биомембран, а также защищают белок от протеолиза и участвуют в межклеточном узнавании и адгезии. Гликолипиды так же, как и гликопротеины, выполняют роль рецепторных молекул, которые взаимодействуют с внеклеточными компонентами и инициируют специфический клеточный ответ.

**Характерные свойства биомембран.** Несмотря на различия в составе формирующих мембраны компонентов, можно выделить следующие свойства биомембран, позволяющие говорить об универсальности их строения.

**Текучесть мембраны.** Это свойство обусловлено постоянным движением мембранных компонентов. Мембраны – это динамические структуры, в которых липиды и белки совершают движения разных типов с различной скоростью. Эти свойства характеризуют жидкокристаллическое состояние мембраны. При переходе мембраны в фазу геля ее текучесть уменьшается и, следовательно, резко нарушается организация и функционирование компонентов мембраны (особенно белков). Поэтому организмы стараются поддерживать мембраны в жидкокристаллическом состоянии. Прокариоты регулируют текучесть своих мембран путем изменения числа двойных связей и длины углеводородных цепей в липидных молекулах. У эукариот ключевым регулятором текучести мембран является также холестерин.

Для компонентов мембраны характерны следующие *типы* движения:

- вращательное движение (вокруг продольной оси, перпендикулярной плоскости бислоя) липидных молекул, которое совершается очень быстро с частотой  $10^9-10^{10} \text{ с}^{-1}$ . При этом наибольшая подвижность наблюдается у центра бислоя, а наименьшая – около полярных головок. Вращательное движение характерно и для большинства мембранных белков, но с гораздо меньшей скоростью, так как белки имеют больший размер и часто формируют агрегаты;
- латеральное перемещение (в плоскости мембраны) молекул липидов. Скорость латеральной диффузии определяется микровязкостью мембран, которая, в свою очередь, зависит от относительного содержания насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Плотность упа-

ковки, а следовательно, и микровязкость меньше при преобладании ненасыщенных и больше при преобладании насыщенных жирных кислот. За 1 с фосфолипидная молекула совершает 1000–100 000 скачков с размером шага, равным ее диаметру (~1 нм). Латеральная диффузия белков органичена, что обусловлено большим размером белковых молекул, их связью с другими белками или с цитоскелетом;

- миграция молекул с одной стороны мембраны на другую (*флип-флоп перескок*), или трансмембранные перемещения. Это наиболее медленный способ движения мембранных компонентов, его скорость для фосфолипидов составляет несколько суток. Причиной такого медленного движения является его энергетическая невыгодность: липиду с полярной головкой требуется пересекать гидрофобную область бислоя. Однако этот тип движения может ускоряться в присутствии некоторых интегральных белков или при возмущениях в бислое. Для белков в естественных мембранах флип-флоп перескок пока не обнаружен. Считается, что белки, находясь в плоскости бислоя, не меняют своей топологической ориентации. Они встраиваются в мембрану в строго определенной ориентации относительно обеих ее поверхностей и остаются в таком положении в течение всего времени их жизни.

**Асимметрия мембраны.** Все природные мембраны асимметричны, что обусловлено различиями в составе омывающих их сред и составе липидов, белков и углеводов наружной и внутренней поверхностей мембраны (поперечная асимметрия). Например, наружная поверхность плазматической мембраны контактирует с окружающим водным раствором, а внутренняя поверхность – с клеточным содержимым. Кроме того, поверхности мембраны различаются по своей кривизне: наружная поверхность выпуклая, а внутренняя – вогнутая. В результате липидные, белковые и углеводные молекулы распределены между двумя слоями бислоя асимметрично. Например, гликолипиды всегда встроены в наружную часть бислоя, так что их углеводная часть направлена во внеклеточную среду. Еще большую асимметрию, которая обусловлена отсутствием трансмембранных перемещений белков на всем протяжении их существования в мембране, имеют интегральные и периферические белки.

Асимметрию мембран также определяет взаимодействие липидов с цитоскелетом. Трансмембранная асимметрия обуславливает чувствительность мембраны к изменениям среды по обе ее стороны и очень важна для функционирования клетки.

Между внутренними мембранами эукариот происходит постоянное перераспределение липидных молекул в ходе процесса межмембранного

транспорта липидов, который обеспечивается специфическими белками. Это позволяет клетке регулировать скорость протекающих в мембранах процессов.

## 5.2. Перекисное окисление липидов

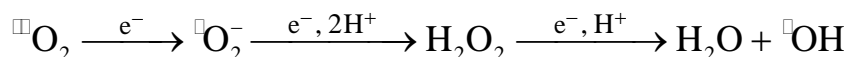
Процессы окисления липидов протекают как в живых клетках (*in vivo*), так и при хранении выделенных липидов (*in vitro*). Кислород, необходимый для функционирования клеток, является одновременно и токсичным для них веществом. В процессе метаболизма в клетках аэробных организмов постоянно образуются активные формы кислорода, которые при нарушении работы защитных систем организма могут оказывать токсическое действие и приводить к окислительному повреждению тканей и органов. Активными они являются потому, что представляют собой высокореакционные формы, чаще всего свободные радикалы (или их источники), и способны реагировать со многими соединениями клетки или запускать в клетке неконтролируемые свободнорадикальные реакции, которые приводят к повреждению липидов. При окислении жирных кислот образуются перекиси, поэтому такое окисление называют **перекисным окислением липидов** (ПОЛ). В результате реакций ПОЛ образуется широкий спектр продуктов – промежуточные (алкильные, алкоксильные и гидропероксидные радикалы, гидропероксиды), вторичные (эпоксиды, эндопероксиды, конъюгированные диены и триены, карбонильные соединения) и конечные (продукты рекомбинации радикалов, аддукты альдегидов с биополимерами, спирты, простые эфиры, углеводороды).

Наиболее чувствительны к действию активных форм кислорода полиеновые жирные кислоты, которые в основном локализованы в фосфолипидах биомембран. Свойства мембран изменяются, в них появляются гидрофильные зоны, через которые проникает вода, вызывая набухание клеток и изменение их внутреннего состава. Продукты ПОЛ обладают способностью непосредственно увеличивать ионную проницаемость липидного бислоя. Ионы  $Ca^{2+}$  и  $Na^{+}$  входят в клетки, что приводит к разрушению субклеточных структур. Свободные радикалы проникают в ядро и митохондрии, окисляя ДНК, что ведет к разрыву цепей ДНК и потере митохондриями способности осуществлять синтез АТФ, в результате клетка оказывается в условиях энергетического голода.

Результатом перекисного повреждения мембран клеток является также уменьшение стабильности липидного бислоя, что может при-

вести к электрическому пробоем мембраны собственным мембранным потенциалом и, как следствие, к разрыву мембраны и полной потере ею своих барьерных функций.

**Активные формы кислорода. Проксиданты.** Молекулы кислорода могут принимать по одному электрону из различных реакций и последовательно превращаться в активные формы кислорода (АФК). К ним относятся супероксид-анион-радикал  $\cdot\text{O}_2^-$ , гидроксильный радикал  $\cdot\text{OH}$ , гидропероксидный радикал  $\cdot\text{OOH}$ , пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$ :



Супероксид-анион-радикал  $\cdot\text{O}_2^-$  способен непосредственно повреждать большинство биомолекул – липиды, белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, низкомолекулярные метаболиты, практически всегда действует поблизости от места своего образования, не способен проникать через биомембраны.

Гидроксильный радикал  $\cdot\text{OH}$  является одной из наиболее токсичных АФК. Он способен взаимодействовать практически со всеми классами органических соединений.

Пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  практически не может сам по себе индуцировать ПОЛ и окислительное повреждение белков. Токсичность  $\text{H}_2\text{O}_2$  для клеток связана с его участием в образовании гидроксильного радикала.

АФК могут образовываться как ферментативным, так и неферментативным путем (табл. 5.2).

Таблица 5.2

**Пути образования активных форм кислорода**

Ферменты, типы реакций	Механизм	Активные формы кислорода
Ферментативные пути образования АФК		
Дыхательная цепь митохондрий	Нарушение переноса электронов в дыхательной цепи приводит к образованию АФК	Главным образом $\cdot\text{O}_2^-$
Оксидазы	Одним из основных продуктов реакций, катализируемых оксидазами, является $\text{H}_2\text{O}_2$ . При нарушениях функционирования ферментов, а также при катализе реакций с участием некоторых определенных субстратов происходит неполное восстановление кислорода с образованием $\cdot\text{O}_2^-$	$\cdot\text{O}_2^-$ , $\text{H}_2\text{O}_2$

Ферменты, типы реакций	Механизм	Активные формы кислорода
Липоксигеназа	Катализирует окисление некоторых ненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой) с образованием их гидроперекисей, которые затем неферментативно деградируют с высвобождением свободных радикалов	RO <sup>•</sup>
Неферментативные пути образования АФК		
Реакция Хабера – Вейсса	$\cdot\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ Катализаторами реакции являются металлы переменной валентности	$\cdot\text{OH}$
Реакция Фентона	$\text{Me}^{n+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Me}^{(n+1)+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ или $\text{Me}^{n+} + \text{ROOH} \rightarrow \text{Me}^{(n+1)+} + \text{RO}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ В реакции Фентона участвуют катионы металлов переменной валентности в низшей степени окисления ( $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Cu}^+$ , $\text{Tl}^{3+}$ , $\text{Cr}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ )	$\cdot\text{OH}$ , RO <sup>•</sup>

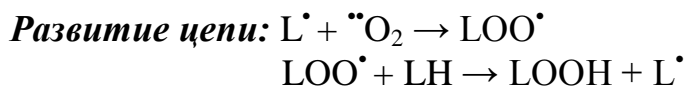
В процессе перекисного окисления липидов окислительной модификации, в первую очередь, подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты – олеиновая (C18:1), линолевая (C18:2), линоленовая (C18:3), арахидоновая (C20:4) и их остатки в составе сложных липидов. Растительные масла, содержащие эти жирные кислоты в больших количествах, нестойки при хранении вследствие окисления липидов кислородом воздуха. Начальными продуктами окисления являются разнообразные по строению пероксиды и гидропероксиды, конечными – спирты, альдегиды, кетоны, кислоты и др. Именно эти вещества вызывают появление неприятного запаха и горького вкуса (прогоркание масла). Автокаталитическое (или неферментативное) окисление липидов ускоряется при повышении температуры хранения, а также под действием световой энергии. Ионы металлов переменной валентности (Cu, Fe, Mn, Ni) могут катализировать процесс автоокисления липидов.

Ферментативное окисление липидов протекает при участии ферментов липазы (катализирует гидролиз триацилглицеринов до глицерина и свободных жирных кислот) и липоксигеназы (катализирует окисление ненасыщенных жирных кислот с образованием их гидроперекисей).

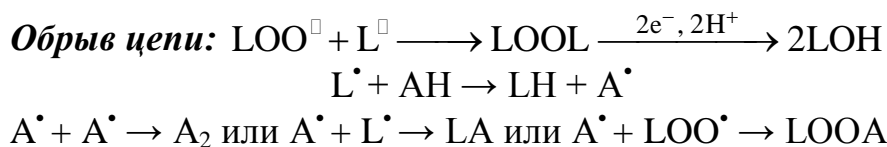
Перекисное окисление полиненасыщенных жирных кислот протекает по следующей схеме.



где LH – липид, содержащий полиненасыщенные жирные кислоты;  $\text{}^{\bullet}\text{O}_2$  – молекулярный кислород;  $\text{L}^{\bullet}$  – свободный радикал липида;  $\text{HOO}^{\bullet}$  – гидропероксидный радикал.

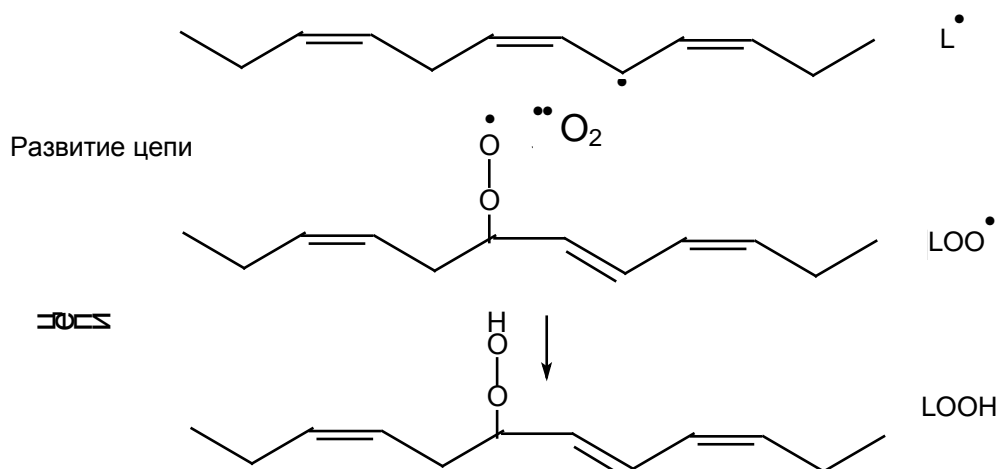


где  $\text{LOO}^{\bullet}$  – перекисный радикал липида; LOOH – гидроперекись липида.



где LOOL – пероксид липидов; LOH – гидроксид липида; AH – антиоксидант;  $\text{A}^{\bullet}$  – радикал антиоксиданта;  $\text{A}_2$  – неактивный димер антиоксиданта; LA – конъюгат липида с антиоксидантом; LOOA – конъюгат перекисного радикала липида с антиоксидантом.

Инициация цепи



Легче всего свободные радикалы кислорода отрывают электрон от  $\text{CH}_2$ -групп, находящихся между двумя двойными связями полиненасыщенных жирных кислот. При этом образуется свободный радикал  $\text{L}^{\bullet}$  жирной кислоты. Затем в результате развития цепной реакции происходит перемещение двойной связи в сопряженное положение и образуется перекисный радикал липида  $\text{LOO}^{\bullet}$ , который реагирует с новой молекулой липида LH с образованием гидроперекиси липида LOOH и

нового свободного радикала липида  $L^{\bullet}$ . Перекисный радикал и гидроперекись липида в отличие от свободного радикала липида представляют собой диеновые конъюгаты, имеющие максимум поглощения в УФ-области спектра. Обрыв цепи происходит при взаимодействии перекисного и свободного радикалов липида с образованием пероксида липидов LOOL и гидроксида липида LOH, а также при взаимодействии свободного радикала липида с антиоксидантом с образованием неокисленного липида и малоактивного радикала антиоксиданта. Последний подвергается димеризации или вступает в реакцию с другими радикалами, образуя неактивные продукты.

Химические соединения и физические факторы, влияющие на скорость перекисного окисления липидов, принято делить на прооксиданты (ускоряют процессы перекисного окисления липидов) и антиоксиданты (тормозят перекисное окисление липидов). К **прооксидантам** относятся высокие концентрации кислорода, ионы  $Fe^{2+}$ , а также ферментные системы, генерирующие супероксидные радикалы (например, ксантиноксидаза, ферменты плазматической мембраны фагоцитов и др.).

**Антиоксиданты.** Свободнорадикальные процессы в норме происходят в клетке постоянно, но с низкой скоростью, так как клетки имеют различные системы защиты от активных форм кислорода или антиоксидантные системы, которые могут останавливать развитие цепи свободнорадикальных реакций. Их условно делят на ферментные и неферментные.

К **неферментным антиоксидантам** относятся:

1. Низкомолекулярные антиоксиданты, синтезируемые в организме, – глутатион, мочевиная кислота, аминокислоты, содержащие сульфгидрильную SH-группу (цистеин) и др. Особого внимания заслуживают низкомолекулярные белки – металлотионеины, содержащие до 30% цистеина, который в составе этих белков в 770 раз более эффективен в процессе инактивации свободных радикалов, чем цистеин глутатиона.

2. Естественные антиоксиданты, поступающие в организм с пищей, – аскорбиновая кислота (витамин С),  $\alpha$ -токоферол (витамин Е), провитамин А, рутин (витамин Р) и другие флавоноиды,  $\beta$ -каротин и другие каротиноиды, меланоидины. Наиболее активен витамин Е: он вследствие своей гидрофобности концентрируется в липидном бислое мембран, где нейтрализует свободные радикалы, связывая их и превращаясь при этом в стабильный (малоактивный) радикал за счет отщепления подвижного атома водорода ОН-группы. Кроме витаминов и их предшественников, к этой же группе веществ могут быть отнесе-



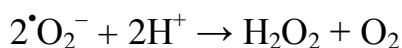
ны химические элементы, входящие в состав активных центров антиоксидантных ферментов, – селен, четыре атома которого входят в состав глутатионпероксидазы; цинк, медь, входящие в состав супероксиддисмутазы, и др.

3. Специфические белки и пептиды, связывающие ионы металлов переменной валентности, которые являются катализаторами реакций свободнорадикального окисления липидов, – ферритин, трансферин и церулоплазмин (в плазме крови), карнозин (в мышцах) и др.

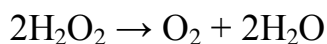
Антиоксидантами могут выступать и искусственно синтезированные соединения – ионол (2,6-ди-*трет*-бутил-*n*-крезол), бутилокситолуол, додецилгаллат и др.

К **ферментным антиоксидантам** относится ряд гемсодержащих ферментов, инактивирующих активные формы кислорода:

- супероксиддисмутаза, катализирующая реакцию



- каталаза, катализирующая реакцию



- глутатионпероксидаза, катализирующая реакцию



**Исследование влияния антиоксидантов на процесс перекисного окисления липидов.** Одним из конечных продуктов деградации полиненасыщенных жирных кислот при перекисном окислении липидов является малоновый диальдегид  $\text{OHC-CH}_2\text{-CHO}$ . Это химически очень активное вещество, которое своими альдегидными группами взаимодействует с  $\text{NH}_2$ -группами белков, вызывая их необратимую денатурацию. О протекании реакции перекисного окисления липидов судят по образованию в результате взаимодействия при высокой температуре в кислой среде малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 532 нм. Интенсивность красного окрашивания пропорциональна интенсивности процесса перекисного окисления липидов, т. е. чем интенсивнее окрашен раствор, тем больше количество образовавшихся продуктов перекисного окисления липидов. Сравнивая между собой интенсивности окрашивания растворов, содержащих разные антиоксиданты и без них, делают вывод о степени окисляемости липидов и влиянии антиоксидантов на интенсивность перекисного окисления липидов.

### **5.3. Методы выделения и хроматографического анализа липидов**

Схема выделения и анализа липидов представлена на рис. 5.3.

Рис. 5.3. Общая схема выделения и анализа липидов

Процедура **выделения липидов** из биологического материала включает следующие стадии:

- измельчение биологического материала до гомогенного состояния (гомогенизация);
- перевод липидов в растворенное состояние (экстракция);
- освобождение липидного экстракта от нелипидных примесей;
- разделение водной и органической фаз;
- высушивание липидного экстракта.

Перед выделением липидов из биологических объектов (органов и тканей животных, клеток микроорганизмов и растений) исследуемый материал тщательно измельчают до гомогенного состояния (гомогенизация), т. е. подвергают дезинтеграции вплоть до разрушения клеточной структуры с целью высвобождения клеточного содержимого. Для разрушения клеток применяют ряд физических методов – гомогенизацию с использованием механических гомогенизаторов различных конструкций, ультразвуковую дезинтеграцию, замораживание-оттаивание и др. При выборе метода разрушения клеток следует учитывать структурные особенности животных, растительных и микробных клеток. Наиболее простым методом является гомогенизация путем растирания клеток с окисью алюминия или абразивным порошком в ступке при помощи пестика.

Гомогенизацию биологического материала обычно сочетают с одновременной экстракцией липидов из гомогенатов с целью перевода липидов в растворенное состояние. Для экстракции липидов используют как неполярные (хлороформ, бензин, гексан, диэтиловый эфир), так и полярные (метанол, этанол, изопропанол, ацетон) растворители. При этом принимают во внимание то, что липиды способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных (сложноэфирных, амидных, гликозидных) связей. Относительно неполярные растворители разрушают белок-липидные комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями. Полярные растворители разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикула. Липиды, находящиеся в комплексах и связанные ковалентными связями с молекулами других соединений, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

При использовании для экстракции липидов смеси растворителей, содержащей спирт, в экстракт помимо липидов переходят нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т. д.). Для удаления нелипидных примесей экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами (не менее 0,2 объема от объема липидного экстракта). При этом образуется двухфазная система, состоящая из органической и водной фаз. В водную фазу переходит большая часть полярных соединений. Органическую фазу, содержащую большую часть экстрагируемых липидов, отделяют от водной декантацией или центрифугированием. Окончательное удаление воды из органической фазы (высушивание) проводят путем добавления порошка безводного сульфата натрия, который является хорошим водоотнимающим средством, образуя с водой кристаллогидраты. Следует иметь в виду, что при удалении нелипидных примесей происходит частичная потеря кислых липидов.

Как указывалось выше, липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградации. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, предварительно удаляя из растворителей кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в стеклянной посуде с шлифованными стеклянными пробками при  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже в присутствии инертных газов. Иногда используют антиоксиданты, предотвращающие окислительное расщепление ненасыщенных жирных кислот.

**Хроматографический анализ липидов.** Липиды, выделенные из биологического материала, представляют собой сложную смесь. Наиболее эффективными и широко применяемыми методами качественного и количественного анализа компонентного состава смесей липидов являются методы газожидкостной и тонкослойной хроматографии. Последняя используется только для качественного анализа липидов.

Хроматография – это метод разделения, а также качественного и количественного анализа смеси веществ, основанный на перемещении дискретной зоны вещества вдоль слоя сорбента (неподвижной фазы) в потоке подвижной фазы с многократным повторением сорбционных и десорбционных актов. Принцип метода описан в пункте 3.2.4.

**Газожидкостная хроматография** – хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара, а неподвижная фаза представляет собой твердый пористый носитель с мономолекулярным слоем вещества, которое селективно адсорбирует отдельные

компоненты разделяемых смесей. Этот метод применим только для летучих соединений.

Неподвижную фазу помещают в длинную и тонкую хроматографическую колонку, а подвижную пропускают через нее. Пробу анализируемой смеси вводят в колонку при температуре, достаточно высокой для перевода входящих в ее состав компонентов в газообразное состояние. При этом компоненты разделяемой смеси перемещаются по колонке с потоком газа-носителя. По мере движения разделяемая смесь многократно распределяется между газом-носителем (подвижной фазой) и неподвижной фазой, которой заполнена колонка. Принцип разделения основан на неодинаковом сродстве компонентов смеси к летучей подвижной фазе и неподвижной жидкой фазе в колонке. Компоненты смеси селективно задерживаются неподвижной жидкой фазой в соответствии с их относительной способностью адсорбироваться ею, поэтому они передвигаются с разной скоростью и таким образом разделяются. Степень разделения зависит как от полярности, так и от летучести компонентов смеси.

Скорости перемещения отдельных веществ определяются значениями коэффициентов распределения веществ  $K$  между жидкой и газовой фазами. Хорошо сорбируемые вещества (значение  $K$  велико) передвигаются вдоль слоя неподвижной фазы по колонке медленнее, чем плохо сорбируемые. Поэтому быстрее всех из колонки выйдет компонент, у которого значение  $K$  наименьшее. После выхода из колонки вещества вместе с газом-носителем попадают в детектор. Электрический сигнал детектора, пропорциональный концентрации определяемого компонента в газе-носителе, записывается в виде хроматограммы на ленте самописца или же регистрируется на мониторе компьютера.

Хроматограмма – это кривая элюирования, характеризующая зависимость интенсивности сигнала детектора от времени с момента начала разделения. Она отражает последовательность элюирования компонентов смеси на выходе из колонки. Хроматограмма состоит из базовой линии и пиков. Базовая (нулевая) линия соответствует участку хроматограммы, полученному при регистрации сигнала детектора во время выхода из колонки чистого газа-носителя. Пик – кривая (в идеале приближающаяся к кривой гауссова распределения), которая описывает постепенное возрастание концентрации вещества в газе-носителе до максимальной (фронт) на выходе из колонки и последующее ее уменьшение (тыл). Площадь хроматографического пика прямо пропорциональна количеству вещества, соответствующего

этому пику. Время, прошедшее от момента ввода пробы в колонку до момента появления максимума пика исследуемого вещества на хроматограмме, называется *временем удерживания*. Другими словами, время удерживания – это время, в течение которого данное вещество находится в колонке. При постоянных условиях работы и составе фаз хроматографической системы время удерживания является величиной постоянной для данного вещества.

Газожидкостную хроматографию осуществляют при помощи специальных приборов – газожидкостных хроматографов. В аппаратном оформлении газожидкостной хроматограф представляет собой совокупность нескольких самостоятельных, параллельно функционирующих систем, включающих систему разделения и систему количественного измерения содержания каждого компонента. В их состав входят:

- источник газа-носителя и блок подготовки газов;
- инжектор для введения пробы в колонку (испаритель);
- хроматографическая колонка;
- термостат колонки;
- детектор;
- система регистрации и обработки данных.

В газожидкостной хроматографии в качестве подвижной фазы применяются инертные газы, сжатые до давления 15 МПа, – аргон, азот, водород, гелий, которые выбирают в зависимости от типа используемого детектора. Легкие газы-носители (водород, гелий) лучше применять для колонок с малым содержанием неподвижной фазы, тяжелые газы-носители (азот, аргон) – для колонок с высоким содержанием неподвижной фазы. Система подготовки газов включает блок регулировки расходов газов, обеспечивающий очистку, подачу и стабилизацию скорости и расхода газа-носителя в колонке, а также других газов, необходимых для работы детектора.

Система дозирования позволяет вводить в поток газа-носителя (вблизи от места входа газа-носителя) определенное количество анализируемой смеси в газообразном или жидком состоянии (в виде раствора в легколетучем растворителе) с помощью микрошприца. Это устройство с самоуплотняющейся резиновой (каучуковой) мембраной или кран-дозатор. Устройство для ввода пробы необходимо термостатировать, поддерживая температуру, при которой жидкая проба испарялась бы полностью. Температура испарителя должна быть равной или превышающей на  $30^{\circ}\text{C}$  температуру колонки.

Неподвижная жидкая фаза определяет селективные взаимодействия между компонентами смеси и твердым носителем, т. е. характеризует последовательность выхода из колонки и отношение времени удерживания компонентов смеси. При выборе неподвижной фазы пользуются правилом «подобное растворяется в подобном». Она должна быть нелетучей при рабочей температуре колонки, с высокой температурой кипения, термостойкой и химически инертной по отношению к хроматографируемым соединениям. Неподвижная жидкая фаза должна фиксироваться на носителе таким образом, чтобы газ-носитель легко вступал с ней в контакт.

Хроматографическая колонка представляет собой трубку с фиксированной неподвижной фазой, через которую протекает подвижная фаза. В зависимости от расположения неподвижной фазы колонки делят на насадочные (набивные) и капиллярные. Насадочные колонки заполнены адсорбентом или инертным твердым носителем с нанесенной неподвижной фазой. В капиллярных колонках неподвижная фаза находится в виде мономолекулярного слоя на внутренней поверхности стенки капилляра. Поток газа двигается по такой колонке с большой линейной скоростью, не встречая значительного сопротивления, поэтому капиллярные колонки имеют большую длину. Отличительной особенностью капиллярных колонок является очень высокая эффективность. Современные газовые хроматографы позволяют применять одновременно две и более колонок.

Температура колонки должна быть регулируемой и поддерживаться с точностью до  $0,1-0,2^{\circ}\text{C}$ . Для этого колонку помещают в термостат. Наиболее распространено воздушное термостатирование с принудительной циркуляцией воздуха и без нее.

Хроматографический процесс может проводиться при разных температурных режимах. Изотермический метод предполагает, что температура колонки на протяжении всего процесса разделения поддерживается постоянной. Градиентный метод (с программированием температуры) обеспечивает постепенное повышение температуры колонки на протяжении всего процесса разделения. Он используется для разделения смеси веществ, кипящих в широком диапазоне температур.

Детектор – устройство, предназначенное для обнаружения в потоке газа-носителя анализируемых веществ по какому-либо физико-химическому параметру. Величина электрического сигнала детектора зависит как от природы компонента, так и содержания его в анализируемой смеси.

Система регистрации и обработки данных регистрирует электрический сигнал детектора в виде хроматограммы. Современные хроматографы имеют встроенные электронные интеграторы (измеряют время удерживания и определяют площади пиков) или компьютеры с банком данных, которые позволяют вести управление экспериментом и обработку результатов (качественную и количественную расшифровку хроматограмм) в диалоговом режиме.

**Качественный анализ.** Идентификацию компонентов смеси проводят по времени удерживания, которое для данного соединения является постоянной величиной при стандартных условиях хроматографирования. При этом время удерживания анализируемого соединения сравнивают со временем удерживания стандартного вещества, подвергнутого хроматографированию в тех же условиях. Совпадение значений времени удерживания свидетельствует об идентичности анализируемого и стандартного соединений, за исключением тех случаев, когда разные по природе вещества обладают одинаковыми значениями времени удерживания. Этот метод можно модифицировать путем добавления в исследуемую смесь при повторном хроматографировании стандартного компонента, наличие которого в этой смеси предполагается. Если добавляемое вещество идентично анализируемому, число пиков на хроматограмме остается неизменным, однако интенсивность одного из них увеличивается по сравнению с интенсивностью этого пика на хроматограмме, полученной до введения стандартного вещества.

**Количественный анализ.** Количество каждого компонента смеси определяют по площади соответствующего пика, которая рассчитывается в автоматическом режиме с помощью электронного интегратора. При обработке хроматограмм вручную площадь пика находят умножением высоты пика на его ширину, измеренную на половине высоты пика. Ширину пика измеряют как расстояние между точками контура пика на половине его высоты, а высоту пика считают как перпендикуляр, опущенный из максимума пика на нулевую линию, либо как перпендикуляр, опущенный на нулевую линию из точки пересечения касательных к кривой в точках перегиба.

При количественном анализе компонентов смеси используют метод абсолютной калибровки, метод внутреннего стандарта или метод стандартной добавки.

*Метод абсолютной калибровки* основан на построении калибровочного графика зависимости площади пика от количества соответствующего вещества в смеси. Эту зависимость определяют экспериментально, разделяя искусственные смеси веществ, взятых в строго опреде-



ленных количествах. Можно исследовать одинаковые количества смесей разного состава или неодинаковые количества одной и той же смеси. Одним из основных условий получения точных результатов является воспроизводимость объема пробы. При хроматографировании анализируемой смеси по калибровочному графику по площади пиков определяют количество каждого компонента. Зная количество введенной смеси, рассчитывают процентное содержание данного компонента в смеси. Этот метод обладает высокой точностью и используется при определении одного или нескольких компонентов смеси.

*Метод внутреннего стандарта* основан на добавлении определенного количества стандартного вещества к определенному количеству анализируемой смеси. Соотношения анализируемых веществ и стандарта различны. Стандартное вещество не должно входить в состав исследуемой смеси, но по структуре оно должно быть похоже на анализируемое соединение. Поэтому при хроматографировании стандартное вещество движется вдоль колонки в непосредственной близости от исследуемого соединения, и пик стандарта располагается достаточно близко от пика анализируемого соединения, а также полностью отделяется от пиков других компонентов смеси. После хроматографирования измеряют площади пиков анализируемого соединения и стандарта, рассчитывают их отношение и строят калибровочный график зависимости отношения площадей пиков от отношения масс анализируемого компонента и стандарта. Такие графики строят для каждого компонента анализируемой смеси.

При анализе смеси неизвестного состава к ней добавляют известное количество стандартного вещества и хроматографируют. Затем рассчитывают отношение площадей пиков анализируемого компонента и стандарта и по калибровочному графику определяют отношение их масс. Поскольку количество добавленного стандарта известно, содержание анализируемого компонента рассчитывают из отношения их масс. К достоинствам метода относятся хорошая воспроизводимость и высокая точность. Однако этим методом можно пользоваться только в области линейной зависимости между показаниями детектора и концентрацией анализируемого компонента.

*Метод стандартной добавки* аналогичен вышеописанному, только добавляемое к исследуемой смеси стандартное вещество является одним из компонентов смеси. При этом на хроматограмме увеличивается площадь соответствующего пика по сравнению с площадью этого пика на хроматограмме, полученной до введения стандартного вещества. Этот метод используют в тех случаях, когда

отсутствует возможность выбора стандарта, который регистрировался бы в виде отдельного пика.

*ГЖХ-анализ жирно-кислотного состава липидов.* Сами по себе триацилглицерины являются нелетучими соединениями, и исследовать их напрямую при помощи этого метода нельзя. Поэтому проводят кислотный гидролиз триацилглицеринов с одновременной этерификацией образующихся жирных кислот метиловым спиртом. Метиловые эфиры жирных кислот являются летучими соединениями и могут быть проанализированы методом ГЖХ.

**Тонкослойная хроматография (ТСХ)** – это универсальный, высокочувствительный и простой метод анализа, который используется для быстрого разделения веществ, основанного на различии в скорости перемещения компонентов смеси в плоском тонком слое адсорбента при их движении в потоке подвижной фазы (элюента), и требует микроколичеств разделяемых веществ.

В качестве адсорбентов используют мелкозернистые (диаметр частиц 2–40 мкм) силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, крахмал, полиамид, иониты. Суспензиями этих адсорбентов покрывают тонким слоем толщиной 0,1–0,3 мм пластинки из стекла, фольги или пластика. Для закрепления слоя применяют крахмал, гипс или другие связующие. Промышленностью выпускаются готовые пластинки с уже закрепленным слоем адсорбента.

Элюентами служат обычно смеси органических растворителей, водных растворов кислот, солей, комплексообразователей и др. При выборе элюента следует учитывать растворимость хроматографируемых соединений в подвижной фазе, полярность растворителя по отношению к разделяемым компонентам, а также его элюирующую силу, при которой значения  $R_f$  разделяемых компонентов будут равными 0,2–0,8. Чем больше элюирующая сила растворителя, тем меньше значение коэффициента адсорбции для данного растворенного вещества и адсорбента. При выборе элюента используют элюотропные ряды (табл. 5.3), где растворители расположены в порядке возрастания их элюирующей силы  $\xi$ . Для всех полярных адсорбентов наблюдается одинаковый порядок изменения элюирующей силы растворителей. Подвижная фаза должна быть достаточно летучей, чтобы после ее удаления с адсорбента можно было детектировать разделенные вещества. В зависимости от выбора хроматографической системы (состава подвижной и неподвижной фаз) в разделении веществ основную роль могут играть процессы адсорбции, экстракции, ионного обмена, комплексообразования. На практике обычно реализуются несколько механизмов разделения.

Таблица 5.3

## Элюотропные ряды органических растворителей

Растворитель	$\varepsilon^0$ (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	$n_D^{20}$	Граница пропускания УФ-света, нм	Температура кипения, °С
<i>n</i> -Пентан	0,00	1,358	210	36,0
<i>n</i> -Гептан	0,01	1,388	210	98,4
Циклогексан	0,04	1,427	210	81,0
Четыреххлористый углерод	0,18	1,466	265	76,7
Толуол	0,29	1,496	285	110,6
Бензол	0,32	1,501	280	80,1
Диэтиловый эфир	0,38	1,353	220	34,6
Хлороформ	0,40	1,443	245	61,2
Хлористый метилен	0,42	1,424	245	41,0
Тetraгидрофуран	0,45	1,408	220	65,0
Метилэтилкетон	0,51	1,381	330	79,6
Ацетон	0,56	1,359	330	56,2
Диоксан	0,56	1,422	220	104,0
Этилацетат	0,58	1,370	260	77,1
Диметилсульфоксид	0,62	1,478	270	190,0
Ацетонитрил	0,65	1,344	210	80,1
Изопропиловый спирт	0,82	1,380	210	82,4
Этиловый спирт	0,88	1,361	210	78,5
Метиловый спирт	0,95	1,329	210	65,0
Этиленгликоль	1,11	1,427	210	198,0
Уксусная кислота	Большая	1,372	251	118,5

На слой адсорбента вблизи основания пластинки тонким капилляром наносят капли образцов (2–10 мкл) в виде 0,1–1,0%-ных растворов анализируемых веществ в летучих растворителях. Линию старта отмечают на пластинке тонкозаточенным карандашом, не повреждая слой адсорбента, на расстоянии 1,5–2,0 см от основания пластинки. Расстояние между точками нанесения должно быть не менее 1–2 см. Диаметр пятна не должен превышать 3 мм. Растворы наносят в виде круглых пятен или коротких узких полосок, осторожно прикасаясь капилляром к поверхности пластинки, и дают раствору впитаться в слой адсорбента.

Пластинку основанием вниз помещают в наклонном положении в герметически закрывающуюся стеклянную камеру, на дне которой нахо-

дится элюент высотой 5–7 мм. Линия старта с нанесенными образцами должна находиться несколько выше уровня элюента в камере. Камеру закрывают стеклянной крышкой для лучшего насыщения ее парами элюента.

Элюент под действием капиллярных сил передвигается по слою адсорбента снизу вверх, увлекая за собой компоненты анализируемой смеси. В результате многократного повторения актов адсорбции и десорбции компоненты смеси в соответствии со своими коэффициентами распределения передвигаются с различной скоростью по мере подъема элюента и распределяются по дискретным зонам, образуя пятна. Как только растворитель дойдет до линии фронта, отстоящей от верхнего края пластинки на ~5 мм, пластинку вынимают из камеры, отмечают карандашом линию фронта и высушивают на воздухе до полного испарения подвижной фазы.

Затем проводят проявление хроматограмм с использованием методов, позволяющих сделать бесцветные пятна разделенных веществ видимыми. Дискретные зоны веществ обнаруживают при рассмотрении хроматограммы в УФ-свете с длиной волны 254 нм (при использовании для элюирования адсорбента с флюорогеном – неорганическим флуоресцентным индикатором), а также после обработки хроматограммы парами йода или после ее опрыскивания растворами реагентов, дающих цветное окрашивание с компонентами смеси. При полном разделении каждое пятно на пластинке соответствует индивидуальному веществу.

Положение пятна разделенного вещества определяют посредством измерения величины его подвижности  $R_f$  (*rate* – скорость; *fraction* – фракция):

$$R_f = \frac{A}{B}, \quad (5.1)$$

где  $R_f$  – подвижность вещества;  $A$  – расстояние, пройденное веществом от линии старта до середины пятна, см;  $B$  – расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта до линии фронта, см.

Величина  $A$  не может быть больше величины  $B$ , поэтому значения  $R_f$  лежат в пределах от 0 до 1. Величина  $R_f$  для каждого индивидуально-го вещества в данных условиях хроматографирования (подвижная и неподвижная фазы, температура) – величина постоянная. Качественный анализ компонентов смеси проводят на основании сравнения значений подвижности  $R_f$  анализируемых веществ с табличными данными или со значениями  $R_f$ , полученными для стандартных веществ («свидетелей») при хроматографировании их вместе с исследуемыми образцами. Стандартные вещества наносят на линию старта пластинки отдельными пятнами по обе стороны от ряда пятен исследуемых

веществ. Последний метод является единственным надежным методом качественного анализа соединений, позволяющим избежать влияния различных факторов на значения  $R_f$ .

*ТСХ-анализ липидов.* Используют готовые хроматографические пластинки Silufol. Для изучения влияния полярности элюента на  $R_f$  индивидуальных липидов в качестве подвижной фазы применяют смеси изопропилового спирта и гексана в различных соотношениях. Проявление хроматограмм осуществляют, обрабатывая их парами йода.

## **Лабораторная работа** **ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ**

*Цель работы* – освоение методов выделения липидов из растительного материала и их качественного анализа с помощью тонкослойной хроматографии; исследование процесса перекисного окисления липидов и влияния антиоксидантов на интенсивность окисления липидов.

*Реактивы, материалы и оборудование:* семена льна масличного; оксид алюминия; гексан; изопропиловый спирт; физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl); сульфат натрия (безводный); дистиллированная вода; этанол (96 об.%);  $1 \cdot 10^{-2}$  М растворы маннита, глутатиона, ионола,  $\alpha$ -токоферола;  $2 \cdot 10^{-2}$  М раствор FeSO<sub>4</sub>; 0,2 М раствор H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 1%-ный раствор тритона X-100; 0,6 М раствор HCl; 0,06 М раствор тиобарбитуровой кислоты в 50%-ном этаноле с 1% тритона X-100; 1%-ный раствор тритона X-100 в 50%-ном этаноле; 5 мМ раствор трилона Б; шпатели; фильтровальная бумага; ступки; пипетки на 1, 2, мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; химически чистые пробирки; пробирки с шлифованными стеклянными пробками; стеклянные воронки; кюветы для фотоэлектроколориметра; штативы для пробирок; электронные весы; ультратермостат; суховоздушный термостат; фотоэлектроколориметр.

### **Выполнение работы**

#### **1. Выделение липидов из растительного материала**

Небольшое количество (~0,5 г) семян льна масличного взвешивают, добавляют 1–2 мл смеси гексана и изопропилового спирта (1 : 1 об.) и растирают в фарфоровой ступке с 0,5–1,0 г окиси алюминия (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) в течение 10 мин. Затем приливают еще 3 мл экстрагента и снова растирают содержимое на протяжении 1–2 мин.

Полученную суспензию фильтруют через фильтровальную бумагу. Осадок на фильтре промывают 5 мл экстрагента, которым предварительно ополаскивают ступку и пестик. Для более полного удаления экстракта осадок на фильтре необходимо слегка (очень осторожно, чтобы не порвать фильтр) отжать. Затем экстракт липидов промывают физиологическим раствором (0,4 объема от объема липидного экстракта) для удаления нелипидных примесей. Смесь тщательно перемешивают встряхиванием.

После расслоения фаз верхнюю органическую фазу аккуратно при помощи пипетки переносят в отдельную пробирку и добавляют к ней 0,3–0,5 г безводного сульфата натрия до просветления экстракта. Полученный липидный экстракт сливают с осадка сульфата натрия в небольшую колбочку или пробирку с шлифованной стеклянной пробкой (**резиновые пробки использовать нельзя!**) и хранят в холодильнике.

## 2. Качественный анализ липидов методом тонкослойной хроматографии

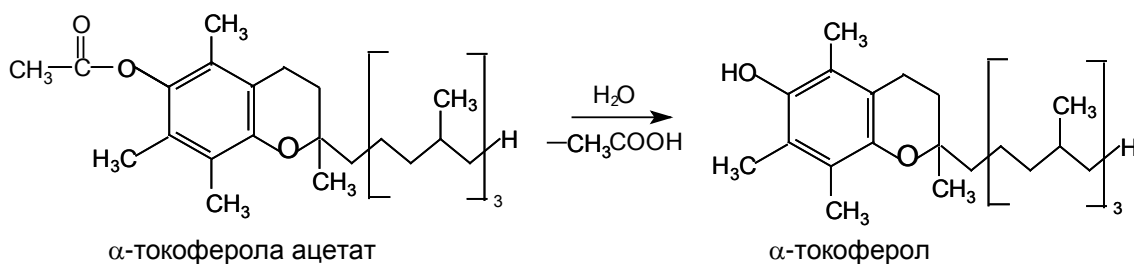
Данный метод проводят, как описано выше.

## 3. Исследование процесса перекисного окисления липидов

0,2 мл полученного липидного экстракта помещают в пробирку и выпаривают растворитель при комнатной температуре. Затем к экстракту добавляют 1,1 мл 96%-ного этилового спирта и 0,3 мл дистиллированной воды. Пробирку интенсивно встряхивают для максимальной дезинтеграции и полного эмульгирования капель липидов.

К липидной эмульсии добавляют 0,2 мл  $1 \cdot 10^{-2}$  М раствора исследуемого антиоксиданта (маннит, глутатион,  $\alpha$ -токоферол (см. примечание) или ионол). Реакцию перекисного окисления липидов запускают добавлением 0,2 мл  $2 \cdot 10^{-2}$  М раствора  $\text{FeSO}_4$  и 0,2 мл 0,2 М раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  (реакция Фентона).

**Примечание.** При использовании в качестве антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола последний получают путем гидролиза фармакопейного  $\alpha$ -токоферола ацетата непосредственно перед использованием:



Для этого 21,5 мг  $\alpha$ -токоферола ацетата смешивают с 25 мл этанола (96 об. %). К 8 мл этой смеси добавляют 2 мл дистиллированной воды и 1–2 капли 1 н. раствора NaOH. Содержимое перемешивают на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение часа. Концентрация  $\alpha$ -токоферола в растворе составляет  $1,6 \cdot 10^{-5}$  М.

Параллельно готовят две контрольных пробирки для проверки:

1) перекисного окисления липидов в отсутствие антиоксиданта (к липидной эмульсии добавляют растворы  $\text{FeSO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а вместо раствора антиоксиданта – дистиллированную воду);

2) самопроизвольного или автоокисления липидов (к липидной эмульсии вместо растворов антиоксиданта,  $\text{FeSO}_4$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  добавляют дистиллированную воду).

Пробирки помещают в термостат и выдерживают при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч.

Затем к 0,5 мл содержимого каждой пробирки последовательно вносят:

- 0,5 мл 1%-ного раствора тритона X-100;
- 0,2 мл 0,6 М раствора HCl;
- 0,8 мл 0,06 М раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в 50%-ном этаноле с 1% тритона X-100.

Пробирки нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем их охлаждают при температуре  $15^\circ\text{C}$  на протяжении 30 мин. Для стабилизации окраски после охлаждения пробирок к смеси добавляют 0,2 мл 5 мМ раствора трилона Б и 5 мл 96%-ного этанола.

Измеряют экстинкцию растворов при 532 нм в кюветах ( $l = 0,5$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы, содержащей растворы тритона X-100, HCl и 1%-ный раствор тритона X-100 в 50%-ном этаноле вместо раствора ТБК.

Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Сравнивают между собой интенсивности окрашивания растворов, содержащих разные антиоксиданты и без них, и рассчитывают количество малонового диальдегида в каждой пробе, используя коэффициент молярной экстинкции окрашенного триметинового комплекса:

$$C_{\text{МА}} = \frac{E_{532}}{\epsilon l}, \quad (5.2)$$

где  $C_{\text{МА}}$  – молярная концентрация малонового диальдегида, М;  $E_{532}$  – поглощение или экстинкция раствора при 532 нм;  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса, равный  $1,56 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $l$  – толщина кюветы, см.

Делают вывод о степени окисленности липидов и влиянии антиоксидантов на интенсивность перекисного окисления.

### Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют липиды и какими свойствами они обладают? Каковы биологические функции липидов?
2. Приведите классификации липидов.
3. Из каких органических соединений построены триацилглицерины? Дайте им характеристику.
4. В чем проявляется нестабильность *цис*-изомеров ненасыщенных жирных кислот?
5. Напишите структурную формулу холестерина. Укажите его биологические функции.
6. Какие классы липидов относятся к полярным липидам? Как структура полярных липидов связана с их функциями?
7. Что общего в структуре каждого из классов полярных липидов? Покажите на конкретных примерах.
8. Каким образом и при каких условиях формируются разные типы липидных агрегатов? Какими свойствами они обладают?
9. Перечислите функции биомембран в клетке.
10. В чем состоит суть жидкостно-мозаичной модели строения цитоплазматической мембраны?
11. По какому принципу мембранные белки делят на периферические и интегральные? Свяжите это с особенностями выделения этих белков из мембраны.
12. В чем состоят принципиальные отличия между известными типами транспортных белков?
13. Какие ферменты функционируют в клеточных мембранах?
14. Охарактеризуйте такие свойства биомембран, как текучесть и асимметрия.
15. Дайте определение понятия «перекисное окисление липидов». Каковы последствия этого процесса для клеток?
16. Что относится к активным формам кислорода? В чем проявляется их токсичность для клеток?
17. Перечислите пути образования активных форм кислорода. Какие жирные кислоты в наибольшей степени подвержены перекисному окислению?
18. Приведите схему перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот.



19. Какое влияние оказывают на процессы перекисного окисления липидов прооксиданты и антиоксиданты? Приведите примеры.

20. Назовите стадии выделения липидов из биологического материала. В чем состоят их особенности?

21. Какие хроматографические методы применяются для качественного и количественного анализа липидов?

22. Объясните принцип метода газожидкостной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный и количественный анализ липидов?

23. В чем состоят особенности ГЖХ-анализа триацилглицеринов?

24. Объясните принцип метода тонкослойной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный анализ липидов?

25. По какому признаку судят о протекании реакции перекисного окисления липидов? Как оценивают влияние антиоксидантов на интенсивность перекисного окисления липидов?

## Глава 6. УГЛЕВОДЫ

### 6.1. Структура и свойства моносахаридов

Моносахариды, их олигомеры (олигосахариды) и полимеры (полисахариды) составляют класс углеводов.

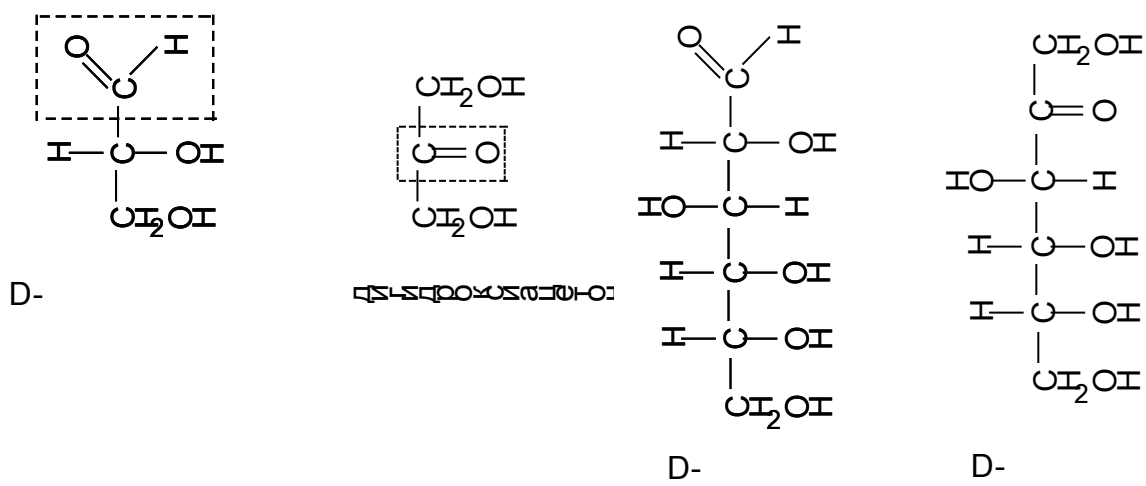
Моносахариды представляют собой альдегиды или кетоны, содержащие две или более ОН-групп, общей формулой  $(\text{C}_n\text{H}_2\text{O})_n$ . Кроме гидроксильных и карбонильных групп они могут содержать тиольные, карбоксильные группы, аминогруппы и др.

Полисахариды являются продуктами поликонденсации моносахаридов. Это типичные полимеры, построенные из множества моносахаридных остатков.

Олигосахариды составляют промежуточную группу между моно- и полисахаридами и содержат от двух до десяти моносахаридных остатков.

Простейшие из моносахаридов ( $n = 3$ ) называются триозами. К ним относятся глицеральдегид и дигидроксиацетон. Глицеральдегид назван *альдозой*, так как он содержит альдегидную группу, а дигидроксиацетон – *кетозой*, поскольку он содержит кетогруппу.

Моносахариды с четырьмя, пятью и шестью атомами углерода называются соответственно тетрозами, пентозами и гексозами. Так, из гексозных сахаров D-глюкоза является альдозой, а D-фруктоза – кетозой:

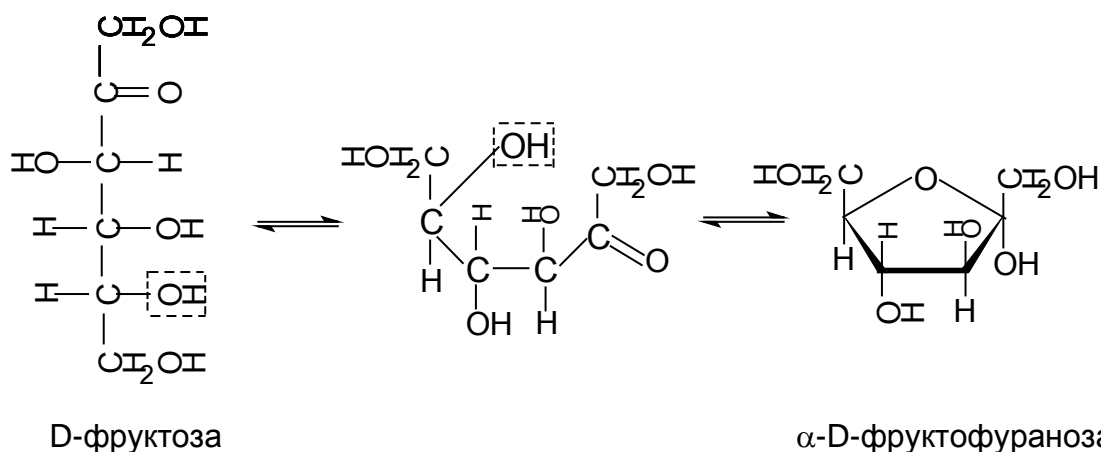
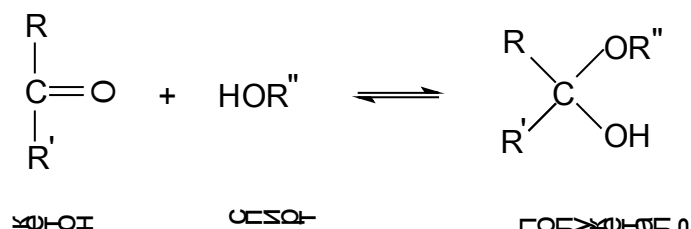


Природные моносахариды обладают оптической активностью, причем величина удельного вращения является характерным параметром моносахарида. Все моносахариды, за исключением дигидроксиацетона, содержат один или более асимметрических атома углерода. Простейшей альдозой, имеющей один асимметрический

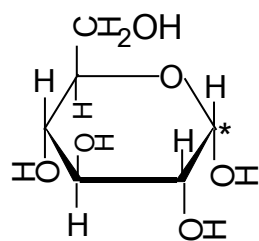




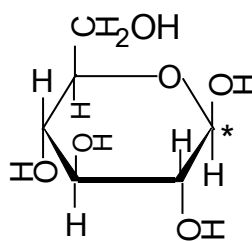
Подобно этому кетогруппа может реагировать с –ОН-группой с образованием циклического *полукетала*. Так, кетогруппа при С2 атоме фруктозы с открытой цепью взаимодействует с –ОН-группой при С5 атоме с образованием внутримолекулярного полукетала. Этот 5-членный циклический сахар называется *фуранозой* из-за его сходства с фураном. У альдоз фуранозный цикл образуется с участием –ОН-группы при С4 атоме:



При циклизации альдоз и кетоз возникает новый хиральный центр при С1 и С2 атомах, ранее входивших в состав альдегидной и кетогруппы соответственно. Это влечет за собой появление еще одной пары стереоизомеров (аномеров) для каждого моносахарида, которые отличаются друг от друга по конфигурации С1 (С2 у кетоз) карбонильного атома и называются α- и β-изомерами (*аномерами*). Символ α означает, что –ОН-группа при С1 (С2 у кетоз) атоме расположена под плоскостью кольца, а символ β означает, что эта –ОН-группа находится над плоскостью кольца. С1 (С2 у кетоз) атом, расположенный в центре полуацетальной группы и непосредственно связанный с двумя атомами кислорода, называется *аномерным углеродным атомом*, а гидроксил, образующийся при С1 (С2 у кетоз) атоме в результате циклизации моносахарида, называется *полуацетальным*. Он резко отличается по свойствам от других –ОН-групп молекулы и легко может замещаться на другие нуклеофильные группы с образованием различных производных моносахаридов:



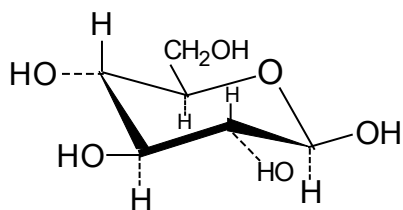
$\alpha$ -D-глюкоза



$\beta$ -D-глюкоза

Циклические формы моносахаридов принято изображать в формулах Хеурса, так как проекционные формулы Фишера дают весьма смутное представление о трехмерной структуре моносахаридов. Нижнюю часть кольца (жирные линии) представляют выступающей к наблюдателю, а противоположный край – лежащим за плоскостью рисунка. Примерная плоскость кольца перпендикулярна плоскости бумаги. Эти формулы однозначно указывают конфигурацию молекулы, но не отображают взаимного пространственного расположения групп, присоединенных к кольцу. Поэтому для изображения пространственной структуры моносахаридов применяются конформационные формулы.

Благодаря свободному вращению групп вокруг C – C-связей молекулы моносахаридов могут принимать различные конформации. Эти 6-членное пиранозное и 5-членное фуранозное кольца в действительности не плоские. Большинство пираноз и их производных имеет термодинамически более устойчивую *конформацию кресла*, в которой большая часть замещающих групп (–CH<sub>2</sub>OH-, –ОН-групп) располагается в экваториальной плоскости. Для  $\beta$ -D-глюкопиранозы конформация кресла является предпочтительной, так как –CH<sub>2</sub>OH- и все –ОН-группы расположены экваториально, когда связь заместителя с кольцом образует с осью молекулы тетраэдрический угол. Все атомы водорода  $\beta$ -D-глюкопиранозы расположены аксиально, т. е. параллельно оси молекулы.



$\beta$ -D-глюкоза

В растворах одновременно присутствуют все возможные изомеры одного и того же моносахарида, находящиеся в динамическом равновесии друг с другом приблизительно в эквимольных соотношениях. В обычных условиях равновесие существенно смещено в сторону циклических  $\alpha$ - и  $\beta$ -пираноз (фураноз), что в значительной

степени определяется термодинамикой конформации пиранозного (фуранозного) кольца. Так, при растворении  $\alpha$ - или  $\beta$ -изомеров D-глюкозы в воде при 25°C образуется равновесная смесь, состоящая примерно на  $\frac{1}{3}$  из  $\alpha$ -D-глюкозы, для которой  $[\alpha]_D^{20} = +112,2^\circ$  и на  $\frac{2}{3}$  из  $\beta$ -D-глюкозы,

для которой  $[\alpha]_D^{20} = +18,7^\circ$ . Со временем оптическое вращение раствора постепенно изменяется и в конце концов достигает равновесного значения  $[\alpha]_D^{20} = +52,7^\circ$ . Это явление называется *мутаротацией*.

Образовывать устойчивые кольца и существовать в виде аномерных форм способны только моносахариды с пятью и более атомами углерода. Тетрозы и триозы в водном растворе могут существовать только в ациклической форме.

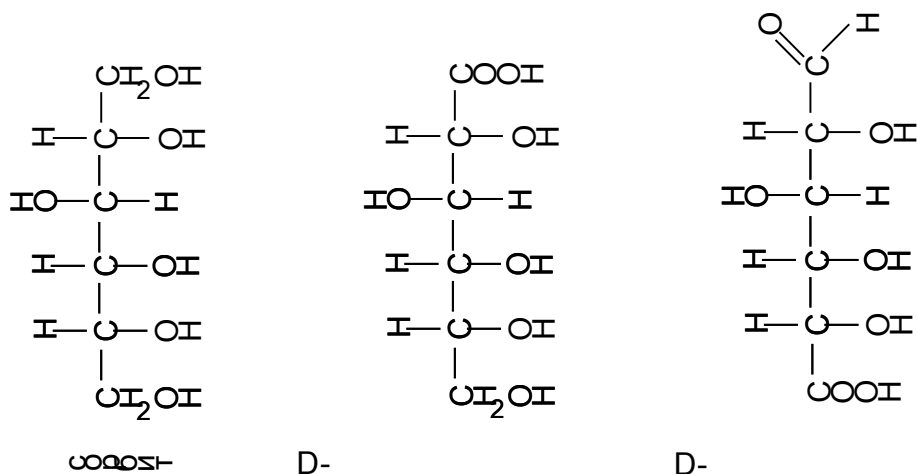
## 6.2. Производные моносахаридов

Несмотря на то, что в растворе моносахарида равновесие существенно смещено в сторону циклических форм, некоторое количество ациклической формы присутствует в растворе, что позволяет моносахаридам вступать в реакции, характерные для альдегидов и кетонов.

Восстановление карбонильной группы моносахарида ведет к образованию *сахарного спирта*, например сорбита, образующегося при восстановлении альдегидной группы глюкозы. К сахарному спирту относится глицерин.

Альдегидные группы альдоз могут окисляться множеством реагентов, образуя *альдоновые кислоты*, относящиеся к классу сахарных кислот. Например, при окислении альдегидной группы D-глюкозы образуется D-глюконовая кислота, фосфорилированная форма которой является важным промежуточным продуктом углеводного обмена.

Окислению может подвергаться и первичная –ОН-группа альдоз. При этом образуются *уроновые кислоты*. Так, при окислении первичной –ОН-группы D-глюкозы образуется D-глюкуроновая кислота. Уроновые кислоты являются компонентами многих полисахаридов. Характерным свойством уроновых кислот считается способность образовывать лактоны:

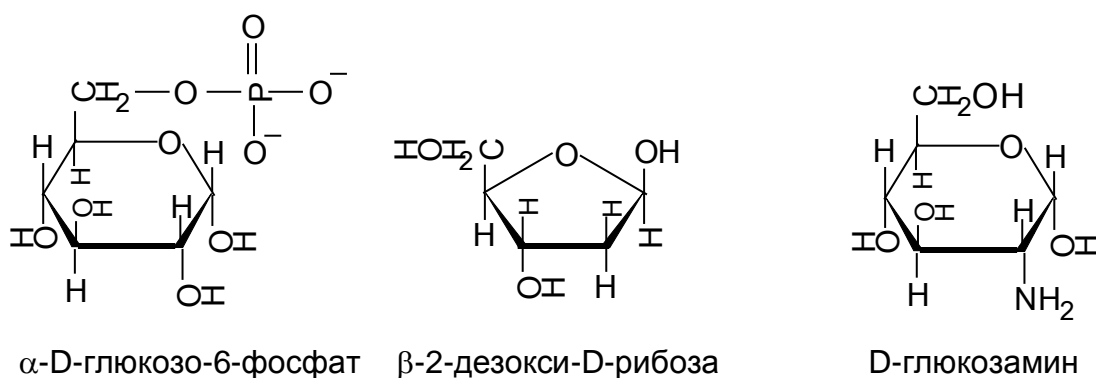


Одной из наиболее важных сахарных кислот является аскорбиновая кислота (витамин С), представляющая собой лактон.

К производным моносахаридов относятся моносахариды, этерифицированные фосфорной кислотой, – *фосфорнокислые эфиры*. Они являются важными промежуточными продуктами углеводного обмена, например  $\alpha$ -D-глюкозо-6-фосфат.

*Дезоксисахара* представляют собой моносахариды, в которых одна или несколько ОН-групп замещены на атомы водорода. Важнейшим представителем является  $\beta$ -D-2-дезоксирибоза, которая входит в состав нуклеотидов ДНК.

*Аминосахара* – моносахариды, в которых одна или несколько –ОН-групп замещены на аминогруппы. Например, N-ацетилглюкозамин вместе с N-ацетилмурамовой кислотой входит в состав клеточной стенки прокариот:

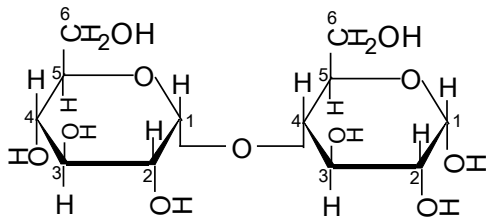


### 6.3. Гликозидная связь и олигосахариды

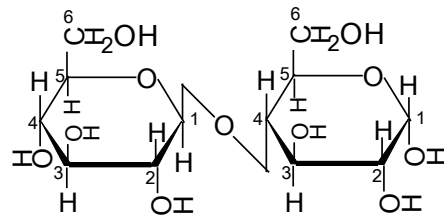
В молекулах олиго- и полисахаридов моносахаридные звенья соединены между собой *гликозидной связью*, в образовании которой участвуют полуацетальный гидроксил одного и любой гидроксил, в том числе и полуацетальный, другого моносахаридного остатка. Гликозидная связь образуется при взаимодействии двух моносахаридов в ходе реакции дегидратации. Гликозидные связи легко гидролизуются в присутствии кислот или под действием ферментов.

Для обозначения гликозидной связи необходимо указывать положение гидроксила при первом аномерном углеродном атоме ( $\alpha$ - или  $\beta$ -), а также номер углеродного атома в молекуле второго остатка моносахарида. Например,  $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь в мальтозе сформирована между атомом кислорода при первом углеродном атоме в  $\alpha$ -положении одного остатка  $\alpha$ -D-глюкозы и углеродным атомом в положении 4 второго остатка  $\beta$ -D-глюкозы:





$\alpha$ -D-глюкозид  
( $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь)

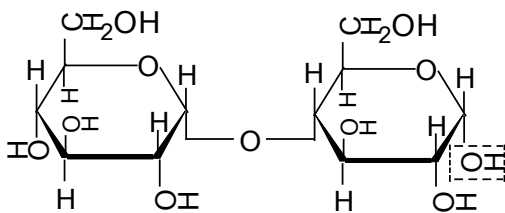


$\beta$ -D-глюкозид  
( $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидная связь)

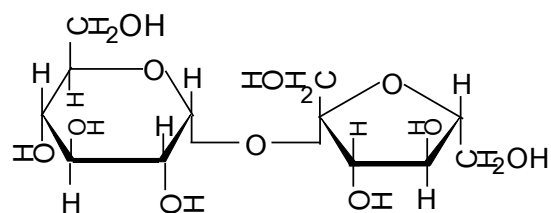
Наиболее часто в природных полисахаридах встречаются гликозидные связи типа  $\alpha(1\rightarrow4)$ ,  $\alpha(1\rightarrow6)$ ,  $\beta(1\rightarrow4)$ ,  $\beta(1\rightarrow3)$ , а мономерами служит D-глюкоза.

Если один из концевых моносахаридных остатков олигосахарида содержит полуацетальный гидроксил, который может находиться как в  $\alpha$ -, так и  $\beta$ -форме, олигосахарид называется *восстанавливающим*, или *редуцирующим*.

Примером могут служить дисахариды мальтоза и лактоза. Если же в образовании гликозидной связи между остатками моносахаридов участвуют оба полуацетальных гидроксила двух моносахаридов, такой олигосахарид не содержит концевой полуацетальный гидроксил и называется *невосстанавливающим*, или *нередуцирующим*. К ним относятся дисахариды сахароза и трегалоза:



$\alpha$ -D-глюкоза



$\alpha$ -D-глюкоза

## 6.4. Полисахариды

В природе углеводы встречаются в основном в форме полисахаридов. Полисахариды представляют собой длинные полимерные цепочки, которые построены из остатков моносахаридов, соединенных между собой гликозидными связями. Полисахариды присутствуют во всех клетках и выполняют в них структурную, рецепторную, защитную функции, а также играют роль запасных веществ. В состав полисахаридов могут входить различные моносахариды. Полисахариды, построенные из остатков одного и того же моносахарида, называются *гомополисахаридами*, а полисахариды, содержащие остатки различных моносахаридов, — *гетерополисахаридами*. Чаще всего в составе полисахаридов встречается

D-глюкоза. Нередко полисахариды имеют заместители неуглеводной природы – остатки серной, фосфорной или органических кислот.

Полисахариды различаются также по типу гликозидной связи, молекулярной массе и степени разветвленности макромолекул. Молекулярная масса полисахаридов колеблется в широких пределах – от нескольких тысяч до нескольких миллионов дальтон.

Большинство полисахаридов имеют тривиальные названия, связанные с источником, из которого они были выделены, например целлюлоза, крахмал, хитин. Основой более строгой номенклатуры служит моносакхаридный состав полисахарида: D-глюканом называется полисахарид, построенный из остатков D-глюкозы.

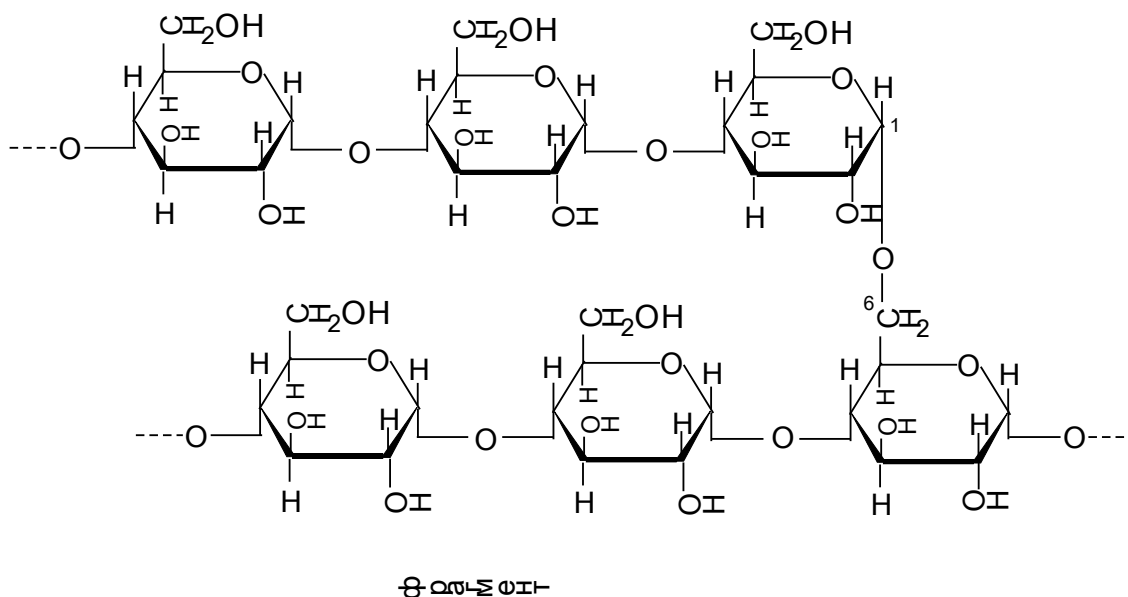
**Резервные полисахариды.** Большинство резервных полисахаридов – это гомополисахариды, в которых преобладают  $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи. Эти вещества выполняют роль источников углерода и энергии для клеток в периоды голодания, поэтому их структура отвечает основному требованию – доступности для гидролитических ферментов, их расщепляющих. К ним относятся крахмал и гликоген, которые представляют собой рыхлые, разветвленные структуры, доступные для ферментативного расщепления в большом количестве участков. Они откладываются в цитоплазме клеток в виде крупных гранул. Поддержание уровня глюкозы в крови является важной физиологической функцией, которая реализуется через биосинтез гликогена при избытке глюкозы и его гидролиз при недостатке глюкозы в клетке.

**Крахмал** преобладает в клетках растений, микроводорослей, некоторых бактерий. Крахмал состоит из двух компонентов –  $\alpha$ -амилозы и амилопектина.  $\alpha$ -Амилоза представляет собой линейный полимер  $\alpha$ -D-глюкозы (1000–4000 звеньев), остатки которой соединены с помощью  $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей. При этом в молекуле появляется большая свобода вращения вокруг связей C1–O и O–C4, и цепочка образует стабильную спираль с шестью остатками глюкозы на один виток. Молекулы йода по своим размерам точно подходят к центральной полости этой спирали и образуют комплекс, обуславливающий приобретение темно-синей окраски растворами  $\alpha$ -амилозы при йодно-крахмальном тесте.

Амилопектин состоит из цепей поли- $\alpha$ -D-глюкозы с  $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями, образующих остов молекулы. От этих цепей отходят боковые ветви, присоединенные к основной цепи  $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями. Ветви являются более короткими цепочками  $\alpha(1\rightarrow4)$ -глюкозида, содержащего 12 остатков D-глюкозы, и мешают основной цепи образовывать спираль. Амилопектин в отличие от  $\alpha$ -амилозы имеет разветвленную структуру и вместе с  $\alpha$ -амилозой образует сложную сеть. Молекулы

амилопектина содержат сотни тысяч остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, являясь одними из самых крупных природных молекул.

**Гликоген** преобладает в клетках животных, грибов и некоторых бактерий. Гликоген состоит из остатков  $\alpha$ -D-глюкозы, соединенных  $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Его структура сильно напоминает структуру амилопектина, но у гликогена боковые ветви, присоединенные к основной цепи  $\alpha(1\rightarrow6)$ -гликозидными связями, расположены значительно чаще, чем у амилопектина, т. е. гликоген отличается от амилопектина большей разветвленностью и более плотной упаковкой молекулы. У гликогена отсутствует спиральная структура, и его молекулы еще более «открыты» действию ферментов:



**Структурные полисахариды.** К ним относятся полисахариды, являющиеся основными компонентами клеточных стенок растений и микроорганизмов.

Клеточные стенки растений обладают необычайной прочностью и в процессе роста растения меняют свою структуру и состав. Основными компонентами клеточных стенок растений являются полисахариды, среди которых преобладает **целлюлоза**, в значительной степени определяющая архитектуру клеточной стенки. Этот гомополисахарид является самым распространенным углеводом на Земле (древесина содержит ~50% целлюлозы).

Мономерами целлюлозы служат остатки  $\beta$ -D-глюкозы, соединенные в длинные цепочки (до 10 000 остатков глюкозы в каждой) с помощью  $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидных связей. В такой молекуле отсутствует полная свобода вращения вокруг C1–O и O–C4-связей, и полимер приобретает

конформацию, благоприятную для образования межцепочечных поперечных водородных связей в случае, когда цепочки располагаются антипараллельно. В результате молекулы целлюлозы объединяются в микрофибриллы толщиной 10–25 нм. Они перевиваются и образуют тонкие нити, которые, в свою очередь, могут обматываться одна вокруг другой, как пряди в канате, формируя макрофибриллы. Каждая макрофибрилла имеет толщину ~0,5 мкм и длину 68 мкм. Прочность макрофибрилл сопоставима с прочностью стальной проволоки. Кроме того, отдельные участки микрофибрилл имеют упорядоченное строение и придают клеточной стенке кристаллические свойства.

Таким образом, целлюлоза за счет сложности своей структуры и высокой упорядоченности выполняет защитную и опорную функции в растении. В таком виде полисахариды недоступны действию собственных ферментов, и целлюлоза не может использоваться растением как резервное вещество. Только некоторые бактерии, грибы, простейшие обладают ферментными системами, способными расщеплять целлюлозу.

Микро- и макрофибриллы целлюлозы в клеточной стенке погружены в матрикс, который также состоит в основном из полисахаридов и меняет свою структуру в процессе роста растения. На начальных этапах развития матрикс состоит из пектиновых веществ, а в дальнейшем в нем появляются гемицеллюлозы. Пектиновые вещества – это полимеры  $\alpha$ -D-галактуроновой кислоты, в которых некоторые водородные атомы замещены метильными группами. Гемицеллюлозы делятся на ксиланы (полимеры ксилозы), глюкоманнаны и галактаны. На более поздних этапах развития растения, когда происходит одревеснение клеточной стенки, в клетках откладывается лигнин – химически устойчивый полимер, содержащий большое число ароматических спиртов. Кроме этого, в составе клеточных стенок растений обнаружены небольшие количества гликопротеинов, нерастворимых липидных полимеров и восков.

## **6.5. Методы выделения и анализа полисахаридов**

Природные полисахариды очень разнообразны по своей структуре, поэтому не существует единых подходов к их выделению из биологического материала. Легче всего выделять экзогенные полисахариды, так как они находятся вне клетки. Для этого клетки осаждают, а из раствора удаляют белки и низкомолекулярные полипептиды. Затем осуществляют экстракцию полисахаридов разбавленными растворами солей или органических кислот и их осаждение этанолом или другими органическими растворителями, смешивающимися с водой.

Эндогенные полисахариды (резервные и структурные) выделяют из биологического материала после гомогенизации клеток, что усложняет методику их выделения. В остальном процедура выделения эндогенных полисахаридов аналогична таковой для экзогенных полисахаридов.

Определение структуры полисахаридов является достаточно сложной задачей. Для выделения полисахарида высокой степени чистоты его несколько раз переосаждают из раствора. После этого проводят кислотный или ферментативный гидролиз полисахарида, продуктами которого являются олиго- и моносахариды. Полученный гидролизат анализируют на присутствие моно-, олиго- и полисахаридов с помощью цветных реакций, а также хроматографических методов, либо подвергнутый химической модификации гидролизат анализируют методами хроматомасс-, ЯМР-спектроскопии, электрофореза и др.

### **Лабораторная работа** **ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ**

**Цель работы** – освоение методов выделения углеводов из биологического материала и их качественного и количественного анализа.

**Реактивы, материалы и оборудование:** пекарские дрожжи (прессованные, 75%-ной влажности); клубни картофеля; 1%-ный раствор NaCl; 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты; 96%-ный этанол; раствор Люголя (1 г йода и 2,5 г KI растворяют в 20 мл дистиллированной воды; после растворения компонентов объем доводят водой до 100 мл); 2%-ный раствор серной кислоты; гидрокарбонат натрия; 0,2%-ный спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола; концентрированная серная кислота; 40%-ный раствор сегнетовой соли (K,Na-винно-кислый,  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ); динитросалициловый реактив; дистиллированная вода; химически чистые пробирки; конические колбы объемом 250 мл; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; шпатели; терка; ступки; центрифужные пробирки; фильтровальная бумага; марля; стеклянные фильтры; кюветы для фотоэлектроколориметра; штативы для пробирок; электронные весы; центрифуга; рН-метр; водоструйный насос; фотоэлектроколориметр.

#### **Выполнение работы**

##### **1. Выделение полисахаридов из биологического материала**

**Выделение крахмала из клубней картофеля.** Картофель (2 клубня) очищают от кожуры и измельчают на мелкой терке. Полученную кашлицу

помещают в колбу и добавляют 30 мл 1%-ного раствора NaCl. Содержимое колбы перемешивают в течение 15 минут и фильтруют через 2 слоя марли. К осадку приливают 20 мл 1%-ного раствора NaCl и полученную суспензию снова фильтруют. При этом в осадке находятся клеточные стенки, а в фильтрате – плохо растворимые белки, низкомолекулярные соединения и крахмальные зерна. Фильтраты объединяют и оставляют на некоторое время для осаждения зерен крахмала. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают холодной водой 2–3 раза, ресуспендируют его в 20 мл 96%-ного этанола и полученную суспензию центрифугируют при  $5000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 5 мин. Осадок крахмала промывают 20–30 мл 96%-ного этанола и высушивают на стеклянном фильтре с помощью водоструйного насоса.

**Выделение гликогена из клеток пекарских дрожжей.** Навеску (10 г) замороженных пекарских дрожжей (прессованных, 75%-ной влажности) растирают в охлажденной фарфоровой ступке с 15 мл охлажденного 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в течение 15 мин. Затем суспензию центрифугируют при  $5000 \text{ мин}^{-1}$  на протяжении 15 мин. Полученный осадок дважды экстрагируют аналогичным образом, добавляя к нему по 5 мл 10%-ного раствора ТХУ. В процессе экстракции в раствор переходят гликоген и низкомолекулярные вещества, а белки и нуклеиновые кислоты остаются в осадке. Экстракты объединяют и вносят при перемешивании в 96%-ный этанол, взятый в количестве 2,5 объема от объема экстракта. При этом низкомолекулярные вещества остаются в растворе, а гликоген выпадает в осадок. Осадок гликогена отделяют центрифугированием при  $5000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 15 мин, промывают 20 мл 96%-ного этанола и высушивают на стеклянном фильтре с помощью водоструйного насоса.

## 2. Качественный анализ полисахаридов

При взаимодействии крахмала и гликогена с йодом образуются комплексные соединения, окрашенные в темно-синий и красно-бурый цвета соответственно. Эти различия обусловлены отличиями в химической структуре полисахаридов. Темно-синее окрашивание комплекса йод – крахмал вызвано  $\alpha$ -амилозой, хотя содержание амилопектина в зернах крахмала в несколько раз превышает количество  $\alpha$ -амилозы. Тем не менее темно-синее окрашивание, возникающее при действии йода на  $\alpha$ -амилозу, перекрывает красно-фиолетовую окраску комплекса йод – амилопектин.

Окраска продуктов реакций крахмала и гликогена с йодом исчезает при нагревании или добавлении NaOH (KOH) и появляется при охлаждении реакционной смеси. Это свидетельствует об образовании нестойких адсорбционных комплексов крахмала и гликогена с йодом и обусловлено тем, что в их образовании принимает участие молекулярный йод, а не иодид-ионы.

В пробирки с 0,5 мл дистиллированной воды вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка выделенных крахмала и гликогена. Пробирку с крахмалом нагревают на кипящей водяной бане до растворения крахмала, а затем содержимое пробирки охлаждают. В пробирки добавляют по несколько капель раствора Люголя и наблюдают за появлением характерного окрашивания.

### 3. Кислотный гидролиз полисахаридов

При нагревании раствора крахмала или гликогена с минеральными кислотами происходит гидролиз полисахаридов с образованием  $\alpha$ -D-глюкозы, присутствие которой можно обнаружить с помощью цветной реакции.

В пробирки помещают по 200 мг порошка выделенных крахмала и гликогена и добавляют по 5 мл 2%-ного раствора серной кислоты. Пробирки закрывают ватными пробками и помещают в кипящую водяную баню на час. По окончании гидролиза пробирки охлаждают, осадки отделяют центрифугированием при  $1000 \text{ мин}^{-1}$  в течение 15 мин и 2–3 раза промывают небольшими порциями горячей дистиллированной воды для полного выделения моно- и олигосахаридов. Супернатанты объединяют с промывными водами. Полученные растворы нейтрализуют сухим гидрокарбонатом натрия до pH 7,0 и фильтруют через бумажный фильтр.

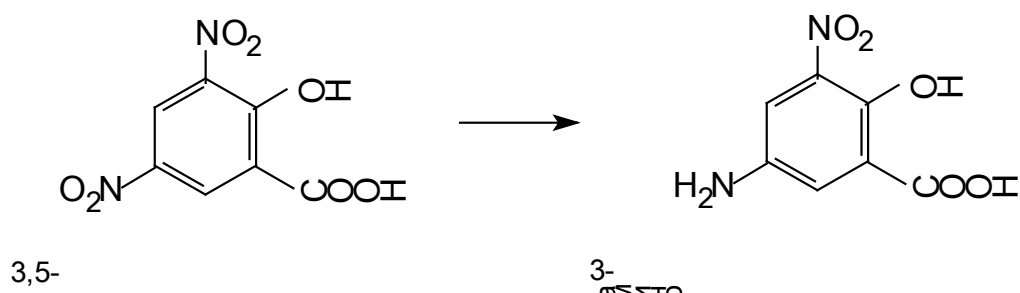
### 4. Качественный и количественный анализ гидролизатов

Убеждаются в отсутствии полисахаридов в гидролизатах путем проведения реакции с раствором Люголя.

Присутствие  $\alpha$ -D-глюкозы в гидролизатах определяют по *реакции Молиша*. Углеводы при взаимодействии с концентрированной серной кислотой дегидратируются с образованием фурфурола и 5-оксиметилфурфурола, которые конденсируются с  $\alpha$ -нафтолом с образованием триарилметанового хромогена. Последний окисляется серной кислотой, и образуется хиноидное соединение красно-фиолетового цвета.

На дно пробирки аккуратно вносят 2 мл концентрированной серной кислоты, сверху которой осторожно наслаивают 1 мл гидролизата и добавляют 0,5 мл 0,2%-ного спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола. Появление на границе раздела фаз красно-фиолетового кольца свидетельствует о присутствии в гидролизате моносахаридов.

Количественное определение содержания  $\alpha$ -D-глюкозы в гидролизатах проводят по *методу Миллера*. При взаимодействии моносахаридов с 3,5-динитросалициловой кислотой последняя восстанавливается в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту, имеющую желто-оранжевую окраску:



В пробирки вносят 1,5 мл гидролизатов и добавляют 1,5 мл динитросалицилового реактива. Пробирки закрывают ватными пробками и помещают в кипящую водяную баню на 15 мин. Затем пробирки быстро охлаждают до температуры  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  и для стабилизации окраски приливают по 0,5 мл 40%-ного раствора сегнетовой соли.

Измеряют экстинкцию растворов при 582 нм в кюветах ( $l = 0,5$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы (вместо гидролизата берут дистиллированную воду, остальные реактивы добавляют в том же объеме и смесь выдерживают такое же время). Каждое определение проводят 3 раза и за результат измерения принимают среднее арифметическое значение экстинкции.

Концентрацию глюкозы в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику зависимости экстинкции от концентрации, предварительно построенному для растворов глюкозы с известной концентрацией.

Для построения калибровочного графика непосредственно перед измерением готовят растворы глюкозы с концентрацией 200, 400, 600, 800 и 1000 мкг/мл. Затем с каждым из растворов проводят цветную реакцию по вышеуказанной методике и измеряют величину экстинкции окрашенных растворов при 582 нм против контрольной пробы. Строят калибровочный график зависимости  $E_{582}$  от концентрации глюкозы в растворе.



Следует помнить, что при каждой смене реактивов необходимо заново строить калибровочный график.

**Динитросалициловый реактив.** Взвешивают 1 г 3,5-динитросалициловой кислоты, 1 г NaOH, 0,05 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 г фенола и растворяют в дистиллированной воде при непрерывном перемешивании, доводя объем раствора до 100 мл. Срок годности раствора при хранении в защищенном от света месте и при температуре (20 ± 2)°C составляет месяц.

### Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют моно-, олиго- и полисахариды?
2. Какие моносахариды относятся к альдозам, а какие – к кетозам? Приведите примеры.
3. Назовите, какие стереоизомерные формы характерны для моносахаридов. Как определить принадлежность моносахаридов, содержащих два и более асимметрических атома углерода, к D- или L-ряду?
4. Что такое эпимеры? Приведите примеры.
5. Напишите реакции образования циклического полуацетала и циклического полукетала из D-глюкозы и D-фруктозы соответственно.
6. Чем обусловлено существование α- и β-изомеров моносахаридов? Какой углеродный атом циклических альдоз называется аномерным?
7. Приведите различные способы изображения циклических форм моносахаридов. Какая из этих конформаций термодинамически более устойчива и почему?
8. В чем состоит суть явления мутаротации?
9. Напишите структурные формулы производных моносахаридов. Укажите их биохимические функции.
10. Какие функциональные группы моносахаридов принимают участие в формировании гликозидной связи и как ее обозначают? Напишите уравнение реакции.
11. Чем отличаются восстанавливающие олигосахариды от невосстанавливающих? Приведите примеры.
12. Какова роль в клетках резервных и структурных полисахаридов? Приведите примеры.
13. В чем состоят особенности выделения и анализа полисахаридов?
14. Объясните принцип качественной реакции Молиша на α-D-глюкозу.
15. На чем основан метод количественного определения α-D-глюкозы по Миллеру?

## Глава 7. ВИТАМИНЫ

**Витамины** – это низкомолекулярные органические соединения, выполняющие в организме человека жизненно важные функции, чаще каталитические и регуляторные. Физико-химические свойства витаминов, а также их физиологическая роль зачастую совершенно различны. Витамины не используются для пластических и энергетических нужд организма, однако без их присутствия в организме невозможно нормальное развитие и жизнедеятельность человека и животных.

Большинство витаминов не может накапливаться или синтезироваться в организмах человека и животных, поэтому они должны поступать в организм с пищей. Синтезируются витамины в клетках растений и микроорганизмов, а некоторые из них вырабатываются в ограниченном количестве микрофлорой кишечника. Витамины проявляют активность в малых количествах, но с ними связаны многие метаболические процессы, которые протекают при участии ферментов. Витамины, поступающие в организм человека с пищей, в большинстве случаев идентичны коферментам или структурно близки им. Это говорит об участии большинства витаминов в ферментативных реакциях в качестве кофакторов ферментов (коферментная функция).

Обеспеченность организма витаминами выражается в трех *формах*:

1. **Авитаминоз** – полный дефицит какого-либо витамина. Он может наступить при несбалансированном питании или гибели кишечной микрофлоры (например, в результате антибиотикотерапии).

2. **Гиповитаминоз** – частичный дефицит одного или нескольких витаминов.

3. **Гипервитаминоз** – избыток какого-либо витамина.

В связи с тем, что большинство витаминов относится к разным классам органических соединений, их классифицируют в соответствии со способностью растворяться в воде или неполярных органических растворителях. По этому признаку витамины делят на две группы: водо- и жирорастворимые. Кроме того, витамины классифицируют по физиологическому действию на организм.

Номенклатура витаминов основана на использовании названий, отражающих химическую природу и функцию витаминов, а также заглавных букв латинского алфавита.

Помимо витаминов, выделяют еще одну группу веществ витаминной природы – витаминоподобные вещества. К ним относятся соединения, которые не являются обязательными компонентами пищи и

их дефицит не сопровождается характерными, четко выраженными симптомами. Это холин, липоевая, оротовая и пангамовая кислоты, витамин U, инозит, карнитин, *n*-аминобензойная кислота.

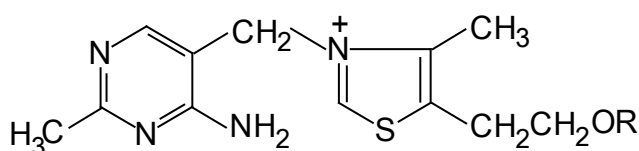
### 7.1. Водорастворимые витамины

Большинство водорастворимых витаминов относятся к группе В и обладают коферментными функциями (входят в состав коферментов и простетических групп). Некоферментные свойства витаминов характеризуются способностью участвовать в регуляции метаболизма, проявлять антимуtagenное действие, усиливать защитные свойства организма, повышать свертываемость крови и др.

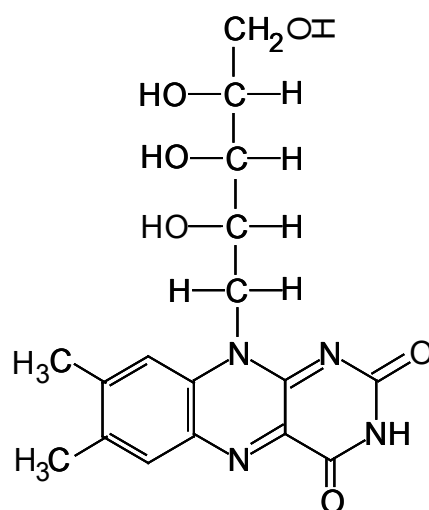
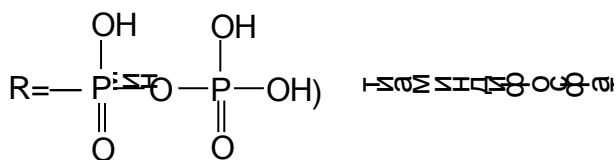
**Витамин В<sub>1</sub> (тиамин).** Молекула тиамина состоит из пиримидинового и тиазолового колец, соединенных метиленовой группой.

Коферментной формой витамина является тиаминдифосфат (тиаминпирофосфат), который участвует в двух важнейших реакциях: 1) в составе декарбоксилаз кетокислот обеспечивает окислительное декарбоксилирование  $\alpha$ -кетокислот (пирувата,  $\alpha$ -кетоглутарата, кетоаналогов аминокислот); 2) в составе транскетолаз, катализирующих реакции переноса альдегидной группы, осуществляет транскетолазные реакции пентозофосфатных путей и цикла Кальвина.

**Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин).** Молекула рибофлавина представляет собой гетероциклическое соединение изоаллоксазин (сочетание бензольного, пиазинового и пиримидиновых колец), к которому присоединен 5-атомный спирт – рибитол:



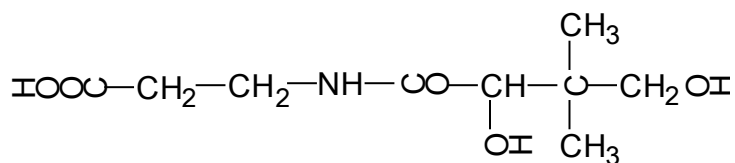
R = H витамин В<sub>1</sub> (тиамин)



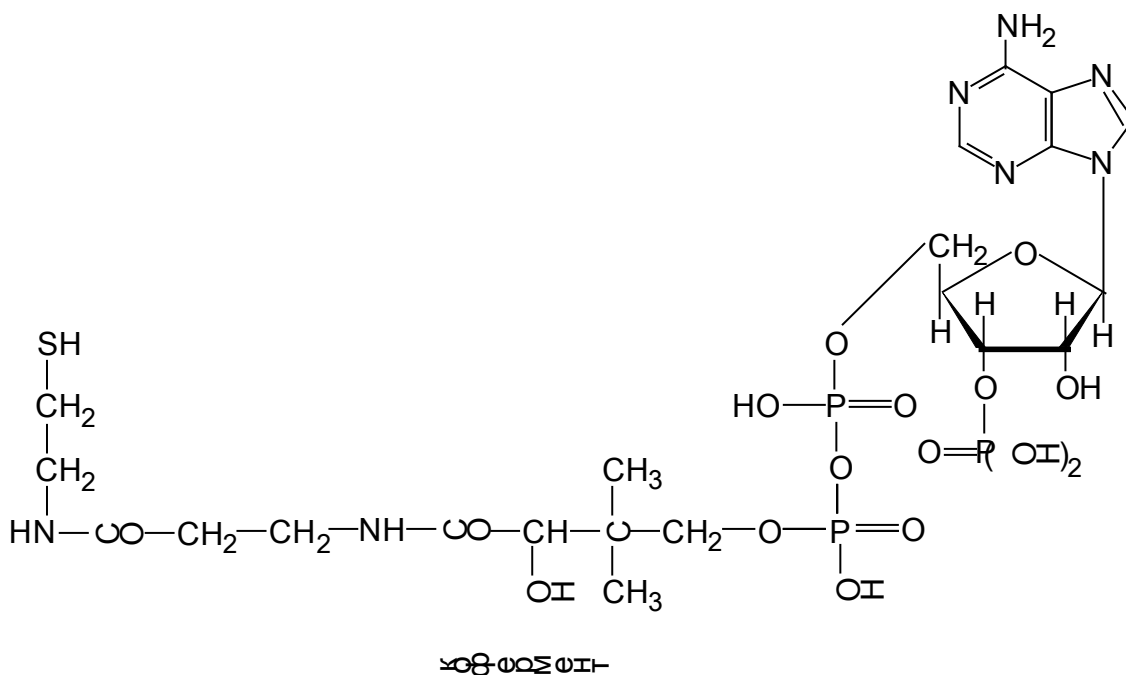
витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин)

Коферментными формами витамина являются ФАД и ФМН, структура которых приведена в главе 4. Флавиновые коферменты служат переносчиками восстановительных эквивалентов и входят в состав дегидрогеназ и оксидаз, катализирующих различные окислительно-восстановительные реакции. ФМН синтезируется из свободного рибофлавина и АТФ, а ФАД – из ФМН и АТФ при участии соответствующих ферментов.

**Витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота).** Коферментной формой витамина является кофермент А или коэнзим А (CoA). Это соединение служит коферментом ацилпереносящих ферментов, принимающих участие в реакциях цикла трикарбоновых кислот, β-окисления жирных кислот, брожения некоторых типов, обмена углеводов и др.:



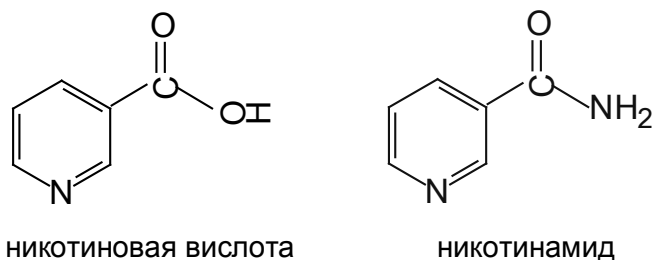
витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота)



Реакционноспособной группой кофермента А служит сульфгидрильная (-SH) группа, расположенная на конце длинной, относительно гибкой цепи. По этой группе с помощью тиоэфирной связи осуществляется присоединение ацильных остатков. Образующиеся в результате

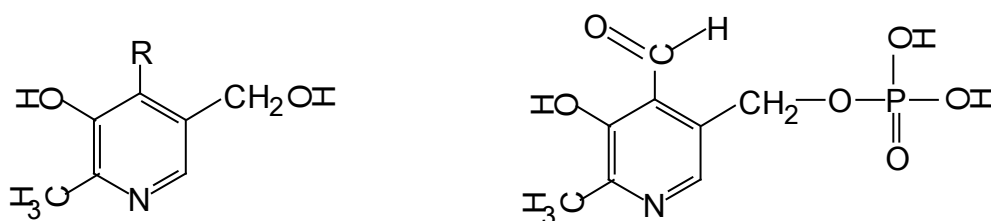
производные носят название ацил-СоА. Простейшим ацильным производным является ацетил-СоА, который характеризуется высоким потенциалом переноса ацетильной группы. Он занимает центральное место в реакциях метаболизма углеводов, аминокислот и жирных кислот.

**Витамин В<sub>5</sub> (никотинамид, никотиновая кислота, витамин РР).** В природе витамин В<sub>5</sub> встречается в двух формах – в виде никотиновой кислоты и никотинамида, представляющих собой соединения пиридинового ряда:



Коферментными формами витамина являются НАД<sup>+</sup> и НАДФ<sup>+</sup>, структура которых приведена в главе 4. Никотинамидные коферменты служат переносчиками восстановительных эквивалентов и входят в состав дегидрогеназ, катализирующих различные окислительно-восстановительные реакции.

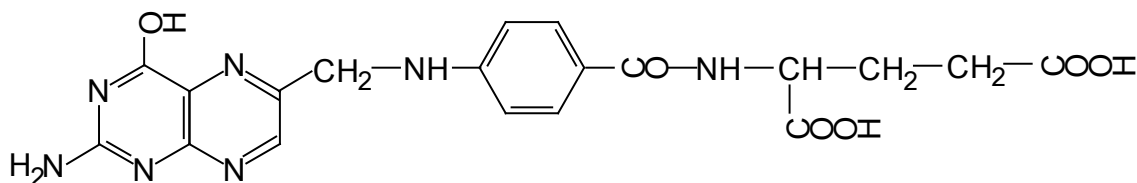
**Витамин В<sub>6</sub> (пиридоксин).** Он включает три производных пиридина: пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин. Каждое из этих соединений способно превращаться в коферментную форму – пиридоксальфосфат. Он входит в состав аминотрансфераз, катализирующих реакции трансаминирования аминокислот. При участии пиридоксальфосфат-зависимых декарбоксилаз происходит декарбоксилирование аминокислот. Коферментные функции пиридоксальфосфата проявляются также в реакциях дезаминирования, изомеризации и синтеза аминокислот, фосфорилирования углеводов, метаболизма жирных кислот и липидов:



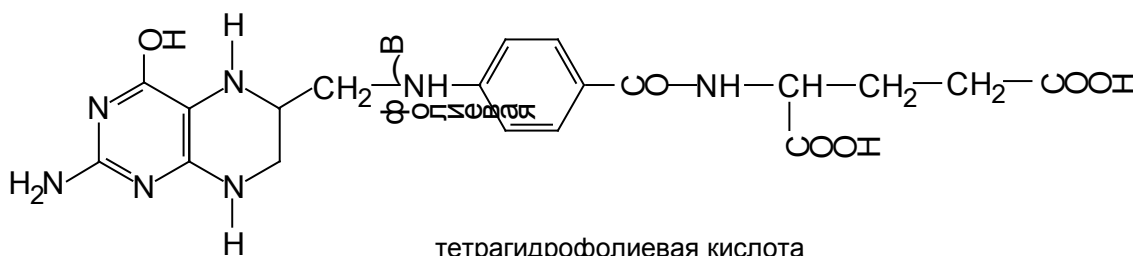
R = CH<sub>2</sub>OH    CSOSPOXUSI  
R = CHO        CSOSPOXUSI  
R = CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>   CSOSPOXUSI

**Витамин В<sub>9</sub> (фолиевая кислота).** Представляет собой птероил-моноглутаминовую кислоту, которая состоит из производного птеридина, *p*-аминобензойной и глутаминовой кислот.

Коферментной формой фолиевой кислоты является тетрагидрофолиевая кислота, которая осуществляет перенос одноуглеродных фрагментов. Такие реакции протекают при биосинтезе некоторых аминокислот, пуринов и пиримидинов:



витамин В<sub>9</sub> (фолиевая кислота)

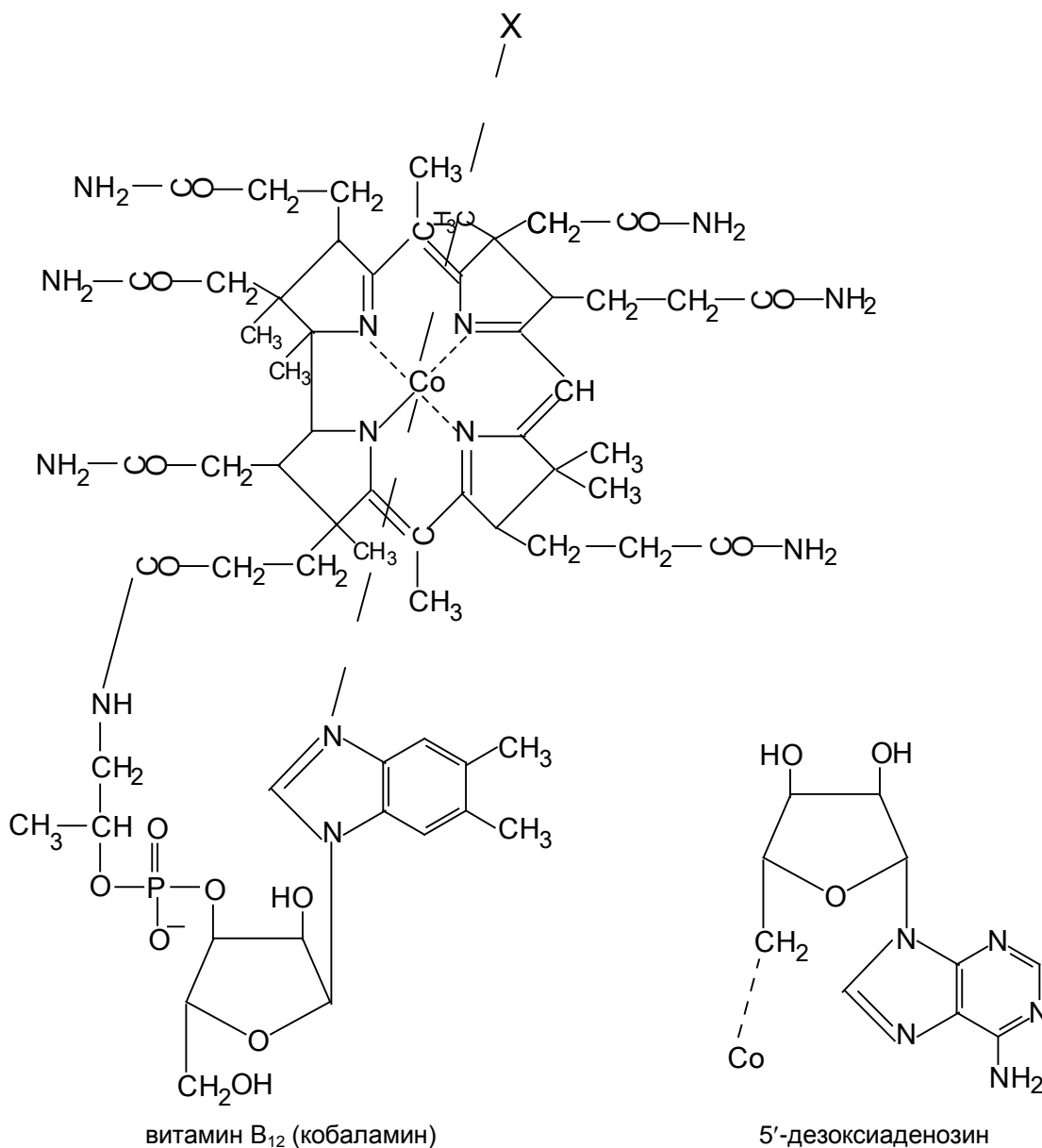


тетрагидрофолиевая кислота

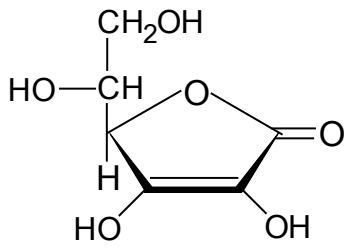
**Витамин В<sub>12</sub> (кобаламин).** Это единственный металлсодержащий витамин. Группа кобаламинов представляет собой сложные соединения, состоящие из следующих частей: атома кобальта, двух связанных с кобальтом лигандов (верхнего и нижнего), тетрапиррольного кольца коррина и аминокпропанолового мостика. Атом кобальта связан с четырьмя атомами азота пиррольных колец, которые образуют планарную структуру. Верхний лиганд (X) может быть представлен цианид-ионом (цианкобаламин), гидроксильной группой (гидроксикобаламин), ионами нитрита, нитрата, хлора и др. Нижний лиганд представлен нуклеотидом, состоящим из 5,6-диметилбензимидазола, остатков α-D-рибозы и фосфорной кислоты и расположенным перпендикулярно плоскости коррина. Нуклеотид через аминокпропаноловый мостик связан в цикл с заместителем атома углерода одного из пиррольных колец.

Коферментной формой витамина является 5'-дезоксаденозилкобаламин (кобамамидный кофермент), у которого верхний лиганд представлен остатком 5'-дезоксаденозина, связанного с атомом кобальта необычной кобальт-углеродной связью. Биохимические функции аденозилкобаламина состоят в изомеризации соединений,

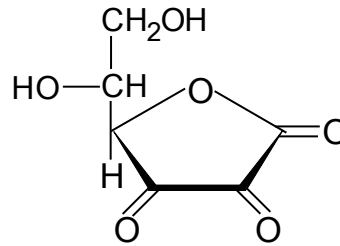
имеющей место в углеводном, азотистом, нуклеиновом и липидном обмене, биосинтезе метионина из гомоцистеина, восстановлении рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов и других процессах:



**Витамин С (аскорбиновая кислота).** Представляет собой  $\gamma$ -лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. Молекула витамина имеет четыре оптических изомера. Биологически активным соединением является только L-аскорбиновая кислота, которая в организме присутствует также и в виде окисленной формы – L-дегидроаскорбиновой кислоты (2,3-дикето-L-гулоновой кислоты), служащей транспортной формой витамина:



L-аскорбиновая кислота

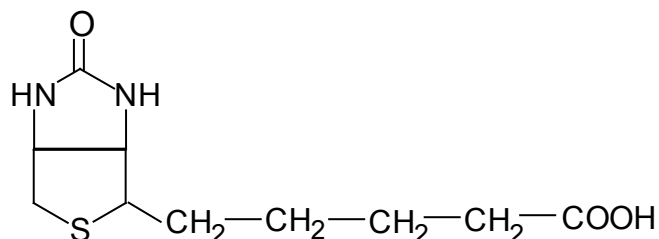


L-дегидроаскорбиновая кислота

Одним из основных свойств аскорбиновой кислоты является ее способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям, которая лежит в основе физиологической активности витамина: L-аскорбиновая кислота является сильным восстановителем, а образуемая при этом L-дегидроаскорбиновая кислота легко восстанавливается с помощью редуктазы. Среди множества реакций, протекающих с участием витамина С, можно упомянуть гидрокселирование предшественников некоторых гормонов, синтез коллагена и желчных кислот, расщепление тирозина и лизина, обмен липидов и др. Аскорбиновая кислота служит сильным антиоксидантом, предохраняющим биологически активные вещества клетки от действия свободных радикалов, а также увеличивает всасывание железа и ингибирует образование нитрозаминов (канцерогенов).

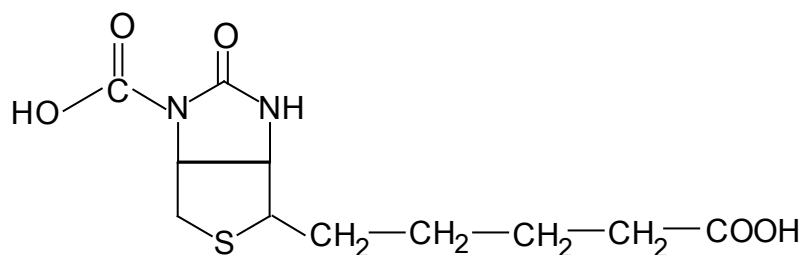
**Витамин Н (биотин).** Молекула биотина состоит из имидазольного и тиофенового колец, являющихся гетероциклической частью, а боковая цепь представлена остатком валериановой кислоты. Коферментной формой биотина служит N<sub>5</sub>-карбоксибиотин («активный карбоксил»), который ковалентно связан с белковой частью фермента.

Биотин служит простетической группой ферментов карбоксилаз, катализирующих реакции переноса карбоксильной группы, которые лежат в основе биосинтеза жирных кислот, превращения пирувата в оксалоацетат, синтеза пуриновых оснований, аминокислот и других процессов:



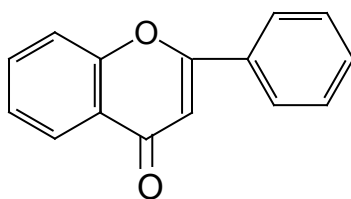
биотин





N<sub>5</sub>-

**Витамин Р (биофлавоноиды).** Это группа соединений фенольной природы, представляющих собой производные флавона. К ним относятся рутин, кверцетин, цитрин, катехины, кумарины, галловая кислота и ее производные:



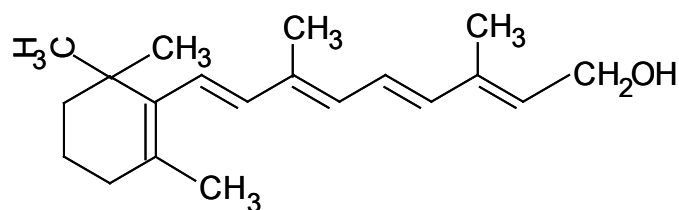
8-д-ш-0-1

Биологическое действие биофлавоноидов обусловлено их взаимосвязью с аскорбиновой кислотой. Они препятствуют окислению L-аскорбиновой кислоты в L-дегидроаскорбиновую, а также восстанавливают последнюю при участии глутатиона. Витамин Р регулирует проницаемость и повышает прочность кровеносных капилляров, а также обладает антиоксидантным и противоопухолевым действием.

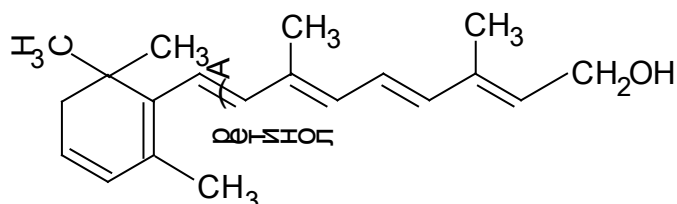
## 7.2. Жирорастворимые витамины

По химической структуре все жирорастворимые витамины, за исключением витамина F, являются изопреноидами (терпенами). Это обширная группа соединений, к которой также относятся каротиноиды, стерины, каучук и др. Жирорастворимые витамины выполняют в организме некоферментные функции.

**Витамин А (ретинол).** Этот витамин существует в двух формах, сходных по химическому строению и обладающих разным физиологическим действием, – ретинол (витамин А<sub>1</sub>) и дегидроретинол (витамин А<sub>2</sub>). Витамин А, легко окисляясь, дает начало группе ретиноидов, к которой принадлежат ретиналь и ретиноевая кислота. Предшественником биосинтеза витамина А служит β-каротин, при расщеплении одной молекулы которого образуется две молекулы ретинола:



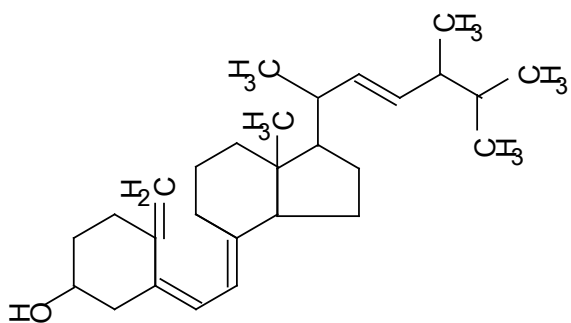
витамин A<sub>1</sub> (ретинол)



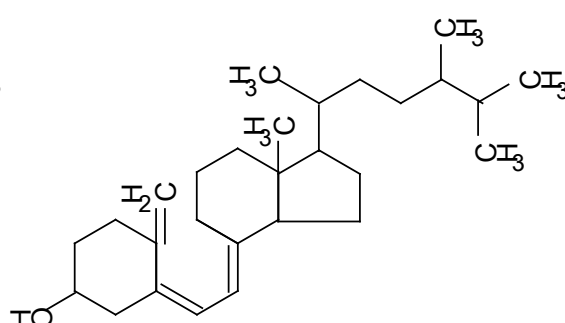
витамин A<sub>2</sub> (дегидроретинол)

Биологическая роль витамина А и его форм состоит в регуляции дифференцировки клеток, предупреждении ороговения эпителиальных тканей, осуществлении репродуктивной функции, участии в обмене белков и липидов, окислительных процессах, регуляции проницаемости мембран. Ретиноль выполняет роль зрительного пигмента. Кроме того, ретиноиды обладают антиопухольевой активностью и ослабляют действие канцерогенов. β-Каротин является антиоксидантом.

**Витамин D (кальциферол).** Кальциферол, как и витамин А, существует в нескольких формах. Важнейшие среди них – эргокальциферол (витамин D<sub>2</sub>) и холекальциферол (витамин D<sub>3</sub>):



витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол)

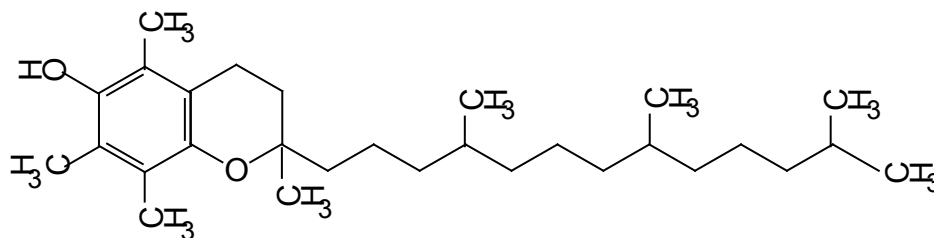


витамин D<sub>3</sub> (холекальциферол)

Основные функции витамина D в организме связаны с обеспечением транспорта ионов кальция и фосфора через биомембраны. Причем витамин D выполняет свои функции в форме образующихся из эрго- и холекальциферола активных метаболитов, важнейшим из ко-

торых является 1,25-дигидроксихолекальциферол (кальцитриол). Последний стимулирует всасывание кальция в желудочно-кишечном тракте и включение его в костную ткань.

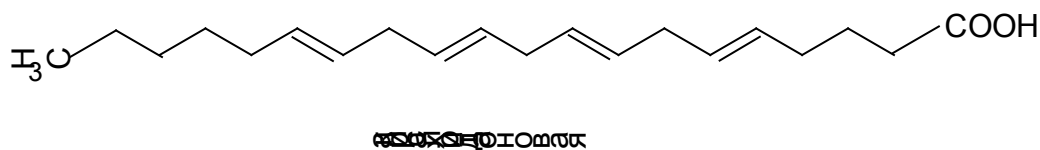
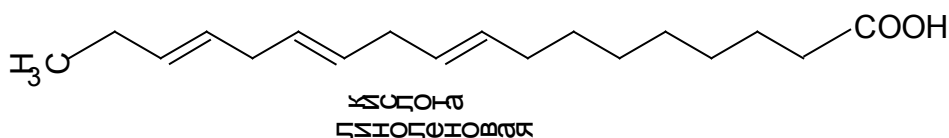
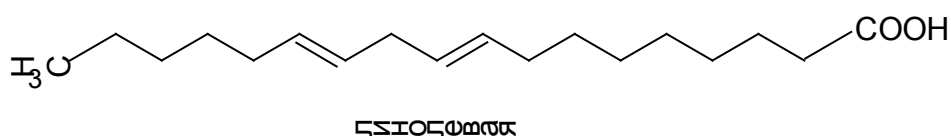
**Витамин Е (токоферол).** Под этим названием объединяется группа соединений – производных токола. Наиболее распространены α-, β- и γ-токоферолы, которые различаются числом и положением метильных групп у бензольного кольца:



α-токоферол

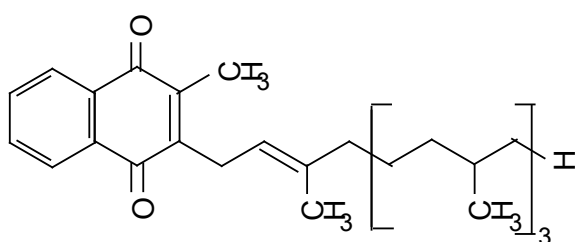
Витамин Е обладает антиоксидантным действием, препятствуя процессам перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот в составе липидов клеточных мембран. Кроме того, токоферолы участвуют в регуляции синтеза ферментов, контролируют обмен и функции убихинона (кофермента Q) – одного из компонентов дыхательной цепи, а также являются синергистами селена.

**Витамин F (эссенциальные жирные кислоты).** Эссенциальными (незаменимыми) жирными кислотами называются жирные кислоты, которые не могут быть синтезированы в организме человека и животных в количествах, необходимых для их нормального роста и развития, и должны поступать с пищей. К ним относятся полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие 18 атомов углерода, – линолевая (C18:2) и α-линоленовая (C18:3):

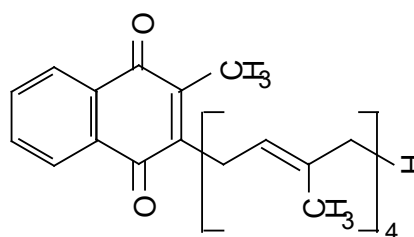


Из линолевой и линоленовой кислот может образовываться арахидоновая кислота, которая служит предшественником большой группы медиаторов – эйкозаноидов. Последние участвуют в высвобождении веществ внутриклеточного синтеза, контролируют сокращение гладкомышечной ткани, оказывают влияние на метаболизм костной ткани, нервную и иммунную системы и др. Следует отметить участие витамина F в регуляции обмена липидов, а также его роль в выведении из организма избыточных количеств холестерина.

**Витамин К (филлохинон).** Витамины этой группы являются производными 2-метил-1,4-нафтохинона и представлены филлохинонами (витамин К<sub>1</sub>) и менахинонами (витамин К<sub>2</sub>), отличающимися строением боковой цепи:



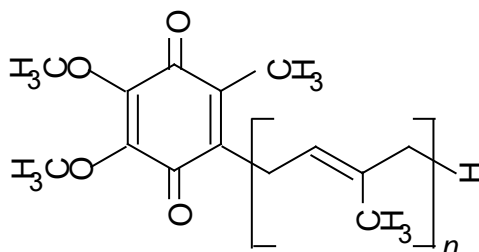
витамин К<sub>1</sub> (филлохинон)



витамин К<sub>2</sub> (менахинон)

Витамин К характеризуется антигеморрагической активностью, стимулируя биосинтез факторов свертывания крови. При этом филлохинон как кофактор карбоксилазы принимает участие в карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты белков плазмы крови (протромбина и др.). Менахиноны функционируют в составе мембран, а также участвуют в окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании.

**Витамин Q (убихинон).** Относится к семейству хинонов, среди которых наиболее распространены убихиноны, называемые также коферментами Q. Они участвуют в процессах транспорта электронов при дыхании и фотосинтезе, а также проявляют антиоксидантное действие в мембранах, причем еще более эффективное, чем у токоферола:



витамин Q (убихинон)

## Лабораторная работа КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

**Цель работы** – освоение методов идентификации и количественного определения витаминов.

**Реактивы, материалы и оборудование:** растворы витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> и С в 50%-ном этаноле (3 мг/мл); растворитель № 1 (бензол : этанол : уксусная кислота : ацетон = 70 : 20 : 5 : 5); растворитель № 2 (бензол : этанол : уксусная кислота : ацетон = 55 : 35 : 5 : 5); сухая хвоя, шиповник, лук, капуста, картофель; оксид алюминия; 2%-ный раствор соляной кислоты; 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия; 0,1%-ный спиртовой раствор витамина Е; 70%-ный раствор азотной кислоты; 96%-ный этанол; дистиллированная вода; пластинки Silufol UV 254; стеклянные капилляры; стеклянная камера; пинцеты; химически чистые пробирки; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл; конические колбы объемом 50 и 100 мл; ступки; шпатели; штативы для пробирок; бюретки; стеклянные воронки; фильтровальная бумага; электронные весы; кюветы для фотоэлектроколориметра; фотоэлектроколориметр.

### **Выполнение работы**

#### **1. Разделение модельной смеси водорастворимых витаминов методом тонкослойной хроматографии**

Метод основан на различии в скорости перемещения компонентов смеси в плоском тонком слое адсорбента при их движении в потоке жидкой фазы (элюента) (см. раздел 5.3).

В левый и правый угол хроматографической пластинки (Silufol UV 254) вблизи ее основания тонким капилляром наносят раствор смеси витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> и С (5 мкл) в 50%-ном этаноле, а между ними – растворы индивидуальных витаминов (5 мкл) в 50%-ном этаноле. Линию старта отмечают на пластинке тонкозаточенным карандашом, не повреждая слой адсорбента, на расстоянии 1–2,0 см от основания пластинки.

Растворы наносят в виде круглых пятен, осторожно прикасаясь капилляром к поверхности пластинки, и дают раствору впитаться в слой адсорбента. Расстояние между точками нанесения должно быть не менее 1–2 см, диаметр пятна не должен превышать 3 мм.

Пластинку основанием вниз помещают в наклонном положении в герметически закрывающуюся стеклянную камеру, на дне которой находится элюент высотой 57 мм. В качестве элюента используют растворитель № 1 (бензол : этанол : уксусная кислота : ацетон = 70 : 20 : 5 : 5) или растворитель № 2 (бензол : этанол : уксусная кислота : ацетон = 55 : 35 : 5 : 5).

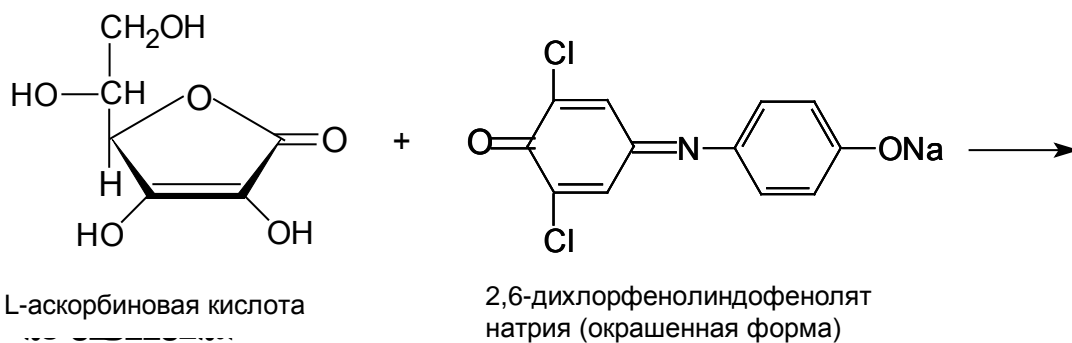
Линия старта с нанесенными образцами должна находиться несколько выше уровня элюента в камере. Камеру закрывают стеклянной крышкой для лучшего насыщения ее парами элюента. Как только растворитель дойдет до линии фронта, отстоящей от верхнего края пластинки на ~5 мм, пластинку вынимают из камеры, отмечают карандашом линию фронта и высушивают на воздухе до полного испарения подвижной фазы. Затем проводят проявление хроматограмм в УФ-свете с длиной волны 254 нм. Положение пятна разделенного витамина на хроматограмме определяют посредством измерения величины его  $R_f$  (см. раздел 5.3).

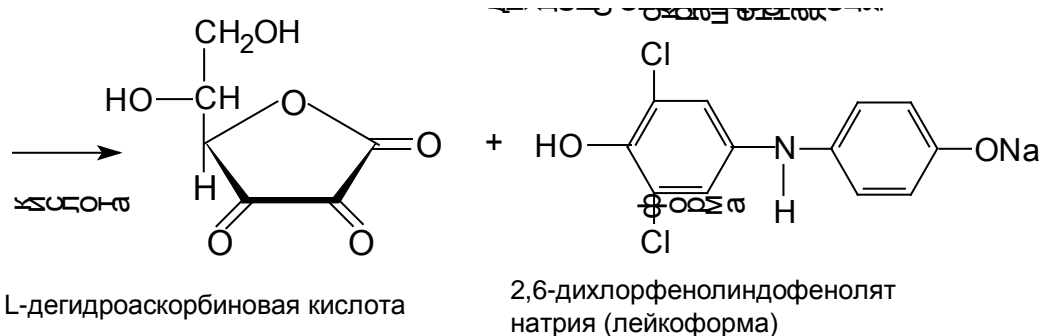
Присутствие витамина в смеси определяют на основании сравнения значений  $R_f$  анализируемых витаминов со значениями  $R_f$  индивидуальных витаминов.

## 2. Количественное определение витамина С по Тильмансу

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия в дегидроаскорбиновую кислоту.

2,6-Дихлорфенолиндофенолят натрия (окисленная форма) является интенсивно окрашенным в синий цвет соединением, имеющим максимум поглощения при 600 нм ( $\epsilon = 2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). При окислении аскорбиновой кислоты 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия восстанавливается в бесцветное соединение – лейкоформу:





По количеству 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, затраченного на титрование исследуемой жидкости в условиях, предохраняющих аскорбиновую кислоту от разрушения (кислая среда), определяют количество последней в исследуемом материале. По мере окисления всего количества витамина С титруемый раствор приобретает розовую окраску за счет образования в кислой среде недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. В нейтральной и щелочной среде 2,6-дихлорфенолиндофенолят натрия имеет синюю окраску, а в кислой среде – красную.

Хвою, шиповник, лук, капусту или картофель в количестве 2 г тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1 г окиси алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), добавляя порциями 2%-ный раствор соляной кислоты до консистенции густой сметаны в течение 10 мин. После этого приливают 2–3 мл 2%-ного раствора соляной кислоты, содержимое перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Половину фильтрата разводят в 2 раза дистиллированной водой, помещают его в коническую колбу и титруют из бюретки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с.

Содержание аскорбиновой кислоты рассчитывают по формулам

$$C_1 = \frac{0,088AV_1V}{V_2a} \quad \text{или} \quad C_2 = \frac{0,0005}{V_2a} \cdot 1,$$

где  $C_1$  – содержание аскорбиновой кислоты, мг/г; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг;  $A$  – количество 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованного на титрование, мл;  $V_1$  – общее количество экстракта, мл;  $V_2$  – объем экстракта, взятый для титрования, мл;  $a$  – масса пищевого продукта, г;  $C_2$  – содержание аскорбиновой кислоты, ммоль/г; 0,0005 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, ммоль.

### 3. Количественное определение витамина E

При взаимодействии спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола с концентрированной азотной кислотой образуется продукт окисления  $\alpha$ -токоферола, имеющий хиноидную структуру. При этом реакционная смесь окрашивается в красный цвет, интенсивность которого пропорциональна концентрации витамина E и может быть определена с помощью фотоэлектроколориметра.

В две пробирки наливают по 2,5 мл 0,1%-ного спиртового раствора витамина E, добавляют по 0,5 мл 70%-ного раствора азотной кислоты и выдерживают в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Пробирки охлаждают и помещают в темное место на 15 мин. Затем объем жидкости в пробирках доводят 96%-ным этанолом до 5 мл, содержимое перемешивают и измеряют экстинкцию растворов при 470 нм в кюветах ( $l = 1$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы (вместо раствора витамина берут 96%-ный этанол, остальные растворы добавляют в тех же объемах и смесь выдерживают в тех же условиях).

Концентрацию витамина E в исследуемом растворе определяют по калибровочному графику зависимости экстинкции от концентрации, предварительно построенному для стандартных растворов витамина.

Для построения калибровочного графика используют спиртовой раствор витамина E, содержащий 100 мг  $\alpha$ -токоферола в 1 мл раствора. Из этого раствора готовят рабочий раствор витамина E с концентрацией 1 мг/мл. В четыре пробирки наливают по 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мл рабочего раствора витамина E, затем в каждую из них добавляют по 0,5 мл 70%-ного раствора азотной кислоты и выдерживают в кипящей водяной бане в течение 3 мин. Пробирки охлаждают и помещают в темное место на 15 мин. После этого объем жидкости в пробирках доводят 96%-ным этанолом до 3 мл, содержимое перемешивают и измеряют экстинкцию растворов при 470 нм в кюветах ( $l = 1$  см) на фотоэлектроколориметре против контрольной пробы. Строят калибровочный график зависимости  $E_{470}$  от концентрации витамина в растворе.

Следует помнить, что при каждой смене реактивов необходимо заново строить калибровочный график.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Что собой представляют витамины? В чем заключается функциональное значение витаминов?



2. В каких формах выражается обеспеченность организма витаминами? По какому признаку классифицируют витамины?
3. Напишите структурные формулы витаминов группы В и их коферментных форм.
4. В каких биохимических процессах участвует коферментное производное тиамина?
5. Коферментные производные каких витаминов служат переносчиками восстановительных эквивалентов?
6. Какой витамин является металлоорганическим соединением? В чем состоят особенности его структуры?
7. Назовите витамины, коферментные формы которых участвуют в процессах карбоксилирования и декарбоксилирования.
8. Напишите структурные формулы жирорастворимых витаминов. Укажите их биохимические функции.
9. Какие жирные кислоты относятся к эссенциальным? Какова их биологическая роль?
10. Назовите, какие витамины существуют в нескольких формах. Какая из форм обладает биологической активностью? Напишите их формулы.
11. Каким витаминам присущи антиоксидантные свойства?
12. Как можно разделить водорастворимые витамины методами хроматографии?
13. Объясните принципы методов количественного определения витаминов С и Е.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия / под ред. Е. С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 779 с.
2. Биохимия человека / Р. Марри [и др.]. – М.: Мир, 2004. – 381 с.
3. Мецлер, Д. Биохимия: в 3 т. / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – Т. 1. – 407 с.; Т. 2. – 606 с.; Т. 3. – 488 с.
4. Ленинджер, А. Биохимия: в 3 т. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 365 с.; Т. 2. – 355 с.; Т. 3. – 313 с.
5. Страйер, Л. Биохимия: в 3 т. / Л. Страйер. – М.: Мир, 1984–1985. – Т. 1. – 232 с.; Т. 2. – 312 с.; Т. 3. – 400 с.
6. Белясова, Н. А. Биохимия и молекулярная биология / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2002. – 360 с.
7. Биополимеры / под ред. Ю. Иманиси. – М.: Мир, 1988. – 544 с.
8. Бохински, Р. Современные воззрения в биохимии / Р. Бохински. – М.: Мир, 1987. – 543 с.
9. Молекулярная биология клетки: в 5 т. / Б. Албертс [и др.]. – М.: Мир, 1987–1994. – Т. 1. – 1993. – 223 с.; Т. 2. – 1994. – 312 с.; Т. 3. – 1993. – 296 с.; Т. 4. – 1987. – 197 с.; Т. 5. – 1987. – 231 с.
10. Диксон, М. Ферменты: в 2 т. / М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – Т. 1. – 392 с.; Т. 2. – 515 с.
11. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под ред. Е. С. Северина, А. Я. Николаева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. – 448 с.
12. Практикум по биохимии / под ред. Е. С. Северина, Г. А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
13. Мусил, Я. Современная биохимия в схемах / Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц. – М.: Мир, 1984. – 215 с.
14. Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
15. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
16. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
17. Практическая химия белка / под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623 с.
18. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. – М.: Мир, 1982. – 448 с.

19. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам: в 2 ч. / под ред. О. Микеша. – М.: Мир, 1982. – Ч. 2. – 381 с.
20. Гольберт, К. А. Введение в газовую хроматографию / К. А. Гольберт, М. С. Вигдергауз. – М.: Химия, 1990. – 352 с.
21. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2 т. / Ю. Кирхнер. – М.: Мир, 1981. – Т. 1. – 616 с.; Т. 2. – 524 с.
22. Экспериментальная витаминология / под ред. Ю. М. Островского. – Минск: Наука и техника, 1979. – 552 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	3
НЕКОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И РАЗМЕРНОСТИ .....	4
Глава 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ .....	6
Глава 2. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ .....	10
Лабораторная работа. Качественное и количественное определение аминокислот .....	24
Глава 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ .....	34
3.1. Физико-химические свойства белков .....	34
3.2. Методы выделения и очистки белков .....	35
3.3. Методы количественного определения белков .....	80
Лабораторная работа. Выделение, очистка и количественное определение белков .....	95
Глава 4. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА .....	100
4.1. Особенности организации и функционирования ферментов. Закономерности ферментативного катализа ...	100
4.2. Активность ферментов и факторы, на нее влияющие. Принципы ферментативной кинетики .....	113
4.3. Методы выделения, очистки и определения активности ферментов .....	124
Лабораторная работа № 1. Определение активности алкогольдегидрогеназы в дрожжевых экстрактах .....	131
Лабораторная работа № 2. Определение активности пероксидазы в растительных экстрактах .....	134
Глава 5. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЛИПИДОВ .....	138
5.1. Структура и свойства липидов. Строение биомембран .....	138
5.2. Перекисное окисление липидов .....	156
5.3. Методы выделения и хроматографического анализа липидов .....	162
Лабораторная работа. Выделение липидов и изучение их свойств .....	173
Глава 6. УГЛЕВОДЫ .....	178
6.1. Структура и свойства моносахаридов .....	178

6.2. Производные моносахаридов .....	183
6.3. Гликозидная связь и олигосахариды .....	184
6.4. Полисахариды .....	185
6.5. Методы выделения и анализа полисахаридов .....	188
Лабораторная работа. Выделение углеводов и изучение их свойств .....	189
Глава 7. ВИТАМИНЫ .....	194
7.1. Водорастворимые витамины .....	195
7.2. Жирорастворимые витамины .....	201
Лабораторная работа. Качественное и количественное определение витаминов .....	205
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	210
ЛИТЕРАТУРА .....	211



## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	3
НЕКОТОРЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И РАЗМЕРНОСТИ .....	4
Глава 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ .....	6
Глава 2. СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ .....	10
Лабораторная работа. Качественное и количественное определение аминокислот .....	24
Глава 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ОЧИСТКИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ .....	34
3.1. Физико-химические свойства белков .....	34
3.2. Методы выделения и очистки белков .....	35
3.3. Методы количественного определения белков .....	79
Лабораторная работа. Выделение, очистка и количественное определение белков .....	95
Глава 4. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА .....	100
4.1. Особенности организации и функционирования ферментов. Закономерности ферментативного катализа .....	100
4.2. Активность ферментов и факторы, на нее влияющие. Принципы ферментативной кинетики .....	113
4.3. Методы выделения, очистки и определения активности ферментов .....	121
Лабораторная работа № 1. Определение активности алкогольдегидрогеназы в дрожжевых экстрактах .....	129
Лабораторная работа № 2. Определение активности пероксидазы в растительных экстрактах .....	132
Глава 5. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЛИПИДОВ .....	137
5.1. Структура и свойства липидов. Строение биомембран ...	137
5.2. Перекисное окисление липидов .....	156
5.3. Методы выделения и хроматографического анализа липидов .....	162
Лабораторная работа. Выделение липидов и изучение их свойств .....	173



Глава 6. УГЛЕВОДЫ .....	179
6.1. Структура и свойства моносахаридов .....	179
6.2. Производные моносахаридов .....	185
6.3. Гликозидная связь и олигосахариды .....	186
6.4. Полисахариды .....	188
6.5. Методы выделения и анализа полисахаридов .....	191
Лабораторная работа. Выделение углеводов и изучение их свойств .....	192
 Глава 7. ВИТАМИНЫ .....	 197
7.1. Водорастворимые витамины .....	198
7.2. Жирорастворимые витамины .....	206
Лабораторная работа. Качественное и количественное определение витаминов .....	 209
 ПРИЛОЖЕНИЕ .....	 215
ЛИТЕРАТУРА .....	216

Учебное издание

**Леонтьев Виктор Николаевич**  
**Ахрамович Татьяна Игоревна**

**БИОХИМИЯ**  
**ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

Учебное пособие

Редактор *Е. С. Ватеичкина*  
Компьютерная верстка *И. А. Ткаченко*

Подписано в печать 17.07.2008. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.  
Усл. печ. л. 12,6. Уч.-изд. л. 12,0.  
Тираж 200 экз. Заказ .

Учреждение образования  
«Белорусский государственный технологический университет».  
220006. Минск, Свердлова. 13а.  
ЛИ № 02330/0133255 от 30.04.2004.

Отпечатано в лаборатории полиграфии учреждения образования  
«Белорусский государственный технологический университет».  
220006. Минск, Свердлова, 13.  
ЛП № 02330/0056739 от 22.01.2004.

Переплетно-брошюровочные процессы произведены  
в ОАО «Полиграфкомбинат им. Я. Коласа».  
220600. Минск, Красная, 23. Заказ .