

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Н. И. ДРОЗДОВА

СТАТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Практическое пособие

для студентов специальности

1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Гомель
ГГУ им. Ф. Скорины
2017

УДК 577.11(076)
ББК 28.072я73
Д754

Рецензенты:

канд. химических наук А. В. Лысенкова,
канд. химических наук А. В. Хаданович

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Дроздова, Н. И.

Д754 Статическая биохимия : практическое пособие /
Н. И. Дроздова ; М-во образования Республики Беларусь,
Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель : ГГУ им.
Ф. Скорины, 2017. – 47 с.
ISBN 978-985-577-260-7

Целью практического пособия является оказание методической помощи студентам в изучении раздела «Статическая биохимия». Каждое занятие включает краткое теоретическое введение, вопросы и упражнения для самоконтроля, тестовые задания, указания к выполнению лабораторных работ.

Адресовано студентам специальности 1-31 01 01-02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)». Может быть использовано учащимися профильных химико-биологических классов при углубленном изучении химии и биологии.

УДК 577.11(076)
ББК 28.072я73

ISBN 978-985-577-260-7

© Дроздова Н. И., 2017
© Учреждение образования «Гомельский
государственный университет
имени Франциска Скорины», 2017

Оглавление

Предисловие	4
Занятие 1. Аминокислоты и пептиды	5
Занятие 2. Уровни структурной организации белков, их классификация и физико-химические свойства	18
Занятие 3. Ферменты	29
Занятие 4. Химическая структура и свойства нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот.....	39
Литература.....	47

Предисловие

Биохимия является одной из важнейших фундаментальных дисциплин в системе биологического образования. Современная биохимия тесно связана с физиологией, генетикой, микробиологией, другими биологическими дисциплинами и является методологической основой для изучения на молекулярном уровне физиологических процессов. Изучение дисциплины позволит расширить научный кругозор студентов-биологов, способствовать их развитию как самостоятельных специалистов и получить знания, необходимые для проведения исследований на современном научном уровне.

Основная цель дисциплины – сформировать у студентов целостную систему знаний о химическом составе живых организмов, физико-химических и биологических свойствах природных соединений, основных путях обмена веществ, механизмах регуляции и взаимосвязи метаболических процессов.

Основными задачами при изучении дисциплины являются:

- познание новейших достижений в области биохимии и перспектив их использования в различных областях народного хозяйства, медицины, фармации;
- развитие умения использовать знания биохимии для объяснения важнейших физиологических процессов, происходящих в органах и тканях человека, животных, растений;
- овладение биохимическими методами исследований в экспериментальной биологии;
- овладение методами количественного и качественного анализа основных классов природных соединений.

В настоящее пособие включен материал, позволяющий изучить физико-химические свойства, строение и биологическую роль таких классов природных соединений, как аминокислоты, белки, нуклеиновые кислоты.

Изложение материала в пособии включает основные теоретические представления по теме, примеры выполнения упражнений, вопросы для контроля усвоения темы, подробные инструкции по выполнению лабораторного практикума, что необходимо для успешного овладения студентами данной дисциплины.

Практическое пособие предназначено для проведения лабораторных занятий по дисциплине «Биохимия» для студентов специальности 1- 31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Занятие 1

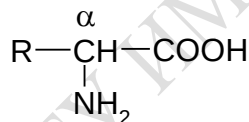
Аминокислоты и пептиды

Цель занятия: изучить классификацию, номенклатуру, физико-химические свойства, биологическую роль и основные биохимические реакции аминокислот.

1. Структура и классификация аминокислот.
2. Изомерия аминокислот.
3. Физико-химические свойства аминокислот: амфотерность, реакционная способность аминокислот.
4. Образование пептидной связи и ее основные свойства.

Основные понятия по теме

Аминокислоты – гетерофункциональные соединения, содержащие карбоксильную (COOH) и аминогруппу (NH₂).



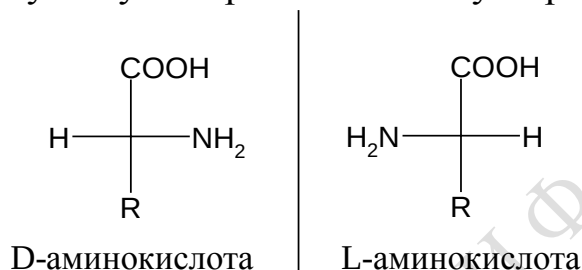
В настоящее время известны более 300 аминокислот, однако *протеиногенными* являются только 20 из них.

Классификация аминокислот:

- 1) по *характеру углеводородного радикала* аминокислоты подразделяют на ациклические и циклические (ароматические и гетероциклические);
- 2) по *количеству функциональных групп* различают моноаминомонокарбоновые (нейтральные), моноаминодикарбоновые (кислые) и диаминомонокарбоновые (основные) аминокислоты;
- 3) в зависимости от положения аминогруппы относительно карбоксила различают α-, β-, γ- и другие аминокислоты;
- 4) по *биологическому значению* аминокислоты делят на заменимые и незаменимые, которые не синтезируются в организме и должны поступать с пищей. Абсолютно незаменимых аминокислот для всех видов живых организмов *восемь (метионин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, лизин, фенилаланин, триптофан)*. В определенные периоды развития организма, ряд других аминокислот также становится незаменимыми. Так, например, для детей и растущих животных помимо вышеуказанных 8 аминокислот требуется также гистидин и аргинин.

Для аминокислот характерна структурная и пространственная изомерия. *Структурная изомерия* может быть обусловлена разветвлением углеродной цепи и положением аминогруппы относительно карбоксила (α , β , γ -аминокислоты).

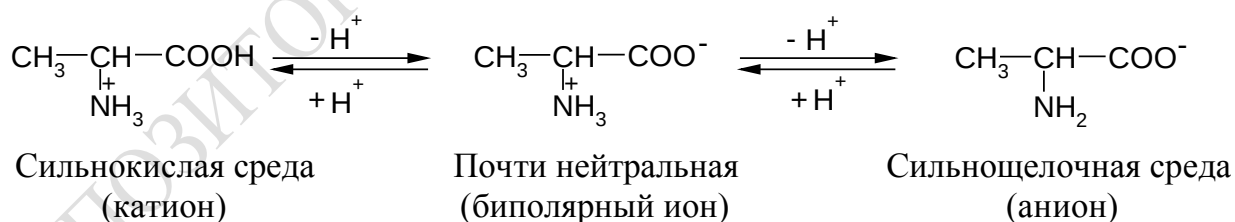
Пространственная изомерия обусловлена наличием у аминокислот ассиметричных атомов углерода (хиральных центров). Принадлежность аминокислоты к D- или L-ряду определяется путем сравнения с конфигурацией ассиметричного атома углерода D- или L-глицеринового альдегида, принятого за эталон. Все протеиногенные аминокислоты, за исключением глицина, обладают оптической активностью, так как в их структуре присутствует хиральный атом углерод.



В природных белках присутствуют остатки только L- α -аминокислот, однако в некоторых короткоцепочечных пептидах и пептидах бактериального происхождения есть остатки D-аминокислот.

Физико-химические свойства аминокислот обусловлены присутствием в молекуле двух типов функциональных групп: карбоксильной и аминогруппы.

Для аминокислот характерны амфотерные свойства, то есть в кислой среде они диссоциируют как основания, приобретая положительный заряд, а в щелочной среде диссоциируют как кислоты, имея отрицательный заряд:



Многие свойства аминокислот (кристалличность, нелетучесть, высокие температуры плавления, растворимость в воде и полярных растворителях и др.) связаны с формой существования аминокислот в виде биполярных ионов (цвиттер-ионов).

Значение pH среды, при котором суммарный заряд аминокислоты равен нулю, называется *изоэлектрической точкой pI (ИЭТ)*.

Для моноаминомонокарбоновых кислот значение $pI \approx 5-6$, для моноаминодикарбоновых кислот (Asp, Glu) ≈ 3 , для диаминомонокарбоновых кислот (His, Lys, Arg) $\approx 8-11$.

Значение изоэлектрической точки (pI) моноаминомонокарбоновых кислот вычисляют по формуле

$$pI = \frac{pK_{COO^-} + pK_{NH_3^+}}{2}.$$

Значения pK карбоксильной и аминогруппы, а также дополнительных ионогенных групп, содержащихся в радикале, представлены в таблице 1.

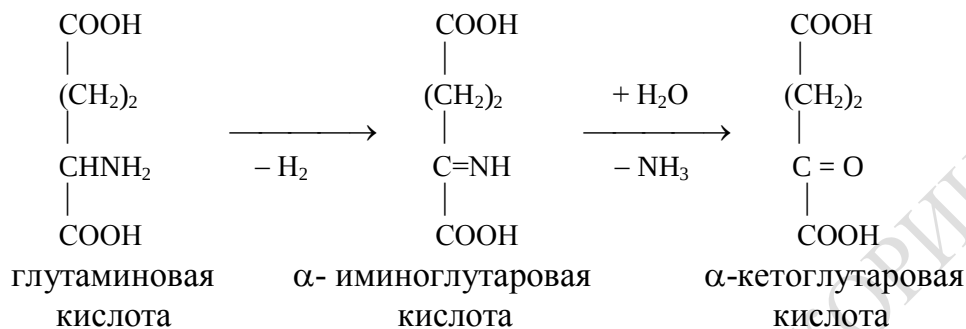
Таблица 1 – Величины pK ионизированных групп аминокислот

Аминокислота	pK ₁ , α-COOH	pK ₂ , α-NH ₃ ⁺	pK ₃ , R – группа
Аланин	2,34	9,69	–
Аргинин	2,17	9,04	12,48 (гуанидин)
Аспарагин	2,02	9,80	–
Аспарагиновая кислота	2,09	9,82 (NH ₃ ⁺)	3,86 (-COOH)
Валин	2,32	9,62	–
Гистидин	1,82	9,17 (NH ₃ ⁺)	6,0 (имидазол)
Глицин	2,34	9,60	–
Глутамин	2,17	9,13	–
Глутаминовая кислота	2,19	9,67 (NH ₃ ⁺)	4,25 (-COOH)
Изолейцин	2,36	9,68	–
Лейцин	2,36	9,60	–
Лизин	2,18	8,95	10,53 (ε-NH ₃ ⁺)
Метионин	2,28	9,21	–
Оксипролин	1,92	9,73	–
Пролин	1,99	10,96	–
Серин	2,21	9,15	–
Тирозин	2,20	9,11	10,07 (-OH)
Треонин	2,71	9,62	–
Триптофан	2,38	9,39	–
Цистеин	1,71	8,33	10,28 (-SH)

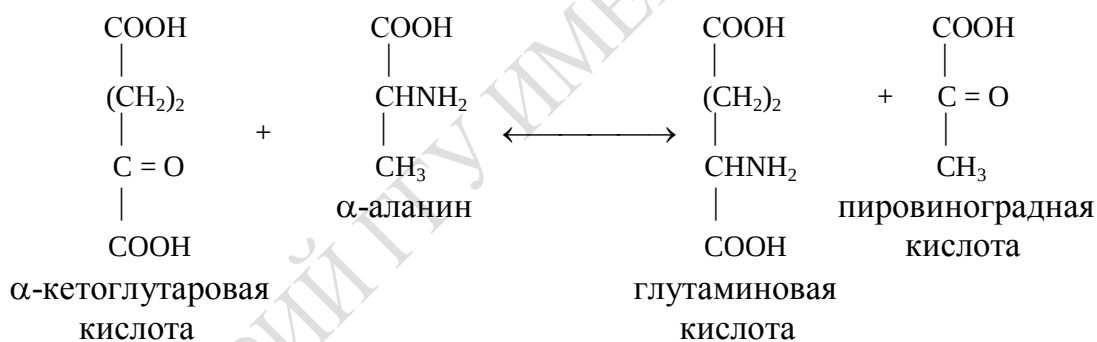
При значении **pH << pI** аминокислоты превращаются в **катион**, имеют положительный заряд и под действием электрического поля перемещаются в сторону **катода**. При значении **pH >> pI** аминокислоты превращаются в **анион**, имеют отрицательный заряд и под действием электрического поля перемещаются в сторону **анода**. На изменении заряда аминокислот и белков в зависимости от pH среды основан электрофоретический метод разделения смесей.

Помимо общих реакций, характерных для карбоновых кислот и аминов, для аминокислот свойственны некоторые *специфические реакции*: дезаминирование, декарбоксилирование, переаминирование, образование пептидной связи.

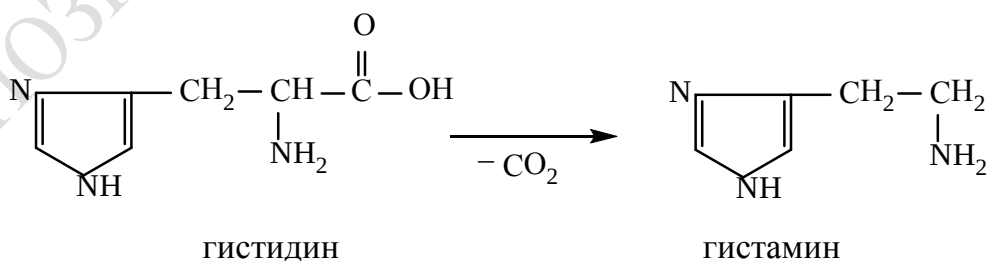
Дезаминирование аминокислот – это отщепление от аминокислот аминогруппы в виде аммиака. Существует несколько типов дезаминирования аминокислот: гидролитическое, внутримолекулярное, восстановительное и окислительное. Наиболее распространенным видом дезаминирования в организме животных и человека является окислительное:



Трансаминирование (или переаминирование) – это процесс переноса аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту, чаще всего α -кетоглутаровую, пировиноградную или щавелевоуксусную. В организме животных и человека этот процесс протекает при участии ферментов аминотрансфераз и является одним из путей синтеза заменимых аминокислот.



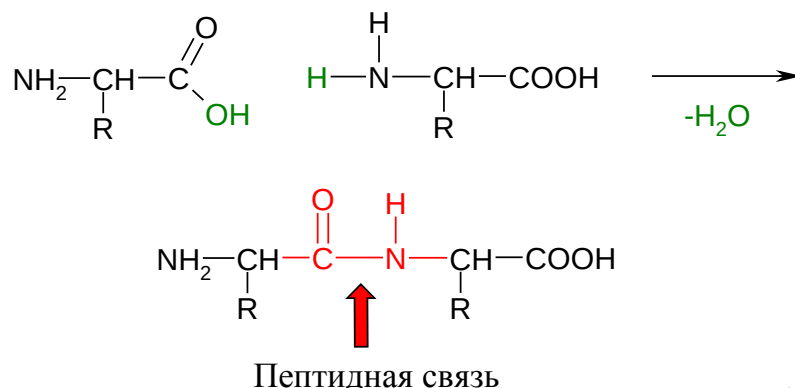
Декарбоксилирование аминокислот сопровождается образованием CO_2 и биогенных аминов. В организме человека и животных данный процесс обеспечивают ферменты декарбоксилазы аминокислот.



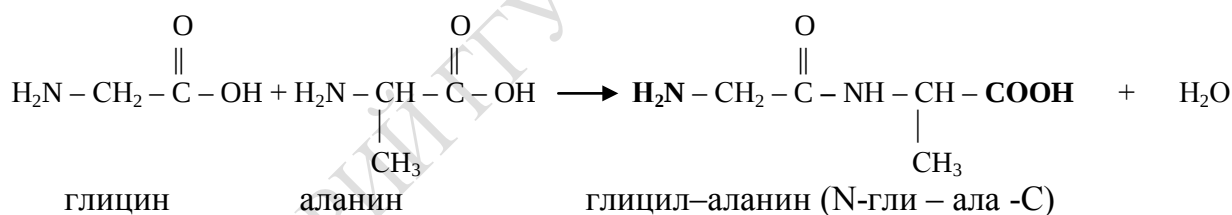
Образующиеся биогенные амины выполняют в организме определенную биологическую роль. Например, гистамин является нейромедиатором, усиливает секрецию соляной кислоты в желудке, участвует в аллергических реакциях организма, расширяет капилляры и снижает кровяное давление.

При взаимодействии α -аминокислот образуются пептиды, в составе которых молекулы объединены с помощью пептидной связи.

Пептидная связь – это связь между α -карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой аминокислоты:



При построении названий пептидов аминокислоты перечисляются в направлении от N-конца к С-концу, при этом окончание аминокислот изменяется на **-ил**, кроме последней аминокислоты, сохраняющей α -карбоксильную группу. В сокращенном обозначении пептидов в начале наименования ставится символ N, указывающий на то, что у аминокислоты остается свободной аминогруппа, в конце наименования пептида ставится символ C, указывающий на наличие у данной аминокислоты свободной α -карбоксильной группы.



Вопросы для самоконтроля

1. Какие соединения называются аминокислотами? На чем основана классификация аминокислот?
2. Приведите структурные формулы наиболее часто встречающихся в живых организмах аминокислот, укажите характер их радикалов.
3. Какие виды изомерии характерны для аминокислот? Рассмотрите стереоизомерию аминокислот на примере аланина и треонина.
4. Чем обусловлены особенности свойств аминокислот, которые отличают их от карбоновых кислот?
5. Запишите строение цвиттер-ионов для аминокислот валина, серина. Укажите, как изменится их заряд в сильноокислой и сильнощелочной среде.
6. Рассмотрите основные физико-химические свойства аминокислот.

7. Напишите формулы и дайте названия трипептидам, которые можно получить из следующих аминокислот: а) аланина, глицина, триптофана; б) гистидина, цистеина, аргинина; в) аспарагина, изолейцина, метионина.

8. Охарактеризуйте основные биохимические реакции аминокислот: переаминирование, дезаминирование, декарбоксилирование и их биологическую роль.

Задания и упражнения

1. Вычислите значения pI аланина, серина, глутаминовой кислоты, гистидина, исходя из величин pK аминокислот (таблица 1).

2. Укажите суммарный заряд глицина, аспарагиновой кислоты, лизина и гистидина при следующих значениях pH : а) 1,0; б) 2,1; в) 4,0; г) 10.

3. Укажите суммарный заряд аланина, цистеина, глутаминовой кислоты, глицина при следующих значениях pH : а) 1,0; б) 2,5; в) 4,2; г) 12.

4. Смесь глицина, аланина, глутаминовой кислоты, лизина, аргинина и серина разделяли методом электрофореза на бумаге при pH 6,0. Укажите, какие соединения двигались к аноду, к катоду, оставались на старте.

5. Каково направление движения пептидов (остаются на старте, движутся к аноду или катоду) в процессе электрофореза при значениях pH 2,0; 3,5; 6,5; 10: а) *лиз-гли-ала-глу*; б) *глу-гли-ала-глу*; в) *гли-гли-ала-лиз*?

6. Укажите направление движения пептида *лиз-гли-ала-гли* в процессе электрофореза на бумаге при значениях pH 1,9; 3,0; 6,5; 10,0.

Примеры выполнения заданий

Пример 1. Рассчитайте значение pI аминокислоты аланина.

Используя данные таблицы 1, находим, что значения pK_{COO^-} и $pK_{NH_3^+}$ для аланина составляют соответственно 2,34 и 9,69.

Отсюда $pI_{аланина} = (2,34 + 9,69) / 2 = 6,2$.

Пример 2. Рассчитайте суммарный заряд аланина при pH , равном 1,5; 6,5 и 12,0. Определите направление перемещения аминокислоты под действием электрического поля в указанных условиях.

Так как pI для аланина составляет 6,2, то при pH равном 1,5 ($pH \ll pI$) аминокислота является катионом и под действием электрического поля перемещается в сторону катода.

При значении pH 6,5, близком к значению pI данной аминокислоты, суммарный заряд практически равен 0. Аминокислота электрофоретически неподвижна. При pH 11,0 аланин является анионом ($pH \gg pI$) и под действием электрического поля перемещаются в сторону анода.

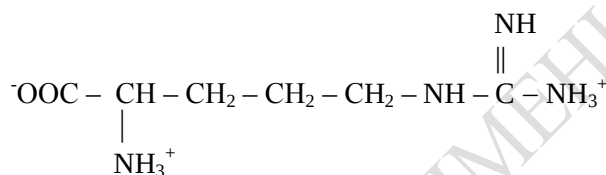
Пример 3. Укажите суммарный заряд для аргинина при pH 4,0.

В случае аминокислот, имеющих дополнительные ионогенные группы в радикале, для расчета суммарного заряда молекулы при данных условиях, значения pK каждой ионогенной группы сопоставляются со значением pH раствора:

- для групп, диссоциирующих по кислотному типу, диссоциацией практически пренебрегают, если $pH < pK$;
- для групп, диссоциирующих по основному типу, диссоциацией практически пренебрегают, если $pH > pK$.

В молекуле аргинина, помимо α -карбоксильной и α -аминогруппы в радикале присутствует гуанидиновая группа, способная к ионизации, что необходимо учитывать при определении заряда аминокислоты.

Значение pH 4,0 больше значения pK_{COO^-} (2,17) и меньше значений $pK_{NH_3^+}$ (9,04) и $pK_{R-группы}$ (12,48). Следовательно, аминокислота имеет положительный суммарный заряд:



Тестовый контроль

Закончите утверждения и ответьте на вопросы, выбрав правильный вариант(ы) из предложенных.

1. *Аминокислоты, входящие в состав белков, являются...*

- 1) α -L-аминопроизводными карбоновых кислот;
- 2) β -L-аминопроизводными карбоновых кислот;
- 3) α -D-аминопроизводными ненасыщенных карбоновых кислот;
- 4) α -D-аминопроизводными карбоновых кислот.

2. *Биполярный ион моноаминомонокарбоновой аминокислоты...*

- | | |
|-----------------|----------------------|
| 1) заряжен (-); | 2) электронейтрален; |
| 3) заряжен (+); | 4) заряжен (2-). |

3. *Иминокислотой является...*

- | | |
|-------------|-------------|
| 1) глицин; | 2) цистеин; |
| 3) аргинин; | 4) пролин. |

4. *Оптической активностью не обладает аминокислота...*

- | | |
|------------|-------------|
| 1) лейцин; | 2) цистеин; |
| 3) глицин; | 4) аргинин. |

5. *Нейтральной аминокислотой является...*

- | | |
|---------------------------|--------------|
| 1) аргинин; | 2) гистидин; |
| 3) аспарагиновая кислота; | 4) валин. |

6. *Какие аминокислоты в растворе имеют кислую реакцию?*

- | | |
|------------|------------------|
| 1) аланин; | 2) глютаминовая; |
| 3) валин; | 4) лейцин. |

7. *Какие аминокислоты обладают основными свойствами?*

- | | |
|-------------|--------------|
| 1) лейцин; | 2) лизин; |
| 3) треонин; | 4) метионин. |

8. *Какие аминокислоты являются производными ароматических (гомоциклических) кислот?*

- | | |
|-----------------|---------------|
| 1) фенилаланин; | 2) триптофан; |
| 3) аланин; | 4) гистидин. |

9. *Какие аминокислоты относятся к гетероциклическим?*

- | | |
|------------|----------------|
| 1) глицин; | 2) гистидин; |
| 3) лейцин; | 4) оксипролин. |

10. *В состав каких аминокислот входит гидроксильная группа?*

- | | |
|-------------|--------------|
| 1) аланин; | 2) метионин; |
| 3) тирозин; | 4) цистин. |

11. *Какие аминокислоты содержат серу?*

- | | |
|------------|-------------|
| 1) глицин; | 2) цистеин; |
| 3) аланин; | 4) лейцин. |

12. *В каких аминокислотах содержится подвижная метильная группа?*

- | | |
|-------------|--------------|
| 1) глицин; | 2) креатин; |
| 3) аргинин; | 4) метионин. |

13. *Какие аминокислоты имеют незаряженные (полярные) R-группы?*

- | | |
|--------------|---------------|
| 1) глутамат; | 2) триптофан; |
| 3) серин; | 4) цистин. |

14. *Какие аминокислоты имеют неполярные R-группы?*

- | | |
|------------|----------------|
| 1) аланин; | 2) серин; |
| 3) лизин; | 4) оксипролин. |

15. *Какие аминокислоты имеют отрицательно заряженные R-группы?*

- | | |
|-------------------|--------------|
| 1) глицин; | 2) глутамин; |
| 3) аспарагиновая; | 4) аргинин. |

16. Какие аминокислоты имеют положительно заряженные R-группы?

- | | |
|-----------|--------------|
| 1) валин; | 2) метионин; |
| 3) лизин; | 4) глицин. |

17. Трансаминирование – процесс межмолекулярного переноса аминогруппы...

- 1) от α -аминокислоты на α -кетокислоту;
- 2) от α -аминокислоты на α -гидроксикислоту;
- 3) от амина на α -кетокислоту;
- 4) от амина на α -гидроксикислоту.

18. Какой путь дезаминирования аминокислот наиболее характерен для млекопитающих?

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1) внутримолекулярный; | 2) гидролитический; |
| 3) окислительный; | 4) восстановительный. |

19. Какая аминокислота подвергается наиболее интенсивному окислительному дезаминированию?

- | | |
|------------|--------------|
| 1) лейцин; | 2) глутамат; |
| 3) валин; | 4) аспартат. |

20. Какие продукты образуются при трансаминировании между α -кетоглутаратом и аланином?

- | | |
|-----------------------|--------------------------|
| 1) аспартат и лактат; | 2) глутамат и пируват; |
| 3) глутамат и лактат; | 4) глутамин и аспарагин. |

Лабораторная работа

«Качественные реакции на аминокислоты и белки»

Цель работы: изучить качественные реакции, используемые для обнаружения белков и определения их аминокислотного состава.

Для обнаружения белка применяют *цветные реакции*, которые делят на два типа: общие или универсальные и специфические. К *универсальным реакциям* относятся биуретовая и нингидрировая. С их помощью можно обнаружить любой белок. К *специфическим* относятся реакции на отдельные аминокислоты, которые позволяют обнаружить специфические функциональные группы в составе радикалов аминокислот.

Опыт 1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

В щелочной среде белки, а также продукты их гидролиза (полипептиды) дают фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание с сульфатом меди. Реакция обусловлена присутствием в белках пептидных связей, которые образуют окрашенные солеобразные комплексные соединения. Интенсивность окраски зависит от количества пептидных связей в молекуле и количества медной соли. Свое название реакция получила от производного мочевины – биурета, который дает эту реакцию. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака. Две молекулы биурета взаимодействуют в щелочной среде с гидроксидом меди (II) с образованием окрашенного комплексного соединения.

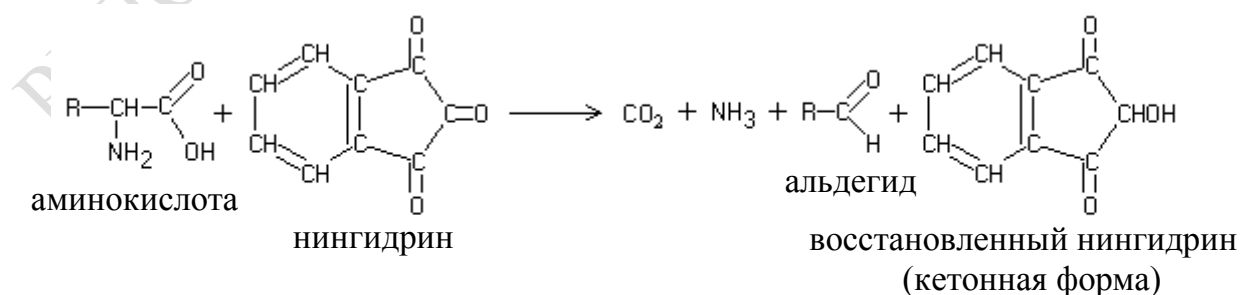
Подобным образом построены окрашенные медно-натриевые соли пептидов и белков. Биуретовую реакцию дает также аспарагин (амид аспарагиновой кислоты) и аминокислоты гистидин, серин, треонин.

Ход работы. В одну пробирку наливают 10–12 капель раствора белка, в другую насыпают 20–30 мг мочевины, нагревают на спиртовке до исчезновения запаха аммиака и охлаждают. В обе пробирки добавляют по 10 капель 10-процентного раствора гидроксида натрия и по 1–2 капли 1-процентного раствора сульфата меди (II). В обеих пробирках появляется сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание.

Опыт 2. Нингидриновая реакция

Белки, полипептиды и аминокислоты при нагревании с нингидрином дают синее и сине-фиолетовое окрашивание. Нингидриновая реакция обусловлена наличием α -аминокислот и является одной из наиболее чувствительных для обнаружения α -аминогрупп.

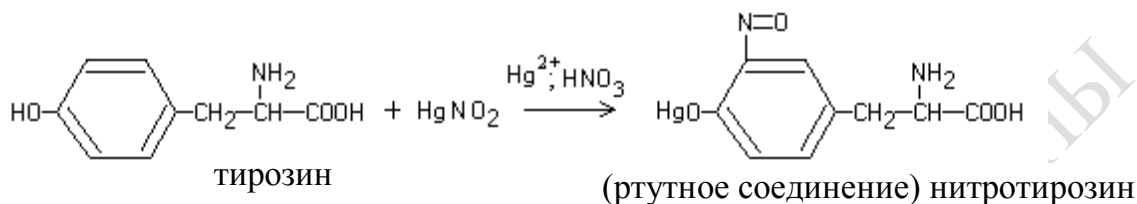
Сущность реакции заключается в том, что α -аминокислоты и пептиды, реагируя с нингидрином, подвергаются окислительному деаминарованию и декарбоксилированию:



Восстановленный нингидрин взаимодействует с аммиаком и второй молекулой нингидрина, в результате чего образуется сложное окрашенное соединение:

Опыт 4. Реакция на тирозин (реакция Миллона)

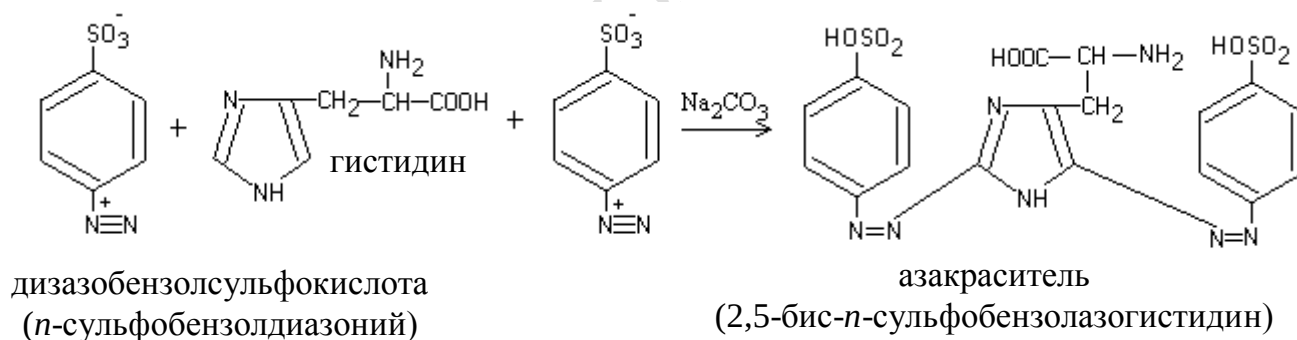
Нагревание большинства белков с реактивом Миллона (раствор нитратов и нитритов ртути (I) и (II) в азотной кислоте) приводит к образованию красного осадка. Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислоты тирозина, которая при взаимодействии с реактивом Миллона дает нитрозопроизводное ртутное соединение, окрашенное в красный цвет:



Ход работы. К 8–10 каплям раствора белка добавляют 2–3 капли реактива Миллона и осторожно нагревают. Жидкость окрашивается в красный цвет и выпадает красно-коричневый осадок.

Опыт 5. Диазореакция на гистидин и тирозин (реакция Паули)

При добавлении к щелочному раствору белка диазореактива жидкость приобретает оранжево-красное окрашивание. Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот гистидина и тирозина, которые, реагируя с диазобензолсульфокислотой, образуют азокраситель красного цвета:

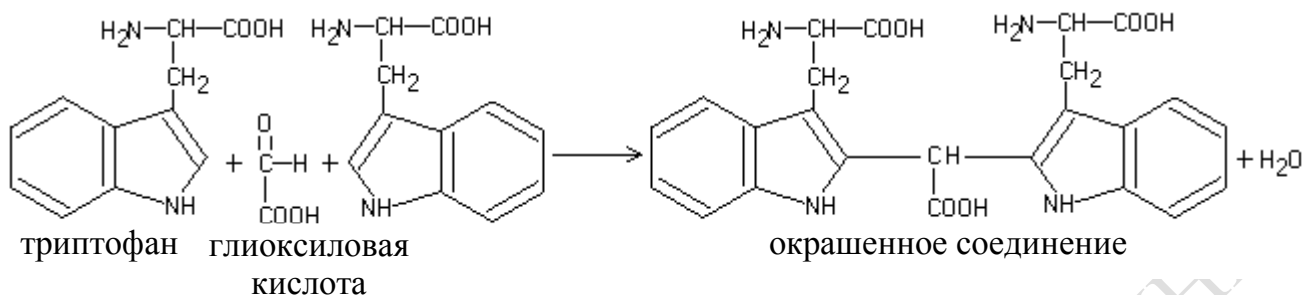


Ход работы. К свежеприготовленному диазореактиву (3 капли 1-процентного раствора сульфаниловой кислоты в 2-процентном растворе соляной кислоты и 3 капли 5-процентного раствора нитрита натрия) добавляют 6–8 капель раствора белка и после перемешивания приливают 3–5 капель 10-процентного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная красная окраска.

Опыт 6. Реакции на триптофан

Реакции основаны на способности триптофана в кислой среде вступать во взаимодействие с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.

1) **Реакция Адамкевича.** Взаимодействие триптофана с глиоксиловой кислотой (которая всегда присутствует в ледяной уксусной кислоте) приводит к образованию соединения красно-фиолетового цвета:



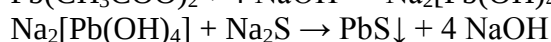
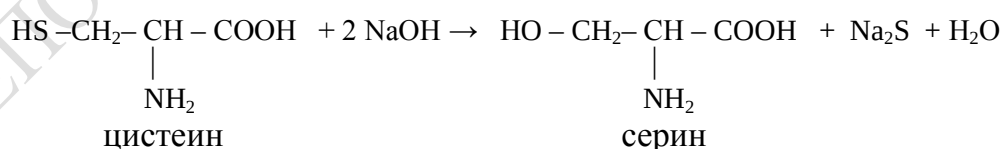
Ход работы. К 5–6 каплям раствора белка добавить 5 капель концентрированной уксусной кислоты, слегка подогреть и подслоить (**осторожно!!! по стенке наклоненной пробирки**) равный объем концентрированной серной кислоты. На границе раздела двух слоев жидкости появляется красно-фиолетовое кольцо.

2) **Реакция Шульца-Распайля.** Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфуролом (образующимся при гидролизе сахарозы и обезвоживании моносахаридов под действием концентрированной серной кислоты), дает комплекс вишнево-красного цвета.

Ход работы. К 5–6 каплям раствора белка приливают 1 каплю 10-процентного раствора сахарозы и подслаивают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе раздела жидкостей появляется вишнево-красное окрашивание.

Опыт 7. Реакция Фоля на содержащие серу аминокислоты

Нагревание белка со щелочью и плюмбитом приводит к появлению бурого или черного осадка. *Реакция обусловлена наличием в белке содержащих серу аминокислот, которые под действием щелочи разрушаются с образованием сульфида щелочного металла; последний с плюмбитом дает осадок сульфида свинца:*



Ход работы. К 5–6 каплям раствора белка добавляют 10 капель 30-процентного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5-процентного раствора ацетата свинца. При длительном нагревании выпадает черный осадок сульфида свинца.

Опыт 8. Контрольное определение

С контрольным раствором белка проводят все изученные реакции на аминокислоты и белки, на основании чего делается вывод об аминокислотном составе белка.

Занятие 2

Уровни структурной организации белков, их классификация и физико-химические свойства

Цель занятия: изучить уровни структурной организации белков и пептидов, их классификацию, основные физико-химические свойства и современные методы анализа.

1. Уровни структурной организации белковых молекул.
2. Классификация и характеристика отдельных групп простых и сложных белков.
3. Физико-химические свойства белков.
4. Методы выделения и анализа состава и структуры белков.

Основные понятия по теме

Белки – это высокомолекулярные соединения (полимеры), состоящие из L-α-аминокислот.

Первичная структура белка представляет собой определенную последовательность расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Основным тип связи этого уровня – *ковалентная пептидная связь*.

В полипептидной цепи многократно повторяется группа -NH-CH-CO-, которая формирует пептидный остов. Отдельные боковые цепи R-групп несут главную нагрузку при выполнении функций белками (рисунок 2.1). Цепи аминокислот имеют на одном конце аминокислоту со свободной α-аминогруппой (N-конец пептида), а на другом конце – аминокислоту со свободной α-карбоксильной группой (C-конец пептида).

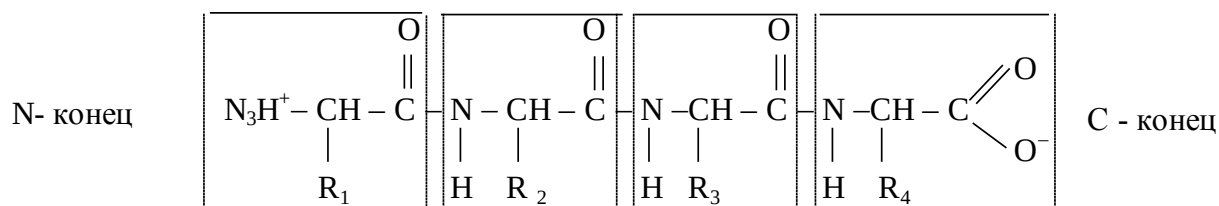


Рисунок 2.1 – Первичная структура белковой молекулы

Пептидные цепочки не разветвляются, но могут быть ковалентно сшиты за счет образования *дисульфидной связи* между сближенными SH-группами цистеинов.

Первичная структура белков детерминирована генетически. Каждый индивидуальный белок характеризуется своей первичной структурой.

Под *вторичной структурой* понимают укладку полипептидной цепи в определенную конформацию. Процесс этот происходит не хаотично, а в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре.

Вторичная структура белков обусловлена способностью пептидных групп к образованию водородных связей: $C=O \dots HN$. Пептид стремится принять конформацию с максимумом водородных связей.

Известны три основных типа вторичной структуры: α -спираль, β -структура (складчатый слой) (рисунок 2.2) и беспорядочный клубок.

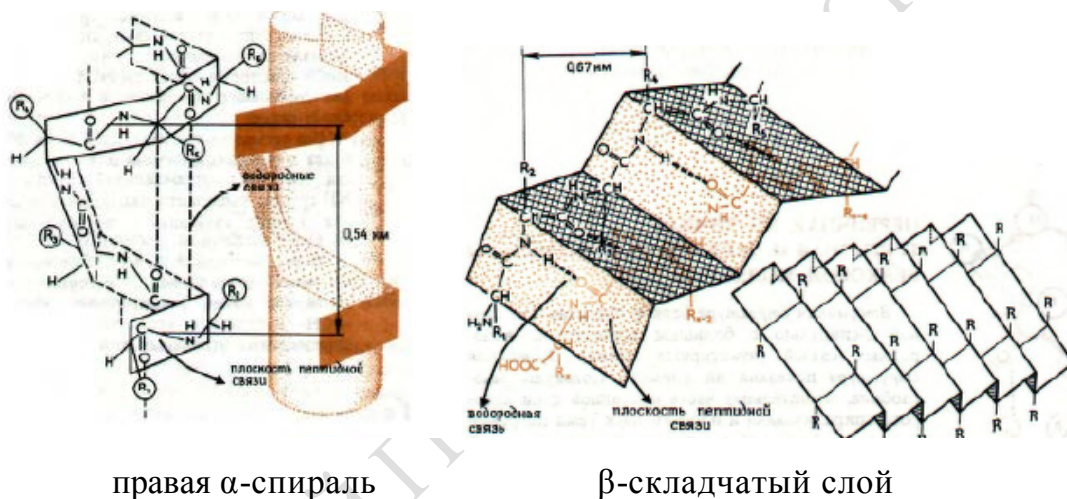


Рисунок 2.2 – Вторичная структура белковой молекулы

Правая α -спираль ($3,6_{13}$) – наиболее распространенная в белках спиральная структура полипептидных цепей из L-аминокислот. Торсионные углы близки к -60° , -45° . Стабилизация достигается за счет того, что витки спирали «сшиты» водородными связями, а также взаимодействием диполей. Число водородных связей максимально. Их направленность почти параллельна продольной оси α -спирали. На виток приходится 3,6 аминокислотного остатка, а все диполи пептидных связей направлены вниз. Шаг спирали 0,54 нм, диаметр спирали около 0,5 нм. Число атомов в цикле, образуемом водородной связью, равно 13. Водородная связь возникает между CO-группой n -го остатка и NH-группой $(n + 4)$ -го остатка, то есть взаимодействие сближенных и направленных в одну сторону диполей пептидных связей имеет место через каждые два диполя.

β -Складчатый слой образуется из довольно вытянутых полипептидных цепей в том случае, когда торсионные углы близки к -120° , $+135^\circ$. Бывает двух видов: параллельный – если направление полипептидных цепей

одинаково; антипараллельный – если полипептидные цепи направлены навстречу друг другу.

Стабилизация β -складчатых слоев достигается за счет образования межцепочечных водородных связей, в которых принимают участие все пептидные связи.

Особенности β -складчатых слоев: цепи вытянуты, но не полностью, поэтому образуется не плоскость, а «гофрированная» структура; водородные связи лежат в плоскостях складок; R-группы располагаются рядами, поочередно выше и ниже плоскости рисунка; антипараллельный β -складчатый слой может быть образован одной полипептидной цепью, которая, поворачивая, образует β -изгибы.

В одном и том же белке могут присутствовать все три способа укладки полипептидной цепи.

Третичная структура – пространственная организация удаленных по цепи аминокислотных остатков, то есть расположение цепи в трехмерном пространстве.

Третичная структура имеет прямое отношение к форме молекулы белка, которая может быть от шарообразной до нитевидной. В формировании третичной структуры важную роль играют нековалентные связи – водородные, ионные и гидрофобные, а также ковалентные дисульфидные связи.

Под четвертичной структурой понимают способ укладки в пространстве нескольких полипептидных цепей с формированием единого макромолекулярного образования для выполнения определенной функции.

Каждая из этих цепей имеет свою завершенную пространственную структуру и называется субъединицей белка. Связи между субъединицами, как правило, нековалентные (силы гидрофобного взаимодействия, ионные, водородные), хотя в ряде белков (например, белки плазмы крови) субъединицы соединены ковалентными дисульфидными мостиками.

Слабое взаимодействие между отдельными частями белковой молекулы дает некоторую свободу к изменениям пространственной структуры. Изменение конформации белковой молекулы лежит в основе ее биологической активности.

Физико-химические свойства белков. Белки являются высокомолекулярными соединениями. Их молекулярная масса колеблется в пределах от 6 000 до 1 000 000 и более.

Большинство белков растворяются в воде и образуют коллоидные растворы, для которых характерны следующие свойства: специфические оптические свойства (опалесценция и способность рассеивать лучи видимого света), малая скорость диффузии, неспособность проникать через полупроницаемые мембраны, высокая вязкость растворов, способность к образованию гелей.

Стабильность водным растворам белков придают поверхностный заряд белковой молекулы, наличие полярных групп и гидратная оболочка.

Из-за наличия карбоксильных и аминогрупп, белки, как и аминокислоты, являются амфотерными соединениями. В кислой среде благодаря диссоциации свободных аминогрупп они заряжаются положительно и перемещаются в электрическом поле к катоду. В щелочной среде диссоциируют свободные карбоксильные группы, белки приобретают отрицательный заряд и передвигаются к аноду. Это свойство белков используют для их разделения методом электрофореза.

Величина рН среды, при которой суммарный заряд белка равен нулю, называется *изоэлектрической точкой* (pI). В изоэлектрическом состоянии белки электрофоретически неподвижны, неустойчивы в растворе и легко осаждаются.

Осаждение белков под действием различных факторов называется *коагуляцией*. Одним из видов коагуляции является *высаливание*. Оно происходит при действии на белки растворов нейтральных солей (сульфата аммония, хлорида натрия и др.).

Под влиянием различных физических (высокая температура, давление, ультразвук, радиация) и химических (действие щелочей, кислот, солей тяжелых металлов, мочевины, этанола и ряда других соединений) факторов происходит *денатурация белков*, нарушается структура (четвертичная, третичная, вторичная), что приводит к свертыванию белка, выпадению его в осадок и потере белковой молекулой своих биологических свойств. При непродолжительном действии и быстром удалении денатурирующих агентов в ряде случаев возможна *ренатурация* белка с полным восстановлением его пространственной структуры и биологической активности.

Классификация белков. По составу белки делят на простые и сложные. Простые белки состоят только из аминокислот. К простым белкам относятся альбумины, глобулины, протамины, гистоны, проламины, глютелины, протеиноиды.

Сложные белки кроме аминокислот содержат небелковый компонент – *простетическую группу*. В зависимости от характера простетической группы сложные белки подразделяются на хромопротеины, фосфопротеины, гликопротеины, липопротеины, нуклеопротеины, металлопротеины.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте первичную структуру белка, укажите особенности строения пептидной связи.
2. Перечислите типы вторичных структур белков и их основные характеристики.

3. Охарактеризуйте третичную структуру белка, укажите основные типы связей, участвующих в формировании нативной структуры белка.

4. Какие типы связей участвуют в формировании четвертичной структуры белков? Поясните сущность эффекта кооперативности.

5. Перечислите основные методы выделения и анализа белков.

6. Охарактеризуйте основные физико-химические свойства белков.

7. Перечислите основные факторы, вызывающие денатурацию белков. В чем состоит сущность процесса ренатурации, какова роль белков Шапперонов в данном процессе?

8. На чем основана классификация белков? Охарактеризуйте отдельные группы простых и сложных белков, укажите их биологическую роль.

Задания и упражнения

1. Напишите структуру указанных ниже пептидов, приведите их полное название: а) *лиз-гли-ала-глу*; б) *глу-гли-ала-глу*; в) *гли-гли-ала-лиз*. Каково направление движения этих пептидов в процессе электрофореза при pH 2; 3,5; 6,5; 10?

2. Укажите, какие продукты образуются при обработке пептида *лиз-ала-гли-асп-ала-глу-сер-арг-гли* трипсином (а) и пепсином (б). Какие производные образуются после их обработки 2,4-динитрофторбензолом и последующего гидролиза?

3. Укажите, каким образом действует трипсин (а) и химотрипсин (б) на следующий пептид: *тир-цис-лиз-ала-арг-арг-гли*. Каждый из образовавшихся фрагментов обрабатывают затем 2,4-динитрофторбензолом, после чего следует гидролиз пептидных связей. Назовите производные аминокислот.

4. Вычислите длину (в нанометрах) полипептидной цепи, содержащей 100 аминокислотных остатков, если вся цепь представлена только α -спиралью.

5. Укажите характер среды в водном растворе следующих пептидов:

а) *лиз-ала-гли-асп-ала-глу-сер-арг-гли*;

б) *тир-цис-лиз-ала-арг-арг-гли*.

6. Какие пептиды образуются при обработке трипсином полипептида *вал-лиз-глу-глу-фен-мет-арг-цис-глу-три-мет-гли*?

7. Какие пептиды образуются при обработке химотрипсином полипептида *ала-вал-лиз-глу-фен-вал-мет-тир-цис-глу-три-мет-гли-фен*?

Тестовый контроль

Закончите утверждения и ответьте на вопросы, выбрав правильный вариант(ы) из предложенных.

1. *Какие свойства характерны для белков?*
 - 1) амфотерные;
 - 2) отсутствие способности кристаллизоваться;
 - 3) отсутствие способности вращать плоскость поляризованного луча;
 - 4) термостабильность.
2. *Какой заряд имеет белок в изоэлектрической точке?*
 - 1) положительный;
 - 2) отрицательный;
 - 3) нейтральный.
3. *В каком направлении будет мигрировать белок при проведении электрофореза в условиях, когда рН раствора ниже ИЭТ?*
 - 1) к аноду;
 - 2) к катоду;
 - 3) остается на линии старта;
 - 4) образует биполярный ион.
4. *Какой метод можно ограниченно использовать для фракционирования и очистки белков?*
 - 1) кристаллизацию;
 - 2) осаждение органическими растворителями;
 - 3) препаративный электрофорез;
 - 4) высаливание.
5. *Какие методы невозможно применять для определения молекулярной массы белка?*
 - 1) криоскопический метод;
 - 2) метод гель-фильтрации;
 - 3) электрофорез в градиенте концентрации полиакриламидного геля;
 - 4) ультрацентрифугирование.
6. *От чего зависит скорость седиментации белков?*
 - 1) от числа растворенных молекул;
 - 2) от заряда белковой молекулы;
 - 3) от молекулярной массы белка.
7. *Какие свойства белка определяют его растворимость?*
 - 1) значение молекулярной массы;
 - 2) значения рН и ионной силы раствора;
 - 3) наличие в структуре гидрофильных аминокислот.
8. *От чего зависит осмотическое давление белковых растворов?*
 - 1) от молекулярной массы белка;
 - 2) от числа растворенных молекул;

3) от суммарного заряда белковой молекулы.

9. *Какие из отмеченных свойств характерны для растворов белков?*

- 1) коллоидное состояние;
- 2) эффект Тиндаля;
- 3) независимость свойств растворов от изменения pH;
- 4) изменение свойств растворов при повышении температуры.

10. *С какими из указанных ниже соединений нингидриновый реактив дает цветную реакцию?*

- 1) с полисахаридами;
- 2) с моносахаридами;
- 3) с нуклеиновыми кислотами;
- 4) с α -аминокислотами.

11. *Какие вещества дают биуретовую реакцию?*

- 1) все аминокислоты;
- 2) глутатион;
- 3) дипептиды;
- 4) трипептиды и белки.

12. *Какие из отмеченных свойств характерны для денатурированных белков?*

- 1) наличие водородных связей;
- 2) наличие пептидных связей;
- 3) полное сохранение вторичной и третичной структуры;
- 4) хорошая растворимость в воде.

13. *Какова роль ковалентных связей в молекулах белков?*

- 1) соединяют белковый и небелковый компоненты в молекулах липопропротеидов;
- 2) поддерживают α -конфигурацию полипептидной цепи;
- 3) участвуют при соединении аминокислот в белковой молекуле.

14. *Какие свойства характерны для гемоглобина?*

- 1) наличие одной геминовой группировки;
- 2) молекулярная масса в четыре раза больше, чем у миоглобина;
- 3) из четырех полипептидных цепей гемоглобина две одинаковые;
- 4) каждая из субъединиц молекулы гемоглобина напоминает по своей третичной структуре молекулу миоглобина.

Выберите правильные сочетания из терминов и понятий, обозначенных прописными и строчными буквами.

15. *Главные свойства альбуминов (А), глобулинов (Б), проламинов (В)...*

- а) нерастворимы в воде, растворимы в 70–80-процентном спирте;
- б) хорошо растворимы в воде;
- в) нерастворимы в воде и солевых растворах умеренных концентраций.

16. Представителем каких белков является коллаген (А), миозин (Б), гемоглобин (В)?

- а) глобулинов;
- б) хромопротеидов;
- в) протеиноидов.

17. Какова роль различных связей и взаимодействий в молекуле белка – ковалентных (А), ионных связей и гидрофобных взаимодействий (Б), внутримолекулярных и водородных связей (В), межмолекулярных водородных связей (Г)?

- а) соединение белковой и небелковой составляющей в молекулах липопротеидов;
- б) присоединение аминокислот в белковой молекуле;
- в) обеспечение складчатой β -структуры полипептидной цепи;
- г) обеспечение α -спиральной конфигурации полипептидной цепи.

Лабораторная работа

«Физико-химические свойства простых и сложных белков»

Цель работы: изучить физико-химические свойства простых и сложных белков.

Опыт 1. Диализ белка

Диализ – метод разделения коллоидов и кристаллоидов с помощью диффузии последних через мембраны.

Ход работы. В мешочек из целлофана или коллодия помещают 15–20 мл солевого раствора белка и опускают его в стакан с дистиллированной водой. Через 40–60 мин из стакана берут пробы жидкости и проводят качественные реакции на хлорид-ионы и белок.

Воду в стакане можно менять через каждые 10–15 мин до появления в растворе белка осадка глобулинов, в результате понижения концентрации хлорида натрия. Диализ проводят до получения отрицательной реакции на хлорид-ионы.

Опыт 2. Определение изоэлектрической точки белка

В изоэлектрической точке (ИЭТ) белки характеризуются наименьшей растворимостью, степенью набухания, легче всего осаждаются из растворов. Определение степени набухания белков в растворах с различным значением рН среды является косвенным методом определения значений ИЭТ.

Ход работы. В сухие мерные пробирки на 10 мл вносят по 0,5 см³ порошка желатины и добавляют до верхней метки растворы, указанные в таблице. Содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой, которую после каждого перемешивания промывают дистиллированной водой. Через 30 мин определяют объем набухшей желатины и рассчитывают степень набухания по формуле:

$$\alpha = (V - V_0) / V_0.$$

Полученные данные оформляют в виде таблицы:

Растворитель	рН	Объем белка		Степень набухания
		исходного (V ₀)	набухшего (V)	
0,1 М раствор HCl 1·10 ⁻⁵ М раствор HCl H ₂ O дистил. 1·10 ⁻⁵ М раствор NaOH 0,1 М раствор NaOH				

Строят график зависимости степени набухания белка от рН среды. На основании проделанной работы определяют ИЭТ желатина и делают вывод о влиянии значений рН среды на степень набухания белков.

Опыт 3. Реакции осаждения белков

Белок при растворении в воде образует коллоидный раствор. Процесс растворения белков тесно связан с гидратацией их молекул. Любой фактор, нарушающий гидратацию, понижает растворимость белков и способствует выпадению их в осадок. Осаждение белков без явления денатурации вызывается действием ацетона, спирта, нейтральных солей щелочных металлов и некоторых других реагентов. Под влиянием нагревания, концентрированных щелочей и кислот, алкалоидных реактивов, солей тяжелых металлов белки претерпевают глубокие изменения, называемые **денатурацией**, при которых существенно изменяется третичная и даже вторичная структура белка.

Результаты работы необходимо представить в виде таблицы.

№ опыта	Действующий фактор	Наблюдения	Причины осаждения
3.1	Насыщ. раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
3.2.1	Нагревание (t)		
3.2.2	1% CH_3COOH + (t)		
3.2.3	10% CH_3COOH + (t)		
3.2.4	10% NaOH + (t)		
3.2.5	10% CH_3COOH + насыщ. р-р NaCl + (t)		
3.3	Органические растворители		
3.4	Минеральные кислоты		
3.5	Органические кислоты		
3.6	Соли тяжелых металлов		

Опыт 3.1. Высаливание белков сульфатом аммония

Ход работы. К 2–3 мл сыворотки крови или разбавленного раствора яичного белка прибавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. В полученном таким образом полунасыщенном растворе сульфата аммония глобулины нерастворимы и выпадают в осадок. Через 5–6 мин осадок отфильтровывают и в фильтрат добавляют кристаллический сульфат аммония до 100-процентного насыщения. Образуется осадок альбуминов, всплывающий наверх.

Опыт 3.2. Осаждение белка при кипячении

Большинство белков при нагревании свертывается. Механизм температурной коагуляции и денатурации белков связан с перестройкой их макромолекул, в частности, коллоидные частицы белка под влиянием высокой температуры из гидрофильных становятся гидрофобными. Скорость температурной коагуляции зависит от присутствия в растворе ионов солей и водородных ионов. Особенно быстро осаждаются белки в изоэлектрической точке. В сильноокислых и сильнощелочных растворах при нагревании белок не денатурирует, так как он получает сильно положительный или отрицательный заряд, что повышает его устойчивость.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 10 капель солевого раствора белка. Нагревают содержимое первой пробирки и наблюдают интенсивное выпадение белка в осадок. Во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1-процентного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок белка выпадает быстрее и полнее (белок находится в изоэлектрической точке). В третью пробирку добавляют 2–3 капли 10-процентного раствора уксусной кислоты. Нагревание такого сильноокислого раствора к денатурации белков не приводят. В четвертую пробирку прибавляют 2–3 капли 10-процентного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок

не образуется. К содержимому пятой пробирки добавляют 2–3 капли 10-процентного раствора уксусной кислоты и столько же насыщенного раствора хлорида натрия. При кипячении образуется осадок белка (ионы натрия и хлора образуют двойной электрический слой и нейтрализуют положительный заряд на частице белка).

Опыт 3.3. Осаждение белка органическими растворителями

Органические растворители (спирт, ацетон, эфир и др.) вызывают дегидратацию белковых молекул, что понижает устойчивость белков в растворе и ведет к выпадению их в осадок. Осаждение наступает только из слабокислых или нейтральных растворов и лучше в присутствии электролитов. Кратковременное воздействие органических растворителей при температуре 0–15 °С сохраняет белок в нативном состоянии, длительное – приводит к денатурации белка.

Ход работы. К 5–6 каплям солевого раствора белка прибавляют 20–25 капель 96° этилового спирта или ацетона. Раствор мутнеет. Добавляют 1 каплю насыщенного раствора NaCl. При стоянии выпадает осадок белка.

Опыт 3.4. Осаждение белка минеральными кислотами

Концентрированные кислоты (азотная, соляная, серная) вызывают резкую дегидратацию белковых молекул и нейтрализацию их заряда. Это ведет к необратимой денатурации белка. Ортофосфорная кислота осаждения белков не вызывает. При длительном воздействии серная и соляная кислоты производят частичный гидролиз белковых молекул, и осадок постепенно растворяется (в азотной кислоте растворение происходит значительно медленнее).

Ход работы. В пробирку наливают 10–15 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно настилают равный объем раствора белка. На границе двух слоев жидкости образуется осадок белка. То же проделывают с концентрированными серной и соляной кислотами.

Опыт 3.5. Осаждение белка органическими кислотами

Органические кислоты необратимо осаждают белок из растворов. Наиболее эффективно и специфично действие сульфосалициловой и трихлоруксусной кислот. Под действием трихлоруксусной кислоты осаждаются только белки, сульфосалициловая кислота кроме белков осаждает и высокомолекулярные продукты их распада – пептоны и полипептиды.

Ход работы. К 6–8 каплям раствора белка добавляют 1–2 капли 5-процентного раствора трихлоруксусной кислоты или 20-процентного раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка.

Опыт 3.6. Осаждение белка солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, образуя нерастворимые в воде соединения. При добавлении избытка соли осадок растворяется (адсорбционная пептизация), что обусловлено адсорбцией ионов металла на поверхности коллоидных частиц и появлением положительного заряда на частицах белка.

Ход работы. К 5–6 каплям раствора белка прибавляют 1 каплю 5-процентного раствора хлорида железа (III) или ацетата свинца, или сульфата меди (II). Выпадает осадок белка. Добавляют еще 5–10 капель раствора соли и наблюдают растворение осадка.

Занятие 3. Ферменты

Цель занятия: изучить особенности строения и свойства ферментов, их классификацию и номенклатуру, кинетику ферментативных реакций, механизмы регуляции активности ферментов.

1. Свойства ферментов как биологических катализаторов, их строение.
2. Механизм ферментативного катализа.
3. Кинетика ферментативных реакций. Регуляция активности ферментов.
4. Номенклатура и классификация ферментов.

Основные понятия по теме

Ферменты или энзимы – специфические белки всех живых клеток, играющие роль биологических катализаторов. С их помощью осуществляется обмен веществ и энергии.

Ферменты увеличивают скорость химической реакции, но сами при этом не расходуются, не изменяют константы равновесия, но состояние равновесия в их присутствии наступает быстрее.

Отличие ферментативного катализа от неорганического: ферменты действуют в мягких условиях организма (p , t° , pH), так как белки

чувствительны к денатурации; для них характерна высокая эффективность (одна молекула может катализировать превращение 10^2 – 10^6 степени молекул субстрата за 1 мин); активность ферментов контролируется генетически и биорегуляторами; в организме, как правило, действуют полиферментные (то есть поликаталитические) системы, в результате чего достигается многоэтапное направленное превращение вещества с допустимыми для организма уровнями перепада энергии.

Для действия ферментов характерна специфичность: а) **абсолютная** – фермент катализирует превращение строго определенного вещества; б) **относительная** – фермент катализирует превращения одного типа связей в ряду близких по химическому строению веществ; г) **стереохимическая** – фермент катализирует превращение только одного стереоизомера при наличии рацемата (L-оксидазы превращают L-аминокислоты, но не D-аминокислоты).

Строение ферментов. По строению ферменты бывают простыми и сложными белками. Простые ферменты состоят только из аминокислот. Сложные ферменты (*холоферменты*) состоят из **апофермента** – белковой части и **кофактора** – небелковой части. Кофакторы делят на **протетические группы** – прочно связанные с апоферментом кофакторы (металлы, гем и др.) и **коферменты**, легко отделяемые от апофермента (витамины, нуклеотиды и др.)

Превращение субстрата происходит в области *активного центра*, который сформирован в третичной структуре ферментов. В формировании активного центра участвует не вся полипептидная цепь фермента, а только ее часть. Непосредственно в реакцию вовлекаются остатки небольшого числа аминокислот, которые могут находиться в различных участках полипептидной цепи, однако они непременно должны быть сближены в пространстве. Такое сближение достигается благодаря трехмерной структуре молекулы белка. У простых ферментов активный центр образован сближенными в пространстве радикалами аминокислот. У сложных ферментов здесь находятся также и кофакторы. В активном центре выделяют 2 части: якорную – обеспечивает фиксацию субстрата и каталитическую – обеспечивает катализ.

У ряда регуляторных ферментов имеется еще один центр – **аллостерический**. Присоединение к этому центру низкомолекулярных веществ (эффекторов) индуцирует изменение третичной структуры фермента, в том числе и в области активного центра. Это и ведет к изменению каталитической активности фермента.

Механизм действия ферментов. Ферментативная реакция протекает в три стадии:

1) образование фермент-субстратного комплекса: $E + S \leftrightarrow ES$. Это быстрая стадия, соответствующая фиксации субстрата на якорном участке активного центра. Ускорение реакции достигается за счет сближения и правильной ориентации субстратов относительно друг друга и увеличения их эффективной концентрации;

2) происходит химическая реакция через переходное состояние с образованием продукта реакции на поверхности фермента $ES \leftrightarrow EZ \rightarrow EP$;

3) продукт отделяется, а фермент в неизменном виде может вновь вступать в катализ: $EP \rightarrow E + P$.

Ферменты обеспечивают одно из основных свойств биологических процессов – ступенчатость, что позволяет снижать энергетические пороги реакций за счет протекания промежуточных этапов, требующих меньших затрат энергии.

Основными свойствами биологических катализаторов являются их высокая активность, термолабильность, субстратная специфичность, зависимость активности от температуры, водородного показателя среды, присутствия активаторов и ингибиторов.

Регуляция активности ферментов. **Активаторы ферментов** – это вещества, формирующие активный центр фермента (Co^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+}), облегчающие образование фермент-субстратного комплекса (Mg^{2+}), восстанавливающие SH-группы (глутатион, цистеин, меркаптоэтанол), стабилизирующие нативную структуру фермента. Активируют ферментативные реакции обычно катионы металлов. Анионы менее активны, хотя ионы хлора и анионы некоторых других галогенов могут активировать пепсин, амилазу, аденилатциклазу. Активаторами могут быть белки.

Ингибиторы ферментов – это соединения, которые, взаимодействуя с ферментом, препятствуют образованию нормального фермент-субстратного комплекса, уменьшая тем самым скорость реакции или прекращая ее. Ингибиторы делят на две группы: **неспецифические**, вызывающие денатурацию фермента (соли тяжелых металлов, кислоты, щелочи и др.); их действие не связано с механизмами ферментативного катализа; **специфические**, действие которых связано с механизмами ферментативного катализа.

Различают два типа ингибирования: необратимое и обратимое. При **необратимом ингибировании** происходит непрерывная модификация молекул фермента, в результате чего фермент частично или полностью теряет свою активность. **Обратимое ингибирование** поддается количественному изучению на основе кинетики Михаэлиса-Ментен. Обратимые ингибиторы делят на конкурентные и неконкурентные.

Конкурентные ингибиторы представлены соединениями, структура которых сходна со структурой субстрата. Это позволяет им связываться с активным центром фермента. В результате этого падает концентрация

истинных фермент-субстратных комплексов и скорость реакции. Ингибитор в продукт не превращается. Конкурентные ингибиторы увеличивают K_m реакции, но не влияют на V_{max} .

Неконкурентный ингибитор присоединяется к ферменту вне активного центра. В связи с этим избыток субстрата не снимает торможения, а наряду с начальной скоростью реакции снижается и максимальная, тогда как сродство фермента к субстрату, то есть K_m , не изменяется. Механизм ингибирования состоит в снижении скорости, с которой субстрат в составе фермент-субстратного комплекса превращается в продукт.

Классификация и номенклатура ферментов. Реакции и ферменты их катализирующие, делят на 6 классов.

Оксидоредуктазы – катализируют окислительно-восстановительные реакции.

Трансферазы – катализируют реакции межмолекулярного переноса различных химических групп и остатков.

Гидролазы – катализируют реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных связей (эфирных, сложноэфирных, пептидных, гликозидных и др.).

Лиазы отщепляют группы от субстратов по негидролитическому механизму с образованием двойных связей. Ферменты действуют на связи C—C, C—O, C—N, C—S и C-галоген.

Изомеразы катализируют различные типы оптических, геометрических и позиционных изомеров. Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, то фермент получает название мутазы. К классу изомераз относят также рацемазы и эпимеразы.

Лигаза катализируют соединения двух молекул, происходящее за счет энергии АТФ или другого макроэргического соединения. В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции образования связей C-O, C-S, C-N, C-C.

Вопросы для самоконтроля

1. Свойства и структурная организация ферментов, понятие об активных и регуляторных центрах, коферментах и простетических группах.
2. Номенклатура и классификация ферментов.
3. Механизм ферментативного катализа.
4. Единицы ферментативной активности.
5. Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации фермента и субстрата, pH и температуры.
6. Активация и ингибирование ферментов.
7. Принципы регуляции ферментативных реакций.

Задания и упражнения

1. Напишите систематические и рабочие названия, укажите класс фермента, катализирующего реакцию:

- 1) D-глюкозо-1-фосфат + H₂O = D-глюкоза + ортофосфат;
- 2) L-аспарагин + H₂O = L-аспартат + NH₃;
- 3) Ацетил-СоА + ортофосфат = СоА + ацетилфосфат;
- 4) Оксалат = формиат + СО₂;
- 5) (1,4-α-D-глюкозил)_n + ортофосфат = (1,4-α-D-глюкозил)_{n-1} + α-D-глюкозо-1-фосфат;
- 6) L-лизин = кадаверин + СО₂;
- 7) L-метионин = D-метионин;
- 8) АТР + D-гексоза = АДР + D-гексозо-6-фосфат;
- 9) АТР + ацетат + СоА = АМР + пирогосфат + ацетил-СоА;
- 10) АТР + протеин = АДР + фосфопроteid;
- 11) АТР + креатин = АДР + фосфокреатин;
- 12) L-глутамат = D-глутамат;
- 13) L-аспартат + 2-оксоглутарат = оксалоацетат + L-глутамат;
- 14) АТР + D-глюкоза = АДР + D-глюкозо-6-фосфат;
- 15) Мочевина + H₂O → 2NH₃ + СО₂;
- 16) Пирогосфат + H₂O = 2-ортофосфат;
- 17) L-глутамат + H₂O + NAD⁺ = 2-оксоглутарат + NH₃ + NADH;
- 18) Ксантин + H₂O + O₂ = урат + перекись водорода.

2. Напишите схему реакции, катализируемой ферментом, укажите рабочее название фермента:

- 1) Алкоголь: NAD⁺ оксидоредуктаза;
- 2) L-лактат: NAD⁺ оксидоредуктаза;
- 3) Альдегид: NAD⁺ оксидоредуктаза;
- 4) L-аланин: NAD⁺ оксидоредуктаза (дезаминирующая);
- 5) L-аминокислота: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая);
- 6) Перекись водорода: перекись водорода оксидоредуктаза;
- 7) UDP-глюкоза: D-фруктозо-6-фосфат 2-α-глюкозилтрансфераза;
- 8) Ацетилхолин-ацетилгидролаза;
- 9) D-глюкозо-6-фосфат фосфогидролаза;
- 10) Карбокси-лиаза 2-оксокислот;
- 11) АТР-пирогосфат-лиаза (циклизирующая);
- 12) Аланинрацемаза.

Тестовый контроль

Закончите утверждения и ответьте на вопросы, выбрав правильный вариант(ы) из предложенных.

1. *Простые ферменты состоят...*

- 1) из аминокислот; 2) из аминокислот и углеводов;
- 3) из липидов; 4) из аминокислот и небелковых компонентов.

2. *Класс ферментов указывает...*

- 1) на конформацию фермента;
- 2) на тип кофермента;
- 3) на тип химической реакции, катализируемой данным ферментом;
- 4) на строение активного центра фермента.

3. *Константа Михаэлиса численно равна такой концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна...*

- 1) максимальной; 2) 1/2 максимальной;
- 3) 1/5 максимальной; 4) 1/10 максимальной.

4. *Активный центр простых ферментов формируется...*

- 1) из одной аминокислоты;
- 2) из остатков нескольких аминокислот;
- 3) из остатков нескольких аминокислот и небелковых компонентов;
- 4) из небелковых компонентов.

5. *В результате взаимодействия фермента с субстратом энергия активации соответствующей ферментативной реакции...*

- 1) увеличивается; 2) уменьшается;
- 3) не изменяется; 4) возрастает в 4 раза.

6. *Скорость ферментативной реакции зависит...*

- 1) от концентрации фермента;
- 2) от молекулярной массы фермента;
- 3) от молекулярной массы субстрата;
- 4) от молекулярной гетерогенности фермента.

7. *Активный центр сложного фермента состоит...*

- 1) из аминокислотных остатков;
- 2) из аминокислотных остатков, связанных с небелковыми веществами;
- 3) из небелковых органических веществ;
- 4) из металлов.

8. *Конкурентными ингибиторами ферментов являются...*

- 1) металлы;
- 2) аминокислоты;
- 3) вещества, по структуре подобные субстрату;
- 4) вещества, по структуре подобные активному центру фермента.

9. Характер кривой скорости ферментативной реакции от pH определяется...

- 1) концентрацией фермента;
- 2) концентрацией субстрата;
- 3) ионизацией функциональных групп активного центра фермента;
- 4) ионизацией химических группировок субстрата.

10. Ферменты необратимо ингибируются под действием...

- 1) липидов;
- 2) аминокислот;
- 3) ионов тяжелых металлов;
- 4) углеводов.

11. Участок молекулы фермента, ответственный одновременно и за присоединение вещества, подвергающегося ферментативному действию, и за осуществление ферментативного катализа, называется...

- 1) гидрофобным центром;
- 2) активным центром;
- 3) каталитическим центром;
- 4) аллостерическим центром.

12. Ферменты, катализирующие внутримолекулярный перенос групп, называются...

- 1) киназы;
- 2) рацемазы;
- 3) мутазы;
- 4) трансфразы.

13. Главной структурной особенностью белков-ферментов является...

- 1) наличие «активного центра»;
- 2) наличие четвертичной структуры;
- 3) наличие полного набора остатков незаменимых аминокислот;
- 4) наличие остатков ионогенных аминокислот.

14. Под специфичностью ферментов понимают...

- 1) особенности третичной структуры ферментного белка;
- 2) способность катализировать строго определенные реакции;
- 3) необходимость специфических условий для функционирования;
- 4) наличие специфических активаторов.

15. Ингибитор не влияет на максимальную скорость реакции, но приводит к увеличению константы Михаэлиса при типе обратимого ингибирования...

- 1) бесконкурентном;
- 2) конкурентном;
- 3) неконкурентном;
- 4) смешанном.

16. Главной структурной особенностью белков-ферментов является...

- 1) наличие у них остатков ионогенных аминокислот;
- 2) наличие у них «активного центра»;
- 3) наличие у них четвертичной структуры;
- 4) наличие у них полного набора незаменимых аминокислот.

17. Класс ферментов, осуществляющих расщепление внутримолекулярных связей при участии воды, имеет название...

- | | |
|---------------|-----------------|
| 1) лиазы; | 2) трансферазы; |
| 3) гидролазы; | 4) изомеразы. |

18. Ферменты аминотрансферазы ускоряют реакции...

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------|
| 1) восстановительного аминирования; | 2) переаминирования; |
| 3) дезаминирования; | 4) декарбоксилирования. |

19. Участвуют во всех реакциях синтеза ферменты класса...

- | | |
|---------------------|-----------------|
| 1) изомеразы; | 2) лигазы; |
| 3) оксидоредуктазы; | 4) трансферазы. |

20. Межмолекулярный перенос различных группировок осуществляют ферменты класса...

- | | |
|--------------------|----------------|
| 1) оксидоредуктаз; | 2) трансфераз; |
| 3) гидролаз; | 4) изомераз. |

Лабораторная работа

«Изучение свойств ферментов»

Цель работы: изучить свойства ферментов, такие как специфичность действия, термолабильность, влияние pH среды, активаторов и ингибиторов на скорость ферментативных реакций.

Опыт 1. Ферментный гидролиз крахмала под действием амилазы

При участии амилазы крахмал подвергается последовательному гидролитическому расщеплению с образованием промежуточных продуктов распада – декстринов. Последние легко обнаружить по образованию окрашенных продуктов с раствором йода.

Продукты гидролиза	Окрашивание с йодом
Крахмал	Синее
Растворимый крахмал	Синее
Амилдекстрины	Сине-фиолетовое
Эритродекстрины	Красно-фиолетовое или красное
Ахродекстрины	Буровато-жёлтое
Мальтодекстрины	Не дают
Мальтоза	Не даёт

Конечный продукт гидролиза – мальтоза – может быть обнаружен реакцией Троммера или Фелинга.

Ход работы. В девять пробирок наливают по 2 мл воды и прибавляют по 2 капли 0,1-процентного раствора йода в иодиде калия. В десятую пробирку наливают 5 мл 0,5-процентного раствора крахмала, прибавляют равный объем разведенной в 10 раз слюны, быстро перемешивают и 2 капли смеси вносят в первую пробирку с раствором йода. Через 5–15 сек (в зависимости от активности фермента) из десятой пробирки берут две капли раствора во вторую, третью, ..., девятую пробирки перемешивают и отмечают получаемое окрашивание. При правильно выбранном интервале времени наблюдается постепенный переход окраски растворов в пробирках от синей до желтой. С содержимым десятой пробирки продельывают реакцию Троммера. Отмечается появление красно-кирпичного осадка оксида меди (I).

Опыт 2. Влияние температуры на активность ферментов

Активность ферментов в значительной степени зависит от температуры. Температура, при которой наблюдается максимальная скорость ферментативной реакции и сохраняются нативные свойства, называется *температурным оптимумом*. Для большинства ферментов животных он близок к температуре тела и лежит в пределах 37–45 °С, а для ферментов растений – между 50–60 °С. При высоких температурах (60–70 °С и выше) ферменты теряют биологическую активность, что объясняется тепловой денатурацией (термолабильностью фермента). При понижении температуры ниже оптимума активность фермента также падает.

Влияние температуры на активность ферментов можно рассматривать на примере амилазы слюны, определяя степень расщепления крахмала при различных температурных условиях по окраске продуктов реакции.

Ход работы. В четыре пробирки наливают по 10–12 капель 0,5-процентного раствора крахмала и помещают первую пробирку в стакан со льдом, вторую – в штатив при комнатной температуре (18–20 °С), третью – в термостат при температуре 40–42 °С, четвертую – в водяную баню при температуре 80–100 °С. В 12 других пробирок наливают по 3 мл воды и по 2–3 капли 0,1-процентного раствора йода в иодиде калия. Спустя 5 мин в пробирки с крахмалом прибавляют по 10 капель разведенной в пять раз слюны, содержимое перемешивают и оставляют при указанных температурах. Через каждые 1,5 мин (3 раза) отбирают по 1 капле содержимого пробирок с субстратом и ферментом и помещают в пробирки с раствором йода. Наблюдают различную окраску продуктов при реакции с йодом, что обусловлено различной степенью гидролиза крахмала вследствие разницы в скоростях ферментативного катализа при указанных температурных условиях опыта.

Опыт 3. Специфичность действия ферментов

Специфичность действия – одно из наиболее характерных свойств ферментов – проявляется в том, что каждый фермент, как правило, действует на определенный субстрат или группу субстратов, близких по своей структуре. Высокая специфичность ферментов обусловлена уникальной структурой их активных центров.

Специфичность действия амилазы и сахаразы. Амилаза катализирует реакцию гидролитического расщепления крахмала и не действует на дисахариды, сахараза ускоряет гидролиз сахарозы, не расщепляя крахмал или другие дисахариды.

Ход работы. В две пробирки помещают по 5–6 капель 0,5-процентного раствора крахмала. В одну из них добавляют 8–10 капель разведенной в 5 раз слюны, содержащей амилазу, в другую – 8–10 капель вытяжки из дрожжей, содержащей фермент сахаразу. Обе пробирки выдерживают 10 мин при комнатной температуре, прибавляют в них по капле 0,1-процентного раствора йода в иодиде калия и отмечают окрашивание.

В две другие пробирки помещают по 10–12 капель 1-процентного раствора сахарозы и добавляют в первую пробирку 8–10 капель вытяжки из дрожжей, во вторую – 8–10 капель разведенной слюны. После выдержки пробирок при комнатной температуре в течение 5 мин с их содержимым проводят реакцию Троммера. Действие ферментов в обоих опытах обнаруживается либо по исчезновению субстрата, либо по появлению продуктов его гидролиза. Убеждаются, что амилаза катализирует гидролиз крахмала (но не сахарозы), а сахараза – гидролиз сахарозы (но не крахмала).

Опыт 4. Влияние pH среды на активность ферментов

Каждый фермент проявляет максимум каталитической активности в пределах довольно узкого диапазона pH, называемого *оптимумом pH*. Зависимость активности фермента от pH среды обусловлена, по-видимому, изменением пространственной конфигурации активных участков молекулы фермента вследствие изменения концентрации ионов водорода, что и приводит к изменению скорости ферментативной реакции. Оптимум pH для различных ферментов различен. Так, для пепсина оптимум pH равен 1,5–2,5, амилазы слюны – 6,8–7,0, трипсина – 7,5–8,5, панкреатической липазы – 7,0–8,5, каталазы – 6,8–7,0.

О влиянии pH на активность ферментов можно судить по расщеплению крахмала амилазой слюны при различных значениях pH.

Ход работы. В 7 пробирок помещают фосфатные буферные смеси с различными значениями pH. В каждую пробирку добавляют по 10 капель 0,5-процентного раствора крахмала и по 10 капель разведенной в 10 раз слюны, содержимое пробирок перемешивают и ставят в термостат при

38–40 °С. Через 5 мин из четвертой пробирки берут каплю смеси и добавляют в заранее приготовленную пробирку с 2 мл воды и каплей 0,1-процентного раствора йода в иодиде калия. Эту реакцию повторяют затем через каждые 2 мин до тех пор, пока в капельной пробе не будет получено желтое или коричнево-желтое окрашивание (то есть произойдет полное расщепление крахмала). После этого во все опытные пробирки прибавляют по 1 капле 0,1-процентного раствора йода, содержимое пробирок перемешивают. Наблюдают различное окрашивание смесей в соответствии с глубиной ферментативного гидролиза крахмала. Устанавливают, при каком значении рН произошло наиболее полное расщепление крахмала (оптимум рН).

Опыт 5. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Значительное влияние на активность ферментов оказывает присутствие в тканях ряда химических соединений. Так, например, ферментативная активность амилазы слюны повышается под влиянием хлорида натрия, панкреатической липазы – под влиянием желчных кислот, пепсина – в присутствии соляной кислоты и т. д. Из ингибиторов ферментов известны цианид-ионы (для некоторых геминовых ферментов), фосфорорганические соединения (для эстераз), ионы тяжелых и другие. Указанные действия активаторов и ингибиторов связаны с их влиянием на структуру активного центра ферментов, что ведет к изменению способности образовывать фермент-субстратные комплексы.

Ход работы. В 3 пробирки с 10 каплями разведенной в 5 раз слюны прибавляют: в первую – 8 капель воды и 2 капли 1-процентного раствора хлорида натрия, во вторую – 10 капель воды, в третью – 8 капель воды и 2 капли 1-процентного раствора сульфата меди (II). Содержимое перемешивают, прибавляют во все пробирки по 5 капель 0,5-процентного раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре. Через каждые 5 минут (3 раза) в заранее приготовленные три пробирки с 2 мл воды, подкрашенной 2 каплями 0,1-процентного раствора йода, отбирают по 2–3 капли содержимого каждой из опытных пробирок. Наблюдают различия характера окраски в зависимости от условий.

Занятие 4

Химическая структура и свойства нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Цель занятия: изучить особенности строения, биологическую роль и свойства нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

1. Химическое строение и номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов
2. Структурная организация и связи, стабилизирующие структуру нуклеиновых кислот.
3. Характеристика первичной структуры ДНК.
4. Вторичная структура ДНК. Правила Чаргаффа.
5. Структура, свойства и функции матричных, рибосомальных и транспортных РНК.

Основные понятия по теме

Нуклеиновые кислоты представляют собой линейные биополимеры, мономерами которых являются нуклеотиды.

В состав **нуклеозида** входят два компонента: моносахарид (рибоза или дезоксирибоза) и азотистое основание. **Нуклеотид** – это фосфорный эфир нуклеозида. Следовательно, каждый нуклеотид содержит три компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид и остаток фосфорной кислоты.

В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые – аденин (А), гуанин (G) и пиримидиновые – цитозин (С), тимин (Т) и урацил (U). Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов приведена в таблице 2.

Таблица 2 – Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Трехбуквенное обозначение
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат	АМФ
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат	ГМФ
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат	ЦМФ
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат	УМФ
Тимин	Тимидин	Тимидинмонофосфат	ТМФ

Пентоза соединяется с основанием N-гликозидной связью, образованной С₁-атомом пентозы и N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина (рисунок 4.1).



Рисунок 4.1 – Пуриновый и пиримидиновый нуклеотиды

Нуклеотиды, в которых пентоза представлена рибозой, называют рибонуклеотидами, а нуклеиновые кислоты, построенные из рибонуклеотидов, – рибонуклеиновыми кислотами, или РНК. Нуклеиновые кислоты, в мономеры которых входит дезоксирибоза, называют дезоксирибонуклеиновыми кислотами, или ДНК.

Остов нуклеиновой кислоты имеет одинаковое строение по всей длине молекулы и состоит из чередующихся групп – пентоза-фосфат-пентоза-. Вариабельными группами в полинуклеотидных цепях служат азотистые основания – пурины и пиримидины. В молекулы РНК входят аденин (А), урацил (U), гуанин (G) и цитозин (C), в ДНК – аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (C). Уникальность структуры и функциональная индивидуальность молекул ДНК и РНК определяются их первичной структурой – последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи.

Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). *Первичная структура ДНК* представляет собой порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в полинуклеотидной цепи. Нуклеотиды в составе полимерной цепи объединяются с помощью 3', 5'-фосфодиэфирной связи. На 5'-конце молекулы находится фосфатная группа, а на 3'-конце цепи – свободная ОН-группа (рисунок 4.2). *Вторичная структура ДНК.* В 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК. Согласно которой, молекула ДНК имеет форму двойной *правозакрученной* спирали, образованной комплементарными, *антипараллельными* цепями, то есть цепи ориентированы в направлении 3'→5' и 5'→3' (рисунок 4.3).

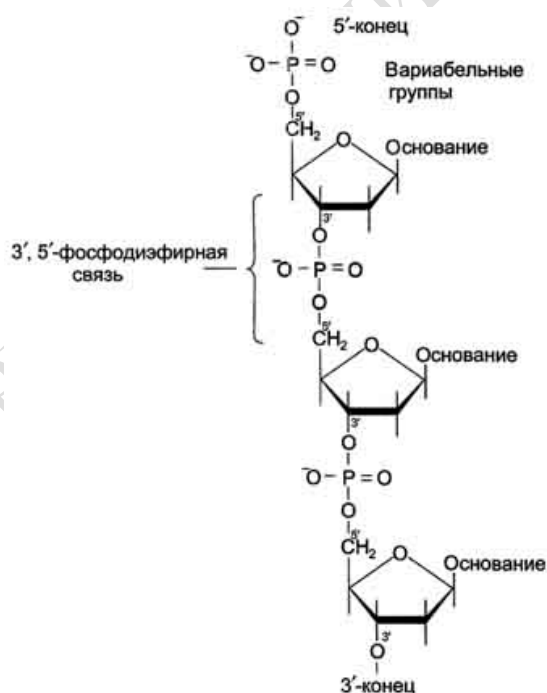


Рисунок 4.2 – Фрагмент цепи ДНК

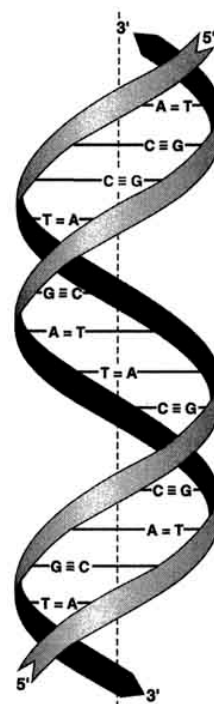


Рисунок 4.3 – Двойная спираль ДНК

На один виток спирали приходится примерно 10 пар нуклеотидов.

Все основания цепей ДНК расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов – снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счёт водородных связей между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями А и Т (две связи) и между G и С (три связи). Согласно правилу Чаргаффа, число пуриновых оснований ($A + G$) равно числу пиримидиновых оснований ($T + C$). Между основаниями двухцепочечной молекулы возникают гидрофобные взаимодействия, стабилизирующие двойную спираль.

В образованной структуре различают две бороздки - большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина.

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК). Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью гистоновых и негистоновых белков, взаимодействующих с определенными последовательностями в структуре ДНК. Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют хроматином.

Структура рибонуклеиновых кислот (РНК). *Первичная структура РНК* – это порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов в полинуклеотидной цепи.

В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями, в связи с чем различают 5'- и 3'-концы цепи РНК. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется.

Вторичная структура РНК. Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК образуют спирализованные петли – «шпильки», за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и G-С. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура РНК. Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путем взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между

нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизирована ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+} , связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

Основные типы РНК. В цитоплазме клеток присутствуют 3 типа рибонуклеиновых кислот – транспортные РНК (тРНК), матричные РНК (мРНК) и рибосомальные РНК (рРНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, продолжительности жизни и по функциональной активности.

Транспортные РНК (тРНК). Пространственную структуру любых

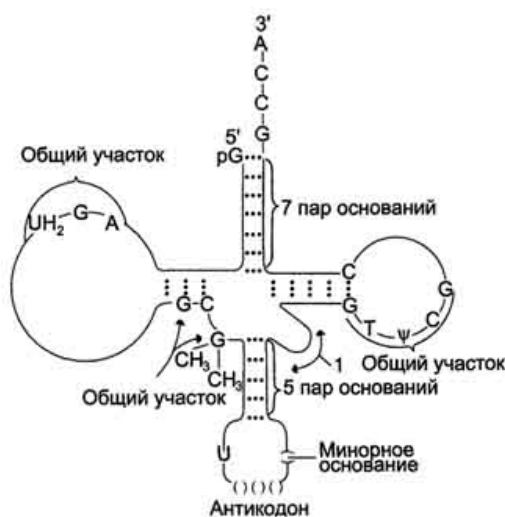


Рисунок 4.4 – Строение т-РНК

тРНК, независимо от различий в последовательности нуклеотидов, описывают универсальной моделью «клеверного листа» (рисунок 4.4). В каждой молекуле тРНК есть участки цепи, не участвующие в образовании водородных связей между нуклеотидными остатками.

К ним, в частности, относят участок, ответственный за связывание с аминокислотой на 3'-конце молекулы и антикодон – специфический триплет нуклеотидов, взаимодействующий комплементарно с кодоном мРНК.

В состав нуклеотидов тРНК входят минорные основания (в среднем 10–12 оснований на молекулу). Они представлены метилированными основаниями, изомерами и аналогами пиримидинов.

Матричные РНК (мРНК). Первичная структура всех мРНК имеет одинаковое строение 5'- и 3'-концов. Так, на 5'- конце присутствует модифицированный нуклеотид 7-метилгуанозин-5'-трифосфат (кэп). Несколько десятков нуклеотидов отделяют кэп от иницирующего кодона. За кодирующим участком следует один из терминирующих кодонов -UGA-, -UUA-, -UAG-. На 3'-конце большинства мРНК присутствует последовательность нуклеотидов из 100-200 аденозинмонофосфатных остатков.

Рибосомальные РНК (рРНК). Рибосомальные РНК имеют многочисленные спирализованные участки. Различают рРНК – 5S, 5,8S, 28S и 18S. Рибосомальные РНК содержат несколько модифицированных нуклеотидов, чаще всего это метилированные производные азотистых оснований или рибозы. рРНК образуют комплексы с белками, которые называют рибосомами.

Тестовый контроль

Закончите утверждения и ответьте на вопросы, выбрав правильный вариант(ы) из предложенных.

1. В состав нуклеозида входит...

- 1) азотистое основание;
- 2) азотистое основание и пентоза;
- 3) азотистое основание, пентоза и остаток фосфорной кислоты;
- 4) азотистое основание и остаток фосфорной кислоты.

2. В состав нуклеотида входит...

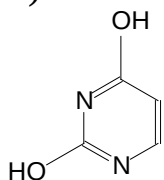
- 1) азотистое основание;
- 2) азотистое основание и пентоза;
- 3) азотистое основание, пентоза и остаток фосфорной кислоты;
- 4) азотистое основание и остаток фосфорной кислоты.

3. В нуклеотидах азотистое основание и пентоза соединены...

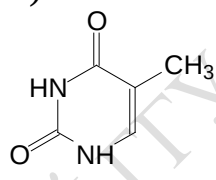
- 1) фосфоэфирной связью;
- 2) N-гликозидной связью;
- 3) O-гликозидной связью;
- 4) сложноэфирной связью.

4. Цитозину соответствует формула...

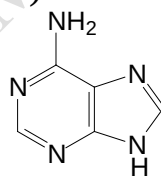
1)



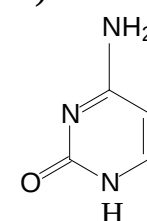
2)



3)

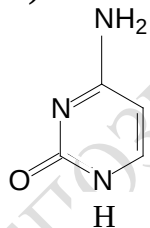


4)

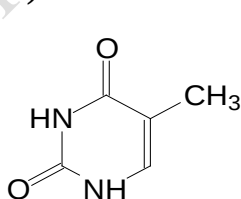


5. Тимину соответствует формула...

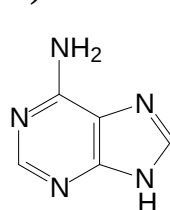
1)



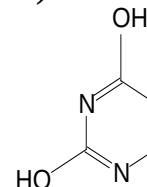
2)



3)



4)

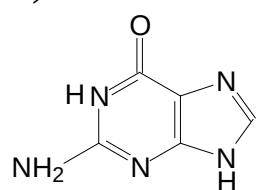


6. Только в состав ДНК входит азотистое основание...

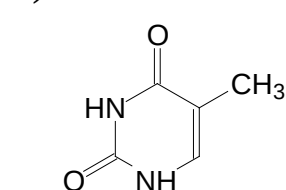
- 1) урацил;
- 2) гипоксантин;
- 3) тимин;
- 4) аденин.

7. Гуанину соответствует формула...

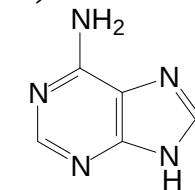
1)



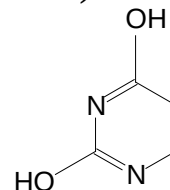
2)



3)



4)



8. В состав РНК входит углевод...

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1) β -D-рибофураноза; | 2) β -D-2-дезоксиррибофураноза; |
| 3) β -D-фруктофураноза; | 4) β -D-галактопираноза. |

9. В состав ДНК входит углевод...

- | | |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1) β -D-глюкопираноза; | 2) β -D-рибофураноза; |
| 3) β -D-фруктофураноза; | 4) β -D-2-дезоксиррибофураноза. |

10. В молекулах нуклеиновых кислот остатки нуклеотидов соединены связями...

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 1) фосфоангидридными; | 2) 2',3'-фосфодиэфирными; |
| 3) 3',5'-фосфодиэфирными; | 4) N-гликозидными. |

11. Вторичная структура ДНК представляет собой спираль...

- 1) двойную левозакрученную;
- 2) двойную правозакрученную;
- 3) одноцепочную левозакрученную;
- 4) одноцепочную правозакрученную.

12. Полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК удерживаются...

- 1) координационными связями;
- 2) водородными связями;
- 3) ионными связями;
- 4) гидрофобными взаимодействиями.

13. В молекуле ДНК число остатков аденина всегда равно числу остатков...

- 1) гуанина; 2) тимина; 3) урацила; 4) цитозина.

14. В молекуле ДНК число остатков гуанина всегда равно числу остатков...

- | | |
|--------------|----------------|
| 1) тимина; | 2) урацила; |
| 3) цитозина; | 4) пиримидина. |

15. На виток двойной спирали ДНК приходится ... пар нуклеотидов

- 1) 5; 2) 10; 3) 15; 4) 20.

16. В формировании третичной структуры ДНК эукариот участвуют...

- | | |
|---------------|---------------|
| 1) гистоны; | 2) глутелины; |
| 3) альбумины; | 4) глобулины. |

17. Вторичная структура тРНК имеет форму...

- | | |
|-----------------------|------------------------|
| 1) линейную; | 2) «клеверного листа»; |
| 3) «локтевого сгиба»; | 4) кольцевую. |

18. Специфичность различных тРНК определяется...

- 1) акцепторным участком; 2) антикодоновой петлей;
- 3) псевдоуридиловой петлей; 4) дигидроуридиновой петлей.

19. Акцепторная ветвь тРНК содержит на 3'-конце последовательность...

- 1) УАГ; 2) ЦАЦ; 3) ЦЦА; 4) АЦЦ.

20. Максимум оптической плотности нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм обусловлен наличием...

- 1) водородных связей; 2) пентоз;
- 3) азотистых оснований; 4) фосфорных остатков.

Лабораторная работа

«Извлечение и гидролиз нуклеопротеидов дрожжей. Открытие в гидролизате составных компонентов»

Цель работы: Выделение нуклеопротеидов из дрожжевых клеток и качественное определение составных компонентов в гидролизате.

Опыт 1. Извлечение и гидролиз нуклеопротеидов дрожжей

Нуклеопротеиды – сложные белки, содержащие в качестве простетической группы нуклеиновые кислоты. Белковый компонент нуклеопротеидов представлен преимущественно белками основного характера (протамины и гистоны).

При непродолжительном гидролизе дрожжей или выделенных из них нуклеопротеидов в гидролизате легко определяются азотистые основания, пентозы и фосфорная кислота.

Ход работы. В фарфоровую ступку помещают 1 г дрожжей, добавляют 1 каплю эфира, 2 капли воды, около 0,1 г песка и растирают пестиком для разрушения клеток. К массе добавляют 4 мл 0,4-процентного раствора NaOH и тщательно растирают. Содержимое переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 минут. Центрифугат помещают в чистую пробирку, добавляют 1,5 мл 5-процентного раствора уксусной кислоты при постоянном перемешивании. Выпадает осадок нуклеопротеидов. Содержимое вновь центрифугируют и центрифугат выбрасывают. К полученному осадку нуклеопротеидов приливают 10 мл 10-процентного раствора серной кислоты, пробирку закрывают пробкой с воздушным холодильником и ставят на слабый огонь. Кипятят

60–90 мин, жидкость охлаждают и фильтруют. В фильтрате находят продукты гидролиза нуклеопротеидов.

Опыт 2. Открытие в гидролизате составных компонентов нуклеиновых кислот

Биуретовая проба на полипептиды. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10-процентного раствора NaOH и 1 каплю 1-процентного раствора CuSO₄. Жидкость окрашивается в сине-фиолетовый цвет.

Серебряная проба на пуриновые основания. 10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного раствора аммиака и добавляют 1 каплю 5-процентного раствора AgNO₃. При стоянии выпадает небольшой рыхлый осадок, окрашенный в бурый цвет.

Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 30-процентного раствора NaOH и 2–3 капли 7-процентного раствора CuSO₄ до появления осадка Cu(OH)₂. Смесь нагревают до начала кипения. Появляется оранжевый осадок CuOH или красный осадок оксида меди вследствие окисления пентоз.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2–3 капли гидролизата и кипятят. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок фосфорно-молибденовокислого аммония.



Литература

1. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1990. – 543 с.
2. Гидранович, В. И. Биохимия: учебное пособие / В. И. Гидранович, А. В. Гидранович. – Минск : ТетраСистемс, 2010. – 528 с.
3. Комов, И. П. Биологическая химия / И. П. Комов. – М. : Мир, 2005. – 532 с.
4. Биохимия человека / Р. Мари [и др.]. – М. : Мир, 1993. – 573 с.
5. Основы биохимии / под ред. А. А. Анисимова. – М. : Высшая школа, 1986. – 546 с.
6. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович – М. : Агар, 1999. – 505 с.
7. Упражнения и задачи по биологической химии / Ю. Б. Филиппович [и др.]. – М. : Просвещение, 1976. – 151 с.

Производственно-практическое издание

ДРОЗДОВА Наталья Ивановна

СТАТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Практическое пособие

Редактор *В. И. Шкредова*
Корректор *В. В. Калугина*

Подписано в печать 01.03.2017. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография. Усл. печ. л. 2,8.

Уч.-изд. л. 3,1. Тираж 50 экз. Заказ 161.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования

«Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины»

Свидетельство о государственной регистрации издателя,

Изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013.

Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013.

Ул. Советская, 104, 246019, г. Гомель.

Н. И. ДРОЗДОВА

СТАТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

Гомель
2017

