

Белки. Установление первичной структуры белка

Лекция 2

Автор Е.А. Кузнецова, 2020
Ред. О.В.Стронин, 2024

Дополнительно (к предыдущему разговору).

Принцип компартментации: Мембранные структуры, гетерогенные системы (гель, золь)

[Harvard MCB – BioVisions Lab: The Inner Life of the Cell \(Narrated\) \(youtube.com\)](#)

Сюжет:

Лимфоцит получает сигнал воспаления и останавливает свое движение в быстром потоке крови в капилляре.

Чтобы добраться до очага воспаления, лейкоциту нужно провести каскад сложных реакций для изменения формы и проникновения между клетками эндотелия,

Перед вами разворачивается завораживающий внутренний мир клетки, демонстрирующий сложность ее устройства и процессов в ней протекающих.

Таймлайн содержит краткое описание событий (англ.)

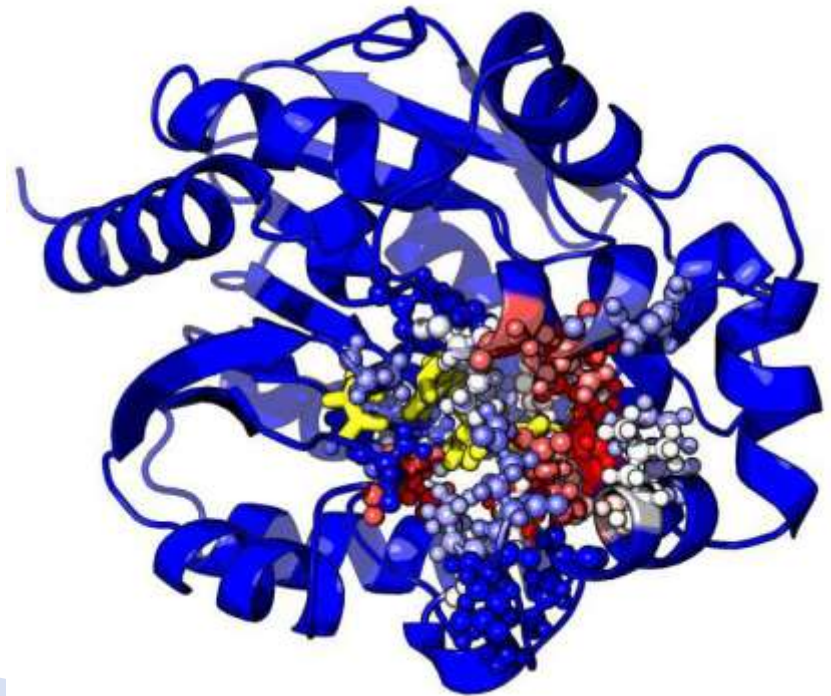
Белки

План:

1. Определение.
2. Классификация белков
3. Первичная структура.
4. Методы определения первичной структуры.

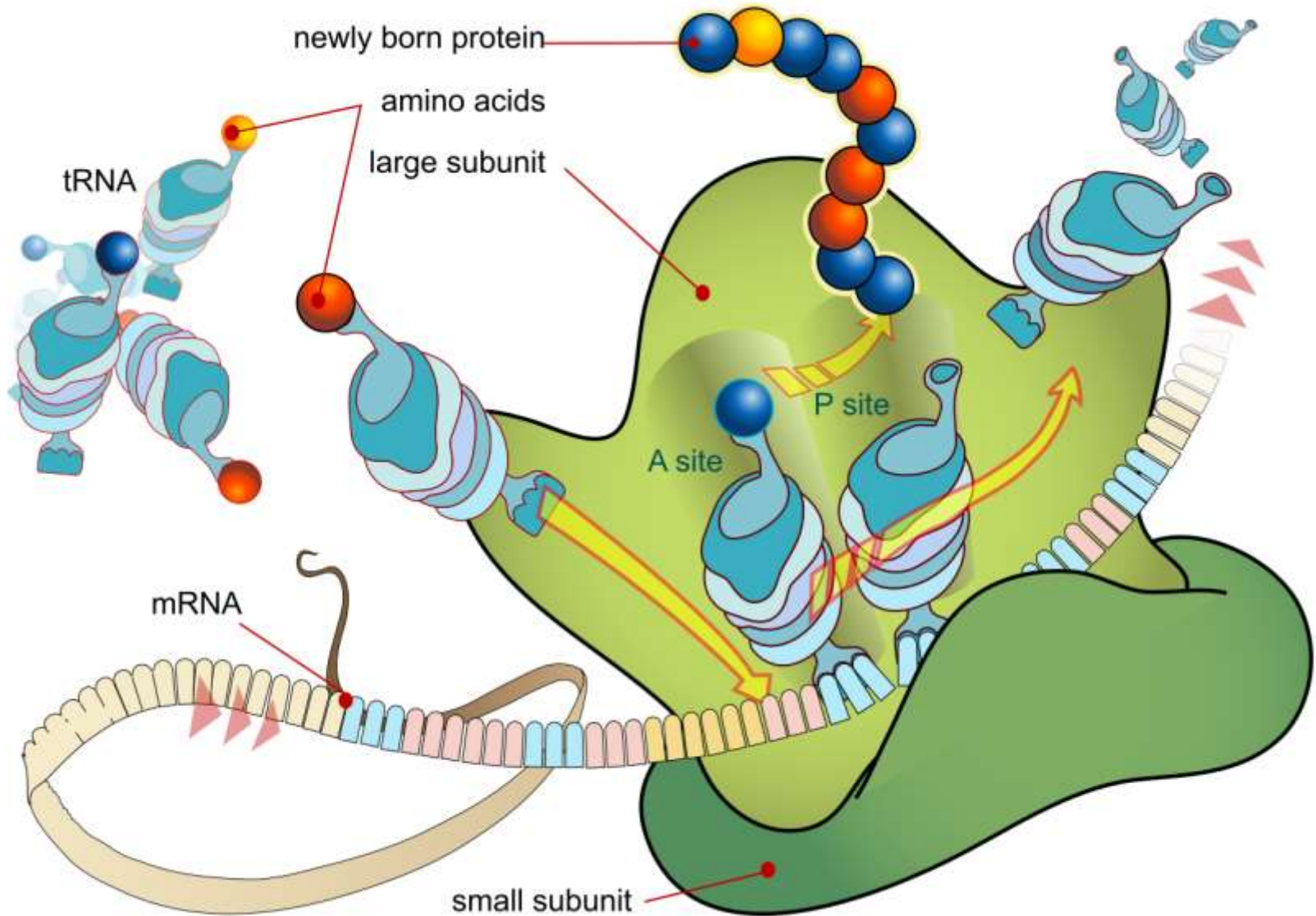
Белки

-это высокомолекулярные органические соединения, мономерными звеньями, которых являются α -аминокислоты, соединённые между собой пептидной связью. Молекулярная масса белков $>10\ 000$ Да.



Биосинтез белка

Трансляция РНК. Генетический код. Рибосомы.

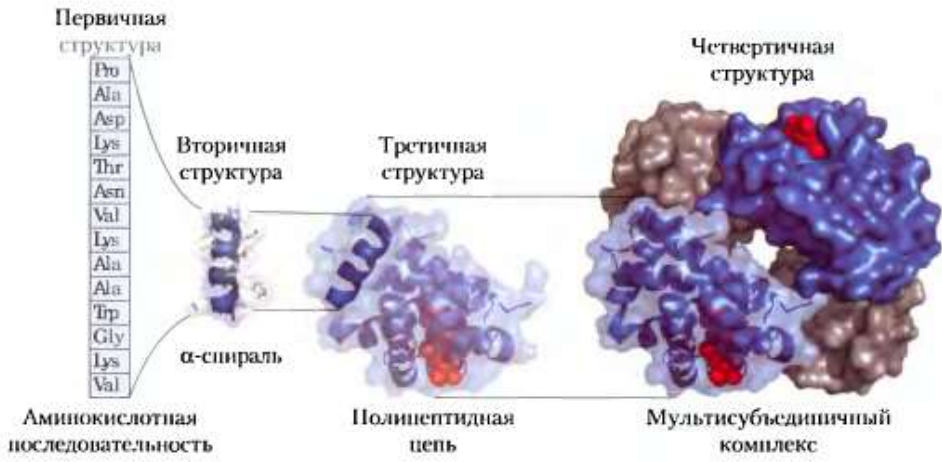


Первичная структура белка

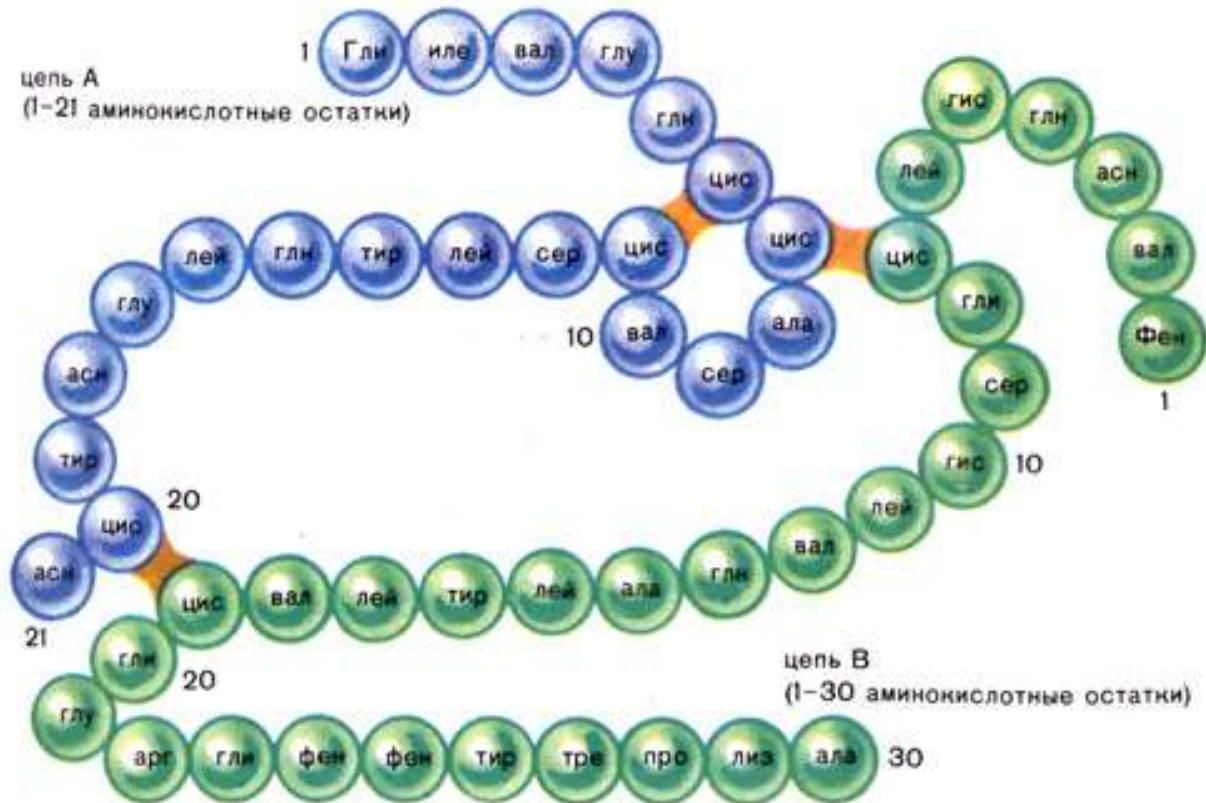
Это последовательность аминокислотных остатков, соединенных пептидной связью. Первичная структура обуславливает трехмерную структуру белка и его функции.

Аминокислотный состав двух белков

Аминокислота	Число остатков в молекуле белка*	
	Цитохром с быка	Химотрипсиноген быка
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Всего	104	245



Первичная структура инсулина

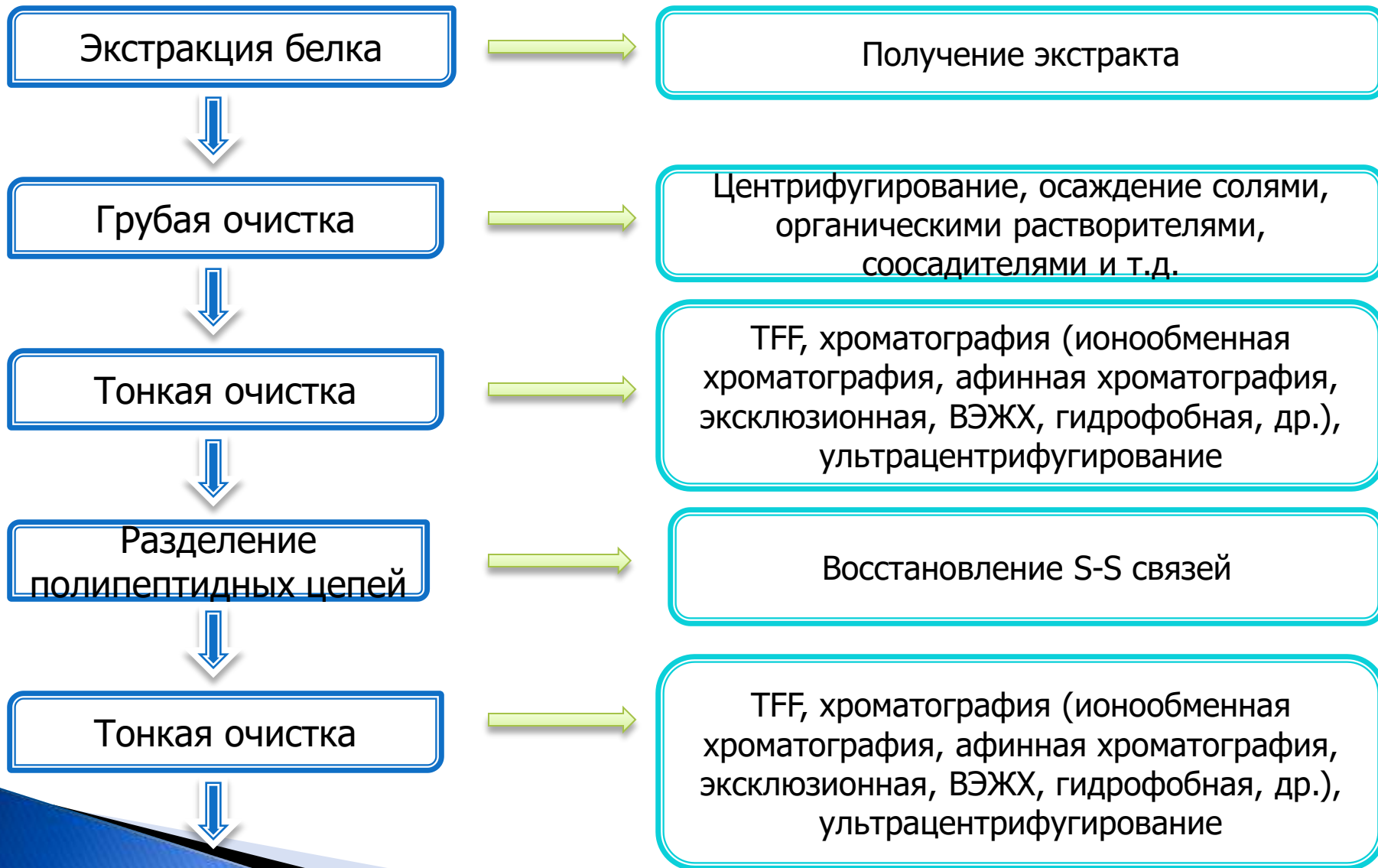


Классификация белков:

- по форме молекул (глобулярные или фибриллярные);
- по молекулярной массе (низкомолекулярные, высокомолекулярные и др.);
- по химическому строению (наличие или отсутствие небелковой части);
- по выполняемым функциям (транспортные, защитные, структурные белки и др.);
- по локализации в клетке (ядерные, цитоплазматические, лизосомальные и др.);
- по локализации в организме (белки крови, печени, сердца и др.);

Определение первичной структуры белка.

Очистка (ред. СОВ)



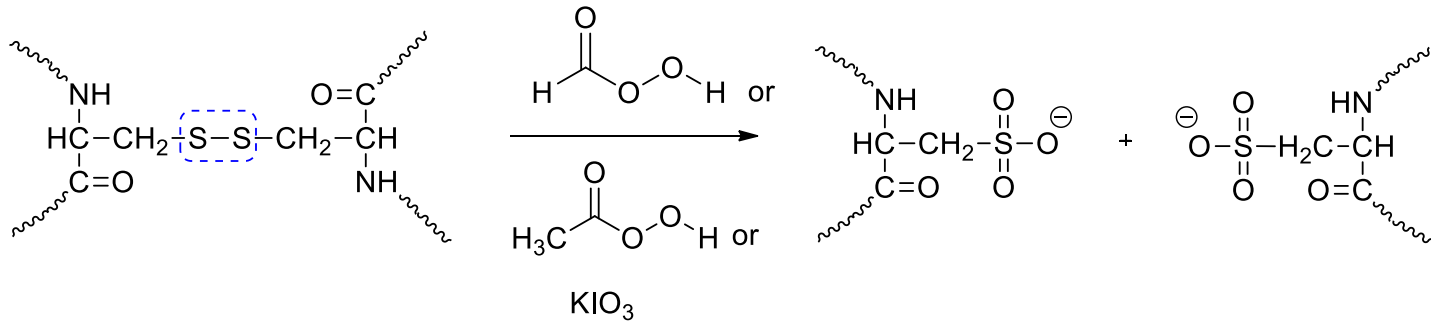
Определение первичной структуры белка.

Анализ



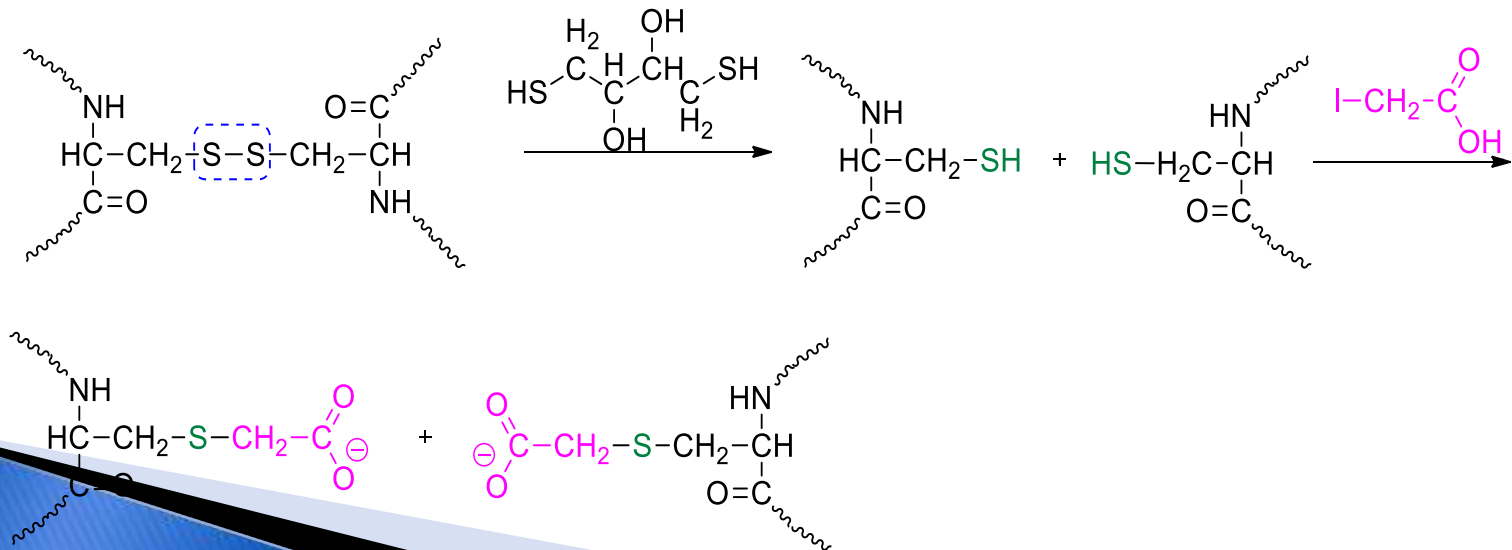
Разрушение дисульфидных мостиков

1. Окисление надуксусной, надмуравьиной или йодатом калия



Недостатки: окислительное расщепление Trp или Met

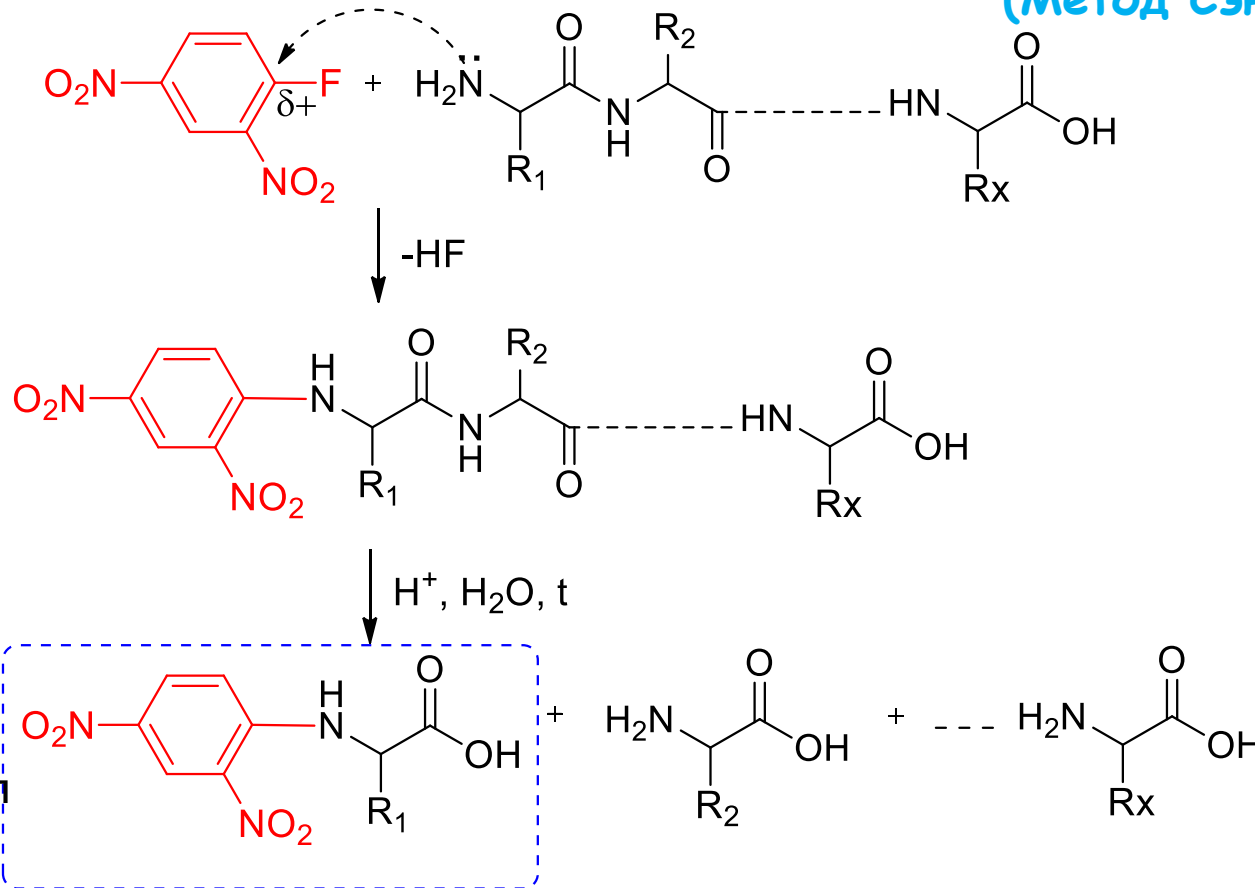
2. Восстановление дитиотрейтолом или β-меркаптоэтанолом



Идентификация N-концевой аминокислоты

1-фтор-2,4-динитробензол
(реактив Сэнгера)

(Метод Сэнджера)

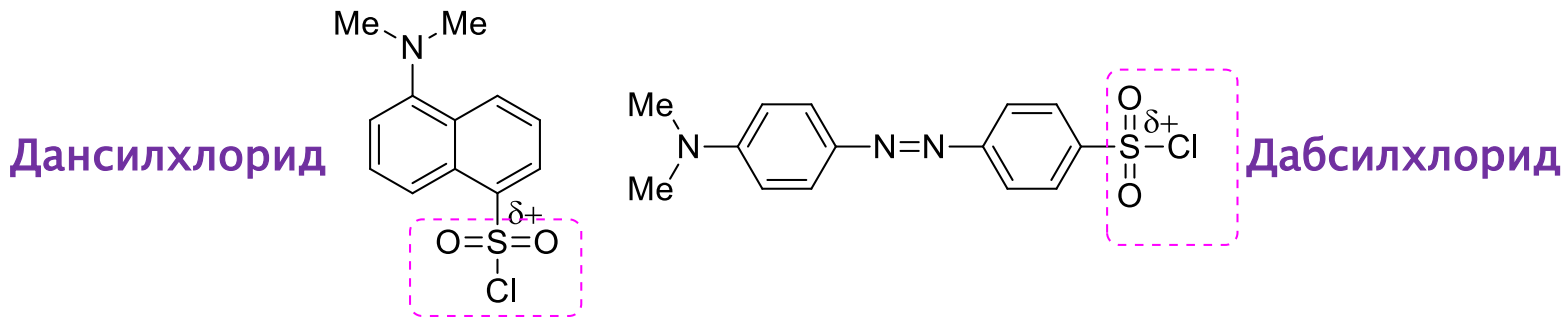


2,4-динитробензол
-аминокислота
(желтая окраска)

Идентификация с помощью хроматографии (тонкослойная, ВЭЖХ, капиллярный электрофорез и т.д.)

Идентификация N-концевой аминокислоты

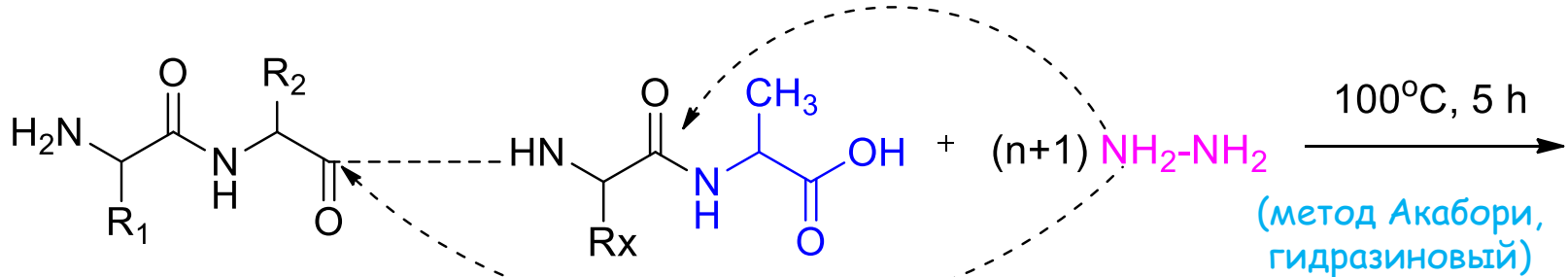
(Дансильный метод)



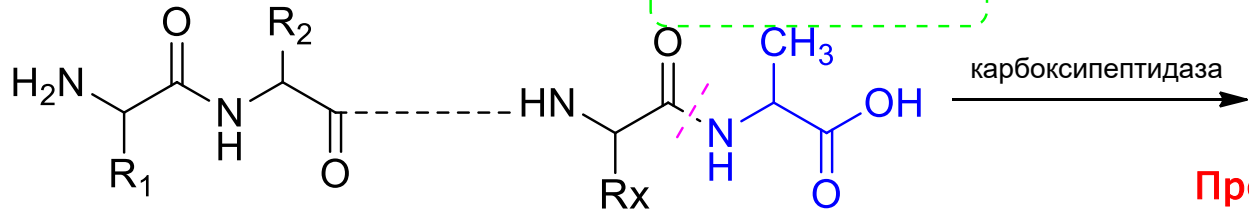
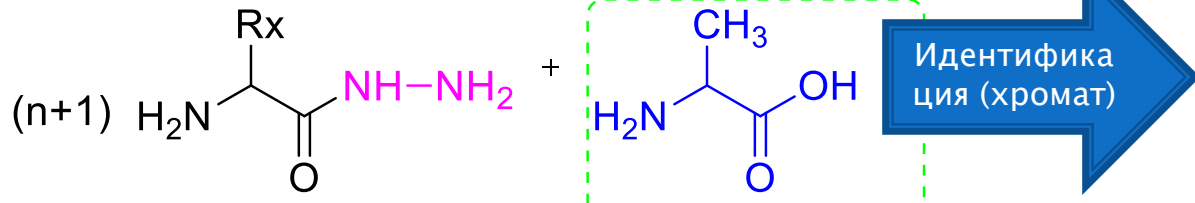
13

Детекция – флюоресценция в УФ
Повышение чувствительности
метода на 2–3 порядка

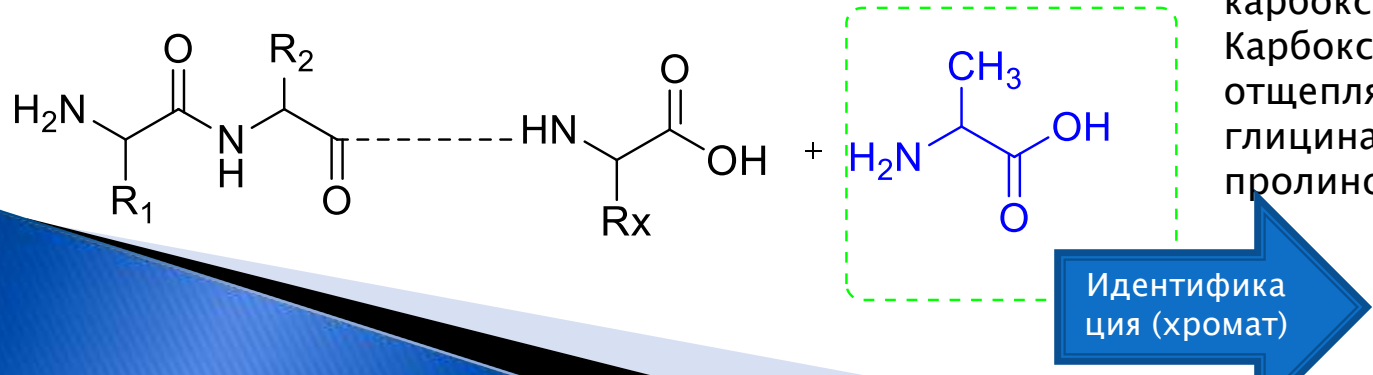
Идентификация C-концевой аминокислоты



кроме: цистена,
 глутамина, аспрагина
 и триптофана,
 аргинин частично
 превращается в
 орнитин



Предпочтительный
 Используют
 карбоксипептидазы А и В.
 Карбоксипептидаза Y
 отщепляет все ак кроме
 глицина, связанного с
 пролином



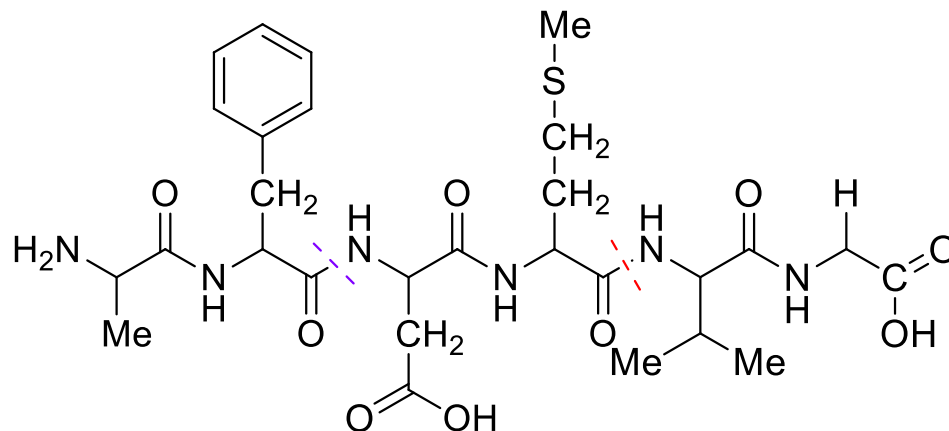
Фрагментирование полипептидных цепочек

Протеаза или реагент	Участок расщепления / Cleavage site
Трипсин (поджелудочная железа быка)	Lys, Arg (C)
Химотрипсин (поджелудочная железа быка)	Phe, Trp, Tyr (C)
Протеаза V8 (бактерия <i>Staphylococcus aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-протеаза (бактерия <i>Pseudomonas flagi</i>)	Asp, Glu (N)
Пепсин (желудок свиньи)	Leu, Phe, Trp, Tyr (N)
Эндопротеиназа Lys C (бактерия <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Бромциан	Met (C)

Все реагенты являются коммерчески доступными

Фрагментирование полипептидных цепочек

Me=CH₃



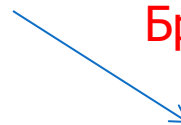
Ала-Фен-Глу-Мет-Вал-Гли

Химотрипсин



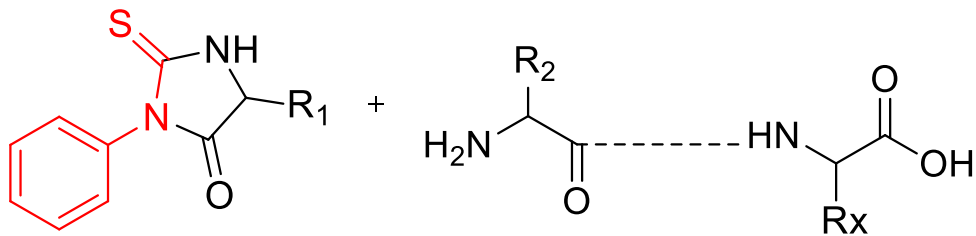
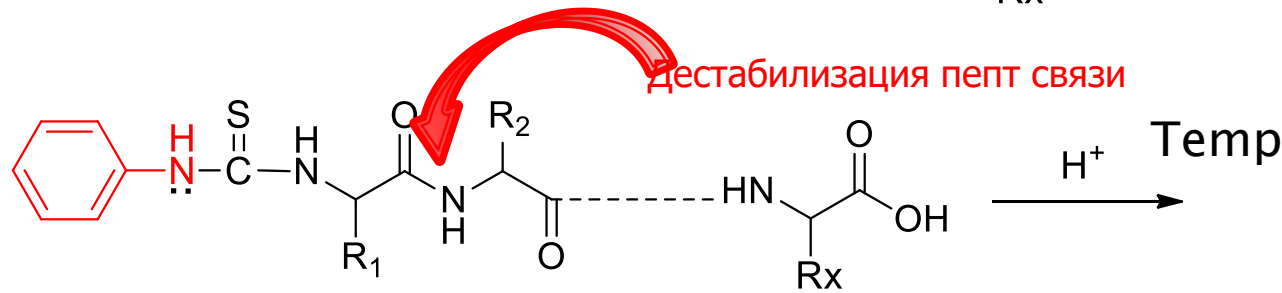
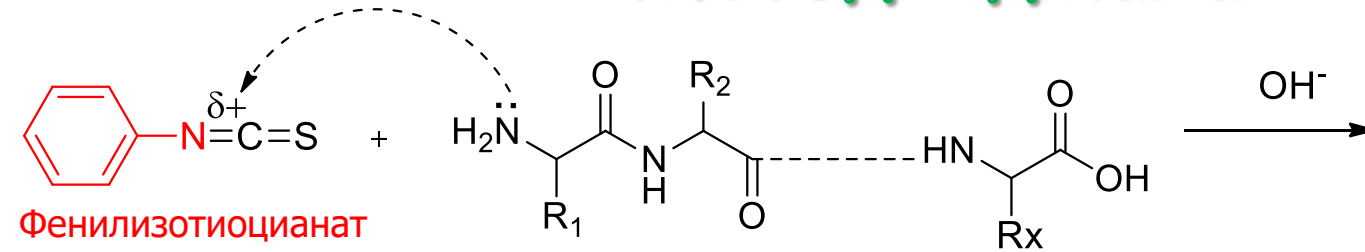
Ала-Фен
+
Глу-Мет-Вал-Гли

Бромциан



Ала-Фен-Глу-Мет
+
Вал-Гли

Метод Эдмана



Фенилтиогидантоиновое производное N-концевого остатка

Разделение и идентификация (хромат)

Укороченный пептид

Секвинаторы

автоматические приборы, позволяющие с помощью метода Эдмана изучать первичную структуру пептидов, содержащих до нескольких десятков аминокислотных остатков.

Установление структуры полипептида

Порядок чередования пептидов в молекулах белков определяется по перекрыванию фрагментов пептидов

Пептиды, полученные при гидролизе белка трипсином

Ала-Гис-Арг

Про-Мет-Тир-Лиз

Вал-Гли

Ала-Гис-Арг-Про-Мет

Тир-Лиз-Вал-Гли

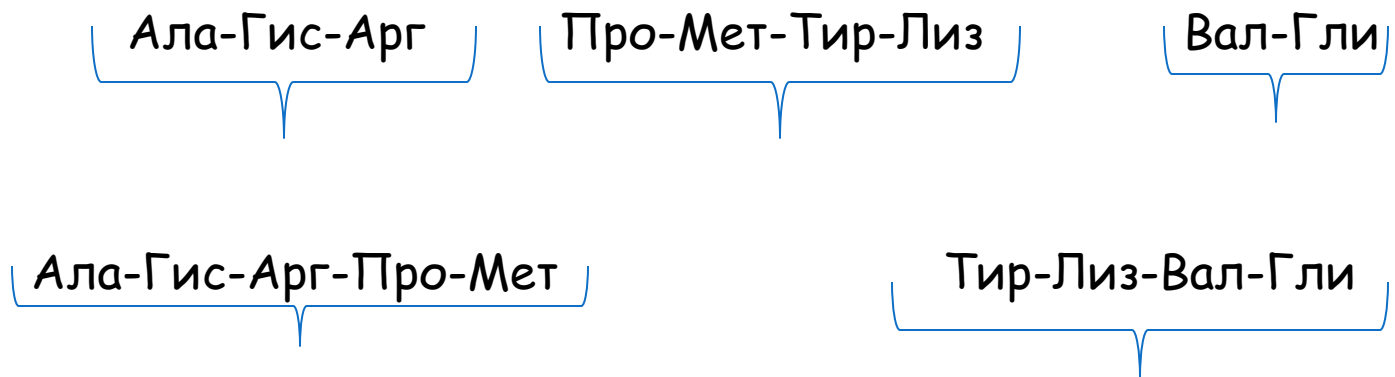
Пептиды, полученные при гидролизе белка бромцианом

Масс-спектрометрия (дополн.)

Методы, основанные на масс-спектрометрии (хроматомасс-спектрометрии).

Гидролиз протеазами+лазерная десорбция -> отдельные олигопептиды.

Сочетание АА в олигопептидах конечно, их массо-зарядные отношения известны и результаты можно обработать современными вычислительными средствами.





Frederick Sanger

13 августа 1918, Рендкомб, Глостершир

— 19 ноября 2013

— английский биохимик,

Нобелевские премии по химии:

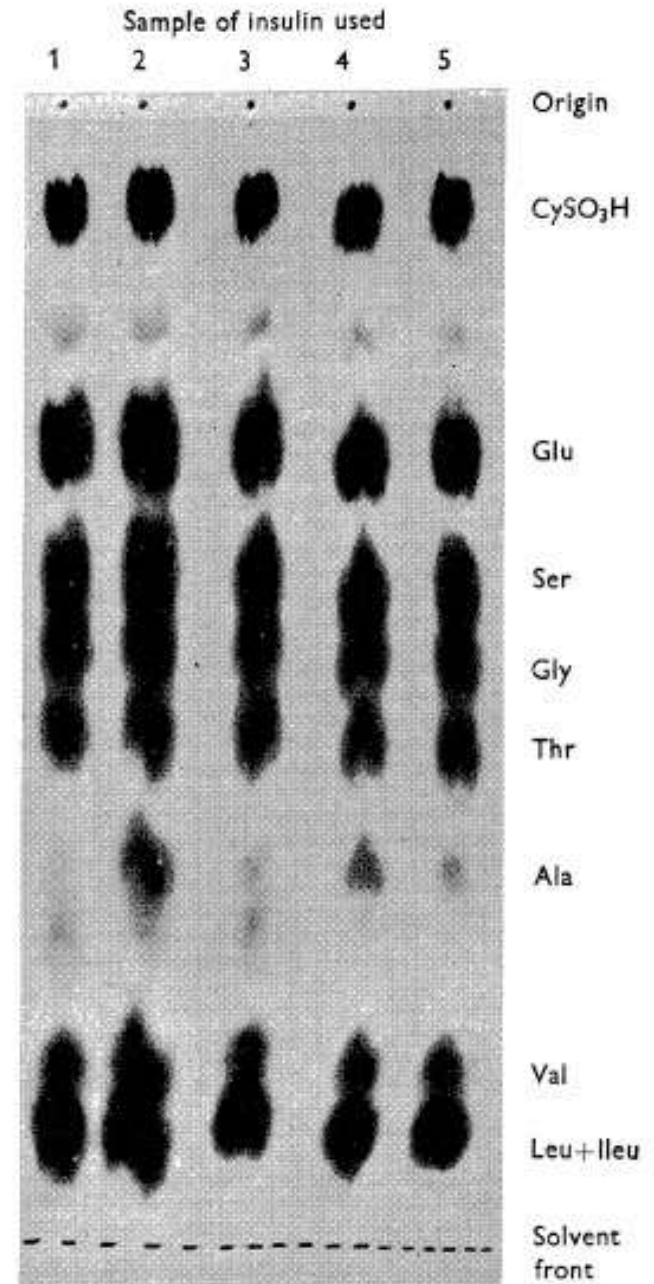
в 1958 году («за установление структур белков, особенно инсулина»)

В 1980 году («за фундаментальные исследования биохимических свойств нуклеиновых кислот, в особенности рекомбинантных ДНК») совместно с Уолтером Гилбертом и Полом Бергом.

Доказал специфическую первичную структуру белка и связь ее с биологической активностью.

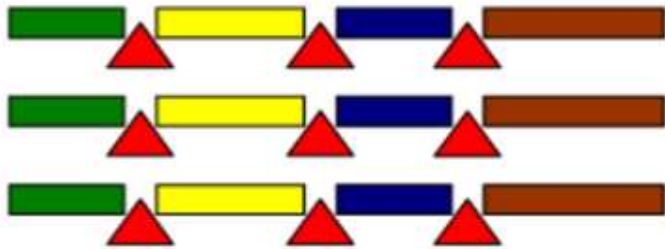
Сиквенс инсулина. Сэнгер.

Paper chromatogram of sample of insulin from one of Sanger's experiments. Credit: Laboratory of Molecular Biology.

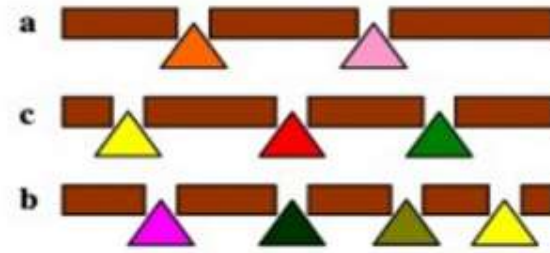


Сиквенс инсулина. Сэнгер.

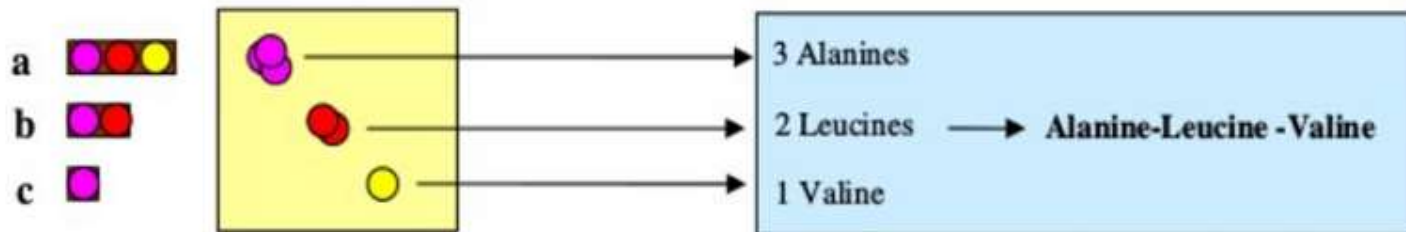
Sanger's degradation procedure for sequencing insulin



1. Various samples of the protein are broken into fragments by acids (when sequencing the final amino acids) or enzymes and acids (when sequencing the whole molecule)



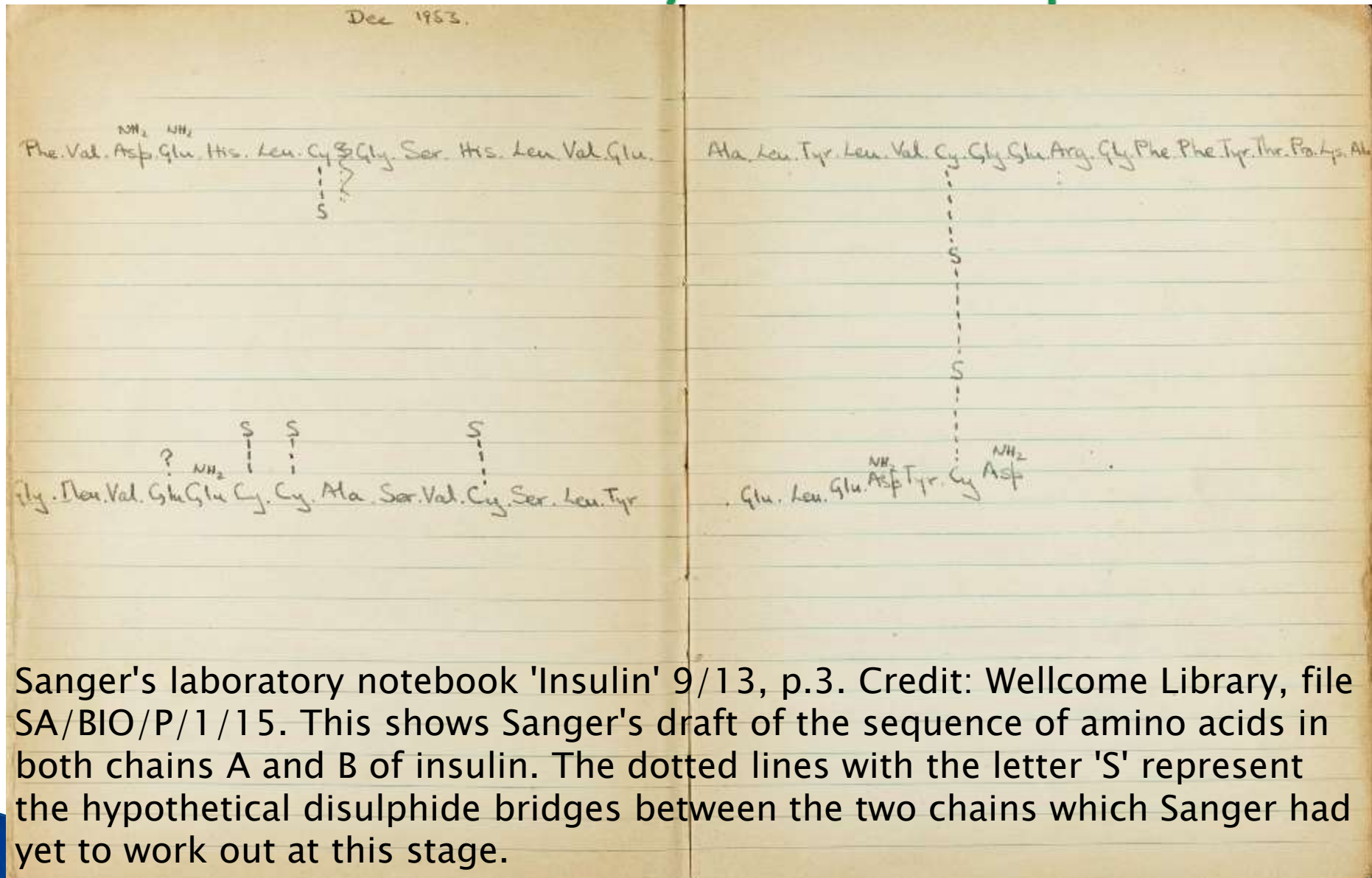
2. Each fragment is further broken down with different acids-enzymes to work out the overlapping sections



3. The overlapping fragments (a, b and c) are cut again and their constituent amino acids separated by paper chromatography

4. Based on the overlapping nature of the sub-fragments it is possible to work out the sequence of constituent amino acids

Сиквенс инсулина. Сэнгер.



Sanger's laboratory notebook 'Insulin' 9/13, p.3. Credit: Wellcome Library, file SA/BIO/P/1/15. This shows Sanger's draft of the sequence of amino acids in both chains A and B of insulin. The dotted lines with the letter 'S' represent the hypothetical disulphide bridges between the two chains which Sanger had yet to work out at this stage.

Сиквенс инсулина. Сэнгер.

Sanger celebrating his first Nobel Prize, October 1958. Credit: Department of Biochemistry, Cambridge University.

