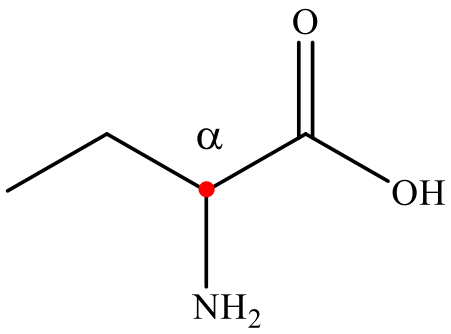
Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова

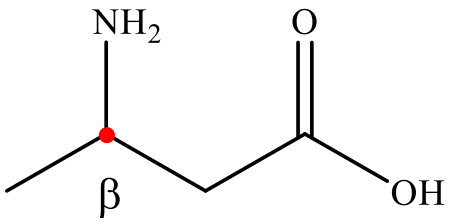
Кафедра общей и биоорганической химии

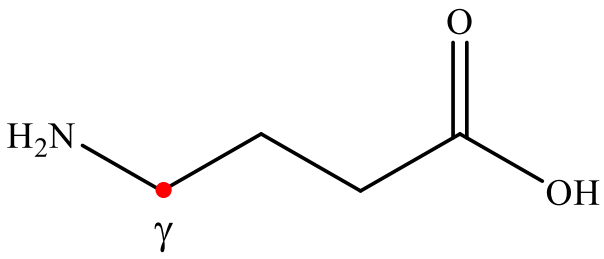
Аминокислоты, пептиды, белки в водных растворах. Аминокислотные и белковые буферные системы.

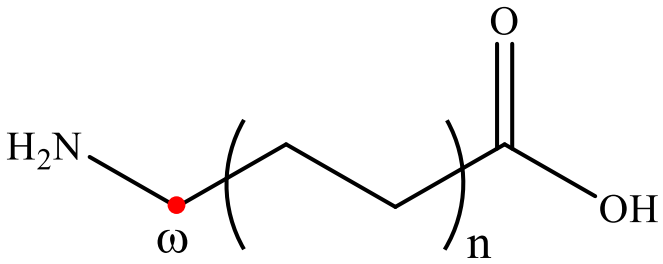
Классификации аминокислот

1. В зависимости от взаимного расположения амино- и карбоксильной групп: α-, β-, γ-, δ-, ε-, и ω- аминокислоты.









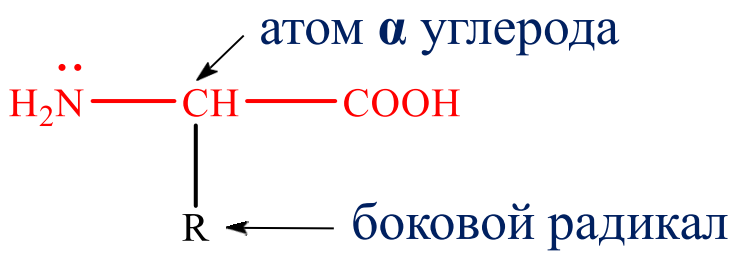
α-Аминокислоты

α-аминокислоты

структурные компоненты белков | **биорегуляторы** | **источник энергии**

α-Аминокислоты — органические гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно аминогруппу и карбоксильную группу при одном атома углерода.

общая формула →



Общий фрагмент всех α-аминокислот *(для глицина R = H)*

Природных — более 300.

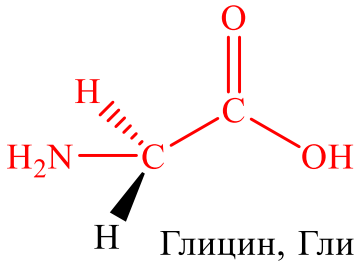
Протеиногенных — 21 α-аминокислота (включая одну иминокислоту — пролин).

2. По природе бокового радикала

Аминокислоты

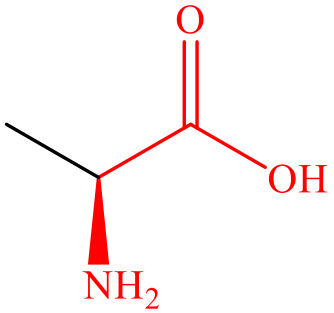
- **Неполярные (гидрофобные)**
- **Полярные (гидрофильные)**
  - **Ионогенные**
    - **Положительно-заряженные**
    - **Отрицательно-заряженные**
  - **Неионогенные**

В данной классификации ***глицин*** — исключение, так как он не имеет бокового радикала. Молекула сильно полярна и оптически неактивна.

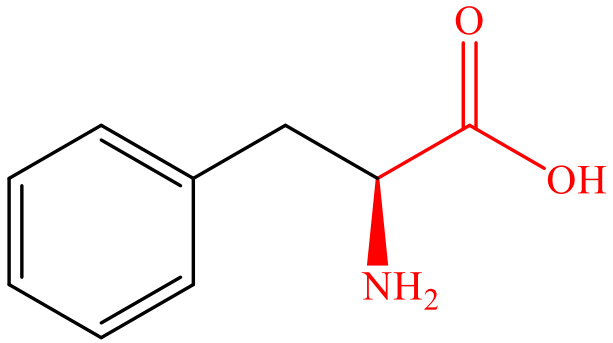


Глицин, Гли
Gly

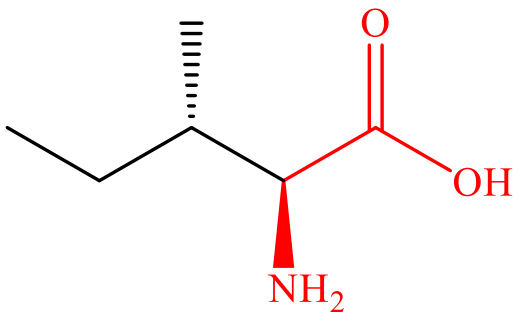
2.1 Аминокислоты с неполярными (гидрофобными) радикалами



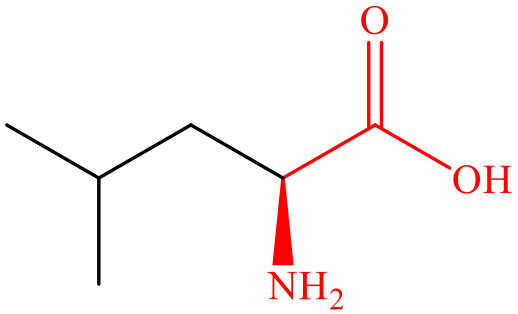
Аланин, Ала
Ala



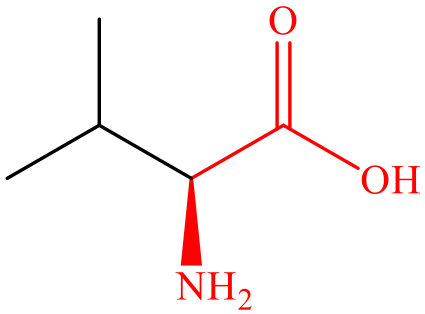
Фенилаланин, Фен
Phe



Изолейцин, Иле
Ile

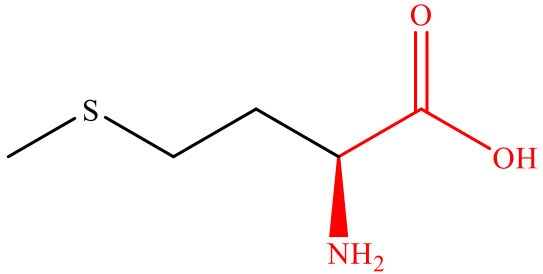


Лейцин, Лей
Leu

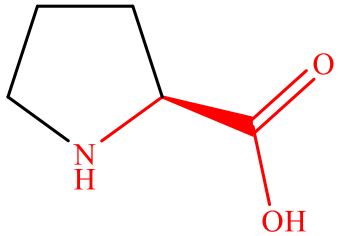


Валин, Вал
Val

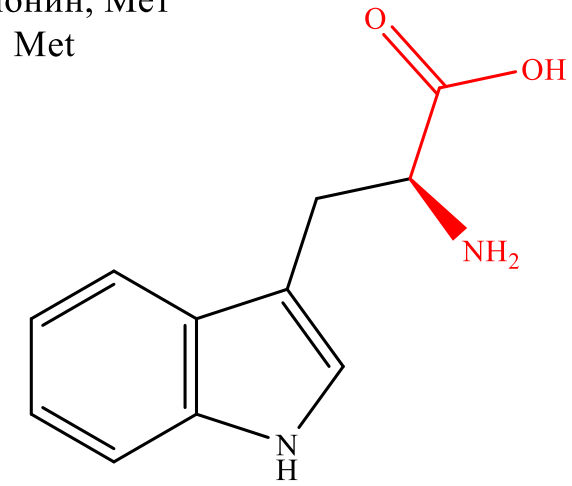
2.1 Аминокислоты с неполярными (гидрофобными) радикалами



Метионин, Мет
Met

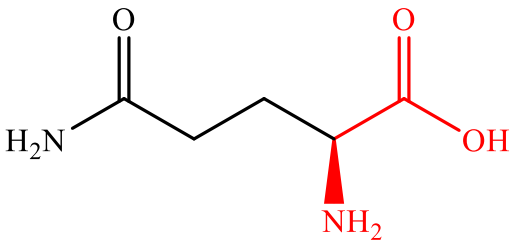


Пролин, Про
Pro

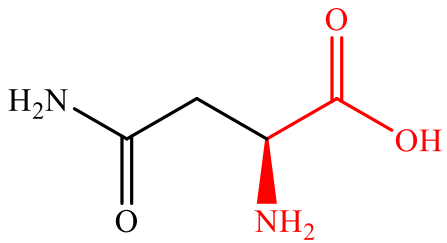


Триптофан, Три
Trp

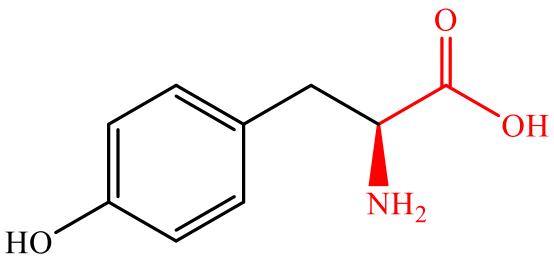
2.2 Аминокислоты с полярными неионогенными радикалами



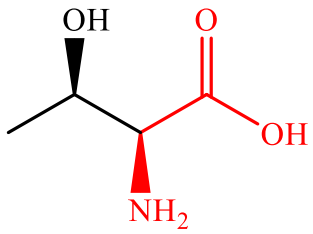
Глутамин, Глн
Gln



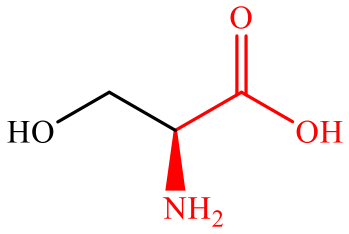
Аспарагин, Асн
Asn



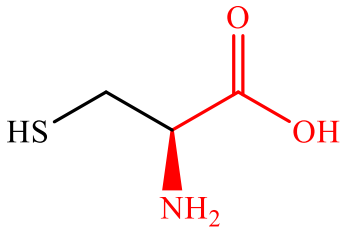
Тирозин, Тир
Tyr



Треонин, Тре
Thr

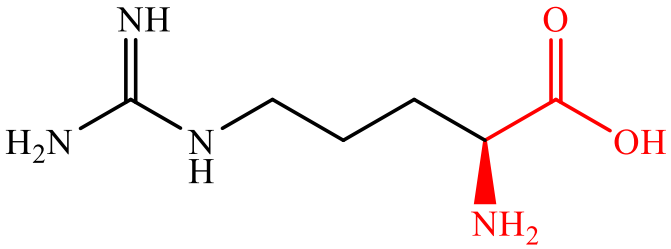


Серин, Сер
Ser

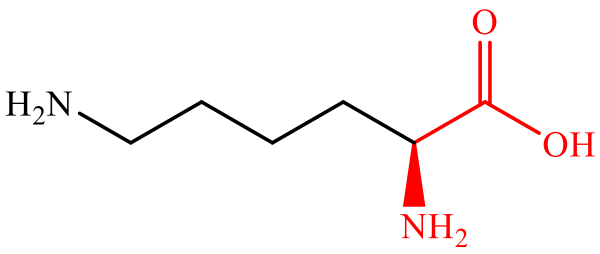


Цистеин, Цис
Cys

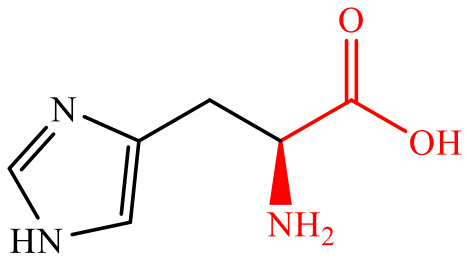
2.3. Аминокислоты с полярными ионогенными радикалами
2.3.1. Положительно заряженный в растворе радикал



Аргинин, Арг
Arg

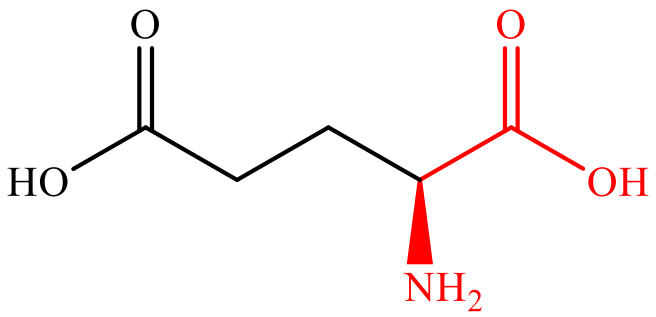


Лизин, Лиз
Lys

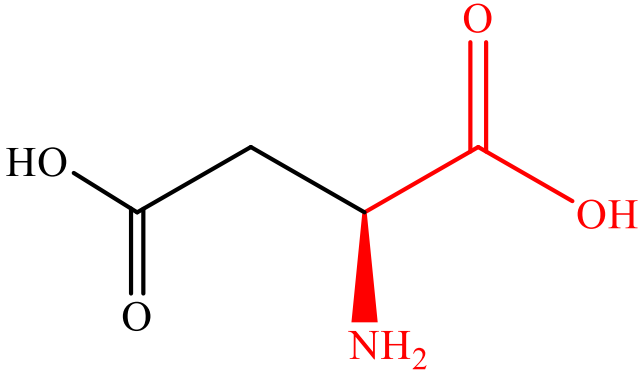


Гистидин, Гис
His

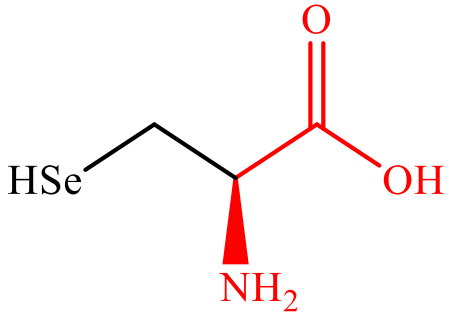
2.3 Аминокислоты с полярными ионогенными радикалами
2.3.2 Отрицательно заряженный в растворе радикал



Глутаминовая кислота, Глу
Glu



Аспарагиновая кислота, Асп
Asp



Селеноцистеин, Сец
Sec

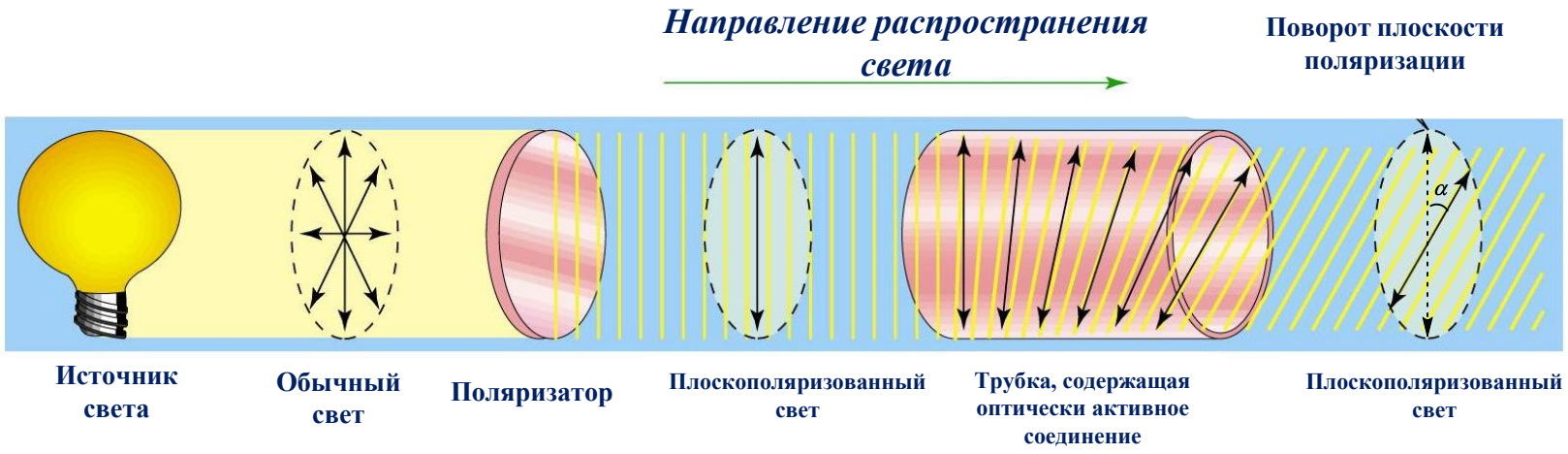
3. По биологической роли (заменимые и незаменимые)

— заменимые аминокислоты (**Ала, Асп, Асн, Глу, Глн, Про, Гли, Сер**) — синтезируются в организме;
— незаменимые аминокислоты (**Вал, Лей, Иле, Мет, Фен, Три, Лиз, Сец**) — должны поступать с пищей;
— частично заменимые аминокислоты (**Гис, Арг**) — синтезируются медленно и в недостаточном количестве, особенно в детском возрасте;
— условно заменимые аминокислоты (**Цис, Тир**) — синтезируются из незаменимых аминокислот **Мет** и **Фен**, соответственно.

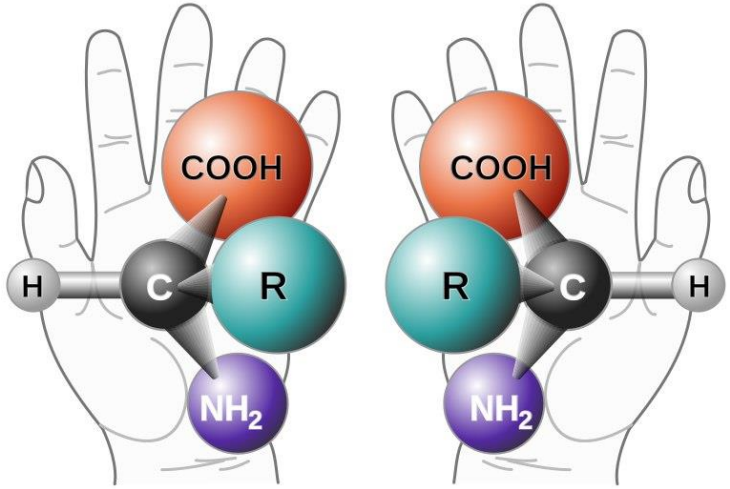
Физические свойства аминокислот

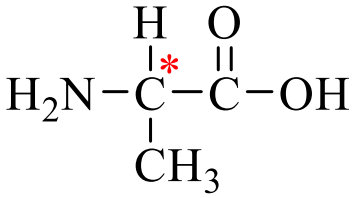
- Белые кристаллические вещества;
- высокие температуры плавления (более 200 °С);
- растворимы в воде;
- α-АК (кроме глицина) являются хиральными, *оптически активны*.

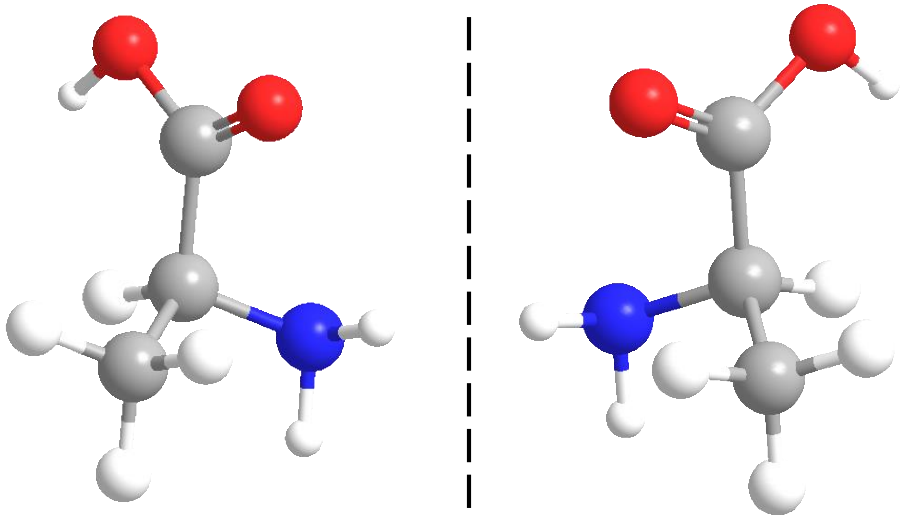
Оптическая активность — способность раствора или кристалла хиральной молекулы вращать плоскость плоскополяризованного света на определенный угол α.



Хиральными являются молекулы, содержащие асимметрический атом углерода (хиральный центр).







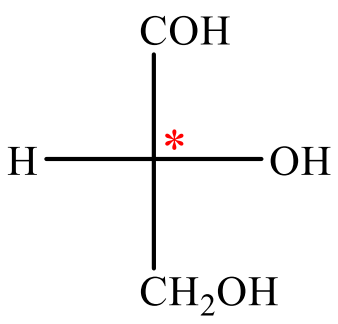
Стереоизомерные формы отличающиеся конфигурацией асимметрического атома углерода.

D-аланин

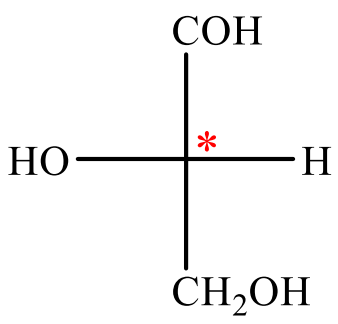
L-аланин

Проекции Фишера

Конфигурационный стандарт — глицериновый альдегид.



D-глицеральдегид



L-глицеральдегид

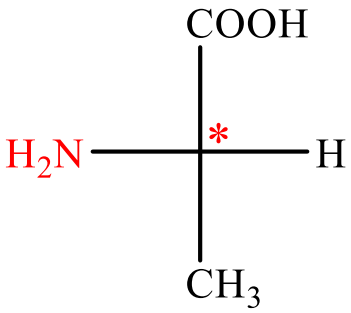
Энантиомеры — это стереоизомеры, молекулы которых относятся друг к другу как предмет и несовместимое с ним зеркальное отображение (оптические изомеры, которые отличаются оптической конфигурацией всех асимметрических атомов углерода).

Правила построения проекций Фишера:

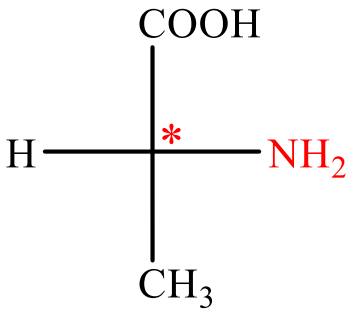
1. Асимметрические атомы углерода представлены в виде пересечения линий связи;
2. Углеводородный скелет располагается вертикально;
3. Нумерация атомов углерода производится сверху вниз от главной функциональной группы;
4. Расположение заместителей, связанных с асимметрическим атомом углерода, обусловлено природой изомера:

— у D-аминокислот NH_2-группа расположена справа (*как в D-глицериновом альдегиде*);

— у L-аминокислот NH_2-группа расположена слева (*как в L-глицериновом альдегиде*).

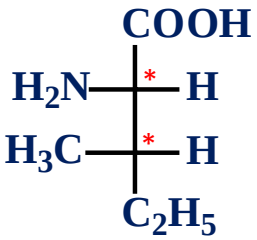


L-аланин

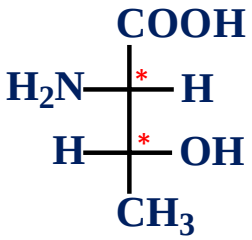


D-аланин

Примеры α-аминокислот с двумя центрами хиральности



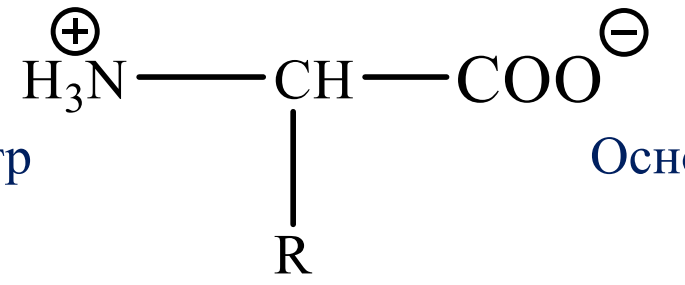
L-изолейцин



L-треонин

Амфотерность α-аминокислот

Нейтральные α-АК в водных растворах при pH ≈ 7 и в кристаллическом состоянии существуют в виде цвиттер-ионов:



Кислотный центр

Основный центр

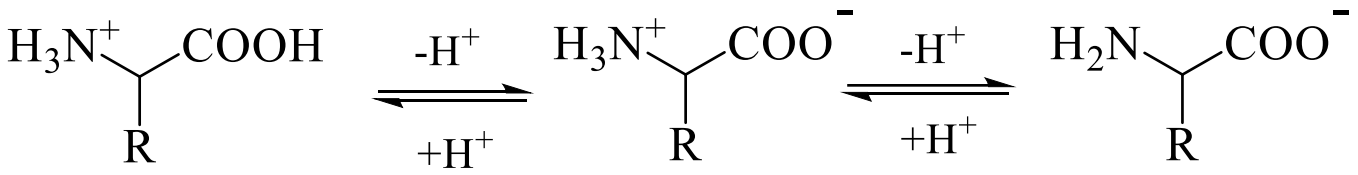
Цвиттер-ион, внутренная соль - биполярный ион

Задание.

Напишите уравнения реакций, характеризующих кислотно-основные свойства валина.

Аминокислоты в водных растворах

1. Нейтральные аминокислоты (Ала, Вал, Лей, Иле, Сер, Тре, Асн, Глн, Мет, Фен, Про, Три) и Гли в растворах существуют в трёх формах.



катионная форма **цвиттер-ион** **анионная форма**

R — боковые радикалы соответствующих нейтральных аминокислот.

$$\mathbf{p}I = \text{ИЭТ} = \frac{\mathbf{p}Ka_1 + \mathbf{p}Ka_2}{2}$$

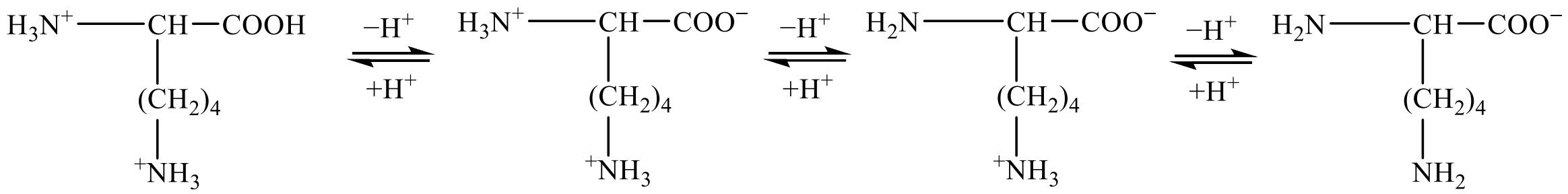
Изоэлектрическая точка (ИЭТ) – **значение pH (p*I*), при котором амфолит находится в изоэлектрическом состоянии,** то есть при котором концентрация биполярных ионов максимальна , а концентрации катионной и анионной форм минимальны и равны друг другу.

Аминокислоты	pK_a			pI
	-COOH	$-NH_3^+$	Ионогенных групп в боковом фрагменте	
Нейтральные				
Аланин	2,3	9,7		6,0
Аспарагин	2,0	8,8		5,4
Валин	2,3	9,6		6,0
Глицин	2,3	9,6		6,0
Глутамин	2,2	9,1		5,7
Изолейцин	2,4	9,7		6,1
Лейцин	2,4	9,6		6,0
Метионин	2,3	9,2		5,8
Пролин	2,0	10,6		6,3
Селеноцистеин	2,5	9,5	5,2	3,9
Серин	2,2	9,2		5,7
Тирозин	2,2	9,1	10,1	5,7
Треонин	2,6	10,4		5,6
Триптофан	2,4	9,4		5,9
Фенилаланин	1,8	9,1		5,5
Цистеин	1,7	10,8	8,3	5,0
Кислые				
Аспарагиновая	2,1	9,8	3,9	3,0
Глутаминовая	2,2	9,7	4,3	3,2
Осно́вные				
Аргинин	2,2	9,0	12,5	10,8
Гистидин	1,8	9,2	6,0	7,6
Лизин	2,2	9,0	10,4	9,8

Задание.

Напишите формы аланина при различных pH.

2. Основные аминокислоты :



дикатион	катион	цвиттер-ион	анион
Лиз$^{2+}$	**Лиз$^{+}$**	**Лиз$^{\pm}$**	**Лиз$^{-}$**
pH << p*I*	**pH < p*I***	**pH = p*I* = 9,8**	**pH > p*I***
pK_{-COOH} = 2,2	**p$K_{—^+NH_3}$ = 9,0**	**p$K_{—^+NH_3}$ = 10,45**	

Основные свойства АК преобладают, среда водного раствора слабощелочная pI >7 (p*I* в щелочной среде)

Задание

Напишите формы аргинина в водном растворе при различных значениях pH.

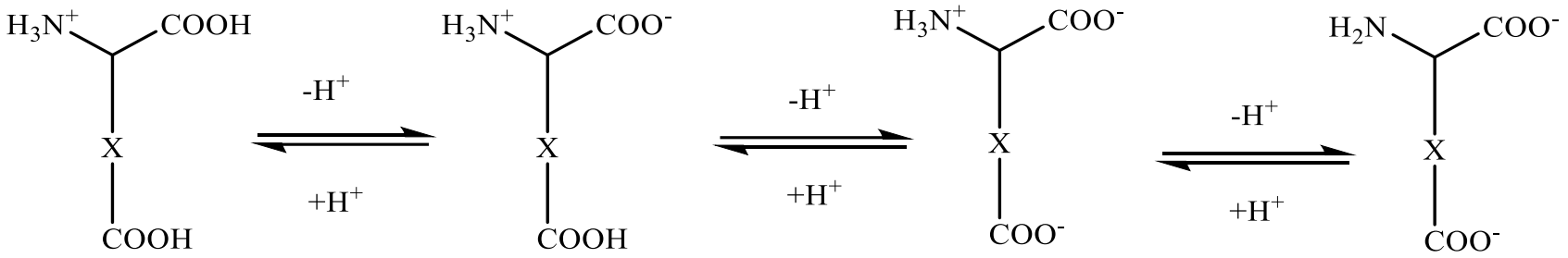
Задание:

Напишите формы гистидина в водном растворе

при различных значениях pH.

Кислые аминокислоты

Ионные формы глутаминовой и аспарагиновой кислот при разных значениях pH раствора



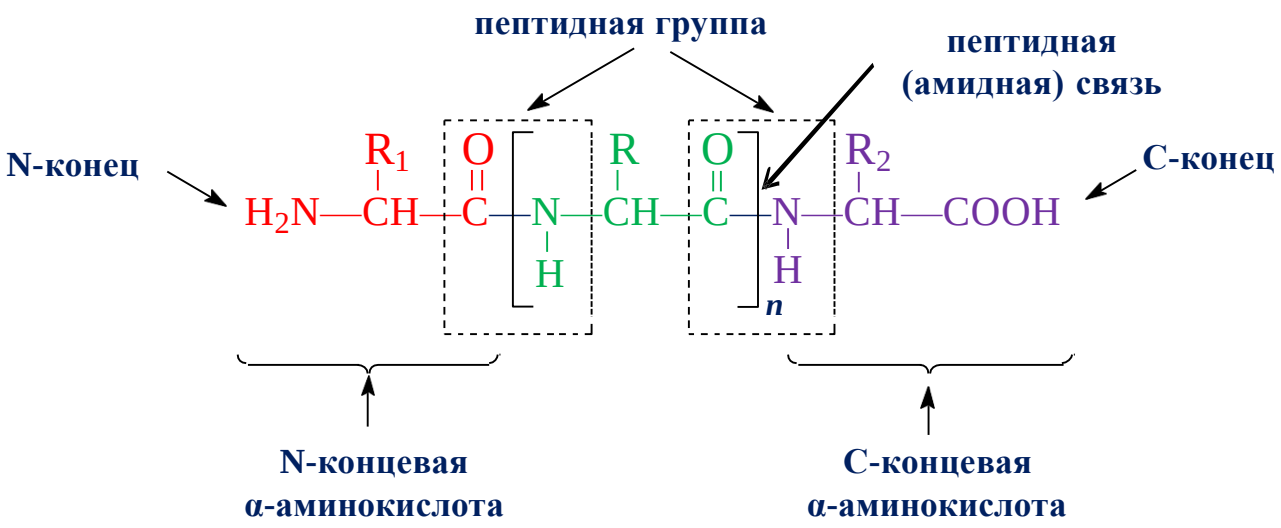
X = для аспарагиновой кислоты — $-CH_2-$, для глутаминовой кислоты $-CH_2-CH_2-$

	катион	цвиттер-ион	анион	дианион
	АК$^+$	**АК$^\pm$**	**АК$^-$**	**АК$^{2-}$**
	pH<p*I*	**pH=p*I* = 3,0 (Асп)** **pH=p*I* = 3,2 (Глу)**	**pH>p*I***	**pH>>p*I***
Асп	**pK_{-COOH} = 2,1**	**pK_{-COOH} = 3,9**	**p$K_{—^+NH_3}$ = 9,8**	
Глу	**pK_{-COOH} = 2,2**	**pK_{-COOH} = 4,3**	**p$K_{—^+NH_3}$ = 9,7**	

Кислотные свойства АК преобладают, среда водного раствора слабокислая pI < 7 (p*I* в кислой среде)

Пептиды

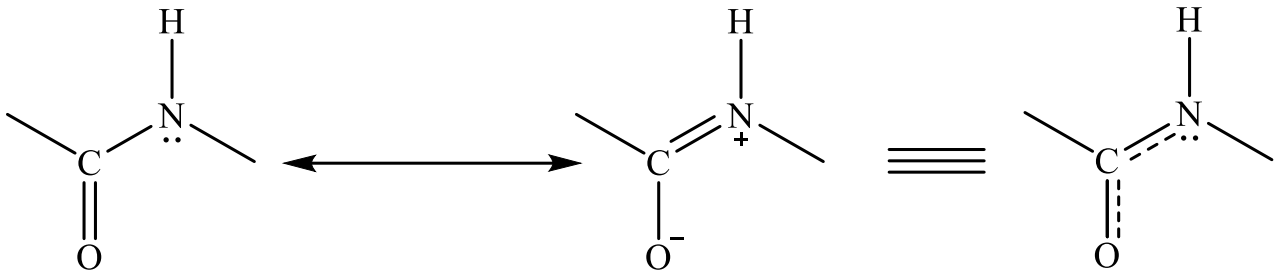
Пептиды **— вещества, в которых остатки аминокислот соединены друг с другом амидной (пептидной) связью за счёт карбоксильной группы одной и аминогруппы другой аминокислоты.**

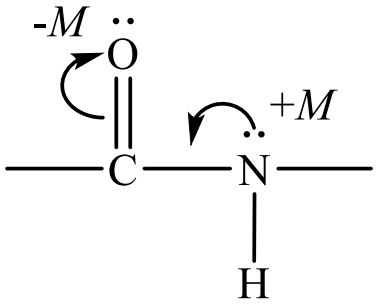


Пептиды и белки

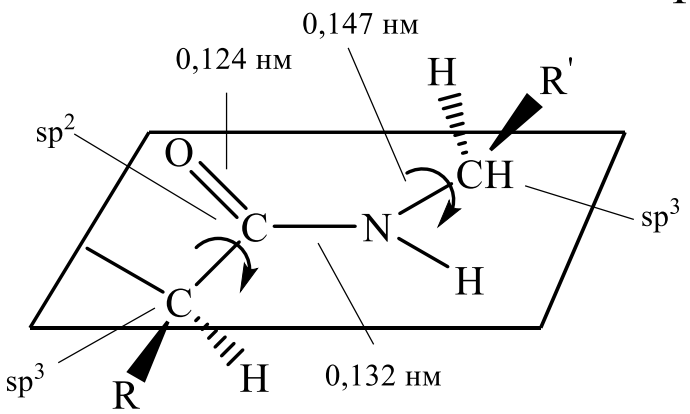
- **Пептиды — до 100 аминокислотных остатков (олигопептиды — до 10);**
- **белки — обычно более 100 аминокислотных остатков, образующих сложные пространственные структуры.**

Строение пептидной группы

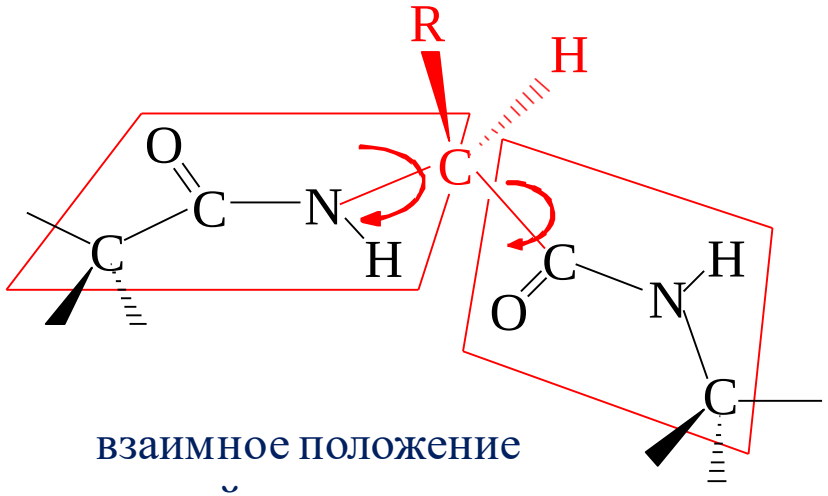




+*M* и –*M* — эффекты
-NH- и -C=O групп



плоскостное расположение пептидной группы –CONH- и α-углеродных атомов аминокислотных остатков



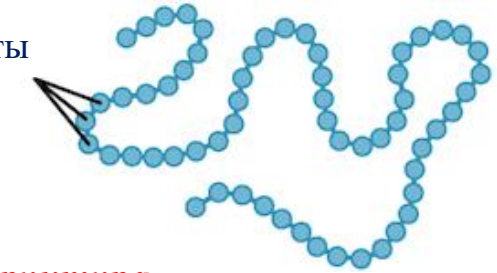
взаимное положение плоскостей пептидных групп

Строение пептидов и белков

Уровни организации пептидов и белков

Первичная структура.

Полимерная цепь, содержащая аминокислотные остатки в определённой последовательности, связанные между собой пептидными связями (прочными ковалентными связями).



Вторичная структура.

Пространственная организация отдельных участков полипептидной цепи, стабилизированная водородными связями (C)=O···H–(N) между пептидными группами.

Третичная структура.

Пространственная организация полипептидной цепи в целом за счёт внутримолекулярного взаимодействия боковых радикалов аминокислот (водородные и дисульфидные связи, ионные и гидрофобные взаимодействия).

Четвертичная структура.

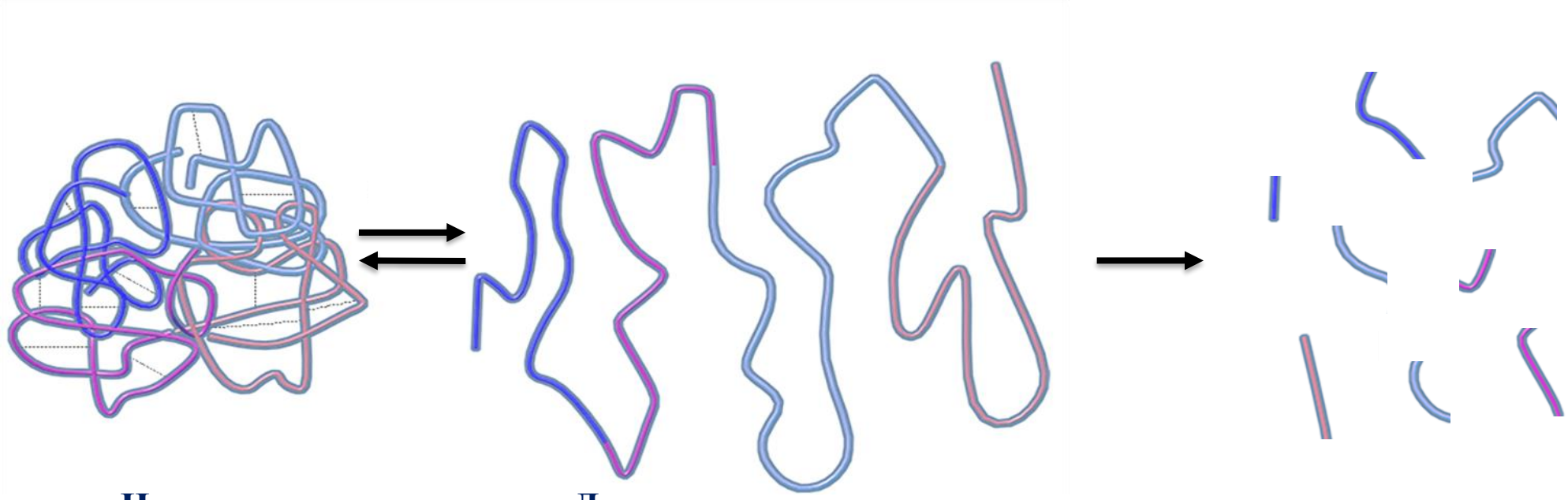
Пространственная организация нескольких полипептидных цепей при образовании белковых комплексов.

В сумме вторичная, третичная и (если она есть) четвертичная структуры определяют *конформацию* белка.

Денатурация и деструкция белка

Денатурация — нарушение пространственной организации белка (изменение нативной конформации) **с сохранением первичной структуры**. Денатурация происходит под влиянием ***температуры, механического воздействия, облучения, действия кислот, щелочей и сильных окислителей***.

Деструкция — разрушение полипептидной цепи (**разрушение первичной структуры**) с образованием пептидов с малой молекулярной массой и аминокислот.



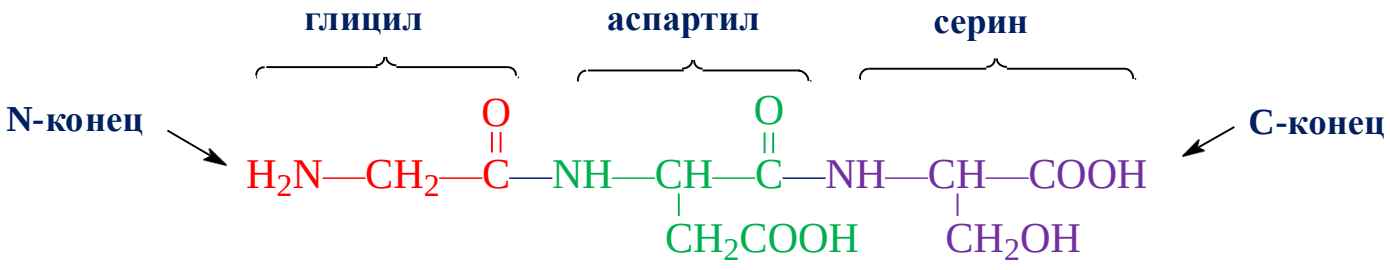
Нативное состояние

Денатурированное состояние

Строение и номенклатура пептидов

Трипептид

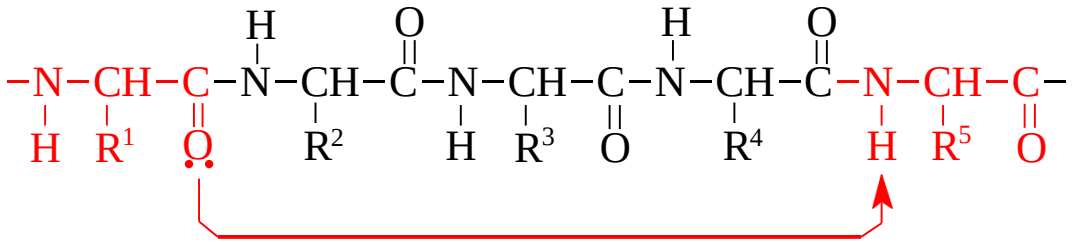
Первичная структура — линейная последовательность остатков аминокислот



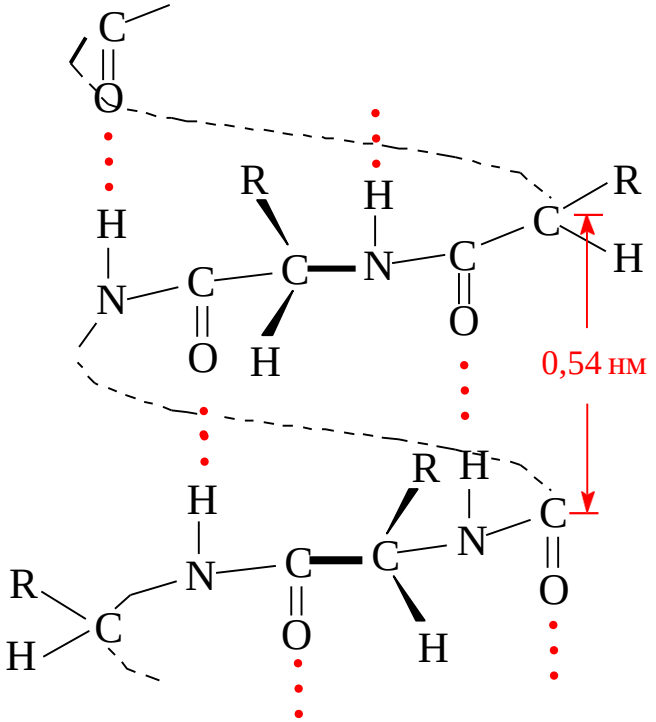
глициласпартилсерин
(Гли-Асп-Сер или Н-Гли-Асп-Сер-ОН)

Строение полипептидной цепи

Вторичная структура (α-спираль)

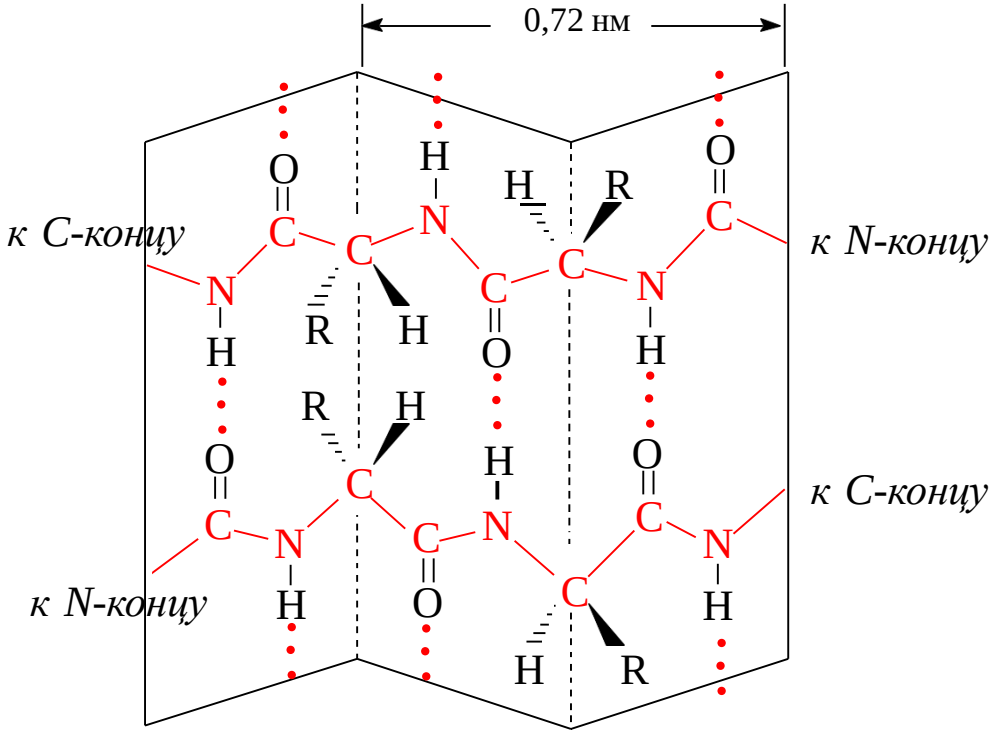


α-Спираль



на один виток — 3.6 аминокислотных остатка, Н-связи C=O···H—N (1—5) закрепляют конформацию

β-Структура (складчатый лист)



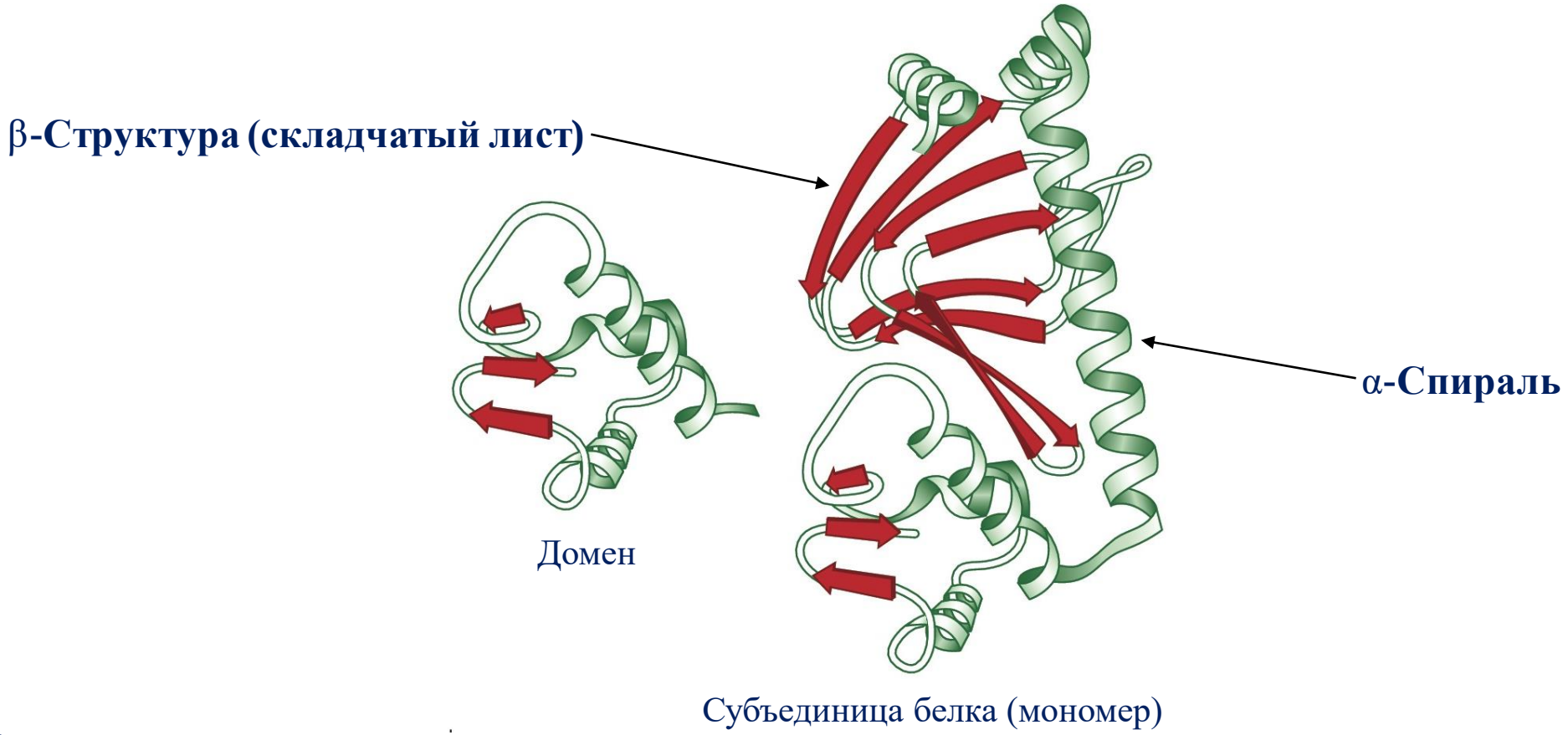
Н-Связи между пептидными группами различных цепей

Задание:
Написать строение тетрапептида Тир-Лиз-Глу-Про

Уровни структурной организации белков

Третичная структура

Конформация всей макромолекулы, т. е. взаимное расположение в пространстве элементов одиночной полипептидной цепи, обусловленное взаимодействием элементов вторичной структуры как близлежащих, так и отдаленных аминокислотных остатков.

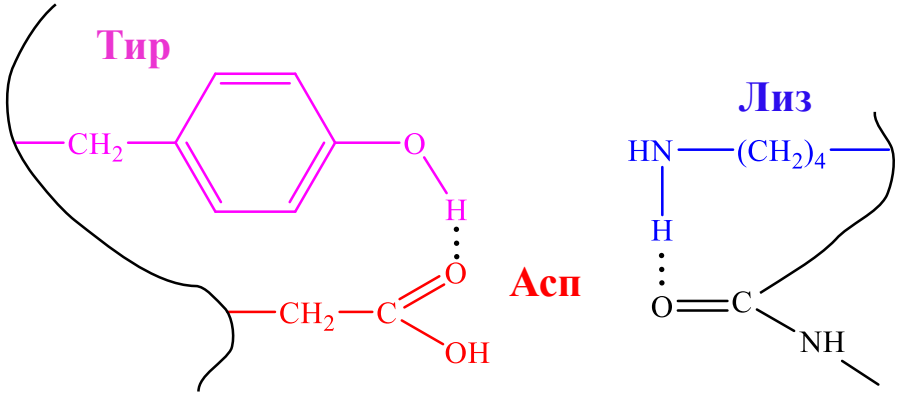


Уровни структурной организации белков

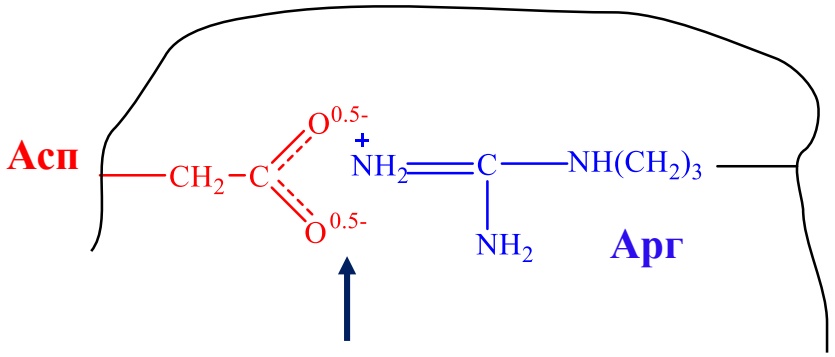
Третичная структура

Типы связей, стабилизирующих третичную структуру

Водородные связи между остатками тирозина и аспарагиновой кислоты

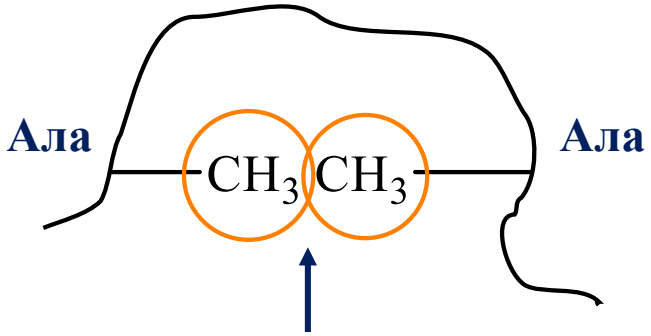


Водородные связи между остатком лизина и кислородом пептидной группы



Ионное взаимодействие между ионногенными группами боковых радикалов

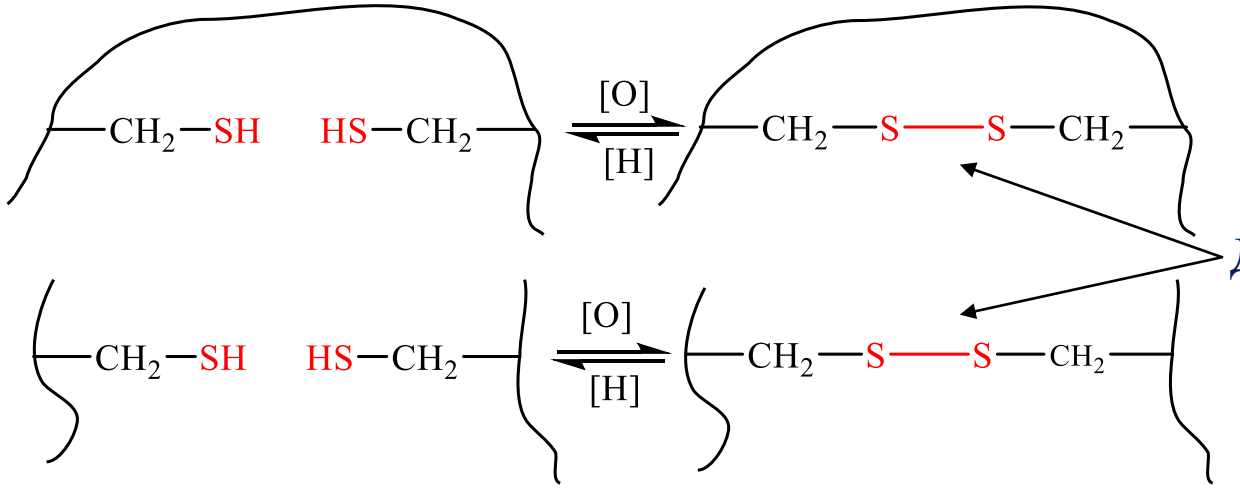
Уровни структурной организации белков



Гидрофобное взаимодействие между неполярными радикалами на примере двух остатков Ала

Полипептидная цепь

Две полипептидные цепи

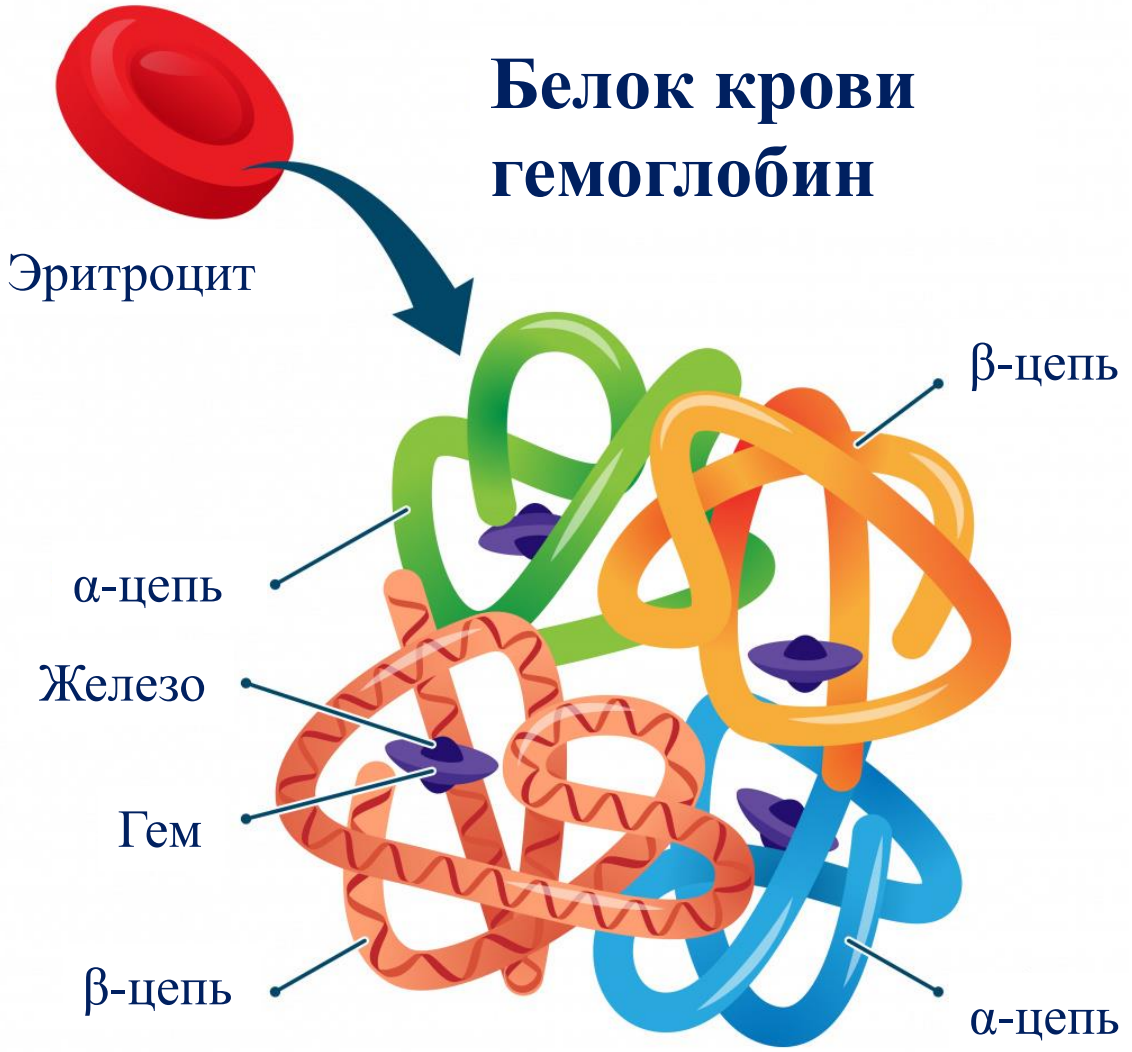


Дисульфидные связи

Уровни структурной организации белков

Четвертичная структура

Макромолекулы, образующие трехмерные ассоциаты, состоящие из нескольких полипептидных цепей, которые не связаны между собой ковалентными связями. Каждую отдельную цепь такого ассоциата называют субъединицей. Четвертичная структура формируется за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий между субъединицами.



Зарядовые состояния белка в зависимости от pH раствора

— пептиды и белки являются **полиамфолитами**

— в водных растворах существуют в поликатионной, полианионной или цвиттер-ионной формах, **заряд и концентрация которых зависит от pH и количества кислотных и основных групп в молекуле.**

— эти свойства лежат в основе **разделения** белковых смесей **методами электрофореза и ионообменной хроматографии.**

pH р-ра	Суммарный заряд белка	Направление движения при электрофорезе	Ионит
pH = p*I*	0 цвиттер-ион	электрофоретически неподвижен	не адсорбируется ионитом
pH < p*I*	x^+ поликатион	движется к катоду	адсорбируется катионитом
pH > p*I*	y^- полианион	движется к аноду	адсорбируется анионитом

Классификация белков

По α-АК составу пептиды и белки классифицируют на три класса:

- нейтральные – количество кислотных и основных центров одинаково p*I*≈7;
- кислые – количество кислотных центров больше количества основных p*I*<7;
- основные – количество основных центров больше количества кислотных p*I*>7,

где **p*I* – изоэлектрическая точка – значение pH** раствора пептида или белка, при котором пептид или белок находится в изоэлектрическом состоянии (электронейтрален).

Задание:

1) напишите схему, отражающую строение дипептида Лиз-Про в водном растворе при pH<7
2) укажите, в какой среде находится ИЭТ этого дипептида, какова реакция среды его водного раствора.

Задание:

Приведите ионную форму дипептида Мет-Глн (Met–Gln) в изоэлектрическом состоянии. Определите характер среды, в которой концентрация такой формы максимальна.

Аминокислотные и белковые буферные системы

— Глициновая буферная система

1. pH раствора = p*I* глицина

глицин преимущественно в форме цвиттер-иона $^{+}NH_3\text{-}CH_2\text{-}COO^{-}$

Буферное действие практически отсутствует.

2. pH раствора < p*I* глицина

$$^{+}NH_3CH_2COOH \rightleftharpoons {}^{+}NH_3CH_2COO^{-} + H^{+}$$

сопряжённая кислота

$^{+}NH_3CH_2COO^{-}$

сопряжённое основание

$$K_{дис} = \frac{[Gly^{\pm}]\cdot[H^{+}]}{[Gly^{+}]} \qquad pH = pK_{-COOH} + \lg\frac{[Gly^{\pm}]}{[Gly^{+}]}$$

Максимальная буферная емкость при pH = pK_{-COOH} = 2,35 $[Gly^{+}]=[Gly^{\pm}]$

3. pH раствора > p*I* глицина

$$^{+}NH_3CH_2COO^{-} \rightleftharpoons NH_2CH_2COO^{-} + H^{+}$$

сопряжённая кислота

$NH_2CH_2COO^{-}$

сопряжённое основание

$$K_{дис} = \frac{[Gly^{-}]\cdot[H^{+}]}{[Gly^{\pm}]}$$

$$pH = pK_{-^{+}NH_3} + \lg\frac{[Gly^{-}]}{[Gly^{\pm}]}$$

Максимальная буферная емкость при pH= $pK_{-^{+}NH_3}$ = 9,78 $[Gly^{-}]=[Gly^{\pm}]$

Белковая буферная система

— pH раствора < p*I* белка

$$\mathbf{Prot^{+}} \rightleftharpoons \mathbf{Prot^{\pm} + H^{+}}$$

сопряженная кислота — сопряженное основание

— pH раствора > p*I* белка

$$\mathbf{Prot^{\pm}} \rightleftharpoons \mathbf{Prot^{-} + H^{+}}$$

сопряженная кислота — сопряженное основание

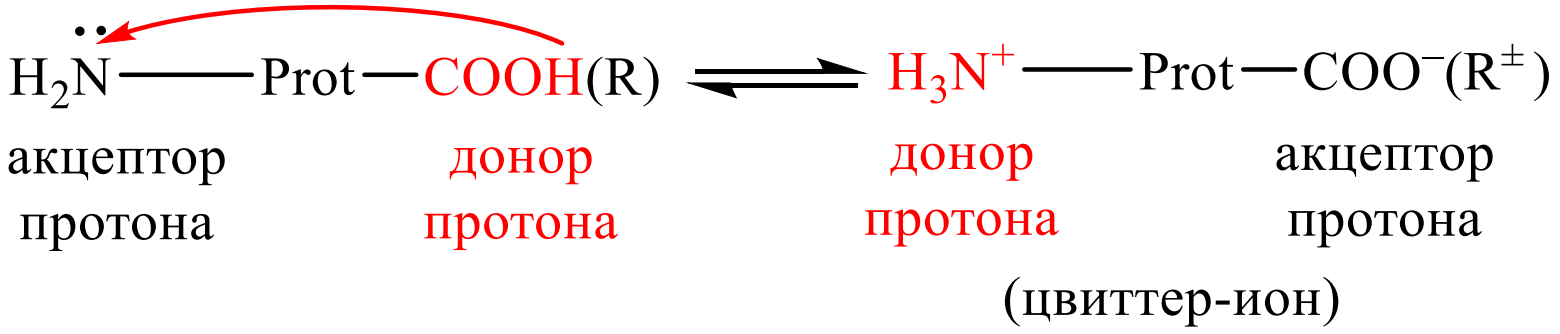
Белковая буферная система

$:NH_2—Prot—COONa$ акцептор протона

$:NH_2—Prot—COOH$ донор протона

Prot — макромолекулярный остаток белка

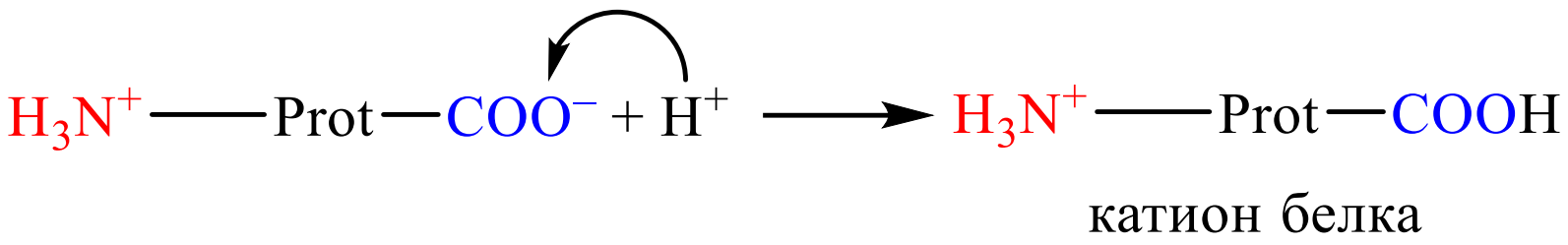
В водных растворах:



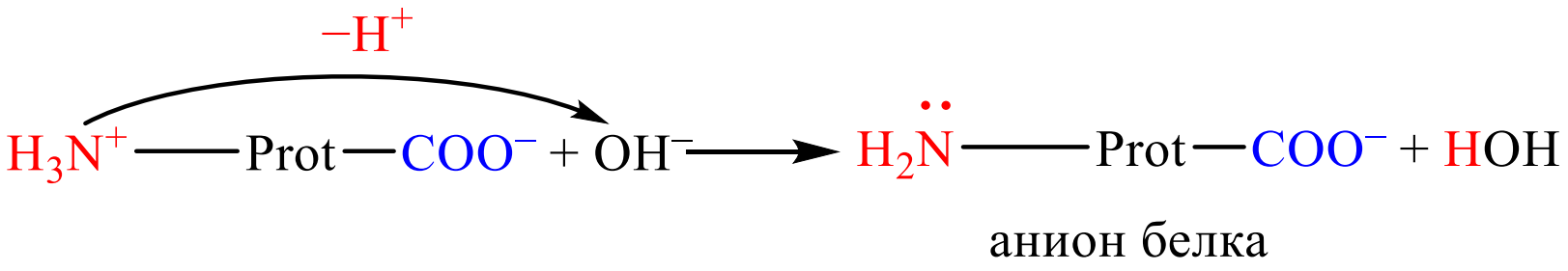
p*I* (ИЭТ) — изоэлектрическая точка белка — значение pH, при котором молекула белка электронейтральна.

Механизм действия

При добавлении сильной кислоты:



При добавлении щёлочи:



Механизм действия

Белковая буферная система поддерживает постоянство pH в клетках и тканях, причём:

катионная (R^+) — в средах с pH < 6;

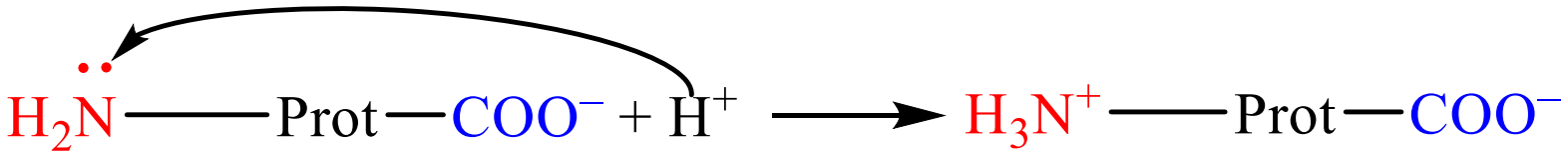
анионная (R^-) — в средах с pH > 6

В крови работает ***анионная*** белковая буферная система

Попадающие на кожу человека небольшие количества кислоты или щёлочи довольно быстро нейтрализуются белковой буферной системой.

Механизм действия анионного белкового буфера

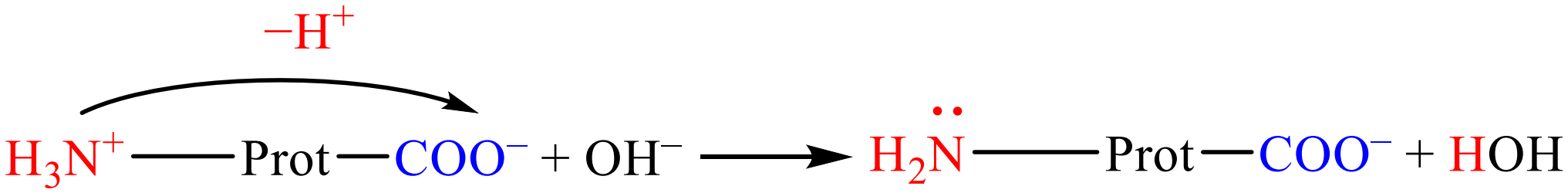
При добавлении сильной кислоты:



белок-основание

соль белка-основания
сопряжённая кислота

При добавлении щёлочи:



соль белка-основания
кислота

сопряжённое белок-основание

Гемоглобиновая буферная система

Гемоглобиновая

$\begin{cases} H–Hb\ (pK_a = 8{,}2) \\ K^+Hb^- \end{cases}$

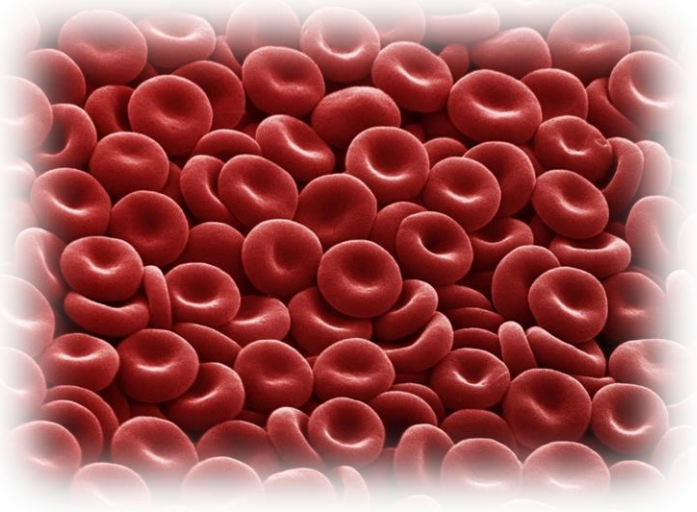
венозная кровь

pH = **7,32–7,36**

$\mathbf{B_щ > B_к}$

$HHb + OH^- \rightleftarrows H_2O + Hb^-$

$Hb^- + H^+ \rightleftarrows HHb$



Оксигемоглобиновая

$\begin{cases} HHbO_2\ (pK_a = 6{,}95) \\ K^+HbO_2^- \end{cases}$

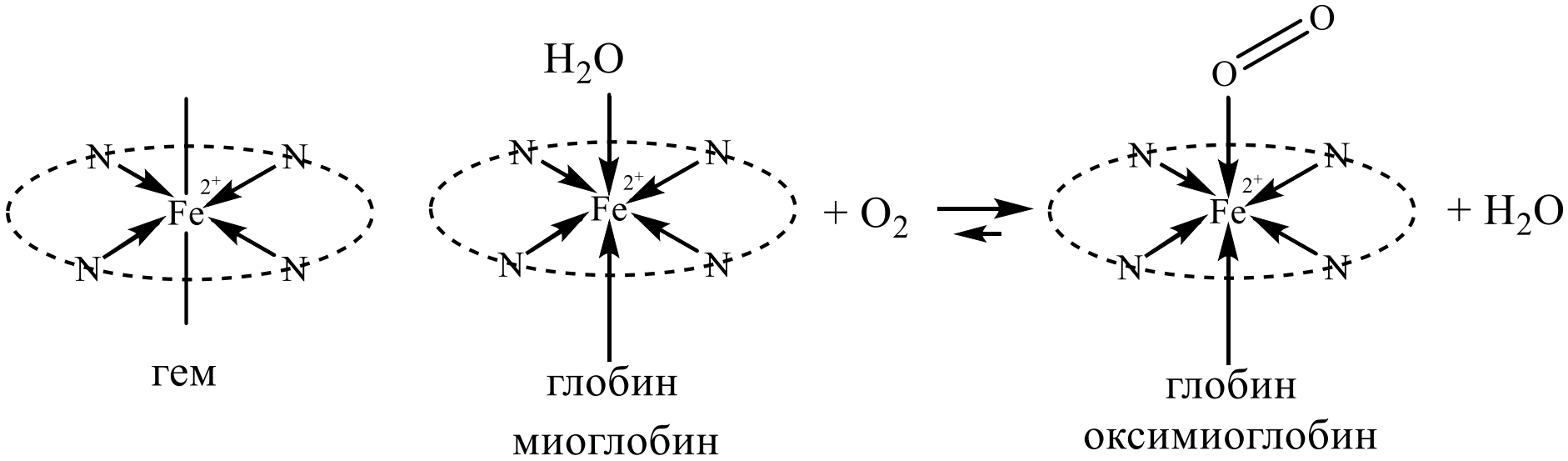
артериальная кровь

pH = **7,42–7,46**

$\mathbf{B_к > B_щ}$

$HHbO_2 + OH^- \rightleftarrows H_2O + HbO_2^-$

$HbO_2^- + H^+ \rightleftarrows HHbO_2 \rightleftarrows O_2 + HHb$



Кооперативное действие гидрокарбонатной и оксигемоглобиновой буферной систем

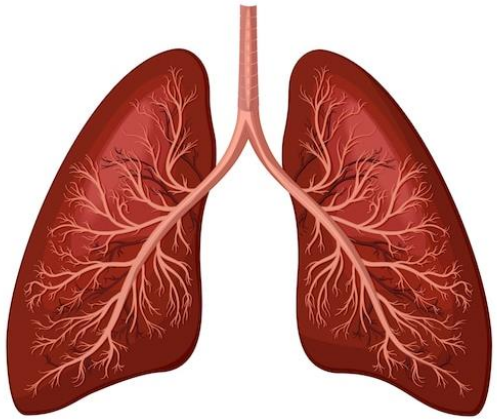
pK_a	6,1	6,95	8,2
	H_2CO_3	$HHbO_2$	HHb

Сила кислоты уменьшается →

HCO_3^-	HbO_2^-	Hb^-

Оксигемоглобин — более сильная кислота, чем гемоглобин, но слабее угольной кислоты!

Кооперативное действие гидрокарбонатной и оксигемоглобиновой буферной систем



В лёгких:

$HHb + O_2 \rightleftarrows HHbO_2$

(вдох)

Карбонангидраза

$HCO_3^- + HHbO_2 \rightarrow HbO_2^- + CO_2 + H_2O$

(выдох)

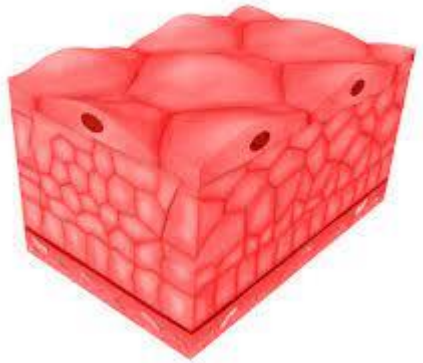
В тканях:

$HbO_2^- \rightarrow Hb^- + O_2$

Карбонангидраза

$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$

$H_2CO_3 + Hb^- \rightarrow HCO_3^- + HHb$



Алгоритм решения задач

1. Рассчитать pH раствора, в котором растворён белок или аминокислота.
2. Сравнить pH и p*I* АК и сделать заключение о формах АК, присутствующих в растворе.
3. Записать формулу буферного раствора, определить его тип.
4. Выбрать уравнение Гендерсона – Гассельбаха для буфера и произвести расчёт.

Задача

Рассчитайте соотношение концентраций форм глицина в 0,01М растворе соляной кислоты

$$pK_{\text{-COOH}}(\text{Гли}) = 2,35$$

$$pK_{\text{-NH}_3^+}(\text{Гли}) = 9,78$$

$$pI(\text{Гли}) = 6,1$$

$$t = 25°C$$

Задача

Рассчитайте соотношение концентраций ацетата натрия и уксусной кислоты в растворе, в котором глицин электрофоретически неподвижен.

pK(уксусной кислоты)=4,75

p$K_{\text{-COOH}}$(Гли)=2,35

p$K_{\text{-NH}_3^+}$(Гли)=6,1

t=25°C

Задача

Какая форма глицина преобладает в растворе аммиака, нейтрализованного соляной кислотой на 25%?

$K_{ионизации}(NH_3) = 1{,}8 \cdot 10^{-5}$

$pK_{-COOH}(Гли) = 2{,}35$

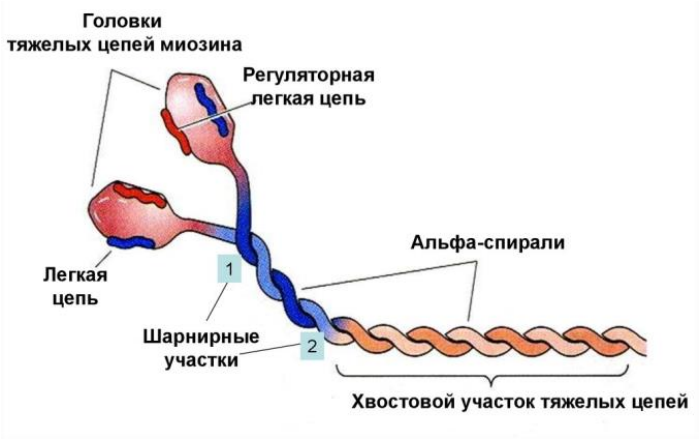
$pK_{-\overset{+}{N}H_3}(Гли) = 9{,}78$

$pI(Гли) = 6{,}1$

$t = 25\,^{\circ}C$

К какому электроду при электрофорезе будет двигаться белок миозин в растворе муравьиной кислоты, наполовину нейтрализованной гидроксидом калия?

$pI_{\text{миозина}} = 7{,}0.\ pK_{\text{диссоциации муравьиной кислоты}} = 3{,}75$



Миозин — фибриллярный белок, один из главных компонентов сократительных волокон мышц — миофибрилл.

Задача.

Имеются два раствора одного белка:

а) 0,001 М раствор аммиака;

б) раствор, содержащий 0,01 моль аммиака и 0,01 моль хлорида аммония.

Объясните, к каким электродам при электрофорезе будет двигаться молекула белка в этих растворах.

$pI_{белка}$ = 9,8. $K_{ионизации}(NH_3)=1,8\cdot10^{-5}$

Задача. Гистон поместили в 0,01 М раствор уксусной кислоты. Изменится ли направление движения этого белка при электрофорезе, если исходный раствор разбавить в 100 раз.

$pI_{\text{гистона}} = 8{,}5.\ pK_{\text{диссоциации уксусной кислоты}} = 4{,}75.$

Гистоны - это небольшие по молекулярной массе белки с высоким содержанием аминокислотных остатков лизина и аргинина, участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и в регуляции синтеза РНК и ДНК.

Задача.

Белок с pI = 3 поместили в 0.01 М раствор соляной кислоты. Изменится ли направление движения этого белка при электрофорезе, если разбавить раствор в 100 раз?

В какой последовательности будут выходить белки из хроматографической колонки, если пропустить через колонку с анионитом аммонийный буферный раствор (pH = 9,25) , содержащий смесь глобулинов крови: α-глобулин (p*I* 4,8), β-глобулин (p*I* 5,2), γ-глобулин (p*I* 6,4).