

Занятие 2. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ. СТРУКТУРА ПЕПТИДОВ

Мотивация: Знание химического строения аминокислот и их свойств необходимо для изучения химического состава и свойств белков.

Цель занятия: Изучить свойства аминокислот, образование пептидной связи, функции белков в организме.

Студент должен:

Знать	Уметь
1. Общую характеристику химического состава белков.	1. Объяснять классификацию, структуру, физико-химические свойства аминокислот.
2. Функции белков в организме.	2. Написать пептид, назвать его, указать его свойства.
3. Структуру и свойства аминокислот.	3. Доказать белковую природу вещества.
4. Принцип классификации аминокислот.	4. Провести анализ аминокислотного состава белка с помощью цветных реакций.
5. Принцип образования пептидной связи. Номенклатуру пептидов.	

Вопросы, изученные ранее и необходимые для данного занятия:

Вопросы	Где изучались
1. Классификация и номенклатура аминокислот.	Кафедра общей и биологической химии (курс химии)
2. Физико-химические свойства аминокислот.	Там же
3. Элементарный состав белков.	Там же

Вопросы к теоретической части занятия:

1. Принципы классификации аминокислот.
1. Структурные формулы протеиногенных аминокислот.
2. Физико-химические свойства аминокислот, роль их функциональных групп.
3. Изоэлектрическая точка аминокислот и пептидов.
4. Влияние изменения рН на заряд аминокислот.
5. Аминокислоты как лекарственные препараты.
6. Пептидная связь, реакция образования.
7. Свойства пептидной связи.
8. Влияние изменения рН на заряд и растворимость пептидов.
9. Биологическая роль пептидов. Пептиды, как лекарственные вещества

Задания для самоподготовки:

1. Зарисуйте схему

Классификация по полярности радикала

Неполярные (гидрофобные)



Характеристика аминокислот

Свойства аминокислот

Чем обусловлены

- Оптическая активность -----> асимметрический α-углеродный атом
- Амфотерность -----> amino- и карбоксильная группы
- Полярность -----> -ОН, -CONH₂ группы радикала
- Заряд -----> -NH₃⁺, -COO⁻ группы радикала
- Образование пептидной связи -----> α-NH₂, α-COOH группы

Функции белков

Каталитическая Резервная Транспортная Защитная
Сократительная Структурная Гормональная

Качественные реакции на белки

Биуретовая Нингидриновая Нитрования Фоля Адамкевича
↓ ↓ ↓ ↓ ↓
пептидная α-амино- ароматическое атом триптофан
связь кислоты кольцо серы

Что выявляет

2. Перепишите в протокол таблицу 1, дополнив ее названиями аминокислот (эмпирическими и рациональными).

Таблица 1. Классификация аминокислот

Неполярные (гидрофобные)		Полярные (гидрофильные)	
		Незаряженные	
		Отрицательно заряженные	
		Положительно заряженные	
Заменимые	Условно заменимые	Незаменимые	

3. Зарисуйте в протокол рис.1, дополнив его формулами катиона, аниона и цвиттер-иона.

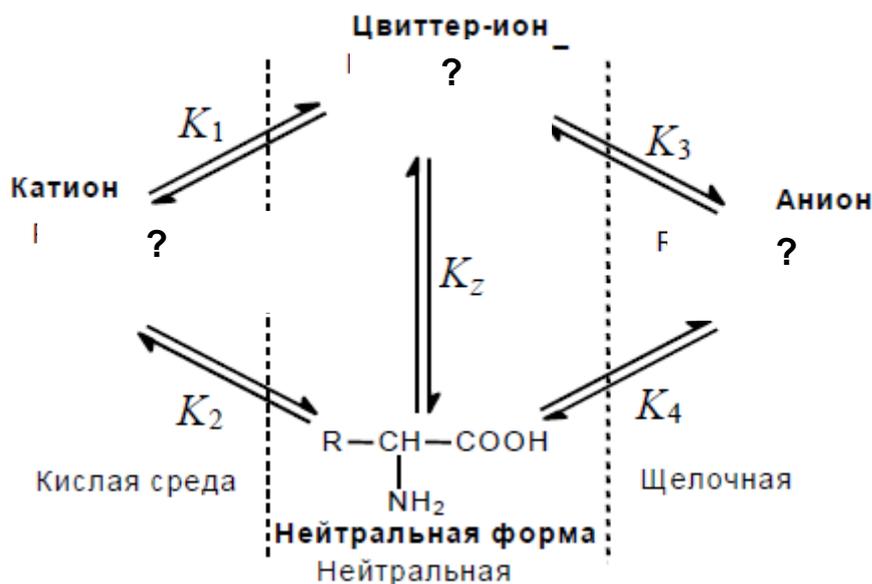


Рисунок 1. Кислотно-основное равновесие в растворе α -аминокислот

4. Выясните, что обозначает понятие «изоэлектрическая точка белка», как влияет химический состав белка на изоэлектрическую точку.
5. Решите ситуационные задачи:

Ситуационные задачи

- 1) Напишите структурные формулы нижеперечисленных соединений:
 - а) (Н)лей-тре-глу-три-арг-фен(ОН)
 - б) (Н)иле-ала-тир-фен-мет-асп-лиз(ОН)
 - в) Пептидов, образующихся при действии на каждое из указанных выше соединений трипсина и химотрипсина.
- 2) Смесь глицина, лизина и глутаминовой кислоты разделяли методом электрофореза на бумаге при рН 6,0. Изоэлектрическая точка глицина достигается при рН 5,97, лизина – при рН 9,74, глутаминовой кислоты – при рН 3,22. Какая из аминокислот:
 - а) Перемещалась к аноду?
 - б) Перемещалась к катоду?
 - в) Оставалась на старте?

Лабораторная работа 2. **Качественные (цветные) реакции на функциональные группы белков и аминокислот**

Присутствие веществ белковой природы в биологическом материале и лекарственных препаратах можно обнаружить с помощью качественных реакций на структурные компоненты белка и его функциональные группы. Все известные реакции выявления белков и пептидов можно разделить на три типа.

1. Реакция на пептидную группу, характерную для полипептидной цепи и нетипичную для прочих биологических веществ. Она специфична для белков и пептидов.

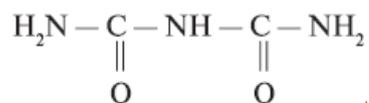
2. Реакции на концевые α -амино- или α -карбоксильные группы. Эти реакции дают также свободные α -аминокислоты и некоторые другие соединения.

3. Реакции на отдельные боковые радикалы или группы аминокислот, входящих в полипептиды. Эти реакции специфичны также и для свободных α -аминокислот и других веществ, содержащих соответствующую функциональную группу в молекуле.

Материалы для исследования: 1% раствор яичного белка, 1% раствор желатина.

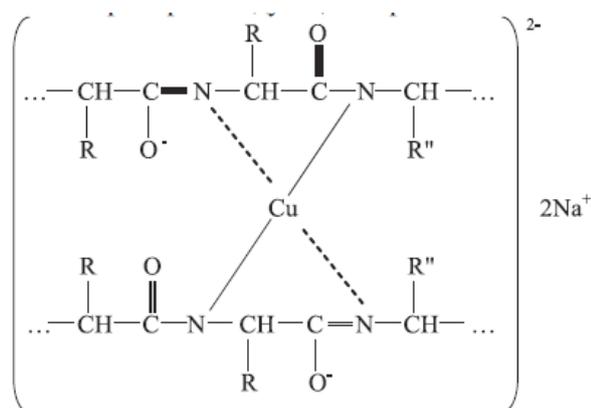
Работа 1. Биуретовая реакция на пептидную группу (реакция Пиотровского)

Принцип. В щелочной среде в присутствии солей меди пептидная группа белков образует окрашенное комплексное соединение. Биуретовая реакция положительна с белками и пептидами, имеющими не менее двух пептидных связей ($\text{H}_2\text{N} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CO} - \text{NH}_2$). С ди- и трипептидами она неустойчива. Биуретовую реакцию дают небелковые вещества, содержащие не менее двух пептидных групп, например, производное мочевины — биурет



давший название этой реакции, и некоторые другие.

В сильнощелочной среде пептидные группы полипептидов переходят в енольную форму, в которой и взаимодействуют с ионом Cu^{2+} , образуя окрашенный биуретовый комплекс примерно следующего строения:



На свободные аминокислоты биуретовая реакция обычно отрицательна. Исключение составляют гистидин, серин, треонин, аспарагин, которые при больших концентрациях в растворе могут образовывать окрашенный биуретовый комплекс с Cu^{2+} .

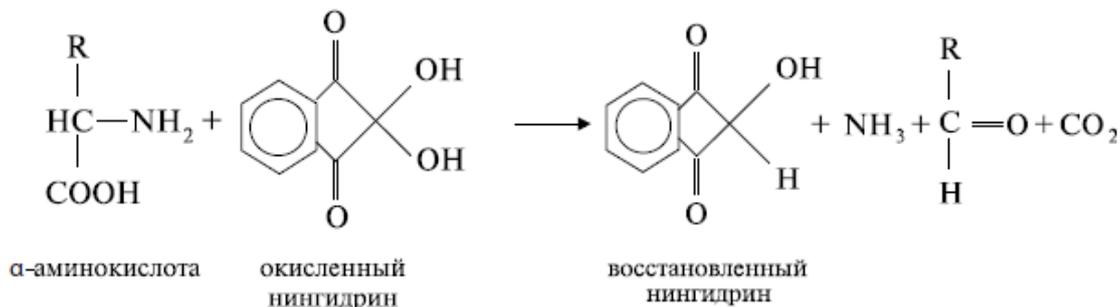
Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1.	1% раствор белка, мл	1	-
2.	1% раствор желатина, мл	-	1
3.	10% раствор NaOH, капли	5	5
4.	1% раствор CuSO_4 , капли	1-2	1-2
Регистрация окраски (указать цвет)			

Вывод:

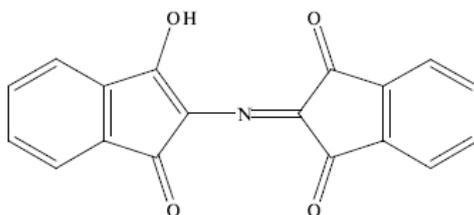
Работа 2. Нингидриновая реакция на α -аминогруппу

Принцип. Реакция обусловлена наличием α -аминогрупп у аминокислот в молекуле белка. При нагревании в присутствии нингидрина происходит окислительное дезаминирование α -аминогрупп аминокислот и пептидов, при этом происходит восстановление молекулы нингидрина и выделение CO_2 , NH_3 и соответствующего альдегида.



Восстановленный нингидрин конденсируется с аммиаком и молекулой

окисленного нингидрина, образуя окрашенное соединение (сине-фиолетовый комплекс Руэмана):



Пролин и оксипролин дают с нингидрином окрашенный продукт желтого цвета. Нингидриновая реакция может быть положительна с некоторыми аминами, амидами кислот и некоторыми другими соединениями.

Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1.	1% раствор белка, капли	5	-
2.	1% раствор желатина, капли	-	5
3.	0,1% раствор нингидрина, капли	2	2
<i>Нагреть до кипения</i>			
Регистрация окраски (указать цвет)			

Вывод:

Работа 3. Реакция Паули (дiazoreакция)

Принцип. При добавлении к раствору белка diazoreактива (сульфаниловая кислота, растворённая в концентрированной соляной кислоте) происходит взаимодействие последнего с аминокислотами тирозином, триптофаном, гистидином с образованием окрашенных азосоединений.

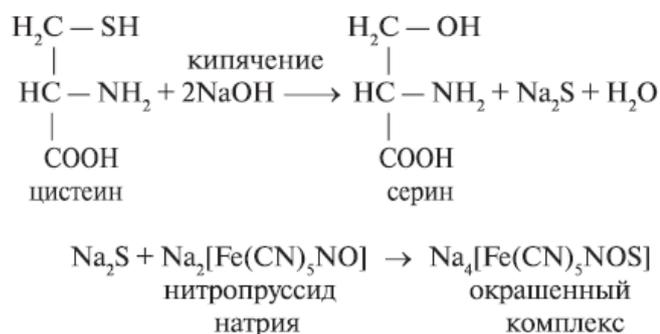
Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1.	Диазосмесь, капли	1	1
2.	0,5% NaNO ₂ , капли	2	2
<i>Перемешать</i>			
3.	1% раствор белка, капли	2	-
4.	1% раствор желатина, капли	-	2
5.	10% раствор Na ₂ CO ₃ , капли	6	6
Регистрация окраски через 10 минут			

Вывод:

Работа 4. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу

Принцип. При добавлении к раствору белка, который содержит серо-содержащие аминокислоты (цистеин, метионин), гидроксида натрия и ацетата свинца (II) с последующим кипячением, образуется сульфид свинца (PbS), который выпадает в осадок.



Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1	1% раствор белка, капли	2	-
2	1% раствор желатина, капли	-	2
3	5% раствор ацетата свинца, капли	2	2
4	30% раствор NaOH	По каплям до полного растворения осадка	
<i>Нагреть до кипения</i>			
Регистрация окраски осадка			

Вывод:

Работа 5. Ксантопротеиновая реакция на ароматическое кольцо циклических аминокислот (реакция Мульдера)

Принцип. При добавлении к раствору белка, который содержит ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан), концентрированной азотной кислоты образуются нитропроизводные аминокислот, которые в щелочной среде образуют окрашенные соли хиноидной структуры.

Ксантопротеиновая реакция характерна для фенилаланина, тирозина и триптофана, имеющих ароматическое (бензольное) кольцо. Эти аминокислоты или содержащие их белки при нагревании с концентрированной азотной кислотой дают нитросоединения желтого цвета.

Например, в реакции с тирозином образуется динитротирозин; добавление гидроксида натрия приводит к образованию натриевой соли хиноидной структуры динитротирозина:



Ксантопротеиновая реакция положительна со многими ароматическими соединениями (бензол, фенол и др.).

Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

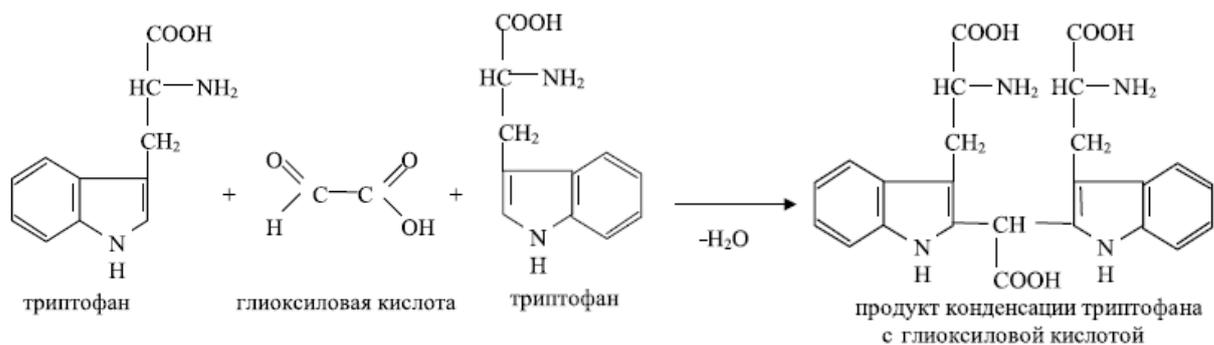
№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1	1% раствор белка, капли	5	-
2	1% раствор желатина, капли	-	5
3	Концентрированная HNO ₃ , капли	3	3
<i>Осторожно!!! нагреть до кипения, после чего пробирку охладить</i>			
4	Конц. раствор NH ₃ OH (или 30% NaOH)	По каплям до изменения окраски	
Регистрация окраски			

Вывод:

Работа 6. Реакция Адамкевича на триптофан

Принцип. Реакция обусловлена присутствием триптофана, который взаимодействует с глиоксиловой кислотой, присутствующей в виде примеси в концентрированной уксусной кислоте, и дает окрашенные продукты конденсации.

При нагревании две молекулы триптофана взаимодействуют с глиоксиловой кислотой с образованием окрашенного соединения:



В качестве водоотнимающего средства используется концентрированная серная кислота.

Ход работы (алгоритм приведён в таблице):

№	Реактивы, последовательность добавления	Пробирка	
		№ 1	№ 2
1	Свежий яичный белок, неразбавленный, капли	2	-
2	1% раствор желатина, капли	-	5
3	Концентрированная уксусная кислота, капли	10	10
<i>Слегка нагреть до растворения осадка, охладить</i>			
4	Концентрированная H ₂ SO ₄	<i>По каплям по стенке, не смешивая</i>	
Регистрация окраски			

Вывод:

« ____ » _____ 20__ г. Подпись преподавателя: _____

Практическое значение

Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную и лекарственную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты. Поэтому представляет интерес наличие именно этих аминокислот в белковых гидролизатах. Гидролизаты белков различной природы используются в медицине как лекарственные препараты для парентерального питания. В лечебных целях применяются различные белки плазмы крови, желатин и др.

Качественные реакции (или, как их часто называют, цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия

белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств, препаратов гидролизатов белков и аминокислот, пептидов и белков на хроматограммах и электрофореграммах. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот.

В практике контроль качества и количественный анализ таких лекарственных средств, как гидролизаты белков и препаратов, содержащих смеси аминокислот или отдельные аминокислоты, основываются на качественном и количественном анализе конкретных аминокислот. Так, одним из основных показателей качества гидролизатов белков является содержание триптофана, которое составляет в аминокептиде и в фибриносоле около 0,5 г/л, а в растворах гидролизина и гидролизата казеина не менее 0,15 г/л.

Задания для контроля усвоения темы

1. Укажите, какие аминокислоты можно получить, замещая один из атомов водорода в метильной группе аланина различными группировками.
2. Назовите продукты замещения аминогруппой гидроксильной группы дикарбоновых аминокислот.
3. Перечислите полярные не имеющие заряда группировки аминокислот. Приведите примеры аминокислот, содержащих такие группировки.
4. Приведите примеры полярных отрицательно заряженных аминокислот.
5. Перечислите аминокислоты, обладающие основными свойствами.
6. Укажите, какие аминокислоты лизина и аргинина могут участвовать в образовании пептидных связей.
7. Поясните, какие цветные реакции универсальны для белков.
8. Назовите, какой компонент белка выявляется с помощью реакции нитрования (ксантопротеиновой).
9. Поясните механизм образования пептидной связи.
10. Поясните, что общего в структуре различных пептидов (независимо от их аминокислотного состава).