

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Под редакцией Н. И. КОВАЛЕВСКОЙ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по специальностям педагогического образования
в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по специальности 032400 «Биология»*

3-е издание, исправленное



Москва
Издательский центр «Академия»
2008

УДК 577.1
ББК 28.072
Б63

Авторы:

Ю. Б. Филиппович (гл. 1, 2, 4, 7, 8);
Н. И. Ковалевская (введение, гл. 2—6, 8, 10—12, задания
для самостоятельной работы, приложения);
Г. А. Севастьянова (гл. 4, 7, 10); *С. М. Клунова* (гл. 1, 2); *Т. А. Егорова* (гл. 8, 9)

Рецензенты:

д-р хим. наук, профессор *И. Г. Горичев*;
канд. биол. наук, профессор *Г. И. Ушакова*

Биологическая химия : учеб. пособие для студ. высш. учеб.
Б63 заведений / [Ю. Б. Филиппович, Н. И. Ковалевская, Г. А. Севастьянова и др.] ; под ред. Н. И. Ковалевской. — 3-е изд., испр. — М. : Издательский центр «Академия», 2008. — 256 с.
ISBN 978-5-7695-5589-3

Рассмотрены строение и свойства белков, ферментов, нуклеиновых кислот, углеводов, жиров, витаминов и коферментов. Изложены общие для всех организмов закономерности обмена веществ и энергии, их взаимосвязи и регуляции. При описании свойств белков и ферментов использован разноуровневый подход. Предложены контрольные вопросы и задания для самостоятельной работы по основным темам курса биологической химии.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Биология».

УДК 577.1
ББК 28.072

*Оригинал-макет данного издания является собственностью
Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом
без согласия правообладателя запрещается*

© Коллектив авторов, 2005
© Коллектив авторов, 2008, с изменениями
© Образовательно-издательский центр «Академия», 2008
© Оформление. Издательский центр «Академия», 2008

ISBN 978-5-7695-5589-3

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая химия — наука о химическом составе живой материи и химических процессах, лежащих в основе жизненных явлений.

Как самостоятельная научная дисциплина биохимия оформилась во второй половине XIX в. Выделение биохимии в отдельную науку стало возможным благодаря значительным успехам органической химии в изучении многочисленных природных соединений и достижениям физиологии в исследовании процессов, протекающих в растительных и животных организмах.

Особенно быстрыми темпами биохимия стала развиваться в последние десятилетия. Этому способствует применение в биохимических исследованиях новых скоростных и высокоразрешающих методов анализа: электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, метода меченых атомов, хроматографии, электрофореза и др. На основе биохимии в XX в. возникли новые перспективные и быстро развивающиеся направления — молекулярная биология и генетическая инженерия, бионеорганическая и биоорганическая химия, биотехнология, экологическая биохимия.

Биохимические процессы, будучи самопроизвольными, подчиняются всеобщим законам термодинамики. Согласно второму закону термодинамики все процессы в любой, в том числе и живой, системе направлены в сторону увеличения энтропии (неупорядоченности) системы и окружающей среды, т. е. являются необратимыми. Именно это стремление энтропии к максимуму является движущей силой любых самопроизвольных процессов. Если энтропия системы уменьшается, например при образовании сложных биологических структур, то энтропия окружающей среды увеличивается, т. е. в целом энтропия системы и окружающей среды всегда возрастает. Мерой изменения энтропии в живых системах (при постоянных значениях температуры и давления) служит изменение свободной энергии (ΔG), которое можно легко определить. При возрастании энтропии свободная энергия всегда уменьшается.

Биохимические реакции протекают очень быстро: от нескольких миллисекунд до нескольких микросекунд. Ферменты в процессе биокатализа за одну секунду совершают свыше одного миллиона актов превращения веществ.

Биохимические процессы протекают в воде, которая составляет до 80 % массы живого вещества и обладает рядом уникальных свойств: низкими значениями температуры замерзания и теплопроводности, высокими значениями температуры кипения, теплоты испарения, теплоемкости, что очень важно для поддержания постоянной температуры тела живых существ. Молекулы воды образуют водородные связи, причем не только в жидкой воде, но и в кристаллах льда и водяных парах. Этим объясняются высокие значения температуры кипения и теплоты испарения воды. В биологических молекулах водородные связи очень важны как для сохранения структуры макромолекул, так и для обеспечения их функционирования.

Особенности строения биомолекул определяются ковалентными связями, характеризующимися энергией 50—200 кДж/моль. Ионные связи (5—20 кДж/моль) важны для сохранения структуры многих биомолекул и для протекания биохимических реакций. Слабые взаимодействия в биосистемах представлены многочисленными водородными и гидрофобными связями. Водородные связи (~3 кДж/моль) возникают в результате дипольных взаимодействий между атомами водорода и кислорода или азота и существуют благодаря высокой электроотрицательности этих элементов и малому объему атома водорода. Гидрофобные взаимодействия (4—8 кДж/моль) возникают между неполярными частями одной или разных молекул, они обеспечивают конформацию биомолекул и структуру надмолекулярных комплексов.

В состав живых клеток входят основные элементы (или макроэлементы): углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера; ионы важнейших элементов: натрия, калия, магния, кальция, хлора, а также в следовых количествах — микроэлементы: железо, медь, цинк, марганец, кобальт, иод, молибден, ванадий, никель, хром, фтор, селен, кремний, олово, бор, мышьяк.

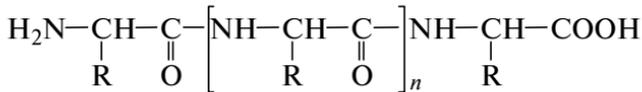
В представленном кратком курсе биологической химии последовательно рассматриваются вопросы статической биохимии — строение и свойства белков, ферментов, нуклеиновых кислот, углеводов, жиров, витаминов и коферментов. Представлены также основные разделы динамической биохимии — обмен веществ и энергии, обмен белков, нуклеиновых кислот, углеводов и жиров (триглицеридов), взаимосвязь и многоуровневая регуляция обмена веществ в организме. При изложении свойств белков и ферментов использован разноуровневый подход с более подробным рассмотрением кислотно-основных свойств аминокислот, пептидов и белков, дан вывод уравнения Михаэлиса—Ментен (прил. 1, 2). Для самостоятельной работы предложены задания по основным разделам курса биохимии.

ГЛАВА 1

БЕЛКИ

Белки — это высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, характеризующиеся строго определенным составом и распадающиеся до аминокислот при гидролизе.

Общая формула белка:



Элементарный состав (%) белков следующий:

Углерод	50—55	Кислород	21—24
Водород	6,5—7,3	Сера	0—24
Азот	15—18	Зола	0—0,5

Впервые белок (клейковина) был выделен Я. Беккари из пшеничной муки в 1728 г. К настоящему времени из природных источников выделены и изучены сотни различных белков.

Белки — важнейшие незаменимые компоненты живого. Белковые тела играют решающую роль и в построении живой материи, и в осуществлении всех процессов жизнедеятельности. «Повсюду, где мы встречаем жизнь, мы находим, что она связана с каким-либо белковым телом, и повсюду, где мы встречаем какое-либо белковое тело, которое не находится в процессе разложения, мы без исключения встречаем и явления жизни»*.

Белки — главные носители жизни благодаря тому, что они обладают рядом особенностей, к числу наиболее важных из которых относятся: неисчерпаемое многообразие структуры и вместе с тем ее высокая видовая уникальность; широкий диапазон физических и химических превращений; способность в ответ на внешнее воздействие обратимо и закономерно изменять конфигурацию молекулы; склонность к образованию надмолекулярных структур, комплексов с другими химическими соединениями; наличие биологической активности — гормональной, ферментативной, патогенной и др.

На долю белков приходится основная масса сухого вещества (55—85 %) активно растущей клетки. В самой маленькой и просто

* *Энгельс Ф.* Анти-Дюринг. — М.: Госполитиздат, 1945. — С. 77.

устроенной бактериальной клетке обнаружено более 2000 различных белков, выполняющих самые разнообразные функции.

1.1. Методы выделения и фракционирования белков

Для изучения структуры и свойств белков необходимо выделить их из биологических объектов. Это трудная задача, так как белки очень легко теряют свои природные, так называемые нативные свойства (растворимость, биологическую активность и т. п.), и переходят в денатурированное (связанное с потерей биологической активности) состояние. Чтобы избежать денатурации белка в процессе его выделения, все операции проводят при достаточно низкой (не выше +5 °С) температуре без воздействия химических реагентов.

Выделение белков начинают с тончайшего измельчения (гомогенизации) ткани вплоть до разрушения клеточных стенок. Для этого используют специальные шаровые мельницы, различного типа гомогенизаторы, проводят растирание с кварцевым песком. Хорошие результаты дают методы разрушения клеточных оболочек путем попеременного замораживания и размораживания ткани или обработки ферментными препаратами (лизоцимом), а также методы продавливания ткани через мельчайшие отверстия (пресс-метод). После тонкого измельчения материала переходят к следующему этапу — экстракции белков. Белки извлекают чаще всего водой, 8—10%-ми растворами различных солей, разнообразными буферными системами (фосфатными, боратными, цитратными и др.), смесями органических реагентов (глицерина, одноатомных спиртов, уксусной кислоты, ацетона, фенола и др.) с водой.

После экстракции смеси белков из биологического материала проводят разделение полученной смеси на индивидуальные белки. Фракционирование белков ведут разными способами: с использованием солей, органических растворителей, электрофоретически, хроматографически, методом молекулярных сит и пр.

Метод фракционирования белков солевыми растворами основан на том, что каждый индивидуальный белок разделяемой смеси осаждается из нее при определенной концентрации той или иной соли. Процесс осаждения белка из раствора под действием соли называют высаливанием. Для фракционирования белков широко применяют водные растворы метилового и этилового спиртов, ацетон и другие органические растворители.

Метод электрофореза, используемый для фракционирования белков, основан на способности различных белков с разной скоростью перемещаться в растворе, по влажной фильтровальной бумаге или в другой твердой среде (крахмале, агар-агаре, полиакриламиде) под действием постоянного электрического тока. Ско-

рость передвижения белковых молекул определенного вида к аноду или катоду зависит от их электрического заряда, молекулярной массы и формы, ионной силы, показателя рН и состава буферного раствора, а также приложенного потенциала.

Хроматографический метод разделения белковых смесей или очистки белка от примесей заключается в пропускании фракционируемой смеси белков через хроматографическую колонку, заполненную адсорбентом (крахмалом, целлюлозой и ее производными, ионообменными смолами и т. д.). Для элюции адсорбированных белков используют солевые растворы различной концентрации. Выход индивидуальных белков после фракционирования контролируют, проводя цветные реакции или измеряя поглощение белковых растворов в ультрафиолетовой области спектра.

Фракционирование белков методом молекулярных сит (гель-фильтрация) основано на различной скорости перемещения белковых молекул через колонку, заполненную специальным сетчатым полимером (сефадексом). В зависимости от молекулярной массы белков внутренний объем ячеек сефадекса в той или иной степени доступен для белковых молекул. Крупные молекулы белков, не способные проникнуть внутрь ячеек, выносятся из колонки элюентом первыми, а мелкие молекулы белка, проникшие внутрь ячеек, задерживаются в них и выходят из колонки вслед за первыми в порядке уменьшения их молекулярной массы. Поэтому сефадекс называют также «антиситом».

Получение индивидуального (гомогенного) белка из сложной природной смеси представляет собой трудную задачу, реализуемую в каждом конкретном случае по определенной схеме, включающей разную комбинацию и последовательность перечисленных выше методов.

1.2. Молекулярная масса белков

Молекулярная масса белков составляет десятки—сотни тысяч дальтон* и более (табл. 1.1).

Молекулярную массу белка определяют различными методами. Из физических методов наиболее часто используют метод ультрацентрифугирования, суть которого заключается в измерении скорости оседания молекул белков в ультрацентрифуге, где при вращении ротора развивается центробежное ускорение, превышающее ускорение силы тяжести в 100 000 и более раз. По скорости оседания рассчитывают молекулярную массу белка. Электрофоретиче-

* Дальтон (Да) — атомная единица массы, выраженная в водородных единицах (в отличие от принятой в настоящее время углеродной единицы).

ский метод основан на зависимости длины пробега от заряда и молекулярной массы белковых молекул при проведении электрофореза в полиакриламидном или других гелях в присутствии белков-маркеров с известной молекулярной массой.

1.3. Форма белковых молекул

С помощью гидродинамических и оптических методов, рентгеноструктурного анализа и электронной микроскопии выяснено, что в большинстве случаев белковые частицы имеют вытянутую форму и построены асимметрично. Степень асимметрии выражают отношением длинной оси частицы b к ее короткой оси a . Данные о степени асимметрии b/a молекул некоторых белков приведены в табл. 1.1. Белки, степень асимметрии молекул которых равна 1 (молекулы сферической формы), встречаются довольно редко. Чаще всего степень асимметрии изменяется в интервале от 3 до 6 (молекулы эллипсоидной или палочкообразной формы). В некоторых случаях степень асимметрии достигает 80 или 200 и более (молекулы нитевидной формы). В целом белковые молекулы асимметричны во всех трех измерениях: длина белковых молекул средней

Таблица 1.1

Значения молекулярной массы, степени асимметрии молекулы и изоэлектрической точки некоторых белков

Белок	Молекулярная масса, Да	Степень асимметрии молекул	Изоэлектрическая точка
Миоглобин кашалота	17 600	3,0	7,0
Пепсин	35 000	4,0	1,1
Альбумин яичный	46 000	4,4	4,6
Гемоглобин лошади	68 000	4,3	6,6
γ -Глобулин человека	160 000	6,0	7,3
Каталаза	250 000	5,8	6,7
Уреаза	483 000	4,8	4,9
Гемоцианин улитки	6 600 000	4,8	4,7

молекулярной массы достигает нескольких десятков нанометров*, а толщина — всего нескольких нанометров.

Между формой белковых молекул и их функциями существует тесная взаимосвязь. Это ярко выражено, например, у крайне асим-

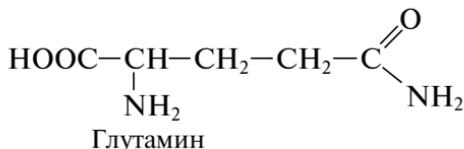
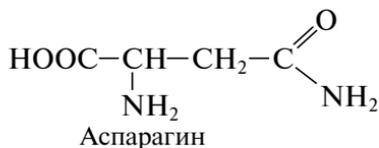
* 1 нанометр (нм) = 10^{-9} м.

метрично построенных молекул мышечных белков (актина, миозина) и белков шелковых волокон (фибрина).

1.4. Аминокислотный состав белков

Прежде чем исследовать химический состав белковых тел, проводят их гидролиз. Для этого белок нагревают с растворами кислот, щелочей или инкубируют с иммобилизованными (прикрепленными к носителю) ферментами. Показано, что продуктами гидролиза белков являются аминокислоты. Следовательно, аминокислоты являются структурными элементами белков. В настоящее время изучены качественный и количественный состав аминокислот нескольких сотен белков. Фракционирование смесей аминокислот, полученных в результате гидролиза белков, осуществляют методом ионообменной хроматографии с помощью автоматических анализаторов аминокислот, в которых количественное содержание аминокислот устанавливается практически без участия исследователя в течение 1,5—2 ч.

Найденные в белках аминокислоты принято делить на две группы: постоянно встречающиеся и иногда встречающиеся в белках. Постоянно встречаются в белках 18 аминокислот; их названия, формулы и сокращенные обозначения приведены в табл. 1.2. Помимо 18 аминокислот в состав белков входят два амида: амид аспарагиновой кислоты — аспарагин (Асп) и амид глутаминовой кислоты — глутамин (Глн):



В белках представлены α -аминокислоты (за исключением пролина — гетероциклической иминокислоты). Все белковые аминокислоты (кроме глицина) проявляют оптическую активность и относятся к L-ряду. Кроме приведенных в табл. 1.2 обязательных 18 аминокислот и двух амидов в белках встречаются также более редкие: оксипролин (оксипирролидин-2-карбоновая кислота), орнитин (α, δ -диаминовалериановая кислота), α -аминоизомасляная кислота, селеноцистеин (содержит селен вместо серы) и др.

Химические свойства α -аминокислот, входящих в состав белков, определяются их радикалами. Реакции солеобразования протекают по NH_2 - и COOH -группам, реакции окисления—восстановления — по SH - и S-S -группам, реакции алкилирования и ацилирования — по NH_2 -, OH - и COOH -группам, реакции фосфорилирования — по OH -группам и т. п.

Аминокислоты, входящие в состав белков

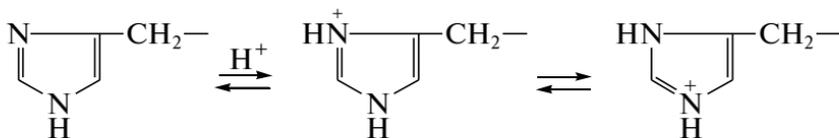
Аминокислота	Формула	Обозначение
Глицин (аминоуксусная кислота)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Гли
Аланин (α -аминопропионовая кислота)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Ала
Валин (α -аминоизовалериановая кислота)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Вал
Лейцин (α -аминоизокапроновая кислота)	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array} - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Лей
Изолейцин (α -амино- β -метилвалериановая кислота)	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2$	Иле
Аспарагиновая (аминоянтарная) кислота	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Асп
Глутаминовая (α -аминоглутаровая) кислота	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Глу
Серин (α -амино- β -оксипропионовая кислота)	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$	Сер

Аминокислота	Формула	Обозначение
Треонин (α -амино- β -окси-масляная кислота)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Тре
Цистеин (α -амино- β -тиолпропионовая кислота)	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Цис
Метионин (α -амино- γ -метилтиомаляная кислота)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Мет
Аргинин (α -амино- δ -гуанидинваляриновая кислота)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Арг
Лизин (α, ϵ -диаминокапроновая кислота)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Лиз
Гистидин (α -амино- β -имидазолпропионовая кислота)	$\begin{array}{c} \text{N} \quad \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Гис
Пролин (пирролидин- α -карбоновая кислота)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Про

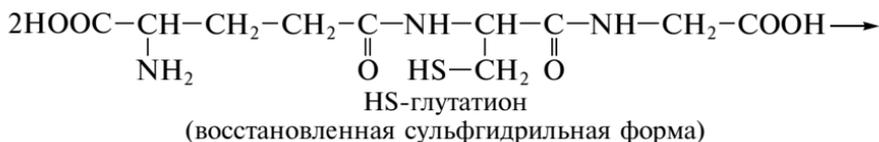
Аминокислота	Формула	Обозначение
Фенилаланин (α -амино- β -фенилпропионовая кислота)		Фен
Тирозин (α -амино- β -пара-оксифенилпропионовая кислота)		Тир
Триптофан (α -амино- β -индоллилпропионовая кислота)		Три

Физические свойства аминокислот также весьма разнообразны. Они определяются прежде всего длиной и объемом радикалов. От длины, объема и взаиморасположения радикалов аминокислот, составляющих белковую молекулу, зависит объем, форма и «рельеф» поверхности белковой частицы. Отсутствие бокового радикала у глицина позволяет ему увеличивать подвижность полипептидной цепи белка и приводит к его изгибам.

Радикалы аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина и триптофана неполярные, а остальных аминокислот — полярные. Это определяет разную степень растворимости белков в различных растворителях. Радикал гистидина обратимо ионизируется (протонируется) при физиологических значениях pH, благодаря чему он участвует в кислотно-основном катализе и присутствует в активных центрах многих ферментов, выполняя роль так называемого «протонного насоса»:



Почти все клетки содержат свободные пептиды. В настоящее время из природных источников выделено более сотни индивидуальных пептидов, детально изучено их строение, свойства и биологическая активность. В качестве примера приведем строение глутатиона (γ -глутамилцистеинилглицина) — одного из наиболее широко распространенных внутриклеточных пептидов так называемого полимодального действия, принимающего участие в переносе аминокислот через клеточную мембрану, в окислительно-восстановительных и других процессах в клетке:



Некоторые природные пептиды-антибиотики имеют циклическое строение (грамидин S, бацитрицин A, циклоспорин A), содержат небелковые аминокислоты и синтезируются микроорганизмами по особому (в отличие от белков) нематричному механизму.

Роль пептидов в процессах жизнедеятельности многообразна. Многие из них служат гормонами (инсулин, глюкагон, гормон роста и др.), некоторые являются сильнейшими ядами (яды змей, пауков, насекомых, высших грибов, микробов и др.), антибиотиками, регуляторами клеточного деления, переносчиками молекул и ионов через биологические мембраны, регуляторами психической деятельности.

Значительное число природных пептидов удалось синтезировать. Искусственным путем получены сотни аналогов природных пептидов, ряд которых обладает более сильным биологическим

действием. Так, в адренокортикотропном гормоне, состоящем из 39 аминокислот, замена аргинина и триптофана соответственно в восьмом и девятом положении цепи на трипептид пролилглицил-пролин приводит к образованию нового пептида, обладающего повышенной по сравнению с природным гормоном способностью стимулировать память и нашедшего применение в медицине при лечении поражений мозга.

Полипептидная теория строения белковой молекулы впервые предложена Э. Фишером в начале XX в. на базе выдвинутых А. Я. Данилевским идей о роли пептидных связей в строении белка. Согласно полипептидной теории белковые молекулы представляют собой гигантские полипептиды, построенные из многих десятков—сотен остатков аминокислот.

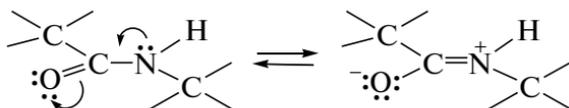
Доказательства полипептидной теории строения белка таковы:

- 1) в нативных белках удается обнаружить лишь небольшое число свободных аминных и карбоксильных групп;
- 2) при гидролизе белков идет постепенное освобождение аминных и карбоксильных групп в строгом соотношении 1 : 1;
- 3) биурет ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}_2$) и белки дают одинаковую (биуретовую) реакцию с гидроксидом меди, что указывает на наличие в белковой молекуле пептидных связей;
- 4) полипептидная природа ряда белков (инсулина, рибонуклеазы и др.) подтверждена химическим синтезом этих белков;
- 5) при рентгеноструктурном анализе белков при разрешении 0,14—0,20 нм удается наблюдать непрерывную полипептидную цепь с характерным для исследуемого белка расположением аминокислотных остатков.

1.6. Тонкая структура белковой молекулы

Строение полипептидной цепи детально изучено. Исследованы расстояния и валентные углы между атомами элементов, входящих в состав пептидной связи. Изучая рентгенограммы кристаллических пептидов, удалось показать, что расстояние между атомами углерода и азота пептидной связи равно 0,13 нм. Таким образом, длина пептидной связи меньше длины одинарной связи

$\text{>C}-\text{N}<$ (0,15 нм) и больше длины двойной связи $\text{>C}=\text{N}-$ (0,12 нм). Следовательно, пептидная связь имеет характер частично двойной связи вследствие сопряжения электронов π -связи карбонильной группы со свободными электронами атома азота:



Поэтому пептидная связь имеет плоскую конфигурацию: все четыре атома (C, N, O, H), лежат в одной плоскости. Атом кислорода группы >C=O и атом водорода группы >N-H находятся в *транс*-положении относительно связи >C-N .

Таким образом, полипептидная цепь составлена из ряда жестких плоскостей, чередующихся с группировками CHR (рис. 1.1). Атомы углерода и азота в цепи располагаются приблизительно в одной плоскости, в то время как атомы водорода и радикалы группировок CHR направлены к этой плоскости под углом $109^{\circ}28'$. При этом в соседних аминокислотных остатках атомы водорода и радикалы направлены противоположно. В результате полипептидная цепь представляет собой гибкую полужесткую структуру, в которой плоскости пептидных связей свободно вращаются относительно α -углеродного атома аминокислот.

Главная цепь, монотонно построенная из большого числа фрагментов -NH-CHR-C(O)- , окружена разнообразными по химической природе боковыми цепями. Характер радикалов оказывает большое влияние на пространственную конфигурацию полипептидной цепи, определяет круг химических реакций, свойственных белковым телам, и оказывает наряду с другими факторами существенное влияние на функциональную активность белков.

В соответствии с законами термодинамики белки как любые физические тела стремятся занять минимальный объем в окружающем их пространстве. Каждая вновь синтезированная белковая молекула самопроизвольно сворачивается, принимая максимально компактную форму и минимальный объем. Различают несколько иерархических уровней организации белков: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. В настоящее время в связи с накоплением новых научных данных рассматривают также надвторичную и доменную структуры белков.

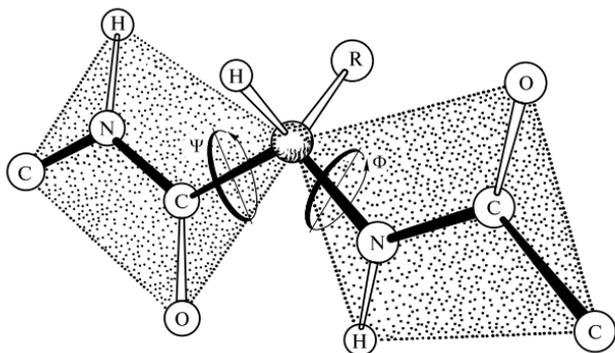


Рис. 1.1. Тонкое строение пептидной цепи

Таким образом, в процессе свертывания полипептидной цепи реализуются шесть уровней организации ее структуры.

1.7. Первичная структура белка

Под *первичной структурой* белка понимают последовательность аминокислотных остатков в одной или нескольких полипептидных цепях, составляющих молекулу белка.

Первичную структуру белка определяют поэтапно в соответствии со схемой, представленной на рис. 1.2.

Расшифровку первичной структуры белка начинают с определения числа полипептидных цепей в молекуле путем выявления числа N- и C-концевых аминокислот в молекуле белка. Определение числа концевых аминокислот ведут разнообразными физическими, химическими и ферментативными методами.

Для определения аминокислотного остатка, с которого начинается белковая молекула (N-концевого остатка со свободной α -аминогруппой), предложено несколько химических методов.

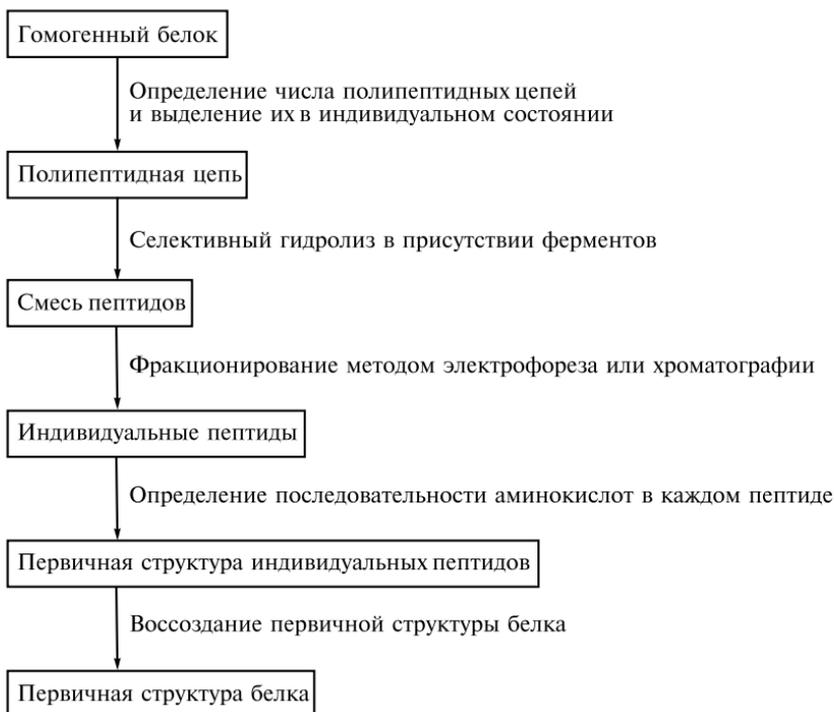
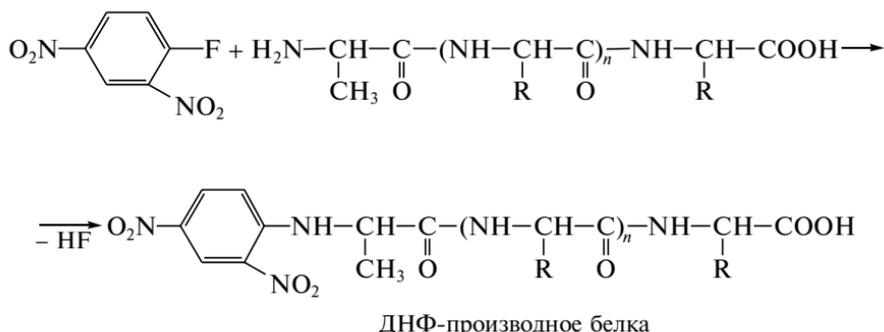
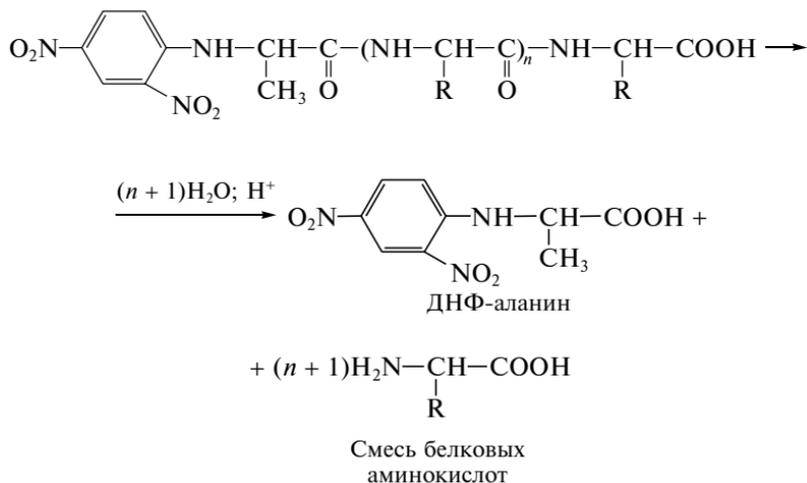


Рис. 1.2. Последовательность операций при установлении первичной структуры белка

По методу Сэнджера раствор белка обрабатывают динитрофторбензолом, который, взаимодействуя со свободной аминогруппой, образует динитрофенильное (ДНФ) производное белка:



После гидролиза динитрофенильного производного белка лишь одна аминокислота распавшейся до свободных аминокислот белковой молекулы будет находиться в гидролизате в виде ДНФ-аминокислоты:



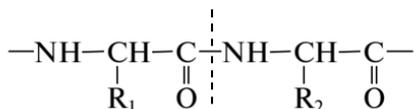
ДНФ-аминокислота может быть легко определена хроматографически в присутствии всех других аминокислот.

Ферментативный метод определения концевых аминокислот состоит в обработке белкового препарата ферментами — аминоклептидазой или карбоксипептидазой, в результате чего отщепляется соответственно N-концевая или С-концевая аминокислота, тестируемая хроматографически (рис. 1.3).

После определения числа полипептидных цепей в молекуле белка и отделения их друг от друга приступают к изучению первичной структуры индивидуальных полипептидных цепей. Для выявления порядка чередования аминокислотных остатков в полипептидной цепи широко используют метод частичного (неполного) гидролиза белка.

С этой целью белок или полипептидную цепь инкубируют с соответствующим ферментом (протеиназой) в течение сравнительно короткого времени. В результате этого гидролизуются лишь некоторое число строго определенных пептидных связей.

Специфичность действия некоторых протеиназ демонстрирует схема:



- | | |
|--------------|--|
| Трипсин: | R ₁ — аргинин, лизин. |
| Химотрипсин: | R ₁ — фенилаланин, тирозин, триптофан. |
| Пепсин: | R ₂ — фенилаланин, тирозин, триптофан, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лейцин. |

Так, при инкубации исследуемого белка с ферментом поджелудочной железы химотрипсином гидролизуются лишь те пептидные связи, в состав которых входят ароматические аминокислоты. Такой гидролиз называют *селективным (избирательным)*. В результате полипептидная цепь распадается на ряд пептидов, каждый из которых составлен всего из нескольких аминокислотных остатков. Пептиды отделяют друг от друга методами высоковольтного электрофореза и хроматографии разных видов (ионообменной, распределительной) и в каждом из них определяют последовательность аминокислот физическими, химическими и ферментативными методами.

Широко распространенный химический метод определения первичной структуры пептидов и белков — метод Эдмана (фенил-изотиоцианатный) — лежит в основе работы автоматического анализатора (секвенатора) аминокислот. В современных моделях за один цикл работы прибора удается идентифицировать до семидесяти аминокислотных остатков в молекуле белка.

Среди физических методов определения последовательности аминокислотных остатков в белковой молекуле большое распространение приобретает масс-спектрометрический метод и метод лазерной фотодиссоциации. В последние годы ведущее место в выяснении первичной структуры белков занимает метод, который условно можно назвать генетическим. Он основан на выведении последовательности аминокислот в белковой молекуле исходя из структуры гена, кодирующего биосинтез этого белка. Имен-

Некоторые белки с известной первичной структурой

Белок	Молекулярная масса, Да	Число аминокислотных остатков в молекуле
Инсулин	6000	51
Цитохром	12 400	104
Рибонуклеаза	13 700	124
Лизоцим	14 100	129
Вирус табачной мозаики*	17 500	158
Миоглобин кашалота	17 600	155
Гемоглобин человека	4 · 17 000	141 (α -цепь), 146 (β -цепь)
Трипсин	23 950	228
Пепсин	34 400	340
Карбоксипептидаза	34 000	255

* Субъединица.

торых животных, все различия между которыми связаны с чередованием аминокислот в 8—10-м положениях цепи А. Выявление структурного подобия лежит в основе изучения молекулярной эволюции белков. Сходство или различие первичных структур белков у разных таксонов используется для построения «филогенетических древ», при анализе которых устанавливают тонкие филогенетические связи между белками и их отдельными участками у сравниваемых видов в процессе эволюции. Так, анализ аминокислотной последовательности цитохромов *c* (дыхательных белков-ферментов, содержащих примерно 100 аминокислот в единственной цепи) у 70 видов организмов показал, что 27 позиций аминокислот совпадают у всех таксонов, видимо, в связи с общей биологической функцией белка у разных видов. Положение в белке остальных аминокислот варьирует от вида к виду, отражая таксономические различия. При этом число аминокислотных остатков, по которым различают цитохромы двух любых видов, соответствует филогенетическому расстоянию между данными видами. Так, молекулы цитохромов *c* лошади и дрожжей различаются по позициям 48 аминокислот, а курицы и утки — только по двум позициям аминокислот в первичной структуре.

Расшифровка первичной структуры показала, что белки — это вещества со строго определенным химическим составом и строением. Выяснение связи между структурой белка и его функциональной активностью имеет большое значение для познания процессов жизнедеятельности организма и управления ими.