

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

МОГИЛЕВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. А.А.КУЛЕШОВА

Н.А.ЖУРА

**Методическая разработка
к изучению темы
"БЕЛКОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ"**

МОГИЛЕВ 1999

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

УДК 577

Ж 1

И.А.Жура. Методическая разработка по теме "Белковые аминокислоты". – Изд-во Могилевского гос. ун-та, 1999. – 36 с.

Методическая разработка предназначена для студентов факультета естествознания, изучающих биологическую химию. В ней представлены α -аминокислоты, постоянно встречающиеся в белках. Охарактеризовано их строение, классификация, важнейшие физико-химические свойства. Особое внимание обращено на те реакции, которые находят широкое практическое применение для идентификации белковых аминокислот. Предлагаемые лабораторные работы составлены на основе программы курса биохимии, с учетом использования современных биохимических методов исследования, таких как электрофорез и хроматография. Описанные методики лабораторных работ позволят студентам выполнить индивидуальные задания по разделению и определению аминокислот в смеси. Для закрепления студентами изучаемого материала в методической разработке содержатся задачи и упражнения для самостоятельного решения.

Составитель: *И.А.Жура*

Рецензент: *М.В.Мащенко*

Электронный архив библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова

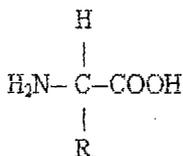
СОДЕРЖАНИЕ

Строение и классификация аминокислот.....	2
Сtereoхимия аминокислот.....	7
Кислотно-основные свойства белковых аминокислот.....	8
Химические реакции белковых аминокислот.....	11
Общие указания к выполнению лабораторных работ.....	15
Лабораторная работа "Качественные реакции на белковые аминокислоты".....	15
Лабораторная работа "Хроматографическое определение аминокислот в смеси".....	23
Лабораторная работа "Разделение смеси аминокислот методом электрофореза".....	29
Задачи и упражнения для самостоятельного решения.....	34
Рекомендуемая литература.....	36

СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Основной структурной единицей белков являются α -аминокислоты. Общее число α -аминокислот, входящих в состав белков, близко к 70. Среди них выделяется группа из 20 наиболее важных α -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках (иногда эту группу расширяют до 22-25 за счет включения производных).

Общая формула белковых α -аминокислот:



Атом углерода, соединенный с амино- и карбоксильной группой, называют α -углеродом, а R-группу, различную для всех белковых аминокислот, — боковой цепью, или радикалом.

Белки всех видов живых существ — от бактерий до человека — построены из одного и того же набора 20 аминокислот. Этот уникальный белковый алфавит существует уже около 2 млрд. лет. Большое разнообразие белковых молекул определяется различной последовательностью соединения аминокислот. Способность белков выполнять различные функции обусловлена разнообразием свойств белковых аминокислот. Аминокислоты, являясь строительным материалом белков, выполняют и ряд других функций. Некоторые из них, по-видимому, участвуют в передаче нервных импульсов; примерами служат глицин и глутаминовая кислота.

Основным источником α -аминокислот для организма человека служат пищевые белки. Некоторые белковые аминокислоты способны синтезироваться в организме из продуктов углеводного и липидного обмена. Их называют *заменимыми* аминокислотами. Другие α -аминокислоты, необходимые для синтеза белков, синтезироваться в организме не могут и должны поступать только извне. Такие аминокислоты называют *незаменимыми*. К ним относятся: валин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Аргинин и гистидин относят к группе частично заменимых аминокислот, поскольку скорость их синтеза в организме недостаточна для обеспечения всей потребности в этих аминокислотах, особенно у детей. При некоторых, чаще всего врожденных заболеваниях, перечень незаменимых аминокислот расширяется.

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности живого организма необходимо ежедневное поступление в организм незаменимых аминокислот. Суточная потребность человека в незаменимых

аминокислотах варьируется от 0,5 г до 2 г. Содержание незаменимых аминокислот в пищевых продуктах различно и определяет пищевую ценность того или иного белка. Наиболее полноценными являются животные белки. Растительные белки часто содержат недостаточное количество незаменимых аминокислот, обычно лизина, метионина или триптофана, что снижает их пищевую ценность. Наиболее богаты незаменимыми аминокислотами яичный белок (1,7-9,2 г в 100 г продукта), белки молока (1,4-9,8 г / 100 г), мышечной ткани (1,2-8,8 г / 100 г), белки бобовых (1,2-7,1 г / 100 г) и злаковых (1,2-6,7 г / 100 г) культур.

КЛАССИФИКАЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Известны различные способы классификации аминокислот, основанные на различиях в природе их боковых радикалов R (табл. 1). Так, по химической природе R-групп α -аминокислоты делят на:

1. Алифатические:
 - а) моноаминомонокарбоновые,
 - б) диаминомонокарбоновые,
 - в) моноаминодикарбоновые и их амиды.
2. Ароматические.
3. Гетероциклические.

В зависимости от полярности боковых цепей белковые аминокислоты делят на:

- 1) неполярные или гидрофобные,
- 2) полярные (гидрофильные), но незаряженные,
- 3) положительно заряженные (кислые),
- 4) отрицательно заряженные (основные).

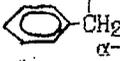
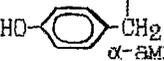
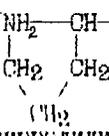
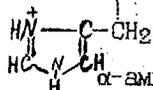
Классификация дана при pH 6-7, что соответствует физиологическим условиям внутри клетки.

В пределах любого из указанных классов имеются значительные различия в размерах и форме R-групп, а также в степени их полярности.

БЕЛКОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислоты	Открытие аминокислот (год источник автор)	Структурная формула при pH = 6-7, химическое название	Величины pK ионизируемых групп			pH _{изот}	Классификация по полярности R-групп
			pK ₁ -COOH	pK ₂ -NH ₃ ⁺	pK _R R-гр.		
1	2	3	4	5	6	7	8
1. АЛФАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ Моноаминомонокарбоновые кислоты							
Глицин (гли)	1820г. в желатине А. Браконно	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ аминоуксусная кислота	2,34	9,60		5,97	полярная нежаряж.
Аланин (ала)	1888г. в фибрине Шелл, Г. Эрлих	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}^-$ α-аминопропионовая кислота	2,34	9,69		6,02	неполярн
Валин (вал)	1901г. в казеине, Э. Фишер	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{COO}^-$ α-аминовалериановая к-та	2,34	9,62		5,97	неполярн
Лейцин (лей)	1820г. в мышечном волокне, А. Браконно	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{COO}^-$ α-аминоизокапроновая кислота	2,36	9,60		5,98	неполярн
Изолейцин (иле)	1904г. в фибрине, Ф. Эрлих	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)_2)-\text{COO}^-$ α-амино-β-метилвалериановая к.	2,36	9,68		6,02	неполярн
Серин (сер)	1865г. в шелке, Э. Крамер	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{COO}^-$ α-амино-β-оксипропионовая к-та	2,21	9,15		5,68	полярная нежаряж.
Треонин (тре)	1925г. в белке овса, С. Шрайвер	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH})-\text{COO}^-$ α-амино-β-оксимасляная кислота	2,63	10,43		6,53	полярная нежаряж.

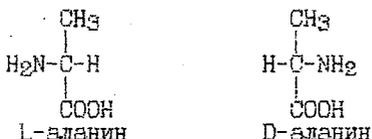
1	2	3	4	5	6	7	8
Цистеин (цио)	1901г. в яичном белке, Г.Эмбден	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{HS}-\text{CH}_2$ α -амино- β -тио- пропионовая к-та	1,71	10,78	8,33	5,02	полярная незаряж.
метионин (мет)	1922г. в казеине, Д.Меллер	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{H}_3\text{C}-\text{S}-(\text{CH}_2)_2$ α -амино- γ -метил- тиомасляная к-та	2,28	9,21		5,74	неполярн
Моноаминодикарбоновые кислоты и их амиды							
Аспара- гиновая (асп)	1868г. в спарже, Г.Ритт- хаузен	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $^-\text{COO}-\text{CH}_2$ аминоянтарная к.	2,09	9,82	3,86	2,97	отрица- тельно заряжен.
Аспара- гин (асн)		$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{O}=\text{C}-\text{CH}_2$ H_2N амид аминоянтарной к.	2,02	8,80		5,41	полярная незаряж.
Глута- миновая (глу)	1866г. в растит. белках, Г.Ритт- хаузен	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $^-\text{COO}-(\text{CH}_2)_2$ α -аминоглутаро- вая кислота	2,19	9,67	4,25	3,22	отрица- тельно заряжен.
Глутамин (гли)		$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{O}=\text{C}-(\text{CH}_2)_2$ H_2N амид α -аминоглутаро- вой кислоты	2,17	9,13		5,65	полярная незаряж.
Диаминомонокарбоновые кислоты							
Лизин (лиз)	1899г. в казеине, Э.Дрек- сель	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{H}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_4$ α, ϵ -диаминокап- роновая кислота	2,18	8,95	10,53	9,74	положи- тельно заряжен.
Аргинин (арг)	1895г. в кератине рога, С.Гедин	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$ $\text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3$ $^+\text{NH}_2$ α -амино δ -гуанидинвале- риановая кислота	2,17	9,04	12,48	10,76	положи- тельно заряжен.

1	2	3	4	5	6	7	8
2. АРОМАТИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ							
Фенил-аланин (фен)	1881г. в ростках люпина, Э. Шульце	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$  $\alpha\text{-амино-}\beta\text{-фенилпропион. к}$	1,83	9,13		5,48	неполярн
Тирозин (тир)	1843г. в казеине, Ф. Болл	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$  $\alpha\text{-амино-}\beta\text{-параоксифенилпропионовая к-та}$	2,20	9,11		5,66	полярная неаарж.
3. ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ АМИНОКИСЛОТЫ							
Пролин (про)	1901г. в казеине, Э. Фишер	$^+\text{NH}_2 - \text{CH} - \text{COO}^-$  $\text{пирролидин-}\alpha\text{-карбоновая кислота}$	1,99	10,60		6,30	неполярн
Триптофан (три)	1902г. в казеине, Д. Коль,	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$  $\alpha\text{-амино-}\beta\text{-индолилпропионовая кислота}$	2,38	9,39		5,89	неполярн
Гистидин (гис)	1896г. в казеине, гистонах А. Косель С. Хедин.	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH} - \text{COO}^-$  $\alpha\text{-амино-}\beta\text{-имидазолпропионовая кислота}$	1,82	9,17	6,00	7,59	положительно заряжен при pH-6

СТЕРЕОХИМИЯ АМИНОКИСЛОТ

Все белковые аминокислоты, за исключением глицина, проявляют оптическую активность, т.е. способность вращать плоскость поляризованного света. Этим свойством обладают соединения, в молекуле которых имеется асимметрический атом углерода, т.е. атом углерода с четырьмя различными заместителями.

Число возможных стереоизомеров равно 2^n , где n - число асимметрических атомов углерода. У глицина $n=0$, у треонина и изолейцина $n=2$. Все остальные 17 белковых аминокислот содержат по одному асимметрическому атому углерода, они могут существовать в виде двух оптических изомеров, например:



Расположение в проекционной формуле Фишера NH_2 -группы слева соответствует L-конфигурации, а справа - D-конфигурации.

Такое пространственное расположение L- и D-аминокислот аналогично конфигурации L- и D-глицеринового альдегида - исходного простого соединения с одним асимметрическим атомом углерода, условно выбранного для сравнения:



Следует отметить, что символы L и D относятся к абсолютной конфигурации, а не к направлению вращения плоскости поляризованного света. Знак вращения (+) для правовращающего изомера или (-) для левовращающего не имеют прямой связи с конфигурацией.

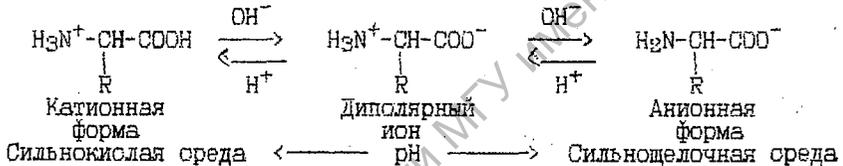
Эквилярная смесь (или равное количество) L- и D-стереоизомеров называется **рацематом** и является оптически неактивной.

В состав природных белков входят только L-аминокислоты, примерно половина из них правовращающие (ала, арг, глу, лей, и др.) и чуть меньше (фен, тре, лей, три и др.) - левовращающие. D-аминокислоты в живых клетках обнаружены лишь в клеточных стенках некоторых микроорганизмов и в антибиотиках. Большинство D-изомеров обладает сладким вкусом, а L-формы горькие или безвкусные.

КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ

Кислотно-основные свойства аминокислот определяют многие физико-химические и биологические свойства белков. Кроме того, на этих свойствах основаны почти все методы разделения, идентификации и количественного анализа аминокислот.

Кислотно-основные свойства аминокислот связаны с наличием в их структуре двух ионируемых групп - карбоксильной и аминогруппы. В результате α -аминокислоты могут проявлять свойства как кислот, так и оснований, т.е. они являются амфотерными соединениями. В кристаллическом состоянии и в водных растворах α -аминокислоты существуют в виде диполярных ионов, называемых также цвиттер-ионами. Ионизация молекул аминокислот зависит от pH раствора. Для моноаминомонокарбоновых кислот процесс диссоциации имеет следующий вид:



Ионное строение обуславливает некоторые особенности α -аминокислот: высокую температуру плавления (200-300⁰C), нелетучесть, растворимость в воде и нерастворимость в неполярных органических растворителях. С растворимостью аминокислот в воде связана их всасываемость и транспорт в организме.

Кислотно-основные свойства аминокислот могут быть интерпретированы исходя из теории кислот и оснований Бренстеда-Лоури.

Полностью протонированная α -аминокислота (катионная форма) с позиции теории Бренстеда является двухосновной кислотой, содержащей две кислотные группы: недиссоциированную карбоксильную группу (-COOH) и протонированную аминогруппу (-NH₃⁺), которые характеризуются соответствующими значениями pK₁ и pK₂.

Величины pK для аминокислот определяют по кривым титрования. Кривые титрования аминокислот рассмотрим на примере аланина (рис.1):

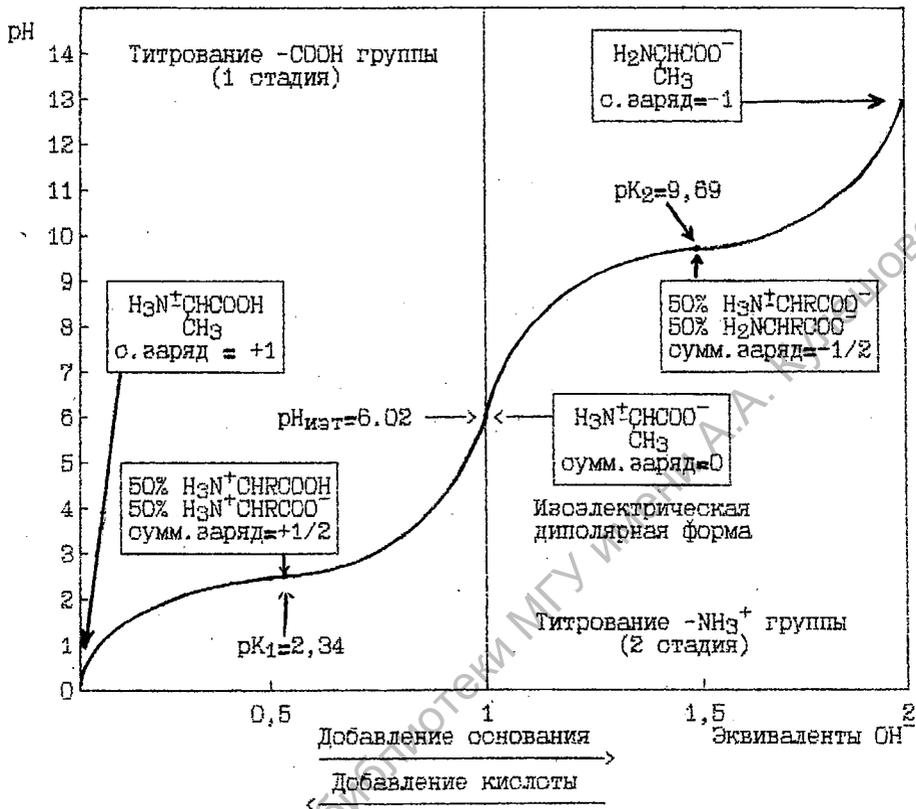


Рис.1. Кривая титрования аланина.

Из кривой титрования аланина следует, что карбоксильная группа имеет $pK_1 = 2,34$, а протонированная аминогруппа — $pK_2 = 9,69$. При $pH = 6,02$ аланин существует в форме дипольного иона, когда суммарный электрический заряд частицы равен 0. При этом значении pH молекула аланина электрически нейтральна. Такое значение pH называют **изоэлектрической точкой** и обозначают $pI_{изт}$ или pI . Изоэлектрическая точка представляет собой среднее арифметическое двух величин pK :

$$pI_{изт} = 1/2 \cdot (pK_1 + pK_2) = 1/2 \times (2,34 + 9,69) = 6,02$$

При любом значении pH, превышающем изоэлектрическую точку, аминокислота имеет суммарный отрицательный заряд, а при значении pH ниже изоэлектрической точки — суммарный положительный заряд. Чем дальше от изоэлектрической точки находится pH раствора, тем больше суммарный электрический заряд, который несут молекулы аланина. Например, при $pH = 1,0$ все молекулы аланина существуют в форме ионов

$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COOH}$ с суммарным зарядом +1. При $\text{pH}=2,34$, когда имеется смесь



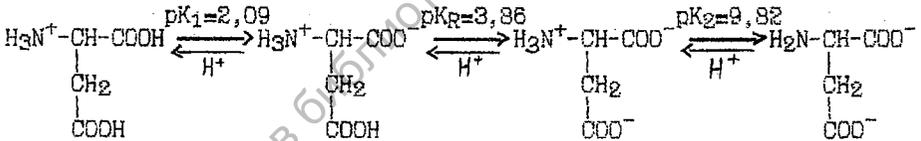
равных количеств ионов $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COOH}$ и $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COO}^-$, суммарный поло-



жительный заряд равен +0,5. Аналогичным образом можно предсказать знак и величину суммарного заряда для любой другой аминокислоты при любом значении pH .

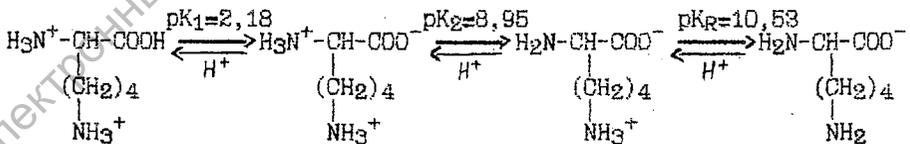
Все аминокислоты, содержащие одну α -аминогруппу, одну карбоксильную группу и неионизируемую R-группу, дают кривые титрования, сходные с кривой титрования аланина. Все эти аминокислоты характеризуются очень близкими, но неодинаковыми значениями pK_1 , лежащими в интервале от 2,0 до 3,0 и pK_2 , лежащими в интервале от 9,0 до 10,0. Их $\text{pH}_{\text{изет}}$ близки к нейтральным значениям (см. табл. 1).

Аминокислоты с ионизируемой R-группой имеют более сложные кривые титрования, складывающиеся из трех участков, соответствующих трем возможным стадиям ионизации, и следовательно, они имеют три значения pK . Ионизация кислых аминокислот, например аспарагиновой, состоит из следующих последовательных стадий:



Кислая среда \leftarrow pH \rightarrow Щелочная среда
 Схема изменения суммарного заряда: +1 \rightarrow 0 \rightarrow -1 \rightarrow -2.

Ионизацию основных аминокислот рассмотрим на примере лизина:



Кислая среда \leftarrow pH \rightarrow Щелочная среда
 Схема изменения суммарного заряда: +2 \rightarrow +1 \rightarrow 0 \rightarrow -1.

Изоэлектрические точки таких аминокислот определяются присутствующей в них ионизируемой R-группой. Для моноаминодикарбоновых кислот изоэлектрические точки смещены в кислую область pH и определяются как среднее арифметическое между величинами pK для двух карбоксильных групп ($\text{pH}_{\text{изет}}$ аспарагиновой = 2,97). Для основных аминокислот $\text{pH}_{\text{изет}}$

омещены в щелочную область и вычисляются как среднее арифметическое между величинами рК для двух протонированных аминогрупп ($pH_{\text{от}} \text{ лизина} = 9,74$).

ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ БЕЛКОВЫХ АМИНОКИСЛОТ

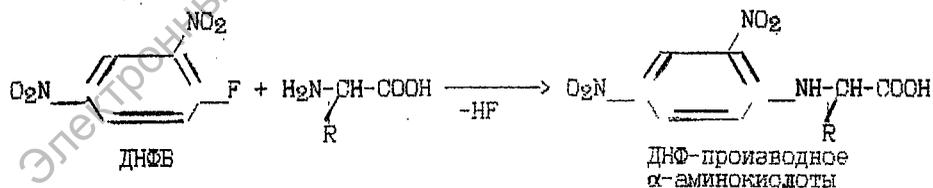
Способность аминокислот, как и всех других органических соединений, вступать в химические реакции определяется наличием в их составе функциональных групп. Поскольку все белковые аминокислоты содержат аминогруппу, карбоксильную группу, а также функциональные группы их боковых радикалов, каждая из них может вступать в химические реакции, характерные для этих групп. Мы не будем рассматривать здесь все химические реакции, в которых способны участвовать аминокислоты, но отметим лишь некоторые важные реакции, широко применяемые для обнаружения, идентификации и количественного анализа белковых аминокислот.

1. Реакции α -аминогруппы

1.1. Вначале рассмотрим реакции, применяемые для идентификации N-концевых аминокислот. Эти реакции используются при определении первичной структуры белков.

Реакция Сенгера - взаимодействие α -аминокислот с 2,4-динитро-1-фторбензолом (сокращенно ДНФБ).

α -Аминокислоты образуют с ДНФБ окрашенные в желтый цвет динитрофенильные производные, растворимые в органических растворителях. ДНФ-производные используют для идентификации индивидуальных аминокислот хроматографическим методом

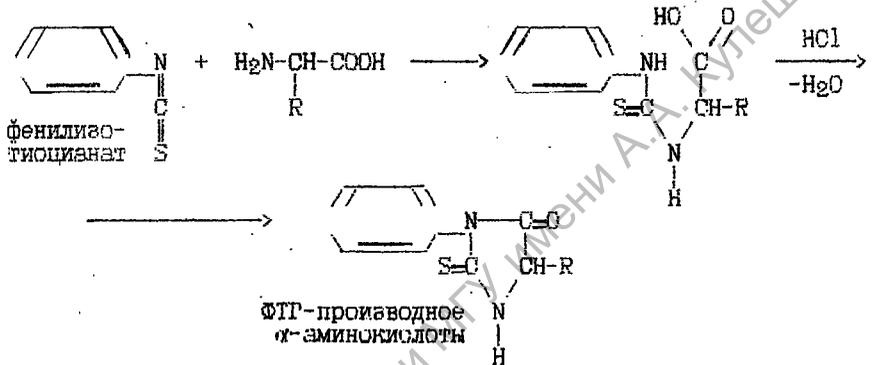


Реакция Сенгера является одной из основных реакций, используемых для идентификации индивидуальных аминокислот и N-концевых аминокислот полипептидных цепей. Однако реакцией Сенгера нельзя определить всю аминокислотную последовательность в полипептидной цепи, поскольку для стрыва ДНФ-производного соответствующей аминокислоты от пептида применяют гидролиз с 6N HCl, что приводит к расщеплению всех пептидных связей.

Этого недостатка лишен другой метод, предложенный Эдманом.

Реакция Эдмана - взаимодействие α -аминокислот с фенилтиоцианатом.

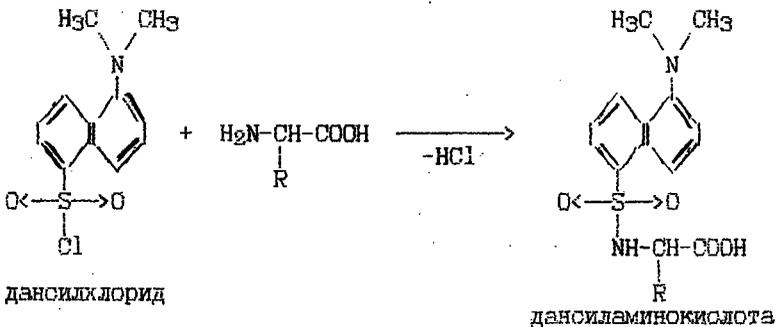
Фенилтиоцианат количественно реагирует с α -аминокислотами с образованием соответствующих фенилтиокарбамильных производных аминокислот. При их обработке безводным HCl происходит циклизация с образованием фенилтиогидантоинового (ФТИГ) производного N-концевой аминокислоты. Затем это производное может быть идентифицировано хроматографическим методом.



Эта реакция широко используется для определения аминокислотной последовательности в пептидах, поскольку циклизация, проводимая в мягких условиях, приводит к расщеплению только первой (от N-конца) пептидной связи. Метод Эдмана автоматизирован, он заключается в последовательном отщеплении аминокислотных остатков от пептида с последующей идентификацией ФТИГ-производных аминокислот.

Реакция с дансилхлоридом (1-диметиламинонафталин-5-сульфохлоридом).

Для определения N-концевых аминокислот полипептидных цепей используется также реакция дансирования, позволяющая превратить аминокислоту во флуоресцирующее соединение.



В результате взаимодействия α -аминокислот с дансильхлоридом образуются дансильные производные аминокислот. Благодаря интенсивной флуоресценции дансильных групп с помощью флуориметрических методов можно обнаружить и измерить минимальные количества дансильных производных аминокислот.

1.2. Реакции, используемые для количественного анализа белковых аминокислот

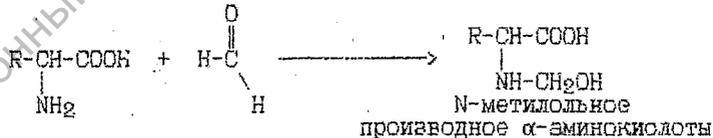
Одной из наиболее характерной и широко применяемой аналитической реакцией на α -аминогруппу является **нингидриновая** реакция, которая используется для точного определения очень небольших концентраций аминокислот. В результате взаимодействия α -аминокислот с нингидрином образуются окрашенные продукты, определяемые колориметрическим методом. Нингидриновая реакция используется также в автоматических анализаторах аминокислот. Химия этой и следующей реакции Ван-Слайка будет рассмотрен далее в лабораторной работе (см. стр. 16).

Реакция Ван-Слайка основана на взаимодействии α -аминокислот с азотистой кислотой. По количеству выделяющегося в результате реакции газообразного азота определяют количественное содержание аминокислот.

Реакция с формальдегидом.

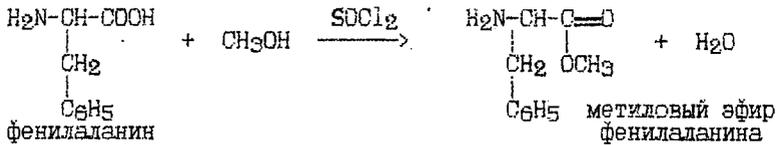
Эта реакция лежит в основе количественного определения α -аминокислот методом формольного титрования (метод Серенсена).

Вследствие амфотерного характера α -аминокислот непосредственное титрование их щелочью не может быть использовано в аналитических целях. При взаимодействии α -аминокислот с формальдегидом получают относительно устойчивые карбиноламины - N-метилольные производные, свободную карбоксильную группу которых затем титруют щелочью.

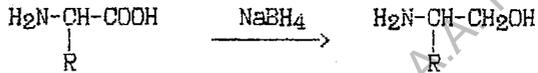


II. Реакции α -карбоксильной группы.

α -карбоксильные группы белковых аминокислот могут вступать в хорошо известные органические реакции, приводящие к образованию амидов, сложных эфиров и ацильных производных галогенидов. Например, при синтезе пептидов для временной защиты α -карбоксильных групп проводят реакцию **этерификации**. Так, фенилаланин этерифицируется почти количественно в безводном метаноле в присутствии соляной кислоты или тионилхлорида:



При анализе аминокислот и полипептидов (например, для определения первичной структуры пептидов) часто используется реакция **восстановления карбоксильной группы** (при помощи сильного восстановительного агента - боргидрида натрия или лития) до соответствующего аминокспирта:



Реакция используется для идентификации С-концевой аминокислоты в полипептиде.

Особое значение имеют многочисленные качественные цветные **реакции на функциональные группы радикалов аминокислот**. Их называют **специфическими** реакциями. Эти реакции, а также наиболее используемые универсальные реакции, характерные для всех α-аминокислот, предлагаем изучить в лабораторной работе по качественному обнаружению белковых аминокислот. В свое время они составляли основу анализа α-аминокислот и белков. В настоящее время, когда исследование аминокислот и белков проводится физико-химическими методами, многие качественные реакции все же сохраняют свое значение и применяются для обнаружения, идентификации и количественного анализа аминокислот.

Из физико-химических методов для разделения и идентификации аминокислот, входящих в состав сложных смесей, широко используют хроматографические и электрофоретические методы анализа, основанные на различии в кислотно-основных свойствах аминокислот.

В данной методической разработке предлагаем для изучения следующие лабораторные работы: "Качественные реакции на белковые аминокислоты", "Хроматографическое определение аминокислот в смеси", "Разделение смеси аминокислот методом электрофореза".

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАБОТА

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Перед выполнением лабораторных работ необходимо самостоятельно изучить соответствующий теоретический материал, используя рекомендуемую литературу, конспекты лекций, теоретическую часть данной методической разработки.

В начале занятий в лаборатории необходимо ознакомиться с методикой выполнения работ, устройством приборов и оборудования и только после этого приступить к выполнению эксперимента.

В ходе выполнения лабораторной работы проводятся наблюдения и отмечаются результаты опытов.

При оформлении лабораторной работы описывают принцип метода, химизм процесса, ход выполнения (кратко), результаты анализа и вывод.

Зачет по лабораторным работам и соответствующая оценка **выставляются при условии**, что студент:

- 1) успешно выполнил лабораторную работу;
- 2) квалифицированно обработал результаты и аккуратно оформил протокол;
- 3) защитил полученные результаты, то есть показал, что разобрался в существе работы и освоил необходимый минимум теории.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА БЕЛКОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Цель работы - изучить универсальные и специфические качественные реакции на белковые аминокислоты, используемые для обнаружения, идентификации и количественного анализа аминокислот.

Экспериментальная работа состоит из двух этапов:

- а) проведение качественных реакций на α -аминокислоты;
- б) выполнение контрольной задачи, связанной с определением аминокислот в предложенных растворах.

Для безопасного проведения лабораторной работы необходимо соблюдать следующие правила:

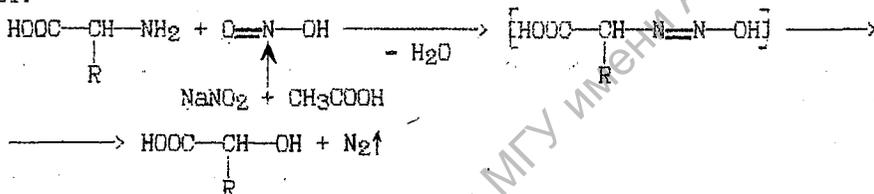
- аккуратно работать с растворами кислот и щелочей;

- опыты с концентрированными минеральными кислотами проводить в вытяжном шкафу; в случае попадания кислоты на кожу ее необходимо смыть водой, а затем обработать слабым раствором соды;
- при нагревании жидкостей следует быть осторожным, пробирки надо держать наклонно в сторону от себя и от соседа;
- соблюдать тишину и порядок в лаборатории.

1. УНИВЕРСАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

1. Реакции Ван-Слайка на первичную аминогруппу

Аминокислоты, содержащие первичную аминогруппу, реагируют с азотистой кислотой с образованием неустойчивого диазосоединения, разлагающегося с выделением свободного азота и образованием оксикислот.

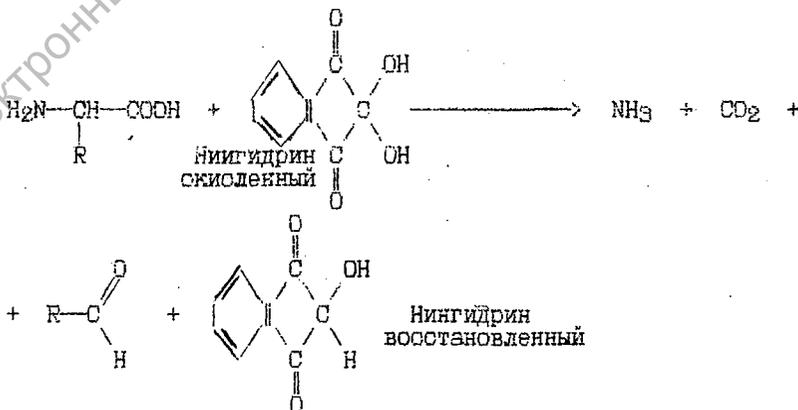


Реакции применяются для количественного определения аминокислот по измерению объема выделившегося газообразного азота.

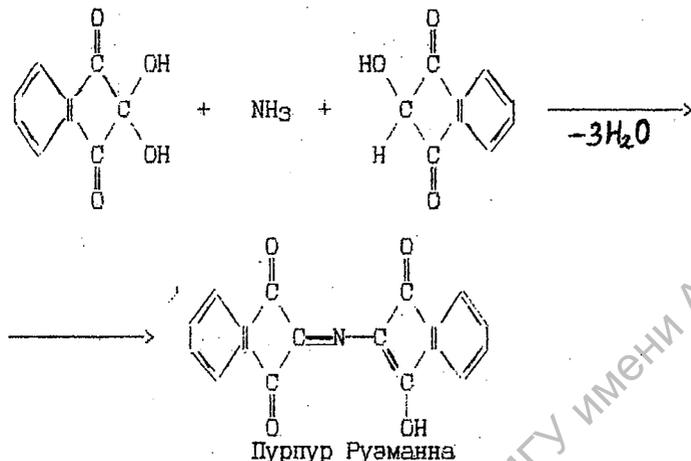
Выполнение работы. К 1 мл раствора глицина приливают равный объем 5%-ного раствора нитрита натрия и 0,5 мл концентрированной уксусной кислоты. Смесь осторожно взбалтывают. Выделяются пузырьки газа.

2. Нингидриновая реакция

α -Аминокислоты, реагируя с нингидрином (трикетогидринденгидрат), подвергаются окислительному деаминированию и одновременно декарбоксилированию.

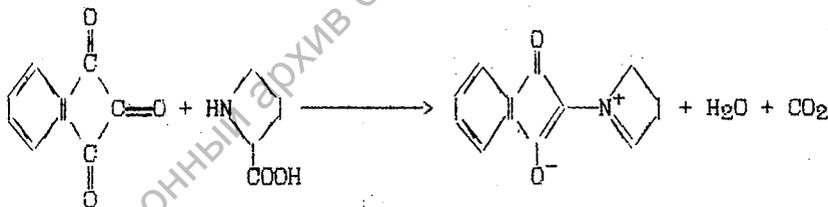


Образовавшийся аммиак реагирует с эквимолекулярными количествами окисленного и восстановленного нингидрина, образуя сине-фиолетовый комплекс (пурпур Рузмана), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.



Здесь приведён один из возможных вариантов протекания реакции. Существуют и другие предположения, например, через промежуточное образование Шиффа основания.

Пролин и оксипролин, содержащие замещённые α -аминогруппы, образуют с нингидрином производные иного строения, окрашенные в жёлтый цвет.



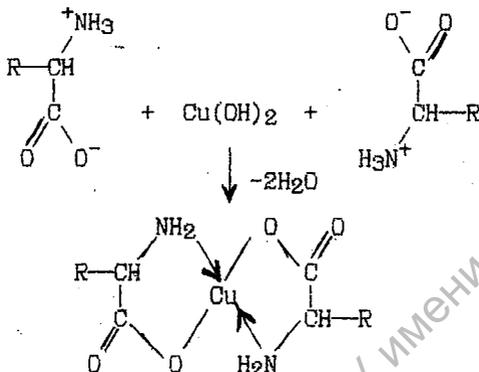
Серосодержащие аминокислоты с нингидрином образуют соединения, имеющие оранжево-бурую окраску.

Реакция с нингидрином используется для обнаружения и точного определения небольших количеств аминокислот.

Выполнение работы. В пробирку наливают 1 мл раствора глицина, а в другую - такой же объём раствора пролина. В обе пробирки прибавляют по 0,5 мл 1%-ного раствора нингидрина. Содержимое пробирок нагревают несколько минут до появления окраски. В первой пробирке появляется сине-фиолетовое окрашивание, во второй - жёлтое.

3. Образование комплексов с металлами

α -Аминокислоты образуют внутриклеточные соли с катионами двухвалентных металлов. Самыми устойчивыми являются соли меди, образующиеся в результате взаимодействия аминокислот с гидроксидом меди (II). Комплексы представляют собой ярко окрашенные в синий цвет хелатные соединения.



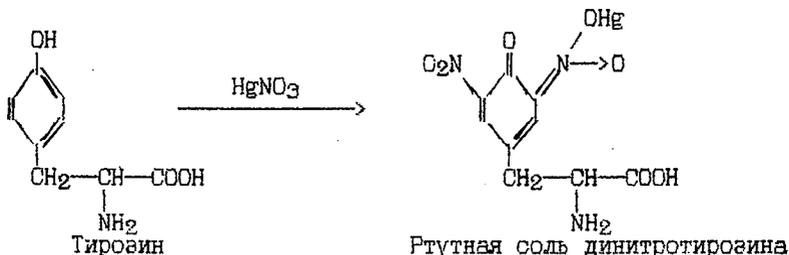
Водные растворы таких комплексных солей в отличие от растворов солей соответствующих металлов обладают очень низкой электропроводностью.

Выполнение работы. В три пробирки наливают по 1 мл 3%-ного раствора сульфата меди (II) и в каждую пробирку прибавляют по несколько капель 10%-ного раствора едкого натра до образования осадка. Затем в одну пробирку добавляют 0,5 мл концентрированного раствора глицина, во вторую - 0,5 мл раствора аргинина. Сравнивают окраску образовавшихся комплексных солей.

2. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

4. Реакция Миллона на тирозин

Тирозин образует с реактивом Миллона (раствор ртути в азотной кислоте с небольшим количеством нитрита натрия) кроваво-красный осадок, представляющий ртутную соль динитротирозина. Химизм реакции может быть представлен следующей схемой:



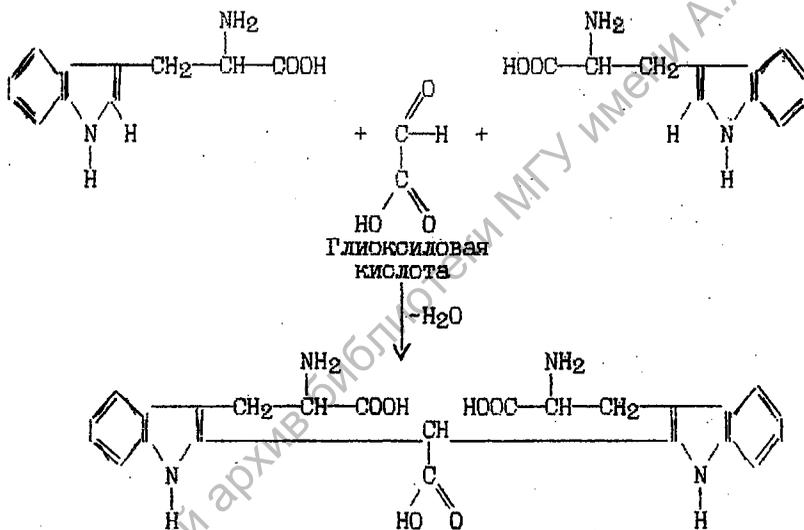
Выполнение работы. К 1 мл концентрированного раствора тирозина прибавляют 0,5 мл реактива Миллона, перемешивают и нагревают до появления красного окрашивания.

5. Реакции на триптофан

Реакция триптофана с альдегидами или альдегидокислотами в кислой среде приводит к образованию окрашенных продуктов конденсации. Это качественные реакции на индольное кольцо триптофана.

Реакция Адамкевича на триптофан

Взаимодействие триптофана с глиоксиловой кислотой, содержащейся в качестве примеси в концентрированной уксусной кислоте, приводит к образованию красно-фиолетового продукта. Конденсация протекает по схеме:

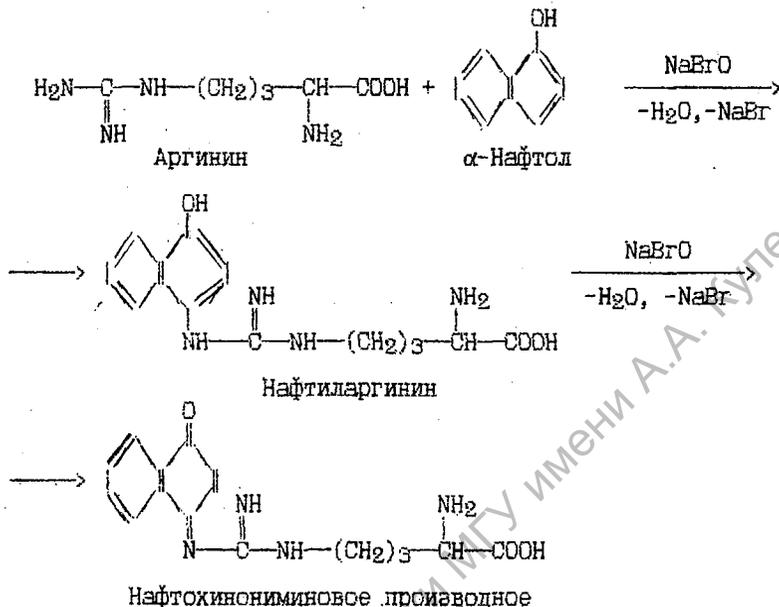


Выполнение работы. К 1 мл раствора триптофана приливают 0,5 мл концентрированной уксусной кислоты, перемешивают и осторожно по стенке пробирки, наклонив её, приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы не происходило смешение жидкостей. На границе двух слоёв через некоторое время проявляется красно-фиолетовое окрашивание.

6. Реакция Салагуши на аргинин

Эта реакция применяется для идентификации гуанидиновой группы пептида аргинина. При взаимодействии с α -нафтолом в присутствии окислителя в щелочной среде гуанидины дают соединения, окрашенные в красный цвет. Аргинин, реагируя с α -нафтолом и гипобромитом натрия,

образует продукт конденсации оранжево-красного цвета. Наиболее вероятный ход реакции может быть представлен следующей схемой:

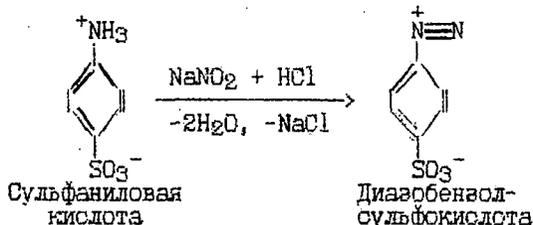


Выполнение работы. К 1 мл раствора аргинина прибавляют 3 капли 10%-ного раствора едкого натра, 2 капли спиртового раствора α -нафтола. Хорошо перемешивают и прибавляют 2 капли раствора гипобромита натрия, снова перемешивают. Для стабилизации быстро развивающегося оранжево-красного окрашивания приливают 0,5 мл 40%-ного раствора мочевины.

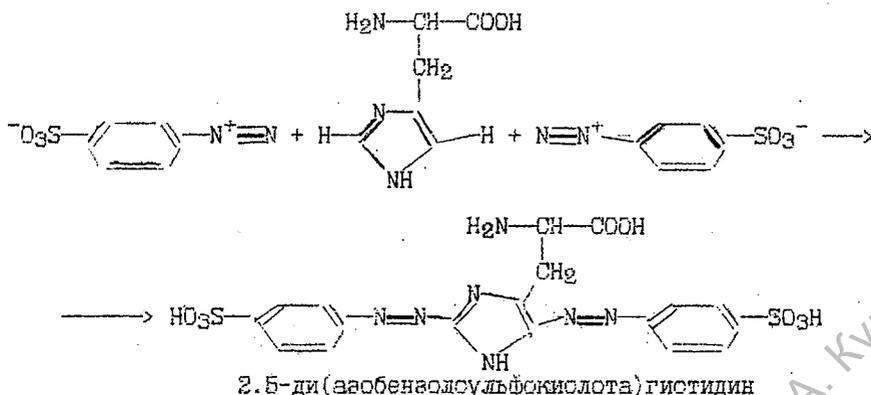
7. Реакция Паули на гистидин

Гистидин в щелочной среде реагирует с диазобензолсульфокислотой с образованием производного вишнево-красного цвета.

Диазобензолсульфокислота образуется при диазотировании сульфаниловой кислоты.



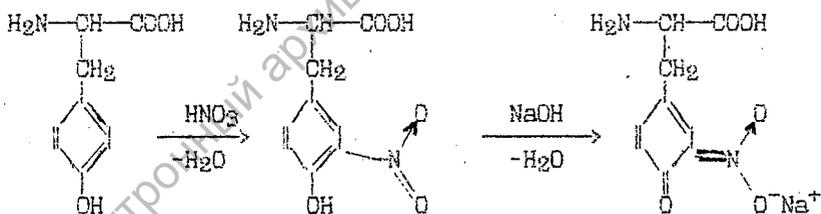
Взаимодействие диазобензолсульфокислоты с гистидином приводит к образованию азосоединения.



Выполнение работы. К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты прибавляют 2 мл 0,5%-ного раствора нитрита натрия, сильно встряхивают и сразу же приливают 2 мл раствора гистидина. После перемешивания содержимого пробирки приливают 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнёво-красная окраска.

8. Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция служит для обнаружения α -аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, фенилаланин, триптофан при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, окрашенные в жёлтый цвет. В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли, окрашенные в оранжевый цвет.

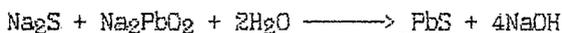
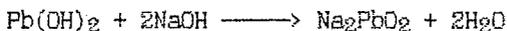
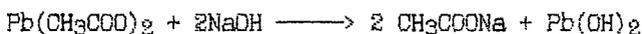
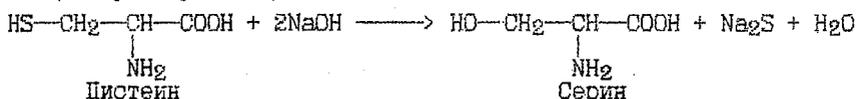


Выполнение работы. К 1 мл тирозина приливают 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и нагревают до появления жёлтой окраски. После охлаждения добавляют 1-2 мл 20%-ного раствора едкого натра до появления оранжевой окраски раствора.

9. Реакция Фоль на цистеин и цистин

При щелочном гидролизе "слабовязкая сера" в цистеине и цистине сравнительно легко отщепляется с образованием сероводорода. Сероводород реагирует со щелочью, образуя сульфиды натрия или калия.

При добавлении ацетата свинца происходит образование осадка сульфида свинца серо-чёрного цвета.



Выполнение работы. К 1 мл раствора цистеина приливают 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают до кипения, а затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца. Наблюдается выпадение серо-чёрного осадка.

КОНТРОЛЬНАЯ ЗАДАЧА

- С помощью универсальной реакции установите, во всех ли пробирках содержатся растворы аминокислот.
- Используя специфические качественные реакции, определите, растворы каких аминокислот находятся в пробирках. Ход работы и результаты оформите в виде таблицы:

Последовательность качественных реакций на аминокислоты	Номер пробирки; результат реакции				
	1	2	3	4	5
1.					
2.					
3. ...					

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

- Перечислите универсальные качественные реакции на белковые аминокислоты.
- Можно ли с помощью реакции Ван-Слайка различить глицин и пролин?
- Какая реакция является специфической на тирозин? Приведите схему этой реакции.
- Можно ли с помощью нингидриновой реакции отличить глицин от пролина?
- С помощью каких реакций можно обнаружить индольное кольцо в триптофане? Каков химизм этих реакций?
- Чем объясняется интенсивность окраски конечного продукта в реакции Паули?

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В СМЕСИ

Для разделения и идентификации аминокислот, входящих в состав сложных смесей, а также для определения их содержания в смеси широко используют хроматографические методы анализа.

Хроматографический метод анализа заключается в разделении многокомпонентных смесей на отдельные составляющие. Этот метод был предложен в 1903 году русским ученым М.С.Давтом. Он основан на избирательном поглощении отдельных компонентов анализируемой смеси различными сорбентами.

Хроматографические методы анализа различают по следующим признакам:

- по механизму разделения на адсорбционную, распределительную, ионообменную, осадочную, окислительно-восстановительную;
- по агрегатному состоянию системы - газовую, жидкостную, газо-жидкостную;
- по способу проведения процесса - колоночную, капиллярную, плоскостную (бумажную и тонкослойную).

В ряде случаев разделение оказывается результатом нескольких одновременно протекающих процессов с различными механизмами.

Следует отметить, что хроматографический метод анализа обладает существенными преимуществами по сравнению с другими методами анализа, что обеспечивает его широкое развитие и применение в последние десятилетия. Основными достоинствами этого метода являются:

1. Высокая избирательность, позволяющая разделять весьма близкие по строению вещества.
2. Определение почти всех типов химических соединений, независимо от их растворимости в воде.
3. Использование небольших количеств исследуемого вещества.
4. Быстрота проведения анализов.
5. Относительная простота оборудования и проведения определений методом распределительной хроматографии.

Целью данной работы является определение смеси аминокислот неизвестного состава методом распределительной плоскостной хроматографии.

Принцип метода распределительной хроматографии. Метод основан на различном распределении компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Разделение веществ происходит в процессе перемещения смеси потоком подвижной фазы вдоль неподвижной. В случае бумажной хроматографии неподвижной жидкой фазой является вода, которая удерживается порами хроматографической бумаги из атмосферы (20-22% от массы бумаги), а жидкой подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель, не смешивающийся или частично смешивающийся с водой. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движется неводный растворитель (подвижная фаза), молекулы вещества, нанесенные на бумагу, распределяются между двумя фазами в соответствии с их коэффициентами распределения. Скорость перемещения веществ на бумаге зависит от их химического строения и от способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. Чем выше растворимость вещества (в частности, аминокислоты) в подвижной фазе, тем дальше оно продвигается по бумаге вместе с растворителем, и наоборот.

Коэффициент распределения (K) данного вещества определяют по следующей формуле:

$$K = \frac{\text{концентрация вещества в подвижной фазе}}{\text{концентрация вещества в неподвижной фазе}}$$

Однако определить значение K в распределительной хроматографии на бумаге практически невозможно, поэтому для количественной оценки способности распределения веществ на бумаге введен коэффициент распределения R_f , представляющий собой отношение расстояния, пройденного данным веществом (а), к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (в):

$$R_f = \frac{\text{расстояние, пройденное аминокислотой}}{\text{расстояние, пройденное фронтом растворителя}};$$

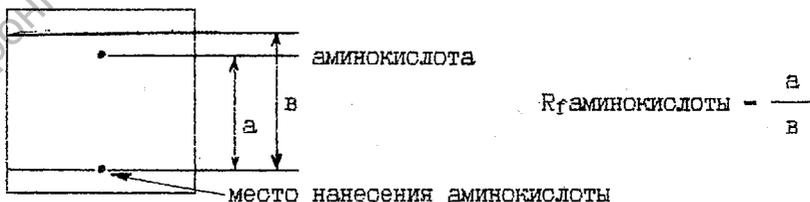


Рис.2. Хроматограмма аминокислоты.

Величина R_f зависит от химического строения аминокислоты, применяемого растворителя, сорта хроматографической бумаги и окружающей температуры. Значение R_f является величиной, характерной для каждой

аминокислоты и постоянной при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.). Чем больше различие в величинах R_f разделяемых веществ, тем лучше осуществляется разделение веществ при хроматографировании.

Идентификация аминокислот, содержащихся в исследуемой смеси, осуществляется сравнением стандартных значений R_f известных аминокислот, с R_f аминокислот, полученными для исследуемых смесей (см. табл. 2).

Способы проведения распределительной хроматографии. Хроматографирование на бумаге или пластине проводят в камере восходящим и нисходящим способами.

В обоих случаях на дно герметичной камеры наливают растворитель для насыщения камеры его парами, а затем помещают в камеру хроматографическую бумагу с нанесенными на нее разделяемыми смесями. При восходящей хроматографии бумажную полоску помещают вертикально так, чтобы нижний конец был опущен в растворитель. По мере движения растворителя вверх происходит разделение веществ. При нисходящей хроматографии верхний конец полоски бумаги с нанесенным веществом закрепляют в кювете, находящейся в верхней части камеры, а нижний конец опускают так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Кювету заполняют растворителем перед началом работы. Растворитель, двигаясь вниз под действием капиллярных сил и силы тяжести, разделяет вещества. Первый вид хроматографии применяется чаще.

Для получения хороших хроматограмм необходимо использовать бумагу высокого качества.

Требования к бумаге для хроматографии:

- 1) она должна быть химически чистой,
- 2) химически и адсорбционно нейтральной,
- 3) однородной по плотности,
- 4) обеспечивать определенную скорость движения (она должна пропускать растворитель с такой скоростью, при которой достигалось бы полное разделение веществ между подвижной и неподвижной фазами и не допускалось бы быстрое испарение растворителя из бумаги).

Хроматография требует и определенных растворителей. Жидкие фазы для хроматографирования на бумаге должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- 1) Обе жидкости (подвижная и неподвижная фаза) должны ограничено смешиваться друг с другом.
- 2) Подвижной фазой должен быть выбран такой растворитель, в ко-

тором компоненты разделяемой смеси имеют меньшую растворимость, чем в растворителе, применяемом в качестве неподвижной фазы.

3) Растворимость, и, следовательно, коэффициенты распределения компонентов хроматографируемой смеси должны быть различными для выбранной пары растворителей. В противном случае разделение смеси не произойдет.

4) Состав растворителя в процессе хроматографии не должен изменяться.

5) Растворители должны быть бесцветными или слабоокрашенными, легко удаляться с бумаги.

В настоящее время индивидуальные растворители используются в качестве жидких фаз редко. Чаще применяются насыщенные водой n-бутаноловый спирт, фенол, крезол и другие смеси органических реактивов.

Проявление хроматограммы. Для определения местоположения соединений хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете или опрыскивают специальными растворами. Наиболее часто положение аминокислот на бумаге обнаруживают при помощи цветной реакции с нингидрином. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в фиолетовый или желто-оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и оборудование:

1. 0,2%-ные водные растворы аминокислот.
2. Растворитель для хроматографирования: n-бутанол, ледяная уксусная кислота и вода смешиваются в отношении 4:1:1 (по объему).
3. 1%-ный раствор нингидрина в 95%-ном растворе ацетона.
4. Полоски хроматографической бумаги или пластины длиной 8-10 см, шириной 3,5 - 4,0 см.
5. Цилиндры с протертыми стеклами.
6. Капилляры для нанесения растворов аминокислот.
7. Пинцеты, ножницы, карандаши, линейки.
8. Термостат или электрическая плитка.

Для безопасного проведения лабораторной работы необходимо соблюдать следующие правила:

- работать с органическим растворителем под тягой и вдали от

электроплитки или горячей горелки, в случае воспламенения пламя надо гасить песком;

- проявлять хроматограмму раствором нингидрина в ацетоне также под тягой.

Кроме того, все операции с хроматографической бумагой и хроматограммами необходимо выполнять тщательно вымытыми руками или в тонких резиновых перчатках. Вся аппаратура должна быть очень чистой, иначе на хроматограмме выступит много пятен, не относящихся к исследуемым соединениям.

Ход работы:

1. Перед началом работы необходимо потренироваться в нанесении пятен раствора аминокислот. Для этого на полоски хроматографической бумаги (или пластины) легким касанием капилляра нанесите каплю раствора аминокислот, стремясь при этом, чтобы диаметр капли не превышал 2-3 мл.

2. На дно цилиндра осторожно, не омачивая стенок, калейте 4-5 мл бутанольного раствора.

3. Аккуратно возьмите за края нарезанную полоску хроматографической бумаги и на нижнем конце полоски на расстоянии 1 см от края наметьте карандашом маленький кружок диаметром 2-3 мм.

4. В середину кружочка при помощи капилляра нанесите каплю исследуемой смеси аминокислот. Нанесение проводите в 3-4 приема, следя за тем, чтобы при каждом прикосновении капилляра пятно не растекалось более чем на 2-3 мм. Каждую последующую порцию наносите после полного высыхания на воздухе предыдущей.

5. Приготовленную полоску опустите в цилиндр с бутанольным раствором так, чтобы она погружалась на 3-5 мм.

6. Закройте цилиндр стеклом и наблюдайте за подъемом растворителя по бумаге.

7. Когда фронт растворителя дойдет до высоты 1-1,5 см от верхнего края, выньте полоску из цилиндра, осторожно отметьте карандашом фронт растворителя и высушите полоску.

8. После испарения растворителя быстро протащите хроматограмму через раствор нингидрина, налитого в чашку Петри.

9. Снова подсушите полоску. После испарения растворителя можно наблюдать проявление хроматограммы — появление фиолетовых и жел-

то-оранжевых пятен. Химиям реакции взаимодействия аминокислоты с нингидрином описан в предыдущей лабораторной работе (см. стр.16).

10. Вычислите значения R_f для распределившихся аминокислот, измерив расстояния: от места нанесения капли до середины каждого пятна аминокислоты (а) и от места нанесения капли до фронта растворителя. По табл. 2 определите заданную смесь аминокислот.

11. Проверить свои результаты можно, проделав этот же опыт, но со "свидетелями".

Таблица 2.

Значения R_f отдельных аминокислот

№ п/п	Название аминокислот	Значения R_f для различных типов бумаг и пластин			
		Хроматограф. пластина silufol V 254	Хроматограф. пластина sorbfil	Хроматограф. бумага ватман № 1	Хроматограф. бумага силицел
1.	Гистидин	0,03	0,04	0,10	0,10
2.	Аргинин	0,05	0,06	0,13	0,12
3.	Аспарагиновая	0,14	0,22	0,13	0,21
4.	Глицин	0,22	0,23	0,18	0,28
5.	Треонин	0,24	0,25	0,22	0,33
6.	Аланин	0,26	0,32	0,29	0,38
7.	Глутамин	0,29	0,40	0,35	0,44
8.	Валин	0,39	0,48	0,48	0,53
9.	Метионин	0,45	0,48	0,48	0,54
10.	Лейцин	0,57	0,61	0,63	0,65
11.	Триптофан	0,59	0,63	0,49	0,62
12.	Фениланин	0,60	0,64	0,64	0,67

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На чем основан хроматографический метод анализа?
2. Какие виды хроматографии известны и какие из них используют для разделения и идентификации смесей аминокислот?
3. В чем заключается принцип распределительной хроматографии?
4. Что характеризует коэффициент распределения?
5. Какие факторы влияют на величину R_f ? Исходя из химического строения аминокислот (например, аспарагиновой и валина), предскажите их поведение при разделении методом распределительной хроматографии, предложенным в лабораторной работе.
6. Техника проведения тонкослойной или бумажной хроматографии. Какие требования к применяемым растворителям, хроматографической бумаге или пластине?
7. Как проявляют хроматограммы? В чем заключается химиям реакции с нингидрином?

РАЗДЕЛЕНИЕ СМЕСИ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Электрофорез - один из основных методов разделения веществ, основанный на различной скорости передвижения соединений с неодинаковыми зарядами в однородном электрическом поле. Применение электрического поля при соответствующих условиях позволяет разделить как вещества, имеющие заряды противоположного знака, так и вещества, которые имеют одинаковый знак заряда и отличаются лишь его величиной.

В 1937 году Арне Тиселиус (лауреат Нобелевской премии) с помощью электрофореза впервые осуществил разделение белков. В настоящее время, используя электрофоретические методы, разделяют аминокислоты, пептиды, белки, полисахариды, витамины, коферменты, компоненты нуклеиновых кислот, бактериальные токсины. Высокая эффективность и чувствительность метода позволяют использовать электрофорез для достаточно быстрого исследования образовавшейся в результате гидролиза белка смеси аминокислот: определить, какое количество аминокислот содержится в белке, и идентифицировать эти аминокислоты.

Разделение веществ при электрофорезе будет тем лучше, тем больше разница в их подвижности. На движение заряженных частиц оказывают влияние силы электрического поля, сопротивления среды, форма самих ионов и их гидратация, продолжительность опыта.

Скорость миграции (V) заряженных частиц вещества в электрическом поле зависит от напряжения электрического поля (E), общего заряда вещества (z) и сопротивления трения (f). Сопротивление трения определяется размером и формой молекул. Все указанные величины связаны между собой соотношением:

$$V = \frac{E \cdot z}{f}$$

Наибольший вклад в электрофоретическую подвижность (V) вносит величина заряда. В меньшей степени на скорость перемещения оказывают влияние форма и масса молекул. Так, белки движутся в электрическом поле гораздо медленнее, чем простые ионы. Это связано с тем, что отношение заряда к массе в белках меньше, чем в простых ионах. Заряды молекул разделяемых веществ зависят от pH среды, поэтому электрофорез осуществляется в буферных системах, стабилизирующих pH.

Вследствие известного сопротивления среды при прохождении тока повышается температура, что приводит к изменению сопротивления среды и испарению растворителей. Для обеспечения воспроизводимости резуль-

татов применяют источники питания, поддерживающие постоянный уровень напряжения или силы тока, используют систему охлаждения. Однако для разделения веществ при небольшом напряжении (100-300 В) и даже более высоком (1500 В) применяют аппаратуру без охлаждения. Наилучшее разделение достигается обычно на приборах, рассчитанных на рабочее напряжение порядка 3000-10000 В. В такие приборы вмонтированы холодильные устройства.

В зависимости от условий проведения, различают несколько видов электрофореза. По величине используемого напряжения - **низковольтный** и **высоковольтный** электрофорез.

По состоянию среды - **свободный** электрофорез, когда разделение проводят в растворе, и **зональный** (или зонный), когда разделение проводят на твердых влажных носителях, например, на хроматографической бумаге, силикагеле, в геле из крахмала или полиакриламида.

По расположению твердых поддерживающих сред - **горизонтальный** и **вертикальный**.

Высокой разрешающей способностью характеризуется электрофорез в полиакриламидном геле со стандартным размером пор, определяемым концентрацией исходных мономеров, ваятых для полимеризации геля. Поэтому разделение веществ происходит и по величине заряда, и по размеру молекул.

Аминокислоты, имеющие сравнительно малые размеры молекул, легко диффундируют, и потому их разделение возможно только при использовании твердой подложки - бумаги или крахмала.

Наиболее распространенным методом разделения белковых аминокислот является **электрофорез на бумаге**. Водный раствор, содержащий смесь аминокислот, наносят на полоску фильтровальной, хроматографической бумаги. Ей дают высохнуть, после чего смачивают буфером с заданным значением pH и помещают в прибор. Концы полоски погружают в кюветы с электродами и включают высокое напряжение (рис.3). В возникающем при этом постоянном электрическом поле аминокислоты разделяются в соответствии с их суммарным электрическим зарядом при выбранном pH.

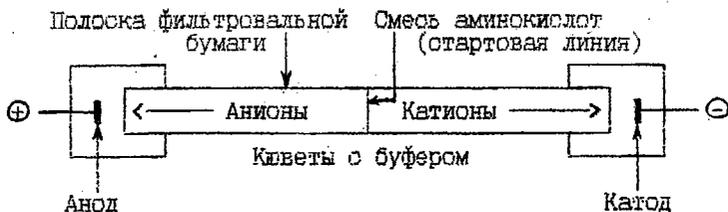


Рис.3. Схема разделения аминокислот методом электрофореза на бумаге.

Электрофоретическое разделение аминокислот основано на различии кислотно-основных свойствах аминокислот (см. стр. 8).

Аминокислоты, которые при заданном значении pH представляют собой катионы, мигрируют к катоду, а аминокислоты, имеющие форму анионов, перемещаются к аноду. Через некоторое время бумажную полоску высушивают, опрыскивают раствором нингидрина и снова сушат. В результате на бумаге проступают окрашенные пятна, расположенные на разных расстояниях от линии старта. Получают электрофореграмму.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Цель работы: - разделение смеси белковых аминокислот методом низковольтного горизонтального электрофореза на бумаге.

Реагенты и оборудование:

1. Прибор для горизонтального электрофореза на бумаге ЭПАУ-20-50.
2. Полоски хроматографической бумаги длиной 90 мм и шириной 85 мм.
3. Капилляры (диаметр отверстия 0,5 мм) для нанесения раствора смеси аминокислот.
4. Резиновые перчатки.
5. Фильтровальная бумага, карандаши, линейки, пинцеты.
6. Сушильный шкаф или электрическая плитка.
7. 0,2%-ые водные растворы белковых аминокислот.
8. Буферные растворы с pH=4 или pH=8.
9. 1%-ый раствор нингидрина и ацетоне.

Устройство аппарата для горизонтального электрофореза на бумаге ЭПАУ-20-50. Аппарат для горизонтального электрофореза состоит из двух соединенных частей: источника питания и камеры деления. Источник питания предназначен для подачи на электроды камеры деления напряжения постоянного тока (0 - 300 В), стабилизированного по току нагрузки и напряжению. Напряжение, подаваемое на электроды, и силу тока показывают приборы (вольтметр и миллиамперметр) на передней панели аппарата. Другая часть аппарата - рабочая камера деления, изготовленная из непрозрачного полистирола, разделенная в средней части перегородкой на два электродных отделения (анодное и катодное). В электродных отделениях расположены электроды, обеспечивающие подачу напряжения от источника питания. Электродные отделения предназначены для заливки буферного раствора, с помощью которого осуществляется

электрический контакт между электродами и полосками хроматографической бумаги с нанесенными на нее разделяемыми аминокислотами. Хроматографическая бумага закрепляется в специальной рамке, состоящей из основания и прижимной рамки и обеспечивающей натяжение полосок хроматографической бумаги в горизонтальном положении.

Для безопасного проведения экспериментальной работы необходимо выполнять следующие правила:

- работать в резиновых перчатках;
- во время работы аппарата запрещается открывать крышку рабочей камеры;
- соблюдать все правила работы в химической лаборатории.

Ход работы:

1. Получите у лаборанта раствор смеси аминокислот с указанным номером или приготовьте сами смесь равных объемов (по 1 мл) аминокислот, предложенных преподавателем.

2. Полоску хроматографической бумаги (перчатки!) положите на лист фильтровальной бумаги, по середине полоски проведите карандашом тонкую поперечную линию - стартовую. На одном из концов полоски обозначьте анод, на другом - катод, напишите свою фамилию и номер пробирки.

3. На стартовую линию легким касанием капилляра нанесите каплю раствора аминокислот, отменясь при этом, чтобы диаметр капли не превышал 2-3 мм. (предварительно потренируйтесь на обычном фильтре). Нанесение повторите 3-4 раза; каждую новую порцию наносят после того, как подсохнет предыдущая.

4. Подготовьте прибор к работе. Налейте в электродные отделения рабочей камеры по 100 мл буферного раствора так, чтобы электроды прибора были покрыты раствором.

5. Полоску хроматографической бумаги с нанесенной смесью аминокислот закрепите в специальной рамке так, чтобы линия старта находилась на ее центральной части. Затем рамку поместите в рабочую камеру, при этом концы полоски должны быть опущены в буферный раствор. В результате хроматографическая бумага начнет равномерно смачиваться буферным раствором под действием капиллярных сил. Смачивание проводить до тех пор, пока не останется сухой лишь центральная часть полоски на расстоянии 1 см по обе стороны от стартовой линии.

6. Закройте крышкой рабочую камеру. Включите аппарат в электросеть. При этом загорается сигнальная лампа. Поворотом ручки регулятора напряжения по часовой стрелке доведите напряжение до 200 В. Вольтметр на передней панели аппарата показывает фактическое напряжение, а миллиамперметр - силу тока.

7. Электрофорез проводится в течение 30-45 минут. По истечении этого времени регулятором уменьшите напряжение до нуля, выключите аппарат.

8. Снимите крышку рабочей камеры, полоски электрофореграммы выньте чистыми пинцетом и удалите с их концов избыток влаги фильтровальной бумагой. Затем высушите полоску в горизонтальном положении в сушильном шкафу или над электрической плиткой.

9. Высушенные полоски электрофореграмм смочите 1%-ным раствором нингидрина в ацетоне и для проявления снова поместите в сушильный шкаф.

10. После выполнения работы тщательно промойте рабочую камеру и рамку.

Проанализируйте полученные результаты. Определите направление перемещения аминокислот при электрофорезе, расположение на электрофореграмме относительно стартовой линии и относительно друг друга. Определите область изот для данных аминокислот и сравните их с теоретическими данными.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ

1. На чем основаны электрофоретические методы разделения веществ?
2. Какие факторы оказывают влияние на перемещение частиц в электрическом поле?
3. Перечислите известные Вам электрофоретические методы и укажите их практическое применение.
4. Определите величину суммарного заряда валина, аспарагиновой кислоты и аргинина при $pH=7$.
5. Смесь белковых аминокислот, содержащую аланин, лизин и глутаминовую кислоту, разделили методом горизонтального электрофореза на бумаге при $pH=6$. Определите положение аминокислот на электрофореграмме относительно линии старта.

ЗАДАЧИ И УПРАЖНЕНИЯ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОГО РЕШЕНИЯ.

1. Какие аминокислоты постоянно встречаются в составе белков: а) аланин, б) гидроксипролин, в) валин, г) лейцин, д) изолейцин, е) аминоуксусная, ж) фенилаланин?
2. Какие белковые аминокислоты являются незаменимыми: а) глицин, б) аланин, в) фенилаланин, г) лизин, д) треонин, е) триптофан, ж) тирозин? Напишите их структурные формулы.
3. Какие аминокислоты имеют неполярные или гидрофобные R-группы: а) серин, б) лейцин, в) метионин, г) цистеин, д) аспарагин?
4. Какие белковые аминокислоты являются производными ароматических кислот: а) тирозин, б) треонин, в) фенилаланин, г) аланин?
5. Напишите формулы оптических изомеров валина и треонина. Укажите, в какой оптически активной форме данные аминокислоты встречаются в белках.
6. Изобразите триптофан в виде диполярного иона. Какой заряд будет иметь аминокислота: а) в нейтральной, б) в кислой, в) в щелочной средах?
7. Напишите формулы природных аминокислот, имеющих при $\text{pH} = 7$: а) отрицательный заряд, б) положительный заряд.
8. Какие белковые аминокислоты в растворе дают кислую реакцию: а) валин, б) глутаминовая, в) лизин, г) аспарагиновая? Почему?
9. Какой заряд имеет белок в изоэлектрической точке: а) положительный, б) отрицательный, в) электрически нейтрален?
10. Определите $\text{pH}_{\text{из}}$ тирозина ($\text{pK}_1 = 2,20$, $\text{pK}_2 = 9,11$).
11. В какой области pH – кислой, нейтральной или щелочной будет находиться изоэлектрическая точка аргинина? Почему?
12. Как будет двигаться аминокислота при проведении электрофореза в условиях, когда pH раствора ниже электрической точки: а) к аноду, б) к катоду, в) останется на линии старта?
13. Смесь глутаминовой аминокислоты и изолейцина разделяли методом электрофореза на бумаге в нейтральной среде. Какое соединение двигалось: а) к аноду? б) к катоду? в) оставалось на линии старта?
14. Методом электрофореза разделяли смесь трех аминокислот: аспарагиновой, лейцина и лизина при $\text{pH} = 7$. Как будут двигаться эти аминокислоты в электрическом поле? Определить в какой области pH будут находиться изоэлектрические точки данных аминокислот. Написать ионные формы этих аминокислот при $\text{pH} = 7$ и при $\text{pH}_{\text{из}}$.
15. Смесь аминокислот цистеина, гистидина и аргинина разделяли методом электрофореза на бумаге при $\text{pH} = 8$. Определите положение

аминокислот на электрофореграмме, если $pH_{\text{кат}} (\text{гис}) = 5,02$, $pH_{\text{анод}} (\text{гис}) = 7,59$, $pI_{\text{мет}} (\text{арг}) = 10,76$.

16. Напишите уравнения реакций валина по аминогруппе.

17. Аминокислоты количественно можно определить по реакции с азотистой кислотой (реакция Ван-Слайка). Определите, сколько аминокислоты было взято, если в результате реакции выделилось 224 мл N_2 . Напишите химизм процесса.

18. Напишите уравнения реакций тирозина с: а) азотной кислотой, б) азотистой кислотой, в) фенилизотиоцианатом, г) 2,4-динитрофторбензолом.

19. Напишите уравнения реакций метионина с: а) формальдегидом, б) нитридрином, в) литийборгидридом.

20. Вычислите объем 0,2 М раствора гидроксида калия, необходимого для нейтрализации 200 мл 0,1 М раствора солянокислого глицина. Напишите уравнение реакции.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Степанов В.М.* Молекулярная биология. – М.: Высшая школа. – 1995.
2. *Филиппович Ю.Б.* Основы биохимии. – М.: Высшая школа. – 1985.
3. *Р.Марри, Д.Греннер, П.Мейес, В.Родуэла.* Биохимия человека. М.: Мир. – Т.1. – 1993.
4. *Ланинджер А.* Биохимия. – М.: Мир. – 1985.
5. *Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.* Биологическая химия. М.: Медицина – 1983.
6. *Бохинский Р.* Современные воззрения в биохимии. – М.: Мир. – 1987.
7. *Филиппович Ю.Б.* Биохимия белка и нуклеиновых кислот. – М.: Просвещение. – 1978.
8. *Шапиро Д.К.* Практикум по биологической химии. – Мн.: Высшая школа – 1976.
9. *Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А.* Практикум по общей биохимии. – М.: Просвещение. – 1975.
10. *Филиппович Ю.Б., Севастьянова Г.А., Щеголева Л.И.* Упражнения и задания по биологической химии. – М.: Просвещение. – 1986.
11. *Кучеренко Н.Е.* и др. Биохимия. Сборник задач и упражнений. – К.: Высшая школа. – 1988.
12. Физико-химические методы анализа / Под ред. *Алесковского В.Б.* Л.: Химия. – 1988.
13. *Уильямс Б., Уилсон К.* Методы биологической химии. – М.: Мир. – 1978.
14. *Ольшанская К.М., Потапова М.А., Морозова Н.М.* Практикум по хроматографическому анализу. – М.: Высшая школа. – 1970.
15. Хроматография на пластинах / Под ред. *Сакодянского К.И.* – Ереван. – 1990.
16. *Духин С.С., Державин Б.В.* Электрофорез. – М.: Наука. – 1976.