

第一章 绪 论

一、生物化学的概念、研究对象和内容

生物化学 (biochemistry) 是运用化学的原理和方法研究生物有机体化学组成和生命过程中化学变化规律的科学。简言之,生物化学就是研究生命活动的化学本质。生物化学的研究对象是生物体,包括动物、植物和微生物。生物化学研究的主要内容包括静态生物化学和动态生物化学。

静态生物化学是研究生物体的化学物质组成,以及它们的结构、性质和功能。地球上种类繁多的各种生物体,无论是微生物、植物、动物还是人,都具有相似的基本化学组成:即 C、H、O、N、P、S 以及少数其他微量化学元素,这些元素组合构成生物体的水分、无机盐离子和含碳有机化合物。其中的有机化合物主要包括核酸、蛋白质、糖类和脂类等,由于这些有机化合物分子量很大,因此称为生物大分子 (biological macromolecule)。此外,生物体还含有可溶性糖、有机酸、维生素、激素、生物碱和天然肽类等多种物质。这些物质在不同生物体中的种类和含量不同。

生物体中最重要的生物大分子是核酸和蛋白质。核酸是遗传信息的携带者和传递者,它通过控制蛋白质的生物合成决定细胞的类型和功能。而蛋白质是细胞结构的主要组成成分,也是细胞功能的主要体现者。本书第二、三章讨论了蛋白质和核酸这两类最重要的生物大分子的结构、性质和生理功能。

动态生物化学是研究组成生物体的化学物质在生物体内进行的分解与合成,相互转化与制约以及物质转化过程中伴随的能量转换等问题。

生物体最显著的基本特征就是能够进行繁殖和新陈代谢 (metabolism)。生物体要从周围环境摄取营养物质和能量,通过体内一系列化学变化合成自身的组成物质,这个过程称为同化作用 (assimilation)。同时,生物体内原有的物质又经过一系列的化学变化最终分解为不能利用的废物和热量排出体外到周围环境中去,这个过程称为异化作用 (dissimilation)。通过这种分解与合成过程,使生物体的组成物质得到不断的更新,这就是生物体的新陈代谢。新陈代谢是生命活动的物质基础和推动力。生物体的所有生命现象,包括生长、发育、遗传、变异等都建立在生物不断进行从不停止的新陈代谢基础之上;在这些变化中,生物体内特殊的生物催化剂——酶起着决定性的作用。本书第四章讨论了酶和辅酶的结构、性质和作用机理。在生物体内各类物质都有其各自的分解和合成途径,而且各种途径的速率总是能恰到好处地满足机体的需要,并且各种途径之间互不干扰,互相配合,彼此协调,互相转化,这说明生物体内有高度精密的自动调节控制系统。本书第五、七、八、九章讨论了生物体内主要物质代谢过程;第十二章讨论了生物体内代谢过程的调节形式和机理。

在生物体新陈代谢的物质转化同时伴随着能量转化。所有生物体内的最初能量来源

是太阳的辐射能。以绿色植物为主的光合生物通过光合作用捕获太阳能，并将太阳能转变为化学能贮存在以碳水化合物为主的有机物中。但生命活动所需的能量并非直接来自光合色素所吸收的太阳能，而是通过生物氧化分解有机物而获得。糖类是细胞结构物质和储藏物质，既是合成其它生物分子的碳源，又是生物界进行代谢活动的主要能源；脂类是生物膜的重要结构成分，可防止热量散发并且提供生物体需要的能量。本书第五、七、六章通过讨论生物体内糖类、脂类的降解和生物氧化过程，介绍了生物体内化学能的转化。

除了物质代谢和能量代谢以外，信息代谢也是生物化学研究的核心内容。生命现象得以延续不断地进行就在于生命体能够自我复制。一方面生命体可以进行繁殖以产生相同的后代。另一方面，多细胞生物在细胞分裂过程中也维持了相似的基本组成。生命体可以在细胞间和世代间保证准确的信息复制和信息传递。核酸是遗传信息的携带者，生物体内遗传信息传递的主要通路是由 DNA 的复制和 RNA 的转录以及蛋白质的生物合成构成的。本书第十、十一章讨论了这方面的内容。

二、生物化学的发展简史

生物化学是 18 世纪 70 年代以后，伴随着近代化学和生理学的发展，开始逐步形成的一门独立的新兴边缘学科，至今只有 200 多年历史。但生物化学知识的积累和应用，却可追溯到远古时代。人类在长期的生产活动和社会实践中，累积了许多有关农牧业生产、食品加工和医药方面的宝贵知识与经验。公元前 21 世纪，我国人民就利用曲造酒，实际上就是用曲中的酶将谷物中糖类物质转化为酒。公元 4 世纪，已知道地方性甲状腺肿可用含碘的海带、紫菜、海藻等海产品防治。公元 7 世纪，已经知道用猪肝治疗夜盲症。夜盲症是由于缺乏维生素 A 引起的，而猪肝富含维生素 A。

1785 年法国著名化学家 Lavoisier 证明，动物呼吸是体内缓慢和不发光的燃烧。在呼吸过程中，吸进的氧气被消耗，呼出的是二氧化碳，同时放出热能，在呼吸过程中有氧化作用。这是生物氧化与能量代谢研究的开端。

19 世纪，德国科学家 Liebig 在 1840 年出版的《有机化学在农业和生理学中的应用》一书中详细地描述了自然界存在的物质循环，阐明了动物、植物和微生物在物质和能量方面相互依赖和循环的关系；法国著名微生物学家 Pasteur 对乳酸发酵和酒精发酵进行了深入的研究，指出发酵是由微生物所引起的，为发酵和呼吸的生物化学理论奠定了基础。

19 世纪末至 20 世纪初，生物化学领域有三个重大发现，即酶、维生素和激素。Buchner 于 1897 年证明破碎酵母细胞的抽提液仍能使糖发酵，引进了生物催化剂的概念。这是用无细胞提取液离体的方法研究动态生物化学的开始，为以后对糖的分解代谢机制的研究以及酶学研究打下基础。随后人们对很多酶进行了分离提纯。1926 年，Sumner 首次将脲酶制成结晶，并证明酶的化学本质是蛋白质。20 世纪初，人们确认脚气病和坏血病是由于缺乏某种微量营养物质引起的。Funk 在 1911 年结晶出抗神经炎维生素，实际是复合维生素 B，并提出 Vitamine（维他命）一词，意为“生命的胺”。后来发现许多维生素并非

胺类化合物，因此，又改为 Vitamin（维生素）。1902 年，Abel 分离出肾上腺素并制成结晶。1905 年，Starling 提出 hormone（激素）一词。1926 年，Went 从燕麦胚芽鞘分离出植物激素——生长素。酶、维生素和激素的研究极大地丰富了生物化学的知识，促进了生物化学的发展，确立了生物化学作为生命科学重要基础的地位。

20 世纪 30 年代以后，随着实验技术和分析鉴定手段不断更新与完善，生物化学进入了动态生物化学发展时期，在研究生物体的新陈代谢及其调控机制方面取得了重大进展。在 1940 年前后，基本上阐明了各类生物大分子的主要代谢途径：糖酵解、三羧酸循环、氧化磷酸化、磷酸戊糖途径、脂肪代谢和光合磷酸化等。如德国生物化学家 Embden、Meyerhof 和 Parnas 阐明了糖酵解反应途径；英国生物化学家 Krebs 证明了尿素循环和三羧酸循环；美国生物化学家 Lipmann 发现了 ATP 在能量传递循环中的中心作用；美国人 Calvin 和 Benson 证明了光合碳代谢途径。另外，对代谢调控机制也有了更多的了解。

从 20 世纪 50 年代开始，生物化学以更快的速度发展，建立了许多先进技术和方法。其中同位素、电子显微镜、X-射线衍射、层析、电泳、超速离心等技术手段应用于生物化学研究中，使人们可以从整体水平逐步深入到细胞、细胞器、以至分子水平，来探索生物分子的结构与功能。例如将放射性同位素示踪法应用于代谢途径的研究；层析法应用于分离和鉴定各种化合物；超速离心法用于分离大分子；用氨基酸自动分析仪测定氨基酸的组成及排列顺序；用 X-衍射等方法测定蛋白质的空间结构。有些科学家的工作为生物化学研究做出了突出贡献，为生物化学的发展奠定了基础。

自 1945 至 1955 年，Sanger 用 10 年时间完成了牛胰岛素蛋白质一级结构的分析，这项工作建立了测定蛋白质氨基酸顺序的方法，为蛋白质一级结构的测定打下基础，具有划时代的意义。1965 年我国首先完成了结晶牛胰岛素的人工合成。

20 世纪 50 年代中期，Kendrew 和 Perutz 采用 X-光衍射法对鲸肌红蛋白和马血红蛋白进行研究，阐明了这两种蛋白的三维空间结构，这是蛋白质研究中的又一重大贡献。

1953 年，Watson 和 Crick 创造性地提出了 DNA 分子的双螺旋结构模型，使人们第一次知道了基因的结构实质，不仅为 DNA 复制机制的研究打下了基础，从分子水平上揭示遗传现象的本质，而且开辟了分子生物学的新纪元，从分子水平上研究和改变生物细胞的基因结构及遗传特性。这是生物学历史上的重要里程碑。

1977 年，Sanger 完成了噬菌体 X174 DNA 一级结构的分析，这是由 5375 个核苷酸组成的 DNA。这一工作对遗传物质的结构与功能的研究具有重要的意义。现在，已有多种 DNA 和 RNA 的结构被成功地测定。1981 年，我国首先完成了酵母丙氨酸转移核糖核酸的人工合成。

现代生物化学正在进一步发展，其基本理论和实验技术目前已经渗透到生命科学的各个领域（如生理学、遗传学、细胞学、分类学和生态学），在光合作用机理、酶作用机理、代谢过程的调节控制、生物固氮机理、抗逆性的生物化学基础、核酸和蛋白质三维空间结构、基因克隆、转化和基因表达的调节控制等领域内的重大问题方面不断取得新的进展；并产生了许多新兴的边缘学科和技术领域，如分子生物学、分子遗传学、量子生物学、结构生物学、生物工程等。生物化学是这些新兴学科的理论基础，而这些学

科的发展又为生物化学提供了新的理论和研究手段。如今生物化学和分子生物学之间日益密切的联系，为阐明生命现象的分子机理开辟了广阔的前景。

三、生物化学与其他学科的关系

生物化学是由化学和生物学互相渗透互相影响而形成的一门学科，所以它与化学及有关的生物学科有着密切的联系。

(一) 与化学的关系

生物化学与化学特别是有机化学和物理化学有着不可分割的联系。近代生物化学的起源依赖于有机化学对各种有机物结构的研究。在进行生物体新陈代谢的研究工作，必须具备有关生物体内有机化合物结构和性质的知识，所以首先要运用化学的方法和原理将生物分子分离纯化出来，再进一步研究其结构和性质；而物理化学中热力学的原则和理论则是分析生物体内物质和能量复杂的变化规律的理论基础。

(二) 与生物科学的关系

生物化学的研究对象是生物体，属于生物学科的一个分支，和生物学科的其他分支均有着密切的关系。

首先，生物化学与生理学是特别密切的姊妹学科。研究植物生命活动原理的植物生理学，必然要涉及植物体内有机物代谢这一生命活动的重要内容，而有机物代谢的途径和机理也正是生物化学的核心内容之一。

生物化学与遗传学关系密切。遗传学研究生命过程中遗传信息的传递与变异。核酸是一切生物遗传信息的载体，而遗传信息的表达是通过核酸所携带的遗传信息翻译为蛋白质来实现的。所以，核酸和蛋白质的结构、性质、代谢与功能，同时是遗传学和生物化学的重要内容。这种将生物化学与遗传学相结合的边缘科学也被称为分子遗传学或狭义的分子生物学，主要研究遗传物质（核酸）的复制、转录、表达、调控以及与其他生命活动的关系。

生物化学与微生物学的联系也十分密切，目前积累的许多生物化学知识，有相当部分是用微生物为研究材料获得的，如大肠杆菌是被生物化学广泛应用的试验材料。而生物化学的理论又是研究微生物形态、分类和生理过程的理论基础。在研究微生物的代谢、生理活动，病毒的本质，以及免疫的化学程序、抗体的生成机制等方面都要应用生物化学的理论和技術。

生物化学与细胞生物学也有着十分密切的联系。细胞生物学研究生物细胞的形态、成分、结构和功能，研究过程中必须探索组成细胞的各种化学物质的性质及其变化。所以要应用生物化学的知识和理论。

生物化学与分类学也有关系。目前的研究发现，不同生物体内某些相似的蛋白质具有一定的保守性，它们比形态解剖特征较少受到自然选择的影响，所以可以作为生物物种遗传关系和进化亲缘关系的可靠指标。蛋白质及其他特殊生化成分，可以作为生物分类的依据，以补充形态分类的不足，解决分类学中的难题。

四、生物化学的应用与发展前景

生物化学的产生和发展源于人们的生产实践，它的迅速进步随即又有力地推动着生产实践的发展。生物化学的理论知识、实验技术以及生化产品广泛应用于农业、工业、医药、食品加工生产等重要经济领域，已经和正在为社会经济发展和人们生活水平的提高做出重要贡献。

在农业生产上，作物栽培、作物品种鉴定、遗传育种、土壤农业化学、豆科作物的共生固氮、植物的抗逆性、植物病虫害防治等学科都越来越多地应用生物化学作为理论基础。

农业科学中栽培学是研究经济植物栽培的理论和技術，运用生物化学的知识，可以阐明这些植物在不同生物环境中新陈代谢变化的规律，了解人们关心的产物成分积累的途径和控制方式，以便设计合理的栽培措施和创造适宜的条件，使人们获取优质的、更高的经济产量。

作物品种鉴定是农业生产中一个很重要的问题。过去鉴定作物品种要将种子在田间分别播种，长成植株后从形态上比较它们的性状来进行鉴定。这种传统的方法需要时间长，消耗人力和土地较多，而现在可运用电泳的方法将不同品种中的储藏蛋白分离，染色后显现出蛋白质的区带，不同作物品种具有不同的区带。将这些区带编号，根据某一品种的蛋白质区带即可查出它属于什么品种。同时，还可利用现代分子生物学中的限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 技术手段，直接提取同一作物不同品种的种子 DNA，进行限制性内切酶消化并进行电泳分析，根据不同品种具有其独特的电泳谱带，来鉴别种子的真伪，保护消费者的权益。

遗传育种就是要应用生物化学的理论和技術，有目的地控制作物品种的优良性状在世代间传递。一些生化性状可以作为确定品种亲缘关系和品种选育的指标。例如，应用同功酶的研究有助于确定作物品种的亲缘关系。利用植物基因克隆和转化研究的理论和实践，可以不受亲缘关系的限制，进行作物品种改良，甚至创造出新物种。这就是整个生物技术的核心内容——基因工程。

土壤农业化学的深入研究依赖生物化学的基础知识。土壤微生物学、土壤酶学和土壤营养元素的研究可以揭示土壤中有机成分的分解转化过程，有助于提高土壤肥力和植物对养分的吸收利用。土壤中的微生物可分泌出多种胞外酶，这些酶对土壤中有机成分的转化及营养物质的释放有密切关系，影响着土壤中营养的有效性。这些问题的研究都要应用生物化学的原理和方法，属于生物化学的研究内容。

豆科植物的共生固氮作用是生物化学的一个重要课题，近年来对豆科植物与根瘤菌的共生固氮作用已经了解得更加清楚，如果进一步了解固氮机理，则有可能扩大优良根瘤菌种的共生寄主范围，促进豆科植物结瘤，从而增加豆科植物的固氮作用并提高产量。

植物的抗寒性、抗旱性、抗盐性以及抗病性的研究离不开生物化学。以抗寒性为例，抗寒性是作物的重要遗传性状，过去育种要在田间鉴定作物的抗寒性。现在已经知道作物的抗寒性与植物的生物膜有密切关系。生物膜上的膜脂的流动性大的品种抗寒性强，

反之抗寒性弱。抗寒品种膜脂中不饱和脂肪酸含量高，非抗寒品种不饱和脂肪酸含量低。另外，抗寒性还与膜上的许多种酶有密切关系，如 ATP 酶、过氧化物歧化酶等。所以现在可利用生物化学方法鉴定作物的抗寒性。

生物化学的理论可以作为病虫害防治和植物保护的理论基础，用于研究植物被病原微生物侵染以后的代谢变化、了解植物抗病性的机理、病菌及害虫的生物化学特征、化学药剂（如杀菌剂、杀虫剂和除草剂）的毒性机理，以提高植物对环境的适应能力，增强植物生产力，使植物资源更好地为人类服务。

此外，家禽、畜牧兽医、桑蚕养殖等农业学科以及农产品、畜产品、水产品的贮藏、保鲜、加工都要运用有关的生物化学知识。

在工业生产上，如食品工业、发酵工业、制药工业、生物制品工业、皮革工业等都需要广泛地应用生物化学的理论及技术。尤其是在发酵工业中，人们可以根据微生物合成某种产物的代谢规律、特别是它的代谢调节规律，通过控制反应条件，或者利用基因工程来改造微生物，构建新的工程菌种以突破其限制步骤的调控，大量生产所需要的生物产品。此外，发酵产物的分离提纯也必须依据和利用生物化学的基本理论和技术手段。利用发酵法已经成功地实现工业化生产维生素 C、许多氨基酸和酶制剂等生化产品。而生产出的酶制剂又有相当部分应用于工农业产品的加工、工艺流程的改造以及医药行业，如淀粉酶和葡萄糖异构酶用来生产高果糖糖浆；纤维素酶用作添加剂以提高饲料有效利用率；某些蛋白酶制剂被用作助消化和溶解血栓的药物，还用于皮革脱毛和洗涤剂的添加剂等。

在医学领域，生物化学的应用非常广泛。人的病理状态往往是由于细胞的化学成分的改变，从而引起代谢及功能的紊乱。按照人体生长发育的不同需要，配制合理的饮食，供给适当的营养以增进人体健康；疾病的临床诊断；根据疾病的发病原因以及病原体与人体在代谢上和调控上的差异，设计或筛选出各种高效低毒的药物来防治疾病等，这些问题的研究都需要应用生物化学的理论和技术。而生化药物是从生物细胞提取的有治疗作用的生物物质，如一些激素、维生素、核苷酸类物质和某些酶。

20 世纪 70 年代，由于生物化学的迅速发展，形成一门独立的新学科——分子生物学。该学科被看成是生命科学以崭新的面目进入 21 世纪的带头学科，是从生物大分子和生物膜的结构、性质和功能的关系来阐明生物体繁殖、遗传等生命过程中的一些基本生化机理问题，如生物进化，遗传变异，细胞增殖、分化、转化，个体发育，衰老等。

在分子生物学基础上又发展起来新兴的技术学科——生物工程，包括基因工程、酶工程、细胞工程、发酵工程、生化工程、蛋白质工程、海洋生物工程、生物计算机及生物传感器等主要八大工程。其中的基因工程是生物工程的核心。人们试图像设计机器或建筑物一样，定向设计并构建具有特定优良性状的新物种、新品系，结合发酵和生化工程的原理和技术，生产出新的生物产品。尽管仍处于起步阶段，但目前用生物工程技术手段已经大规模生产出动植物体内含量少而为人类所需的蛋白质，如干扰素、生长素、胰岛素、肝炎疫苗等珍贵药物，展示出广阔的应用前景，对人类的生产和生活将产生巨大而深远的影响，是 21 世纪新兴技术产业之一。

世人瞩目的 Celera Genomics 人类基因组测序计划启动于 1999 年 9 月 8 日，其基因组序列工作框架草图的测绘已于 2000 年 6 月 26 日完成，并在 2000 年 10 月 1 日完成序列组装。此外，大肠杆菌、酵母、果蝇、拟南芥等模式生物的基因组测序也都在此之前完成。目前，水稻、家猪等基因组测序正在进行。人类迎来了生命科学发展的崭新阶段

后基因组时代。在这个时代，功能基因组学、蛋白质组学等新的学科相继诞生。许多新的技术、新的手段都被用来阐明基因的功能，如在 mRNA 水平上，通过 DNA 芯片（DNA chips）和微阵列分析法（microarray analysis）以及基因表达连续分析法（serial analysis of gene expression, SAGE）等技术检测到了成千上万基因的表达。因此作为新世纪的科技工作者，学习生物化学的基础理论、基础知识和基本技能，掌握生物化学、分子生物学和基因工程的基本原理及操作技术，密切关注生物化学发展的前沿知识和发展动态，是十分必要的。

五、生物化学的学习方法

生物化学内容十分丰富，发展非常迅速，在生命科学中的地位极其重要，是生物学、农学、畜牧、兽医、食品科学和医学等专业必修的专业基础课。学习生物化学时，要有明确的学习目的，同时还要有勤奋的学习态度，科学的学习方法。要根据本学科的特点，联系先修课程（如有机化学、生物学）的知识，在教师指导下全面了解教材内容，以核酸、蛋白质等生物大分子的结构、性质、代谢及生物功能为重点，在理解的基础上加强记忆，在记忆的过程中加深理解。要重视实验的研究方法，通过实验课和完成练习题，培养和提高分析问题和解决问题的能力。要重视理论联系实际，在学习基本理论知识同时，应该注意理解科学、技术与社会间的相互关系，理解所学生物化学知识的社会价值，并运用所学知识去解释一些现象，解决一些问题，指导生产实践。

第二章 蛋白质

蛋白质 (protein) 是生物体内主要的生物分子。蛋白质存在于所有生物体中, 从高等动植物到低等的微生物, 从人类到最简单的病毒, 都含有蛋白质。例如, 人体的蛋白质含量占人体固体总量的 45%, 皮肤、肌肉、内脏、毛发、韧带、血液等都是蛋白质为主要成分的。动物体内蛋白质约占鲜重的 20% 左右, 微生物中蛋白质含量也很高, 细菌含蛋白质约 50% ~ 80%, 干酵母含蛋白质约 46.6%。病毒中除了一小部分核酸外, 其余几乎都是蛋白质。植物体内蛋白质含量一般较低, 因为植物中淀粉和纤维素含量很高, 但在植物细胞的原生质和种子中蛋白质含量较高。生物体的化学组成极其复杂, 有各种高分子物质和低分子物质, 有各种有机物和无机物, 其中蛋白质起着非常重要的作用, 各种生物功能及生命现象往往是通过蛋白质来体现的。生命的主要机能都与蛋白质有关, 例如消化、排泄、运动、收缩, 以及对刺激的反应和繁殖等, 因此蛋白质具有重要的生物功能。

第一节 蛋白质的重要功能及元素组成

一、蛋白质的重要功能

蛋白质的功能主要有以下几个方面:

(一) 生物体的组成成分

蛋白质是生物体的主要结构成分。细胞里的片层结构, 如细胞膜、线粒体、叶绿体、内质网等都是由不溶性蛋白质和脂质组成的。高等动物的胶原纤维是主要的细胞外结构蛋白, 参与结缔组织和骨骼作为身体的支架。

(二) 酶的催化作用

生命的最基本特征是不能进行新陈代谢, 新陈代谢包括的所有化学反应都是在生物催化剂——酶的作用下进行的。生物体内的有些化学反应非常简单, 而有些反应则非常复杂, 如染色体的复制和蛋白质的合成等等, 这些反应都需要许多种酶的催化, 否则反应就不能进行。到目前为止, 已鉴定出的酶几乎都是蛋白质。所以蛋白质起到了确定化学转化作用类型的独特作用。

(三) 运输功能

生物体中许多小分子和离子要靠特殊的蛋白质运输, 如血红蛋白在红血球中运输氧, 血液中的脂蛋白负责运输脂类, 铁传递蛋白负责运输铁, 生物氧化过程中细胞色素 C 等电子传递体负责电子的传递。

(四) 储藏作用

有些蛋白质可作为生物体生长发育的养料储存起来, 如植物种子中的醇溶蛋白和谷

蛋白都是储藏蛋白，这些蛋白质有储藏氨基酸的功能，可供种子萌发时利用。动物的卵清蛋白和酪蛋白也是储藏蛋白。

（五）收缩运动

生物的运动也离不开蛋白质。蛋白质是肌肉的主要成分，肌肉收缩实际上是肌球蛋白和肌动蛋白丝状体的滑动运动，而运动是通过肌肉收缩完成的。细菌的鞭毛及纤毛是由许多微管蛋白组装起来的，也能产生类似的活动。近年来研究发现，在非肌肉的运动系统中普遍存在着运动蛋白。

（六）免疫保护功能

疾病的发生与防御也与蛋白质有关，如免疫系统中的抗原和抗体都是蛋白质。抗体能够识别特异的抗原（如病毒、细菌和其它生物体的细胞）并与之结合以清除抗原的作用，因此它具有防御疾病和抵抗外界病原侵袭的免疫能力。

（七）激素功能

有些蛋白质具有激素功能，对生物体的新陈代谢起调节作用，如胰岛素能参与血糖的代谢调节，降低血液中的葡萄糖含量。

（八）接受和传递信息

生物体内起接受和传递信息作用的信号受体也是蛋白质，例如接受各种激素的受体蛋白和接受外界刺激的感觉蛋白（如视网膜上的视色素、味蕾上的味觉蛋白等）都属于这一类。

（九）控制生长和分化

遗传信息的表达不是随意的，无控制的，在某一个时期只有小部分细胞的基因被表达。这种有控制的表达对于细胞的正常生长和分化是必须的。而控制基因表达的“开”和“关”也是由蛋白质来完成的，如组蛋白和阻抑蛋白等都参与细胞生长和分化的调节控制。

总之，蛋白质是生命活动所依赖的基础，是生命现象的主要执行者和体现者，蛋白质在生物的几乎所有生命过程中起着极其重要的作用。生物体中蛋白质的种类非常之多，每种类型生物细胞都含有成千上万种蛋白质，且各自具有其独特的结构和功能。不同生物所含有的蛋白质的种类和数量也各不相同，并且具有时空性和可调节性，因而表现出不同的性状和特征。对于蛋白质组（指由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白质）的研究形成了一个新的领域——蛋白质组学。蛋白质组学是以蛋白质组为对象，在整体水平上研究蛋白质的组成与调控的活动规律，它旨在阐明生物体全部蛋白质的表达模式及功能模式，其内容包括蛋白质的定性鉴定、定量检测、细胞定位和相互作用研究等，最终揭示蛋白质功能，增进我们对生命活动规律的了解，诠释生命的奥秘。

二、蛋白质的元素组成

蛋白质的元素组成是指蛋白质分子中所含的各种元素的多少，通过对不同生物的蛋白质样品进行元素分析，发现大多数蛋白质的基本组成相似，并以一定的比例关系存在。

蛋白质所含的主要元素有：

碳：50% ~ 55%，平均 52%；

氢：6.9% ~ 7.7%，平均 7%；

氧：21% ~ 24%，平均 23%；

氮：15% ~ 17.6%，平均 16%；

硫：0.3% ~ 2.3%，平均 2%。

有些蛋白质还含有少量的其他元素，称为微量元素。蛋白质中所含的微量元素主要有：磷（0.4% ~ 0.9%）、铁（0.4% ~ 0.9%）、碘，此外还含有锌、钼、铜等元素。

大多数蛋白质中氮的含量较恒定，平均为 16%，即每 100g 蛋白质中含 16g 氮，因此可通过测定生物样品中的氮来测定蛋白质的含量（每测得 1g 氮即相当于 6.25g 蛋白质）。这是定氮法测定蛋白质含量的计算基础，即用定氮法测得的样品含氮量乘以 6.25，即可算出样品中蛋白质的含量。

$$\text{蛋白质含量} = \text{含氮量} \times \frac{100}{16} = \text{含氮量} \times 6.25$$

测定蛋白质含量的方法很多，其中最基本和常用的方法就是测定含氮量的方法。测定含氮量一般都采用微量凯氏定氮法。其基本原理是蛋白质样品先经浓硫酸加热消化，使蛋白质中的有机氮转变成为无机氮，然后经碱化蒸馏，放出的氨气用标准酸吸收，再用标准碱来滴定剩余的酸，计算出的含氮量乘以 6.25 即是该样品中的蛋白质含量。除此之外，还可用 280nm 紫外吸收法、双缩脲法、福林酚试剂法和考马斯亮蓝比色等方法测定蛋白质的含量。

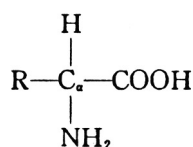
第二节 氨基酸

蛋白质是生物大分子，分子量大且结构复杂。蛋白质可被酸、碱水解，也可以被酶水解，水解后的产物为低分子量的肽和氨基酸（amino acid, AA）。如彻底水解则可得到各种氨基酸，而且氨基酸不能再水解成更小的单位，所以氨基酸是组成蛋白质的基本结构单位。各种蛋白质所含的氨基酸的种类和数目都各不相同。

一、氨基酸的结构特点及分类

（一）氨基酸的结构特点

目前已发现的氨基酸很多，但组成蛋白质分子的氨基酸有 20 种，这 20 种氨基酸也称为编码氨基酸，因为遗传密码表中只有这 20 种氨基酸。所有生物都是利用这 20 种氨基酸作为构件组成各种蛋白质分子的。这些天然氨基酸的结构有其共同特点。每个氨基酸分子（脯氨酸除外）的 α -碳原子上都结合一个氨基（amino group）、一个羧基（carboxyl group）、一个氢原子和一个各不相同的侧链 R 基团，故称为 α -氨基酸。各种氨基酸的差别就在于其 R 侧链的结构不同。



氨基酸都是白色晶体，每种氨基酸都有其特殊的结晶形状，利用结晶形状可以鉴别各种氨基酸。除胱氨酸（2分子半胱氨酸可形成1分子胱氨酸）和酪氨酸外，其他氨基酸都能溶于水，脯氨酸和羟脯氨酸还能溶于乙醇或乙醚中。

（二）氨基酸的分类

氨基酸分类的方法有多种，目前常以氨基酸的 R 基团的结构和性质作为氨基酸分类的基础。如果按侧链 R 基团的结构分类，可将 20 种氨基酸分为七类：

（1）R 为脂肪族基团的氨基酸；（2）R 为芳香族基团的氨基酸；（3）R 为含硫基团的氨基酸；（4）R 为含醇基基团的氨基酸；（5）R 为碱性基团的氨基酸；（6）R 为酸性基团的氨基酸；（7）R 为含酰胺基团的氨基酸。

根据 R 基团的极性可将氨基酸分为四大类：

（1）非极性 R 基团氨基酸；（2）极性不带电荷 R 基团氨基酸；（3）R 基团带负电荷的氨基酸；（4）R 基团带正电荷的氨基酸。这种分类方法更有利于说明不同氨基酸在蛋白质结构和功能上的作用。氨基酸的名称常使用三字母的简写符号表示，有时也使用单个字母简写符号表示。

1. 非极性 R 基团氨基酸

这一类包括 8 种氨基酸（表 2-1），其中 5 种是带有脂肪烃侧链的氨基酸（丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和脯氨酸）。丙氨酸的侧链是一个简单的甲基；缬氨酸的侧链是一个含有支链的三碳侧链；亮氨酸和异亮氨酸都含有带支链的四碳侧链。这 4 种氨基酸的侧链是高度疏水的，所以它们倾向于聚集以避开水，这在建立和维持蛋白质的三维结构中起着重要的作用。脯氨酸明显地不同于其它 19 种氨基酸，它有一个环形的饱和烃侧链结合在 α -碳和 α -氨基的氮上，所以严格地讲，脯氨酸是一个亚氨基酸而不是氨基酸，因为它不含有氨基而含有亚氨基。脯氨酸的环形侧链结构限制蛋白质的空间结构，有时会在多肽链中引进一个转折的变化。苯丙氨酸是一个含有苯基的氨基酸。色氨酸的侧链带有一个双环的吲哚基，所以色氨酸又称为吲哚丙氨酸。甲硫氨酸含有硫元素，又称蛋氨酸，是疏水氨基酸，它的侧链上带有一个非极性的甲基硫醚基。

表 2-1 非极性 R 基团氨基酸

氨基酸名称	结构式	三字母符号	单字母符号
丙氨酸 (alanine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Ala	A
缬氨酸 (valine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Val	V
亮氨酸 (leucine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Leu	L
异亮氨酸 (isoleucine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Ile	I
脯氨酸 (proline)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{N} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \\ \\ \text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$	Pro	P
苯丙氨酸 (phenylalanine)	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Phe	F
色氨酸 (tryptophan)	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{C}=\text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{N H} \\ \\ \text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Trp	W
甲硫氨酸 (methionine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N H}_3^+ \end{array}$	Met	M

2. 极性不带电荷 R 基团氨基酸

这一类包括 7 种氨基酸 (表 2-2), 它们的侧链含有极性基团, 可与水形成氢键。甘氨酸是 20 种氨基酸中结构最简单的, 它的侧链是个氢原子, α -碳上的 2 个氢原子赋予分子一点疏水性。由于甘氨酸的侧链很小, 所以在许多蛋白质的构象中起着独特的作用。丝氨酸和苏氨酸是两个侧链含有 $-\text{OH}$ 基的不带电荷的氨基酸。由于丝氨酸和苏氨酸的侧链含有羟基, 所以是极性氨基酸。丝氨酸的羟甲基 ($-\text{CH}_2\text{OH}$) 可参与很多酶的活性部位反应。

半胱氨酸也是一种含硫氨基酸, 其侧链上含有一个巯基 ($-\text{SH}$), 所以又称为巯基丙氨酸。虽然半胱氨酸的侧链具有疏水性, 但 $-\text{SH}$ 是一个高反应性的基团, 它可以失去氢质子, 象一个弱酸, 所以是一种极性氨基酸。两个半胱氨酸分子通过二硫键连接形成胱

氨酸。二硫键 (disulfide bonds) 是两个半胱氨酸的巯基氧化形成的。二硫键又称为二硫桥, 在稳定某些蛋白质的三维结构中起着重要作用。

酪氨酸的侧链也含有芳香族基团, 结构类似于苯丙氨酸。由于酪氨酸的侧链带有极性基团 (-OH), 所以具有极性。

天冬酰胺和谷氨酰胺分别是天冬氨酸和谷氨酸的酰胺化产物。虽然这两种氨基酸的侧链是不带电荷的, 但它们的极性很强, 也经常出现在蛋白质分子的表面, 它们可以和水相互作用。这两种氨基酸的酰胺基可以和其它极性氨基酸侧链上的原子形成氢键。

表 2-2 极性不带电荷 R 基团氨基酸

氨基酸名称	结构式	三字母符号	单字母符号
甘氨酸(glycine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Gly	G
丝氨酸(serine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Ser	S
苏氨酸(threonine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Thr	T
半胱氨酸(cysteine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Cys	C
酪氨酸(tyrosine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Tyr	Y
天冬酰胺(asparagine)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Asn	N
谷氨酰胺(glutamine)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$	Gln	Q

3. R 基团带负电荷的氨基酸

这一类包括 2 种酸性氨基酸 (表 2-3)。天冬氨酸和谷氨酸都是二羧基氨基酸, 除了含有 羧基外, 天冬氨酸还含有 羧基, 谷氨酸还含有 羧基。由于这两种氨基酸的侧

链在 pH7 时都离子化了，所以在蛋白质中是带负电荷的。这两种氨基酸经常出现在蛋白质分子表面上。

表 2-3 R 基团带负电荷的氨基酸

氨基酸名称	结构式	三字母符号	单字母符号
天冬氨酸 (aspartic acid)	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$	Asp	D
谷氨酸 (glutamic acid)	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\ \\ \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$	Glu	E

4. R 基团带正电荷的氨基酸

这一类包括 3 种氨基酸 (表 2-4)。组氨酸、精氨酸和赖氨酸的侧链都带有亲水性的含氮碱基团，在 pH7 时它们的侧链基团带有正电荷。组氨酸的侧链有一个咪唑环，所以又称为咪唑丙氨酸。咪唑基是可以离子化的。赖氨酸是一个双氨基酸，含有 γ -氨基和 ϵ -氨基。在中性 pH 时， ϵ -氨基是以碱性氮离子 ($-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$) 形式存在的，在蛋白质中通常带正电荷。精氨酸的侧链带有一个胍基，它是 20 种氨基酸中碱性最强的氨基酸。

表 2-4 R 基团带正电荷的氨基酸

氨基酸名称	结构式	三字母符号	单字母符号
赖氨酸 (lysine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Lys	K
精氨酸 (arginine)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$	Arg	R
组氨酸 (histidine) (pH6.0 时)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HC} = \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$	His	H

从以上氨基酸的结构和极性可以看出，由于 R 侧链的结构不同，引起各种氨基酸的

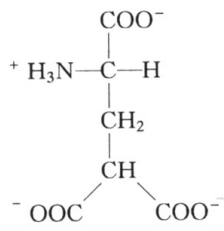
体积不同，形状不同，酸碱性不同以及化学性质不同。

二、必需氨基酸

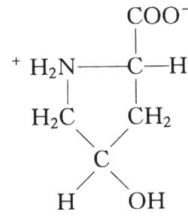
植物和某些微生物可以合成各种氨基酸，而人和动物则不同。人体和动物通过自身代谢可以合成大部分氨基酸，但有一部分氨基酸自身不能合成，必须由外界食物供给，这些氨基酸称为必需氨基酸(essential amino acids, EAA)。人体所需的必需氨基酸有 8 种，包括 L-赖氨酸、L-色氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸、L-异亮氨酸、L-苏氨酸。当人体缺乏这 8 种必需氨基酸中的任何一种时就会引起生长发育不良，甚至引起一些缺乏症。如果一种蛋白质中含有全部必需氨基酸，能使动物或人正常生长，称为完全蛋白质，如酪蛋白、卵蛋白等。如果蛋白质组成中缺少一种或几种必需氨基酸则称为不完全蛋白质，如白明胶等。所以一种蛋白质的营养价值高低要看它是否含有全部必需氨基酸以及含量多少。

三、蛋白质的稀有氨基酸

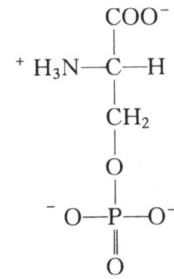
绝大多数蛋白质水解后产生的氨基酸是上述 20 种氨基酸，有些蛋白质中还含有少数特殊的氨基酸，称为蛋白质的稀有氨基酸。这些氨基酸都是正常氨基酸的衍生物，如弹性蛋白和胶原蛋白中的 4-羟基脯氨酸和 5-羟基赖氨酸；肌球蛋白和组蛋白中含有 6-N-甲基赖氨酸；凝血酶原中存在 γ -氨基谷氨酸；酪蛋白中存在磷酸丝氨酸；哺乳动物的肌肉中存在 N-甲基甘氨酸等。蛋白质中的稀有氨基酸在遗传上是特殊的，因为它们没有三联体密码，所有已知的稀有氨基酸都是在蛋白质合成后，在常见的氨基酸的基础上经过化学修饰而形成的。某些稀有氨基酸的结构式如下；



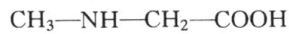
γ-羧基谷氨酸



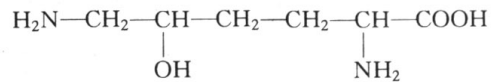
羟脯氨酸



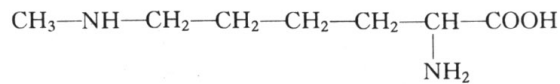
磷酸丝氨酸



N-甲基甘氨酸 (肉氨酸)



5-羟赖氨酸

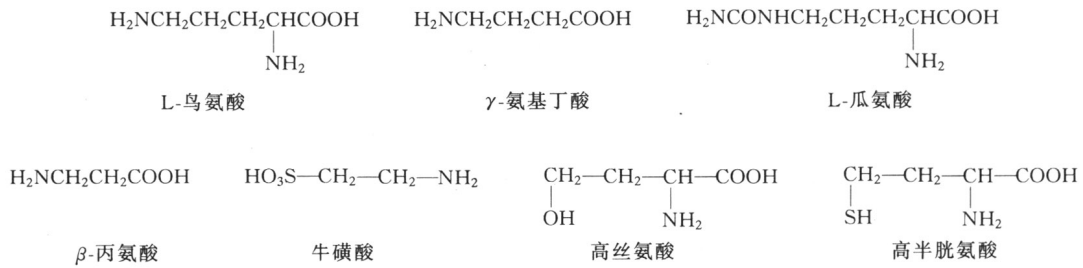


6-N-甲基赖氨酸

四、非蛋白质氨基酸

除了参与蛋白质组成的 20 种氨基酸和少数稀有氨基酸外，还在各种组织和细胞中发现很多其它氨基酸，它们不存在于蛋白质中，而是以游离或结合状态存在于生物体内，所以称为非蛋白质氨基酸。这些氨基酸大多数是蛋白质中存在的 L-型 α-氨基酸的衍生物，如鸟氨酸 (ornithine) 瓜氨酸 (citrulline) 高丝氨酸 (homoserine) 高半胱氨酸等，但也有一些是 β-、γ-或 δ-氨基酸，如 β-丙氨酸、γ-氨基丁酸。这些氨基酸虽然不参与蛋白质组成，但在生物体中往往具有一定的生理功能，如鸟氨酸和瓜氨酸是合成精氨酸的前体，β-丙氨酸是维生素泛酸的组成成分，γ-氨基丁酸是神经传导的化学物质。植物中含有很多非蛋白质氨基酸，其中有些具有特殊的生物功能，但大多数非蛋白质氨基酸的功能还不清楚。

另外，有些非蛋白质氨基酸呈 D-构型，如人牙齿蛋白中含有 D-精氨酸。D-氨基酸的存在也与某些蛋白质的功能密切相关。一些非蛋白质氨基酸的分子结构如下：

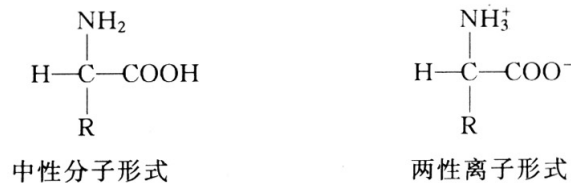


五、氨基酸的性质

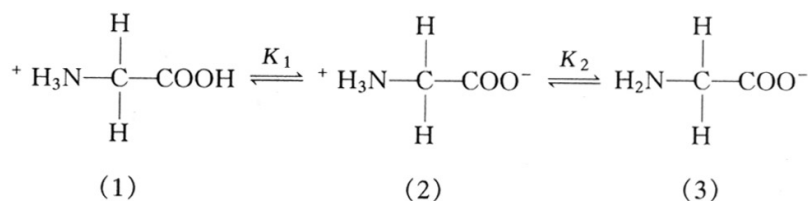
氨基酸的性质是由它的结构决定的，不同氨基酸之间的差异只是在侧链上，因此氨基酸具有许多共同的性质。个别氨基酸由于其侧链的特殊结构还有许多特殊的性质。

(一) 氨基酸的酸碱性质和等电点

根据 Bronsted-Lowry 的酸碱学说，酸是质子的供体，碱是质子的受体，氨基酸分子中既含有氨基，又含有羧基，在水溶液中它既可以释放质子作为酸，又可以接受质子作为碱，所以氨基酸是两性电解质 (ampholyte)。实验证明氨基酸在水溶液中或固体状态时是以两性离子 (dipolar ion) 形式存在的。所谓两性离子是指在同一种氨基酸分子上带有等量的正负两种电荷，由于正负电荷相互中和而呈电中性，这种形式又称兼性离子 (zwitterions) 或偶极离子。



因为氨基酸是两性电解质，所以它在溶液中的带电状况随溶液的 pH 变化而变化，即氨基酸上的氨基和羧基的解离取决于溶液的 pH。例如甘氨酸，它完全质子化时可以看作是一个二元弱酸，其解离情况如下：



在一定的 pH 条件下，氨基酸分子中所带的正电荷和负电荷数相同，即净电荷为零，此时溶液的 pH 称为该氨基酸的等电点 (isoelectric point)，用符号 pI 表示。也就是说，溶液中的氨基酸绝大多数以两性离子形式存在，净电荷为零，在电场中既不向正极移动，也不向负极移动。由于静电作用，在等电点时，氨基酸的溶解度最小。

各种氨基酸的结构不同，在给定 pH 条件下不同氨基酸的解离情况不同，即带电状况不同。各种氨基酸都有其特定的等电点，即在一特定 pH 条件下以两性离子形式存在，净电荷为零，在电场中不移动。当溶液的 pH 小于某氨基酸的等电点时，该氨基酸带正电荷，在电场中向负极移动。当溶液的 pH 大于等电点时，该氨基酸带负电荷，在电场中向正极移动。而在同一 pH 条件下，各种不同氨基酸的带电状况不同，所以可根据这一性质，通过电泳法或离子交换法将氨基酸进行分离制备。氨基酸的羧基、氨基以及侧链上的可解离基团都有一个特定的 pK 值 (即解离常数的负对数)。pK 的编号通常是从酸性最强的基团的解离开始，分别用 pK₁、pK₂、表示。由于各种氨基酸分子上所含氨基、羧基等基团的数目不同以及各种基团的 pK 值的不同，使每种氨基酸都有各自特定的等电点，碱性氨基酸的等电点较高，如 Arg 为 10.76，而酸性氨基酸的等电点相当低，如 Glu 为 3.22。

氨基酸的等电点可由实验测定，也可根据氨基酸分子中所带的可解离基团的 pK 值来计算，如根据甘氨酸的解离方程，可推导出计算等电点的公式。当甘氨酸在酸性溶液中，它是带净的正电荷的形式存在的，可以看作是一个二元弱酸，具有两个可解离的 H⁺，即 COOH 和 -NH₃⁺ 上的 H⁺。根据上述甘氨酸的解离方程可得到：

$$\begin{array}{ll}
 K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{Gly}^\pm]}{[\text{Gly}^+]} & [\text{Gly}^+] = \frac{[\text{H}^+][\text{Gly}^\pm]}{K_1} \\
 K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{Gly}^-]}{[\text{Gly}^\pm]} & [\text{Gly}^-] = \frac{[\text{Gly}^\pm]K_2}{[\text{H}^+]}
 \end{array}$$

K₁、K₂ 为解离常数，当达到等电点时， [Gly⁺] = [Gly⁻]

即：

$$\frac{[\text{H}^+][\text{Gly}^\pm]}{K_1} = \frac{[\text{Gly}^\pm]K_2}{[\text{H}^+]} \quad \text{则} \quad K_1K_2 = [\text{H}^+]^2$$

方程两边取负对数： $-\lg[H^+]^2 = -\lg K_1 - \lg K_2$

则 $pH = pK_1 + pK_2$

由此可推导出等电点计算公式： $pI = \frac{(pK_1 + pK_2)}{2}$

从上述结论可知，等电溶液的 pH 与离子浓度无关，其值决定于两性离子两侧的可解离基团的 pK 值。

通过测定氨基酸的滴定曲线可以求得氨基酸的各个解离基团的 pK 值。图 2-1 为甘氨酸的滴定曲线。甘氨酸有两个可解离基团， $-\text{COOH}$ 和 $-\text{NH}_3^+$ ，它们的 pK 值分别是 2.34 和 9.60。当进行甘氨酸滴定时，以外加的碱量为横坐标，以 pH 值为纵坐标可得 S 形曲线。从曲线可知，在 pH 2.34 处有一转折，这时相当于 50% 的羧基解离，释放出的 H^+ 被 OH^- 中和，溶液中 $[H_3^+ NCH_2COOH] = [H_3^+ NCH_2COO^-]$ ，此时 $pH = pK_1(-\text{COOH})$ 。

当继续加入碱，在 pH 9.6 处又有一转折，此时相当于有 50% 的 $-\text{NH}_3^+$ 作为质子供体而解离，释放出的 H^+ 被 OH^- 中和，溶液中 $[H_3^+ NCH_2COO^-] = [H_2NCH_2COO^-]$ ，此时的 $pH = pK_2$

($-\text{NH}_3^+$)。pK 值就是指某种解离基团有一半解离时的 pH 值，pK 值的大小可以表示解离基团酸性的强弱，pK 值小则酸性强。在滴定曲线中间 $pH = 5.97$ 处有一转折点，此时甘氨酸分子上的净电荷为零，绝大多数的甘氨酸分子以两性离子形式存在，此时的 pH 就是

甘氨酸的等电点。一氨基一羧基氨基酸的等电点都可以根据公式 $pI = \frac{(pK_1 + pK_2)}{2}$ 求

得，所以甘氨酸的等电点为： $pI = \frac{2.34 + 9.60}{2} = 5.97$ 。

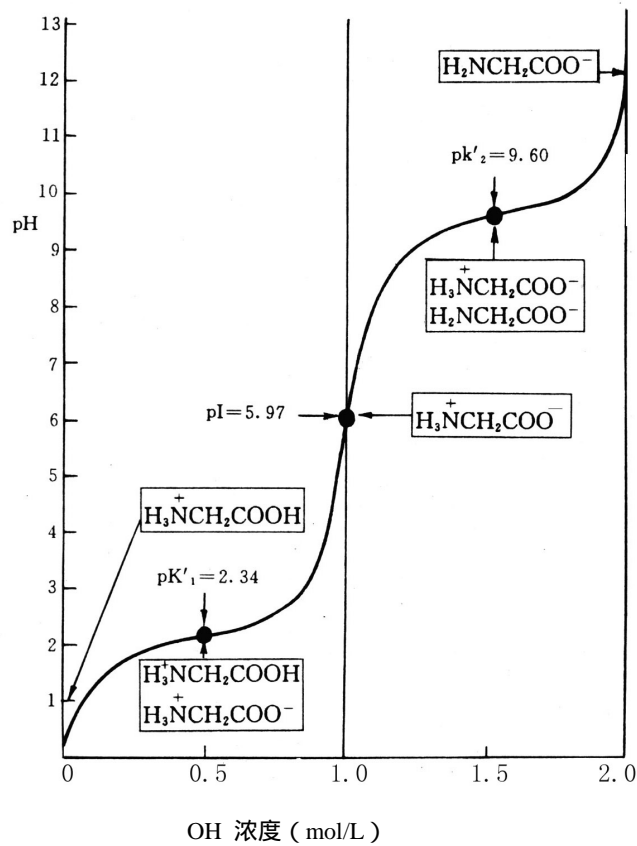
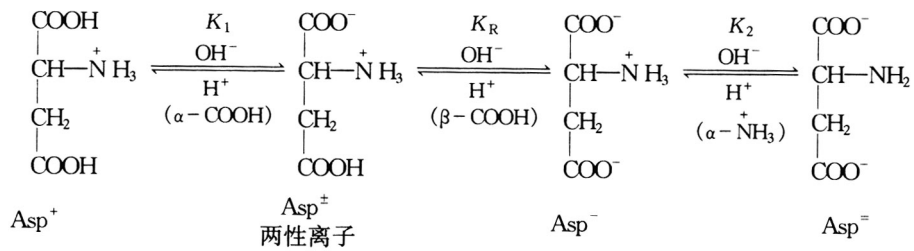


图 2-1 甘氨酸的滴定曲线

对于含有三个可解离基团的氨基酸来说，只要依次写出它从酸性经过中性至碱性溶液解离过程的各种离子形式，然后取两性离子两侧的 pK 值的平均值，即可求出其 pI。例如天冬氨酸的解离，天冬氨酸有三个解离基团可以释放出氢质子，所以相当于是一个三元弱酸。当所处环境的 pH 从酸性逐渐增加至碱性时，三个解离基团依次解离，所以有三个 pK 值，在不同 pH 条件下可以有四种离子形式：



在等电点时两性离子形式为 Asp^- ,因此天冬氨酸的 $\text{pI} = \frac{2.09 + 3.86}{2} = 2.98$ 。

由此可见 ,氨基酸的等电点相当于该氨基酸的两性离子状态两侧的基团 pK 值之和的一半 ,根据此原则可求出任何一种氨基酸的等电点。20 种氨基酸的解离常数和等电点见表 2-5。

表 2-5 氨基酸的解离常数和等电点

氨基酸	$\text{pK}_1(\text{COOH})$	$\text{pK}_2(\text{NH}_3^+)$	$\text{pK}_R(\text{R 基})$	pI
甘氨酸	2.34	9.60		5.97
丙氨酸	2.34	9.60		6.02
缬氨酸	2.32	9.62		5.97
亮氨酸	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸	2.36	9.68		6.02
丝氨酸	2.21	9.15		5.68
苏氨酸	2.63	10.43		6.53
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86(-COOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(-COOH)	3.22
谷氨酰胺	2.17	9.13		5.65
精氨酸	2.17	9.04	12.48(胍基)	10.76
赖氨酸	2.18	8.95	10.50(-氨基)	9.74
组氨酸	1.82	9.17	6.00(咪唑基)	7.59
半胱氨酸	1.71	8.33	10.78(-SH)	5.02
甲硫氨酸	2.28	9.21		5.75
苯丙氨酸	1.83	9.13		5.48
酪氨酸	2.20	9.11	10.07(-OH)	5.66
色氨酸	2.38	9.39		5.89
脯氨酸	1.99	10.60		6.30

(二) 氨基酸的光学性质

从氨基酸的结构可以看出 ,除甘氨酸的 R 侧链为氢原子外 ,氨基酸的 α -碳原子都是不对称碳原子。在此碳原子上连着四个互不相同的基团或原子 (即-R、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、和 H)。这四个基团在空间排列的位置可以有两种形式 ,互为镜象不能重迭 ,成为两个相对映的异构体 ,它们的分子式和结构式均相同 ,只是构型不同。氨基酸的构型可参照甘

油醛的构型而确定。与 D-甘油醛构型相同的氨基酸为 D-氨基酸，与 L-甘油醛构型相同的氨基酸为 L-型氨基酸，书写时， $-\text{NH}_2$ 在左边为 L-型， $-\text{NH}_2$ 在右边为 D-型，如图 2-2 所示。这种由于基团或原子在空间排列的不对称性而引起光学活性的立体结构叫作构型 (configuration)。蛋白质中的氨基酸除甘氨酸外都具有不对称的碳原子，所以都有 L-型和 D-型两种构型，但天然蛋白质中存在的氨基酸都是 L-氨基酸。

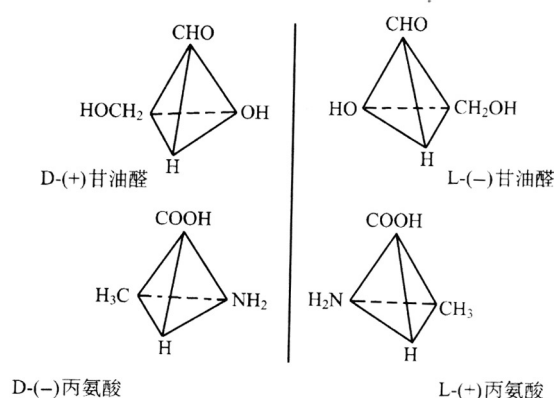


图 2-2 甘油醛和丙氨酸的立体异构示意图
(+)代表右旋,(-)代表左旋

由于氨基酸分子中含有不对称碳原子，所以具有旋光性，两种立体异构体也可称为旋光异构体，它们在旋光仪中旋光角度相同，但方向相反，左旋用(-)表示，右旋用(+)表示。蛋白质中的氨基酸有些是右旋的 (dextrorotatory)，如丙氨酸，异亮氨酸、谷氨酸、赖氨酸等，有些则是左旋的 (levorotatory)，如色氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、脯氨酸等。

(三) 氨基酸的吸收光谱

组成蛋白质的 20 种氨基酸都不吸收可见光，但酪氨酸，苯丙氨酸和色氨酸在紫外光区具有明显的光吸收能力，这是因为它们的 R 基团含有苯环共轭双键系统。酪氨酸的最大吸收波长在 275nm，苯丙氨酸的最大吸收波长在 257nm，色氨酸的最大吸收波长在 280nm。由于大多数蛋白质都含有酪氨酸，有些蛋白质还含有色氨酸或苯丙氨酸，所以可以利用紫外分光光度法测定蛋白质的含量。

三、氨基酸的化学反应

氨基酸的化学反应主要是指氨基酸分子中的 $-\text{氨基}$ 和 $-\text{羧基}$ 以及 R 基团所参与的

那些反应。在此着重介绍几种在蛋白质化学及结构测定中具有重要意义的化学反应。

(一) 茚三酮反应

茚三酮反应 (ninhydrin reaction) 这是氨基酸的 $-NH_2$ 所引起的反应。α-氨基酸与水合茚三酮一起在水溶液中加热, 可发生反应生成蓝紫色物质。首先是氨基酸被氧化分解, 放出氨和二氧化碳, 氨基酸生成醛, 水合茚三酮则生成还原型茚三酮。在弱酸性溶液中, 还原型茚三酮、氨和另一分子茚三酮反应, 缩合生成蓝紫色物质。反应过程如图 2-3。

所有氨基酸及具有游离 α-氨基的肽都产生蓝紫色, 但脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应产生黄色物质, 因其 α-氨基被取代, 所以产生不同的衍生物。此反应十分灵敏, 根据反应所生成的蓝紫色的深浅, 在 570nm 波长下进行比色就可测定样品中氨基酸的含量。也可在分离氨基酸时作为显色剂定性、定量地测定氨基酸。

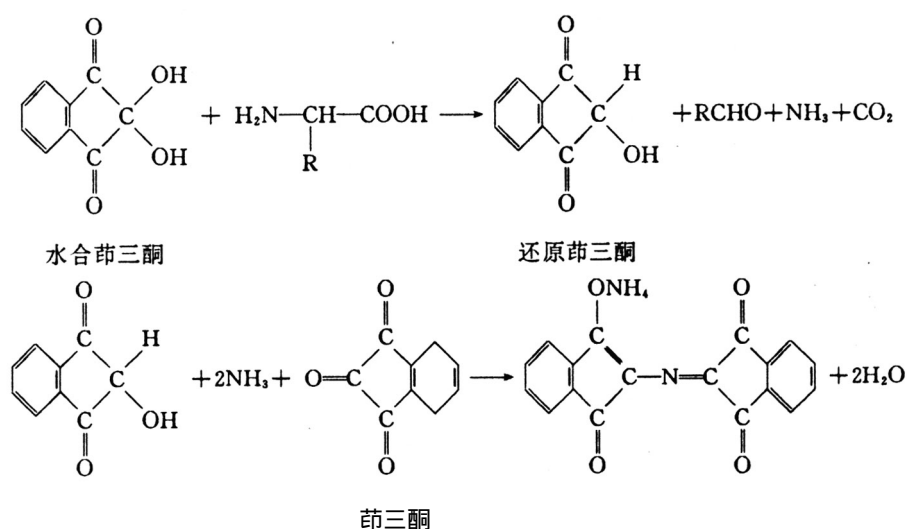


图 2-3 茚三酮反应

(二) 氨基酸与 2,4-二硝基氟苯的反应

此反应又称桑格反应 (Sanger reaction)。在弱碱性 (pH 8~9) 暗处、室温或 40 条件下, 氨基酸的 α-氨基很容易与 2,4-二硝基氟苯 (缩写为 FDNB) 反应, 生成黄色的 2,4-二硝基氨基酸 (dinitrophenyl amino acid, 简称 DNP-氨基酸)。该反应由 F. Sanger 首先发现。

多肽或蛋白质的 N-末端氨基酸的 α-氨基也能与 FDNB 反应, 生成一种二硝基苯胺 (DNP-肽)。由于硝基苯与氨基结合牢固, 不易被水解, 因此当 DNP-多肽被酸水解时, 所有肽键均被水解, 只有 N-末端氨基酸仍连在 DNP 上, 所以产物为黄色的 DNP-氨基酸和其它氨基酸的混合液。混合液中只有 DNP-氨基酸溶于乙酸乙酯, 所以可以用乙酸乙酯抽提并将抽提液进行色谱分析, 再以标准的 DNP-氨基酸作为对照鉴定出此氨基酸的种

类。因此 2,4-二硝基氟苯法可用于鉴定多肽或蛋白质的 N-末端氨基酸 (图 2-4)。

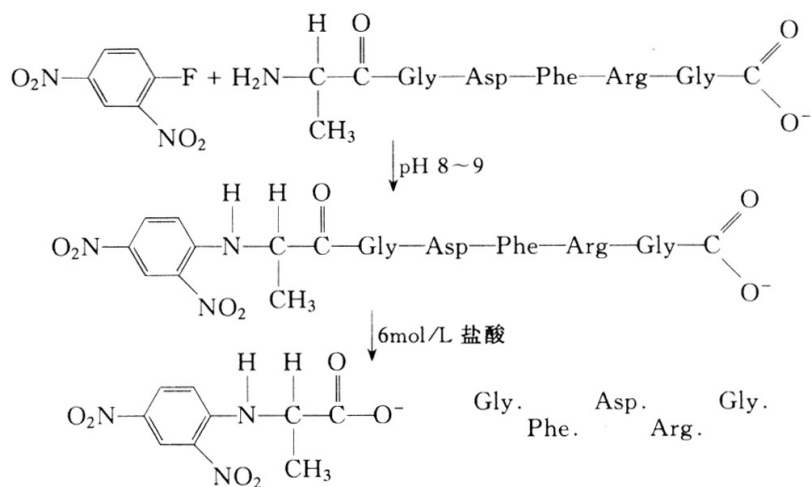


图 2-4 2,4-二硝基氟苯法

(三) 氨基酸与苯异硫氰酸 (PITC) 的反应

此反应又称艾德曼反应 (Edman reaction)。在弱碱性条件下, 氨基酸的 α -氨基可与苯异硫氰酸 (phenylisothiocyanate, PITC) 反应生成相应的苯氨基硫甲酰氨基酸 (简称 PTC-氨基酸)。在酸性条件下, PTC-氨基酸环化形成在酸中稳定的苯乙内酰硫脲氨基酸 (phenylthiohydantoin, 简称 PTH)。蛋白质多肽链 N-末端氨基酸的 α -氨基也可有此反应, 生成 PTC-肽, 在酸性溶液中释放出末端的 PTH-氨基酸和比原来少一个氨基酸残基的多肽链 (图 2-5)。PTH-氨基酸在酸性条件下极稳定并可溶于乙酸乙酯, 用乙酸乙酯抽提后, 经高压液相层析鉴定就可以确定肽链 N-末端氨基酸的种类。该法的优点是可连续分析出 N 端的十几个氨基酸。瑞典科学家 P. Edman 首先使用该反应测定蛋白质 N-末端的氨基酸。氨基酸自动顺序分析仪就是根据该反应原理而设计的。

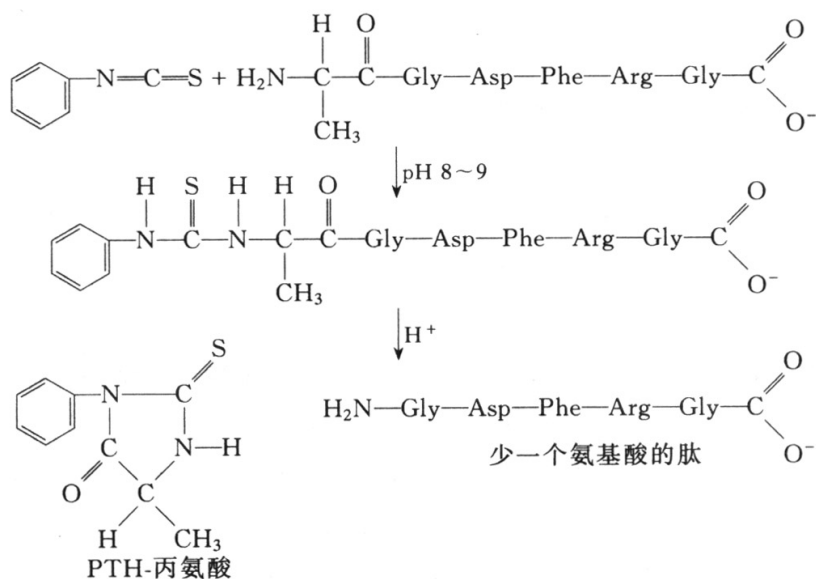
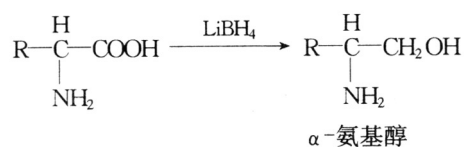


图 2-5 Edman 降解法

(四) -羧基的反应

氨基酸的 -羧基和一般的羧基一样，可以和碱作用生成盐，其中重金属盐不溶于水。氨基酸的羧基还能与醇类作用，被酯化生成相应的酯。酯化作用在人工合成多肽中常用来保护氨基酸的 -羧基。例如，氨基酸在无水乙醇中通入干燥氯化氢气体，或加入二氯亚砷，然后回流，生成氨基酸酯的盐酸盐。氨基酸的 -羧基被还原可产生相应的 -氨基醇，例如被氢硼化锂还原的反应。此性质在蛋白质一级结构的测定中是鉴定 C-末端氨基酸的一种方法。



(五) R基的反应

氨基酸的 R 侧链含有官能团时也能发生化学反应，例如丝氨酸、苏氨酸和羟脯氨酸均为含有羟基的氨基酸，所以能形成酯。酪氨酸的 R 侧链含有苯酚基，具有还原性，所以可利用此性质定量地测定蛋白质。另外，苯酚基和组氨酸中的咪唑基具有芳香环或杂环的性质，能与重氮化合物（如对氨基苯磺酸的重氮盐）结合而生成棕红色的化合物，

此反应可用于定性、定量测定。

此外，半胱氨酸的侧链上的巯基(-SH)的反应性能高，在碱性溶液中容易失去硫原子并且容易被氧化而生成胱氨酸。另外，极微量的某些重金属离子，如 Ag^+ 、 Hg^{2+} ，都能与-SH基反应，生成硫醇盐，从而导致含-SH酶失活。

第三节 肽

蛋白质的基本结构单位是氨基酸，由20种氨基酸组成了各种各样的蛋白质。自然界存在的蛋白质大约有 $10^{10} \sim 10^{12}$ 种，不同的蛋白质具有不同的结构。那么氨基酸之间是通过什么方式连接的？如何组成了数目繁多、结构各异的蛋白质大分子？研究证明，蛋白质是由许多氨基酸按照一定的排列顺序通过肽键连接起来的生物大分子。

一、肽键及肽链

肽键 (peptide bond) 是蛋白质分子中氨基酸之间的主要连接方式，它是由一个氨基酸的 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基缩合脱水而形成的酰胺键 (图 2-6)。

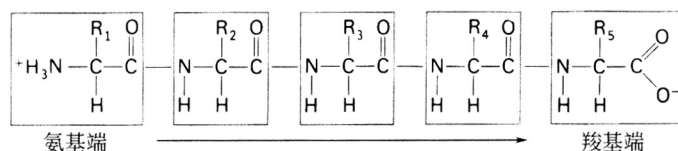


图 2-6 一个五肽的结构

一个氨基酸的 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基之间失去一分子水相互连接而成的化合物称为肽 (peptide)，由2个氨基酸缩合形成的肽叫二肽 (dipeptide)，由3个氨基酸缩合形成的肽叫三肽 (tripeptide)，少于10个氨基酸的肽称为寡肽 (oligopeptide)，由10个以上氨基酸形成的肽叫多肽 (polypeptide)，因此蛋白质的结构就是多肽链结构。多肽的长短十分不同，一般含有50~2000个氨基酸。氨基酸的平均分子量为110，所以大多数肽的分子量为5500~220000。每个肽在其一端有一自由氨基，称为氨基端或N-末端 (amino-terminus or N-terminus)，在另一端有一自由羧基，称为羧基端或C-末端 (carboxyl terminus or C-terminus)。

二、肽的命名及结构

一个肽可根据所含的氨基酸残基数简单地称为二肽、三肽、四肽等等。肽链中的氨基酸由于参加肽键的形成已经不是原来完整的分子，因此称为氨基酸残基 (amino acid residues)。肽的命名是从肽链的N-末端开始，按照氨基酸残基的顺序而逐一命名。氨基

酸残基用酰来称呼，称为某氨基酰某氨基酰 某氨基酸。例如，由丝氨酸、甘氨酸、酪氨酸、丙氨酸和亮氨酸组成的五肽就命名为丝氨酰甘氨酰酪氨酰丙氨酰亮氨酸。

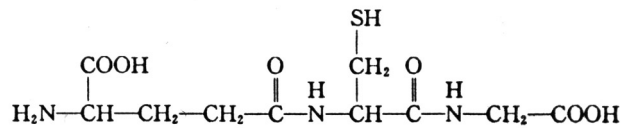
如果用结构式表示肽链中氨基酸的排列顺序非常不方便，并且所占空间很大。因此对于多肽来说，一般用氨基酸中文名称的字头表示，中间用“ ”号或“-”号将它们隔开，也可用氨基酸英文名称的三字符或单字符缩写表示，中间用“ ”号或“-”号将其隔开。

甘 丙 丝 缬 亮 蛋 赖 赖 精 谷
 Gly-Ala-Ser-Val-Leu-Met-Lys-Lys-Arg-Glu
 G-A-S-V-L-M-K-K-R-E

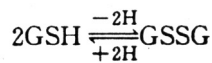
在书写时，含自由氨基的一端总是写在左边，含自由羧基的一端总是写在右边。肽的化学性质与氨基酸相似，但因 -氨基和 -羧基已经缩合，所以各氨基酸残基的 R 侧链对肽的性质的影响就更加突出。另外，肽的呈色反应也和氨基酸相似。

三、天然存在的活性寡肽

除了蛋白质的部分水解可以产生各种简单的多肽外，生物体中还广泛存在着许多长短不同的游离的肽，有些肽具有特殊的生理功能。例如谷胱甘肽 (glutathione)，这是一种存在于动植物和微生物细胞中的一种重要的三肽，缩写为 GSH。它是由谷氨酸，半胱氨酸和甘氨酸组成的，结构如下：

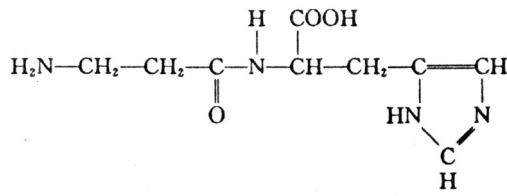


谷胱甘肽 (GSH) 分子中有一个特殊的 -肽键，是由谷氨酸的 -羧基与半胱氨酸的 -氨基缩合而成的，这与蛋白质分子中的肽键不同。由于谷胱甘肽中含有一个活泼的巯基，所以很容易氧化，则两分子谷胱甘肽脱氢以二硫键相连形成氧化型的谷胱甘肽 (GSSG)。

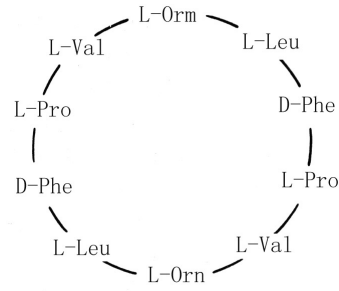


谷胱甘肽参与细胞内的氧化还原作用，它是一种抗氧化剂，对许多酶具有保护功能。生物体中还有许多其它的多肽，也具有重要的生理意义。如牛加压素、催产素、舒缓激肽都是具有激素作用的多肽。还有一些肽链不是开链结构，而是形成环状结构，所以没有自由的羧基端和自由的氨基端。环状肽在微生物中常见，如短杆菌肽 S 和短杆菌酪肽

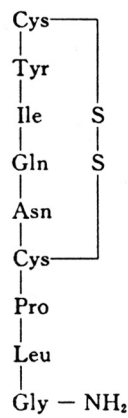
A，它们都具有抗菌素的作用。又如毒蘑菇中存在的 -鵝膏蕈碱是一个环状 8 肽，它能抑制真核 RNA 聚合酶的活性，从而抑制核糖核酸（RNA）的合成，导致机体死亡。



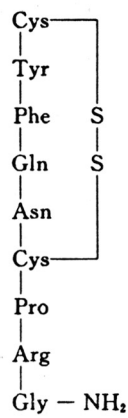
肌肽 (β-丙氨酰组氨酸)



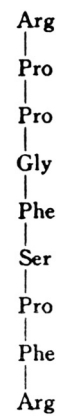
短杆菌肽 S



牛催产素



牛加压素



舒缓激肽

第四节 蛋白质的分子结构

蛋白质的结构可以分为四个层次来研究，即一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。其中一级结构又称蛋白质的化学结构（chemical structure）共价结构或初级结构。而二级结构、三级结构和四级结构又称为蛋白质的空间结构或三维结构(three dimensional structure)。

一、蛋白质的一级结构

(一) 蛋白质的一级结构

所谓蛋白质的一级结构是指蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序以及二硫键的位置。

一级结构是蛋白质分子结构的基础，它包含了决定蛋白质分子所有结构层次构象的全部信息。蛋白质一级结构研究的内容包括蛋白质的氨基酸组成、氨基酸排列顺序和二硫键的位置，肽链数目，末端氨基酸的种类等。

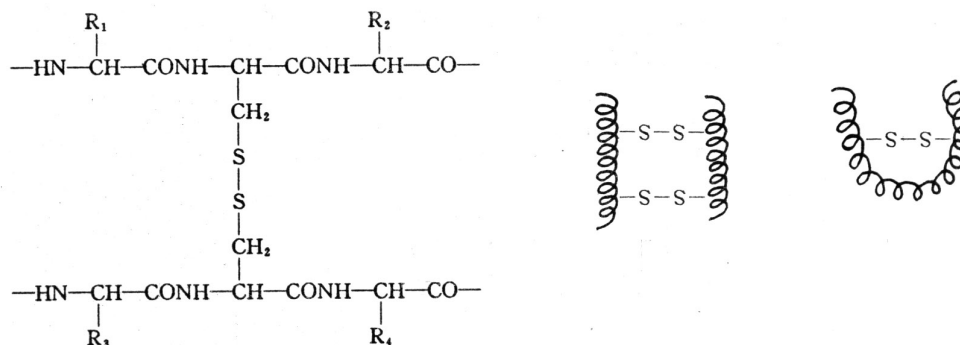


图 2-7 蛋白质肽链内和肽链间二硫键示意图

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接起来的生物大分子，不同蛋白质的氨基酸种类、数量和排列顺序都不同，这是蛋白质生物学功能多样性的基础。一级结构是蛋白质的共价键结合的全部情况，在生物化学及其相关领域中，许多问题都需要知道蛋白质的一级结构。有些蛋白质不是简单的一条肽链，而是由 2 条以上肽链组成的，肽链之间通过二硫键连接起来，还有的在一条肽链内部形成二硫键（图 2-7）。二硫键在蛋白质分子中起着稳定空间结构的作用。一般二硫键越多，蛋白质的结构越稳定。蛋白质的氨基酸排列顺序对蛋白质的空间结构以及生物功能起着决定作用，通常氨基酸的排列顺序是不能轻易改变的，有的蛋白质分子只有一个氨基酸的改变就可能改变整个蛋白质分子的空间结构和功能，所以蛋白质的一级结构包含着决定其空间结构的因素。

（二）蛋白质一级结构的测定

蛋白质一级结构的测定就是测定蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序，这是揭示生命本质，阐明结构与功能的关系，研究酶的活性中心和酶蛋白高级结构的基础，也是基因表达、克隆和核酸顺序分析的重要内容。蛋白质一级结构的测定主要包括以下基本步骤：

1. 测定蛋白质的分子量和氨基酸组成

获取一定量纯的蛋白质样品，测定其分子量。将一部分样品完全水解，确定其氨基酸种类、数目和每种氨基酸的含量。

2. 进行末端分析，确定蛋白质的肽链数目及 N-端和 C-端氨基酸的种类

测定 N-末端氨基酸的方法有多种，常用的有二硝基氟苯 (DNFB) 法和异硫氰酸苯酯 (PTH) 法（如氨基酸的化学性质中所介绍的）。其中异硫氰酸苯酯法应用广泛，并已根据其原理设计制造出氨基酸顺序分析仪。此外，还可以用丹磺酰氯 (dansyl chloride, DNS-CL) 法测定 N-末端氨基酸。其原理是：多肽链 N 端氨基酸的氨基可与 5-二甲氨基萘-1-磺酰氯 (DNS) 反应，生成丹磺酰肽 (DNS-肽)，此产物经酸水解产生 DNS-氨基酸（具有荧光）和其它游离的氨基酸。用乙酸乙酯抽提，可得到 DNS-氨基酸，然后可用色谱分析进行鉴别。

定 (图 2-8)。

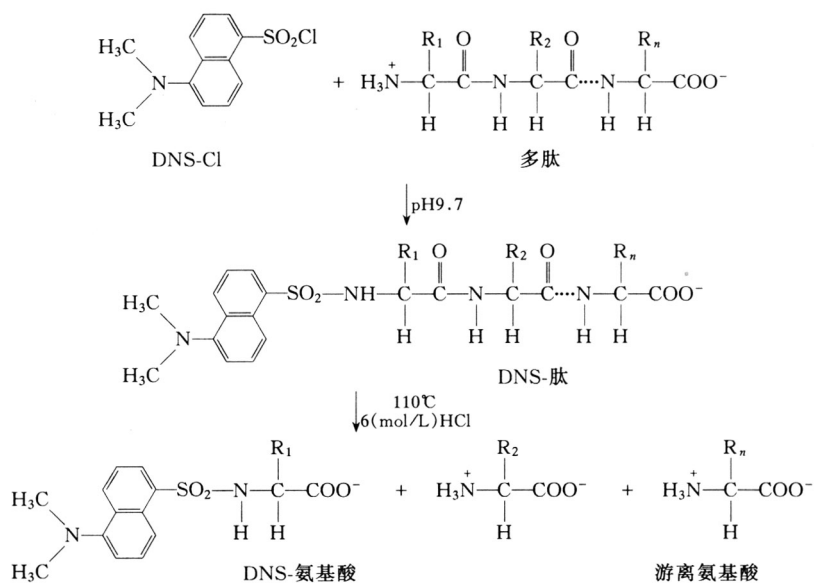


图 2-8 丹磺酰氯法 (DNS 法)

测定 C-末端氨基酸常用的方法有胍解法和还原法等。胍解法的原理为：多肽链和过量的无水胍在 100 反应 5 ~ 10h，所有肽键被水解，除 C-末端氨基酸自由存在外，其他氨基酸都转变为氨基酸酰胍。向反应体系中加入苯甲醛，氨基酸酰胍转变为不溶于水的二亚苄衍生物，离心分离后 C-末端氨基酸在水相，向水相中加入 2,4-二硝基氟苯，使其与 C-端氨基酸反应，经色谱分析可鉴定其种类 (图 2-9)。

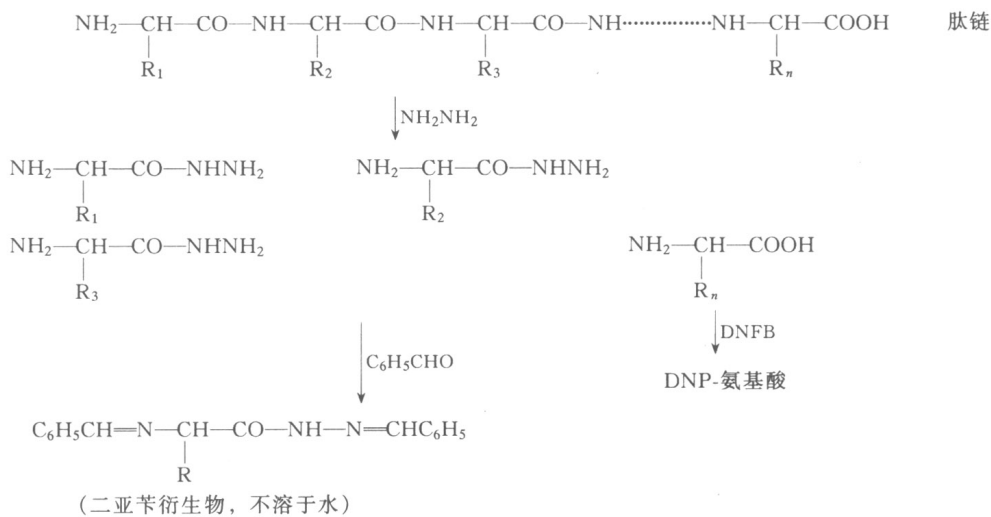
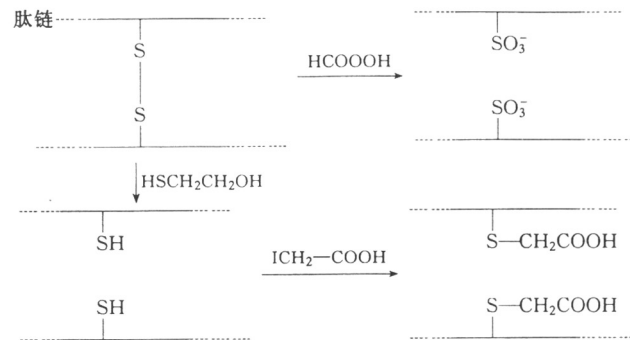


图 2-9 C 末端分析 胍解法

还原法原理为：肽链 C-末端氨基酸可被氢硼化锂还原成相应的 β -氨基醇，肽链完全水解后，此 β -氨基醇可用层析法鉴定，从而确定 C-末端氨基酸的种类。

3. 拆开二硫键并分离出每条多肽链

如果蛋白质分子是由几条不同的多肽链构成的，则必需把这些多肽链拆开并单独分离开来，以便测定每条多肽链的氨基酸顺序。拆开二硫键最常用的方法是用过甲酸（即过氧化氢 + 甲酸）将二硫键氧化，或用过量的 β -巯基乙醇处理，将二硫键还原。还原法应注意用碘乙酸（烷基化试剂）保护还原生成的半胱氨酸中的巯基，以防止二硫键的重新生成。例如胰岛素经巯基乙醇还原后分子中三对二硫键被拆开，两条链被分开，再用碘乙酸保护，得到 A 链和 B 链的羧甲基衍生物，并且不会重新氧化生成二硫键。拆开二硫键以后形成的肽链可用层析、电泳等方法进行分离。



4. 分析每条多肽链的 N-末端和 C-末端残基

取每条多肽链的部分样品进行 N-末端和 C-末端氨基酸的鉴定，以便建立两个重要的氨基酸顺序参考点。方法如前所述。

5. 用两种不同方法将肽链专一性地水解成两套肽段并进行分离

将每条多肽链用两种不同方法进行部分水解，这是一级结构测定中的关键步骤。目前用于顺序分析的方法一次能测定的顺序都不太长，然而天然的蛋白质分子大多在 100 个残基以上，因此必须设法将多肽断裂成较小的肽段，以便测定每个肽段的氨基酸顺序。水解肽链的方法可采用酶法或化学法，通常是选择专一性很强的蛋白酶来水解。如胰蛋白酶专一性地水解由碱性氨基酸（赖氨酸或精氨酸）的羧基参与形成的肽键，胰凝乳蛋白酶专一性地水解芳香族氨基酸（苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸）的羧基参与形成的肽键。

除了酶法之外，还可以用化学方法部分水解肽链，例如用溴化氰处理时，只有甲硫氨酸的羧基参与形成的肽键发生断裂。根据肽链中甲硫氨酸残基的数目就可以估计多肽链水解后可能产生的肽段的数目。

多肽链经部分水解后产生的长短不一的肽段可以用层析或电泳的方法加以分离，提纯，由于不同方法水解肽链的专一性不同，所以用两种方法水解肽链后，可以得到两套不同的肽段，便于拼凑出完整肽链的氨基酸顺序。

6. 测定各个肽段的氨基酸排列顺序并拼凑出完整肽链的氨基酸排列顺序

多肽链部分水解后分离得到的各个肽段需进行氨基酸排列顺序的测定，序列测定可用氨基酸序列分析仪。然后用重叠顺序法将两种水解方法得到的两套肽段的氨基酸顺序进行比较分析，根据交叉重叠部分的顺序推导出完整肽链的氨基酸顺序。比如有一蛋白质肽链的一个片段为十肽，用两种方法水解，水解法 A 得到四个小肽，分别为 A₁:Ala-Phe；A₂:Gly-Lys-Asn-Tyr；A₃:Arg-Tyr；A₄:His-Val。水解法 B 得到三个小肽，分别为 B₁:Ala-Phe-Gly-Lys；B₂:Asn-Tyr-Arg；B₃:Tyr-His-Val。将两套肽段进行比较分析得出如下结果：

肽	氨基酸顺序
A ₁	Ala-Phe
B ₁	Ala-Phe-Gly-Lys
A ₂	Gly-Lys-Asn-Tyr
B ₂	Asn-Tyr-Arg
A ₃	Arg-Tyr
B ₃	Tyr-His-Val
A ₄	His-Val
十肽顺序	Ala-Phe-Gly-Lys-Asn-Tyr-Arg-Tyr-His-Val

7. 二硫键位置的确定

蛋白质分子中二硫键位置的确定也是以氨基酸的测序技术为基础的。这一步骤往往在确定了蛋白质的氨基酸顺序后再进行。其基本步骤是：根据已知氨基酸顺序选择合适的专一性蛋白水解酶，在不打开二硫键的情况下部分水解蛋白质，将水解得到的肽段进行分离。将分离得到的含有二硫键的肽段进行氧化或还原，切断二硫键。分离切断二硫键以后生成的两个肽段，并确定这两个肽段的氨基酸顺序。将这两个肽段的氨基酸顺序与多肽链的氨基酸顺序比较，即可推断出二硫键的位置。

应用这种方法，Sanger 等人于 1953 年完成了第一个蛋白质——牛胰岛素一级结构的测定。胰岛素是动物胰脏中胰岛细胞分泌的一种激素蛋白，其功能是调节糖代谢。胰岛素分子由 51 个氨基酸残基组成，分子量为 5734，由 A、B 两条肽链组成，A 链含 21 个氨基酸残基，B 链含 30 个氨基酸残基。A 链和 B 链通过两个二硫键连接在一起，在 A 链内部还有一个二硫键，图 2-10 为胰岛素的氨基酸顺序。我国生化工作者根据胰岛素的氨基酸顺序于 1965 年用人工方法成功地合成了具有生物活性的胰岛素，第一次成功地完成了蛋白质的全合成。

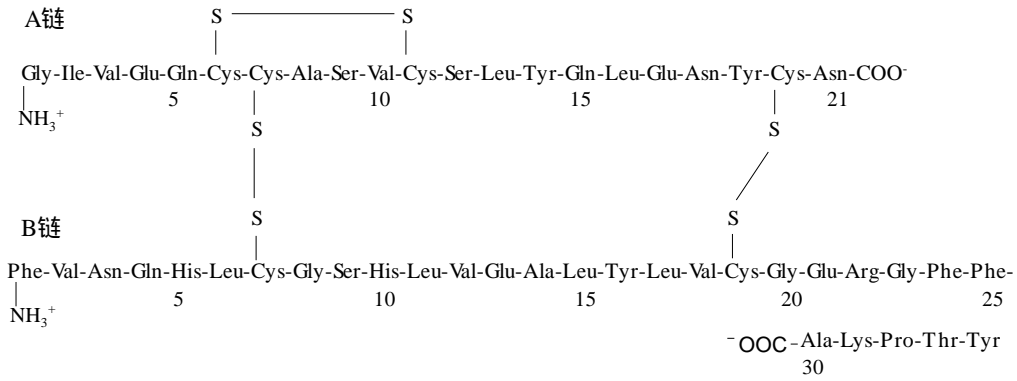


图 2-10 胰岛素的氨基酸顺序

又如，20 世纪 50 年代末，美国学者 Moore 等人完成牛胰核糖核酸酶全序分析。该酶由一条含 124 个氨基酸残基的多肽链组成，分子内含有 4 个链内二硫键，分子量为 12 600，是水解核糖核酸分子中磷酸二酯键的一种酶。图 2-11 为牛胰核糖核酸酶的氨基酸顺序。

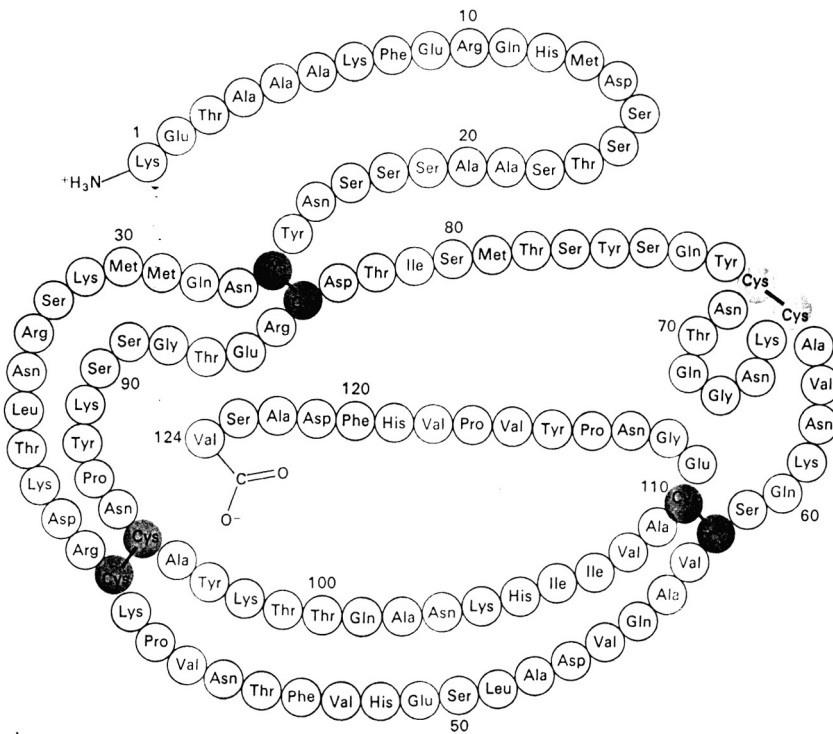


图 2-11 牛胰核糖核酸酶的氨基酸顺序

另外，由于蛋白质的一级结构归根结底是基因表达的结果，所以蛋白质的氨基酸排列顺序也可以通过相应的 DNA 的序列测定间接推导出来，例如具有重要功能的人胰岛素受体蛋白（含 1370 个氨基酸残基）的一级结构就是这样间接测定出来的。

二、蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构(secondary structure)是指蛋白质多肽链本身的折叠和盘绕的方式。研究证明，蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、 β -折叠和转角。氢键是稳定二级结构的主要作用力。

天然蛋白质都有特定的构象，所谓构象(conformation)是指分子中各个原子和基团在三维空间的排列和分布。这些原子的空间排列取决于它们绕键的旋转，因此，构象的改变不涉及共价键的改变。

构象和构型的概念有根本的区别。构型(configuration)是指在立体异构体中取代原子或基团在空间的取向。一个碳原子与四个不同的基团相连时，只可能有两种不同的空间排列，这两种不同的空间排列称为不同的构型。构型的改变涉及共价键的形成和破坏。

具有生物活性的蛋白质在一定条件下往往只有一种或很少几种构象，这是由蛋白质分子中肽键的性质决定的。

(一) 肽单位的构象

20 世纪 30 年代后期，Linus Pauling 和 Robert Corey 就开始用 X-射线衍射法分析氨基酸和肽的精确结构，希望获得这些构件的标准键距和键角，并用这些资料去预测蛋白质的构象，它们的重要发现之一是确定了肽单位。肽单位(peptide group)是多肽链中从一个 α -碳原子到相邻 α -碳原子之间的结构(图 2-12)。

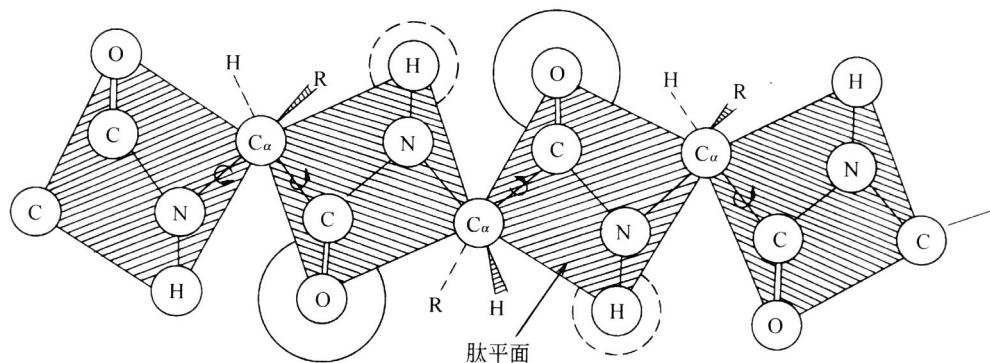


图 2-12 多肽链主链骨架的构象

肽单位的构象具有三个显著的特征：

1. 肽单位是一个刚性的平面结构

肽键中羰基碳原子与氮原子之间所形成的键不能自由旋转,因为这个键(C-N 键)的长度为 0.132nm,比一般的 C-N 单键(0.147nm)要短些,而比一般的 C=N 双键(0.127nm)要长些,所以具有部分双键的性质,不能自由旋转,这样使得肽单位所包含的六个原子处于同一个平面上,这个平面又称为酰胺平面(amide plane)或肽平面(peptide plane),见图 2-13。

2. 肽平面中羰基氧与亚氨基氢几乎总是处于相反的位置

虽然肽平面中的羰基氧与亚氨基氢可以有顺式和反式两种排布,但由于连接在相邻两个 α -碳上的侧链基团之间的立体干扰不利于顺式构象的形成,而有利于伸展的反式构象的形成,所以蛋白质中几乎所有的肽单位都是反式构象(图 2-13)。

3. C 和亚氨基 N 及 C 与羰基 C 之间的键是单键,可以自由旋转

α -碳原子与羰基碳原子之间的键是一个纯粹的单键,其键长为 0.153nm。 α -碳原子与亚氨基氮原子之间的键也是一个纯粹的单键,其键长为 0.147nm,因此,可以自由旋转。C-N 键旋转的角度通常用 ϕ 表示;C-C 键旋转的角度用 ψ 表示,它们被称为 C 原子的二面角(dihedral angle)或肽单位二面角,如图 2-14 所示。肽单位的二面角都可以在 $0 \sim 180^\circ$ 范围内变动。相邻的两个肽平面通过 C 相对旋转的程度决定了两个相邻的肽平面的相对位置。一个蛋白质的构象取决于肽单位绕 C-N 键和 C-C 键的旋转,于是肽平面就成为肽链盘绕折叠的基本单位,也是蛋白质之所以会形成各种立体构象的根本原因。因为 C-N 和 C-C 键旋转时将受到 α -碳原子上的侧链 R 基的空间阻碍影响,所以使肽链的构象受到限制,只能形成一定的构象。如果每一个氨基酸残基的 ϕ 和 ψ 角已知,多肽主链的构象就被完全确定。由于肽平面的存在,大大限制了主链所能形成的构象数目,但如果没有这个平面的存在,蛋白质多肽链主链的自由度过大,则会导致蛋白质不能形成特定的构象。

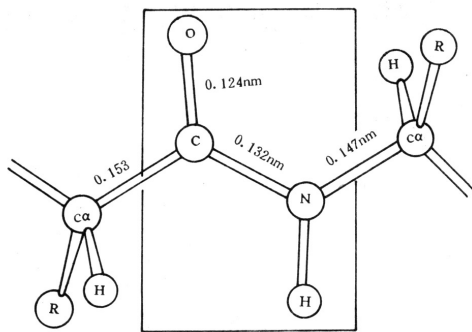


图 2-13 肽键是一个刚性的平面,标准键长以 nm 为单位在图中示出;相邻氨基酸残基的 R 侧链总是处于反式位置

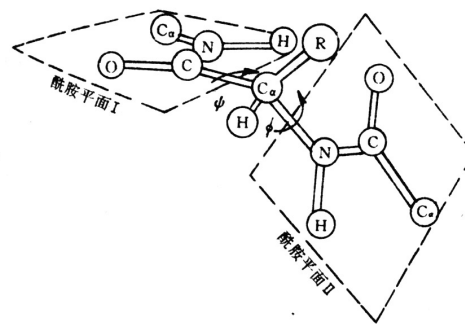


图 2-14 α -碳原子的二面角

(二) 蛋白质的二级结构

一条多肽链可以折叠成什么样的规则结构？1951年，Pauling 和 Corey 根据对一些简单化合物（如氨基酸和寡肽）的 X-射线晶体图的数据，提出了两个周期性的多肽结构模型，分别称为 α -螺旋结构和 β -折叠结构。

1. α -螺旋(α -helix)结构

α -螺旋结构具有以下主要特征：

(1) α -螺旋结构是一个类似棒状的结构，从外观看，紧密卷曲的多肽链主链构成了螺旋棒的中心部分，所有氨基酸残基的 R 侧链伸向螺旋的外侧，这样可以减少立体障碍。肽链围绕其长轴盘绕成右手螺旋体（图 2-15 a）。

(2) α -螺旋每圈包含 3.6 个氨基酸残基，螺距为 0.54nm，即螺旋每上升一圈相当于向上平移 0.54nm。相邻两个氨基酸残基之间的轴心距为 0.15nm，每个残基绕轴旋转 100°（图 2-15 b）。

(3) α -螺旋结构的稳定主要靠链内的氢键维持。螺旋中每个氨基酸残基的羰基氧与它后面第 4 个氨基酸残基的 α -氨基上的氢之间形成氢键，所有氢键与长轴几乎平行。螺旋内的一个氢键对结构的稳定性的作用并不大，但 α -螺旋内的许多氢键的总体效应却能稳定螺旋的构象。实际上， α -螺旋结构是最稳定的二级结构。

α -螺旋有左手螺旋和右手螺旋，但所有研究过的天然蛋白质的 α -螺旋都是右手螺旋。蛋白质多肽链是否能形成 α -螺旋体以及螺旋体的稳定程度如何，与它的氨基酸组成和排列顺序有很大关系，而且 R 基的电荷性质，R 基的大小都会影响到螺旋的形成。有些氨基酸出现在 α -螺旋中的次数要比其它氨基酸的多，例如丙氨酸带有小的、不带电荷的侧链，它很适合填充在 α -螺旋构象中。而有些氨基酸则基本上不会出现在 α -螺旋中，如多肽链中有脯氨酸时 α -螺旋就被中断，这是因为脯氨酸的 α -亚氨基上氢原子参与肽键形成后就再没有多余的氢原子形成氢键，所以在有脯氨酸存在的地方就不能形成 α -螺旋结构。又如多聚异亮氨酸的 R 侧链体积大，造成空间阻碍，所以不能形成 α -螺旋体。另外，多聚精氨酸由于带正电荷，所以互相排斥，也不能形成 α -螺旋体。同样，谷氨酸和天冬氨酸的侧链有游离的羧基，带负电荷，由于负电荷之间的斥力，使这个区域的 α -螺旋不稳定，而只在酸性溶液中羧基的解离度减小时才能形成稳定的 α -螺旋结构。

由于各种不同蛋白质的一级结构不同，所以不同蛋白质分子中 α -螺旋结构的比例也很不相同。如肌红蛋白和血红蛋白主要是由 α -螺旋结构组成的，而有些蛋白质几乎不含 α -螺旋结构，如 β -球蛋白和肌动蛋白。有些蛋白，如毛发、皮肤、指甲中的 β -角蛋白几乎全是 α -螺旋结构组成的纤维蛋白，而且组成 β -角蛋白的 α -螺旋还以三股或七股并列拧成螺旋束，彼此间靠二硫键交联在一起，于是形成了强度大的长纤维状蛋白质。

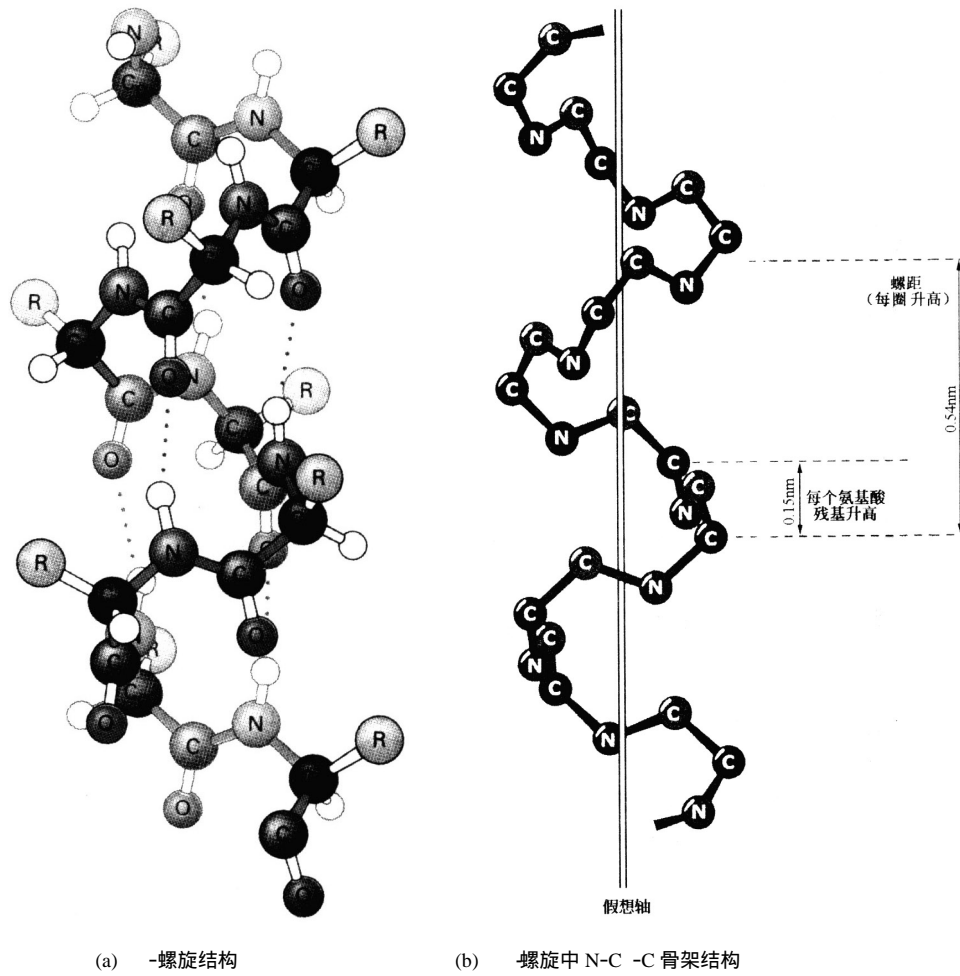


图 2-15 右手 α -螺旋

2. β -折叠结构

β -折叠结构 (β -sheet) 又称为 β -折叠片层 (β -plated sheet) 结构和 β -桶结构等。这是 Pauling 和 Corey 继发现 α -螺旋结构后在同年又发现的另一种蛋白质二级结构。 β -折叠结构是一种肽链相当伸展的结构, 多肽链呈扇面状折叠 (图 2-16)。

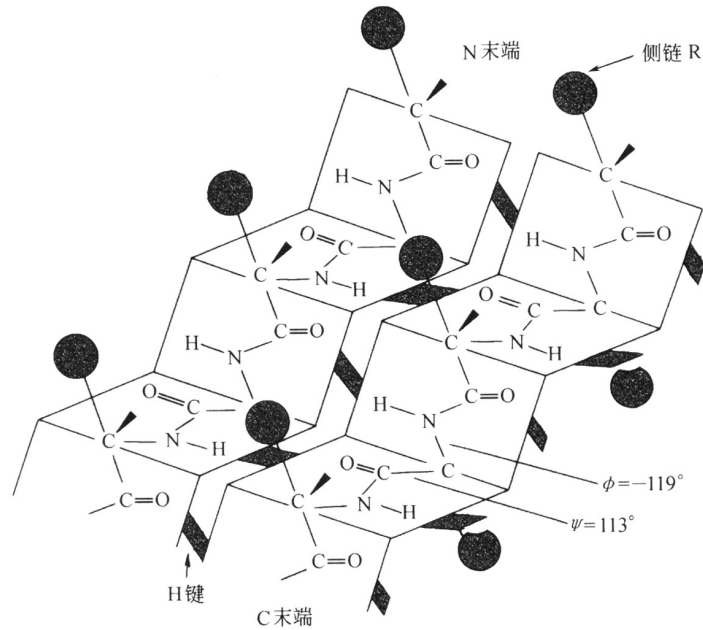


图 2-16 β -折叠结构

β -折叠结构的形成一般需要两条或两条以上的肽段共同参与，即两条或多条几乎完全伸展的多肽链侧向聚集在一起，相邻肽链主链上的氨基和羰基之间形成有规则的氢键，维持这种结构的稳定。 β -折叠结构的特点如下：

(1) 在 β -折叠结构中，多肽链几乎是完全伸展的。相邻的两个氨基酸之间的轴心距为 0.35nm。侧链 R 交替地分布在片层的上方和下方，以避免相邻侧链 R 之间的空间障碍。

(2) 在 β -折叠结构中，相邻肽链主链上的 C=O 与 N-H 之间形成氢键，氢键与肽链的长轴近于垂直。所有的肽键都参与了链间氢键的形成，因此维持了 β -折叠结构的稳定。

(3) 相邻肽链的走向可以是平行和反平行两种。在平行的 β -折叠结构中，相邻肽链的走向相同，氢键不平行（图 2-17a）。在反平行的 β -折叠结构中，相邻肽链的走向相反，但氢键近于平行（图 2-17b）。从能量角度考虑，反平行式更为稳定。

β -折叠结构也是蛋白质构象中经常存在的一种结构方式。如蚕丝心蛋白几乎全部由堆积起来的反平行 β -折叠结构组成。球状蛋白质中也广泛存在这种结构，如溶菌酶、核糖核酸酶、木瓜蛋白酶等球状蛋白质中都含有 β -折叠结构。

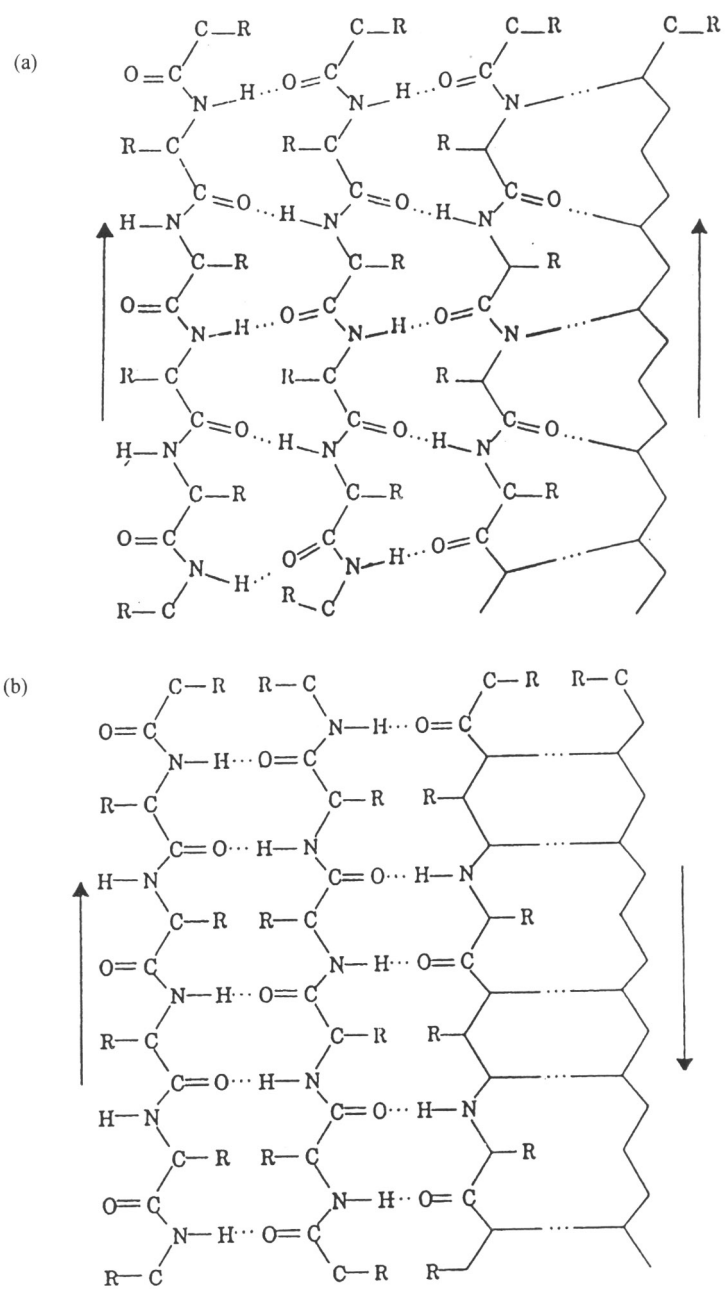


图 2-17 折叠结构的类型

(a) 平行的 折叠片 (b) 反平行的 折叠片

3. β -转角结构

β -转角结构 (β -turn) 又称为 β -弯曲 (β -bend)、 β -回折 (reverse turn)、发夹结构 (hairpin structure) 和 U型转折等。蛋白质分子多肽链在形成空间构象的时候, 经常会出现 180° 的回折 (转折), 回折处的结构就称为 β -转角结构, 一般由四个连续的氨基酸组成。在构成这种结构的四个氨基酸中, 第一个氨基酸的羧基和第四个氨基酸的氨基之间形成氢键 (图 2-18)。甘氨酸和脯氨酸容易出现在这种结构中。在某些蛋白质中也有三个连续氨基酸形成的 β -转角结构, 第一个氨基酸的羰基氧和第三个氨基酸的亚氨基氢之间形成氢键。

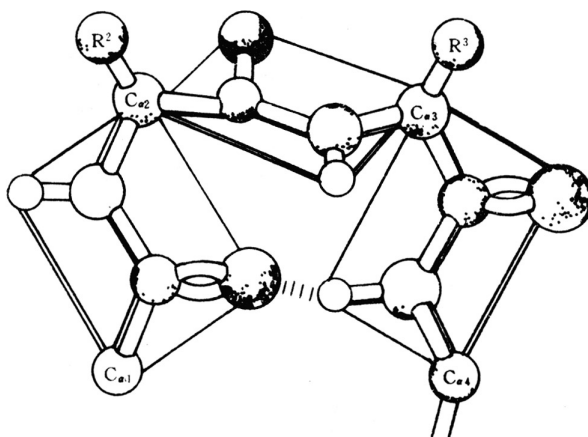


图 2-18 β -转角结构

对 580 多种蛋白质的 X 射线晶体衍射分析发现, 有些蛋白质几乎全是由 α -螺旋结构组成的, 有些蛋白质几乎全是由 β -折叠结构组成的, 而有些蛋白质分子中 α -螺旋和 β -折叠结构都存在。

除以上三种二级结构外, 在蛋白质分子中还有一些没有规律的松散的肽链构象, 称为自由回转, 这种结构对蛋白质的生物功能也有着重要作用。

三、超二级结构和结构域

(一) 超二级结构

超二级结构 (super-secondary structure) 的概念是 M. Rossmann 于 1973 年提出来的。蛋白质分子中的多肽链在三维折叠中形成有规则的二级结构聚集体, 如 α -螺旋聚集体 (型)、 β -折叠聚集体 (型) 以及 α -螺旋和 β -折叠的聚集体, 常见的是型聚集体 (图 2-19)。在一些纤维状蛋白质和球状蛋白质中都已发现有 α -螺旋聚集体 (型) 的存在。在球状蛋白质中常见的是两个聚集体连在一起, 形成结构, 称为 Rossmann 卷曲 (Rossmann-fold)。这种由二级结构间组合的结构层次称为超二级结构。超二级结构一般以一个整体参与三维折叠, 作为三级结构的构件。

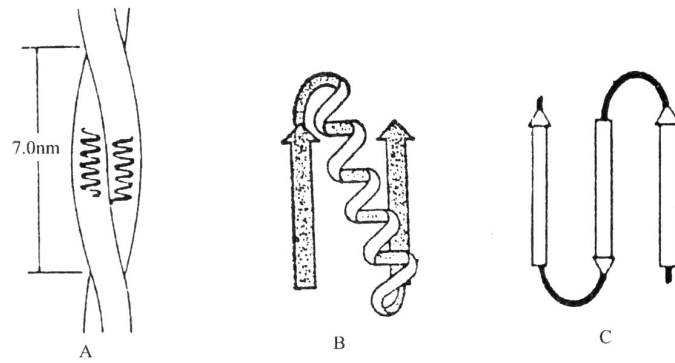


图 2-19 几种超二级结构的类型
(A) 型； (B) 型； (C) 型

(二) 结构域

Wetlaufer 于 1973 年根据对蛋白质结构及折叠机制的研究结果提出了结构域的概念。结构域 (structural domain) 是介于二级和三级结构之间的另一种结构层次。所谓结构域是指蛋白质亚基结构中明显分开的紧密球状结构区域, 又称为辖区。多肽链首先是在某些区域相邻的氨基酸残基形成有规则的二级结构, 然后, 又由相邻的二级结构片段集装在一起形成超二级结构, 在此基础上多肽链折叠成近似于球状的三级结构。对于较大的蛋白质分子或亚基, 多肽链往往由两个或多个在空间上可明显区分的、相对独立的区域性结构缔合而成三级结构, 这种相对独立的区域性结构就称为结构域。对于较小的蛋白质分子或亚基来说, 结构域和它的三级结构往往是一个意思, 也就是说这些蛋白质或亚基是单结构域。结构域自身是紧密装配的, 但结构域与结构域之间关系松懈。结构域与结构域之间常常有一段长短不等的肽链相连, 形成所谓铰链区。不同蛋白质分子中结构域的数目不同, 同一蛋白质分子中的几个结构域彼此相似或很不相同。常见结构域的氨基酸残基数在 100~400 个之间, 最小的结构域只有 40~50 个氨基酸残基, 大的结构域可超过 400 个氨基酸残基。图 2-20 为免疫球蛋白 G 轻链的两个结构域的结构。

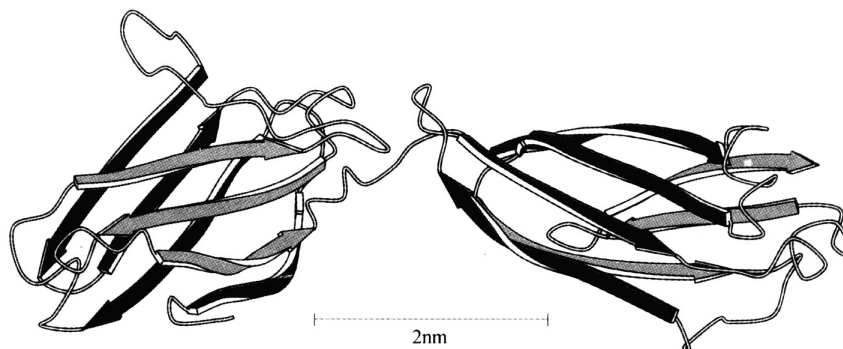


图 2-20 免疫球蛋白 G 轻链的两个结构域

四、蛋白质的三级结构

(一) 蛋白质的三级结构及其特点

蛋白质的三级结构 (tertiary structure) 是指多肽链在二级结构、超二级结构以及结构域的基础上, 进一步卷曲折叠形成复杂的球状分子结构。三级结构包括多肽链中一切原子的空间排列方式。

蛋白质多肽链如何折叠卷曲成特定的构象, 是由它的一级结构即氨基酸排列顺序决定的, 是蛋白质分子内各种侧链基团相互作用的结果。维持这种特定构象稳定的作用力主要是次级键, 它们使多肽链在二级结构的基础上形成更复杂的构象。肽链中的二硫键可以使远离的两个肽段连在一起, 所以对三级结构的稳定也起到重要作用。

1958年, 英国著名的科学家 Kendwer 等人用 X-射线结构分析法第一个搞清了抹香鲸肌红蛋白的三级结构。在这种球状蛋白质中, 多肽链不是简单地沿着某一个中心轴有规律地重复排列, 而是沿多个方向卷曲、折叠, 形成一个紧密的近似球形的结构 (图 2-21)。

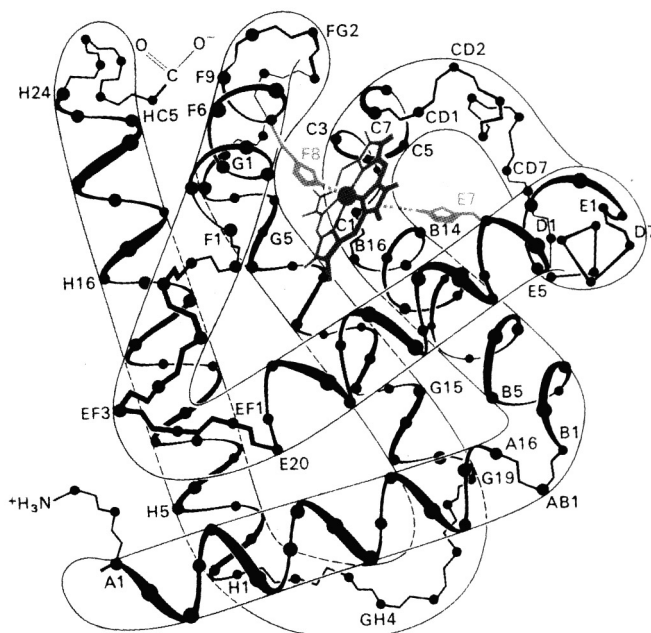


图 2-21 抹香鲸肌红蛋白的构象

肌红蛋白是哺乳动物肌肉中运输氧的蛋白质。它由一条多肽链构成, 有 153 个氨基酸残基和一个血红素 (heme) 辅基, 分子量为 17 800。肽链中约有 75% 的氨基酸残基以 α -螺旋结构存在, 形成 8 段 α -螺旋体, 分别用 A, B, C, D, E, F, G, H 表示, 每个螺旋的长度为 7~8 个氨基酸残基, 最长的由大约 23 个氨基酸残基组成。在拐弯处都有一段 1~8 个氨基酸残基的松散肽链, 使 α -螺旋体中断。但脯氨酸、异亮氨酸及多聚精氨酸

等难以形成 α -螺旋体的氨基酸都存在于拐弯处。由于侧链的相互作用，使肽链盘绕成一个外圆中空的紧密结构，疏水性残基包埋在球状分子的内部，而亲水性残基则分布在分子的表面，使肌红蛋白具有水溶性。血红素辅基垂直地伸出在分子表面，并通过肽链上的第 93 位组氨酸残基和第 64 位组氨酸残基与肌红蛋白分子内部相连。

虽然各种蛋白质都有自己特殊的折叠方式，但根据大量研究的结果发现，蛋白质的三级结构有以下共同特点：

(1) 具备三级结构的蛋白质一般都是球蛋白，都有近似球状或椭球状的外形，而且整个分子排列紧密，内部有时只能容纳几个水分子。

(2) 大多数疏水性氨基酸侧链都埋藏在分子内部，它们相互作用形成一个致密的疏水核，这对稳定蛋白质的构象有十分重要的作用，而且这些疏水区域常常是蛋白质分子的功能部位或活性中心。

(3) 大多数亲水性氨基酸侧链都分布在分子的表面，它们与水接触并强烈水化，形成亲水的分子外壳，从而使球蛋白分子可溶于水。

(二) 维持蛋白质构象的作用力

蛋白质的构象包括从二级结构到四级结构的所有高级结构，其稳定性主要依赖于大量的非共价键，又称次级键，其中包括氢键、离子键、疏水键和范德华力。此外，二硫键也在维持蛋白质空间构象的稳定中起重要作用。主要的次级键有以下几种：

1. 氢键

氢键 (hydrogen bond) 是由一个极性很强的 X—H 基上的氢原子与另一个电负性强的原子 Y (如 O、N、F 等) 相互作用形成的一种吸引力，本质上仍属于弱的静电吸引作用。氢键是保持肽链折叠结构的主要因素。它在维持蛋白质空间构象中起着重要作用。氢键可以在带电荷的分子间形成，也可以在不带电荷的两个分子间形成。氢键的实质是一个氢原子被两个其它原子“瓜分”。例如：



其中一个原子与氢原子连接较紧密的叫氢供体，而另一个连接得不紧密的叫氢受体。氢受体带有一部分负电荷可以吸引氢原子，所以实际上可以把氢键看作是质子从酸向碱转移的介质。在生物系统中，一个氢键的供体是氧原子或氮原子，它们可以共价地与氢原子结合，而氢受体是氧或氮。氢键的键能比共价键弱得多，但由于蛋白质分子中有许多氢键，所以在维持蛋白质空间结构的稳定性中有重要作用。

2. 离子键

所谓离子键 (ionic bond) 是带相反电荷的基团之间的静电引力，也称为静电键或盐键。蛋白质的多肽链由各种氨基酸组成，有些氨基酸残基带正电，如赖氨酸和精氨酸，有些氨基酸残基带负电，如谷氨酸和天冬氨酸。另外，游离的 N-端氨基酸残基的氨基和

C-端氨基酸残基的羧基也分别带正电荷和负电荷，这些带相反电荷的基团，如羧基和氨基、胍基、咪唑基等基团之间都可以形成离子键。



3. 疏水键

蛋白质分子含有许多非极性侧链和一些极性很小的基团，这些非极性基团避开水互相聚集在一起而形成的作用力称为疏水键 (hydrophobic bond)，也称疏水作用力。例如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸等氨基酸的侧链基团具有疏水性，在水溶液中它们会离开周围的溶剂聚集在一起，在空间关系上紧密接触而稳定起来，从而在分子内部形成疏水区。这种疏水相互作用在维持蛋白质的三级结构中也起到重要作用。

4. 范德华力

范德华力(Vander Waal's interactions)是一种非特异性引力，任何两个相距 0.3 ~ 0.4nm 的原子之间都存在范德华力，范德华力比离子键弱，但在生物体系中却是非常重要的。

这些次级键的键能都较弱，但由于它们在蛋白质分子中广泛存在，所以在维持蛋白质的二级结构、三级结构和四级结构的构象上起着非常重要的作用。如果外界因素影响或破坏了这些次级键的形成，则会引起蛋白质空间结构的变化。图 2-22 为维持蛋白质结构的各种键。

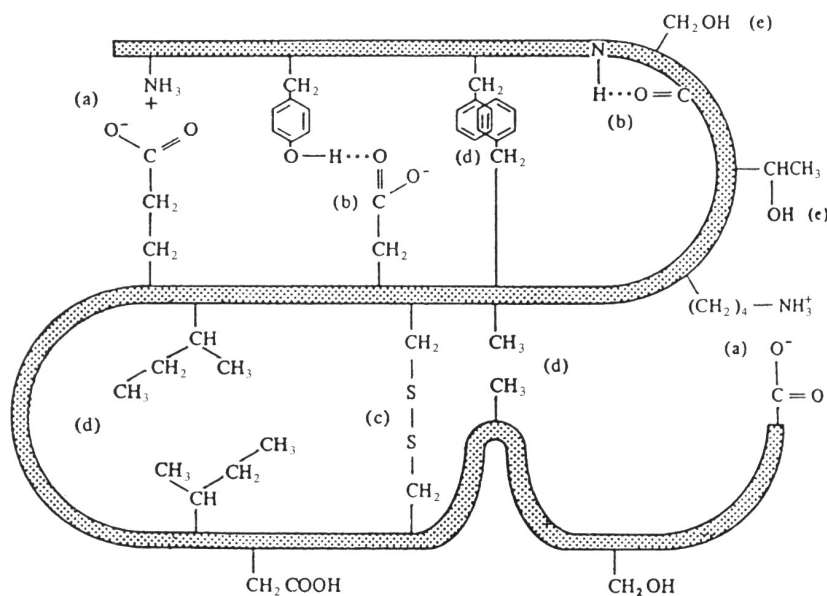


图 2-22 维持蛋白质构象的作用力

(a) 盐键；(b) 氢键；(c) 二硫键；(d) 疏水的相互作用

五、蛋白质的四级结构

有些蛋白质分子含有多条肽链，每一条肽链都具有各自的三级结构。这些具有独立三级结构的多肽链彼此通过非共价键相互连接而形成的聚合体结构就是蛋白质的四级结构 (quaternary structure)。在具有四级结构的蛋白质中，每一个具有独立的三级结构的多肽链称为该蛋白质的亚单位或亚基 (subunit)。亚基之间通过其表面的次级键连接在一起，形成完整的寡聚蛋白质分子。亚基一般只有一条肽链组成，亚基单独存在时没有活性，具有四级结构的蛋白质当缺少某一个亚基时也不具有生物活性。

有些蛋白质的四级结构是均一的 (homogeneous)，即由相同的亚基组成，而有些则是不均一的，即由不同亚基组成。亚基一般以 α ， β 等命名。亚基的数目一般为偶数，个别为奇数，亚基在蛋白质中的排布一般是对称的，对称性是具有四级结构的蛋白质的重要性质之一。

由两个亚基组成的蛋白质一般称为二聚体蛋白质，由四个亚基组成的蛋白质一般称为四聚体，由多个亚基组成的蛋白质一般称为寡聚体蛋白质或多体蛋白质。但并不是所有的蛋白质都具有四级结构，有些蛋白质只有一条多肽链，如肌红蛋白，这种蛋白称为单体蛋白。维持四级结构的作用力与维持三级结构的力是相同的。

血红蛋白 (hemoglobin) 就是由 4 条肽链组成的具有四级结构的蛋白质分子。血红蛋白的功能是在血液中运输 O_2 和 CO_2 ，分子量为 65 000，由 2 条 α 链 (含 141 个氨基酸残基) 和 2 条 β 链 (含 146 个氨基酸残基) 组成 (图 2-23)。

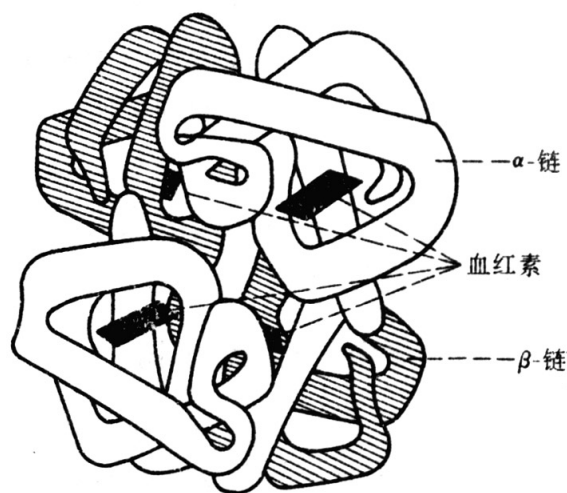


图 2-23 血红蛋白四级结构示意图

在血红蛋白的四聚体中，每个亚基含有一个血红素辅基。 α 链和 β 链在一级结构上的差别较大，但它们的三级结构却都与肌红蛋白相似，形成近似于球状的亚基，每条肽链都含有约 70% 的 α -螺旋结构部分，并且每个亚基中都含有 8 个肽段的 α -螺旋体，都

有长短不一的非螺旋松散链。肽链拐弯的角度和方向也与肌红蛋白相似。每个亚基都与一个血红素辅基结合。血红素是一个取代的卟啉，在中央有一个铁原子，血红素中的铁原子可以处在亚铁 (Fe^{+2}) 或高铁 (Fe^{+3}) 状态中，只有亚铁形式才能结合 O_2 。血红蛋白的亚基和肌红蛋白在结构上相似，这与它们在功能上的相似性是一致的。四级结构对于生物功能是非常重要的。对于具有四级结构的寡聚蛋白质来说，当某些变性因素（如酸，热或高浓度的尿素、胍）作用时，其构象就发生变化。首先是亚基彼此解离，即四级结构遭到破坏，随后分开的各个亚基伸展成松散的肽链。但如果条件温和，处理得非常小心时，寡聚蛋白的几个亚基彼此解离开来，但不破坏其正常的三级结构。恢复原来的条件，分开的亚基又可以重新结合并恢复活性。但如果处理条件剧烈时，则分开后的亚基完全伸展成松散的多肽链。这种情况下要恢复原来的结构和活性就比只具三级结构的蛋白质要困难得多。

蛋白质的结构层次可总结为：

一级结构（肽链结构，指多肽链中的氨基酸排列顺序）

二级结构（多肽链主链骨架盘绕折叠形成的有规律性的结构）

超二级结构（相邻二级结构的聚集体）

结构域（在空间上可明显区分的相对独立的区域性结构）

三级结构（球状蛋白质中所有原子在空间的相对位置）

四级结构（亚基聚合体）

第五节 蛋白质结构与功能的关系

蛋白质的种类很多，各种蛋白质都有其独特的生物学功能，而实现其生物学功能的基础就是蛋白质分子所具有的结构，其中包括一级结构和空间结构，从根本上来说取决于它的一级结构。因此，研究蛋白质的结构与功能的关系已成为从分子水平上认识生命现象的最终目标，它与生命起源、细胞分化、代谢调节等重大理论问题的解决密切相关。同时，也为解决工农业生产和医疗实践中所存在的许多重大问题提供重要的理论依据。

一、蛋白质一级结构与功能的关系

蛋白质的一级结构与其生物功能的密切关系可从以下几方面说明。

（一）分子病与结构的关系

蛋白质一级结构与功能的关系可以分子病来说明。分子病是指蛋白质分子一级结构

的氨基酸排列顺序与正常顺序有所不同的遗传病，如镰刀型贫血病就是一例。病人的血红蛋白分子与正常人的血红蛋白分子相比，在 574 个氨基酸中有 2 个不同。正常人的血红蛋白的 α -链 N-端第 6 位氨基酸为谷氨酸，而病人的血红蛋白的 α -链 N-端第 6 位氨基酸为缬氨酸。这样就使血红蛋白分子表面的负电荷减少，亲水基团成为疏水基团，导致血红蛋白分子不正常聚合，溶解度降低，在细胞内易聚集沉淀，丧失了结合氧的能力，血球收缩成镰刀状，细胞脆弱而发生溶血。这个例子说明，蛋白质的一级结构。是蛋白质行使功能的基础，甚至只有一个氨基酸的改变就能引起功能的改变或丧失。

(二) 同功能蛋白质中氨基酸顺序的种属差异

有些蛋白质存在于不同的生物体中，但具有相同的生物学功能，这些蛋白质被称为同功能蛋白质或同源蛋白质。研究发现，不同种属的同一种蛋白质其一级结构上有些变化，这就是所谓的种属差异。将不同生物体中的同源蛋白质的一级结构进行比较，发现在结构上有相似性，例如细胞色素 C 就是一例。

细胞色素 C 广泛存在于需氧生物细胞的线粒体中，是一种与血红素辅基共价结合的单链蛋白质，它在生物氧化反应中起重要作用。从各种生物的细胞色素 C 的一级结构分析结果表明，虽然各种生物在亲缘关系上差别很大，但与功能密切有关的氨基酸顺序却有共同之处。例如 104 个氨基酸中有 35 个氨基酸是各种生物所共有的，是不变的，其中第 14 和第 17 位是半胱氨酸，第 18 位是组氨酸，第 80 位是甲硫氨酸，第 48 位是酪氨酸，第 59 位是色氨酸，这些氨基酸的位置都没有变化。研究证明，这几个氨基酸都是保证细胞色素 C 功能的关键部位，如肽链上第 14 和第 17 位两个半胱氨酸是与血红素共价连接的位置。另外，研究结果也表明，亲缘关系越近，结构越相似。例如人和黑猩猩的细胞色素 C 的氨基酸残基种类、排列顺序和三级结构大体上都相同，而人与马相比就有 12 处不同，与鸡相比有 13 处不同，与昆虫相比有 27 处不同，与酵母相比有 44 处不同，相差最大。因此，可以根据它们在结构上的差异程度断定它们在亲缘关系上的远近，从而为生物进化的研究提供有价值的根据。表 2-6 为不同生物与人的细胞色素 C 相比较的氨基酸差异数目。

表 2-6 不同生物与人的细胞色素 C 所差的氨基酸残基数目

生物名称	相差氨基酸数目	生物名称	相差氨基酸数目
黑猩猩	0	响尾蛇	14
恒河猴	1	海 龟	15
兔	9	金枪鱼	21
袋 鼠	10	狗 鱼	23
牛、羊、猪	10	小 蝇	25
狗	11	蛾	31
驴	11	小 麦	35
马	12	粗糙链孢酶	43
鸡、火鸡	13	酵母菌	44

（三）一级结构的局部断裂与蛋白质的激活

生物体中的很多酶、蛋白激素、凝血因子等蛋白质都具有重要的生物学功能，但它们在体内往往以无活性的前体（precursor）形式贮存着，酶的前体称为酶原。这些酶原在体内被切去一个或几个肽段后才能被激活成有催化活性的酶。例如胃蛋白酶原，由 392 个氨基酸残基组成，在胃酸的作用下，酶原的第 42 与第 43 个氨基酸间的肽键断裂，失去 42 个氨基酸，从而变为有活性的胃蛋白酶，而且有活性的胃蛋白酶又可进一步去激活其它的胃蛋白酶原。又如胰蛋白酶原的激活。胰蛋白酶原进入小肠后在有 Ca^{2+} 的环境中受到肠激酶的激活，使酶原中赖氨酸和异亮氨酸之间的肽键被打断，失去 6 个氨基酸的一个肽段，使构象发生一定变化，成为有活性的胰蛋白酶。

以上例子都充分说明，每种蛋白质分子都具有特定的结构，并且都以某种特异的结构行使其特定的功能，当一级结构改变时，则丧失其功能，说明蛋白质的一级结构与功能之间有高度的统一性和相适应性。

二、蛋白质的空间结构与功能的关系

各种蛋白质都有特定的构象，而这种构象是与它们各自的功能相适应的。蛋白质的空间结构对于表现其生物学功能也是十分重要的。当蛋白质空间结构遭到破坏时，它的生物学功能也随之丧失。以下几例可充分说明蛋白质的空间结构对其功能的重要性。

（一）核糖核酸酶的变性与复性

核糖核酸酶的功能是水解核糖核酸，其分子中含有 124 个氨基酸残基，一条肽链经不规则折叠形成一个近似于球形的分子。维持核糖核酸酶构象稳定的因素除了次级键外还有 4 对二硫键。如果将天然的核糖核酸酶在 8mol/L 的脲中用巯基乙醇处理，则分子中的 4 对二硫键被破坏，球状分子变成一条松散的多肽链，同时酶活性完全丧失。但如果用透析法除去脲（变性剂）和巯基乙醇后，此酶经氧化又可自发地折叠成原来的天然构象，因为二硫键又重新形成，并且酶活性又可以恢复（图 2-24）。此实验说明，蛋白质的变性是可逆的，同时也说明，蛋白质分子多肽链的氨基酸排列顺序包含了自动形成正确的空间构象所需要的全部信息，蛋白质的特定的空间结构是其特有的生物学功能的基础。

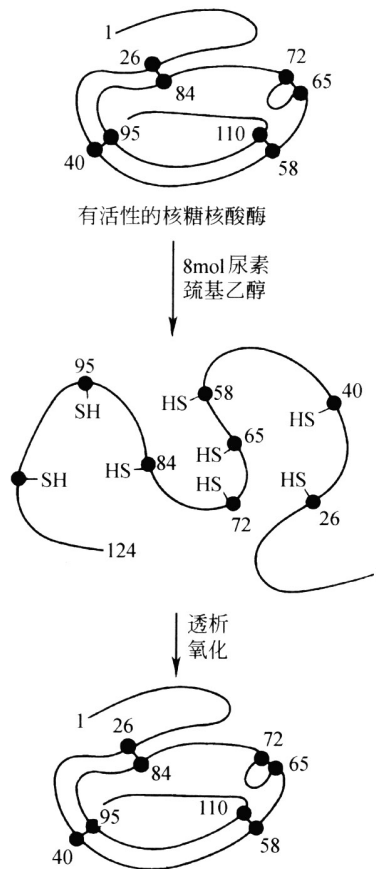


图 2-24 核糖核酸酶的变性与复性

(二) 蛋白质的变构现象

一些蛋白质由于受某些因素的影响，其一级结构不变而空间结构发生变化，导致其生物功能的改变，称为蛋白质的变构现象或别构现象。变构现象是蛋白质表现其生物功能的一种普遍而十分重要的现象，也是调节蛋白质生物功能的极为有效的方式，例如血红蛋白就是典型的例子。

血红蛋白的主要功能是在体内运输氧。血红蛋白未与氧结合时处于紧密型，是一个稳定的四聚体（ $\alpha_2\beta_2$ ），这时与氧的亲合力很低。一旦 O_2 与血红蛋白分子中的一个亚基结合，即引起该亚基构象发生变化，并且会引起其余三个亚基构象相继发生变化，结果引起整个分子构象改变，使得所有亚基的血红素铁原子的位置都变得适于与 O_2 结合，所以血红蛋白与氧结合的速度大大加快。血红蛋白的 α 链和 β 链与肌红蛋白的构象十分相似，使它们都具有基本的氧合功能。但由于血红蛋白是一个四聚体，其分子结构要比肌红蛋白复杂得多，因此除了运输氧以外还有肌红蛋白所没有的功能，如运输质子和二氧

化碳。而且血红蛋白与氧的结合还表现出协同性，这一点可以从血红蛋白的氧合曲线看出。在溶液中，血红蛋白分子上已结合氧的位置数与可能结合氧的位置数之比称为饱和度或饱和分数。以饱和度为纵坐标，氧分压（1Torr=1mm 水银柱）为横坐标作图可得到氧合曲线。血红蛋白的氧合曲线为 S 型，而肌红蛋白的氧合曲线则为双曲线（图 2-25）。S 型曲线说明血红蛋白与氧的结合具有协同性，而肌红蛋白则没有。如果将血红蛋白中的 α -亚基和 β -亚基分离，得到单独的 α -亚基或 β -亚基，则它们的氧合曲线也和肌红蛋白的一样，都是双曲线，没有变构性质。可见，血红蛋白的变构性质来自于它的亚基之间的相互作用。这些都说明蛋白质的空间结构与其功能具有相互适应性和高度的统一性，结构是功能的基础。

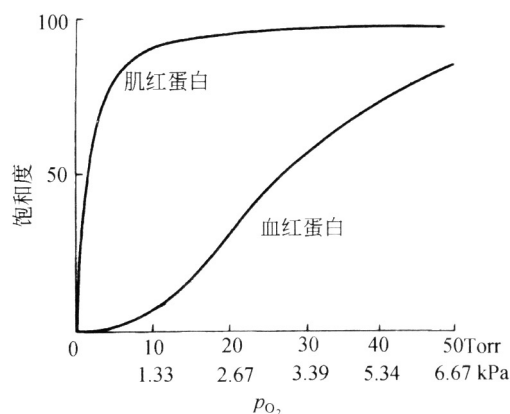


图 2-25 血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线
(1Torr = 133.322Pa)

第六节 蛋白质的重要性质

一、蛋白质的两性性质和等电点

蛋白质是由氨基酸组成的，在其分子表面带有很多可解离基团，如羧基、氨基、酚羟基、咪唑基、胍基等。此外，在肽链两端还有游离的 α -氨基和 ω -羧基，因此蛋白质是两性电解质，可以与酸或碱相互作用。溶液中蛋白质的带电状况与其所处环境的 pH 有关。当溶液在某一特定的 pH 条件下，蛋白质分子所带的正电荷数与负电荷数相等，即净电荷为零，此时蛋白质分子在电场中不移动，这时溶液的 pH 称为该蛋白质的等电点，此时蛋白质的溶解度最小。由于不同蛋白质的氨基酸组成不同，所以都有其特定的等电点，在同一 pH 条件下所带净电荷不同。如果蛋白质中碱性氨基酸较多，则等电点偏碱，如果酸性氨基酸较多，等电点偏酸。酸碱氨基酸比例相近的蛋白质其等电点大多为中性偏酸，约在 5.0 左右。

带电质点在电场中向相反电荷的电极移动，这种现象称为电泳 (electrophoresis)。由于蛋白质在溶液中解离成带电的颗粒，因此可以在电场中移动，移动的方向和速度取决于所带净电荷的正负性和所带电荷的多少以及分子颗粒的大小和形状。由于各种蛋白质的等电点不同，所以在同一 pH 溶液中带电荷不同，在电场中移动的方向和速度也各不相同，根据此原理就可利用电泳的方法将混合的各种蛋白质分离开。

二、蛋白质的胶体性质

蛋白质是生物大分子，蛋白质溶液是稳定的胶体溶液，具有胶体溶液的特征，其中电泳现象和不能透过半透膜对蛋白质的分离纯化都是非常有用的。蛋白质之所以能以稳定的胶体存在主要是由于：

(1) 蛋白质分子大小已达到胶体质点范围 (颗粒直径在 1 ~ 100nm 之间)，具有较大表面积。

(2) 蛋白质分子表面有许多极性基团，这些基团与水有高度亲和性，很容易吸附水分子。实验证明，每 1g 蛋白质大约可结合 0.3 ~ 0.5g 的水，从而使蛋白质颗粒外面形成一层水膜。由于这层水膜的存在，使得蛋白质颗粒彼此不能靠近，增加了蛋白质溶液的稳定性，阻碍了蛋白质胶体从溶液中聚集、沉淀出来。

(3) 蛋白质分子在非等电状态时带有同性电荷，即在酸性溶液中带有正电荷，在碱性溶液中带有负电荷。由于同性电荷互相排斥，所以使蛋白质颗粒互相排斥，不会聚集沉淀。

蛋白质的胶体性质具有重要的生理意义。在生物体中，蛋白质与大量水结合形成各种流动性不同的胶体系统，如细胞的原生质就是一个复杂的胶体系统。生命活动的许多代谢反应即在此系统中进行。

如果这些稳定因素被破坏，蛋白质的胶体性质就会被破坏，从而产生沉淀作用。所谓蛋白质的沉淀作用是指在蛋白质溶液中加入适当试剂，破坏了蛋白质的水化膜或中和了其分子表面的电荷，从而使蛋白质胶体溶液变得不稳定而发生沉淀的现象。下列方法可使蛋白质产生沉淀并可有效地用于蛋白质的分离。

(一) 盐析

在蛋白质溶液中加入一定量的中性盐 (如硫酸铵、硫酸钠、氯化钠等) 使蛋白质溶解度降低并沉淀析出现象称为盐析 (salting out)。这是由于这些盐类离子与水的亲和性大，又是强电解质，可与蛋白质争夺水分子，破坏蛋白质颗粒表面的水膜。另外，大量中和蛋白质颗粒上的电荷，使蛋白质成为既不含水膜又不带电荷的颗粒而聚集沉淀。盐析时所需的盐浓度称为盐析浓度，用饱和百分比表示。由于不同蛋白质的分子大小及带电状况各不相同，所以盐析所需的盐浓度不同。因此，可以通过调节盐浓度使混合液中几种不同蛋白质分别沉淀析出，从而达到分离的目的，这种方法称为分段盐析。硫酸铵是最常用来盐析的中性盐。

另外，当在蛋白质溶液中加入中性盐的浓度较低时，蛋白质溶解度会增加，这种现

象称为盐溶 (salting in), 这是由于蛋白质颗粒上吸附某种无机盐离子后, 使蛋白质颗粒带同种电荷而相互排斥, 并且与水分子的作用加强, 从而溶解度增加。

(二) 调 pH至等电点

当蛋白质溶液处于等电点 pH 时, 蛋白质分子主要以两性离子形式存在, 净电荷为零。此时蛋白质分子失去同种电荷的排斥作用, 极易聚集而发生沉淀。

(三) 有机溶剂

有些与水互溶的有机溶剂如甲醇、乙醇、丙酮等可使蛋白质产生沉淀, 这是由于这些有机溶剂和水的亲和力大, 能夺取蛋白质表面的水化膜, 从而使蛋白质的溶解度降低并产生沉淀。此法也可用于蛋白质的分离、纯化。

以上方法分离制备得到的蛋白质一般仍保持天然蛋白质的生物活性, 将其重新溶解于水仍然能成为稳定的胶体溶液。但用有机溶剂来沉淀分离蛋白质时, 需在低温下进行, 在较高温度下进行会破坏蛋白质的天然构象。

(四) 重金属盐

当蛋白质溶液的 pH 大于其等电点时, 蛋白质带负电荷, 可与重金属离子 (如 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^+ 等) 结合形成不溶性的蛋白盐而沉淀。

(五) 生物碱试剂

生物碱是植物组织中具有显著生理作用的一类含氮的碱性物质。能够沉淀生物碱的试剂称为生物碱试剂。生物碱试剂都能沉淀蛋白质, 如单宁酸、苦味酸、三氯乙酸等都能沉淀生物碱。因为一般生物碱试剂都为酸性物质, 而蛋白质在酸性溶液中带正电荷, 所以能和生物碱试剂的酸根离子结合形成溶解度较小的盐类而沉淀。

三、蛋白质的变性与复性

蛋白质因受某些物理或化学因素的影响, 分子的空间构象被破坏, 从而导致其理化性质发生改变并失去原有的生物学活性的现象称为蛋白质的变性作用 (denaturation)。变性作用并不引起蛋白质一级结构的破坏, 而是二级结构以上的高级结构的破坏, 变性后的蛋白质称为变性蛋白。

引起蛋白质变性的因素很多, 物理因素有高温、紫外线、X-射线、超声波、高压、剧烈的搅拌、震荡等。化学因素有强酸、强碱、尿素、胍盐、去污剂、重金属盐 (如 Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 等) 三氯乙酸, 浓乙醇等。不同蛋白质对各种因素的敏感程度不同。

蛋白质变性后许多性质都发生了改变, 主要有以下几个方面:

(一) 生物活性丧失

蛋白质的生物活性是指蛋白质所具有的酶、激素、毒素、抗原与抗体、血红蛋白的载氧能力等生物学功能。生物活性丧失是蛋白质变性的主要特征。有时蛋白质的空间结构只有轻微变化即可引起生物活性的丧失。

(二) 某些理化性质的改变

蛋白质变性后理化性质发生改变, 如溶解度降低而产生沉淀, 因为有些原来在分子

内部的疏水基团由于结构松散而暴露出来,分子的不对称性增加,因此粘度增加,扩散系数降低。

(三) 生物化学性质的改变

蛋白质变性后,分子结构松散,不能形成结晶,易被蛋白酶水解。蛋白质的变性作用主要是由于蛋白质分子内部的结构被破坏。天然蛋白质的空间结构是通过氢键等次级键维持的,而变性后次级键被破坏,蛋白质分子就从原来有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构(但一级结构并未改变)。所以,原来处于分子内部的疏水基团大量暴露在分子表面,而亲水基团在表面的分布则相对减少,至使蛋白质颗粒不能与水相溶而失去水膜,很容易引起分子间相互碰撞而聚集沉淀。

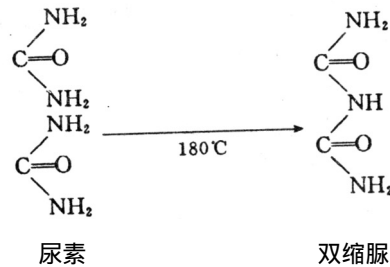
如果变性条件剧烈持久,蛋白质的变性是不可逆的。如果变性条件不剧烈,这种变性作用是可逆的,说明蛋白质分子内部结构的变化不大。这时,如果除去变性因素,在适当条件下变性蛋白质可恢复其天然构象和生物活性,这种现象称为蛋白质的复性(renaturation)。例如胃蛋白酶加热至 80~90 时,失去溶解性,也无消化蛋白质的能力,如将温度再降低到 37 ,则又可恢复溶解性和消化蛋白质的能力。

四、蛋白质的颜色反应

蛋白质分子中的肽键、苯环、酚以及分子中的某些氨基酸可与某些试剂产生颜色反应,这些颜色反应可应用于蛋白质的分析工作,定性定量地测定蛋白质。

(一) 双缩脲反应

双缩脲是由两分子尿素缩合而成的化合物。将尿素加热到 180 ,2 分子尿素缩合成 1 分子双缩脲并放出 1 分子氨:



双缩脲在碱性溶液中能与硫酸铜反应产生红紫色络合物,此反应称双缩脲反应(biuret reaction)。蛋白质分子中含有许多肽键,结构与双缩脲相似,因此也能产生双缩脲反应,所以可用此反应来定性定量地测定蛋白质。凡含有两个或两个以上肽键结构的化合物都可能有双缩脲反应。

(二) 蛋白质黄色反应

蛋白质溶液遇硝酸后先产生白色沉淀,加热则白色沉淀变成黄色,再加碱,颜色加深呈橙黄色。这是因为硝酸将蛋白质分子中的苯环硝化,产生了黄色硝基苯衍生物。所以

凡含有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的蛋白质均有此反应。

(三) 米隆反应

米隆试剂为硝酸汞、亚硝酸汞，硝酸和亚硝酸的混合物。将此试剂加入蛋白质溶液后即产生白色沉淀，加热后沉淀变成红色。这是由于酚类化合物所引起的反应，而酪氨酸含有酚基，所以含有酪氨酸的蛋白质及酪氨酸都有此反应。

(四) 乙醛酸反应

将乙醛酸加入蛋白质溶液，然后沿试管壁慢慢注入浓硫酸，则在两液层之间会出现紫色环。凡含有吲哚基的化合物都有此反应，所以凡含有色氨酸的蛋白质及色氨酸都有此反应。

(五) 坂口反应

精氨酸分子中的胍基能与次氯酸钠（或次溴酸钠）及 2-萘酚在氢氧化钠溶液中产生红色产物。此反应可用来测定精氨酸的含量或鉴定含有精氨酸的蛋白质。

(六) 酚试剂反应

酚试剂又称福林试剂。酪氨酸中的酚基能将酚试剂中的磷钼酸及磷钨酸还原成蓝色化合物（钼蓝和钨蓝的混合物）。由于蛋白质分子中一般都含有酪氨酸，所以可用此反应来测定蛋白质含量。

(七) 醋酸铅反应

凡含有半胱氨酸、胱氨酸的蛋白质都能与醋酸铅起反应，生成黑色的硫化铅沉淀，因为其中含有 -S-S- 或 -SH 基。

第七节 蛋白质的分类

分类是把科学知识系统化的一个有用的手段。整个生物界大约有 100 亿种不同的蛋白质，可根据不同原则对蛋白质进行分类。目前常用的分类方法有如下几种：

一、根据分子形状分类

根据蛋白质分子外形的对称程度可将其分为两类。

(一) 球状蛋白质

球状蛋白质（globular proteins）分子比较对称，接近球形或椭球形。溶解度较好，能结晶。大多数蛋白质属于球状蛋白质，如血红蛋白、肌红蛋白、酶、抗体等。

(二) 纤维蛋白质

纤维蛋白质（fibrous proteins）分子对称性差，类似于细棒状或纤维状。溶解性质各不相同，大多数不溶于水，如胶原蛋白、角蛋白等。有些则溶于水，如肌球蛋白、血纤维蛋白原等。

二、根据化学组成分类

根据化学组成可将蛋白质分为两类。

(一) 简单蛋白质

简单蛋白质 (simple proteins) 分子中只含有氨基酸, 没有其他成分。

(二) 结合蛋白质 (conjugated proteins)

结合蛋白质 (conjugated proteins) 是由蛋白质部分和非蛋白质部分结合而成。主要的结合蛋白有六种:

1. 核蛋白

非蛋白部分为核酸称核蛋白 (nucleoprotein)。核蛋白分布广泛, 存在于所有生物细胞中。

2. 糖蛋白

非蛋白部分为糖类称糖蛋白 (glycoprotein)。糖蛋白广泛存在于动物、植物、真菌、细菌及病毒中。

3. 脂蛋白

蛋白质和脂类结合构成脂蛋白 (lipoprotein)。在脂蛋白中, 脂类和蛋白质之间以非共价键结合。脂蛋白广泛分布于细胞和血液中。

4. 色蛋白

蛋白质和某些色素物质结合形成色蛋白 (chromoprotein)。非蛋白质部分多为血红素, 所以又称为血红素蛋白。

5. 金属蛋白

金属蛋白 (metalloprotein) 是一类直接与金属结合的蛋白质, 如铁蛋白含铁; 乙醇脱氢酶含锌, 黄嘌呤氧化酶含钼和铁等。

6. 磷蛋白

磷蛋白 (phosphoprotein) 类分子中含磷酸基, 一般磷酸基与蛋白质分子中的丝氨酸或苏氨酸通过酯键相连。如酪蛋白、胃蛋白酶等都属于这类蛋白。

三、根据蛋白质的溶解度分类

根据溶解度不同, 可将蛋白质分为以下几类:

(一) 清蛋白

清蛋白 (albumin) 又称白蛋白, 分子量较小, 溶于水、中性盐类、稀酸和稀碱, 可被饱和硫酸铵沉淀。清蛋白在自然界分布广泛, 如小麦种子中的麦清蛋白、血液中的血清清蛋白和鸡蛋中的卵清蛋白等都属于清蛋白。

(二) 球蛋白

球蛋白 (globulins) 一般不溶于水而溶于稀盐溶液、稀酸或稀碱溶液, 可被半饱和的硫酸铵沉淀。球蛋白在生物界广泛存在并具有重要的生物功能。大豆种子中的豆球蛋白、

血液中的血清球蛋白、肌肉中的肌球蛋白以及免疫球蛋白都属于这一类。

（三）组蛋白

组蛋白（histones）可溶于水或稀酸。组蛋白是染色体的结构蛋白，含有丰富的精氨酸和赖氨酸，所以是一类碱性蛋白质。

（四）精蛋白

精蛋白（protamines）易溶于水或稀酸，是一类分子量较小结构简单的蛋白质。精蛋白含有较多的碱性氨基酸，缺少色氨酸和酪氨酸，所以是一类碱性蛋白质。精蛋白存在于成熟的精细胞中，与 DNA 结合在一起，如鱼精蛋白。

（五）醇溶蛋白

醇溶蛋白（prolamines）不溶于水和盐溶液，溶于 70% ~ 80% 的乙醇，多存在于禾本科作物的种子中，如玉米醇溶蛋白、小麦醇溶蛋白。

（六）谷蛋白类

谷蛋白（glutelins）不溶于水、稀盐溶液，溶于稀酸和稀碱。谷蛋白存在于植物种子中，如水稻种子中的稻谷蛋白和小麦种子中的麦谷蛋白等。

（七）硬蛋白类

硬蛋白（scleroproteins）不溶于水、盐溶液、稀酸、稀碱，主要存在于皮肤、毛发、指甲中，起支持和保护作用，如角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、丝蛋白等。

第八节 蛋白质的分离纯化及分子量测定

一、蛋白质分离纯化的一般原则

大多数蛋白质在组织细胞中都是和核酸等生物分子结合在一起，而且每种类型的细胞都含有成千上万种不同的蛋白质。许多蛋白质在结构、性质上有许多相似之处，所以蛋白质的分离提纯是一项复杂的工作。到目前为止，还没有一套现成的方法能把任何一种蛋白质从复杂的混合物中提取出来。但是对于任何一种蛋白质都有可能选择一种较合适的分离纯化程序以获得高纯度的制品。且分离的关键步骤、基本手段还是共同的。

蛋白质提纯的目的是增加产品的纯度和产量，同时又要保持和提高产品的生物活性。因此，要分离纯化某一种蛋白质，首先应选择一种含目的蛋白质较丰富的材料。其次，应设法避免蛋白质变性，以制备有活性的蛋白质。对于大多数蛋白质来说，纯化操作都是在 0~4 的低温下进行的。同时也应避免过酸、过碱的条件以及剧烈的搅拌和振荡。另外，还要设法除去变性的蛋白质和其它杂蛋白，从而达到增加纯度和提高产量的目的。

二、分离纯化蛋白质的一般程序

分离纯化蛋白质的一般程序可分为以下几个步骤：

（一）材料的预处理及细胞破碎

分离提纯某一种蛋白质时，首先要把蛋白质从组织或细胞中释放出来并保持原来的天然状态，不丧失活性。所以要采用适当的方法将组织和细胞破碎。常用的破碎组织细胞的方法有：

1. 机械破碎法

这种方法是利用机械力的剪切作用，使细胞破碎。常用设备有，高速组织捣碎机、匀浆器、研钵等。

2. 渗透破碎法

这种方法是在低渗条件使细胞溶胀而破碎。

3. 反复冻融法

生物组织经冻结后，细胞内液结冰膨胀而使细胞胀破。这种方法简单方便，但要注意那些对温度变化敏感的蛋白质不宜采用此法。

4. 超声波法

使用超声波震荡器使细胞膜上所受张力不均而使细胞破碎。

5. 酶法

如用溶菌酶破坏微生物细胞等。

（二）蛋白质的抽提

通常选择适当的缓冲液溶剂把蛋白质提取出来。抽提所用缓冲液的 pH、离子强度、组成成分等条件的选择应根据欲制备的蛋白质的性质而定。如膜蛋白的抽提，抽提缓冲液中一般要加入表面活性剂（十二烷基磺酸钠、tritonX-100 等），使膜结构破坏，利于蛋白质与膜分离。在抽提过程中，应注意温度，避免剧烈搅拌等，以防止蛋白质的变性。

（三）蛋白质粗制品的获得

选用适当的方法将所要的蛋白质与其它杂蛋白分离开来。比较方便的有效方法是根据蛋白质溶解度的差异进行的分离。常用的有下列几种方法：

1. 等电点沉淀法

不同蛋白质的等电点不同，可用等电点沉淀法使它们相互分离。

2. 盐析法

不同蛋白质盐析所需要的盐饱和度不同，所以可通过调节盐浓度将目的蛋白沉淀析出。被盐析沉淀下来的蛋白质仍保持其天然性质，并能再度溶解而不变性。

3. 有机溶剂沉淀法

中性有机溶剂如乙醇、丙酮，它们的介电常数比水低。能使大多数球状蛋白质在水溶液中的溶解度降低，进而从溶液中沉淀出来，因此可用来沉淀蛋白质。此外，有机溶剂会破坏蛋白质表面的水化层，促使蛋白质分子变得不稳定而析出。由于有机溶剂会使蛋白质变性，使用该法时，要注意在低温下操作，选择合适的有机溶剂浓度。

（四）样品的进一步分离纯化

用等电点沉淀法、盐析法所得到的蛋白质一般含有其他蛋白质杂质，须进一步分离提纯才能得到有一定纯度的样品。常用的纯化方法有：凝胶过滤层析、离子交换纤维素

层析、亲和层析等等。有时还需要这几种方法联合使用才能得到较高纯度的蛋白质样品。

1. 凝胶过滤层析

凝胶过滤层析 (gel-filtration chromatography) 又称为分子排阻层析或分子筛层析。它是将葡聚糖凝胶 (Sephadex) 装入一个柱子中, 制成凝胶柱。这种凝胶颗粒具有网状结构, 不同类型凝胶的网孔大小不同。当把蛋白质混合样品加到凝胶柱中时, 比凝胶网孔小的蛋白质可进入网孔内, 而大于网孔的分子则不能进入被排阻在凝胶颗粒之外。当用洗脱液洗脱时, 被排阻的分子量大的蛋白质直接通过凝胶之间的缝隙先被洗脱下来, 而比网孔小的蛋白质可连续不断地进入网孔内。这样的小分子不但流经的路程长, 而且受到来自凝胶内部的阻力也很大, 所以蛋白质越小, 从柱子上洗脱下来所需时间越长。由于不同蛋白质的分子大小不同, 进入网孔的程度不同, 因此流出的速度不同, 洗脱所用体积及时间不同, 从而达到分离的目的 (图 2-26)。

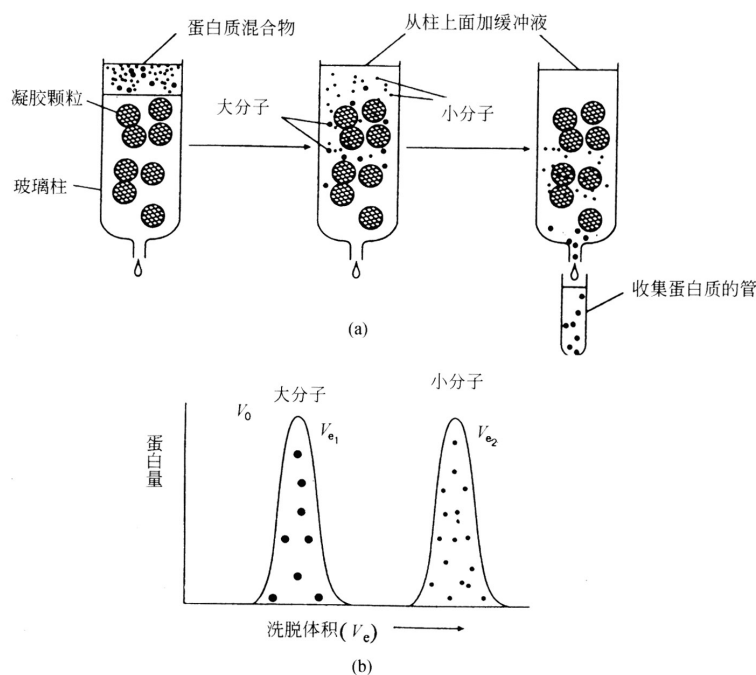


图 2-26 凝胶过滤层析示意图

(a) 分子排阻层析示意; (b) 洗脱顺序, 大分子先被洗出

2. 纤维素柱层析法

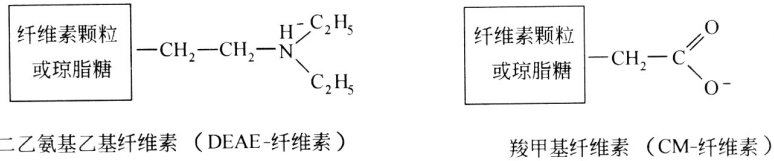
该法是利用蛋白质的酸碱性质作为分离的基础。离子交换纤维素 (cellulose ion exchanger) 是人工合成的纤维素衍生物, 它具有松散的亲水性网状结构, 有较大的表面积, 使蛋白质大分子可以自由通过。因此常用于蛋白质的分离。

(1) 羧甲基纤维素 (CM-纤维素) 在纤维素颗粒上带有羧甲基基团。在中性 pH 条件下, 羧甲基上的质子可解离下来 (图 2-27a), 而溶液中带正电荷的蛋白质分子可与纤

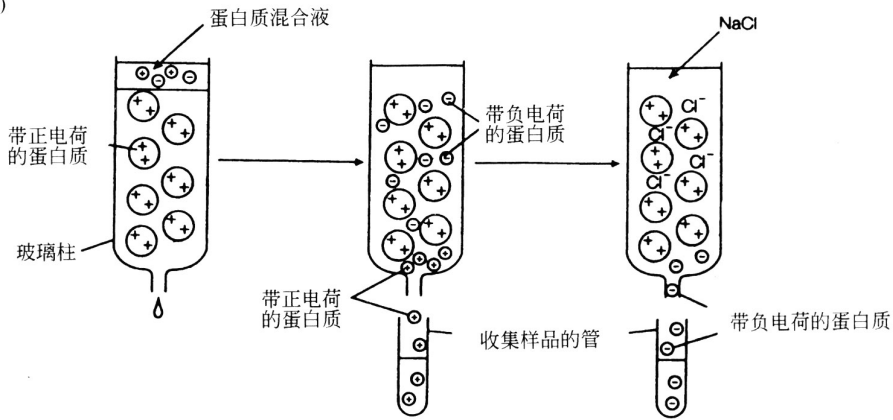
纤维素颗粒上的羧甲基负电荷结合。可交换的基团带正电，因此是一种阳离子交换剂。蛋白质与离子交换纤维素之间结合能力的大小取决于彼此间相反电荷基团之间静电吸引。

(2) 二乙氨基乙基纤维素 (DEAE-纤维素) 在中性 pH 条件下，它含有带正电荷的基团，可与溶液中的带负电荷的蛋白质结合，可交换的基团带负电荷，因此是一种阴离子交换剂。当某一蛋白质混合溶液通过装有 DEAE-纤维素的层析柱时，带正电荷的蛋白质不能结合而随着洗脱液的流动先被洗脱下来。带负电荷的蛋白质将被结合到柱上。结合力取决于彼此相反电荷基团间的静电吸引。然后选用一定 pH 和离子强度的缓冲液进行洗脱，改变蛋白质分子所带的静电荷，依次从层析柱流出达到相互分离的目的(图 2-27)。

(a)



(b)



(c)

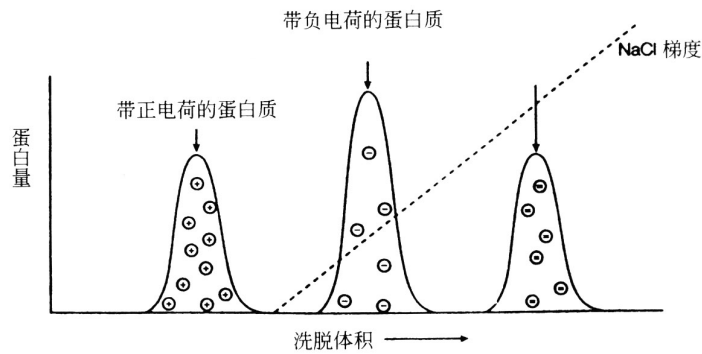
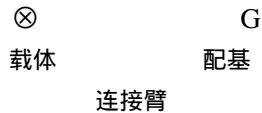


图 2-27 纤维素柱层析示意图

(a) DEAE 纤维素和 CM 纤维素的结构；(b) 离子交换纤维素层析示意；(c) 离子交换纤维素层析分离图谱

3. 亲和层析

亲和层析 (affinity chromatography) 分离技术是根据许多蛋白质对特定的化学基团具有专一性结合的原理。这些能被生物大分子如蛋白质所识别并与之结合的基团称为配基或配体 (ligand)。亲和层析是一种极有效的分离纯化蛋白质的方法。例如酶对它的底物具有特殊的亲和力；抗原和抗体互为配基。以伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A) 的分离纯化为例，由于该蛋白对葡萄糖有专一性亲和吸附，因此可把葡萄糖通过适当的化学反应共价地连接到像琼脂糖凝胶一类的载体表面上。为了防止载体表面的空间位阻影响待分离的蛋白质大分子与其配基的结合，在配基和载体之间往往插入一段所谓的连接臂 (或称为间隔臂, spacer arm)，使配体与载体之间保持足够的距离。如下所示：



将这种多糖颗粒装入一定规格的玻璃管中就制成了一根亲和层析柱。当含有伴刀豆球蛋白的提取液加到层析柱的上部，并沿柱向下流过时，待纯化的蛋白质与其特异性配基结合而被吸附到柱上，其他蛋白因不能与葡萄糖配基结合将通过柱子而流出 (图 2-28a)。然后采用一定的洗脱条件，如浓的葡萄糖溶液进行洗脱，即可把该蛋白质洗脱下来，达到与其它蛋白质分离的目的 (图 2-28b)。

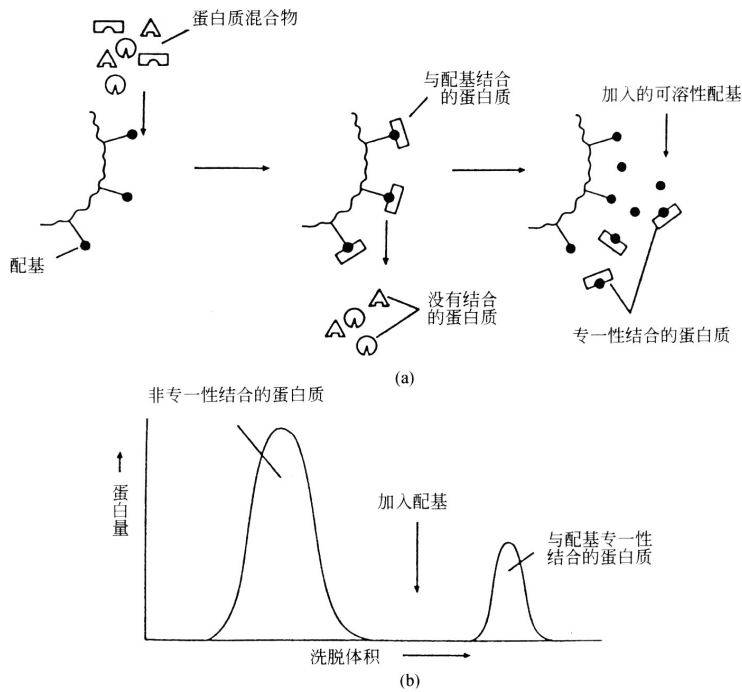


图 2-28 亲和层析示意图

三、蛋白质分子量的测定

蛋白质分子量测定的方法很多，目前常用的方法有以下几种。

(一) 凝胶过滤法

凝胶过滤法测定蛋白质分子量的原理如“分离纯化方法”中所述。一定型号的凝胶颗粒上具有一定大小的孔隙，只允许较小的分子进入胶粒，而大于孔隙的分子则不能进入胶粒而被排阻在胶粒外面。用洗脱液洗脱时，被排阻的分子量大的蛋白质先被洗脱下来，随后能够进入颗粒的蛋白质也按分子量大小而先后被洗脱下来，分子量越小的越后被洗脱下来。由于不同排阻范围的葡聚糖凝胶有一特定的蛋白质分子量范围，在此范围内，分子量的对数和洗脱体积之间成线性关系。因此，用几种已知分子量的蛋白质为标准进行层析分析，以每种蛋白质的洗脱体积对它们的分子量的对数作图，绘制出标准洗脱曲线。未知蛋白质在同样的条件下进行层析分析，根据其所用的洗脱体积，从标准洗脱曲线上可求出此未知蛋白质对应的分子量来（图 2-29）。

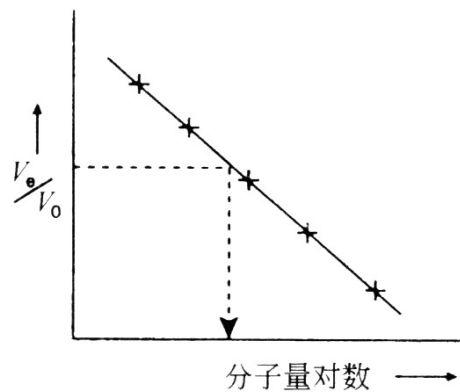


图 2-29 蛋白质的分子量与洗脱体积之间的关系

V_0 - 外水体积 V_e - 洗脱体积

(二) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定分子量

蛋白质在普通聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度取决于蛋白质分子大小、所带电荷的量以及分子形状。而 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与此不同的是在样品及电泳缓冲液中加入了十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)。SDS 是一种阴离子去污剂，可使蛋白质变性并解离成亚基。当蛋白质样品中加入 SDS (一般加入量为 0.1%) 后，SDS 与蛋白质分子结合，使蛋白质分子带上大量的负电荷，这些电荷量远远超过蛋白质分子原来所带的电荷量，因而掩盖了不同蛋白质之间的电荷差异。所有结合 SDS 的蛋白质-SDS 复合物的形状近似于长的椭圆棒，它们的短轴是恒定的，而长轴与蛋白质分子量的大小成正比。这样，消除了蛋白质之间原有的电荷和形状的差异，电泳的速度只取决于蛋白质分子量的大小。

进行凝胶电泳时，常常用一种染料作前沿物质，蛋白质分子在电泳中的移动距离和前沿物质移动的距离之比值称为相对迁移率，相对迁移率和分子质量的对数成直线关系。以标准蛋白质分子质量的对数和其相对迁移率作图，得到标准曲线。将未知蛋白质在同样条件下电泳，根据测得的样品相对迁移率，从标准曲线上便可查出其分子量(图 2-30)。

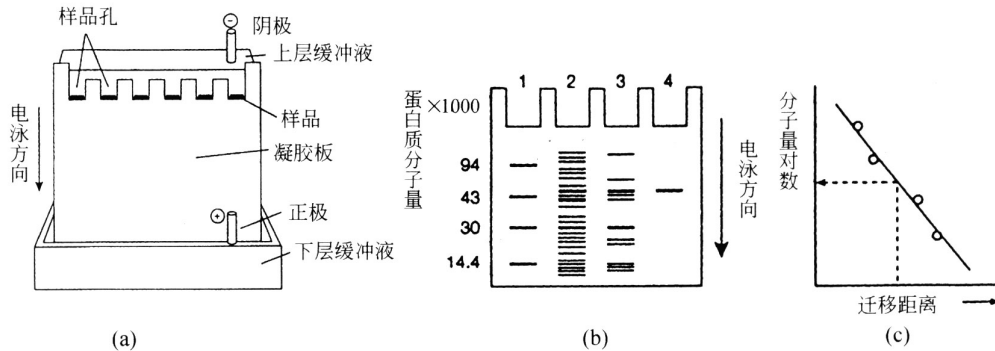


图 2-30 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定分子量

(a) 聚丙烯酰胺凝胶电泳示意；(b) 电泳分离图谱；(c) 蛋白质分子量对数与其迁移率的关系

(三) 沉降法

沉降法又称超速离心法。蛋白质溶液在受到强大的离心力作用时，蛋白质分子趋于下沉，沉降速度与蛋白质分子的大小、密度和分子形状有关，也与溶剂的密度和粘度有关。蛋白质颗粒在离心场中的沉降速度用每单位时间内颗粒下沉的距离来表示。

在离心场中，蛋白质分子所受到的净离心力（离心力减去浮力）与溶剂的摩擦力平衡时，每单位离心场强度的沉降速度称为沉降系数（Sedimentation Coefficient）。国际上采用 Svedberg 单位作为沉降系数的单位，用 S 表示，以纪念超速离心法的创始人，瑞典著名的蛋白质化学家 T. Svedberg。一个 Svedberg 单位（或直接称一个 S）为 10^{-13} s。蛋白质的沉降系数大约在 10^{-13} ~ 200×10^{-13} s 范围内，即 1S ~ 200S。

如测得蛋白质的沉降系数及扩散系数等有关参数，可按下列公式计算出蛋白质的相对分子量。

$$M = \frac{RTS}{D(1 - \rho v)}$$

式中：S 沉降系数，S；

T 绝对温度，K；

D 扩散系数，在数值上等于当浓度梯度为 1 单位时，在 1s 内，通过 1cm^2 面积而扩散的溶质量， $\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{s})$ ；

M 蛋白质的分子量；

R 气体常数， $R=8.314\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ；

ρ 溶剂密度，20 时 1mL 溶剂的质量， g/cm^3 ；

v 蛋白质分子的微分比体积，即向无限大体积的溶剂中加入 1g 蛋白质时溶液

体积的增量。

主要参考文献

- [1] 吴显荣, 基础生物化学(第二版), 北京: 中国农业出版社, 1997
- [2] 沈同, 王镜岩, 生物化学(第二版), 北京: 高等教育出版社, 1990
- [3] 于自然, 黄熙泰, 现代生物化学, 北京: 化学工业出版社, 2001
- [4] 王希成, 生物化学, 北京: 清华大学出版社, 2000
- [5] 甄朱, 蛋白质组学进展, 生物工程学报, 2001, 17(5): 491
- [6] 郭静成, 滕晓月, 基础生物化学题解, 北京: 科学出版社, 2002
- [7] Lubert Stryer, Biochemistry, 3rd ed. W.H. Freeman and co., New York, 1988

唐 咏

第一章 绪 论	1
一、生物化学的概念、研究对象和内容	1
二、生物化学的发展简史	2
三、生物化学与其他学科的关系	4
四、生物化学的应用与发展前景	5
五、生物化学的学习方法	7
第二章 蛋白质	8
第一节 蛋白质的重要功能及元素组成	8
一、蛋白质的重要功能	8
二、蛋白质的元素组成	9
第二节 氨基酸	10
一、氨基酸的结构特点及分类	10
二、必需氨基酸	15
三、蛋白质的稀有氨基酸	15
四、非蛋白质氨基酸	16
五、氨基酸的性质	17
三、氨基酸的化学反应	22
第三节 肽	26
一、肽键及肽链	26
二、肽的命名及结构	26
三、天然存在的活性寡肽	27
第四节 蛋白质的分子结构	28
一、蛋白质的一级结构	28
二、蛋白质的二级结构	34
三、超二级结构和结构域	40
四、蛋白质的三级结构	42
五、蛋白质的四级结构	45
第五节 蛋白质结构与功能的关系	46
一、蛋白质一级结构与功能的关系	46
二、蛋白质的空间结构与功能的关系	48
第六节 蛋白质的重要性质	50
一、蛋白质的两性性质和等电点	50
二、蛋白质的胶体性质	51
三、蛋白质的变性与复性	52
四、蛋白质的颜色反应	53
第七节 蛋白质的分类	54

一、根据分子形状分类	54
二、根据化学组成分类	55
三、根据蛋白质的溶解度分类	55
第八节 蛋白质的分离纯化及分子量测定.....	56
一、蛋白质分离纯化的一般原则	56
二、分离纯化蛋白质的一般程序	56
三、蛋白质分子量的测定	61