

第二章 蛋白质

第一节 氨基酸

第二节 蛋白质的结构

第三节 蛋白质的分子结构与功能的联系

第四节 蛋白质的重要性质

第五节 蛋白质的分类

第六节 蛋白质的分离纯化与利用

第二章 蛋白质

蛋白质是最基本的生命物质之一,是细胞中含量最为丰富、功能最多的生物大分子,它参与动物、植物、微生物的几乎所有生命结构和生命过程,它在细胞结构、生物催化、物质运输、运动、防御、调控以及记忆、识别等各个方面起着极其重要的作用。

第一节 氨基酸

一、蛋白质AA的结构特点

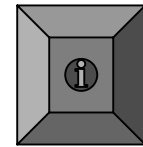
- 1、除Pro为 α -亚AA外，其余氨基酸均为 α -AA。
- 2、 α -碳原子上均有一个氨基和一个羧基。
- 3、除Gly外，其余氨基酸都有一个不对称碳原子，有旋光性。
- 4、除Gly外，其余蛋白质AA都是L型AA。

二、氨基酸的分类

(一) 常见的蛋白质氨基酸

按R基团的极性可将氨基酸分为四大类：

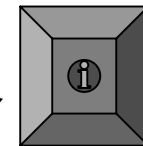
(1) 非极性R基团氨基酸：8个



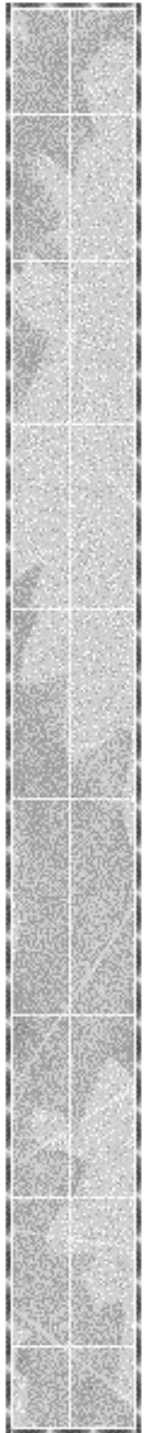
Ala Val Leu Ile Pro Phe Trp

Met

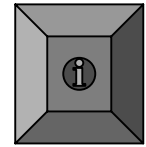
(2) 极性R基团不带电荷氨基酸：7个



Gly Ser Thr Cys Tyr Asn Gln

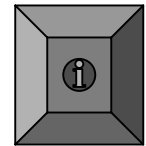


(3) 极性R基团带负电荷氨基酸: 2个



Asp Glu

(4) 极性R基团带正电荷氨基酸: 3个



His Lys Arg

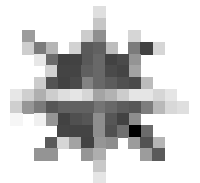


表 3-2 非极性 R 基团氨基酸

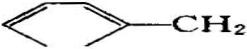
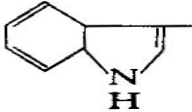
名 称	三字符或一字符	R 基团	α -羧基及氨基
丙氨酸 (alanine)	Ala A	CH_3	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
缬氨酸 (valine)	Val V	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
亮氨酸 (leucine)	Leu L	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
异亮氨酸 (isoleucine)	Ile I	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
脯氨酸 (proline)	Pro P	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{H}_2\text{C} \\ \diagup \\ \text{CH}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_2^+ \end{array}$
苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe F		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
色氨酸 (tryptophan)	Trp W		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
甲硫氨酸 (蛋氨酸) (methionine)	Met M	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

表 3-3 极性不带电荷 R 基团氨基酸

名 称	三字符或一字符	R 基团	α -羧基及氨基
甘氨酸 (glycine)	Gly G		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
丝氨酸 (serine)	Ser S		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
苏氨酸 (threonine)	Thr T		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{OH} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
半胱氨酸 (cysteine)	Cys C		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
酪氨酸 (tyrosine)	Tyr Y		$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
天冬酰胺 (asparagine)	Asn N		$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \diagup \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$
谷氨酰胺 (glutamine)	Gln Q		$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COO}^- \\ \diagup \quad \\ \text{O} \quad \text{NH}_3^+ \end{array}$

表 3-4 R 基团带负电荷氨基酸

名 称	三字符或一字符	R 基团	α -羧基及氨基
天冬氨酸 (aspartic acid)	Asp D	$ \begin{array}{c} \text{-O} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array} \text{-CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \text{-COO}^- $	
谷氨酸 (glutamic acid)	Glu E	$ \begin{array}{c} \text{-O} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{O} \end{array} \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \text{-COO}^- $	

表 3-5 R 基团带正电荷氨基酸

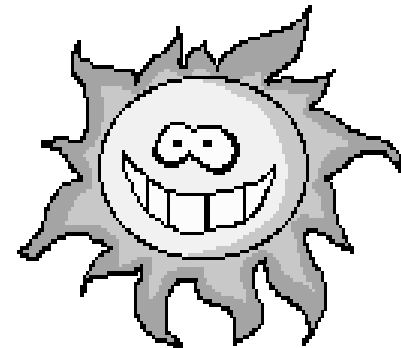
名 称	三字符或一字符	R 基团	α -羧基及氨基
赖氨酸 (lysine)	Lys K	$\begin{array}{c} + \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
精氨酸 (arginine)	Arg R	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{NH}_2^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
组氨酸 (histidine) (pH6.0 时)	His H	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{C} - \text{CH}_2 - \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{NH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}^+ \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

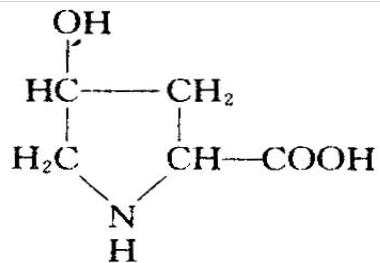
(二) 稀有的蛋白质氨基酸

羟基化的AA、甲基化的AA，是蛋白质氨基酸的衍生物。

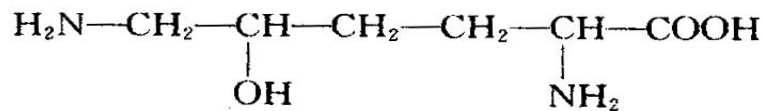
(三) 非蛋白质氨基酸

存在于各种细胞或组织中，但不存在于蛋白质中，是蛋白质常见AA的衍生物，也有D型或一些 β -、 γ -或 δ -AA。

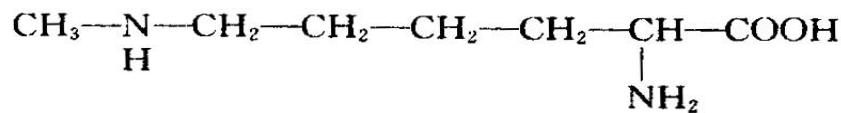




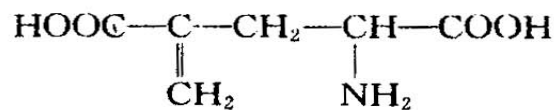
4-羟脯氨酸



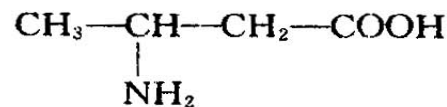
5-羟赖氨酸



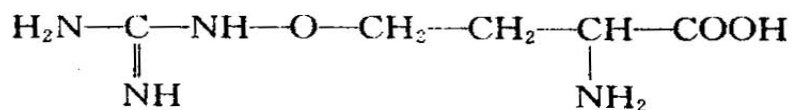
6-N-甲基赖氨酸



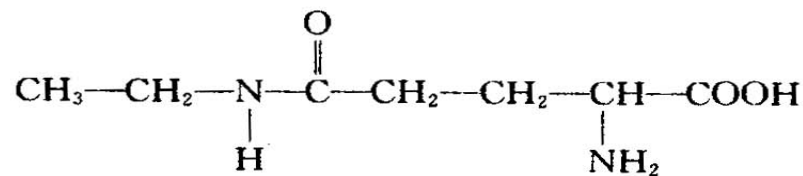
γ-亚甲基谷氨酸



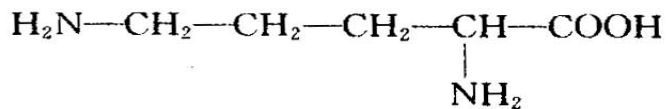
β-氨基丁酸



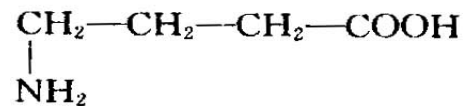
刀豆氨酸



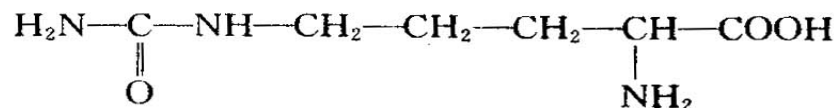
茶氨酸



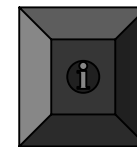
鸟氨酸



γ-氨基丁酸



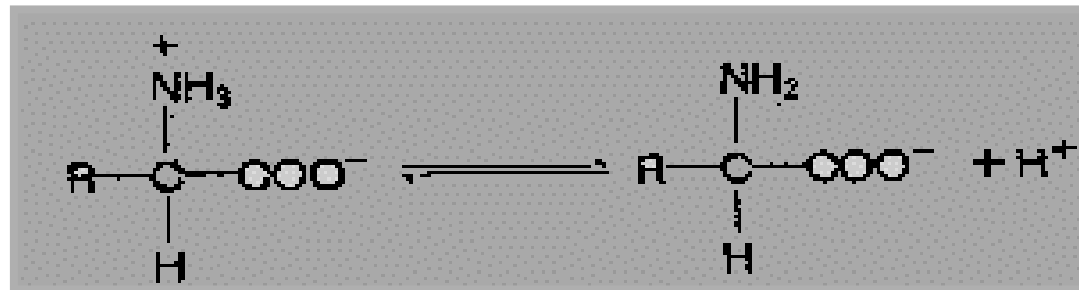
瓜氨酸



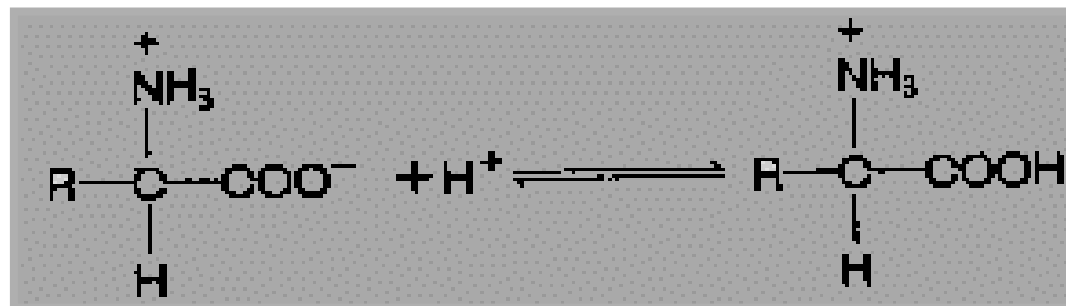
三、氨基酸的性质(两性)和等电点

依照酸、碱质子理论,酸是质子的供体,碱是质子的受体。

氨基酸在水中即起酸的作用(供体)

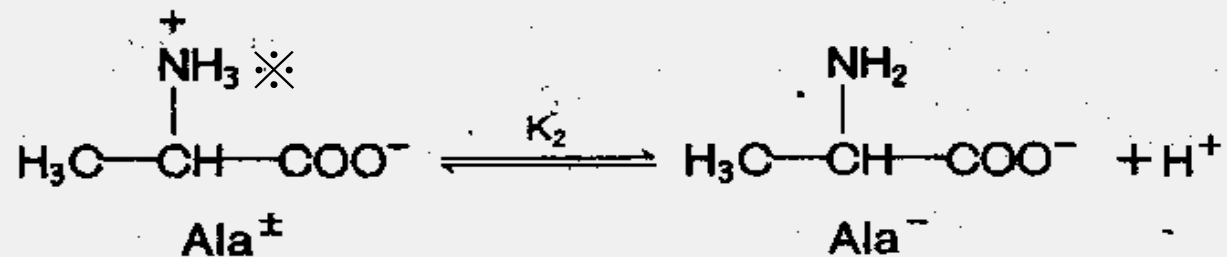
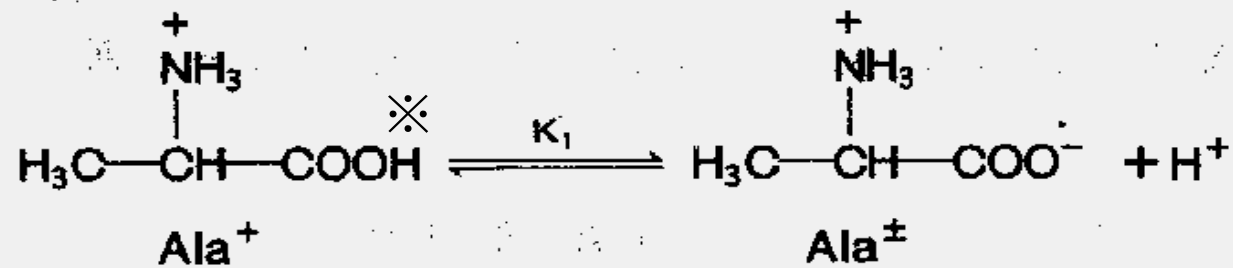


也起碱的作用(质子的受体)



在酸性条件下，丙aa以阳离子形式存在，可以看作是一个二元弱酸，有两个可以解离的H⁺，即COOH上的H⁺和NH₃上的H⁺。

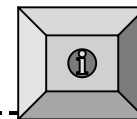
它的分解步骤如下：



$$K_1 = \frac{[\text{Ala}^\pm][\text{H}^+]}{[\text{Ala}^+]}$$

$$K_2 = \frac{[\text{Ala}^-][\text{H}^+]}{[\text{Ala}^\pm]}$$

物质的解离常数是用滴定曲线的实验方法求得，画出曲线。



加入酸碱使丙aa净电荷等于0时，丙aa所带正、负电荷相等，这时的pH值就是丙aa的等电点。

pI：两性电解质所带正负电荷相等时溶液的pH值

$pI = \text{两性离子状态两侧的基团} pK' \text{ 值之和的一半 } (2.34 + 9.69) / 2 = 6.02。$



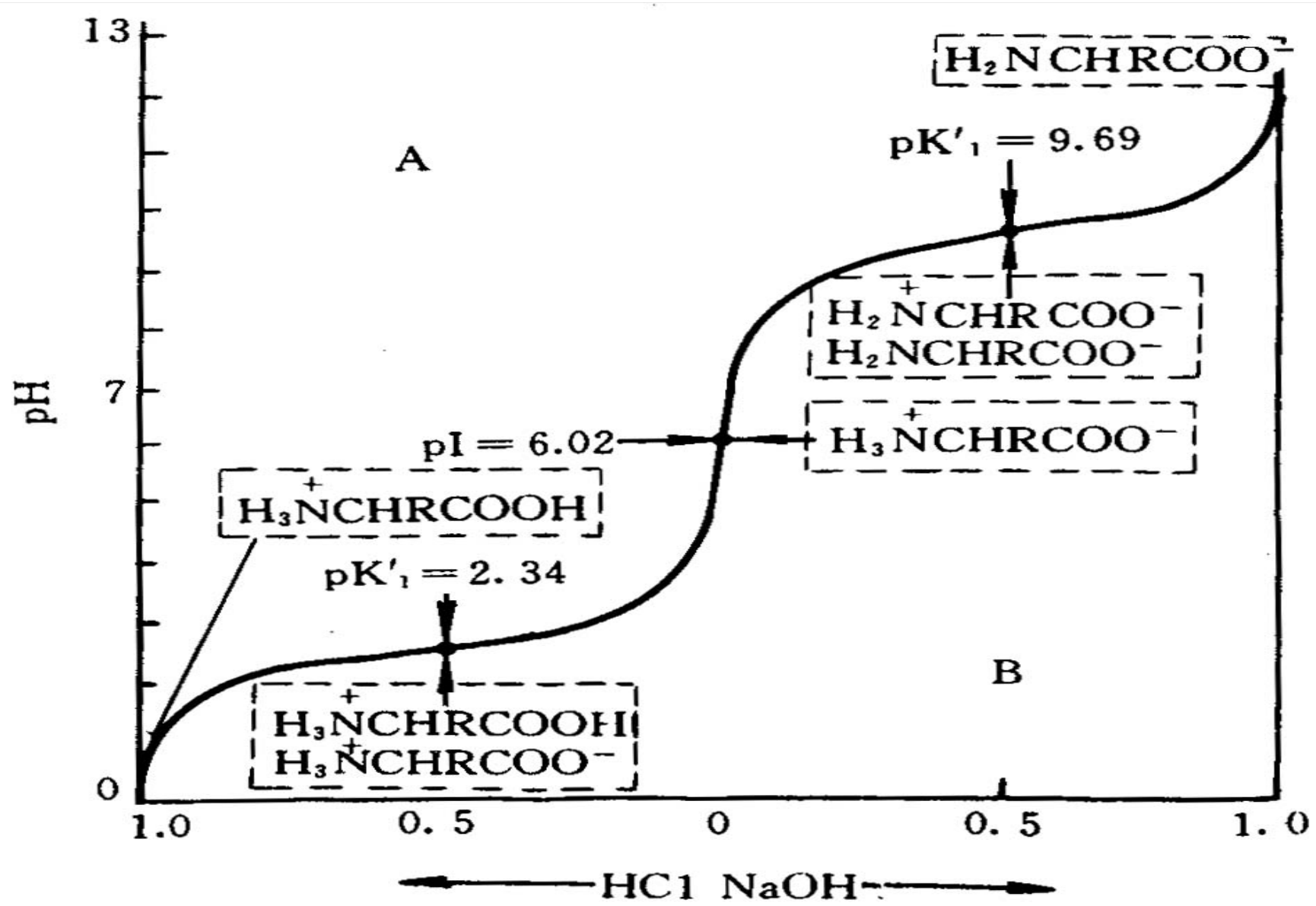


图 3-2 丙氨酸的解离曲线
 (虚线方框内表示在解离曲线拐点处的 pH 时所具有的离子形式)

归纳AA等电点的计算：

中性AA: $pI = (pK_1 + pK_2) / 2$

酸性AA: Glu、Asp、 $pI = (pK_1 + pK_R) / 2$

碱性AA: Arg、Lys、His、 $pI = (pK_2 + pK_R) / 2$

中性AA的等电点不是pH7，而是小于7，在pH6.0左右，如：Val=5.96，Ala=6.02，Ser=5.68，这是因为AA中羧基的解离度大于氨基的解离度。

低于等电点的pH溶液，AA带正电荷
高于等电点的pH溶液，AA带负电荷

四、氨基酸的光学性质

生物体内组成Pr的AA(除甘aa以外)都是L-型,只在少数细菌细胞壁上发现D-型。

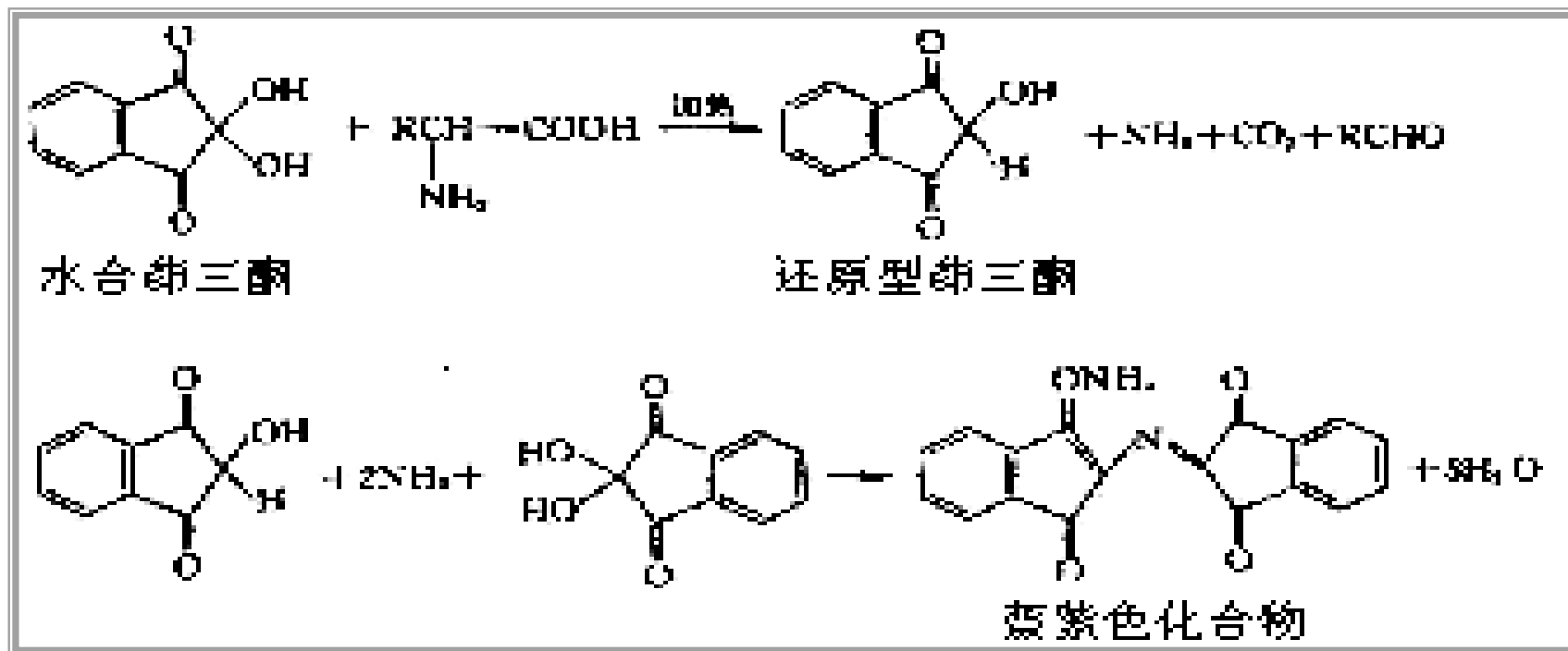
- 1、含有不对称碳原子,所有aa具有旋光性。
- 2、含有共轭双键系统

20种氨基酸都没有可见光的吸收,而Trp、Phe、Tyr含有苯环在紫外区显示特征的吸收光谱, Pr最大光吸收峰在280nm。因此可以用紫外法测定蛋白质含量。

五、氨基酸的化学反应

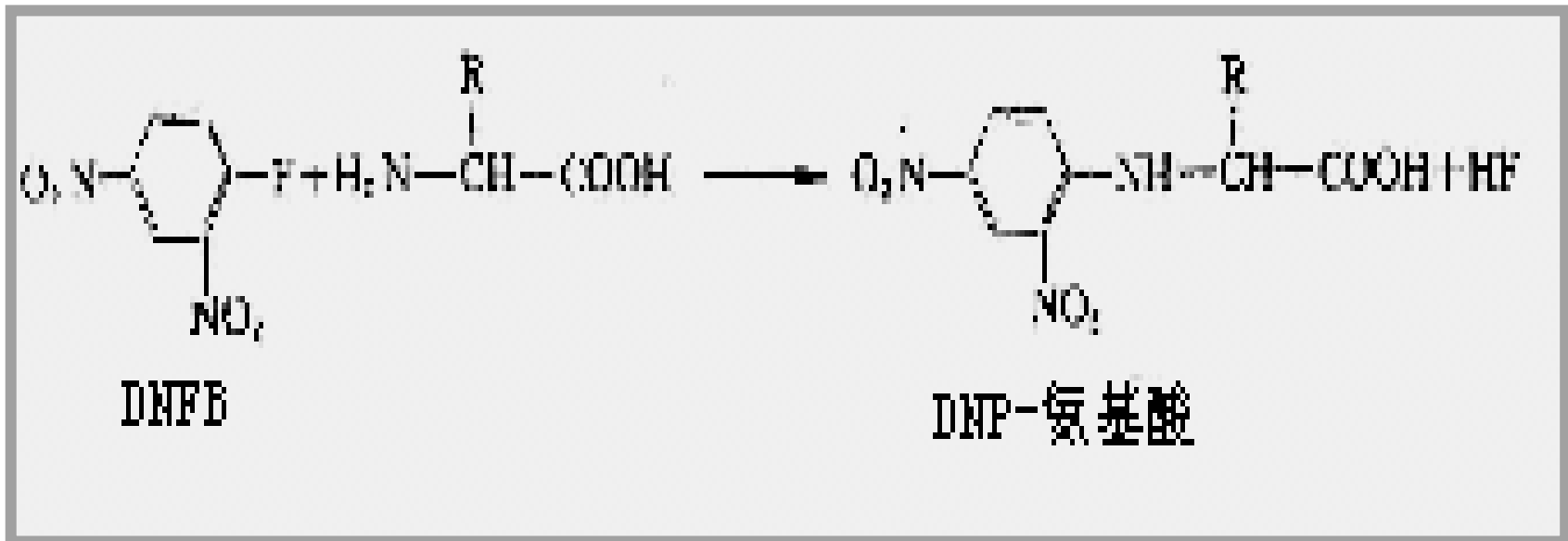
1、茚三酮反应

茚三酮在弱酸性溶液中与 α -氨基酸共热，生成蓝紫色物质。



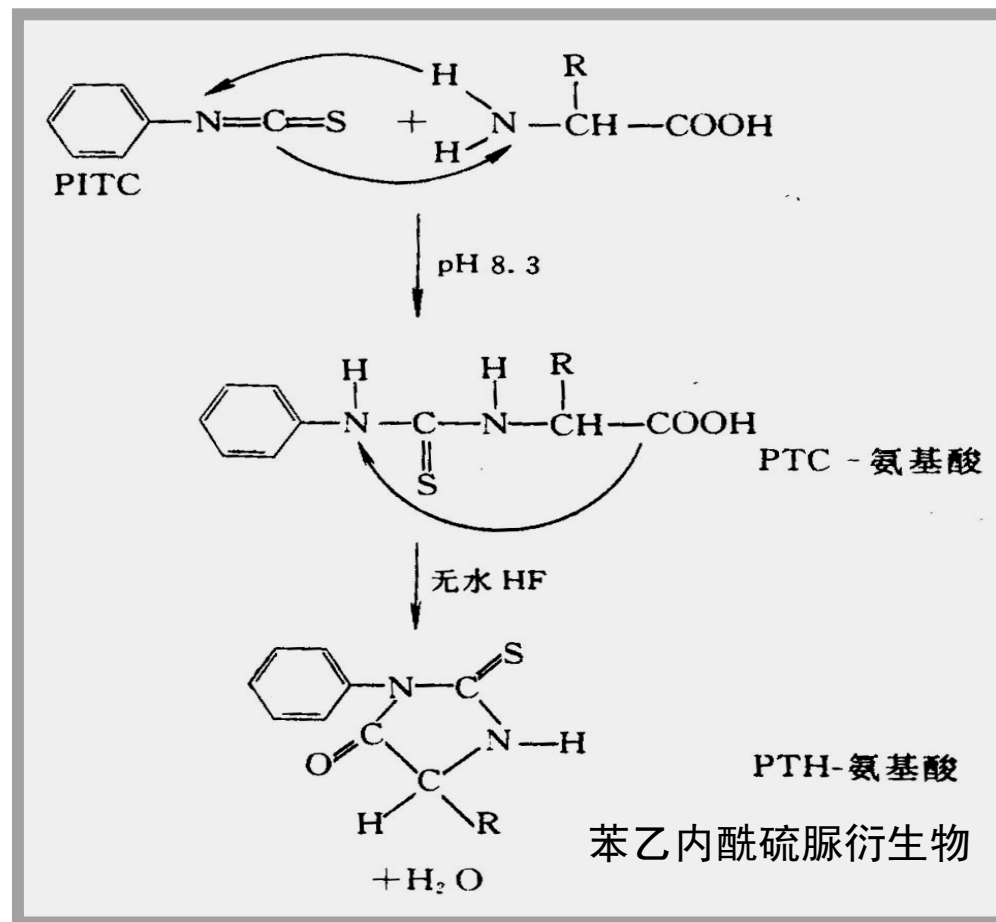
2、Sanger反应

2, 4-二硝基氟苯 (DNFB) 在弱碱溶液中与AA反应生成2, 4-二硝基苯基氨基酸, 英国的Sanger用这个反应鉴定多肽N-末端的氨基酸, 用以测定多肽或蛋白质的AA排序。



3、Edman反应

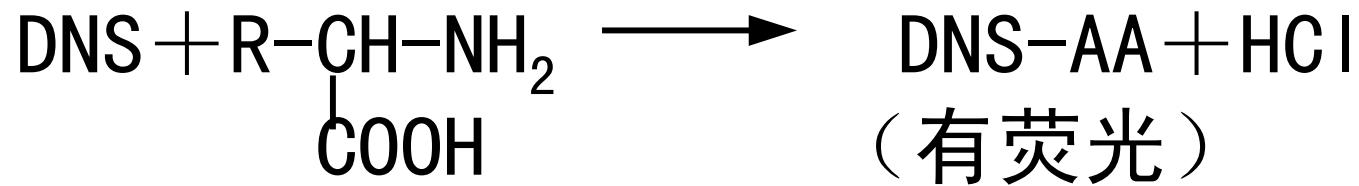
与苯异硫氰酸酯（PITC）在弱碱条件下形成相应的苯氨基硫甲酰（PTC）衍生物，与酸发生环化生成PTH-aa，这是著名的Edman降解，进行多肽链N-末端氨基酸测定。



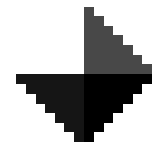
现在根据此原理设计出了“蛋白质顺序测定仪

4、与丹磺酰氯（DNS）的反应

用以测验多肽链的N-末端。



由于丹磺酰基具有强烈的荧光，用荧光分光光度计可快速检出，灵敏度比DNFB法高100倍，而且水解后的DNS-氨基酸不需提取，可直接用纸电泳或薄层层析鉴定 N-末端。



第二节 蛋白质的结构

化学元素: 主要由C、N、O、H、S; 微量P、Fe、Cu、Zn、Mo、I、硒。
大多数蛋白质的含氮量是16%, N若用凯氏定氮法进行测定, 蛋白质的含量=N的含量 \times 6.25。

1克氮相当于6.25克蛋白质, 称为蛋白质系数。



真重!

一、蛋白质一级结构

1、一级结构是指蛋白质肽链中氨基酸的排列顺序和连接方式。蛋白质的一级结构也叫化学结构

2、肽和肽链的结构和命名

肽：由一AA的羧基和另一氨基脱水缩合而成的化合物。

肽键：AA之间脱水后形成的共价键，又称酰胺键。



AA残基：指的是肽链中的AA单位，不是完整的AA分子。

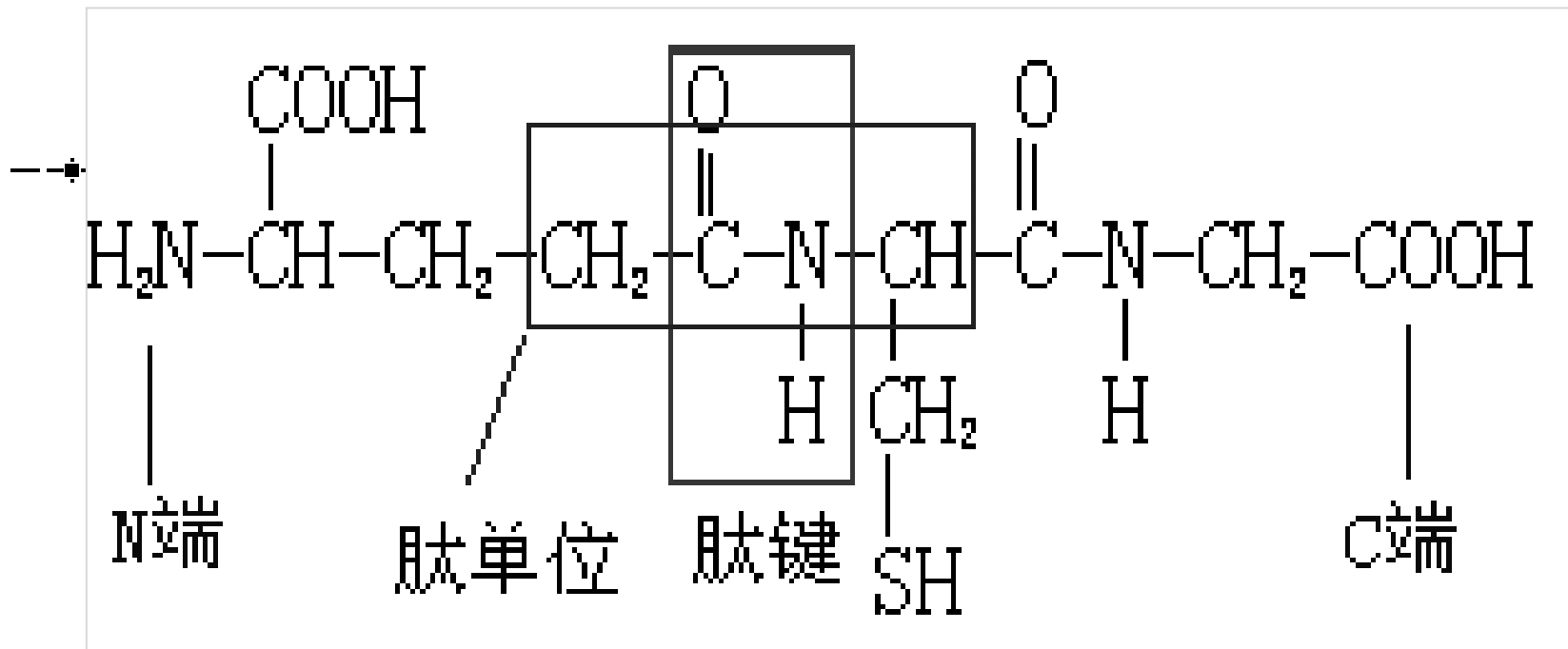
肽的命名是根据氨基酸残基的数目决定的：

寡肽：十个以下AA残基组成的肽。

多肽：超过10个AA残基组成的肽。

多肽链：由多个AA以肽键连接的一条链。

肽单位：由CO和NH构成肽键的四个原子和与之相连的两个 α -碳原子构成的刚性平面。



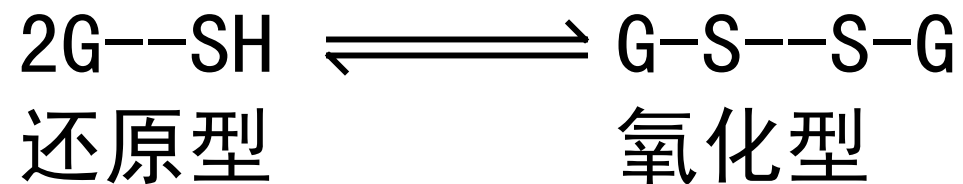
谷氨酰 半胱氨酰 甘氨酸

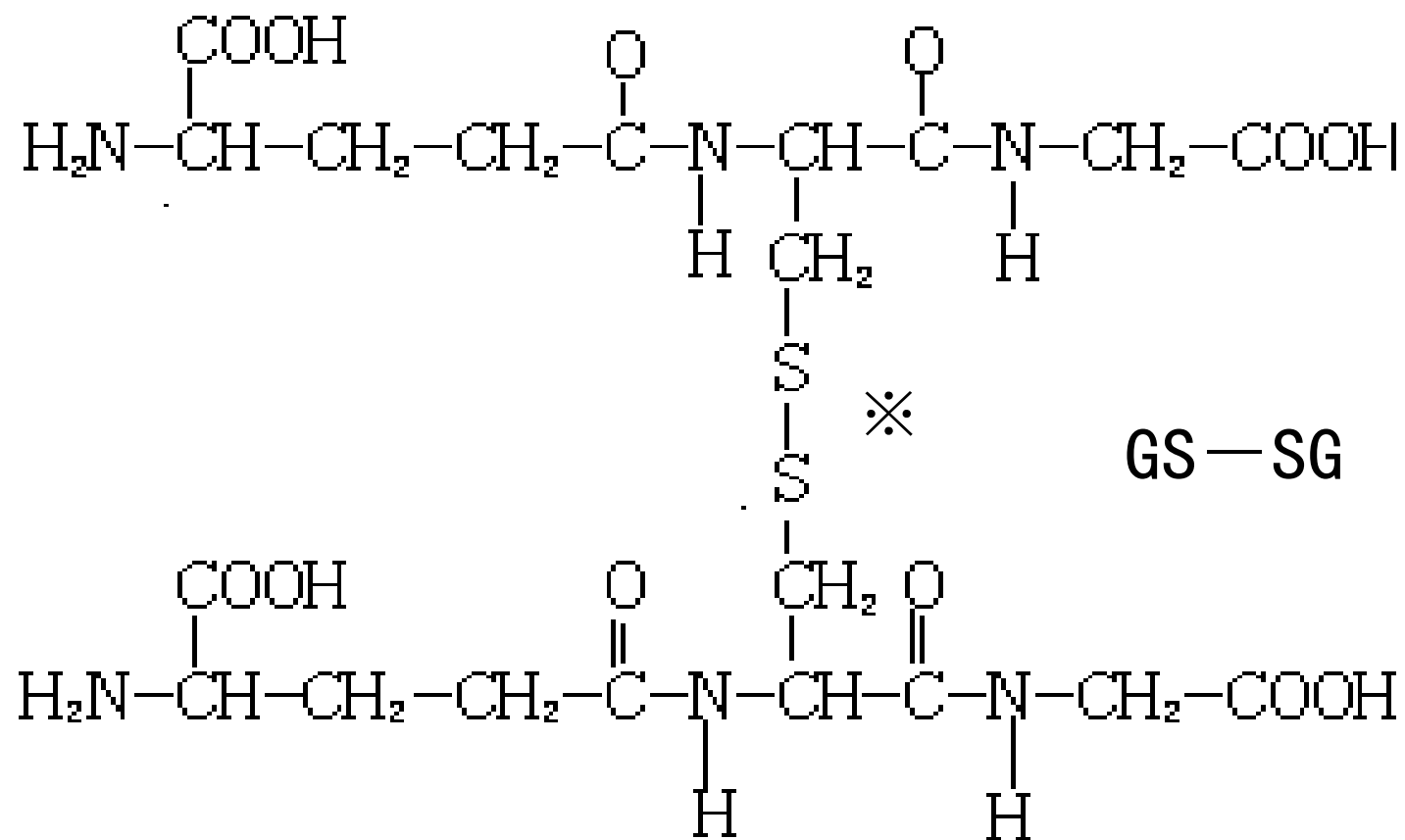
谷胱甘肽 (GSH)

非 α -羧基, 如谷aa、天门冬aa的中非 α -羧基可形成肽键。非 α -氨基不能形成肽键。

谷胱甘肽的功能:

- (1) 是一些酶的辅酶。
- (2) 保护SH基酶。
- (3) 防止过氧化物的积累。



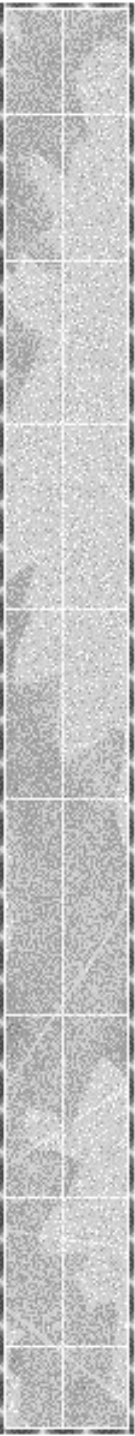


二、蛋白质的二级结构

二级结构：多肽链主链本身通过氢键按一定方向盘绕、折叠而形成的构象。

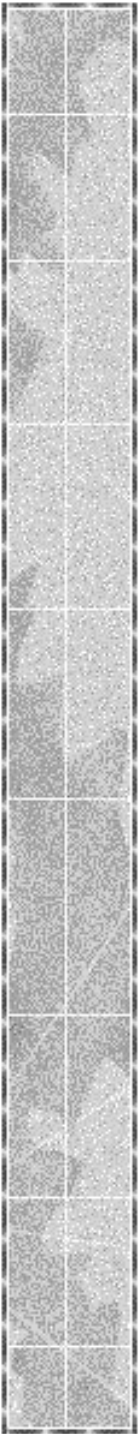
（一）构型、构象

构型：指不对称碳原子上相连的各原子或取代基团的空间排布。如D-构型，L-构型。构型的转变必定伴随着共价键的断裂和重组。



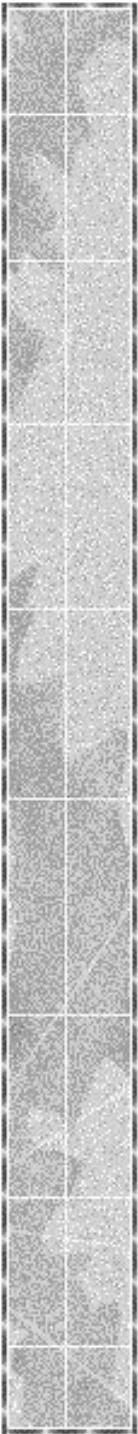
构象：指相同构型的化合物中，与碳原子相连的原子或取代基团在单键旋转时形成的相对空排布。

构象的改变不需要共价键的断裂，只需要单键旋转方向或角度改变即可。



在肽链的主链中，只有 $\text{Ca-N}_1(\phi)$ ， $\text{Ca-C}_2(\psi)$ 是单键，可以自由旋转，所以多肽链可以形成特定的构象。

实际上一个天然的蛋白质多肽链在一定条件下，只有一种或很少几种构象，而且相当稳定，这是因为：



(1) 主链上三分之一是肽键，具双键性质不能旋转。

(2) 主链上还有侧链，其大小及带电情况不同。它们在单链旋转时产生空间位阻和静电效应，制约着大量的构象形成。

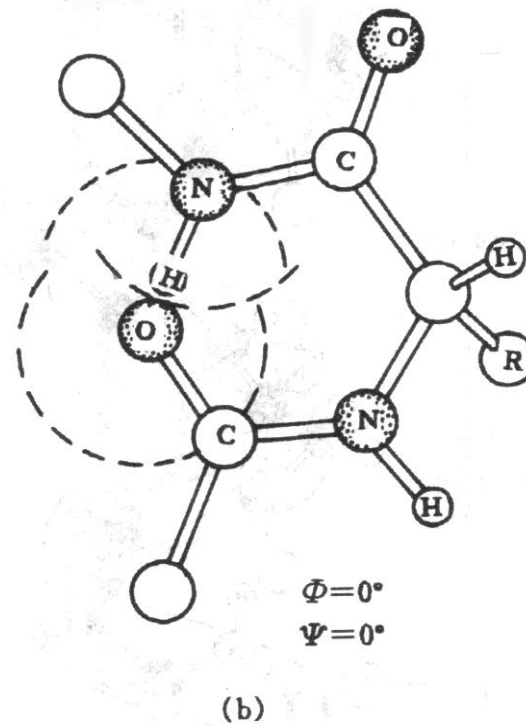
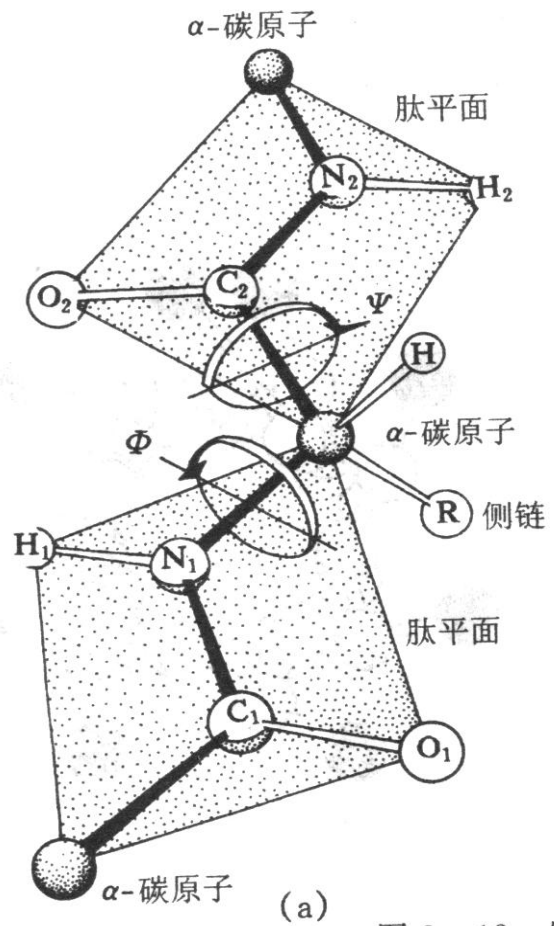


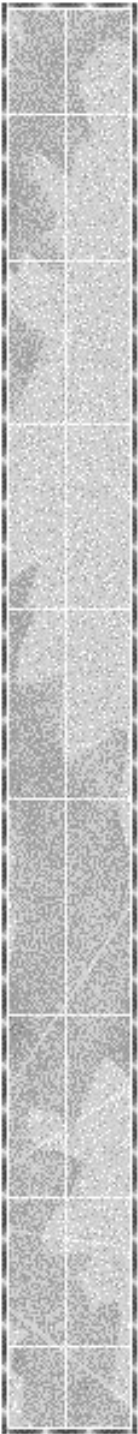
图 2-10 肽平面和二面角

a. $\phi = 180^\circ, \psi = 180^\circ$; b. $\phi = 0^\circ, \psi = 0^\circ$

(二) 蛋白质二级结构的类型

1、 α -螺旋结构的主要特征如下：

a、肽链中的肽平面绕 $C\alpha$ 相继旋转一定角度形成 α 螺旋。每隔3.6个氨基酸残基，螺旋上升一圈；每圈间距0.54nm，即每个氨基酸残基沿螺旋中心轴上升0.15nm，螺旋上升时，每个氨基酸残基沿轴旋转 100° 。



b、螺旋体中所有氨基酸残基侧链都伸向外侧，链中的全部 C=O 和 N-H 几乎都平行于螺旋轴，每个氨基酸残基的 N-H 与前面第四个氨基酸残基的 C=O 形成氢键。肽链上所有的氨基酸残基都参与了氢键的形成，因此 α -螺旋相当稳定，螺旋体内氢键形成示意如下：

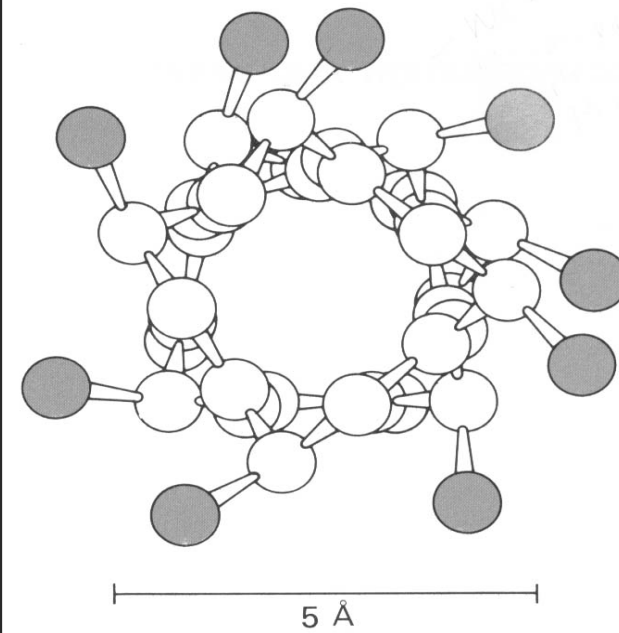
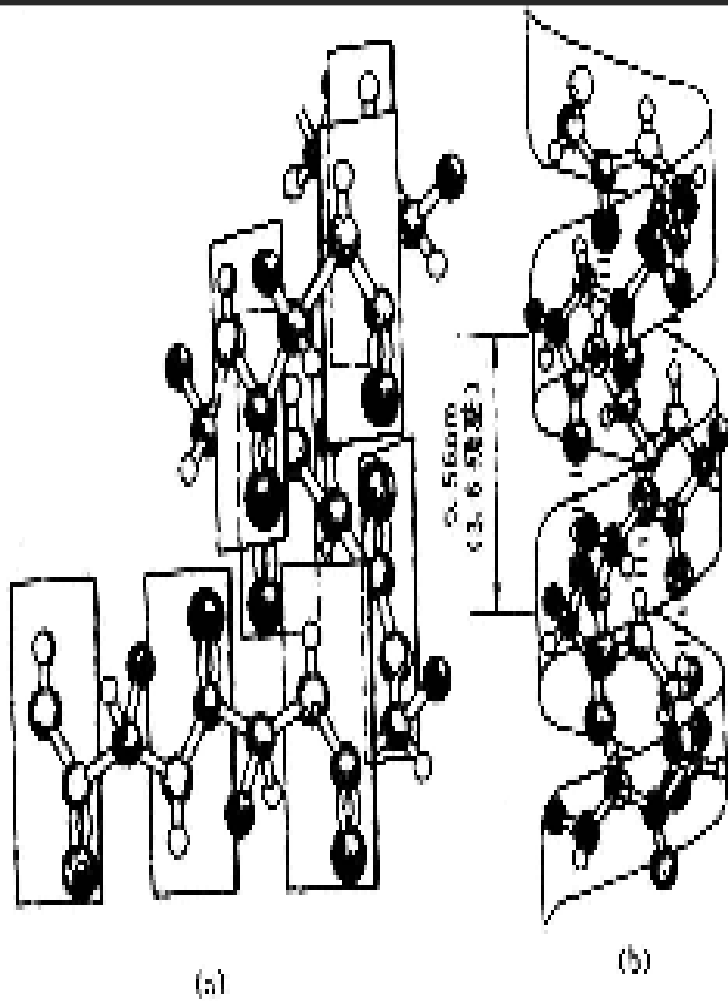
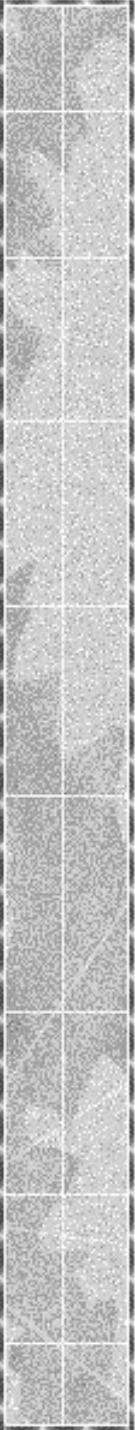


Figure 2-38
 Cross-sectional view of an α helix. Note that the side chains (shown in green) are on the outside of the helix. The van der Waals radii of the atoms are larger than shown here; hence there is almost no free space inside the helix.

C

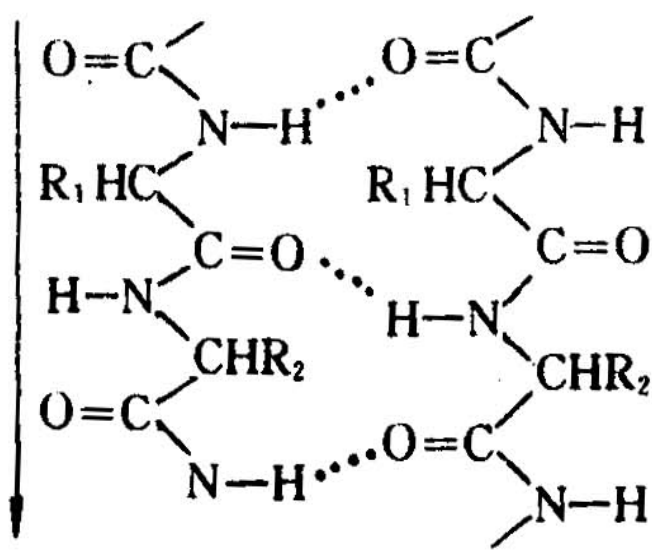


遇上pro就会中断或拐弯， α -亚基引起没有多余的H形成H键。

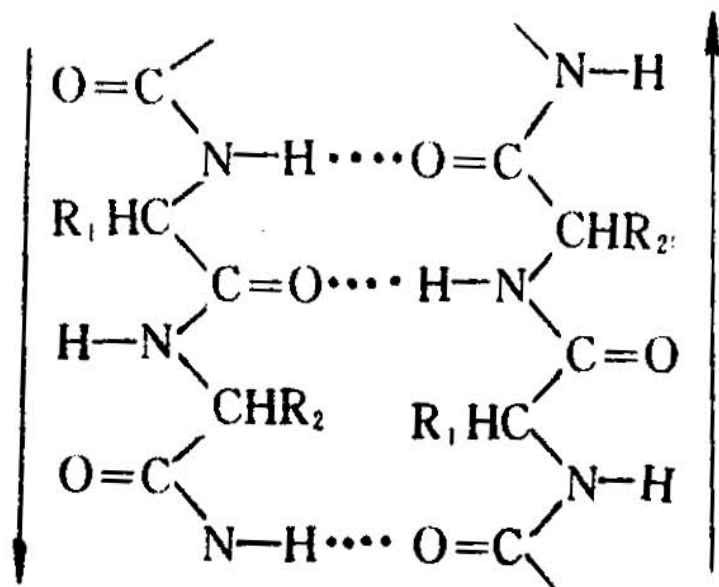
c、天然蛋白质中绝大多数都是右手 α -螺旋，左手螺旋只在少数蛋白质中发现，例如嗜热菌蛋白酶中有一很短的左手 α -螺旋，Asp-Asn-Gly-Gly组成

2、蛋白质的 β 折叠结构

如图3-11 H键连接, 锯齿状的片层结构



平行 β -折叠



反平行 β 折叠

图 3-11 β -折叠结构



β 折叠结构与 α -螺旋结构相比有如下特点:



α -螺旋

β -折叠

卷曲的棒状结构

几乎是完全伸展
的片层结构

链内氢键

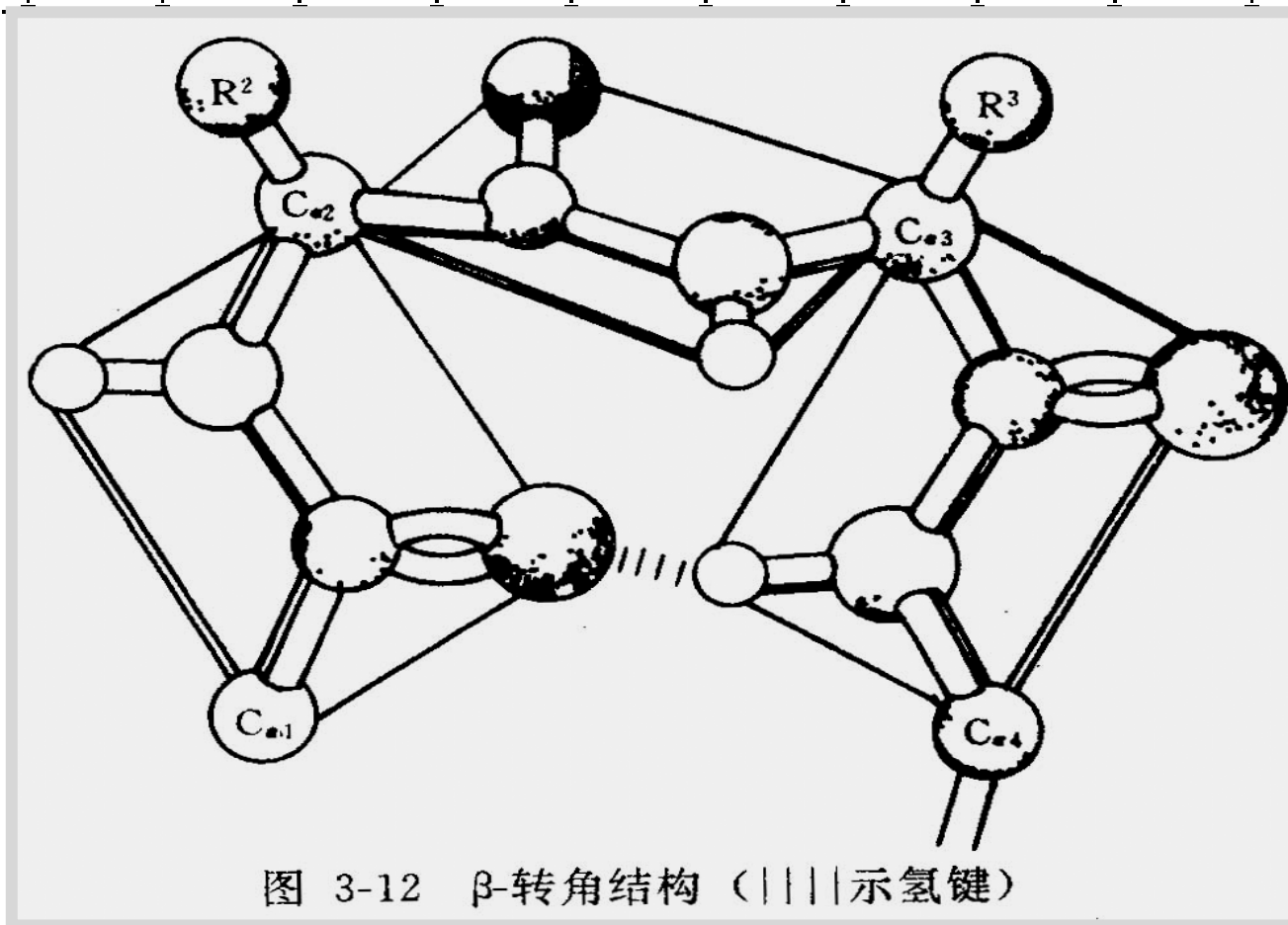
链间氢键

大多数是右手 α -螺旋

平行式和反平行式

3、 β -转角

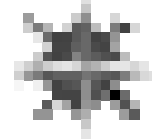
β -转角也叫做 β -回折，即肽链回折 180° ，使得AA残基的 C=O与第四个AA残基的>N-H形成氢键。



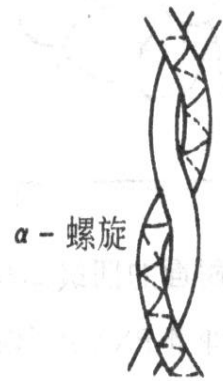
4、无规则卷曲：指没有一定规律的松散结构。

三、蛋白质的超二级结构和结构域

超二级结构：多肽链上相邻的构象单元组合在一起，形成有规则的、在空间上能辨认结构组合体。如： α 螺旋- β 转角- α 螺旋， β 折叠- α 螺旋- β 折叠。

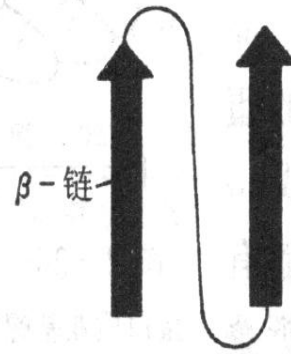


结构域：指在二级结构的基础上，多肽链进一步卷曲折叠成几个相对独立、近似球形的组装体。



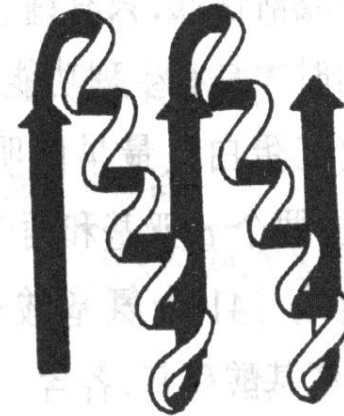
α -螺旋

(a)



β -链

(b)



(c)

图 2-17 蛋白质中的几种超二级结构

四、蛋白质的三级结构

指多肽链借助各种次级键盘绕成具有特定肽链走向的紧密环状构象。

多肽链在二级结构的基础上，主链构象和侧链构象相互作用，进一步盘曲折叠形成特定的球状分子结构即为三级结构。

肌红蛋白的三级结构

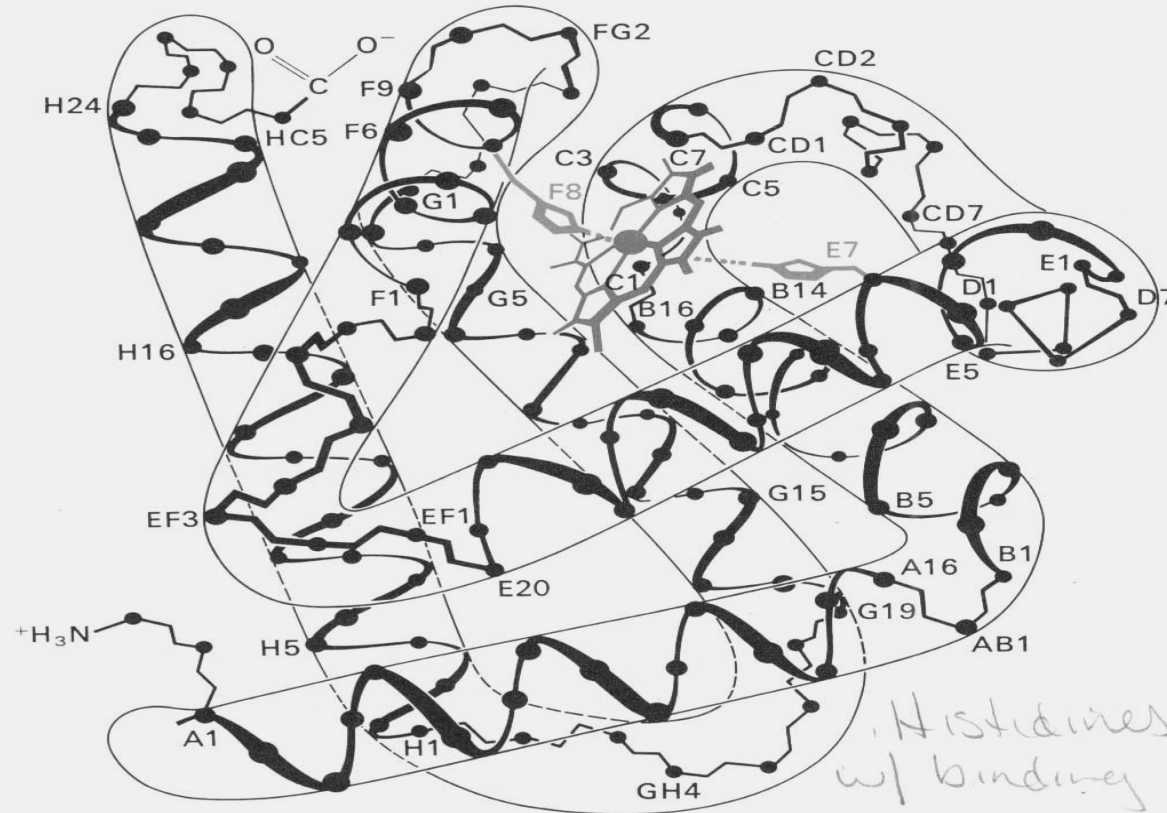


Figure 3-12

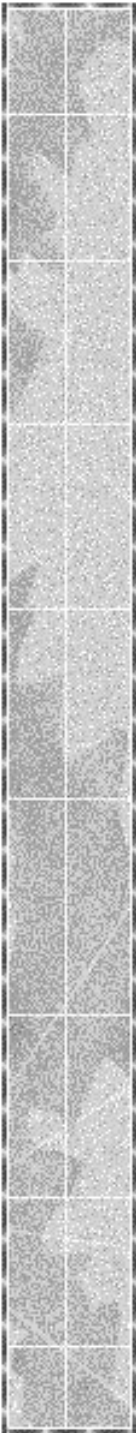
Model of myoglobin at high resolution. Only the α -carbon atoms are shown. The heme group is shown in red. [After R. E. Dickerson. In *The Proteins*, H. Neurath, ed., 2nd ed., vol. 2 (Academic Press, 1964), p. 634.]

维持蛋白质三级结构的作用力：

1、二硫键：两个Cys残基的-SH经氧化作用而形成。

2、氢键：多肽链中负电性很强的N、O原子孤对电子与N-H或O-H的氢原子间的相互吸引力。

3、范德华力：范德华吸引力，产生于极性基团之间和极性基团与非极性基团之间。



4、疏水作用力：疏水基团之间的相互作用力。主要指疏水基团避开水分子而互相靠近聚集的作用。

5、离子键：也称盐键，它是正、负电荷之间的一种静电相互作用。

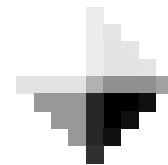
6、酯键：AA残基的-OH与另-AA的COOH脱水形成酯键。

7、配位键：两个原子之间由单方面提供共用电子对形成的共价键称为配位键，Pr中含有的金属离子以配位键相连。

五、蛋白质的四级结构

四级结构:由两条或两条以上具有三级结构的多肽链聚合而形成有特定三维结构的蛋白质构象。

其中具有三级结构的多肽链称为亚基。单独的亚基并无活性,只有形成特定的四级结构才具有生理功能。例如血红蛋白(hemoglobin)。



第三节 Pr分子结构与功能的关系

一、Pr的一级结构与功能的关系

1、脊椎动物细胞色素C, 104个AA, 90多个生物种属研究亲缘关系的树状图。

2、分子病 e. g. 血红Pr, 574个AA

Hb-A β -链6 Glu

Hb-S β -链6 Val 血红蛋白表面的电荷改变, 聚集成纤维状血红蛋白, 使红细胞收缩成镰刀状, 输氧性能下降, 易溶血, 严重时致死。

3. Pr前体的激活与一级结构

很多功能Pr以无活性的前体肽的形式产生和贮存。在特定条件下经Pr E 水解去掉一部分肽段后才有活性。

胰岛素 84AA， 经Pr E 水解形成A， B两条链， 由两个二硫键相连， 形成具 α -螺旋、 β -折叠的空间构象， 才具有生物活性。

见下图

胰岛素激活图

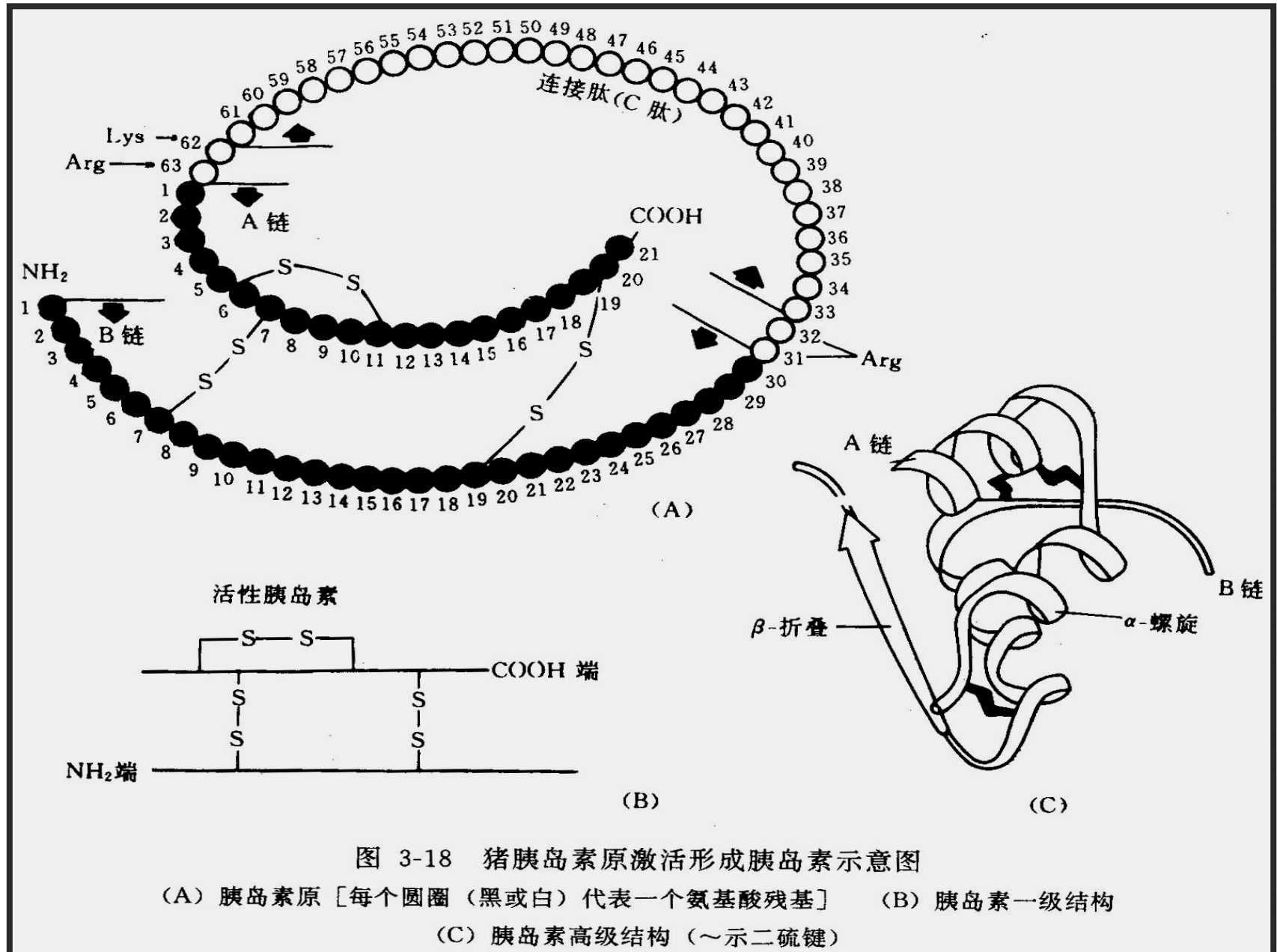


图 3-18 猪胰岛素原激活形成胰岛素示意图

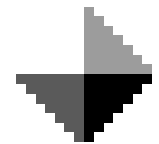
(A) 胰岛素原 [每个圆圈 (黑或白) 代表一个氨基酸残基] (B) 胰岛素一级结构

(C) 胰岛素高级结构 (~示二硫键)

二、蛋白质构象与功能的关系

蛋白质分子的生物功能直接由其特定构象所决定，一旦构象遭到破坏，功能也就丧失了。

例如：牛核糖核酸酶的功能是水解RNA，其球状分子构象中含有四对二硫键。如果用尿素（8mol/L）和B-巯基乙醇处理，使其中的二硫键全部还原为巯基，酶的构象破坏，功能丧失。如及时除去尿素和B-巯基乙醇，酶可恢复原来的构象而恢复其催化功能。



第四节 蛋白质的重要性质

一、蛋白质的两性性质、等电点和电泳

1、蛋白质的两性性质

蛋白质分子中除N-端的 α -氨基和C-端的 α -羧基外，还有许多可解离的侧链基团，是两性电解质，在一定pH条件下，上述基团解离而使蛋白质带电荷。

2、蛋白质的等电点

等电点：在某一pH溶液中，使蛋白质分子上所带正负电荷相等，成为两性离子，在电场中既不向阴极也不向阳极移动，此时溶液的pH值称为该蛋白质的等电点。

等电点时的蛋白质：最不稳定、溶解度最小、易形成沉淀析出（常用于蛋白质的分离纯化）；粘度、渗透压、膨胀性和导电能力均最小。

3、电泳

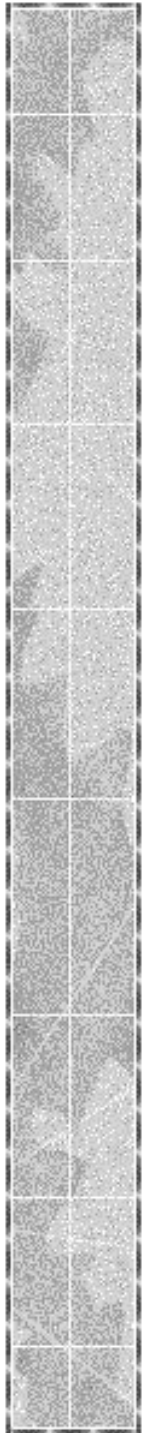
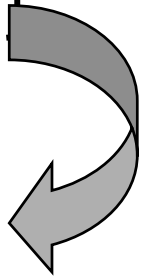
电泳：蛋白质在溶液中解离成带电颗粒，在电场中可以向与电荷相反的电极移动的现象。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，主要用于测定分子量。

蛋白质 { 在特定PH溶液中所带电荷不同
分子量不同
分子的大小和形状不同

在电场中移动的速度和方向不同

用于蛋白质的分析、分离、纯化、鉴定和制备



二、蛋白质的胶体性质

单分子蛋白质颗粒：直径1—100nm.

蛋白质具有胶体的特征：布朗运动、丁达尔效应以及不能透过半透膜

稳定蛋白质的因素：

(1) 水膜：AA极性基团，如 NH_3^+ 、 COO^- 、 OH 、 SH 、 CONH 等易吸附水分子，在蛋白质颗粒外面形成一层水化层。

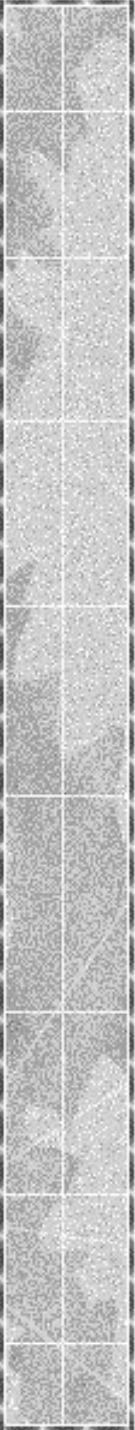
(2) 电荷：在非等电状态时，蛋白质带同种电荷相互排斥。

三、蛋白质沉淀反应

沉淀蛋白质的方法有以下几种：

1、 盐析

盐析：向蛋白质溶液中加入高浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 NaCl 等中性盐，破坏蛋白质分子表面的水化层，中和他们的电荷，而使蛋白质沉淀析出现象。即加入高浓度中性盐使蛋白质沉淀析出现象



盐溶：低浓度中性盐增加蛋白质溶解度的现象

分段盐析：不同蛋白质所带电荷和亲水性不同，析出时需要的盐浓度不同，调节中性盐浓度使混合蛋白质溶液中的几种蛋白质分段析出的方法。

2、有机溶剂沉淀

乙醇、甲醇、丙酮等极性有机溶剂降低介质的介电常数，破坏蛋白质水膜（乙醇等有机溶剂亲水性更强，脱水剂），使蛋白质沉淀。

3、重金属盐沉淀

Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^{+} 等重金属离子可与蛋白质中带负电荷（ $\text{pH} > \text{pI}$ 时）的基团形成不溶性的盐而沉淀。

误服重金属盐的病人可口服大量牛奶、生蛋清等，防止这些有害离子被吸收。

4、生物碱试剂沉淀

生物碱试剂，如苦味酸、单宁酸或三氯乙酸等可与蛋白质中带电荷的基团生成不溶性的盐而析出沉淀。

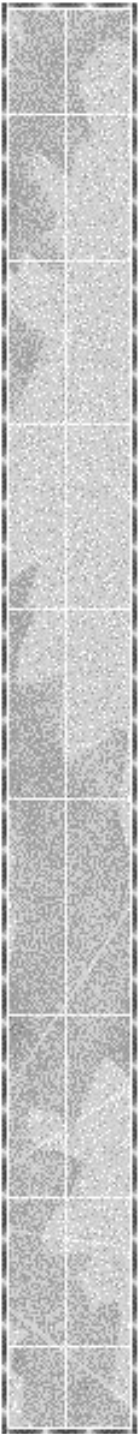
四、Pr的变性

Pr的变性：天然Pr受到某些物质或化学因素的影响，分子构象发生变化，Pr的理化性质和生物学功能都随之改变，但一级结构未遭破坏的现象。变性后的Pr称为变性Pr。



Pr 变性后：

-
- (1) 分子构象发生变化
(二级以上的高级结构改变)
 - (2) 理化性质和生物学功能改变
 - (3) 共价键不断裂 (一级结构不变, 组成成分和分子量不变)



变性的实质：由于外界条件破坏了Pr内部的次级键使有序而紧密的结构变为无序而松散的结构。

引起Pr变性的因素：加热、紫外线照射、强酸强碱、重金属盐、生物碱、有机溶剂剂等。

复性：当若引起变性的因素较温和，当除去这些因素后，Pr重新自发折叠恢复原来的构象的现象。

Pr 变性后的特征:

-
- (1) 生物活性丧失, eg. E的催化
 - (2) 溶解度降低, 粘度增加, 扩散系数降低, 易凝聚
 - (3) 光学性质变化: Pr分子内的侧链基因暴露到分子表面, 从而出现光谱变化
 - (4) 生化性质改变: 易被Pr E水解

Pr变性的应用：

-
- (1) 大豆Pr溶液加热加盐制成豆腐。
 - (2) 分析非Pr成分时，常用三氯醋酸将样品中的Pr变性沉淀除去。
 - (3) 人体衰老，Pr变性，亲水性渐弱，皮肤失去弹性。

五、蛋白质的呈色反应

1、双缩脲反应

双缩脲反应：双缩脲在碱性溶液中能与 CuSO_4 反应生成红紫色络合物的反应。

一般含有两个或两个以上的肽键的化合物与 CuSO_4 碱性溶液发生双缩脲反应生成红紫色络合物，是肽和蛋白质所特有而AA没有的颜色反应。用于蛋白质或肽的定性和定量测定。

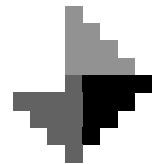
2、 酚试剂反应

蛋白质的酪氨酸基能将福林试剂中的磷钼酸和磷钨酸还原成蓝色化合物（钼兰和钨兰的混合物），这一反应常用于蛋白质微量测定。

3、 茚三酮反应（同AA反应）

Pr的 α -AA能与水合茚三酮生成蓝紫色化合物

4、 紫外吸收



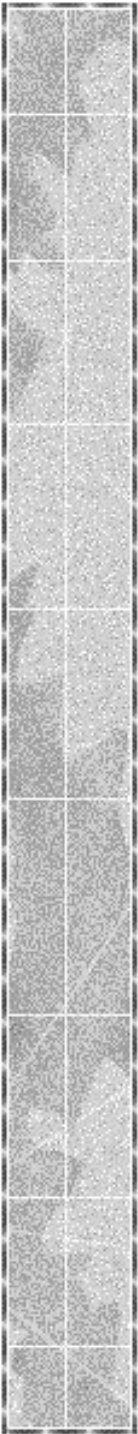
第五节 蛋白质的分类

1、按蛋白质的分子形状分

- 球状蛋白
- 纤维状蛋白

2、按化学组成成分

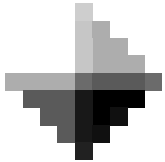
单纯蛋白质：仅由 α -AA组成的Pr。根据溶解度不同又分为：清蛋白、球蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白、组蛋白、精蛋白、硬蛋白。



结合蛋白质：由AA和辅因子组成。
根据辅基的不同可分为：核蛋白、脂蛋白、糖蛋白、磷蛋白、血红蛋白、黄素蛋白、金属蛋白。

3、按功能分

运输蛋白、贮藏蛋白、收缩蛋白、抵御蛋白、结构蛋白、调节蛋白。



第六节、蛋白质的分离纯化和利用

一、蛋白质的分离纯化

1、蛋白质分离纯化的一般原则

前处理（得蛋白质提取液）→粗分级

结晶 ← 细分级



2、分离纯化蛋白质的基本原理

(1) 按蛋白质分子大小不同分离



A、透析和超滤

利用蛋白质分子颗粒大、不能透过半透膜的胶体性质设计的。超滤是在透析的基础上增加压力或离心力，迫使蛋白质混合物中的其它小分子通过滤膜，而蛋白质分子被阻留在膜上。



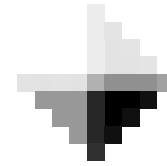
B、离心沉降法

蛋白质颗粒在超速离心场内的沉降趋势，与蛋白质的颗粒大小和密度有关。

沉降平衡离心法：分子大小近似，
密度差异较大

沉降速度离心法：密度近似，大小
差异较大

C、凝胶过滤（凝胶层析）



凝胶是具有网孔结构的颗粒，当分子大小不同的蛋白质混合液流经凝胶装成的层析柱时，比凝胶网孔小的蛋白质分子进入网孔内，比凝胶网孔大的蛋白质被排阻在外，当用溶剂洗脱时，大分子先被洗脱，小分子后被洗脱。



(2) 根据蛋白质溶解度的差异进行分离

A、等电沉淀

B、盐析

C、有机溶剂分级分离

降低水的介电常数

破坏水膜

(3) 根据蛋白质的电离性质不同进行分离



A、电泳

B、离子交换层析

(4) 亲和层析

利用蛋白质的特异生化性质：某些蛋白质能与其相应的专一性配基进行特异的非共价结合。



A: 目的Pr

B: 专一配基

R: 固体载体

3、蛋白质纯度的鉴定

电泳法

超速离心沉降法

二、蛋白质分子量的测定

1、超速离心法

2、凝胶过滤法

3、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

三、蛋白质的利用

食品：叶Pr 、甜味Pr

医药：胰岛素Pr 、干扰素Pr 、天然花粉Pr

饲料：叶Pr

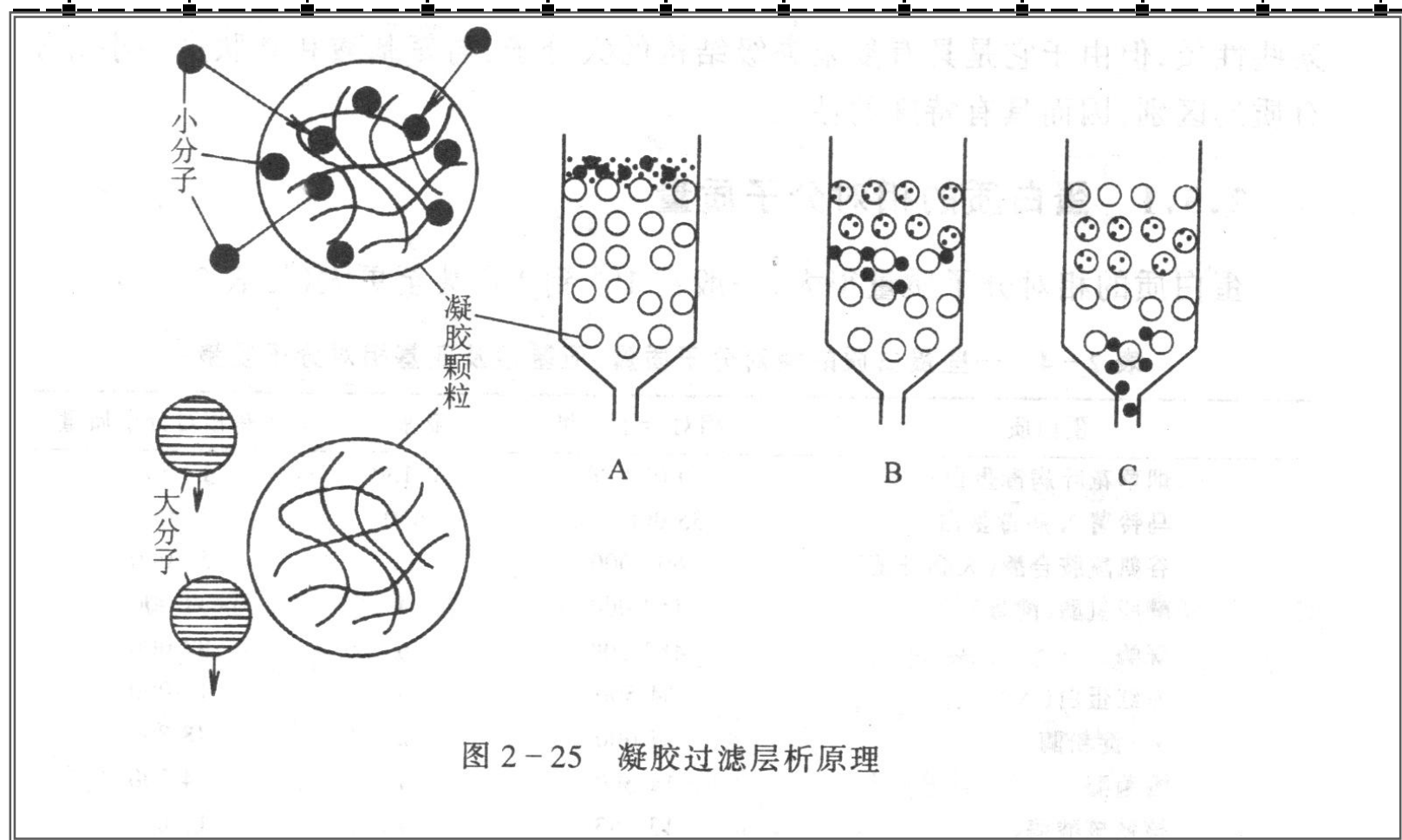


图 2-25 凝胶过滤层析原理