

等教育“十二五”规划教材

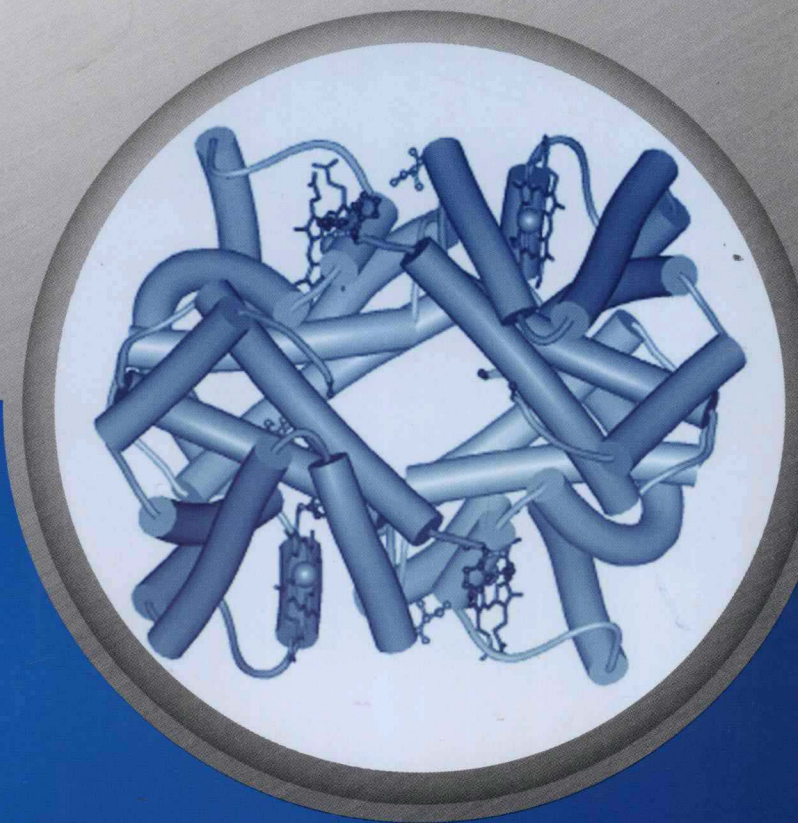


生物科学专业6+x 简明教程系列·配套实验教材

生物化学实验教程

Biochemical Experimental Course

武金霞 主编



科学出版社

普通高等教育“十二五”规划教材

生物科学专业“6+X”简明教程系列·配套实验教材

生物化学实验教程

武金霞 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书介绍了生物化学研究中重要的实验技术原理,包括纸层析技术、薄层层析技术、离子交换层析技术、凝胶过滤层析技术、分光光度技术、电泳技术、蛋白质免疫印迹技术等。在介绍了每一种实验技术原理之后,都列举了数个应用该技术解决实际研究问题的基础实验,内容丰富,不同学校不同专业可根据实际情况进行选做。另外,本书还增加了以蛋白质、酶、多糖和核酸等生物大分子的提取、纯化、定量、活性测定等为研究内容的综合性实验,每一个综合性实验涵盖了多种生物化学实验技术,能培养学生对所学知识的综合运用能力和创新实践能力。

本书可作为综合性、农林、师范等高等院校生物科学类相关专业本科生实验教材,也可作为从事生命科学教学与研究人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学实验教程/武金霞主编. —北京:科学出版社,2012.8

普通高等教育“十二五”规划教材 生物科学专业“6+X”简明教程系列·配套实验教材

ISBN 978-7-03-035294-1

I. ①生… II. ①武… III. ①生物化学-实验-高等学校-教材 IV. ①Q5-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 187683 号

责任编辑:刘 丹 席 慧 / 责任校对:林青梅

责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京天时彩色印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012年8月第一次印刷 印张:15

字数:376 000

定价:36.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《生物化学实验教程》编委会名单

主 编 武金霞

副 主 编 周艳芬 张贺迎 杨致荣

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

鞠建松 李 楠 柳峰松 倪志华

孙 磊 武金霞 杨致荣 张贺迎

张金桐 张瑞英 张 妍 周艳芬

前 言

生物化学实验技术是生命科学领域各分支学科研究必不可少的方法与手段。夯实学生的生物化学基础对于培养高质量优秀人才至关重要,目前许多学校越来越重视生物化学实验课教学效果,因而编写一本易教易学的实验教材是十分必要的。

本书主编从事生物化学教学和科研工作二十余年,总结整理多年的教学实践,曾于2005年出版《生物化学实验原理与技术》。在该书经多所学校不同专业学生使用的过程中,我们广泛收集师生的意见和建议,补充了不断发展的实验教学新内容,吸取同时期其他版本实验教材的优点,结合生命科学发展前沿,同时联合了河北师范大学、保定学院、广西大学和山西农业大学长期工作在生物化学教学和科研一线的教师,共同编写了这本《生物化学实验教程》。

本书综合了不同类型学校生命科学相关专业的特点和需求,适合作为生物科学、生物技术、生物工程、生物制药、食品科学等相关专业本科生实验教材,也适合生物类硕士研究生使用。

本书的主要特色:

1. 详细介绍了重要的生物化学实验技术原理,随后列举了如何应用该技术解决生活、生产、科研实际问题的多个基础实验项目,使学生了解一项实验技术在多领域研究中的应用。

2. 本书选择了以蛋白质、酶、多糖、核酸等重要生物大分子为研究对象的11个综合性实验,每一个综合性实验涵盖了多种实验技术,可培养学生对所学知识的综合运用能力。

3. 本书中所有定量测定实验均以日常生活中的生物材料(花椰菜、面粉、鸡蛋清、蚯蚓、大蒜、牛奶、大豆和兔肝等)为研究对象,使学生深切体会到生物化学实验技术的实际应用价值。

4. 在多年的实验教学中,我们发现学生写实验报告时,能较好地书写目的、原理、试剂和操作步骤,但不懂如何写实验结果与分析,许多实验教材欠缺这一部分。在本书中,我们特别强调了每一个实验项目的结果与分析部分,明确了标准曲线绘制、计算公式、图谱扫描、表格汇总、实验成败分析等要求,实验结果的表述方式与当前期刊科研论文接轨,方便学生书写及规范实验报告。

本书中所列绝大多数实验项目经过河北大学生命科学学院生物技术、生物工程专业学生实验课检验,逐步得到了完善。感谢同学们对完善实验项目作出的贡献。

本书由武金霞主编,由武金霞、周艳芬负责全面校对。感谢河北大学生命科学学院、河北大学教务处和科学出版社农林与生命科学分社的大力支持。

本书是编者总结多年实验教学经验和教训的结晶,尽管付出了极大的精力与心血,但由于编者自身水平的限制,还恳请同行对书中的不妥之处提出宝贵意见和建议。

编 者

2012年6月

目 录

前言

第一篇 实验要求

第一章 生物化学实验基本要求	1
第一节 生化实验室学生实验守则	1
第二节 实验室安全及防护知识	1
第三节 生物化学实验报告	3

第二篇 实验技术原理与基础实验

第二章 生物物质的定性鉴定	7
第一节 氨基酸和蛋白质的结构及性质	7
第二节 核酸的结构组成特点	10
第三节 糖的基本性质	12
第四节 酶的催化特性	13
第五节 实验部分	15
实验一 蛋白质的双缩脲反应	15
实验二 蛋白质和氨基酸的茚三酮反应	17
实验三 蛋白质的黄色反应	19
实验四 蛋白质的沉淀反应	20
实验五 蛋白质的两性性质及等电点的测定	24
实验六 酵母 RNA 的提取与鉴定	26
实验七 糖的呈色反应及还原糖的检测	29
实验八 α -淀粉酶的激活剂、抑制剂及其特异性分析	33
实验九 肌糖原的酵解作用研究	36
实验十 生物氧化作用研究	38
第三章 纸层析技术	42
第一节 纸层析基本原理	42
第二节 影响相对迁移率的主要因素	43
第三节 实验部分	45
实验一 氨基酸的纸层析分离	45
实验二 纸层析法检测谷丙转氨酶活性	47

第四章 薄层层析技术	50
第一节 薄层层析原理	50
第二节 固定相支持介质的选择	51
第三节 实验部分	53
实验一 硅胶薄层层析法分离鉴定水果中的糖类物质	53
实验二 DEAE-纤维素薄层层析分离鉴定核苷酸	55
第五章 离子交换层析技术	58
第一节 离子交换层析原理	58
第二节 核酸蛋白质检测仪的构造及使用	63
第三节 实验部分	64
实验一 离子交换法制备无离子水	64
实验二 DEAE-Cellulose 柱层析分离纯化大蒜超氧化物歧化酶	67
第六章 凝胶过滤层析技术	72
第一节 凝胶过滤层析原理	72
第二节 实验部分	78
实验一 分子筛过滤层析脱盐	78
实验二 分子筛层析法分离蛋白质及相对分子质量测定	80
第七章 亲和层析技术	84
第八章 离心技术	89
第九章 分光光度技术	94
第一节 分光光度技术的原理	94
第二节 分光光度计的构造及使用	97
第三节 实验部分	100
实验一 双缩脲法测定蛋白质含量	100
实验二 Folin-酚试剂法测定蛋白质浓度	102
实验三 紫外吸收法测定蚯蚓提取液的蛋白质含量	104
实验四 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度	106
实验五 花椰菜 DNA 的提取与二苯胺法测定 DNA 的含量	108
实验六 植物组织中可溶性糖含量的测定(蒽酮比色法)	111
实验七 兔肝转氨酶活力测定	113
实验八 酵母发酵过程中无机磷的利用(定磷法)	116
第十章 电泳技术	119
第一节 电泳的基本原理	119
第二节 电泳的分类	121
第三节 常用的电泳技术	122
第四节 染色方法	133
第五节 电泳有关的仪器及使用	135
第六节 实验部分	137
实验一 醋酸纤维素薄膜电泳分离血清蛋白	137

实验二 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离大蒜超氧化物歧化酶	139
实验三 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定超氧化物歧化酶的相对分子质量	143
实验四 等电聚焦电泳法测定鸡卵类黏蛋白的等电点	146
第十一章 蛋白质免疫印迹技术	149
第一节 蛋白质免疫印迹技术原理	149
第二节 抗血清的制备	153
第十二章 滴定技术	159
第一节 概述	159
第二节 实验部分	160
实验一 温度、pH 对糖化酶活力的影响	160
实验二 果蔬中维生素 C 的定量测定 (2, 6-二氯酚靛酚滴定法)	163
第三篇 综合性实验	
第十三章 实验举例	167
实验一 微量凯氏定氮法测定牛奶蛋白质含量	167
实验二 鸡卵类黏蛋白的分离纯化、活性及相对分子质量测定	172
实验三 蛋白质免疫印迹检测小鼠肝脏、脾脏及血液超氧化物歧化酶	179
实验四 胰蛋白酶米氏常数及最大反应速度的测定	183
实验五 胰蛋白酶的固定化及其性质	186
实验六 亲和层析纯化蚯蚓丝氨酸蛋白酶	191
实验七 植物过氧化物同工酶提取、活性测定及电泳鉴定	196
实验八 大豆多糖的提取及测定	199
实验九 定磷法测定酵母核糖核酸的含量	203
实验十 小鼠肝脏 DNA 的提取及测定	207
实验十一 兔肝总 RNA 的提取及 RT-PCR	210
参考文献	215
附录一 常用标准溶液的配制和标定	216
附录二 常用缓冲液的配制方法	220
附录三 硫酸铵饱和度的调整用表	225
附录四 柱层析材料	227

第一篇 实验要求

第一章 生物化学实验基本要求

第一节 生化实验室学生实验守则

(1) 学生在实验课前要认真预习实验内容,明确实验目的和要求,了解实验的步骤、方法和基本原理,写好预习报告。

(2) 学生进入实验室时,需穿实验服,不得穿拖鞋和暴露的衣服。

(3) 自觉遵守实验室纪律,保持室内安静,禁止喧哗。

(4) 爱护仪器设备,严格遵守仪器操作规程。仪器发生故障时应及时报告教师,未经许可不得随意拆卸、检修。因违反操作规程造成仪器损坏者需按规定赔偿。

(5) 配制试剂要节约,按实验实际使用量配制。多余的贵重试剂、材料和各种有机试剂要按照教师要求回收和处理,不得随意丢弃。

(6) 所用试剂和样品,必须贴上标签,标签写上试剂名称、浓度、班级、姓名和日期。易挥发溶液和酸性溶液必须严密封口。

(7) 各实验组的仪器和玻璃器皿需妥善保管,实验完毕及时清理洗净,放回各组的实验柜内。不得将实验器皿丢弃在实验台面上或水池内,保持实验台面整洁。

(8) 实验室内的一切物品,未经实验室负责人批准,不得私自带出实验室。

(9) 实验完毕后,值日生负责做好实验室的卫生清理工作,并检查水、电,关好门、窗,经教师检查合格后,方可离开实验室。

(张瑞英)

第二节 实验室安全及防护知识

生物化学实验室是进行教学和科研的场所,人员多、设备多、线路多、化学试剂多,稍有不慎,水、电、火、毒、伤等事故均有可能发生,会危及人体健康乃至生命。学生初次进入实验室,教师及实验室管理人员应首先对学生进行实验室安全观念的教育,要求学生重视实验中的安全工作,防患于未然。学生应该熟悉实验室安全防护知识。一旦发生事故,应及时采取适当的急救措施。

一、实验室安全知识

(一) 安全用电

(1) 实验室管理人员必须经常检查电源线路及插座,发现电线绝缘胶皮老化或插座破裂等隐患要及时维修更换。

(2) 不得超负荷使用电器设备。

(3) 严格按照仪器使用规程操作。

(4) 使用仪器设备时, 要注意电压、电流是否符合仪器的规定要求, 必要时应使用稳压器或调压器。

(二) 节约用水, 安全防火

(1) 节约用水。用水完毕应随手关闭水龙头。水槽内不可堆积仪器或杂物, 以防排水不畅时溢出水槽。

(2) 生物化学实验过程中经常使用一些易燃易爆试剂, 如乙醚、丙酮、乙醇、苯等, 因此, 实验室内严禁吸烟, 冰箱内不许存放可燃液体。实验室内使用的可燃物, 应远离火源和电器开关。

(3) 易燃易爆物质的残渣不得倒入污物桶或水槽中, 应收集在指定的容器内。

(三) 严防中毒, 注意安全

(1) 领用剧毒试剂应按规定办理审批手续后领取, 并由专人妥善保管。

(2) 使用毒性物质和致癌物质必须根据试剂瓶上标签说明严格操作, 安全称量、转移和保管。操作时应戴手套, 必要时戴口罩或防毒面罩, 并在通风橱中进行, 使用后的容器应单独清洗、处理。

(四) 小心处理生物化学实验废弃物

生物材料, 如微生物、动物的组织、细胞培养液、血液、分泌物, 以及实验动物等都可能存在细菌和病毒感染的潜在性危险。实验完成后, 被污染的物品必须进行高压消毒灭菌或烧成灰烬, 被污染的玻璃器皿应高压灭菌之后再清洗。

(五) 教学科研资料, 妥善收藏

教学科研资料是科研人员艰苦劳动的文字记录或视听记载、实物证据, 应妥善保管。

二、实验室急救

(一) 实验中不慎受伤, 应立即采取适当的急救措施

(1) 受玻璃割伤或其他机械损伤。首先检查伤口内是否有玻璃或金属碎片, 然后用硼酸水洗净, 再涂擦碘酒或红药水, 必要时用纱布包扎。如伤口较大或过深而大量出血, 应迅速在伤口上部和下部扎紧血管止血, 立即送往医院诊治。

(2) 烫伤。轻度烫伤一般可涂上苦味酸软膏。如果伤口红痛或红肿(一级灼伤), 可擦医用橄榄油; 若皮肤起泡(二级灼伤), 不要弄破水泡, 防止感染; 若伤处皮肤呈棕色或黑色(三级灼伤), 应用干燥而无菌的消毒纱布轻轻包扎好, 紧急送医院治疗。

(3) 化学试剂灼伤。强碱和碱金属引起的灼伤, 先用大量的自来水冲洗, 再用5%硼酸溶液或2%乙酸溶液涂洗。强酸、溴等引起的灼伤, 立即用大量的自来水冲洗, 再用5%碳酸氢钠溶液或5%氢氧化铵溶液洗涤。酚触及皮肤引起灼伤可用乙醇洗涤。

(4) 被实验动物咬伤。被咬后立即挤压伤口排去带毒液的污血, 然后用20%肥皂水或

0.1%新洁尔灭彻底清洗,再用清水洗净,继用2%~3%碘酒或75%乙醇局部消毒。为确保安全,必须及时去防疫部门接种疫苗。

(二) 实验室常备急救药品

为了对实验室意外事故进行紧急处理,实验室应配备急救药箱,常备药品清单如下。

(1) 红药水。将20g红汞加入800mL无离子水中,搅拌使之溶解后定容至1000mL。配制时勿将红汞一次完全倒入水中,以免结块。红药水有止血、消毒的功能。

(2) 碘酒。碘25g,碘化钾10g,乙醇500mL,水加至1000mL。配制时应先将碘化钾溶解于10mL水中,配成饱和溶液,再将碘加入碘化钾溶液中,最后加入乙醇搅拌溶解,再定容至1000mL。

(3) 烫伤膏。

(4) 饱和碳酸氢钠溶液。

(5) 5%硼酸溶液。

(6) 2%醋酸溶液。

(7) 5%氨水。

(8) 5%硫酸铜溶液。

(9) 高锰酸钾晶体(需要时再制成溶液)。

(10) 甘油。

(11) 消炎粉。

(12) 泻药(如硫酸镁等)。

(13) 催吐剂。镁浆或氧化镁甘油浆液(将200g氧化镁与240g甘油混合)。万能解毒剂(医用活性炭:氧化镁:单宁酸=2:1:1,混合后,保存于干燥处)。

(张瑞英)

第三节 生物化学实验报告

一、生化实验记录

(1) 实验前必须认真预习,弄清目的、原理和操作步骤,写出扼要的预习报告,操作时作为提示和参考。

(2) 准备好便于保存的记录本。记录实验条件,如材料的名称和来源,仪器的名称、生产厂家、规格、型号,化学试剂的规格、浓度、pH等,并如实记录实验中观察到的现象、测试的数据等。

(3) 如果怀疑测定结果不正确或数据记录不完整,有条件时需重做实验。

二、数据处理

(一) 表格

应以图表的形式记录实验数据或概括实验结果。表格设计要求紧凑、简明,一般用三线表,要有编号和表头(表1-1)。

表 1-1 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度标准曲线加样表

试剂	管号及加量					
	1	2	3	4	5	6
标准蛋白质/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
无离子水/mL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蛋白质浓度/($\mu\text{g/mL}$)	0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0
考马斯亮蓝 G-250/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
A_{595}	0					

(二) 绘图

许多实验需要测量一个量对另一量的影响。已知量叫做自变量，未知量或待测量叫做因变量。画图时，习惯把自变量画在横坐标（ x 轴）上，而把因变量画在纵坐标（ y 轴）上。应使用 Office 中 Excel 软件绘图。例如，将表 1-1 数据绘图，结果如图 1-1 所示。

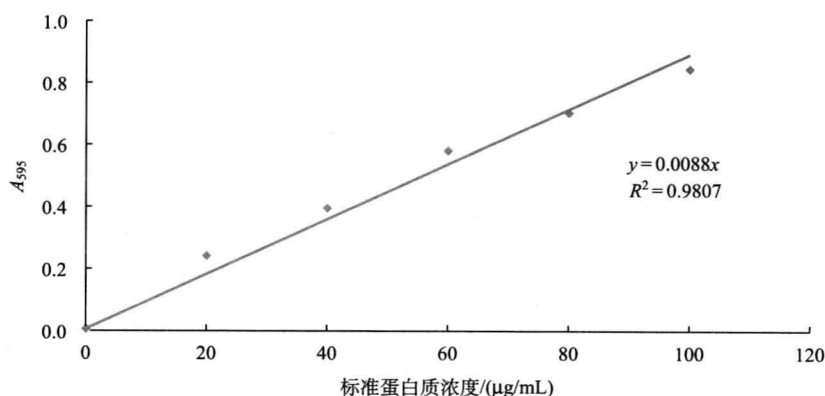


图 1-1 蛋白质含量测定标准曲线

(三) 图谱

在实验报告中，层析或电泳的结果经常以图谱表示（图 1-2、图 1-3）。绘制层析、电泳图谱时，图片大小可酌情缩放，但层析斑点、电泳区带形状、位置、颜色及其深度背景颜色

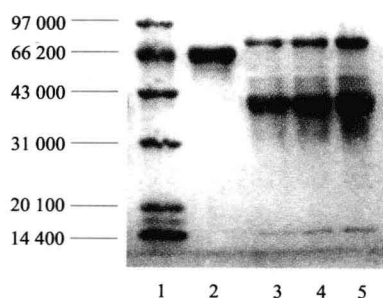


图 1-2 SDS-PAGE 图谱

1. 蛋白质低分子质量 Marker; 2. 牛血清白蛋白;
3~5. 稀释 200 倍蛋清 5 μL 、10 μL 、15 μL

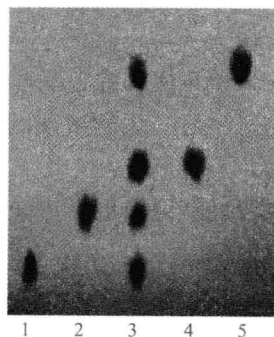


图 1-3 氨基酸纸层析图谱

1. 赖氨酸; 2. 天冬氨酸; 3. 待测样品;
4. 丙氨酸; 5. 苯丙氨酸

等应力求与原物一致。最好对图谱进行照相或扫描。对图谱中条带或斑点要有注解，一般在图谱的下方列出项目，两边用相应的直线指出条带或斑点。

三、基础生化实验报告

学生在实验结束后要及时整理实验数据，总结实验结果，并对结果进行分析，写出实验报告。生化实验报告书写格式如下。

实验编号及名称		
实验者姓名：	班次：	实验日期：
一、实验目的与要求		
二、实验原理		
三、仪器、试剂和材料		
四、操作步骤		
五、实验结果		
六、结果讨论		
七、思考题		

四、综合性生化实验报告

一个综合性实验相当于一个微型毕业实践题目，基础生化实验报告的格式已经不适合综合性实验。我们要求学生按照国家公开发表的核心期刊研究论文格式书写，以提高学生写作水平，为将来完成毕业论文打好基础。

综合性生化实验报告包括以下部分：题目、作者及单位、中文摘要及关键词、英文摘要及关键词、前言、材料与方法、结果与讨论、参考文献。

每一部分的要求如下。

1. 题目

每一次实验的题目。

2. 作者

一个综合性实验的合作者（两位同学）。

3. 单位

××大学和××学院，城市，邮编。

4. 中文摘要及关键词

总结本次实验的主要内容，采用××技术，取得了××结果，得出××结论。关键词是本次实验涉及的最核心的专业词语。

5. 英文摘要及关键词

以英文书写本次实验的摘要，与中文部分内容对应，切忌逐字翻译。英文关键词与中文关键词相对应。

6. 前言

写明本次实验研究对象有什么性质、用途、研究其的重要意义及目前的研究现状等。

7. 材料与方法

详细写明所用材料及实际采用的方法。分条目写。

以综合性实验“鸡卵类黏蛋白的分离纯化及性质测定”为例，材料与方法部分的书写格式如下。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜鸡蛋、丙酮、三氯乙酸-丙酮、透析袋、DEAE-纤维素等。

1.2 仪器

冷冻离心机、可见分光光度计等。

1.3 方法

1.3.1 鸡卵类黏蛋白的提取

1.3.2 DEAE-Cellulose-52 离子交换柱层析纯化鸡卵类黏蛋白

1.3.3 BAEE 法测定鸡卵类黏蛋白的抑制活性

1.3.4 SDS-PAGE 鉴定鸡卵类黏蛋白纯度及测定相对分子质量

8. 结果与讨论

与方法相对应，写明采用每一种方法得到了什么结果，可以用列表、绘图、图片等形式表示。并对得到的结果进行分析和评价。

9. 参考文献

写明完成本次实验阅读了哪些文献，包括图书、期刊、电子出版物、专利、论文集等。例如：

1. 武金霞，张贺迎，张瑞英，等．生物化学实验原理与技术 [M]．保定：河北大学出版社，2005：66-68.
2. 方林求，褚楠，薛静．鸡卵清蛋白对蛋白酶抑制作用的研究 [J]．中国生化药物杂志，1995，16 (6)：262-265.
3. 邵雪玲，毛歆，郭清．生物化学与分子生物学实验指导 [M]．武汉：武汉大学出版社，2003：22-25，32-35.

(武金霞 张瑞英)

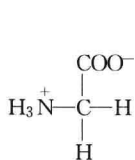
第二篇 实验技术原理与基础实验

第二章 生物物质的定性鉴定

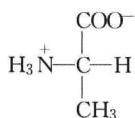
第一节 氨基酸和蛋白质的结构及性质

一、氨基酸的结构特点

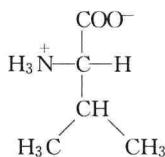
氨基酸 (amino acid) 是蛋白质的基本结构单位。构成蛋白质的 20 种常见氨基酸均为 α -L-氨基酸。根据侧链 (side chain) 的极性可将其分为四大类: 非极性 R 基氨基酸、不带电荷的极性 R 基氨基酸、带正电荷的 R 基氨基酸及带负电荷的 R 基氨基酸。其中, 非极性 R 基氨基酸共 8 种, 分别为丙氨酸 (Ala, A)、缬氨酸 (Val, V)、亮氨酸 (Leu, L)、异亮氨酸 (Ile, I)、脯氨酸 (Pro, P)、苯丙氨酸 (Phe, F)、色氨酸 (Trp, W) 和甲硫氨酸 (Met, M); 不带电荷的极性 R 基氨基酸共 7 种, 分别为甘氨酸 (Gly, G)、丝氨酸 (Ser, S)、苏氨酸 (Thr, T)、半胱氨酸 (Cys, C)、酪氨酸 (Tyr, Y)、天冬酰胺 (Asn, N) 和谷氨酰胺 (Gln, Q); 带正电荷的 R 基氨基酸共有 3 种, 分别为赖氨酸 (Lys, K)、精氨酸 (Arg, R) 和组氨酸 (His, H); 带负电荷 R 基氨基酸共有 2 种, 分别为天冬氨酸 (Asp, D) 和谷氨酸 (Glu, E)。20 种氨基酸的结构式如下:



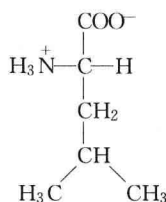
甘氨酸 (Gly, G)



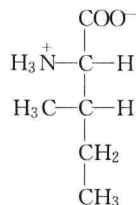
丙氨酸 (Ala, A)



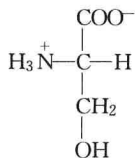
缬氨酸 (Val, V)



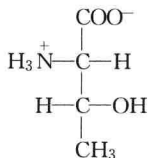
亮氨酸 (Leu, L)



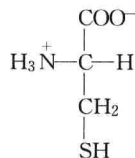
异亮氨酸 (Ile, I)



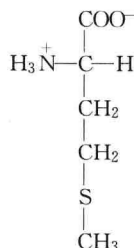
丝氨酸 (Ser, S)



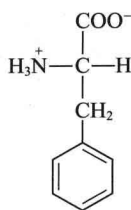
苏氨酸 (Thr, T)



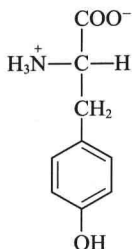
半胱氨酸 (Cys, C)



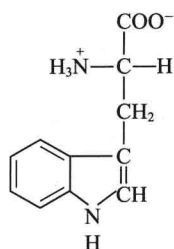
甲硫氨酸 (Met, M)



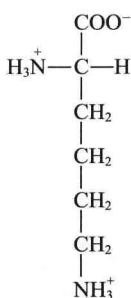
苯丙氨酸(Phe, F)



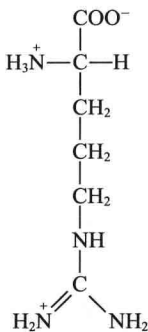
酪氨酸(Tyr, Y)



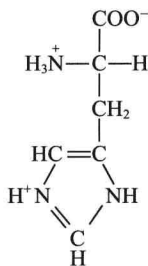
色氨酸(Trp, W)



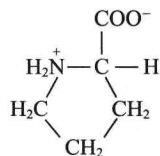
赖氨酸(Lys, K)



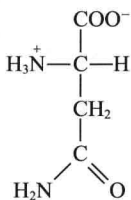
精氨酸(Arg, R)



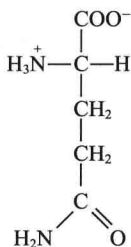
组氨酸(His, H)



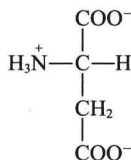
脯氨酸(Pro, P)



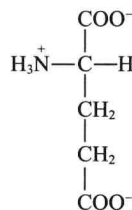
天冬酰胺(Asn, N)



谷氨酰胺(Gln, Q)



天冬氨酸(Asp, D)



谷氨酸(Glu, E)

二、氨基酸的化学反应

氨基酸的化学反应主要指它的 α -氨基与 α -羧基及侧链上的功能基团所参与的反应。

1. α -氨基参加的反应

α -氨基与其他伯胺一样可以参与很多化学反应。例如, α -氨基能与亚硝酸反应放出氮气, 这是 Van Slyke 法测定氨基氮的基础; α -氨基在弱碱性溶液中与酰氯或酸酐作用, 被酰基化, 这类反应可用于蛋白质和多肽人工合成中进行氨基保护。 α -氨基的氢原子能被烃基或烃的衍生物取代, 如与 2,4-二硝基氟苯 (FDNB 或 DNFB) 反应, 产生 DNP-氨基酸, 此反应首先被英国的 Sanger 用来鉴定蛋白质和多肽的 N 端氨基酸; 与异硫氰酸苯酯 (PITC) 反应, 产生 PTH-氨基酸, 这个反应被 Edman 用于鉴定多肽和蛋白质的 N 端氨基酸。当 N 端氨基酸形成 PTH-衍生物之后, 使第一个肽键的稳定性下降, N 端的氨基酸从肽链上脱落下来, 这时剩下的是少了一个氨基酸残基的多肽链。它的 N 端暴露出一个新的游离 α -氨基, 可参加下一轮的反应。因此可通过分析 PTH 衍生物来推断氨基酸的排列顺序, 这是全自动氨基酸顺序分析仪的基础, 称为 Edman 降解。除此之外, α -氨基还能与醛类形成席夫碱。

2. α -羧基参加的反应

α -羧基能与碱形成盐, 与醇形成酯。如果氨基被保护, 则 α -羧基能与二氯亚砷或五氯化

磷作用生成酰氯,此反应在多肽和蛋白质人工合成中用于活化羧基;在氨基被保护的情况下,羧基先转变为甲酯,再与胼和亚硝酸反应,形成叠氮化合物,这也是活化羧基的反应。

3. α -氨基和 α -羧基共同参加的反应

(1) 与茚三酮反应:茚三酮在弱酸性溶液中,与 α -氨基酸共热,使氨基酸氧化、脱氨、脱羧,放出氨,茚三酮再与氨、还原型茚三酮发生作用,形成紫色物质,该紫色物质在 570nm 有最大光吸收,可用来定性、定量测定氨基酸。

(2) 成肽反应:一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基可以脱水缩合成肽 (peptide),形成的键称为肽键 (peptide bond)。多肽和蛋白质分子中含有肽键,游离的氨基酸分子中不含有肽键。

4. 侧链 R 基参加的反应

氨基酸的 R 侧链具有功能团时也能发生化学反应,这些功能团包括羟基、酚基、巯基、吡啶基、咪唑基、胍基及非 α -氨基和非 α -羧基等。例如,酪氨酸的酚 (羟) 基能与重氮化合物结合成橘黄色物质,称为 Pauly 反应;精氨酸的胍基能与 α -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中反应,产生红色物质。半胱氨酸的巯基 ($-SH$) 反应性能很高,在微碱性条件下, $-SH$ 发生解离形成硫醇阴离子 ($-CH_2-S^-$),此离子是巯基的反应形式,能与卤代烷 (如碘乙酸、碘乙酰胺、甲基碘等) 迅速反应,生成相对稳定的烷基衍生物;另外,巯基还能与各种金属离子形成稳定程度不同的络合物,因此,在制备以巯基为活性中心的酶时,应避免重金属离子的进入。

三、蛋白质的结构与性质

(一) 蛋白质的结构

蛋白质 (protein) 分子是由 20 种标准氨基酸首尾相连而成的共价多肽链 (polypeptide chain)。天然的蛋白质分子并不是走向随机的松散多肽链,每种天然蛋白质都有自己特有的空间结构,或称为三维结构,此三维结构通常被称为蛋白质的构象 (conformation)。蛋白质的结构可以分为 4 个不同的组织层次:一级结构 (primary structure) 是指多肽链的氨基酸排列顺序;二级结构 (secondary structure) 是指多肽链借助氢键排列成自己特有的 α 螺旋、 β 折叠片、 β 转角和无规则卷曲;三级结构 (tertiary structure) 是指多肽链借助各种非共价相互作用力弯曲、折叠成具有特定走向的紧密球状构象;四级结构 (quaternary structure) 是指寡聚蛋白质中各亚基之间在空间上的相互关系和结合方式。

(二) 蛋白质的性质

蛋白质的性质一方面由多肽主链决定,另一方面由组成它的氨基酸残基的侧链决定,因此,可以依据蛋白质作为生物大分子所具有的特性及组成它的氨基酸残基的侧链所具有的特性对蛋白质进行定性和定量分析。

1. 蛋白质变性

天然蛋白质分子具有特定的空间构象,当受到某些物理因素 (如加热、紫外线照射、高压等) 或化学因素 (如有机溶剂、脲、胍等) 的影响时,蛋白质分子的空间构象发生改变或破坏,导致其生物活性丧失和一些理化性质的改变,这种现象称为蛋白质的变性作用 (denaturation)。

2. 蛋白质沉淀

蛋白质是高分子化合物,由于其分子质量很大,在溶液中形成的质点大小为 1~100nm,