

生物化学丛书

蛋白质化学

鲁子贤 编著

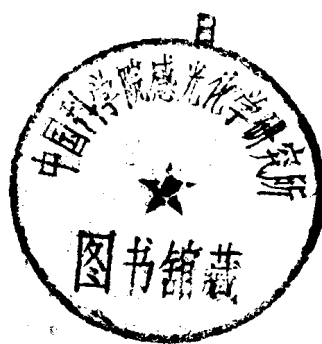


65.17.21

DF19/19

蛋 白 质 化 学

鲁 子 贤 编 著



科 学 出 版 社

1 9 8 1

内 容 简 介

本书依据生物化学研究所开办的“生化训练班”的教材加以补充修改而成。内容着重介绍蛋白质的排列顺序、构象和缔合性质等有关基本概念及方法，同时也介绍了与上述各结构层次密切相关的一些新进展。可供生物化学研究工作者、大专院校有关专业师生参考。

蛋 白 质 化 学

潘子贤 编 著

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1981年8月第一版 开本：787×1092 1/16

1981年8月第一次印刷 印张：11 插页：1

印数：0001—7,250 字数：249,000

统一书号：13031·1618

本社书号：2219·13—10

定 价：1.80 元

序 言

生物化学研究所举办的生化训练班始自 1950 年,开始时着重实验室训练,我们的目的是为了使青年生化工作者掌握这门学科研究的一些新方法、新技术。以后随着我所科研人员的增多,又添加了讲课内容,围绕当时的生化生长点,系统地讲述国际生化的新进展。课文内容逐渐发展充实,并结合在上海科技大学讲授高级生化课的需要,编写成高级生化训练班讲义。1960 年中国科学院在上海召开第一次全国生化学术会议,会议期间各地代表纷纷要求生化所举办一次大型高级生化训练班,为全国各有关单位培训生化人才。因此,生化所于 1961 年举办了一次有四百多学员参加的高级生化训练班,以系统介绍生化学科新知识为主,部分学员并参加了实验训练。十几年来,我们发现通过该次训练班学习的学员,大部分已成为各有关单位的生化科研或教学骨干。这个发现给予生化所同志以极大鼓舞。“文化大革命”中,高级生化训练班横遭批判,但 1972 年以后,各方面仍不断有呼声,要求生化所再次举办高级生化训练班。1976 年我们在所内作一次小型尝试,着重发挥部分中级科研人员在教学中的作用,包括从编写讲义到讲课。1979 年在中国科学院一局的催促和支持下,为克服住宿的困难,我们再次在沪杭两地同时举行一次大型高级生化训练班,人数近五百人,课程内容大为扩充,包括十余年来进展最迅速的生化或分子生物学领域。如分子遗传、DNA 重组、生物膜、免疫生化等等。为适应国内广大生化工作者的需要,特将上述讲课内容整理成书,分册付印,定名为“生物化学丛书”。尚望国内同行对本书内容不吝批评指正,供今后再版时修改参考。

王 应 睐

目 录

第一章 蛋白质是一类重要的生物高分子·····	1
第二章 氨基酸·····	4
出现在蛋白质中的氨基酸 ·····	4
氨基酸的构型 ·····	6
氨基酸的电离性质 ·····	8
氨基酸的化学性质 ·····	9
氨基酸的定性分析 ·····	15
离子交换法定量分析氨基酸 ·····	16
气相色谱与质谱法分析氨基酸 ·····	17
第三章 蛋白质一级结构测定方法原理·····	20
一级结构的定义及测定一级结构的基本战略 ·····	20
测定前的必备知识 ·····	21
肽链与肽片段的分离 ·····	22
肽的顺序测定 ·····	26
在肽片段的顺序的基础上建立蛋白质的一级结构 ·····	35
其它的战略思想 ·····	37
第四章 蛋白质的分离纯化·····	40
蛋白质的抽提 ·····	40
利用溶解度不同的纯化方法 ·····	41
利用分子形状和大小不同的分离方法 ·····	43
利用电离性质不同的分离方法 ·····	46
利用生物功能的专一性的纯化方法 ·····	47
蛋白质纯度的鉴定 ·····	48
第五章 蛋白质一级结构和功能关系·····	49
蛋白质和它的前体的一级结构关系 ·····	49
蛋白质种属差异与分子进化 ·····	54
蛋白质一级结构变异与分子病 ·····	63
第六章 蛋白质的构象·····	68
蛋白质构象的结构单元 ·····	68
稳定蛋白质构象的次级键 ·····	78
第七章 蛋白质构象测定方法简介·····	84
主链构象测定方法 ·····	84
微区的研究方法 ·····	94
蛋白质晶体的 X 射线结构分析 ·····	113
第八章 蛋白质构象与功能的关系·····	125
蛋白质的变性作用 ·····	125

蛋白质和多肽的界线	130
细胞色素 C 的构象与分子进化	137
第九章 蛋白质-蛋白质相互作用——蛋白质的四级结构	139
蛋白质的亚基、单体和分子	139
亚基缔合成分子	140
蛋白质分子的缔合	140
线性缔合	142
蛋白质 蛋白质相互作用	143
装配及分子识别	146
第十章 血红蛋白	148
血红蛋白的基本结构	148
血红蛋白与氧的结合	155
Bohr 效应与二磷酸甘油酸的影响	160
血红蛋白分子病与高级结构关系	163
索引	167
后记	170

第一章 蛋白质是一类重要的生物高分子

十九世纪中叶,随着化学这门科学的兴起,蛋白质也成了科学工作者的研究对象,并且一开始人们就注意到它在生物体中的重要作用。在十九世纪中叶以后约半个世纪中,曾用过不同的词汇来称呼它,如英文中的“Protein bodies”,“Albuminoids”与“Proteids”,德文中的“Eiweisskörper”,“Proteinstoff”及“Proteinkörper”等。直到本世纪初,生物化学家才统一采用“Protein”一词。该词系从希腊文 *Πρωτο* 转化而来,意思是“最原始的”。中文译为蛋白质。曾根据 Protein 的原义建议设新字“朊”表示,但因蛋白质一字沿用已久,“朊”字未被广泛接受。

蛋白质是一类重要的生物高分子,不同的蛋白质具有各种不同的生理功能。它是各种 α -氨基酸通过酰胺键联成的长链分子。这种长链即所谓的肽链。许多蛋白质还包含有非肽链结构的其它组成成分,这种成分称配基或辅基。

蛋白质的种类非常之多。为了研究的方便,就出现了分类问题。曾经出现过众多的分类方法,它们各依据蛋白质分子的某一特征而进行分类。这些分类法大多因发现大量

表 1.1 按分子对称性划分的蛋白质分类表

球状蛋白质 (Globular protein): 分子接近球状或椭球状,溶解度较好,能结晶。包括大多数蛋白质。

纤维状蛋白质 (Fibrous protein): 分子很不对称,类似细棒或纤维。可分成:

可溶性纤维状蛋白质: 如许多肌肉的结构蛋白,血纤蛋白原等等。

不溶性纤维状蛋白质: 包括胶原、弹性蛋白、角蛋白及丝心蛋白等。

新的蛋白质而产生困难。为了有助于了解蛋白质的全貌,在此介绍几种分类方法。一种是按分子对称性分类的方法,如表 1.1。这种分类方法在蛋白质研究热衷于分子大小与分

表 1.2 按溶解性质与结构内容混合考虑的分类法

一、简单蛋白质

1. 白蛋白 (Albumins): 溶于水及稀盐、稀酸或稀碱溶液。硫酸铵盐析时, 50% 饱和度以上开始析出。普遍存在于生物体系之中。
2. 球蛋白 (Globulins): 一般在等电点时不溶于水, 但加少量盐、酸或碱后可以溶解。50% 饱和度硫酸铵可以析出。这类球蛋白又名优球蛋白 (Euglobulins)。另有一些球蛋白盐析的性质相同, 但溶于水, 称为拟球蛋白 (Pseudoglobulins), 普遍存在于生物体系之中。
3. 醇溶谷蛋白 (Prolamines): 可溶于 70—80% 乙醇中, 但不溶于水或无水乙醇。在化学组成上有一定特点, 如含脯氨酸及酰胺较多, 非极性侧链远较极性侧链多。这类蛋白质在植物种子中较多。典型的例子如玉米醇溶蛋白 (Zein)、麦醇溶蛋白 (Gliadin)、大麦醇溶蛋白 (Hordein)。
4. 谷蛋白 (Glutelins): 等电点时不溶于水和稀盐溶液中, 但易溶于稀酸和稀碱。如麦谷蛋白 (Glutenin) 和米谷蛋白等 (Oryzenin)。
5. 鱼精蛋白 (Protamines): 溶于水及稀酸, 但为稀氨水所沉淀。分子中碱性氨基酸特别多, 所以分子呈强碱性。分子量很小, 没有特定的空间结构。一般多自鱼精中抽提。似应归于多肽。
6. 组蛋白 (Histones): 溶于水及稀酸, 但为稀氨水所沉淀。分子中精氨酸与赖氨酸特别多, 分子呈弱碱性。一般存在于动物体中, 与酸性物质如核酸等相结合。

二、硬蛋白 (Scleroproteins)

这类蛋白质是动物体中作为结缔及保护功能的蛋白质, 不溶于水、盐溶液、稀碱和稀酸溶液。

1. 角蛋白 (Keratins)

2. 胶原 (Collagens)
 3. 网硬蛋白 (Reticulins)
 4. 弹性蛋白 (Elastin)
- 三、结合蛋白 (Conjugated proteins)
1. 磷蛋白 (Phosphoproteins): 丝氨酸或苏氨酸侧链上连结了磷酸的蛋白质, 如酪蛋白 (Casein)、胃蛋白酶。
 2. 粘蛋白 (Mucoproteins): 与氨基多糖结合的蛋白质。一般多含有 α -氨基葡萄糖, 与下列一种或多种物质结合——半乳糖、甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、硫酸或磷酸。这类蛋白质可分为粘蛋白 (Mucins)——如唾液腺及消化道所分泌的粘蛋白——和类粘蛋白 (Mucoid)——如卵类粘蛋白 (Ovomucoid)、血清粘蛋白 (Seromucoid) 等。
 3. 糖蛋白 (Glycoprotein): 与粘蛋白类似, 但含糖量在 4% 以下, 例如卵白蛋白。
 4. 核蛋白 (Nucleoprotein): 与核酸结合的蛋白质。如小牛胸腺核蛋白、简单的植物病毒等。
 5. 脂蛋白 (Lipoproteins) 和蛋白脂 (Proteolipids): 与脂类相结合的蛋白质。脂类成分有磷脂、固醇等。脂类包于分子内部而呈水溶性, 即是脂蛋白, 例如卵黄球蛋白 (Lipovitellin), 凝血致活酶 (Thromboplastin), 血清中 α 和 β -脂蛋白等。脂类包于外而溶于有机溶剂的, 就是蛋白脂, 如脑中的蛋白脂。也有两类溶剂都溶解的, 如牛脑磷脂蛋白 II。
 6. 血红素蛋白 (Hemoproteins): 与辅基血红素相结合的蛋白质, 主要功能为参与呼吸运氧。血红素是卟啉类化合物。高等动物的血红蛋白含铁, 低等动物的血蓝蛋白含铜。
 7. 金属蛋白 (Metalloproteins): 与金属直接结合的蛋白质, 如铁蛋白 (Ferritin) 含铁。许多蛋白质都含有少量的金属。
 8. 黄素蛋白 (Flavoproteins) 及氮苯蛋白 (Pyridinoproteins)

子形状的时期, 是十分简便有用的, 但太笼统。表 1.2 介绍的是一种按溶解度与结构内容混合考虑的分类法。20 世纪初, 蛋白质的研究工作主要集中在利用蛋白质的各种不同的溶解性质而将它们分离纯化。表 1.2 前一半的分类法是这一历史的反映。表 1.2 后一部分是蛋白质研究进入化学结构时期的反映。

近年来, 蛋白质研究已发展到深入了解结构功能间关系及蛋白质-蛋白质 (或其它生物高分子) 相互关系的阶段, 因此相继有人提出依据蛋白质的功能进行分类的方法。表 1.3 就是这样一种分类法。其实, 这无非也是各种蛋白质的列举。随着时间的转移, 表的内容还将有很大的发展。

表 1.3 蛋白质按功能的分类表

活性蛋白质 (Active proteins) 包括在生命运动过程中一切有活性的蛋白质, 以及它们的前体。绝大部分蛋白质都属于此。可以分属下列各种类型:

酶: 司催化活性的蛋白质, 种类繁多。生物体内几乎所有的化学反应都由酶所催化。酶的催化活性比人工制备的催化剂催化效率高得多。不少蛋白水解酶的抑制蛋白也归在这里。

激素蛋白: 司调节机体各种代谢过程的蛋白质和相应的前体。激素蛋白的经典概念认为它们是由内分泌腺所分泌的, 近年来这一概念越来越不严格, 例如肠胃道就分泌一系列的激素蛋白。蛋白质类激素中包括了大量的肽。

运输和贮存蛋白质: 生物体内有专一输送各种小分子和离子 (也包括电子) 的蛋白质。如血清白蛋白、血红蛋白等。有许多专一结合激素或其它小分子的蛋白质看来也属于这一类型。

运动蛋白: 司生物体或有机体运动的蛋白质。如一系列肌肉蛋白, 细菌的鞭毛或纤毛蛋白等。近年来发现, 在非肌肉的运动体系中普遍存在着运动蛋白。

防御蛋白和病毒外壳蛋白: 在这一类蛋白质中, 有一类是司防御异物侵入体内的功能的, 如各种免疫球蛋白。防御病毒侵入后致病的干扰素也可属于这一类。血纤维蛋白和它的前体是另一类起防御功能的蛋白质, 它们的功能是防止体液大量损失和异物侵入。此外, 病毒的外壳蛋白不能简单地认为是防御, 但有其相当相似之处, 归于此。

续表 1.3

受体蛋白: 接受和传递调节信息的蛋白质。如一系列专一地接受各种激素的受体蛋白。蛋白质类激素的受体在细胞膜上, 甾体激素的受体在细胞内。接受外界刺激的蛋白质——感觉蛋白也可归于此, 如视网膜上的视色素, 味蕾上的味觉蛋白都是。此外还有许多药物的受体蛋白。

控制生长与分化的蛋白质: 参与生长与分化的调节的各种蛋白质。如组蛋白、阻遏蛋白等。各种生长因子可能也该归属于此。

毒蛋白: 侵入动物体引起各种中毒症状甚至死亡的异物蛋白质。细菌毒素种类很多, 有过详细的研究。蛇毒及虫蝎毒等毒蛋白结构相似, 分子量一般都比较小, 硫-硫键含量高。植物毒蛋白种类很多, 是另一类毒蛋白。

膜蛋白: 存在于膜上的具各种生物活性的蛋白质。这类蛋白质大多是脂溶性而水不溶的。结构上具有自己的特征。

非活性蛋白质 (Passive proteins) 主要包括一大类担任生物的保护或支持作用的蛋白质, 从现有的了解看, 都是不具生物活性的物质。主要包括:

胶原: 哺乳类动物皮肤的主要成份, 一般不溶解。从化学组成看, 脯氨酸及羟脯氨酸的含量特别高。有非硫-硫键的侧链间的化学键使肽链联结起来。鞣制成革, 部分水解成明胶。这类蛋白质是工业原料。

角蛋白: 一类化学性质十分稳定的, 含二硫键特别多的蛋白质。一般条件下都不溶解。功能是保护作用, 或加强机械强度用, 包括毛发、羽毛、蹄角等。都是工业上的重要原料, 如毛纺工业用的羊毛等即是。

弹性蛋白: 存在于韧带、血管壁等处, 性质与胶原类似。主要作用是有机体的支持与润滑。

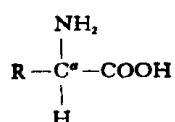
丝心蛋白: 一般不溶, 含丝氨酸特别多。蚕丝去丝胶后的纤维就是它。

此外还有网硬蛋白等。

分类并非是我们在这里讨论的主题。上列列举的几张表让我们了解到蛋白质的概况。同时, 几个表中列出的各种蛋白质的名称还在各种文献中大量使用, 因此也有了解它们的必要。从表中可以看到蛋白质种类与功能的多种多样。还可以看到, 将有机体看成一台机器的话, 蛋白质就是这台机器中的各种工作部件, 在机器的运转中起着十分重要的作用。

第二章 氨基酸

含有氨基及羧基的有机化合物都叫氨基酸。但在生物体中出现的氨基酸种类不多，在蛋白质中出现的更只是一类特殊的氨基酸，它们的氨基和羧基都在 α -C 上，称为 α 氨基酸，可表达成下式：

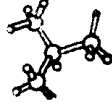
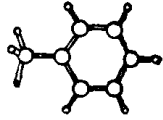
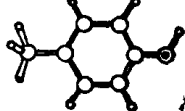


R 称侧链，R 不同，就是不同的氨基酸。

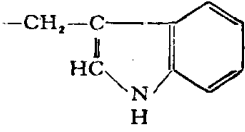
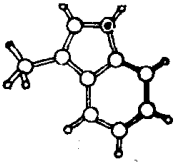
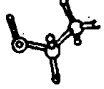
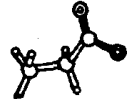
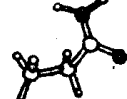
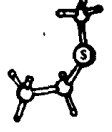
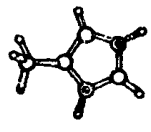
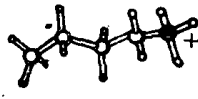
出现在蛋白质中的氨基酸

作为蛋白质组成成分的氨基酸一共有二十种，它们的名称及结构列在表 2.1 中。为

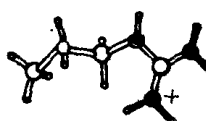
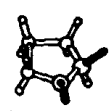
表 2.1 存在于蛋白质中的氨基酸

分 类	全 名	常用符号		单字 符号	R 的化学结构	R 的立体结构
		中文	英文			
疏水侧链	甘氨酸	甘	Gly	G	-H	
	脂肪族侧链 丙氨酸	丙	Ala	A	-CH ₃	
	缬氨酸	缬	Val	V	$-\text{CH}_3 \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	
	亮(白)氨酸	亮(白)	Leu	L	$-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_3 \end{array}$	
	异亮(白)氨酸	异亮(白)	Ile	I	$-\text{CH} \begin{array}{l} \nearrow \text{CH}_3 \\ \searrow \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	
芳香环侧链	苯丙氨酸	苯(丙)	Phe	F	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	
	酪氨酸	酪	Tyr	Y	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	

续表 2.1

分 类	全 名	常用符号		单字 符号	R 的化学结构	R 的立体结构
		中文	英文			
亲水侧链	色氨酸	色	Trp	W		
	丝氨酸	丝	Ser	S	$-\text{CH}_2-\text{OH}$	
	苏氨酸	苏	Thr	T	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$	
	天冬氨酸	天冬	Asp	D	$-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{OH}$	
	谷氨酸	谷	Glu	E	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{OH}$	
	天冬酰胺	天酰	Asn	N	$-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$	
	谷氨酰胺	谷酰	Gln	Q	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{NH}_2$	
	天冬氨酸或酰胺未定		Asx	B		
	谷氨酸或酰胺未定		Glx	Z		
	半胱氨酸	半胱	Cys	C	$-\text{CH}_2-\text{SH}$	
含硫侧链	甲硫氨酸	甲硫	Met	M	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	
	组氨酸	组	His	H	$-\text{CH}_2-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{CH}-\text{NH}_2$	
	赖氨酸	赖	Lys	K	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	

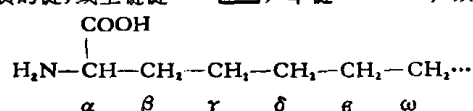
续表 2.1

分 类	全 名	常用符号		单字 符号	R 的化学结构	R 的立体结构
		中文	英文			
亚氨基酸	精氨酸	精	Arg	R	$\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH---}\overset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{C}}}\text{---NH}_2$	
	脯氨酸	脯	Pro	P	全结构 $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HN---C---COOH} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \quad \text{C} \\ \quad \\ \quad \text{H}_2 \end{array}$	

1. 立体结构中各种原子的表示法是:

•, H ○, C ⊙, N ⊙, S ○, O
 ■, 中间性质的键, 或主链键 □, 单键 —, 双键。

2. C 位置的表示:



3. 两个半胱氨酸分子通过巯基变成二硫键后变成胱氨酸。

了表达蛋白质或肽结构的需要,每个氨基酸都有符号表示,常用符号由氨基酸英文名字的前三个字母组成。一个蛋白质有时可以由上千个氨基酸组成,为了表达的方便,又设计出单字符号。这种符号因大家不熟悉,因此使用不广。但是近年来越用越多。特别是研究蛋白质氨基酸排列顺序规律的工作,几乎一律用单字符号。由于空间结构的重要,表 2.1 最右边一栏内列出了侧链的空间结构。

早年认为组成蛋白质的氨基酸一共有二十一种。但是发现羟脯氨酸是在蛋白质生物合成以后经专一的酶的作用,将脯氨酸羟基化而成的,因此不计入基本氨基酸之列,而认为蛋白质由二十种氨基酸组成。与此相似,在组蛋白等蛋白质中发现有甲基组氨酸与甲基赖氨酸,它们也是生物体合成了肽链后,经专一的酶作用而甲基化的,也不属于基本氨基酸。近年发现在凝血酶中有几个谷氨酸的 γ 位置多一个羧基的残基,称 γ -羧基谷氨酸,简写符号是 Gla。也是在蛋白质合成后转变而来的。

氨基酸的构型

上面谈到,组成蛋白质的氨基酸都是 α -氨基酸。从结构上看,除甘氨酸以外,所有这些氨基酸的 α -C 上的四个基团都不相同。脯氨酸虽是环状结构,其 α -C 上的四个基团也不相同。这种碳原子就是不对称碳原子。根据立体化学的研究,凡是有这种碳原子的分子都有光学活性,或者说有旋光。分子的手性 (Chirality 或译手征性) 指的就是光学活性,近年来用这一词汇的人越来越多。一个化合物因化学结构的不对称引起分子的手性,这一类问题就是构型问题。

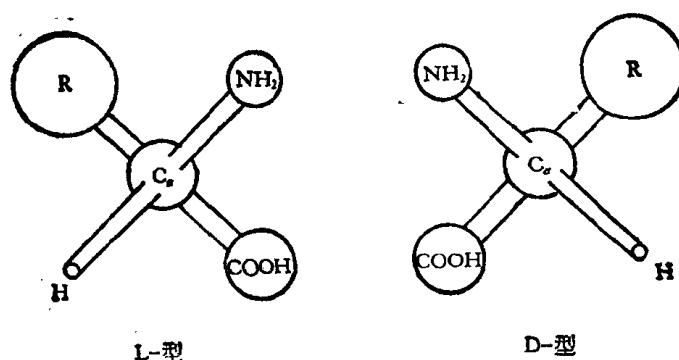
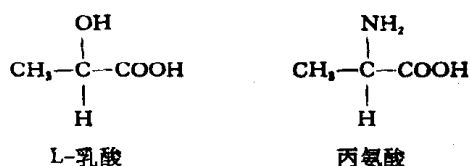


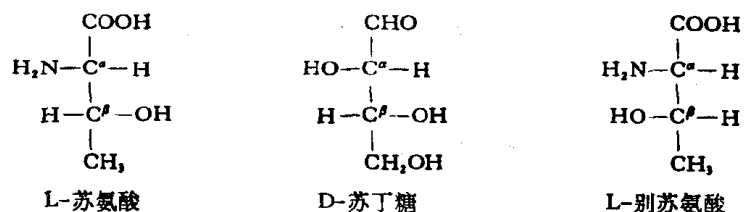
图 2.1 氨基酸的构型。

一般 α -氨基酸的构型有两种,用图形表达如图 2.1。经与乳酸的构型相比,发现蛋白质中的丙氨酸与 L-乳酸的构型相同:



还发现,存在于蛋白质中的氨基酸的构型都相同,都是 L-型的(甘氨酸例外,是非光学活性的)。这一点颇有意思,到现在为止还找不出满意的解释来说明,为什么蛋白质选择了全部 L-型的氨基酸。

从表 2.1 中可以看到苏氨酸与异亮氨酸的 β -碳也是不对称碳原子。因此,它们各有四种构型。 α -C 是 L-型的氨基酸,可是 β -C 的构型不同,又出现两种对映体。经对比,天然蛋白质中的苏氨酸的 β -C 构型与 D-苏丁糖的构型一致,如下:



天然的苏氨酸称 L-型, C_β 与此相对映的称 L-别苏氨酸。立体地表示在图 2.2 中。

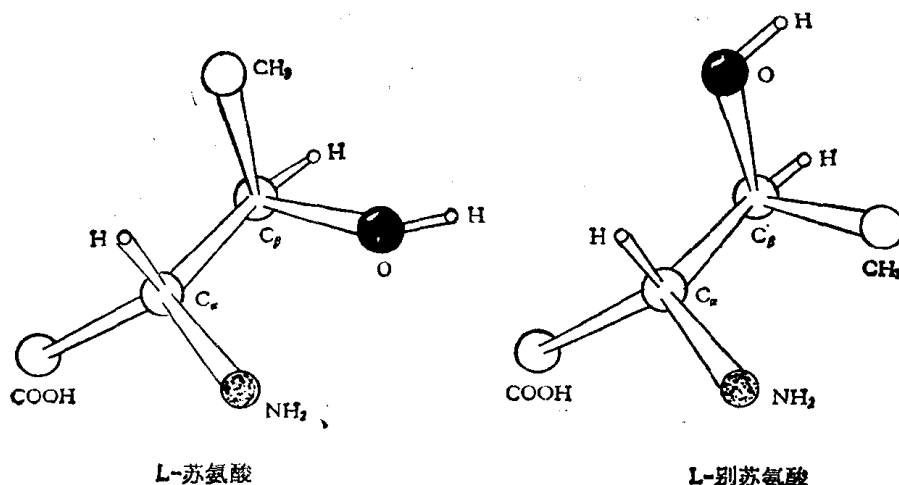
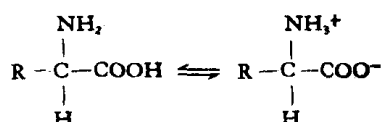


图 2.2 L-苏氨酸的两种对映体。

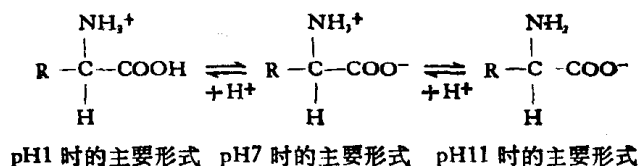
需注意, L- 与 D- 只表示空间四个基团的相互位置, 与旋光值的正负值是两码事。在有机化学中经常将旋光值的正 (+) 或负 (-) 表示出来。如 L(+) - 乳酸, 表示 L- 型乳酸的旋光值是正值。与此相应, 可以将氨基酸的旋光值正负表示出来, 如 L(+) - Ala, L(-) - Thr 等。但按生化工作者的习惯, 不作如此表示。在日常使用中, 因蛋白质所含氨基酸都是 L- 型的, 因此连 L- 型也不标出。

氨基酸的电离性质

氨基与羧基都是可电离的基团, 因此氨基酸可形成两性离子:

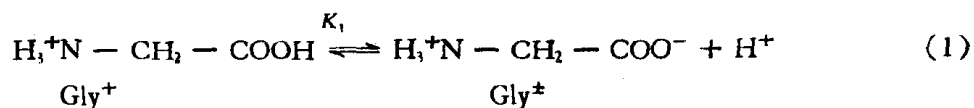


经实验证明, 不同条件时带电情况如下:

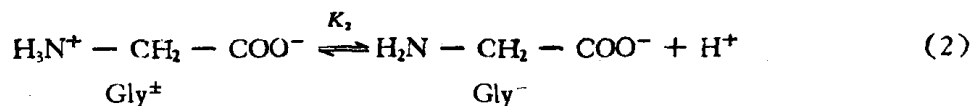


不电离的形式在溶液中只以少量存在。

依照 Brönsted 的酸碱理论, 酸是质子的供体, 碱是质子的受体。氨基酸是酸又是碱。如以甘氨酸为例:



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



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

(1) 中 Gly⁺ 接受一个质子, 所以是碱。(2) 中 Gly⁺ 是质子的供体, 所以是酸。按定义, 所谓等电点是某氨基酸所带净电荷为零时的 pH 值。对于甘氨酸, 此时

$$[\text{Gly}^+] = [\text{Gly}^-]$$

因此有

$$\begin{aligned} \frac{[\text{Gly}^+][\text{H}^+]}{K_1} &= \frac{K_2[\text{Gly}^+]}{[\text{H}^+]} \\ \therefore \frac{[\text{H}^+]}{K_1} &= \frac{K_2}{[\text{H}^+]} \\ [\text{H}^+] &= \sqrt{K_1 K_2} \end{aligned}$$

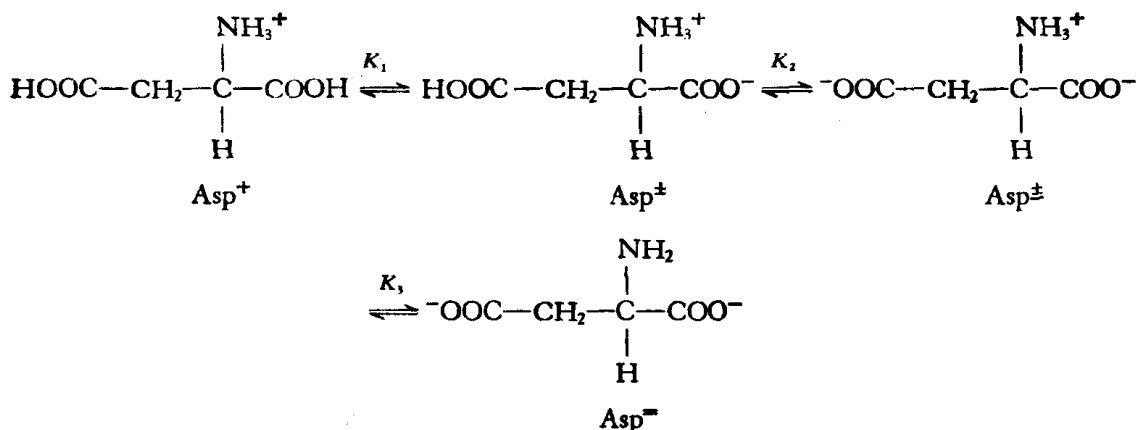
令 pI 表示等电点时的 pH , 则

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

根据实验, 甘氨酸的两个 pK 值是 2.34 与 9.60, 所以它的等电点是

$$pI = \frac{2.34 + 9.60}{2} = 5.97$$

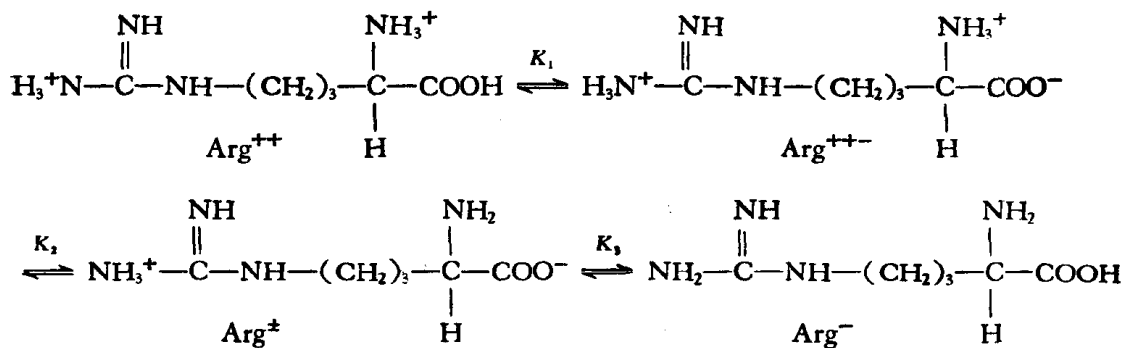
对于侧链上没有解离基团的氨基酸来讲, 上述处理完全适用。侧链上有解离基团的氨基酸的 pI 如何计算呢? 试以天冬氨酸为例来说明。天冬氨酸解离时:



等电点时是 $\text{Asp}^\pm$ 。此时 $[\text{Asp}^-]$ 的量可忽略不计, 因此天冬氨酸的等电点是

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

又如精氨酸, 解离情况如下:



同天冬氨酸, $\text{Arg}^\pm$ 是等电点, $[\text{Arg}^{++}]$ 的影响极小, 因此

$$pI = \frac{pK_2 + pK_3}{2}$$

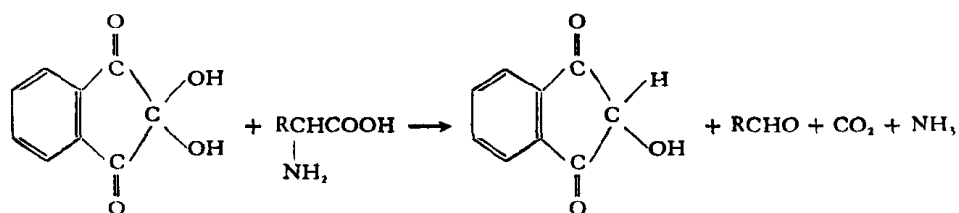
其它含有多功能团的氨基酸的解离情况及等电点的计算, 与此相似。

氨基酸的化学性质

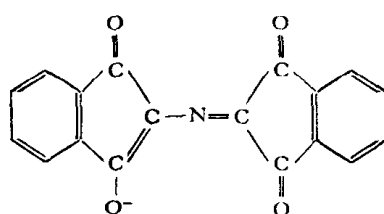
烷基与芳香基在化学上是不活泼的, 因此氨基酸的化学性质主要由其它的功能团决定。这些功能团有: 氨基、羧基、胍基、咪唑基、巯基、羟基、酚基及吡啶基。下面将讨论

一些生化研究工作经常遇到的化学反应,主要是氨基的化学反应。

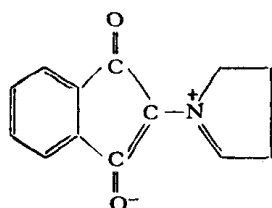
氨基的反应 氨基酸与茚三酮的反应是非常有用的反应,可以定性检出氨基酸或定量测定氨基酸。反应第一步是:



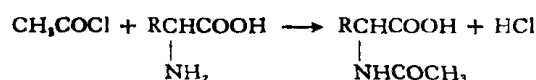
这步反应的产物 RCHO、CO₂ 及 NH₃ 是定量转变来的。所产生的 NH₃ 又定量地与一分子茚三酮及一分子还原型茚三酮合成 Ruhemann 紫:



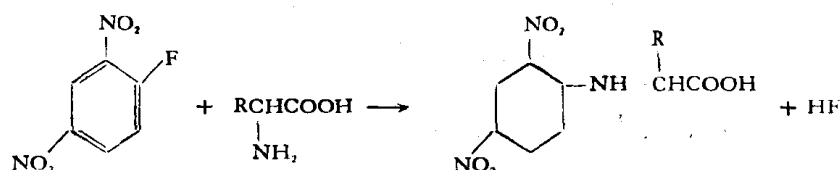
这一产物显示紫蓝色,吸收光谱峰在 570nm。茚三酮与天冬氨酸反应释放二分子的 CO₂,与脯氨酸及羟脯氨酸反应不释放 NH₃,而直接生成黄色产物,结构是



氨基的酰化是比较方便的,乙酰氯、醋酸酐、苯甲酰氯、邻苯二甲酸酐苯都可以用作酰化剂,得到相应的氨基酸衍生物。



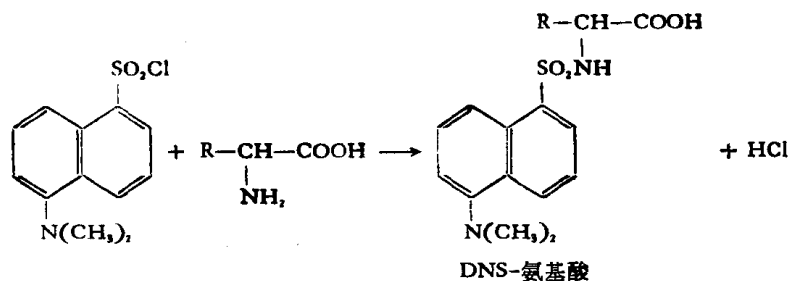
氨基与二硝基氟苯的反应很重要,生成二硝基苯代氨基酸(DNP-氨基酸)。反应如下:



这一反应是定量转变的,产物在酸性条件下能经受 100℃ 的高温而无严重的破坏。产物是黄色的。最早用二硝基氯苯与氨基酸反应,反应条件必须是碱性水溶液沸腾。后来 Sanger 改用二硝基氟苯后,只要在高 pH 条件下,室温就能反应。这一反应在蛋白质化学的研究史上起过重要作用,当年 Sanger 大量使用这一反应测出了第一个蛋白质——胰岛

素的排列顺序。现在依旧是蛋白质端基测定的方法之一。

氨基的磺酰化有一些重要的反应。5-(二甲胺基)萘-1-磺酰氯 (Dansyl Chloride, 简写 DNS-Cl, 亦译成丹酰氯) 与氨基酸的反应是



此反应趋向于定量,产物在酸性条件下 (6N HCl), 100℃ 也不破坏。DNS-氨基酸有强的荧光,激发波长是 360nm 左右。荧光一般都比较灵敏,因此此反应可用于微量分析。

表 2.2 各种氨基酸的碱基与 5-二甲氨基萘磺酰氯 (DNS-Cl) 的反应率(以氨基酸计)

氨基酸 (碱基)	碱基的 pK	反应速率常数 k	反应率 %
OH ⁻	—	15	—
NH ₂	9.26	0.5	39
丙氨酸	9.87	10	99
精氨酸 (α-氨基)	9.0	6.4	99
天冬酰胺	8.80	3.1	97
天冬氨酸	9.82	4.4	93
半胱氨酸	9.0	5.7	99
谷酰胺	9.13	4.8	99
谷氨酸	9.67	5.0	97
甘氨酸	9.78	13	99
组氨酸 (α-氨基)	9.18	12	99
组氨酸 (咪唑基)	6.1	0.5	53
异亮氨酸	9.76	14.5	99
亮氨酸	9.74	13.5	99
赖氨酸 (α-氨基)	8.95	3.6	98
赖氨酸 (ε-氨基)	10.50	42	99
甲硫氨酸	8.6	3.2	98
苯丙氨酸	9.24	10	99
脯氨酸	10.60	360	99
丝氨酸	9.15	4.6	99
苏氨酸	9.12	4.9	99
色氨酸	9.39	35	99
酪氨酸 (α-氨基)	9.11	(10)	99
酪氨酸 (解离酚基)	10.07	280	99
缬氨酸	9.72	13	99

k 是 22℃ 时的二级反应速率常数。反应在 pH9.8, 5mM DNS-Cl 下进行。

近年来出现一个荧光试剂荧光胺 (fluorescamine), 它本身是没有荧光的,与第一胺产生一荧光物质如下: