

蛋白化学

姜涌明 赵国骏 编著

扬州大学农学院
一九九七年十二月

第四節 化學

王國維著

新亞書局印行

一九三九年九月

蛋白質化學

姜涌明 赵国骏 编著

扬州大学农学院
一九九七年十二月

前　　言

1997年8月,在全国高等农业院校硕士研究生生物化学教学大纲审定会上,审查并通过了全国高等农业院校硕士研究生高级生化教学大纲。本教材就是根据该大纲而编写的。

本教材在本科生“基础生化”的基础上,不仅进一步增加了蛋白质的基础知识与理论,而且,介绍如何研究,同时,还力求反映蛋白质化学领域的研究方向及新进展。

本教材包括下列内容:蛋白质的特性,组成,结构,结构与功能的关系,蛋白质分子相互作用,糖蛋白结构与功能,蛋白质的分离提纯,氨基酸组成、一级结构以及三级结构的测定。

本教材可以作为高等农业院校各专业硕士研究生高级生化课的主要参考教材。

本教材在编写过程中,得到了扬州大学农学院教务处和基础部,以及兄弟院校同行的鼓励和支持,胡健同志为本教材的排版花费了不少心血,贡福海同志为本教材的出版给予了大力支持。对此,我们表示衷心的感谢!尽管我们作了很多的努力,但是,由于水平有限,缺点与错误在所难免,希望读者指正。

姜涌明
1997.12.14

目 录

第一章 蛋白化学绪论

一、蛋白的概念	1
二、蛋白化学研究内容	1
三、决定蛋白种类多样化的因素	1
四、蛋白质分子的结构层次	1
五、蛋白质对生物体的作用	1
六、蛋白质的应用与开发	2

第二章 蛋白质的物理化学性质

一、蛋白质分子的大小形状	6
二、蛋白质的两性解离	7
(一) 氨基酸的两性解离	7
(二) 蛋白质的两性解离	7
(三) 蛋白质的等电点	8
(四) 电泳现象	9
(五) 离子交换现象	9
三、蛋白质的胶体性质	10
四、沉降作用	10
五、沉淀作用	11
六、蛋白质的呈色反应	12
七、蛋白质的光谱特性	12

第三章 蛋白质的分离提纯及鉴定

第一节 引言

一、蛋白质的存在	16
二、为什么要分离提纯蛋白质	16
三、对蛋白质分离提纯的要求	17
四、蛋白质分离提纯的一般程序	17

第二节 前处理

一、材料的选择	19
二、细胞破碎	19
三、抽提	20

第三节 蛋白质分离提纯

一、利用溶解度差异的分离方法	21
(一) 蛋白质沉淀剂法	21
(二) 选择性变性法	21

(三) 等电点沉淀法	22
(四) 盐析法	22
(五) 有机溶剂分级法	23
(六) 有机聚合物沉淀法	24
(七) 结晶法	24
二、利用分子大小的分离方法	25
(一) 透析	25
(二) 超过滤	26
(三) 密度梯度区带离心分离法	27
(四) 凝胶过滤	27
三、根据电荷差异的分离方法	30
(一) 蛋白质的电泳分离	30
(二) 离子交换层析	33
四、亲和层析	39
五、利用吸附能力差异的分离方法	40
(一) 吸附层析	40
(二) 疏水吸附层析	40
六、高效液相层析	41
(一) 高效液相层析仪概述	42
(二) 层析填料	42
(三) 高效液相层析在蛋白质分离中的应用	42

第四节 对蛋白质浓度及纯度的检测

一、测定蛋白质浓度	43
(一) 双缩脲法	43
(二) 福林—酚试剂法	43
(三) 紫外吸收法	44
(四) 考马斯亮蓝 G—250 染色法	44
二、蛋白质的纯度鉴定	45

第四章 蛋白质的组成及营养价值

第一节 氨基酸

一、蛋白质的常见氨基酸	48
(一) 氨基酸的结构	48
(二) 氨基酸分类	48
二、蛋白质的不常见氨基酸	51

第二节 蛋白质氨基酸组成的测定

一、样品处理	52
--------------	----

二、离子交换柱色谱	53
三、显色与检测	54
四、数据处理	55
五、胰岛素的氨基酸组成	56

第三节 对蛋白质的营养价值的评价

一、必需氨基酸的种类和比例	57
二、优质蛋白质及蛋白质互补作用	58
三、氨基酸分数	58
四、蛋白质的消化率、生物价、净利用率及效率比值	59

第五章 蛋白质的一级结构及其测定

第一节 测定蛋白质一级结构的基本战略和步骤

一、测定蛋白质一级结构的基本战略	62
二、测定蛋白质一级结构的基本步骤	62
三、一级结构测定前的准备工作	63
(一) 对蛋白质样品纯度的要求	63
(二) 对蛋白质分子量的测定	63
(三) 测定蛋白质分子中多肽链的数目与种类	63
(四) 测定二硫键	64
(五) 链间二硫桥的打开及多肽链的分离提纯	64
(六) 测定蛋白质的氨基酸定量组成	64
(七) 测定蛋白质分子中配基的种类与数目	64

第二节 测定末端氨基酸残基

一、测定 N 末端氨基酸残基	65
(一) 二硝基氟苯法	65
(二) 丹磺酰氯法	66
(三) 测定封闭的 N 末端残基	67
二、测定 C 末端氨基酸的残基	67
(一) 肽解法	67
(二) 羧肽酶法	68

第三节 对多肽链的有限水解及肽段的分离纯化

一、对多肽链的有限水解	69
(一) 化学裂解法	69
(二) 酶解法	69
二、肽段的分离纯化及纯度鉴定	72

第四节 测定肽段序列

一、手工测定肽段序列	73
(一) Edman 化学降解法	73
(二) 酶解法	74
二、自动测定肽段序列	74
第五节 由已知序列肽段建立蛋白质的一级结构	
一、重迭肽	74
二、确定二硫键的位置	75
三、确定酰胺基的位置	75
四、确定糖类、脂类及磷酸基的位置	75
第六节 蛋白质一级结构的研究进展及测定方法的应用	
一、蛋白质一级结构的研究进展	76
二、用测定 DNA 序列推断蛋白质序列	76
三、蛋白质序列测定方法的应用	76

第六章 蛋白质分子构象

第一节 概述

一、蛋白质结构层次	78
二、构象与构型的区别	78
三、研究构象的必要性	78
四、蛋白质构象研究进展	79

第二节 维持蛋白质分子构象的化学键

一、范德华力	79
二、氢键	80
三、疏水键	80
四、离子键	80
五、配位键	81
六、二硫键	81

第三节 多肽链立体化学原理

一、肽单位平面结构	81
二、二面角	82
三、拉氏构象图	83

第四节 二级结构

一、螺旋结构	86
二、 β -折叠股和 β -折叠片	89

三、回折	90
四、 β -发夹和 Ω 环	92
五、三股螺旋	93
六、无规卷曲	94
七、侧链构象	94

第五节 超二级结构

一、复绕 α -螺旋	94
二、 $\beta\text{x}\beta$ -单元	94
三、 β -迂回	95
四、 β -折叠筒	95
五、 α -螺旋- β -转角- α -螺旋	96

第六节 结构域

一、结构域的概念	96
二、结构域与功能域	97
三、结构域运动	97

第七节 三级结构

一、三级结构的概念	98
二、几种球蛋白分子的构象	98
三、膜蛋白的特殊构象	106

第八节 四级结构

一、引言	108
二、亚基的种类和数目	109
三、亚基排布	111
四、亚基之间的相互作用	112

第九节 多肽链卷曲

一、一级结构决定空间结构	114
二、多肽键为什么形成球状构象	115
三、手性效应对多肽链折迭的影响	116
四、多肽链如何卷曲成高级结构	118

第十节 球蛋白分子结构的一般规律

第十一节 蛋白质分子构象的研究方法

一、X射线衍射结构分析法	122
二、圆二色性光谱法	122

三、紫外差光谱法	123
四、荧光光谱法	124
五、激光拉曼光谱法	125
六、氢同位素交换法	125
七、核磁共振法	126

第七章 蛋白质的结构与功能

第一节 活性蛋白质与前体

一、激素与激素原	129
二、酶与酶原	131
三、两类前体的不同功能	135

第二节 血红蛋白的结构与功能

一、概述	137
二、血红蛋白分子结构	137
三、血红蛋白对氧分子的结合	143
四、血红蛋白的变构效应	144
五、血红蛋白的变构过程	145
六、S形氧合曲线的生理意义	148
七、影响血红蛋白氧亲和力的因素	149

第三节 分子病

一、概述	151
二、镰刀状红细胞贫血症	152
三、活性部位突变的血红蛋白	154
四、三级结构突变的血红蛋白	155
五、四级结构突变的血红蛋白	156

第四节 蛋白质分子的进化

一、概述	157
二、细胞色素C分子的进化	158

第五节 蛋白质变性

一、概述	165
二、各种变性因素对蛋白质构象的影响	167
三、变性蛋白质的构象	172
四、变性和复性	173
五、变性的预防和利用	177

第六节 蛋白质与活性多肽的界线

一、活性多肽的构象	177
二、蛋白质和多肽的区别	178

第八章 蛋白质分子相互作用

第一节 蛋白质分子相互作用

一、分子或亚基的聚合	181
二、分子杂交	183
三、分子识别	184
四、分子自我装配	184
五、多酶复合体	185

第二节 抗原与抗体

一、抗原的结构与功能	187
二、抗体的结构与功能	189
三、抗体对抗原专一结合的实例	198
四、抗体和抗原的应用	200

第九章 糖蛋白的结构与功能

一、引言	203
二、糖蛋白的糖链结构	203
三、糖形的多样化及其原因	206
四、糖蛋白的蛋白质结构	206
五、糖蛋白与细胞识别	208
六、糖蛋白与植物抗病性	208
七、糖蛋白与生物抗冻性	209

第一章 蛋白质化学绪论

一、蛋白质的概念

蛋白质(Protein, Pr)是由多种普通氨基酸通过肽键(peptide bond)彼此连接的具有一定空间结构的分子量一般在一万以上的生物大分子。多肽(Polypeptide)亦是由多种普通氨基酸通过肽键彼此连接而成的生物分子。它与蛋白质的区别,在于多肽的分子量一般小于5000,其空间结构的浮动性很大。

二、蛋白质化学研究内容

蛋白质化学研究蛋白质和多肽的分离提纯、物理化学性质、结构与功能、蛋白质分子相互作用、蛋白质分子与其它分子(如核酸、糖类、脂类)相互作用、以及应用等。

三、决定蛋白质种类多样化的因素

在生物界,蛋白质的种类,估计在 $10^{10} \sim 10^{12}$ 数量级。20种普通氨基酸为什么能造成如此众多的蛋白质?其原因有二个:1.组成蛋白质的氨基酸的种类与数目,氨基酸的种类和数目不同,则蛋白质不同;2.多肽链上氨基酸的排列顺序,顺序不同,则蛋白质不同。后者是主要的原因。根据排列理论,由20种氨基酸组成的二十肽,其顺序异构体有: $A_{20}^{20} = 20! = 1 \times 10^{20}$ 种。如果一个分子量为34000的蛋白质含12种氨基酸,并假设,每种氨基酸在该蛋白质分子中的数目相等,则不难算出,其顺序异构体数目为 10^{300} 。蛋白质的这种顺序异构体现象,是蛋白质生物功能多样性和种属特异性的结构基础。

四、蛋白质分子的结构层次

蛋白质分子有明显的结构层次。它可以被划分为一级结构、二级结构、超二级结构、结构域、三级结构、以及四级结构。但有些蛋白质分子没有四级结构。一级结构决定空间结构。蛋白质分子的结构决定蛋白质的性质和生物功能。每一种蛋白质分子都具有特定的一级结构和空间结构,因而,亦具有特定的生物功能。

五、蛋白质对生物体的作用

蛋白质存在于一切生物体之中,是构成生物体的基本物质之一,是生命活动的物质基础。不同的蛋白质执行不同的生理功能。

(一) 酶

绝大多数酶是蛋白质。新陈代谢中所有的化学反应,几乎都是在酶的催化之下进行的。酶的缺乏或不足,会导致机体疾病的产生。

(二) 蛋白质激素

机体的新陈代谢需要激素来调节。蛋白质激素对机体的新陈代谢过程起重要的调节作用。例如:胰岛素参与血糖的代谢调节,能降低血液中葡萄糖的含量。胰岛素含量的不足,会使人和

家畜产生糖尿病。

(三) 运输蛋白

新陈代谢所需要的各种小分子物质、离子以及电子，需要适当的运输工具来运输。有些蛋白质充当了上述物质的运输工具。例如：血液中的血红蛋白分子，随着血液循环，将 O₂ 从肺运输到组织，供生物氧化之用，同时，将 CO₂ 从组织运输到肺，以便排出体外。呼吸链中的细胞色素 b 和细胞色素 c 起传递电子的作用。

(四) 运动蛋白

人和动物的运动，靠肌肉收缩来实现。参与肌肉收缩的主要成分是肌球蛋白和肌动蛋白。没有肌球蛋白和肌动蛋白，就没有人和动物的运动。鞭毛运动蛋白使细菌产生运动。

(五) 防御蛋白

为了生存，动物体产生了防御机构，用来抵抗病毒和细菌的侵害。例如：免疫球蛋白对病毒和细菌起识别和“逮捕”作用，补体则杀死病毒和细菌。干扰素消灭病毒；而溶菌酶则杀死细菌。

(六) 受体

受体是蛋白质，起接受和传递信息的作用。细胞的受体蛋白能选择性地接受激素；视网膜上的视色素，能接受光刺激；舌头上的味觉蛋白能接受味道。

(七) 膜蛋白

膜蛋白是生物膜的主要成分。生物膜的各种功能，如物质运输、细胞识别、信息传递、等生理功能，都与膜蛋白的作用有密切的关系。

(八) 结构蛋白

结构蛋白作为机体的结构成分。例如：在高等动物里，胶原蛋白参与结缔组织和骨骼，作为身体的支架；参与皮肤的构造，形成体表的保护层，以阻止微生物和灰尘的侵入。弹性蛋白参与血管壁和韧带的构造，起支持和润滑的作用。

(九) 贮藏蛋白

有些蛋白质有贮藏氨基酸的作用，用作有机体及其胚胎或幼体生长发育的原料。例如：蛋类中的卵清蛋白，乳中的酪蛋白，以及小麦种子中的麦醇溶蛋白等。

(十) 其它蛋白

有些蛋白质能调节或控制细胞的生长、分化以及遗传信息的表达。例如组蛋白、阻遏蛋白等。

总之，蛋白质是生命活动所依赖的重要的物质基础。没有蛋白质，就没有生命。

六、蛋白质的应用与开发

蛋白质在工业、农业以及医药等方面，有广泛的应用价值和开发前景，特别是在医药方面，更为突出。

(一) 医药工业

以家畜的各种内脏或人的血、尿为原料，运用现代生化技术，生产了各种宝贵的生化药品，用以治疗人类的各种疾病，有明显的疗效（表 1—1，表 1—2）。

表皮生长因子、神经生长因子、肿瘤坏死因子、干扰素、白细胞介素、红细胞生成素、集落刺

激因子、干细胞生长因子等各种细胞生长因子，具有重要的生理功能和广泛的应用前景。现在，对细胞生长因子的研究最活跃，已发现的细胞生长因子不下 100 种，还在不断的发现之中。其中，已有 10 多种用于临床。上述研究为生化药物开辟了一条新途径。

表 1—1 以猪、牛、羊的各种脏器为原料生产的各种生化药物

表 源	生 化 药 物 品 种	用 途
胰 脏	胰酶(蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶)	助消化
	弹性蛋白酶	治疗冠心病等
	DNA 酶	治疗慢性气管炎
	RNA 酶	
	胰岛素	治疗糖尿病
	激肽释放酶	治疗高血压、血管硬化症、心绞痛等
心	细胞色素 C	治疗脑缺氧、心肌缺氧等
	超氧化物歧化酶(SOD)	治疗风湿性关节炎、红斑狼疮、肺气肿、抗辐射、抗肿瘤、抗衰老等
血	超氧化物歧化酶	
	凝血酶	止血
	复合氨基酸制剂	给重病患者补充营养
胃	胃蛋白酶	助消化
	胃膜素	治疗消化道溃疡、胃酸过多等
睾丸	透明质酸酶	局部麻醉，增强剂，治疗青光眼
胸腺	胸腺激素(多肽混合物)	增强免疫力，治疗免疫缺陷病、自身免疫病、支气管哮喘等
肺	抑肽酶	治疗急性胰腺炎等
肝	超氧化物歧化酶	
脑垂体	促肾上腺皮质激素(ACTH)	治疗风湿性关节炎、红斑狼疮、过敏症等
	生长激素(GH)	促进动物生长
	催产素(九肽)	促分娩
甲状腺	降钙素(32 肽)	降低血钙、治疗骨质疏松症、成人高血钙症、畸形性骨炎、十二脂肠溃疡等

表 1-2 从人的血、尿中生产的生化药物

来 源	生 化 药 物 品 种	用 途
男人尿	尿激酶	治疗各种血栓病
	激肽释放酶	
	胰蛋白酶抑制剂	治疗急性胰腺炎等
	集落刺激因子(CSF)	
	表皮生长因子(EGF)	促表皮细胞生长、促伤口愈合、治疗胃溃疡、角膜损伤等
人 血	白蛋白	治疗失血性休克、严重烧伤、低蛋白血症等
	α -干扰素(IFN - α)	治疗病毒性疾病、恶性肿瘤等
	白细胞介素-2(IL - 2)	治疗免疫性疾病、艾滋病、癌症等
	血纤维溶酶原	溶解血栓，治疗血栓病
	纤维蛋白原	止血
	免疫球蛋白	预防流行性疾病，如肝炎、水痘、脊髓灰质炎等
	抗凝血酶Ⅲ(AT - Ⅲ)	使凝血酶失活动，抗凝血
	凝血因子Ⅶ、Ⅸ	止血
	SOD	
孕妇尿	α_2 -巨球蛋白	抑制纤溶酶
	绒毛膜促性腺激素(HCG)	保胎、作避孕疫苗、诊断怀孕等
绝经妇女尿	老年激素(HMG)	防治不育病、促子宫发育、保持青春等

(二) 食品工业

蛋白质是食品中重要的营养成分，为人体和家畜、家禽提供各种必需氨基酸。肉制品、乳制品、蛋制品以及豆腐，是传统的蛋白质食品。由于世界人口不断的增长，蛋白质资源的不足，因此，需要开发新的蛋白质食品。大豆、花生、棉籽、油菜籽、藻类、酵母等，是新蛋白质食品的重要原料。现在，对上述原料正在研究开发，有的已经开发成功。例如：以大豆为原料，已经生产浓缩蛋白、分离蛋白、纺丝蛋白、组织状蛋白、脱脂大豆粉，以及豆奶等产品。

食品营养对于人体素质的提高极为重要。现在，高血压、心脏病、糖尿病、肥胖症的发病率在大幅度上升。人们要求健康、长寿，希望吃保健食品。保健食品正在大发展之中，已经成为食品工业的新潮流。目前，保健食品中受重视的有效成分有好多种。其中，包括超氧化物歧化酶和蚯蚓激酶。蚯蚓激酶(地龙蛋白)作为保健食品，从 70 年代起，日、美、加、韩等国正在大量研究开发，用以防治心脑血管疾病。用修饰的超氧化物歧化酶作保健食品，亦正在研制之中，用以防治糖尿病、老年性白内障、心血管病等。 α -淀粉酶、糖化酶以及葡萄糖异构酶在淀粉糖生产过程中发挥了重要的作用。例如：利用糖化型 α -淀粉酶将淀粉制成饴糖；利用液化型 α -淀粉

酶将淀粉制成糊精；利用糖化酶将糊精制成具有广泛应用价值的葡萄糖；利用葡萄糖异构酶将葡萄糖制成高甜度的果糖。

(三) 发酵工业

酵母细胞不能利用淀粉进行发酵。因此，培养基中的淀粉必须事先通过 α -淀粉酶的液化和糖化酶的糖化，才能被酵母细胞利用，进行发酵。

(四) 饲料工业

地球上大量存在的纤维素，除了食草动物而外，一般不能被家畜、家禽消化吸收。从绿色木霉、黑曲霉中制备的纤维素酶，能够将稻草、锯木屑、废纸中的纤维素水解成葡萄糖。现在，已开始小规模生产，有重大的开发价值。由纤维素生产的葡萄糖，主要作为动物饲料，也可以作为发酵工业的培养基成分，用以生产酒精、丙酮、各种化工产品、抗菌素以及各种酶等。

(五) 纺织工业

用富含 α -角蛋白的羊毛为原料，可以生产毛线和毛织品。用木瓜蛋白酶或菠萝蛋白酶除去羊毛表面的鳞垢，可以使染色率提高~30%，提高羊毛质量。用富含丝心蛋白的蚕丝为原料，可以生产绸缎。用碱性蛋白酶或中性蛋白酶从蚕丝上脱下丝胶蛋白，可以使蚕丝手感润滑柔软，光泽鲜艳、牢度增加。

(六) 制革工业

用富含胶原蛋白的动物（牛、马、猪等）皮作原料，可以生产具有多种用途的皮革。在制革过程中，用碱性蛋白酶或中性蛋白酶处理，可以使动物皮脱毛、软化、提高皮革质量。

总之，蛋白质在工业、农业以及医药等方面，有广泛的应用价值和开发前景。

思 考 题

1. 什么是蛋白质？决定蛋白质种类多样化的因素是哪些？
2. 蛋白质对生命的重要性表现在哪些方面？
3. 蛋白质在工、农、医方面有哪些应用？
4. 蛋白质分子结构可以分为哪些结构层次？
5. 蛋白质化学研究哪些内容？

第二章 蛋白质的物理化学性质

蛋白质是由氨基酸组成的高分子化合物。其理化性质一部分与氨基酸相似；如：两性解离、等电点、呈色反应、成盐反应等；但也有一部分理化性质又不同于氨基酸，如：高分子量、胶体性质、沉降、沉淀、变性、变构等。变性和变构在第七章叙述，现择其主要理化性质分述如下：

一、蛋白质分子的大小形状

用高分辨率的电子显微镜能够显示蛋白质分子的形状。蛋白质分子有一定的形状。大多数蛋白质分子是近似球形的或椭球形的，如：肌红蛋白、血红蛋白、胰岛素、免疫球蛋白、溶菌酶等；少数蛋白质分子是纤维状的或细棒状的，如：血纤维蛋白、胶原蛋白、丝心蛋白、 α -角蛋白等。蛋白质具有一定的分子量。不同的蛋白质有不同的分子量。其分子量，小者数千，大者数千万，但大多数蛋白质在 $10^4 \sim 10^8$ 数量级，如表 2-1 所示。

表 2-1 蛋白质的分子量

蛋白质	分子量	蛋白质	分子量
胰岛素(单体)	6,000	淀粉酶	215,000
细胞色素 C(马心)	13,000	过氧化氢酶	240,000
肌红蛋白(马)	16,000	黄嘌呤氧化酶	275,000
卵白蛋白	44,000	乳酸脱氢酶	330,000
血红蛋白(马)	68,000	脲酶	483,000
血清白蛋白(马)	70,000	斑纹病毒(烟草)	60,000,000

可以采用不同的方法测定蛋白质分子量，如表 2-2 所示。其中，超离心法、凝胶过滤法，以及 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳法，常用来测定蛋白质的分子量。

表 2-2 蛋白质分子量的测定方法

方 法	说 明
凝胶过滤法： 1、柱层析 2、薄层凝胶层析	设备简单，操作方便，快速易行，样品用量少，不要求样品均一，达到较高纯度即可，误差 $\pm 10\%$ ，最常用。
聚丙烯酰胺凝胶浓度梯度电泳法	设备简单，样品浓度可以很稀，可以测定天然构象状态下的蛋白质分子量，适用于球蛋白，但不适用于纤维蛋白。
SDS—凝胶电泳法	设备简单，操作简便，重复性好，样品用量少，常用于测定亚基分子量，误差 $\pm 10\%$ 。
超离心法： 1、沉降速度法 2、沉降平衡法	较准确，常用法，需贵重的分析性超速离心机，一般实验室不能具备。
光散射法	需激光小角散射仪，可以用来研究分子量的迅速变化。
渗透压法	需渗透压计，现在不常用。
粘 度 法	需粘度计，很少用。
电 镜 法	需高分辨率的电子显微镜，很少用。
X 光衍射法	需高分辨率的 X 光衍射仪，很少用。
荧光偏振法	
化学分析法	