

现代动物 生物化学

●汪玉松 邹思湘 张玉静 主编

**XIANDAI DONGWU
SHENGWUHUAXUE**

中国农业科技出版社

现代动物生物化学

XIAN DAI DONG WU SHENG WU HUA XUE

汪玉松 邹思湘 张玉静 主编

中国农业科技出版社

(京)新登字 061 号

图书在版编目(CIP)数据

现代动物生物化学/汪玉松, 邹思湘, 张玉静主编.-北京: 中国农业
科技出版社, 1999.3

ISBN 7-80119-599-X

I. 现 … II. ①汪 …②邹 …③张 … III. 动物学: 生物化学 N. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 10739 号

责任编辑	沈 银 书	
出版发行	中国农业科技出版社	
	(北京海淀区白石桥路 30 号 邮编: 100081)	
经 销	新华书店北京发行所	
印 刷	解放军农牧大学印刷厂	
开 本	787×1 092 1/16	印张: 29.00
印 数	1~2 000 册	字数: 700 千字
版 次	1999 年 3 月第 1 版	1999 年 3 月第 1 次印刷
定 价	38.00 元	

《现代动物生物化学》编委会

主 编 汪玉松 邹思湘 张玉静

副主编 杨国宇 赵建军 欧阳红生

编 者 (以姓氏笔画为序)

王清吉	龙良启	汤艾非	刘万臣	刘松财
刘晓明	任明强	汪玉松	张永亮	张玉静
杨国宇	邹思湘	郑玉才	姜礼胜	赵建军
崔建华	欧阳红生			

前 言

生物化学在 20 世纪取得了巨大的发展,数理科学广泛而又深刻地渗透到生物学的各个领域,全面改变了这门学科的面貌,由此应运而生的分子生物学,又极大地扩展了生物化学的内涵。分子生物学的兴起还不到半个世纪,而一系列新的理论和技术成就不断涌现出来,令人们兴奋不已,目不暇接。一些传统的观点正在受到质疑和挑战。许多新的研究成果,已经和正在工业、农业以及医药卫生等各个领域发挥着重要作用并展示出广阔的前景。把现代生物化学和分子生物学的新发展尽可能全面系统地介绍给大家已是一项十分迫切的工作。

编写一本适用于畜牧、兽医、水产养殖、动物营养、兽医公共卫生、生物制药、食品等专业研究生、科研人员和教师使用的现代动物生物化学参考书是学科发展的需要,也是我们多年的愿望。直到 1997 年夏,全国高等农业院校研究生生物化学教学大纲审定会(山东泰安)的召开,使大家更加明确了目标,加快了编写的进度。本书共分 20 章。除了系统阐述现代生物化学基本理论和基本知识,注意突出动物科学特点,还较为详细地介绍了生物化学在蛋白质变性复性、活性肽、核酶和抗体酶、分子克隆、基因表达调控、细胞信号转导、生物大分子的膜转运等领域的重大进展,较为系统完整地阐述了动物机体代谢联系及调节机理。并对酶的动力学和催化活性调节、基因工程在动物科学中的应用、主要生化技术的原理及进展作了充分的讨论。

参加本书编写的成员都有一定的教学经验和科研实践,但学科发展日新月异,使我们深感学识浅薄,加之编者经验不足,致使本书虽经多次讨论、修改和审校,疏漏和错误仍然难免,热忱期望专家、读者批评指正。

本书的编写得到了中国农业大学齐顺章教授的热情鼓励。国务院学位委员会兽医学科组组长、中国畜牧兽医学会全国动物生理生化分会理事长、南京农业大学陈杰教授对本书的出版给予了有力支持和热忱推荐。中国生物化学和分子生物学会理事、农业生化专业委员会理事长、中国农业大学周顺伍教授对本书作了详细的审阅并提出宝贵的意见。编者所在各院校,特别是主编和副主编所在的解放军农牧大学、南京农业大学和河南农业大学给予了极大支持,在此一并表示诚挚的感谢。

编 者

1999 年 1 月

内 容 提 要

本书共 20 章。第 1 至 6 章介绍蛋白质的结构和功能及蛋白质分离纯化与鉴定的基本技术;第 7 至 11 章介绍生物催化剂,包括酶催化机理、酶促反应动力学、酶活性调节、核酶及抗体酶;第 12 至 17 章介绍遗传分子结构和功能及调节,包括核酸的结构、DNA 复制、转录、蛋白质生物合成、基因表达的调控、基因工程原理及其在动物科学中的应用;第 18 至 20 章讨论生物膜与物质转运、细胞信号转导机制及动物机体物质代谢相互联系及调节。书中对现代生物化学和分子生物学的基本理论与基本知识作了重点论述,并对学科的新发展、新成果作了较为详细的介绍,突出动物科学特点。

本书可作为畜牧、兽医、水产养殖、动物营养、兽医公共卫生及食品专业的研究生、科研人员和教师的参考书,对其他从事生物科学技术工作的教学和科研人员也有参考价值。

目 录

第 1 章 蛋白质的一级结构	1
1-1 蛋白质的构件分子	1
1-2 肽键与肽链	3
1-3 蛋白质一级结构内容	5
1-4 蛋白质一级结构的测定方法与原理	5
第 2 章 蛋白质一级结构与功能的关系	17
2-1 同源蛋白质一级结构差异与分子进化	17
2-2 同种蛋白质一级结构差异与分子病	23
2-3 活性肽一级结构与功能	24
第 3 章 蛋白质分子构象	31
3-1 蛋白质结构的层次	31
3-2 维持蛋白构象的化学键	31
3-3 主链构象	34
3-4 侧链构象	39
3-5 蛋白质分子的二级结构	40
3-6 超二级结构和结构域	43
3-7 蛋白质分子的三级结构	50
3-8 蛋白质分子的四级结构	53
3-9 蛋白质分子的缔合	54
第 4 章 蛋白质构象与功能的关系	58
4-1 分子识别	58
4-2 蛋白质的折叠	61
4-3 蛋白质空间结构的测定和预测	67
4-4 蛋白质的变性	71
4-5 蛋白质的变构	75
4-6 构象的运动性	79
第 5 章 糖蛋白	82
5-1 糖蛋白的种类与分布	82
5-2 糖蛋白的组成	83
5-3 糖蛋白的结构	84
5-4 糖链的生物合成	90
5-5 糖蛋白的功能	91
第 6 章 蛋白质的分离纯化与鉴定	97

6-1	分离纯化蛋白质的意义	97
6-2	蛋白质分离纯化的一般程序	97
6-3	前处理	98
6-4	蛋白质的分离纯化方法	100
6-5	蛋白质的纯度鉴定	106
第 7 章	酶的催化机理	120
7-1	酶的化学结构与活性中心	120
7-2	酶降低反应活化能的机理	127
第 8 章	酶促反应动力学	132
8-1	化学反应动力学	132
8-2	底物反应动力学	133
8-3	抑制反应动力学	141
第 9 章	酶活性的调节	152
9-1	别构调节	152
9-2	酶的化学修饰	162
9-3	限制性蛋白水解对酶活性的调节	168
第 10 章	核酶的催化作用	172
10-1	概述	172
10-2	剪接型核酶	173
10-3	剪切型核酶	180
10-4	核酶的应用	186
第 11 章	抗体酶	187
11-1	抗体酶的催化特征	187
11-2	抗体酶的催化作用机理	189
11-3	抗体酶的催化反应类型	192
11-4	抗体酶的制备	194
11-5	抗体酶的应用前景	198
第 12 章	核酸的结构	200
12-1	DNA 的结构	200
12-2	RNA 的结构	221
第 13 章	DNA 的复制	234
13-1	DNA 复制过程基本要点	234
13-2	复制过程所需主要酶类及相关蛋白	242
13-3	原核生物 DNA 复制模型和真核生物 DNA 复制的特点	250
13-4	DNA 的损伤及修复	255
13-5	在 RNA 指导下 DNA 的合成 (逆向转录)	259
第 14 章	基因转录与转录后加工	262

14-1	原核生物基因的转录	262
14-2	真核生物基因的转录	271
第 15 章	蛋白质生物合成	282
15-1	遗传密码	282
15-2	核糖体	287
15-3	原核生物蛋白质生物合成的过程	289
15-4	真核生物的蛋白质生物合成	293
15-5	蛋白质生物合成初始产物的后处理	299
15-6	蛋白质生物合成的抑制剂	301
第 16 章	基因表达的调控	303
16-1	原核生物基因表达的调控	303
16-2	真核生物基因表达的调控	316
第 17 章	基因工程的原理和应用	337
17-1	基因工程一般原理	337
17-2	基因工程技术在动物科学中的应用及其前景	354
第 18 章	生物膜与物质转运	358
18-1	膜的化学组成	358
18-2	生物膜研究技术	362
18-3	生物膜的结构与特性	365
18-4	生物膜的转运功能	371
第 19 章	细胞信号转导机制	381
19-1	信号转导的生理意义	381
19-2	细胞间和细胞环境间信号转导的类型	381
19-3	细胞信号转导中的配体与受体	383
19-4	细胞信号转导机制	386
19-5	细胞信号转导的基本规律	408
19-6	细胞信号转导的研究前景	410
第 20 章	动物机体物质代谢的相互关系及调节	411
20-1	动物机体物质代谢的基本要略和调节方式	411
20-2	动物机体物质代谢关系概述	414
20-3	动物机体中主要物质代谢途径的调节	417
20-4	动物组织器官的代谢特点	423
20-5	非反刍动物与反刍动物糖、脂代谢的比较	428
20-6	物质代谢的整体调节	428
名词索引		435
主要参考文献		450

第 1 章 蛋白质的一级结构

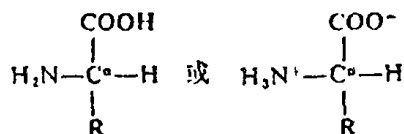
蛋白质(Protein)是一类生物大分子,是生物体最重要的组成成分。其含量丰富,种类繁多,如在单细胞的大肠杆菌就含有 3 000 余种不同结构的蛋白质,复杂的动物体含有 10 万种以上,在整个生物界天然蛋白质估计约有百亿种之多。不同的蛋白质结构,体现各种不同的特殊功能,在生命活动过程中起非常重要的作用。

蛋白质的功能,都与它的一级结构和空间结构密切相关。一级结构是空间结构的基础。一定的蛋白质结构决定特定的功能。

本章简要介绍蛋白质的构件分子(氨基酸)、肽键与肽链的基本结构、一级结构的内容和测定的原理。

1-1 蛋白质的构件分子

蛋白质构件分子(Building block molecule)是氨基酸(Amino acid)。氨基酸是蛋白质的基本结构单位。自然界存在的氨基酸有 300 多种,但合成蛋白质的氨基酸只有 20 种,都属于 α -氨基酸。其中除甘氨酸外,其余都是 L- α -氨基酸。天然存在的肽类中,有的含 D-系或 β -氨基酸。除脯氨酸为 α -亚氨基酸外,其余 19 种氨基酸都有一部分相同的结构和不同的侧链(R-基团),通式为:



L- α -氨基酸

在 20 种氨基酸中,按侧链(R-基团)的极性和有无电荷分为非极性侧链氨基酸(表 1-1 的 1~9)、不带电荷的极性侧链氨基酸(表 1-1 的 10~15)、带电荷的极性侧链氨基酸(表 1-1 的 16~20)。其中 Asp、Glu 带负电荷,His、Lys、Arg 带正电荷。

蛋白质分子中的 20 种氨基酸在 DNA 分子中有它们特异的遗传密码(Genetic code)相对应,因而也称编码氨基酸(Coding amino acid)。新近发现的硒代半胱氨酸(Selenocysteine, Se-Cys)也是一种编码氨基酸,在原核生物和真核生物的某些蛋白质中都已发现,但种类不多,所以未列入。此外,原核生物中起始甲酰蛋氨酸不出现在成熟蛋白质中,所以也不计在内。现将 20 种编码氨基酸的中英文名称、缩写代号、侧链结构及主要特性列出,如表 1-1、表 1-2 所示。中文名称的第 1 个字母和英文名称前 3 个字母为其缩写代号。现多采用英文单字母代号。

在天然蛋白质中还存在一些非编码氨基酸。这些氨基酸都是在蛋白质合成后或合成过程中由相应的氨基酸残基经过修饰而成的,包括胱氨酸(Cystine)、羟赖氨酸(Hydroxylysine)、羟脯氨酸(Hydroxyproline)、醛基赖氨酸(Allysine)、磷酸丝氨酸(Phosphoserine)、焦谷氨酸(Pyroglutamic acid)、羧基谷氨酸(Carboxylglutamate)、甲基组氨酸(Methylhistidine)、甲基赖氨酸(Methyllysine)等。

表 1-1 蛋白质分子中的编码氨基酸

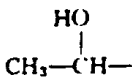
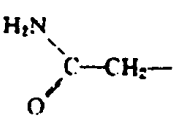
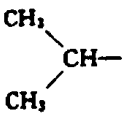
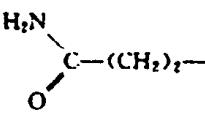
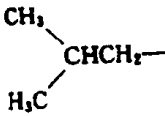
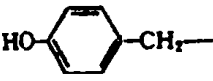
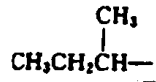
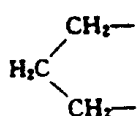
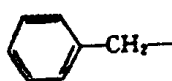
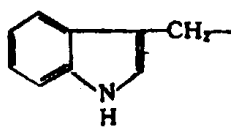
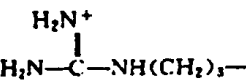
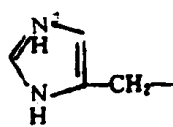
名称(缩写代号)	侧链结构(R-)	名称(缩写代号)	侧链结构(R-)
1. 甘氨酸(甘) Glycin (Gly, G)	H—	11. 苏氨酸(苏) Threonine (Thr, T)	
2. 丙氨酸(丙) Alanine (Ala, A)	CH ₃ —	12. 天冬酰胺(天胺, 天- NH ₂) Asparagine (Asn, N)	
3. 缬氨酸(缬) Valine (Val, V)		13. 谷氨酰胺(谷胺, 谷- NH ₂) Glutamine (Gln, Q)	
4. 亮氨酸(亮) Leucine (Leu, L)		14. 酪氨酸(酪) Tyrosine (Tyr, Y)	
5. 异亮氨酸(异) Isoleucine (Ile, I)		15. 半胱氨酸(半) Cysteine (Cys, C)	HS—CH ₂ —
6. 蛋氨酸(蛋) Methionine (Met, M)	CH ₃ S(CH ₂) ₂ —	16. 天冬氨酸(天) Aspartic acid (Asp, D)	—OOCCH ₂ —
7. 脯氨酸(脯) Proline (Pro, P)		17. 谷氨酸(谷) Glutamic acid (Glu, E)	—OOC(CH ₂) ₂ —
8. 苯丙氨酸(苯) Phenylalanine (Phe, F)		18. 赖氨酸(赖) Lysine (Lys, K)	H ₃ N ⁺ —(CH ₂) ₄ —
9. 色氨酸(色) Tryptophan (Trp, W)		19. 精氨酸(精) Arginine (Arg, R)	
10. 丝氨酸(丝) Serine (Ser, S)	HO—CH ₂ —	20. 组氨酸(组) Histidine (His, H)	

表 1-2 蛋白质分子中编码氨基酸的性质

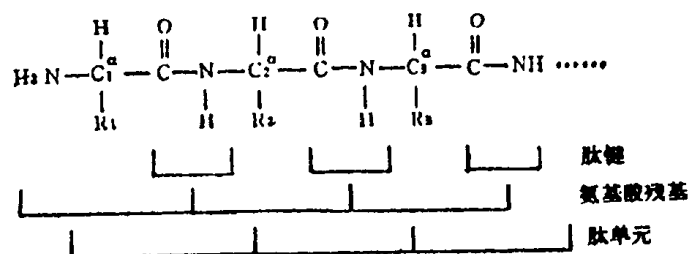
名称	pK ₁ (α -羧基)	pK ₂ (α -氨基)	pK _R (侧链)	pI	残基 分子量	蛋白质中含量 (mol/L)
Gly	2.35	9.78	—	6.07	57.06	75
Ala	2.35	9.87	—	6.11	71.08	90
Val	2.29	9.74	—	6.02	99.14	69
Leu	2.33	9.74	—	6.04	113.17	75
Ile	2.32	9.76	—	6.04	113.17	46
Met	2.13	9.28	—	5.71	113.21	17
Pro	2.95	10.65	—	6.80	97.12	46
Phe	2.16	9.18	—	5.67	147.18	35
Trp	2.43	9.44	—	5.94	186.21	11
Ser	2.19	9.21	—	5.70	87.08	71
Thr	2.09	9.10	—	5.60	101.11	60
Asn	2.10	8.84	—	5.47	114.11	44
Gln	2.17	9.13	—	5.65	128.14	39
Tyr	2.20	9.11	10.13	5.66	163.18	35
Cys	1.92	10.78	8.33	5.07	103.14	28
Asp	1.99	9.90	3.90	2.95	115.09	55
Glu	2.10	9.47	4.07	3.09	129.12	62
Lys	2.16	9.18	10.79	9.99	113.17	75
Arg	1.82	8.99	12.48	10.74	156.20	47
His	1.80	9.33	6.04	7.69	137.15	21

1-2 肽键与肽链

1-2-1 肽键

蛋白质分子是由构件分子氨基酸通过肽键(Peptide bond)连接而成的多聚生物大分子多肽(Polypeptide)。

肽键是一分子氨基酸的 α -羧基与另一分子氨基酸的 α -氨基脱水缩合而成的酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}-$),是蛋白质结构中的主键。肽键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 residue)。由肽键连接各氨基酸残基形成的长链骨架称为多肽链主链,连接于 C^α 上的各氨基酸残基(R-基团)统称为多肽链的侧链。多肽链结构中的 $-\text{C}^\alpha-\text{CO}-\text{NH}-$ 或 $-\text{C}^\alpha-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}^\alpha-$ 结构是肽链骨架重复单位,称肽单元(Peptide unit)。肽单元和氨基酸残基的结构比较如下:



多肽链就是由许多肽单元的 α -碳原子(C^α)互相连接而成。肽单元是各种构象的结构基础,由于肽单元的互相旋转,使主链出现各种构象。

肽键易被酸、碱和蛋白质水解酶水解。水解肽键的酶有内肽酶(Endopeptidase)和外肽酶(Exopeptidase)两大类。内肽酶水解的肽键对氨基酸种类有选择性,而外肽酶中羧基肽酶(羧肽酶)和氨基肽酶(氨肽酶),分别水解肽链游离的 C-末端和 N-末端的氨基酸,对氨基酸的种类无特殊选择性。这些水解酶类,是蛋白质分子氨基酸序列分析时的工具酶。

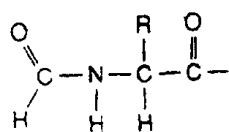
1-2-2 肽链

肽的命名,是根据参与其组成的氨基酸残基来确定的。通常从肽链的氨基($-NH_2$)末端氨基酸残基开始,称为某氨基酰某氨基酰……氨基酸。如依次由丝氨酸、甘氨酸、酪氨酸、丙氨酸和亮氨酸组成的 5 肽,称为丝氨酰甘氨酰酪氨酰丙氨酰亮氨酸。一般由 10 个以下氨基酸残基组成的肽称寡肽(Oligopeptide),而由 10 个以上氨基酸残基组成的肽称多肽。因为多肽呈链状,所以又称为多肽链(Polypeptide chain)。

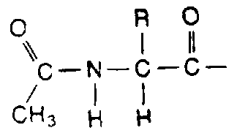
一条多肽链通常有两个游离末端。一末端是未参与肽键形成的 α -氨基,称为氨基端(Amino terminal),简写 $-NH$ 末端或 N-末端,用 H-表示,习惯上写在肽链的左侧;另一末端是 α -羧基,称为羧基端(Carboxy terminal),简写 $-COOH$ 末端或 C-末端,用-OH 表示,写在肽链的右侧。

多肽链的 N-末端与 C-末端有时也可再形成肽链连接,而形成环形多肽,见于某些抗生素。当谷氨酸成为多肽链的 N-末端时,如免疫球蛋白的 λ 链及 γ -1 链,常可脱水形成焦谷氨酸,简称焦谷。

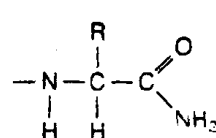
有些多肽链中的 N-末端被 N-甲酰基(N-formyl)或 N-乙酰基(N-acetyl)封闭,少数 C-末端的氨基酸残基被修饰而形成酰胺基(如甘氨酰胺)。



N-甲酰基



N-乙酰基



C-酰胺基

在肽链中,除肽键是主要连接方式之外,在一条肽链之内或两条肽链之间还可通过二硫键($-S-S-$)连接起来,二硫键在多肽链或蛋白质分子结构中是一种常见的共价连接键。如猪赖氨酸加压素、牛乳 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白分子内的二硫键及牛胰岛素分子内和分子间的二硫键等。二硫键在巯基化合物存在下可被还原为自由巯基($-SH$),因而二硫键的形成是可逆反应。二硫键对蛋白质构象有稳定作用。

在体内,除构成蛋白质的多肽链之外,还存在一些具有生物活性的短肽,称为活性肽(Active peptide)或生物活性肽(Bioactive peptide, BAP)。活性肽在体内具有重要的生物功能。

多肽和蛋白质都是氨基酸的多聚物,多肽是指氨基酸残基较少的多聚物,而蛋白质则是指氨基酸残基较多的多聚物。多与少的界限也很难明确划分。习惯上,把由 39 个氨基酸残基组成的促肾上腺激素(ACTH)作为多肽,而把 51 个氨基酸残基组成的胰岛素归为蛋白质。一般以 50~100 个氨基酸残基组成作为界限,但也并非绝对。多肽与蛋白质之间的界限不能简单地由氨基酸残基数或分子量大小来决定,还得看分子空间结构的稳定性。有生物功能的多肽和蛋

白质都是有序结构,但多肽一般不具有稳定的空间结构,所以在加热、加酸后无变性作用,而蛋白质具有特定且复杂的空间结构和新的性质。人们为了叙述方便,多肽与蛋白质常混为一体,如化学性质为多肽或蛋白质的激素统称多肽激素,多肽与蛋白质的化学统称为多肽化学等。多肽和蛋白质又都对蛋白水解酶敏感,两者无绝对区别,因此,虽大多数人认为胰岛素是蛋白质,但仍有人称之为多肽。

1-3 蛋白质一级结构内容

蛋白质一级结构(Primary structure)是指多肽链中氨基酸的排列顺序(Sequence),也称化学结构。一级结构是蛋白质分子的基本结构,是高级结构的基础。一级结构内容,包括多肽链数目,每一条多肽链中末端氨基酸种类,每一条多肽中氨基酸的数目、种类和排列顺序,链内和链间二硫键的位置和数目。

蛋白质一级结构是由遗传信息决定的,信息量很大,20种不同氨基酸组成包含有100个氨基酸的蛋白质理论上就有 100^{130} 种结构形式。可见蛋白质一级结构也是蛋白质结构与功能多样性和高度特异性的基础。

一级结构表示方法,一般都从左到右,即N-末端到C-末端。序号以氨基末端为1号,自左向右排列,氨基酸顺序用代号表示。每一代号间用一点或一横线隔开,有时不用。N-末端用—H或—NH₂标明,C-末端用—OH或—COOH标明,有时不用。

1-4 蛋白质一级结构的测定方法与原理

蛋白质一级结构的测定是蛋白质高级结构和酶活性部位的研究的前提,并为生物进化的研究提供重要依据。

英国科学家 Sanger(1954)发表了胰岛素的全部氨基酸排列顺序,揭开了测定蛋白质一级结构的序幕,是生物化学和分子生物学发展过程的一个重要突破。随后,Moore 等改进了 Sanger 的方法,测定了核糖核酸酶的一级结构。随着测序技术的不断改进,一系列新技术的问世,如蛋白质的层析技术、电泳技术、多种自动分析仪的使用,使测序的精确度越来越高,速度越来越快,亦使测序工作向自动化迈进了一步。已测出的最大的蛋白质有1 000多个氨基酸残基的序列。

自DNA测序工作开展以来,迄今DNA测序效率已超过蛋白质测序的效率。这样,可先测出DNA的序列,再翻译出相应的蛋白质的一级结构,有时如此操作反而来得快速、精确。

一级结构测定方法的基本战略是用两套断链方法分别将纯化的蛋白质的肽链专一性地裂解成肽段;再将各个肽段分离纯化,并测定每个肽段的顺序;然后比较两套肽段氨基酸顺序以排定蛋白质一级结构。从原则上讲,只要两套断链方法的切点都不相同,就能得出蛋白质一级结构。

具体测定的主要内容包括:测定前的准备、氨基酸组成的测定、肽链的拆离与纯化、末端氨基酸的测定、肽链的专一性裂解与肽段的分离纯化、肽段氨基酸顺序的测定、蛋白质一级结构的建立、蛋白质分子中二硫键位置的确定等。

1-4-1 一级结构测定前的准备

1. 蛋白质的纯化 蛋白质序列测定对蛋白质样品的纯度要求很严。如果含有一定量的杂蛋白,一级结构研究将是没有意义的。一般要求蛋白质的纯度必须达到 98% 以上。这样的样品,通常需用层析和电泳纯化。如用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和高效液相层析(High performance liquid chromatography, HPLC)等。从 SDS-PAGE 纯化的蛋白质必须经过特殊处理,使 SDS 浓度低于 0.0005%,否则 SDS 会影响到胰蛋白酶的酶解,也会大大降低 HPLC 分离肽时的分辨力。在 SDS-PAGE 后采用电印迹(Blotting)到 PVDF 膜上,这也是常用的方法,经过这样处理,能用 CNBr 化学裂解或酶解。如果蛋白质是用反相 HPLC 纯化的,因为流动相是挥发性溶剂,应进一步利用真空离心干燥或冻干除去溶剂;如果蛋白质是用离子交换 HPLC 或疏水 HPLC 或凝胶过滤 HPLC 纯化的,则要进行脱盐。

蛋白质纯度鉴定方法通常有分析电泳和层析法(常用 HPLC)。近年来,质谱法在生物大分子中的应用也很活跃。化学方法检测蛋白质末端的均一性也是评价纯度的好方法。

2. 蛋白质分子量的测定 蛋白质分子量的测定对研究蛋白质肽链组成是很重要的。测定蛋白质的分子量常用凝胶过滤、SDS-PAGE、超速离心等方法。近年来毛细管电泳测定蛋白质分子量,所需蛋白质的量和测定的精确性都优于 SDS-PAGE;质谱,尤其是电喷雾质谱的发展,可在 pmol 水平上测定蛋白质的分子量,精确度约为 0.02%。

3. 蛋白质多肽链数目和大小的测定 将待测蛋白质作还原型 SDS-PAGE 分析,若分子量变小,则说明此蛋白质是由 2 条以上多肽链组成。根据几条多肽链是非共价键结合或以二硫键连接的不同,采取不同的方法将肽链分离出来,再分别测定每一条链的一级结构。如果链是相同的,就不需要分离。

4. 封闭自由巯基 蛋白质分子中的游离巯基必须封闭,否则在纯化肽段时易氧化为各种产物,包括形成无序的二硫键,因此需将半胱氨酸先转变成稳定的衍生物。常用碘代乙酸烷化,因为这个反应是快速和专一的,同时这类试剂保存在暗处很稳定。

5. 去除 N-端封闭的基团 蛋白质 N-端有时会被封闭,应用相应的方法去除一些 N-端封闭基团,如去除 N-乙酰丝氨酸和 N-乙酰苏氨酸残基,去除 N-甲酰蛋氨酸的甲酰基,去除 N-端的焦谷氨酸,去除 N-乙酰基封闭的氨基酸残基等。

1-4-2 氨基酸组成的测定

在蛋白质测序前测定氨基酸组成,可推算出蛋白量的可靠值和了解蛋白质中氨基酸的分布情况;在蛋白质测序中,有时可能由于蛋白质 N-端封闭或可能样品本身不是蛋白质或大部分是非蛋白质而测不出结果时,氨基酸组成测定是解决这些问题的有效手段。

1. 蛋白质的水解 在测定氨基酸组成之前,将蛋白质水解成游离氨基酸。蛋白质的水解一般有酸水解、碱水解和酶水解三种方法。最常用的是酸水解法,常规方法是采用 5.7mol/L HCl,真空状态下,在 110℃ 水解 24h,也有在 150℃ 快速水解 90min。评价降解蛋白质方法的有效性,应从降解蛋白质效果和待分析样品的回收两方面来评价。

在酸水解过程中,色氨酸全部被破坏,所以要另取样品用碱水解后,再进行分析,或在水解液中添加巯基乙醇作为保护剂。丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸等含羟基的氨基酸会有一部分遭受破

坏,可以用 24h、48h 及 72h 水解结果,用内推法求得零时各氨基酸的数量,就是该氨基酸的真正含量。天冬酰胺和谷氨酰胺在水解后转变成天冬氨酸和谷氨酸,但是含有酰胺氨基酸和没有酰胺氨基酸的肽段,其电泳结果不同,所以在氨基酸成分测定后再辅以电泳法,即可解决。含硫氨基酸,如半胱氨酸,胱氨酸及蛋氨酸均易被氧化,最好方法是用过甲酸(Performic acid)来氧化成氧化物,再进行分析。

酶水解一般不能将蛋白质彻底水解成游离氨基酸,因此,做氨基酸分析时常不采用。碱水解法虽属完全水解,但遭到破坏的氨基酸较多,所以也不采用。

2. 氨基酸的组成 蛋白质完全水解为游离氨基酸,然后冷却、干燥,进行氨基酸组成的分析。氨基酸组成分析可分为柱后分析法和柱前分析法两大类。前一类方法是将游离氨基酸经过层析柱分离后,各种氨基酸再与显色剂(茚三酮、荧光胺、邻苯二甲醛)作用,这类方法比较稳定,对样品预处理要求低,容易定量和自动化操作,但检测灵敏度不高,分析时间长。后一类方法是将氨基酸和化学偶联试剂反应生成氨基酸衍生物,然后再用层析柱将各种衍生物分离,直接检测衍生物的光吸收或荧光发射,此类方法可检测 OPA-、PTC-、PTH-、DABS-、Dansyl-和 DABTH-氨基酸,分析灵敏度高,可用 HPLC 进行氨基酸分析,缺点是有的衍生物不稳定,衍生试剂可能干扰氨基酸检测。

经典的氨基酸组成分析法是茚三酮法。水解后氨基酸样品,用自动氨基酸分析仪经离子交换层析相继分离,各种氨基酸与茚三酮(Ninhydrin)反应形成紫色化合物,与脯氨酸和羟脯氨酸形成黄色化合物。显色后溶液在 570nm 及 440nm 波长测定光吸收。从记录峰面积可以计算出样品中各氨基酸的含量。现在有自动进样、氨基酸分析和定量报告联为一体的氨基酸自动分析仪出售,可自动得出结果。茚三酮柱后法氨基酸图谱如图 1-1 所示。

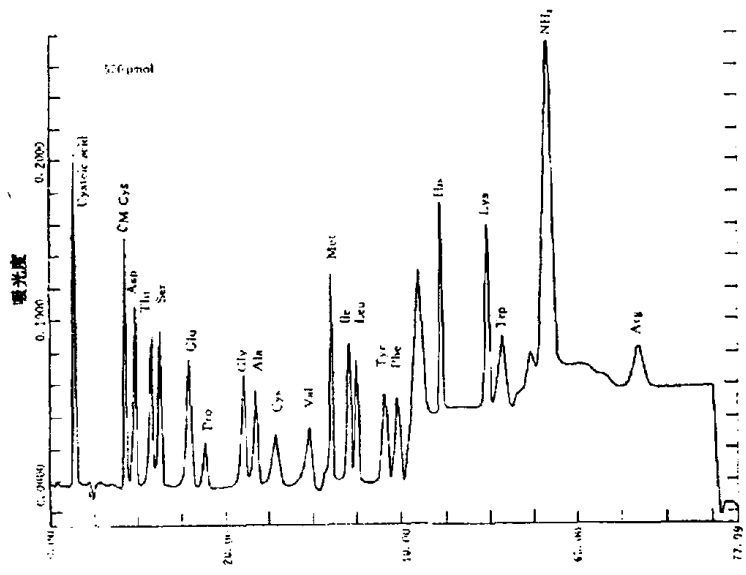


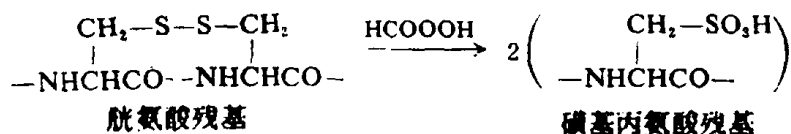
图 1-1 茚三酮柱后法氨基酸图谱

1-4-3 肽链的拆离与纯化

一种由几个亚单位或由几条多肽链组成的蛋白质,必须先将不同的亚单位或多肽链之间的连接拆开,并分离纯化。

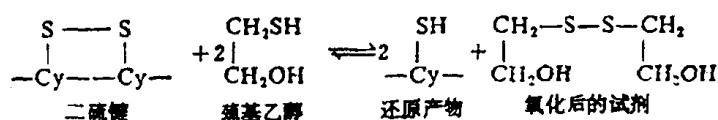
1. 二硫键的拆开 在多肽链之间如有二硫键连接,或链内有二硫键的,需将二硫键切断,拆开二硫键。二硫键拆开主要有如下两种方法。

(1)氧化法。氧化剂过甲酸可拆开二硫键,生成相应的磺羟基。在酸性条件下氧化时,胱氨酸残基生成稳定的磺基丙氨酸残基。



氧化法优点是拆开二硫键后,肽链不能重新形成二硫键,便于肽链的分离。缺点是在氧化过程中,蛋氨酸侧链被氧化,色氨酸侧链被完全破坏,增加了反应的复杂性。

(2)还原法。用还原剂,如巯基乙醇、巯基乙酸、赤藓醇、二巯基丁二醇等也能拆开二硫键,使二硫键还原为-SH。巯基乙醇拆开二硫键反应式如下:



由于蛋白质分子中半胱氨酸残基的巯基(-SH)很不稳定,极易氧化成二硫键,因此利用巯基乙醇等还原剂拆开二硫键时,往往进一步用碘代乙酸、碘代乙酰胺等试剂与巯基作用,使巯基烷基化而保护起来,防止重新氧化。

2. 非共价键的拆开 蛋白质分子中亚单位之间多数是以非共价键连接起来的,如氢键、疏水键、静电引力等。这些键是比较弱的,在温和条件下就可解离。

(1)pH 的改变引起多肽链解离。这是一种简便、有效的方法。蛋白质解离的临界 pH 范围约在 pH3~4(羧基滴定范围)和 pH9~10(赖氨酸-酪氨酸滴定范围)。当滴定蛋白质溶液的 pH 值低于 3 或者高于 10 时,就可引起蛋白质分子中多肽链的解离。

(2)强变性剂导致多肽链解离。大部分蛋白质在尿素或盐酸胍浓溶液中易发生变性,其原因有时是因蛋白质解离为亚单位所致。使用这种变性剂的主要缺点是高浓度变性剂能使随后的物理化学性质研究复杂化,除去变性剂又常常发生重新缔合或无规则聚合。实际工作中,常将盐酸胍(6mol/L)或尿素(8mol/L)与还原剂(如巯基乙醇)一起使用,拆离蛋白质的亚单位。

3. 肽链的分离纯化 将蛋白质分子中不同的肽链拆离之后,就要对肽链进行分离纯化。肽链的分离纯化同一般的蛋白质纯化。

1-4-4 末端氨基酸的测定

测定末端氨基酸,可确定蛋白质分子中多肽链的数目,了解 N-末端氨基酸是否被其他基团保护而封闭。所以在测定氨基酸序列之前,应确定多肽链 N-末端和 C-末端氨基酸的种类。

1-4-4-1 N-末端的测定

测定氨基酸 N-末端方法主要有:2,4-二硝基氟苯(2,4-Dinitrofluorobenzene, DNFB)法、二甲基氨基萘磺酰氯(丹磺酰氯, Dansyl chloride, DNS-Cl)法、异硫氰酸苯酯(PTH)法和 Edman 降解法。此外,还有氰化物羧氨基化法、氨基肽酶法等。现在主要介绍前两种方法。

1. 二硝基氟苯法 Sanger(1945)基于多肽链中 N-末端的游离氨基与 2,4-二硝基氟苯反应的特点,提出 N-末端氨基酸的鉴定方法,曾广泛应用于测定多肽或蛋白质中的 N-末端氨基