

第五节 蛋白质的理化性质

北京化工大学
王炳武

一、蛋白质的酸碱性质

* 两性电解质（侧链基团）

表 3-10 蛋白质分子中可解离基团的 pK' 值

可解离基团		pK' (25℃)
α-羧基	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	3.0~3.2
β-羧基 (Asp)	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	3.0~4.7
γ-羧基 (Glu)	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	4.4
α-氨基	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2$	7.6~8.4
ε-氨基 (Lys)	$-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2$	9.4~10.6
咪唑基 (His)	$ \begin{array}{c} \text{H}^+ \\ \\ \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{CH} \\ \backslash \quad / \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{N} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{CH} \\ \backslash \quad / \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array} $	5.6~7.0
巯基 (Cys)	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^-$	9.1~10.8
苯酚基 (Tyr)	$ \text{—} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{—OH} \rightleftharpoons \text{—} \langle \text{C}_6\text{H}_4 \rangle \text{—O}^- $	9.8~10.4
胍基 (Arg)	$ \text{—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_3^+ \\ \searrow \text{NH} \end{array} \rightleftharpoons \text{—C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{NH} \end{array} $	11.6~12.6

等电点

- * $\text{pH} < \text{pI}$: 带正电荷;
- * $\text{pH} > \text{pI}$: 带负电荷;
- * 蛋白质在等电点时溶解度最小;

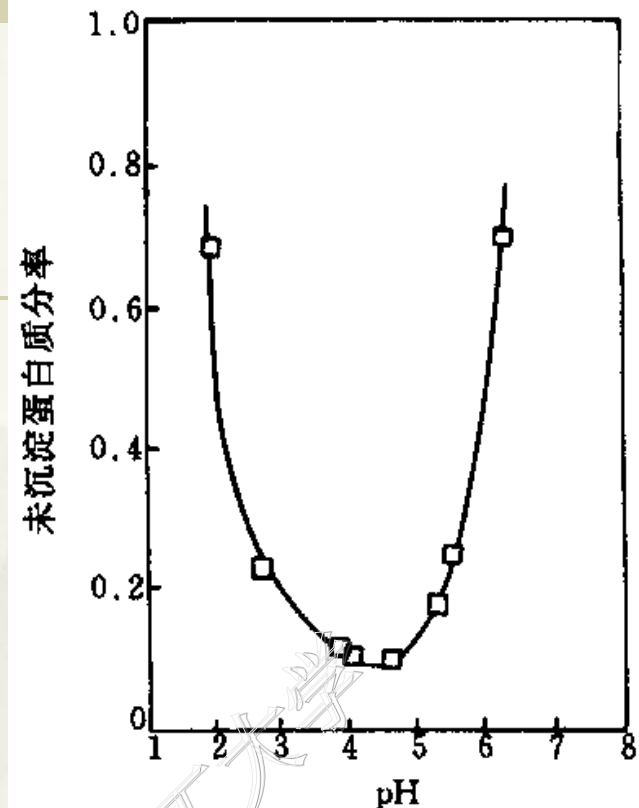


表 1-8 几种蛋白质的等电点

大豆蛋白质溶解度与 pH 的关系

蛋白质名称	等电点	蛋白质名称	等电点
鱼精蛋白	12.00 ~ 12.40	胰岛素(牛)	5.30 ~ 5.35
胸腺组蛋白	10.8	明胶	4.7 ~ 5.0
溶菌酶	11.0 ~ 11.2	血清清蛋白(人)	4.64
细胞色素 c	9.8 ~ 10.3	鸡蛋清蛋白	4.55 ~ 4.90
血红蛋白	7.07	胰蛋白酶(牛)	5.0 ~ 8.0
血清 γ_1 -球蛋白(人)	5.8 ~ 6.6	胃蛋白酶	1.0 ~ 2.5

应用：电泳分离蛋白质 page122

- * 由于蛋白质在溶液中解离成带电的颗粒，因此在电场中能移动。这种带电粒子在电场中移动的现象称为电泳
- * 蛋白质电泳的方向、速度主要决定于其所带电荷的正负性、所带电荷的多少以及分子颗粒大小

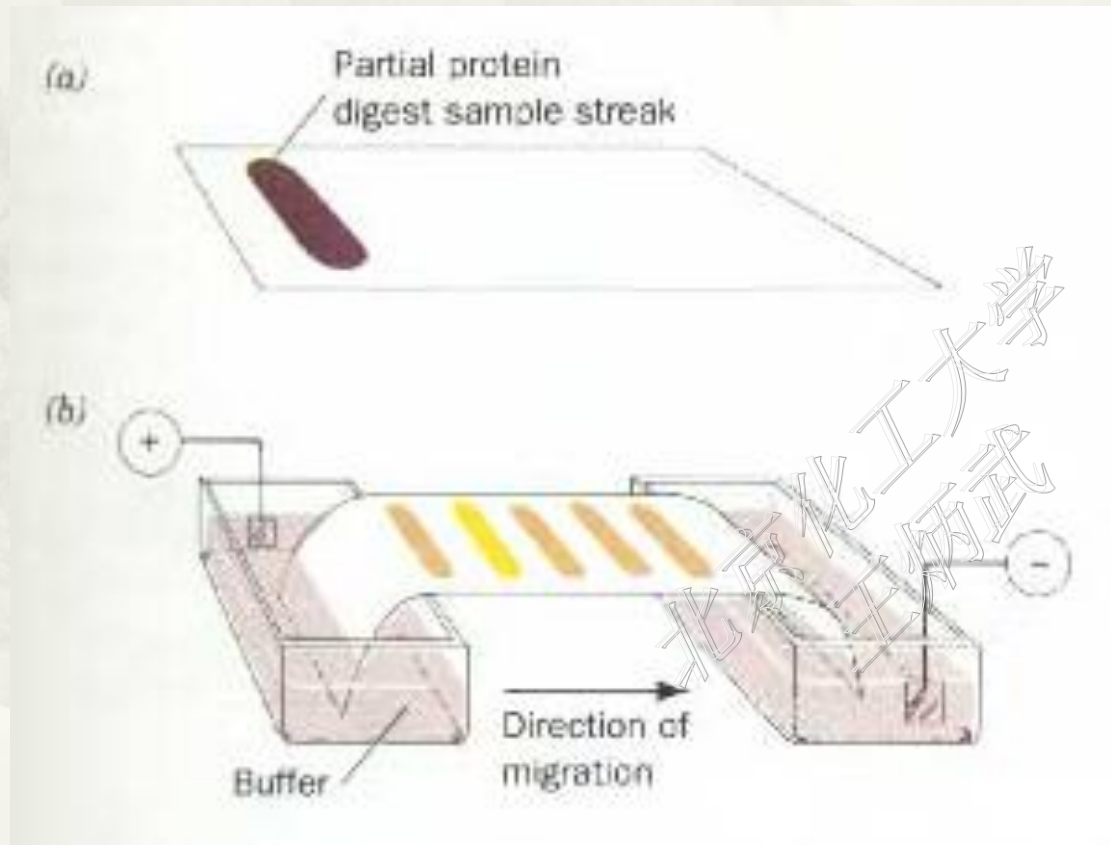
北京化工大学
王炳武

醋酸纤维薄膜电泳分离血清蛋白质

血清中含有白蛋白、 α 球蛋白、 β 球蛋白、 γ 球蛋白等，各种蛋白质由于氨基酸组分、立体构象、相对分子质量、等电点及形状不同，在电场中迁移速度不同。

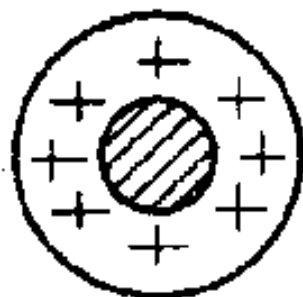
蛋白质名称	等电点	相对分子质量
白蛋白	4.88	69 000
α_1 球蛋白	5.06	200 000
α_2 球蛋白	5.06	300 000
β 球蛋白	5.12	90 000 ~ 150 000
γ 球蛋白	6.85—7.50	156 000 ~ 300 000

将血清蛋白质点样在醋酸薄膜纤维上，放入电场中，在 pH8.6 的缓冲液中，血清蛋白质各组分蛋白质均带负电荷，在电场中向阳极移动，但是速度不等，从而彼此可以分离。



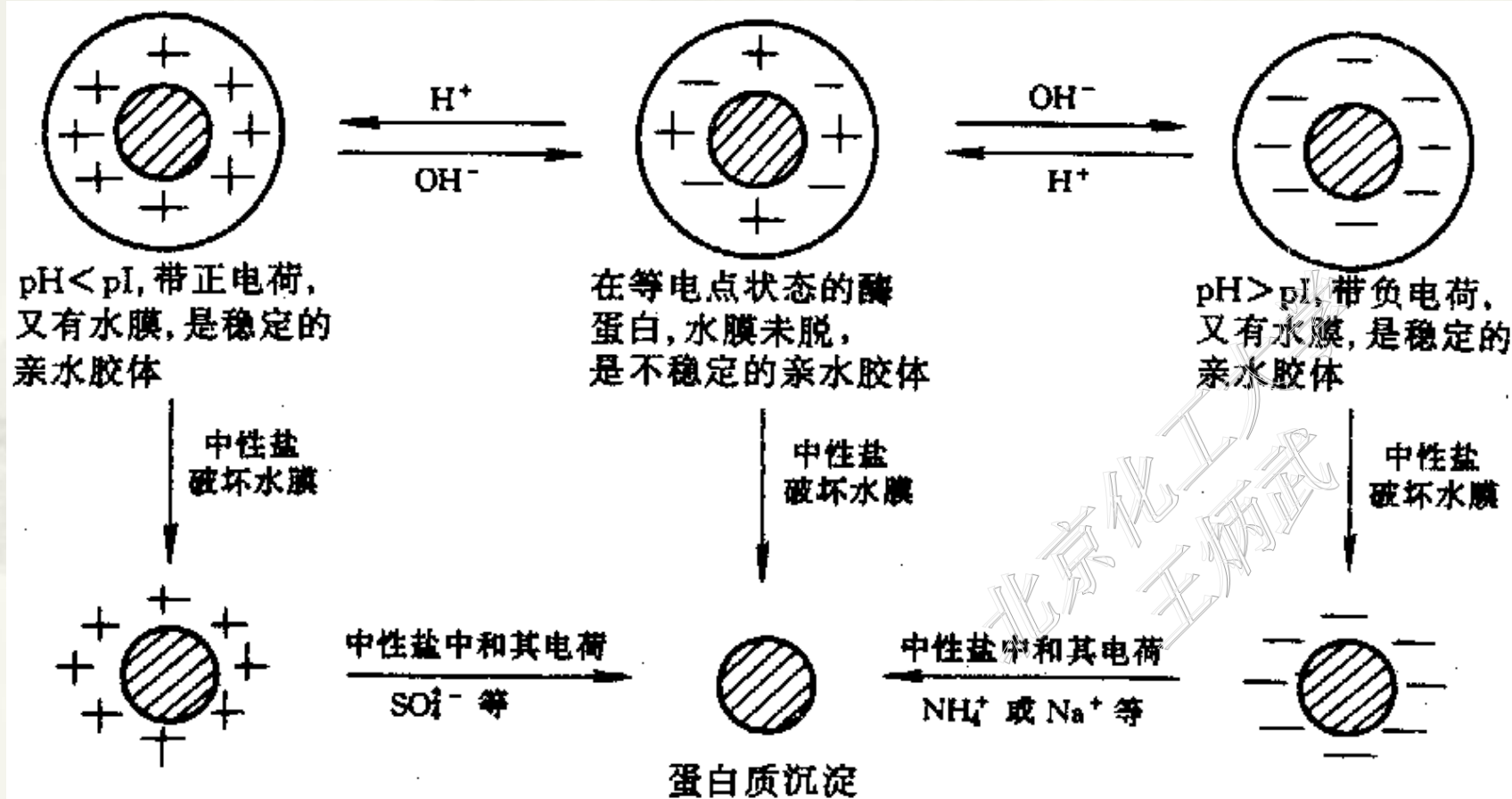
二、蛋白质的沉淀反应

- * 蛋白质分子表面的亲水性基团可吸附水分子在蛋白质表面形成水化层；
- * 蛋白质分子表面的可解离基团在溶液中解离后吸引溶液中相反电荷的离子形成双电层；
- * 由于具有水化层和双电层，蛋白质分子难于聚集，所以蛋白质溶液是稳定的胶体溶液；



pH < pI, 带正电荷,
又有水膜, 是稳定的
亲水胶体

* 破坏水化层、双电层，蛋白质分子易于聚集成团而沉淀析出；



1、盐析与盐溶

- * 盐析：高浓度的中性盐破坏蛋白质的水化层，中和蛋白质的电荷，使蛋白质沉淀；
- * 盐溶：低浓度的中性盐可增加蛋白质与水分子的作用，减弱蛋白质分子之间的作用力，从而促进蛋白质溶解；

* 硫酸铵、氯化钠



2、有机溶剂沉淀法

- * 有机溶剂可降低溶液的介电常数，蛋白质侧链基团难于解离，双电层被破坏；
- * 有机溶剂可破坏蛋白质表面的水化层；
 - * 乙醇、丙酮

表7-11 几种溶剂的介电常数

有机溶剂	介电常数	有机溶剂	介电常数
水	80	5M 尿素	91
40%乙醇	60	丙酮	22
60%乙醇	48	甲醇	33
100%乙醇	24	丙醇	23
2.5M 尿素	84	2.5M 甘氨酸溶液	137

* 蛋白质的其他沉淀方法：

- * 重金属盐沉淀法：氯化高汞、硝酸银、醋酸铅

- * 生物碱试剂：鞣酸

- * 加热：肽链变松散，蛋白质分子内部疏水基团暴露，聚集成团，蛋白质溶解度降低而沉淀

* 应用实例：豆腐的制作

北京化工大学
王炳武

三、蛋白质的变性与复性

1777年，法国科学家马凯利在对一系列蛋白质食品(鸡蛋、乳酪、动物血液等)的性质进行分析时，最早发现了蛋白质变性现象。比如把一个鸡蛋加热后，它就会凝固而渐变成软质硬状物，从液态变成了固体；若温度再冷却下来，它不能再恢复成原样。

* 变性 denaturation

- * 通过某些物理或者化学因素的作用，使蛋白质天然的空间构象被破坏，从而引起蛋白质生物学活性的丧失

变性的本质

* 吴宪

- * 高级结构被破坏，一级结构不变
- * 肽链变松散，生物功能丧失
- * 溶解度降低，粘度增大，易沉淀，易酶解
- * 酸、碱、盐、有机溶剂、盐酸胍、尿素、重金属盐、高温、搅拌、射线等
- * 辨析：变性、沉淀、降解

北京化工大学
王炳武

蛋白质的复性renaturation

- * 某些蛋白质变性后，如果除去变性因素，蛋白质分子的空间结构可以部分或者完全恢复，从而部分或者完全恢复其生物学活性，该现象称为复性；

北京化工大学
王炳武

第六节 蛋白质的分析、分离

北京化工大学
王炳武

* 分析技术

- * 纸层析
- * 离子交换层析
- * 高效液相层析

* 分离技术

- * 透析、超滤
- * 超速离心
- * 电泳、凝胶过滤

* 定量测定

北京化工大学
王炳武

一、蛋白质分子量的测定

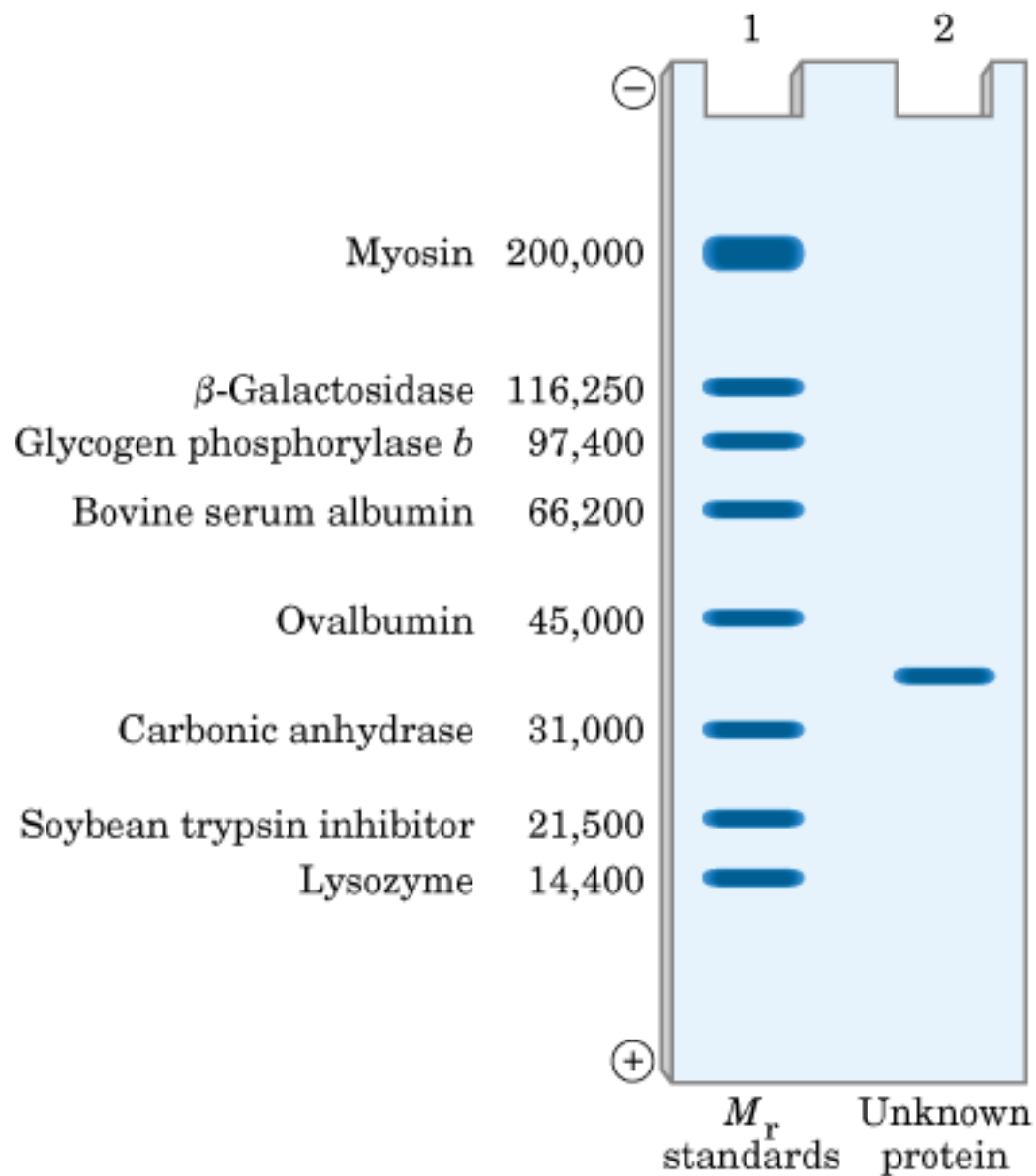
表 1-7 一些蛋白质的相对分子质量、亚基数及亚基相对分子质量

蛋白质名称	相对分子质量(M_r)	亚 基	
		亚 基 数	相对分子质量(M_r)
胰岛素	5 734	1	5 734
细胞色素 c	12 398	1	12 398
RNA 酶	13 683	1	13 683
溶菌酶	14 300	1	14 300
α -淀粉酶	97 600	2	48 800
血红蛋白(人)	64 500	4	16 000
天冬酰胺酶	255 000	2	139 000
脲酶	483 000	6	83 000
醇脱氢酶(酵母)	150 000	4	37 000
RNA 聚合酶	880 000	2	440 000
烟草花叶病毒蛋白	40 000 000	2130	17 500

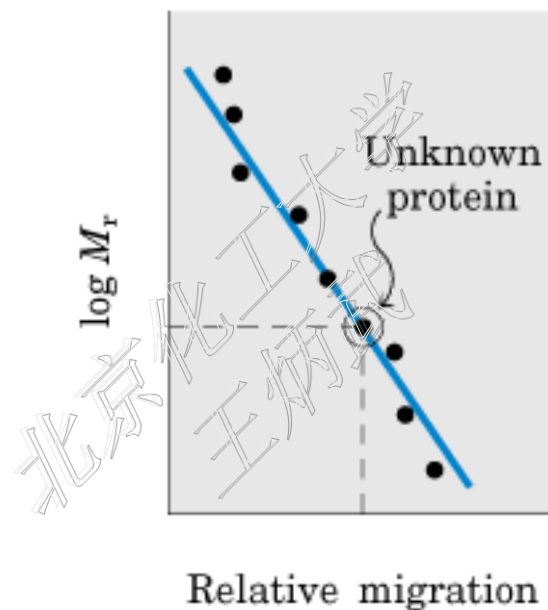
1、SDS凝胶电泳测定蛋白质分子量

- * SDS是十二烷基磺酸钠的简称，与蛋白质分子结合成带负电荷的复合物，其负电荷远远超过了蛋白质原有的电荷差别，也就消除或降低了不同蛋白质之间原有的电荷差别
- * **电泳迁移率只取决于分子大小**这一个因素，根据标准蛋白质分子量的对数和迁移率所作的标准曲线，求得未知物的分子量。

北京化工大学
王炳武



(a)



(b)

2、凝胶过滤法 page121

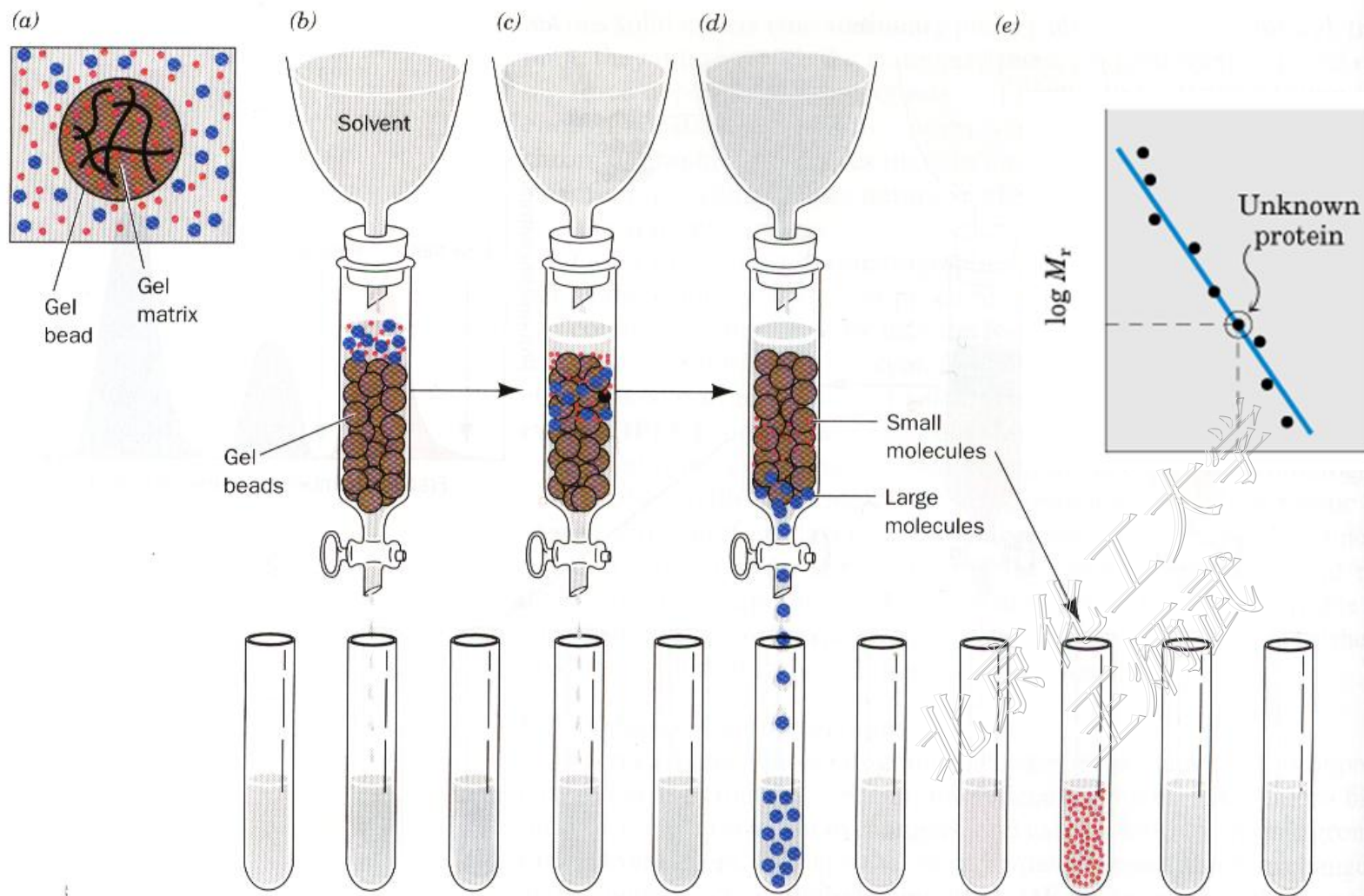


Figure 5-6 Gel filtration chromatography. (a) Column packed with gel beads. (b) Column filled with solvent. (c) Column filled with solvent and sample. (d) Column filled with solvent and sample. (e) Column filled with solvent and sample.

原理

- * 凝胶是一种具有立体网状结构且呈多孔的不溶性珠状颗粒物质
- * 凝胶对不同半径的蛋白质分子（近于球形）具有不同的排阻效应
- * 大分子不能进入凝胶颗粒内部而完全被排阻在外，只能沿着颗粒间的缝隙流出柱外；
- * 小分子可以进入凝胶内部的筛孔
- * 分子越小，所走的路程越多
- * 经过凝胶层析后，分子按照从大到小的顺序依次流出。
- * 由标准曲线得出分子量

二、蛋白质的定量测定

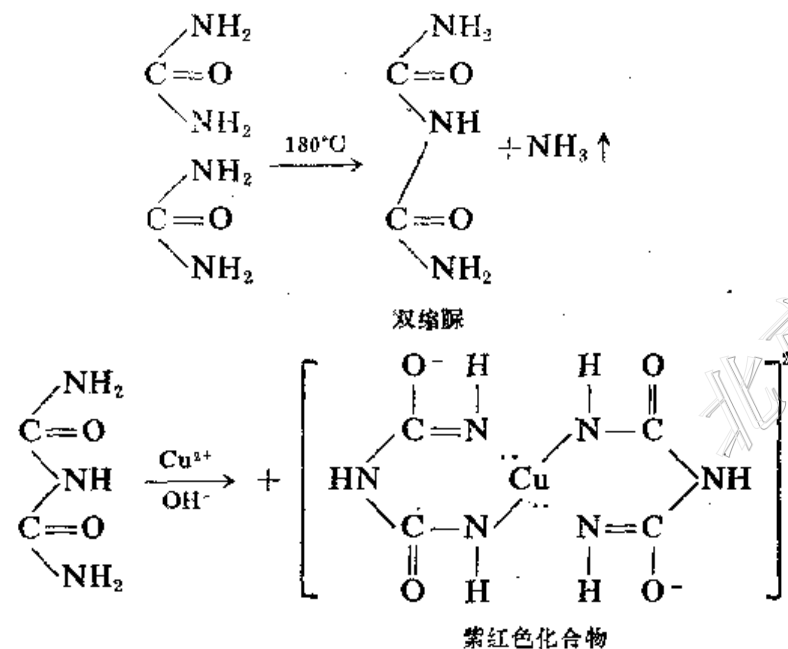
- * 凯氏定氮法
- * 双缩脲反应
- * 福林—酚法
- * 考马斯亮兰显色
- * 紫外吸收

北京化工大学
王炳武

1、双缩脲法

- * 在碱性溶液中双缩脲与铜离子结合形成复杂的紫红色复合物
- * 蛋白质及多肽的肽键与双缩脲的结构类似

反应式如下:



2、Folin—酚法（Lowry法）

- * 在碱性条件下蛋白质与铜作用生成蛋白质—铜复合物；复合物将Folin—酚试剂中的磷钼酸—磷钨酸还原成蓝色复合物，蓝色程度与蛋白质的含量成正比；

北京化工大学
王炳武

3、考马斯亮兰法

- * 考马斯亮兰G-250染料在酸性溶液中与蛋白质结合，使染料的最大吸收峰的位置由465nm变为595nm，溶液的颜色也由棕黑色变为兰色。
- * 灵敏度最高，检出下限可达1ug/mL；
- * 操作简单、快速；

北京化工大学
王炳武

4、紫外吸收

- * 蛋白质分子中，酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键，使蛋白质具有吸收紫外光的性质。
- * 吸收高峰在280nm处，吸光度（即光密度值）与蛋白质含量成正比，可以进行蛋白质含量的测定。
- * 适用于柱层析洗脱液的快速连续检测

北京化工大学
王炳武

本章总结1

- * 蛋白质的定义
- * 20种常见氨基酸及其分类
- * 氨基酸的等电点及应用
- * 氨基反应（茚三酮、DNFB、PITC）
- * 羧基反应、侧链基团反应（用于鉴定）

北京化工大学
王炳武

本章总结2

- * 蛋白质的一~四级结构的定义、作用力
- * 一级结构的测定步骤和方法
- * 二级结构的种类和特征
- * 蛋白质的性质和应用
- * 蛋白质的测定 (SDS电泳、凝胶过滤)

需要掌握的单词

- * protein
- * peptide
- * amino acid (AA)
- * polypeptide
- * peptide bond
- * protease
- * primary structure
- * secondary structure
- * tertiary structure
- * quaternary structure
- * subunit
- * isoelectric point (pI)
- * denaturation
- * renaturation

填空题

- * 维系 α 螺旋的主要作用力是____，该键的取向与螺旋中心轴____。
- * 当溶液中盐离子强度较低时，可使蛋白质的溶解度增大，这种现象称为____；当溶液中盐离子强度高时，可使蛋白质产生沉淀，这种现象称为____。

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 变性蛋白质的特点是 ()
 - * A、双缩脲反应减弱
 - * B、溶液粘度下降
 - * C、溶解度增加
 - * D、丧失原有的生物学活性

北京化工大学
王炳武

判断题

- * 蛋白质构象的改变是由于分子内共价键的断裂所致。
- * 蛋白质分子的亚基就是蛋白质的结构域。
- * 大多数蛋白质的主要带电基团是由它的C末端羧基和N末端的氨基决定的。

北京化工大学
王炳武

判断题

- * 变性蛋白质通常由于溶解度降低而产生沉淀，因此凡是使蛋白质产生沉淀的因素都可使蛋白质发生变性作用。
- * 采用凝胶过滤法分离生物大分子时，主要是根据分子的大小和形状，一般说来分子大的不易通过凝胶柱。
- * 蛋白质的亚基是与肽链同义的。

北京化工大学
王炳武

简答题

- * 氨基酸残基的平均分子量为120，某一多肽链完全以 α -螺旋形式存在，分子量为15120，求该多肽链的长度。

- * $15120/120=126$

- * $126 \times 0.15\text{nm}=18.9\text{nm}$

北京化工大学
王炳武

作业题

- * 简要说明为什么大多数球状蛋白质在溶液中具有以下性质：
- * 1) 在离子强度从零增加到高值时，先是溶解度增大，然后溶解度降低，最后沉淀；2) 当介质的介电常数因加入与水混溶的非极性溶剂而下降时，溶解度降低；如果介电常数大幅度下降至以非极性溶剂为主时产生变性

北京化工大学
王炳武

完毕!

北京化工大学
王炳武