

第三章 蛋白质化学

北京化工大学
王炳武

蛋白质的定义

- * 蛋白质是由许多不同的 α -氨基酸按照一定的序列，通过肽键缩合而成的，具有较稳定的构象，具有一定生物功能的生物大分子

北京化工大学
王炳武

本章内容

蛋白质的概念、分类和功能

● 蛋白质的分子组成

★ 蛋白质的分子结构

蛋白质结构的测定与多肽的人工合成

● 蛋白质的理化性质

氨基酸及蛋白质的分析和分离

蛋白质组学的理论与进展概要

蛋白质的生物信息学简介

北京化工大学
王炳武

第一节 蛋白质的概念、 分类和功能

北京化工大学
王炳武

分类

* 单纯蛋白质

- * 清蛋白：溶于水
- * 球蛋白：微溶于水，溶于稀盐溶液；
- * 谷蛋白：不溶于水，溶于稀酸稀碱；
- * 醇溶蛋白：不溶于水，溶于70%乙醇；
- * 硬蛋白

* 结合蛋白质

- * 核蛋白、糖蛋白、脂蛋白

* 结构蛋白

* 活性蛋白

* 纤维状蛋白

* 球状蛋白

北京化工大学
王炳武

蛋白质的功能

- * 生物催化：酶
- * 结构成分：角蛋白、胶原蛋白
- * 转运：血红蛋白
- * 运动：肌球蛋白与肌动蛋白
- * 营养与贮存：卵清蛋白、乳酪蛋白
- * 免疫、信息传递、调控

北京化工大学
王炳武

第二节 蛋白质的分子组成

北京化工大学
王炳武

元素组成

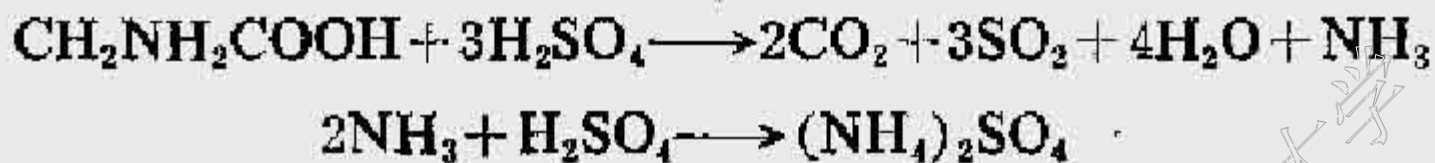
- * 元素组成:碳、氢、氧、氮、硫
- * 蛋白质含氮量平均为16%
 - * 凯氏定氮实验

北京化工大学
王炳武

例题

- * 取0.1g卵清蛋白进行凯氏定氮实验，测得其中蛋白氮含量为10%，那么样品中蛋白质的质量是多少？

蛋白质的含量=氮的含量×**6.25**

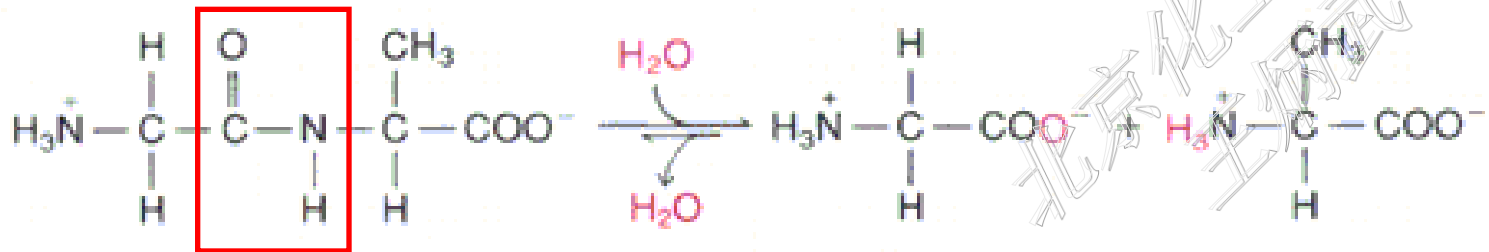


缺点：易将其他氮(如核酸中的氮)归入蛋白质中

- * 由于食品和饲料工业中蛋白质含量测试方法采用凯氏定氮法，通过测出样品的含氮量来估算蛋白质的含量，蛋白质平均含氮量为16%左右；
- * 三聚氰胺的含氮量为66%左右，不法商人在食品中添加三聚氰胺会使得食品的蛋白质测试含量偏高，从而使劣质食品通过食品检验机构的测试，因此三聚氰胺也被人称为“蛋白精”；
- * 以合格的牛奶中蛋白质含量为2.8%计算，含氮量为0.44%；合格的奶粉中蛋白质含量为18%计算，含氮量为2.88%；三聚氰胺含氮量为66.6%，是牛奶的151倍，是奶粉的23倍；所以每100g牛奶中添加0.1克三聚氰胺，理论上能提高0.625%的蛋白质含量，而费用只有添加真实蛋白原料的1/5；并且三聚氰胺作为一种白色结晶粉末，没有什么气味和味道，所以掺杂后不易被发现。

一、结构单元：氨基酸

- * 蛋白质和多肽可以被酸、碱或蛋白酶催化水解
- * 酸或碱能够将蛋白质完全水解，酶水解一般是部分水解。



1) 酸水解

- * 用 6mol/L 的盐酸或 4mol/L 的硫酸在 105–110℃ 条件下水解约 20 小时
- * **优点**：不容易引起水解产物的消旋化，得到的是 L-氨基酸。
- * **缺点**：色氨酸被沸酸破坏生成腐黑质，导致水解液呈黑色；含有羟基的氨基酸（丝氨酸或苏氨酸）部分被分解；天冬酰胺和谷氨酰胺侧链的酰胺基水解生成羧基。

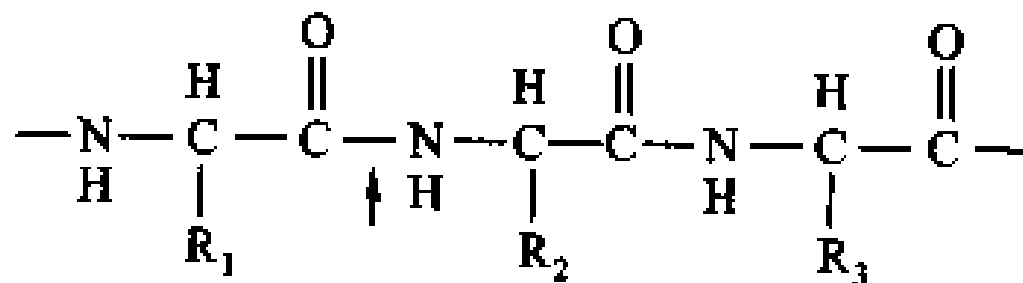
2) 碱水解

- * 5mol/L氢氧化钠煮沸10~20小时。
- * **优点**：色氨酸不受破坏，水解液清亮。
- * **缺点**：精氨酸脱氨生成鸟氨酸和尿素；水解产物发生消旋化，产物是D-型和L-型氨基酸的混合物。

北京化工大学
王炳武

3) 酶水解

- * 蛋白酶 (proteinase)
- * 优点：常温，不破坏氨基酸，不发生消旋化
- * 缺点：水解不完全，产物为较小的肽段。
- * 最常见的蛋白水解酶：胰蛋白酶trypsin、糜蛋白酶、胃蛋白酶、微生物蛋白酶。



胰蛋白酶

$R_1 = \text{Lys}$ 或 Arg 侧连 (专一要求, 水解速度快); ABCys (能水解, 速度较慢)

$R_2 = \text{Pro}$ (抑制水解)

糜蛋白酶

$R_1 = \text{Phe}$ 、 Trp 或 Tyr (水解速度快); Leu 、 Met 或 His (水解速度次之)

$R_2 = \text{Pro}$ (抑制水解)

嗜热菌蛋白酶

$R_2 = \text{Leu}$ 、 Ile 、 Phe 、 Trp 、 Val 、 Tyr 或 Met (疏水性强的残基, 水解速度快)

$R_2 = \text{Gly}$ 或 Pro (不水解)

R_1 或 $R_3 = \text{Pro}$ (抑制水解)

胃蛋白酶

R_1 和/或 $R_2 = \text{Phe}$ 、 Leu 、 Trp 、 Tyr 以及其他疏水性残基 (水解速度好)

$R_1 = \text{Pro}$ (不水解)

图 4-9 几种蛋白水解酶(内肽酶)的专一性

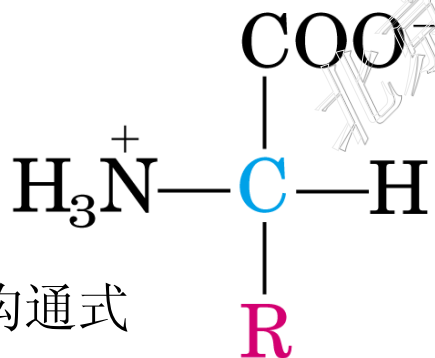
练习题

- * 已知100g蛋白质样品完全水解后得到8.6g苯丙氨酸
- * 求蛋白质样品中的苯丙氨酸残基百分含量
- * 已知苯丙氨酸分子量为165

北京化工大学
王炳武

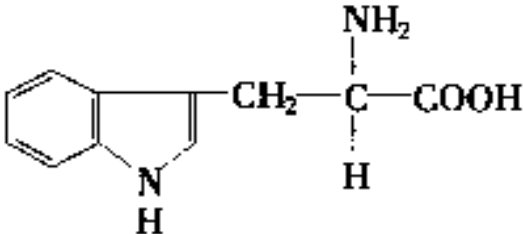
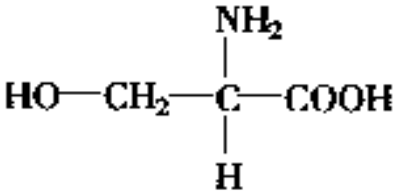
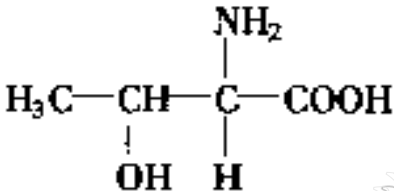
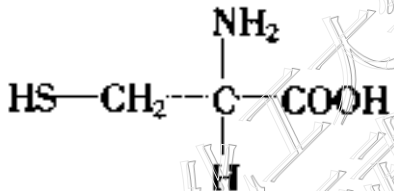
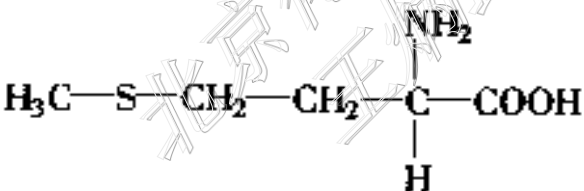
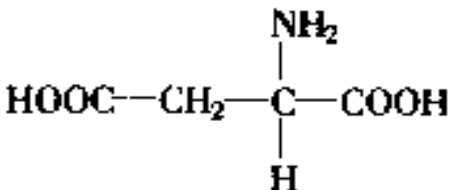
结构单元：氨基酸 amino acid

- * 羧酸分子中 α - 碳原子上的一个氢原子被氨基取代
- * 构成天然蛋白质的氨基酸有20种，R代表侧链基团，不同的氨基酸只是侧链R基不同。



氨基酸的结构通式

名 称	符 号	结 构 式
甘氨酸 (Glycine)	Gly G	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
丙氨酸 (Alanine)	Ala A	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
缬氨酸 (Valine)	Val V	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \end{array} $
亮氨酸 (Leucine)	Leu L	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \end{array} $
异亮氨酸 (Isoleucine)	Ile I	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{H} \end{array} $
苯丙氨酸 (Phenylalanine)	Phe F	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
酪氨酸 (Tyrosine)	Tyr Y	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array} $

名 称	符 号	结 构 式
色氨酸 (Tryptophan)	Try (Trp) W	
丝氨酸 (Serine)	Ser S	
苏氨酸 (Threonine)	Thy T	
半胱氨酸 (Cysteine)	CysH (Cys) C	
甲硫氨酸 (Methionine)	Met M	
天门冬氨酸 (Asparic acid)	Asp D	

谷氨酸 (Glutamic acid)	Glu E	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
天门冬酰胺 (Asparagine)	Asn N	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{NH}_2 \\ \qquad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
谷氨酰胺 (Glutamine)	Gln Q	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{NH}_2 \\ \qquad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
精氨酸 (Arginine)	Arg R	$\begin{array}{c} \text{NH} \qquad \qquad \text{NH}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
赖氨酸 (Lysine)	Lys K	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
组氨酸 (Histidine)	His H	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{N} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{C} \text{---} \text{COOH} \\ \qquad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \quad \text{N} \quad \text{H} \end{array}$
脯氨酸 (Proline)	Pro P	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2 \\ \qquad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N} \\ \\ \text{H} \end{array}$

1、氨基酸的分类（1）

* 脂肪族氨基酸

* 甘、丙、缬、亮、异亮等

* 芳香族氨基酸

➢ 苯丙氨酸 Phe

➢ 酪氨酸 Tyr

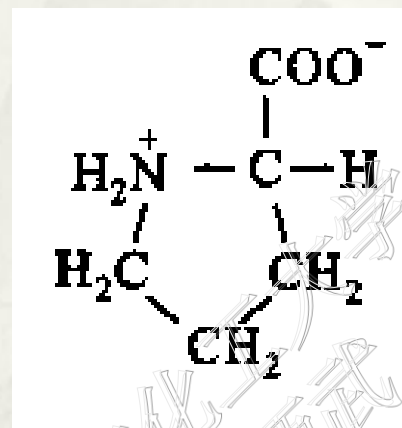
➢ 色氨酸 Trp

* 杂环氨基酸

➢ 组氨酸 His

* 杂环亚氨基酸

➢ 脯氨酸 Pro



氨基酸的分类（2）

- * 中性氨基酸（一氨基一羧基）
 - * 脂肪族：甘、丙、缬、亮、异亮
 - * 芳香族：苯丙、酪、色
 - * 含羟基：丝、苏
 - * 含硫：半胱、甲硫
 - * 含酰胺基：天冬酰胺、谷氨酰胺
 - * 亚氨基酸：脯
- * 酸性氨基酸（一氨基二羧基）
 - * 天冬氨酸、谷氨酸
- * 碱性氨基酸（二氨基一羧基）
 - * 精氨酸、赖氨酸、组氨酸

氨基酸的分类 (3)

必需氨基酸:

异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸、亮氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸

半必需氨基酸:

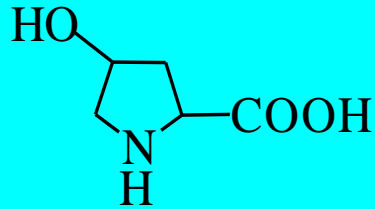
精氨酸、组氨酸

Ile Met Val Leu Trp Phe Thr Lys
一 家 写 两 三 本 书 来

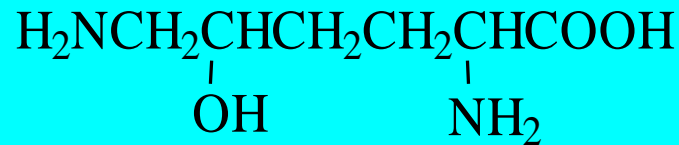
2、其他氨基酸

* 1) 稀有氨基酸

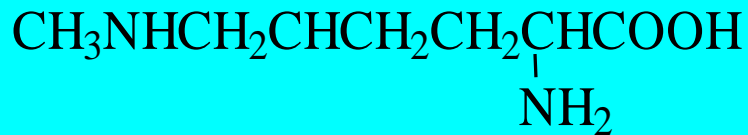
* 由相应的基本氨基酸衍生而来



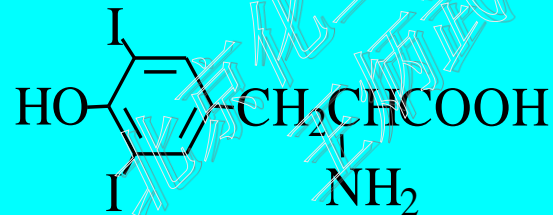
4-羟基脯氨酸



5-羟基赖氨酸

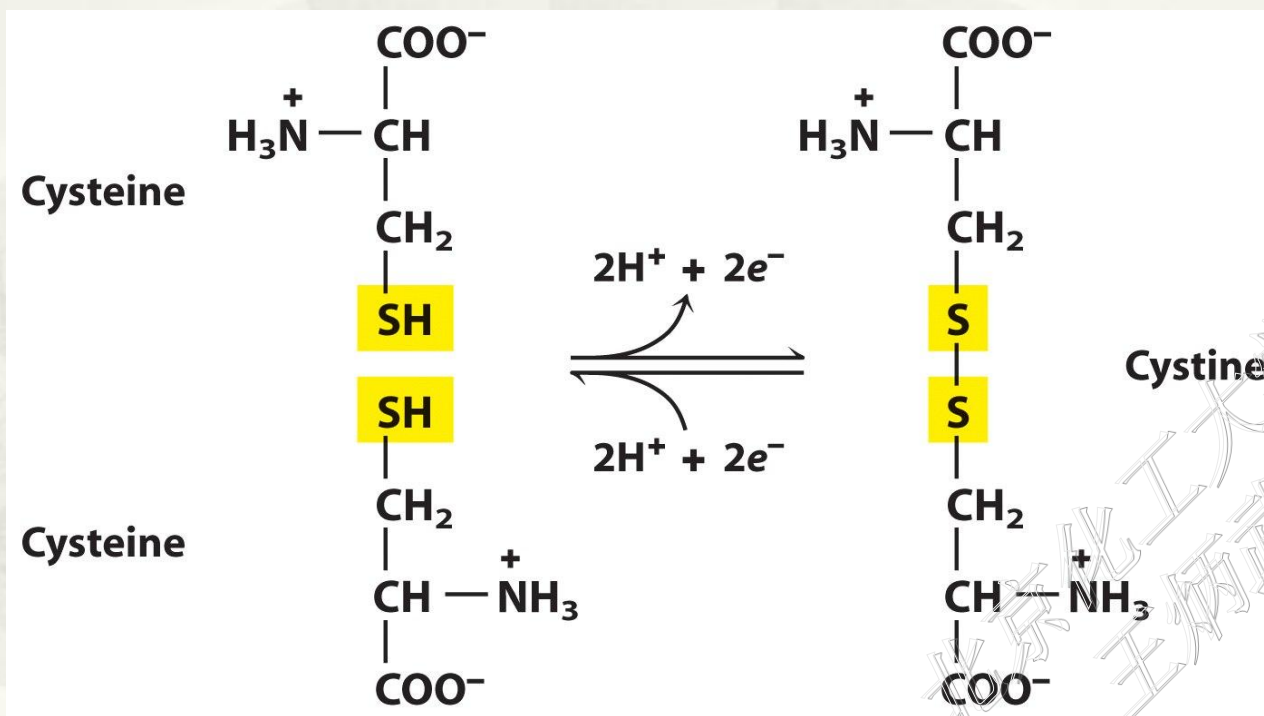


6-N-甲基赖氨酸



3,5-二碘酪氨酸

胱氨酸



2) 非蛋白质氨基酸

- * 广泛存在于各种细胞和组织中，呈游离或结合态，但不存在蛋白质中（即不是蛋白质组分）
- * 大部分也是蛋白质氨基酸的衍生物
- * 鸟氨酸、瓜氨酸（尿素循环）

3) D-氨基酸

表 1-2 D,L-氨基酸的比较^[5]

Tab 1-2 Comparison between *D* and *L*-amino acids

<i>L</i> 型	<i>D</i> 型
数量多、分布广、种类 400 种以上 除谷、丙、脯、丝、苏、正亮氨酸外， 多有苦味 多参与蛋白质的组成，是机体主要组成 代谢酶及辅酶单一	数量少、分布窄、种类约 40 种 除谷、脯、天冬、半胱、正亮氨酸外， 均有甜味 不是机体重要组成，主要有保护作用 代谢酶及辅酶具多样性

3、氨基酸的性质

- 无色晶体
- 熔点一般在 $200 \sim 300^{\circ}\text{C}$
- 多数可溶于水，不溶于有机溶剂
 - 谷氨酸钠

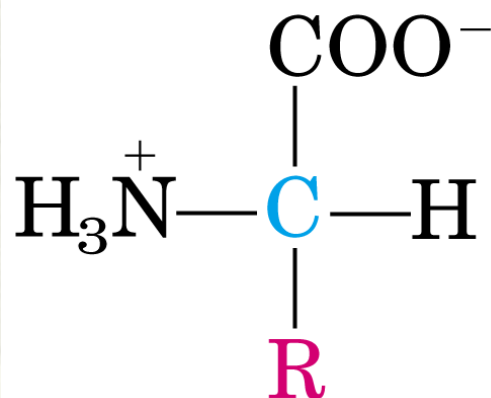
北京化工大学
王炳武

1) 光学性质

- * 不对称碳原子

- * 旋光性

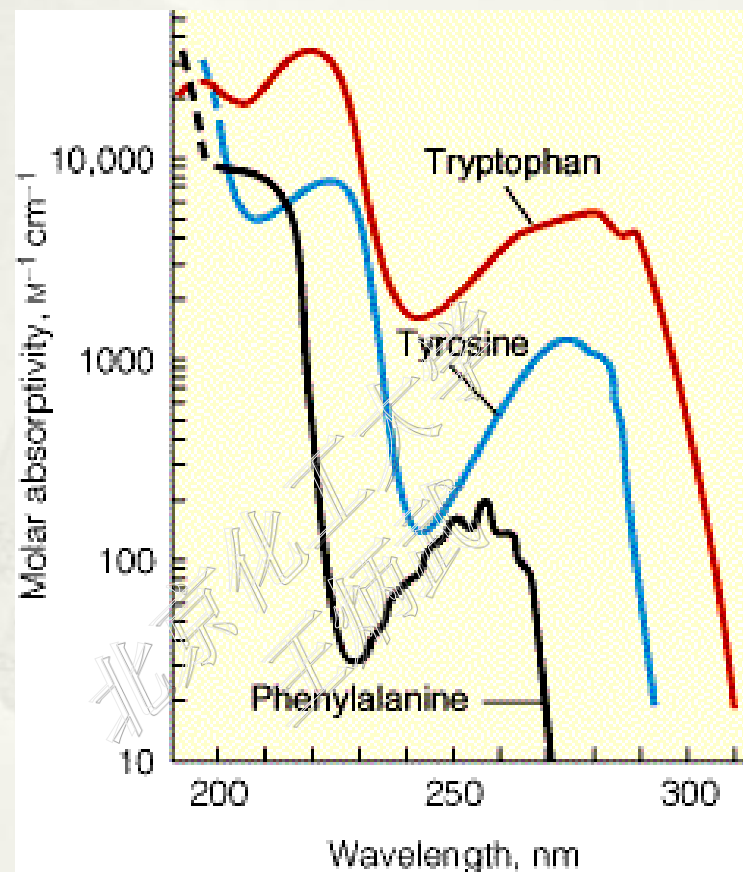
- * 手性异构体



北京化工大学
王炳武

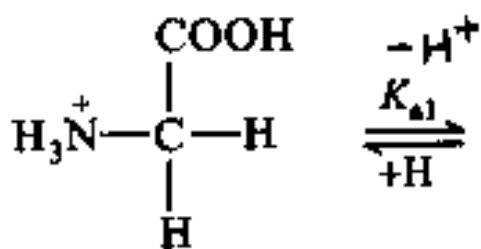
紫外光吸收

- 构成蛋白质的20种氨基酸在可见光区都没有光吸收，在远紫外区 ($<220\text{nm}$) 均有光吸收。
- 在近紫外区 ($200\text{--}300\text{nm}$) 只有酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸有光吸收

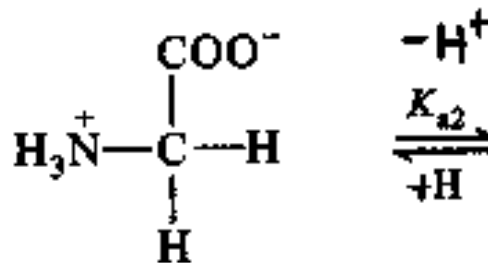


2) 氨基酸的酸碱性质

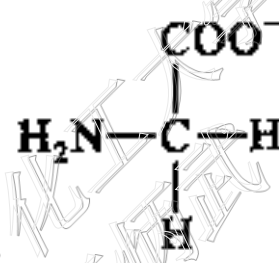
- * 两性解离与偶极离子（兼性离子）
- * 等电点pI (isoelectric point)
 - * 使氨基酸分子内正负电荷恰好相等时溶液的pH值



阳离子(A⁺)



兼性离子(A[°])



阴离子(A⁻)

氨基酸等电点的求取

- * 侧链不含解离基团的中性氨基酸，等电点是它的 pK_1 和 pK_2 的算术平均值： $pI = (pK_1 + pK_2)/2$
- * 对于侧链含有可解离基团的氨基酸， pI 值等于两性离子两边的 pK 值的算术平均值。

北京化工大学
王炳武

结论

- * 中性氨基酸等电点在6左右;
- * 碱性氨基酸等电点为碱性: 赖、精、组
- * 酸性氨基酸等电点为酸性: 谷、天
- * 在等电点以上的任何pH (即 $\text{pH} > \text{pI}$), 氨基酸带净负电荷, 在电场中将向正极移动;
- * 在低于等电点的任何pH (即 $\text{pH} < \text{pI}$), 氨基酸带净正电荷, 在电场中将向负极移动
- * 在一定pH范围内, 氨基酸溶液的pH离等电点越远, 氨基酸所携带的净电荷越大。
- * 氨基酸在等电点时溶解度最小。

练习题

- * 构成蛋白质的氨基酸中含有亚氨基的是____，而____没有旋光性。
- * 组成蛋白质的氨基酸中，含硫的氨基酸有____和____。能形成二硫键的氨基酸是____。
- * 采用紫外分光光度法测定蛋白质含量，是由于蛋白质分子中存在____、____和____三种具有共轭双键的氨基酸。

选择题

* 组成蛋白质的基本单位是：

* a. L- α -氨基酸

* b. D- α -氨基酸

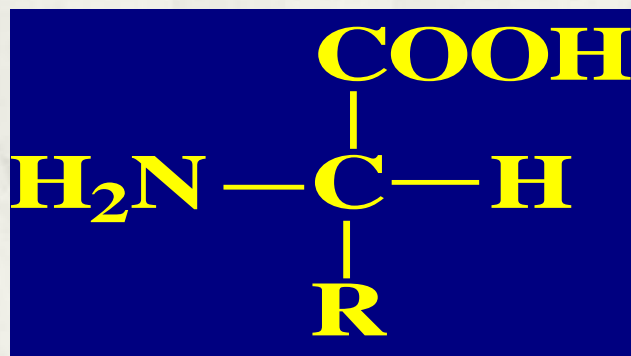
* c. L- β -氨基酸

* d.. D- β -氨基酸

北京化工大学
王炳武

4、氨基酸的化学反应

与茚三酮反应
与甲醛反应
与DNFB反应
与PITC反应
与DNS反应



与茚三酮反应
成盐反应
成酯反应
脱羧基反应

侧链基团反应

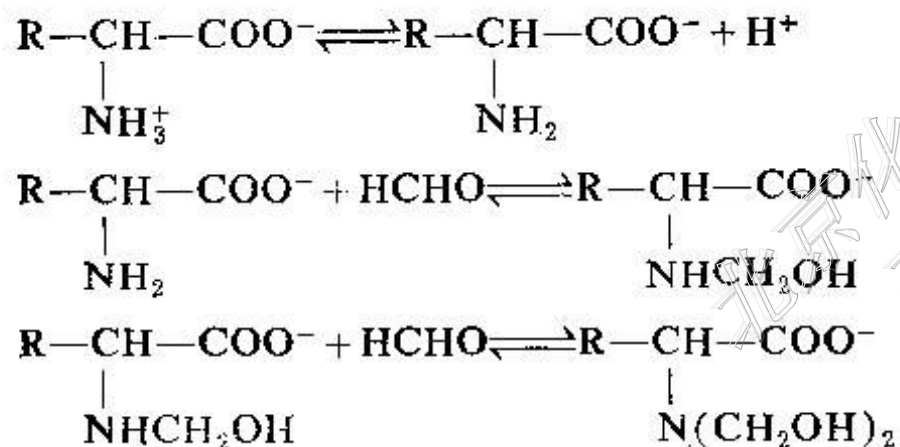
1) 氨基参与的反应

- * 与甲醛反应
- * 与2,4-二硝基氟苯 (DNFB或FDNB) 反应
- * 与异硫氰酸苯酯 (PITC) 反应
- * 与丹磺酰氯 (DNS) 反应
- * 成盐作用

①与甲醛反应

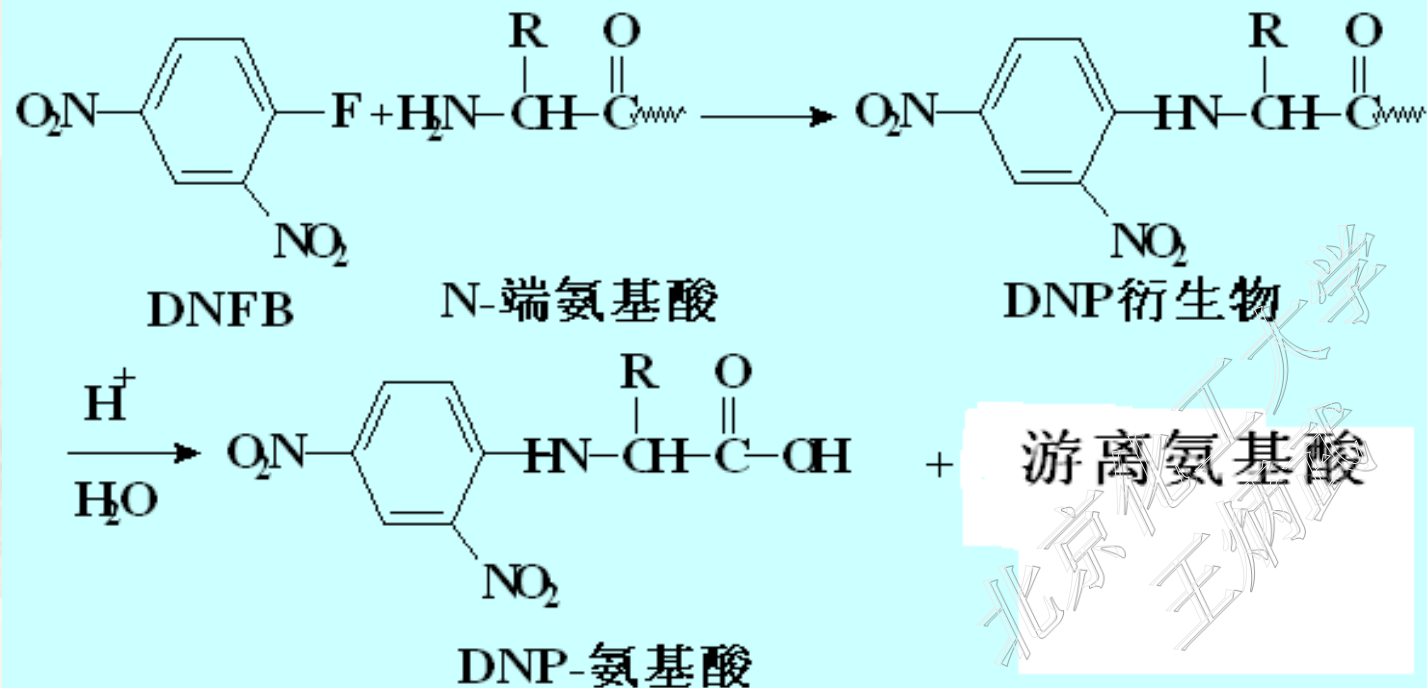
* 应用：测定蛋白质水解进程

原理 水溶液中的氨基酸为两性离子,因而不能直接用碱滴定氨基酸的羧基。用甲醛处理氨基酸,甲醛与氨基结合,可形成 $\text{—NH—CH}_2\text{OH}$, $\text{—N(CH}_2\text{—OH)}_2$ 等羟甲基衍生物,使 NH_3^+ 上的 H^+ 游离出来,这样就可 用碱滴定 NH_3 放出的 H^+ ,测出氨基氮,从而计算氨基酸的含量。



②与2,4-二硝基氟苯反应

* 弱碱性溶液中；黄色



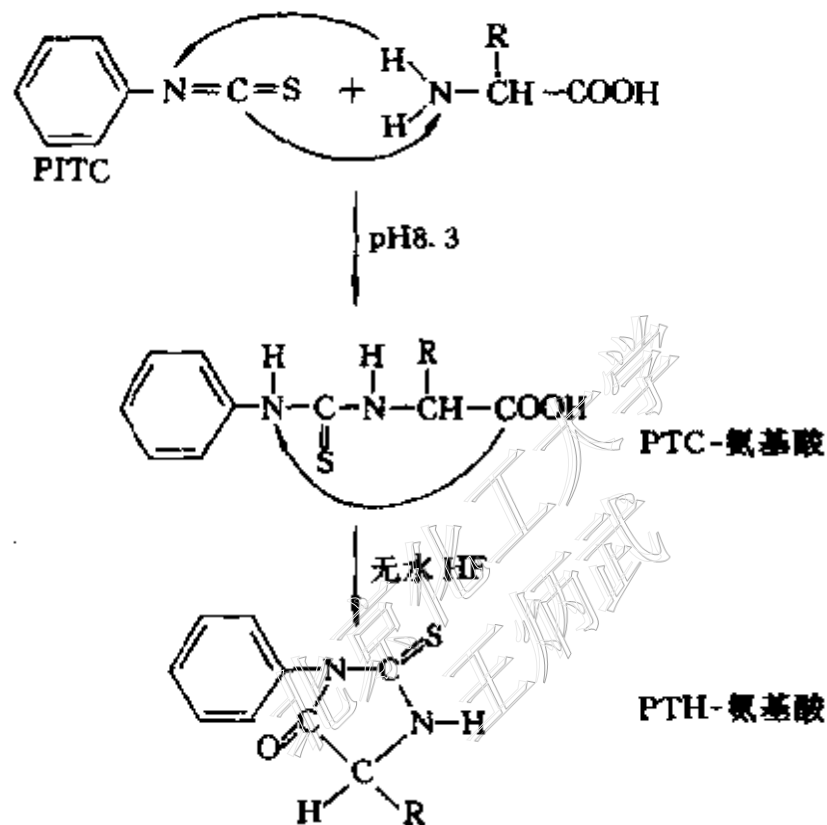
应用：蛋白质N末端氨基酸的测定

- * 首先由Sanger应用，确定了胰岛素的一级结构
 - * 肽分子与DNFB反应，得DNP-肽
 - * 水解DNP-肽，得DNP-N端氨基酸及其他游离氨基酸
 - * 乙醚提取分离DNP-氨基酸
 - * 层析法定性DNP-氨基酸，得出N端氨基酸的种类、数目

北京化工大学
王炳武

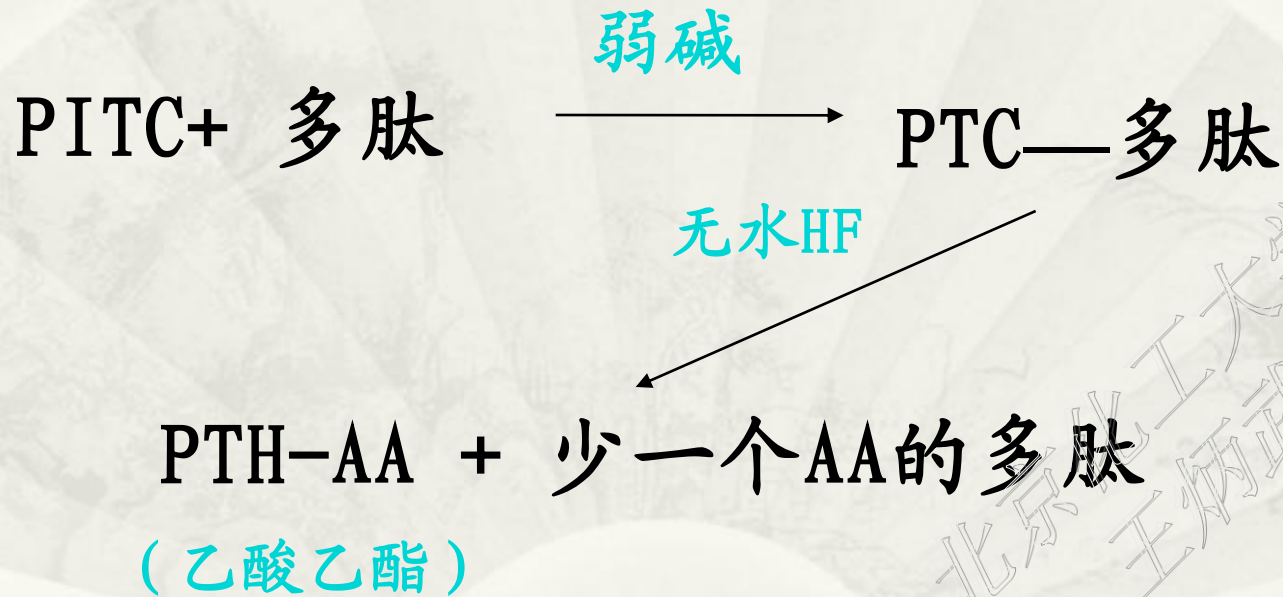
③ 与异硫氰酸苯酯反应

- * 由Edman于1950年首先提出，又称Edman降解法



应用

- * 用于N末端分析，能够不断重复循环，将肽链N-端氨基酸残基逐一进行测定



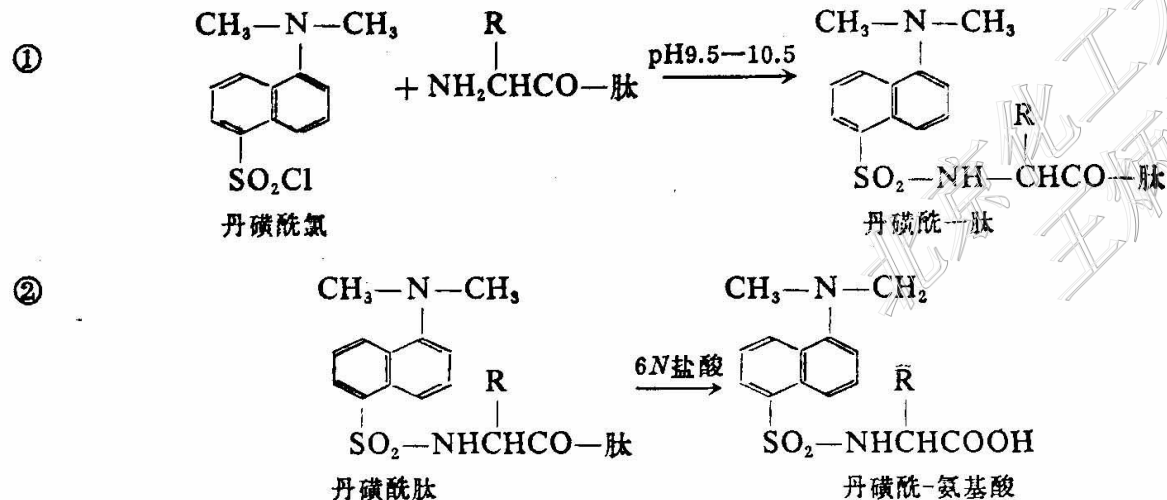
④ 与丹磺酰氯反应

* 用于测定N端氨基酸

* 原理DNFB法相同

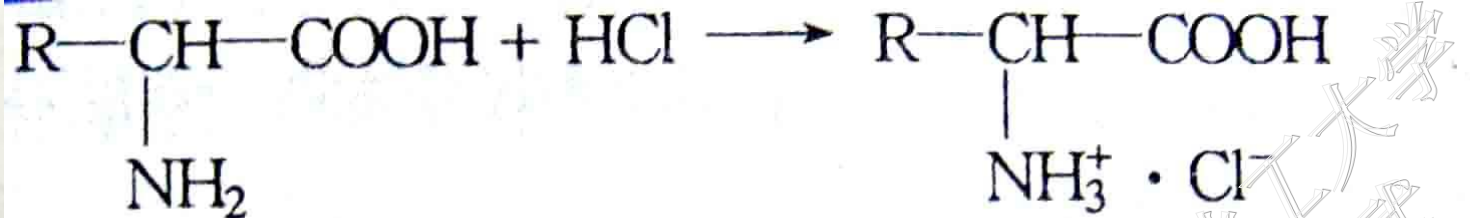
* 由于DNS有强烈荧光，水解后的DNS-氨基酸不需分离，可直接用电泳或层析法鉴定，灵敏度比DNFB法高100倍，比Edman法高几到十几倍

* 可用于微量氨基酸的定量



⑤成盐作用

- * 与盐酸反应生成盐酸盐
- * 氨基酸盐在水中的溶解度大于氨基酸



氨基酸盐酸盐

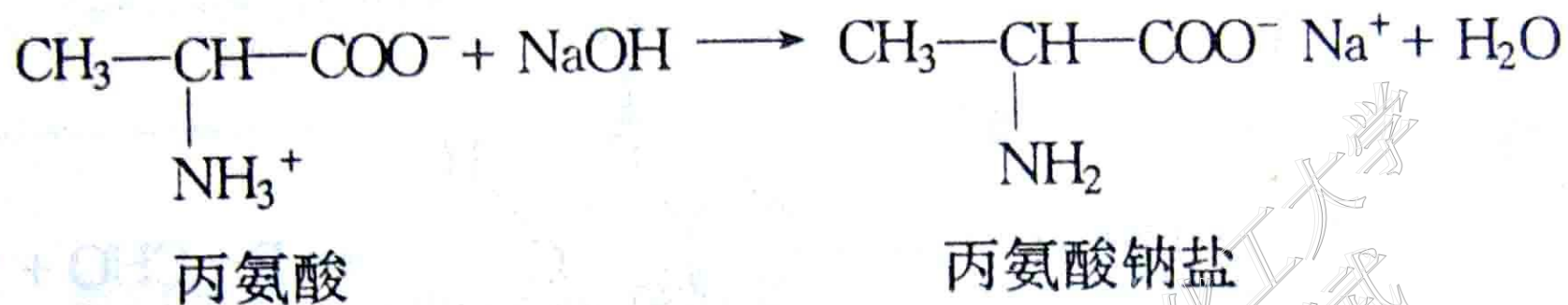
2) 羧基参与的反应

- * 成盐反应
- * 脱羧反应

北京化工大学
王炳武

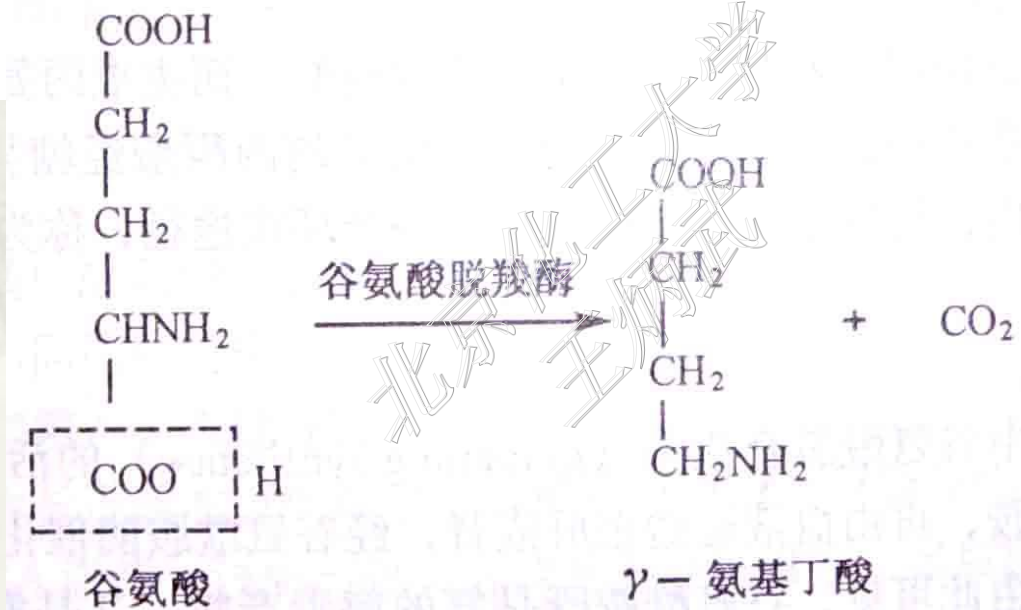
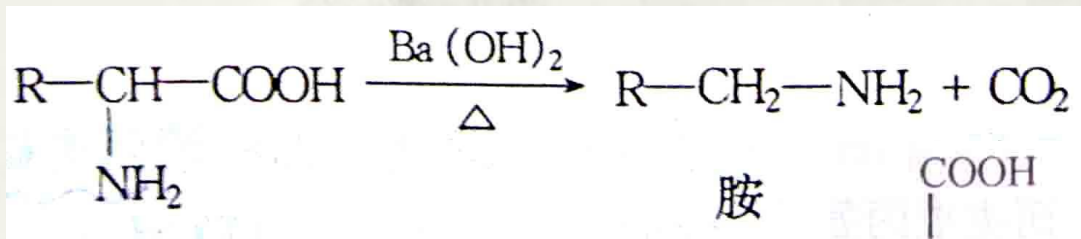
①成盐反应

* 与碱作用



②脱羧反应

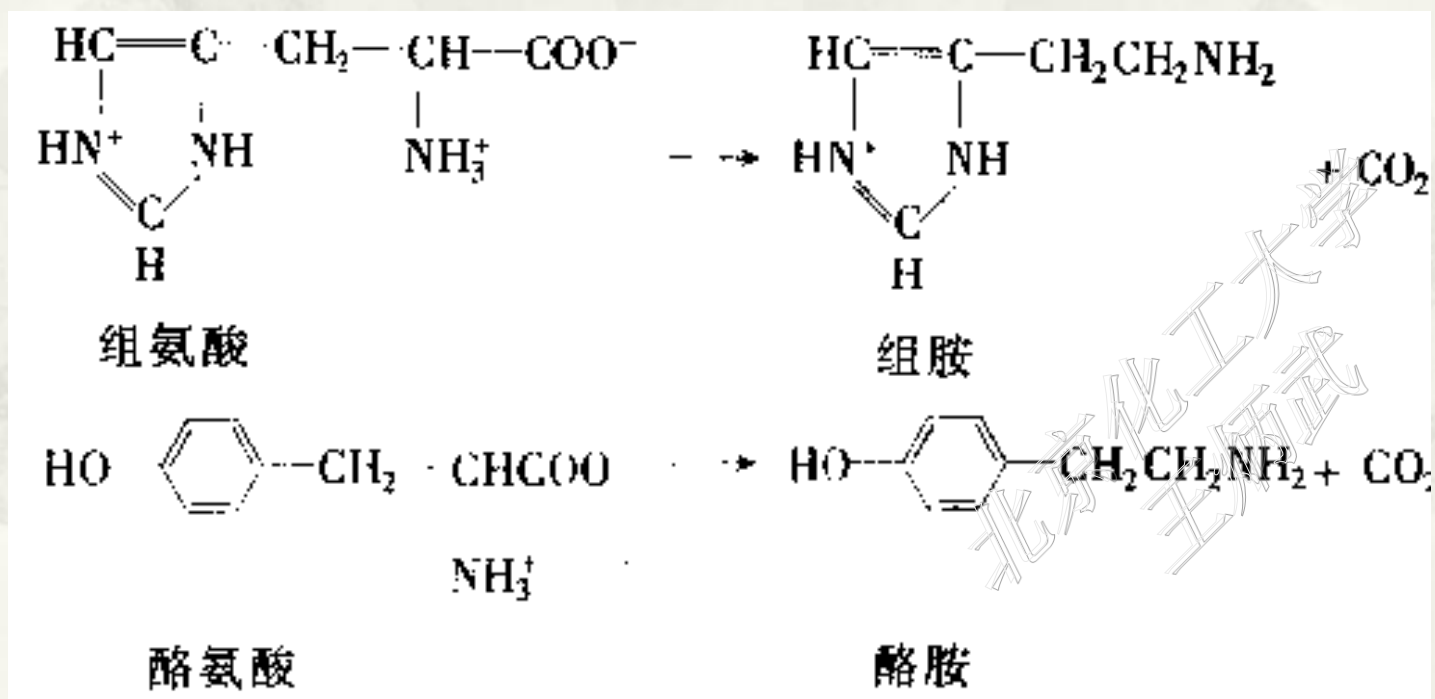
- * 在弱碱或脱羧酶催化下生成胺；
- * 生物体内氨基酸的分解代谢途径之一；



几种重要的脱羧产物

* 组胺：降低血压；

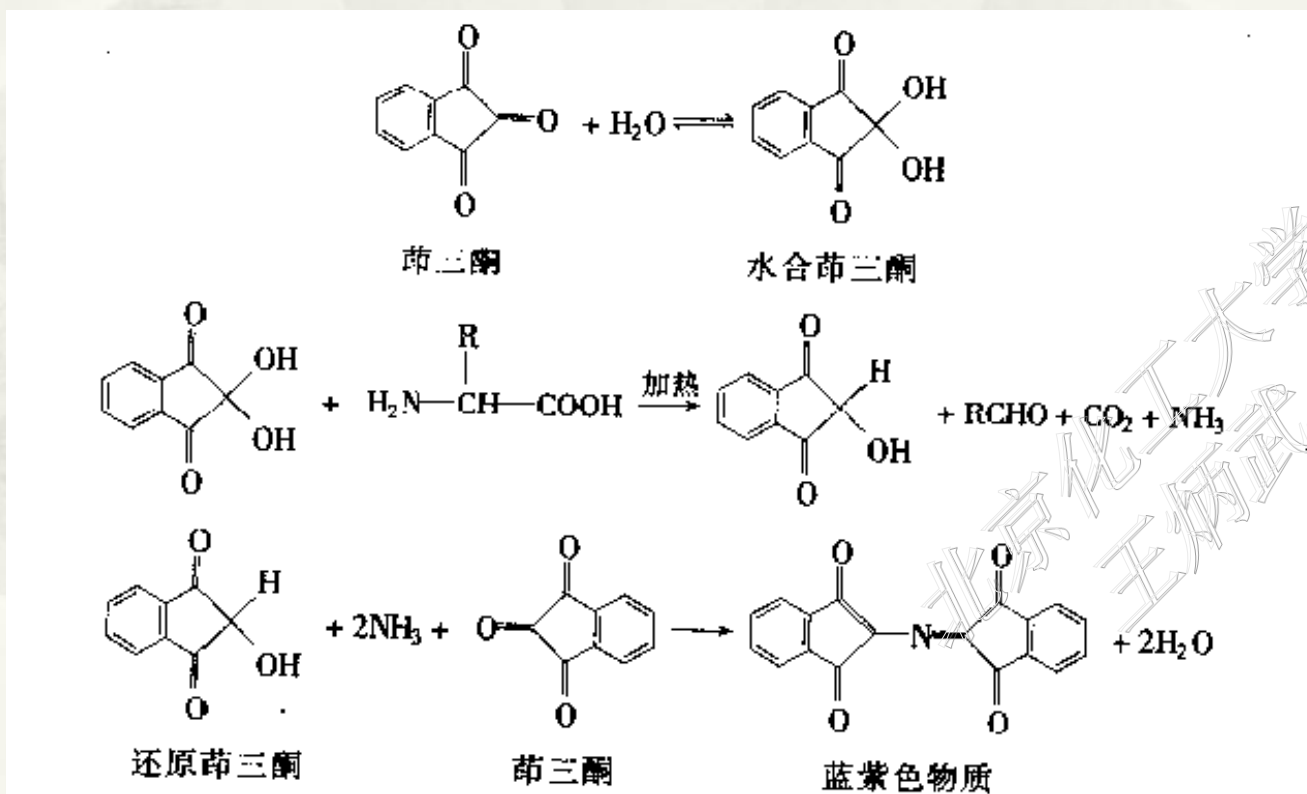
* 酪胺：升高血压；



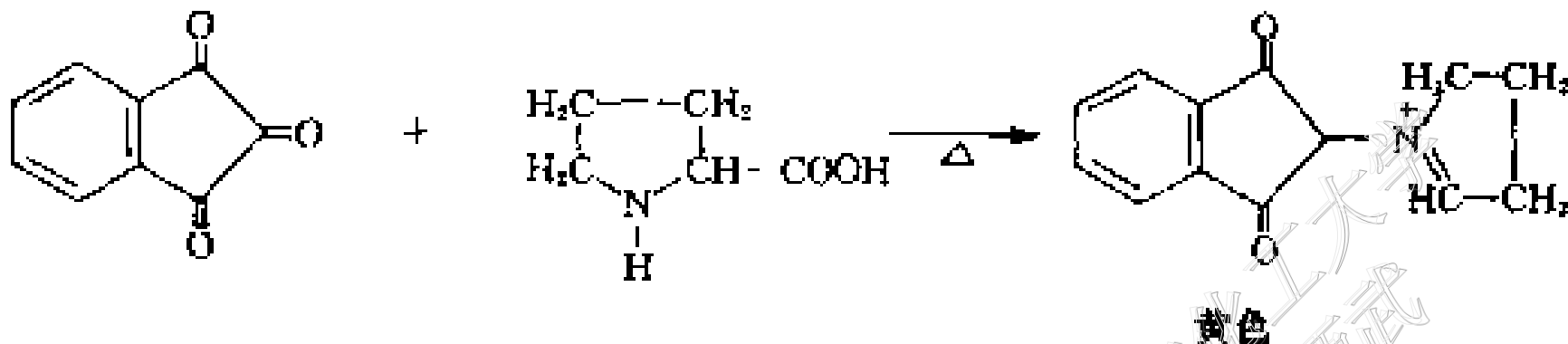
3) 氨基与羧基共同参与的反应

* ① 茚三酮反应

* 弱酸性溶液中，加热；蓝紫色，570nm

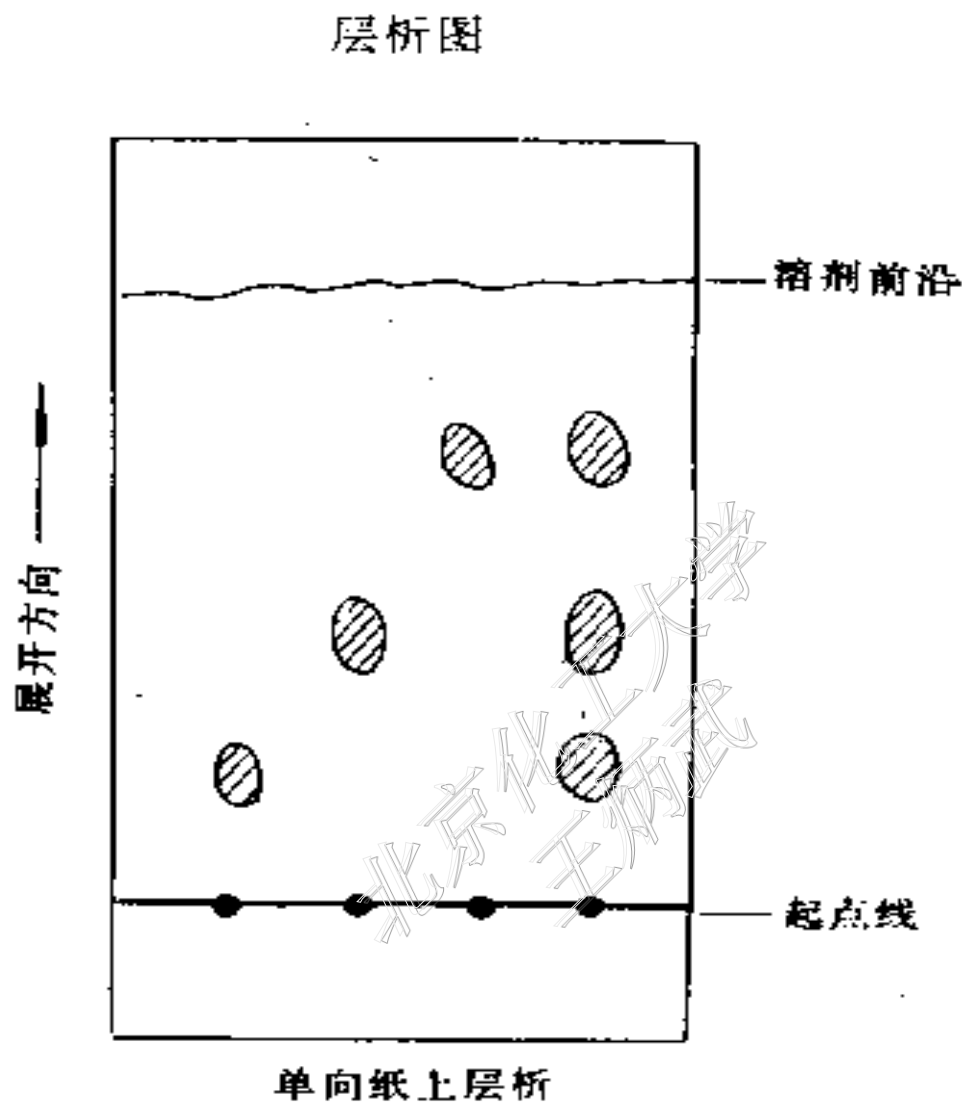


* 脯氨酸：黄色，440nm



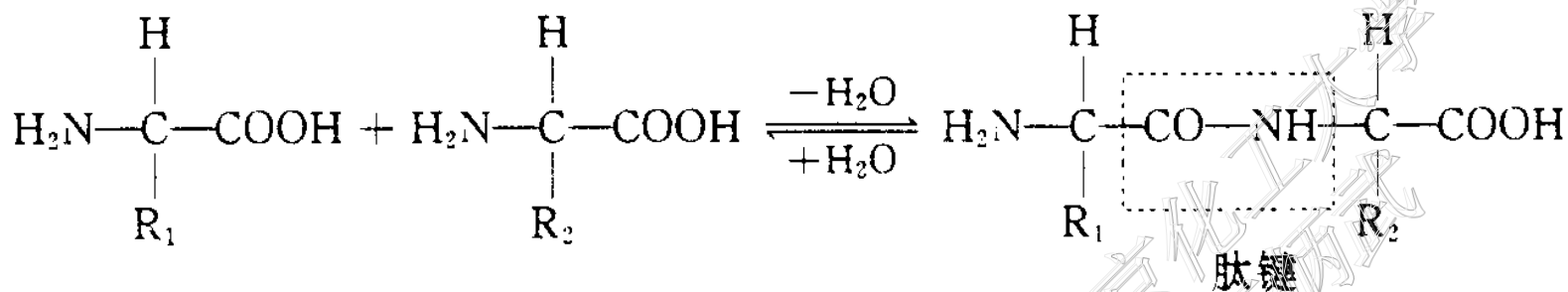
应用

- * 纸层析、电泳分离氨基酸时作为显色剂





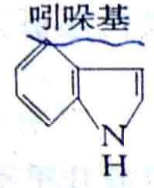
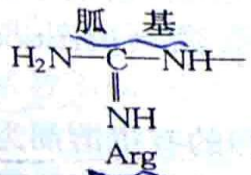
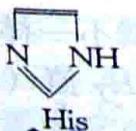
* ②成肽反应

* 一分子氨基酸的 α -羧基与另一分子氨基酸 α -氨基脱水缩合的化合物叫做肽



4) 侧链基团参与的反应

表 3-5 氨基酸侧链 R 基团的部分反应

R 基名称	化 学 反 应	用途及重要性
 苯 环 Tyr, Phe	<u>黄色反应：与 HNO_3 作用产生黄色物质</u>	作蛋白质定性试验，用于鉴定苯丙氨酸和酪氨酸
 酚 基 Tyr	<u>Millon 反应：与 HgNO_3、$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 和 HNO_3 反应呈红色</u> <u>Folin 反应：酚基可还原磷钼酸、磷钨酸生成蓝色物质</u>	用于鉴定酪氨酸，作蛋白质定性定量测定
 吲哚基 Try	<u>乙醛酸反应：与乙醛酸或二甲基氨甲醛反应 (Ehrlich)，生成紫红色化合物</u> <u>还原磷钼酸、磷钨酸成钼蓝、钨蓝</u>	鉴定色氨酸，作蛋白质定性试验
 胍 基 Arg	<u>坂口反应 (Sakaguchi 反应)：在碱性溶液中胍基与含有 α-萘酚及次氯酸钠的物质反应生成红色物质</u>	作精氨酸的测定
 咪唑基 His	<u>Pauly 反应：与重氮盐化合物结合生成棕红色物质</u>	用于组氨酸及酪氨酸的测定

棕红色

桔黄色

练习题

- * 天冬氨酸的pI为2.98，在pH 5的溶液中它应带____电荷，在电场中向____极移动。
- * 在pH=6时，将Gly、Ala、Glu、Lys、Arg和Ser混合物进行纸电泳，向阳极移动最快的是____，向阴极移动最快的是____和____。

北京化工大学
王炳武

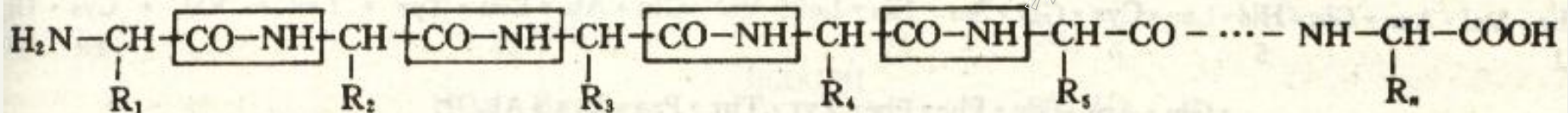
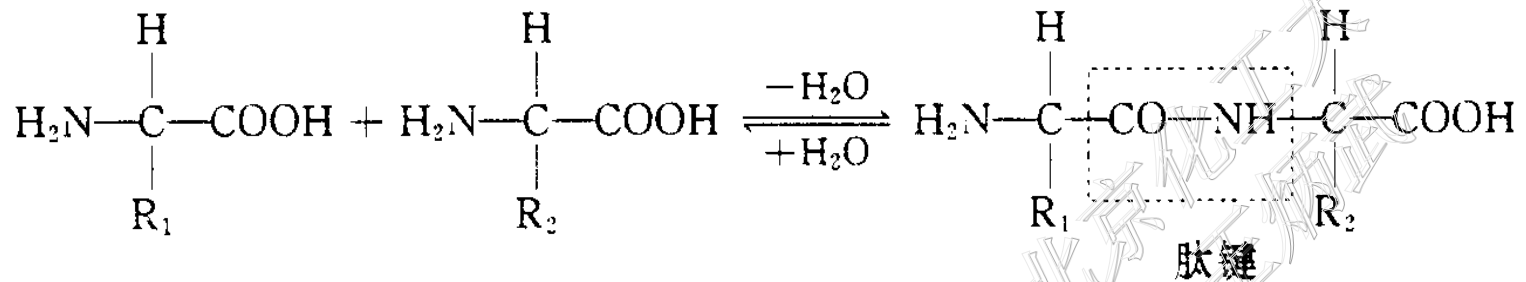
判断题

- * 组成蛋白质的20种氨基酸分子中都含有不对称 α -碳原子。
- * 在酸性条件下茚三酮与20种氨基酸都能生成蓝紫色物质。
- * 只有在很高或者很低的pH溶液中，氨基酸才主要以非离子形式存在。

北京化工大学
王炳武

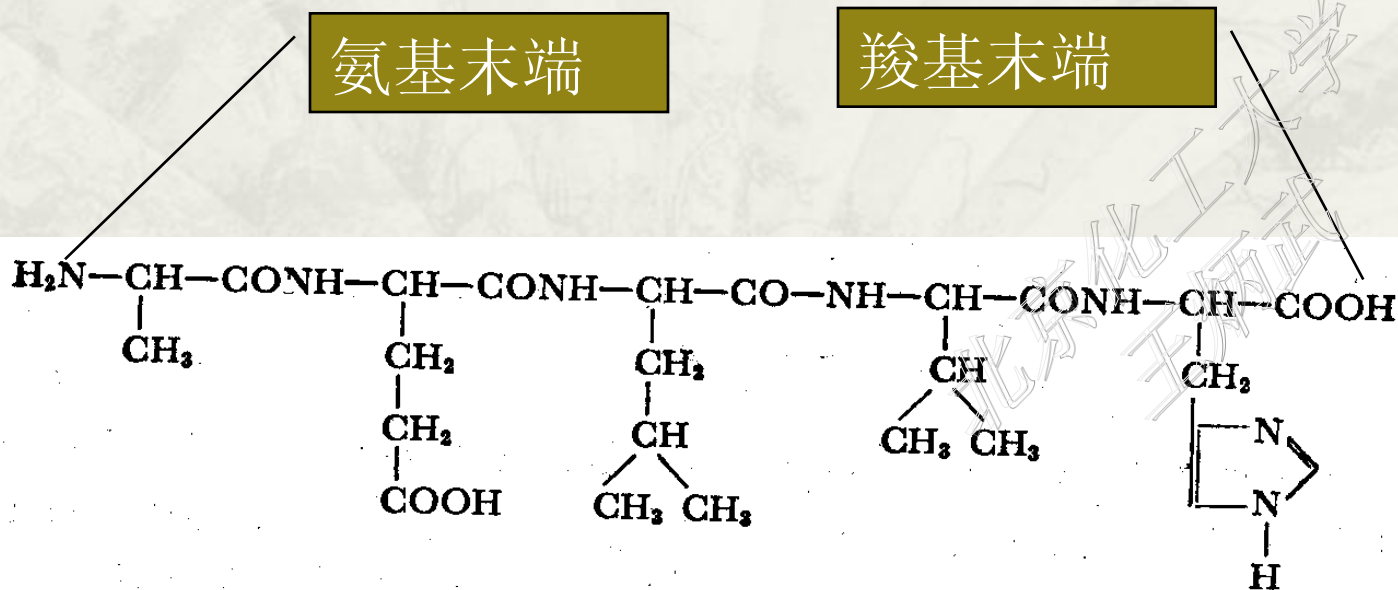
二、肽键与肽

- * 肽(peptide)是两个或者两个以上氨基酸通过肽键(peptide bond)共价连接而成的聚合物,常称为肽链(peptide chain)。
- * 蛋白质通常由一条或者多条肽链构成。



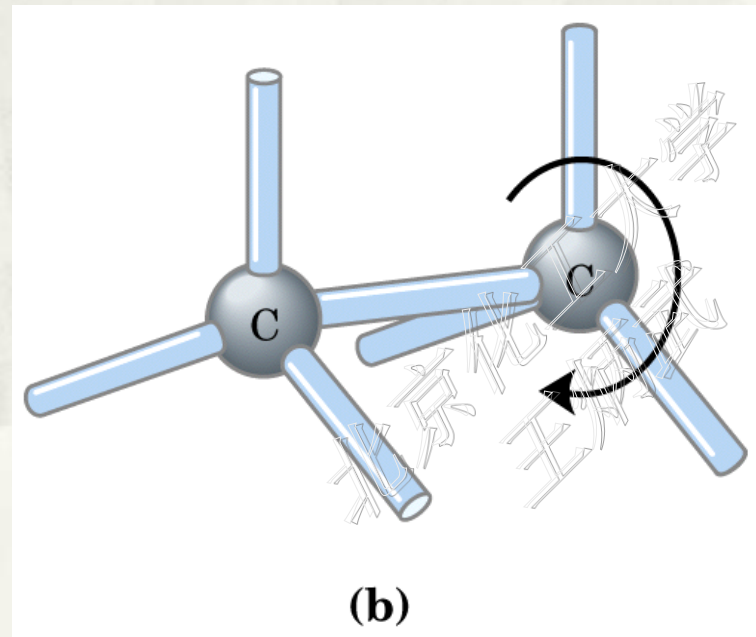
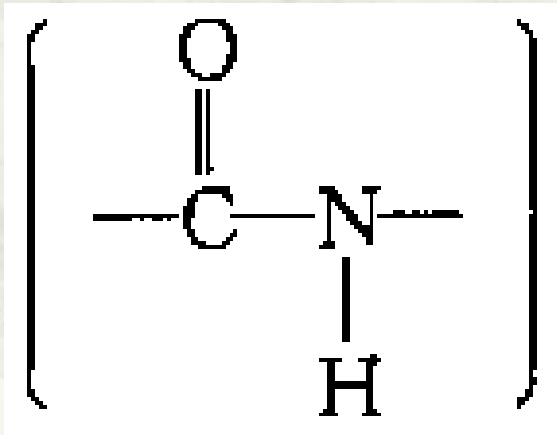
肽的命名

- 多肽化合物的名称，通常按照肽内氨基酸残基的排列顺序，以残基名称（如某某氨酰）**从N端依次阅读到C端**，并以C端残基全名结束肽的名称。
- 下列五肽命名为丙氨酰谷氨酰亮氨酰缬氨酰组氨酸：



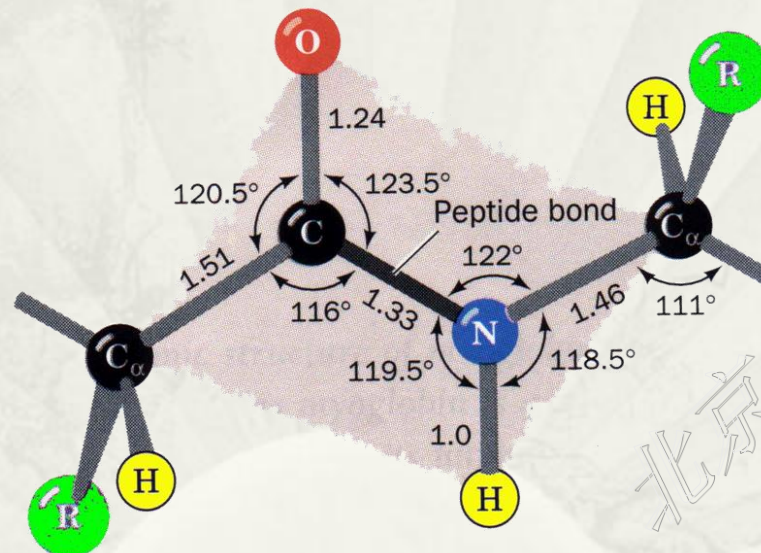
肽键

- * 肽键C-N具有双键的性质，不能自由转动，因此四个原子处于同一平面，H和O呈反式排列
- * C=O双键具有单键性质



肽平面

- * 肽键中的两个 α -碳原子为反式结构；
- * 构成肽键的C、O和N、H以及两个 α -碳原子位于同一平面内，该平面称为肽平面。



待续！

北京化工大学
王炳武