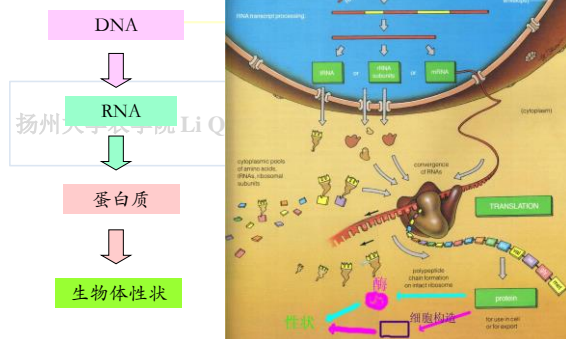


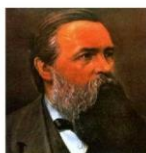
## 第四章 蛋白质检测技术

### 基因表达



### 生命是蛋白质

#### 存在的一种形式



恩格斯



### 第一节 蛋白质的组成及其理化特性

- 一、氨基酸的结构与分类
- 二、蛋白质的理化性质
- 三、蛋白质的功能及研究意义

扬州大学农学院 Li QF

### 第二节 蛋白质检测和鉴定技术类型及其原理

- 一、总蛋白检测技术
- 二、特异性蛋白检测技术
- 三、未知蛋白鉴定技术

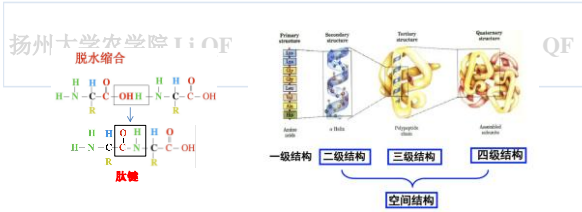
### 第一节 蛋白质的组成及其理化特性

扬州大学农学院 Li QF

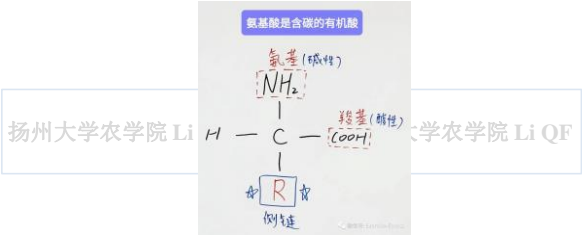
扬州大学农学院 Li QF

一、氨基酸的结构与分类

蛋白质由氨基酸以“脱水缩合”的方式组成多肽链，再经盘曲折叠形成的具有一定空间结构的物质。



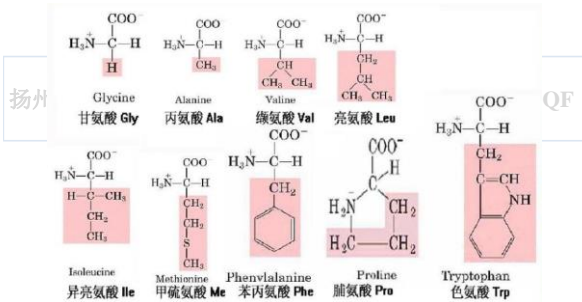
一、氨基酸的结构与分类



- ◆ 氨基酸由一个中心 $\alpha$ 碳，并接上一个羧基、一个氨基、一个氢原子和一个R基的侧链构成。
- ◆ 每一个氨基酸的身份根据其特有的R基侧链来决定。

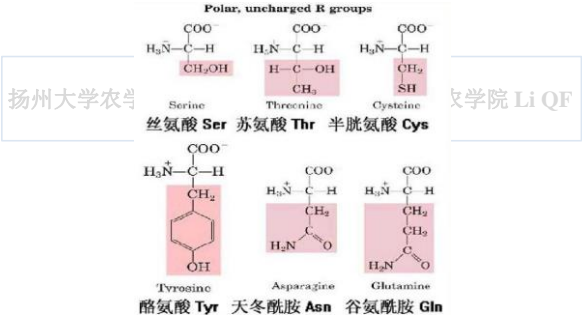
组成生命体中蛋白质的二十种氨基酸

非极性氨基酸



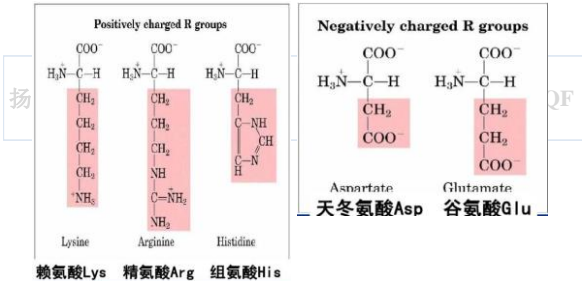
组成生命体中蛋白质的二十种氨基酸

极性但不带电荷氨基酸



组成生命体中蛋白质的二十种氨基酸

带电荷氨基酸

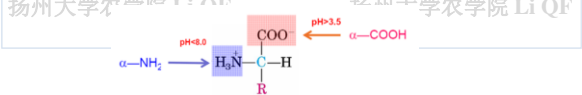


二、蛋白质的理化性质

(一) 蛋白质的两性解离及等电点

1. 氨基酸的解离

- 当 $\text{pH} > 3.5$ 时， $\alpha\text{-COOH}$ 以 $\alpha\text{-COO}^-$ 形式存在；
- 当 $\text{pH} < 8.0$ 时， $\alpha\text{-NH}_2$ 以 $\alpha\text{-NH}_3^+$ 形式存在；
- 当溶液的 $\text{pH}$ 值在 $3.5\text{--}8.0$ 范围时，氨基酸以两性离子存在。



2. 蛋白质的等电点 (pI)

- 等电点：当蛋白质溶液处于某一 $\text{pH}$ 时，蛋白质上可解离基团解离成正、负离子的趋势相等，从而净电荷为零时溶液的 $\text{pH}$ 。
- 等电点时溶解度最小，可使蛋白质沉淀。

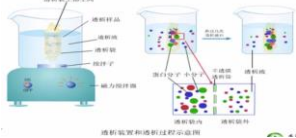
(二) 蛋白质的胶体性质

1. 胶体溶液的三个条件:

- ①大小在1-100nm范围内: 蛋白质分子量很大, 属胶体颗粒范围。
- ②同种电荷互相排斥: 相同蛋白质颗粒带有同性电荷, 与周围的反离子构成稳定的双电层。
- ③质点外有水化层: 多肽链上的极性基团极易吸附水分子, 使蛋白质颗粒外围形成一层水化膜。

蛋白质可以形成稳定的胶体溶液。

2. 利用胶体溶液性质, 可用透析法将蛋白质中小分子杂质除去。



蛋白质变性理论



吴宪  
(1893—1959)

蛋白质变性学说对于研究蛋白质大分子的高级结构有重要价值, 是当前国际蛋白质变性和蛋白质折叠研究的基础。

吴宪于1929年首次提出蛋白质变性理论, 但该理论在当时未受重视。1931年吴宪在《中国生理学杂志》用英文正式提出“变性说”, 指出天然可溶性蛋白质的长肽链一定是由氨基酸的各种极性基团被分子内的某种次级键按一定方式连接而形成有规律的折叠, 使蛋白质分子具有一种紧密的构型(即构象)。蛋白质的这种次级键一旦被物理、化学的力破坏, 构型就被打开, 肽链则由有规律的折叠而变为无序、松散的形式, 即发生了变性。

该篇论文于1995年重新全文刊登于国际权威丛书《Advances in Protein Chemistry》。

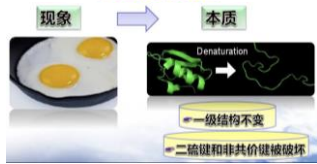
(三) 蛋白质的空间结构被破坏, 会导致变性

• 蛋白质变性: 在某些理化因素作用下, 蛋白质特定的空间构象被破坏, 有序的空间构象变成无序的空间结构, 从而导致其理化性质的改变和生物活性(功能)的丧失。

• 变性因素: 加热、强酸、强碱、重金属离子及生物碱试剂等。

• 此种蛋白质的变性不涉及一级结构的破坏, 只限于二硫键和非共价键的破坏。

蛋白质的变性



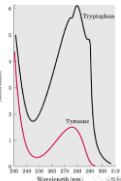
(四) 蛋白质的呈色反应

• 蛋白质分子中某些氨基酸残基侧链基团和肽键可与某些化学试剂反应显色。



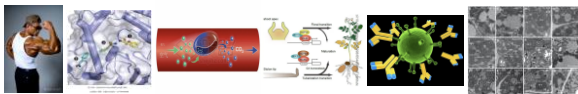
(五) 蛋白质的紫外吸收

• 由于绝大多数蛋白质分子中含有酪氨酸和色氨酸, 因此在紫外280nm波长处有特征性吸收峰。常被作为蛋白质定性或定量测定依据。



三、蛋白质的功能及研究意义

- 1、有机体内的结构组分——蛋白质空间结构具有天然性;
- 2、有机体代谢的催化剂——酶催化底物进行化学反应;
- 3、运输载体——血液载体蛋白运输氧气、荷尔蒙等;
- 4、信号传导——激素分泌后与膜表面的受体蛋白结合
- 5、激素调节——引发蛋白质激酶级联反应, 最终在细
- 6、遗传表达调节——胞核中启动特定基因转录程序;
- 7、有机体免疫防御——抗体结合病原体表面特定抗原;
- 8、贮藏功能——贮藏蛋白。



三、蛋白质的功能及研究意义

1. 蛋白质是生命活动的物质基础

生物体内的蛋白质是除了水以外, 机体组织中最多的组分, 占人体干重的45%, 占细菌干重的50-70%。

2. 帮助开发新药物

蛋白质工程技术已被广泛应用于制备疫苗和细菌毒素抗毒素、生产超滤聚合物等方面, 也为研究疾病发病机理及其治疗提供了重要依据。

3. 促进人类进化和农业进步

蛋白质对其他生命体如树木、蔬菜和动物的生长发育有重要影响。通过改造植物基因组序列, 提高农业产能和产品品质。

4. 推动交叉学科发展

在蛋白质结构学、组学和分析等领域中, 大量其他学科知识的交叉融合, 如: 化学、物理学、计算机科学等彼此相互促进。

## 第二节 蛋白质检测和鉴定技术

### 类型及其原理

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

- 蛋白质定量分析:

确定样品中**总蛋白**含量，或者某种**单一蛋白**成分的多少

- 蛋白质定性分析:

确定样品中**是否有蛋白质存在**，以及存在的是**何种蛋白质**

扬州大学农学院 Li QF

扬州大学农学院 Li QF

### 1、总蛋白检测技术

#### 1.1 凯氏定氮法

#### 1.2 分光光度法

#### 1.3 双缩脲法

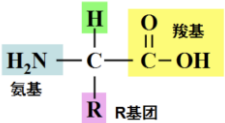
#### 1.4 Bradford法

#### 1.5 BCA法

### 1.1 凯氏定氮法

1. 蛋白质主要由C、N、H、O四种元素组成；
2. 氮元素是蛋白质区别于糖和脂肪的特征。

因此，只要测定出生物样品中的含氮量，就可以推算出样品中的**总**蛋白质含量。



**原理：**绝大多数蛋白质氮元素含量接近，一般恒定在12~19%，平均值为16%左右。

蛋白质与**浓硫酸**和**催化剂**一同加热消化，使蛋白质分解，其中碳和氢被氧化为二氧化碳和水溢出，而样品中分解的氮与硫酸结合生成硫酸铵；然后**碱化**蒸馏使氮游离，用**硼酸** (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 吸收后再以**硫酸或盐酸**标准溶液滴定，**根据酸的消耗量可以计算出含氮量**，**再来以相应的蛋白换算系数得蛋白质含量**。

整个过程分为三步：**消化、蒸馏与吸收、滴定**

**仪器：**



优缺点:

优点:

- 1、用途广，可用于所有食品的蛋白质分析。
- 2、操作相对简单。
- 3、实验费用较低。
- 4、测氮含量结果准确，重复性好。



缺点:

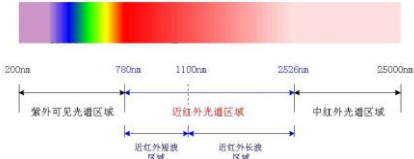
- 1、最终测定的是总有机氮，而不只是蛋白质氮。
- 2、实验时间长，至少需要2小时才能完成。
- 3、精度不高。

1.2 分光光度法

物质与光作用，具有选择吸收的特性。有色溶液所呈现的颜色是由于溶液中的物质对光的选择性吸收所致。

利用物质所特有的吸收光谱来鉴别物质的存在（定性分析），或利用物质对一定波长光的吸收程度来测定物质含量（定量分析）的方法，称为分光光度法。

常用的技术包括紫外-可见分光光度法、红外分光光度法等。



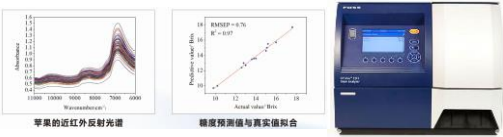
分光光度法定量依据：朗伯-比尔（Lambert-Beer）定律

朗伯-比尔定律 $A=abc$ ，a: 吸光系数, b: 液层厚度（光程），c: 浓度  
其意义为：当一束单色光通过一均匀溶液时，溶液对单色光的吸光度与溶液浓度和液层厚度的乘积成正比。

由上式可知，当溶液层厚度b和吸光系数a固定时，吸光度A与溶液的浓度成线性关系

近红外（NIR）光谱法

原理：近红外光谱的波长范围通常是700-2500nm，这个范围内的光可以穿透样品并与样品中的分子相互作用。蛋白质分子中的氨基酸残基对红外光具有吸收特性，不同残基对光的吸收和散射程度也不同，因此可以用近红外光谱来区分不同的蛋白质。



优缺点:

优点:

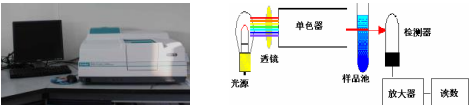
- 1、简单方便，可直接测定液体、固体、半固体和胶状体等样品。
- 2、检测成本低。
- 3、分析速度快，可在1min内完成。
- 4、可进行无损检测。
- 5、分辨率高，可同时对样品中多个组分进行定性和定量分析。

缺点:

- 1、需大量有代表性且化学值已知的样品建模。
- 2、模型需不断更新，如仪器状态改变或标准样品变化，模型也随之变化。
- 3、模型不通用，每台仪器的模型都不同，增加使用局限性。
- 4、建模成本高。

紫外光光度法

原理：组成蛋白质的氨基酸中，酪氨酸和色氨酸残基的苯环含有共轭双键，在280nm处有一个紫外吸收高峰。一定浓度范围内，蛋白质溶液在最大吸收波长处的吸光度与其浓度成正比，服从朗伯-比耳定律，通过测定吸光度来计算蛋白质浓度，测定浓度范围为0.1-1mg/ml。



优缺点:

优点:

- 1、方法操作简便、迅速;
- 2、设备简单;
- 3、不消耗样品;
- 4、稳定性好 (低浓度的盐和大多数缓冲溶液不干扰测定)

缺点: 准确度和灵敏度较差。

如测定与标准蛋白质中铬氨酸和色氨酸含量差异较大的蛋白质, 有一定误差。  
如样品中含有嘌呤、嘧啶等吸收紫外光的物质, 会产生较大干扰。

试剂:

- (1) 标准蛋白质溶液  
用标准结晶牛血清蛋白 (BSA) 或酪蛋白配制。

- (2) 双缩脲试剂  
由0.1g/mL氢氧化钠、0.01g/mL硫酸铜和酒石酸钾钠配制而成。

仪器:

可见分光光度计 (在540nm比色测定)。



1.4 Bradford法

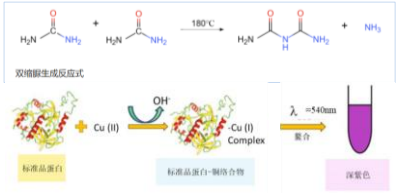
原理: 考马斯亮蓝G-250染料, 带负电荷, 在酸性溶液中与蛋白质中的碱性氨基酸 (特别是精氨酸) 和芳香族氨基酸残基结合, 溶液颜色也由棕黑色变为蓝色。在595nm下测定的吸光值与蛋白质浓度成正比。



1.3 双缩脲法

原理: 双缩脲 (NH<sub>2</sub>CONHCONH<sub>2</sub>) 是两个分子脲经180℃左右加热, 放出一个分子氨后得到的产物。在强碱性溶液中, 双缩脲与二价铜离子形成紫色络合物, 称为双缩脲反应。

紫色络合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比, 而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关, 故可用来测定蛋白质含量。



优缺点

优点:

- 1、不同种类蛋白质产生颜色深浅相近, 干扰物少;
- 2、测定时间较短 (20-30分钟), 方法较为简单快速;
- 3、适用于需要快速但不需要精确测定的蛋白质测定。

缺点:

- 1、灵敏度较低。
- 2、干扰物质主要是硫酸铵、Tris缓冲液和某些氨基酸等。

优缺点

优点:

- 1、蛋白质-染料复合物有更高的消光系数, 灵敏度高。
- 2、测定快速 (~5分钟)、简便 (只需加一种试剂)。
- 3、干扰物质少。

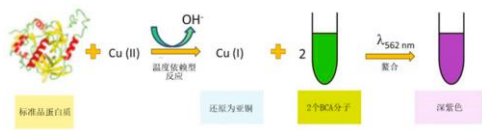
缺点:

- 1、由于各种蛋白质中精氨酸和芳香族氨基酸含量不同, 因此测定不同蛋白质有较大偏差。
- 2、标准曲线也有轻微非线性。



1.5 二喹啉甲酸（BCA）法

**原理：**将二价铜离子还原为一价铜离子，并与BCA溶液相互作用形成明亮的紫色溶液，该溶液可在500-570 nm 的波长下进行测量。



优缺点

- 优点：**
- (1) 灵敏度较高，适合蛋白质的微量测定；
  - (2) 所用仪器简单，不同蛋白质间的变异少。

- 缺点：**
- (1) 对本法产生干扰的物质较多；
  - (2) 反应速度慢、耗时较长。

2、特异性蛋白检测技术

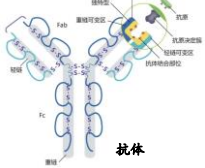
2.1 Western Blot（免疫印迹）

2.2 ELISA（酶联免疫吸附）

2.1 Western Blot 技术

**抗原：**指能刺激机体产生（特异性）免疫应答，并能与免疫应答产物（抗体）和致敏淋巴细胞在体内外结合，发生免疫效应（特异性反应）的物质。

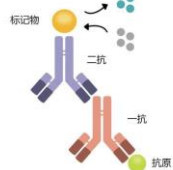
**抗体：**指机体的免疫系统在抗原刺激下，由B淋巴细胞或记忆细胞增殖分化成的浆细胞产生的、可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。



**一抗：**一种免疫球蛋白，能**特异性结合目的蛋白**或重点研究的其他生物分子，目的是对其进行纯化、检测和测量。

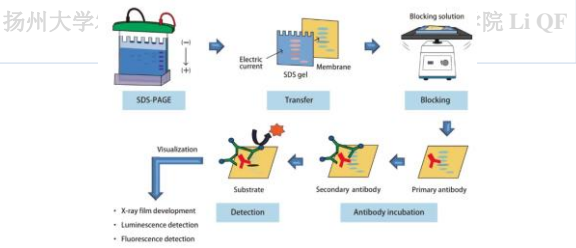
**二抗：**可结合针对某一特定物种（如兔子）的所有一抗，即**抗体的抗体**，属于通用型抗体。**二抗上会耦联标记**，例如酶（辣根过氧化物酶HRP等）、荧光基团、生物素等，易被检出，从而指示出目的蛋白。

如一抗自带可被检测出的耦联标记，则无需二抗，但生产成本会很高。因此，商业化的二抗设计为可识别所有一抗，以免去对每个一抗进行标记。

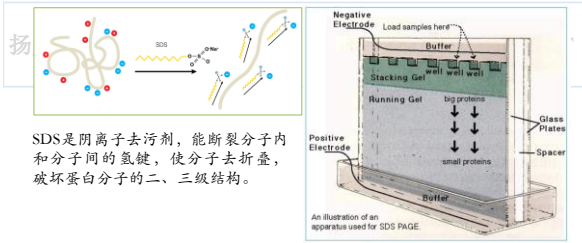


一抗用来特异性识别目的蛋白，二抗用来放大信号并显色

**WB原理：**采用的是**十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳**（SDS-PAGE），被检测物是蛋白质，“探针”是**抗体（一抗）**，“显色”用**标记的二抗**。经PAGE分离的蛋白质样品，转移至固相载体（如硝酸纤维素薄膜、PVDF膜），以非共价键形式吸附蛋白质。固相载体上的蛋白与对应抗体起免疫反应，再与标记的二抗反应，**经底物显色检测电泳分离的特异性目的蛋白**。



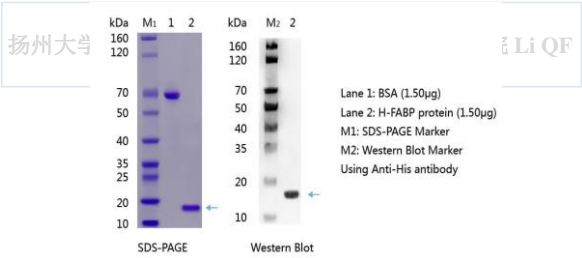
**SDS-PAGE原理：**是一种可以根据蛋白质的分子量大小分离样本中蛋白的技术，在电荷的影响下分离大分子称为电泳（electrophoresis），在SDS-PAGE中使用的凝胶是聚丙烯酰胺（polyacrylamide），使蛋白质呈线性化的试剂是SDS，因此得名SDS-PAGE。



SDS是阴离子去污剂，能断裂分子内和分子间的氢键，使分子去折叠，破坏蛋白分子的二、三级结构。

**Western Blot的应用：**

- 1、目的蛋白的表达特性分析
- 2、目的蛋白与其它蛋白的互作
- 3、目的蛋白的组织定位目的蛋白的表达量分析



**优缺点**

**优点：**

- 1、可以同时检测多个目的蛋白
- 2、可以区分分子量相近的蛋白
- 3、可定量
- 4、低背景，高信噪比
- 5、适合检测低丰度蛋白

**缺点：**

- 1、有交叉反应引起的非特异性条带
- 2、额外的二抗孵育以及条件优化

**2.2 ELISA法**

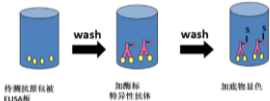
**原理：**酶标记抗体可与吸附在固相载体上的抗原或抗体发生特异性结合。滴加底物溶液后，底物可在酶作用下使其所含的供氢体由无色的还原型变成有色的氧化型，出现**颜色反应**。因此可通过底物的颜色反应来判定有无相应的免疫反应，颜色反应的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正比。

ELISA方法中有3种必要的试剂：①固相的抗原或抗体；②酶标记的抗原或抗体；③酶作用的底物。

**ELISA法不同类型**

**1、直接 ELISA**

在直接 ELISA 中，抗原直接结合微孔板表面，随后添加直接偶联的抗体来结合/检测。



**2、间接 ELISA**

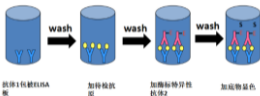
间接 ELISA 类似于直接 ELISA；但主要的差别在于会通过第二偶联抗体来检测结合抗体。



**ELISA法不同类型**

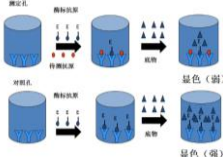
**3、夹心法 ELISA**

在夹心 ELISA 中，抗原成为 2 种抗体之间的“三明治”中心。



**4、竞争性ELISA**

也称封闭 ELISA，它对干扰预计信号的程度进行定量，以测定分析物的数量。这样做的一个方法是用一种对靶标有特异性的抗体包被平板。





3、未知蛋白鉴定技术

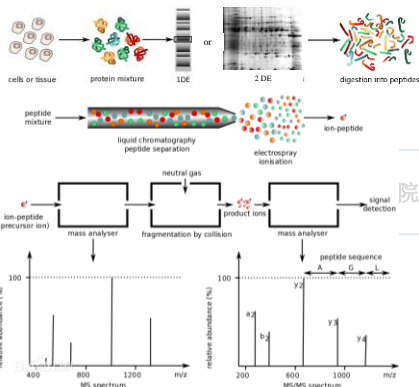
3.1 Edman降解法测N端序列

3.2 质谱技术

原理：是测定蛋白质一级结构的方法，利用异硫氰酸苯酯（PITC）从蛋白质N端逐一降解，分为耦合、切割、萃取、转化和鉴定等几个步骤。这种方法可得到准确的肽序列，是蛋白质鉴定可靠性的的重要依据。



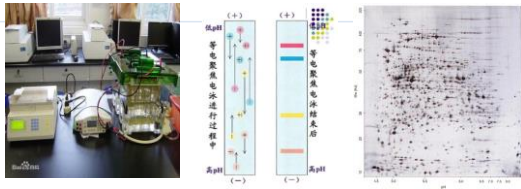
全自动蛋白测序仪



蛋白质双向电泳技术

蛋白质组分首先需通过双向电泳等分离技术分离，然后再利用适当的技术鉴定，才可揭示特定蛋白组分的性质、结构和功能。

双向电泳是等电聚焦电泳和SDS-PAGE的组合，即先进行固相PH梯度等电聚焦电泳（IEF），再进行SDS-PAGE（按照分子大小），经染色得到的电泳图是个二维分布的蛋白质图。



3.2 质谱技术

原理：分离的蛋白质样品经蛋白酶酶切消化后成肽段混合物，其在质谱仪中电离形成带电离子，质谱分析器的电场、磁场将具有特定质量与电荷比值（即质荷比，M/Z）的肽段离子分离开，经检测器收集分离的离子，确定每个离子的M/Z值。经过质量分析器可得到蛋白质所有肽段的M/Z图谱，即蛋白质的一级质谱峰图。



质谱图

以质荷比m/z为横坐标，以对基峰（最强离子峰，规定相对强度为100%）相对强度（或称丰度，abundance）为纵坐标所构成的图谱，称之为质谱图。

