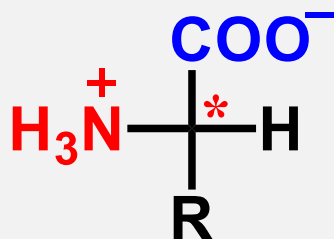


第三章 蛋白质

- 一. 蛋白质概述 ✓
- 二. 氨基酸 (重点) ✓ ←
- 三. 多肽 (重点) ←...
- 四. 蛋白质的结构 (重点)
- 五. 蛋白质结构与功能 (重点)
- 六. 蛋白质的性质 (重点)
- 七. 蛋白质的分离纯化与鉴定 (重点)

上次课要点回顾

● 氨基酸结构



L- α -amino acid

20种基本氨基酸

- 15种中性氨基酸
- 2种酸性氨基酸
- 3种碱性氨基酸

必需氨基酸

非基本氨基酸

● 氨基酸的一般性质

- 手性 (旋光活性)
- 紫外吸收 (特征吸收)
- 两性离子 (既是酸又是碱)
- 等电点 (定义、计算、特性)
- α -氨基酸中羧基、氨基的酸碱性与普通有机羧酸、胺的差异

课后思考题堂上答

两个学生作答 (1~3个*) :

1. α -氨基酸中氨基的碱性比普通的有机胺中氨基的碱性强还是弱? 为什么?
2. 试比较 α -氨基酸、 β -氨基酸和 γ -氨基酸的等电点高低, 并解释原因。

二、氨基酸

6. Chemical Reactions

- 自学 (参看教材p52-57)

- (1) α -氨基参与的反应

- (2) α -羧基参与的反应

- (3) α -氨基和羧基共同参与的反应

- 要求了解

- 1. 各反应的原理及其用途

- 2. 生物体系中的有关反应过程

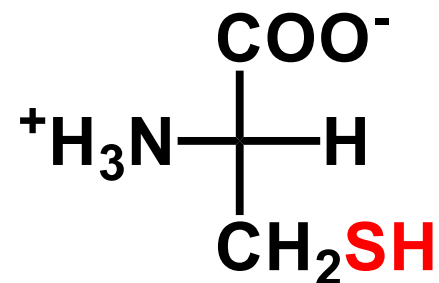
二、氨基酸

6. Chemical Reactions

(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

a. Sulfhydryl (-SH, 巯基)

- 弱酸性 ($pK_a = 10.28$)
- 亲核性
- 络合性
- 还原性

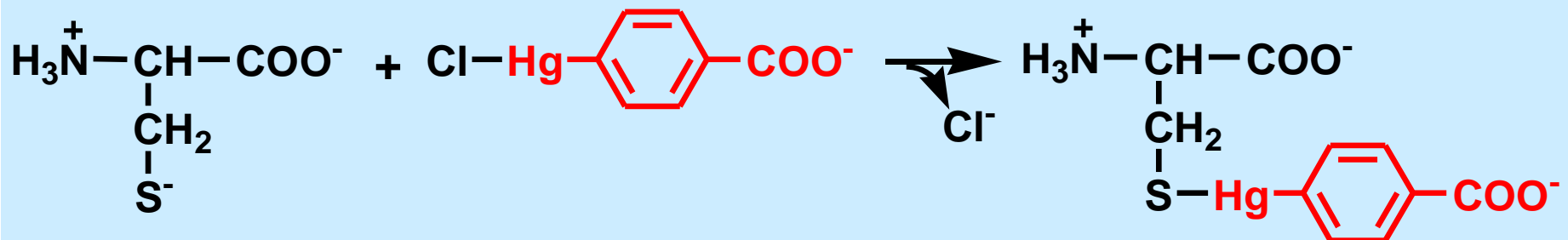


Cysteine (Cys, C)
半胱氨酸

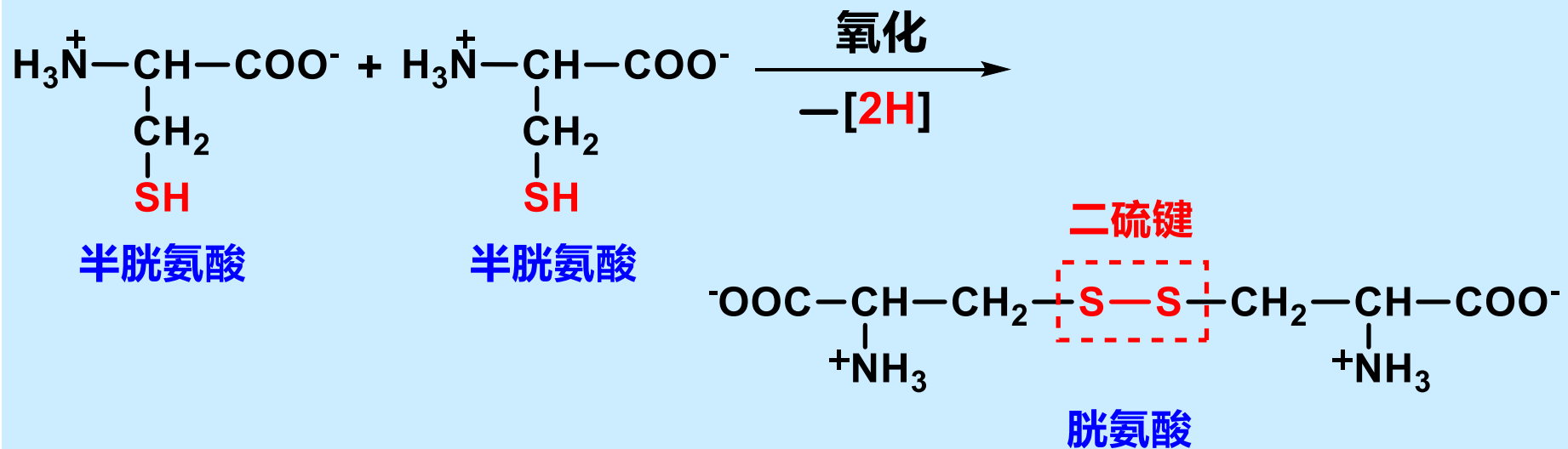
亲核性



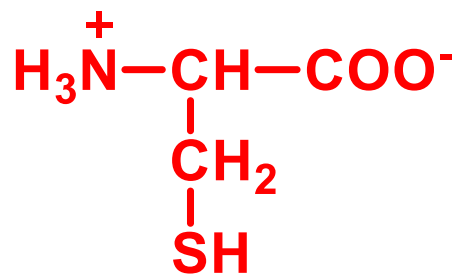
络合性



还原性

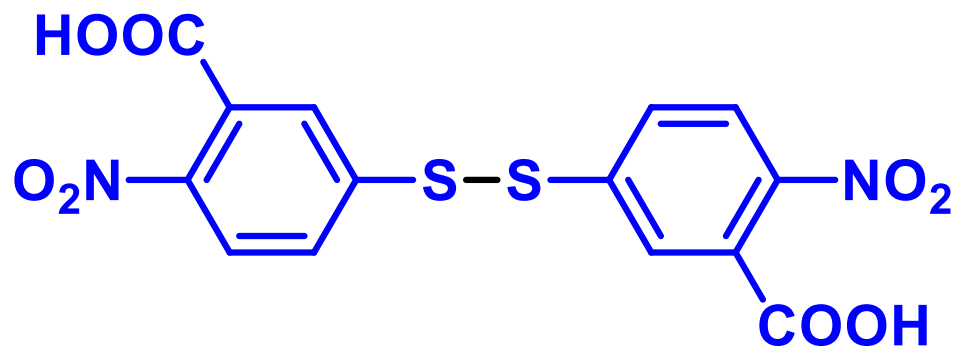


还原性 (Cys分析测定)

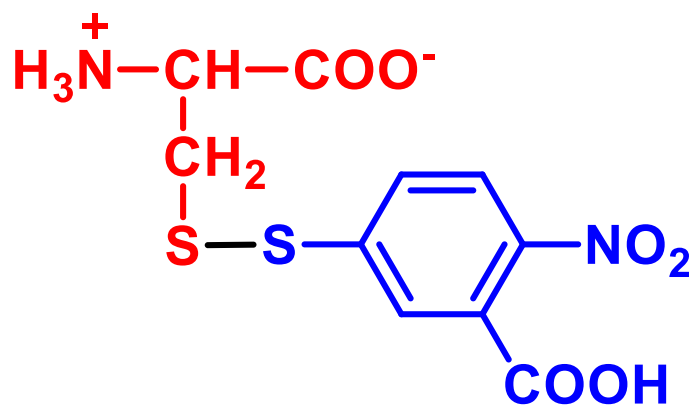


半胱氨酸

+

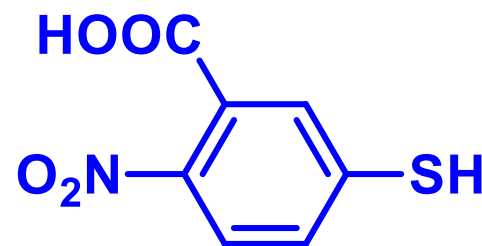


Ellman试剂：二硫硝基苯甲酸



半胱氨酸—硝基苯甲酸二硫化物

+



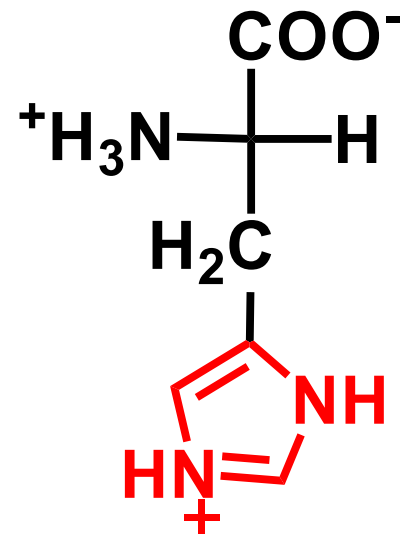
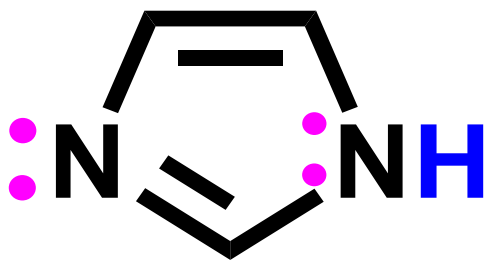
间巯基邻硝基苯甲酸

特征吸收：412nm

(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

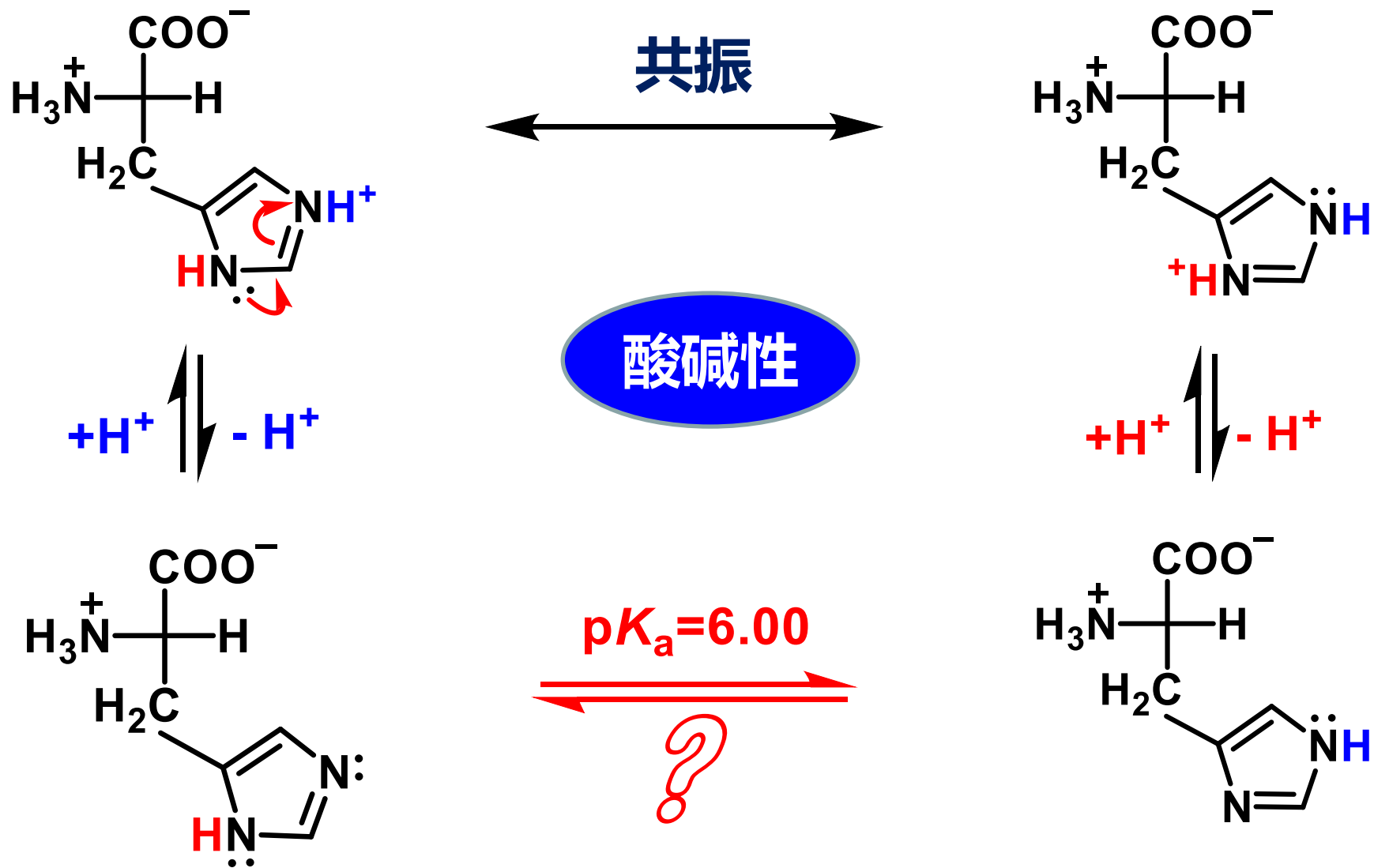
b. Imidazole group (咪唑基)

- 酸碱性 (重要特性)
- 亲核性 (重要特性)
- 烷基化、磷酸化



Histidine (His, H)
组氨酸

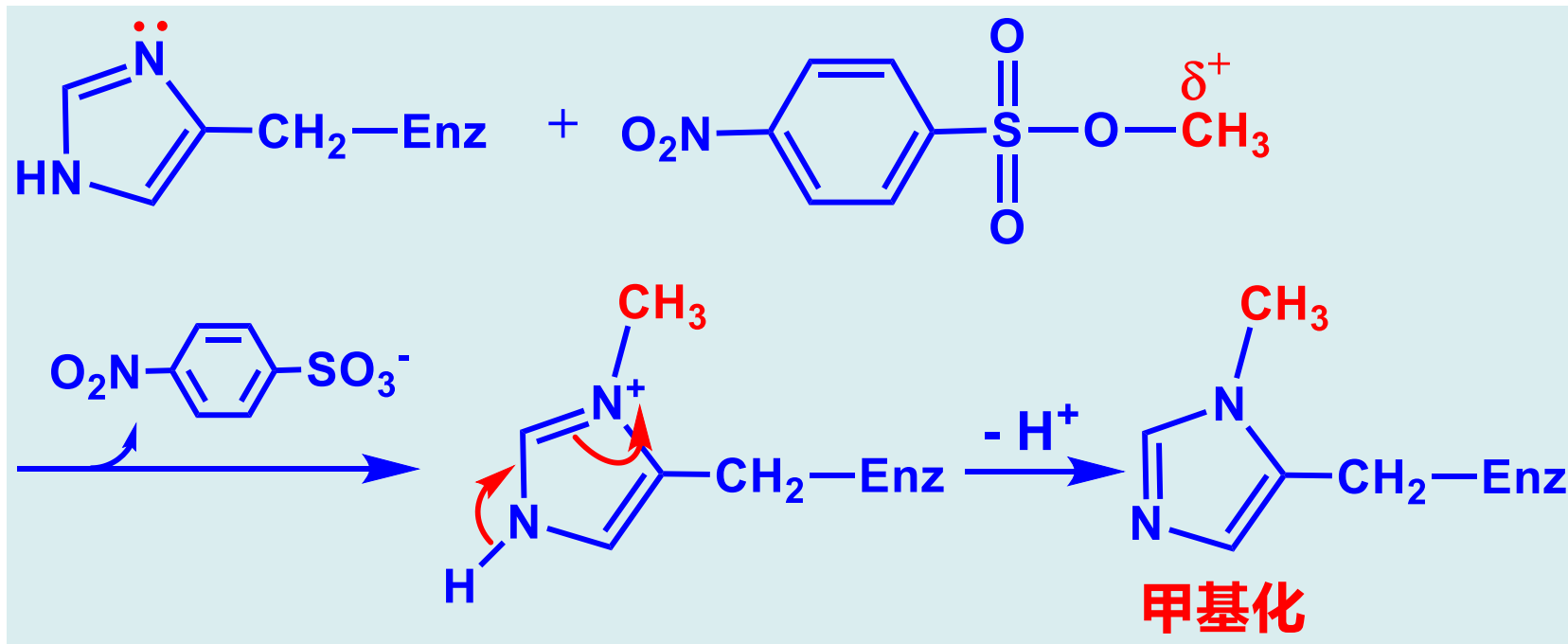
Acid-base properties of imidazole group



亲核性

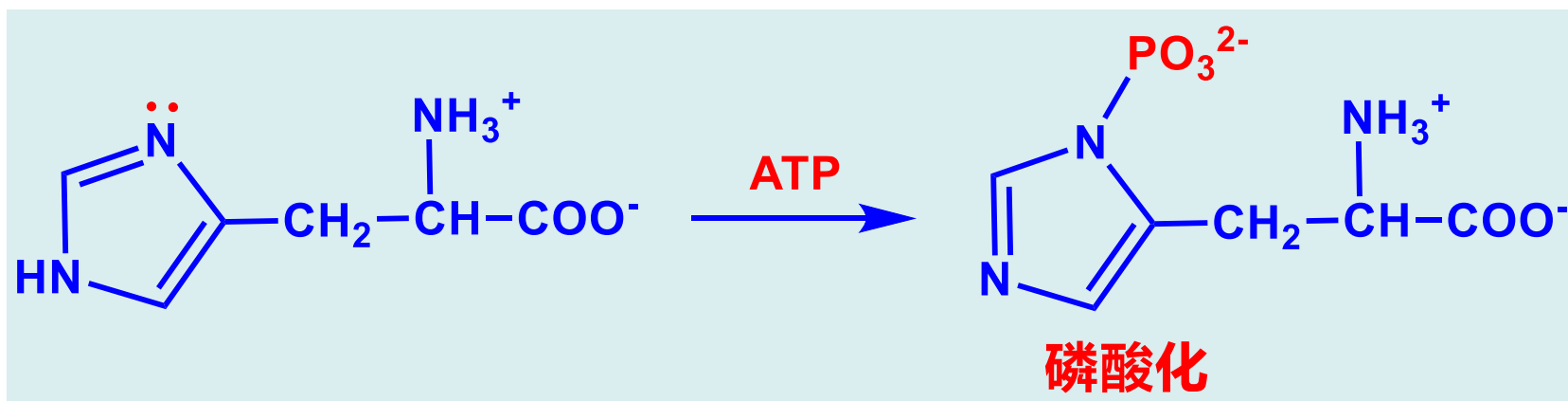
烷基化

➡ 酶失活



磷酸化

➡ 酶活化

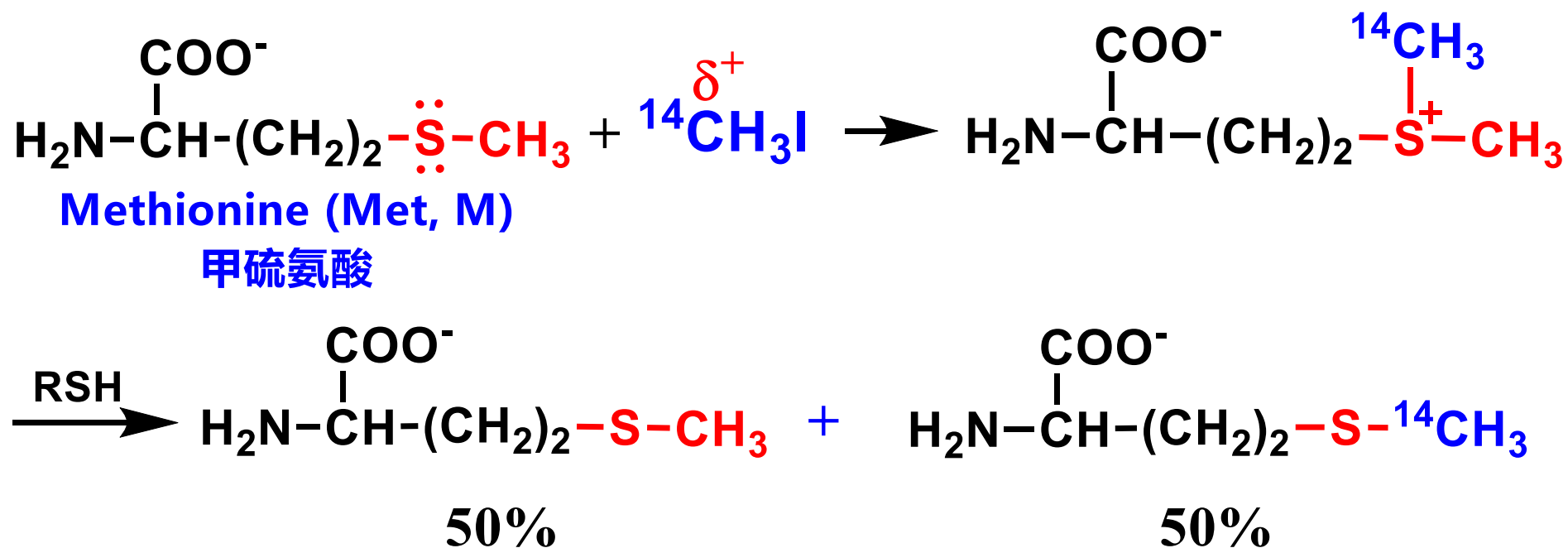


(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

c. Methyl thioether group (-SCH₃, 甲硫醚基)

--- 亲核性

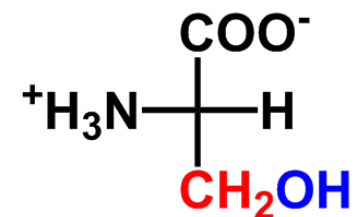
应用：蛋白标记



(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

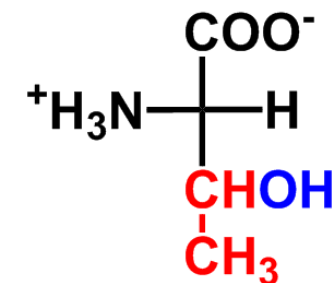
d. hydroxyl group (-OH, 羟基)

- Ser and Thr
- form hydrogen bond with other groups.
- 亲核性
 - form ester with acids, such as phosphate in casein (酪蛋白).
 - acylating reagent (酰基化剂) as inactivator (失活剂) of enzyme.



Serine (Ser, S)

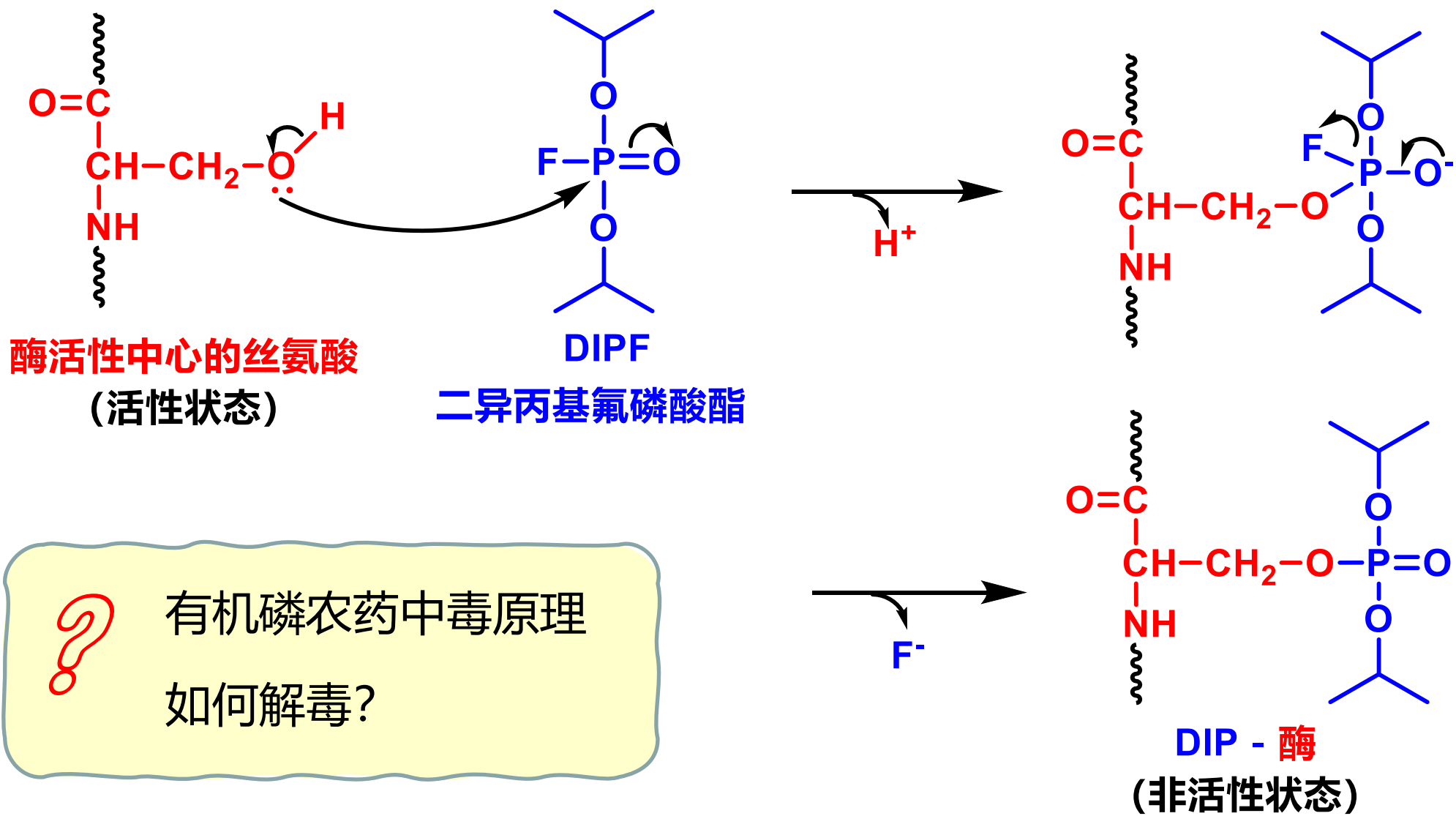
丝氨酸



Threonine (Thr, T)

苏氨酸

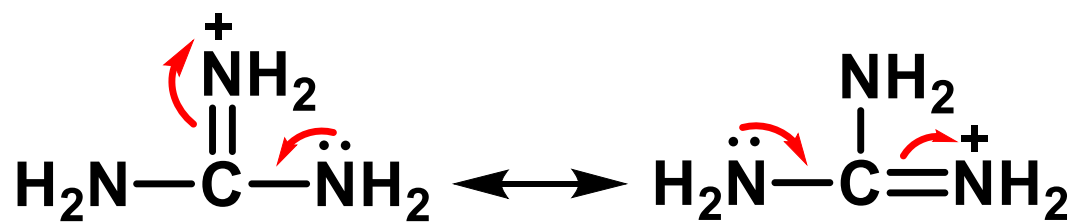
Inactivation of Enzyme



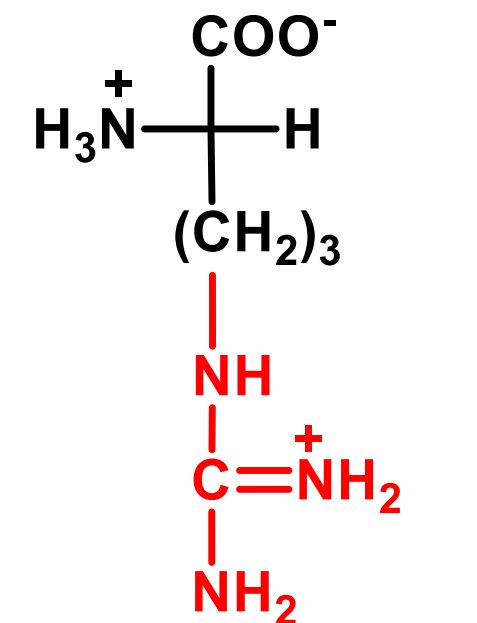
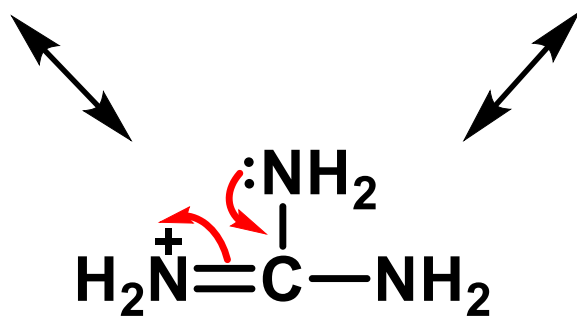
(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

e. guanidino group (胍基)

-- 强碱性 ?



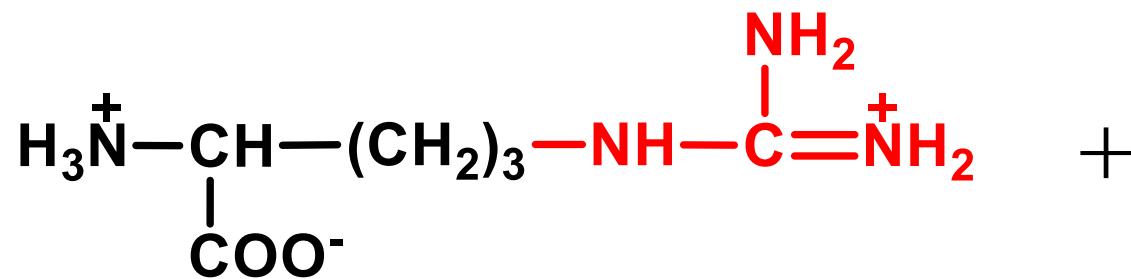
胍的共轭酸



Arginine (Arg, R)
精氨酸

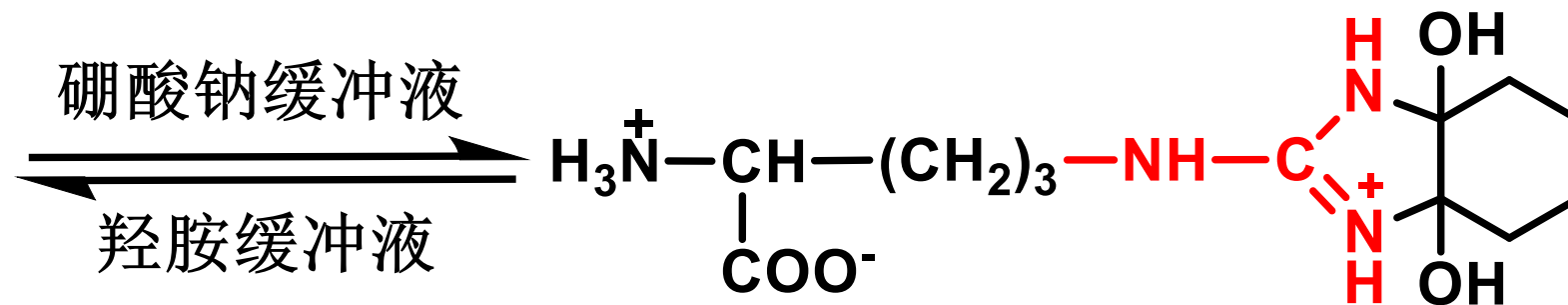
e. guanidino group (胍基)

应用：氨基酸顺序分析



精氨酸

[3 + 2]环加成反应



精氨酸环己二酮缩合物

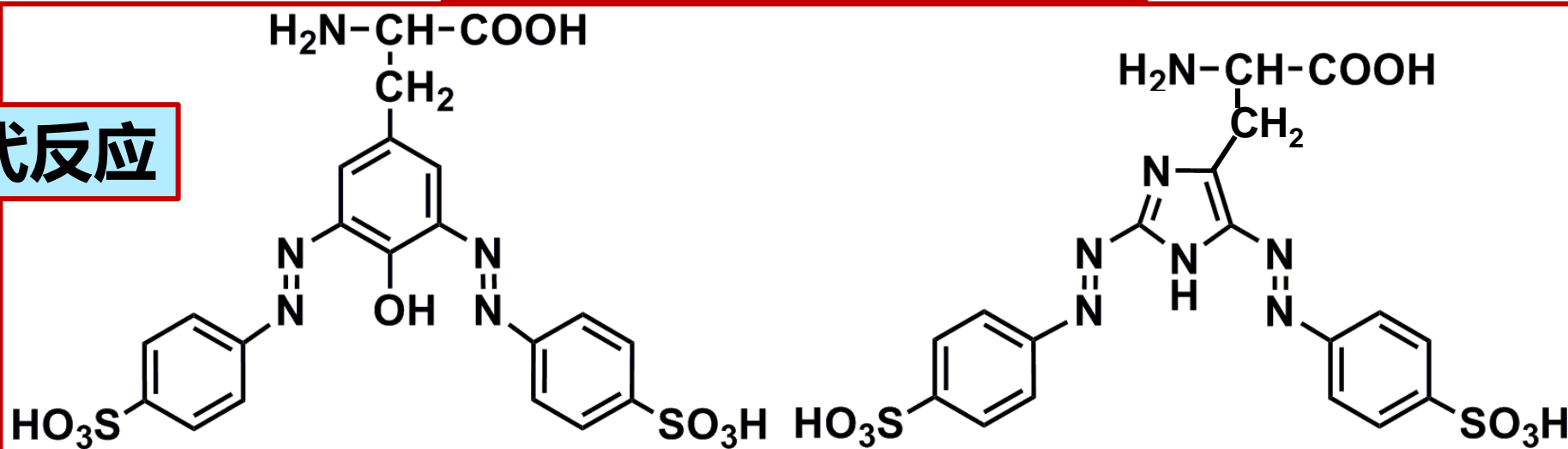
(4) 侧链基团的化学性质 (教材p57-62)

f. Aromatic group (芳基, -Ar)

与重氮盐发生颜色反应

应用: Pauly显色反应

亲电取代反应



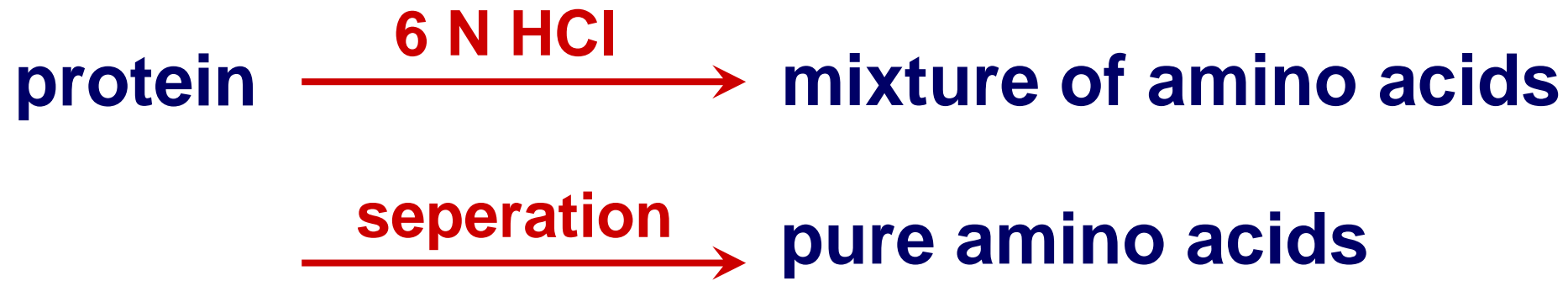
酪氨酸与重氮盐反应的产物 (橘黄色)

组氨酸与重氮盐反应的产物 (棕红色)

二、氨基酸

7. Preparation of amino acids

1. 蛋白质水解法



2. 微生物发酵法

3. 人工合成法

二、氨基酸

8. Chemical Synthesis

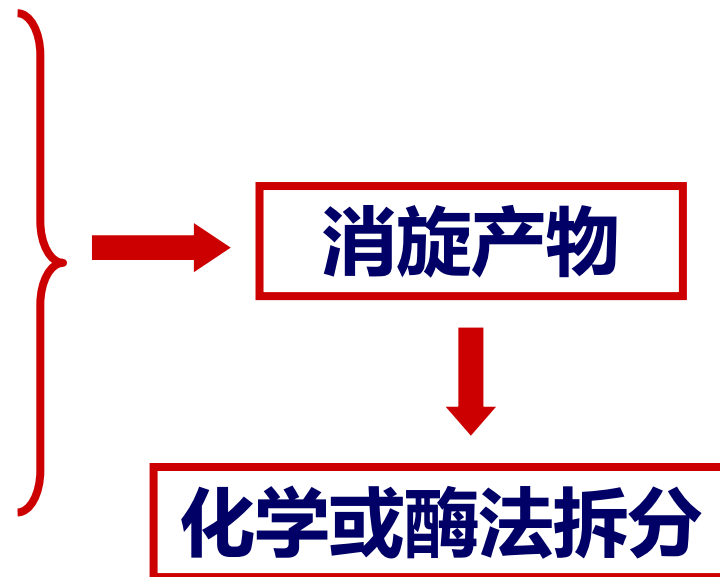
(1) 经典化学合成法及拆分 (自学, 教材p62 ~ 64)

a. 还原氨化法

b. α -卤代酸的氨化

c. Gabriel-丙二酸酯合成法

d. Strecker合成法



二、氨基酸

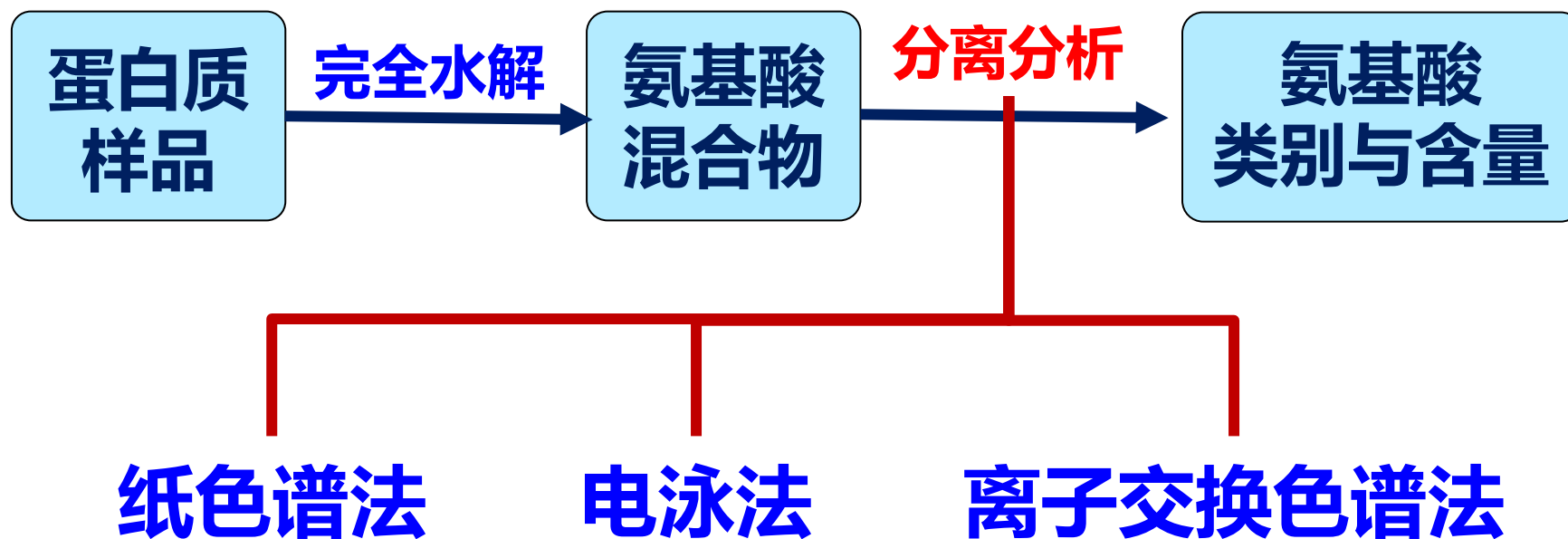
8. Chemical Synthesis

(2) 氨基酸的不对称合成 (自学, 了解原理, 教材p64 ~ 65)

- a. 应用不对称前体 (asymmetric precursor)
合成法的原理
- b. 应用不对称催化剂 (asymmetric catalyst)
合成法的原理

二、氨基酸

9. Separation and analysis



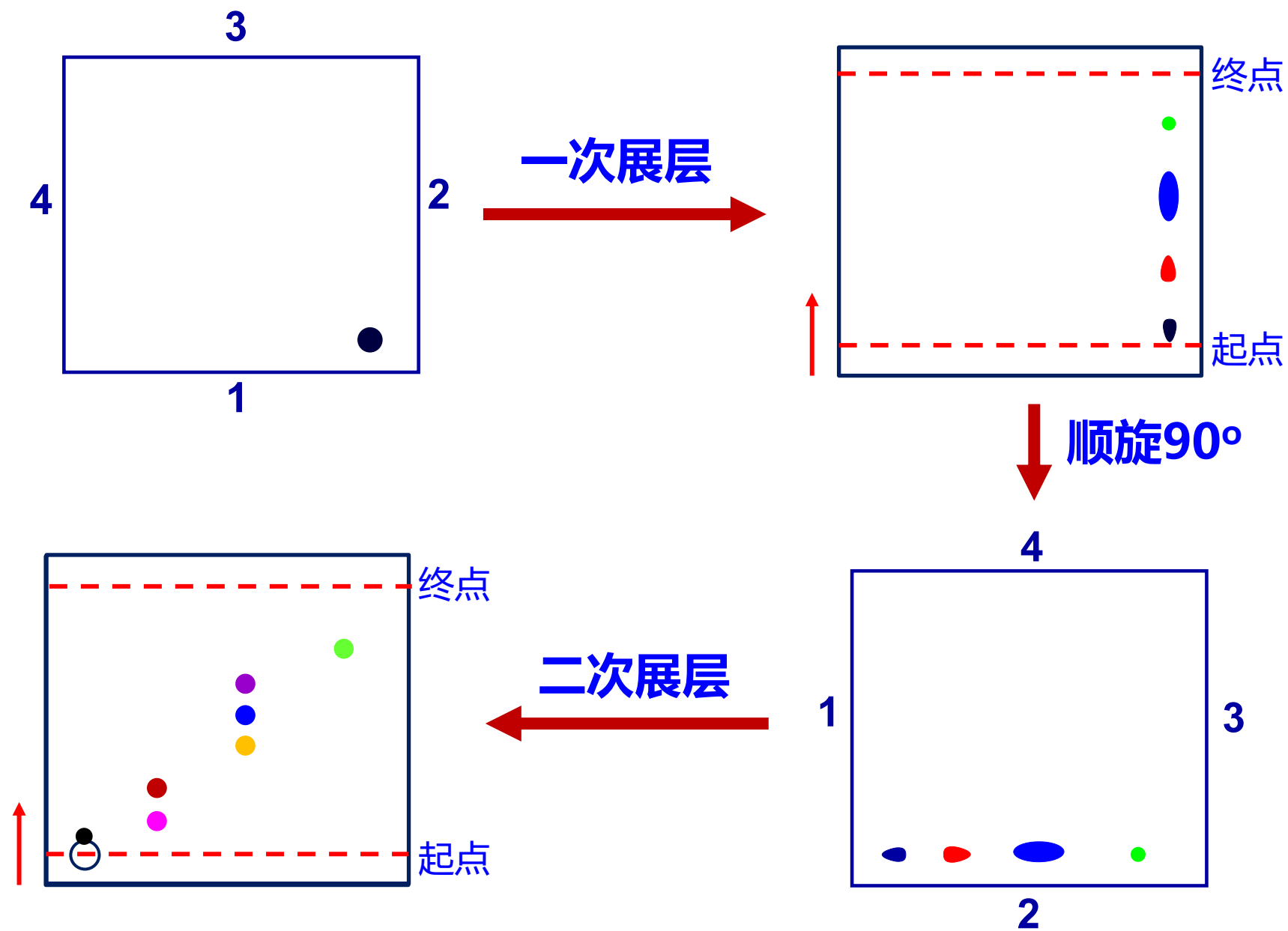
二、氨基酸

9. Separation and analysis

(1) 纸色谱 (Paper chromatography)

- 固定相：滤纸吸附的水
- 流动相：水饱和的有机溶剂
- 分离原理：不同氨基酸在水和有机溶剂中的溶解度不同。
- 鉴定：茚三酮显色，与氨基酸标样对照。
- 二维层析：分离效果更佳。

二维纸层析



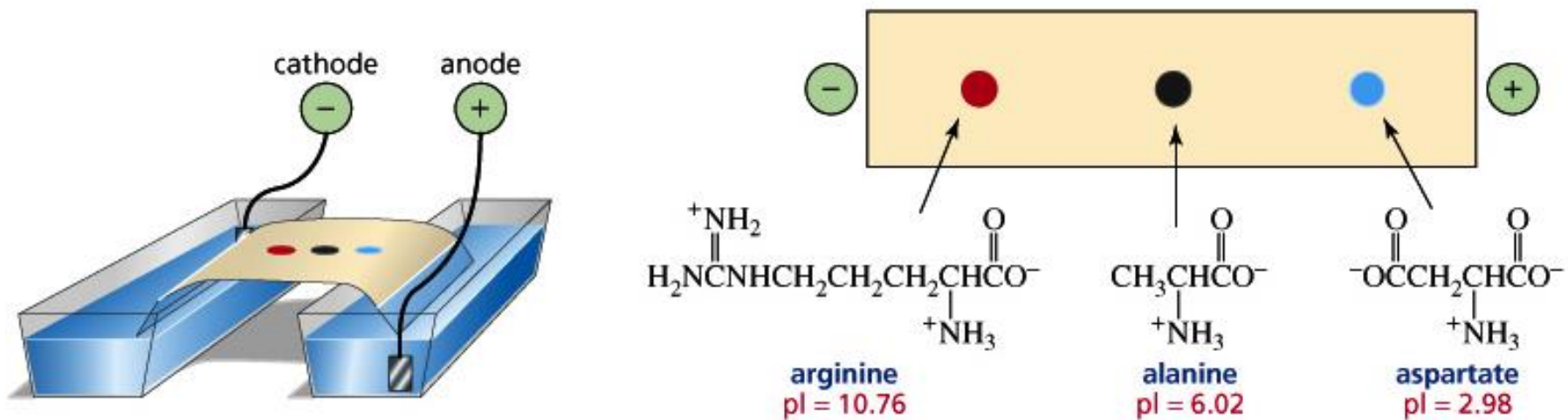
二、氨基酸

9. Separation and analysis

(2) 电泳 (Electrophoresis)

- 分离原理: 不同氨基酸在一定pH值下, 所带的净电荷不同, 在电场中移动情况不同。
- 载体: 凝胶薄层或滤纸片。
- 纸电泳示意图 (下一页)

纸电泳 (Paper electrophoresis)



$\text{pH} < \text{pI}$, 样品带正电荷, 样品点向阴极移动

$\text{pH} > \text{pI}$, 样品带负电荷, 样品点向阳极移动

$\text{pH} = \text{pI}$, 样品不带电荷, 样品点不移动

$$\Delta P = \text{pI} - \text{pH}$$

ΔP 为正, 带正电荷, 越正, 带正电荷越多
 ΔP 为负, 带负电荷, 越负, 带负电荷越多

二、氨基酸

9. Separation and analysis

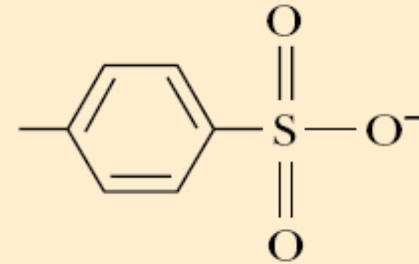
(3) 离子交换色谱 (Ion-exchange chromatography)

- 分离原理: 不同氨基酸在一定pH值下, 所带的净电荷不同, 在离子交换柱中移动情况不同
- 固定相: 可与待分离样品进行离子交换的树脂
- 交换方式: 阳离子和阴离子
- 磺酸型阳离子交换树脂最为常用
- 广泛应用

Cation exchange resins commonly used

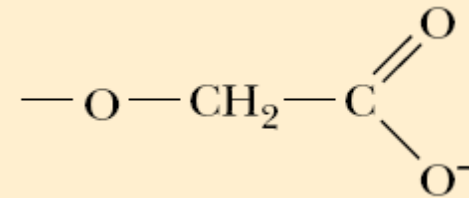
Strongly acidic, polystyrene resin (Dowex-50)

强酸型聚苯乙烯树脂



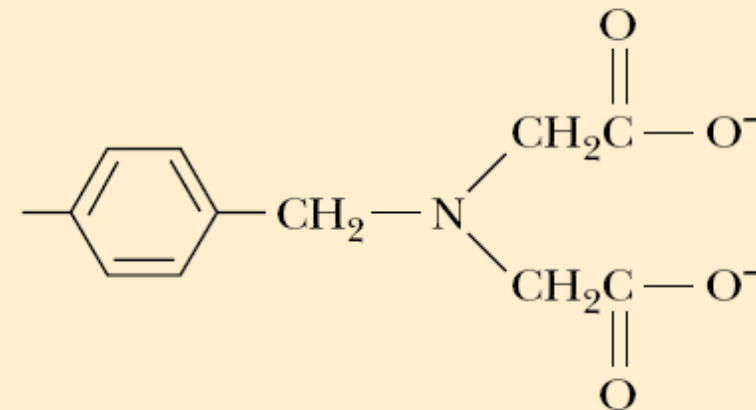
Weakly acidic, carboxymethyl (CM) cellulose

弱酸型羧甲基纤维素



Weakly acidic, chelating, polystyrene resin (Chelex-100)

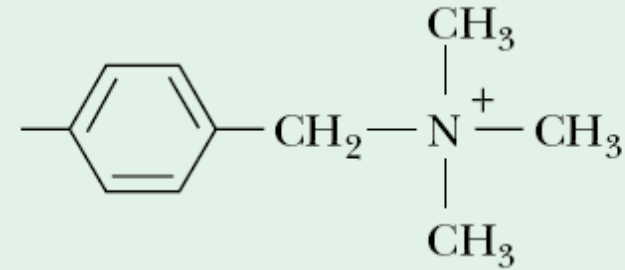
弱酸型螯合型聚苯乙烯树脂



Anion exchange resins commonly used

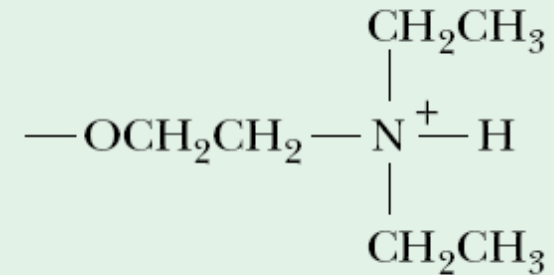
Strongly basic, polystyrene resin (Dowex-1)

强碱型聚苯乙烯树脂

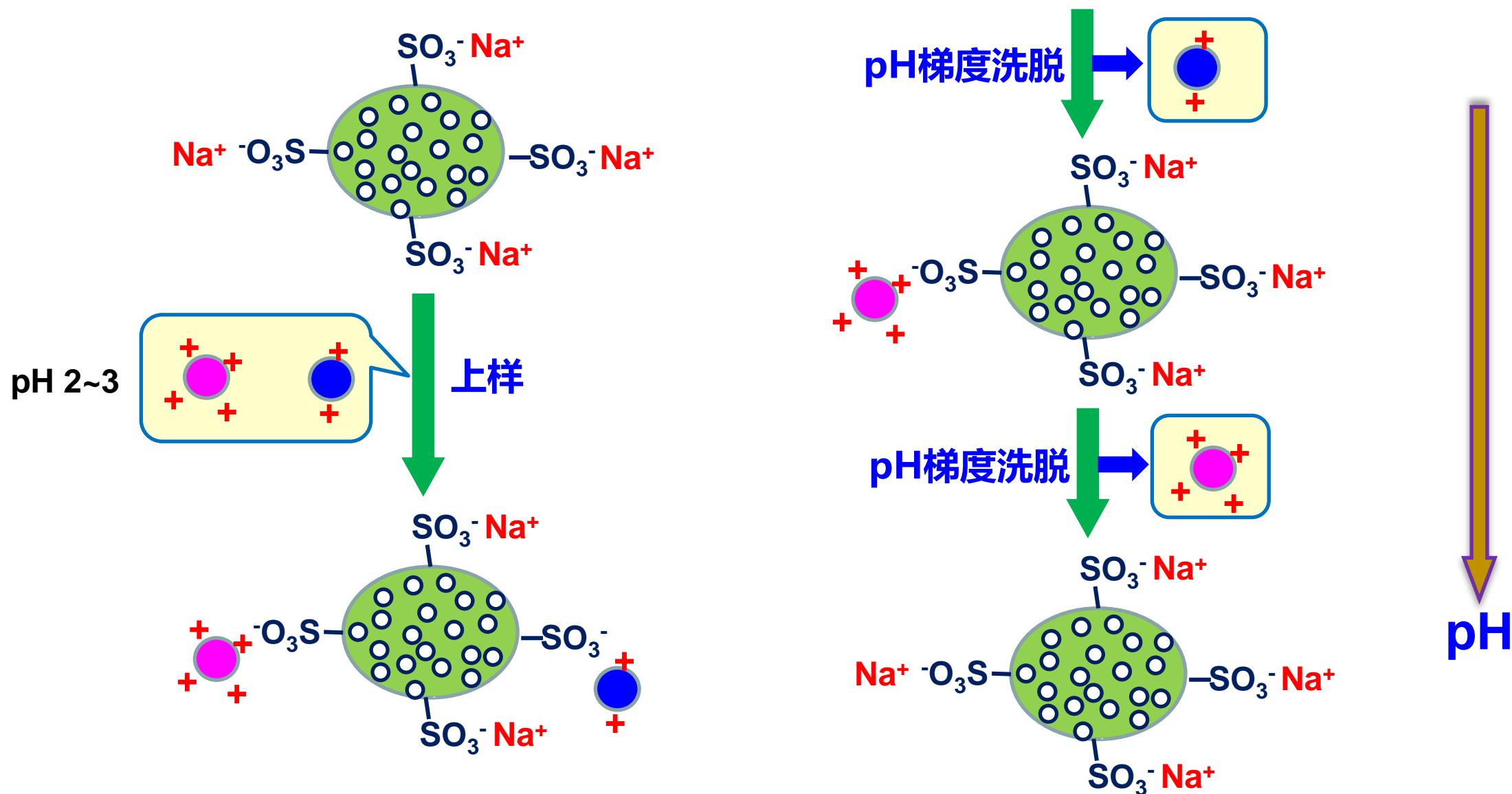


Weakly basic, diethylaminoethyl (DEAE) cellulose

弱碱型二乙胺基乙基纤维素



磺酸型阳离子交换树脂分离氨基酸



例题1

磺酸型阳离子交换树脂分离氨基酸

一氨基酸混和液，含有Lys，Ala和Glu三种氨基酸，如何用阳离子交换树脂进行分离？通过合理分析指出氨基酸从树脂上洗脱出来的先后顺序。

	Lys	Ala	Glu
pI	9.7	6.0	3.2

例题1

磺酸型阳离子交换树脂分离氨基酸

- (1) 氨基酸样品液调为酸性 (pH 2~3) 后, 上样, 进行pH梯度洗脱。
- (2) 原理: 某一pH下, 各氨基酸所带正电荷多少不同, 被吸附的强弱程度不同。如: pH = 3时,

$$\Delta P_{\text{Lys}} = +6.7, \Delta P_{\text{Ala}} = +3.0, \Delta P_{\text{Glu}} = +0.2$$

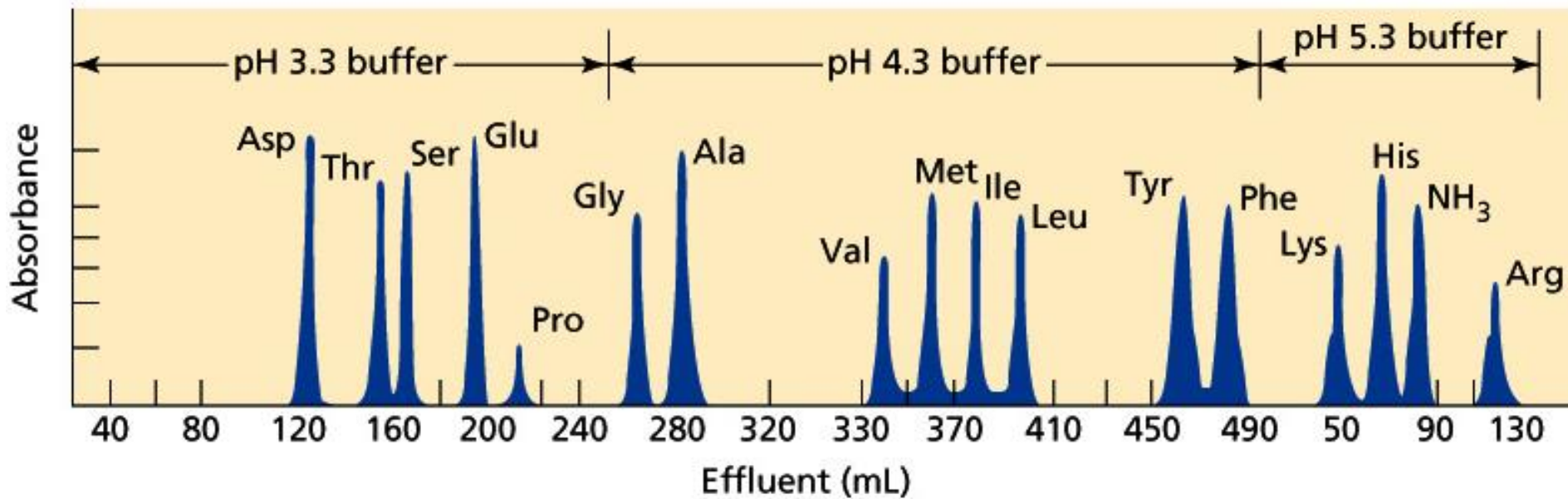
吸附强弱: $\text{Lys} > \text{Ala} > \text{Glu}$

洗脱先后: $\text{Glu} > \text{Ala} > \text{Lys}$

一般洗脱规律: 酸性aa > 中性aa > 碱性aa

极性相同时, 分子量小的aa > 分子量大的aa

Automated amino acid analyzer (氨基酸自动分析仪)

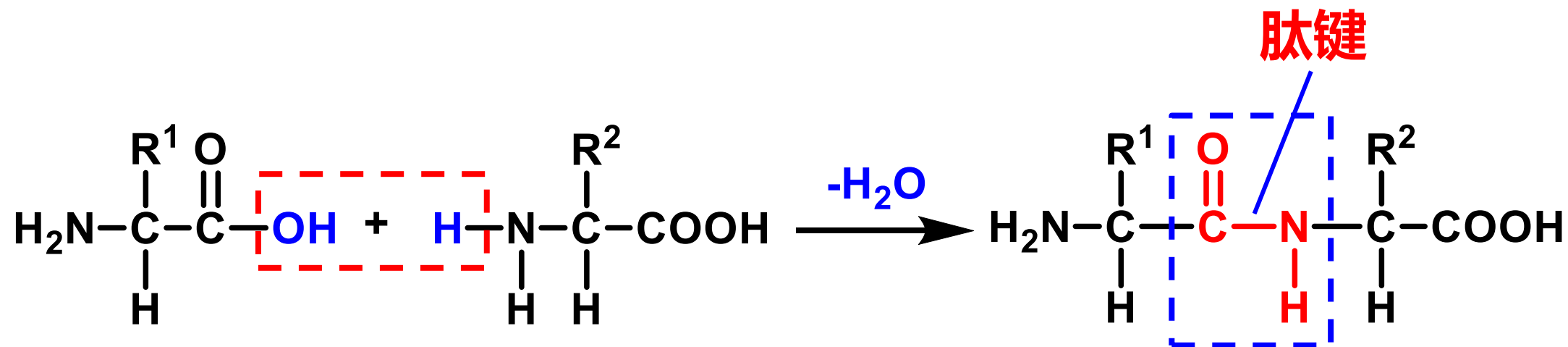


思考题

上图是阳离子交换树脂下对20种基本氨基酸的实际测定图谱。
你发现了什么？如何解释？

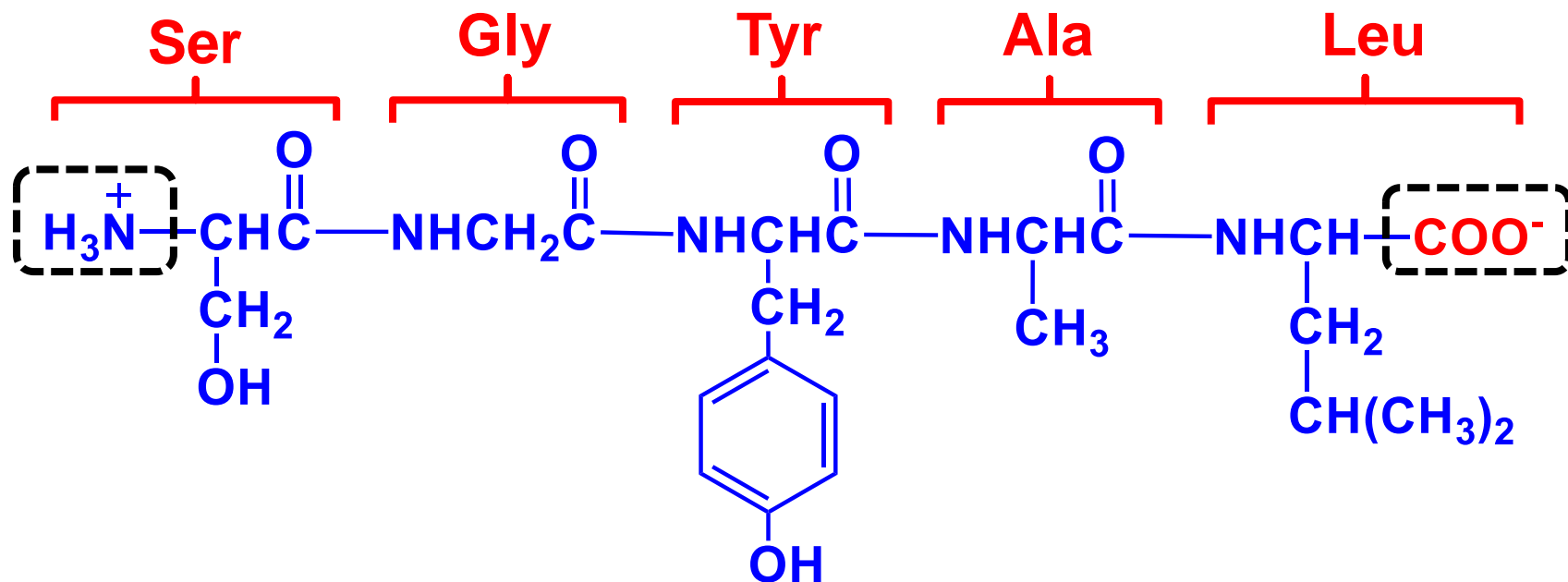
三、多肽

1. Structures




有关概念

- 肽键 (peptide bond), 肽 (peptides), 二肽 (dipeptides), 多肽 (polypeptides), 氨基酸残基 (amino acid residues)

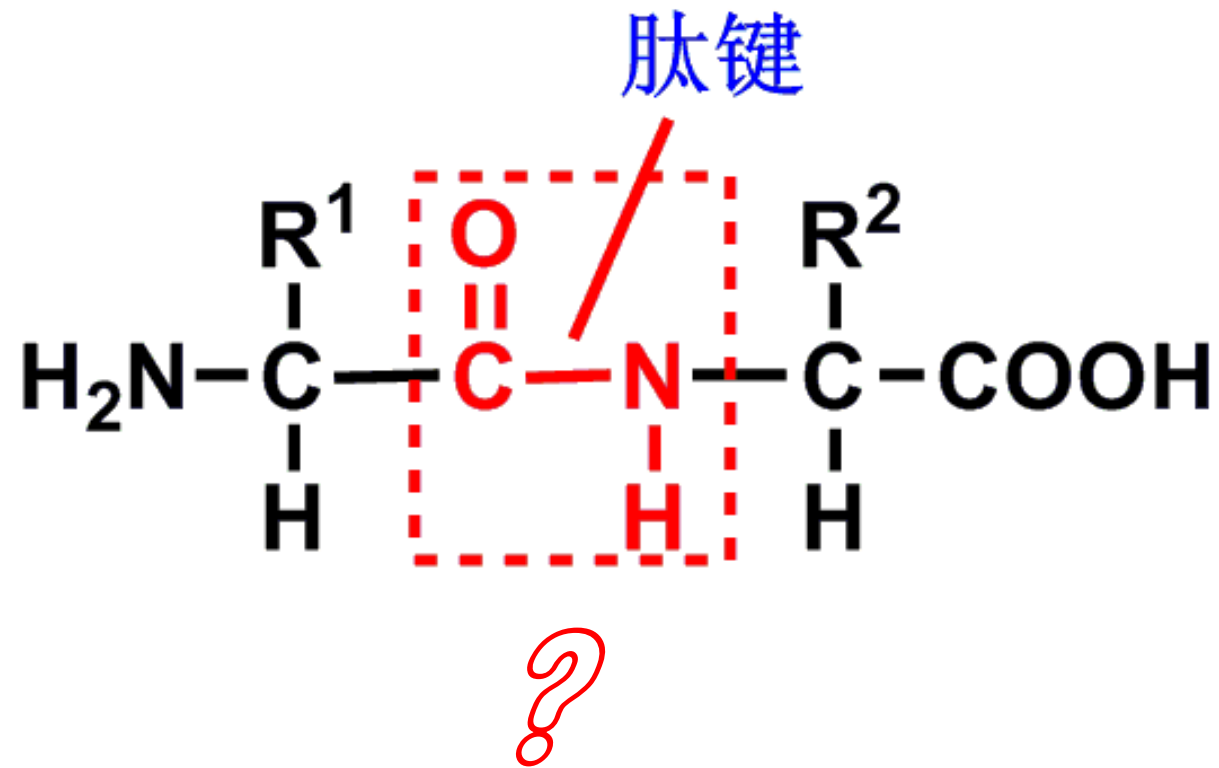


N-terminate  C-terminate

- **氨基酸顺序** --- 多肽链中氨基酸残基排列的顺序
- **氨基端或N-端** --- 多肽链中有游离 α -氨基的一端
- **羧基端或C-端** --- 多肽链中有游离 α -羧基的一端
- **肽链方向**: N-端(左)  C-端(右)
- Are Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu and Leu-Ala-Tyr-Gly-Ser same peptides?

三、多肽

2. Peptide bond

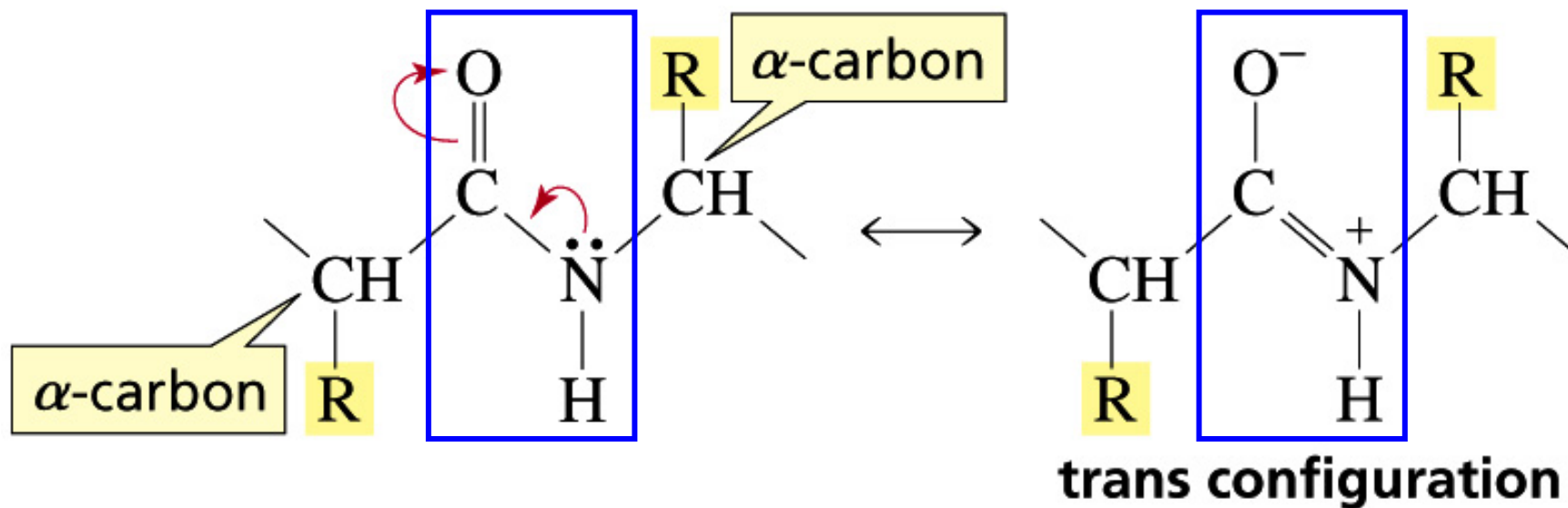


三、多肽

2. Peptide bond

■ 特点:

- 1) N上的孤对电子与C=O具有明显的**共轭**作用，C-N键具有部分双键性质，不能**自由旋转**。

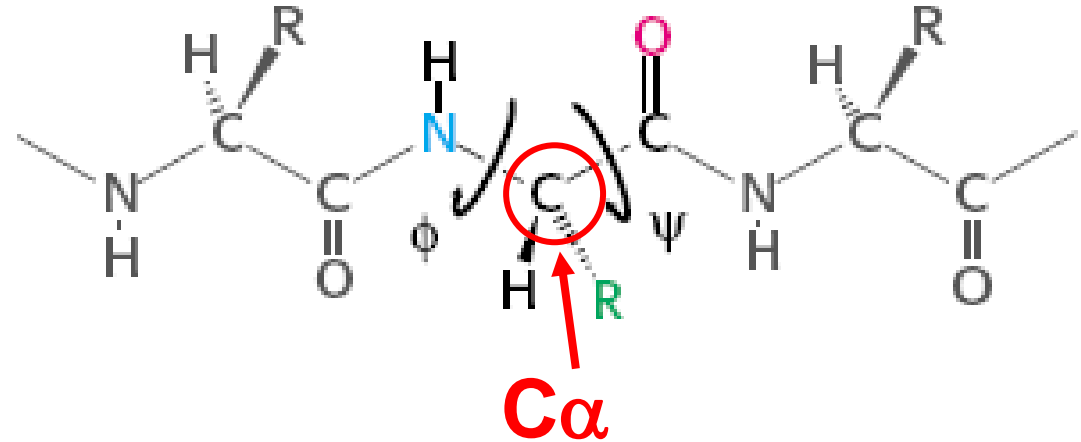
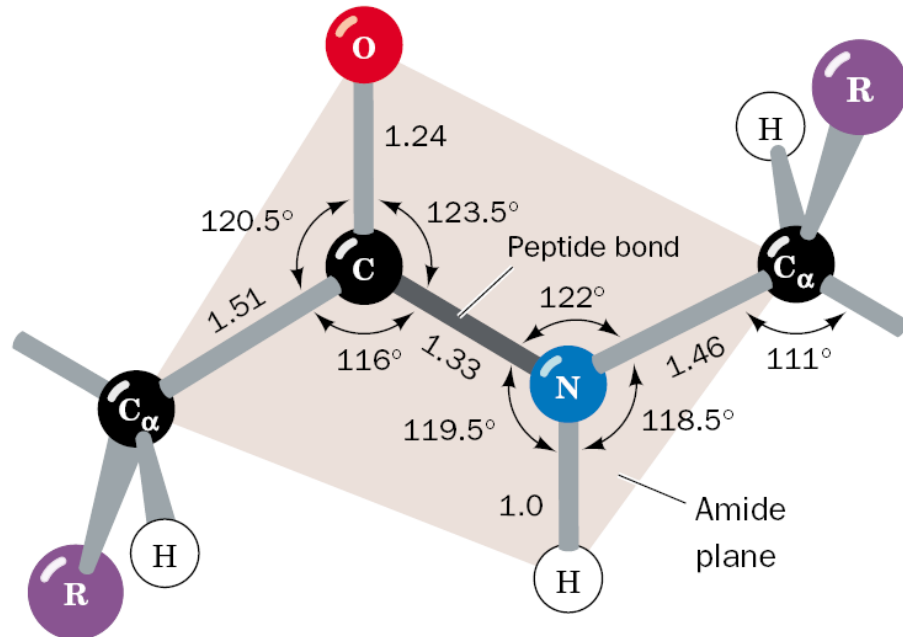


2. Peptide bond

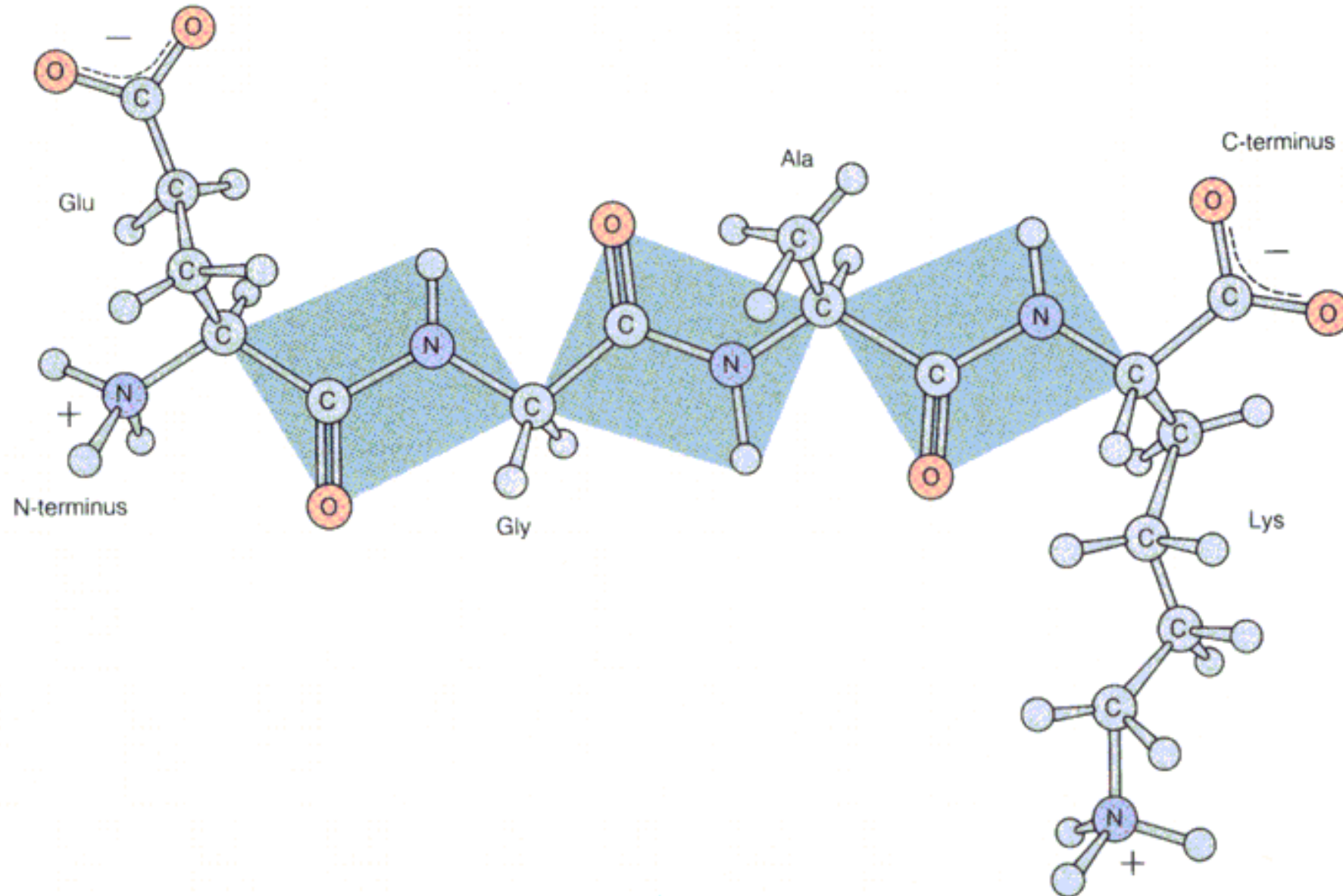
■ 特点:

2) 组成肽键的原子处于同一平面，一般为**反式**。

3) 两个相邻的肽键通过共同的 α -碳 (C_α) 相连， C_α -N, C_α -C 可以自由旋转。

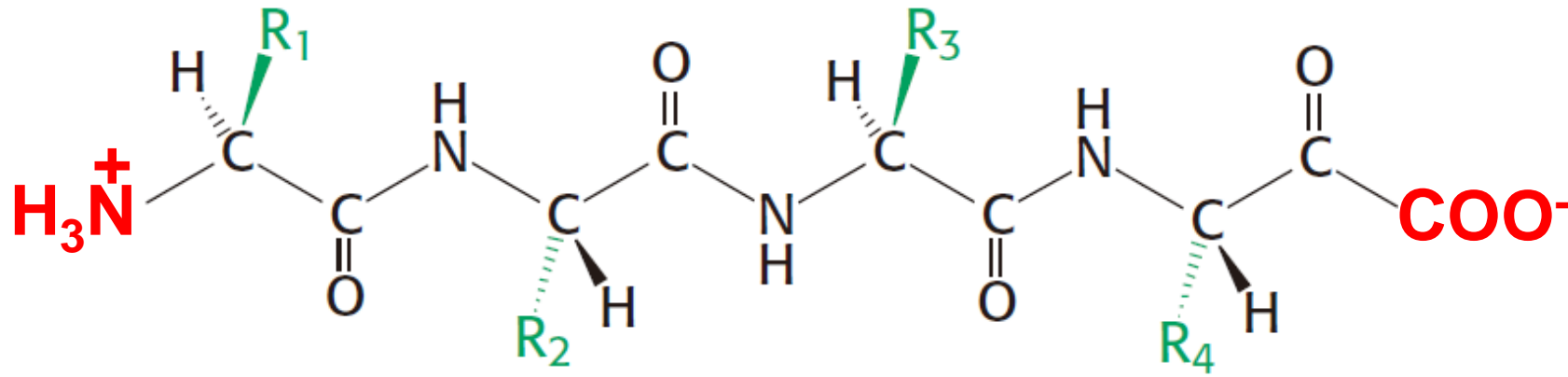


The structure of a tetrapeptide



三、多肽

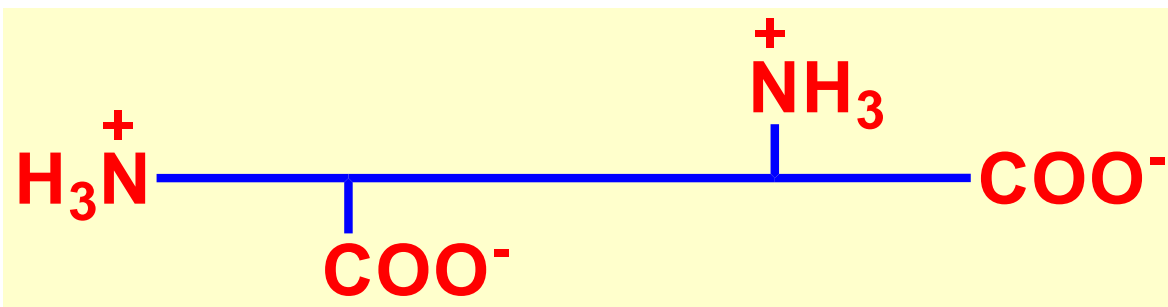
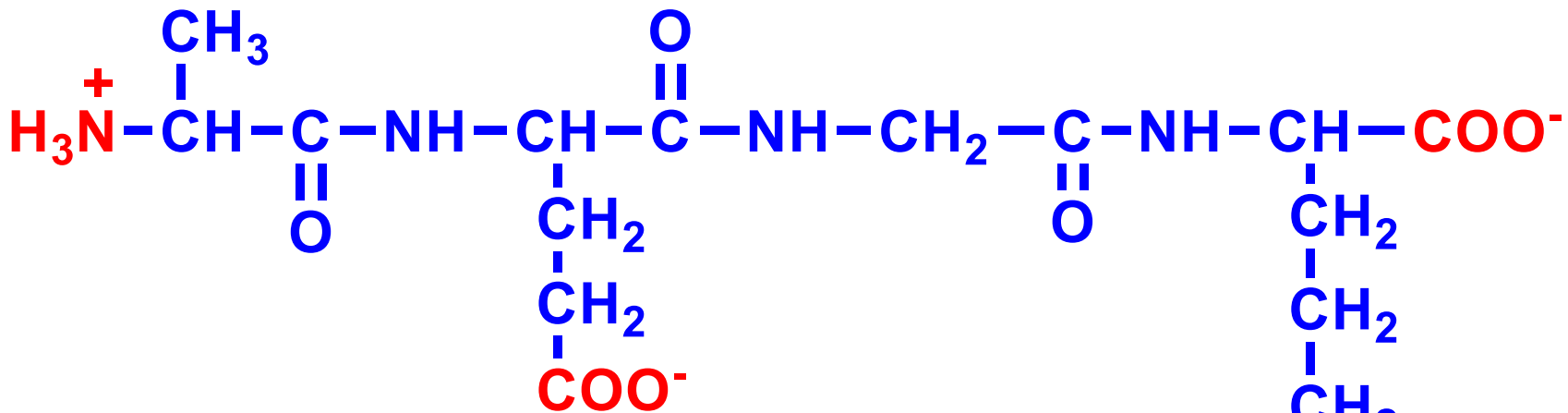
3. Acid-Base Properties



- 可看成是一个“大氨基酸”。
- 水溶液中也以两性离子形式存在，有滴定曲线，也有等电点。
- 也可通过离子交换层析或电泳进行分离纯化。

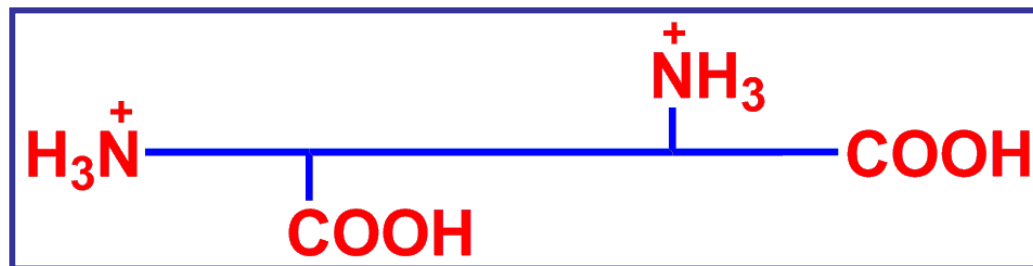
例题2

请计算四肽Ala-Glu-Gly-Lys在pH = 1和 pH = 6.5 时所带电荷的多少并判断在电场中的移动情况。



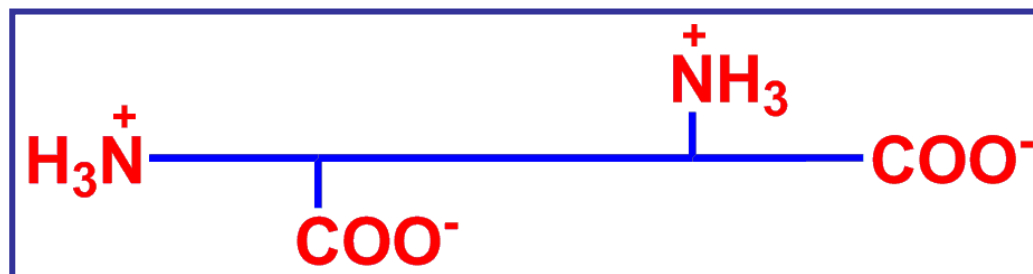
	pK_1	pK_2	pK_R
Lys	2.18	8.95	10.53
Gly	2.34	9.60	
Ala	2.34	9.69	
Glu	2.19	9.67	4.25

● pH = 1,



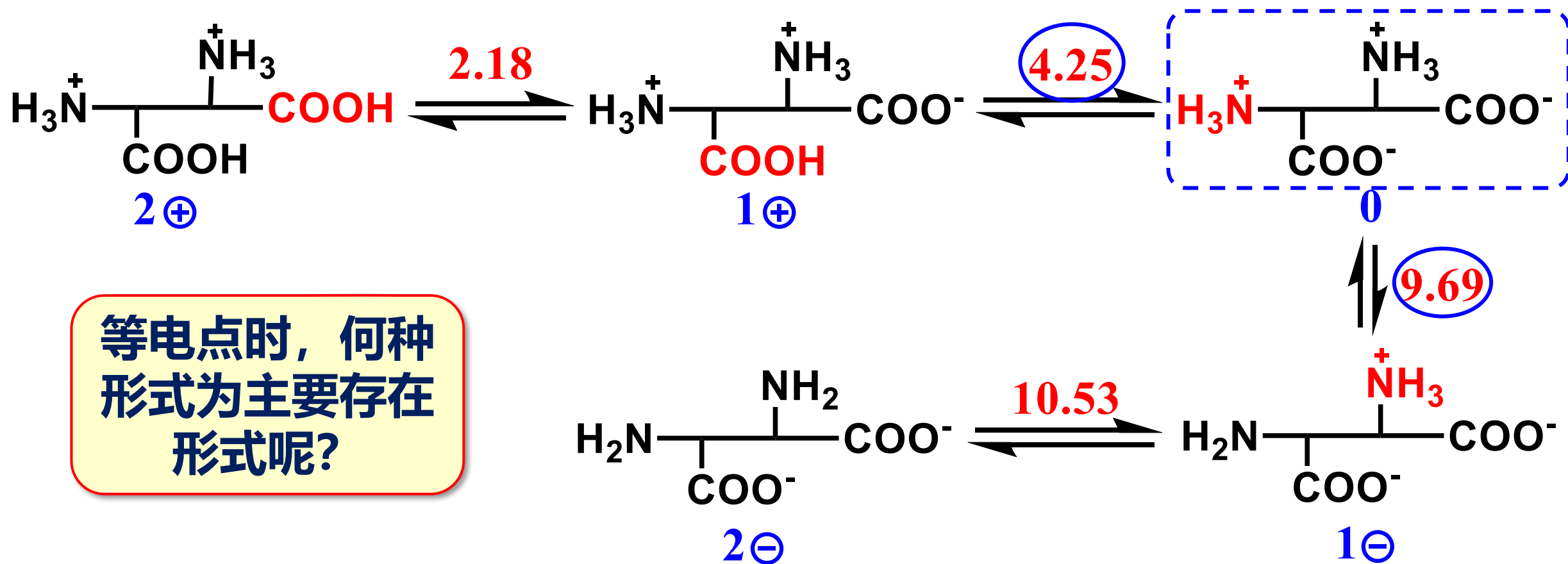
带正电荷，向阴极移动。

● pH = 6.5,



不带电荷，不移动。

多肽pI的计算



$$pI = \frac{4.25 + 9.69}{2} = 6.97$$

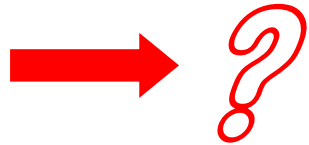
pH = 1.0, $\Delta P = + 5.97$, 向阴极移动
 pH = 6.5, $\Delta P = + 0.47$, 微向阴极移动

三、多肽

4. Hydrolysis

- 可被酸、碱、酶水解。
- 根据水解程度不同，分为：
 - 完全水解：得各种氨基酸的混合物。
 - 部分水解：通常得到多肽片段。
- 酸或碱能将多肽完全水解，酶水解一般是部分水解。

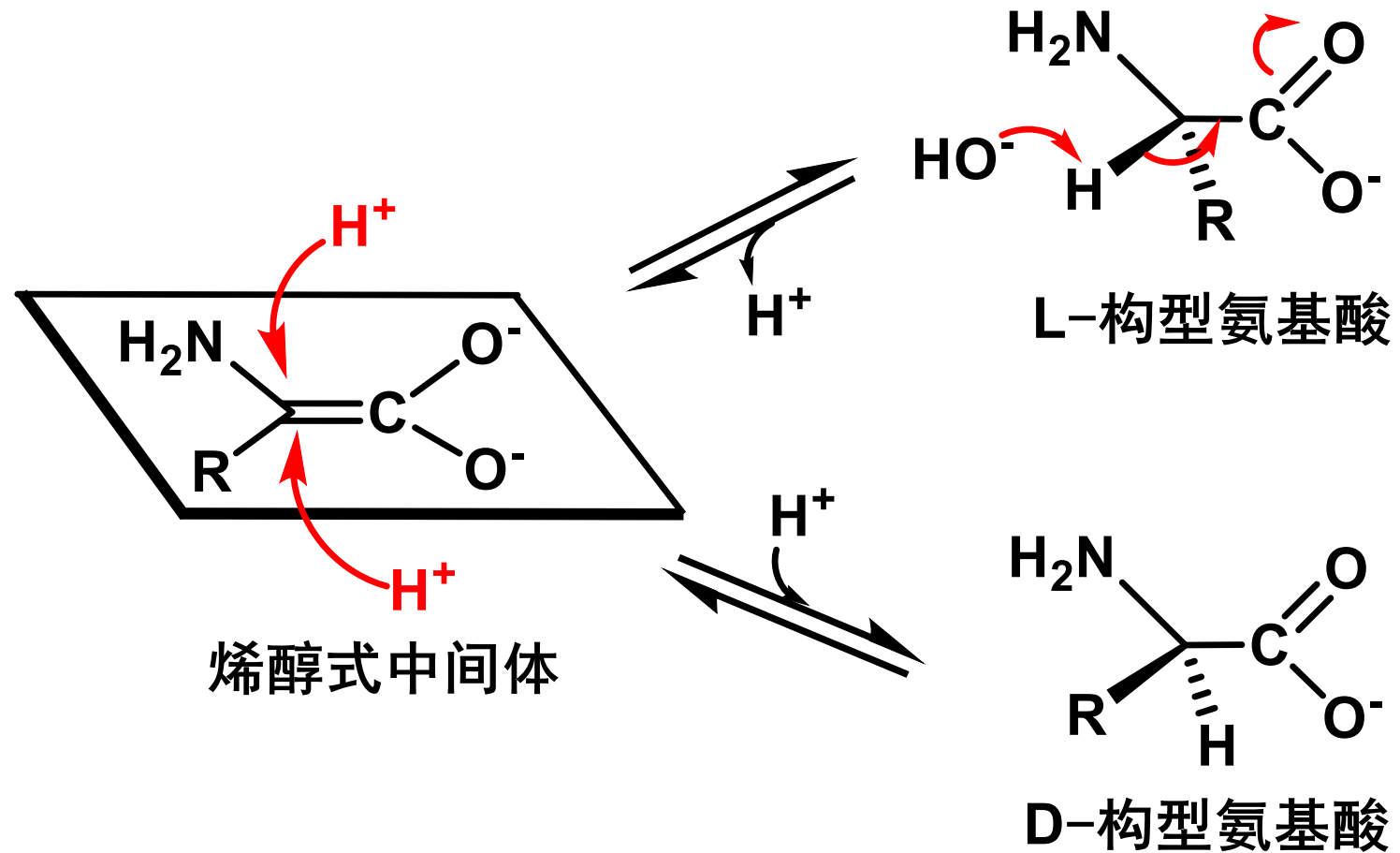
(1) 酸水解

- 6N HCl 或4M H₂SO₄在105-110°C条件下进行水解，反应时间约20小时。
- **优点:** 不易引起水解产物的消旋化。
- **缺点:** Trp 被沸酸完全破坏；
- Ser或Thr有一小部分被分解； 
- Asn和Gln侧链的酰胺基被水解成羧基。

(2) 碱水解

- 5 N NaOH煮沸10-20小时。
- **缺点：** 由于水解过程中许多氨基酸都受到不同程度的破坏，产率不高。
- **缺点：** 部分的水解产物发生消旋化。 → ?
- **优点：** Trp 在水解中不受破坏。

碱性条件下氨基酸的消旋化



(3) 酶水解

- 目前用于蛋白质肽链断裂的蛋白水解酶（proteolytic enzyme）或称蛋白酶（proteinase）有十多种（以后介绍）。
- **优点：**不会破坏氨基酸，也不会发生消旋化。
- 水解的产物为较小的肽段。

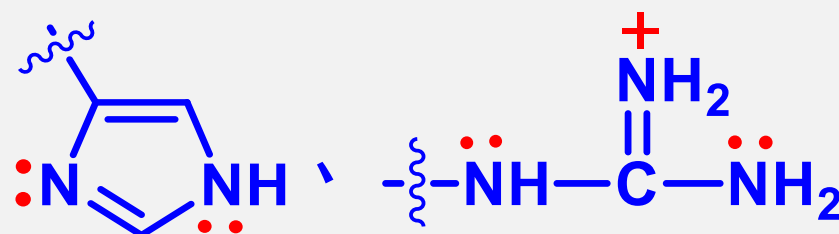
结构、性质、方法、原理

二. 氨基酸

-- 氨基酸侧链基团的性质

$-\text{SH}$ 、 $-\text{SCH}_3$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{Ar}$ 、

-- 分离与分析



概念、结构、性质、方法

三. 多肽

1. 结构和基本概念
2. 肽键及其特点
3. 酸碱性与pI计算
4. 肽链的水解方法及优缺点

课后复习要点

- **掌握重要概念：肽键、肽链、氨基酸顺序、氨基酸残基等。**
- **掌握多肽链带电情况的判断及等电点的计算。**
- **熟悉氨基酸分离方法与原理。**
- **熟悉多肽的水解方法及优缺点。**
- **了解氨基酸的制备及合成方法。**
- **教材相关习题。**

预 习

- **三、多肽**
 - 多肽的化学合成
- **四、蛋白质的结构**
 - 蛋白质结构层次的划分
 - 蛋白质的一级结构