

蛋白质的化学改性及其应用

朱 尚 权

(中国科学院上海生物化学研究所)

蛋白质是生命活动的重要物质之一。蛋白质种类繁多,各具有自己的特殊的生物功能,如催化、传递系统,调节代谢过程和参与结构成分等等。蛋白质功能的多样性是与其化学结构以及由化学结构所决定的空间结构的多样性分不开的。

从分子水平上来说,许多蛋白质作用的对象是小分子,如酶与底物或抑制剂间的作用,抗体与抗原尤其是半抗原间的作用。这些底物或抑制剂,抗原或半抗原等分子往往都比酶和抗体分子小得多。因此可以假定;这些小分子只与蛋白质表面的一部分区域发生作用。蛋白质分子本身也只有少数基团直接参与这一作用过程。所谓酶的“活性中心”就是指能专一结合底物并起催化作用从而形成或打开化学键的酶的区域。直接参与底物形成非共价键结合的侧链

基团称为“连结基团”,(或称“结合基团”)而参与催化作用使之打开化学键或形成新的化学键的基团称为“催化基团”。近年来对蛋白多肽激素作用过程的研究也证明;这些激素发挥作用时首先是与靶细胞质膜上的受体蛋白结合。受体蛋白的分子量一般都很大,如胰岛素的受体蛋白的分子量估计为 300,000,而胰岛素的分子量只有 5,700,当两者结合时,受体蛋白肯定只有部分区域参与这一作用。

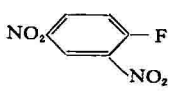
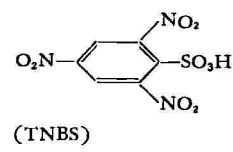
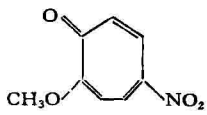
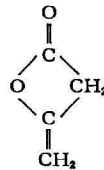
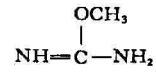
为了阐明蛋白质分子中哪些侧链基团对蛋白的功能是重要的,或者说是“必需品”,曾广泛应用蛋白质化学改性的方法,并且合成了许多能与蛋白质分子中的功能团如氨基、羧基、巯基(-SH)、胍基、酚基、羟基等以及硫硫键起反应的试剂。表 1 列举了一些常用的试剂及其作用情况。

表 1 常用的蛋白质化学改性试剂

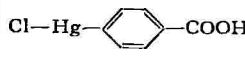
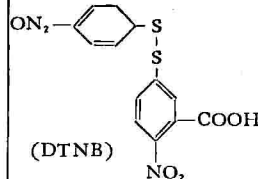
(1) 作用于氨基的试剂

试 剂 名 称	试 剂 化 学 结 构	注 释	副反应的基团	参 考 文 献
乙酸酐	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \\ \text{CH}_3-\text{C}=\text{O} \end{array}$	将氨基封闭	-SH, 咪唑基, 酚基	<i>Methods Enzymol.</i> , 4 , 247, 1957
顺丁烯二酸酐	$\begin{array}{c} \text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \parallel \quad \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}-\text{C}=\text{O} \\ \\ \text{R} \end{array}$ R = H, CH₃	将碱性氨基转变成羧基在酸性条件下, 酰化基团可自动脱去, 当 R = CH ₃ 时, 脱酰基作用更易进行		<i>Biochem. J.</i> , 112 , 679, 1969 <i>Biochem. J.</i> , 116 , 843, 1970
三氟乙酸硫代乙酯	$\text{F}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})\text{SC}_2\text{H}_5$	三氟乙酸酐在 1M 吡啶下很容易脱去, 是氨基理想的可逆保护基		<i>Biochem.</i> , 4 , 254, 1965

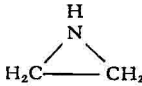
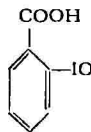
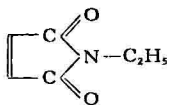
续表 1 (1)

试剂名称	试剂化学结构	注 释	副反应的基团	参 考 文 献
乙基氧甲酸酐	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_3$		咪唑基	<i>Biochem.</i> , 9 , 25, 1970
2,4-二硝基氟苯 (FDNB)		由于二硝基苯氨基酸对酸水解稳定, 用于测定蛋白质和肽的 N-端氨基酸	巯基, 咪唑基和酚基	<i>Biochem. J.</i> , 39 , 507, 1954 <i>Biochem.</i> , 9 , 816, 1970
三硝基苯磺酸 (TNBS)		见正文	巯基	<i>B. B. A.</i> , 200 , 1, 1970
磺酰氯(氟)	$\text{R}-\text{SO}_2\text{Cl}(\text{F})$	5-二甲氨基萘磺酰(Dansyl)氯与氨基酸反应产物有很强的荧光, 完全可以代替 FDNB 而且灵敏度更高 0.1—0.01N 的量已足够分析		<i>Methods Enzymol.</i> , 11 , 469, 1967
2-甲氧基二硝基环庚烯酮		产物在 420 毫微米有特殊吸收峰。在 1—2 M 胍作用下, 去保护基, 伴随 420 毫微米吸收峰消失, 出现 345 毫微米吸收峰		<i>J. Biochem.</i> , 62 , 7, 1967
醛(酮)/NaBH ₄		反应产物为 $\text{pr}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_3$, 反应可通过 278 毫微米光吸收增加或用 3% FeCl ₃ 显色定量		<i>Experientia.</i> , 25 , 1016, 1969 <i>B. B. A.</i> , 154 , 450, 1968
亚硝酸		醛或酮先与氨基形成 Schiff 碱, 再经 NaBH ₄ 还原烷基化		<i>Biochem.</i> , 7 , 2192, 1968
气酸盐	NCO^-	可用来测定 α -氨基酸的量	巯基	<i>J. Biol. Chem.</i> , 83 , 425, 1929
O-甲基异脲		见正文 主要作用于 δ -氨基, 对 α -氨基作用较慢或几乎不作用	巯基 (产物不稳定)	<i>Biochem.</i> , 1 , 1025, 1962 <i>Biochem.</i> , 5 , 3449, 1966

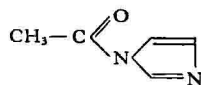
(2) 作用于巯基的试剂

对氯汞苯甲酸		见正文		<i>J. A. C. S.</i> , 76 , 4331, 1954
5,5'-二硫双硝基苯甲酸 (DTNB)		见正文		<i>B. B. A.</i> , 118 , 716, 1967

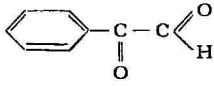
续表 1 (2)

试剂名称	试剂化学结构	注 释	副反应的基团	参 考 文 献
乙撑亚胺		将半胱氨酸转变成胰蛋白酶水解的碱性氨基酸 见正文		<i>J. Biol. Chem.</i> , 243 , 3702, 1968
过甲酸	$\text{H}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}-\text{OH} \end{array}$	将半胱氨酸变成半胱磺酸	吡啶基和二硫键	<i>Biochem. J.</i> , 44 , 126, 1949
丙烯腈	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CN}$	当反应在 pH7 时, 主要作用于-SH 上	氨基	<i>J. Biol. Chem.</i> , 243 , 3357, 1968
亚碘酰苯甲酸		将-SH 变成-S-S-类似四硫磺酸钠($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$)作用		<i>J. Biol. Chem.</i> , 244 , 180, 1969
N-乙基顺丁烯亚胺	 (NEM)	试剂本身在 302 毫微米有很强吸收峰, 与-SH 反应后, 吸收峰消失, 可用于-SH 定量	氨基	<i>Anal. Chem.</i> , 30 , 1292, 1958
卤代乙酸(酰胺)	$\text{X}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH}(-\text{NH}_2) \end{array}$ $\text{X}=\text{Br}, \text{I}$	见正文	咪唑	<i>Methods Enzymol.</i> , 11 , 532, 1967

(3) 作用于酚基的试剂

重氮盐	$\text{R}-\text{N}_2^+$	产物呈红色, 可作蛋白质定量和定性	咪唑基	<i>Biochem.</i> , 5 , 3574, 1966
四硝基甲烷	$\text{C}(\text{NO}_2)_4$	使酚基硝基化, 反应过程中会产生蛋白分子内和分子间交联	吡啶	<i>Biochem.</i> , 5 , 3574, 1966
碘化试剂	I_2, CHI_3 等	见正文	咪唑基, 巯基	<i>Biochem.</i> , 8 , 1919, 1969
N-乙酰咪唑		酚羟基乙酰化	咪唑基, 巯基	<i>Biochem.</i> , 4 , 1758, 1965

(4) 作用于胍基的试剂

1,2-环己二酮		反应是在强碱性下进行	氨基	<i>J. Biol. Chem.</i> , 242 , 1036, 1967
乙二醛	$\text{OHC}-\text{CHO}$		氨基	<i>B. B. A.</i> , 194 , 301, 1969
苯乙酮醛			氨基	<i>J. Biol. Chem.</i> , 243 , 6171, 1968
2,3-丁二酮	$\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$ $\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$			<i>J. A. C. S.</i> , 90 , 1664, 1964
1,3-丙二醛	$\text{O}=\text{C}-\text{H}$ XCH $\text{H}-\text{C}=\text{O}$ $\text{X}=\text{H}, -\text{NO}_2$	反应要求在 10NHCl 下进行, 大多数蛋白不宜适用, 产物在 315 毫微米下有特殊的吸收峰		<i>Biochem.</i> , 5 , 3545, 1966

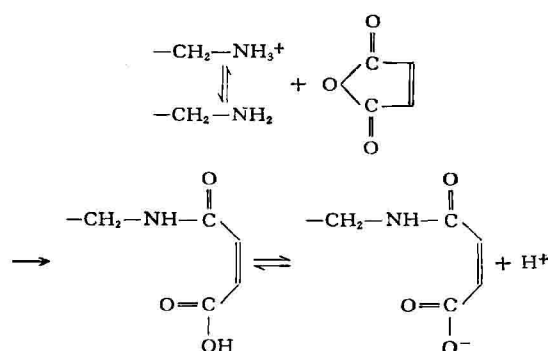
试剂名称	试剂化学结构	注 释	副反应的基团	参 考 文 献
甲醇/氯化氢	CH ₃ OH/HCl	一般用 0.02—0.1 M HCl, 几乎可使羧基全部甲酯化	少量脱酰胺和 N→O 转移	<i>Biochem.</i> , 4, 751, 1965
其他酯化试剂	$\text{N}_2\text{—CH—C}\begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{R} \end{matrix}$	酯化作用不易完全, SO ₄ ²⁻ NO ₃ ⁻ , 尤其是 Cl ⁻ 促进试剂分解, 因此用过氯酸调反应 pH	巯基	<i>J. Biol. Chem.</i> , 244, 154, 1969
	R = —NH ₂ —NHR'			
	—OCH ₃ 等			
	CH ₂ N ₂		副反应较多	<i>Adv. Protein. Chem.</i> , 3, 169, 1947
水溶性碳二亚胺	(C ₂ H ₅) ₃ O ⁺ BF ₄ ⁻		咪唑基, 甲巯基	<i>Biochem.</i> , 8, 700, 1969
	R—N=C=N—R' (R 或 R' 含有很强的亲水基团, 使试剂能很好地溶于水)	反应最适 pH 4.5—5.0 能将 NH ₂ —R 缩合到羧基上	酚基, 巯基	<i>Chem. Rev.</i> , 67, 107, 1967

注: 关于咪唑基、吡嗪基、二硫键及甲巯基的改变试剂, 可参见上表副反应基团部分及正文

当蛋白质某侧链基团被改性后不影响蛋白质生物活性时, 我们可以认为这些被改性的基团是蛋白质表现其功能时所不必需的。若改性后导致蛋白质功能的丧失, 则可以初步认为这个被改性的基团是蛋白质发挥功能作用所“必需”的。当然, “必需”一词是较含糊的, 因为它没有说清楚蛋白质的功能是如何依赖于“必需”基团。如果某一基团化学改性后不影响蛋白质的活性, 那就可比较肯定地说这一基团对蛋白质的功能是不必需的。但要确定蛋白质的“必需”基团常常不那么容易, 要考虑各种导致蛋白质失活的因素, 包括试剂作用是否专一, 反应条件对蛋白质结构有无破坏作用, 试剂是直接作用在“必需”基团上还是作用在别的基团上, 由于空间障碍或其他原因影响了真正的“必需”基团与底物的结合等等。现就蛋白质化学改性中的一些问题叙述如下。

一、试剂的选择

试剂的选择在很大程度上要根据改性的目的。如果改性的目的是希望改变蛋白质的带电行为或者溶解性, 则必须选择能引入最大量带电荷的试剂。用顺丁烯二酸酐可将中性的巯基和酸性 pH 下带正电荷的氨基转变成在中性 pH 下带负电的衍生物。



巯基的作用情况与氨基相似。如果拟改性的蛋白质对有机溶剂不稳定, 必须在水的解质下进行反应, 则试剂应选择在水中有一定溶解性的。在选择试剂时还必须考虑反应生成物容易进行定量测定, 如果引入的基团有特殊的光吸收或者在酸水解时是稳定的, 那只要测定光吸收的变化或做氨基酸全分析, 这是最方便的。用同位素标记的试剂虽然比较麻烦, 但有其优越性。它可对蛋白改性反应进行连续测定, 进行反应动力学研究。动力学的研究可给我们提供许多有价值的信息。如某基团处于暴露状态还是处于埋藏状态, 是处于自由态还是处于结合态, 因它们对试剂的活性不同, 因此可通过动力学的研究来证明其所处状态。试剂的大小也是应该注意的, 试剂体积过大, 往往由于空间障碍而不能与作用的基团接近, 当然也就不能发生作

用。一般认为试剂的体积小一些为宜。这样既可保证改性能顺利进行又减少了因空间障碍而破坏蛋白质分子严密的结构的危险。

二、反应条件

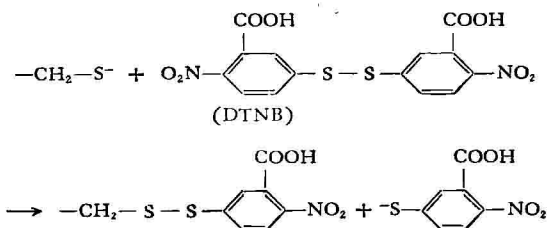
当蛋白质分子与试剂作用时,要求的反应条件除允许改性能顺利进行外,还必须满足以下二方面的要求:一是不造成蛋白质的不可逆变性。为了鉴定这一点必须做对照试验。二是有利于蛋白质专一性地改性。为此反应条件应尽可能在保证蛋白质特定空间构象不变或少变的情况下进行。有时在结晶状态下进行反应,可以提高改性的专一性。如胰凝乳蛋白酶用 I_3^- 进行碘化时,若反应是在晶体状态下进行,只有第171位的酪氨酸碘化,而其它酪氨酸不反应。又如,核糖核酸在晶体下进行羧甲基化时,能使反应主要集中在119位的组氨酸上,发生在第12位组氨酸上很少,两者之比为60:1。而在水溶液下进行同样的改性时,两者之比则为15:1。换言之,核糖核酸羧甲基化时,在晶体状态下进行比在溶液中进行其反应的专一性提高了三倍。

三、反应的专一性

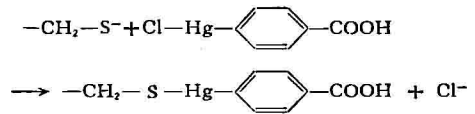
在蛋白质化学改性的研究中,反应的专一性是非常重要的,必须得到真正的保证。由于改性试剂的专一性较差,除了控制反应条件外,还可利用其它途径来实现改性的专一性。

1. 利用蛋白质分子中某些基团的特殊活性

蛋白质分子中半胱氨酸残基的侧链巯基($-SH$)是相当活泼的,它有两个特征性的作用:一是与二硫化物如5,5'-二硫双硝基苯甲酸进行交换反应

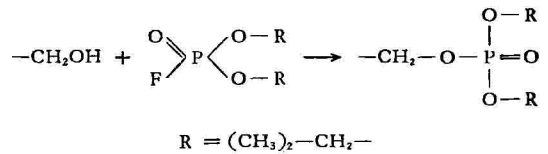


二是与有机汞盐如对氯汞苯甲酸发生亲核作用:



这两个反应都伴随有紫外吸收光谱的变化,而且对巯基又非常专一,因此常用于定量分析测定。

此外,蛋白质特殊的空间结构能够影响某些基团的活性,如蛋白水解酶分子中的活性丝氨酸是一个很突出的例子。二异丙基氟磷酸(DFP)与胰凝乳蛋白酶作用而迅速导致酶失活就是作用于酶的活性丝氨酸:



但 DFP 在同样条件下却不能与胰凝乳蛋白酶原及一些简单的模拟化合物作用。相反的情况也同样存在,即一些基团从简单的模拟化合物证明是活泼的,但在某些蛋白质中却变得很不活泼,如 L-谷氨酸脱氢酶的巯基。当用 N-乙基顺丁酰亚胺和 2,4,6-三硝基苯磺酸处理时,只作用在活泼的氨基上,而巯基不作用。造成这一现象的原因大概有二方面;一是基团处于“埋藏”状态,试剂不能进去,二是这一基团参与形成次级键(如氢键)。

在蛋白质分子中特别活泼的基团如上述活性丝氨酸,在适当条件下只是其本身发生作用而其他皆不作用,这种现象称为“位置专一性”,因为这是由于它在蛋白质分子中所处的位置环境所决定的。

2. 选择不同的反应 pH

我们知道,蛋白质分子中的功能基团的解离常数(pK_a)是不同的(见图1)。当控制不同的反应 pH 时,就同样控制了各种功能基团的解离程度,从而有利于改性的专一性。如用溴(碘)代乙酸(或它的酰胺)对蛋白进行改性时,这种试剂可与组氨酸,甲硫氨酸,半胱氨酸的侧链及 α -氨基、 ϵ -氨基发生作用。当反应是在 pH6 下进行,只专一地与组氨酸的咪唑环作用;而反应在 pH3 进行时,专一地与甲硫氨酸

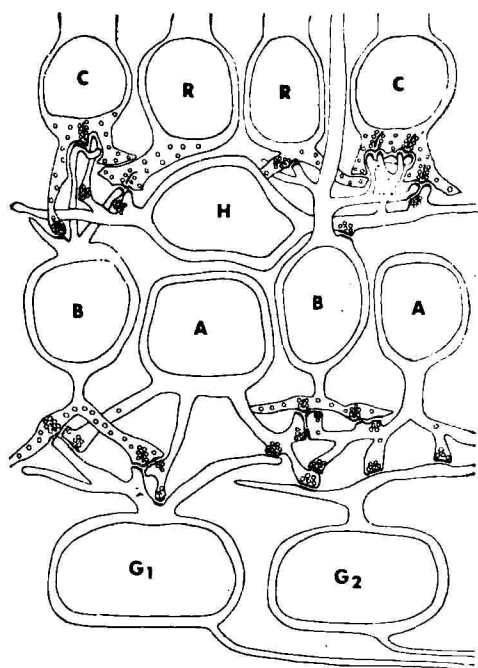
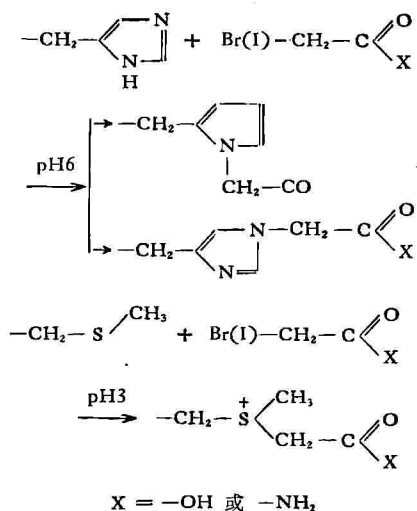


图 1 各种氨基酸侧链的质子解离数与 pH 的关系

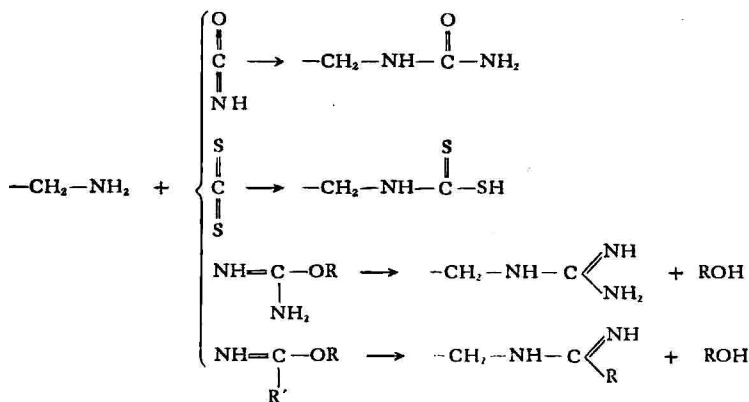
的侧链作用,在这样酸性 pH 下,比较活泼的巯基和氨基都以带质子的形式存在而变成不活泼

状态。



3. 利用某些产物的不稳定性

当用氰酸,二硫化碳, O-甲基异脲和亚氨酸酯将氨基转变成脲和胍的衍生物时,反应是在高 pH 下进行,因此,虽然巯基也能与上述试剂作用,但因 pH 很高,与巯基生成的产物很易水解。



4. “亲合标记”

“亲合标记”是实现专一性改性的重要途径。“亲合标记”的试剂除了能与蛋白质作用外,还要求试剂的结构和与蛋白作用的底物或抑制剂相似。这样,试剂与蛋白质发生作用前先以非共价形式结合到蛋白质的活性中心上,然后再发生化学作用将试剂挂在活性中心的基团上。这一方法在研究酶的活性中心时特别有用。如对甲基苯磺酰氟 ($\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{F}$)

能作用于胰凝乳蛋白酶的活性丝氨酸上。

5. 差别标记

在底物或抑制剂存在下进行化学改性时,由于它们保护着蛋白质的活性中心基团,使这些基团不能与试剂作用,然后将过量的底物或抑制剂除去,所得到的部分改性的蛋白质再与含同位素标记的同样试剂作用,结果只有原来被底物或抑制剂保护的基团是带放射性同位素标记的。用这一方法能直接得到蛋白质发挥功

能作用时的“必需”基团。

四、蛋白质功能改变的解釋

蛋白质进行化学改性后，在确证试剂已经作用上去并且反应又是专一进行的基础上，除了用物理化学方法如旋光色散，圆二色性等验证一下改性的蛋白质在溶液中的构象是否发生了显著的变化外，还必须进一步证明改性作用的确是发生在“活性中心”上，常用的方法有

1. 如果改性发生在“活性中心”或“必需”基团上，那么，蛋白质活性的丧失与改性程度一定成某种化学计量关系(计算的比率关系)。

2. 如果改性发生在“活性中心”或“必需”基团上，那么，底物(或已经确定是与“活性中心”结合的抑制剂)必然能降低改性蛋白的失活程度，而与“活性中心”不能结合的有关分子则没有这种影响。

3. 当采用“可逆保护”试剂时，改性失活的蛋白质随着保护基的去除，可以使蛋白质重新恢复活力，而且两者之间有一定的相应关系，即活力的恢复程度应与保护基去除量成一定比例关系。

当然，在蛋白质化学改性中还可能出现这样一种可能性，就是被改性的基团的确是处于“活性中心”区域，但却没有直接参与作用，而是由于带电或庞大的基团引入后，扰乱了活性位置的精巧结构，从而造成蛋白质活力的丧失。这只能通过高分辨率的 X-射线结构分析研究结果才能加以说明。

应该指出，有些蛋白质改性后活力不但没有下降反而有提高的可能性。如细胞色素 C 分子中 5 个氨基都用三硝基苯磺酸 (TNBS) 改性后导致活力丧失。但若用 O-甲基异脲作用，将氨基转变成碱性更强的胍基时，却能增加其活力。因此可以肯定：不是氨基本身而是正电荷是它表现活力所“必需”的。另一个例子是肝醇脱氢酶，氨基改变后，使酶——底物络合物的结合减弱了，加速了其解离，从而增加酶的活性。上述例子又一次说明，蛋白质化学改性时，试剂的选择是很重要的，试剂选择得当，可以为我们

提供更多的信息。

五、蛋白质化学改性的应用

1. 用来测定蛋白质的含量和蛋白质分子中某种氨基酸的数量

蛋白质化学改性已广泛用来测定样品中蛋白质的含量，表 2 列举了一些常用的方法。其中用得最多而且灵敏度较高的是，用对氯汞苯甲酸与蛋白质分子中的巯基作用，反应的最适 pH 是在 pH4.5—5.0 之间，并能通过 250—255 毫微米波长下光吸收的变化定量测出巯基数目，从而也可换算出蛋白质的总量，另一种是通过三硝基苯磺酸 (TNBS) 与蛋白质分子的氨基反应；



反应产物呈黄色，可在 345 毫微米波长下测定其光密度。应该注意，反应生成物中有亚硫酸氢盐 (HSO_3^-)，随着反应介质 pH 升高，它可进一步解离成亚硫酸根，这将影响光密度，因此用 TNBS 测定蛋白质浓度时，保证标准样品和测试样品的反应 pH 相同是很重要的。

近年来，利用荧光方法来测定微量蛋白质是非常有效的。它的灵敏度比一般光吸收方法高 100 倍左右。只要用毫克量的蛋白质样品就能准确进行定量。常用的试剂是荧光胺 (Fluorescamine)，试剂本身及水解产物是没有荧光的，但与一级胺反应的产物却有很强的荧光；

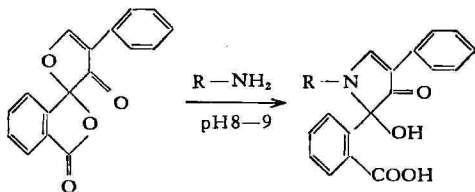
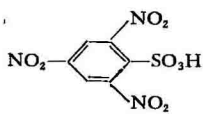
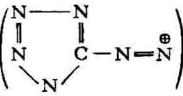
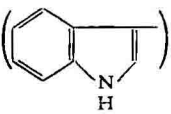
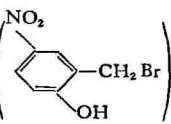
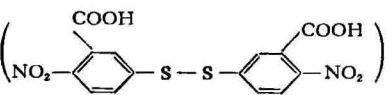


表2 一些常用来进行蛋白质质量的化学改性

反 应 基 团	试 剂	参 考 文 献
氨基 ($-\text{NH}_2$)	1. 三硝基苯磺酸  2. 茚三酮 3. 荧光胺 水溶性碳二亚胺	$\{$ <i>Anal. Biochem.</i> , 14 , 328, 1966 { 生物化学生物物理进展 1976 年 第 3 期 19 页 $\{$ <i>J. Biol. Chem.</i> , 211 , 907, 1954 $\{$ <i>Science</i> , 135 , 441, 1962 $\{$ <i>Science</i> , 178 , 871, 1972 $\{$ <i>J. Biol. Chem.</i> , 242 , 2447, 1967
羧基 ($-\text{COOH}$)		
胍基 ($-\text{NH}-\text{C} \begin{smallmatrix} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{smallmatrix}$)	8-羟基喹啉+次溴酸钠	<i>J. Biochem.</i> , 49 , 566, 1961
咪唑基 	四唑重氮盐 	$\{$ <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , 194 , 293, 1969 $\{$ <i>Biochem.</i> , 5 , 3574, 1966
和酚基 ()		
吲哚基 	1. 对-二甲氨基苯甲醛+硫酸 2. 2-羟基-5-硝基溴化苄 	$\{$ <i>Anal. Chem.</i> , 39 , 1412, 1969 $\{$ <i>J. Biol. Chem.</i> , 242 , 5771, 1967
巯基 ($-\text{SH}$)	1. 对氯汞苯甲酸 2. 5,5'-二硫双硝基苯甲酸  DTNB	$\{$ <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 76 , 4331, 1954 $\{$ <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 82 , 70, 1959

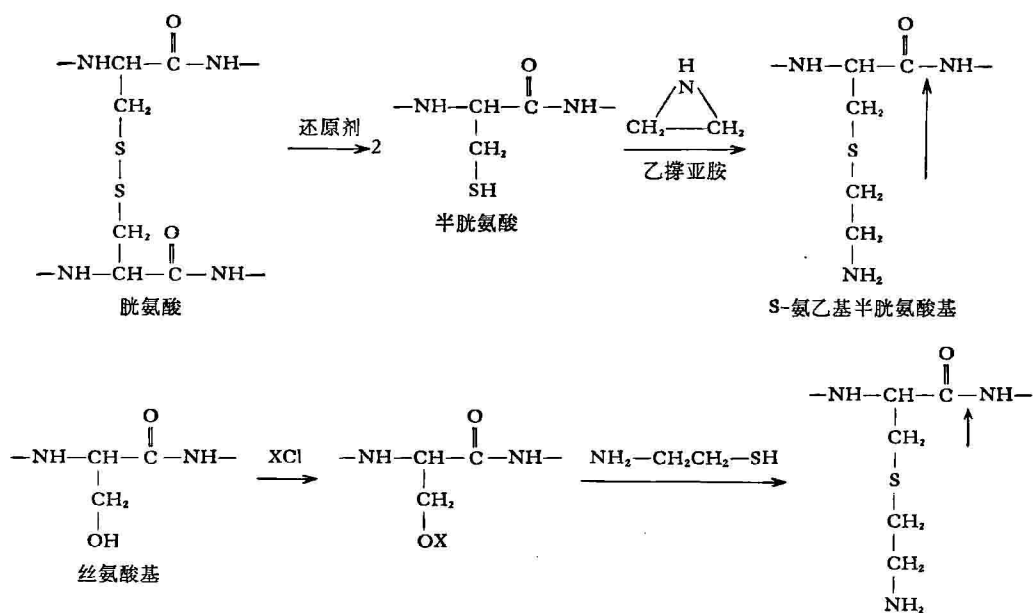
产物荧光的激发波长为 390 毫微米，而发射波长为 475 毫微米。

2. 在研究蛋白质一级结构中的应用

目前用于测定蛋白质及多肽化学结构的许多经典方法都是以蛋白质化学改性为基础，这里介绍的是其它方面的应用。

(1) 控制酶解程度 在测定蛋白质的氨基酸排列顺序时，首先必须用具有不同专一性的蛋白水解酶(胃蛋白酶，胰蛋白酶，胰凝乳蛋白酶)将蛋白质水解成一定大小的肽。然后将它们分离纯化，测定其氨基酸排列顺序。胰蛋白

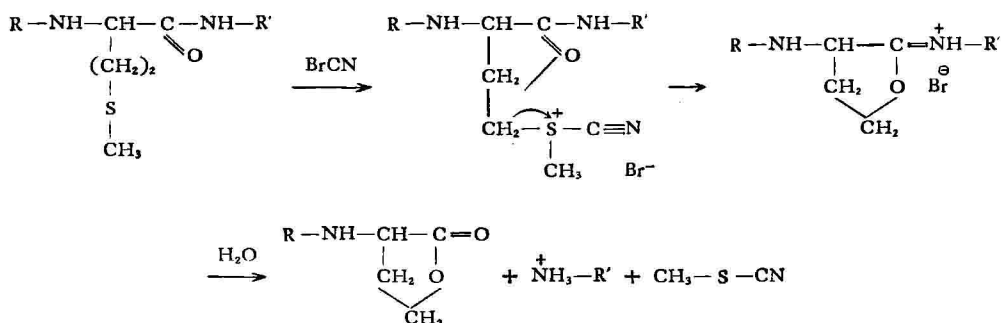
酶在这方面用得最多，它能专一地水解碱性氨基酸(精氨酸和赖氨酸)的羧基所形成的肽键。如果要使胰蛋白酶只水解精氨酸所形成的肽键，可以将赖氨酸 ϵ -氨基“保护”起来，使它转变成酶不能水解的衍生物。通常用三氟乙酰化方法，因它很容易除去，是一个比较理想的可逆保护基。相反，如果要增加胰蛋白酶水解位置，也可通过化学改性的途径将半胱氨酸转变成 S-氨乙基半胱氨酸，S-氨乙基半胱氨酸的羧基所形成的肽键对胰蛋白酶的作用是敏感的。必要时还可将丝氨酸也转变成 S-氨乙基半胱氨酸。反应过程如下：



(注: 箭头指向是胰蛋白水解的位置。X = CH₃——SO₂ 或 CH₃—SO₂—)

(2) 化学裂解 除了用蛋白水解酶将蛋白降解成肽以外,用化学方法裂解肽键也很常用。有关报道甚多,但大多数由于专一性不高或存

在其它副反应而限制了它们为实际应用。目前最理想而且普遍采用的是用溴化氰专一地裂解甲硫氨酸的羧基所形成的肽键



由于甲硫氨酸在蛋白质分子中的含量很少,如具有 1320 氨基酸的免疫球蛋白仅含有 18 个甲硫氨酸。因此测定这个蛋白质的一级结构时,用溴化氰裂解是很重要的一步。

3. 研究蛋白质高级结构中的应用

(1) 用来区别某种基团在蛋白质分子中是处于“埋藏”状态还是处于分子表面 特别是当酸碱滴定不能肯定的时候,用化学改性的方法往往可以得到比较可靠的信息。一般认为蛋白质在几乎处于天然状态下时能与试剂作用的基团都处于分子表面,不作用的基团则处于“埋

藏”状态或参与次级键的形成。

(2) 用来测定蛋白质分子中特定基团之间的距离 自从 Zahn 用二硝基二氟苯与胰岛素作用时,发现这个试剂可将胰岛素分子中的 A₁-甘氨酸和 B₂₉-赖氨酸这两个从化学结构上看来似乎相距甚远的氨基交联起来,因而推测这两个氨基在胰岛素分子空间排布上非常靠近。X-射线晶体结构分析结果证明这一推测是完全正确的。近年来,已合成了许多所谓双功能试剂用于蛋白质交联。

双功能试剂除了用于测定基团间的距离

外,还可用来将一种蛋白与另一种蛋白或将多肽与蛋白质共价交联起来,这对于制备小肽的抗体是很常用的。Kennedy 等最近对双功能团试剂的类型,反应以及应用已作了系统的综述。

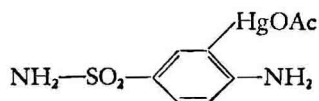
(3) 用来研究蛋白质亚基之间的相互作用 许多蛋白质特别是酶都具有亚基结构,这些亚基通过次级键结合成完整的蛋白质分子。当我们研究具有亚基结构的蛋白质时,常常希望了解亚基之间通过什么形式的次级键来起作用,也就是说那些基团对亚基间的相互作用是“必需”的。化学改性为这一研究提供了一个很有用的工具,尤其是引进荧光基团后,可通过荧光的变化来了解亚基间的作用。

(4) 为蛋白质溶液构象研究提供适当的标记样品 近年来,核磁共振和荧光技术已广泛用来研究蛋白质溶液状态下的构象。蛋白质化学改性能为这些研究提供合适的标记蛋白质样品。如将含 ^{13}C 和 F 的基团引入到蛋白质分子中以进行核磁共振的研究。

荧光标记的蛋白质除了上述所说的用来进行微量蛋白质含量的测定外,还可用来测定蛋白质在组织中的位置(如荧光抗体,见下)。并可作为测定蛋白质结构的“探针”。蛋白质分子中的色氨酸和酪氨酸虽然也能产生荧光,但其强度太弱,不能满足某些测定需要。为了增加蛋白质荧光,可通过化学改性途径将荧光基团

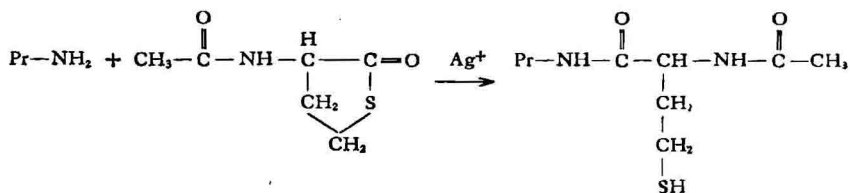
引进到蛋白质分子中。此外,荧光偏振技术可用来测定蛋白质的旋转弛豫时间,从而推算出蛋白质分子的大小、形态以及构象变化。荧光标记蛋白质还可用来研究蛋白质的解离——缔合现象等方面。

(5) 制备含重原子的蛋白质衍生物 用 X 射线进行蛋白质晶体结构分析时,一般都采用“多对同晶置换法”。这一方法要求制备几个带重原子(如 Hg、Pb、I 等)并与天然蛋白质同晶型的衍生物。这些衍生物一般是将蛋白质晶体浸泡在含重原子化合物的溶液中,让重原子化合物自然地扩散到蛋白质晶体内某些位置。但也可通过化学改性的方法将重原子有目的地引入到蛋白质分子中去。如测定血红蛋白的晶体结构时,就是将对氯汞苯甲酸引到蛋白的巯基上。含重原子的酶的底物或抑制剂类似物也曾用于酶的晶体结构分析工作。如

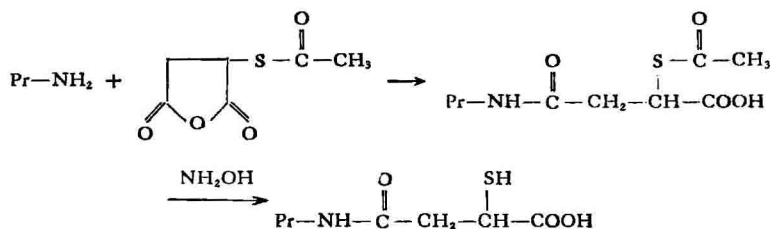


用于碳酸酐酶的测定, $\text{I}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{F}$ 用于胰凝乳蛋白酶的测定。当蛋白质分子中缺少与重原子结合的基团时,可通过间接方法,即先将易与重原子结合的巯基引到蛋白质分子的氨基上,一般叫巯基化作用。可通过以下三种试剂进行:

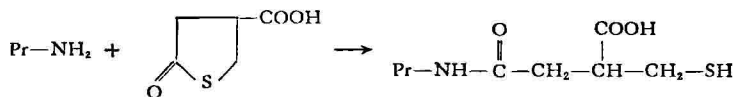
a) N-乙酰高半胱氨酸硫内脂



b) S-乙酰基基琥珀酸酐



c) 硫代内酯



巯基化的蛋白质可以先与重原子结合再进行结晶，也可以先制成晶体再浸泡在含重原子化合物的溶液中。这一方法成败与否关键是巯基化蛋白质是否能结晶，即使能结晶，所得到的晶体是否与天然蛋白同晶。

4. 蛋白质免疫化学研究中的应用

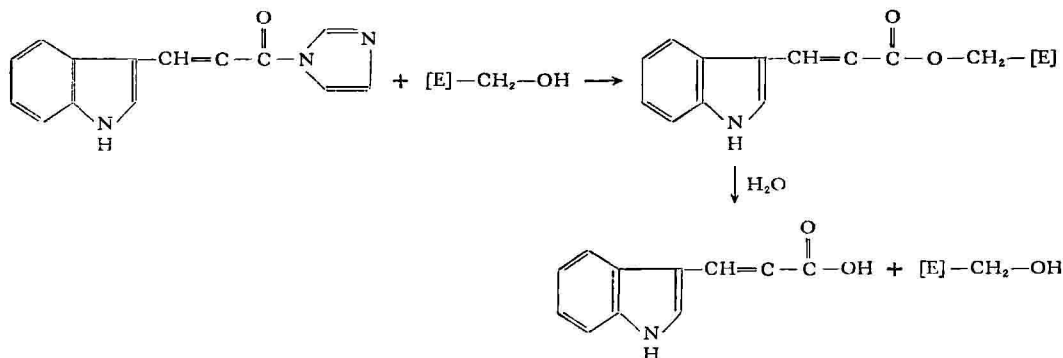
六十年代以来，蛋白质化学改性为免疫化学技术的发展提供了有力的工具。众所周知，灵敏度非常高的放射免疫技术已广泛用于蛋白质和多肽等的检测和定量。这一技术的基础就是通过化学改性将放射性同位素碘引入到抗原分子中的酪氨酸侧链上，产物保持其原有的抗原性。此外，荧光标记的抗体可用于抗原在组织中的定位。抗体的酶标记也是根据同样的原理，通过双功能团试剂(如戊二醛)将抗体与酶(如过氧化物酶)结合在一起，产物既保留抗体的原有活性又保留酶的活性。

化学改性在蛋白质免疫化学中的另一用途是将易产生抗体的基团引入到蛋白质分子中，所引入的基团本身不能产生抗体，只有连结到蛋白质分子上才能产生抗体，因此叫做“半抗原”。“半抗原”可以增加免疫性较弱的蛋白质的免疫性。芳香基是最常用的“半抗原”，它可

通过重氮盐或芳香卤试剂与蛋白质作用而联结到蛋白质分子上。这一方法产生的抗体能与“半抗原”和蛋白质结合。由于抗体与小分子之间形成的复合物要比抗体与大分子间形成的复合物简单得多，我们能用蛋白质与小分子相互作用的处理方法来研究“半抗原”与抗体的相互作用。诸如平衡常数，速率常数和结合部位等可用相当简便的物化技术进行测定。通过不同的“半抗原”研究，可帮助我们了解抗体的结合位置及它与抗原作用的化学本质。

5. 其它方面的应用

(1) 证明酶在晶体状态下和在溶液状态下具有相同的反应速率常数 用 X-射线衍射方法测定出蛋白质特别是酶的晶体结构以后，人们对蛋白质分子复杂结构的细节了解得一清二楚，尤其对某些活性蛋白质如酶的作用过程。但同时也出现这样一个问题，即酶在溶液状态下和在晶体状态下的活力是否相同。1970 年 Rossi 将吲哚丙烯酰基引入到胰凝乳蛋白酶第 195 位的活性丝氨酸上，从而证明胰凝乳蛋白酶在晶体下和在溶液状态下自身水解吲哚丙烯酰基的速率常数是相同的。



但是有些作者认为酶在晶体或固相情况下的反应速率比溶液状态下要小。因此关于这一问题目前仍无肯定的回答，可能各个酶的情况

有差异。

(2) 用于膜的研究 近十多年来，细胞质膜及亚细胞膜的生物功能越来越引人注意。如

多肽蛋白激素与靶细胞作用产生生物效应时，首先与靶细胞质膜上的所谓受体蛋白结合。因此，我们可以利用化学改性的方法来改变膜蛋白的结构，比较改变前后的质膜对多肽蛋白激素结合能力的变化，这对进一步了解激素与受体蛋白之间的相互作用以及了解膜的结构是很有帮助的。

6. 蛋白质化学改性在生产实际上的应用

在生产实际上应用蛋白质化学改性已有很长的历史。如医药工业上用甲醛使细菌毒素和病毒改性,使毒素失活和杀死病毒。从而不能产生毒性作用和致病效应,但却保持其免疫性。经这一方法处理的细菌毒素就是所谓类毒素。又如制革工业上,因蛋白质交联剂(如戊二醛)将胶原蛋白交联起来,当然这一反应历程是很复杂的。此外在毛纺工业上,羊毛纤维的染色过程从广义来说也是蛋白质化学改性。近年来,固相酶技术已在生产实际上推广应用,这一技术的基础也是蛋白质化学改性,所不同的是引入到酶分子中的不是一般化学基团,而是固相载体。固相免疫和亲和层析也是以类似的原

理发展起来的。

六、蛋白质化学改性的局限性

综上所述，蛋白质化学改性只能在含特殊功能团的侧链上进行，但蛋白质分子中还有许多不含特殊功能基团的氨基酸，而且从种属差异的比较来看，它们在进化上又是比较保守的。X-射线晶体结构分析结果表明，这些氨基酸的侧链在维持蛋白质的特定空间构型方面起着重要的作用，目前的化学改性方法不能用来研究它们对蛋白质结构和功能关系中的作用。此外，蛋白质化学改性虽然对于了解蛋白质结构和功能关系方面能提供一些有用的信息，但从整体来看往往感到系统性不够。即使有些结果似乎很满意，如蛋白质分子中某一基团被改性以后完全导致活力的丧失，我们也只能说某一基团是蛋白质表现其生物活力所“必需”的，但为什么是“必需”就不能确切地加以说明了。这只能借助高分辨率的 X-射线晶体结构分析和其它物理化学方法的帮助来回答了。

[本文于 1978 年 4 月 11 日收到]

(上接第 77 页)

组成的微分电路,被微分成两个方向相反的尖脉冲,经 D_3 、 D_4 隔离选择后面的一个尖脉冲触发波宽单元,造成延迟。 BG_8-9 、 BG_{10-11} 组成二个单稳态,构成正负波波宽单元。该二单元的电容器须经挑选配对,装在同一波段开关 K_4 上调节波宽,电阻器也要配对,以使正波与负波的波宽相等,这是避免输出直流分量的又一必要条件。正负波分别经 BG_{12} 、 BG_{13} 组成的射极跟随器输出后,由 BG_{14-17} 将正负二方波混合成双向方波。 BG_{18} 、 BG_{19} 为射极输出,以降低输出阻抗,得到恒压输出特性。 BG_{20} 、 BG_{21} 为集电极输出,以得到恒流输出特性。

为了保证正负波的对称性,以消除直流分

量,特设“平衡调整” W_{50}

K_6 为恒流恒压转换波段开关,双刀六位,图中上位为恒流状态,下位为恒压状态。

R_{55} 为假负载,便于在无负载时调节仪器参数,在接入负载后即自动断开。

R_{56} 在恒流时提供引入示波器的电位,以便换算为电流值。

示波器监视输出使实验者能够随时观察实际刺激波形并定量。

本仪器已正式投入科研使用,达到设计要求,完成科研任务。但由于初步试制,缺乏经验,在设计原理,设计要求等各方面都有待同志们提出宝贵意见,以便改进。

[本文于 1977 年 9 月 17 日收到]