



实验二

蛋白质的颜色反应

酪蛋白等电点pH的测定

目的:

- 1、学习氨基酸和蛋白质呈色反应的基本原理和方法
- 2、掌握测定蛋白质等电点的方法
- 3、了解蛋白质的理化性质



蛋白质的理化性质



- (一) 蛋白质的两性电离
- (二) 蛋白质的胶体性质
- (三) 蛋白质的变性、沉淀
- (四) 蛋白质的紫外吸收
- (五) 蛋白质的呈色反应



蛋白质的理化性质



(一) 蛋白质的两性电离

蛋白质分子除两端的氨基和羧基可解离外，氨基酸残基侧链中某些基团，在一定的溶液pH条件下都可解离成带负电荷或正电荷的基团。

 * 蛋白质的等电点(**isoelectric point, pI**)

 当蛋白质溶液处于某一pH时，蛋白质解离成正、负离子的趋势相等，即成为兼性离子，净电荷为零，此时溶液的pH称为蛋白质的等电点。

 * 处于等电点的蛋白质溶解度最低。





- 当 $\text{pH} < \text{pI}$ 时，蛋白质带净正电荷，在电场中向负极移动；当 $\text{pH} > \text{pI}$ 时，蛋白质带净负电荷，在电场中向正极移动。
- 溶液的 pH 偏离蛋白质的 pI 越远，蛋白质带净电荷越多，在电场中越容易分离。





实验操作:

一、蛋白质的两性反应

- 0.5% 酪蛋白溶液
- 0.02HCl, 0.02N NaOH (课堂使用时稀释)
- 酸碱指示剂: 溴甲酚绿溶液 (Bromocresol green)

分子式: $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$; 分子量: 698.02

性质: 浅黄色结晶或棕色粉末。溶于乙醇和稀碱溶液, 不溶于水。

pH变色域: 3.8 (黄绿) - 5.4 (蓝)

实验过程中观察颜色变化同时测定pH值



实验操作:

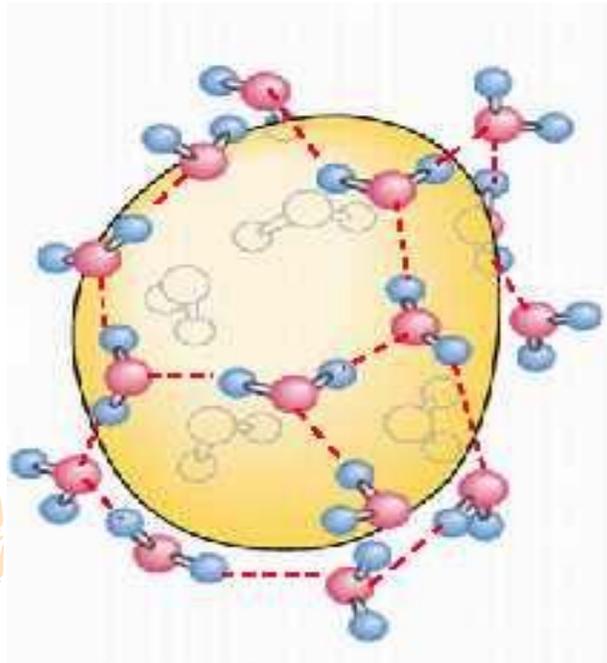
二、酪蛋白等电点的测定

- “+ -”
- 无沉淀用“-”表示
- 沉淀用“+”表示



(二) 蛋白质的胶体性质

吉祥



蛋白质溶液是一种亲水胶体，每克蛋白质分子能结合0.3~0.5克水。

■ 蛋白质属于生物大分子之一，分子量可自1万至100万之巨，其分子的直径可达1~100nm，为胶粒范围之内。

■ 真溶液(1nm) < 胶体溶液 < 悬浮液(100nm)

蛋白质的胶体特征

1. 蛋白质的分子大小属于胶体质点的范围

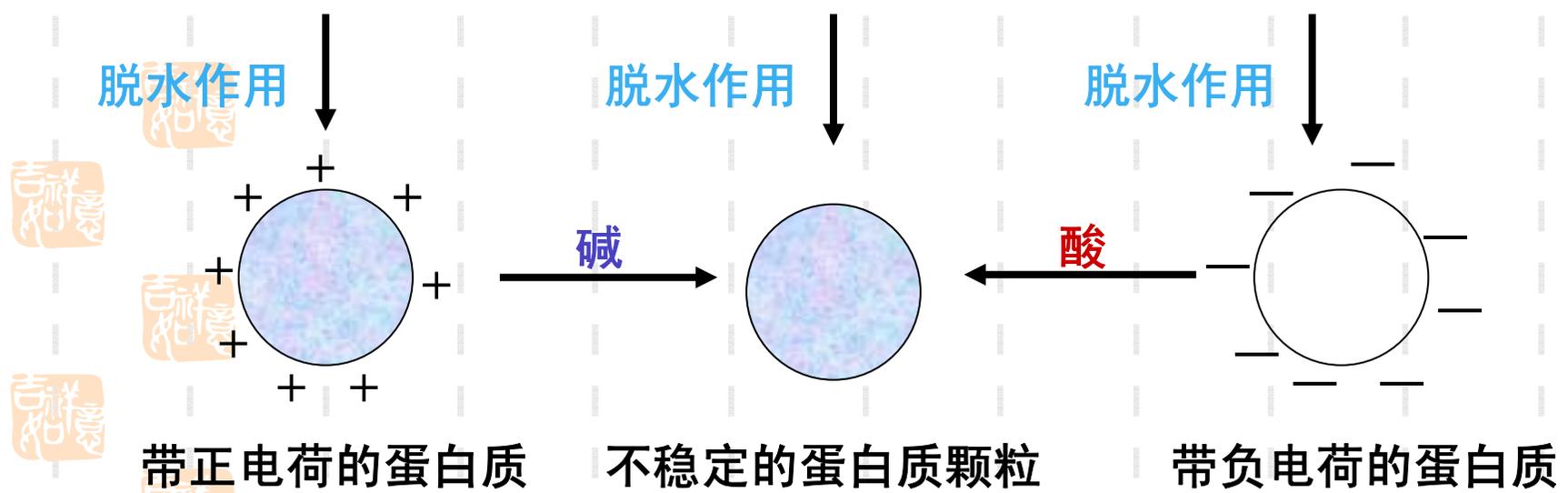
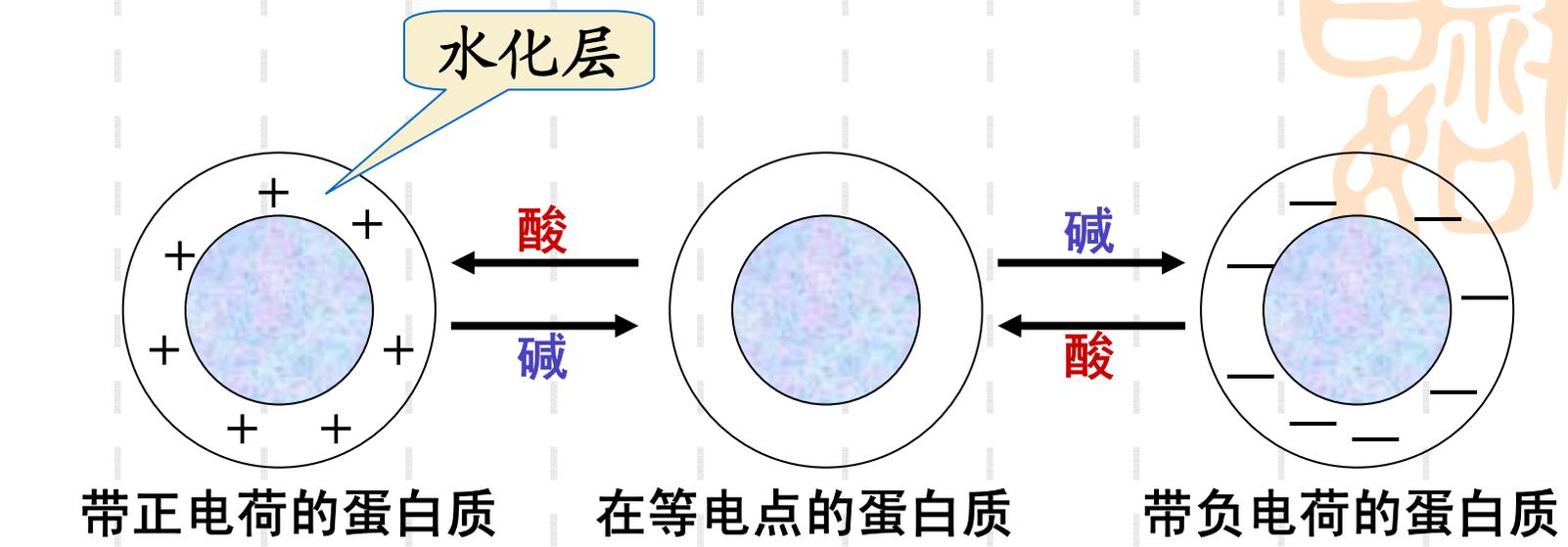
2. 蛋白质溶液稳定:

(1) 水化层: 可溶性蛋白质分子表面分布着大量极性氨基酸残基, 对水有很高的亲和性, 通过水合作用在蛋白质颗粒外面形成一层水化层

(2) 双电层: 分子表面上的可解离基团, 在适当的pH条件下, 都带有相同的净电荷, 与其周围的反离子构成稳定的双电层。

3. 蛋白质溶液也和一般的胶体系统一样具有丁达尔效应、布朗运动以及不能通过半透膜等性质

吉祥



溶液中蛋白质的聚沉

吉祥



(三) 蛋白质的变性、沉淀和凝固

* 蛋白质的变性(denaturation)

在某些物理和化学因素作用下，其特定的空间构象被破坏，也即有序的空间结构变成无序的空间结构，从而导致其理化性质改变和生物活性的丧失。



- 变性的本质

破坏非共价键和二硫键，不改变蛋白质的一级结构。

- 造成变性的因素

如加热、乙醇等有机溶剂、强酸、强碱、重金属离子及生物碱试剂等。



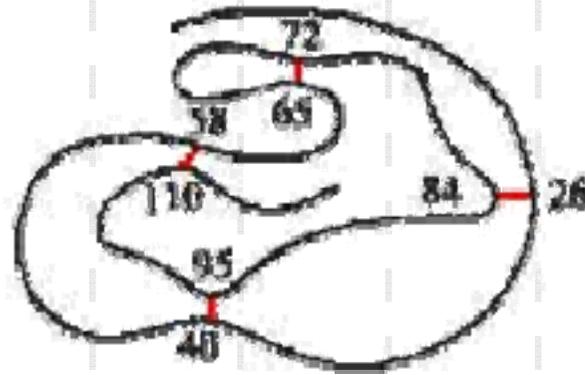
- 应用举例

- 临床医学上，变性因素常被应用来消毒及灭菌。
- 此外，防止蛋白质变性也是有效保存蛋白质制剂（如疫苗等）的必要条件。
- 若蛋白质变性程度较轻，去除变性因素后，蛋白质仍可恢复或部分恢复其原有的构象和功能，称为**复性(renaturation)**。



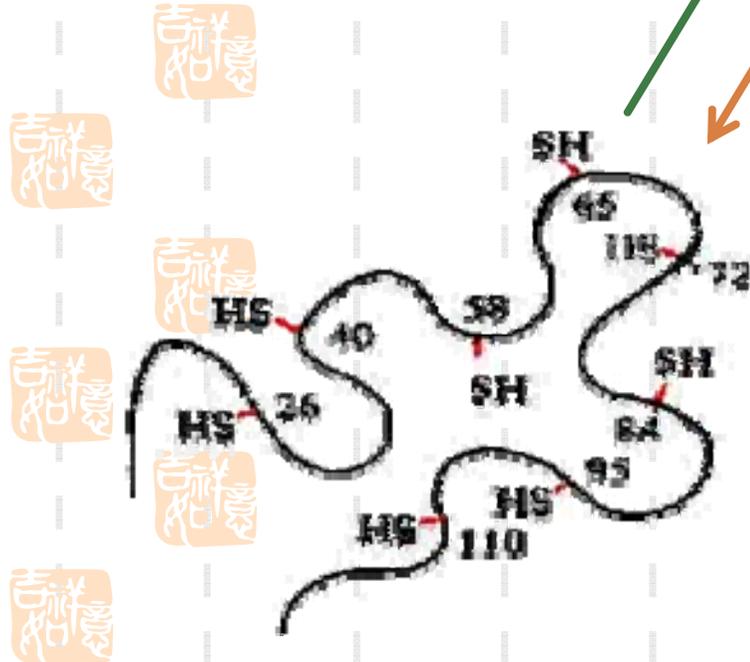
吉祥

天然状态，有催化活性



去除尿素、 β -巯基乙醇

尿素、 β -巯基乙醇



非折叠状态，无活性



蛋白质的沉淀

蛋白质在溶液中的稳定性是有条件的、相对的。在一定的物理化学因素影响下，蛋白质颗粒失去电荷，脱水，甚至变性，则以固态形式从溶液中析出，这个过程称为蛋白质的沉淀反应。





(四) 蛋白质的紫外吸收

由于蛋白质分子中含有共轭双键的酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸，因此在280nm波长处有特征性吸收峰。蛋白质的 OD_{280} 与其浓度呈正比关系，因此可作蛋白质定量测定。



(五) 蛋白质的呈色反应

蛋白质中含有不同的氨基酸，可以和不同的试剂发生特殊的颜色变化。

(1) 茚三酮反应 试剂：水合茚三酮

与 α -氨基酸一样所有蛋白质都能与水合茚三酮反应生成蓝紫色物质。

(2) 缩二脲反应 试剂：稀碱，稀硫酸铜溶液

含二个以上肽键的肽和各种蛋白质与稀碱，稀硫酸铜溶液反应时产生紫色或粉红色物质，称为缩二脲反应

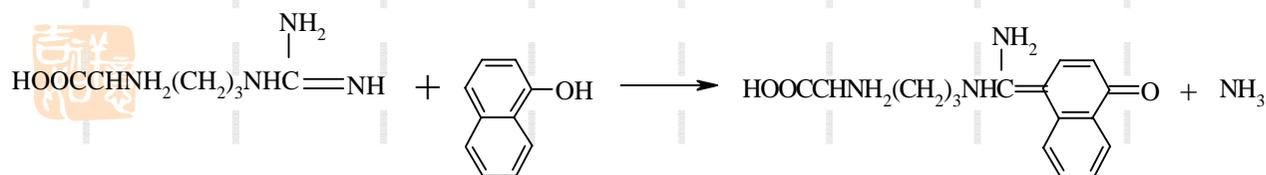
(3) 米伦反应 试剂：汞-浓硝酸

含芳香基的蛋白质遇浓硝酸后变黄



(4) 坂口反应

含有精氨酸的蛋白质与 α -萘酚在碱性次溴酸钠溶液中发生颜色反应，生成红色产物。在次溴酸钠缓慢作用下，醌式结构发生变化引起颜色的消失，因此过量的次溴酸钠对反应不利。加入尿素可破坏过量次溴酸钠，增加颜色的稳定度。



实验操作

- 1、3ml精氨酸+NaOH/ α -萘酚/溴水——观察颜色
- 2、卵清蛋白+ NaOH/ α -萘酚/溴水+尿素——颜色

(5) Pauly反应

- 酪氨酸的酚基及组氨酸的咪唑基可与对氨基苯磺酸/亚硝酸钠反应形成具有色泽的重氮化合物，在冷却的条件下进行。

2ml 组氨酸

(酪氨酸) + 对氨基苯磺酸/亚硝酸钠

冰浴，观察颜色变化

蛋白质的颜色反应

吉
祥
意

反应名称	试剂	显色	阳性反应物
茚三酮反应	茚三酮	蓝紫	肽、蛋白质、所有氨基酸
双缩脲反应	碱、硫酸铜	红紫	蛋白质的肽键
米伦反应	米伦试剂（汞-浓硝酸）	红	酪氨酸（酚基）
坂口反应	α -萘酚、次溴酸钠	红	精氨酸（胍基）
Pauly反应	对氨基苯磺酸、亚硝酸钠	桔黄色 棕红色	酪氨酸（酚基） 组氨酸（咪唑基）

吉
祥
意

吉
祥
意

吉
祥
意

吉
祥
意

氨基酸的结构

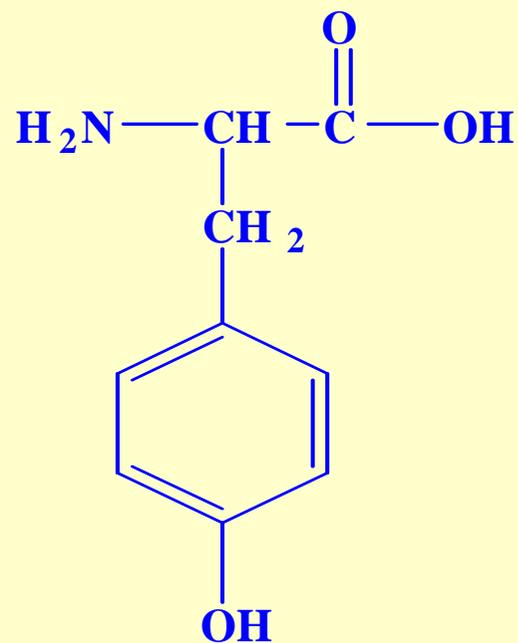
芳香族氨基酸

苯丙氨酸

Phenylalanine

酪氨酸

Tyrosine

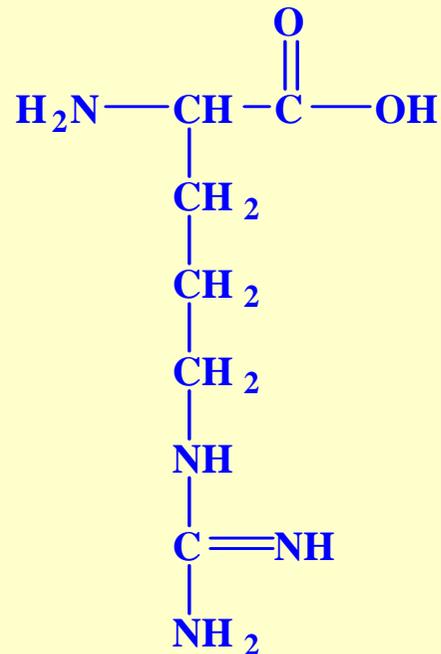


α -氨基- β -对羟苯基丙酸

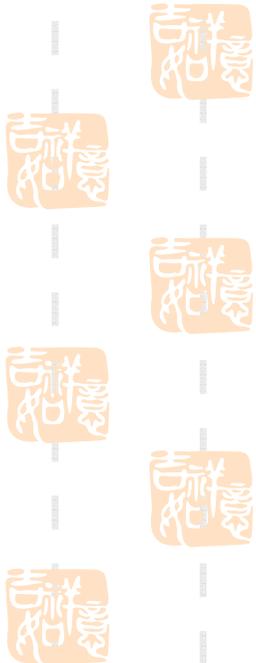
氨基酸的结构

精氨酸
Arginine

碱性氨基酸



α -氨基- δ -胍基戊酸



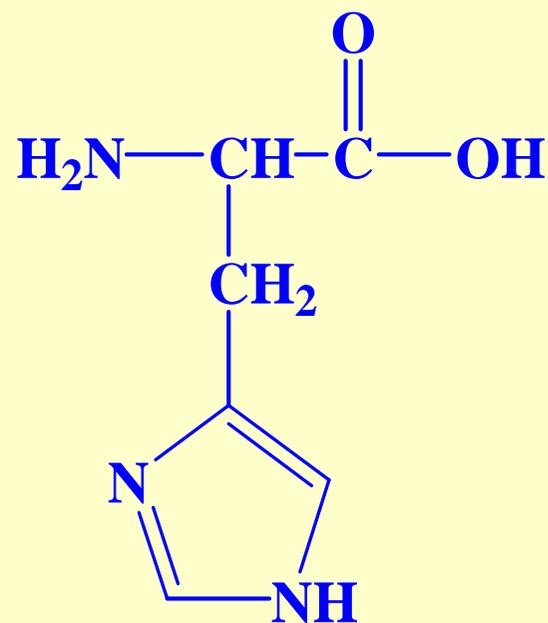
氨基酸的结构

精氨酸
Arginine

赖氨酸 Lysine

组氨酸
Histidine

碱性氨基酸



α -氨基- β -咪唑基丙酸