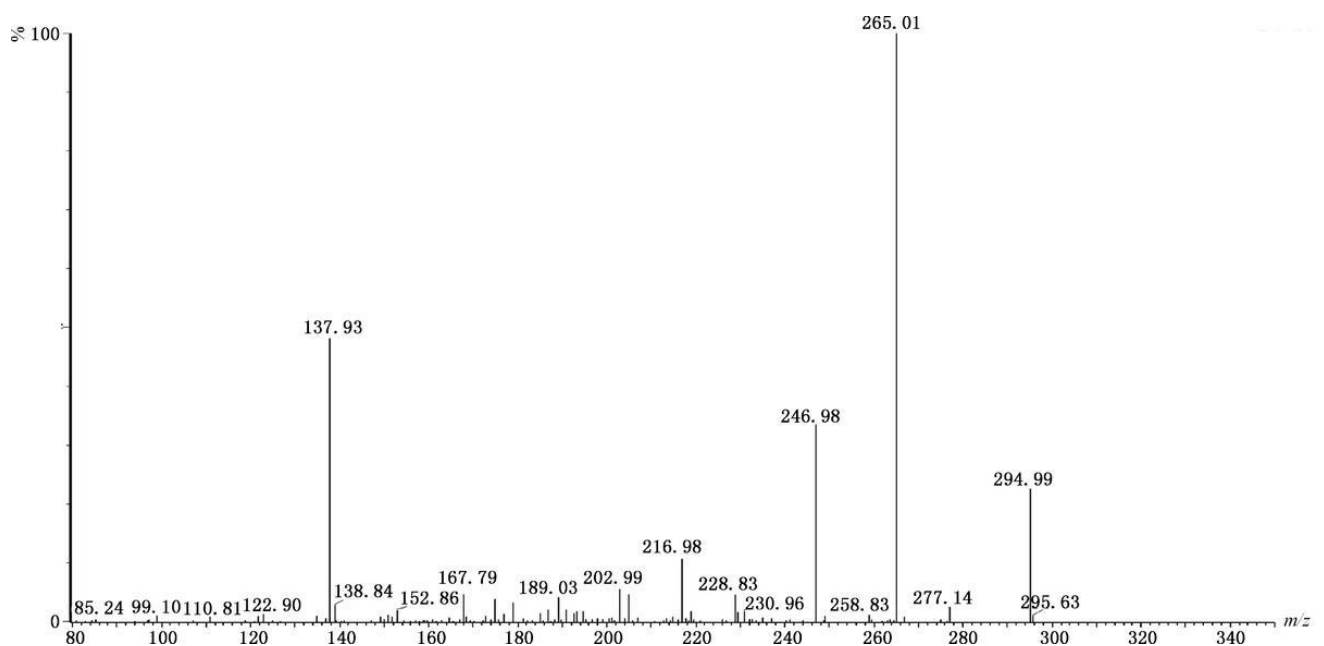




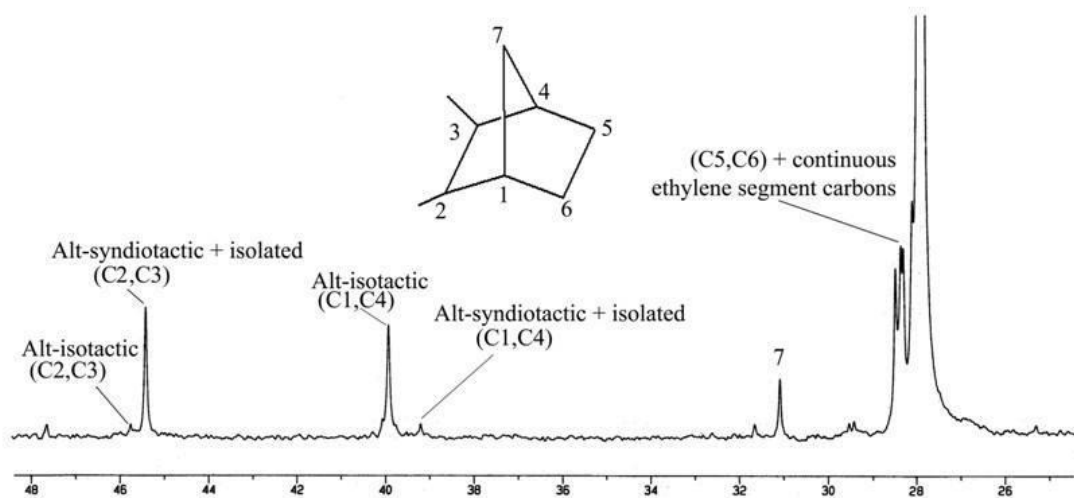
由氨基酸组成的多肽数目惊人，情况十分复杂，由 100 个氨基酸聚合成线形分子，可能形成 20100 种多肽。仅由 Gly、Val、Leu 三种氨基酸就可组成六种三肽。因此，多肽结构的确定，尤其是长链多肽结构的确定是一个相当重要也相当复杂的工作。纯的、单一的多肽是保证肽结构确证的前提条件。杭州专肽生物可对多肽提供 1-5 种检测报告。

(一) 多肽的结构分析方法——质谱



经典的多肽测序方法包括 N 末端序列测定的化学方法，如 Edman 法、C 末端酶解方法及 C 末端化学降解法等，这些方法都存在一定缺陷。例如作为多肽和蛋白质序列测定标准方法的 N 末端氨基酸苯异硫氰酸酯 (phenylisothiocyanate, PITC) 分析法 (即 Edman 法, 又称 PTH 法), 测序速度较慢 (每天 50 个氨基酸残基); 样品用量较大 (nmol 级或几十 pmol 级); 对样品纯度要求很高; 对修饰氨基酸残基往往会产生错误识别, 而对 N 末端保护的肽链则无法测序。C 末端化学降解测序法则由于无法找到 PITC 这样理想的化学探针, 仍面临着很大的困难。在这种背景下, 质谱 (mass spectrometry, MS) 由于具有较高的灵敏度、准确性、易操作性而备受关 MS 用于多肽序列测定时, 灵敏度及准确性随分子量增大而明显降低, 所以采用 MS 进行多肽序列分析比蛋白质简单, 许多研究均是以多肽作为分析对象。近年来随着电喷雾电离质谱 (electrospray ionisation, ES) 及基质辅助激光解吸质谱 (matrix assisted laser desorption/ Ionization, MALD) 等质谱软电离技术的发展与完善, 使极性大分子多肽的分析成为可能, 检测限可达 fmol 级, 可测定的分子量范围则高达 100kDa。目前 MALD 已成为测定生物大分子尤其是蛋白质、多肽分子量和一级结构的有效工具。

(二) 多肽的结构分析方法——核磁共振

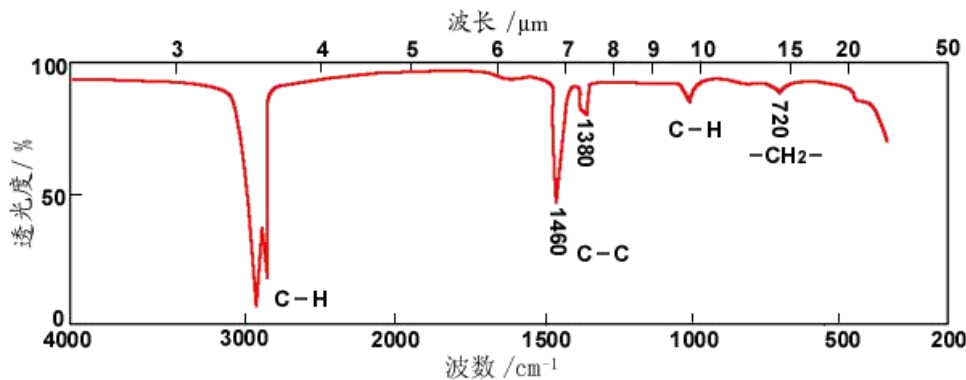


由于信号的纯数字化、重叠范围过宽 (由于相对分子质量太大) 和信号弱等, 核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 图谱在多肽的分析中应用较少, 随着二维、三维以及多维 NMR 的应用, 分子生物学、计算机处理技术的发展, NMR 才逐渐成为多肽分析的主要方法之一。NMR 可用于确定氨基酸序列及定量混合物中的各组分含量等, 但应用于多肽分析中仍有许多问题需要解决, 例如, 如何使分子量大的多肽有特定的形状面便于定量与定性分析, 如何缩短数据处理的时间等, 这些问题均有不少学者在进行研究, NMR 在分析含少于 30 个氨基酸的多肽时比较有效

最近的超高场超导磁铁的建造已将 NMR 研究的分子质量范围扩展到 100kD 以上如此大的蛋白质分子, 其 NMR 谱常遇到谱带增宽的问题, Wuthrich 等研

究的横向弛豫优化光谱法 (transversal relaxation optimized spectroscopy, TRDSY) 为此提供了解决方法

(三) 多肽的结构分析方法——红外光谱

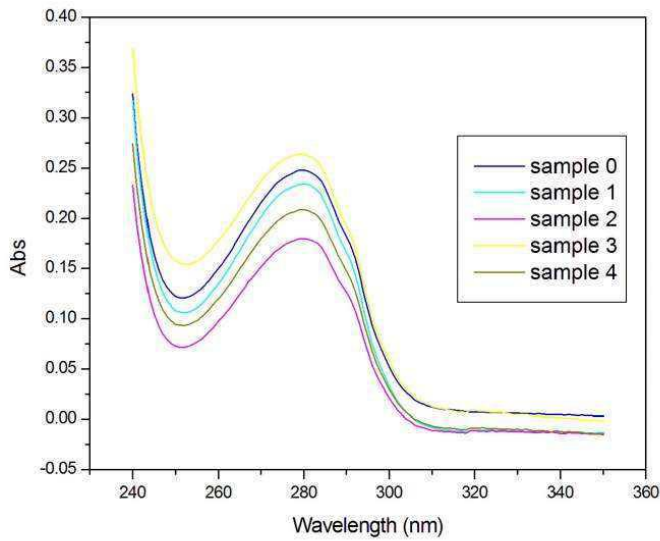


红外光谱是鉴定有机化合物结构的重要方法,具有样品用量小和不需要高纯晶体等特点。用红外光谱法研究多肽等的结构、构象,能反映与正常生理条件(水溶液、温度、酸碱性等)相似情况下的生物大分子的结构变化信息,这是用其它方法难以做到的。

用傅里叶变换红外光谱方法研究蛋白质和多肽二级结构,主要是对红外光谱中的酰胺 I 谱带(氘代后,称酰胺 I 谱带)进行分析,酰胺 I 谱带为 α 螺旋, β 折叠、无规则卷曲和转角等不同结构振动峰的加合带,彼此重叠,在 1620~1780 cm⁻¹ 范围内通常为一个不易分辨的宽谱带。目前常应用去卷积微分等数学方法,对加合带中处于不同波数的各个吸收峰进行分辨,最后经谱带拟合,获得各个吸收峰的定量信息。

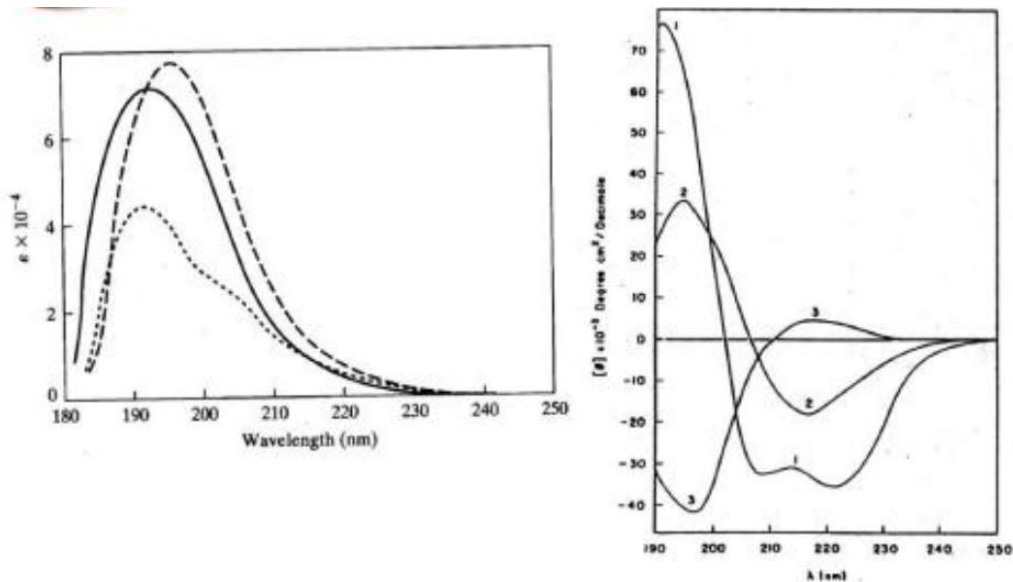
红外光谱可用于监测酰胺质子的交换速率,暴露于表面的质子比处于中心的质子 H/D 交换要快得多。内部伸缩区或参与二级结构形成的酰胺质子交换速率为中等。它可以提供多肽或蛋白质的所有氨基酸残基的信息。

(四) 多肽的结构分析方法——紫外光谱



在研究生物大分子的溶液构象时，紫外可见吸收光谱是十分重要的方法。它对测定样品没有特殊要求，只需处于溶液状态即可，因此紫外光谱在探索生物大分子结构与功能的关系方面可获得有意义的信息。蛋白质在紫外光范围内 (250~300nm) 的光吸收主要是由于芳香族氨基酸 Trp 及 Tyr，其次是 Phe 和 His 的电子激发引起的。

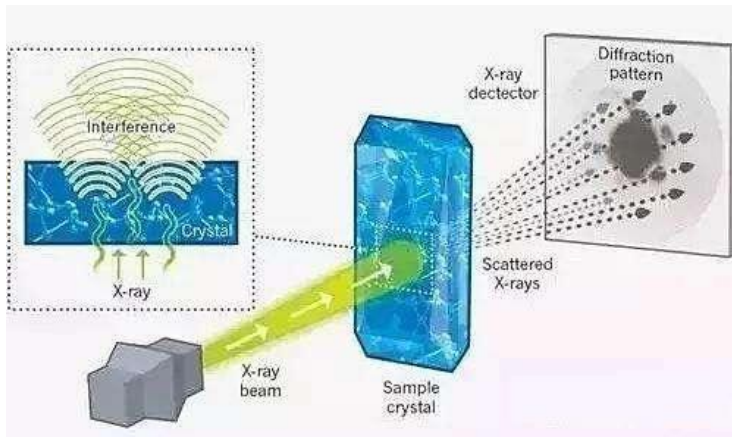
(五) 多肽的结构分析方法——圆二色谱



多肽多为手性分子，实验室主要采用圆二色谱 (circular Dichroism spectra, CD) 研究分子的立体结构、反应动力学及在溶液中的构象变化等。CD 谱具有 UV 分析相同的精密度但比 UV 的灵敏度高，而且在 UV 谱中的重叠的峰在 CD 谱中也有可能分开。CD 的测定通常是分子椭圆度 $[\theta]$ 的测定，它表示该物质

由于分子的光学不对称性而对左、右圆偏振光有不同程度的吸收。根据 Cotton 效应, $[\theta]$ 值只在吸收峰有较大的值, 并且与吸收峰波长位置相对应, 而多肽的紫外吸收光谱主要有两个吸收峰, 在 280nm 处的吸收峰由芳香族侧链引起(主要是 Tyr、Trp、Phe), 但在波长约低于 230nm 时, 不但有其他氨基酸侧链的电子跃迁, 还有肽链骨架本身电子位移的跃迁所引起的吸收, 因而通过对这一区域的 CD 研究可以分析多肽主链的构象。

(六) 多肽的结构分析方法——X 射线晶体学



X 射线晶体学方法是迄今为止研究蛋白质结构最有效的方法, 所能达到的精度是任何其他方法所不能比拟的。其缺点是蛋白质/多肽的晶体难以培养, 晶体结构测定的周期较长。X 射线衍射技术能够精确测定原子在晶体中的空间位置; 中子衍射和电子衍射技术则用于弥补 X 射线衍射技术的不足。生物大分子单晶体的中子衍射技术用于测定生物大分子中氢原子的位置; 纤维状生物大分子的 X 射线衍射技术用于测定这类大分子的一些周期性结构, 如螺旋结构等; 电子显微镜技术能够测定生物大分子的大小、形状及亚基排列的二维图像; 它与光学衍射和滤波技术结合而成的三维重构技术能够直接显示生物大分子低分辨率的三维结构。

除上述方法之外, 场解析质谱、生物鉴定法、放射性同位素标记法及免疫学方法等都已应用于多肽类物质的结构鉴定、分析检测之中。