

蛋白质的 结构与功能



GDOU

动物生物化学 Animal Biochemistry



复习：

- 1.核酸的定义及分类；
- 2.组成核酸的基本结构单元有哪些？
2. 简述chargaff定律的主要内容；
3. T_m 值的定义。

第一节 蛋白质的生物学功能与分类



什么是蛋白质？

蛋白质是由多个**氨基酸**，通过**肽键**相连形成具有**特殊结构**的高分子含氮化合物。

蛋白质(protein)是DNA的遗传信息体现者，是生命的物质基础，几乎在一切生命过程中都起着关键的作用。没有蛋白质就没有生命。

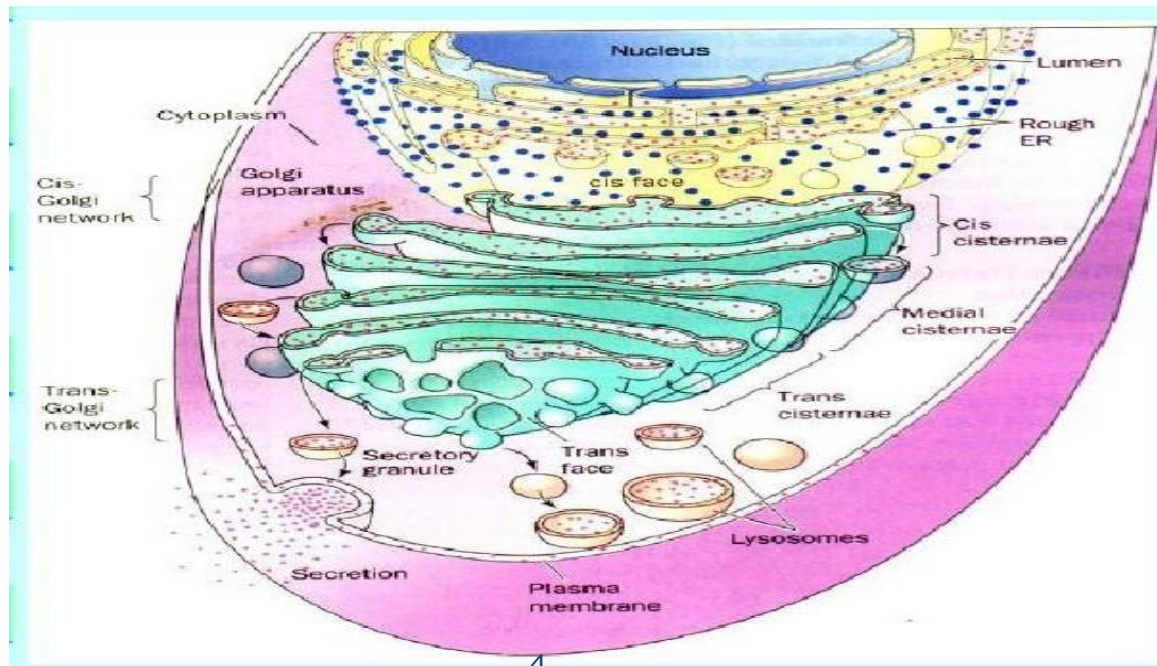
第一节 蛋白质的生物学功能与分类



一、蛋白质的生物学功能

1. 细胞结构组成成分

生物体里面蛋白质是除了水以外含量最高的成分，占到干物质的50%以上。



第一节 蛋白质的生物学功能与分类



2. 蛋白质是生理活性物质

1. 催化功能： 酶（处核酶外）
2. 运输功能： 血红蛋白、转铁蛋白、载体蛋白
3. 调节功能： 胰岛素、生长激素
4. 运动功能： 肌动蛋白、肌球蛋白
5. 防御功能： 免疫蛋白、凝血因子
6. 营养功能： 卵清蛋白、酪蛋白等
7. 结构蛋白： 胶原蛋白、角蛋白
8. 能量转换蛋白： 细胞色素
9. 信息传递功能： 受体蛋白
8. 基因调节蛋白： 阻遏蛋白

第一节 蛋白质的生物学功能与分类



3. 氧化供能

除了这些重要的结构成分和生理活性物质以外，蛋白质也可以氧化为生物体提供能量。

蛋白质基本组成单位是氨基酸,但是在肝内,氨基酸可以同过脱氨基作用或转氨基作用转变成有氧呼吸中的中间产物,从而参与能量的代谢。

如丙酮酸是有氧呼吸能量代谢的主要底物。丙酮酸加上一个氨基就变成了丙酮氨酸，但是脱去了氨基，就变成了能量代谢的底物,这样相互转化，蛋白质就可以参加能量代谢了。

第一节 蛋白质的生物学功能与分类



二、蛋白质的分类

蛋白质的分类方法有多种：按照分子的**对称性**、**溶解性**、**功能**和化学组成的不同等等。

(一) 依据形状结构分类

1. 纤维状蛋白：形如丝状，长而富有弹性，一般是不溶于水，如 α -角蛋白和胶原蛋白等。

2. 球状蛋白：形近球状，易溶于水，具有广泛的生物学功能，如免疫蛋白、酶等。

(二) 依据化学组成分类

1. 单纯蛋白质(simple protien) , **仅由肽链**组成。如清蛋白、球蛋白等。

2. 结合蛋白质(protein binding) 由肽链与非蛋白物两部分构成，非蛋白部分称为辅基(prosthetic group)或配体(ligand)。

(三) 依据功能分类

分为运输蛋白、免疫蛋白结构蛋白、催化蛋白、乳酶等等。

第二节 蛋白质的化学组成



一、蛋白质的元素组成

蛋白质的物质元素组成基本相似，除含有碳、氢、氧外，还有氮和少量的硫。某些蛋白质还含有其他一些金属与非金属元素，主要是磷、铁、碘、锌和铜等。这些元素在蛋白质中的组成百分比约为：

碳 50~55%

氢 6~7%

氧 19~24%

氮 13~19 %（平均值为16%）

硫 0-4%（半胱氨酸、蛋氨酸）

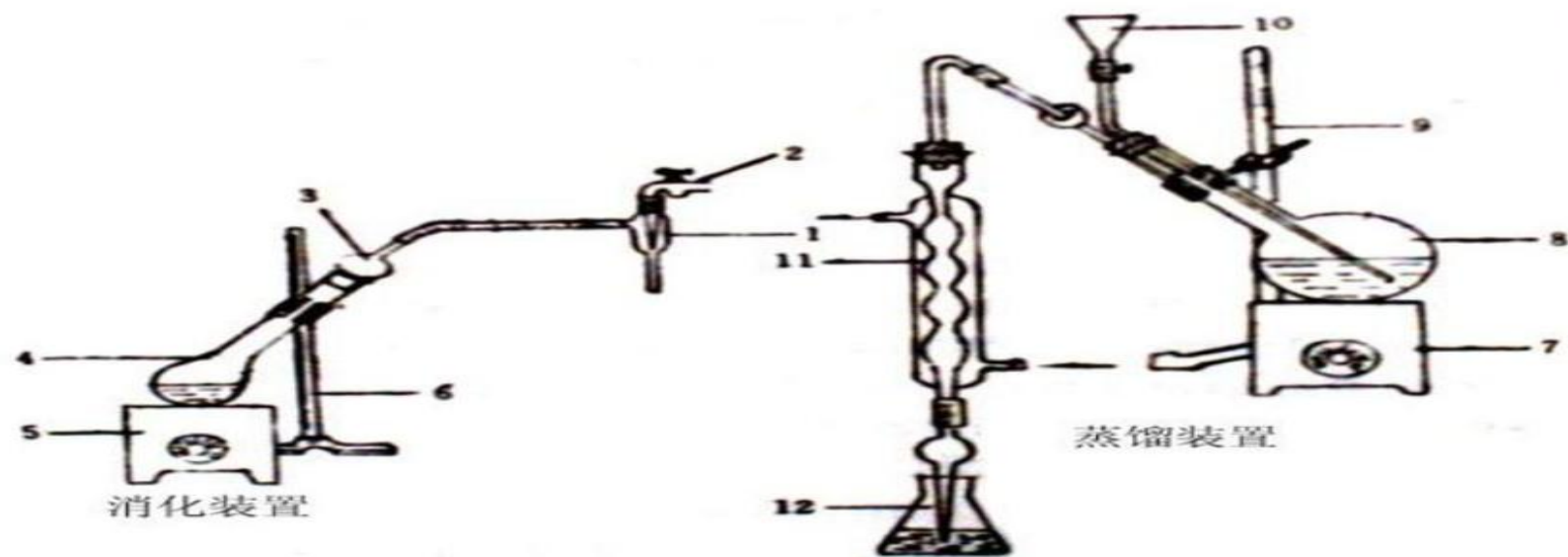
P 0-1%（羟基上磷酸化，磷蛋白）

各种蛋白质的氮含量比较恒定。平均值为16%。通过测定样品中的含氮量，可以计算出样品中蛋白质的总含量。凯氏定氮法（Kjeldahl method）就是依据这一原理来测定蛋白质含量的。



凯氏定氮法:

含氮量*6.25=蛋白含量，凯氏定氮法测定的蛋白含量是高于真蛋白的含量



常量凯氏定氮消化、蒸馏装置

- | | | | |
|----------|----------|-----------|----------|
| 1— 水力抽气管 | 2— 水龙头 | 3 倒置的干燥管 | 4— 凯氏烧瓶 |
| 5、7—— 电炉 | 8— 蒸馏烧瓶 | 6、9—— 铁支架 | 10— 进样漏斗 |
| 11— 冷凝管 | 12—— 接收瓶 | | |

第二节 蛋白质的化学组成

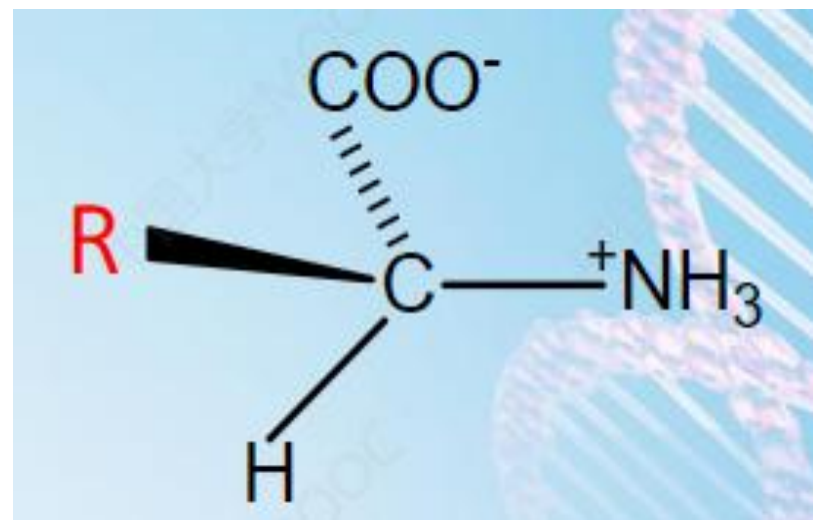
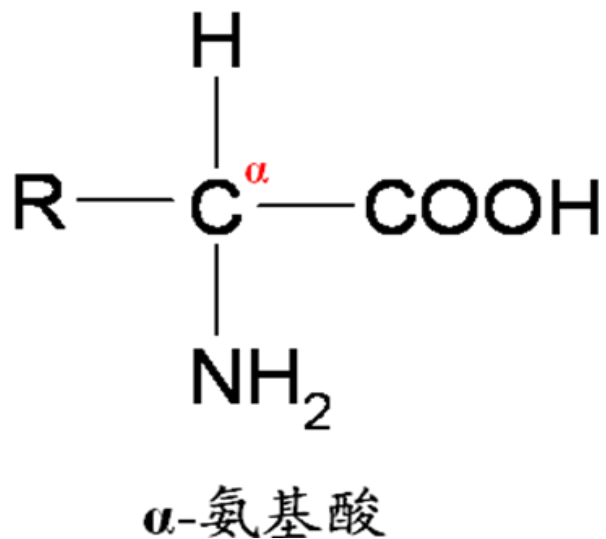


一、氨基酸

(一) 编码氨基酸

1. 基本结构

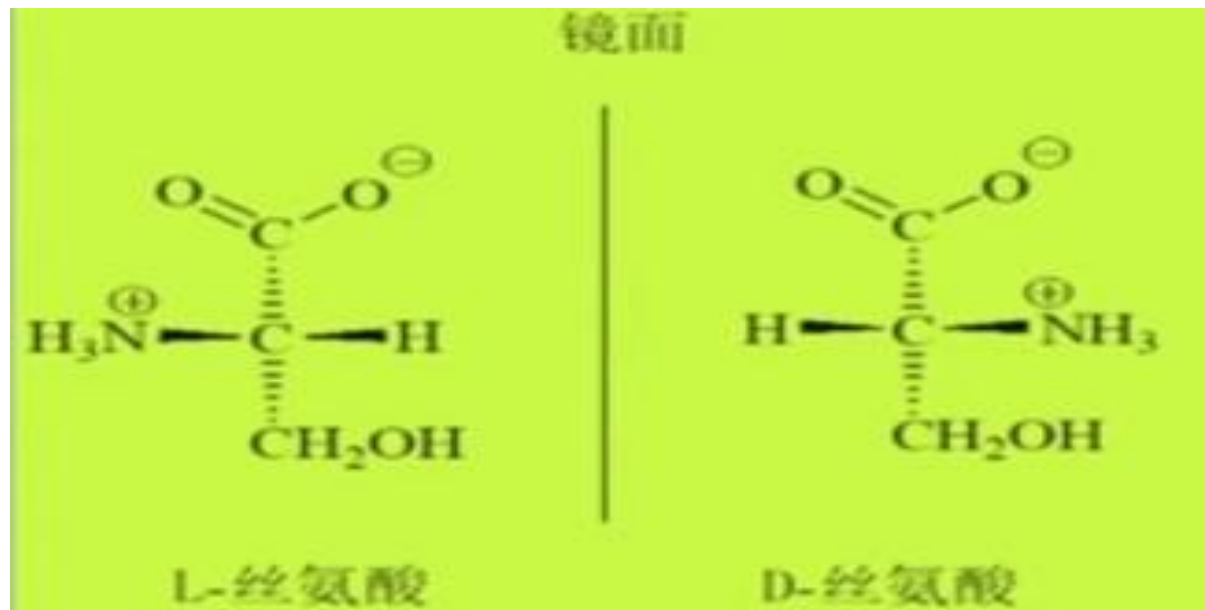
除脯氨酸以外，化学结构通式：



第二节 蛋白质的化学组成



除甘氨酸以外，均为L型。



第二节 蛋白质的化学组成



2.分类

20种天然氨基酸有多种分类方法，而他们结构上的差别取决于侧链R基团的不同。通常根据R基团的化学结构或性质将20种氨基酸进行分类。如：极性、非极性、芳香、含硫等。

第二节 蛋白质的化学组成



1) 根据侧链的极性和电荷分

非极性氨基酸(R基团为非极性的疏水基团)

丙(Ala, A)、缬(Val, V)、亮(Leu, L)、异亮(Ile, I)、蛋(Met, M)、苯丙(Phe, F)、色(Trp, W)、脯(Pro, P)。

极性氨基酸(亲水)：

a.不带电荷(R侧链基团在中性溶液中不发生解离)

甘(Gly, G)、丝(Ser, S)、苏(Thr, T)、半胱(Cys, C)、酪(Tyr, Y)、天冬酰胺(Asn, N)、谷氨酰胺(Gln, Q)

b.带正电荷(碱性) 3种

赖(Lys, K)、精(Arg, R)、组(His, H)

c.带负电荷(酸性) 2种

天冬(Asp, D)、谷(Glu, E)

第二节 蛋白质的化学组成



2) 根据侧链基团的化学结构

a. 脂肪族氨基酸:

丙(Ala, A)、缬(Val, V)、亮(Leu, L)、异亮(Ile, I)、蛋(Met, M)、天冬(Asp, D)、谷(Glu, E)、赖(Lys, K)、精(Arg, R)、甘(Gly, G)、丝(Ser, S)、苏(Thr, T)、半胱(Cys, C)、天冬酰胺(Asn, N)、谷氨酰胺(Gln, Q)

b. 芳香族氨基酸:

苯丙(Phe, F)、酪(Tyr, Y)

c. 杂环族氨基酸:

组(His, H)、色(Trp, W)

d. 杂环亚氨基酸:

脯(Pro, P)

第二节 蛋白质的化学组成



7
种

非
极
性
疏
水
性
氨
基
酸

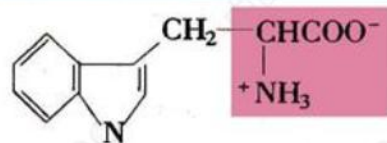
分子结构	中文名称	英文名称	三字母缩写	单字母	等电点
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CHCOO}^- \\ \\ \text{+NH}_3 \end{array}$	甘氨酸	<u>glycine</u>	<u>Gly</u>	G	5.97
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CHCOO}^- \\ \\ \text{+NH}_3 \end{array}$	丙氨酸	<u>alanine</u>	Ala	A	6.00
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CHCOO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{+NH}_3 \end{array}$	缬氨酸	<u>valine</u>	Val	V	5.96
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CHCOO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{+NH}_3 \end{array}$	亮氨酸	<u>leucine</u>	<u>Leu</u>	L	5.98
$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CHCOO}^- \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{+NH}_3 \end{array}$	异亮氨酸	<u>isoleucine</u>	Ile	I	6.02
$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CHCOO}^- \\ \\ \text{+NH}_3 \end{array}$	苯丙氨酸	phenylalanine	<u>Phe</u>	F	5.48
$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2 \quad \text{CHCOO}^- \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \quad \text{NH}_2^+ \end{array}$	脯氨酸	<u>proline</u>	Pro	P	6.30

第二节 蛋白质的化学组成



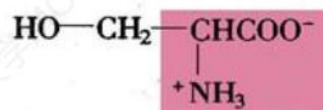
极
性
中
性
氨
基
酸

8
种



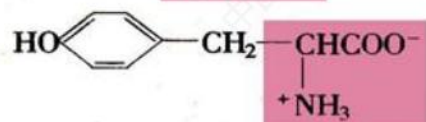
色氨酸

tryptophan Try W 5.89



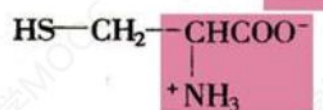
丝氨酸

serine Ser S 5.68



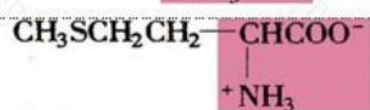
酪氨酸

tyrosine Try Y 5.66



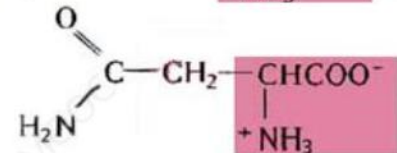
半胱氨酸

cysteine Cys C 5.07



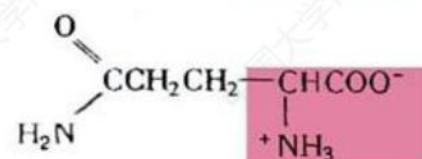
蛋氨酸

methionine Met M 5.74



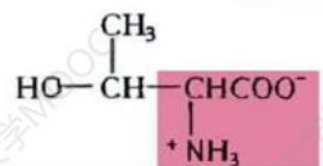
天冬酰胺

asparagine Asn N 5.41



谷氨酰胺

glutamine Gln Q 5.65



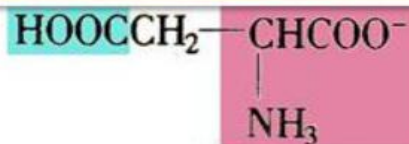
苏氨酸

threonine Thr T 5.60

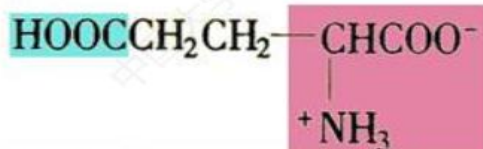
第二节 蛋白质的化学组成



2 种 酸性氨基酸

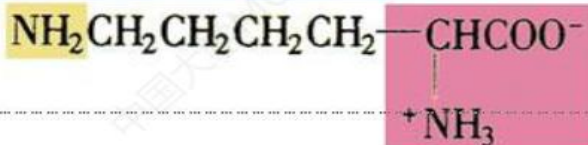


天冬氨酸 aspartic acid Asp D 2.97

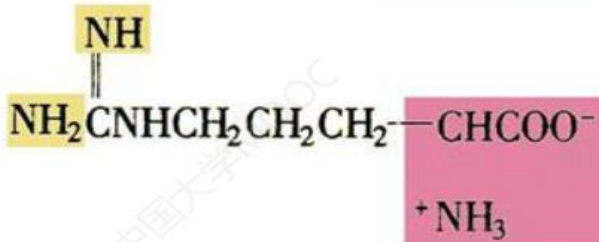


谷氨酸 glutamic acid Glu E 3.22

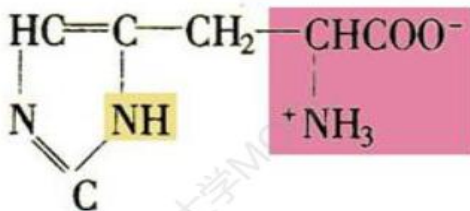
3 种 碱性氨基酸



赖氨酸 lysine Lys K 9.74



精氨酸 arginine Arg R 10.76



组氨酸 histidine His H 7.59

第二节 蛋白质的化学组成



(二) 非编码氨基酸

1. 稀有蛋白质氨基酸

稀有氨基酸是指，存在于一些蛋白质中，没有核苷酸编码(遗传密码)的L-型氨基酸。

如胶原蛋白中的**4-羟脯氨酸**和**5-羟赖氨酸**；肌球蛋白中的**6-N-甲基赖氨酸**； α -角蛋白中的**胱氨酸**；凝血酶原蛋白中的 **γ -羧基谷氨酸**；甲状腺素中的3,5-**二碘酪氨酸**等。

稀有氨基酸都是天然氨基酸经过化学修饰后形成的。

2. 非蛋白质氨基酸

它们并没有核苷酸编码，也不是构建蛋白质的成分的一类氨基酸。

如L-瓜氨酸、L-鸟氨酸及大量的编码氨基酸的衍生物，还有一些是D-型氨基酸、 β -丙氨酸等。

第二节 蛋白质的化学组成



(三) 氨基酸的主要理化性质

1. 一般理化特性

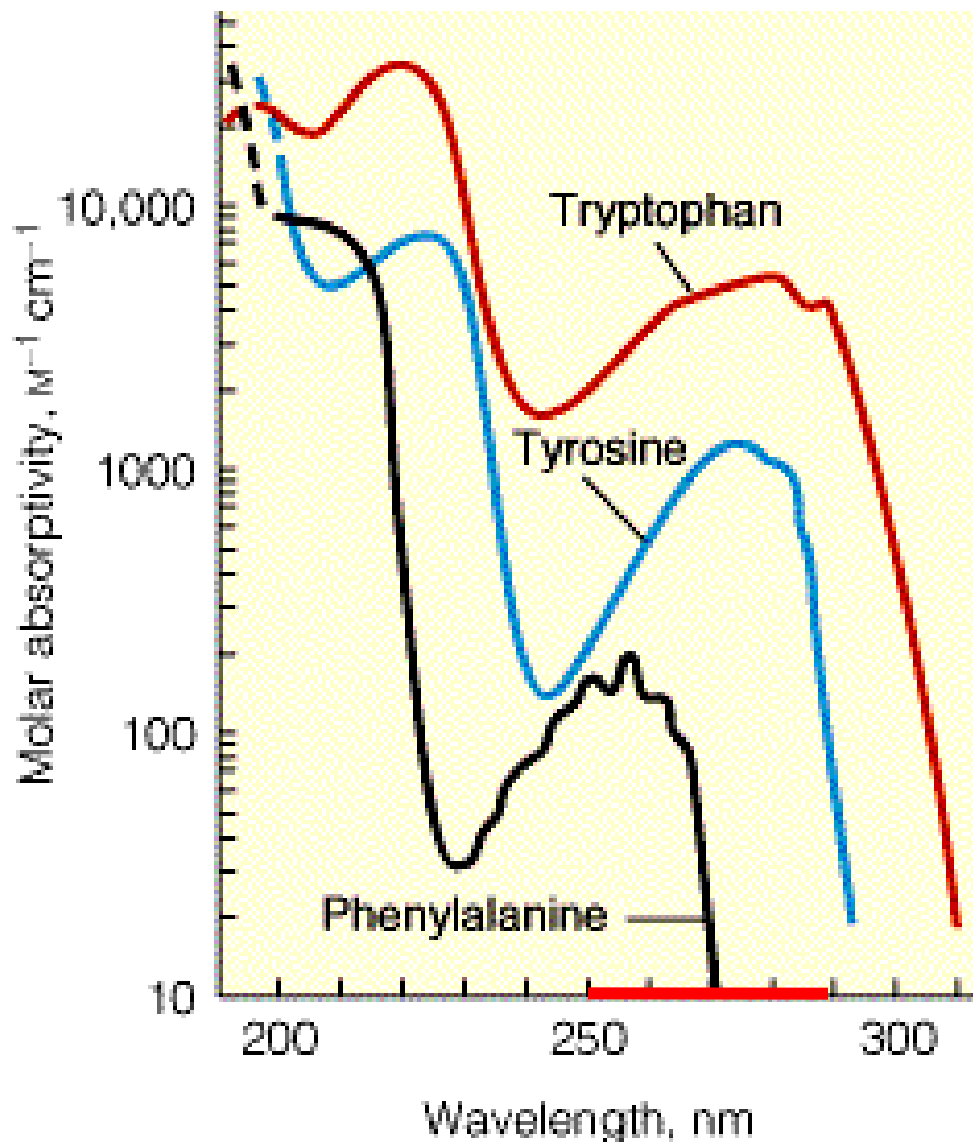
常见 α -氨基酸均为无色无味的结晶，水中溶解度各不同，取决于侧链。能溶于稀酸或稀碱，一般不溶解于有机溶剂(Pro溶于乙醇或乙醚)。所以常用乙醇从溶液中沉淀氨基酸。

第二节 蛋白质的化学组成



2. 紫外吸收特性。

20种常见的氨基酸在可见光均无光吸收，氨基酸中还有三种芳香族的氨基酸，苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。因为我们知道苯环结构的 π - π 共轭双键，在紫外光区有一个最大的光吸收，所以含有苯环结构的芳香族氨基酸，那么他们在紫外光区280纳米处有一个最大的吸收峰，我们可以根据280纳米处的吸收的强度来测定氨基酸的浓度。

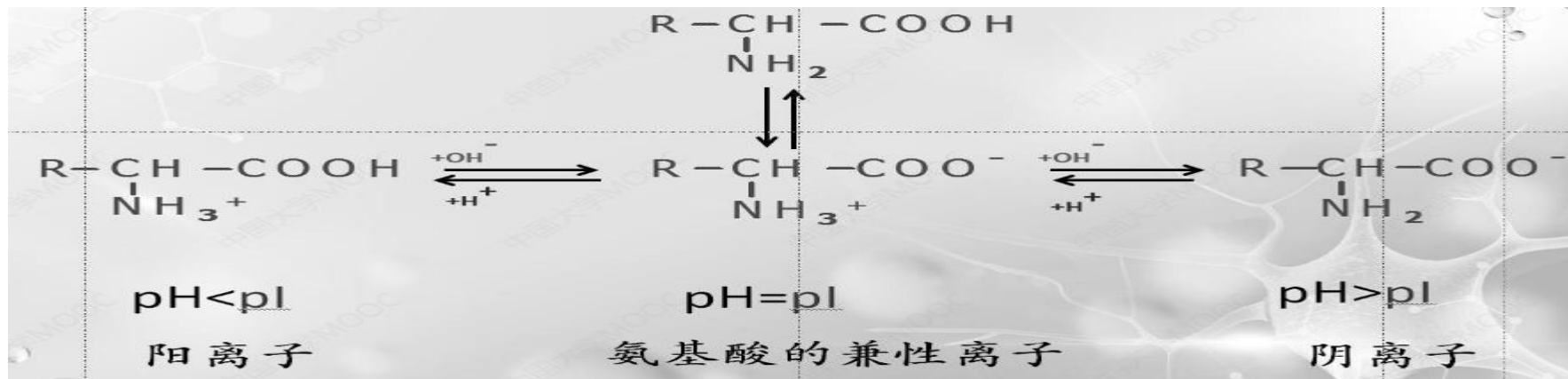


第二节 蛋白质的化学组成



3. 两性解离及等电点

氨基酸同时具备酸碱特征的化学分子。



化学里面我们学过所有的两性电解质都有一个性质，即等电点，也就是说在某一pH溶液中，这个两性电解质解离成阳离子和阴离子的趋势和程度是相等的，它成为兼性离子，所带电荷为0，成电中性，这时候的溶液pH值就称为该两性物质的等电点（PI）。

等电点处的氨基酸溶解度最小。利用两性解离的特性，可分离纯化氨基酸（电泳、沉淀）。

第二节 蛋白质的化学组成



4. 氨基酸的一些重要化学反应

(1) 茚三酮显色反应

在加热或弱酸性条件下，由氨基酸的 α -NH₂所引起，反应产生蓝紫色，但脯氨酸和羟脯氨酸反应产生黄色。

此反应灵敏，并蓝紫色的深浅与氨基酸含量成比例，在570nm波长下进行比色就可测定样品中氨基酸的含量。常用于定性、定量测定氨基酸。

(2) Sanger反应

弱碱性条件下， α -氨基很容易与2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitro-1-fluorobenzene, **FDNB**)反应，生成黄色的**2,4-二硝基苯氨基酸**(dinitrophenyl amino acid, 简称**DNP-氨基酸**)。用于鉴定多肽或蛋白质的N-末端氨基酸。

第二节 蛋白质的化学组成



(3) Edman反应

弱碱性条件下， α -氨基可与**苯异硫氰酸酯**(phenylisothiocyanate, **PITC**)反应生成相应的**苯氨基硫甲酰氨基酸**(phenylthiocarbamoyl, 简称**PTC-氨基酸**)。

在酸性条件下，PTC-氨基酸环化形成**苯乙内酰硫脲**(phenylthiohydantoin, **PTH**)的衍生物-----**PTH-氨基酸**。

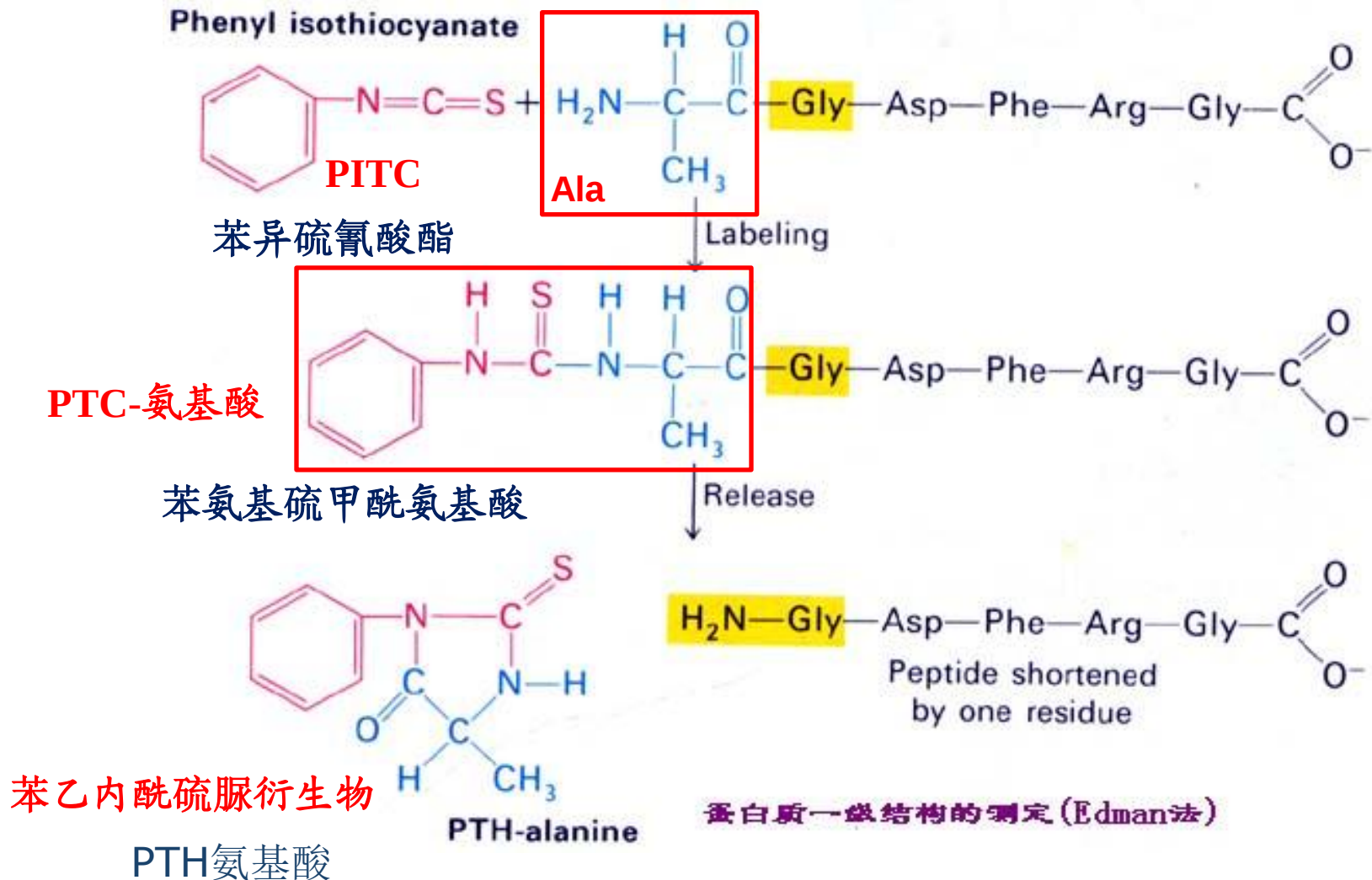
多肽链N-末端的 α -氨基也有Edman反应，生成PTC-肽，并在酸解时放出末端的PTH-氨基酸。使的肽链的N-末端少一个氨基酸残基。鉴定释放出的PTH-氨基酸就可以确定肽链N-末端氨基酸的种类。

该法的优点是可连续分析出N端的十几个氨基酸。根据该反应原理可制成氨基酸顺序自动分析仪。

第二节 蛋白质的化学组成



(3) Edman反应



第三节 肽



一、基本概念

(1) 肽(peptide)

α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基缩合形成的化合物。

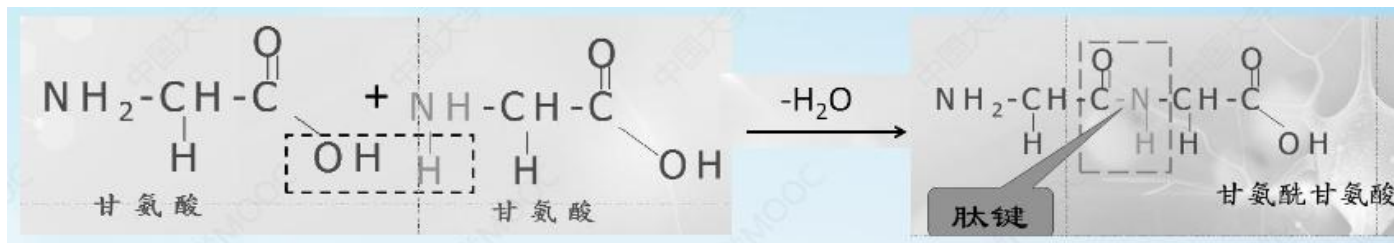
两个氨基酸结合在一起形成二肽，三个氨基酸结合形成三肽。通常把含几个至十几个氨基酸残基的肽链统称为寡肽(Oligopeptide)，更长的肽链称为多肽(polypeptide)。

一般来说，**把含50个以上氨基酸残基的多肽称为蛋白质**。但是寡肽和多肽、多肽和蛋白质之间很难划定一个严格的界限。

(2) 肽键(peptide bond)

肽链中两个氨基酸残基之间的C-N(酰胺)键称为肽键。

肽键中的C-N键具有部分双键的性质，**不能自由旋转**；而且肽键中羰基的氧和亚氨基的氢呈**反式**排布。



第三节 肽



(3) 氨基酸残基(amino residue)

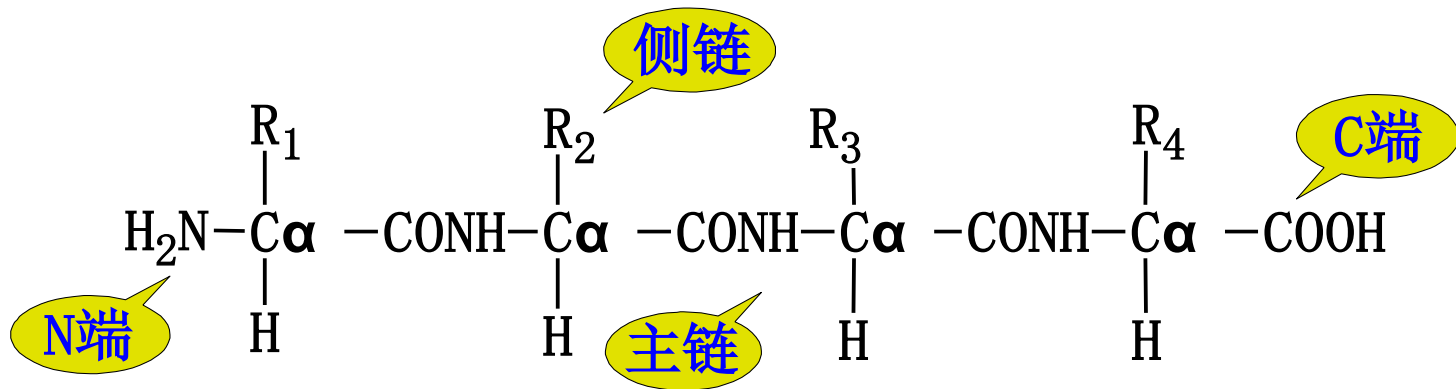
肽链中的不完整氨基酸被称为**氨基酸残基**。

(4) 主链和侧链

多肽链中的肽键通过 **α -碳原子**连接而成的线性结构，称为多肽链的主链；而多肽链中的所有氨基酸残基的R基则称为多肽链的侧链。

(5) 氨基端(amino terminal)和羧基端(carboxyl terminal)

肽链中，含游离 **α -氨基端**称氨基端(**N-端**)，含游离 **α -羧基端**称为羧基端(**C-端**)。 方向：N-末端 $\rightarrow$ C末端



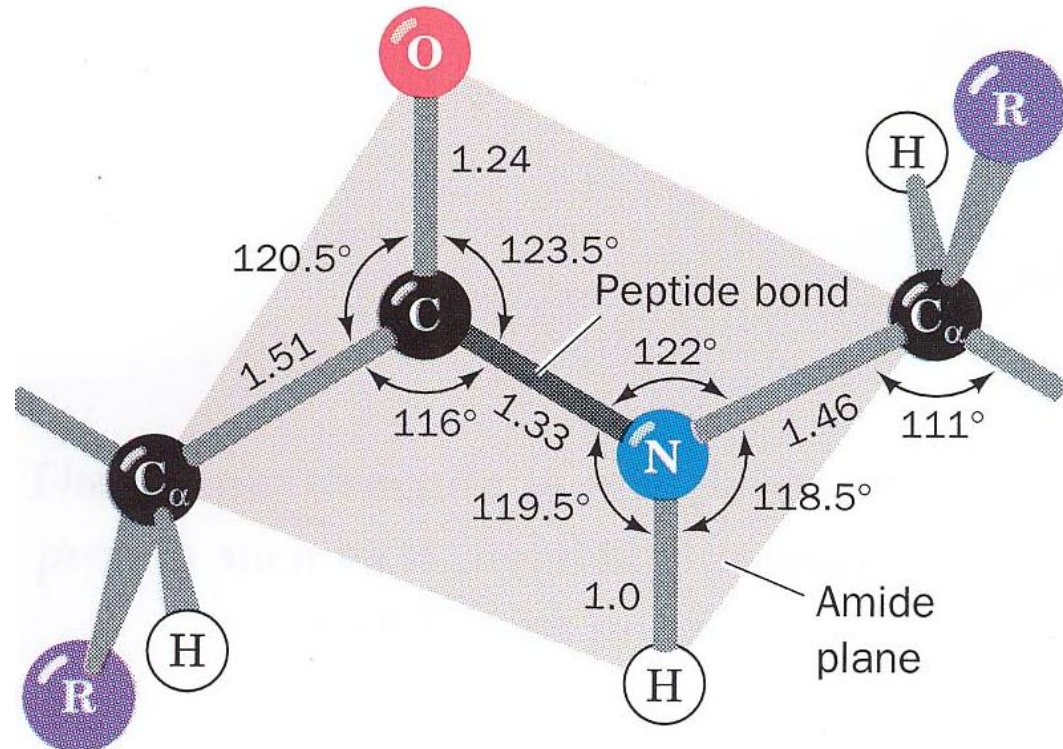
第三节 肽



(6) 肽平面(peptide plane)

肽键的特点是氮原子上的孤对电子与羰基具有明显的共轭双键作用。因此其前后六个原子都躺在同一平面上，称为肽平面（酰胺平面）。

因肽平面是多肽链主链的重复单位，故肽平面又被称为肽单位(peptide unit)。

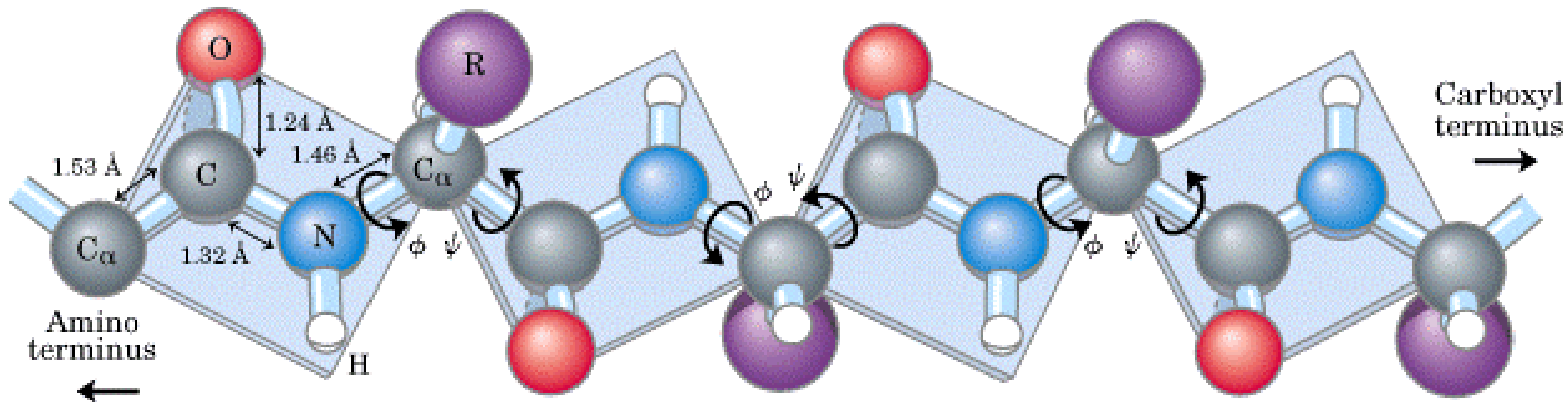


第三节 肽



(7)二面角(dihedral angle)

与 C_α 相连接的 C_α -N和 C_α -C键均为可旋转的共价键，旋转角度分别称 Φ 角和 ψ 角； ψ 与 Φ 形成一个夹角，称为**二面角**。



第三节 肽



二、生物活性肽

(1) 谷胱甘肽 (glutathione, GSH)



第三节 肽



(2) 多肽类激素及神经肽

- 体内许多激素属寡肽或多肽



促甲状腺素释放激素(TRH)

- 神经肽(neuropeptide): 存在于神经组织并参与神经系统功能作用的内源性活性物质。

第四节 蛋白质的分子结构



一、概述

(一)蛋白质分子

主要由氨基酸分子以**肽键**相连组成的有机物

功能蛋白与其空间结构密切相关。蛋白质的空间结构也称**构象**(conformation)，或三维结构、空间结构、立体结构。

(二)构象与构型(configuration and configuration)。

构象：由于分子中的某个原子(基团)绕 C-C 单键自由旋转而形成不同的暂时、易变的空间结构形式。

构型：分子中由于各原子或基团间特有的固定的空间排列方式不同而使它呈现出不同的较稳定的立体结构，如D-葡萄糖和L-葡萄糖是链状葡萄糖的两种构型， α -D-葡萄糖和 β -D-葡萄糖是环状葡萄糖的两种构型。

一般情况下，一种构型转变另一种构型则要求共价键的断裂、原子(基团)间的重排和新共价键的重新形成。

第四节 蛋白质的分子结构



蛋白质的分子结构包括

一级结构(primary structure)

二级结构(secondary structure)

三级结构(tertiary structure)

四级结构(quaternary structure)

} 高级结构

第四节 蛋白质的分子结构



二、蛋白质的一级结构

(一)概念

1969年国际纯化学与应用化学联合会(IuPAC)规定：蛋白质的化学结构(又称共价结构)包括氨基酸组成、末端氨基酸组成、氨基酸序列、多肽链数目以及二硫键的位置等。

蛋白质的一级结构实际上就是多肽链中的**氨基酸排列顺序**

维持蛋白质一级结构的化学键是**肽键**，有些也包含**二硫键**。

两个不同蛋白质的一级结构如果具有显著相似性，则称它们彼此**同源**(homology)。由于同源蛋白的编码DNA序列也有显著的相似性，因此一般认为它们在进化上是相关的，是从一个共同的始祖基因(ancestral gene)进化而来。

写方式一般从蛋白质左(N端)写到右(C端)。

第四节 蛋白质的分子结构



(二)蛋白质一级结构的测定

一级结构是蛋白质结构层次体系的基础，决定更高层次结构的主要因素。**一级结构决定高级结构。**

测定蛋白质一级结构也成为研究蛋白质结构与功能的关系的重要手段。蛋白质测序的一般程序可以概括如下：

①测定蛋白质(要求纯度必须达到97%以上)的相对分子质量和它的氨基酸组成，推测所含氨基酸的大致数目。

②测定肽链N-端和C-端的氨基酸，确定蛋白质分子中肽链的数目；测定二硫键的数目、二硫键属性(链间或链内)，并对条多肽链的蛋白进行变性处理和拆链水解。

③分离纯化蛋白质多肽链，以获得高纯度单链样品，用裂解点不同的两种裂解方法分别将长的多肽链裂解成两套较短的肽段。

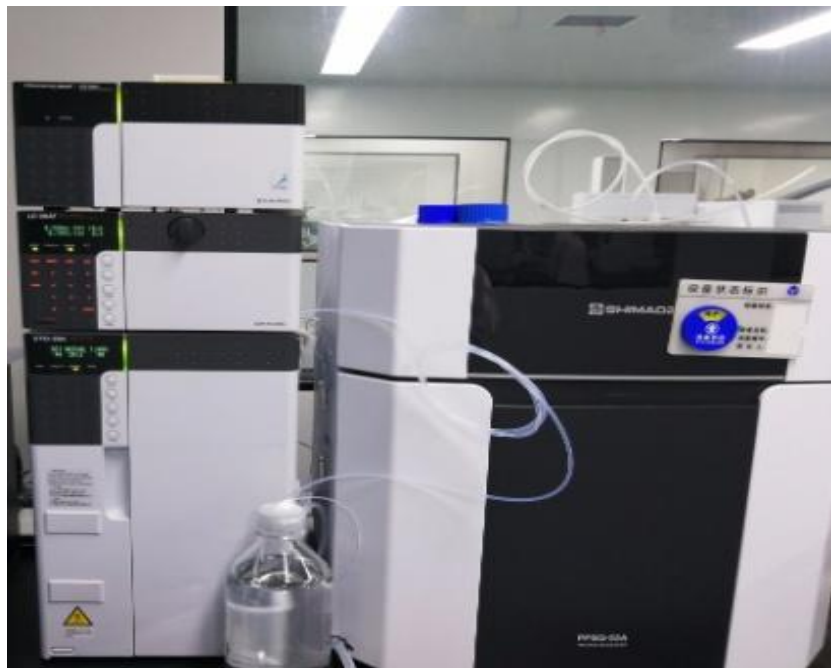
第四节 蛋白质的分子结构

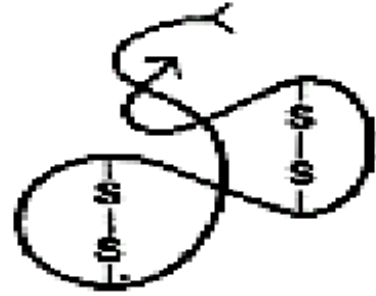


④分离提纯所产生的肽段，用蛋白质序列仪分别测定它们的氨基酸序列。

⑤应用肽段序列重叠法确定各种肽段在多肽链中的排列次序，即确定多肽链中氨基酸排列顺序。

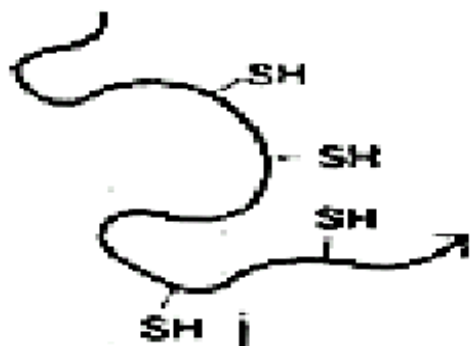
⑥如果有二硫键，需要确定其在多肽链中的位置。





纯蛋白质

二硫键拆开



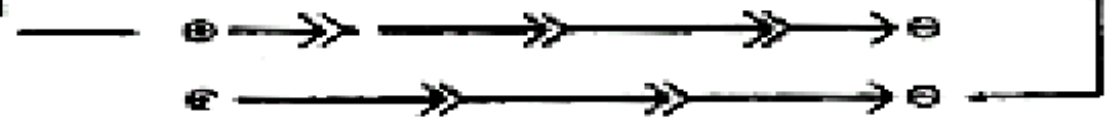
末端氨基酸测定



专一性裂解



将肽段分离并测出顺序

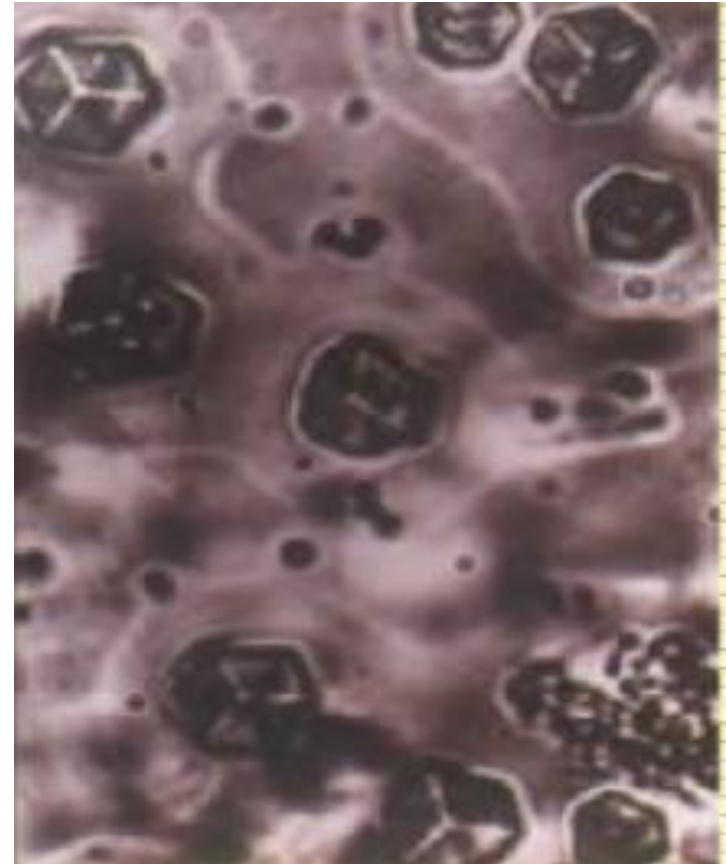


将肽段顺序进行叠联以确定完整的顺序

第四节 蛋白质的分子结构



1965年由我国科学
家人工合成的世界
上第一个有生物活
性的结晶牛胰岛素
其分子量相对较小
是由51个氨基酸组
成。



人工合成的牛胰岛素结晶，
见课本46页图3-5

第四节 蛋白质的分子结构



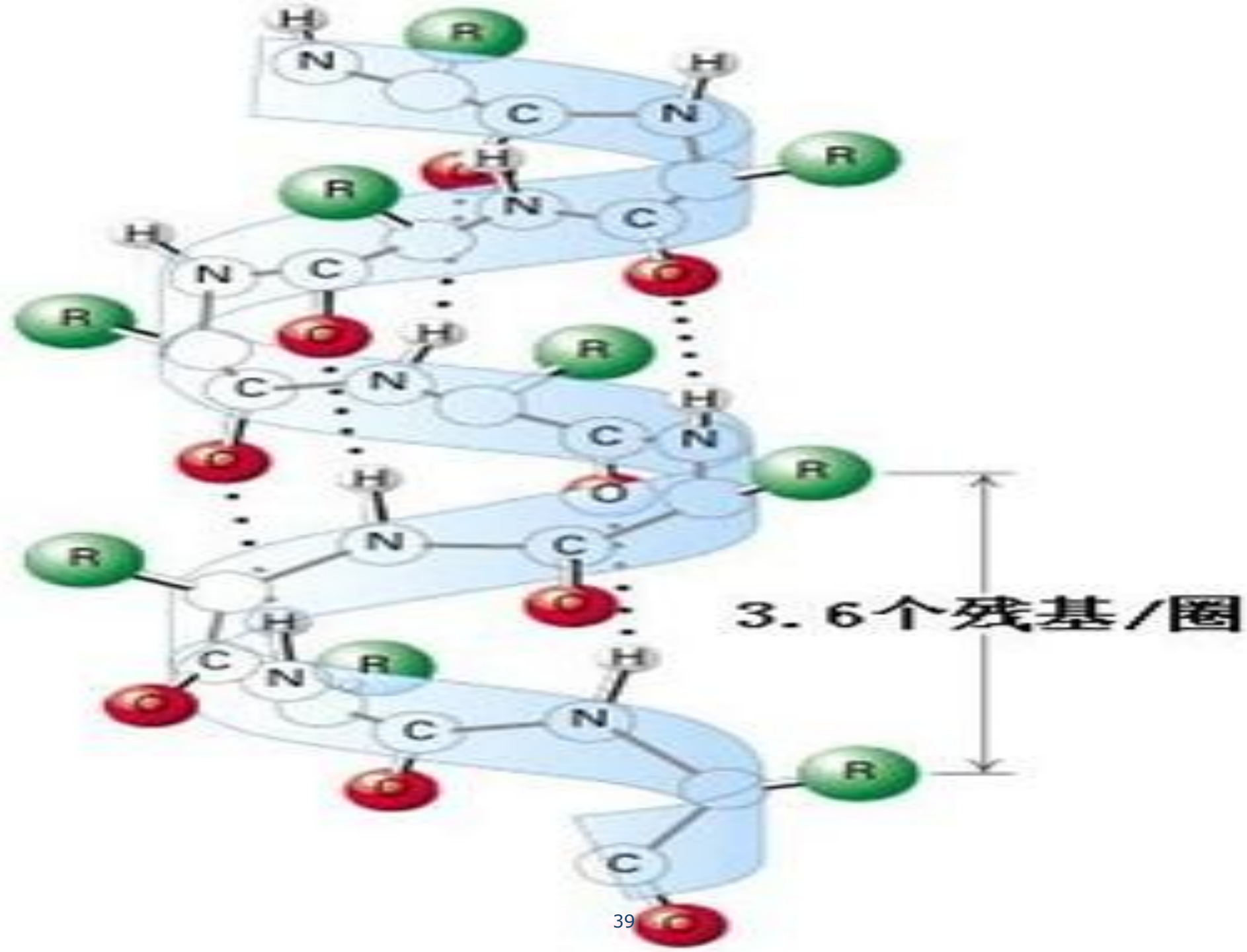
三、蛋白质的二级结构

(一)概念

蛋白质二级结构是指**多肽链主链**借助**氢键**形成的一些有规则的构象。即：在一段连续的肽单位中具有同一相对取向，可以用相同的二面角(Φ, Ψ)来表征，构成一种特征的多肽链线性组合。

(二)基本类型

维持二级结构的主要化学键是**氢键**，组成蛋白质二级结构的主要结构单元，或者称之为结构形式，有4种： **α -螺旋**、 **β -折叠**、 **β -转角**和**无规卷曲**。



第四节 蛋白质的分子结构



2、 β -折叠(β -sheet) (常见于丝心蛋白和角蛋白)

指由两条或多条几乎完全伸展的肽链(可以是1条肽链的不同肽段或2条与多条肽链),借助于链间形成的**氢键**,侧向聚集在一起而形成的折叠的层状结构,其特征如下:

① β -折叠的一条肽链或肽段中构成肽键的**羰基氧原子**与另一条肽链或肽段中构成肽键的**-NH的氢原子**生成**氢键**, β -折叠中的**所有肽键**都参与了链间氢键的形成。

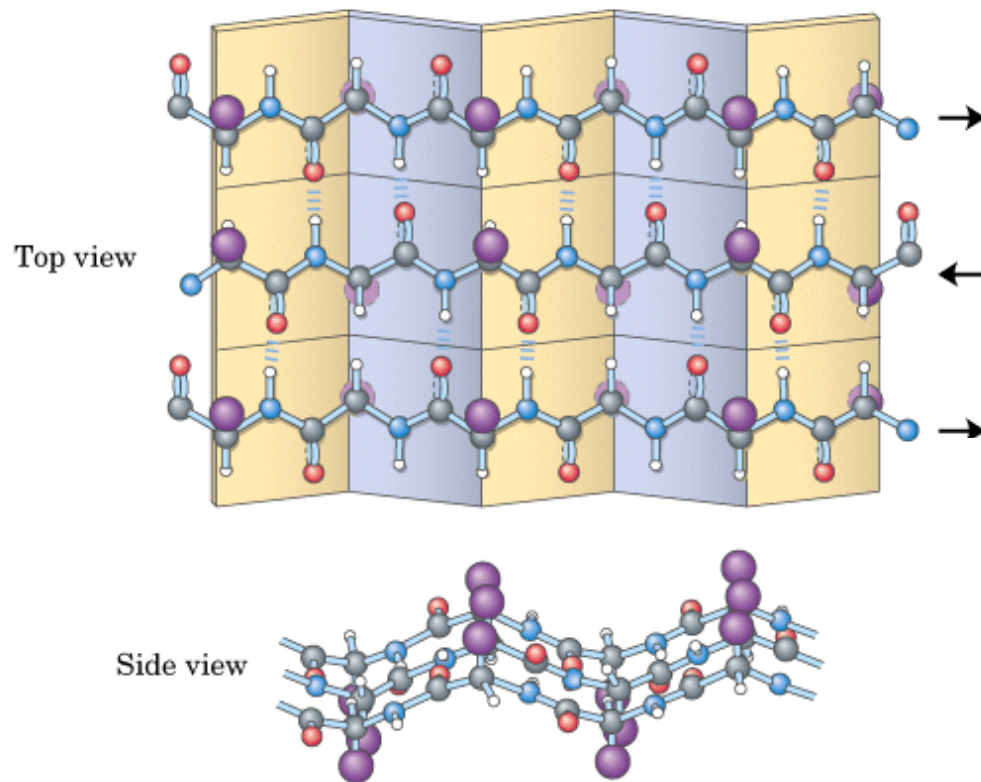
② β -折叠的多肽链主链比较伸展,呈**锯齿状**折叠构象;侧链R基交替地分布在片层平面的上方和下方,以避免相邻侧链R基之间的空间障碍。

③ β -折叠结构有**平行**和**反平行**2种。在反平行式的 β -折叠结构中,相邻肽链的走向相反,链间氢键近于**平行**;在平行的 β -折叠结构中,相邻肽链的走向相同,链间氢键**不平行**。反平行式的 β -折叠结构在蛋白质中存在更为普遍。

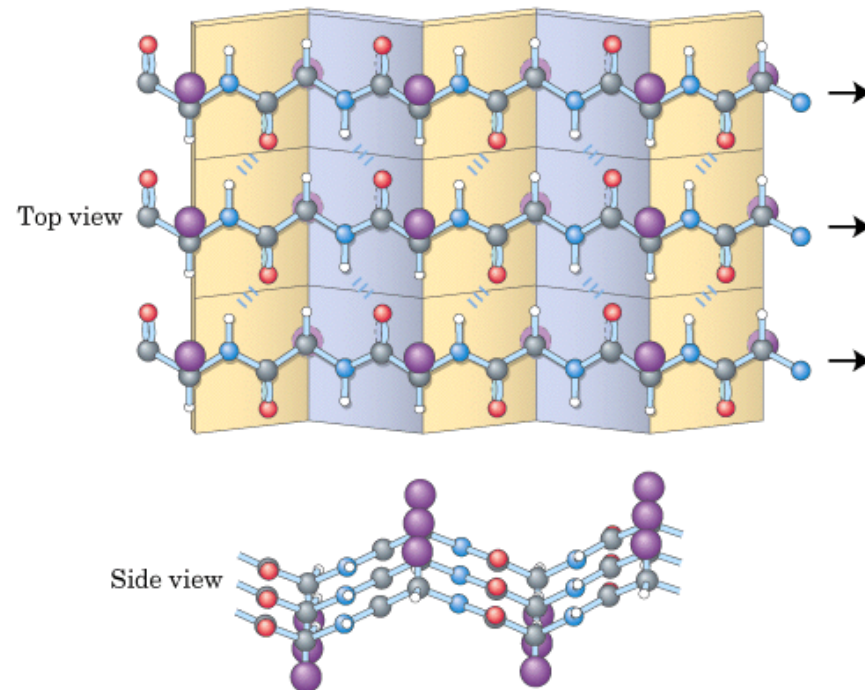
第四节 蛋白质的分子结构



(a) Antiparallel



(b) Parallel



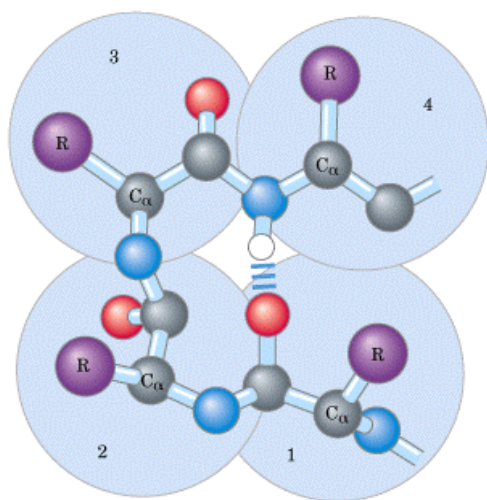
第四节 蛋白质的分子结构



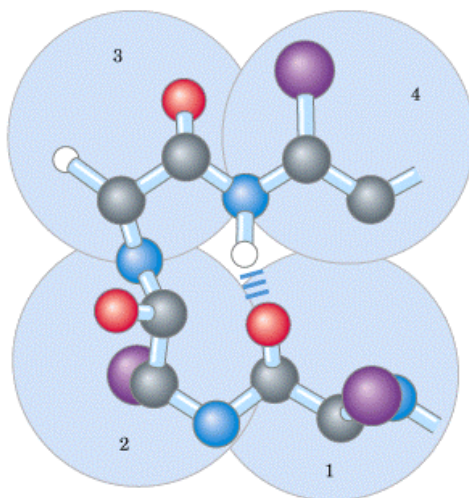
3、 β -转角(β -turn)

多肽链的主链骨架中，经常出现一个氨基酸残基的**羧基氧**和相邻的第四个氨基酸残基的**氨基氢**形成氢键，肽链呈 180° 转弯的一类非重复性稳定结构，称 β -转角。

β -转角通常由4个氨基酸残基组成。 β -转角分为I型和II型两种，差别在于I型第2个氨基酸残基的**羧基氧**与相邻两个氨基酸残基的**R侧链**呈反式排列，II型则为顺式排列。

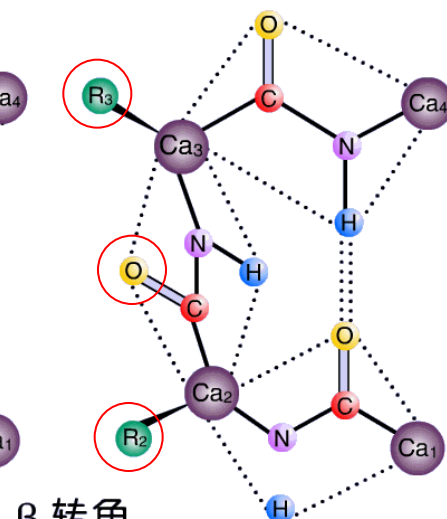
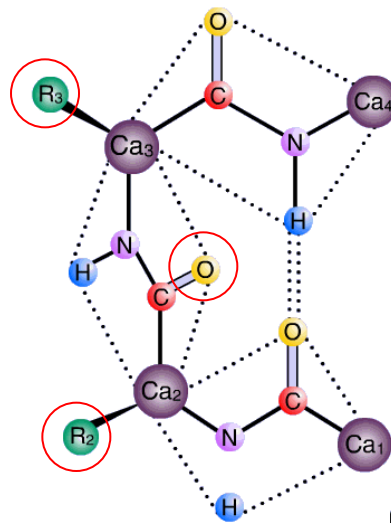


Type I



β Turns

Type II



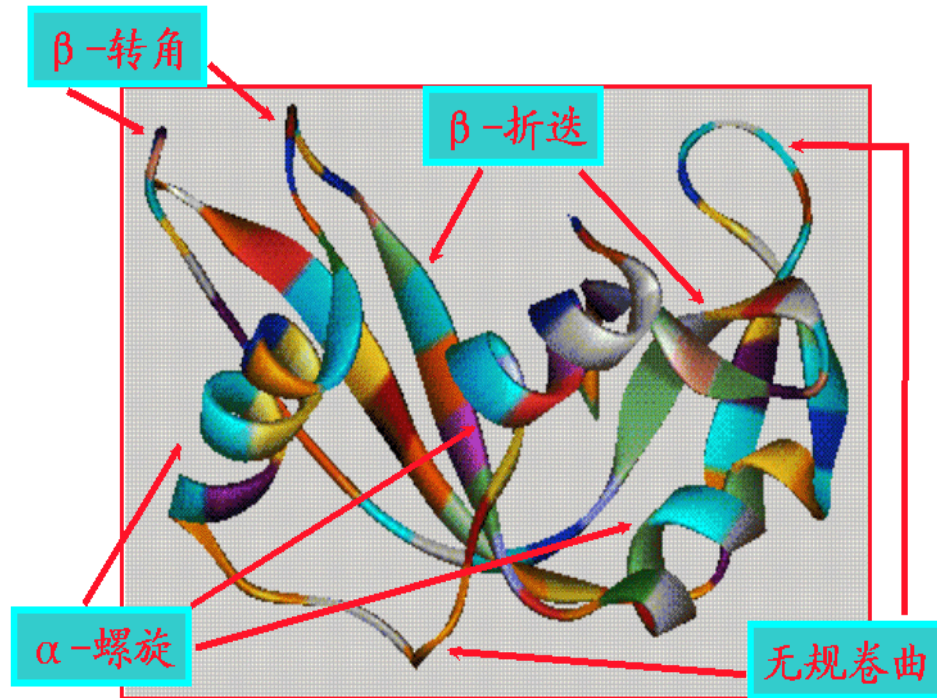
β 转角

第四节 蛋白质的分子结构



4、无规卷曲(random coil)

主链骨架片段中，大多数的二面角(Φ , Ψ)都不相同，其构象不规则。



(三)维持蛋白质二级结构的化学键

维持蛋白质二级结构的化学键是**链内氢键**，由肽键中的羰基氧原子(电负性强、原子半径小)与-NH的氢原子之间生成。

第四节 蛋白质的分子结构

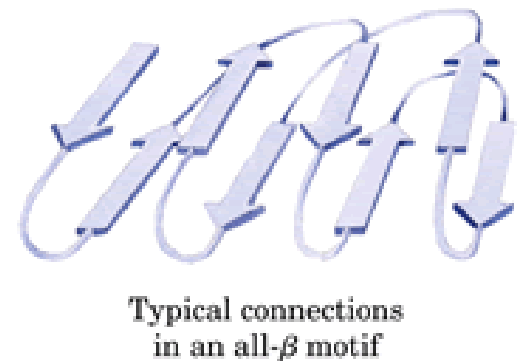
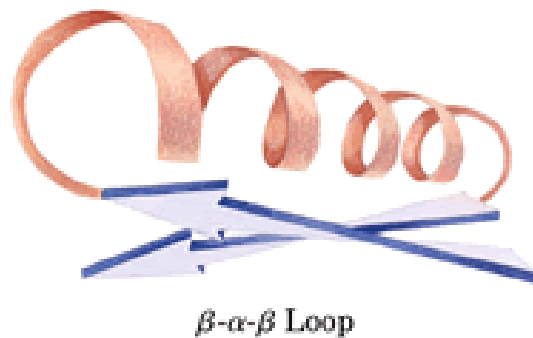


四、蛋白质的超二级结构与结构域

(一) 超二级结构 (motif)

两个及以上二级结构单元按一定方式组合而形成有规则的二级结构集合体，是充当更高层次结构的构件。

超二级结构有多重类型： $\alpha\alpha$ 型、 $\beta\alpha\beta$ 型、 $\beta\beta\beta$ 型



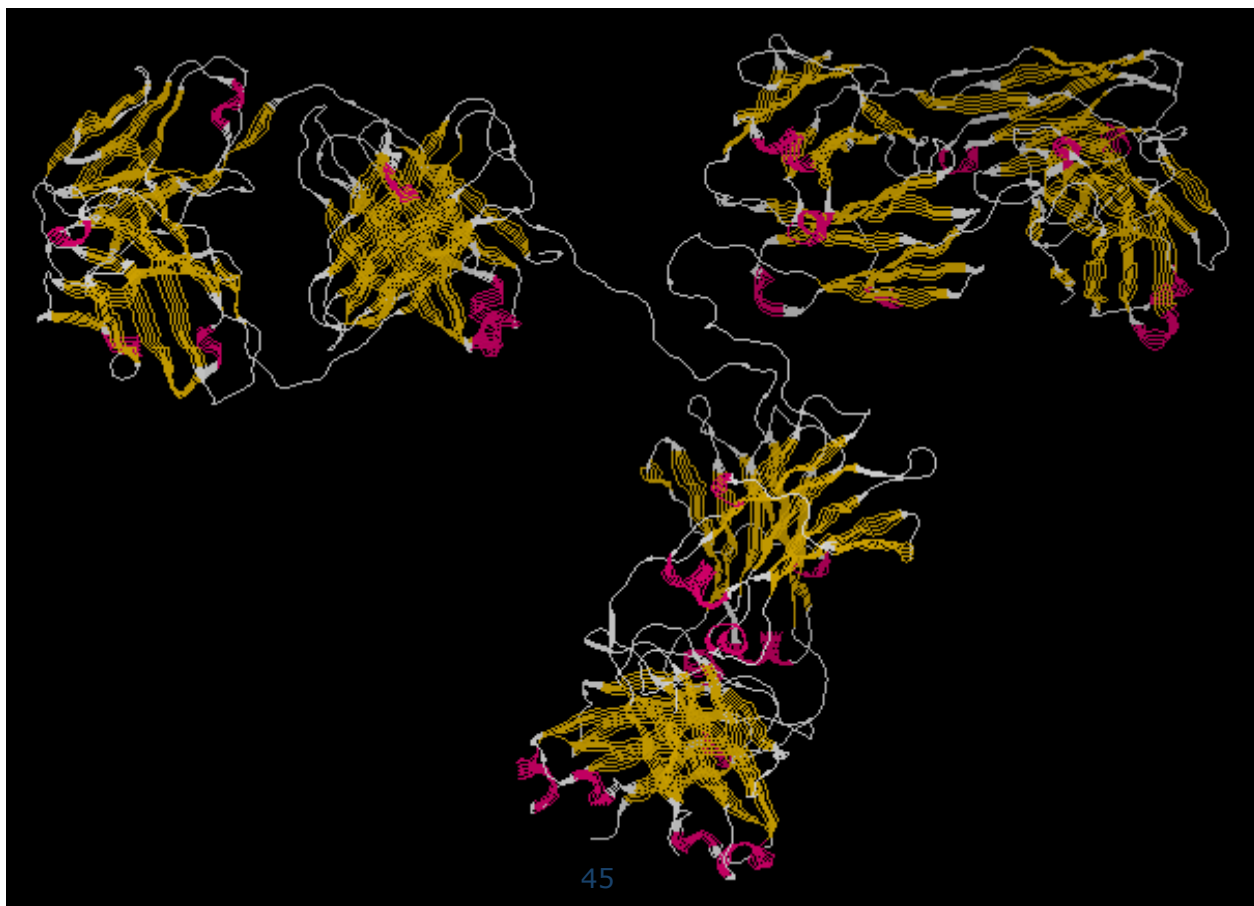
第四节 蛋白质的分子结构



(二)结构域(domain)

对于较大的球状蛋白分子，在二级结构或超二级结构的基础上，进一步卷曲折叠，形成若干个在空间上相对独立，与蛋白质生理功能有密切相关的局部折叠区。

抗体分子包含的结构域



第四节 蛋白质的分子结构

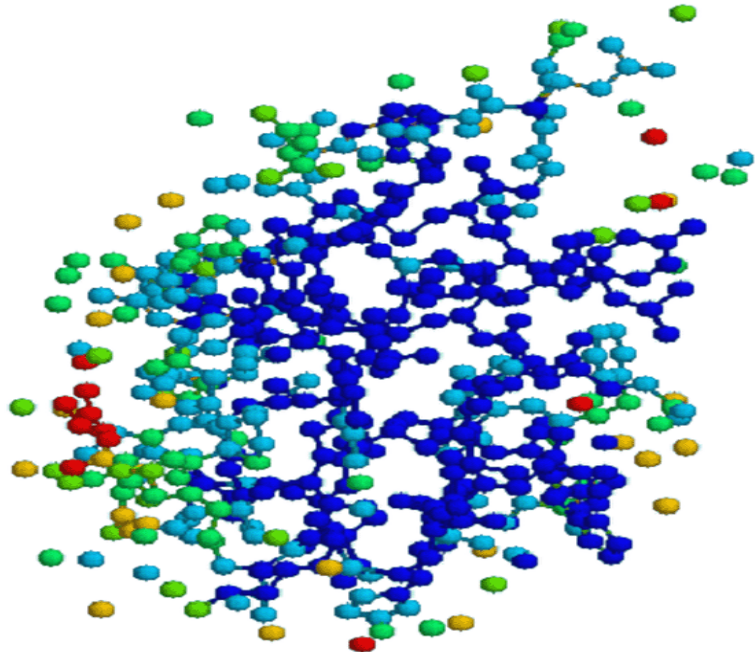


五、蛋白质的三级结构

(一)概念

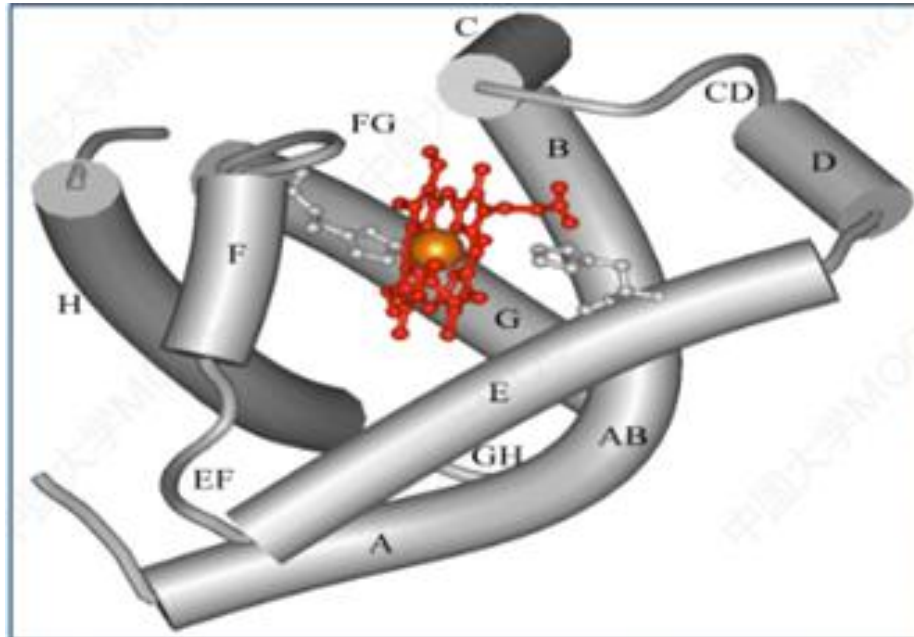
三级结构是指多肽链中**所有的原子**在三维空间中的排布。即在二级结构、超二级结构乃至结构域的基础上，由肽链的不同区段的侧链基团相互作用，在空间进一步盘绕、折叠，形成包括主链和侧链构象在内的、近似**球状**的特征性三维结构。

三级结构研究的内容是蛋白质分子中全部氨基酸残基的相对空间位置



热力学上最稳定的空间结构

第四节 蛋白质的分子结构



肌红蛋白的三级结构及结合的血红素亚基

第四节 蛋白质的分子结构



(二)分子伴侣

定义：分子伴侣(chaperon)指能够帮助新生多肽链正确折叠成天然构象的小分子**蛋白质**。

分子伴侣(chaperon)通过提供一个保护环境从而加速蛋白质折叠成天然构象或形成四级结构。

第四节 蛋白质的分子结构



分子伴侣的基本机制：

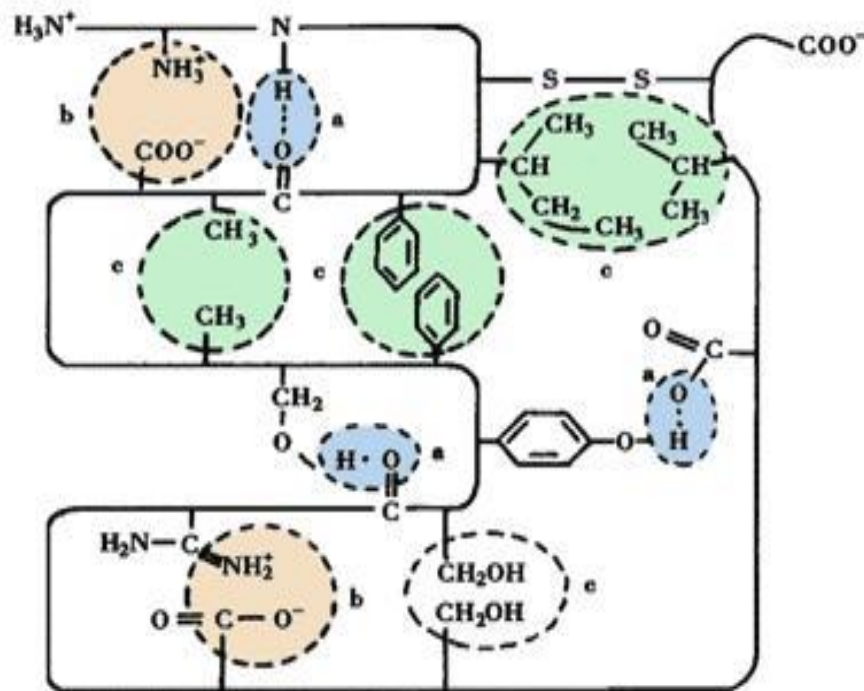
- 分子伴侣可逆地与未折叠肽段的疏水部分结合随后松开，如此重复进行可防止错误的聚集发生，使肽链正确折叠。
- 分子伴侣也可与错误聚集的肽段结合，使之解聚后，再诱导其正确折叠。
- 分子伴侣在蛋白质分子折叠过程中二硫键的正确形成起了重要的作用。

第四节 蛋白质的分子结构



(三) 维系力

多肽链中所有的原子在三维空间中的排布，主要靠**疏水作用力**、**氢键**、**离子键**、**范德华力**等非共价键，尤其是R基团间形成的疏水作用。此外，在某些蛋白质中**二硫键**、**配位键**也参与维持蛋白质的三级结构。



维持蛋白质分子构象的各种化学键

a 氢键, b 离子键, c 疏水键

第四节 蛋白质的分子结构



六、蛋白质的四级结构

(一)概念

1、寡聚蛋白(oligomeric protein)、多聚蛋白和亚基

由少数肽链通过非共价键组成的蛋白质叫寡聚蛋白。更多条肽链聚合而成的蛋白质称为多聚蛋白(polymeric protein)。

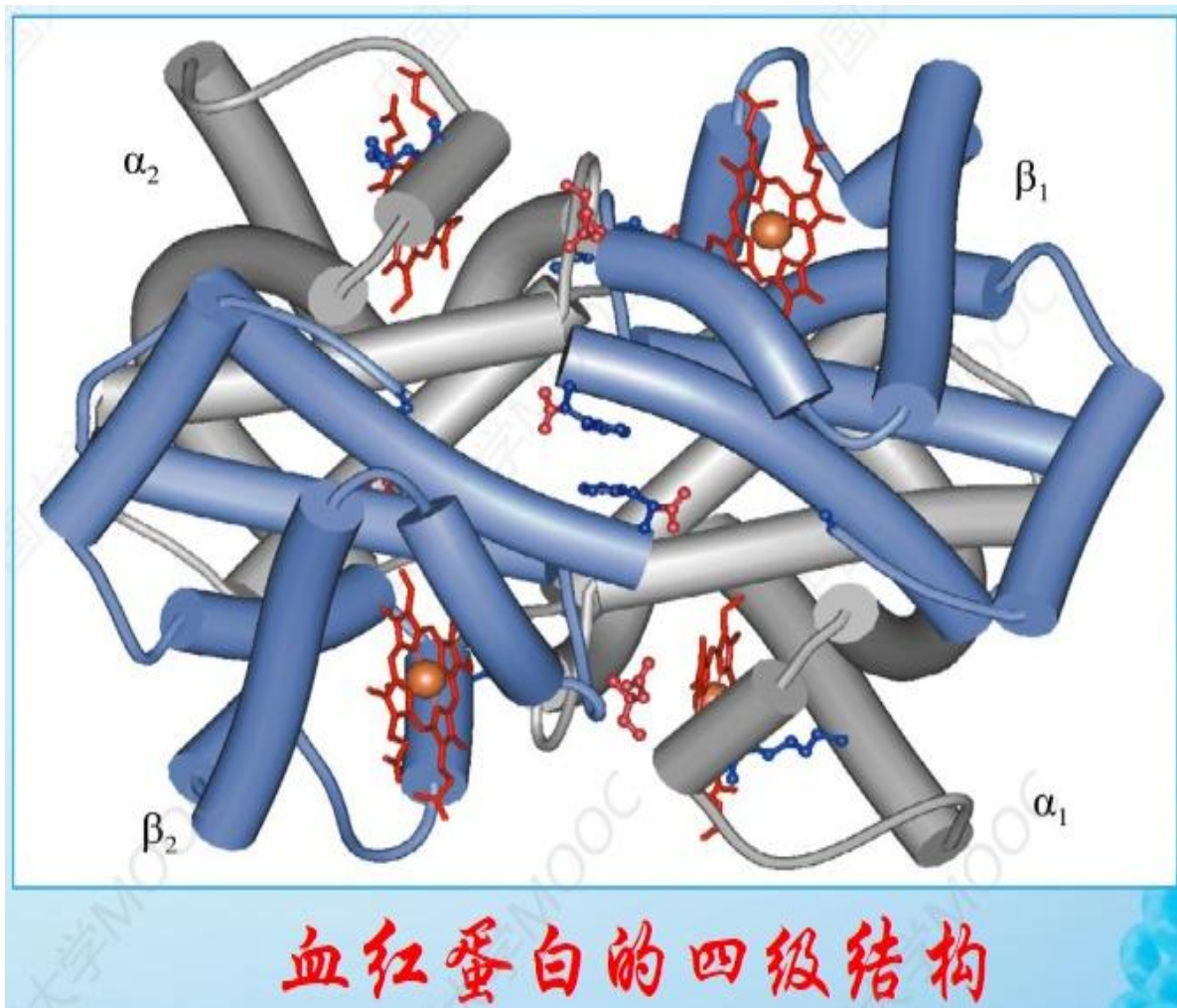
组成寡聚或多聚蛋白的每一个肽链都具有完整的三级结构，也称为**亚基(subunit)**。

2、四级结构

指亚基的相互结集、以特定的方式接触、排列组成的空间构象。因此**不是所有的蛋白质都具有4级结构**，4级结构只有含有两个以上的亚基的多亚基蛋白质才具有4级结构。

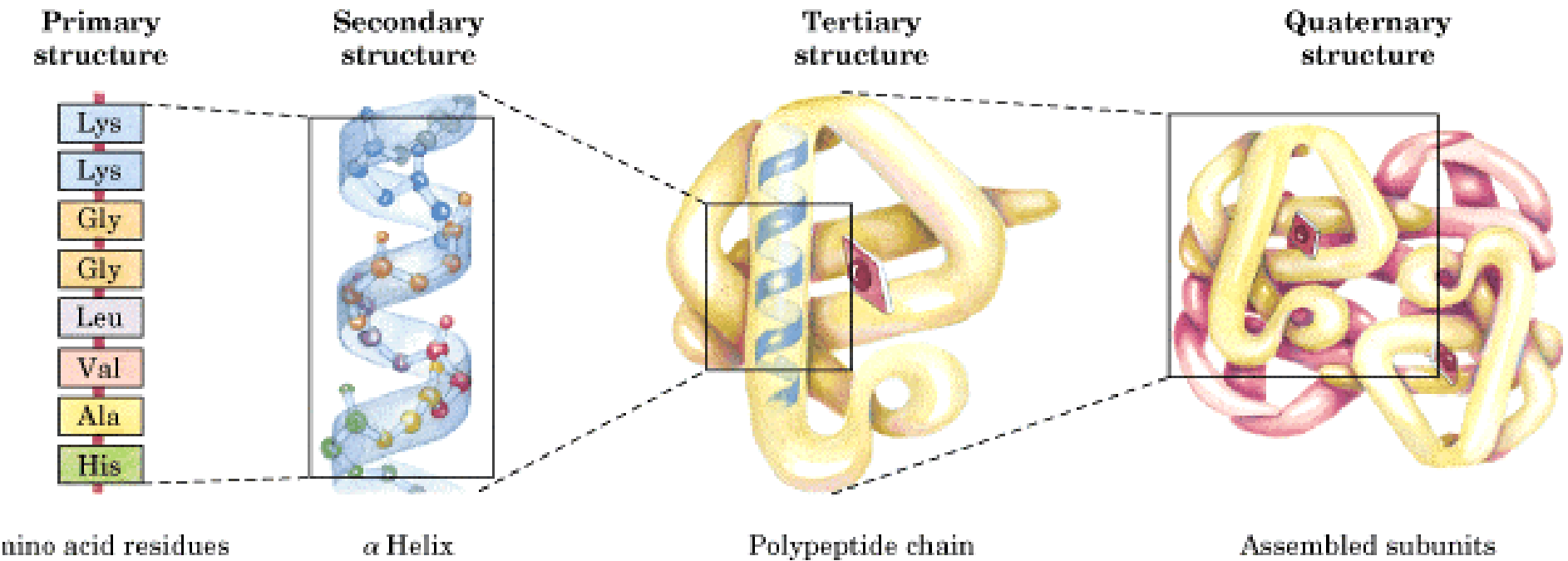
维系蛋白质四级结构的作用力与三级结构相同，仍是**疏水作用力、氢键、离子键、范德华力**等。

第四节 蛋白质的分子结构





蛋白质的结构层次





知识点归纳总结：

1. 什么是蛋白质？

蛋白质是由多个氨基酸，通过肽键相连形成具有特殊结构的高分子含氮化合物。

2. 蛋白质的生物学功能

细胞结构组成成分、是生理活性物质、氧化供能。



3.蛋白质的化学组成

20种氨基酸，

氨基酸的主要理化性质：一般理化特性（能溶于稀酸或稀碱，一般不溶解于有机溶剂）

紫外吸收特性（苯环，280nm）

两性解离特性

茚三酮显色反应、Edman反应，Sanger反应



4. 肽

肽键、肽平面、二面角

5. 蛋白质的分子结构

一级结构：氨基酸排列顺序

二级结构： α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲

三级结构、四级结构

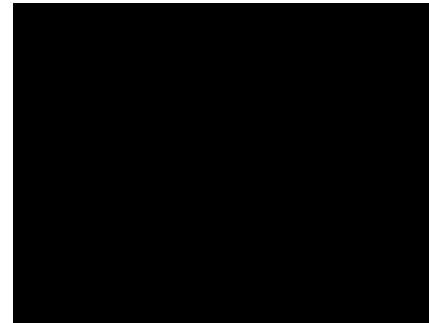
第四节 蛋白质的分子结构



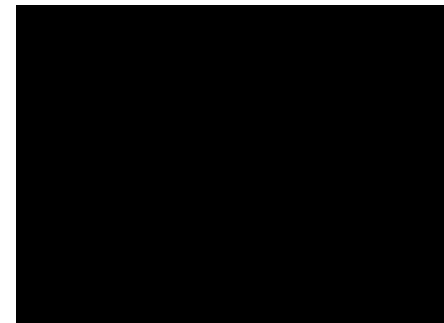
一个视频复习蛋白质的结构



人体内蛋白质如何形成？



蛋白质结构的重要性

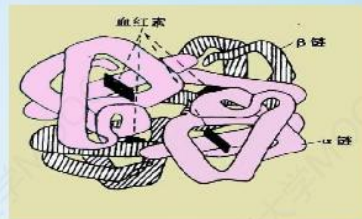
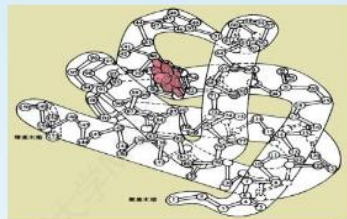


第五节 蛋白质结构与功能的关系



一、蛋白质一级结构与功能的关系

1. 一级结构是空间构象的基础

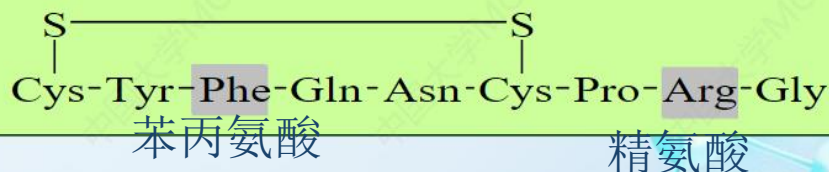


一级结构相似，往往会有相似的高级结构和生物学功能。

牛催产素



牛加压素



一级结构发生改变，高级结构和生物学功能也会发生改变。

例：镰刀形红细胞贫血

HbA β 肽链 N-val · his · leu · thr · pro · glu · glu ······C(146)

HbS β 肽链 N-val · his · leu · thr · pro · val · glu ······C(146)

这种由蛋白质分子发生变异所导致的疾病，称为“分子病”。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



分子病(molecular disease)

基因突变可导致蛋白质一级结构的改变。如果蛋白质一级结构的改变导致蛋白质生物功能的下降或丧失，就会产生疾病。这种病称谓**分子病**。

镰刀形红细胞贫血(sickle-cell anemia)是最早认识的一种分子病。研究发现：患者的Hb S与正常人的Hb A，仅在 β 链上有一个AA不同。

血红蛋白分子 β -链N-端序列

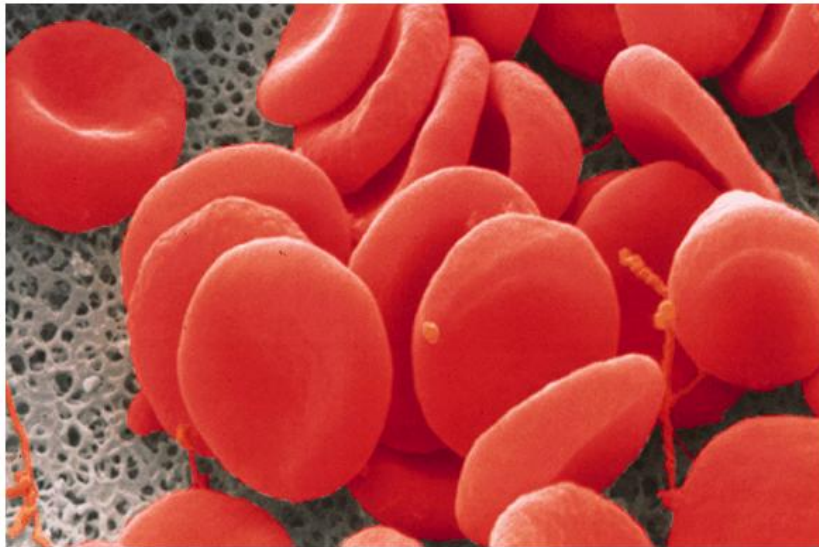
	1	2	3	4	5	6	7	8
HbA (正常) :	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys
HbS (患者) :	Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys

当Glu被Val取代之后，Glu的R侧链是带负电荷的亲水基团，而Val的R侧链是不带电荷的疏水基团，使原来血红蛋白分子表面的电荷发生了改变。

第五节 蛋白质结构与功能的关系

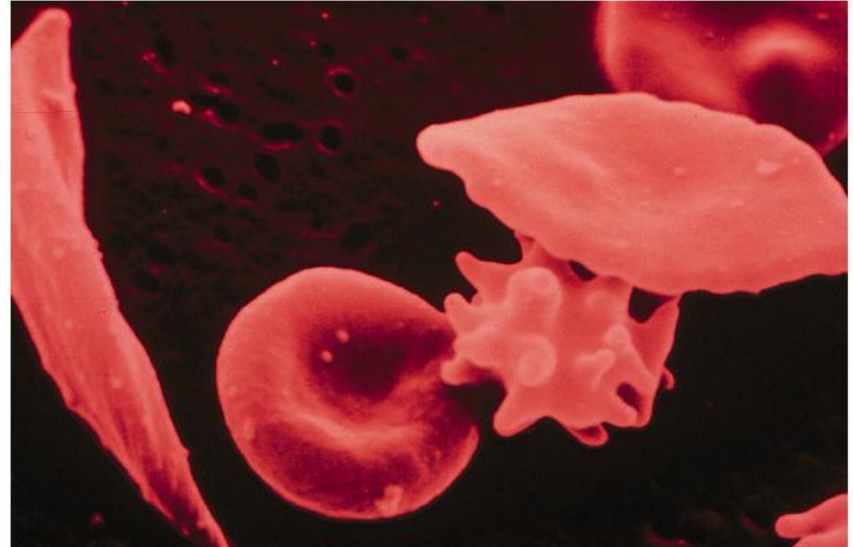


Hb S的等电点改变，溶解度降低，产生细长的聚合体，从而使扁圆形的红细胞变成镰刀形，运输氧的功能下降，细胞脆弱而溶血，严重的可以致死。



(a)

2 μm



(b)

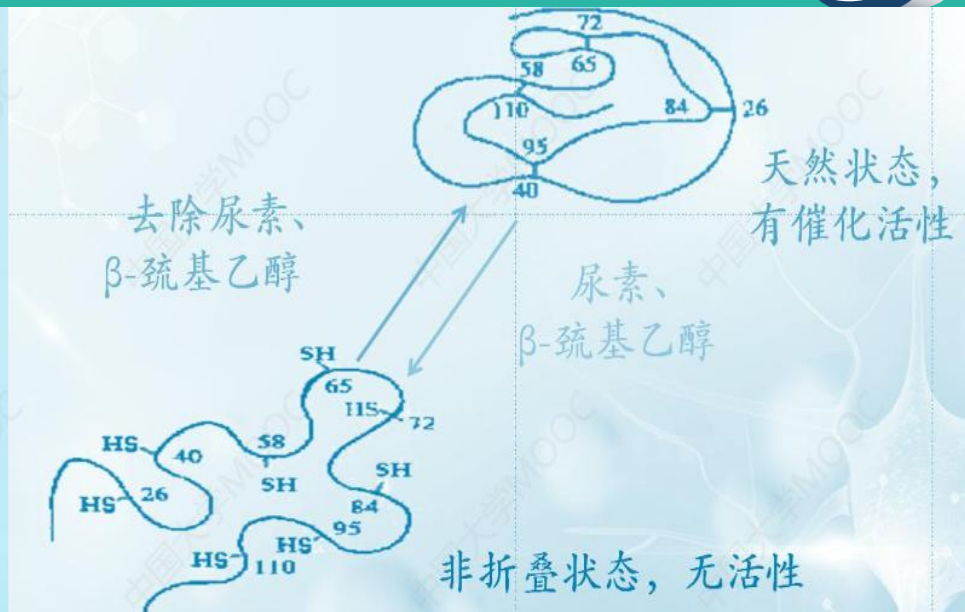
第五节 蛋白质结构与功能的关系



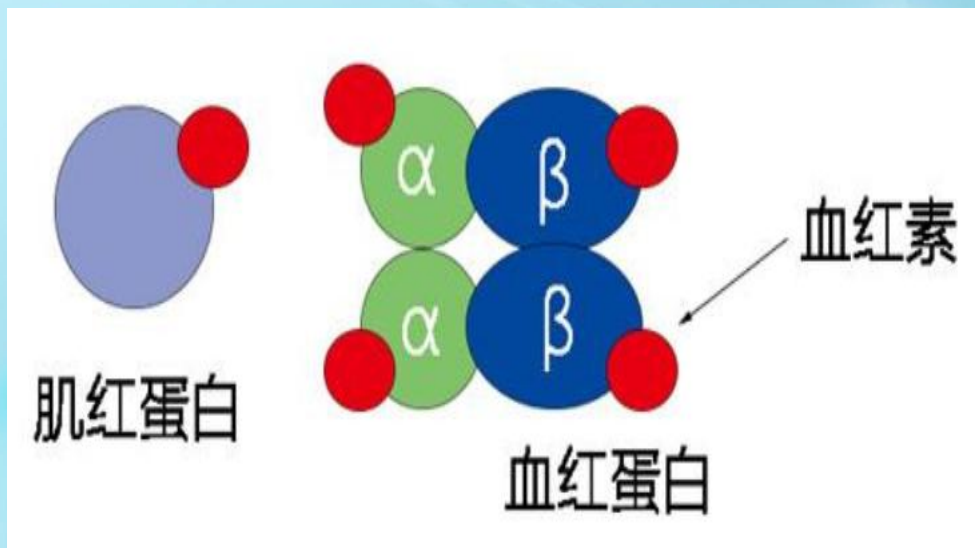
2 高级结构与生物学功能的关系

高级结构是生物学功能的基础，高级结构改变，会影响生物学功能。

(1) 变性：核糖核酸酶（124aa，单链）



(2) 变构：血红蛋白 ($\alpha_2\beta_2$)



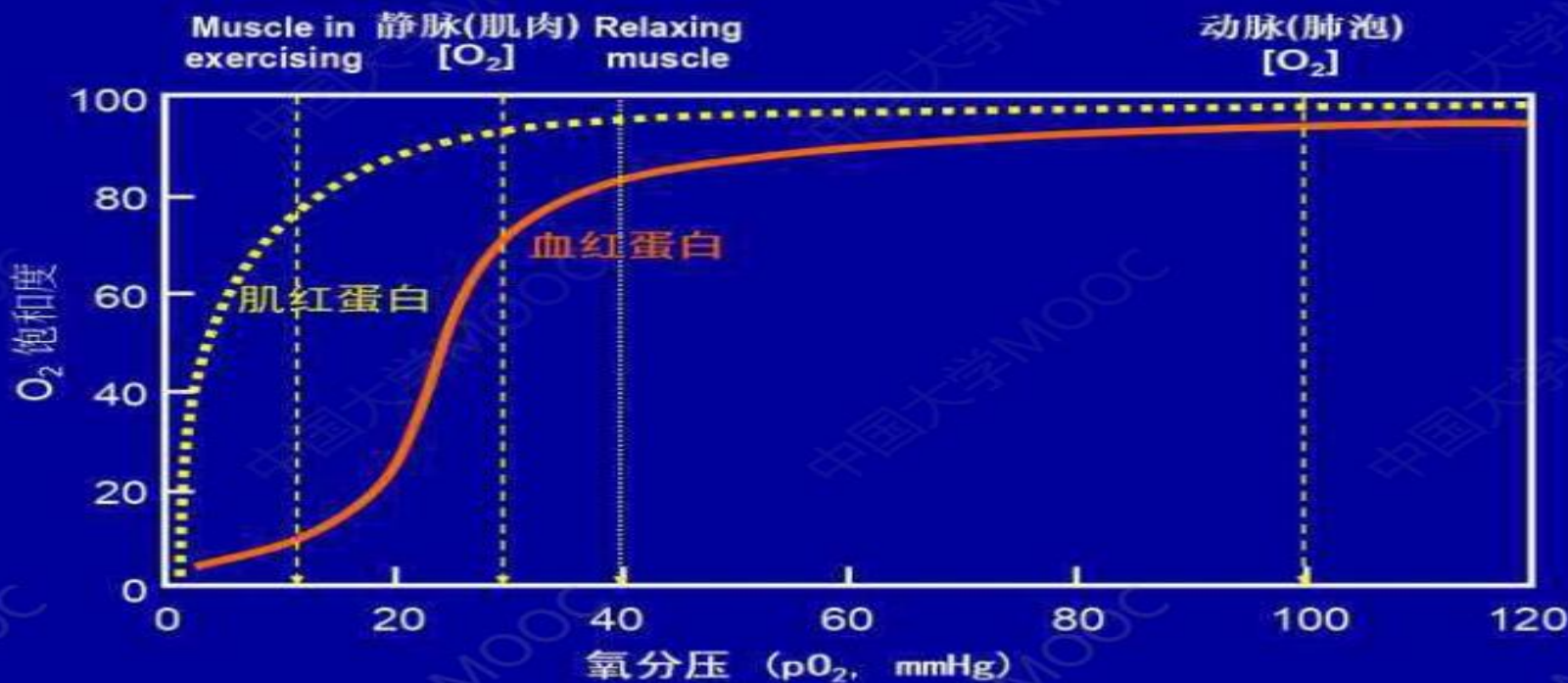
第五节 蛋白质结构与功能的关系



血红蛋白与肌红蛋白的氧合能力

- ①Mb的氧合曲线为双曲线，而Hb为S形氧合曲线；
- ②氧分压相同时，Mb的氧饱和度总是高于Hb；
- ③氧分压较低时，Hb较难与氧结合

血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线



导致氧合功能不同的原因是什么？

第五节 蛋白质结构与功能的关系



生物化学

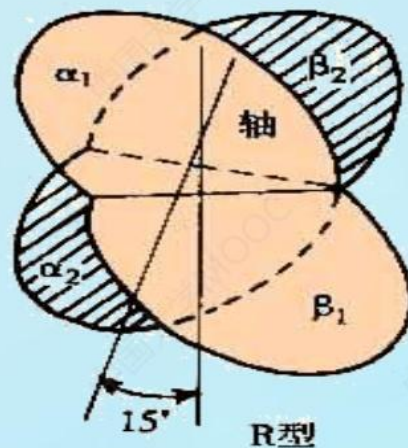
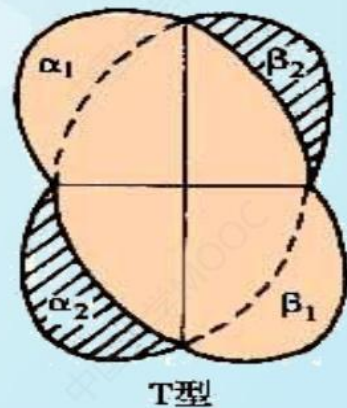
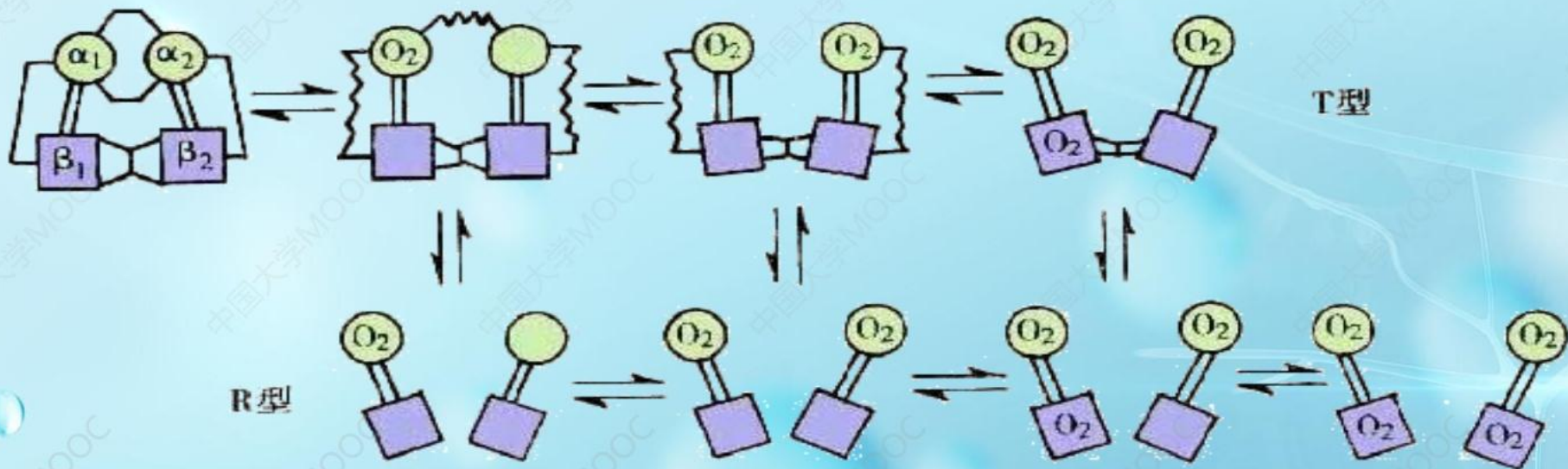


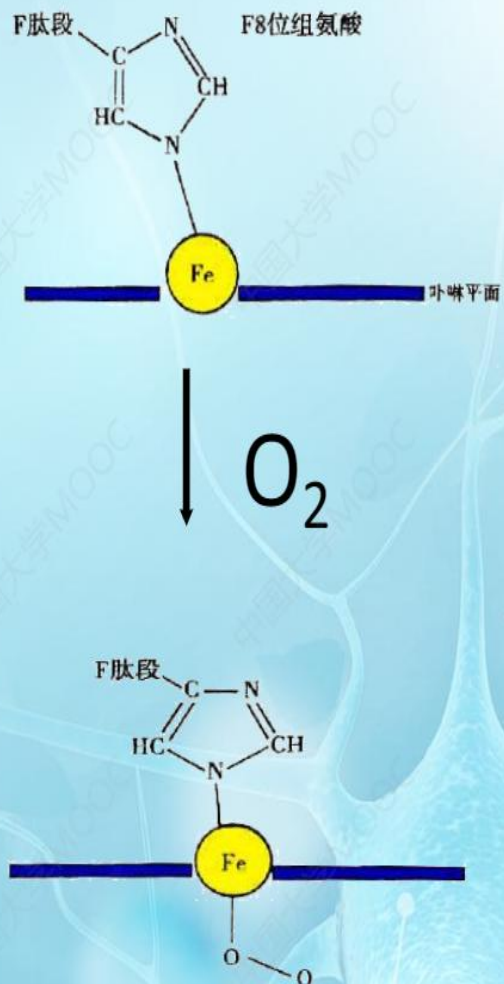
图 2-23 Hb T 态和 R 态互变



第五节 蛋白质结构与功能的关系



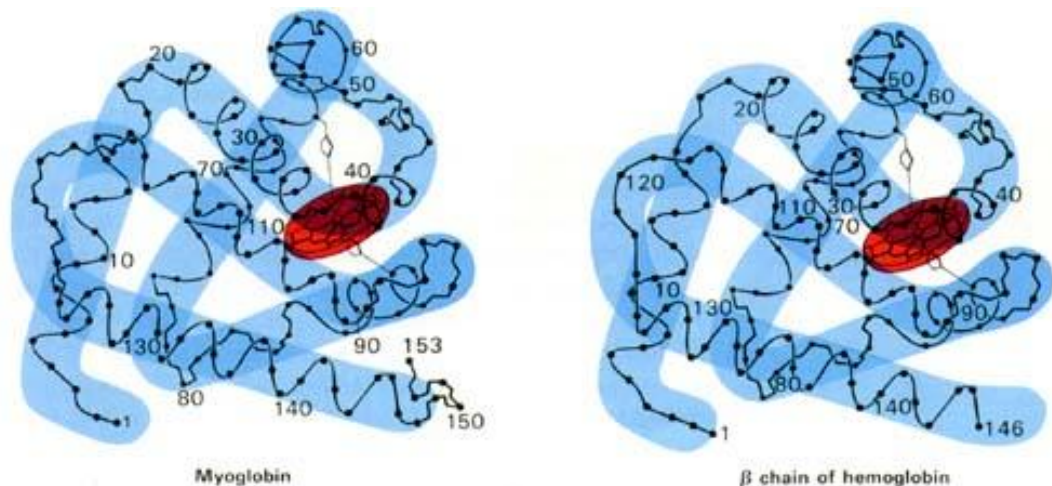
- ◆ 当Hb与氧气结合前，Hb的构象处于紧张状态，不利于与氧气结合。
- ◆ 当氧气与铁原子以配位键结合后，铁的配位数减小，直径也由于没有不成对的电子而减小，正好可以移动0.075nm进入到卟啉环中，这一移动通过F8位组氨酸牵动了它所在的肽段，进而影响Hb亚基间的相互作用，破坏了盐键和其它次级键。
- ◆ 当第一个亚基与O₂结合时，肽段的移动最为困难。而一旦肽段被移动后，这种构象的变化使第二个氧分子相比于第一个氧分子更容易寻找血红蛋白的另一个亚基结合，而它的结合会进一步促进第三个氧分子的结合，以此类推直到构成血红蛋白的四个亚基分别与四个氧分子结合。
- ◆ 因此因此Hb的氧饱和曲线呈S形，也就是氧气的结合影响了Hb的构象，从而影响了进一步结合氧气的活性。



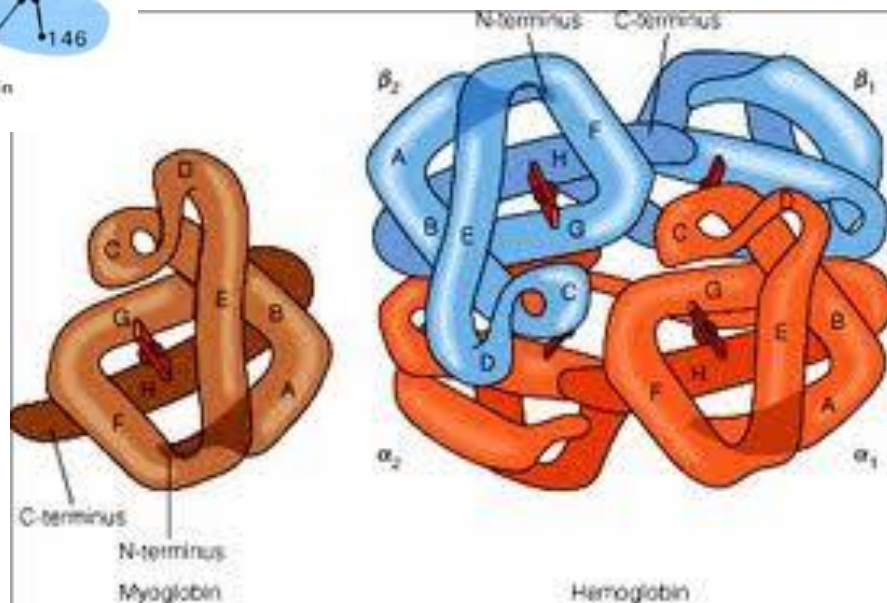
第五节 蛋白质结构与功能的关系



Mb为单亚基结合蛋白；Hb为四亚基($\alpha_2\beta_2$)寡聚蛋白，Mb与Hb的亚基同属珠蛋白，一级结构及高级结构都极为相似。



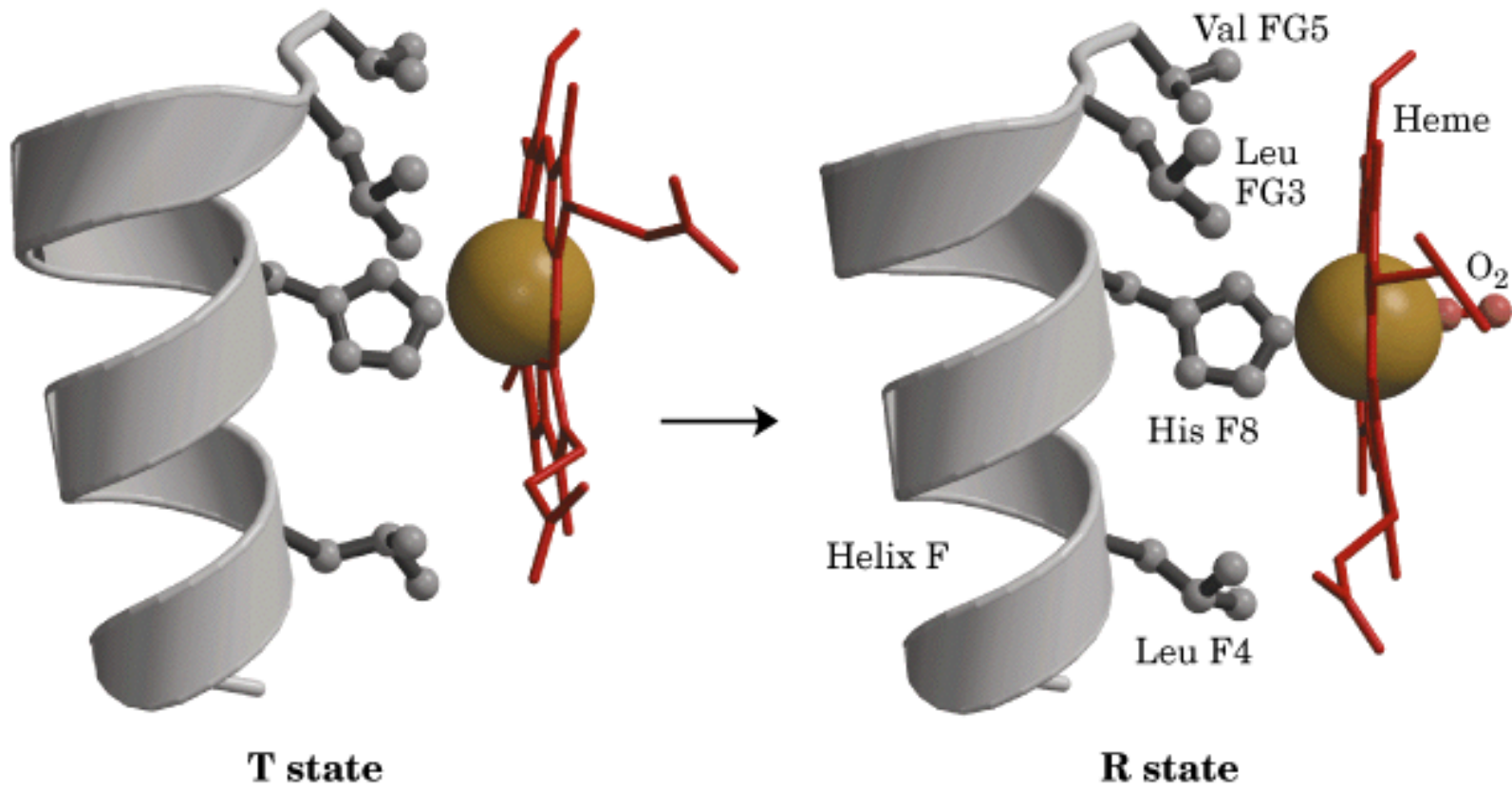
Myoglobin β chain of hemoglobin
肌红蛋白与血红蛋白 β -链三级结构的比较



第五节 蛋白质结构与功能的关系



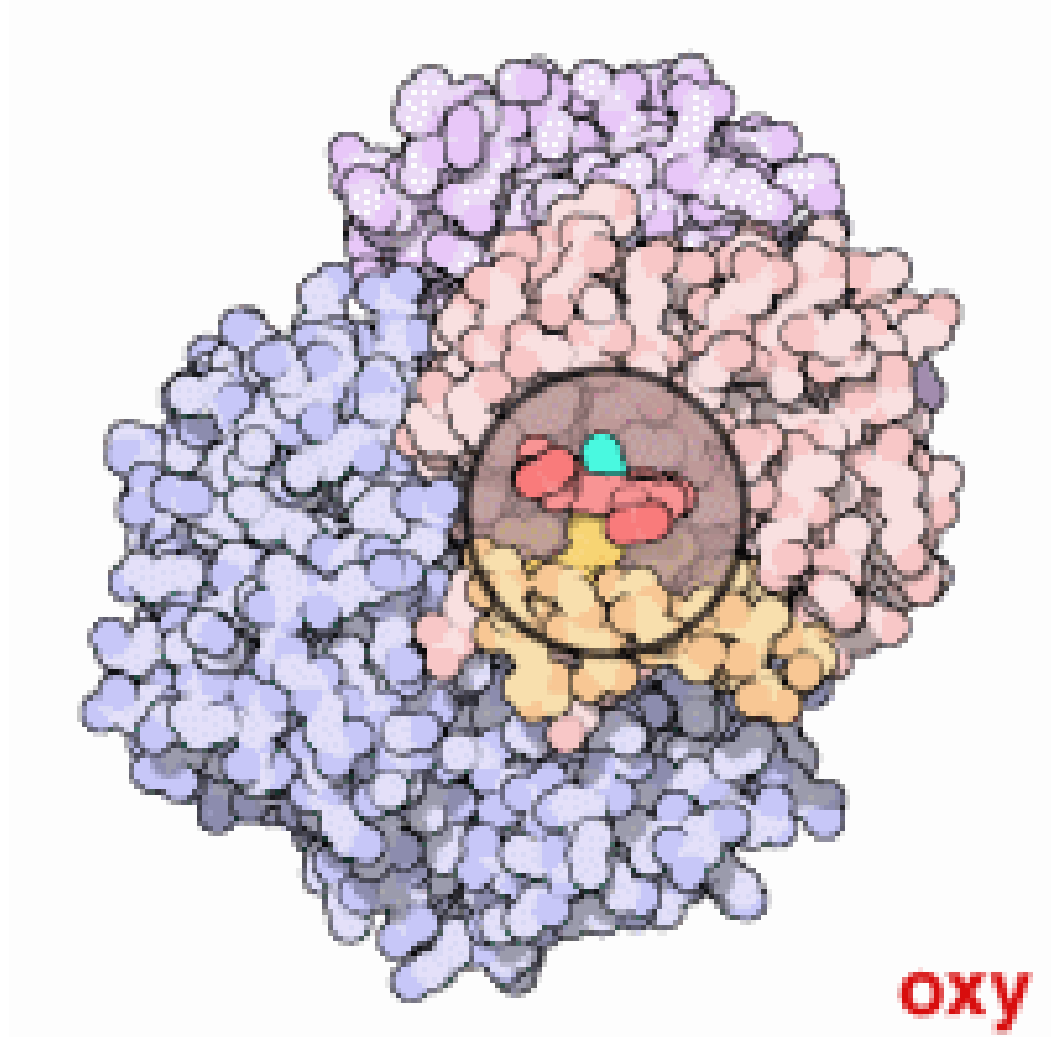
与氧的结合前后血红素发生位移。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



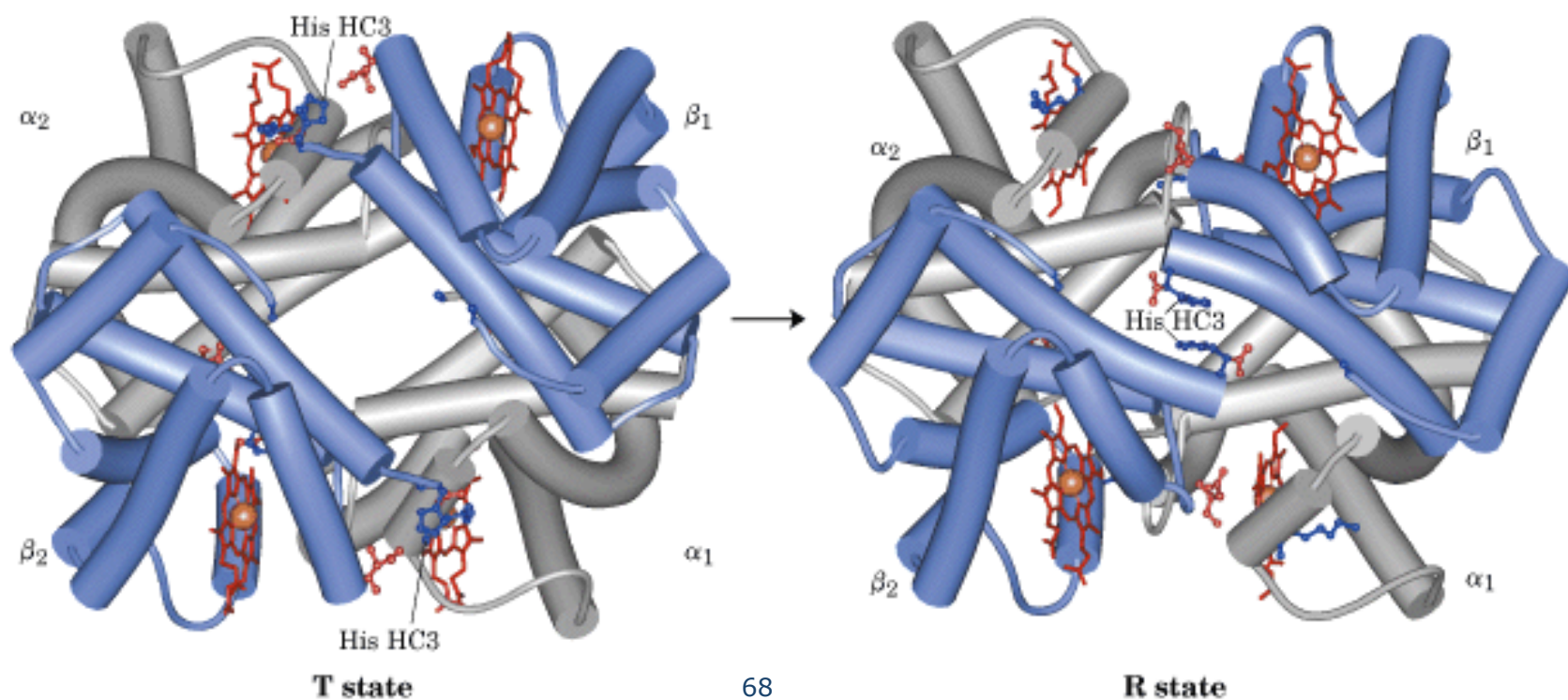
与氧的结合后血红素发生位移，肽链的构象发生变化。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



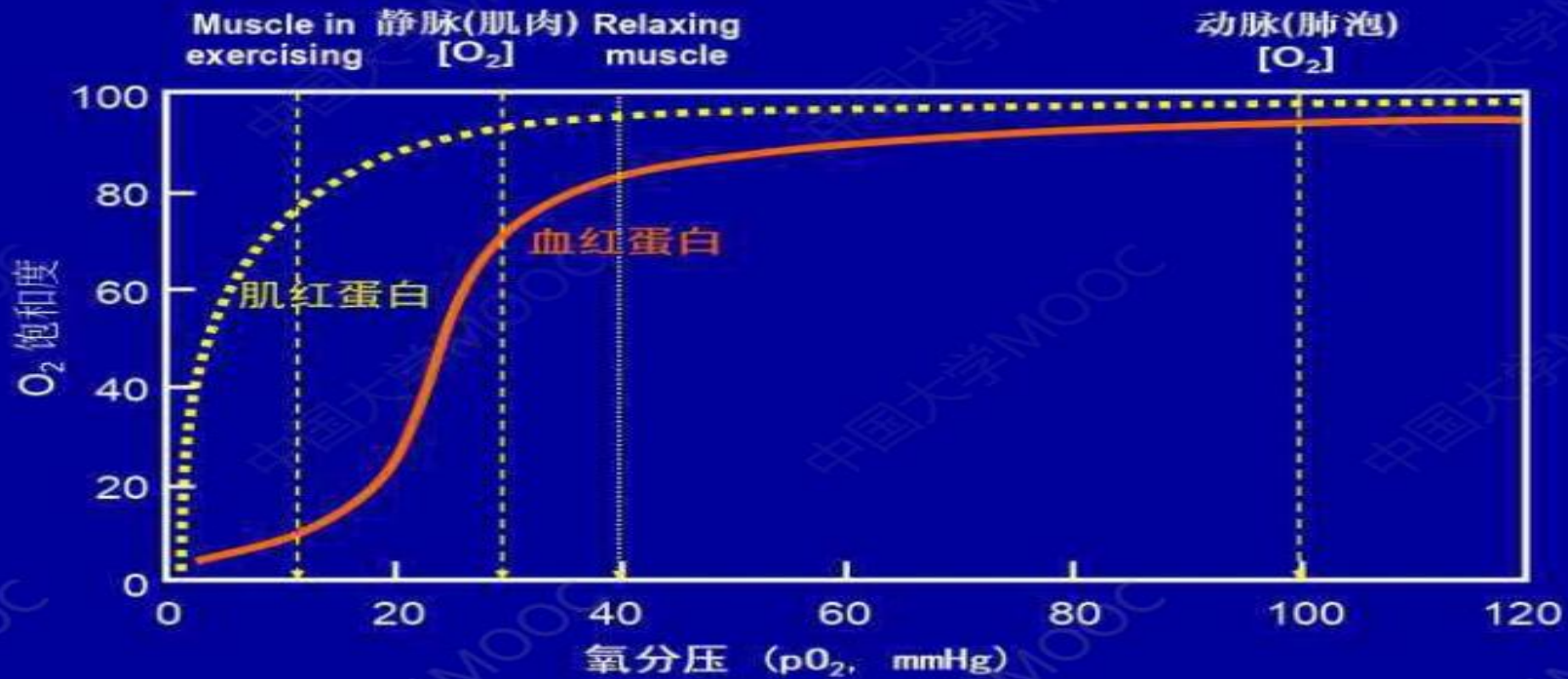
去氧Hb分子的4个亚基之间通过8个盐键相连，各亚基受到较大约束，成为紧密型构象，使其氧亲和力小于单独的 α -亚基或 β -亚基的氧亲和力(小于Mb)。但一旦氧与其中一个亚基结合，该亚基发生构象改变，继而引起相邻的亚基发生构象改变，消除了亚基的氧结合部位的空间位阻，使之更易与氧结合。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线



Hb与Mb的结构差异造成了他们功能差异。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



变构效应(allosteric effect)

蛋白质空间结构的改变伴随其功能的变化，称为变构效应。

蛋白质构象疾病：若蛋白质的折叠发生错误，尽管其一级结构不变，但蛋白质的构象发生改变，仍可影响其功能，严重时可导致疾病发生。



疯牛病中的蛋白质构象改变

疯牛病是由朊病毒蛋白(prion protein, PrP)引起的一组人和动物神经退行性病变。

正常的PrP富含 α -螺旋，称为PrP^c。

PrP^c在某种未知蛋白质的作用下可转变成全为 β -折叠的PrP^{sc}，从而致病。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



朊病毒(Prion)

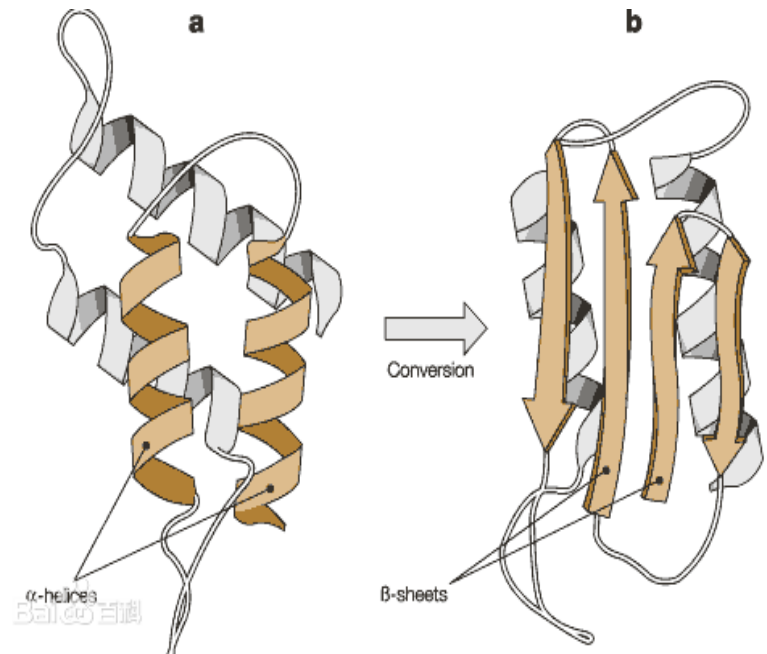
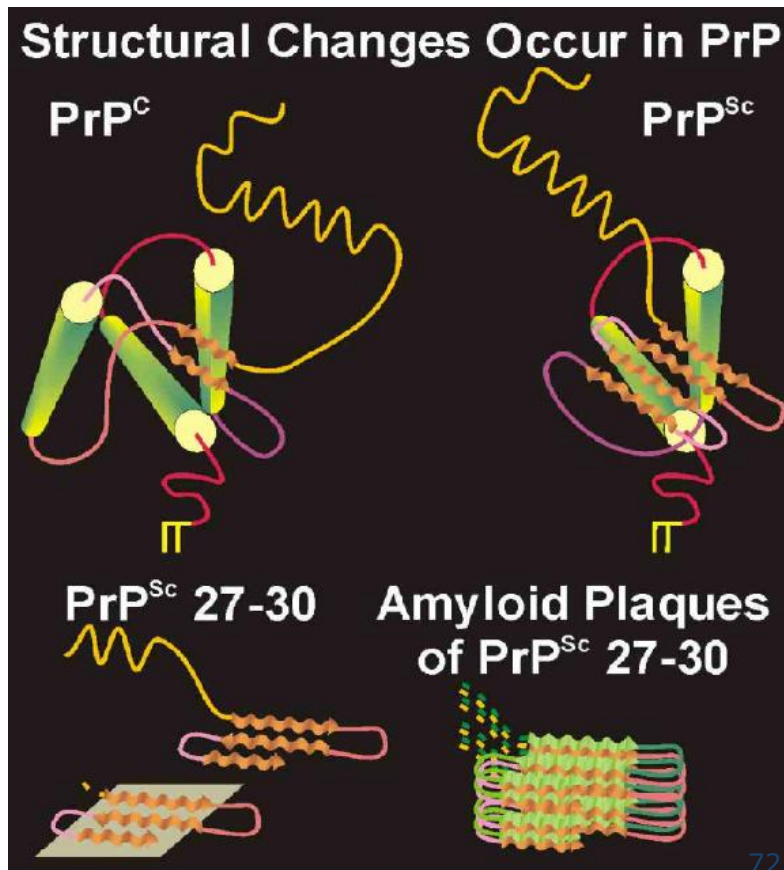
1982年，Stanley B. Prusiner[美]将感染的羊脑样品中的细菌、病毒、细胞组分等都去除掉之后，发现余下的蛋白质仍然有感染性，他提出这种蛋白质就是该病的病原，并称其为prion，是蛋白质感染因子之意。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



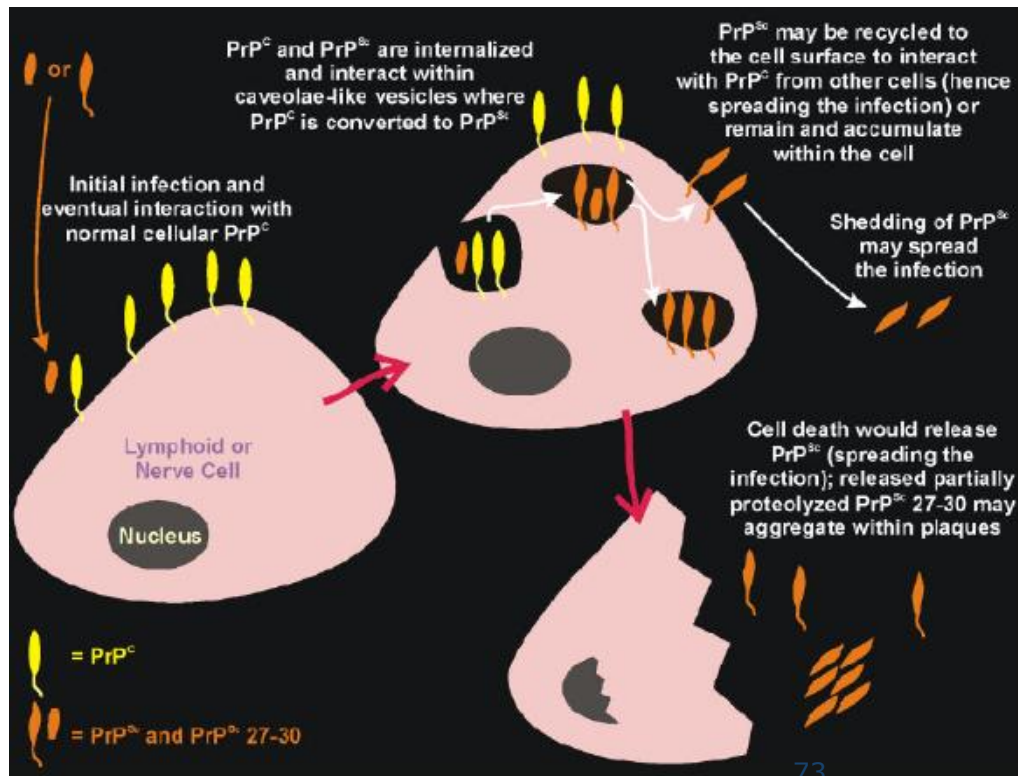
1982斯坦利后续的研究表明朊病毒和PrPC蛋白有相同的一级结构（氨基酸序列），但三级结构（构象）不同。打破了之前人们认为的“蛋白质的一级结构决定高级结构”（一条序列一种结构）的定律。斯坦利因此获得了1997年的诺贝尔生理学或医学奖。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



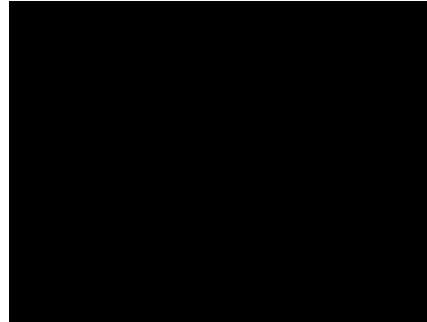
目前被普遍接受的理论是：朊病毒和神经细胞细胞膜上的PrP^C蛋白质有相同的一级结构，但三级结构不同。当朊病毒与体内的PrP^C接触时，会诱导其转化为朊毒体蛋白，该蛋白不能被酶分解，于是在脑部形成斑块，最终导致中枢神经细胞死亡，脑组织被破坏。



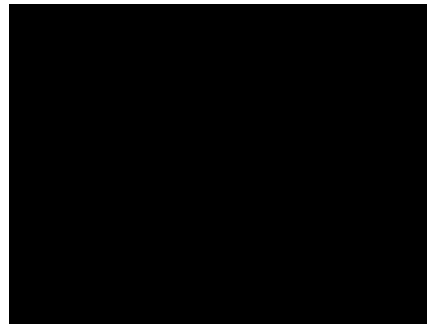
第五节 蛋白质结构与功能的关系



镰刀型贫血症



朊病毒



第六节 蛋白质的主要性质



一、蛋白质的理化性质

1. 理化性质

(1) 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。

第六节 蛋白质的主要性质



(2) 蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀

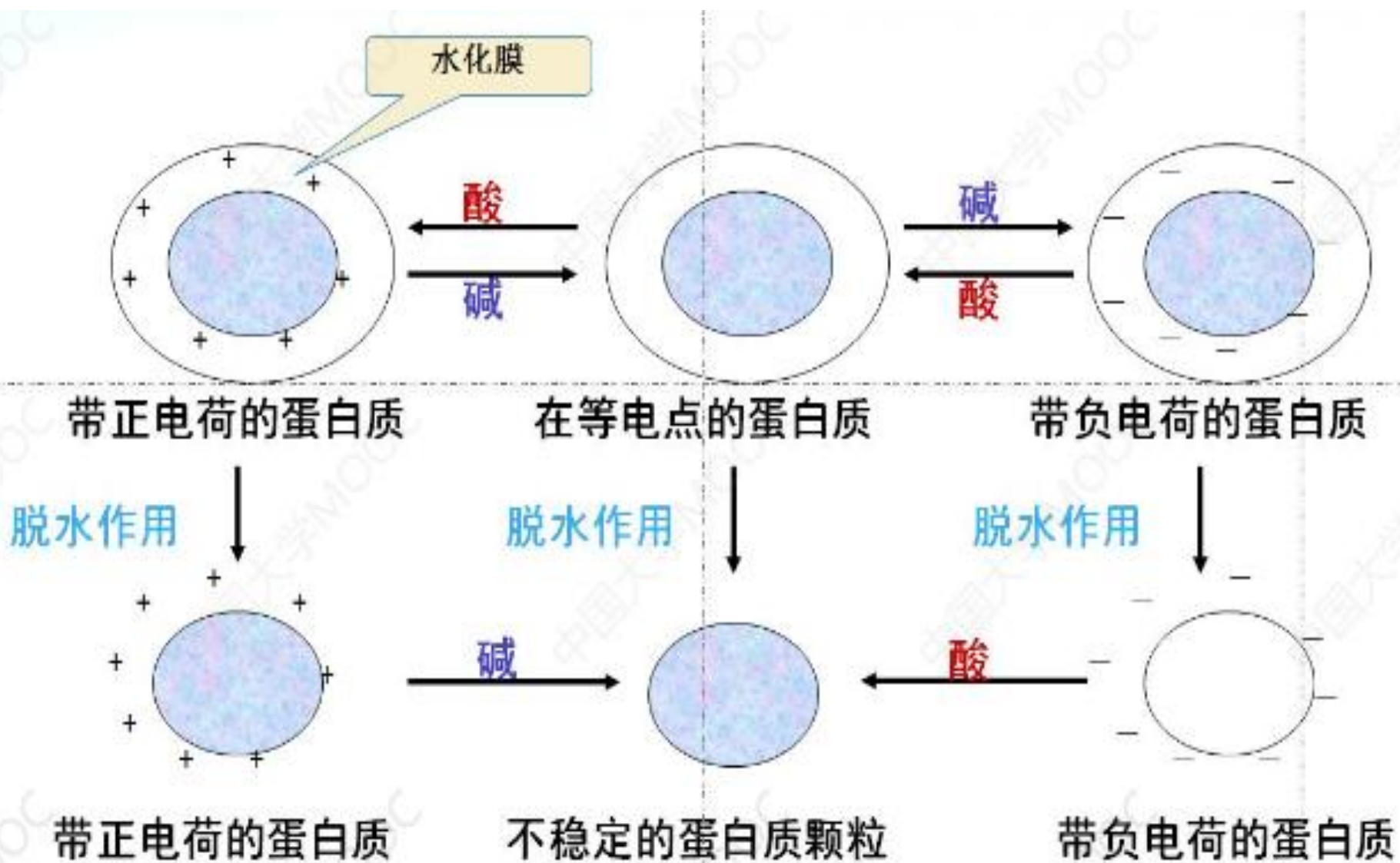
蛋白质的胶体性质

胶体(colloid)

是一种均匀混合物，大小（直径）介于**1-100nm**之间的颗粒，均匀地遍布在整个连续相态中。

蛋白质分子恰在胶体颗粒的直径范围之内，因此，蛋白质溶液具有胶体的性质，并且不能通过半透膜。实验室最常用的透析(dialysis)法分离提纯蛋白质。

第六节 蛋白质的主要性质



第六节 蛋白质的主要性质



盐溶(salting in)：在蛋白质水溶液中，加入少量的中性盐，如硫酸铵等，会增加蛋白质分子表面的电荷，增强蛋白质分子与水分子的作用，从而使蛋白质在水溶液中的溶解度增大。

盐析(salting out)：在高浓度的盐溶液中，无机盐的离子从蛋白质分子的水膜中夺取水分子，将水化膜除去，导致蛋白质分子的相互结合，从而发生沉淀(非变性)。

由于不同蛋白质分子的水膜厚度和带电量不同，因此，使不同蛋白质盐析所需要的盐浓度，一般是不同的。这样，逐步加大盐浓度，便可以使不同蛋白质从溶液中分段沉淀。这种方法称为分段**盐析法**，常用来分离提纯蛋白质。

第六节 蛋白质的主要性质



* **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。

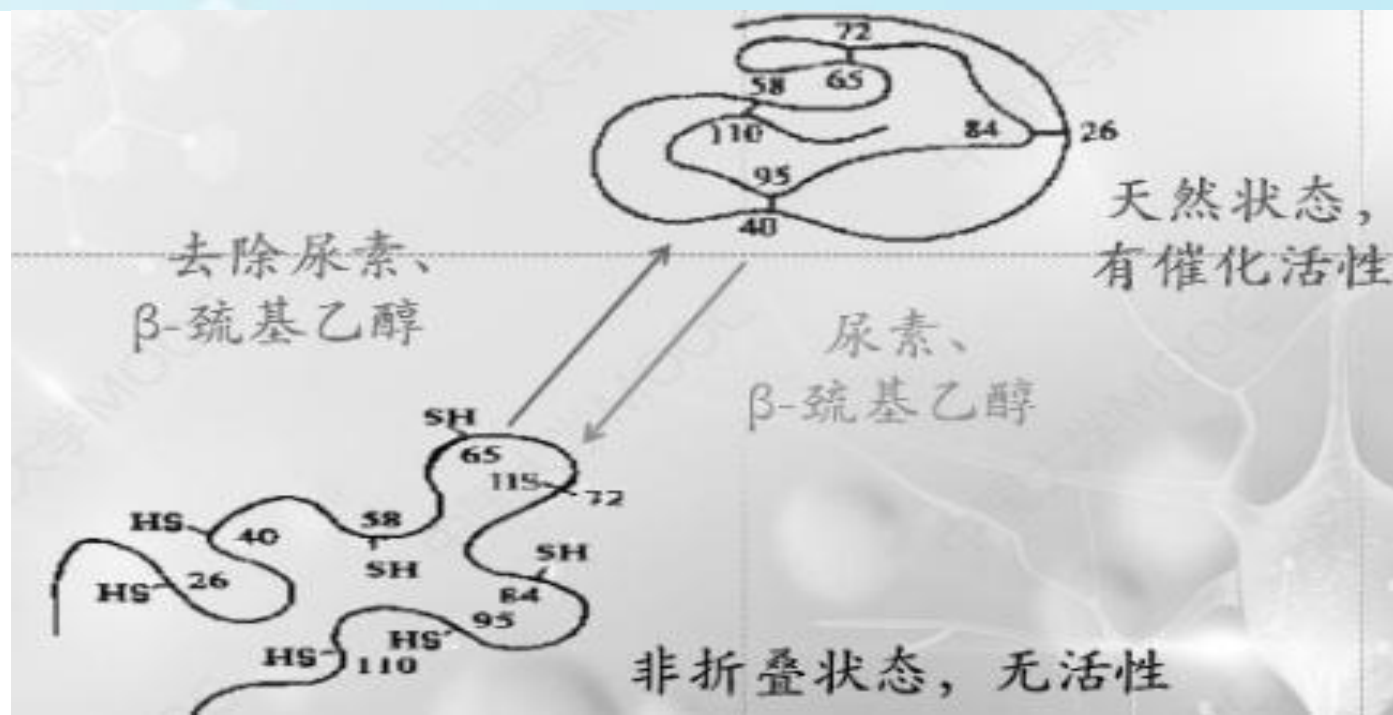
- 此外,防止蛋白质变性也是有效保存蛋白质制剂(如疫苗等)

第六节 蛋白质的主要性质



蛋白质的复性

复性：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)**。



第六节 蛋白质的主要性质



蛋白质的沉淀(precipitation)

受某些物理或化学因素的影响，蛋白质从溶液中析出，这种现象称为蛋白质的沉淀(包括变性与非变性)。蛋白质发生沉淀时，不一定发生变性。

1. 有机溶剂沉淀反应

高浓度的乙醇、丙酮等有机溶剂能够脱去蛋白质分子的水膜，也降低溶液的介电常数，使得蛋白质从溶液中沉淀。不同蛋白质沉淀所需要的有机溶剂浓度一般是不同的。因此，逐步加大有机溶剂浓度，可以使不同的蛋白质从溶液中先后沉淀下来。这种方法，称为有机溶剂分级法，常用来分离提纯蛋白质。

2. 重金属盐沉淀反应

在碱性溶液中，蛋白质分子的负离子基团(如 -COO^-)可以与重金属盐(如醋酸铅、氯化高汞、硫酸铜等)的正离子结合成难溶的蛋白质重金属盐，并从溶液中沉淀下来。在临床上，利用这种特性抢救重金属中毒的病人和家畜。

第六节 蛋白质的主要性质



3. 生物碱试剂沉淀反应

生物碱试剂(如：苦味酸、单宁酸、三氯醋酸，钨酸，等)在溶液pH小于蛋白质等电点时，其酸根负离子能与蛋白质分子上的正离子基团相结合，变成为溶解度很小的蛋白盐，并从溶液中沉淀下来。临床化验时，常用上述生物碱试剂除去血浆中干扰测定的蛋白质。

4. 加热变性法：在近于等电点处加热蛋白质溶液，可使蛋白质发生凝固(coagulation)而沉淀。加热，使规则的肽链结构变为不规则的松散状结构，分子的不对称性增加，疏水基团暴露，进而凝聚成凝胶状的蛋白块。

蛋白质的变性、沉淀和凝固三者之间有着密切的关系。蛋白质变性后不一定沉淀，变性蛋白质只在等电点附近才容易沉淀，沉淀的变性蛋白也不一定凝固。例如，蛋白质被强酸、强碱变性后由于蛋白质颗粒带有大量电荷，故仍溶于强酸或强碱之中。但若将强碱和强酸溶液的pH调节至等电点处，则变性蛋白质凝集成絮状沉淀物，若将此絮状物加热，则分子间相互盘缠而变成较为坚固的凝块。

第六节 蛋白质的主要性质



三、蛋白质的呈色反应

在蛋白质分析工作中，常利用蛋白质分子中游离的氨基、羧基、肽键以及一些氨基酸的侧链基团能与某些化学试剂反应产生有色物质的性质，进行蛋白定性和定量测定。常见的显色反应主要有以下几种。

第六节 蛋白质的主要性质



反应名称	试剂	反应基团	呈色	应用
茆三酮反应	茆三酮	游离 α -氨基	蓝紫色 (Max570nm)	定性
双缩脲反应	硫酸铜、氢氧化钠	多肽键	紫色 (Max540nm)	定性、定量
Millow(米伦)	米伦试剂	酪氨酸的酚基	白色加热变红色	定性
Folin-酚法 (Lowry法)	Folin-酚试剂		蓝色 (Max650nm)	定量 (近年逐渐被考马斯亮兰法取代)
考马斯亮蓝法 (Bradford法)	考马斯亮蓝 G250		蓝色 (Max595nm)	定量

第六节 蛋白质的主要性质



四、蛋白质的紫外吸收

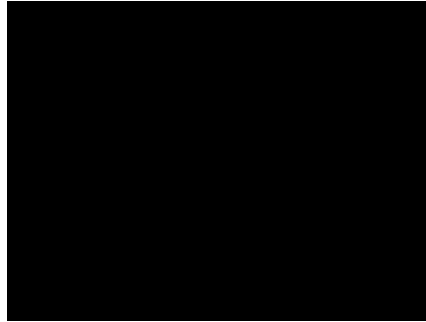
蛋白质不能吸收可见光，但能吸收一定波长范围内的紫外光。大多数蛋白质在280 nm波长附近有最大的光吸收，这主要与蛋白质中氨基酸苯环（苯丙氨酸，酪氨酸、色氨酸）对紫外光的吸收有关，我们通常用蛋白质280纳米处的光吸收与其浓度成正比这个关系来做蛋白质的定量测量。

那么核酸在由于它的碱基中也含有碳碳或者碳氮的共轭双键，因此在紫外光区也有一个特征的吸收峰，不过它的最大吸收峰在260nm，因此我们可以用260纳米处的光吸收来测定核酸的浓度。那么我们知道染色体是DNA和蛋白组成的，在提取的过程中，往往DNA分子中是包含有蛋白质的，那么为了测定核酸的程度会用 A_{260}/A_{280} ，也就是260纳米处的光吸收和280纳米处的光吸收的比值来判断其纯度。如果比值在1.8~2.0之间，说明提取的核酸纯度较高，可以用后续的反应。

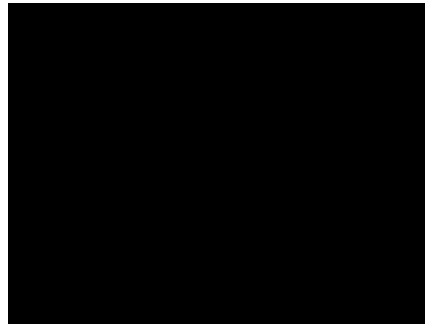
第六节 蛋白质的主要性质



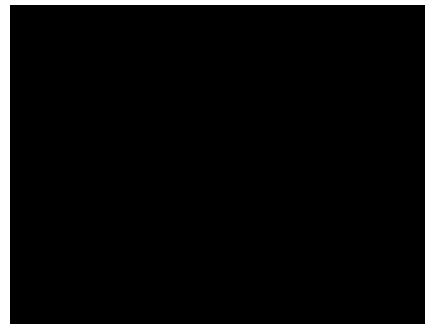
双缩脲实验：



蛋白质的盐析：



蛋白质的变性：





第七节 蛋白质的分离和提纯

一、蛋白质的分离和纯化

1. 蛋白质的分离和纯化

(1) 透析及超滤法（胶体性质）

- **透析(dialysis)**: 利用透析袋把大分子蛋白质与小分子化合物分开的方法。
(除盐)
- **超滤法**: 应用正压或离心力使蛋白质溶液透过有一定截留分子量的超滤膜, 达到浓缩蛋白质溶液的目的。

第七节 蛋白质的分离和提纯



(2) 有机溶剂沉淀、盐析及免疫沉淀

- *使用丙酮沉淀时，必须在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 低温下进行，丙酮用量一般10倍于蛋白质溶液体积。蛋白质被丙酮沉淀后，应立即分离。除了丙酮以外，也可用乙醇沉淀。
- *盐析(salt precipitation)是将硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等加入蛋白质溶液，使蛋白质表面电荷被中和以及水化膜被破坏，导致蛋白质沉淀。
- *免疫沉淀法：将某一纯化蛋白质免疫动物可获得抗该蛋白的特异抗体。利用特异抗体识别相应的抗原蛋白，并形成抗原抗体复合物的性质，可从蛋白质混合溶液中分离获得抗原蛋白。



(3) 电泳

蛋白质在非pI的溶液中为带电的颗粒，在电场中能向正极或负极移动。这种通过蛋白质在电场中泳动而达到分离各种蛋白质的技术，称为电泳(electrophoresis)。

根据支撑物的不同，可分为薄膜电泳、凝胶电泳等。

几种重要的蛋白质电泳

*SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，常用于蛋白质分子量的测定。

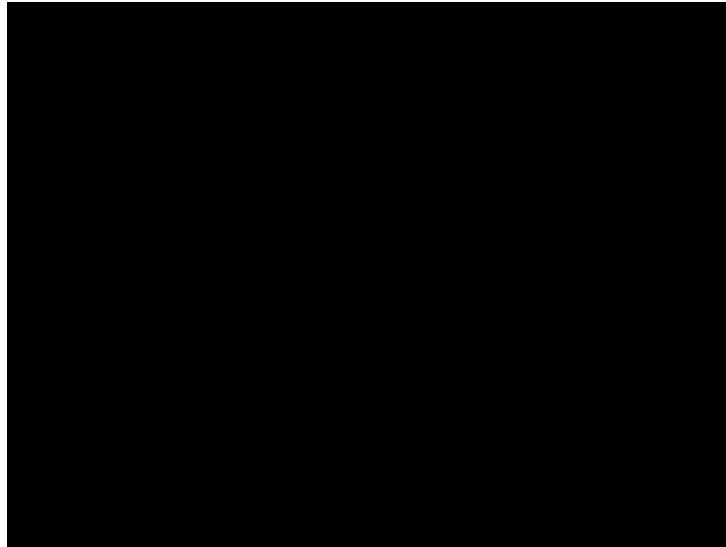
*等电聚焦电泳，通过蛋白质等电点的差异而分离蛋白质的电泳方法。

*双向凝胶电泳是蛋白质组学研究的重要技术。

第七节 蛋白质的分离和提纯



SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳



第七节 蛋白质的分离和提纯



(4) 层析

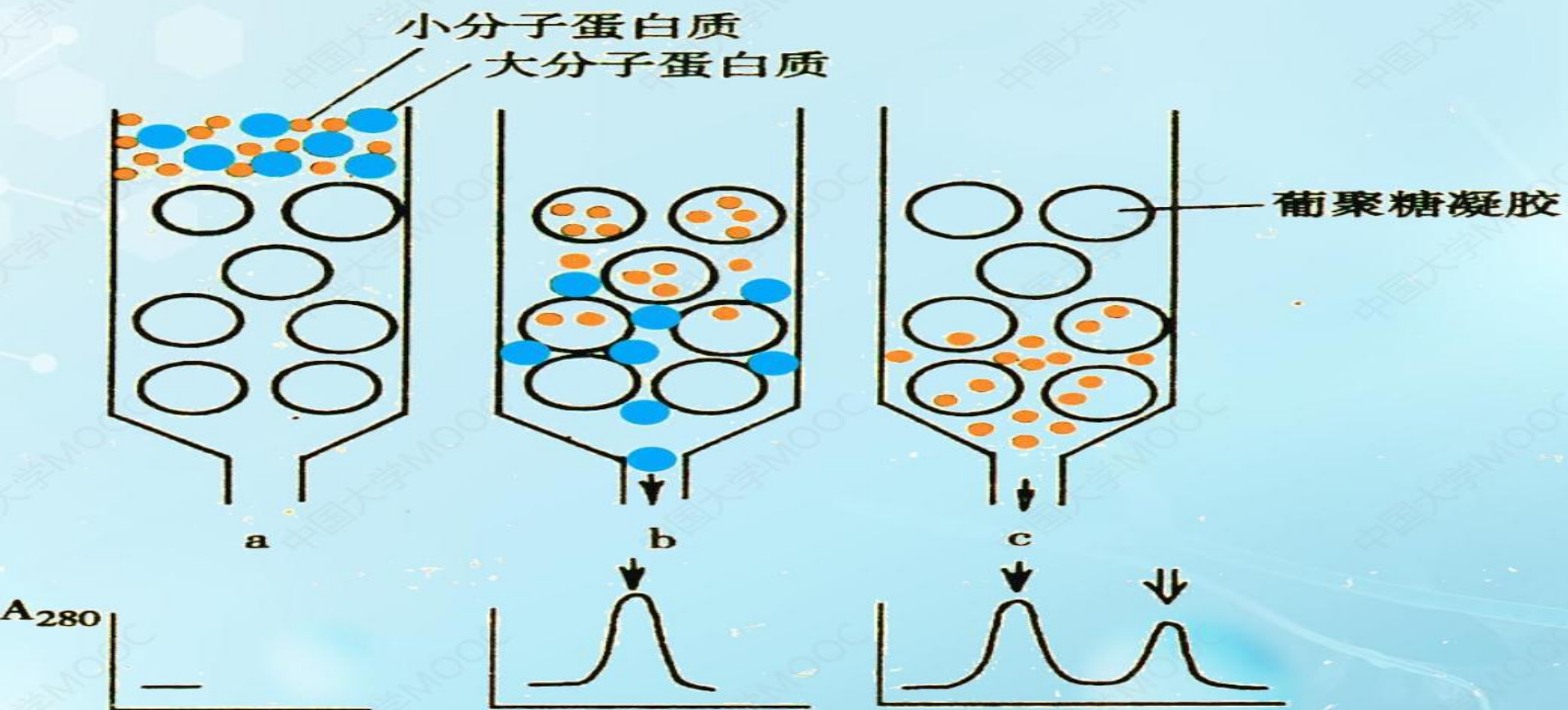
层析(chromatography)分离蛋白质的原理：待分离蛋白质溶液（流动相）经过一个固态物质（固定相）时，根据溶液中待分离的蛋白质颗粒大小、电荷多少及亲和力等，使待分离的蛋白质组分在两相中反复分配，并以不同速度流经固定相而达到分离蛋白质的目的。

蛋白质分离常用的层析方法

* **离子交换层析：**利用各蛋白质的电荷量及性质不同进行分离。

* **凝胶过滤(gel filtration)又称分子筛层析，**利用各蛋白质分子大小不同分离。

第七节 蛋白质的分离和提纯



凝胶过滤分离蛋白质

- a. 大球是葡聚糖凝胶颗粒
- b. 样品上柱后，小分子进入凝胶微孔，大分子不能进入，故洗脱时大分子先洗脱下来
- c. 小分子后洗脱出来



(5) 超速离心

* 超速离心法(ultracentrifugation)既可以用来分离纯化蛋白质也可以用作测定蛋白质的分子量。

* 蛋白质在离心场中的行为用**沉降系数(sedimentation coefficient, S)**表示,沉降系数 ($s=v/(\omega^2 \cdot r)$) 与蛋白质的密度和形状相关。沉降系数以每单位重力的沉降时间表示即 $1s=10^{-13}$ 秒。

因为沉降系数S大体上和分子量成正比关系, 故可应用超速离心法测定蛋白质分子量, 但对分子形状的高度不对称的大多数纤维状蛋白质不适用。



3、多肽链中氨基酸序列分析

分析已纯化蛋白质的氨基酸残基组成



测定多肽链的氨基末端与羧基末端为何种氨基酸残基



把肽链水解成片段，分别进行分析



测定各肽段的氨基酸排列顺序，一般采用Edman降解法



一般需用数种水解法，并分析出各肽段中的氨基酸顺序，然后经过组合排列对比，最终得出完整肽链中氨基酸顺序的结果。

第七节 蛋白质的分离和提纯



通过核酸来推演蛋白质中的氨基酸序列

分离编码蛋白质的基因



测定DNA序列



排列出mRNA序列



按照三联密码的原则推演出氨基酸的序列



4. 蛋白质空间结构测定

二级结构测定

- 通常采用圆二色光谱(circular dichroism, CD)测定溶液状态下的蛋白质二级结构含量。 α -螺旋的CD峰有222nm处的负峰、208nm处的负峰和198 nm处的正峰三个成分；而 β -折叠的CD谱不很固定。

三级结构测定

X射线衍射法(X-ray diffraction)和核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)是研究蛋白质三维空间结构最准确的方法。

第七节 蛋白质的分离和提纯



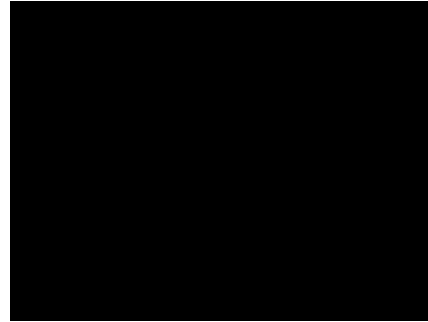
根据蛋白质的氨基酸序列预测其三维空间结构

- * 用分子力学、分子动力学的方法，根据物理化学的基本原理，从理论上计算蛋白质分子的空间结构。
- * 通过对已知空间结构的蛋白质进行分析，找出一级结构与空间结构的关系，总结出规律，用于新的蛋白质空间结构的预测。

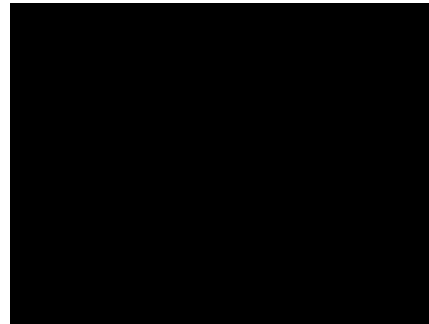
第七节 蛋白质的分离和提纯



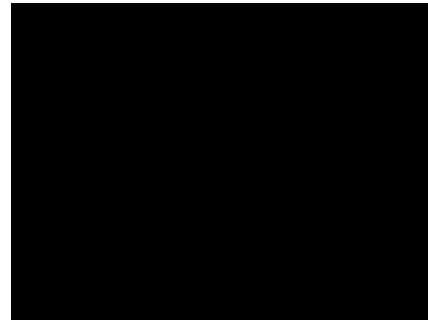
X射线衍射:



核磁共振成像技术:



人工预测蛋白质结构:



第七节 蛋白质的分离和提纯



复习：

1. 蛋白质一级结构与功能的关系
2. 分子病（举例）
3. 蛋白质高级结构与功能的关系
4. 解释血红蛋白S形曲线的原因
5. 蛋白质的理化性质
6. 蛋白质分离纯化的方法