

第三章

蛋白质的结构与功能



GDOU

动物生物化学 Animal Biochemistry

目 录



- 一、蛋白质概述
- 二、蛋白质基本结构单位——氨基酸
- 三、肽
- 四、蛋白质分子结构
- 五、蛋白质结构与功能的关系
- 六、蛋白质的理化性质
- 七、蛋白质的分离和纯化

第一节 蛋白质概述



1. 蛋白质的概念

蛋白质 (protein) 是由多个**氨基酸** (amino acids, AA) 通过**肽键** (peptide bond) 相连形成的具有**特定空间结构和生物学功能**的高分子有机物。

第一节 蛋白质概述



2. 蛋白质的生物学功能

- 催化功能： 酶
- 调节功能： 激素类蛋白、调控蛋白等
- 运输功能： 血红蛋白、载体蛋白
- 信息传递功能： 受体蛋白、糖蛋白
- 运动功能： 肌动蛋白、肌球蛋白
- 防御功能： 免疫球蛋白
- 营养功能： 卵清蛋白、酪蛋白等
- 保护与支持功能： 胶原蛋白、角蛋白等
- 能量转换蛋白： 细胞色素
- 基因调节蛋白： 阻遏蛋白

第一节 蛋白质概述



3. 蛋白质的分类

按**形状**分为：

- 纤维转蛋白质：多为结构蛋白，如角蛋白、胶原蛋白。
- 球状蛋白质：具有广泛的生物学功能，如免疫球蛋白，酶。

按**组成结构**分为：

- 单纯蛋白质(simple protien) 又称简单蛋白质，仅由肽链组成，如清蛋白、球蛋白等。
- 结合蛋白质(protein binding) 由肽链与非蛋白物（有机分子或离子）两部分构成，**非蛋白部分称为辅基(prosthetic group)或配体(ligand)。**

按**功能**分为：运输蛋白、免疫球蛋白、结构蛋白、酶等。

第一节 蛋白质概述



4. 蛋白质的化学组成

蛋白质的物质元素组成基本相似，除含有碳、氢、氧、氮外，还有少量的硫。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**平均值**约为：

碳 50%

氢 7%

氧 23%

氮 **16%**

硫 0-3%

其他微量元素

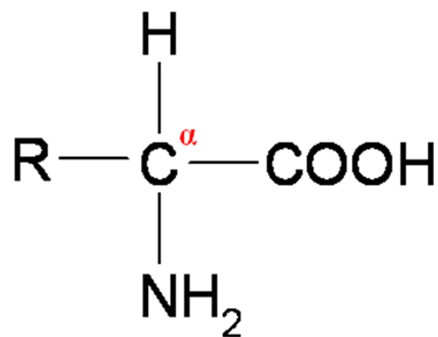
各种蛋白质的氮含量比较恒定，平均值为**16%**。**凯氏定氮法**就是依据这一原理来测定蛋白质含量的。

第二节 氨基酸

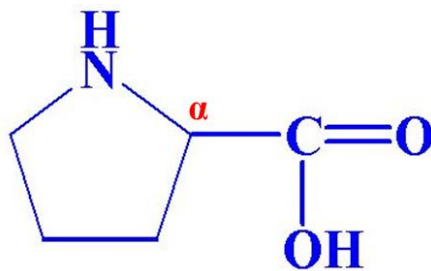


1. 氨基酸的基本结构

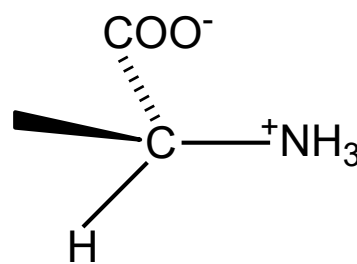
存在与自然界的氨基酸有700多种，但能合成蛋白质，有自己密码子的氨基酸只有20种，并且均为L-氨基酸（除了甘氨酸），含不对称的 α -碳原子，具有相同的结构通式（脯氨酸除外），他们之间的差别在于有不同的侧链基团R。



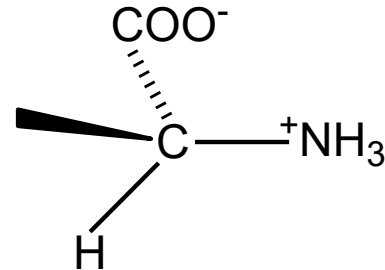
α -氨基酸



脯氨酸 (α -亚氨基酸)



甘氨酸



L-氨基酸的通式

氨基酸的分类



据R基团化学结构分类 { 脂肪族AA (R基为脂肪链, 可能含羟基、巯基或羧基、氨基)
杂环AA (His、Pro)
芳香族AA (Phe、Tyr、Trp)

据R基团极性分类 { 非极性R基团AA (8种)
极性R基团AA { 不带电荷 (7种)
带电荷: 正电荷 (3种) 负电荷 (2种)

据营养学分类 { 必需AA
非必需AA

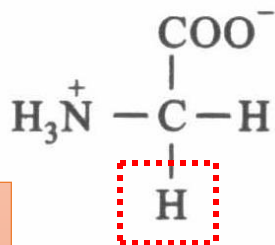
人的必需氨基酸

Lys Trp Phe
Val Met Leu
Ile Thr

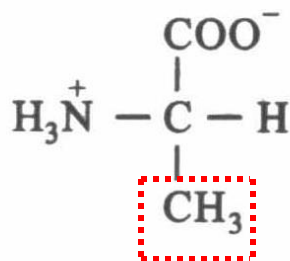
Arg、His (半必需)

据氨基、羧基数分类 { 中性: 一氨基一羧基AA
碱性: 二氨基一羧基AA (Lys、His、Arg)
酸性: 一氨基二羧基AA (Glu、Asp)

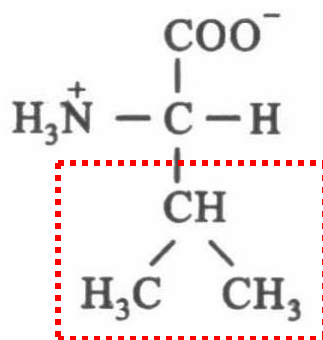
R侧链
中性的
脂肪族
氨基酸



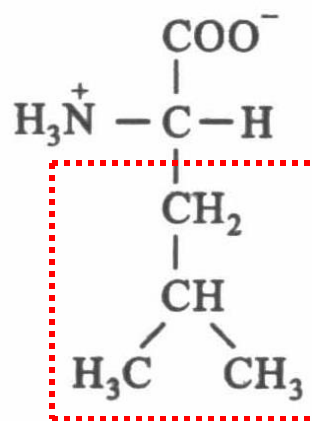
甘氨酸
(Gly,G)



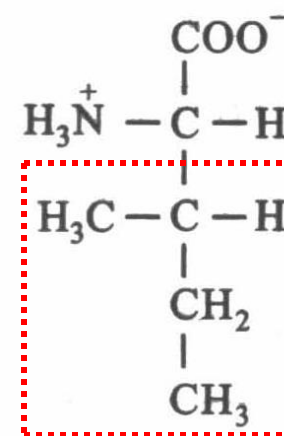
丙氨酸
(Ala,A)



缬氨酸
(Val,V)

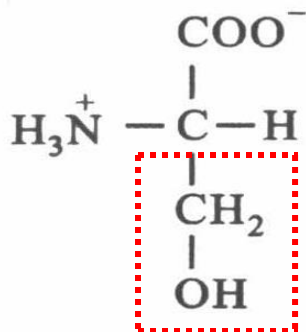


亮氨酸
(Leu,L)

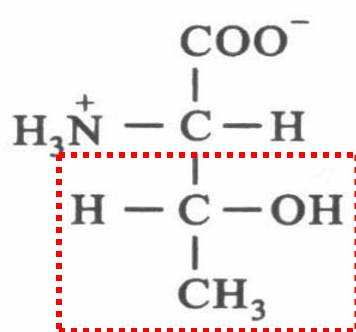


异亮氨酸
(Ile,I)

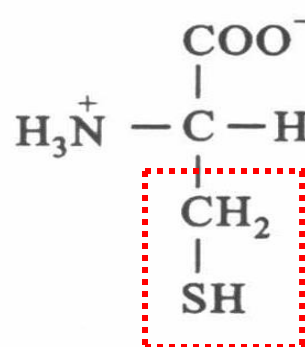
R侧链
含羟基
或硫的
脂肪族
氨基酸



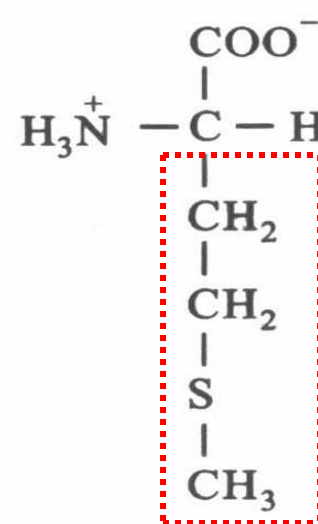
丝氨酸
(Ser,S)



苏氨酸
(Thr,T)

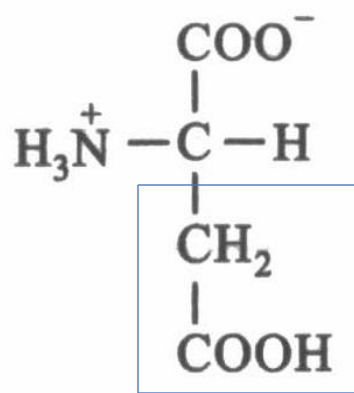


半胱氨酸
(Cys,C)

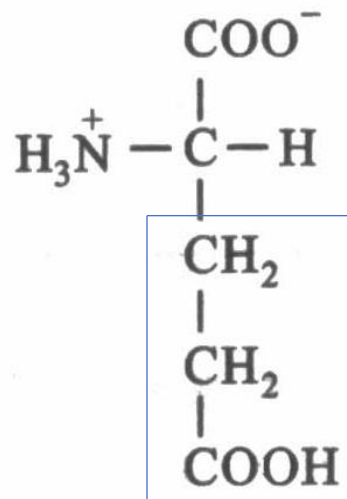


甲硫氨酸
(Met,M)

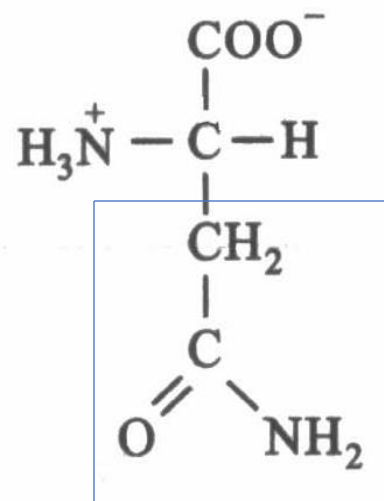
在生理pH条件下酸性氨基酸及酰胺



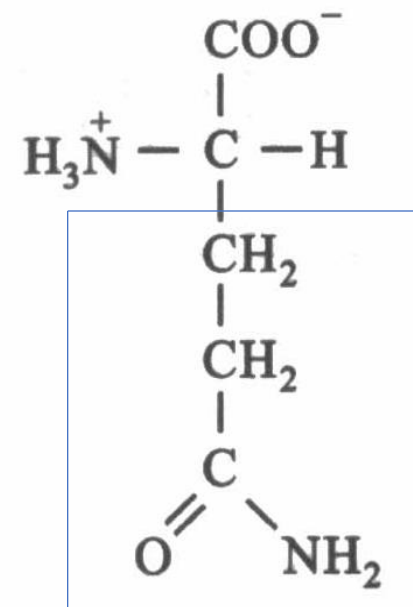
天冬氨酸
(Asp,D)



谷氨酸
(Glu,E)

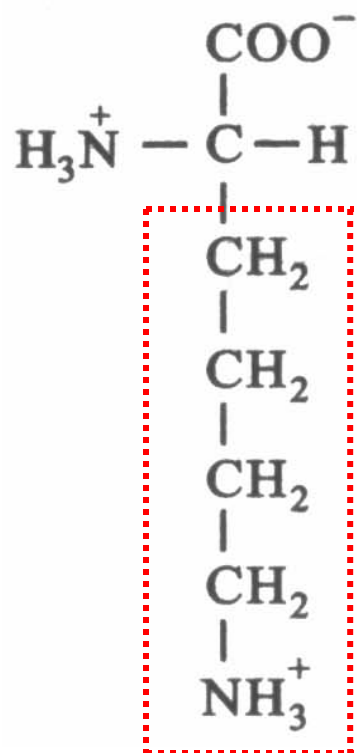


天冬酰胺
(Asn,N)

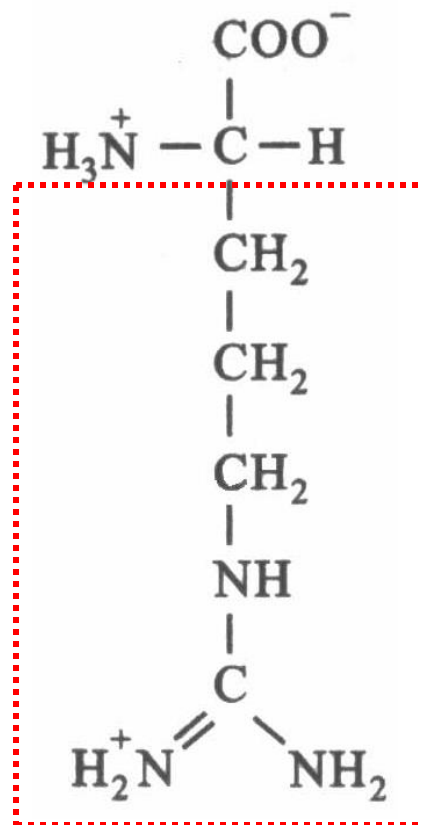


谷氨酰胺
(Gln,Q)

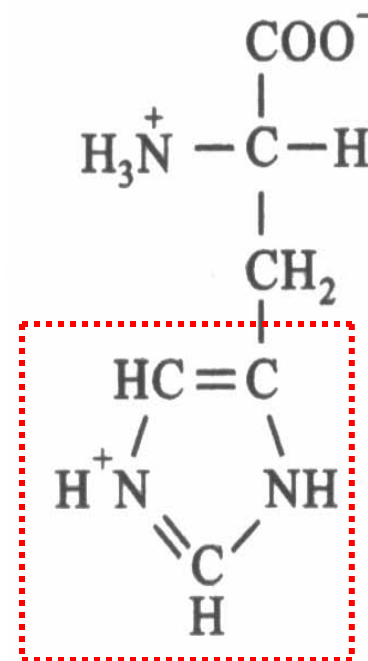
在生理pH条件下碱性氨基酸



赖氨酸
(Lys,K)



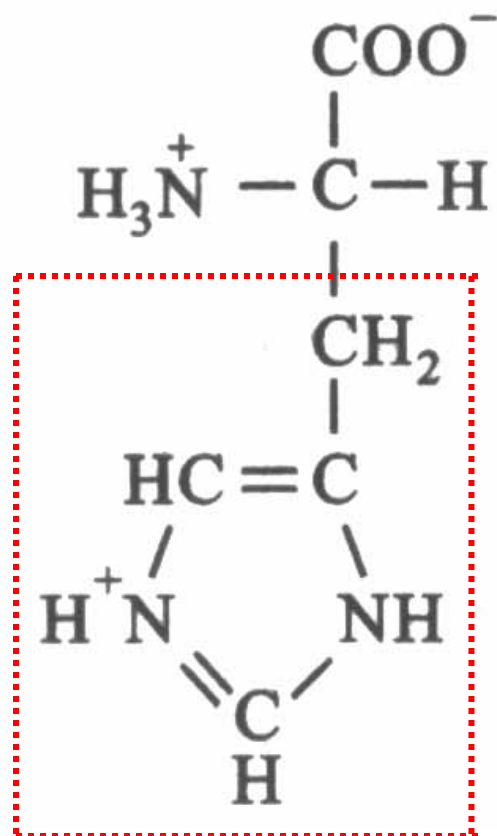
精氨酸
(Arg,R)



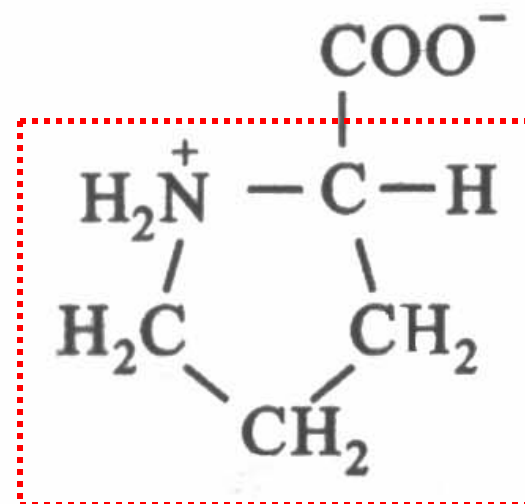
组氨酸
(His,H)

杂 环
氨基酸

杂环氨基酸

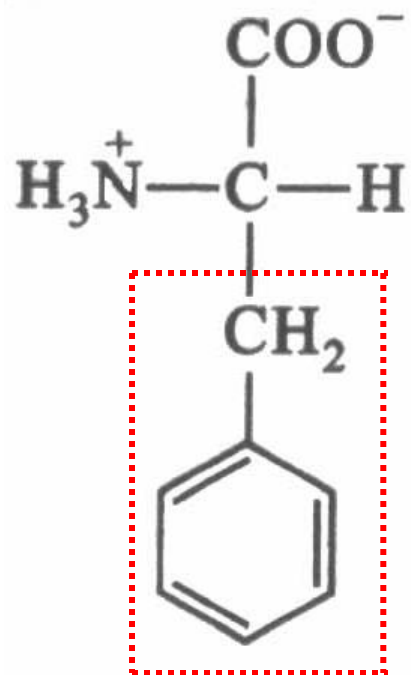


组氨酸 (His, H)

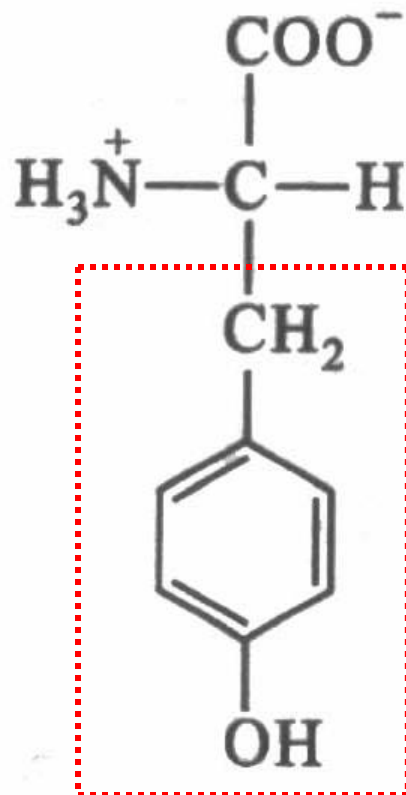


脯氨酸 (Pro, P)

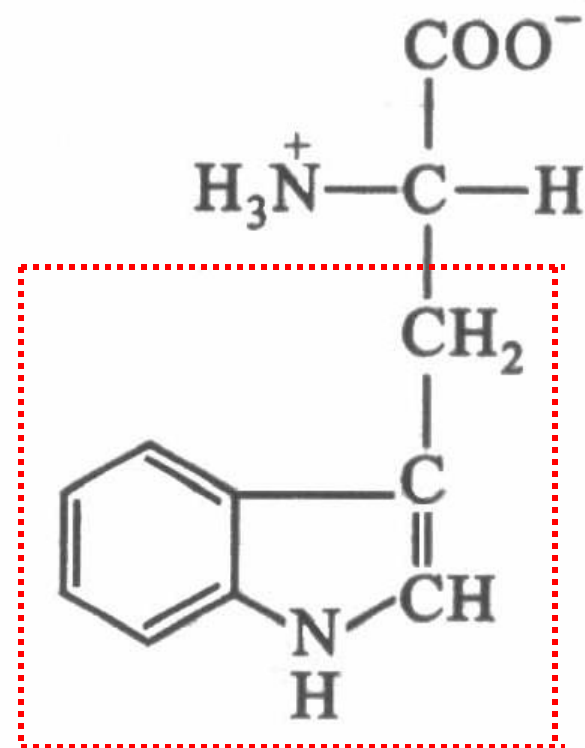
芳香族氨基酸



苯丙氨酸
(Phe,F)

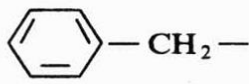
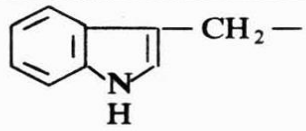
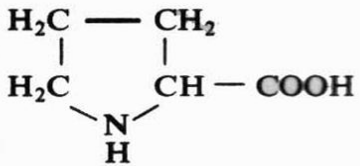


酪氨酸
(Tyr,Y)

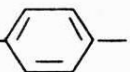


色氨酸
(Trg,W)

非极性R基团氨基酸

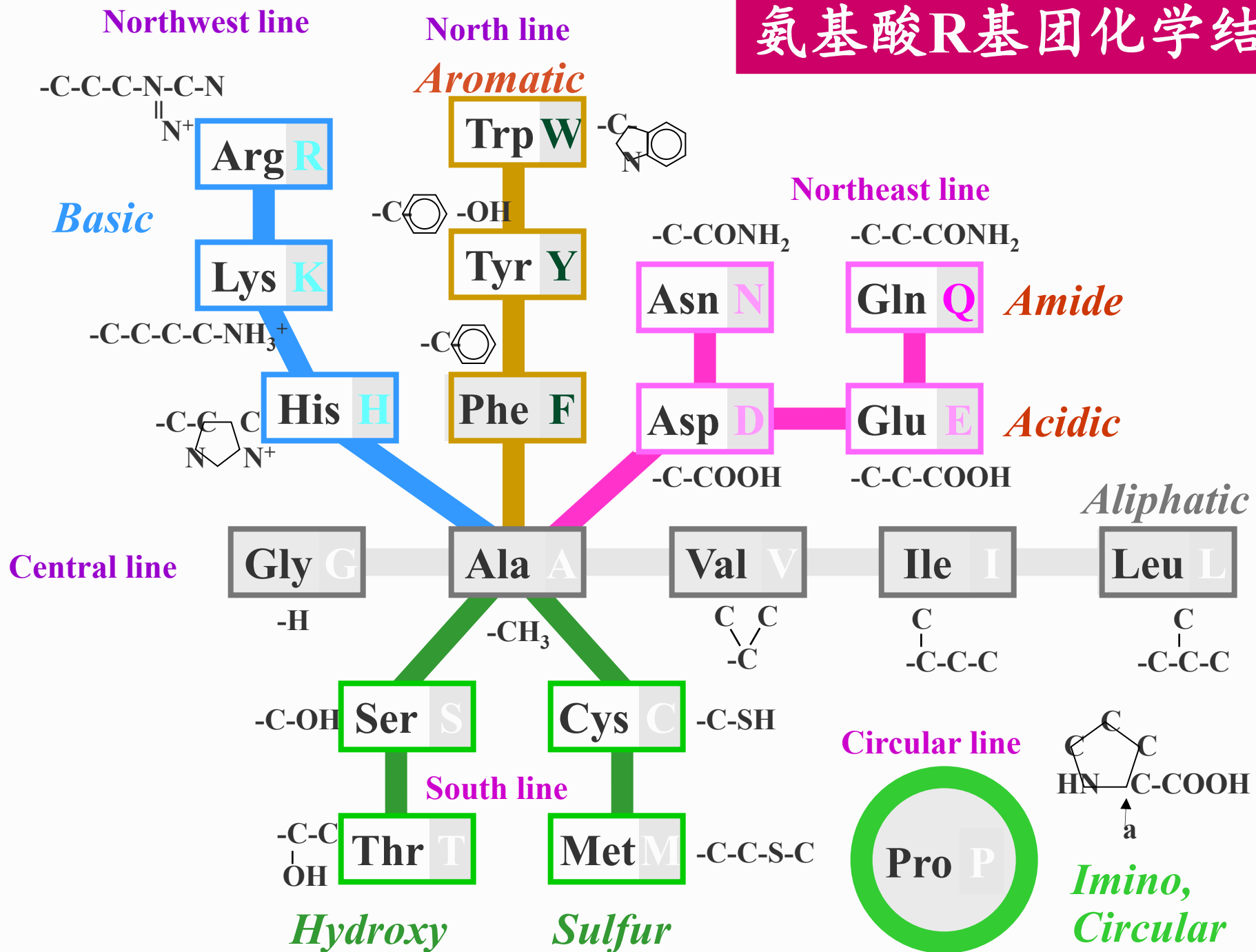
分类	氨基酸名称	三字符号	单字符号	中文简称	R基化学结构	等电点
非极性氨基酸	丙氨酸 (alanine)	Ala	A	丙	$\text{H}_3\text{C}-$	6.02
	缬氨酸 (valine)	Val	V	缬	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5.97
	亮氨酸 (leucine)	Leu	L	亮	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	5.98
	异亮氨酸 (isoleucine)	Ile	I	异亮	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	6.02
	苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe	F	苯丙	 $-\text{CH}_2-$	5.48
	色氨酸 (tryptophan)	Trp	W	色	 $-\text{CH}_2-$	5.89
	蛋氨酸 (甲硫氨酸) (methionine)	Met	M	蛋 (甲硫)	$\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	5.75
	脯氨酸 (proline)	Pro	P	脯		6.30

在生理pH条件下不带电荷极性R基团氨基酸

分类	氨基酸名称	三字符号	单字符号	中文简称	R基化学结构	等电点
不带电荷极性氨基酸	甘氨酸 (glycine)	Gly	G	甘	H—	5.97
	丝氨酸 (serine)	Ser	S	丝	HO—CH ₂ —	5.68
	苏氨酸 (threonine)	Thr	T	苏	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{CH} - \\ \\ \text{OH} \end{array}$	6.53
	半胱氨酸 (cysteine)	Cys	C	半胱	HS—CH ₂ —	5.02
	酪氨酸 (tyrosine)	Tyr	Y	酪	HO—  —CH ₂ —	5.66
	天冬酰胺 (asparagine)	Asn	N	天酰	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{CH}_2 - \end{array}$	5.41
	谷氨酰胺 (glutamine)	Gln	Q	谷酰	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \end{array}$	5.65



氨基酸R基团化学结构



第二节 氨基酸



非编码/标准氨基酸

1. 稀有氨基酸

稀有氨基酸是指存在于一些蛋白质中，没有遗传密码的L-型氨基酸，**多为标准氨基酸的衍生物。**

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；甲状腺素中的3, 5-二碘酪氨酸等。

2. 非蛋白质氨基酸

没有遗传密码，也不是构建蛋白质的成分的氨基酸，以游离状态存在，是合成标准氨基酸的前体物，或是代谢途径的中间物。

如瓜氨酸、鸟氨酸是尿素循环的中间物。

近年发现了**硒代半胱氨酸**和**吡咯赖氨酸**，参与蛋白质合成，有遗传密码，被标注为第21、22种氨基酸。

第二节 氨基酸



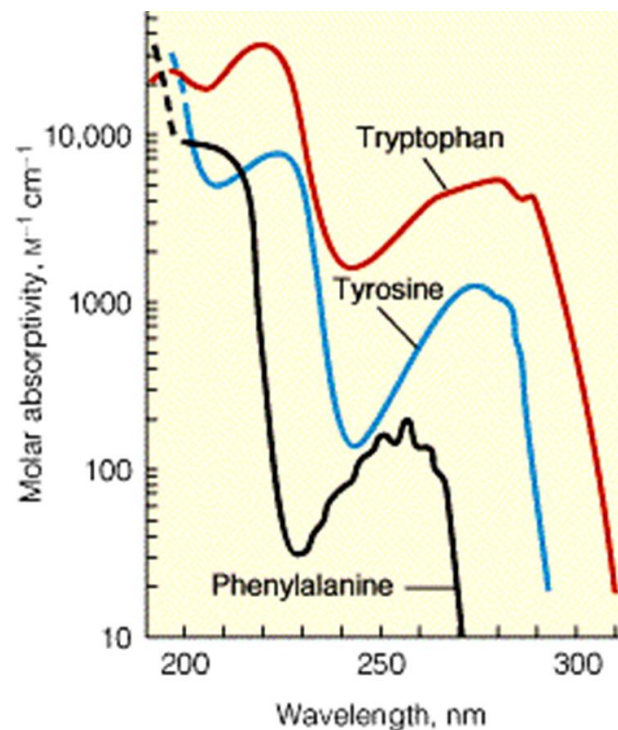
2. 氨基酸的理化性质

(1) 一般理化特性

常见 α -氨基酸均为无色无味的结晶，水中溶解度取决于R侧链。能溶于稀酸或稀碱，一般不溶解于有机溶剂。所以常用乙醇从溶液中沉淀氨基酸。

(2) 光吸收特性

20种常见的氨基酸在可见光均无光吸收，由于Phe、Tyr和Trp存在 π - π 共轭双键($C=C-C=C$)，所以在紫外区Phe、Tyr和Trp有光吸收，最大光吸收波长分别为259 nm、278 nm和279 nm。



第二节 氨基酸



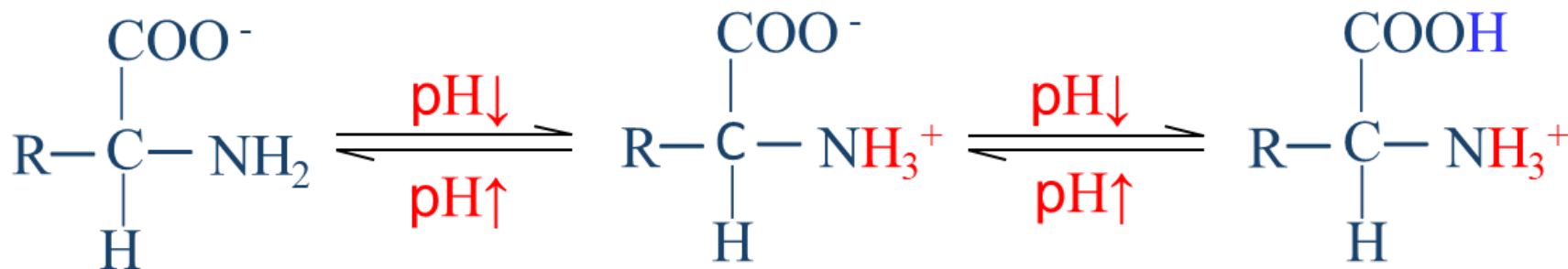
(3) 两性解离及等电点

氨基酸是两性电解质，同时具备酸碱特征，其解离程度取决于溶液的酸碱度。

等电点(isoelectric point, pI)

在某一pH的溶液中，氨基酸解离成阳离子和阴离子的趋势及程度相同，成为兼性离子，呈电中性，此时溶液的pI值称为该氨基酸的等电点。

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 氨基酸



(4) 氨基酸的一些重要化学反应

茚三酮显色反应

由氨基酸的 α -NH₂和 α -COOH参与反应，发生氧化脱氨、脱羧反应，产生蓝紫色物质。但脯氨酸反应产生黄色。此反应灵敏，蓝紫色的深浅与AA含量成比例，在570nm波长下进行比色就可测定氨基酸的含量。常用于定性、定量测定氨基酸。

Sanger反应

弱碱性条件下， α -氨基与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 氨基酸



Edman反应

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

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

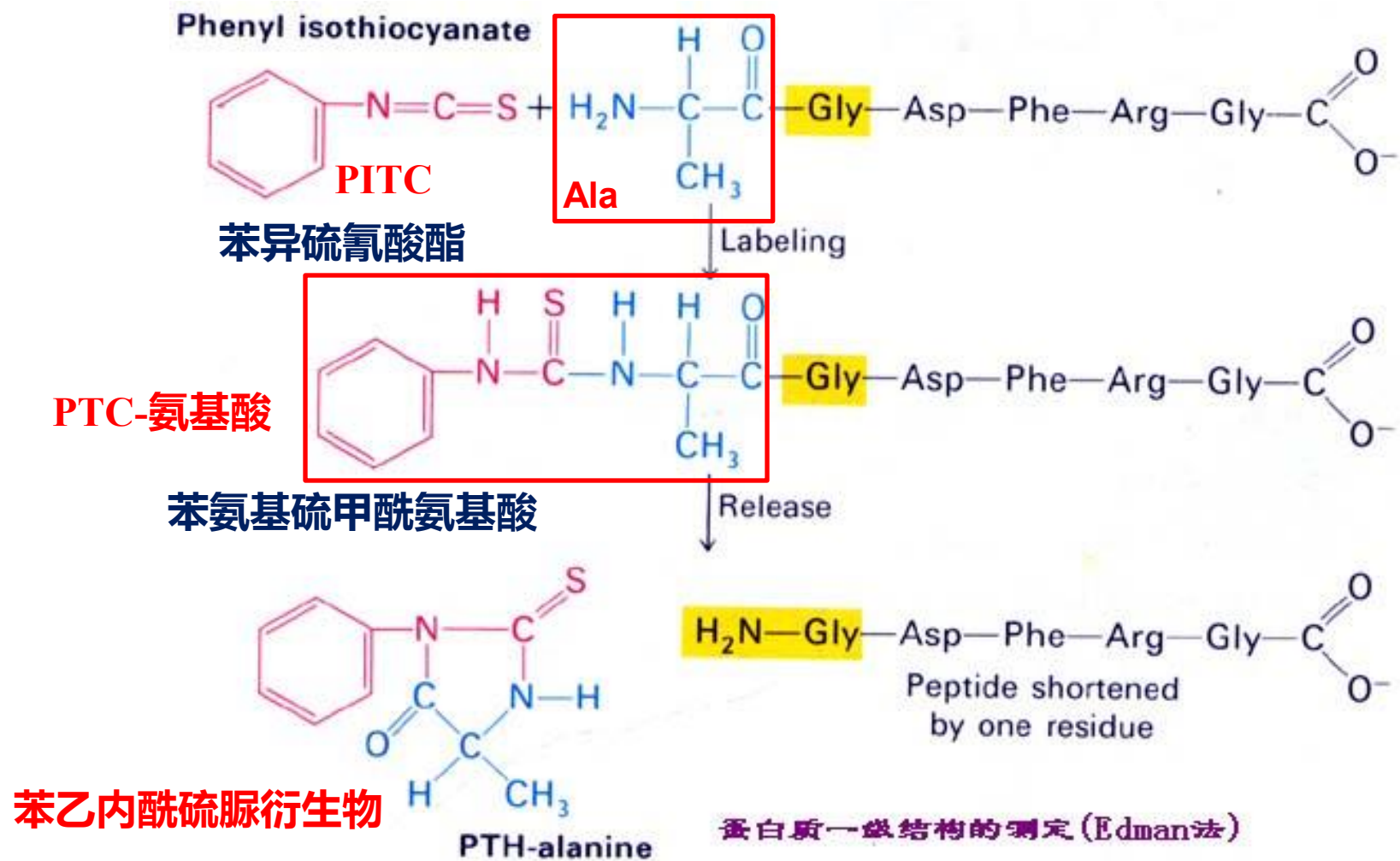
多肽链N-末端的 α -氨基也有Edman反应，生成PTC-肽，并在酸解时放出末端的PTH-氨基酸。使的肽链的N-末端少一个氨基酸残基。鉴定释放出的PTH-氨基酸就可以确定肽链N-末端氨基酸的种类。

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 氨基酸



Edman反应



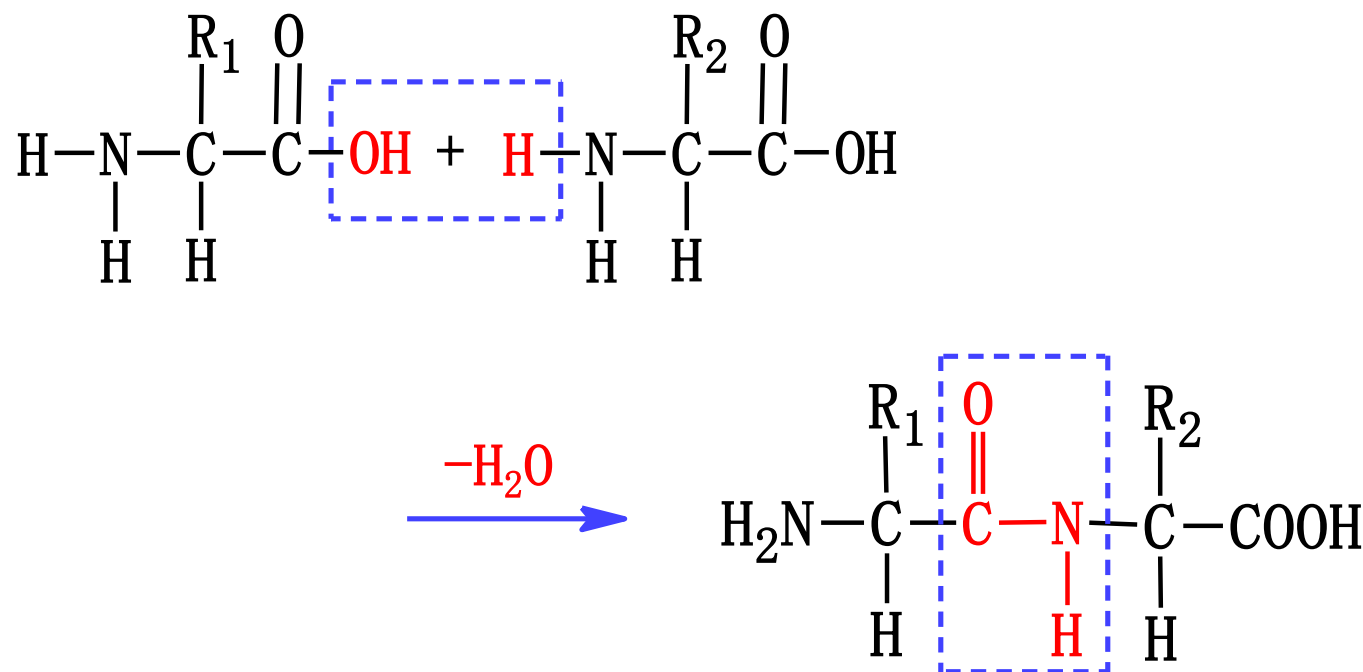
第三节 肽



1. 肽

肽(peptide)是氨基酸 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基缩合形成的化合物。

肽链中两个氨基酸残基之间的C-N(酰胺)键称为**肽键(peptide bond)**。

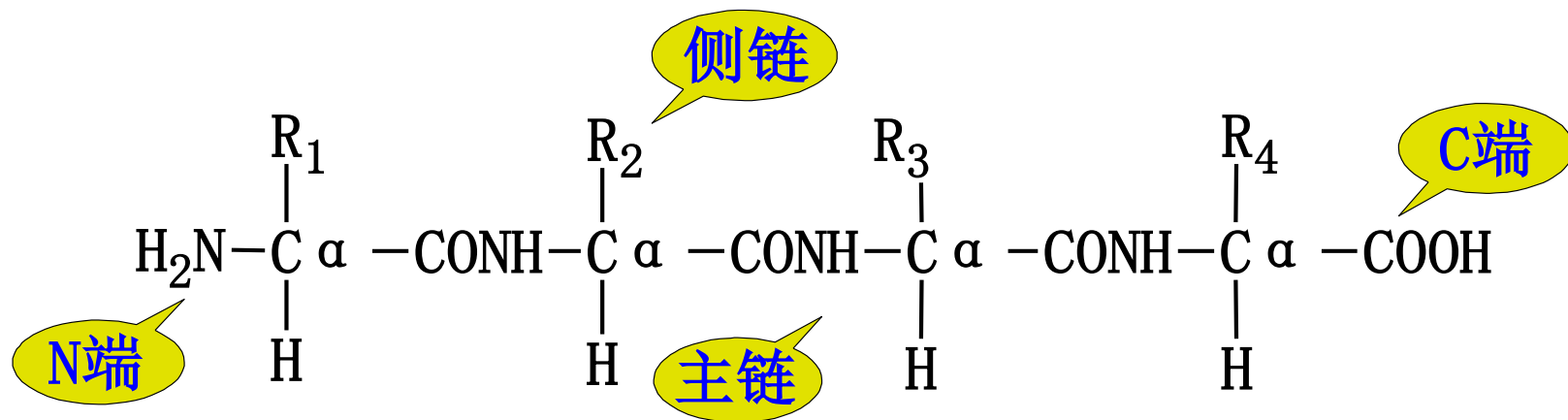


第三节 肽



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。

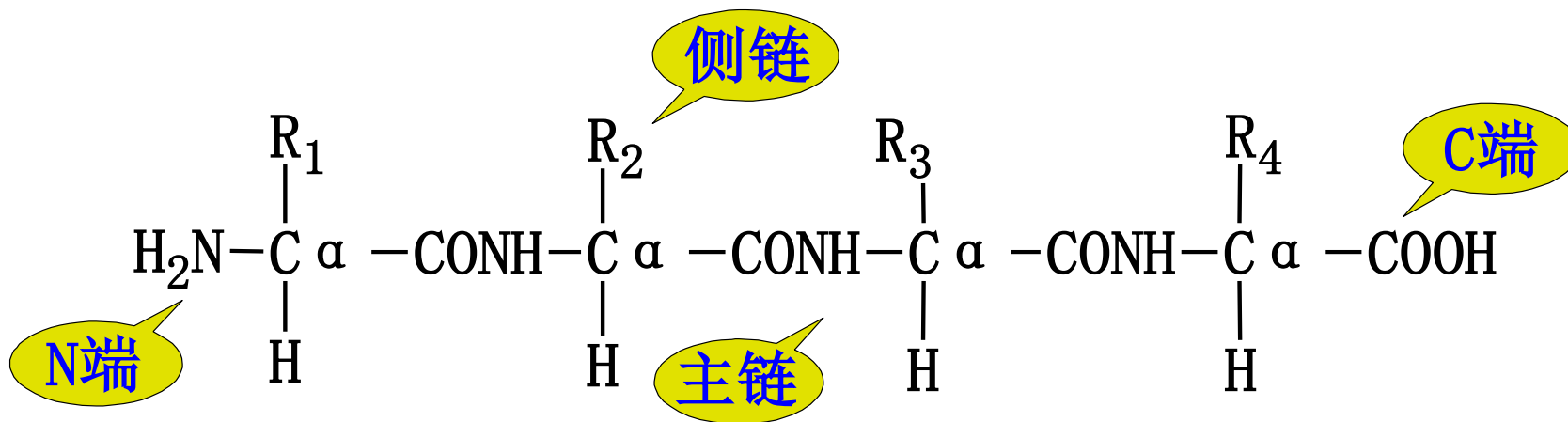


第三节 肽



肽链中的氨基酸分子因为脱水缩合而基团不全，被称为**氨基酸残基**(amino residue)。

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**。



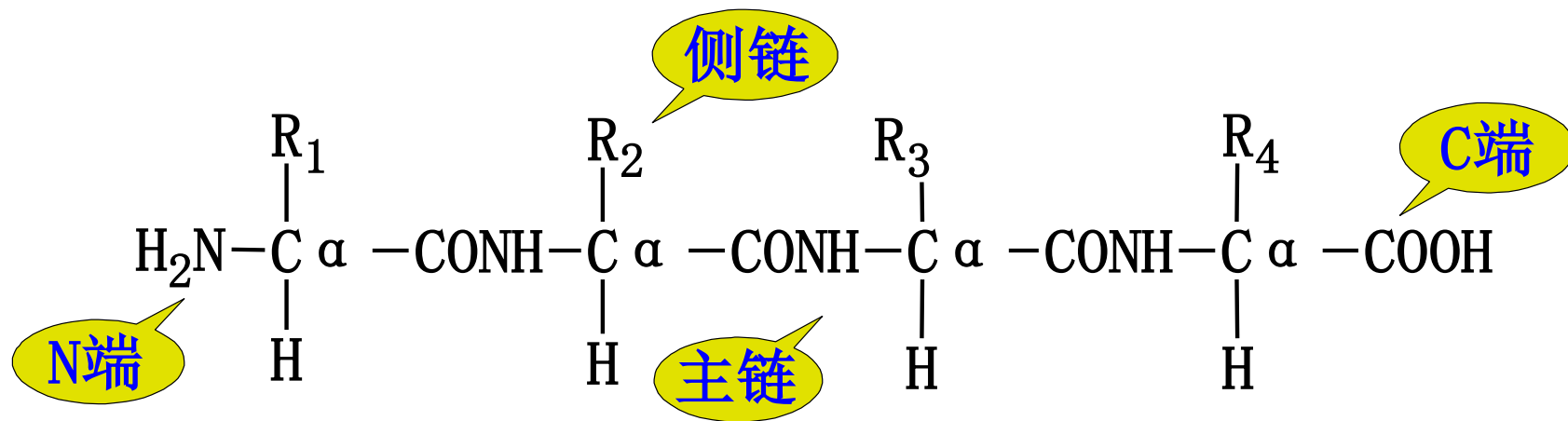
第三节 肽



多肽链具有方向性

N-端：含游离 α -氨基端，也称氨基端

C-端：含游离 α -羧基端，也称为羧基端



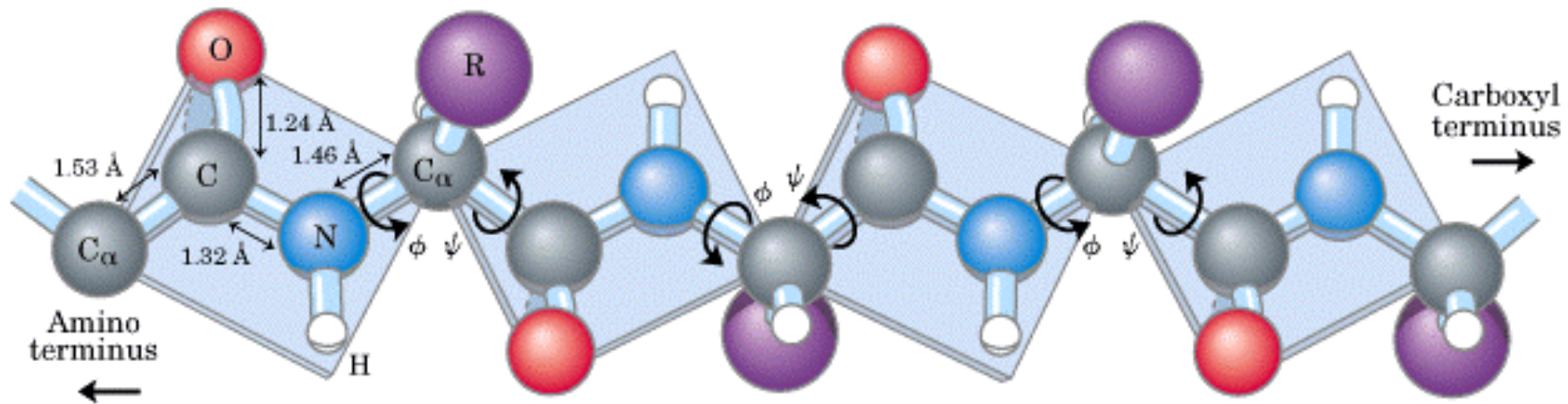
第三节 肽



肽平面(peptide plane)

肽键的特点是氮原子上的电子与羰基具有明显的共轭作用。因此其前后六个原子都躺在同一平面上，称为**肽平面**。

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)**。

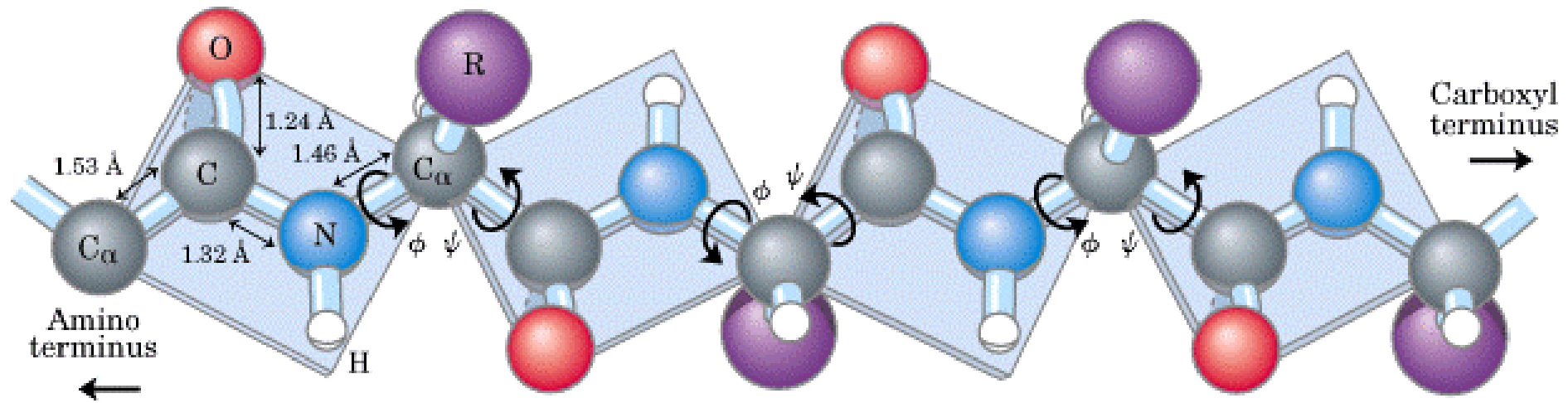


第三节 肽



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**。



第四节 蛋白质的分子结构



蛋白质的分子结构

蛋白质 (protein) 是由多个**氨基酸**通过**肽键**相连形成具有**特定空间结构和生物学功能**的高分子有机物。

蛋白质的功能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。

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**。**构象的变化不涉及共价键的断裂**。

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。

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



蛋白质的结构层次包括

一级结构（多肽链上的氨基酸排列顺序）

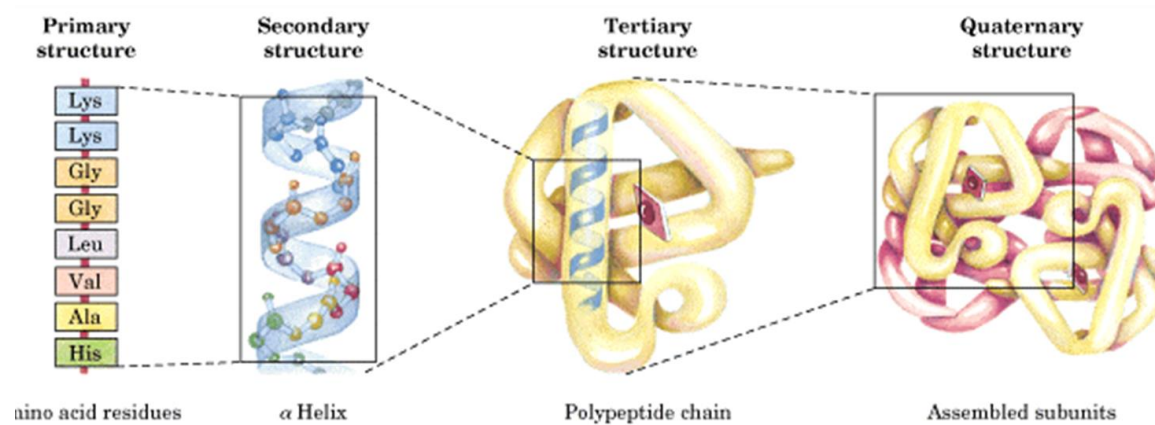
二级结构（多肽链主链骨架的局部空间结构）

超二级结构（二级结构单位的集合体）

结构域（多肽链上可以明显区分的球状区域）

三级结构（多肽链上所有原子和基团的空间排布）

四级结构（由球状亚基或分子缔合而成的集合体）



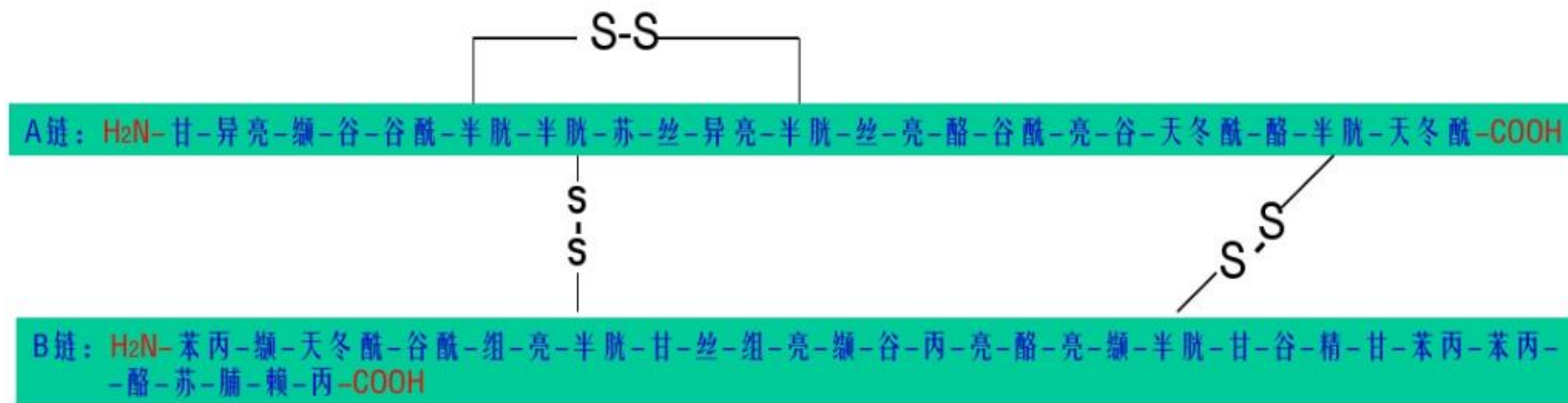
第四节 蛋白质的分子结构



1. 蛋白质的一级结构

蛋白质 (protein) 的一级结构指氨基酸组成、氨基酸序列、多肽链数目以及二硫键的位置等。

主要化学键：肽键，有些蛋白质还包括二硫键。



牛胰岛素一级结构

第四节 蛋白质的分子结构



2. 蛋白质的二级结构

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，即该段肽链主链骨架原子的相对空间位置，**不涉及氨基酸残基侧链的位置**。

主要的化学键：氢键

蛋白质二级结构的主要形式：

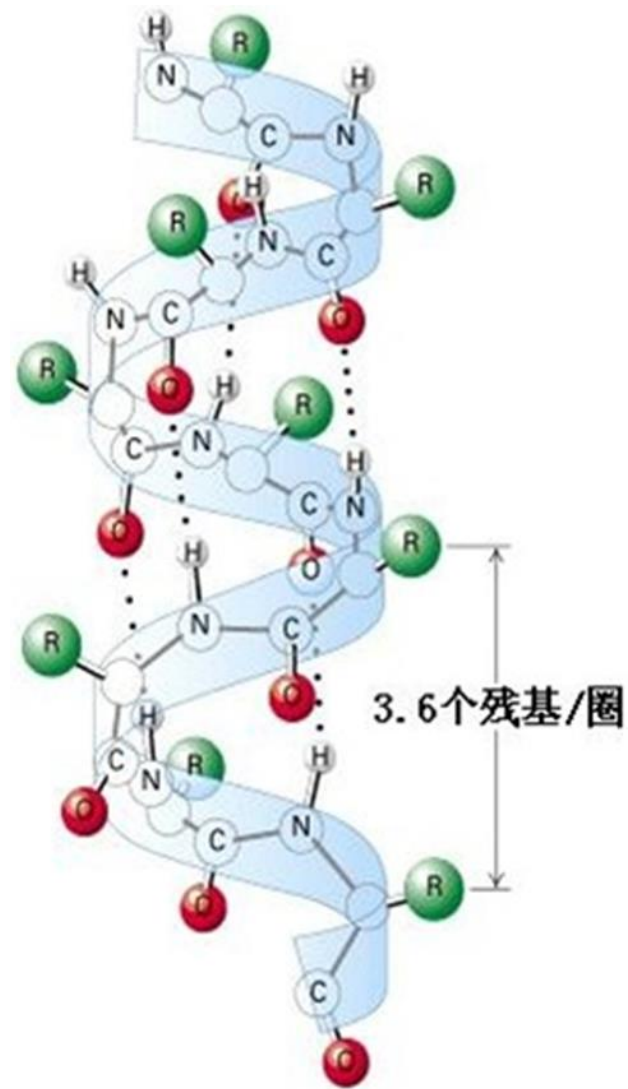
- α -螺旋 (α -helix)
- β -折叠 (β -pleated sheet)
- β -转角 (β -turn)
- 无规则卷曲 (random coil)

第四节 蛋白质的分子结构



(1) α -螺旋(α -helix)

- 是角蛋白中最常见的构象，为右手螺旋；每圈含有3.6个氨基酸残基，螺距为0.54 nm；主链内部形成氢键，不涉及R侧链。
- 典型的 α -螺旋又称为 3.6_{13} 螺旋，一个螺旋含3.6个氨基酸，氢键封闭环本身包含13个原子。
- AA残基的R基均伸向螺旋外侧，侧链R基的不同，氨基酸在肽链中 α -螺旋的倾向性不同，影响 α -螺旋的形成和稳定。

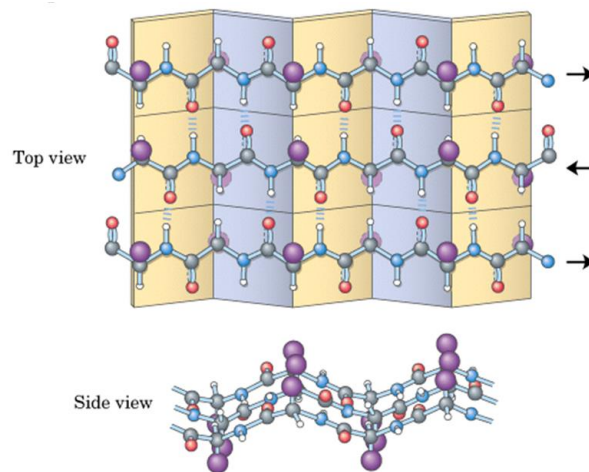
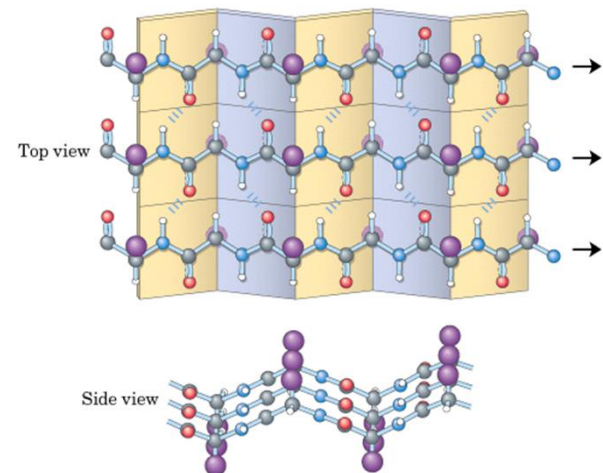
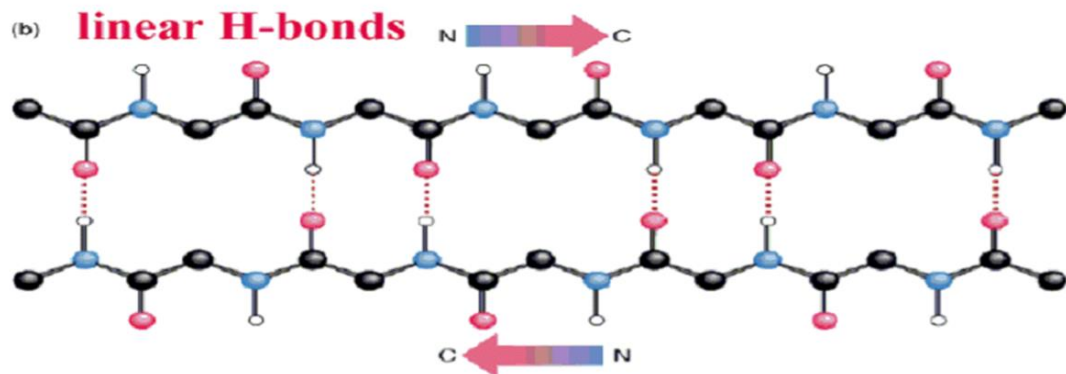
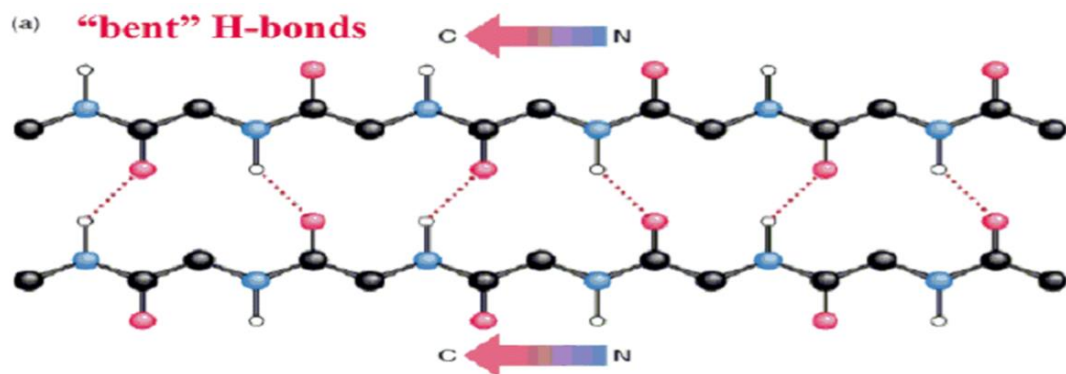


第四节 蛋白质的分子结构



(2) β -折叠

存在于丝心蛋白、角蛋白。呈平行的或反平行的伸展构象。主链之间形成H键，侧链基团R交替地位于片层的上、下。



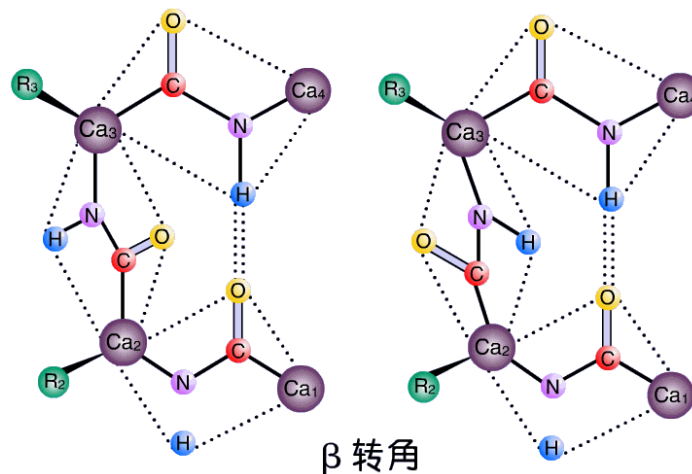
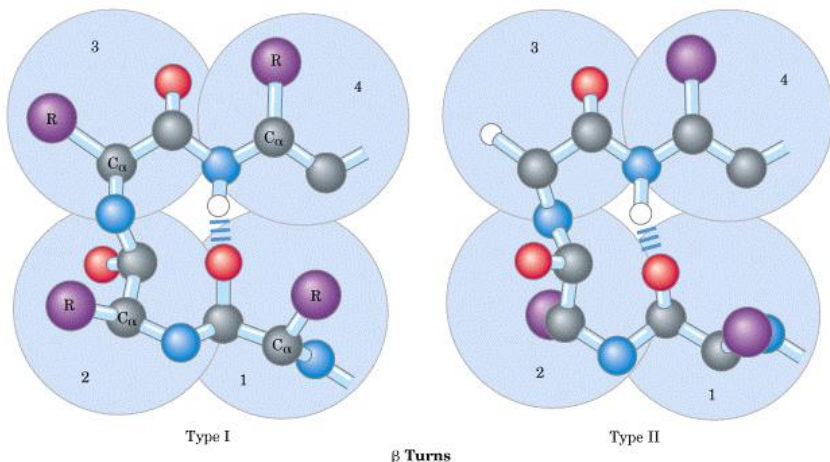
第四节 蛋白质的分子结构



(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羰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个氨基酸残基的羰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。

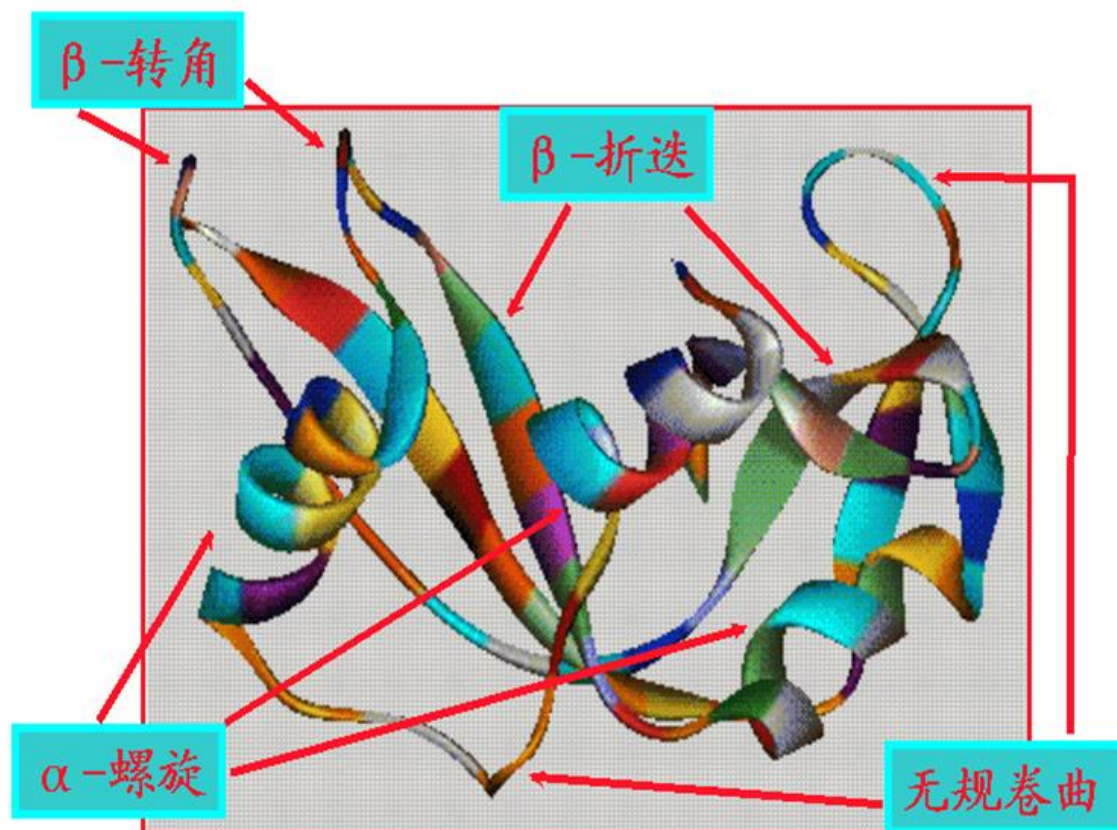


第四节 蛋白质的分子结构



(4) 无规则卷曲(random coil)

指蛋白质的肽链中没有确定规律性的那部分肽段构象。



根据二级结构的蛋白质分类

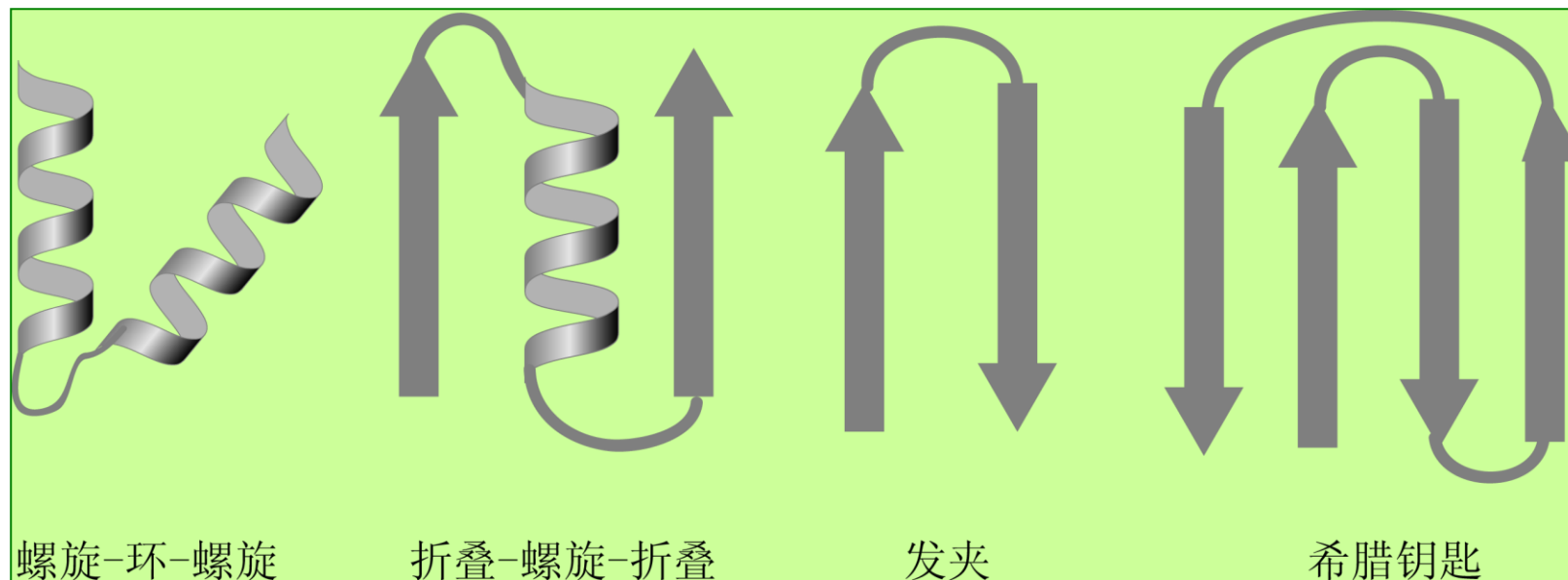
类型	二级结构种类	举例
α 型	只含 α -螺旋结构	肌红蛋白
		血红蛋白
β 型	只含 β -折叠结构	免疫球蛋白
$\alpha+\beta$ 型	α -螺旋结构和 β -折叠结构肽段相独立	胰岛素、溶菌酶
α/β 型	α -螺旋结构和 β -折叠结构相间存在	磷酸丙糖异构酶
		黄素氧还蛋白

第四节 蛋白质的分子结构



(5) 超二级结构 (super secondary structure)

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，超二级结构又称**基序或模体 (motif)**，是充当更高层次结构的构件。



四种类型的超二级结构

第四节 蛋白质的分子结构



(6) 结构域 (domain)

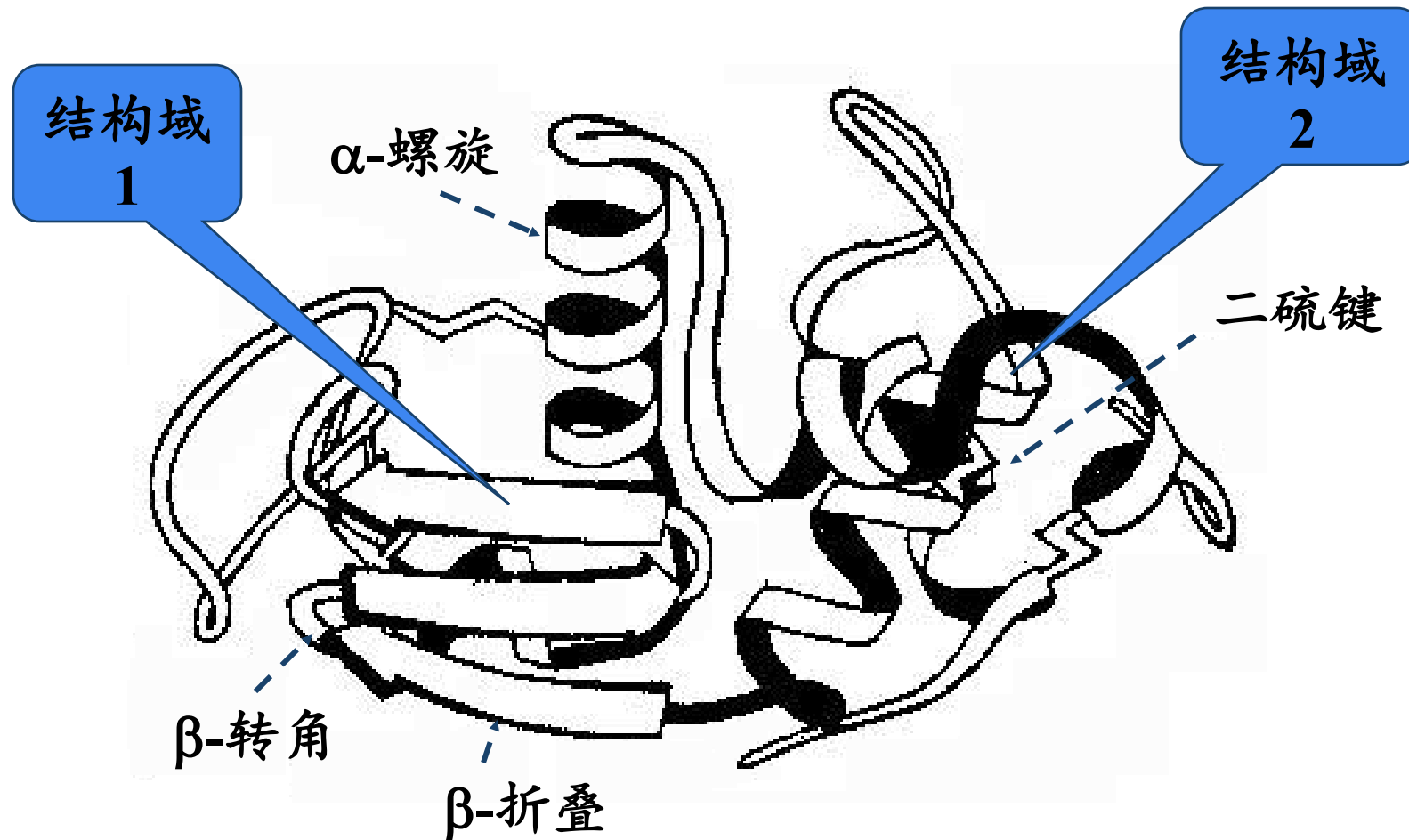
在二级结构或超二级结构的基础上，形成三级结构中相对独立，与蛋白质生理功能有密切相关的局部折叠区。

结构域的概念有三种不同而又相互联系的涵义:即**独立的结构单位**、**独立的功能单位**和**独立的折叠单位**。

类型： α -螺旋域； β -折叠域； $\alpha+\beta$ 域； α/β 域；无规则卷曲+ β -回折域；无规则卷曲+ α -螺旋结构域

结构域形成的意义：结构域本身都是紧密装配的，结构域之间通过松散的肽键形成牢固而又柔韧的连接，为域间较大幅度的相对运动提供了可能，这种结构调整与其整体功能的行使密切相关

卵溶菌酶的三级结构中的两个结构域



第四节 蛋白质的分子结构

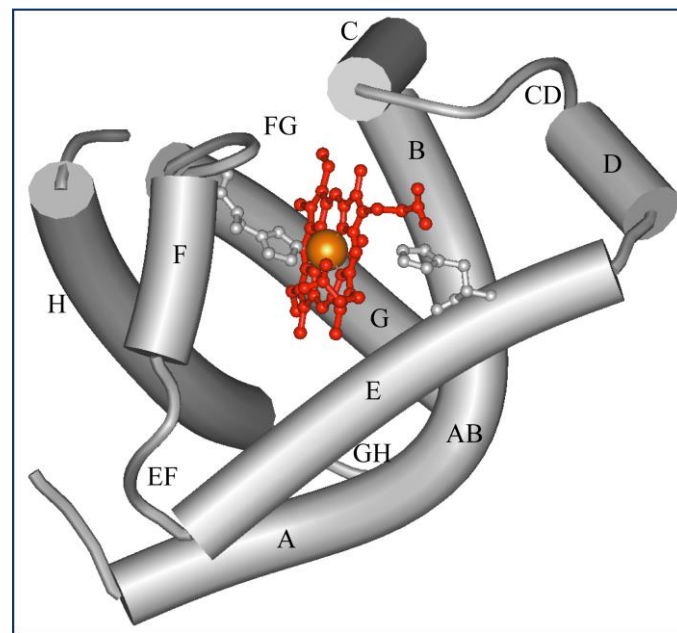


3. 三级结构

三级结构 (tertiary structure)：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**主链和侧链中所有原子在内的、近似球状的紧密结构**。

特征：

- 含多种二级结构单元；
- 有明显的折叠层次；
- 是紧密的球状或椭球状实体；
- 分子表面有一空穴(活性部位)；
- 疏水侧链埋藏在分子内部，
- 亲水侧链暴露在分子表面。



肌红蛋白的三级结构及其结合的血红素亚基

第四节 蛋白质的分子结构



肌红蛋白的结构与功能：

肌红蛋白的生物功能是在肌肉中储存和供应氧。

肌肉中，氧浓度一般在0-10mmHg，Mb必需具备在低氧环境中可逆结合氧的能力。

Mb要有怎样的空间结构才具备这样的能力？

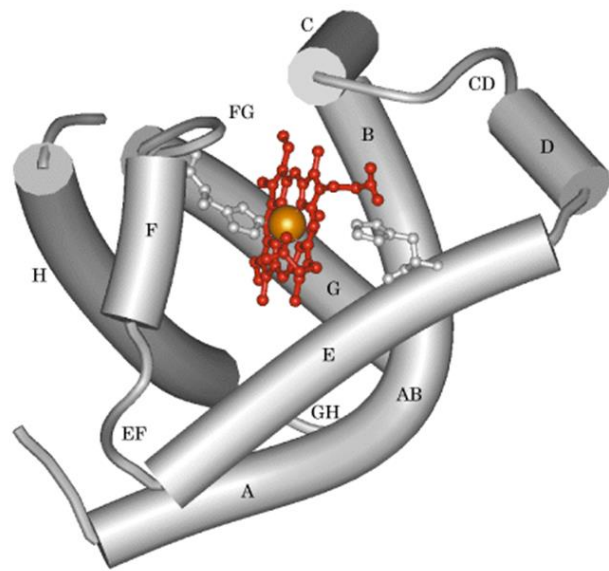
第四节 蛋白质的分子结构



肌红蛋白的结构与功能：

肌红蛋白相对分子质量为16700，尤为一条含有153个氨基酸残基的多肽链和一个血红素组成。

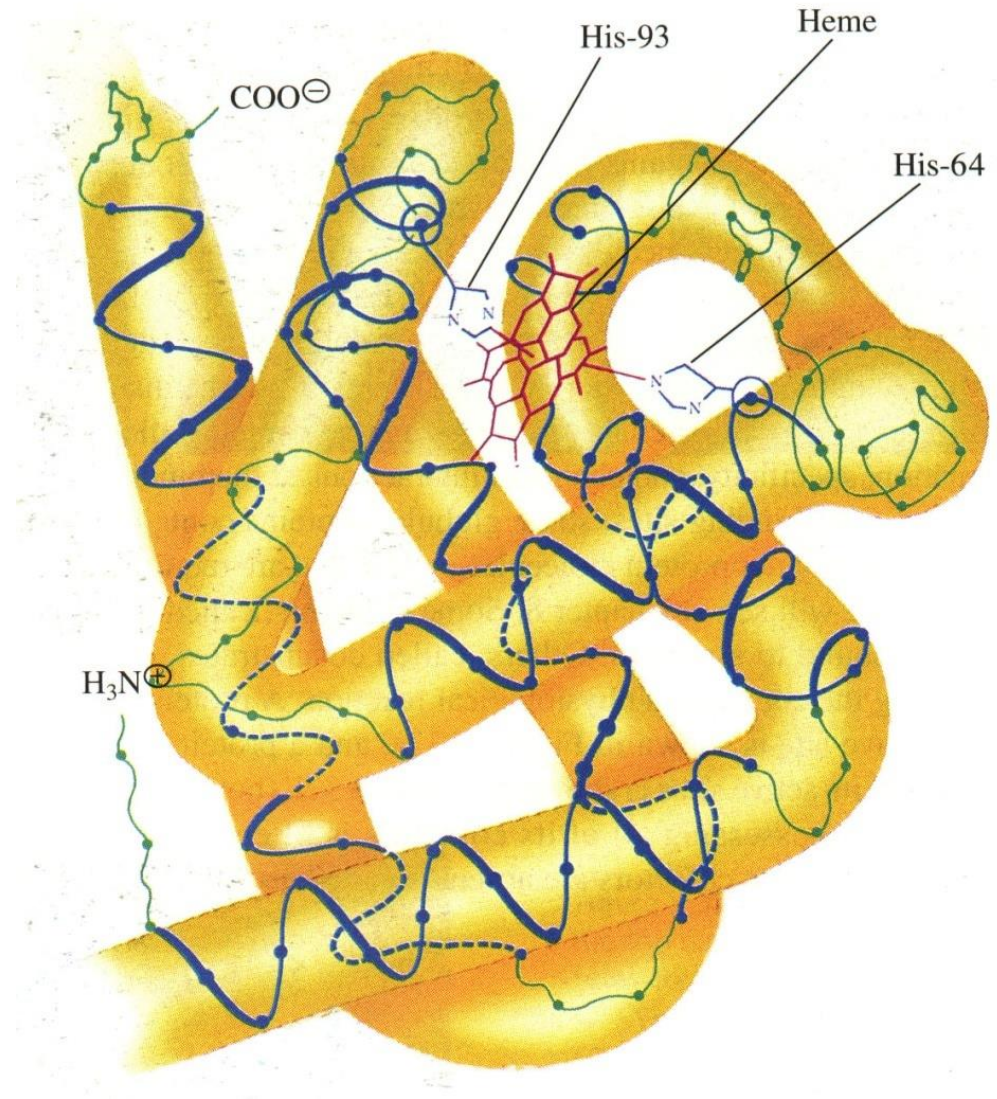
肌血红蛋白分子致密紧实，呈扁平状；有8段 α -螺旋，占多肽链的75%；分子内部多为疏水性氨基酸残基或极性氨基酸残基的疏水部分。



第四节 蛋白质的分子结构



肌红蛋白最突出的特点是分子表面有一个多肽链折叠成的**疏水裂隙**，主要由Val68和Phe43的侧链组成，还有两个His，一个离血红素近的称为近端，远一些的称为远端His；**裂隙中嵌有血红素（Heme）**。



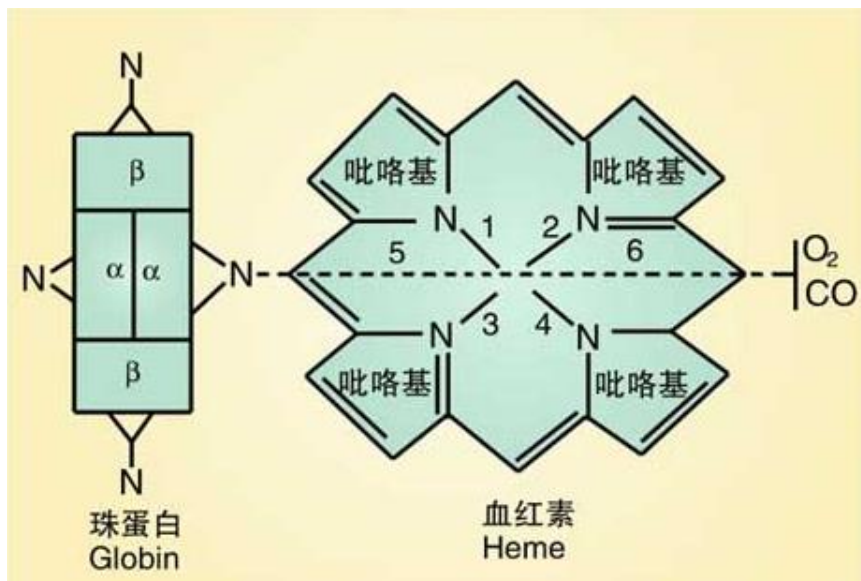
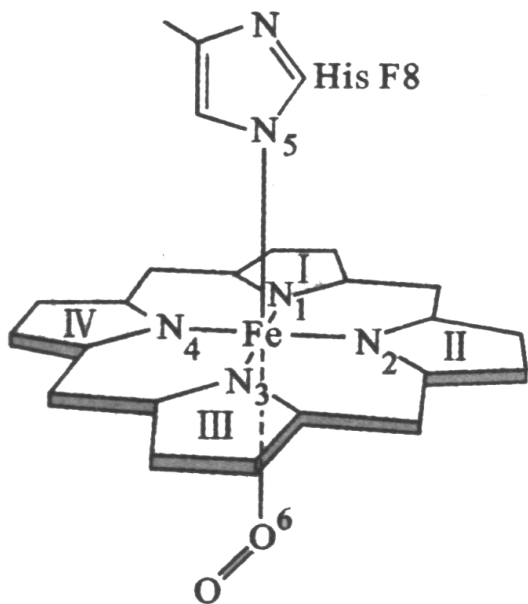
第四节 蛋白质的分子结构



血红素由一个有机分子（原叶啉）和Fe原子组成。

原叶啉，由4个吡咯环通过亚甲基桥联而成，连着4个甲基，2个乙烯基和2个丙酸基团。

Fe原子位于原叶啉环的中央，以4个配位键分别于吡咯氮原子相连，第5个位点被近端His93的咪唑环占据，**第6个位点为氧结合位点。**



第四节 蛋白质的分子结构



分子伴侣

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**，但本身不构成蛋白质的组成部分。

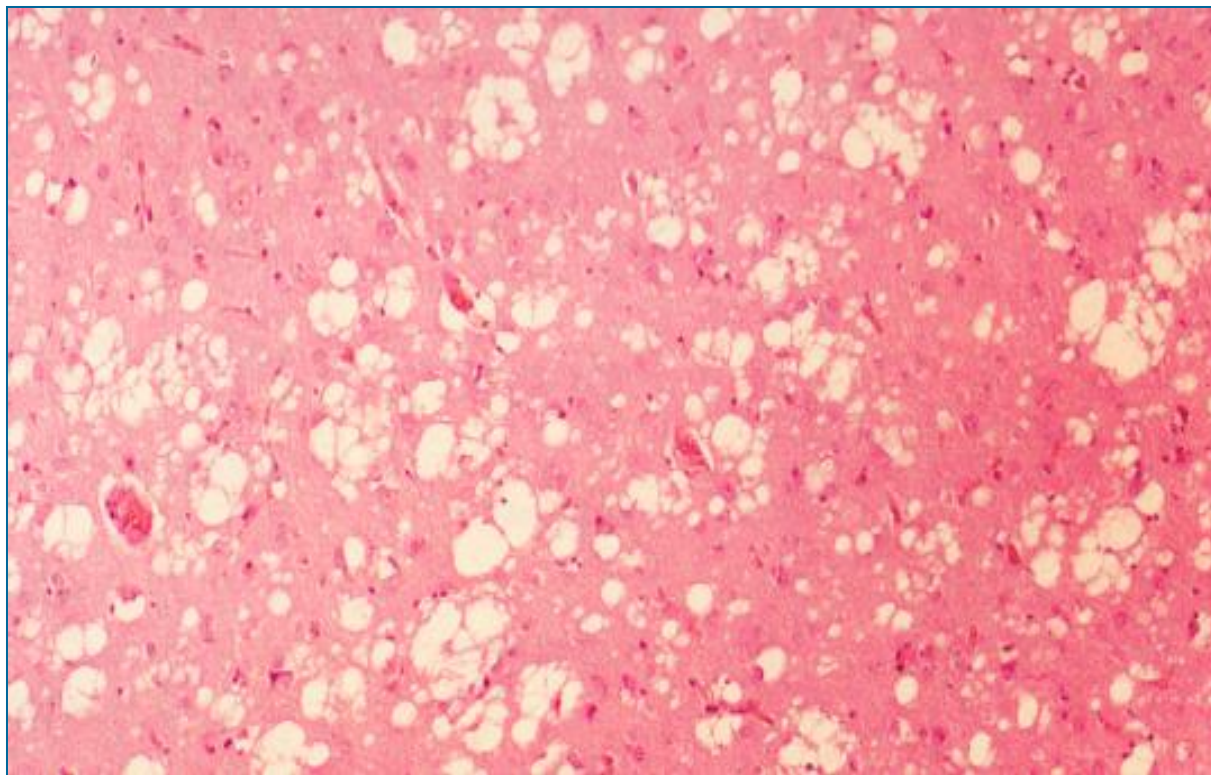
分子伴侣通过提供一个保护环境从而加速蛋白质折叠成天然构象或形成四级结构。

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，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。



疯牛病(BSE)可能是由于
朊蛋白 (Pron protein,
PrP) 的错误折叠引起的,
被认为是一种**构象病**。



疯牛病病牛的海绵样脑组织

第四节 蛋白质的分子结构

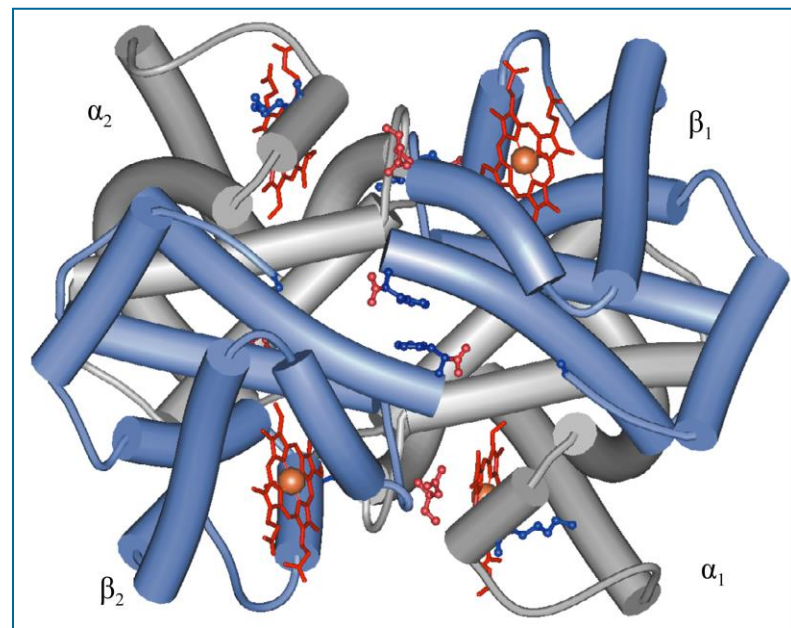


4. 四级结构 (quaternary structure)

有些蛋白质分子含有二条或多条肽链，每一条肽链都具有三级结构，称为蛋白质的**亚基(subunit)**。亚基本身都具有球状三级结构，一般只包含一条多肽链，也有的由二条或二条以上由二硫键连接的肽链组成。

四级结构指由相同或不同的称作亚基 (subunit) 的**亚单位**按照一定排布方式缔合而成的蛋白质结构，维持四级结构稳定的作用力是**疏水键、离子键、氢键、范德华力**。

对称性是四级结构蛋白质最重要的性质之一。



血红蛋白的四级结构

第四节 蛋白质的分子结构

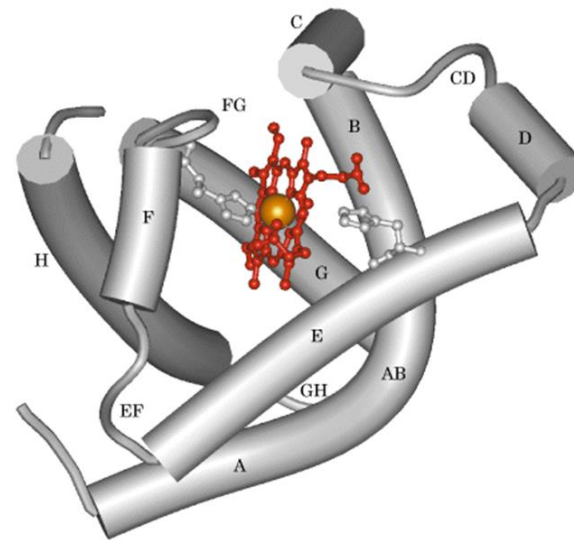
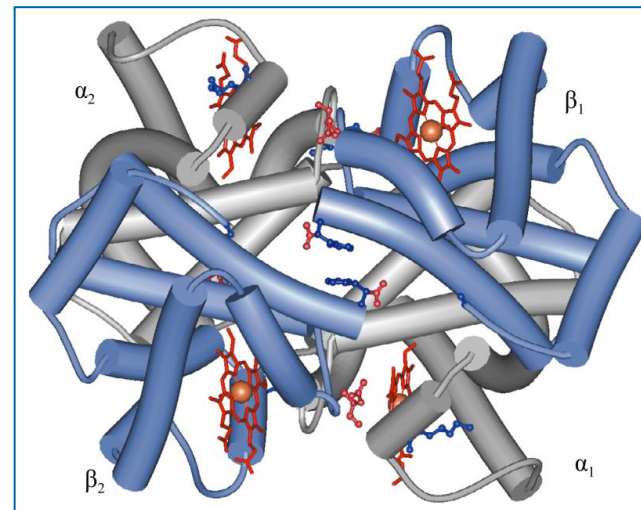


4. 四级结构 (quaternary structure)

四级缔合在结构和功能上有很多优越性：

- 增强结构稳定性；
- 提高遗传经济性和效率；
- 使催化剂基团汇集在一起；
- 具有**协同效应**和**别构效应**（血红蛋白）。

血红蛋白由4个亚基组成 ($\alpha_2\beta_2$)，
每个亚基都与肌红蛋白非常相似。



第四节 蛋白质的分子结构与功能



蛋白质复杂的组成和结构是其多种多样生物学功能的基础；而蛋白质独特的性质和功能则是其结构的反映。研究生物大分子如蛋白质、核酸的结构和功能的关系，是探索生命奥秘的突破口，是从分子水平上认识生命现象的最终目标。

一、蛋白质一级结构决定其高级结构

二、蛋白质的一级结构与功能

- 1、同功能蛋白质中氨基酸顺序的种属差异与分子进化
- 2、蛋白质一级结构差别愈小，其功能相似性愈大
- 3、一级结构上的细微变化可直接影响其功能

三、蛋白质的空间结构和功能

- 1、血红蛋白的结构与功能
- 2、肌红蛋白的结构与功能

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. 同功能蛋白质一级结构的种属保守性与分子进化

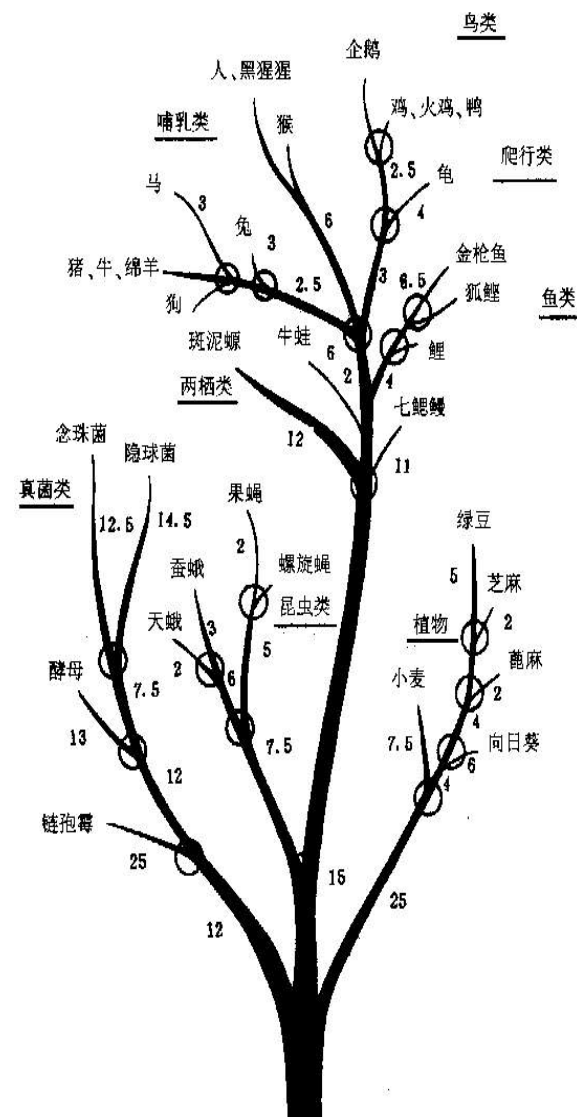
同功能蛋白质（或称同源蛋白质）是指来自不同生物的具有相同生物学功能的蛋白质。**即同祖先蛋白。**

同功能蛋白质在种属之间的氨基酸差异大小，常与这些种属在进化位置的差距相平行。

①不同物种的Cyt c一级结构由104~114个氨基酸残基组成，亲缘关系愈远，一级结构差别愈大。

生物 与人不同的AA数目

黑猩猩	0
恒河猴	1
兔	9
袋鼠	10
牛、猪、羊、狗	11
马	12
鸡、火鸡	13
响尾蛇	14
海龟	15
金枪鱼	21
角饺	23
小蝇	25
蛾	31
小麦	35
粗早链孢霉	43
酵母	44



第五节 蛋白质结构与功能的关系



比较各种动物胰岛素一级结构及其活性发现：

胰岛素是由51个氨基酸组成的双链(A、B链)蛋白激素，A链含有21个氨基酸，B链有30个氨基酸。两条肽链之间由两个二硫键连接，A链的第6和第11位氨基酸残基之间也由二硫键相连。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



一些哺乳动物胰岛素一级结构及其活性的差异

名称	A8	A9	A10	B30	与人的差异数	活性
人	Thr	Ser	Ile	Thr	-	
猪	-	-		Ala	1	
抹香鲸	-	-		Ala	1	
马	-	Gly		Ala	2	↓
象	-	Gly	Val		2	↓
牛	Ala	-	Val	Ala	3	↓

- 一级结构相似，往往会有相似的高级结构和生物学功能；
- 一级结构发生改变，高级结构和生物学功能也会发生改变。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



一级结构差异与分子病(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，这种病称为分子病。

镰刀形红细胞贫血(sickle-cell anemia)：患者的Hb与正常人的Hb，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

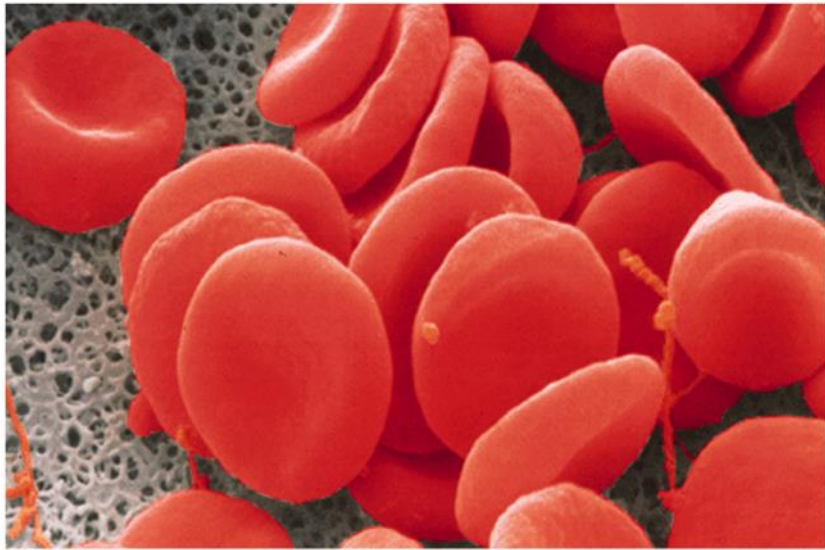
HbA（正常）：Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys

HbS（患者）：Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys

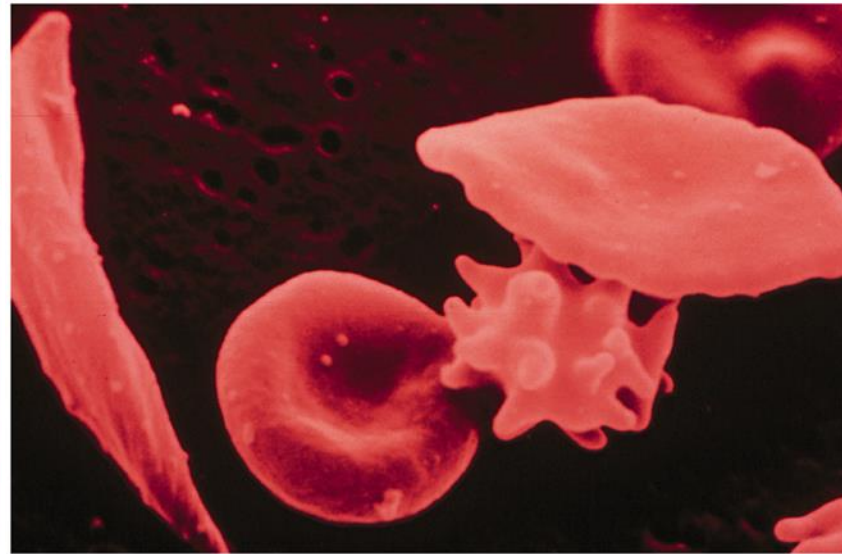
第五节 蛋白质结构与功能的关系



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。于是等电点改变，溶解度降低，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。



(a)



(b)

第五节 蛋白质结构与功能的关系

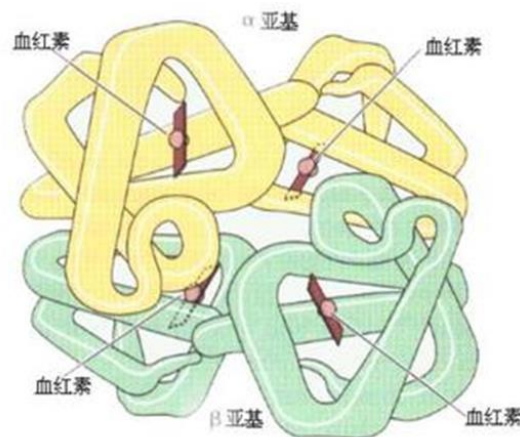
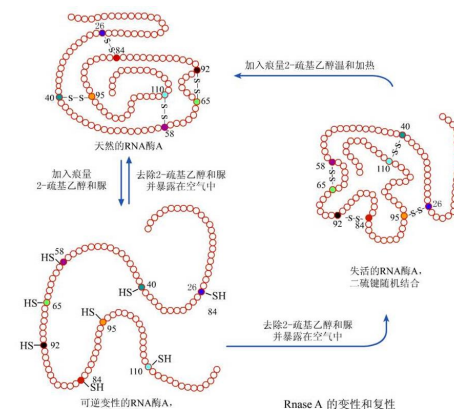


二、蛋白质高级结构与生物学功能的关系

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

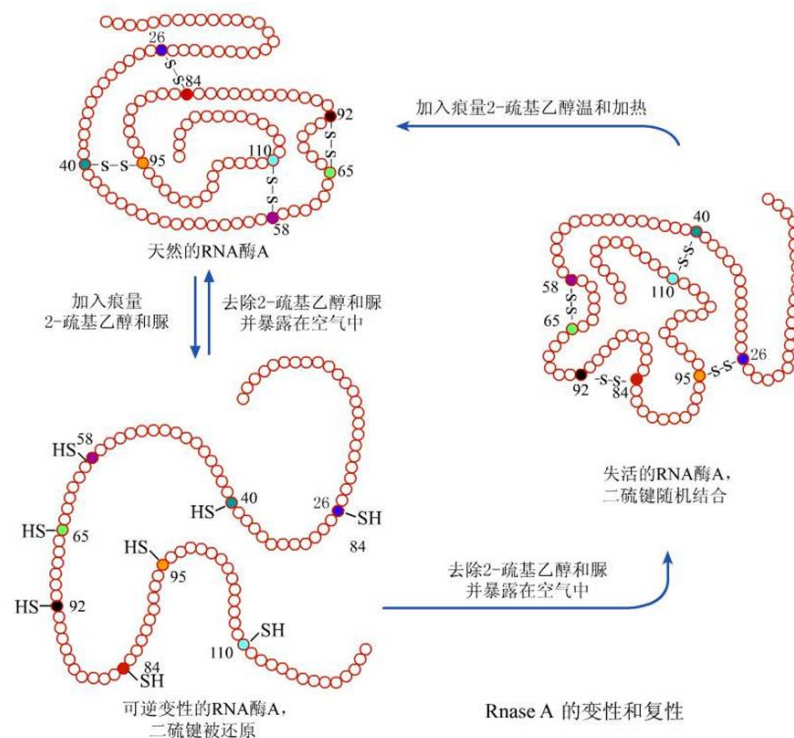


1. 蛋白质的变性

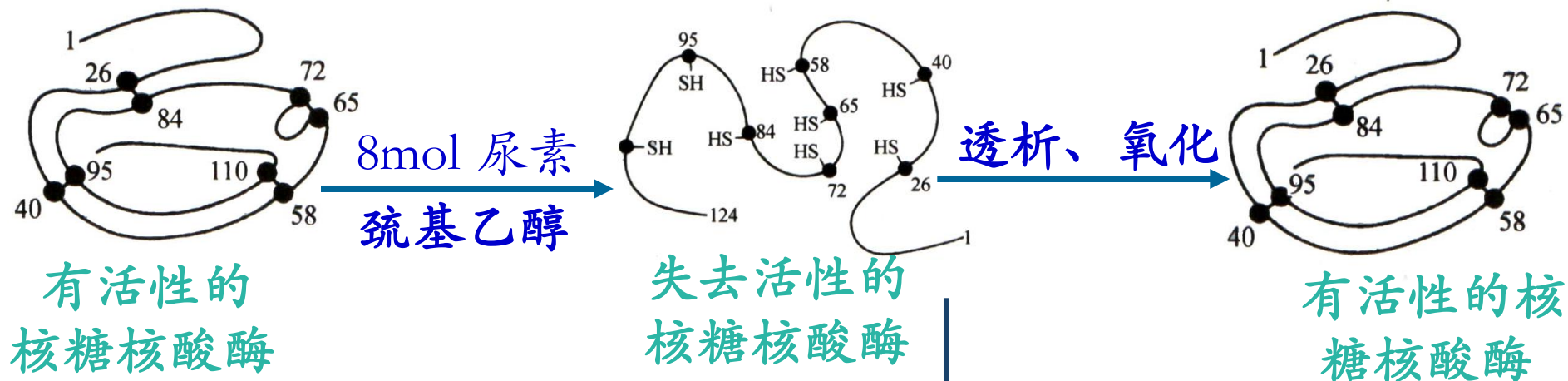
蛋白质的变性(denaturation)

天然蛋白质在理化因素作用下，其特定的空间构象被改变，导致其理化性质改变和生物活性的丧失，这种现象称为蛋白质的变性。

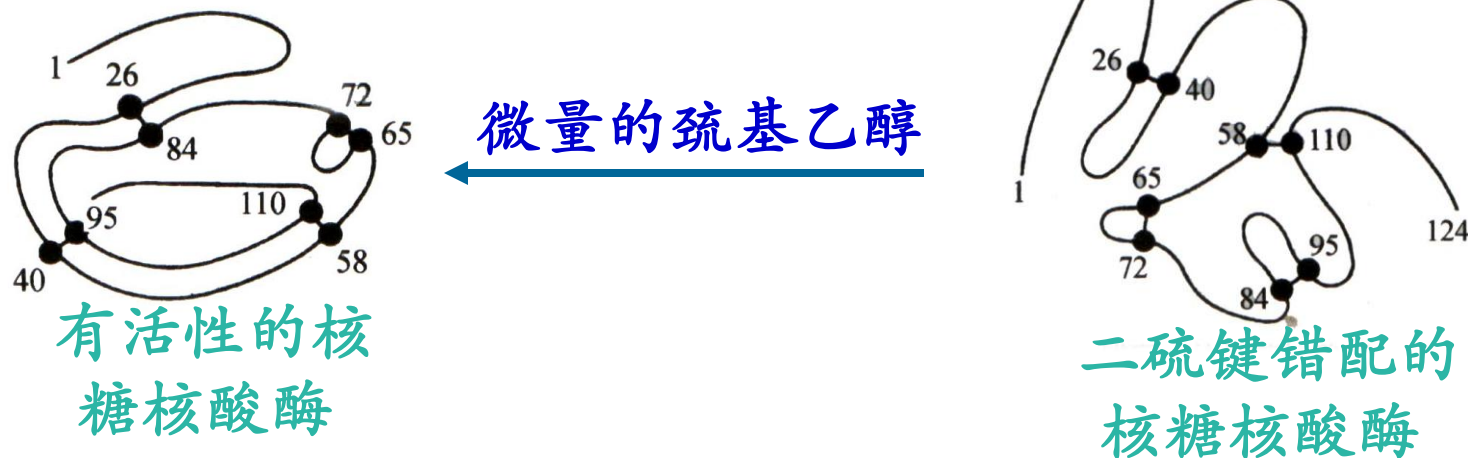
变性的机理是高级结构被破坏，
但蛋白质一级结构完整。



核糖核酸酶变性与复性



蛋白质一级结构决定其高级结构



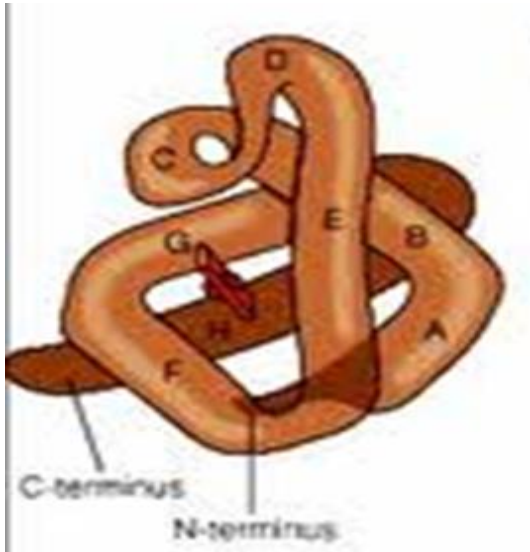
第五节 蛋白质结构与功能的关系



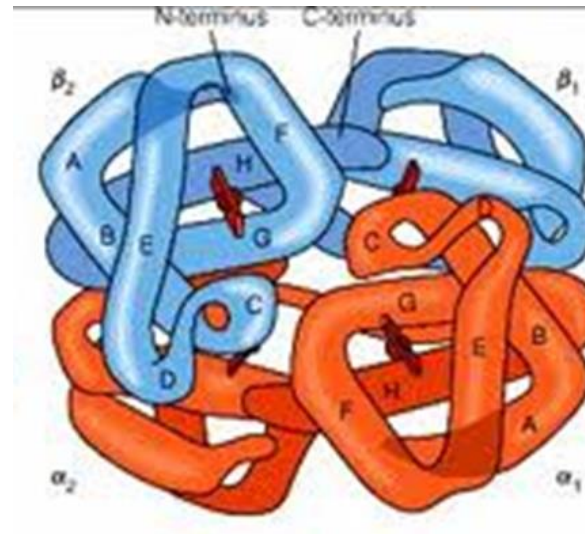
2. 蛋白质的空间结构与功能

肌红蛋白Mb、血红蛋白Hb的结构与功能

Mb为单体结合蛋白；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。



Mb



Hb

第五节 蛋白质结构与功能的关系



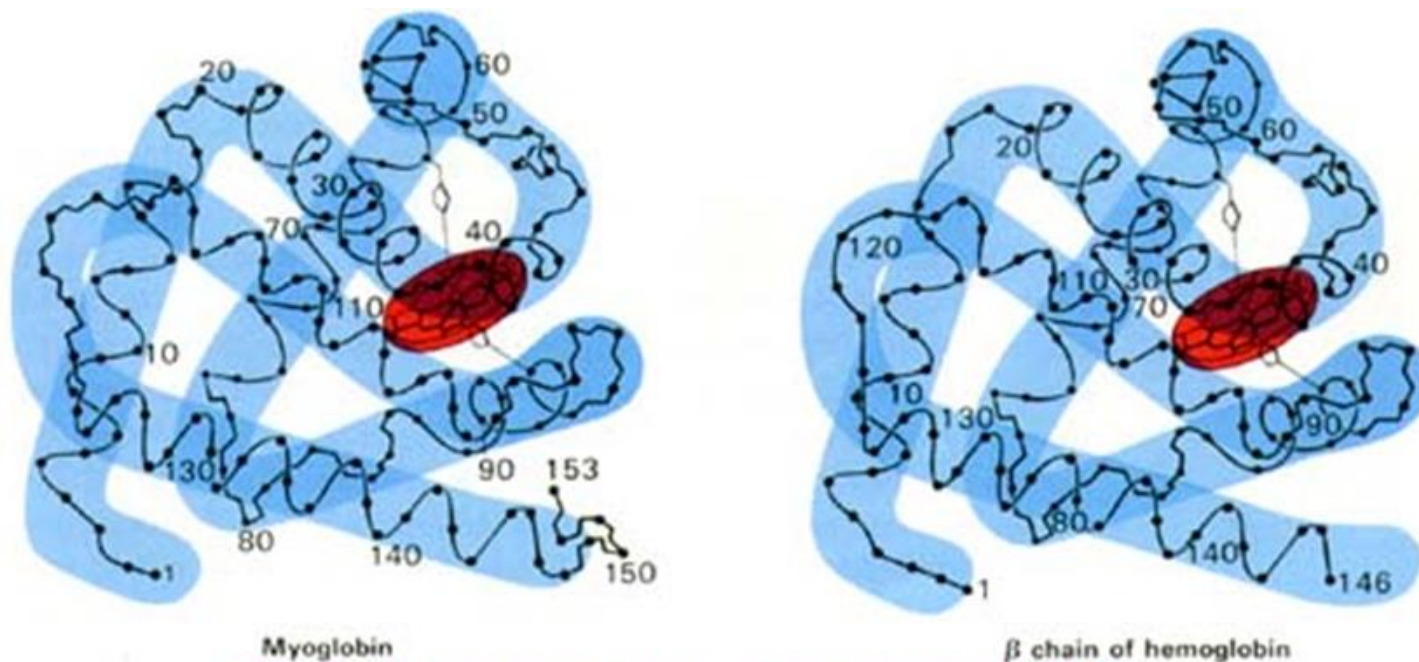
1、血红蛋白（Hemoglobin, Hb）的结构与功能

- (1) Hb的结构特点及辅基血红素
- (2) Hb与氧结合的协同性和输氧功能
- (3) Hb的变构效应与 O_2 的运输

第五节 蛋白质结构与功能的关系



肌红蛋白分子和血红蛋白的 β -亚基空间构象极其相似



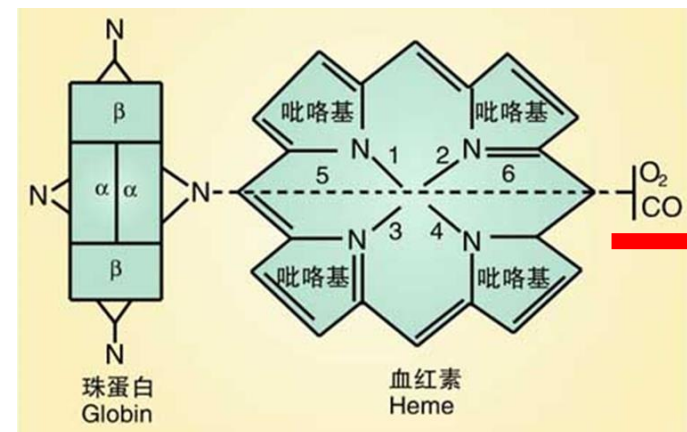
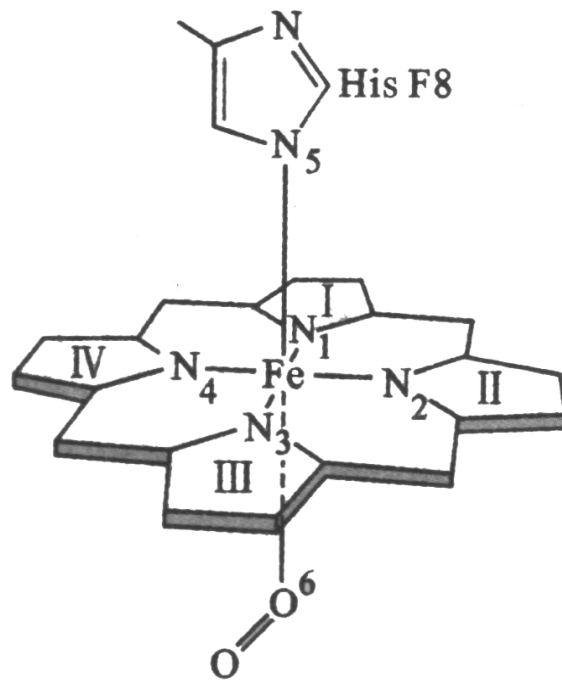
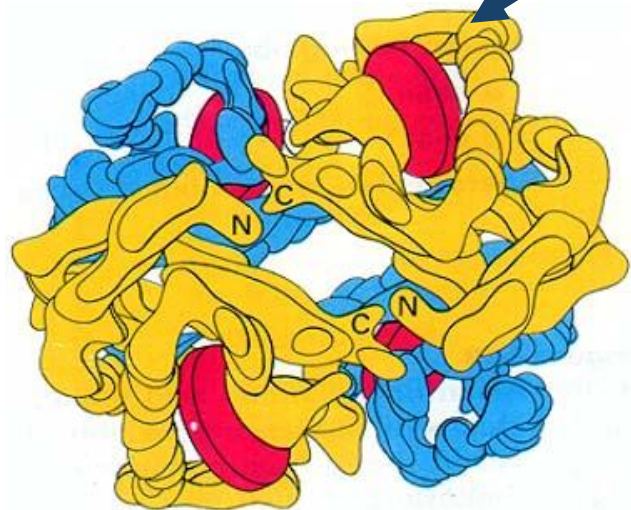
肌红蛋白与血红蛋白 β -链三级结构的比较

第五节 蛋白质结构与功能的关系



血红蛋白的结构模型及血红素辅基

血红素(heme)



氧合血红蛋白中血红素 Fe^{2+} 的六个配体
无论是Mb还是Hb与氧的结合都是在配基
血红素上Fe的第六配位键。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



血红蛋白与氧结合的协同性和输氧功能



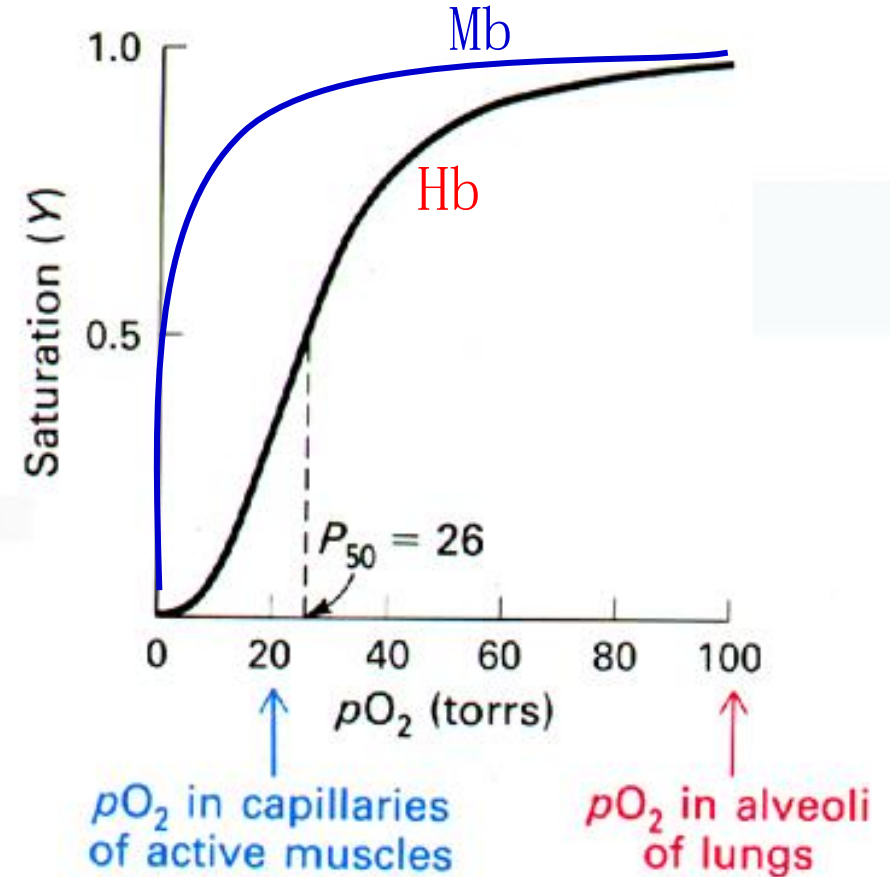
Hb的氧饱和度:

$$Y = \frac{n[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{n([\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_n])}$$

Mb的氧饱和度

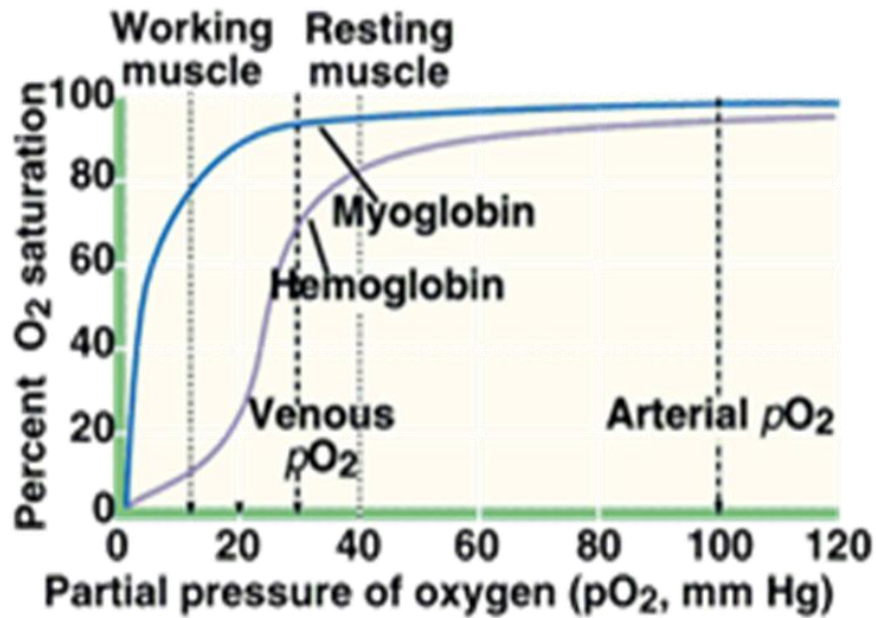
$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]}$$

Hb可逆地与O₂结合，Hb与O₂结合后称为氧合Hb，氧合Hb占总Hb的百分数，称氧饱和度，随O₂浓度变化而改变。



Hb和Mb的氧合曲线

第五节 蛋白质结构与功能的关系

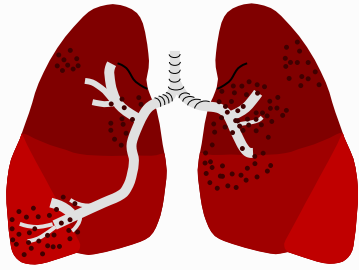


- ①Mb的氧合曲线为双曲线，而Hb为S形氧合曲线；
- ②氧分压相同时，Mb的氧饱和度总是高于Hb；
- ③氧分压较低时，Hb较难与氧结合。

Hb为S形氧合曲线，在低氧浓度时，对氧分子的吸收作用不强，但在高氧浓度时，吸收能力强。反之，Mb就管氧浓度如何，结合氧分子能力强。因为两者分布位置不同，生理意义不同；

Hb 在高氧浓度的肺部中携带充分的氧分子，循环到肌肉的低氧浓度，释放出氧分子，使Mb 携带氧，供给肌肉细胞使用。

血红蛋白输氧功能和构象变化



Any one subunit receives an oxygen molecule will increase the oxygen-binding affinity of the others



● **协同效应 (cooperative effect)** : 一个效应物分子结合于蛋白

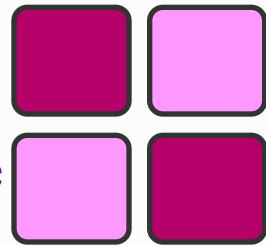
质的变构中心后对第二个效应物分子结合的影响称为协同效应。

When environmental $[O_2]$ increases, Hb binds oxygen efficiently

脉

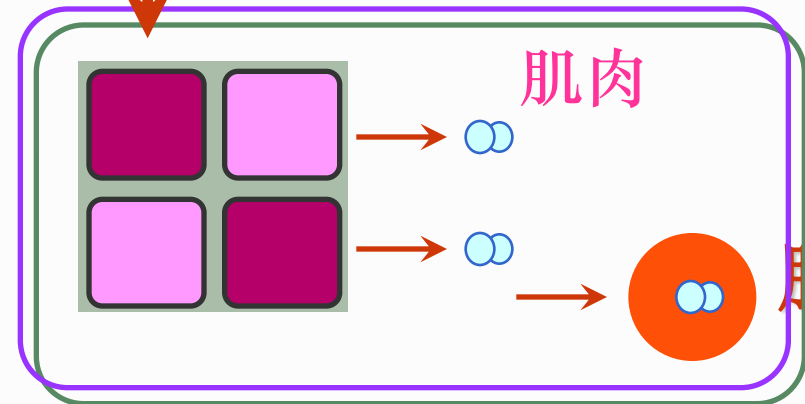
decreases, Hb releases oxygen to Mb

(T)
tense state



静脉

血红蛋白



肌红蛋白

第五节 蛋白质结构与功能的关系



变构效应 (allosteric effect)

某些小分子化合物(别构效应物,allosteric effectors)可以结合于蛋白质的活性部位,诱导出蛋白质的某种构象,使该蛋白质的活性受到影响,从而调节蛋白者的生物功能,此效应称为**变构效应,亦称别构效应**。

具有别构效应的蛋白质成为别构蛋白。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



Hb的变构效应

结合氧前后构象不同。

主要包括两大变化：

1. 血红素中 Fe^{2+} 的移动；
2. 2个 $\alpha\beta$ 二聚体之间的滑动。

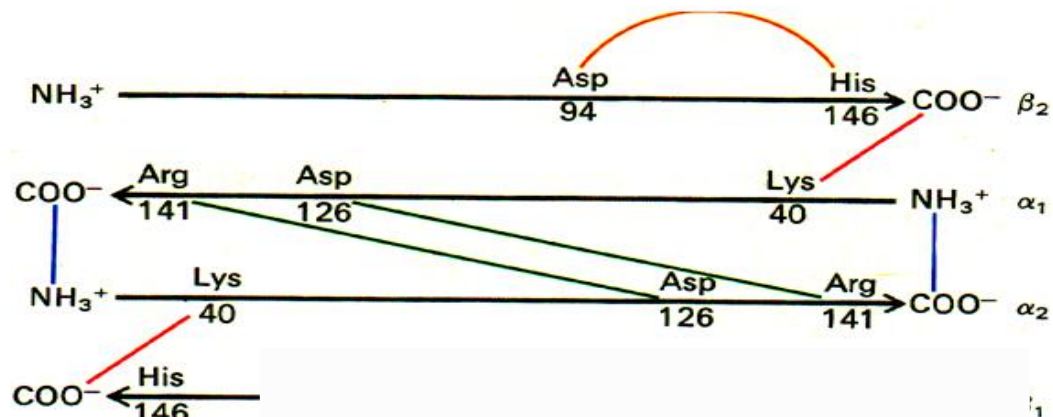
第五节 蛋白质结构与功能的关系



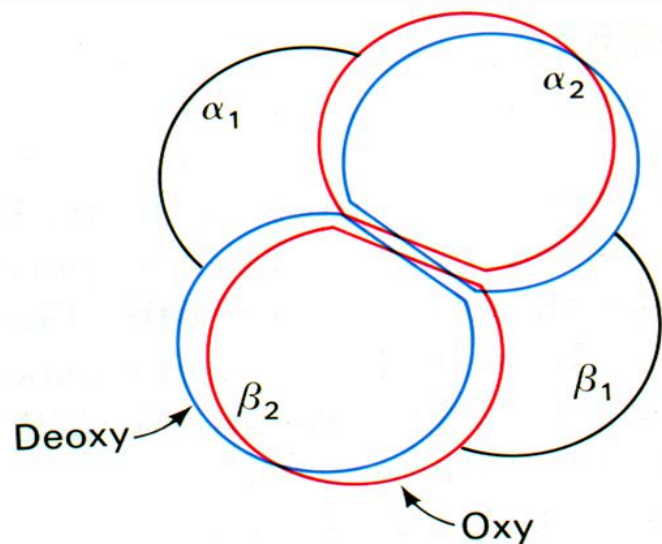
脱氧时，整个分子各亚基之间被离子键约束，血红素第6个配位键空位。由于近端His的作用， Fe^{2+} **移出**血红素平面，呈紧张态，这种构象称为T-态。T-态构象对底物的亲和力低。

当氧与Hb中的一个亚基结合时， Fe^{2+} **移进**血红素平面，亚基间的部分盐键被破坏，使Hb从紧张态变为松弛态，这种构象称为R-态。R-态构象对底物的亲和力高。

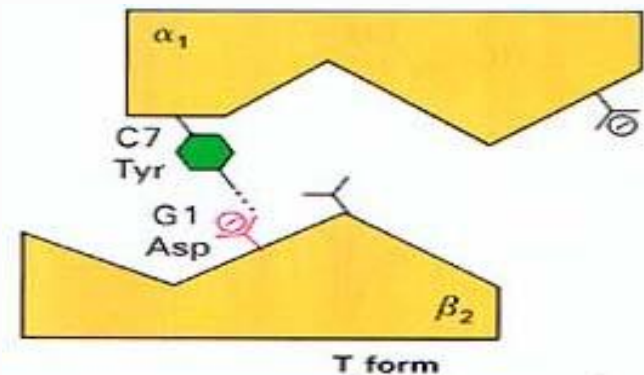
氧合作用显著改变Hb的四级结构



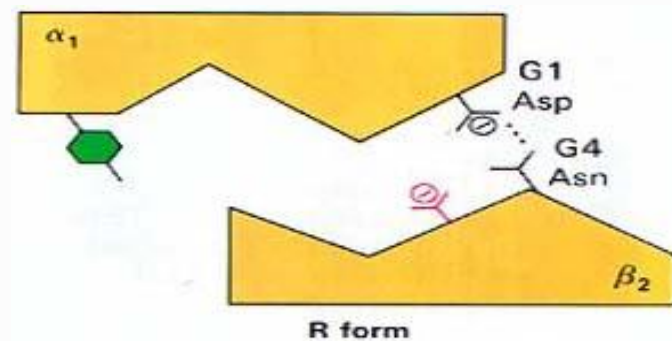
脱氧血红蛋白亚基间的交联键



血红蛋白四级结构的旋转变

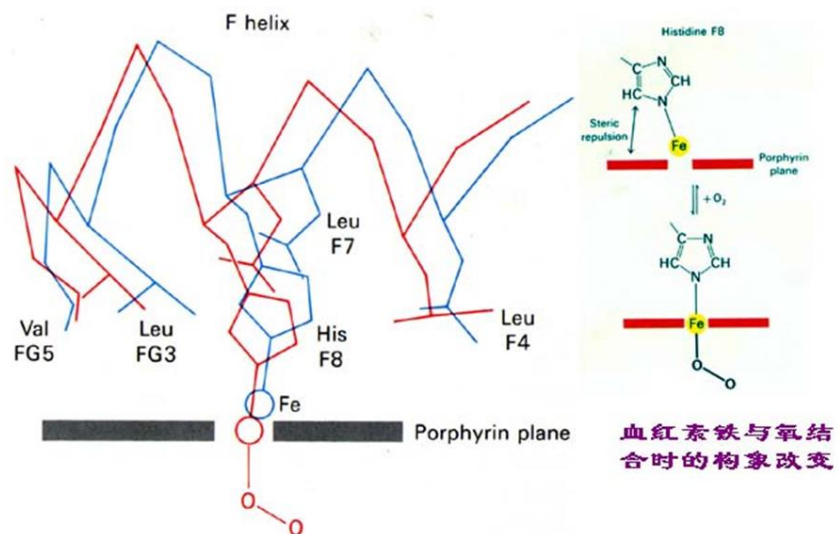
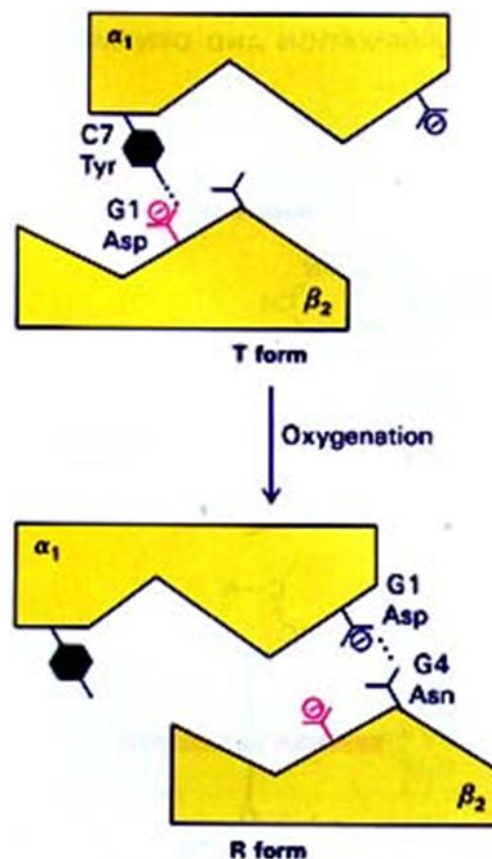
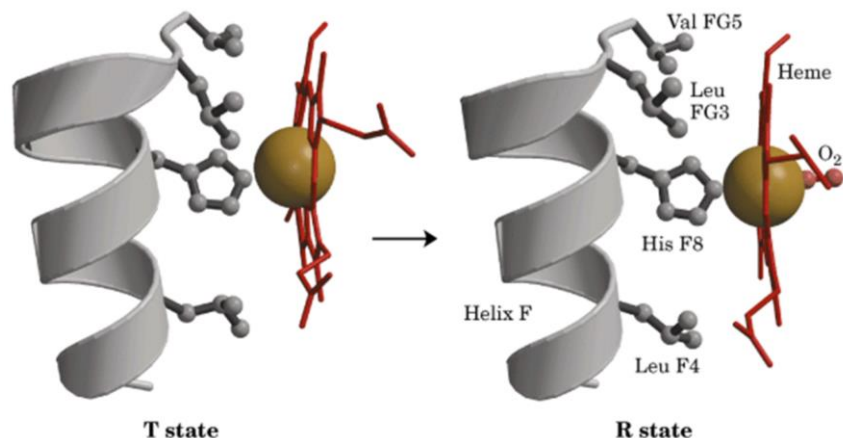


Oxygenation



血红蛋白四级结构的滑动变化

血红素铁的微小移动导致Hb构象的转换



血红素铁与氧结合时的构象改变

血红蛋白氧合时
两个亚基构象的改变

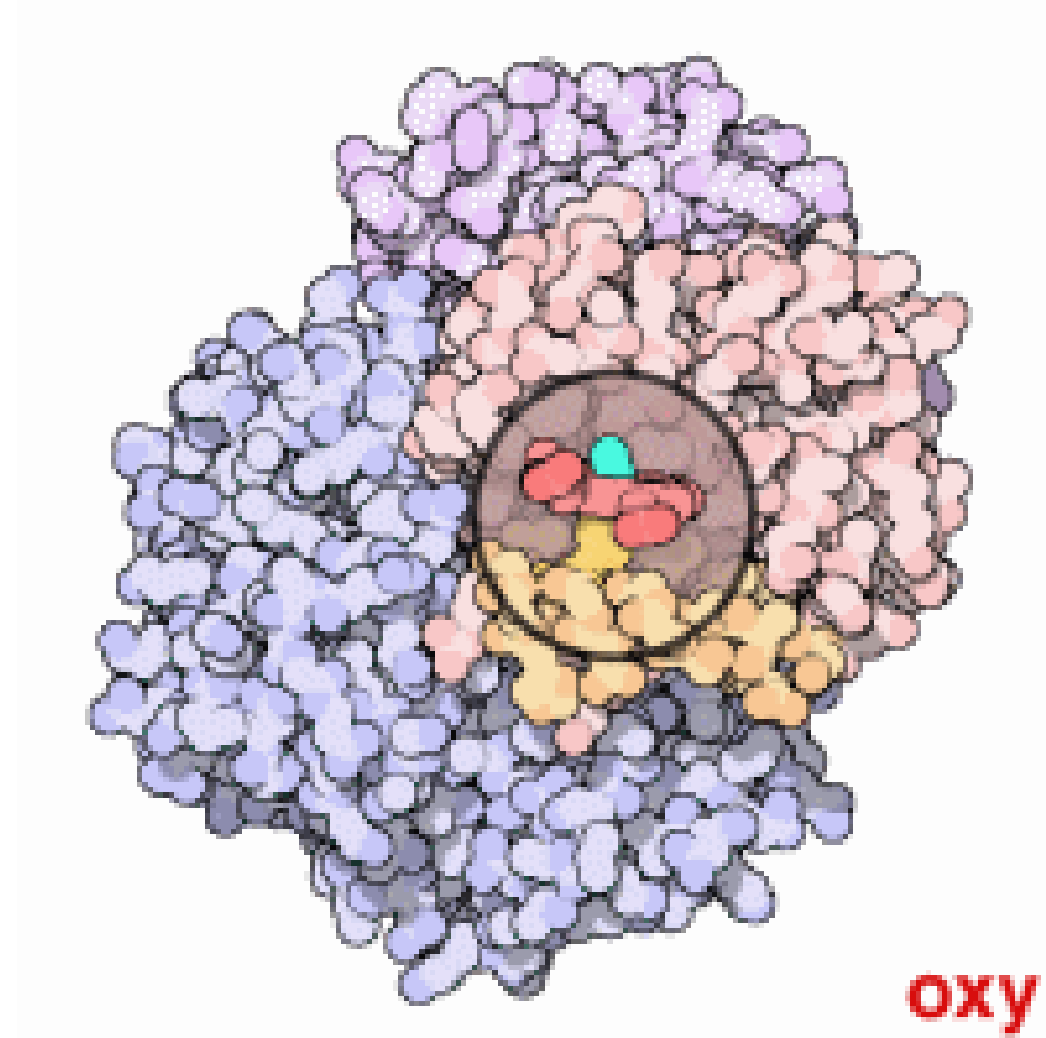
Hb 与氧的结合前后血红素发生位移，这些移动传递到亚基的界面，引发构象的重调，导致四级结构的改变。

(T → R)

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，肽链的构象发生变化

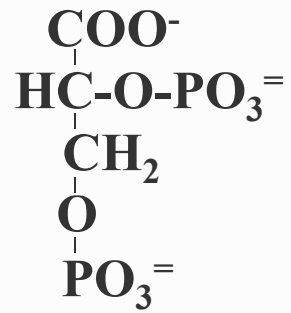


第五节 蛋白质结构与功能的关系

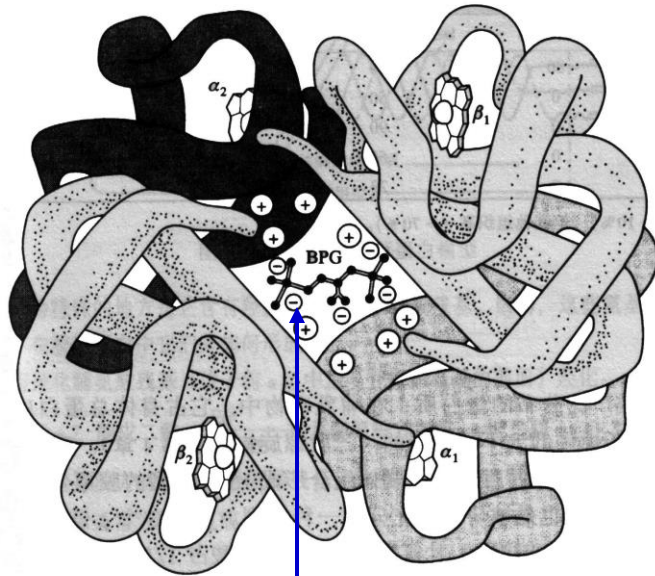


- (1) Hb与氧结合前，Hb的构象处于紧张状态，不利于与氧结合。
- (2) 当氧与铁原子以配位键结合后，铁的配位数减小，直径也由于没有不成对的电子而减小，正好可以移动0.075nm进入到卟啉环中，这一移动通过F8位His牵动所在肽段，进而影响Hb亚基间的相互作用，破坏了离子键和其它次级键。
- (3) 当第一个亚基与氧结合时，肽段的移动最为困难。而一旦肽段被移动后，这种构象的变化使第二个氧分子相比于第一个氧分子更容易寻找血红蛋白的另一个亚基结合，而他的结合进一步会促进第三个氧分子的结合，以此类推直到构成血红蛋白的四个亚基分别与四个氧原子结合。

因此，Hb的氧饱和曲线呈S形，也就是氧的结合影响了Hb的构象，从而影响了进一步结合氧气的活性。



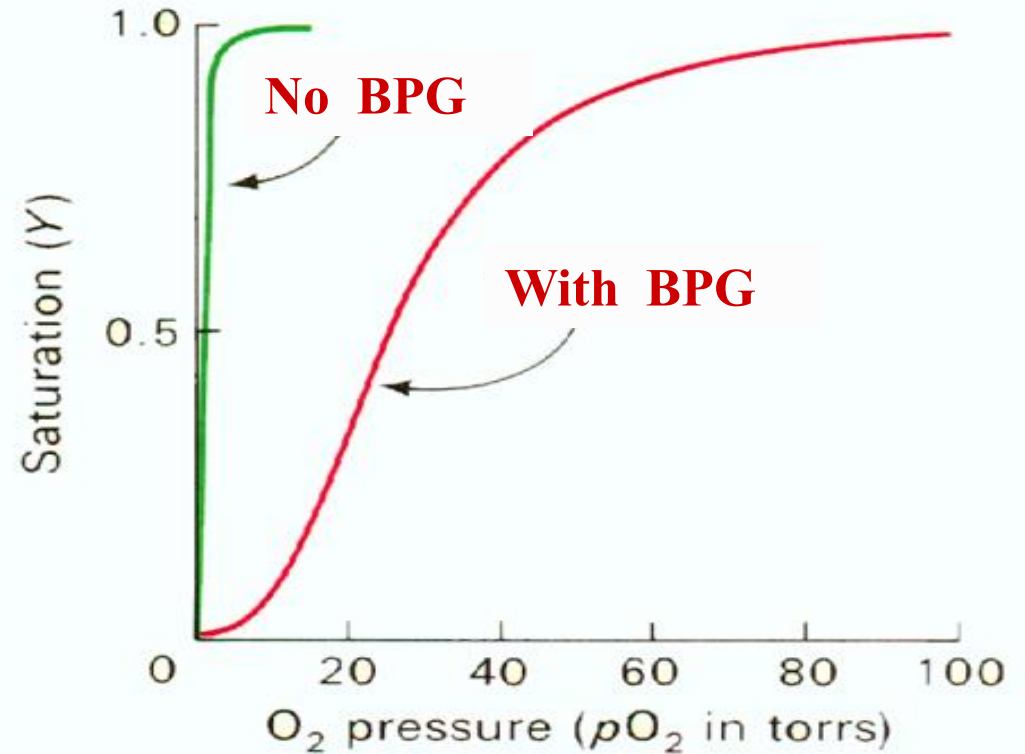
2,3-二磷酸甘油酸 (BPG)



BPG binding site

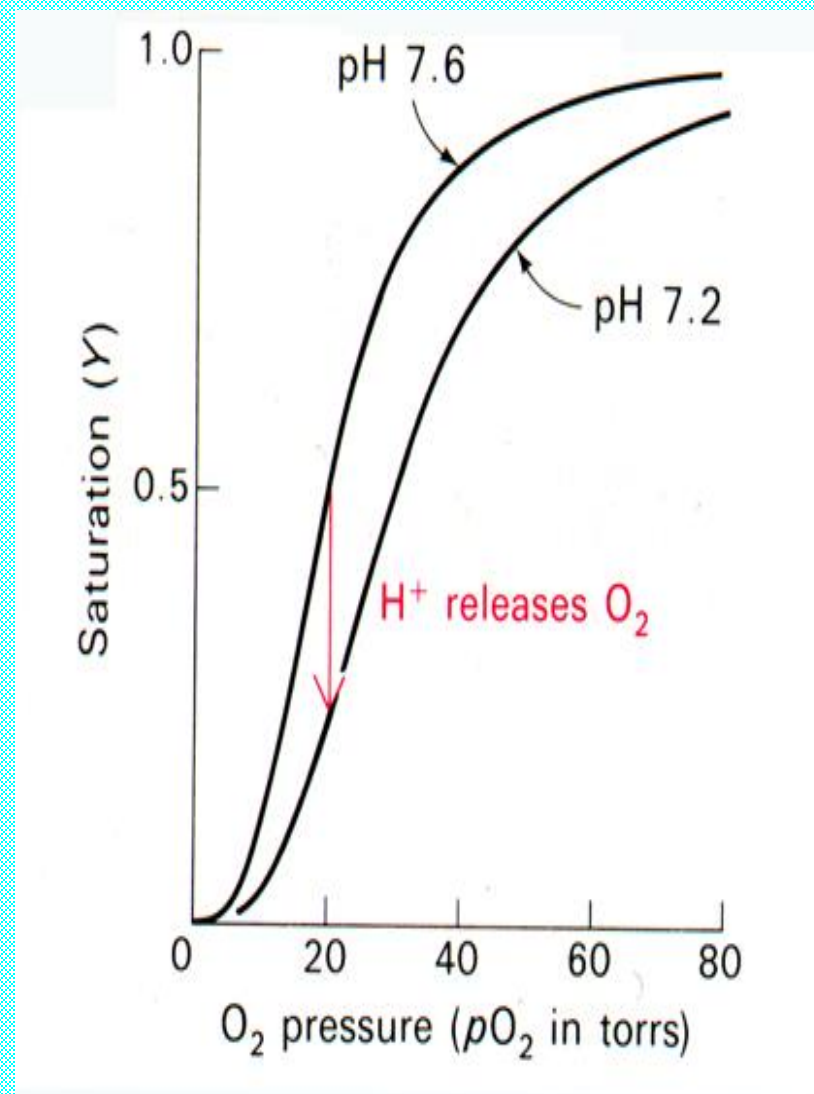
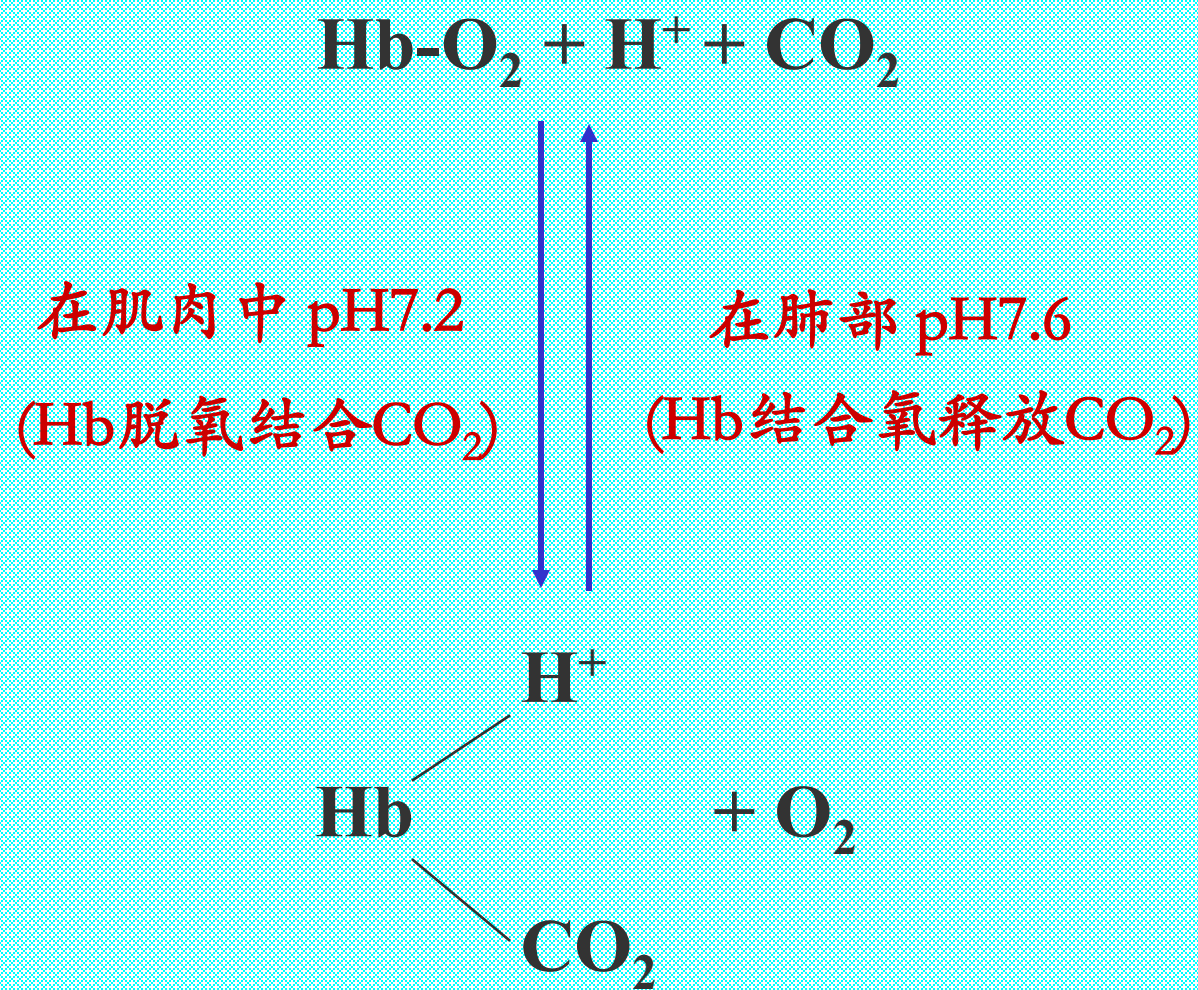
BPG在脱氧Hb中的结合位点

BPG对血红蛋白氧亲和力的影响



BPG对Hb的变构效应物功能

波尔效应



pH对Hb与氧亲和力的影响

第五节 蛋白质结构与功能的关系



总结:

因此, Hb的氧饱和曲线呈S形, 也就是氧的结合影响了Hb的构象, 从而影响了进一步结合氧气的活性。

(1) 氧的S形曲线结合, 使得血红蛋白的输氧能力达到最高效。同时由于能在较窄的氧分压范围内完成输氧功能, 因此使机体的氧水平不致有很大的起伏。

(2) 此外, 血红蛋白使肌体内的pH也维持在一个较稳定的水平。

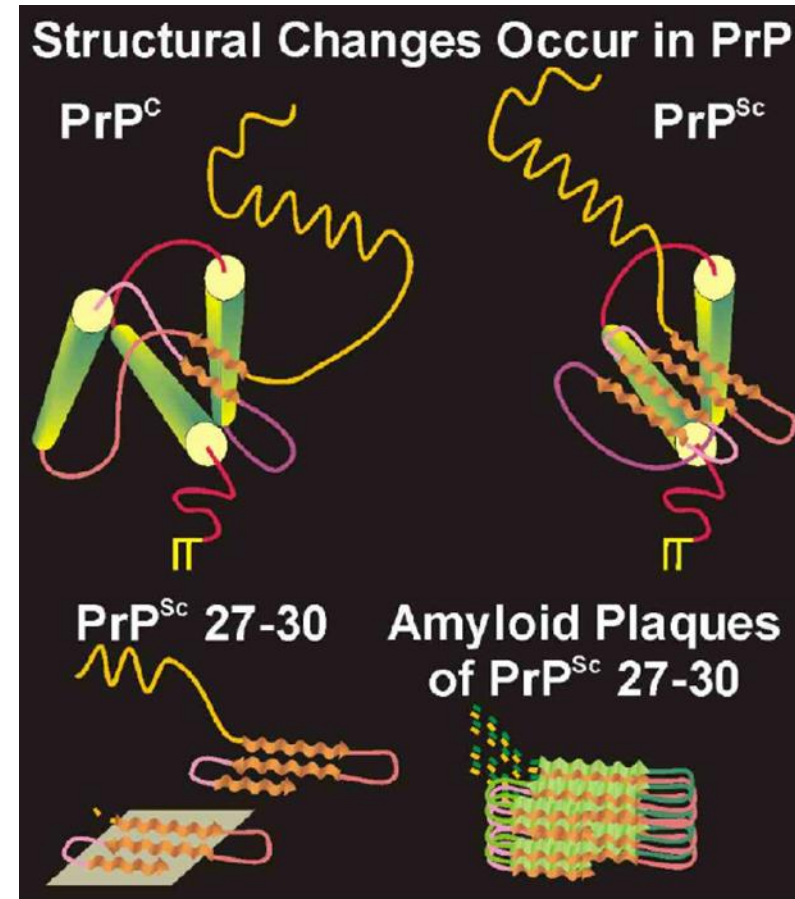
血红蛋白的别构效应反映了它的生物学适应性、结构与功能的高度统一性。

第五节 蛋白质结构与功能的关系



1982斯坦利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。

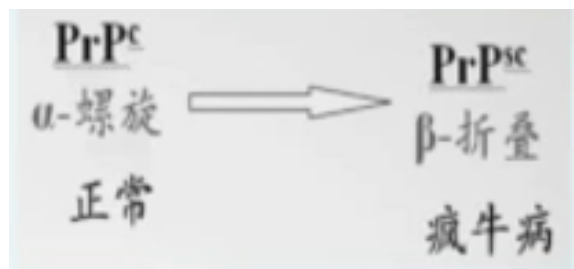
斯坦利因此获得了1997年的诺贝尔生理学或医学奖。



第五节 蛋白质结构与功能的关系



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，成为PrP^c。

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

第六节 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，侧链氨基酸残基中某些基团，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

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。

应用：电泳分类法分离蛋白质

第六节 蛋白质的理化性质



(2) 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。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。

胶体不能通过半透膜，实验室最常用的透析(dialysis)法分离提纯蛋白质。

蛋白质胶体稳定的因素有二个：

- 一是球状大分子表面的水化膜，将各个大分子分隔开来；
- 二是，各个球状大分子带有同种电荷，由于同性电荷的相互排斥，使大分子不能互相结合成较大的颗粒。

第六节 蛋白质的理化性质



蛋白质胶体性质的应用：

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 蛋白质的理化性质

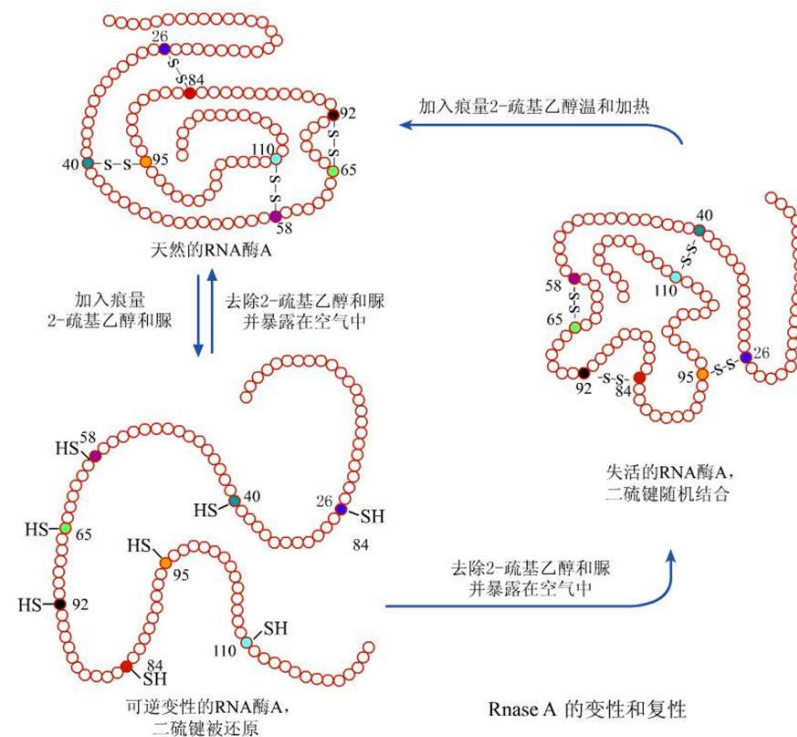


3. 蛋白质的变性、沉淀和凝固

蛋白质的变性(denaturation)

天然蛋白质在理化因素作用下，其特定的空间构象被改变，导致其理化性质改变和生物活性的丧失，这种现象称为蛋白质的变性。

变性的本质是高级结构被破坏（非共价键和二硫键），但蛋白质一级结构完整。



第六节 蛋白质的理化性质



变性蛋白质有下列各种表现：

- **失活**：酶丧失催化活性；激素蛋白丧失生理调节作用；抗体失去与抗原专一结合的能力。还有蛋白质的抗原性发生改变。
- **物理性质改变**：溶解度明显降低，易结絮，凝固沉淀，失去结晶能力，电泳迁移率改变，特性黏度增加，紫外光谱和荧光光谱发生改变等。
- **化学性质改变**：促进蛋白酶水解速度，提高了消化率等。

第六节 蛋白质的理化性质



蛋白质变性的应用与预防

- 高温、高压、紫外线、70%~75%酒精消毒。三氯醋酸或钨酸等沉淀除去蛋白质。
- 保持低温，防止强酸、强碱、重金属盐、剧烈震荡

蛋白质的复性(renaturation)

一般而言，变性后的蛋白质难以再恢复原有的空间结构，生物功能也无法恢复。但一些小分子量蛋白质的特定变性，**若除去变性因素其高级结构可以恢复，并恢复全部的生物活性**，这种现象，称为蛋白质的复性。

第六节 蛋白质的理化性质



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。

变性的蛋白质易于沉淀，有时蛋白质发生沉淀，但并不变性。

第六节 蛋白质的理化性质



(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，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盐中毒的病人和家畜。

(3) 生物碱试剂沉淀反应

(4) 加热变性法

第六节 蛋白质的理化性质



蛋白质的凝固作用

蛋白质变性后的絮状物加热可变成比较坚固的凝块，此凝块不易再溶于强酸和强碱中。

第六节 蛋白质的理化性质



4. 蛋白质的呈色反应

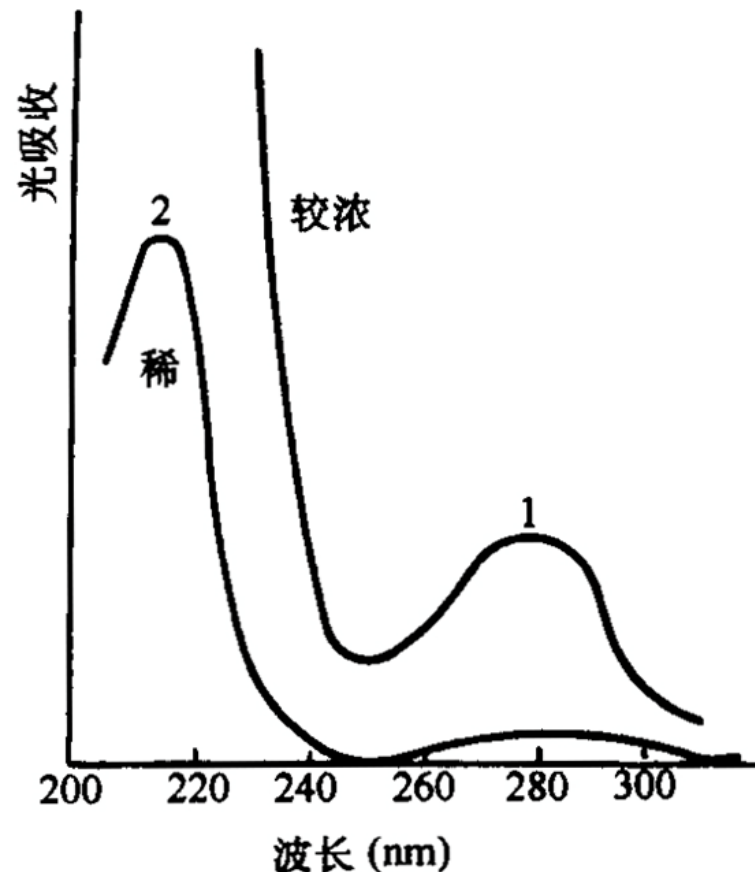
反应名称	试剂	反应基团	呈色	应用
茚三酮反应	茚三酮	游离 α -氨基	蓝紫色 (Max570nm)	定性
双缩脲反应	硫酸铜、氢氧化钠	多肽键	紫色 (Max540nm)	定性、定量
Milrow(米伦)	米伦试剂	Tyr的酚基	白色加热变红色	定性
Folin-酚法 (Lowry法)	Folin-酚试剂		蓝色 (Max650nm)	定量(近年逐渐被考马斯亮兰法取代)
考马斯亮蓝法 (Bradford法)	考马斯亮蓝G250		蓝色 (Max595nm)	定量

第六节 蛋白质的理化性质



5. 蛋白质的紫外吸收

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Trp、Tyr及Phe对紫外光的吸收有关，肽键在225nm波长附近，有一个吸收峰。因此，可以利用紫外分光光度法，在280nm或220nm波长，测定蛋白质浓度。



第七节 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：利用透析袋把大分子蛋白质与小分子化合物分开。

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滤膜，达到浓缩蛋白质溶液的目的。

第七节 蛋白质的分离和纯化



(2) 有机溶剂沉淀、盐析及免疫沉淀

- 丙酮、乙醇沉淀蛋白质
- 用硫酸铵、氯化钠等，中和蛋白质表面电荷，破坏水化膜。
- **免疫沉淀法**：将某一纯化蛋白质免疫动物可获得特异抗体。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。

第七节 蛋白质的分离和纯化



(3) 电泳(electrophoresis)

蛋白质在非pI的溶液中为带电颗粒，在电场中向着与其所带电荷相反的电极方向移动。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**。

带电分子在电场强度(E)下的移动速度(v)，也称迁移率。蛋白质的迁移率与其**分子的大小、形状和净电荷量**有关。

根据支持介质的不同，可分为等电聚焦电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）、双向电泳、火箭免疫电泳、高效毛细管电泳等。

第七节 蛋白质的分离和纯化



几种重要的蛋白质电泳

- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，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分离蛋白质。
- 双向凝胶电泳，是蛋白质组学研究的重要技术

第七节 蛋白质的分离和纯化



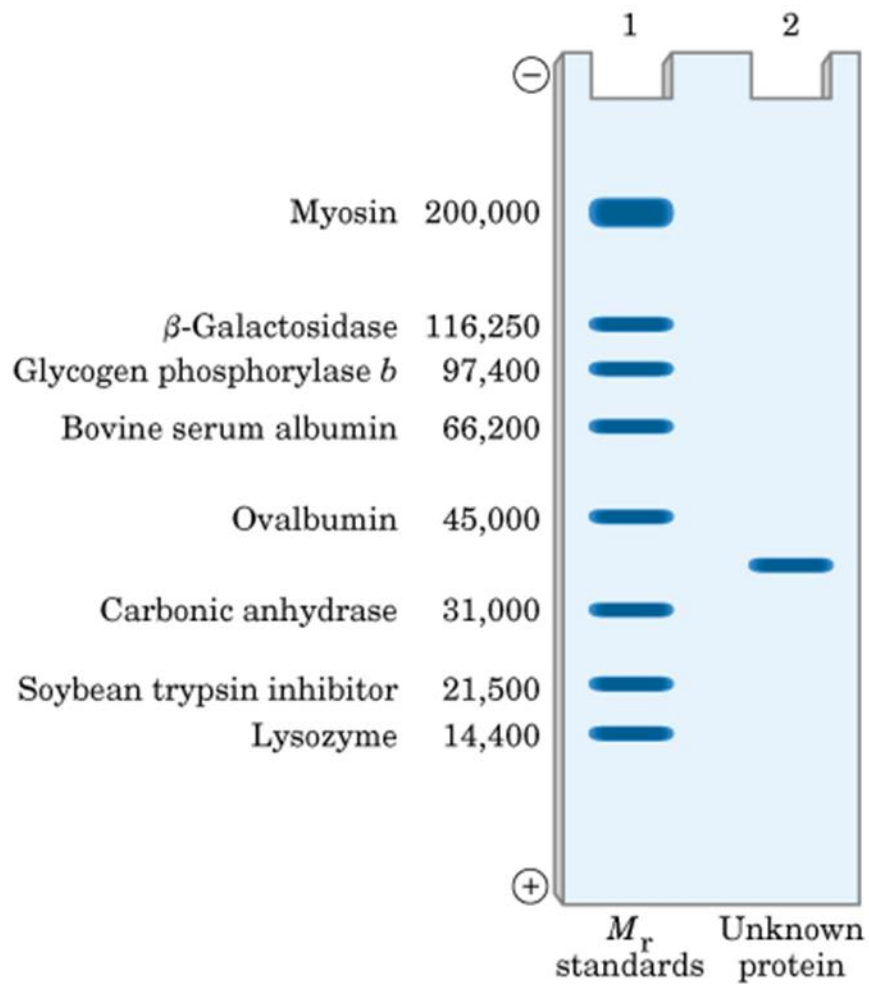
(1) SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)

PAGE也是种凝胶。驱动蛋白质通过PAGE的是电场和蛋白质所带的电荷，蛋白质的形状也影响其速度。

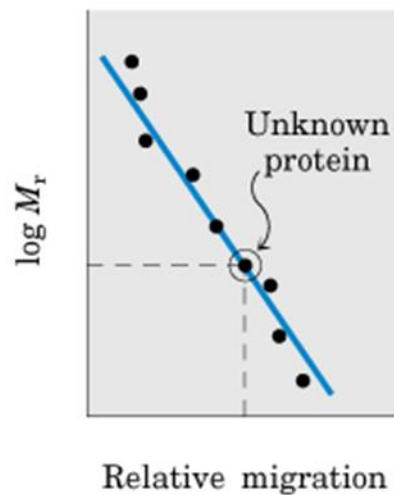
十二烷基硫酸钠(SDS)是一种有效的蛋白质变性剂，它能破坏蛋白质分子中的疏水键和氢键，使亚基或单体蛋白质的多肽链由紧密状态变成伸展状态；SDS以其烃链与蛋白质分子的侧链结合成复合体。

SDS与蛋白质的结合带来2个后果：①使蛋白质分子带上负电荷；②使不同蛋白质的形状都变成杆状。最终使得蛋白质的电泳速度只决定于其相对分子质量的大小。

第七节 蛋白质的分离和纯化



(a)



(b)

第七节 蛋白质的分离和纯化



(4) 层析(chromatography)

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。

第七节 蛋白质的分离和纯化

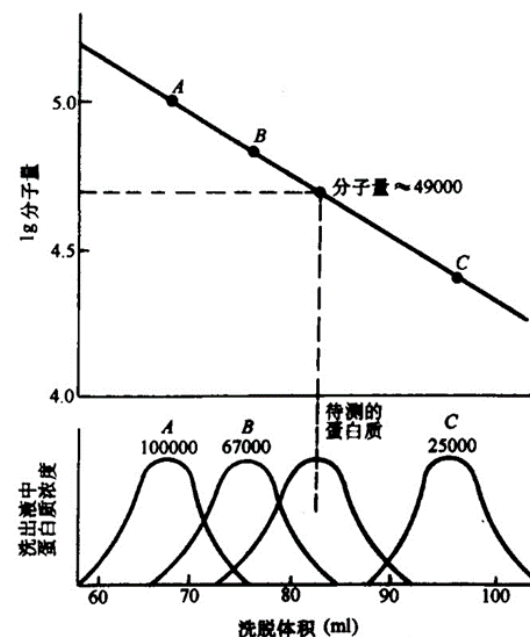
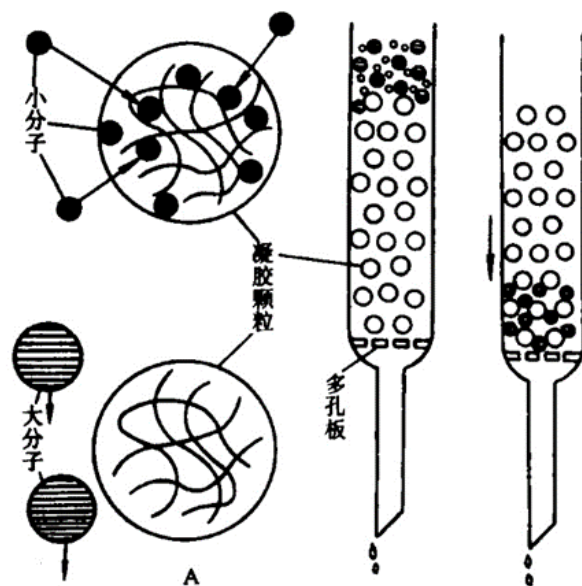


蛋白质分离常见的层析方法：

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。

凝胶层析法：又称凝胶过滤(gel filtration)、凝胶排阻层析、分子筛层析，利用各蛋白质分子大小不同分离。

凝胶是一种具有多孔网状结构的颗粒，如葡聚糖、聚丙烯酰胺。各个组分在凝胶中被洗脱出来的顺序是按分子量从大到小依次排列。



第七节 蛋白质的分离和纯化



(5) 超速离心

超速离心法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。

蛋白质分子在单位离心场里的沉降速度为恒定值，称为**沉降系数(sedimentation coefficient)**。沉降系数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， $1S=10^{-13}$ 秒。

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

第七节 蛋白质的分离和纯化



2. 多肽链中氨基酸序列分析

蛋白质测序的一般程序：

- ①分析已纯化蛋白质的氨基酸残基组成；
- 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，用不同的裂解酶将长的多肽链裂解成两套较短的肽段。

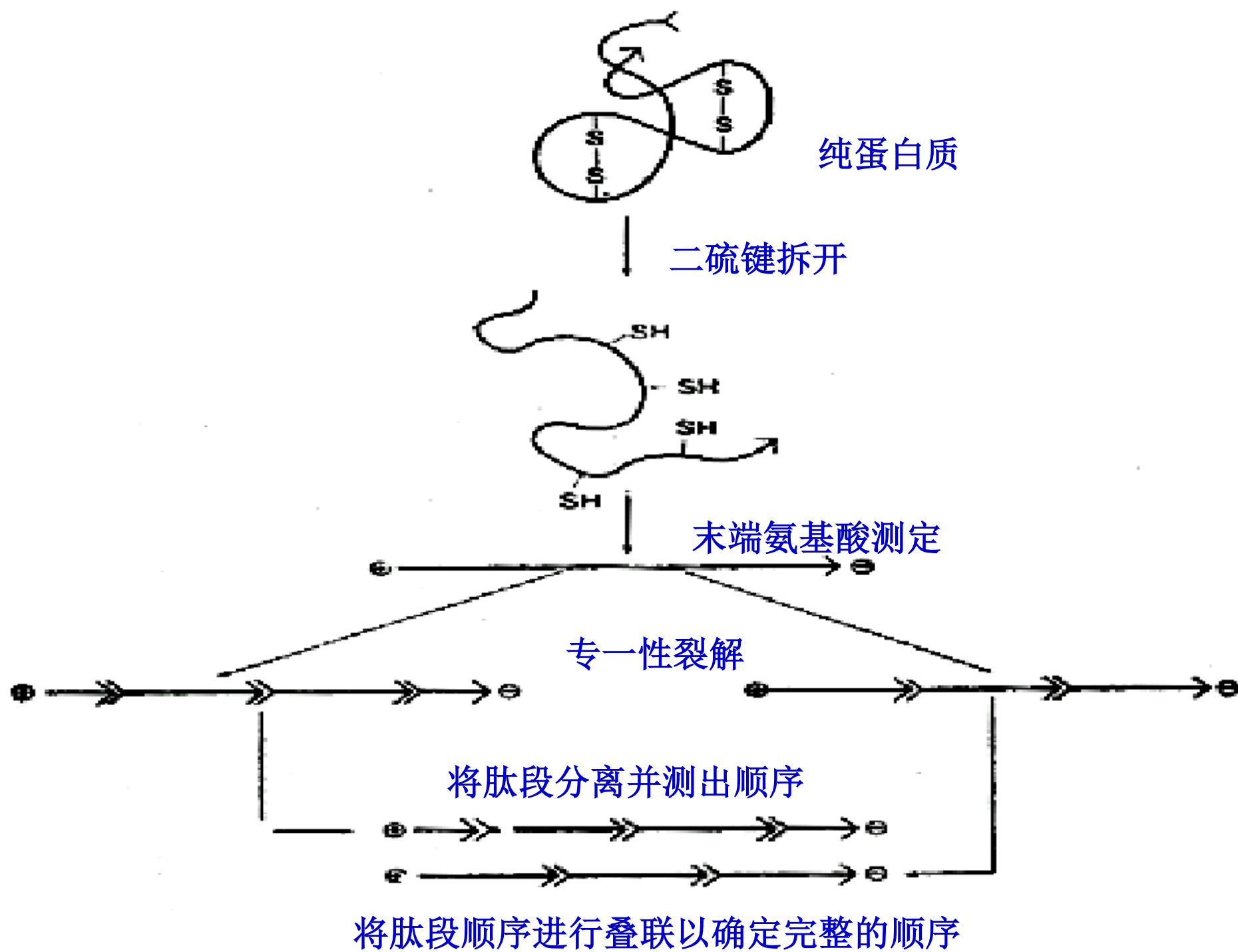
第七节 蛋白质的分离和纯化



2. 多肽链中氨基酸序列分析

蛋白质测序的一般程序：

- 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确定二硫键在多肽链中的位置。



第七节 蛋白质的分离和纯化



通过核酸来推演蛋白质中氨基酸序列分析

- (1) 分离编码蛋白质的基因
- (2) 测定DNA序列
- (3) 排列出mRNA序列
- (4) 按照密码子的原则推演出氨基酸序列

思考题



- 1、为什么说蛋白质是生命活动最重要的物质基础？
- 2、试举例说明蛋白质结构与功能的关系（包括一级结构、高级结构与功能的关系）。
- 3、为什么说蛋白质水溶液是一种稳定的亲水胶体？
- 4、什么是蛋白质的变性？变性的机制是什么？举例说明蛋白质变性在实践中的应用。

名词解释

等电点 (pI) 肽键和肽链 肽平面 一级结构 二级结构 三级结构
四级结构 超二级结构 结构域 蛋白质变性与复性 肽