第3章 蛋白质化学

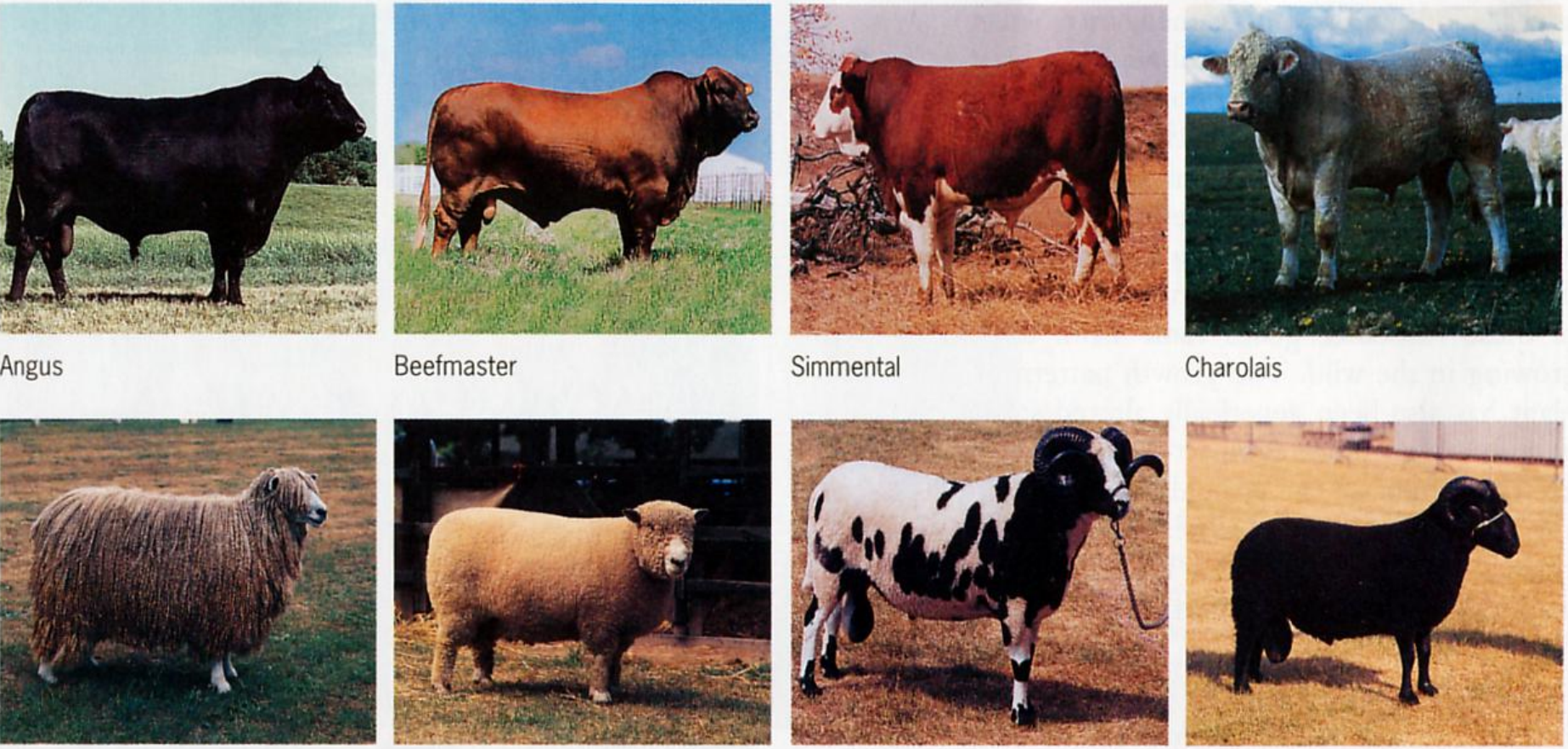
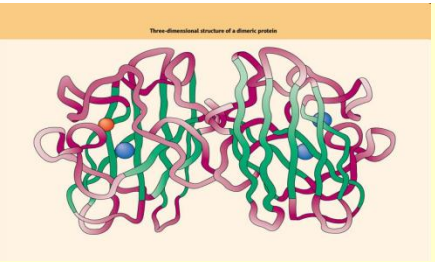


Figure 1.9 Some of the many varieties of beef cattle and sheep produced by hybridization and selection.



本章内容包括以下学习内容：

第一节：蛋白质概述

第二节：蛋白质的构件分子—氨基酸

第三节：蛋白质的基本结构

第四节：蛋白质的高级结构

第五节：蛋白质的结构与功能

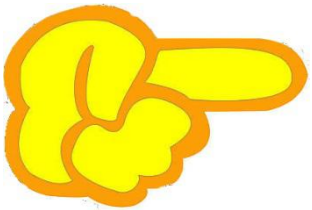
第六节：蛋白质的分离纯化。

第一节　蛋白质概述
Introduction to Protein

十九世纪中叶，荷兰化学家Gerardus.Mulder从动物和植物体中提取出一种**共同的物质，**他在他的论文中指出：

“……在有机界的一切物质中无疑是最重要的，缺少它我们这个星球上的生命可能就不存在了”。

根据瑞典著名化学家Berzelius的提议将这种物质命名为**protein，means: “first important material ”**。



首先要在四个方面了解 Protein

一、Protein的化学组成和分类

二、 Protein分子的形状和大小

三、 Protein构象和蛋白质结构的组织层次

四、 Protein功能的多样性

一、蛋白质的化学组成和分类
chemical composes and classes of proeins

（一）化学组成(chemical composes)：

蛋白质由20种氨基酸以不同的数量和顺序组成的复杂的生物大分子，但它们的元素组成是一致的。

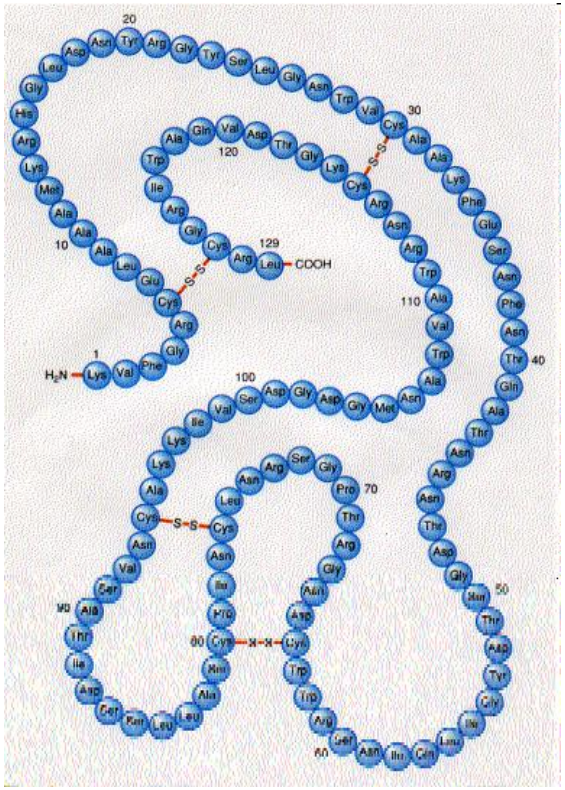
C 50%，H 7%，O 23%， N 16%，
S 0－3%，其他 P,Cu,Zn,Fe等微量。

其中蛋白质平均含N量为16% 比较恒定，是蛋白质元素的一个特点。可根据测定蛋白质含N的量计算出蛋白质的含量。化学家Kjedahl设计了凯氏定氮法测定蛋白质

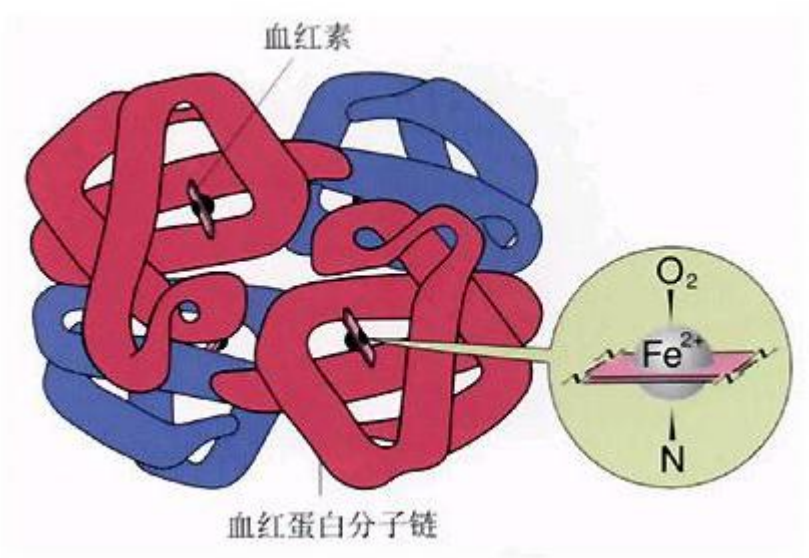
蛋白质含量＝蛋白氮 X 6.25

（二）蛋白质分类 Classes of Proteins

1、单纯蛋白质类



2、缀合蛋白质类



二、蛋白质分子的形状和大小

蛋白质根据形状和溶解度可分为三类：

①纤维状蛋白质（fibrou, protein）

具有比较简单有规则的线性或纤维状结构。这类蛋白质在生物体内主要起结构作用。

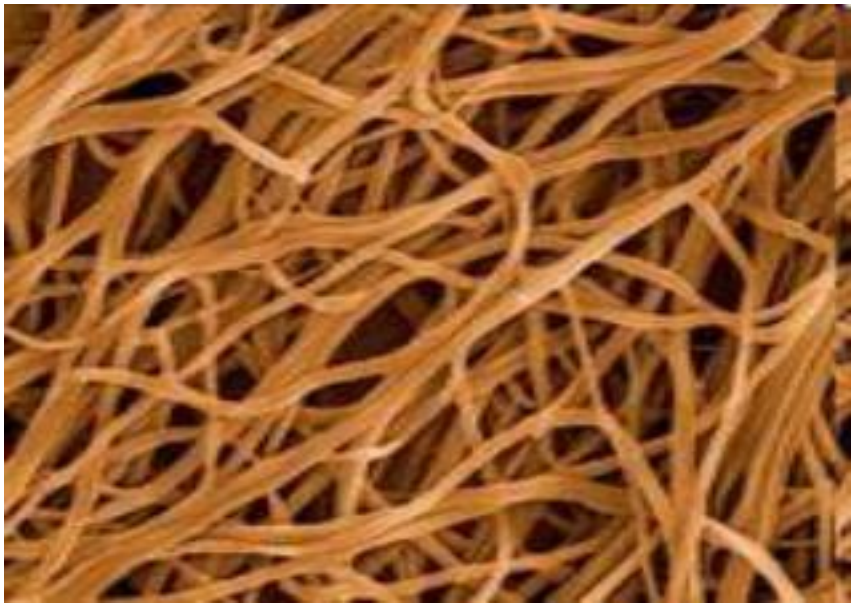
②球状蛋白质（globular protein）

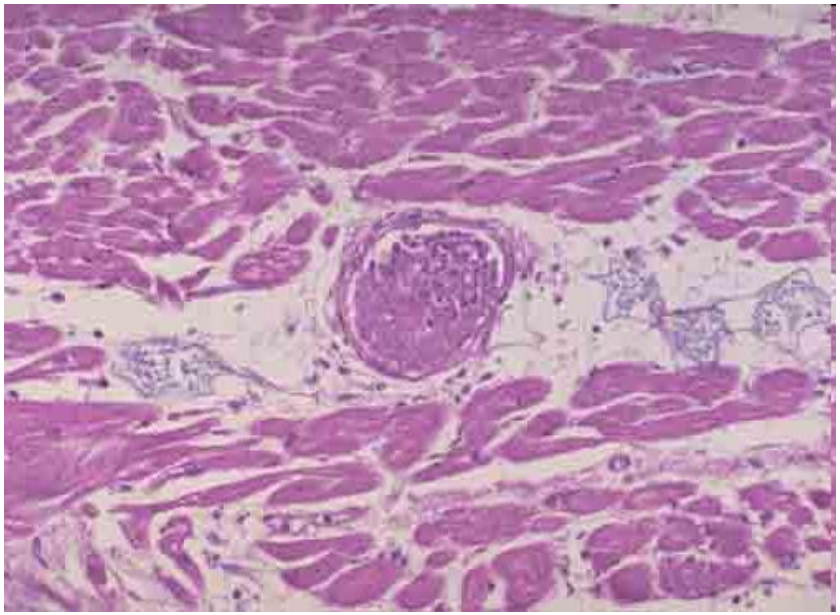
形状接近球形或椭球形。因此球状蛋白质在水溶液中溶解性好，细胞中的大多数可溶性蛋白质，如胞质酶类都属于球状蛋白质。

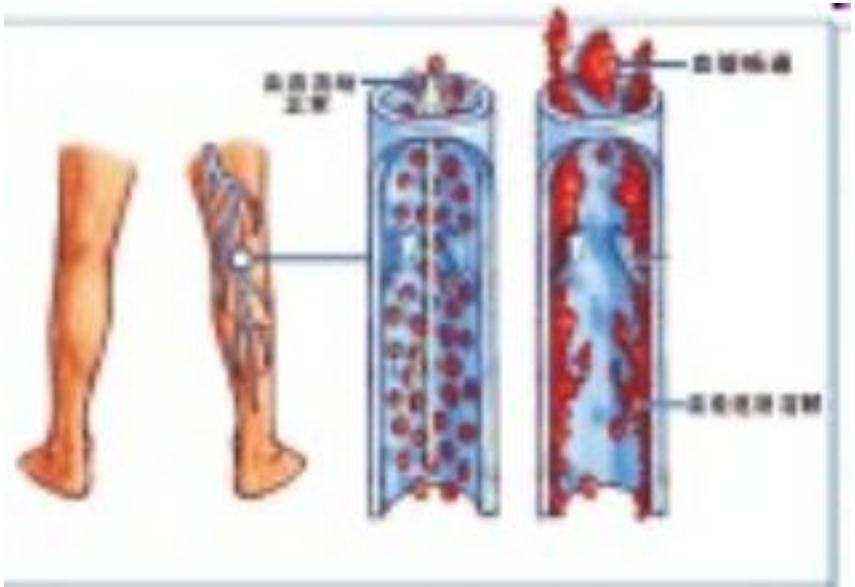
③膜蛋白（membrane protein）

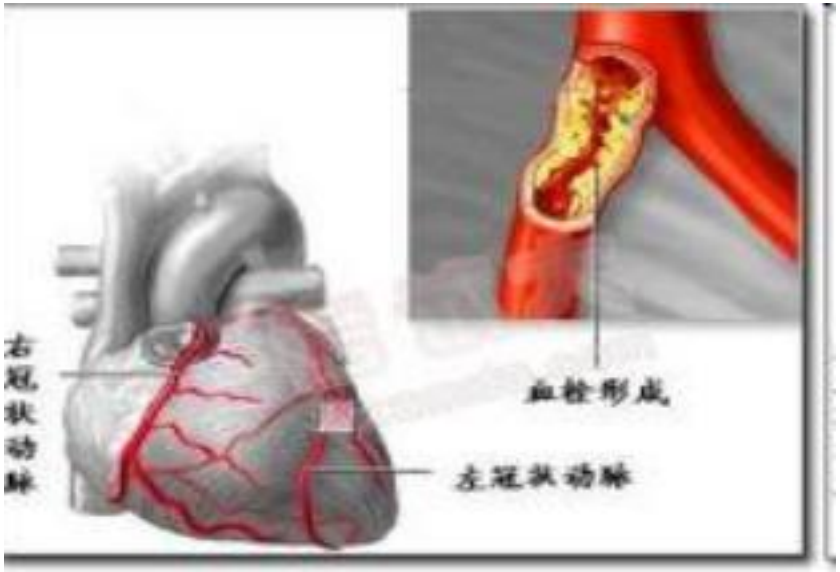
与细胞的各种膜系统结合而存在。

纤维蛋白构成动物的蹄、角、甲、皮毛等

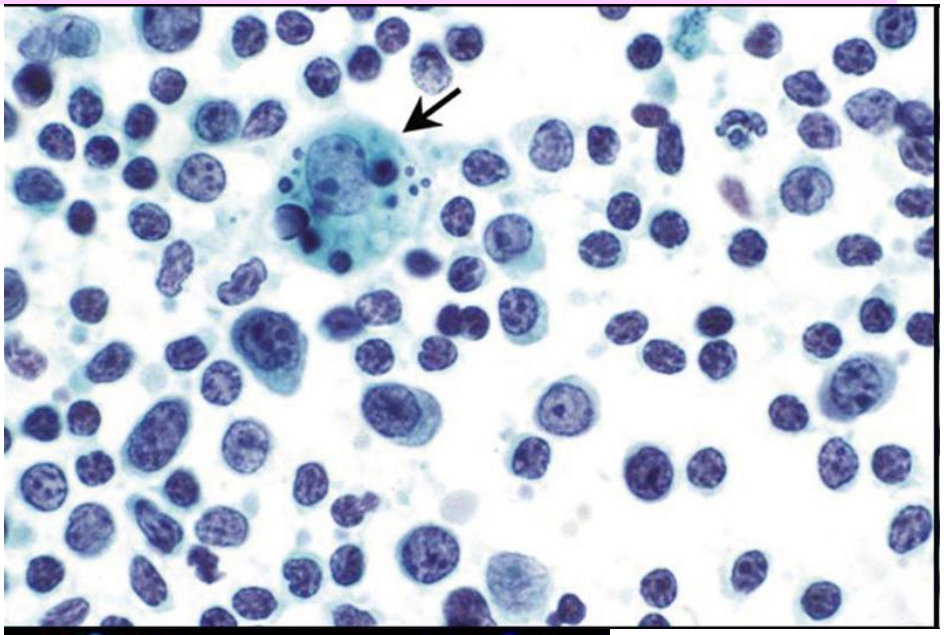


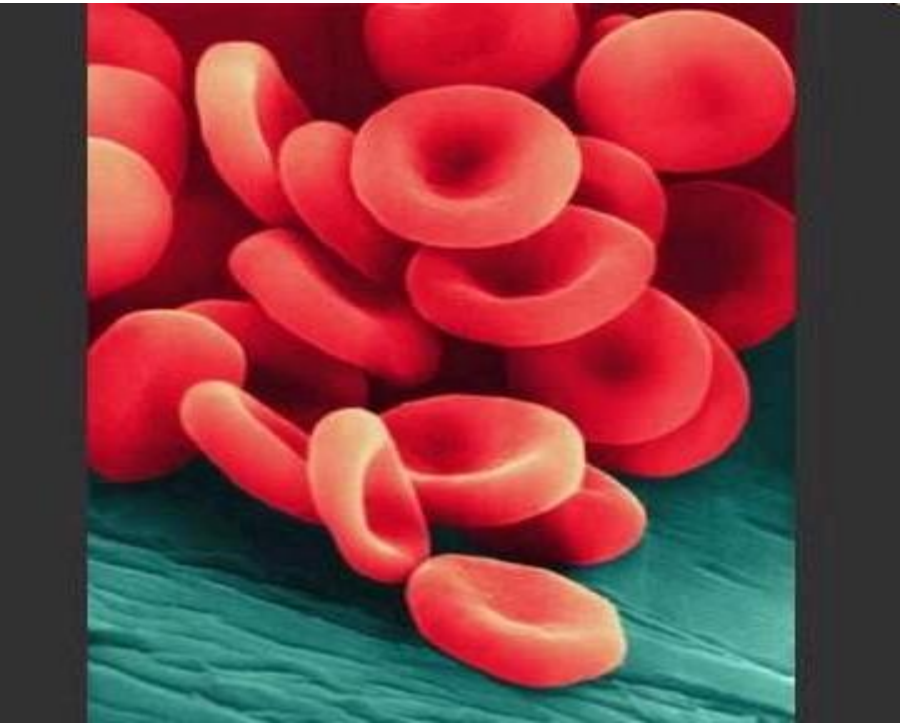


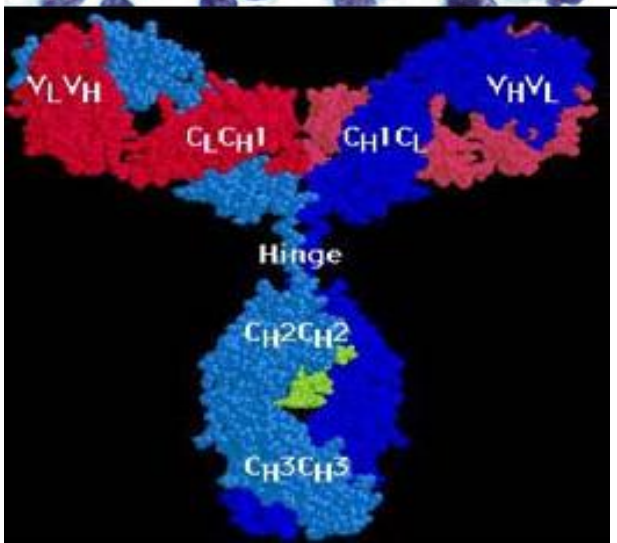




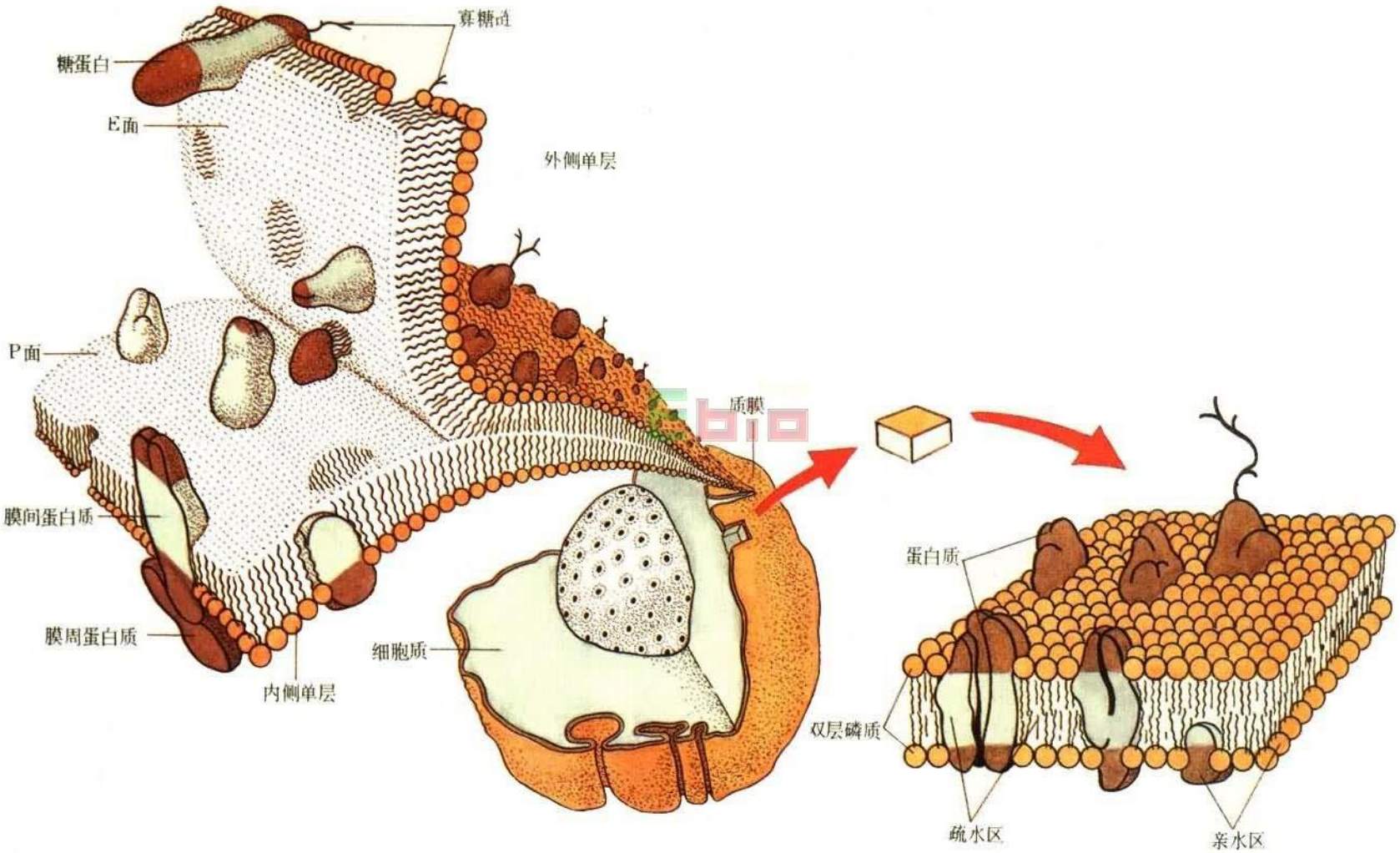
球状蛋白质构成体内的酶，免疫球蛋白以及可溶性蛋白质







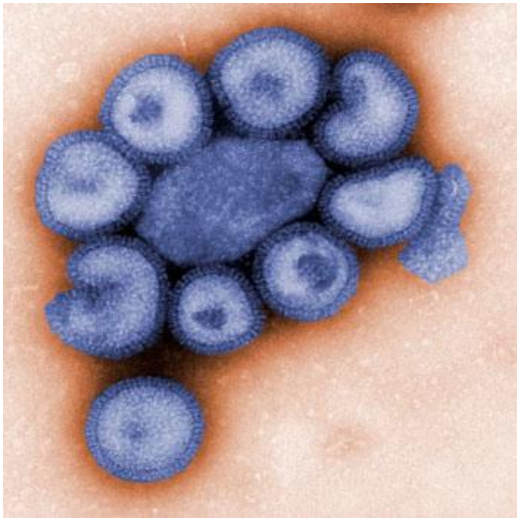
膜蛋白构成细胞的生物膜结构

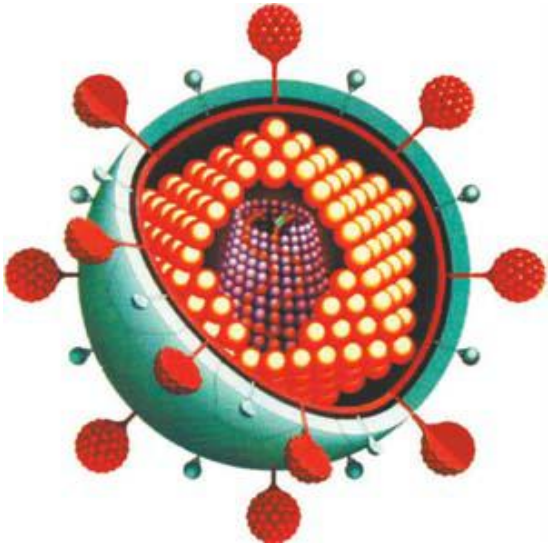


蛋白质是相对分子质量很大，从1万－－100万。
上下限是人为规定的。

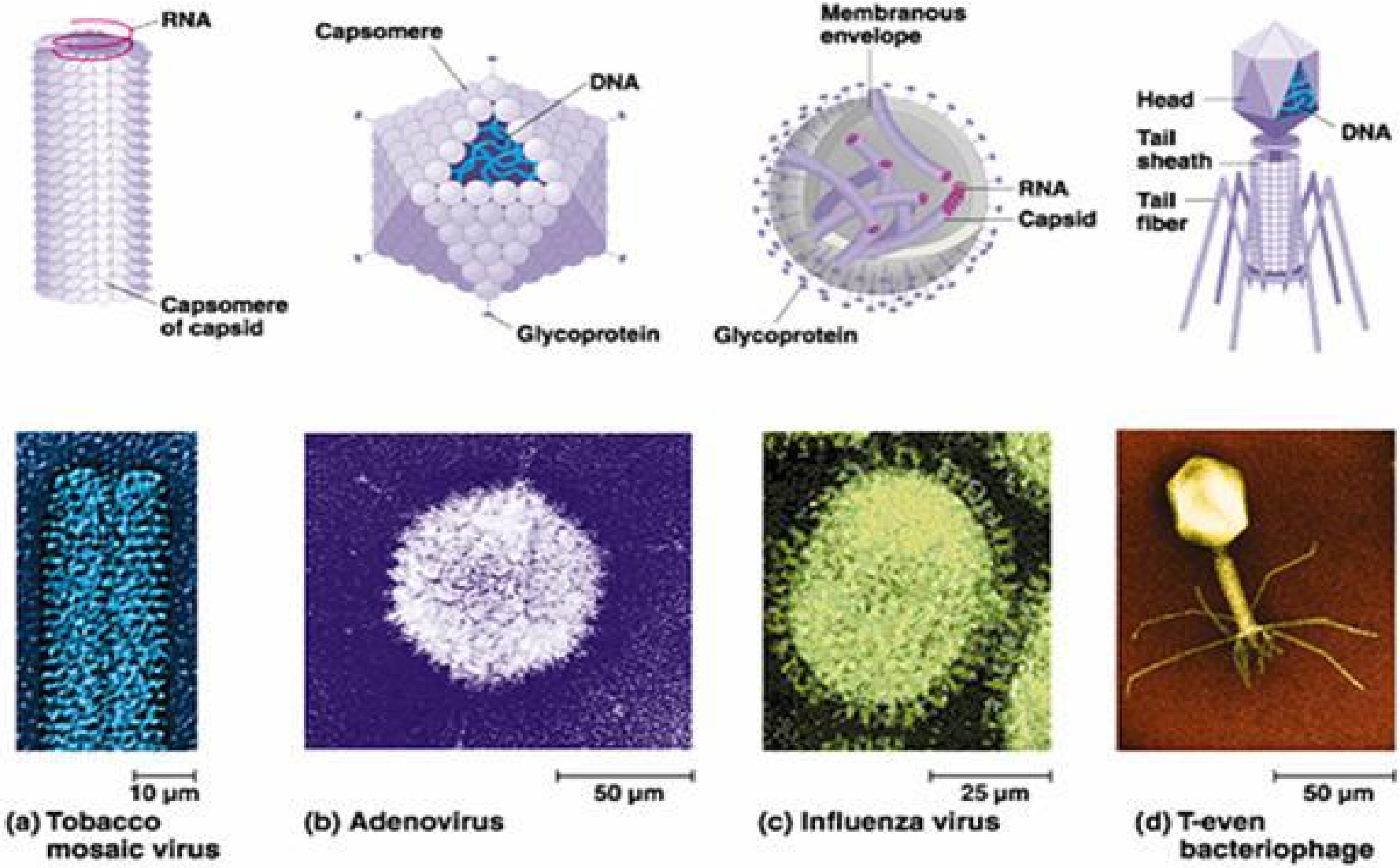
下限一般认为从胰岛素开始，其相对分子质量为5700。

其中每条多肽链称为亚基或亚单位亚基之间通过非共价键相互缔合。如果把这些寡聚蛋白质看作一个分子，那么蛋白质相对分子质量可达百万。





各种病毒



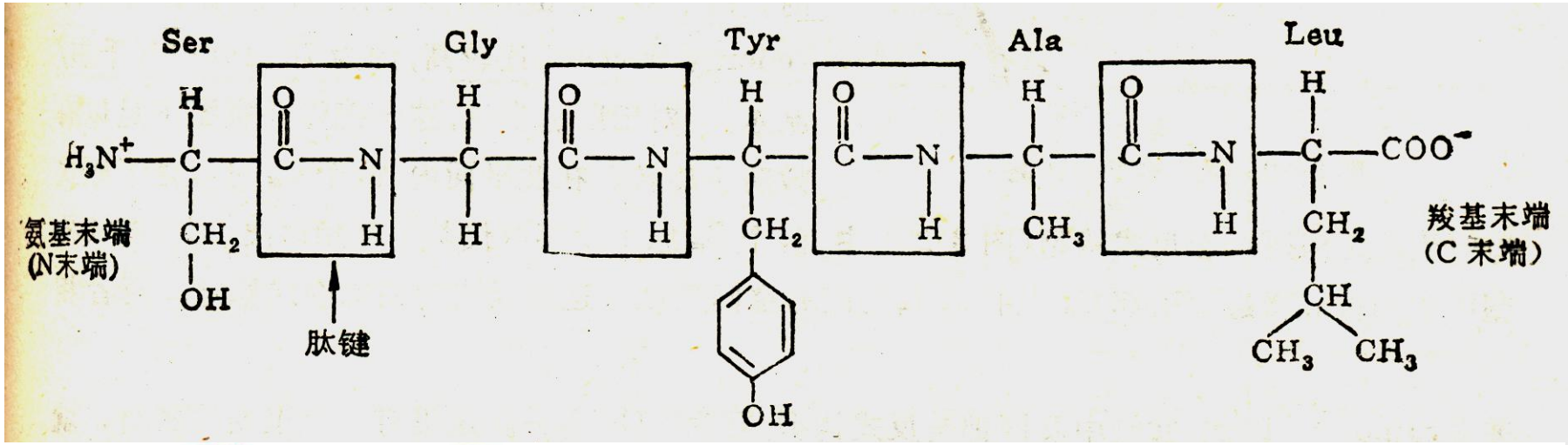
©1999 Addison Wesley Longman, Inc.

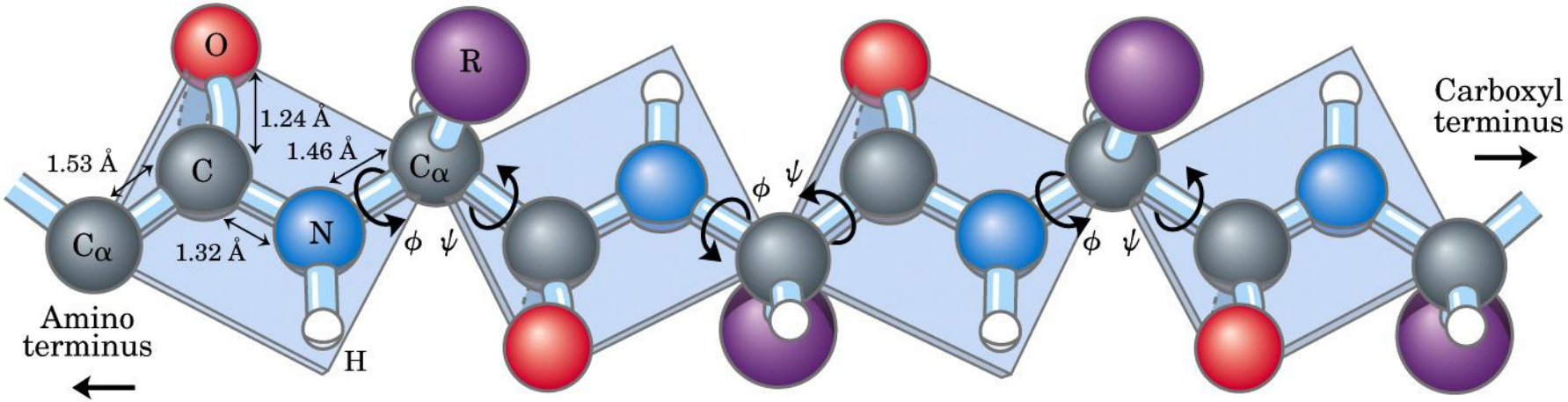
三、蛋白质构象和蛋白质结构的组织层次

蛋白质分子是由20种氨基酸构成的生物大分子，它的天然结构并不是走向随机的松散多肽链。

每一种天然蛋白质都有自己特有的空间结构，这种三维结构通常被称为蛋白质的构象。构象形态间的改变不涉及共价键的破裂。

蛋白质 或多肽链的结构





(b)

为了表示蛋白质结构的不同组织层次（level hierarchy），一般采用下列专门术语。

一级结构（primary structure）

是指多肽链的氨基酸序列，氨基酸的数目和二硫键的位置。

二级结构（secondary structure）

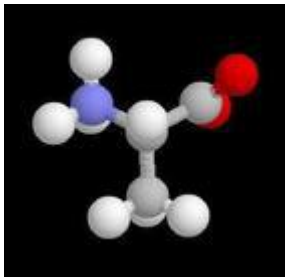
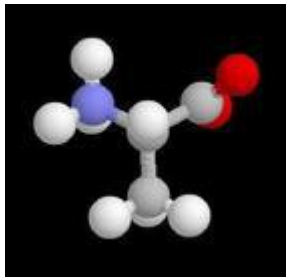
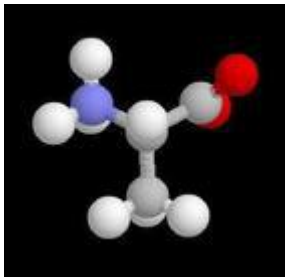
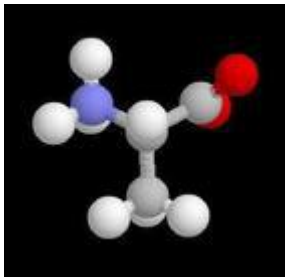
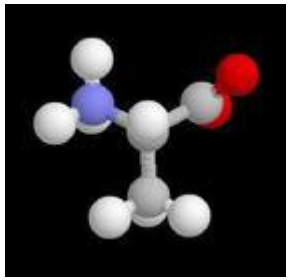
是指多肽链借助氢键排列成自己特有的 a-螺旋和β-折叠等形式的片段。

三级结构（tertiary structure）

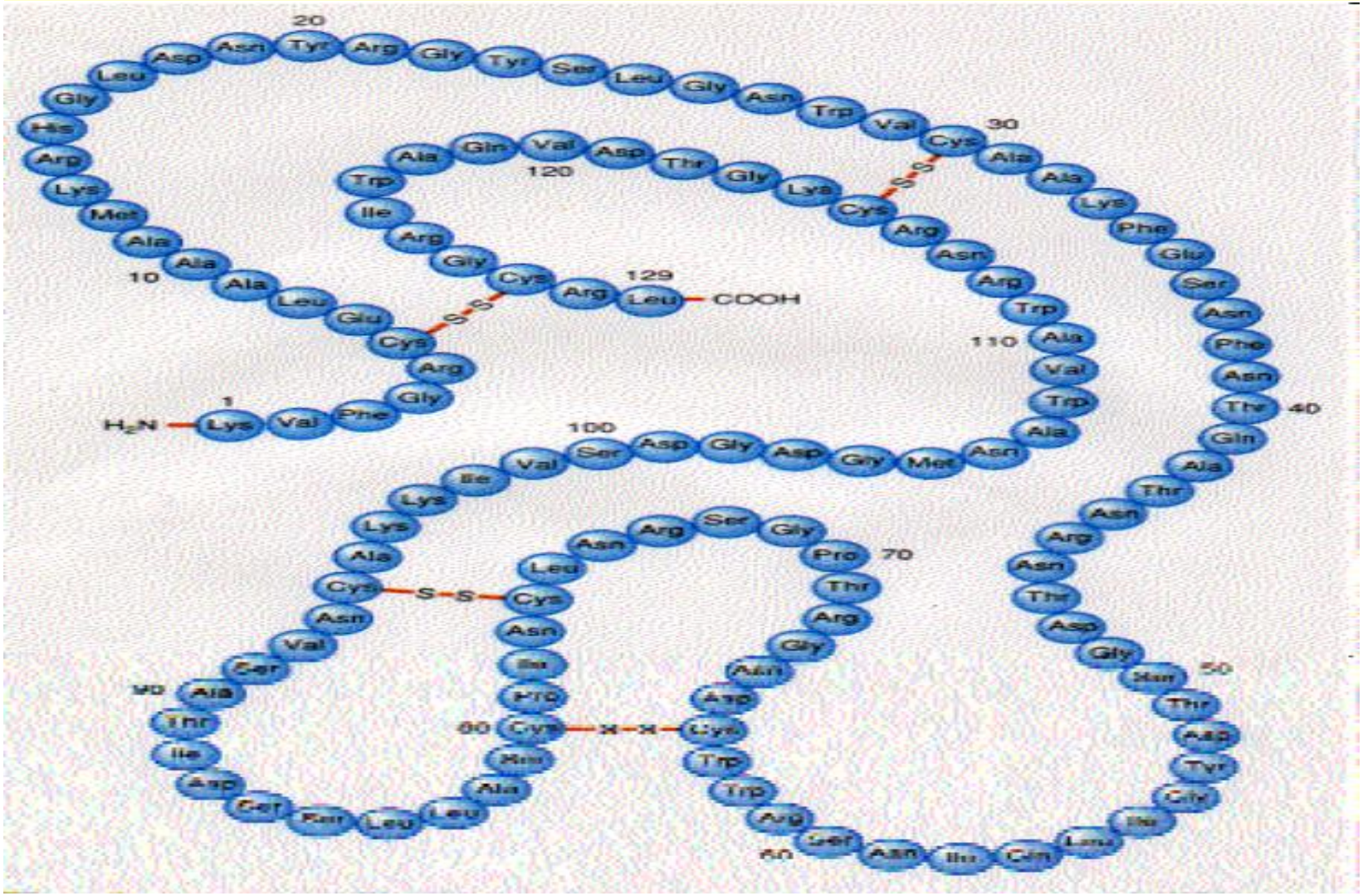
是指多肽链借助各种非共价键（或非共价力）弯曲、折叠成具有特定走向的紧密球状构象。

四级结构（quaternary structure）

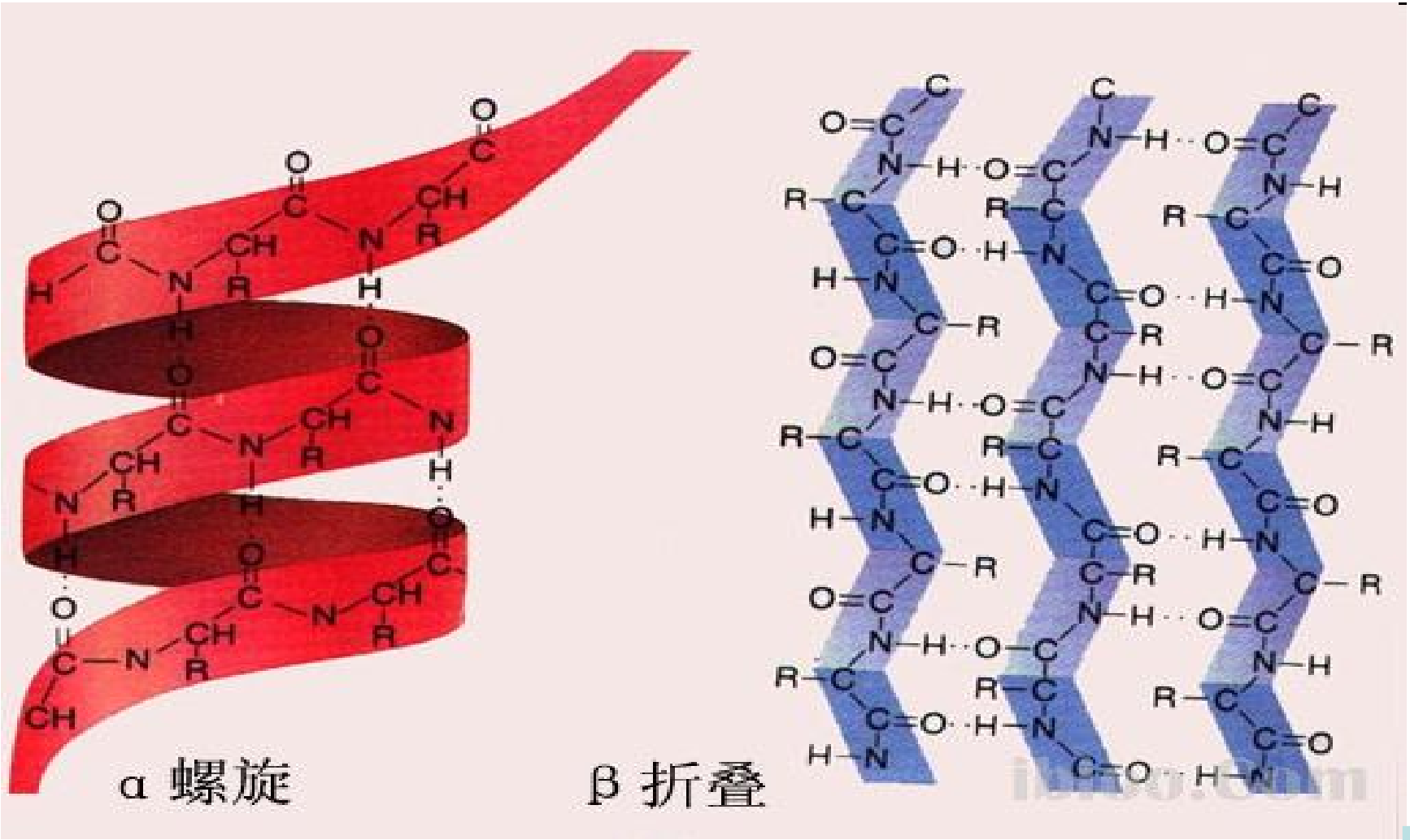
是指寡聚蛋白质中各亚基之间在空间上的相互关系和结合方式。当然其中各个亚基又有自己特定的三级结构。

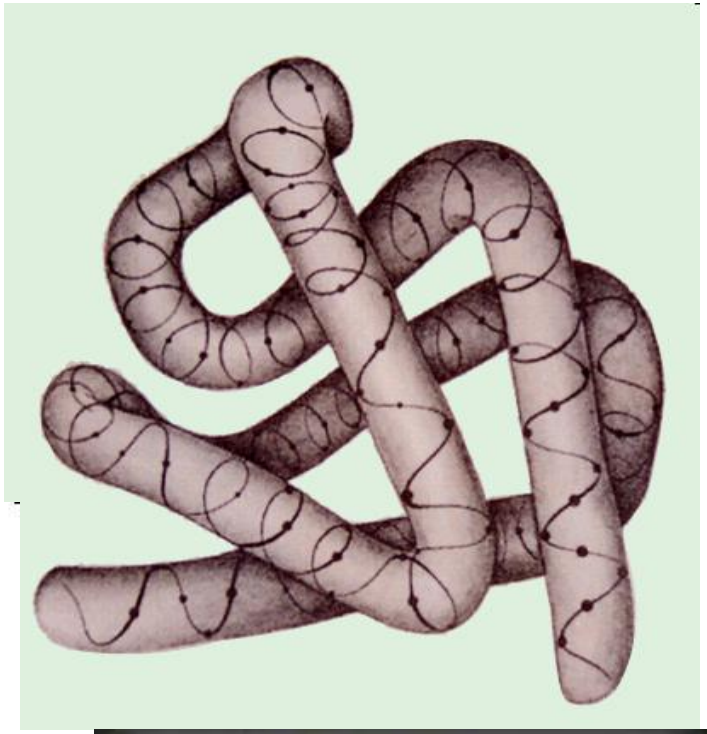
蛋白质的一级结构

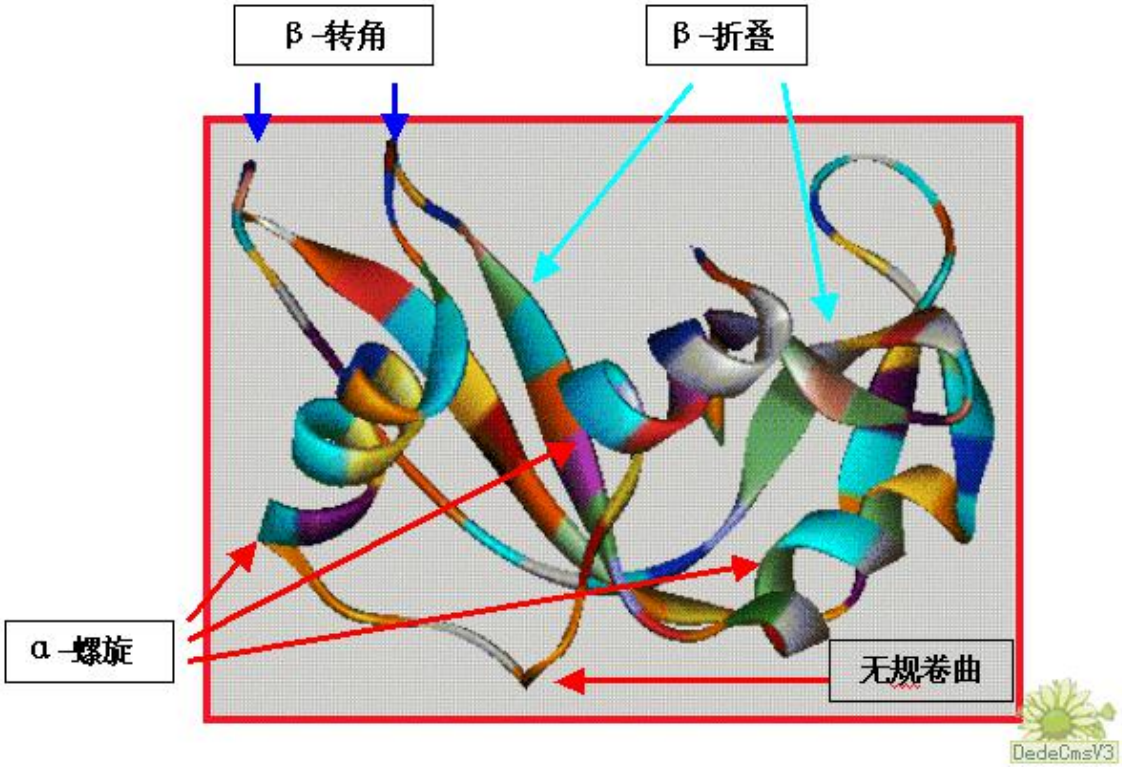


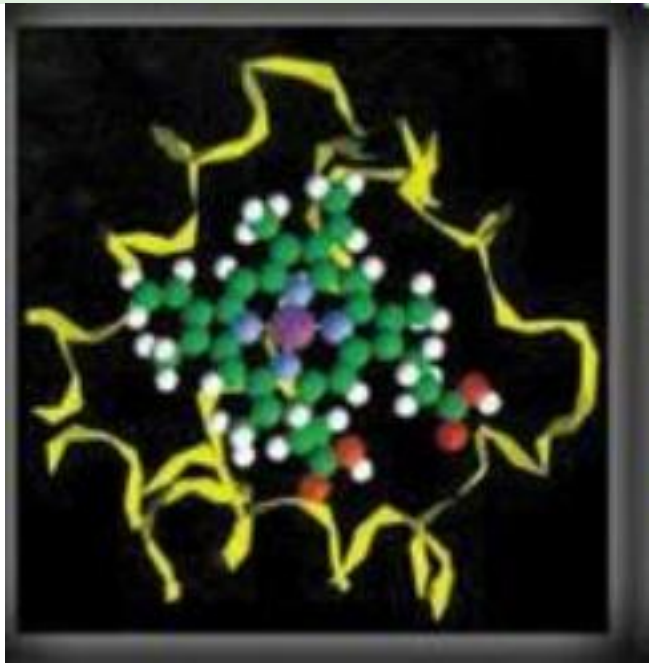
蛋白质的二级结构类型



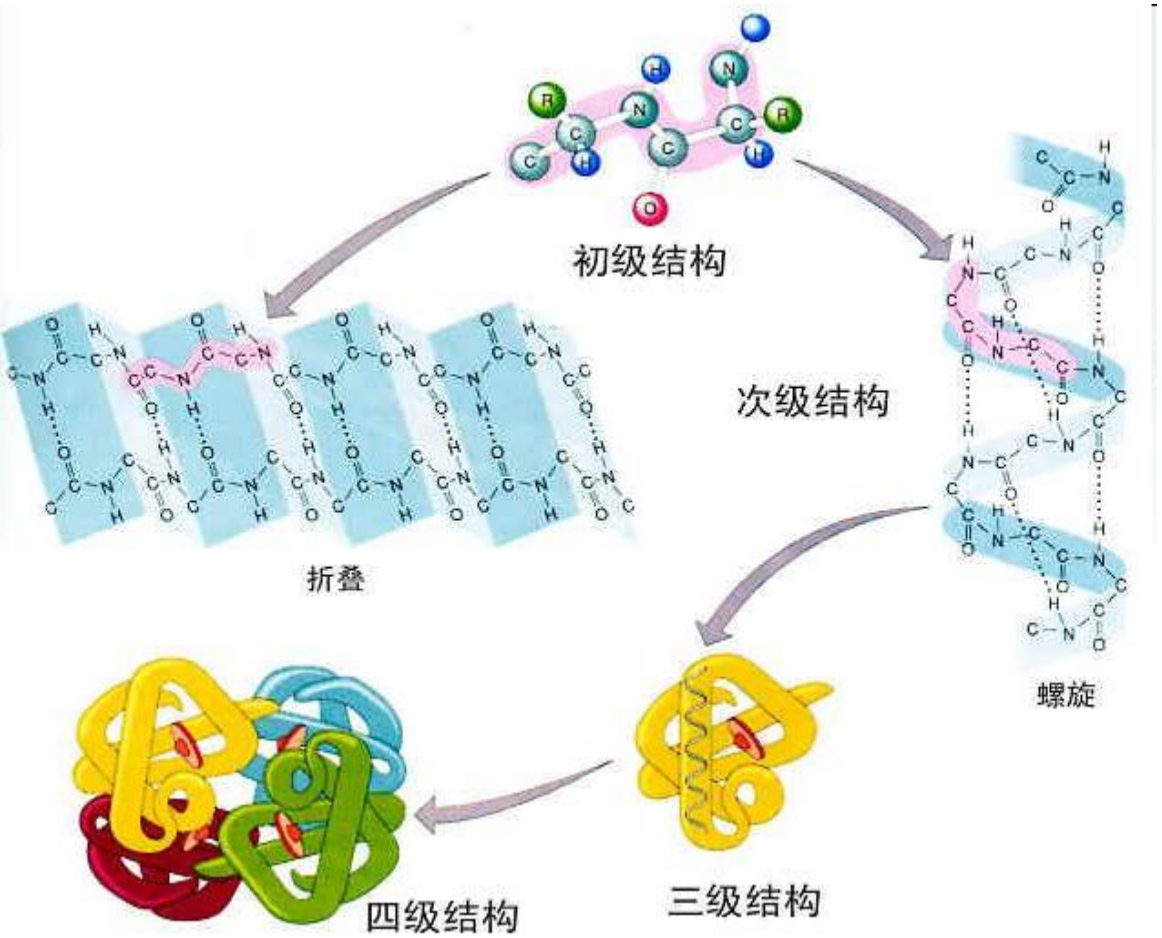
蛋白质的三级结构

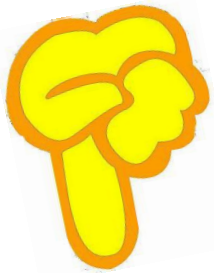


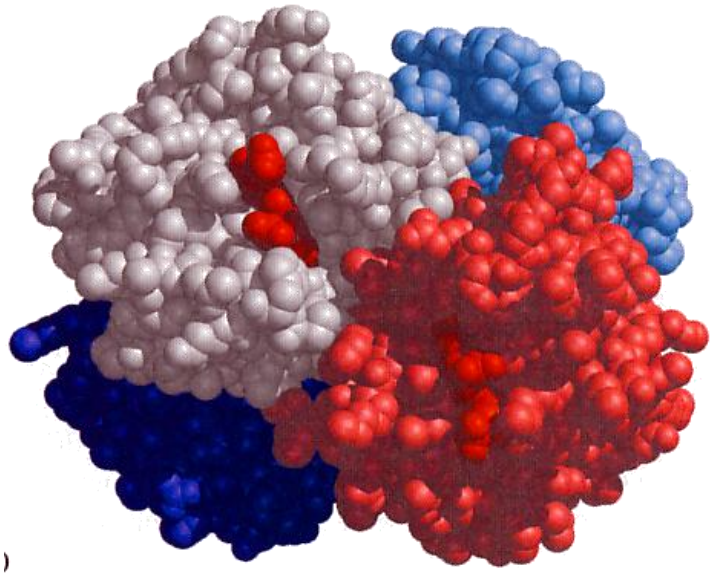




蛋白质的四级结构



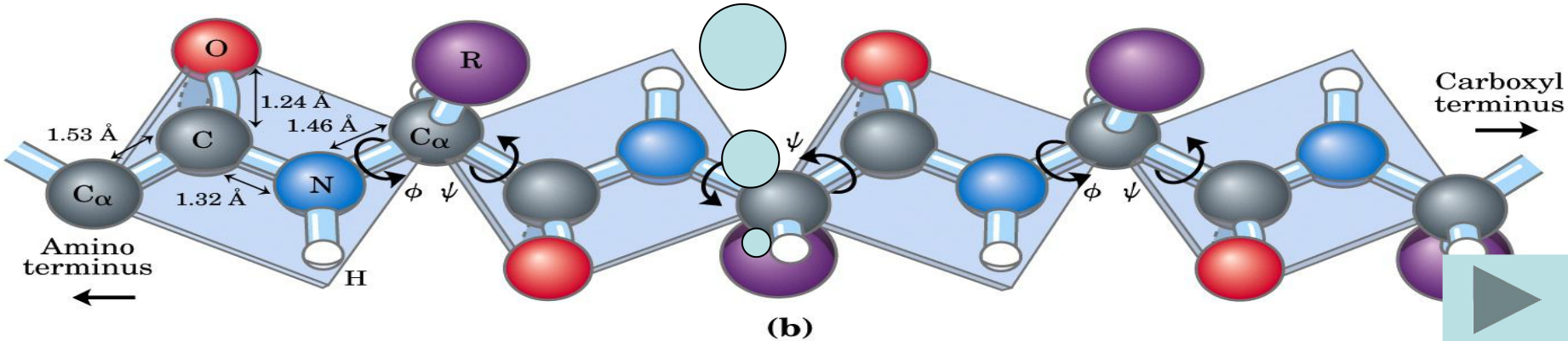




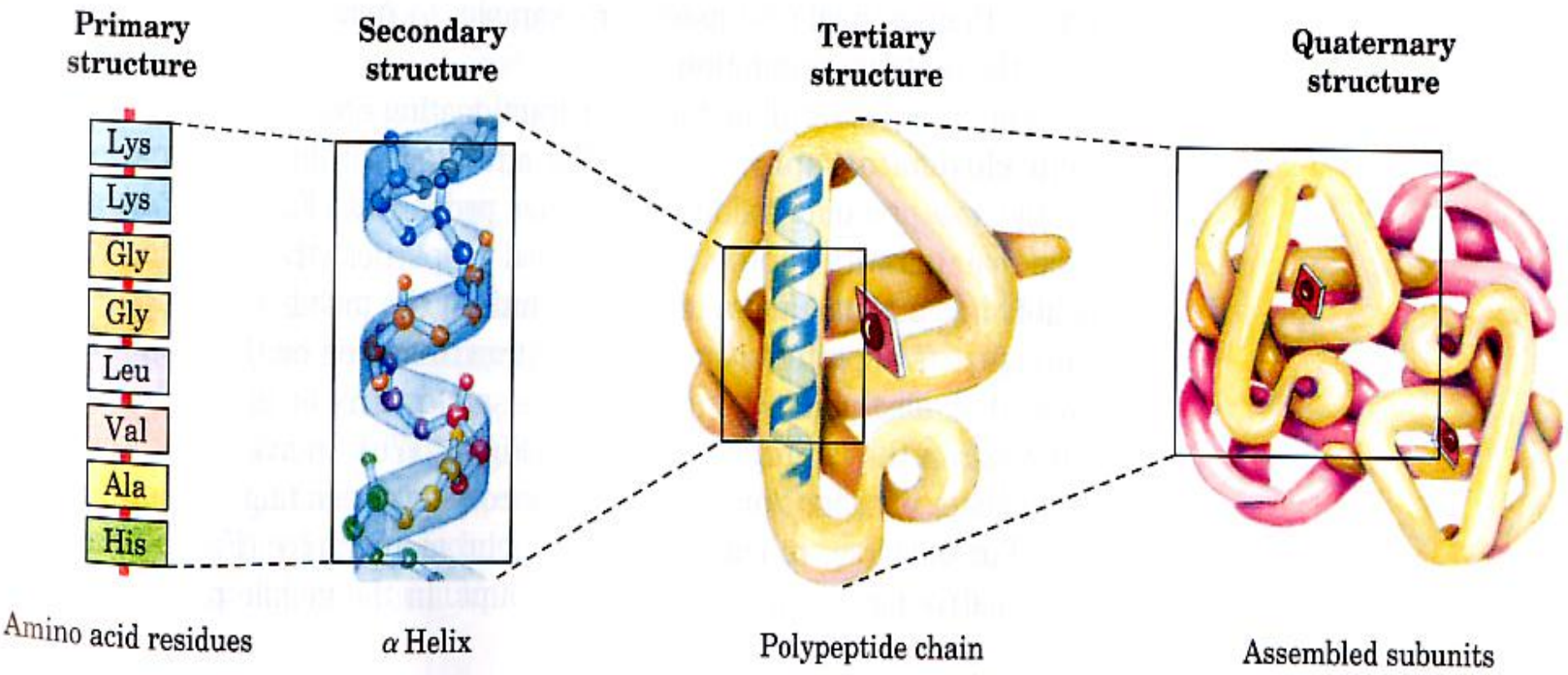
蛋白质的一级结构是由多肽链主链（backbone）上共价连接的氨基酸残基决定的。

二级结构和其他高级结构层次主要是由非共价力作用决定的。

必须强调指出，一个蛋白质分子为获得复杂结构所需的全部信息都含于一级结构即多肽链的氨基酸序列中。

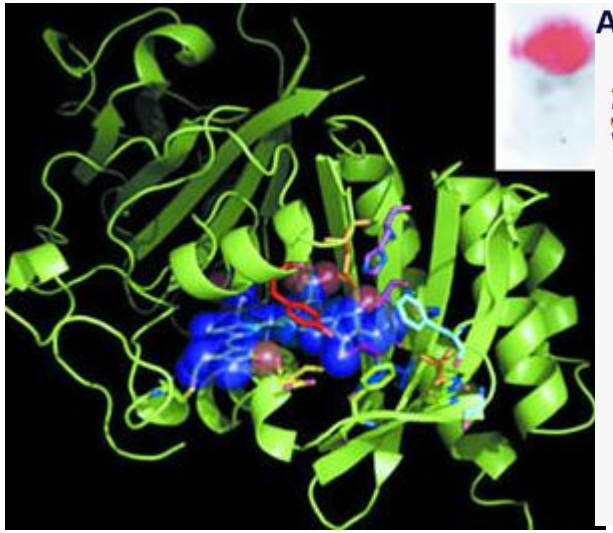


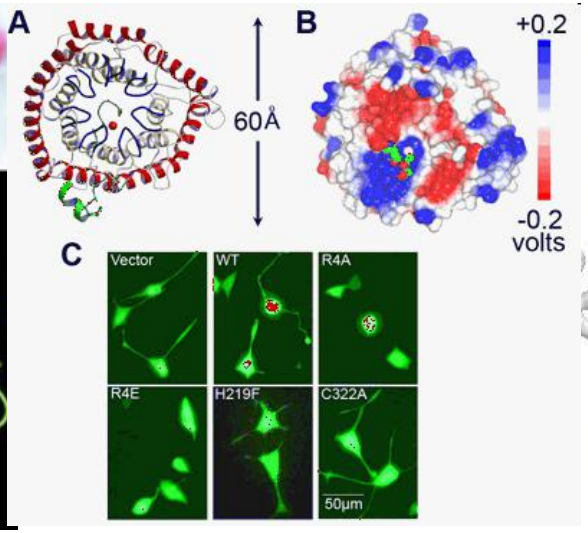
protein structure

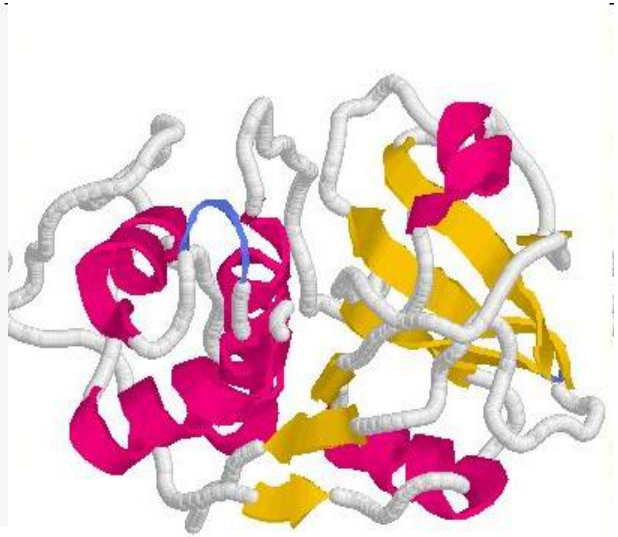


四、蛋白质功能的多样性

生物界蛋白质的种类估计在 10^{10}～10^{12}数量级。造成种类如此众多的原因主要是 20种参与蛋白质组成的氨基酸在肽链中的排列顺序不同所引起的。







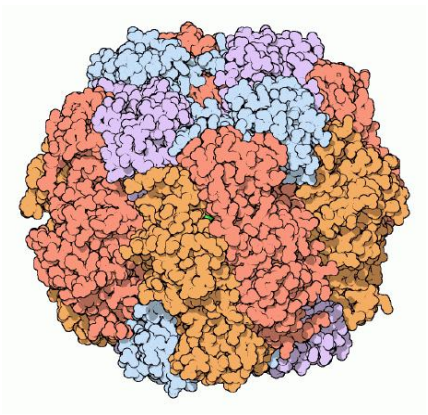
蛋白质的生物学功能有以下几个方面：

（1）
催化

（2）
结构成分

（3）
转运

（4）
调节



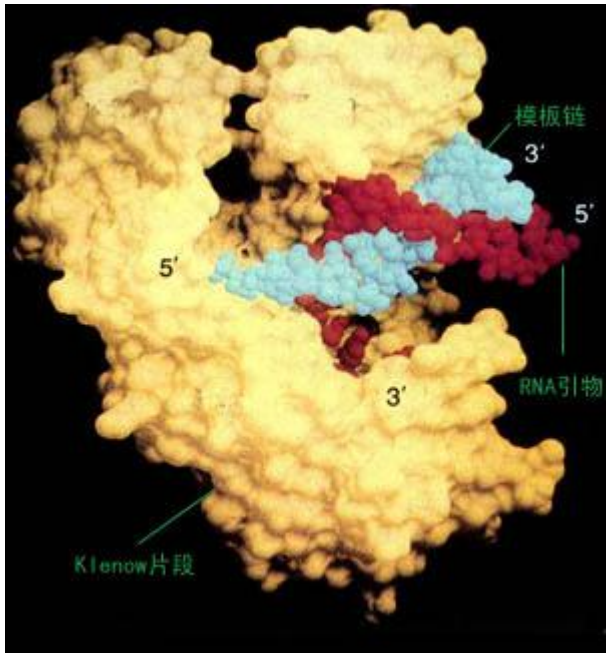
（5）
运动

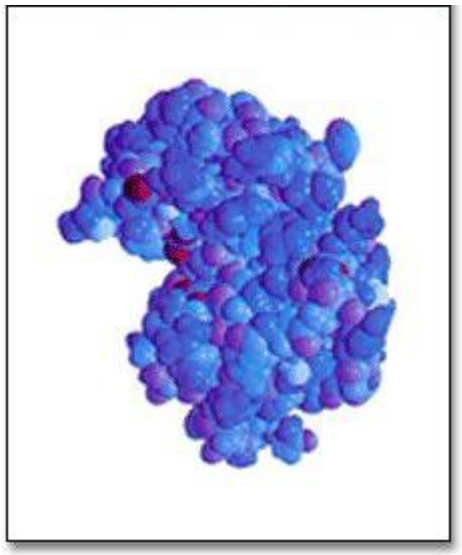
（6）
贮存

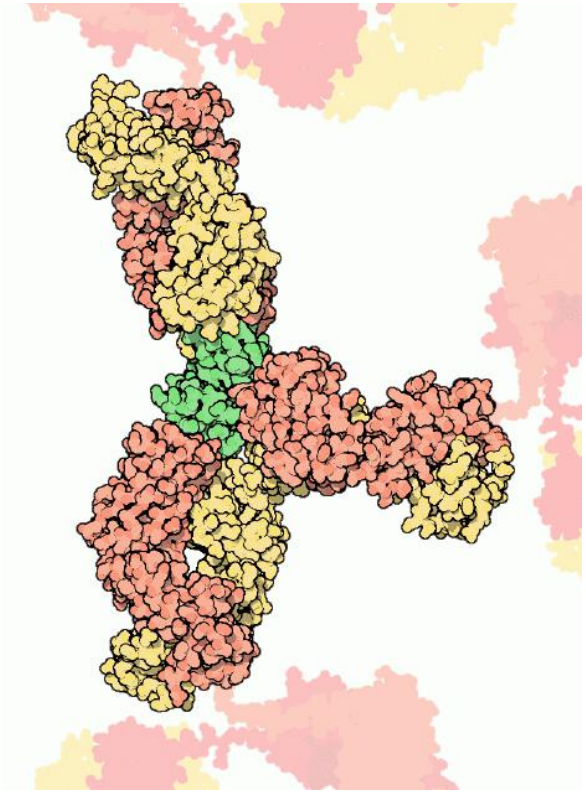
（7）
防御和进攻

（8）
特殊功能

（1）催化


模板链
3′
5′
5′
3′
RNA引物
Klenow片段

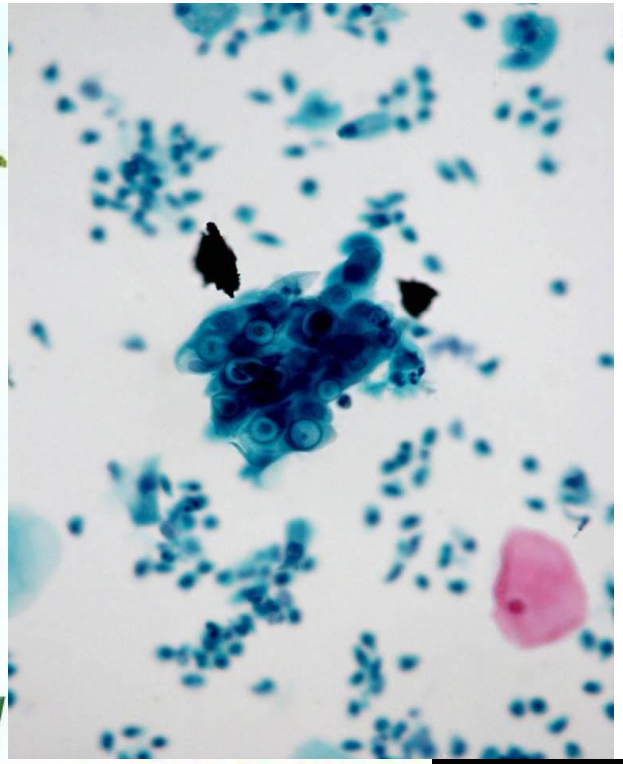




Three-dimensional structure of a dimeric protein

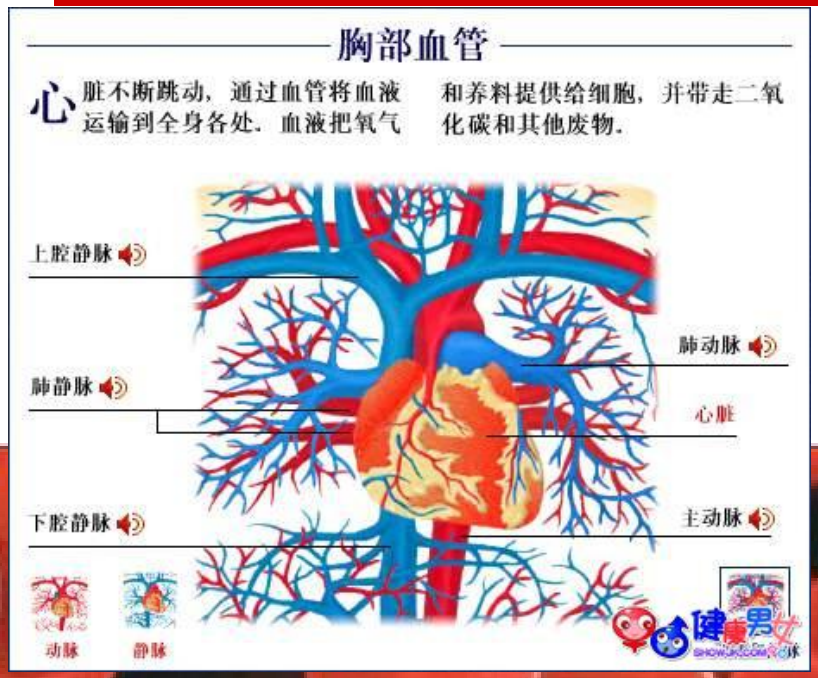
（2）结构成分

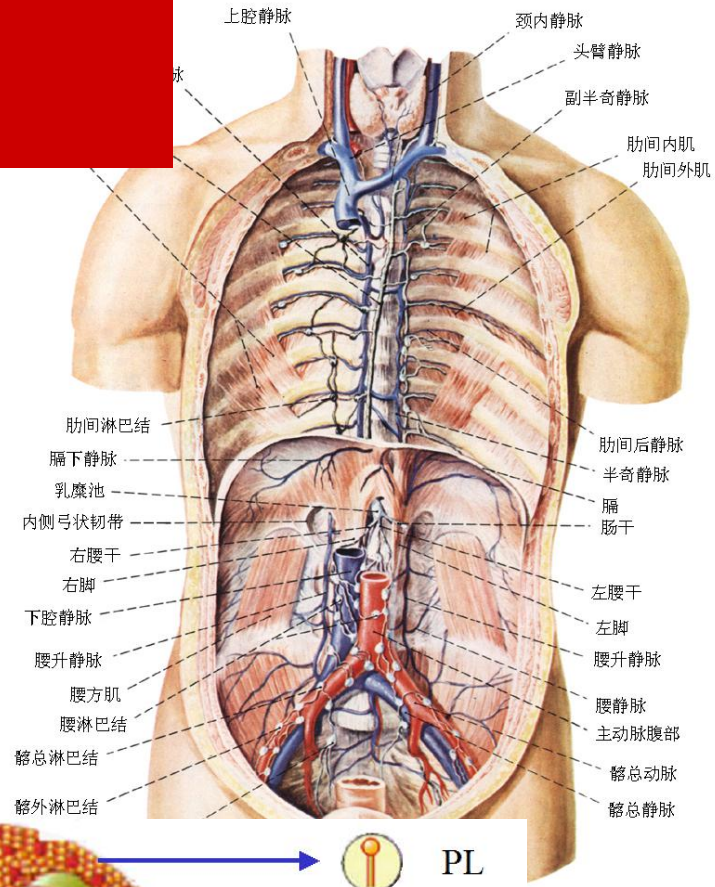
龙眼
枣
荆条
柃
乌桕
紫云英
山乌桕
鸭脚木
四川园林网
dogreens.com

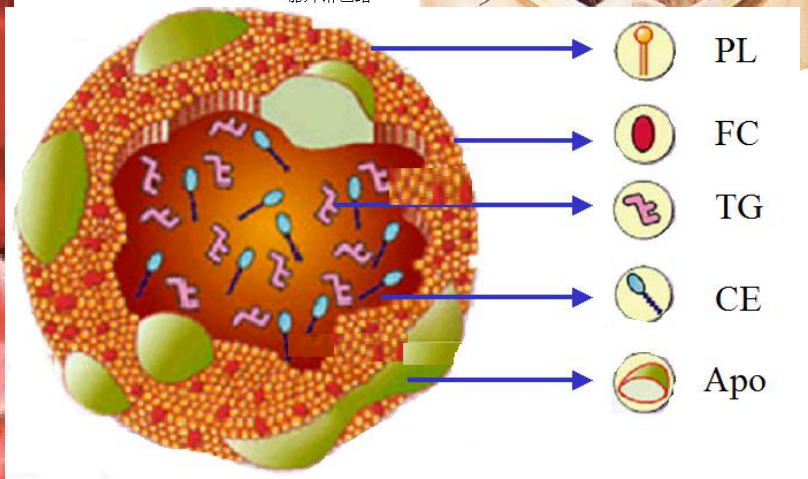


我图网 ooopic.com
NO.20090709113688

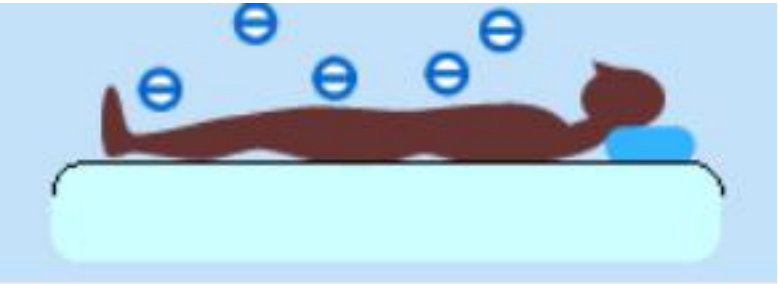
（3）转运

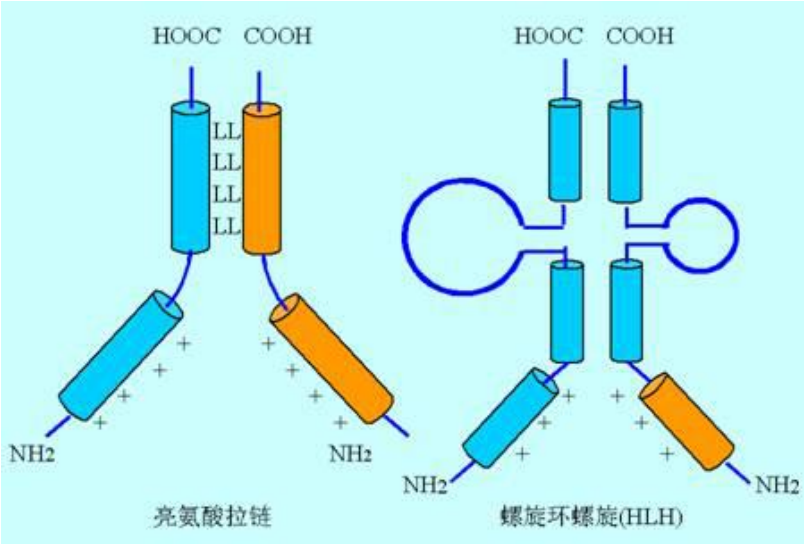

胸部血管
心脏不断跳动，通过血管将血液运输到全身各处。血液把氧气和养料提供给细胞，并带走二氧化碳和其他废物。
上腔静脉
肺动脉
肺静脉
心脏
下腔静脉
主动脉
动脉
静脉

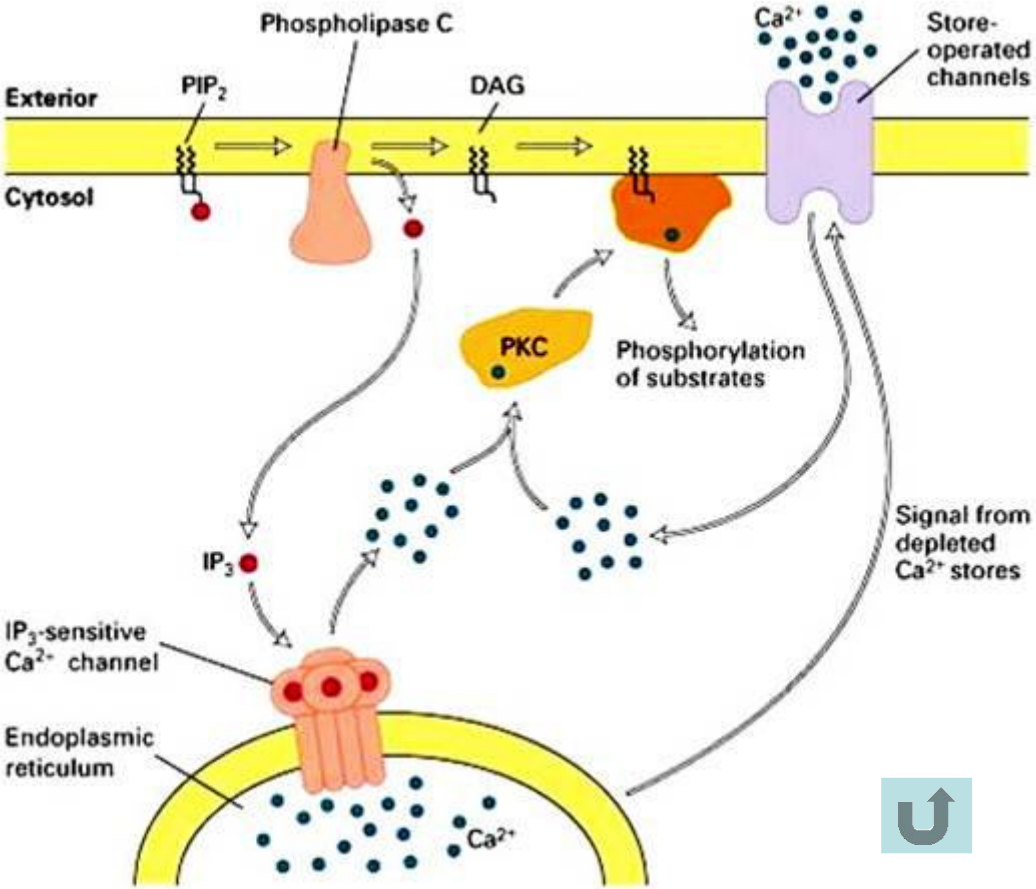

上腔静脉
颈内静脉
头臂静脉
副半奇静脉
肋间内肌
肋间外肌
肋间淋巴结
膈下静脉
乳糜池
内侧弓状韧带
右腰干
右脚
下腔静脉
腰升静脉
腰方肌
腰淋巴结
髂总淋巴结
髂外淋巴结
肋间后静脉
半奇静脉
膈
肠干
左腰干
左脚
腰升静脉
腰静脉
主动脉腹部
髂总动脉
髂总静脉

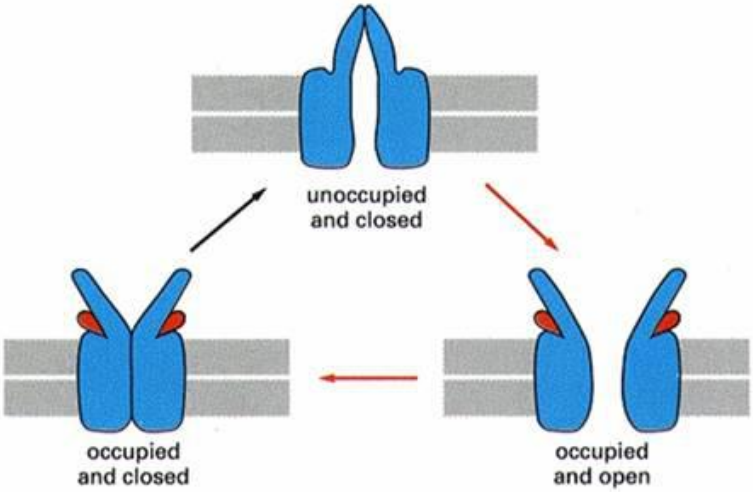

PL
FC
TG
CE
Apo

（4）调节

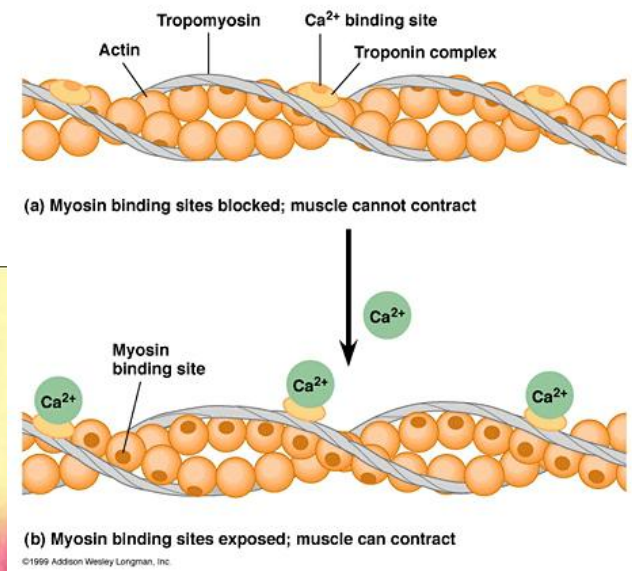


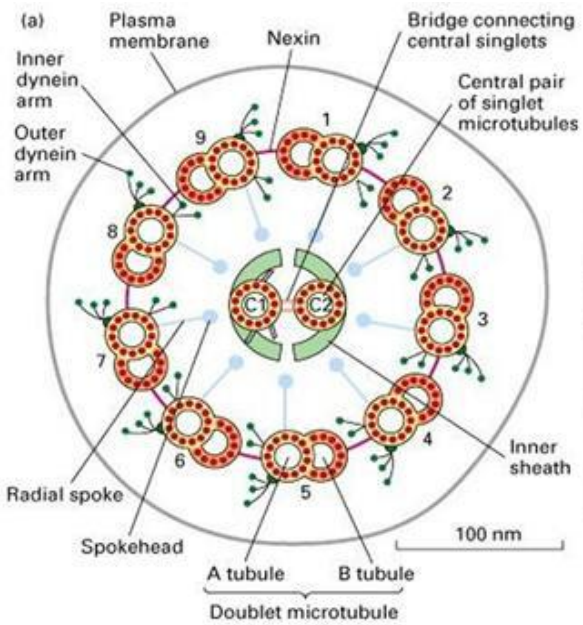

HOOC COOH
LL
LL
LL
LL
NH2
NH2
亮氨酸拉链
HOOC COOH
NH2
NH2
螺旋环螺旋(HLH)

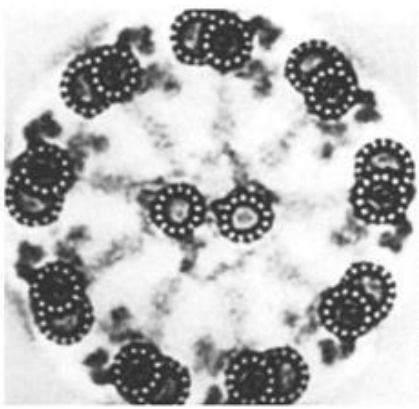

Phospholipase C
Ca2+
Store-operated channels
Exterior
PIP2
DAG
Cytosol
PKC
Phosphorylation of substrates
Signal from depleted Ca2+ stores
IP3
IP3-sensitive Ca2+ channel
Endoplasmic reticulum
Ca2+

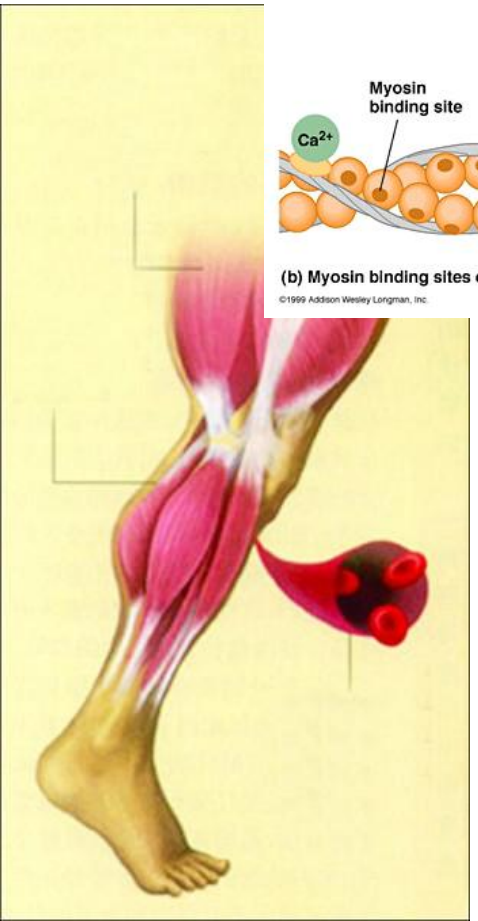

unoccupied and closed
occupied and closed
occupied and open

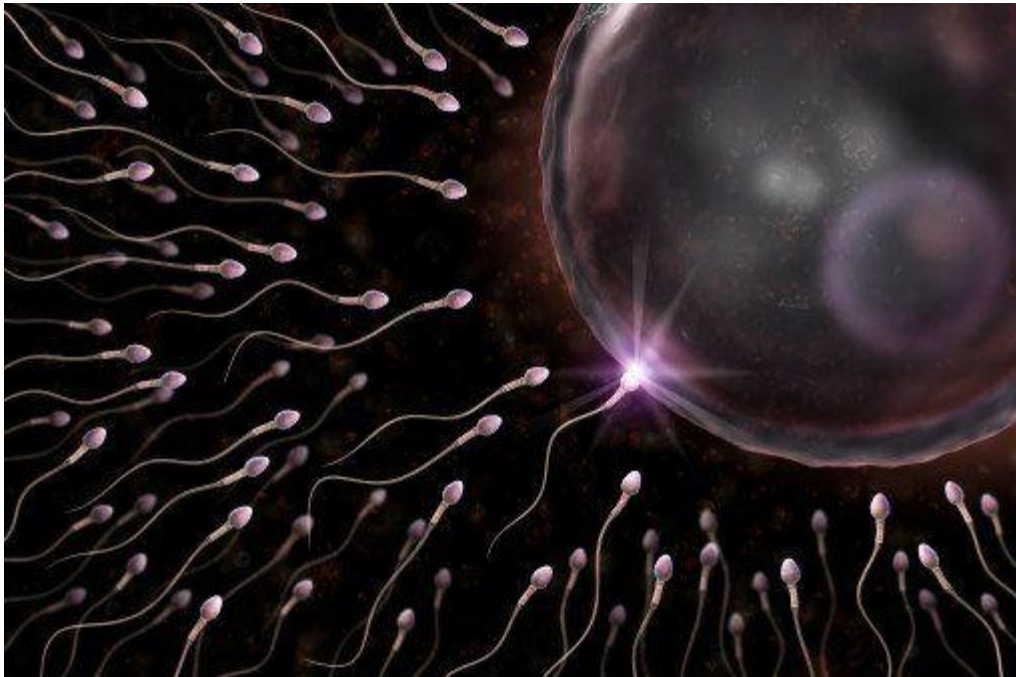
（5）运动


Tropomyosin
Ca^{2+} binding site
Actin
Troponin complex
(a) Myosin binding sites blocked; muscle cannot contract
Ca^{2+}
Myosin binding site
Ca^{2+}
Ca^{2+}
Ca^{2+}
(b) Myosin binding sites exposed; muscle can contract
©1999 Addison Wesley Longman, Inc

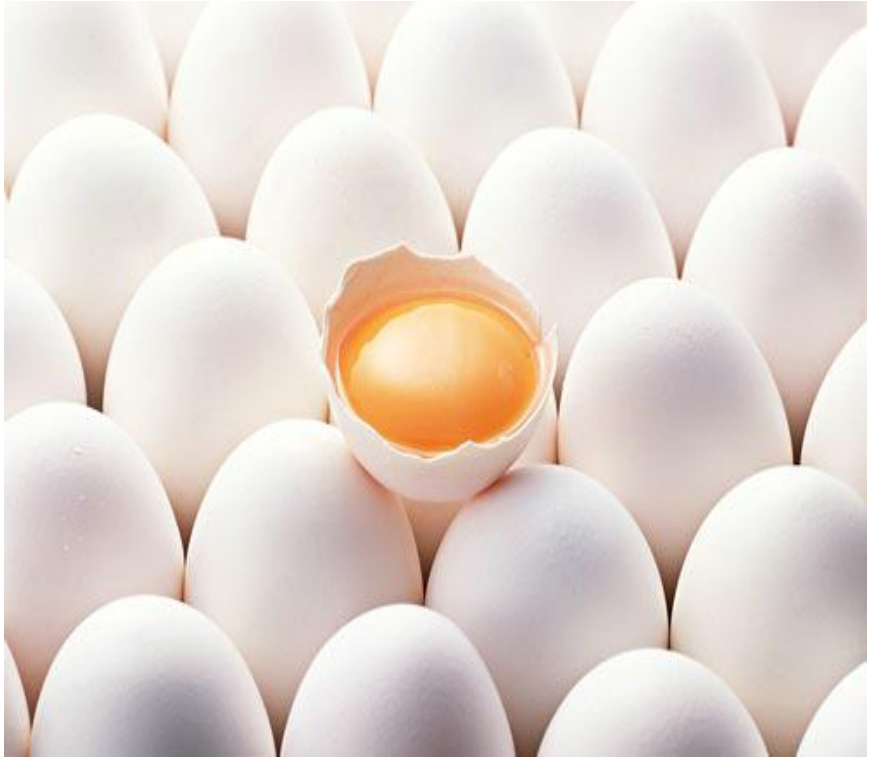

(a)
Plasma membrane
Nexin
Bridge connecting central singlets
Inner dynein arm
Central pair of singlet microtubules
Outer dynein arm
1
2
3
4
5
6
7
8
9
C1
C2
Inner sheath
Radial spoke
Spokehead
100 nm
A tubule
B tubule
Doublet microtubule

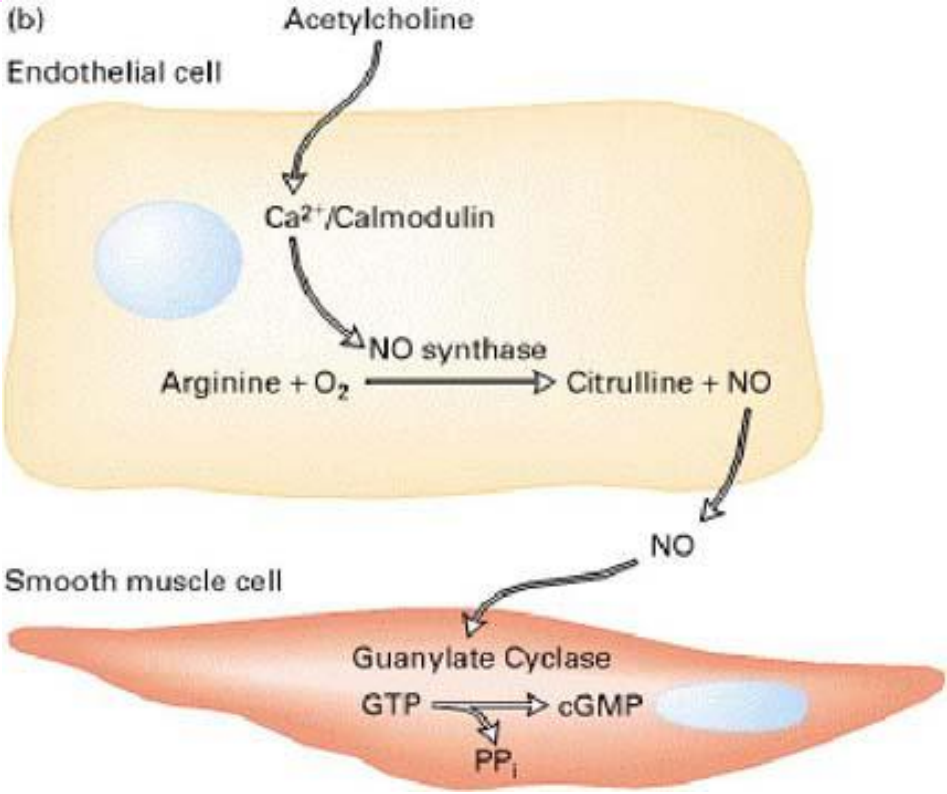






（6）贮存

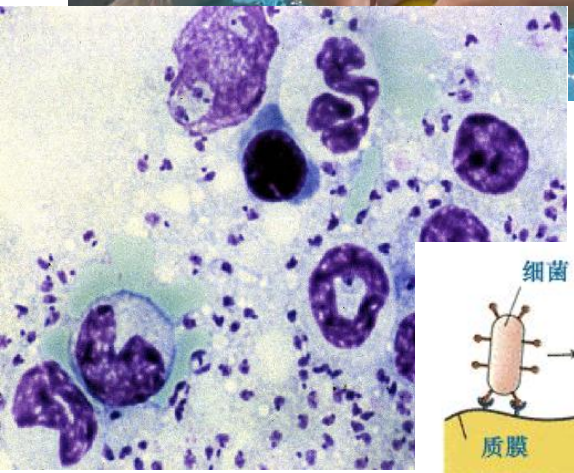


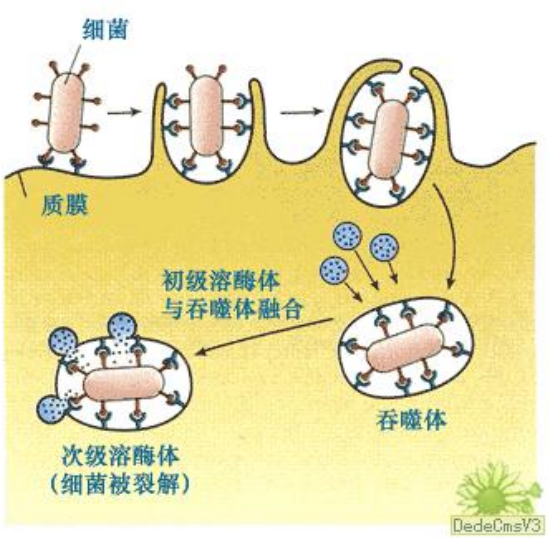


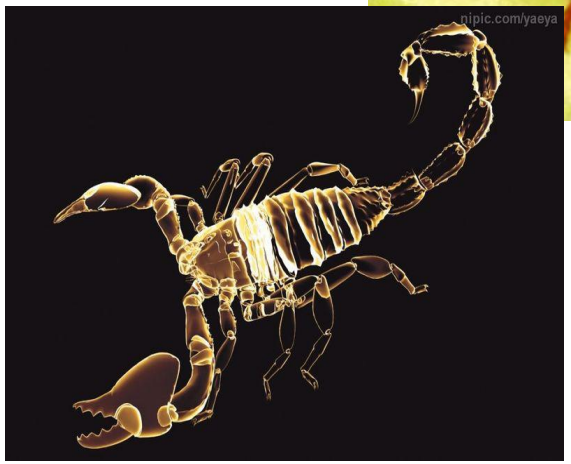
铁蛋白，铜蓝蛋白，卵清白蛋白，
钙贮存蛋白

（7）防御和进攻

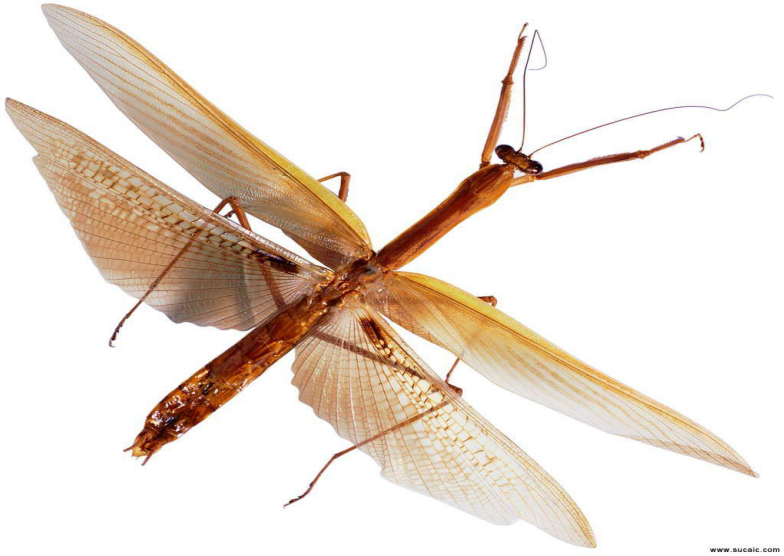
Zoom Tool




细菌
质膜
初级溶酶体
与吞噬体融合
吞噬体
次级溶酶体
（细菌被裂解）
DedeCmsV3


nipic.com/yaeya

（8）特殊功能



第二节
蛋白质的构件分子—氨基酸

一、氨基酸——蛋白质的构件分子

二、氨基酸的分类

三、氨基酸的酸碱化学

四、氨基酸的化学反应

五、氨基酸的光学活性和光谱性质

六、氨基酸混合物的分析分离

一、氨基酸---蛋白质的构件分子

（一）蛋白质的水解

（二）氨基酸的一般结构

（一）蛋白质的水解

- 1、酸水解：

  H_2SO_4或HCl进行水解，一般用6mol/L HCI or 4mol/L H_2SO_4, 112 ^{0}C 20小时可使蛋白质完全水解。

  优点：是蛋白质水解完全，不引起消旋作用得到的产物是L－型氨基酸。

  缺点：是色氨酸全部破坏，丝氨酸和苏氨酸部分破坏。

2、碱水解：

一般用5mol/L NaOH,100 ⁰C　10-20小时可使蛋白质完全水解。

优点：是色氨酸完全保留，

缺点：是（1）消旋（2）多数氨基酸破坏（3）产物有L-、D-型（4）精氨酸脱氨，形成鸟氨酸和尿素。

3、酶水解:

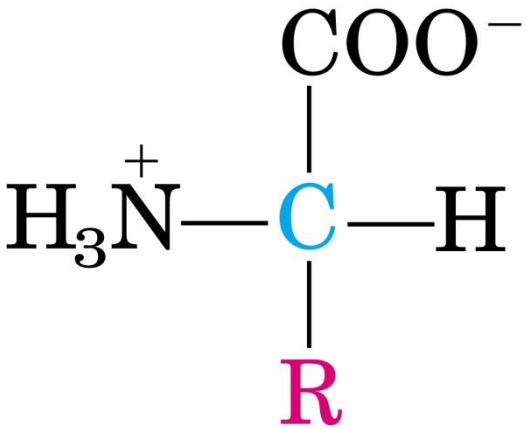
常用蛋白水解酶对蛋白质进行水解。

优点：酶水解的优点是不产生消旋作用，不破坏氨基酸；

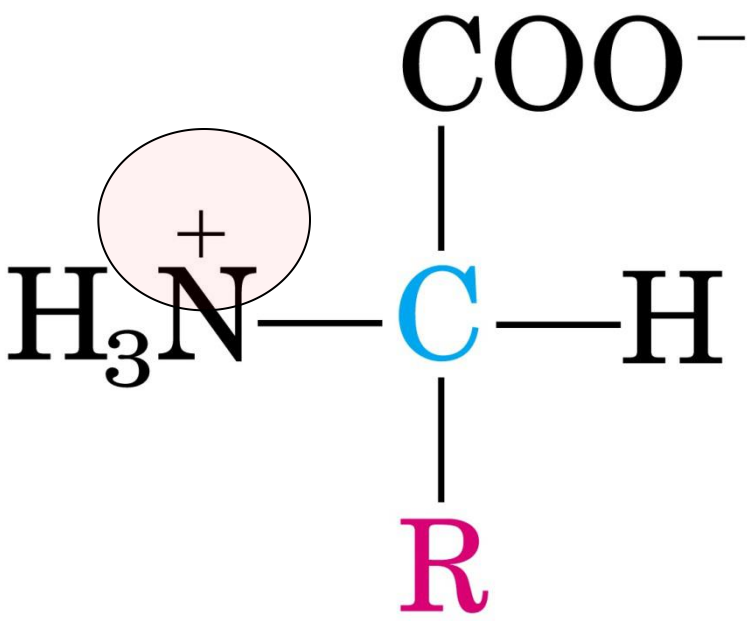
缺点：是水解不彻底，水解时间长易污染，本法常用于多肽类和水解蛋白的制取。

（二）氨基酸的一般结构

- 组成蛋白质的氨基酸有20种。除脯氨酸外及衍生物，这些氨基酸都有一个共同的结构特点：与羧基相连的α-C原子上都有一个氨基。因此称它们为α-氨基酸。除脯氨酸外，它们都有共同的结构通式：



氨基酸在中性时，羧基以－COO^-，氨基以－NH_3^+存在。这样氨基酸分子含有一个正电荷和一个负电荷，称为兼性离子。



α-氨基酸中除甘氨酸外（α-C原子上都有两个氢基），α-C原子是手性碳原子，因此都具有旋光性；

蛋白质中的氨基酸都是L-型氨基酸。

α-氨基酸都是白色结晶体，每种氨基酸都有自己独特的晶形，可以用来鉴别不同的氨基酸。

氨基酸熔点较高，一般在200^{0}C以上。

除胱氨酸和酪氨酸微溶于水外大部分氨基酸溶于水，它们的盐易溶于水。

脯氨酸和羟脯氨酸能溶于乙醇和乙醚。

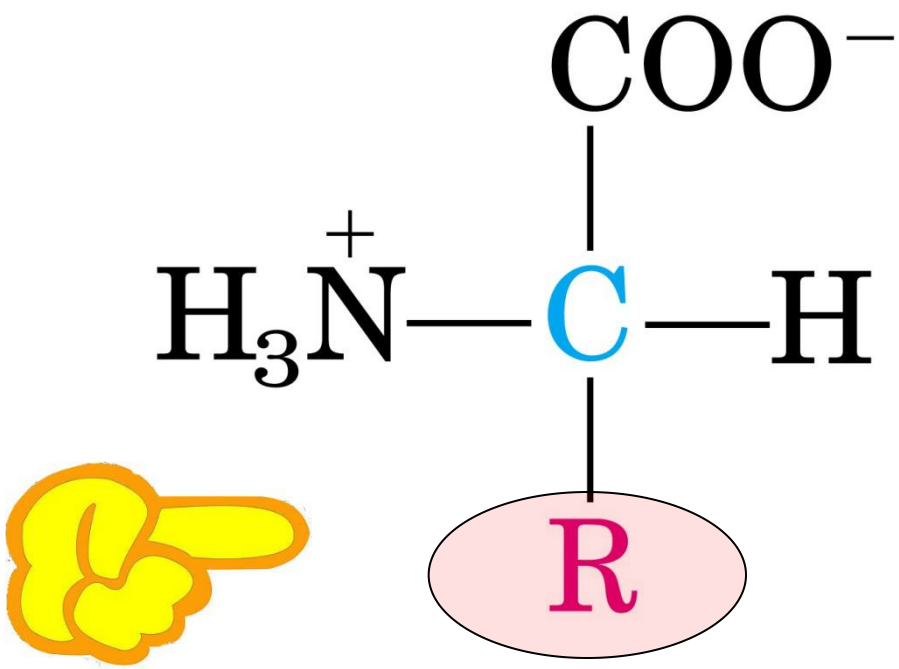
二、氨基酸的分类

自然界中，生物体内发现的天然氨基酸有180多种，但组成蛋白质的氨基酸只有20种。这20种氨基酸称为蛋白质氨基酸，其他氨基酸称为非蛋白质氨基酸。

我们主要研究的是组成蛋白质的这20种氨基酸。

常见的蛋白质氨基酸

氨基酸的区别在于它们的R基，因此R基就成为了分类的依据。按R基的化学结构将20种氨基酸分为脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸和杂环族氨基酸三类。



1、脂肪族氨基酸

（1）中性氨基酸

甘氨酸、丙氨酸、
缬氨酸、亮氨酸
异亮氨酸

（2）含羟基或硫氨基酸

丝氨酸、苏氨酸、
半胱氨酸
和甲硫氨酸（蛋氨酸）

（3）酸性氨基酸及其酰胺

天冬氨酸、天冬酰胺、
谷氨酸、谷氨酰胺

（4）碱性氨基酸

赖氨酸、
精氨酸

2、芳香族氨基酸

苯丙氨酸、
酪氨酸、
色氨酸

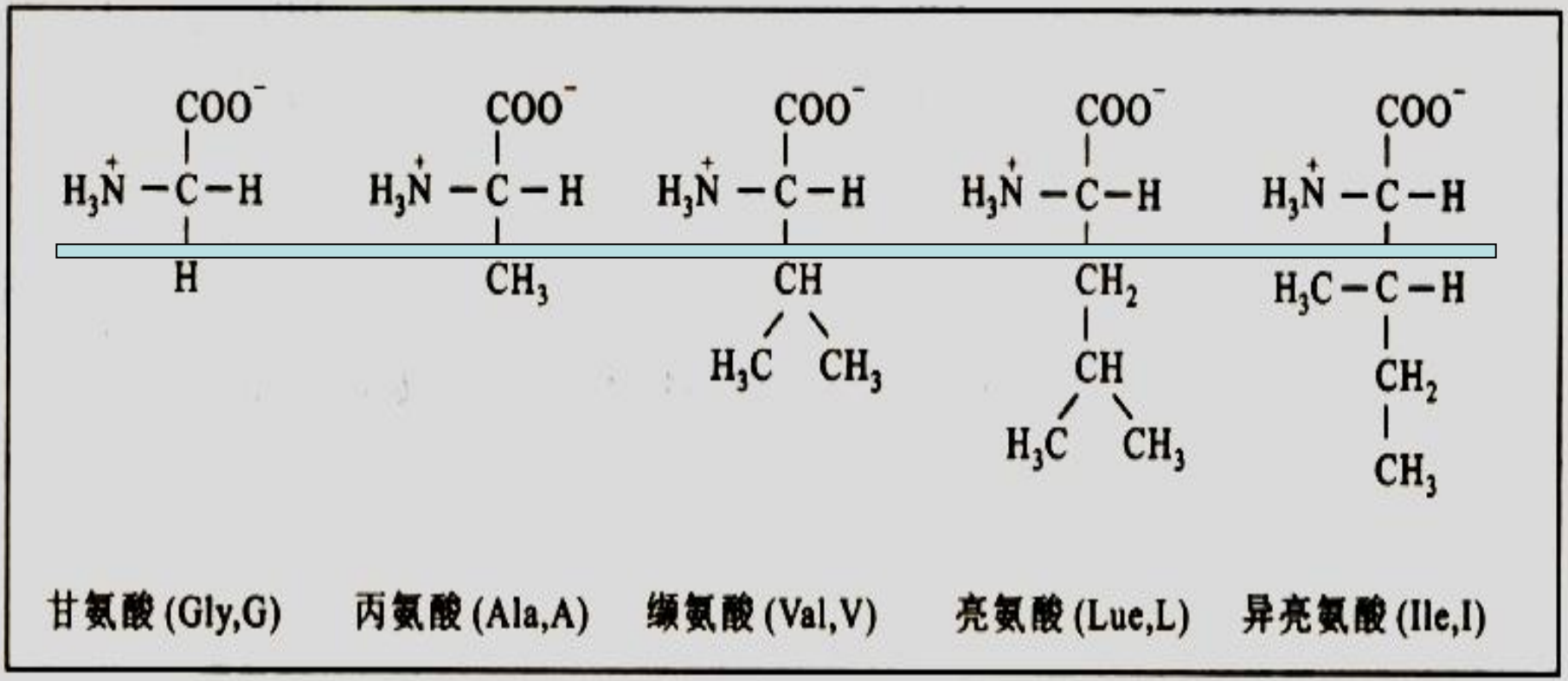
3、杂环族氨基酸

组氨酸、

脯氨酸

脂肪族氨基酸

中性氨基酸



脂肪族氨基酸

含羟基或硫氨基酸

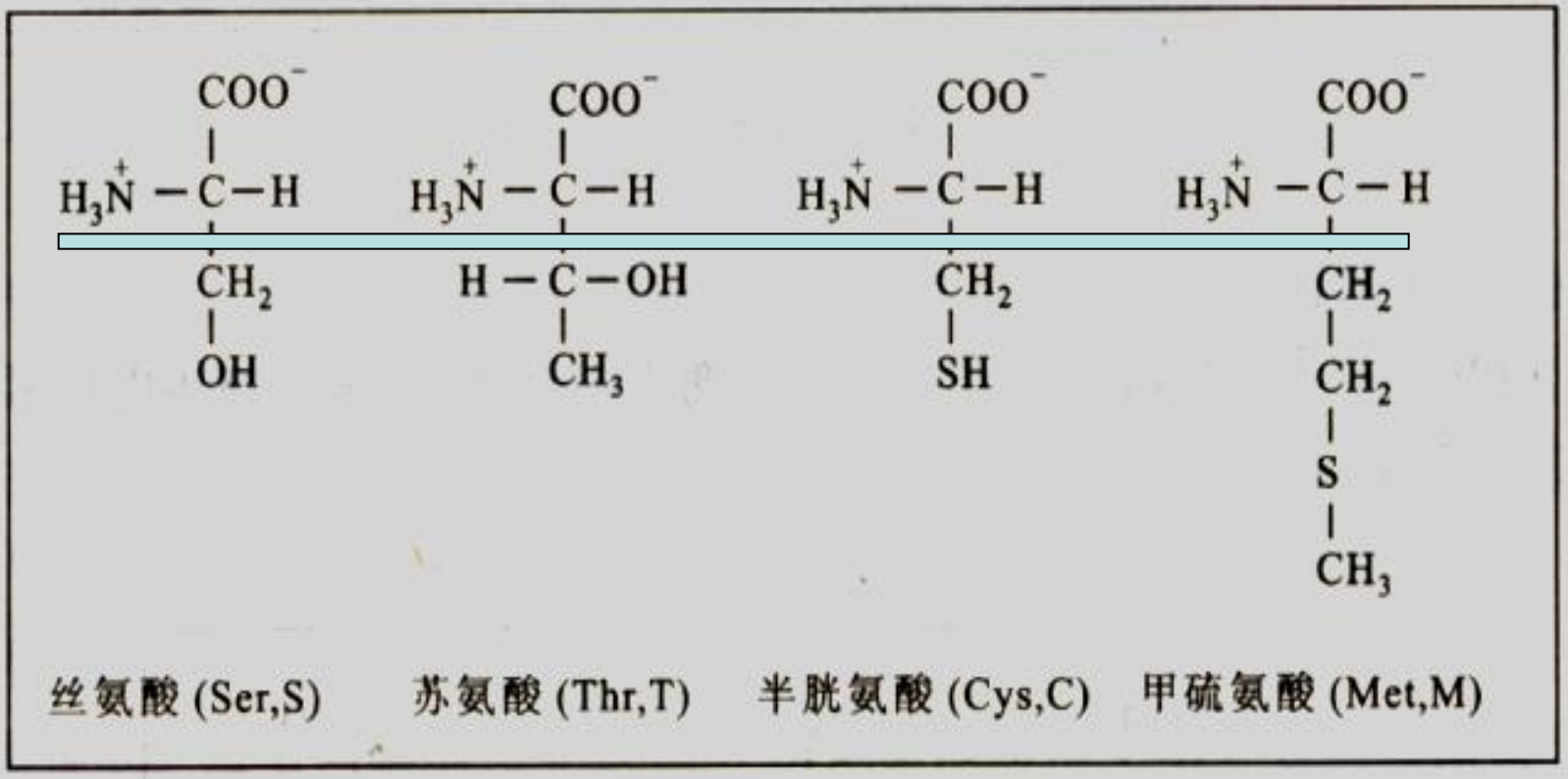


图 3－3　含羟基或硫氨基酸

酸性氨基酸及其酰胺

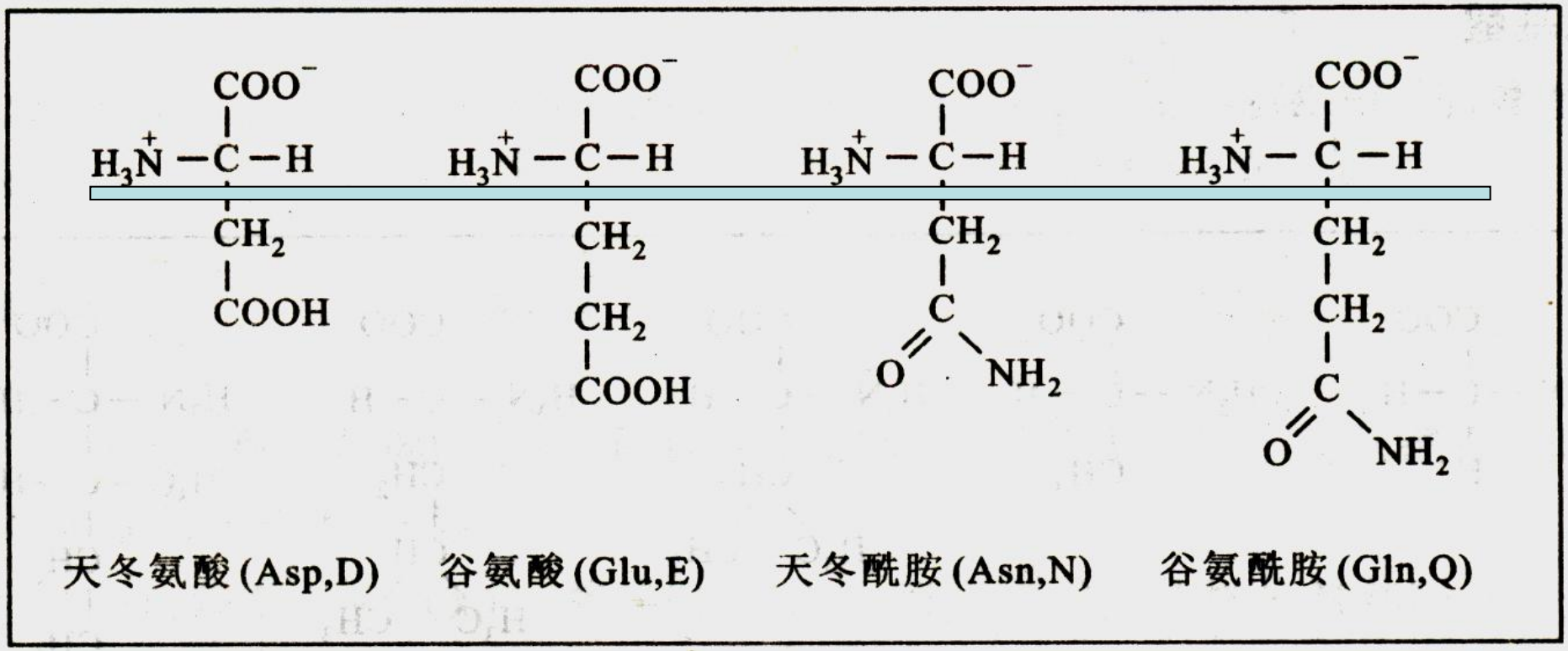


图 3－4　酸性氨基酸及其酰胺

脂肪族氨基酸

碱性氨基酸和杂环氨基酸

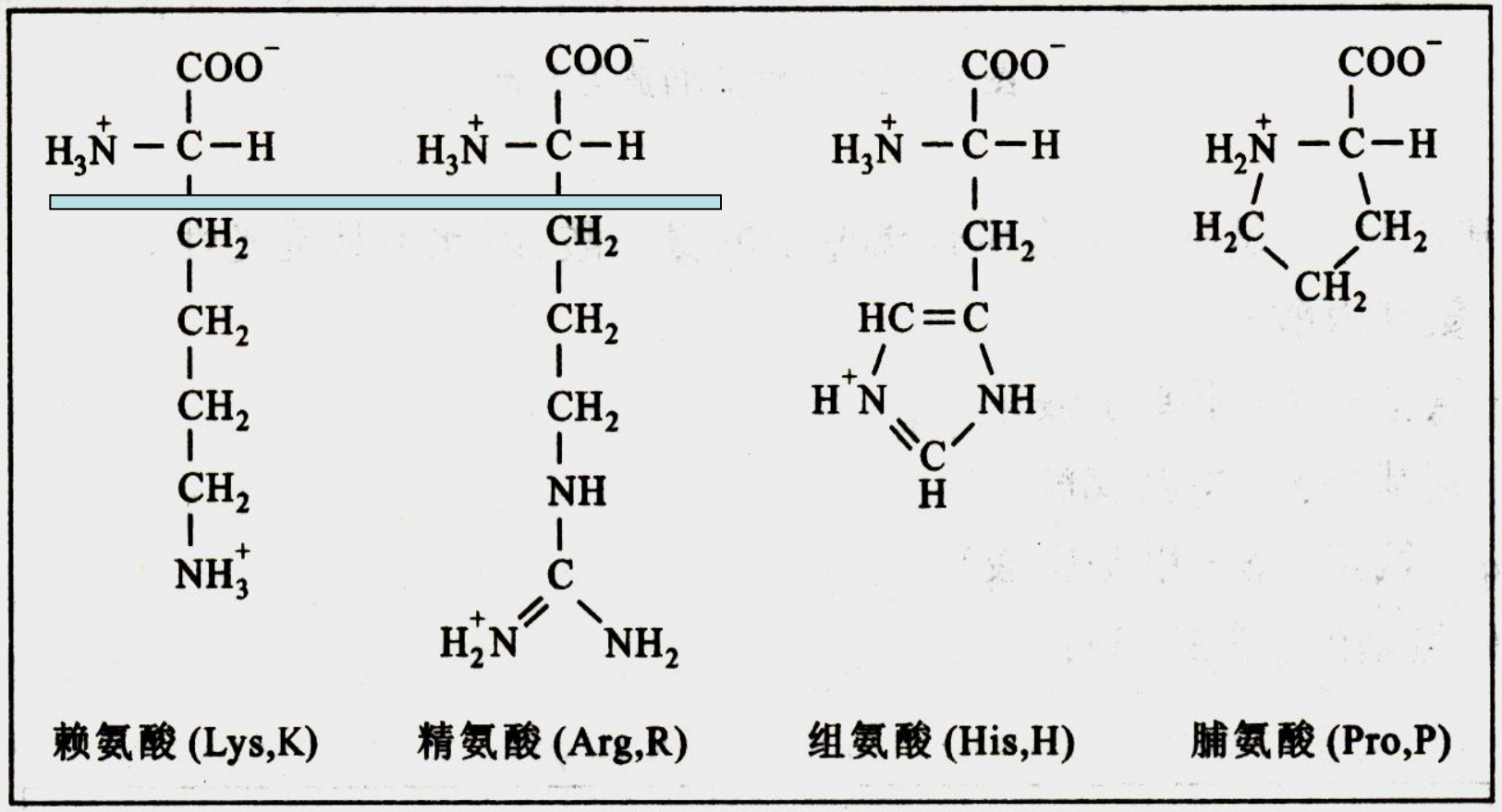


图 3－5　碱性氨基酸和杂环氨基酸

芳香族氨基酸

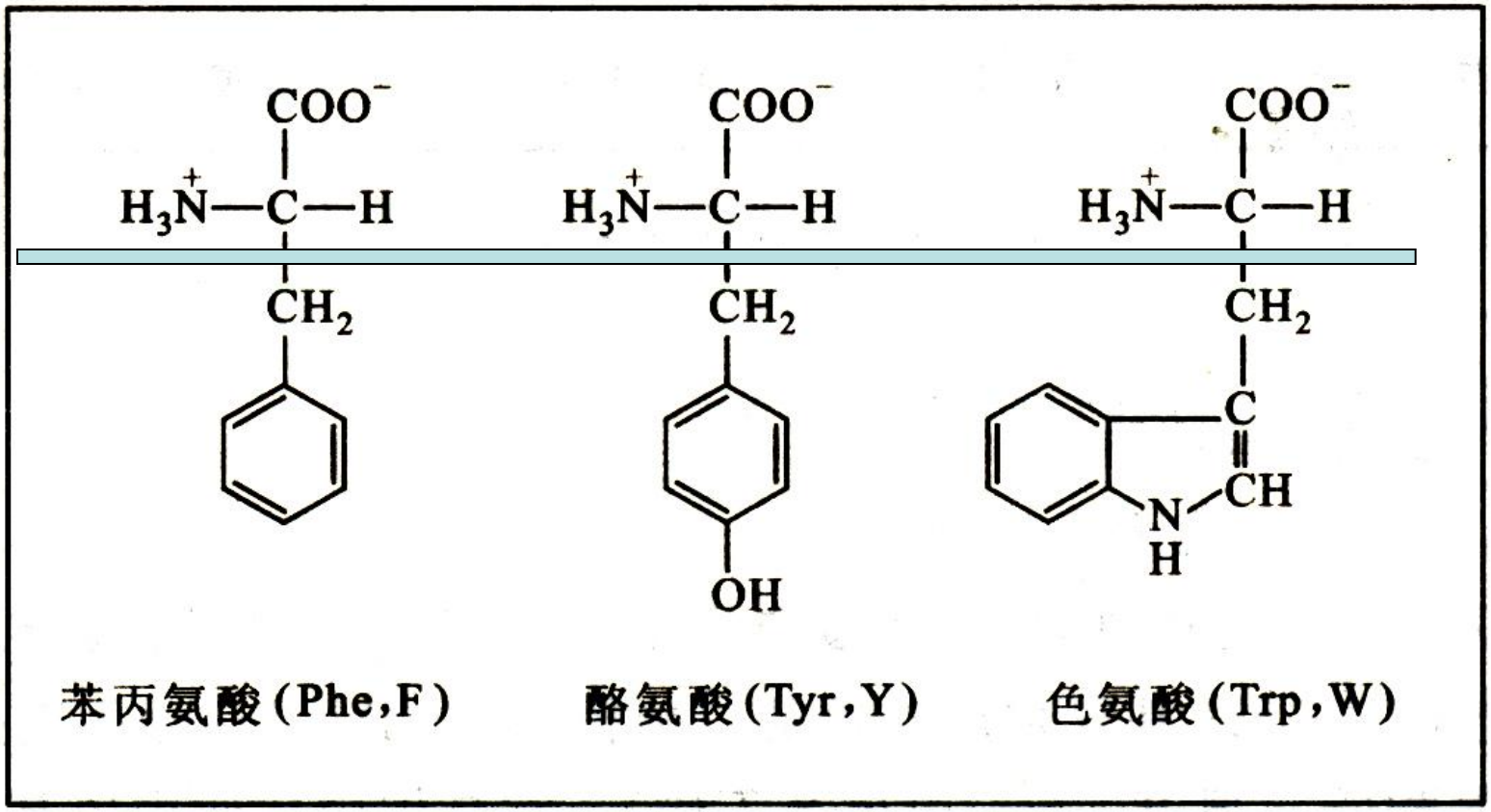


图 3－6　芳香族氨基酸

杂环类氨基酸

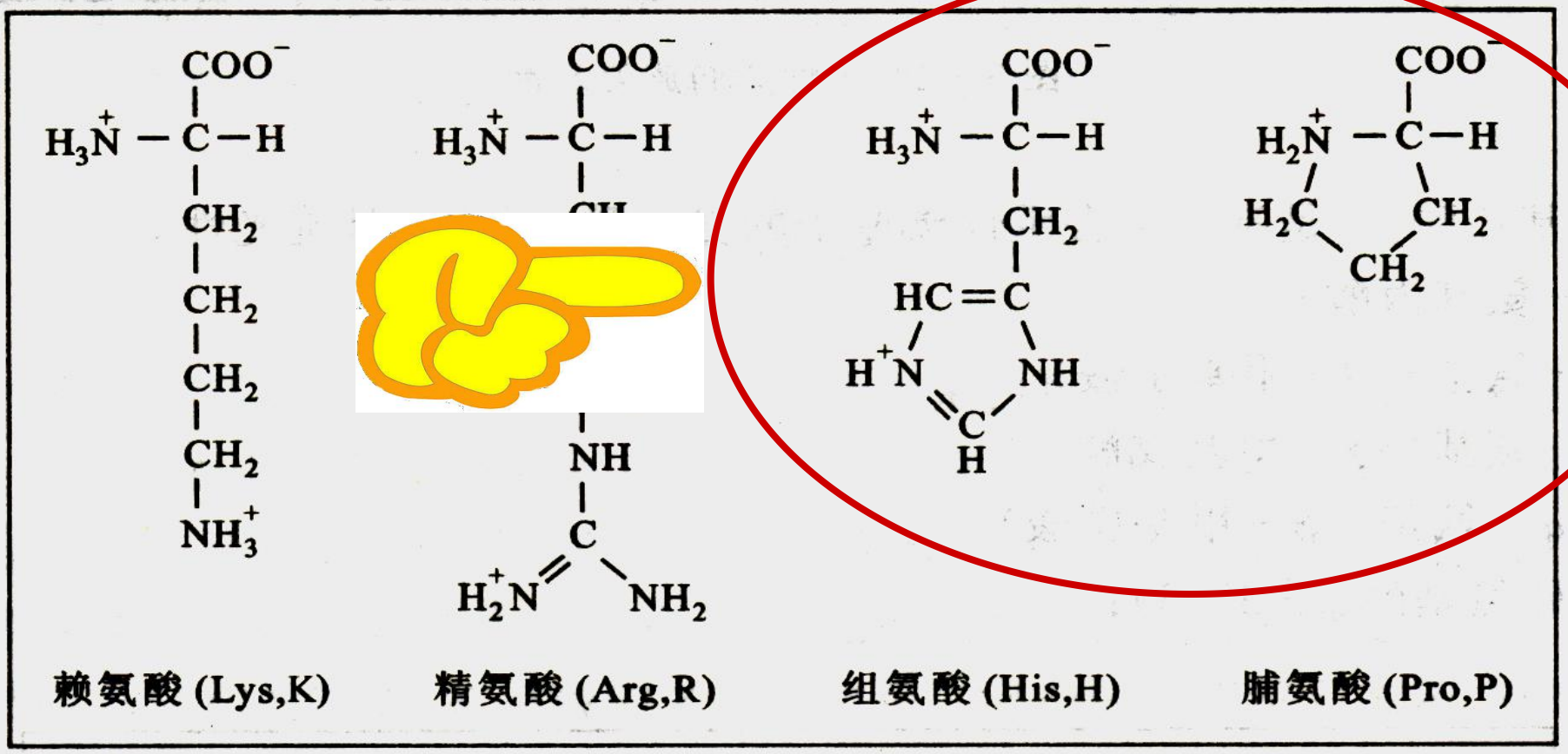
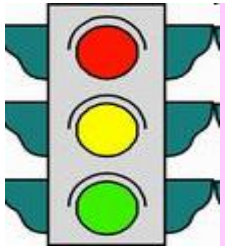


图 3－5　碱性氨基酸和杂环氨基酸

氨基酸的简写符号

表 3－1　氨基酸的简写符号

名　　称	三字母符号	单字母符号	名　　称	三字母符号	单字母符号
丙氨酸(alanine)	Ala	A	亮氨酸(leucine)	Leu	L
精氨酸(arginine)	Arg	R	赖氨酸(lysine)	Lys	K
天冬酰胺(asparagine)	Asn	N	甲硫氨酸(蛋氨酸)(methionine)	Met	M
天冬氨酸(aspartic acid)	Asp	D	苯丙氨酸(phenylalanine)	Phe	F
Asn 和/或 Asp	Asx	B			
半胱氨酸(cysteine)	Cys	C	脯氨酸(proline)	Pro	P
谷氨酰胺(glutamine)	Gln	Q	丝氨酸(serine)	Ser	S
谷氨酸(glutamic acid)	Glu	E	苏氨酸(threonine)	Thr	T
Gln 和/或 Glu	Glx	Z			
甘氨酸(glycine)	Gly	G	色氨酸(tryptophan)	Trp	W
组氨酸(histidine)	His	H	酪氨酸(tyrosine)	Tyr	Y
异亮氨酸(isoleucine)	Ile	I	缬氨酸(valine)	Val	V



提要

一、了解蛋白质的结构和功能

1、Protin的化学组成和分类

2、 Protin分子的形状和大小

3、 Protin构象和蛋白质结构的组织层次

4、 Protin功能的多样性

二、蛋白质的基本组成是氨基酸

1、蛋白质水解后得到的是20中不同的氨基酸

2、组成蛋白质的氨基酸有共同的结构通式

3、氨基酸按R基不同分为三类

4、生物中氨基酸是L-型的。

思考题

1. 含硫氨基酸包括：（　　）

   A. 蛋氨酸　　B. 苏氨酸　　C. 组氨酸　　D. 半胖氨

2. 下列哪些是碱性氨基酸：（　　）

   A. 组氨酸　　B. 蛋氨酸　　C. 精氨酸　　D. 赖氨酸

3. 芳香族氨基酸是：（　　）

   A. 苯丙氨酸　　B. 酪氨酸　　C. 色氨酸　　D. 脯氨酸

4. 组成蛋白质的主要元素有____，_____，_____，_____。

5. 蛋白质分子组成中不含有下列哪种氨基酸？

   A. 半胱氨酸　　B. 蛋氨酸　　C. 胱氨酸　　D. 丝氨酸　　E. 瓜氨酸

6. 测得某一蛋白质样品的氮含量为0．40g，此样品约含蛋白质多少？（　）

   A. 2．00g　　B. 2．50g　　C. 6．40g　　D. 3．00g　　E. 6．25g

7. 下列含有两个羧基的氨基酸是：（　）

   A. 精氨酸　B. 赖氨酸　C. 甘氨酸　D. 色氨酸　E. 谷氨酸

Ok! let’s have a break

三、氨基酸的酸碱化学

（一）氨基酸的兼性离子形式

（二）氨基酸的解离

（三）氨基酸的等电点

（四）氨基酸的甲醛滴定

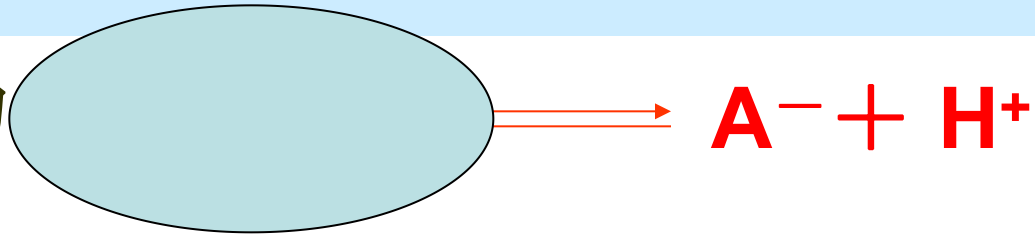
（一）氨基酸的兼性离子形式

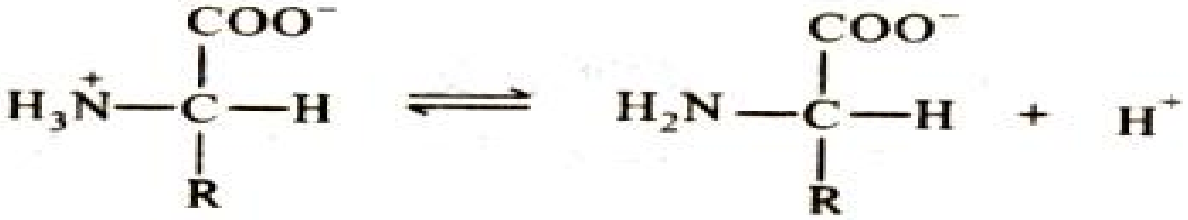
- 氨基酸在固体和溶液中以什麼形式存在？根据氨基酸在固体时有较高的熔点推断它是以离子形式存在的。
- 即在同一个分子上既有正电荷又有负电荷，净电荷为0。这种分子称为偶极离子或称为兼性离子。
- 偶极离子的电荷性使晶格维持稳定，解释了为氨基酸有较高的熔点。
- 而溶于水后，使水的介电常数增加也证明氨基酸在溶液中也是以兼性离子存在。

（二）氨基酸的解离

氨基酸在溶液中是两性电解质，当我们遮住氨基酸的氨基时，它是一个典型的酸，它应该有酸的性质；遮住它的羧基时，它又是一个典型的碱。它应该有碱的性质。所以氨基酸在水溶液中既是酸，可作为质子的供体，又是碱，可以作为质子的受体。

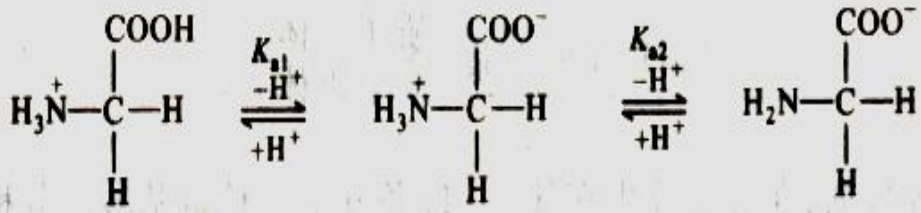
这种性质可表示为




COO⁻
H3N+—C—H
R
H2N—C—H
+ H+

COO⁻
H3N+—C—H
R
+ H+
COOH
H3N+—C—H
R

以甘氨酸为例,说明氨基酸的解离。当甘氨酸完全质子化时，它可看作是一个二元酸，失去一个质子时，称为兼性离子，再失去一个质子，成为阴离子。



阳离子(A^+)　　兼性离子(A°)　　阴离子(A^-)

第一步解离，
$$K_{a1}=\frac{[A^\circ][H^+]}{[A^+]} \quad (1)$$

第二步解离，
$$K_{a2}=\frac{[A^-][H^+]}{[A^\circ]} \quad (2)$$

- K1和K2为氨基酸C原子上氨基和羧基上的两个质子的解离常数。

解离常数的滴定求法

- 氨基酸的解离常数可以用滴定的方法求出，将0.1M的甘氨酸溶于水，PH约等于6，用标准NaOH溶液滴定，得到B段，在PH9.6处有一个拐点。这时甘氨酸兼性离子有一半变为阴离子，$A^0=A^-$，K2＝H^+两边各取对数，P_{K2}=PH 而此时的PH＝9.6。同样，用标准HCI滴定，的另一拐点，P_{K1}=2.34。

用滴定的方法可以求出20种氨基酸的个解离基团的解离常数。并利用Handerson-Hasselbalch公式可计算出任意PH条件下氨基酸各种离子的比例。

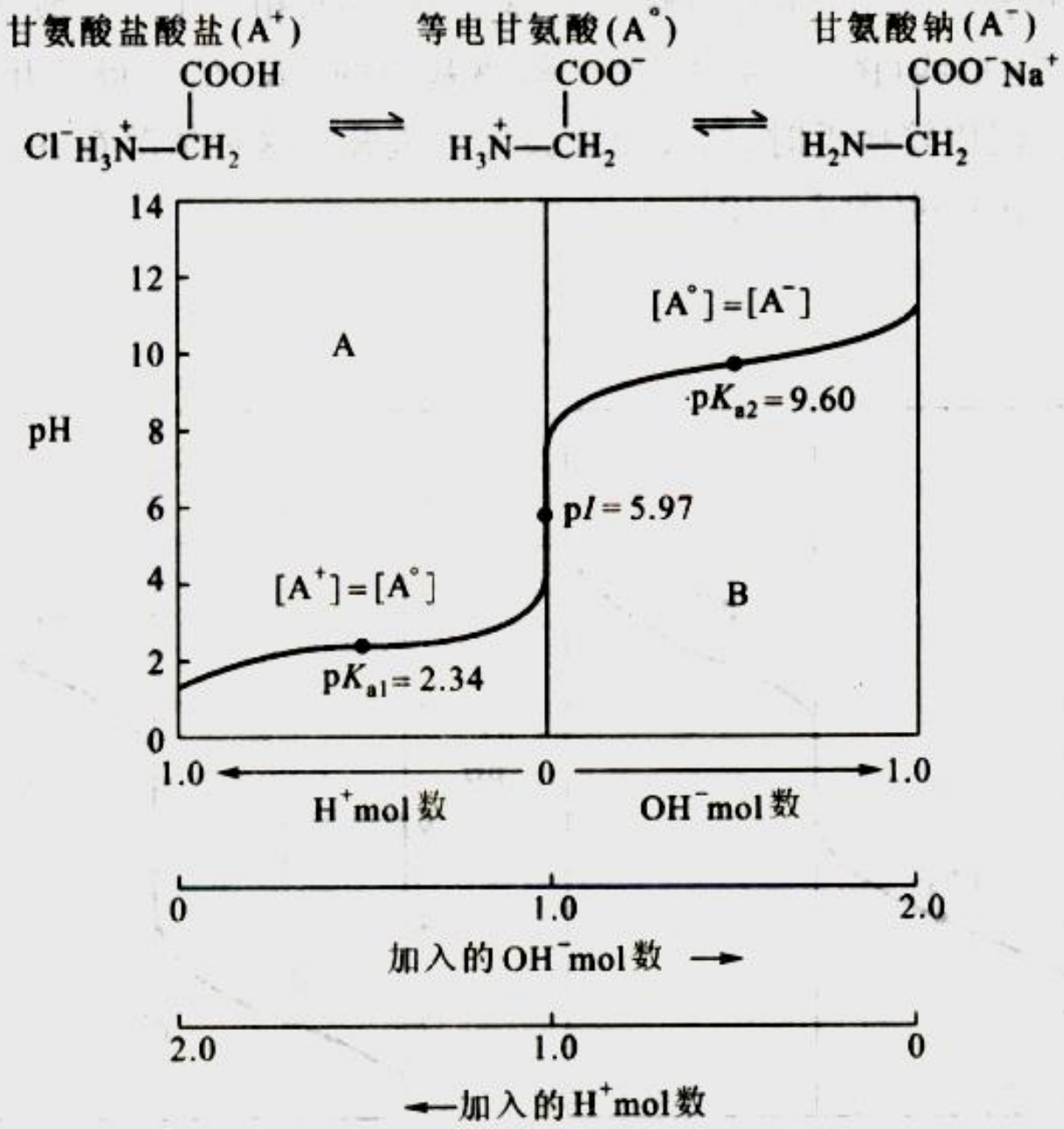
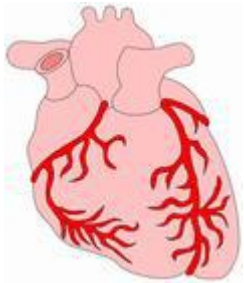


图 3－9　甘氨酸的滴定曲线(解离曲线)



氨基酸的解离及等电点

表 3－3　氨基酸的解离常数和等电点

氨基酸*	$-COOH\ pK_a$	$-\overset{+}{N}H_3\ pK_a$	R 基 pK_a	pI
甘氨酸	2.34	9.60		5.97
丙氨酸	2.34	9.69		6.02
缬氨酸	2.32	9.62		5.97
亮氨酸	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸	2.36	9.68		6.02
丝氨酸	2.21	9.15		5.68
苏氨酸	2.63	10.43		6.53
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86(βCOOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(γCOOH)	3.22
谷氨酰胺	2.17	9.13		5.65
精氨酸	2.17	9.04	12.48(胍基)	10.76
赖氨酸	2.18	8.95	10.53(ε $\overset{+}{N}H_3$)	9.74
组氨酸	1.82	9.17	6.00(咪唑基)	7.59
半胱氨酸	1.71	10.78	8.33(SH)	5.02
甲硫氨酸	2.28	9.21		5.75
苯丙氨酸	1.83	9.13		5.48
酪氨酸	2.20	9.11	10.07(OH)	5.66
色氨酸	2.38	9.39		5.89
脯氨酸	1.99	10.60		6.30

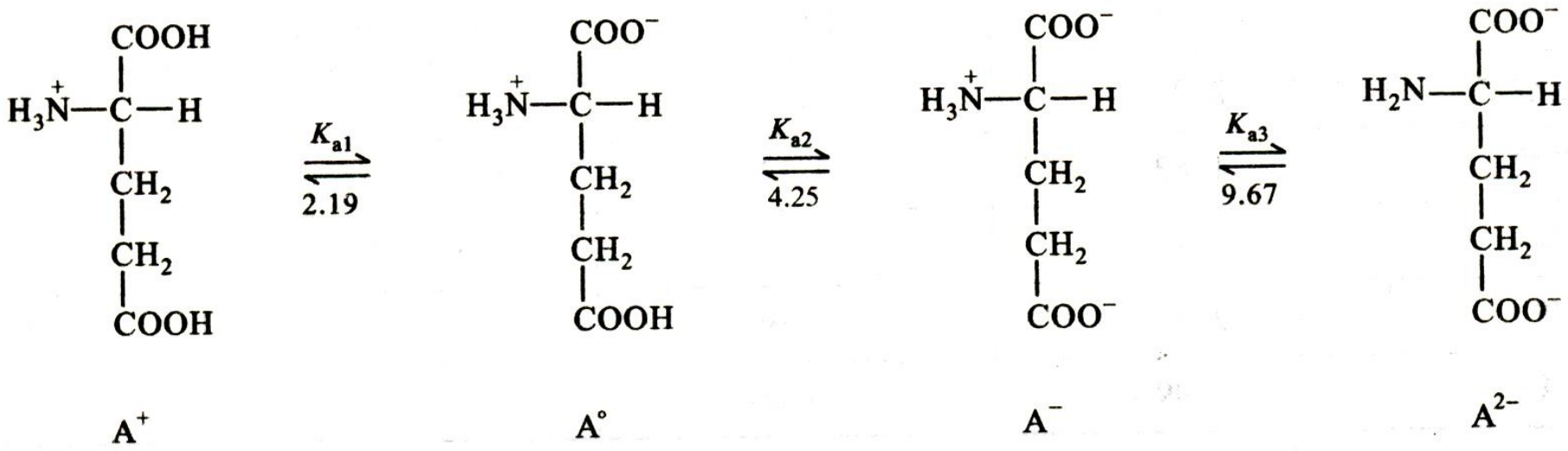
* 除半胱氨酸是 30℃ 测定数值外，其他氨基酸都是 25℃ 测定数值。

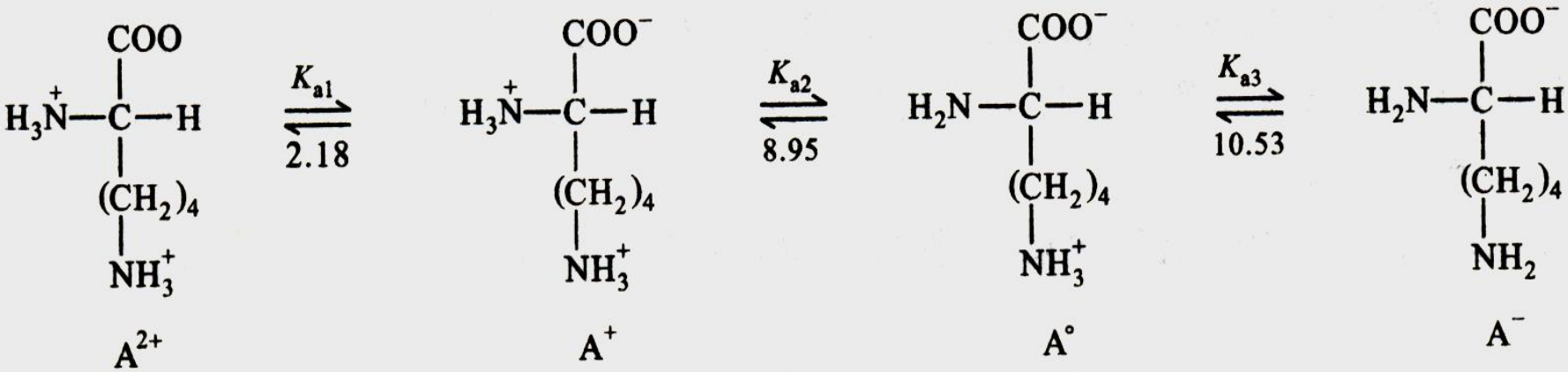
（三）氨基酸的等电点及求法

- 对于侧链R基不解离的中性氨基酸，它的等电点是氨基和羧基解离常数的算术平均值。pI＝1／2（pK_1+pK_2）. 如甘氨酸的等电点：

pI = 1/2(pK1+pk2) = 1/2(2.34+9.60) = 5.97

对于两氨基一羧基的氨基酸和两羧基一氨基的酸性氨基酸，就要写出它们的解离公式，取兼性离子两边的解离常数的平均值 ！


COOH
H3N—C—H
CH2
CH2
COOH
A+
Ka1
2.19
COO−
H3N—C—H
CH2
CH2
COOH
A°
Ka2
4.25
COO−
H3N—C—H
CH2
CH2
COO−
A−
Ka3
9.67
COO−
H2N—C—H
CH2
CH2
COO−
A2−


COO
H3N—C—H
(CH2)4
NH3+
A2+
Ka1
2.18
COO−
H3N—C—H
(CH2)4
NH3+
A+
Ka2
8.95
COO−
H2N—C—H
(CH2)4
NH3+
A°
Ka3
10.53
COO−
H2N—C—H
(CH2)4
NH2
A−

（四）氨基酸的甲醛滴定

甲醛滴定是定量测定氨基酸的方法，因为氨基酸是两性电解质，既是酸又是碱，不能用标准酸和碱直接滴定，因为没有一种指示剂可同时指示两个滴定终点。加入过量的甲醛可封闭氨基的解离，用标准碱来滴定羧基的质子。

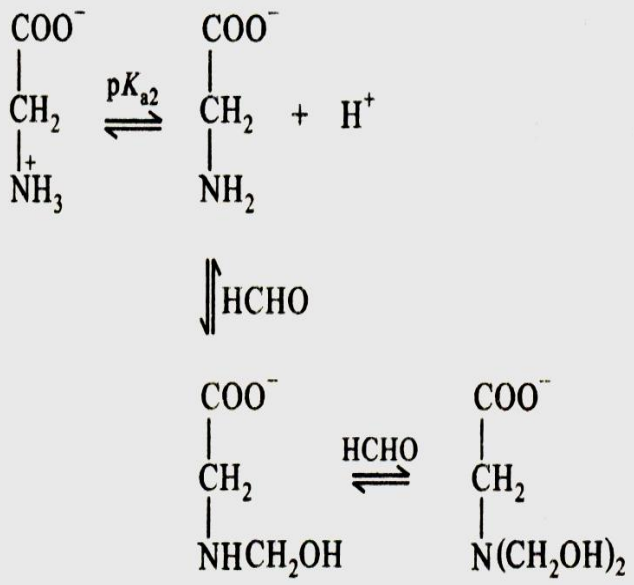


图 3－11　甲醛与氨基酸的氨基作用形成羟甲基衍生物

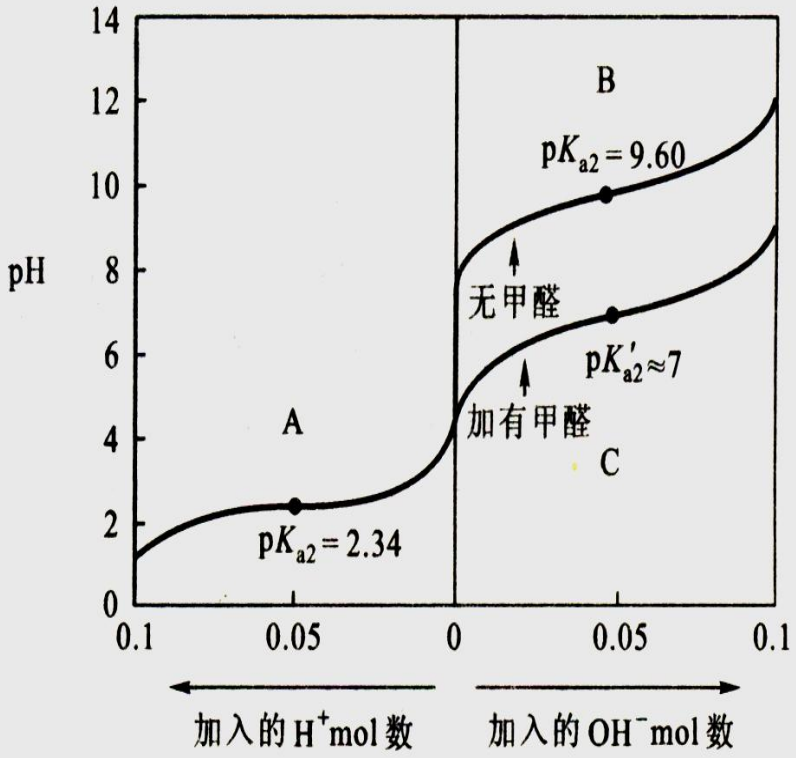


图 3－12　加甲醛和不加甲醛的甘氨酸滴定曲线

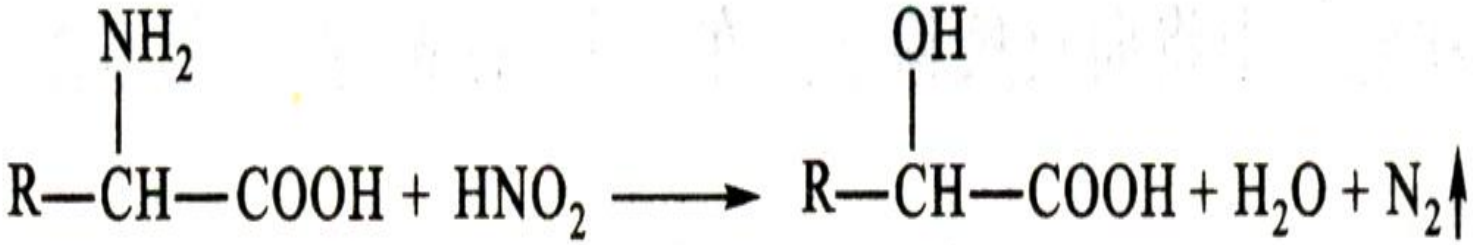
四、氨基酸的化学反应

•氨基酸的化学反应主要是指它的氨基、羧基和侧链R基上的功能基团所参与的反应，包括以下四个方面：

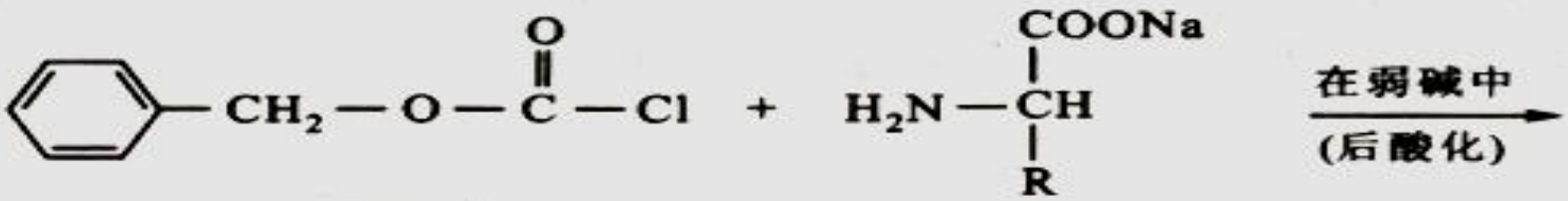
（一） α-氨基参加的反应
（二） α-羧基参加的反应
（三） α-氨基酸和α-羧基共同参加的反应
（四） 侧链R基参加的反应

（一） α-氨基参加的反应

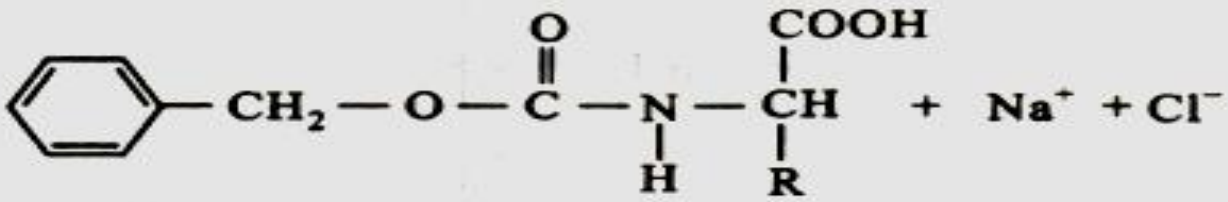
- 1、与亚硝酸的反应：在室温下与亚硝酸作用生成氮气。



2、与酰化试剂反应： α-氨基与酰氯或酸酐在弱碱条件下发生作用氨基可被酰基化。

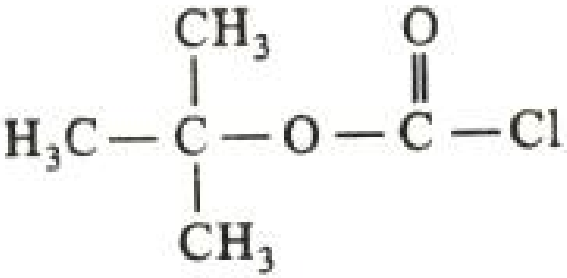


苄氧酰氯

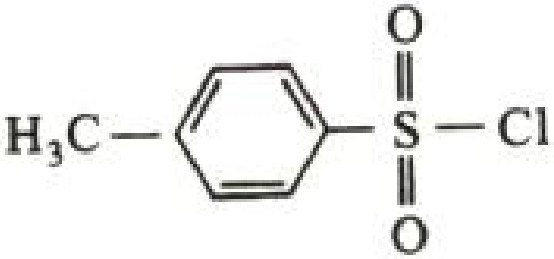


苄氧酰氨基酸

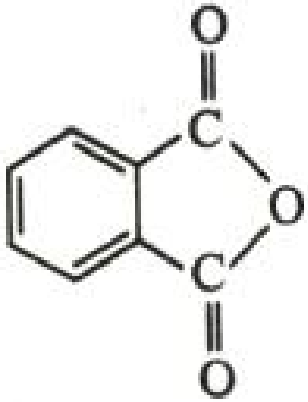
酰化剂



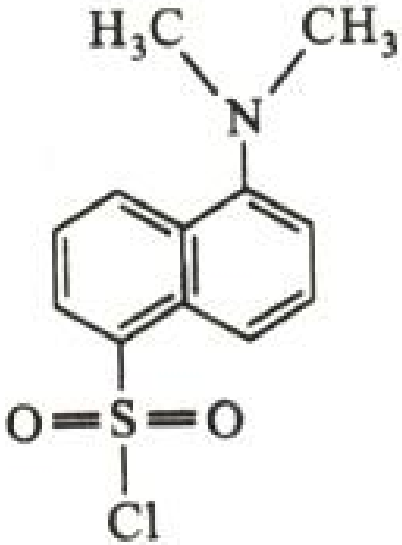
叔丁氧甲酰氯



对甲苯磺酰氯

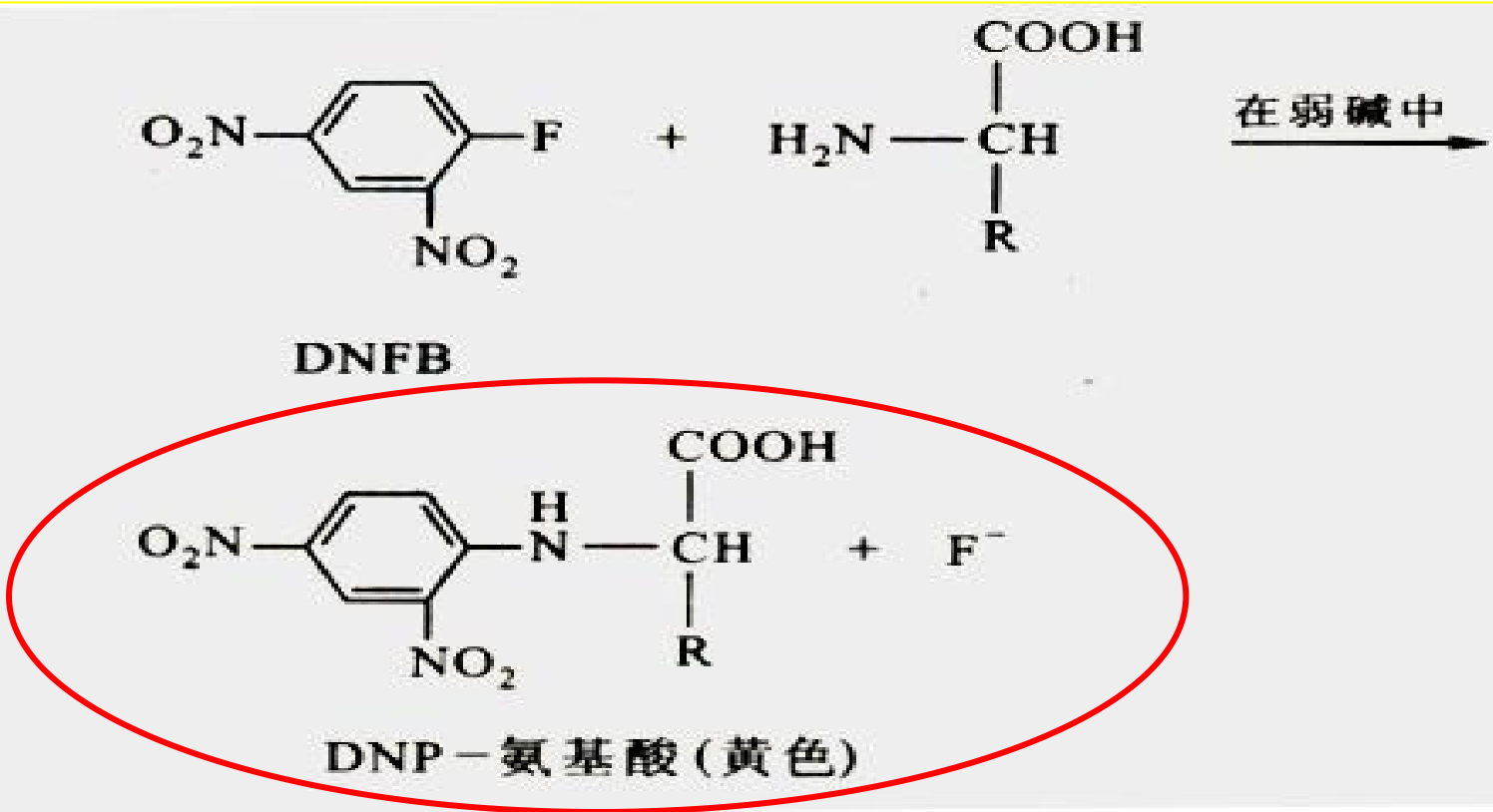


邻苯二甲酸酐



丹磺酰氯

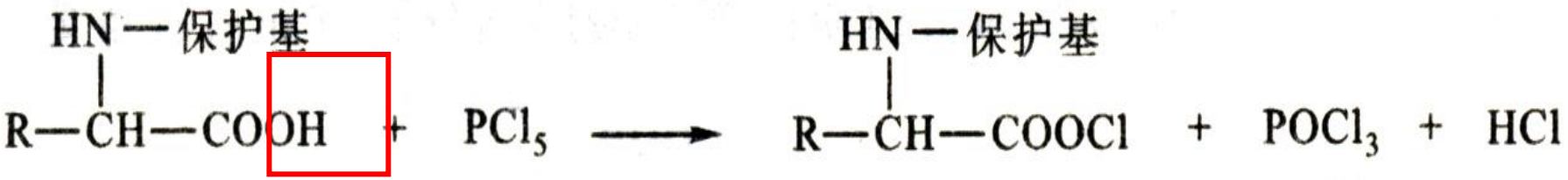
3、烃基化反应：　α-氨基的一个氢原子可被烃基取代，例如与2，4-二硝基氟苯（DNFB）的反应，这个反应最初是英国的Sanger发明的他用来鉴定蛋白质和多肽的N末端氨基酸。



（二） α-羧基参加的反应

1、成盐和成酯反应：氨基酸与碱作用生成盐，其中重金属盐不溶于水。氨基酸的羧基被醇酯化后形成相应的酯，羧基被保护，是制备氨基酸酰胺的中间物。

- 2、成酰氯反应：当氨基酸的氨基被保护后，羧基可与五氯化磷作用生成酰氯。这一反应使羧基活化，以便于另一氨基酸的氨基结合，常用在人工合成多肽。



3、脱羧基反应：

氨基酸脱羧后生成一级胺，并放出CO_2

尸胺

即1,5-二氨基戊烷或戊二胺，结构简式$NH_2(CH_2)_5NH_2$。为蛋白质腐败时赖氨酸在脱羧酶的作用下发生脱羧反应生成。

腐胺

精氨酸、鸟氨酸的脱羧产物——腐胺都是尸体腐败产生气味中的成分。

是广泛存在于生物体中的正常成分，但也作为一种肉毒胺存在于腐败物中。

（三） α-氨基酸和α-羧基共同参加的反应

- 1、与茚三酮反应：

氨基酸在弱酸条件下与茚三酮发生反应生成紫红色化合物，可以鉴别氨基酸存在。

脯氨酸和羟脯氨酸生成黄色化合物。

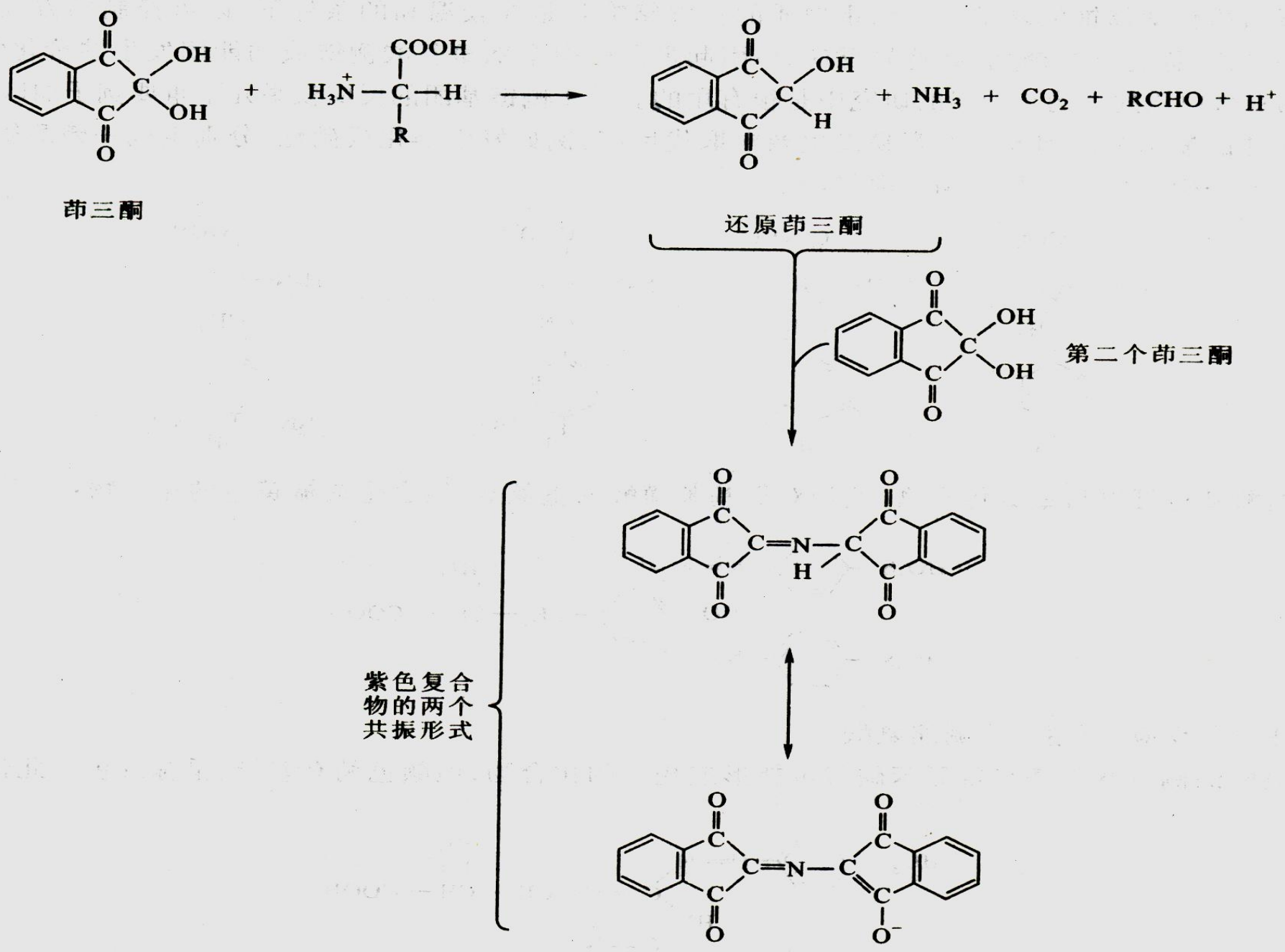
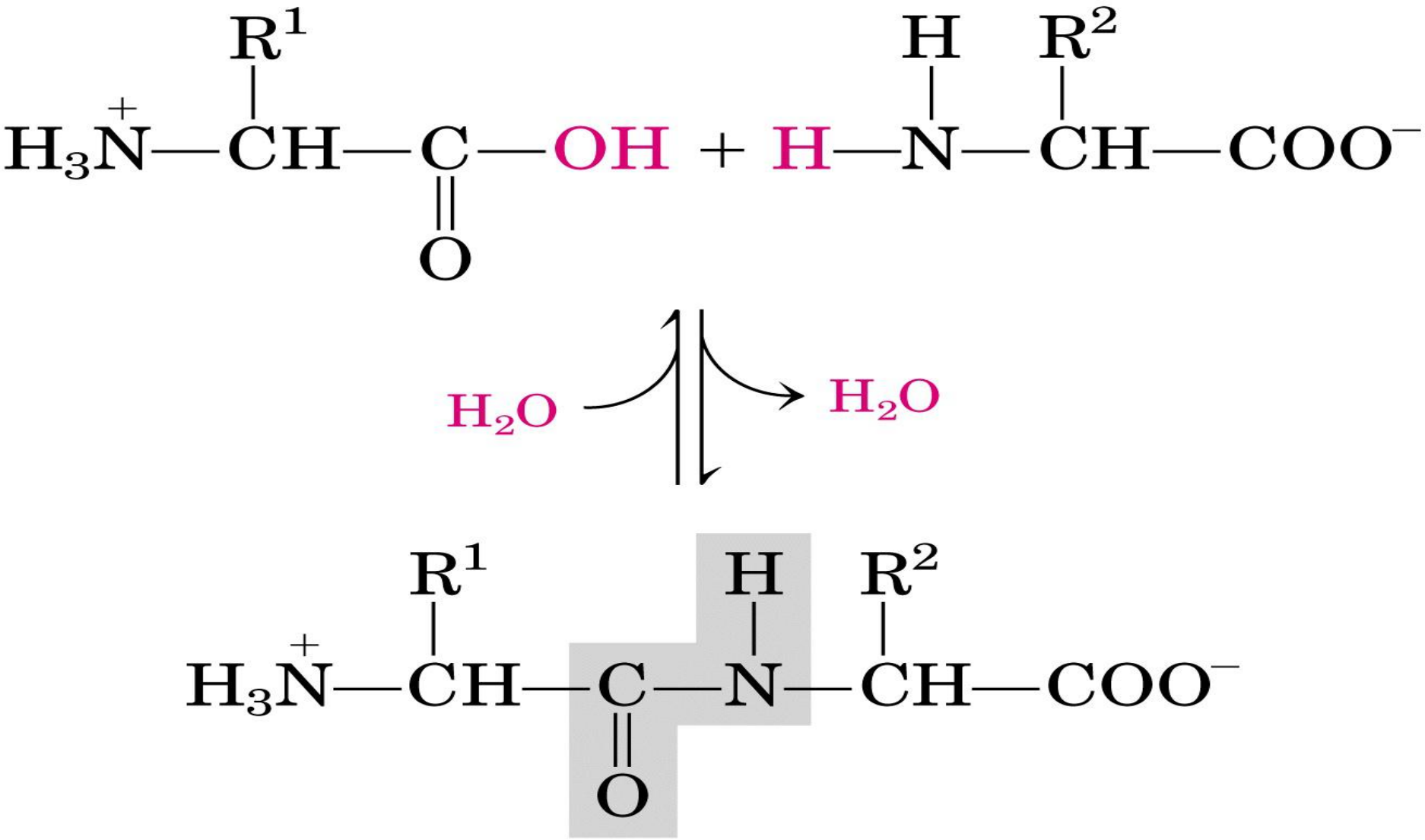
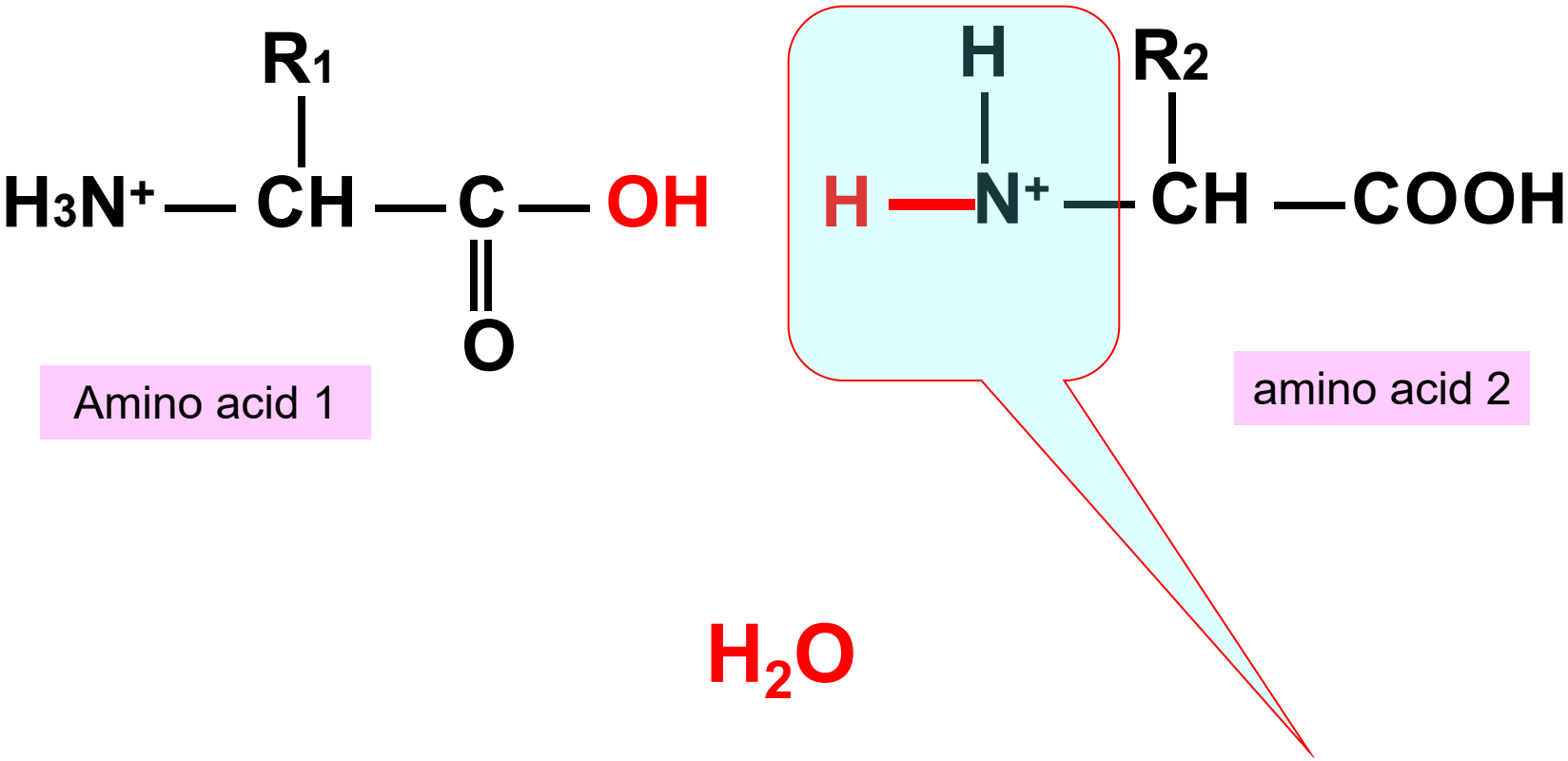


图 3－13　氨基酸与茚三酮反应的过程

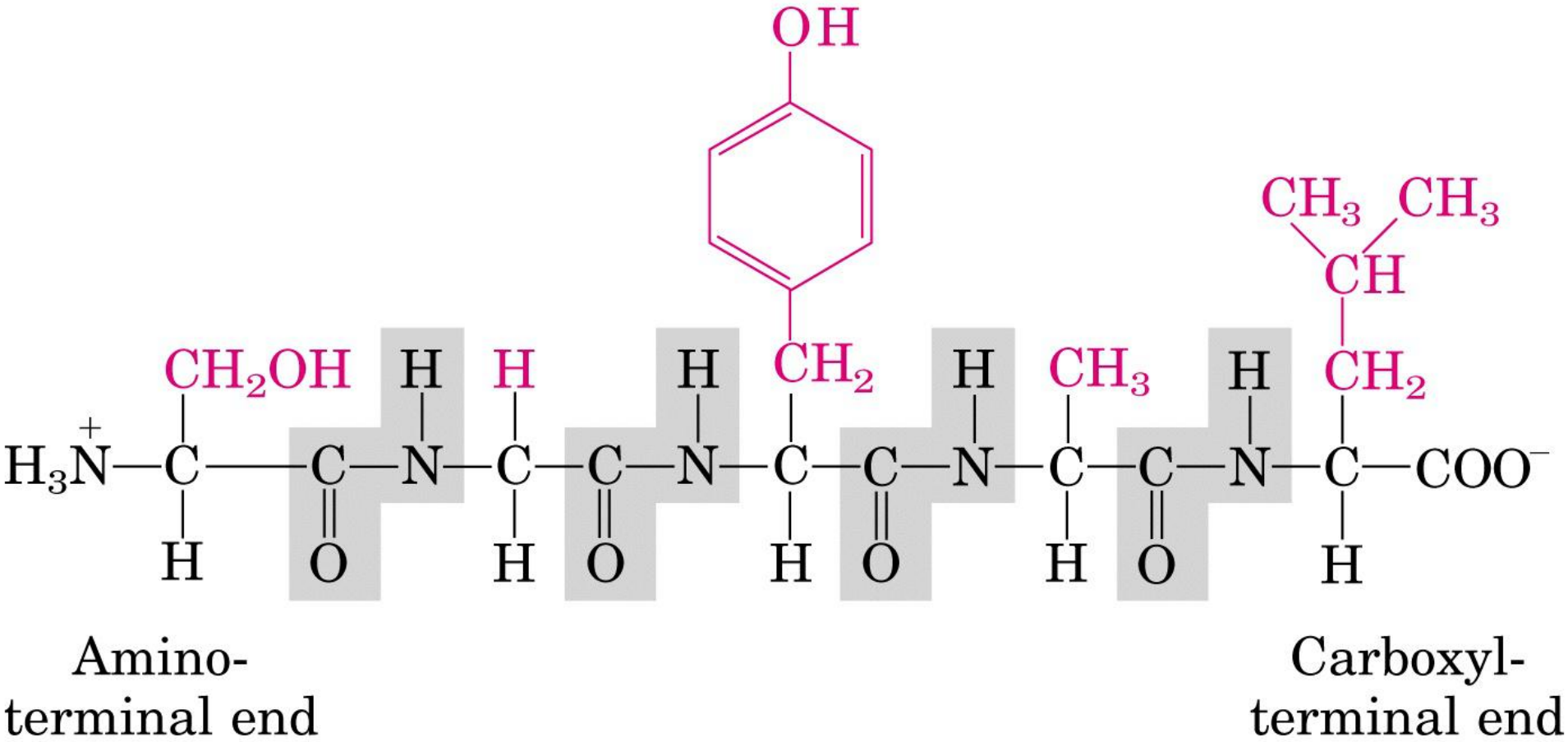
2、成肽反应：两个氨基酸可形成酰胺键或称肽键。





肽　键 或 酰胺键

多肽链


OH
CH3 CH3
CH
CH2OH
H
H
H
CH2
H
CH3
H
CH2
H3N+
C
C
N
C
C
N
C
C
N
C
C
N
C
COO−
H
O
H
O
H
O
H
O
H
Amino-
terminal end
Carboxyl-
terminal end

（四）侧链R基参加的反应

- 氨基酸的侧链具有功能基团，可以发生化学反应。这些基团有：羟基、酚基、巯基、吲哚基、咪唑基、胍基以及非α —氨基与羧基等。它们是氨基酸被修饰的化学基础。可以和多种化学试剂发生反应，有的可出现特殊颜色、沉淀等用以鉴别个别氨基酸。

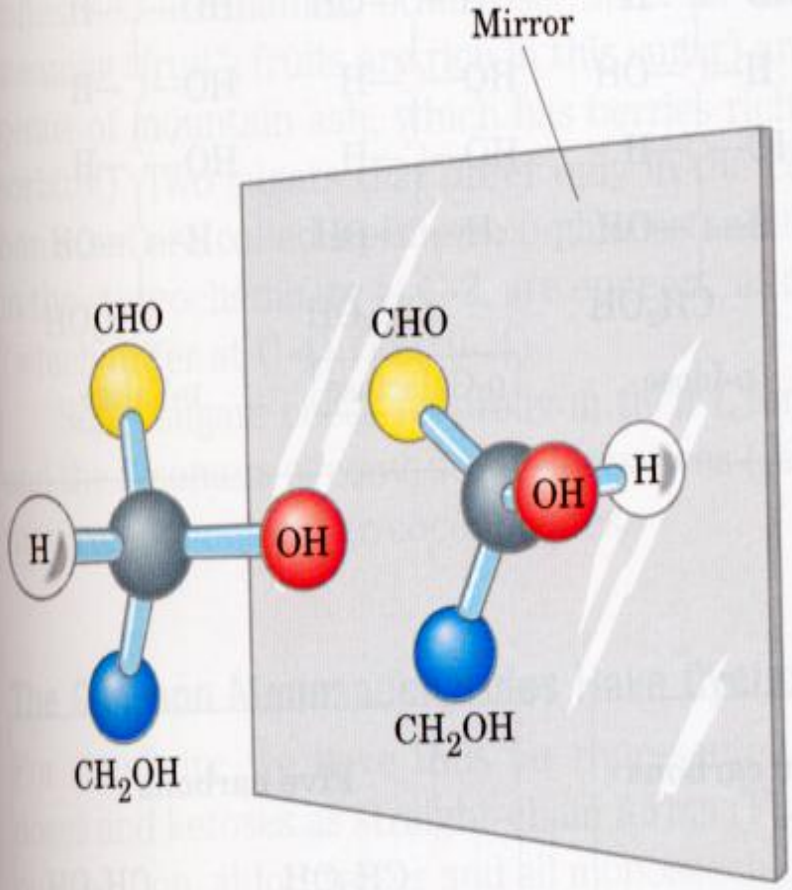
五、氨基酸的光学活性和光谱性质

- （一）氨基酸的光学活性和立体化学
- （二）氨基酸的光谱性质

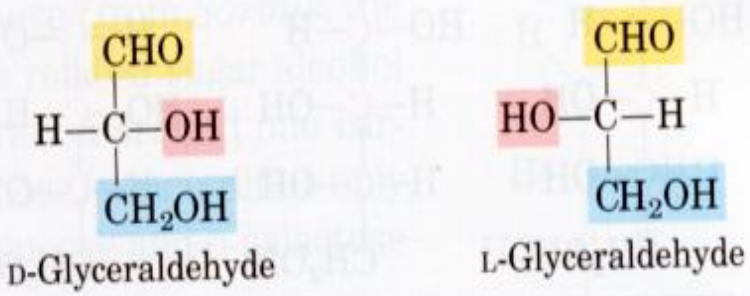
（一）氨基酸的光学活性和立体化学

- 氨基酸的α-C是一个不对称的碳原子，它可以有两种构型，即L-型和D-型，两种构型在生物体内将有着完全不同的行为。天然蛋白质中的氨基酸都是L-型的D-性极少见。
- 氨基酸的构型也和糖一样，是以甘油醛的构型规定的。

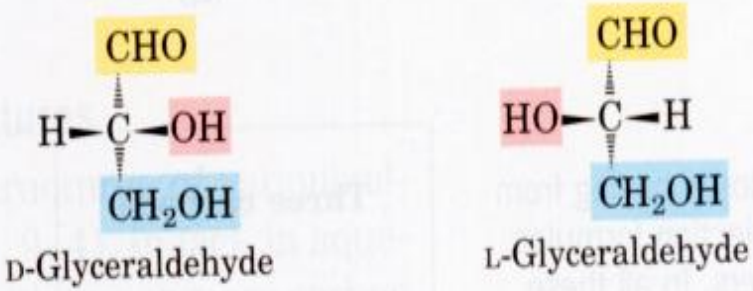
- 由于构型而引起氨基酸具有旋光活性，氨基酸在溶液中的旋光角度和旋光方向可在旋光仪中测出，它和旋光物的性质、浓度、温度溶剂的性质、波长及测定所用的旋光管长度都有关系，必须规定在一定条件下测定。每一旋光物在一定条件下都有一定的比旋光值，这时旋光物质的特征常数。用［α］$^{t}_{D}$表示。



Ball-and-stick models

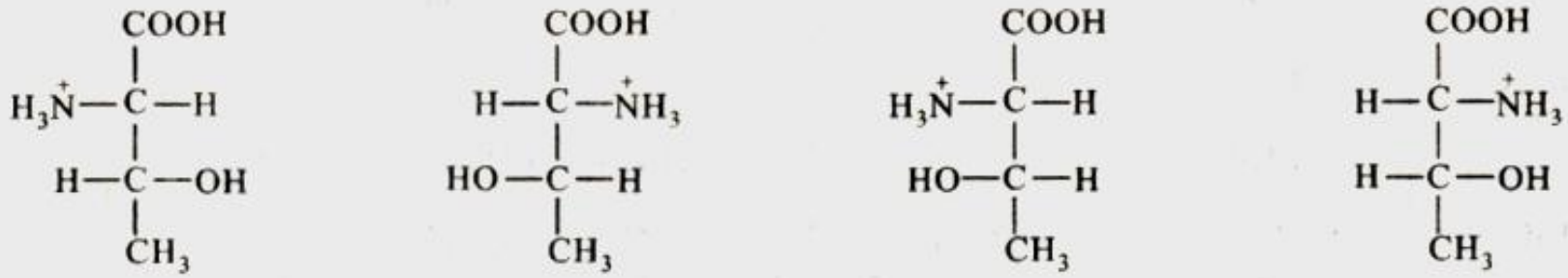


Fischer projection formulas



Perspective formulas

氨基酸中，甘氨酸的α-C原子不是手性原子因此不具有旋光性，而苏氨酸、异亮氨酸、羟脯氨酸、羟赖氨酸还有一个手性C原子，可以形成四种光学异构体。如苏氨酸：分别称为：L-苏氨酸、D-苏氨酸、L-别苏氨酸和D-别苏氨酸。



L-苏氨酸
(2S,3R)-(-)-苏氨酸
$[\alpha]_D^{20} = -28.4°$

D-苏氨酸
(2R,3S)-(+)-苏氨酸
$[\alpha]_D^{20} = +28.3°$

L-别苏氨酸
(2S,3S)-(+)-苏氨酸
$[\alpha]_D^{20} = +9.0°$

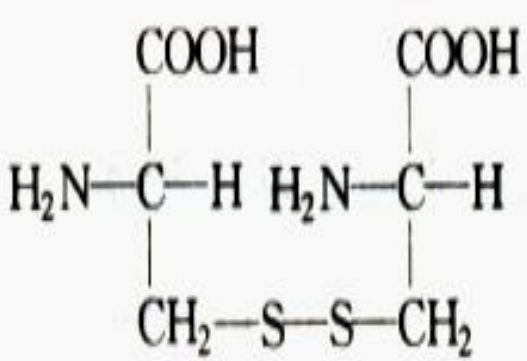
D-别苏氨酸
(2R,3R)-(-)-苏氨酸
$[\alpha]_D^{20} = -8.8°$

图 3-15 苏氨酸的光学异构体

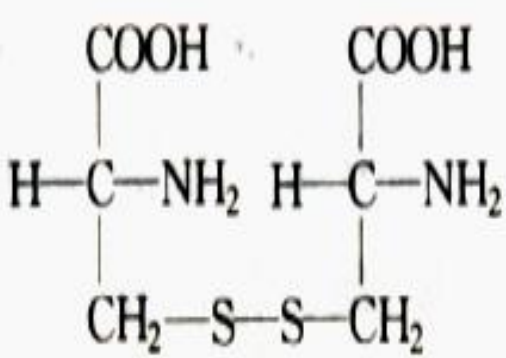
内消旋与外消旋的概念

外消旋： L-型和D-型分子各占50%时的混合物，彼此旋光值相抵消的现象，这是分子间的消旋。如蛋白质的碱水解产物，得到D－和L－型氨基酸，引起消旋。

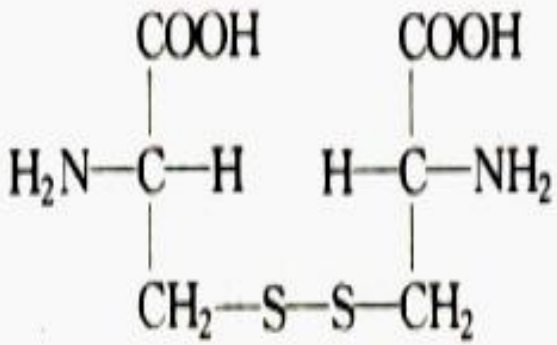
内消旋： 在分子内部的消旋现象。如内消旋胱氨酸。



L-胱氨酸



D-胱氨酸



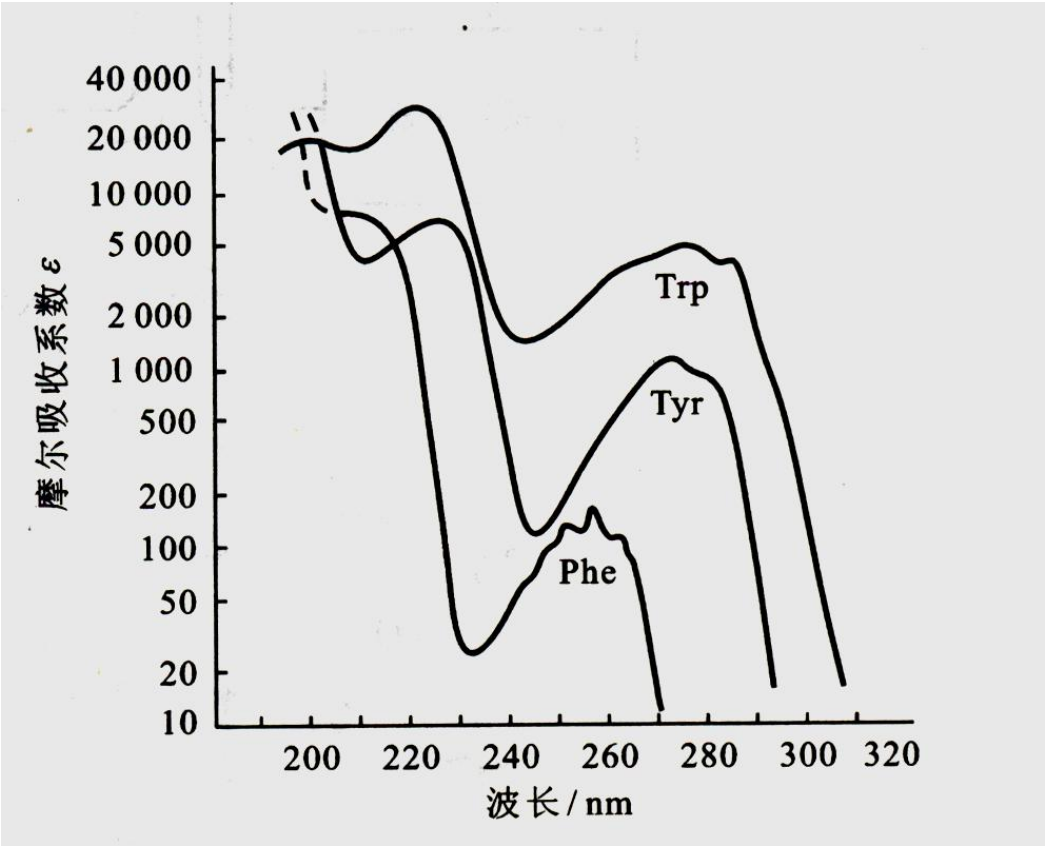
内消旋胱氨酸

（二）氨基酸的光谱性质

- 氨基酸在可见光区没有光吸收（入＝420－－720nm）。在紫外区，色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸有光吸收。它们的最大光吸收：

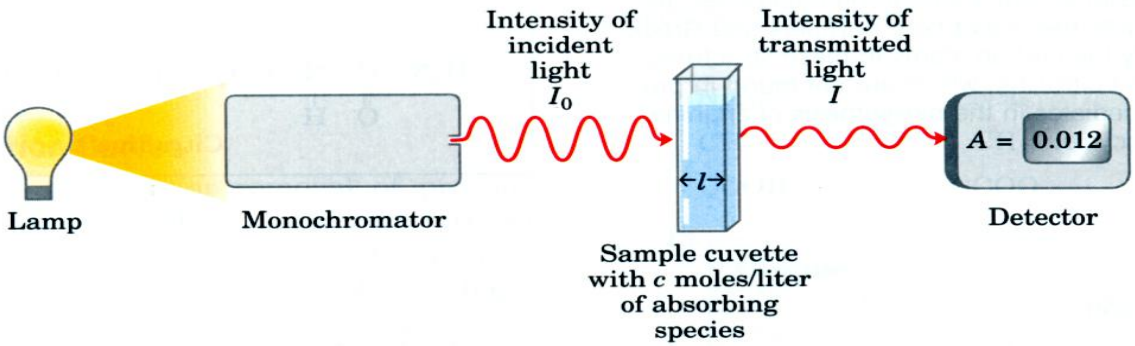
Trp:279nm，
Tyr:278nm，
Phe:259nm。

根据此原理，用分光光度法可测定蛋白质含量。



Lambert-Beer定律

- 分光光度法测定蛋白质含量（朗一比尔定律）。蛋白质在280nm波长下有最大吸收峰，用分光光度法可以测的蛋白质含量。



$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

六、氨基酸混合物的分析分离

（一）分配层析的一般原理

（二）分配柱层析

（三）纸层析

（四）薄层层析

（五）气液层析

（一）分配层析的一般原理

- 色层分析也称色谱分析（chromatogrophy）最初由俄国植物学家于1903年提出。1941年英国学着Martin和Synge发展为分配层析。根据此原理发展出各种层析技术。
- 分配层析原理：一种物质在两种互不相容的溶剂中分配时，在一定温度下平衡，他在这两相中的浓度比值是一个常数，这一比值称为该物质在这两相溶剂中的分配系数。用α表示。
- *α ＝溶质在A相中的浓度／溶质在B相中的浓度*

  每种物质都有自己特点的分配系数。

Martin对分配层析原理的解释：

（二）分配柱层析

- 应用分配层析建立的一种分离方法，将惰性支持物装入柱中，作为固定相，溶剂作为流动相，对混合物进行洗脱分离。

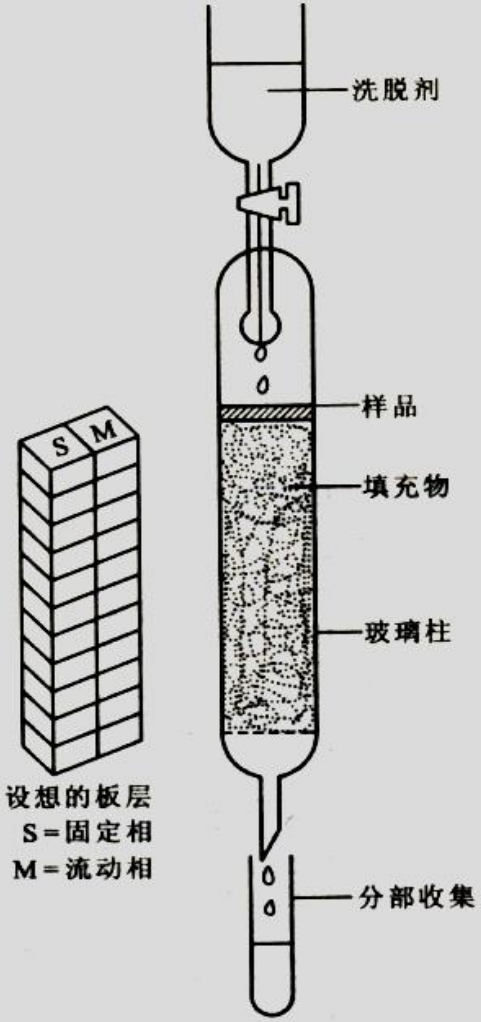


图 3－24　柱层析

（三）纸层析

- 用纸作为固相支持物，应用分配层析原理对物质进行分离的方法。

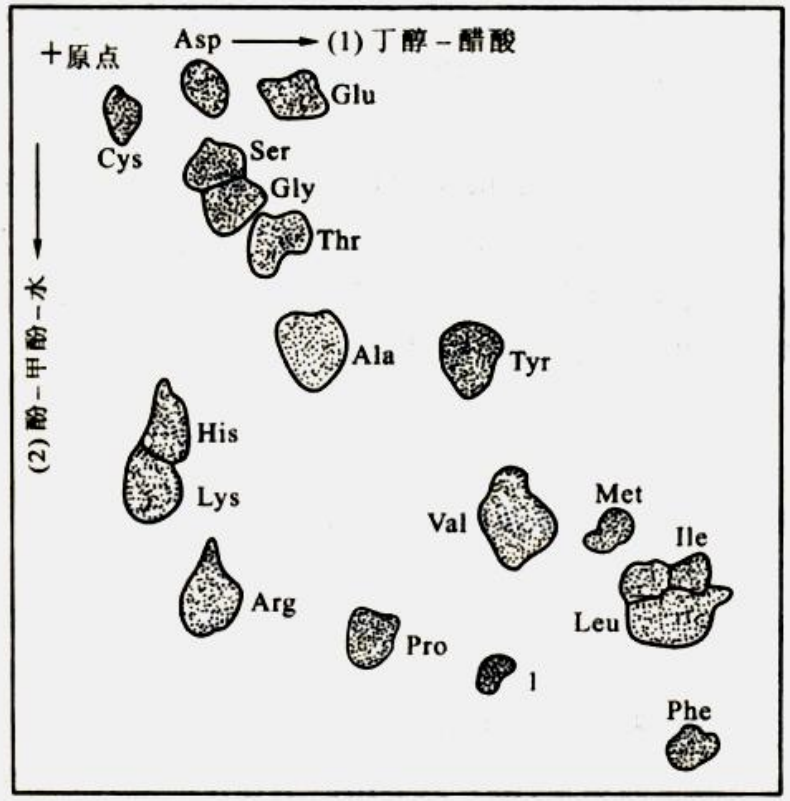


图 3－25　氨基酸的双向纸层析图谱

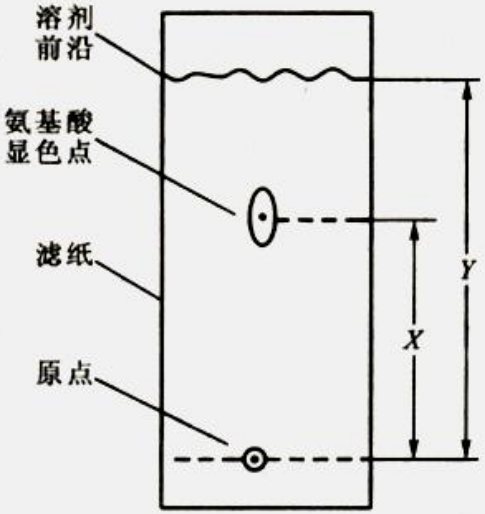
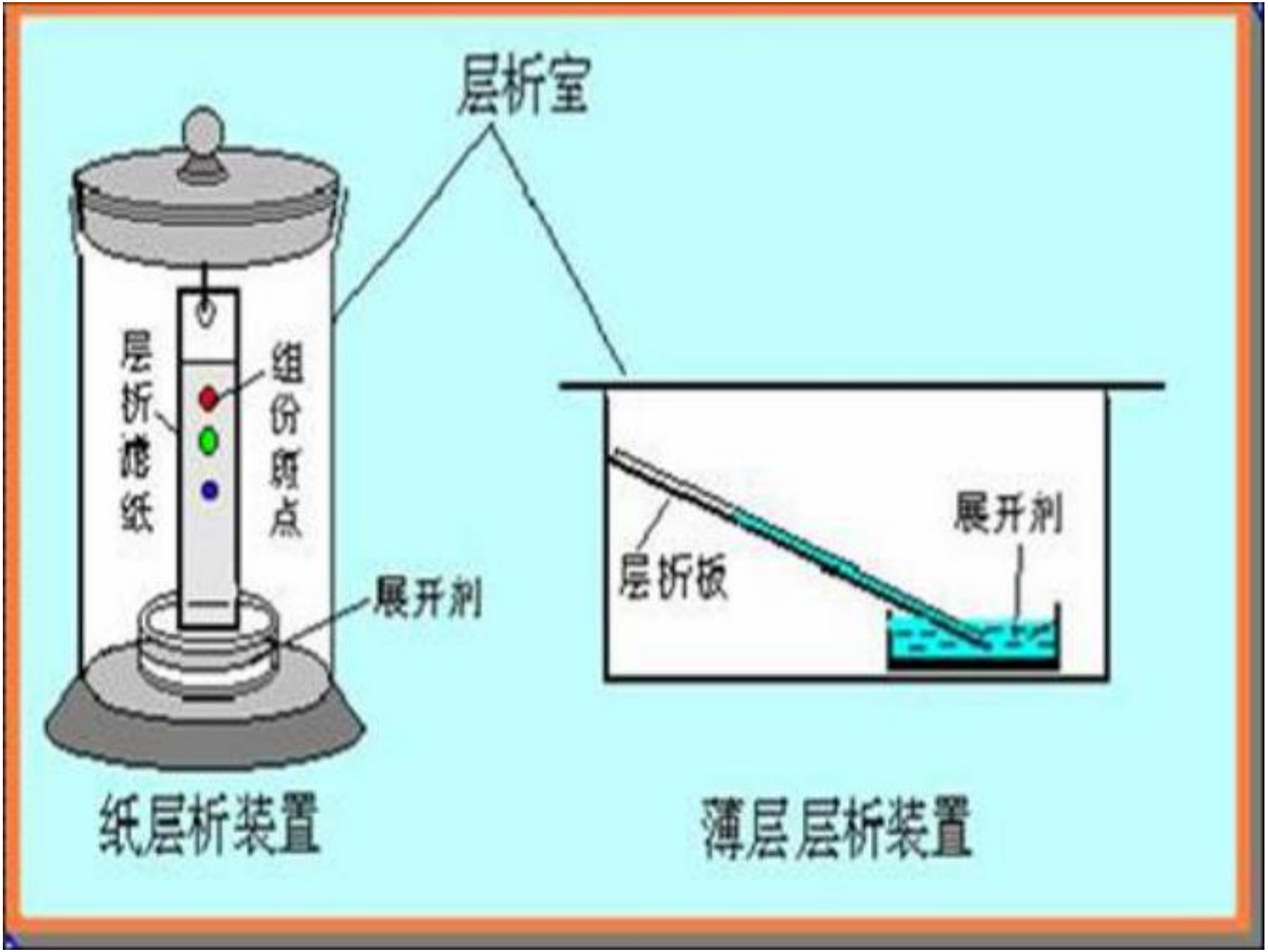
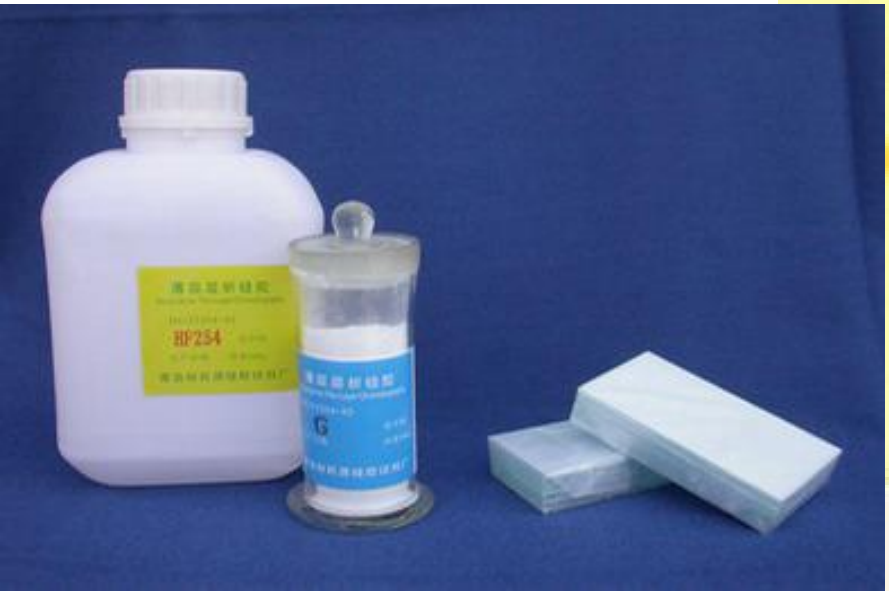


图 3－26　纸层析中的 R_f 值，$R_f = \frac{X}{Y}$


层析室
层析滤纸
组份斑点
展开剂
纸层析装置
展开剂
层析板
薄层层析装置

（四）薄层层析

- 用纤维素、硅胶等作为固相支持物等进行层析的技术。这些层析方法原理相同，但不同的方法又有各自的特点和优势，用于不同的物质分离。


HF254

1
2
3
4
5
6

（五）离子交换层析

- 离子交换层析技术原理与分配层析原理不同。它用的是离子交换的方法将混合物分离。根据离子交换层析分离原理，制成氨基酸自动分析仪。

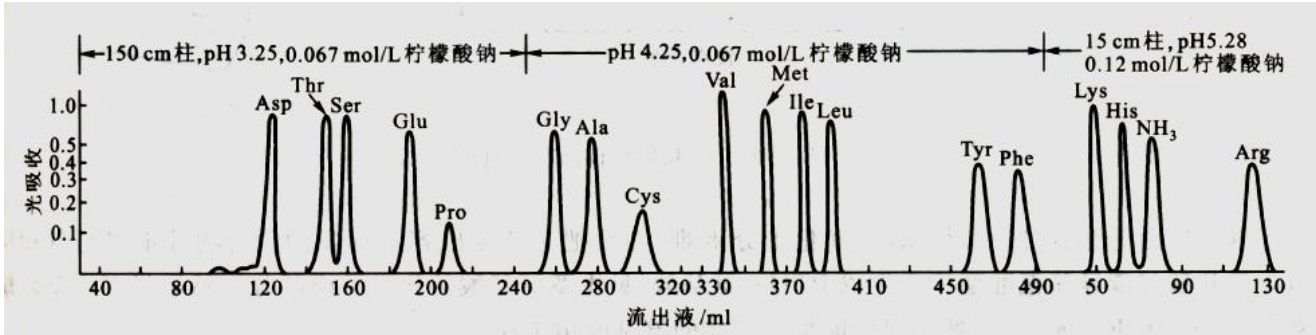


图 3－29　氨基酸自动分析仪记录的氨基酸混合物分析结果

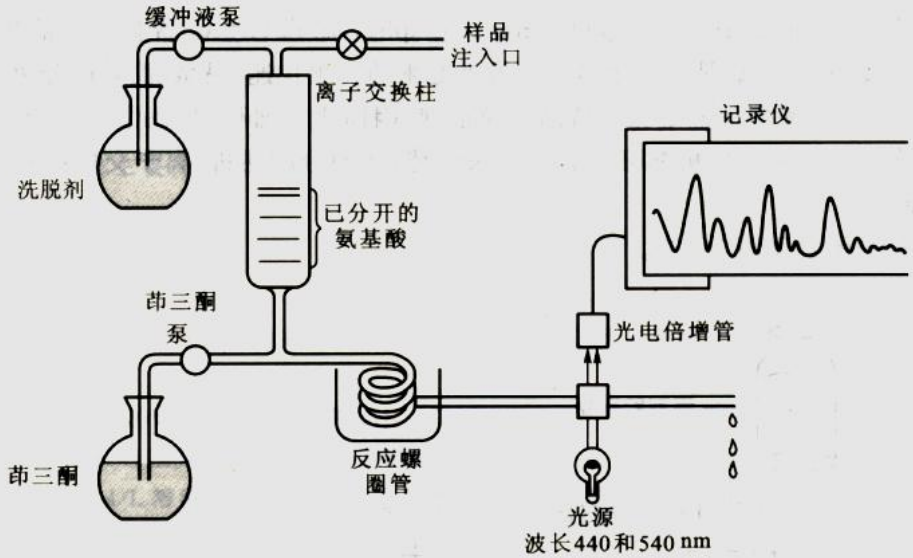
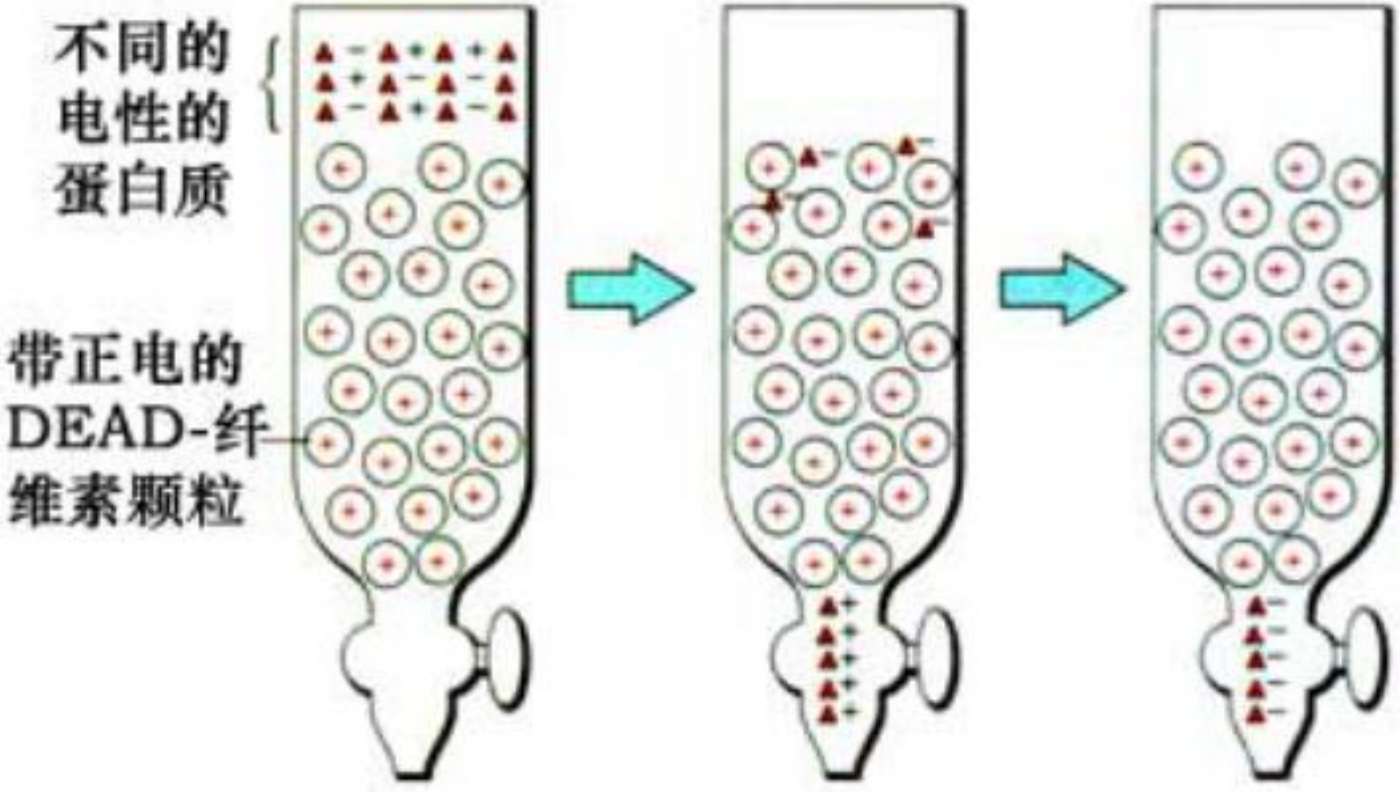
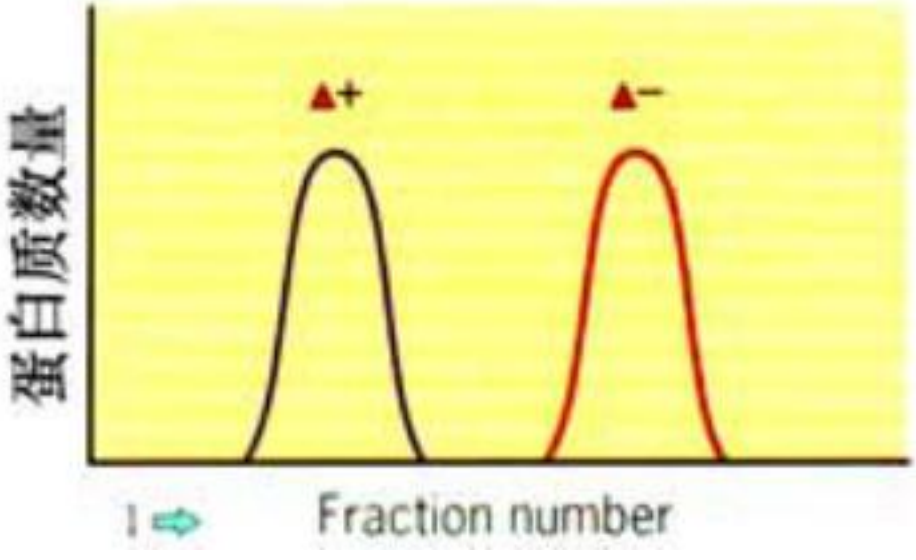


图 3－30　氨基酸分析仪的图解


不同的
电性的
蛋白质
带正电的
DEAD-纤
维素颗粒


蛋白质数量
Fraction number

（六）气液层析

- 应用分配层析原理制作的气相层析仪。以气体作为流动相，喷涂在固体颗粒上的液体为固定相进行物质分离的仪器。

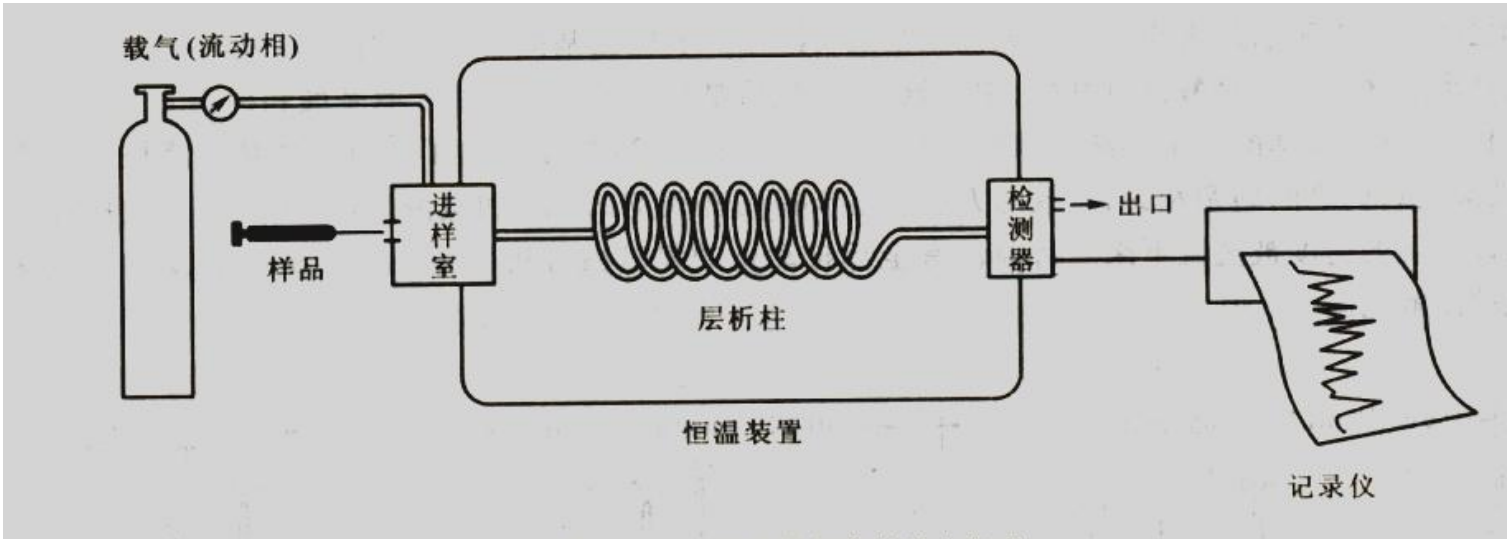


图 3－31　气相层析仪的基本组件

气相色谱仪

（七）高效液相层析

- 高效液相色谱层析 (High performance liquid chromatography HPLC)

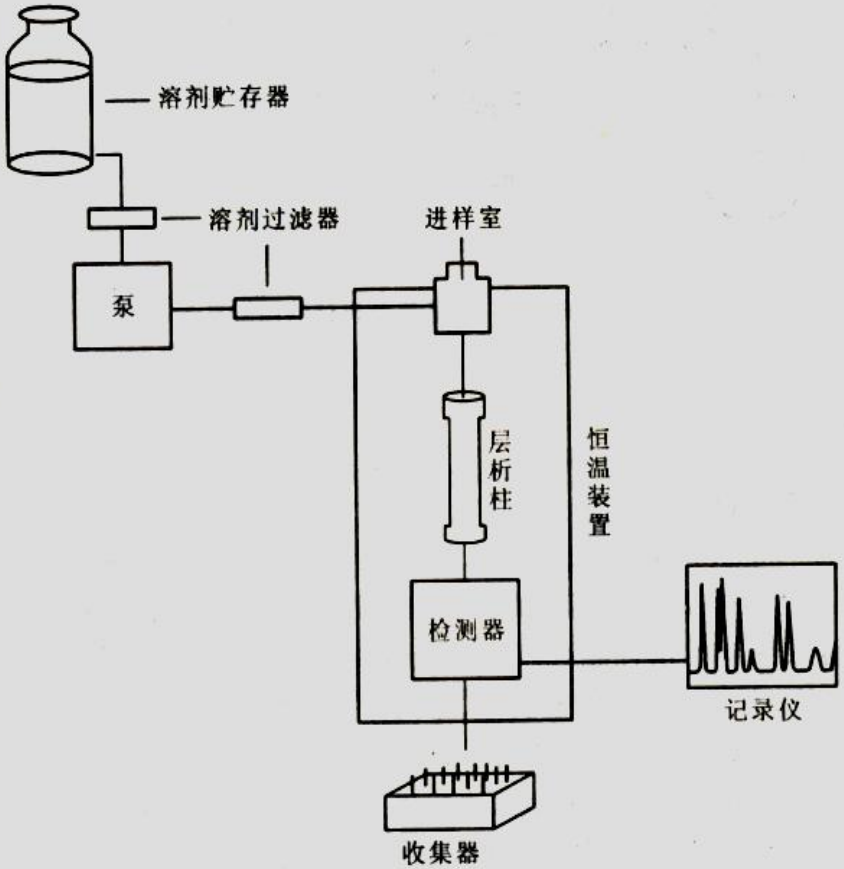
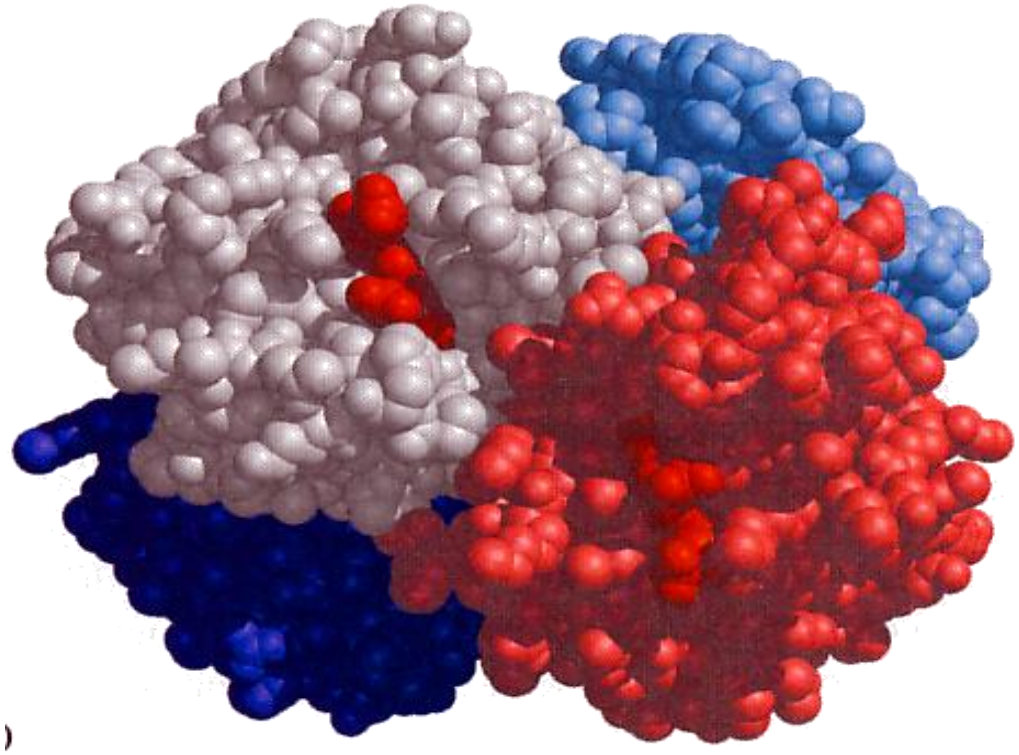


图 3－32　高效液相层析的图解

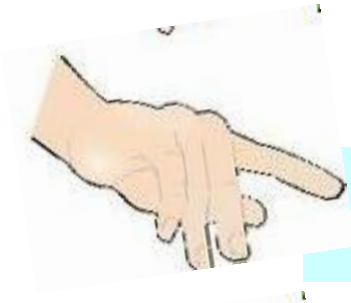
HPLC

第三节

蛋白质的基本结构



一、肽（piptide）



（一）肽和肽键的结构

（二）肽的物理和化学性质

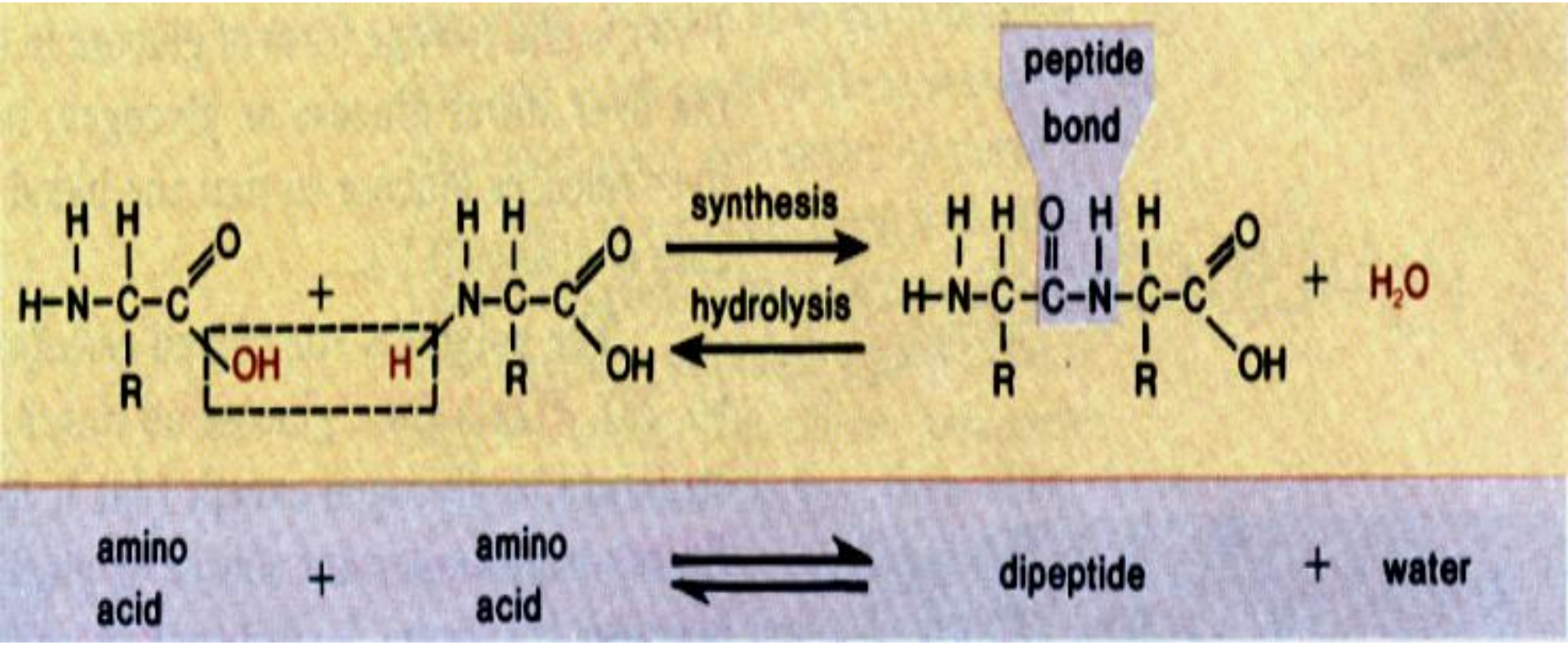
（三）天然存在的活性肽

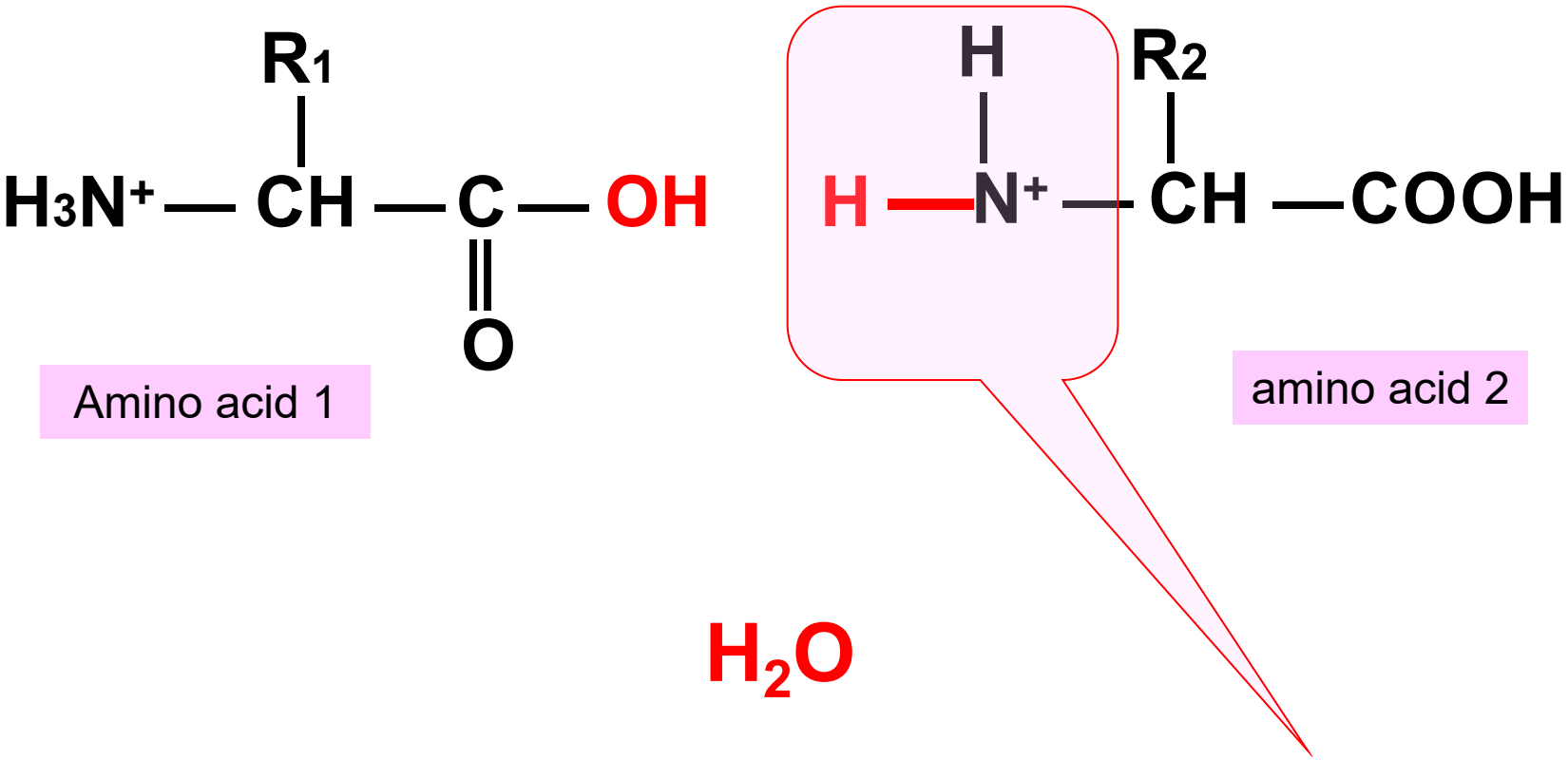
（一）肽和肽键的结构

肽是氨基酸的线性聚合物，因此也常称肽链（peptide chain）。蛋白质是由一条或多条具有确定的氨基酸序列的多肽链构成的大分子。除蛋白质之外，蛋白质的部分水解产物和生物体内游离存在的一些激素和抗生素也是多肽，不过与蛋白质分子相比，它们是比较短的多肽。下面将以较短的多肽或称肽为例讲述蛋白质的共价结构。

肽键是由两个氨基酸缩合，失去一分子的水而形成。

方框中标出的地方是肽键，也称酰胺键。





肽　键 或 酰胺键

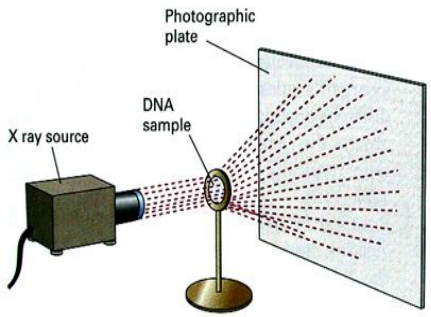
肽键的结构
（structure of peptide bond）

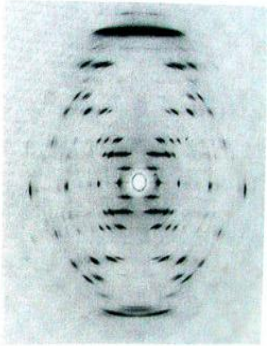
美国化学家L.Pauling和Robert.Corey用X-ray衍射晶体结构的方法对氨基酸和肽键进行了精确的测定。

1、组成肽键有四种元素：C、N、H、O

2、它们同处在一个平面上，H和O分别在C-N的两边。

3、C-N键长1.32A，比正常C-N键（1.49A）短，比C=N（1.27A）键长，它具有双键的性质。





X-ray diffraction pattern

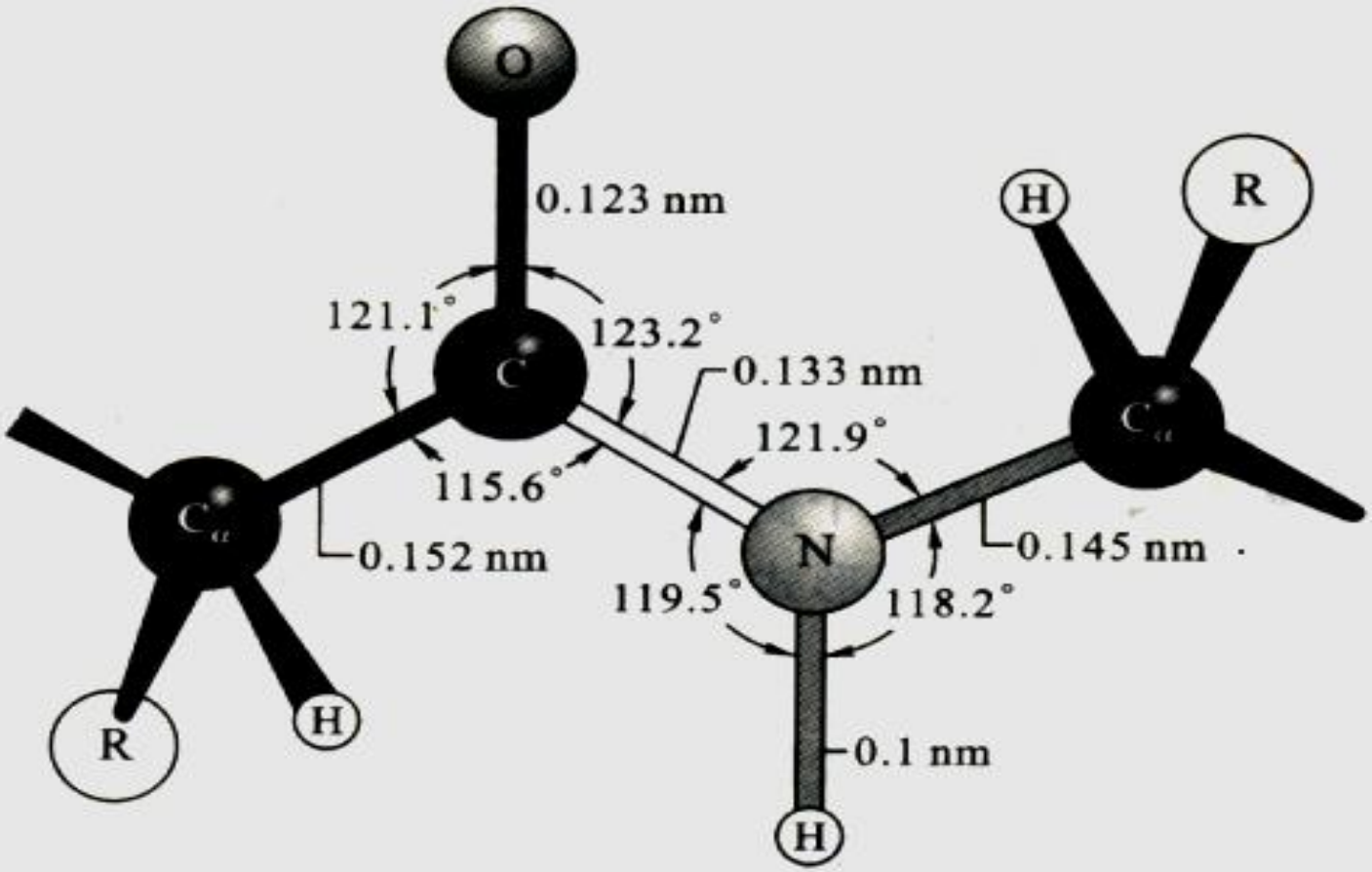
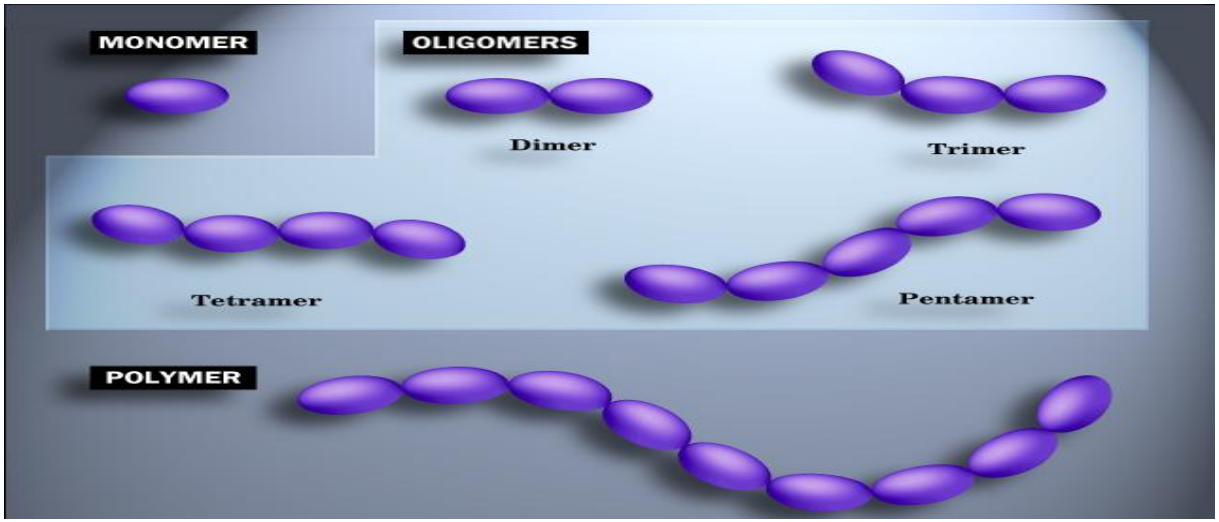


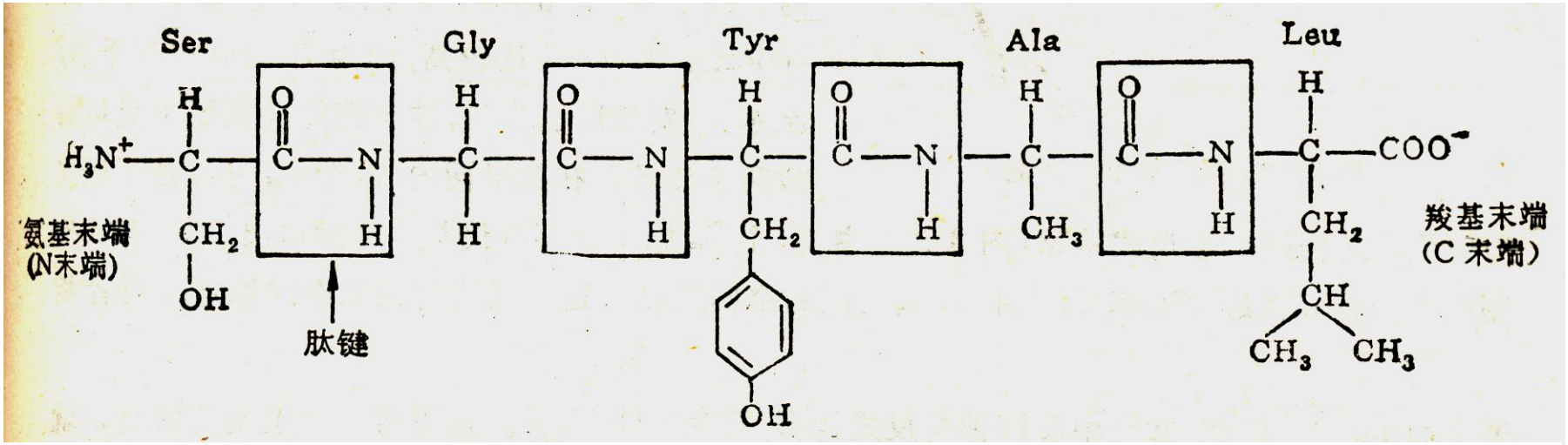
图 4－3　反式构型的肽键

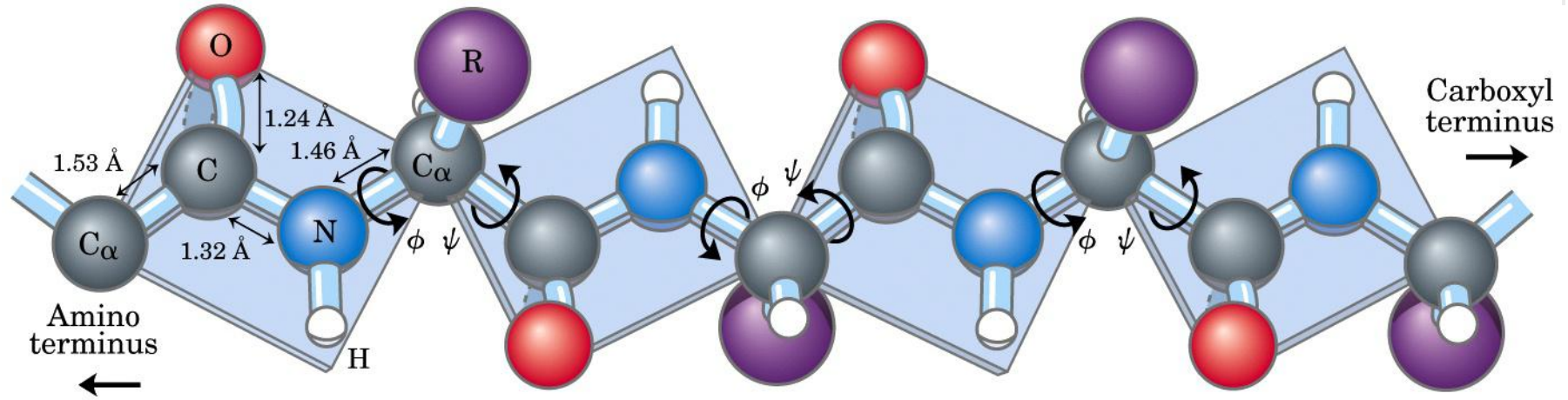
肽链　(piptide chain)

- 最简单的肽链是二肽，有两个氨基酸缩合而成，三个氨基酸缩合为三肽，依此类推，四肽、五肽——，数不过来时，称为多肽。
- 肽链中的氨基酸已是不完整了，不能再称为氨基酸，因此称为氨基酸残基（amino acid residue）。



肽链结构


Ser
Gly
Tyr
Ala
Leu
氨基末端
(N末端)
羧基末端
(C 末端)
肽键


O
R
1.24 Å
1.46 Å
1.53 Å
C
Cα
N
1.32 Å
Cα
H
Amino terminus
Carboxyl terminus
φ ψ
φ ψ
φ ψ

(b)

（二）肽的物理和化学性质

- 肽链的物理性质
- 1、许多得到的短肽纯品都是白色结晶，具有较高的熔点说明短肽是离子晶格。
- 2、在水中以兼性离子存在，肽键的氨基和羧基不解离，而两头发生解离；链较长时，解离忽略，起影响作用的是R基尚可解离的基团。
- 可解离的基团会受到环境pH影响，当溶液中的pH正好使某一多肽链的净电荷为0时，那么，这一pH值就是该多肽链的等电点（pI）。

肽链的化学反应

肽链的化学性质与氨基酸基本相同

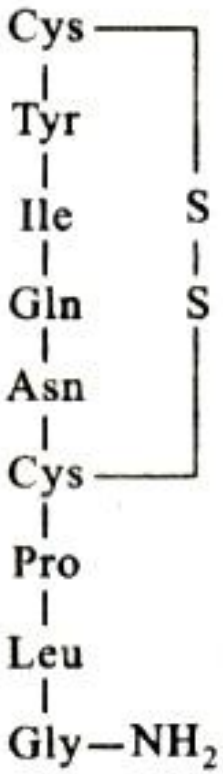
1、可与茚三酮发生呈色反应，用于定性。

2、可与双缩脲试剂发生呈色反应，用于定性和定量测定。这是酰胺键特有的反应，氨基酸没有此反应。

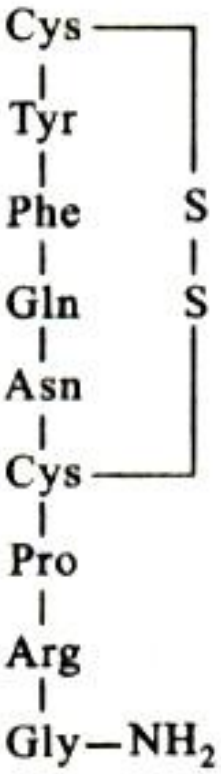
3、有离氨基和羧基及R基与氨基酸的化学反应类似。

（三）天然存在的活性肽

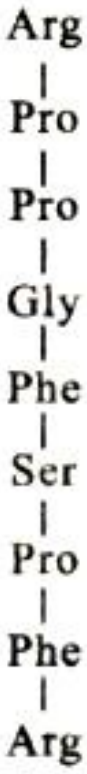
- 蛋白质经水解后可得到长短不一的肽段，在生物体内还有很多具有活性的肽游离存在。它们具有各种特殊的生理活性和生物学功能。如：催产素、加压素、舒缓激肽、谷胱甘肽、肌肽鹅肌肽等。



牛催产素
(bovine oxytocin)



牛加压素
(bovine vasopressin)



舒缓激肽
(bradykinin)

图 4－5　一些肽类激素的结构

二、蛋白质一级结构 (primary structure)

蛋白质的一级结构是指蛋白质多肽链中氨基酸的序列，包括数目和二硫键的位置。

同源蛋白质的物种差异与生物进化

表 4-9 不同生物体的细胞色素 c 序列间氨基酸差异数目的比较[a]

	黑猩猩	绵羊	响尾蛇	鲤鱼	蜗牛	天蛾	酵母	花椰菜	欧防风
人	0	10	14	18	29	31	44	44	43
黑猩猩		10	14	18	29	31	44	44	43
绵羊			20	11	24	27	44	46	46
响尾蛇				26	28	33	47	45	43
鲤鱼					26	26	44	47	46
花园蜗牛						28	48	51	50
烟草天蛾							44	44	41
啤酒酵母								47	47
花椰菜									13

a. 取自 Creighton, T.E., Protein Structure and Molecular Properties, W.H.Freeman and Co., San Francisco, 1983.

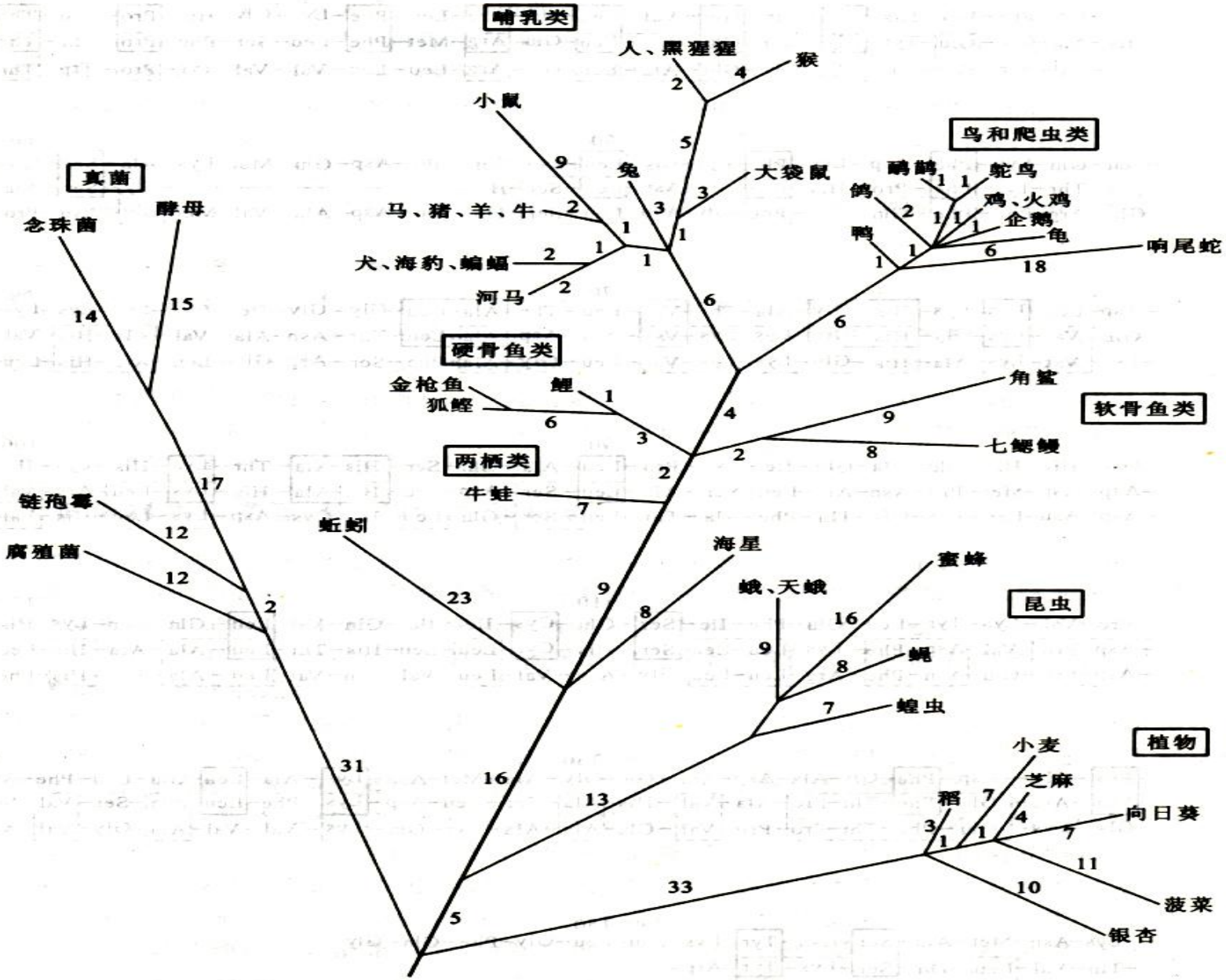
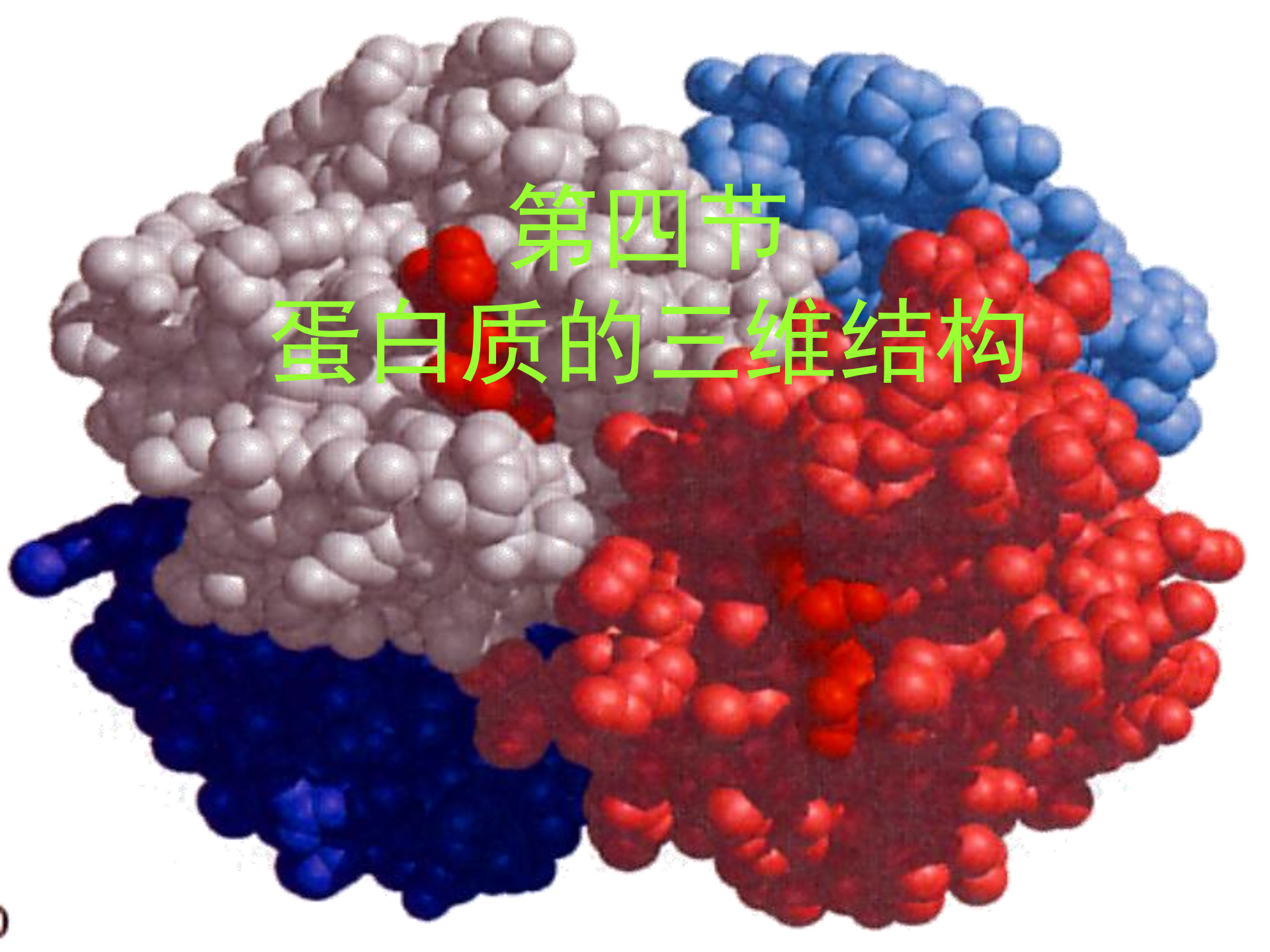


图 4－17　根据细胞色素 c 序列的物种差异建立的进化树

分支顶端是现存的物种。沿分支线的数字表示物种和潜在(假设)的祖先之间的氨基酸变化



第四节
蛋白质的三维结构

一、研究蛋白质构象的方法
二、稳定蛋白质三维结构的作用力
三、二级结构：多肽则迭的规则方式
四、纤维状蛋白质
五、超二级结构和结构域
六、 球状蛋白质与三级结构
七、亚基缔合和四级结构

一、研究蛋白质构象的方法

- （一）X-射线衍射法
- （二）光谱学方法

（一）晶体X-射线衍射法

目前研究蛋白质三维结构的方法主要是X-射线衍射技术,结合电脑分析,可以将衍射获得的数据处理成图像,从中分析出物质的三维结构。

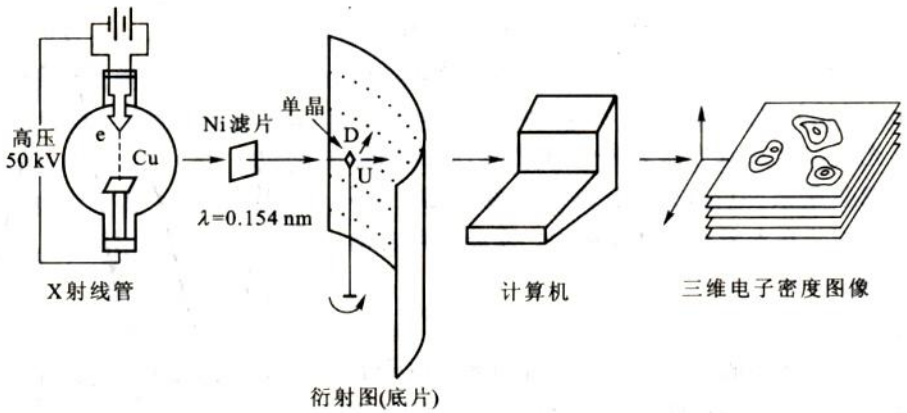


图 5－1　X 射线衍射晶体结构分析示意图

Cu:阳极靶,产生 X 射线;e:高速电子;Ni:镍滤片,获得单色 X 射线(λ=0.154 nm);D:衍射光束;U:未衍射光束

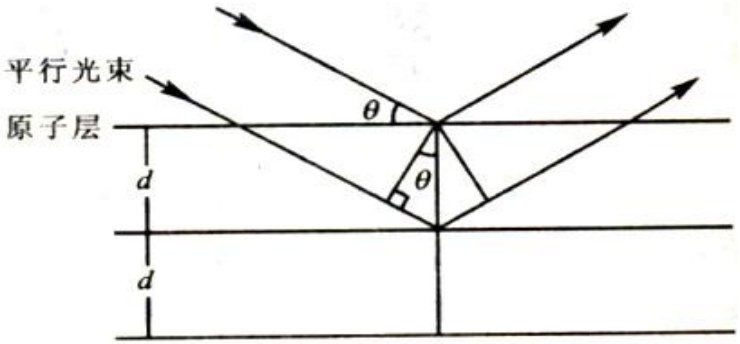
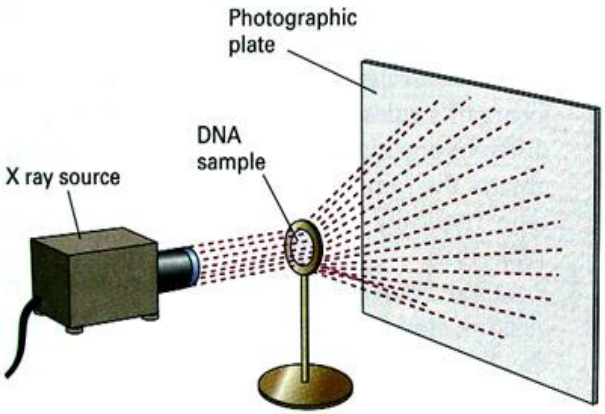
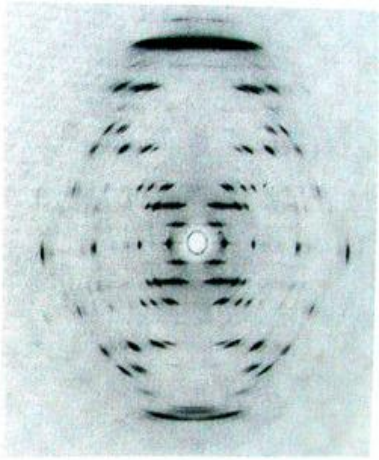


图 5－2　布拉格方程的图解

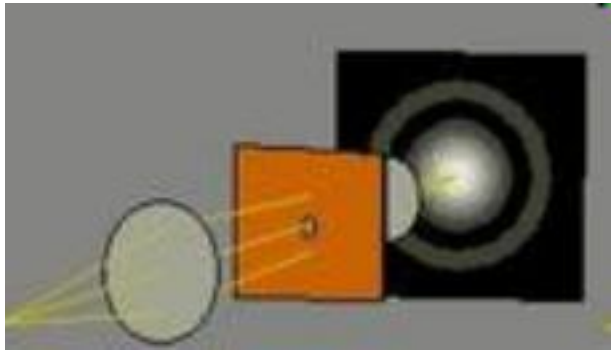




X-ray diffraction pattern

（二）溶液光谱学方法

- 研究溶液中蛋白质构象的光谱学方法有：
- 1、紫外差光谱
- 2、荧光和荧光偏振
- 3、圆二色性
- 4、核磁共振



二、稳定蛋白质三维结构的作用力

（一）氢键

（二）范德华力

（三）疏水作用

（四）盐键

（五）二硫键

除二硫键外其他都属非共价键作用力。

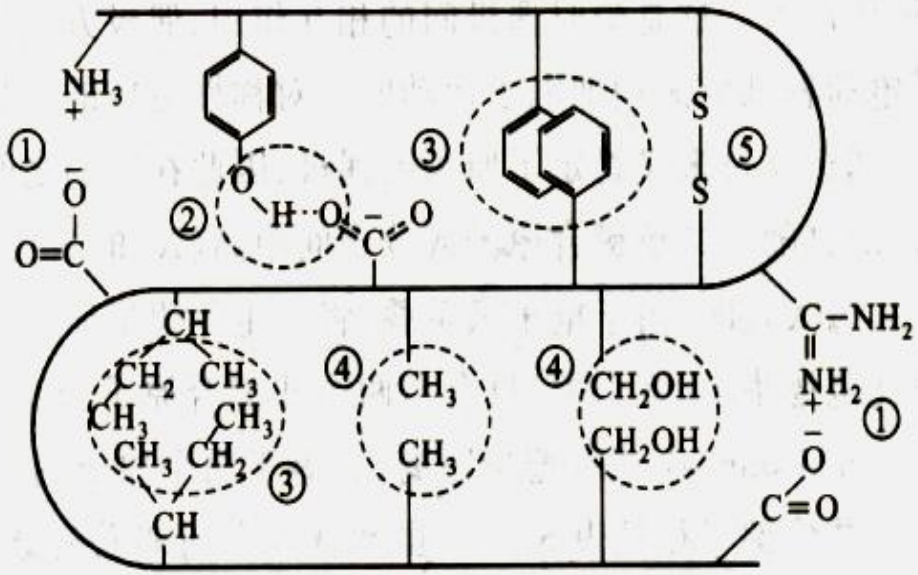


图 5-8 稳定蛋白质三维结构的各种作用力

① 盐键;② 氢键;③ 疏水作用;④ 范德华力;⑤ 二硫键

表 5-1 稳定蛋白质三维结构的几种键的键能

键	键能[a]/($kJ \cdot mol^{-1}$)
氢键	13～30
范德华力	4～8
疏水作用	12～20[b]
盐键	12～30
二硫键	210

a. 键能是指断裂该键所需的自由能。

b. 此数值表示在 25℃ 非极性侧链从蛋白质内部转移到水介质中所需的自由能。它与其他键的键能不同,此数值在一定温度范围内随温度升高而增加。实际上它并不是键能,此能量的大部分并不用于伸展过程中键的断裂。

1、氢键（hydrogen bone）

在稳定蛋白质的结构中起极其重要的作用，它是稳定蛋白质为二级结构主要的作用力。

2、范德华力（van der Warls force）

包括三种较弱的作用力（1）定位效应，发生在极性分子或极性基团之间；（2）诱导效应，发生在极性物质和非极性物质之间；（3）分散效应，是非极性分子或基团的范德华力，

3、疏水作用（hydrophobic interaction）

是稳定蛋白质三维结构最主要的力。

4、盐键（ion bone）

又称为离子键，是正电荷和负电荷之间的一种静电相互作用力。

5、二硫键（disulfide bone）

二硫键在已形成的蛋白质三维结构中起很大作用，它是共价键。

三、二级结构：多肽折叠的规则方式

提纯的纤维蛋白经X-ray衍射技术分析后，蛋白质主链的折叠产生有氢键维系的有规则的构象，称为二级结构。二级结构的元件有如下几种：

（一）α-螺旋

（二）β -折叠片

（三） β-转角和β-凸起

（四）无规则卷曲

（一）α-螺旋

1、α－螺旋（ α－ helix ）

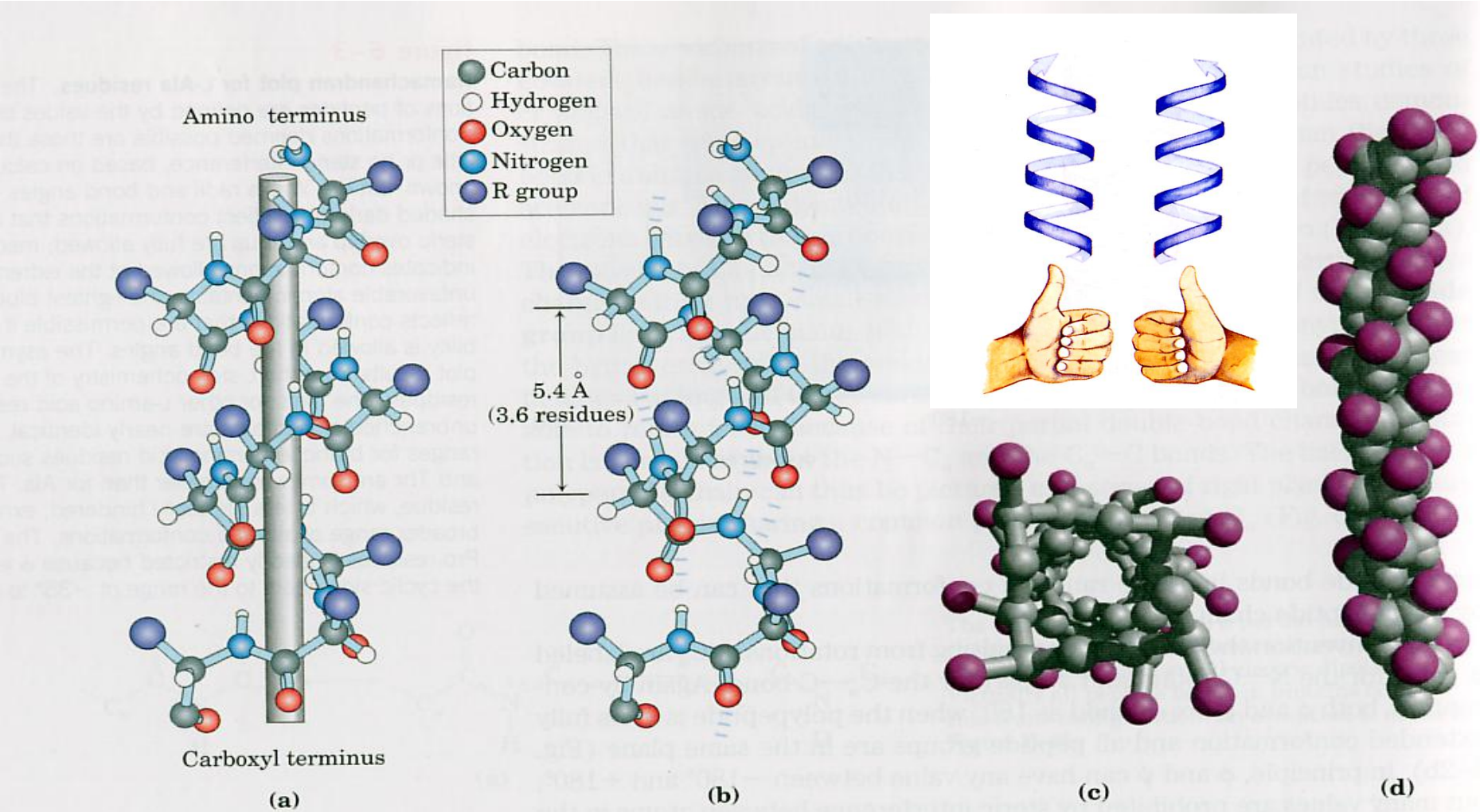
是蛋白质中最常见的、最典型、最丰富的二级结构元件。

整数螺旋，非整数螺旋　　左手螺旋，右手螺旋

2、　α－螺旋构象：

Astberg 等人用X-ray衍射技术分析了毛发一类的角蛋白得到的衍射图沿长轴方向每隔5.5A就有一个周期性结构，认为它是一种螺旋结构。Pauling根据X-ray衍射图建立了**α-**螺旋结构模型。

α -helix structure



3、α－螺旋模型特点

1）多肽链主链的骨架围绕中心轴螺旋上升，每隔3.6个氨基酸残基上升一圈，相当于向上平移5.4A；每个AA残基沿中心轴旋转100^0，向上平移1.5A每个角等于－57^0。

2）相邻螺圈之间形成链内氢键。

3）R基位于α－ helix 外侧，

4）可以是右手螺旋，也可以是左手螺旋，但右手螺旋能量最低，较左手螺旋稳定，因此，蛋白质中一右手螺旋为主要构象。左手极少。

5）侧链R基影响α- helix 的构象。

4、影响α- helix 形成的因素

1）AA的组成

2）AA的序列,多肽链上连续带有极性AA。

3）AA侧链的大小，Gly、ILe、Lue、Pro、羟Pro。

4）环境pH。

5、其他类型的螺旋

其他类型的螺旋

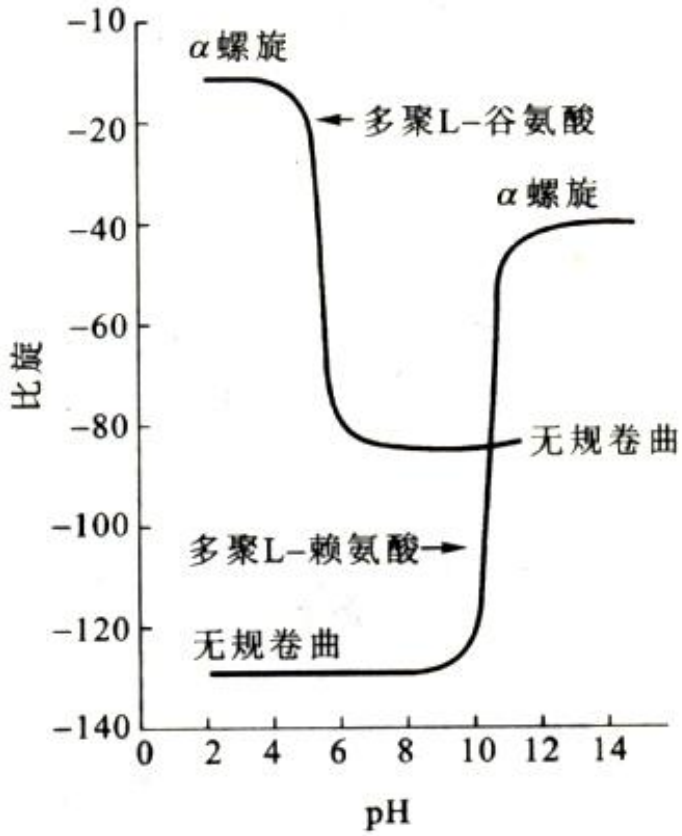
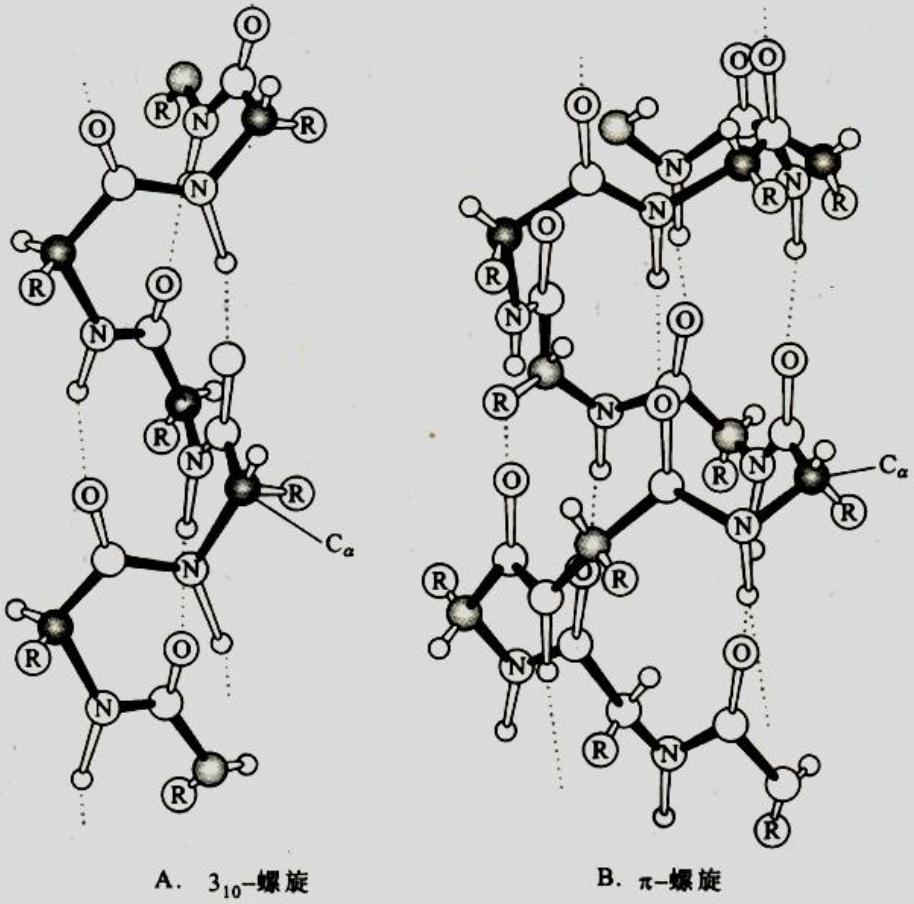
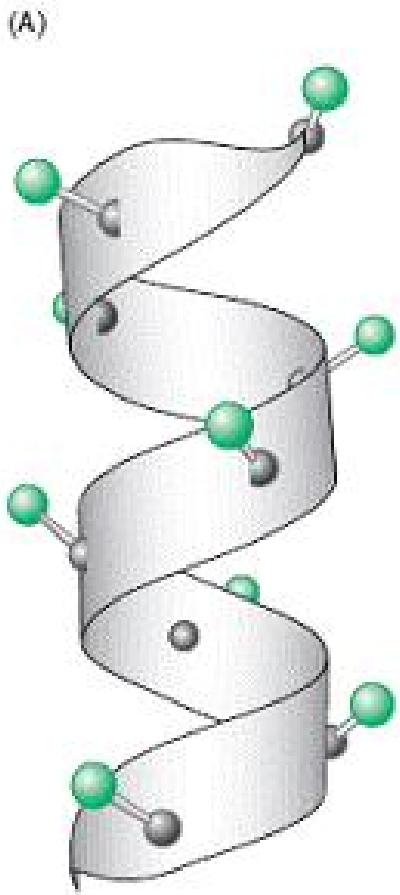


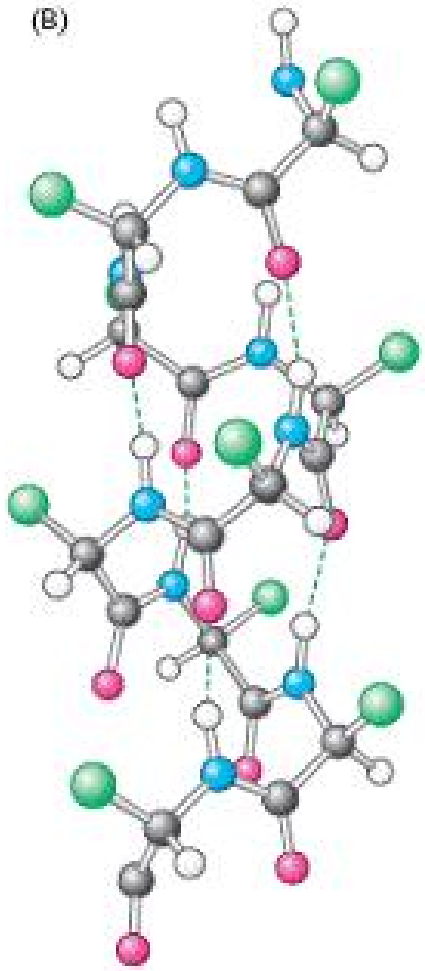
图 5－15　pH 对多聚 L－谷氨酸和多聚 L－赖氨酸在 α 螺旋和无规卷曲之间构象互变的影响

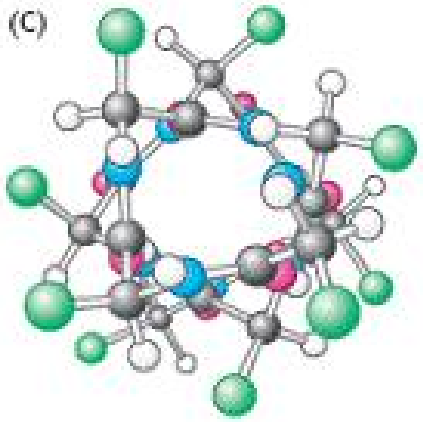


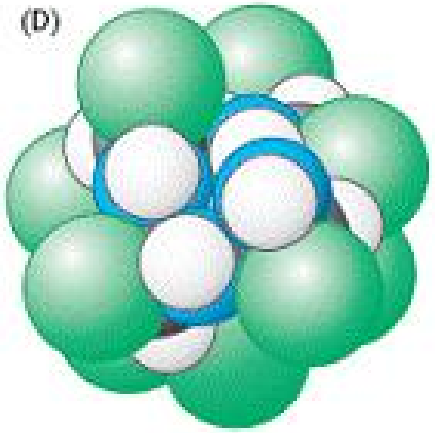
A. 3_{10}-螺旋　　B. π-螺旋

图 5－16　多肽链的其他两种类型的螺旋结构


(A)


(B)


(C)


(D)

（二）β－折叠片

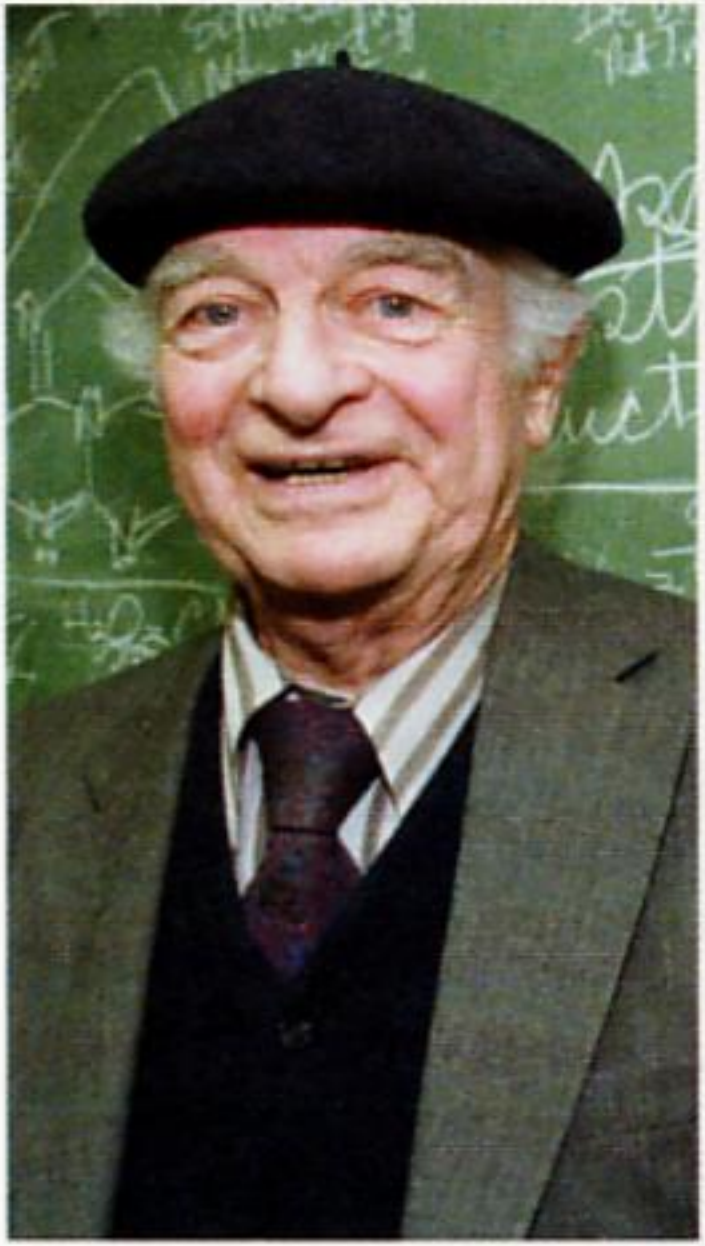
β－折叠片（ β－ pleated sheet）或称 β－构象。

1951年Pauling在研究角蛋白时，发现含Gly、Ala、Ser 较高的角蛋白，它的X-ray衍射光谱不同于α－helix ，而是具有7A的重复结构，肽链几乎是完全伸展的，两条肽链的轴距是3.5A，两链以氢键相联系，所有的肽键都参加氢键的形成氢键与链的长轴垂直，因此是一种片层结构，称为β－折叠片结构。

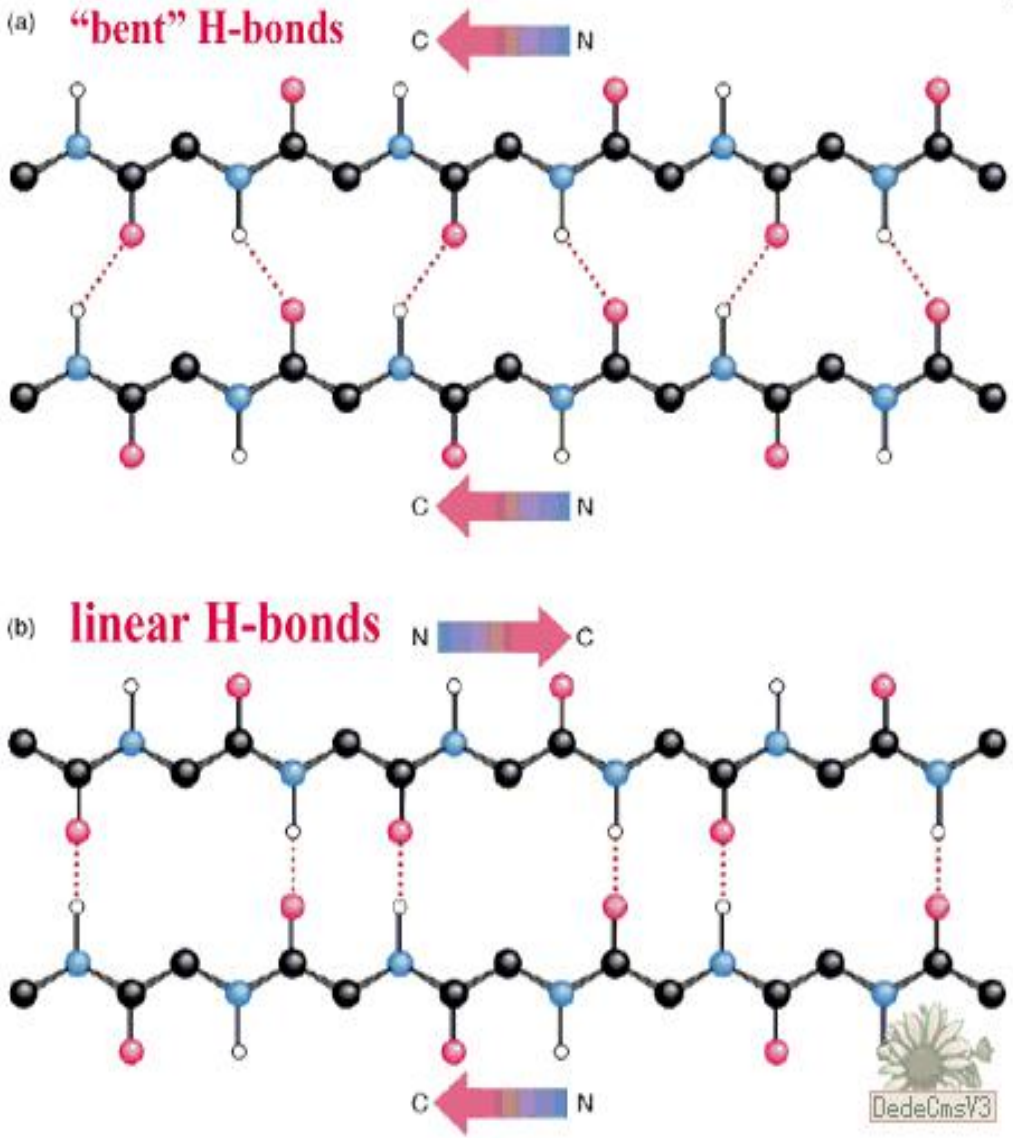
β－折叠片有两种类型

1、平行式　不稳定

2、反平行式 稳定



Linus Pauling
1901–1994



（三） β转角和β凸起

B－ 转角（ β－ turn）

蛋白质在折回、弯曲和转向处的结构是一种称为β转角结构，也是一种二级结构的元件，这一结构象发卡，也称发卡结构。有四个AA参加，第一个AA的羰基与第四个AA的亚氨基之间形成氢键。

β- 凸起(β- bugle)

- 是一种小片的非重复结构，被认为是β折叠中额外插入的一个残基，是正常的β折叠形成突起。

β凸起

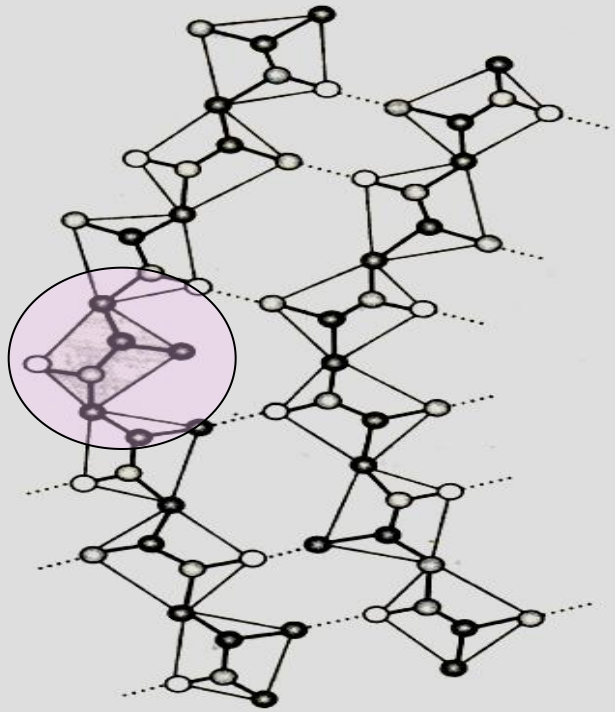


图 5－20　一种典型的 β 凸起

β—转角

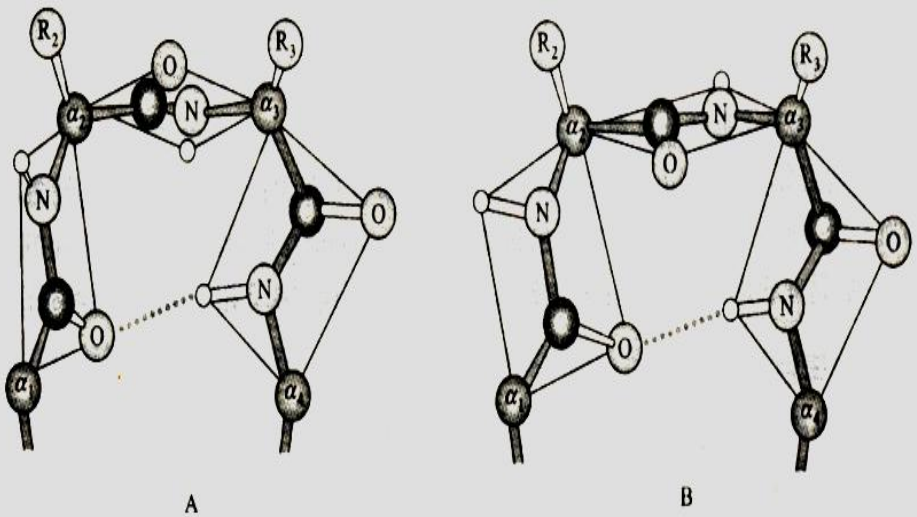
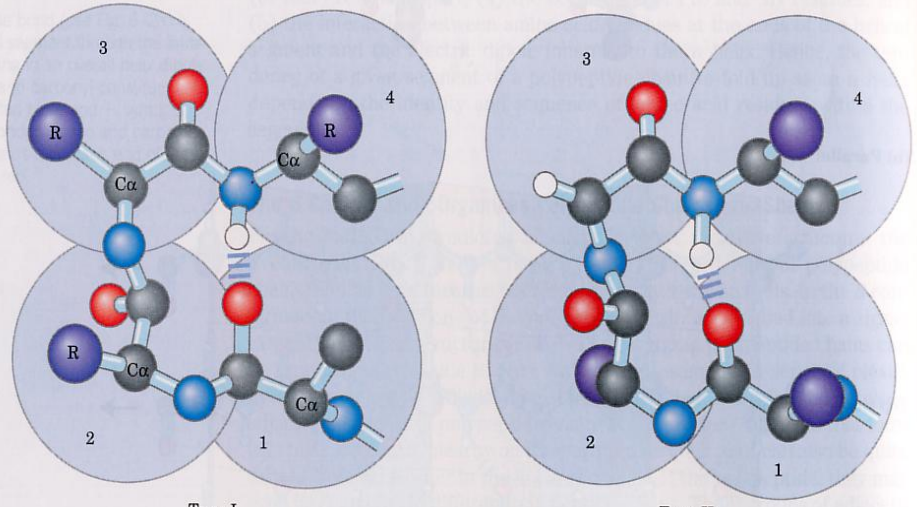
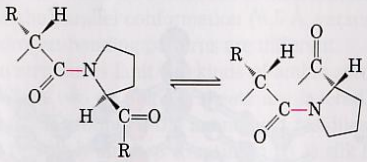


图 5－19　两种主要类型的 β 转角



β Turns
(a)

Type I and type II β turns are
occur more than twice as fre-
turns always have Gly as the
rogen bond between the
and fourth residues of the
id residues are framed by large
and cis isomers of a peptide
trogen of proline. Of the
ino acid residues other than
trans configuration. For
imino nitrogen of proline,
he cis configuration; many of



Proline isomers
(b)

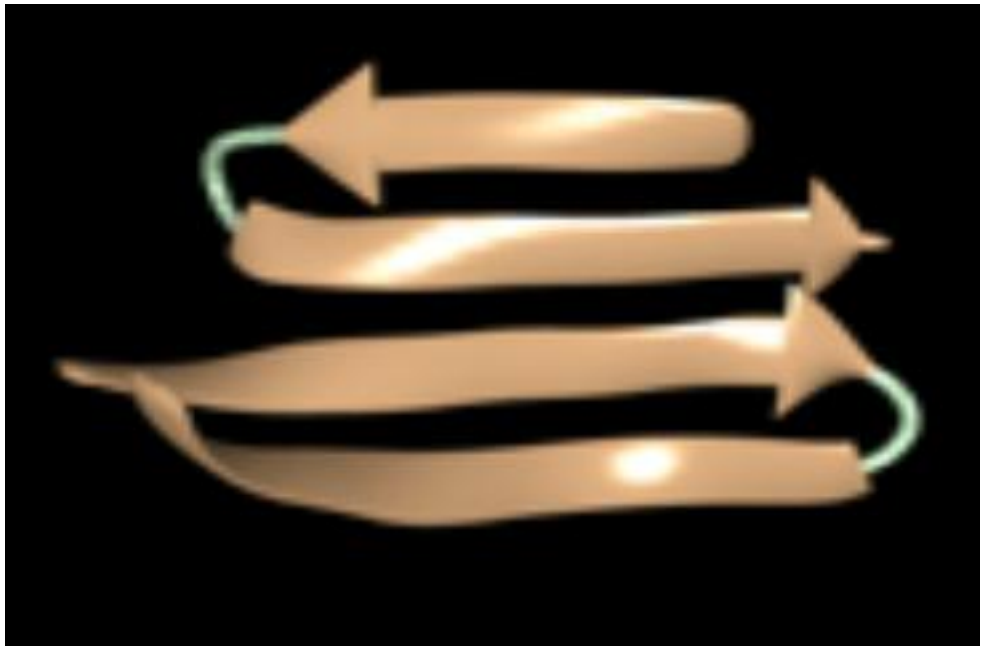
（四）无规则卷曲

无规则卷曲（randon coil）是指那些即不是螺旋又不是折叠的肽段区，但也向其他二级结构一样有明确稳定的结构。它们受侧链的影响很大，常常构成酶的活性部位或其他蛋白质的功能部位。

五、超二级结构和结构域

- （一）超二级结构
- （二）结构域

Typical connections in an all-β motif



（一）超二级结构

超二级结构（super secondary structure）介于二级结构与三级结构之间的一种结构形式。它是由二级结构有规则组合而成的，充当三级结构的构件。有三种基本组合形式：

1、 αα：由两条右手α-螺旋形成的左手螺旋。

2、 βαβ：由两条β-折叠和一条螺旋组成。

3、 ββ：由两条两条β-折叠组成，之间的连接为β 曲折，也称为β发卡结构 （ β- hairpin）。

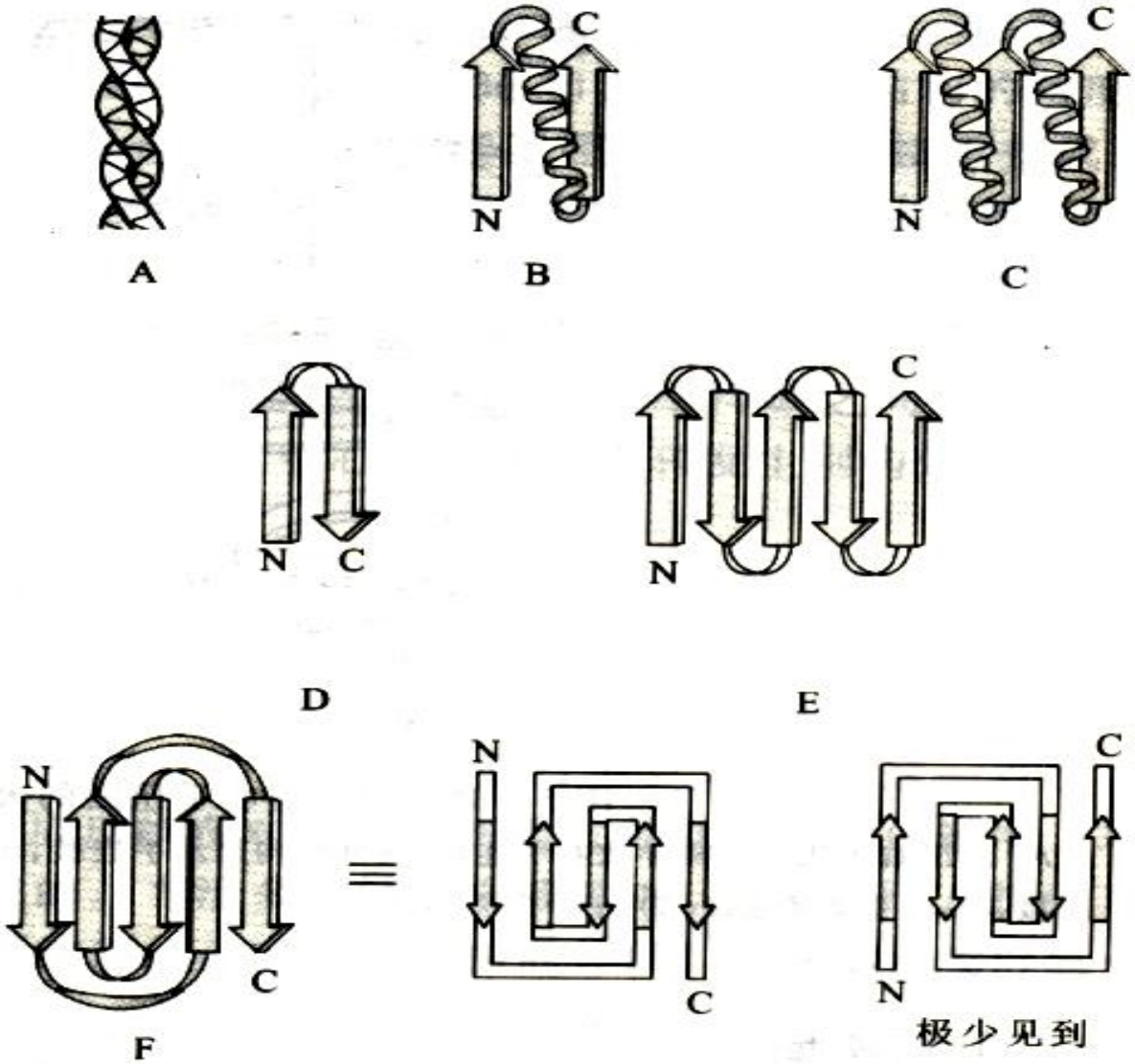
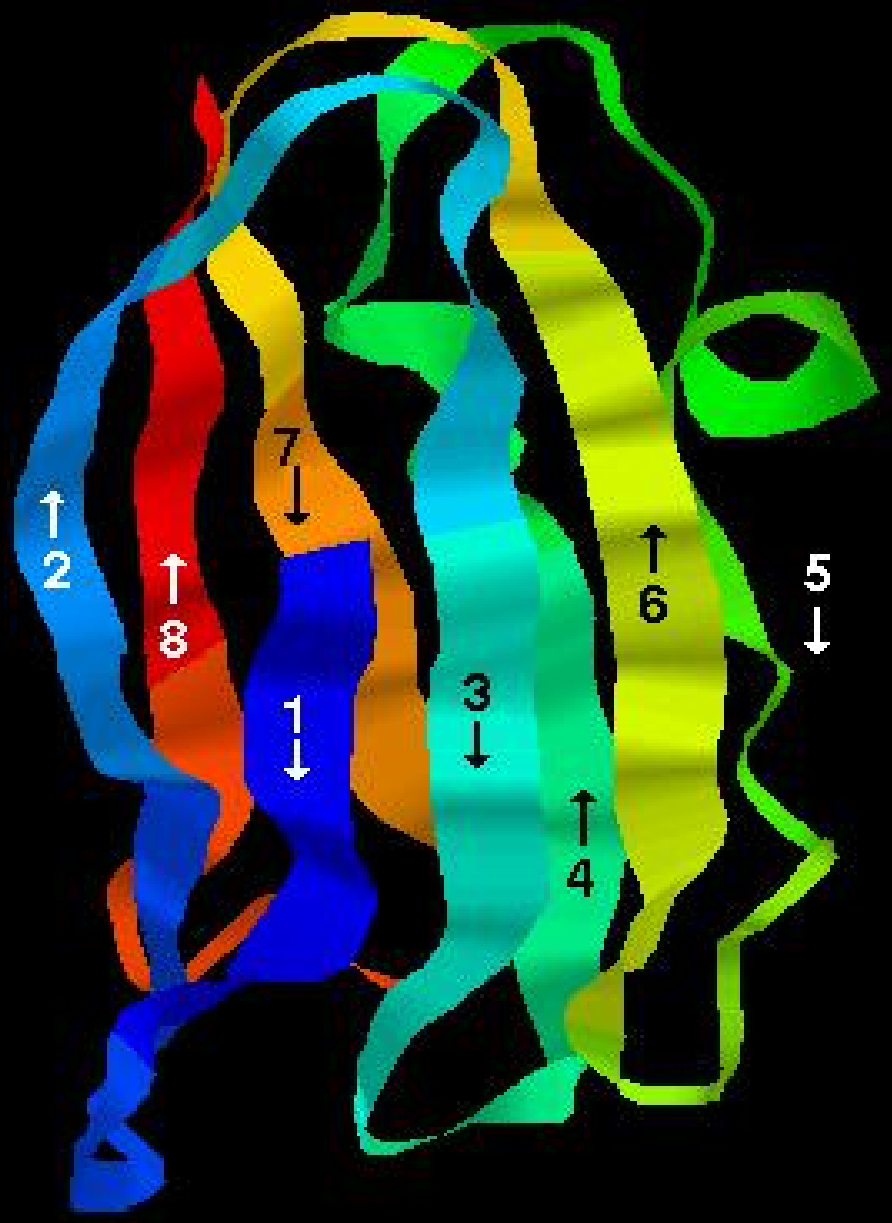
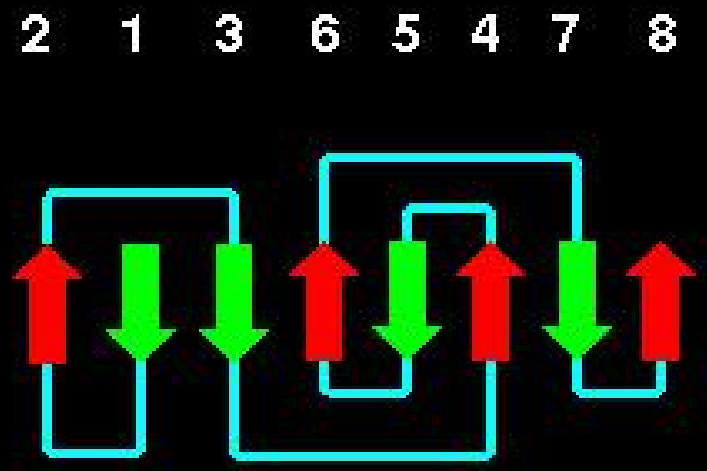


图 5－29　蛋白质中的几种超二级结构

A. αα；B. βαβ 单元；C. Rossman 折叠，其中 α 螺旋处于 β 折叠片上侧；D. β 发夹；E. β 曲折；F. 希腊钥匙拓扑结构，只有一种"手性"形式存在.（带子表示 β 股）

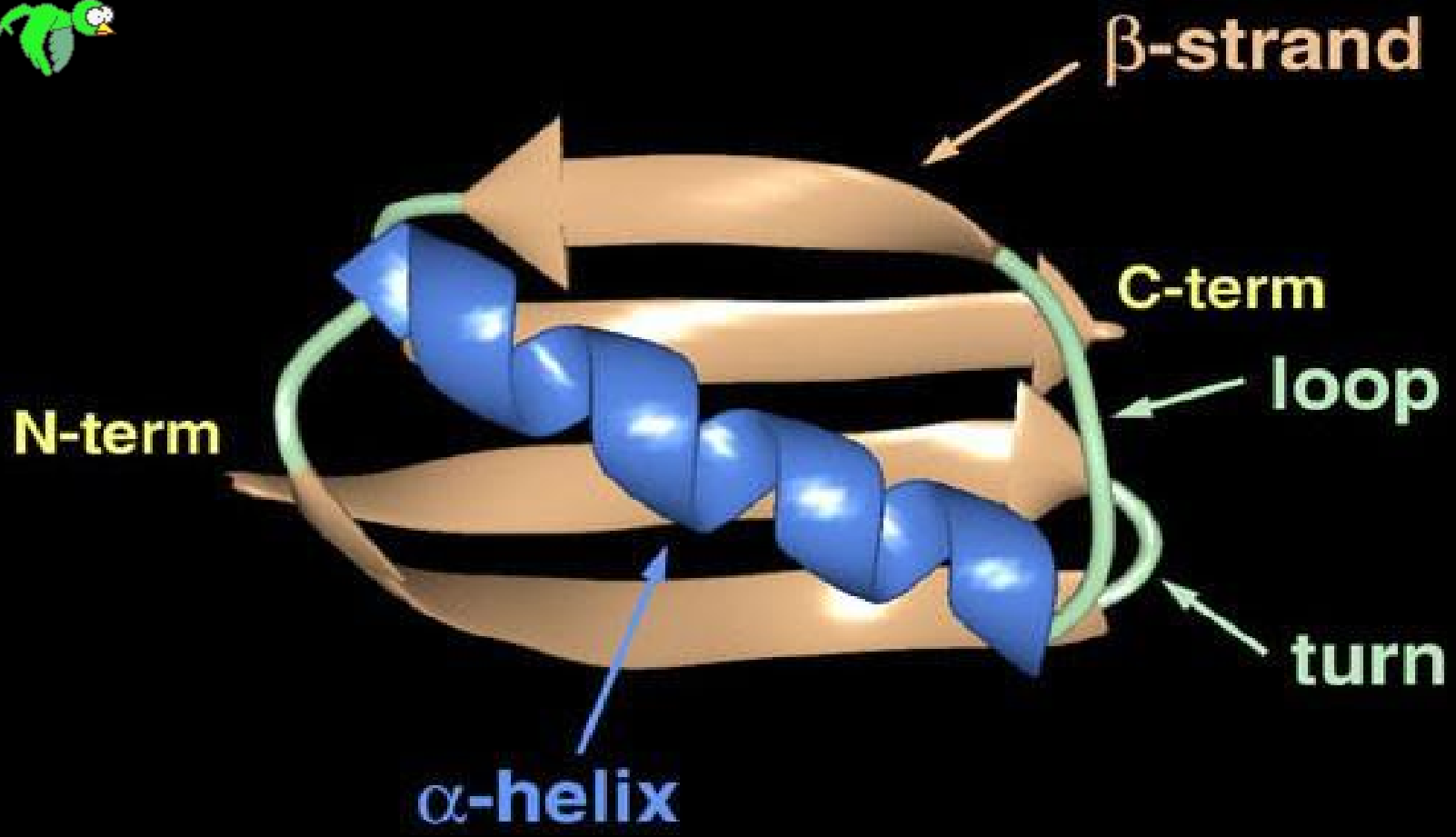




plastocyanin fold
including Greek key

http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section10/10_plasto.gif

immunoglobulin binding domain of protein G

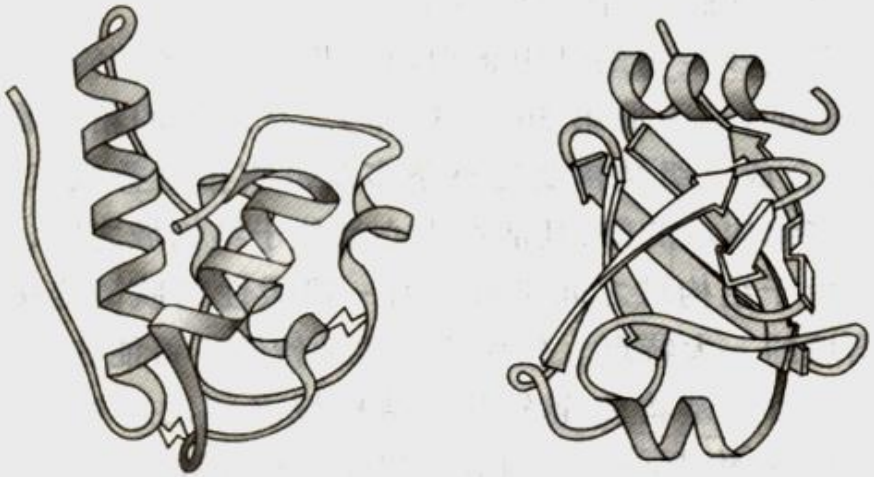


（二）结构域

- 1、结构域的概念：

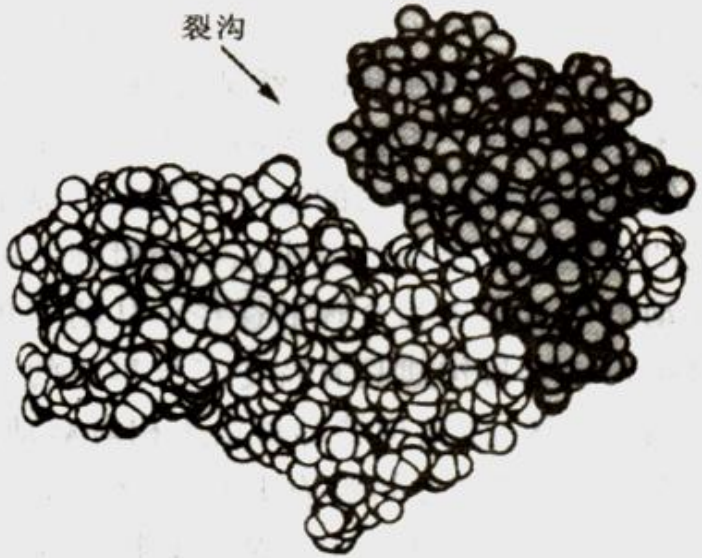
多肽链在二级结构或超二级结构的基础上形成三级结构的局部折叠区域，它是相对独立的紧密球形实体，称为结构域（structure domain）。

结构与含40－400个以上AA残基。对较小的蛋白质或亚基，结构域和三级结构是同一概念，如肌红蛋白RNA酶等，但对较大蛋白质或亚基时，三级结构往往是由几个结构与缔合而成。结构域有时也称功能域（functional domain）.



木瓜蛋白酶结构域1　　木瓜蛋白酶结构域2

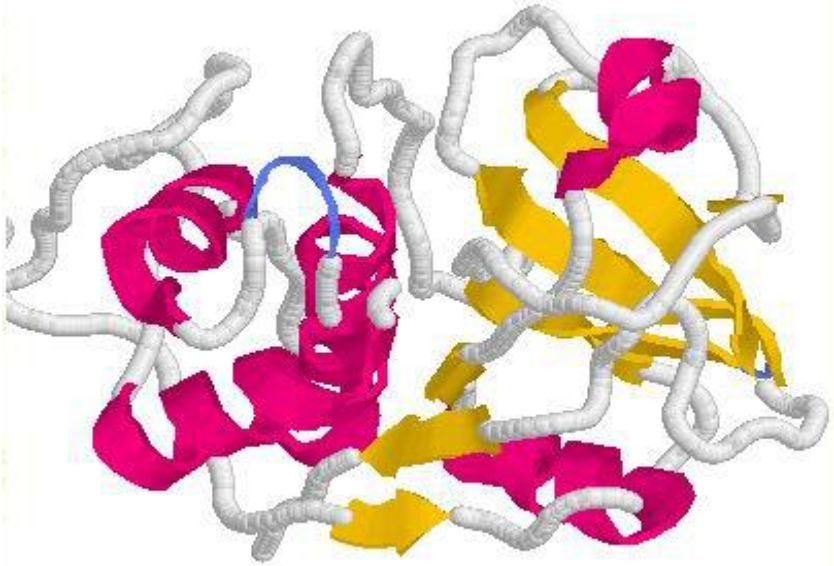
图 5－34　木瓜蛋白酶中两个彼此不相同的

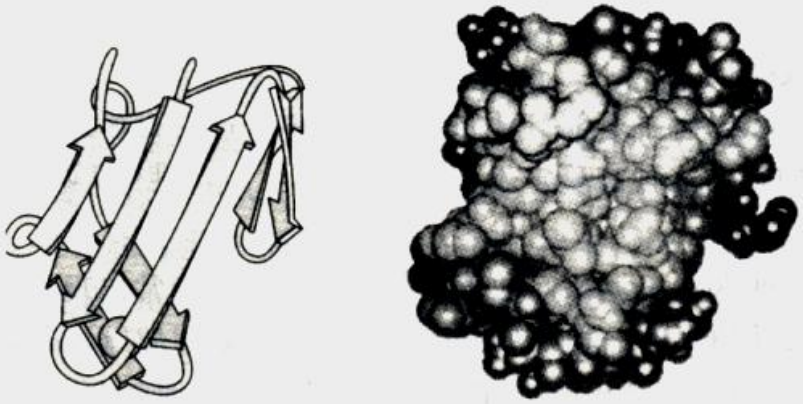


己糖激酶

图 5－35　酵母己糖激酶的三级结构

两个结构域(阴影不同)之间有一裂沟





A　　B

图 5－32　红氧还蛋白的三级结构(单结构域)

A. 带式图解(细带表示连接区或回环);B. 空间充满模型

七、球状蛋白质与三级结构

- （一）球蛋白的三级结构的特性

（一）球蛋白的三级结构的特性

球蛋白都有的共同特点：

1、球蛋白质分子含多种二级结构元件。

2、球蛋白质三维结构具有明显的折叠层次。

3、球蛋白质分子是紧密的球砖或椭球状实体。

表 5－4　几种单链蛋白质或亚基中 α 螺旋、β 折叠和 β 转角的近似含量

蛋白质（总残基数）	残基/(%)[a]		
	α 螺旋	β 折叠	β 转角
肌红蛋白（153）	78	0	16
溶菌酶（129）	40	12	19
核糖核酸酶 A（124）	26	35	–
牛 Cu·Zn－SOD 亚基（151）	14	47	17
胰凝乳蛋白酶（247）	14	45	28
羧肽酶 A（307）	38	17	17

a. 多肽链的其余部分由无规卷曲等组成。

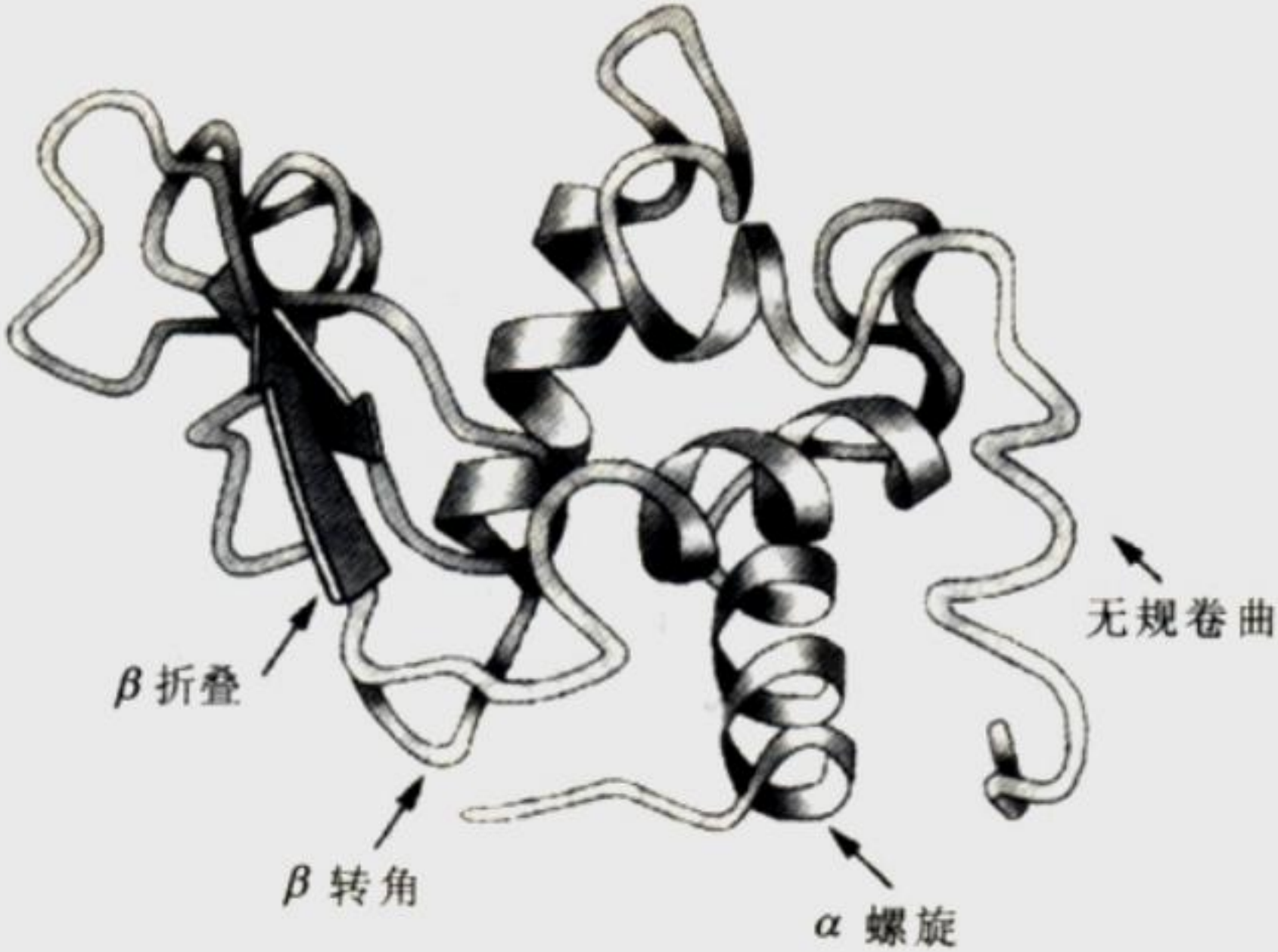
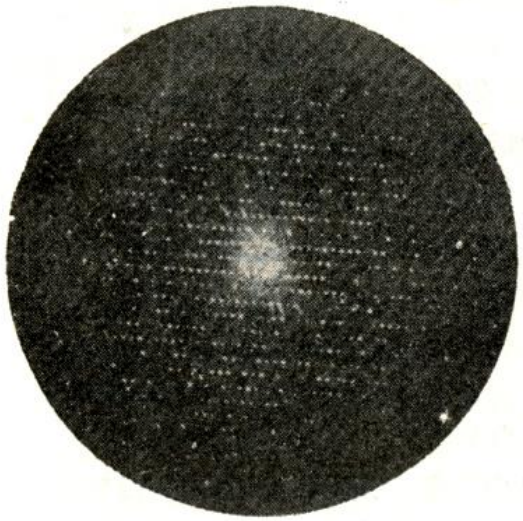
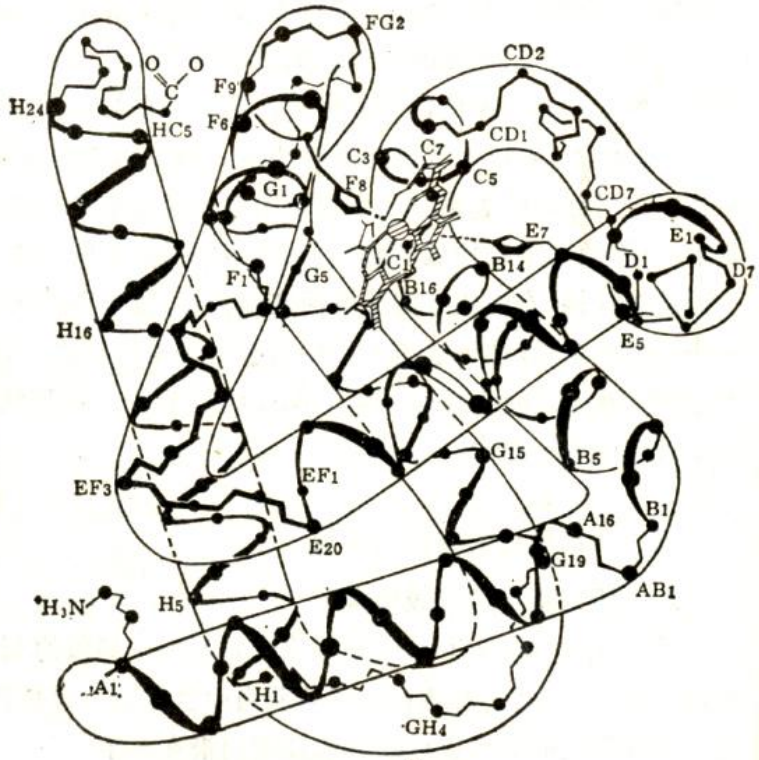


图 5－42　鸡卵清溶菌酶的三级结构

- 4、球状蛋白质疏水侧链埋藏在分子内部，亲水侧链暴露在分子表面。
- 5、球状蛋白质分子的表面有一个空穴，这种空穴常是结合底物并行使生物学功能活性部位。

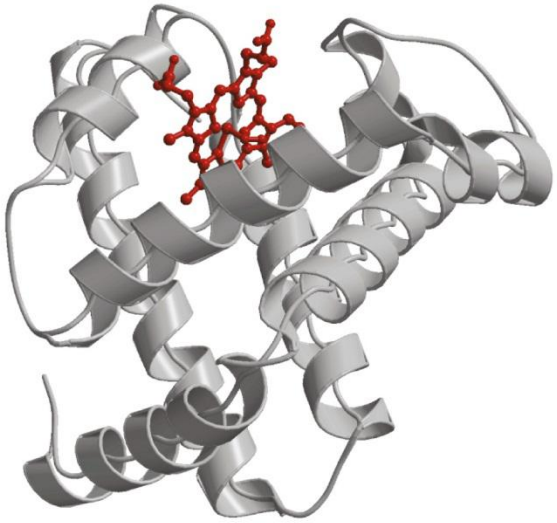


A



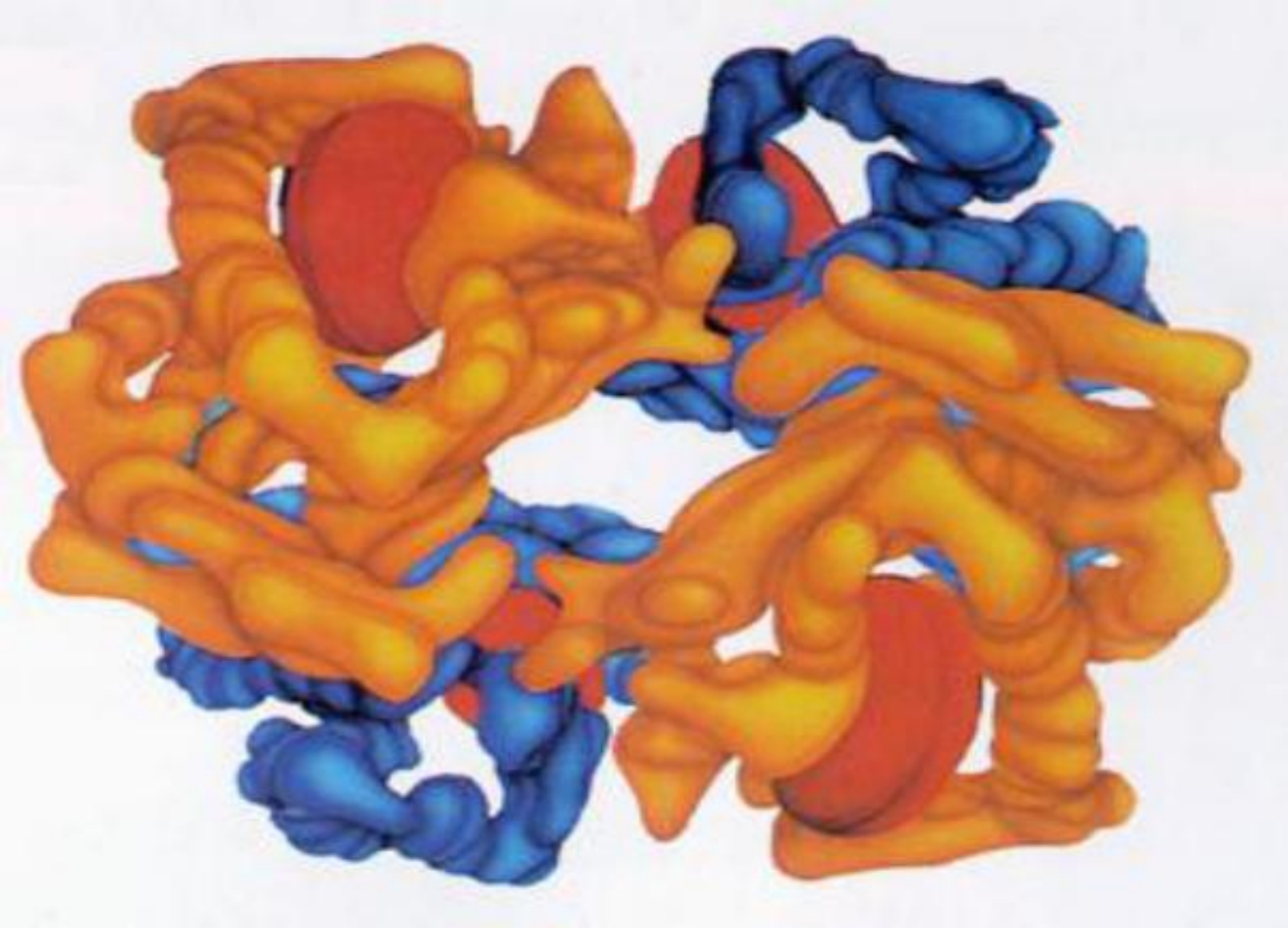
B

图 3-76 A. 抹香鲸肌红蛋白的 X-射线衍射图案；B. 肌红蛋白的三级结构(根据 0.2 nm 分辨率的资料分析所得的结构)



(a)

血红蛋白



九、蛋白质的变性

（一）蛋白质的变性

（二）氨基酸序列规定蛋白质的三维结构

（一）蛋白质的变性

蛋白质变性（denature of protein）：

天然蛋白质分子受到某些物理因素如：热、紫外、高压和表面张力或化学因素如：有机溶剂、脲、胍、酸碱等影响时，生物活性丧失，溶解度降低等这个过程称为蛋白质的变性。蛋白质的变性不涉及到共价键的破坏，只是次级键遭到破坏。

变性蛋白往往伴随出现以下现象：

1、生物活性丧失。

2、一些侧链基团暴露。

3、一些物理化学性质的改变。

4、生物化学性质改变。

变性学说是我国生物化学家吴宪在20世纪30年代提出的。

蛋白质的复性：

变性的蛋白质再除去变性因素后，恢复到原来的天然构象和生物活性的现象，称为蛋白质复性。不是所有的蛋白质变性都可以复性。

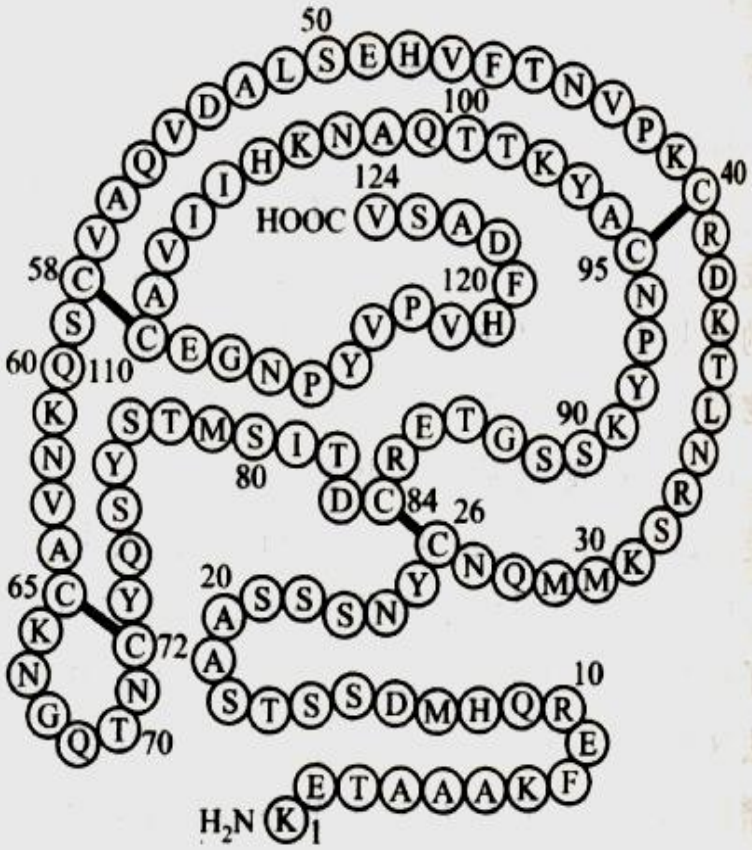


图 5－48　核糖核酸酶 A 的化学结构

RNA 酶 A 是由 124 个氨基酸残基组成的单个多肽链，它由 4 个
链内二硫桥在 Cys26 和 Cys84、Cys40 和 Cys95、Cys58 和 Cys110
以及 Cys65 和 Cys72 之间交联而成。图中短黑棒代表二硫桥

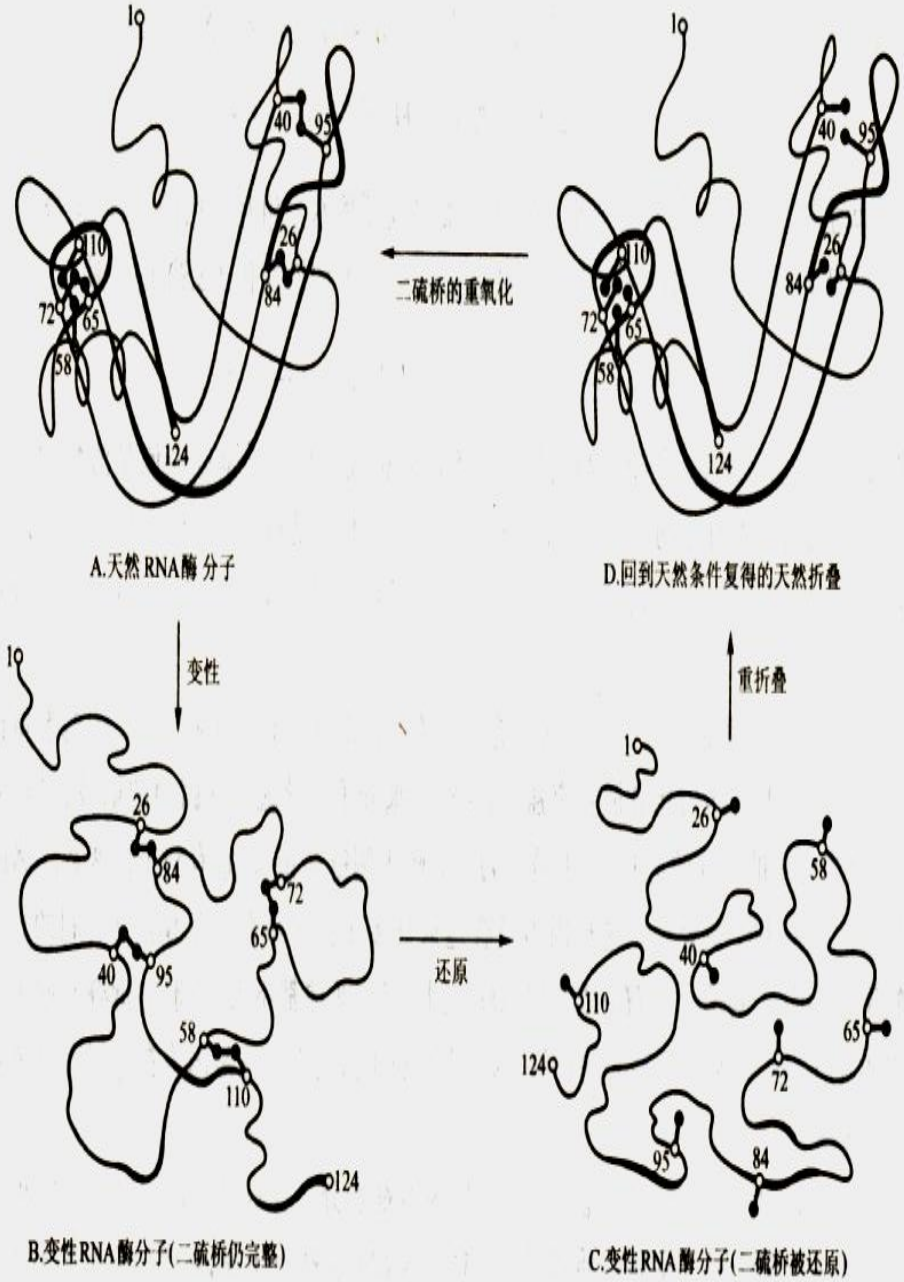


图 5－49　核糖核酸酶 A 的变性与复性示意图

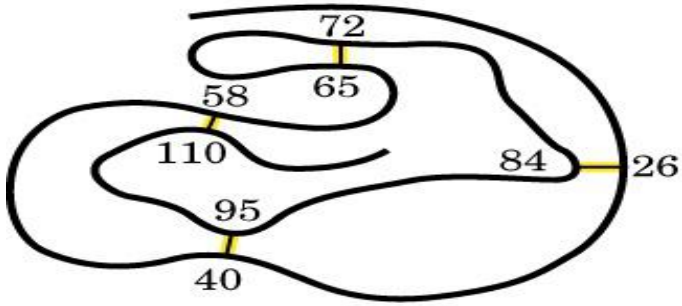
（二）氨基酸序列规定蛋白质的三维结构

- 一个有力的实验证据表明AA序列决定蛋白质的三维结构。
- 核糖核酸酶的变性与复性实验：

20世纪60年代，Anfinsen.C的经典实验

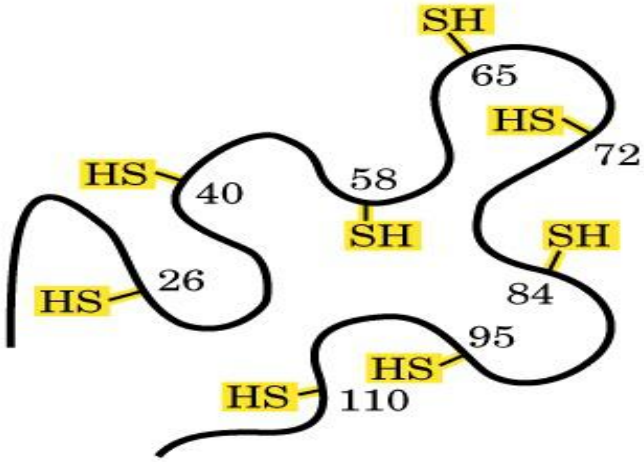
1、牛RNA酶在8M尿素或6M盐酸胍存在下用巯基乙醇处理，RNA酶的四个二硫键断裂，成为松散无序的构象。将尿素、盐酸胍和巯基乙醇除去后，RNA酶又恢复了原来的活性。

2、二硫桥在稳定蛋白质构象中的作用；RNA酶的8个巯基如果随机组合成正确的二硫桥几率是1／105。但去除变形因素后，RNA酶的活性却是100％，说明蛋白质的三维结构是由一级结构所决定的 也就是说，三维结构是由肽链上的各个单键旋转自由度受到各种限制的总结果。



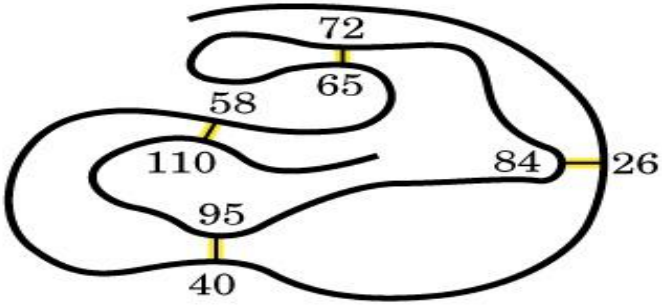
Native state; catalytically active.

addition of urea and mercapto-ethanol



Unfolded state; inactive. Disulfide cross-links reduced to yield Cys residues.

removal of urea and mercapto-ethanol



Native, catalytically active state. Disulfide cross-links correctly re-formed.

七、亚基缔合和四级结构

（一）有关四级结构的一些概念

（二）四级结构缔合的驱动力

（三）亚基相互作用的方式

（四）四级结构的对称性

（五）四级结构在结构上和功能上的优越性

（一）有关四级结构的一些概念

自然界中有些蛋白质是以一条多肽链独立折叠成球状蛋白质，大多数是以多个亚基通过非共价键彼此缔合在一起形成一个有功能的蛋白质分子这种聚合体的方式成为蛋白质四级结构。一个亚基一般是一条多肽链。

（二）四级结构缔合的驱动力

稳定四级结构的力与稳定三级结构的力无区别，包括氢键、范德华力、二硫键、疏水键和离子键，四级结构缔合的驱动力起重要作用的是疏水键和二硫键。

（三）亚基相互作用的方式

蛋白质亚基之间紧密接触的界面存在极性相互作用和疏水作用。因此极性基团和疏水基团互补排列，而亚基缔合的专一性则由相互的表面上的极性基团之间的离子键和盐键提供。

当蛋白质只有一种亚基组成时亚基的相互作用和排列四级结构方式比较简单，如果涉及到不同亚基构成的蛋白质时亚基之间的性互作用可以是十分复杂。

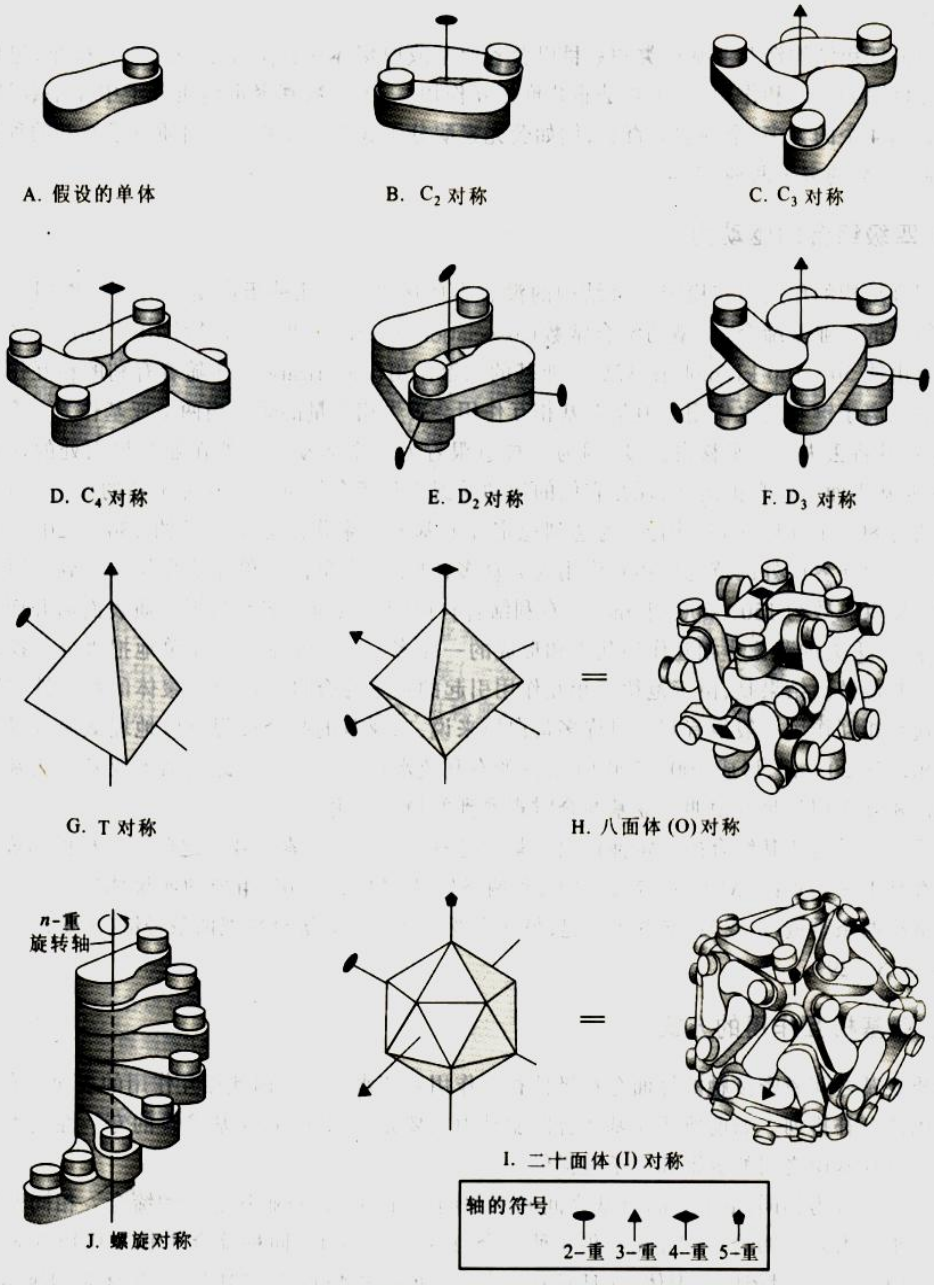


图 5－53　四级结构中相同单体亚基的几种可能的对称排列

A. 假设的不对称单体，为了形象化，采用一只右脚鞋表示；B～D. 环状对称；E 和 F. 二面体对称；G. 四面体对称；H. 六面体或八面体对称的 24－聚体，含 4－、3－、和 2－重轴；I. 二十面体对称的 60－聚体，含 5－、3－和 2－重轴；J. 螺旋对称，每单体相对前一个单体旋转 360°/n 形成的螺旋

（四）四级结构的对称性

对称性时蛋白质四级结构最重要的性质之一。大多数的寡聚蛋白质分子的亚基排列都是对称性的。最简单的是对称二聚体，复杂的有立方点群对称形成对称四面体、八面体、二十面体等许多球形病毒的外壳蛋白是二十面体对称结构。螺旋点群对称形成螺旋对称聚集体，如烟草花叶病毒（TMV）外壳蛋白质。

第五节
蛋白质的分离纯化

一、蛋白质的酸碱性质

二、蛋白质分子的大小和形状

三、蛋白质的胶体性质和蛋白质的沉淀

四、蛋白质分离纯化的一般原则

五、蛋白质的分离纯化方法

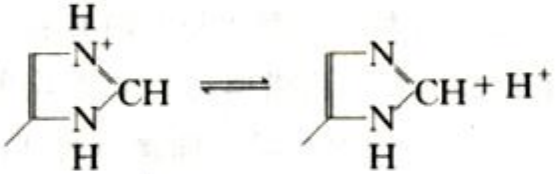
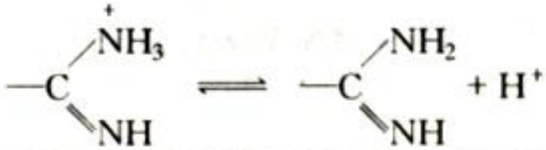
六、蛋白质的含量测定与纯度鉴定

一、蛋白质的酸碱性质

- 蛋白质也使一类两性电解质,能与酸反应也能与碱发生反应。蛋白质可解离的基团来自侧链的功能团，少数N－，C-末端，如果是复杂蛋白还包括辅基上可解离的功能团。蛋白质上基团可解离性决定于环境的pH值，在某pH下，使某一蛋白质的净电荷为零。这一pH值就是这一蛋白质的pI。蛋白质的等电点与组成它的酸性氨基酸或碱性氨基酸数目及比例有关。

解离基团

表 7－1　蛋白质分子中可解离基团的 pK_a 值

基　团	酸⇌碱 + H^+	pK_a(25℃)
α－羧基	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3.0～3.2
β－羧基(Asp)	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3.0～4.7
γ－羧基(Glu)	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	4.4
咪唑基(His)		5.6～7.0
α－氨基	$-\overset{+}{N}H_3 \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	7.6～8.4
ε－氨基(Lys)	$-\overset{+}{N}H_3 \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	9.4～10.6
巯基(Cys)	$-SH \rightleftharpoons -S^- + H^+$	9.1～10.8
苯酚基(Tyr)		9.8～10.4
胍基(Arg)		11.6～12.6

几种蛋白质的等电点

表 7－2　几种蛋白质的等电点

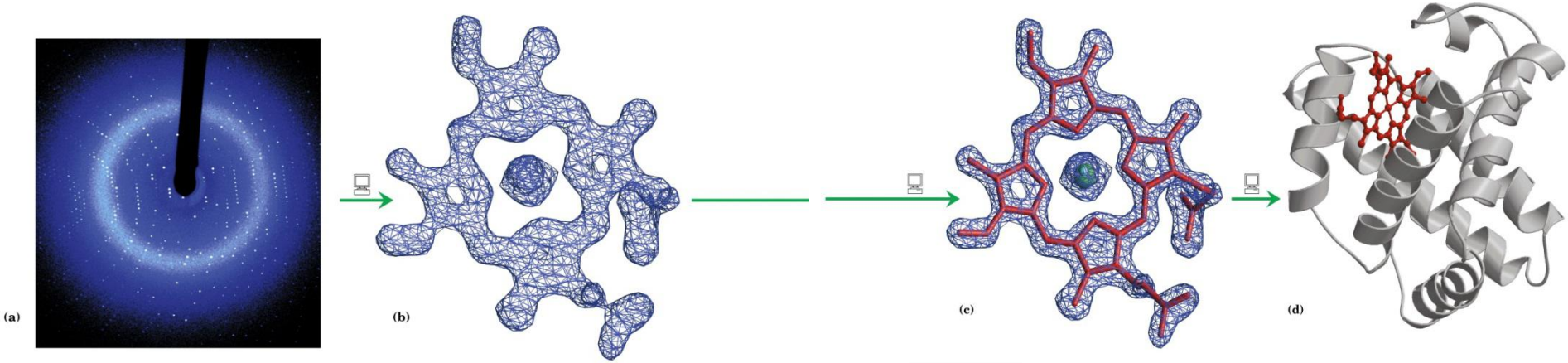
蛋白质	等电点	蛋白质	等电点
胃蛋白酶	1.0	α－胰凝乳蛋白酶	8.3
卵清蛋白	4.6	α－胰凝乳蛋白酶原	9.1
血清清蛋白	4.7	核糖核酸酶	9.5
β－乳球蛋白	5.2	细胞色素 c	10.7
胰岛素	5.3	溶菌酶	11.0
血红蛋白	6.7		

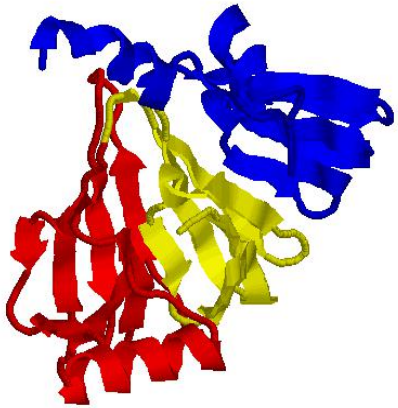
表 7－3　蛋白质的酸性氨基酸和碱性氨基酸含量与等电点的关系

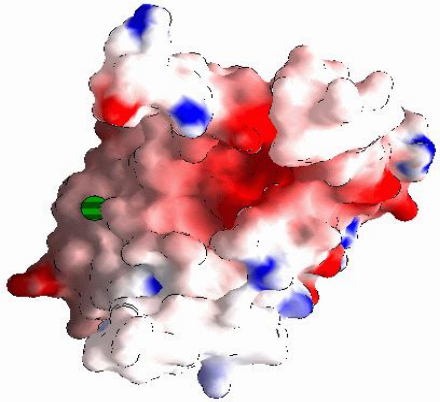
蛋白质	酸性氨基酸（残基数/蛋白分子）	碱性氨基酸（残基数/蛋白分子）	碱性残基数/酸性残基数	等电点
胃蛋白酶	37	6	0.2	1.0
血清清蛋白	82	99	1.2	4.7
血红蛋白	53	88	1.7	6.7
核糖核酸酶	7	20	2.9	9.5

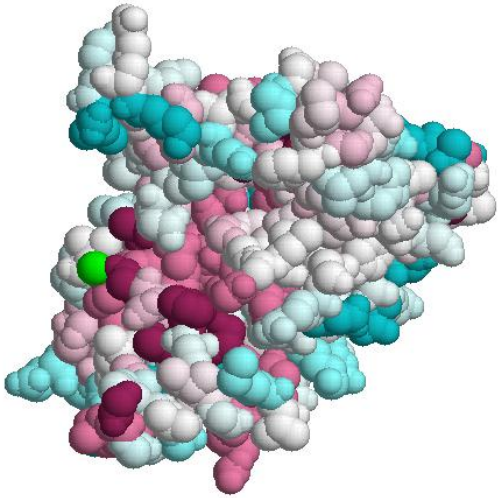
（七）蛋白质分子的形状

- 测定蛋白质分子的形状和构象，最精确的仍是用X射线晶体衍射技术。但这只能给出蛋白质晶体的立体结构信息，而蛋白质在溶液中的性状或沟象的信息到目前没有更好的方法，只能借用其他的间接方法获得。









X-ray 研究蛋白质大分子结构

三、蛋白质的胶体性质和蛋白质的沉淀

- （一）蛋白质的胶体性质
- （二）蛋白质的沉淀

（一）蛋白质的胶体性质

蛋白质分子量在1万－－百万之间，在溶液中是以颗粒的形式存在，因为溶质分子在溶剂中，如果溶质的颗粒<1nm,称为真溶液；1nm—100nm范围称为胶体溶液；颗粒>100nm称为悬浊液。

分散质点在胶体系统中如果保持稳定，必须满足3个条件：

1、分散相质点在1－100之间，在动力学上是稳定的，质点间的碰撞和力不为零，使之能在介质中作布朗运动。

2、分散相带有同种电荷相互排斥，不易聚集成大颗粒而沉淀。

3、质点能与水形成水化层。

而蛋白质在溶液中正好符合上述条件。蛋白质在溶液中分散的程度来说，它属于胶体系统。蛋白质分子表面带有很多高度亲水的基团，吸附了大量的水分子在蛋白质分子上形成较厚的水化层，这些水化层将蛋白质颗粒相互分开不易聚成大的颗粒，因此蛋白质溶液是比较稳定的亲水胶体溶液。

蛋白质溶液也像其他胶体溶液一样，具有丁达尔效应、布朗运动以及对半透膜的不同透性。

蛋白质的亲水性和稳定性对生命来说是十分重要的，生物体内水几乎占80％。

（二）蛋白质的沉淀

蛋白质在溶液中的稳定性是有条件的、相对的如果条件发生改变，破坏了蛋白质溶液的稳定性。蛋白质分子就会从溶液中沉淀出来。这个过程称为蛋白质的沉淀。为研究蛋白质的性质，有时要用这种方法将蛋白质从溶液中沉淀出来，有如下方法：

1、盐析法：向蛋白质溶液中加入大量的中性盐使蛋白质脱水失去水化层而聚集从溶液中沉淀。盐析沉淀的蛋白质不引起蛋白质的变性。

2、有机溶剂沉淀法：向蛋白质溶液中加入大量的有机溶剂，使蛋白质脱去水化层，并降低溶液的介电常数，使蛋白质沉淀出来。（需在低温的条件下，以免使蛋白质变性）。

3、重金属盐沉淀法：但溶液PH值大于等电点时，蛋白质带有负电荷易于与金属离子反应生成重金属盐沉淀。可使蛋白质变性。

4、生物碱和某些有机酸沉淀法：鞣酸、苦味酸、三氯乙酸水杨酸等可使蛋白质变性沉淀。

5、加热变性沉淀法： 几乎所有的蛋白质加热到一定程度时都会变性沉淀。如果在一定离子强度下，沉淀更彻底，如豆腐和酪蛋白的制作。

四、蛋白质分离纯化的一般原则

- 蛋白质在生物组织或细胞中一般都是以复杂的混合物形式存在，每种组织或细胞中都含有大量各种各样的蛋白质，而研究蛋白质时需要得到蛋白质的单一纯品，这是一个极艰巨的工作。到目前为止，没有一个单独的分离纯化程序能把任何一种蛋白质从复杂的混合物中纯化出的方法。但可以用一系列的方法将任何一种蛋白质分离提取出来，获得纯品。一般步骤是：

- 1、前处理：将某一蛋白质含量高的生物材料粉碎，用适当提取液提取，使蛋白质尽可能溶于提取液。离心或分离出杂质。

- 2、粗分离：用盐析、有机溶剂沉淀、吸附等方法将蛋白质粗分离出来。

- 3、细分离：用分子筛、离子交换、亲和层析、免疫吸附沉淀电泳技术等对蛋白质进行纯化。

五、蛋白质的分离纯化方法

（一）根据分子大小不同的纯化方法

（二）根据溶解度不同的纯化方法

（三）根据电荷不同的纯化方法

（四）根据选择性吸附不同的纯化方法

（五）根据对配体的特异性生物学亲和力

（六）高效液相层析和快速蛋白质液相层析

（一）根据分子大小不同的纯化方法

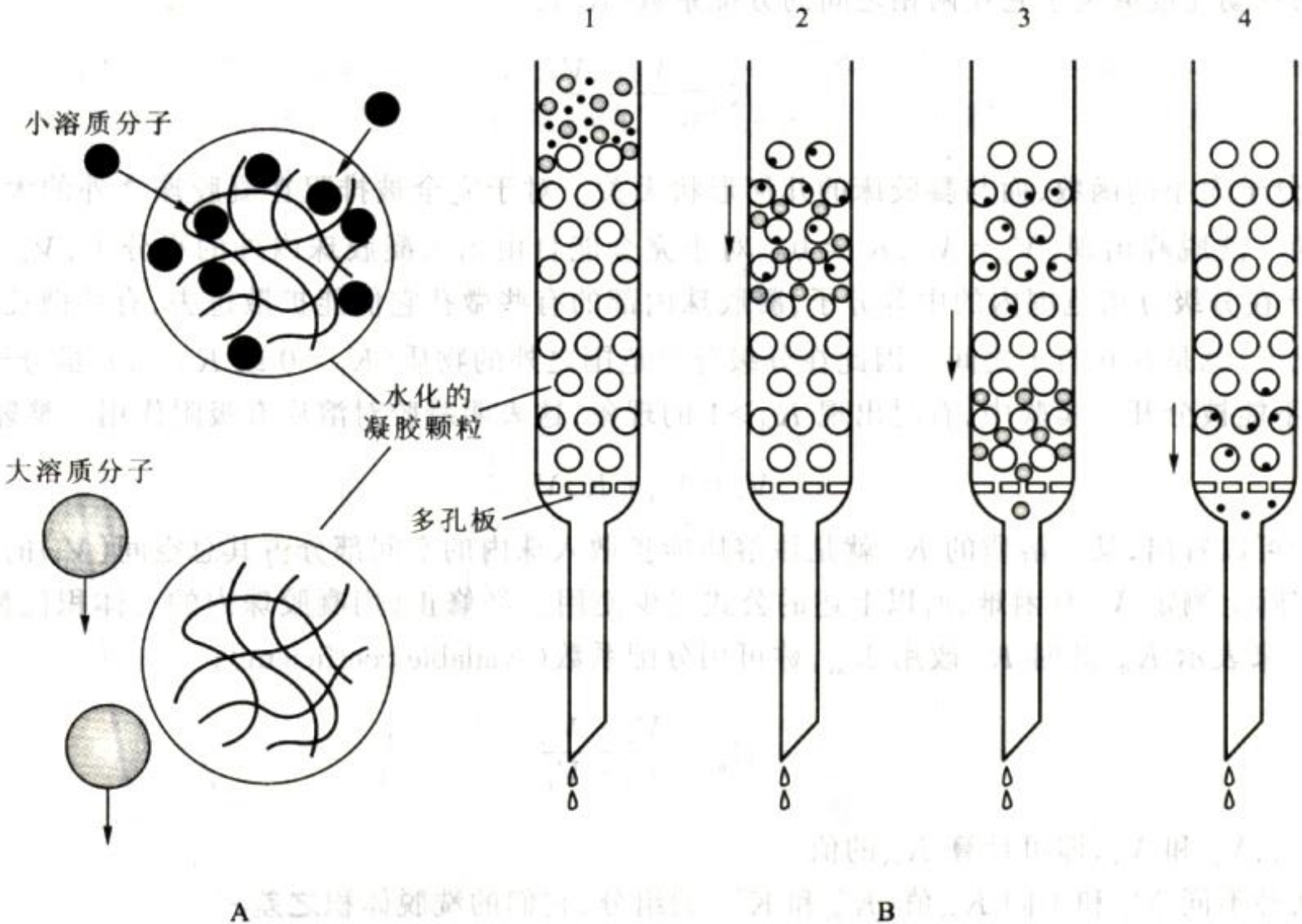
可根据蛋白质分子大小及形状分离，其方法有：

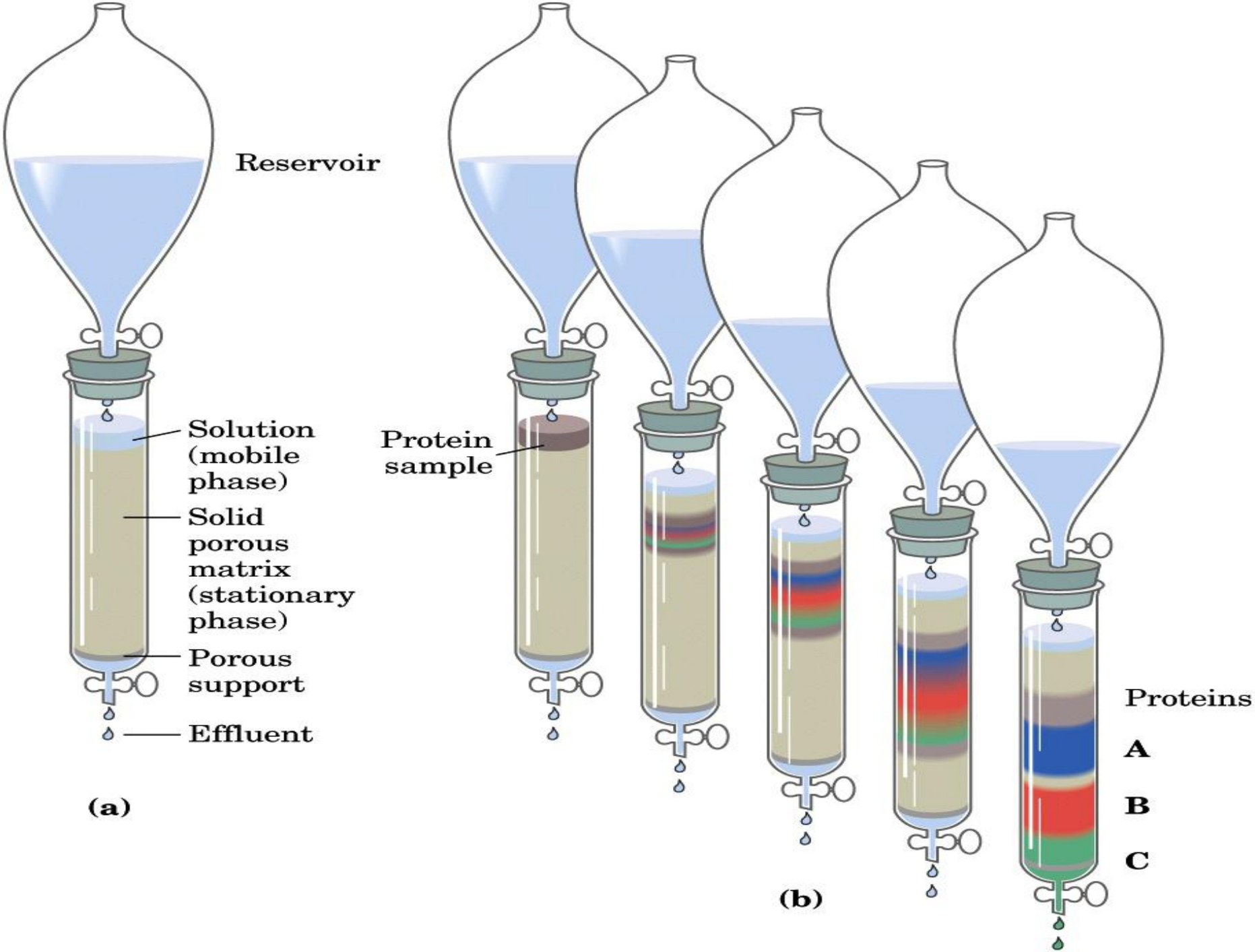
1、透析和超滤

2、密度梯度离心

3、凝胶过滤（分子筛）

凝胶层析图解




Reservoir
Solution (mobile phase)
Solid porous matrix (stationary phase)
Porous support
Effluent
(a)
Protein sample
Proteins
A
B
C
(b)

（二）根据溶解度不同的纯化方法

利用溶解度的差别分离蛋白质是实践中最常用的方法。影响蛋白质溶解的环境因素有（1）溶液的PH（2）离子强度（3）介电常数（4）温度。内部因素有（1）蛋白质的分子结构（2）分子带电的性质（3）亲水基团的数量、比例及在分子表面的排列等。

1、等电点沉淀和pH控制

2、盐析和盐溶

3、有机溶剂分级分离

4、温度对蛋白质溶解度的影响

（三）根据电荷不同的纯化方法

根据蛋白质的电荷性分离方法有两类，一类是电泳法，另一类是离子交换法：

1、电泳法

2、聚丙烯酰胺凝胶电泳

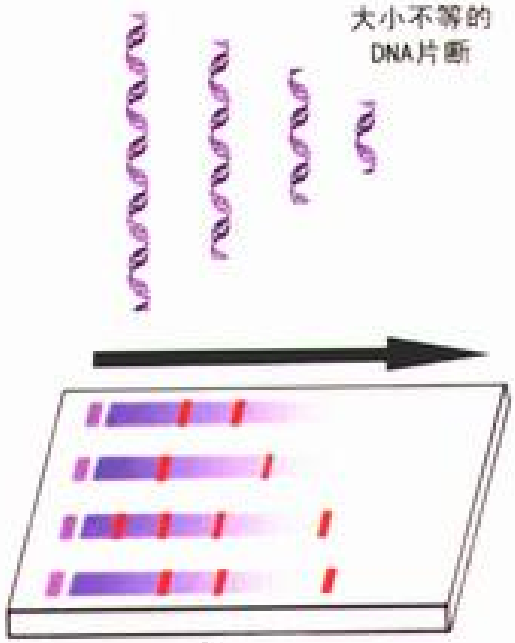
3、毛细管电泳

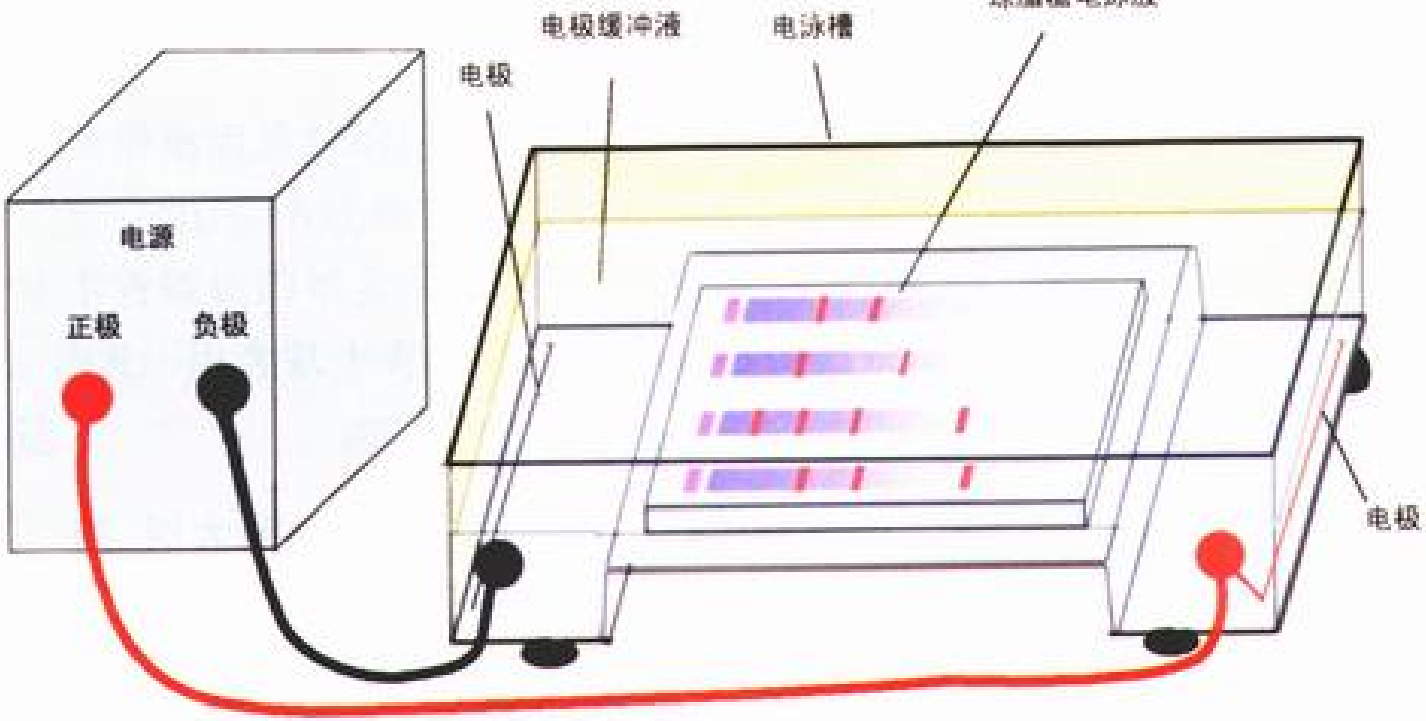
4、等电聚焦

5、层析聚焦

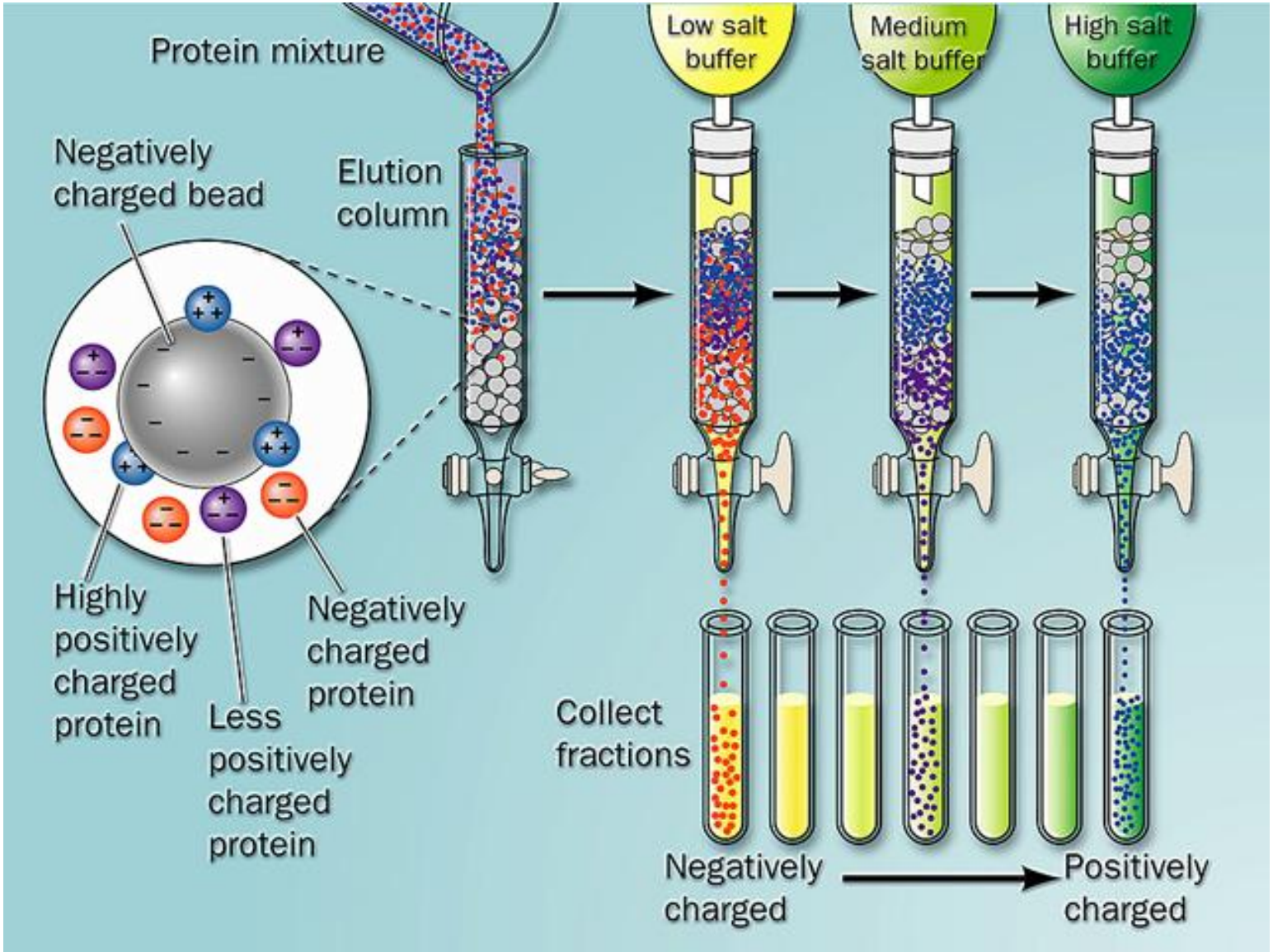
离子交换层析

正在进行的DNA电泳





离子交换层析


Protein mixture
Low salt buffer
Medium salt buffer
High salt buffer
Negatively charged bead
Elution column
Highly positively charged protein
Less positively charged protein
Negatively charged protein
Collect fractions
Negatively charged
Positively charged

（四）根据选择性吸附不同的纯化方法

某些吸附剂固体具有吸附能力，能将其他种类的分子吸附到自己的表面。吸附力的强弱，因吸附剂的性质和被吸附物的性质有关。吸附层析就是利用某些吸附剂对某种分子吸附的不同达到吸附分离的目的。

1、羟基磷灰石吸附层析

2、疏水作用层析

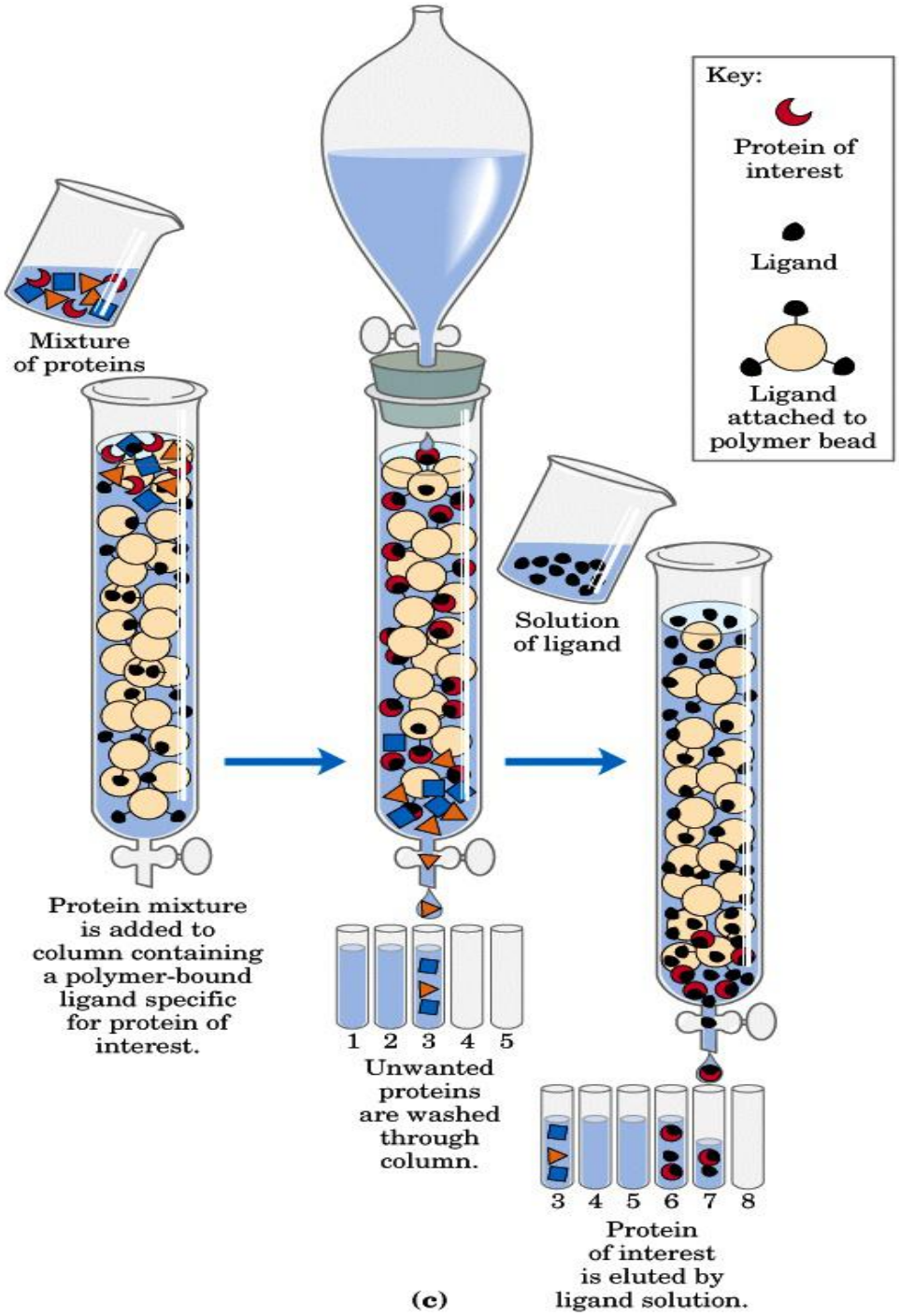
（五）根据对配体的特异性生物学亲和力

- 亲和层析（affinity chromatography）

  利用蛋白质分子对其配体分子有特异的识别能力而建立的一种有效地分离方法。只要经过一步的处理即可将所需的蛋白质从复杂的混合物中分离出来而且纯度相当高。

亲和层析

基本原理：将配体连接在一个惰性不溶性的支持物上，装成层析柱，样品过柱，蛋白质和其配体能特异性结合，其它物质不能结合。在洗脱的过程中，所需蛋白质结合在柱中，杂质洗脱掉。改变环境，使蛋白质洗脱出来并加以收集，得到纯品。



（六）高效液相层析和快速蛋白质液相层析

高效液相色谱层析HPLC

快速蛋白质液相层析（fast protein liquid chromatographyFPLC）是专门用于蛋白质分离的仪器。

它没有自己独特的原理，只是基于反相、亲和、排阻离子交换和等电聚焦等原理设计的蛋白质分离的仪器。

六、蛋白质的含量测定与纯度鉴定

在蛋白质提取和纯化过程中，经常要检测蛋白质的含量和蛋白质的纯度。测定的方法有下面两种：

- （一）蛋白质含量测定
- （二）蛋白质纯度测定

（一）蛋白质含量测定

蛋白质含量测定方法有：

1、凯氏定氮法

2、双缩脲法

3、Folin－phenol试剂法

4、紫外吸收法

5、染料结合法

6、胶体金测定法

（二）蛋白质纯度测定

蛋白质纯度鉴定常用的物理和化学方法：

1、电泳法

2、离心沉降法

3、HPLC

4、溶解度法

5、N-末端分析法等

提要

思考