



生物化学

Biochemistry



武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系

Tel: 68759795

第三节

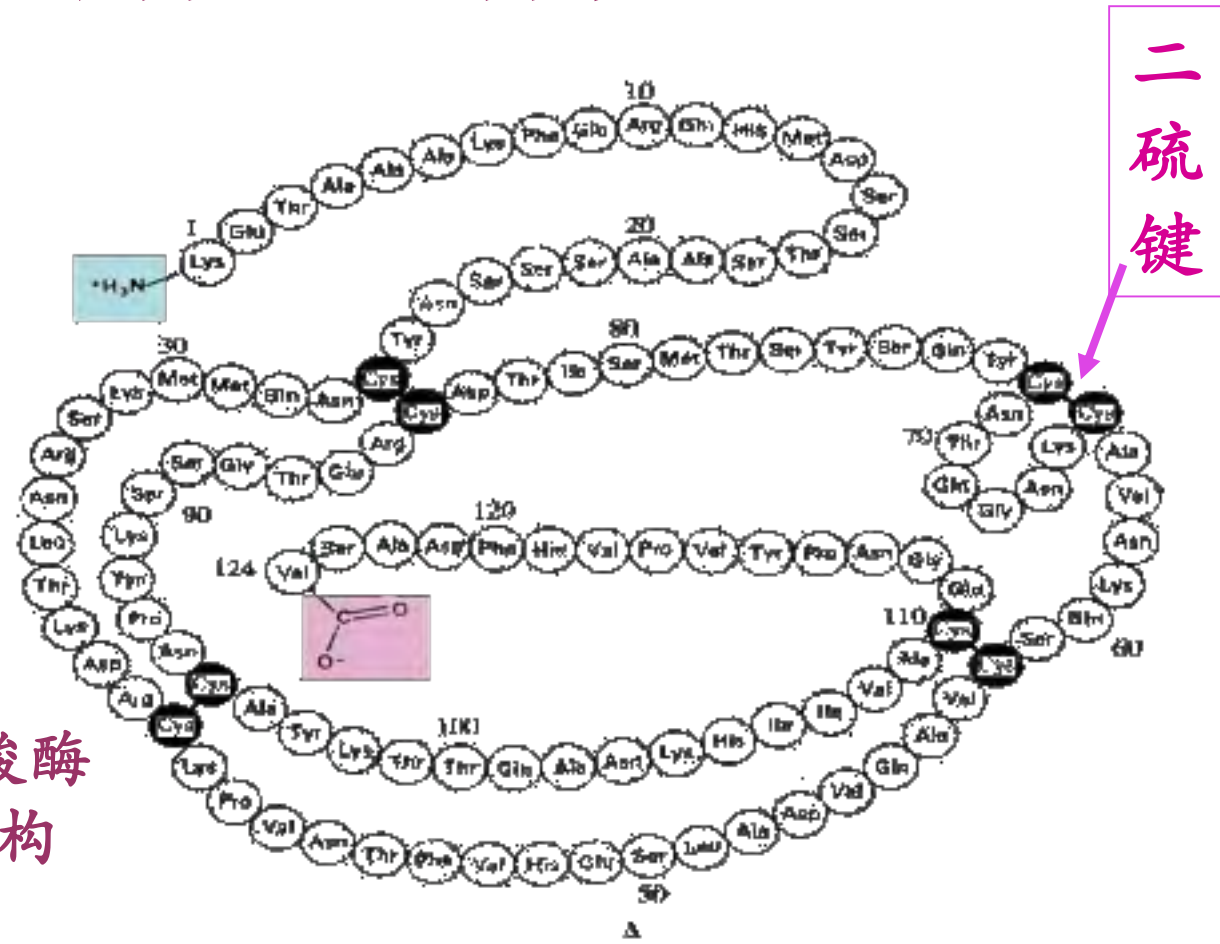
蛋白质结构与功能的关系

The Relation of Structure and Function of Protein



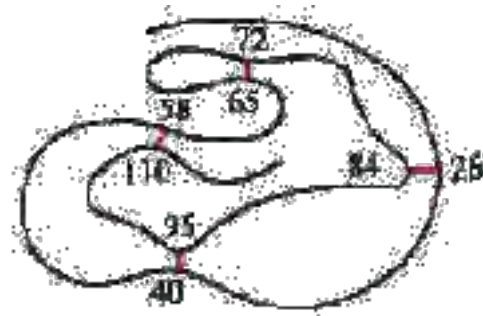
一、蛋白质一级结构是高级结构与功能的基础

(一) 一级结构是空间构象的基础



牛核糖核酸酶
的一级结构

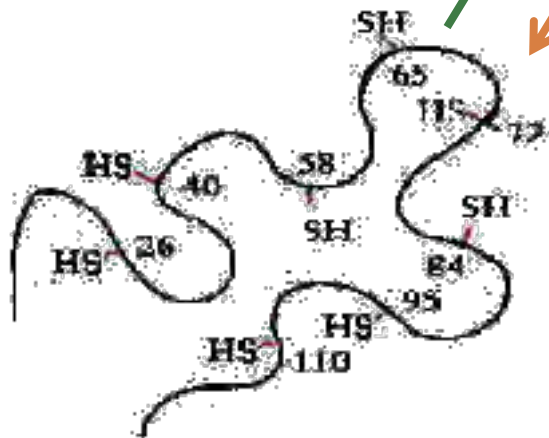
牛核糖核酸酶的一级结构与空间结构的关系



天然状态，
有催化活性

去除尿素、
 β -巯基乙醇

尿素、
 β -巯基乙醇



非折叠状态，
无活性

(二) 一级结构相似的蛋白质具有相似的高级结构与功能

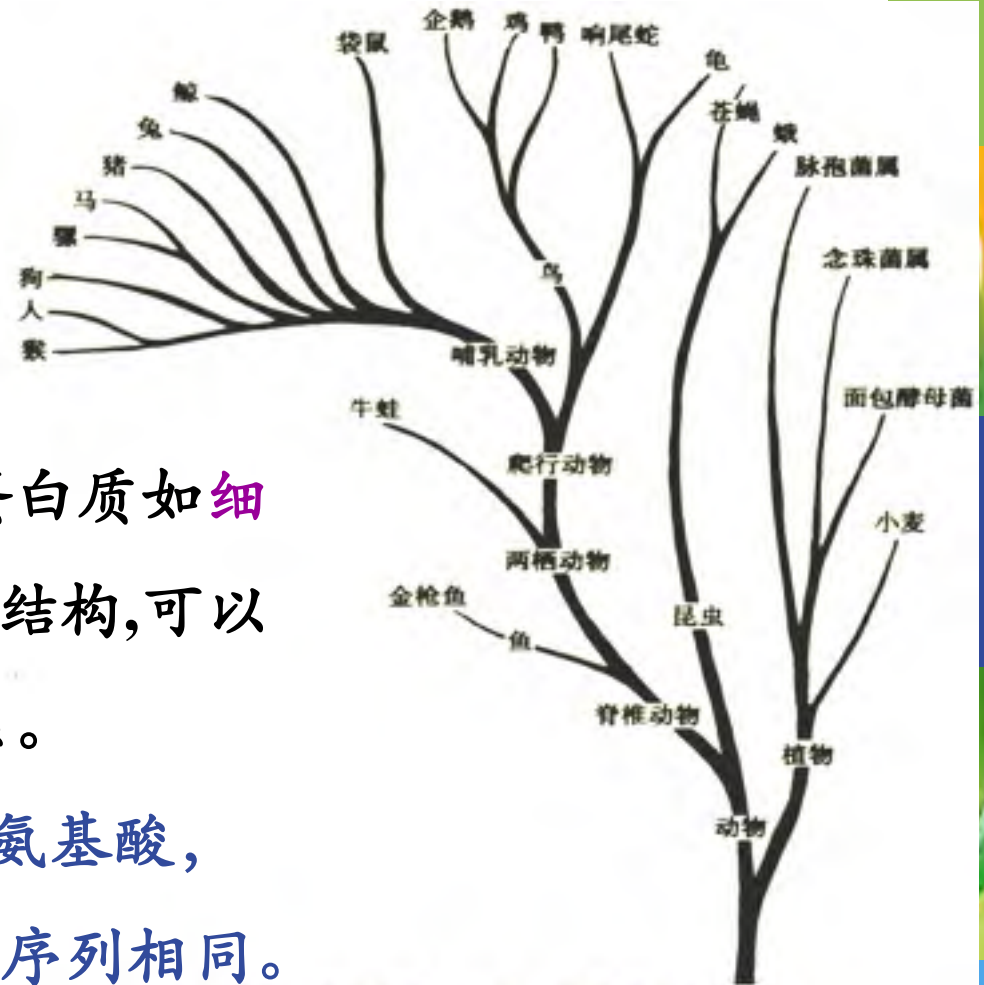
哺乳动物胰岛素A链氨基酸序列的差异

胰岛素	氨基酸残基序号			
	A5	A6	A10	B30
人	Thr	Ser	Ile	Thr
猪	Thr	Ser	Ile	Ala
狗	Thr	Ser	Ile	Ala
兔	Thr	Gly	Ile	Ser
牛	Ala	Gly	Val	Ala
羊	Ala	Ser	Val	Ala
马	Thr	Ser	Ile	Ala

(三) 氨基酸序列提供重要的生物进化信息

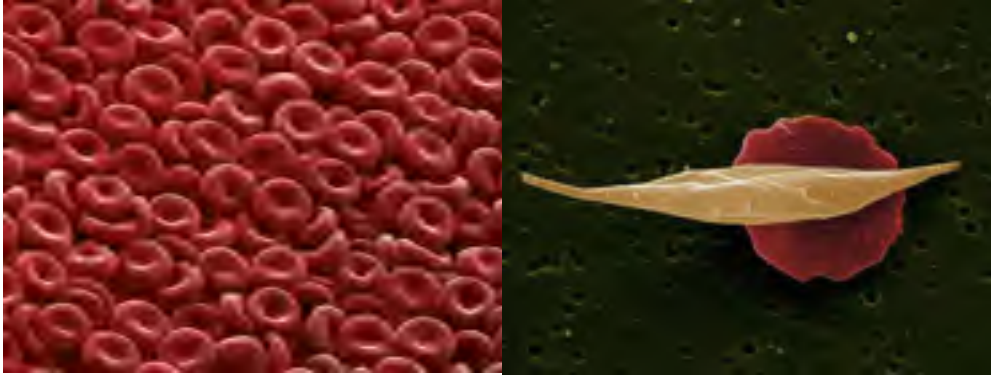
一些广泛存在于生物界的蛋白质如**细胞色素C**，比较它们的一级结构，可以帮助了解物种进化间的关系。

人和猕猴的Cyt C相差一个氨基酸，人和黑猩猩的Cyt C氨基酸序列相同。



(四) 重要蛋白质的氨基酸序列改变可引起疾病

■例：镰刀形红细胞贫血



HbA β 肽链

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

HbS β 肽链

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

由蛋白质分子发生变异所导致的疾病，称为“分子病”。

二、蛋白质的功能依赖特定空间结构

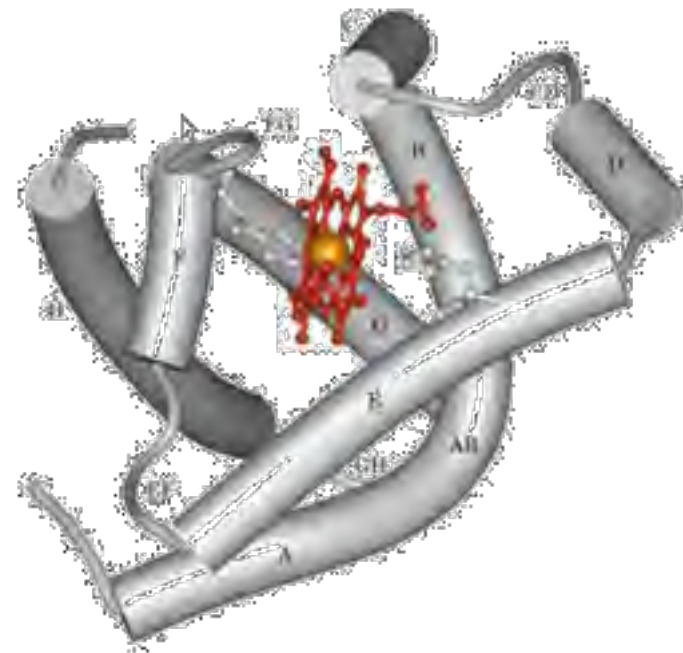
(一) 血红蛋白亚基与肌红蛋白结构相似

- 肌红蛋白/血红蛋白含有血红素辅基

血红素结构



■ 肌红蛋白 (myoglobin, Mb)



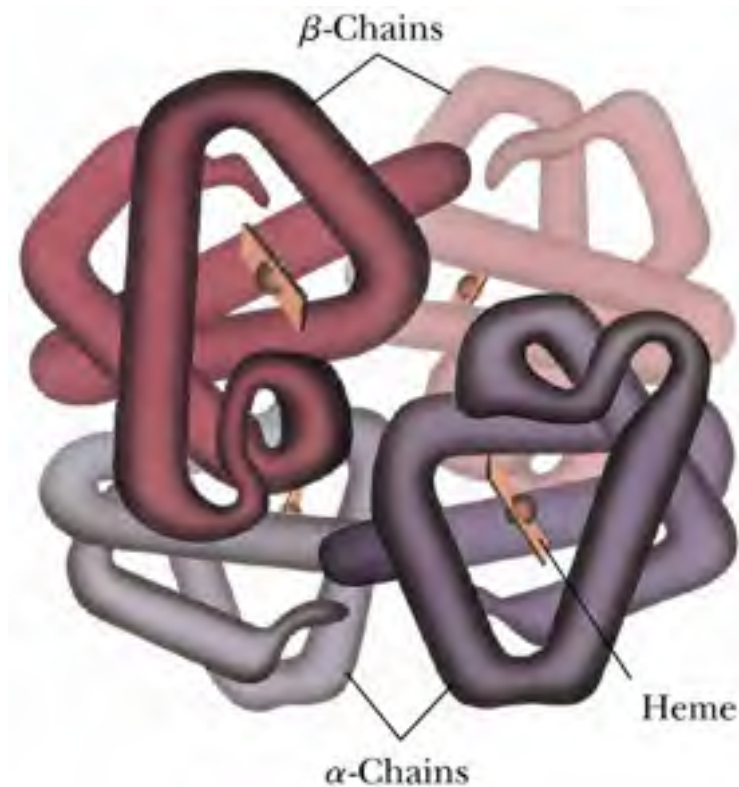
Mb是只有**三级结构**的单链蛋白质，有8段 α -螺旋结构。

血红素分子中的两个丙酸侧链以离子键形式与肽链中的两个碱性氨基酸侧链上的正电荷相连，加之肽链中的F8组氨酸残基还与 Fe^{2+} 形成配位结合，所以血红素辅基与蛋白质部分稳定结合。



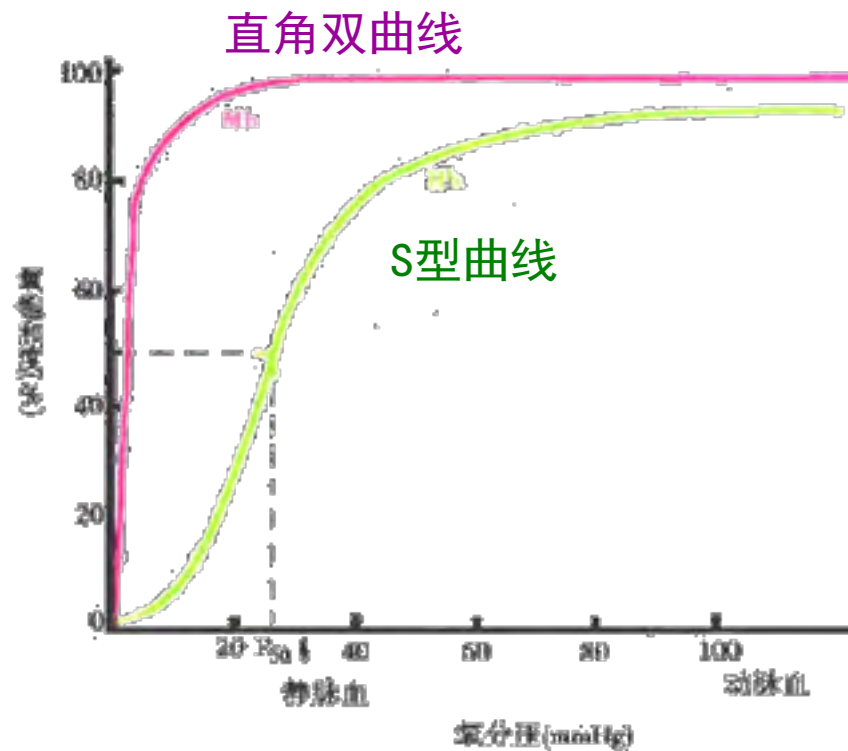
■ 血红蛋白 (hemoglobin, Hb)

Hb具有4个亚基($\alpha_2\beta_2$)组成的四级结构，每个亚基可结合1个血红素并携带1分子氧。Hb亚基之间通过8对盐键，使4个亚基紧密结合而形成亲水的球状蛋白。



(二) Hb亚基构象变化可影响亚基与氧结合

Hb与Mb一样能可逆地与 O_2 结合，Hb与 O_2 结合后称为**氧合Hb**。氧合Hb占总Hb的百分数（称**百分饱和度**）随 O_2 浓度变化而改变。



Mb和Hb的氧解离曲线

■ 协同效应 (cooperativity)

一个寡聚体蛋白质的一个亚基与其配体结合后，能影响此寡聚体中另一个亚基与配体结合能力的现象。

如果是促进作用则称为正协同效应

(positive cooperativity)

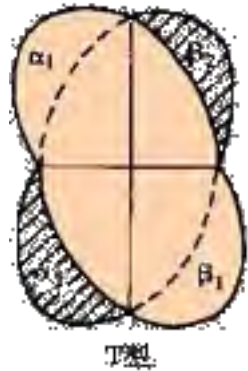
如果是抑制作用则称为负协同效应

(negative cooperativity)

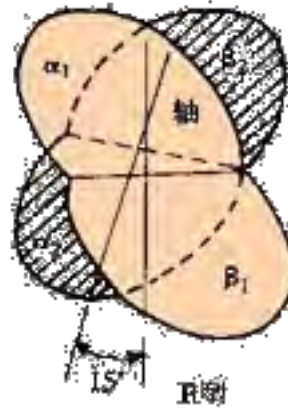


O₂与Hb结合的正协同效应

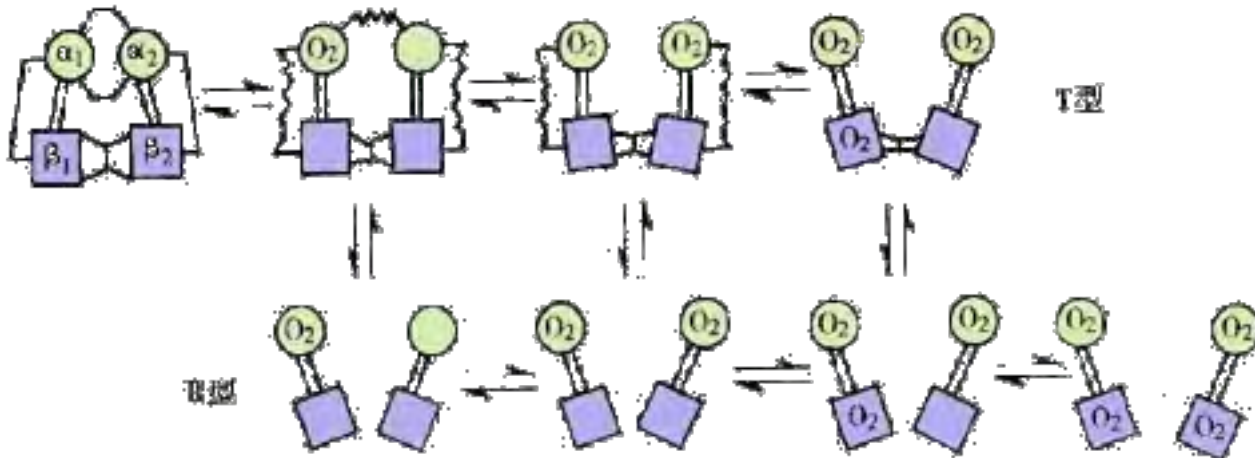
Hb与O₂的亲和力小



Hb与O₂的亲和力大

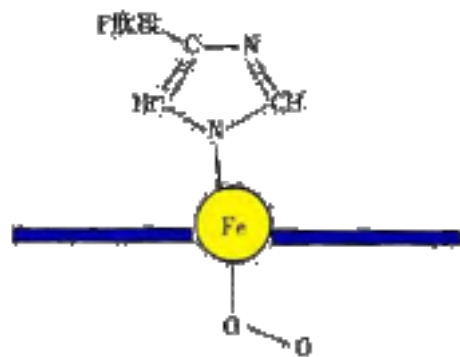
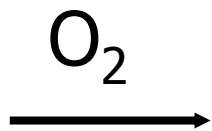
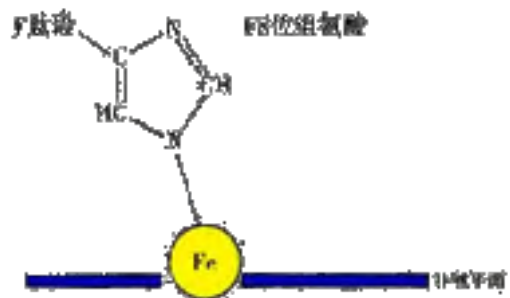
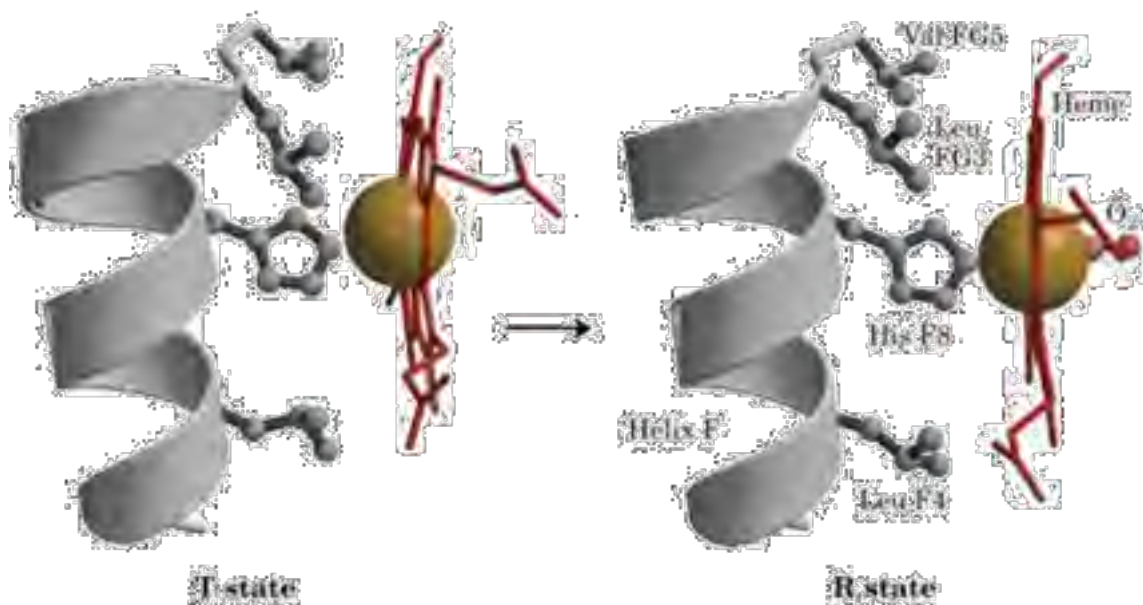


Hb-T态和R态互变



Hb-氧合与脱氧构象转换示意

血红素与氧结合后，铁原子半径变小，就能进入卟啉环的小孔中，继而引起肽链位置的变动。



■ 变构效应(allosteric effect)

蛋白质空间结构的改变伴随其功能的变化，称为变构效应。

具有变构效应的蛋白质称为变构蛋白。

如Hb，一分子 O_2 与一个血红素辅基结合，引起亚基构象变化，进而引起相邻亚基构象变化，更易与 O_2 结合。



S.Prusiner 提出没有核酸的传染源

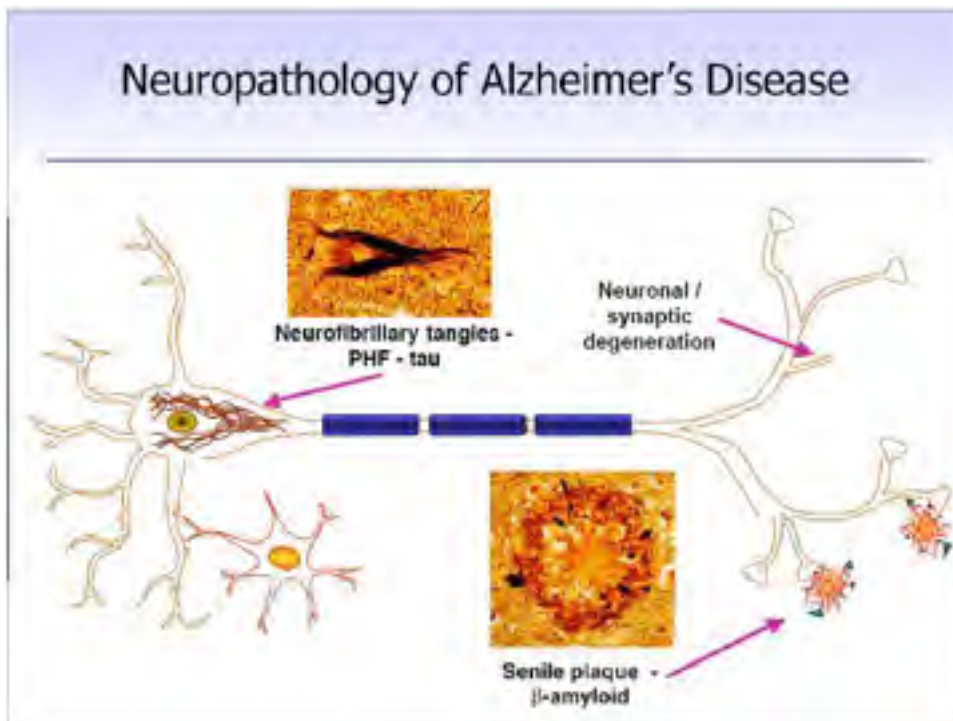
(三) 蛋白质构象改变可引起疾病

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。

病机：有些蛋白质错误折叠后相互聚集，常形成抗蛋白水解酶的**淀粉样纤维沉淀**，产生毒性而致病，表现为蛋白质淀粉样纤维沉淀的病理改变。**如**：人纹状体脊髓变性病、老年痴呆症(Alzheimer)、亨廷顿舞蹈病、**疯牛病**等。

淀粉样蛋白病 (amyloid disease)

- ❖ 是一类由表观上正常的蛋白质构象异常而造成的疾病。蛋白质聚合成不溶性的聚集体沉积在组织内，称为**沉淀样蛋白变性**。沉淀样蛋白聚集在脑中，可致神经性疾病，最常见的是**老年性痴呆症**(Alzheimer's disease)。



脑组织中塞满了由错误折叠蛋白质形成的杂乱的蛋白质簇。通常有两类蛋白沉淀：

沉淀样 β 蛋白 ($A\beta$) 的沉淀样斑
(β -淀粉酶的粘蛋白沉积于神经元)
tau 蛋白于神经体和节细胞形成纤维缠结块，引起神经细胞内自损伤

疯牛病 Mad cow disease

- ❖ 死亡率100%——可能威胁人类生存
- ❖ 比爱滋病更可怕——无法找到防治疫苗
- ❖ 疯牛病毒杀不死——常规消毒杀不死，非常规消毒玉石俱焚
- ❖ 疯牛病防不胜防——医疗用品食品传播，化妆品也不能排除

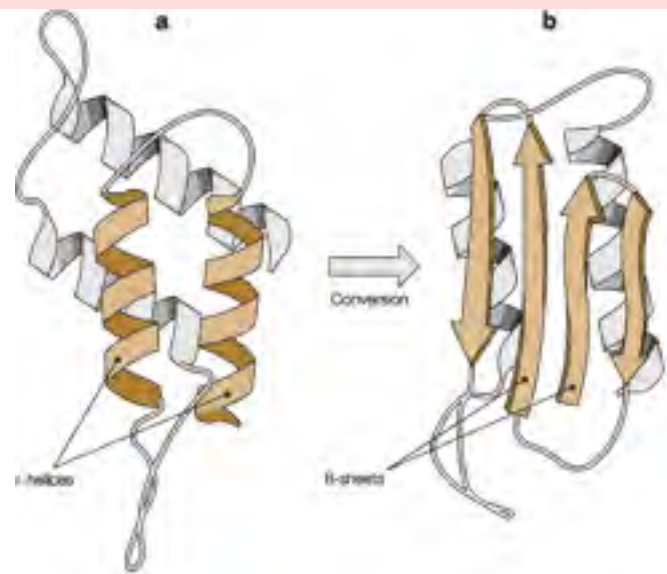
疯牛病是由朊病毒蛋白(PrP)引起的一组人和动物神经退行性病变。 (蛋白致病)

蛋白“折叠”错误



Prion protein

天然型朊蛋白(PrP^C)存在于正常动物体内，不致病，而感染型的朊蛋白(PrP^{Sc})则特异地出现在被感染的动物脑组织中，呈淀粉样改变，导致神经性疾病。



PrP^C内 α 螺旋转化为 β 折叠的PrP^{Sc}，从而具蛋白酶K抗性。

第四节

蛋白质的理化性质

The Physical and Chemical Characters of Protein



蛋白质的理化性质

理化性质

两性解离

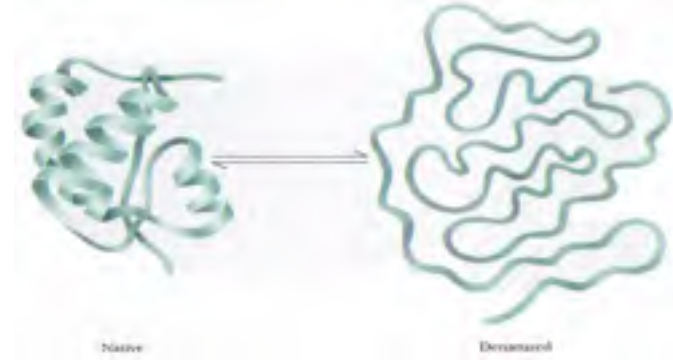
胶体性质

变性与复性

沉淀、凝固

特征性紫外吸收(280 nm)

蛋白质呈色反应(茚三酮反应、双缩脲反应)



一、蛋白质具有两性电离的性质

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

■ 蛋白质的等电点(isoelectric point, pI)

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



二、蛋白质具有胶体性质

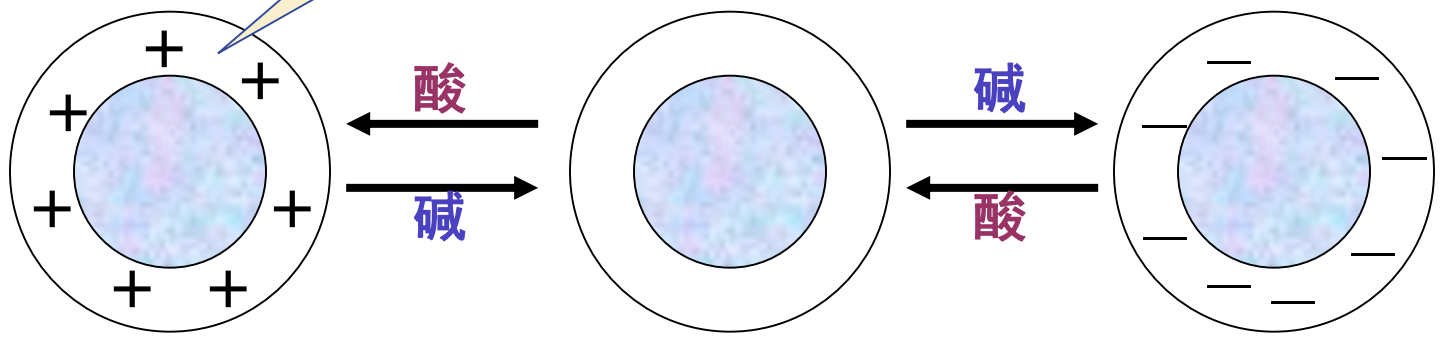
蛋白质属于生物大分子之一，分子量可自1万至100万之巨，其分子的直径可达1~100nm，为胶粒范围之内。

■ 蛋白质胶体稳定的因素：

- 颗粒表面电荷
- 水化膜



水化膜



带正电荷的蛋白质

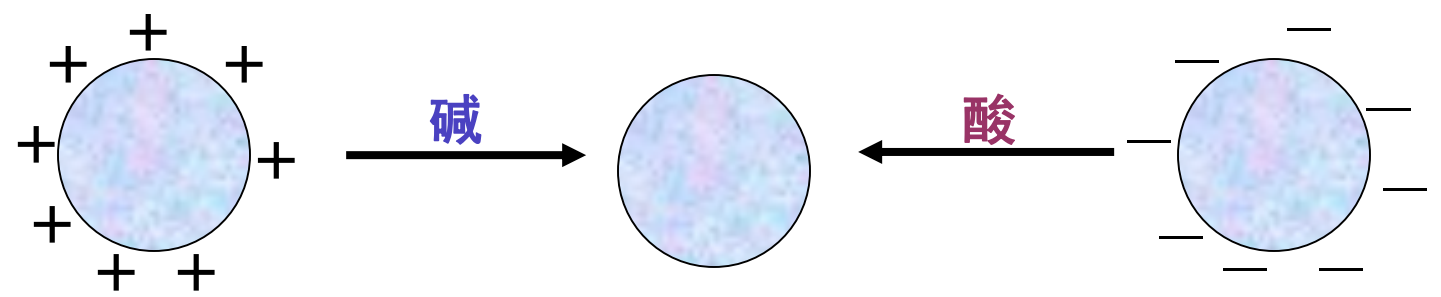
在等电点的蛋白质

带负电荷的蛋白质

脱水作用 ↓

脱水作用 ↓

脱水作用 ↓



带正电荷的蛋白质

不稳定的蛋白质颗粒

带负电荷的蛋白质

溶液中蛋白质的聚沉

三、蛋白质空间结构破坏而引起变性

■ 蛋白质的变性 (denaturation)

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

■ 变性的本质：

——破坏非共价键和二硫键，
不改变蛋白质的一级结构。



■ 造成变性的因素:

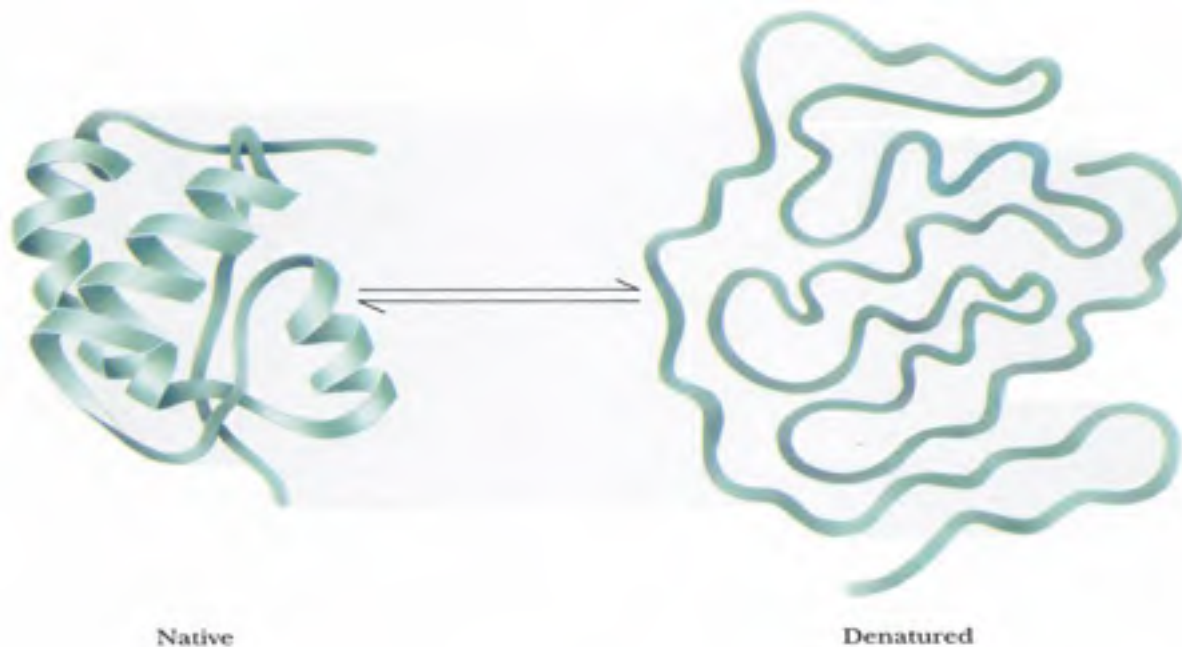
如加热、乙醇等有机溶剂、强酸、强碱、重金属离子及生物碱试剂等。

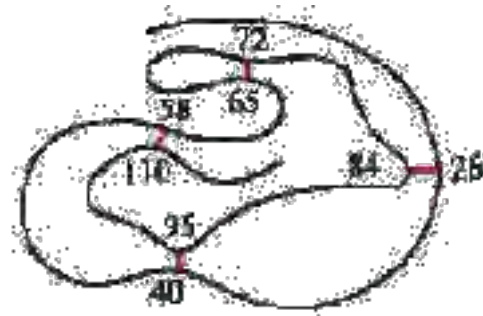
■ 应用举例:

- 临床医学中，变性因素常被应用来消毒及灭菌。
- 防止蛋白质变性也是有效保存蛋白质制剂（如酶、疫苗等）的必要条件。

■ 蛋白质的复性 (renaturation)

若蛋白质变性程度较轻，去除变性因素后，蛋白质仍可恢复或部分恢复其原有的构象和功能，称为**复性**。

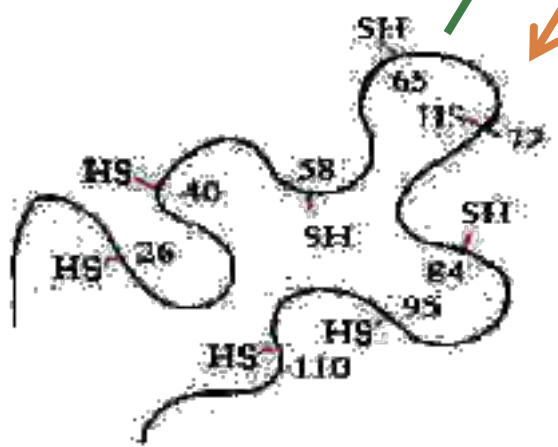




天然状态，
有催化活性

去除尿素、
 β -巯基乙醇

尿素、
 β -巯基乙醇



非折叠状态，
无活性

■ 蛋白质沉淀

在一定条件下，蛋白疏水侧链暴露在外，肽链融会相互缠绕继而聚集，因而从溶液中析出。

变性的蛋白质易于沉淀，有时蛋白质发生沉淀，但并不变性。

■ 蛋白质的凝固作用(protein coagulation)

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，即凝固为不可逆的变性结果。



四、蛋白质在紫外光谱区有特征性吸收峰

由于蛋白质中含有共轭双键的酪氨酸Tyr和色氨酸Trp，因此在280nm波长处有特征性吸收峰。蛋白质溶液的 A_{280} (OD_{280})与其浓度呈正比关系，因此可作蛋白质定量测定。



五、应用蛋白质呈色反应可测定蛋白质含量

1. 茚三酮反应(ninhydrin reaction)

蛋白质经水解后产生的氨基酸也可发生茚三酮反应。

2. 双缩脲反应(biuret reaction)

蛋白质和多肽分子中肽键在稀碱溶液中与硫酸铜共热，呈现紫色或红色，此反应称为双缩脲反应，双缩脲反应可用来检测蛋白质水解程度。



第五节

蛋白质的分离纯化与结构分析

The Separation and Purification and Structure Analysis of Protein



蛋白质的分离纯化

分离纯化方法

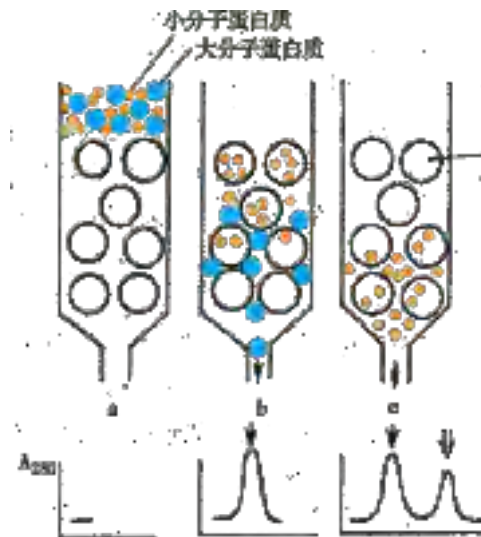
透析和超滤

超速离心法

丙酮沉淀、盐析及免疫沉淀

电泳

层析（色谱）

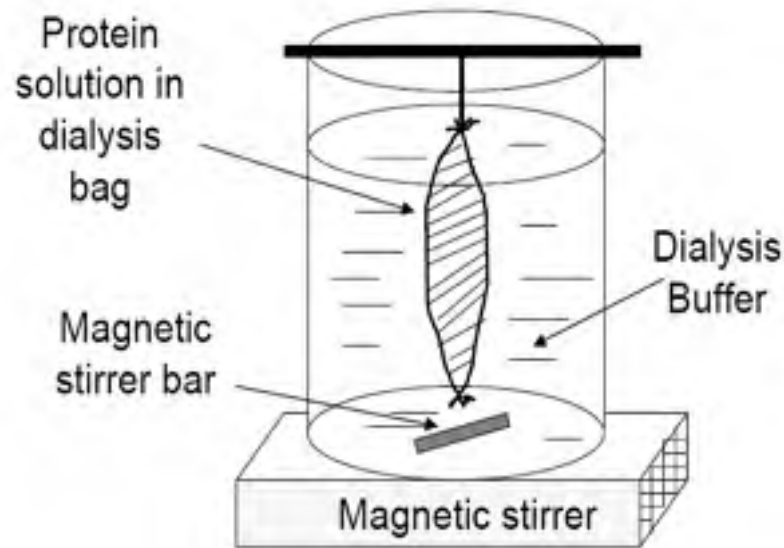


一、透析及超滤法

可去除蛋白质溶液中的小分子化合物

■ 透析(dialysis)

利用透析袋把大分子蛋白质与小分子化合物分开的方法。



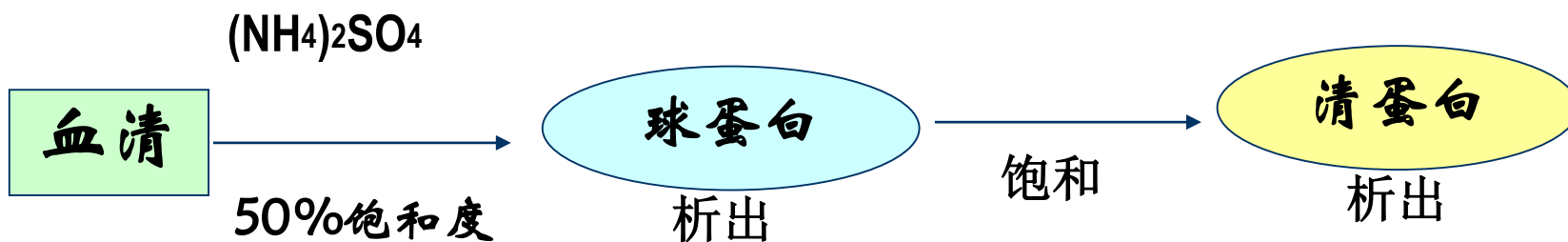
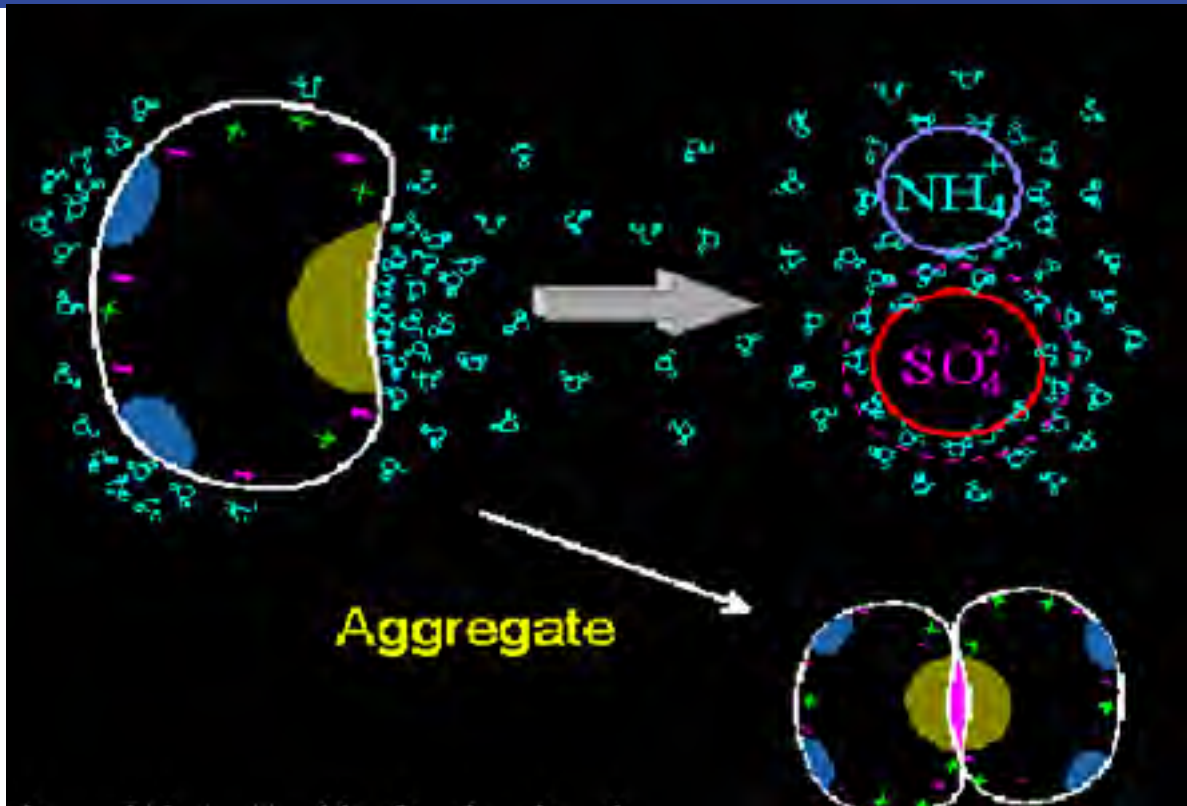
■ 超滤法

应用正压或离心力使蛋白质溶液透过有一定截留分子量的超滤膜，达到浓缩蛋白质溶液的目的。

二、丙酮沉淀、盐析及免疫沉淀 是常用的蛋白质沉淀方法

- 使用**丙酮沉淀**时，须在 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 进行，丙酮用量一般10倍于蛋白质溶液体积。蛋白质被丙酮沉淀后，应立即分离。以外，也可用**乙醇沉淀**。
- **盐析 (salting-out)**是将硫酸铵、硫酸钠或NaCl等加入蛋白质溶液，使蛋白质表面电荷被中和以及水化膜被破坏，导致蛋白质沉淀。
- **免疫沉淀法**：利用某一蛋白质的特异抗体识别相应抗原蛋白，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。





三、利用荷电性质采用电泳法将蛋白质分离

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

根据支撑物不同, 可分为薄膜电泳、凝胶电泳等。

■ 几种重要的蛋白质电泳:

- **SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳**, 常用于蛋白质分子量的测定。
- **等电聚焦电泳IEF**: 通过蛋白质等电点的差异分离蛋白质
- **双向凝胶电泳**: **IEF + SDS-PAGE**

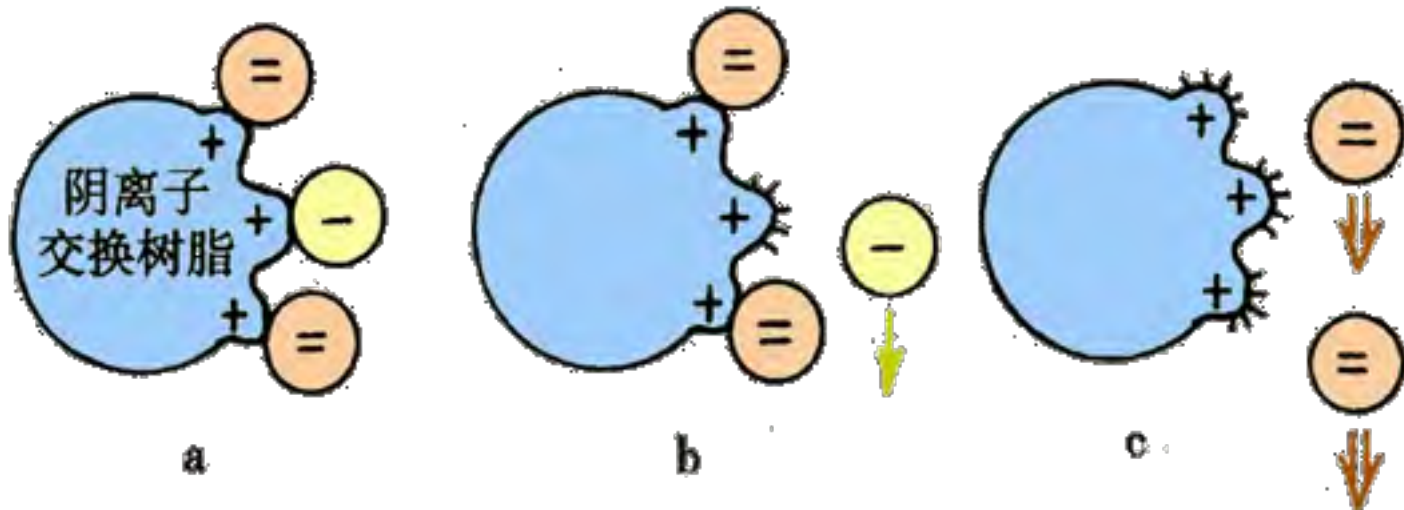


四、应用相分配或亲和原理 可将蛋白质进行层析分离

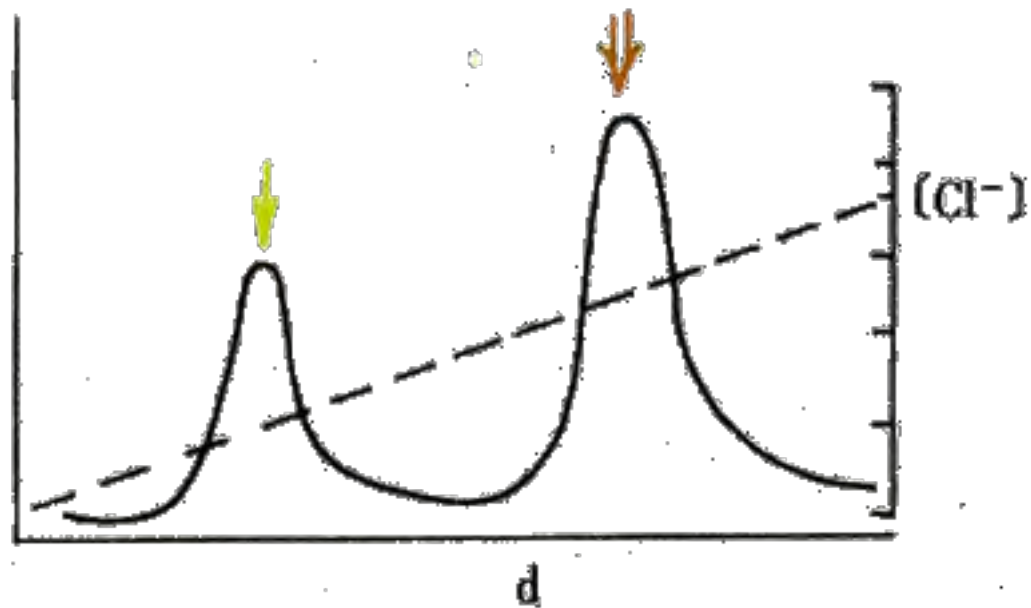
层析 (chromatography): 待分离蛋白质溶液（流动相）经过一个固态物质（固定相）时，根据溶液中待分离的蛋白质颗粒大小、电荷多少及亲和力等，使待分离的蛋白质组分在两相中反复分配，并以不同速度流经固定相而达到分离蛋白质的目的。

■ 蛋白质分离常用的层析方法

- **离子交换层析:** 利用各蛋白质的电荷量及性质不同分离。
- **凝胶过滤 (gel filtration) 又称分子筛层析:** 利用各蛋白质分子大小不同分离。
- **亲和层析:** 利用生物分子间专一、可逆的亲和力而分离纯化

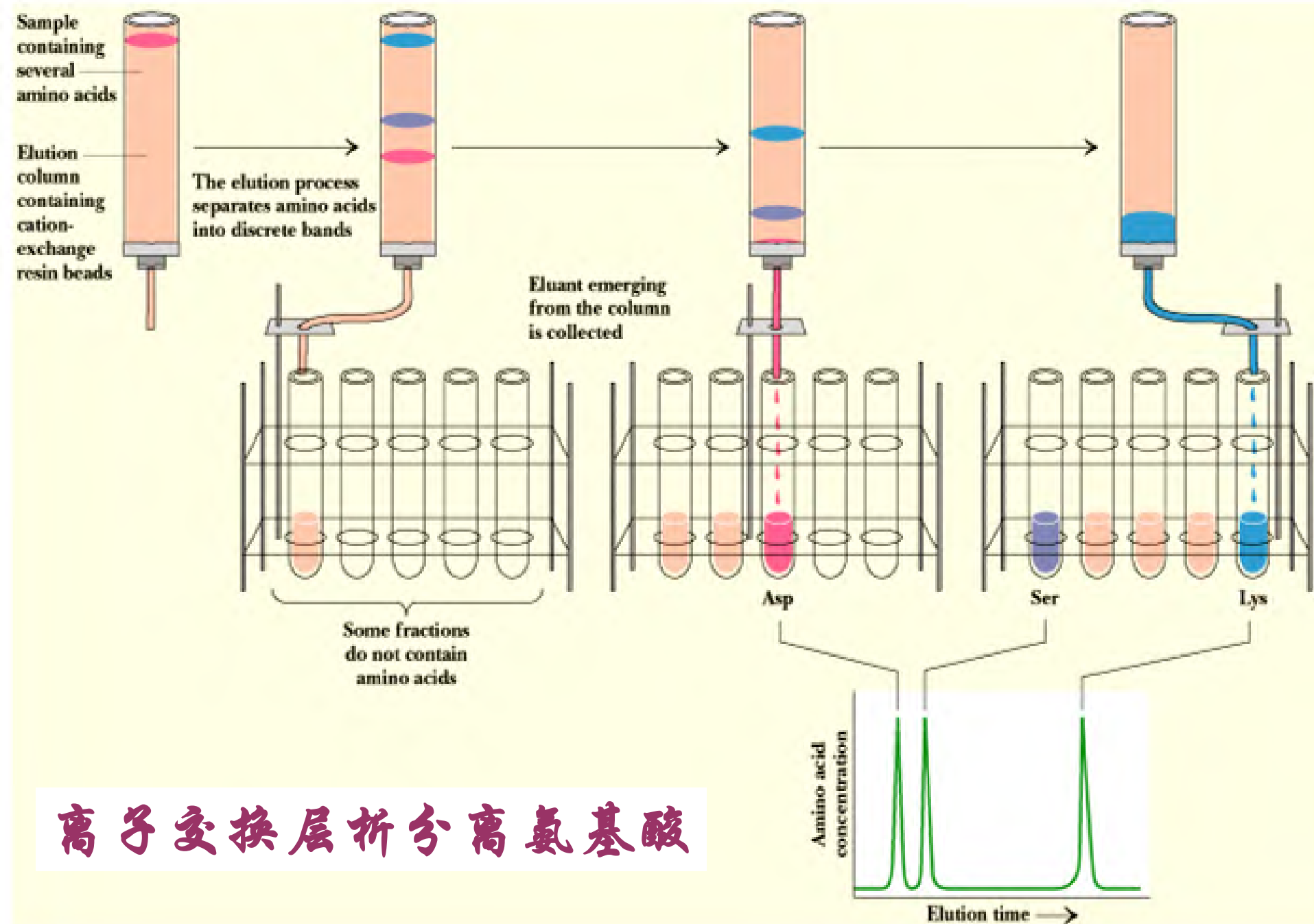


- a. 样品全部交换并吸附到树脂上
- b. 负电荷较少的分子用较稀的 Cl⁻ 或其他负离子溶液洗脱
- c. 电荷多的分子随 Cl⁻ 浓度增加依次洗脱
- d. 洗脱图



A_{280} 表示为 280nm 的吸光度

离子交换层析分离蛋白质

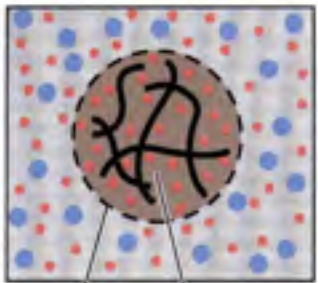


离子交换层析分离氨基酸

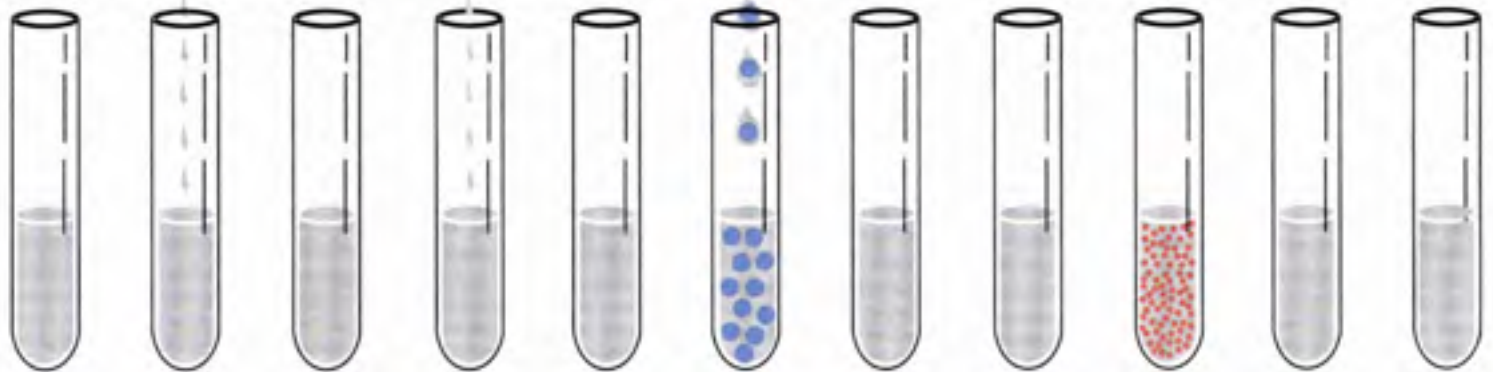
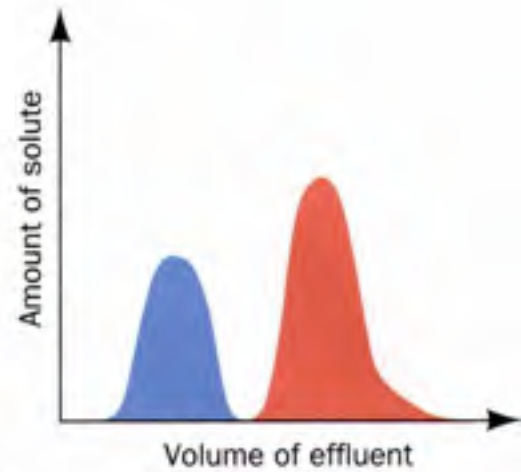
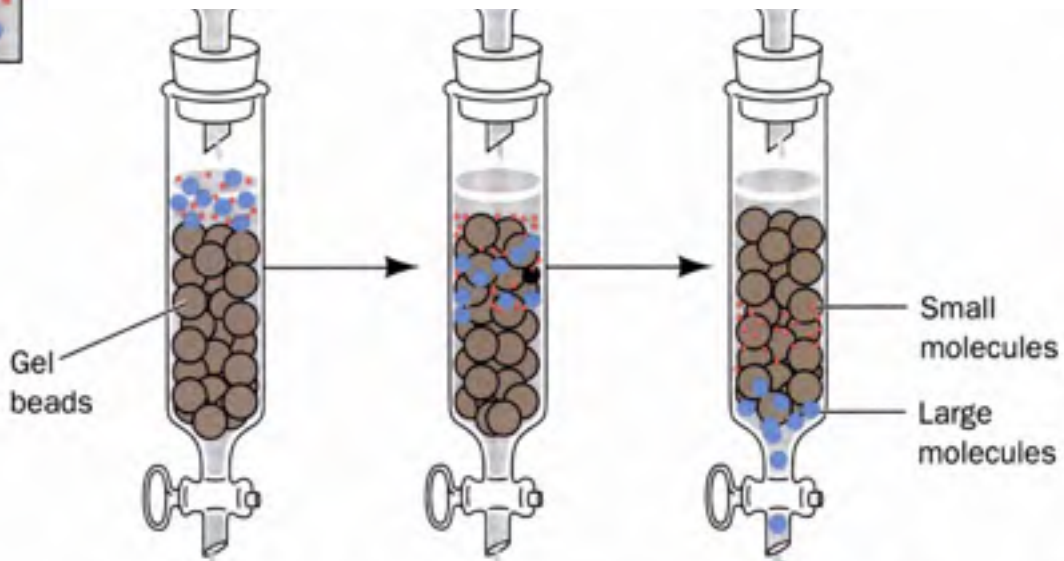


凝胶过滤分离蛋白质

(a)



Gel bead
Gel matrix



五、利用蛋白质颗粒沉降行为不同 可进行超速离心分离

- **超速离心法 (ultracentrifugation)** 既可以用来分离纯化蛋白质，也可用作测定蛋白质的分子量。
- 蛋白质在离心场中的行为用 **沉降系数 (sedimentation coefficient, S)** 表示，沉降系数与蛋白质的密度和形状相关。
- 因 S 大体上和分子量成正比关系，故可应用超速离心法测定蛋白质分子量，但对分子形状的高度不对称的大多数纤维状蛋白质不适用。



六、应用化学或反向遗传学方法 可分析多肽链的氨基酸序列



Frederick Sanger

1918.8.13-2013.11.19

University of Cambridge, United Kingdom

The Nobel Prize in Chemistry 1958

水解纯化的肽链成片段



采用Edman降解法分析各肽段的
N端与C端氨基酸顺序



经过组合排列对比，最终得出
完整肽链中氨基酸顺序的结果

分离编码蛋白质的基因



测定DNA序列，排列出mRNA序列



通过核酸按照三联密码的原
则推演出氨基酸的序列

思考题

- ❖ 叙述L- α -氨基酸结构特征，比较各种结构异同并分析与性质的关系。
- ❖ 简述蛋白质一级结构、二级结构、三级结构、四级结构的概念及各结构层次间的内在关系。
- ❖ 蛋白质分子中模体和结构域的概念及其与二三级结构的关系；
- ❖ 举例说明蛋白质结构与功能的关系
- ❖ 简述蛋白质的理化性质在蛋白质分离纯化中的应用（常用蛋白质分离纯化方法的基本原理）



测试题

1、组成蛋白质的氨基酸（除甘氨酸外）为

- A. L- β -氨基酸
- B. D- β -氨基酸
- C. L- α -氨基酸
- D. D- α -氨基酸
- E. L- α -氨基酸和 D- α -氨基酸

2、属于碱性氨基酸的是

- A. Asp
- B. Leu
- C. Cys
- D. Trp
- E. His

3、维持蛋白质二级结构的主要化学键是：

- A. 盐键
- B. 疏水键
- C. 肽键
- D. 二硫键
- E. 氢键

测试题

4、谷胱甘肽分子中包括下列那些氨基酸

A. Ala B. Gly C. Lys D. Cys E. Glu

5、蛋白质 α -螺旋的结构特点有

- A. 多为左手螺旋
- B. 螺旋方向与长轴平行
- C. 靠氢键维系稳定性
- D. 氨基酸侧链伸向螺旋外侧
- E. 3.6个氨基酸残基螺旋一圈



测试题

6、解释与问答:

- A. 肽键与肽平面 (肽单元)
- B. 模体与结构域
- C. 蛋白质等电点
- D. 蛋白质变性与变构效应
- E. 蛋白质一级结构、二级结构
- F. 亚基与辅基

7、为什么蛋白质变性后再复性，二硫键的正确配对率几乎达**100%**? 蛋白质变性与沉淀的关系。

