

第五章 蛋白质纯化、鉴定及
结构与功能分析-2

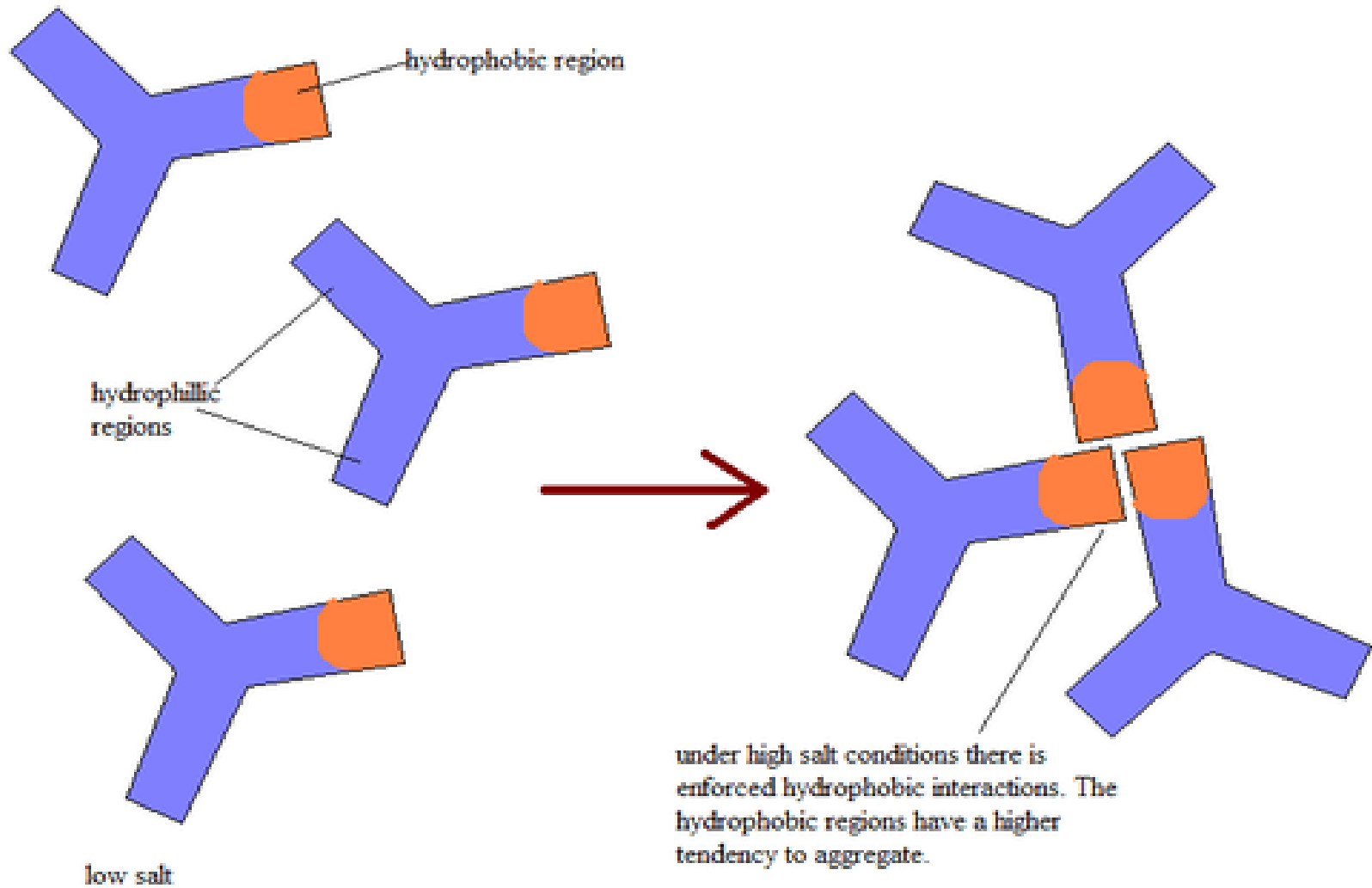
杜 芬

Email: fen.du@whu.edu.cn

疏水相互作用层析

- ❁ 1. 固定相：有偶联的疏水性配基的固定相载体； 流动相： 混合物和缓冲液；
- ❁ 2. 高盐时， 疏水性弱的蛋白质洗脱下来； 低盐时， 疏水性强的蛋白质洗脱下来。
- ❁ 3. 离子强度越高， 物质所形成的疏水键越弱。
- ❁ 4. 影响疏水作用的因素： 盐浓度、 温度、 pH、 表面活性剂和有机溶剂等。
- ❁ 5. 疏水层析刚好和离子交换层析互补。

疏水所用层析原理示意图



反向层析

- 1. 依据蛋白质的疏水性差异来分离；
- 2. “正相”与“反相”是指固定相与流动相的相对极性大小。反相层析中固定相的非极性很强，而流动相的极性相对较高，利用有机溶剂降低洗脱液（流动相）的极性，样品中的疏水性较低的组分先被洗脱，疏水性较高的组分后被洗脱。
- 3. 介质是一类在支持物上固定有疏水配体的凝胶，常用的是C4，C8，C18烷基，配体碳链越长，疏水性越强。当增加流动相的有机溶剂的含量的时候，降低了流动相的极性。
- 4. 硅胶不耐碱，所以使用酸性的buffer。
- 5. 分离能力较强，精细纯化，有时候可以分辨一个氨基酸差异的蛋白质。

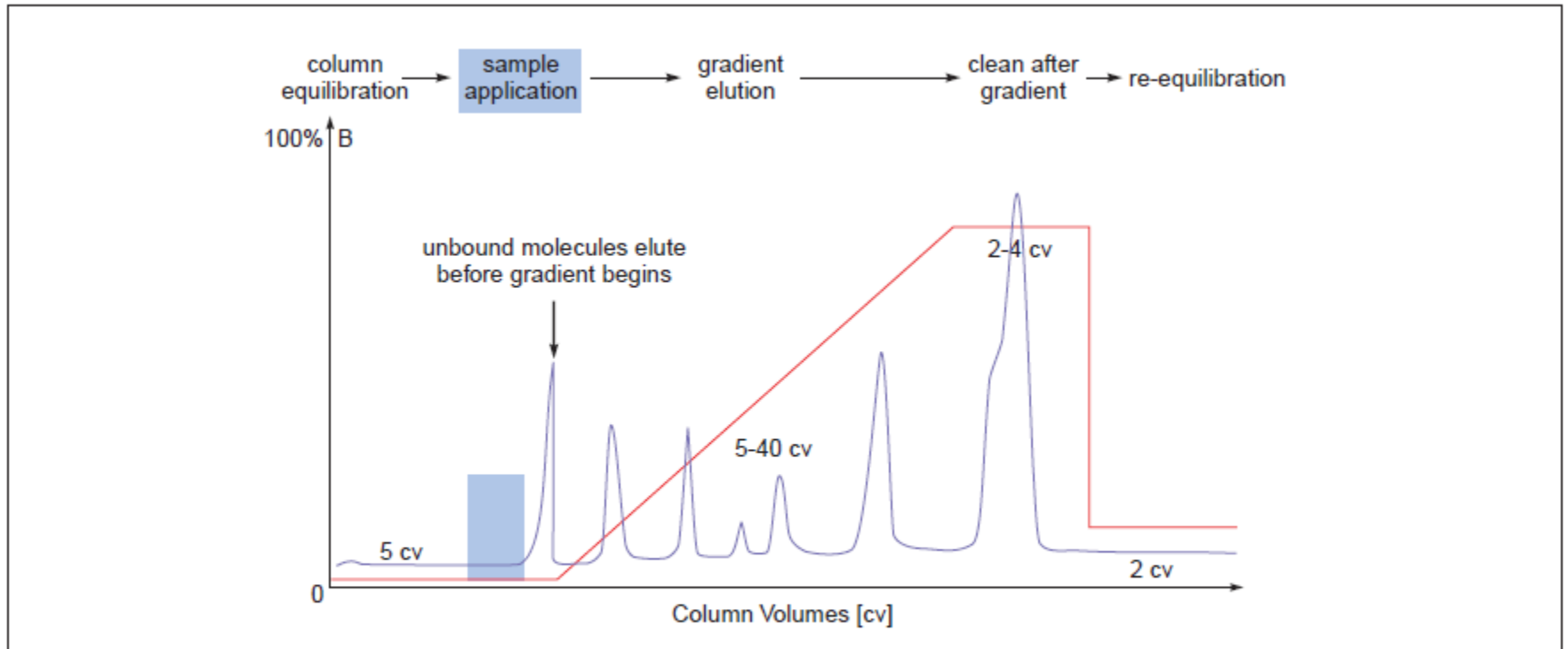


Fig. 43. Typical RPC gradient elution.

高效液相层析(HPLC)和FPLC



Ettan MDLC



ÄKTApilot™



ÄKTExpress™



ÄKTExplorer



ÄKTAFPLC™



ÄKTApurifier™



ÄKTAprime Plus



上海全达生化仪器有限公司

纯化后鉴定

- ❁ 蛋白质浓度鉴定
- ❁ SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, or 银染, 估计纯度
- ❁ 等电聚焦电泳
- ❁ Western Blot
- ❁ 质谱

Isoelectric Focusing

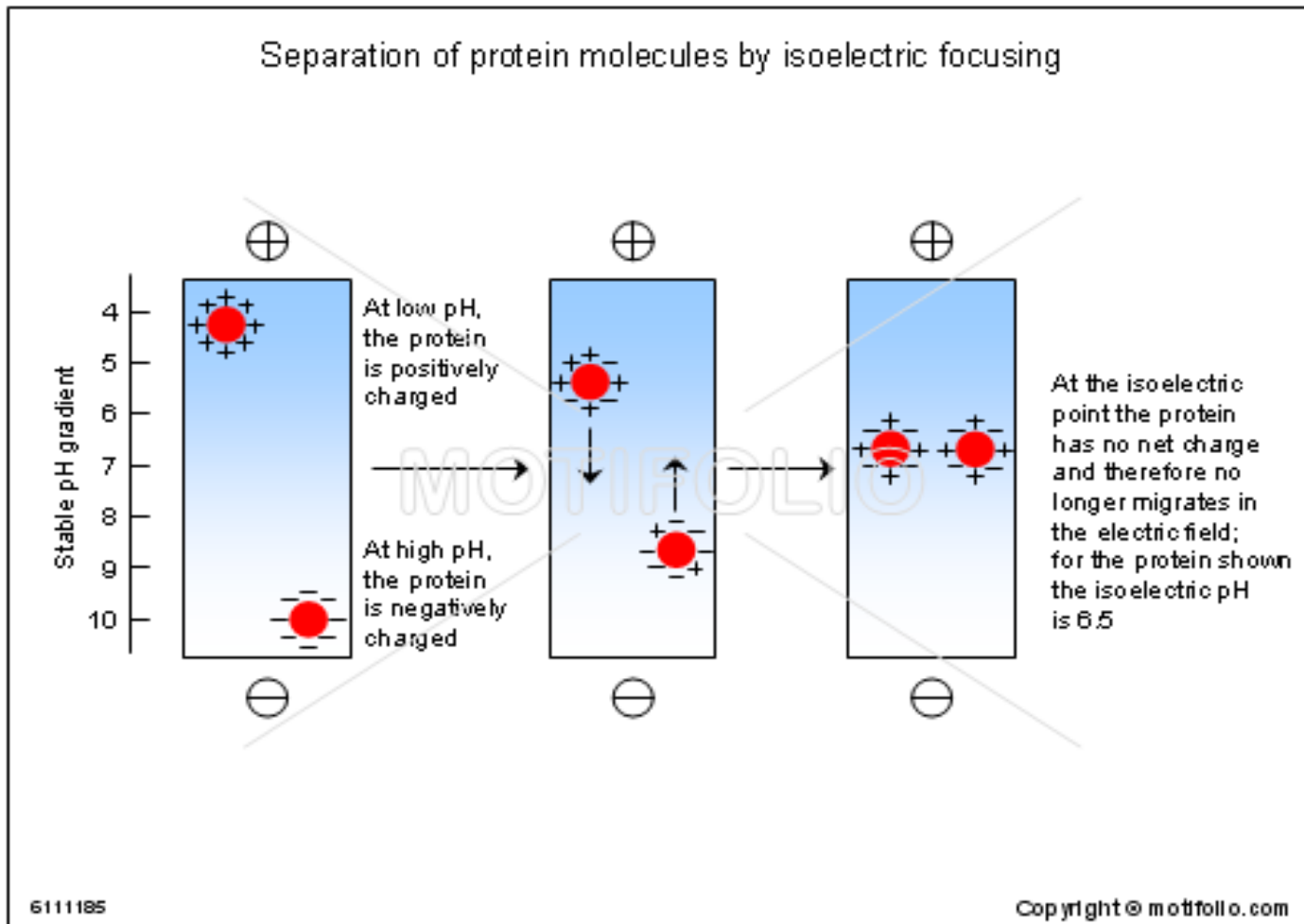
- ✿ A pH gradient is set up along the length of the gel
- ✿ An electric field is applied
- ✿ Proteins move to the point where they no longer have a charge i.e. their pI
- ✿ Used as the first dimension of 2D gel electrophoresis

等电聚焦电泳

凝胶中加脂肪族多氨基多羧基的两性电解质

正极电极液：磷酸

负极电极液：氢氧化钠



第二节 蛋白质结构与功能分析

❁ 蛋白质的功能

❁ 酶的催化作用

❁ 物质运载和贮存作用

❁ 营养存贮作用

❁ 运动协调作用

❁ 机械支持作用

❁ 免疫保护作用

❁ 信号接受与传导作用

❁ 生长和分化控制作用

错折叠疾病分类	相关蛋白质	分子机理
1. 无法折叠为正常功能产物		
囊性纤维化	I. 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白	错折叠 分子伴侣错误作用
马方综合征	肌原纤维蛋白	错折叠
肌萎缩性脊髓侧索硬化	过氧化物歧化酶	错折叠 错组装
坏血病	胶原蛋白	错折叠
Maple糖尿病	α -酮酸脱氢酶复合物	错折叠
癌症	P53	错折叠 与Hsp70错作用
成骨不全	I类胶原 pro α	错折叠
2. 错折叠引起错误定位		
家族性高胆固醇血症	LDL受体	定位错误
α 1-抗胰蛋白酶	抗胰蛋白酶	定位错误
家族性黑蒙性白痴	β -氨基己糖苷酶	定位错误
视网膜炎 矮妖精综合症	视紫红质 胰岛素受体	定位错误 定位错误
3. 毒性折叠产物		
疯牛病/羊搔痒症	朊病毒蛋白	集聚 抗蛋白水解
老年性痴呆症	β -淀粉样蛋白质	集聚 抗蛋白水解
家族性淀粉样变性	甲状腺转运蛋白\溶菌酶	集聚 抗蛋白水解
白内障	晶体蛋白	集聚 抗蛋白水解

与蛋白质错误折叠有关的疾病 (Protein-misfolding diseases)

✿ 翻译后的质量控制失败可能导致病理性的聚合，到目前已经发现**20**多种蛋白质能形成淀粉样沉淀，与人的纹状体脊髓变性病(**Creutzfeldt-Jakob disease, CJD**) ,老年痴呆症(**Alzheimer**),亨丁顿氏舞蹈病(**Huntington**),帕金森氏病(**Parkinson**)和淀粉样蛋白病(**systemic amyloidoses**)等病相关。

- ✿ 近年来Prion Diseases(又称传染性海绵状脑炎病, transmissible spongiform encephalopathies, TSEs)成为最被关注的疾病之一。
- ✿ Prion Diseases包括人的纹状体脊髓变性病(CJD)、疯牛病(mad cow disease, 牛海绵状脑炎, bovine spongiform encephalopathy, BSE)、羊瘙痒病(scrapie)和其它海绵体脑病。

疯牛病

- ✿ 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

蛋白“折叠”错误

疯牛病属于**传染型海绵状脑病(TSE)**的一种，是因为叫Prion的病变蛋白造成的。无肉眼可见的病理变化，也无生物学和血液学异常变化。典型的组织病理学和分子学变化都集中在中枢神经系统。



Prion protein

- ✿ **天然型朊蛋白 (PrP^C)**在正常动物体内存在，不导致疾病，而**感染型的朊蛋白 (PrP^{Sc})**则导致某些神经性疾病。
- ✿ **TSE**发病机理的关键是正常蛋白酶敏感的宿主朊蛋白转化为异常的具蛋白酶抗性的形式。

✿ 美国加州大学的Stanley B. Prusiner教授对天然型和感染型朊蛋白(prion)进行了深入的研究，发现 Prion的传播主要是通过细胞中正常的蛋白质分子向疾病型蛋白质分子的转化，其核心是蛋白质内 α 螺旋结构向 β 折叠结构的转化。

PrP^C 与 PrP^{Sc} 的结构比较

➤ PrP^S 与 PrP^{Sc} 一级结构完全相同

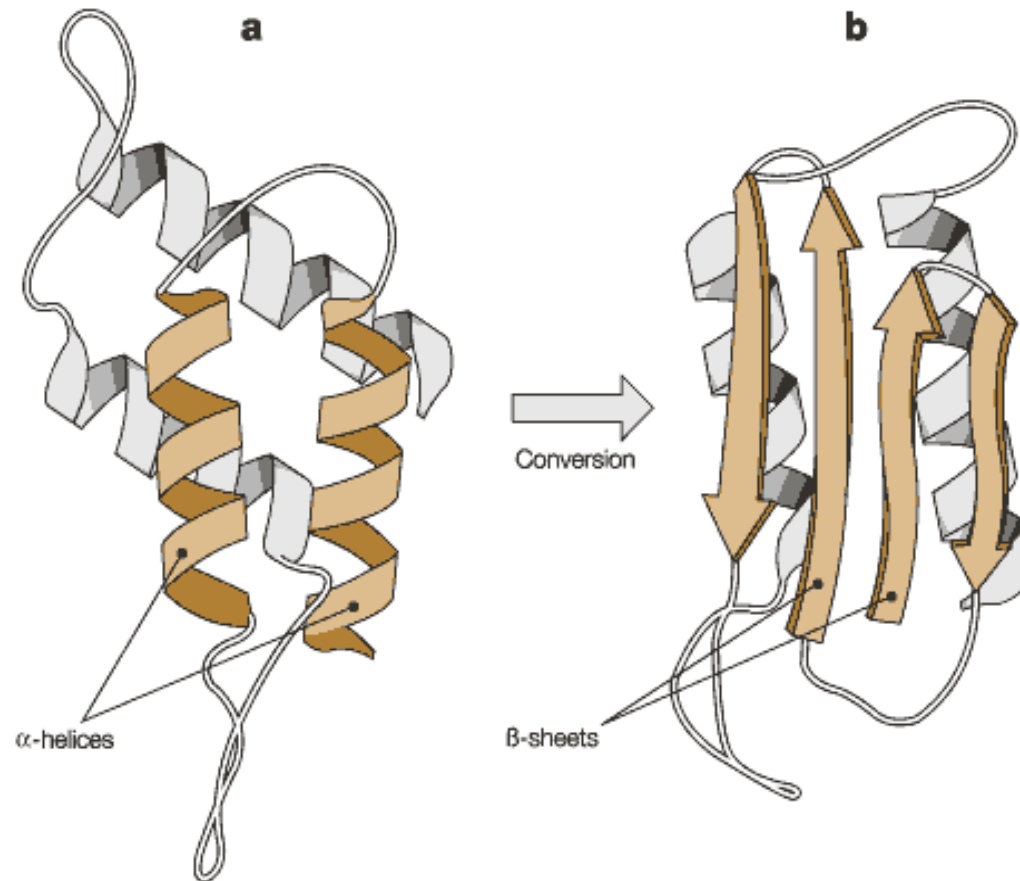
➤ PrP 二级结构

Fourier 变形红外线分光镜测定表明：

PrP^{Sc} 二级结构含有 43% 的 β 折叠片、30% 的 α 螺旋结构；

PrP^C 的二级结构含有 40% 的 α 螺旋，3% 的 β 折叠片。

PrP 三维结构 (a) PrP^C, (b) PrP^{Sc}



Source: *Prion Biology and Diseases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999

PrP^C 与 PrP^{Sc}

- PrP^C 分子量33~35 KDa, 含有1对二硫键和2个N型复合寡糖链, 二硫键和糖基化的残基都在PrP的C端。N端含有由22个氨基酸残基组成的信号肽序列, C端含有由23个氨基酸组成的糖基磷酸肌醇锚受体结合位点(GPI)。PrP^C是一种膜蛋白, 定位于细胞膜的穴样内陷类结构域(CLDs)。
- 致病的朊蛋白 (PrP^{Sc})具有**抗蛋白酶K有限水解**的能力, 它特异地出现在被感染的动物脑组织中, 呈淀粉样形式存在。经有限酶解后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳显示其分子量为27~30 KDa(称PrP_{27~30}), PrP_{27~30}仍保留其感染活性。



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1997



**“For his discovery
of Prions - a new
biological principle
of infection”**

Stanley B. Prusiner

(1942-)

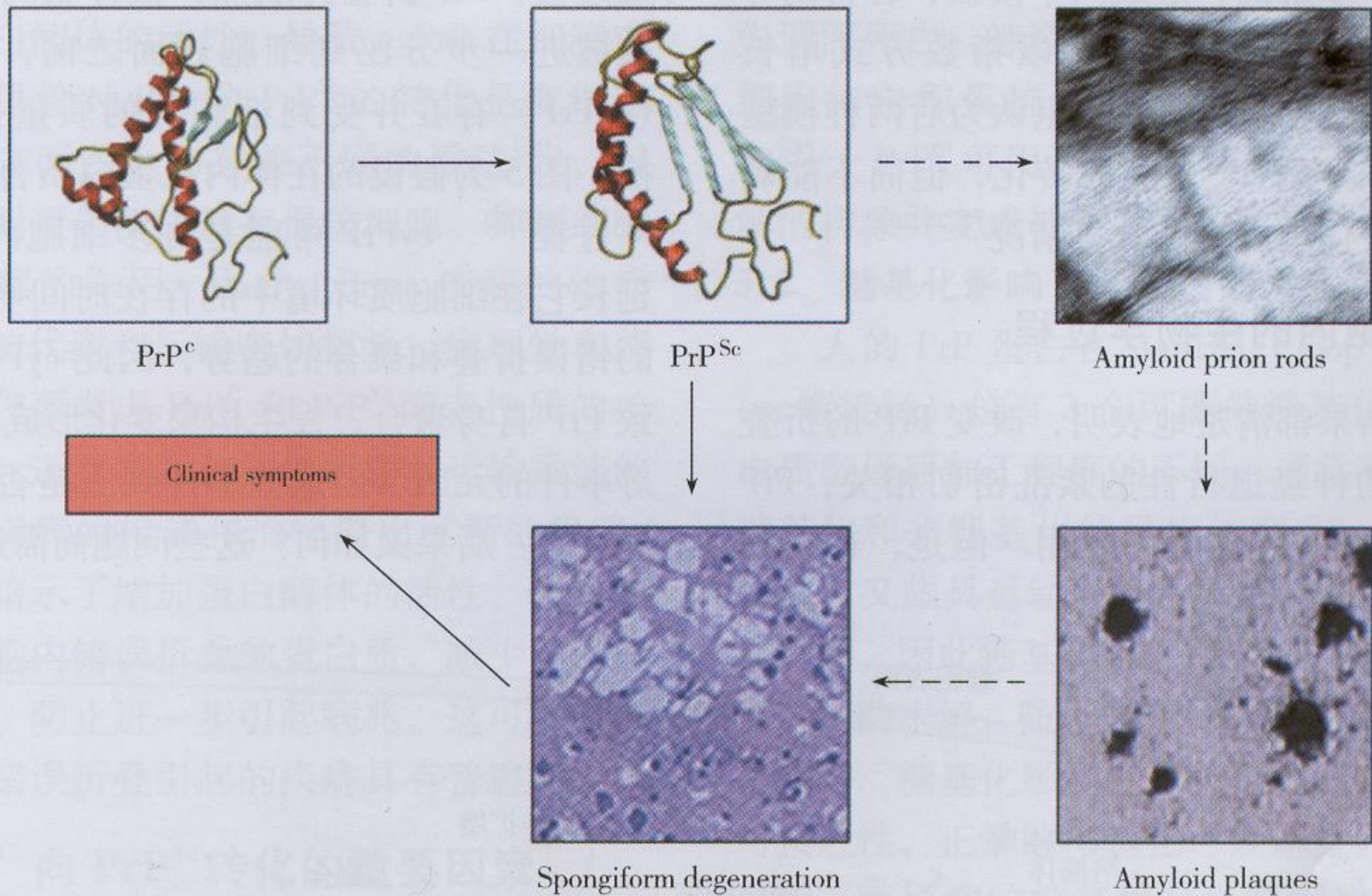
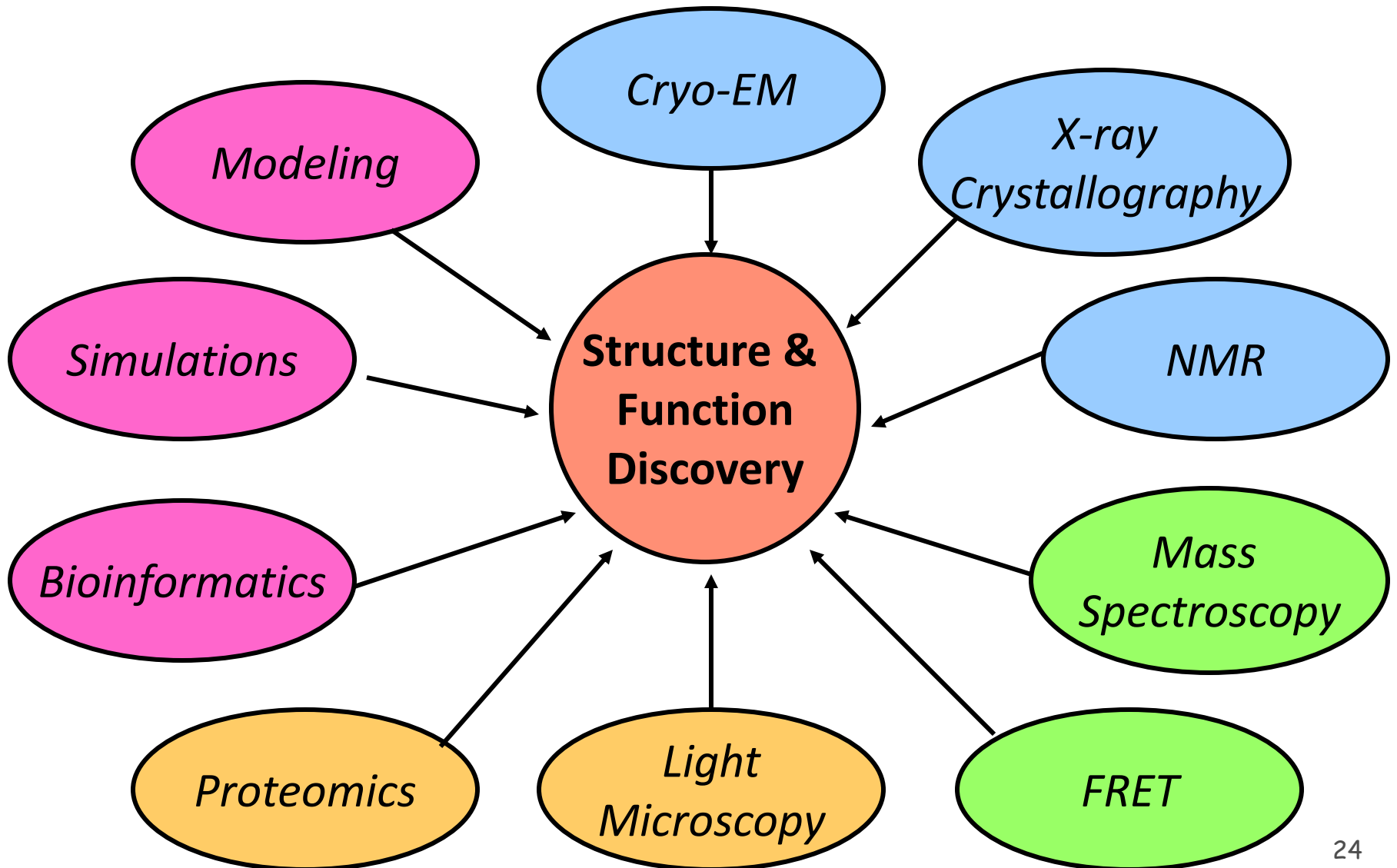


Fig. 3 A model for progression of TSEs pathogenesis

图3 TSEs 疾病的致病过程^[13]

图中 PrP^c 和 PrP^{Sc} 的结构是计算模型.

Structure Biology



研究蛋白质结构的方法

- ✿ X-ray 晶体衍射分析
- ✿ 二维核磁共振技术
- ✿ 电镜三维重构
- ✿ 扫描隧道显微技术
- ✿ 质谱技术
- ✿ 蛋白质结构预测和分子动力学模拟
- ✿ 微量热技术
- ✿ 荧光光谱技术
- ✿ 紫外可见光谱技术
- ✿ 圆二色技术
- ✿

1、X射线衍射法

- ❁ 晶体具有点阵结构，点阵结构的周期（即晶胞边长）与X射线的波长属于同一数量级。X射线衍射现象是一种基于波叠加原理的干涉现象。X射线通过晶体之后，在衍射方向X射线的强度增强，而另一些方向X射线强度却减弱甚至消失，如果在晶体的背后放置一张感光底片，将会得到X射线的衍射图形。
- ❁ 利用X射线衍射原理制造的X射线衍射仪，是测定晶体结构的最主要仪器。根据衍射的方向可以测定晶格参数或晶胞的大小和形状。根据衍射线强度分布能够测定原子在晶胞中的坐标，因此X射线衍射法也是测定分子空间构型的主要方法。

PNAS: 解析三维蛋白质 晶体结构

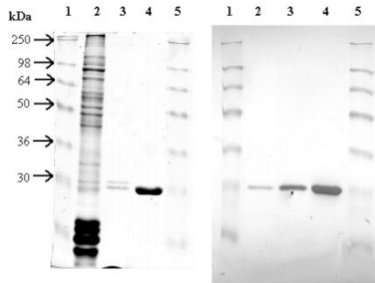
- 来自加州理工大学和加州大学圣地亚哥分校的研究者联合研究蛋白质晶体结构，构建了一个蛋白质三维结构数学模型，破解了氨基酸链蛋白质三维结构的秘密。
- 研究人员使用加州理工大学研发的新技术获得大量的实验数据构建了一个蛋白质折叠结构模型。
- 研究者使用一个能捕捉到皮秒图像的摄影机来观察蛋白质结构；链接蛋白质与摄影机的是一个探针，这个探针可捕捉激光的脉冲波激发出的荧光，并将这一信息传递到模型的探针上。这些发光的信息能将链接蛋白的结构秘密转移到模型上，这样就可勾勒出蛋白质的三维立体结构。

PNAS February 10, 2009 vol. 106 no. 6 1796-1801

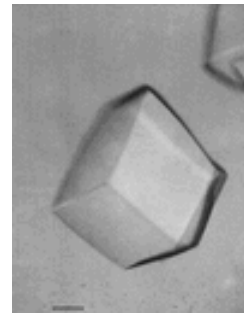
X-ray蛋白质晶体学测定结构的基本步骤

1. 选取靶标蛋白；
2. 天然提取或者重组表达；
3. 分离纯化；
4. 鉴定，如纯度和浓度；
5. 筛选晶体生长条件；
6. 优化晶体生长条件，获得晶体；
7. 收集晶体的X-ray衍射数据；
8. 获得相位信息，构建结构模型来诠释电子密度图；
9. 结构修正和模型验证。

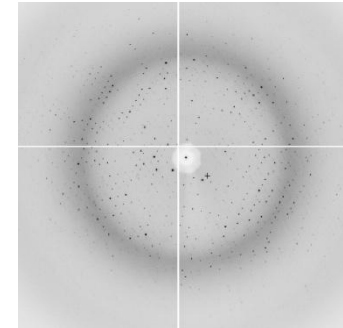
How to obtain structures by protein crystallography?



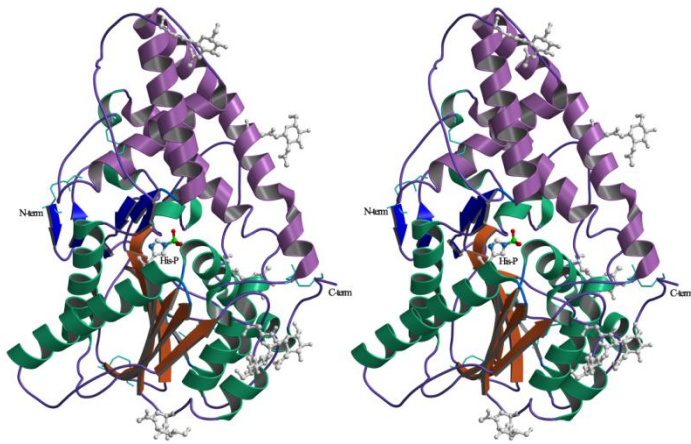
Expression/purification



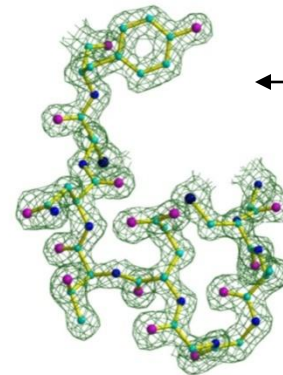
crystallization



X-ray diffraction



Refined structure



Model building

$$F(h,k,l) = |F(h,k,l)| e^{i\alpha(h,k,l)}$$
$$\alpha(h,k,l) = ?$$

phasing

蛋白质结晶(crystallization)

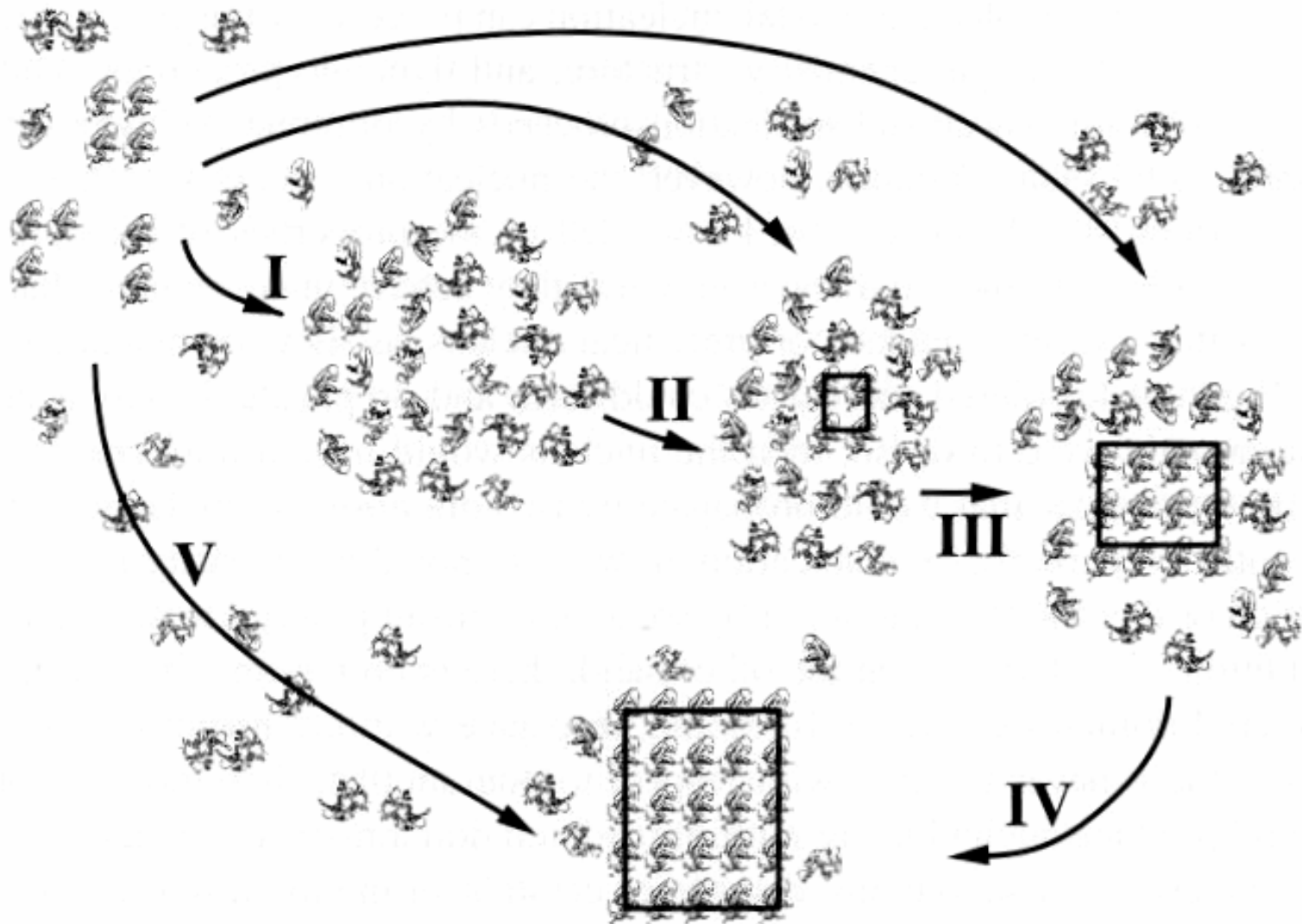
(1) 结晶是溶质呈晶态从溶液中析出的过程。

(2) 蛋白质结晶是一个有序化过程，在溶液中的处于随机状态的分子转变为有规则排列状态的固体。首先要形成晶核，然后开始晶体生长。因此，必须首先使蛋白质溶液达到过饱和，保持一定条件，使溶液中的分子失去自由运动的能量。

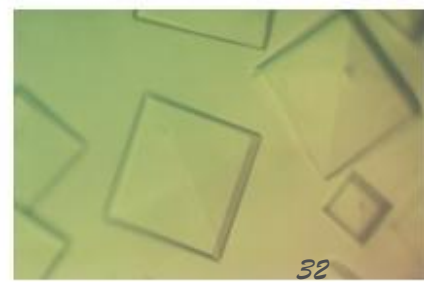
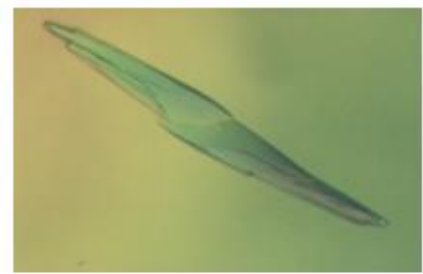
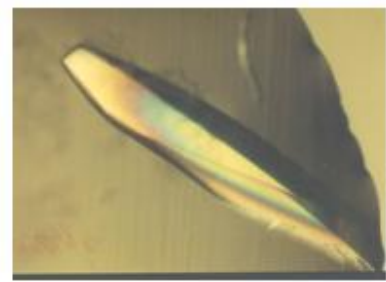
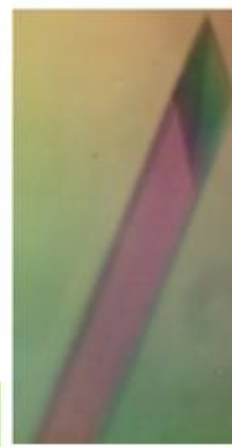
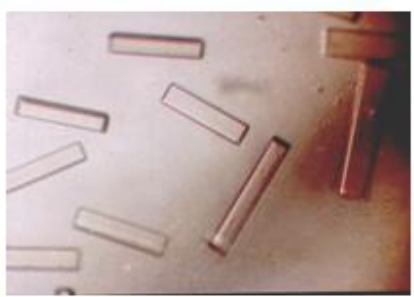
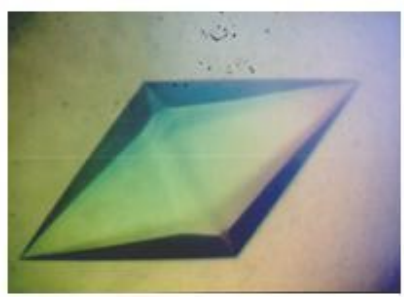
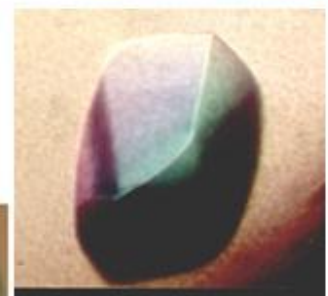
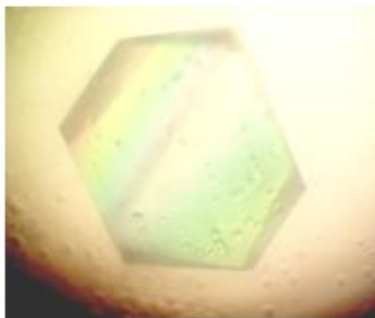
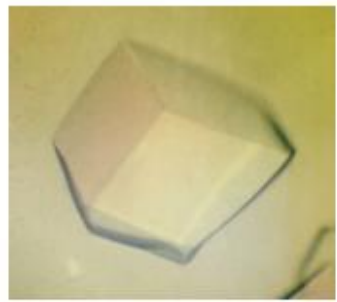
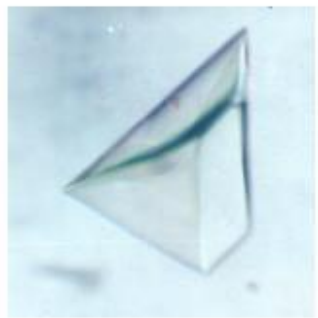
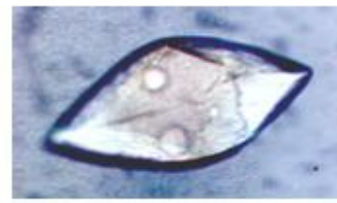
(3) 蛋白质的饱和度和蛋白质的浓度、离子强度、温度、pH值、添加剂或者去垢剂等因素相关。

(4) 蛋白质结晶方法：气象扩散法、成批法、透析法、液-液扩散法等。

溶液中的蛋白质分子堆成晶体(crystal packing)



观察到的蛋白质晶体的实际外形具有多样性；
同一种蛋白质晶体的不同个体也是有差异的。



2、二维核磁共振原理

- ✿ NMR法通过测定蛋白质在稀溶液状态下反应位点的特定参数来计算蛋白质的三级结构,并可深入了解一定时间范围内化学反应和蛋白质构象转变的动力学过程。
- ✗ 自旋核在外加磁场中存在两种能量状况,通常处于低能级的核比处于高能级的核稍多一些。如果在垂直于外加磁场的方向上增加一个电磁场,当电磁场的能量与核磁能级差相等时,处于低能级的多余的磁核就会吸收电磁波能量而跃迁到高能级,即产生核磁共振。

NMR主要三个参数

- 化学位移：同种核素因化学环境的差异而共振频率不同；
- 耦合常数：核自旋产生的核磁矩间的相互干扰成为自旋耦合。
由自旋耦合引起的核磁共振峰分裂的现象称为自旋-自旋分裂。
由自旋分裂产生的峰裂称为耦合常数。
- 弛豫过程：高能级的核必须回到低能级。高能态的核是以非辐射的形式放出能量的形式放出能量回到低能态。

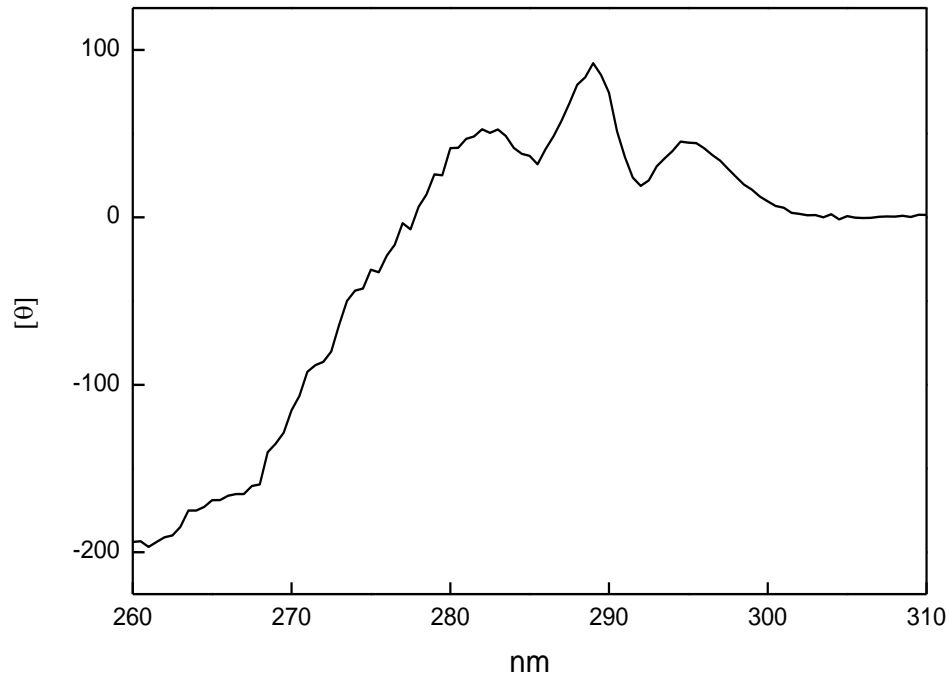
NMR可以获得蛋白质的结构信息

- (1) 反映结构特征的质子对间距离:
- (2) 反映主链和测量构象的扭转角:
- (3) 反映主链规则排布的二级结构单元:
- (4) 蛋白质溶液三级结构的测定
- (5) 蛋白质的构象变化
- (6) 蛋白质与靶分子（靶蛋白、核酸、配体、小分子、药物）的相互作用
- (7) 蛋白质的动态特性
- (8) 蛋白质的折叠机制和折叠路径

3、蛋白质的CD谱

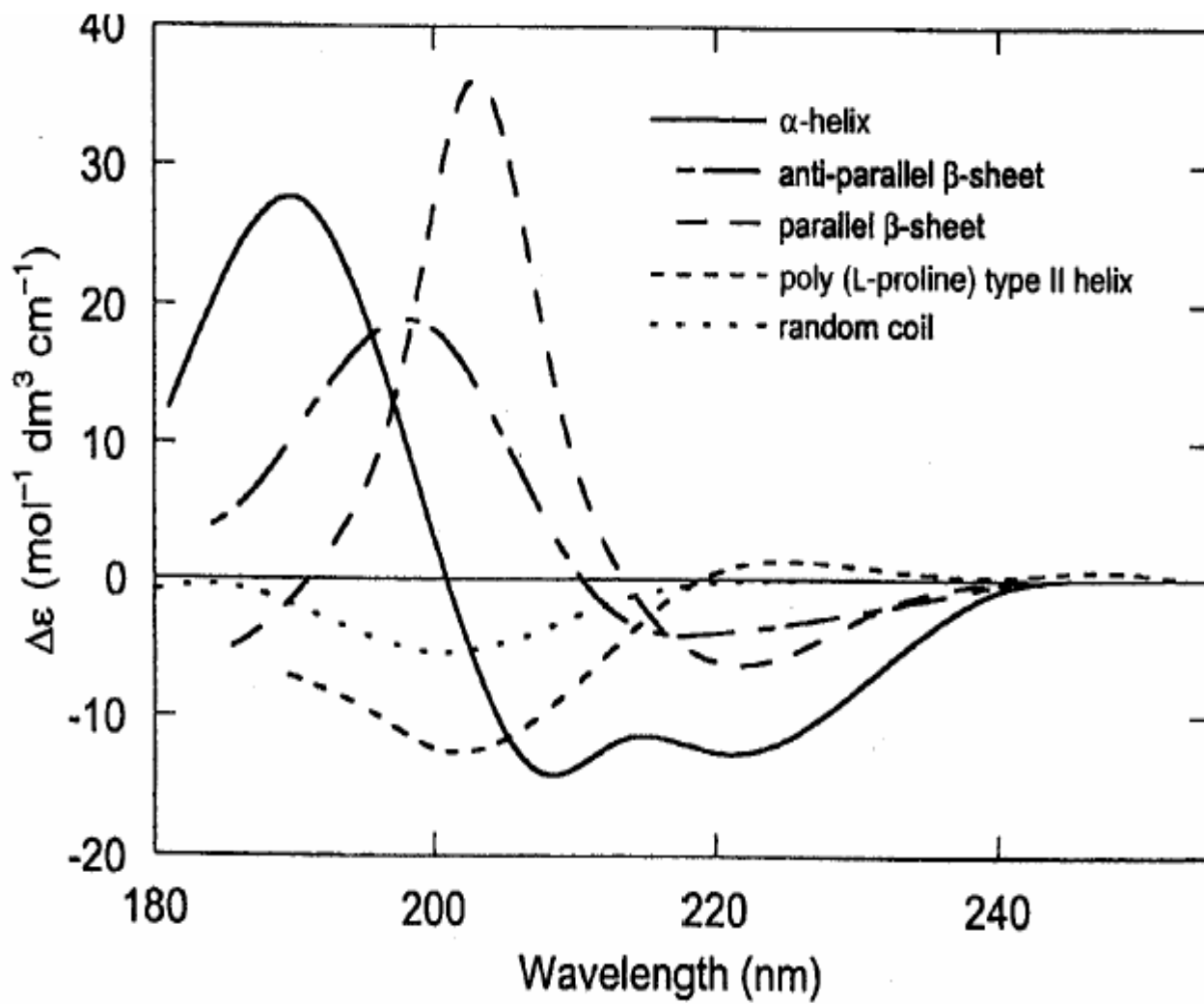
- ✿ CD spectra in the far UV region (180 nm - 250 nm) probes the secondary structures of proteins.
- ✿ CD spectra in the near UV region (~250 and ~ 350) monitors the side chain tertiary structures of proteins.

Near UV CD spectrum of Lysozyme



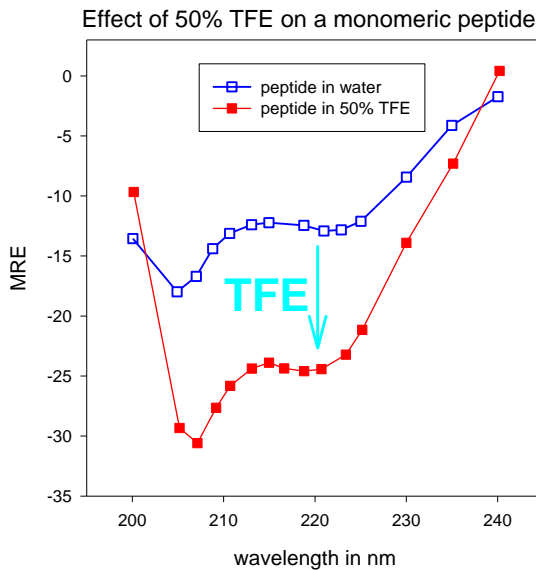
Main CD features of protein 2ndary structures

	- band (nm)	+ band (nm)
α-helix	222 208	192
β-sheet	216	195
β -turn	220-230 (weak) 180-190 (strong)	205
polypro II helix	190	210-230 weak
Random coil	200	212

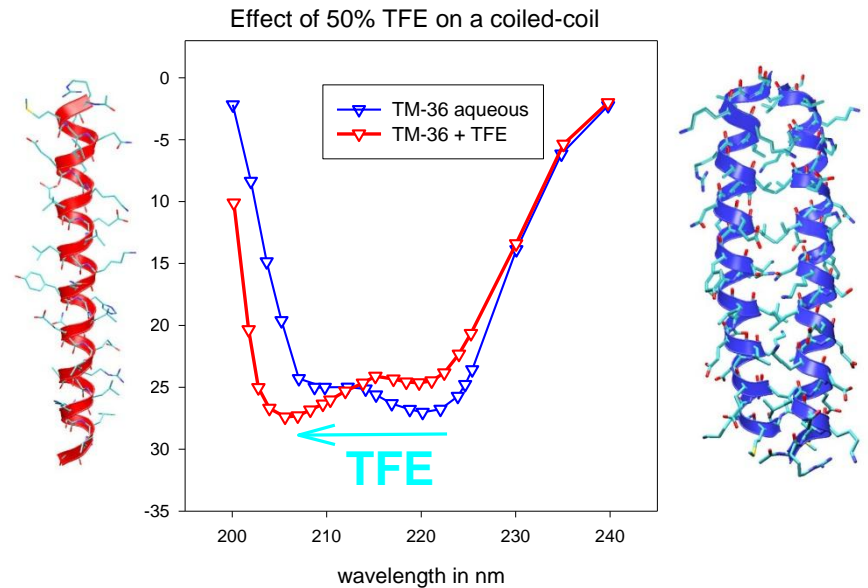


CD signals for same secondary structure can vary (a bit) with environment

- Can see this by looking at the effect of trifluoroethanol (TFE) on a coiled-coil similar to GCN4-p1
- TFE induces helicity in all peptides



- But on a coiled-coil breaks down helical dimer to single helices



- Although 2ndry structure same CD changes

