

第一章 蛋白质的结构与功能

Chapter 1
Structure and function of protein

本章要求

- 1.掌握蛋白质的分子组成、分子结构及理化性质。
- 2.熟悉蛋白质多肽链组成，蛋白质结构与功能的关系，氨基酸的理化性质。
- 3.了解蛋白质的分离纯化方法及一级结构测定原理。
- 4.掌握下列概念：氨基酸、肽键、一级结构、二级结构、三级结构、四级结构、 α 螺旋、 β 折叠、模体、结构域、亚基、分子伴侣、分子病、蛋白质等电点。

第一节 概述

一、蛋白质的生物学意义

1. 蛋白质是构成生物体的重要组成物质
2. 蛋白质是生物体生命活动的执行者

二、蛋白质的分类

1.按组成成分

A.单纯蛋白质

B.结合蛋白质

2.按分子的形状或空间构象

A.纤维状蛋白

B.球状蛋白质

3.按“家族”

具有相同或类似结构的蛋白归为一个“家族”，这种分类方法既包含结构特性，又提示功能特性。

三、蛋白质的功能

催化功能——酶

运输与储存——血红蛋白

调节功能——蛋白质多肽类激素

机械运动与支持——肌肉蛋白

保护与免疫——凝血酶原和免疫球蛋白

营养和储存——酪蛋白、铁蛋白

四、蛋白质结构的组织层次

为了对蛋白质结构叙述的方便，人为地将蛋白质的结构分为一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。



第二节 蛋白质的分子组成

一、蛋白质的元素组成

C	H	O	N	S
(50%)	(7%)	(23%)	(16%)	(0~3%)

其他 : **P**、**Cu**、**Fe**、**Zn**、**Mn**、**Co**、**Se**、**I**

磷	铜	铁	锌	锰	钴	硒	碘
---	---	---	---	---	---	---	---

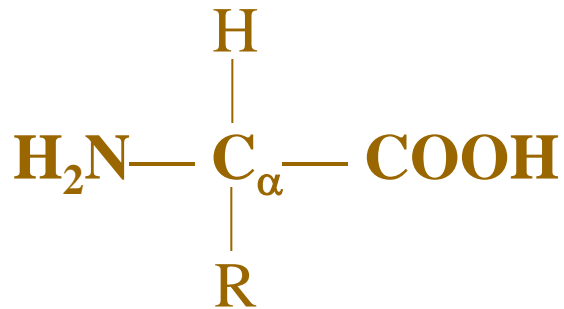
凯氏定氮法

蛋白质含量/g样品 = 含氮量/g样品 × 6.25

二、氨基酸

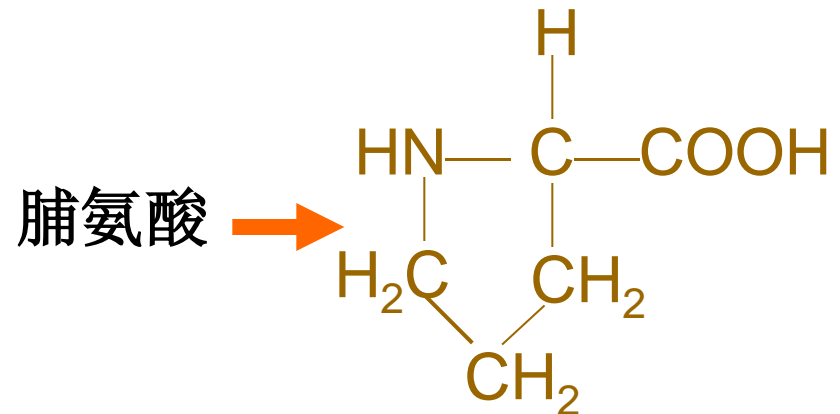
(一) 氨基酸的结构

α -氨基酸结构通式

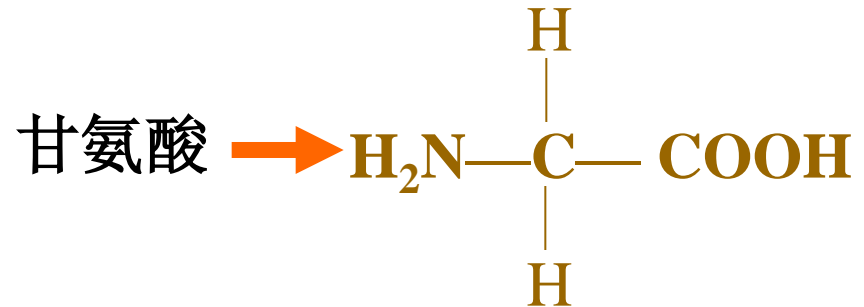


L- α -氨基酸

脯氨酸



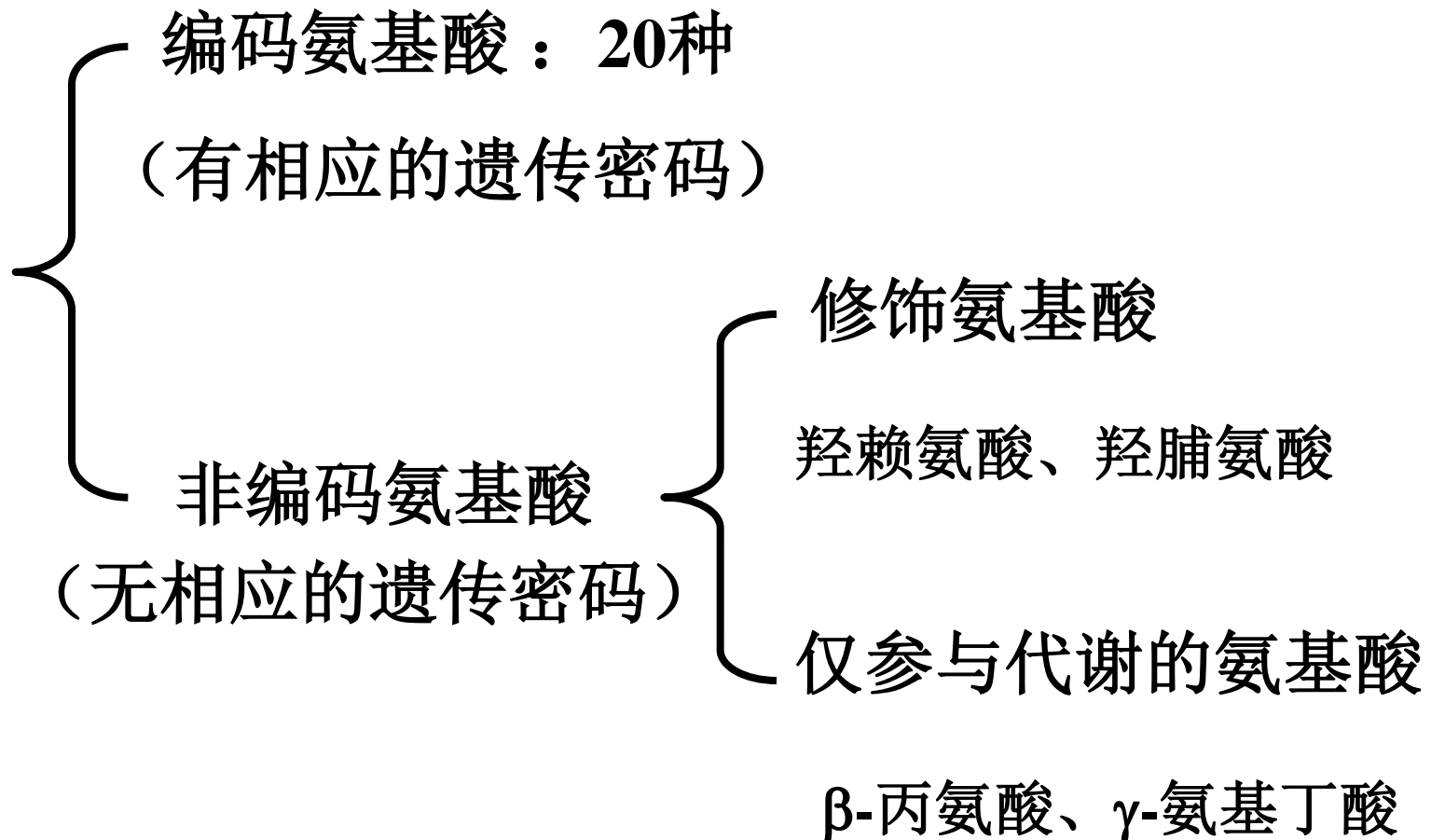
甘氨酸



构型：根据甘油醛构型确定D型和L型

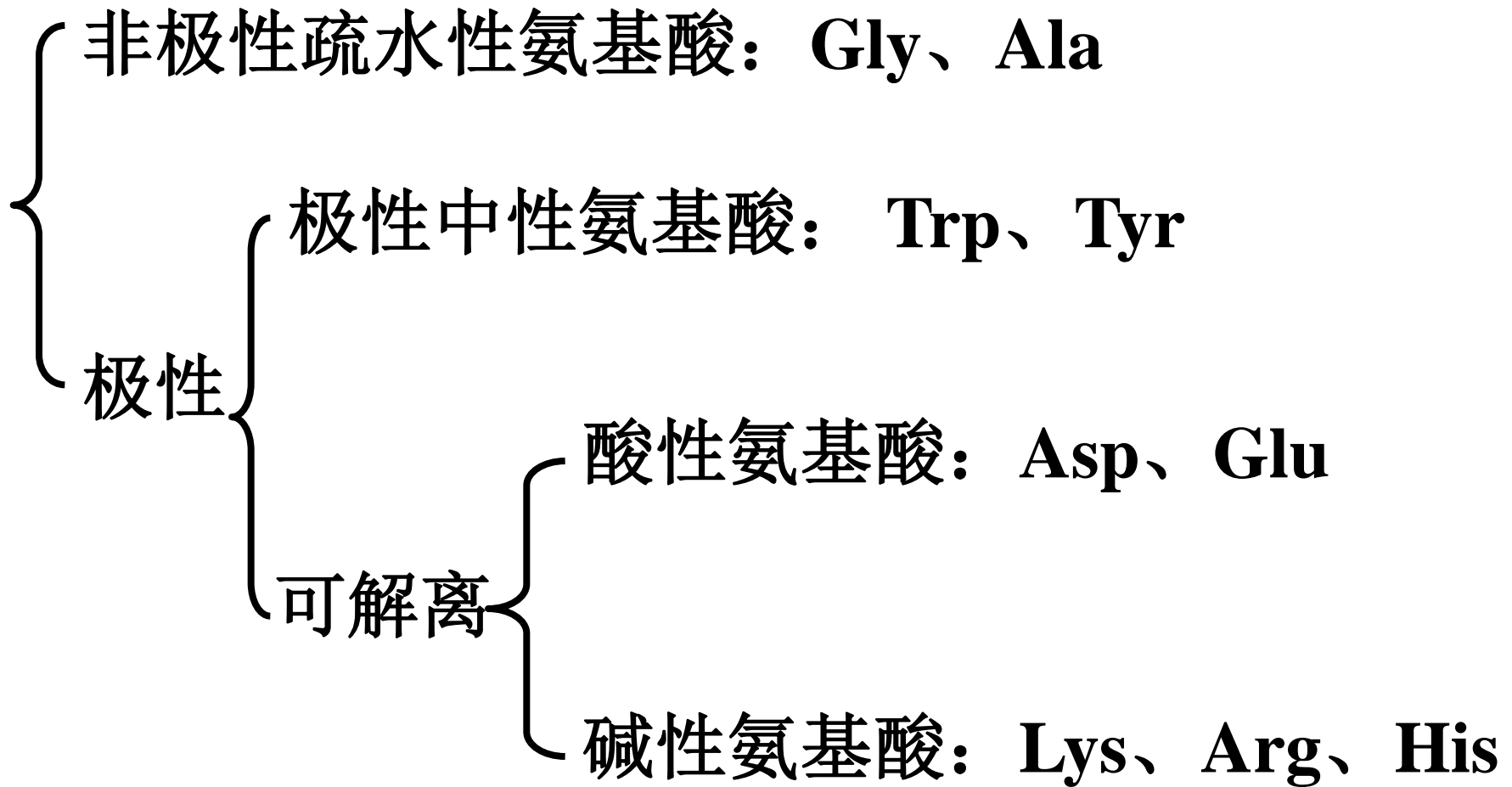
1. 根据甘油醛原则确定构型。
2. 自然界的氨基酸有两种构型。
3. 组成蛋白质的氨基酸都是**L型**。

(二) 氨基酸的分类



编码氨基酸的分类原则：

侧链基团**R**的结构及理化性质



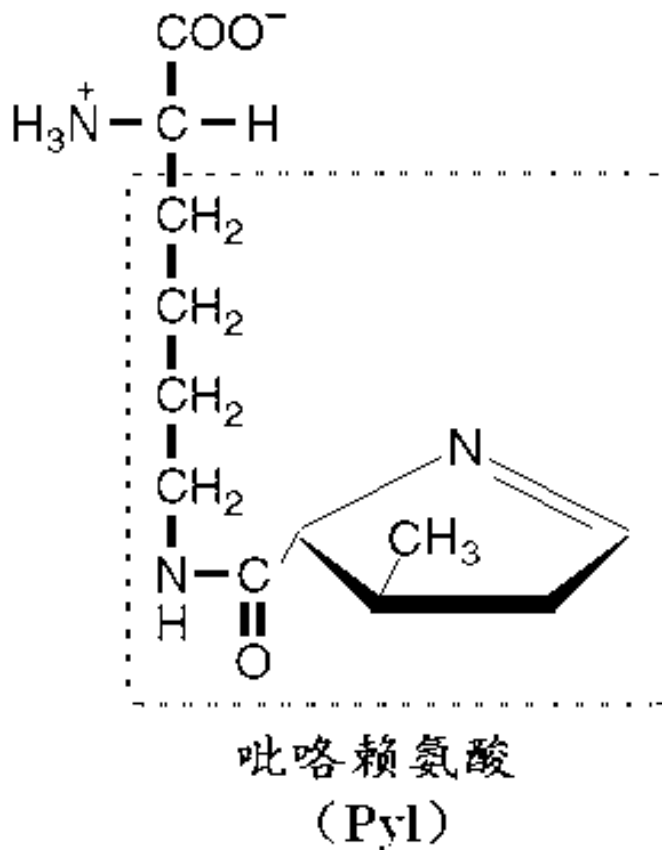
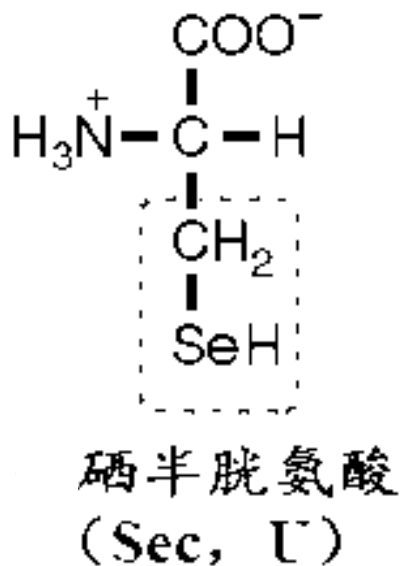
氨基酸名称	英文缩写	简 写		氨基酸名称	英文缩写	简 写
甘氨酸	Gly	G		丝氨酸	Ser	S
丙氨酸	Ala	A		苏氨酸	Thr	T
缬氨酸	Val	V		天冬酰胺	Asn	N
异亮氨酸	Ile	I		谷酰胺	Gln	Q
亮氨酸	Leu	L		酪氨酸	Tyr	Y
苯丙氨酸	Phe	F		组氨酸	His	H
脯氨酸	Pro	P		天冬氨酸	Asp	D
甲硫氨酸	Met	M		谷氨酸	Glu	E
色氨酸	Trp	W		赖氨酸	Lys	K
半胱氨酸	Cys	C		精氨酸	Arg	R

20种基本氨基酸的英文简写

2种新发现的基本氨基酸：

硒半胱氨酸（第21种）

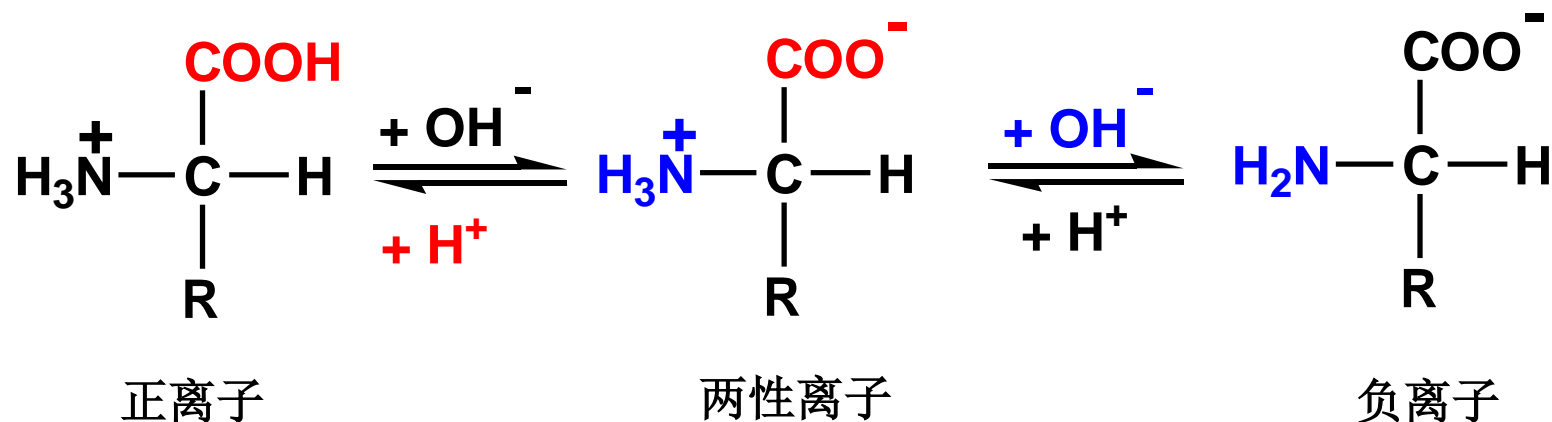
吡咯赖氨酸（第22种）



(三) 氨基酸的理化性质

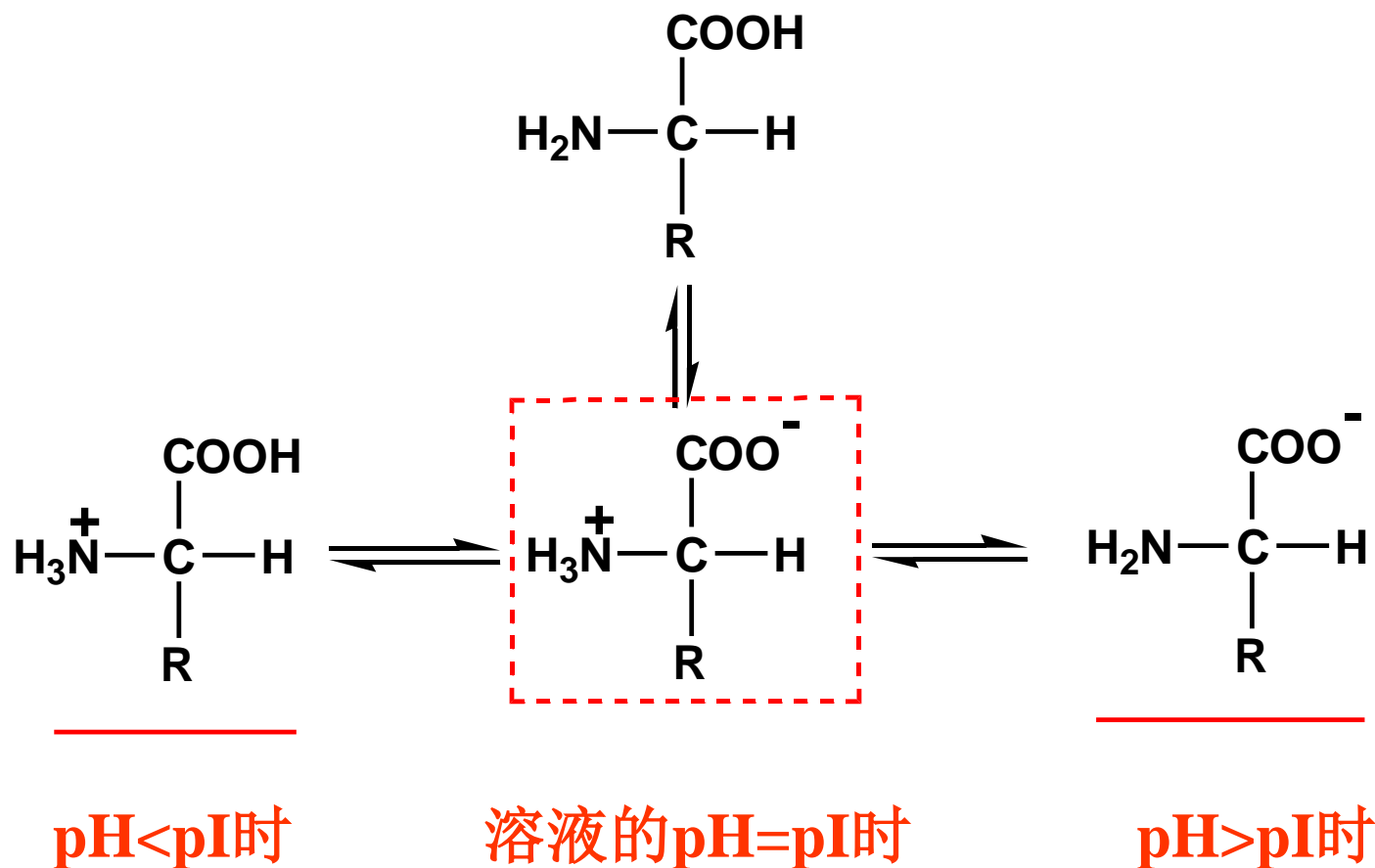
1. 两性电离和等电点 (isoelectric point, pI)

不同pH时氨基酸以不同的离子化形式存在：



氨基酸所带静电荷为“零”时，溶液的pH值称为该氨基酸的等电点 (isoelectric point)，以pI表示。

实验证明在等电点时，氨基酸主要以两性离子形式存在，但也有少量的而且数量相等的正、负离子形式，还有极少量的中性分子。



2. 紫外吸收性质

- 酪氨酸 $\lambda_{\max}=275\text{nm}$
- 苯丙氨酸 $\lambda_{\max}=257\text{nm}$
- 色氨酸 $\lambda_{\max}=280\text{nm}$

3. 呈色反应

茚三酮反应：



两个亚氨基酸——脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应形成黄色化合物。

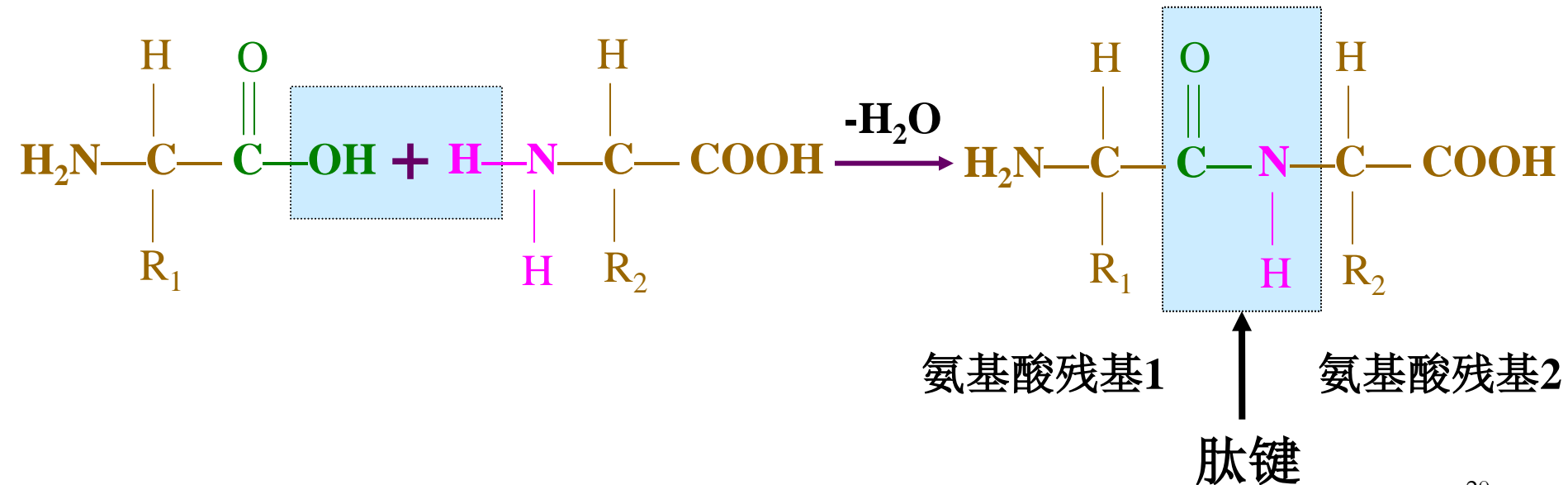
4. 其他反应

氨基酸的 α -氨基、 α -羧基及侧链R基
均可参加多种化学反应。

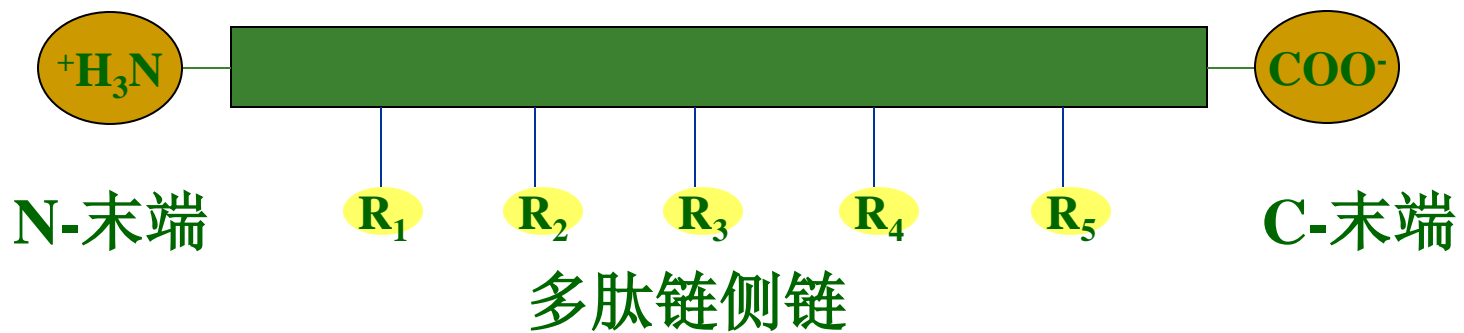
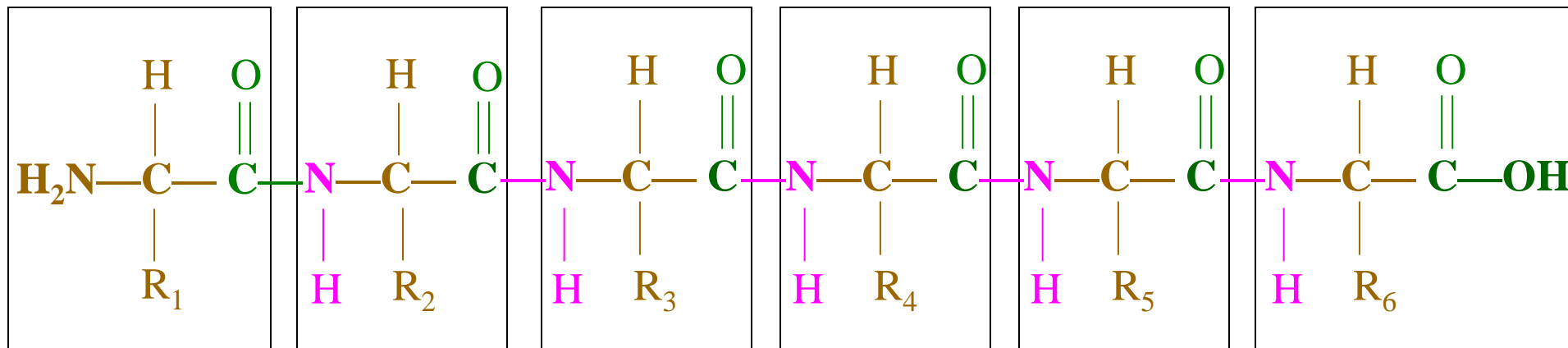
三、肽键和多肽链

(一) 肽与肽键

一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基之间失水形成的酰胺键称为**肽键**，所形成的化合物称为**肽**。



寡肽 < 10aa < 多肽



肽链书写方式：N端→C端

（二） 生物活性肽

谷胱甘肽（glutathione, GSH）

三肽（Glu—Cys—Gly），含有自由的巯基，具有很强的还原性，可作为体内重要的还原剂，保护某些蛋白质或酶分子中的巯基免遭氧化，使其处于活性状态。

分子中具有一个 γ -肽键

第三节 蛋白质的分子结构

一、一级结构 (*primary structure*)

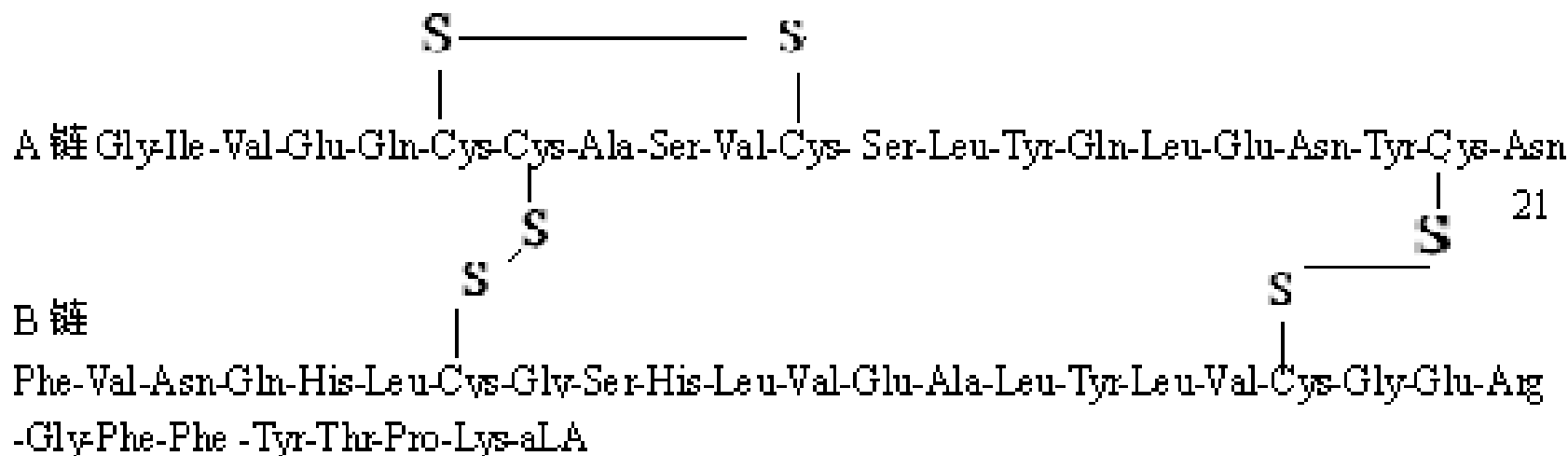
1. 定义

1969年，国际纯化学与应用化学委员会 (IUPAC) 规定：

蛋白质的一级结构指蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序，包括二硫键的位置。

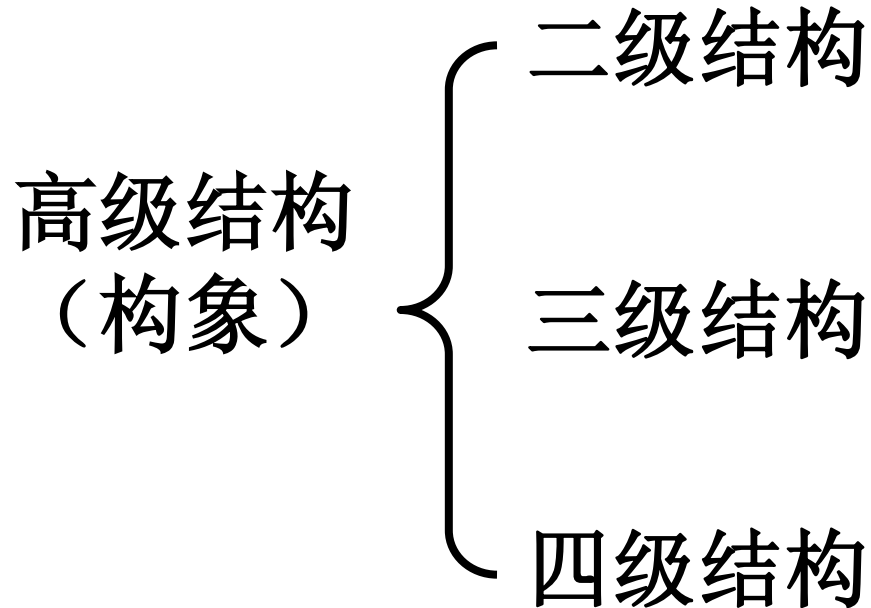
2. 一级结构的意义

最先由Sanger于1953年完成测定胰岛素一级结构



胰岛素是动物胰中胰岛 β 细胞分泌的一种分子量较小的激素蛋白，它的主要功能是降低体内血糖含量。临床上用来治疗糖尿病。

蛋白质的一级结构又称初级结构，二级结构、三级结构、四级结构的三度空间排列称蛋白质的空间结构、高级结构、三维结构或构象。



构象 (conformation)

主链构象：指多肽主链骨架上各原子的排列与相对关系



侧链构象：指各氨基酸残基侧链R基团中原子的排列及相互关系

二、二级结构 (secondary structure)

早在20世纪30年代，Pauling和Corey就开始用X射线衍射方法研究了氨基酸和肽的结构，他们得到了重要的结论：

肽键的键长介于C-N单键和双键之间，具有部分双键的性质，不能自由旋转。

(一) 肽单元 (peptide unit)

参与肽键的6个原子 $C_{\alpha 1}$ 、C、O、N、H、 $C_{\alpha 2}$ 被约束于一个平面上，此同一平面上的6个原子构成肽单元。

（二）二级结构的概念和种类

蛋白质的二级结构指多肽链本身通过氢键沿一定方向盘绕、折叠而形成的构象。

指蛋白质分子中某一段肽链的局部空间结构，也就是该段肽链主链骨架原子的相对空间位置。

它只涉及肽链主链的构象及链内或链间形成的氢键。(注:二级结构不涉及侧链的构象)

主要有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角、无规卷曲。

维持二级结构的化学键：氢键

1. α 螺旋 (α -helix)

1950年美国Pauling等人在研究纤维状蛋白质时，提出了 α 螺旋，后来发现在球状蛋白质分子中也存在 α 螺旋。

- (1) 右手螺旋，每圈含3.6个aa，螺距为0.54 nm
- (2) 链内氢键维持螺旋稳定
- (3) 侧链R分布在螺旋外侧

2. β 片层/ β 折叠 (β -sheet)

也是 Pauling 等人提出来的，它是与 α 螺旋完全不同的一种结构。

- (1) β 折叠主链骨架以一定的折叠形式形成一个折叠的片层。
- (2) 链间氢键维持稳定。
- (3) β 折叠有平行和反平行的两种形式
- (4) 侧链向片层上下伸出

3. β 转角 (β -turn)

也称 β 回折，存在于球状蛋白中。其特点是肽链回折 180° ，使得氨基酸残基的C=O和与第四个残基的N-H形成氢键。

β 转角都在蛋白质分子的表面。

4.无规卷曲或自由回转 (non-regular coil)

肽段在空间的不规则排布称为无规卷曲。

没有一定规律的松散肽链结构，但仍是有序的稳定结构。

超二级结构 (supersecondary structure)

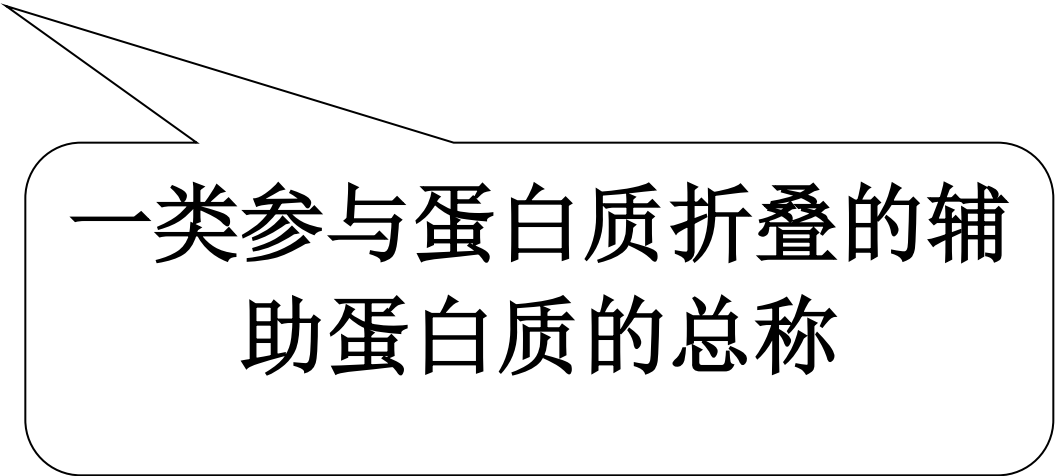
蛋白质中相邻的二级结构单位 (α 螺旋或 β 折叠或 β 转角) 组合在一起, 形成有规则的、在空间上能够辨认的二级结构组合体。

模体

在许多蛋白质分子中，2个或多个具有二级结构的肽段，在空间上相互接近，形成一个特殊的空间构象，并发挥专一的功能，被称为模体（**motif**）

影响二级结构形成的因素

- 一级结构是基础
- 需要分子伴侣（chaperon）



一类参与蛋白质折叠的辅助蛋白质的总称

三、三级结构（tertiary structure）

指整条肽链中全部氨基酸残基的相对空间位置，即整条肽链中所有原子在三维空间的排布位置。

三级结构的特征：

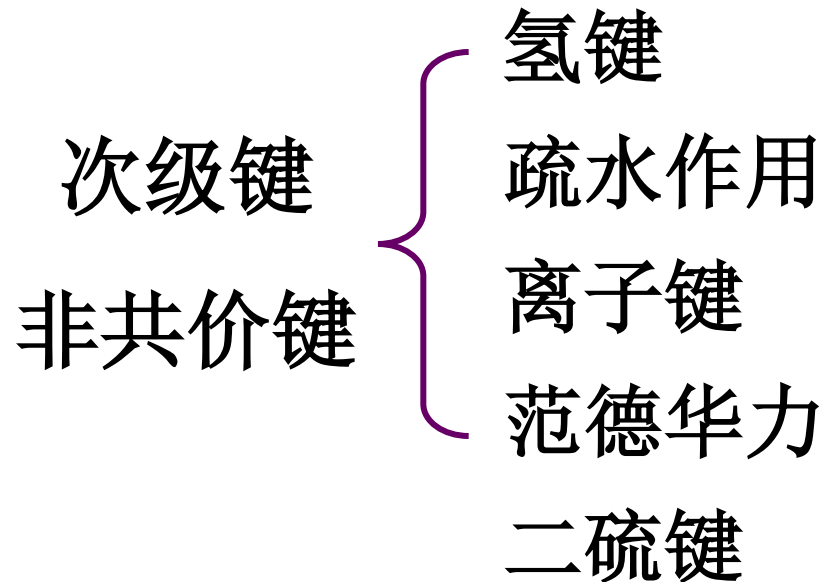
- 含多种二级结构单元；
- 有明显的折叠层次；
- 是紧密的球状或椭球状实体；
- 分子表面有一空穴(活性部位)；
- 疏水侧链埋藏在分子内部，
- 亲水侧链暴露在分子表面。

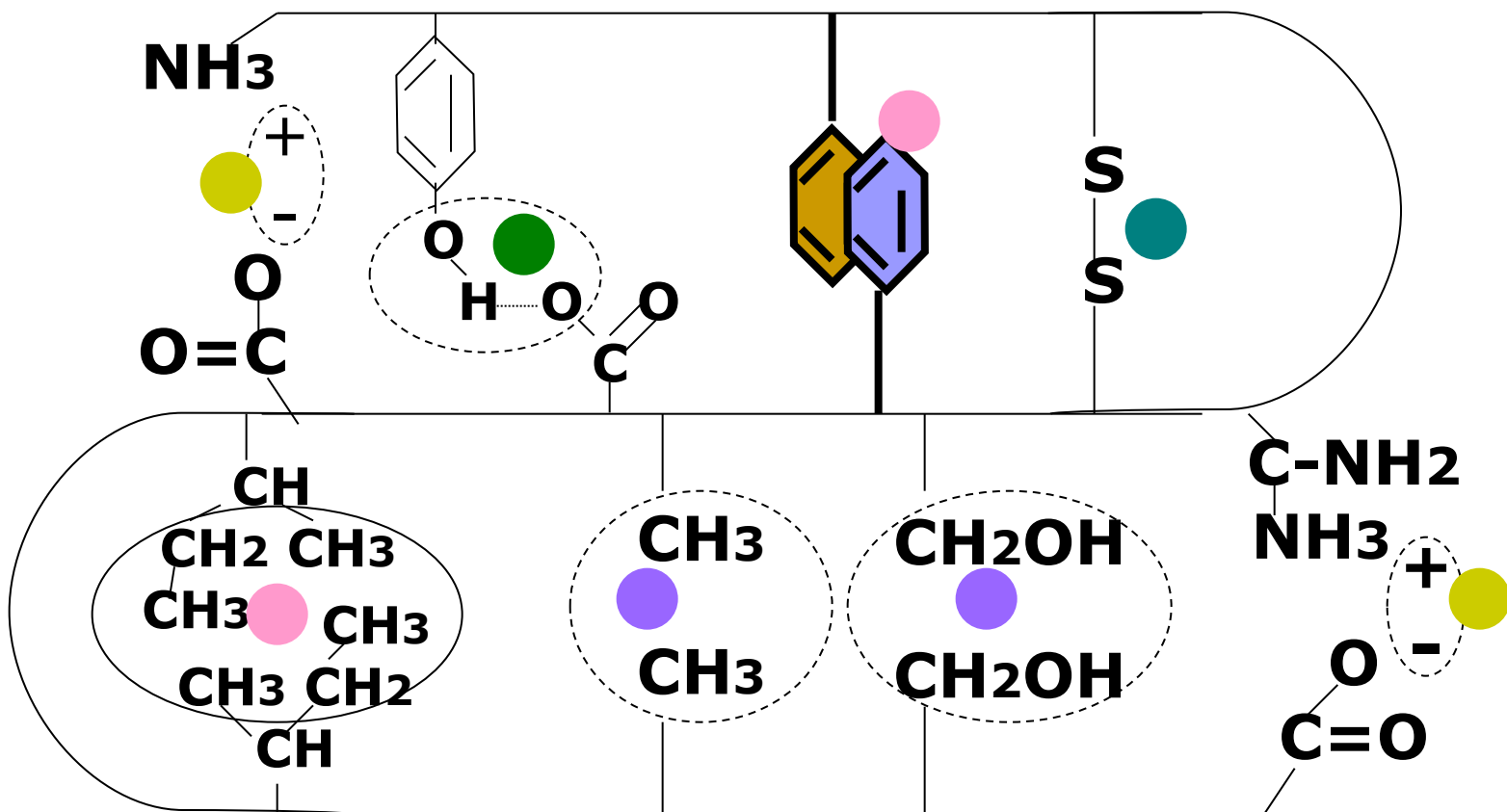
实例：肌红蛋白

结构域(domain)

对于较大的蛋白质分子，多肽链往往由两个或两个以上相对独立的三维实体缔合而成三级结构，这种相对独立的三维实体称结构域。

维持三级结构的化学键





● 离子键; ● 氢键; ● 疏水力; ● 范德华力; ● 二硫键

四、四级结构 (quaternary structure)

四级结构是指由两个或两个以上具有三级结构的多肽链按一定方式聚合而成的特定构象的蛋白质分子。其中每条多肽链称为亚基。

- 亚基单独存在时无生物学活性。
- 一般来说具有四级结构的蛋白属于寡聚蛋白。
- 维持构象的化学键：氢键、离子键、疏水作用

一级结构 氨基酸残基排列顺序

二级结构 局部主链骨架的折叠

三级结构 所有原子的排列
完整的三维结构

四级结构 亚基的排列方式

第四节 蛋白质结构与功能的关系

一、一级结构与功能

（一）一级结构是空间结构的基础

例：牛胰核糖核酸酶A（RNase A）的变性与复性

(二) 相似结构表现相似功能 不同结构具有不同功能

胰岛素

	A6	B30
人	Ser	Thr
猪	Ser	Ala
牛	Gly	Ala

(三) 一级结构的改变与分子病

镰状细胞贫血：

Hb-A（正常人）： Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys

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

β-链	1	2	3	4	5	6	7	8
-----	---	---	---	---	---	---	---	---

由于基因突变导致其编码蛋白质的氨基酸序列异常，进而引起生物学功能改变的遗传性疾病称为分子病

二、蛋白质空间结构与功能

(一) 血红蛋白与氧结合

(二) 别构效应

别构效应：又称变构效应，是指寡聚蛋白与配基结合，改变蛋白质构象，导致蛋白质生物活性改变的现象，它是细胞内最简单的调节方式。

血红蛋白的别构效应

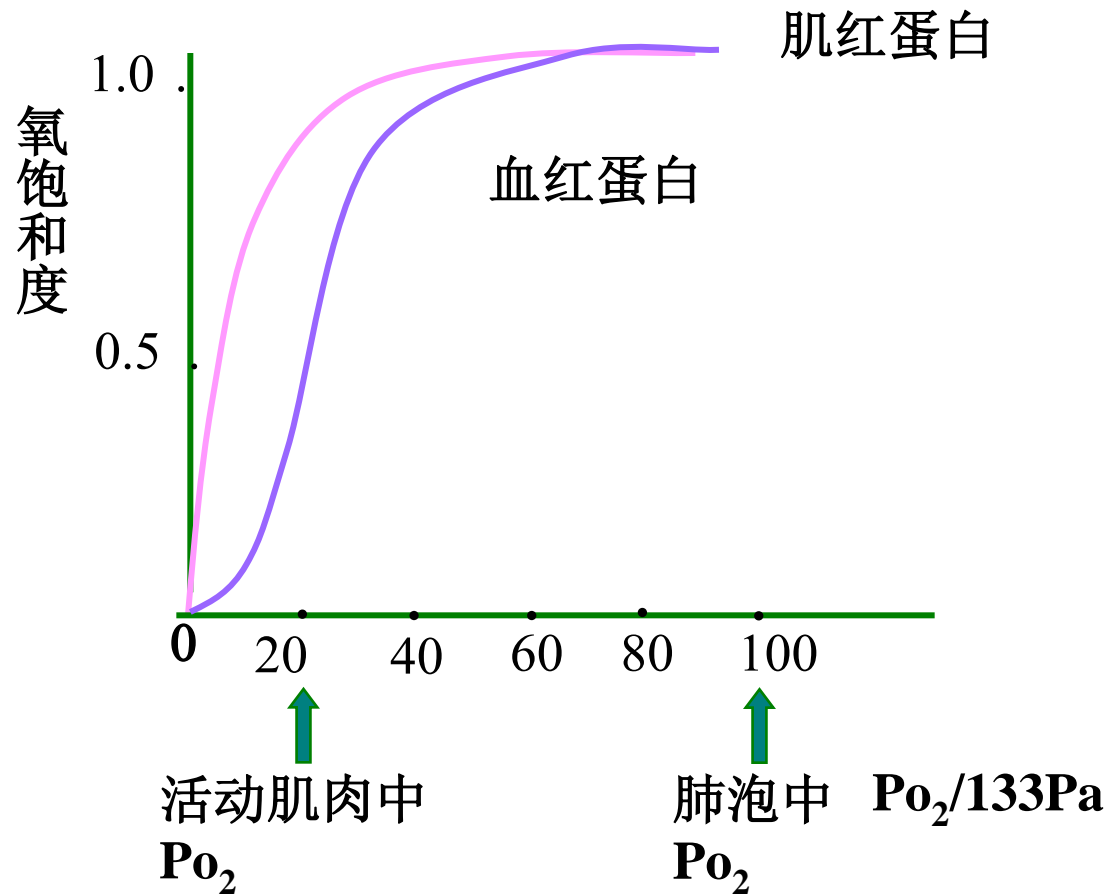
- 一个亚基与氧结合后，引起该亚基构象改变
- 进而引起另三个亚基的构象改变
- 整个分子构象改变
- 与氧的结合能力增加

蛋白质的一个亚基与配体结合后构象发生改变，引起其他亚基乃至整个分子构象发生改变，影响其他亚基与配体的结合能力，这种现象称为亚基间的协同效应（**cooperativity**）

正协同效应

负协同效应

肌红蛋白与血红蛋白：两者三级结构相似



(三) 构象改变与疾病

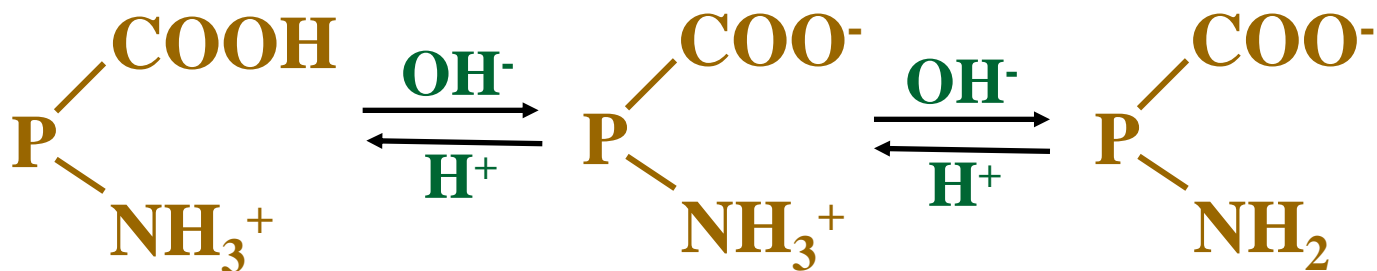
疯牛病：

朊病毒蛋白

(**prion protein, PrP**)

第五节 蛋白质的理化性质 及其分离纯化

一、两性解离和等电点



阳离子

两性离子

阴离子

($\text{pH} < \text{pI}$)

($\text{pH} = \text{pI}$)

($\text{pH} > \text{pI}$)

蛋白质的等电点（ pI ）

使蛋白质所带正负电荷相等时的溶液
 pH 值。

蛋白质为两性离子，所带净电荷为零

等电点沉淀蛋白质

——在等电点时，蛋白质的溶解度最小。

电泳

——带电粒子在电场中移动的现象，是分离蛋白质的一种方法。

二、高分子性质

分子量_大

在水溶液中形成胶体

不能透过半透膜

——透析

蛋白质胶体性质的应用

由于胶体溶液中的蛋白质不能通过半透膜，因此可以应用透析法将非蛋白的小分子杂质除去。

透析法：以半透膜提纯蛋白质的方法叫透析法

半透膜：只允许溶剂小分子通过，而溶质大分子不能通过，如羊皮纸、火棉胶、玻璃纸等。

三、蛋白质的变性(denaturation)

(一) 蛋白质的变性定义

天然蛋白质因受物理、化学因素的影响，使蛋白质分子的构象发生了异常变化，从而导致生物活性的丧失以及物理、化学性质的异常变化。但一级结构未遭破坏，这种现象称为蛋白质的变性。

(二) 引起蛋白质变性的主要因素

1.物理因素:

加热、高压、紫外线照射、X射线、超声波、剧烈振荡和搅拌等

2.化学因素:

强酸、强碱、脲、去污剂[十二烷基硫酸钠(SDS)]、重金属盐、三氯醋酸、浓乙醇等。

(三) 蛋白质的变性后的表现

生物活性丧失；溶解度降低，对于球状蛋白黏度增加；光吸收系数增大；生物化学性质改变。
组分和分子量不变。

（四）蛋白质变性的本质

分子中各种次级键断裂，使其空间构象从紧密有序的状态变成松散无序的状态，一级结构不破坏。

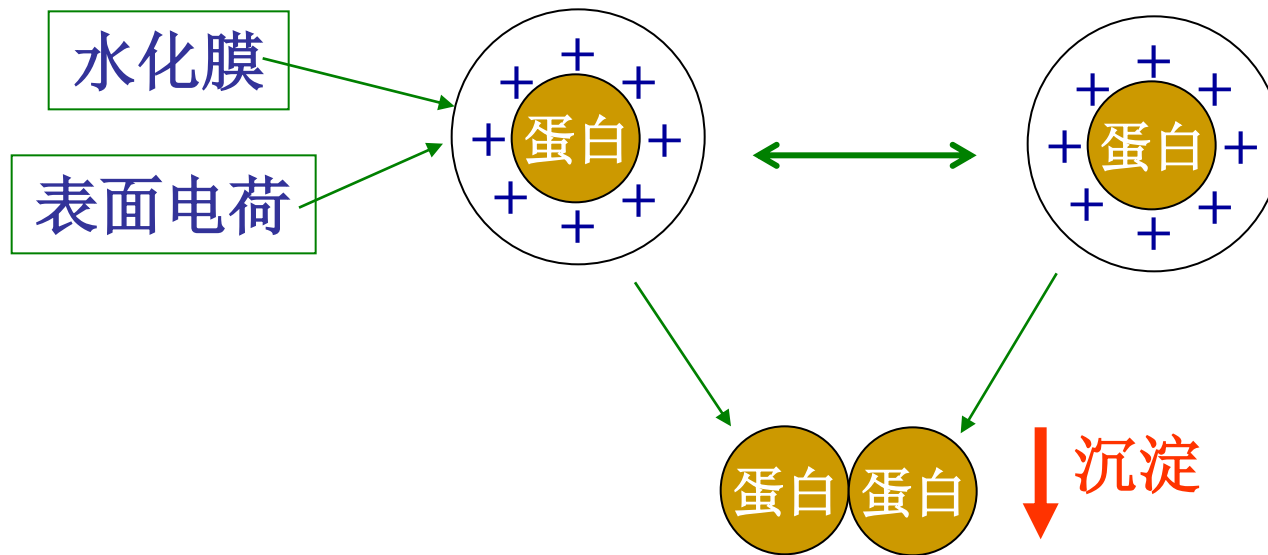
变性后的蛋白质在结构上虽有改变，但组成成分和分子量不变。

四、蛋白质的沉淀

蛋白质亲水胶体稳定的因素：

水化膜：吸附水分子而形成

表面电荷：同种电荷互相排斥



蛋白质沉淀的原理：

破坏水化膜

中和电性

可逆沉淀
(不变性)

盐析：破坏蛋白质的水化膜，中和表面电荷
常用硫酸铵、氯化钠、硫酸钠等

等电点沉淀：破坏蛋白质表面净电荷
常用乙醇、丙酮等

有机溶剂沉淀法（低温）：破坏蛋白质的水化膜

不可逆沉淀
(变性)

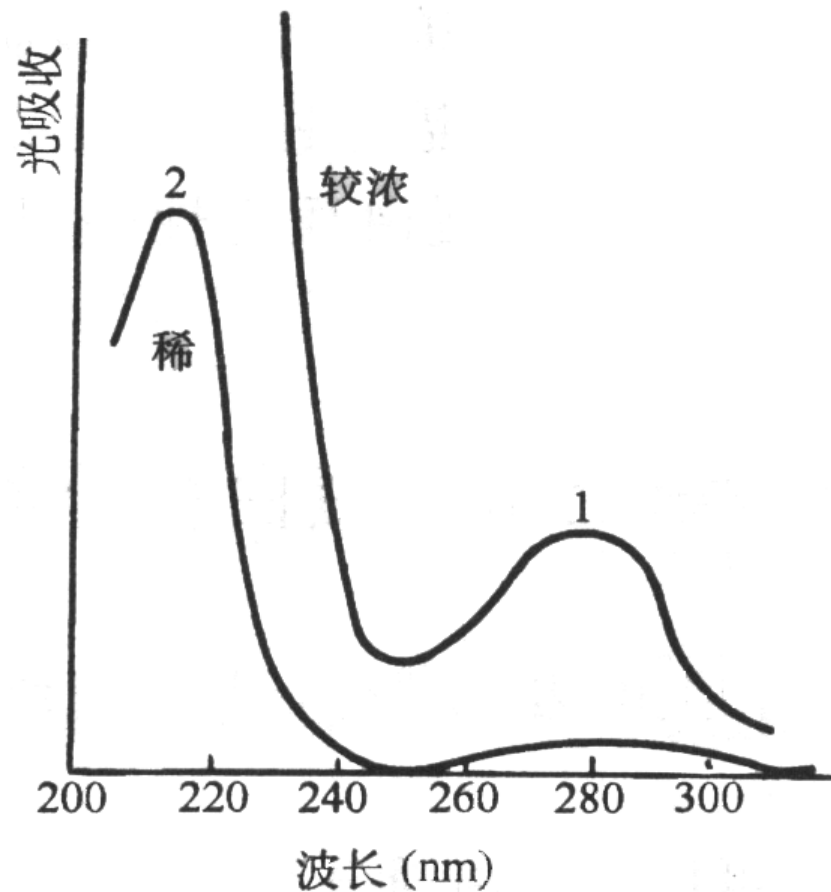
重金属盐沉淀(条件：pH 稍大于pI)：与蛋白质中带负电基团形成不易溶解的盐,或改变蛋白质的空间结构，如 Hg^{2+} 、 Ag^{+} 、 Pb^{+} 。

生物碱试剂沉淀法（条件：pH稍小于pI）：与蛋白质中带正电荷的基团生成不溶性盐，如苦味酸、钼酸、钨酸等

加热变性沉淀法：如煮鸡蛋

五、紫外吸收特性

蛋白质在远紫外光区（200~230nm）有较大的吸收，在**280nm**有一特征吸收峰，可利用这一特性对蛋白质进行定性定量鉴定。



六、蛋白质的呈色反应

- 茚三酮反应
- 双缩脲反应
- **Folin-酚反应**
- 考马斯亮蓝反应

蛋白质分离纯化的常见方法

1. 根据分子大小分
 - 透析或超滤
 - 离心沉淀
 - 沉降平衡离心法
 - 沉降速度离心法
 - 凝胶过滤层析
2. 根据溶解度分
 - 等电点沉淀
 - 盐析（常用硫酸铵）
 - 有机溶剂沉淀
3. 根据电离性质分
 - 电泳
 - 离子交换层析
4. 特异亲和力：亲和层析

第六节

蛋白质的一级结构测定

一、样品的纯度要求：

杂蛋白不应超过5%

二、氨基酸组成分析：

分析每条肽链中氨基酸的种类和数目

三、多肽链的末端分析和序列测定：

通过末端残基的确定可估计蛋白质中的肽链数目

四、二硫键的拆开：

用变性剂拆开链间和链内二硫键

五、肽链的部分水解：

将很长的肽链切割成适合于作序列分析的足够小的片段

六、完整多肽链顺序的确定：

用肽段重叠法确定整个肽链的氨基酸排列顺序

七、二硫键的定位：

氨基酸序列分析完成后，还需另加确定二硫键位置的实验步骤

思考题：

- 1.组成蛋白质的元素有哪几种？其中哪一种的含量可以表示蛋白质的相对含量？
- 2.何为氨基酸的等电点？酸性和碱性氨基酸的等电点如何计算？
- 3.何为肽键、肽链？自然界中有哪些生物活性肽？生理功能如何？
- 4.什么是蛋白质的一级结构？其维系键是什么？
- 5.什么是蛋白质的二级结构？它主要有哪几种？各有何结构特征？

6.举例说明蛋白质的一级结构、空间结构与功能的关系。

7.蛋白质的分离纯化常见方法有哪几种？

8.何为蛋白质变性？变性蛋白有何特征？

9.何为蛋白质沉淀？常用的沉淀方法有哪几种？
变性与沉淀的关系如何？

10.解释下列名词：**isoelectric point; motif; domain; subunit; allosteric effect; protein denaturation; molecular disease**