

第三节 蛋白质分子的结构

北京化工大学
王炳武

蛋白质结构的研究内容

- * 由哪些氨基酸组成?
- * 各种氨基酸的含量?
- * 氨基酸之间如何连接?
- * 不同氨基酸的排列顺序如何?
- * 氨基酸长链的空间形状如何?

北京化工大学
王炳武

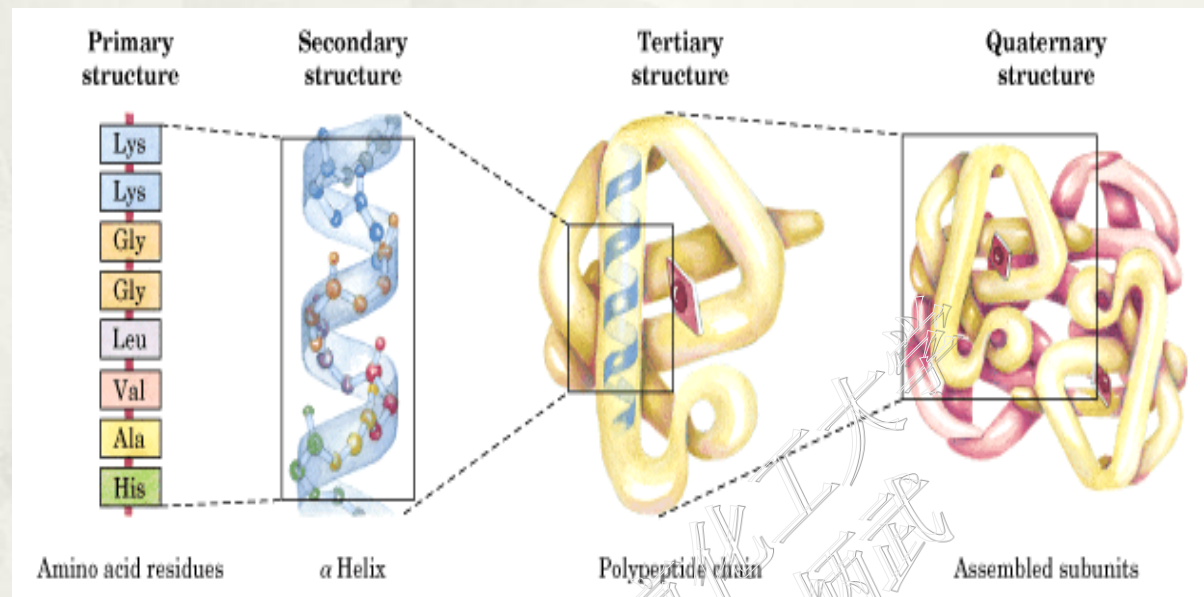
练习

- * 某多肽链分子量为6000，完全水解10g样品得到0.46g丙氨酸
- * 求该多肽链中丙氨酸残基的个数
- * 已知丙氨酸的分子量为89。

北京化工大学
王炳武

蛋白质的结构层次

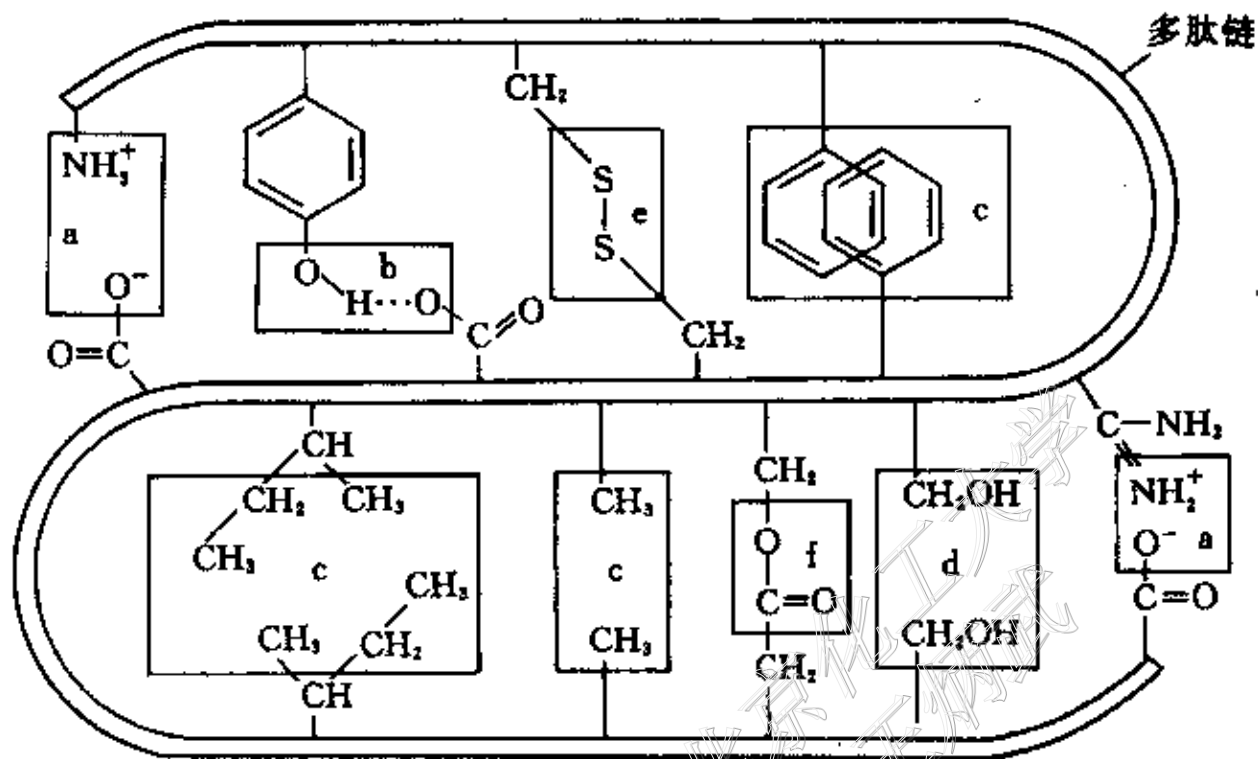
- * 一级结构
- * 二级结构
- * 超二级结构
- * 结构域
- * 三级结构
- * 四级结构



维持各级结构的主要作用力不同

一、维持蛋白质构象的作用力

- 二硫键
- 离子键
- 氢键
- 范德华力
- 疏水作用



子

图 1-13 蛋白质分子中的化学键

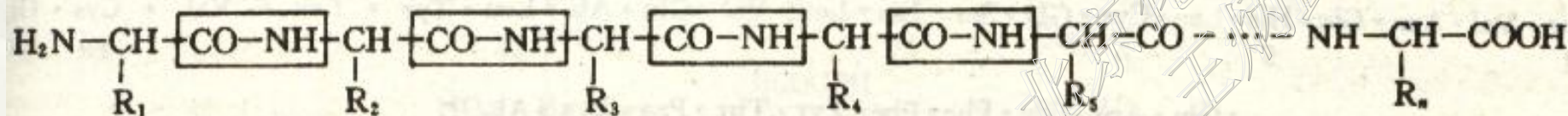
a 离子间的盐键；b 极性基间的氢键；c 非极性基间的相互作用力（疏水键）；

链

d 范德华力；e 二硫键；f 酯键；e f 为共价键

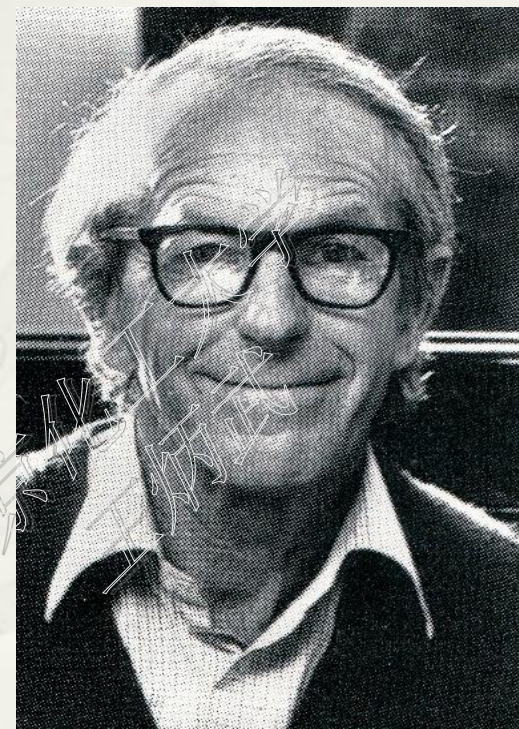
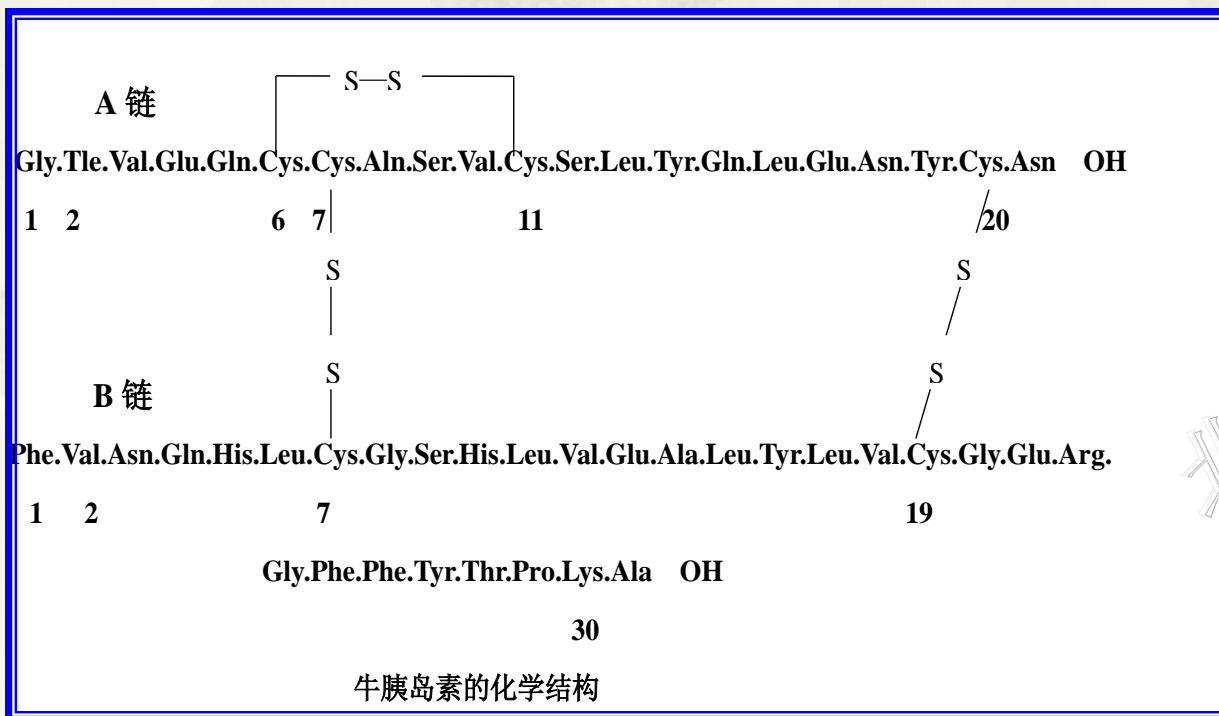
二、蛋白质的一级结构 primary structure

- * 蛋白质多肽链中氨基酸残基的排列顺序，也称为蛋白质的氨基酸序列
- * 一级结构由遗传密码排列顺序决定
- * 肽键是构成一级结构的主要作用力。
- * 左N右C



背景资料：氨基酸序列测定的第一人

- * 英国化学家桑格 F.Sanger
- * 1958年诺贝尔化学奖
- * 牛胰岛素 (1945~1955)



三、蛋白质的三维构象

- * 高级结构

- * 二级结构 secondary structure

- * 超二级结构 supersecondary structure

- * 结构域 domain

- * 三级结构 tertiary structure

- * 四级结构 quaternary structure

北京化工大学
王炳武

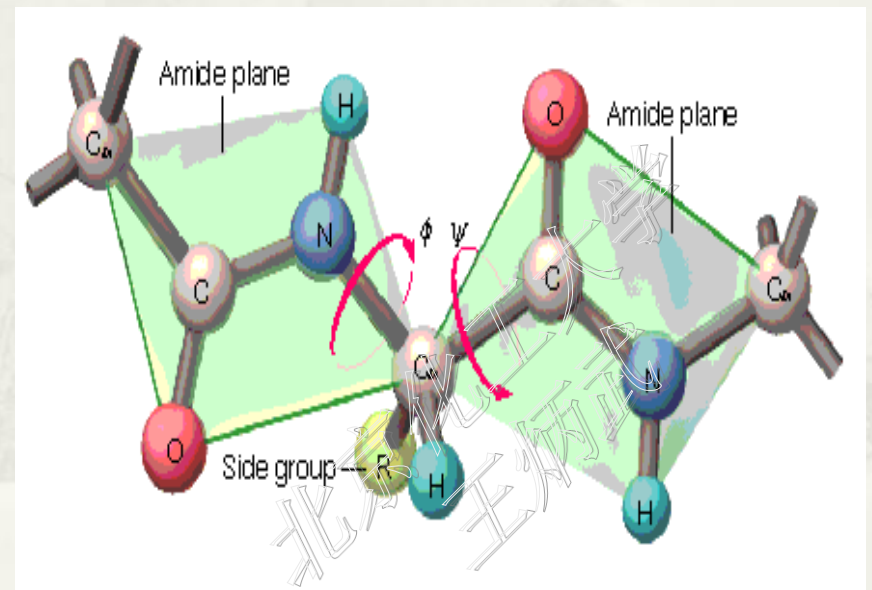
1、二级结构

- * 蛋白质多肽链借助氢键排列成沿着某个方向具有周期性结构的构象
- * 仅限于多肽链主链原子的相对空间位置，不涉及侧链部分
- * 氢键

北京化工大学
王炳武

肽平面

- * 构成肽平面的各个原子的键长、键角在蛋白质构象中恒定不变。



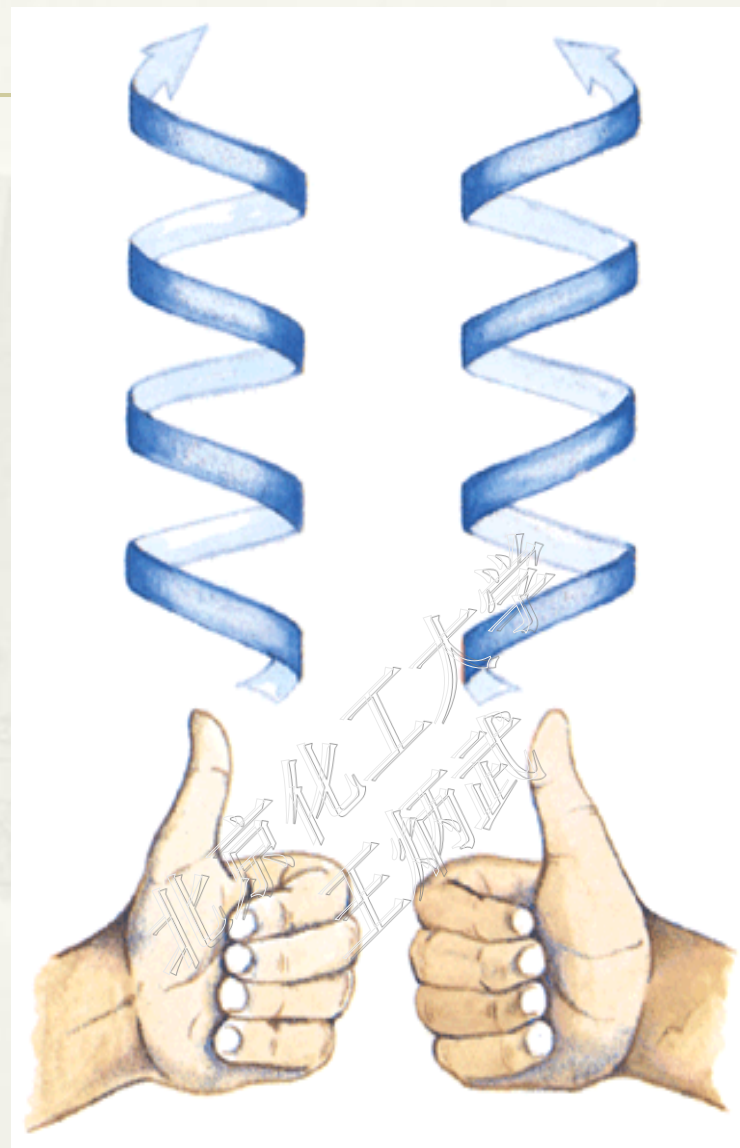
二级结构的种类

- * α -螺旋
- * β -折叠
- * β -转角
- * 自由回转

北京化工大学
王炳武

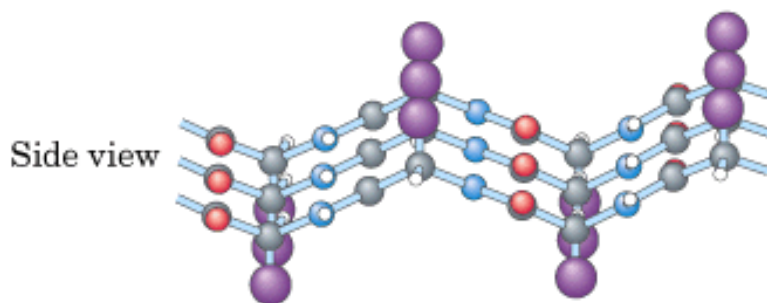
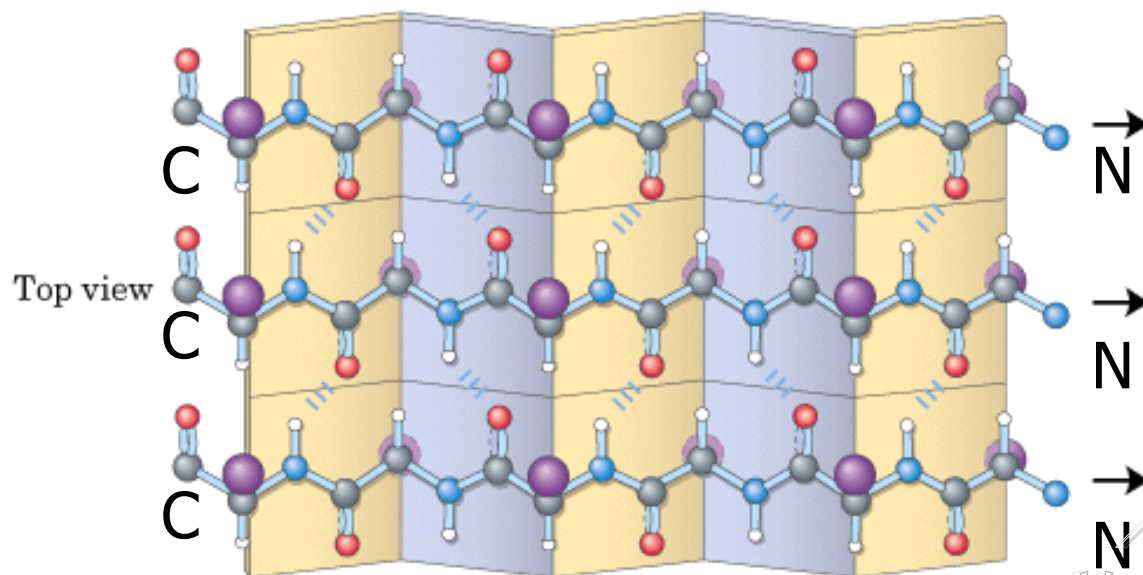
① α -螺旋

- * L. Pauling, α -角蛋白
- * 绝大多数为右手螺旋
- * 结构要点
 - * 每3.6个氨基酸残基螺旋上升一圈；
 - * 螺距为0.54nm；
 - * 氨基酸残基侧链伸向外侧，相邻螺圈之间形成氢键，氢键基本与中心轴平行
- * $S_N: 3.6_{13}$



② β - 折叠 (平行式)

(b) Parallel

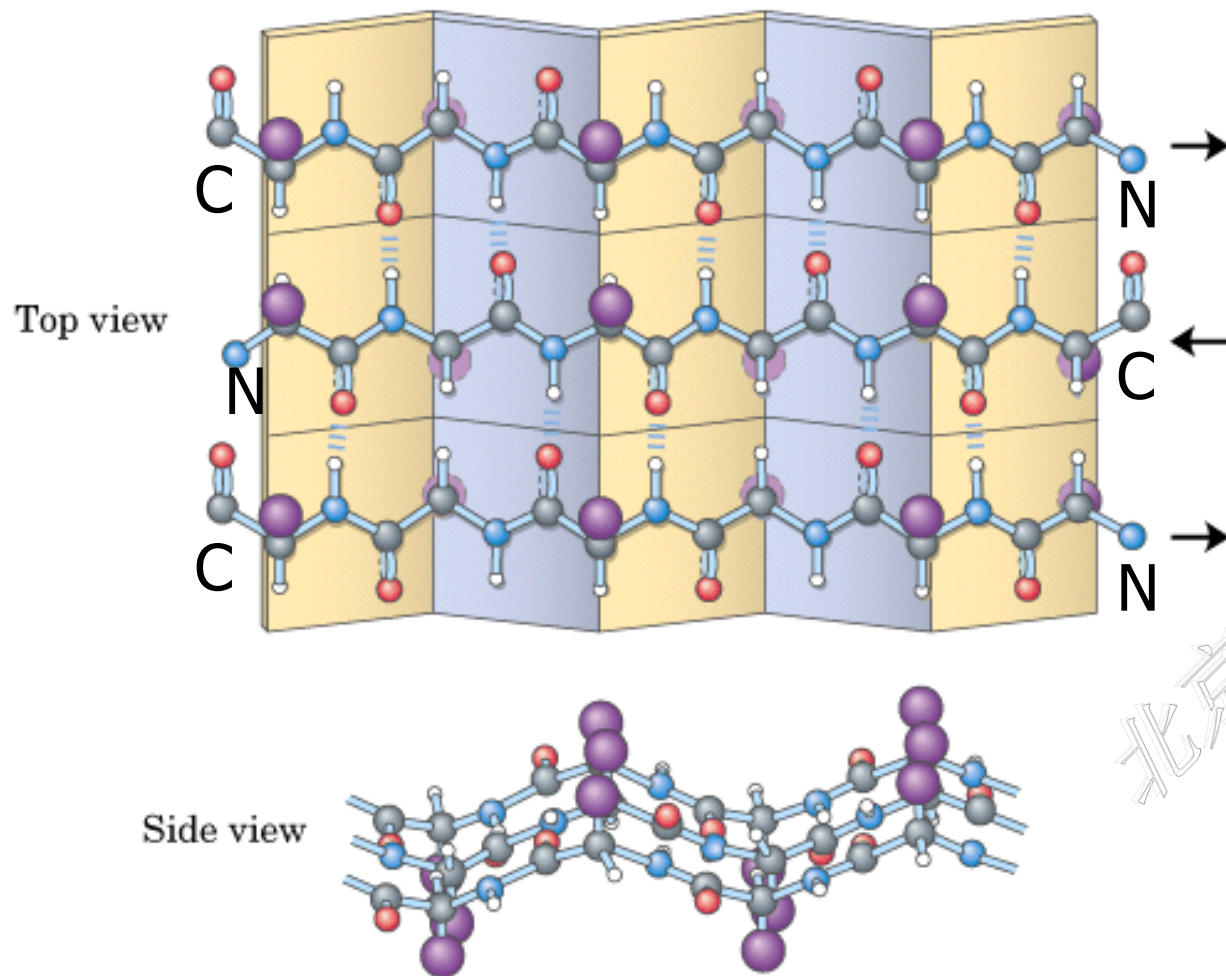


- * 相邻的两条肽链之间
- * 氢键倾斜

北京化工大学
王炳武

β - 折叠 (反平行式)

(a) Antiparallel

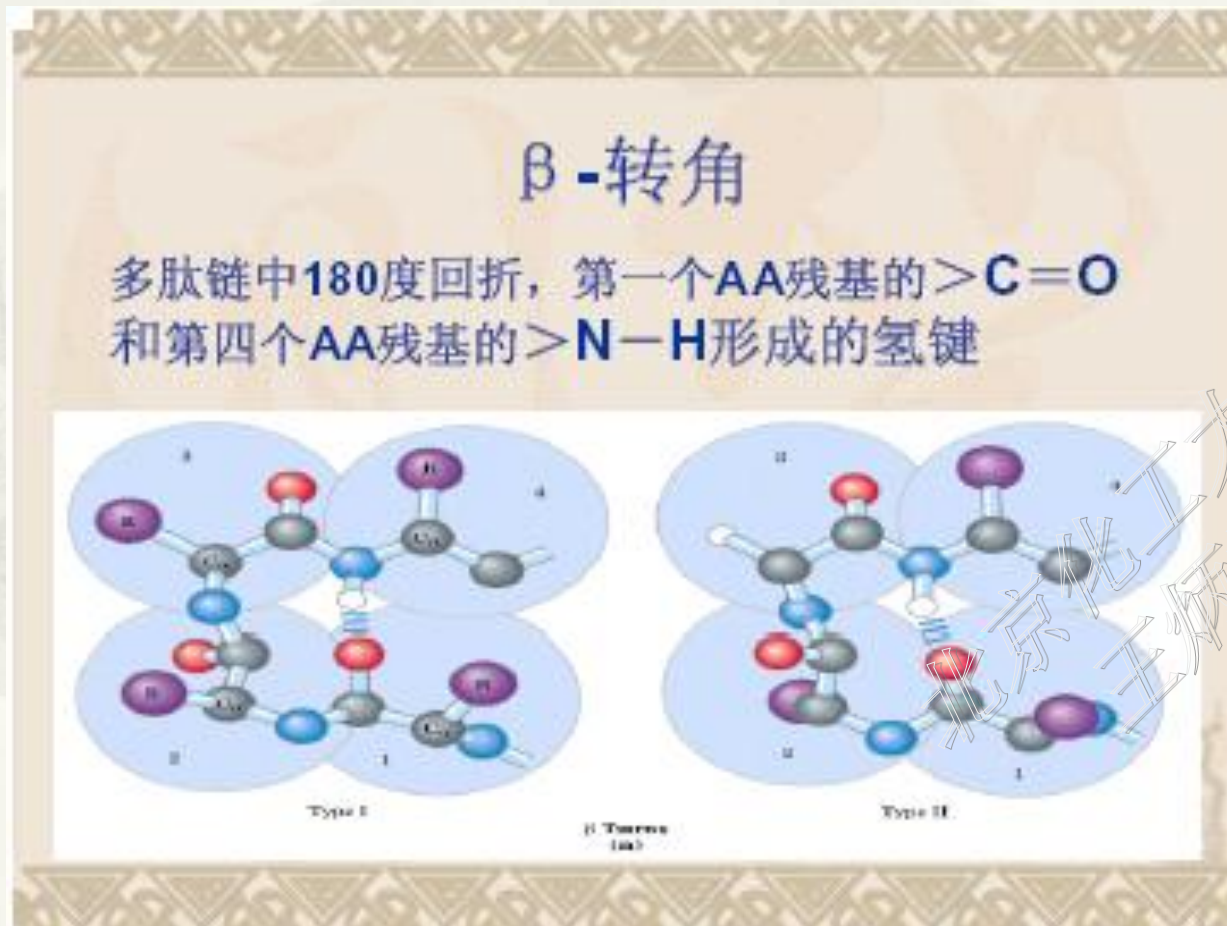


- * 氢键垂直
- * 更稳定

北京化工大学
王炳武

* ③ β - 转角

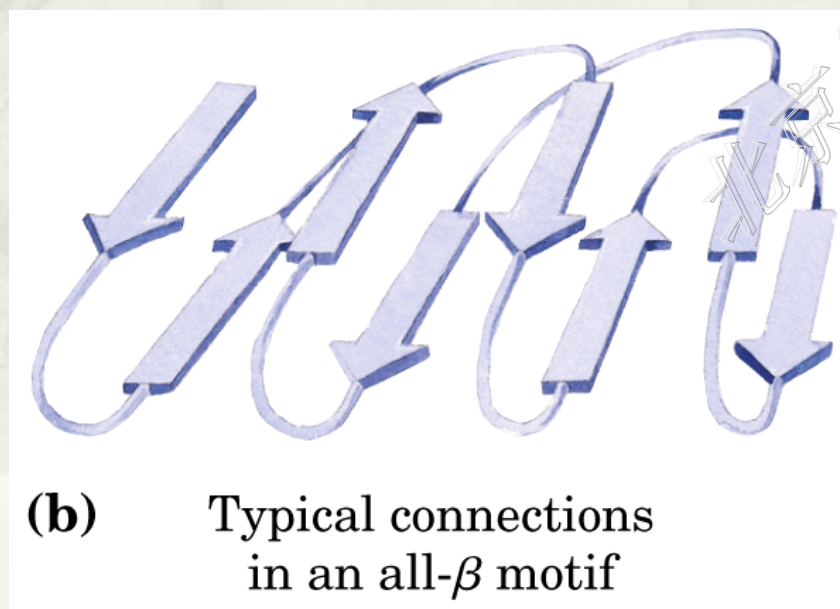
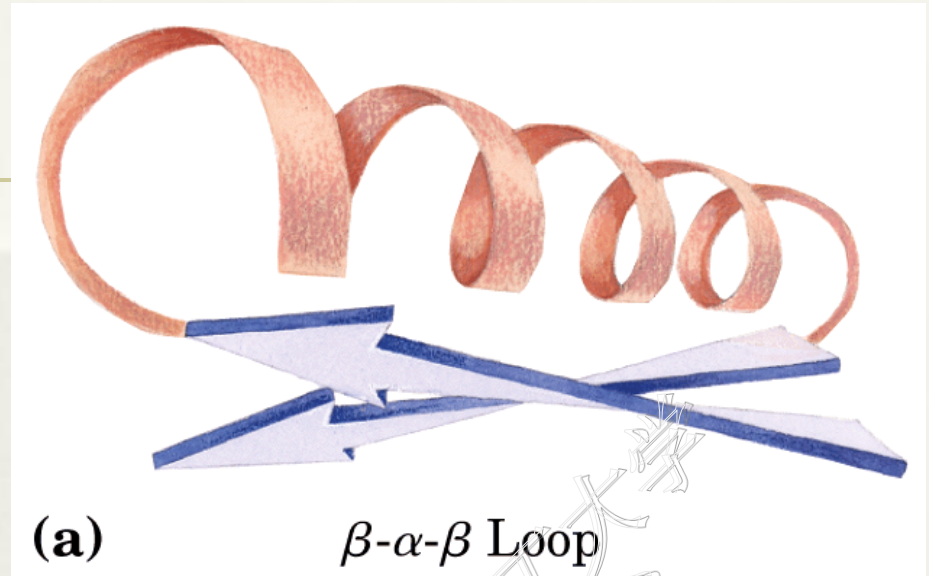
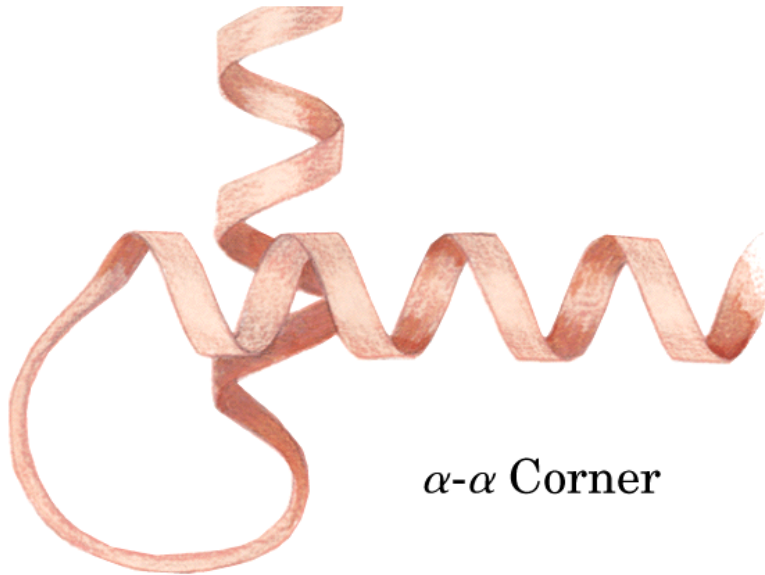
* ④ 自由回转：无规律的松散结构



2、超二级结构

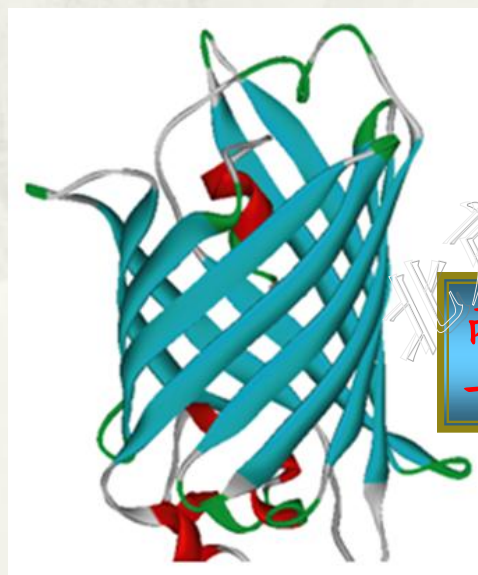
- * 二级结构和三级结构的过渡层次
- * 肽链上若干相邻的二级结构彼此相互作用，形成有规则的二级结构组合体；
- * 不具有生物学功能；
- * 组合方式： $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 、 $\beta\beta\beta$

北京化工大学
王炳武



3、结构域

- * 部分多肽链在超二级结构基础上进一步缠绕折叠形成紧密的近似球状的结构
- * 每个结构域自身紧密装配，但结构域之间的联系比较松散；
- * 结构域是蛋白质三级结构的基本单元，具有部分的生物学功能



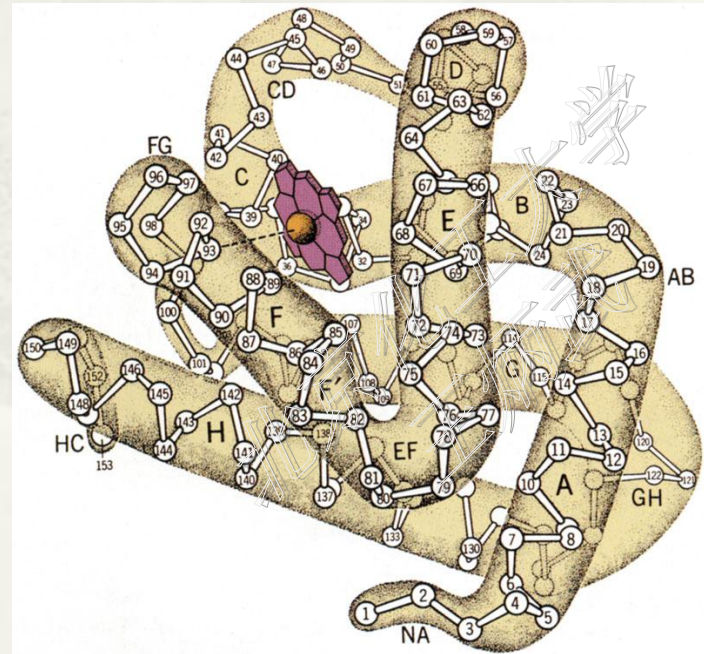
丙酮酸激酶的一个结构域

4、三级结构

- * 由于侧链基团的相互作用，多肽链在二级结构的基础上进一步折叠、卷曲构成的空间构象，使整个分子成为球状或者颗粒状
- * 三级结构包括多肽链上所有原子（包括主链和残基侧链）在三维空间的分布
- * 维持三级结构的主要作用力为疏水作用，其次为氢键、离子键、范德华力

鲸肌红蛋白

- * 英国剑桥大学的John Kendrew等人
- * 153个残基分成8段长度为7~24个氨基酸残基组成的 α 螺旋区，各区之间通过1~8个松散的残基相连
- * 内部疏水，外部亲水

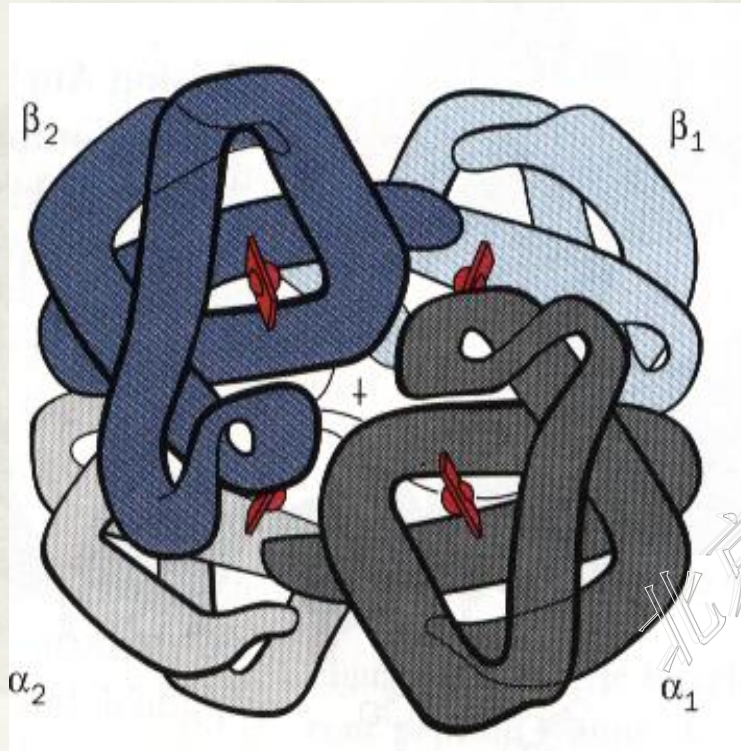


5、四级结构

- * 分子量大的蛋白质通常由多条多肽链组成，肽链间通过次级键连接，这种多肽链称为亚基subunit；
- * 四级结构是指由两条或者两条以上的具有三级结构的多肽链通过次级键聚合而成的特定空间结构
- * 亚基间的相互作用、立体排布；
- * 维持四级结构的作用力主要为疏水作用，其次为氢键、离子键、范德华力；

马血红蛋白

- * 英国剑桥大学Max Perutz经23年研究于1959年提出



小结

- ✓ 维系一级结构主要作用力：肽键、二硫键
- ✓ 维系二级结构主要作用力：氢键
- ✓ 维系三级、四级结构主要作用力：疏水作用力

- 氢键、范德华力、疏水作用力、盐键，均为次级键
- 氢键、范德华力键能虽小，但数量多
- 二硫键对稳定蛋白质构象很重要，二硫键越多，蛋白质分子构象越稳定（如角蛋白）

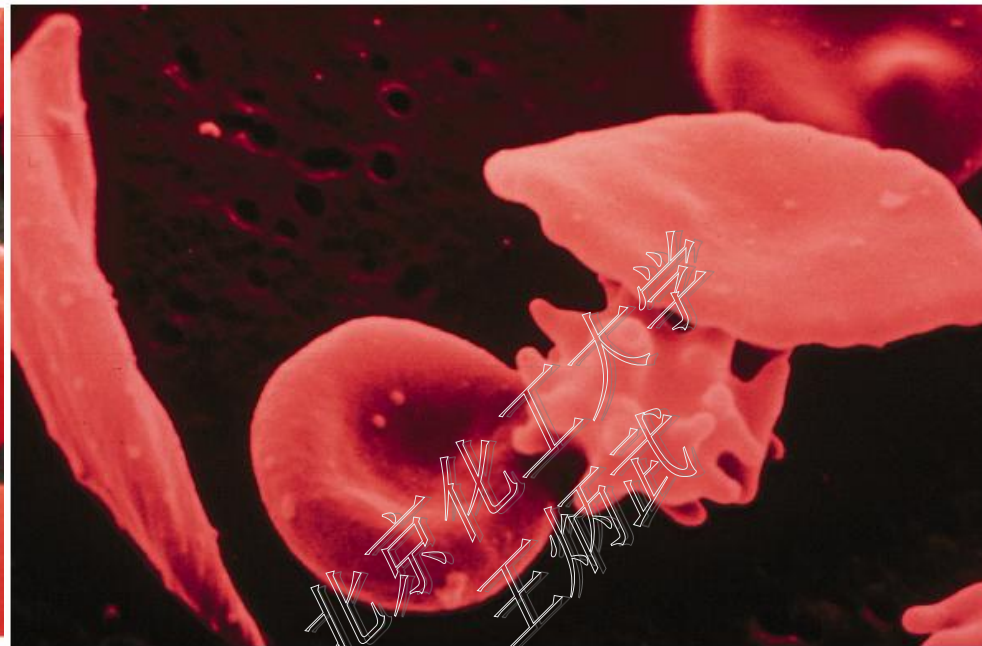
四、结构与功能的关系

* 镰刀型红细胞贫血症



(a)

2 μm



(b)

产生原因

- * 一级结构中带负电荷的Glu变为疏水性的Val，使血红蛋白分子表面的负电荷减少，亲水基团变为疏水基团，导致HbS分子聚合，溶解度降低，红细胞变形，呈镰刀状，并易于破裂溶血

β -链 N 端氨基酸排列顺序

Hb-A

1 2 3 4 5 6 7 8 ...
Val • His • Leu • Thr • Pro • Glu • Glu • Lys ...

Hb-S

Val • His • Leu • Thr • Pro • Val • Glu • Lys ...

- * 蛋白质的一级结构决定其高级结构，高级结构决定蛋白质的生物学功能。

2、角蛋白

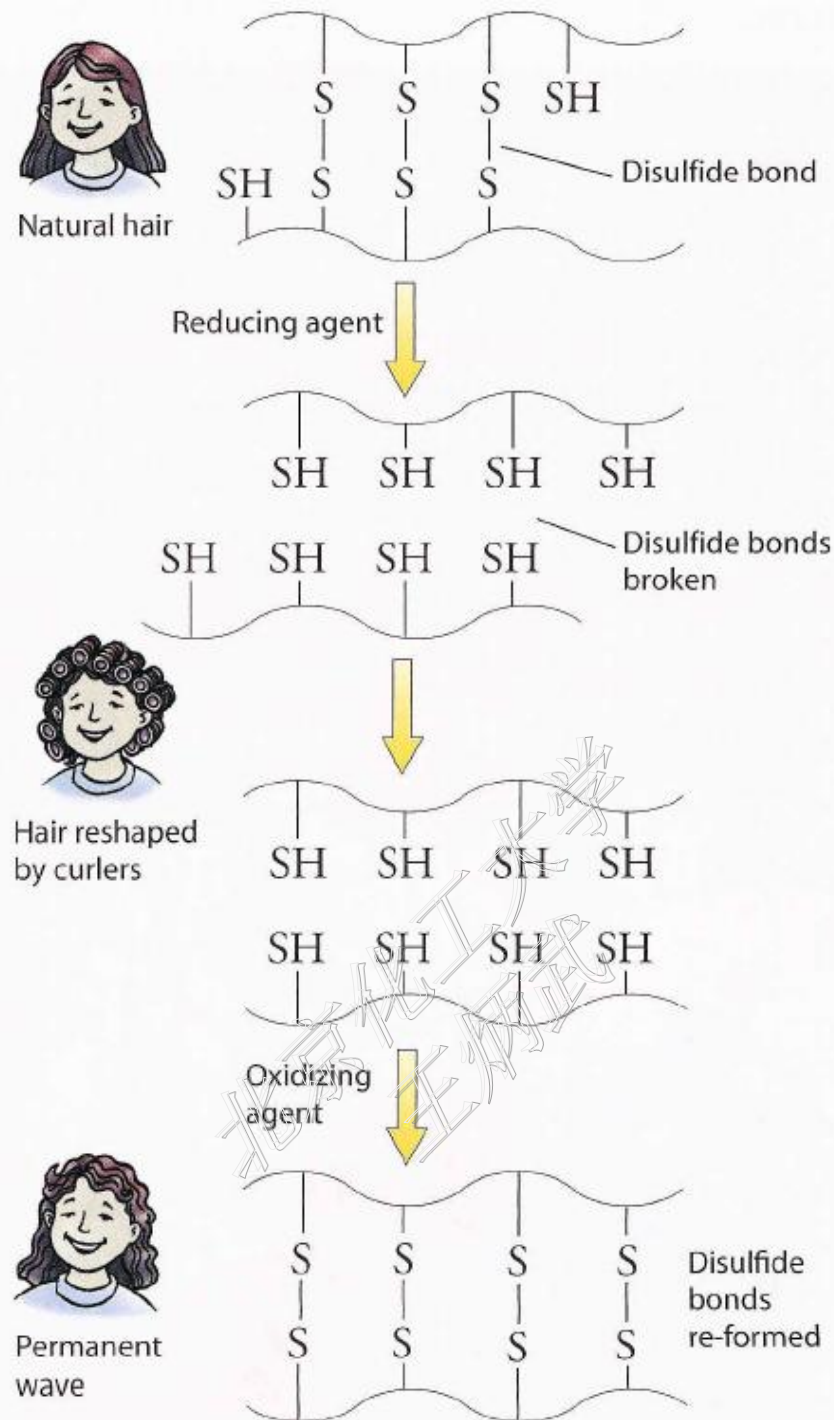
* α -角蛋白

* 毛、发、羽毛、指甲

* 湿热和外力拉直

* β -角蛋白

* 蜘蛛丝、蚕丝



第四节 蛋白质一级结构测定

北京化工大学
王炳武

蛋白质序列分析的意义

- * 研究蛋白质结构和功能的关系
 - * 人类血红蛋白变种有300多种,有些变种严重影响分子的携氧的能力,进行序列分析有助于说明血红蛋白的结构与功能差异
- * 寻找基因
 - * 根据蛋白质序列可以反推DNA序列,有助于确定基因和克隆基因

北京化工大学
王炳武

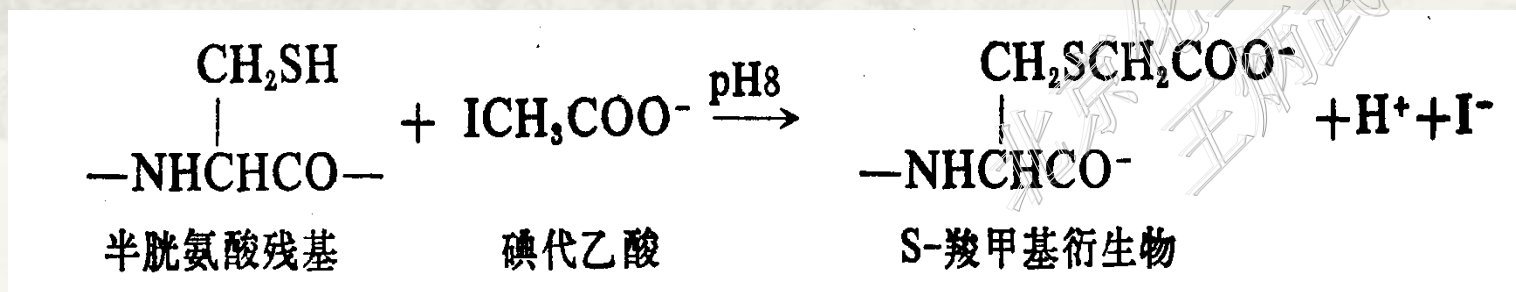
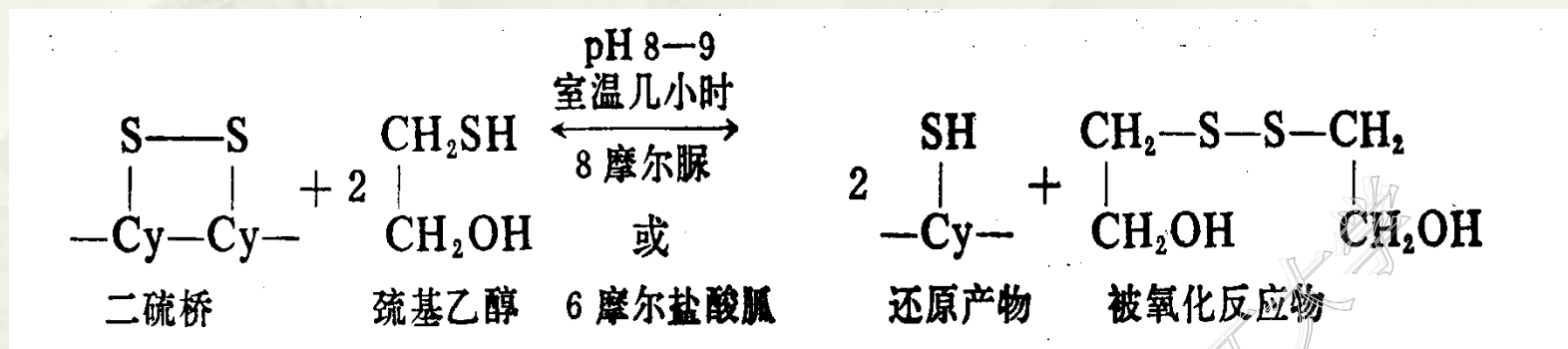
一、一级结构的研究方法

- * 1、多肽链的拆分，获得单一多肽链
- * 非共价交联
 - * 酸、碱、高浓度的盐、变性剂处理
 - * 8mol/L尿素或6mol/L盐酸胍
- * 通过链间二硫键交联或者存在链内二硫键
 - * 氧化或者还原二硫键使其断开

北京化工大学
王炳武

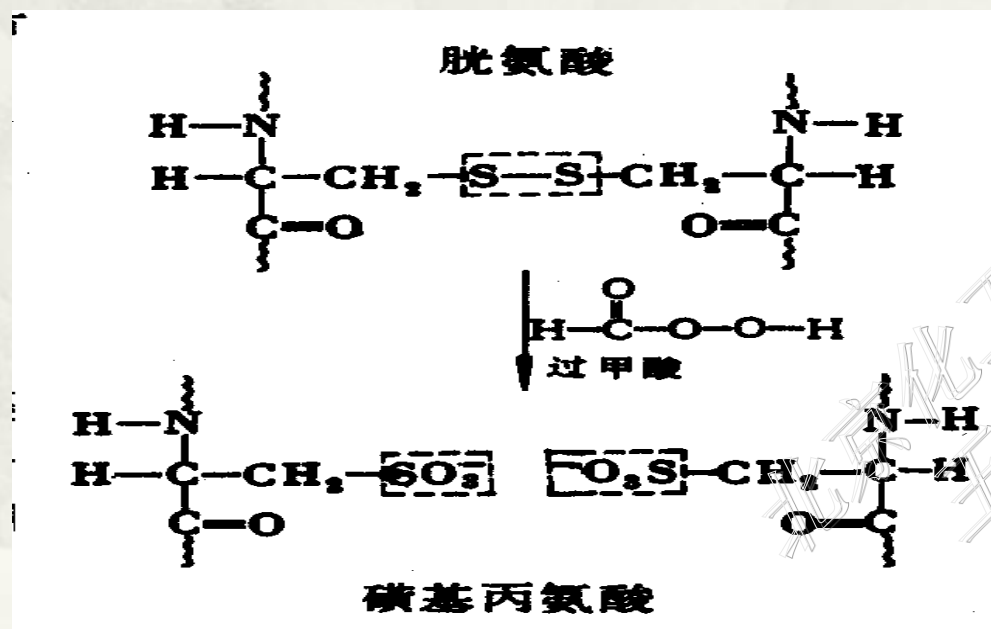
1) 巯基乙醇还原法

- * 用过量巯基乙醇还原二硫键使其断开
- * 加入碘乙酸保护生成的巯基



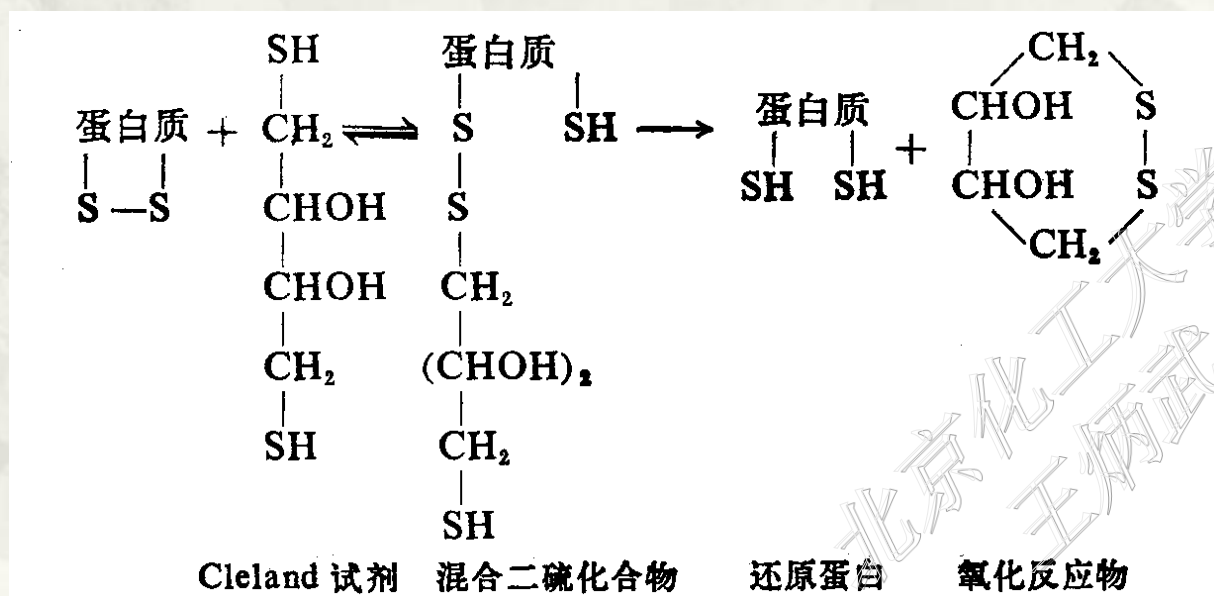
2) 过甲酸氧化法

- * 加入发烟甲酸将二硫键氧化成磺酸基从而断开二硫键

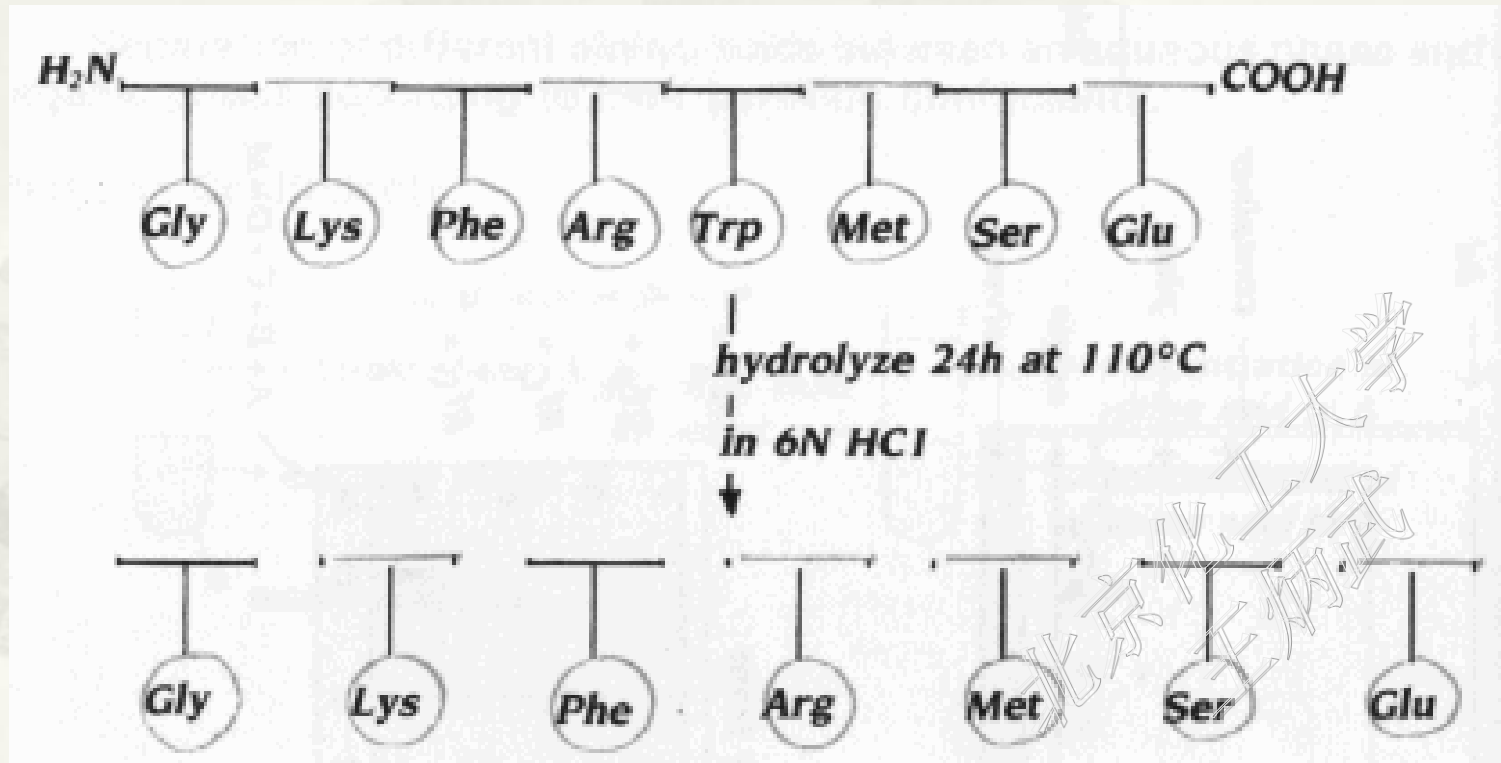


3) 二硫苏糖醇法

* 加入二硫苏糖醇或者二硫赤藓糖醇还原二硫键



- * 2、确定每条肽链的氨基酸的种类和数量
(需要将蛋白质完全水解)



* 3、蛋白质多肽链的末端分析---确定末端氨基酸

* **N**末端测定

- * DNFB法
- * PITC法
- * DNS法
- * 氨肽酶法

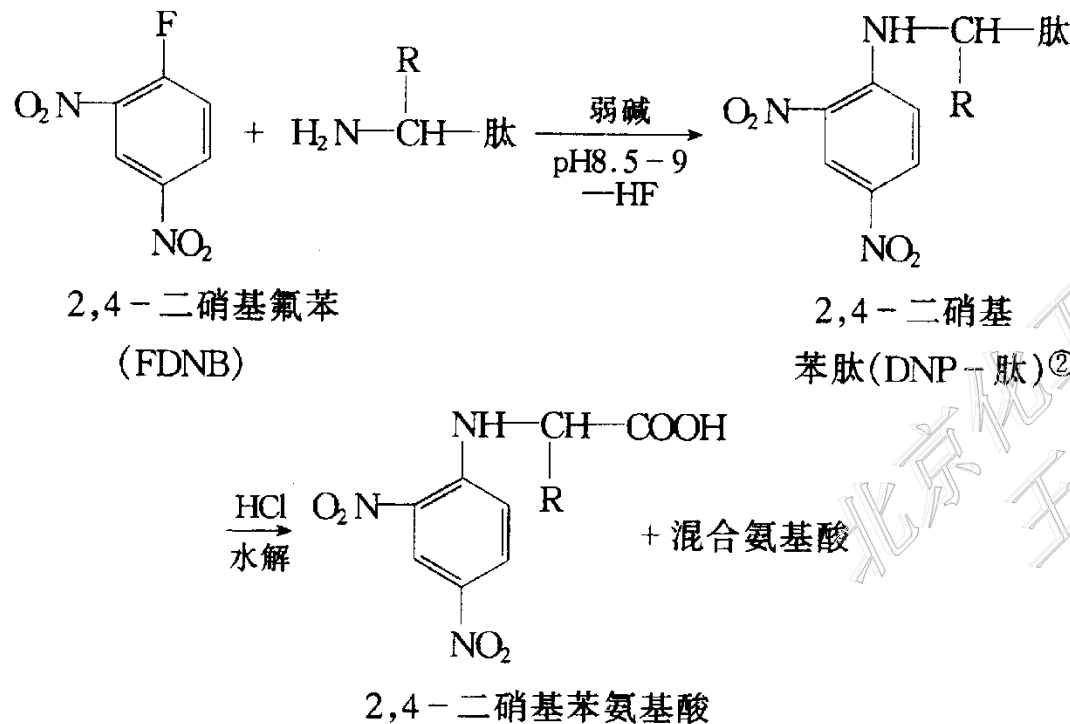
* **C**末端测定

- * 胍解法
- * 羧肽酶法

北京化工大学
王炳武

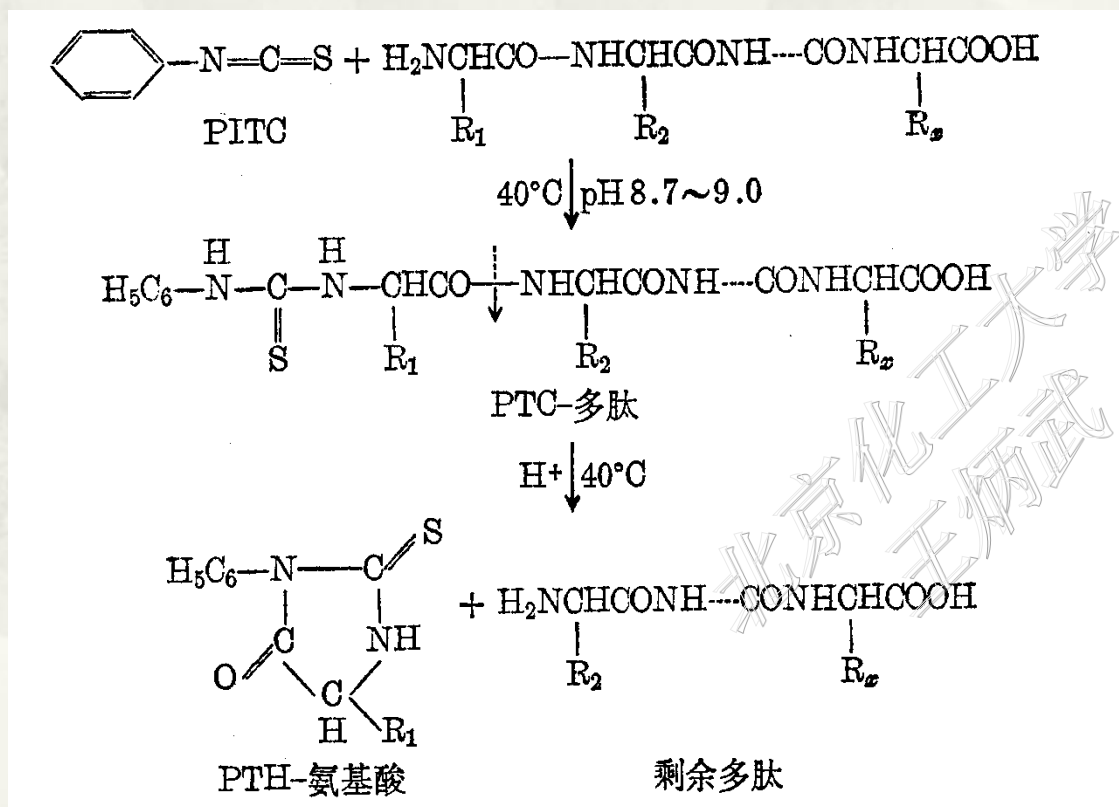
DNFB法 (Sanger法)

- * 乙醚提取得到黄色DNP-氨基酸
- * 层析法定性、定量测定



PITC法(Edman法、 PTH法)

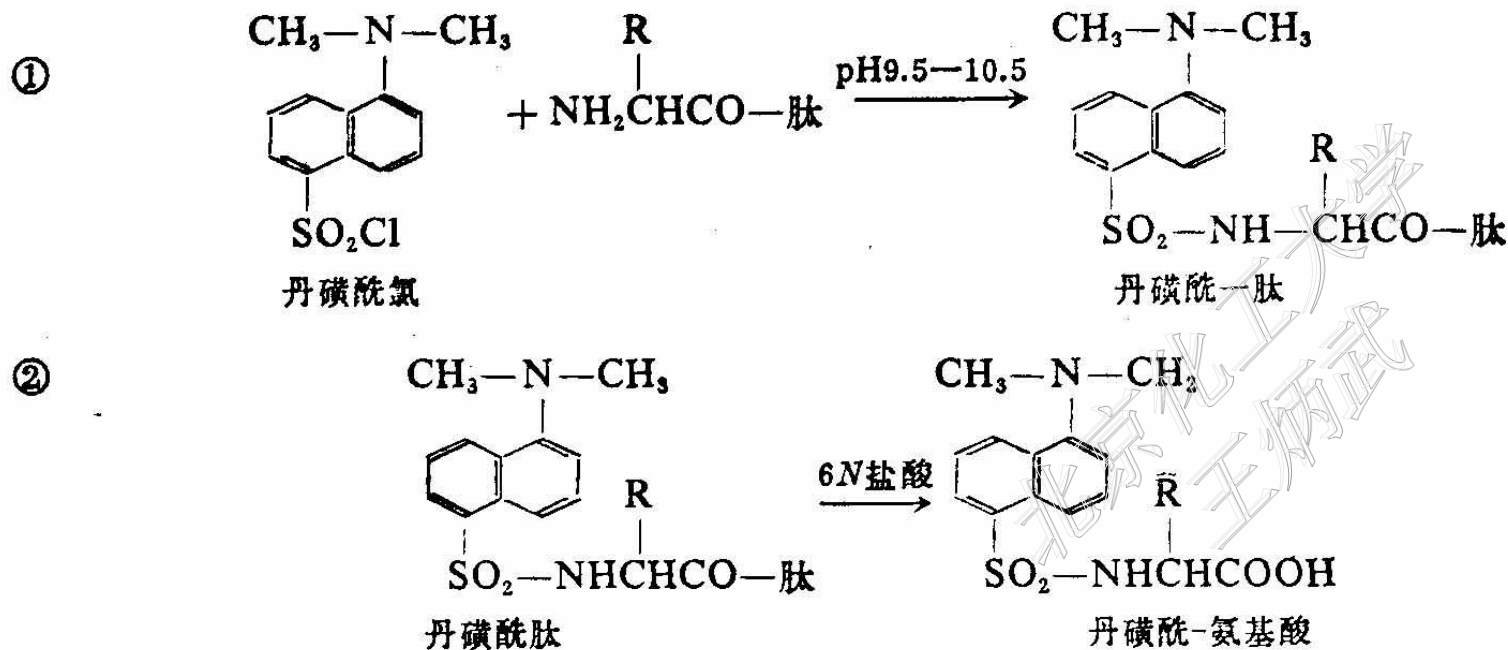
- * 异硫氰酸苯酯
- * 乙酸乙酯抽提



DNS法

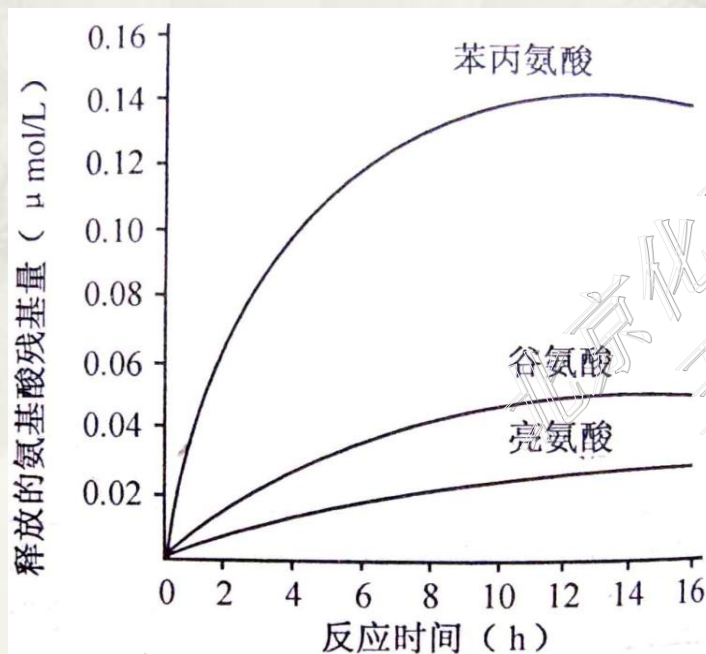
* 丹磺酰氯（二甲基氨基萘磺酰氯）

* 6mol/L HCl 105℃ 水解18hr



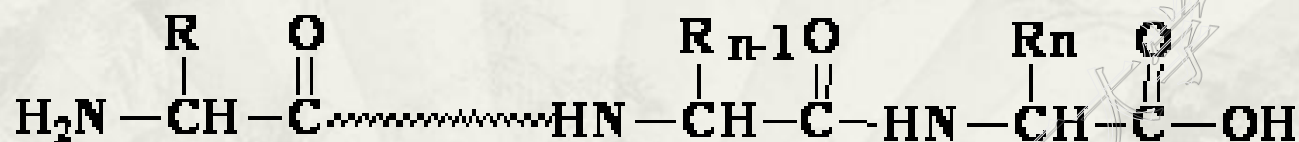
氨基酸酶法

- * 肽链外切酶，从多肽链的N-端逐个向里水解
- * 根据不同的反应时间测出酶水解所释放出的氨基酸种类和数量，按反应时间和氨基酸残基释放量作动力学曲线，从而知道蛋白质的N-末端残基顺序



* 胍解法

- * 多肽与胍在无水条件下加热，C-端氨基酸即从肽链上解离出来，其余的氨基酸则变成胍化物
- * 胍化物能够与苯甲醛缩合成不溶于水的物质而与C-端氨基酸分离



N-端氨基酸

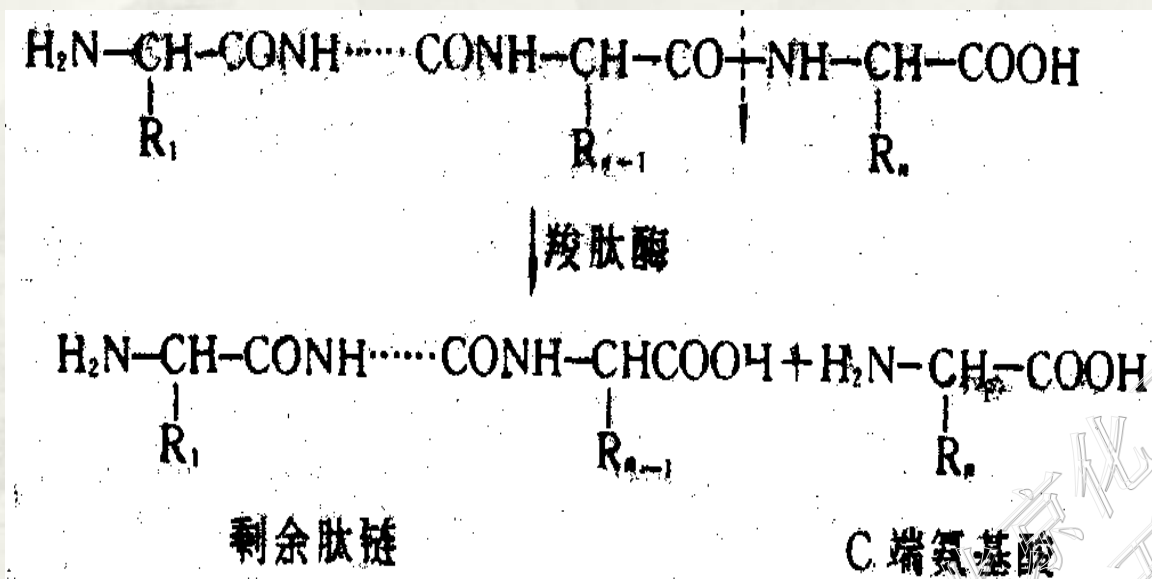
C-端氨基酸



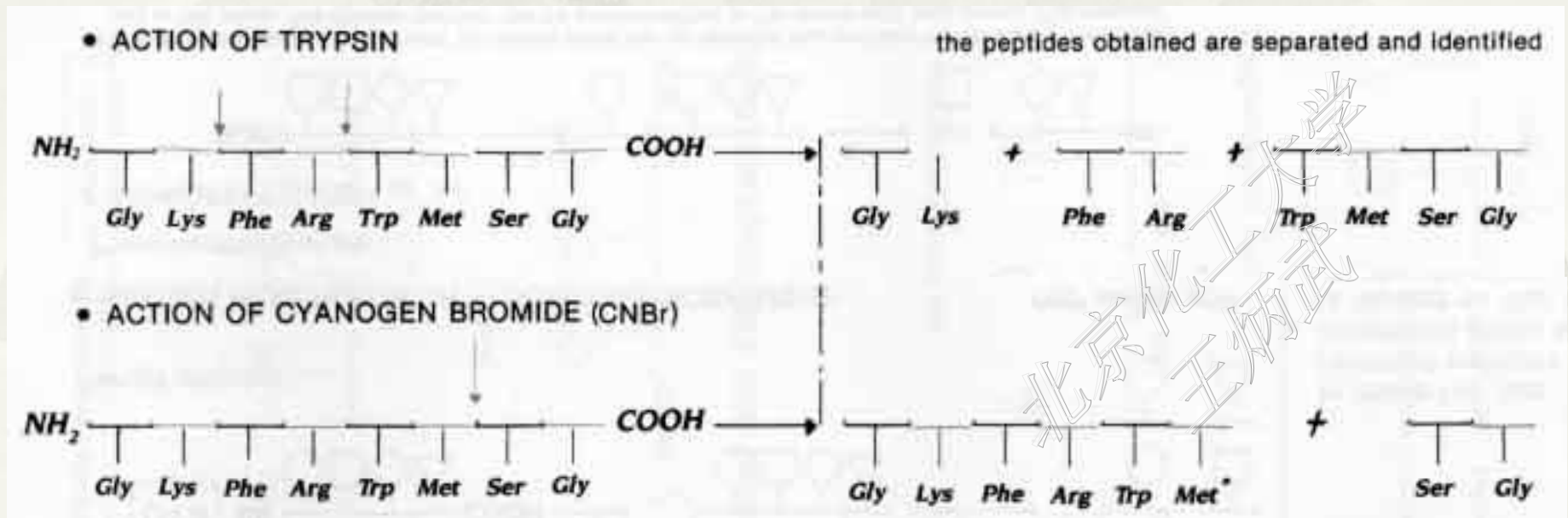
氨基酸胍

C-端氨基酸

* 羧肽酶法



- * 4、对多肽链进行部分水解，获得一套短肽混合物；用不同的方法分别进行部分水解,得到几套短肽混合物。



肽链部分水解的方法

- * 化学法

- * 溴化氰法

- * 羟胺法

- * 酶解法

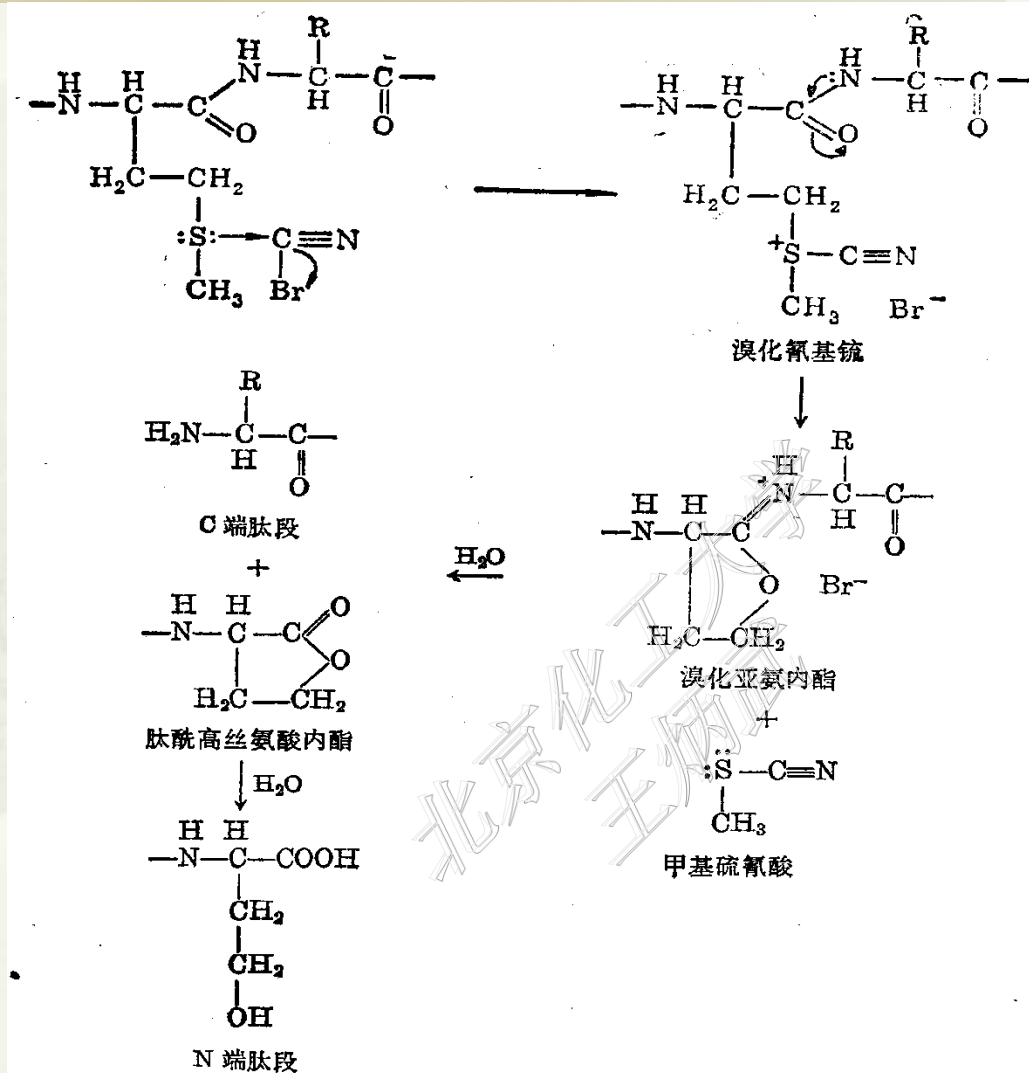
- * 胰蛋白酶

北京化工大学
王炳武

1) 溴化氰法

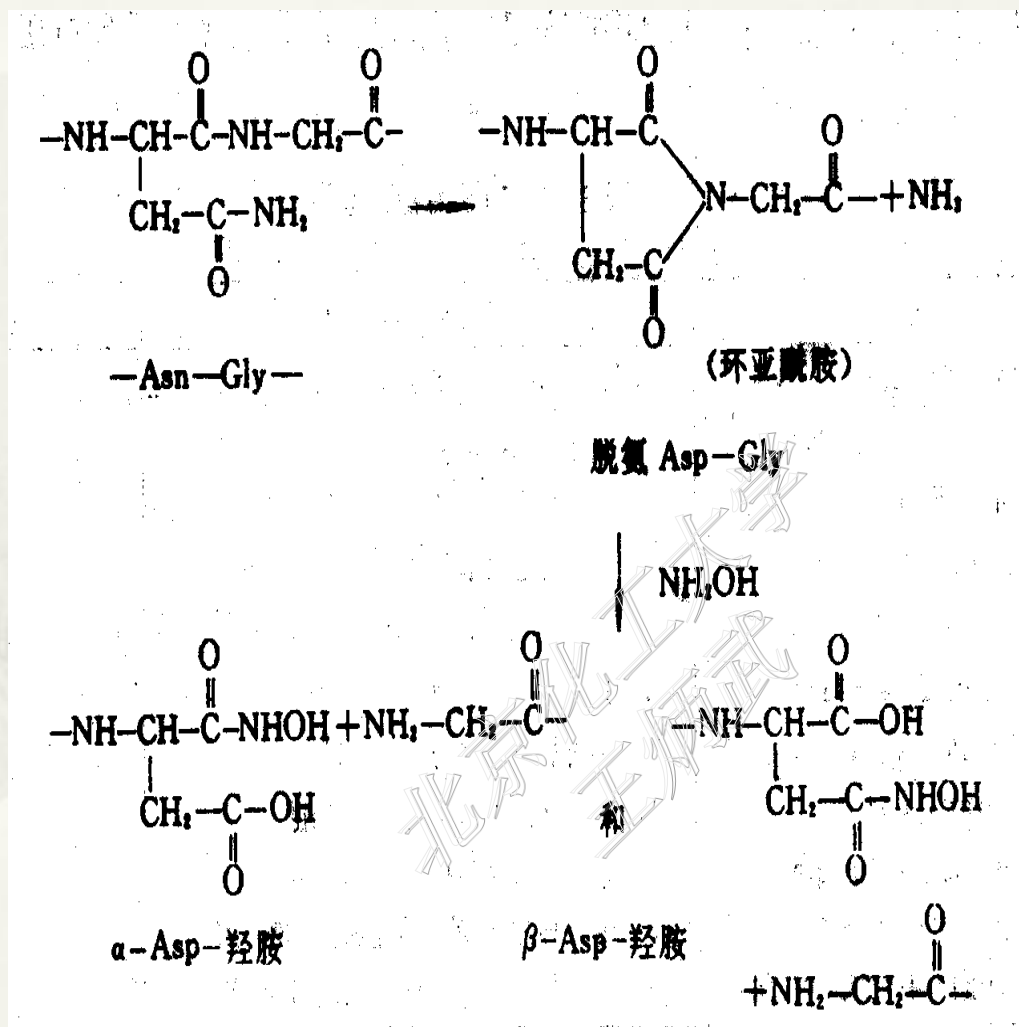
* 断开**甲硫氨酸羧基**参与的肽键

* 由于蛋白质中含有很少的甲硫氨酸，因此可以得到较大的片断



2) 羟胺法

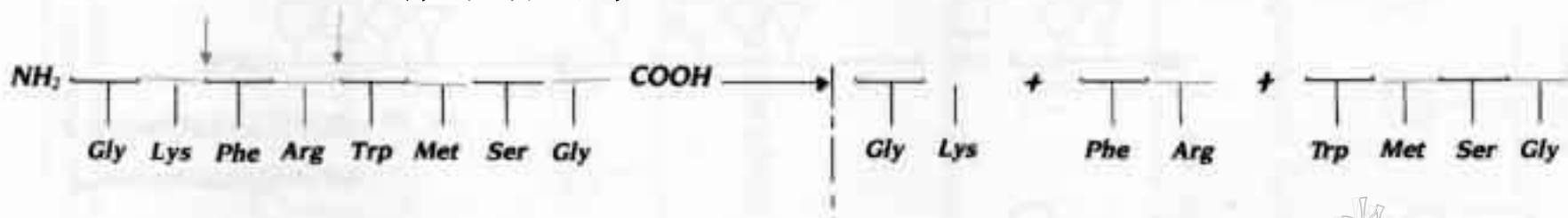
* 羟胺能专一地裂解Asn-Gly的肽键



3) 酶水解法

• ACTION OF TRYPSIN 胰蛋白酶

the peptides obtained are separated and identified



北京化工大学
王炳武

- * 5、分离部分水解得到的短肽混合物，获得单一的短肽；
- * 6、利用Edman降解法测定所有短肽的氨基酸序列；
- * 7、将所获得的所有序列进行拼凑，确定蛋白质序列；

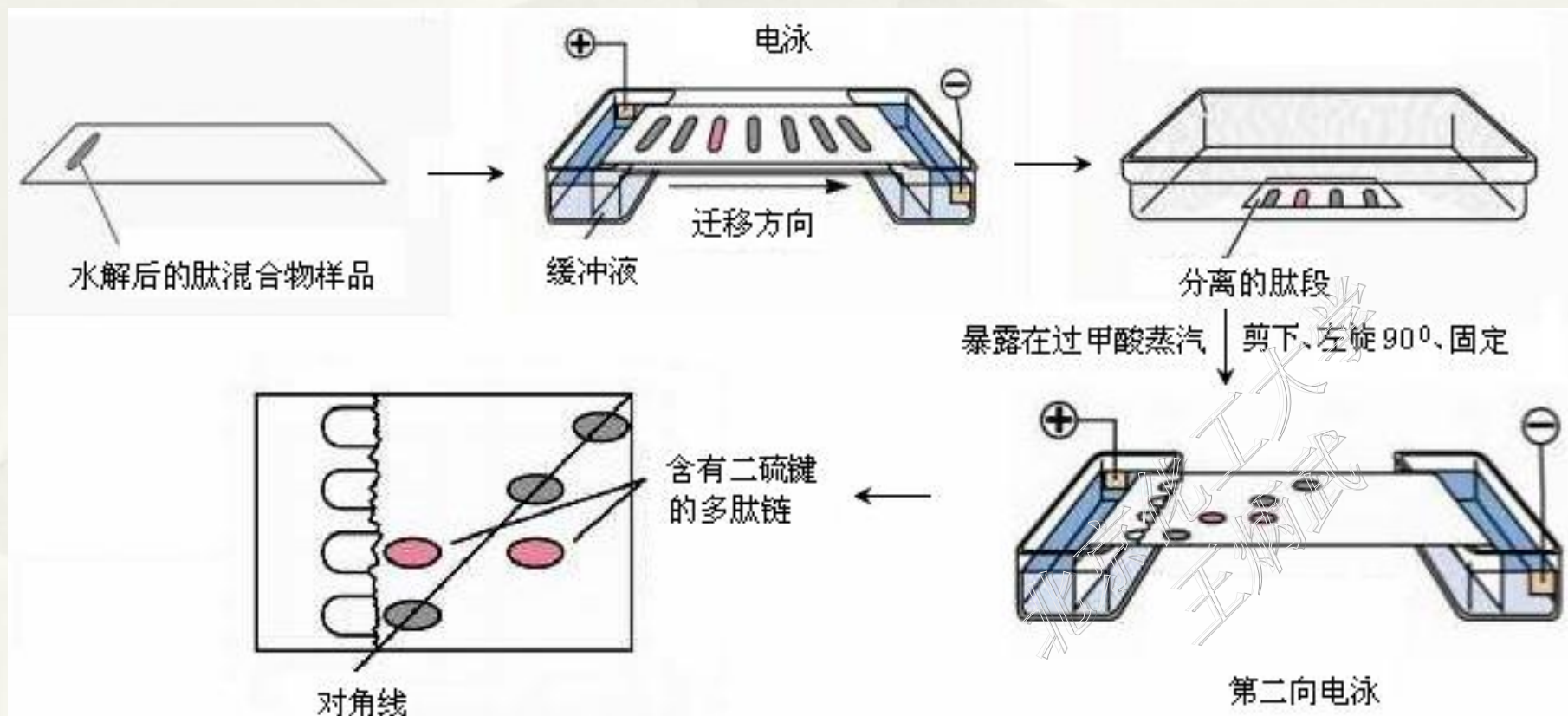
如何拼凑？

- * 某多肽由十个氨基酸残基组成，N末端氨基酸为Ala；
- * 用A酶水解得到四个短肽：A1 (Gly-Lys-Asn-Tyr)、A2 (Ala-Phe)、A3 (His-Val) 和A4 (Arg-Tyr) ；
- * 用B酶水解得到三个短肽：B1 (Ala-Phe-Gly-Lys)、B2 (Tyr-His-Val) 和B3 (Asn-Tyr-Arg) ；

肽	顺序
A ₁	Ala · Phe
B ₁	Ala · Phe · Gly · Lys
A ₂	Gly · Lys · Asn · Tyr
B ₂	Asn · Tyr · Arg
A ₃	Arg · Tyr
B ₃	Tyr · His · Val
A ₄	His · Val
十肽顺序	Ala · Phe · Gly · Lys · Asn · Tyr · Arg · Tyr · His · Val

* 8. 测定二硫键位置，测出全部一级结构

* 对角线电泳法



填空题

- * 1953年英国科学家_____首次完成牛胰岛素一级结构的测定，证实牛胰岛素由两条肽链共_____个氨基酸组成。
- * 维持蛋白质构象的作用力有_____、_____、_____、_____和_____。

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 下列关于蛋白质分子中肽键的叙述哪个是不正确的？
 - * (a) 能自由旋转
 - * (b) 比通常的C-N单键短
 - * (c) 通常有一个反式结构
 - * (d) 具有部分双键性质

北京化工大学
王炳武

选择题

* 下列氨基酸经常处于球蛋白分子内部的是 ()

* A、Tyr B、Glu C、Asn D、Val

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 关于大多数蛋白质结构叙述错误的是（ ）
- * A、分子中二硫键的生成并不是蛋白质分子构象的决定因素
- * B、大多数带电荷的氨基酸侧链伸向蛋白质分子表面
- * C、一级结构是决定高级结构的重要因素
- * D、只有少数疏水氨基酸侧链处于分子内部

填空题

- * 常用的拆开蛋白质中二硫键的试剂为_____、_____和_____。
- * 常用的肽链 N 端分析的方法有_____法、_____法、_____法和_____法；C 端分析的方法有_____法和_____法。
- * 溴化氰能使 Gly-Arg-Met-Ala-Pro 裂解为_____和_____两个肽段。

北京化工大学
王炳武

选择题

- * 下列试剂能使二硫键断裂的是 ()
- * A、溴化氰 B、巯基乙醇
- * C、碘乙酸 D、尿素

北京化工大学
王炳武

待续!

北京化工大学
王炳武