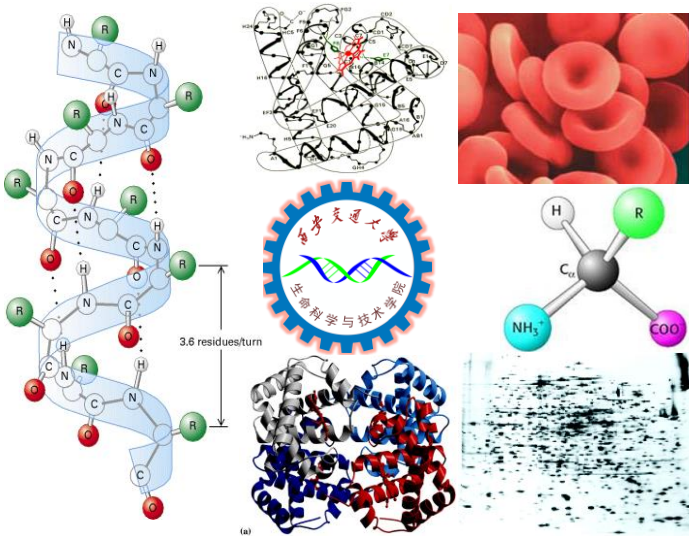


第二章 细胞的物质基础
第三节 蛋白质
课外拔高内容

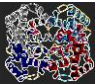
孔宇

西安交通大学生命科学与技术学院

2020年1月20日



3.1 蛋白质的分类

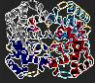


□ 形状：球状-血红蛋白；纤维状-甲/丝/羽

- 球状蛋白质(globular protein) 溶解性较好，能形成结晶，大多数蛋白质属于这一类。
- 纤维状蛋白质(fibrous protein)分子类似纤维或细棒。它又可分为可溶性纤维状蛋白质和不溶性纤维状蛋白质。



3.1 蛋白质的分类



□ 功能：活性、非活性

□ 溶解度：

✓ 清：白蛋白、乳清蛋白

✓ 球：血清球蛋白。微溶

✓ 谷：米、麦蛋白，溶于烯酸

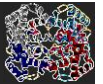
✓ 醇溶：玉米蛋白

✓ 精/组：碱性蛋白，细胞核中

✓ 硬：软骨、腱、毛、发、丝等组织中，分为角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白和丝蛋白。



3.3.2 化学性质



◆ 氨基

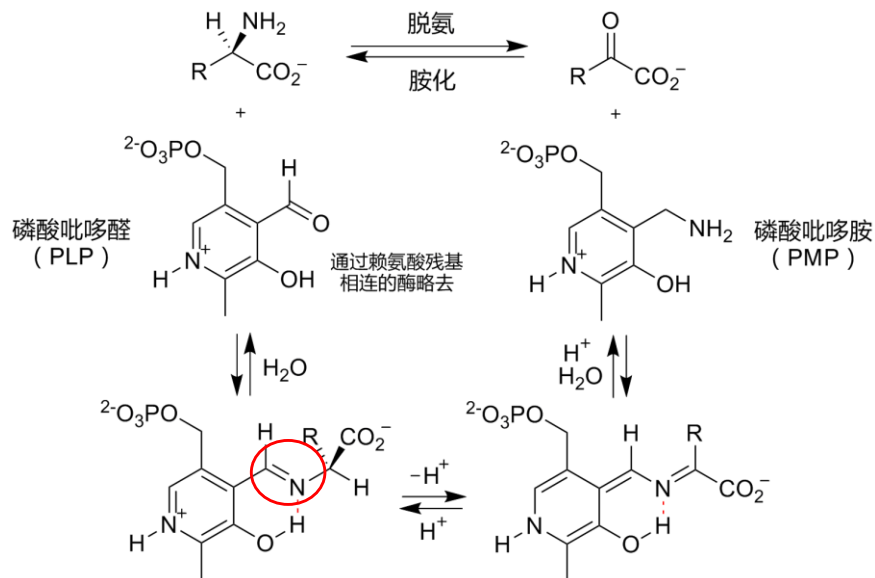
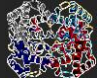
◆ 羧基

◆ 氨基和羧基

◆ 其它侧链基团



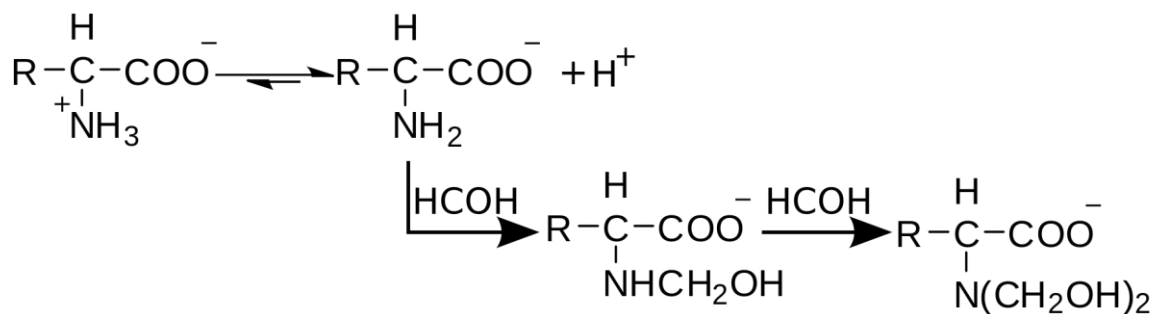
体内脱氨示意图



与甲醛反应

❖ 测定蛋白质水解程度

❖ 增强了AA的酸性

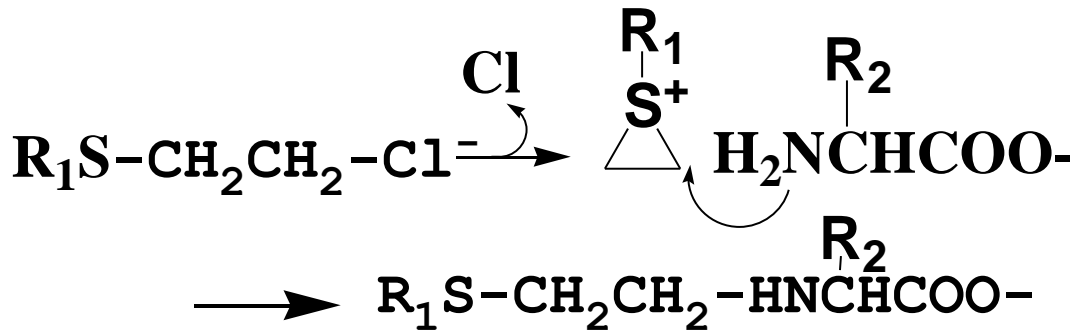




卤化硫醚等

❖ 多肽N端测定

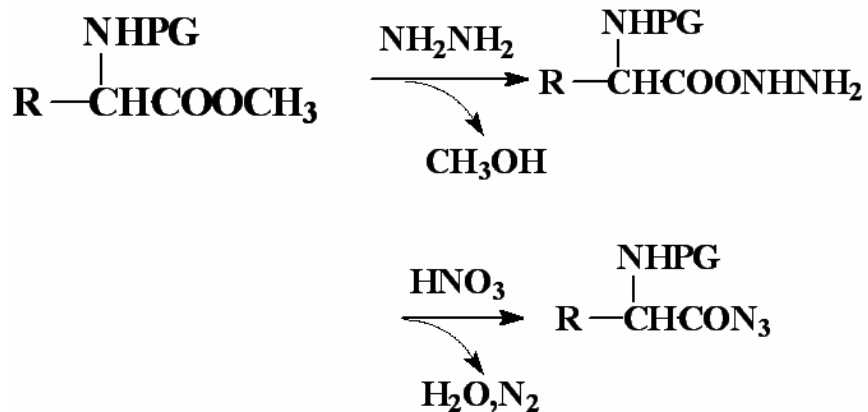
❖ 与HCl成盐：AA-NH₃Cl



叠氮化

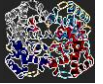
❖ 活化羧基，用于多肽合成

❖ 危险！





侧链基团的性质

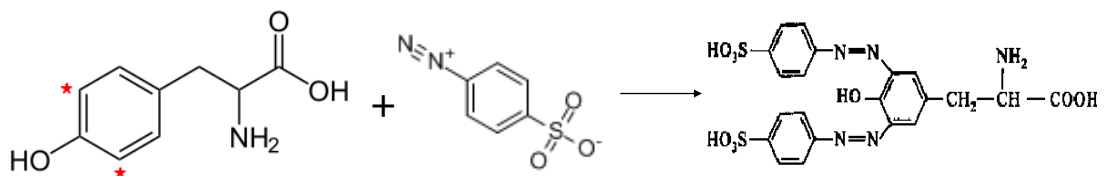


- ❖ 苯基/酚基
- ❖ 羟基
- ❖ 巯基
- ❖ 吲哚基
- ❖ 胍基
- ❖ 咪唑基



苯基/酚基

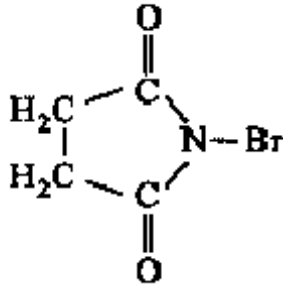
- ❖ 硝化、磺酸化，卤化
- ❖ 对磺酸基苯重氮硫酸盐，生成橘黄色化合物，(Pauly反应)



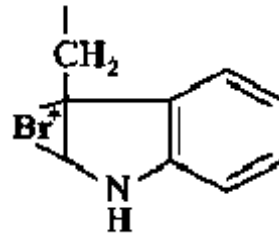


吲哚基

❖ 与溴代琥珀酰亚胺反应



N-溴代琥珀酰亚胺



色氨酸残基侧链的氧化产物
(在一定条件下可发生重排)

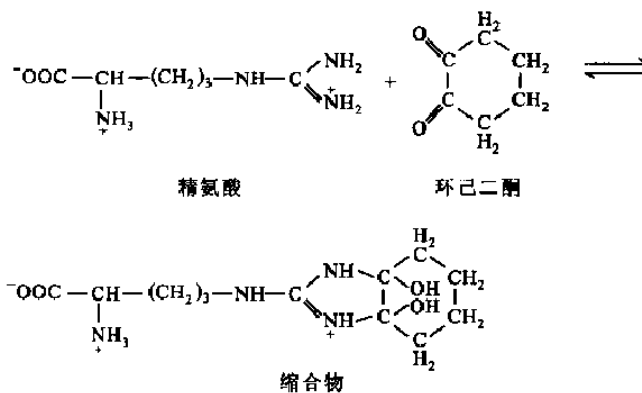


胍基

❖ 与1,2-环己二酮反应 (硼酸体系), 坂口反应

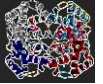
❖ 用于鉴定精氨酸

❖ 蛋白质修饰, 防酶切





3.5 多肽



❖ (人工)合成



(人工)合成

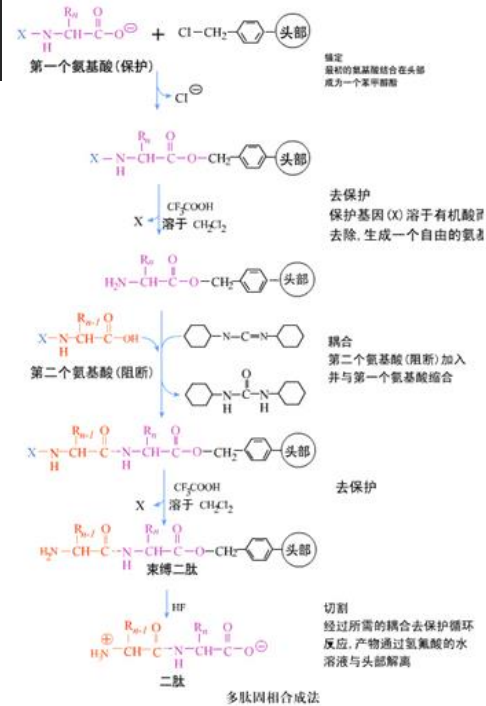
- ❖ 保护A的氨基
- ❖ 活化A的羧基
- ❖ 保护B的羧基，活化氨基
- ❖ **必要时保护侧链基团**
- ❖ 成肽
- ❖ 脱去保护基团（选择性去除）
- ❖ 液相/固相合成法



多肽合成流程

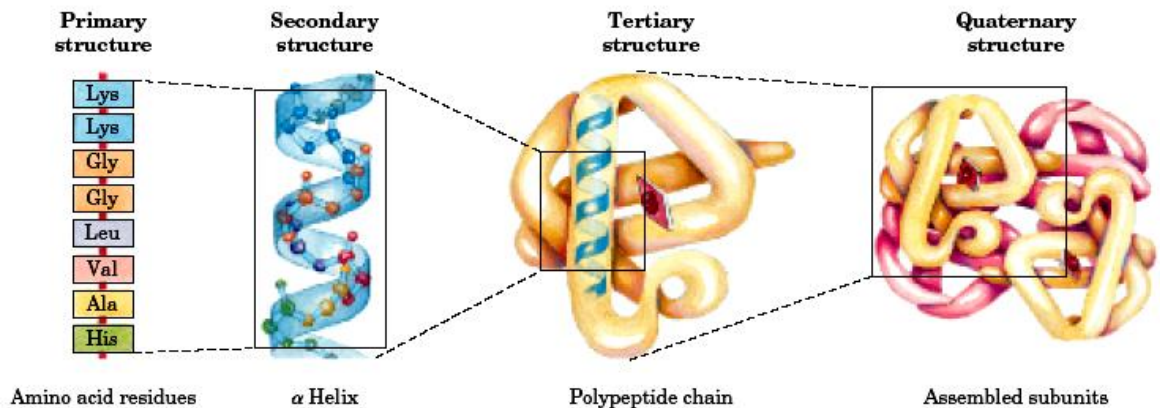
❖ 分离容易

❖ 现已自动化



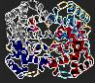
3.6 蛋白质结构 分子量>6,000

- 一级结构(primary structure)
- 二级结构(secondary structure)
- 三级结构(tertiary structure)
- 四级结构(quaternary structure)





3.6.1 蛋白质一级结构测定



- A. 已知蛋白质的分子量，纯度 $>97\%$
- B. 测定多肽链数目：蛋白质摩尔数 / N (C) 末端摩尔数；
- C. 拆分多肽链：变性剂（非共价键），氧化剂或还原剂（二硫键）
- D. 分析AA组成：AA分析仪；
- E. 裂解多肽链成肽段：几种不同断裂方法；
- F. 各肽段的AA测序：Edman降解法，自动测序仪；
- G. 重建多肽链一级结构：几套重叠肽段；



A: 蛋白质分子量测定

❖ SDS-PAGE

❖ 质谱-MS

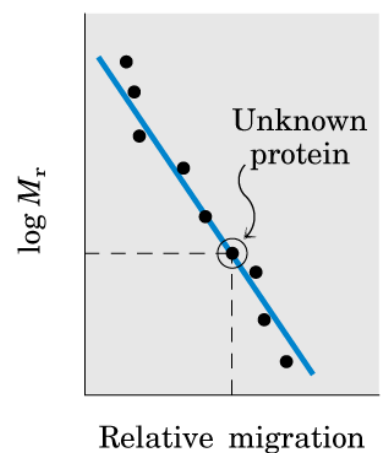
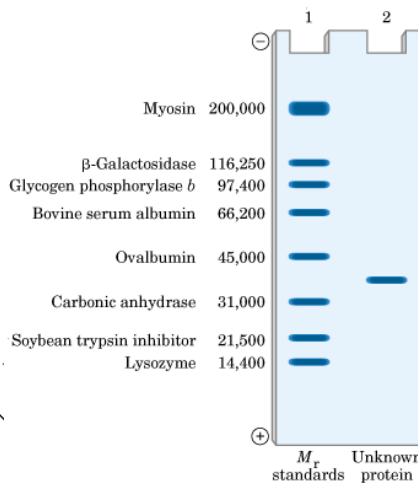
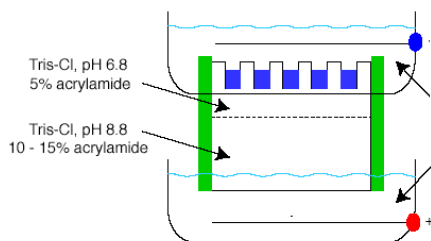
❖ 元素分析

Fe: 0.34% → 最小分子量16700

❖ 氨基酸分析

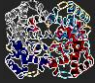
确定AA间的最小比

❖ ...





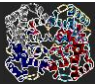
B: 测定多肽链数目



- ❖ 蛋白质摩尔数 / N (C) 末端摩尔数
- ❖ N端、C端分析法
- ❖ C端：胍解法；还原法；羧肽酶
- ❖ N端：DNFB；DNS；氨肽酶；PITC



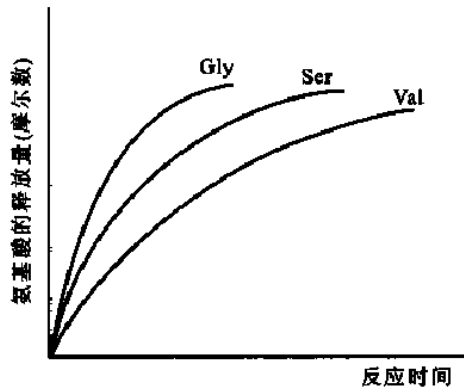
还原法



肽链C-末端氨基酸也可用硼氢化锂还原成相应的 α -氨基醇。肽链完全水解后，代表原来C-末端氨基酸的 α -氨基醇，可用层析法加以鉴别。



羧肽酶(carboxypeptidase)法

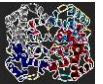


羧肽酶法鉴定 C-末端残基及 C-末端序列的示意图
序列是 Val-Ser-Gly

❖ 羧肽酶是一种肽链外切酶，它从多肽链的C-端逐个的水解AA。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，从而知道蛋白质的C-末端残基顺序。



羧肽酶(carboxypeptidase)法

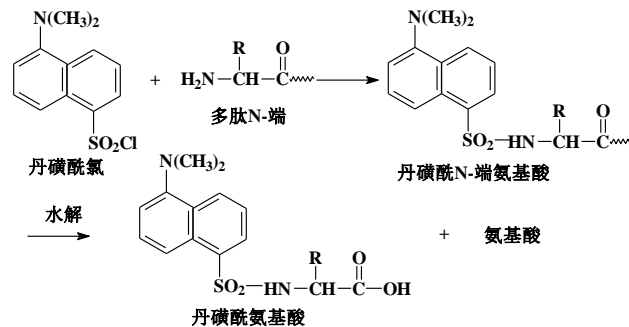


- ❖ 目前常用的羧肽酶有四种：A,B,C和Y；A和B来自胰脏；C来自柑桔叶；Y来自面包酵母。
- ❖ 羧肽酶A能水解除Pro,Arg和Lys以外的所有C-末端氨基酸残基；B只能水解Arg和Lys为C-末端残基的肽键。

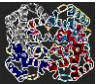


丹磺酰氯法

- ❖ 在碱性条件下，丹磺酰氯（二甲氨基萘磺酰氯，DNS）可以与N-端氨基酸的游离氨基作用，得到丹磺酰-氨基酸。
- ❖ 此法的优点是丹磺酰-氨基酸有很强的荧光性质，检测灵敏度可以达到 $1 \times 10^{-9} \text{mol}$ ，比DNFB法高100倍。DNS-氨基酸不需要抽提，可直接用纸电泳或者薄层层析加以鉴定。



氨肽酶法



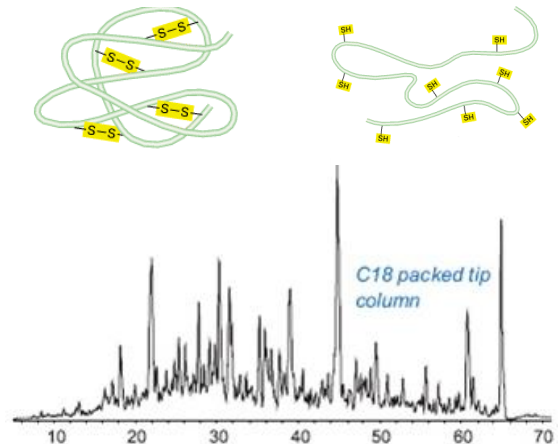
- ❖ 氨肽酶是一类肽链外切酶，从多肽链N-末端逐个释放氨基酸。根据不同的反应时间所释放的氨基酸种类和数量，就能知道该蛋白质的N-末端残基序列。但实际应用困难：酶对不同肽键敏感性不同，残基先后难以判断。
- ❖ 最常用的氨肽酶是亮氨酸氨肽酶（LAP）



C: 拆分多肽链

- ❖ 有二硫键：需要加还原剂：GSH、DTT、巯基乙醇等，打开后需保护，过甲酸、碘乙酸等
- ❖ 无二硫键：
- ❖ 变性，分离，纯化
- ❖ 变性：6~8mol/L 尿素或盐酸胍
- ❖ 色谱类、纸层析、盐析等

某蛋白质的胰酶解产物rp-HPLC分离图



D: 分析AA组成

- ❖ 水解后测定相应氨基酸的量
- ❖ 酸、碱水解
- ❖ 测定水解液中的氮量，计算酰胺含量
- ❖ 羧肽酶、氨肽酶



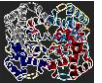
E: 裂解多肽链成肽段

❖ 酶法

❖ 化学法



酶解法

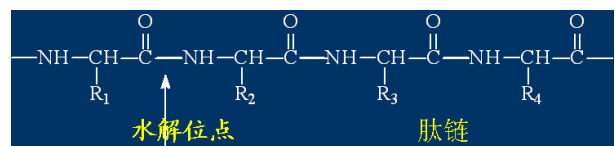
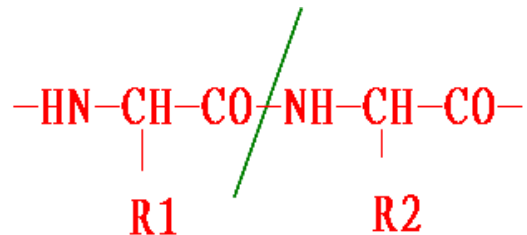
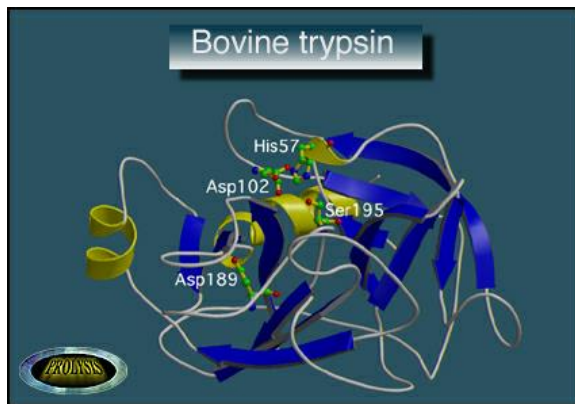


❖ 胰蛋白酶，糜蛋白酶，胃蛋白酶，嗜热菌蛋白酶。
又叫肽链内切酶或内肽酶。

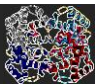


胰蛋白酶

- R_1 =Lys和Arg侧链（专一性较强，水解速度快）。 R_2 =Pro 水解受抑



胰蛋白酶



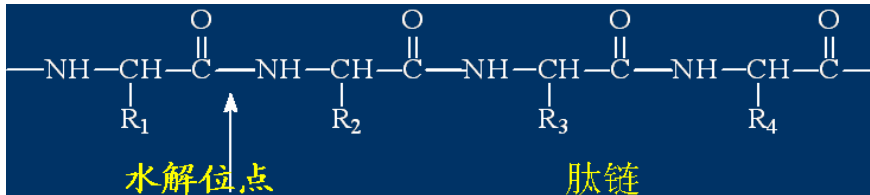
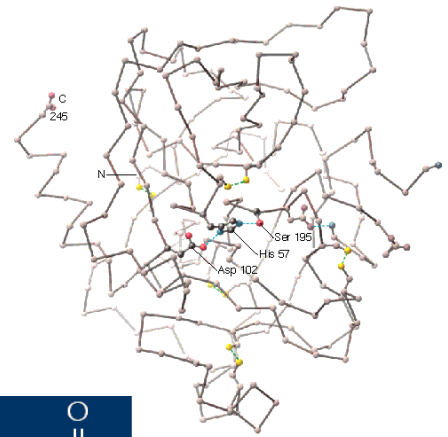
- ❖ 待测多肽链中赖氨酸残基和（或）精氨酸残基的数量较多时，为了减少胰蛋白酶的作用位点，可以通过化学修饰将其侧链基团保护起来。如用马来酸酐（即顺丁烯二酸酐）可以保护 Lys 残基侧链上的 ϵ -NH₂，这样胰蛋白酶就不会水解 Lys 残基的羧基端肽键，只能断裂 Arg 残基羧基端的肽键。反之，如果用 1, 2-环己二酮修饰 Arg 的胍基，则胰蛋白酶只能断裂 Lys 残基羧基端的肽键。

- ❖ 若需增加多肽链中胰蛋白酶断裂点，可以用氮丙啶处理多肽链样品。这时 Lys 残基侧链被修饰成



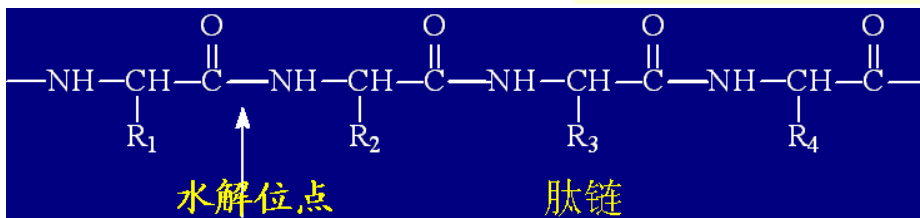
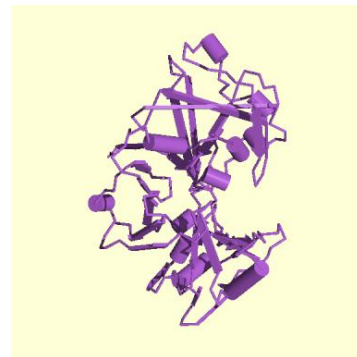
糜蛋白酶

- ❖ 或胰凝乳蛋白酶 (Chymotrypsin) :
R1=Phe, Trp, Tyr 时水解快; R1= Leu, Met 和 His 水解稍慢。
- ❖ R2=Pro 水解受抑



胃蛋白酶

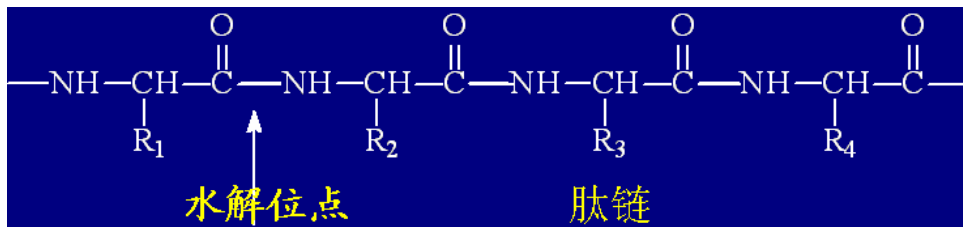
- ❖ Pepsin: R1和R2 = Phe, Trp, Tyr; Leu 以及其它疏水性氨基酸水解速度较快。
- ❖ R1=Pro 不水解





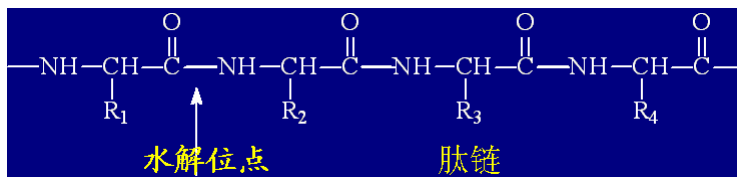
嗜热菌蛋白酶

- ❖ thermolysin: R2=Phe, Trp, Tyr; Leu, Ile, Met以及其它疏水性强的氨基酸水解速度较快。
- ❖ R2=Pro或Gly 水解受抑。
- ❖ R1或R3=Pro 水解受抑。



木瓜蛋白酶

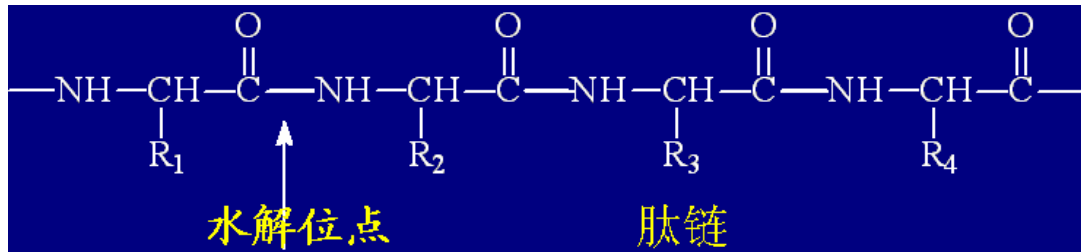
- ❖ R1=Arg或Lys





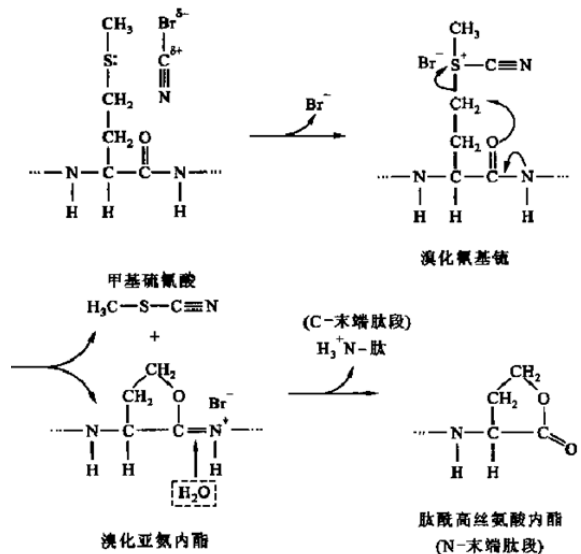
葡萄球菌蛋白酶和梭菌蛋白酶

- ❖ 前者又叫谷氨酸蛋白酶：R1=Glu、Asp(pH7.8磷酸缓冲液)；R1=Glu (pH7.8碳酸氢铵缓冲液或pH4.0醋酸铵缓冲液)
- ❖ 后者又叫精氨酸蛋白酶：R1=Arg



化学法-溴化氰

- ❖ 溴化氰(Cyanogen bromide)水解法，它能选择性地切割由甲硫氨酸的羧基所形成的肽键

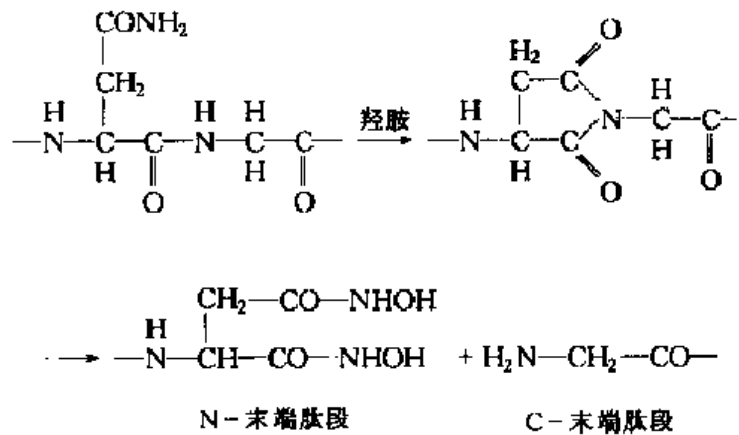


可获得较大的肽段

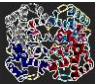


化学法-羟胺

专一性断裂-Asn-Gly-之间的肽键。也能部分裂解-Asn-Leu-之间的肽键以及-Asn-Ala-之间的肽键。



蛋白质的高级结构



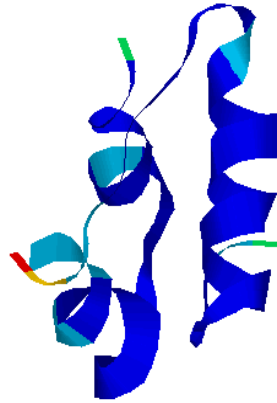
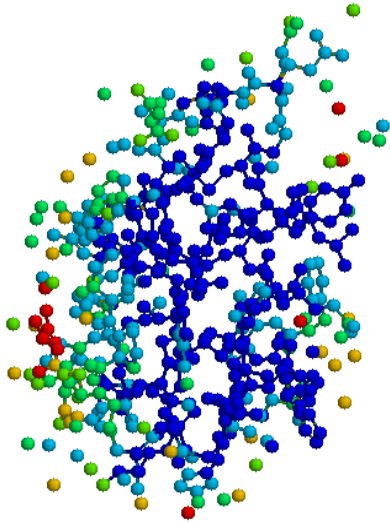
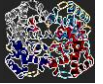
❖ 二级

❖ 三级

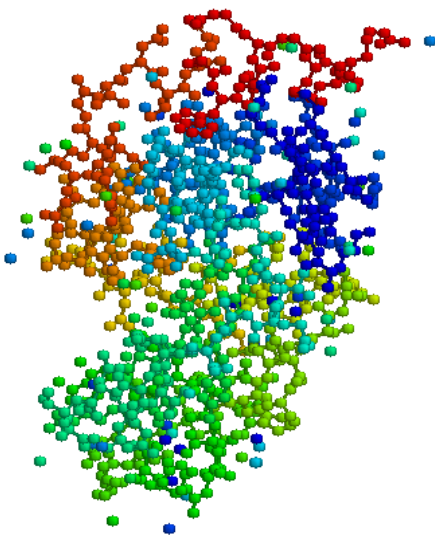
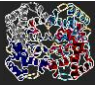
❖ 四级



胰岛素分子的三级结构

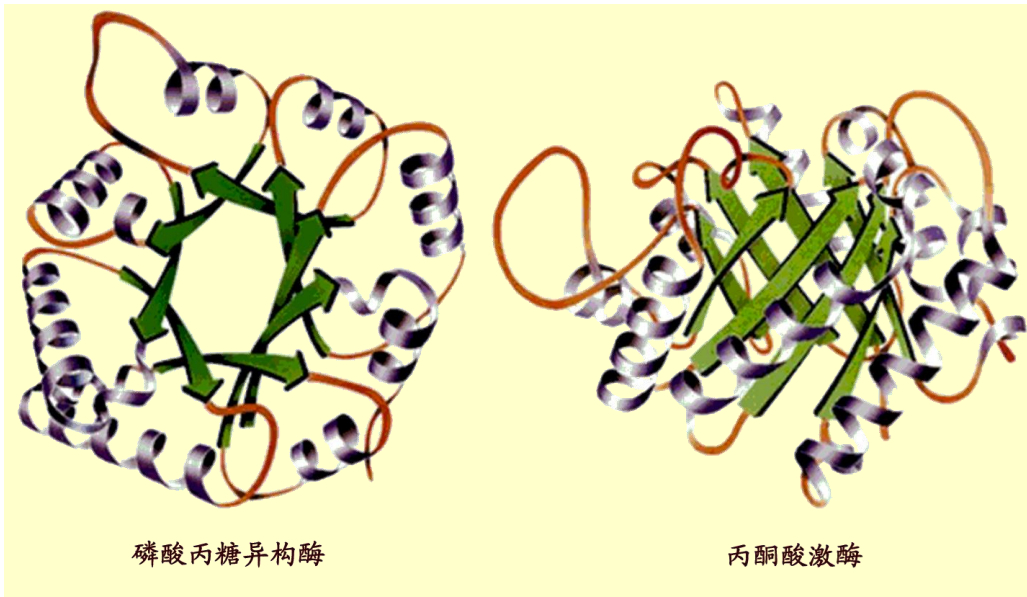
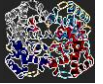


溶菌酶分子的三级结构





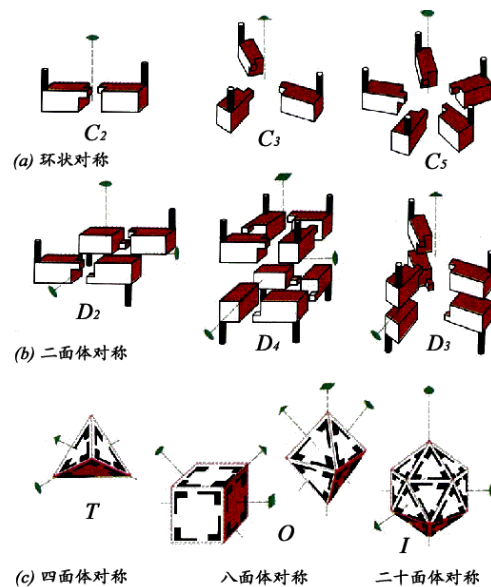
磷酸丙糖异构酶和丙酮酸激酶的三级结构



3.6.4 四级结构quaternary structure

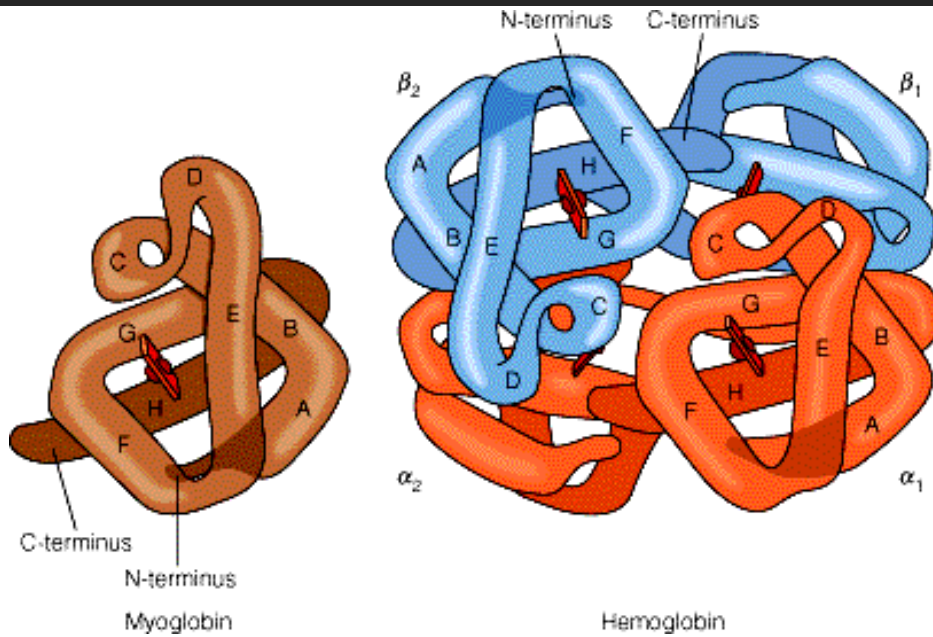
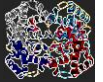
❖ 指蛋白质分子中亚基的立体排布，亚基间的相互作用与接触部位的布局。

❖ 亚基(subunit)就是指参与构成蛋白质四级结构的、每条具有三级结构的多肽链。

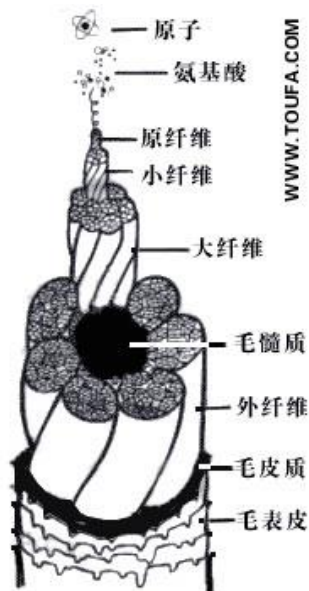




血红蛋白

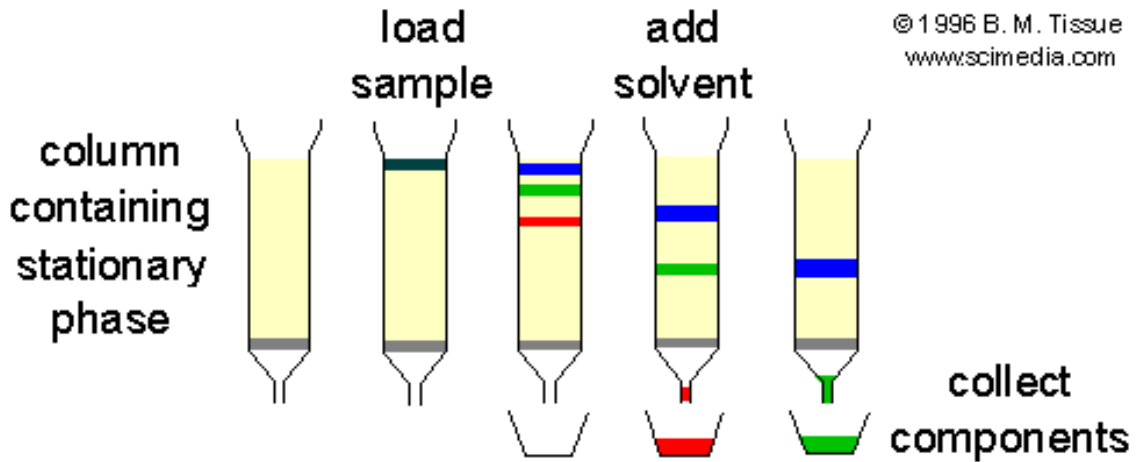
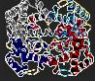


发质结构

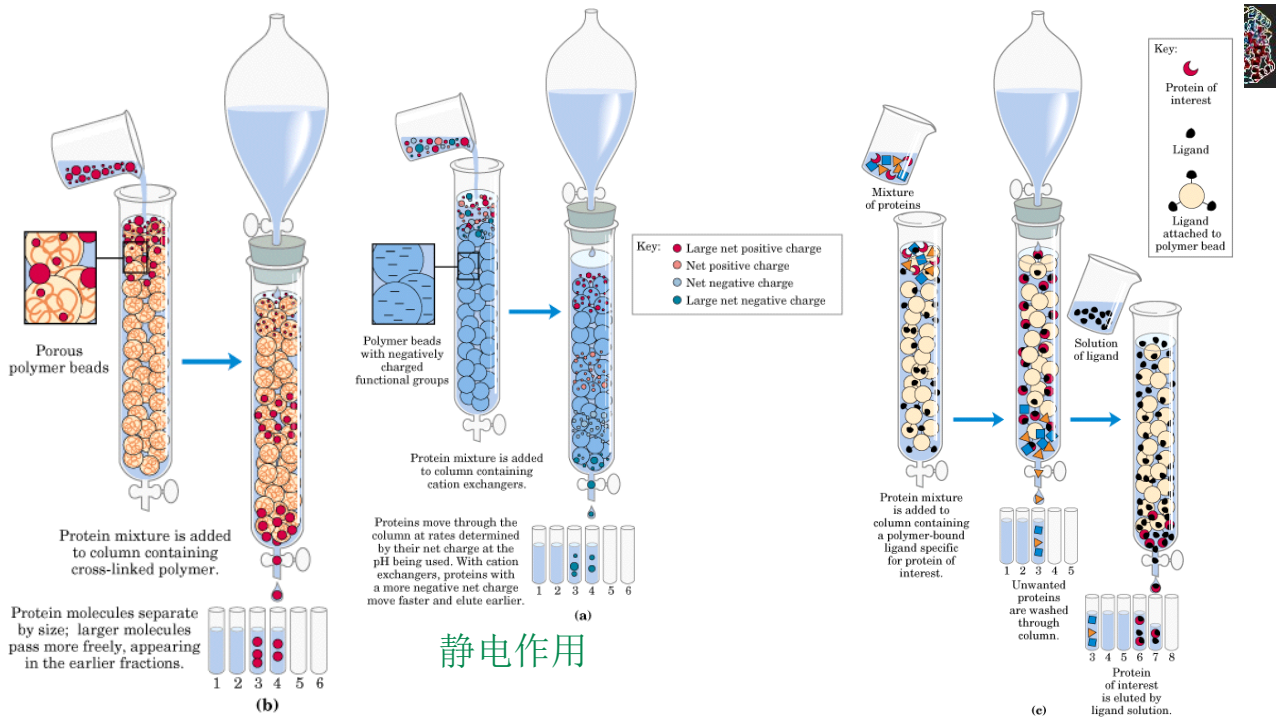




色谱分离过程



可根据蛋白质的不同性质选择分离模式





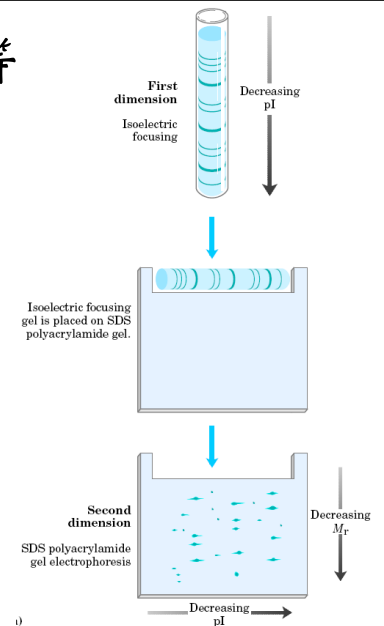
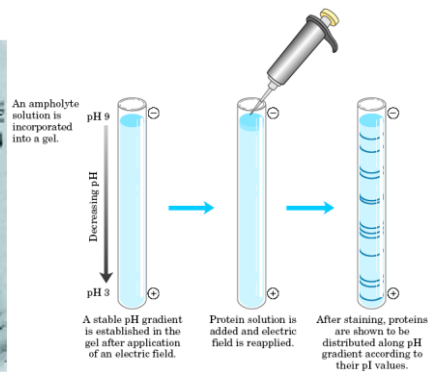
3.9 其它

- ❖ 双向电泳
- ❖ MS
- ❖ X-ray
- ❖ CD
- ❖ ...
- ❖ 后修饰与功能的关系及调控方式



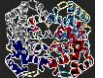
双向电泳

- ❖ 等电聚焦电泳(IEE): 通过蛋白质等电点的差异进行的蛋白电泳分离
- ❖ 第二向进行SDS-PAGE电泳



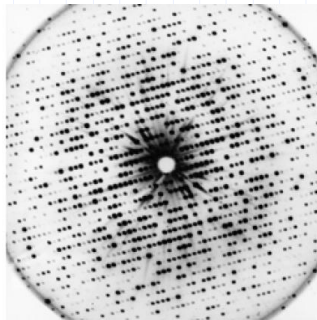


5.7 蛋白质空间结构测定或预测

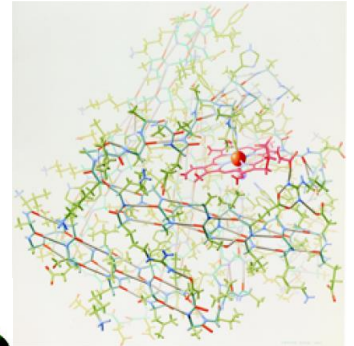
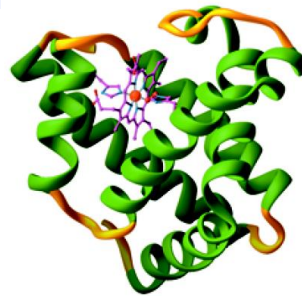


三维空间结构测定

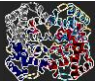
X射线衍射法(X-ray diffraction)和核磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)是研究蛋白质三维空间结构最准确的方法。



抹香鲸肌红蛋白
晶体X射线衍射图

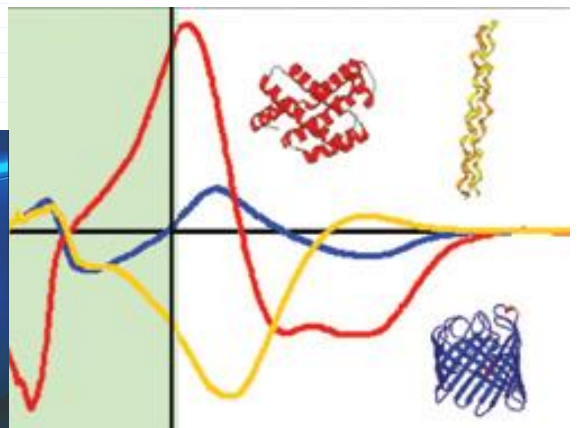
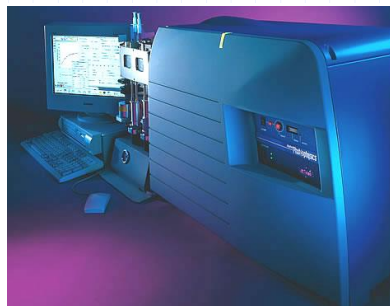


5.7 蛋白质空间结构测定或预测



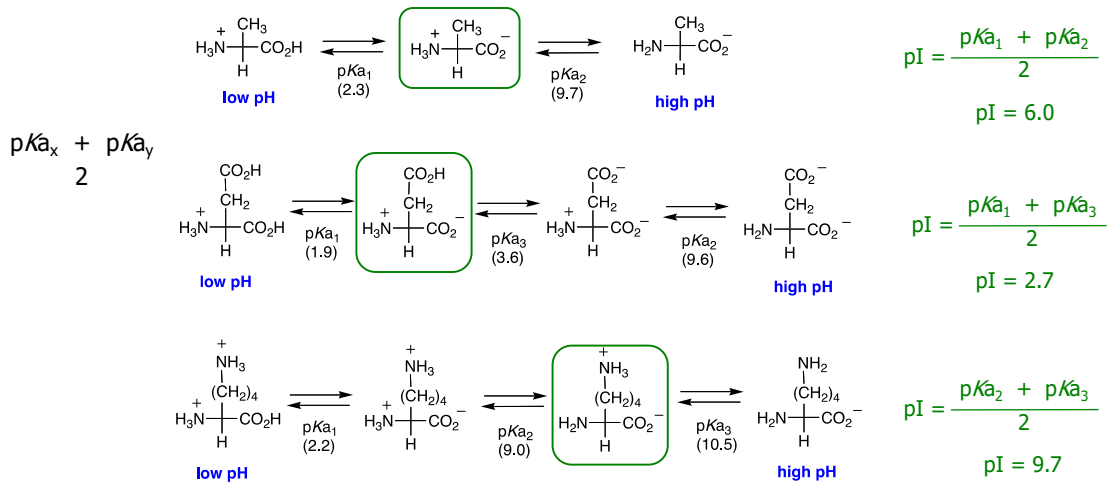
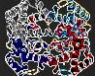
二级结构测定

通常采用圆二色光谱(circular dichroism, CD)测定溶液状态下的蛋白质二级结构含量。 α -螺旋的CD峰有222nm处的负峰、208nm处的负峰和198nm处的正峰三个成分；而 β -折叠的CD谱不很固定。





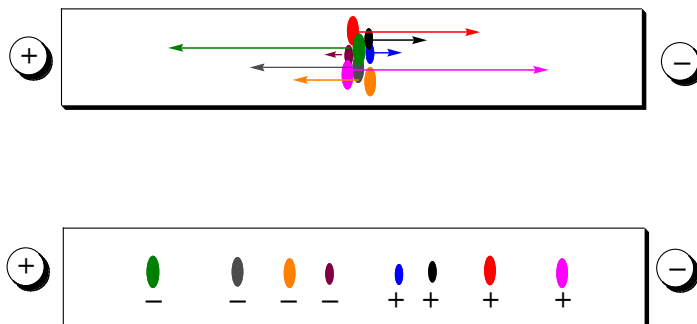
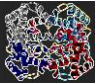
pI = _____



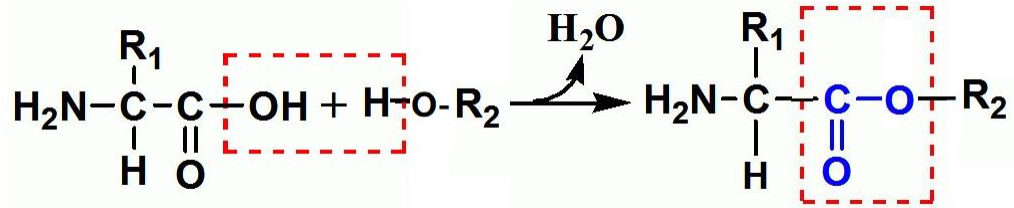
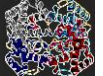
51



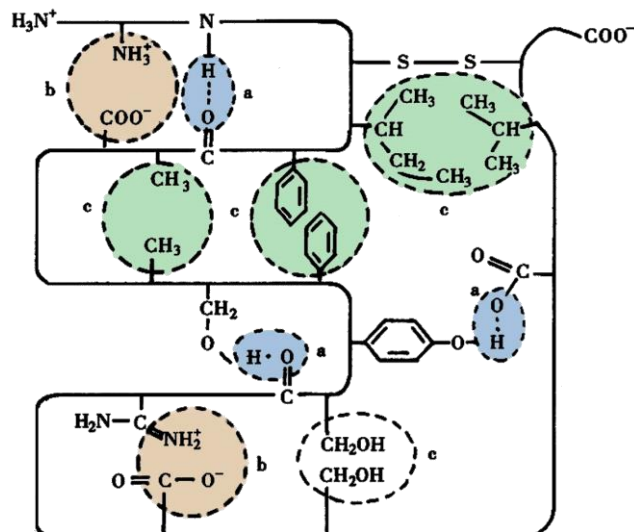
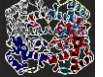
Electrophoresis: separation of polar compounds based on their mobility through a solid support. The separation is based on charge (pI) or molecular mass.



52



总结：三级结构相关化学键



维持蛋白质分子构象的各种化学键

a 氢键, b 离子键, c 疏水键