

# Chapter III - Proteins

## 化学组成

- 蛋白质由多肽链和可能的其他组分构成：
  - **辅因子 (cofactors)**: 功能性的非氨基酸组分，如金属离子或有机分子。
  - **辅酶 (coenzymes)**: 有机辅因子，如乳酸脱氢酶中的NAD<sup>+</sup>。
  - **辅基 (prosthetic groups)**: 共价连接的辅因子，如肌红蛋白中的血红素。
  - **翻译后修饰 (posttranslational modifications)**: 如糖基化

## 蛋白质纯化技术

分离依赖于蛋白质物理和化学性质的差异：

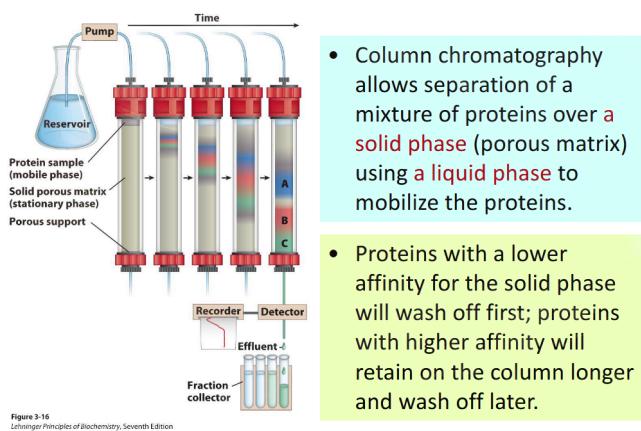
- 电荷
- 大小
- 对配体的亲和力
- 溶解度
- 疏水性
- 热稳定性

## 柱层析(Column Chromatography)

又名色谱法

### 原理

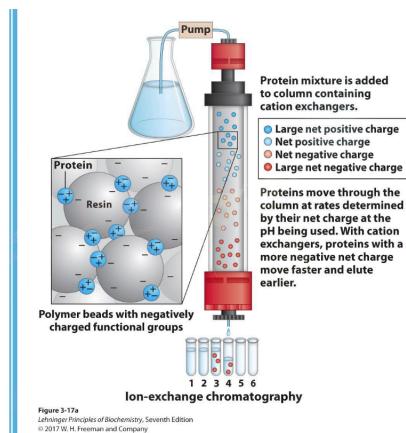
- 柱层析允许使用液体来动员蛋白质在固体（多孔矩阵）上分离蛋白质混合物。
- 对固相亲和力较低的蛋白质将首先被洗掉；亲和力较高的蛋白质将在柱上停留更长时间，然后被洗掉



## 分类及依据

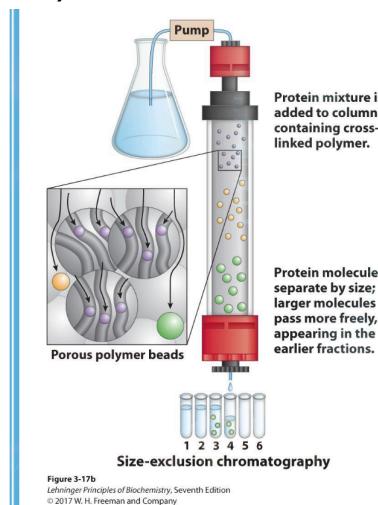
- 离子交换(Ion Exchange)层析：根据蛋白质在特定pH下的净电荷进行分离。

### (1) Separation by Charge: Ion Exchange



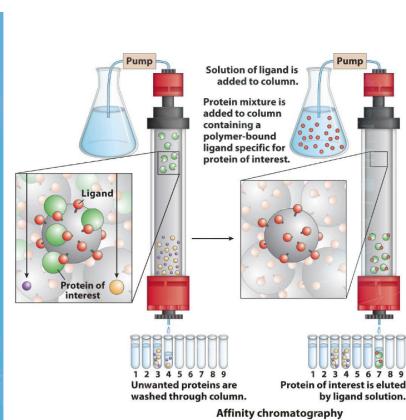
- 分子排阻(Size Exclusion)层析（或凝胶过滤）：根据蛋白质的大小进行分离，大分子先被洗脱。

### (2) Separation by Size: Size Exclusion



- 亲和(Affinity)层析：利用蛋白质对其特异性配体的高亲和力进行分离。

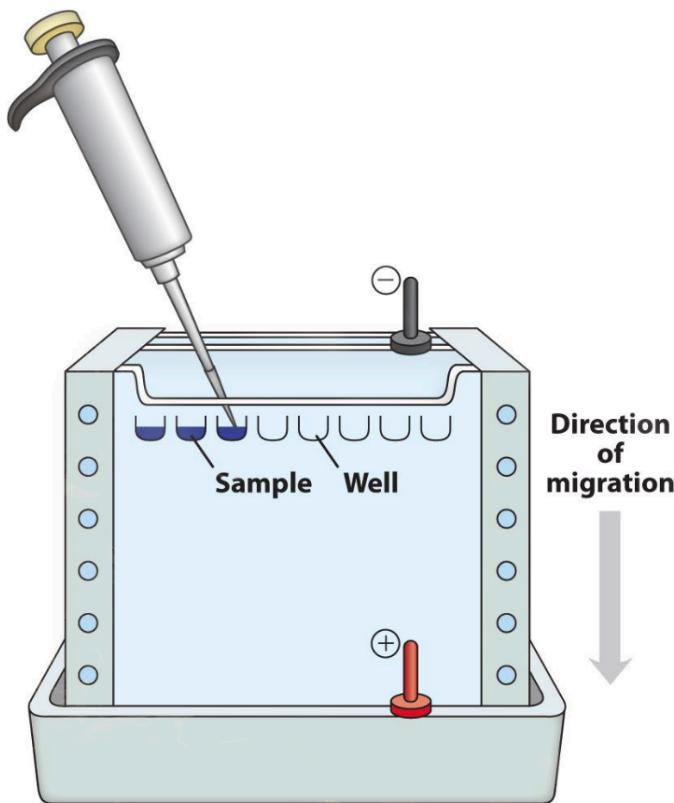
### (3) Separation by Binding: Affinity



## 电泳 Electrophoresis

### 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

在电场中，蛋白质根据其电荷、大小和形状在凝胶基质中迁移。



**Figure 3-18a**  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W. H. Freeman and Company

## SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)十二烷基硫酸钠-聚丙烯酸凝胶电泳

- SDS能使蛋白质**解折叠**，让蛋白质变成螺旋状，然后烷基链插入每个螺旋之间，暴露出带负电的磷酸基，这样就能让蛋白质**带负电**，结合比约为1g蛋白质：1.414gSDS
  - **不能用SDS-PAGE分离的蛋白：分子量相近的，不满足这样的结合比的、展开后不是螺旋结构的、表面自带很多电荷的.....**
- 施加外部电场之后，蛋白质就能在凝胶中**向正极迁移**
- SDS电泳迁移速率与蛋白质原来的形状无关，只和**分子量**有关
- 小分子迁移的快
- 电泳结束可以进行考马斯亮蓝染色
  - G250反应迅速可用于定量
  - R250反应较慢（40min），但可以被洗脱，且灵敏度高（下限0.1 $\mu$ g）
- 电泳的Marker：都是单链的、纯粹由氨基酸组成的（即没有糖基化等修饰）
  - Marker指已知分子量的标准蛋白
  - 可用于计算未知蛋白的分子量：相对迁移距离正比于分子量的负对数
  - **含有糖基化、脂质修饰的蛋白不可以用这种方法测量分子量**

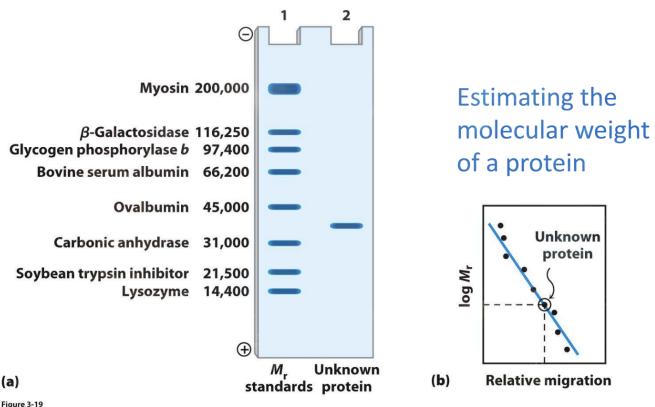


Figure 3-19  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W.H. Freeman and Company

## Isoelectric Focusing 等电聚焦

- 使用两性电解质，施加电场后从负极到正极会形成从高到底的pH梯度
- 在中央点样，蛋白质会移动到等电点的位置，此时蛋白质带电量为0，不再迁移
- 一般需要施加3000V的电压

### Ampholyte [两性电解质]

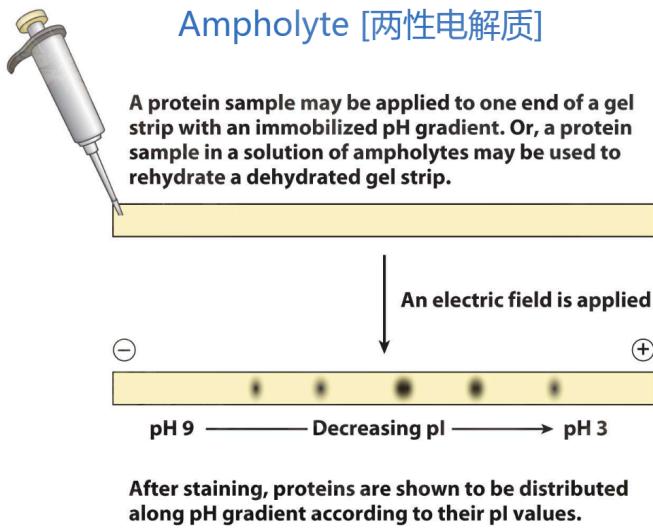


Figure 3-20  
Lehninger Principles of Biochemistry, Seventh Edition  
© 2017 W.H. Freeman and Company

## 蛋白质定量技术

### 吸光度法

- 对于已知含有芳香环氨基酸的蛋白质可以使用朗伯-比尔定律测定UV吸光度定量

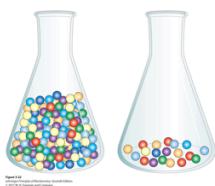
$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

其中 A 是吸光度， $\epsilon$  是摩尔吸光系数，c 是浓度，l 是光程。

## 比活力测定

- 活力 (Activity)**: 反应目标蛋白的功能状况

- **比活力 (Specific activity):** 指每毫克蛋白的活力单位数
- 比活力越高，蛋白纯度越高



- The flasks contain the same number of red marbles, but different numbers of marbles of other colors.
- If the marbles represent proteins, both flasks contain the same **activity** of the protein represented by the red marbles.
- The second flask, however, has the higher **specific activity** because red marbles represent a higher fraction of the total.

## 蛋白质测序技术

### Edman's Degradation

- 一种经典的测序方法，从多肽的**N-末端**开始，逐个对氨基酸进行修饰、切割和鉴定。
- 可用于鉴定具有已知序列的蛋白质
- 该过程已实现自动化，但通常只适用于较短的肽链（约50个残基）。

#### 步骤：

- 先在碱性环境下PTC与目标肽链氨基末端耦合
- 再酸性环境中切断
- 进一步转化为较为稳定的PTH-氨基酸
- 色谱检测PTH-氨基酸种类
- 开启下一轮反应

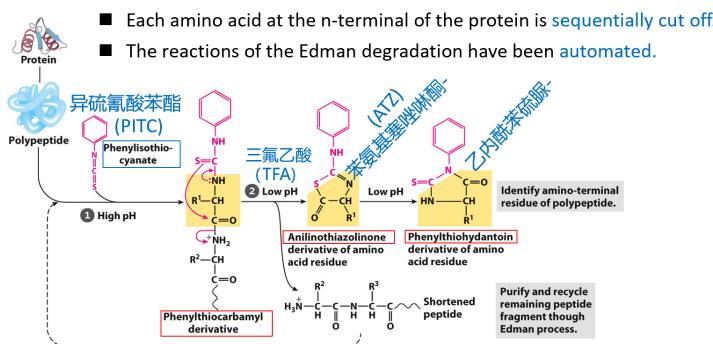


Figure 3-27 Leininger Principles of Biochemistry, 5  
© 2017 W. H. Freeman and Company

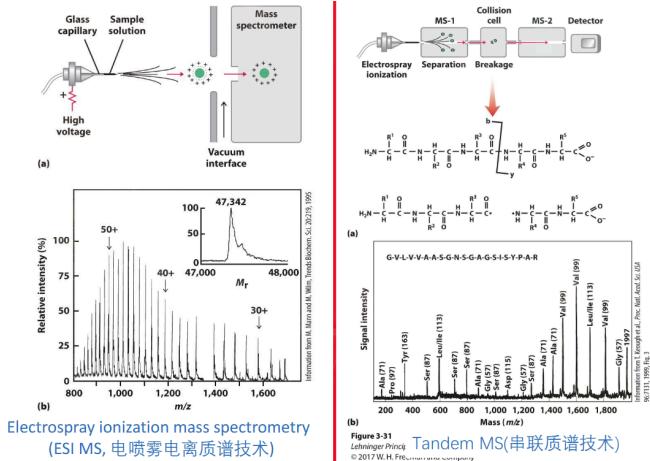
### 酶切法

某些酶可以识别特定的氨基酸序列并在特定位点切断肽链

### 质谱法

- **电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 和 串联质谱 (Tandem MS):** 肽段首先被离子化并根据质荷比 ( $m/z$ ) 分离，然后被破碎成更小的片段，通过分析这些片段的质量差，可以推断出氨基酸序列。

- 质谱法还可用于鉴定翻译后修饰。



## 蛋白质序列与进化关系

- **同源蛋白 (Homologous proteins)**: 具有显著序列相似性和共同祖先的蛋白质。
  - **直向同源蛋白 (Orthologs)**: 存在于不同物种中，功能通常相同。
  - **旁系同源蛋白 (Paralogs)**: 存在于同一物种中，由基因复制产生，功能可能已分化。
- 通过比较不同物种间功能相同的蛋白质序列，可以分析其差异，这些差异反映了进化距离。
- 对多个蛋白质家族的分析可以构建**进化树**，揭示生物体之间的进化关系。

