

第三章 蛋白质

- 一. 蛋白质概述 ✓
- 二. 氨基酸 (重点) ✓
- 三. 多肽 (重点) ✓
- 四. 蛋白质的结构 (重点) ←
- 五. 蛋白质结构与功能 (重点)
- 六. 蛋白质的性质 (重点)
- 七. 蛋白质的分离纯化与鉴定 (重点)

文献阅读报告活动
小组名单公布

见课堂派“资料”

内容回顾

三. 多肽

- 重要的天然肽（蛋白质亚单位、活性肽）
- 肽的化学合成（固相合成、均分合成法）

四. 蛋白质的结构

1. 蛋白质的结构层次：一、二、三、四级结构
2. 一级结构

一级结构
的测定

组成分析

端基分析

肽链拆分

选择性降解

顺序分析

二硫键测定

一级结构研究先进技术

① Sequencing by mass spectrometry

- <25 amino acid residues

- Ionization:

 - FAB (Fast Atom Bombardment, 快原子轰击)

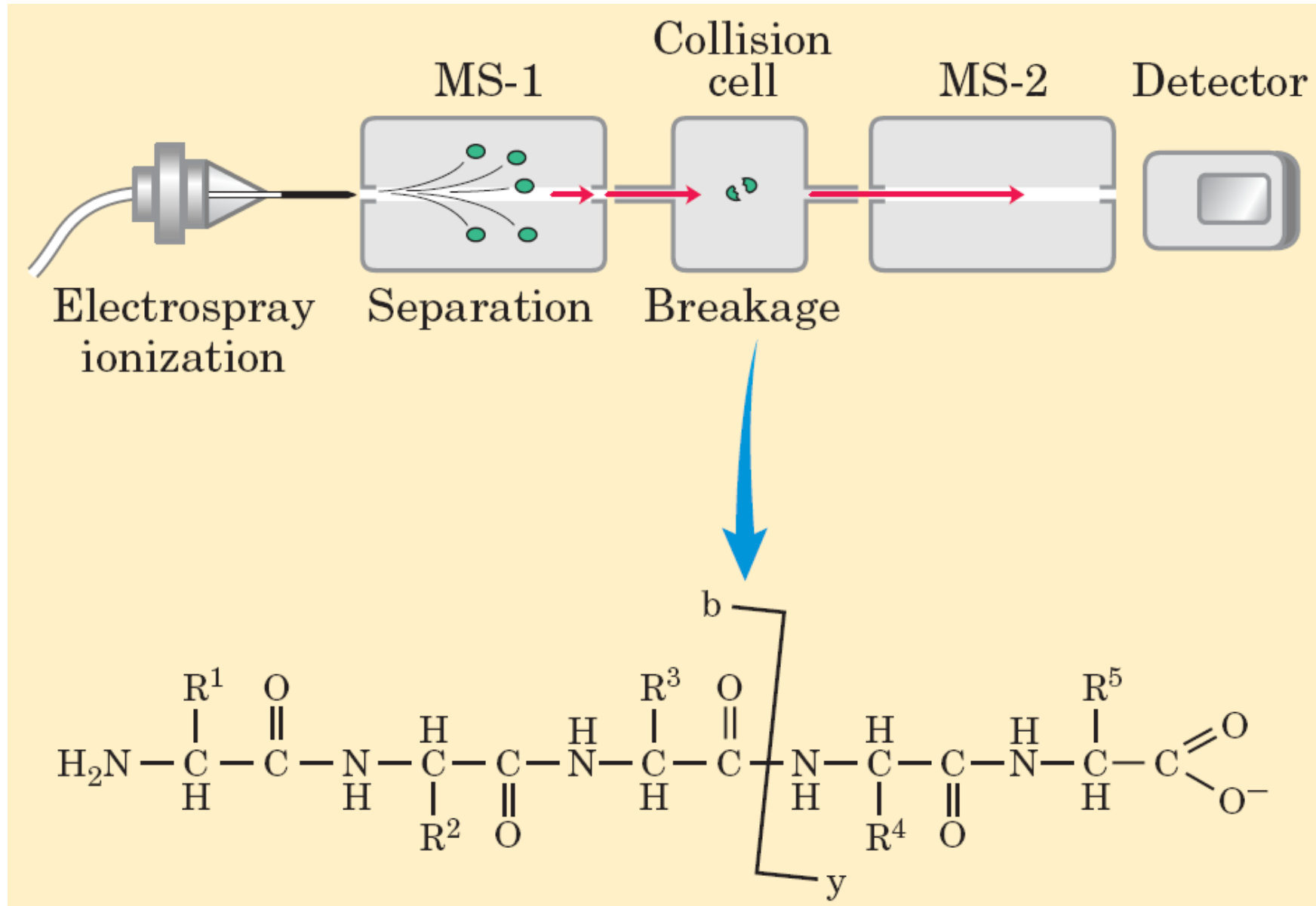
 - ESI (Electrospray Ionization, 电喷雾)

- tandem mass spectrometer (MS-MS) (串联质谱仪)

- can be used to sequence mixture

- can analyze the blocked N-terminal

Tandem Mass Spectrometer



一级结构研究先进技术

② Recombinant DNA technology

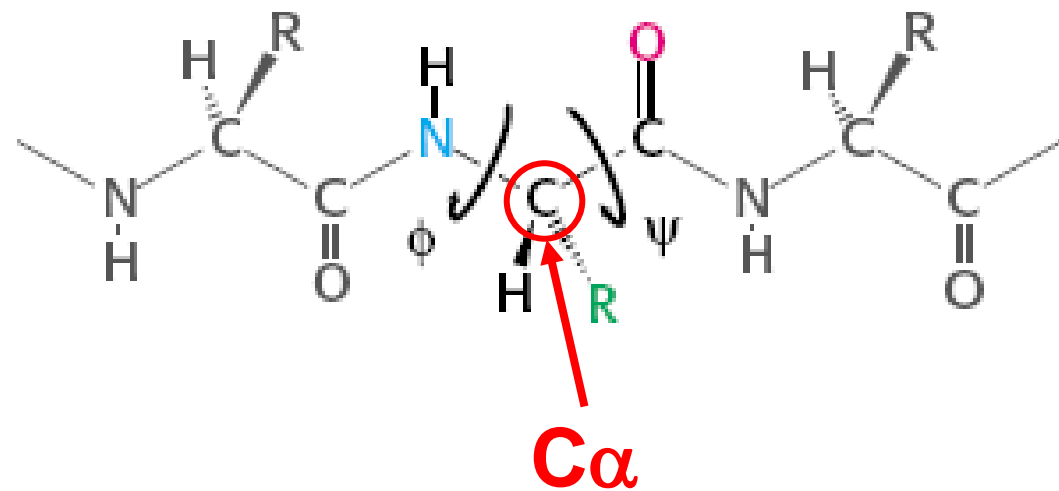
- **Principle:** DNA sequence decide the protein sequence
- Confirm the direct protein sequence
- Protein sequencing and DNA sequencing are used together to determine the complete sequence of a protein

四、蛋白质的结构

3. Secondary Structure

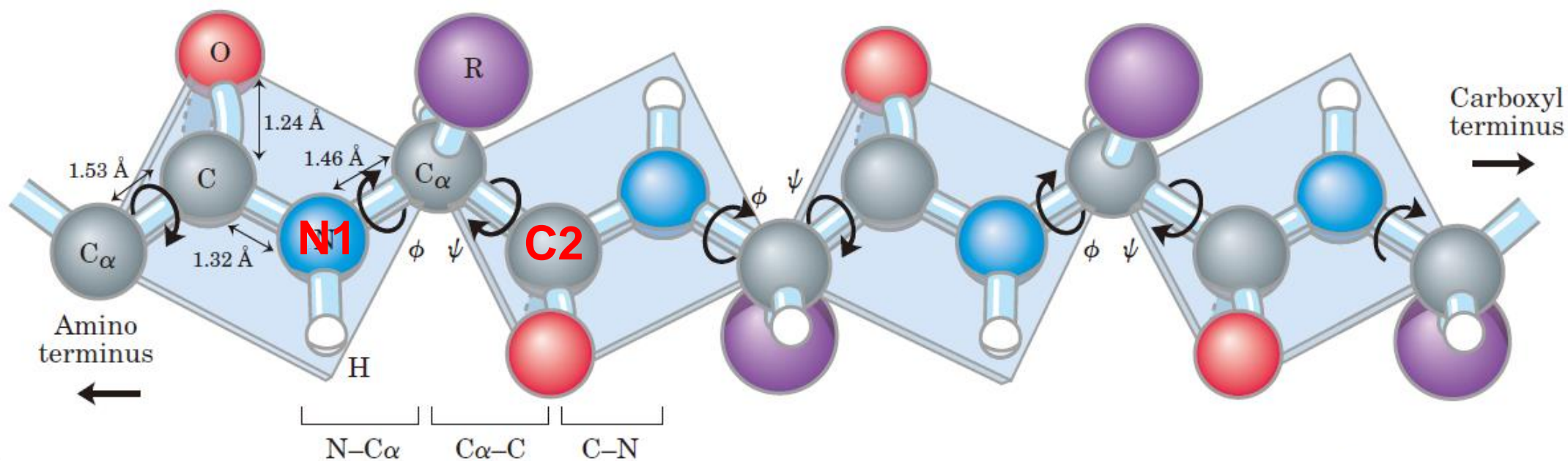
- **定义：**指肽链主链在空间的排列。只涉及肽链主链的构象及链内或链间形成的氢键。
- **主链的构象：**由肽键的特殊结构决定。

肽链中， $C_{\alpha}-N$ 和 $C_{\alpha}-C$ 键可自由旋转，在保持肽键平面结构不变的条件下，可形成不同的空间排布。

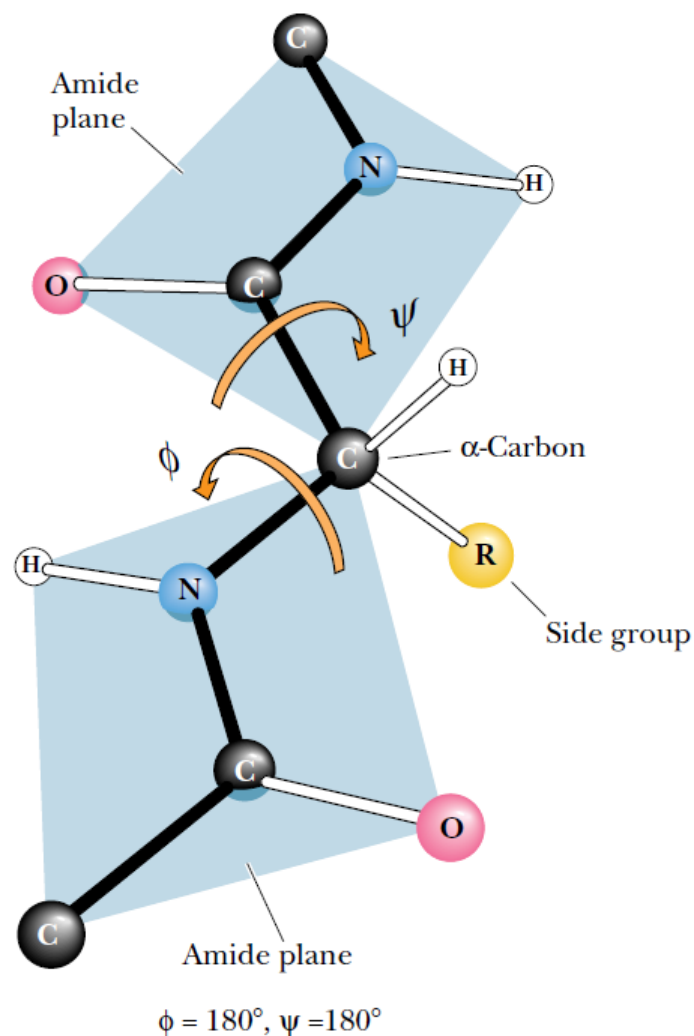


扭角 (ϕ , ψ)

- 一个肽平面围绕 N1- C_α 旋转的角度用 ϕ 表示；另一个肽平面围绕 C_α -C2 旋转的角度用 ψ 表示。这两个旋转角度叫扭角 (torsion)。

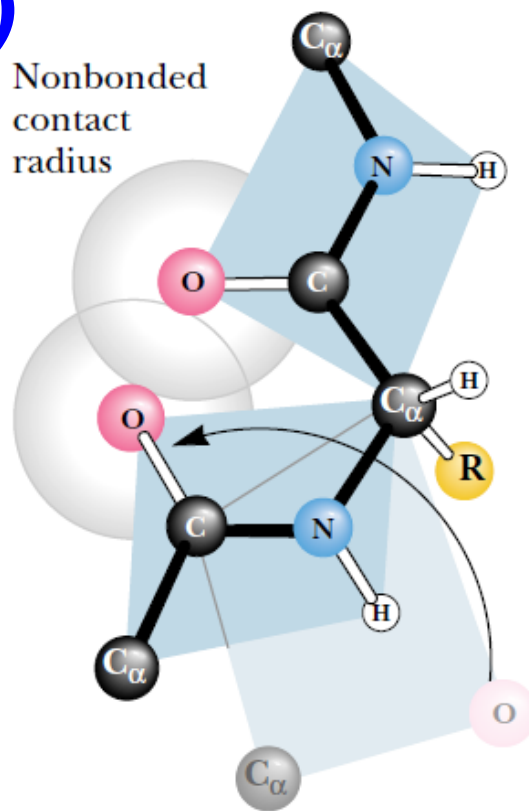


扭角 (ϕ , ψ) 决定相邻肽平面的相对位置



(1)

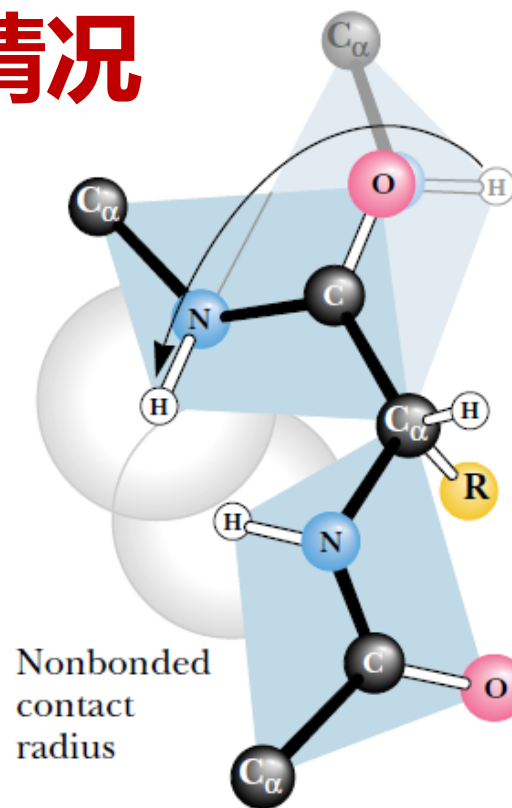
Nonbonded contact radius



$\phi = 0^\circ, \psi = 180^\circ$

四种极端情况

(2)



$\phi = 180^\circ, \psi = 0^\circ$

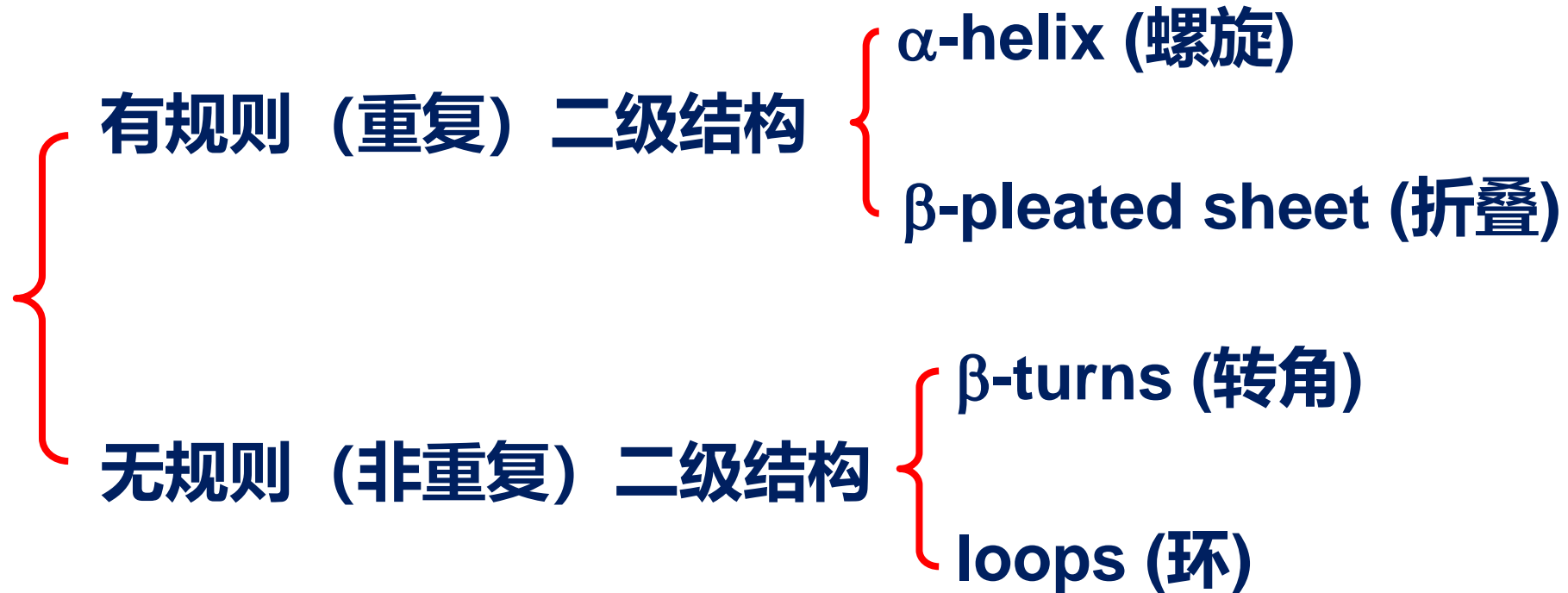
■ 由于各基团的空间取向限制，肽链构象受到限制

蛋白质二级结构中的氢键

- **氢键**：维持主链构象的非共价作用力。
- 主链中的 —C=O 和 —N—H 能够相互形成**链内或链间的氢键**。($\text{—C=O} \cdots \text{H—N—}$)
- 在各种可能的构象中，能够**形成氢键最多的构象最稳定**。

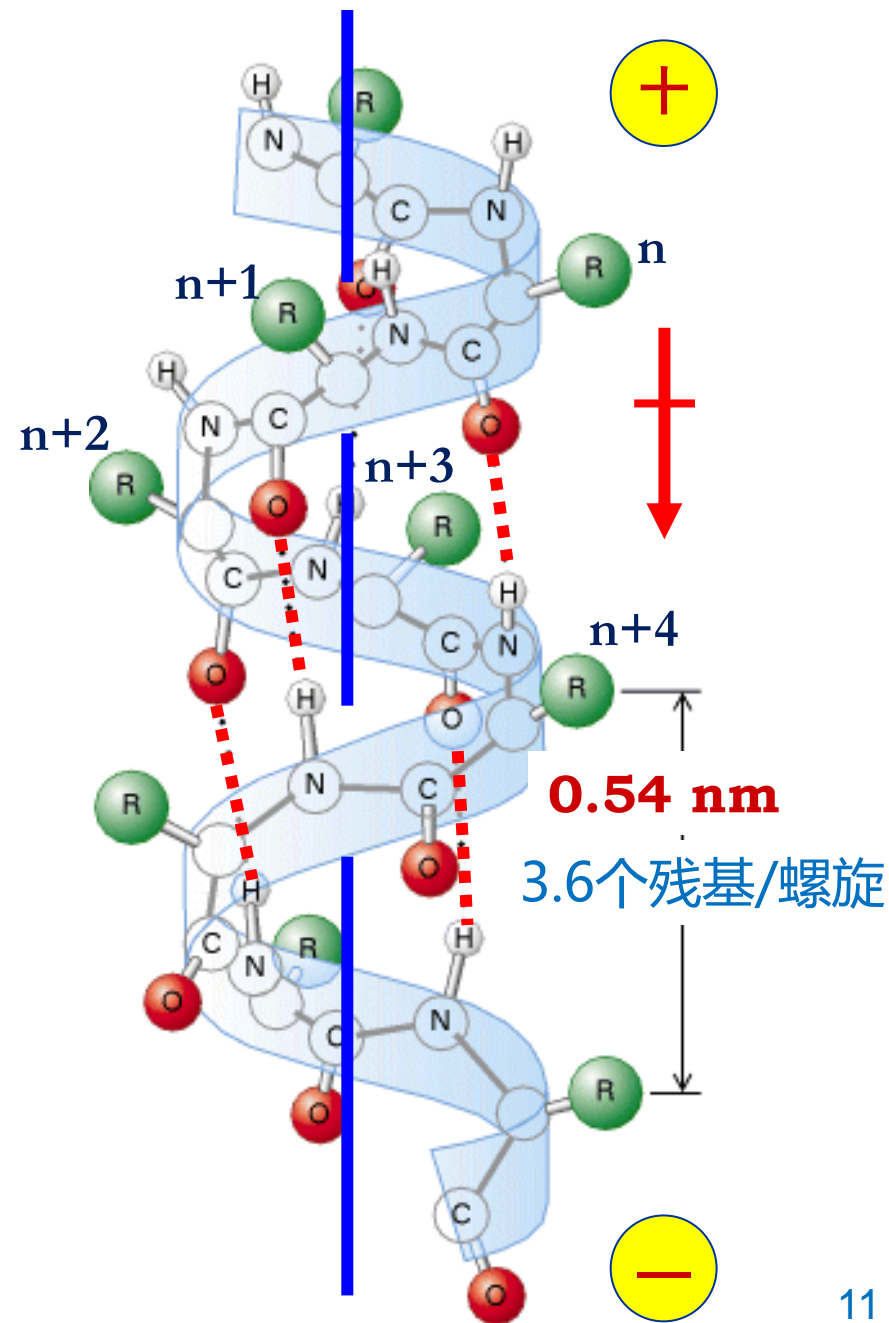
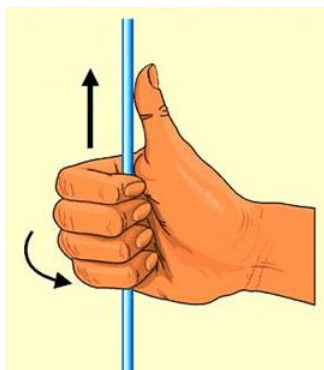
蛋白质二级结构的类型

■ 蛋白质的主要二级结构:

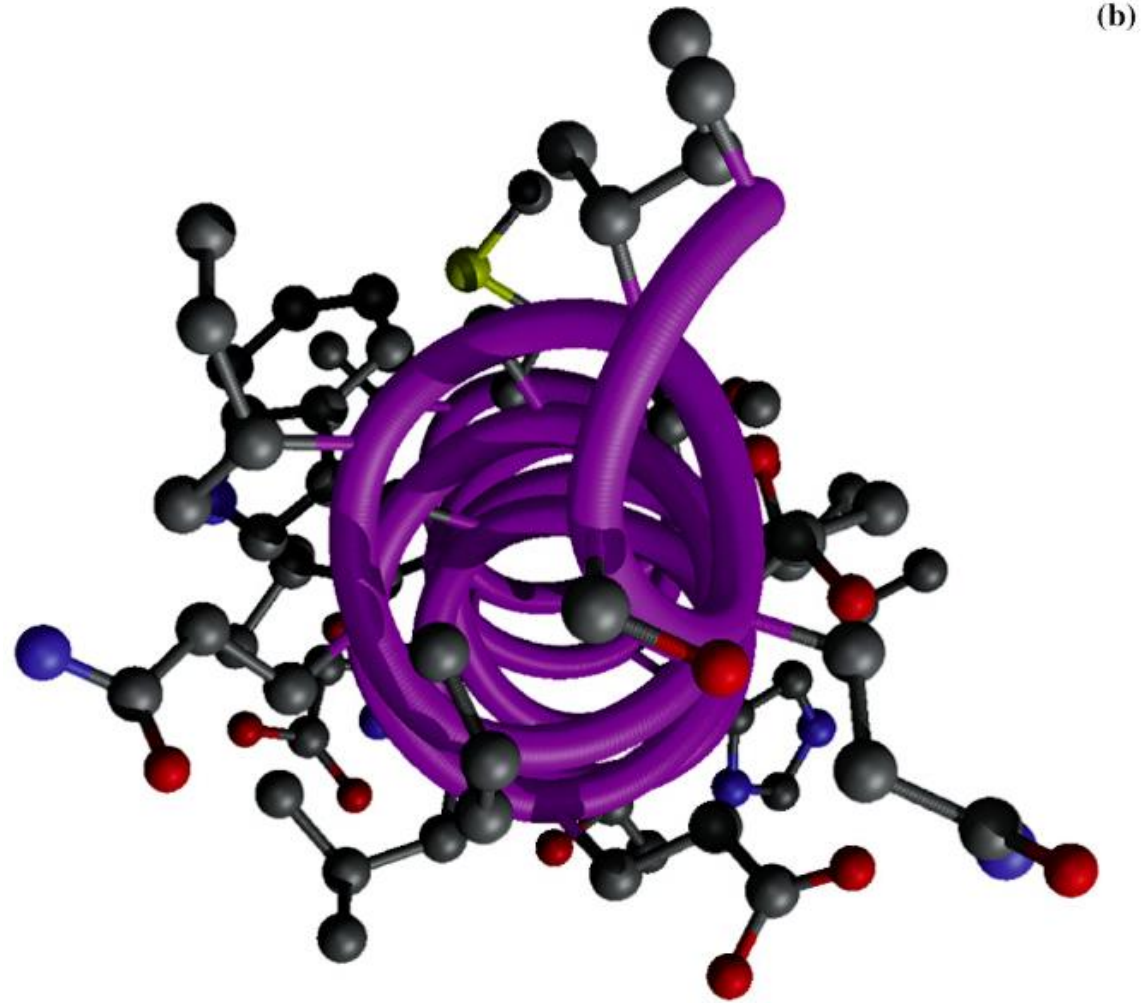
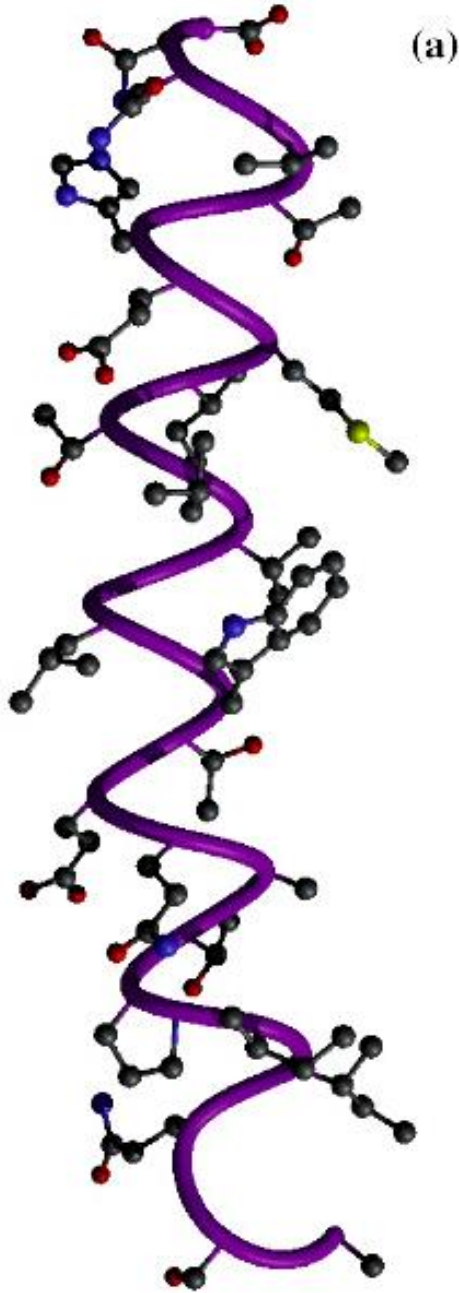


(1) α -Helix

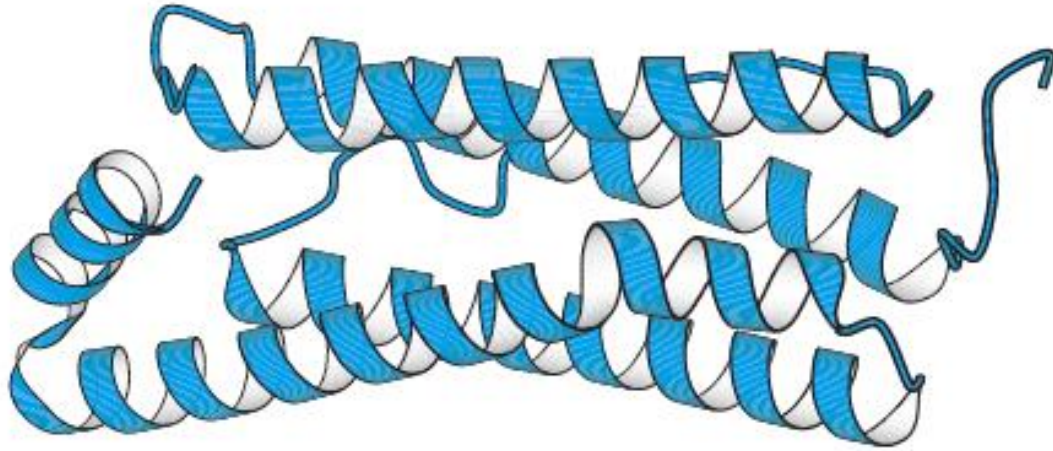
- 肽平面绕同一轴旋转，成螺旋结构，螺距**0.54 nm**，相邻残基间距**0.15 nm**。
- 链内氢键取向与轴几乎平行，第n个氨基酸残基的—CO与第n+4个氨基酸残基的—NH形成氢键。
- 有偶极矩。
- 多为右手螺旋。
- 普遍存在。



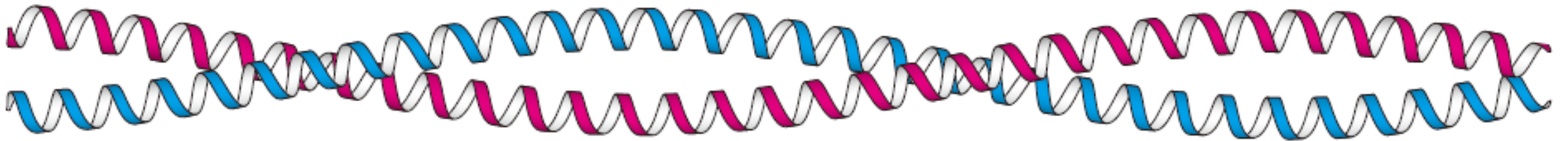
(1) α -Helix



(1) α -Helix



Ferritin (铁蛋白), an iron-storage protein, is built from a bundle of helices.



The two helices wind around one another to form a superhelix. Such structures are found in many proteins including keratin (角蛋白) in hair, quills, claws, and horns.

影响 α -helix形成的因素

■ 电荷

(polyGlu, polyLys)

■ 侧链大小

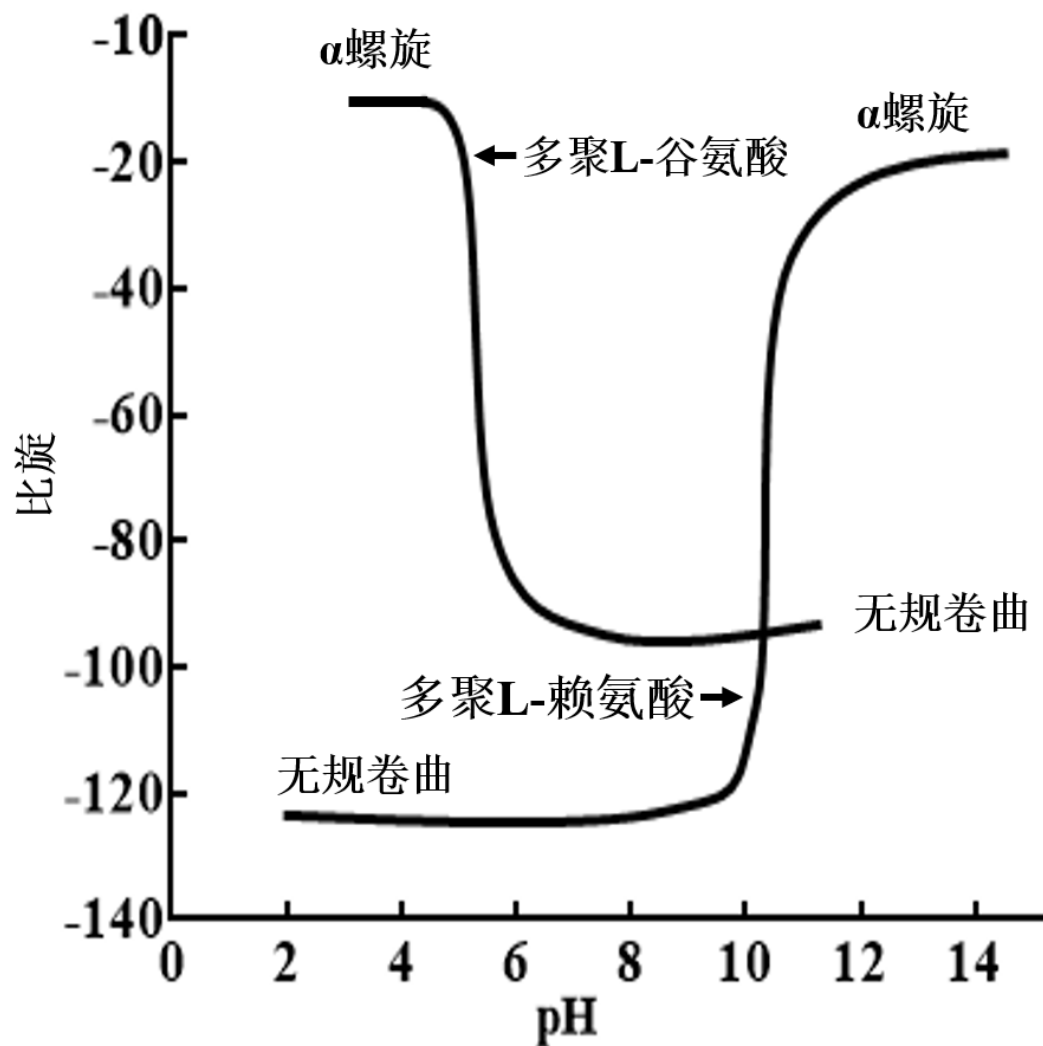
(polyIle)

■ Pro

--- 刚性 + 无链内氢键

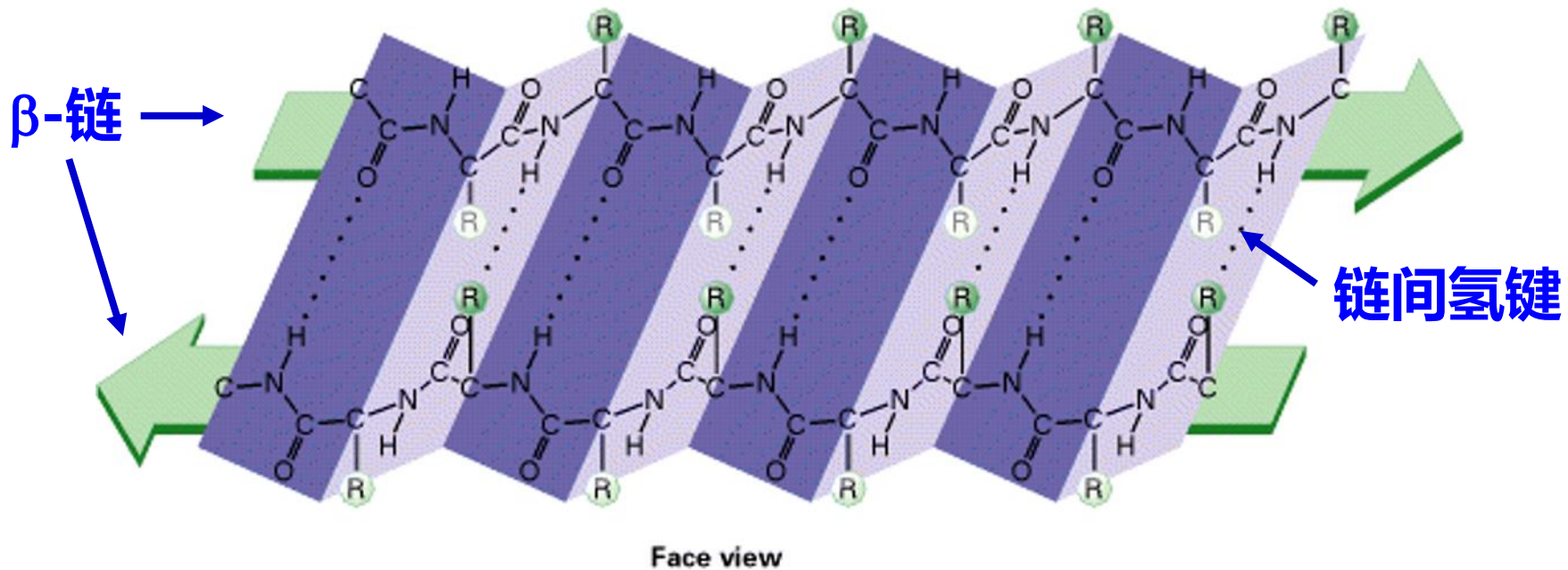
--- 产生“结节”

(kink)

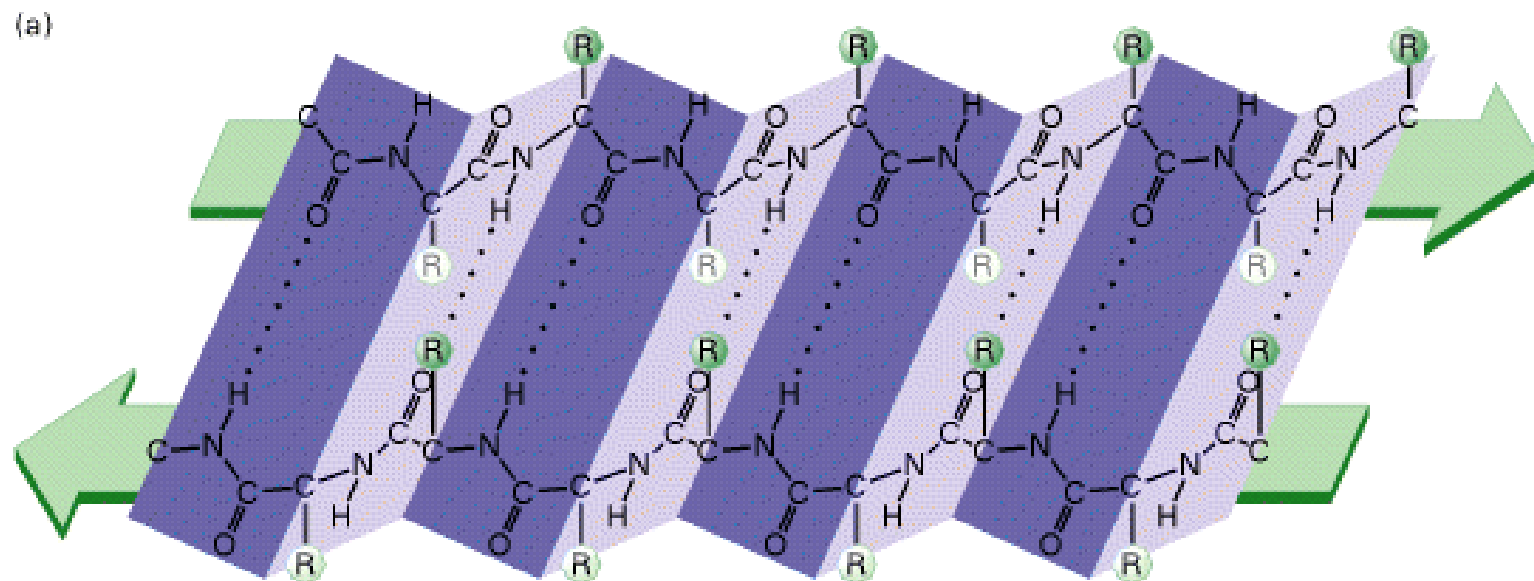


(2) β -pleated sheet

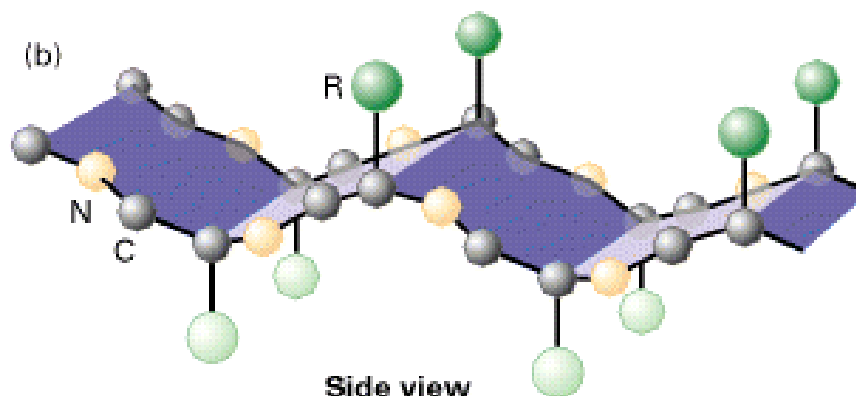
- ① 两条或多条几乎完全伸展的肽链平行排列，通过链间氢键交联形成锯齿状折叠构象。
- ② 每条肽链称作 β -strand.



③ α -C 原子总处于折棱上，氨基酸的 R 基团处于折棱上方并与棱垂直。

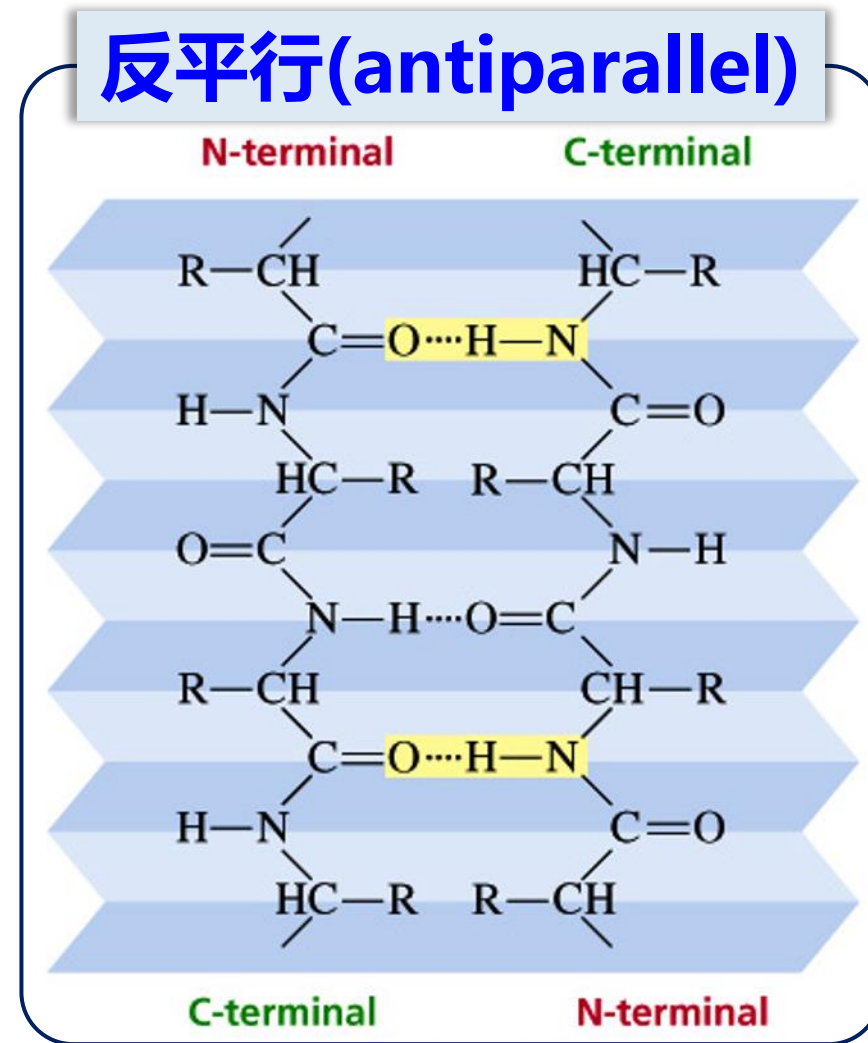
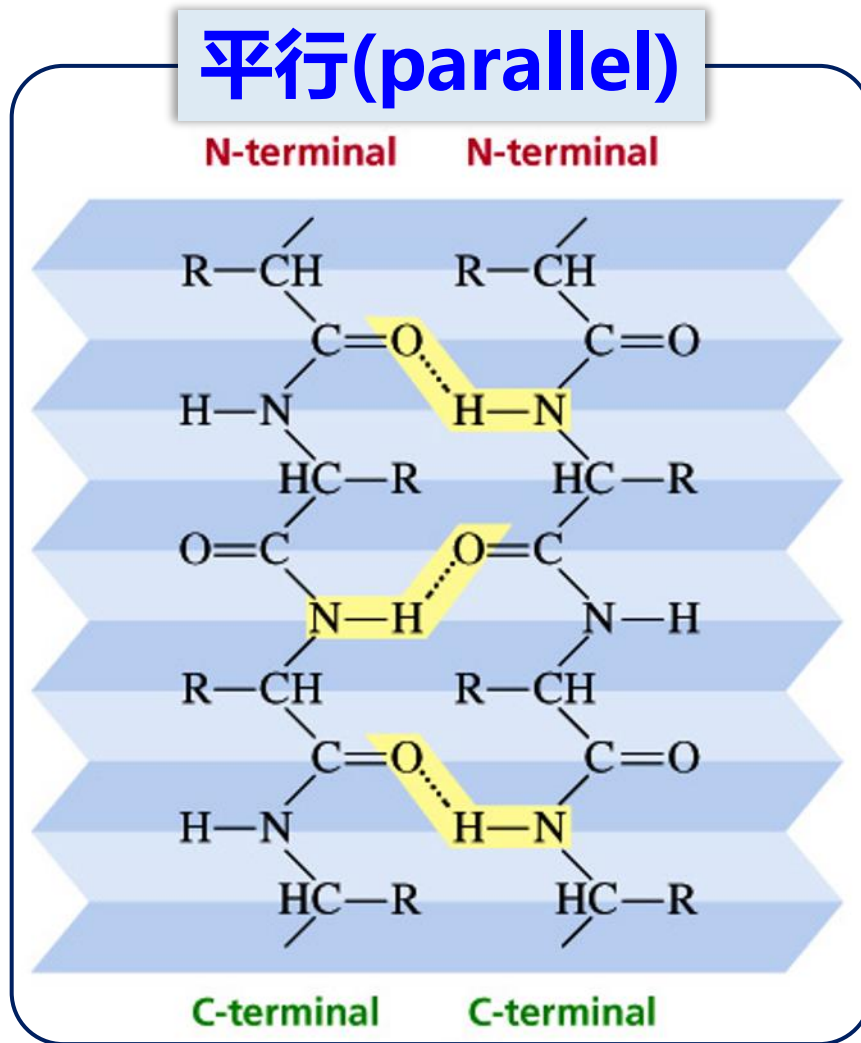


Face view



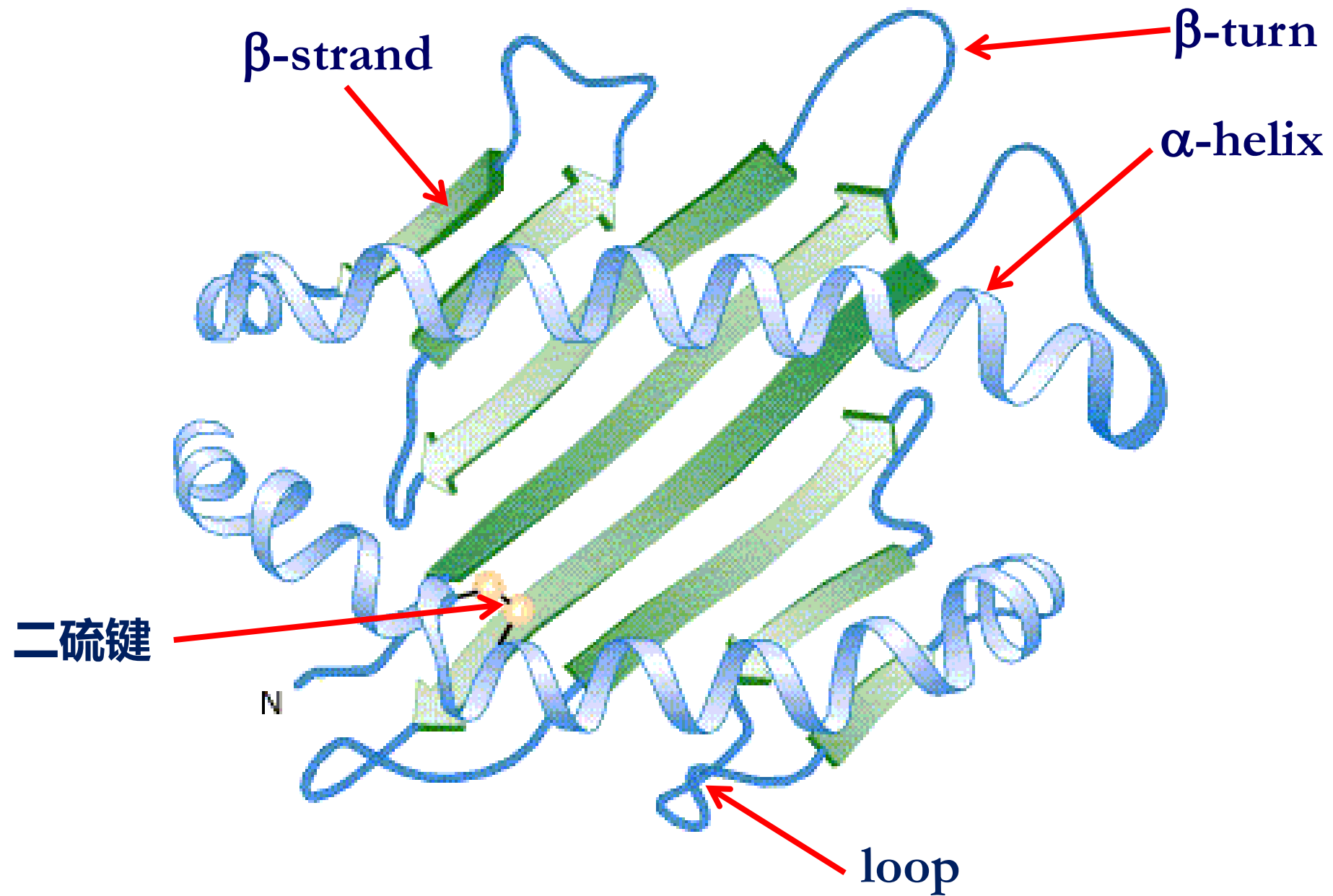
Side view

- ④ 存在平行和反平行两种形式。普遍存在于纤维状蛋白质（反平行为主）和球状蛋白质（两种形式）中。



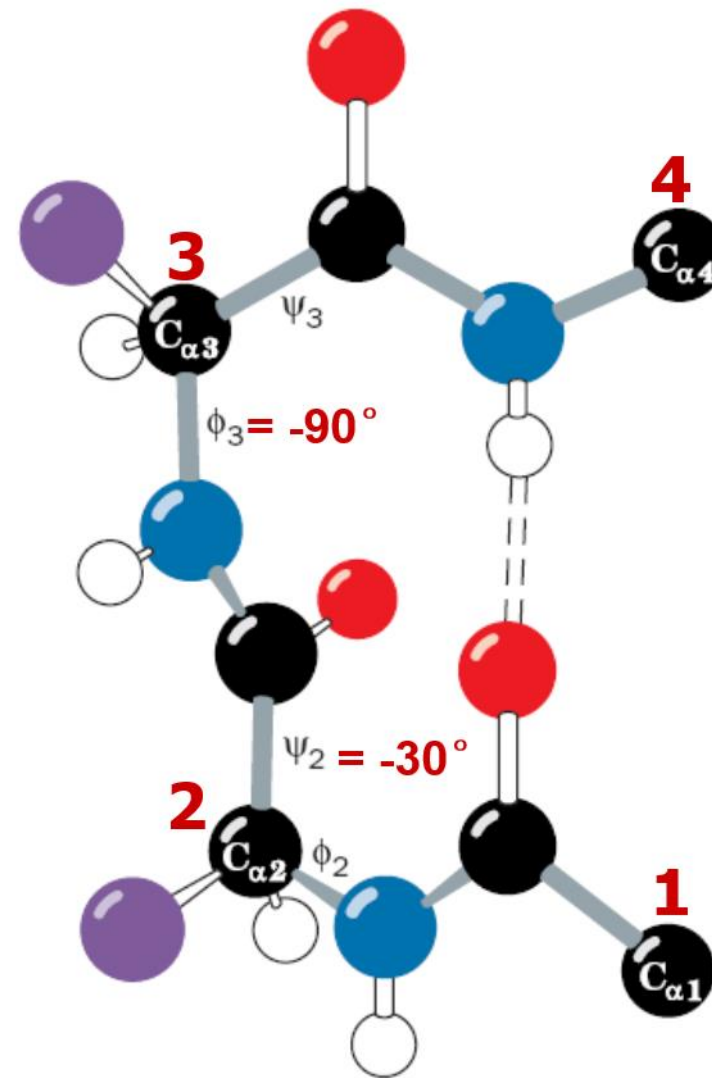
(3) Turn (转角) and loop (凸环)

- Connected α -helix and β -strands and allow the polypeptide chain to fold back to itself, producing the compact three-dimensional shape seen in the native structure.
- 1/3 AA in a typical protein are found in such nonrepetitive structures as turns and loops.

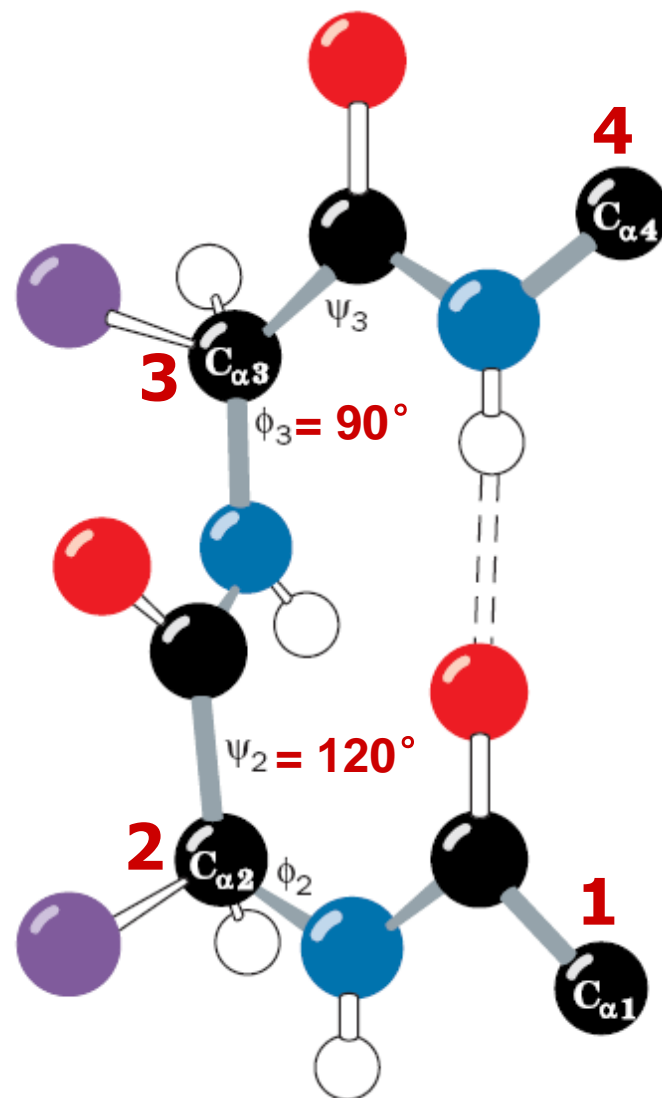
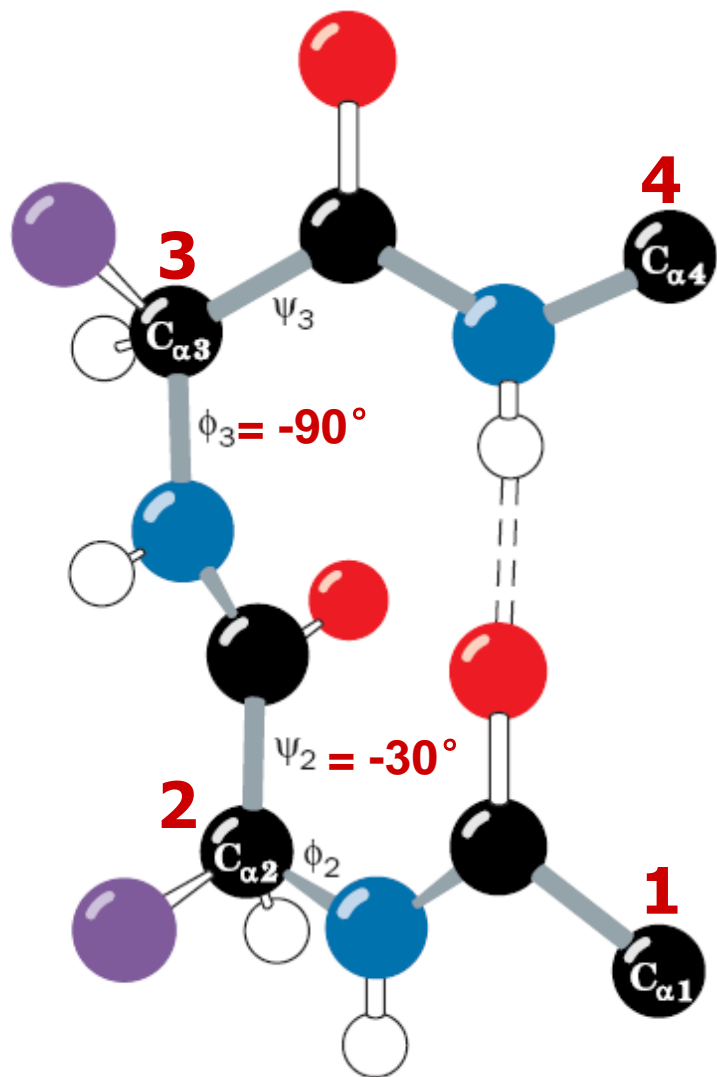


β -turn (β -转角)

- 由**四个**氨基酸残基组成。
- 弯曲处的第 **1** 个氨基酸残基的 $-\text{C}=\text{O}$ 和第 **4** 个残基的 $-\text{N}-\text{H}$ 之间形成**氢键**，形成一个比较稳定的**环状**结构。
- **Gly** 和 **Pro** 常常出现在 β -转角结构中。
- 主要存在于球状蛋白中，约占全部残基的1/4。



两种主要 β -转角结构



Ω loop

- 肽链片段的主链形成环形结构，卷曲成希腊字母 Ω 。
- 一般由6~16个氨基酸残基组成，肽链片段两末端间距离较小，约为0.37~1.0 nm。
- 残基侧链可堆积在环内，通过疏水作用或氢键等形成紧密结构。
- 几乎总位于蛋白质表面，与蛋白质识别功能有关，并参与催化作用。

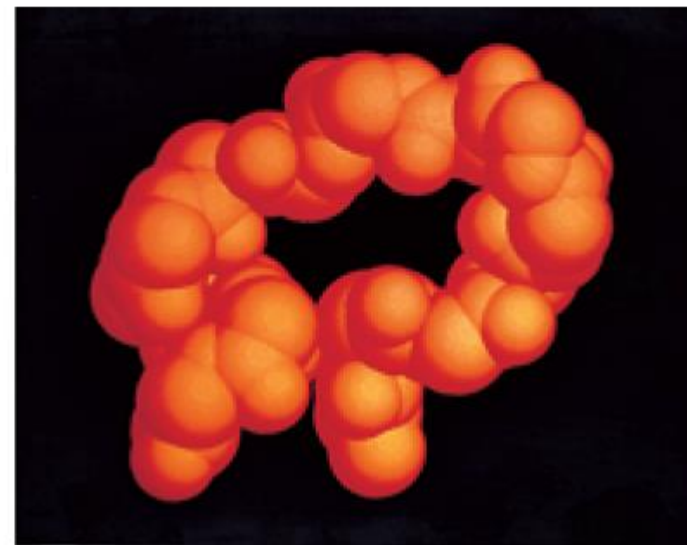
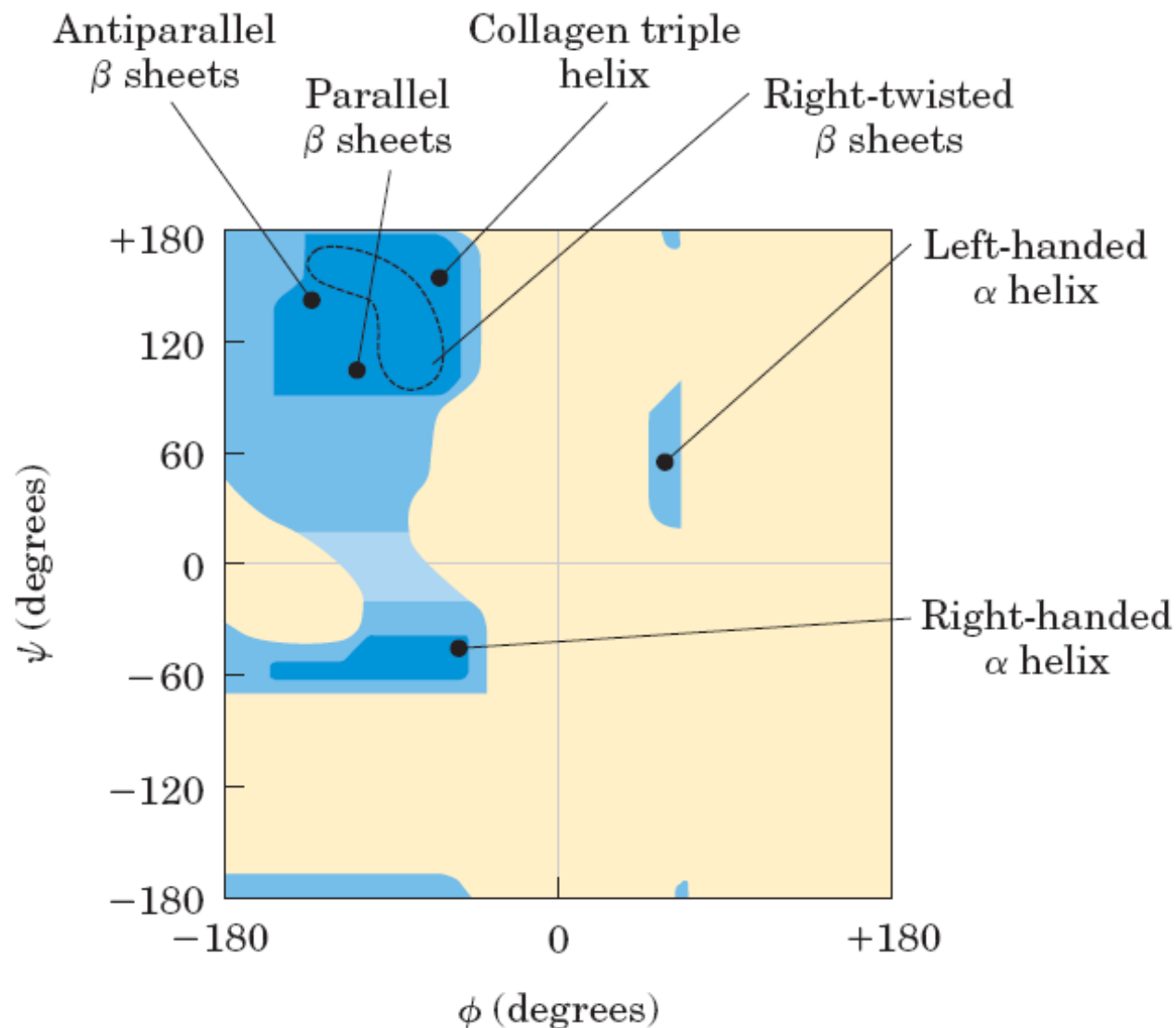


FIGURE 8-23 Space-filling representation of an Ω loop comprising residues 40 to 54 of cytochrome c. Only backbone atoms are shown; the addition of side chains would fill in the loop. [Courtesy of George Rose, Washington University School of Medicine.]

拉氏图 (Ramachandran plot)

可用来预测肽链允许的构象

Ala-**Ala**-Ala



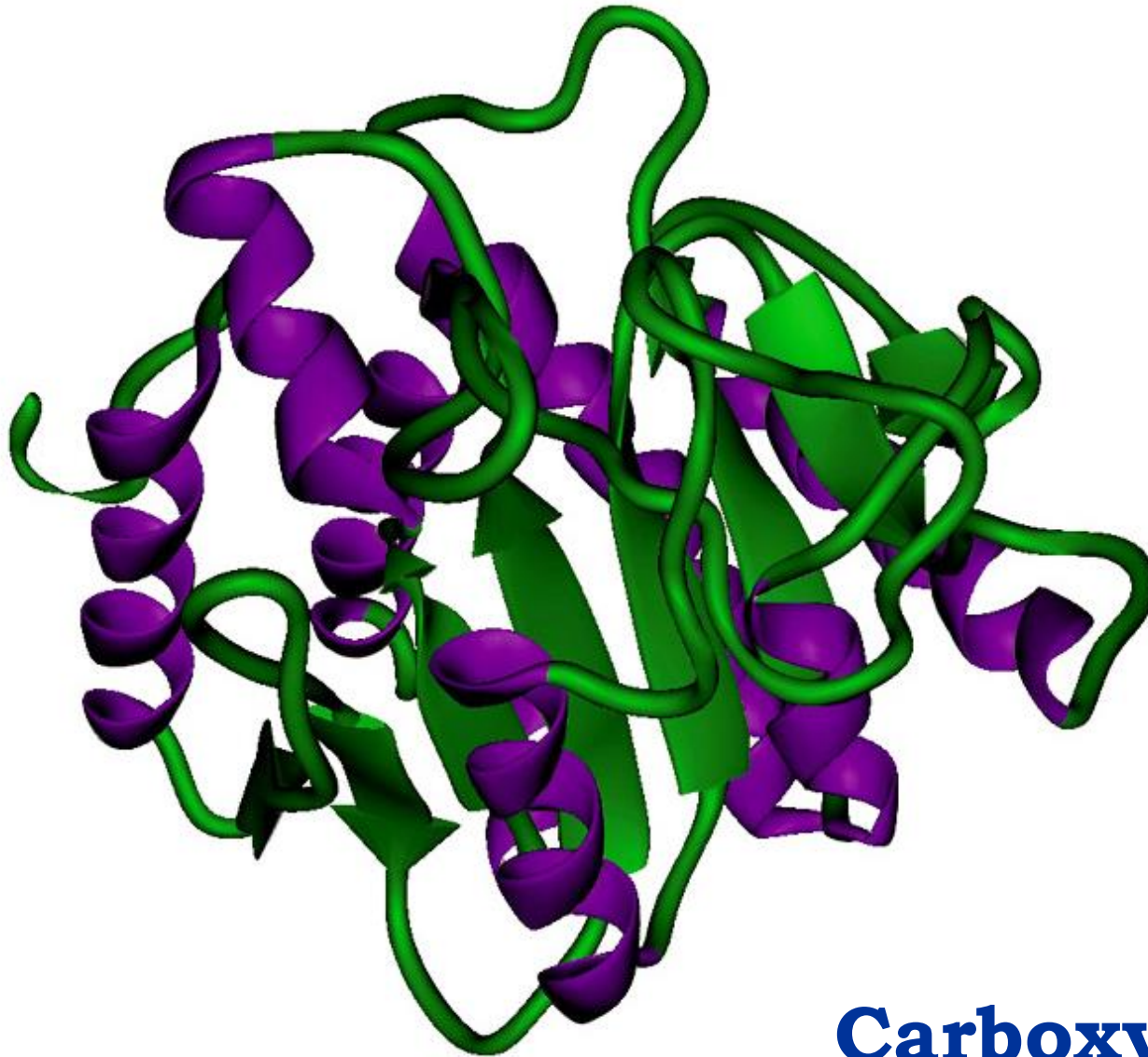
- *Rotation around the N—Ca and Ca—C bond that link peptide groups in a polypeptide chain.mp4*

四、蛋白质的结构

4. Tertiary Structure

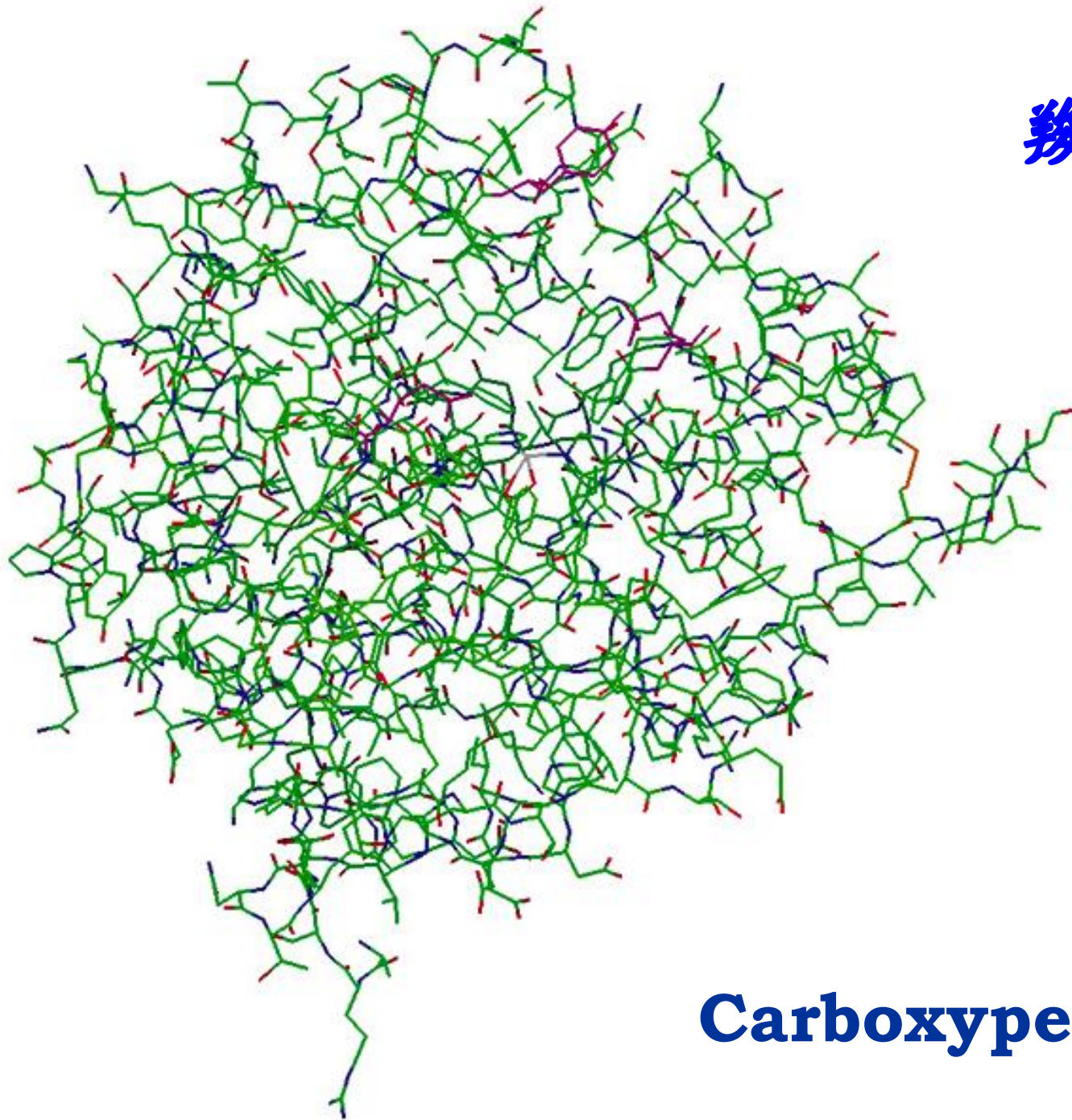
- **定义：**在二级结构基础上，肽链上不同区段的侧链基团相互作用，在空间进一步盘绕、折叠，形成包括主链和侧链构象在内的特征三维结构。
- **主要作用力：**氢键、疏水键、离子键、二硫键和范德华力等。

羧肽酶A



Carboxypeptidase A

羧肽酶A



Carboxypeptidase A

Determining the Three-Dimensional Structure of Proteins

- **No direct method** to determine the three-dimensional structure of proteins so far.
- **X-ray** single crystal diffraction analysis
- **NMR** spectroscopy analysis
- **Cryo-ME** (Cryo-electronmicroscopy, **冷冻电镜**)
- **Structural Bioinformatics** (**结构生物信息学**)
- **蛋白质数据库** (protein data bank, PDB, 网址: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

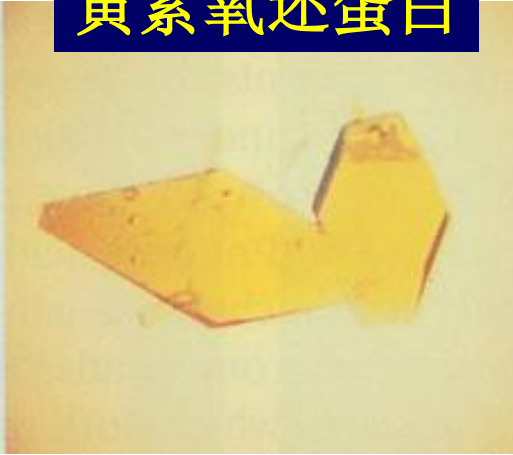
Protein crystals

天青蛋白



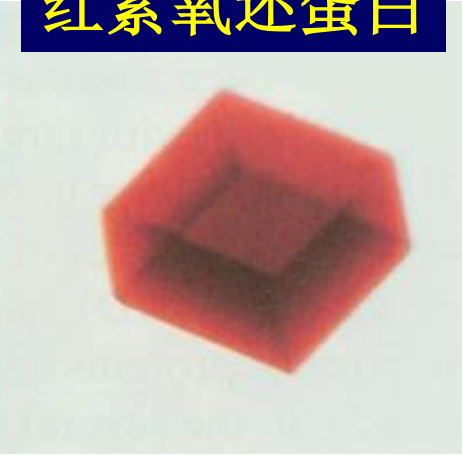
Azurin

黄素氧还蛋白



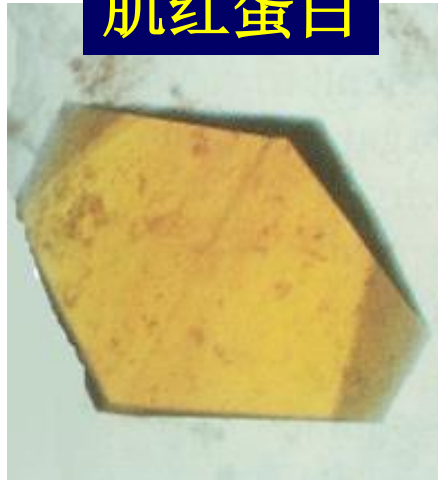
flavodoxin

红素氧还蛋白



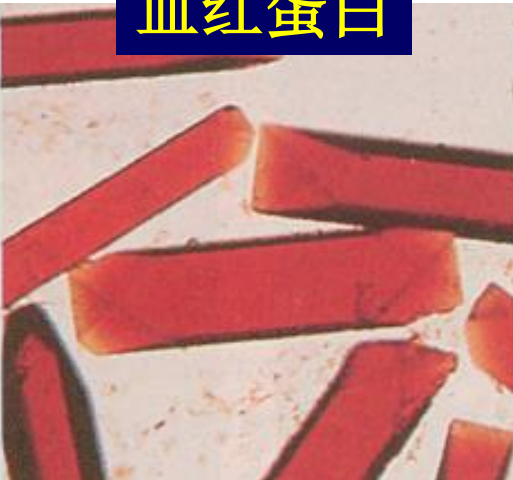
rubredoxin

肌红蛋白



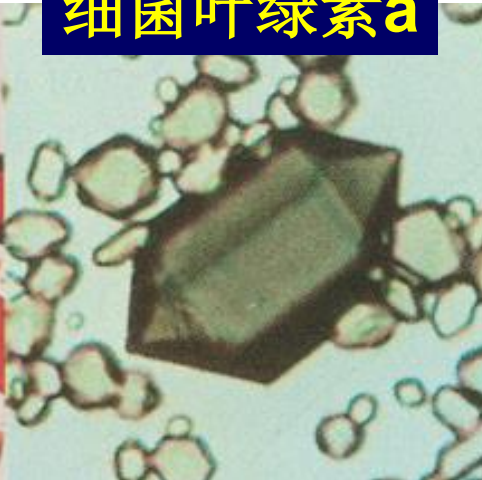
myohemerythrin

血红蛋白



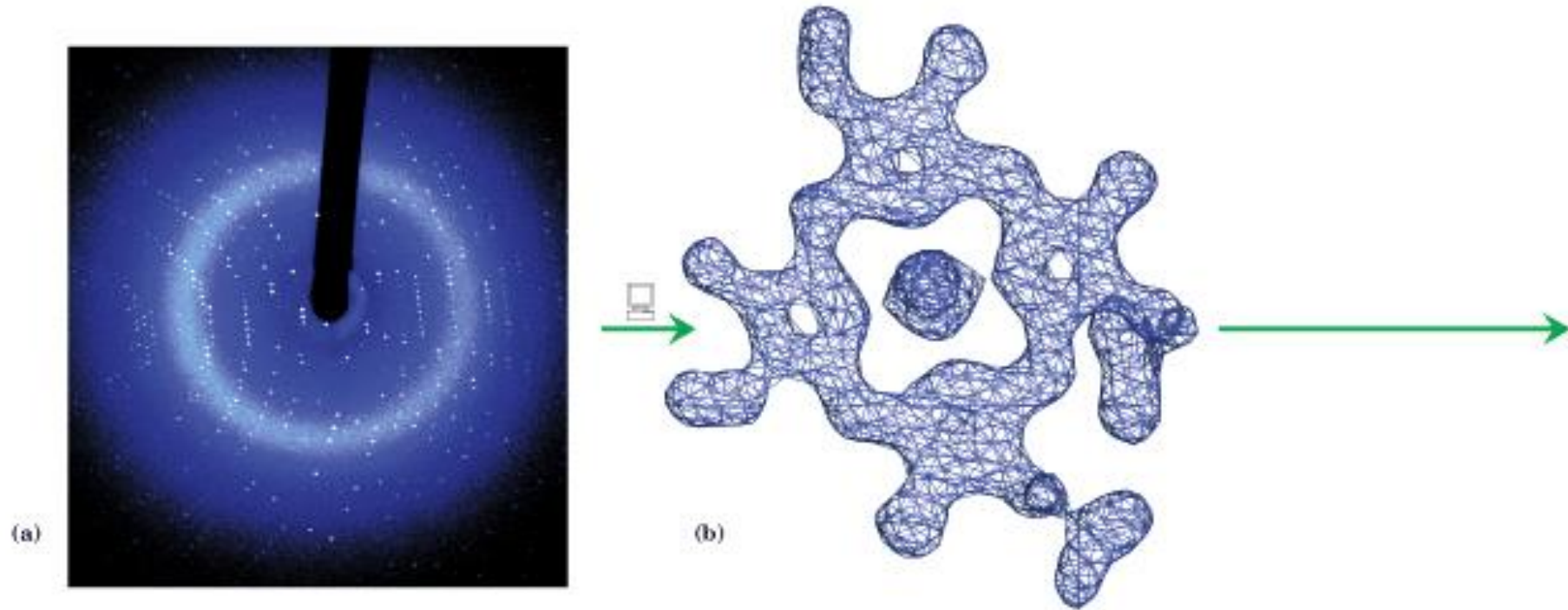
hemoglobin

细菌叶绿素a



Bacterio-chlorophyll a

X-ray single crystal diffraction analysis



G Protein-Coupled Receptors (GPCR)

2012 Nobel Chemical Prize



Robert J. Lefkowitz

69

**Howard Hughes
Medical Institute**



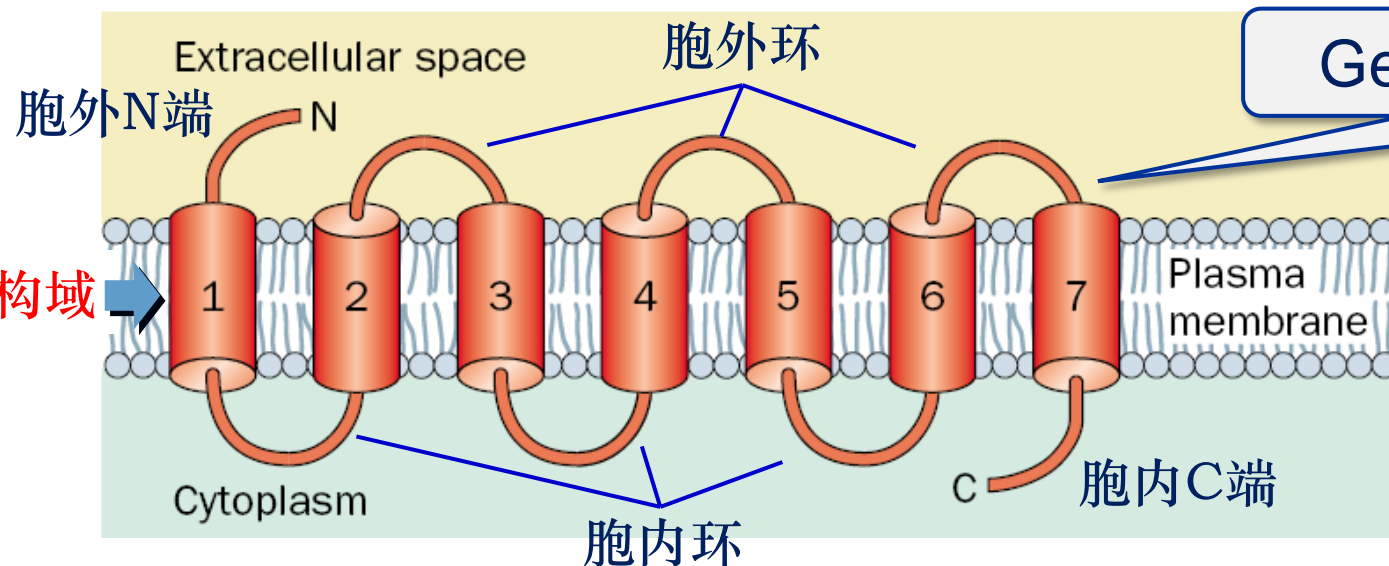
Brian K. Kobilka

57

Stanford U

- one of the largest known protein families (>800 members).
- 1000 species in mammals, which constitutes 3% of the 30,000 genes.
- 60% of approved drugs elicit their therapeutic effects by selectively interacting with a specific GPCR.

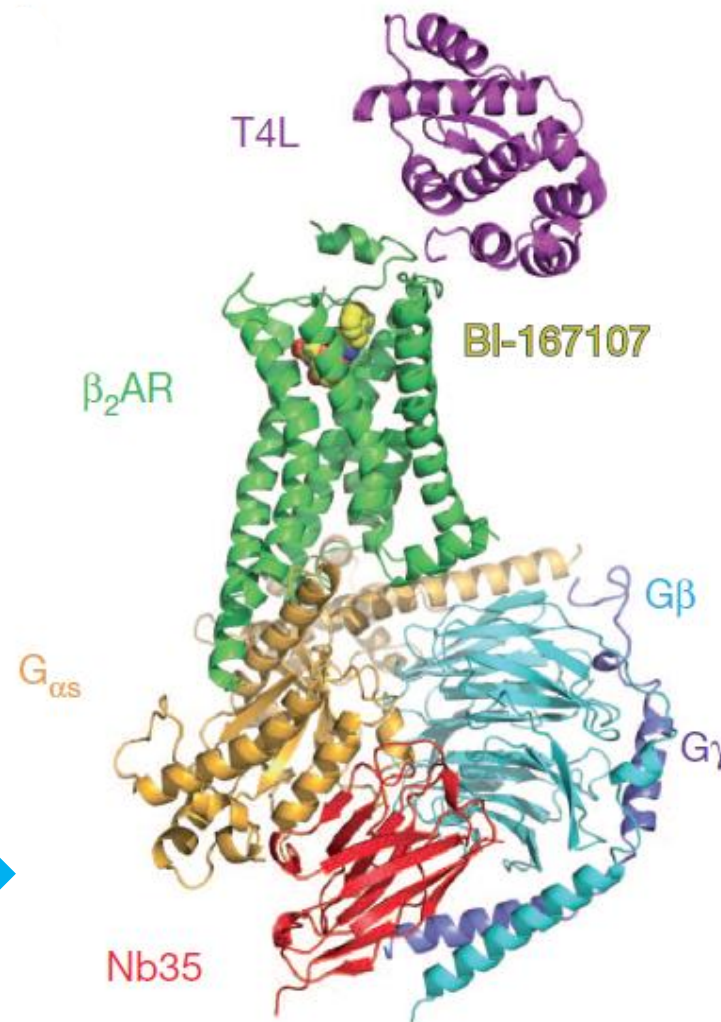
G Protein-Coupled Receptors



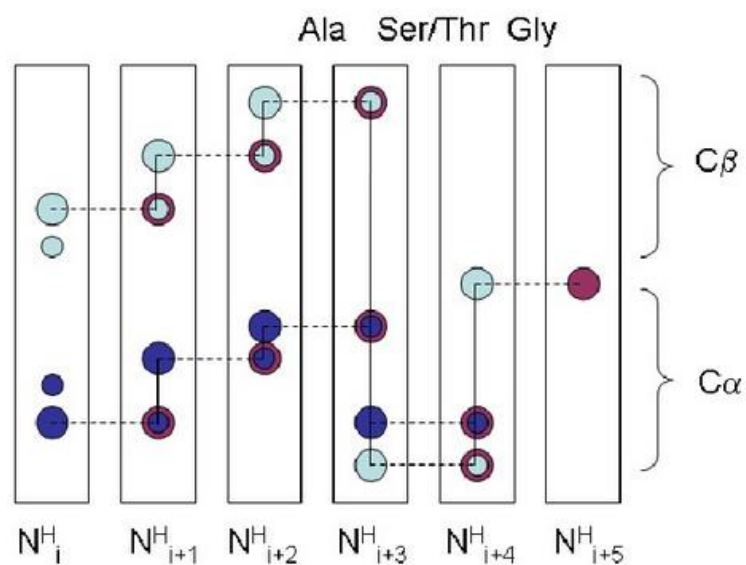
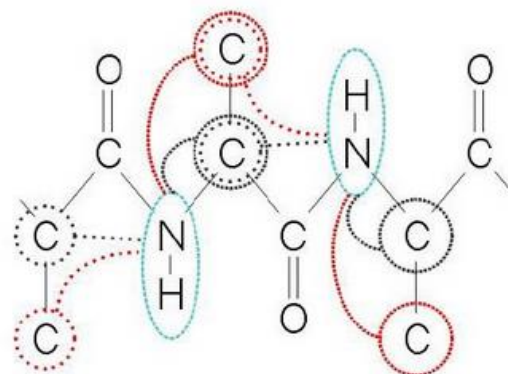
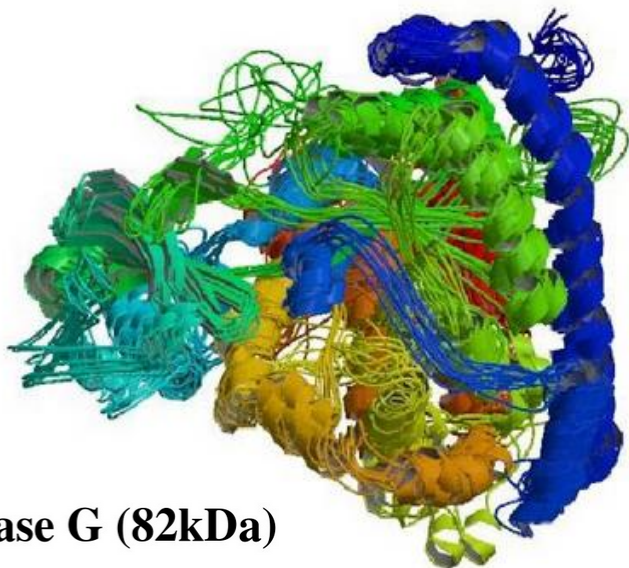
General structure of a GPCR

Overall structure of the **$\beta 2\text{AR}$ -Gs** complex. The overall structure of the asymmetric unit contents shows the **$\beta 2\text{AR}$** (green) bound to an **agonist** (yellow spheres) and engaged in extensive interactions with **G α s** (orange). G α s together with **G β** (cyan) and **G γ** (purple) constitute the heterotrimeric G protein Gs. A Gs-binding **nanobody** (red) binds the G protein between the α and β subunits. The nanobody (Nb35) facilitates crystallization, as does **T4 lysozyme** (magenta) fused to the amino terminus of the **$\beta 2\text{AR}$** .
Nature 2011, 477, 549-557.

$\beta 2\text{AR}$: $\beta 2$ 肾上腺素能受体 **Gs**: 兴奋性G蛋白



NMR spectroscopy analysis

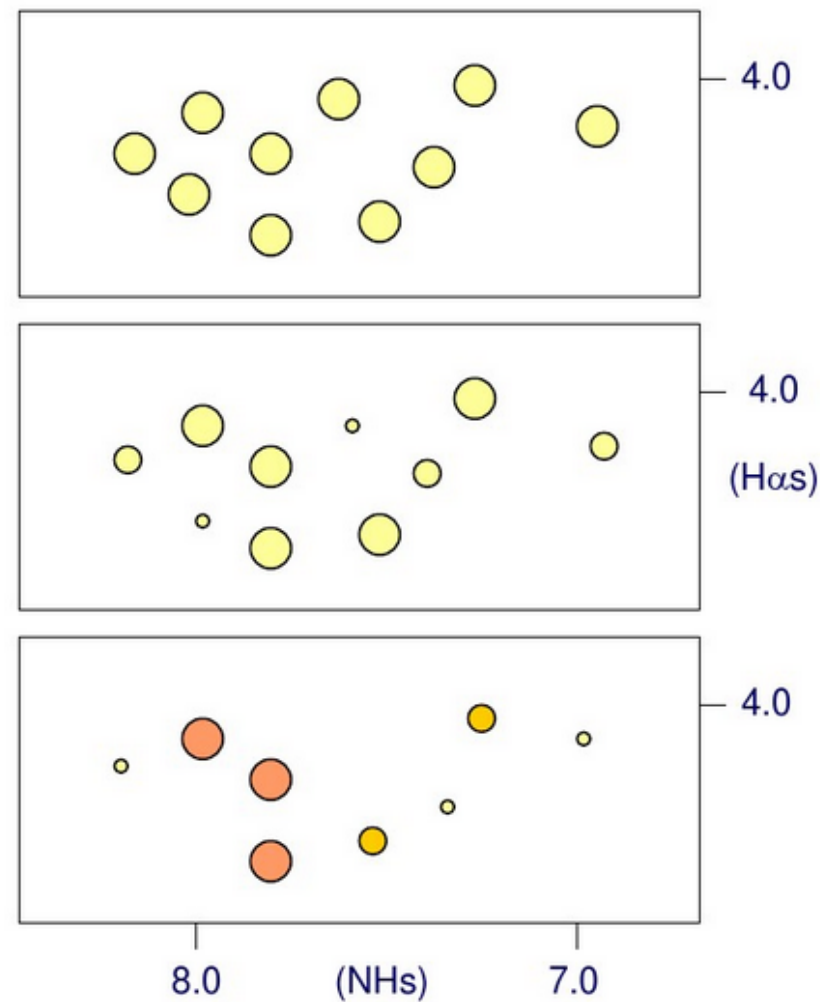


$t = 0$ - No D_2O

Add D_2O

$t = t_1$

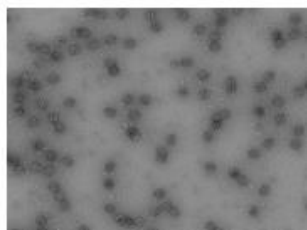
$t = t_2$



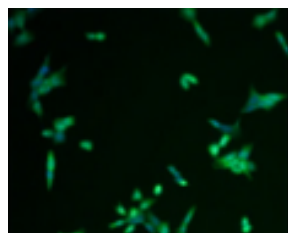
冷冻电镜技术 (Cryo-ME)

尤其适于分析难以形成三维晶体的 膜蛋白以及病毒和蛋白质-核酸复合物等大的复合体的三维结构。

负染电镜筛选



生化样品制备



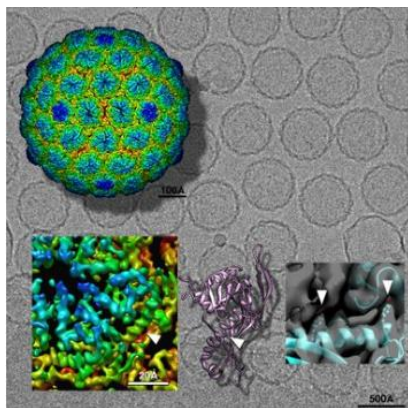
样品玻璃化冷冻固定



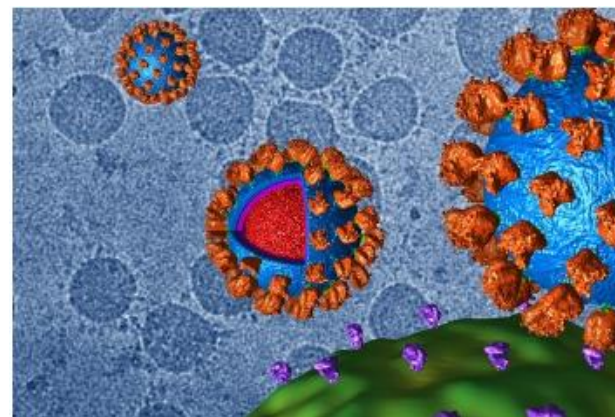
样品筛选和数据采集



300 kV 数据采集



三维重构



The Nobel Prize in Chemistry 2017



© Nobel Media, Ill. N. Elmehed
Jacques Dubochet
Prize share: 1/3



© Nobel Media, Ill. N. Elmehed
Joachim Frank
Prize share: 1/3



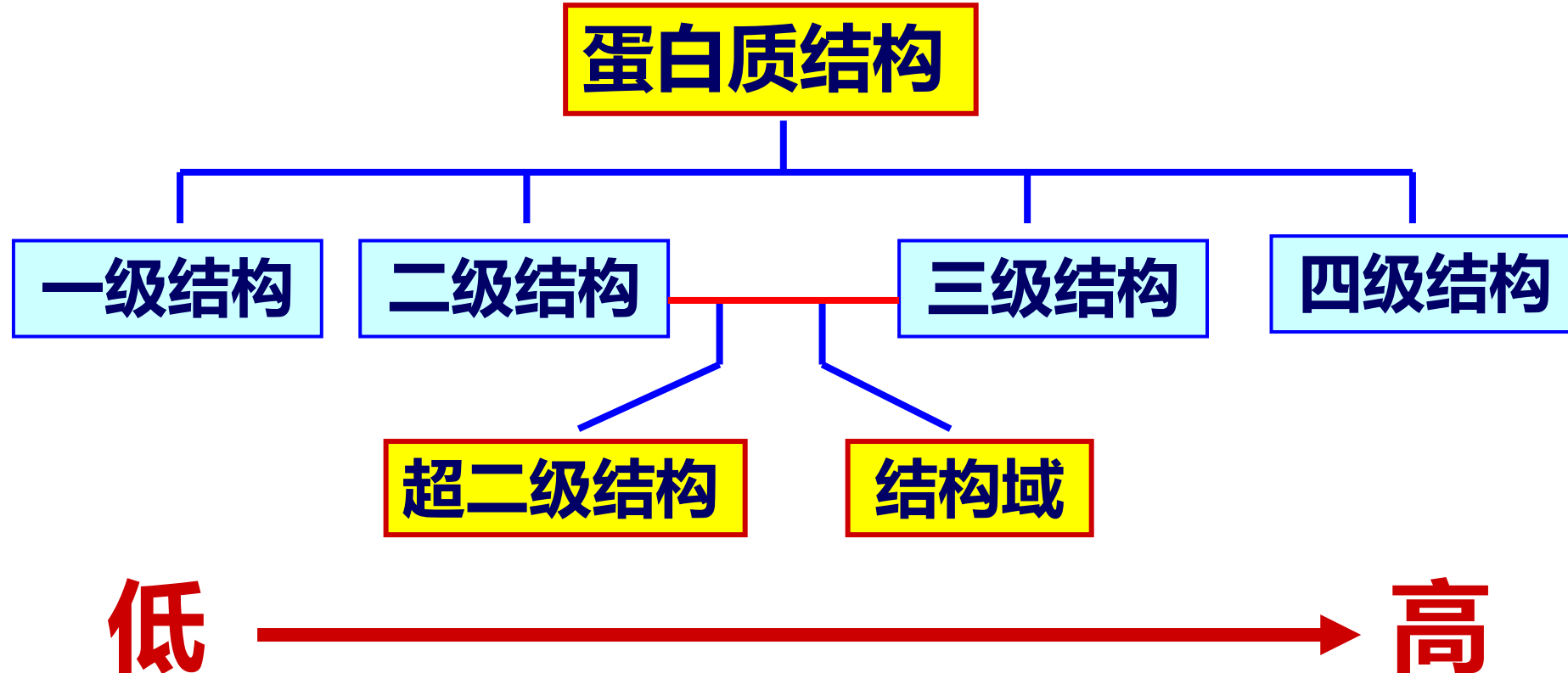
© Nobel Media, Ill. N. Elmehed
Richard Henderson
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2017 was awarded to Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson "for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution".

■ 研究范围广、更接近真实状态、

蛋白质结构层次的进一步细分

- 将蛋白质结构层次进一步细分，可在二、三级结构之间增加超二级结构和结构域两个层次。



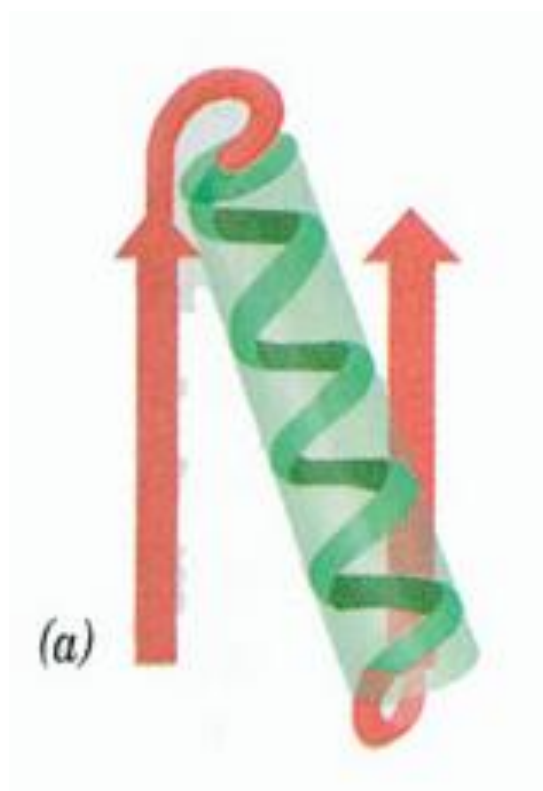
四、蛋白质的结构

5. Supersecondary structure

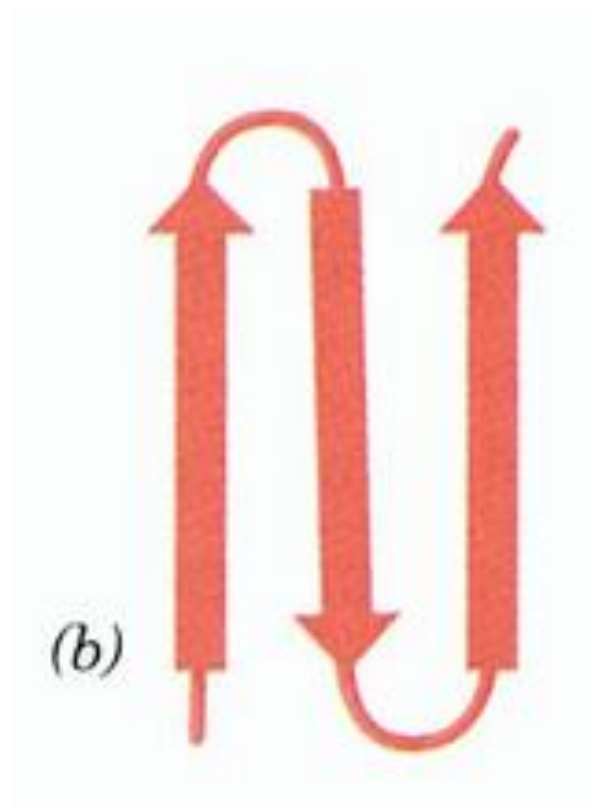
- **超二级结构**：相邻二级结构单元按一定规律，规则地组合在一起，形成特征的二级结构组合单位。
- 又称为**Motif**
- 可作为构成三级结构的元件。
- 可具有一定的功能。

蛋白质中的几种超二级结构

$\beta\alpha\beta$ motif



β hairpin

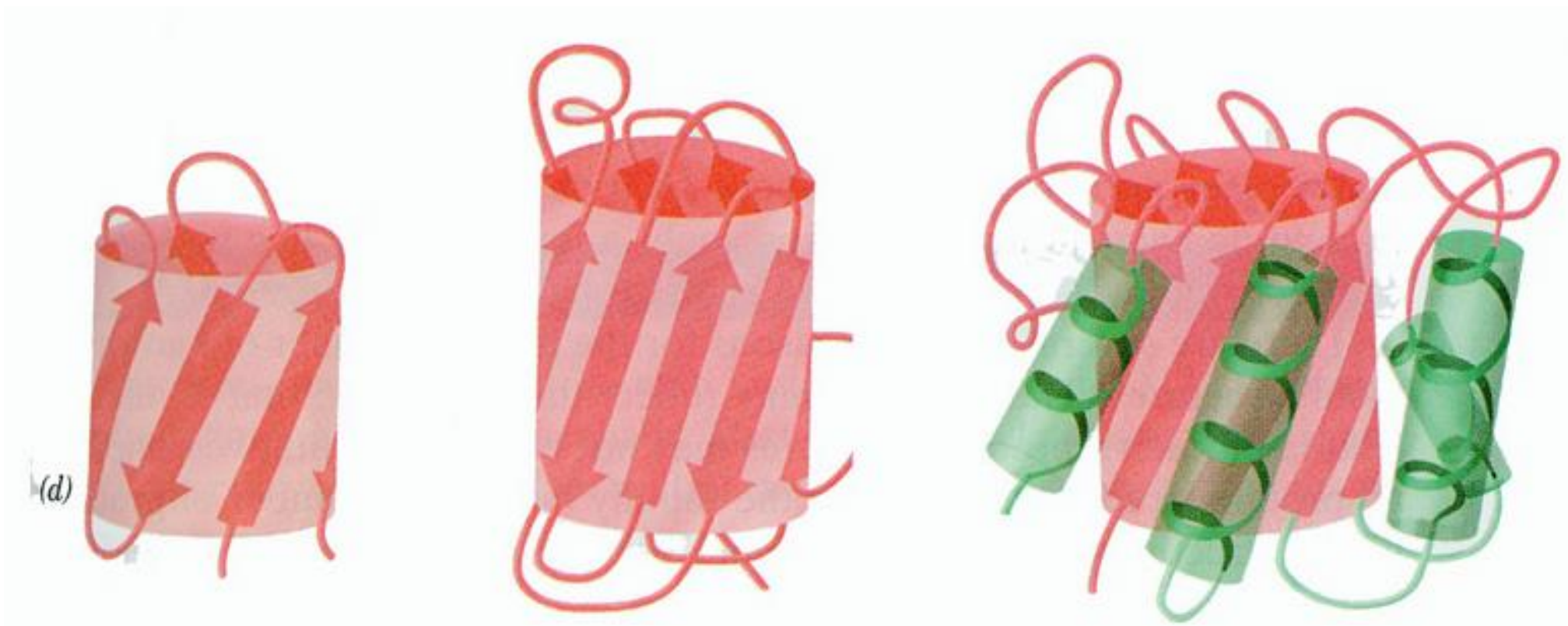


$\alpha\alpha$ motif



蛋白质中的几种超二级结构

β barrels (桶型)

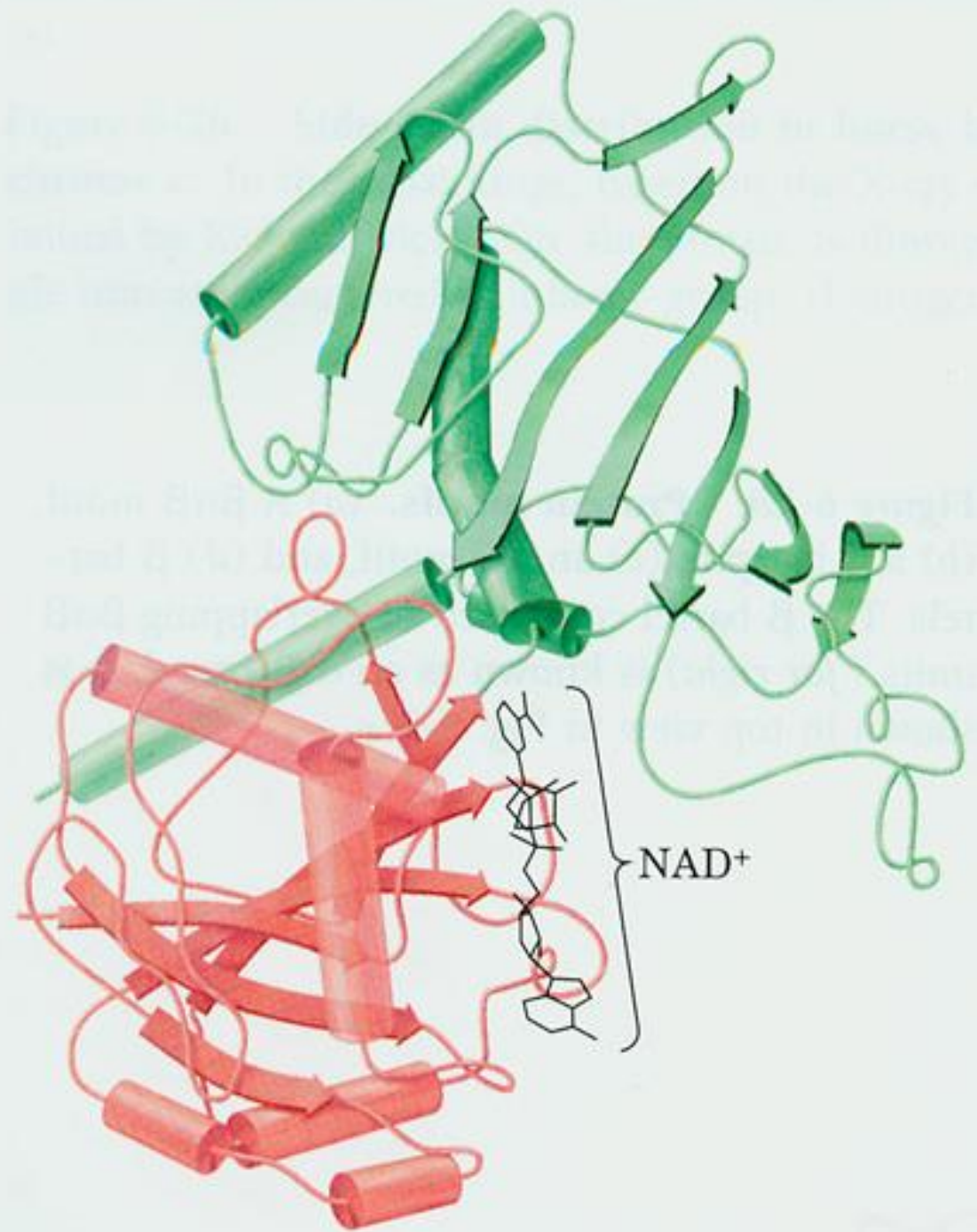


四、蛋白质的结构

6. structural domain

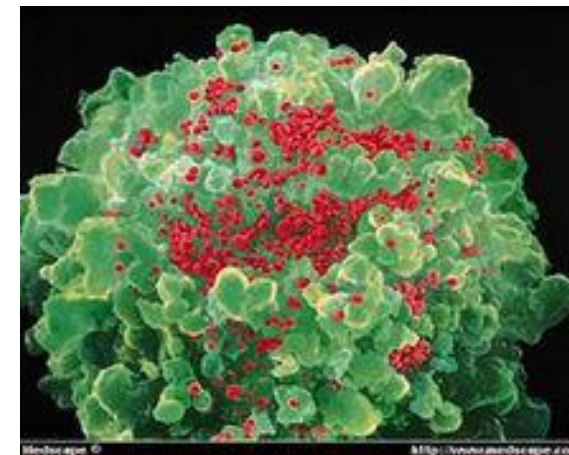
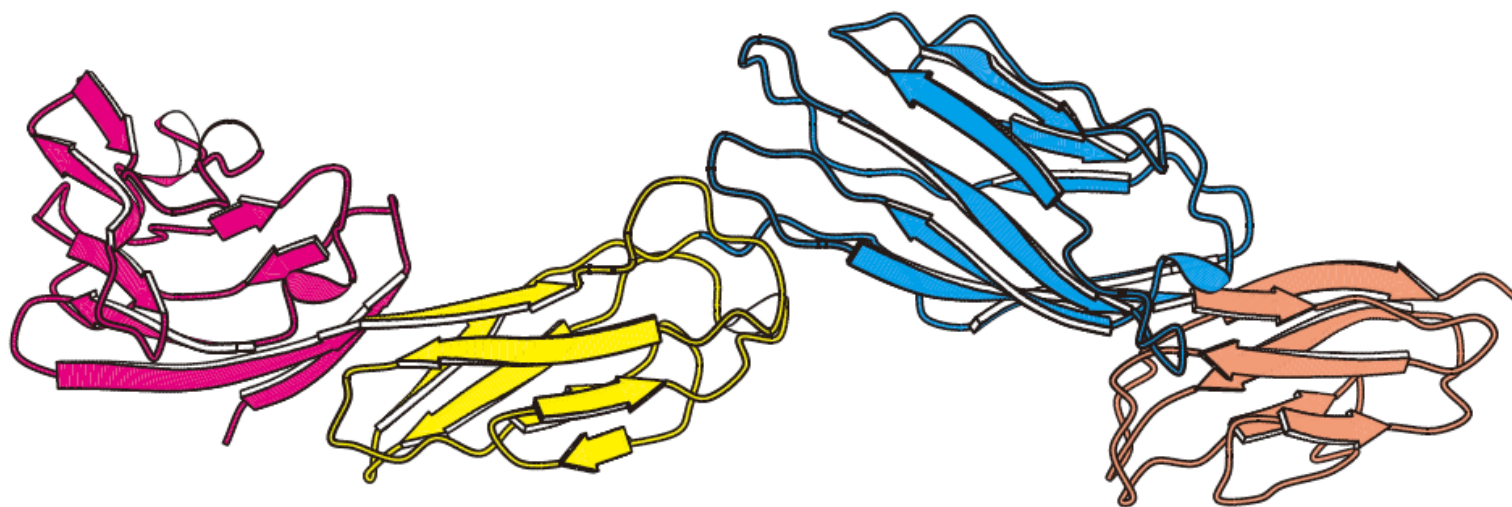
- **结构域**：在二级结构或超二级结构基础上形成并相对独立的三级结构局部折叠区。
- 自身紧密装配，但结构域之间联系相对松散，常在两个结构域间形成空穴。
- 不同的蛋白质，其结构域的数目不相同。
- 蛋白质的结构域常常也就是功能域。

**The two-domain protein
glyceraldehyde-3-
phosphate dehydrogenase
(3-磷酸甘油醛脱氢酶)**



cell-surface protein CD4

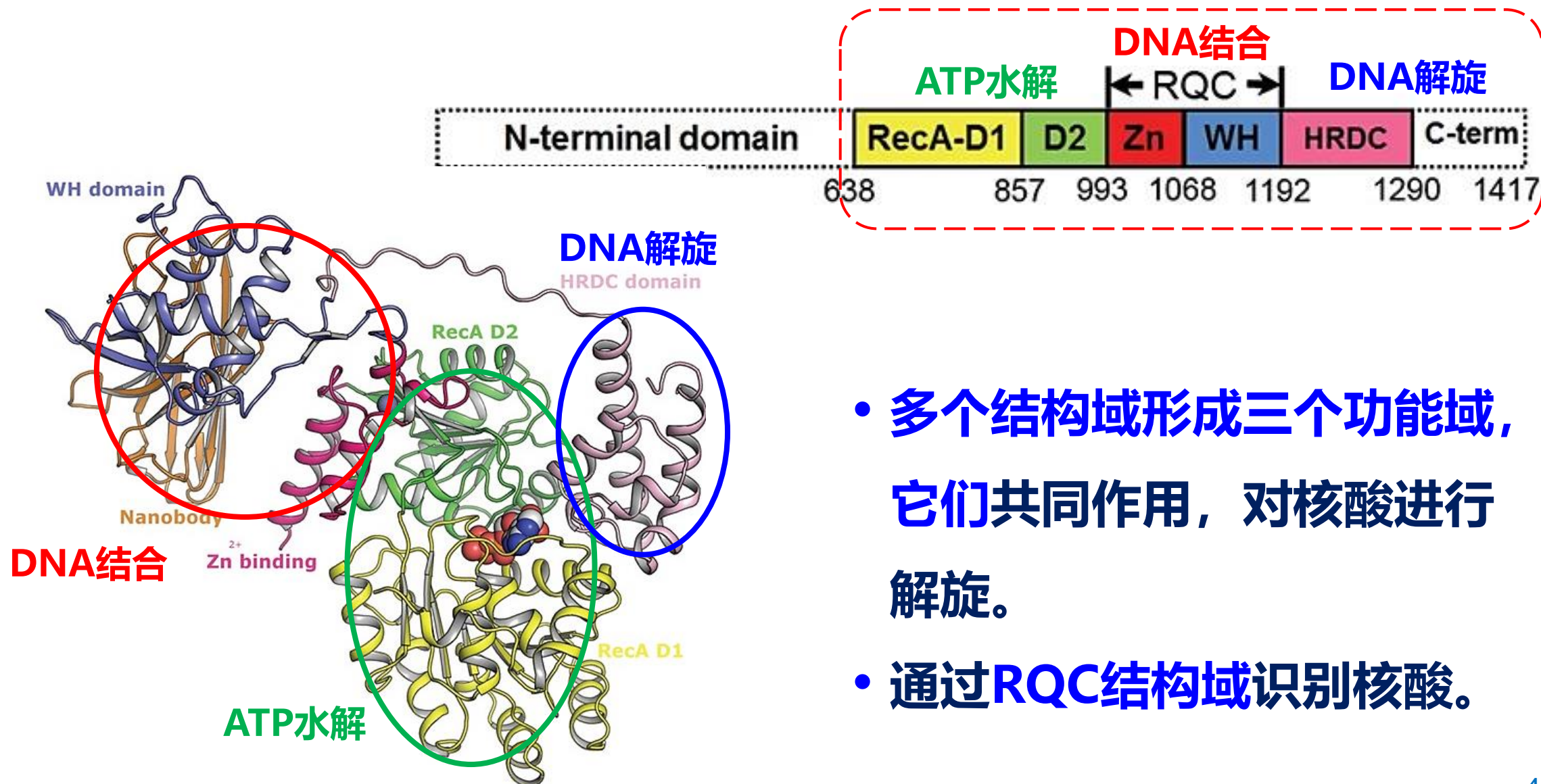
- On certain T cells of the immune system to which HIV attaches.
- The extracellular part comprises four similar **domains**, approximately 100 AA each.



CD4细胞

- ✓ 正常成人的为每立方毫米500~1600个。
- ✓ HIV感染者CD4记数水平低于350个就可以开始治疗。

核酸解旋酶BLM



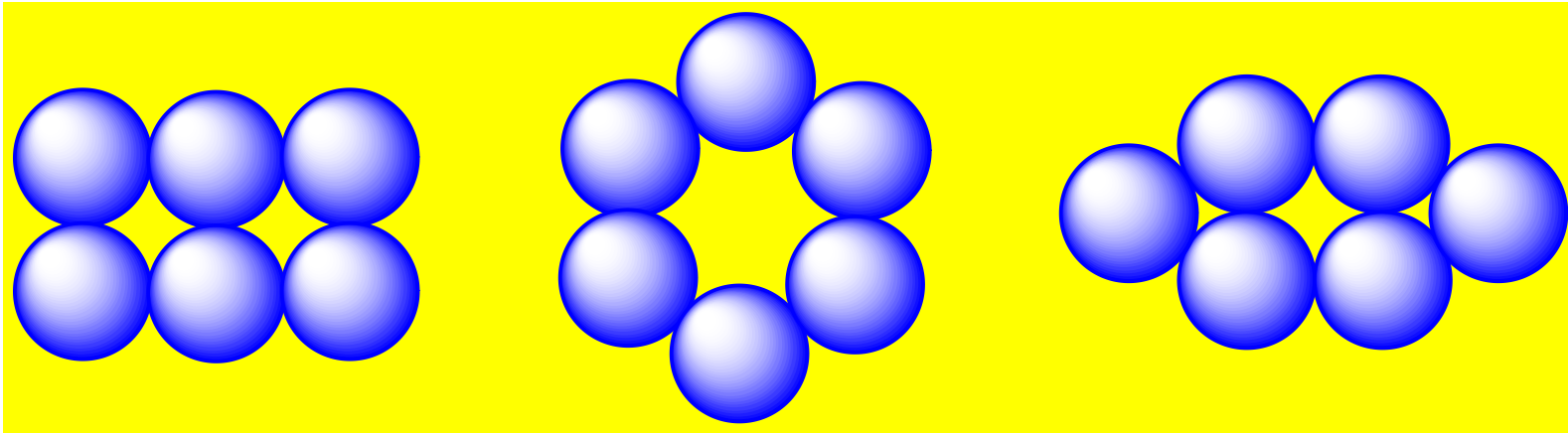
- 多个结构域形成三个功能域，它们共同作用，对核酸进行解旋。
- 通过RQC结构域识别核酸。

四、蛋白质的结构

7. Quaternary Structure

- **定义：**由多条各自具有一、二、三级结构的肽链（**亚基**）通过**非共价键**连接起来的结构形式。
- 各亚基在空间的排列方式及亚基间的相互作用关系。

Some of the possible arrangements of the six subunits of a hexamer



7. Quaternary Structure

■ 单体蛋白质(monomer)

- 只含一个亚基的蛋白质
- 没有四级结构

■ 寡聚蛋白质(oligomer)

- 含有多个亚基的蛋白质
 - 同多聚 (homomultimeric) 蛋白质
 - 杂多聚 (heteromultimeric) 蛋白质

寡聚蛋白质的亚基数目

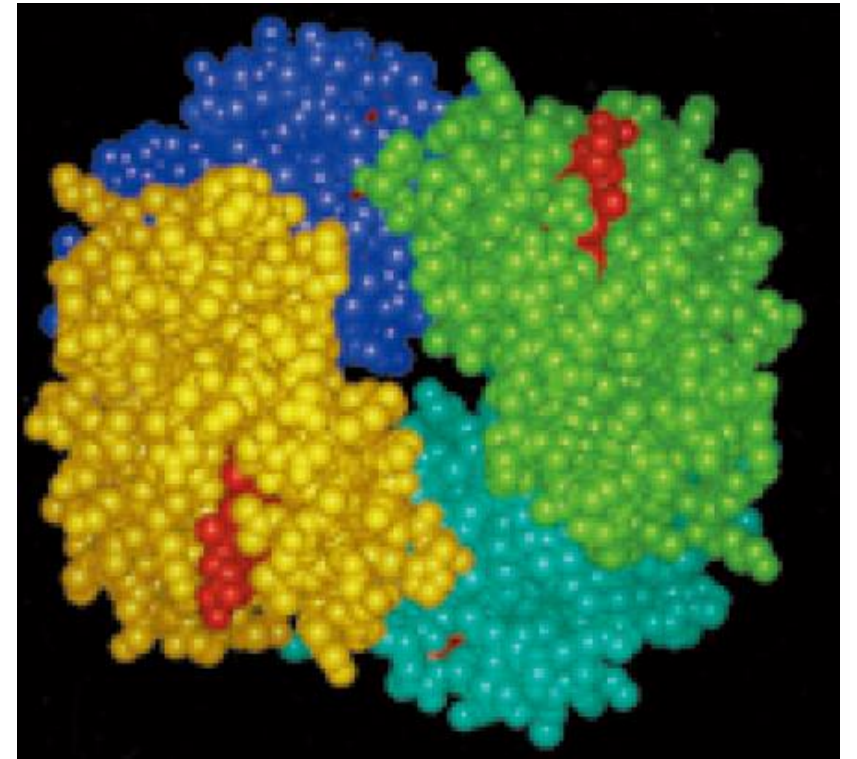
蛋白质	亚基数目
醇脱氢酶	2
苹果酸脱氢酶	2
醛缩酶、荧光素酶	3
3-磷酸甘油醛脱氢酶	4
乳酸脱氢酶	4
血红蛋白	4
谷氨酸合成酶	12
蕃茄株低矮病毒外壳蛋白	180

7. Quaternary Structure

■ 原体(protomer)

寡聚蛋白中相同的结构成分。

- A protomer may consist of one polypeptide chain or several unlike polypeptide chains.
- hemoglobin is a dimer (oligomer of two protomers) of protomers (See Figure).



7. Quaternary Structure

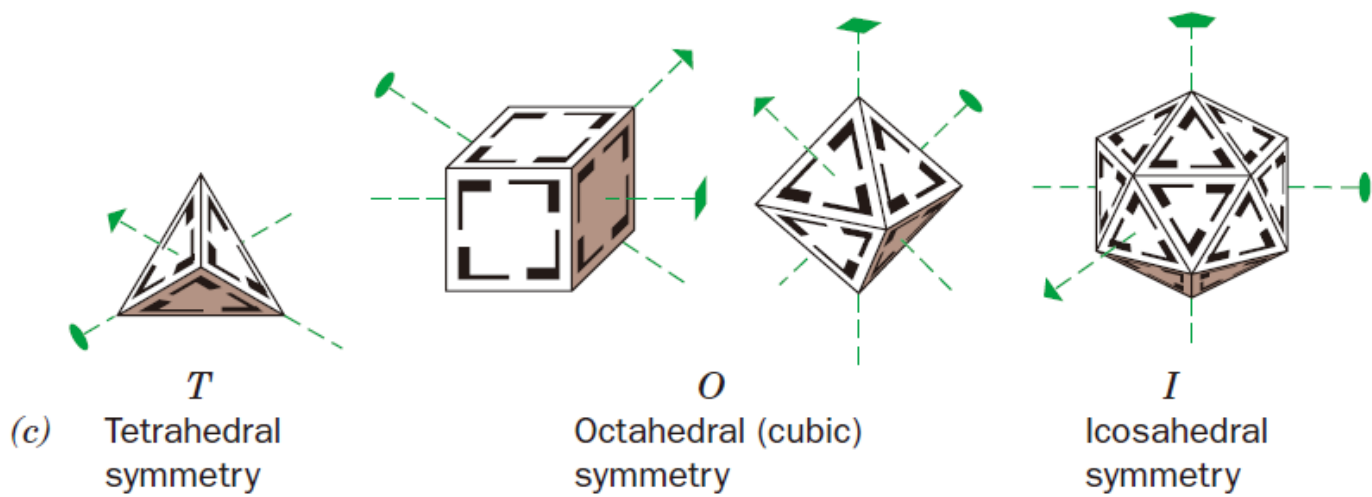
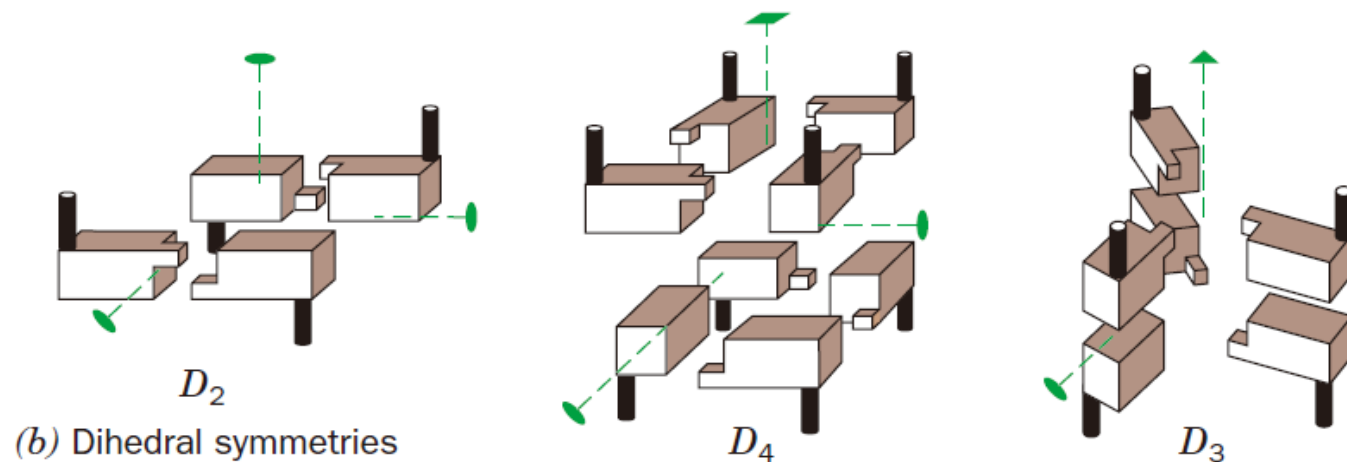
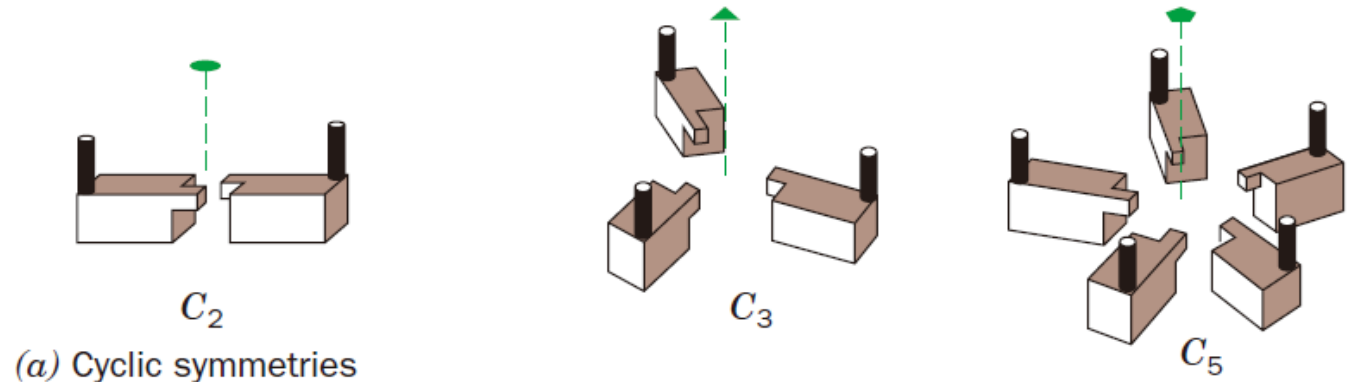
■ 四级缔合的驱动力

- 与维系三级结构的作用力相似
- 疏水作用占重要地位。

■ 对称性

- 含有2或多个相同亚基或原体的蛋白质（大多数）
- The protomers are **symmetrically** arranged, and proteins can have only rotational symmetry.

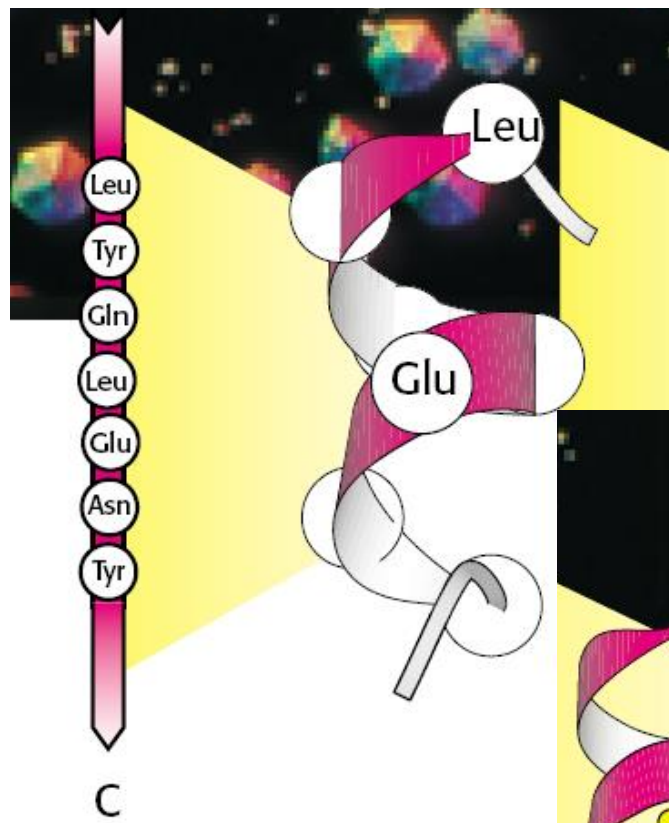
Some possible symmetries of proteins with identical protomers



四级结构的优越性

- 1) 稳定性
 - 2) 遗传经济性
 - 3) 催化性
 - 4) 协同性和别构效应
- 

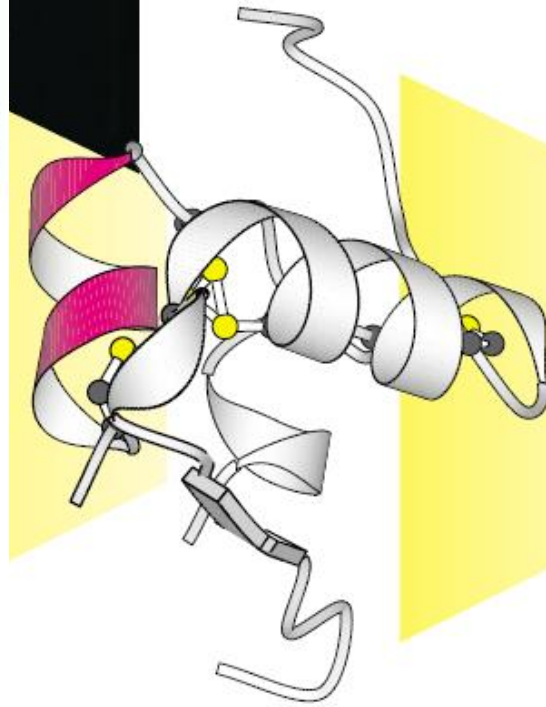
课堂分组讨论



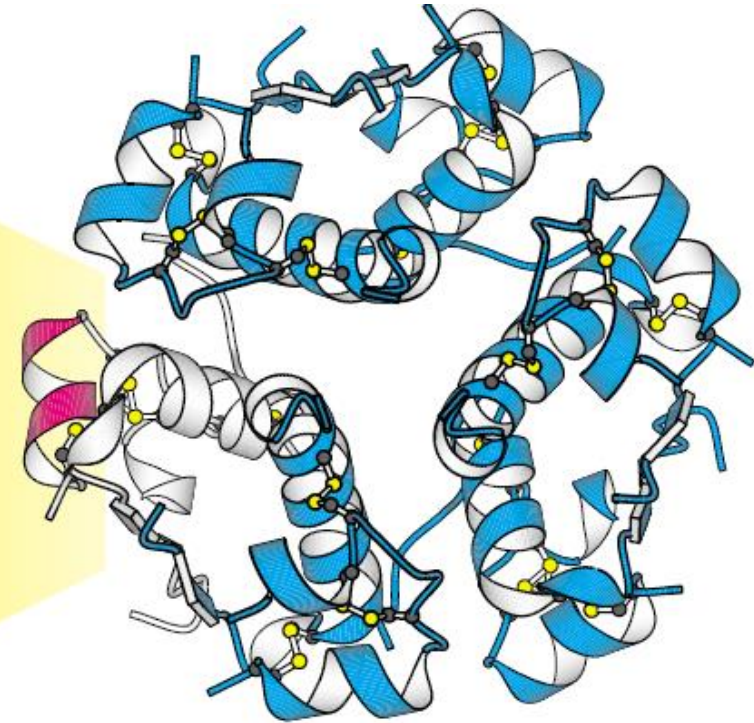
Secondary structure



Tertiary structure



Quarternary structure



动画

本次课主要内容小结

■ 蛋白质的结构

--- 蛋白质的一级结构

- 一级结构研究先进技术（质谱测序、DNA重组）

--- 蛋白质的二级、三级、四级结构

- 典型二级结构的特征
- 二、三级、四级结构定义及维系的力
- 三级结构测定方法
- 四级结构的优越性

课后复习要点

- 掌握蛋白质结构相关的基本概念；
- 掌握蛋白质二、三级、四级结构的定义及 维系的力；
- 了解蛋白结构的研究方法；
- 理解四级结构的优越性；
- 教材课后相关习题。

课后预习

四、蛋白质的结构

--- 四级结构

五、蛋白质的结构与功能

下周一 (18/9) 第2节后半节
PDB数据库应用培训 (林钰薇)

下周三 (20/9) 8:00-8:20
三组同学进行探究题1展示

下周三课间
推文文献
抽签