

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) ←

上节课内容回顾

五、蛋白质的结构与功能

收缩与能动蛋白

肌球蛋白与肌动蛋白

- ✓ 结构特点
- ✓ 肌肉收缩分子机制

免疫球蛋白

- ✓ 抗体-抗原概念
- ✓ 抗体结构特点
- ✓ 抗体两大特性：多样、特异
- ✓ 生化分析方法：ELISA, WB

六、蛋白质的性质

1. 两性离子

蛋白质分析：电泳法

2. 胶体性质

蛋白质分离：透析法

3. 沉淀作用

不可逆、可逆、免疫沉淀

六、蛋白质的性质

4. Denaturation and renaturation (变性与复性)

- **天然构象**是在生理条件下热力学**最稳定**的。

蛋白质空间结构稳定的因素：

1. **静电相互作用**：离子键；
2. **氢键**：内部氢键，外部氢键（与水作用）；
3. **疏水作用**：使非极性基团被包埋在蛋白质结构的内部；
4. **π - π 堆积作用**：芳香性基团间的相互作用；
5. **范德华力**：广泛的原子间相互作用；
6. **二硫键**：常存在于细胞外的蛋白质中；

六、蛋白质的性质

4. Denaturation and renaturation (变性与复性)

■ 蛋白质的变性

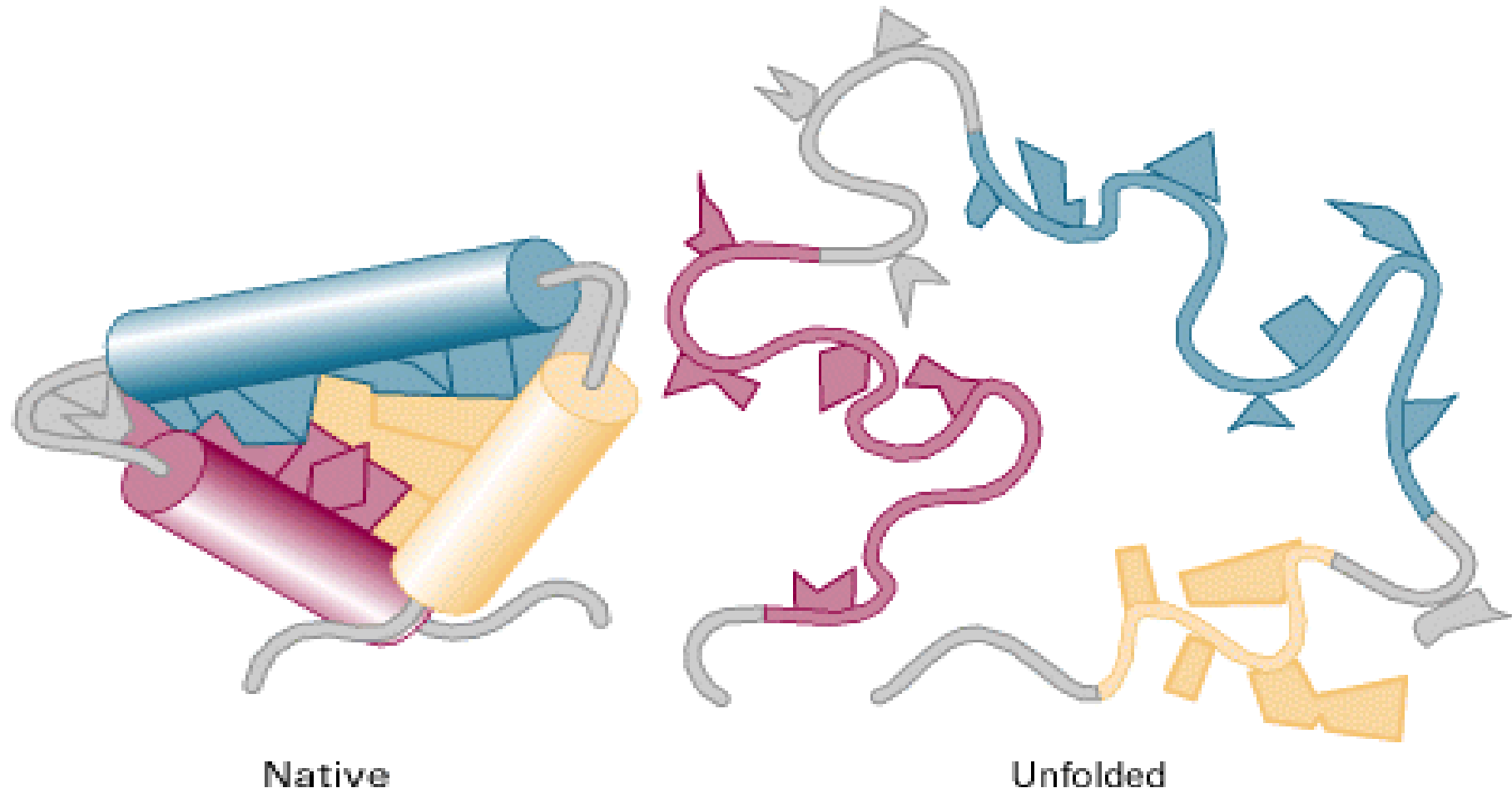
某些物理或化学因素，能够破坏蛋白质的天然结构状态，引起蛋白质理化性质改变并导致其生理活性丧失。

为什么熟食易于消化？

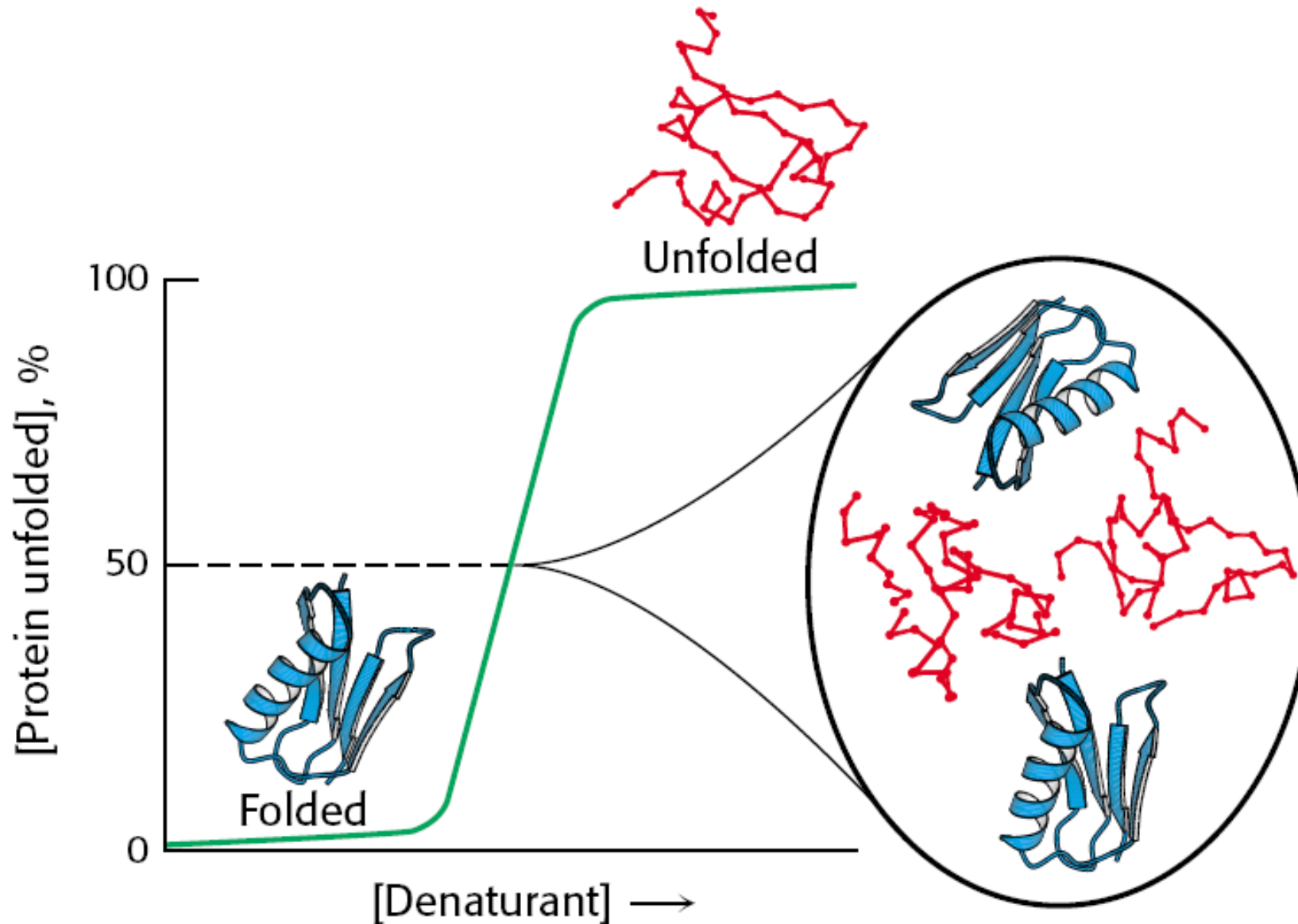
■ 蛋白质的变性的本质

破坏了维系蛋白质空间结构的作用力，从而使蛋白质二级结构
以上的空间结构发生改变或破坏。并不引起蛋白质一级结构的破坏。

Denaturation



Most proteins show a sharp transition from the folded to unfolded form



引起蛋白质变性的因素

1. **Heating** ---- disrupt noncovalent interactions
2. **pH** ---- alter the ionization states
3. **Detergents** ---- interfering with the hydrophobic interactions

引起蛋白质变性的因素

4. Chaotropic agents (离液剂, 又称促溶剂)

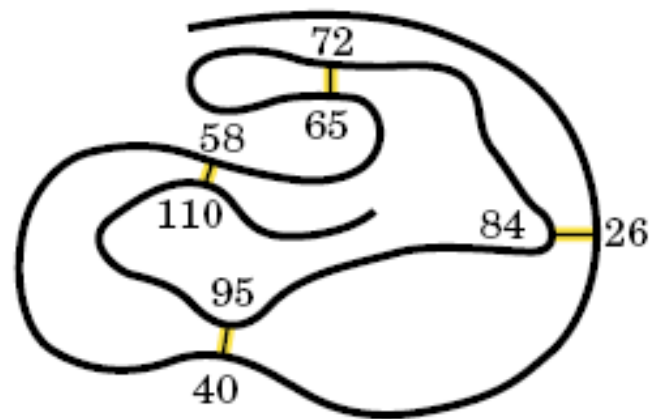
- Gu^+ , urea, I^- , ClO_4^- , SCN^- , Li^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}
- ions or small organic molecules that increase the solubility of nonpolar substances in water
- the most commonly used protein denaturants
- disrupt hydrogen bond and hydrophobic interactions

蛋白质的复性 (renaturation)

- 当变性因素除去后，变性蛋白质又回复到天然构象，这一现象成为蛋白质的复性。
- 有些变性的蛋白质是可以复性的
如核糖核酸酶A的复性。

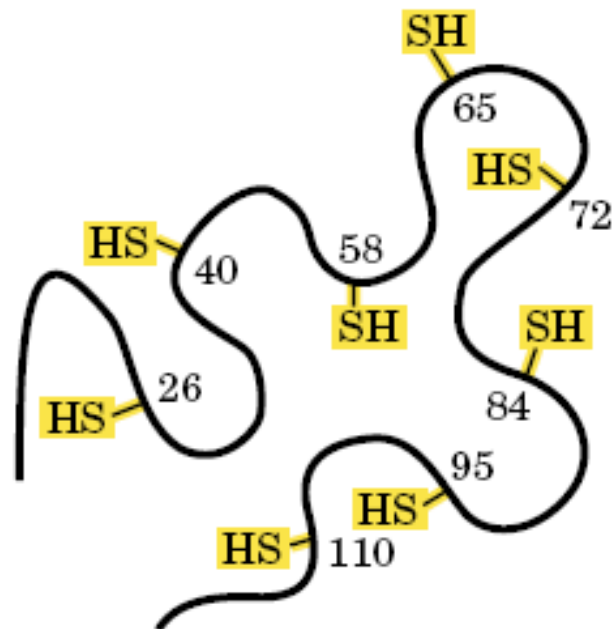
核糖核酸酶A的复性

(to be continue)



Native state;
catalytically active.

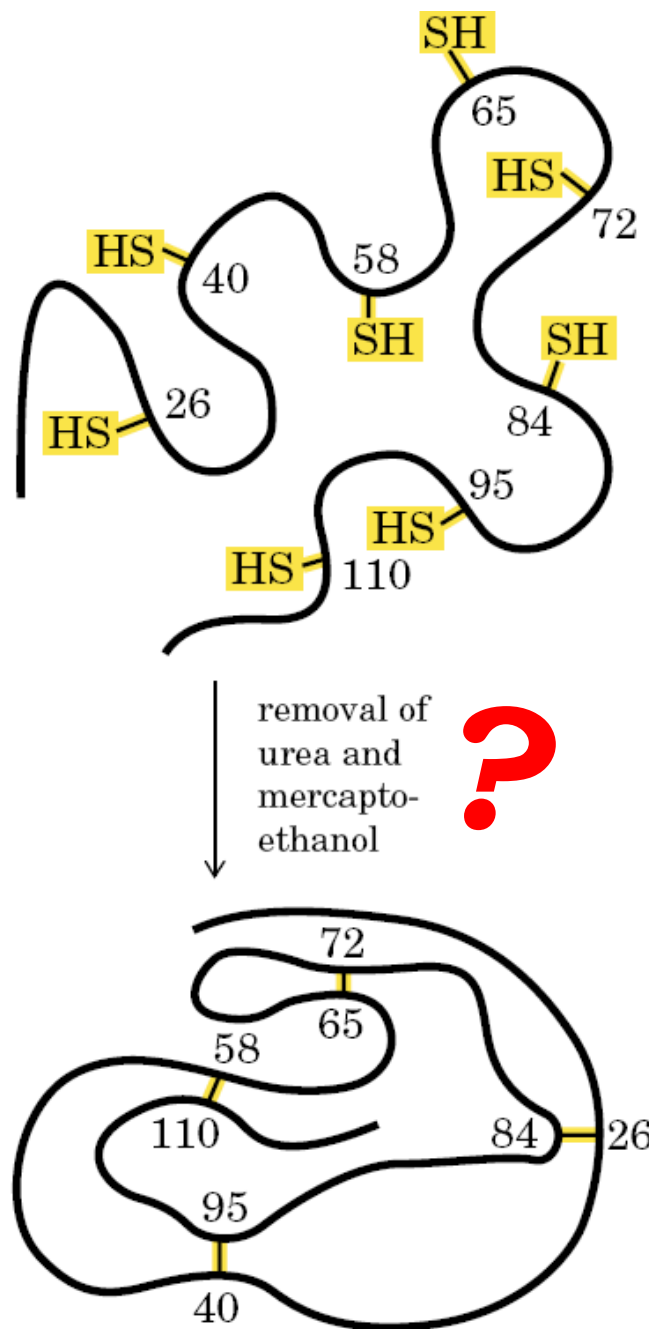
addition of
urea and
mercapto-
ethanol



Unfolded state;
inactive. Disulfide
cross-links reduced to
yield Cys residues.

核糖核酸酶A的复性

(the end)



Unfolded state;
inactive. Disulfide
cross-links reduced to
yield Cys residues.

Native,
catalytically
active state.
Disulfide cross-links
correctly re-formed.

六、蛋白质的性质

5. Protein folding

- How does a protein fold to its native conformation?
- The protein's random exploration (随机搜索) is impossible.

100 氨基酸残基, 每个残基有3个不同取向

构象总数 = $3^{100} = 5 \times 10^{47}$

每种构象搜索时间: 10^{-13}s

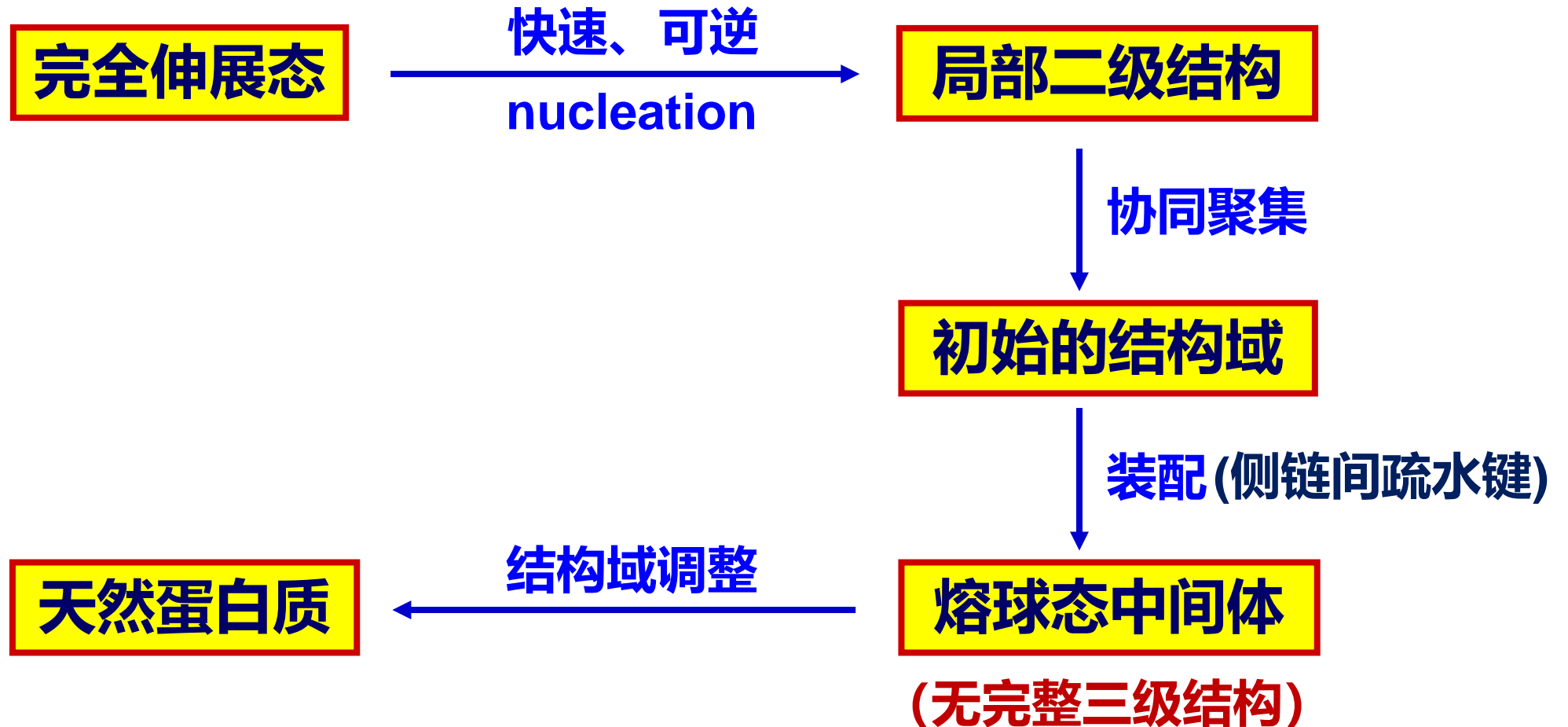
总搜索时间 = $1.6 \times 10^{27}\text{y}$

实际仅用s ~ min

利文索尔疑题
(Levinthal's paradox)
(1968)

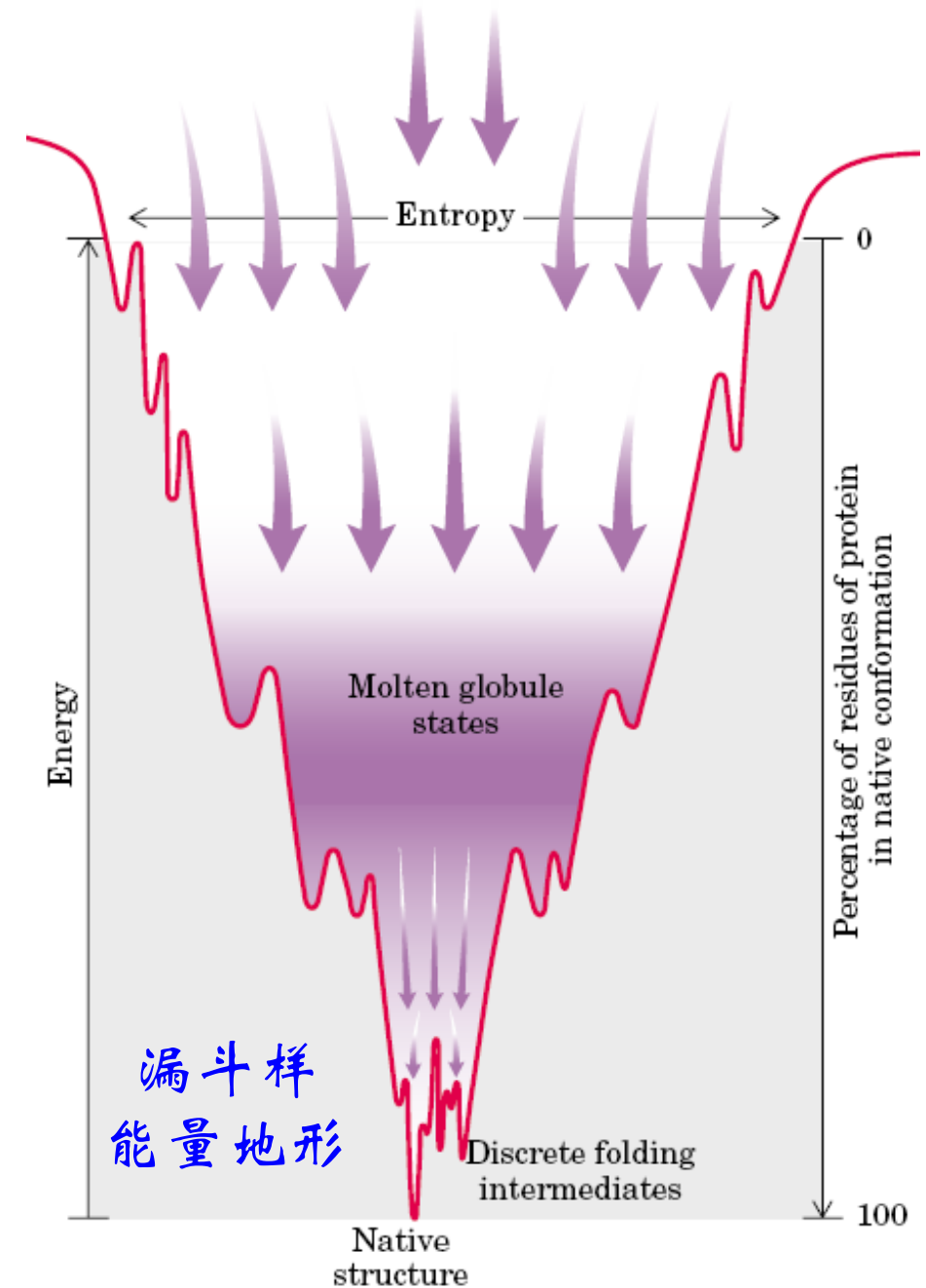
5. Protein folding

Globular Protein Folding Pathway



The thermodynamics of protein folding depicted as a free-energy funnel

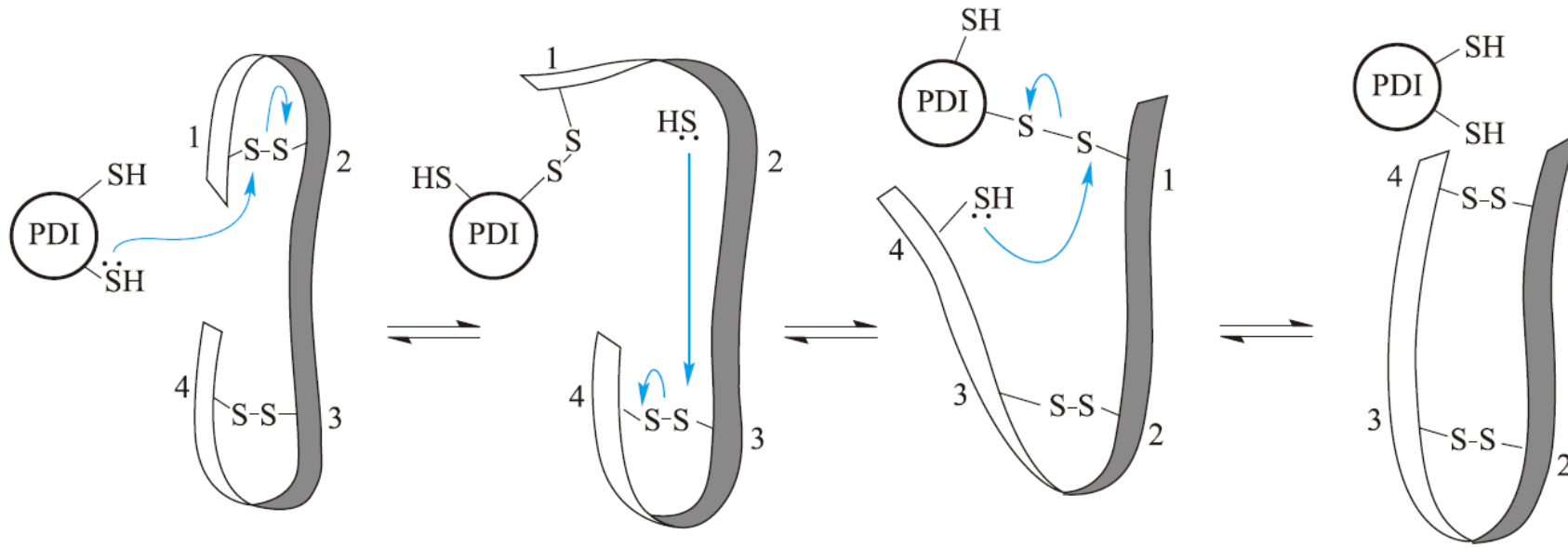
At the top, the number of conformations, and hence the conformational entropy, is large. Only a small fraction of the intramolecular interactions that will exist in the native conformation are present. As folding progresses, the thermodynamic path down the funnel reduces the number of states present (decreases entropy), increases the amount of protein in the native conformation, and decreases the free energy.



5. Protein folding

Protein Disulfide Isomerase (PDI)

- often fold **more slowly** in *vitro* than in *vivo*
- disulfide bonds interchange
- PDI catalyzes the interchange of disulfide bonds



不正确的二硫键

PDI-底物共价复合物

正确的二硫键

5. Protein folding

Molecular Chaperones (分子伴侣)

- 作用:

- 抑制新生肽链不恰当聚集
- 排除与其他蛋白质不合理结合
- 协助多肽链的正确折叠

- 大多为**热激蛋白**(heat shock protein, HSP)

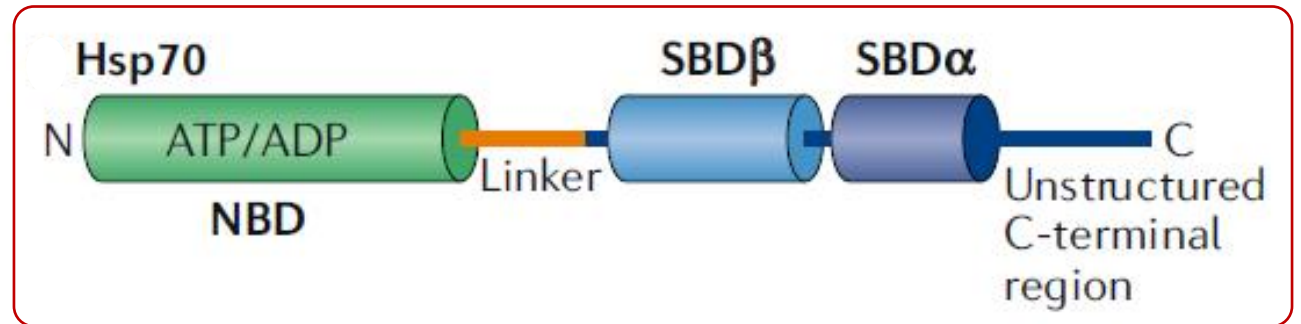
- 亦称**热休克蛋白**

Heat Shock Protein (HSP)

- Are synthesized in response to temperature increase (heat shock) or other changes that cause protein denaturation *in vivo*.
- **Role:** as chaperones, is to repair the damage caused by temperature increase by binding to denatured proteins and helping them to refold rapidly into their native conformation.
- **representative :**
Hsp70, chaperonin (Hsp60), Hsp90等。

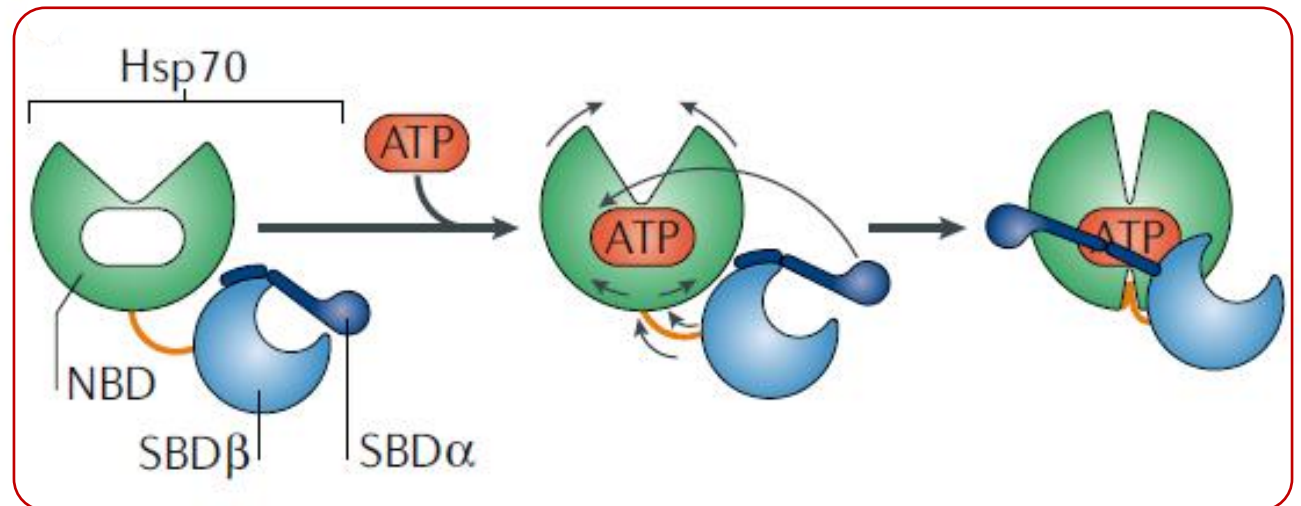
HSP70 ($M_r = 70$ KD)

- Also called DnaK in bacteria.
- Is present in every species except some species of archaeobacteria.
- One of the most highly conserved proteins known in all of biology.



- **Role:**

- 折 叠
- 解 聚
- 降 解
- 转 位



折叠病 (protein misfolding diseases)

- 因蛋白质构象改变引起的疾病（序列未变）。

或称构象病 (protein conformational disorders)

- 朊病毒 (Prion)

又称蛋白质侵染因子，是一类能侵染动物并在宿主细胞内复制的小分子无免疫性疏水蛋白质。

1982年，Prusiner等提出，即蛋白质侵染颗粒假说。(1997年Nobel医学与生理学奖)

折叠病（或构象病）

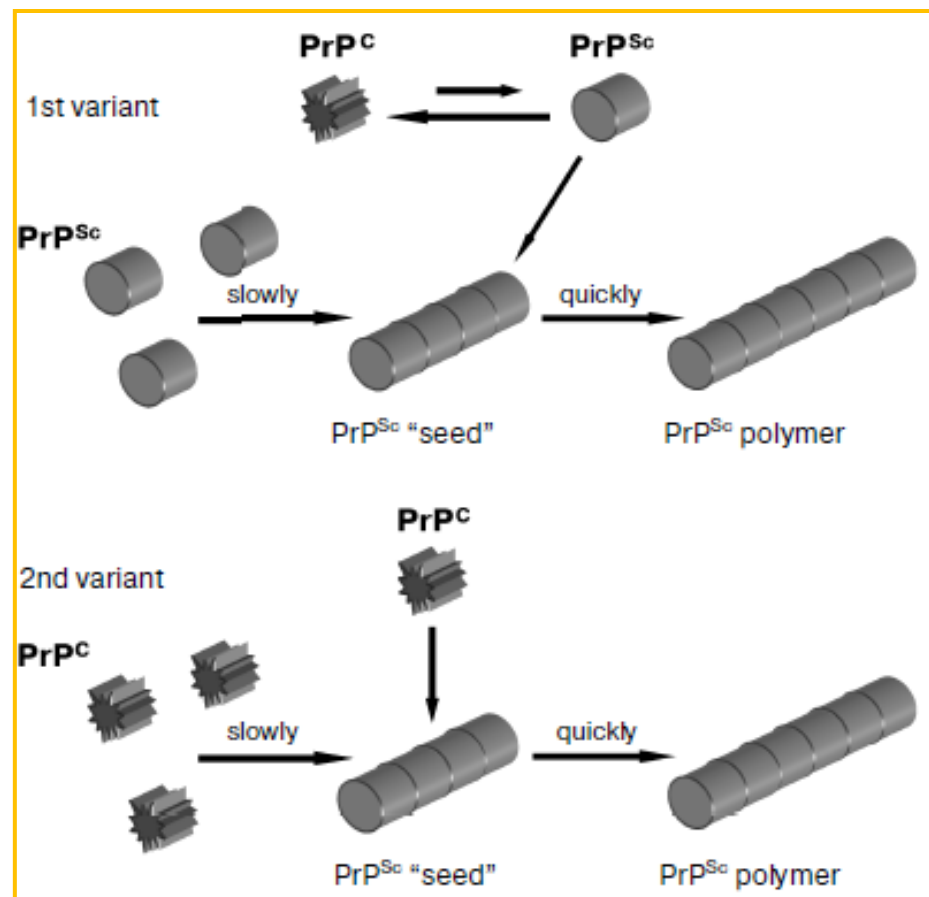
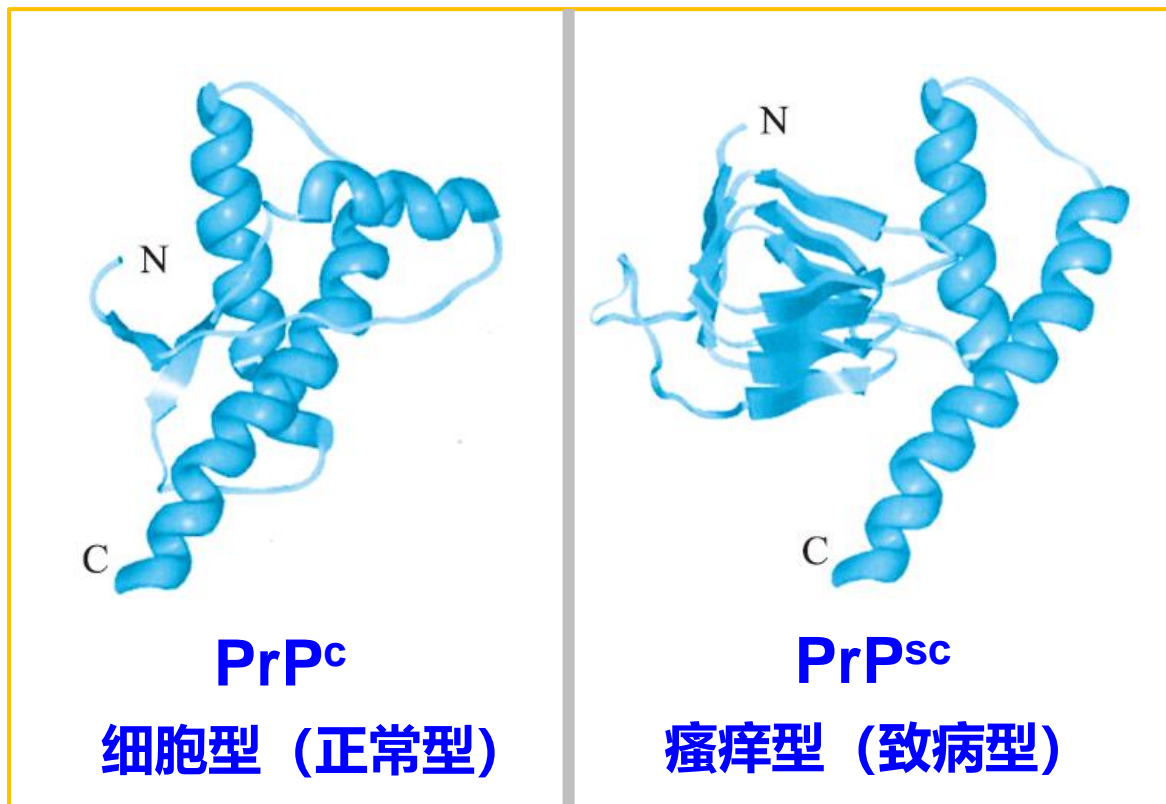
■ 朊病毒引起的疾病包括：

- 克雅氏综合征 (Creutzfeldt Jakob disease, CJD)
- 致死性家族失眠症 (fatal familial insomnia, FFI)
- 羊瘙痒症 (scrapie for sheep)
- 牛海绵状脑病 (疯牛病, bovine spongiform encephalopathy, BSE)

统称为：传染性海绵状脑病 (transmissible spongiform encephalopathies)

引起疯牛病的朊病毒

- 正常细胞的糖蛋白 PrP^c 通过构象改变，错误折叠成非正常蛋白 PrP^{Sc} ，而后者的积累，最终会造成神经元的 β -淀粉样变性，从而造成朊病毒的相关疾病。
- 构象转变机理：“种子模型”（右图）



六、蛋白质的性质

6. UV absorption

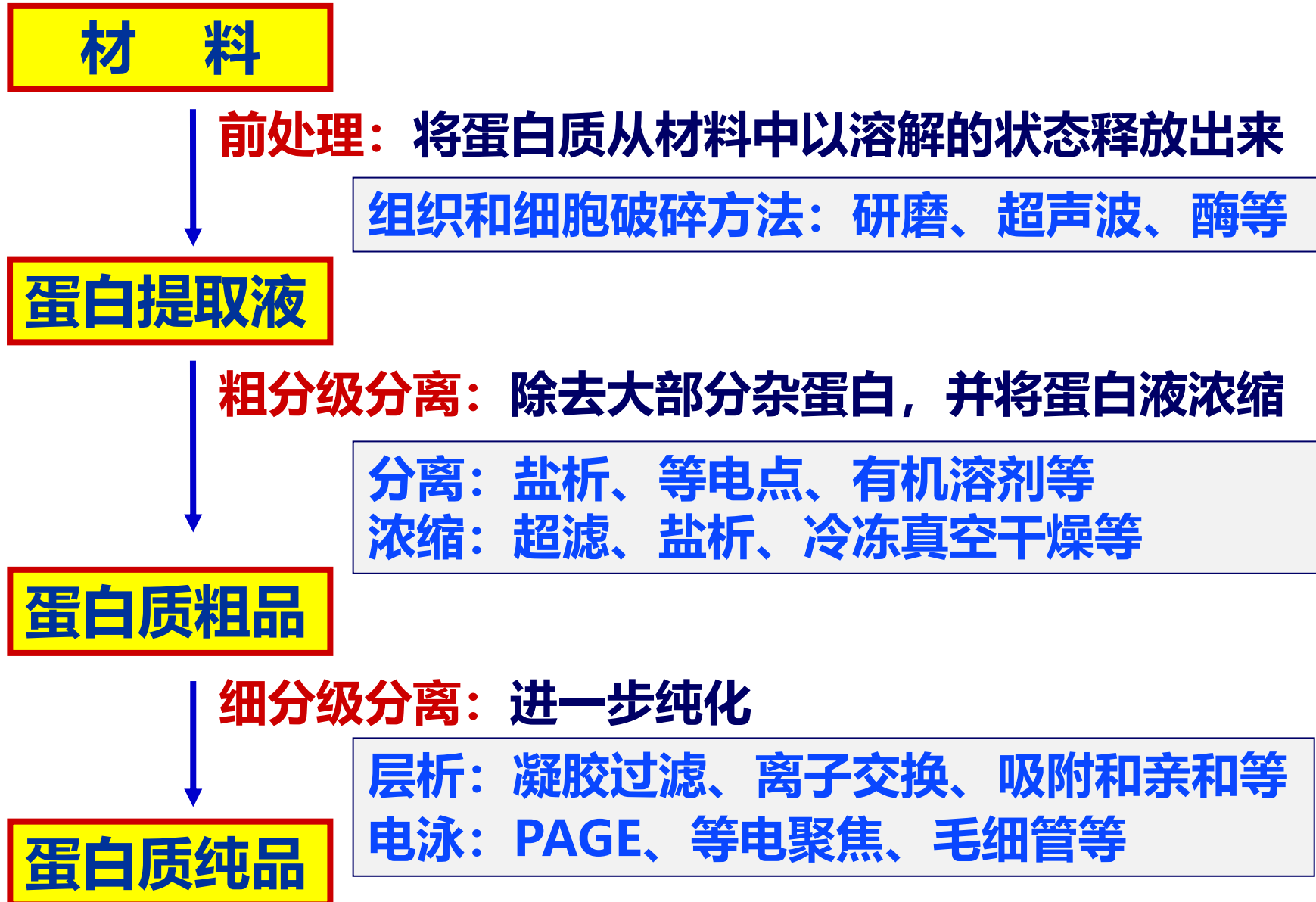
- 大部分蛋白质均含有带芳香环的Phe、Tyr和Trp。
- 这三种氨基酸均在280 nm 附近有最大吸收。因此，大多数蛋白质在280nm 附近显示强的吸收。
- 利用这个性质，可以对蛋白质进行定性鉴定。

七、蛋白质纯化

目标： 获得高纯度或高活性的所需蛋白质

- 一、盐析
- 二、离子交换层析
- 三、等电聚焦
- 四、凝胶过滤层析
- 五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
- 六、超速离心
- 七、透析
- 八、亲和层析

General approach of Protein Purification



Separation techniques

Characteristic	Procedure
Solubility	<u>Salting out</u>
Charge	<u>Ion exchange chromatography</u> Electrophoresis (略) <u>Isoelectric focusing</u>
Molecular size	<u>Gel filtration chromatography</u> <u>SDS-PAGE</u> <u>Ultracentrifugation</u> <u>Dialysis and ultrafiltration</u>
Binding specificity	<u>Affinity chromatography</u>

七、蛋白质纯化

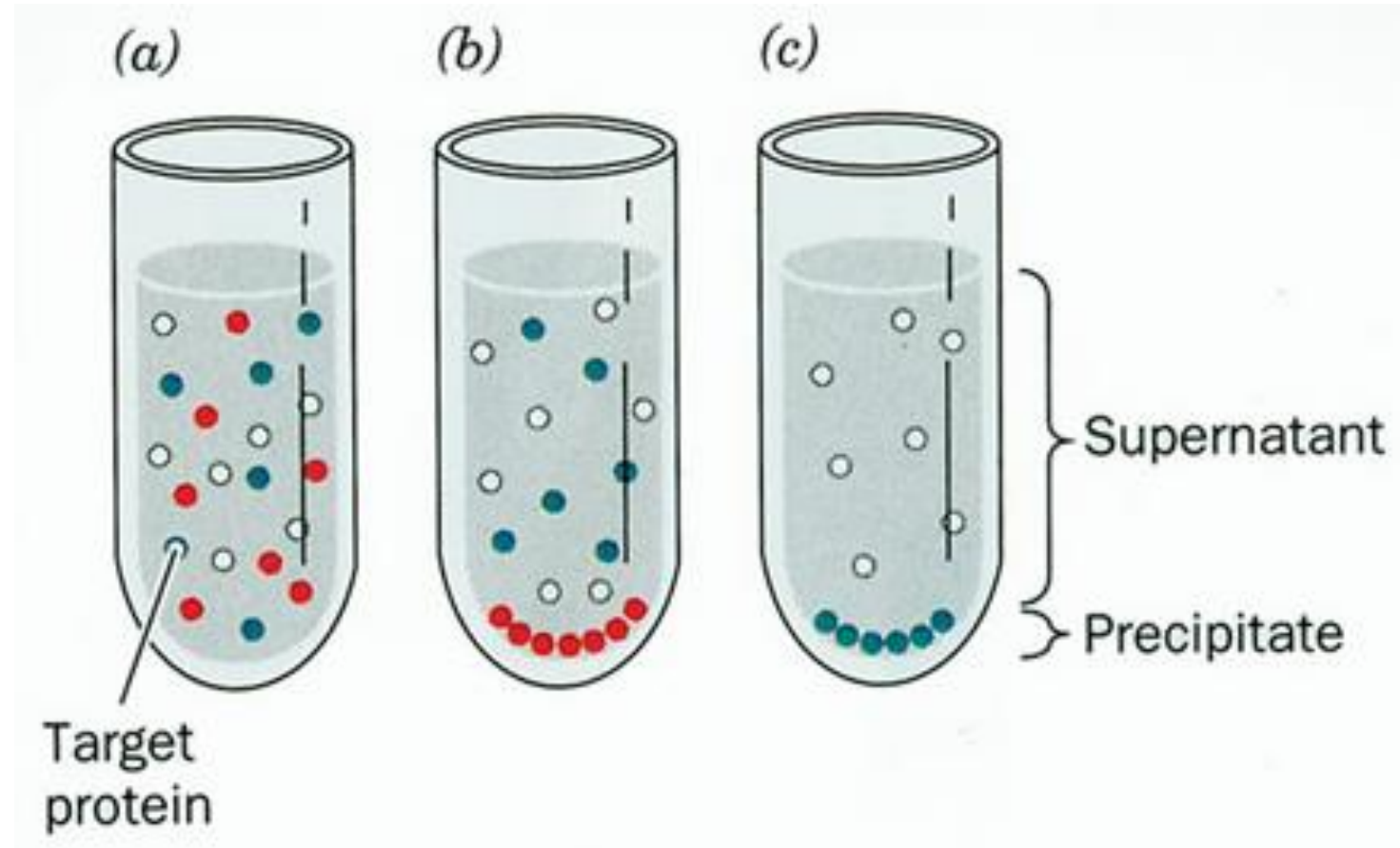
1. Salting out

- **盐析 (salting out) 原理**：破坏蛋白质疏水区表面的水化层导致蛋白质沉淀。最先聚集的是那些表面疏水残基最多的蛋白质。
- Different proteins precipitated at different salt concentrations (饱和或半饱和浓度).
- It is one of the most commonly used for protein purification.
- **盐溶 (Salting in)**：稀盐浓度范围内，增加蛋白质溶解度。

1. Salting out

- Ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, is the most commonly used reagent for salting out proteins.
- The pH may be adjusted to approximate the pI of the desired protein.
- A significant concentration (浓缩) of large quantities of protein

Salting out

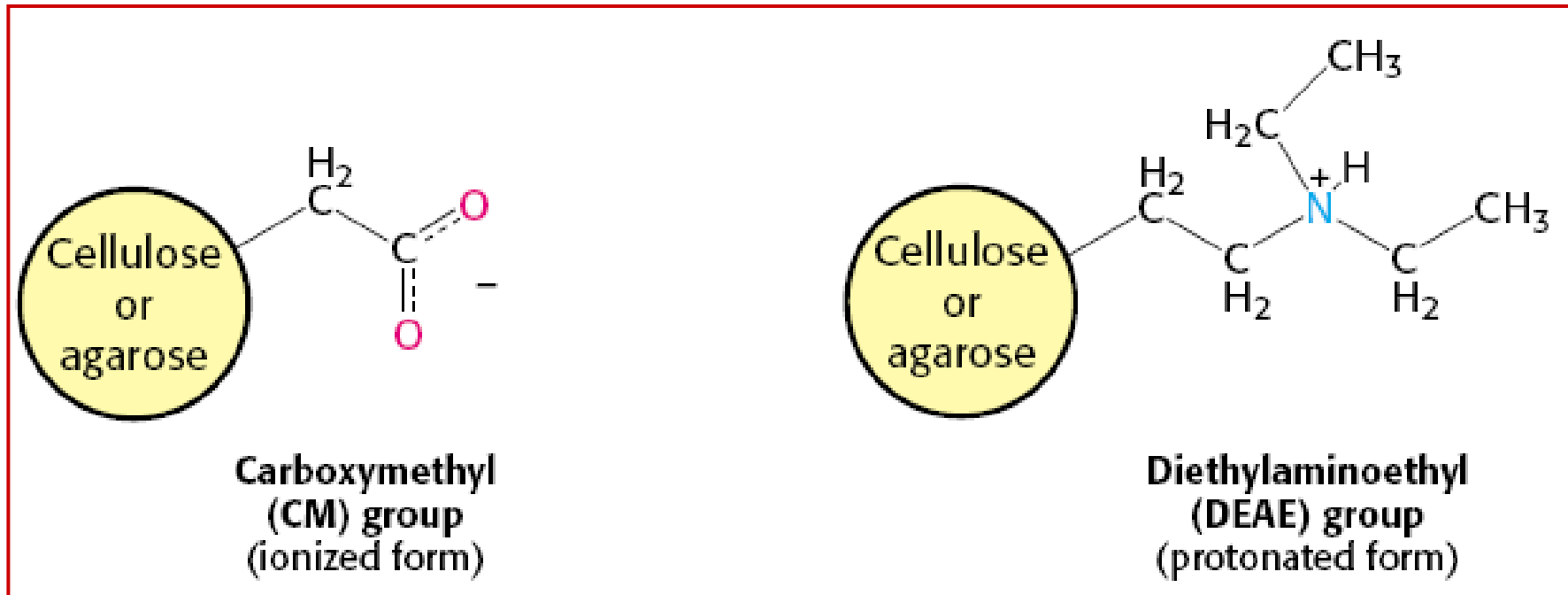


分级沉淀

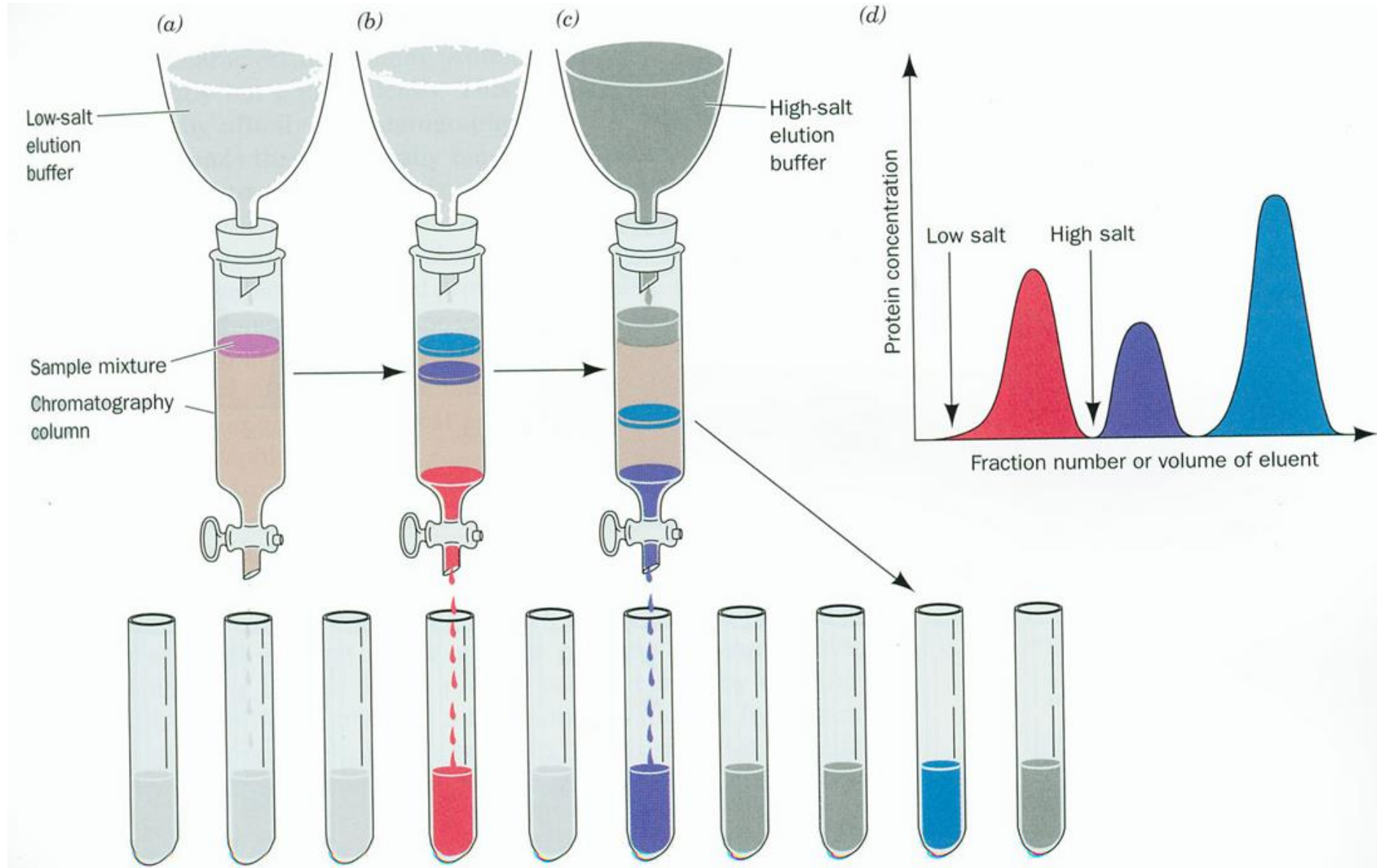
- 某盐浓度，控制pH，沉淀大部分杂蛋白（红色、蓝色），离心分离。
- 增加盐浓度，控制pH，沉淀目标蛋白（白色）。

2. Ion exchange chromatography

- **原理：** 电荷差异，参看amino acids
- Anion (阴离子) exchangers: **DEAE** (diethylaminoethyl)
- Cation (阳离子) exchangers: **CM** (carboxymethyl)
- Matrix: 基质, cellulose- and agarose-based resins (树脂)



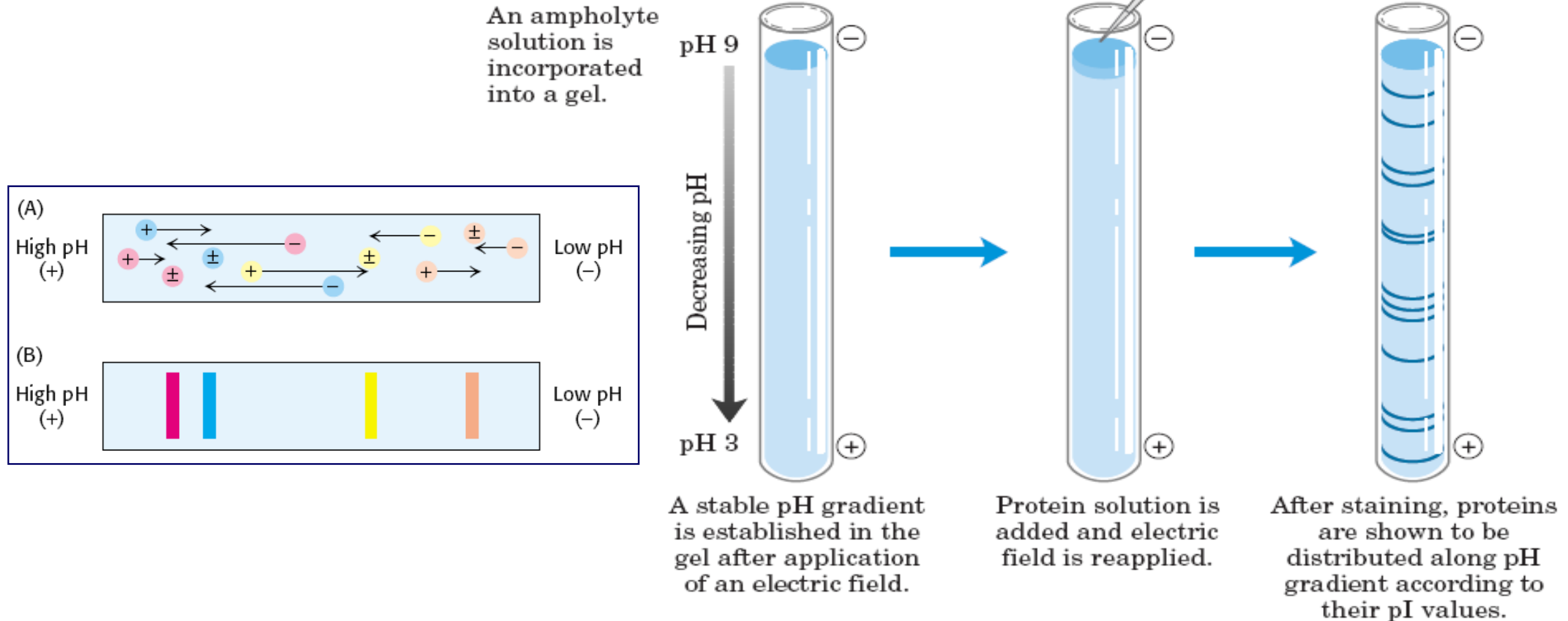
Ion exchange chromatography



3. Isoelectric focusing

- **等电聚焦 (IEF) 原理:** 电荷不同。
- **可用于蛋白质等电点测定, 分辨率高。** ($pI < 0.02\text{pH}$)
- **介质:** 含有两性电解质的凝胶 (如聚丙烯酰胺凝胶等)。
- **pH梯度:** pI 不同的两性电介质在电场作用下自然形成。

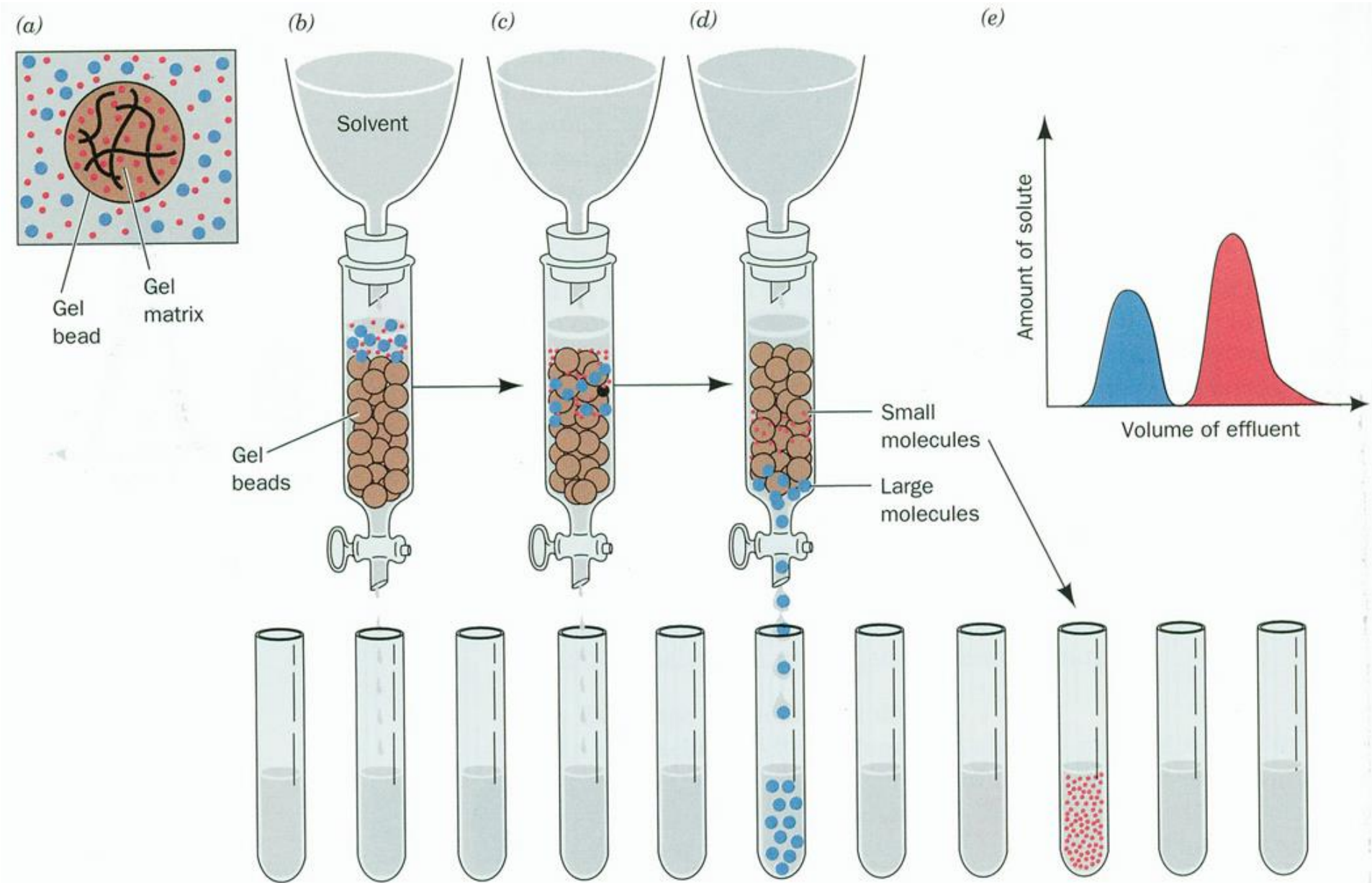
Isoelectric focusing



4. Gel filtration chromatography

- Molecular sieve (分子筛) chromatography
- Molecular are separated according to their size and shape
- Stationary phase (固定相):
gel beads containing pores that span a relatively narrow size range
 - Sephadex (葡聚糖凝胶)
 - Sepharose (琼脂糖凝胶)
 - Bio-gel P (聚丙烯酰胺凝胶)
- **原理:** 大分子不能进入小孔, 路径短, 先流出
小分子能进入小孔, 路径长, 后流出

Gel filtration chromatography



七、蛋白质纯化

5. SDS-PAGE

■ SDS-PAGE

SDS = sodium dodecyl sulfate (十二烷基磺酸钠)

PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis
(聚丙烯酰胺凝胶电泳)

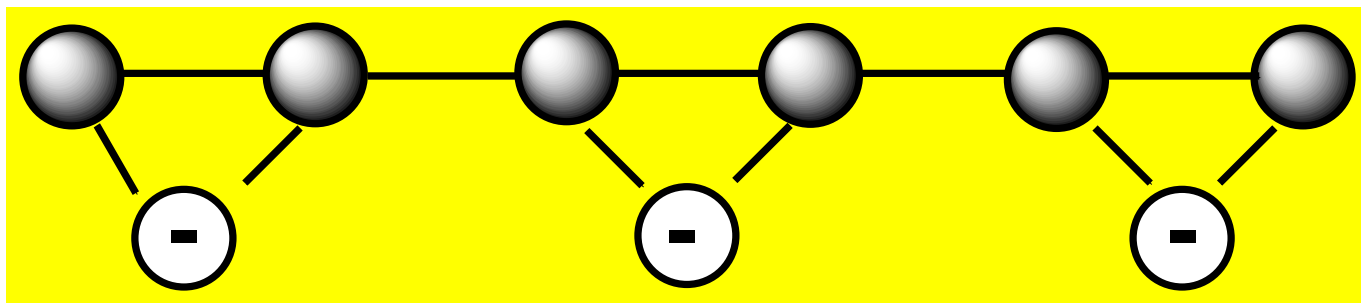
■ 非常有用:

纯度检测; 亚基组成分析; 分子量测定。

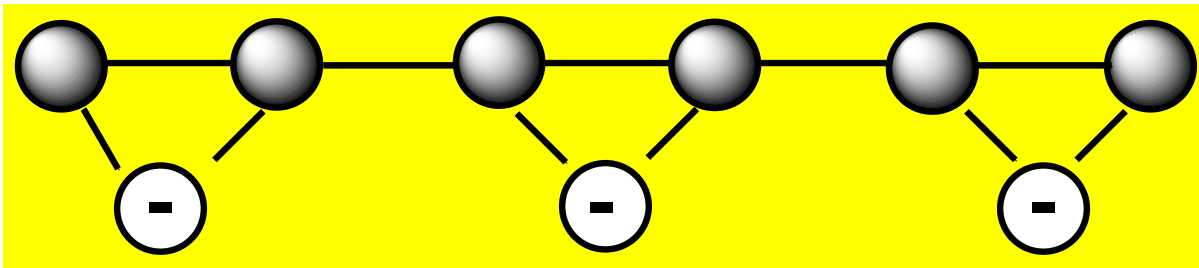
■ 由于SDS使蛋白质解聚, 所测分子量代表寡聚蛋白亚基的分子量。

SDS

- 有效的变性剂，能破坏蛋白质分子中的氢键和疏水键等，使各肽链呈展开状态。
- 可与蛋白质分子几乎定量结合，形成复合体。
 - 1.4 g SDS/1g protein,
 - 两个氨基酸结合一个SDS



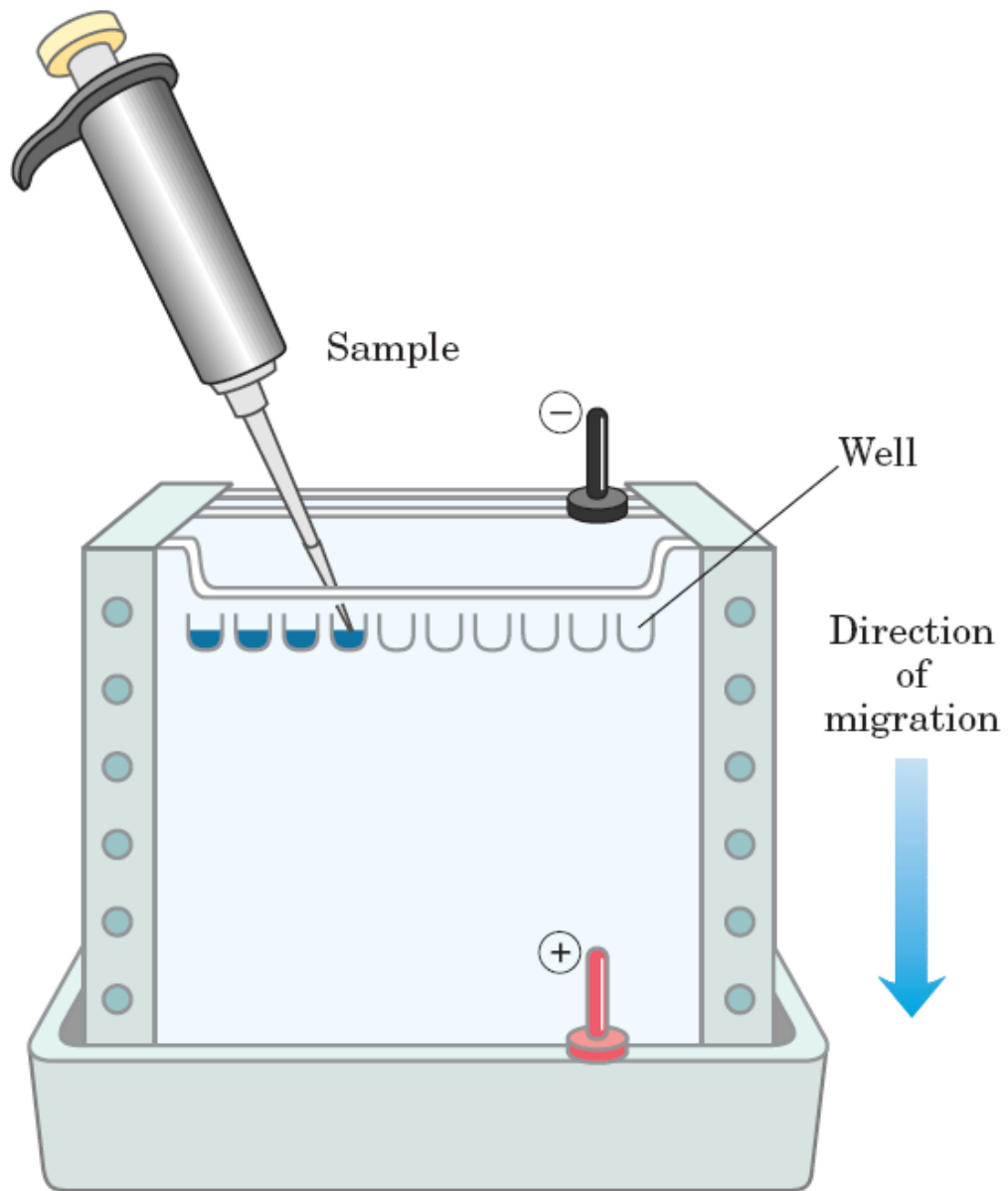
SDS



■ 结果:

1. 所有肽链覆盖上相同密度的负电荷。
 2. 所有SDS-蛋白复合体具有相同构象，类似雪茄烟形的长椭圆棒。
 3. 分子移动不受电荷及形状影响， q/f 为定值，分子移动速度只与分子量有关。
- 可看成以电场为驱动力的凝胶过滤。
 - 若存在链间二硫键，如何进行分析？

SDS-PAGE装置及电泳图



SDS-PAGE测定蛋白质的分子量

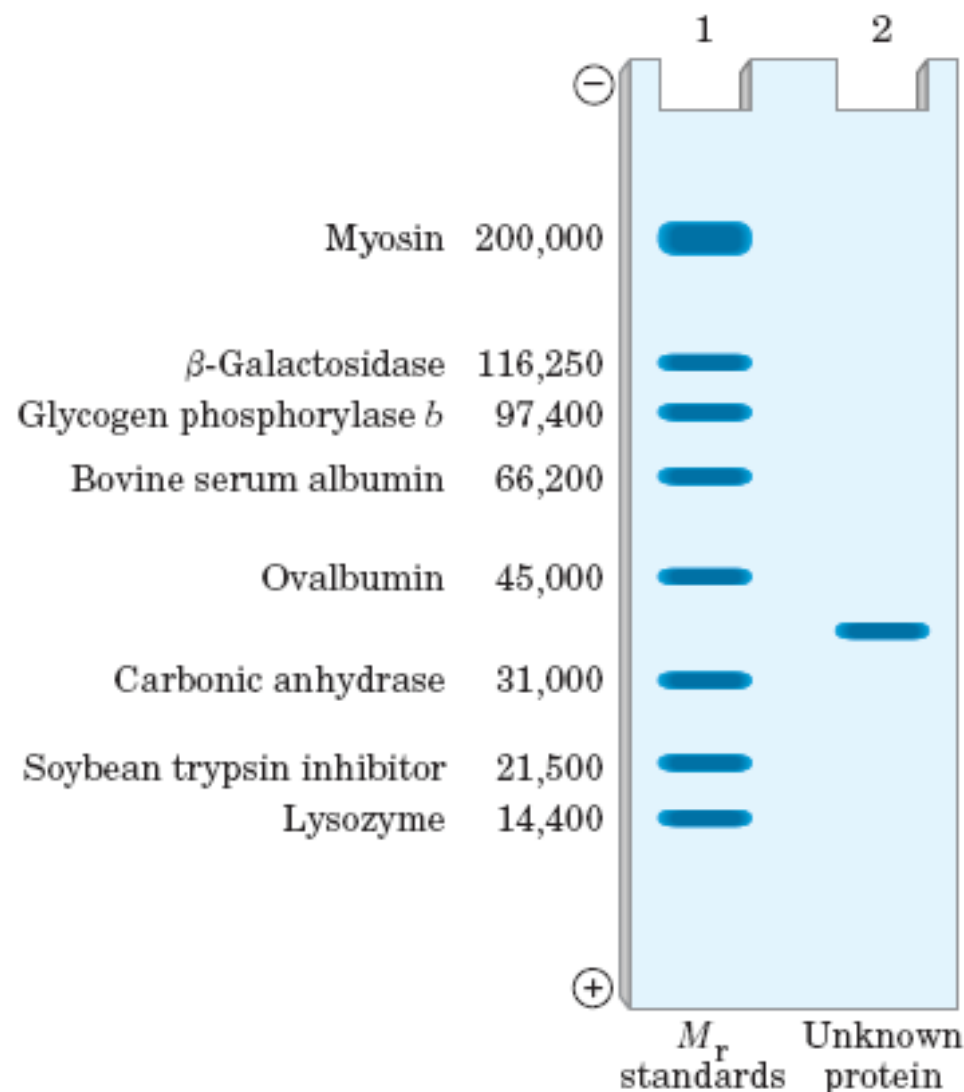
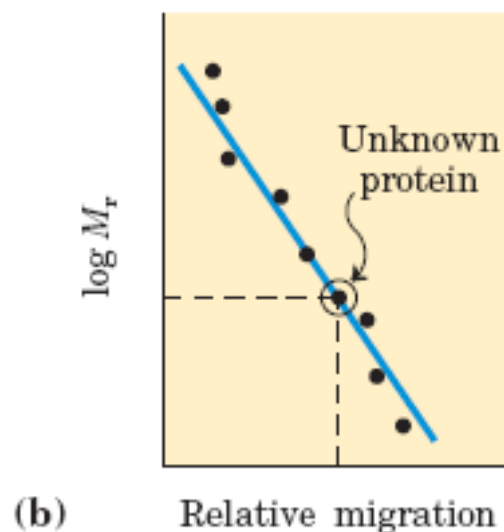


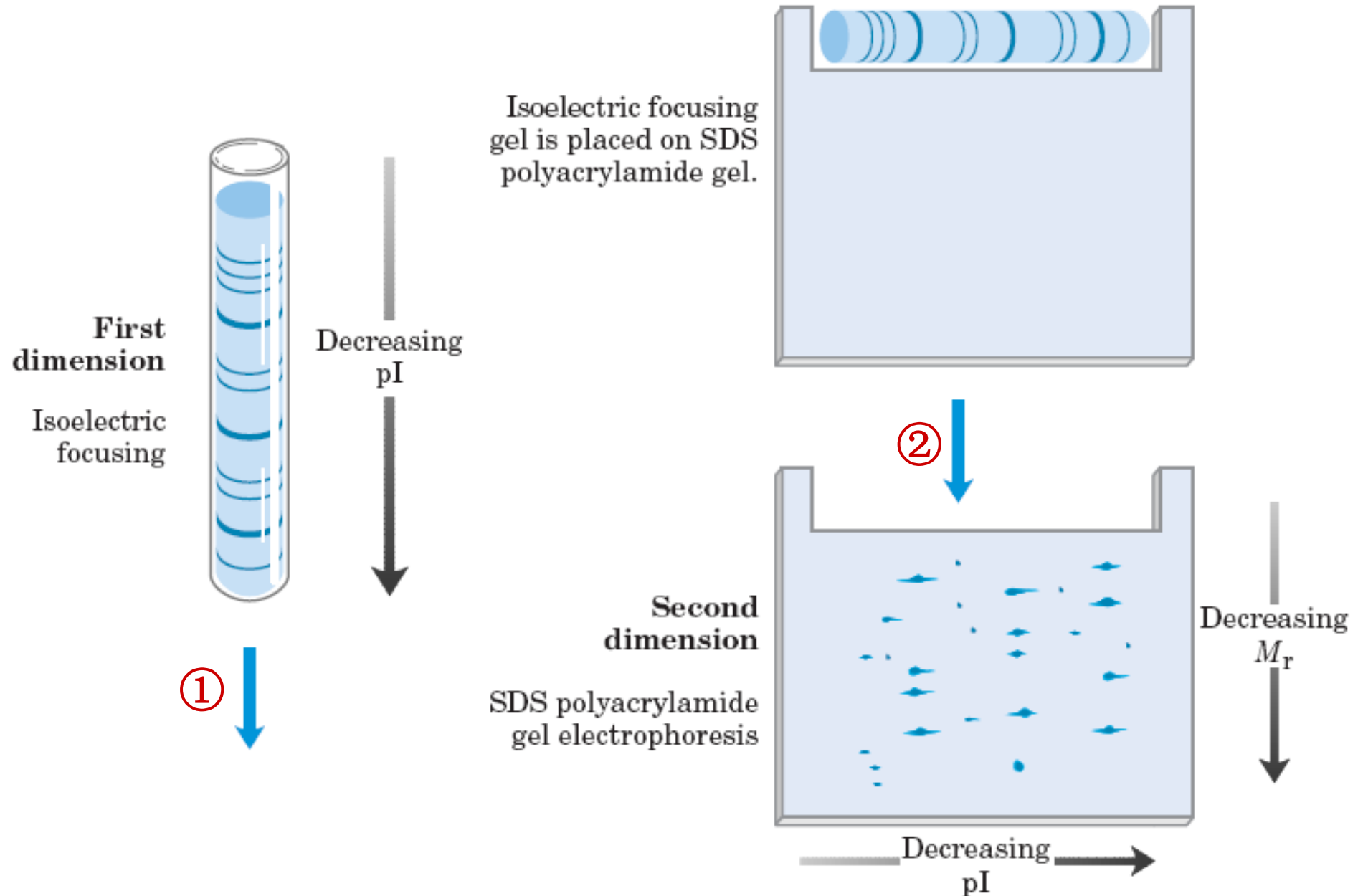
FIGURE 3-20 Estimating the molecular weight of a protein. The electrophoretic mobility of a protein on an SDS polyacrylamide gel is related to its molecular weight, M_r . (a) Standard proteins of known molecular weight are subjected to electrophoresis (lane 1). These marker proteins can be used to estimate the molecular weight of an unknown protein (lane 2). (b) A plot of $\log M_r$ of the marker proteins versus relative migration during electrophoresis is linear, which allows the molecular weight of the unknown protein to be read from the graph.



Two-dimensional Electrophoresis

- Isoelectric focusing + SDS-PAGE
- Permits the resolution of complex mixtures of proteins
- A more sensitive analytical method than either electrophoretic method alone.
- Separates proteins of identical molecular weight that differ in pI , or proteins with similar pI values but different molecular weights.

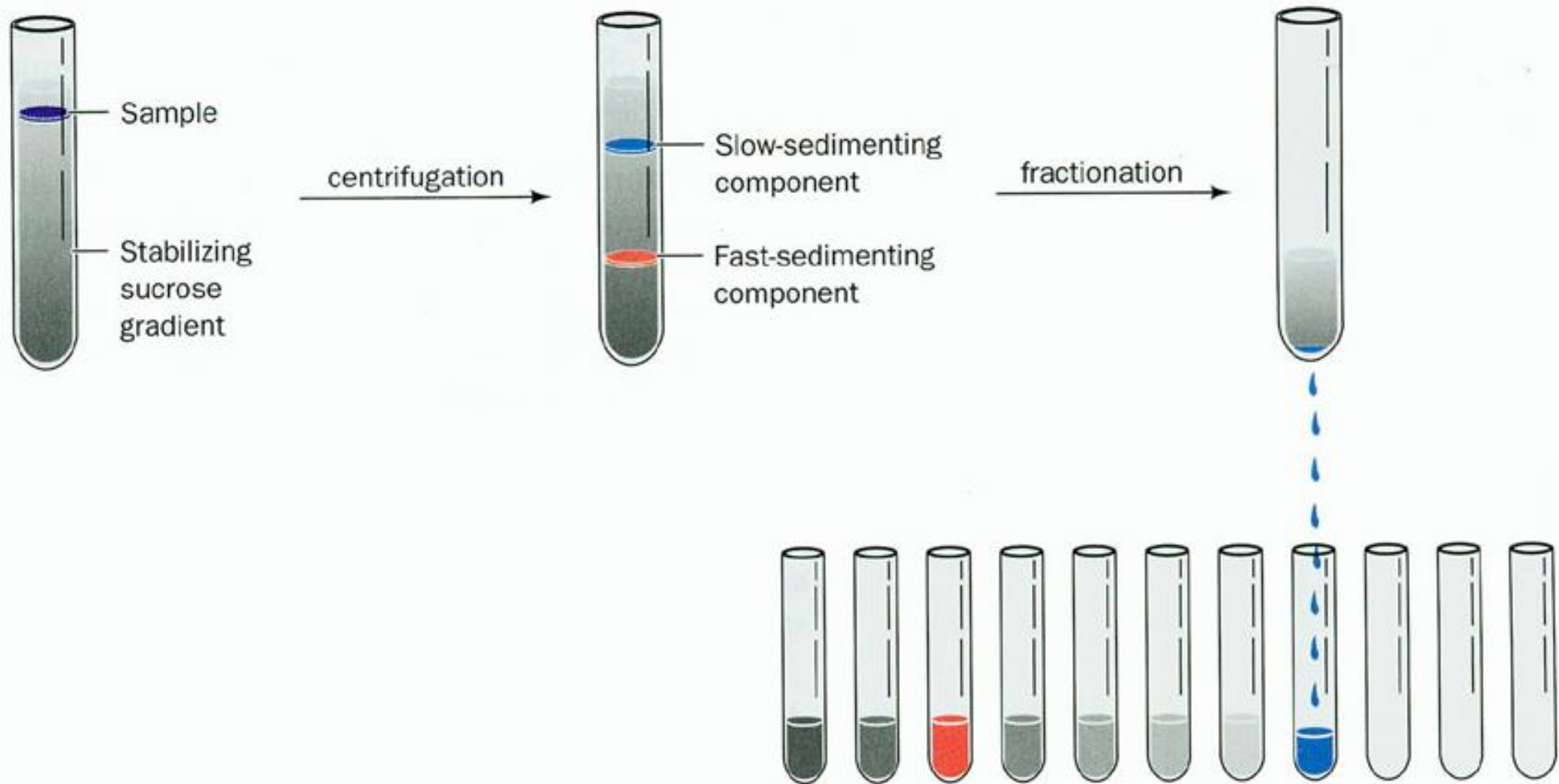
Two-dimensional electrophoresis



6. Ultracentrifugation

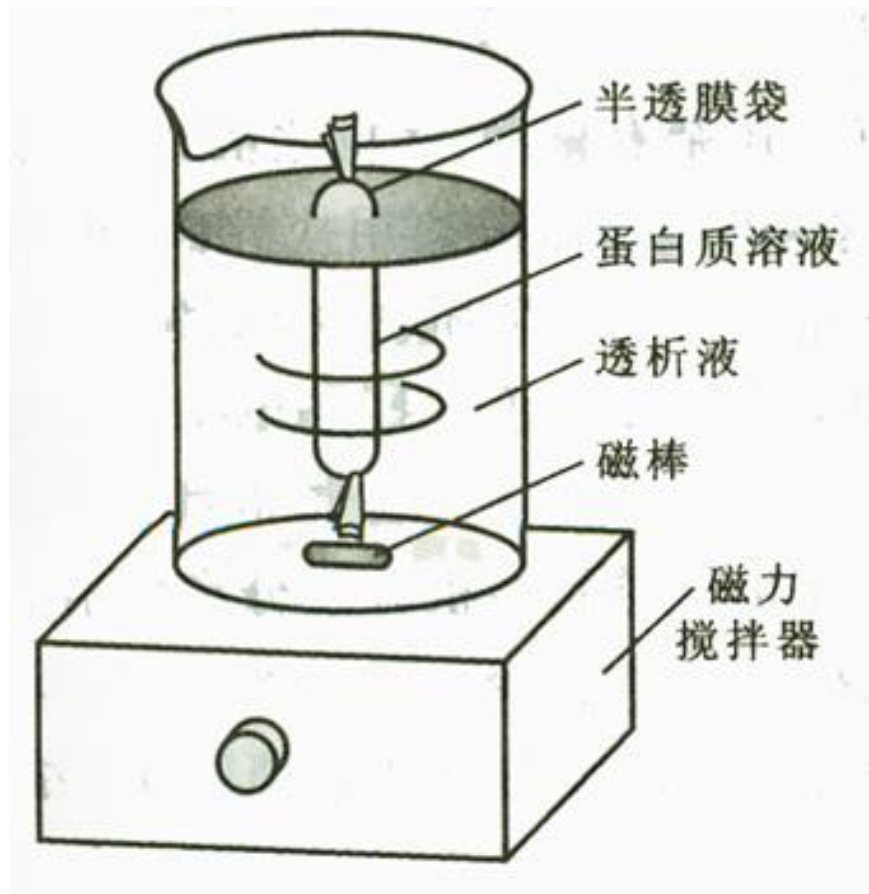
- **> 60000 rpm**
- **应用：**纯化、分子量测定。
- **最常用方法：**密度梯度离心(density gradient centrifugation)。
- **超速离心原理：**蛋白质颗粒的沉降取决于分子的质量和密度。
质量和密度大的颗粒比小的颗粒沉降的快，当颗粒沉降到与自身密度相等的介质密度梯度时，就停止不前。
- **常用的密度梯度：**蔗糖梯度、聚蔗糖梯度等。

Density Gradient Centrifugation (密度梯度离心)

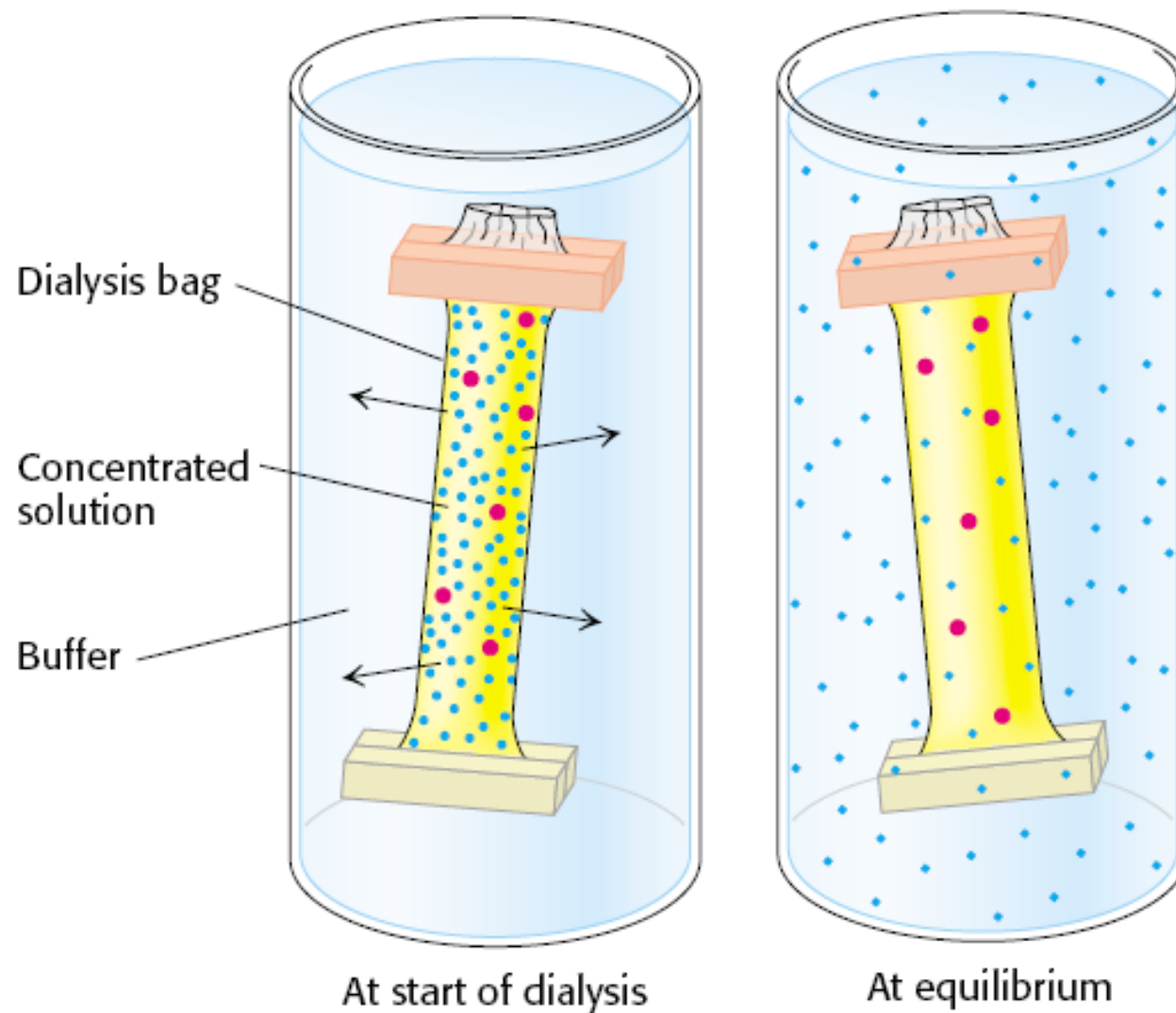


7. Dialysis and ultrafiltration

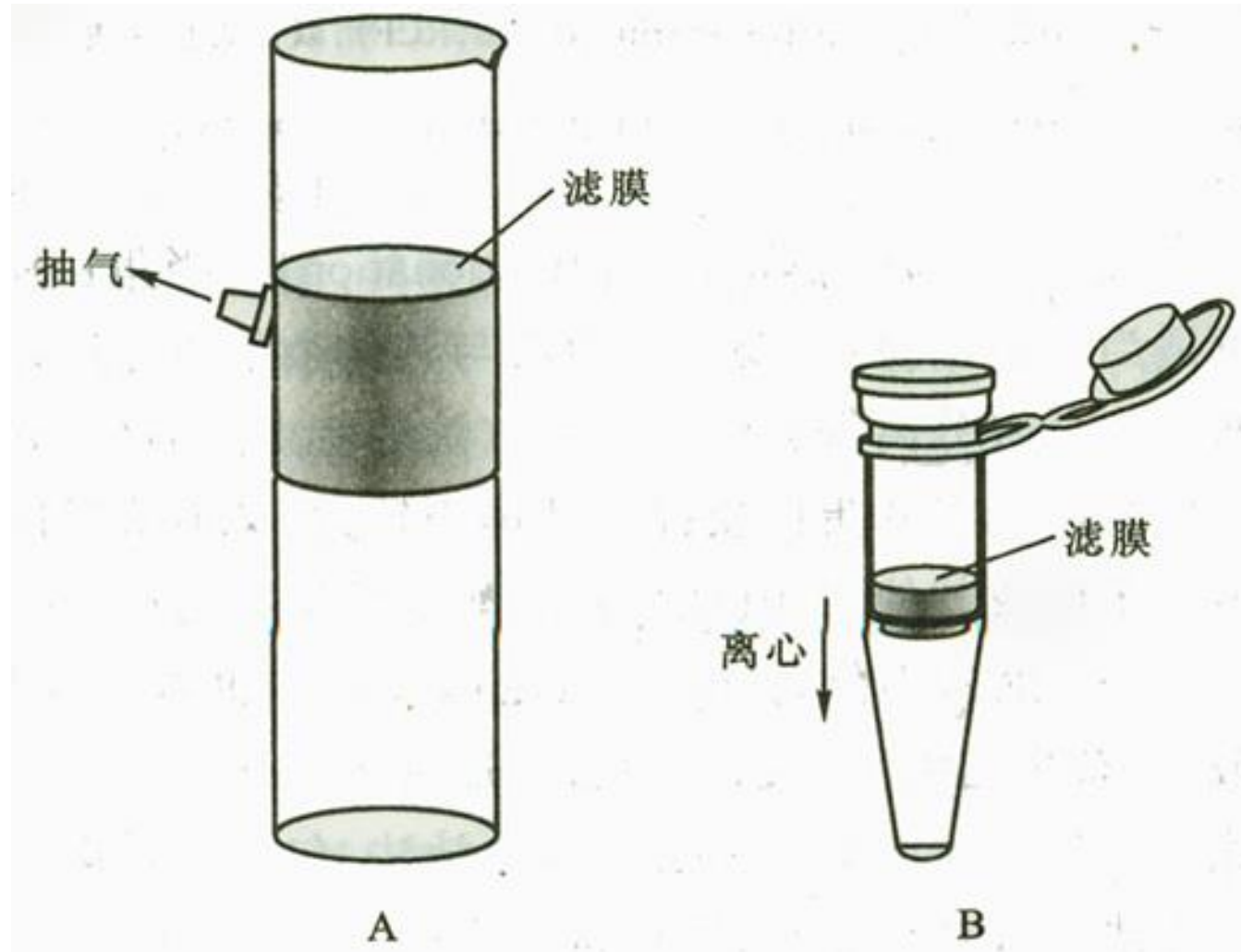
- **透析和超滤原理：**利用蛋白质分子不能通过半透膜的性质（胶体性质）。
- **半透膜：**玻璃纸、火棉纸、改性纤维素。
- **应用：**
 - 将蛋白质与其他小分子物质分开
 - 浓缩和脱盐
 - 粗分离



Dialysis (透析)

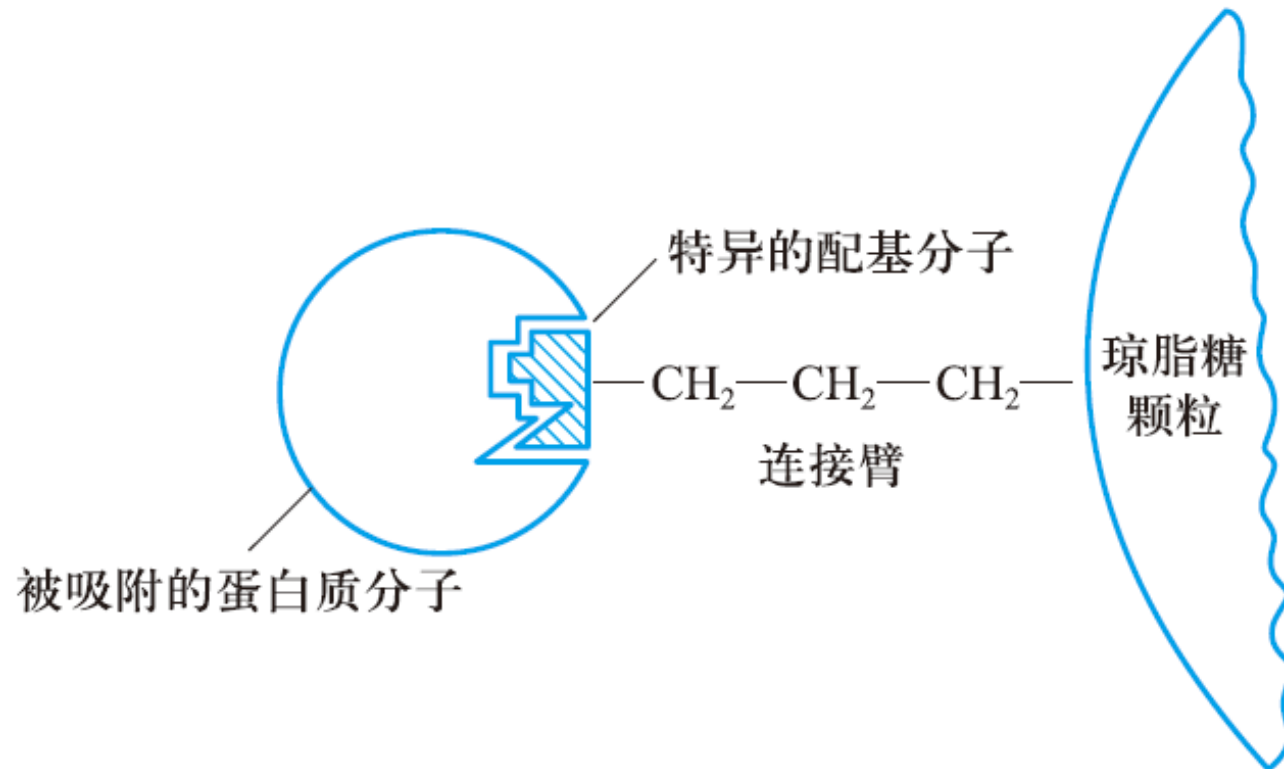


Ultrafiltration (超过滤)



8. Affinity chromatography

- **Principle:** Many proteins can bind specific molecules (ligand) tightly.
- Ligand is covalently attached to an inert matrix.
- A significant purification method.
- **Immunoaffinity chromatography** (ligand = antibody)

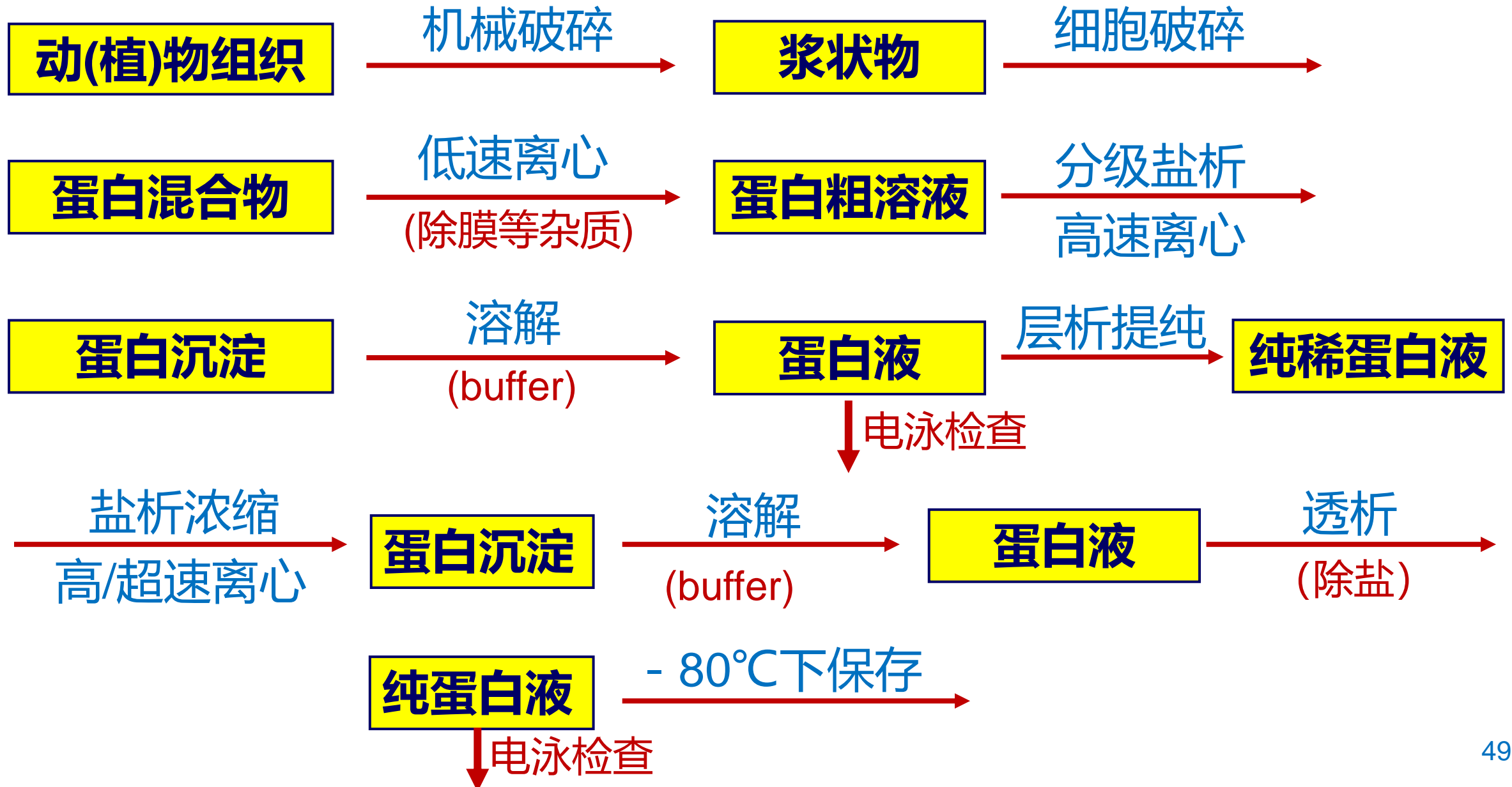


Metal chelating affinity chromatography

金属螯合亲和层析

- **原理**：蛋白质表面的一些氨基酸（如His、Trp、Cys等）能和金属离子发生特殊的相互作用。
- **6组氨酸标签**（His-tag）：应用最为广泛。
- His-tag与二价金属离子(**镍**、**锌**等) 螯合，过**镍柱**即可纯化蛋白质。
- His-tag其他用途：
 - 用针对His-tag的抗体来检测该融合蛋白。
 - 增加蛋白可溶性。
 - 提高蛋白稳定性。

蛋白质分离纯化全过程



蛋白质含量、纯度、分子量测定

■ 蛋白质含量测定

- (1) 凯氏定氮法
- (2) 双缩脲法
- (3) Folin - 酚试剂法 (Lowry法)
- (4) Bradford法 (考马斯亮蓝结合法)
- (5) 紫外吸收法
- (6) 胶体金测定法

■ 蛋白质纯度测定

- (1) 电泳法：常用。纯蛋白在不同pH条件下电泳时，均得到一条区带（或峰）
- (2) 沉降法：纯蛋白在离心场中，以单一的沉降速度移动
- (3) HPLC：常用。纯蛋白在洗脱图谱中呈现单一的对称峰。
- (4) 恒浓度法：纯蛋白在一定的溶剂系统中具有恒定的溶解度。
- (5) N-末端分析法：适用于单链蛋白质。N-端只有一种氨基酸。

■ 蛋白质分子量测定

(1) SDS-PAGE

- 蛋白质在凝胶上的迁移速度取决于蛋白质的分子量
- Marker
- 分子量标准曲线

(2) 凝胶过滤法

- 不同分子量的蛋白质分子在凝胶过滤中的洗脱体积不同
- FPLC

(3) 质谱法：准确、快速、需样量少。

本次课主要内容小结

六、蛋白质的性质

4. 复性作用

去除变性因素，有可能

5. 折叠作用

辅助蛋白：PDI, HSP
构象病（折叠病）

6. 紫外吸收

280 nm，定性鉴定

七、蛋白质分离纯化

纯化步骤

提取 → 粗品 → 纯品

分离技术

盐析

离子交换层析

等电聚焦

凝胶过滤

SDS-PAGE

超速离心

透析/超滤

亲和层析

本章学习要点

- 会画20种基本氨基酸及寡肽的结构
- 掌握氨基酸及肽的性质，特别是带电性质和各氨基酸侧链性质
- 掌握蛋白质的各种性质
- 掌握氨基酸、肽和蛋白质的各种分离纯化方法（原理及解析）
- 掌握测定蛋白质一级结构的各种步骤及方法
- 掌握蛋白质各级结构的概念及维系的力
- 掌握蛋白质结构与功能的关系
- 熟悉蛋白质的分类、蛋白质含量测定等
- 了解蛋白质研究的历史

第四章 酶

一、酶的概念

1. 酶的催化特点
2. 酶的化学本质及组成
3. 酶的命名及分类
4. 酶的专一性
5. 酶的活力测定