

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
建组
截止时间：今天中
午12点前

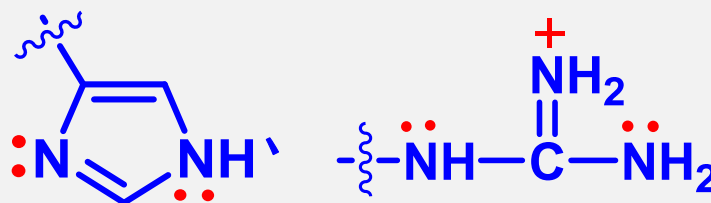
结构、性质、方法、原理

二. 氨基酸

-- 氨基酸侧链基团的性质

-SH、-SCH₃、-OH、-Ar、

-- 分离与分析



概念、结构、性质、方法

三. 多肽

1. 结构和基本概念
2. 肽键及其特点
3. 酸碱性与pI计算
4. 肽链的水解方法及优缺点

三、多肽

5. Important natural peptide

- **蛋白质的亚单位（亚基，subunit）—— 多肽最重要的存在形式。**
- **活性肽（active peptide）—— 分子量较小并以游离状态存在。常具有特殊的生理功能。**

脑啡肽

谷胱甘肽

蛇毒多肽

肽类抗生素

肽类激素

等等

脑啡肽 (enkephalin) — 类吗啡性神经递质

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met Met-脑啡肽 (五肽, 镇痛)

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu Leu-脑啡肽 (五肽, 镇痛)

牛催产素 (九肽, 激素)

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂

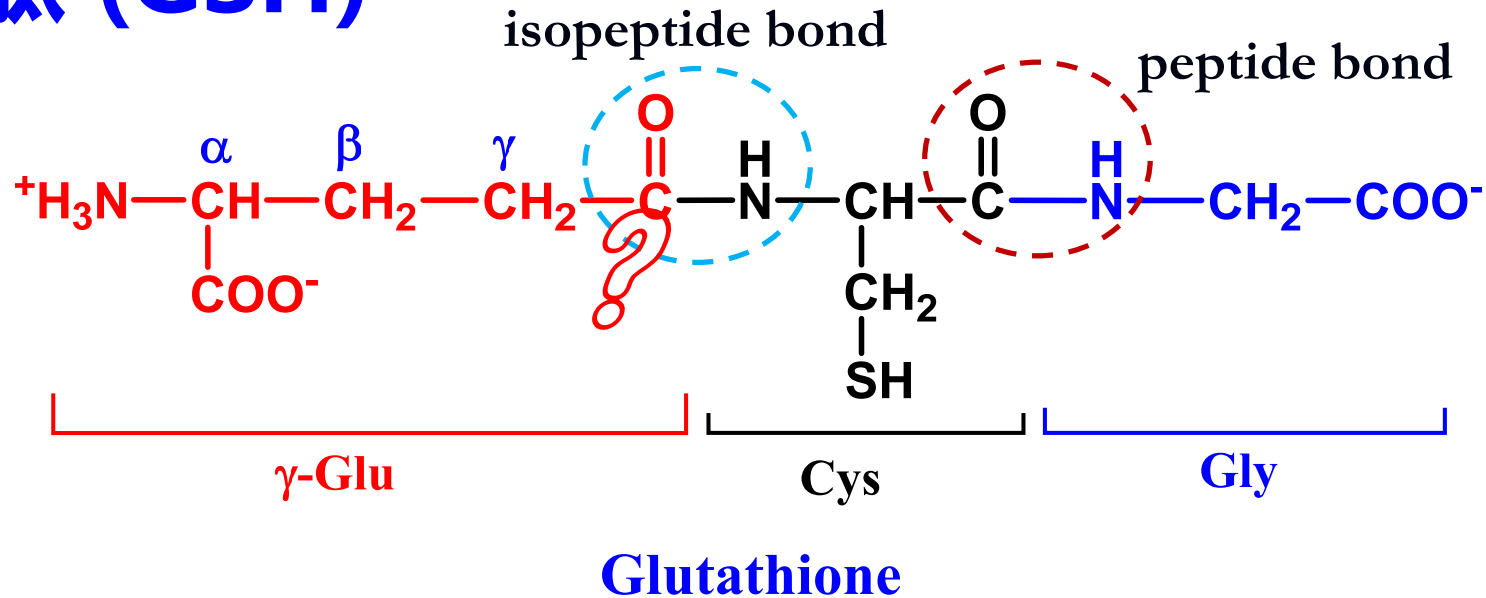


短杆菌肽S (环十肽, 抗生素)

D-Phe → L-Leu → L-Orn → L-Val → L-Pro

L-Pro \leftarrow **L-Val** \leftarrow **L-Orn** \leftarrow **L-Leu** \leftarrow **D-Phe**

谷胱甘肽 (GSH)



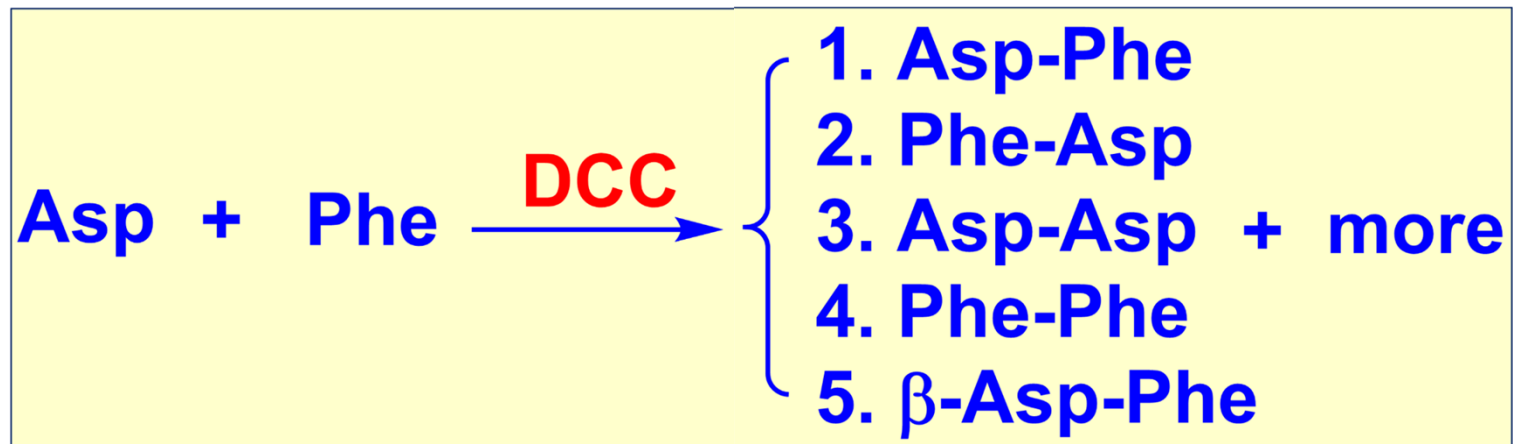
- γ -谷氨酰半胱氨酰甘氨酸，简称为GSH
- 广泛存在于动物和植物细胞中
- 多种重要作用：**抗氧化损伤**、**保护蛋白巯基**、**参与AA跨膜转运**、**植物体内的电子传递体等**。
- 两种形式：还原型(GSH)和氧化型(GSSG)

三、多肽

6. Chemical synthesis

How to synthesize **Asp-Phe-OMe**?

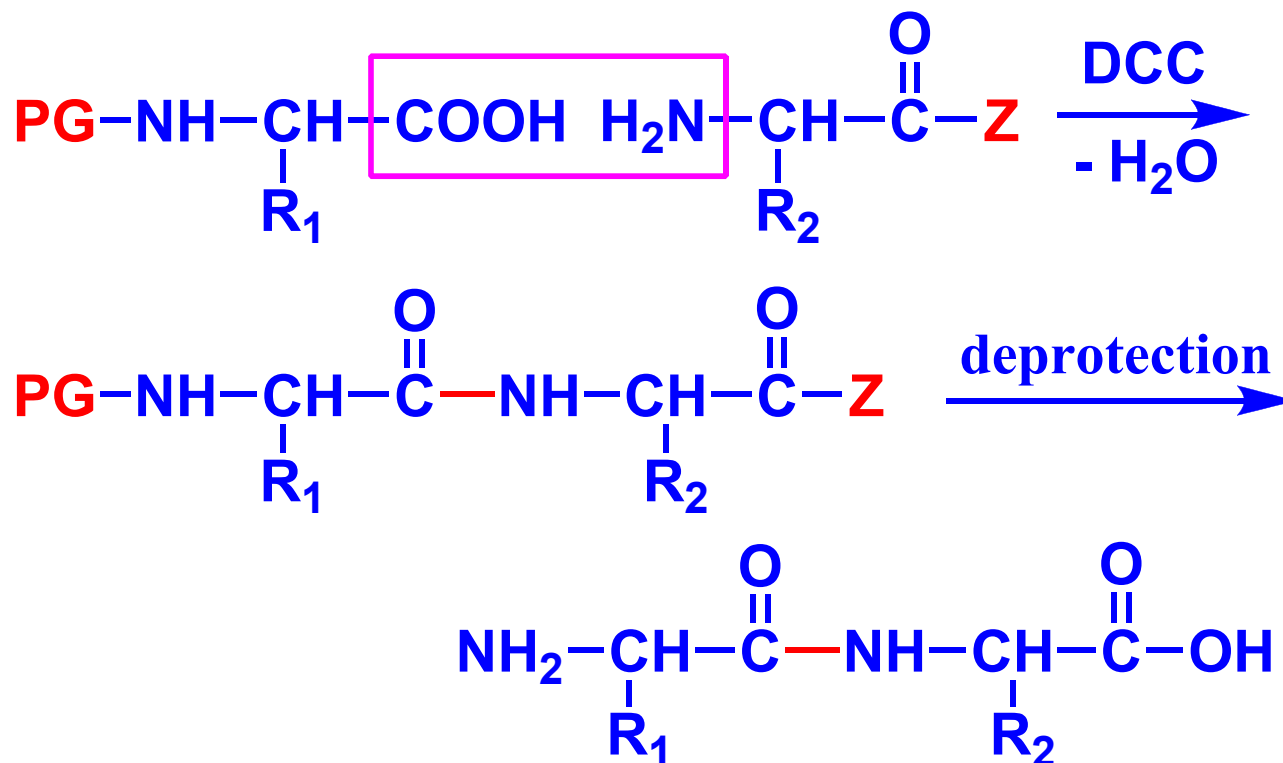
(**阿斯巴甜**, *Aspartame* or *NutraSweet*, 200 sweeter than sucrose)



Chemical synthesis of polypeptides

- **策略：**定向形成酰胺键
- **方法：**保护不反应的基团（氨基和羧基）
活化反应的基团（羧基）

此法缺点



多肽固相合成法

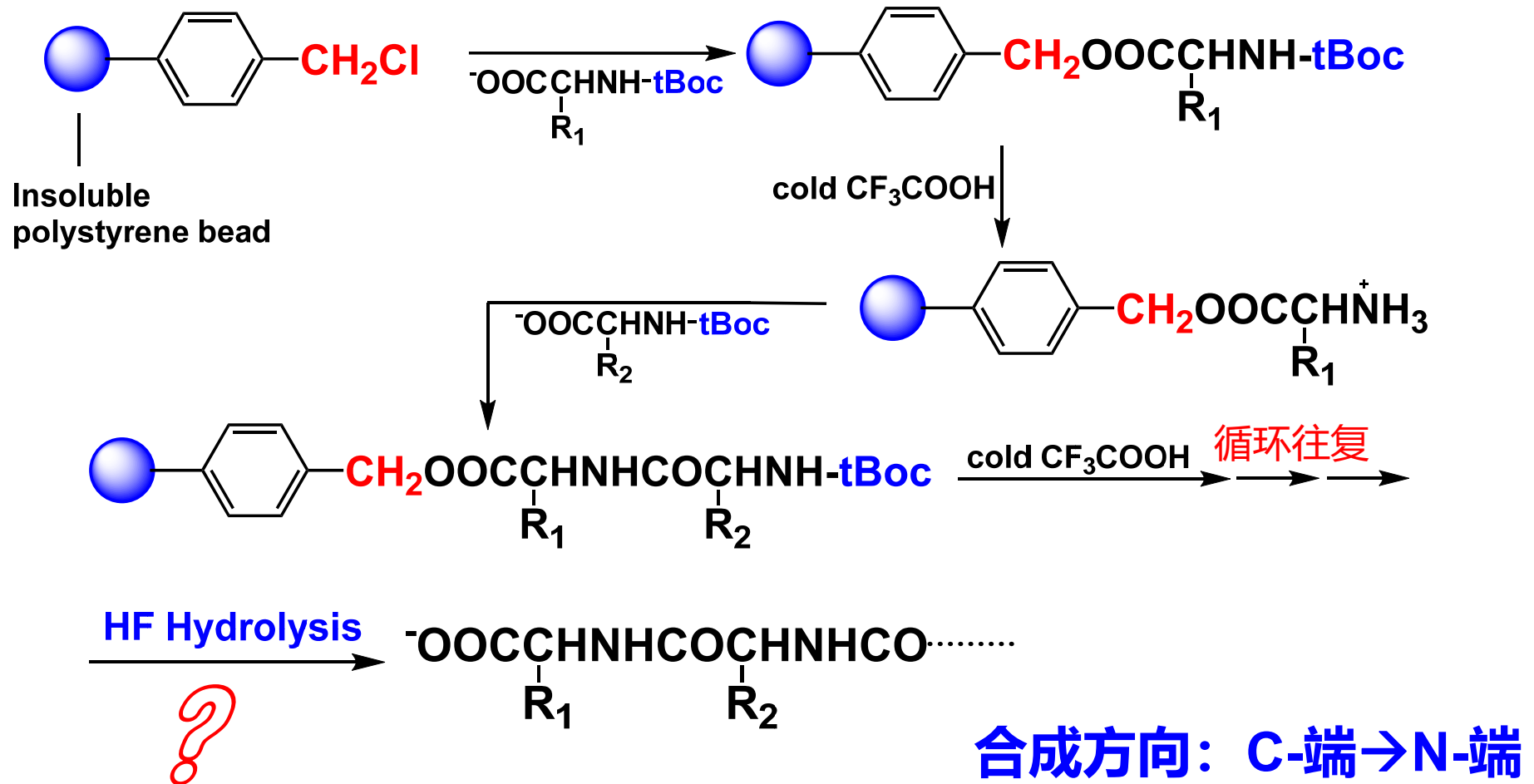
Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS)

- ✓ 1963年, R. B. Merrifield首次提出SPPS。
- ✓ 保护基: 苄氧羰基 → 叔丁氧羰基(tBoc)
- ✓ 发明第一台多肽合成仪。
- ✓ 首次合成核糖核酸酶 (124个氨基酸)。
- ✓ 1984 Nobel Chemistry Prize
- ✓ 可参看百度词条。

Robert Bruce Merrifield



Solid-Phase Peptide Synthesis



三、多肽

7. Combinatorial peptides libraries

组合化学 (combinatorial chemistry)

- 应用:

 - 定量构效关系 (QSAR) 研究

 - 活性筛选 (activities screening)

- Amino acids: 20

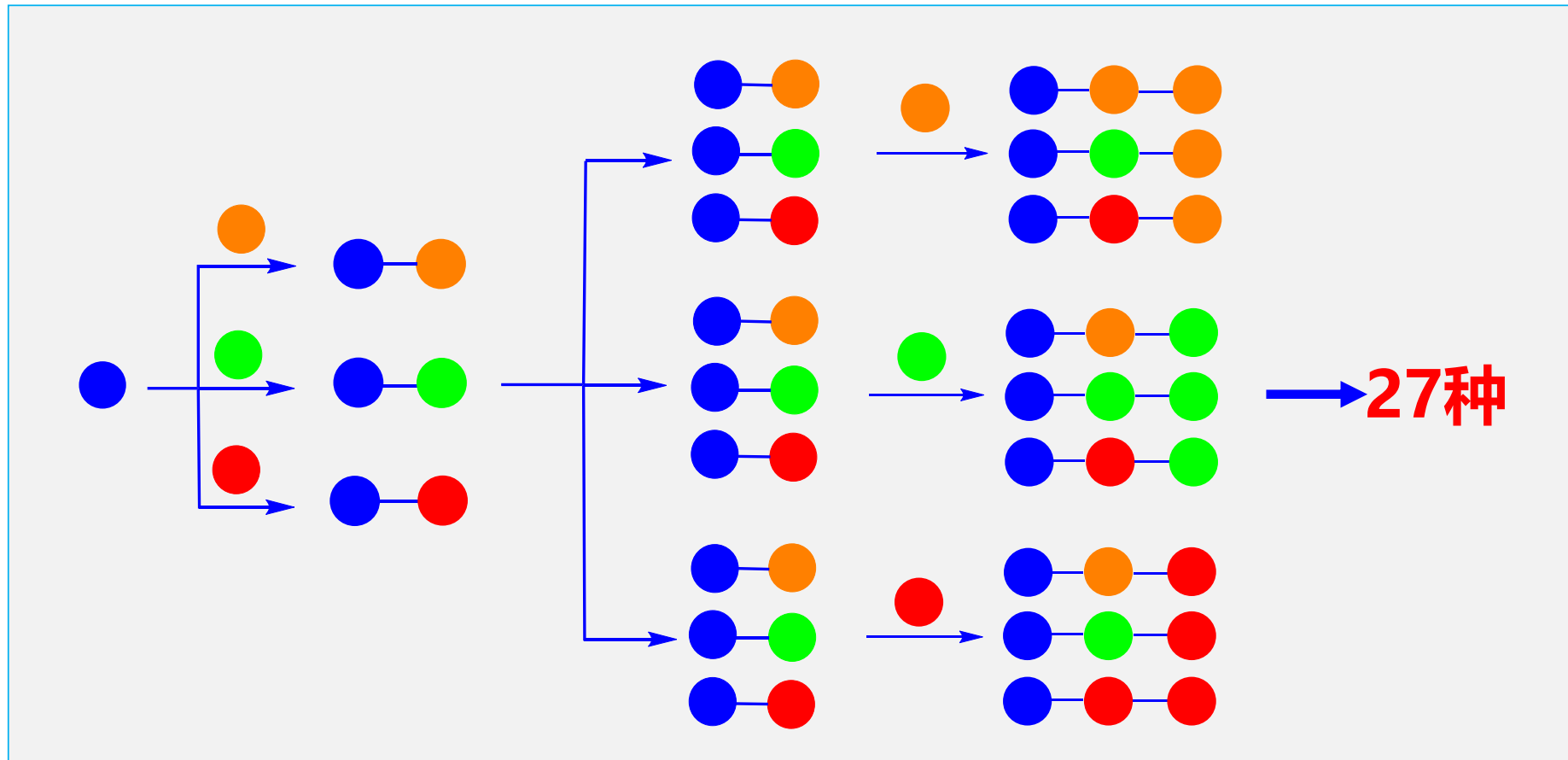
 - dipeptides: $20^2 = 400$

 - hexapeptides: $20^6 = 64,000,000$

- 均分合成法 (split synthesis)

例题: ● ● ● ● → ● — ???

均分合成法 (split synthesis)



四、蛋白质的结构

- 蛋白质：是由一条或多条多肽链以特殊方式结合而成的生物大分子。

- 与多肽并无严格的界线。

氨基酸残基数 > 40

蛋白质分子量 $> 4400\text{ D}$

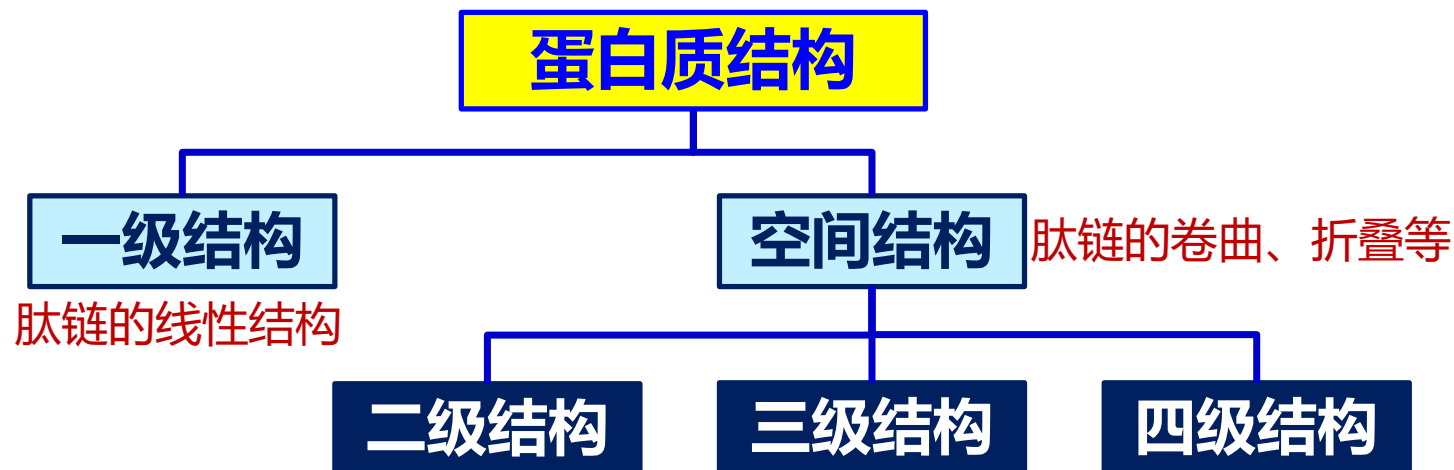
- 分子量变化范围很大。

约 $5\text{ KD} \sim 1,000\text{ KD}$ ，甚至更大。

四、蛋白质的结构

1. Definition of Protein Structural Levels

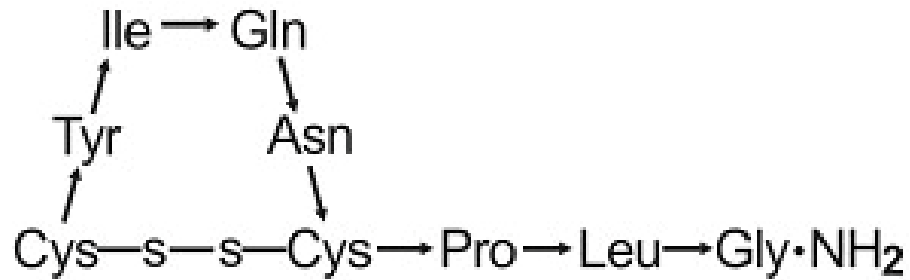
- 蛋白质结构非常复杂。
- 1969年，IUPAC对蛋白质高级结构的不同层次作了界定。



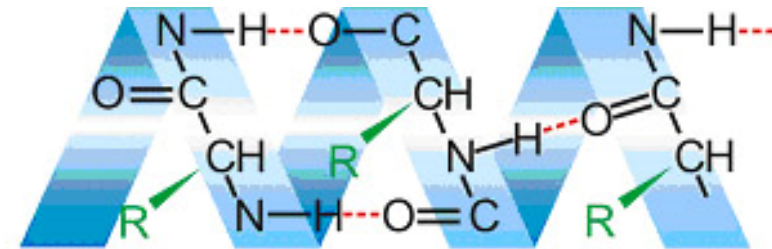
Four Levels of Protein Structure

- **Primary structure** --- the linear sequence of amino acids in the chain and the location of the disulfide bridges (二硫键).
- **Secondary structure** --- the conformation (构象) of segments of the backbone chain (主链) of a protein.
- **Tertiary structure** --- the three-dimensional arrangement of all the atoms in the protein.
- **Quaternary structure** --- the way the subunits (亚基) are arranged in space.

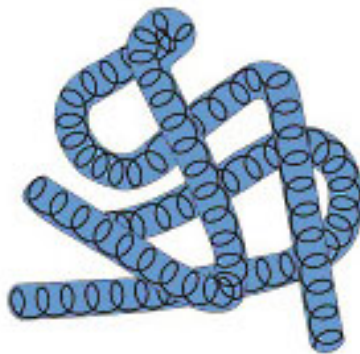
Four Levels of Protein Structure



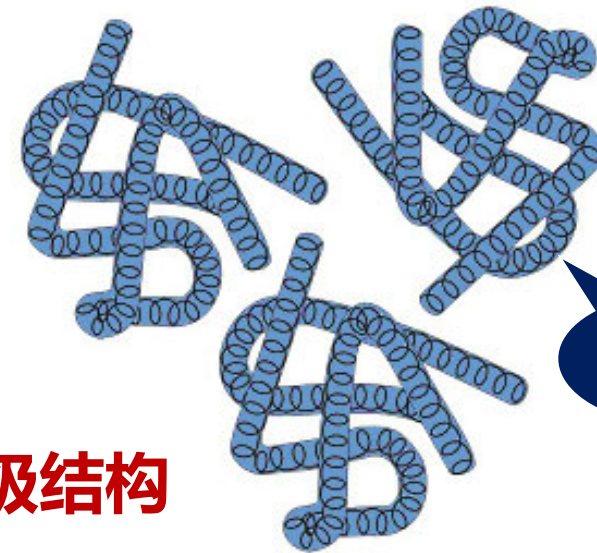
一级结构



二级结构



三级结构



四级结构

亚基

四、蛋白质的结构

2. Primary Structure

- 蛋白质的一级结构包括以下内容：
 - 组成蛋白质的氨基酸种类和数量
 - 组成蛋白质的多肽链数目
 - 多肽链的氨基酸顺序
 - 多肽链内或链间二硫键的数目和位置

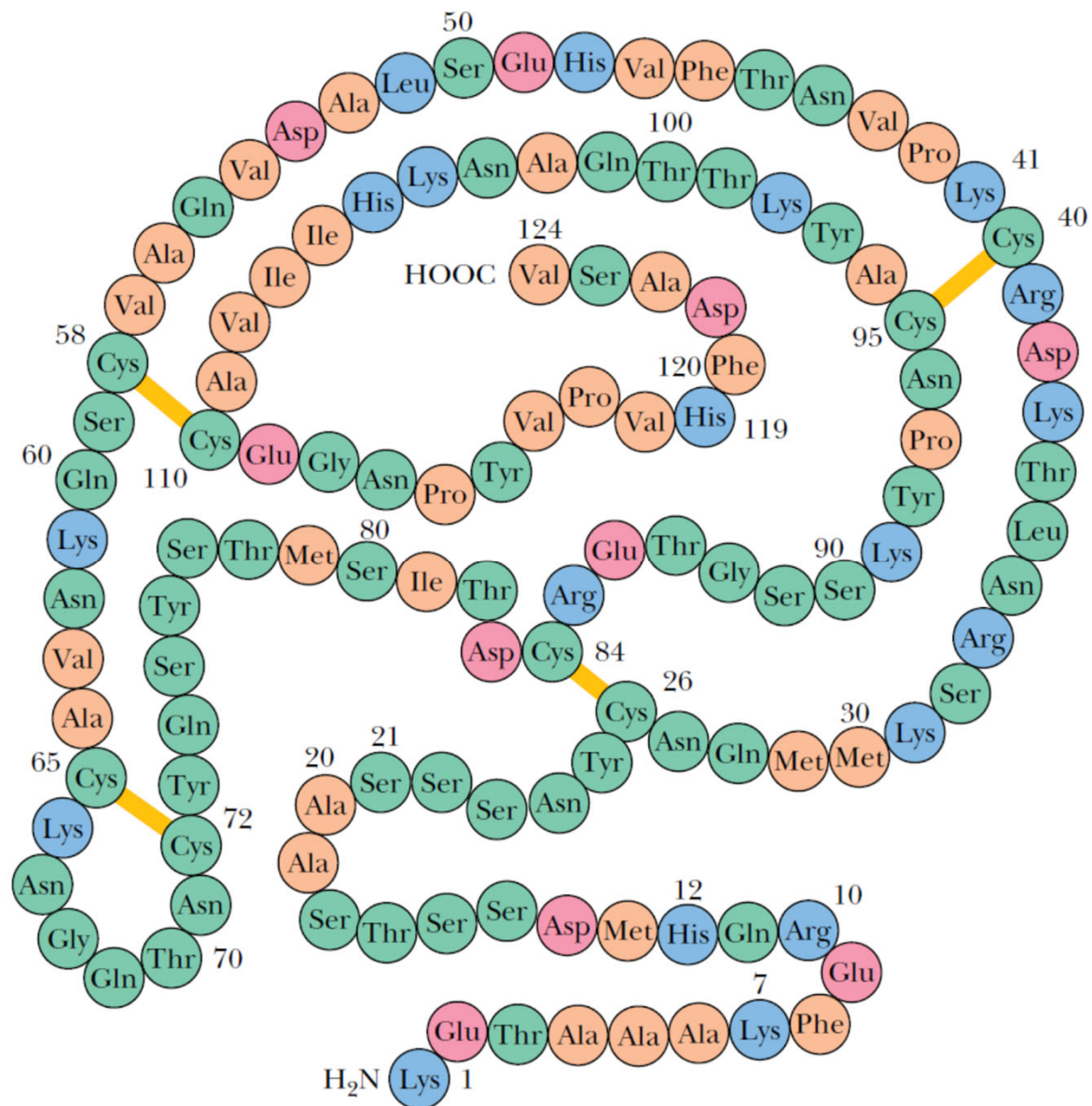
2. Primary Structure

- **最重要的内容：多肽链的氨基酸顺序**

原因：

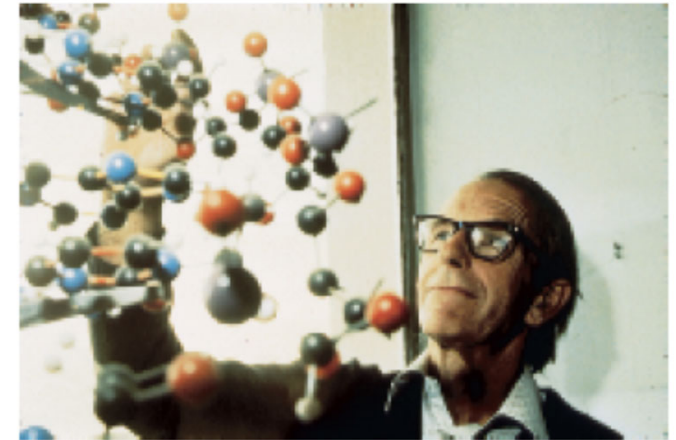
- **蛋白质生物功能的基础**
- **预测空间结构**
- **蛋白质分类、进化、功能**

牛胰核糖核酸酶 的一级结构

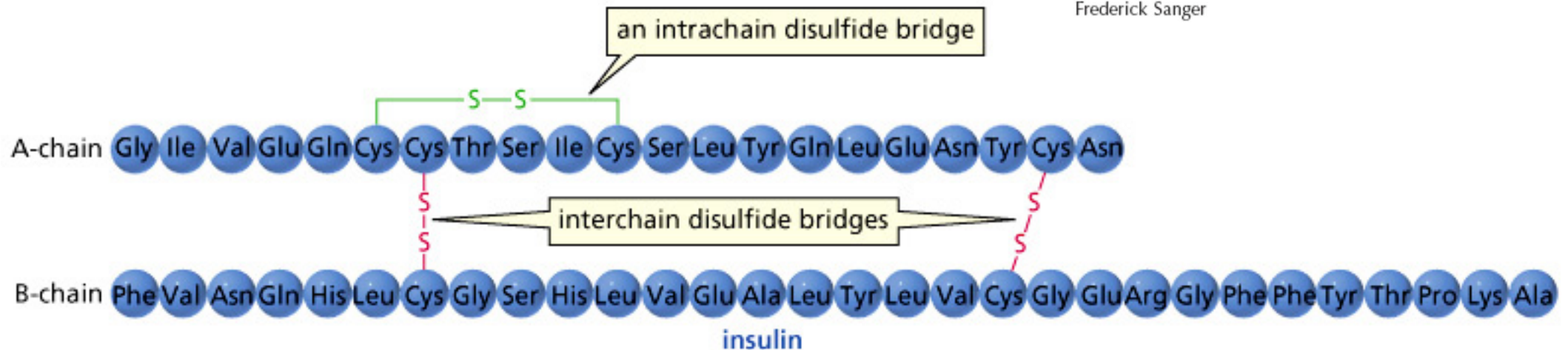


蛋白质一级结构的测定

- 1953年, F. Sanger测定了胰岛素的一级结构, 1958年获Nobel Chemical Prize.



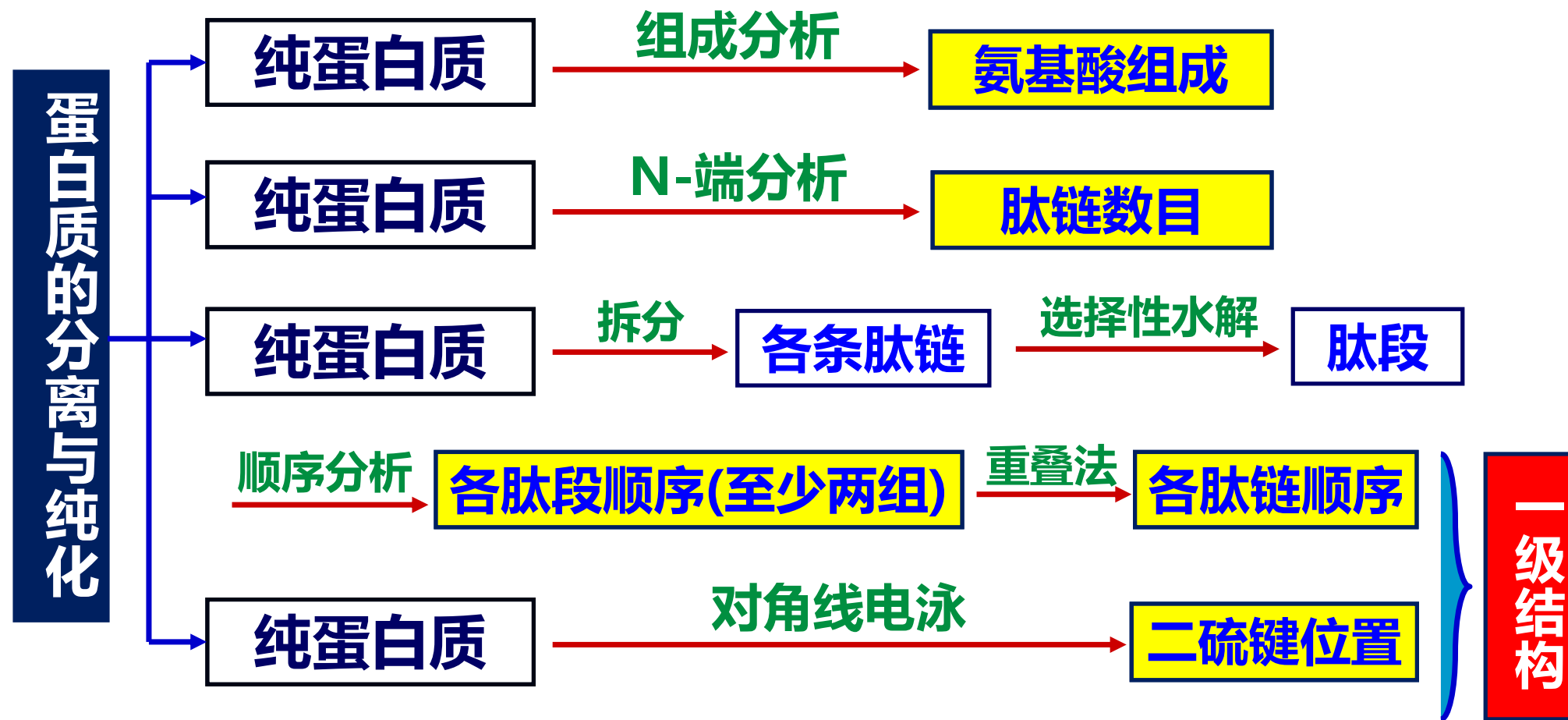
Frederick Sanger



蛋白质一级结构测定内容

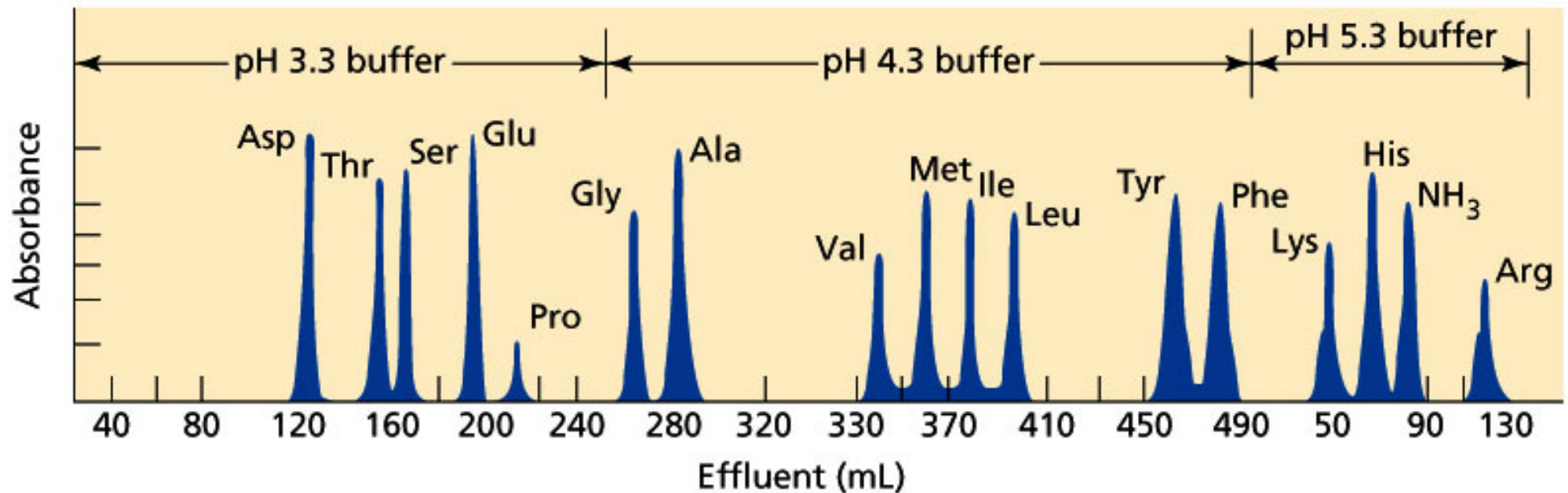
- ① 根据蛋白质分子量，计算出构成蛋白质的各种氨基酸的数量。
- ② 蛋白质分子中多肽链的数目。
- ③ 二硫键的断裂及多肽链的拆分。
- ④ 各多肽链的选择性降解及各肽段的氨基酸顺序测定。
- ⑤ 重叠法拼凑出整条多肽链的氨基酸顺序。
- ⑥ 多肽链中二硫键位置的确定。

蛋白质一级结构测定步骤及方法



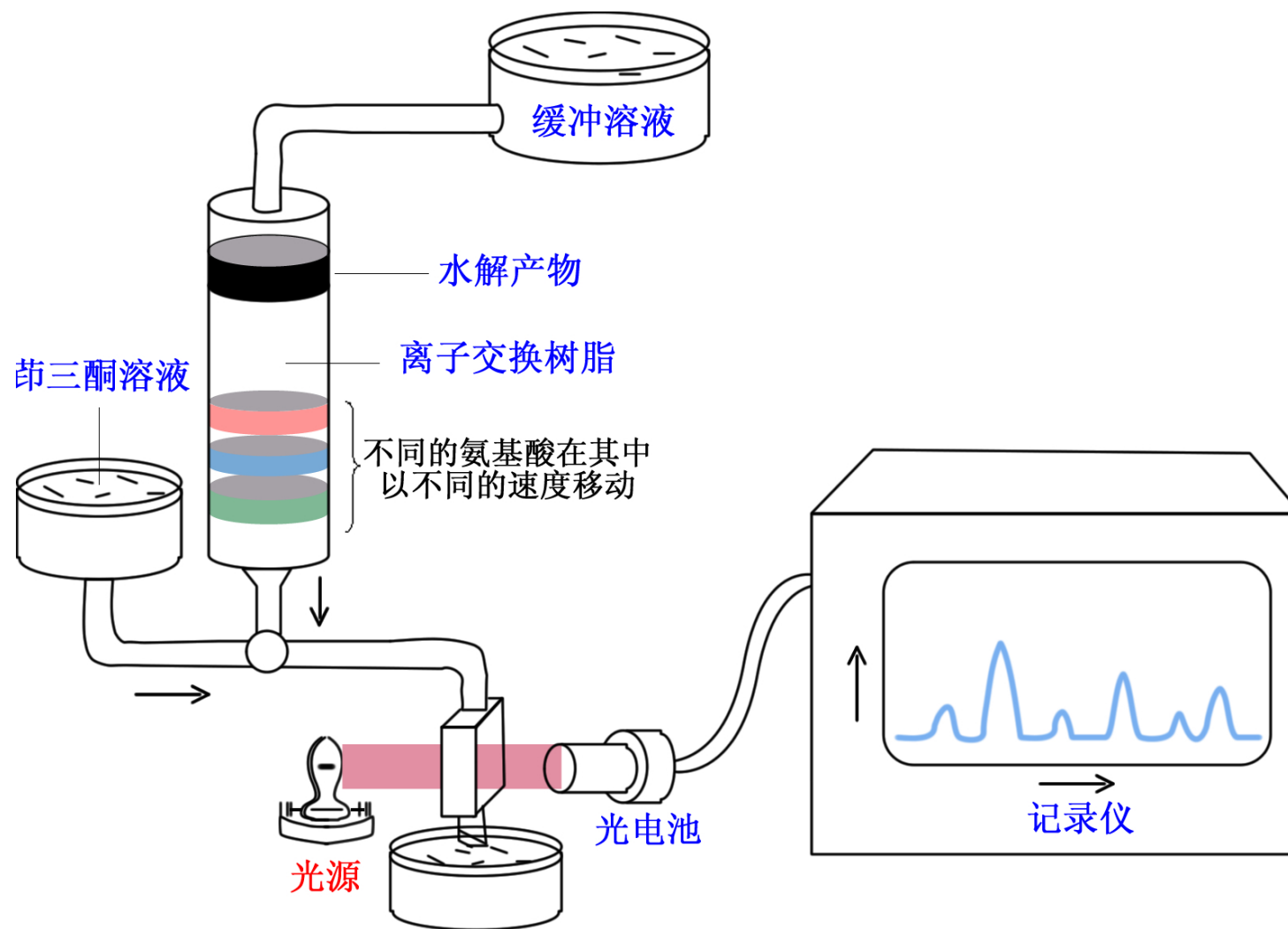
(1) Amino Acids Analysis in Protein

- The number and kinds of amino acids
- 6 N HCl, heating at 100°C for 24 h
- Automated amino acid analyzer

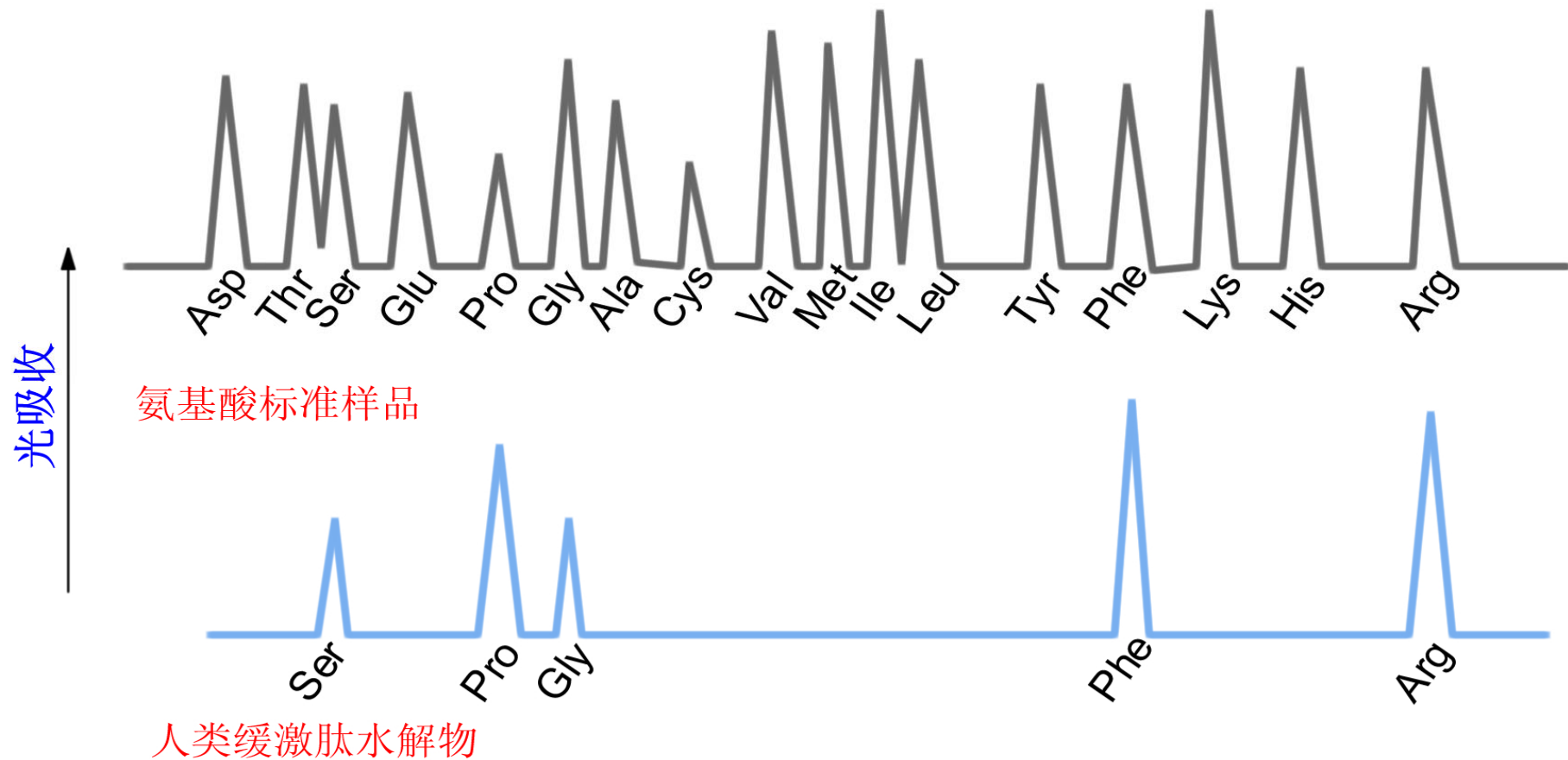


Automated Amino Acid Analyzer

氨基酸自动分析仪



氨基酸标准样品和人类缓激肽水解物的氨基酸组成分析谱



(2) End Group Analysis

- 末端氨基酸分析
蛋白质分子量 } → 多肽链的数目
- 多肽链端基氨基酸分为两类：
 - N-端氨基酸
 - C-端氨基酸
- N-端氨基酸分析法：最重要

(2) End Group Analysis

① 2, 4 - 二硝基氟苯 (DNFB) 法

--- Sanger法

--- N-端测定法

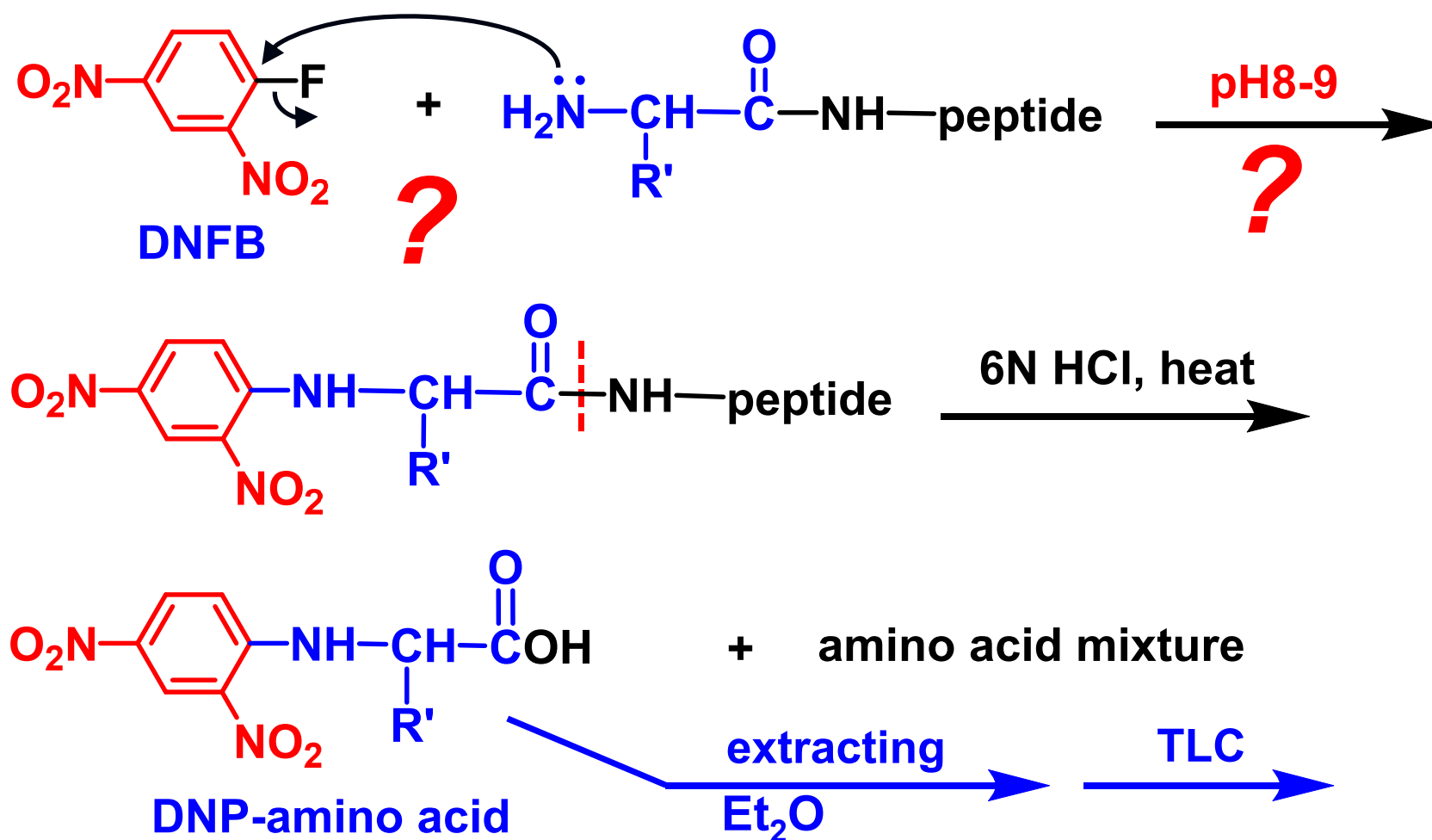
--- 产物为黄色、脂溶性的DNP-氨基酸。

--- 不能继续对肽链其余氨基酸进行测定。

有何好处呢?

为什么?

Principle of DNFB Method

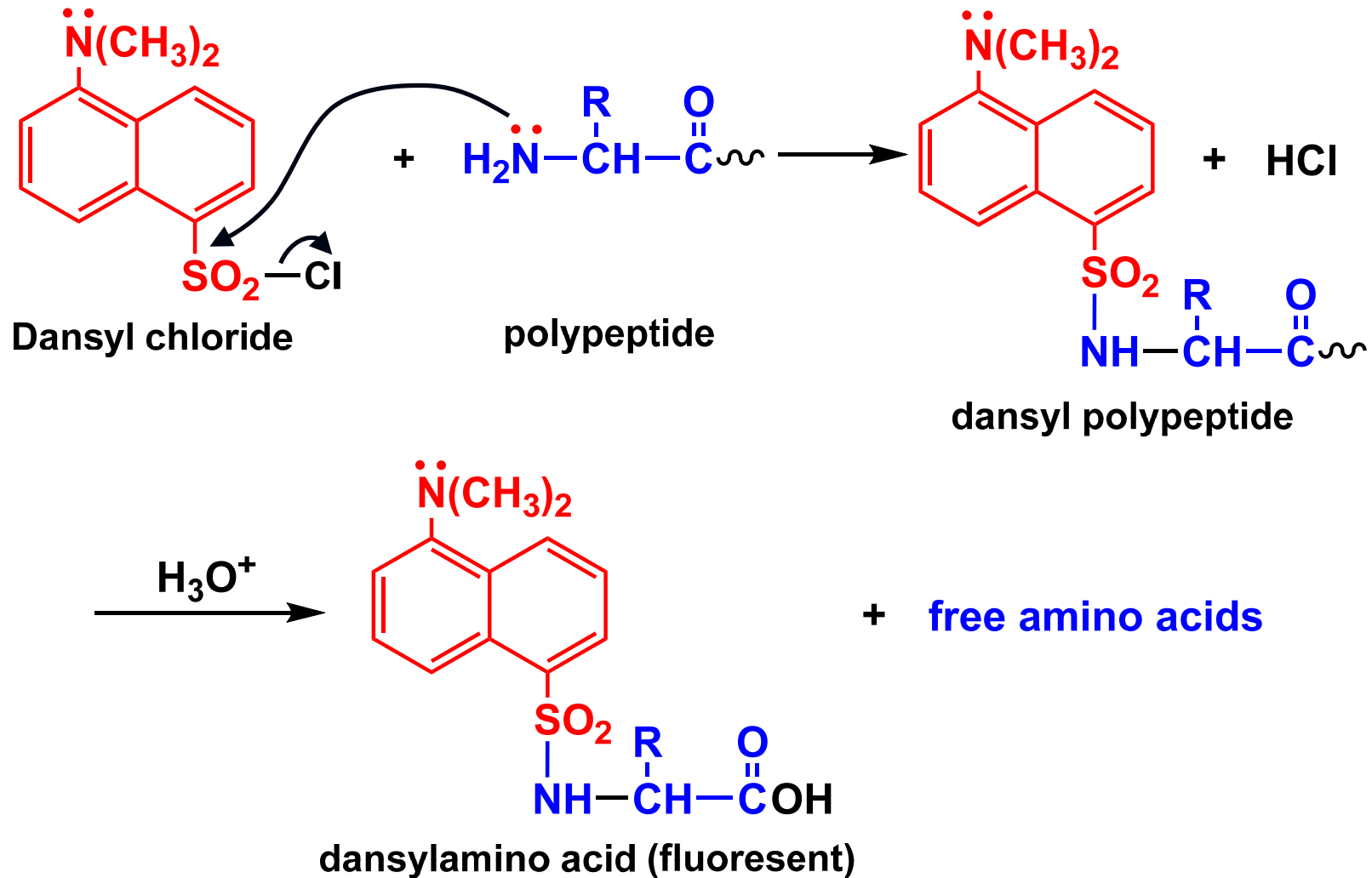


(2) End Group Analysis

② 丹磺酰氯 (Dansyl chloride) 法

- N-端测定法，常用。
- 产物为丹磺酰-氨基酸。有很强的荧光性质，检测灵敏度可达 1×10^{-9} mol。
- 不能继续对肽链其余氨基酸进行测定。

Principle of Dansyl Chloride Method

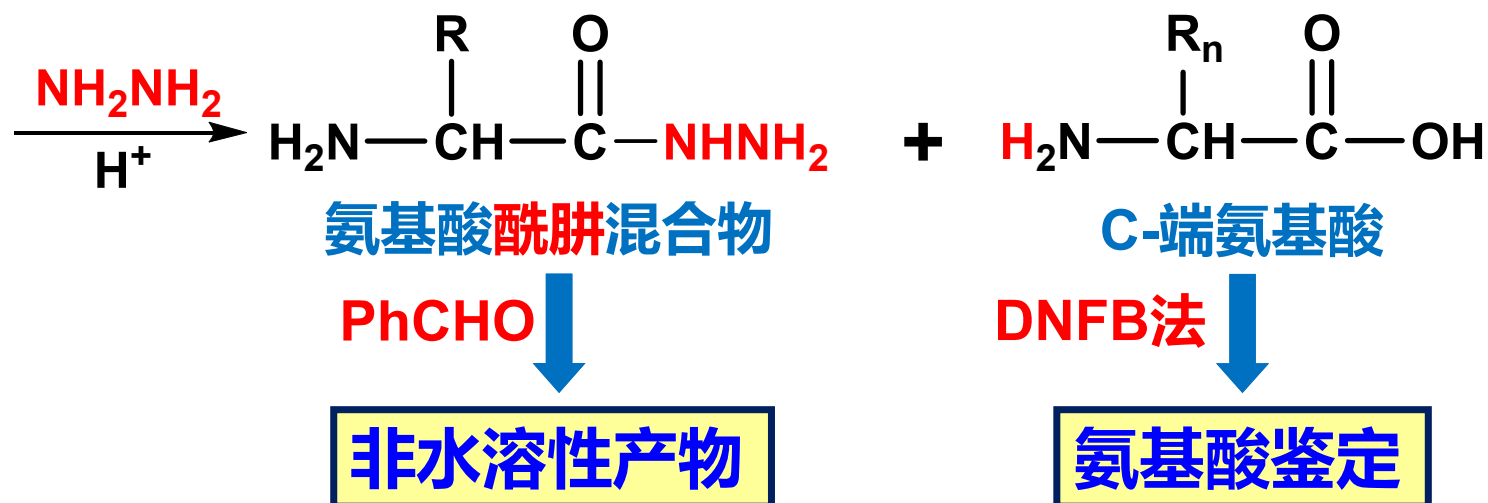
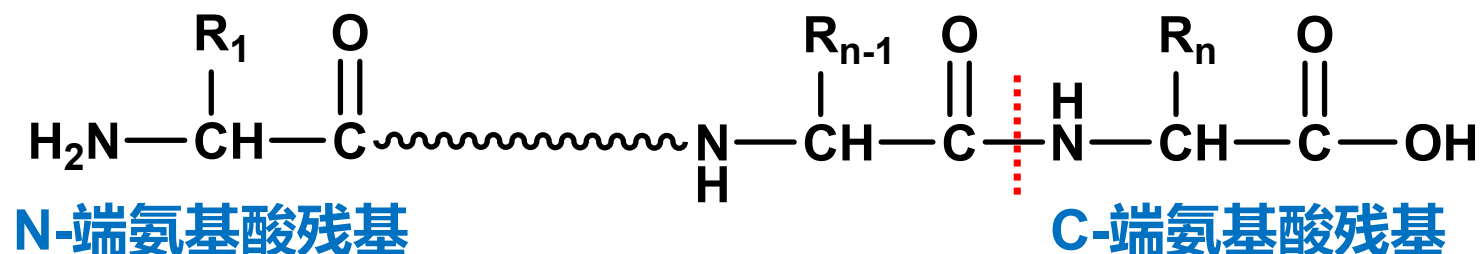


(2) End Group Analysis

③ 肼解 (hydrazinolysis) 法

- C-端测定法
- 多肽与肼在无水条件下加热，C-端氨基酸即从肽链上解离出来。
- 其他氨基酸变成肼化物。经与苯甲醛缩合成不溶于水的物质，与C-端氨基酸分离。

Principle of hydrazinolysis Method

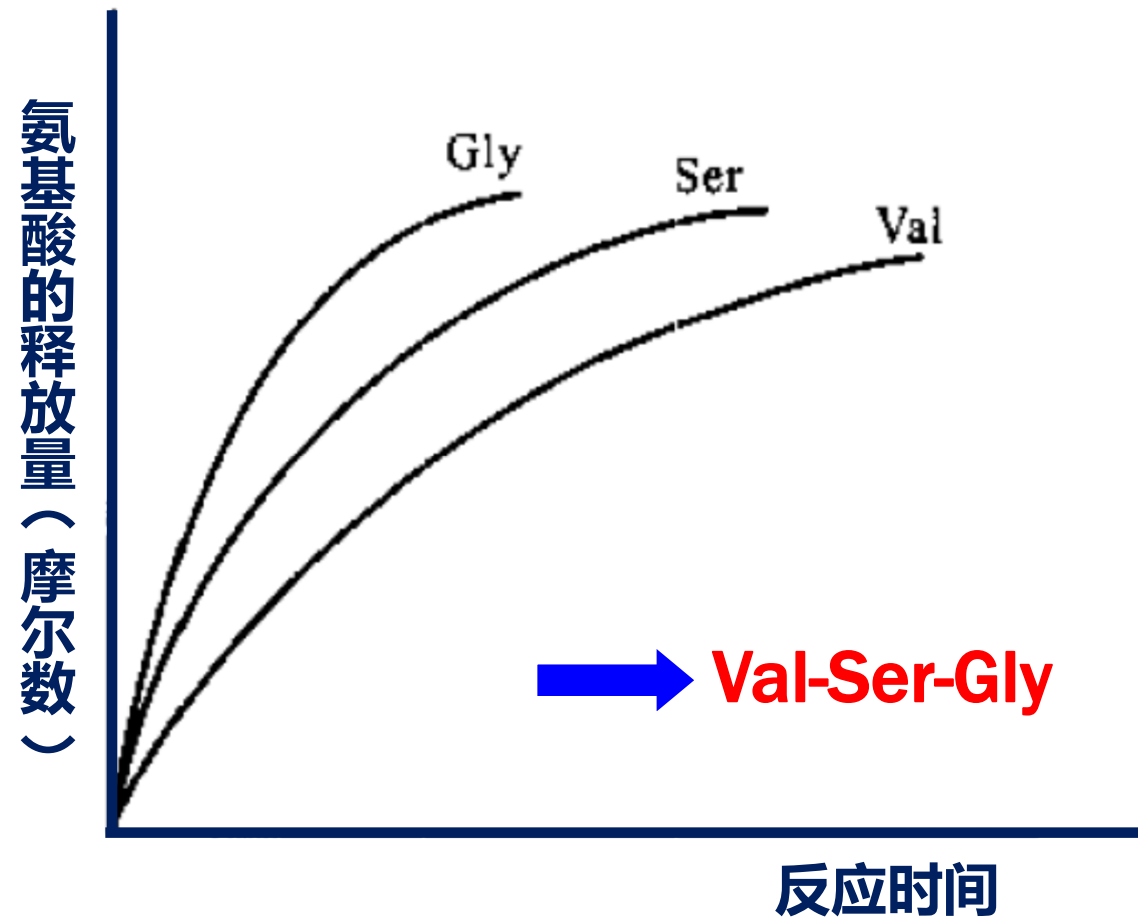


(2) End Group Analysis

④ 羧肽酶 (carboxypeptidase) 法

- C-端测定法，常用。
- 肽链外切酶。
- 可获得蛋白质C-端残基顺序（较难）。
- 目前常用的羧肽酶：A, B, C 和 Y
 - A：大多数氨基酸 (除Pro, Arg, Lys外)
 - B：只能水解Arg 和 Lys
 - Y：所有氨基酸

羧肽酶法测定氨基酸顺序



(3) Cleavage of Disulfide Bond

- **拆分 (resolution):**

将蛋白质分子中各多肽链分离开来。

- **根据多肽链间连接方式不同，拆分方式不同：**

- **非共价结合：**非共价作用力维系，变性试剂拆分。
- **共价结合：**二硫键维系，化学方法拆分。

(3) Cleavage of Disulfide Bond

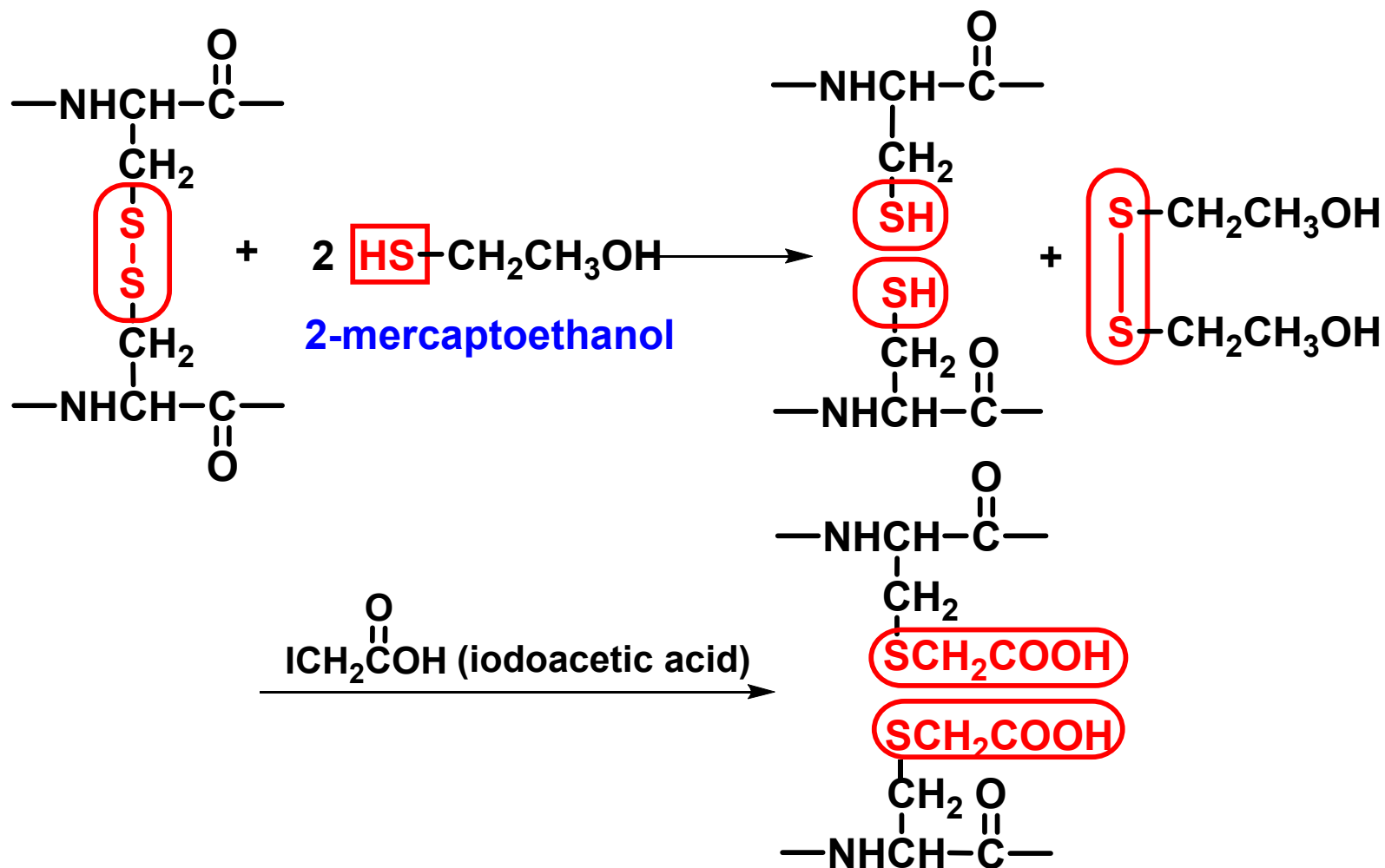
蛋白质多肽链拆分的一般方法

8M **尿素**或6M **盐酸胍**存在下，用过量的 β -**巯基乙醇**处理，然后再用**烷基化试剂**作用。

问题： 你知道上述各种试剂的用途吗？

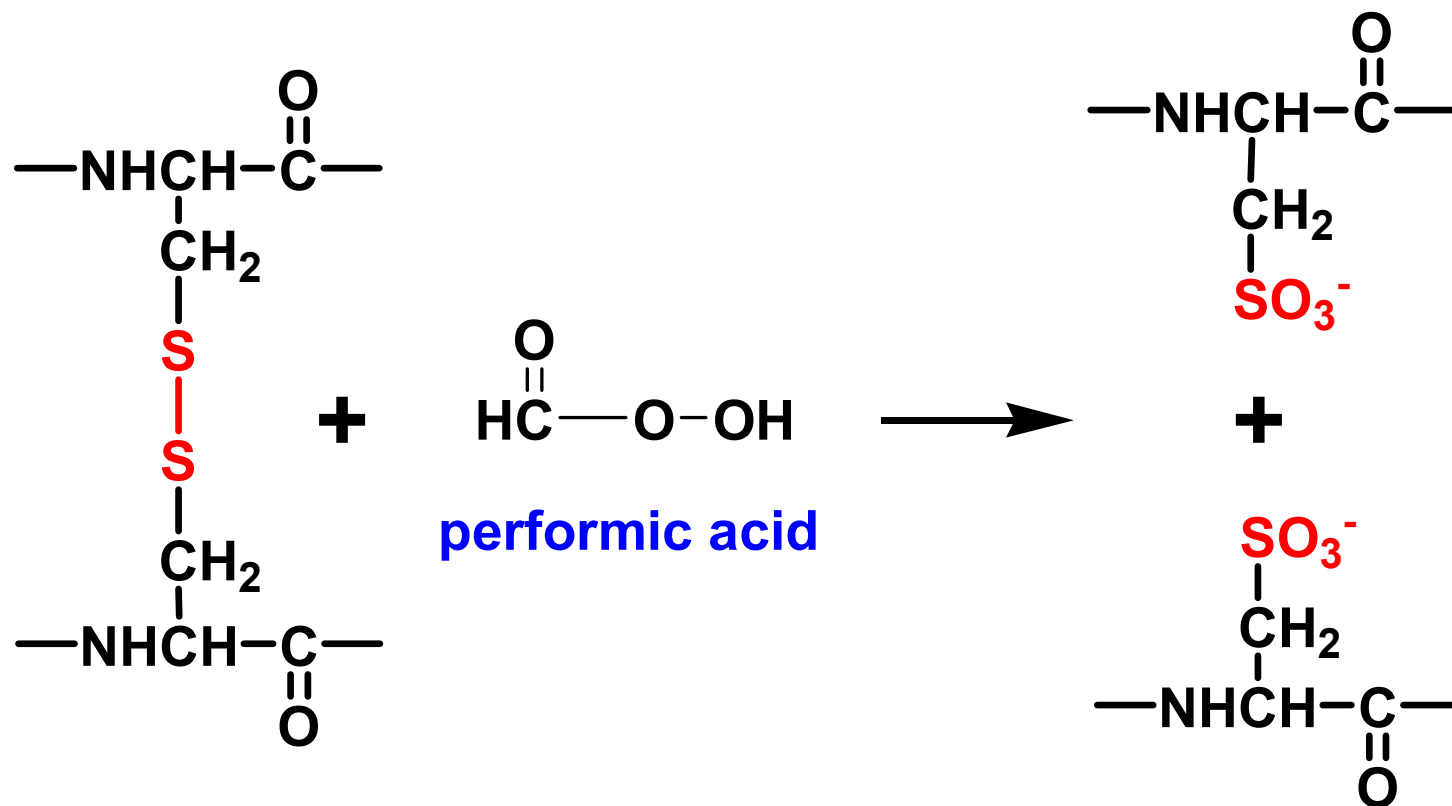
二硫键的断裂方法

① 巯基还原法



二硫键的断裂方法

② 过甲酸氧化法



(4) Cleavage of Peptide Chain

① 酶解法

- **蛋白水解酶（proteolytic enzymes）：**
 - 特异性水解多肽链。
 - 能预测获得小肽段数目及末端氨基酸种类。
- **不同的蛋白水解酶有不同的水解特点。**
- **胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶等。**

胰蛋白酶 (Trypsin)

- 最常用
- 水解Lys 和 Arg 残基的羧基端
- 若断裂点另一氨基酸为Pro, 会抑制水解 ?
- 专一性较强, 水解速度快

Ala-Lys-Phe-Gly-Asp-Trp-Ser-Arg-Met-Val-Arg-Tyr-Leu-His

cleavage by trypsin

糜蛋白酶 (Chymotrypsin)

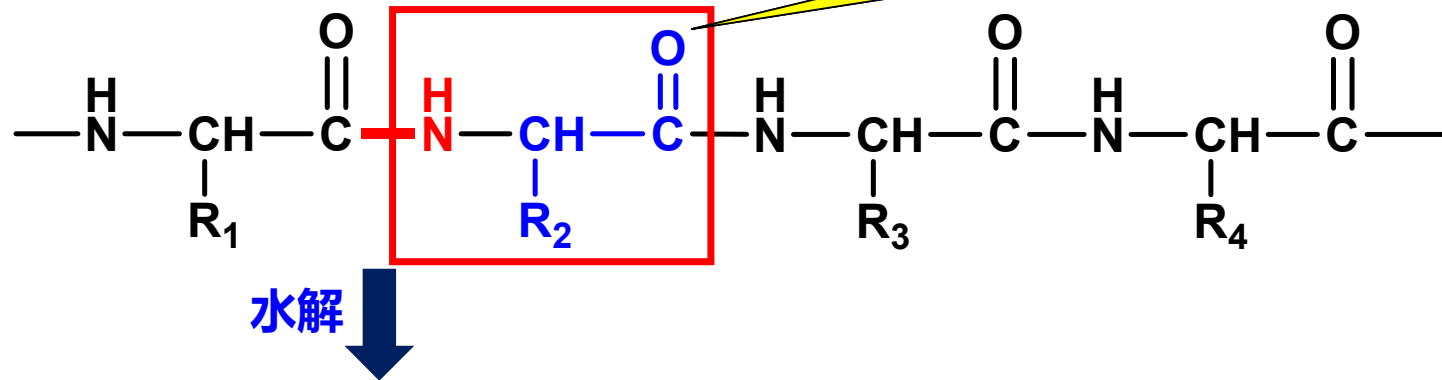
- 或称胰凝乳蛋白酶
- 碱性条件水解，pH8~9。
- **Phe, Trp, Tyr** 残基的羧基端，水解速度快。
- Leu, Met, Asn, His 水解较慢。
- 若断裂点另一氨基酸为**Pro**，会抑制水解。
- 有一定的专一性。

Ala-Lys-Phe-Gly-Asp-Trp-Ser-Arg-Met-Val-Arg-Tyr-Leu-His

cleavage by chymotrypsin

胃蛋白酶 (Pepsin)

- 酸性条件, pH = 2, 适用于二硫键位置确定
- 水解Phe, Trp, Tyr, Leu等的**氨基端肽键**
- R₁ = **Pro**, 不水解
- 专一性较差, 水解速度快



(4) Cleavage of Peptide Chain

② 化学法

- 溴化氰水解法 (Cyanogen bromide)

选择性切割Met羧基所形成的肽键。

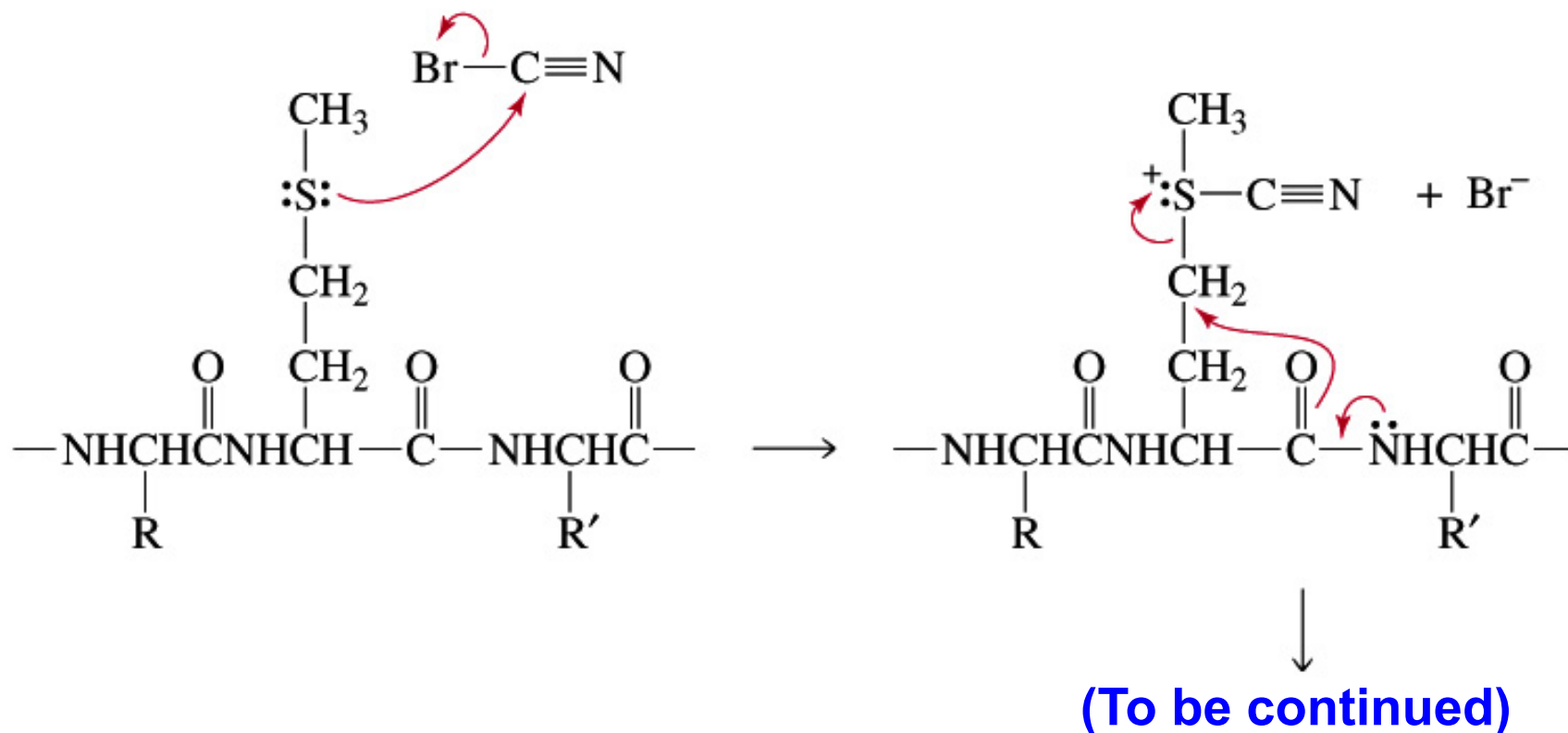
- 特点：专一性强；产率高；条件温和；较理想小肽段。

Ala-Lys-Phe-Gly-Lys-Trp-Ser-Arg-Met-Val-Arg-Tyr-Leu-His

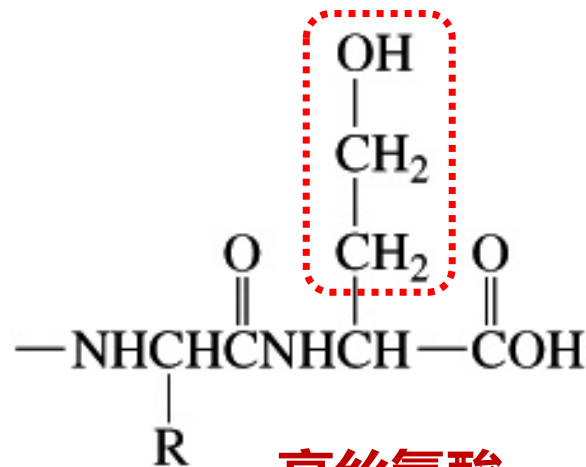
cleavage by cyanogen bromide

Mechanism for the Cleavage of a Peptide Bond by Cyanogen Bromide

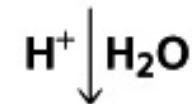
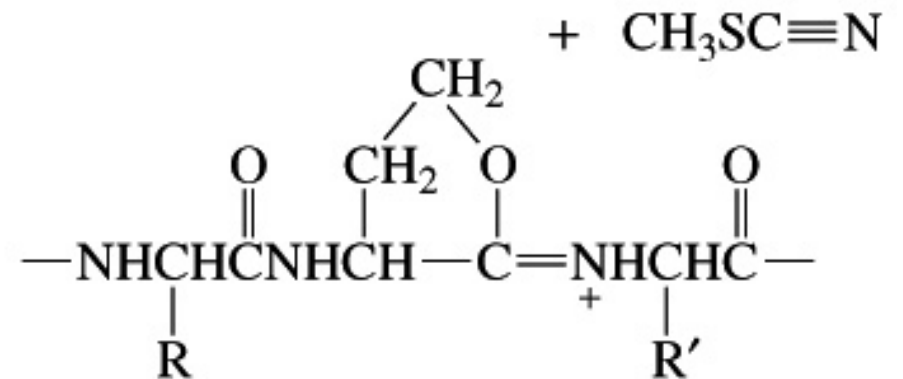
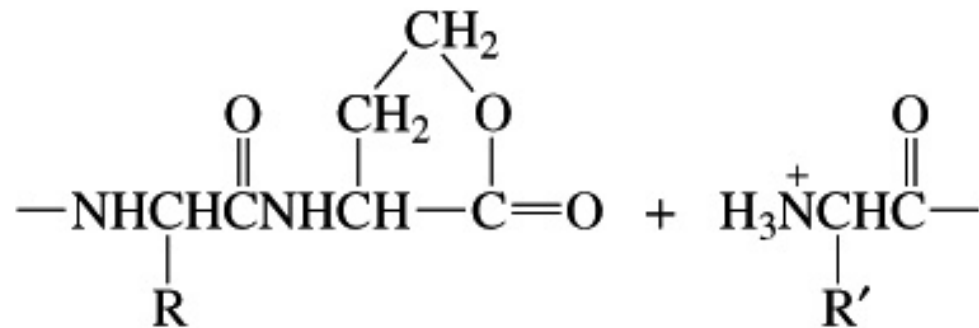
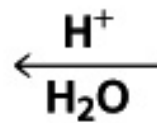
mechanism for the cleavage of a peptide bond by cyanogen bromide



Why won't cyanogens bromide cleave at cysteine residues?



高丝氨酸
(homoserine)



(The End)

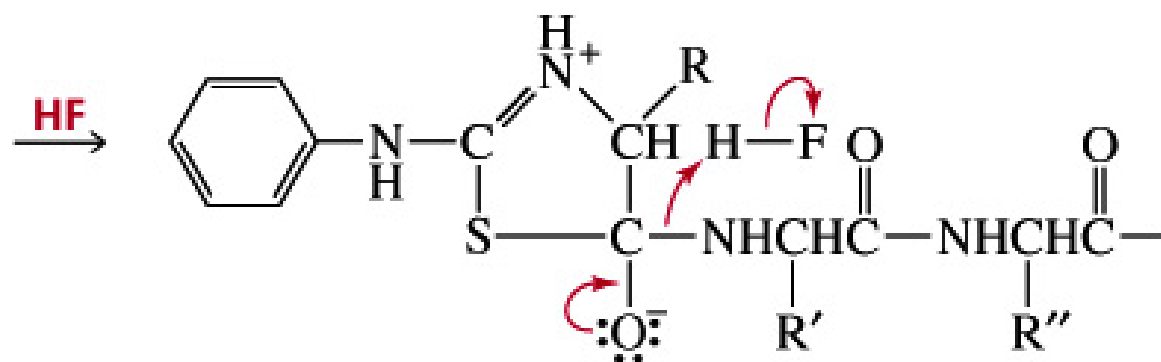
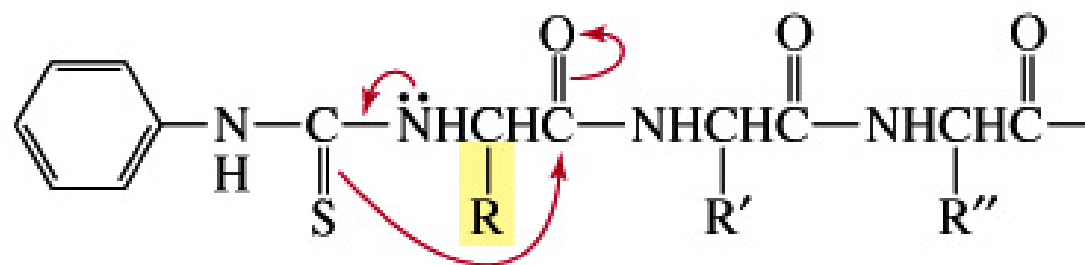
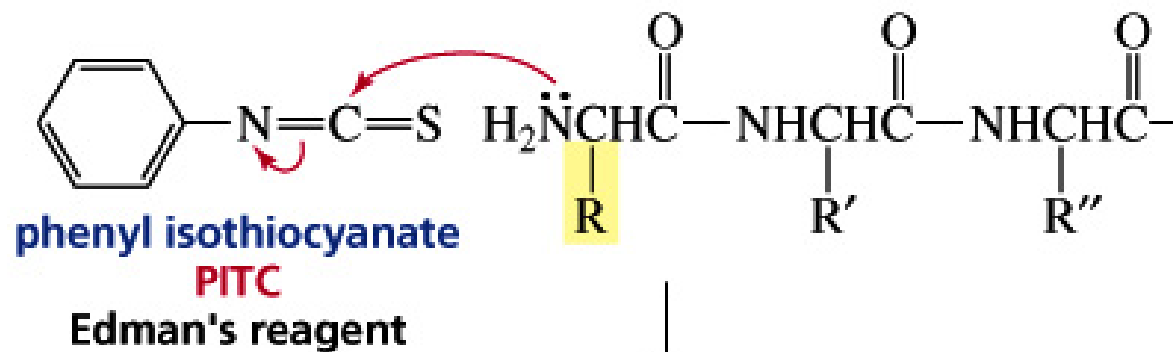
常用多肽链断裂方法的选择性

<i>Reagent (biological source)*</i>	<i>Cleavage points[†]</i>
<u>Trypsin</u> (bovine pancreas)	Lys, Arg (C)
<i>Submaxillaris</i> protease (mouse submaxillary gland)	Arg (C)
<u>Chymotrypsin</u> (bovine pancreas)	Phe, Trp, Tyr (C)
<i>Staphylococcus aureus</i> V8 protease (bacterium <i>S. aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-protease (bacterium <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
<u>Pepsin</u> (porcine stomach)	Phe, Trp, Tyr (N)
Endoproteinase Lys C (bacterium <i>Lysobacter</i> <i>enzymogenes</i>)	Lys (C)
<u>Cyanogen bromide</u>	Met (C)

(5) Edman Analysis of Peptide Chain

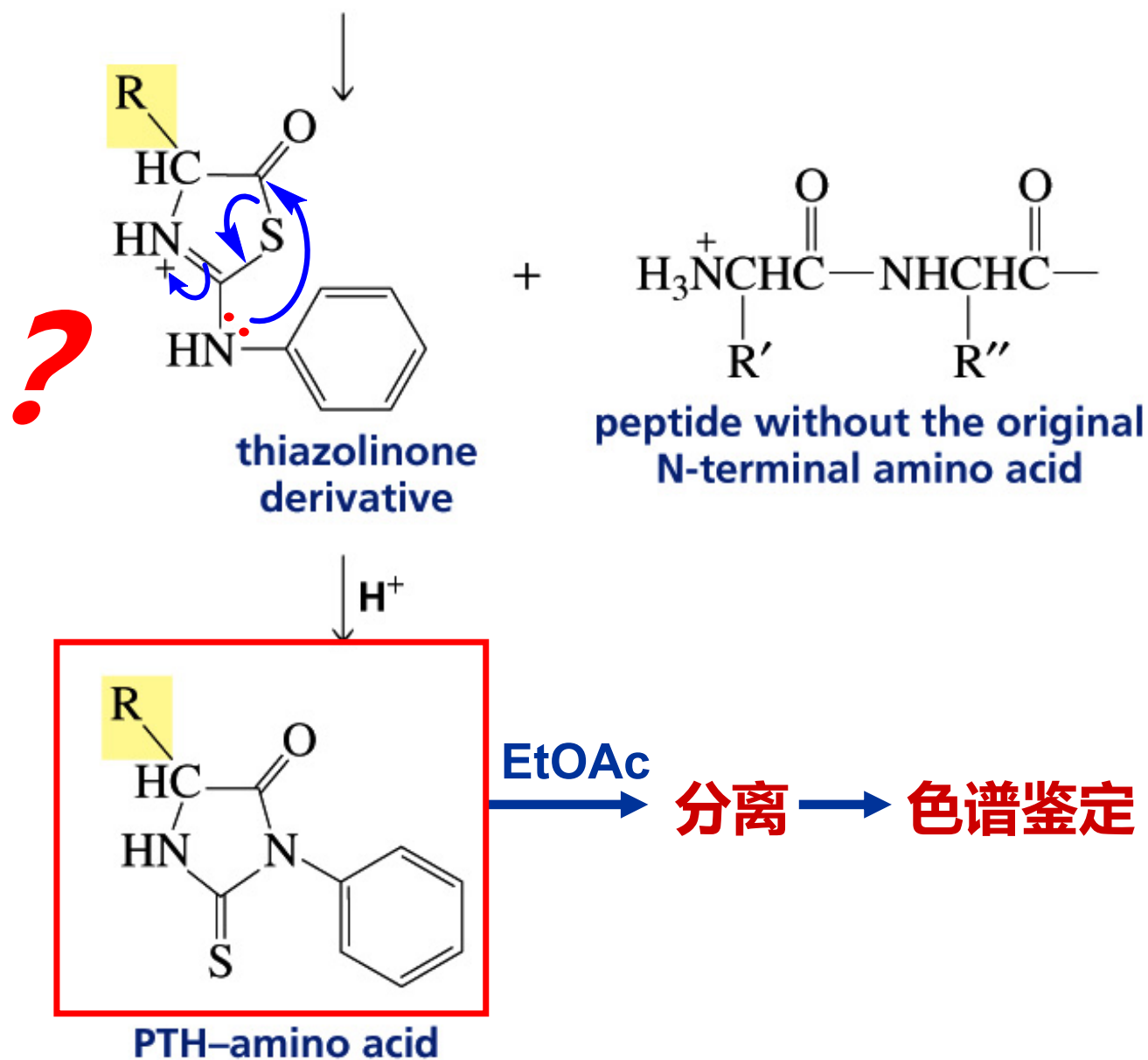
- 称Edman chemical degradation, 又称PTH法。
- N-端分析法
- 特点: 能不断重复循环, 将肽链N-端氨基酸残基进行逐一标记、解离和鉴定。
- 产物: PTH-amino acid, EtOAc 萃取, 色谱鉴定。
- 氨基酸顺序自动分析仪:
适用于较小肽段 (一般 < 50) 的氨基酸顺序分析。

PTH法 原理



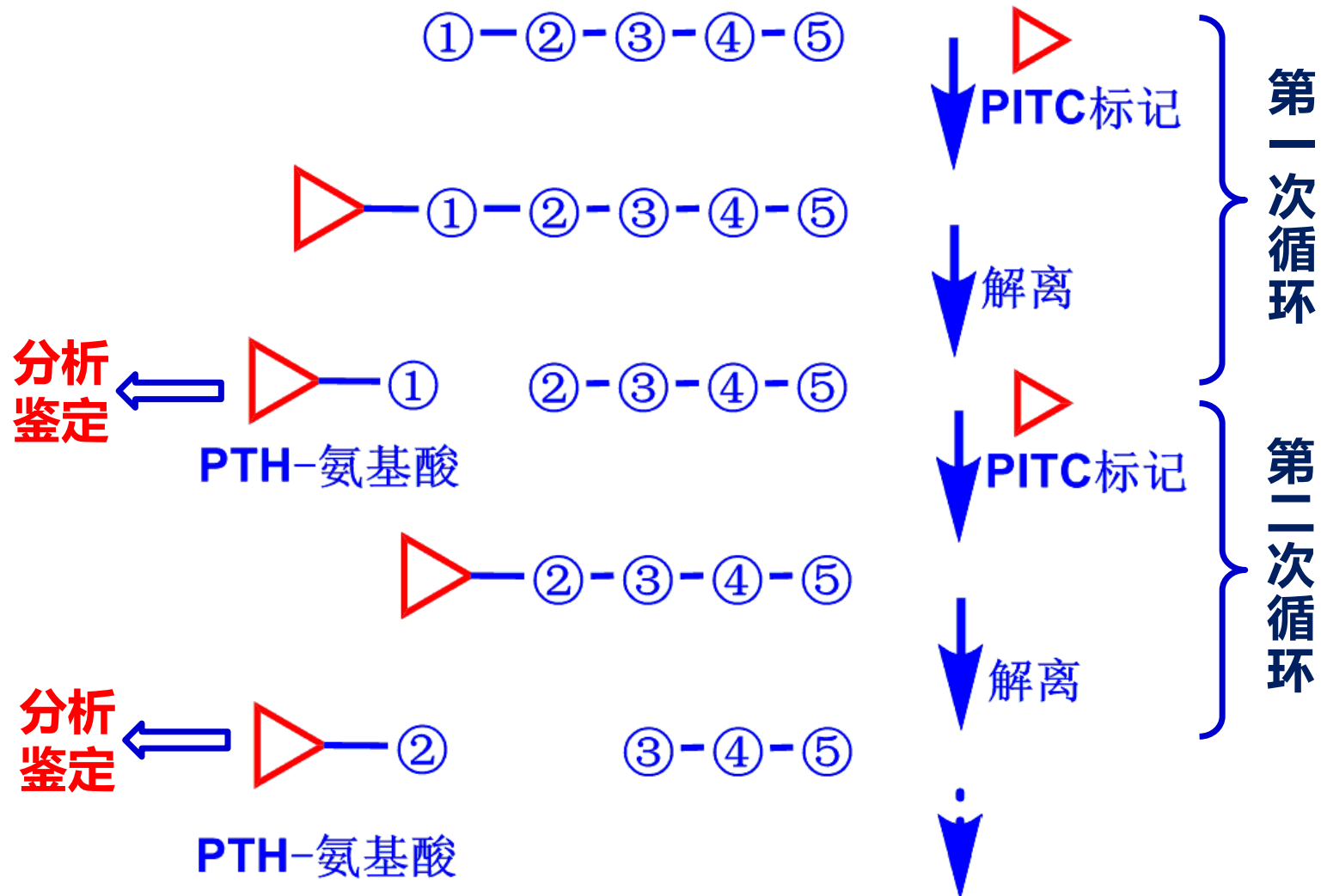
Edman试剂
苯基异硫氰酸酯

PTH法 原理

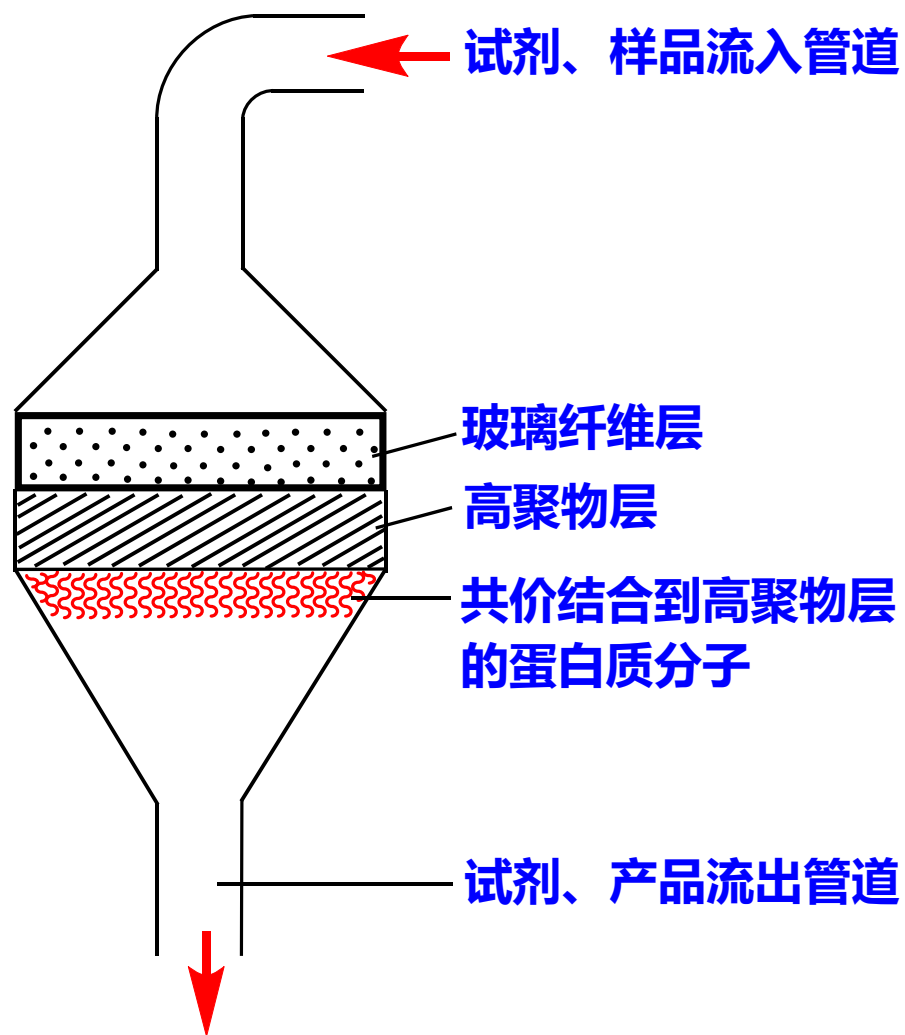


(The End)

PTH法循环原理



氨基酸顺序自动分析仪 设计原理示意图



(6) Reconstructing the Protein's Sequence

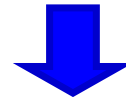
利用两套或多套肽段的氨基酸顺序彼此间的交错重叠，拼凑出整条多肽链的氨基酸顺序。

方法1

1 — 10 11 — 23 24 — 30 31 — 50

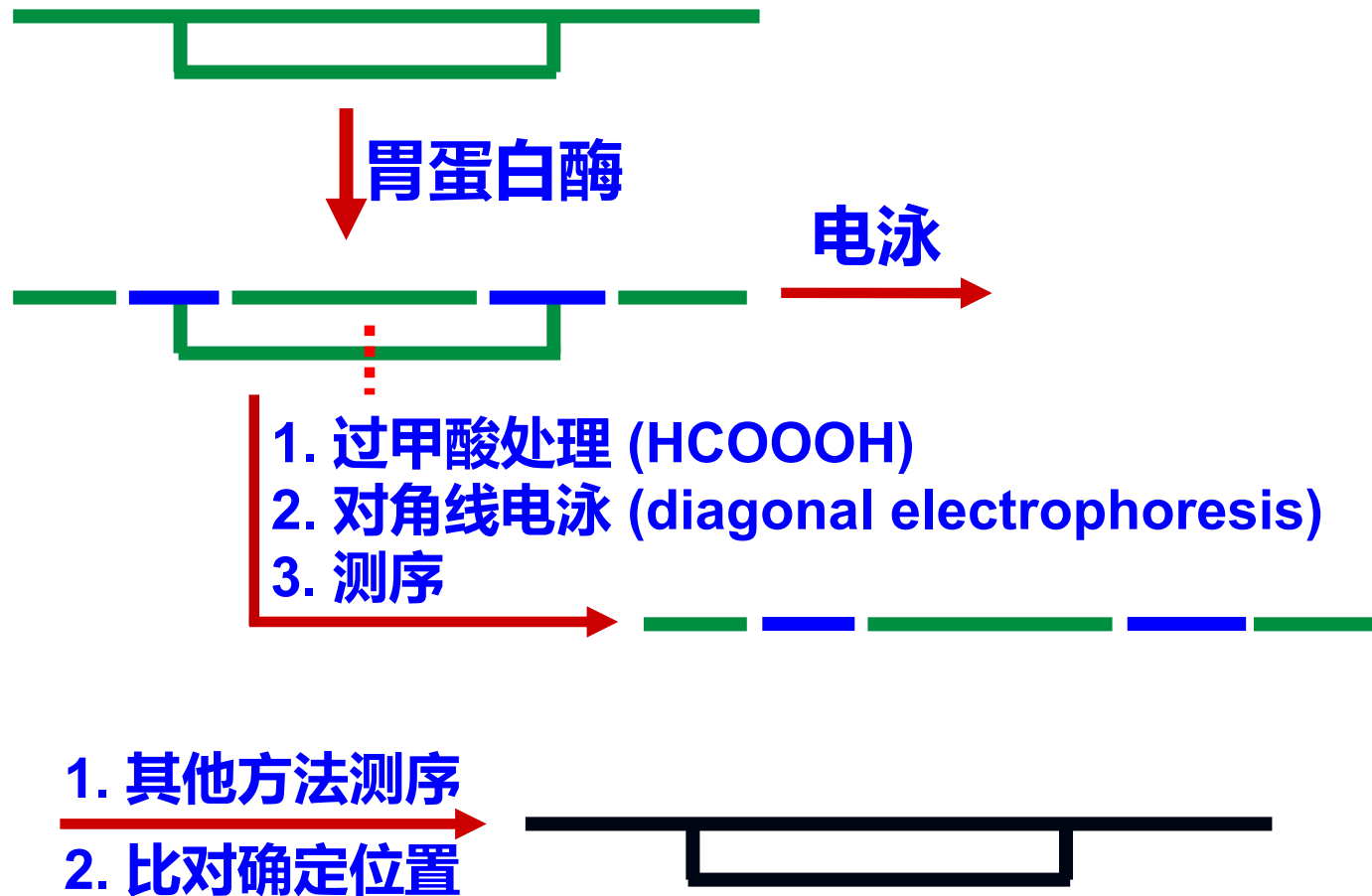
方法2

1 — 15 16 — 26 27 — 45 46 — 50

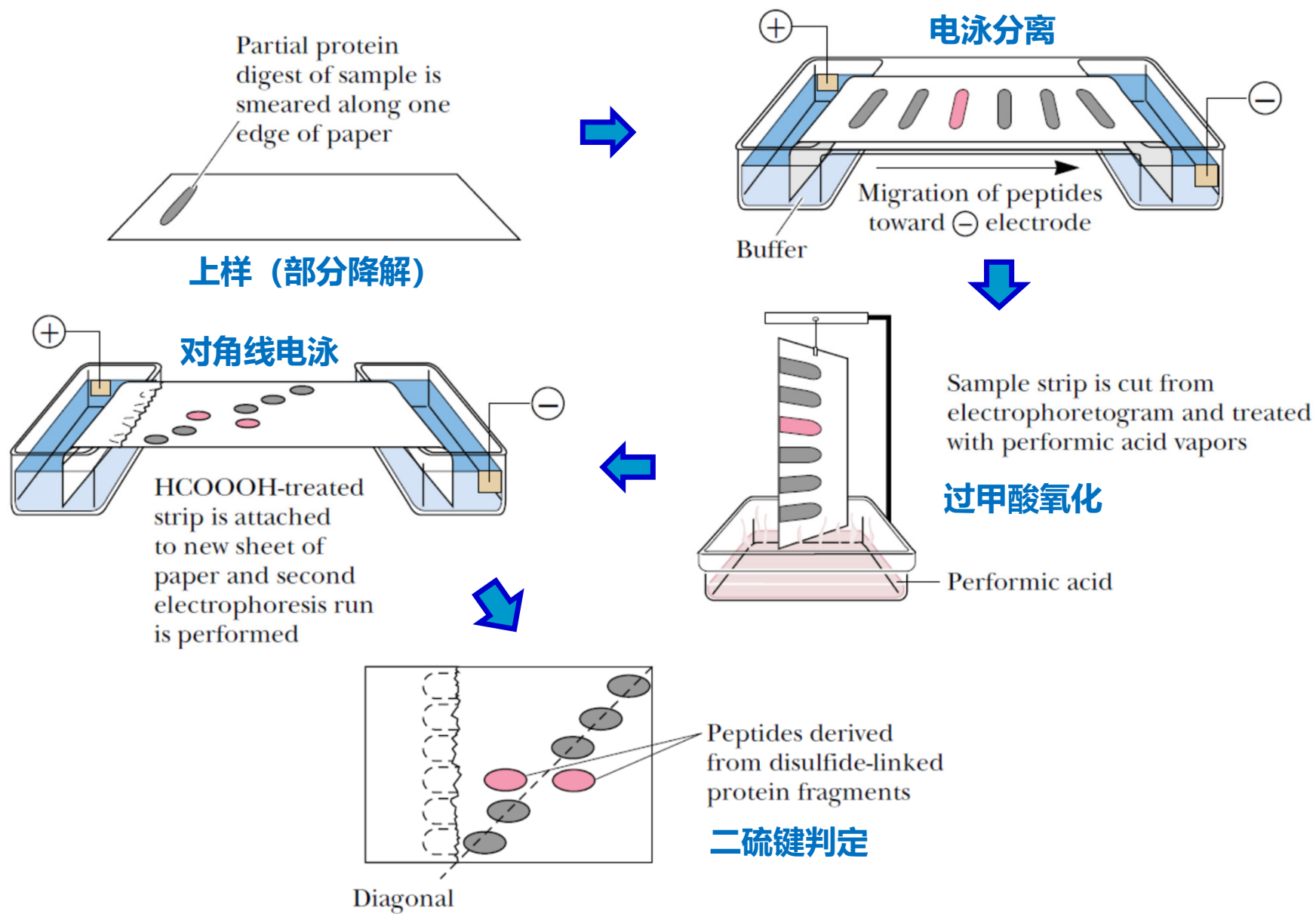


1 — 50

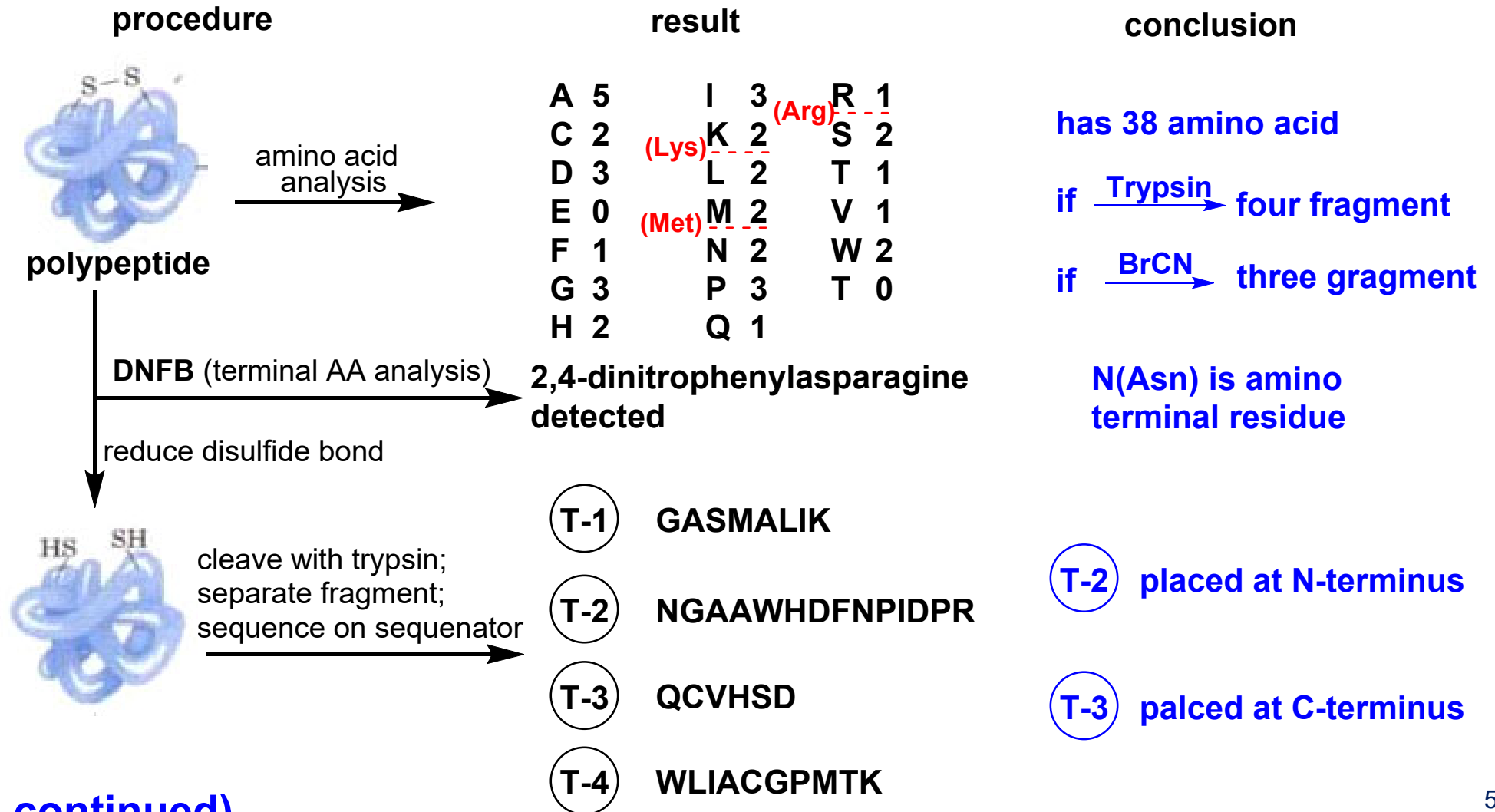
(7) Determining the Position of Disulfide bonds



对角线电泳

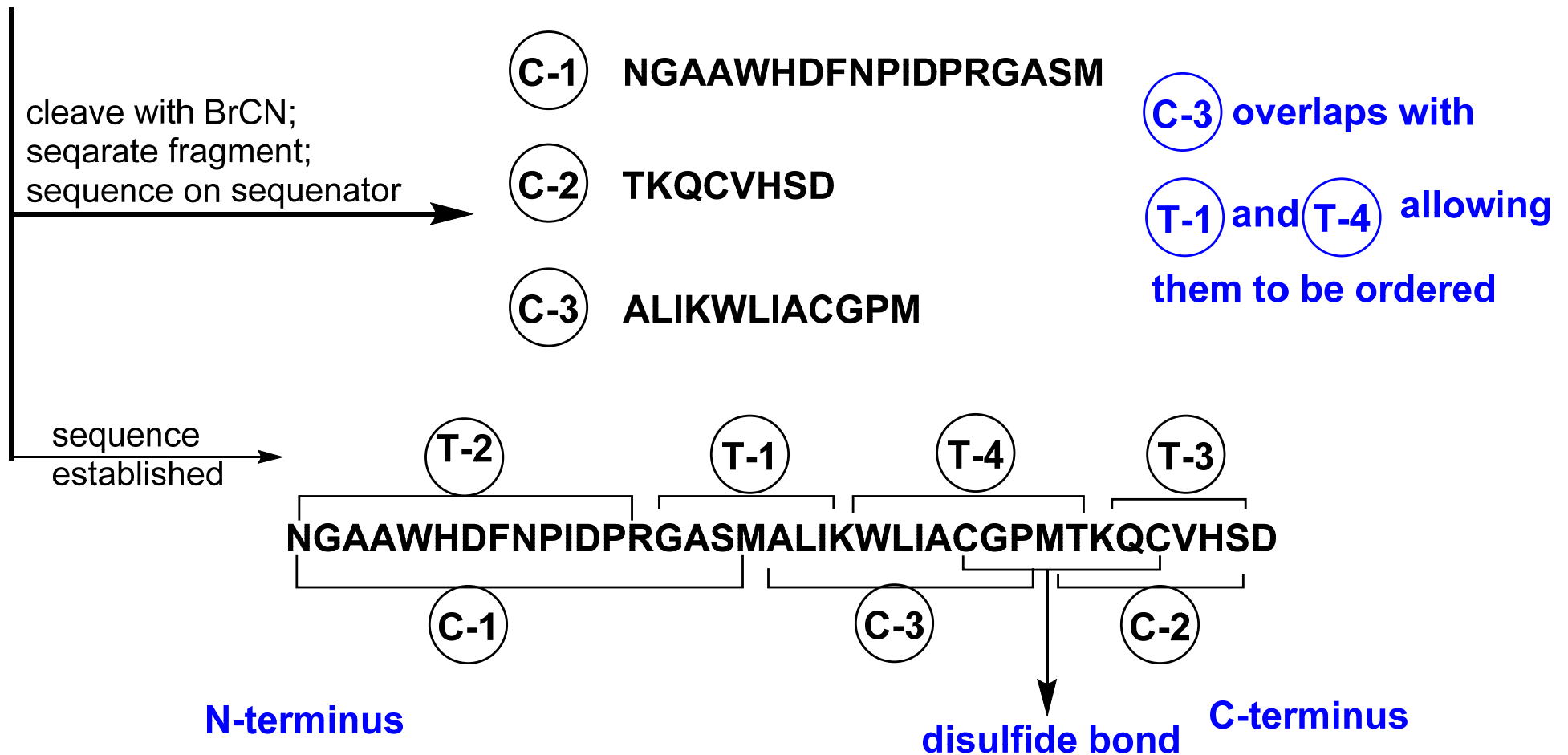


Example



(to be continued)

Example



(The End)

本次课主要内容小结

三. 多肽

- 重要的天然肽
- 肽的化学合成（固相合成、均分合成法）

四. 蛋白质的结构

- 蛋白质的结构层次：一、二、三、四级结构
- 蛋白质一级结构测定

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

课后复习要点及思考题

- 熟悉多肽固相合成的基本原理；
- 掌握蛋白质结构层次的划分及内涵；
- 掌握蛋白质一级结构测定中重要的方法和技术原理及其应用；
- 教材课后相关习题。

课后预习

四、蛋白质的结构

- 一级、二级、三级、四级结构
- 超二级结构、结构域

随堂测

下周一（3月13日）PDB数据库使用培训