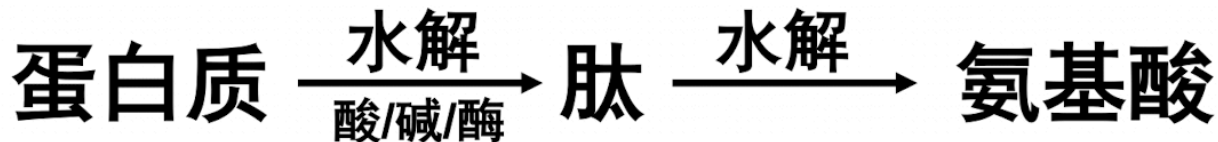


# 蛋白质

## 1 蛋白质分子组成

### 1.1 绪论

蛋白质 N 含量 = 16%  $\rightarrow$   $m(\text{Pro}) = m(\text{N}) \times 6.25$



组成人体蛋白质的氨基酸仅有 **20** 余种

基本结构单位：L- $\alpha$ - 氨基酸

### 1.2 分类

甲携异亮铺饼干（非极性 R 基：甲硫氨酸 Met，缬氨酸 Val，异亮氨酸 Ile，亮氨酸 Leu，脯氨酸 Pro，丙氨酸 Ala，甘氨酸 Gly）

姑苏城外思半天（极性 R 基：谷氨酰胺 Gln，苏氨酸 Thr，丝氨酸 Ser，半胱氨酸 Cys，天冬酰胺 Asn）

笨鸟先飞花落色（芳香族：苯丙氨酸 Phe，酪氨酸 Tyr，色氨酸 Trp）

腊月天冬无谷杆（酸性：天冬氨酸 Asp，谷氨酸 Glu）

家有千金赖祖先（碱性：精氨酸 Arg，赖氨酸 Lys，组氨酸 His）

营养必需氨基酸：缬、异亮、苯丙、蛋、色、苏、赖、组，携一本亮色书来（组）

### 1.3 性质

#### 1.3.1 两性解离 / 等电点

$\text{PH-PI} \rightarrow$  带电

#### 1.3.2 紫外吸收

芳香族氨基酸，主要有 Tyr 酪氨酸、Trp 色氨酸，在 280nm 达最大吸收峰

#### 1.3.3 茚三酮反应

氨基酸与茚三酮水合物共热，生成 **蓝紫色** 化合物，其最大吸收峰为 570nm。

#### 1.3.4 成肽反应

合成肽键

- 寡肽 <20

- 多肽 >30

方向：N → C

氨基酸残基：肽链中的氨基酸分子因为脱水缩合而基团不全被称为氨基酸残基（residue）。

谷氨酰胺：还原卫士

## 2 蛋白质的分子结构

蛋白质有一、二、三、四级结构，其中二、三、四称为高级结构（空间构象）

### 2.1 一级结构

蛋白质的一级结构是指 **多肽链上各种氨基酸从 N 端至 C 端的排列顺序**。

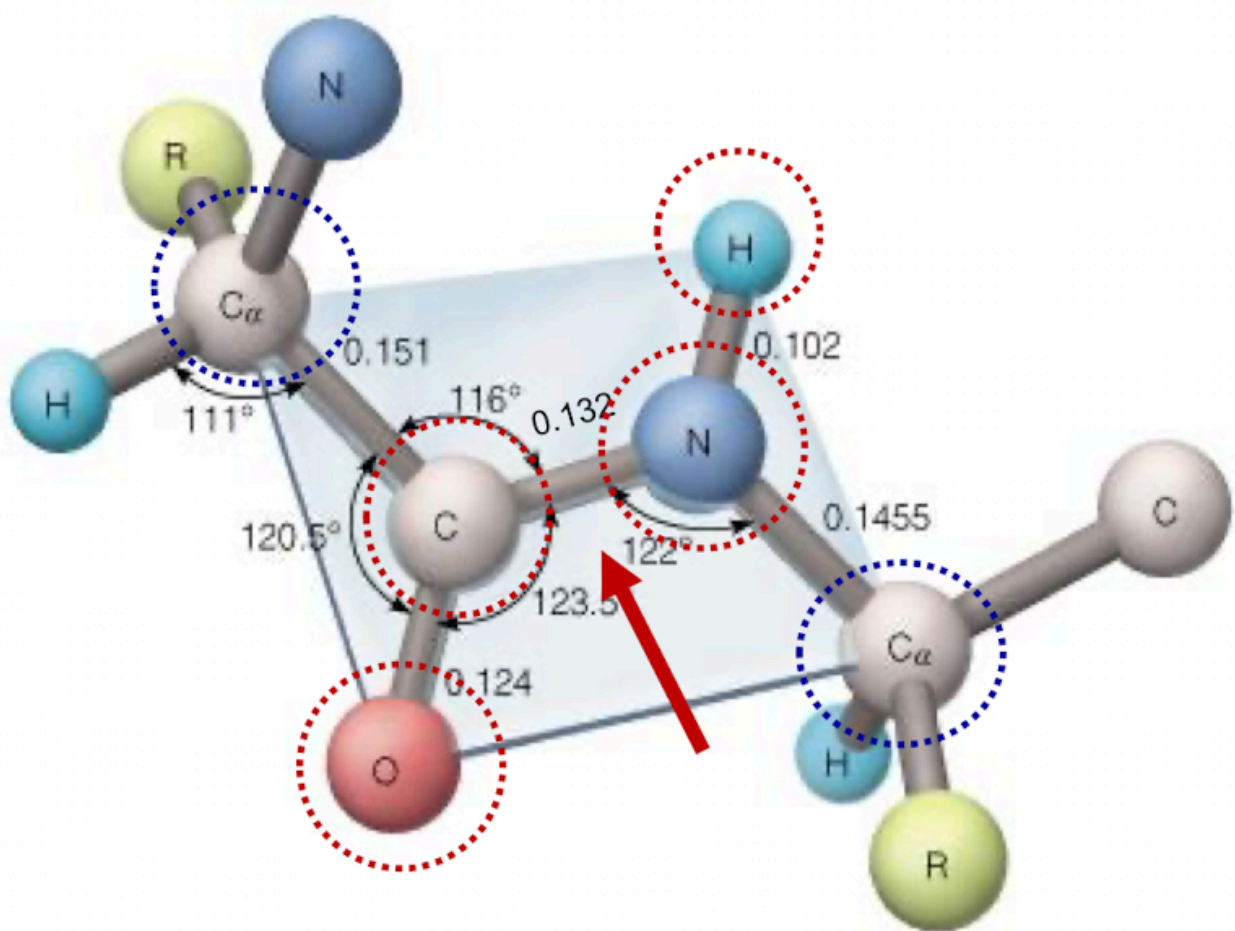
主要化学键为 **肽键**，有些含**二硫键**。一级结构是蛋白质空间结构的基础，也是其生物学活性的基础。

### 2.2 二级结构

蛋白质的二级结构是指蛋白质主链分子中 **某一段肽链的局部空间结构**，即该段肽链主链**骨架原子的相对空间位置**，并不涉及氨基酸残基侧链的结构。

多肽链的局部主链构象，即多肽链骨架：由  $C_{\alpha}$ 、羧基 C 和氨基 N 依次重复排列

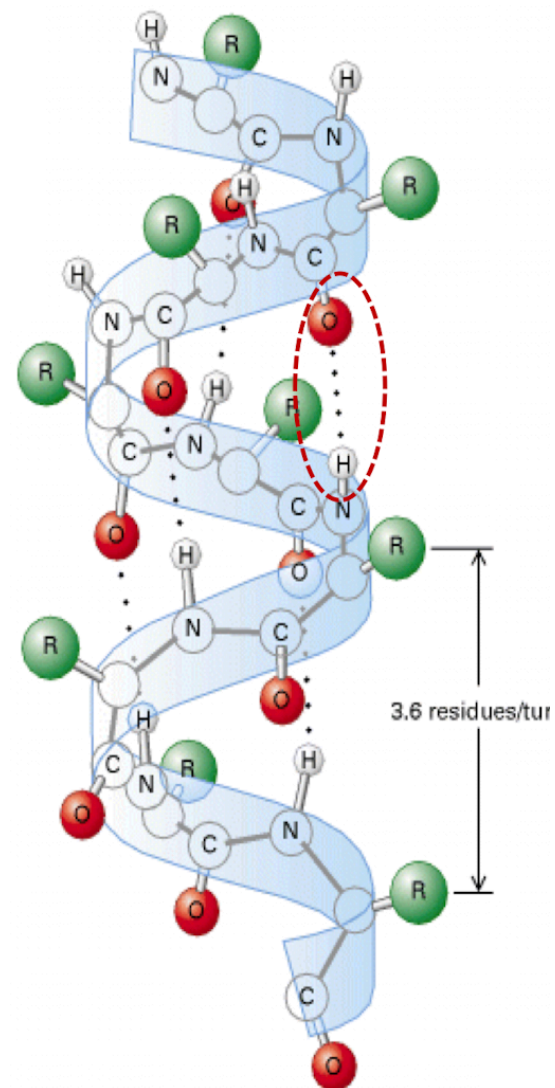
**肽单元**：二级结构的结构基础。肽键中的四个原子（-CO-NH-）和与之相邻的两个  $\alpha$  碳原子（ $C_{\alpha 1}, C_{\alpha 2}$ ）位于同一**刚性平面**内，称为肽单元。



反式肽单元 ( $C_{\alpha 1}$ ,  $C_{\alpha 2}$  位于肽键两侧) 构型更稳定 (可以用原子斥力解释)。

### 2.2.1 $\alpha$ 螺旋 ( $\alpha$ Helix)

1. 多肽链主链围绕中心轴螺旋式上升, 3.6 个氨基酸残基 / 圈, 螺距为 0.54 nm。
2. 第 1 个肽单元羰基上的氧与第 4 个肽单元亚氨基上的氢形成 **氢键**, 方向与螺旋长轴平行。
3. 通常为右手螺旋。



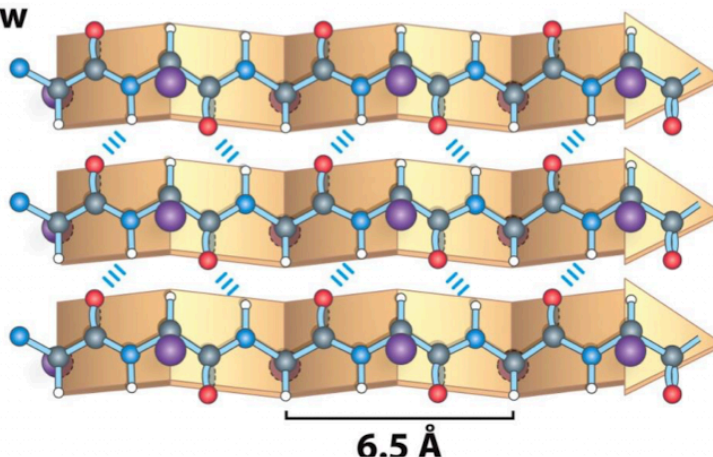
### 2.2.2 $\beta$ 折叠 ( $\beta$ Sheet)

1. 锯齿状,  $C_\alpha$  为转折点
2. 侧链 R 基团位于锯齿结构上方或下方
3. 不同链方向可以一致, 也可以相反
4.  $\beta$  折叠之间可通过 **氢键** 相连

平行

### Parallel $\beta$ sheet

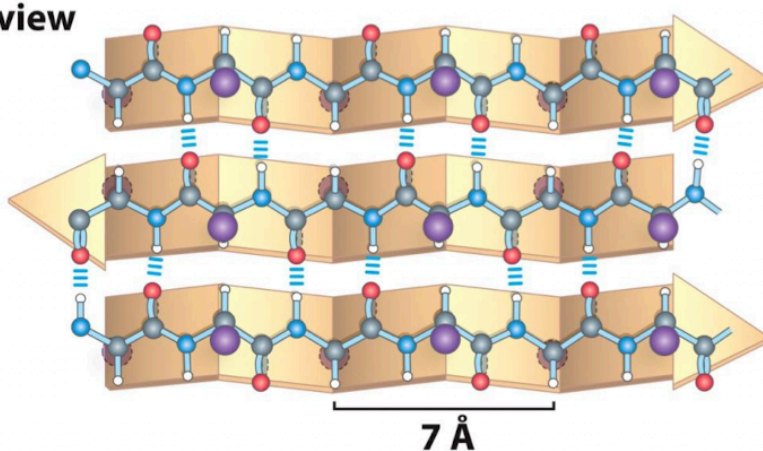
Top view



反平行

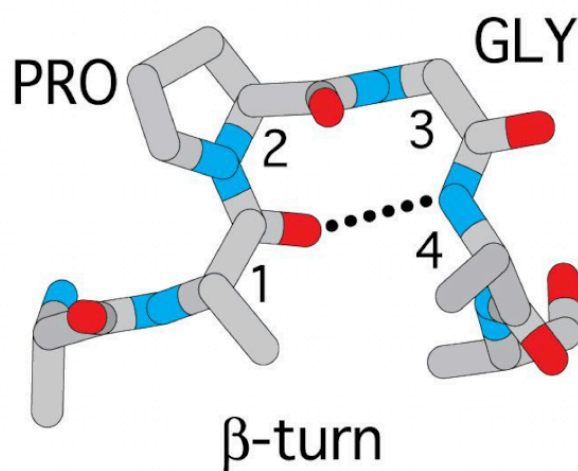
### Antiparallel $\beta$ sheet

Top view



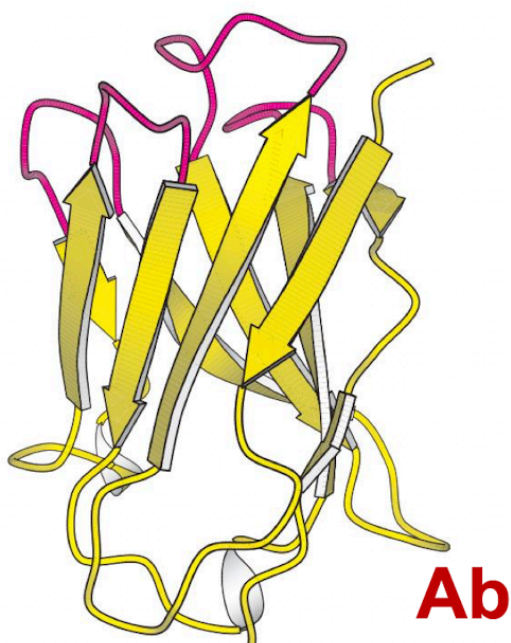
#### 2.2.3 $\beta$ 转角 ( $\beta$ Turn)

1. 在多肽链 **180 度回折** 处形成的特定构象
2. 一般由四个氨基酸残基组成，第 2 或第 3 个残基常为脯氨酸 (Pro)、甘氨酸 (Gly)
3. 第 1 个残基的羰基氧和第 4 个残基的亚氨基氢形成氢键



#### 2.2.4 $\Omega$ 环 ( $\Omega$ Loops)

1. 存在于球状蛋白质分子的 **表面**
2. 形状像希腊字母  $\Omega$
3. 以 **亲水氨基酸残基** 为主
4. 参与分子间识别



## 2.3 超二级结构

在许多蛋白质分子中，可发现 2 个或 2 个以上具有二级结构的肽段，在空间上相互接近，形成一个规则的二级结构组合，称为 **超二级结构** 或 **模体 (Motif)**。

常见的模体形式如  $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta$



a.  $\alpha\alpha$  组合



b.  $\beta\beta\beta$  组合

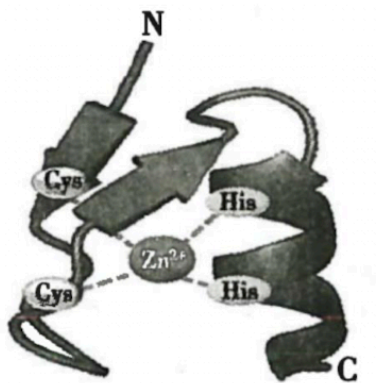


c.  $\beta\alpha\beta$  组合

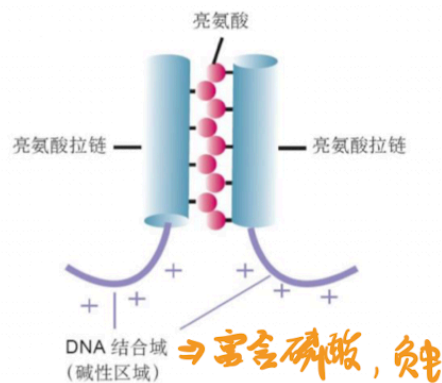
常见的模体形式还有

- 锌指结构 (zinc finger)

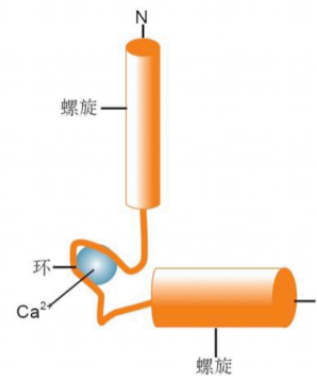
- 亮氨酸拉链 (leucine zipper)
- 螺旋 - 环 - 螺旋 (helix-loop-helix) 结构。



锌指结构



亮氨酸拉链



螺旋-环 - 螺旋

## 2.4 三级结构

蛋白质的三级结构指整条肽链中 **所有氨基酸残基的相对空间位置**，即一条多肽链中所有原子的整体空间排布，包括主链和侧链。

1. 肽链进一步盘曲、折叠，长度大大缩短，呈棒状、纤维状或球状；
2. 三级结构的稳定性主要靠 **次级键（疏水键，盐键（离子键），氢键和范德华力）** 维持，尤其是**疏水键**；
3. 疏水基团多位于分子内部，亲水基团多位于分子表面；
4. 分子表面或某些部位形成 **功能区（结构域）**。

只有 **一条肽链** 组成的蛋白质，三级结构是其最高的结构形式。

**结构域（Domain）**：具有三级结构的多肽链的一部分区域，具有特定功能。

几个模体组合在一起，形成紧凑的、局部的、半独立的单元，称为结构域。

## 2.5 四级结构

有的蛋白质分子包含 **多条肽链**，它们彼此**通过次级键相连，形成一定的空间结构**，称为四级结构。

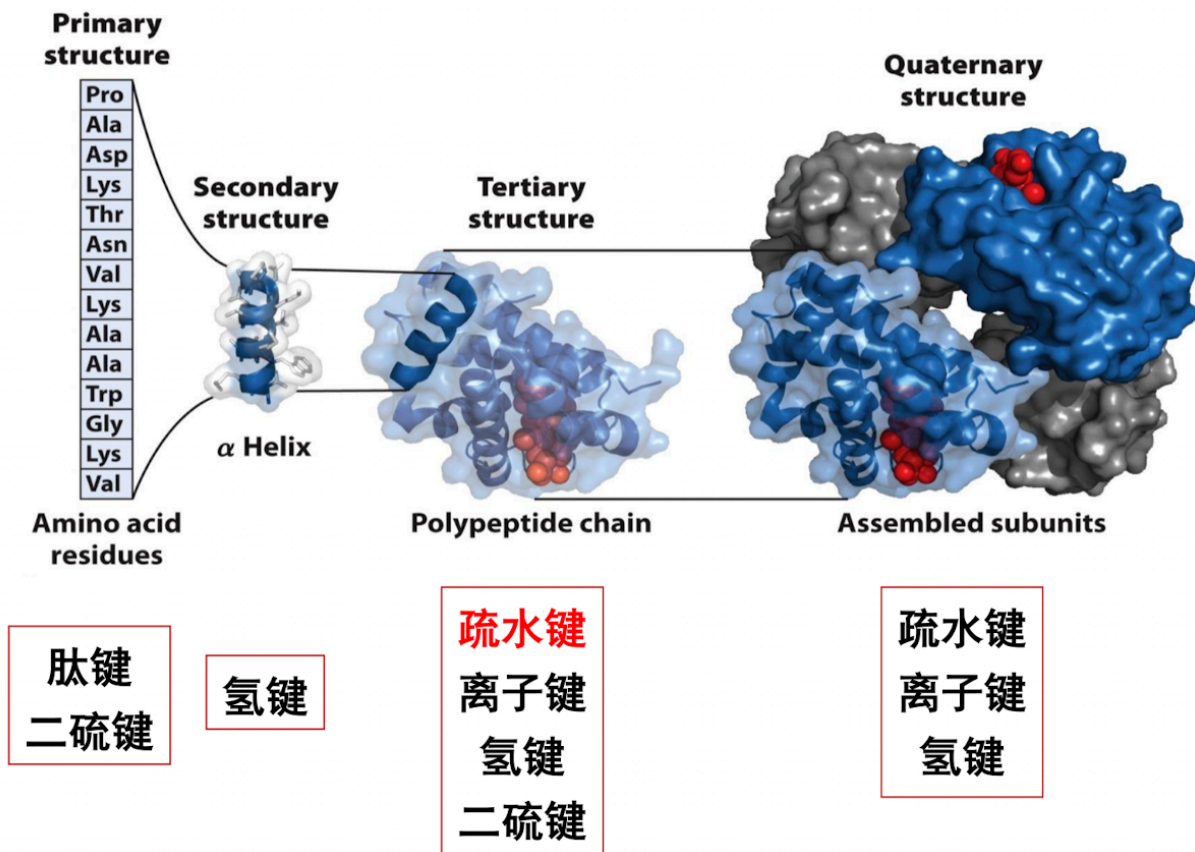
具有独立三级结构的多肽链单位，称为亚基（subunit）。

具有四级结构的蛋白质其亚基单独存在时一般没有生物学活性，只有 **完整的四级结构寡聚体才有生物学活性**。

## 2.6 小结

维持蛋白质各级结构的主要化学键：





### 3 蛋白质结构和功能的关系

#### 3.1 一级结构

- 一级结构是空间结构和功能的基础：天然构象 RNase（核糖核酸内切酶）有催化活性，非天然构象无催化活性。
- 一级结构不同，功能不同：催产素、加压素
- 一级结构相似，功能可能相似：催产素、加压素
- 一级结构改变，功能可能改变：镰刀型红细胞贫血（6 位谷氨酸 Glu 酸性  $\rightarrow$  缬氨酸 Val 非极性）

分子病（molecular disease）：由于蛋白质分子发生变异所导致的疾病。

#### 3.2 空间结构

蛋白质行使其功能依赖特定的空间结构

- 空间结构相似，功能相似（血红蛋白 Hb（结合氧气）和肌红蛋白 Mb（储存氧气）都可以结合氧）
- 空间构象不同，功能也有所不同，如 Hb、Mb 结合氧的能力不同 — 体现空间结构对功能的影响

**协同效应 (cooperative effect)**：含多个亚基的蛋白质，其中一个亚基与配体结合后，能影响该寡聚体中其他亚基与配体的结合能力，称协同效应。

如果是促进作用称为正协同效应，反之为负协同效应。

Hb 各亚基具有正协同效应



- 空间结构改变，功能相应改变

**变构效应 (allosteric effect)：**蛋白质分子的特定部位与小分子化合物结合后，蛋白质的空间构象发生改变，从而影响其生物学活性的变化。

在生命体中广泛应用以调节代谢活动。

蛋白质构象改变引起的疾病

- 疯牛病 Mad cow disease, or bovine spongiform encephalopathy (BSE)
- 老年痴呆 (Alzheimer's disease, AD)
- 亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease)

## 4 蛋白质的理化性质

### 4.1 蛋白质的两性解离 (amphoteric)

在一定的 pH 条件下，蛋白质分子除两端的氨基和羧基可解离外，氨基酸残基侧链中的某些基团，可解离成带负电荷或正电荷的基团。

蛋白质的 **等电点 (isoelectric point, pI)** 当蛋白质溶液处于某一 pH 时，蛋白质解离成正、负离子的趋势相等，成为兼性离子，净电荷为零，此时溶液的 pH 称为 pI。

### 4.2 蛋白质的紫外吸收 (ultraviolet absorption)

蛋白质分子含有色氨酸和酪氨酸残基（共轭双键），在 280nm 波长处有特征性吸收峰。蛋白质的  $OD_{280}$  与其浓度呈正比关系，因此可作蛋白质定量测定。

### 4.3 蛋白质的呈色反应

#### 1. 茚三酮反应

蛋白质 **水解后产生的氨基酸** 可发生茚三酮（蓝紫色）反应。

#### 2. 双缩脲反应

蛋白质和多肽分子中均含有两个以上肽键，与双缩脲结构相似，在稀碱溶液中与硫酸铜共热，呈现 **紫色或红色**，此反应称为双缩脲反应，双缩脲反应可用来蛋白质定量，还可用于检测蛋白质的水解程度，水解越完全则颜色越浅。

### 4.4 蛋白质的胶体性质

蛋白质胶体的稳定因素：**颗粒表面带电荷和水化膜**，不稳定。

## 4.5 蛋白质变性 (denaturation)

在某些物理或化学因素作用下，蛋白质的空间结构破坏，导致蛋白质若干理化性质的改变、生物学活性的丧失，这种现象称为蛋白质的变性作用。

举例：RNase 天然构象变性后丧失活性。

变性因素：

1. 物理因素：高温、高压、射线等
2. 化学因素：强酸、强碱、重金属盐等

变性后的表现：

1. 理化性质改变：黏度增加，溶解度降低、易被蛋白酶水解、结晶能力消失。
2. 生物学活性丧失。

应用：

1. 利用变性：酒精消毒，高压灭菌，血滤液制备
2. 防止变性：低温保存生物制品
3. 取代变性：乳品解毒（用于急救重金属中毒）

复性：蛋白质变性程度较轻时，将变性因素去除后，有些蛋白质仍可恢复或部分恢复其原有的构象和功能，称为复性。

## 5 蛋白质的分离与纯化

### 5.1 透析及超滤法（根据分子量）

#### 透析法 Dialysis

把含有小分子杂质的蛋白质溶液放于生物膜等材料制成的透析袋内，将袋置于流动的水或缓冲液中，小分子杂质从袋中透出，大分子蛋白质留于袋内，蛋白质得以纯化，称为透析。

#### 超滤法 Ultrafiltration

应用正压或离心力使蛋白质溶液透过 **超滤膜**，小分子物质和溶剂滤出，大分子留在膜内，起到纯化和浓缩的作用。

可以在短时间内进行大体积稀溶液的浓缩，有利于防止变性可应用于各种高分子溶液的脱盐、浓缩、分离和纯化等。

### 5.2 沉淀 Precipitation

#### 盐析 (salt out)

将硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等加入蛋白质溶液，使蛋白质表面电荷被中和以及水化膜被破坏，导致蛋白质沉淀。

**丙酮、乙醇等有机溶剂，可破坏蛋白质的水化膜**，在 0~4℃低温下，使蛋白质沉淀。环境温度高时，有机溶剂可促使蛋白质变性。

**等电点沉淀法**：利用蛋白质在其等电点附近溶解度最小、容易沉淀析出的特性以及各种蛋白质等电点的差异，从一混合蛋白质溶液中分离出不同的蛋白质。

例子：免疫沉淀（利用特异抗体识别相应的抗原蛋白，形成抗原 - 抗体复合物的性质，可从蛋白质混合溶液中分离获得抗原蛋白）。

## 5.3 电泳 Electrophoresis

蛋白质在高于或低于其 pI 的溶液中为带电的颗粒，在电场中能向正极或负极移动。这种通过蛋白质在电场中泳动而达到分离各种蛋白质的技术，称为电泳。

带电颗粒在电场中泳动的速度主要取决于所带电荷的性质、数目、颗粒的大小和形状等因素。

## 5.4 层析 Chromatography

### 1. 凝胶过滤 (gel filtration)

根据蛋白质分子大小不同来分离

### 2. 离子交换

根据蛋白质电荷量及性质不同来分离

阳离子交换剂：CM - 纤维素

阴离子交换剂：DEAE - 纤维素

### 3. 亲和层析：

抗原 - 抗体，配体 - 受体，金属离子，生物素等

## 5.5 超速离心

根据蛋白质的分子量与形状分离。

**沉降系数 (sedimentation coefficient)**：颗粒在单位离心力场中的移动速度，用“S”表示。