

第二章 蛋白质化学

- 第一节 蛋白质的通论
- 第二节 蛋白质的基本组成单位—氨基酸
- 第三节 蛋白质的结构
- 第四节 蛋白质的分子结构与功能的关系
- 第五节 蛋白质的重要性质
- 第六节 蛋白质的分离纯化及测定

1. 蛋白质在生命活动中的重要作用

1.1 蛋白质在机体内的生物学功能

-  生物催化作用： 酶
-  运输作用： 如血红蛋白、转铁蛋白
-  调节作用： 如胰岛素、生长激素
-  运动作用： 如肌动蛋白和肌球蛋白
-  防御功能： 如免疫球蛋白、凝血因子
-  营养功能： 如卵清蛋白、酪蛋白
-  结构蛋白： 如胶原蛋白、角蛋白
-  能量转换蛋白： 如细胞色素
-  基因调节蛋白： 如阻遏蛋白

1.2 蛋白质的分类

按形状可将蛋白质分为：

纤维状蛋白质：多为结构蛋白。

球状蛋白质：具有广泛的生物学功能。如酶、蛋白类激素等。

按结构和功能可将蛋白质分为：

简单蛋白（**simple protein**）：仅有蛋白质组成的、结构简单的蛋白质。

结合蛋白（**conjugated protein**）：在蛋白质分子中除了含有氨基酸成分外，还要有其他的成分的存在，才能保证其正常生物活性的蛋白质。

分子中包含蛋白质和非蛋白质两部分。

结合蛋白质按辅基成分分类

蛋白质类别	举 例	辅 基
核蛋白 (nucleoprotein)	病毒核蛋白、染色体蛋白	核酸
脂蛋白 (lipoprotein)	乳糜微粒、高密度脂蛋白	各种脂类
色蛋白 (chromoprotein)	血红蛋白、黄素蛋白	色素
磷蛋白 (phosphoprotein)	酪蛋白、卵黄磷蛋白	磷酸
糖蛋白 (glycoprotein)	免疫球蛋白、糖蛋白	糖类
金属蛋白 (metalloprotein)	铁蛋白	金属离子



2. 蛋白质的化学组成

2.1 蛋白质的元素组成

所有蛋白质均含有：

C 50%-55%

H 6%-8%

O 20%-23%

N 15%-17%

某些蛋白质含有：**S 0.3%-2.5%** 以及**P**

少数蛋白质含有：**Fe, Cu, Zn, Mo和I**等元素

蛋白质中**N**的平均含量约**16%**，因此食物与饲料中蛋白质的含量可以通过凯氏定**N**（**Kjeldahl**法）进行大致估计。

元素组成的特点

蛋白质中N是特征元素，大多数蛋白质含氮量较恒定，平均16%，在生物样品中，每测得即1g氮就相当于6.25g蛋白质。**6.25称为蛋白质系数。**

由于生物体内的含氮物质以蛋白质为主，因此，只要测定生物样品中的含氮量，就可以根据以下公式推算出蛋白质的含量：

$$\text{样品中蛋白质含量} = (\text{样品的总氮量} - \text{非蛋白氮量}) \times 6.25$$

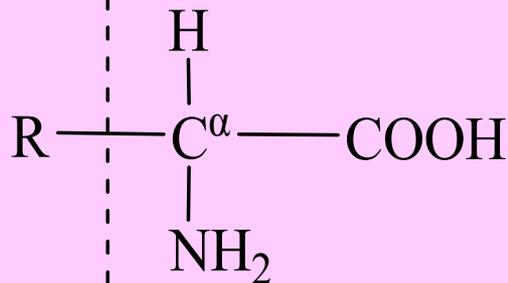
$$\text{样品中粗蛋白质含量} = \text{样品中的含氮量} \times 6.25$$

此公式是凯氏定氮法测定蛋白质含量的计算基础。

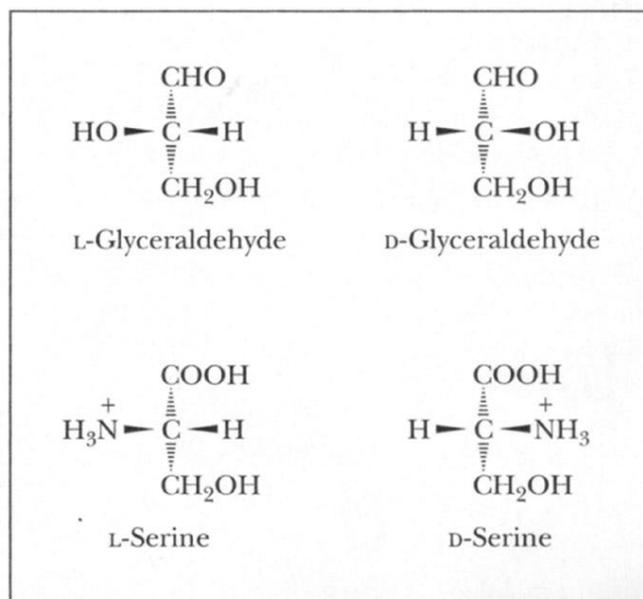
2.2 蛋白质的基本结构单位——氨基酸

2.2.1 氨基酸的基本结构和构型

存在于自然界的氨基酸有300种。动物机体的蛋白质经强酸水解之后可以得到20种氨基酸，并且均为L-氨基酸（除了甘氨酸），含不对称的 α -碳原子。它们之间的差别在于有不同的侧链基团 R。



氨基酸的结构通式



氨基酸与甘油醛的构型

2.2.3 氨基酸的分类

在中性pH条件下

按其R侧链极性和所带电荷的不同，分为四大类，

不带电荷极性氨基酸： Gly, Ser, Thr, Cys, Thr, Asn, Gln

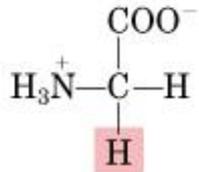
带负电荷极性氨基酸： Asp, Glu

带正电荷极性氨基酸： His, Arg, Lys

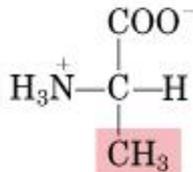
非极性氨基酸： Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met

含非极性侧链基团

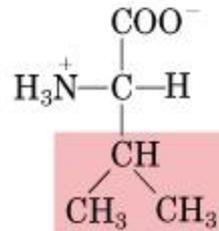
Nonpolar, aliphatic R groups



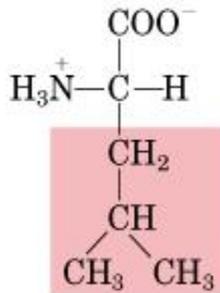
Glycine



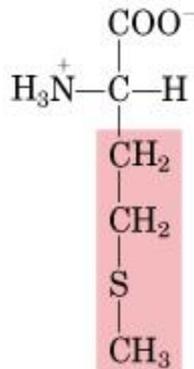
Alanine



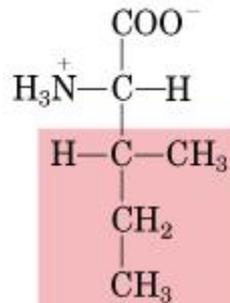
Valine



Leucine



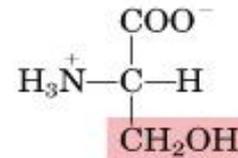
Methionine



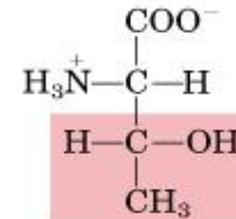
Isoleucine

含极性侧链基团

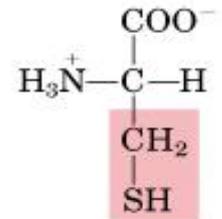
Polar, uncharged R groups



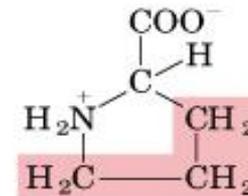
Serine



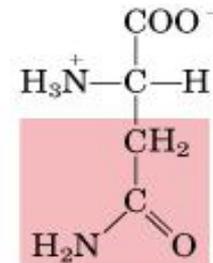
Threonine



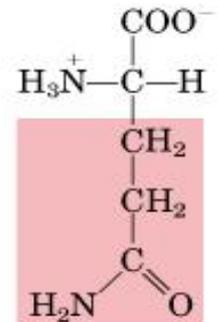
Cysteine



Proline



Asparagine



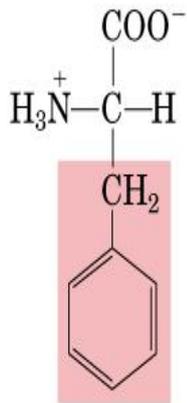
Glutamine

Gly, G Ala, A Val, V
Leu, L Met, M Ile, I

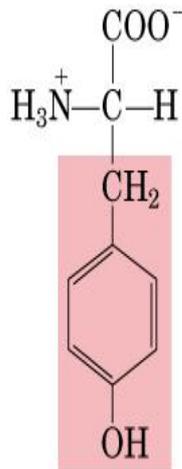
Ser, S Thr, T Cys, C
Pro, P Asn, N Gln, Q

含芳香基团

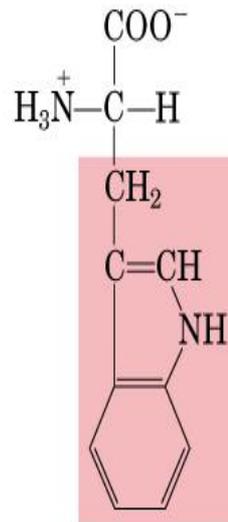
Aromatic R groups



Phenylalanine



Tyrosine

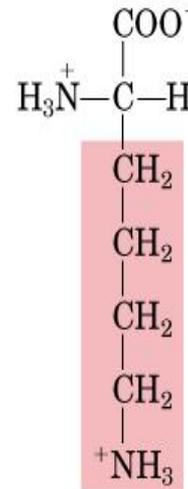


Tryptophan

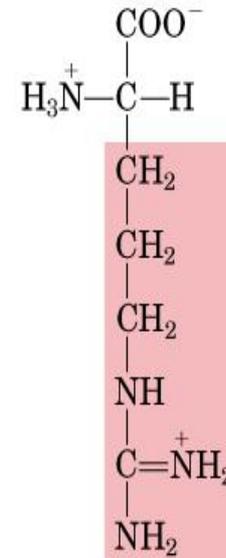
Phe, F; Tyr, Y; Trp, W

含碱性侧链基团（带正电荷）

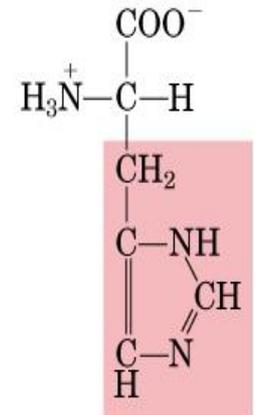
Positively charged R groups



Lysine



Arginine

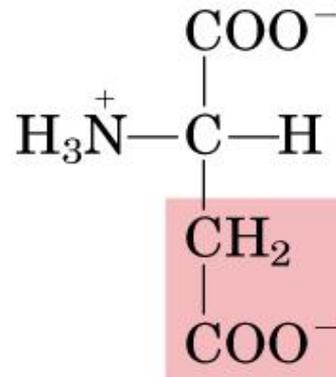


Histidine

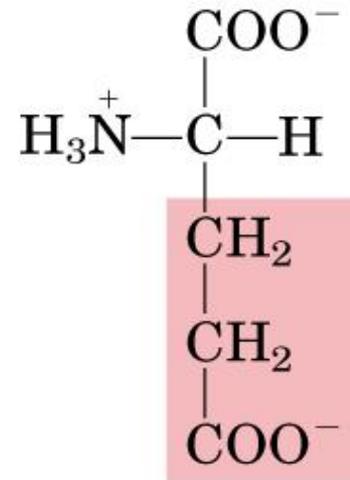
Lys, K; Arg, R; His, H

含酸性侧链基团（带负电荷）

Negatively charged R groups



Aspartate



Glutamate

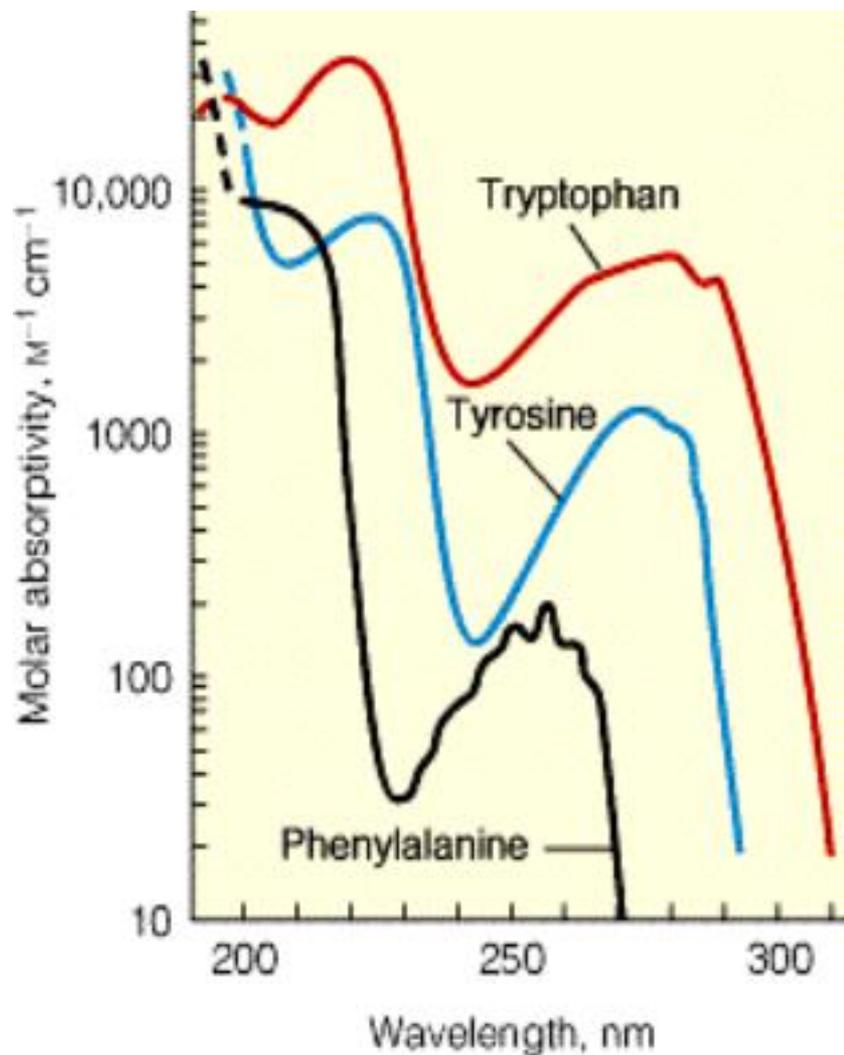
Asp, D; Glu, E

2.2.4 氨基酸的主要理化性质

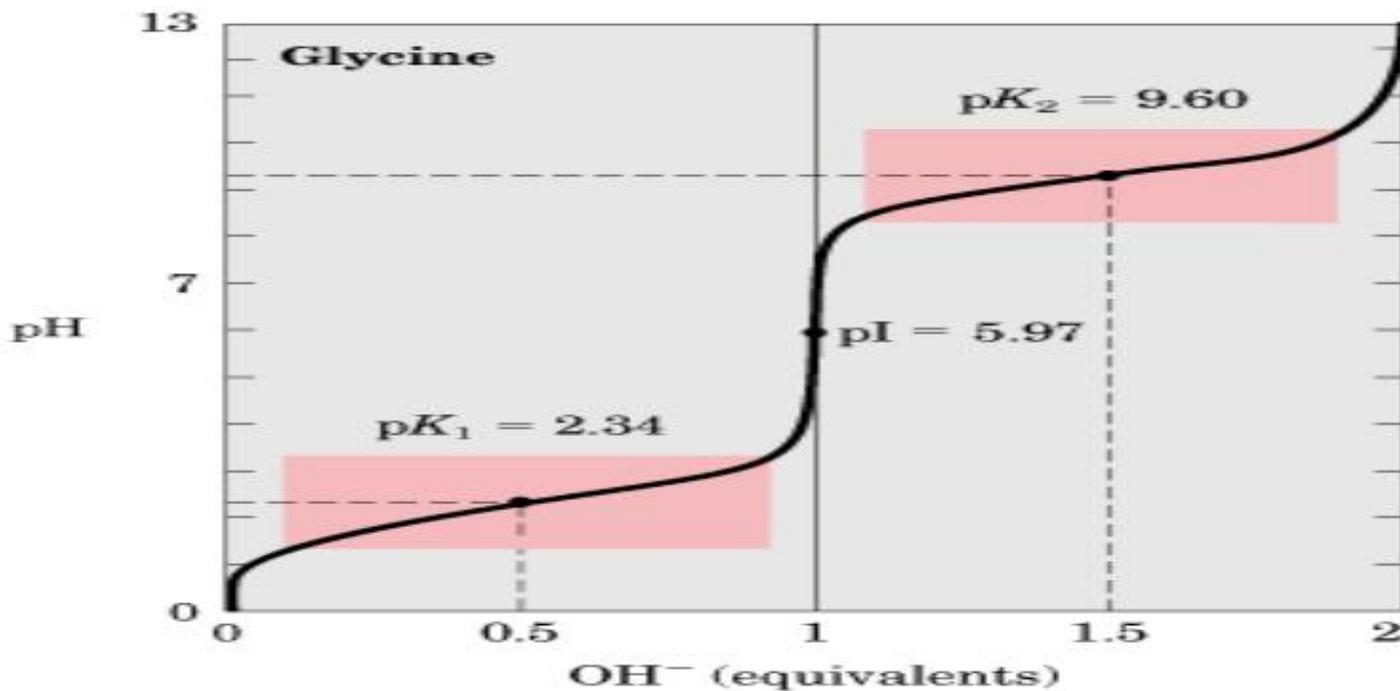
光吸收特性

各种氨基酸在可见区都没有光吸收。

在紫外光区芳香族氨基酸在**280nm**处有最大吸收峰（色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸的最大吸收波长分别为**279、278、259nm**）



氨基酸的两性解离



氨基酸分子在水溶液中呈两性离子状态，在其等电点时，氨基酸所带的正、负电荷相等，净电荷为零。

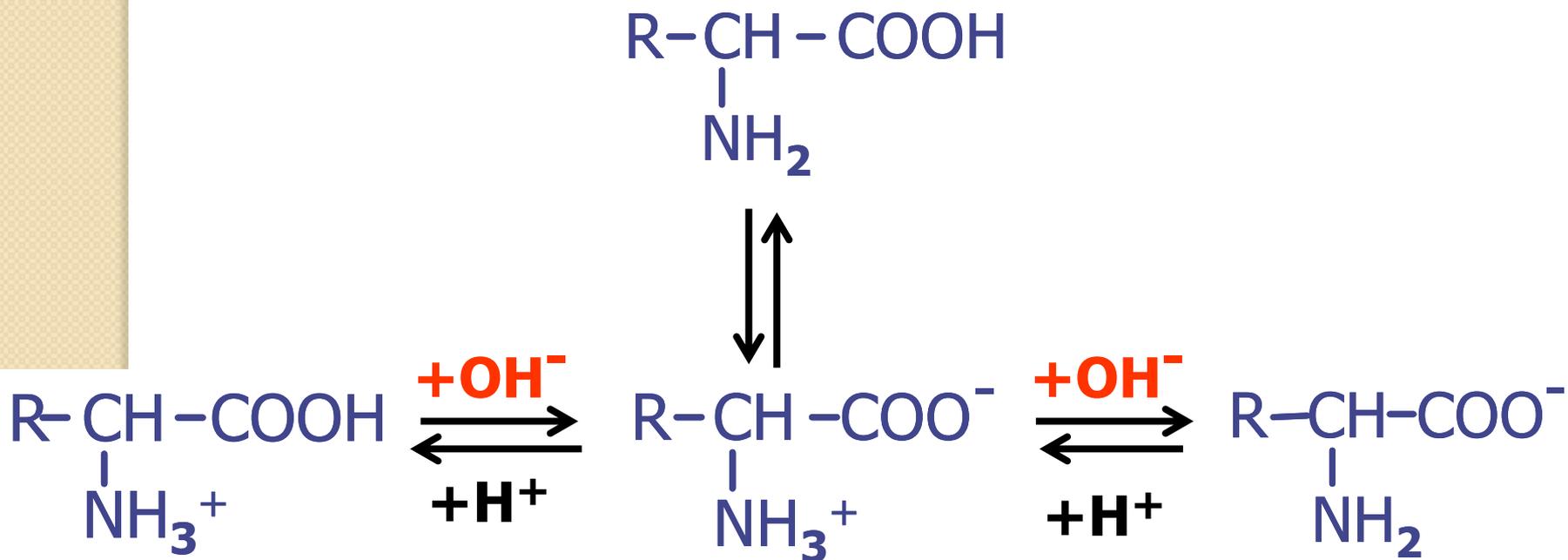


氨基酸的等电点

对某一种氨基酸而言，当溶液在某一个特定的pH，氨基酸以两性离子的形式存在，并且其所带的正电荷数与负电荷数相等，即净电荷为零。在直流电场中，它既不向正极，也不向负极移动。此时溶液的pH称为这种氨基酸的等电点（pI）。

例如，甘氨酸的羧基的 pK_1 为2.34，氨基的 pK_2 为9.60，其pI为5.97。

不同pH时氨基酸以不同的离子化形式存在：



pH < pI

阳离子

pH = pI

氨基酸的兼性离子

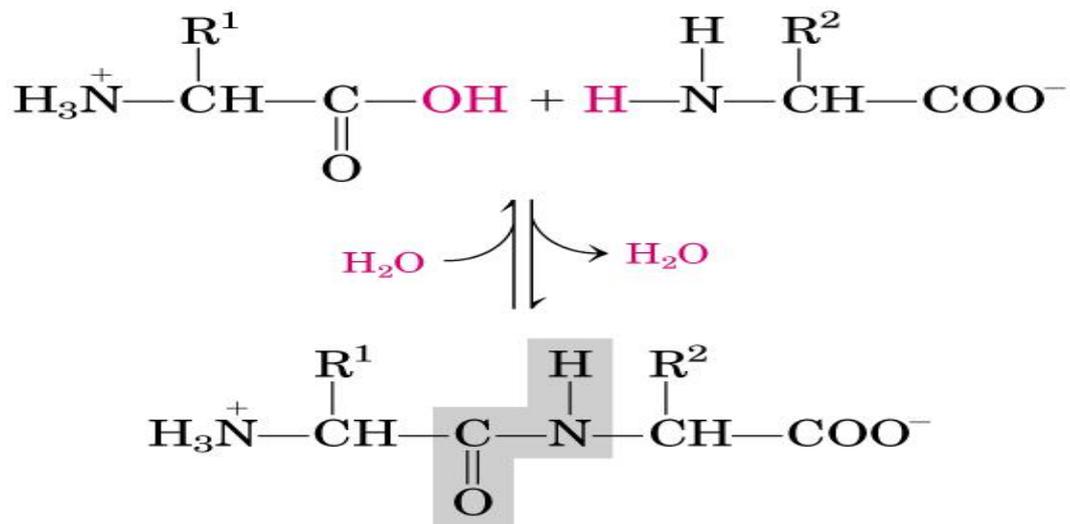
pH > pI

阴离子

3. 蛋白质的化学结构和高级结构

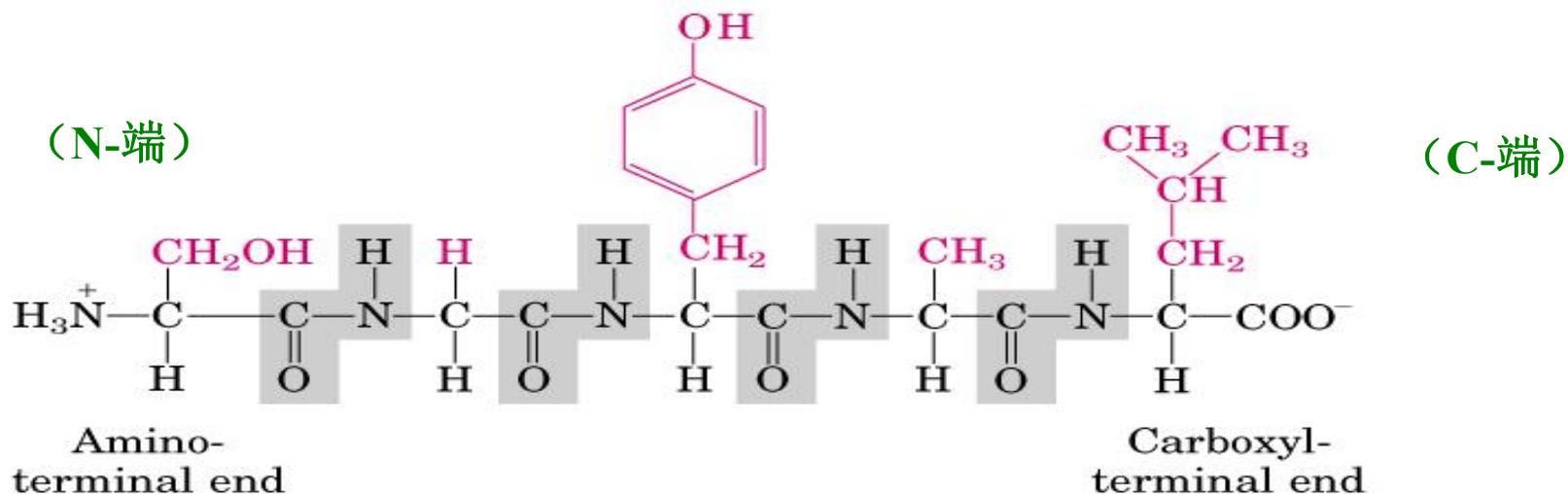
3.1 肽键 (peptide bond) 和肽 (peptide)

肽键：指蛋白质分子中，由一个氨基酸的 α -COOH和另一个氨基酸的 α -NH₂之间脱水缩合而成的酰胺键，它是蛋白质结构中的主要共价键。



肽：由肽键形成的化合物（二肽、三肽、寡肽、多肽）

多肽 (polypeptide) 和多肽链 (polypeptide chain)

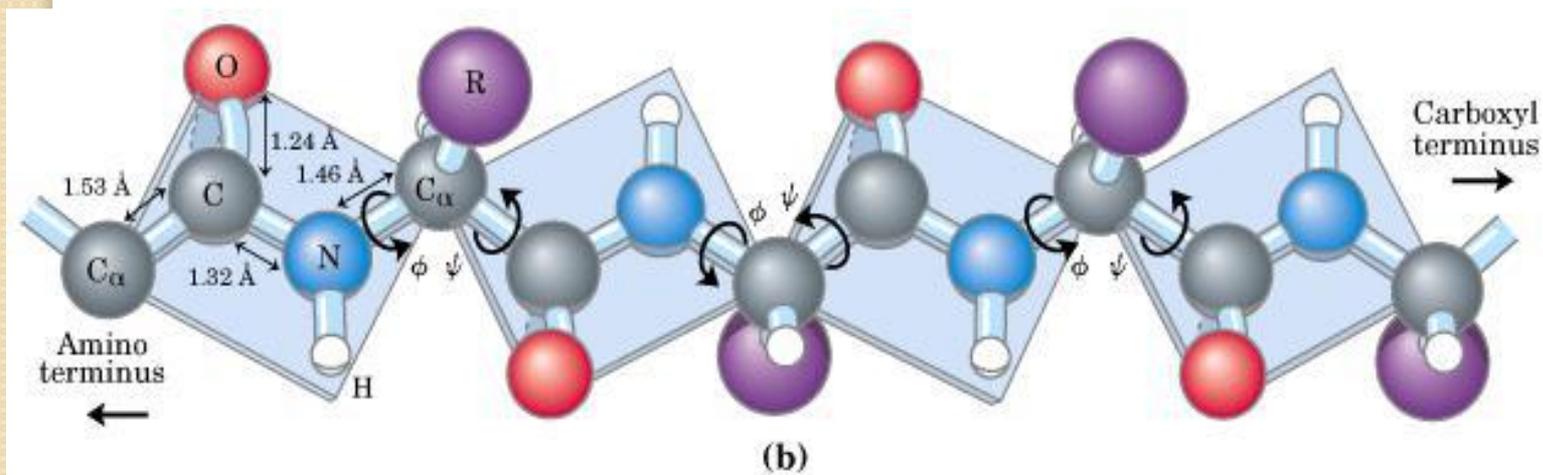


在多肽链中，氨基酸残基按一定的顺序排列，这种排列顺序称为氨基酸序列，多肽链上不完整的氨基酸，称为**氨基酸残基(amino acid residue)**

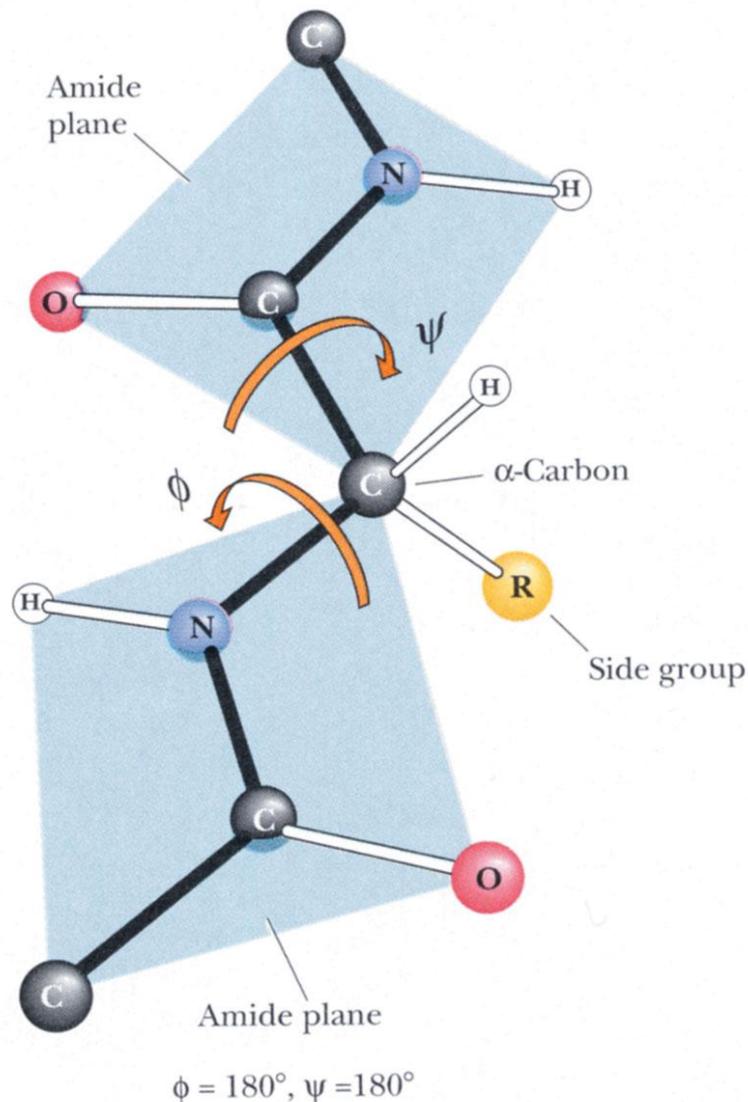
上图为：丝氨酰-甘氨酰-酪氨酰-丙氨酰-异亮氨酸

3.2 肽单位平面与二面角

肽平面 (peptide plane)：肽链主链的肽键C-N具有双键的性质，因而不能自由的旋转，使连接在肽键上的六个原子共处于一个平面上，此平面称为肽单位平面，又称酰胺平面。通常是反式的。



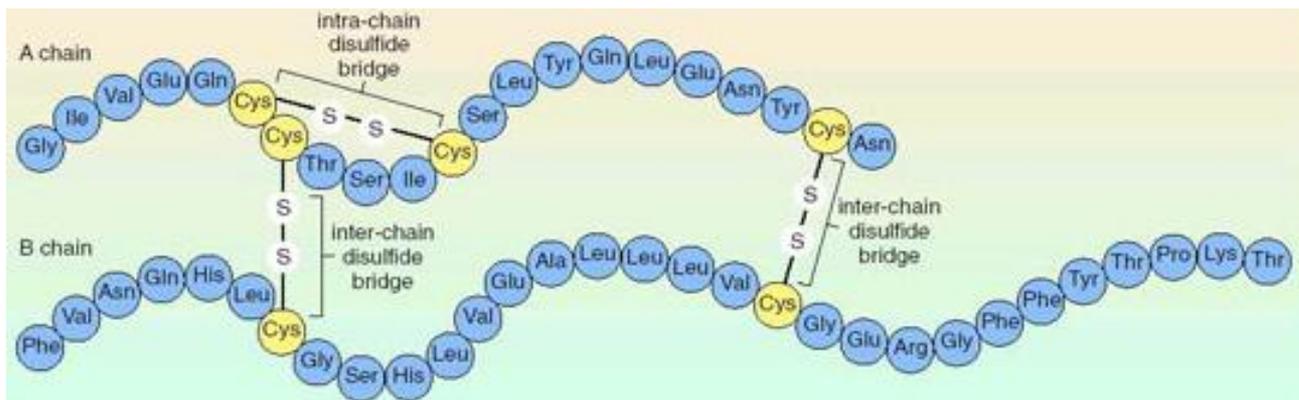
二面角 (dihedral angle) : 肽平面的连接处为 α 碳原子。它与相邻的两个参与肽键形成的C和N原子之间的单键可以在一定范围内转动， $C\alpha-N$ 之间称 ϕ 角，在 $C\alpha-C$ 之间称 ψ 角，这就是 α -碳原子上的一对二面角。这对二面角决定了相邻肽平面的相对位置。



相邻二个肽平面上的二面角

3.3 蛋白质的一级结构

一级结构 (primary structure)：即蛋白质的化学结构，是指多肽链上各种氨基酸残基的种类和排列顺序，也包括二硫键的数目。



牛胰岛素的一级结构：51个氨基酸，A（21肽）、B（30肽）两条肽链，A链内一对S-S，A和B链间2对S-S

3.4 蛋白质的高级结构

指一条或数条多肽链上所有原子和基团在三维空间上的排布，即构象（conformation）或空间结构。

构象由单键旋转产生的各种立体结构，而构型（configuration）是通过改变共价键形成的结构。

蛋白质的高级结构由明显的结构层次。

一级结构是空间结构的基础。

维持蛋白质空间结构中重要的化学键

(1) 非共价键

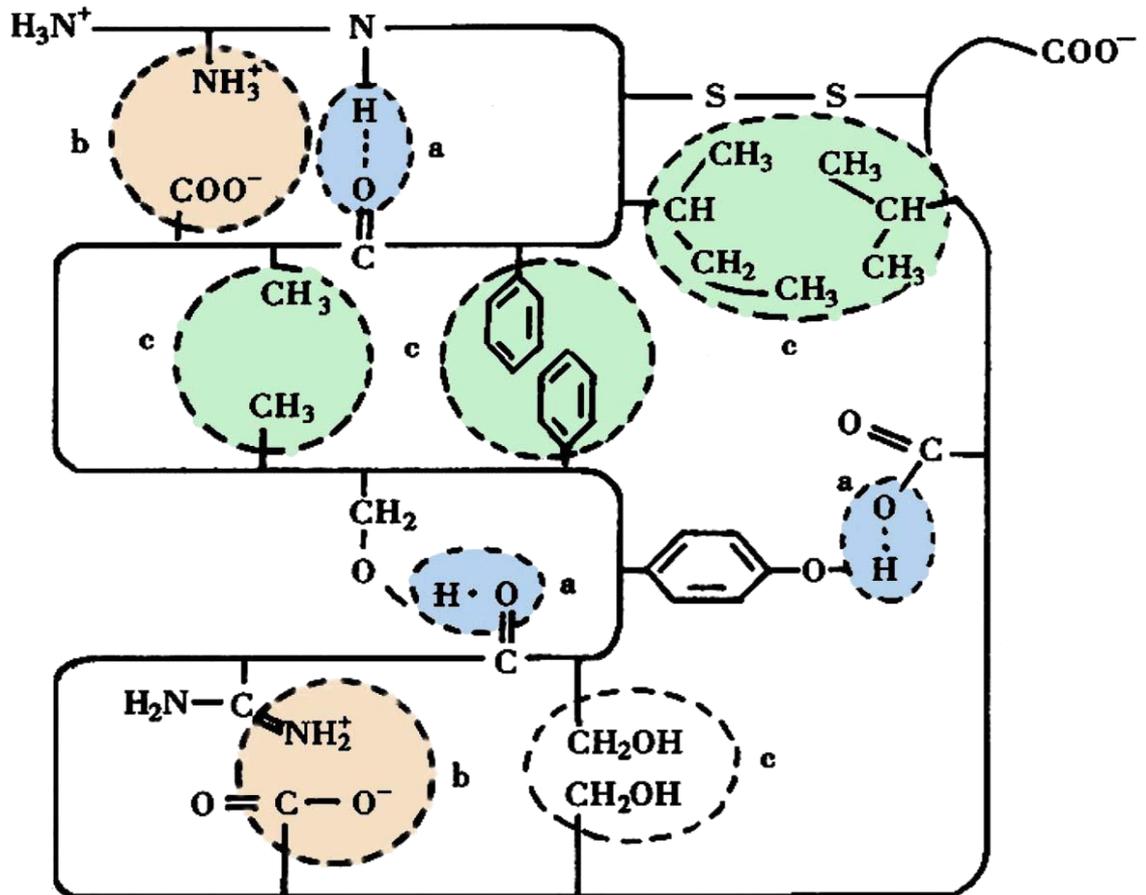
氢键

离子键

范德华力

疏水作用

(2) S-S键



维持蛋白质分子构象的各种化学键

a 氢键, b 离子键, c 疏水键

3.4.1 蛋白质结构层次

蛋白质结构极其复杂，但具有明显的结构层次

↪ 一级结构（多肽链上的氨基酸排列顺序）

↪ 二级结构（多肽链主链骨架的局部空间结构）

↪ 超二级结构（二级结构单位的集合体）

↪ 结构域（多肽链上可以明显区分的球状区域）

↪ 三级结构（多肽链上所有原子和基团的空间排布）

↪ 四级结构（由球状亚基或分子缔合而成的集合体）

Primary structure



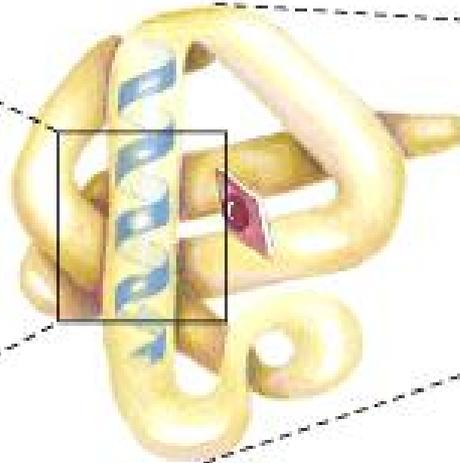
Amino acid residues

Secondary structure



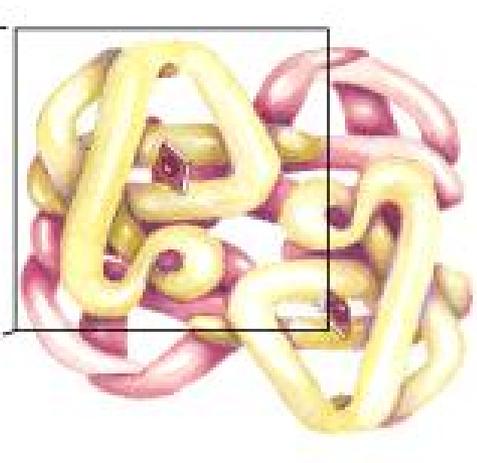
α Helix

Tertiary structure



Polypeptide chain

Quaternary structure



Assembled subunits

蛋白质的主要结构层次

3.4.2 二级结构

二级结构 (secondary structure)：指多肽链主链在一级结构的基础上进一步的盘旋或折叠，形成的周期性构象，维系二级结构的力是氢键。

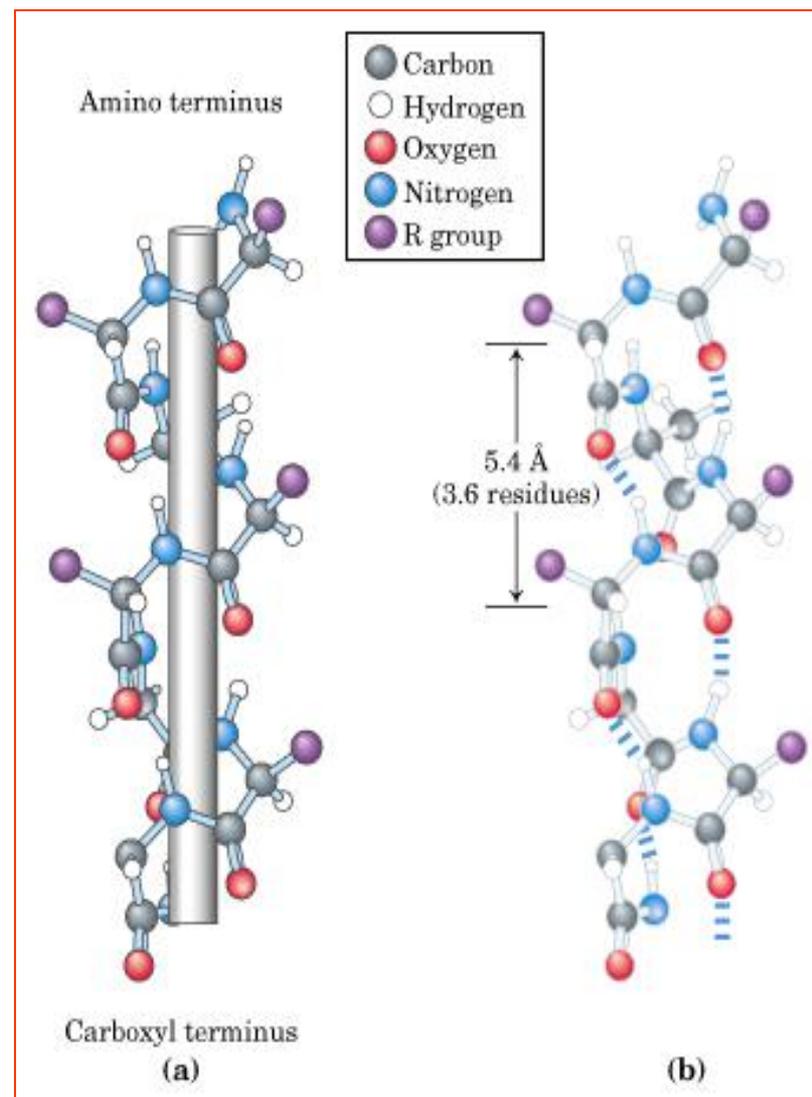
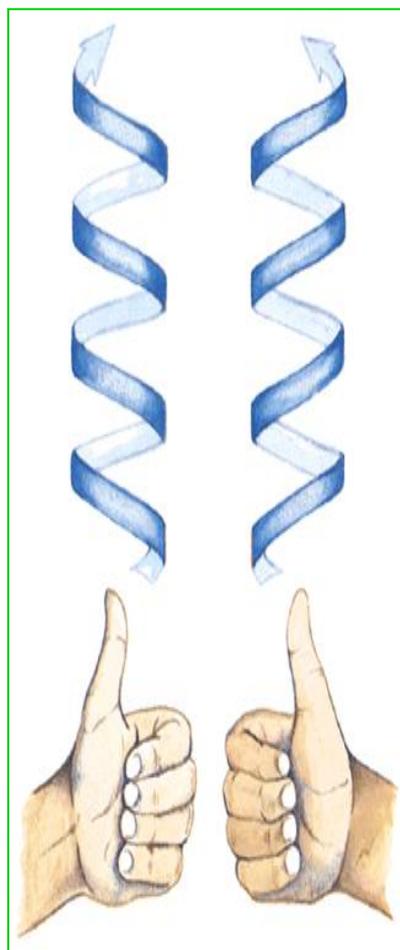
二级结构主要形式有：

α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规卷曲

α -螺旋 (α -helix)

是在角蛋白中最常见的构象，为右手螺旋。每圈螺旋3.6个氨基酸残基。侧链基团R在螺旋外侧。主链内部形成H-键，不涉及侧链R。

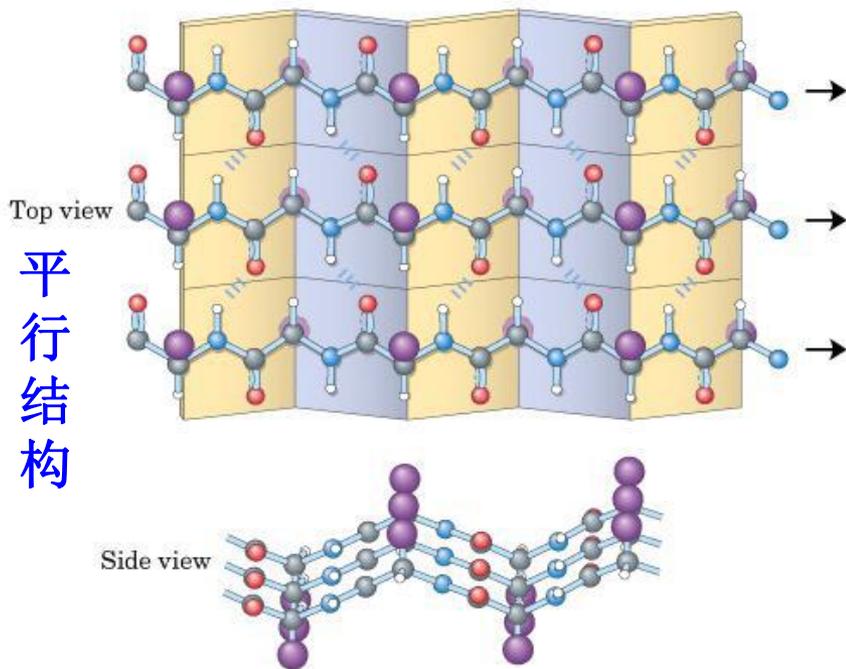
典型的 α -螺旋是 3.6_{13} 螺旋，一周螺旋3.6个氨基酸，跨越13个原子。



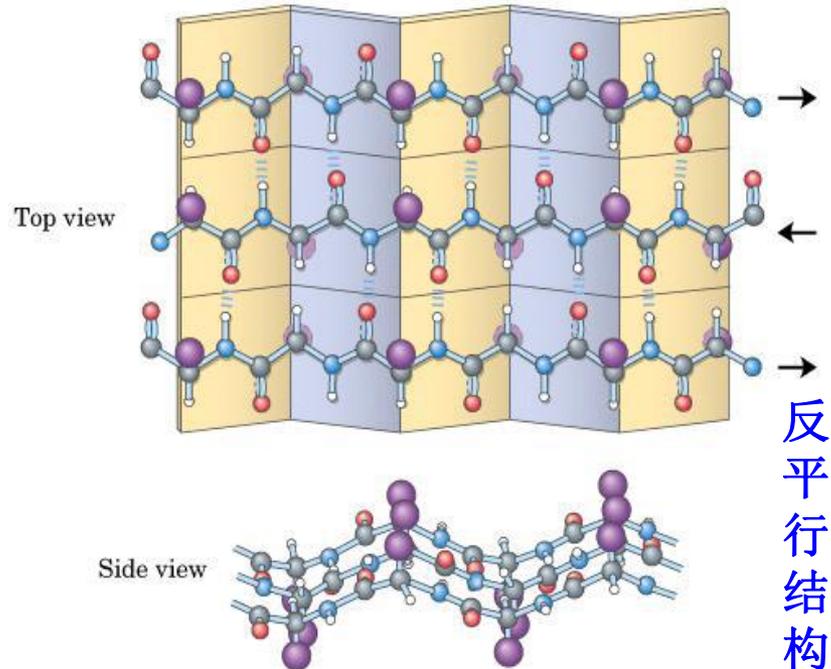
β -折叠 (β -sheet)

存在于丝心蛋白、角蛋白。呈平行的和反平行的比较伸展的构象。主链之间形成H键，侧链基团R交替地位于片层的上、下。

(b) Parallel



(a) Antiparallel

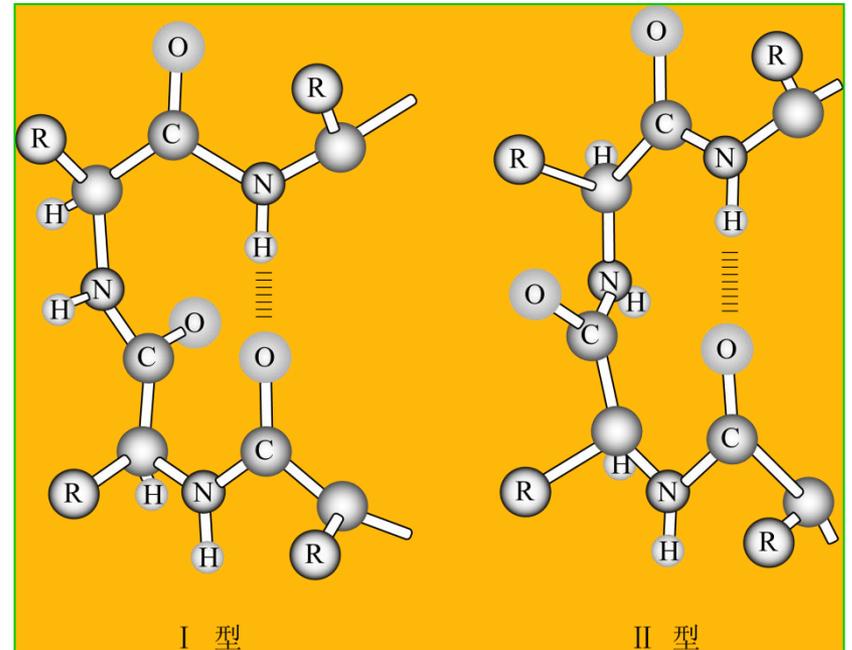


⌚ β -转角 (β -turn)

肽链 180° 的回折

⌚ 无规卷曲 (random coil)

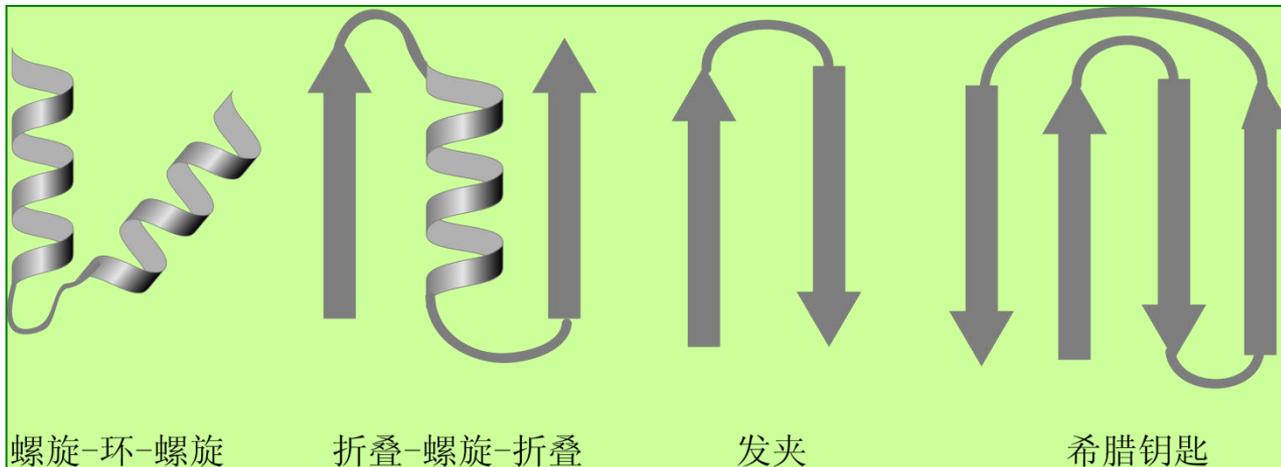
指蛋白质的肽链中没有确定规律性的那部分肽段构象。



两种主要类型的 β -转角

3.4.3 超二级结构

超二级结构 (super secondary structure)：在蛋白质中经常存在由若干相邻的二级结构单元按一定规律组合在一起，形成有规则的二级结构集合体，超二级结构又称**基序或模体 (motif)**

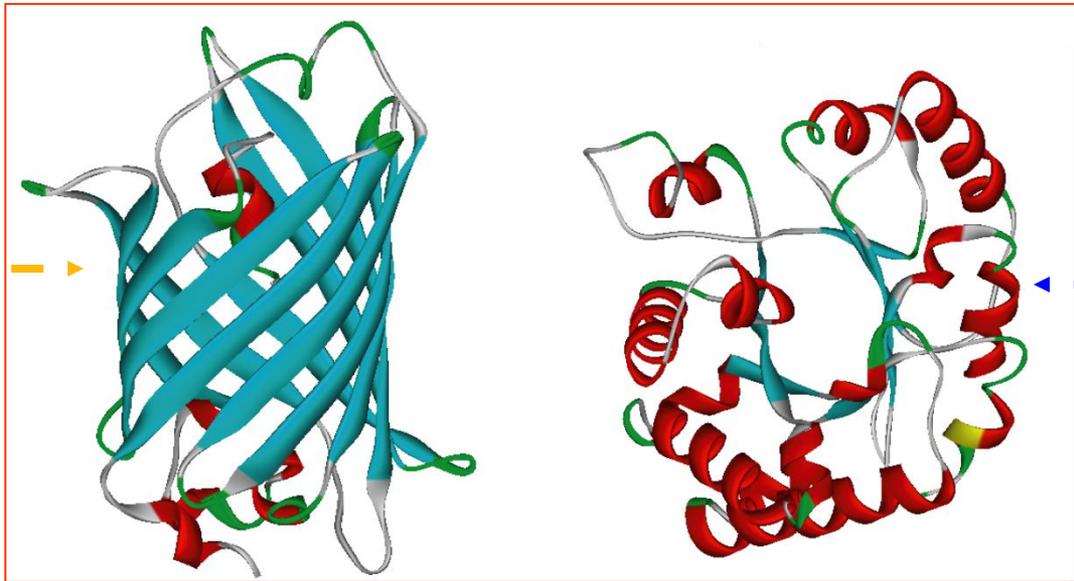


四种类型的超二级结构

3.4.4 结构域

结构域 (domain)：在较大的蛋白质分子里，多肽链的空间折叠常常形成两个或多个近似球状的三维实体,它们之间连接松散。

丙酮酸激酶
的一个结构
域



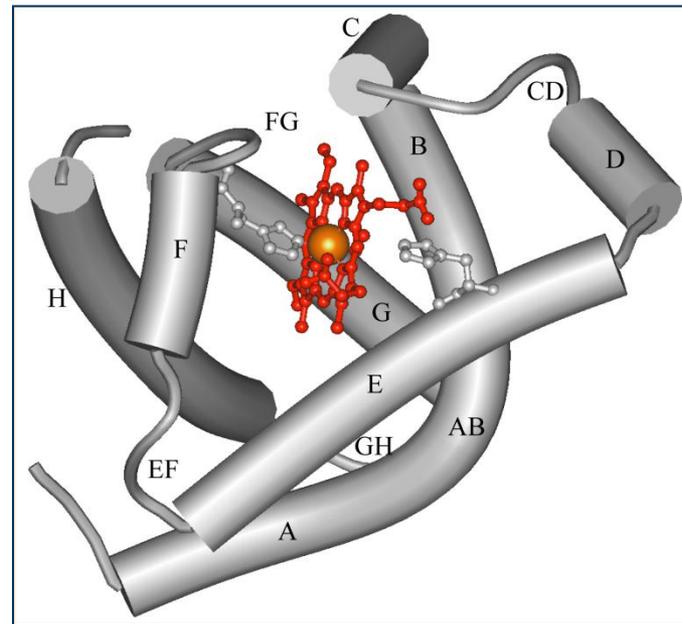
免疫球蛋白
的一个结构
域

由 β -折叠、 α -螺旋形成的结构域

3.4.5 三级结构

三级结构 (tertiary structure)：指一条多肽链在二级结构（超二级结构及结构域）的基础上，进一步盘绕、折叠而成的具有特定肽链走向的紧密球状结构,或者说三级结构是指多肽链中所有原子和基团在三维空间的排布。

三级结构的稳定主要靠非共价相互作用
氨基酸亲水的基团倾向于分布在分子的表面，疏水的基团在分子的内部。



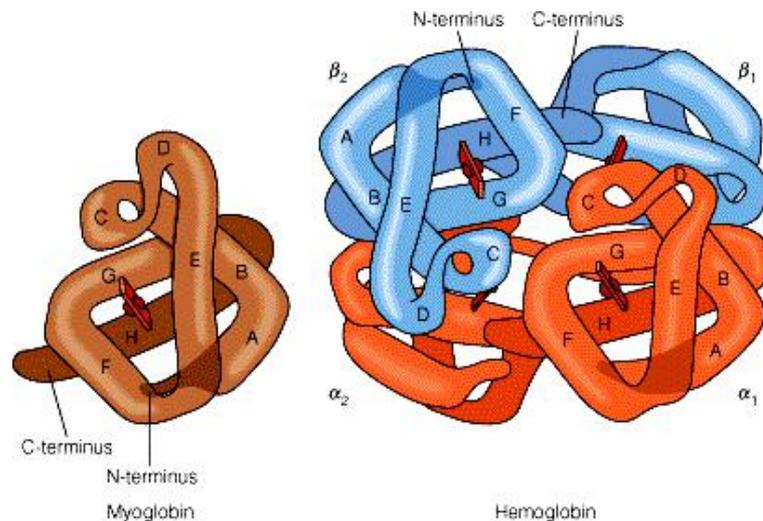
肌红蛋白的三级结构及其结合的血色素亚基

3.4.6 四级结构

四级结构 (quaternary structure)：多个具有三级结构的多肽链（称**亚基**，Subunit）的聚合。或者说四级结构指亚基的种类、数目及各个亚基在寡聚蛋白中的空间排布和亚基之间的相互作用。

四级结构的稳定主要靠是疏水作用力，另外还有离子键、氢键、范德华引力等。

血红蛋白由4个亚基组成 ($\alpha_2\beta_2$)，每个亚基都与肌红蛋白非常相似。



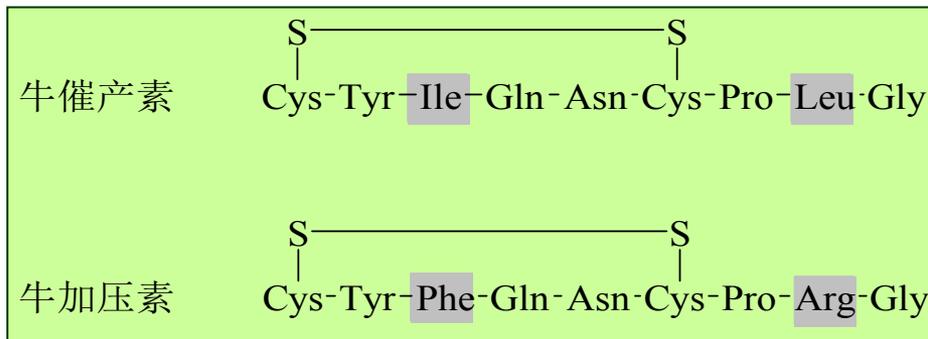
血红蛋白的四级结构

4. 多肽、蛋白结构与功能的关系

4.1 一级结构与功能的关系



氨基酸组成变化改变其功能



一级结构改变引起分子病

基因突变导致蛋白质一级结构的突变，导致蛋白质生物功能的下降或丧失，就会产生疾病，这种病称为**分子病 (molecular disease)**。

分子病：指某种蛋白质分子氨基酸排列顺序异常导致的遗传病。（基因突变导致蛋白质分子结构的改变）
突出例子：**镰刀型红细胞贫血症**

β -链N端氨基酸排列顺序：

	1	2	3	4	5	6	7	8	...
Hb-A	Val	His	Leu	Thr	Pro	Glu	Glu	Lys	...
Hb-S	Val	His	Leu	Thr	Pro	Val	Glu	Lys	...

由于谷氨酸在生理条件下带负电荷，使Hb-A相互排斥，不能聚集。缬氨酸为疏水氨基酸（处于分子表面），使患者的Hb-S在氧气缺乏时聚集成纤维状，丧失运氧功能，同时，红细胞呈镰刀状，易胀破发生溶血。引起患者头昏、胸闷等贫血症状，严重时可致死。

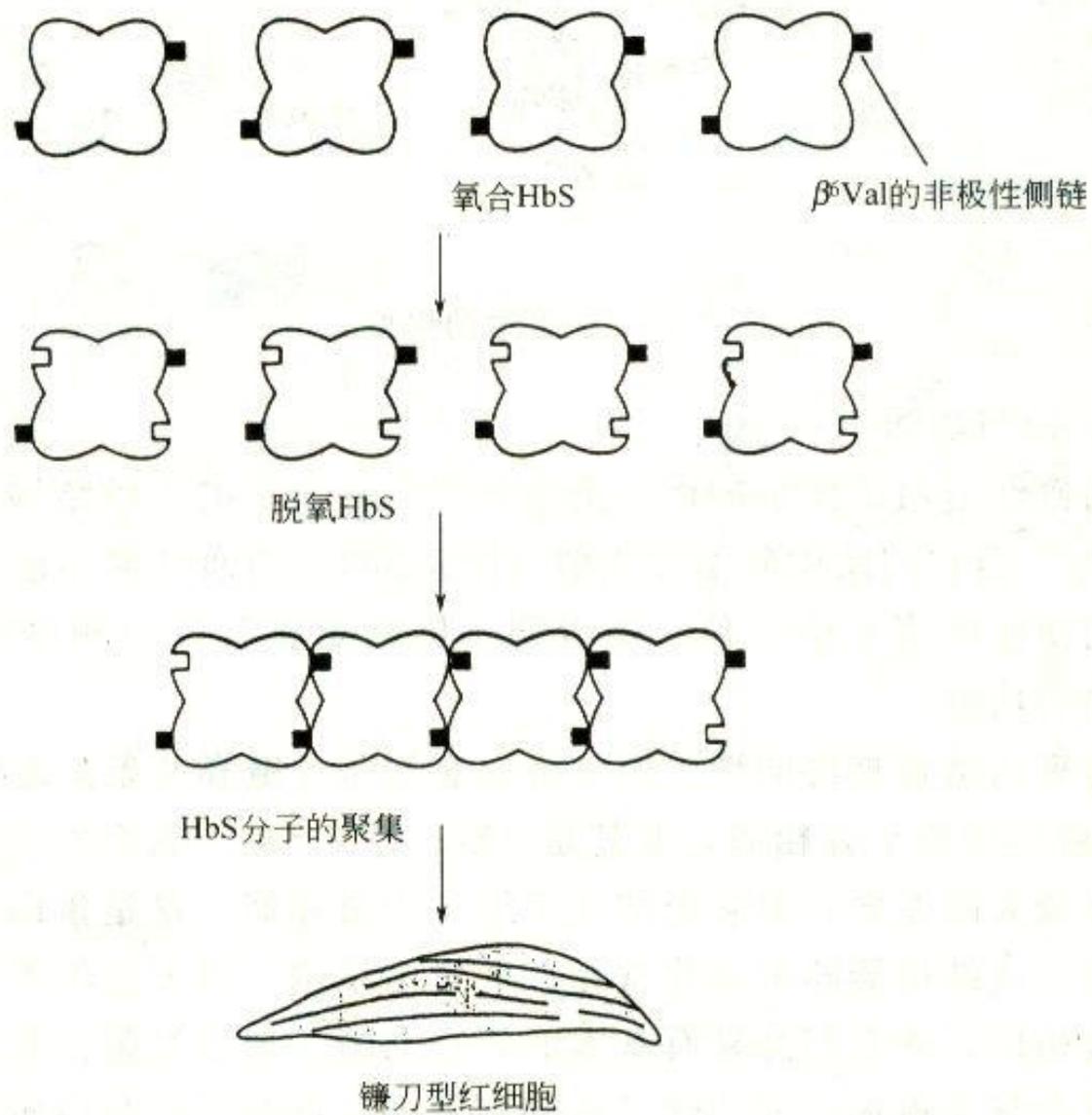
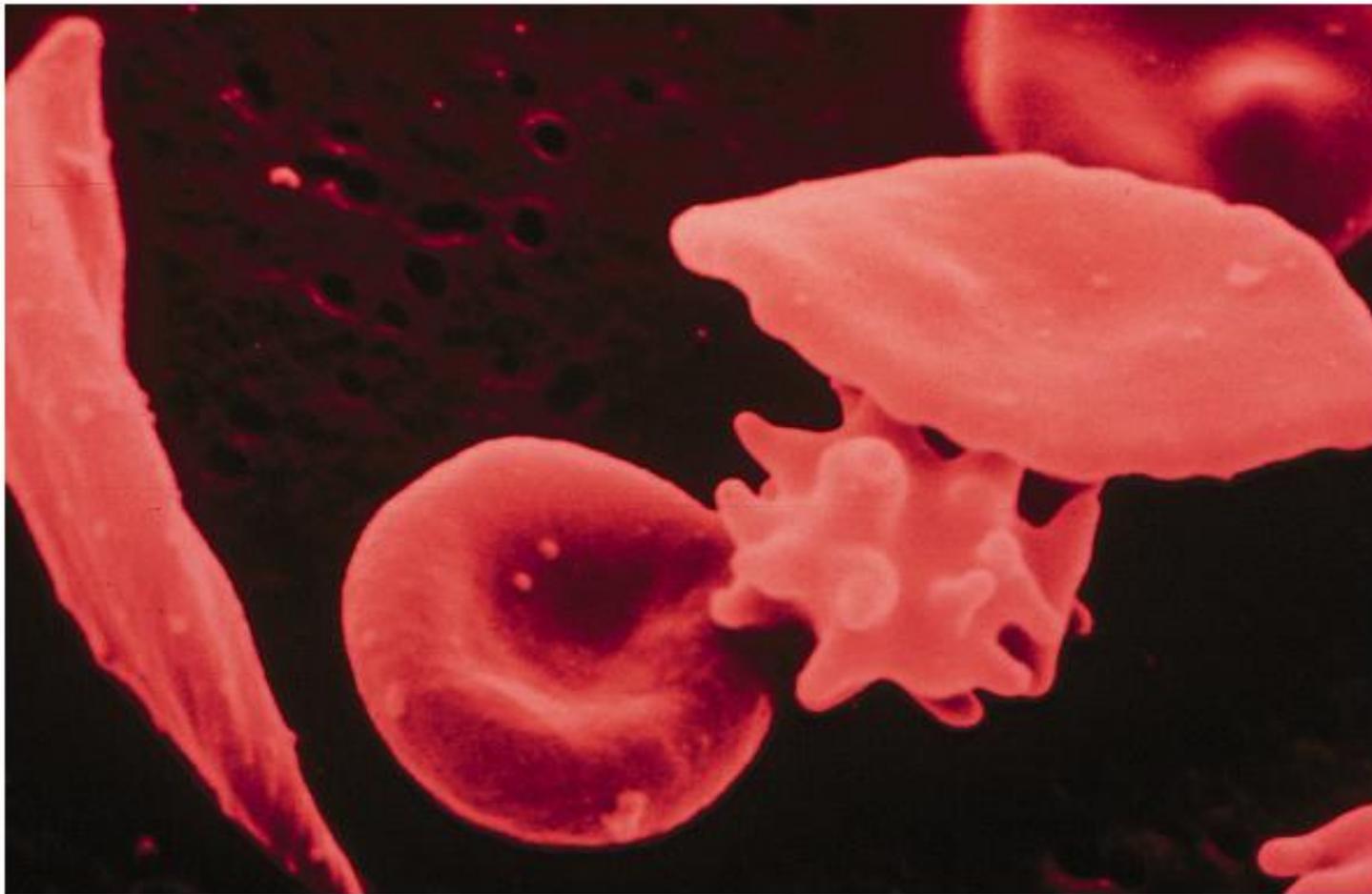


图 2-31 突变的血红蛋白凝集导致细胞变形



(b)

每种蛋白质分子都具有其特定的结构来完成它特定的功能，甚至个别氨基酸的变化就能引起功能的改变或丧失，证实了蛋白质结构与功能的高度统一性。

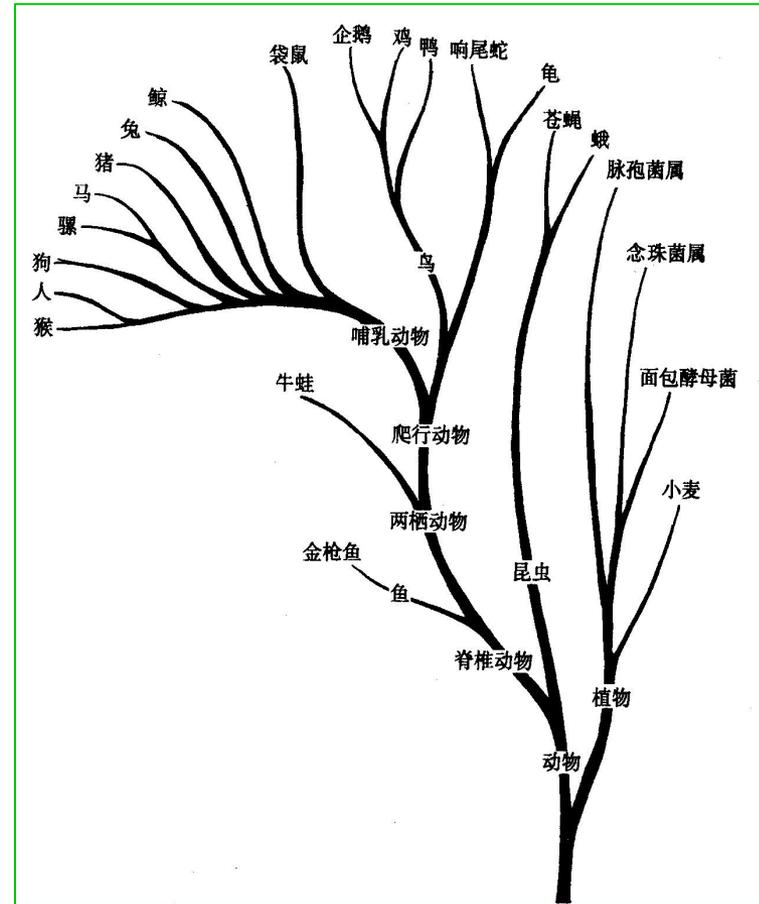


分子进化

细胞色素c 是由
104个氨基酸组
成的蛋白质。

比较50种不同的
生物，发现由35
个是保守的。

凡与人类亲缘关
系越远的生物，
其氨基酸顺序与
人类的差异越大。



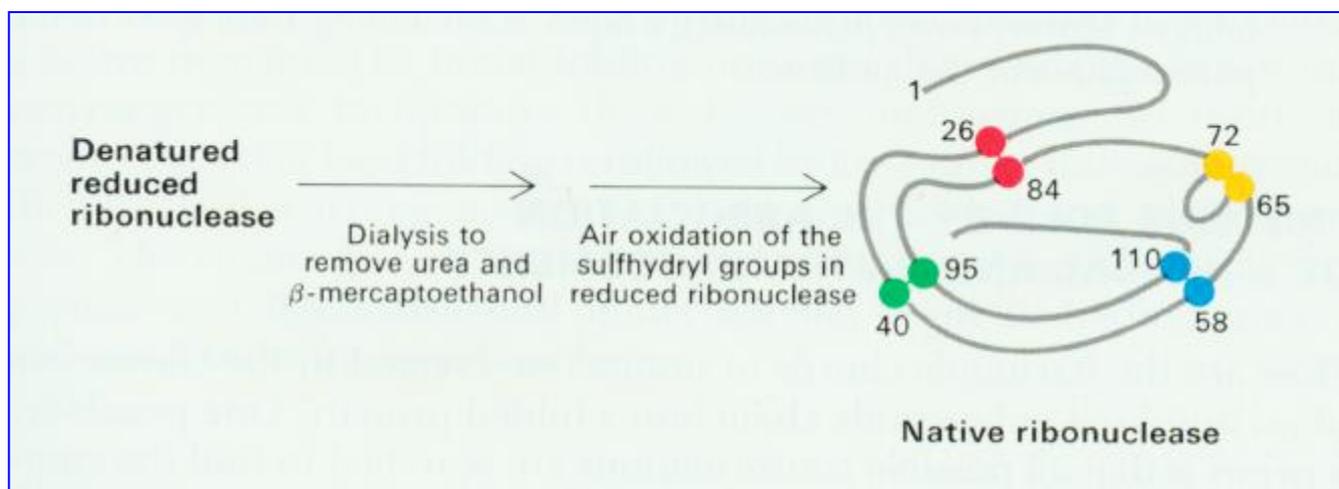
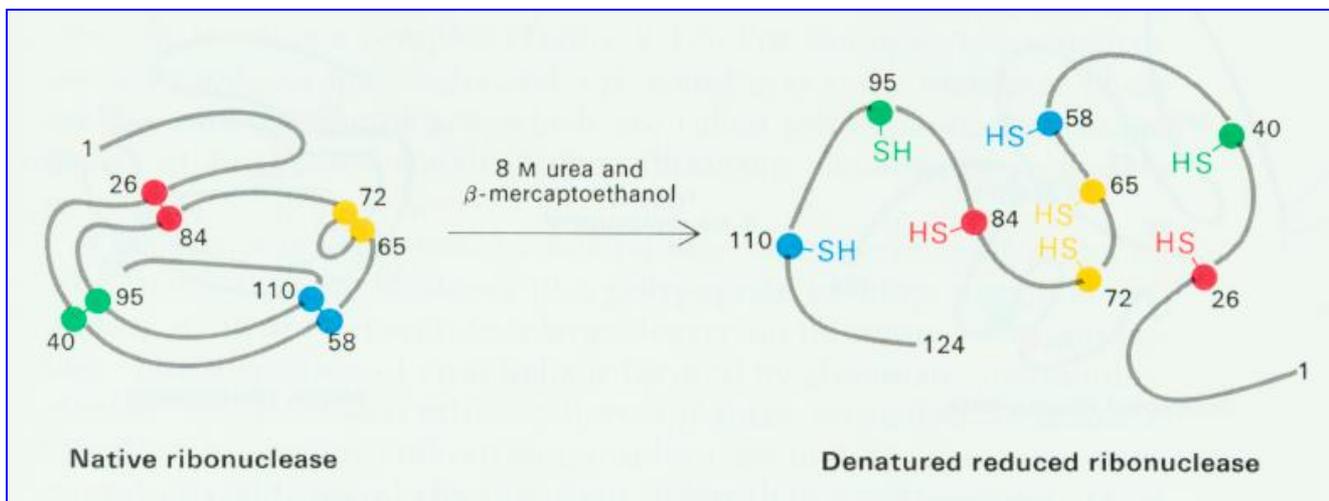
从细胞色素c的一级结构看生物进化

4.2 高级结构与功能的关系

蛋白质的变性与复性

变性（denaturation）是指一些理化因素，如热、光、机械力、酸碱、有机溶剂、重金属离子、变性剂（如尿素等），破坏了维持蛋白质空间构象的非共价作用力，使其空间结构发生改变，结果导致其生物活性的丧失。变性一般并不引起肽键的断裂，但蛋白质的溶解度可能降低，可能凝固和沉淀。

变性有时是可逆的。消除变性的因素，有些蛋白质的生物活性可能得以恢复，称为**复性**（renaturation）。



核糖核酸酶RNase的变性与复性



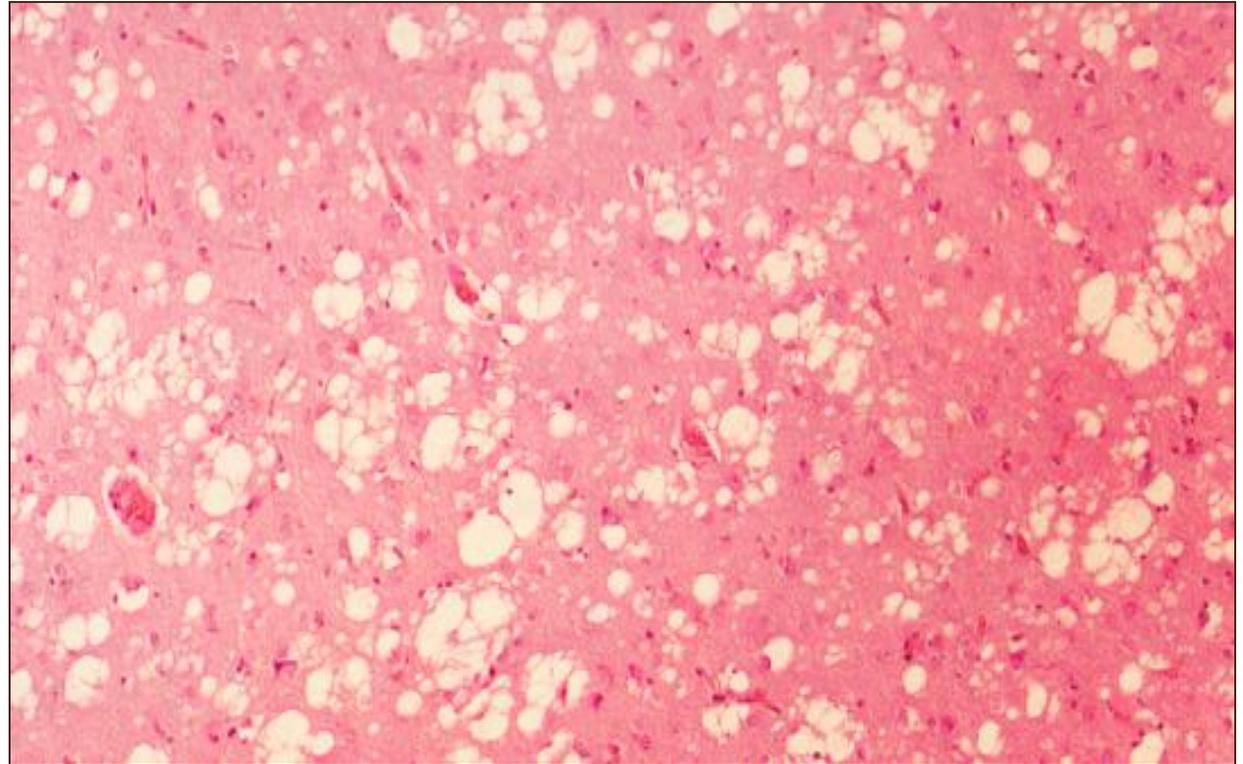
蛋白质的正确折叠与分子伴侣

多肽链的特定空间结构是其功能的保证。

肽链的正确折叠或者亚基的装配常常需要由一些蛋白质，例如热激蛋白（Heat shock protein , Hsp）和某些酶的帮助，并且消耗ATP。

但是，这样的蛋白质与酶并不加入到最终的折叠产物或装配复合物中。它们被称为**分子伴侣（molecular chaperone）**。

疯牛病(BSE)可
能是由于朊蛋白
(Prion protein, PrP)
的错误折叠引起
的



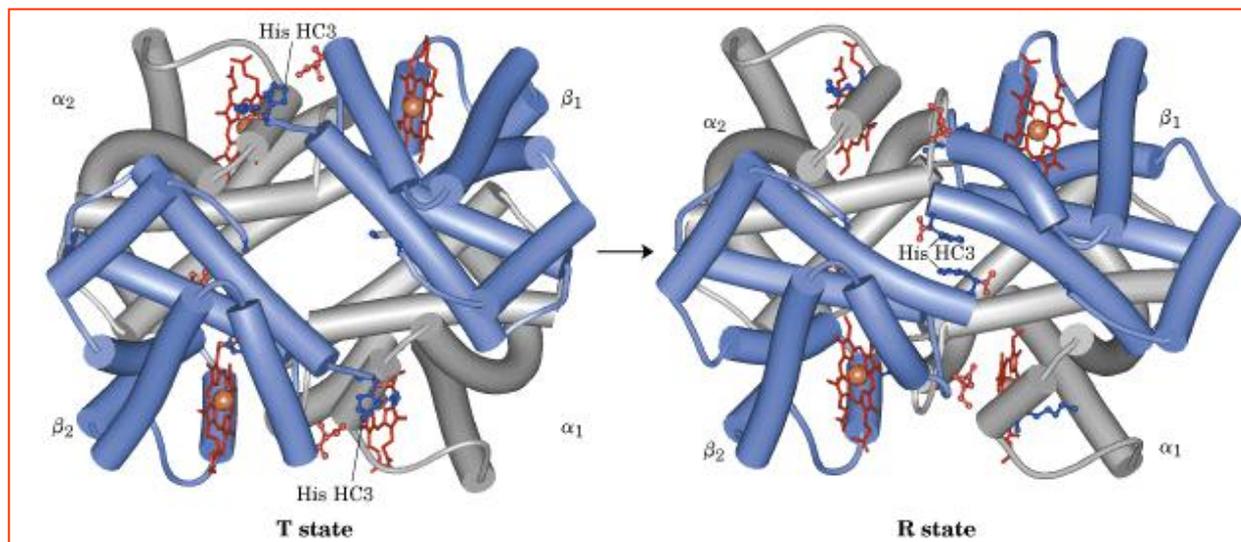
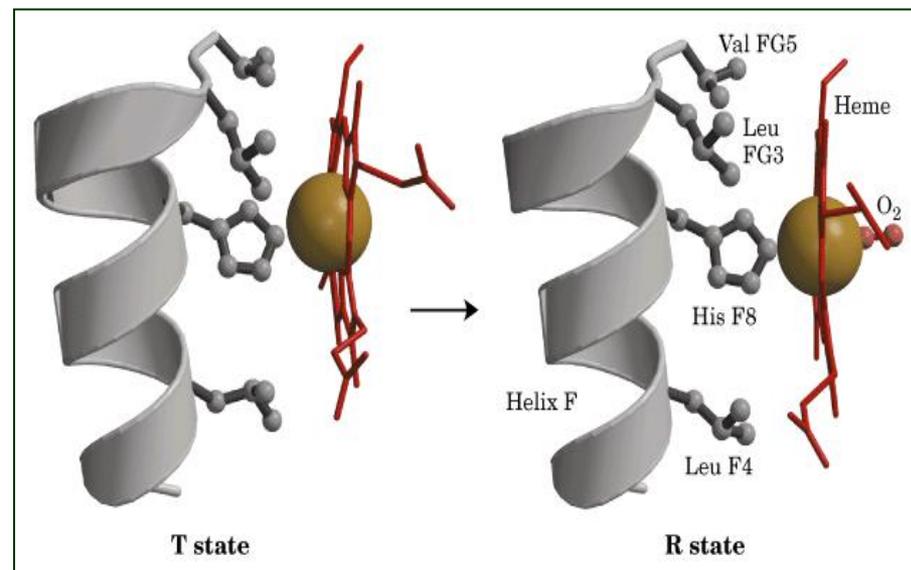
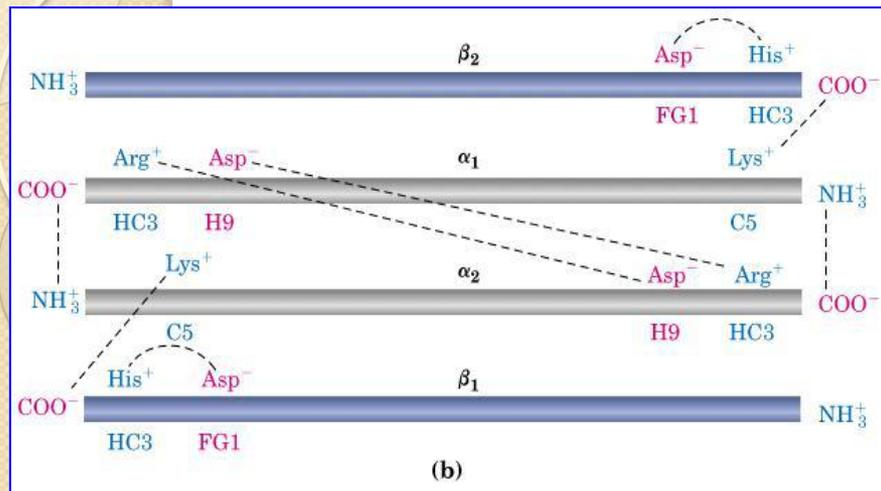
疯牛病病牛的海绵样脑组织



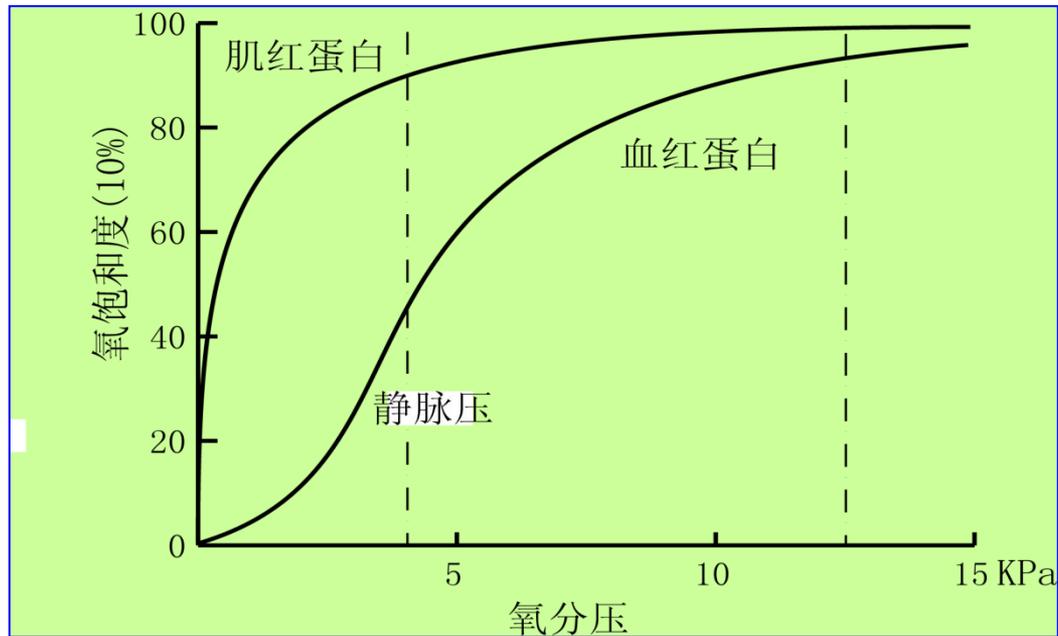
蛋白质的变构与血红蛋白的输氧功能

变构作用 (Allosteric effect) 是指效应剂 (变构剂) 作用于多亚基的蛋白质或酶的某个亚基后, 导致其构象改变, 继而引起其他亚基构象的改变, 结果是蛋白质或酶的生物活性的变化。可能是变构激活, 也可能是变构抑制。

血红蛋白中的4个亚基与氧分子的亲和性不同。氧分子与血红蛋白的一个亚基结合后, 引起其构象发生改变, 这种变化在亚基之间传递, 从而改变了其他亚基与氧的结合能力。(邮票模型)



氧合可以引发维系血红蛋白4个亚基的8对离子键相继断开，从比较紧凑的T构象转变为比较松弛的R构象。



血红蛋白和肌红蛋白的氧合曲线

与肌红蛋白相比，血红蛋白的多个亚基之间的相互作用使其与氧的结合能力总体上削弱了（氧合曲线右移，由双曲线转变成S形曲线），但是赋予了其新的能力——可以容易地将其结合的氧从氧分压高的组织（肺泡）向氧分压低的组织（肌肉）输送和转移。

5. 蛋白质的理化性质与分离纯化

5.1 蛋白质的理化性质

(1) 形态与分子量

球状、杆状、纤维状，分子量5000以上至数百万

(2) 等电点

等电点时，蛋白质通常有低的溶解度

(3) 胶体特性

中性盐、有机溶剂可以破坏蛋白质胶粒的水化膜，引起沉淀

5.2 蛋白质的分离纯化

(1) 材料来源

来源方便、含量丰富、容易提取、防止变性

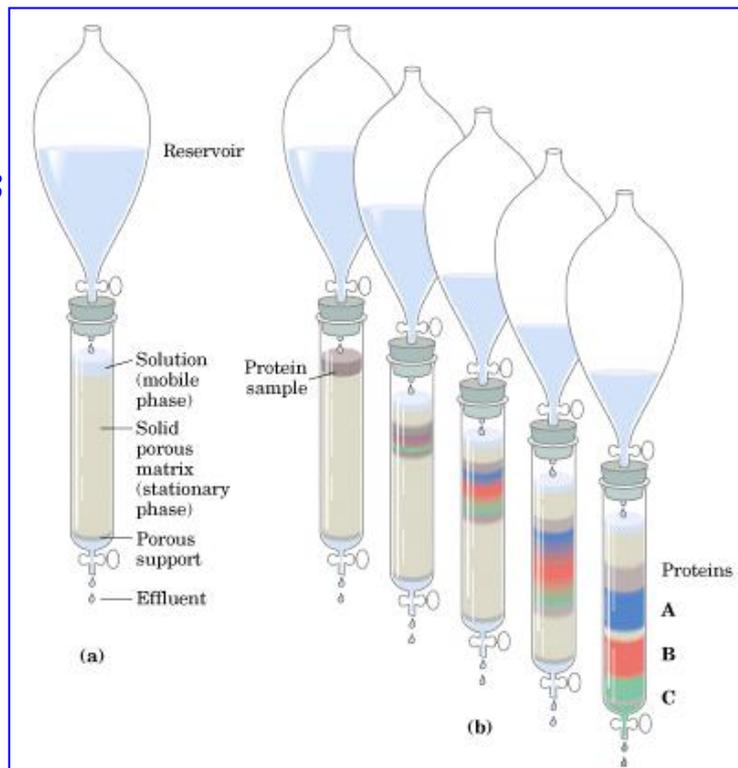
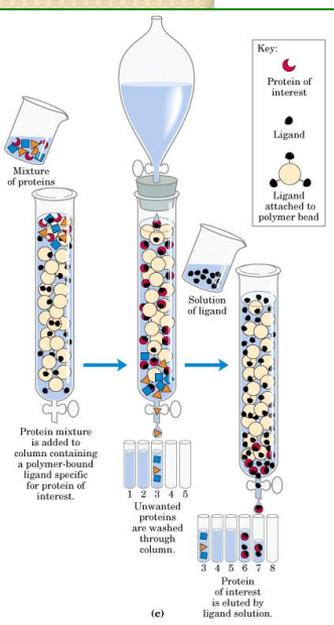
(2) 分离的一般原则

利用分子大小，如分子筛凝胶过滤；

利用电离性质，如电泳；

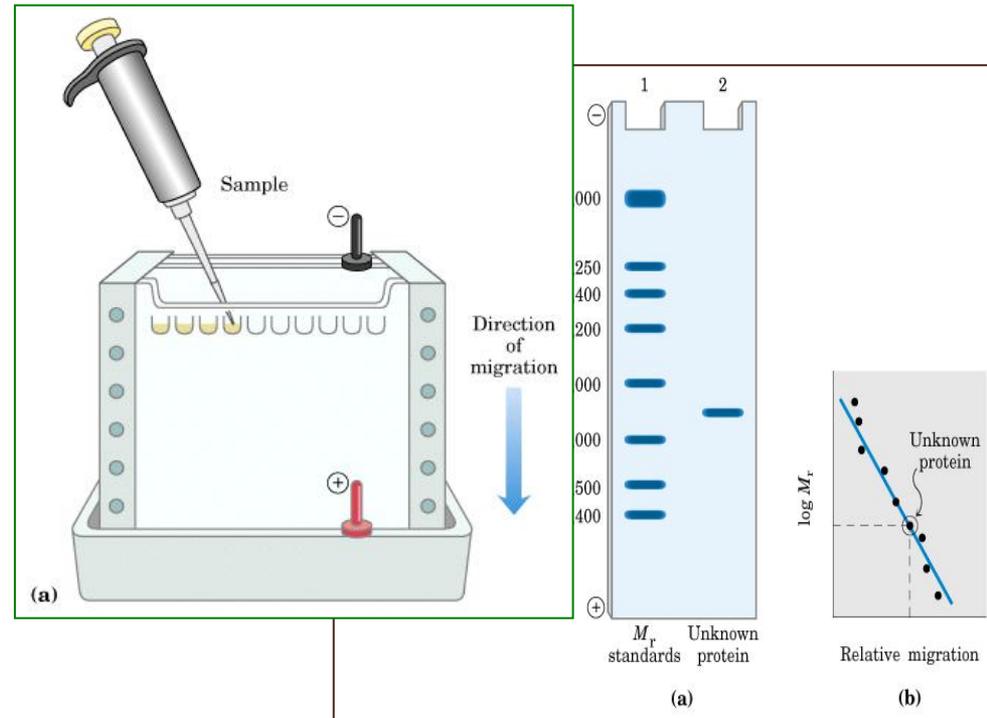
利用溶解性，如等电点；

利用生物学特性，如亲和层析等



(3) 纯化鉴定

氨基酸组成分析、末端分析、
色谱分析、电泳分析、等电聚
焦分析、免疫化学分析



(4) 序列测定

确定肽链的氨基酸组成、末端和S-S键数目

专一地酶解大的多肽成为较小的片段

蛋白质序列仪

应用肽段序列重叠法确定氨基酸的排序

确定S-S键的位置

蛋白质化学

(1) 通论

基本要求：了解蛋白质的概念、化学组成与分类；掌握其氮含量特点、理解蛋白质功能的多样性。

(2) 蛋白质的基本组成单位-----氨基酸

基本要求：了解蛋白质的水解；熟练掌握蛋白质中含有的氨基酸的结构特点、氨基酸的三字母符号；了解氨基酸的分类方法；掌握氨基酸的主要化学性质（ α -氨基参与的反应、茚三酮反应）、掌握氨基酸的两性解离、等电点及等电点 pI 与解离基团 pK 值的关系；

(3) 蛋白质的一级结构

基本要求：掌握蛋白质的一级结构、肽键、活性肽的概念；熟练掌握谷胱甘肽的结构特点及生物学功能；了解蛋白质一级结构的测定步骤、能够据已知条件推断蛋白质一级结构序列；理解蛋白质氨基酸顺序与生物功能的关系。

(4) 蛋白质的空间结构:

基本要求: 熟练掌握二级、三级、四级结构、超二级结构和结构域的概念以及稳定蛋白质三维结构的作用力; 掌握 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等基本构象单元的结构特点及主要参数。

(5) 蛋白质结构与功能的关系

基本要求: 熟悉蛋白质一级结构与空间结构的关系, 熟练掌握肌红蛋白和血红蛋白的结构与功能; 能够举例说明蛋白质的结构与功能的关系。

(6) 蛋白质的分离、提纯与鉴定

基本要求: 掌握蛋白质的两性解离、等电点、胶体性质; 熟练掌握蛋白质的变性作用及沉淀作用; 了解蛋白质分子的大小与形状、蛋白质分离纯化的一般原则; 掌握几种(凝胶过滤层析、离子交换层析、盐析等)分离纯化蛋白质的方法与原理; 了解蛋白质的含量测定与纯度鉴定的几种方法。