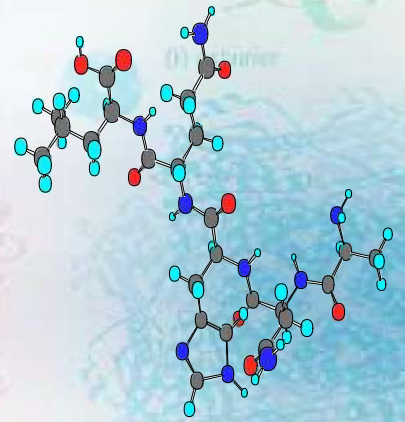


第3章 蛋白质的共价结构

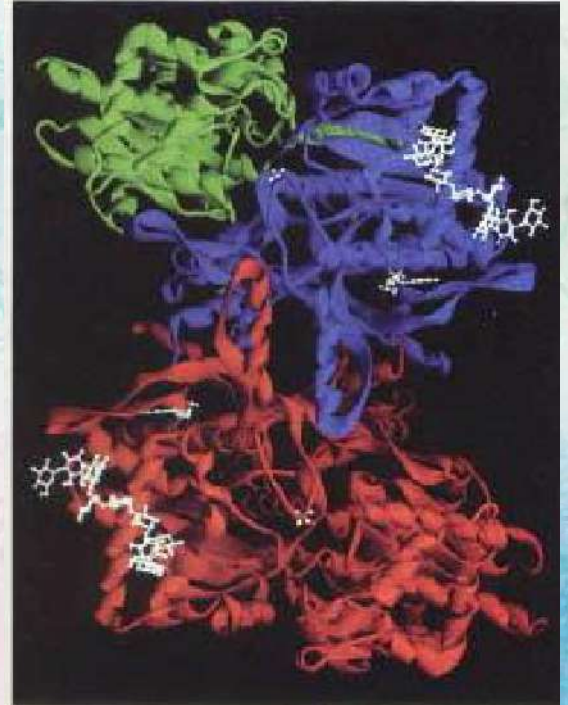
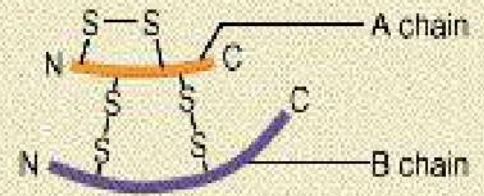
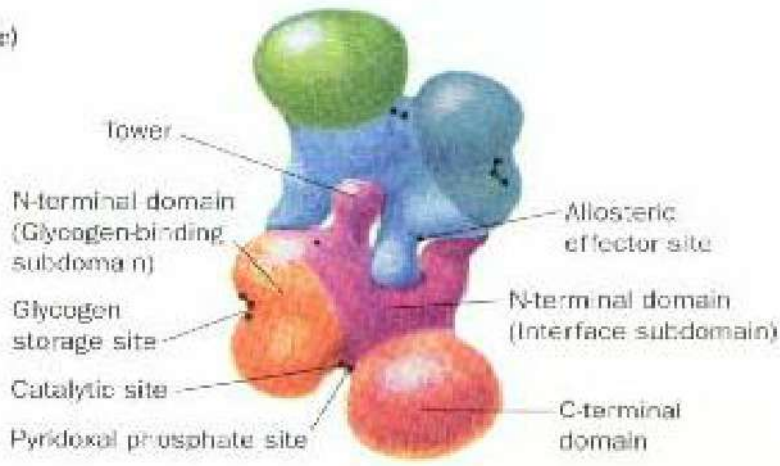




一、蛋白质的大小与分子量

- 蛋白质是分子量很大的生物分子
- 对任一种给定的蛋白质，其所有分子在AA组成和顺序以及肽链的长度方面都应是相同的，即所谓均一的蛋白质。

(e)



蛋白质——月示——胨——多肽——肽——AA
1*10⁴ 5*10³ 2*10³ 1000 200 100
-500

- 蛋白质与多肽无严格的界线
——通常将6000Dr以上的多肽称为蛋白质。
- 蛋白质分子量变化范围很大



二、蛋白质构象和结构的组织层次

蛋白质的结构层次

一级结构

二级结构

超二级结构

结构域

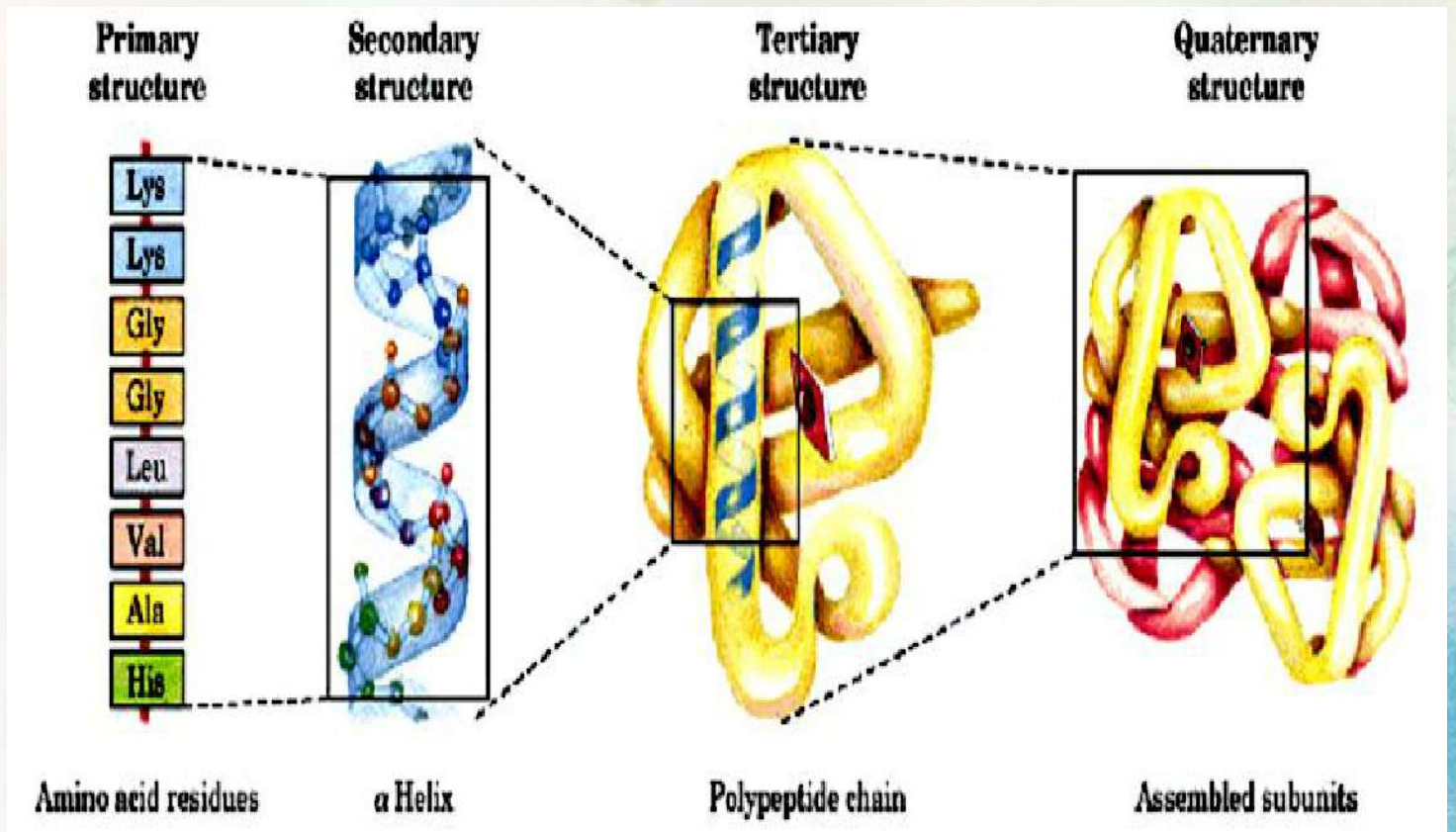
三级结构

四级结构

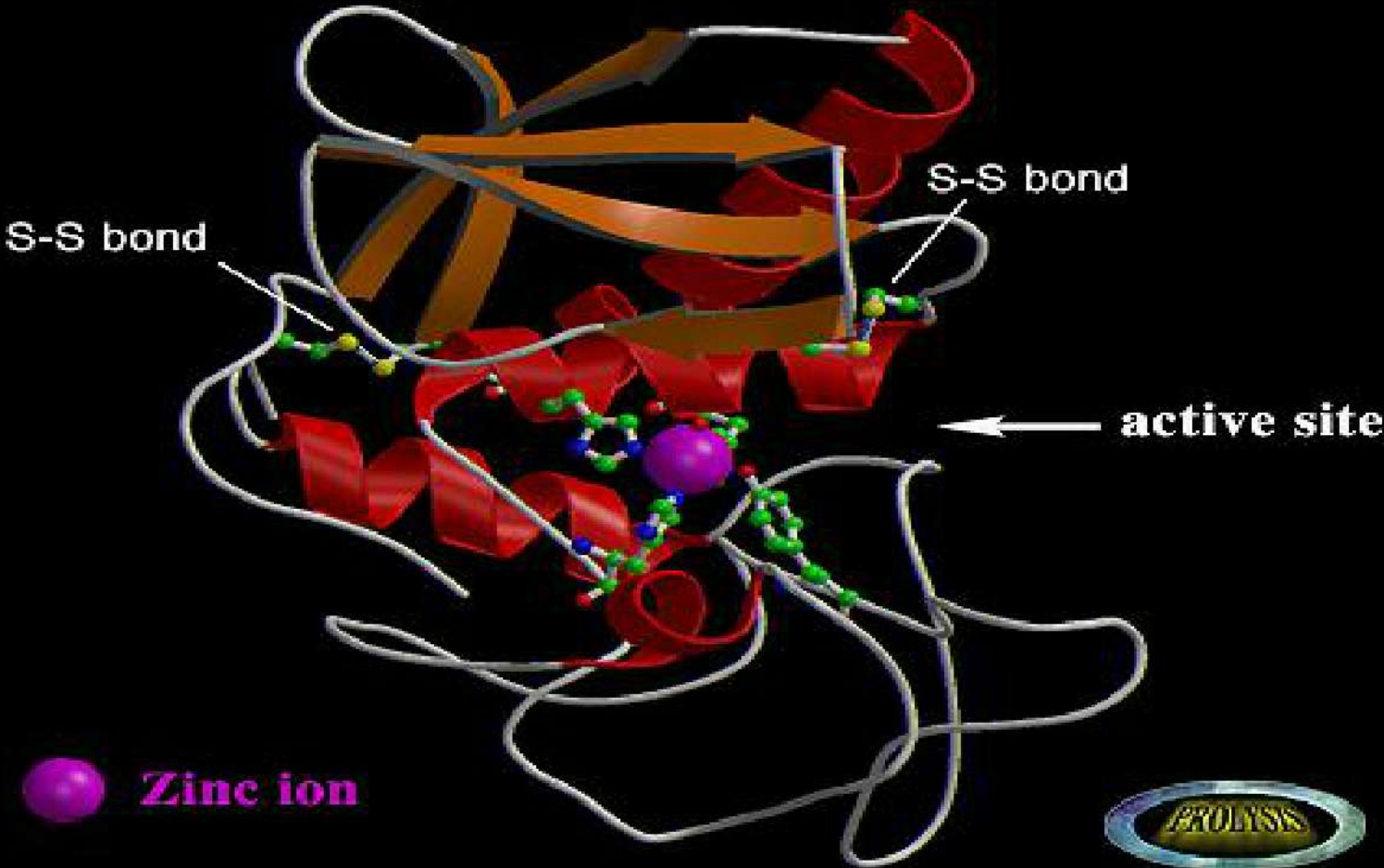
高级结构

空间构象

一级结构→二级结构→超二级结构→结构域→三级结构→亚基→四级结构



Astacin





active site

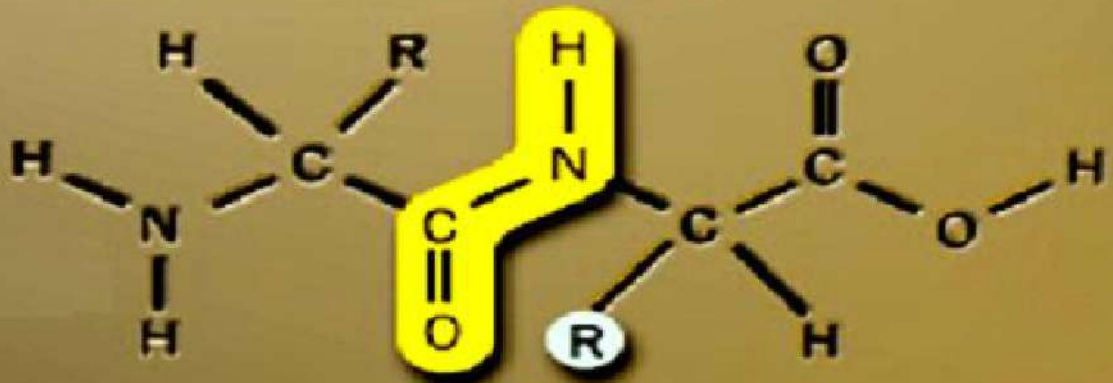
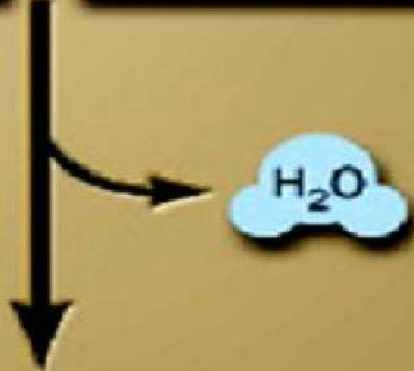
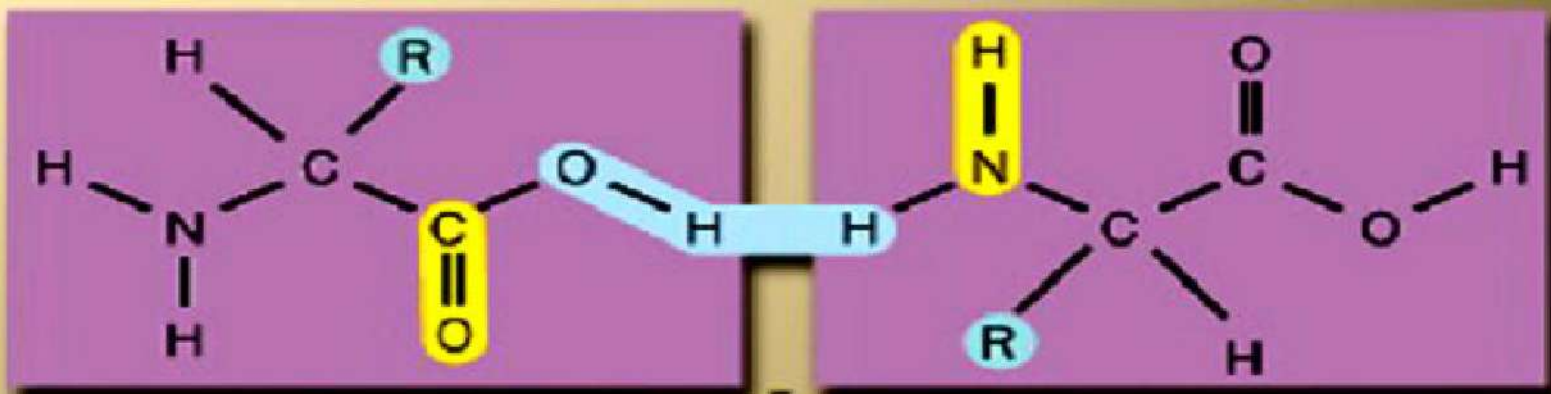
occluding loop



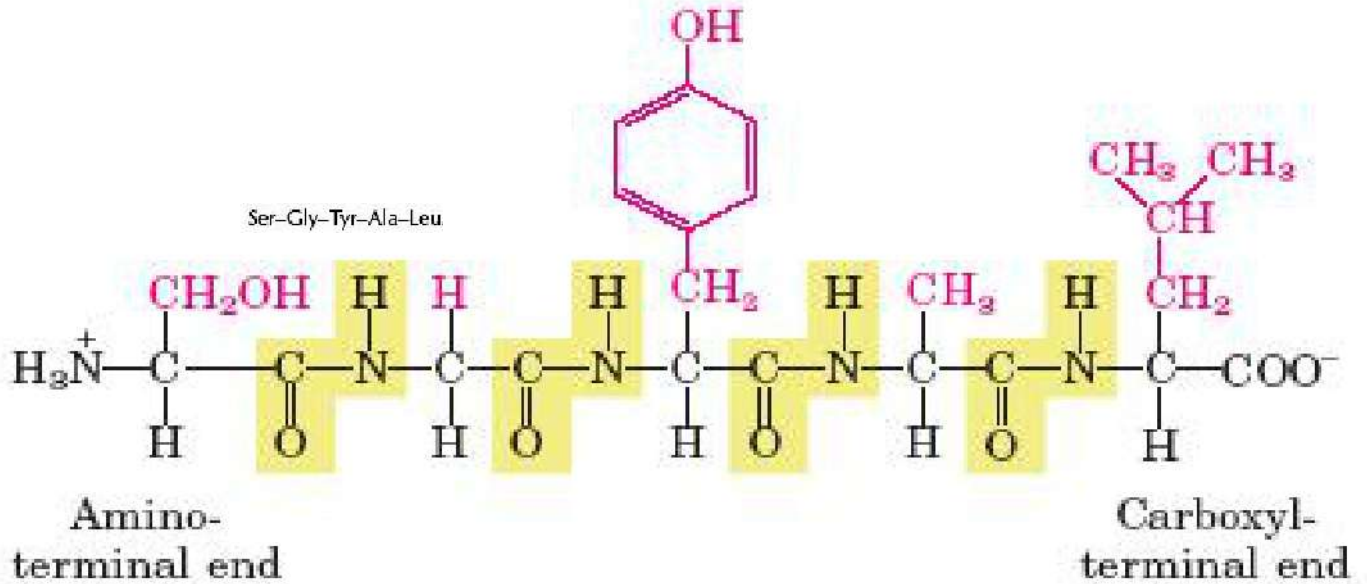
Papain

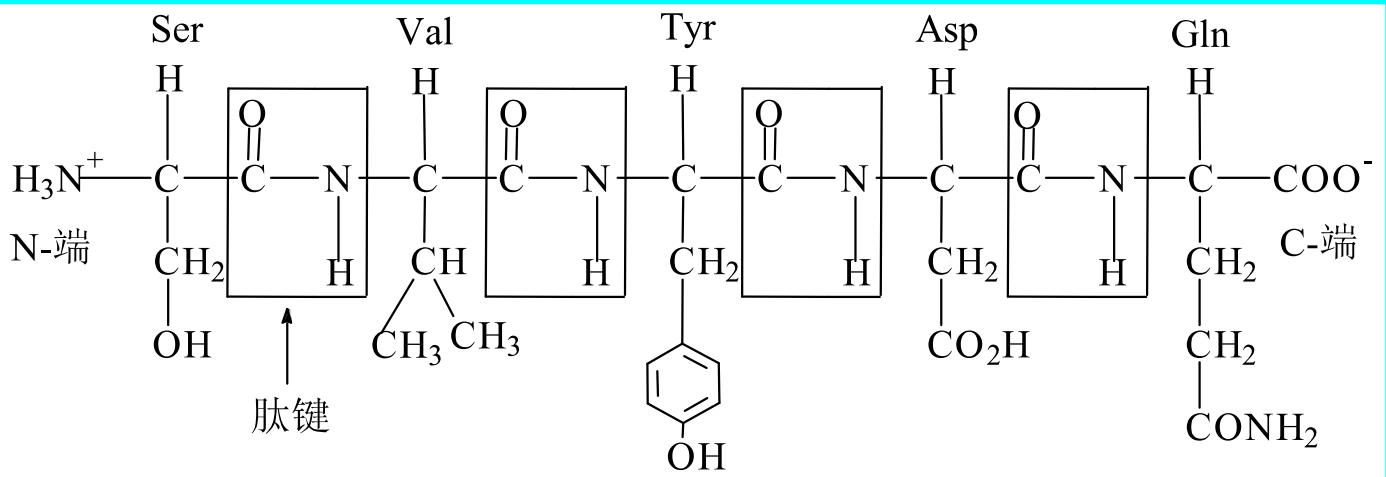


Cathepsin B



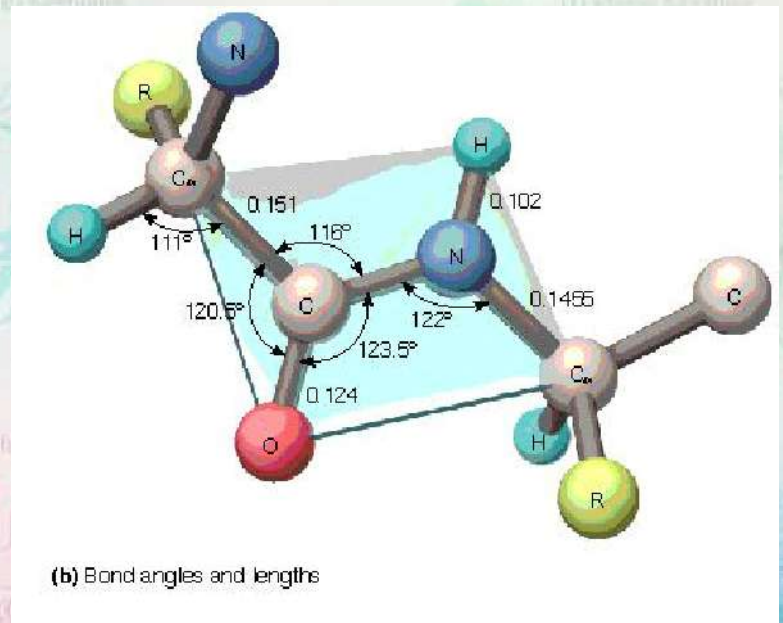
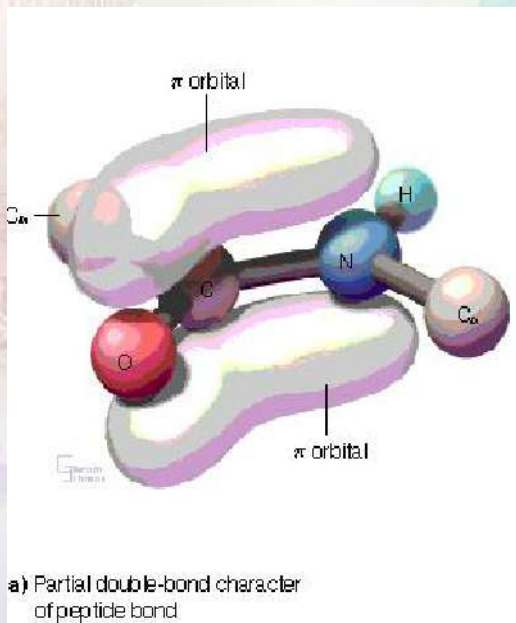
- 由两个AA组成的肽称为二肽。
- 由多个AA组成的肽则称为多肽。
- 组成多肽的AA单元称为氨基酸残基。





- 多肽链中AA残基按一定顺序排列：氨基酸顺序
- 含游离 α -氨基的一端：氨基端或N-端
- 含游离 α -羧基的一端：羧基端或C-端
- AA顺序是从N-端开始以C-端氨基酸残基为终点
如上述五肽：Ser-Val-Tyr-Asp-Gln

(一)、肽和肽键的结构



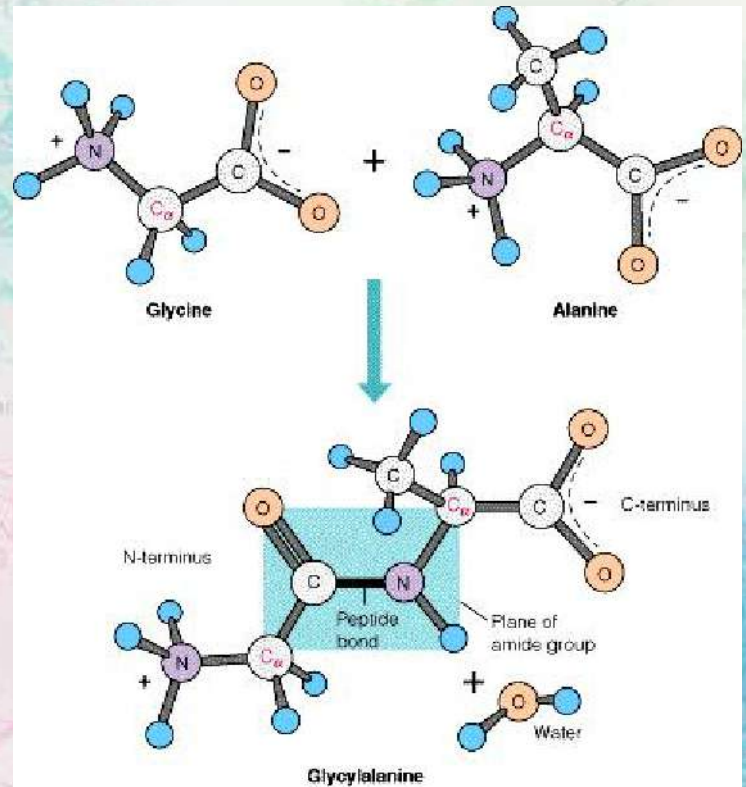
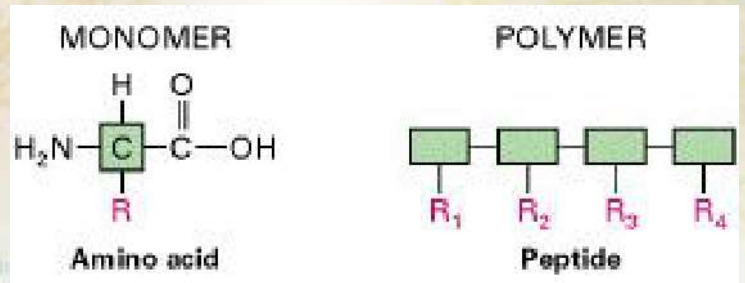
① 肽键中C-N键有部分双键性质

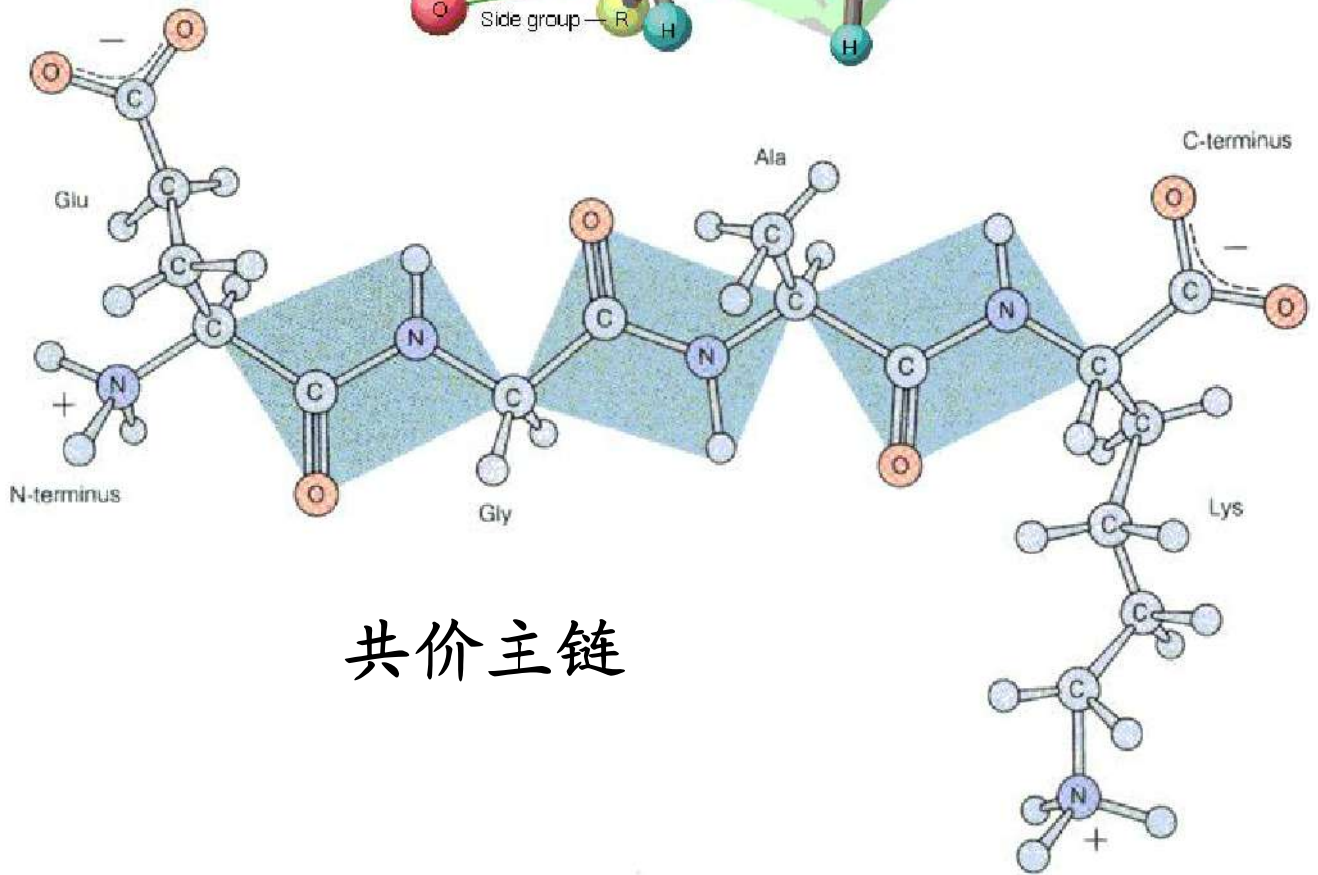
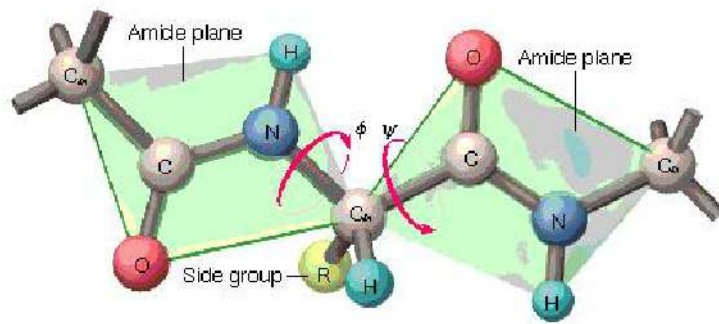
——不能自由旋转

② 组成肽键原子处于同一平面（肽平面）

③ 键长及键角一定

④ 大多数情况以反式结构存在





共价主链

(二)、肽的物理化学性质



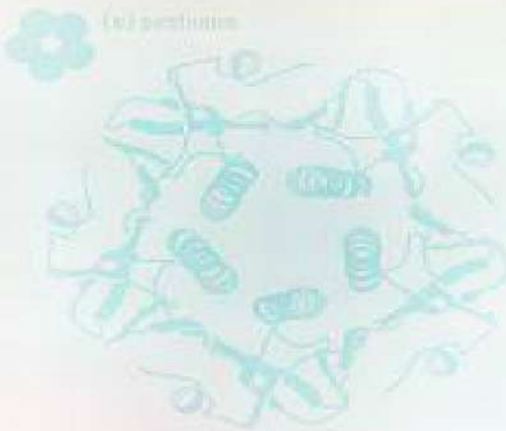
- 肽末端 α -羧基 pK_a 值比游离 AA 中的大。
肽末端 α -氨基 pK_a 值比游离 AA 中的小。
- 等电点 (两性)。
- 酸碱性质取决于：
 - α -羧基、 α -氨基、侧链基团的解离
- 具有双缩脲反应——Pr 特有的反应。

(三)、天然存在的重要多肽

(I) Insulin



(II) Penicillin



(III) albumin



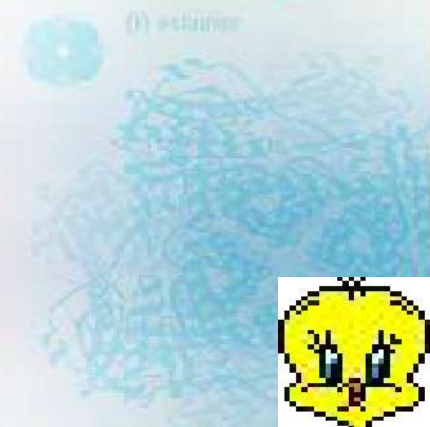
(IV) haemoglobin (tetramer of dimers)

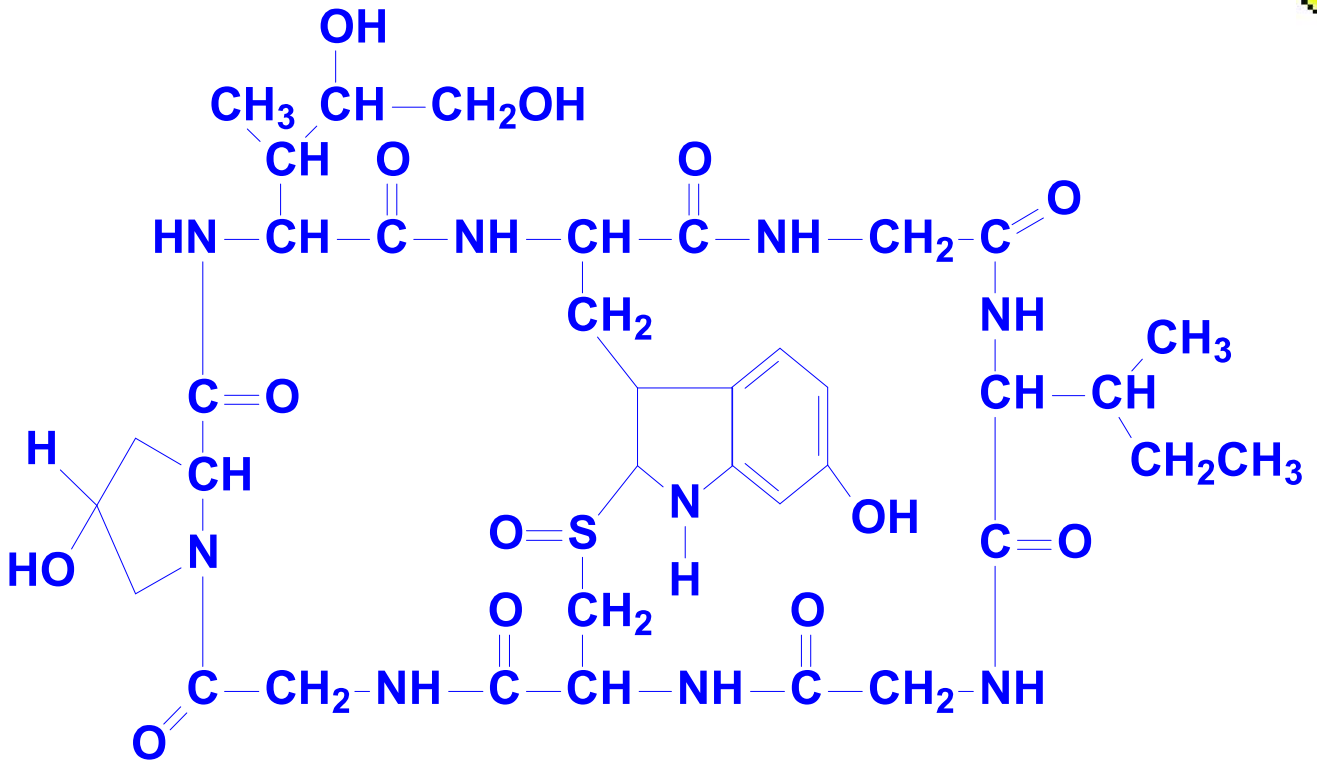


(V) myoglobin

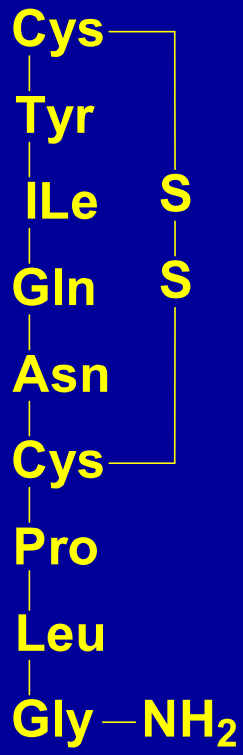


(VI) actin

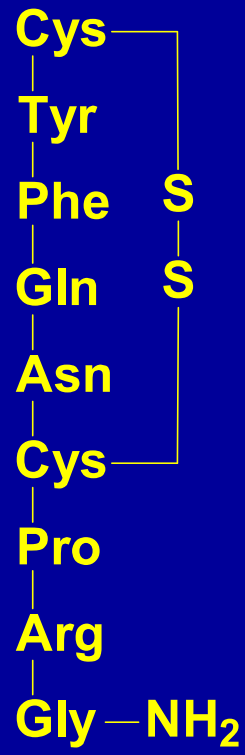




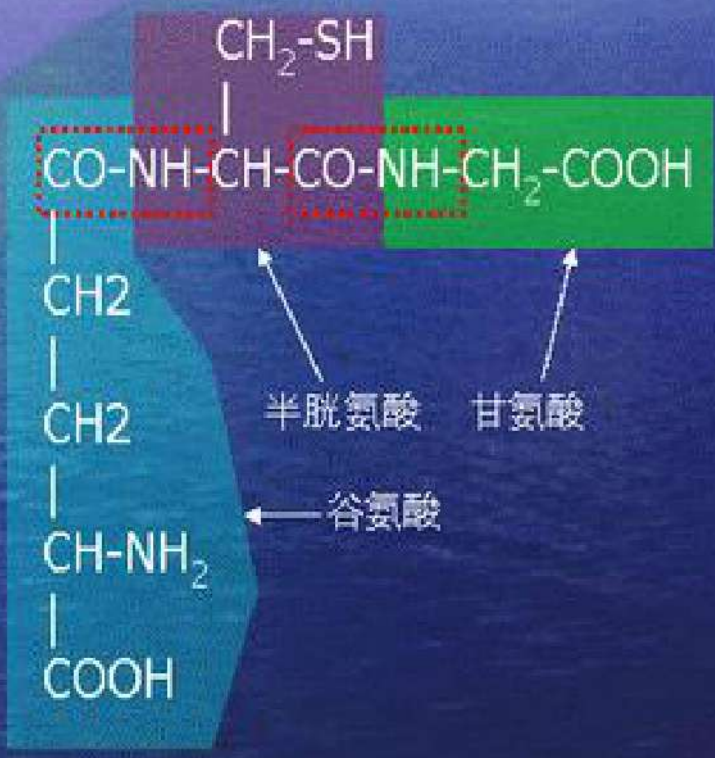
鹅膏覃碱的化学结构



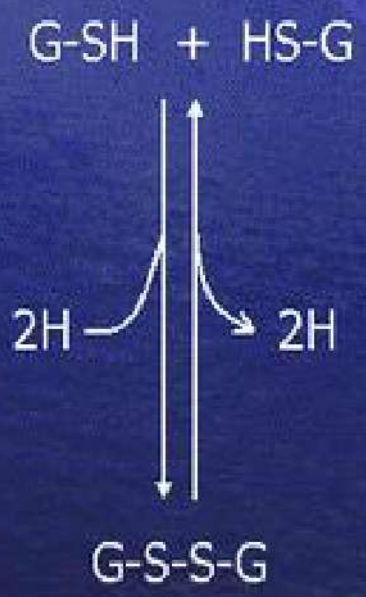
牛催产素



牛加压素



半胱氨酸 甘氨酸
 谷氨酸



谷胱甘肽G-SH
 细胞内重要的还原剂

四、蛋白质一级结构的测定

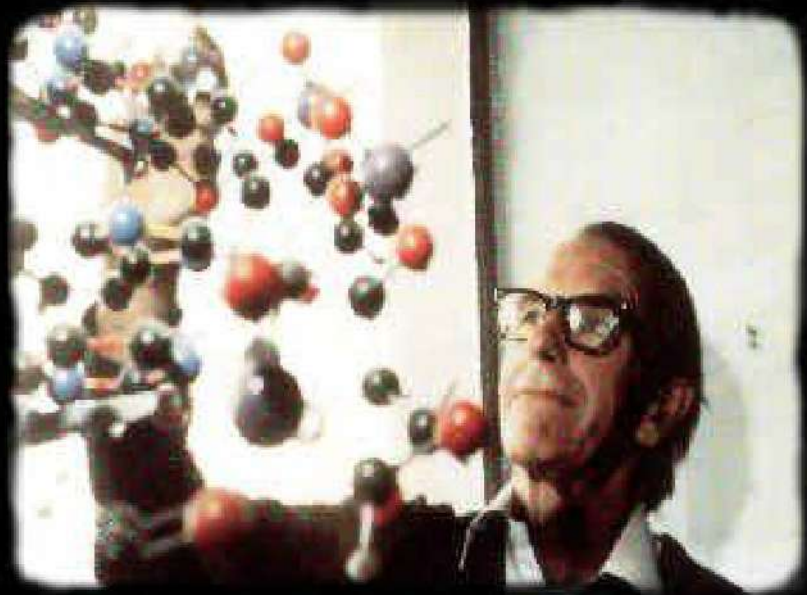
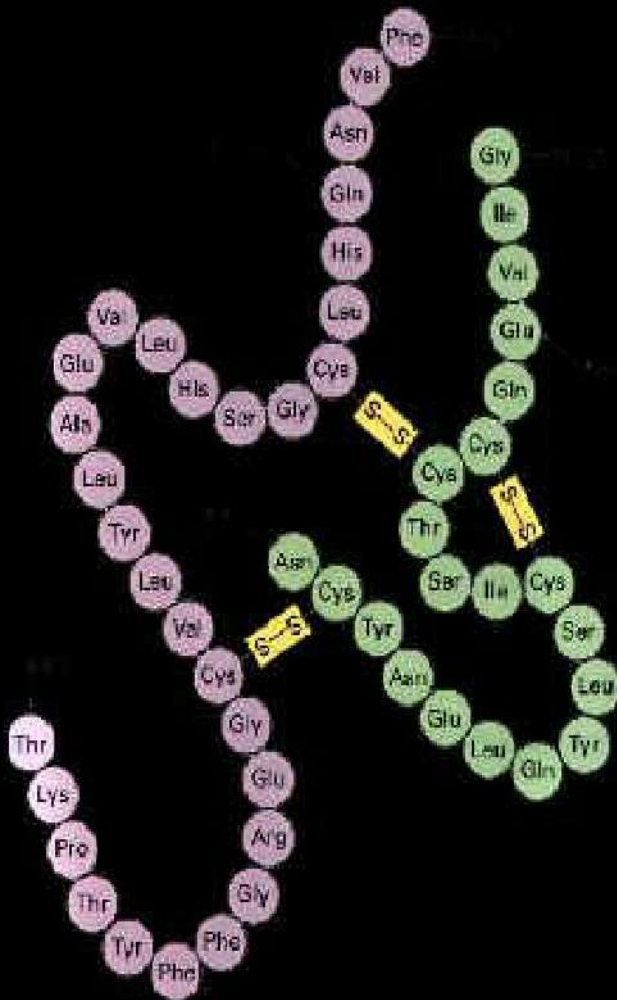
什么是Pr的一级结构？

蛋白质中氨基酸的排列顺序。



F. Sanger (Cambridge U.) 定序

Insulin 胰島素 (A, B chains)



Dame et al (1990) *Molecular Cell Biology* (2e) p.53, Fig. 2-12

Nelson & Cox (2000) *Principles of Biochemistry* (3e) p.142

😊 前提

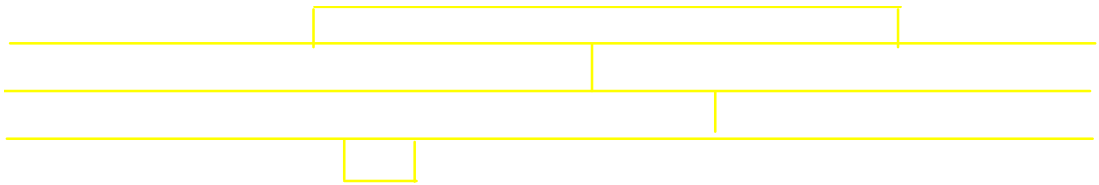
- 1. 样品必需纯 (>97%以上)
- 2. 知道蛋白质的分子量
- 3. 知道蛋白质由几个亚基组成
- 4. 测定蛋白质的AA组成并根据分子量
计算每种AA的个数
- 5. 测定水解液中的氨量计算酰胺的含量

(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(1) 测定蛋白质分子中多肽链的数目

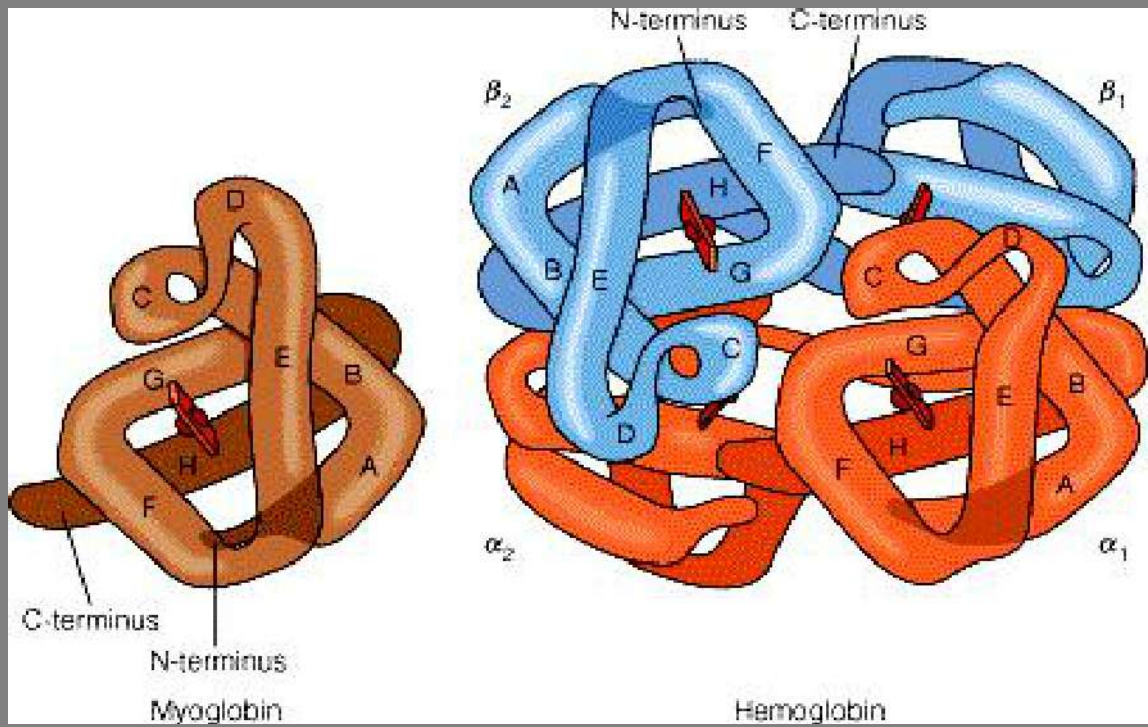
- 通过测定末端氨基酸残基的摩尔数与蛋白质分子量之间的关系，即可确定多肽链的数目。



(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(2) 多肽链的拆分



(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

- 几条多肽链借助非共价键连接在一起，称为寡聚蛋白质，血红蛋白为四聚体，烯醇化酶为二聚体。
- 可用8mol/L尿素或6mol/L盐酸胍处理，即可分开多肽链(亚基)。

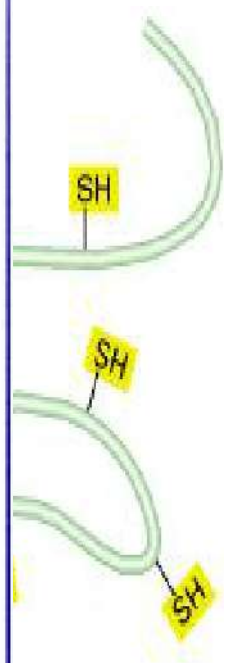
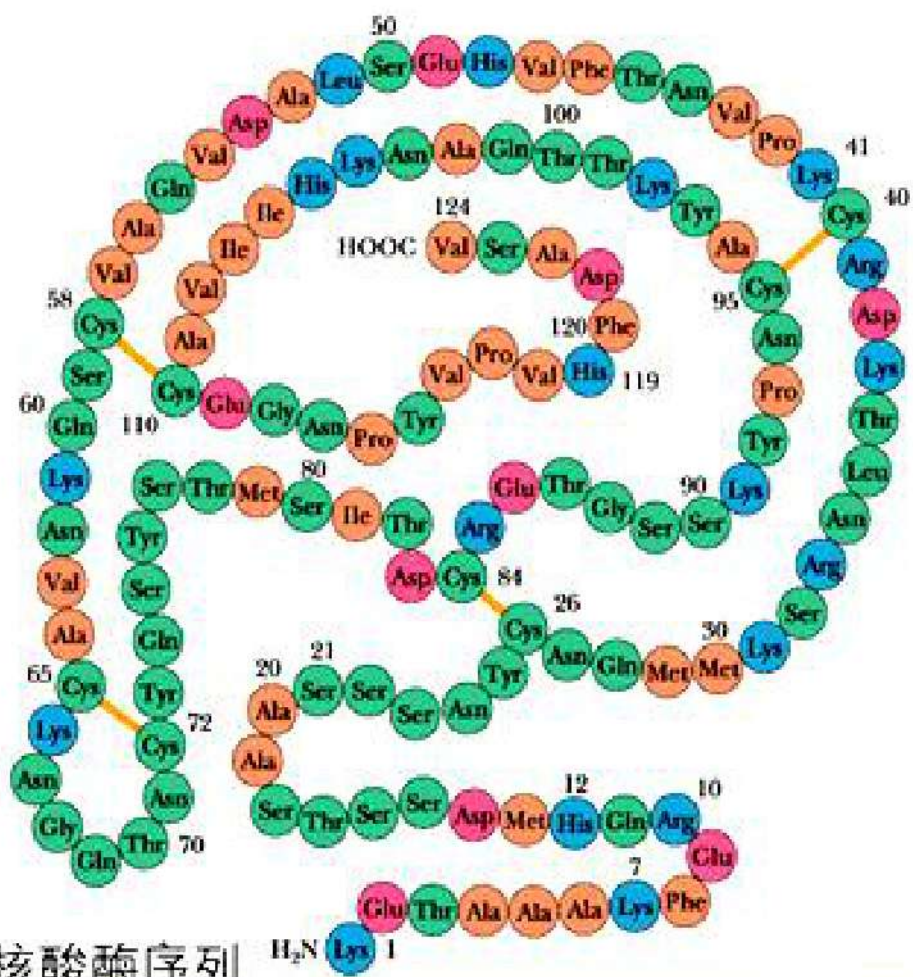
(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(3) 断开二硫键

- 在8mol/L尿素或6mol/L盐酸胍存在下，用过量的 β -巯基乙醇处理，使二硫键还原为巯基，然后用烷基化试剂保护生成的巯基，防止重新被氧化。



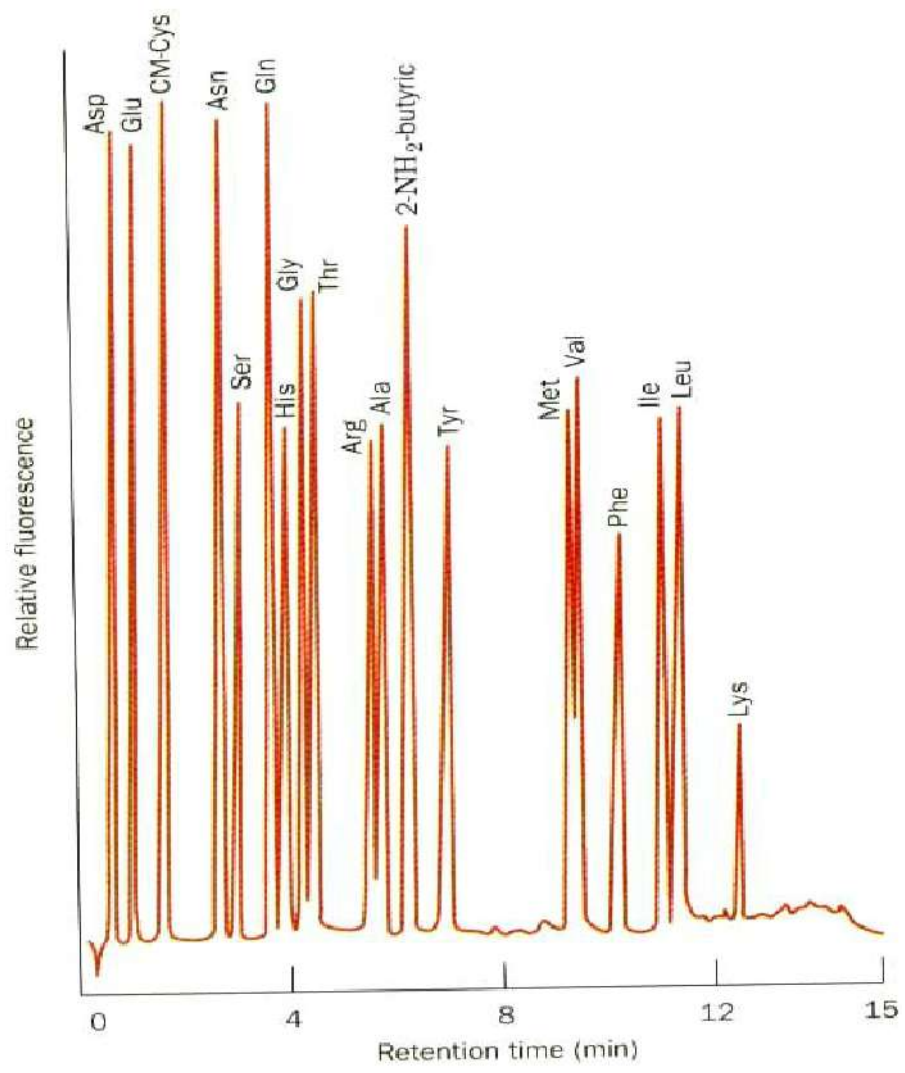


核糖核酸酶序列

(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(4) 测定每条多肽链的AA组成，并计算出AA成分的分子比



(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(5) 分析多肽链的N-末端和C-末端



(6) 多肽链断裂成多个肽段

- 采用两/多种不同的断裂方法将多肽断裂成两套或多套肽段，并将其分离。



(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(7) 测定每个肽段的氨基酸顺序



(8) 确定肽段在多肽链中的次序

利用两/多套肽段的AA顺序彼此间的交错重叠，拼凑出整条多肽链的AA顺序。



(一)、蛋白质测序策略

蛋白质一级结构的测定

(9) 确定原多肽链中二硫键的位置。



(二)、末端氨基酸残基测定

- 两类多肽链末端氨基酸残基:

N-端氨基酸

C-端氨基酸

- 在肽链氨基酸顺序分析中，最重要的是N-端氨基酸分析法。

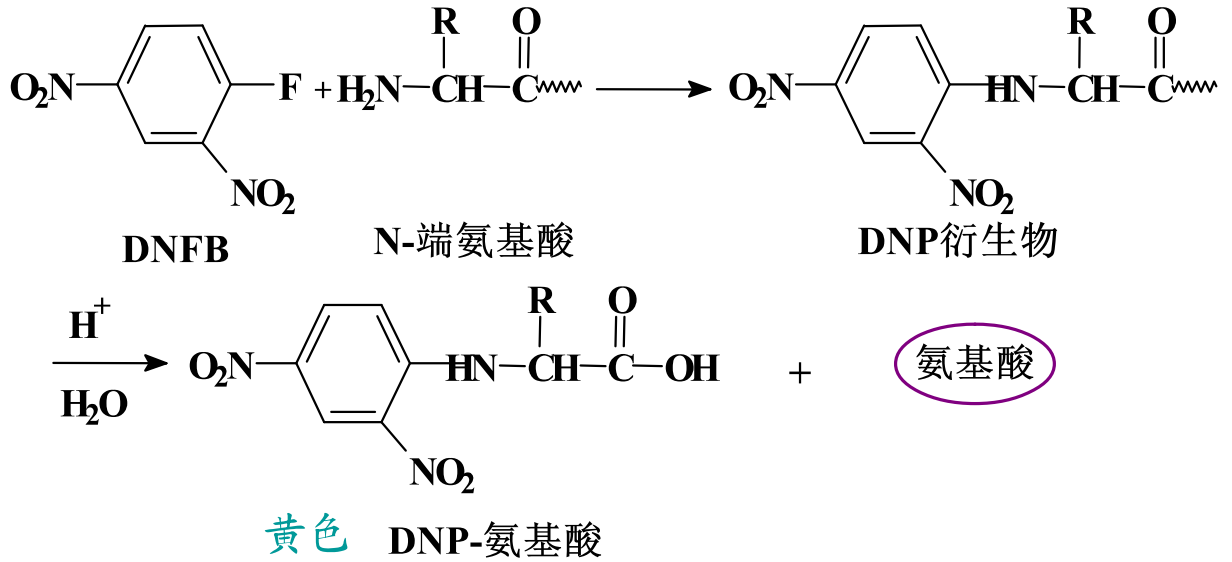


(二)、末端氨基酸残基的鉴定

① 二硝基氟苯 (DNFB) 法

• Sanger法

二硝基苯衍生物



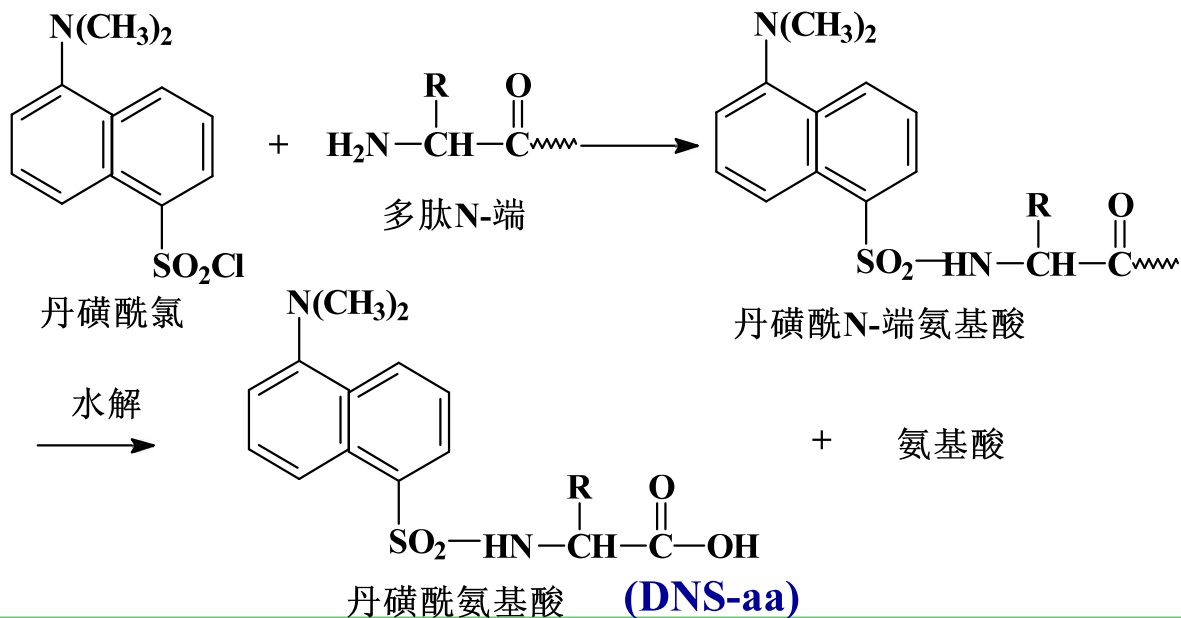
1、N
末端
分析

(二)、末端氨基酸残基的鉴定

② 丹磺酰氯 (DNS) 法

- 二甲氨基萘磺酰-AA有强荧光，检测灵敏度高

1. N末端分析

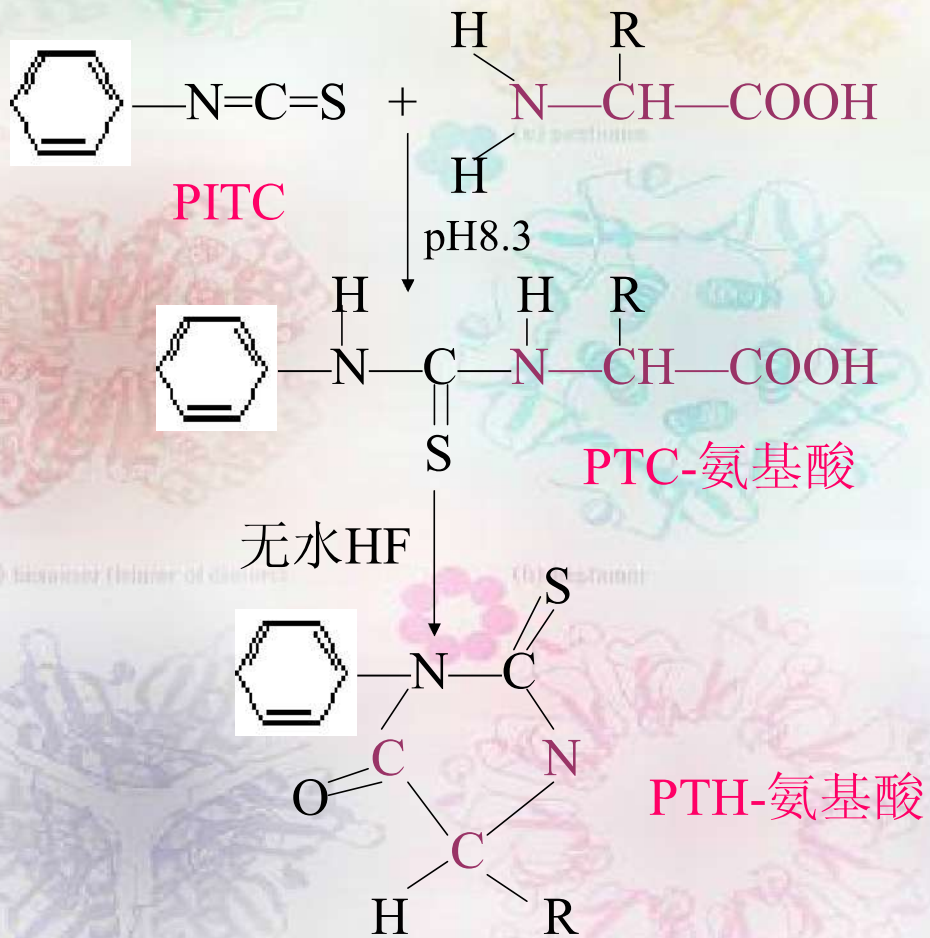


(二)、末端氨基酸残基的鉴定

③ 苯异硫氰酸酯 (PITC) 法

1. N 末端分析

苯异硫氰酸酯PITC



(二)、末端氨基酸残基的鉴定

④ 氨肽酶法

1. N 末端分析

- 肽链外切酶: 从多肽链N-端逐个向里水解
- 根据不同反应时间测出释放的AA种类和数量,
按反应时间和AA残基释放量作动力学曲线
——→ 蛋白质N-末端残基顺序。
- 最常用的氨肽酶是亮氨酸氨肽酶
——水解以Leu残基为N-末端的肽键速度最大。

(二)、末端氨基酸残基的鉴定

① 胍解法

- 胍化物可与苯甲醛缩合成不溶于水的物质

2、C
末端分析

(二)、末端氨基酸残基的鉴定

② 还原法

2、C
末端分析



(二)、末端氨基酸残基的鉴定

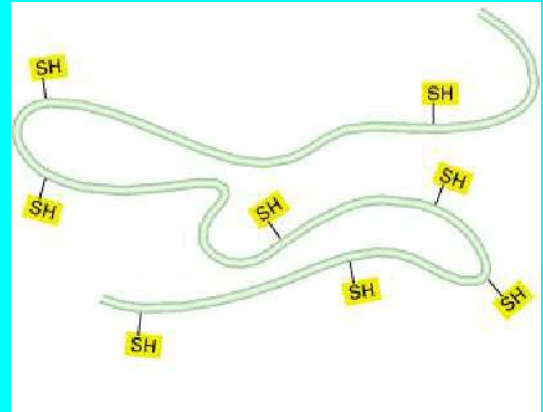
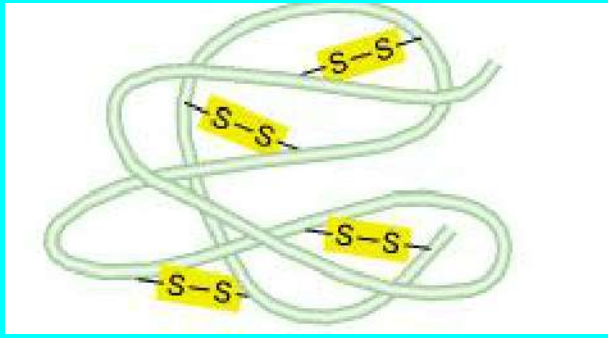
③羧肽酶法

2、C 末端分析

- 肽链外切酶: 从多肽链C-端逐个水解
- 根据不同反应时间释放出的AA种类和数量
——→ 蛋白质C-末端残基顺序。
- 四种羧肽酶: A, B, C和Y;
A和B(胰脏)、C(柑桔叶)、Y(面包酵母)
- ∞ A: 除Pro/Arg/Lys/外所有C-末端AA残基
∞ B: 只水解Arg和Lys为C-末端残基的肽键

(三)、二硫键的断裂

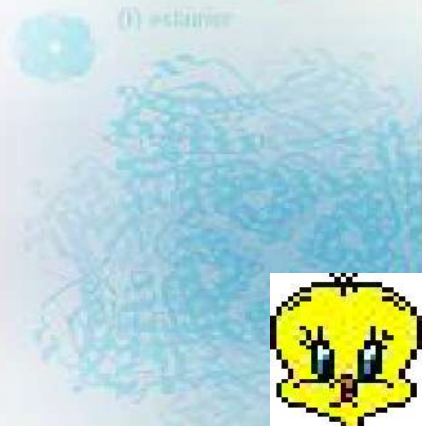
- 盐酸胍/尿素解离多肽链间的非共价力。
- 应用过甲酸氧化法或巯基还原法拆分多肽链间的二硫键。



(四)、氨基酸组成的分析

1、酸水解

2、碱水解



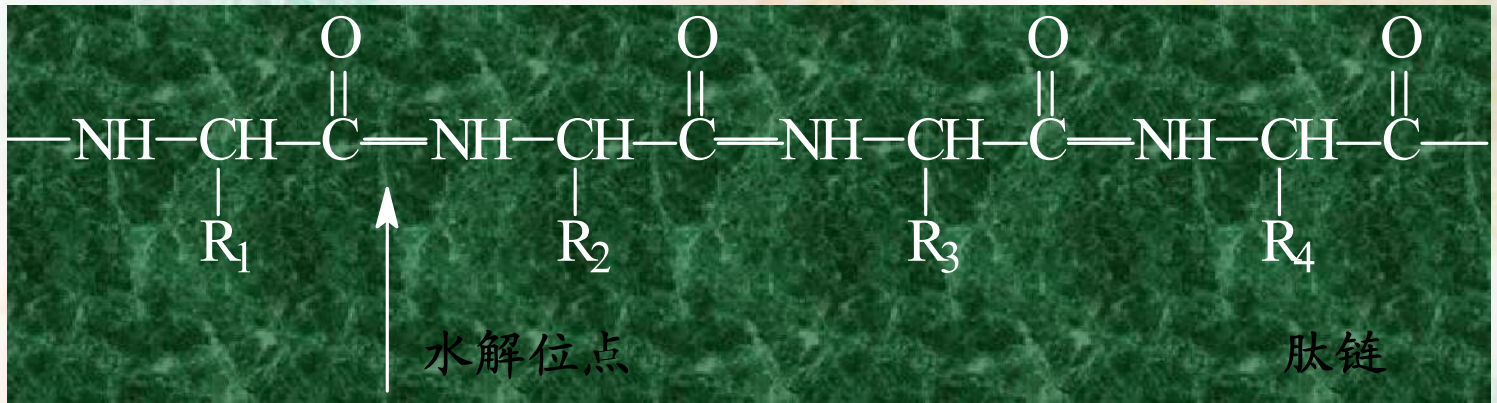
(五)、多肽链的部分裂解和肽段混合物的分离纯化

多肽链的选择性降解

1、酶解法:

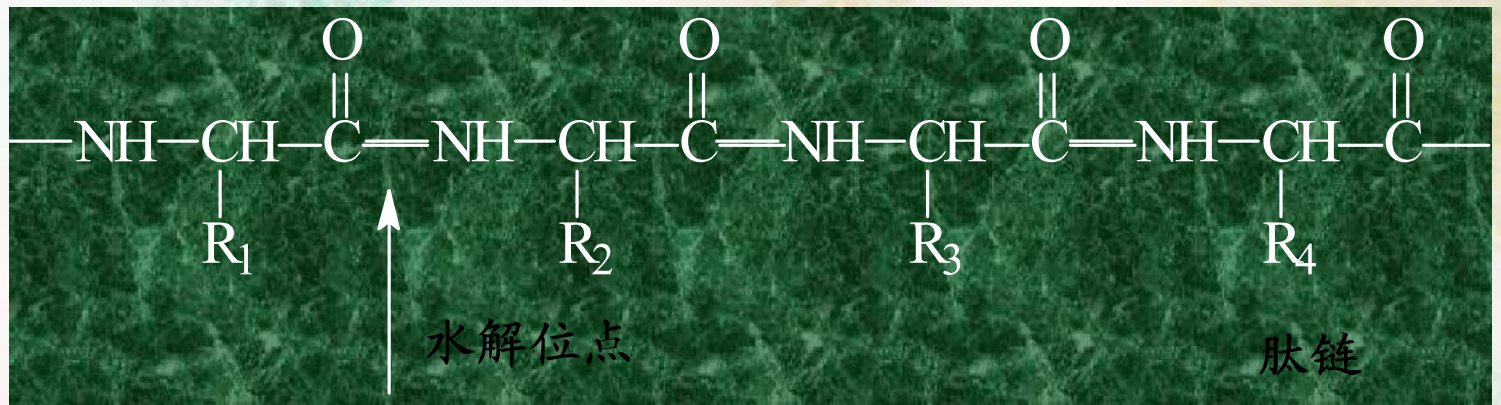
- 内切酶: 胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶、嗜热菌蛋白酶
- 外切酶: 羧肽酶和氨肽酶





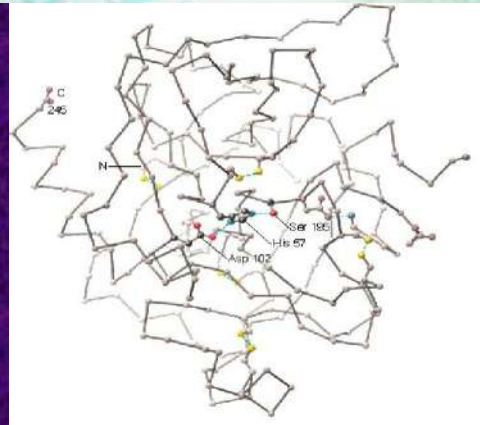
胰蛋白酶trypsin

- $R_1 = \text{Lys (K)}$ 和 Arg (R)
- 专一性较强，水解速度快
- $R_2 = \text{Pro}$ (抑制)



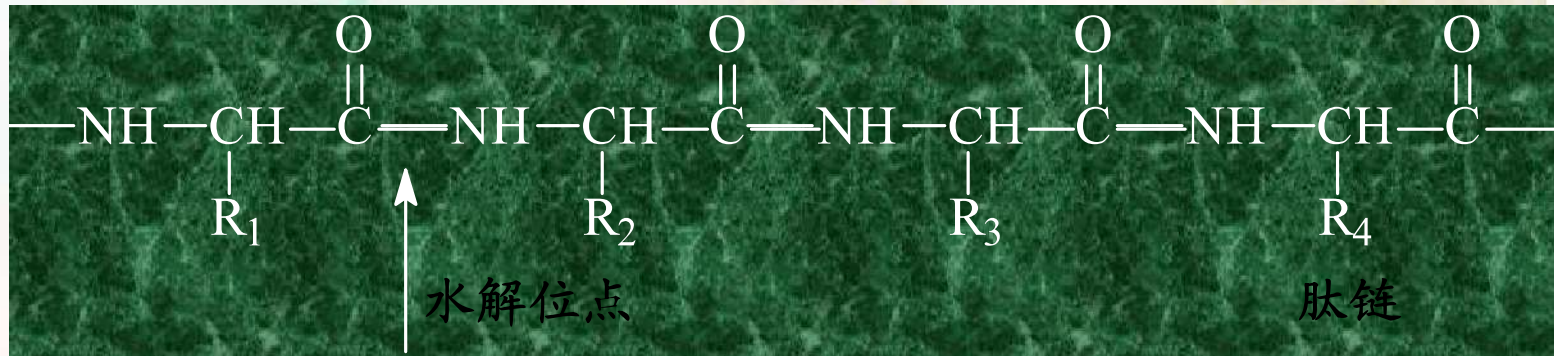
糜蛋白酶/胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)

- R1=Phe (F)、Trp (W)
Tyr (Y) 等疏水性AA
- Leu、Met和His稍慢
- R2=Pro (抑制)
- pH8-9



水解速度与相邻AA性质有关：酸性：- / 碱性：+

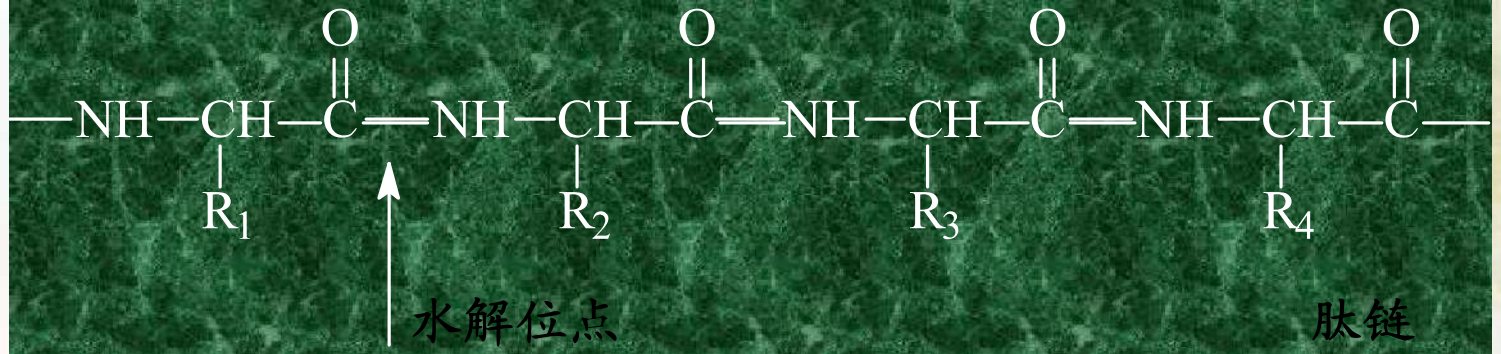




嗜热菌蛋白酶 (thermolysin)

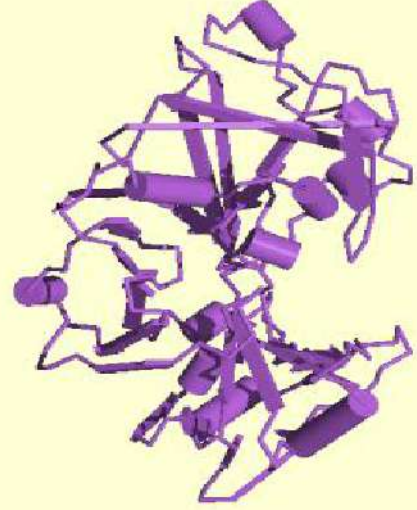
- $R_2 = \text{Phe (F)}$ 、 Trp (W) 、 Tyr (Y) 、 Leu (L) 、 Ile (I) 、 Met (M) 、 Val (V) 及其它疏水性强的AA水解速度较快

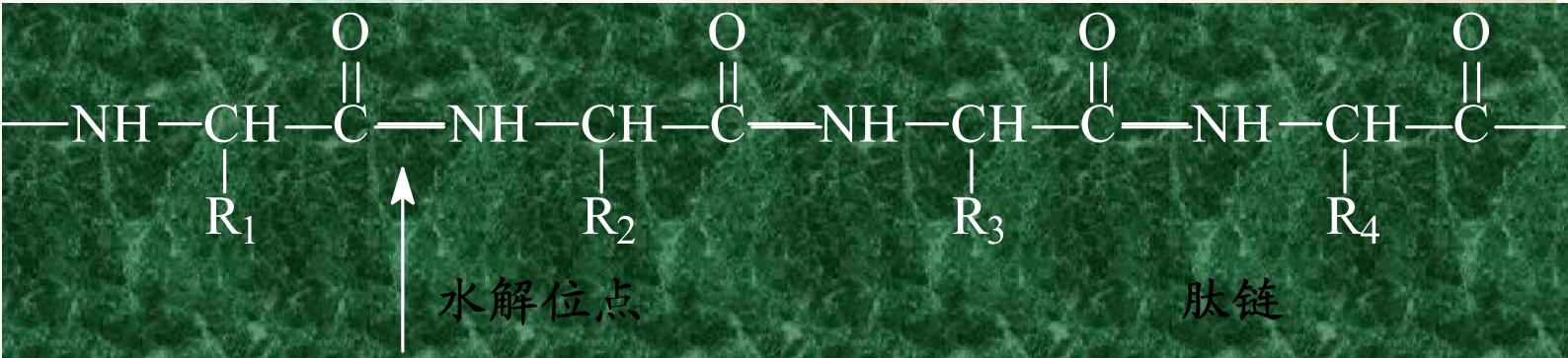
$R_2 = \text{Pro}$ 或 Gly ，不水解
 R_1 或 $R_3 = \text{Pro}$ ，抑制水解



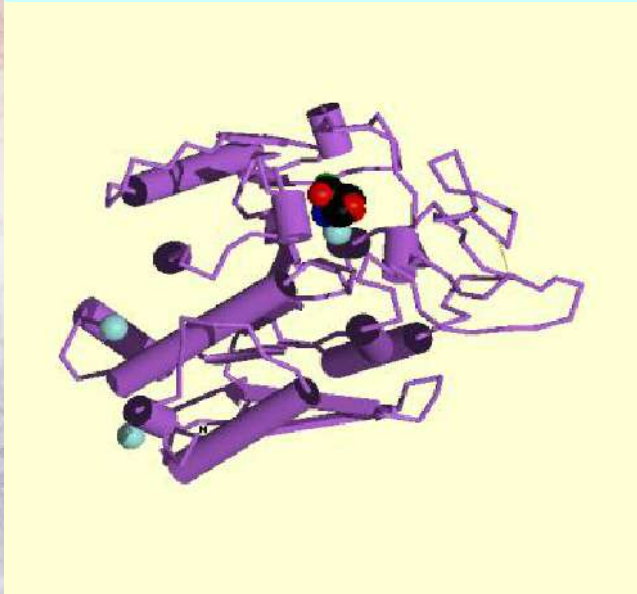
胃蛋白酶Pepsin

- R1和/或R2 = Phe (F)、Trp (W)、Tyr (Y)、Leu (L) 及其它疏水性AA水解速度较快
- R1=Pro (抑制)
- pH2





羧肽酶和氨肽酶



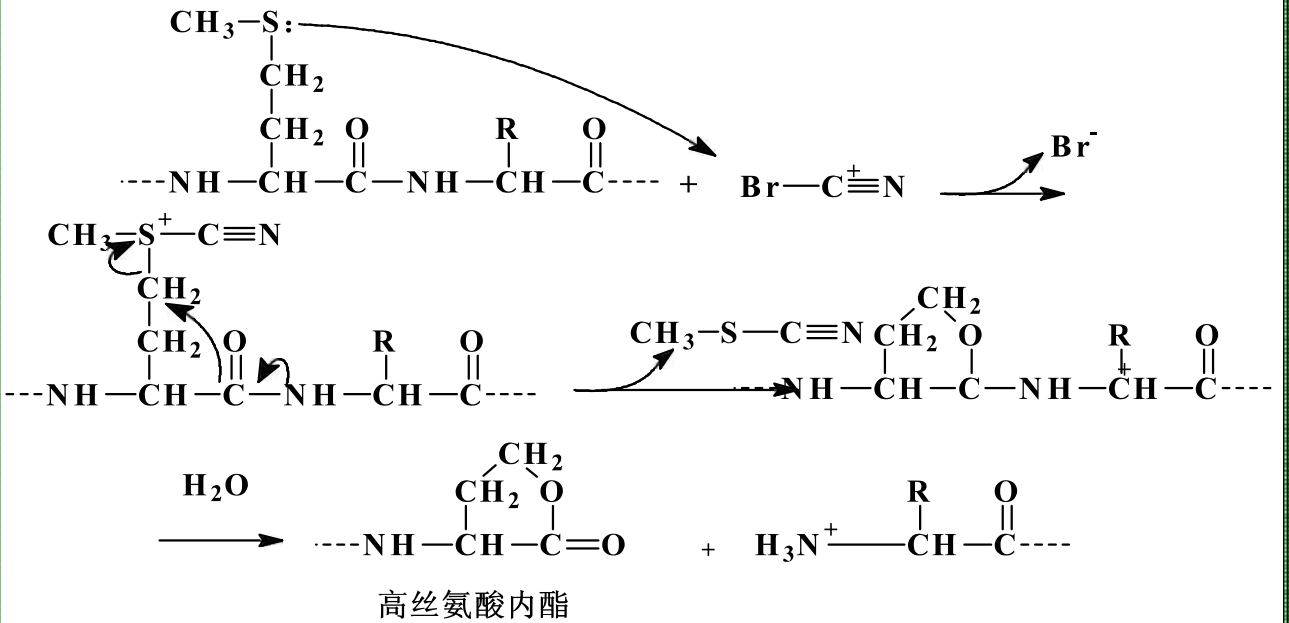
(五)、多肽链的部分裂解和肽段混合物的分离纯化

多肽链的选择性降解

2、化学裂解法

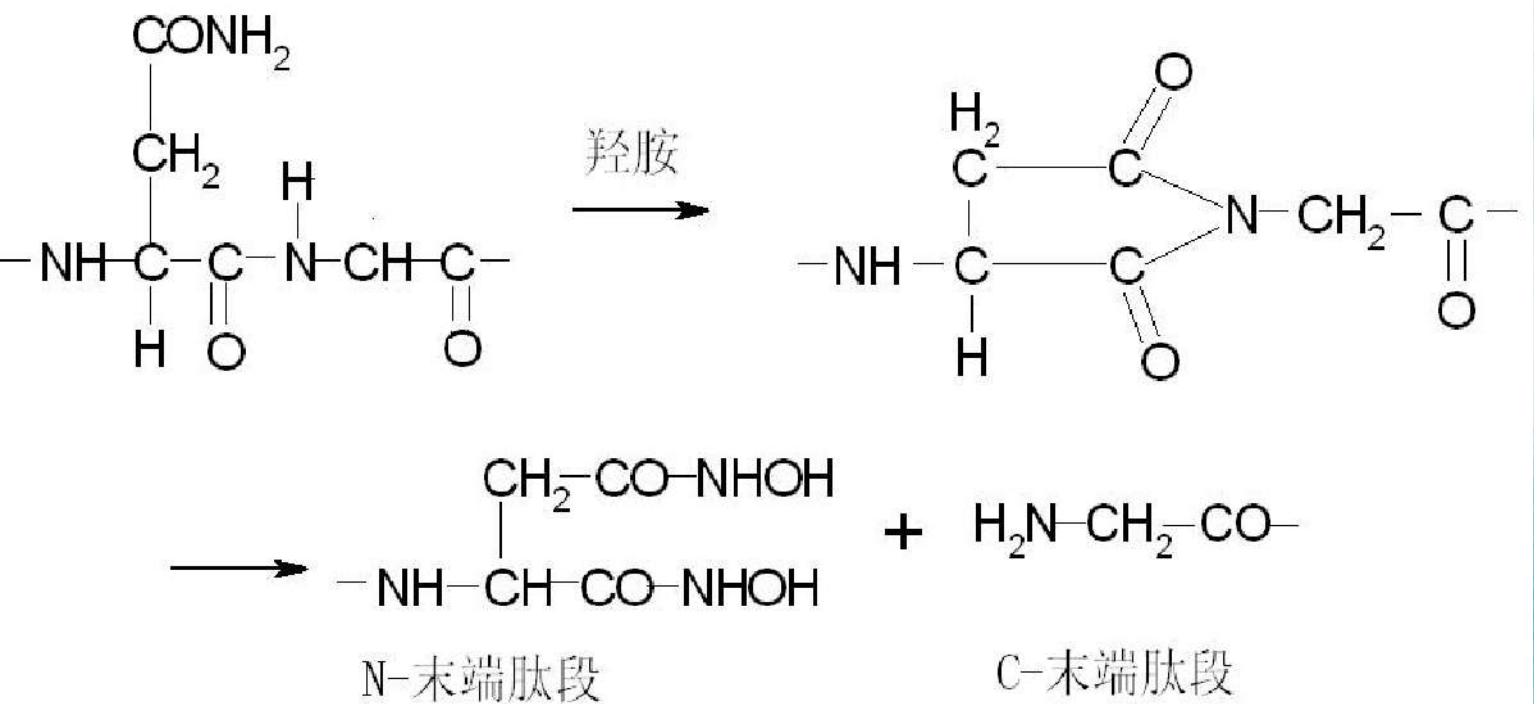
① 溴化氰水解法(Cyanogen bromide)

——选择性地切割由Met羧基形成的肽键。



② NH_2OH 断裂:

较专一性断裂 **Asn-Gly** 之间的肽键
Asn-Leu 及 **Asn-Ala** 键也能部分断裂



3、肽段的分离纯化:

凝胶过滤、凝胶电泳和HPLC法



(六)、肽段氨基酸序列的测定

1、Edman法（苯异硫氰酸酯法）

Edman于1950年首先提出。

N-端分析法

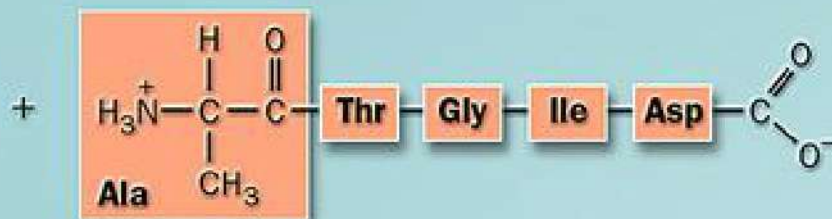
特点：能够不断重复循环，将肽链N-端氨基酸残基逐一进行标记和解离。

Edman Degradation Reactions

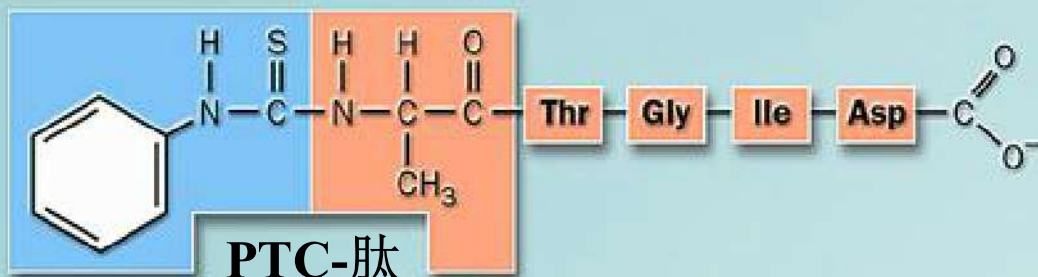
Phenyl isothiocyanate
(Edman's reagent)



PITC

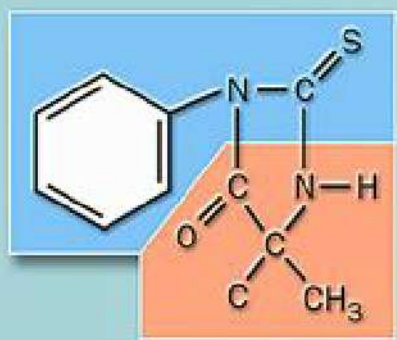


+ Weak alkali



PTC-肽

+ Weak acid



PTH-Alanine



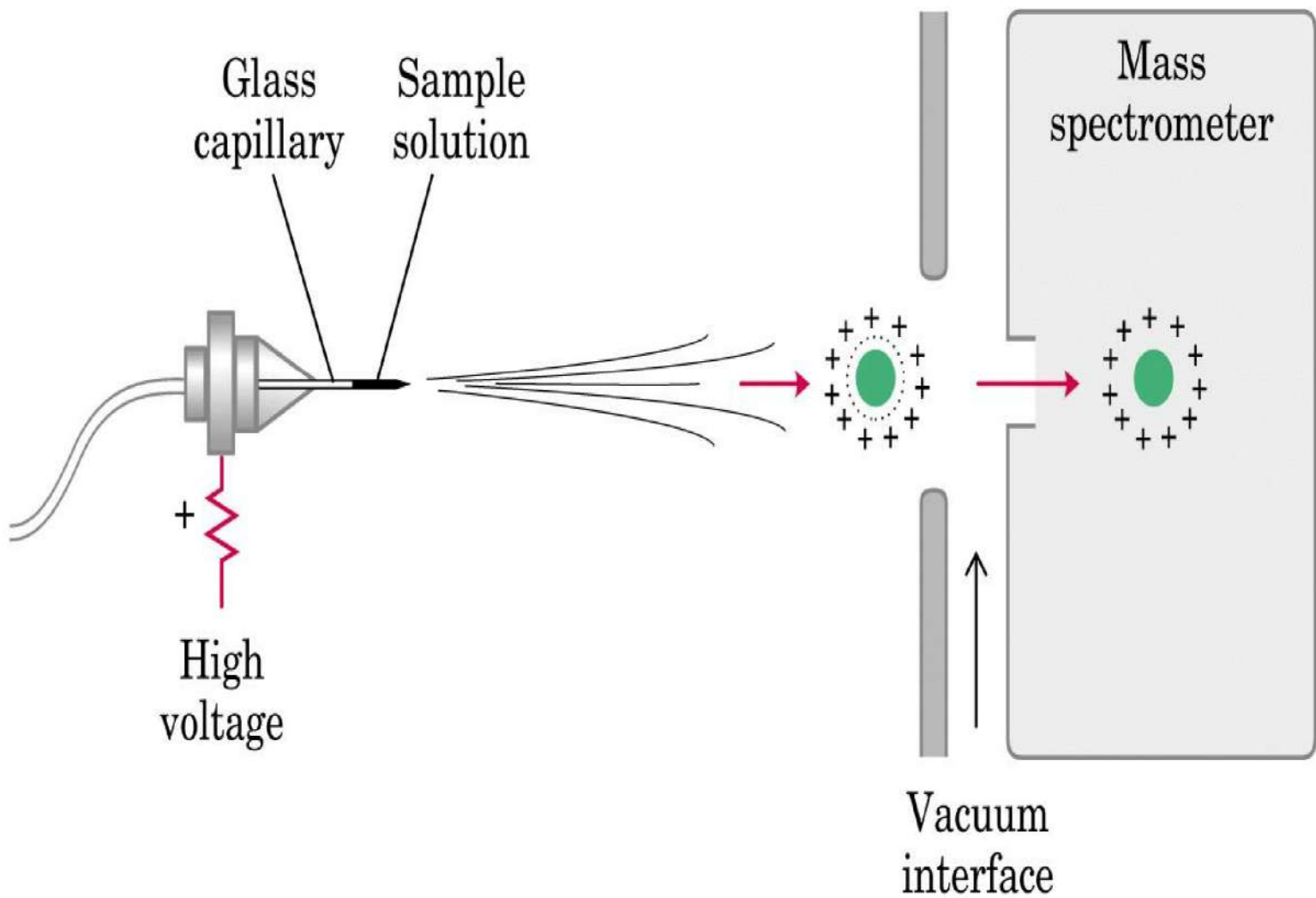
Polypeptide one
residue shorter

2、 氨基酸酶法或羧肽酶法

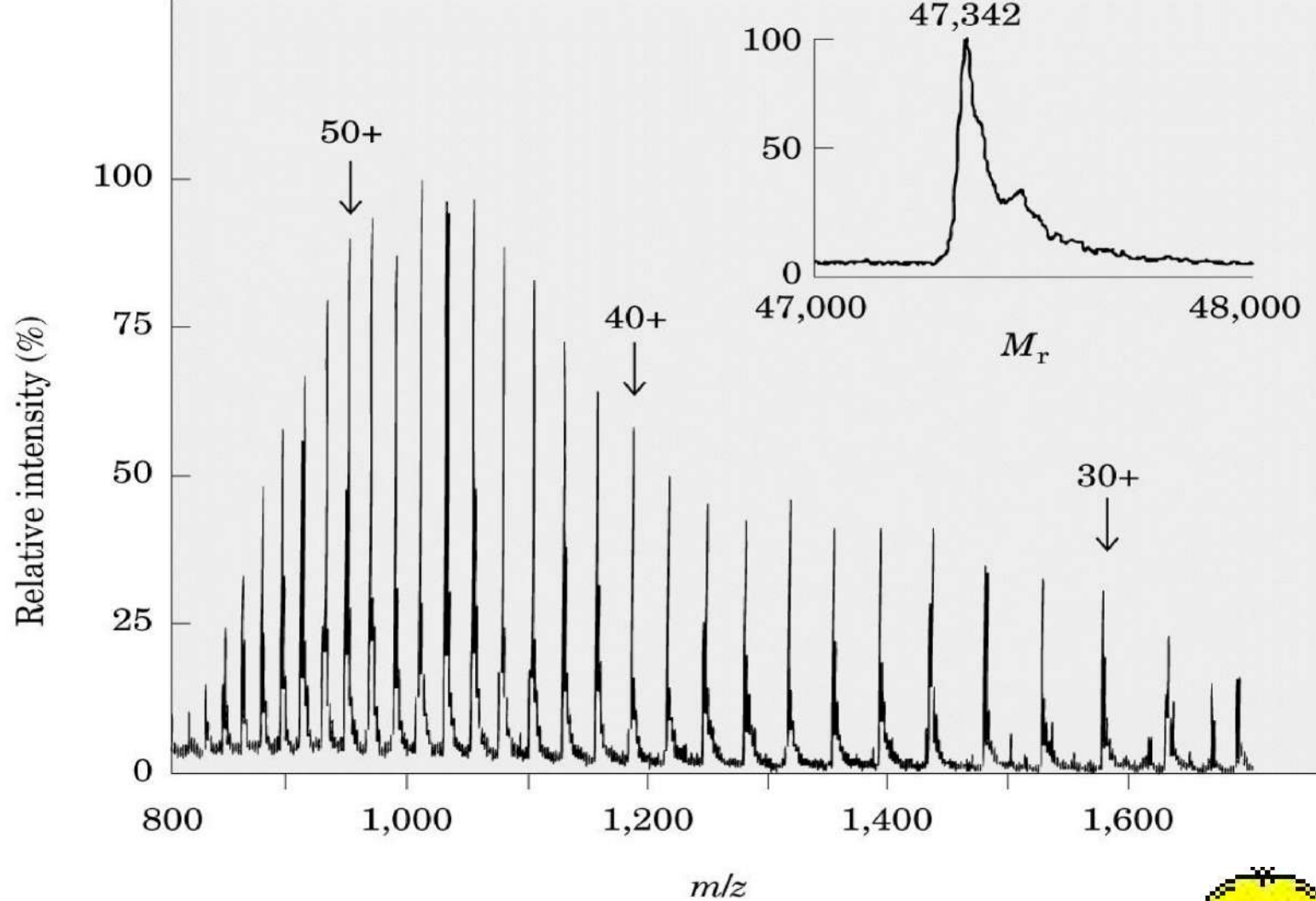
3、 质谱法 (MS)

灵敏度高、所需样品少、测定速度快



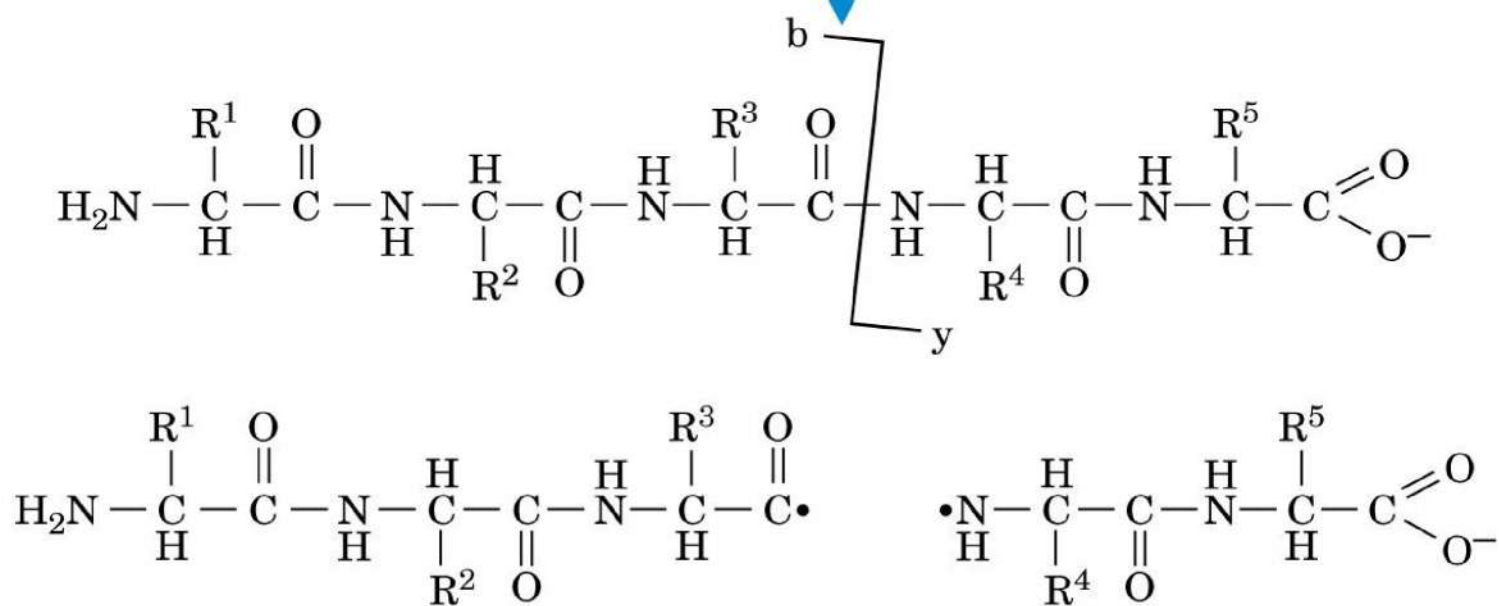
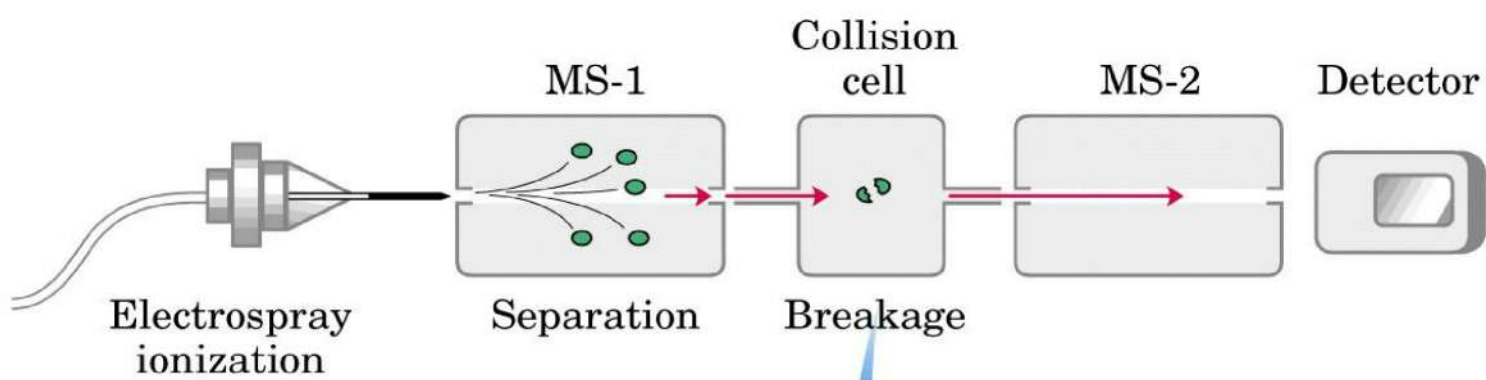


(a)

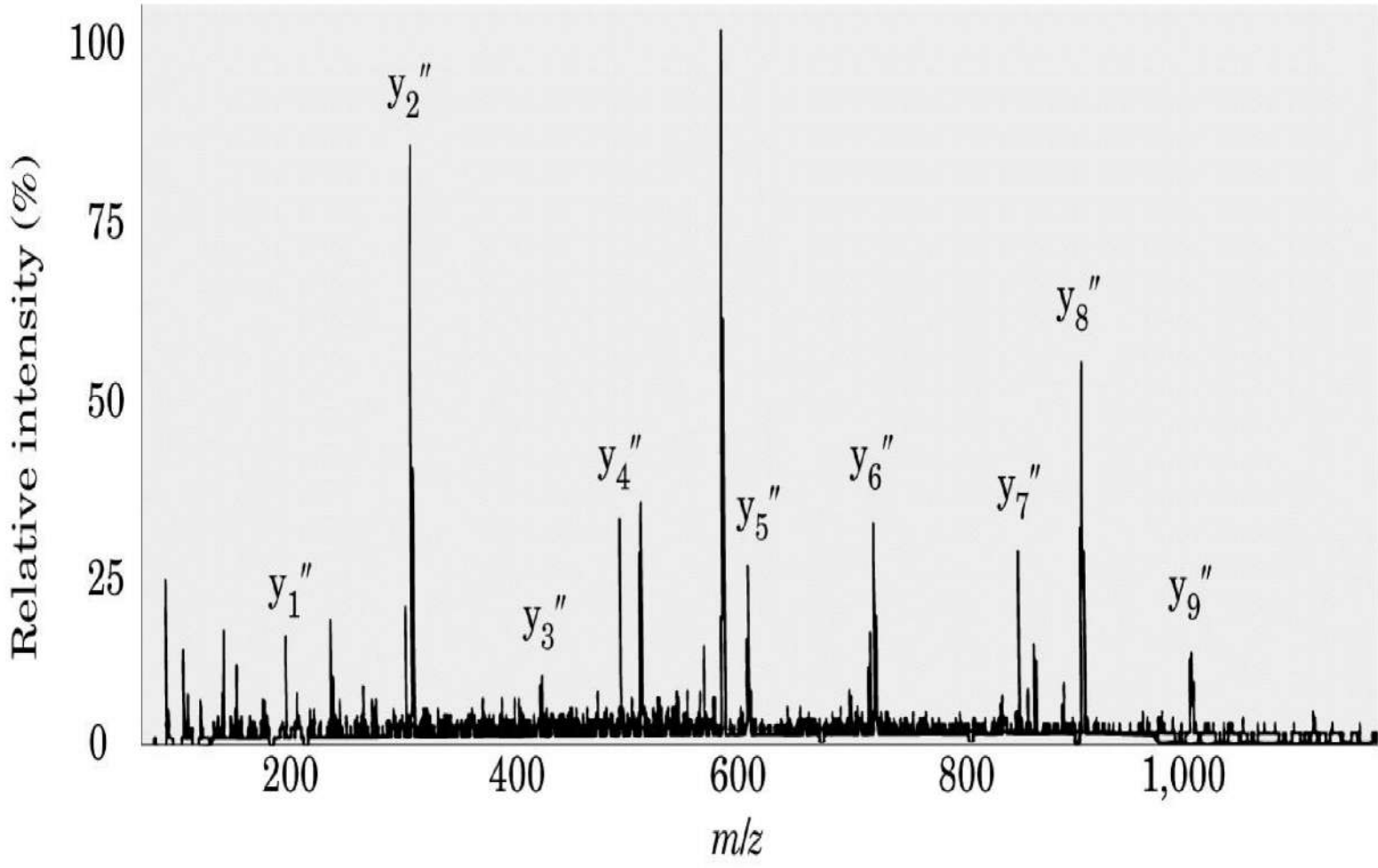


(b)





(a)

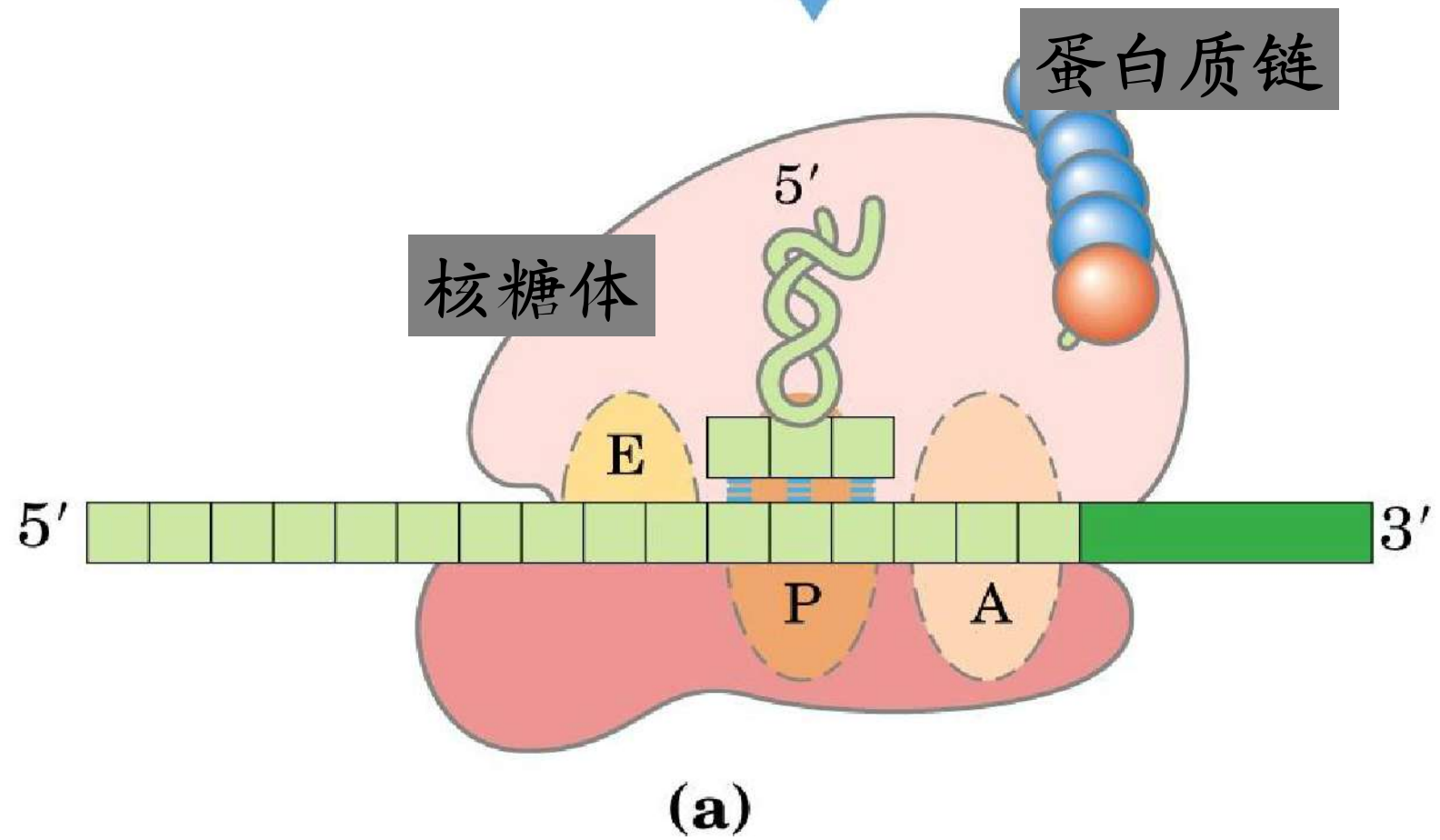


[BACK](#)

(b)



4. 根据核苷酸序列的推定法



(七)、肽段在多肽链中次序的决定

重叠肽 (overlapping peptide)



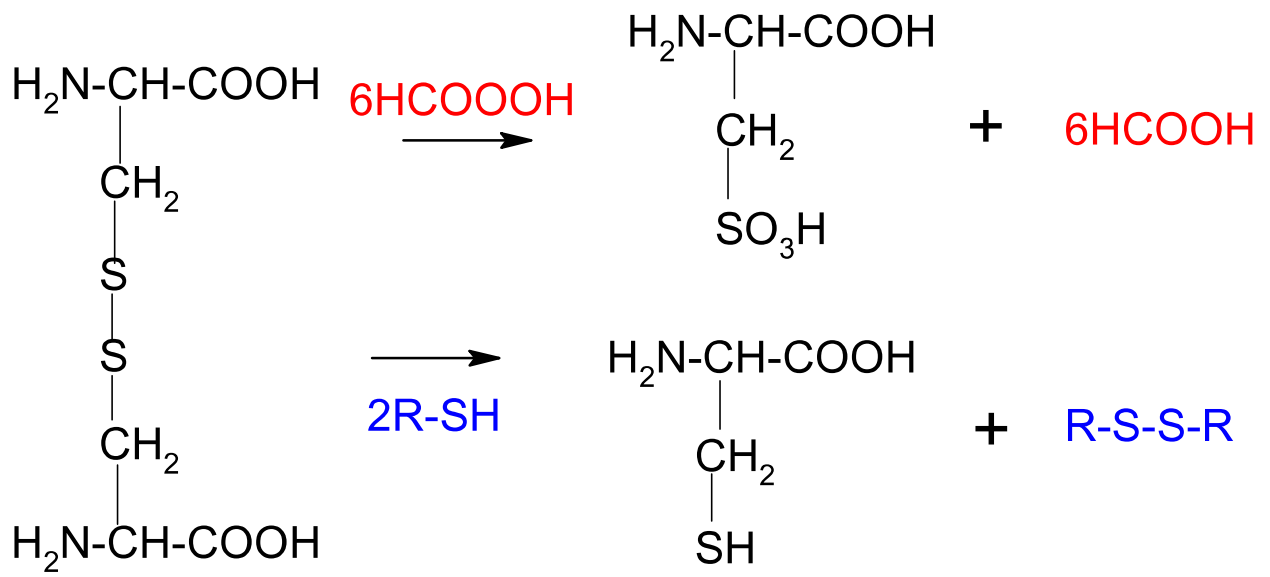
(八)、二硫键位置的确定

- 胃蛋白酶处理没有断开二硫键的多肽链
- 经电泳分离各肽段
- 用过甲酸断开二硫键，含有-S-S-的肽段带电性质发生变化，转向90℃二次电泳，曾含二硫键的肽段迁移率发生变化
- 然后同其它方法分析的肽段进行比较，确定二硫键的位置

胃蛋白酶

- 最适pH约2，此时二硫键不断开
- 专一性低、肽段短





(九)、蛋白质测序举例



(a) hexameric ribosome of diatoms



(b) Insulin



(c) Octin



(十) 蛋白质序列数据库

www.ncbi.nlm.nih.gov

(c) subunit



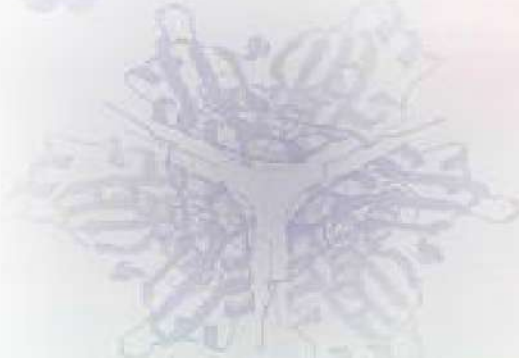
(e) pentamer



(f) alpha-hexamer



(g) hexamer (cluster of dimers)



(h) heptamer



(i) octamer



五、肽与蛋白质的人工合成

(一) 肽的人工合成

保护（氨基、羧基、侧链活性基团）

活化（氨基、羧基）

缩合剂

(二) 胰岛素的人工合成

(三) 固相肽合成



