

生物化学讲义

第二章 蛋白质化学



东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

蛋白质 (protein) 朊

来自于希腊语 **proteios** : 首要, 第一

- u 蛋白质在机体中的重要作用

催化 高效专一地催化机体内几乎所有的反应。
如: 各种酶

调节 调节机体代谢活动。
如: 激素 (胰岛素)、钙调蛋白、阻遏蛋白

东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

运输 专一运输各种小分子和离子。
如: 血红蛋白、肌红蛋白、脂蛋白、离子通道

营养 生物体利用蛋白质作为提供充足氮素的一种方式
如: 卵清蛋白、酪蛋白、麦醇溶蛋白、铁蛋白

运动 某些蛋白赋予细胞以运动的能力。
如: 肌动蛋白、肌球蛋白、鞭毛和纤毛蛋白

结构蛋白 作为构建机体某部分的材料。
如: α -角蛋白、胶原蛋白、膜蛋白、微管蛋白

东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

防御和进攻 防御异物侵入机体。
如: 免疫球蛋白、病毒外壳蛋白、干扰素

东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

- u 蛋白质的化学组成

0 C H O N, 大多含有 S
有的还含有 R Fe I Cu Mn Zn

0 各元素的百分比对于大多数蛋白质都较相似, 其中N约占16%。

这可用于测定蛋白质的含量——**凯氏定氮法**。

蛋白质含量 = 蛋白氮 **6.25**

东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

- u 蛋白质的分类

0 根据蛋白质的结构分类:

单体蛋白、寡聚蛋白、多聚蛋白

0 根据蛋白质的化学组成分类:

{ 单纯蛋白质
结合蛋白质

东北农业大学生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

结合蛋白质

分类	辅基	实例
核蛋白类	DNA或RNA	病毒、脱氧核糖核蛋白
糖蛋白类	糖类	免疫球蛋白、血型糖蛋白
脂蛋白类	脂类	血浆脂蛋白
磷蛋白类	磷酸基	酪氨酸蛋白
黄素蛋白类	黄素腺嘌呤二核苷酸或黄素单核苷酸	氨基酸氧化酶、琥珀酸脱氢酶
色蛋白类	血红素或叶绿素	血红蛋白、叶绿素蛋白
金属蛋白	金属离子, 如: Fe、Mo、Cu、Zn等	固氮酶、铁氧还蛋白

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 按分子形状分：

球状蛋白质 (globular protein) :
血红蛋白、豆球蛋白、多数酶和抗体

纤维状蛋白质 (fibrous protein) :
角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、丝蛋白等

0 根据蛋白质的功能分类：

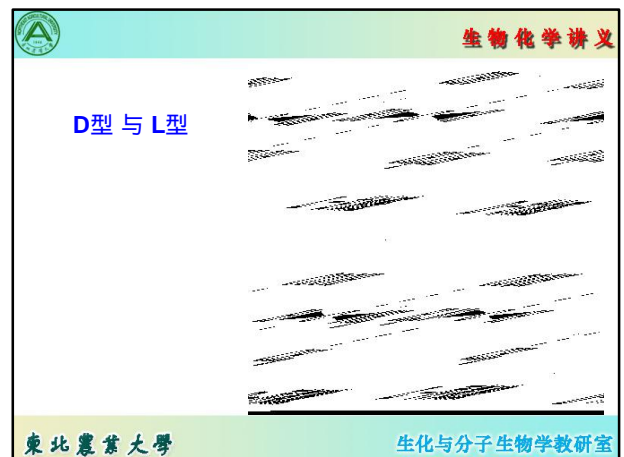
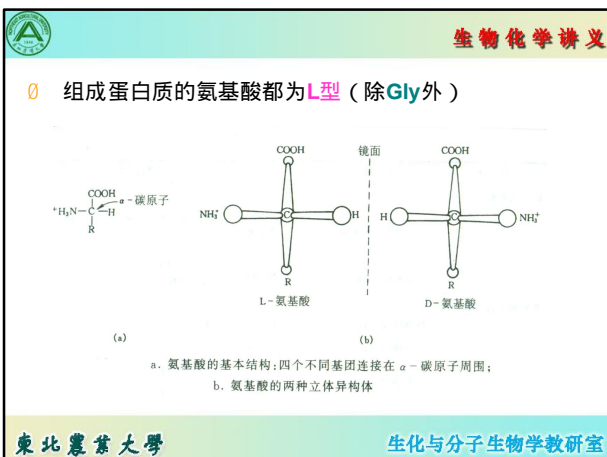
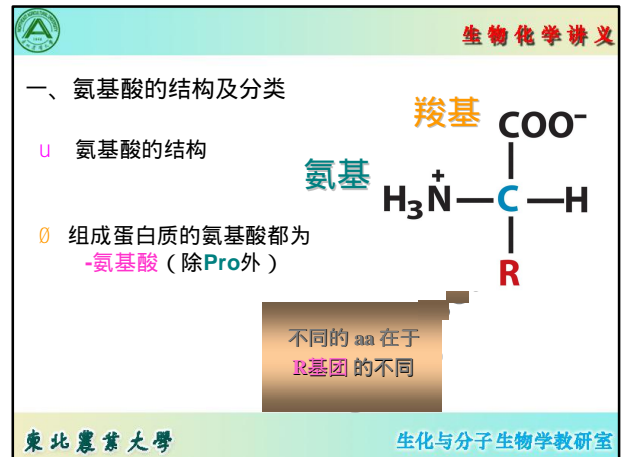
酶、调节蛋白、转运蛋白、贮存蛋白、收缩和滑动蛋白、结构蛋白、支架蛋白、保护蛋白、异常蛋白.....

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

第一节 氨基酸

东北农业大学 生化与分子生物学教研室



生物化学讲义

氨基酸的分类

1、根据R基团的极性

组成蛋白质的氨基酸共有 20 种

非极性氨基酸 (8)

极性氨基酸 { 非解离的极性氨基酸 (不带电 7)
酸性氨基酸 (带负电 2)
碱性氨基酸 (带正电 3)

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

I 非极性氨基酸

丙氨酸 Ala (A) $\text{CH}_3 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

缬氨酸 Val (V) $\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

I 非极性氨基酸

亮氨酸 Leu (L) $\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

异亮氨酸 Ile (I) $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

脯氨酸 Pro (P) $\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}) - \text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

I 非极性氨基酸

苯丙氨酸 Phe (F) $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

色氨酸 Trp (W) $\text{C}_8\text{H}_7\text{N} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

甲硫氨酸 Met (M) $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$
(蛋氨酸)

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

II 非解离的极性氨基酸

甘氨酸 Gly (G) $\text{H} - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

丝氨酸 Ser (S) $\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

苏氨酸 Thr (T) $\text{HO} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

II 非解离的极性氨基酸

半胱氨酸 Cys (C) $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

酪氨酸 Tyr (Y) $\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{C}(\text{H})(\text{NH}_2) - \text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

II 非解离的极性氨基酸

天冬酰胺 Asn (N) $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

谷氨酰胺 Gln (Q) $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

II 酸性氨基酸

天冬氨酸 Asp (D) $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

谷氨酸 Glu (E) $\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

IV 碱性氨基酸

赖氨酸 Lys (K) $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

精氨酸 Arg (R) $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

组氨酸 His (H) $\text{HN} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH}_2 \\ \diagdown \end{array} \text{N} - \overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

2 由R基团的化学结构

- 脂肪族氨基酸
- 芳香族氨基酸 Phe, Tyr, Trp
- 杂环氨基酸 Pro, His

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

3 由人对 aa的营养需求

- 非必需氨基酸
- 必需氨基酸 (8+2)

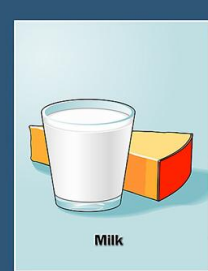
Lys Val Leu Ile Met Phe Thr Trp Arg His

苏缬亮异亮
色苯丙芳香
还有酪与蛋
酸一人遭殃

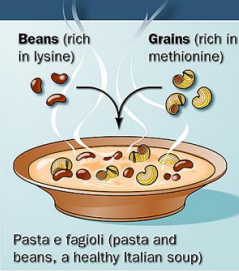
东北农业大学 生化与分子生物学教研室

讲义

Essential amino acids



Milk



Beans (rich in lysine) Grains (rich in methionine)

Pasta e fagioli (pasta and beans, a healthy Italian soup)

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

二、氨基酸的理化性质

(一)、两性性质和等电点

氨基酸同时含有氨基和羧基：氨基具有碱性，羧基具有酸性。

$$\begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}-\text{COOH} \end{array}$$

酸性溶液中
阳离子(完全质子化形式)
 $\text{pH} < \text{pI}$
向负极移动

$$\begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COO}^- \end{array}$$

晶态或水溶液中
两性离子
 $\text{pH} = \text{pI}$
不移动

$$\begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \end{array}$$

碱性溶液中
阴离子(完全去质子化形式)
 $\text{pH} > \text{pI}$
向正极移动

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

甘氨酸 (Gly) 的滴定曲线

等电点 (pI)：使氨基酸净电荷为零时溶液的 pH 值。

pK_2 是 AA 的 NH_3^+ 被滴定一半时的 pH 值 (NH_3^+ 释放 H^+)

pK_1 是 AA 的 COO^- 被滴定一半时的 pH 值 (COO^- 结合 H^+)

pI 是氨基酸的特征常数

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

20种氨基酸的pI

氨基酸	pI	氨基酸	pI	氨基酸	pI	氨基酸	pI
Ala	6.02	Pro	6.48	Thr	5.87	Asp	2.77
Val	5.97	Phe	5.48	Cys	5.07	Glu	3.22
Leu	5.98	Trp	5.89	Tyr	5.66	Lys	9.74
Ile	6.02	Gly	5.97	Asn	5.41	Arg	10.76
Met	5.74	Ser	5.68	Gln	5.65	His	7.59

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

等电点的计算

例：Gly 的 pI 计算

$$\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COOH} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^- \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$$

$\text{Gly}^+ \quad \text{Gly} \quad \text{Gly}^-$

K'_1 、 K'_2 分别代表 $\alpha\text{-COOH}$ 和 $\alpha\text{-NH}_3^+$ 的表现解离常数。可以从滴定曲线中求得。

$\text{pI} = 1/2 (\text{pK}'_1 + \text{pK}'_2)$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

例：Glu 的 pI 计算

$$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COO}^- \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{COO}^- \end{array}$$

$\text{Glu}^+ \quad \text{Glu} \quad \text{Glu}^- \quad \text{Glu}^{2-}$

溶液 pH 值增大

$\text{pI} = 1/2 (\text{pK}'_1 + \text{pK}'_R)$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

例：Lys 的 pI 计算

$$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ (\text{CH}_2)_4 \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_3^+ \\ | \\ (\text{CH}_2)_4 \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ (\text{CH}_2)_4 \\ | \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \xrightleftharpoons[\text{+H}^+]{-\text{H}^+} \begin{array}{c} \text{COO}^- \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ (\text{CH}_2)_4 \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$

$\text{Lys}^{2+} \quad \text{Lys}^+ \quad \text{Lys} \quad \text{Lys}^-$

溶液 pH 值增大

$\text{pI} = 1/2 (\text{pK}'_2 + \text{pK}'_R)$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

小结

氨基酸等电点 (PI) 的计算

中性氨基酸： $PI = 1/2(pK_1 + pK_2)$
 酸性氨基酸： $PI = 1/2(pK_1 + pK_R)$
 碱性氨基酸： $PI = 1/2(pK_2 + pK_R)$

氨基酸的等电点等于两性离子两侧pK值之和的一半。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

(二)、光学性质

0 旋光性质

除Gly之外，其余蛋白质氨基酸都有手性碳原子，都具有旋光性。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 紫外吸收

Trp、Tyr、Phe 含芳香环共轭双键系统，最大吸收峰分别在 279nm、278nm、259nm。

一般地，蛋白质最大光吸收在280nm处——紫外分光光度法测蛋白含量

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

(三)、重要的化学性质

0 茚三酮反应

在弱酸性条件下，氨基酸与茚三酮共热，生成紫色化合物，最大光吸收：570nm

Pro的茚三酮反应呈黄色。440nm

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

反应分2步：

O=C1C(O)C(O)C1 + RCH(NH2)COOH >> O=C1C(O)C(O)C1 + NH3 + CO2 + RCHO

茚三酮 (无色) 还原性茚三酮

O=C1C(O)C(O)C1 + 2NH3 + O=C1C(O)C(O)C1 >> O=C1C(O)C(O)C1 + 3H2O

紫色化合物

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 Sanger反应

在弱碱溶液中，氨基酸的氨基与2,4-二硝基氟苯 (DNFB) 反应，生成黄色的二硝基苯氨基酸 (DNP-AA)。

O=[N+]([O-])c1ccc(F)cc1 + H2N-CH(R)-COOH >> O=[N+]([O-])c1ccc(NC(R)C(=O)O)cc1 + HF

DNP-AA(黄色)

此反应最初被Sanger用于测定肽链N-末端氨基酸。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

U 蛋白质的结构层次

Primary structure: Amino acid residues (Lys, Lys, Gly, Leu, Val, Ala, His)

Secondary structure: α Helix

Tertiary structure: Polypeptide chain

Quaternary structure: Assembled subunits

東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

一级结构	初级结构
二级结构	高级结构（空间结构）
三级结构	
四级结构	

在二级结构和三级结构之间还有另一些层次，如超二级结构和结构域。

東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

一、蛋白质的一级结构

蛋白质的一级结构（primary structure）：是指多肽链内氨基酸残基从N末端到C末端的排列顺序，或称氨基酸序列，是蛋白质最基本的结构。

化学结构 共价结构 初级结构

東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

胰岛素是动物胰脏中胰岛细胞分泌的一种分子量较小的激素蛋白，它的主要功能是降低体内血糖含量。临床上用来治疗糖尿病。

最先由 Sanger 于 1945-1955 年测定牛胰岛素的—级结构。

Disulfide bridges link cysteine residues

A chain: Gly, Ile, Thr, Ser, Cys, Thr, Val, Cys, Thr, Ser, Ile, Thr, Val, Asn, Thr, Cys, Arg

B chain: Phe, Tyr, Ile, Thr, Ser, Cys, Thr, Val, Cys, Thr, Ser, Ile, Thr, Val, Asn, Thr, Cys, Arg

Insulin

東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

二、蛋白质的构象和维持构象的作用力

蛋白质的多肽链并非线性伸展，而是以一定的方式折叠成特定的空间结构，并在此基础上产生特有的功能。

蛋白质的构象：每一种蛋白质所特有的空间结构或三维结构。

東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

1. 构型和构象

构型（configuration）是指不对称碳原子上相连的各原子或取代基的空间排布（D构型、L构型）。

构型的改变伴随着共价键的断裂和重新形成。

构象（conformation）是指相同构型的化合物中，与碳原子相连的各原子或取代基在单键旋转时形成的相对空间排布。

构象的改变不需要共价键的断裂和重新形成。只需要单键旋转方向和角度的改变。

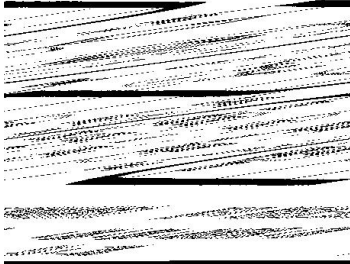
東北農業大學 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

2 稳定蛋白质三维结构的作用力

稳定蛋白质三维结构的作用力主要是一些所谓的弱相互作用或称非共价键。

- 盐键 (离子键)
- 氢键
- 疏水作用力
- 范德华力
- 二硫键
- 配位键



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

三、蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构 (Secondary structure) 指多肽主链的折叠产生由氢键维系的有规则的构象。

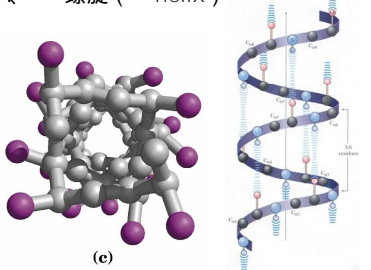
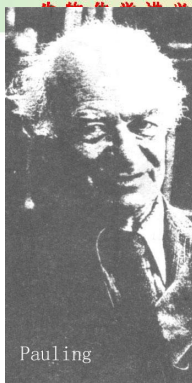
二级结构是蛋白质结构的构象单元, 主要包括: 螺旋、折叠、转角、无规卷曲等。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

(二)、主要的二级结构形式

1 螺旋 (α-helix)

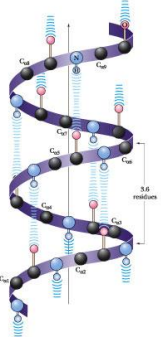
Pauling

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

α 螺旋结构的主要特点:

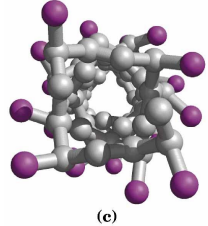
- 肽链中的酰胺平面绕 C 相继旋转一定角度形成 α 螺旋, 并盘绕前进。每隔 3.6 个氨基酸残基, 螺旋上升一圈; 每圈间距 0.54nm, 即每个氨基酸残基沿螺旋中心轴上升 0.15nm, 旋转 100°。



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

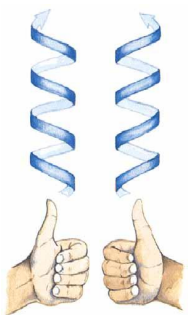
- 螺旋体中所有氨基酸残基侧链都伸向外侧;
- 肽链上所有的肽键都参与氢键的形成, 链中的全部 C=O 和 N-H 几乎都平行于螺旋轴, 氢键几乎平行于中心轴;



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

- 绝大多数天然蛋白质都是右手螺旋。每个氨基酸残基的 N-H 都与前面第四个残基 C=O 形成氢键。



$$3.6_{13} \begin{array}{c} \text{O} \cdots \cdots \cdots \text{H} \\ \parallel \quad \quad \quad | \\ \text{C} - (\text{NH} - \text{CH} - \text{CO})_3 - \text{N} \\ \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \text{R} \end{array}$$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

u 影响 α -螺旋形成的因素：


一条肽链能否形成 α -螺旋，及形成 α -螺旋是否稳定，与其氨基酸组成和序列有极大的关系。

0 螺旋遇到 Pro 就会被中断而拐弯，因为 Pro 是亚氨基酸，环内的 C-N 键和 C-N 肽键都不能旋转，而且多聚 Pro 的肽键不具酰氨基，不能形成链内氢键。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 多肽链上连续出现带同种电荷基团的氨基酸残基，(如 Lys, 或 Asp, 或 Glu), 不能形成稳定的 α -螺旋。如多聚 Lys 多聚 Glu



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

2 折叠 (β -pleated sheet)

0 折叠是由两条或多条伸展的多肽链靠氢键联结而成的锯齿状片状结构。

结构特点：

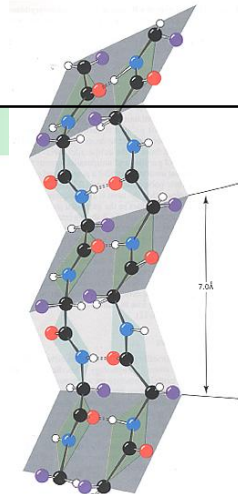
- u 氢键与肽链的长轴接近垂直
- u 多肽主链呈锯齿状折叠构象
- u 侧链 R 基交替地分布在片层平面的两侧



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

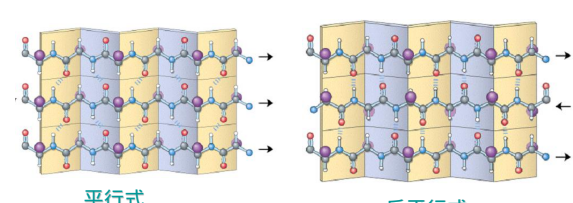
0 维持 β -折叠结构稳定性的力 氢键由一条链上的羰基和另一条链上的氨基之间形成，即氢键是在链与链之间形成的。



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 折叠分平行式和反平行式，后者更为稳定。



平行式 反平行式

在纤维状蛋白质中 β -折叠主要是反平行式，而球状蛋白中，二者几乎同样广泛存在。

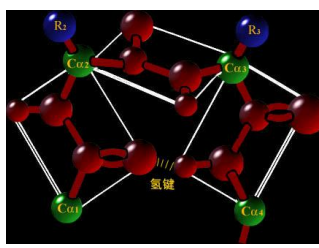
东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

3 转角 (β -turn)

0 也称 β -回折，存在于球状蛋白中。其特点是肽链回折 180°，使得氨基酸残基的 C=O 和与第四个残基的 N-H 形成氢键。

0 转角都在蛋白质分子的表面。



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

两种主要类型的 β -转角：

区别：中央肽基旋转了180

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

4 无规则卷曲 (random coil)

又称自由卷曲，泛指那些不能被归入明确的二级结构如折叠片或螺旋的多肽区段。

事实上这些区段大多数既不是卷曲，也不是完全无规的，它们也像其它二级结构那样是明确而稳定的结构。

这类有序的非重复性结构经常构成酶的活性部位和其它蛋白质特异的功能部位。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

四、蛋白质的超二级结构和结构域

1、超二级结构

指蛋白质中相邻的二级结构单位 (α -螺旋、 β -折叠、 β -转角等) 组合在一起，形成有规则的在空间上能辨认的二级结构组合体。

蛋白质中的几种超二级结构示意图 (有箭头的条带表示 β -链)
A. α 螺旋束 B. β 折叠单元 C. β 折叠 (Rossmann 折叠) D. β 曲折 (β -meander)

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

2 结构域 (domain)

指多肽链在二级结构或超二级结构的基础上形成三级结构局部折叠区，它是相对独立的紧密球状实体。

双结构域蛋白——
3-磷酸甘油醛脱氢酶

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

五、蛋白质的三级结构

指由二级结构元件 (α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等) 构建成的总三维结构，包括一级结构中相距较远的肽段之间的几何相互关系和侧链在三维空间中彼此间的相互关系。

三级结构是多肽链中所有原子的空间排布。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

卵溶菌酶 (egg lysozyme) 的三级结构

抹香鲸肌红蛋白的三级结构

东北农业大学 生化与分子生物学教研室



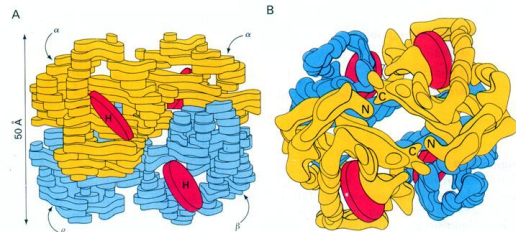
六、蛋白质的四级结构

指由两条或两条以上具有三级结构的多肽链聚合成、有特定三维结构的蛋白质构象。

每条多肽链又称为**亚基 (subunit)**，或**单体 (monomer)**

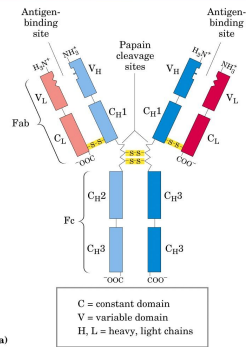


血红蛋白四级结构



u 四级结构缔合的驱动力

- o 亚基间的缔合主要靠非共价键（如范德华力、氢键、离子键、疏水作用等）。
- o 对某些蛋白质对亚基缔合的稳定性作出贡献的还有一个重要因素是亚基间二硫桥的形成。



第四节 蛋白质结构与功能的关系



一、一级结构与功能的关系

1. 同源蛋白质的物种差异与生物进化

u 同源蛋白质 (homologous protein)

在不同的生物体内行使相同或相似功能的蛋白质。



同源蛋白质的特点：

- o 同源蛋白质的氨基酸序列具有明显的相似性（**顺序同源性**）
- o 有许多位置的氨基酸对所有种属来说都是相同的，称**不变残基**。除不变残基以外，其它位置的氨基酸对不同的种属有很大变化，称**可变残基**。
- o 多肽链长度相同或相近，并且它们的氨基酸序列与那些提取它们的物种的亲缘关系具有同一性。

生物化学讲义

U 细胞色素C与系统树

细胞色素C是一种含血红素的电子转运蛋白，存在于所有真核生物线粒体中。

生物	AA差异数	生物	AA差异数
黑猩猩	0	鸡、火鸡	13
恒河猴	1	响尾蛇	14
兔	9	乌龟	15
袋鼠	10	金枪鱼	21
鲸	10	狗鱼	23
牛羊猪	10	蚕蛾	31
狗	11	小麦	43
骡	11	面包酵母	45
马	12	红色面包霉	48

不同生物和人的细胞色素C氨基酸序列差异数的比较：

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

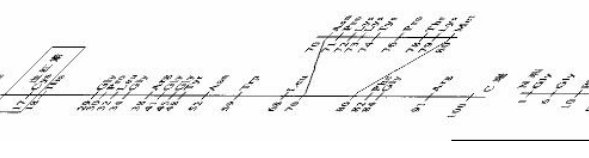


从蛋白质一级结构所绘制的进化树与经典形态分类学所绘制的进化树是一致的，这说明了蛋白质的进化反映了生物的进化。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

对不同生物的细胞色素C的一级结构分析表明，大约有28个氨基酸残基是各种生物共有的（不变残基），表明这些氨基酸残基是规定细胞色素C的生物功能所必需的。



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

2 一级结构变异与分子病

分子病是指由于遗传基因突变导致蛋白分子中某些氨基酸残基被更换所造成的一种遗传病。

镰刀状细胞贫血病是最早被认识的一种分子病，这种疾病在非洲的某些地区十分流行。病人的红细胞在氧气不足的情况下变形而呈镰刀状，故由此得名。



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

通过对血红蛋白分子的一级结构研究表明，病人的血红蛋白(HbS)与正常人的血红蛋白(HbA)相比，在574个氨基酸残基中只有1个氨基酸残基的差异。HbA和HbS的α-链是完全相同的，所不同只是-链上从N末端开始的第6位的氨基酸残基，在正常的Hb-A分子中是**谷氨酸**，而患者的Hb-S分子中为**缬氨酸**所代替。

Hb-A (正常人) :	Val	-His	-Leu	-Thr	-Pro	-Glu	-Glu	-Lys
Hb-S (患者) :	Val	-His	-Leu	-Thr	-Pro	-Val	-Glu	-Lys
-链	1	2	3	4	5	6	7	8

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

二、空间结构与功能的关系

U 蛋白质高级结构破坏，功能丧失



东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

核糖核酸酶的变性与复性实验

天然状态, 有催化活性

去除尿素、 β -巯基乙醇

尿素、 β -巯基乙醇

非折叠状态, 无活性

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

蛋白质在表现生物功能时, 构象发生一定变化

抹香鲸肌红蛋白的三级结构

血红蛋白的四级结构

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

血红蛋白的别构效应

象Hb这样因与配基 (O_2) 结合导致构象改变, 进而改变其生物活性的现象称为别构效应 (allosteric effect)

氧饱和度

肌红蛋白

血红蛋白

肌肉毛细血管中的氧分压

肺泡中的氧分压

$PO_2/133Pa$

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

第五节 蛋白质的重要性质

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

一、蛋白质的两性解离和等电点

蛋白质同氨基酸一样也是两性电解质, 既能和酸作用, 也能和碱作用。

蛋白质分子中可解离的基团除肽链末端的 α -氨基和 α -羧基外, 主要还是多肽链中氨基酸残基上的侧链基团, 如 ϵ -氨基、羧基、 γ -羧基、咪唑基、胍基、酚基、巯基等。在一定的pH条件下, 这些基团能解离为带电基团从而使蛋白质带电。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

蛋白质的等电点 (pI)

当某蛋白质在一定的pH的溶液中, 所带的正负电荷相等, 它在电场中既不向阳极也不向阴极移动, 此时溶液的pH值叫做该蛋白质的等电点。

蛋白质等电点和蛋白质所含氨基酸种类和数目有关。

- 0 含碱性和酸性氨基酸数目相近的蛋白质属中性蛋白质, 等电点多为中性偏酸。
- 0 含碱性氨基酸较多的碱性蛋白质, 等电点偏碱。
- 0 含酸性氨基酸较多的酸性蛋白质, 等电点偏酸。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

二、蛋白质的胶体性质

蛋白质的分子量很大

- 蛋白质的分子量，一般在 $10^4 \sim 10^6$ ，甚至更大。
- 其分子直径 $1\text{-}100\text{nm}$ 之间，在胶体颗粒的范围。

图 3-107 血浆中一些蛋白质的相对大小与近似形状

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

蛋白质的胶体性质

- 蛋白质的水溶液是一种比较稳定的亲水胶体。
 - 在蛋白质颗粒表面带有很多极性基团，如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COO}^-$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 等和水有高度亲和性，当蛋白质与水相遇时，就很容易在蛋白质颗粒外面形成一层水膜。
- 蛋白质具有胶体溶液的性质。
 - 如布朗运动、光散射、电泳、不能透过半透膜及具有吸附能力等。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

三、蛋白质的沉淀反应

加入适当的试剂使蛋白质分子处于等电点状态或失去水化层，蛋白质的胶体溶液就不再稳定并将产生沉淀。

能使蛋白质沉淀的方法有：

- 高浓度中性盐：** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 Na_2SO_4 、 NaCl
(破坏蛋白表面的水化层，中和蛋白质的电荷)
- 盐析 (salting out)：** 加入大量中性盐使蛋白质沉淀析出的现象。常被用于蛋白质分离制备。
- 盐溶 (salting in)：** 球蛋白溶于稀的中性盐溶液，其溶解度随稀盐溶液浓度增加而增大的现象。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

- 有机溶剂** 丙酮、乙醇 (破坏蛋白质水膜，降低介电常数)
- 重金属盐** Hg^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+}
(与蛋白质中带负电基团形成不易溶解的盐)
- 生物碱试剂**
苦味酸、三氯乙酸、单宁酸、钨酸等
(与蛋白质中带正电荷的基团生成不溶性盐)
- 加热变性沉淀**

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

四、蛋白质的变性 (denaturation)

蛋白质变性： 蛋白质受到某些理化因素的影响，其空间结构发生改变，蛋白质的理化性质和生物学功能随之改变或丧失，但未导致蛋白质一级结构的改变的现象。

变性的实质：
次级键被破坏，天然构象解体。变性不涉及共价键 (肽键、二硫键) 的断裂，一级结构仍保持完好。

蛋白质变性的因素：

- 物理因素：** 加热、紫外线、超声波、高压等；
- 化学因素：** 强酸、强碱、脲、盐酸胍、去垢剂、重金属盐等

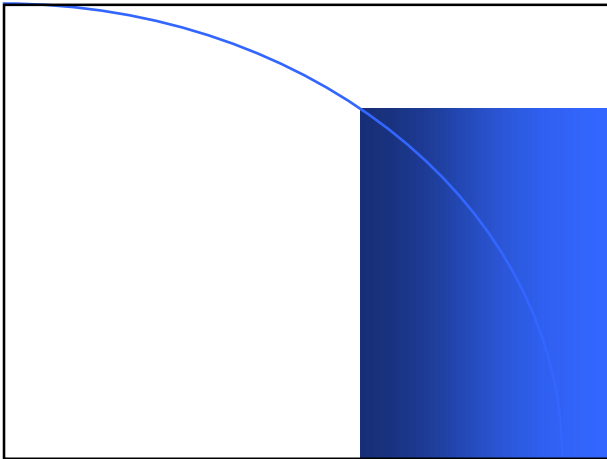
东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

蛋白质变性后的表现：

- 生物活性丧失 (酶、血红蛋白、调节蛋白、抗体)
- 一些侧链基团暴露
蛋白变性后，有些原来在分子内部包藏而不易与化学试剂起反应的侧链基团，由于结构伸展松散而暴露出来。
- 一些物理化学性质改变
溶解度降低，粘度增大，扩散系数变小，旋光和紫外吸收变化。
- 生物化学性质改变
蛋白变性后分子结构伸展松散，易被蛋白水解酶作用。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室



生物化学讲义

蛋白质的复性 (renaturation)

蛋白质的变性作用若不过于剧烈, 则是一种可逆过程。高级结构松散的变性蛋白质通常在除去变性因素后, 可缓慢地重新自发折叠形成原来的构象, 恢复原有的理化性质和生物活性的现象。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

五、蛋白质的紫外吸收和呈色反应

0 紫外吸收

Trp, Tyr, Phe 含芳香环共轭双键系统, 最大吸收峰分别在 279nm, 278nm, 259nm

一般地, 蛋白质最大光吸收在 280nm 处
——紫外分光光度法测蛋白含量

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 双缩脲反应

双缩脲是由两分子尿素缩合而成的化合物。双缩脲在碱性溶液中能与硫酸铜反应产生红紫色络合物的反应。

蛋白质分子中含有许多和双缩脲结构相似的肽键, 因此也能起双缩脲反应。通常可用此反应来定性鉴定蛋白质, 也可根据反应产物的颜色深浅在 540nm 处进行蛋白质的定量测定。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 酚试剂 (Folin-酚试剂) 反应

蛋白质分子中一般都含有酪氨酸 (Tyr), 而酪氨酸中的酚基能将 Folin-酚试剂中的磷钼酸及磷钨酸还原成蓝色化合物 (即钼蓝和钨蓝的混合物)。

这一反应常用来定量测定蛋白质含量。可根据反应产物的颜色深浅在 540nm 处进行蛋白质的定量测定。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室

生物化学讲义

0 茚三酮反应

由于蛋白质多肽链两端有游离的 α -NH₂ 和 α -COOH, 所以蛋白质也可以和茚三酮发生反应。

0 考马斯亮蓝

考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质特异结合后变为青色, 在 595nm 处有光吸收, 故常用于蛋白质含量的测定。

东北农业大学 生化与分子生物学教研室