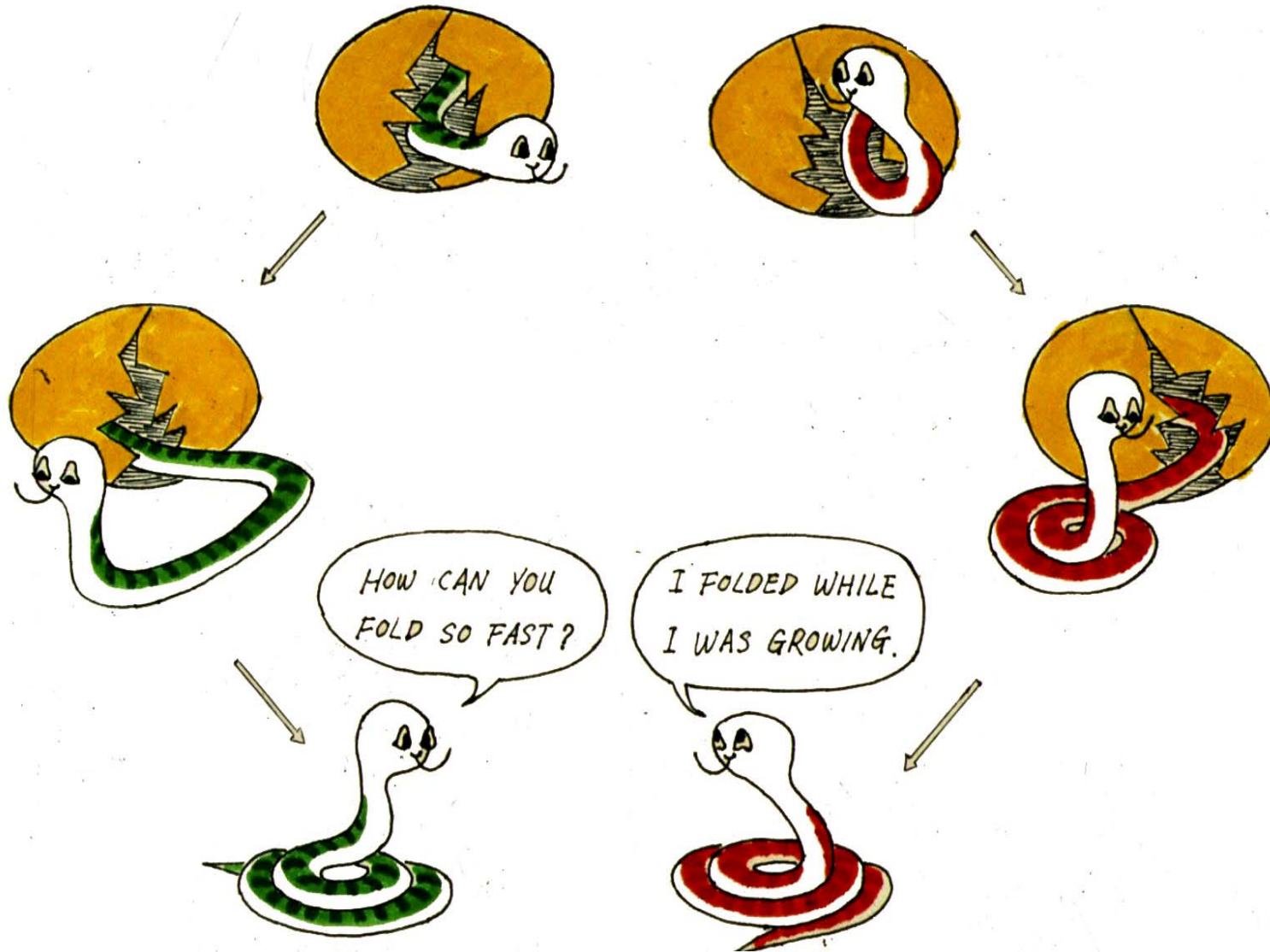


3.8. 蛋白质的折叠



3.8. 蛋白质的折叠



多肽链可迅速折叠为其天然构象

In *E.coli*, 100 aa peptide fold in 5s at 37° C

Levinthal's paradox: $10^{100} \times 10^{-13} \text{s} = 10^{77} \text{yr}$

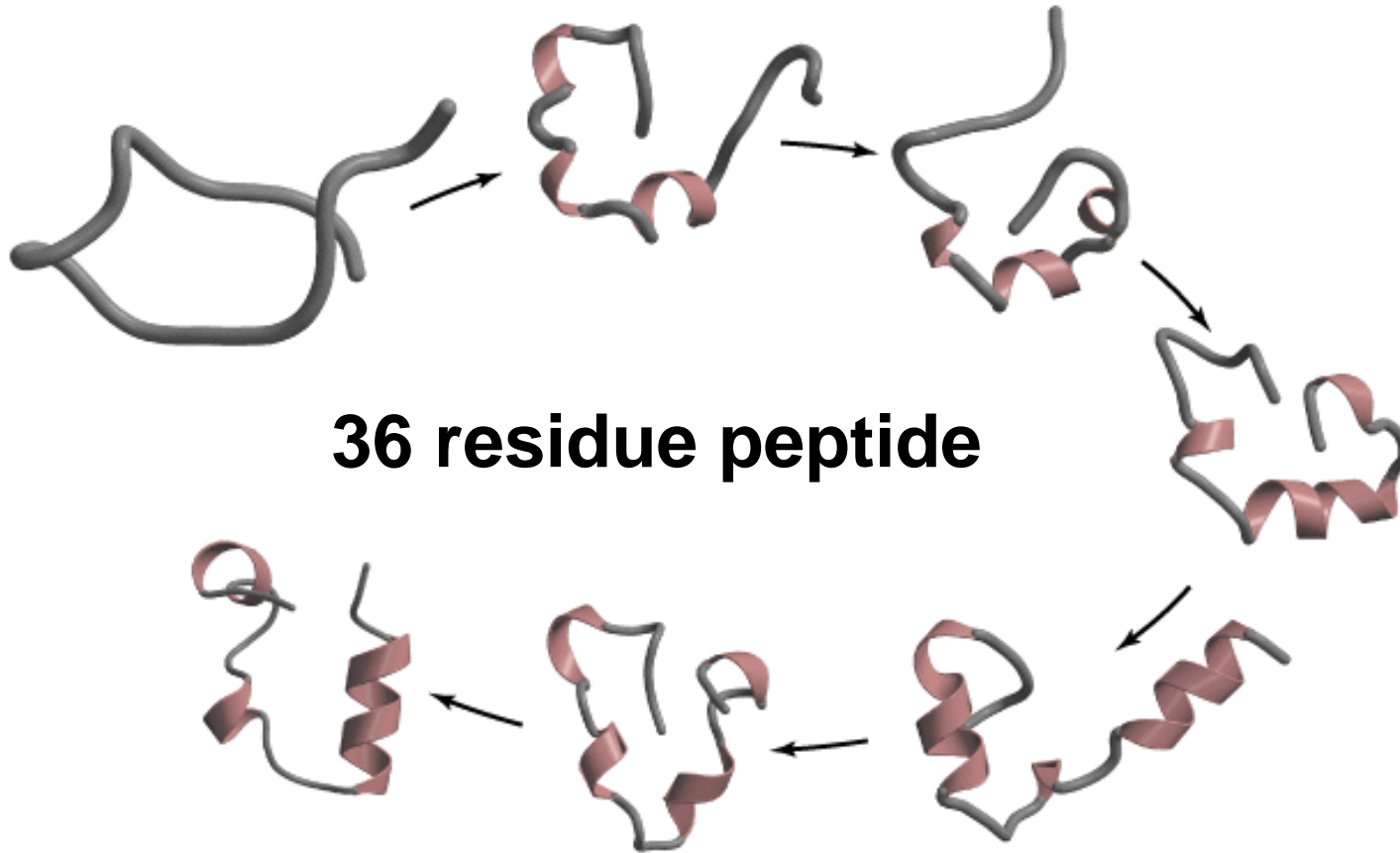
蛋白质的折叠不是随机的搜索过程

Protein folding cannot be a completely random, trial-and-error process

There must be shortcuts!

3.8.1 蛋白质折叠模型

- Hierarchical model:** 先形成二级结构，逐渐折叠成超二级结构，结构域，三级结构；





3.8.1 蛋白质折叠模型

2. Hydrophobic collapse model

(疏水塌缩模型)：

疏水残基侧链的相互作用先形成一个较紧密的球状中间体，其中包含部分二级结构，称为熔球态中间体。然后进一步折叠成天然结构。

熔球态 (molten globule)： 部分折叠的中间态

3.8.1 蛋白质折叠模型

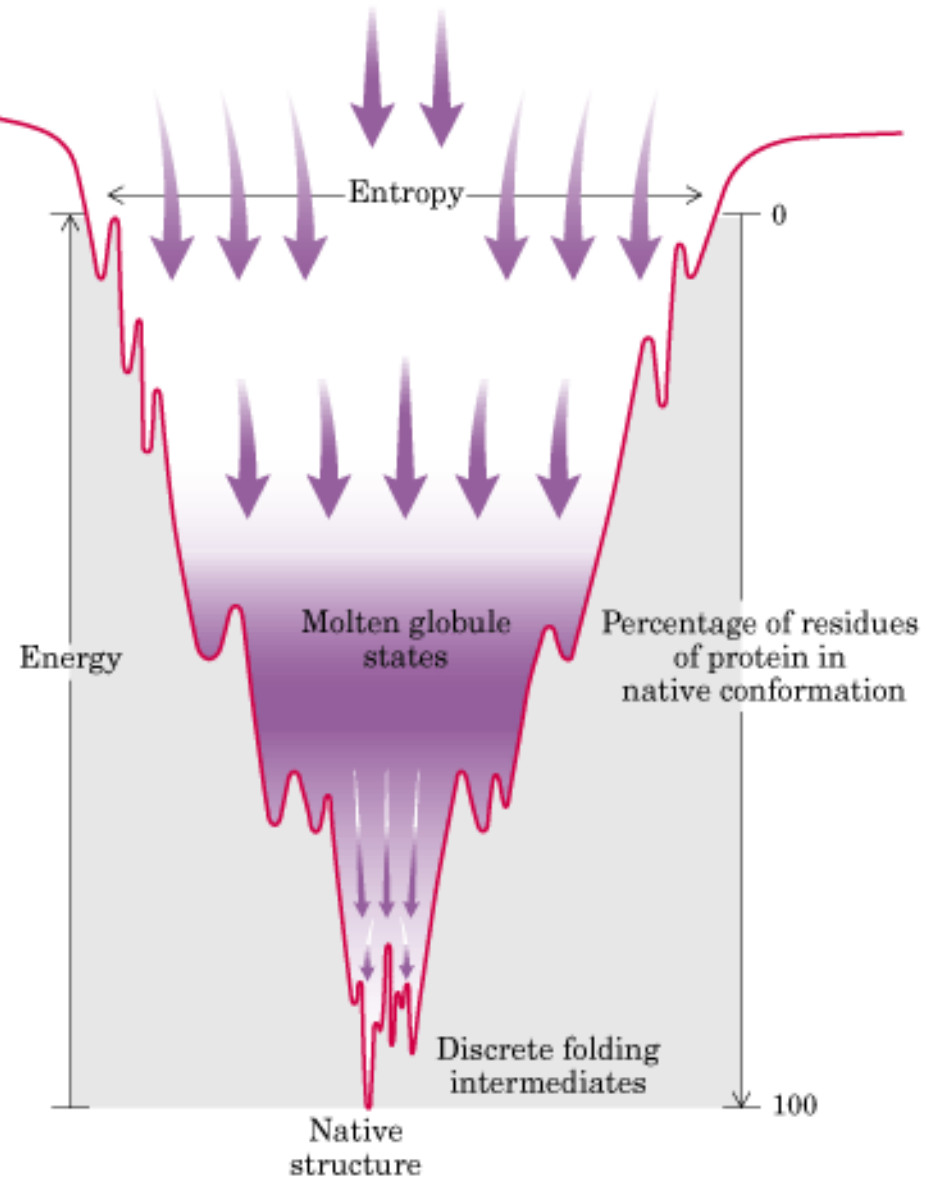


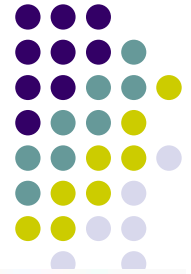
Beginning of helix formation and collapse

3. 自由能漏斗模型 (folding funnel)

- 天然构象的自由能最低，折叠的主要推动力是疏水作用；
- 折叠过程中，构象数目减少，天然构象比例增加，蛋白质熵值降低。自由能降低。

as the protein folds,
entropy is traded for
enthalpy

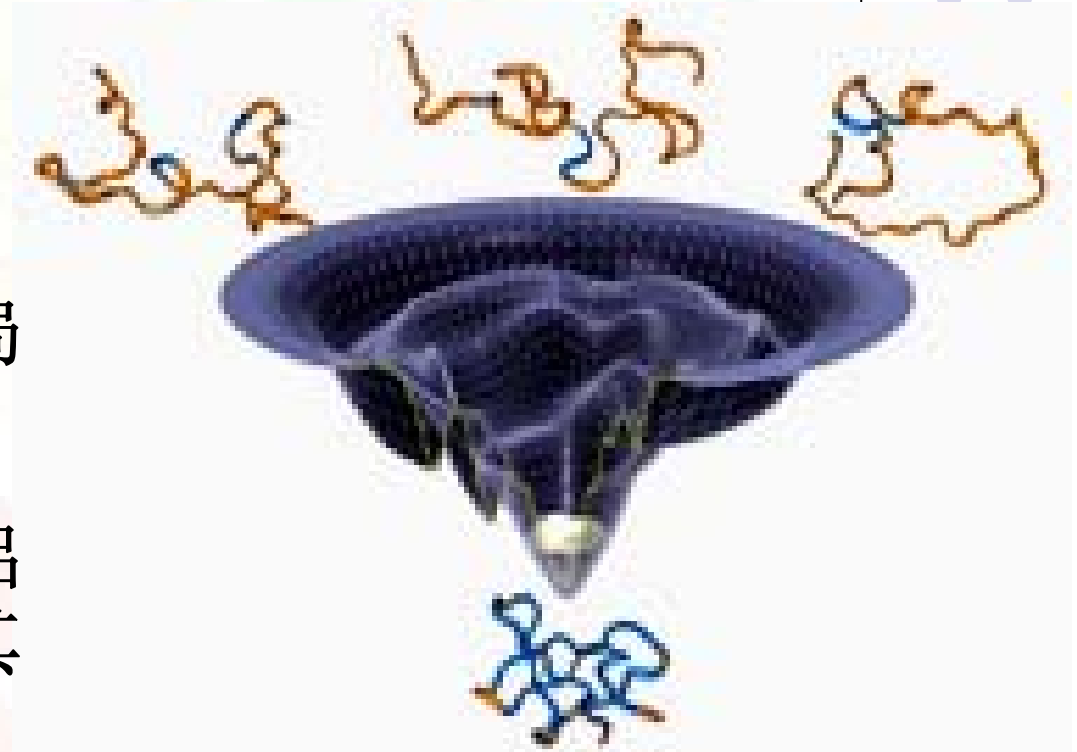




3.8.1 蛋白质折叠模型

3. 自由能漏斗模型

- 折叠的道路可能不止一条；
- 有的蛋白会被困在局部能量最低的状态；
- 体内折叠时分子伴侣可以消耗**ATP**帮助其重新折叠。



events taking place early along the folding pathway are crucial in that they 'set-up' downstream events

Image Credit: Peter G. Wolynes

3.8.3 细胞内蛋白质折叠



- 并非所有蛋白都能自发折叠为天然构象，细胞内许多蛋白质的正确折叠需要其它蛋白质的帮助。
- 与部分折叠或错误折叠的肽链相互作用并帮助它正确折叠和成熟的一类蛋白质被称为**分子伴侣(Molecular Chaperons)**;

3.8.4 分子伴侣



Molecular Chaperones

分子伴侣

- ① Person, usually a married or elderly woman who, for the sake of propriety, accompanies a young unmarried lady in public as guide and protector

Oxford English dictionary(2nd Ed.)

Chaperone 監護者

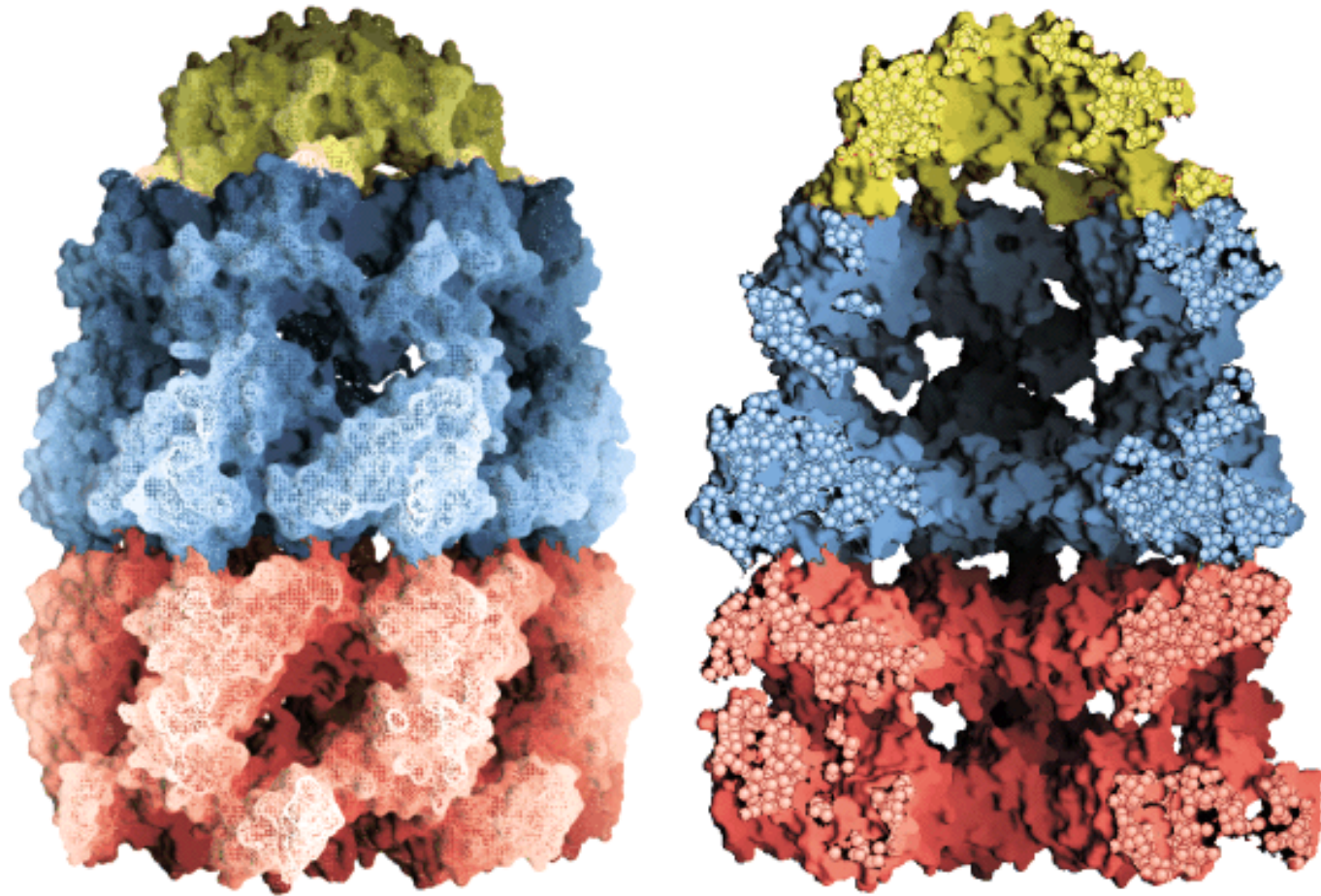




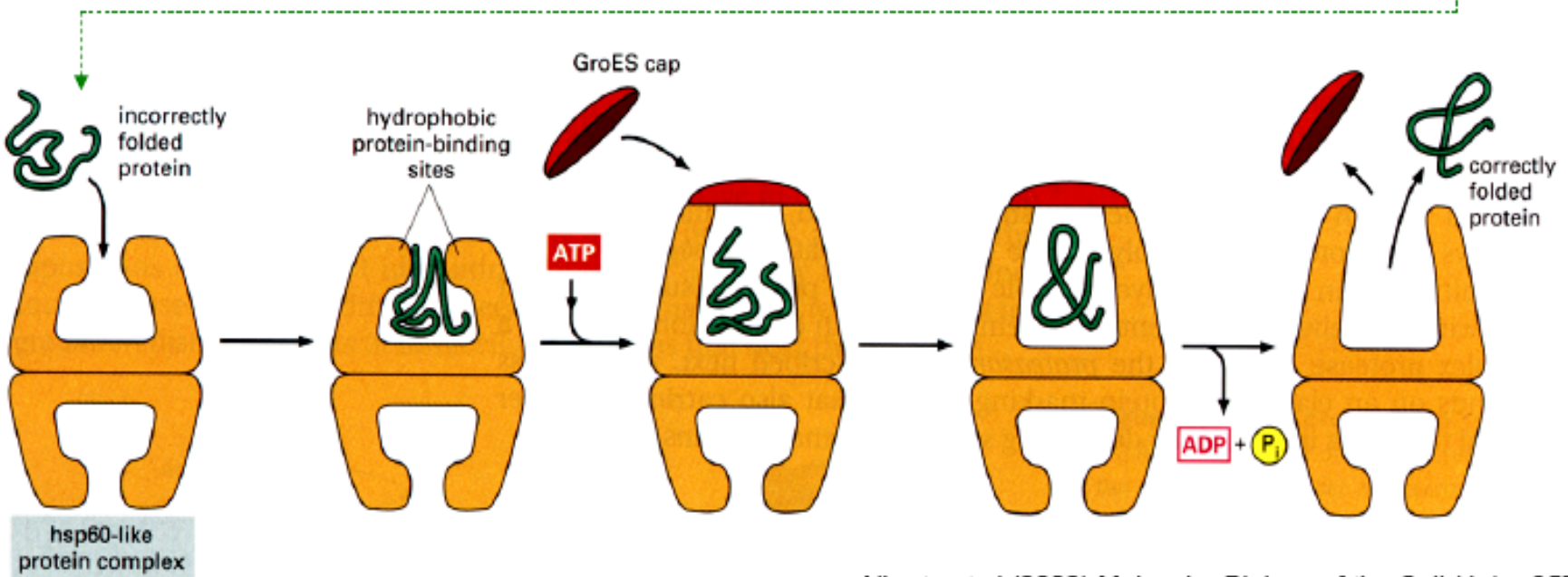
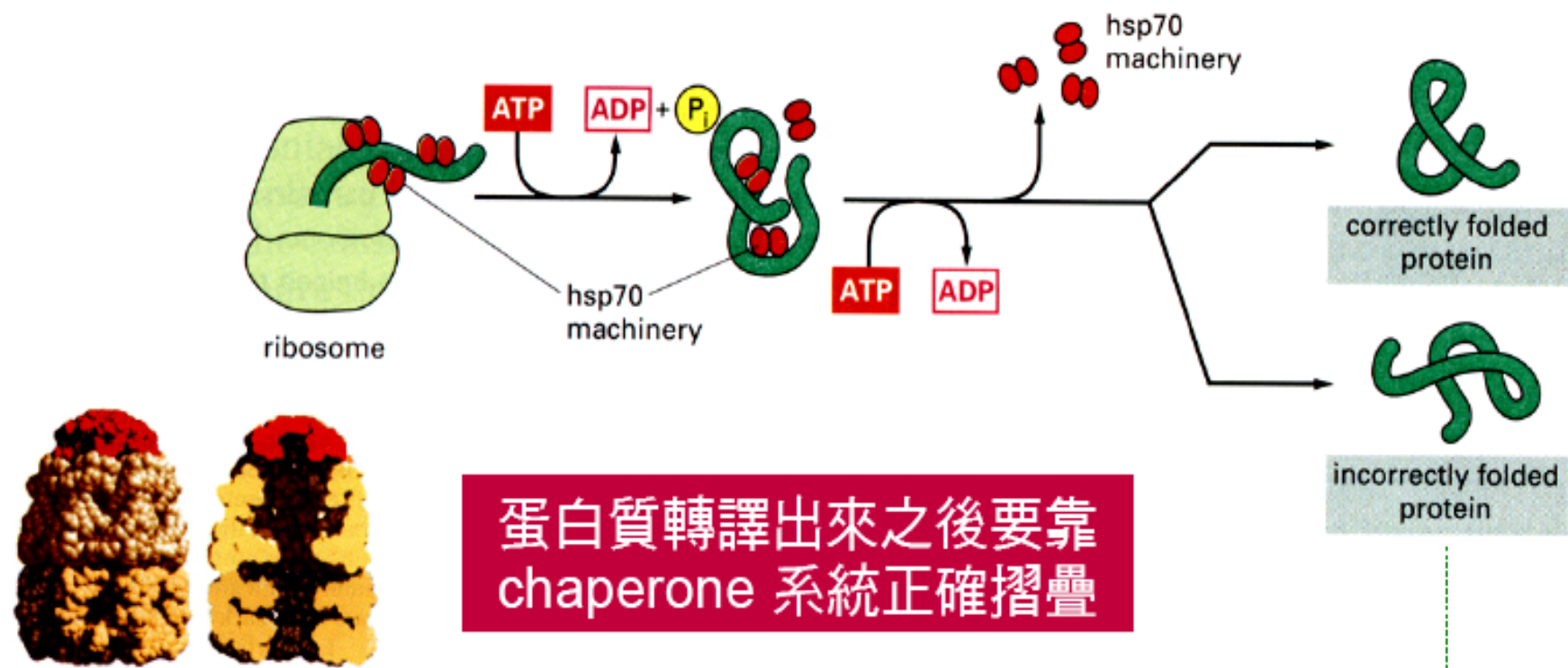
3.8.5 体内几种帮助折叠的蛋白

- **热休克蛋白(Hsp70)**: 结合蛋白质疏水残基
 - **伴侣蛋白(Chaperonins)**: 组成帮助折叠的大复合物
 - **二硫键异构酶(PDI)**: 帮助二硫键正确配对
 - **肽酰脯氨酸顺反异构酶(PPI)**: 帮助脯氨酸顺反异构
- 分子伴侣是一个**功能性的概念**，它是指一类相互之间没有关系的蛋白,它们的功能是帮助其它蛋白质在体内正确折叠。

E.Coli的伴侣蛋白复合物 GroEL/GroES complex

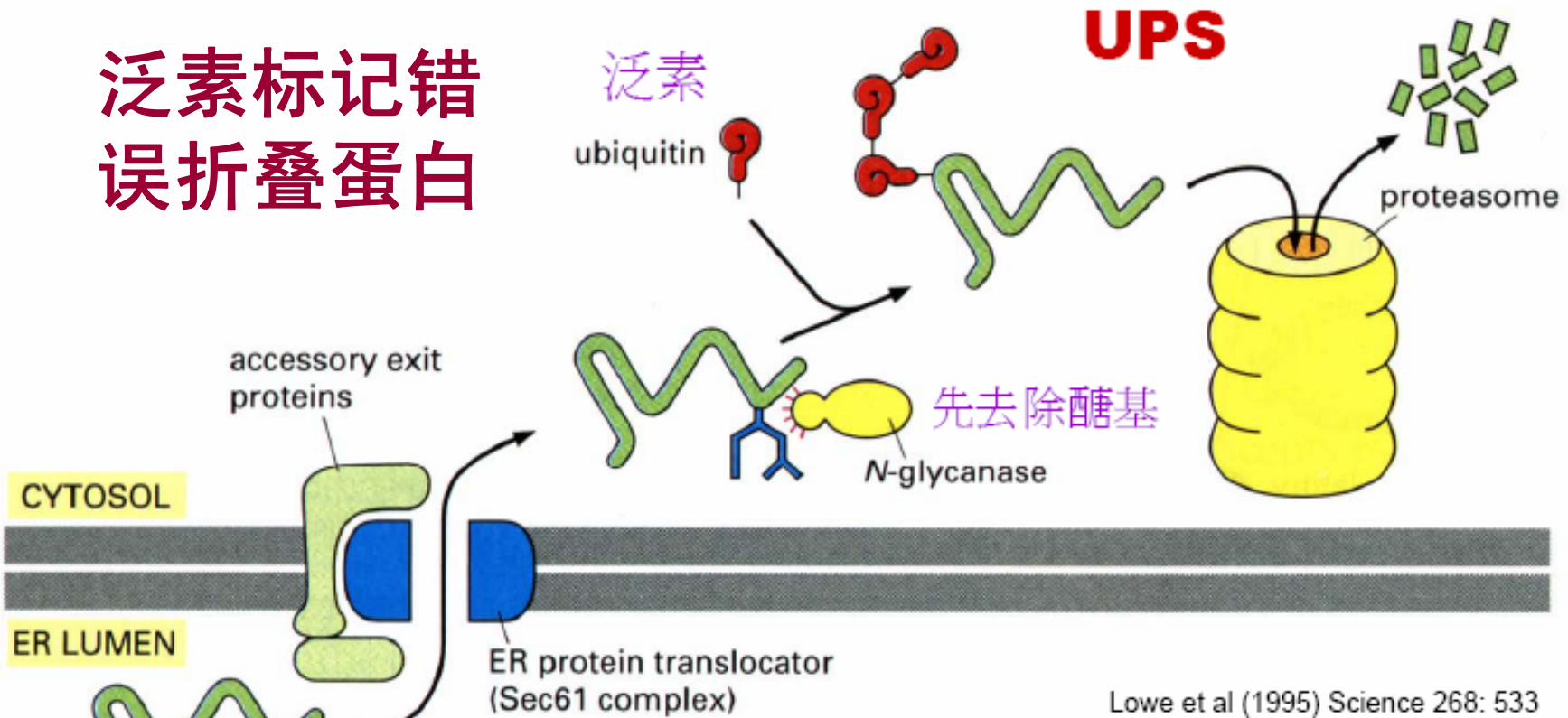


(b)

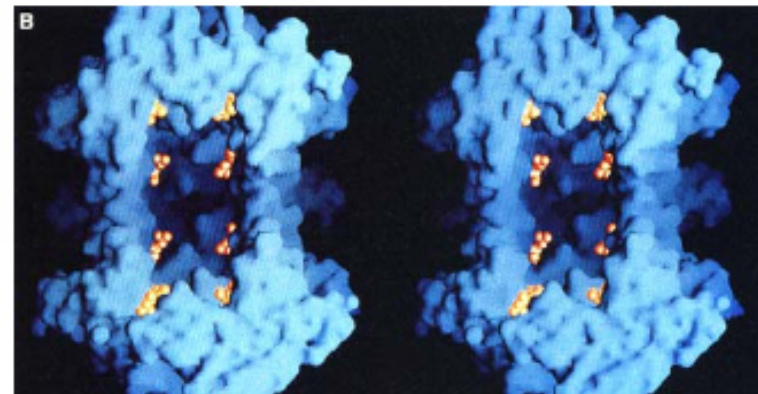


3.8.6 摺疊不良的蛋白質會被送到銷毀系統

泛素标记错误折叠蛋白



Lowe et al (1995) Science 268: 533

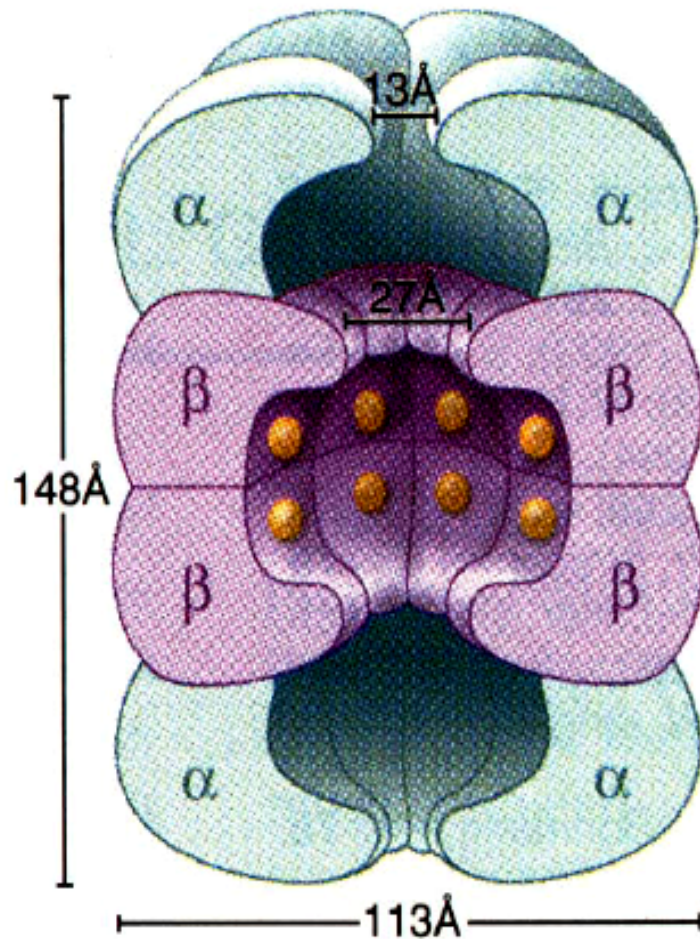


送入蛋白
酶体降解

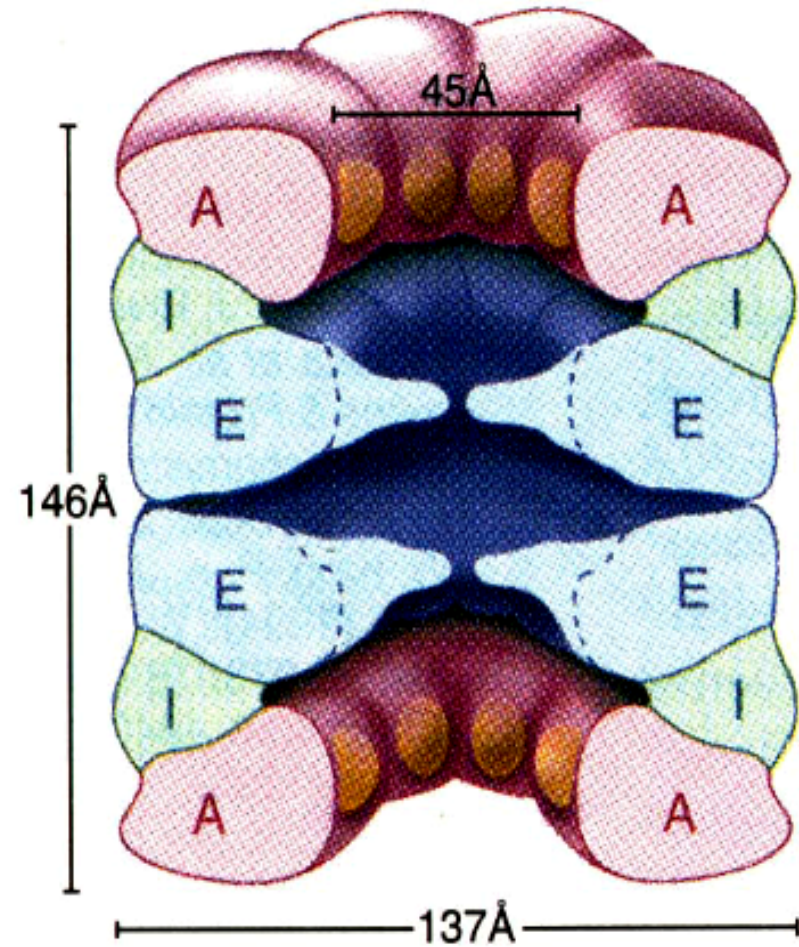
Proteasome (内部水解区)

相似的桶狀巨分子卻有相反的作用

蛋白酶体：蛋白质的碎肉机



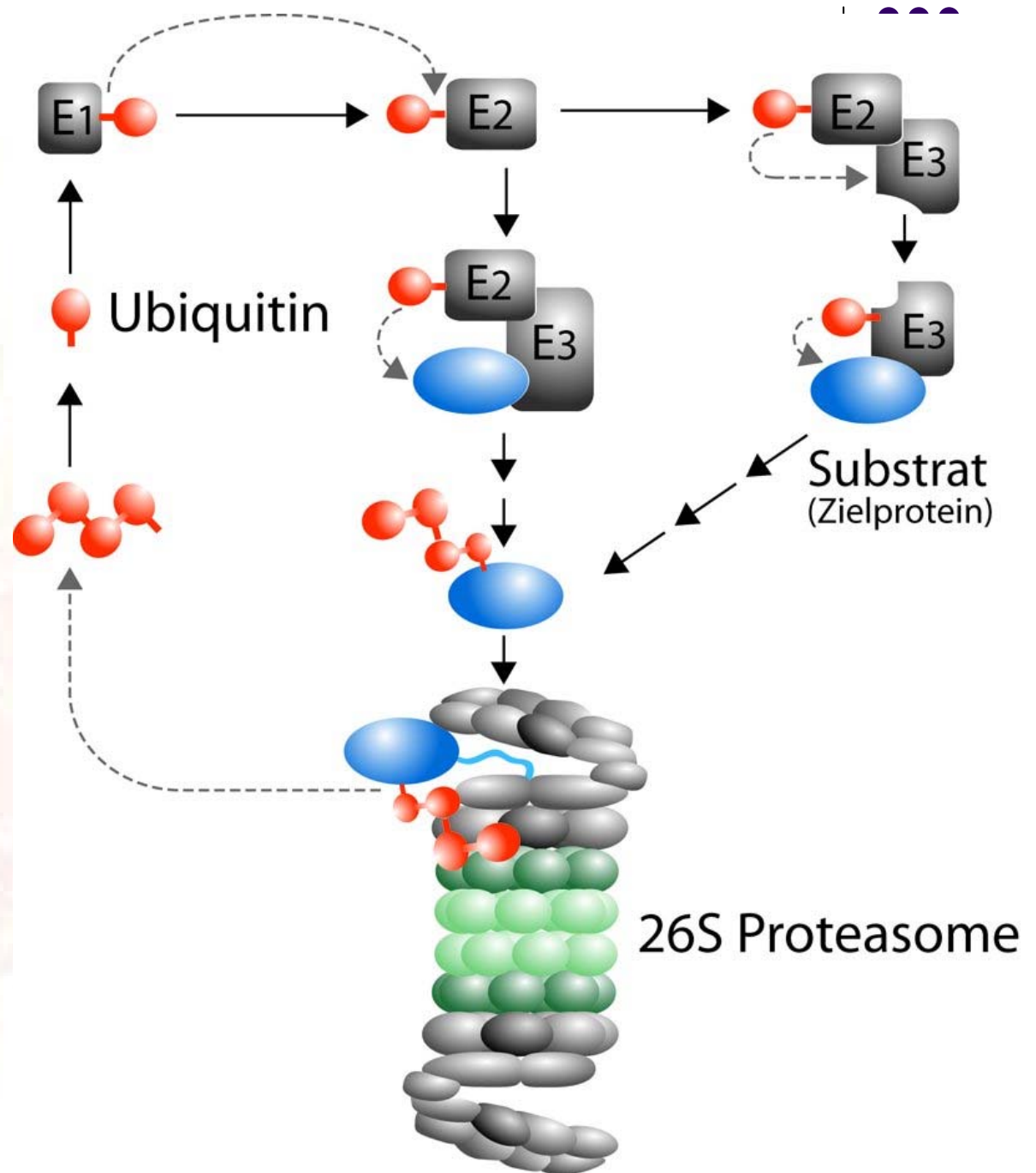
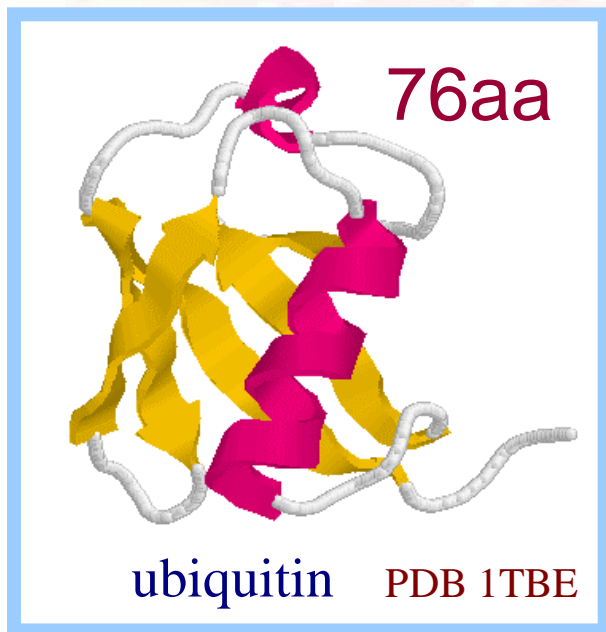
Proteasome (20S)



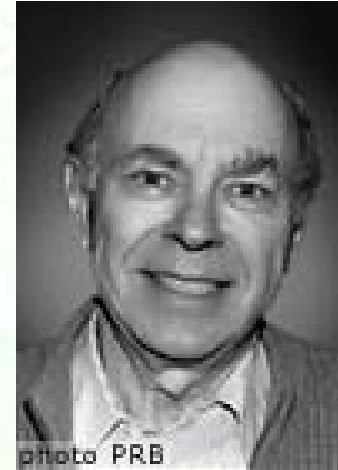
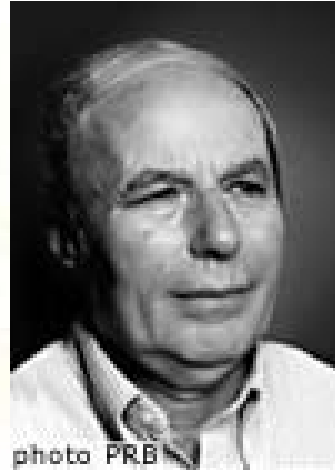
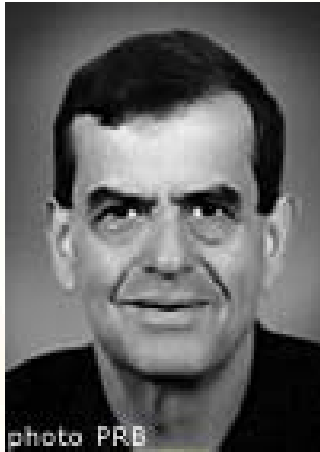
Chaperonin (GroEL)

3.8.7 泛素： 死亡标签

被泛素标记的
蛋白的命运是
送入蛋白酶体
被降解



The Nobel Prize in Chemistry 2004



Aaron Ciechanover Avram Hershko Irwin Rose

Israel

Israel

USA

They discovered cellular ‘machinery’ by which unwanted proteins are first marked for destruction by attaching a small protein tag – called **ubiquitin (泛素) then digested by intracellular proteolysis by a specialized organelle called the proteasome**

3.8.8 蛋白质错误折叠可导致疾病



- ① **囊肿性纤维化(cystic fibrosis)**是一种慢性、进行性粘液性遗传病,常见于北欧白人后裔.
- ② **朊蛋白疾病(prion disease)**: 疯牛病,羊搔痒病,人Kuru病,人Jakob病,又统称为**海绵样脑病(spongiform encephalopathy)**.
- ③ **神经神经退行性疾病** (如**Alzheimer's disease, AD; Parkinson's disease, PD**)

3.8.8 蛋白质错误折叠可导致疾病

① 囊肿性纤维化(cystic fibrosis, CF)

CF是一种常见的严重的遗传病，**5%**的美国白人携带致病基因

病人的呼吸道堵塞不畅，导致反复病菌感染而损伤肺脏。病人往往**30岁前**即因呼吸衰竭而死亡。



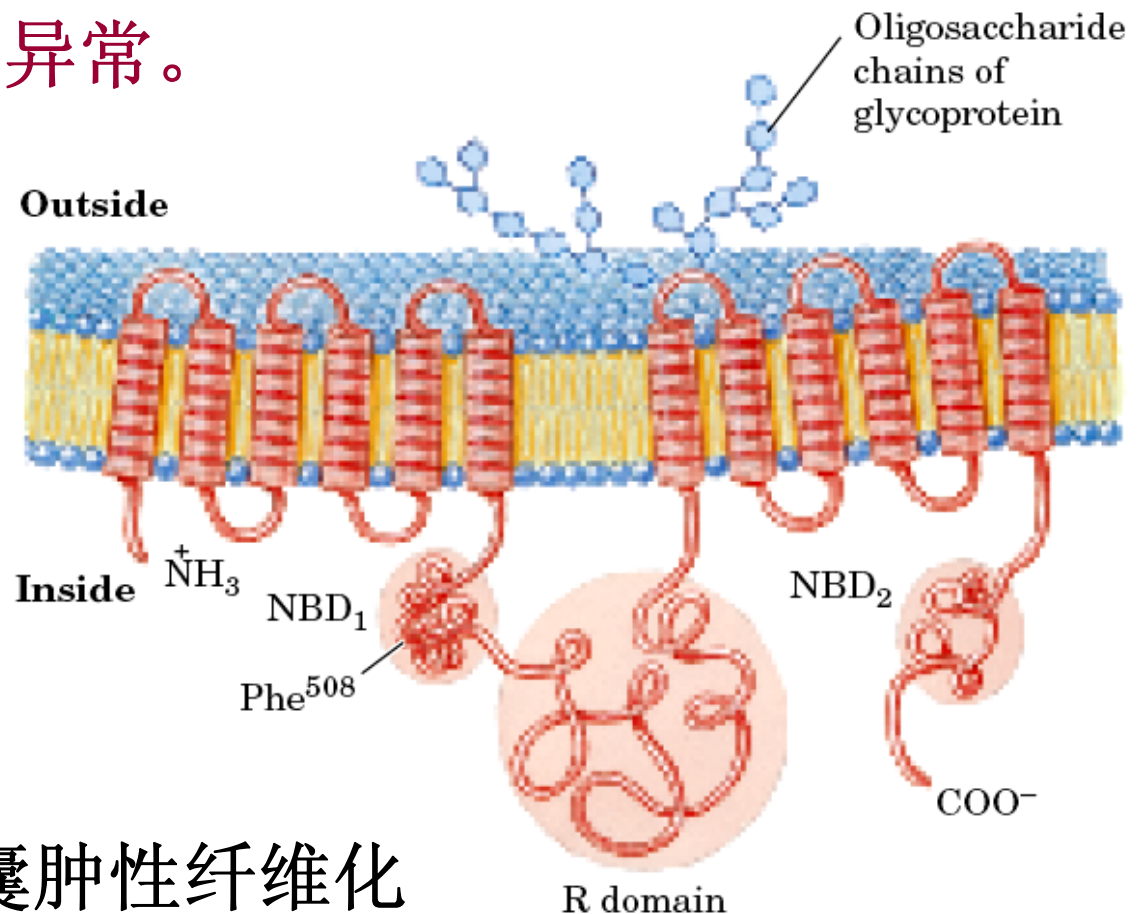
3.8.8 蛋白质错误折叠可导致疾病



① 囊肿性纤维化(cystic fibrosis)

1989年发现，引起CF的病因是CFTR蛋白的异常。

CFTR蛋白是一个Cl⁻通道，致病基因的Phe⁵⁰⁸缺失，导致CFTR不能正确折叠，丧失Cl⁻通道功能。引起肺上皮细胞功能异常。



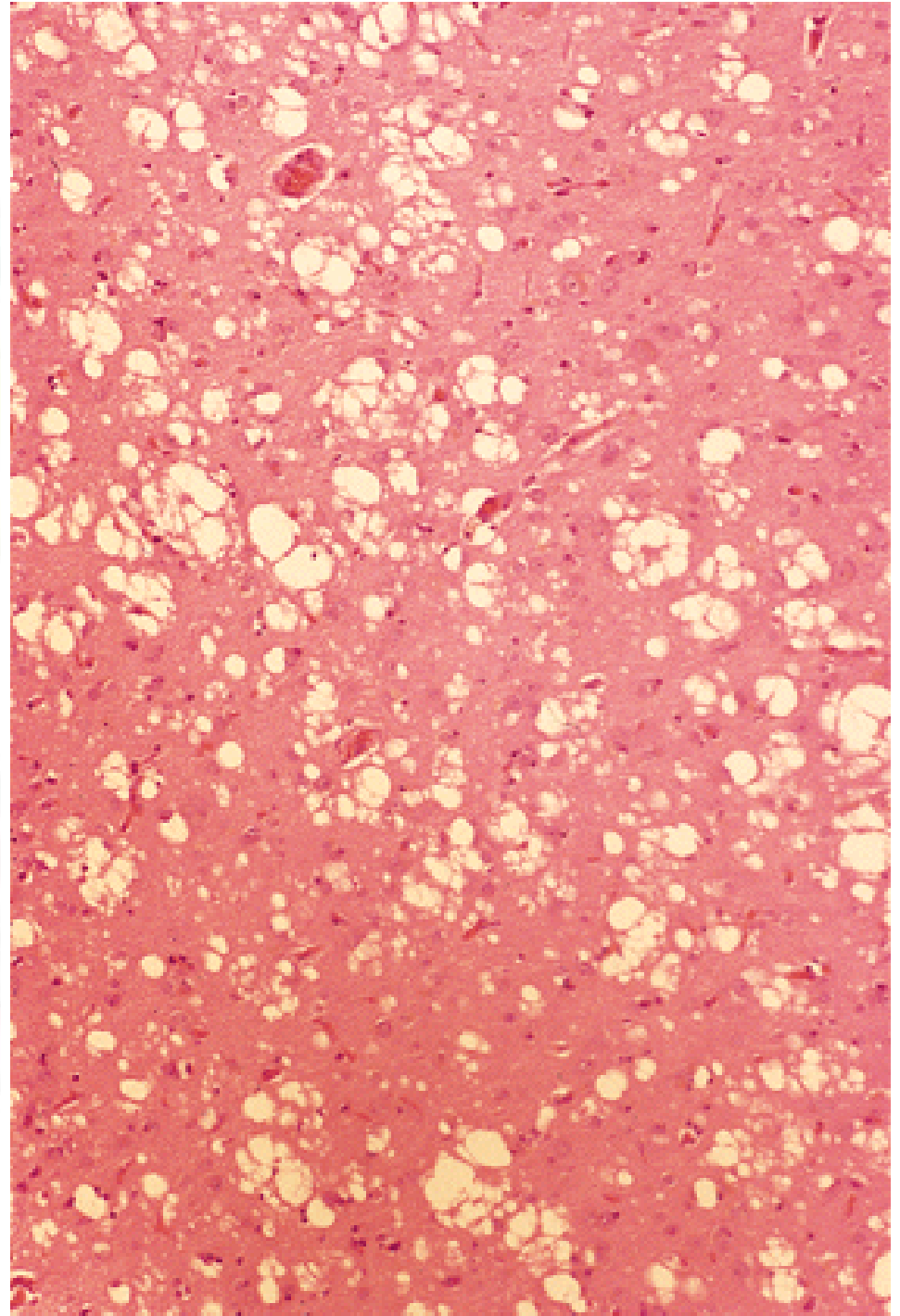
囊肿性纤维化

3.8.8 蛋白质错误折叠 可导致疾病

②海绵样脑病

**spongiform
encephalopathy**

Jakob病人脑组织切片



能够传染致病的蛋白质粒子—— Prion（普列昂，朊蛋白）



1997年度Nobel生理及医学奖
S.B.Prusiner(加大旧金山分校)

发现一种新的蛋白质性质
致病因子prion(普列昂)



S.B.Prusiner



引发传染病的罪魁祸首——病源物

低等动物：血吸虫、绕虫
原生动物：疟原虫、变形虫
真菌：霉菌、酵母
细菌：痢疾、炭疽
立克次氏体：斑疹伤寒
支原体：类胸膜肺炎
衣原体：沙眼
病毒：流感、小儿麻痹症

这些病源物都含有遗传物质！



在羊搔痒病病因的研究中，经过八年努力
(1974-1982)，1982年，B. Prusiner在
《science》发表一篇文章：

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie

提出羊搔痒病病原物是一种蛋白质粒子。他
称之为Prion(Proteinaceous Infectious only)
Protein(PrP)，即蛋白质类的感染颗粒(朊蛋白)

6种针对蛋白质的方法，如蛋白水解酶可以使Prion丧失感染力；而五种针对核酸的处理对Prion无效。



Prion概念的提出，立刻引起轩然大波。

许多人问：没有核酸，这个病原物如何增殖？如何复制本身的遗传信息。

许多人怀疑：可能还是存在核酸，只是未能检测出来。



具有讽刺意味的是：

最早提出实验证据，证明核酸是遗传信息载体的是 **Avery 1942年** 有关肺炎球菌转化因子的实验。

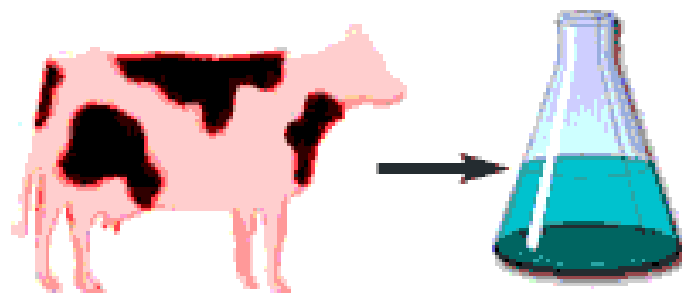
当时，Avery 的报告未能引起多大重视。有人怀疑转化因子中起作用的仍是蛋白质，只是 Avery 未能检测出来。



关键在于普利昂是否含有核酸？

普鲁西纳回忆说：

在寻找核酸上，D.Riesner 和我所花的功夫比其他任何人都多。



Mad cow

From www.wiley.com/.../cutting_edge/prions/prions.htm

更深入的研究，更意外的结果



随着研究的深入，得到更多打破传统观念的结果：

在寻找Prion-P基因的研究中发现编码普列昂蛋白 (PrP) 的基因，不但在染病动物脑中存在，亦在正常动物脑中**找到**，而且表达得一样多。

对 PrP^c 和 PrP^{sc} 两种蛋白质做分析发现

它们都是由208个氨基酸残基组成的疏水性很强的糖蛋白。

PrP^c
和
PrP^{sc}

{ DNA序列
RNA剪切
氨基酸序列
翻译后修饰 }

均无差别

C: cellular

Sc: scratchie



最后，终于找到差别

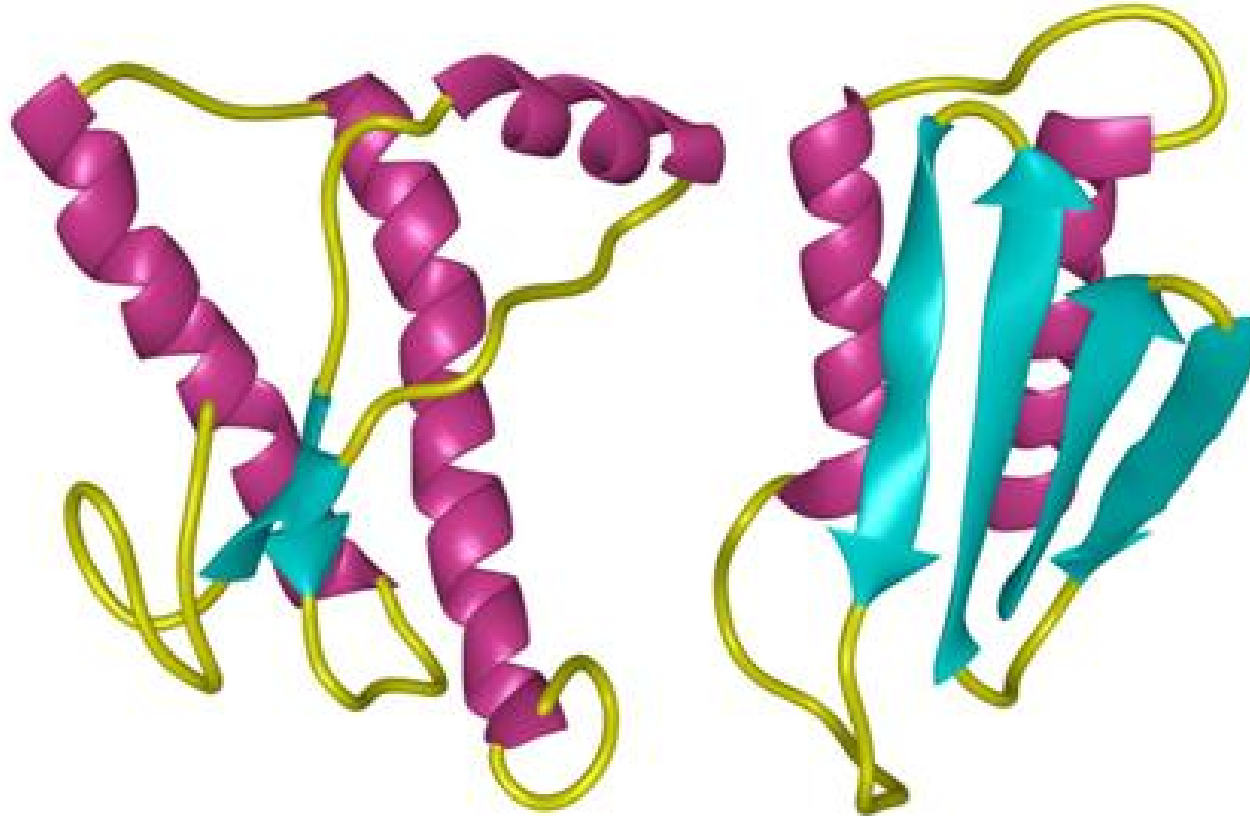


PrP^c 和 PrP^{sc} 在高级结构上有巨大差别

	PrP^c	PrP^{sc}
α - 螺旋	40%	21%
β - 折叠	3%	54%

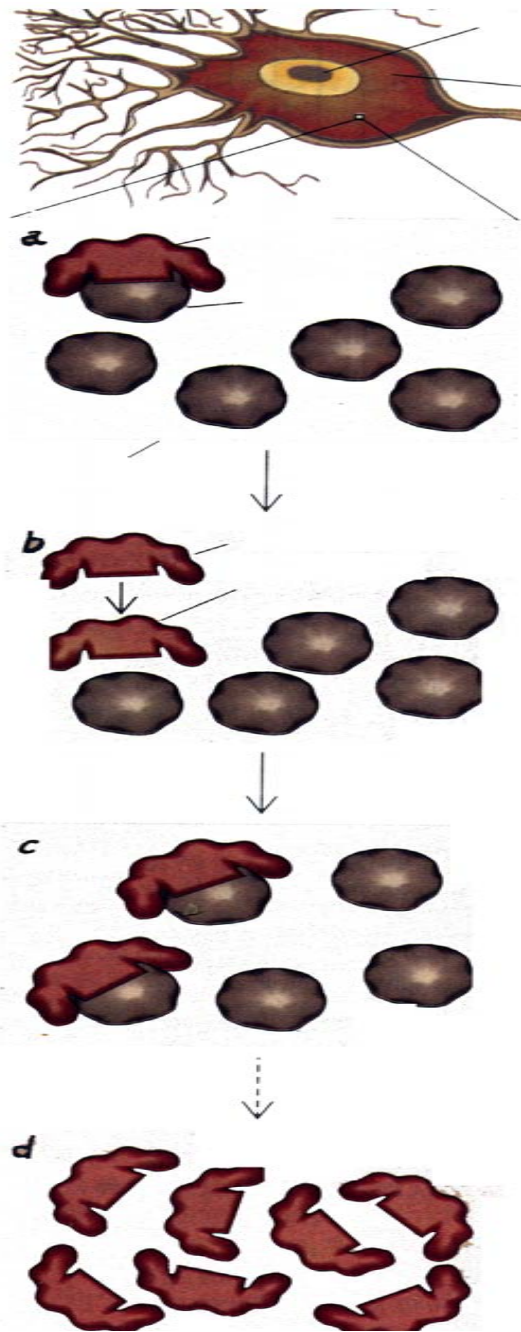
PrP^C

PrP^{Sc}



From <http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/media/pages/gallery.html>

羊搔痒病的病因：



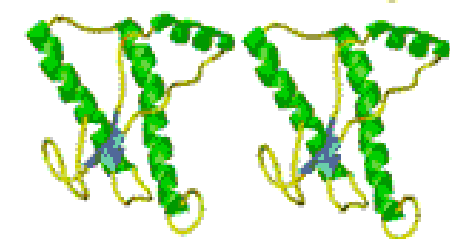
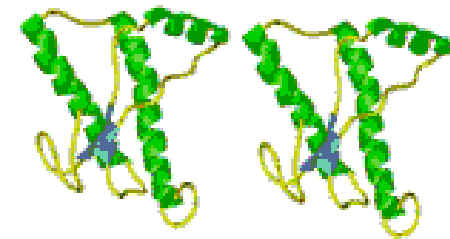
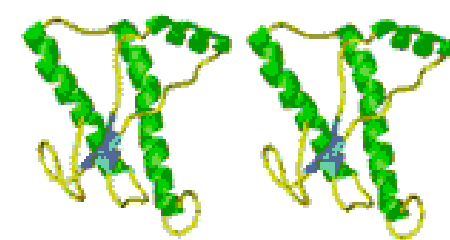
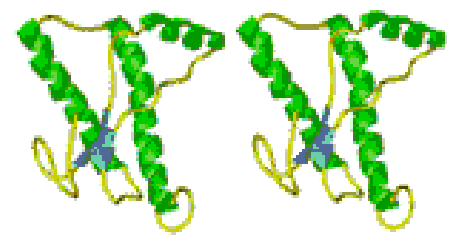
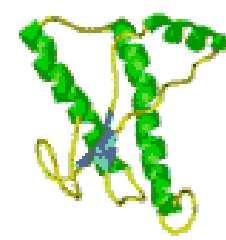
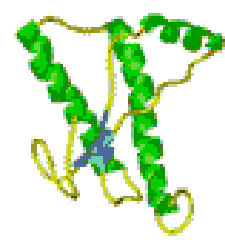
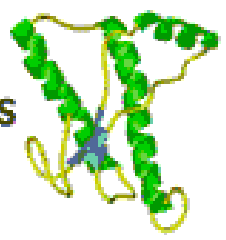
搔痒病的发生是因为 PrP^{SC} 的入侵，使脑细胞中原来就有的 PrP^C 重新折叠，变成了 PrP^{SC}。这种转化是指数放大的。

增多的 PrP^{SC} 形成淀粉样斑，造成脑细胞破坏，出现空斑。

蛋白质与蛋白质之间的相互作用而引起折叠方式的改变



Cellular PrPS

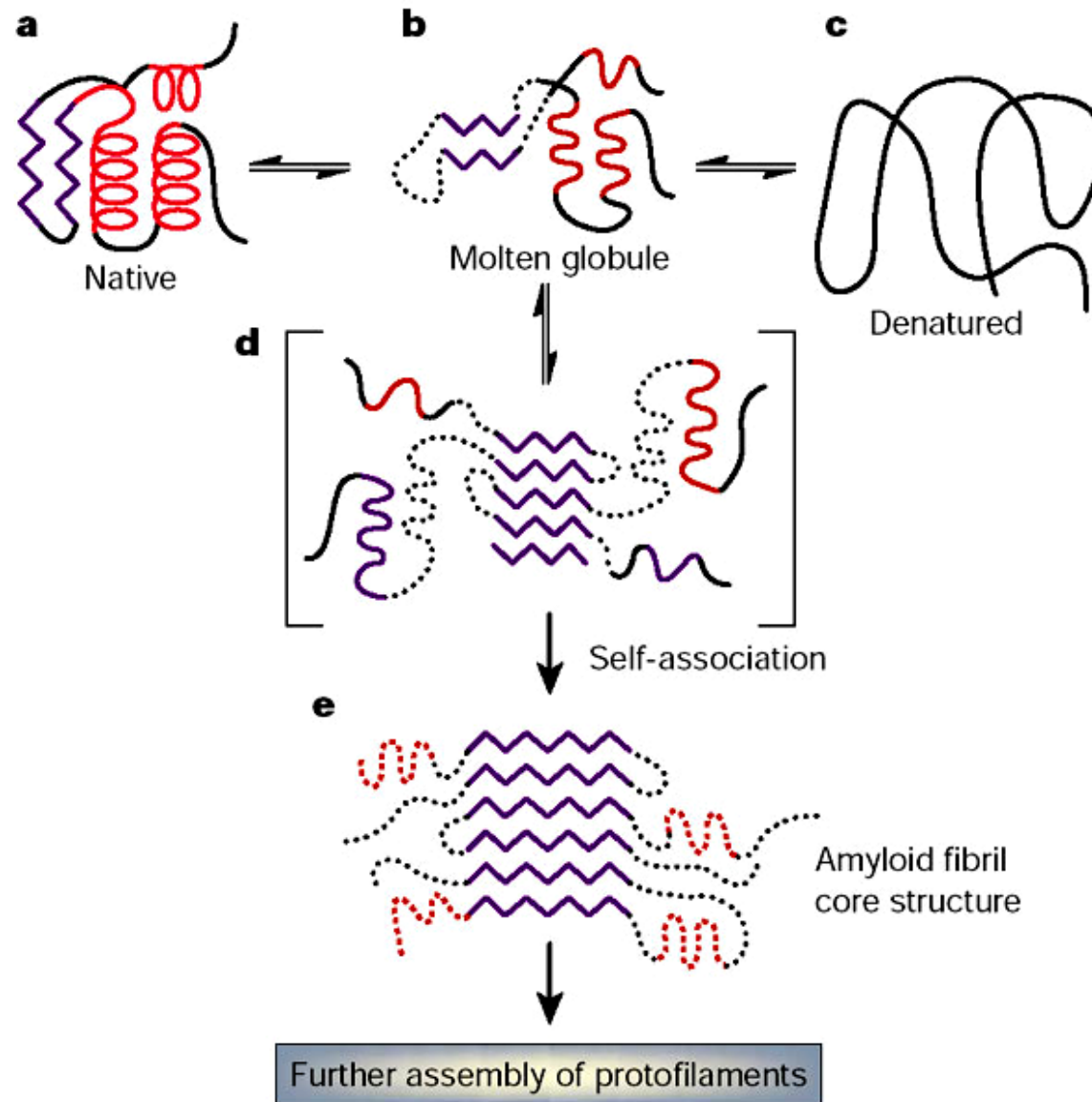


From www.wiley.com/.../cutting_edge/prions/prions.htm

错误折叠的蛋白形成淀粉样沉淀



AD
PD



From www.nature.com/.../n6968/full/nature02264.html

3.9. 测定蛋白质三维结构的主要方法



◆蛋白质晶体学

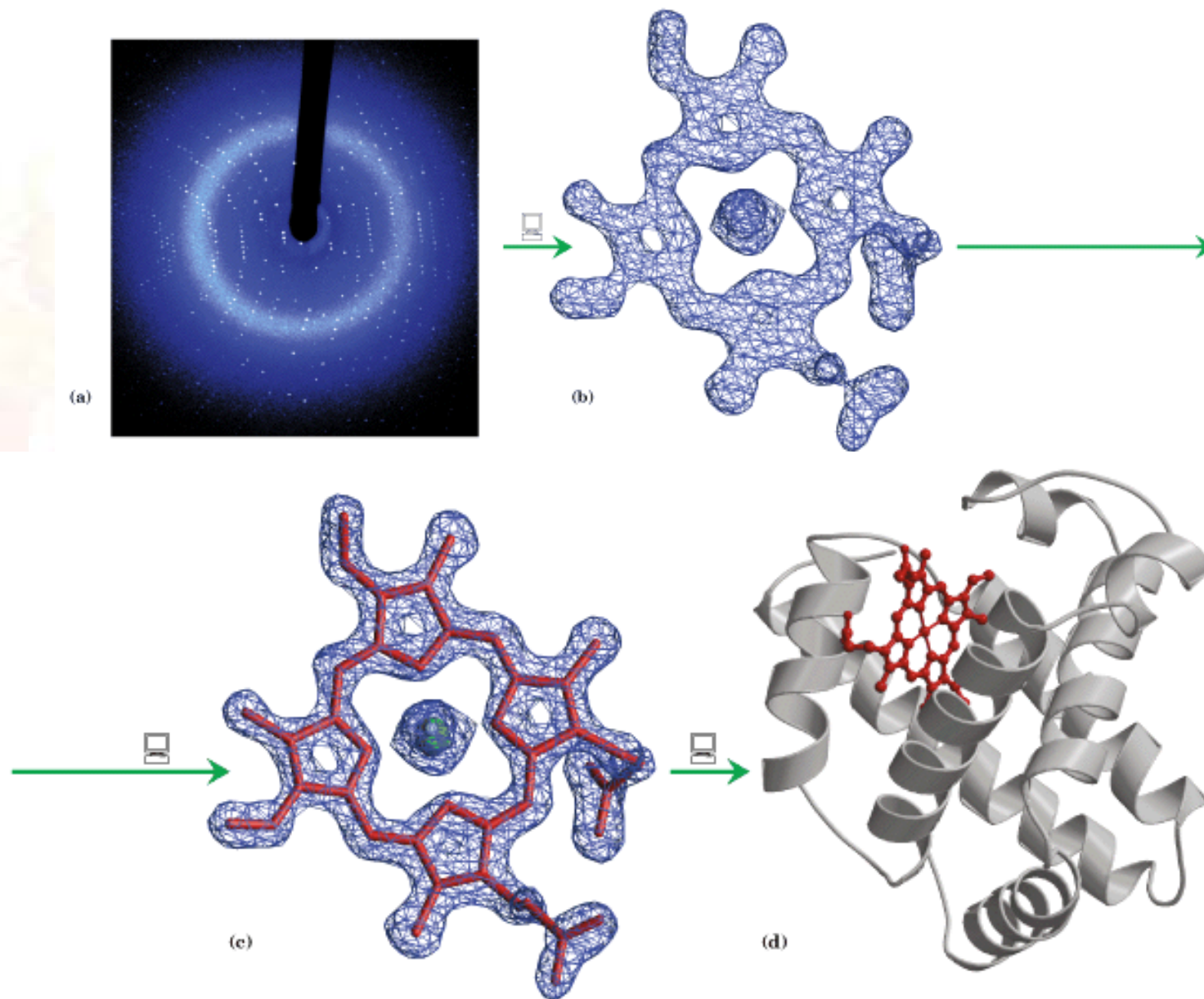
◆核磁共振波谱学(NMR)

◆电镜三维重构

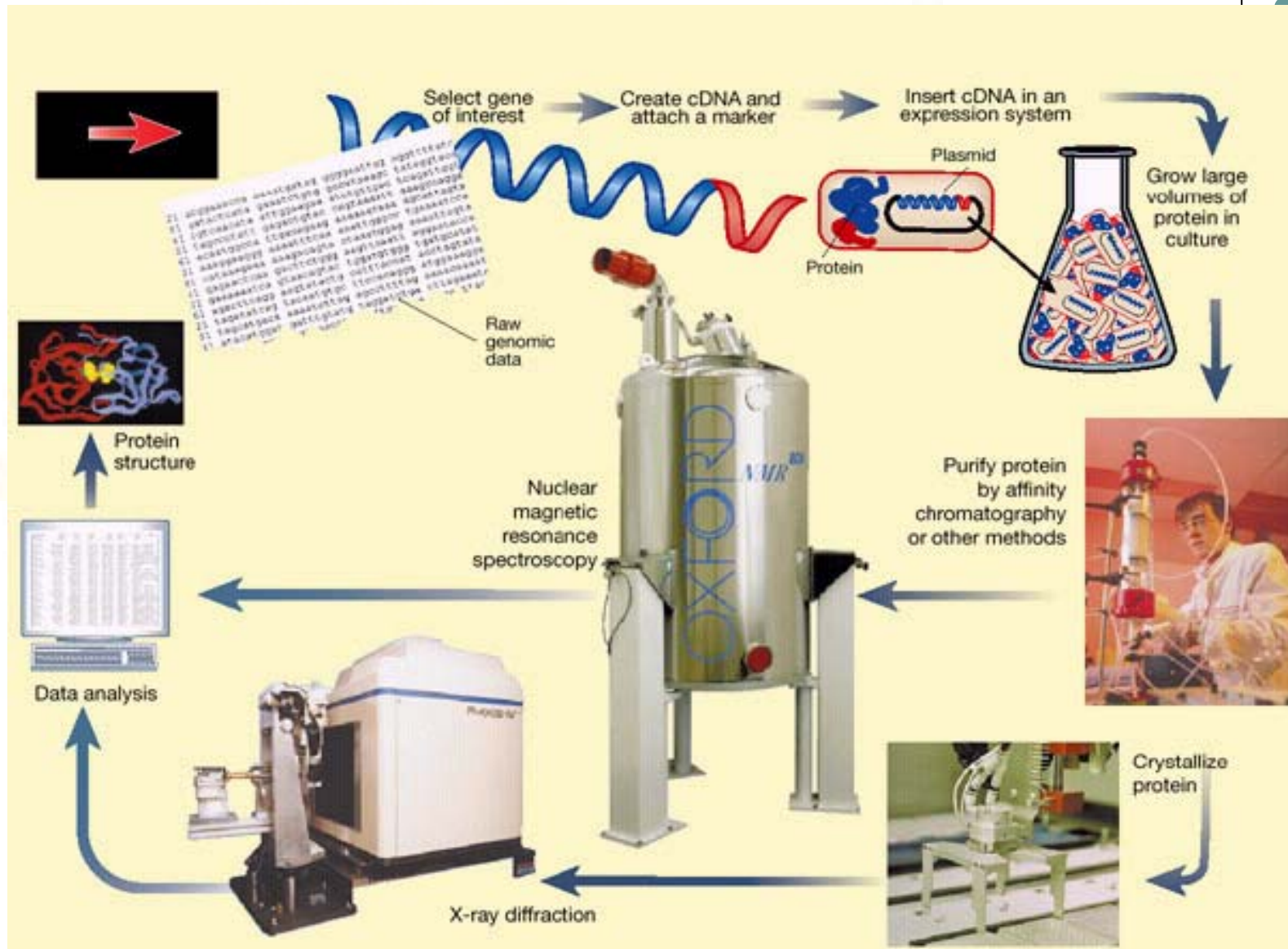
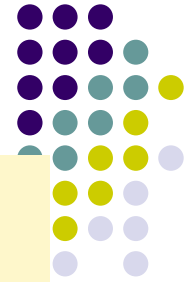
X-Ray Diffraction



大部分的蛋白质的晶体结构与其天然的溶液构象几乎没有差别。



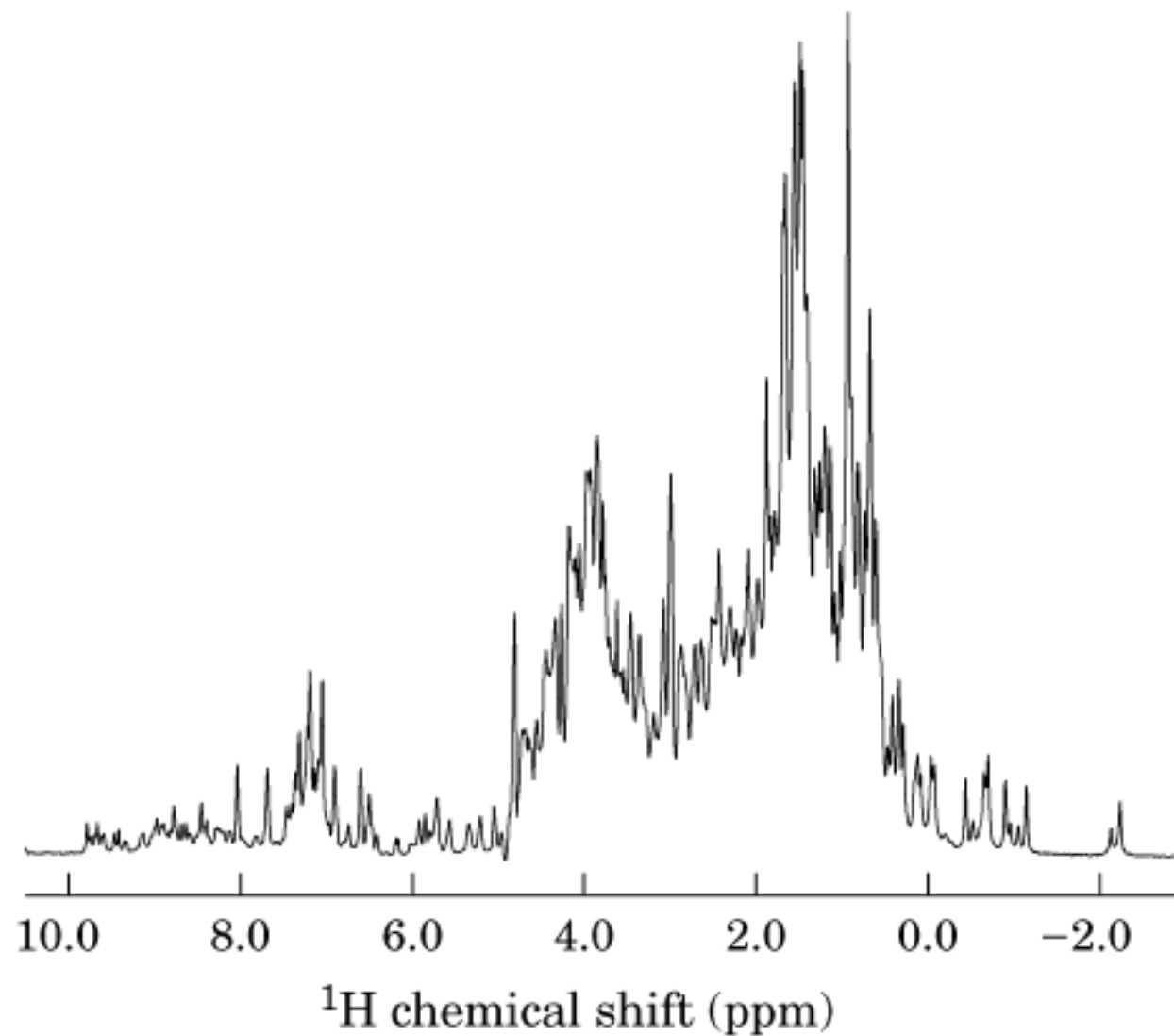
NMR Procedure



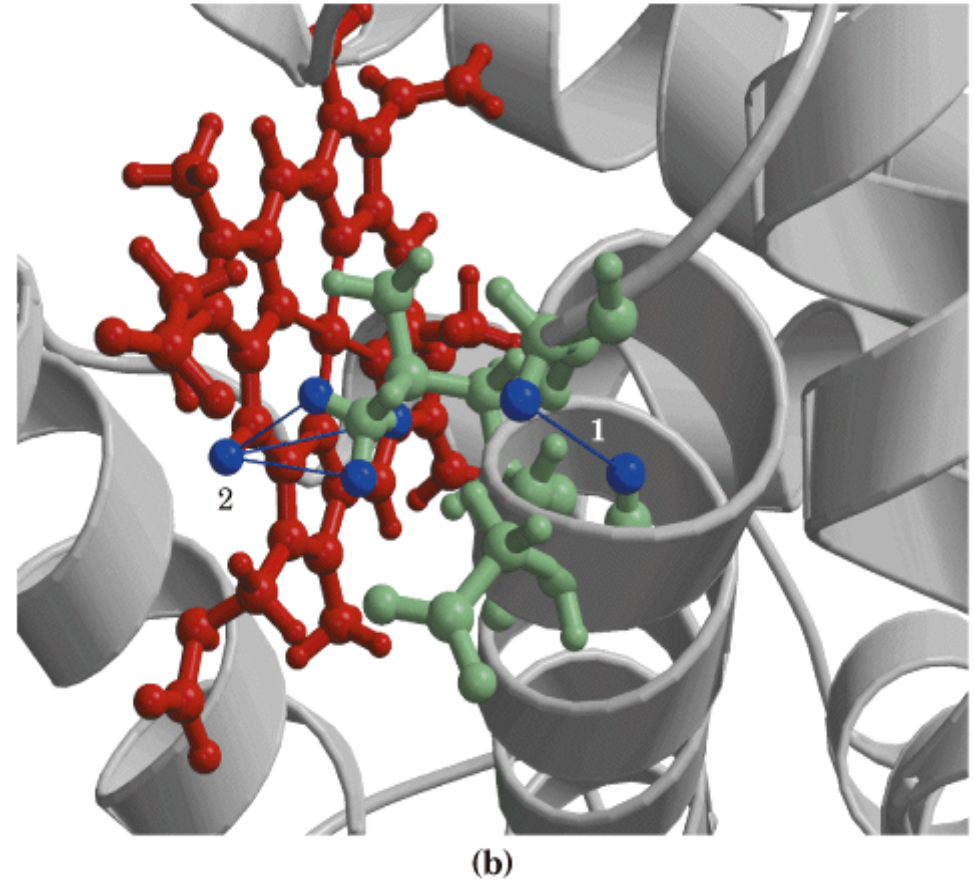
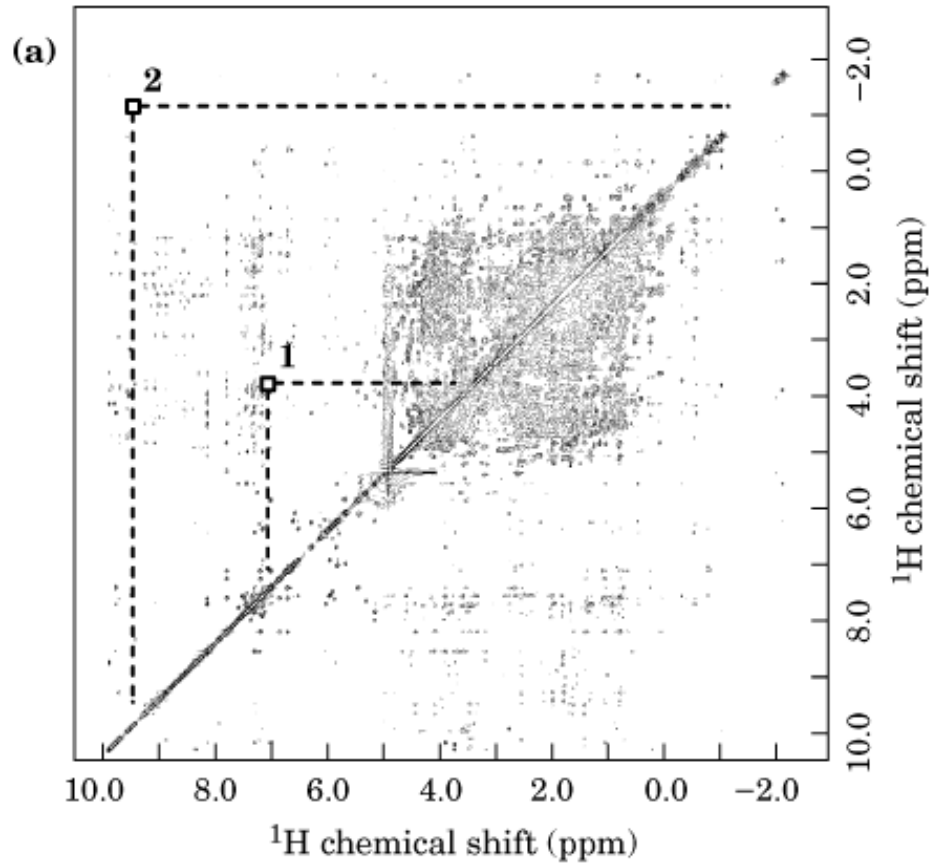
Nuclear Magnetic Resonance



H一维谱



Nuclear Magnetic Resonance

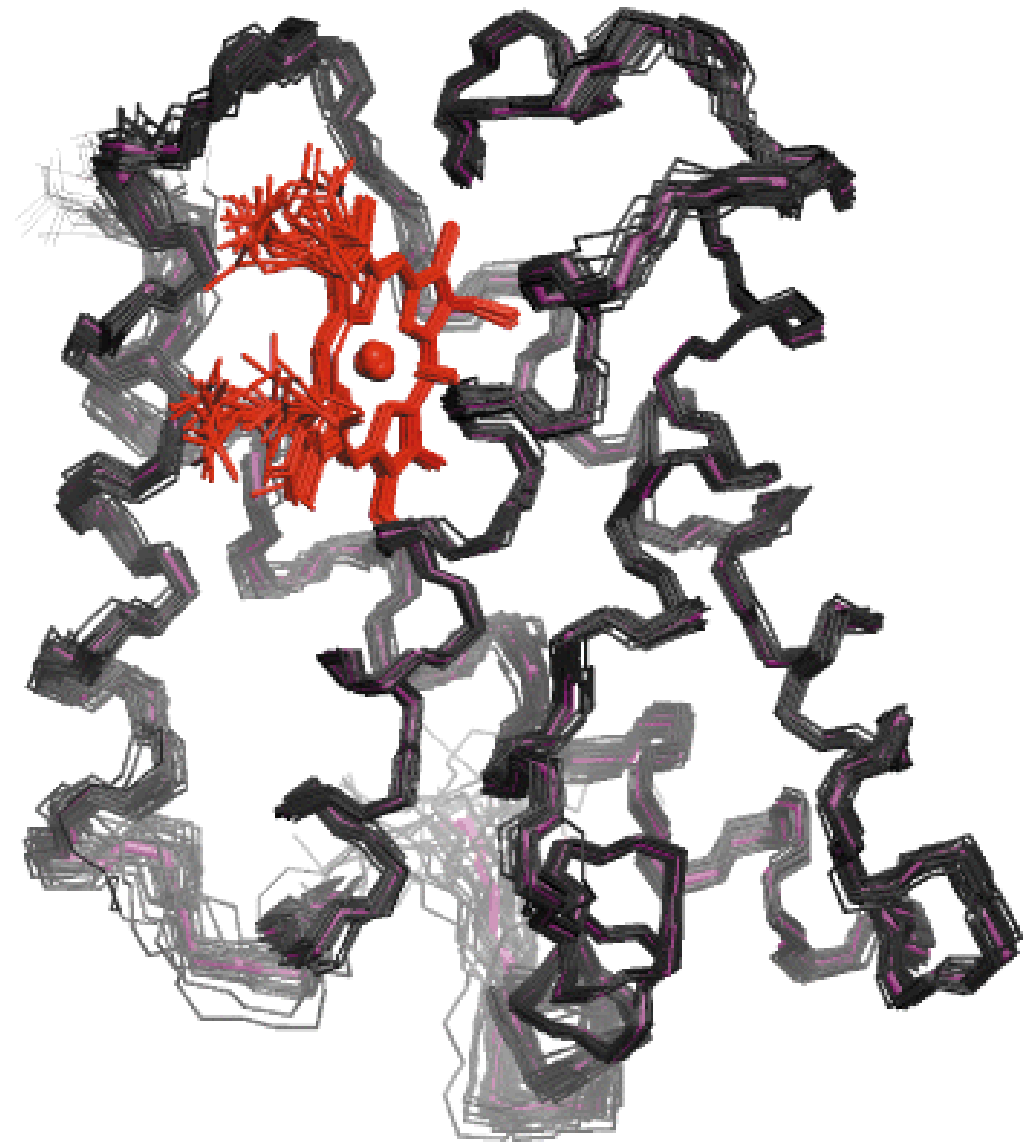


NOE效应



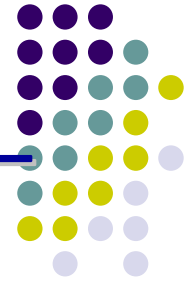
NMR可以解析蛋白质的溶液结构

NMR determines the solution structure of proteins



(c)

- 在日本第三代同步辐射光源Spring-8同步辐射工厂已于1997年10月建成，其中有4条结构生物学光束线，2条**结构基因组**专用光束线。



RIKEN Yokohama NMR Park

规模化的核磁实验室

大规模的蛋白质结构测定已经开始

900 MHz x 4
800 MHz x 6
600 MHz x 10
进一步发展
为40台

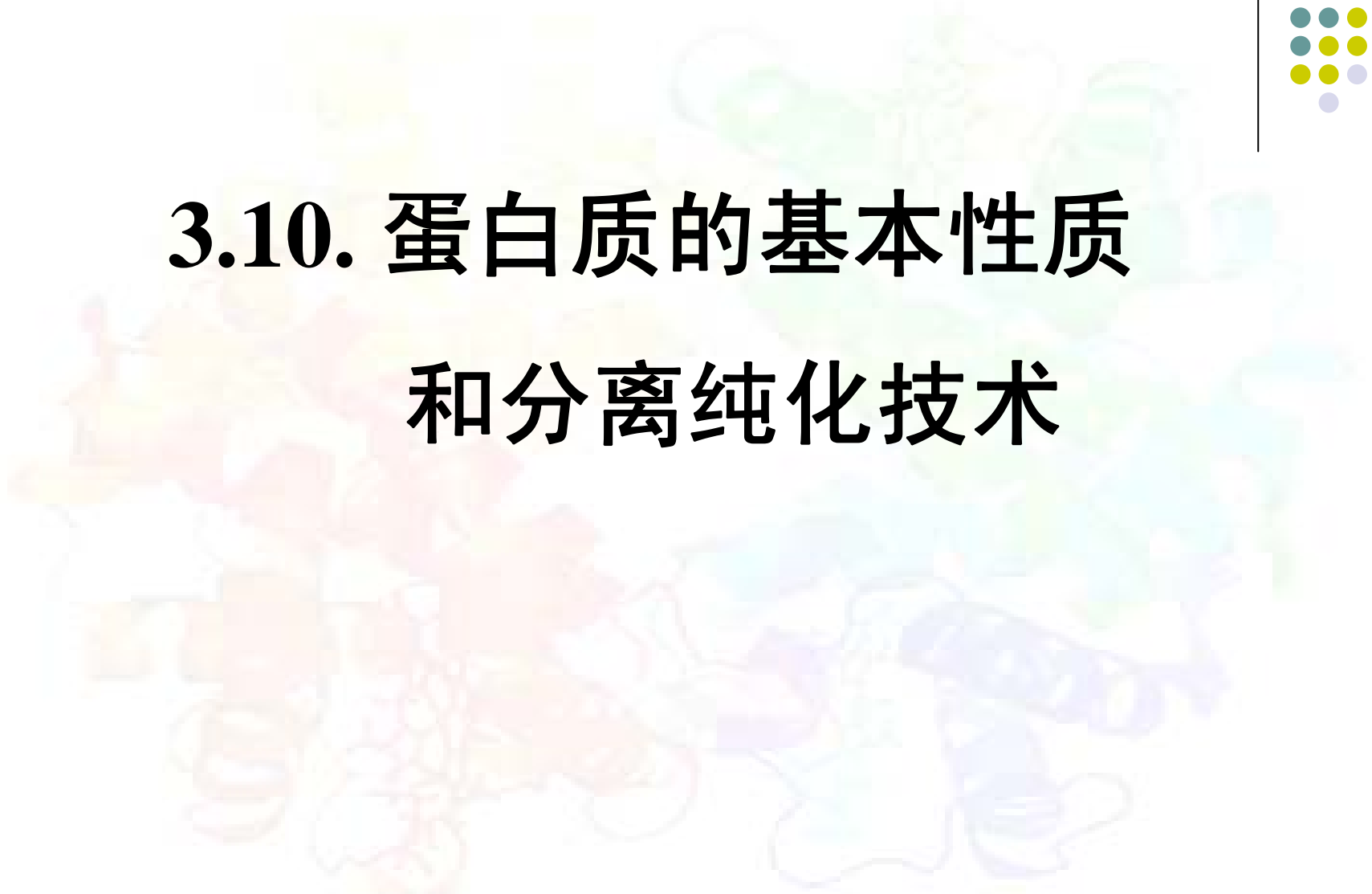


Fig. 1 The NMR facility of Genomic Sciences Center, the RIKEN Yokohama Institute.

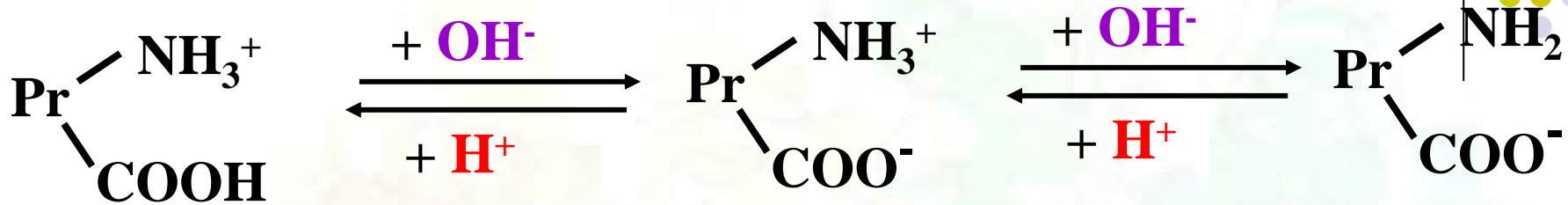




3.10. 蛋白质的基本性质 和分离纯化技术



3.10.1 蛋白质两性解离性质和等电点



pH < pI

净电荷为正

pH = pI

净电荷=0

pH > pI

净电荷为负

当蛋白质溶液在某一定pH值时，使某特定蛋白质分子上所带正负电荷相等，在电场中既不向阳极也不向阴极移动，此时溶液的pH值即为该蛋白质的等电点（isoelectric point, **pI**）。



3.10.2 蛋白质胶体性质

由于蛋白质分子量很大，在水溶液中形成1-100nm的颗粒，因而具有胶体溶液的特征。可溶性蛋白质分子表面分布着大量亲水的极性氨基酸残基通过水合作用在蛋白质颗粒外面形成一层水化层，同时这些颗粒带有电荷，因而蛋白质溶液是相当稳定的亲水胶体。

$d < 1\text{nm}$, 真溶液

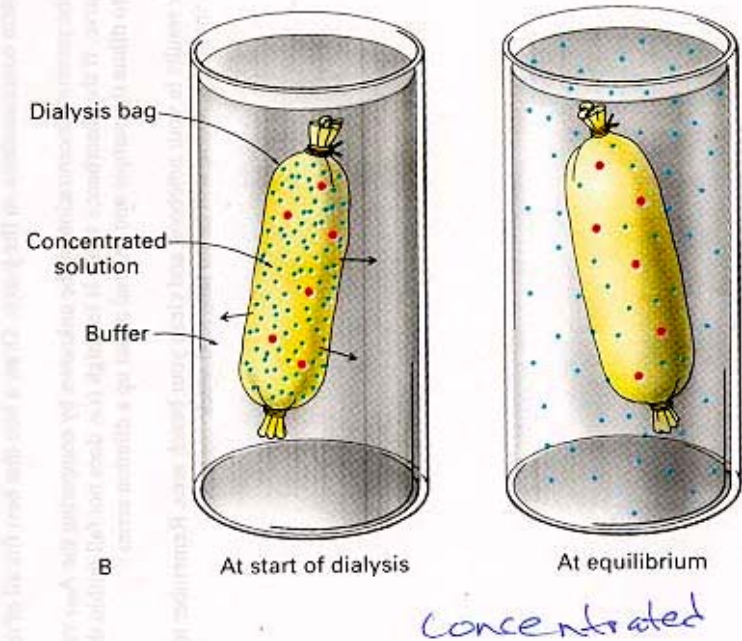
$1\text{nm} < d < 100\text{nm}$, 胶体溶液

$d > 100\text{nm}$, 悬浊液

3.10.3 蛋白质胶体性质的应用



①**透析**:利用蛋白质不能透过半透膜的的性质,将含有小分子杂质的蛋白质溶液放入透析袋再置于流水中,小分子杂质被透析出,大分子蛋白质留在袋中。这种方法称为**透析 (dialysis)**。



透析的方法常用来改变蛋白质缓冲液**成分和浓度**

3.10.3 蛋白质胶体性质的应用



②**超滤**：利用蛋白质不能透过一定孔径的**超滤膜**的性质而浓缩蛋白质



3.10.3 蛋白质胶体性质的应用



③**盐析法**:在蛋白质溶液中加入高浓度的**硫酸铵**、**氯化钠**等中性盐,可有效地**破坏**蛋白质颗粒的**水化层**。同时又**中和**了蛋白质表面的**电荷**,从而使蛋白质颗粒集聚而生成沉淀,这种现象称为**盐析** (**salting out**)。

不同的蛋白质在不同的盐浓度沉淀,因此可通过**分部盐析**的方法分离纯化蛋白质。



3.10.4. 蛋白质的其它沉淀方法

如果加入适当的试剂使蛋白质分子失去水化层，消除同种电荷，蛋白质胶体溶液就不再稳定而产生沉淀。

沉淀方法类别：

- 1、高浓度中性盐（盐析）
- 2、等电点沉淀（改变pH）
- 3、有机溶剂沉淀（使蛋白变性）
- 4、重金属盐类沉淀（ $\text{pH} > \text{pI}$ ）
- 5、生物碱试剂和某些酸类沉淀（ $\text{pH} < \text{pI}$ ）
- 6、热变性沉淀

3.10.5 蛋白质变性与复性



● **变性(denaturation):**在某些物理或化学因素的作用下，蛋白质的高级结构发生变化，但其一级结构并未改变。变性使蛋白质的物理化学性质和生物学功能都随之改变或丧失。

表征:生物活性丧失；物理性质（溶解度、粘度、扩散系数、光谱特性等）和化学性质（化学反应、被酶解性）改变。

● **复性 (renaturation):**蛋白质的变性作用如果不过于剧烈，则是一种可逆过程，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成原来的天然构象，恢复原有的理化性质和生物活性。



3.11. 蛋白质的定性和定量测定

呈色反应:

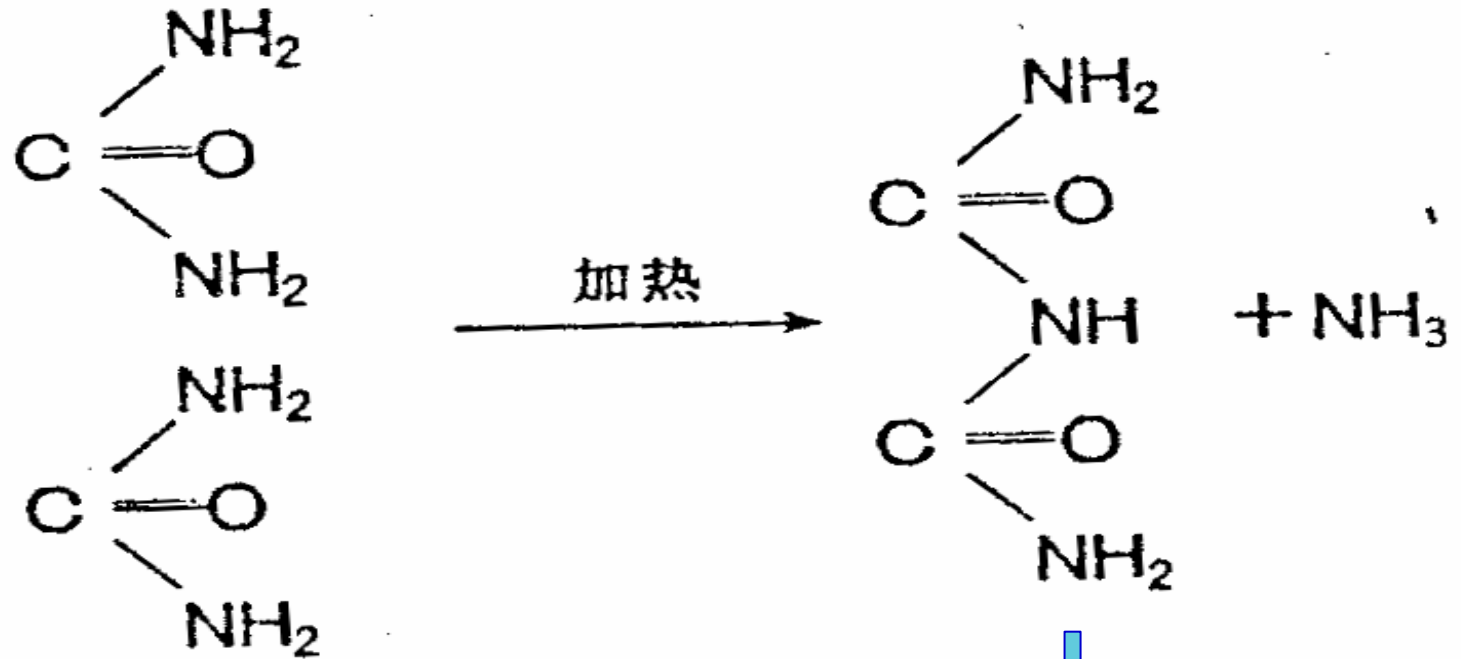
双缩脲反应

酚试剂反应

茚三酮反应

蛋白质定量、定性
测定常用方法

3.11.1 双缩脲反应



蛋白质的**肽键**在碱性溶液中也能与硫酸铜发生相同反应，产生红紫色络合物。

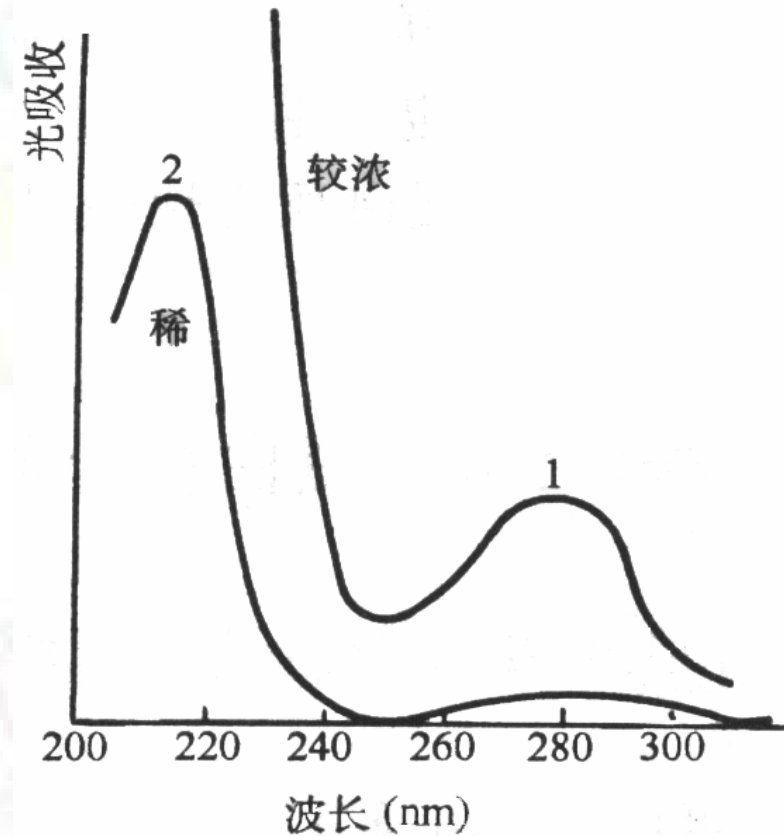
此反应可用于蛋白质定量测定

Cu^{2+} (碱性溶液)
↓
红紫色络合物



3.11.2. 蛋白质的紫外吸收光谱

蛋白质在远紫外光区（200-230nm）有较大的吸收，在280nm有一特征吸收峰，可用于蛋白质的定性定量鉴定。



$$\text{蛋白质质量浓度/ (mg/ml)} = 1.55A_{280}^{1\text{cm}} - 0.76A_{260}^{1\text{cm}}$$

测定范围：0.1~0.5mg/ml

3.12. 蛋白质的分离纯化步骤



1. 抽提

2. 粗分离（盐析，**pI**沉淀，透析）

3. 纯化（柱层析，**HPLC**）



1.抽提：合适的Buffer + 合适的 破细胞方法

细胞破碎方法：

1. 反复冻融
2. 组织匀浆
3. 超声波破碎
4. 压力破碎
5. 溶菌酶破碎

破碎细胞前需加入蛋白酶抑制剂！！

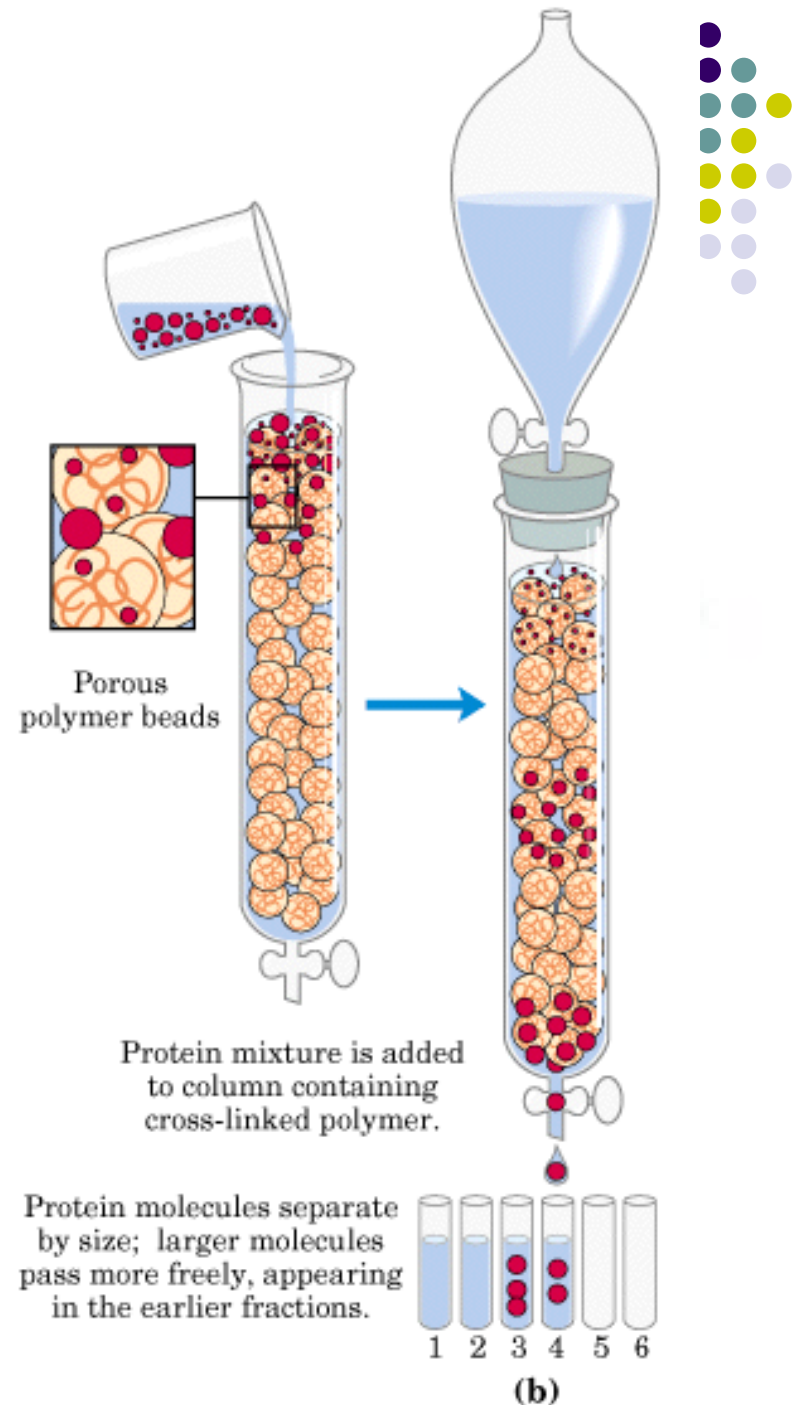
3.14. 柱层析(色谱)技术



- ① **Size-exclusion chromatography**
分子排阻层析
(Gel Filtration 凝胶过滤)
- ② **Ion-exchange chromatography**
离子交换层析
- ③ **Affinity chromatography**
亲和层析

① Size-exclusion chromatography (分子排阻层析) Gel Filtration (凝胶过滤)

分子量大的蛋白质
首先流出层析柱

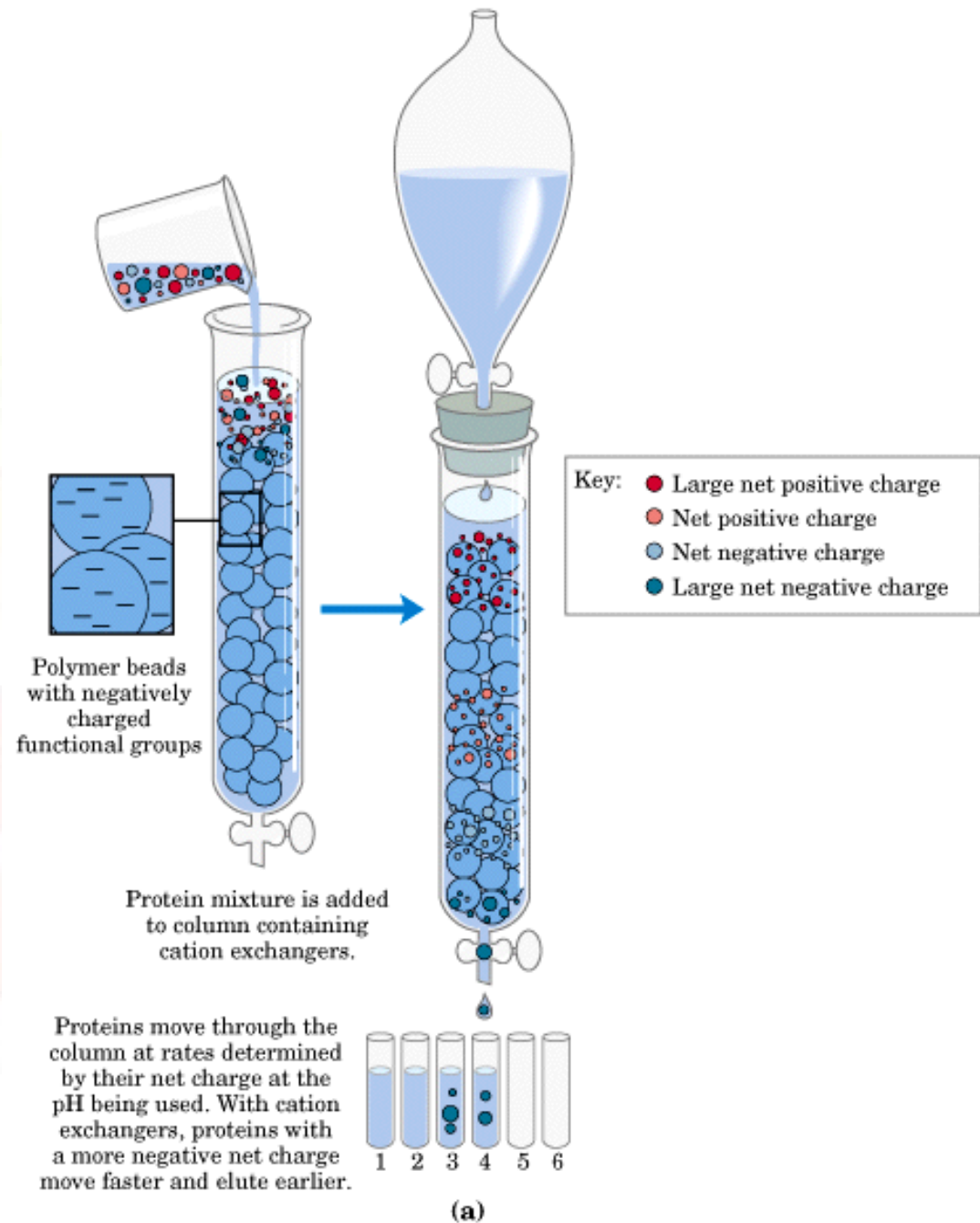


② Ion-exchange chromatography 离子交换层析

阳离子交换剂 例：
羧甲基(CM)

阴离子交换剂 例：
氨基乙基(DEAE)

通过改变离子
强度或pH值使
蛋白质洗脱



③亲和层析

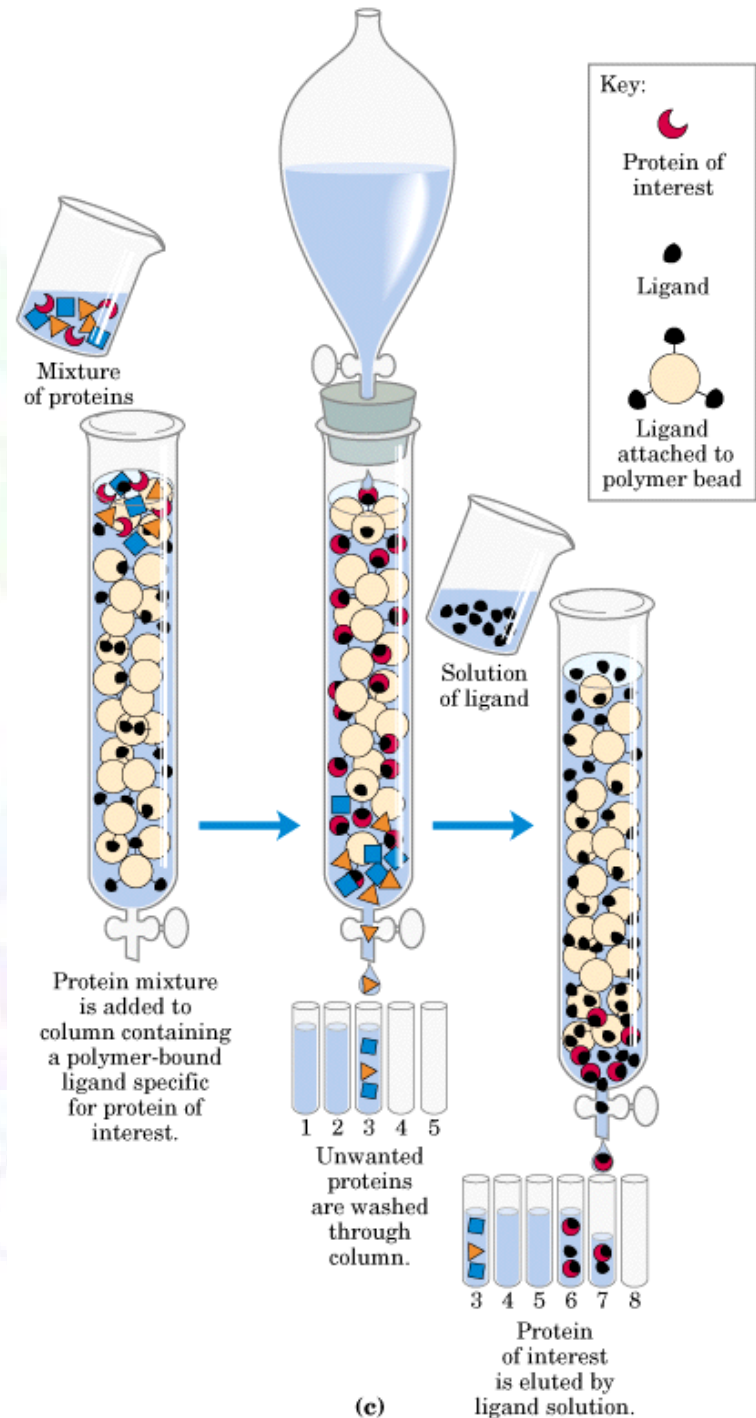
Affinity chromatography

Ligand (配基)：可与生物大分子如蛋白质特异性结合的分子或基团

抗体—抗原

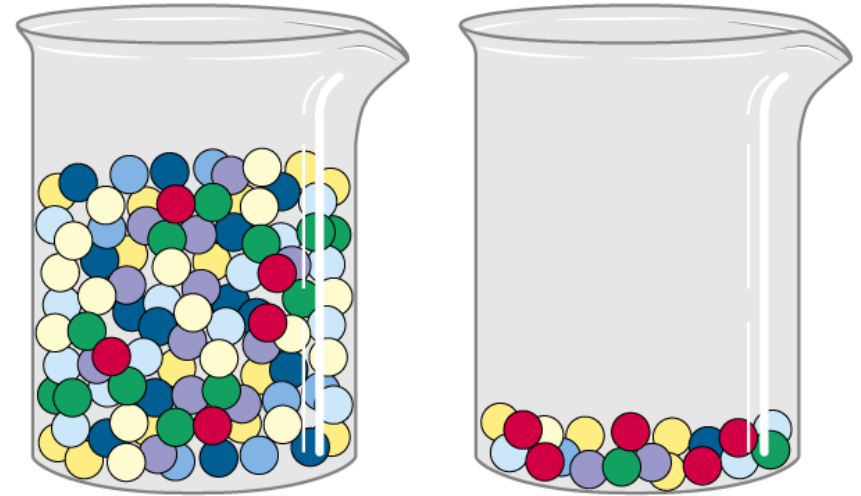
凝集素—糖蛋白

底物类似物—酶



3.15 纯化效率的定量分析

酶活力单位：在25° C和最适条件下，一分钟催化1.0 μ mol底物转化所需的酶量为一个酶活力单位。



总活力 (activity)：一个样品的酶活力单位的总和
比活力 (specific activity)：**1mg**蛋白中的酶活力单位

酶的纯化过程中，**总活力**下降，**比活力**上升。

监控各纯化步骤的效率



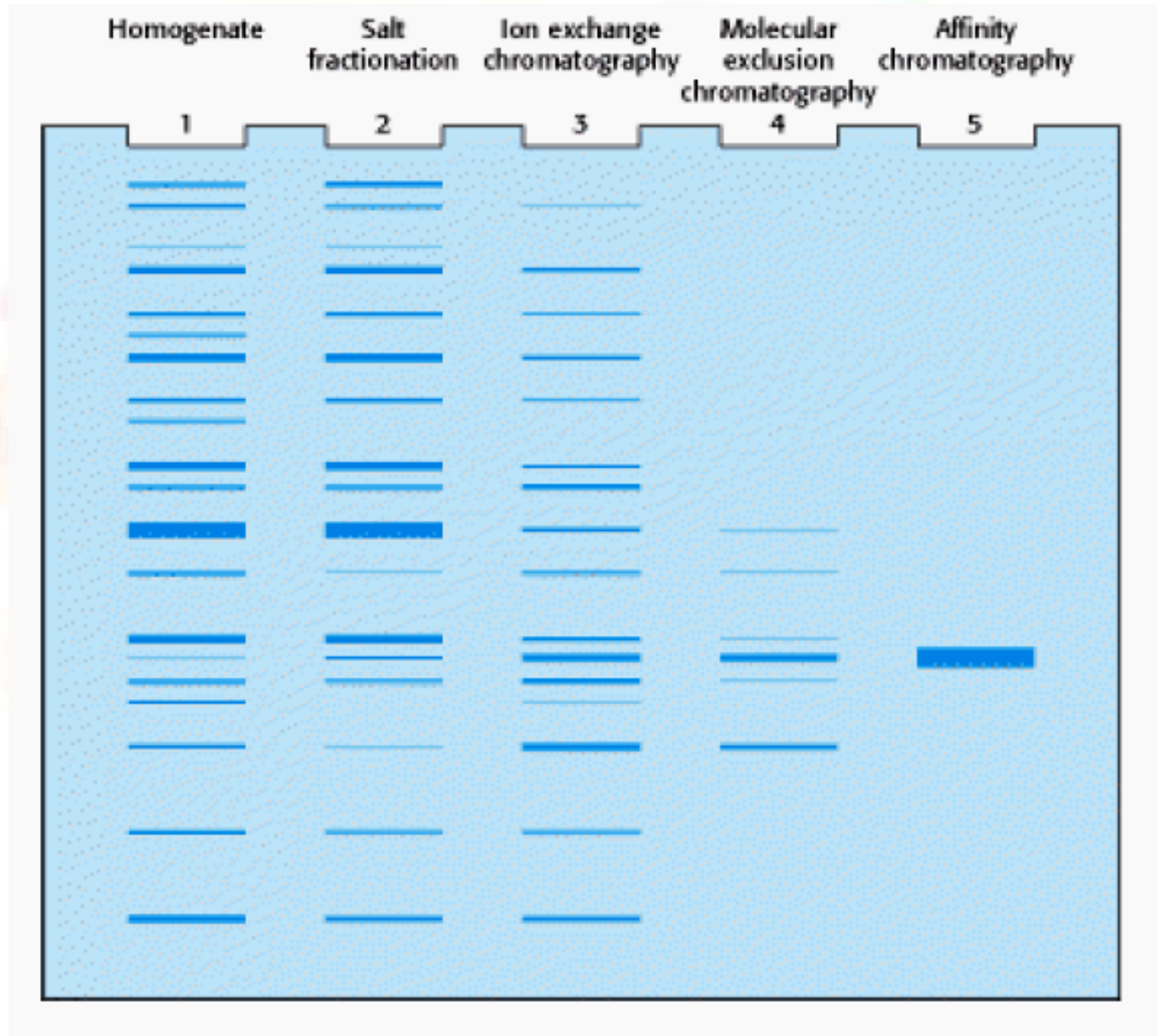
table 5-5

A Purification Table for a Hypothetical Enzyme*

Procedure or step	Fraction volume (ml)	Total protein (mg)	Activity (units)	Specific activity (units/mg)
1. Crude cellular extract	1,400	10,000	100,000	10
2. Precipitation with ammonium sulfate	280	3,000	96,000	32
3. Ion-exchange chromatography	90	400	80,000	200
4. Size-exclusion chromatography	80	100	60,000	600
5. Affinity chromatography	6	3	45,000	15,000

*All data represent the status of the sample *after* the designated procedure has been carried out. Activity and specific activity are defined on page 137.

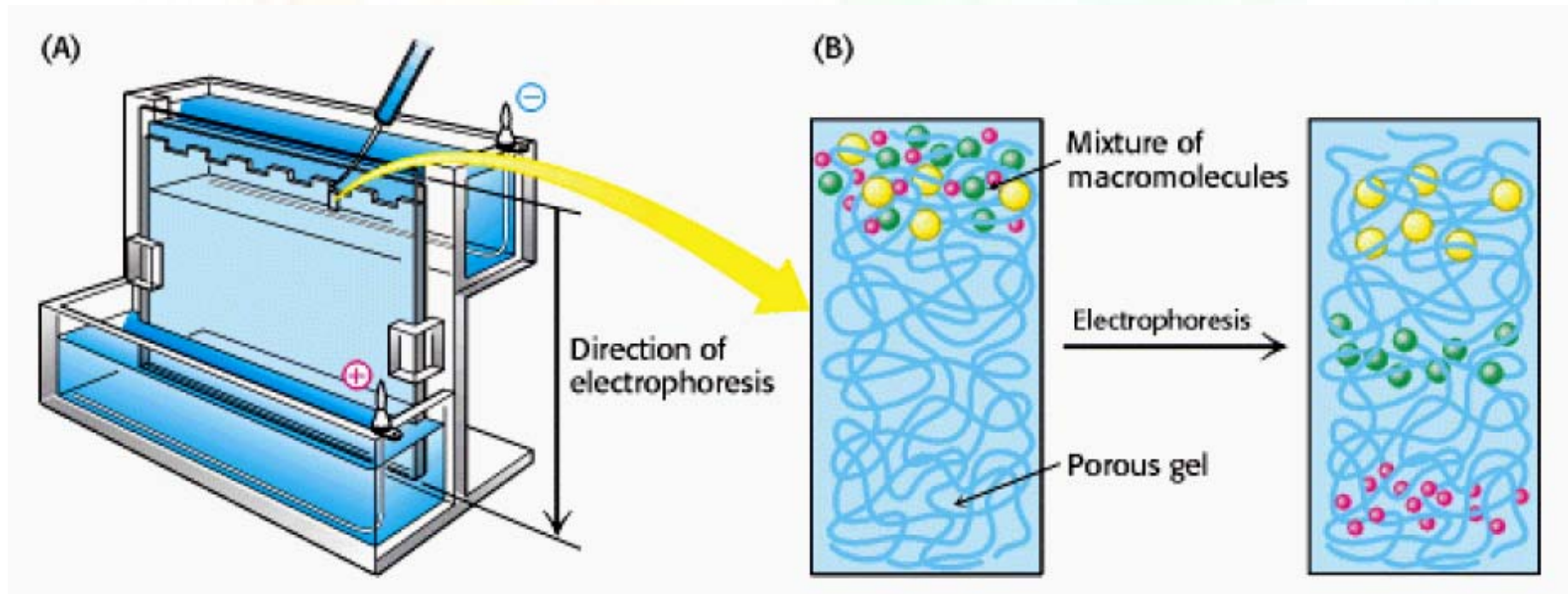
通过电泳可以直观看出各步骤纯化效果



3.16 电泳 (electrophoresis) 技术



蛋白质分子大小不同、所带电荷不同，则在电场中泳动速度不同。



3.16 电泳（electrophoresis）技术



用途：1) 分离蛋白 2) 鉴定蛋白纯度
3) 测定分子量 4) 测定等电点

非变性电泳

变性电泳（**SDS-PAGE**）

等电聚焦电泳

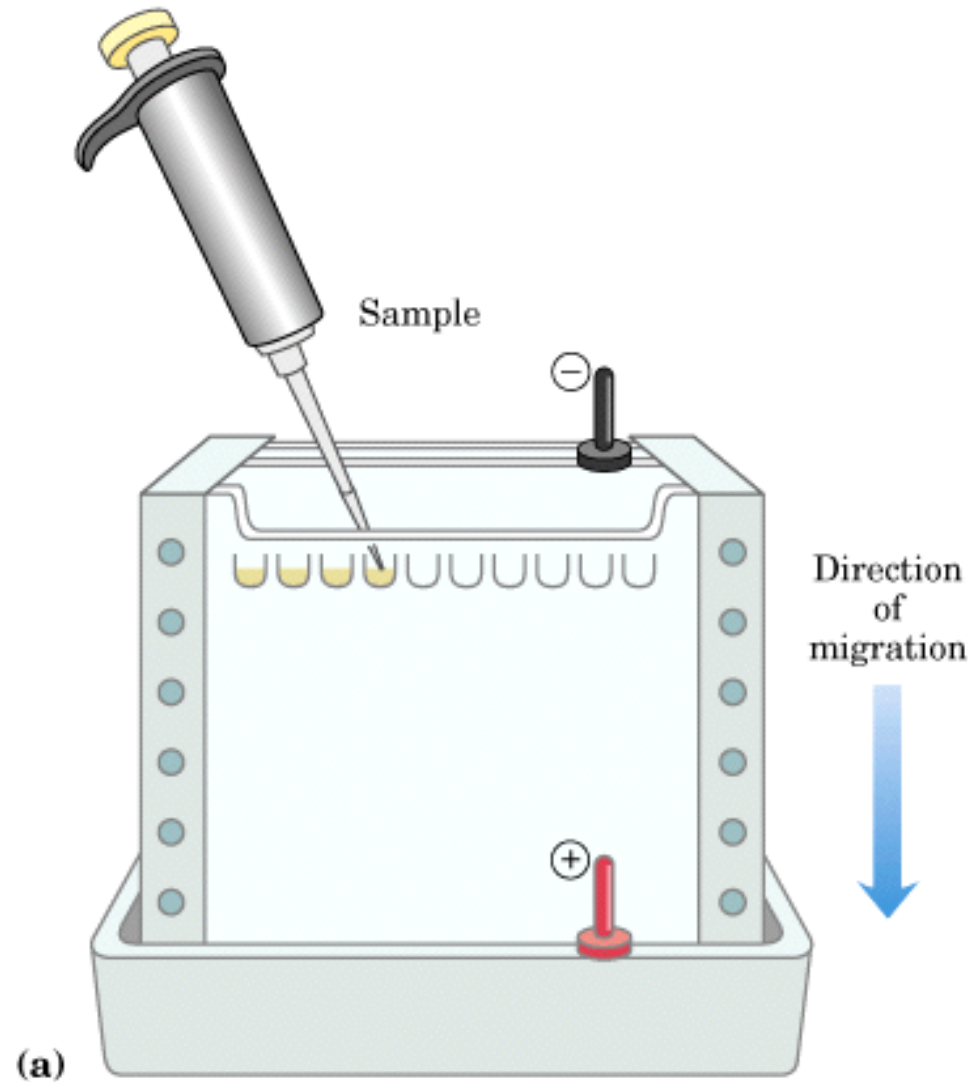
双向电泳

毛细管电泳

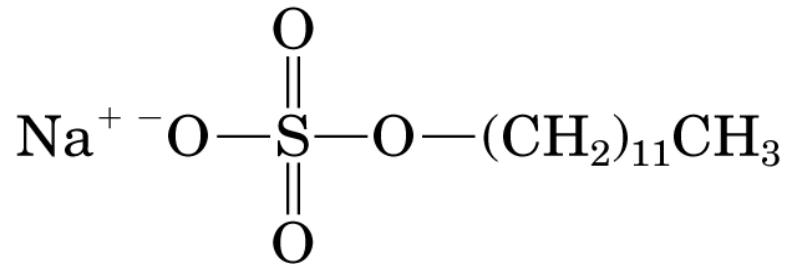
3.16.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)



聚丙烯酰胺凝胶是电泳支持介质，可用于非变性电泳、**SDS-PAGE**或等电聚焦。



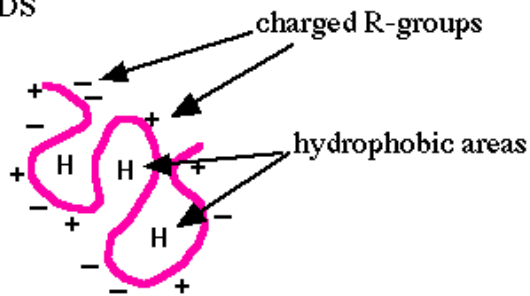
3.16.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)



Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS: 十二烷基磺酸钠

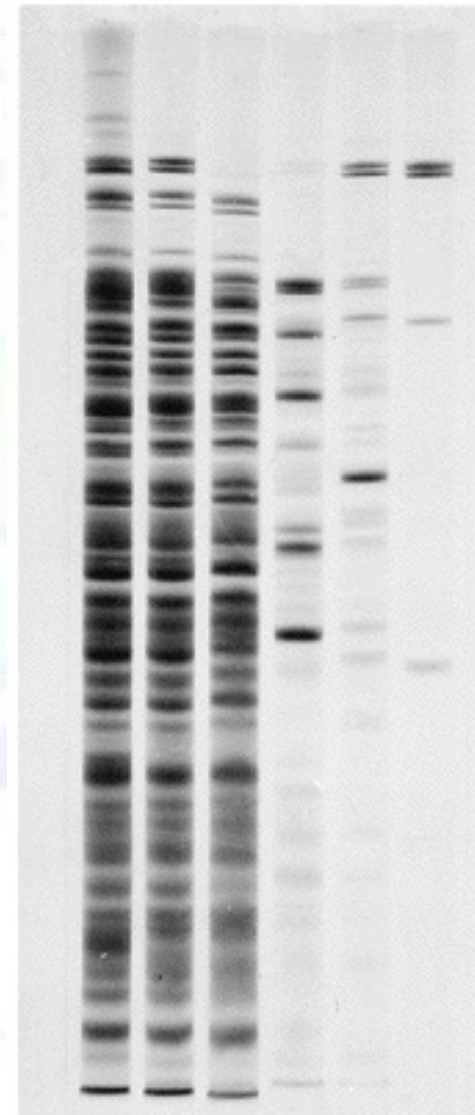
BEFORE SDS



AFTER SDS

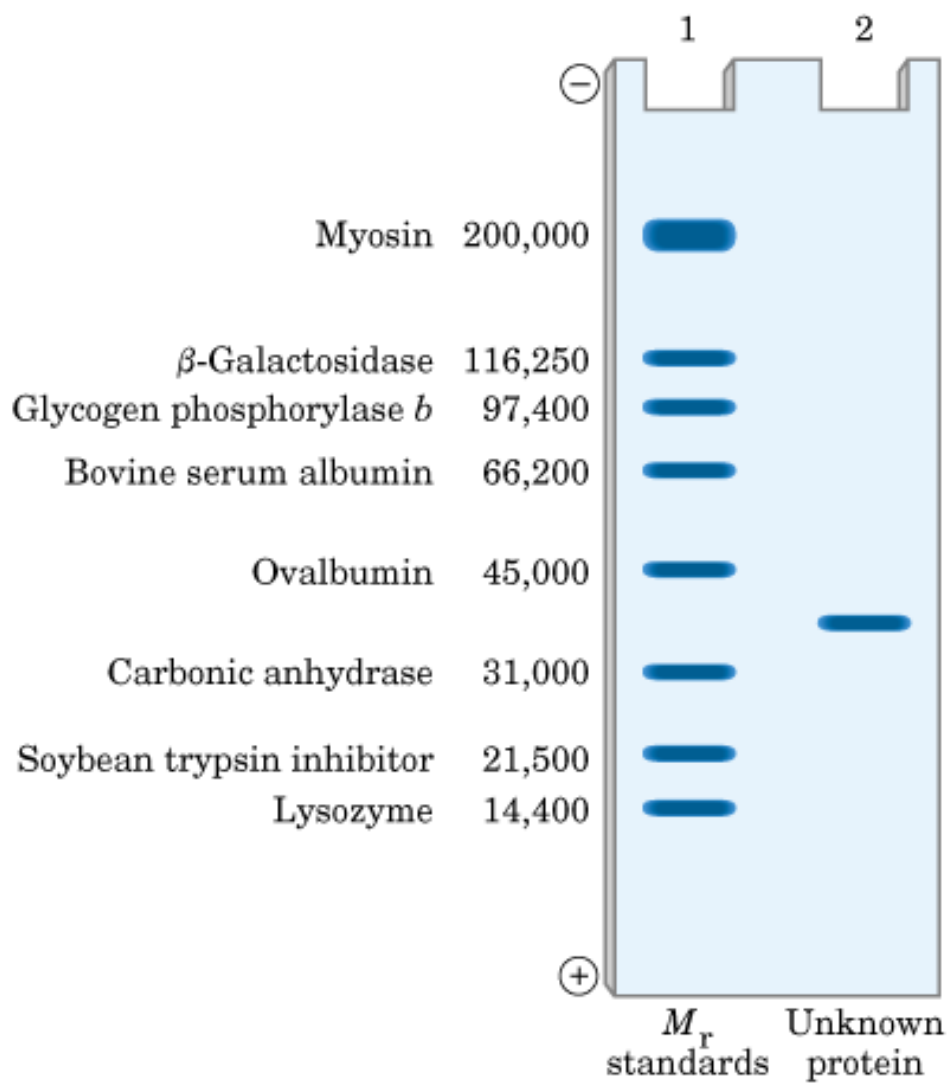


SDS是蛋白变性剂并使之带大量负电荷

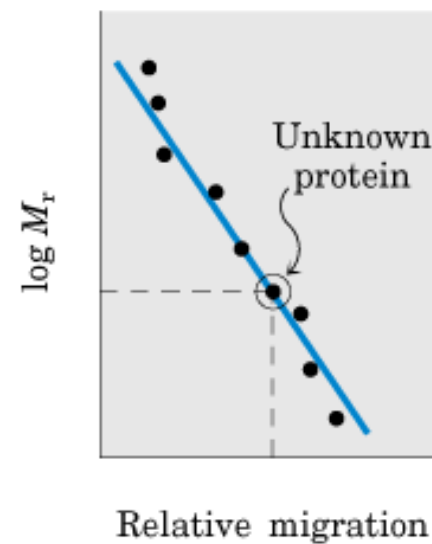


(b)

① SDS-PAGE测定蛋白分子量



(a)



(b)

3.16.3 等电聚焦利用蛋白质的等电点分离蛋白



Proteins has isoelectric points

The Isoelectric Points of Some Proteins

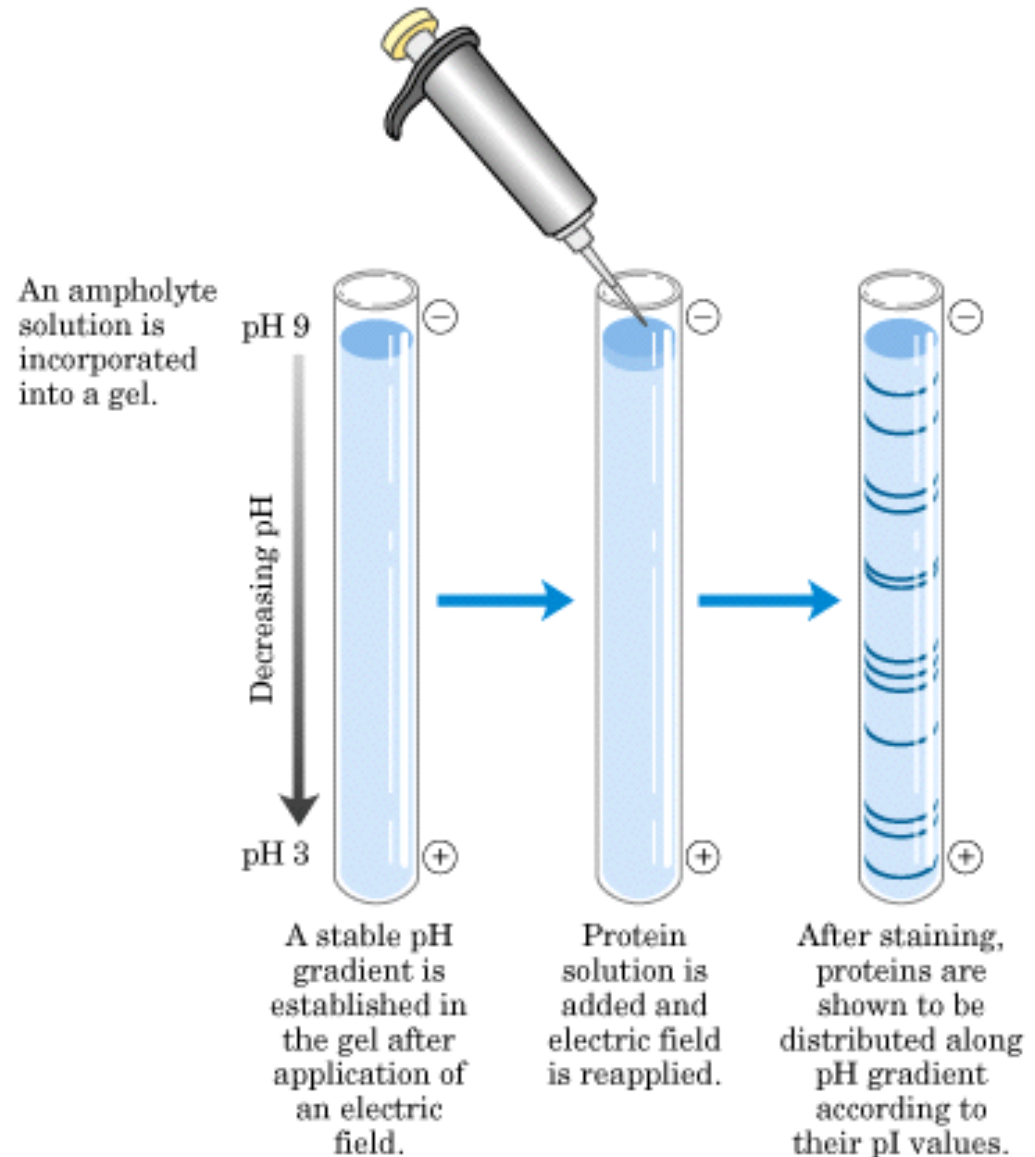
Protein	pI
Pepsin	~1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0

3.16.3 等电聚焦利用蛋白质的等电点 分离蛋白



载体两性电解质
(carrier ampholytes) 在
电场中可以形成
pH梯度。

蛋白质在电场中
会聚在其等电点。
等电聚焦可纯化蛋白
或测定其等电点。

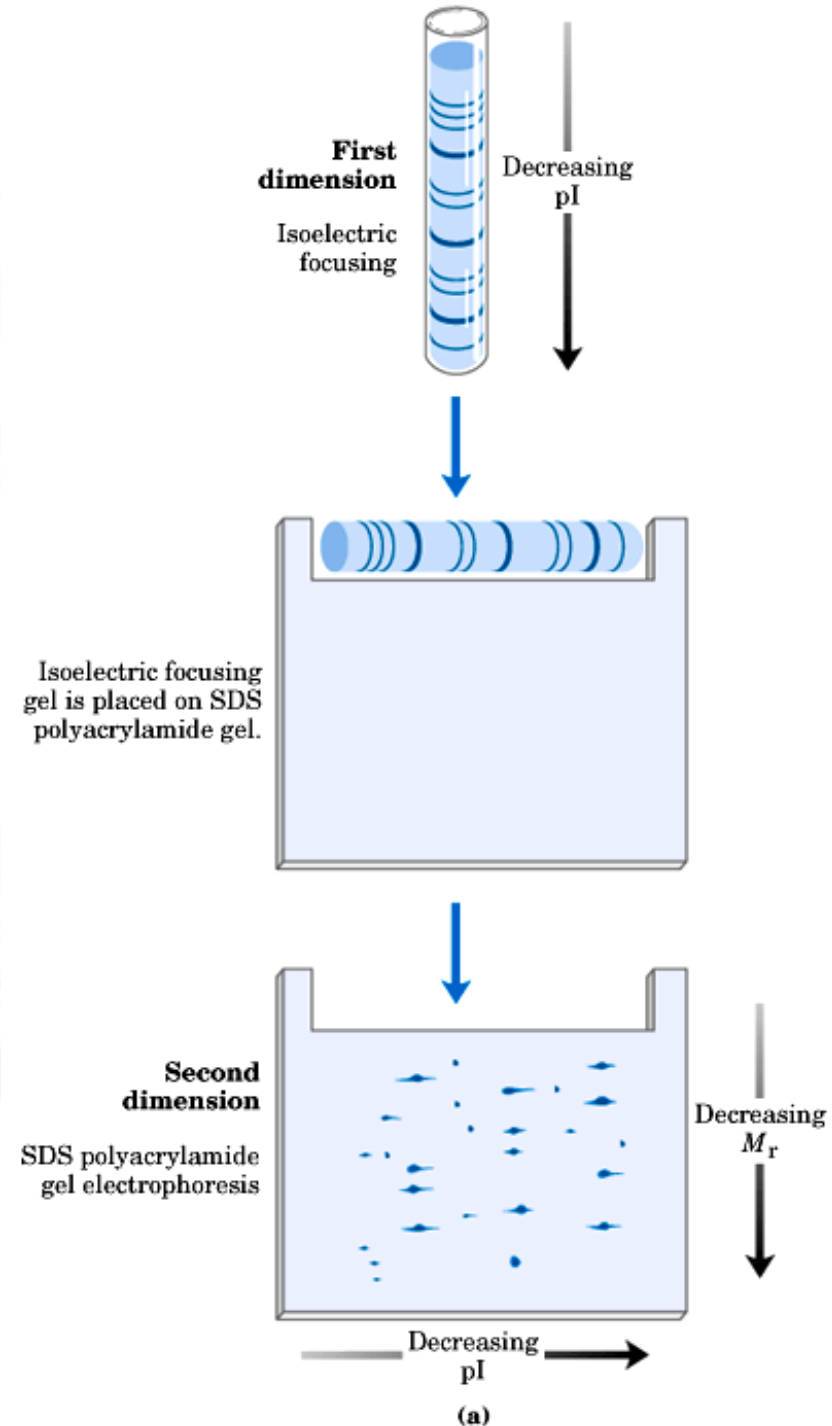


3.16.4 双向电泳

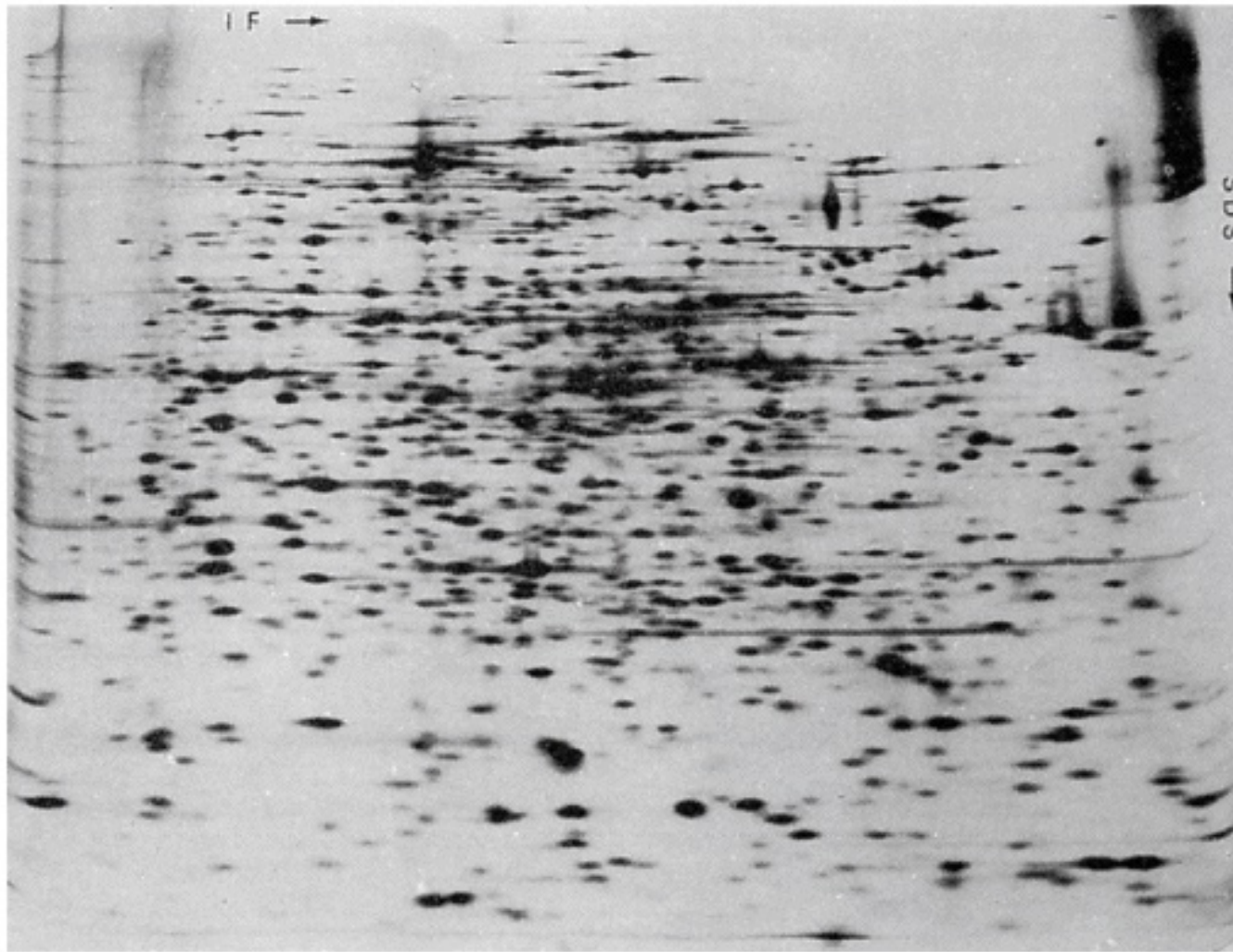
I向:等电聚焦

II向: SDS-PAGE

双向电泳有极高的分辨率(1000个蛋白质/胶), 是蛋白质组学研究的有力工具。



More than 1,000 different proteins can be resolved by 2D-PAGE



(b)



3.17 质谱 (MS) 是研究蛋白质组学的重要工具

基质辅助激光解吸附/离子化质谱
(MALDI-TOF MS)

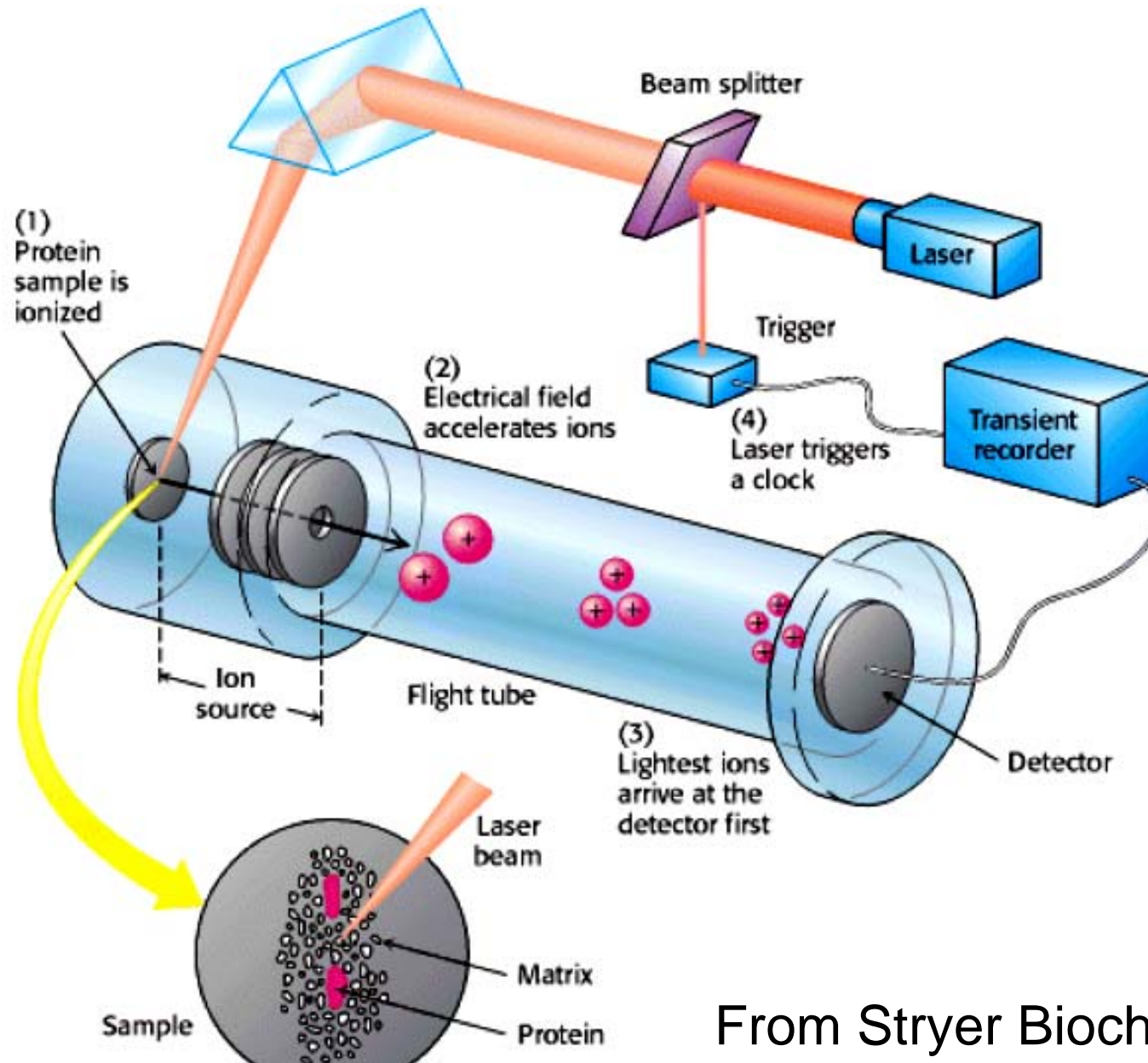
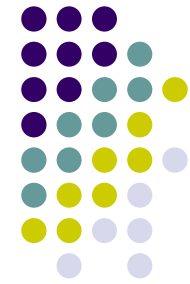
电喷雾离子化质谱 (ESI MS)

串联质谱 (MS/MS)

液质连用 (LC/MS, LC/MS/MS)

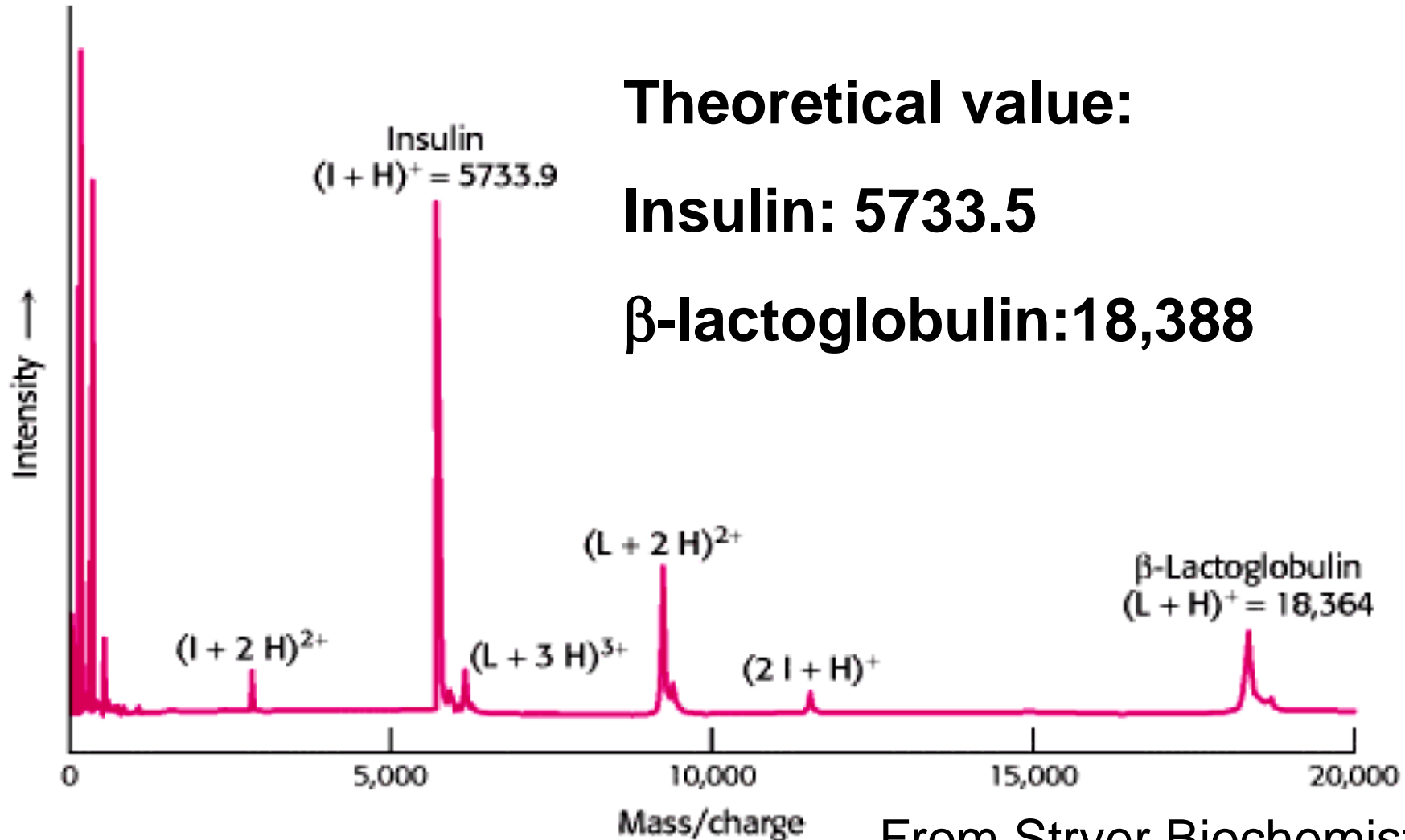
鉴定未知蛋白，测定蛋白质的氨基酸序列，检测蛋白质的磷酸化状态

MALDI-TOF Mass Spectrometry



From Stryer Biochemistry

Sample MALDI-TOF Spectrum



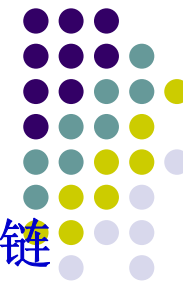
From Stryer Biochemistry



综述：

蛋白质折叠与“折叠病”

蛋白质组学及其研究方法



问答题和计算题

- 1、试比较Gly、Pro与其它常见氨基酸结构的异同，它们对多肽链二级结构的形成有何影响？
- 2、为什么说蛋白质水溶液是一种稳定的亲水胶体？
- 3、什么是蛋白质的变性？变性的机制是什么？

名词解释

等电点 (pI) 肽键和肽链 肽平面及二面角 一级结构
二级结构 三级结构 四级结构 超二级结构 结构域
蛋白质变性与复性 肽