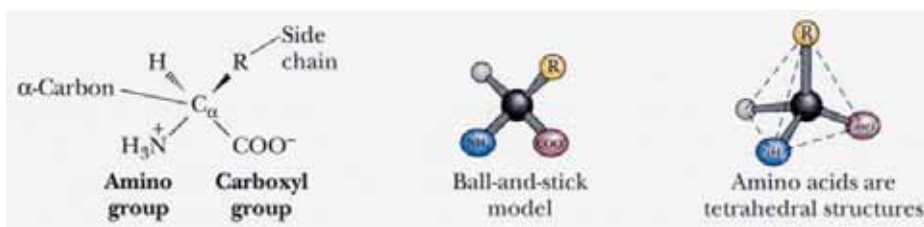


第一章 蛋白质

第一节 蛋白质的基本结构单位——氨基酸

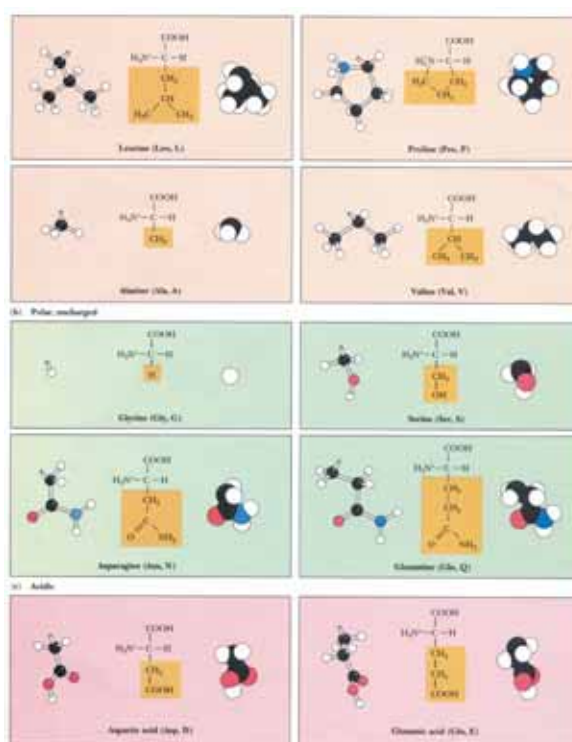
1. 氨基酸的基本结构

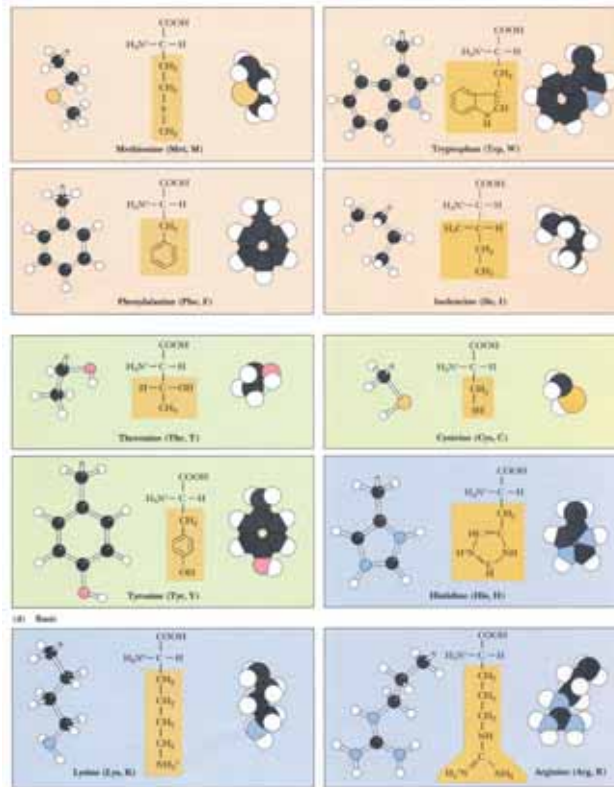
1.



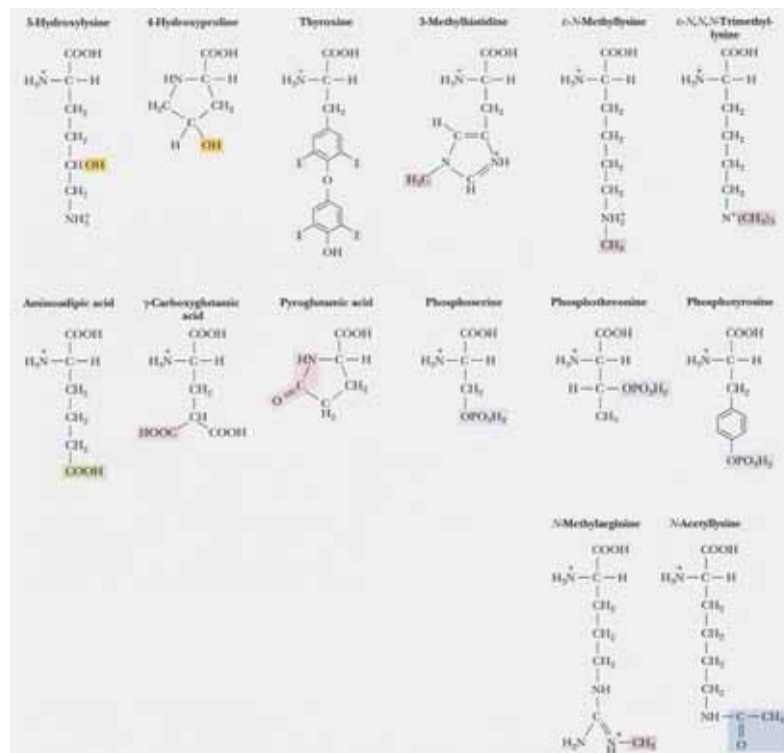
2. 氨基酸的分类及其结构

- (1) 非极性氨基酸：丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸
- (2) 极性、不带电荷氨基酸：丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天门冬酰胺、谷氨酰胺、酪氨酸
- (3) 酸性氨基酸：天门冬氨酸、谷氨酸
- (4) 碱性氨基酸：精氨酸、赖氨酸、组氨酸

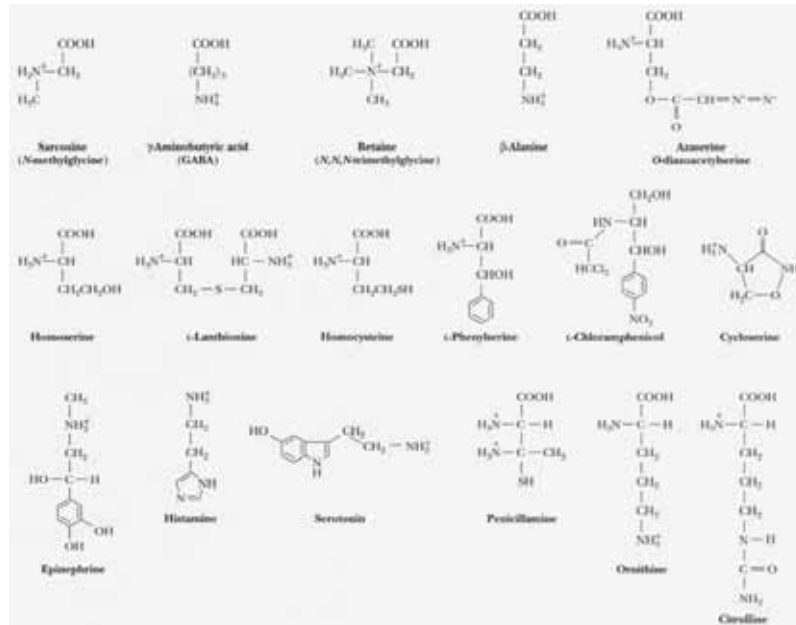




3. 蛋白质中不常见的氨基酸



4. 非蛋白质氨基酸



5. 氨基酸的理化性质

(1) 一般物理学性质

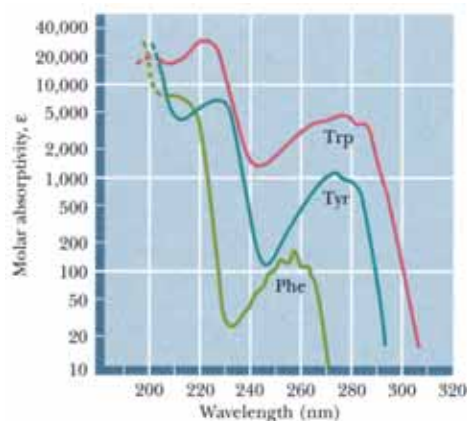
A. 外观形状： 无色晶体或粉末状

B. 熔点高： 200-300 °C

C. 溶解性质：

D. 光学性质： 旋光活性和紫外吸收

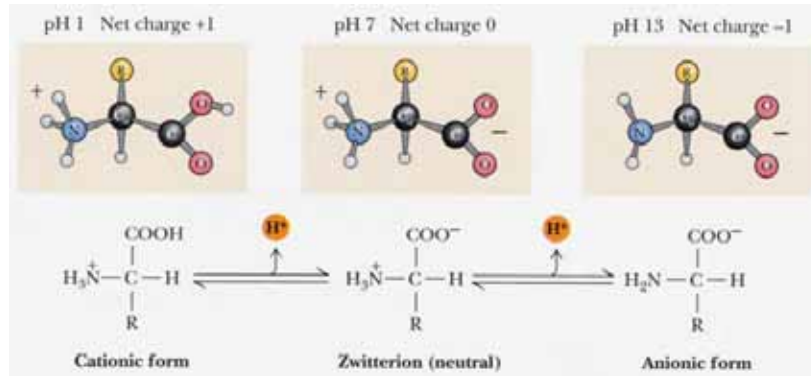
旋光活性：L型和D型氨基酸在旋光仪中的旋光方向相反，但角度相同。溶液中的氨基酸使平面偏振光偏向左的为左旋异构体，偏向右的为右旋异构体。



色氨酸 : 279 nm 苯丙氨酸 ; 259 nm 酪氨酸 : 275 nm

(2) 氨基酸的化学性质

A. 氨基酸的酸碱性质



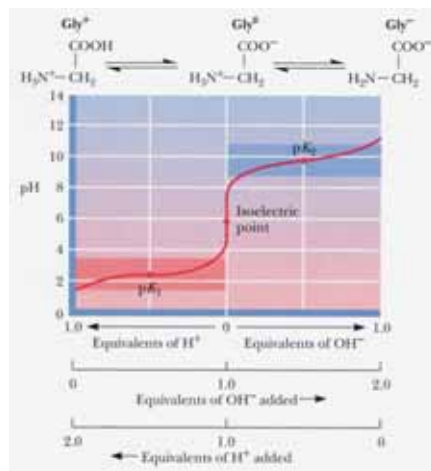
B. 等电点 : pI (等电 pH)

在一定的 pH 条件下，氨基酸分子中所带的正电荷和负电荷数相等，即净电荷为零，此时溶液的 pH 称为该氨基酸的等电点 (isoelectric point)，用 pI 表示。氨基酸在等电点时溶解度最小。

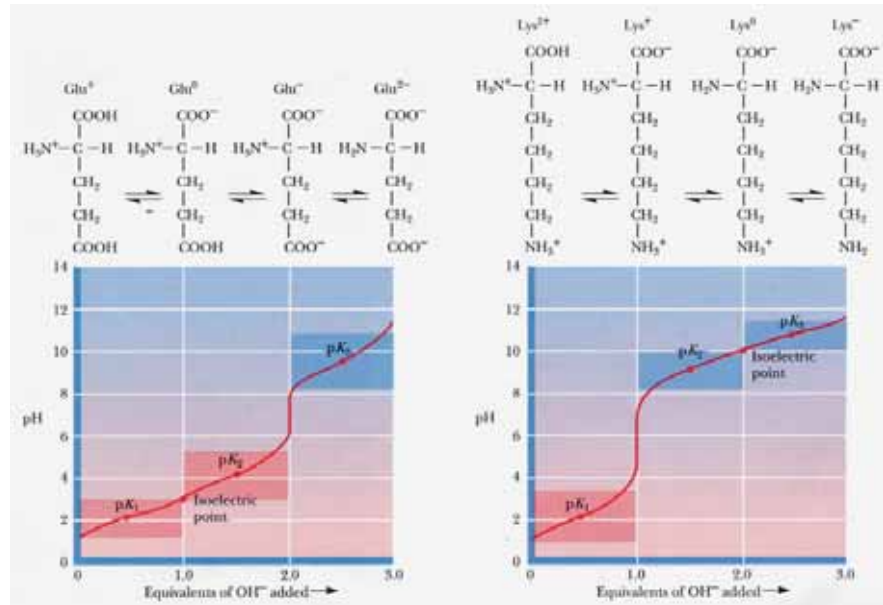
pK 值 : 指某种解离基团有一半被解离时的 pH 值。

计算 pI :

$$pI = 1 / 2 (pK_1 + pK_2)$$



$$pI = 1 / 2 (pK_1 + pK_2) = 1 / 2 (2.34 + 9.6) = 5.97$$



6. 氨基酸的化学反应

- (1) 茚三酮反应
- (2) 亚硝酸反应
- (3) 2,4—二硝基氟苯反应 (FDNB)
- (4) 甲醛的反应
- (5) 二甲基氨基萘磺酰氯反应 (DNS - Cl)
- (6) 氨基酸与酰化剂 (苯氧羰酰氯) 的反应
- (7) -羧基的成酯反应
- (8) 侧链基团参加的反应

7. 氨基酸的分离和分析鉴定

(1) 蛋白质的水解

- A. 酸水解：6 mol/L HCl, 110–120 °C, 24 h
- B. 碱水解：5 mol/L NaOH 110 °C, 24 h

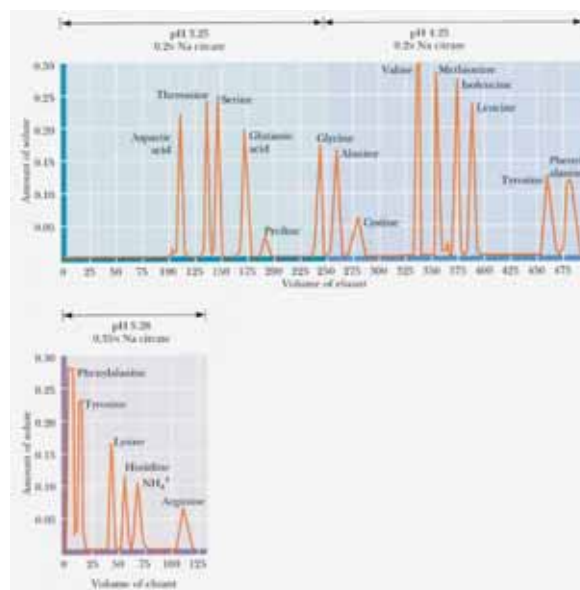
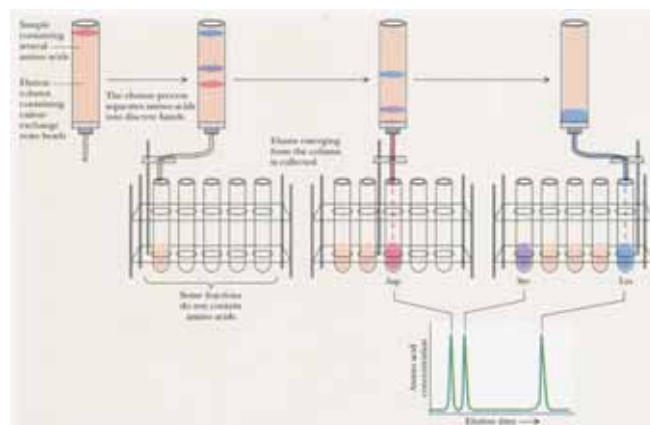
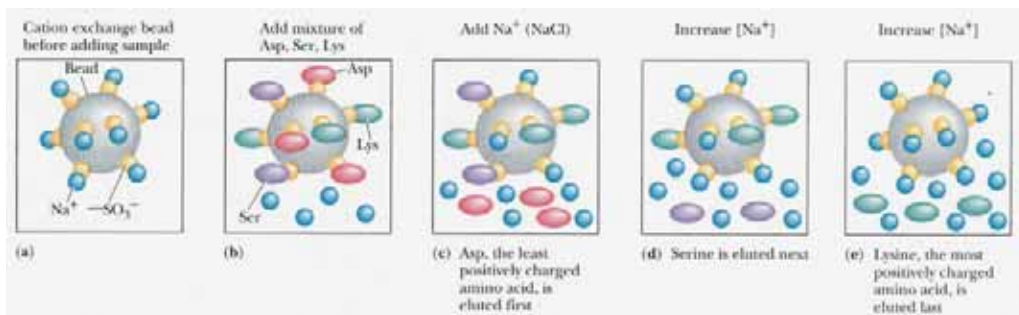
C. 酶水解

(2) 氨基酸的分离鉴定

A. 纸层析

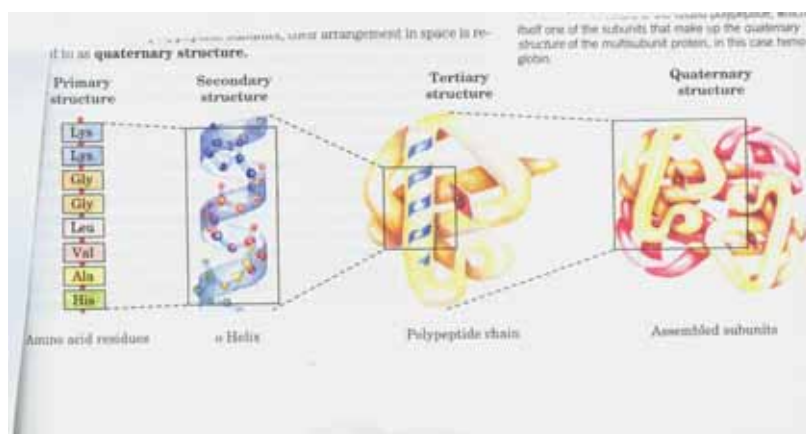
B. 薄层层析：硅胶、氧化铝、纤维素粉等

C. 离子交换柱层析：离子交换树脂、原理、方法



第二节 蛋白质的结构

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



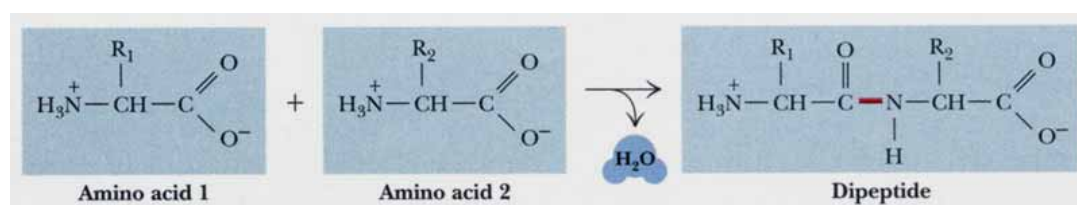
1. 蛋白质的一级结构

定义：一级结构是指蛋白质多肽链中的氨基酸排列顺序，包括肽链数目和二硫键位置。

蛋白质一级结构是高级结构的分子基础，它包含了决定蛋白质分子所有结构层次构象的全部信息。

(1) 肽键和肽链

肽键：一个氨基酸的 -羧基与另一个氨基酸的 -氨基之间脱去一分子水形成的共价键称为肽键。又称酰胺键。



肽链：多个氨基酸以肽键相连成链称肽链或多肽(二肽、三肽.....

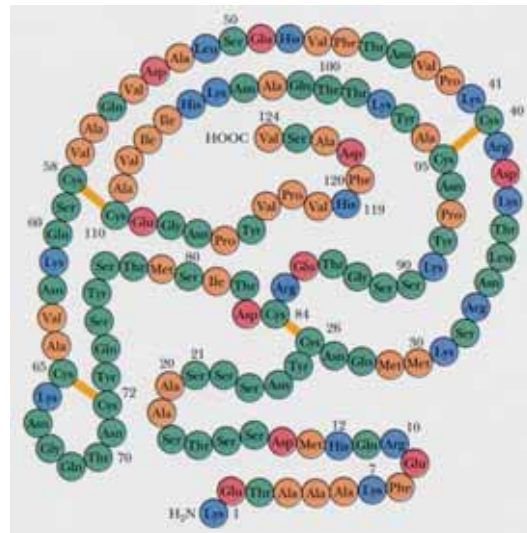
多肽)

主链： $--N-C-C-N-C-C-N-C-C-N-C-C-N--$

侧连：R

命名：氨基酸残基，N-末端，C-末端 表达：

(2). 二硫键： $--S-S--$



(3) 蛋白质的一级结构测定----片段重叠法

A. 原理：

B. 测定步骤

a. 提纯蛋白质样品

b. 测定蛋白质的分子量和氨基酸组成

c. 氨基酸末端分析 (N-末端和 C-末端)

d. 拆开二硫键：

e. 专一水解肽链成大小不等的一系列片段 (化学法和酶法)

f. 分离纯化各肽段并采用 Edman 降解法测序

g. 用重叠法推断肽链全部氨基酸序列

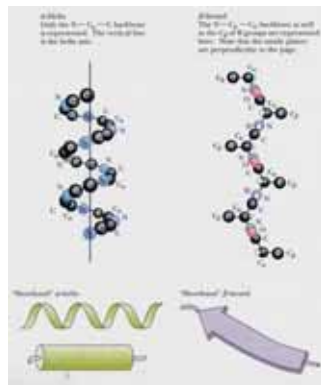
h. 二硫键的定位 : (对角线电泳)

2. 蛋白质的二级结构

蛋白质二级结构的概念：通过肽链上的羰基氧和亚氨基氢之间形成的氢键，使肽链主链骨架上的局部区域形成有规则的空间排布。

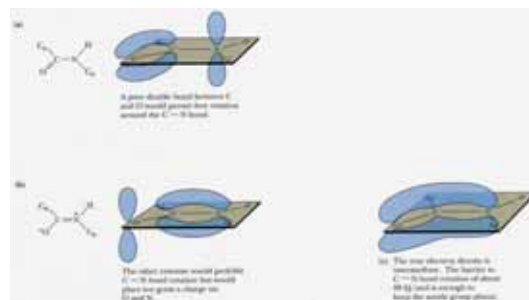
这种主链上的、有规则的空间排布称为蛋白质的二级结构。包括：

-螺旋、 -折叠、 -转角和无规卷曲。

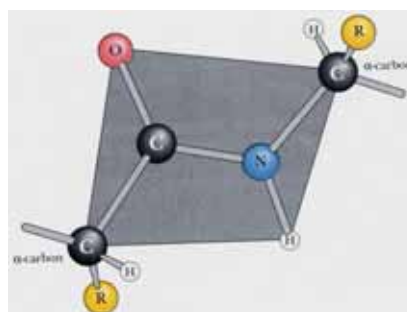


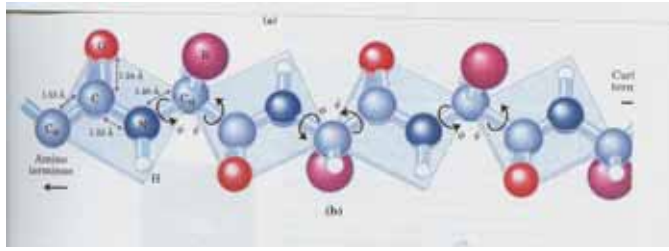
(1) 酰胺平面和蛋白质的构象

A. 酰胺平面（肽平面、肽单位）：



C—N 0.147 nm， C=N 0.128 nm， 肽键 0.132 nm





双面角： (psi) C_2-C_3 轴上的旋转角

C_2-N_1 与 C_2-N_2 顺式时， $\psi = 0$ 以 C_2-C_3 为轴，
顺时针旋转所形成的角为正值，反时针为负值

(phi) C_1-N_1 轴上的旋转角

N_1-C_1 与 C_2-C_3 顺式时， $\phi = 0$ 以 C_1-N_1 为轴，
顺时针旋转所形成的角为正值，反时针为负值

所有肽单位在同一平面时，规定 ϕ 和 ψ 为 180 度

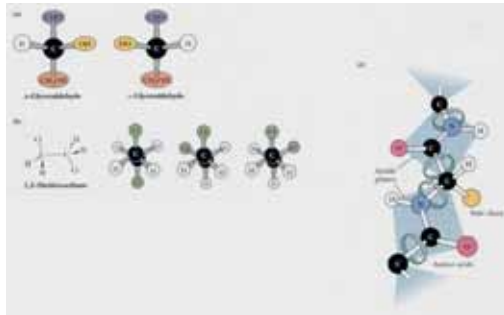
肽平面的意义：是蛋白质结构最小单位，限制了肽链的构象数

B. 蛋白质的构象 (conformation)：

构象是指分子内各原子或基团之间的相互立体关系。构象的改变是由于单键的旋转产生的，不需有共价键的变化，但涉及到氢键等次级键的改变 (二级以上的结构都属于构象的范畴)。

构型：(configuration)

构型是指在立体异构体中，取代原子或基团在空间的取向。一个碳原子与四个不同基团相连时，只可能有二种不同的空间排列，这二种不同的排列称为不同的构型。构型的改变必须有共价键的断裂。

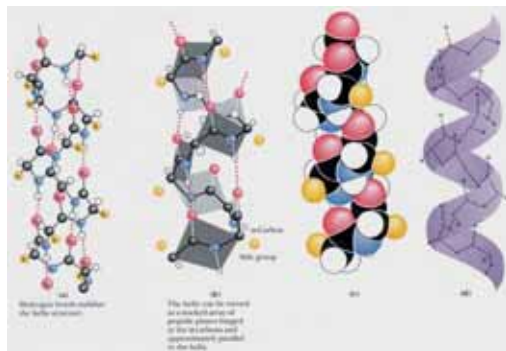


(2) 维持蛋白质构象的作用力

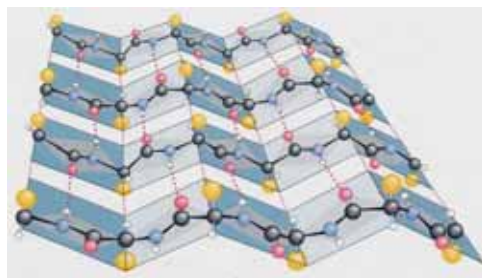
- A. 氢键 B. 离子键 (盐键) C. 范德华力 D. 疏水作用
 E. 配位键 F. 二硫键

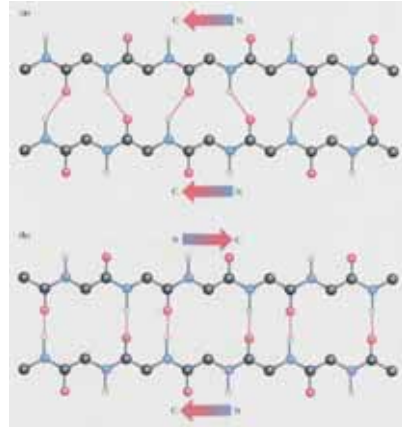
(3). 蛋白质二级结构的主要类型

- 螺旋 (α -helix) 的结构

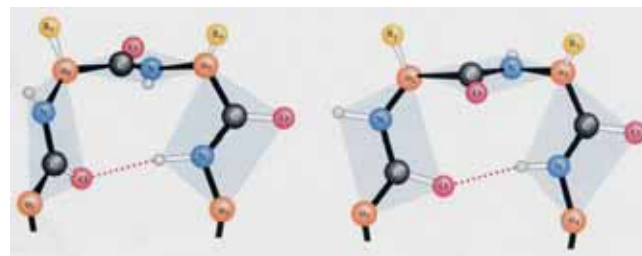


β -折叠 β -折叠是二条或多条几乎完全伸展的多肽链侧向聚集在一起，相邻肽链主链的氨基与羰基氧形成氢键。





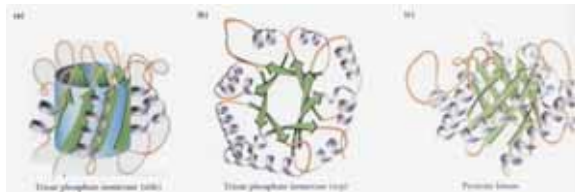
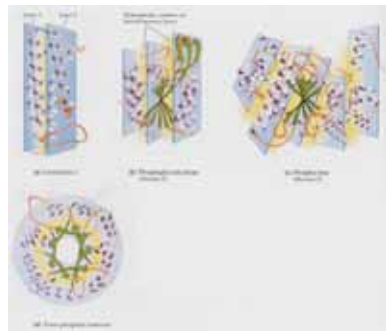
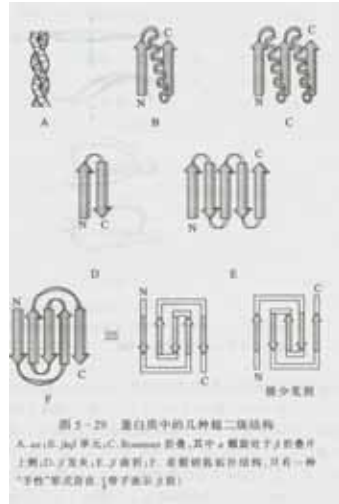
C. β -拐角结构



在各种蛋白质中，可同时存在几种二级结构，也可只有一种二级结构。

3. 蛋白质的超二级结构和结构域

(1). 超二级结构 在蛋白质分子中，肽链主链形成的二级结构相互靠近，可以形成二级结构的聚集体。在许多蛋白质中发现很有规律的二级结构聚集体如： α -螺旋聚集体 型； β -螺旋聚集体 型； β -折叠聚集体 型，我们称这种二级结构的聚集体为超二级结构。当形成平行式 β -折叠的俩段肽段之间存在着较长的无规卷曲时，这一区域称为 C 结构。

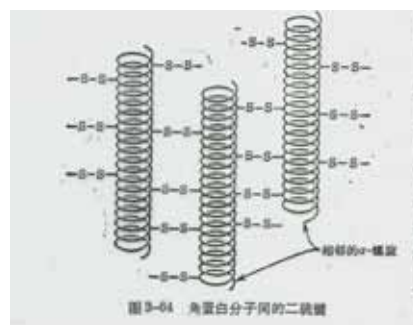
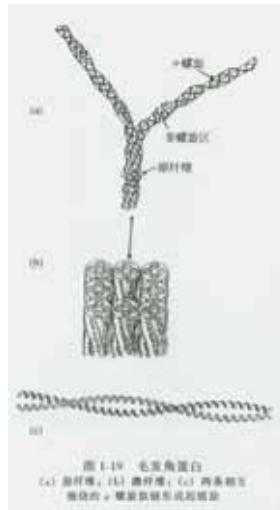


(2) 结构域(domain)：在一些较大的蛋白质中，往往存在 2 个或多个空间上可明显区分的相对独立的区域性结构，我们称相对独立的实体结构为结构域。常见的结构域含 100-400 个氨基酸，至少 40 个左右。结构域与结构域之间关系松懈，它们之间常有一段长短不等的肽链相连。对于一个小分子来说，结构域与其三级结构是同一意思。从动力学角度来讲，一条较长的多肽链先折叠成几个相对独立的单位，在此基础上进一步盘绕、折叠成为完整的立体结构要比直接形成一个完整的立体结构更为合理些。

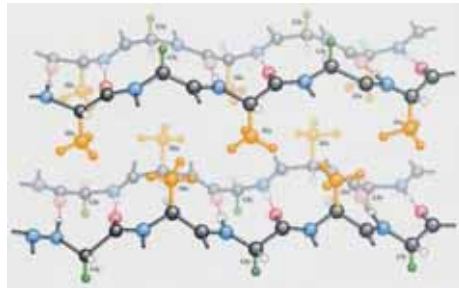
4. 纤维状蛋白质 (fibrous protein)

(1) 角蛋白 : (keratin)

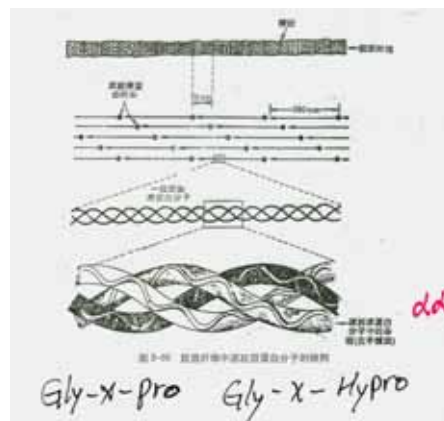
-角蛋白 : 皮肤、毛、发、角、鳞、蹄、爪



-角蛋白 : 蚕丝、蜘蛛丝的丝心蛋白 , 典型的反平行折叠片层以平行的方式堆积成多层结构



(2) 胶原蛋白 (collagen): 腱、骨、软骨、牙、皮、
 原胶原分子由三股自身为左手螺旋的多肽链向右缠绕, 形成右三螺旋。胶原蛋白的氨基酸组成与球状蛋白不同, Gly 和 Pro 含量很高, 并含有 3 个不常见的氨基酸: 4-羟脯氨酸、3-羟脯氨酸和 5-羟赖氨酸。是蛋白质合成后, 由 Pro 和 Lys 在脯氨酰羟化酶和赖氨酰羟化酶的催化下进行的。有很长的 Gly—X—Y 顺序。

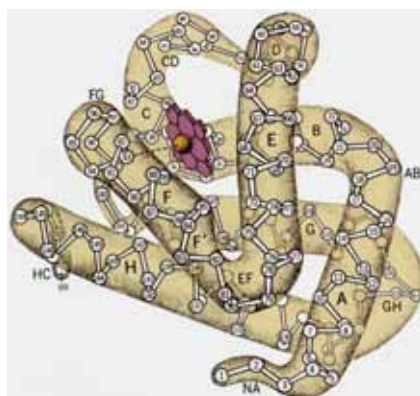


原胶原分子在胶原纤维中按 1/4 错位有规律的首尾相接, 并行排列成纤维束, 电镜下呈现横纹区带。

5. 蛋白质的三级结构

球状蛋白质分子在二级结构、超二级结构乃至结构域的基础上, 沿多个方向进一步折叠、卷曲形成一个紧密的近似球形的结构,

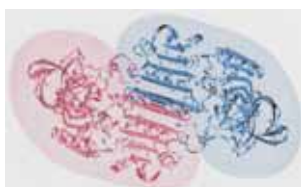
这种结构称为蛋白质的三级结构。三级结构包括多肽链中一切原子的空间排列方式。三级结构主要靠次级键（包括二硫键）来维持。



在不同的蛋白质中， α -螺旋和 β -折叠的含量不同。如肌红蛋白中只有 α -螺旋，免疫球蛋白中只有 β -折叠，而磷酸丙糖异构酶中 α -螺旋和 β -折叠相间存在。

6. 蛋白质的四级结构

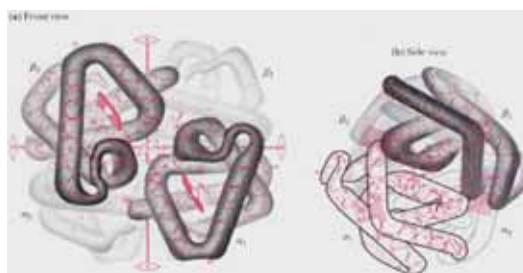
自然界中有很多蛋白质是以独立折叠的球状蛋白质的聚集体形式存在，这些球状蛋白质通过非共价键彼此缔合在一起而成的聚集体结构就是蛋白质的四级结构。在具有四级结构的蛋白质中，每一个具有独立三级结构的多肽链称该蛋白质的亚基，也称亚单位。在一种蛋白质中的亚基可以相同，也可以不同。亚基一般以



， ， 等命名。

肝乙醇脱氢酶：两个相同亚基组成的二聚体

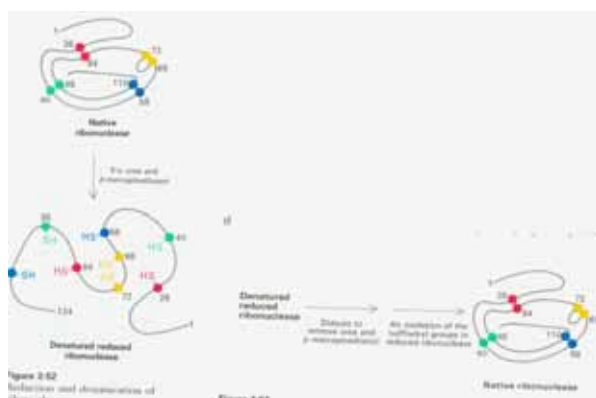
血红蛋白：(2 2)



第三节 蛋白质的结构与功能

1. 蛋白质的一级结构与空间结构的关系

蛋白质的一级结构决定于它的空间结构 ;蛋白质的空间结构取决于它的一级结构 , 包括氨基酸的组成和顺序。



2. 一级结构与功能的关系

一级结构的微小差别可导致生理功能的重大不同

镰刀形红细胞贫血症 (sickle-cell anemia)

Hemoglobin A	Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-
Hemoglobin S	Val-His-Leu-Thr-Pro-Val-Glu-Lys-
	β_1 2 3 4 5 6 7 8



3. 蛋白质的空间结构与功能

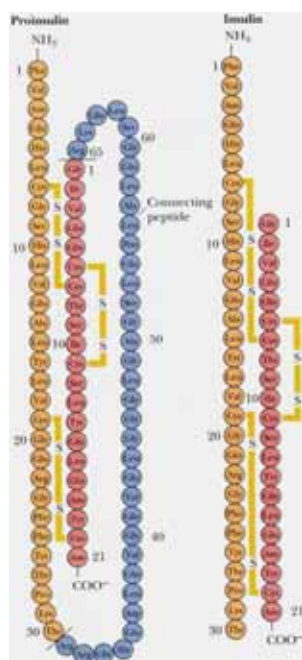
蛋白质的空间结构与它的生物学功能是密切相关的,生物体中的各种蛋白质都有自己特定的空间构象,这种构象与它们的功能是相适应的,如果空间构象发生了改变,蛋白质的生理功能也就随之消失。

(1) 蛋白质的变性

蛋白质的变性是指二级结构以上的高级结构的破坏,从而导致生物活性丧失的过程。变性的本质是次级键的破坏(包括二硫键)。

(2) 蛋白质的复性 变性蛋白在去除变性因素后可重新恢复到天然构象,恢复其生物活性,这种现象称为蛋白质的复性。

4. 胰岛素的结构与功能 (proinsulin 84, A 21, B 30, C33)



猪胰岛素的空间结构

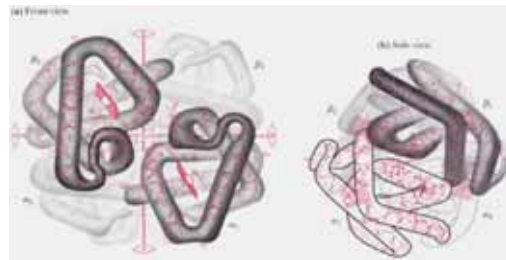
5. 血红蛋白的结构与功能

(1) 血红蛋白的功能

(2) 血红蛋白与肌红蛋白结构的比较

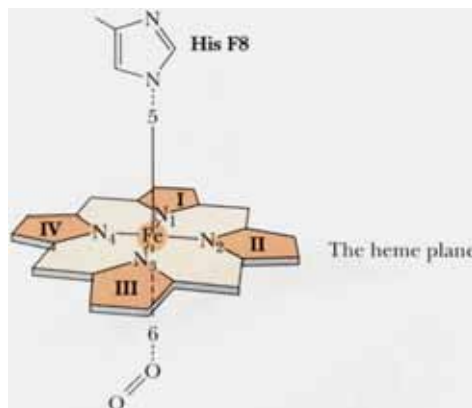
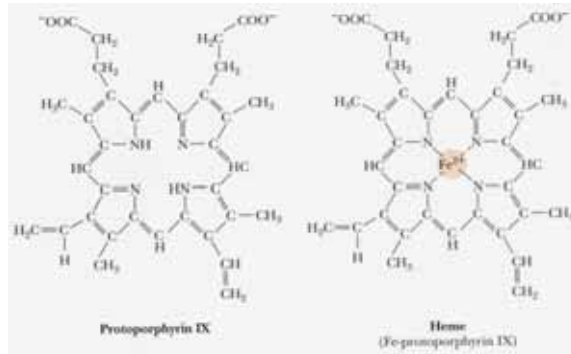


Mb: 153 个氨基酸，分子量；17.2 kD

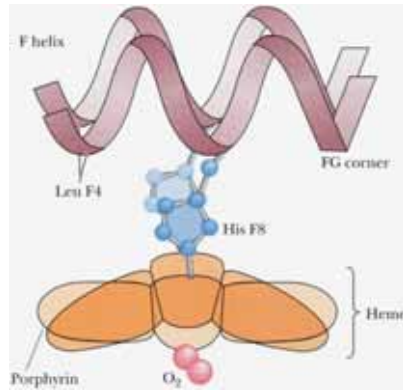


Hb: α -亚基 : 141 个氨基酸, β -亚基 : 146 氨基酸, $\alpha_2\beta_2$: 64.45 kD

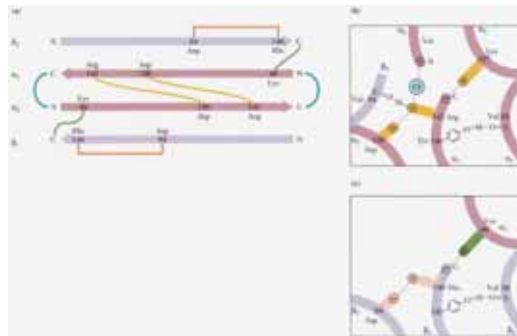
(3) 原卟啉环和血红素分子的结构



(4) 氧的结合诱导血红蛋白分子构象的变化



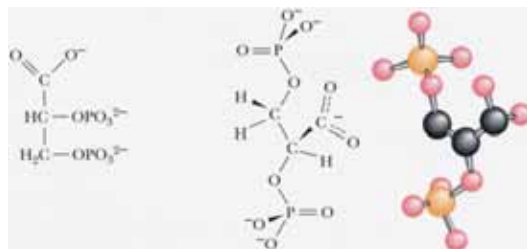
脱氧血红蛋白分子中的盐键：



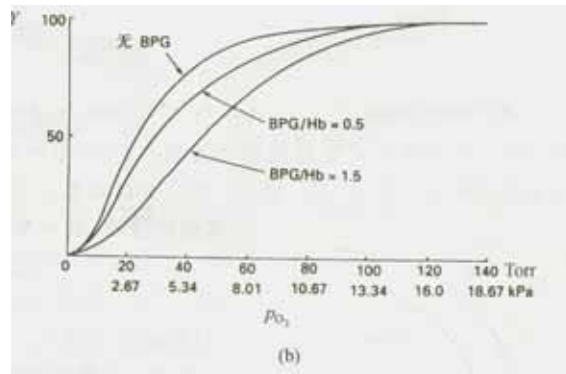
(5) 质子和二氧化碳促进血红蛋白释放氧 (Bohr 效应)

Bohr效应的意义：在代谢旺盛的组织，高H⁺和CO₂ 浓度，促进氧的释放，有利于组织摄取氧。在肺部pCO₂降低，有利于Hb对氧的结合

(6) 2, 3—二磷酸甘油酸 (BPG) 对 Hb 氧合曲线的影响



BPG 降低 Hb 对氧的亲和力，增加 Hb 的卸氧量



BPG 与去氧 Hb 的结合部位



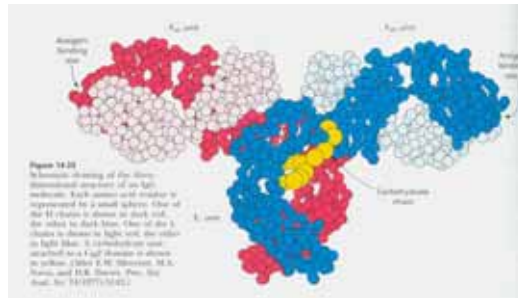
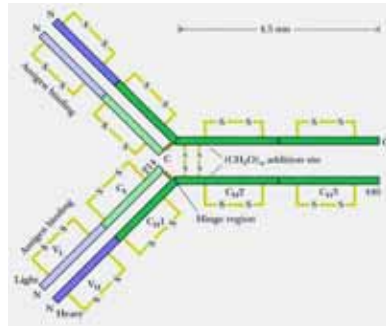
6. 免疫球蛋白的结构与功能

(1) 抗原与抗体的一般概念

抗原：能引起免疫反应的任何大分子（包括蛋白、核酸、多糖、毒素等）或病原体（细菌、病毒等）称为抗原。

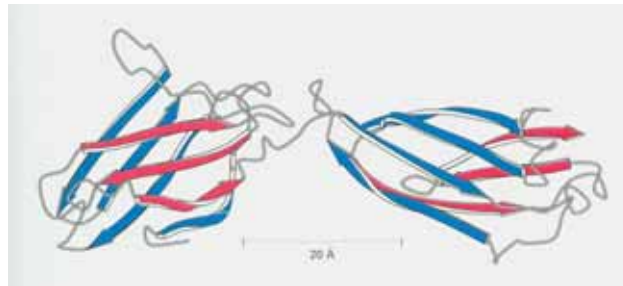
抗体（免疫球蛋白）：血浆糖蛋白，由肝、脾、淋巴结等组织的网状内皮细胞合成。抗体的特点是特异性强，专一识别相应的抗原。

(2) 免疫球蛋白(IgG) 的结构



IgG 不变区结构域的构象, (B) IgG 可变区结构域构象

IgG 轻链的二个结构域



(3) 免疫球蛋白 (immunoglobulin) 的分类

IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

表 1-5 人免疫球蛋白的种类

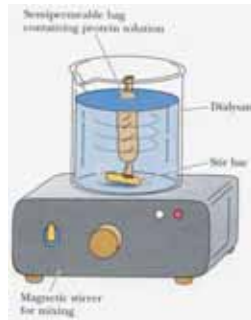
种类	血清浓度/(mg/ml)	相对分子质量	沉降系数/S	轻链	重链	分子结构
IgG	12	150 000	6.6	κ 或 λ	γ	$\kappa_2\gamma_2$ 或 $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	160 000	7, 9, 11	κ 或 λ	α	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ 或 $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	900 000	18-20	κ 或 λ	μ	$(\kappa_2\mu_2)_5$ 或 $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0.1	185 000	7	κ 或 λ	δ	$\kappa_2\delta_2$ 或 $\lambda_2\delta_2$
IgE	0.001	200 000	8	κ 或 λ	ϵ	$\kappa_2\epsilon_2$ 或 $\lambda_2\epsilon_2$

第四节 蛋白质的理化性质

1. 蛋白质的胶体性质

蛋白质的分子量：1 万到 100 万 颗粒：1—100 毫微米

胶体性质：稳定性（水化层和双电层）和不可透性

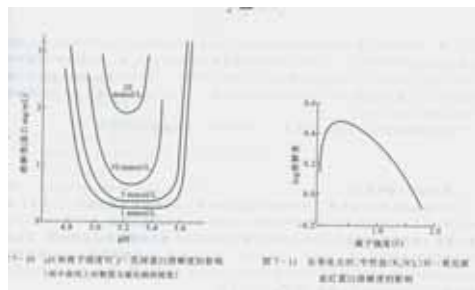


2. 蛋白质的两性性质和等电点

基 团	酸 \rightleftharpoons 碱 + H ⁺
α 羧基	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$
β - 羧基(Asp)	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$
γ - 羧基(Glu)	$-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$
咪唑基(His)	
α 氨基	$-\text{NH}_2 \rightleftharpoons -\text{NH}_3^+ + \text{H}^+$
ϵ - 氨基(Lys)	$-\text{NH}_2 \rightleftharpoons -\text{NH}_3^+ + \text{H}^+$
巯基(Cys)	$-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^- + \text{H}^+$
苯酚基(Tyr)	
胍基(Arg)	

3 蛋白质的沉淀作用

(1) 可逆沉淀作用：盐析和盐溶



(2) 不可逆沉淀作用

重金属沉淀；生物碱试剂沉淀；有机溶剂沉淀；加热变性沉淀

4 蛋白质的紫外吸收性质

5 蛋白质的沉降作用

第五节 蛋白质的分离纯化与鉴定

1. 蛋白质分离纯化的基本原则

2. 细胞破碎及蛋白质的抽提：

3. 蛋白质分离纯化的主要方法

蛋白质分离纯化的一般原理：蛋白质分离纯化主要是根据蛋白质的酸碱性质、电荷情况、等电点、分子的大小、形状、溶解度、稳定性、吸附性质（包括与其它小分子的亲和力等）以及蛋白质的光吸收性质（280 nm）等。

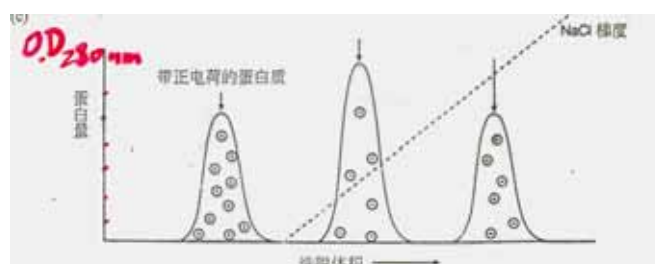
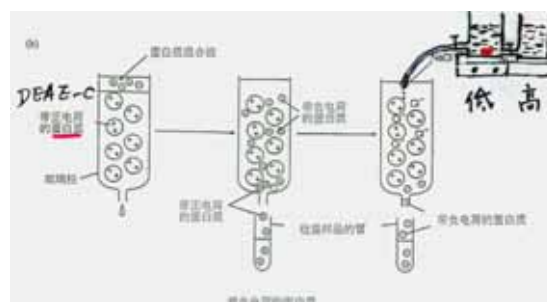
蛋白质分离纯化的主要方法：

(1) 离子交换柱层析法

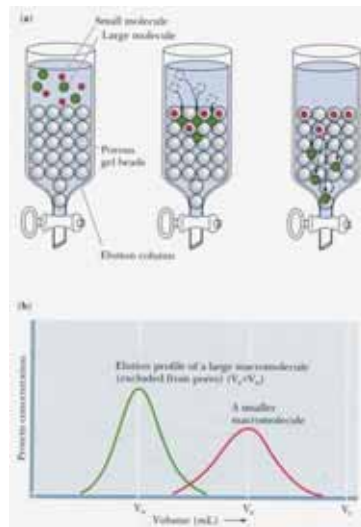
A. 支持介质（纤维素、凝胶等）

B. 交换剂类型：阴离子交换剂、阳离子交换剂

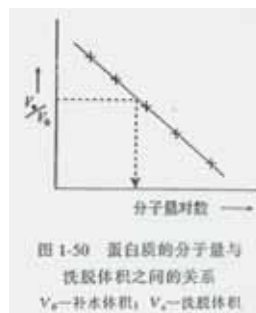
C. 方法



(2) 凝胶过滤法原理

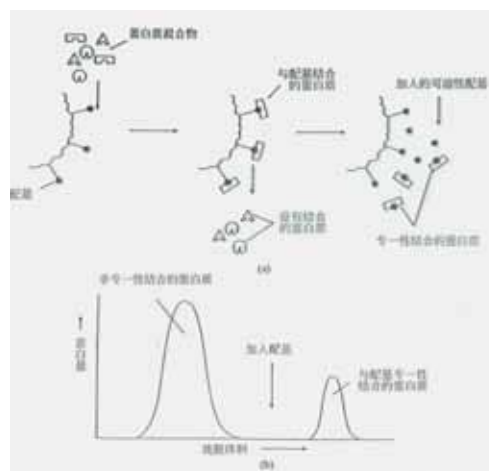


- 要点： A. 根据分离样品分子量，选择合适的介质
 B. 柱床要用缓冲液平衡稳定



- C. 可根据洗脱体积测定样品分子量

(3) 亲和层析法原理



- (4) 蛋白质沉淀法：等电点沉淀法、盐析法、有机溶剂

沉淀法

4. 蛋白质分子量的测定

(1) 凝胶过滤法：

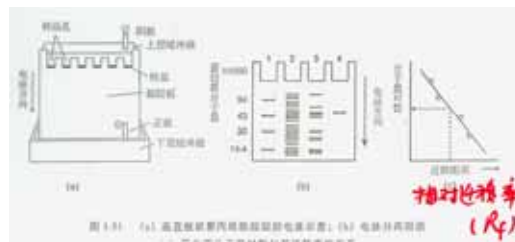
(2) SDS-PAGE (SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)

A. 电泳原理

a. 支持介质

b. SDS: 十二烷基硫酸钠 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$, 1.4g/g蛋白

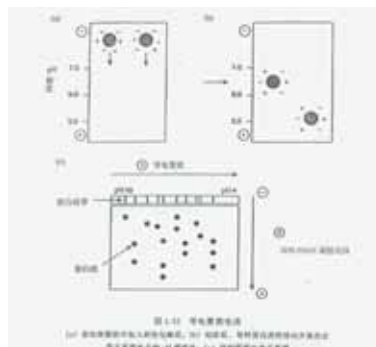
B. 方法及分析：聚胶—电泳—染色—脱色，分析分子量和纯度



5. 蛋白质的纯度鉴定

(1) 电泳

(2) 等电聚焦：检查纯度，确定等电点



6. 蛋白质含量的测定

(1) 紫外吸收法 280 nm , 1cm 光径 , 克分子浓度蛋白的吸收
值

(2) 染料结合法 (Bradford 法) 考马斯亮蓝-G250

A_{595} / A_{465} (样品) A_{595} / A_{465} (对照)