

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

第一章 蛋白质的结构与功能

制作：刘友平 审校：李洪

(2009年4月)

一、内容提示：

本章主要讨论氨基酸与多肽，蛋白质的分子结构及结构与功能的关系，蛋白质的分离、纯化及结构分析等内容。

(一) 氨基酸 (amino acid)：

1. 结构特点：

氨基酸是蛋白质分子的基本组成单位。蛋白质分子的平均含氮量为 16%。构成天然蛋白质分子的氨基酸约有 20 种，其共同的结构通式为： α -碳原子上均连接有一个氨基、一个羧基、一个氢原子和一个侧链 R 基团，故名 α -氨基酸（脯氨酸为 α -亚氨基酸）。除甘氨酸外，其余氨基酸的 α -碳原子由于结合了四种不同的原子或基团而成为不对称碳原子或手性碳原子，因而可以存在两种不同的空间排布形式，彼此成镜像结构，为对映异构体，分别称为 L-构型和 D-构型。组成天然蛋白质分子的氨基酸为 L 系氨基酸。

2. 分类：

各种氨基酸的主要区别在于其 R 基团的不同。根据氨基酸的 R 基团的极性大小可将 20 种氨基酸分为四类：① 非极性中性氨基酸(8 种)；② 极性中性氨基酸(7 种)；③ 酸性氨基酸(2 种，Glu 和 Asp)；④ 碱性氨基酸(3 种，Arg, Lys 和 His)。

3. 氨基酸的理化性质：

由于氨基酸分子中都含有碱性的氨基和酸性的羧基，故在溶液中解离后可形成兼性离子。氨基酸所带正、负电荷相等时溶液的 pH 值就称为氨基酸的等电点 (isoelectric point, pI)。等电点的高低主要由兼性离子两侧的可解离基团的 pK 值所决定。构成天然蛋白质的 20 种氨基酸中，只有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸三种对紫外光有光吸收，其中以色氨酸的光吸收最强，其最大光吸收峰在 280nm。此外，氨基酸也可与茚三酮产生缩合反应，生成蓝紫色化合物，其最大光吸收峰在 570nm。

(二) 肽 (peptide)：

1. 肽键与肽链：

氨基酸与氨基酸之间通过肽键共价连接而形成的链状结构，即多肽链。所谓肽键是指由一分子氨基酸的 α -羧基与另一分子氨基酸的 α -氨基经脱水而形成的共价键(-CO-NH-)。氨基酸分子在参与形成肽键之后，由于脱水而结构不完整，称为氨基酸残基。每条多肽链都有两端：即自由氨基端(N 端)与自由羧基端(C 端)，肽链的方向是 N 端→C 端。各种不同的多肽链都有自己特定的氨基酸顺序。

2. 生物活性肽：

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

结构复杂性介于氨基酸与蛋白质之间的化合物称为肽，是通过肽键连接氨基酸而形成的化合物。通常情况下，多肽分子中氨基酸残基的数目在 50 个以下，且没有特定的空间结构。具有特定生物学功能的多肽称为生物活性肽。医学上有许多重要的低分子多肽，如谷胱甘肽、促甲状腺素释放激素及某些多肽类抗生素等，它们都具有重要的生理功能。

(三) 蛋白质的分子结构：

为了表示蛋白质分子不同结构水平，常常使用一级结构、二级结构、三级结构和四级结构这样一些专门术语。一级结构又称化学结构，二、三、四级结构又称空间结构或构象（conformation）。

1. 一级结构（primary structure）：

蛋白质的一级结构是指多肽链中氨基酸的排列顺序，其维系键是肽键。多肽链中氨基酸的排列顺序不仅是蛋白质一级结构的核心内容，也是蛋白质空间结构的决定因素。

2. 二级结构（secondary structure）：

二级结构是指多肽链盘绕折叠所形成的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规卷曲及无序结构等主链构象，其维系键是氢键。以上几种二级结构中， α -螺旋、 β -折叠较普遍、典型。若干具有二级结构的肽段在空间上相互接近并组织起来，形成具有特定生物学功能的结构则称为模序（motif）

3. 三级结构（tertiary structure）：

三级结构是指多肽链在二级结构的基础上进一步盘曲，依靠侧链基团相互连接而形成的球状结构。三级结构包括主链构象(二级结构)和侧链构象，即所有原子的空间排布。其维系键主要是非共价键（次级键），如氢键、疏水键、范德华力及离子键等；也可涉及共价键，如二硫键、配位键等。某些具有三级结构的蛋白质分子，可被分割为几个空间结构相对紧凑、且功能相对独立的叶瓣状结构，称为结构域（domain）。

4. 四级结构（quaternary structure）：

四级结构是指由两条或两条以上的多肽链各自形成具有独立三级结构的亚基，借次级键连接构成的更复杂的结构。这里的亚基（subunit）是指参与构成蛋白质四级结构的而又具有独立三级结构的多肽链。蛋白质四级结构的维系键也主要是一些非共价键。

(四) 蛋白质结构与功能的关系：

1. 一级结构与功能的关系：

蛋白质分子的一级结构是决定其空间结构的基础。蛋白质一级结构的改变往往导致其空间结构、理化性质及生物学功能的改变。如在镰刀状红细胞贫血患者中，其血红蛋白 β 链的第 6 位氨基酸残基由谷氨酸突变为缬氨酸，使血红蛋白的溶解性改变而易于聚集，造成红细胞形态改变且易于破裂。这种由于遗传因素而引起蛋白质分子变异所导致的疾病称为分子病。此外，蛋白质一级结构的分析也有助于了解生物物种进化之间的关系。

2. 空间结构与功能的关系：

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

蛋白质的空间结构与其功能直接相关，空间结构改变则可导致其功能发生改变。血红蛋白的氧解离曲线表现为典型的“S”形，就与其存在变构效应有关。

(五) 蛋白质的理化性质：

1. 蛋白质的两性解离与等电点：

组成蛋白质分子的酸性及碱性氨基酸残基侧链及多肽链两端的游离基团使蛋白质具有两性解离的性质，因而也具有等电点（pI）。蛋白质分子等电点的高低主要由其组成的酸性或碱性氨基酸残基的比例所决定，含碱性氨基酸越多，则其等电点偏高；反之，则偏低。蛋白质溶液的 pH 高于其等电点时，该蛋白质颗粒带净负电荷；反之，则带净正电荷。

2. 蛋白质的胶体性质：

蛋白质分子属于亲水溶胶，其稳定因素是水化膜和表面电荷。

3. 蛋白质的变性（denaturation）：

蛋白质的生物学功能是蛋白质分子的天然构象所具有的性质。蛋白质在某些理化因素的作用下，其特定的空间结构被破坏而导致其理化性质改变及生物活性丧失，这种现象称为蛋白质的变性作用。常见的变性因素有：高温、高压、电离辐射、超声波、紫外线及有机溶剂、重金属盐、强酸强碱等。蛋白质变性的实质是由于维持空间结构的次级键遭到破坏而造成的天然构象的解体，但未涉及共价键的破坏。绝大多数蛋白质分子的变性是不可逆的。

4. 蛋白质的紫外吸收：

蛋白质分子中所含的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基使蛋白质对 280nm 紫外光有特征性光吸收，可用于蛋白质含量的测定。

(六) 蛋白质的分离和纯化：

分离蛋白质混合物的各种方法主要是根据蛋白质在溶液中的下列性质：① 分子大小；② 溶解度；③ 电荷；④ 吸附性质；⑤ 对其它分子的生物学亲和力。常见的分离提纯蛋白质的方法有：① 盐析法；② 电泳法；③ 透析法；④ 层析法；⑤ 分子筛；⑥ 超速离心法等。

(七) 多肽链中氨基酸序列分析：

分析测定多肽链中氨基酸的序列，即蛋白质分子一级结构的测定，一般步骤包括：① 分离纯化蛋白质，测定 N-末端基的数目，由此确定蛋白质分子由几条肽链构成。② 将蛋白质分子中各条肽链拆开并分离出来。③ 分析多肽链的氨基酸组成，由此确定各组成氨基酸的百分比。④ 分析肽链的 N-和 C-末端基。分析 N-末端基常用二硝基氟苯法，分析 C-末端基常用肼解法。⑤ 肽链用不同的酶或化学试剂进行部分水解以获得两套或几套大小不等的肽链。常用的酶裂解试剂为胰蛋白酶，可特异性水解由碱性氨基酸残基羧基端构成的肽键。常用的化学裂解试剂为溴化氰，可特异性裂解由蛋氨酸残基的羧基端所构成的肽键。⑥ 将每套肽段中的各个肽段分离出来，用 Edman 降解法测出各个肽段的氨基酸顺序；⑦ 比较两套或几套肽段的氨基酸顺序，拼凑出整条肽链的氨基酸顺序；⑧ 确定原来多肽链中二硫键和酰

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

胺基的位置。

二、重点解析：

(一) 肽键平面(肽单位, peptide unit):

肽键平面主要是指肽键的结构特征。X 射线结构分析指出, 肽键中的 C—N 键长为 0.132nm, 介于 C—N 单键 (0.149nm) 与 C=N 双键 (0.127nm) 之间, 具有部分双键的性质, 不能自由旋转。这一性质可借助于有机化学的基本理论来加以解释, 即参与构成肽键的碳原子为 sp^2 杂化, C=O 双键间存在一 π 电子云, 此电子云与构成肽键的氮原子上的 p 电子云相互交盖, 而使肽键具有部分双键的性质。

此时, 组成肽键的四个原子及其相邻的两个 α 碳原子均处在同一个平面上, 为刚性平面结构, 且 O、H 原子反式相连。但是, N 原子及 C 原子与 α 碳原子 ($C_{\alpha 1}$ 、 $C_{\alpha 2}$) 都是以典型的单键相连接, 可以自由旋转。因此, 处在平面对角的 α 碳原子 ($C_{\alpha 1}$ 、 $C_{\alpha 2}$) 实际上就是相邻肽键平面转动的枢纽。多肽链便是以各个肽键平面为单位, 以 α 碳原子为活动枢纽进行盘绕、折叠、卷曲而形成特定的空间结构。

(二) 蛋白质分子的二级结构:

蛋白质的空间结构包括二级结构、三级结构及四级结构, 但三、四级结构都是在二级结构的基础上进一步盘曲、缠绕所形成的, 因此蛋白质的二级结构便是蛋白质空间结构的重点, 应对其深入透彻地理解和掌握。蛋白质的二级结构有多种不同的构象, 其中以 α -螺旋和 β -折叠较为普遍、典型。故在此详细叙述这两种构象的结构特征。

1. α -螺旋 (α -helix):

α -螺旋构象的结构特征为: ① 多肽链每个残基沿螺旋中心轴旋转 100° , 使主链骨架围绕中心轴螺旋盘绕, 螺旋每上升一圈是 3.6 个氨基酸残基, 螺距为 0.54nm; ② 绝大多数为稳定的右手螺旋; ③ 相邻螺旋圈之间形成许多链内的主链氢键, 即一个肽单元的肽键的 N-H 基氢原子与它前面第三个肽单元肽键的 C=O 基氧原子形成氢键, 这些氢键基本上与螺旋中心轴平行, 所有的肽键的 C=O 和 N—H 都参与氢键形成, 使 α -螺旋相对稳定; ④ 侧链基团位于 α -螺旋的外侧, 但对 α -螺旋的形成和稳定有重要的影响。

另外, 不利于 α -螺旋形成的因素常见的是: ① 存在侧链基团 (R) 较大的氨基酸; ② 连续存在带相同电荷的氨基酸残基; ③ 脯氨酸、甘氨酸、丝氨酸、谷氨酰胺、苏氨酸和天冬酰胺都被称作破坏螺旋结构的氨基酸残基。

2. β -折叠 (β -sheet):

β -折叠片层结构特征为: ① 若干条多肽链或一条多肽链迂回形成的若干肽段互相靠拢, 并行排列, 通过主链氢键连接成片; ② 所有肽键的 C=O 和 N—H 形成链间氢键, 氢键与主链互相垂直; ③ 侧链基团分别交替位于片层的上、下方, 由于侧链基团的存在, 而主链又必须互相靠拢, 所以主链不能完全伸展, 而呈锯齿状折叠。

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

(三) 蛋白质的变性及其实际意义:

蛋白质在某些理化因素作用下,其特定的空间构象被破坏而导致理化性质改变及生物学活性丧失,此现象称为蛋白质的变性作用。天然蛋白质的空间结构主要由次级键维系,变性因素使次级键断裂,空间结构破坏,多肽链伸展,形成随机卷曲的无规线团。但未涉及肽键的断裂,因此其一级结构仍然完好。蛋白质这一空间结构的改变导致性质发生了根本性的改变:① 蛋白质变性最重要的改变是生物学活性的丧失;② 理化性质的改变:易沉淀、扩散常数降低、粘度增加、侧链高能基团转移率升高,易被蛋白酶水解等。

天然蛋白质溶液经加热煮沸后,即转变为比较坚固的凝块,称为蛋白质的凝固作用。这种热凝固现象也是蛋白质变性的一种特殊表现。蛋白质的变性作用具有重要的实际意义:① 在生产和保存激素、酶、抗体和血清等具有生物活性的蛋白质时,应十分小心,以防止其变性失活。在低温条件下生产与贮存这些蛋白质就是这个道理。② 在医药卫生工作中用酒精、紫外线、蒸汽、加热等方法消毒,也就是因为这些因素能使细菌、病毒的蛋白质变性以达到杀灭的作用。

三、知识扩展:

(一) 从肌红蛋白(Mb)与血红蛋白(Hb)分子结构的差异看蛋白质结构与功能的密切关系:

Mb 与 Hb 这两个蛋白质都属于球状蛋白质。但在结构上, Mb 仅存在三级结构,没有四级结构; Hb 是由四个亚基组成的具有四级结构的蛋白质,且其亚基与 Mb 的三级结构基本相似。因此,虽然 Mb 和 Hb 的功能都是参与 O₂ 的运输或储存,但二者的氧解离曲线明显不同。前者为直角双曲线,后者为“S”形曲线。Mb 的直角双曲线容易理解,即随着氧分压的增大, Mb 的氧饱和度呈正比增加直到饱和。而 Hb 的“S”形曲线需用别构效应和 Bohr 效应来解释。别构效应是指一个蛋白质与它的配体(或其它蛋白质)结合后,构象发生改变并进而引起某些功能的变化,使之更适合于生理功能的需要。Hb 含四个亚基,各亚基与 O₂ 的结合能力受别构效应的影响。当 Hb 的第一个亚基与 O₂ 结合时较难,但一旦结合后,可促进第二及第三个亚基与 O₂ 的结合,到第四个亚基时根本没有阻力。因此 Hb 的氧解离曲线表现为“S”形。同时 Hb 与 O₂ 的结合也受 CO₂ 及 H⁺ 的影响,即在酸性溶液中(或 CO₂ 浓度高时), Hb 与 O₂ 的结合力下降,这就是所谓的 Bohr 效应。其机制仍可用别构效应加以解释,即 pH 降低(或 CO₂ 浓度升高),溶液中 H⁺ 增加,使-NH₂ 及咪唑基等质子化,有利于盐键的形成,使 Hb 的结构趋向紧密,减弱了 Hb 与 O₂ 的亲合力,也使得 Hb 的氧解离曲线表现为“S”形。上述现象充分说明蛋白质的结构与其功能是密切相关的。

(二) 多肽链中氨基酸顺序测定的基本原理:

氨基酸顺序的测定历来是分子生物学的一个难题,且随着科学技术的不断发展,其测定方法、技术不断改进。所以这里仅探讨一下其测定的基本原理。

1. 端基分析法与不同切点的肽段拼对法的结合:

泸州医学院

生物化学与分子生物学精品课程

这一基本战略思想最初是由 Sanger 开创的，它为氨基酸顺序的测定起了很大的促进作用。

端基分析法是确定肽链末端是何种氨基酸的方法。确定 N-端氨基酸者称为 N-末端分析法，确定 C-端氨基酸者称为 C-末端分析法。首先提出并且应用最多的是 N-末端分析法，主要手段是用有色物质或荧光物质来标记肽链的 N-端，即与 N-端的 α -氨基结合，标记后将肽链完全水解成氨基酸，再用层析法分离鉴定氨基酸，即可测定带标记物的是何种氨基酸。不同切点的肽段拼对法是用一种蛋白质水解酶将多肽链水解为若干个肽段（第一套肽段），再用另一种酶或化学方法将多肽链切成若干个肽段（第二套肽段），两种水解法水解不同部位的肽键，即切点互相错开，分离纯化各个肽段并分别进行端基分析，然后将不同肽段拼对成一条完整多肽链。这仅是初期分析工作的基本战略思想，但实际操作过程相当复杂。

2. Edman 顺序递减法：

Edman 提出可对肽段直接进行顺序分析的方法。此法的原理是将异硫氰酸苯酯(PITC)与肽链 N-端氨基结合生成苯氨基硫甲酰肽(PTC-肽)，然后用稀酸处理使 N-末端的 PTC-氨基酸环化生成苯乙内酰硫脲衍生物(PTH-氨基酸)从肽链上脱下，用气-液色谱法鉴定此氨基酸，留下的肽链又可重复上述过程，依次逐个测定，故称为顺序递减法。根据此法的原理已制成自动化的氨基酸顺序分析仪，可测定含 20 个以上残基的肽段的氨基酸顺序，大大提高了分析速率。但对于多数蛋白质的多肽链不能单独靠此法完成全顺序分析，还必须与 Sanger 提出的不同切点的肽段拼对法结合，实际上是采用 Sanger 的战略才能完成全顺序分析。

3. 倒推法：

由于 DNA 的核苷酸顺序分析发展快，分析速率超过了氨基酸顺序分析，故可分离该蛋白质相应的 mRNA，再以 mRNA 为模板合成互补 DNA (cDNA)，分析此 cDNA 的核苷酸顺序即可推断出多肽链中氨基酸排列顺序。但由于存在蛋白质翻译后加工，故此法所得到的氨基酸顺序并不能完全代表天然蛋白质分子中的氨基酸排列顺序。

(三) 联系相关知识，加深对蛋白质一级结构的理解：

蛋白质的一级结构，实际上就是蛋白质多肽链中氨基酸的排列顺序。不同蛋白质分子氨基酸排列顺序的差异，主要是由于其编码基因的碱基顺序不同所致。因此，在学习了 DNA 复制、RNA 转录及蛋白质翻译等内容之后，应注意将相关内容与蛋白质一级结构联系起来。譬如：① 在 DNA 和 mRNA 分子中，以三个连续的核苷酸来代表一个氨基酸的信息；② 以 DNA 为模板转录生成 mRNA 时，两条链间存在反平行关系；③ 模板 DNA 的方向是 $3' \rightarrow 5'$ ，mRNA 转录合成的方向是 $5' \rightarrow 3'$ ，模板 mRNA 的方向也是 $5' \rightarrow 3'$ ，多肽链的合成方向是 N 端 \rightarrow C 端。