

蛋白质结构基础

● 李惟

刘兰英

主编

● 吉林大学出版社

蛋白质结构基础

主编	李 惟	刘兰英
编者	李青山	罗贵民
	赵 荧	董贻诚
	张学忠	王树岐

吉林大学出版社

蛋 白 质 结 构 基 础

主 编 李 惟 刘 兰 英

责任编辑：杨继奎

封面设计：甘 莉

吉林大学出版社出版
(长春市东中华路29号)

吉林省新华书店发行
长春市第四印刷厂印刷

开本：850×1168毫米 1/32

1990年12月第1版

印张：15

1990年12月第1次印刷

字数：374千字

印数：1—800册

ISBN 7-5601-0767-2/O·94

定价：3.75元

序

《蛋白质结构基础》是《蛋白质分子基础》的姐妹篇，两者在内容上虽然明显不同，但有着密切的关系。《蛋白质分子基础》一书重点阐述蛋白质的分离纯化原理，蛋白质结构与功能关系、酶的催化原理与反应动力学。书中虽然也设有蛋白质结构的章节，但主要是基本概念的叙述。近些年来，蛋白质结构研究有了长足的进步，一方面已知结构的蛋白质数目越来越多，蛋白质一级结构和晶体结构数据库越来越充盈，另一方面，对蛋白质不同层次的结构的认识又得到了进一步深化，增添了新的概念和研究领域。基于上述情况，我们觉得很有必要写一本有关蛋白质结构及其表征方法的教学用书，供大学生，研究生和从事生物化学基础研究人员参考之用。

本书的全部内容集中阐述蛋白质结构及其主要表征方法，因此全书分为Ⅰ、Ⅱ两部分，第Ⅰ部分为蛋白质结构部分，第Ⅱ部分是结构表征方法。在第Ⅱ部分各章节中，着重原理而不涉及具体实验细节。

众所周知，在蛋白质结构这一大题目下所涉及的内容极多，问题既重大又很复杂。因此，书中必然要出现许多错误和不足，望各位同行批评和指正。

本书在编写过程中得到了许多同行的帮助和支持，特别是沈家骢、姚启智、周惠、查晓、孔威等同志为本书的编写作出了重要贡献，在此一并表示感谢。

李 惟

于吉林大学分子生物学系

1989年8月

目 录

I 蛋白质的结构特征

第一章 蛋白质的共价结构	(1)
第一节 氨基酸之间的共价键	(1)
第二节 蛋白质翻译后的共价修饰	(9)
第二章 多肽链的立体结构原理	(29)
第一节 α -碳原子双面角的限制	(29)
第二节 氨基酸残基的侧链基团与构象的关系	(35)
第三章 蛋白质的二级结构及超二级结构	(41)
第一节 蛋白质的二级结构	(41)
第二节 蛋白质的超二级结构	(53)
第四章 蛋白质的结构域	(74)
第一节 结构域的基本概念	(74)
第二节 结构域的生物功能	(78)
第三节 结构域的分类及表达方法	(80)
第四节 结构域与基因分片	(85)
第五章 球状蛋白质的三级结构	(91)
第一节 蛋白质一级结构与三级结构的关系	(91)
第二节 某些球状蛋白质的三级结构	(93)
第三节 决定及稳定蛋白质三级结构的因素	(103)
第四节 蛋白质构象的刚性和柔性	(106)
第六章 球状蛋白质的四级结构及超分子体系	(111)
第一节 球状蛋白质的四级结构及超分子体系	(111)

第二节 几种球状蛋白质的四级结构及超分子体系	(126)
第七章 蛋白质变性与复性	(136)
第一节 天然蛋白质和变性蛋白质	(136)
第二节 蛋白质变性的物理基础	(142)
第三节 蛋白质复性	(153)
第四节 蛋白质的稳定化	(157)
第八章 蛋白质肽链折叠的热力学和动力学	(160)
第一节 蛋白质肽链折叠的热力学	(160)
第二节 蛋白质折叠的动力学	(171)
第九章 免疫球蛋白和抗体	(182)
第一节 免疫球蛋白的基本结构	(182)
第二节 免疫球蛋白的一级结构特征	(183)
第三节 免疫球蛋白的空间结构	(191)
第四节 抗体的抗原结合部位	(194)
第五节 抗原抗体的相互作用	(197)
第六节 免疫球蛋白家族	(201)
第七节 单克隆抗体	(205)
第八节 抗体多样性的起源	(207)
第十章 生物膜蛋白	(214)
第一节 膜蛋白的增溶溶解	(214)
第二节 膜蛋白的结构	(221)
第三节 膜蛋白和膜脂的相互作用	(238)
第四节 膜蛋白的合成和装配	(249)
第十一章 蛋白质的结构与生物进化	(269)
第一节 蛋白质氨基酸序列的进化	(269)
第二节 蛋白质三维结构的进化	(288)

II 蛋白质结构表征

第一章 蛋白质一级结构的测定.....	(307)
第一节 测定一级结构的基本战略	(308)
第二节 测定前的准备工作.....	(309)
第三节 蛋白质和肽的氨基酸组成的测定	(311)
第四节 末端氨基酸的测定	(318)
第五节 二硫键的拆开	(324)
第六节 肽链的专一性水解和肽片段的分离提纯...	(325)
第七节 肽段的序列测定	(329)
第八节 由已知序列肽段建立蛋白质的一级结构...	(332)
第九节 蛋白质一级结构研究进展	(334)
第十节 DNA 序列分析与蛋白质序列分析.....	(336)
第二章 蛋白质晶体结构分析.....	(339)
第一节 引言.....	(339)
第二节 蛋白质晶体生长	(342)
第三节 蛋白质重原子衍生物的制备	(344)
第四节 蛋白质晶体衍射数据收集和处理	(346)
第五节 重原子位置的测定	(351)
第六节 同晶置换法基本原理	(356)
第七节 电子密度图的解释和改进.....	(361)
第八节 蛋白质结构修正	(363)
第三章 蛋白质荧光.....	(365)
第一节 基本概念	(365)
第二节 蛋白质荧光	(374)
第四章 蛋白质的圆二向色性光谱.....	(408)
第一节 偏振光及其与光学活性物质的相互作用...	(408)

第二节	旋光色散.....	(417)
第三节	CD谱及其在研究蛋白质构象中的应用 ...	(420)
第五章	蛋白质的核磁共振.....	(433)
第一节	NMR基础	(433)
第二节	多维核磁共振	(444)
第三节	NMR测定蛋白质的空间结构.....	(453)

I 蛋白质的结构特征

第一章 蛋白质的共价结构

蛋白质分子是由许多氨基酸以肽键相互连接构成的具有生物功能的长链高分子。其氨基酸残基的序列称为蛋白质的一级结构。它是mRNA翻译后的直接产物。这种共价结构，在以后的代谢过程及其发挥生物活性过程中会发生一些改变，如：主链的专一性裂解，氨基酸残基侧链的化学修饰等。这些变化都涉及到多肽链共价结构的改变，而这些变化对蛋白质的生物功能的发挥具有重要作用。

第一节 氨基酸之间的共价键

蛋白质分子中每一个氨基酸的羧基与下一个氨基酸的氨基脱去一个水分子后缩合成酰胺键（肽键），这是构成蛋白质分子主链的主要共价键，其次是两个半胱氨酸氧化后形成的二硫键。

一、合成肽键的能量主要用于翻译的准确性上

氨基酸在细胞的核糖体上经一系列的高度控制的反应相互聚合成肽键。一个肽键的形成大约需四个ATP和GTP的酸苷键被裂解，提供的自由能大约为105kJ/mol。而在体外仅需约21kJ/mol自由能，因此在体内合成一个肽键，其消耗的自由能仅一部分用于肽的合成，其余大部分是用于将mRNA翻译成氨基酸，并且尽量使翻译准确。这种准确的翻译消耗的自由能远大于肽键形成所需的能量。

肽键不能自发水解，因其水解需要跨过一个高活化能的壁

垒。但这个高能壁垒很易被蛋白水解酶克服，因此肽键易被蛋白水解酶水解。

二、肽键的两种共振结构

1951年Pauling 等人根据氨基酸及小肽的晶体 X- 射线分析，确定了肽的键长、键角（图 1-1）。

肽键的 C—N 键长为 0.132nm，较正常的 C—N 单键（0.147nm）短10%左右，但比正常的 C=N 双键（0.127nm）长4%左右，因此其键长介于单键与双键之间。产生这种现象的原因是由于在肽键 C—N 之间不仅有正常的一个 σ 键，而且由

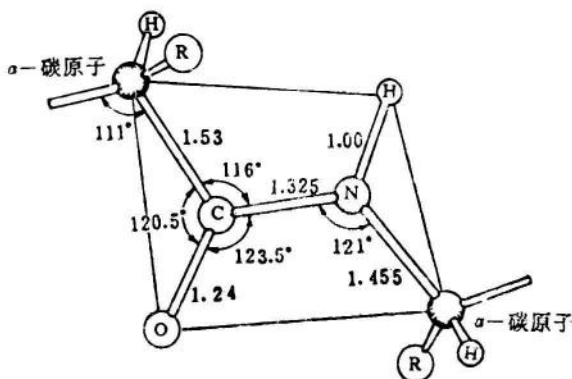


图1-1 肽的大小

于 $O=C-N$ 中的 $O=C$ 兀电子可以在 $O=C$ 及 $C-N$ 之间产生共振现象（图 1-2）。基于共振作用可得到两种结构的混合物。通过键长的差异推导出混合物中结构 I 占有60%，结构 II

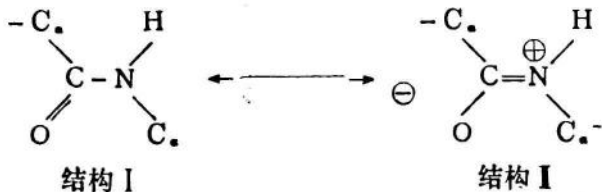


图1-2 肽共振的两种结构

占有 40%。其共振能约为 84kJ/mol 左右。由于这种共振作用使得 $\text{C}=\text{O}$ 键变得长于正常的酮、醛中的 $\text{C}=\text{O}$ 键。结构 I 具有较大的瞬时偶极，而且 $\text{C}=\text{N}$ 键以双键的形式存在，这使 $\text{C}-\text{N}$ 键的旋转受到限制，并使在肽键两侧相连的原子与肽键位于同一平面内，即 C_α , C , O , N , H , C_α 六个原子在同一平面内。肽键是以结构 II 与结构 I 的混合物形式存在，也使此六个原子在同一平面内。这即是肽的平面性质（肽单元的平面性质）。

三、大多数肽是反式结构

肽单元中的原子排布，有两种几何异构体，一种为顺式，另一种为反式。这是由于 $\text{C}-\text{N}$ 相连的两个 α -碳原子是在肽键同一侧（顺式）还是分布于肽键的两侧（反式）造成的。在（图 1-1）中表示的是反式。顺式结构如图（1-3）所示。

顺式与反式结构之间难于相互转换，因为二者之间存在有很高的能量壁垒，相当于 84kJ/mol 的能量。蛋白质中的肽键绝大多数是以反式结构存在，其原因之一是顺式与反式异构体之间存在有 84kJ/mol 的能量差异，反式

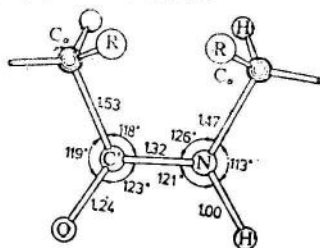


图1-3 顺式肽的键长及键角

结构具有较低的自由能。另一方面在蛋白质多肽链中的顺式结构使得连续的 α -碳原子在几何上处于互相接近的位置，使得邻近的侧链之间产生严重的空间障碍。而反式结构的肽键可避免这种空间障碍。

四、脯氨酸可形成顺式肽

脯氨酸的情况有所不同，由于其侧链为吡咯烷环，它可使肽的两种异构体转换的能量壁垒降低到 54.6kJ/mol 。而且脯

氨酸形成肽键的顺式与反式结构的能量差异小于 84kJ/mol 。这使得脯氨酸形成的肽键可呈顺式结构。

顺式肽键在生物体内许多小的环状肽中被发现，尤其是脯氨酸的亚氨基形成的肽键，很多是顺式肽键。在球蛋白中也有少数的顺式肽出现，例如：核酸酶-S中 Pro-93及Pro-114的亚氨基，葡萄球菌核酸酶中Pro-116的亚氨基，枯草杆菌蛋白酶Pro-168的亚氨基等形成的肽键都是顺式结构。而人工合成的聚L-Pro I全是顺式肽键，因此在基准氨基酸中脯氨酸是易形成顺式肽键的一个特殊氨基酸。

五、二硫键的两种形式

二硫键是由两个半胱氨酸氧化脱氢后形成的。若两个半胱氨酸在一条肽链内，这样形成的二硫键称链内二硫键，若两个半胱氨酸分别在不同的肽链内，这样的二硫键称为链间二硫桥（链间二硫键）。对每种蛋白质而言，其二硫键的位置都是特定的，即：一个蛋白质中二硫键的搭配显示了很强的特异性。

只有链内的二硫键在体外可自发形成特定的搭配，在体外这种二硫键是自发形成的，不需外加因素。但对于由两条或两条以上肽链构成的蛋白质，其链间二硫桥很难自发形成特定的搭配，如：胰岛素由两条肽链构成，若把人工合成的此两条肽链放在一起时，仅有60%可形成正确的二硫桥的搭配；胰凝乳蛋白酶由三条肽链构成，当将这三条肽键拆开，再将它们放在一起时，它们不能形成链间的正确的二硫桥的配置，不能恢复其活性。但同一条肽链内的半胱氨酸可自发地氧化成特定搭配的二硫键，例如：由一条肽链组成的核糖核酸酶，当它变性时，二硫键均被拆开，当除去变性因素后，这些二硫键可以自发地重新恢复，使其又具有生物活性。

体内二硫键的形成需氧化型谷胱甘肽的参加。许多蛋白质

可以自发地折叠成能量较低的构象。但许多蛋白质的活性形式并不是能量最低的构象，这种构象能够存在的主要原因之一是由于在肽链片段之间存在着附加的共价键（主要是二硫键），胰岛素和胶原蛋白就是典型的例子。

胰岛素在生物合成时，首先是mRNA由翻译成单肽链的前胰岛素原。胰岛素的基因只有在特定的细胞—胰腺中的胰岛β细胞中才能表达。前胰岛素原比胰岛素原长24个残基的肽段（信号肽），（在肽链通过高尔基体之前，信号肽被水解除去。于是胰岛素原开始折叠成具有较低能量的构象，在这种构象中，正确成对的Cys残基相互接近，以便形成二硫键。

二硫键的形成需要氧化型的谷胱甘肽参加，它的二硫键与胰岛素原中Cys的巯基之间产生交换，使胰岛素的巯基转换成氧化的二硫键，谷胱甘肽还原成它的巯基形式（图1-4）。在

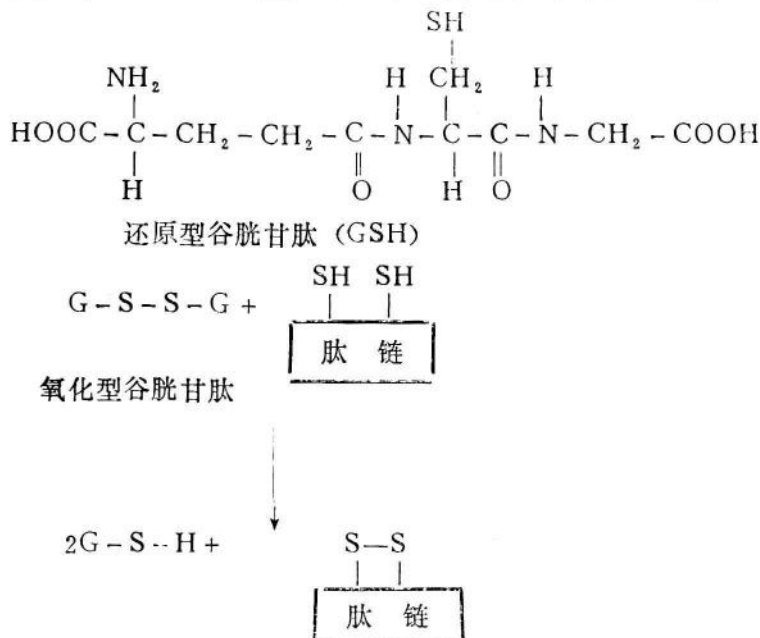


图1-4 氧化型谷胱甘肽参与链内二硫键形成的反应

刚开始形成二硫键时，经常是错误的搭配，这样的构象在自由能方面并不合适，因此还需要二硫键的重排。体内有一种含巯基的酶，它可以裂解各种二硫键，并可以重新形成二硫键，通过此酶的催化作用，不断地发生二硫键的重排，直至得到能量最低的二硫键的搭配为止（图 1-5）。这种搭配方式只有特定的一种，因此在蛋白质的天然构象中，二硫键的位置是特定的。

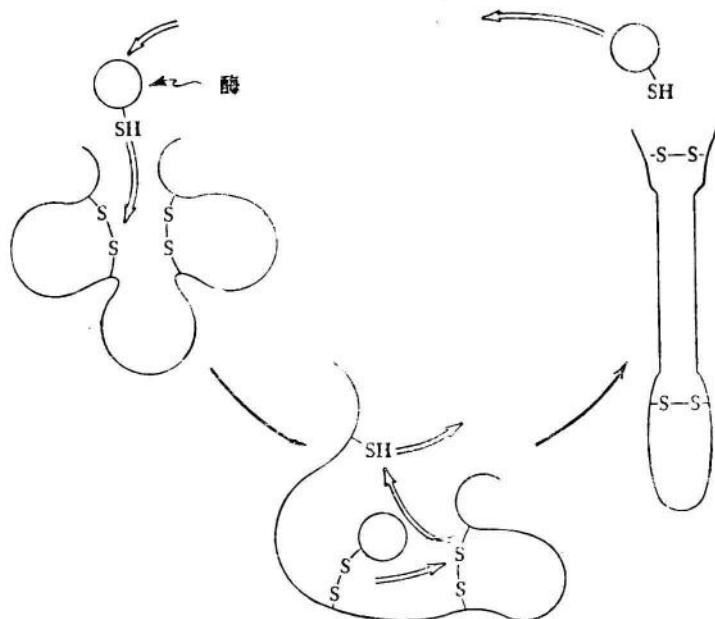


图1-5 含巯基的酶参与二硫键重排的示意图

胰岛素原被高尔基体包裹成分泌颗粒后。在胰岛素原的两个位置上开始水解，连接胰岛素两条肽链的 C-肽和一些附属的残基Arg, Lys被释放出来，剩下的两条肽链（A链和B链）仍以二硫键连在一起（图 1-6），这就是有活性的胰岛素分子。它以颗粒的形式贮存于高尔基体中，在颗粒内它形成高密

度的六聚体的锌络合物的结晶。直到需要时，它才分泌入血液中。胰岛素原中的二硫键的搭配方式是其可能达到的最稳定的构象，而在胰岛素分子中，这种搭配不是最稳定的构象，这种构象依靠二硫键来维持。许多由几条多肽链组成、彼此又以二硫键相连的蛋白质分子，都有由一条多肽链组成的前体，因为在一条链内易形成正确的链内二硫键配置，然后再水解成具有生物活性的由几条肽链组成的蛋白质分子。

二硫键对稳定蛋白质的结构有重要作用，折叠的蛋白质分子通过二硫键的作用变得更加稳定。有些蛋白质分子由于二硫键的断裂，使活性中心的构象发生改变，导致其生物活性的丧失。但也有的蛋白质在二硫键遭到破坏后，虽然蛋白质的局部构象发生了变化，但因未涉及活性中心的变化，仍可保持其活性，其中的某些例子列于（表1-1）中。尤其值得提出的是 α -淀粉酶，当其全部的三对二硫键都被还原后，仍没有削弱酶的活性。

表1-1 二硫键还原作用与蛋白质活性的关系

蛋 白 质	二硫键数目	总残基数	保持蛋白质活性允许的二硫键断裂数
牛胰酶抑制剂	3	58	1
核糖核酸酶	4	124	1
溶菌酶	4	129	三个中的任何一个
胰酶	6	224	3
糜酶	5	242	2
α -淀粉酶	3	410	3

六、细胞外或在细胞外发挥作用的蛋白质往往含有二硫键

位于细胞内和细胞外的蛋白质其二硫键具有不同的生理功能。二硫键通常存在于细胞外或在细胞外发挥作用的蛋白质

中，例如：蛇毒及其它毒蛋白、肽类激素、消化酶、补体蛋白、免疫球蛋白及乳蛋白等。这些二硫键在蛋白质的庞大结构中具有重要的稳定作用。另外，一些天然物的粘弹性质与其所含的结构蛋白质之间二硫桥的交联有一定关系，如角蛋白分子间的交联使毛发具有弹性。

七、细胞内蛋白质的二硫键往往具有一定的功能作用

应该说在细胞内的蛋白质所含二硫键并不多，这类二硫键一方面起着稳定结构的作用，另一方面往往和生物功能有关，例如，谷胱甘肽还原酶中的二硫键在催化过程中扮演了活性部位的角色。苏氨酸脱氢酶的二硫键可以稳定蛋白质亚基聚合的正确构象。巯基-二硫键的交换作用对调节酶的活性具有重要功能，例如：在海胆卵分裂期中，发现控制膜连接的收缩蛋白与微管蛋白的相互作用就是利用了这种交换作用。但膜蛋白和细胞外蛋白质的特异性结合并不是通过巯基-二硫键的交换作用来调节的。

有些蛋白质，例如：在胃蛋白酶、巯基氧化还原酶、胰岛素A链、丝纤维蛋白、硫辛酰胺脱氢酶及其它的嘧啶核苷酸-二硫键氧化还原酶中，发现有紧密接近的链内二硫桥环，两个键合的半胱氨酸之间仅相隔2-4个氨基酸残基，通过X-光衍射分析表明，这种环一般是扁平而坚硬的。谷胱甘肽还原酶及有关的酶就是用这样的环与FAD与的异咯嗪环相接触。

第二节 蛋白质翻译后的共价修饰

蛋白质在核糖体处合成之后，在酶作用下，还会发生共价键的改变，把这种蛋白质在翻译期间或翻译后共价键的变化，称为蛋白质的共价修饰。在体内这种共价修饰是在酶的控制下进行的。一种修饰方式是对主链的共价修饰，（如：主链N-