

清华大学学术专著

蛋白质化学修饰

周海梦 王洪睿 编著

清华大学出版社

(京)新登字 158 号

内 容 提 要

本书是清华大学学术基金资助的学术专著。

蛋白质研究是当今生物化学和分子生物学中最活跃的课题,其核心问题是探讨蛋白质结构与功能的关系。本书所介绍的蛋白质化学修饰方法是研究上述关系的常用手段,是我国生物化学家对生物化学和分子生物学的重要贡献,邹承鲁教授领导的此项研究曾荣获国家自然科学基金一等奖,本书作者周海梦教授是此项目的主要研究者之一。

本书共分 8 章:绪论、蛋白质分子的结构基础、蛋白质侧链基团的修饰反应、蛋白质化学修饰的定量处理、蛋白质的位点专一性修饰、蛋白质化学交联和化学偶联以及基因定点诱变。书末 3 个附录,分别介绍了修饰试剂的反应性、邹承鲁作图法的数学证明和计算机模拟确定必需基团的数目。

本书可作为从事生物化学和分子生物学的研究人员以及高等院校生物专业师生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

蛋白质化学修饰/周海梦,王洪睿编著.-北京:清华大学出版社,1998
ISBN 7-302-02938-5

I.蛋… II.①周… ②王… III.蛋白质-生物化学 IV.Q51

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 09248 号

出版者:清华大学出版社(北京清华大学校内,邮编 100084)

[http:// www .tup .tsinghua .edu .cn](http://www.tup.tsinghua.edu.cn)

印刷者:北京人民文学印刷厂

发行者:新华书店总店北京科技发行所

开 本:787×1092 1/16 印张:11 字数:257 千字

版 次:1998 年 月第 1 版 1998 年 月第 1 次印刷

书 号:ISBN 7-302-02938-5/Q·5

印 数:00011200

定 价:24.00 元

A Brief Introduction

The techniques of chemical modification of proteins have been extensively used in protein research for a long time . Owing to the developments of site-specific chemical modification of proteins as described in this book , such technology is still applied extensively as a useful technique . The statistical approach advanced by Tsou is based on establishing a relationship between the number of residues modified and the change in biological activity . Tsou 's plot has been extensively used to ascertain the number of essential groups for enzyme activity . In addition, the kinetic theory of the substrate reaction during modification of enzyme activity previously described by Tsou has also been extensively used for studying the courses of irreversible inhibition of enzymes . However, there is no book which completely and in detail introduces the important theory and methods proposed by Tsou . The reader is referred to Chapters 3 and 4 for description of the kinetic theory of the substrate reaction and Tsou 's plot . The reader is also referred to Appendix I for information concerning the availability of various reagents . References are given with each chapter . A brief introduction for site-directed mutagenesis is given in Chapter 8 . Although site-directed mutagenesis is an active area, chemical modification of side chain groups of proteins is still a problem-solving technique used in research of protein structure and function .

In presenting this book, we welcome your criticisms, suggestions and comments of all kinds . We hope this book will be useful for the laboratory workers .

序

自 90 年代初期以来,结构生物学已经取代了分子生物学成为生物学领域内发展最为迅速的领域,而蛋白质研究又是当前结构生物学研究的主流。从几种主要结构生物学期刊论文内容分析,大部分(约 70%)与从蛋白质结构分析阐明其生物学功能有关。此外,还有一些以蛋白质为主题的新刊,其中最重要的是《Proteins, Structure, Function and Gene-tics》和《Protein Science》。这两种刊物虽然创刊时间不长,但已在生物化学与分子生物学领域内,以影响因子为序的学术刊物排列中名列前茅,超过了以核酸为主题的专业刊物《Nucleic Acid Research》。这一事实充分说明,蛋白质研究是当前生物化学与分子生物学领域内最为活跃的内容。如果说,生物大分子研究的主流在 50 年代从蛋白质转向了核酸,那么现在可以说,已经又从核酸回到了蛋白质。国际性的蛋白质学会在 1986 年成立时,曾宣称蛋白质研究的第二个黄金时代已经开始,这完全符合近 10 年来生物化学与分子生物学学科发展的实际情况。可以预见,在人类基因组序列完成后,为了鉴定大量未知蛋白的结构与功能,蛋白质研究还将进入一个空前活跃的时期。

结构与功能关系的研究一直是结构生物学研究的核心,也有人称之为结构生物学的中心法则。而蛋白质侧链基团的化学修饰多年来曾经是研究蛋白质结构与功能关系的主要方法。虽然近年来基团定点突变技术已经为蛋白质结构功能研究开创了一条崭新的道路,但不仅是现在,而且在未来的一段时间内,蛋白质侧链基团的化学修饰仍将是蛋白质结构与功能关系研究的重要方法之一。周海梦教授在本书中全面地论述了蛋白质侧链基团化学修饰的理论与实验方法,包括不同基团的化学修饰方法、亲和标记和专一性修饰、基团修饰对功能影响的定量处理、修饰反应的动力学等。最后,对基因定点突变方法也做了必要的介绍。因此可以说是对蛋白质结构与功能关系研究的一本重要的参考书。

我国蛋白质研究是有基础的,至今仍为国际上所公认的蛋白质变性的理论,就是 30 年代我国科学家吴宪基于他在国内的工作提出的。60 年代中,胰岛素的人工合成也是我国在生物化学领域内的一项历史性的成就。对蛋白质侧链基团化学修饰研究,我国也做出过重要贡献。当今科学发展突飞猛进,研究手段日新月异,新的研究成果不断涌现,我殷切希望本书的出版将对进入蛋白质研究领域的我国新一代的生物化学家有所帮助,对我国蛋白质研究再创辉煌做出贡献。

邹承鲁

前言

蛋白质化学修饰技术曾在生物化学的发展史中起过重要的作用,是人们探索和研究蛋白质结构和功能常用的研究手段。近年来由于试剂专一性的改进,定量处理方法的发展,特别是位点专一性修饰试剂的进展,使这一技术仍然是目前研究蛋白质结构与功能方面的有效手段。

在蛋白质化学修饰的定量处理方法和蛋白质化学修饰的不可逆抑制动力学方面,我国科学家邹承鲁先生取得了令世人瞩目的成就,这也是我国科学家对生物化学和分子生物学领域的重要贡献。国际上许多有关酶学方法和蛋白质化学修饰的重要专著均详细地介绍了邹先生的研究成就。然而,迄今为止,国内尚无详细介绍这些方法和成果的教科书和专著,使得这些方法在国内同行中的使用受到影响。我在 70 年代末 80 年代初师从邹承鲁先生。在邹先生的指导下,曾在蛋白质化学修饰方面开展了很多研究工作,有的研究成果在国际上被广泛地引用,也与邹先生共享过由这些成果所带来的荣誉。后来,在清华大学执教的十几年里,继续在这方面进行研究,并将这些方法和成就介绍给一届又一届的学生。但是,长期以来,一直缺乏一本系统的教材,因此着手撰写《蛋白质化学修饰》一书,但由于教学和科研工作繁忙,进展很慢。主要原因还得归咎于我,不太善于挤时间。现在这本书终于出版了。全书共分 8 章,其中的第 3 和第 5 两章是与王洪睿合作编写的,第 8 章是与杨建合作编写的。本书附录 2 为王志新教授的科学论文,他系统和科学地论证了邹承鲁作图法的理论基础。附录 3 是我与孙之荣等人合作的科学论文,是我们将这一重要的作图法进行计算机模拟的工作,在此介绍和推荐给读者。在本书的写作过程中得到多位专家与教授的指点及学术界前辈的关怀,在此表示衷心的感谢。此外,我对张彤也表示衷心的感谢,感谢她在本书的写作、整理与打印过程中给予的合作。

谨以此书献给我敬爱的老师,我国著名生物学家邹承鲁教授 75 华诞。

周海梦

目 录

第 1 章 绪论..... 1

第 2 章 蛋白质分子的结构基础..... 4

2.1 蛋白质的生物学功能 4

2.2 蛋白质分子的化学结构 5

2.3 蛋白质分子的空间结构..... 11

参考文献 18

第 3 章 蛋白质侧链基团的修饰反应 19

3.1 特定的氨基酸残基侧链基团的反应试剂..... 19

3.2 巯基的化学修饰..... 22

3.3 氨基的化学修饰..... 26

3.4 羰基的化学修饰..... 30

3.5 咪唑基的化学修饰..... 32

3.6 酚和脂肪族羟基的化学修饰..... 34

3.7 胍基的化学修饰..... 35

3.8 吡啶基的化学修饰..... 38

3.9 硫醚基的化学修饰..... 40

3.10 二硫键的化学修饰 41

3.11 化学修饰反应条件的影响 43

参考文献 46

第 4 章 蛋白质化学修饰的定量处理 50

4.1 Ray-Koshland 方法..... 50

4.2 邹承鲁作图法..... 52

参考文献 61

第 5 章 酶的化学修饰动力学 63

5.1 酶化学修饰的动力学机制..... 63

5.2 利用失活动力学确定酶-配体解离常数 65

5.3 酶活性修饰过程中底物反应动力学..... 69

5.4 不可逆抑制动力学在其它方面的应用..... 82

参考文献 86

第 6 章 蛋白质的位点专一性修饰 89

6.1 亲和标记..... 89

6.2 光亲和标记..... 96

6.3 蛋白质分子中特定部位的专一性荧光标记 102

6.4 蛋白质专一性标记在探测酶的活性部位构象变化上的应用	110
参考文献.....	115
第 7 章 蛋白质的化学交联和化学偶联.....	118
7.1 不可切断的和可切断的化学交联	118
7.2 蛋白质的光亲和交联	122
7.3 蛋白质分子的固定化	125
参考文献.....	129
第 8 章 基因定点诱变——蛋白质主链结构的化学修饰.....	131
8.1 基因的缺失和插入	131
8.2 寡聚核苷酸介导的定点诱变	135
参考文献.....	140
附录 1 各种修饰试剂对蛋白质侧链基团的反应性	141
附录 2 邹承鲁作图法的数学证明	150
参考文献.....	155
附录 3 蛋白质功能基团的修饰与其生物活力之间的定量关系	
——计算机模拟确定必需基团的数目和性质	156
参考文献.....	163

Table of Contents

Chapter 1	Introduction	1
Chapter 2	Fundamentals of Molecular Structure of Proteins	4
2.1	Biological Function of Proteins	4
2.2	Chemical Structure of Proteins	5
2.3	Three-Dimensional Structure of proteins	11
	References	18
Chapter 3	Modification of Side Chain Groups of Proteins	19
3.1	Specific Reagents of Modification Reaction of Amino Acid Residues	19
3.2	The Modification of Thiol Groups	22
3.3	The Modification of Amino Groups	26
3.4	The Modification of Carboxyl Groups	30
3.5	The Modification of Imidazole Groups	32
3.6	The Modification of Enol and Hydroxyl Groups	34
3.7	The Modification of Guanidine Groups	35
3.8	The Modification of Indole Groups	38
3.9	The Modification of Thioether Groups	40
3.10	The Modification of Disulfides Groups	41
3.11	Effects of Reaction Conditions on Modification	43
	References	46
Chapter 4	Quantitative Treatment of Protein Chemical Modification	50
4.1	Ray-Koshland's Method	50
4.2	Tsou's Method	52
	References	61
Chapter 5	Kinetics of Chemical Modification of Enzymes	63
5.1	Principles of Kinetics of Chemical Modification	63
5.2	Determination of Enzyme-Ligand Dissociation Constant Using Kinetic Method	65
5.3	Kinetics of Substrate Reaction during Modification of Enzymes	69
5.4	Applications of Kinetiks of Irreversible Inhibition in the Other Research Field	82
	References	86
Chapter 6	Site-Specific Chemical Modification of Proteins	89
6.1	Affinity Labeling	89

6.2	Light-Affinity Labeling	96
6.3	Fluorescence Labeling at Specific Sites of Protein Molecules	102
6.4	Site-Specific Labeling Applied to Explore the Conformational Changes at the Active Site of Enzymes	110
	References	115
Chapter 7	Chemical Cross-Linking of Peptide Chains	118
7.1	Cleavable and Incleavable Cross-Linking	118
7.2	Light-Affinity Cross-Linking	122
7.3	Immobilization of Proteins	125
	References	129
Chapter 8	Site-Directed Mutagenesis—Chemical Modification of Main Chain Structure of Proteins	131
8.1	Deletion and Insertion of Genes	131
8.2	Site-Directed Mutagenesis by Oligonucleotide	135
	References	140
Appendix I	Some Commonly Used Reagents for Chemical Modification in Proteins	141
Appendix II	Mathematical Illustration of Tsou plot	150
	References	155
Appendix III	Quantitative Relation between Modification of Functional Groups of Pro- teins and Their Biological Activity—A Computer Program for Ascertaining the Number of Essential Residues	156
	References	163

第 1 章 绪 论

蛋白质是一类重要的生物大分子,它是生命活动的主要承担者,蛋白质的生物学活性不仅决定于其特定的化学结构,而且还决定于其特定的空间结构,如果化学结构不发生改变,因空间结构破坏而导致蛋白质生物学功能的丧失,这个过程称为蛋白质变性或去折叠。所谓蛋白质的化学修饰是指蛋白质分子化学结构的改变。有的情况下化学结构改变并不影响蛋白质的生物学活性,这些修饰称为非必需部分的修饰。但是在大多数情况下,蛋白质化学结构的改变将导致生物活性的改变(如下降以至完全丧失)。蛋白质的化学修饰主要包括两个方面:①蛋白质分子的侧链基团的改变;②蛋白质分子中主链结构的改变。化学修饰是研究蛋白质的结构与功能关系的一种重要手段,也是定向改造蛋白质性质的一种有力工具。本书主要涉及前一方面的问题,即蛋白质侧链基团的化学修饰。后一个方面的问题,即主链结构的改变,属于基因重组和定点突变的技术,本书第 8 章只作简单的介绍,如需详细的了解请阅读其它有关专著。

蛋白质侧链基团的化学修饰是一种广泛使用的研究手段,也是一种比较成熟的经典技术,在蛋白质特别是酶的结构与功能研究中,曾经起到过十分重要的作用。近年来,由于化学修饰试剂专一性的提高,定量处理方法的发展以及不可逆抑制动力学理论和方法的发展,使这一经典研究技术仍然被广泛使用,并有新的发展。

化学修饰的主要作用有如下几个方面。

(1) 探测酶和蛋白质的必需氨基酸残基的性质和数目。蛋白质的化学修饰可以很快地揭示蛋白质分子中哪些侧链基团是表现酶活性所必需的。这对于目前空间结构尚未搞清楚的蛋白质分子尤为重要。它可以帮助人们初步认识该蛋白质分子中哪些残基能处于活性部位并为其表现功能所必需。这将为空间结构的解析提供重要的信息。

(2) 用于蛋白质纯度分析与鉴定。

(3) 用于蛋白质一级序列的测定。如在蛋白质序列分析时,首先必须了解 N-末端的残基。多肽链 N-末端残基的分析常用的修饰试剂有二硝基氟苯(DNFB, dinitrofluorebenzene)、丹氟酰氯,即二甲基氨基萘磺酰氯(DNS, dimethylamino-naphthalene)和苯异硫氰酸酯(PITC, phenyl isothiocyanate)。PITC 也是测定蛋白质序列的 Edman 降解法的关键试剂。此外,在氨基酸组成分析中的半胱氨酸残基的测定、二硫键的断裂、侧链基团的保护等均采用各种方法的化学修饰。

(4) 探测蛋白质分子的构象变化和运动性。利用化学修饰试剂的反应,探测某些基因的暴露程度,以分析蛋白质分子的构象变化,如利用 5, 5'-二硫双(2-硝基苯甲酸, DTNB)测定不同去折叠状态的反应巯基数目,可以探测其去折叠的程度,还可以通过监测 A_{412} 随时间的变化探测去折叠的动力学。

(5) 利用亲和标记探测活性部位局部区域的构象状态。有些化学试剂可专一性地修饰酶的活性部位的侧链基团,从而在活性部位引入探测基团(如具有荧光性或顺磁性基

团),以探明活性部位的构象状态及构象变化。

(6) 探索蛋白质和酶作用的化学机理。通过化学修饰可以探明哪些侧链基团参与了酶的催化作用,为探明其作用的化学机理和催化历程起了重要的作用,也为药物设计提供了分子基础。

(7) 利用共价交联技术研究蛋白质分子的拓扑学、构象的运动性以及寡聚蛋白质的亚基结合状态。

(8) 利用蛋白质晶体的重金属衍生物(也属于一种化学修饰),进行 X 衍射晶体结构分析。

(9) 用于蛋白质和酶分子的固定化。在蛋白质和酶分子的固定化技术中,除部分用物理方法固定外,主要的还是采用化学方法的固定化。其本质是蛋白质和酶的化学修饰,其中包括载体偶联法和共价交联法。这类化学修饰希望只修饰非必需基团,设法避免必需基团的破坏,以保持蛋白质和酶的活性。

(10) 定向改造蛋白质分子的性质。用基因定点突变技术,改变蛋白质主链的化学结构,在蛋白质的肽链结构中删去、替换或增加某些氨基酸残基,以研究其结构与功能的关系,并可定向地进行蛋白质的改造。此外,还可以通过侧链基团的化学修饰,改造蛋白质分子的性质,如使其激活、失活,或使其稳定性提高等。

总之蛋白质化学修饰仍然作为一种有效的研究手段广泛地应用于基础性和应用研究。

蛋白质分子具有错综复杂的三维结构,而它的所有氨基酸残基的侧链基团分布于蛋白质分子的各个部分。有的残基处于蛋白质分子的表面,易于受到试剂的进攻和作用,有的残基则内埋于蛋白质分子的疏水内环境,不易与试剂接触和反应。即使都处于能与试剂作用部位的同类基团,由于它们所处的化学微环境不同,因此与试剂作用反应速度也不相同。出于不同的研究目的,对化学修饰反应发生的部位也有一定的要求。例如需测定某一蛋白质的表面可反应巯基数,那么修饰试剂(如 DTNB)与蛋白质的反应需在天然条件下进行,避免因变性引起深度修饰反应的发生。若需要测定蛋白质的总巯基数,则应在变性条件下(如在 8mol/L 脲或盐酸胍溶液中),使蛋白质分子充分去折叠而使其所有的内埋巯基都充分地暴露出来,以便试剂与之作用。有的化学修饰反应需专一性的发生于蛋白质分子的某一特定部位,例如要专一性修饰酶分子的活性部位侧链基团,这时就需对化学修饰试剂本身有特定的要求,使其能专一性标记于酶的活性部位,常用的修饰方法是亲和标记。有的研究工作希望化学修饰后引起酶的失活;有的则希望化学修饰后保持酶的活性。因此在进行化学修饰时,应视不同要求来选择试剂和控制反应条件。

由于蛋白质分子结构的复杂性,要严格控制反应发生在某一位点上是有困难的。然而,可以通过反应试剂的选择与设计、反应条件的控制与改变、采用某些保护措施等等,做到使反应主要发生于某一特定位点。由于化学修饰的反应性与蛋白质的空间结构有如此密切的关系,因此本书的第 2 章将简要介绍蛋白质的结构,重点放在可溶性的球状蛋白。这些知识对于具有生化专业背景的读者来讲似乎是没有必要,然而它可以使非生化专业的读者对蛋白质分子的结构有一些基础的知识。

大多数化学修饰将导致酶的不可逆失活,因此化学修饰又称为酶的不可逆抑制作用,

用于化学修饰的试剂称为酶的不可逆抑制剂。研究酶活性不可逆改变动力学,可以为酶的催化作用机理的阐明提供重要的信息和实验依据,同时也可作为药物设计提供重要的信息。本书涉及的不可逆抑制作用的动力学分析方法是我国科学家邹承鲁先生提出来的,这一方法简便、有效,同时可得到多个动力学常数,而且,即使数学基础比较薄弱的读者也是可以掌握的。此外,化学修饰技术的应用显然与生物学功能密切相关,侧链基团的改变有可能导致生物学活性的改变,这类基团一般称为必需基团。一般说来,必需基团的改变将导致蛋白质生物学活性的下降或丧失。另外,某些基团的破坏,对蛋白质生物学功能没有影响,这类基团一般称为非必需基团。因此我们应该注意这类非必需基团的所谓非必需性仅因其破坏对活性没有影响而言,这些非必需基团的氨基酸残基对于维持蛋白质特定的空间结构是有作用的,有的则是非常重要的。

在我们的研究对象中,有许多蛋白质的空间结构还没有解出来,甚至没有任何有关的数据可参考。有的蛋白质,特别是新发现的蛋白质,甚至连一级结构都不清楚。在这种情况下,利用化学修饰很快可以获得对这个蛋白质的初步认识。另外,侧链基团改变与生物活性密切相关,很多情况下我们需要同时监测某些基团的改变和其生物活性的改变。在这方面,我们选择了一些具体的例子以供参考。本书重点介绍蛋白质化学修饰反应的类型及其试剂、蛋白质化学修饰的定量分析与处理、化学修饰时酶活性的不可逆改变动力学、酶的活性部位的专一性化学修饰以及蛋白质固定化技术。本书的以后各章都附有一定数量的文献,以便读者能利用这些文献从事自己的研究工作。

第 2 章 蛋白质分子的结构基础

蛋白质(protein)是一类重要的生物大分子,在体内占有特殊的地位,它与核酸是构成细胞内原生质的主要成分,是生命现象的主要物质基础。已经获得许多蛋白质的纯品,根据蛋白质元素分析表明,蛋白质主要含有碳、氢、氧、氮,此外,还含有少量的硫。有些蛋白质还含有一些其它的元素,主要是磷、铜、铁、碘、锌和钼等。就其化学结构来说,有些蛋白质完全由氨基酸残基构成的多肽链组成,称为简单蛋白质(simple proteins),如核糖核酸酶、胰岛素等。有些蛋白质除了肽链部分外,还有非肽链成分,这种成分称为辅基(prosthetic groups)或配基(ligand),这类蛋白质称为结合蛋白质(conjugated proteins),如血红蛋白、核蛋白。蛋白质的分子量变化范围很大,大约 5 000~1 000 000 或更大一些。蛋白质分子的结构与功能的研究是生命科学中的一个核心问题,而蛋白质的化学修饰是研究这一问题的有效手段之一。本章将扼要介绍一些有关蛋白质的生物学功能和分子的结构基础,若需进一步了解这方面的知识,可以阅读有关的教科书和专著^[14]。

2.1 蛋白质的生物学功能

生物界中蛋白质的种类估计在 $10^{40} \sim 10^{50}$ 数量级。造成种类如此众多的原因主要是 20 种参与蛋白质组成的氨基酸在肽链中排列顺序不同。蛋白质这种顺序的多样性是其生物学功能多样性和种属特异性的结构基础。蛋白质的主要生物学功能可以分为以下几类:

(1) 催化功能

蛋白质在生物体内最主要的生物学功能是作为体内各种生化反应的催化剂——酶(enzyme)。我们知道新陈代谢的所有化学变化几乎都是在生物催化剂催化下进行的。生物催化剂是生物体内产生的具有催化功能的生物大分子,它包括两类物质,一类是酶(enzyme),其化学本质为蛋白质,另一类是 ribozyme(有人建议译成核酶),其化学本质是核酸。目前已知极少数反应是在核酸催化下进行的;体内几乎所有的化学反应都是在酶催化下进行的。酶的催化效率极高,某些在体外需要千万年才能完成的反应,在体内酶的催化下仅需几秒钟即可完成。因此可以说,没有酶的存在就没有生命现象。蛋白质的化学修饰所涉及最多的是酶。按国际分类法,生物体内所有的酶根据催化反应的性质可分为 6 大类(见表 2-1)^[1]。此外,近年来还发现了一类催化抗体,或称为抗体酶,也是一类具有催化功能的蛋白质。

(2) 结构功能

蛋白质另外一个主要的生物学功能是作为有机体的结构成分。在高等动物里,胶原纤维是主要的细胞结构蛋白质,参与结缔组织和骨骼作为机体的支架。生物膜里的结构成分,如细胞膜、线粒体、叶绿体和内质网等都是由蛋白质和脂质组成。

除了上述两个主要的功能外,蛋白质还有多种多样的功能。有一类蛋白质具有贮藏氨

表 2-1 酶的国际分类法^[1]

编号	类 别	催 化 反 应 的 类 型
1	氧化还原酶类	电子转移(阴离子 H ⁻ 或 H 原子)
2	转移酶类	基团转移反应
3	水解酶类	水解反应(功能基团转移到水分子上)
4	裂合酶类	将基团加到双键或移去基团形成双键
5	异构酶类	分子内基团转移而得到异构体
6	合成酶类	通过与 ATP 降解偶联的缩合反应形成 C—C, C—S, C—O 和 C—N 键

基酸的功能,用作有机体及其胚胎或幼体生长发育的原料。这类蛋白质有蛋类中的卵清蛋白(ovalbumin)、乳中的酪蛋白(casein)、小麦种子中的麦醇溶蛋白等。某些蛋白质具有运输功能,例如脊椎动物红细胞中的血红蛋白和无脊椎动物中的血蓝蛋白在呼吸过程中起着运输氧的功能,血液中的脂蛋白随着血流输送脂质,生物氧化过程中某些色素蛋白如细胞色素 C 等起电子传递体的作用,各种起跨膜主动运输的通道蛋白。有些蛋白质是肌肉收缩系统的必要成分,例如肌纤维中的肌球蛋白(myosin)和肌动蛋白(actin),细菌的鞭毛或纤毛蛋白也能产生类似的活动。此外,某些蛋白质还具有激素的功能,如胰岛素(insulin);免疫功能,如抗体(antibody)或免疫球蛋白(immunoglobulin);接受和传递信息的功能,如各种各样的受体蛋白;调控功能,即调节或控制细胞生长、分化以及遗传信息的表达,例如组蛋白、阻遏蛋白(repressor)等。

蛋白质分子中局部化学结构的改变,包括某些侧链基团的改变可能导致上述功能的降低或丧失,这对于弄清蛋白质的作用机理以及对蛋白质进行改性是十分重要的。

2.2 蛋白质分子的化学结构

蛋白质分子是一类结构极其复杂的生物大分子,其功能多样性的基础是分子结构的多样性和复杂性。蛋白质分子的结构大致可分为如下几个层次:

- 一级结构 (primary structure)
- 二级结构 (secondary structure)
- 超二级结构 (supersecondary structure 或 motif)
- 结构域 (domain)
- 三级结构 (tertiary structure)
- 四级结构 (quarternary structure)

蛋白质分子的化学结构包括了肽链中氨基酸残基的排列顺序(即一级结构)、二硫键的连接方式以及辅基的结合方式。

(1) 蛋白质分子的基本结构单位——氨基酸

氨基酸是蛋白质分子的基本结构单位。已发现自然界有一百多种氨基酸,但是组成

图 2-1 氨基酸结构

(a) 不带电荷的氨基酸; (b) 带双重电荷的兼性离子

蛋白质的氨基酸却只有 20 种,这 20 种氨基酸称为组成蛋白质的常见氨基酸。除脯氨酸外,均为 α -氨基酸。图 2-1(a)表示常见氨基酸的结构(除脯氨酸外,因脯氨酸侧链包含 C 和 N 的环状结构),中间具有四面体结构的碳原子称为 α -碳原子(C_α)。它以共价键的形式一侧与氨基($-NH_2$)相连,另一侧与羧基($-COOH$)相连,它的第三个键总是与氢原子相连,而第四个键与 1 个可变的侧链(R 基团)相连。20 种氨基酸的区别在于具有各自不同的 R 基团。在中性溶液(pH7.0)中羧基失去 1 个质子而带负电荷,氨基获得 1 个质子而带正电荷,构成带有双重电荷的兼性离子,见图 2-1(b)。 α -碳原子周围的 4 个不同的基团按四面体排布,使氨基酸具有旋光性。两个互为对映体的形式称为 L-和 D-异构体,参与蛋白质组成的所有氨基酸都是 L 型(除没有不对称碳原子的甘氨酸外),因此,以后非特定情况下,不再指明是哪一种异构体了。这些氨基酸按照其侧链 R 基团的化学性质可以分为亲水和疏水两大类。在亲水性侧链中,又可以进一步分为中性、酸性和碱性侧链基团(表 2-2)。少数蛋白质含有上述 20 种以外的氨基酸,它们是在蛋白质合成以后,由这些氨基酸残基经过一定的酶反应对侧链修饰而形成的,例如原胶原蛋白中的羟脯氨酸,就是在肽链合成以后,由脯氨酸残基在羟化酶作用下在吡咯环上发生羟化生成的。

表 2-2 组成蛋白质的 20 种氨基酸

名 称	R	三字母简写	一字母简写	备注
甘氨酸	H	Gly	G	
(1) 疏水性侧链				
丙氨酸	CH ₃	Ala	A	
缬氨酸	CH(CH ₃) ₂	Val	V	b
亮氨酸	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Leu	L	b
异亮氨酸	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	Ile	I	b
苯丙氨酸	CH ₂	Phe	F	a, b
酪氨酸	CH ₂ OH	Tyr	Y	a, b
色氨酸	CH ₂	Trp	W	a, b
	N H			
脯氨酸	CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —Na	Pro	P	
甲硫氨酸	CH ₂ —SH	Met	M	s

续表

名 称	R	三字母简写	一字母简写	备注
(2) 亲水中性侧链				
丝氨酸	CH ₂ OH	Ser	S	p, h
苏氨酸	CH(OH)CH ₃	Thr	T	p, h
天门冬酰胺	CH ₂ —CONH ₂	Asn	N	p
谷氨酰胺	CH ₂ CH ₂ —CONH ₂	Gln	Q	p
(3) 亲水酸性侧链				
天门冬氨酸	CH ₂ —COO ⁻	Asp	D	p, c
谷氨酸	CH ₂ CH ₂ —COO ⁻	Glu	E	p, c
(4) 亲水碱性侧链				
组氨酸	CH ₂ C CH + NH NH	His	H	p
赖氨酸	CH CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ —NH ₃ ⁺	Lys	K	p
精氨酸	CH ₂ CH ₂ CH ₂ —NH C NH ₂ + NH ₂	Arg	R	p, k
半胱氨酸	CH ₂ —SH	Cys	C	s

a: 芳香族, b: 疏水性, p: 亲水性, h: 羟基, c: 酸性, k: 碱性, s: 含硫。

(2) 肽和肽键的结构

图 2-2 由两个氨基酸形成二肽
(a) 两个氨基酸; (b) 肽键($-\text{CO}-\text{NH}-$)

图 2-3 多肽链的结构

蛋白质分子中氨基酸连接的基本方式是肽键 (peptide bond) $-\text{CO}-\text{NH}-$ 。最简单的肽是由两个氨基酸分子之间失去 1 个分子水而形成的二肽 (图 2-2): 一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基连接起来, 反应失去一分子水。肽键具有部分双键的性质, 其结果使肽键处于一个分子平面上。任何数目的氨基酸都能以这种方式连接成多肽链。多肽链中氨基酸由于参加肽键的形成已经不是原来完整的氨基酸分子了, 因此称之为氨基酸残基 (amino acid residue)。图 2-3 表示线性排列的蛋白质分子中的一段肽键结构。连续排列的酰胺平面构成蛋白质分子的主链骨架结构, 每个氨基酸残基的 R 基团构成蛋白质分子的侧链基团。在蛋白质分子中氨基酸残基的排列具有特定的顺序, 这是由遗传信息