

[By glove@smth.org](mailto:glove@smth.org)

生物化学

第二版
(上)

沈同、王镜岩编著

目 录

绪论	1
第一章 糖	10
第一节 单糖	11
一、葡萄糖的分子结构	11
二、单糖的分类	18
三、单糖的物理性质与化学性质	19
四、重要的单糖	25
五、单糖的重要衍生物	28
第二节 寡糖	29
一、双糖	29
二、三糖	31
第三节 多糖	31
一、均一多糖	31
二、不均一多糖	36
第四节 结合糖	38
一、糖蛋白	39
二、蛋白聚糖	40
提要	41
习题	42
主要参考书	43
第二章 脂类	44
第一节 脂酰甘油类	44
一、脂肪酸	45
二、三脂酰甘油的类型	48
三、三脂酰甘油的物理、化学性质	49
四、甘油	50
五、其他脂酰甘油类	51
第二节 磷脂类	53
一、甘油磷脂	53
二、鞘氨醇磷脂类	59
第三节 萜类和类固醇类及前列腺素	60
一、萜类	61
二、类固醇类	62
三、前列腺素	66
第四节 结合脂类	67
一、糖脂	67
二、脂蛋白类	68
第五节 蜡	71
提要	72
习题	73

主要参考书	73
第三章 蛋白质	74
第一节 蛋白质通论	74
一、蛋白质的化学组成与分类	74
二、蛋白质的大小与分子量	75
三、蛋白质的构象	76
四、蛋白质功能的多样性	77
第二节 蛋白质的基本结构单位——氨基酸	78
一、蛋白质的水解	78
二、氨基酸的分类	79
三、氨基酸的旋光性和光吸收	85
四、氨基酸的酸碱性质	88
五、氨基酸的化学反应	94
六、氨基酸的分析分离	102
第三节 蛋白质的共价结构	110
一、肽和肽键的结构	110
二、肽的物理和化学性质	113
三、天然存在的活性肽	114
四、氨基酸顺序测定的一般步骤	116
五、N末端和C末端氨基酸残基的测定	116
六、二硫键的断裂和多肽链的分离	119
七、氨基酸组成的测定	120
八、多肽链的部分断裂和肽段的分离	121
九、肽段的氨基酸顺序测定	124
十、肽段在多肽链中次序的决定	126
十一、二硫键位置的确定	127
十二、蛋白质的一级结构举例	127
十三、蛋白质的一级结构与生物功能	130
十四、多肽与蛋白质的人工合成	135
第四节 蛋白质的二级结构和纤维状蛋白质	140
一、构型与构象	140
二、研究构象的方法	141
三、多肽链折叠的空间限制	143
四、二级结构的基本类型	145
五、二级结构的预测	150
六、超二级结构	152
七、纤维状蛋白质	154
第五节 球状蛋白质的结构与功能	162
一、氨基酸顺序决定蛋白质的三级结构	163
二、维持蛋白质三级结构的作用力	164
三、蛋白质的变性作用	167

四、球状蛋白质的结构域和三级结构	196	第七节 RNA-酶	294
五、肌红蛋白的结构与功能	171	第八节 多酶体系	296
六、胰岛素的结构与功能	175	一、多酶体系及其分类	296
七、球状蛋白质的聚集体	177	二、多酶体系的自我调节	298
八、血红蛋白的结构与功能	181	第九节 酶活性的调节控制和调节酶	300
九、免疫球蛋白的结构与功能	192	一、别构效应的调控	301
十、蛋白质的结构与功能的进化	195	二、共价调节酶	312
第六节 蛋白质的分离、提纯与鉴定	196	三、酶原的激活	313
一、蛋白质的酸碱性质	196	第十节 寡聚酶、同工酶及诱导酶	317
二、蛋白质分子的大小与形状	198	一、寡聚酶	317
三、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀	207	二、同工酶	319
四、蛋白质分离纯化的一般原则	209	三、诱导酶	320
五、蛋白质混合物的分离方法	210	第十一节 酶工程简介	321
六、蛋白质含量的测定与纯度鉴定	223	一、酶工程的定义及分类	321
提要	225	二、化学酶工程	321
习题	228	三、生物酶工程	322
主要参考书	231	提要	324
第四章 酶	232	习题	326
第一节 酶是生物催化剂	232	主要参考书	327
一、酶的生物学意义	232	第五章 核酸	329
二、酶是生物催化剂	233	第一节 核苷酸	330
三、酶的化学本质	234	一、碱基	330
第二节 酶的分类及命名	237	二、核苷	331
一、习惯命名法	237	三、核苷酸	332
二、国际系统命名法	238	第二节 脱氧核糖核酸(DNA)	333
三、国际系统分类法及编号	238	一、DNA的碱基组成	333
第三节 酶的分离提纯及活力测定	241	二、DNA的一级结构	333
一、酶的分离提纯	241	三、DNA的空间结构	334
二、酶活力的测定	242	四、环形DNA	340
第四节 酶促反应的动力学	244	五、DNA的生物学功能	342
一、底物浓度对酶反应速度的影响——米氏学说的提出	244	第三节 核糖核酸(RNA)	343
二、米氏公式的导出	245	一、RNA的结构	343
三、米氏常数的意义	247	二、RNA的类型	344
四、米氏常数的求法	250	第四节 核酸的某些物化性质与最常用的研究方法	347
五、多种底物的反应	251	一、核酸的紫外吸收	347
六、pH对酶反应速度的影响	253	二、核酸的沉降特性	348
七、温度对酶反应速度的影响	254	三、凝胶电泳	349
八、酶浓度对酶反应速度的影响	255	四、核酸的变性、复性及杂交	350
九、激活剂对酶反应速度的影响	255	五、DNA的固相合成	353
十、抑制剂对酶反应的影响	256	六、DNA的限制酶图谱	354
第五节 酶的专一性及活性中心	266	提要	356
一、酶的底物专一性	266	习题	357
二、酶的活性中心	272	主要参考书	358
第六节 酶的作用机理	274	第六章 维生素的结构与功能	359
一、与酶的高效率有关的因素	274	第一节 维生素的发现	359
二、某些酶的活性中心及其作用原理	280		
三、酶与抗体——抗体酶	283		

第二节 维生素 A 和胡萝卜素	359
第三节 维生素 D 和紫外线	361
第四节 维生素 E	363
第五节 维生素 K	364
第六节 维生素 C	365
第七节 维生素 B ₁	367
第八节 维生素 B ₂	368
第九节 尼克酸与尼克酰胺	369
第十节 泛酸	370
第十一节 叶酸	371
第十二节 生物素	373
第十三节 硫辛酸	374
第十四节 吡哆醛	375
第十五节 钴胺素	376
第十六节 维生素 B 族与辅酶	378
提要	378
习题	379
主要参考书	380
第七章 抗生素	381
第一节 抗生素的概况	381
一、抗生素的定义	381
二、拮抗作用与抗生素的发现	381
三、抗生素的抗菌性能	382
四、新抗生素的寻找	382
第二节 细菌对抗生素耐药性的生物化学机理	383
一、耐药菌产生导致抗生素失效的酶	383
二、耐药菌改变对抗生素敏感的部位	384
三、耐药菌降低细胞透过抗生素的能力	385
四、耐药性的遗传结构和传播	385
第三节 抗生素的抗菌作用机理	386
一、抑制核酸的合成	386
二、抑制蛋白质的合成	388
三、改变细胞膜的通透性	389
四、干扰细胞壁的形成	390
五、作用于能量代谢系统和作为抗代谢物	391
第四节 青霉素抑制细菌细胞壁的合成	391
一、细菌细胞壁的化学组成	391
二、肽聚糖的结构	391
三、肽聚糖的生物合成	393
四、青霉素抑制细菌细胞壁的合成	395
第五节 几种重要抗生素的化学和医疗特性	396
一、青霉素	396
二、链霉素	400
三、氨基环醇类抗生素	400
四、氯霉素	403
五、四环素族抗生素	403
六、红霉素	404
七、多肽类抗生素	405
八、创新霉素	406
九、利福霉素类抗生素	406
十、灰黄霉素	407
十一、制霉菌素	408
第六节 抗肿瘤抗生素的探索	409
一、自力霉素	409
二、放线菌素 K	410
三、争光霉素	411
四、光辉霉素	412
第七节 抗生素在农业中的应用	412
一、灭瘟素	413
二、春雷霉素	413
三、放线酮	414
四、多氧菌素	415
五、日光霉素	415
六、四抗生素	416
七、有效霉素	416
八、奥弗麦菌素	417
提要	418
习题	419
主要参考书	419
第八章 激素	420
第一节 概述	420
一、激素的分泌	420
二、激素的化学本质	420
三、激素的作用机理	424
第二节 含氮激素(一)——氨基酸衍生物类激素	426
一、肾上腺髓质的激素——肾上腺素	426
二、甲状腺的激素——甲状腺素	432
第三节 含氮激素(二)——多肽及蛋白质激素	434
一、垂体激素、下丘脑激素及脑肽	434
二、胰岛及甲状旁腺等的激素	441
第四节 磷酸肌醇级联放大作用	447
一、G 蛋白的功能, PIP ₂ 、IP ₃ 和 DAG 的形成及转变	447
二、磷酸肌醇级联的两个细胞内信使——IP ₃ 将钙离子释放到细胞质中, DAG 活化蛋白激酶 C	449
三、具有螺旋区-泡区-螺旋区结构(BF 手图象)的钙传感器家族成员之一——钙调蛋白	450
第五节 甾醇类激素	455

一、肾上腺皮质激素	456
二、雌性性激素	457
三、雄性性激素	459
四、两类性激素间的相互关系	460
第六节 脂肪族激素	461
第七节 激素分泌的调节	463
一、上级内分泌腺对下级内分泌腺的调节, 神经系统与内分泌的关系	463
二、负反馈作用	463
三、酶的分步剪裁调控	465
四、多元调控	465
第八节 植物激素	466
一、植物生长素	466
二、赤霉素	466
三、细胞分裂素	467
四、脱落酸	467
五、乙烯	468
第九节 昆虫激素	468
一、昆虫的内激素	468

二、昆虫外激素	469
提要	469
习题	471
主要参考书	471
第九章 生物膜的组成与结构	473
第一节 生物膜的组成	473
一、脂质	473
二、膜蛋白	477
三、糖类	479
第二节 生物膜的流动性	479
一、膜脂的流动性	479
二、膜蛋白的运动性	481
第三节 生物膜的分子结构	483
一、生物膜中分子间作用力的类型	483
二、生物膜分子结构的模型	483
提要	485
习题	486
主要参考书	486

绪 论

发展中的生物化学

生物化学可以认为是生命的化学，是研究微生物、植物、动物及人体等的化学组成和生命过程中的化学变化的一门科学。

生命是发展的，生命起源、生物进化、人类起源等，说明生命是在发展，因此，我们对生物化学的认识也是在发展之中。

现代科学是从15世纪下半叶才开始的。那时，资本主义兴起，自然科学冲破了中世纪封建宗教的束缚而较快地发展起来。而现代生物化学可以从拉瓦锡研究燃烧和呼吸叙述起，那是18世纪的下半叶，约相当清乾隆年间。

法国的著名化学家拉瓦锡 (Antoine-Laurent Lavoisier, 1743—1794年) 曾对农业和工业的发展作出贡献；他还对街道的照明系统付出了聪明才智，从而导致他钻研燃烧现象，并进一步研究呼吸作用，也就是不发光的燃烧作用。拉瓦锡29岁时开始燃烧的科学试验。他发现磷燃烧后成为磷酸，硫燃烧后成为硫酸；磷酸和硫酸都分别比磷和硫为重，这表明燃烧并不是失去了“燃素”(phlogeston)，而是跟氧结合的过程。1783年，拉瓦锡和拉普拉斯 (P. S. Laplace, 1749—1827年，法国数学家和天文学家) 在法国科学院院报上发表了关于“动物热”的理论。他们利用天平和量热器，测量豚鼠等动物在一定时期内的呼吸，定量测定CO₂和释放的热能。他们把动物的呼吸比作蜡烛的燃烧；只是动物体内的燃烧是缓慢的和不发光的燃烧。拉瓦锡通过燃烧试验和呼吸试验，彻底推翻了燃素说(The phlogiston Theory)。当时燃素说处于支配地位。根据这种理论，一切燃烧的本质都在于从燃烧物体中分离出一种称为燃素的物质。普里斯特列 (Joseph Priestly) 于1774年析出了氧，他称这种气体为无燃素气体。瑞典的舍勒 (Carl Wilhelm Scheele) 也析出了氧，并且证明它存在于大气中；他还发现当一种物体在氧或空气中燃烧时，氧就消失了，因此，他称氧为火气。普里斯特列和舍勒析出了氧，他们都被“燃素说”范畴所束缚。当时在巴黎的普里斯特列立刻把他的发现告诉了拉瓦锡。拉瓦锡通过定量的燃烧试验和呼吸试验，才彻底地推翻了“燃素说”，为生命过程中的氧化奠定了基础。

瑞典化学家舍勒 (1742—1786年) 因为家无恒产，14岁时即随一位药剂师为学徒，共8年，在这期间，他废寝忘食地学习化学，并经常在业余时间进行化学试验。在他以后从事药剂师工作期间，对当时的化学领域中的问题都进行了科学试验。1770年舍勒28岁时和他的朋友 (Anders Retzius) 发表第一篇科学论文，从酒石里分离出酒石酸 (tartaric acid)。舍勒分析膀胱结石获得尿酸 (uric acid)。他还分析研究了柠檬酸 (citric acid)、苹果酸 (malic acid)、没食子酸或称五倍子酸 (gallic acid)；他分析研究了甘油 (glycerol)。舍勒还有许多无机化学方面

的贡献,他于1771年发现氟。他发现砷酸铜(copper arsenate)称为舍勒氏绿(scheele's green)。1776年舍勒被选入斯德哥尔摩科学院。舍勒拒绝了柏林大学和英国的邀请担任化学教授职位,他乐于在他的药剂师实验室中进行化学试验。舍勒曾跟友人写信,信中有下列一段话:“为了解释新的现象,使我能忘却一切的一切,因为假使能够达到最后的目的,那末这种考察是何等的愉快啊!而这种愉快,便可从心里涌出”。“这种尊贵的学问乃是我一生的目的”。

18世纪,由化学家通过科学试验,发现生物体的呼吸氧化作用;发现柠檬酸、苹果酸等生物中间代谢的产物。他们的科学发现是通过他们对科学真理的热忱追求,也通过他们严谨的科学试验。这里应该指出,他们的科学试验是从生产实际出发的;还可以指出,由于拉瓦锡获得及时的科学情报,因而进行定量试验,推翻了当时盛行的“燃素说”。当我编写拉瓦锡和舍勒对生物化学所作出的开拓性工作时,我受到教益和启发。我相信青年读者一定更能够从中得到鼓舞。

进入19世纪后,在物理学、化学、生物学方面有极大进展。从而生物化学也就跟着有了发展。这里仅列举一些有关学科的重大进展:1804年道尔顿的原子论,1869年门捷列夫的元素周期律,1895年伦琴发现X-射线,1835年贝采利乌斯(Jöns Jacob Berzelius)说明催化作用,1859年达尔文发表《物种起源》,1865年孟德尔的豌豆杂交试验和遗传定律,1848年亥姆霍兹(Helmholtz)找到肌肉中热能来源,和贝尔纳(Bernard)发现肝脏生糖功能。当然,有许多关于物理、化学、生物学和生理学的发现和进展不能在这里叙述。如此多的发现和进展必然会影响到促进生物化学的发展,而且是现代生物化学发展的前提。此外,还应该指出,生产的前进、工业的发达和社会的进步也都跟生物化学的发展息息相关。

以下将介绍现代生物化学发展中重要的学术中心和科学家。

德国化学家李比希(Justus von Liebig, 1803—1873年)是法国化学家、物理学家盖-吕萨克(Joseph-Louis Gay-Lussac)的学生,是农业化学的奠基人,也是生理化学和碳水化合物化学的创始人之一。他于1826年在德国吉森(Giessen)大学建立李比希实验室,并首创在大学进行化学实验的教学,创刊了李比希年刊(Liebig's Annalen, 1832—1874年)。他在1842年撰写的《有机化学在生理学与病理学上的应用》专著,首次提出新陈代谢(stoffwechsel)这个学术名词。李比希研究土壤的化学肥料、有机酸、氯化物、氮化物、醛类和苯酰化合物。他发现马尿酸(hippuric acid)、氯醛(chloral)和氯仿(chloroform)。他对脂肪、血液、胆汁和肌肉提取物进行了研究。在李比希实验室内聚集了许多热诚并努力工作的学生。李比希曾长期跟维勒(Friedrich Wöhler, 1800—1882年)一起工作。维勒于1828年合成了尿素($\text{CO}(\text{NH}_2)_2 = \text{NH}_4\text{CNO}$)。有一位李比希的学生施洛斯比尔格尔(Julius Schlossberger),他也跟其他化学教授学习过,第一次担任生理化学教授职位,于1840—1859年间在德国蒂宾根(Tübingen)大学教授有机化学和生理化学。Schlossberger逝世后,蒂宾根大学的生理化学的盛名延续了一个世纪。历任生理化学教授的都是当时第一流的生理化学家,具有医学和有机化学的基础。这些蒂宾根大学教授有霍佩-赛勒(Hoppè-Seyler)、Gustav Hüfner、Han Thierfelder(研究脂肪氧化)和Franz Knoop(研究脂肪氧化,尿中排出马尿酸)。

霍佩-赛勒(Ernst Felix Hoppe-Seyler, 1825—1895年)德国医生,因将生理化学(即生

物化学)建成一门独立的科学而著名。1877年霍佩-赛勒首次提出“Biochemie”这个名词,译为英语名词为 Biochemistry 或 Biological Chemistry, 汉译为生物化学。他创办并编辑了第一种《生理化学杂志》(F. Hoppe-Seyler, Zeitschrift für physiologische Chemie(1877—1895),他还出版了《生理化学及病理化学分析手册》。他首次获得纯卵磷脂;曾获得晶体状的血红素。首创蛋白质(proteids)一词,又研究过代谢、叶绿素及血液。他研究病理液体和脓细胞,从而导致他的学生 Friedrich Miescher(1844—1895年)从脓细胞的细胞核分离出 nuclein,即是脱氧核糖核蛋白,论文发表在 Med. Chem. Untersuch 1871年。Hoppe-Seyler 的另一位学生 Albrecht Kossel(1853—1927年)因对蛋白质、细胞及细胞核化学的研究而获1910年诺贝尔生理学或医学奖金,他分离出腺嘌呤、胸腺嘧啶、胸腺核苷酸,还分离出组氨酸。

Hoppe-Seyler 建立了著名的斯特拉斯堡研究所(Strausbourg Institute)。这里提到战争和政治跟学术的联系,1870年法普战争结束后,法国割让斯特拉斯堡给德国,斯特拉斯堡大学也被德国大学(1872—1918年)取而代之。1919年,斯特拉斯堡复归法国,这所大学重建为自治的法国大学。德国诗人 J. W. 歌德(1749—1832年)于1771年在斯特拉斯堡完成了他的法学学习。L. 巴斯德(1822—1895)于1849年在该大学任科学教授时,开始进行发酵素的研究。Hoppe-Seyler 在 Strausbourg 任生理化学教授(1877—1895),在科学研究和培养方面做出突出成绩,但那研究所是建立在法国原有的医学院院址上。Albrecht Kossel 回忆起早期的情景。美国的 Chittenden 从耶鲁大学所在的纽黑文到达时,对研究所的科学研究有深刻印象,但对实验室的拥挤和设备的陈旧感到惊奇。以上叙述了德国的两位著名的化学家和生理学家和他们的教学和科研中心。自1840至1900年间,德国的生理化学跟其他领域的科学一样,处于开拓和领先地位。

以下将叙述一些生理学家和生理化学家,以及美国学生到德国留学情况;更要叙述这批美国留德学生回到美国后,创建美国的生物化学的教学和科学研究中心的一些事例。

马扬迪(François Magendie, 1783—1855年)是法国实验生理学的创始人,也是现代实验药理学的奠基者。他的著名学生是法国生理学家贝尔纳(Claude Bernard, 1813—1878年)。Magendie 发现他的学生 Bernard 的才能,就坦率地对他的学生说:“你比我好,你胜过我。”Magendie 的实验工作多但比较零乱,而 Bernard 就在实验前后多加思考。可以用 Bernard 自己的话来表明:“当你进入实验室时,放下你的想象,要如同你进入实验室脱下外衣那样,不再进行想象。当你离开实验室时穿上外衣,再进行想象的思维。实验工作之前和两个实验之间,你要让想象把你包裹起来。实验工作进行时刻,你不能有一点儿想象,否则要妨碍你的观察能力”。

Bernard 的学生寇南(Willy Kühne, 1837—1900年)是德国汉堡人,于1868—1871年任 Amsterdam 的生理学教授,于1871—1900年任 Heidenberg 教授,在生理化学方面的工作有血红蛋白、胰液对蛋白质的消化,提出胰酶(Trypsin)的名词。并跟他的美国留德学生池廷登(Russel Henry Chittenden, 1856)对胃液和肠液消化过程中的产物进行化学研究,并分离出许多新发现的物质。Kühne 和 Chittenden 的论文多篇发表于 Zeitsch. f. Biol., Munich.

Chittenden 回到美国纽黑文的耶鲁大学教授生理化学。他是全美国第一位任生理化学教授职位的留德归国学生。自 1882 年到 1921 年退休, Chittenden 在生理化学方面任教达 30 年, 他居于美国生理化学的领导地位。Chittenden 在耶鲁仍常与老师 Kühne 通讯, 合作进行蛋白质分解试验。他的继承人为 Lafayette B. Mendel 进行蛋白质的营养研究。

勒布(Jacques Loeb, 1859—1924 年)德国出生的美国生物学家, 曾获斯特拉斯堡大学医学博士学位。1891 年去美国。先后在宾夕法尼亚的布林莫尔学院、芝加哥大学、伯克利加利福尼亚大学任教授。1910 年在纽约洛克菲勒研究所工作, 直到逝世。1899 年开始孤雌生殖试验, 把未受精的海胆卵置于可控制的环境中, 成功地育出海胆幼体。后来把试验范围扩大到蛙, 把孤雌生殖产生的蛙培养到性成熟期。晚年的重要贡献是蛋白质胶体行为学说。此外他对生物体持全面观点和机械论的观点, 他的两本著作说明了他的学术观点 [The Mechanistic Conception of Life(1912 年); The Organism as a Whole(1916 年)]。

艾贝尔(John Jacob Abel, 1857—1938 年)曾在德国学习 7 年, 斯特拉斯堡大学医学博士。返美后在密西根大学(1891—1893 年)和约翰斯·霍普金斯大学任教(1893—1938 年)。他分离肾上腺素。1926 年制成胰岛素晶体。1932 年领导内分泌研究室。1909—1932 年主编《药理学与实验治疗学杂志》。他的学生 Reid Hunt(1870—)和 Leonard Rowntree(1883—)研究甲状腺和胆碱衍生物。

总的说来, 美国生理化学初始阶段受到德国的影响。有这样的估计, 在第一次世界大战开始的 1914 年以前, 大约有 15 000 位美国医生曾在德国留学。1870 到 1900 年之间, 美国生理化学等深受德国大学莱比锡和海德堡(Leipzigs 和 Heidefbergs)的影响。

20 世纪后, 生物化学有了很大的发展。德国、美国、英国和法国都有生物化学的学术中心。就生物化学来说, 20 世纪前半叶, 在蛋白质、酶、维生素、激素和物质代谢及生物氧化方面都有了很大的进展。

英国剑桥生物化学中心: 霍普金斯(Sir Frederick Gowland Hopkins, 1861—1947 年)剑桥大学生物化学教授, 因发现维生素而与荷兰的艾克曼(C. Eijkman, 1858—1930)共获 1929 年诺贝尔生理学或医学奖。后又发现色氨酸和谷胱甘肽。霍普金斯在剑桥大学度过大半生(1898—1943 年)。他创建剑桥普通生物化学学派和中心。J. B. S. Haldane 是剑桥第一位高级讲师(Reader), 后来从事遗传学研究。Muriel William Onslow 她教一门植物生物化学, 研究植物色素的生化遗传。Robin Hill 和 David Keilin 从事植物细胞色素和离体叶绿体的能力学。Malcolm Dixon 从事酶学。Dorothy M. Needham 专攻肌肉收缩的生化机理。Ernest Baldwin 进行比较生物化学并开创分子水平的生物进化研究。李约瑟(Joseph Needham)开创胚胎发生的生物化学领域。Marjory Stephenson 从事细菌生理学的研究。Sydney Cole 长期跟霍普金斯一起从事教学与氨基酸等方面的研究。20 年代在英国生化杂志(Biochemical Journal)所刊登的研究成果的论文中, 霍普金斯的普通生物化学学派或中心占据杂志全部论文的一半。

霍普金斯在剑桥初期, 克服了许多艰辛, 充分体现霍普金斯创建普通生物化学学派的理想、襟怀和毅力。剑桥大学生理学著名教授福斯特(Sir Michael Foster, 1838—1907 年)曾开

拓生理学化学, 约请霍普金斯参加教学。霍普金斯为化学出身, 后学医学。当时霍普金斯被分配人体解剖的教学任务, 科学研究时间极少。直到1914年成为剑桥生物化学教授, 而第一次世界大战爆发, 又延缓其教学和科研工作。其后得到Dunn基金的资助, 才能建设实验室, 扩大教学科研队伍, 从而霍普金斯得以开展普通生物化学的领域, 脱离生理学化学的范畴。这里应该着重叙述, 在1912年前后, 霍普金斯既无教授职位, 又无正式实验室和新的仪器, 但是他改装了地下室, 使用陈旧的仪器, 完成了动物饲养试验, 发现了食物的辅助因子, 即维生素。该论文原文如下: Hopkins, F. G. "Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries" J. Physiol. [London], 1912。

德国在20世纪初, 直到第二次世界大战前夕, 在生理化学及有机化学方面有突出贡献的科学家可以列举如下: 埃米尔·费歇尔(Emil Fischer, 1852—1919年)普鲁士化学家。研究糖和嘌呤类物质获1902年诺贝尔化学奖金。他证明了尿酸、黄嘌呤、咖啡碱、可可碱和另外一些含氮化合物都与嘌呤这一物质有关系。他合成苯肼, 这是糖类化合物的鉴别试剂, 确定了左旋糖、葡萄糖及其他许多糖的分子结构, 并合成了这些化合物, 验证了这些化合物; 此外对蛋白质及酶的化学也有重要贡献。汉斯·费歇尔(Hans Fischer, 1881—1945年)德国生物化学家, 因对氯血红素及叶绿素的研究而获诺贝尔化学奖金。他证明氯血红素结构, 并接近完成叶绿素的人工合成, 并研究过胡萝卜素及卟啉。埃姆登(Gustav Embden, 1874—)在糖代谢、脂肪代谢及肝脏合成氨基酸方面做出贡献。迈尔霍夫(Otto Meyerhof, 1884—1951年)德国生物化学家, 因研究肌肉代谢的糖原-乳酸循环而与英国的A. V. Hill共获1922年诺贝尔生理学或医学奖金。他曾在法国、英国和美国讲学, 1924年著有《生命现象的化学动力学》一书。威尔施泰特(Richard Willstätter, 1872—1942年)德国化学家, 研究叶绿素及其他植物色素结构而获1915年诺贝尔化学奖金。他阐明了叶绿素的结构并指出血红素在结构上与叶绿素中的卟啉化合物类似。20年代, 他关于酶在本质上不是蛋白质的观点在1930年被证明不对, 以前曾广为流传。(美国化学家萨姆纳, J. B. Sumner, 1887—1955年最先将酶结晶, 从而证明酶是蛋白质)。威尔施泰特作为一个犹太人, 1924年辞去他在慕尼黑大学的职务; 以抗议反犹压迫, 他继续在慕尼黑, 1939年后在瑞士进行秘密研究。温道斯(Adolf Windaus, 1876—1959年)德国有机化学家, 因研究维生素D等有重要生物学作用的物质而获1928年诺贝尔化学奖金。他从医学研究转入化学研究。1901年开始的胆固醇结构测定工作, 进行了大约30年。在试验紫外线能否使胆固醇转化为维生素时发现了这种维生素的化学前身是7-脱氢胆固醇。他的工作还有助于性激素化学的建立, 和促进了治疗心脏疾病的药物研究。瓦尔堡(Otto Warburg, 1883—1970年)德国生物化学家, 因对细胞呼吸的研究而获1931年诺贝尔生理学或医学奖金。1932年分离出第一种黄酶, 即参与细胞脱氢反应的黄素蛋白, 发现的黄酶是与辅酶-黄素腺嘌呤二核苷协同作用。1935年发现另一种脱氢辅酶, 即尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸。还发现恶性细胞生长时所需氧气量明显小于正常细胞。

美国在20世纪前半叶, 在留德学者的推动下, 生物化学方面有极大进展。耶鲁大学池延登的后继者为门德尔(Lafayette Benedict Mendel, 1872—1935年)美国生物化学家, 发现维生素和蛋白质的营养价值, 建立现代营养学概念。他和奥斯本(T. B. Osborne)合作, 确定了

大鼠单纯吃碳水化合物、脂肪和蛋白质不能生存的原因。所需矿质有 Osborne-Mendel 矿质配方。门德尔又和美国生物化学家麦科勒姆和戴维斯(E. V. McCollum 和 M. Davis)合作,于 1913 年在鱼肝油及奶油中发现一种脂溶性因子(今知为维生素 A),于 1915 年在牛奶中发现一种水溶性因子(今知为复合维生素 B)。他们又证明不同蛋白质的营养价值决定于所含必需氨基酸的种类和数量。著有《食物供应及其与营养的关系(1916 年)》及《营养:生物的化学》(1923)。加州的伊文思(H. M. Evans)等于 1922 年发现动物生殖需要的营养因子(维生素 E)。哥伦比亚大学的谢尔曼(H. C. Sherman)于 1920 年出版了《食物化学与营养》并于 1931 年与人合作出版了《维生素》专著。美国的勒斯克(Graham Lusk)著有《营养科学》,于 1928 年已出第四版,记载了热能方面的许多科学家的研究成果。20 至 30 年代营养与维生素方面的研究较为突出,其研究成果在医药、畜牧都有应用。

哈佛大学医学院福林(Otto Folin)于 1909 年任生物化学教授。1915 年时福林教授将哈佛生物化学系办成有影响的学术中心;重点放在分析方法和临床应用上。福林建立尿中肌酸和肌酸酐的测量方法、氨基酸测定、尿氮测定。福林和吴宪于 1919—1922 年间设计了血液分析的颜色测量方法。

哥伦比亚大学希望池廷登去开办生理化学系,池廷登推荐吉斯(William J. Gies)主持生理化学系。宾夕法尼亚大学请到池廷登的学生并从哥伦比亚获得学位的霍克(Philip B. Hawk)。霍克的《实验生理化学》于 1907 年出版,一直发行到第十三版。

约自 20 世纪中叶,直到 20 世纪 80 年代,生物化学的发展加快,并且生物化学的领域向广度和深度发展。这个时期的特征,或许可以归纳为下列几项:首先是物理学家、化学家以及遗传学家等参加到生命化学的领域中来,而且研究人员的迁居和交往频繁;其次是研究方法有突出的改进,从而仪器公司、试剂厂家兴起;还有讯息交流方面,各类科学刊物日益增多,各类学术会议增多,以及计算机贮存讯息的应用,等等。以下就这个时期,即近三、四十年的生物化学突飞猛进的发展,择要举例如下:

(一)生物化学研究方法的改进:马丁与辛格(A. J. Martin, 1910—)与 L. M. Syngé)发明了一种快速而又经济的分析技术——分配色谱,使化学、医学和生物学研究得到广泛的进展。蒂塞利乌斯(A. Tiselius, 1902—1971 年)用电泳方法分离血清中化学构造相似的蛋白质成分;1940 年开始研究用吸附层析法分离蛋白质及其他物质。斯韦德贝里(T. Svedberg, 1884—1971 年)瑞典化学家,1924 年完成第一台超离心机,能产生 5000 倍于重力的离心力。以后的几种型号能产生数十万倍于重力的离心力。他用超离心机准确地测定了高度复杂的蛋白质,例如血红蛋白的分子量。此外有荧光分析法、同位素示踪和电子显微镜的应用,等等。也许可以说,生物化学的分离、纯化和鉴定的方法向微量、快速、精确、简便、自动化方向发展。

(二)物理学家、化学家、遗传学家等参加到生命化学领域中来:肯德鲁(John Cowdery Kendrew, 1917—)英国物理学家,测定了肌红蛋白的结构。英国物理学家佩鲁茨(Max Ferdinand Perutz, 1914—)对血红蛋白结构进行 X-射线衍射分析,与肯德鲁共获 1962 年诺贝尔化学奖金。鲍林(Linus Pauling, 1901—)美国化学家,他确认氢键在蛋白质结构中以及大分子间相互作用的重要性;认为某些蛋白质具有类似螺旋结构。鲍林还研究镰刀形红

细胞贫血症,提出了分子病的名称。鲍林获得诺贝尔化学奖和和平奖。桑格(Frederick Sanger, 1918—)英国生物化学家,经10年研究之后,于1955年确定了牛胰岛素的结 构,获1958年诺贝尔化学奖。1980年桑格因设计出一种测定DNA内核苷酸排列顺序的方法,而与吉尔伯特(Walter Gilbert)、伯格(Paul Berg)共获1980年诺贝尔化学奖。伯格研究DNA重组技术,最早的重组技术实例之一便是育成含有编码哺乳动物激素基因的菌株。麦克林托克(Barbara Mc Clintock, 1902—)美国遗传学家,从事玉蜀黍遗传研究40多年,发现可移动的遗传成分,因而获得1983年诺贝尔生理或医学奖金。

20世纪下半世纪研究人员的交往和迁居频繁。第二次世界大战前夕,德国科学家迁居美国、英国等国家。克雷布斯(Sir Hans Adolf Krebs(1900—)英籍德裔生物化学家,他出生于犹太医生家庭,1933年被迫迁居英国)1937年发现三羧酸循环,对细胞代谢及分子生物学的研究作出重要贡献,因此与李普曼,美籍德裔生物化学家于1953年共获诺贝尔生理或医学奖金。李普曼(Fritz Albert Lipmann)在鸽肝浸出物中发现一种具催化性而又耐热的因子,1947年分离成功,1953年确定其分子结构,并定名为辅酶A。奥乔亚(Severo Ochoa, 1905—

)美籍西班牙生物化学家,发现细菌内的多核苷酸磷酸化酶,由于该酶的发现,他得以合成核糖核酸,使科学家能够了解并重建基因内的遗传信息,通过RNA中间体而翻译成各种酶的过程,这些酶决定每个细胞的功能及特点。科恩伯格(Arthur Kornberg, 1918—)美国医师、生物化学家,因发现DNA分子在细菌细胞内及试管内的复制方式而与奥乔亚共获1959年诺贝尔生理学或医学奖金。

关于证明DNA是细胞的基本遗传物质,是加拿大细菌学家艾弗里(Oswald Avery, 1877—1955年)、美生物学家麦克劳德(Macleod)和麦卡蒂(Mc Carty)在纽约的洛克菲勒研究所于1944年发表的著名实验中提到的。肺炎球菌会产生荚膜,其成分证明为多糖。若将具荚膜的肺炎球菌(光滑型)制成无细胞的物质,与活的无荚膜的肺炎球菌(粗糙型)细胞混合,结果粗糙型细胞也具有与之混合的光滑型的荚膜。研究结果表明,引起这种遗传的物质是DNA。关于DNA的X-射线衍射研究是由威尔金斯(Maurice Wilkins, 1916—)完成的。威尔金斯是新西兰出生的英国物理学家。1946年参加伦敦王学院医学研究工作,终于使他完成了对DNA的X-射线衍射研究。这对于证实沃森和克里克(James Dewey Watson, 1926— , 和 Francis Harry Compton Crick, 1916—)所确定的DNA分子结构是至关重要的。他们三人因此共获1962年诺贝尔生理或医学奖金。克里克于1949年入剑桥大学卡文迪什实验室医学研究组。1951年美国生物学家沃森来到该研究所,克里克接受了他的观点,了解DNA三维结构即可明了它在遗传中所起的作用。两年后,即1953年,他们建立了DNA双螺旋结构模式,并跟已知的物理-化学性质相符合。也许我们可以从中得到教益,不同学科的学者相互学习和讨论是推动生物化学前进的一个因素。1961年克里克证明每条DNA长链中的碱基,每三个构成一组,称三联体,标示着蛋白质分子中氨基酸残基的位置。尼伦伯格(Marshall Warren Nirenberg, 1927—)美国生物化学家,在破译遗传密码方面作出重要贡献。霍利(Robert William Holly, 1922—)阐明酵母丙氨酸tRNA的核苷酸的排列顺序,后来证明所有tRNA结构均相似。科拉纳(Har Gobind Khorana, 1922—)美籍印度裔生物化

学家,曾合成了精确结构已知的核酸分子,首次人工复制成酵母基因。尼伦伯格、霍利和科拉纳共获 1969 年诺贝尔生理学或医学奖。

法国巴黎的巴斯德研究所是著名的生物化学、分子生物学中心。利沃夫(André Lwoff, 1902—)具有俄罗斯-波兰血统的法国生物学家。曾在巴黎大学求学,后来在巴黎的巴斯德研究所做研究工作,1966—1972 年在董事会任职。第二次世界大战期间因从事法兰西地下工作而获得抗敌勋章。他的研究证明:在感染细菌后病毒 DNA 能连续传给细菌以后各代,这些细菌称为溶源性细菌,并指出,称为原噬菌体的病毒在一定条件下可产生一种感染型,它破坏细菌的细胞壁,而释放出的病毒又能感染其他细菌。其友人、同事及学生曾撰文纪念他从事生物学研究 50 周年,合编《论微生物和生命》一书(1971)。雅各布(François Jacob, 1920—)法国生物学家。莫诺(Jacques Monod, 1910—1976 年)法国生物化学家、遗传学家。莫诺与雅各布进行了大量研究工作,阐明了基因控制酶的生物合成,从而调节细胞代谢的方式。1961 年他们提出信使核糖核酸, mRNA 的存在,说明其碱基序列与染色体中脱氧核糖核酸的碱基序列互补;并假定 mRNA 将编码在碱基序列上的遗传信息带到蛋白质的合成场所——核糖体(ribosomes),在此翻译成酶的氨基酸序列。1960 年他们发现操纵子(operon)的基因集团,能影响 mRNA 的合成,从而调节其他基因的功能。在微生物界 Operon 普遍存在。由于这些发现,他们二人(Jacob 和 Monod)与利沃夫共获 1965 年诺贝尔生理学或医学奖。

美国哈佛医学院的福林(Otto Folin)与吴宪于 1919—1922 年首次用比色定量方法测定血糖等。吴宪回国后于 1924—1942 年担任私立北京协和医学院(PUMC)生物化学教授,兼生物化学系主任教授,在生物化学系跟吴宪共同工作的先后有刘恩职、万昕、陈同度、汪猷、张昌颖、杨恩孚、周启源等。在吴宪教授领导下完成了蛋白质变性理论、血液的生物化学方法检查研究、免疫化学研究、素食营养研究、内分泌研究,等等,在生物化学方面做出重要贡献。

20 到 30 年代,中国留学生主修生物化学的多数从美国留学回国,亦有留德、留法的;在 40 年代有从苏联学习回国的。这里将叙述从英国剑桥回国的,如王应睐、曹天钦、邹承鲁等,他们在中国科学院上海生物化学研究所,和留美国国的王德宝、钮经义等,在生物化学领域里做出新的贡献。他们协同有机化学研究所汪猷等和北京大学邢其毅等于 1965 年用化学方法成功地完成了人工合成具有生物学活性的蛋白质——结晶牛胰岛素;1983 年又通过协作,采用有机合成和酶促合成相结合的方法,完成酵母丙氨酸转移核糖核酸的人工全合成。此外,我国在酶的作用机理、血红蛋白变异、生物膜结构功能等方面都做出国际水平的研究成果。

生物化学在蛋白质、核酸、酶及代谢等方面已有理论方面的成就,理论成果必然能导致应用。生物化学在约 80 年代发展生物工程或生物高技术方面的崭新领域。生物工程(Biotechnology)所包涵的内容也在发展之中,有遗传工程或基因工程,蛋白质合成的分子生物学,或称蛋白质工程、酶工程,还有组织培养、细胞培养,以及其他体外技术,以求生产对人类有用的产物。有工业微生物学,利用合适原料经过发酵,生产酶类和人类食品和动物饲料。生物工程的远景,包括应用于人类健康、动物疾病治疗和预防、污水和废物处理,以及生物电子学等等。由于生物工程对人类社会目前的效益和广阔的前景,世界各国,特别是欧美、澳洲、日本等,国家重视,企业发达,竞争中求发展,但是在学术方面则相互交流。我们亦已重视生物工程的理论

研究,应用研究,特别重视与生产方面的开发,列为国家重点发展的高技术之一。生物化学的发展与生物技术是相互推动前进的,二者不能分隔和偏废。

生物化学虽有近二百年的历史,但是还在发展之中。目前看得到的一些未知领域,例如:地球上生命是怎样起源的?地球以外的天体上有没有生命?遗传物质是怎样进化的?一个受精卵中的遗传物质怎样发生成个体?怎样发生为各种器官和组织的?细胞器的进化途径还有争论,癌的问题、病毒问题、人体自身免疫问题、大脑的记忆、推理的分子生物学、生物行为有什么规律,其分子的基础又是什么?还有环境生态等问题。总之,生物化学是在发展之中。

我国青年学者,包括将从留学归来的学者必将在发展中的生物化学领域里有所发现,有所创新,在理论与实践方面做出更突出的贡献。

主要参考书

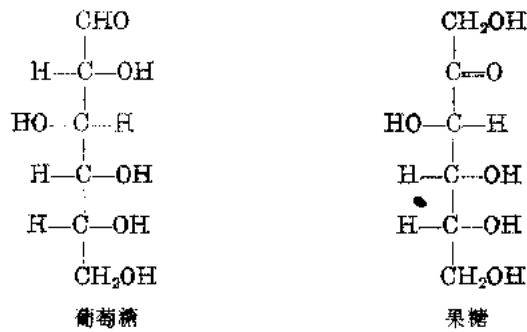
1. 黄素封译,[美]Mary Elviva Weeks 著,《化学元素的发现》,商务印书馆,1965。
2. 《简明不列颠百科全书》,中国大百科全书出版社,1986。
3. 《中国协和医科大学校史(1917—1987)》,北京科学技术出版社,1987。
4. Florkin, Marcel and Stotz, Elmer H.(editors), Comprehensive Biochemistry, Elsevier Publishing Company, 1972. Volume 30, A History of Biochemistry, by Marcel Florkin
5. Garrison, Fielding H., An Introduction to the History of Medicine, Fourth Edition, W. B. Saunders Company, 1929.
6. Kohler, Robert E., From Medical Chemistry to Biochemistry the making of a biomedical discipline, Cambridge University Press, 1982.
7. Lwoff, André and Ullmann, Agnes(editors), Origins of Molecular Biology, A tribute to Jacques Monod, Academic Press, 1979.
8. Taylor, J. Herbert, Selected Papers on Molecular Genetics, Academic Press, 1965.
9. Combs, J., The International Biotechnology Directory, Macmillan Publishers Ltd 1984.

沈 同

第一章 糖

糖是自然界存在的一大类具有广谱化学结构和生物功能的有机化合物。它主要是由绿色植物经光合作用形成的。这类物质主要是由碳、氢和氧所组成，其分子式通常以 $C_n(H_2O)_m$ 表示。由于一些糖分子中氢和氧原子数之比往往是 2:1，刚好与水分子中氢、氧原子数的比例相同，过去误认为此类物质是碳与水的化合物，故有“碳水化合物(carbohydrate)”之称，但实际上有些糖，如鼠李糖(rhamnose, $C_6H_{12}O_5$)和脱氧核糖(deoxyribose, $C_5H_{10}O_4$)等，它们分子中氢、氧原子数之比并非 2:1，而一些非糖物质，如甲醛(CH_2O)、乳酸($C_3H_6O_3$)和乙酸($C_2H_4O_2$)等，它们分子中氢、氧原子数之比却都是 2:1。所以，称糖为“碳水化合物”并不恰当。只是沿用已久，现在已成为人们对糖的习惯称呼了。

糖类物质是含多羟基的醛类或酮类化合物。常见的葡萄糖(glucose)和果糖(fructose)分别是它们的典型例子。它们的链状结构是：



由上述结构式可见，葡萄糖含有一个醛基，六个碳原子，称己醛糖；而果糖则含有一个酮基，六个碳原子，称己酮糖。

糖类物质以它们水解的情况分类：凡不能被水解成更小分子的糖为单糖(monosaccharides)。单糖又可根据糖分子含碳原子数多少分类；在自然界分布广、意义大的是五碳糖和六碳糖，它们分别称为戊糖(pentose)和己糖(hexose)。核糖(ribose)、脱氧核糖属戊糖；葡萄糖、果糖和半乳糖(galactose)为己糖。凡能水解成少数(2—6个)单糖分子的称为寡糖(oligosaccharides)，其中以双糖存在最为广泛，蔗糖(sucrose)、麦芽糖(maltose)和乳糖(lactose)是其重要代表。单糖和寡糖能溶于水，多有甜味。凡能水解为多个单糖分子的糖为多糖(polysaccharide)，其中以淀粉(starch)、糖原(glycogen)和纤维素(cellulose)等最为重要，与非糖物质结合的糖称复合糖，如糖蛋白和糖脂。糖的衍生物称衍生糖，如糖胺、糖酸和糖酯等。

糖是生物界中分布极广，含量较多的一类有机物质，几乎所有的动物、植物、微生物体内都含有它。其中以植物界最多，约占其干重的 80%。生物细胞内、血液里也有葡萄糖或由葡萄糖等单糖物质组成的多糖(如肝糖原、肌糖原)存在。人和动物的器官组织中含糖量不超过组织干重的 2%。微生物体含糖量约占菌体干重的 10—30%，它们或以糖或与蛋白质、脂类结合

成复合糖存在。

糖类物质的主要生物学作用是通过氧化而放出大量的能量，以满足生命活动的需要。淀粉、糖原是重要生物能源，它也能转化为生命必需的其它物质，如蛋白质和脂类物质。纤维素是植物的结构糖。

第一节 单 糖

单糖的种类很多，其中以葡萄糖(游离的，结合形式的)数量最多，在自然界分布亦广。单糖的结构及性质虽各有异，但相同之处也不少。葡萄糖结构及性质有代表性。现以葡萄糖为例来阐述单糖的分子结构。

葡萄糖可以游离存在于水果、谷类、蔬菜和血液中，也可以结合形式存在于麦芽糖、蔗糖、淀粉、糖原、纤维素及其他葡萄糖衍生物中。

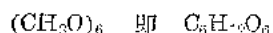
一、葡萄糖的分子结构

(一)葡萄糖的化学组成和链状结构

纯净的葡萄糖，其元素组成是 C、H 和 O，三者所占的比例是

$$\text{C: } 40\% \quad \text{H: } 6.7\% \quad \text{O: } 53.3\%$$

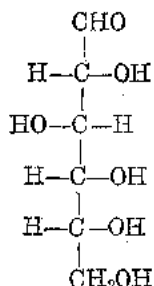
根据三者的比例，可知其实验式为 $(\text{CH}_2\text{O})_6$ 。用冰点降低或沸点升高法测得其分子量为 180，从而断定葡萄糖分子式为：



搞清了葡萄糖的化学组成和分子式，就需要进一步了解各元素之间是按什么方式结合的？即其结构式是什么？大量科学实验为解决这个问题提供了根据。

1. 葡萄糖能和费林氏(Fehling)试剂或其他醛试剂反应，证明葡萄糖分子含有醛基。
2. 葡萄糖能和乙酸酐结合，并产生具有五个乙酰基的衍生物，证明葡萄糖分子含有五个羟基。
3. 葡萄糖经钠汞齐作用，被还原成一种具有六个羟基的山梨醇；而山梨醇是由六个碳原子构成的直链醇，证明了葡萄糖的六个碳原子是连成一条直链的。

由此可知葡萄糖的链状结构式是：



上述结构式可以简化。用“—”表示碳链及不对称碳原子上羟基的位置，“△”表示醛基，即“—CHO”，“—”表示羟基“—OH”，“O”表示第一醇基，即“—CH₂OH”，则葡萄糖结构可简化为：



葡萄糖

与葡萄糖同属己醛糖的甘露糖和半乳糖的结构分别为：



甘露糖



半乳糖

葡萄糖、甘露糖(mannose)和半乳糖都含六个碳原子,五个 $-OH$ 和一个 $-CHO$, 它们都有四个不对称碳原子(C^*), 但它们分子中基团的排列有所不同, 因而它们彼此也就不同。

上述三种己醛糖中, 葡萄糖与甘露糖, 葡萄糖与半乳糖, 两两之间, 除一个不对称碳原子(它们分别是 C_2^* 和 C_1^* 及 OH 位置)有所不同外, 其余结构部分完全相同。这种仅一个不对称碳原子构型不同, 两镜象非对映体异构物称为差向异构体(epimers)。

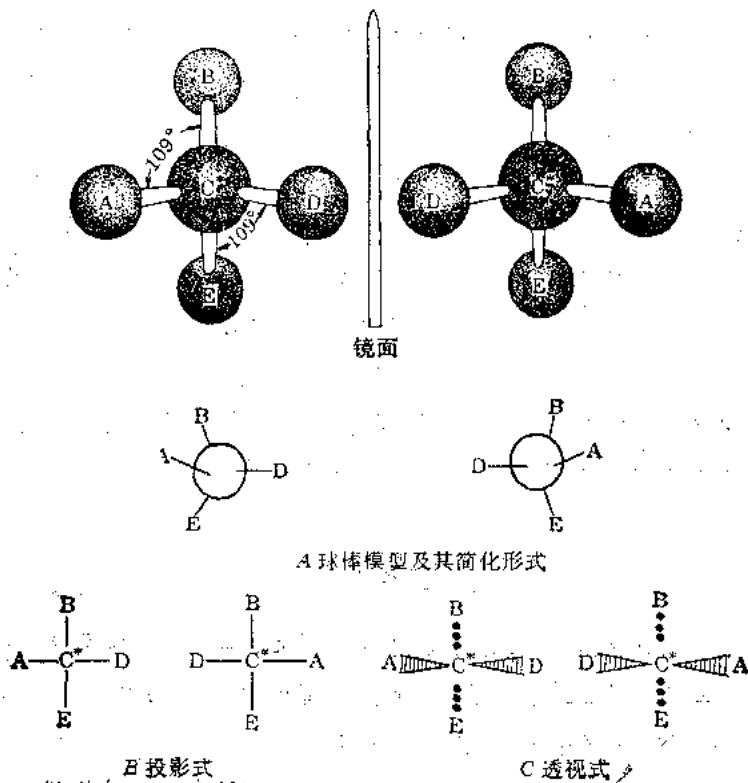


图 1-1 不对称碳原子(C^*)

(二) 葡萄糖的构型

构型(configuration) 是指一个分子由于其中各原子特有的固定的空间排列, 而使该分子所具有的特定的立体化学形式。当某一物质由一种构型转变为另一种构型时, 要求共价键的断裂和重新形成。

不对称碳原子 是连接四个不同原子或基团的碳原子。它有下列表示方式(图 1-1): 球棒模型表现出 A、B、C*、(不对称碳原子)和 D 间的空间排布。

连接到 C* 上的四个不同原子和基团投影到一个平面上, 水平键被视为垂直放置在纸平面之前, 而垂直键则在纸平面之后。这种相互关系在透视式中可看得更清楚。其中虚线指延伸在纸平面之后的键, 而变形键处于纸平面之前。

现以具有一个不对称碳原子的最简单的单糖——甘油醛为例(图 1-2):

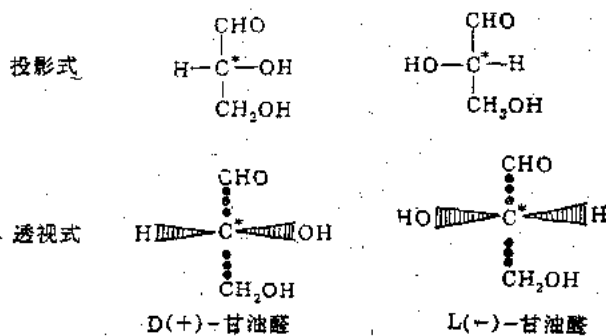


图 1-2 甘油醛结构

镜像对映体 图 1-1 是以不同方式表示两类彼此类似但并不等同的物质的结构图象。只要将它们重叠起来即可证明它们并非等同, 而是互为镜像, 不能重叠。这两类化合物称为一对“对映体”(antipode)。其两种构型, 一个为 D-型, 一个为 L-型。

旋光异构现象和旋光度 当光波通过尼克棱镜(nicol prism)时, 由于棱镜的结构通过的只是沿某一平面振动的光波, 其他都被遮断, 这种光称为“平面偏振光”。当它通过具有旋光性质的某异构物溶液时, 则偏振面会向右(顺时针方向)或向左(反时针方向)旋转。使偏振光振动面右旋的称右旋光性物质, 而使偏振光振动面左旋的称左旋光性物质。

旋光度是旋光性物质的一种物理性质。它和其他物理性质一样, 在一定的条件下是一个常数。为了能使各种旋光性物质的旋光度均为常数, 必须把影响它们旋光度的因素, 如温度、浓度、光的波长、旋光管的长度等加以固定。旋光度(α_b)的表示法常用旋光率(specific rotation) $[\alpha]_b^t$ 。

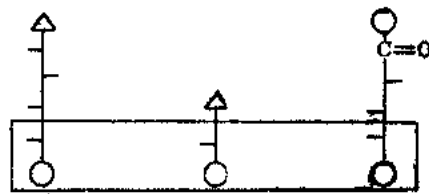
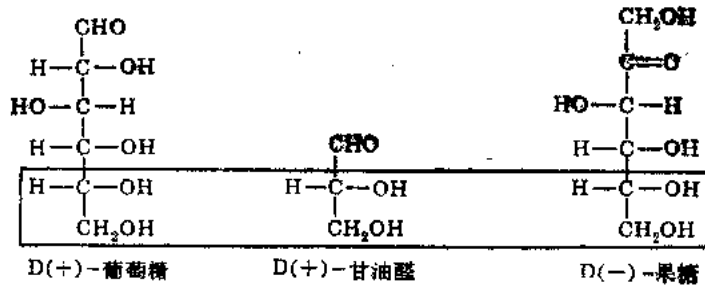
$$[\alpha]_b^t = \frac{\alpha_b^t \times 100}{L \times C}$$

式中, L 是管的长度, 以厘米表示, C 代表浓度, 即在 100 ml 溶液中所含溶质的克数; α_b^t 是在钠光灯(D 线, λ : 589.6 与 589.0 nm)为光源, 温度为 t , 管长为 L , 浓度为 C 时所测得的旋光度。在旋光率数值前加“+”和“-”分别表示右旋和左旋。

一个碳原子和四个不同的原子或基团相连时, 形成两种不同的空间排布, 构成两类不同的构型。单糖的构型是以甘油醛为基准进行比较而确定的(图 1-2)。

正如前述，能使平面偏振光右旋和左旋的甘油醛分别规定为 D-型和 L-型。在其投影结构中，OH 写在不对称碳原子的右边和左边分别称为 D-型和 L-型。

葡萄糖和果糖的空间构型是以其不对称碳原子 C^{*} 上的一OH 在空间的排布与甘油醛的不对称碳原子上的一OH 在空间的排布相比较而确定的。



L(-)-葡萄糖 L(-)-甘油醛 L(-)-果糖

D、L 是指构型，“+”、“-”指旋光方向。D 与“+”、L 与“-”并无必然联系。D-葡萄糖和 D-果糖旋光方向分别为“+”和“-”，而 L-葡萄糖与 L-果糖旋光方向却均为“-”。构型与旋光方向是两种概念。

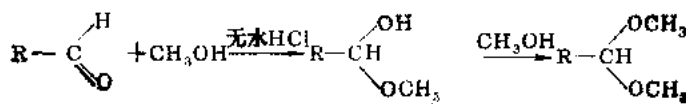
(三) 葡萄糖的环状结构

前已证明葡萄糖的链状结构，随后，发现葡萄糖的某些物理、化学性质不能用糖的链状结构来解释，从而提出葡萄糖存在环状结构的可能。

葡萄糖不具有某些典型醛类特性，如

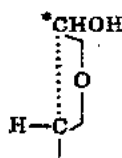
1. 缺少 Schiff 化反应，即不能使被 H₂SO₃ 漂白了的品红呈现红色。
2. 醛类能与 NaHSO₃ 起加成反应，而葡萄糖不能。

从而怀疑典型醛基是葡萄糖分子唯一还原性基团形式。后来实验证明：葡萄糖与醛不同，不能与两分子醇而仅能与一分子醇反应，不能生成缩醛 (acetals)，仅能生成半缩醛 (semi-acetals)。这意味着半缩醛基的存在。

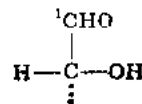


半缩醛基

醛基



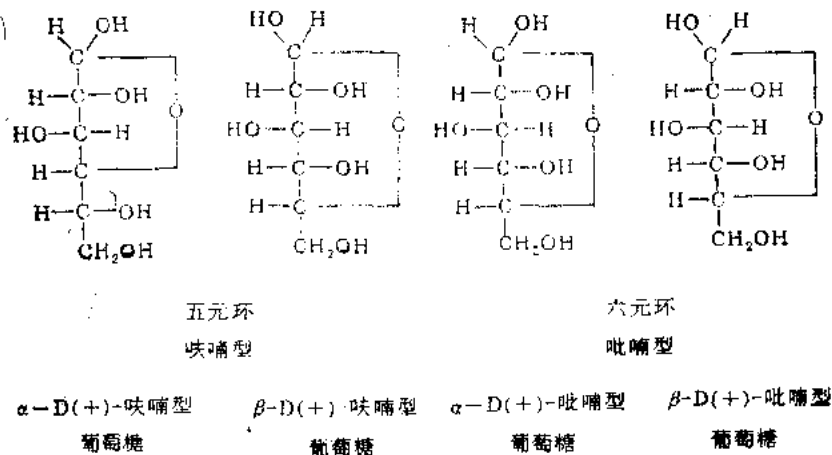
*C 是不对称碳原子



C 是对称碳原子

葡萄糖以两种具有不同旋光率的形式存在,一种 $[\alpha]_D^{20} = +112^\circ$,称为 α -D-(+)葡萄糖;另一种 $[\alpha]_D^{20} = +18.7^\circ$,称为 β -D-(+)葡萄糖。这两种旋光率反映葡萄糖以环状糖苷形式存在,其 C_1 为不对称C原子。将两种葡萄糖分别溶于水后,其旋光率都逐渐转变为 -52.7° 。这种现象称为变旋现象(mutarotation);原因是不同结构形式的葡萄糖可互变,各种形式最后达一定的平衡所致。

葡萄糖在无水甲醇溶液内受到氯化氢的催化作用,能产生两种各含有一个甲基的所谓 α -或 β -甲基葡萄糖苷。也表明 C_1 有两种不对称形式葡萄糖分子环状结构有两种可能:五元环,六元环

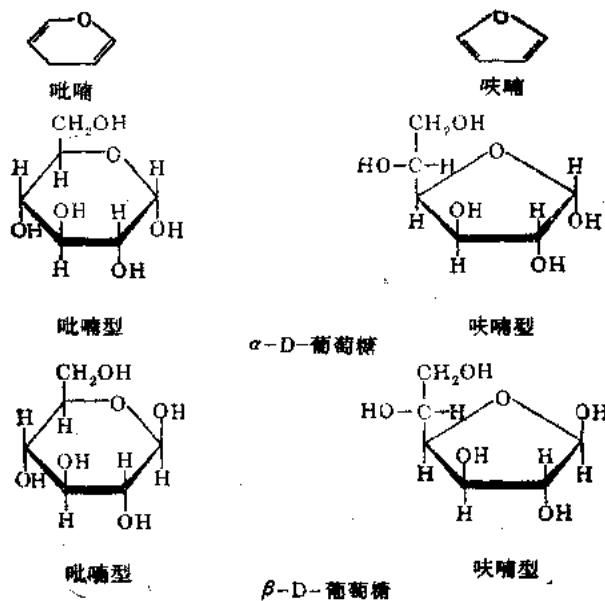


元环五元环,即呋喃型葡萄糖不甚稳定,天然葡萄糖多以六元环,即吡喃型葡萄糖的形式存在。

α -D-(+)-与 β -D-(+)-葡萄糖分子在构型上,仅头部不同,它们间互为异头物(anomer)。

1893年E. Fischer正式提出葡萄糖分子环状结构学说。

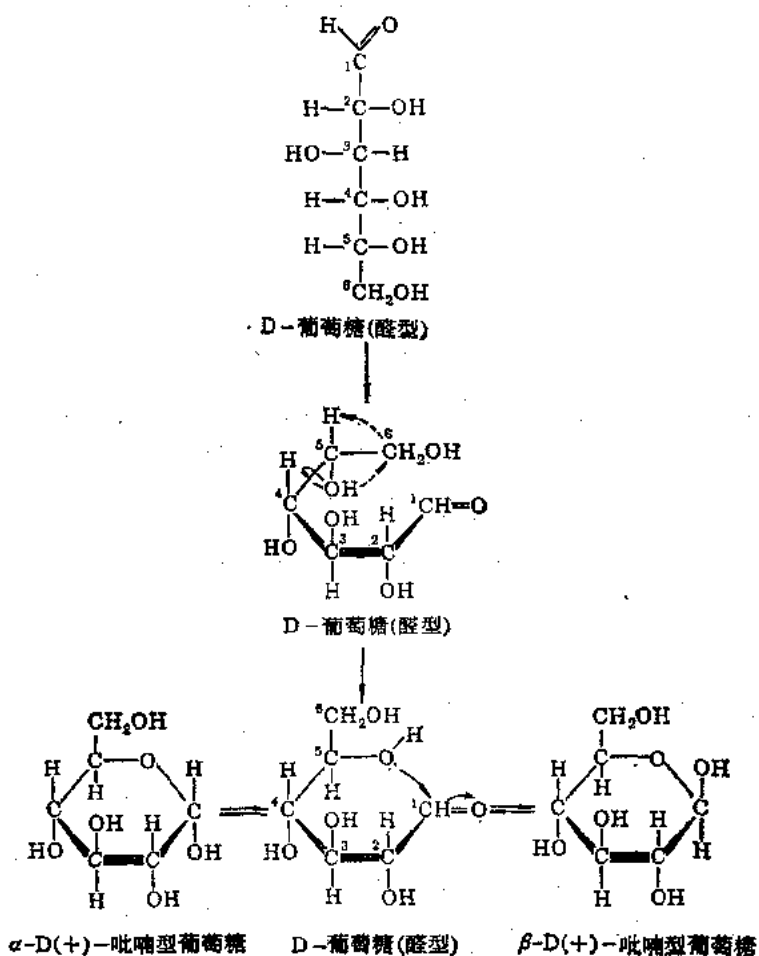
在上述葡萄糖分子投影式结构中,过长的氧桥是不合理的。1926年W. N. Haworth提出用透视式表达糖的环状结构。



上列各透视式中省略了构成环的碳原子。粗线表示平面向前的边缘, 细线是向后的边缘。对于 D-葡萄糖来说,

投影式中向右的羟基在透视式中处于平面之下。在投影式中向左的羟基在透视式中处于平面之上的位置。当直链形葡萄糖 C₅ 上的羟基与 C₁ 上的醛基连成 1→5 型氧桥, 形成环状结构时, 为了使 C₅ 上的羟基与 C₁ 醛基接近, 依照单键自由旋转不改变构型的原理, 将 C₅ 旋转 109°28', 所以 D-葡萄糖的尾端羟甲基在平面之上。透视式中, D、L 和 α、β 的确定分别是以 C₅ 上羟甲基和半缩醛羟基在含氧环上的排布而决定的。如果氧环上的碳原子按顺时针方向排列时, 羟甲基在平面之上为 D-型, 在平面之下为 L-型。在 D-型中, 半缩醛羟基在平面之下为 α-型, 在平面之上为 β-型。

这可用以下图式表达:



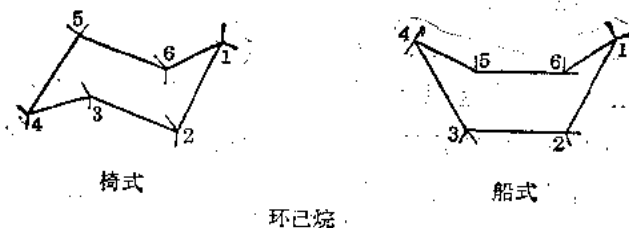
(四) 葡萄糖的构象

构象(conformation) 指一个分子中, 不改变共价键结构, 仅单键周围的原子旋转所产生的原子的空间排布。一种构象改变为另一种构象时, 不要求共价键的断裂和重新形成。

吡喃型己糖构象是在 40 年代中和 50 年代初由 Hassel 等人在解决了环己烷的构象后又接着解决的。

所有环己烷的 C—C 键都保持正常四面体价键方向, 即它并非是一个真正的平面, 而是折

成椅式和船式两种无张力环。X-射线衍射, 红外光谱和旋光性数据都证明环己烷及其衍生物主要以椅式构象存在, 而船式构象仅占极小比例。



两种构象间可以互变。室温下, 船式构象很少。随温度升高船式比例相应增大, 建立两种构象间的平衡。环己烷有六个环碳原子, 计 12 个键, 其中 6 个与通过平面中心的对称轴平行, 即 C—H 键, 称为直立键或 α 键; 分布在两个平面上, 即 1, 3, 5 和 2, 4, 6 两组。另 6 个与水平平面成 $\pm 19^\circ 28'$ 角, 即 C—OH, C—CH₂OH 键, 称为平伏键或 \circ 键。

吡喃型己糖与环己烷之间在结构上有同有异。吡喃型己糖环中氧原子代替了环己烷中的一个甲烯基, O 和 C 原子半径不同, 它与环己烷相比可能变形, 但由于 C—O—C 键角和 C—C—C 环角相近, 加上 O 原子的 p 电子轨道近似四面体分布等原因, 环己烷的构象可以表达吡喃型己糖结构。

50 年代初, Reeves 等人从多种角度研究, 推论吡喃型己糖可能有八种无张力环的构象, 两种椅式和六种船式(图 1-3); 进而他们通过相邻 —OH 间射影角大小, 旋光度改变和稳定性关系论证 C₁ 常常是优势构象。能用它来说明吡喃型己糖及其他糖苷的一般性质。在纤维素和蔗糖的晶体结构中, D-葡萄糖残基构象测定的结果, 同样支持这种论断。

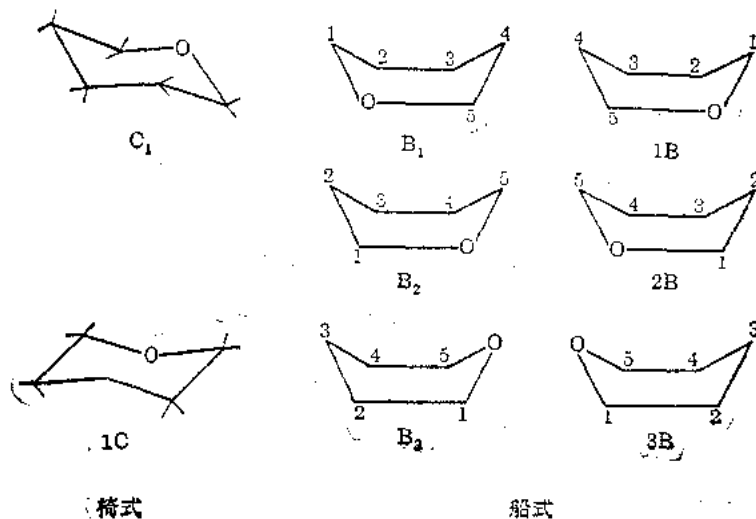
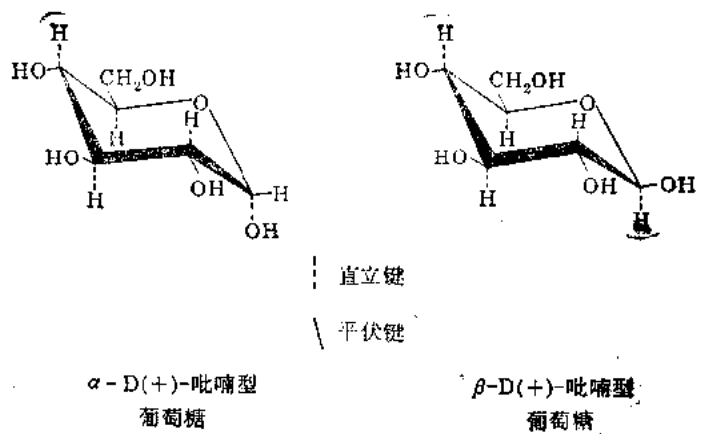


图 1-3 吡喃型己糖构象

对 D-葡萄糖构象来说, 上述 C₁ 又有 α -和 β -型之分; α -型的异头体羟基直立, 其余的 —OH 和 —CH₂OH 均为平伏的。而 β -型的全部 —OH 和 —CH₂OH 均为平伏的。在溶液中, β -异头体比 α -异头体(羟基直立)更稳定些。 α -D(+)-葡萄糖和 β -D(+)-葡萄糖分别占总碳含量的 36 和 63%, 而链式结构葡萄糖仅占总碳含量的 1% 以下。



二、单糖的分类

单糖根据碳原子数多少，分别称为丙糖、丁糖、戊糖、己糖及庚糖。单糖分子中除有醇基(-OH)外，还有醛基($\text{—C} \begin{matrix} \text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$)或酮基(>C=O)。分子中有醛基的单糖称为醛糖，分子中有酮基的称为酮糖。

常见醛糖、酮糖见表 1-1。

表 1-1 常见单糖

	醛 糖	酮 糖
丙糖(3C)	D-甘油醛	二羟丙酮
丁糖(4C)	D-赤藓糖	
戊糖(5C)	D-核糖 D-脱氧核糖	D-木酮糖 D-核酮糖
己糖(6C)	D-半乳糖 D-甘露糖 D-葡萄糖	D-果糖
庚糖(7C)		D-景天庚酮糖
辛糖(8C)		D-辛酮糖

醛糖与酮糖以甘油醛和二羟丙酮为基准，构型谱系又可分为 D-型和 L-型(图 1-4、图 1-5)。单糖的分类及成员数目见表 1-2。

表 1-2 单糖分类及构型数目

	醛 糖		酮 糖	
	D-系	L-系	D-系	L-系
丙糖*	1	1		
丁糖	2	2	1	1
戊糖**	4×2	4×2	2×2	2×2
己糖**	8×2	8×2	4×2	4×2

注* 丙糖指为二羟丙酮，无 D-, L- 系之分

** 戊糖、己糖环状结构，有 α -、 β -异头体之分，故 ×2

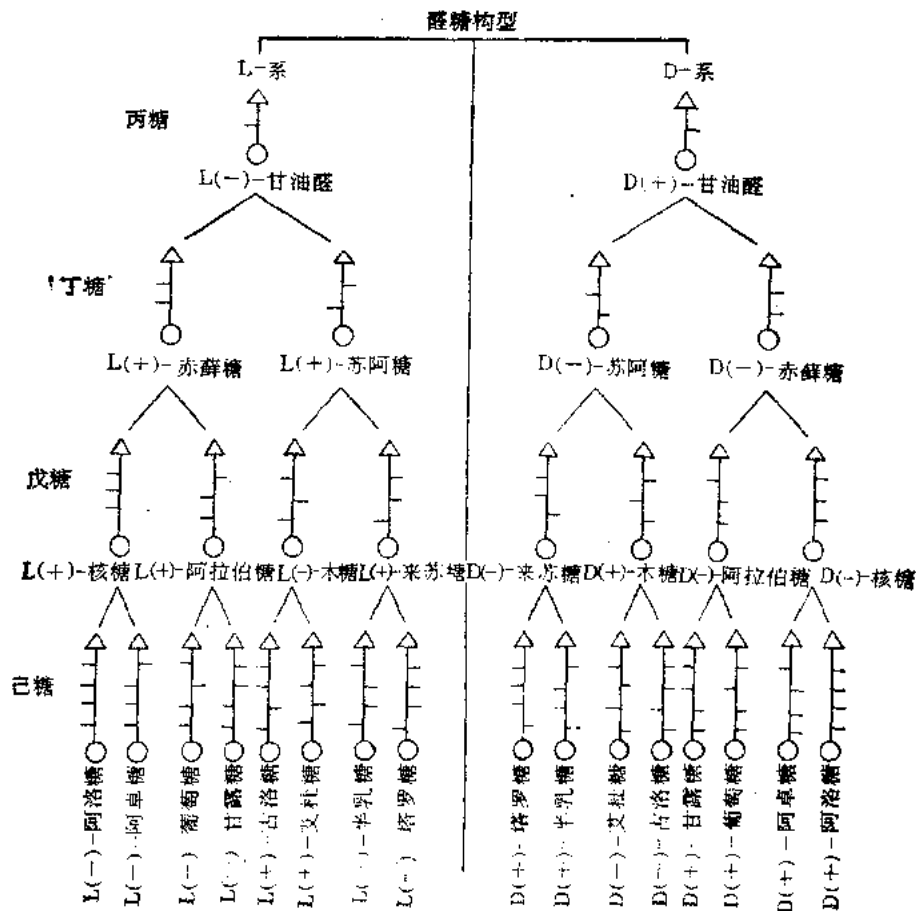


图 1-4 醛糖构型

上图糖的英文名: 苏阿糖(threose)、赤藓糖(erythrose)、来苏糖(lyxose)、木糖(xylose)、阿拉伯糖(arabinose)、核糖(ribose)、塔罗糖(talose)、半乳糖(galactose)、艾杜糖(idose)、古洛糖(gulose)、甘露糖(mannose)、阿卓糖(allose)和阿洛糖(allose)。

单糖衍生物有: 糖脂、糖苷、糖酸、糖醇和糖胺等。

三、单糖的物理性质与化学性质

(一)物理性质

1. 旋光性 一切糖类都有不对称碳原子, 都具有旋光性。旋光性是鉴定糖的一个重要指标。几种重要单糖、寡糖和多糖的旋光率如表 1-3。

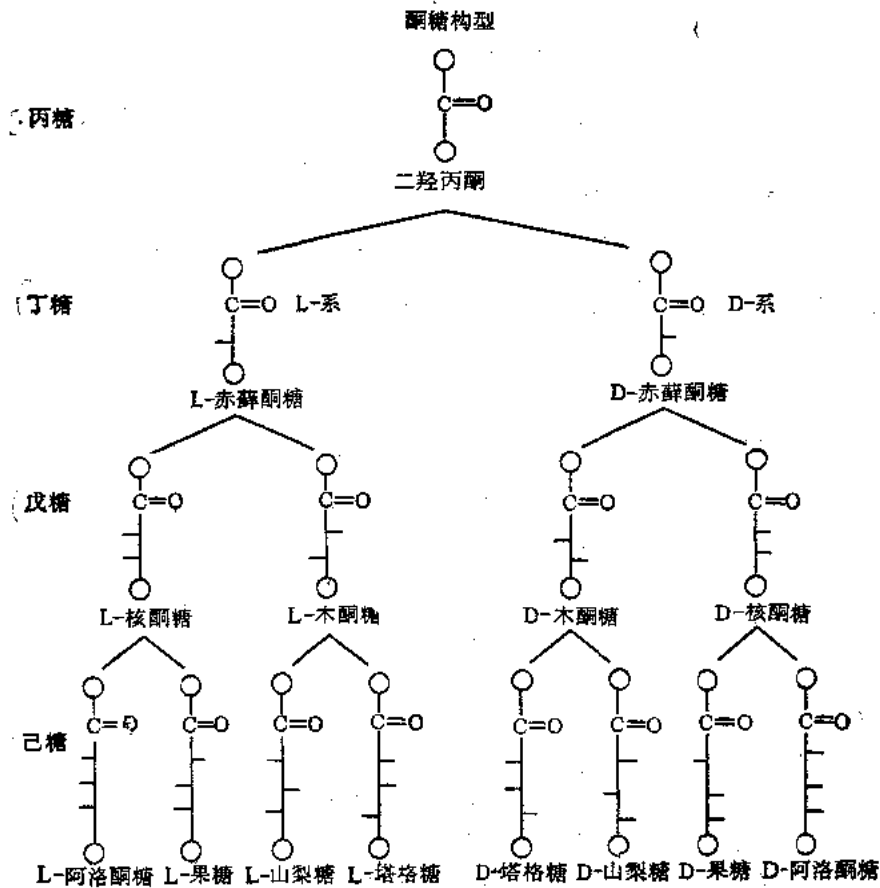
许多单糖在水溶液中都有变旋现象。

2. 甜度 各种糖的甜度不一, 常以蔗糖的甜度为标准进行比较, 其比值如表 1-4, 表中*尚附有 4 种非热源性增甜剂作参考。

3. 溶解度 单糖分子中有多个羟基, 增加了它的水溶性, 尤其在热水中溶解度极大。但不溶于乙醚、丙酮等有机溶剂。

(三)化学性质

单糖都是多羟基醛和多羟基酮结构, 其中醇羟基具有成酯、成醚和成缩醛等反应, 而羰基



上图糖的英文名: 二羟丙酮(dihydroxyacetone)、赤藓酮糖(erythrulose)、核酮糖(ribulose)、木酮糖(xylulose)、阿洛酮糖(psicose)、果糖(fructose)、山梨糖(sorbose)和塔格糖(tagatose)。

表 1-3 重要单糖、寡糖和多糖旋光率, $(\alpha)_D^{20}$

单糖	$(\alpha)_D^{20}$	寡糖、多糖	$(\alpha)_D^{20}$
D-阿拉伯糖	-105.0°	麦芽糖	+130.4°
L-阿拉伯糖	+104.5°	蔗糖	+66.5°
D-木糖	+18.8°	转化糖*	-19.8°
D-葡萄糖	+52.2°	乳糖	+55.4°
D-果糖	-92.4°	糊精	+195°
D-半乳糖	+80.2°	淀粉	$\geq 196^\circ$
D-甘露糖	+14.2°	糖原	+196°--+197°

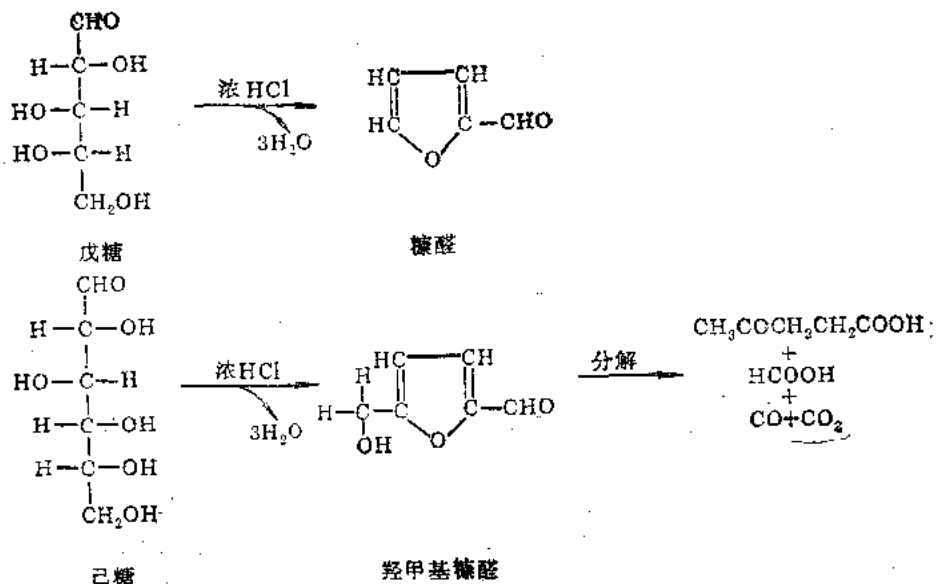
* 转化糖(Invert sugar)指蔗糖水解生成的葡萄糖和果糖的混合物。

表 1-4 糖和非热源性增甜剂(*)相对甜度

蔗糖	1.00	半乳糖	0.32
果糖	1.33	乳糖	0.16
转化糖	1.30	糖精(Saccharin)*	400
葡萄糖	0.74	Na-cyclamate*	30
木糖	0.40	Aspartame*	180
麦芽糖	0.32	Monellin*	2000

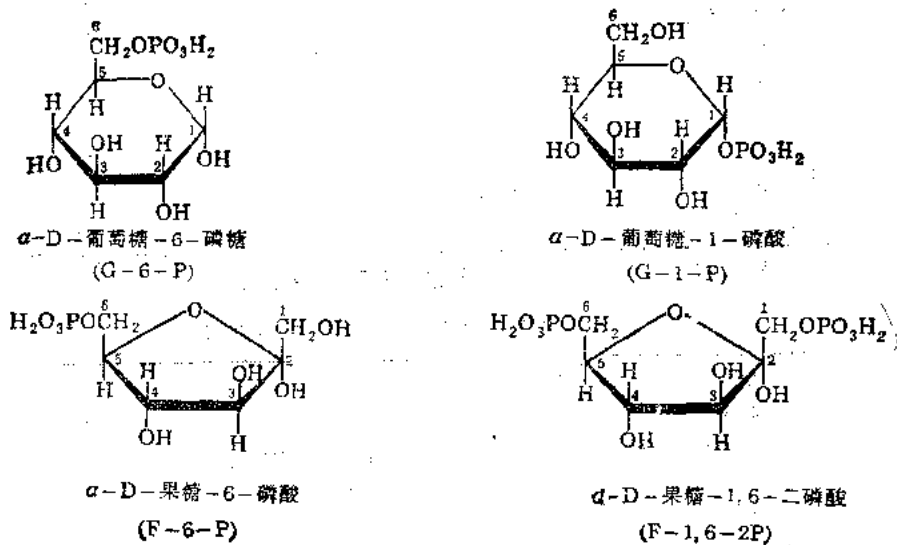
具有某些加成反应，又具有由于它们相互影响而产生的一些特殊反应。单糖的主要化学性质如下：

1. 酸的作用 戊糖与强酸共热，因脱水而生成糠醛。己糖与强酸共热，生成羟甲基糠醛，然后分解成乙酰丙酸、甲酸、CO 和 CO₂，以及少量未分解的羟甲基糠醛：



糠醛和羟甲基糠醛能与某些酚类作用生成有色的缩合物。利用这一性质可以鉴定糖。如 α -萘酚与糠醛或羟甲基糠醛生成紫色。应用这一反应来鉴定糖的存在称为 Molisch 试验。间苯二酚与盐酸遇酮糖呈红色，遇醛糖呈很浅的颜色，根据这一特性可以区分酮糖与醛糖。这一反应称为 Seliwanoff 反应。

2. 酯化作用 单糖为多元醇，与酸作用生成酯。生物化学上较重要的糖酯是磷酸酯。它们代表了糖的代谢活性形式，糖代谢的中间产物。重要的己糖磷酸酯有：

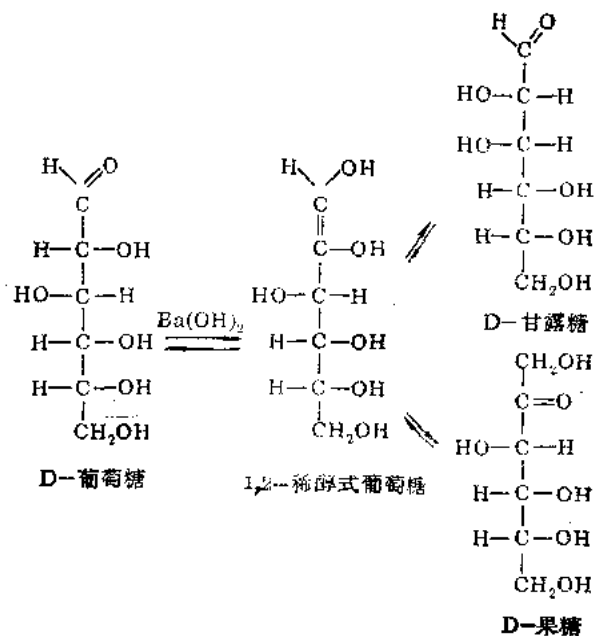


此外,葡萄糖的核苷二磷酸酯,如UDPG,参与许多代谢反应,如寡糖或多糖生物合成和葡萄糖和半乳糖间相互转化。

3. 碱的作用 单糖好象弱酸,它在18°C时的解离常数与弱酸的解离常数比较如下:

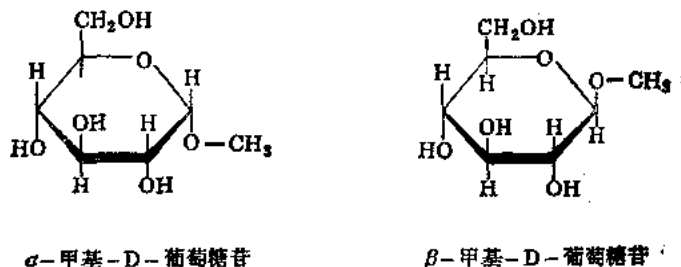
葡萄糖	6.6×10^{-12}	乙酸	1.8×10^{-5}
果糖	9.0×10^{-13}	乳酸	1.4×10^{-4}
半乳糖	5.2×10^{-13}		
甘露糖	10.9×10^{-13}		

在弱碱作用下,葡萄糖、果糖和甘露糖三者可通过烯醇式而相互转化。活体内,在酶的催化下也能进行类似的转化。



单糖在强碱溶液中很不稳定,分解成各种不同的物质。

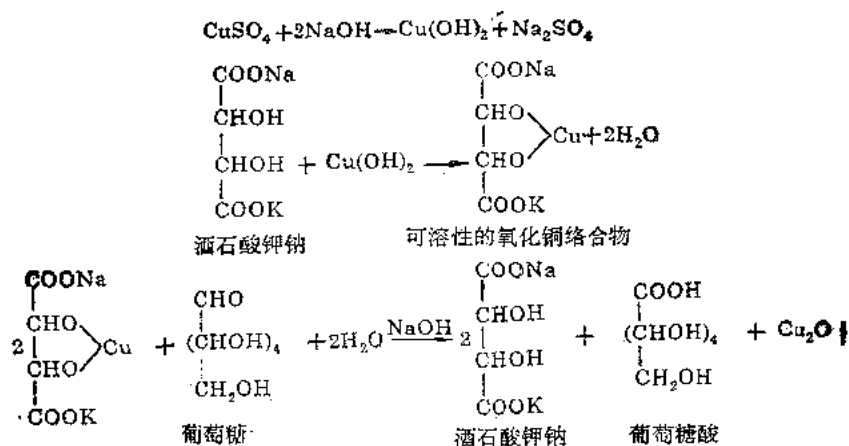
4. 形成糖苷 单糖的半缩醛羟基很容易与醇及酚的羟基反应,失水而形成缩醛式衍生物,通称糖苷(glycosides)。其中,非糖部分称配糖体,如甲基等。如果配糖体也是单糖,如此缩合生成双糖。由于单糖有 α -与 β -型之分,生成的糖苷也有 α -与 β -两种形式。核糖和脱氧核糖与嘌呤或嘧啶碱形成的糖苷称核苷或脱氧核苷,在生物学上具有重要意义。 α -与 β -甲基葡萄糖苷是最简单的糖苷。天然存在的糖苷多为 β -型。



糖苷与糖的化学性质完全不同。糖是半缩醛,很容易变为醛,从而显示醛的多种反应。糖苷需水解后才能分解为糖与配糖体,所以糖苷比糖稳定。它不与苯肼发生反应,不易被氧化,

也无变旋现象。

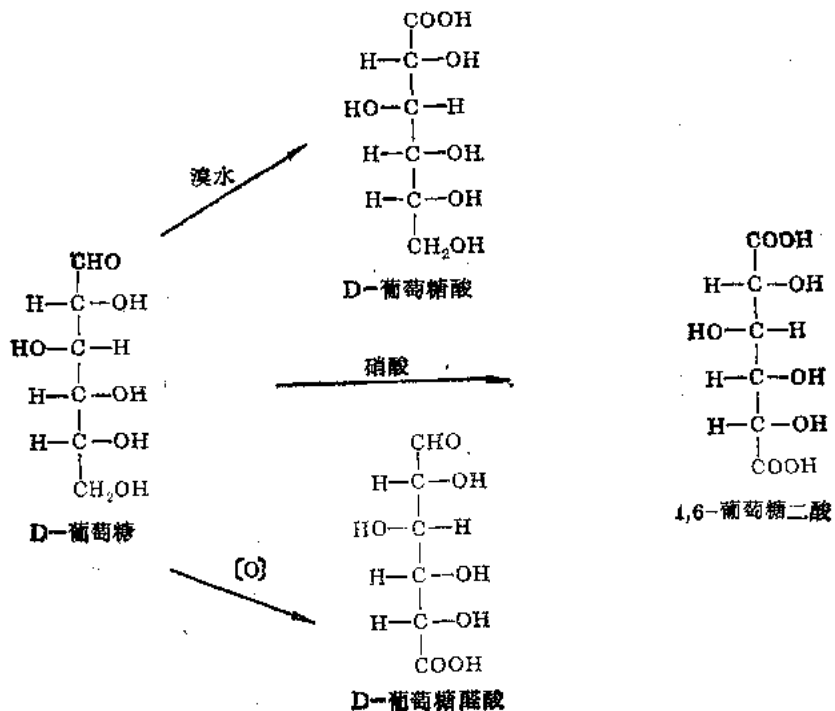
5. 糖的氧化作用 单糖含有游离羰基, 因此具有还原性。某些弱氧化剂 (如硫酸铜的碱性溶液) 与单糖作用时, 单糖的羰基被氧化, 两价铜离子被还原成氧化亚铜。测定氧化亚铜的生成量即可测知溶液中的含糖量。实验室常用的 Fehling 试剂和 Benedict 试剂就是硫酸铜的碱性溶液。单糖与 Fehling 试剂反应如下:



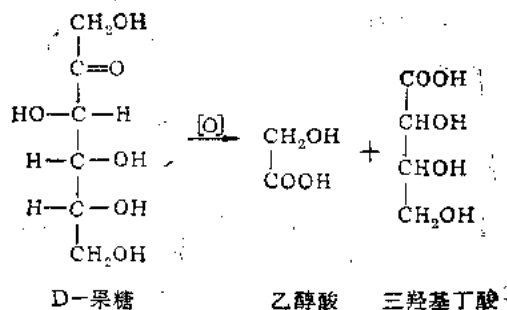
除了羰基之外, 单糖分子中的羟基也能被氧化。所以因氧化条件不同, 单糖可被氧化成不同的产物。

醛糖可以三种不同的方式进行氧化而产生与原来糖含有的碳原子数相同的酸:

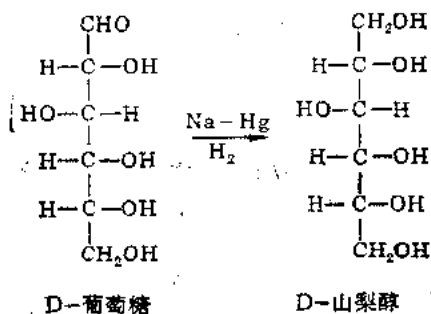
- (1) 在弱氧化剂 (如溴水) 作用下形成相应的糖酸;
- (2) 在较强的氧化剂 (如硝酸) 作用下, 除了醛基被氧化外, 伯醇基也被氧化成羧基, 生成 1, 6-葡萄糖二酸;
- (3) 有时只有伯醇基被氧化成羧基, 这样就形成糖醛酸。以葡萄糖为例, 反应如下:



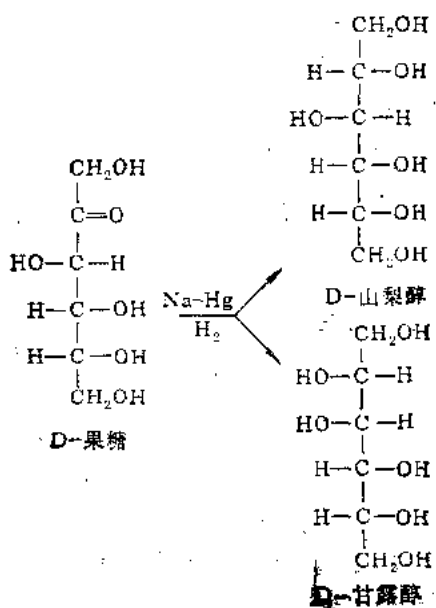
酮糖对溴的氧化作用无影响,因此,可将酮糖与醛糖分开。在强氧化剂作用下,酮糖将在羰基处断裂,形成两个酸。以果糖为例,反应如下:



6. 还原作用 单糖有游离的羰基,所以易被还原成多羟基醇。在钠汞齐及硼氢化钠类还原剂作用下,醛糖还原成糖醇,如D-葡萄糖被还原成D-山梨醇(D-sorbitol)。



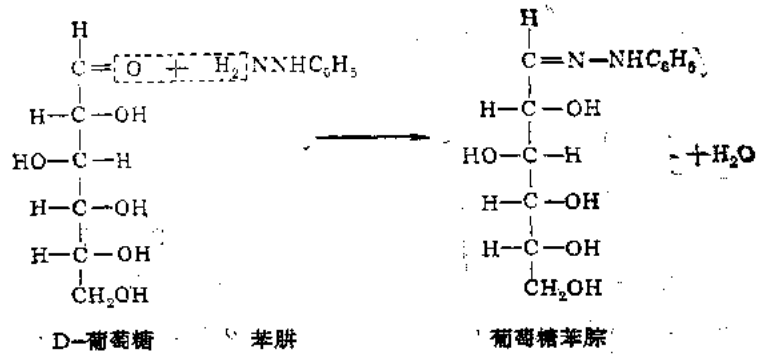
而酮糖被还原成两种具有同分异构的糖醇,如果糖被还原成D-山梨醇和D-甘露醇(D-mannitol)。



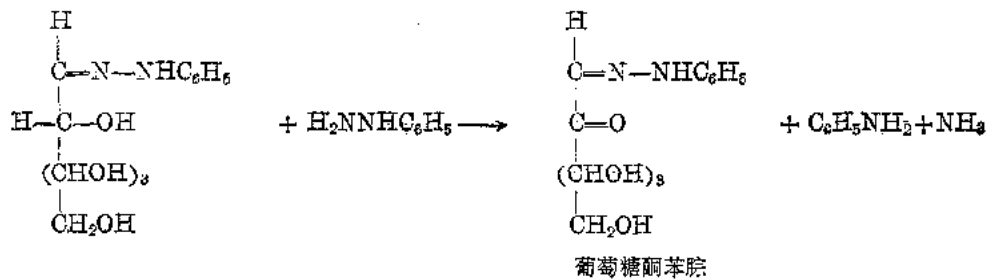
在机体内,以 NADH 或 NADPH 为供氢体,特异的脱氢酶能催化糖醇的合成。

7. 糖脎的生成 单糖游离羰基能与 3 分子苯肼 (phenylhydrazine) 作用生成糖脎 (osazone)。反应步骤如下:

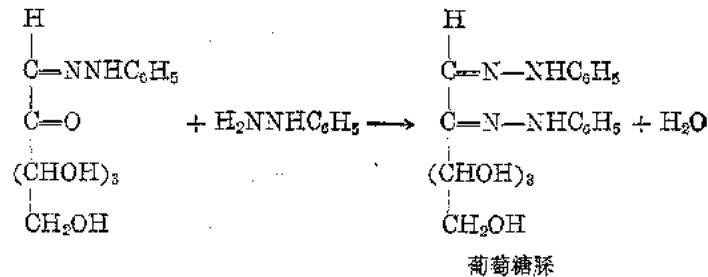
(1) 一分子葡萄糖与一分子苯肼缩合成苯腙(phenylhydrazone)。



(2) 葡萄糖苯腙(Glucose phenylhydrazone)再被一分子苯肼氧化成葡萄糖酮苯腙。



(3) 葡萄糖酮苯腙再与另一分子苯肼缩合,生成葡萄糖脎(glucosazone)。

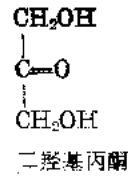
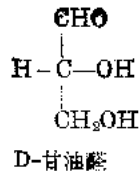


糖脎为黄色结晶,难溶于水。各种糖生成的糖脎结晶形状与熔点都不相同,因此,常用糖脎的生成以鉴定各种不同的糖。

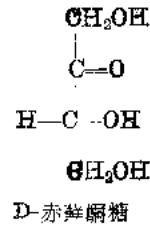
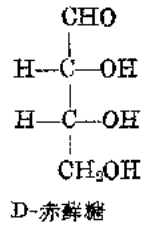
四、重要的单糖

单糖根据碳原子数多少,分别称为丙糖、丁糖、戊糖、己糖等。

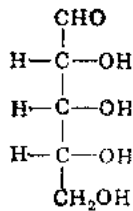
1. 丙糖 含三个碳原子的糖称丙糖。比较重要的丙糖有 D-甘油醛和二羟基丙酮。它们的磷酸酯是糖代谢的重要中间产物。



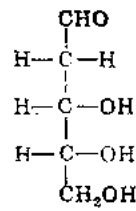
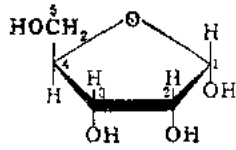
2. 丁糖 含四个碳原子的糖称丁糖。自然界常见的丁糖有 D-赤藓糖及 D-赤藓酮糖。它们的磷酸酯是糖代谢的重要中间产物。



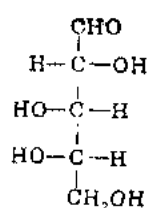
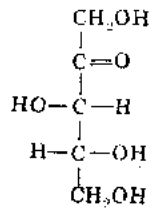
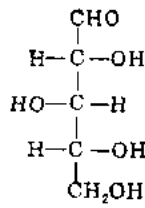
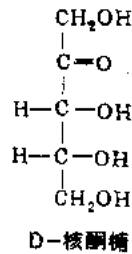
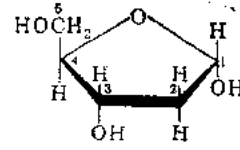
3. 戊糖 自然界存在的戊醛糖主要有 D-核糖、D-2-脱氧核糖、D-木糖和 L-阿拉伯糖。它们大多以多聚戊糖或以糖苷的形式存在。戊酮糖有 D-核酮糖和 D-木酮糖，均是糖代谢的中间产物。



D-核糖



D-2-脱氧核糖

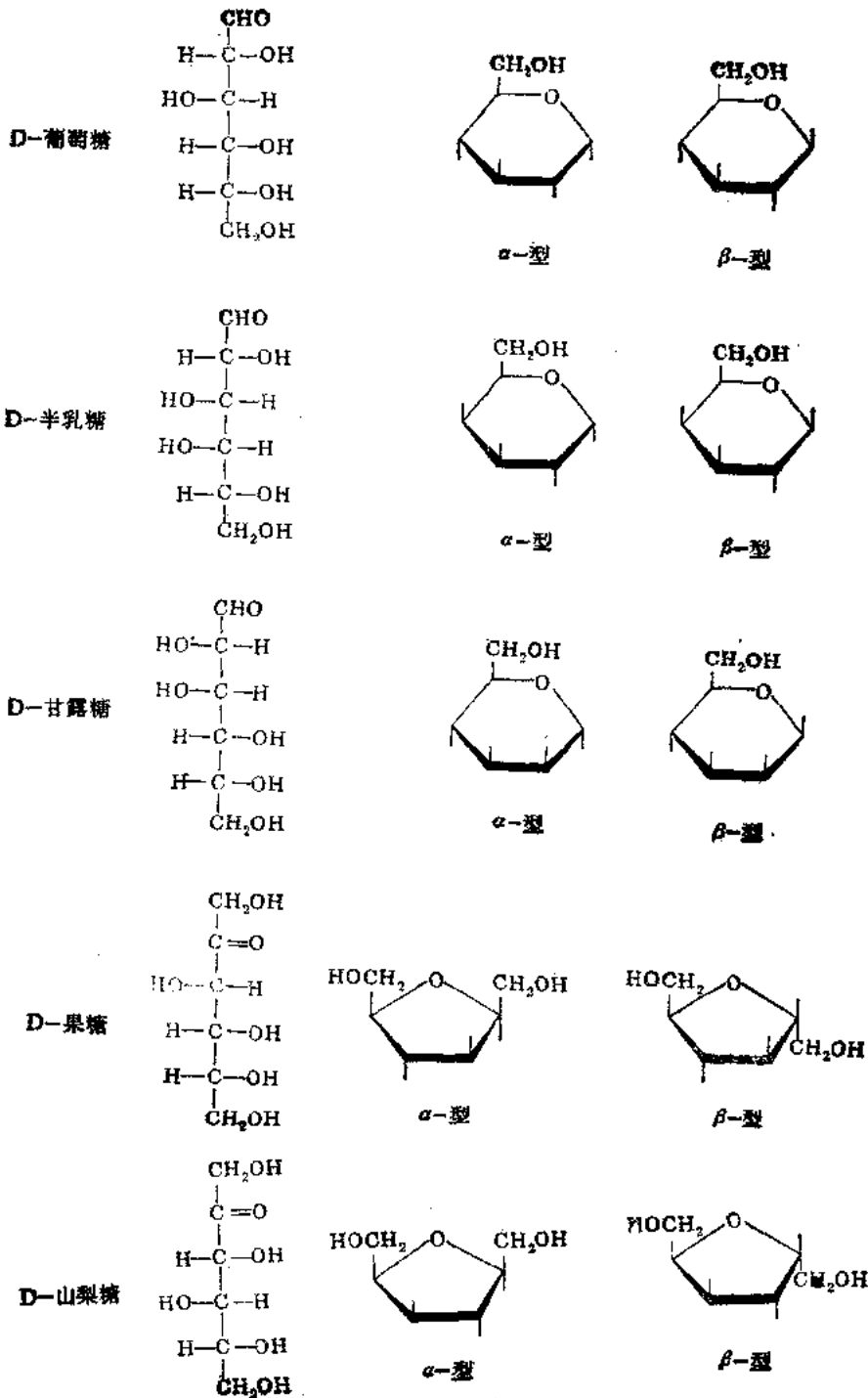


L-阿拉伯糖 广泛分布于植物界，是粘质、树胶、果胶物质与半纤维素的组成成分。其mp 160°C， $[\alpha]_D^{20}$ 为 +104.5°。酵母不能使其发酵。

D-木糖 它是植物粘质、树胶及半纤维素的组成成分。其熔点为 143°C， $[\alpha]_D^{20}$ 为 +18.8°。酵母不能使其发酵。

D-核糖及 D-2-脱氧核糖 它们是核酸的组成成分。它的衍生物核醇是某些维生素与辅酶的组成成分。核糖与脱氧核糖以呋喃型存在于天然化合物中。D-核糖的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -28.7° ，D-2-脱氧核糖的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -60° 。

4. 己糖 重要的己醛糖有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖，重要的己酮糖有 D-果糖、D-山梨糖。



D-葡萄糖(右旋糖) 广泛分布于生物界,其 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+52.5^\circ$ 。它是许多多糖的组成成分。酵母可使其发酵。

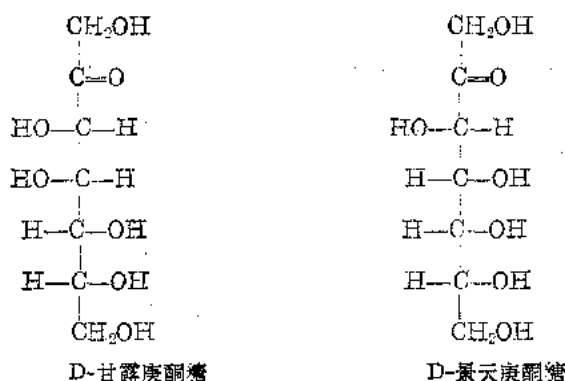
D-半乳糖 它是乳糖、蜜二糖、棉子糖、琼胶、粘质和半纤维素的组成成分。其熔点为 167°C , $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+80.2^\circ$ 。可被乳糖酵母发酵。

D-甘露糖 它是植物粘质与半纤维素的组成成分。其 $[\alpha]_D^{25}$ 为 $+14.2^\circ$ 。酵母可使其发酵。

D-果糖(左旋糖) 广泛分布于生物界。 C_2 为一酮基,故为酮糖。果糖也可以形成半缩醛,所以它也呈环状结构,也有变旋现象。果糖的 $[\alpha]_D^{25}$ 为 -92.4° 。酵母可使其发酵。果糖是糖类中最甜的糖。

D-山梨糖 是抗坏血酸合成的重要中间产物。其熔点为 $159-160^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25}$ 为 -43.4° 。

5. 庚糖 自然界存在的主要有 D-甘露庚酮糖和 D-景天庚酮糖。

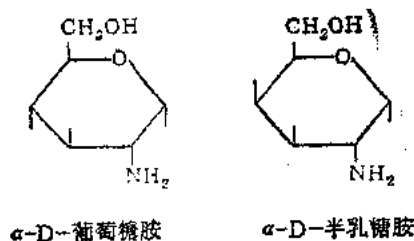


五、单糖的重要衍生物

1. 糖醇 溶于水及乙醇中,较稳定,有甜味,不能还原 Fehling 试剂。常见糖醇有甘露醇及山梨醇。甘露醇广泛分布于各种植物组织中。其熔点为 106°C , $[\alpha]_D^{25}$ 为 -0.21° 。海带中的甘露醇含量占干物质的 $5.2-20.5\%$ 。海带是制取甘露醇的原料。山梨醇在植物界分布也很广。其熔点为 97.5°C , $[\alpha]_D^{25}$ 为 -1.98° 。山梨醇氧化时可形成葡萄糖、果糖或山梨糖。

2. 糖醛酸(uronic acid) 由单糖的伯羟基氧化而得。其中最常见的是葡萄糖醛酸(glucouronic acid)。它是肝脏内的一种解毒剂。半乳糖醛酸存在于果胶中。

3. 糖胺(glycosamine) 又称氨基糖。糖分子中一个羟基为氨基所代替。自然界中存在的糖胺都是己糖胺。常见的是 D-葡萄糖胺,它存在于几丁质(即壳多糖, chitin)和粘液酸中。半乳糖胺是软骨组成成分软骨酸的水解产物



4. 糖苷 它主要存在于植物的种子、叶子及皮内。天然糖苷中有醇类、醛类、酚类、固醇和嘌呤等。它大多极毒，但微量糖苷可作药物。重要糖苷有能引起溶血的皂角苷(saponin)，有强心剂作用的毛地黄苷(digitalin)以及能引起葡萄糖随尿排出的根皮苷(phloridzin)。苦杏仁苷(amygdalin)也是一毒性物质。

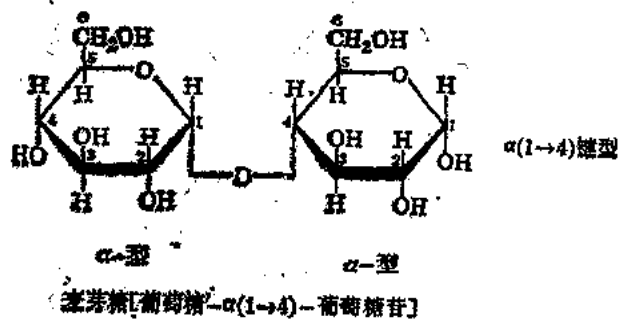
第二节 寡糖

寡糖是由比较少数分子的单糖(2—6个)缩合形成的糖。与稀酸共煮，寡糖可水解成各种单糖。寡糖中以双糖分布最为普遍，意义也较大。

一、双糖

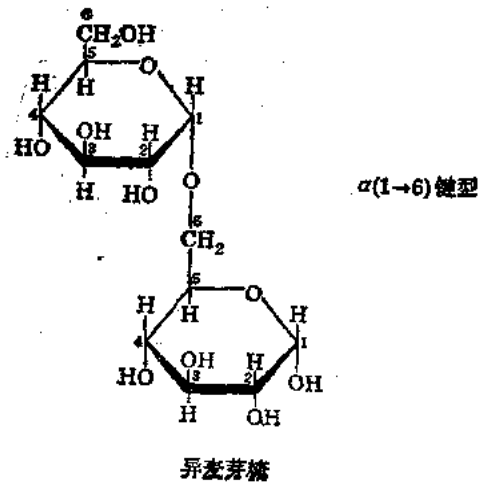
与日常生活密切相关的双糖有麦芽糖、蔗糖和乳糖，三者均易水解为单糖。

1. 麦芽糖 它大量存在于发芽的谷粒，特别是麦芽中。淀粉、糖原被淀粉酶水解也可产生少量麦芽糖。它是由两个葡萄糖分子缩合、失水形成的。其糖苷键型为 $\alpha(1\rightarrow4)$ 。

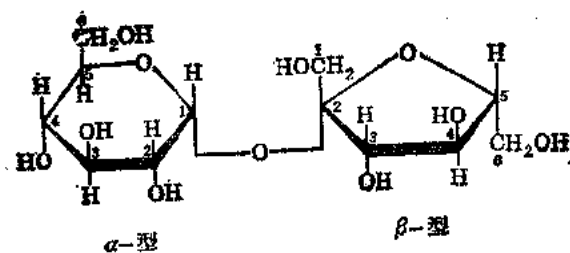


麦芽糖分子内有一个游离的苷羟基，能使 Fehling 试剂还原，所以具有还原性。它在水溶液中有变旋现象，其 $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+136^\circ$ ，且能成脎，极易被酵母发酵。

如两分子 α -D-葡萄糖按 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键型缩合、失水，则生成异麦芽糖(isomaltose)，它存在于分枝淀粉和糖原中。



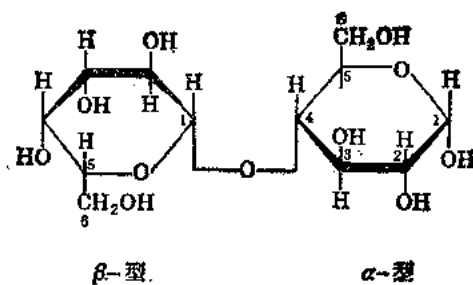
2. 蔗糖 日常食用的糖主要是蔗糖。甘蔗、甜菜、胡萝卜和有甜味的果实(如香蕉、菠萝等)里面都富含蔗糖。甘蔗含蔗糖约 20%。蔗糖是由 α -D-葡萄糖和 β -D-果糖各一分子按 $\alpha, \beta(1 \rightarrow 2)$ 键型缩合、失水形成的。它是植物机体糖的运输形式。



蔗糖[葡萄糖- $\alpha, \beta(1 \rightarrow 2)$ -果糖苷]

蔗糖很甜,易结晶,易溶于水,但较难溶于乙醇。若加热至 160°C ,便成为玻璃样的晶体,热至 200°C 便成棕褐色的焦糖。它没有游离醛基,无还原性。右旋, $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+66.5^{\circ}$ 。经水解后,由于水解产物果糖的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -92.4° 比另一水解产物,葡萄糖的 $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+52.2^{\circ}$ 的绝对值大,使水解液具有左旋性。

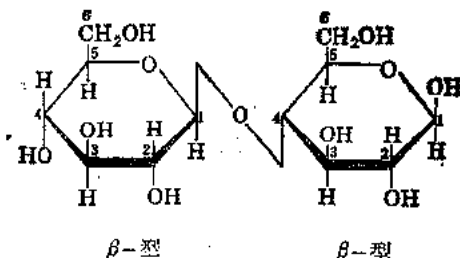
3. 乳糖 它是哺乳动物乳汁中主要的糖。牛乳含乳糖 4%,人乳含乳糖 5—7%,这是乳婴幼儿食物中唯一的糖。它是由 α -D-葡萄糖和 β -D-半乳糖各一分子以 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 键型缩合、失水形成的半乳糖苷。



乳糖[葡萄糖- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -半乳糖苷]

乳糖不易溶解,味不甚甜,具有还原性,且能成胶,纯酵母不能使它发酵,能被酸水解,右旋,其旋光率与葡萄糖的相近, $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+55.4^{\circ}$

4. 纤维二糖 它是纤维素的基本结构单位。水解纤维素可得到纤维二糖(cellobiose)。它由两个分子 β -D-葡萄糖按 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 键型相连而成。与麦芽糖不同,它是 β -葡萄糖苷。

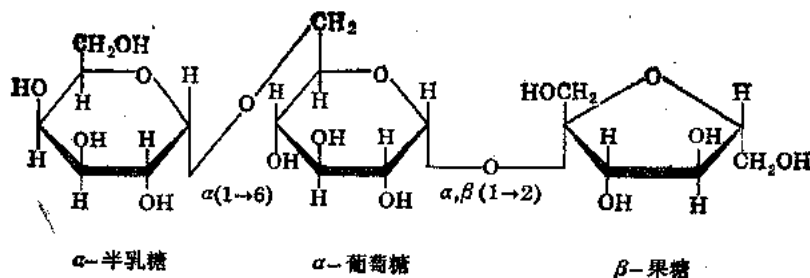


纤维二糖[葡萄糖- $\beta(1 \rightarrow 4)$ -葡萄糖苷]

二、三糖

以棉子糖(raffinose)为例。

棉子糖, $C_{18}H_{32}O_{16}$, 常见于许多植物, 尤其是棉子与桉树干性分泌物(甘露蜜)中。甜菜中也有棉子糖, 用甜菜制糖时, 糖蜜中含有大量棉子糖。棉子糖的水溶液 $[\alpha]_D^{20}$ 为 $+105.2^\circ$, 不能使 Fehling 试剂还原。与酸共煮时, 棉子糖即行水解, 生成葡萄糖、果糖和半乳糖各一分子。它的分子结构式为:



在蔗糖酶作用下, 由棉子糖中分解出果糖而留下密二糖; 在 α -半乳糖苷酶作用下, 由棉子糖中分解出半乳糖而留下蔗糖。

第三节 多 糖

多糖是由多个单糖分子缩合、失水而成的。它是自然界中分子结构复杂且庞大的糖类物质。按其功能来说, 某些不溶性多糖, 如植物的纤维素和动物的几丁质(即壳多糖), 可构成植物和动物骨架的原料; 另一些作为贮存形式的多糖, 如淀粉和糖原等, 在需要时, 可以通过生物体内酶系统的作用, 分解、释出单糖; 还有许多多糖, 具有更复杂的生理功能, 如粘多糖(mucopolysaccharide)、血型物质等, 它们在动物、植物和微生物中起着重要作用。

多糖可以由一种单糖缩合而成, 如戊糖胶(pentosan)、木糖胶, xylan; 阿拉伯糖胶(arabinan)、己糖胶(淀粉、糖原、纤维素等), 称为均一多糖(homopolysaccharide), 也可以由不同类型的单体缩合而成, 如结缔组织中的透明质酸, 称为不均一多糖(heteropolysaccharide)。

多糖在水溶液中不形成真溶液, 只能形成胶体, 没有甜味, 也无还原性, 有旋光性, 但无变旋现象。

一、均一多糖

1. 淀粉

淀粉几乎存在于所有绿色植物的多数组织中。光照下, 它在叶中积累; 长时间置黑暗下, 则降解供能。

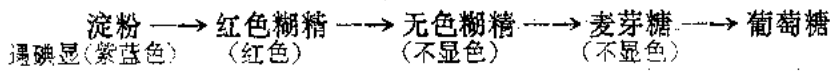
淀粉以显微镜下可见大小的颗粒大量存在于植物种子(如麦、米和玉米等)、块茎(如薯类)以及干果(如栗子、白果等)中, 也存在于植物的其他部位。它是植物营养物质的一种贮存形

表 1-5 几种主要农作物的淀粉含量(%)

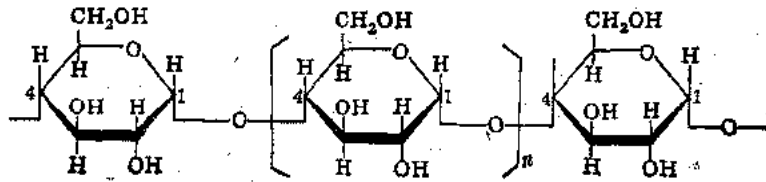
作物名称	淀粉含量
大麦(种子)	63.5
小麦(种子)	63.7—67.0
玉米(种子)	64.7—66.9
米	70—80
山芋	16.0
马铃薯	13.2—23

式。各种作物淀粉含量不同,就是同种作物,也因品种、气候、土壤等条件变化而有所不同(表 1-5)。

淀粉在酸和体内淀粉酶的作用下被降解,其最终水解产物是葡萄糖。这种降解过程是逐步进行的:



用热水溶解淀粉时,可溶的一部分为“直链淀粉”(amylose),另一部分不能溶解的为“支链



直链淀粉

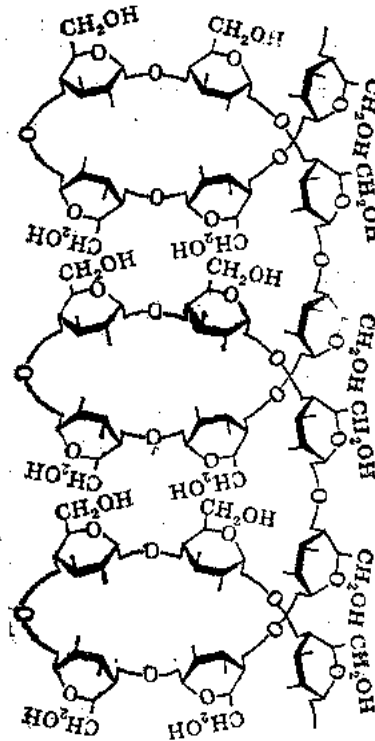
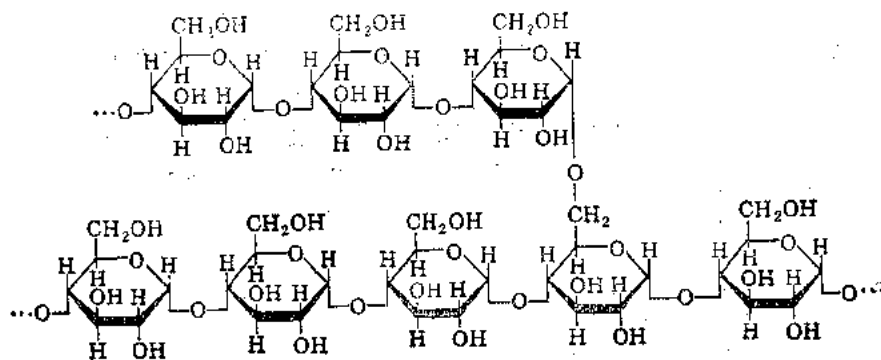


图1-6 直链淀粉的螺旋形结构

淀粉”(amylopectin)。

直链淀粉的分子量约在 $1.0 \times 10^4 - 2.0 \times 10^6$ ，相当于 250—300 个葡萄糖分子，以 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键型缩合而成。实验证明直链淀粉不是完全伸直的，而通常是卷曲成螺旋形，每一转有 6 个葡萄糖分子(图 1-6)。遇碘，直链淀粉形成螺旋形复合物，呈紫蓝色，碘位于其中心腔中，在 620—680 nm 间呈现最大光吸收。

支链淀粉中 α -D-葡萄糖结合方式，除主要以 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键外，还有 5—6% 存在于分支点处的 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 糖苷键，所以支链淀粉具有很多分支(图 1-7)。支链淀粉的分子较直链淀粉的大，其分子量 $5.0 \times 10^4 - 4.0 \times 10^5$ ，相当于由 6,000 个或更多的葡萄糖分子所组成。支链淀粉的分支短链的长度平均为 24—30 个葡萄糖残基。遇碘显紫红色，在 530—555 nm 呈现最大光吸收。



支链淀粉

一般淀粉都含有直链淀粉和支链淀粉。玉米淀粉、马铃薯淀粉分别含有 27% 和 20% 的直链淀粉，其余部分为支链淀粉。有的淀粉(如糯米)全部为支链淀粉，而有的豆类淀粉则全是直链淀粉。

淀粉与酸缓和地作用时(如 7.5% HCl，室温下放置 7 日)即形成所谓“可溶性淀粉”(soluble starch)，实验室常使用它。

淀粉除供食用外，在工业上用途也很广泛，如通过发酵造酒和通过水解制糖等。

2. 糖原

糖原是动物和细菌细胞内糖及其所反映的能源的一种贮存形式，其作用与淀粉在植物中的作用一样，故有“动物淀粉”之称。

它在高等动物组织内分布很广，肝脏和骨骼肌中贮量最为丰富，分别占它们湿重的 5% 和

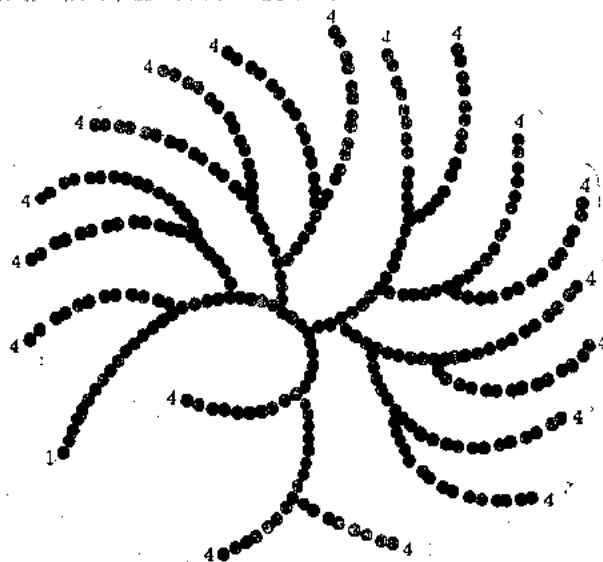


图 1-7 支链淀粉结构示意图

1%, 70 公斤体重的人肝和骨骼肌糖原量分别为 90 和 3 350 克。在肝脏中,有效葡萄糖过量时,即转化为肝糖原贮存;为维持血糖正常水平,肝糖原又可降解为葡萄糖。肝糖原的合成和分解依据血糖水平的高低。其他组织仅为自身功能利用糖原。

细菌生成条件受限制时或处于静止状态下,细菌发生糖原积累(假定培养基中碳源供应丰富)。细菌糖原用于供能和供碳, clostridia 种细菌,当开始形成孢子前,这些微生物可积累高达其干重 60% 量的糖原,但当孢子生成时,这种糖原迅速降解。

干燥状态下,糖原呈无定形粉末状。糖原与碘作用显棕红色,在 430—490 nm 下呈现最大光吸收。其结构与支链淀粉相似,主要是 α -D-葡萄糖,按 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键型缩合、失水而成,另有一部分支链可通过 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键连接。每个分枝平均长度相当于 12—18 个葡萄糖残基。在生物体内,它能酶促合成和降解。

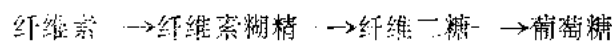
3. 纤维素

纤维素无疑是地球表面天然起源的,最丰富的有机化合物,它占植物界碳含量的 50% 以上。最纯的纤维素来源是棉花,它含高于 90% 的纤维素。

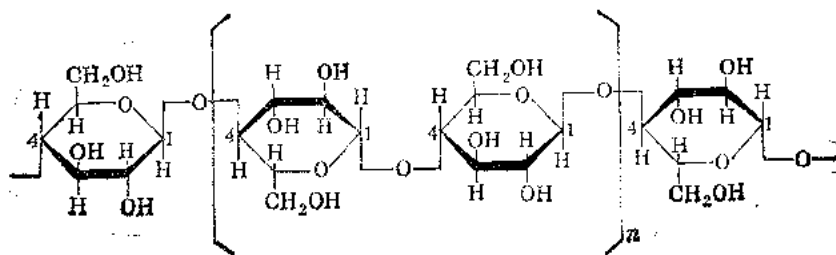
自然界纤维素主要来源是棉花、麻、树木、野生植物等等,此外还有很大一部分来源于各种作物的茎秆,如麦秆、稻草、高粱秆、甘蔗渣等。它是植物的支持组织。

通常纤维素、半纤维素和木质素总是同时存在于植物细胞壁中。

纤维素与淀粉一样也是一种复杂的多糖。其分子量介于 5.0×10^4 到 4.0×10^9 之间,大致相当于 8.0×10^3 — 1.0×10^4 个葡萄糖残基。不溶于水。它在酸的作用下发生水解,经过一系列中间产物,最后形成葡萄糖。



实验证明,纤维素是由许多 β -D-葡萄糖分子以 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连接而成的直链。直链间彼此平行。链间葡萄糖的羟基之间极易形成氢键,再加上半纤维素、果胶 (pectin) 木质素 (lignin) 的粘合作用,使得完整的纤维具有高度不溶于水的性质。



纤维素个体链

纤维素经弱酸水解可得纤维二糖。在浓硫酸(低温)或稀硫酸(高温和高压)中水解木材废料,可以产生约 20% 的葡萄糖。

除反刍动物胃外,一般动物胃无纤维素酶,不能消化纤维素。

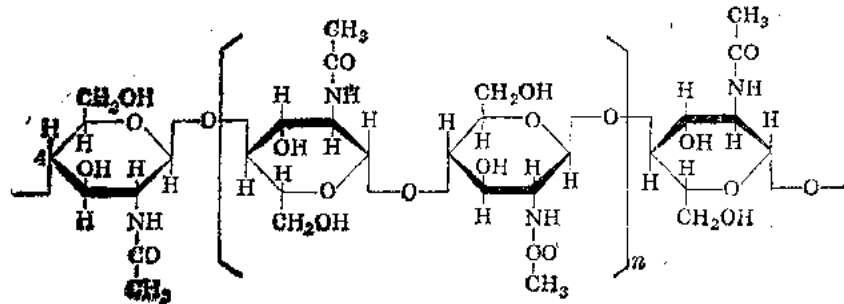
纯净的纤维素是无色无臭、无味的物质。

4. 半纤维素 大量存在于植物木质化部分,包括很多高分子的多糖。用稀酸水解则产生己糖和戊糖,所以它是多聚戊糖(如多聚阿拉伯糖、多聚木糖)和多聚己糖(如多聚半乳糖和多

聚甘露糖)的混合物。

5. 几丁质(壳多糖)

它是包括有 N-乙酰-D-葡萄糖胺, 以 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键型缩合、失水形成的线性均一多糖。由于其结构与纤维素的很相似, 它的功能也与纤维素的相似。它是某些无脊椎动物(如虾等)外骨骼主要有机结构组分。其个体链结构如下:



几丁质个体链

表 1-6 五种均一多糖分子结构、物理化学性质与自然界分布

	直链淀粉 (淀粉)	支链淀粉 (淀粉)	糖 原	纤维素	几丁质 (壳多糖)
1. 单体单位	α -D-葡萄糖			β -D-葡萄糖	β -2,6-二乙酰葡萄糖胺
2. 单体数目	$60-6.0 \times 10^3$ (250-300)	$3.0 \times 10^2-1.0 \times 10^4$ (6.0×10^2)	$6.1 \times 10^2-5.6 \times 10^6$ ($1.7 \times 10^3-1.2 \times 10^6$) [*]	$3.0 \times 10^2-1.5 \times 10^4$ ($8.0 \times 10^2-1.0 \times 10^4$)	850(?)
3. 分子量	$1.0 \times 10^4-2.0 \times 10^6$ ($5.0 \times 10^5 \pm$)	$5.0 \times 10^4-4.0 \times 10^8$ (1.0×10^6)	$1.0 \times 10^5-9.0 \times 10^8$ ($2.7 \times 10^5-1.0 \times 10^8$)	$3.0 \times 10^4-1.0 \times 10^6$ ($5.0 \times 10^4-4.0 \times 10^5$) [*]	$5.0 \times 10^3-9.0 \times 10^4$ (50)
4. 糖苷键型	$\alpha(1\rightarrow4)$	$\alpha(1\rightarrow4)$ 和 $\alpha(1\rightarrow6)$		$\beta(1\rightarrow4)$	
5. 分支	无	$\approx 4\%$	$\approx 9\%$	无	
6. 旋光率			$[\alpha]_D^{20} +196^\circ$ $-+197^\circ$		$[\alpha]_D^{20} -14^\circ$ $\rightarrow 56^\circ$ (HCl)
7. 溶解度	溶于热水(70-80°C)	热水不溶	溶于水	水不溶	绝大部分溶剂不溶
8. 与碘反应	紫蓝色	紫红色	棕红色	—	—
9. 主要功能	食 物 贮 存			参 照 结 构 建 筑	
10. 存在形式	各种白色微粒		白色粉末	白色微晶形等	不定形固体
11. 自然界分布	整个植物界, 特别是玉米、土豆和米		动物肝、肌肉和细菌	整个植物界	低等动物外骨骼、植物

说明: 上述五种多糖包有单体数目和分子量数值, 各书报导不一。归结原因, 多种多样。参考近 20 本专著和工具书报导数值, 给予数量范围, 以资对比分析, 这是可行的。一般反映平均或集中数值的括号内数值(除带*者外)均引自《糖类的生物化学》(吴东儒主编), 高等教育出版, 1987。

6. 其他

(1) 菊糖 也称为菊粉(inulin), 它是多聚果糖, 主要存在于菊科植物的根部。

(2) 琼脂(agar) 是某些海藻(如石花菜属)所含的多糖物质, 主要成分是多聚半乳糖, 含

硫及钙。它是微生物培养基组分,也是电泳、免疫扩散的支持物之一。食品工业中常用来制造果冻、果酱等。1-2%的琼脂在室温下便能形成凝胶。

(3) 多聚木糖 也称为木糖胶(xylan),它是高分子量的吡喃型木糖多聚物,通常通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连接,以半纤维素为主要成分存在于所有植物中。

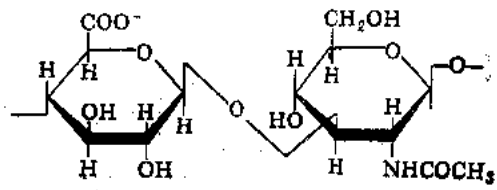
7. 现对几类多糖的分子结构和某些性质作一比较,如表 1-6。

二、不均一多糖

糖胺聚糖(glycosaminoglycan),又称为糖胺多糖、粘多糖(mucopolysaccharides)、氨基多糖、酸性糖胺聚糖等。糖胺聚糖通过共价键与蛋白质相连接构成蛋白聚糖(proteoglycans)。这类物质存在于软骨、腱等结缔组织中,构成组织间质。各种腺体分泌的润滑粘液,多富有粘多糖。它在组织成长和再生过程中,在受精过程中以及机体与许多传染病原(细菌、病毒)的相互作用上都起着重要作用。其代表性物质有透明质酸(hyaluronic acid)、软骨素4-或6-硫酸(chondroitin 4-or 6-sulfate)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)、肝素(heparin)及硫酸乙酰肝素等。分述如下:

1. 透明质酸

透明质酸是糖胺聚糖中结构最简单的一种,它的结构中含有重复的二糖结构单位如下:



透明质酸
(hyaluronate)

在高等动物组织中发现的粘多糖唯有透明质酸同时存在于某些细菌中,如A型链球菌。其主要功能是在组织中吸着水,具有润滑剂的作用。它广泛分布于哺乳动物体内,特别是滑液、玻璃样体液中,也存在于关节液、疏松结缔组织、脐带、皮肤、动脉管壁心脏瓣膜、角膜以及雄鸡冠中。

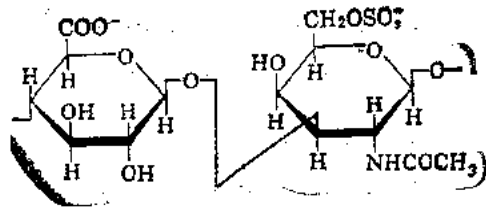
在具有强烈侵染性的细菌、迅速生长的恶性肿瘤以及蜂毒和蛇毒中含有透明质酸酶(hyaluronidase),能引起透明质酸分解,因此搞清楚透明质酸和透明质酸酶在病理过程中的作用,在临床上是很有价值的。

关于透明质酸的存在形式,长期以来都认为它是通过共价键与蛋白质相连接,以蛋白聚糖形式存在。最近有资料表明,透明质酸可能以蛋白聚糖形式在体内合成,再裂解释出,成为不含蛋白质的产物。

2. 硫酸软骨素

分为软骨素-4-硫酸与软骨素-6-硫酸两类。两者间,除硫酸基位置不同,红外光谱差别较明显外,其他许多物理、化学性质都较接近。

硫酸软骨素也含有重复的二糖单位,以软骨素-6-硫酸为例其结构单位如下:



软骨素-6-硫酸
(chondroitin-6-sulfate)

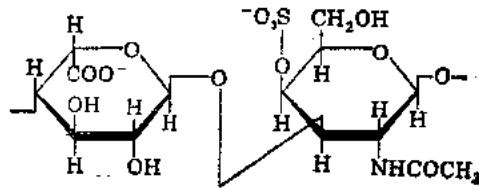
软骨素-4-硫酸 猪和牛的软骨及马鼻中隔含量可多达 35—40%；也存在于皮肤、角膜、巩膜、骨、脐带、尿、血浆、白细胞、血小板和软骨瘤中。

软骨素-6-硫酸 存在于脐带、腱软骨、心脏瓣膜和唾液等中。

上述纯 4-或 6-硫酸软骨素较少见，一般同一分子中呈混合型硫酸酯结构，既含 4-硫酸又含 6-硫酸两种形式同时存在。

3. 硫酸皮肤素

硫酸皮肤素最初是从猪皮中分离出来，后发现它存在于许多动物组织，如猪胃粘膜、脐带、肌腱、脾、脑、心瓣膜、巩膜、肠粘膜、关节囊、纤维性软骨等中。它的结构与性质都与硫酸软骨素的相似，其二糖单位结构如下：

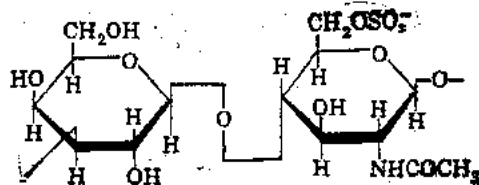


硫酸皮肤素
(dermatan sulfate)

4. 硫酸角质素

首先从角膜的蛋白水解液中分离出来，后证明它也存在于人的主动脉和人、牛的髓核中。婴儿几乎不含硫酸角质素，随着年龄的增大逐渐增加，直到 20—30 岁时，它的含量约占肋软骨中粘多糖总量的 50%。

硫酸角质素的重复二糖单位结构如下：

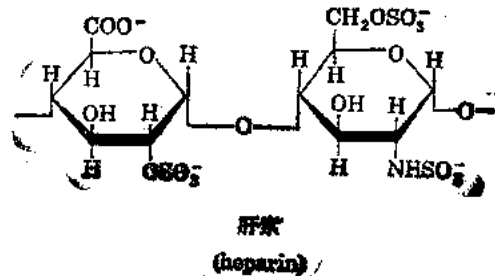


硫酸角质素
(keratan sulfate)

5. 肝素

肝中肝素含量最为丰富,因此得名。实际上,它广泛分布于哺乳动物组织和体液中。猪胃粘膜中含量十分丰富,肺、脾、肌肉和动脉壁肥大细胞中肝素含量也很高。

肝素的二糖结构单位如下。除二糖重复单位外还含有糖醛酸分子。



肝素的生物意义在于它具有阻止血液凝固的特性。目前输血时,广泛以肝素为抗凝剂,临床上也常用于防止血栓形成。

6. 硫酸乙酰肝素

大多数细胞(如肝、肺的)都能产生硫酸乙酰肝素。它是许多细胞表面的一种普遍组分,也存在于细胞外介质中。它在结构上虽与肝素相似,都含有同样的重复寡糖单位,只是被修饰的程度不同,例如其硫酸化的程度比肝素低。平均一个二糖单位含一个硫酸基团。硫酸乙酰肝素也有抗凝血活性,但比肝素的低得多。

糖胺聚糖的某些物理常数如表 1-7。

表 1-7 糖胺聚糖某些物理常数

糖 胺 聚 糖	分 子 量 $\times 10^3$	电 荷 数 双糖衍生物	旋 光 率 [α] _D	特 性 粘 度
透明质酸	4,000—8,000	1.0	-68°	2.0—4.8
软骨素-4-硫酸	5—50	1.1—2.0	-26°—-30°	0.2—1.0
软骨素-6-硫酸	5—50	1.2—2.3	-12°—-22°	0.2—1.3
硫酸皮肤素	15—40	2.0—2.2	-55°—-63°	0.5—1.0
硫酸角质素	4—19	0.9—1.8	+4.5°	0.2—0.5
肝素	4—16	3—4	+48°	0.1—0.2
硫酸乙酰肝素	50	1.1—2.8	+39°—+69°	—

第四节 结 合 糖

糖与非糖物质如脂类或蛋白质共价结合,分别形成糖脂(glycolipids),糖蛋白(glycoproteins)和蛋白聚糖(proteoglycans)。总称为结合糖或复合糖。有关糖脂情况将在下章叙述。

糖与蛋白质之间,以蛋白质为主,其一定部位以共价键与若干糖分子链相连所构成的分子称为糖蛋白;其总体性质更接近蛋白质;其中糖含量变化很大,如免疫球蛋白 G 糖含量仅占

4%，人红细胞膜糖蛋白和血型糖蛋白(glycophorin)含糖60%，而人胃糖蛋白含糖量竟高达82%；特别是这些糖链不呈现双糖系列重复，如上述粘多糖那样结构。与糖蛋白相比，蛋白聚糖的糖是一种长而不分支的多糖链，即糖胺聚糖，其一定部位上与若干肽链连接，糖含量可超过95%，多糖呈现系列重复双糖结构。其总体性质与多糖更相近。

一、糖蛋白

糖蛋白多肽链常携带许多短的杂糖链。它们通常包括N-乙酰己糖胺和己糖(常是半乳糖和/或甘露糖，而葡萄糖竟较少)。该链末端成员常常是唾液酸(sialic acid)或L-岩藻糖(L-fucose)。这种寡糖链常分支，很少含多于15个单体的，一般含2—10个单体，分子量相当于540—3,200。糖链数目也变化很大。

寡糖链与多肽链(蛋白质)中的氨基酸以多种形式共价连接，构成糖蛋白的糖肽连接键，简称糖肽键，糖肽连接键的类型可概括如下：

1. 以丝氨酸、苏氨酸和羟赖氨酸的羟基为连接点，形成-O-糖苷键型；
2. 以天冬酰胺的酰胺基、N-末端氨基酸的 α -氨基以及赖氨酸或精氨酸的 ω -氨基为连接点，形成-N-糖苷键型；
3. 以天冬氨酸或谷氨酸的游离羧基为连接点，形成酯糖苷键型；
4. 以羟脯氨酸的羟基为连接点的糖肽键；
5. 以半胱氨酸为连接点的糖肽键。

糖蛋白在植物和动物(微生物并不如此)中较为典型。这些糖蛋白可被分泌、进入体液或作为膜蛋白。它们包括许多酶、大分子蛋白质激素、血浆蛋白、全部抗体、补体因子、血型物质和粘液组分以及许多膜蛋白。

由于糖蛋白的高粘度特性，机体用它作为润滑剂，防护蛋白水解酶的水解作用，以及防止细菌、病毒的侵袭。在组织培养时对细胞粘着和细胞接触抑制起作用。对外来组织的细胞识别也有作用。也与肿瘤特异性抗原活性的鉴定有关。如正常时仅在胎儿和新生儿肝中存在的一种糖蛋白，即胎甲球蛋白(fetuin)，若在成年人血清中发现此种糖蛋白即可基本上确诊为肝癌患者。糖蛋白也是病毒、植物凝集素(plant agglutinins)以及血型物质的基本组分。 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、血红蛋白和甲状腺素转运蛋白也是糖蛋白。某些糖蛋白似乎是膜载体蛋白。促性腺激素的糖部分对它们的生物活性是必要的。选择性地移去许多末端唾液酸可使该激素失活，人们认为糖起受体识别标志作用。南极鱼Trematodes血中存在一种最不寻常的抗冷冻糖蛋白。

现集中介绍有关血浆和粘液糖蛋白：

1. 血浆糖蛋白 这类糖蛋白的生理与临床意义很大，研究较多，其中某些糖蛋白研究得比较清楚。

血浆经电泳后，除清蛋白外，其他部分 α_1 、 α_2 、 β 和 γ 球蛋白以及纤维蛋白原都含有糖。糖分以唾液酸、葡萄糖胺、半乳糖和甘露糖为多，也有少量半乳糖胺和岩藻糖。它们全掺入高分子糖蛋白中，例如血浆中有80 mg%的葡萄糖胺全掺入糖蛋白分子中，而无游离形式存在。重

表1-8 人血浆糖含量及其分子组成

糖蛋白	血清中含量 mg/100 ml	糖 (%)					蛋白质 (%)	
		己糖	己糖胺	唾液酸	岩藻糖	总糖 ^a	氮	双缩脲法测得蛋白质
前清蛋白	30	1.1	0.15	0	0	1.3	—	96
α_1 -酸性糖蛋白	75	15.0 ^b	19.0 ^{b,c}	12	1.0 ^b	41.0 ^d	10.1	63 ^b
α_1 -3.5S-糖蛋白	30	4.7	3.9	3.5	0.2	12.3	13.3	86
α_2 - κ -糖蛋白	—	8.0	8.0	6.0	0.7	22.7	—	75
铜蓝蛋白	30	3.0	1.9	2	0.18	7.1	13.8	95
触珠蛋白	100	7.8	5.3	5.3	0.2	18.6	12.9	81
α_2 -巨球蛋白	240	5.3	3.8	—	—	—	—	98
小 α_2 -球蛋白	—	5.0	3.5	7.0	—	15.5 ^d	12.6	80
凝血酶原(牛)	—	4.6	2.3	4.2	0.09	11.2	14.7	85
α_2 -酸性糖蛋白	—	12.0	13.0	17.0	0.6	42.6	—	—
Gc-组分	—	2.0	2.0	0	0.2	4.2	—	96
α_2 -HS-糖蛋白	—	5.2	3.6	4.1	0.2	13.1	—	—
Homopoxin	—	9.0	7.4	5.3	0.4	22.6	—	80
转铁蛋白	400	2.4	1.6	1.4	0.07	5.5	15.4	95
β_2 A-球蛋白	—	4.9	3.7	—	—	—	16.2	—
纤维蛋白原	—	3.2	1.0	0.8	0	5.0	16.7	—
β -糖蛋白	—	6.7	5.8	4.4	0.2	17.1	—	82
γ -7S-球蛋白	1,480	1.2	1.4 ^c	0.22	0.29	3.1	15.64	97
γ -10S-球蛋白	—	5.2	2.9	1.7	0.62	10.4	14.57	—

上表综合了24篇文献资料, α_2 -巨球蛋白依据 Brown 结果。

注: a. 己糖、己糖胺、唾液酸和岩藻糖之总和

b. 几个发表数字的组合

c. 仅葡萄糖胺

d. 不包括岩藻糖

要血浆糖蛋白血清含量及其分子组成如表1-8。

血浆糖蛋白中,具有运输功能的有:运输铜的铜蓝蛋白,运输铁的转铁蛋白,运输血红蛋白的触珠蛋白,运输甲状腺素的甲状腺素结合蛋白。参预凝血过程的有凝血酶原和纤维蛋白原。

肝实质性障碍时,血浆糖蛋白量减少。而在胆汁性肝硬变症和肝癌情况下却增加。

2. 粘液糖蛋白 它存在于消化道分泌物(如唾液、胃液、肠液、胰液和胆汁)和呼吸道分泌物(如痰液)中,呈粘稠性,这些粘液全含高浓度的糖蛋白。

牛颞下腺唾液糖蛋白的糖组成比较简单,大体上由等分子数的唾液酸和N-乙酰半乳糖胺组成,它占糖分的80%。

人的胃液、唾液和卵巢囊肿的粘液和红细胞中,有所谓血型物质,它包含约75%的糖,主要是岩藻糖、半乳糖、葡萄糖胺和半乳糖胺。含糖部分决定血型物质的特异性。A、B和C型的红细胞表面上存在有参预各个血型决定的特异结构。

二、蛋白聚糖

蛋白聚糖已在不均一多糖一节中进行了讨论。这是一类结构极为复杂,由蛋白质和糖胺

聚糖通过共价键相连的化合物。糖胺聚糖具有粘稠性,所以蛋白聚糖过去曾被称为粘蛋白、粘多糖-蛋白质复合物、软骨粘蛋白等。

在过去很长一段时间内蛋白聚糖的研究进展很慢,主要困难在于: 1. 用一般抽提蛋白质的方法很难得到分离; 2. 分子量很高且是不理想的溶液,难以用经典物理化学方法测定其分子大小和形状; 3. 大多数制剂的分子大小具有高分散性,分子量可相差 10 倍之多; 4. 具有明显的不均一性,这种不均一性来自多肽链长度和多糖链的数目和分布上的差别。由于多糖链链长和硫酸基团分布上的差别,也存在微观不均一性。直至本世纪 60 年代末 70 年代初,由于分离技术的改进,对蛋白聚糖的研究才取得了突破性的进展。

在温和条件下,以 4 摩尔氯化胍(guanidine chloride)溶液从软骨中成功地提取出蛋白聚糖。从所得蛋白聚糖测得其沉降系数为 16S,分子量为 1.6×10^6 。在该组织中,蛋白聚糖以巨大分子聚集体存在(沉积系数 70S 和 600S)。

完整的蛋白聚糖不仅分子量大,而且在溶液中呈高度伸展的状态,这主要是由于糖胺聚糖分子高度解离所形成的固定负电荷,促使同一链中相邻片段互相排斥的结果。以透明质酸为例,它的流体动力学体积较未水化的分子所占的空间大一千倍。这表明透明质酸在溶液中具有一种伸展的随机卷曲的构象。

在蛋白聚糖中已知有三种不同类型的糖肽键: 1. D-木糖与丝氨酸羟基之间形成的-O-糖肽键; 2. N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺之间形成的-N-糖肽键; 3. N-乙酰半乳糖胺与苏氨酸或丝氨酸羟基之间所形成的-O-糖肽键。木糖-丝氨酸连接键是结缔组织蛋白聚糖所特有的。

在蛋白聚糖的分子结构中,蛋白质分子居于中间,构成一条主链,称为核心蛋白,糖胺聚糖分子排列在蛋白分子的两侧。这种结构称为蛋白聚糖的“单体”。单体的糖胺聚糖链的分布是不均匀的。因此根据功能和结构的不同,核心蛋白又可以划分为不同的区域,本章不作详细介绍。

多糖研究的突破性发展使它在近代生物化学中成为活跃的领域。特别对多糖结构与功能的研究向分子生物学提出了新的挑战。

提 要

糖是具有实验式 $(CH_2O)_n$ 的多羟基醛或酮,它分为单糖、寡糖、多糖和结合糖四类。

单糖 丙糖中的醛糖是甘油醛,它有一个不对称碳原子,故其构型有 D-甘油醛和 L-甘油醛之分。凡可视为 D-甘油醛衍生物的糖都是 D 糖; 凡可视为 L-甘油醛衍生物的糖都是 L 糖。丙糖中的酮糖为二羟基丙酮。

自然界中的单糖多为醛糖,其中以己糖最普遍、最重要,戊糖次之。己醛糖中的葡萄糖分布最广,是构成淀粉、糖原、纤维素及其他许多糖类物质的基本单位;且是人类血液中的正常成分,给机体提供能量的重要物质。

己糖多以比较稳定的 1:5 氧桥的六元环结构存在。在溶液中,六元环结构己糖常与极少量 1:4 氧桥五元环结构糖成平衡状态,前者称为吡喃型己糖,后者称为呋喃型己糖。戊糖以呋

喃型结构存在。在环状结构中,戊糖、己糖分别含有四个和五个不对称碳原子,它们分别有 2^4 即16, 2^5 即32种同分异构体。每种糖又依据第一碳原子上羟基和氢的相对空间位置分为 α 和 β 型两类,它们互为异头物。

单糖具有旋光性,其旋光度可借旋光仪测得,并计算得到旋光率。它能与酸、碱起作用,不同条件下氧化产生不同类型的酸。它会被还原成醇。有成酯、成糖苷和成脎、成脞反应,常借助这些反应分析、鉴定糖。

单糖中的酮糖,与醛糖相同,亦具有环状结构,其五元环即呋喃型糖较常见。

寡糖 最重要的是双糖。双糖中常见的是蔗糖、乳糖和麦芽糖。蔗糖分子中的葡萄糖和果糖经醛、酮基缩合,失去还原、成脎、变旋等特性。而麦芽糖分子由两分子葡萄糖,乳糖分子由葡萄糖、半乳糖各一分子通过1,4糖苷键连接起来。二者仍有一个自由醛基,也即半缩醛基,故有还原、成脎、变旋等性质。

多糖 种类甚多,以淀粉、糖原和纤维素最为常见。淀粉是植物贮存的养料,是人类食物中的主要成分,有直链、支链之分,葡萄糖分子间多是 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键,而其分支点上则是 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键,无变旋现象,亦无还原、成脎反应,遇碘液呈紫蓝色反应。能为酸或淀粉酶所水解。糖原是动物组织,如肝和肌肉中贮存的养分,其分子量较淀粉的略大,分支较支链淀粉略多,且较易溶于水,遇碘液呈棕红色外,其他性质与淀粉的大致相似。纤维素是构成植物躯干的主要成分,它由许多 β -D-葡萄糖分子通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键缩合生成,其分子甚大,故不溶于水、稀酸、稀碱及其他普通有机溶剂中。

糖胺聚糖 为含氮多糖。有透明质酸、硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素及硫酸乙酰肝素之分,存在于软骨、腱等结缔组织和各种腺体分泌的粘液中,有构成组织间质、润滑剂、防护剂等多方面作用。

结合糖 是糖与非糖物质的结合物,常见的是与蛋白质的结合。两者间,在含量和总体组成、结构上,蛋白质为主连接以若干糖分子,称糖蛋白。以糖,即糖胺聚糖为主,连接有若干肽链的称蛋白聚糖。前者主要存在于血浆、消化道和呼吸道分泌物以及膜、尿等中,后者主要存在于软骨、腱和各种粘液中。它们的作用是多种多样的,是机体不可缺少的。

多糖研究近20年来取得了突破性的进展,并成为近代生物化学中一个新兴的活跃领域。

习 题

1. 简述糖的分类;哪些糖对人类营养较为重要?
2. 在糖的名称之前附有“D”或“L”、“+”或“-”以及“ α ”或“ β ”,它们有何意义?什么称为变旋现象?什么称为旋光度、旋光率?如何测定?
3. 麦芽糖水溶液的旋光率为 $+138^\circ$,在旋光管长10cm下观察到旋光度为 $+23^\circ$,求测试的麦芽糖浓度(g/100ml)。
4. 举例说明何谓异头物?何谓差向异构体?

5. 葡萄糖分子结构是如何通过实验确立下来的?
6. 写出下列糖及其衍生物的 Haworth 结构式
(a) 半乳糖 (b) 甘露糖 (c) 果糖 (d) 核糖 (e) 葡萄糖-6-磷酸 (f) 葡萄糖醛酸
(g) 葡萄糖酸 (h) 1-甲基 α -D-葡萄糖苷
7. 试想单糖有哪些重要性质? 你如何去理解和记忆这些性质?
8. 蔗糖、乳糖和麦芽糖的化学组成、结构特点和鉴定方法。
9. 淀粉、糖原和纤维素及几丁质化学组成如何? 其结构和性质有何异同?
10. 举例说明某些粘多糖的化学组成及生物功能。
11. 举例说明糖蛋白、粘蛋白及蛋白聚糖, 并简述它们的分子结构及生物功能。

主要参考书

1. 吴东儒《糖类的生物化学》, 14—32, 303—360, 628—665, 687—712 高等教育出版社, 1987。
2. Lehninger, A. L., Principles of Biochemistry, 277—301, Worth Publishers, Inc., New York. 1982.
3. Stryer, L., Biochemistry, 331—348, W. H. Freeman and Co., New York. 1988.
4. Bohinski, R. C., Modern Concepts in Biochemistry, 198—223, 4th edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston. 1983.
5. Devlin, T. M., Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 103—106, 344—352, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York. 1982.
6. Smith, E. L., Principles of Biochemistry, General Aspects, 83—106, 7th edition, McGraw-Hill Book Co., New York. 1983.
7. Zubay, G., Biochemistry, 437—460, Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Massachusetts. 1983.
8. Aspimall, G. O., The Polysaccharides, vol. 3, 161—162, 214—226, 284—292, 338—345, Acad. Press, New York. 1985.
9. Jakubke, H. D. et al, Concise Encyclopedia of Biochemistry, Walter de Gruyter, Berlin. 1983.
10. 今堀和友等, 《生化学辞典》, 东京化学同人, 1983。

李建武

第二章 脂 类

脂类包括的范围很广,这些物质在化学组成和化学结构上也有很大差异,但是它们都有一个共同的特性,即不溶于水,而易溶于乙醚、氯仿、苯等非极性溶剂中。用这类溶剂可将脂类物质从细胞和组织中萃取出来。脂类的这种特性,主要是由构成它的碳氢结构成分所决定的。

脂类具有重要的生物功能,它是构成生物膜的重要物质,几乎细胞所含有的磷脂都集中在生物膜中。脂类物质,主要是油脂,是机体代谢所需燃料的贮存形式和运输形式。脂类物质也可为动物机体提供溶解于其中的必需脂肪酸和脂溶性维生素。某些萜类及类固醇类物质,如维生素 A、D、E、K、胆酸及固醇类激素具有营养、代谢及调节功能。在机体表面的脂类物质有防止机械损伤与防止热量散发等保护作用。脂类作为细胞的表面物质,与细胞识别,种特异性和组织免疫等有密切关系。具有生物活性的某些维生素和激素也是脂类物质。

脂类可按不同组成分类。通常将之分为五类,即

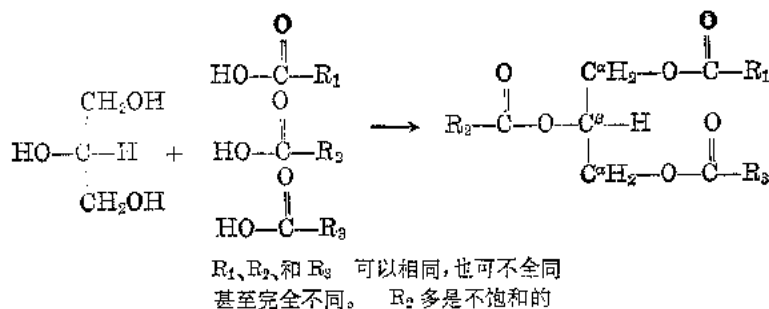
1. 单纯脂 是脂肪酸和醇类所形成的酯,其中甘油三酯通称油脂,系甘油的脂肪酸酯,而蜡则是高级醇的脂肪酸酯;
2. 复合脂 除醇类、脂肪酸外,尚含有其他物质。如甘油磷脂类,含有甘油、脂肪酸、磷酸和某种含氮物质。又如鞘磷脂类,由脂肪酸、鞘氨醇或其衍生物、磷酸和某种含氮物质组成;
3. 萜类和类固醇及其衍生物,一般不含脂肪酸;
4. 衍生脂系指上述脂类物质的水解产物,如甘油、脂肪酸及其氧化产物,乙酰 CoA;
5. 结合脂类,即脂分别与糖或蛋白质结合,依次形成的糖脂和脂蛋白。

也有人认为比较理想的分类方法是根据构成脂类的主要成分,即脂肪酸存在与否进行分类。简单脂类(不含结合脂肪酸的脂类),如萜类、固醇类化合物和前列腺素类;复合脂类(与脂肪酸结合的脂类),如脂酰甘油酯类、磷酸甘油酯类、鞘磷脂类及蜡。

第一节 脂酰甘油类

脂酰甘油(acyl glycerols),又可称为脂酰甘油酯(acyl glycerides),即脂肪酸和甘油所形成的酯。根据参与产生甘油酯的脂肪酸分子数,脂酰甘油分为单脂酰、二脂酰和三脂酰甘油三类。三脂酰甘油(triacylglycerols),又称为甘油三酯(triglycerides)是脂类中含量最丰富的一大类,其结构如下:

• • •



它是甘油的三个羟基和三个脂肪酸分子缩合、失水后形成的酯。单脂酰甘油(monoacylglycerols)和二脂酰甘油(diacylglycerols)自然界少见。

甘油三酯(三脂酰甘油)是植物和动物细胞贮脂(depot lipids)的主要组分。一般在室温下为液态的称为油(oils),在室温下为固态的称为脂(fats),有时也统称为油脂或中性脂。

一、脂肪酸

在组织和细胞中,绝大部分的脂肪酸是以结合形式存在的,以游离形式存在的脂肪酸数量极少。从动、植物和微生物中分离的脂肪酸已有百种以上。

所有的脂肪酸都有一长的碳氢链,其一端有一个羧基。碳氢链以线性的为主,分枝或环状的为数甚少。碳氢链有的是饱和的,如软脂酸(palmitic acid)、硬脂酸(stearic acid)等;有的碳氢链含有一个或几个双键,为不饱和脂肪酸如油酸(oleic acid)、亚油酸(linoleic acid)和亚麻酸(linolenic acid)等。不同脂肪酸之间的区别主要在于碳氢链的长度,饱和与否,以及双键的数目和位置。

脂肪酸常用简写法表示。简写法的原则是:先写出碳原子的数目,再写出双键的数目,最后表明双键的位置。如

软脂酸 16:0 表明软脂酸含 16 碳原子,无双键;

油酸 18:1(9) 或 18:1⁴⁹ 表明油酸为具有 18 个碳原子,在第 9—10 位之间有一个不饱和双键的脂肪酸;

花生四烯酸 20:4(5, 8, 11, 14) 或 20:4^{5, 8, 11, 14},

表明花生四烯酸为具有 20 个碳原子,在第 5—6、8—9、11—12 和 14—15 碳原子之间各有一个不饱和键的脂肪酸;

表 2-1 列举了一些重要的饱和与不饱和脂肪酸,以及一些在结构上比较特殊的脂肪酸。

高等动、植物的脂肪酸有以下共性:

(1) 脂肪酸链长为 14—20 个碳原子的占多数,且都是偶数。最常见的是 16 或 18 个碳原子酸。12 个碳原子以下的饱和脂肪酸大量存在于哺乳动物的乳脂中。

(2) 饱和脂肪酸中最普遍的是软脂酸和硬脂酸。不饱和脂肪酸中最普遍的是油酸。

(3) 在高等植物和低温生活的动物中,不饱和脂肪酸的含量高于饱和脂肪酸含量。

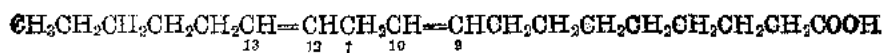
(4) 不饱和脂肪酸的熔点比同等链长的饱和脂肪酸的熔点低(见表 2-1)。

(5) 高等动、植物的单不饱和脂肪酸的双键位置一般在第 9—10 碳原子之间,多不饱和

表 2-1 某些天然存在的脂肪酸

习惯名称		缩写符号	系统名称	分子结构式	熔点 (°C)
饱和脂肪酸					
月桂酸	lauric acid	12:0	n-十二烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	44.2
豆蔻酸	myristic acid	14:0	n-十四烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	58.9
软脂酸	palmitic acid	16:0	n-十六烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	63.1
硬脂酸	stearic acid	18:0	n-十八烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	69.6
花生酸	arachidic acid	20:0	n-二十烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	76.5
山萘酸	behenic acid	22:0	n-二十二烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	—
狗鱼油酸	lignoceric acid	24:0	n-二十四烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	86.0
蜡酸	cerotic acid	26:0	n-二十六烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	
褐煤酸	montanic acid	28:0	n-二十八烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{COOH}$	
不饱和脂肪酸					
棕榈油酸	palmitoleic acid	16:1 ⁴⁹	9-十六碳烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18.4
	oleic acid	18:1 ^{49,trans}	9-十八碳烯酸(顺)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	
亚油酸	vaccenic acid	18:1 ^{411,trans}	11-十八碳烯酸(反)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{C}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	-5
	linoleic acid	18:2 ^{49,12}	9, 12-十八碳二烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{cis, cis})$	-11
α -亚麻酸	α -linolenic acid	18:3 ^{49,12,15}	9, 12, 15-十八碳三烯酸	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{all cis})$	
γ -亚麻酸	γ -linolenic acid	18:3 ^{46,9,12}	6, 9, 12-十八碳三烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}(\text{all cis})$	
花生四烯酸	arachidonic acid	20:4 ^{45,8,11,14}	5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}(\text{all cis})$	-49.5
少见脂肪酸					
反油酸	elaidic acid	18:1 ^{49,trans}	9-十八碳烯酸(反)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}=\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}(\text{trans})$	
	结核硬脂酸	tuberculostearic acid		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	
结核菌酸	pathoic acid			$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CHCH}_2\text{COOH}$	
乳杆菌酸	lactobacillic acid			$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{HC}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	
脑羟脂酸	cerebyonic acid		α -羟二十四烷酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{CHCOOH}$	
桐油酸	eleostearic acid	18:3 ^{49,11,13}	9, 11, 13-十八碳三烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	
神经酸	nervonic acid	24:1 ⁴¹⁵	15-二十四碳烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	
大枫子酸	gynocardic acid			$\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	
蓖麻酸	ricinoleic acid			$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	
芥子酸		22:1 ⁴¹³	13-二十二碳烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	
			α -羟-15-二十四碳烯酸	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CHCOOH}$	

脂肪酸中的一个双键一般也位于第9—10碳原子之间。其他的双键位于49和碳氢链的末端甲基之间,而且在两个双键之间往往隔着一个亚甲基(methylene group)。例如,亚油酸的双键位置为9—10和12—13,其间就有一个亚甲基(—CH₂—)。



亚甲基

只在少数植物的不饱和脂肪酸中含有共轭双键(—CH=CH—CH=CH—)。

(6) 高等动、植物的不饱和脂肪酸,几乎都具有相同的几何构型,而且都属于顺式(cis)。只有极少的不饱和脂肪酸是属于反式(trans)的(见表2-1)。反式脂肪酸碳原子和双键位置的简写表示法和顺式脂肪酸表示法不同处是在表示双键位置的符号右边加有“trans”的字样。如反十六碳烯酸应写做16:1^{49,trans},又如反油酸写做18:1^{49,trans}等。

(7) 细菌所含的脂肪酸种类比高等动、植物的少得多。细菌脂肪酸的碳原子数目和高等动、植物脂肪酸的碳原子数目相似,也在12至18个碳原子之间。而且细菌中绝大多数的脂肪酸为饱和脂肪酸,有的脂肪酸还带有分支的甲基。细菌的不饱和脂肪酸只带有一个双键,到目前为止,还未发现细菌有带两个或两个以上双键的不饱和脂肪酸。哺乳动物体内能够合成饱和和单不饱和脂肪酸,但不能合成亚油酸和亚麻酸,我们把维持哺乳动物正常生长所需的,而体内又不能合成的脂肪酸称为必需脂肪酸(essential fatty acids)。哺乳动物体内所含的必需脂肪酸,以亚油酸含量最多,它在甘油三酯和磷酸脂中占脂肪酸总量的10%—20%。哺乳动物体内的亚油酸和亚麻酸是从植物中获得的。这两种脂肪酸在植物中含量非常丰富,哺乳动物中的花生四烯酸是由亚油酸合成的。花生四烯酸在植物中并不存在。必需脂肪酸在体内的作用还未完全阐明,已发现的一个功能作为合成前列腺素的必需前体。前列腺素是类似激素的物质,极微量的前列腺素就可以产生明显的生物活性。

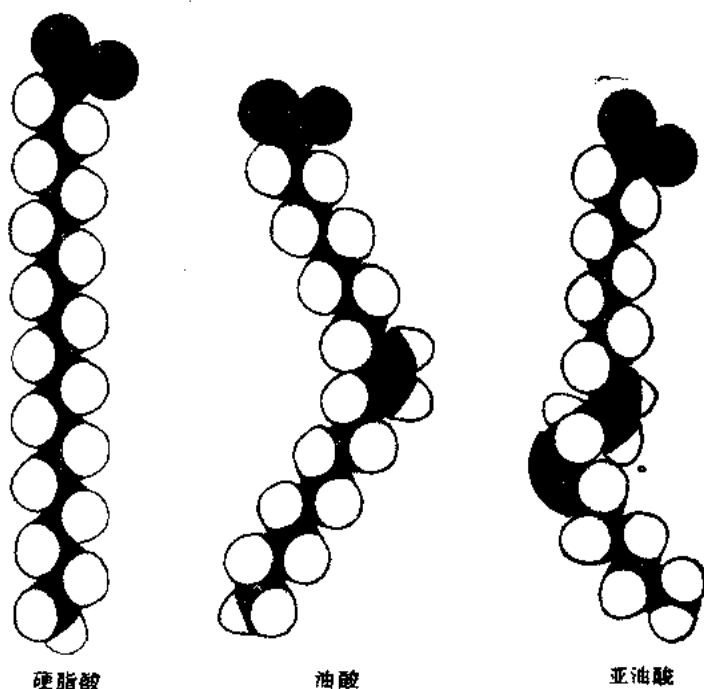
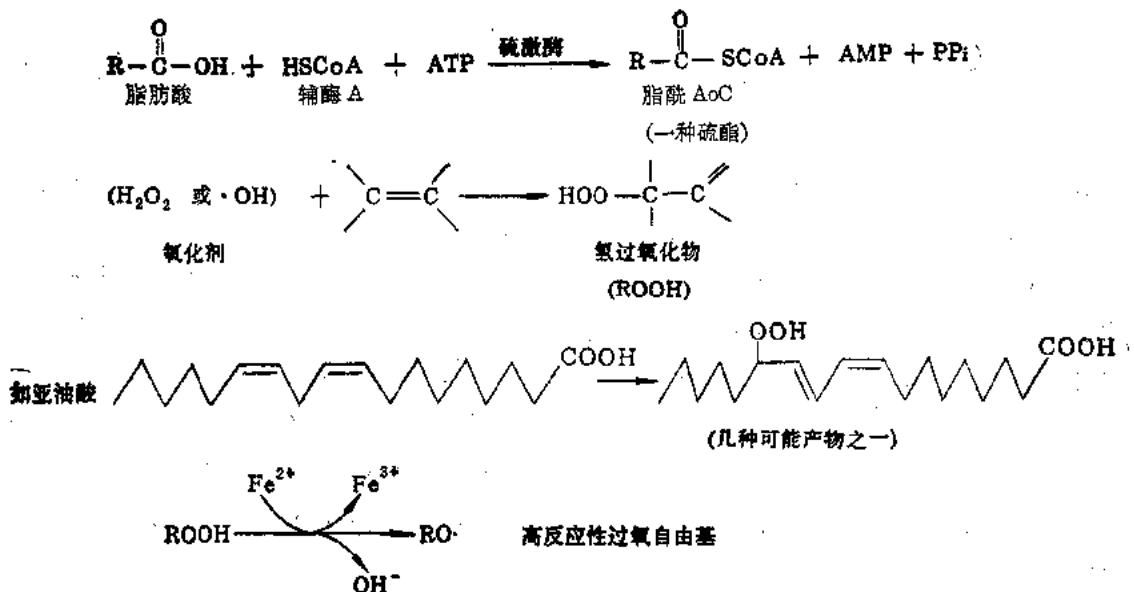


图2-1 饱和、单和双不饱和脂肪酸的空间结构模型

饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸的构象(有关概念见蛋白质章)有很大的差别,饱和脂肪酸的碳氢链比较灵活,能以各种构象形式存在,因碳骨架中的每个单键完全可以自由旋转,它的完全伸展形式几乎是一条直链,以硬脂酸为例,其结构见图 2-1。

当加入一些催化剂并加热时,顺式不饱和脂肪酸即可转化为反式。用这种方法可以很容易地使油酸转变为反油酸。虽然反油酸不是自然界存在的天然脂肪酸,但当将食用的菜籽油催化加氢时即可大量产生反油酸,催化加氢是制造人造黄油——麦吉林(margarine)的必需步骤。人体内曾发现有反油酸,可能是食用人造黄油的结果。

脂肪酸主要化学反应有二,其一,在机体代谢中,脂肪酸酶促活化硫酸化,形成脂肪酸活性形式,脂酰 CoA。其二,不饱和脂肪酸双键极易为强氧化剂,如 H_2O_2 、超氧化物阴离子自由基(O_2^-)或羟自由基($\cdot OH$)所氧化:



含不饱和脂肪酸丰富的生物膜脂对过氧化作用敏感。膜脂过氧化继而可引起膜蛋白氧化,严重影响膜的结构和功能。

分析脂肪酸混合物的分离最好用气液柱层析(gas-liquid column chromatography, GLC)简称气液色谱技术。气液色谱是用气体作为流动相,以高沸点液体作为固定相的柱层析法。脂肪酸在进行分析前需先甲酯化,然后注入充有固定相的层析柱中。样品经高温气化后呈流动相,在一定压力和温度下以一定流速通过固定相进行分配,从而使各组分得到分离,流出的组分经检测器转变为电讯号,放大后传送给记录系统,以峰形曲线形式记录,以出峰时间作为定性依据,以峰高或峰面积作为定量依据。图 2-2 为用气-液色谱对挥发性脂肪酸甲酯混合物的分离图谱。利用 GLC 分析任何一种非聚合材料的唯一要求是挥发性。若分离物质,如脂肪酸不易挥发,必须先转化为能汽化的另一化学形式。GLC 优点在于分辨力强灵敏度高,小到 10^{-12} mole 亦可测出,分析速度快。

二、甘油三酯的类型

甘油三酯有许多不同类型,主要是由它们所含脂肪酸的情况决定的。如果三个脂肪酸

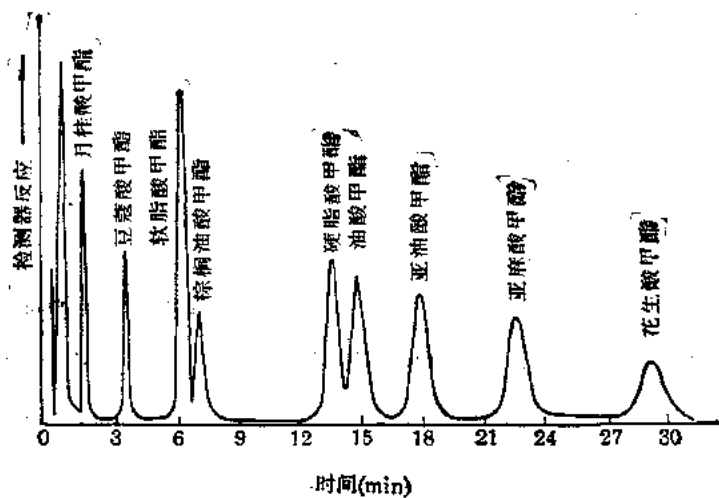


图 2-2 气液色谱对挥发性脂肪酸甲酯混合物的分离图谱

都是相同的,称为简单三脂酰甘油(simple triacylglycerols),具体命名时即称为某某脂酰甘油,如三硬脂酰甘油(tristearoylglycerol),三软脂酰甘油(tripalmitoylglycerol),三油酰甘油(trioleoylglycerol)等,商品名称依次为 tristearin, trigalmitin, triolein 等。如果含有两个或三个不同脂肪酸的甘油三酯称为混合三脂酰甘油(mixed triacylglycerols)。如 A 和 B 分别代表两种不同的脂肪酸,则由 A 和 B 可以构成六种不同的三脂酰甘油异构体,即 BBA、BAA、ABB、ABA、BAB 和 AAB,其中 AAB、BAA、ABB、BBA 四种属于立体异构体。例如,一软脂酰二硬脂酰甘油,俗名 1-palmitoyldistearin,即属于混合甘油三酯。

多数天然油脂都是简单甘油三酯和混合甘油三酯的极复杂的混合物。到目前为止,还没有发现在天然油脂中脂肪酸分布的规律。

三、甘油三酯的物理、化学性质

1. 溶解度 甘油三酯不溶于水,也没有形成高度分散的倾向。

甘油二酯和甘油单酯则与三脂酰甘油不同,由于它们有游离羟基,故有形成高度分散态的倾向,其形成的小微粒称为微团(micelles),甘油二酯和甘油单酯常用于食品工业,使食物更易均匀,便于加工,且二者都可以被机体利用。

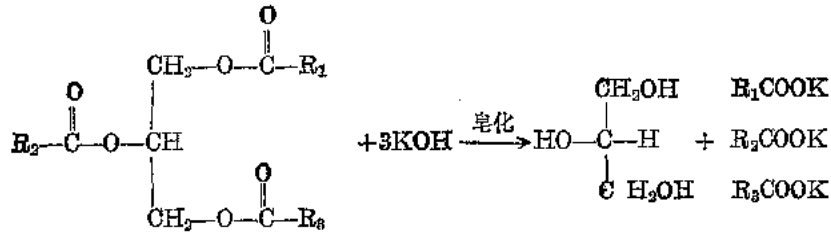
2. 熔点 甘油三酯的熔点是由其脂肪酸组成决定的,它一般随饱和脂肪酸的数目和链长的增加而升高。例如,三软脂酰甘油和三硬脂酰甘油在体温下为固态,三油酰甘油和三亚油酰甘油在体温下为液态。猪的脂肪中油酸占 50%,猪油固化点 30.5°C。人脂肪中油酸占 70%,人脂固化点 15°C。植物油中含大量的不饱和脂肪酸,因此呈液态。

3. 光学活性 甘油本身虽无光学活性,但如果甘油的第 1 和第 3 碳原子上的脂肪酸不不同时,第 2 个碳原子为不对称碳原子。天然存在的具有一个不对称碳原子的甘油三酯,习惯上按照 L-甘油醛衍生物的原则命名。

4. 皂化和皂化值 当将脂酰甘油与酸或碱共煮或经脂酶(lipase)作用时,都可发生水解。

酸水解可逆,碱水解。由于脂肪酸羧基全部处于解离状态,即成为负离子,因而没有和甘油作用的可能性,故碱水解不可逆。

当用碱水解脂酰甘油时,由于产物之一为脂肪酸的盐类,即肥皂,此反应称为皂化作用(saponification)。完全皂化1克油或脂所消耗的氢氧化钾毫克数称为皂化值(saponification number),用以评估油脂质量,并计算该油脂分子量。



5. 酸败和酸值 油脂在空气中暴露过久即产生难闻的臭味,这种现象称为“酸败”(rancidity)。酸败的化学本质是由于油脂水解放出游离的脂肪酸,后者再氧化成醛或酮,低分子的脂肪酸(如丁酸)的氧化产物都有臭味。脂肪分解酶(lipolytic enzyme)或称脂酶(lipase)可加速此反应。脂肪酸的双键先氧化成过氧化物 $\begin{array}{c} \text{—C—C—} \\ | \quad | \\ \text{O—O} \end{array}$,再分解成有臭味的醛或

酮。油脂暴露在日光下可加速此反应。

中和1克油脂中的游离脂肪酸所消耗的氢氧化钾毫克数称为酸值(acid number)。酸败的程度一般用酸值来表示。

不饱和脂肪酸氧化后所形成的醛或酮可聚合成胶膜状的化合物。桐油等可用作油漆即根据此原理。

6. 氢化(Hydrogenation) 油脂中的不饱和键可以在金属镍催化下发生氢化反应。氢化可防止酸败作用。

7. 卤化和碘值 油脂中不饱和键可与卤素发生加成作用,生成卤代脂肪酸,这一作用称为卤化作用(halogenation)。

碘值(iodine number)指100克油脂所能吸收的碘的克数。它也可以碘的百分数表示。在实际碘值测定中,多用溴化碘或氯化碘为卤化试剂。

8. 乙酰化值(acetylation number) 油脂中含羟基的脂肪酸可与乙酸酐或其他酰化剂作用形成相应的酯。

乙酰化值指1克乙酰化的油脂所分解出的乙酸用氢氧化钾中和时,所需氢氧化钾的毫克数。

9. 某些油脂的一些物理常数和脂肪酸组成(表2-2, 2-3):

四、甘油

甘油味甜,比重为1.26(20°C)。和水或乙醇可以任何比例互溶,但不溶于乙醚、氯仿及苯。甘油可被过氧化氢氧化,形成二羟基丙酮和甘油醛的混合物。甘油在脱水剂如硫酸氢钾、五氧

表 2-2 某些油脂的一些物理常数

油脂	来源	熔点(或固化点 °C)	比重(或 密度)	折射指数 $n_D^{40^\circ}$	皂化值	碘值	乙酰化值	非皂化值 (%)
动 物								
牛乳脂	<i>Bos taurus</i>	32.2	0.911 ^{40/15°}	1.4548	227	36.1		
人贮存脂	<i>Homo sapiens</i>	(15)	0.918 ^{15°}	1.4602	196.2	67.6		
猪油	<i>Sus scrofa</i>	(30.5)	0.919 ^{15°}	1.4615	194.6	58.6	2.6	
牛油	<i>Bos taurus</i>	—	—	—	197	49.5	2.7—8.6	
羊油	<i>Ovis aries</i>	(42.0)	0.945 ^{15°}	1.4565	194	40		
鱼肝油	<i>Gadus morhua</i>	—	0.925 ^{25°}	1.481 ^{25°}	186	165	1.15	0.54—0.62
沙丁鱼油	<i>Sardinops caerulea</i>	—	0.905 ^{60°}	1.4660 ^{60°}	191	185		
鲸油	<i>Balaena mysticetus</i>	—	0.892 ^{60°}	1.460 ^{60°}	195	120		
植 物								
蓖麻油	<i>Ricinus communis</i>	(-18.0)	0.961 ^{15°}	1.4770	180.3	85.5		
玉米油	<i>Zea mays</i>	(-20.0)	0.922 ^{15°}	1.4734	192.0	122.6		
棉籽油	<i>Gossypium hirsutum</i>	(-1.0)	0.917 ^{25°}	1.4735	194.3	105.7		
橄榄油	<i>Olea europaea sativa</i>	(-6.0)	0.918 ^{15°}	1.4679	189.7	81.1		
花生油	<i>Arachis hypogaea</i>	(3.0)	0.914 ^{15°}	1.4691	192.1	93.4	3.5	0.5—0.9
芝麻油	<i>Sesamum indicum</i>	(-6.0)	0.919 ^{25°}	1.4646	187.9	106.6		
黄豆油	<i>Glycine soja</i>	(-16.0)	0.927 ^{15°}	1.4729	190.6	130.0		
葵花籽油	<i>Helianthus annuus</i>	(-17.0)	0.923 ^{15°}	1.4694	188.7	125.5		
桐油	<i>Alseodendron fordii</i>	(-2.5)	0.934 ^{15°}	1.5174 ^{25°}	199.1	168.2		0.4—0.8
小壳胚油	<i>Triticum aestivum</i>	—	—	—	—	125		
油菜籽油	<i>Brassica campestris</i>	(-10)	0.915 ^{15°}	1.4706	174.7	98.6		

所列常数, 乙酰化值和非皂化值除外, 均引自《Handbook of Biochemistry and Molecular Biology》(Lipids, Carbohydrates, Steroids), 1975, 502, CRC Press.

特定样品特定方法所得典型数值, 而非平均数值。

比重, 除非特别指出, 油脂和水在相同温度下测算。

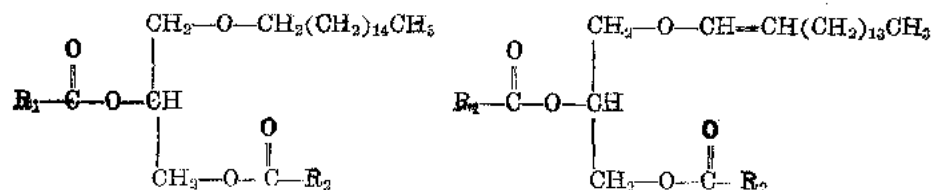
类固醇类物质不为碱所水解, 称为非皂化物质, 其占总脂 % 称非皂化值。

化二磷存在下加热, 即生成丙烯醛($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$, acrolein), 成为有刺激臭味的气体。用这一反应鉴定甘油。

甘油是许多化合物的良好溶剂, 广泛地用于化妆品和医药工业。由于甘油能保持水分, 可作湿润剂。它还大量用于制备硝酸甘油。

五、其他脂酰甘油类

1. 烷基醚脂酰甘油(alkyl ether acylglycerols) 它含有两个脂肪酸分子和一个长的烷基或烯基链分别与甘油分子以酯键和醚键相连。例如烷基醚二脂酰甘油和 α, β -烯基醚二脂酰甘油(α, β -alkenyl ether diacylglycerols), 其结构如下:



这种脂类不易与甘油三酯分开, 因此发现较晚。用弱碱或酶促水解, 它们则形成甘油醚

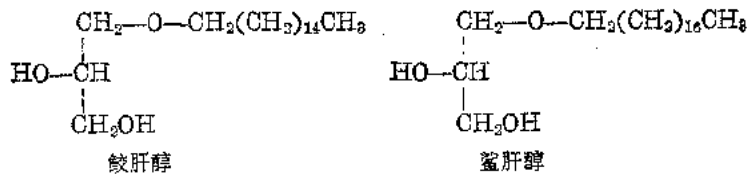
表 2-3 某些油脂的脂肪酸组成(100 g 总脂肪酸中各脂肪酸组分的 g 数)

油脂	来源 (动、植物名称)		饱和					不饱和				其他
	月桂酸	豆蔻酸	软脂酸	硬脂酸	花生酸	其他	棕榈油酸	油酸	亚油酸	亚麻酸	其他	
牛乳脂	2.5	11.1	29.0	9.2	2.4	2.0 ^a ; 0.5 ^b ; 2.3 ^c	4.6	26.7	3.6	—	3.6 ^a ; 0.1 ^b ; 0.1 ^c ; 0.9 ^d	
人贮存脂	—	2.7	24.0	8.4	—	—	5	40.9	10.2	—	1.4 ^b ; 1.0 ^c ; 1.0 ^d ; 0.4 ^e	
猪油	—	1.3	28.3	11.9	—	—	2.7	47.5	6	—	2.5	
牛油	—	6.3	27.4	14.1	—	—	—	49.6	2.5	—	—	
羊油	—	4.6	24.6	30.5	—	—	—	36.0	4.3	—	—	
鱼肝油	—	5.8	8.4	0.6	—	—	20.0	← 29.1 →	← 4.3 →	—	25.4 ^a ; 9.6 ^b	
沙丁鱼油	—	5.1	14.6	3.2	—	—	11.8	← 17.8 →	← 15.4 →	—	18.1 ^b ; 14.0 ^b ; 薇流	
鲸油	0.2	9.3	15.6	2.8	—	—	14.4	35.2	—	—	13.6 ^c ; 5.9 ^c ; 2.5 ^c 0.2 ^d	
动 物												
植 物												
蓖麻油	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	87 ^a
玉米油	—	1.4	10.2	3.0	—	—	1.5	7.4	3.1	—	—	—
棉籽油	—	1.4	23.4	1.1	1.3	—	2.0	49.6	34.3	—	—	—
橄榄油	—	薇流	6.9	2.3	0.1	—	—	22.9	47.8	—	—	—
花生油	—	—	8.3	3.1	2.4	—	—	84.4	4.6	—	—	—
芝麻油	—	—	9.1	4.3	0.8	—	—	56.0	28.0	—	—	3.1 ^a ; 1.1 ^a
黄豆油	0.2	0.1	9.8	2.4	0.9	—	—	45.4	40.4	—	—	—
葵花籽油	—	—	5.6	2.2	0.9	—	—	28.9	50.7	—	—	0.1 ^g
桐油	—	—	4.6 ^w	—	—	—	—	25.1	66.2	—	—	—
小麦胚油	—	—	16.0 ^w	—	—	—	—	4.1	0.6	—	—	90.7 ^y
油菜籽油	—	—	1	—	—	—	—	28.1	52.3	—	—	3.6
								32	15	—	—	1

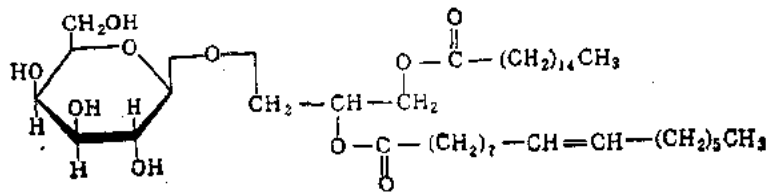
注：所列数据引自《Handbook of Biochemistry and Molecular Biology》(Lipids, Carbohydrates, Steroids), 1975, 508, CRC Press.

a. 己酸; b. 辛酸; c. 癸酸; d. 丁酸; e. 癸烯酸; f. C₁₆ 单烯; g. C₁₄ 单烯; h. 二十二碳-9-烯酸和亚芥子酸; i. C₁₂-戊烯酸; j. C₁₇-十七烯酸; k. 12-甲基丁烯酸; l. C₂₀ 聚乙烯酸; m. C₂₂ 聚乙烯酸; n. 山萘酸; o. C₂₄ 聚乙烯酸; p. 萘烯酸; q. C₂₄ 聚乙烯酸; r. 萘烯酸; u. 二十四烯酸; v. 亚芥子酸; w. 包括亚芥子酸

(glycerol ethers)。例如鯨肝醇(chimyl alcohol)和鯊肝醇(batyl alcohol), 它们实际上都是甘油醚, 其结构如下:



2. 糖基脂酰甘油(glycosylacylglycerols) 糖基与甘油分子第三个羟基以糖苷键相连, 甘油另两个羟基与脂肪酸以酯键相连。最普通的例子是在高等植物和脊椎动物神经组织中发现的单半乳糖基二脂酰甘油, 其结构如下:



单半乳糖基二脂酰甘油

从细菌中可分离到二甘露糖基二脂酰甘油(dimannosyl diacylglycerol)。

第二节 磷 脂 类

磷脂是分子中含磷酸的复合脂。由于所含醇的不同, 可分为甘油磷脂类和鞘氨醇磷脂类, 它们的醇物质分别是甘油和鞘氨醇(sphingosine)。两类磷脂分子的组成对比如表 2-4。

表 2-4 两类磷脂的分子组成(分子数)

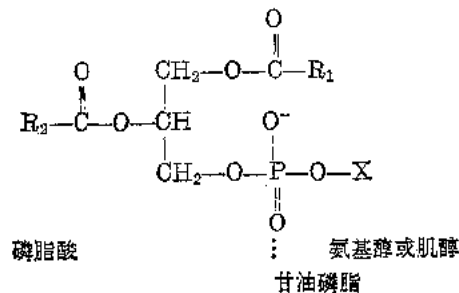
	组 成 相 同		组成不同或不尽相同	
	脂肪酸	磷 酸	醇 类	其 他
甘油磷脂	2	1	甘 油	胆碱、乙醇胺、丝氨酸和肌醇等
鞘氨醇磷脂	1	1	鞘 氨 醇	胆碱

一、甘油磷脂

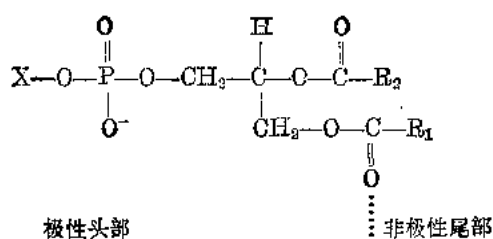
即磷酸甘油酯(phosphoglycerides), 它是生物膜的主要组分。

(一) 甘油磷脂的组成

这类化合物中所含甘油的第三个羟基被磷酸、另两个羟基为脂肪酸酯化, 继而, 其中的磷酸再与氨基醇(如胆碱、乙醇胺或丝氨酸)或肌醇结合。其结构如下:



磷脂酸(phosphatidic acid)是各种甘油磷脂的母体化合物。交换一下上述甘油磷脂分子结构为:



甘油磷脂两条长的碳氢链构成它的非极性尾部(nonpolar tail), 其余部分构成它的极性头部(polar head)

不同类型的甘油磷脂的分子大小、形状、极性头部的电荷等都不相同。

根据所含脂肪酸的不同, 每一类甘油磷脂又可分为若干种。甘油磷脂分子中一般含有饱和与不饱和脂肪酸各一分子。不饱和脂肪酸常与甘油第二个碳原子羟基缩合。

例如磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline), 通称卵磷脂(lecithin), 其中 R_1 和 R_2 分别为硬脂酸和油酸碳氢链。图示其空间结构(图 2-3)。

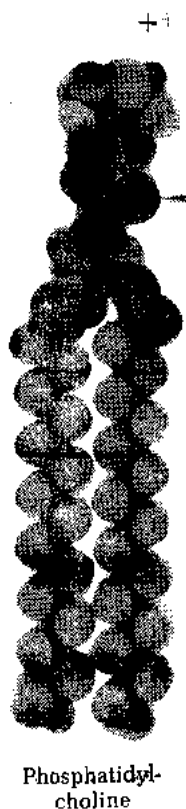
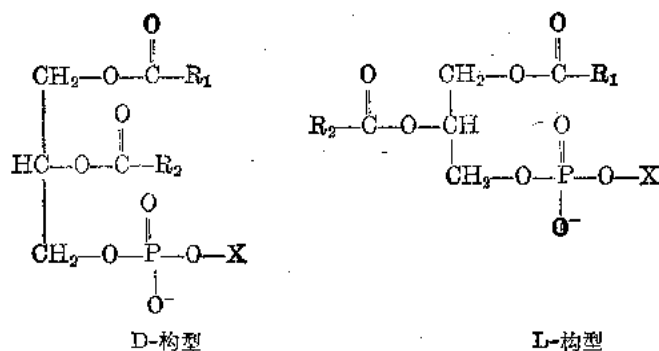


图 2-3 磷脂酰胆碱(卵磷脂)空间结构模型

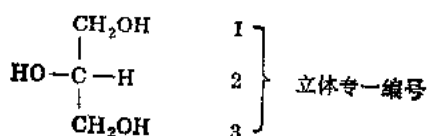
(二) 甘油磷脂的命名

如果将甘油 C_1 或 C_3 分别用脂肪酸或磷酸酯化, C_2 则成为一个不对称 C 原子, 于是形成两个互为对映体(antipode)的异构物。天然存在的甘油磷脂都属 L-构型。



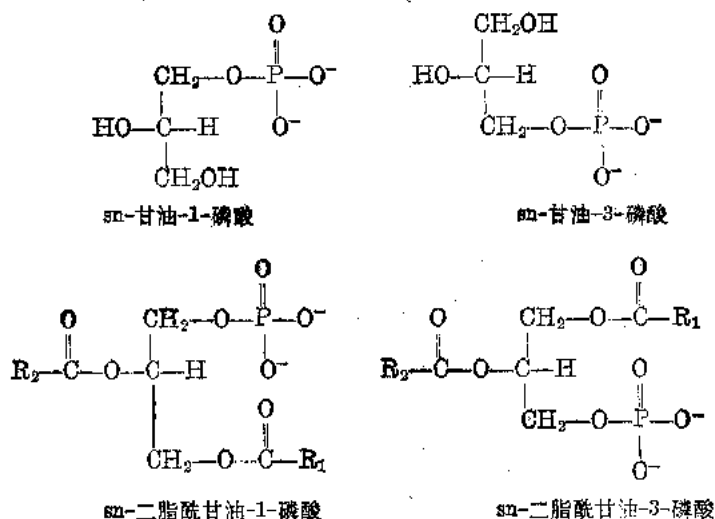
1967年国际理论和应用化学联合会及国际生物化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry-International Union of Biochemistry, IUPA-IUB) 的生物化学命名委员会 [Commission on Biochemical Nomenclature] 建议采用下列命名原则:

将甘油的三个碳原子分别标号为 1, 2, 3, (三者顺序不能随便颠倒)。



用投影式表示, O_2 上羟基一定要放在 C_2 的左边。这种编号称为立体专一编号 (stereospecific numbering), 用 *sn* 表示, 写在化合物名称的前面。

根据这一命名原则, 磷酸甘油和磷脂酸命名如下:



(三) 几种甘油磷脂名称、分子组成、分布和生物作用的综合对比 (表 2-5),

(四) 甘油磷脂的性质

的甘油磷脂都是白色蜡状固体。它们溶于含有少量水的多数非极性溶剂中。用氯仿-甲醇混合溶剂很容易从组织、细胞中将甘油磷脂提取出来。甘油磷脂不易溶于无水丙酮。当将甘油磷脂溶在水中时, 除其极少数形成真溶液外, 绝大部分不溶的脂类形成微团 (micells)。

1. 电荷和极性 所有的甘油磷脂在 pH7 时, 其磷酸基团带负电荷 (pK' 值 1-2)。其磷

表 2-5 几种甘油磷脂名称、分子组成、分布和生物作用

系统名称	习惯名称	相同部分(分子/分子)			不同部分(分子/分子)		分布及生物作用
		甘油	脂肪酸	磷酸	氨基醇	其他	
L- α -磷脂 酰胆碱 3-sn-磷脂 酰胆碱	卵磷脂	1	2	1	胆碱 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$		植物、动物中,(脑、精液、肾上腺和红细胞尤多,卵黄含量可达8-10%)。生物膜主要成分之一。控制肝脂代谢,防止脂肪肝形成。
L- α -磷脂酰乙醇胺 3-sn-磷脂酰乙醇胺	脑磷脂	1	2	1	乙醇胺 $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$		参与血液凝缩
L- α -磷脂酰丝氨酸 3-sn-磷脂酰丝氨酸	丝氨酸磷脂	1	2	1	丝氨酸 $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)\text{NH}_2$		
L- α -磷脂酰肌醇 3-sn-磷脂酰肌醇	肌醇磷脂	1	2	1-3		肌醇 	单磷酸脂:肝、心肌中,双、三磷酸脂:脑
L- α -磷脂酰缩醛 3-sn-磷脂酰缩醛	缩醛磷脂	1	1 (C ₂)	1	胆碱或乙醇胺	长链烯醇 (Cr)	细胞膜,肌肉和神经细胞膜含量特别丰富
二磷脂酰甘油	心磷脂	3	4	2	—	—	存在于细菌细胞膜中,真核细胞线粒体内膜中

脂酰肌醇、磷脂酰甘油和磷脂酰糖类头部不带电荷,但因含有羟基,所以是极性的。而磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的极性头部在 pH7 时都带正电荷。因此,这两种化合物本身是既带正电荷又带负电荷的兼性离子(zwitterions),而整个分子是电中性的。磷脂酰丝氨酸含有一个氨基($pK'=9.15$)和一个羧基($pK'=2.21$),因此,磷脂酰丝氨酸分子在 pH7 时,带有两个负电荷和一个正电荷,净剩一个负电荷。O-赖氨酸磷脂酰甘油有两个正电荷和一个负电荷,净剩一个正电荷。现列表(表 2-6)对比各种甘油磷脂的电荷量:

2. 水解作用 用弱碱水解甘油磷脂生成脂肪酸的金属盐,剩余部分不被水解。例如,水解磷脂酰乙醇胺反应如下:

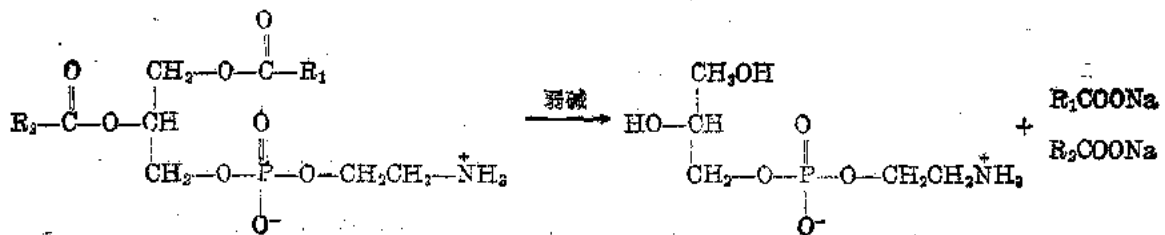
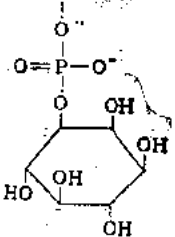


表 2-6 各种甘油磷脂极性头部和电荷量

甘油磷脂	极性头部	磷酸基团	肌醇等基团	净电荷
磷脂酰肌醇		-1	0	-1
磷脂酰甘油	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-1	0	-1
磷脂酰糖基	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{糖} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-1	0	-1
磷脂酰胆碱	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-1	+1	0
磷脂酰乙醇胺	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-1	+1	0
磷脂酰丝氨酸	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	-1	+1, -1	-1
3'-O-赖氨酸磷脂酰甘油	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{O}^- \qquad \qquad \qquad \text{NH}_3^+ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{C}-\text{O} \\ \\ \text{H} \end{array}$	-1	+2	+1
二磷脂酰甘油 (心磷脂)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O}^- \qquad \qquad \text{CHOH} \\ \\ \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	-2	0	-2

如用强碱水解则生成脂肪酸、乙醇胺和磷酸甘油。酶促水解参看第十五章脂类代谢。

3. 氧化作用 暴露在空气中的甘油磷脂, 由于其中所含不饱和脂肪酸被氧化, 形成过氧化物, 最终形成黑色过氧化物的聚合物。

(五) 重要的甘油磷脂

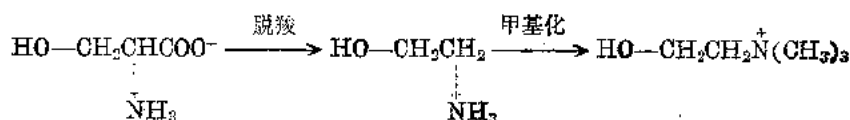
1. 磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline) 是白色蜡状物质, 极易吸水, 其不饱和脂肪酸能很快被氧化。各种动物组织、脏器中都含有相当多的磷脂酰胆碱。

胆碱的碱性甚强, 可与氢氧化钠相比。它在生物界分布很广, 且有重要的生物功能, 它在甲基转移中起提供甲基作用。乙酰胆碱是一种神经递质, 与神经兴奋的传导有关。

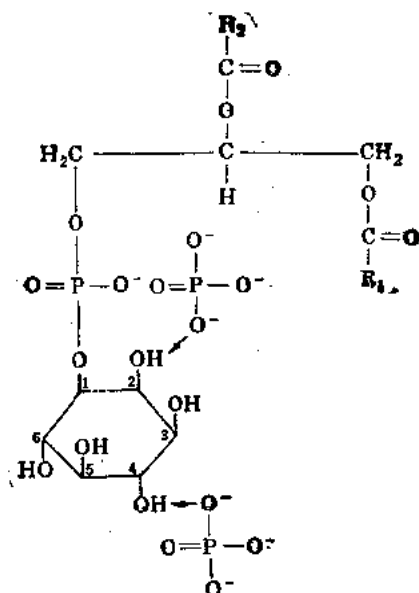
磷脂酰胆碱有控制动物机体代谢, 防止脂肪肝形成的作用。

2. 磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamines) 它也是动、植物含量最丰富的磷脂, 它与血液凝结有关。

3. 磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serines) 来自血小板和损伤组织的、带有负电荷的磷脂酰丝氨酸能引起损伤表面凝血酶原的活化。它与磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺间可互相转化。其依据是:



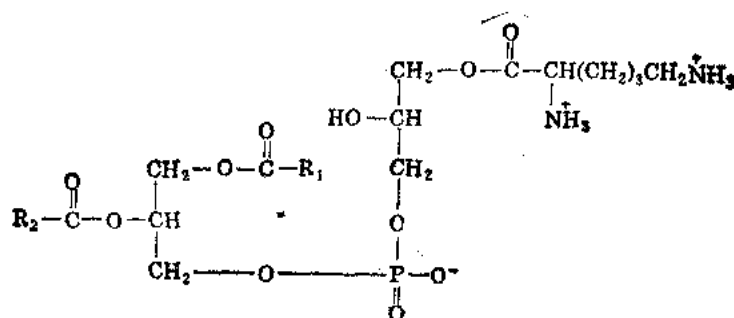
4. 磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositols) 其极性基部分是一六碳环状糖醇, 即肌醇(inositol), 其结构是:



其中, 肌醇基 C₂ 所带磷酸基团, 为磷脂酰肌醇磷酸; 肌醇基 C₂ 和 C₄ 均带有磷酸基团, 为磷脂酰肌醇二磷酸。

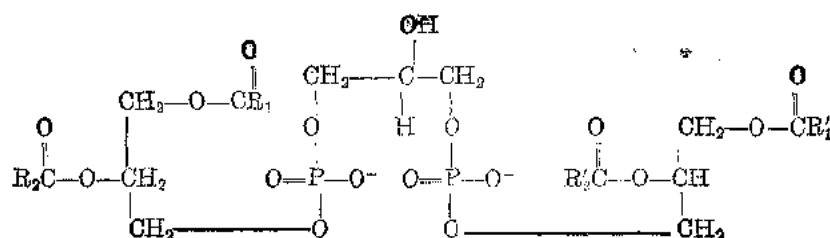
磷脂酰肌醇常与磷脂酰乙醇胺等混在一起。肝脏和心肌多是磷脂酰肌醇, 而脑中多为磷脂酰肌醇磷酸、磷脂酰肌醇二磷酸。

5. 磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerols), 其极性基团是一个甘油分子。细菌的细胞膜中常含有磷脂酰甘油的氨基酸衍生物(特别是L-赖氨酸)。赖氨酸与甘油的第三个羟基以酯键相连, 称为3'-O-赖氨酸磷脂酰甘油, 其结构如下:



3'-O-赖氨酸磷脂酰甘油

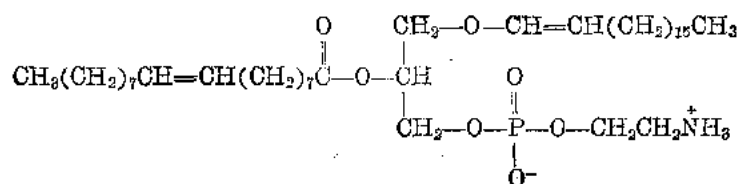
6. 二磷脂酰甘油(diphosphatidyl glycerols), 又称心磷脂(cardiolipin)。这类磷脂含有两个磷脂酸分子, 它们的磷酸基团分别与一个甘油分子的1, 3碳原子上的羟基以酯键相连, 其结构如下:



二磷脂酰甘油

二磷脂酰甘油存在于细菌的细胞膜, 也存在于真核细胞的线粒体内膜中。

7. 缩醛磷脂(plasmalogens) 与前面各种甘油磷脂不同点在于: 一个长碳氢链取代脂肪酸以酯键与甘油 C₁ 羟基相连。其结构如下:

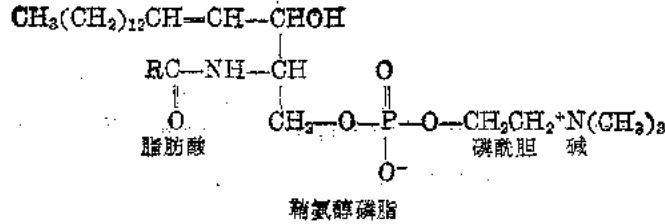


缩醛磷脂

它存在于细胞膜, 特别是肌肉和神经细胞膜中含量丰富。

二、鞘氨醇磷脂类

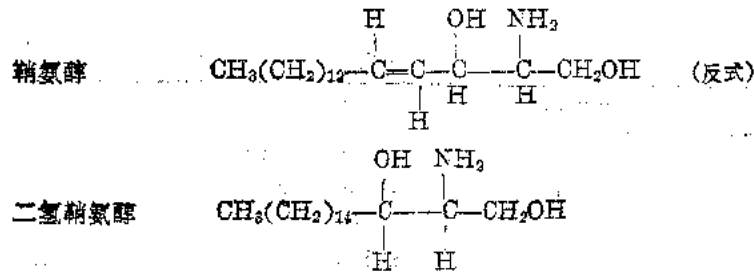
简称鞘磷脂类(sphingophospholipids, sphingomyelins), 它是长的、不饱和的氨基醇, 鞘氨醇, 而非甘油的衍生物。在鞘磷脂中, 鞘氨醇氨基以酰胺键连接到一脂肪酸上, 其羟基以酯键与磷酸胆碱相连。其结构如下:



(一) 鞘氨醇(sphingosine)

已发现的鞘氨醇类有 30 余种,其分布:哺乳动物鞘磷脂主要含有鞘氨醇和二氢鞘氨醇。高等植物和酵母鞘磷脂含 4- 羟双氢鞘氨醇,又称植物鞘氨醇(phytosphingosine)

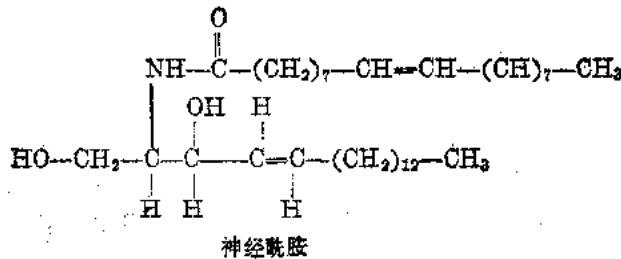
海生无脊椎动物常含有双不饱和氨基醇,如 4, 8-双烯鞘氨醇(4, 8-sphingadiene)。



鞘氨醇 即 2-氨基-4-十八碳烯-1, 3-二醇。因有氨基,呈碱性。以结合形式存在于自然界中。

(二) 神经酰胺

神经酰胺(ceramide)是构成鞘磷脂类的母体结构。其结构是由鞘氨醇氨基以酰胺键与一长链(18—26C)脂肪酸羧基相连。



(三) 鞘磷脂

它是鞘脂类(sphingolipids)的典型代表,它是高等动物组织中最丰富的鞘脂类。

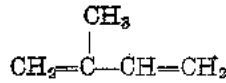
鞘磷脂的极性头部是磷酸胆碱或磷酸乙醇胺。因此,鞘磷脂的性质和磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺性质相似,在 pH7 时也是兼性离子。

第三节 萜类和类固醇类及前列腺素

本节所述脂类物质特点是它们都不含脂肪酸。它们在组织和细胞内含量虽少,但却包括许多有重要生物功能的物质,例如维生素、激素和前列腺素等。

一、萜类

萜类 (terpenes) 与下述类固醇类(胆固醇酯除外)化合物都不含脂肪酸, 都是非皂化性物质, 而且都是异戊二烯(isoprene)的衍生物。

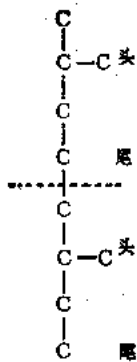


萜的分类主要根据异戊二烯的数目。由两个异戊二烯构成的萜称为单萜, 由三个异戊二烯构成的萜称为倍半萜, 由四个异戊二烯构成的萜称为二萜, 同理还有三萜、四萜等等。(表 2-7)。

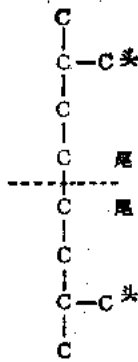
表 2-7 萜类化合物

碳原子数	异戊二烯单位数	类 名	重 要 代 表
10	2	单萜(monoterpenes)	柠檬烯(limonene)
15	3	倍半萜(sessquiterpenes)	法尼醇(farnesol)
20	4	二萜(diterpenes)	叶绿醇(phytol)
30	6	三萜(triterpenes)	鲨烯(squalene)
40	8	四萜(tetraterpenes)	胡萝卜素(carotene)
	几千	多萜(polyterpenes)	天然橡胶

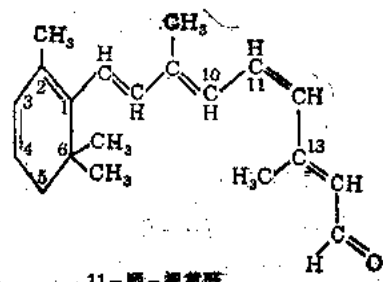
萜类有的是线状, 有的是环状, 有的二者兼有。相连的异戊二烯有的是头尾相连, 也有的是尾尾相连。多数直链萜类的双键都是反式, 但在 11-顺-视黄醛(11-cis-retinal) 第 11 位上的双键为顺式。



异戊二烯
头尾连接形式



异戊二烯
尾尾连接形式

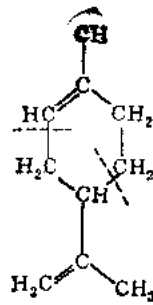


11-顺-视黄醛

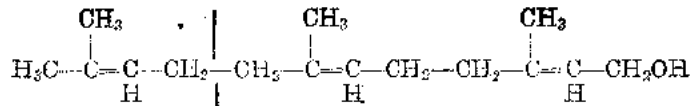
植物中, 多数萜类都具有特殊臭味, 而且是各类植物特有油类的主要成分。例如柠檬苦素、薄荷醇(menthol)、樟脑(camphor)等依次是柠檬油、薄荷油、樟脑油的主要成分。

几种萜类化合物结构如下:

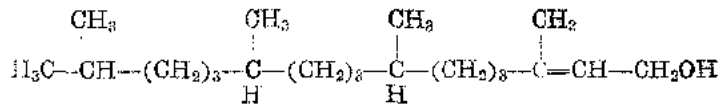
柠檬苦素



法尼醇



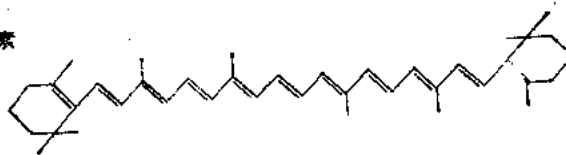
叶绿醇



鲨烯



β胡萝卜素



β-胡萝卜素

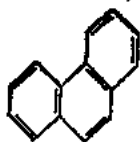
多聚萜类,如天然橡胶等;维生素 A、E、K 等都属于萜类。多聚萜醇常以磷酸酯的形式存在,这类物质在糖基从细胞质到细胞表面的转移中,起类似辅酶的作用。

二、类固醇类

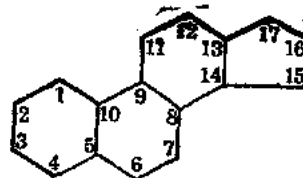
即甾类或类固醇类化合物(steroids)多少不等地、广泛地分布于生物界。其功能多种多样:作为激素,起某种代谢调节作用;作为乳化剂,有助于脂类的消化与吸收。也有抗炎症作用。能用脂肪溶剂从动物组织中将之提取出来。它们不能为碱所皂化。它们以环戊烷多氢菲(cyclopentanoperhydrophenanthrene)为基本结构。



环戊烷



菲



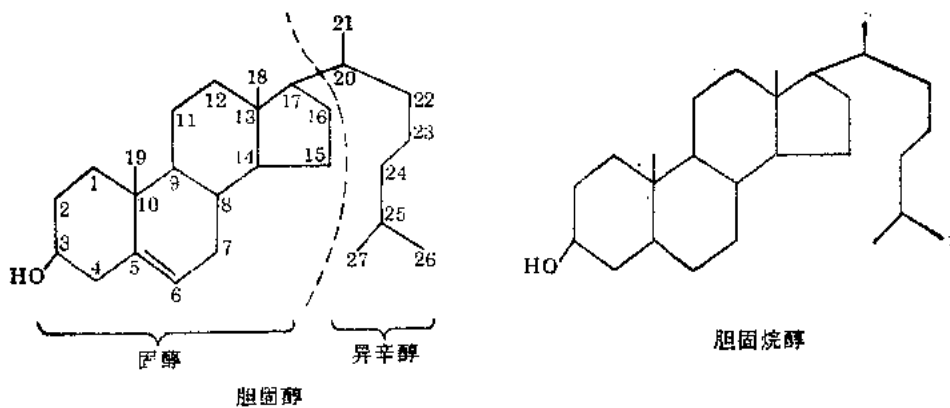
环戊烷多氢菲

其中一大类称为固醇类(sterols, 甾醇类)化合物, 其特点是在甾核的第3位上有一个羟基, 在第17位上有一个分支的碳氢链。根据甾核上羟基的变化, 它又可分为固醇和固醇衍生物两大类。

(一) 固醇类 在生物界分布甚广, 为一环状高分子一元醇。在生物体中它可以游离状态或以与脂肪酸结合成酯的形式存在, 它可分为:

1. 动物固醇(zosterols) 多以酯的形式存在。

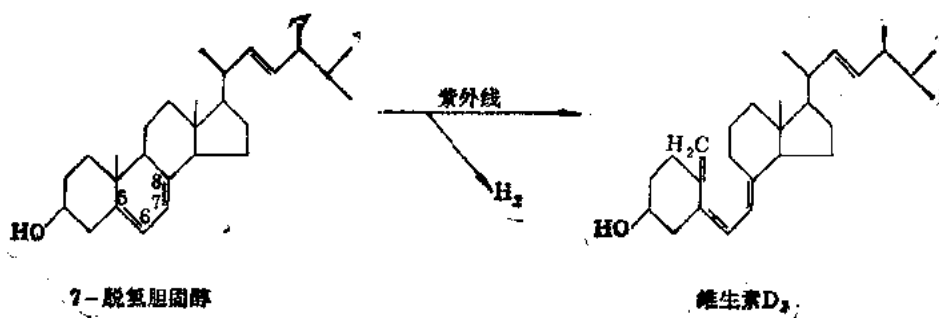
胆固醇(cholesterol, 胆甾醇)是脊椎动物细胞的重要成分, 在神经组织和肾上腺中含量特别丰富, 它约占脑的固体物质的17%。人体内发现的胆石, 几乎全都是由胆固醇构成。肝、肾和表皮组织含量也相当多。伴随胆固醇共同存在的还有微量的胆固醇的二氢化物胆甾烷醇(cholestanol)。它们的结构如下:



胆固醇易溶于乙醚、氯仿、苯及热乙醇中, 不能皂化。胆固醇C₃上的羟基易与高级脂肪酸形成胆固醇酯。胆固醇易与毛地黄糖苷结合而沉淀, 利用这一特性可以测定溶液中胆固醇的含量。胆固醇在氯仿溶液中与乙酸酐及浓硫酸反应, 产生蓝绿色, 其颜色深浅与胆固醇浓度成正比, 常用这一颜色反应来测定胆固醇等不饱和固醇。

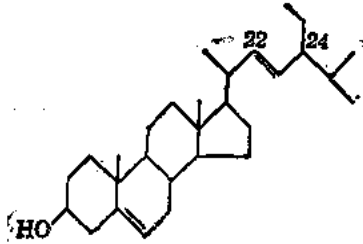
动物能吸收利用食物胆固醇, 也能自行合成。其生理功能与生物膜的透性、神经髓鞘的绝缘物质以及动物细胞对某种毒素的保护作用有一定关系。

7-脱氢胆固醇 存在于动物皮下, 它可能是由胆固醇转化来的。它在紫外线作用下形成维生素D₃。

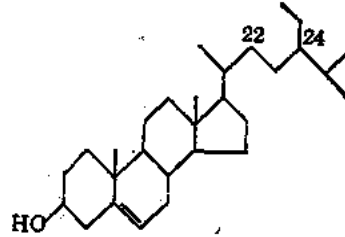


粪固醇(coprostanol) 在动物粪便中发现。其结构比胆固醇少一个双键。

2. 植物固醇(phytosterols) 它是植物细胞的重要组分, 不能为动物吸收利用。植物固醇以豆固醇(stigmasterol)、麦固醇(sitosterol)含量最多, 它们分别存在于大豆、麦芽中。

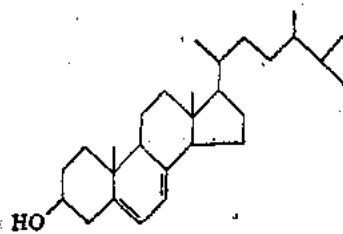


豆固醇

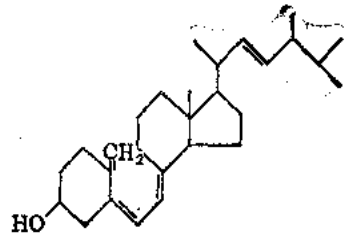
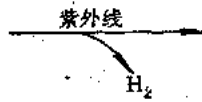


麦固醇

3. 酵母固醇(zymosterols) 它存在于酵母菌、霉菌中, 其含量以麦角固醇(ergosterol)最多, 它经日光和紫外线照射可以被转化为维生素 D₂。



麦角固醇



维生素D₂

上述常见固醇的性质、分子结构、分布和生理作用的综合对比(见表 2-8)

(二) 固醇衍生物 其典型代表是胆汁酸, 具有重要的生理意义。强心苷也是, 它是治疗心脏病的重要药物。

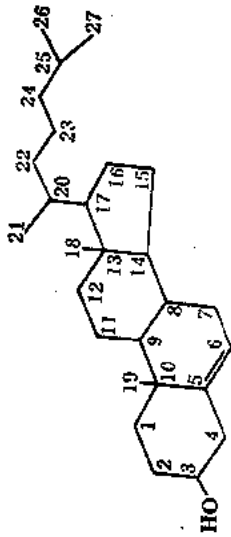
1. 胆汁酸(bile acid) 在肝中合成, 可从胆汁分离得到。人胆汁含有三种不同的胆汁酸, 即胆酸(cholic acid, 3, 7, 12-三羟基)、脱氧胆酸(deoxycholic acid, 3, 12-二羟基)及鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid, 3, 7-二羟基), 其结构如下:



	羟基位置	分子量	熔点	$[\alpha]_D^{25}$ (乙醇)
胆酸	3, 7, 12	408.56	196-198°	+37°
脱氧胆酸	3, 12	392.56	176-177°	+55°
鹅脱氧胆酸	3, 7	392.56	119°	+11

大多数脊椎动物胆酸能以肽键与甘氨酸或牛磺氨酸结合, 分别生成甘氨酸胆酸或牛磺胆酸, 它们是胆苦的主要原因, 它们分别存在于人、牛或猪胆汁中。胆酸与脂肪酸或其他脂类, 如胆固醇, 胡萝卜素形成盐类。它们是乳化剂, 能降低水和油脂的表面张力, 使肠腔内油脂乳化成微粒, 以增加油脂与消化液中的脂肪酶(Lipase)的接触面积, 便于油脂消化吸收。

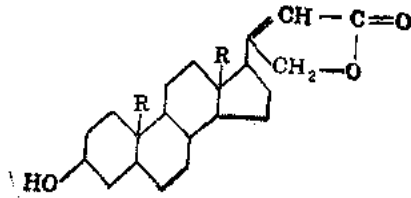
表 2-8 各种固醇分类、名称、性质、分子结构、分布和生理作用的综合对比:



类别	固醇名称	分子量	熔点 (°C)	旋光率 [α] _D (20°C)	分子结构式				分布、生理作用	
					羟基	双键	甲基	乙基		脂肪酸
动物固醇	胆固醇 cholesterol	386.64	149°	-39.5° (20°C)		Δ ⁵			—	脊椎动物细胞的重要组分, 神经组织和肾上腺中含, 属特别丰富。其功能是: 胆汁酸、固醇类激素的前体, 维持生物膜的正常透过程能力, 神经鞘绝缘物质, 解毒等。
	胆固醇								3	维生素D ₃ 前体。由于它经紫外线照射能被转化为维生素D ₃ , 有助于佝偻病的预防和治疗。
	7-脱氢胆固醇 7-dehydrocholesterol (cholesta-5, 7-diene-3β-ol)	384.6	150°	-114° (20°C)		Δ ^{5,7}				动物粪便
植物固醇	麦固醇 coprostanol (5β-cholestan-3β-ol)	388.64	101°	+28°	8		18, 19			存在于大豆中
	豆固醇 stigmasterol (5α-stigmasta-5, 22-diene-3β-ol)	412.7	170°	-49°		Δ ^{5,22}				存在于麦芽中
	麦角固醇 sitosterol (stigmast-5ene-3β-ol)	414.7	140°	-37°		Δ ⁵		24		存在于酵母菌、霉菌中, 维生素D ₂ 前体
酵母固醇	麦角固醇 ergosterol (ergost-5, 7, 22-triene-3β-ol)	386.63	168°	-135° (20°C)		Δ ^{5,7,22}				

2. 强心苷及蟾毒 植物中一些糖苷及蟾蜍分泌的毒液可使心搏率减慢,强度增加。这类糖苷称为强心苷(cardiac glycoside);蟾蜍分泌的毒物称为蟾毒素(bufotoxin)。

强心苷来源于玄参科及百合科植物。它水解后产生糖及苷原。后者为毒素,是固醇类化合物,难溶于水。具有下列基本结构:



式中 R 可以是甲基或醛基。

最常见的强心苷是洋地黄毒素,它存在于洋地黄植物的叶子中。

蟾毒不是以糖苷而是以酯的形式存在。我国人民利用蟾毒治病已有几千年历史,其毒理作用与洋地黄相似。

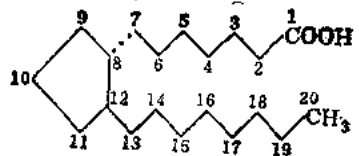
3. 性激素 睾酮(testosterone)、雌二醇(estradiol)和孕酮(progesterone), 详见第八章激素。

4. 维生素 D₃、D₂, 详见第六章维生素。

三、前列腺素

前列腺素(prostaglandins, PG) 是一类脂肪酸的衍生物,是花生四烯酸以及其他不饱和脂肪酸的衍生物。它是在前列腺的分泌物中检测出来的,故名前列腺素。现知,它存在于大多数哺乳动物组织、和细胞中,但量甚微,10⁻⁹克或更少。

前列腺素是具有五元环和 20 个碳原子的脂肪酸。其基本结构是前列腺(烷)酸(prostanoic acid):



前列腺(烷)酸

前列腺素主要有 PGA、PGB、PGD、PGE、PGF、PGG、PGH 到 PGI 等八类,它们又可分为亚类;如 PGE₁、PGE₂ 和 PGE₃ 等注角“1”、“2”等表示在环外碳原子与碳原子间双键的数目。这一系列的前列腺素都是由还原酶类(reductases)和同分异构酶类(isomerases)的作用形成的。

在某些细胞中, PGG₂ 和 PGH₂ 能分别在血小板和动脉壁细胞中转化为生理作用相反两种产物,即凝血噁烷(thromboxanes)具有六元醚环(促进血液凝结)和环前列腺素(prosta-cyclin),即 PGI₂, (防止血液凝结)。花生四烯酸还可转变为白色三烯类(leukotrienes)前列腺

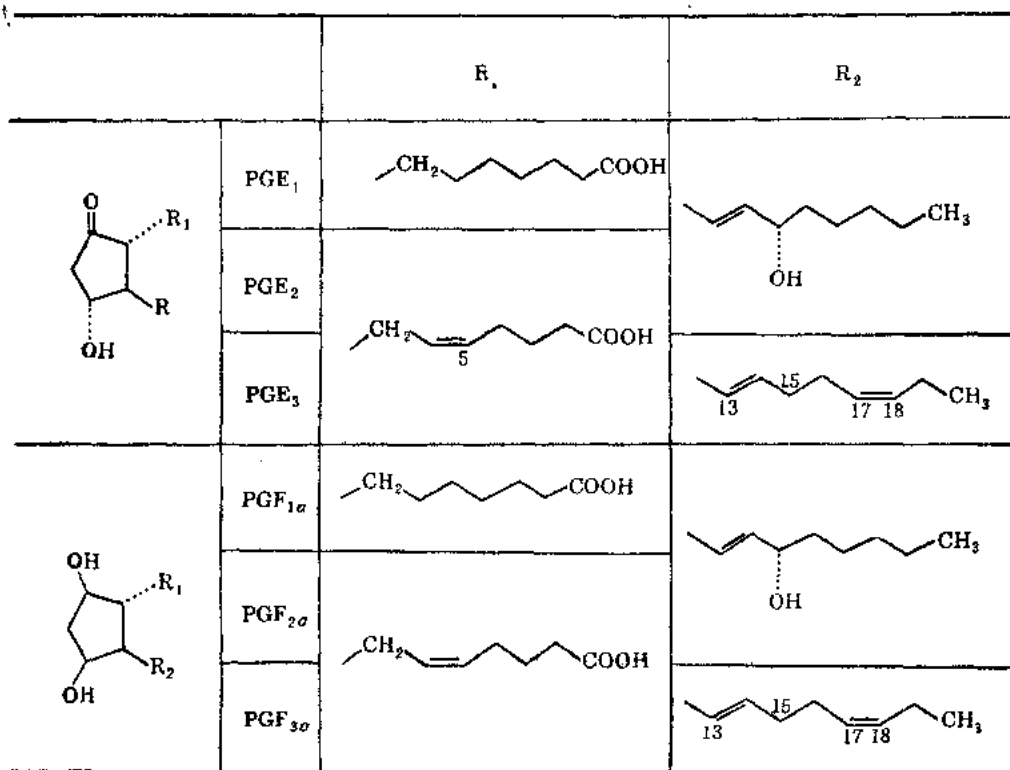


图 2-4 前列腺素(PG)E 和 F 分子结构对比

素。凝血噁烷和白色三烯等总称为二十碳类(eicosanoids),因为它们都含有20个碳原子(eikosi是希腊语的20)。以前列腺素 PGE 和 PGF 为例,它们的分子结构如图 2-4。

前列腺素调节控制的生理过程有:平滑肌收缩,血液供应(血压),神经传递,发炎反应的发生,水滞留,电解质出钠和血液凝结等。

前列腺素 PGE₁ 和肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素、甲状腺素一道,可调节脂肪组织脂肪的水解作用。当 PGE₁ 浓度小于 10⁻⁷ mole 时,它能强烈地抑制上述激素引起的 cAMP 浓度升高,进而抑制脂肪水解。

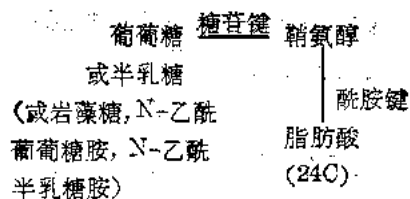
第四节 结合脂类

一、糖脂

一个或多个单糖残基与脂类部分、单脂酰或二脂酰甘油,象鞘氨醇样长链上的碱基或神经酰胺上的氨基以糖苷键相连所形成的化合物,称为糖脂(glycolipids)。

通常使用糖脂一词是指不包括磷酸的鞘氨醇衍生物,称糖鞘脂类(glycosphingolipids)。它分中性和酸性糖鞘脂两类,分别以脑苷脂(cerebrosides)和神经节苷脂(gangliosides)为代表。

(一)脑苷脂类 其共同结构是:



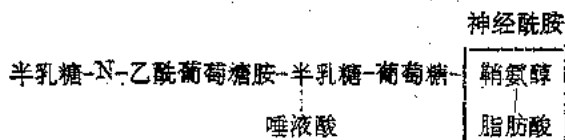
它占脑干重的 11%，少量存在于肝、胸腺、肾、肾上腺、肺和卵黄中。
 天然存在的脑苷脂有以下几种(表 2-9)：

表 2-9 四种天然存在的脑苷脂

脑 苷 脂 类	脂 肪 酸 残 基	分 子 量	溶 点 (°C)
1. 角苷脂 kerosin	二十四碳烷酸(24:0) lignoceric acid	812	180
2. 羟脑苷脂 phrenosin	2-羟二十四碳烷酸 cerebronic acid	828	212
3. 神经苷脂 nervone	二十四碳烯酸(24:1), 即神经酸 nervonic acid	810	180
4. 羟神经苷脂 hydroynervone	2-羟二十四碳烯酸, 即 2-羟神经酸 2-hydroxynervonic acid	—	—

脑硫脂类(sulfatides), 又称硫酸脑苷脂类。其结构是在脑苷脂糖基 C₃ 位为硫酸残基所酯化。它存在于脑中。

(二)神经节苷脂 它是含有唾液酸的糖鞘脂, 又称为唾液酸糖鞘脂(sialoglycosphingolipid)。脑神经节苷脂的(熔点为190°C)具有下列结构:



神经节苷脂在脑灰质和胸腺中含量特别丰富, 它也存在于红细胞、白细胞、血清、肾上腺和其他脏器中, 它是中枢神经系统某些神经元膜的特征性脂组分。它可能与通过神经元的神经冲动传递有关。它在一定遗传病(如 tay-sachs 病)患者脑中积累。神经节苷脂也可能存在于乙酰胆碱和其他神经介质的受体部位。细胞表面的神经节苷脂与血型专一性和组织器官专一性以及组织免疫和细胞识别等都有关系。

二、脂蛋白类

脂蛋白类(lipoproteins)可根据其蛋白质组成, 大致分为:

(一)核蛋白类(nucleoproteins) 其代表是凝血酶致活酶, 它含脂类达 40—50% (其中卵磷脂、脑磷脂和神经磷脂占其大半), 核酸约占 18%。

(二)磷蛋白类(phosphoproteins) 如卵黄中的脂磷蛋白, 所含脂类占 18%。在中性盐(氯化钠等)存在下溶于水, 但用醇从中除去脂后即不再溶解。

(三)单纯蛋白类(simple proteins) 它与脂的重要结合物有血浆脂蛋白, 水溶; 还有从脑

表 2-10 血浆脂蛋白物理、化学性质, 化学组成与主要生理功能

超速离心分份	电泳分份	合成脏器	密 度	漂浮系数 (S_f)	分子量	血浆脂蛋白 浓度 mg/100ml
乳糜微粒	乳糜微粒	肠	<0.960	10^3-10^5		0-50
极低密度 脂蛋白 LDL ₁ , VLDL	前 β	肝	0.960-1.006	20-400	$(5.0-20) \times 10^5$	150-250
低密度 脂蛋白 LDL ₂ LDL ₃	α_2, β_1 β_1	肝	1.006-1.019	12-20	3.4×10^6	50-100
			1.019-1.059	2-12	2.7×10^6	300-360
高密度 脂蛋白 HDL ₁ HDL ₂ HDL ₃	β α_1 α_1	肝	1.059-1.062	0-2	2.0×10^6	15-25
			1.063-1.125		3.75×10^5	50-60
			1.125-1.210		1.75×10^5	200-320
极高密度 脂蛋白 VHDL ₁ (清蛋白- 脂肪酸) VHDL ₁	α_1 清蛋白	脂肪组织	>1.210	沉降常数	1.45×10^5	?
			>1.210	2-10S	2.80×10^5	?

超速离心分份	化 学 组 成						主要生理功能		
	蛋白质 (%)	总脂类 (%)	占总脂类的%						
			三脂酰 甘油	磷脂	胆固醇			游离 脂肪酸 (FFA)	
				酯型	游离型				
乳糜微粒	1	99	88	8	3	1	—	转运外源性脂肪	
极低密度 脂蛋白 LDL, VLDL	7	93	56	20	15	8	1	转运内源性脂肪	
低密度 脂蛋白 LDL ₂ LDL ₃	11 21	89 79	29 13	28 28	34 48	9 10	1 1	转运胆固醇及磷脂	
高密度 脂蛋白 HDL ₁ HDL ₂ HDL ₃	83 57	67 43	16 13	43 46	31 29	10 6	— 6	转运磷脂及胆固醇	
极高密度 脂蛋白 VHDL ₁ 清蛋白- 脂肪酸) VHDL ₁	99	1	0	0	0	0	100	转运游离脂肪酸	

等组织中分离得到的脂蛋白脂, 它不溶于水, 易溶于氯仿、甲醇和水的混合溶液中。

1. 血浆脂蛋白 由于血浆脂蛋白在脂类的含量和组成比例上不相同, 其蛋白质部分也不一样, 它们在体内的合成部位和生理功能并不一致, 血浆脂蛋白类型多种多样。通常用高 NaCl 浓度或密度梯度下超速离心方法, 根据不同脂蛋白所含脂类多少, 密度大小上的差别, 可

将血浆脂蛋白分为五个密度范围不同的组成部分：乳糜微粒(chylomicrons)、极低密度脂蛋白(very low density lipoproteins, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白[high density lipoprotein, HDL)和极高密度脂蛋白(very high density lipoprotein, VHDL)。根据不同脂蛋白所带电荷和颗粒大小上的差别,可用纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳和琼脂糖电泳等方法将血浆脂蛋白分为四个区带：位于原点不移动的乳糜微粒、前 β -、 β -和 α -脂蛋白等。现总结对比各种血浆脂蛋白性质如表2-10。血浆超速离心脂蛋白密度类型和血浆电泳脂蛋白迁移率类型间存在着某种一致性(图2-5)：

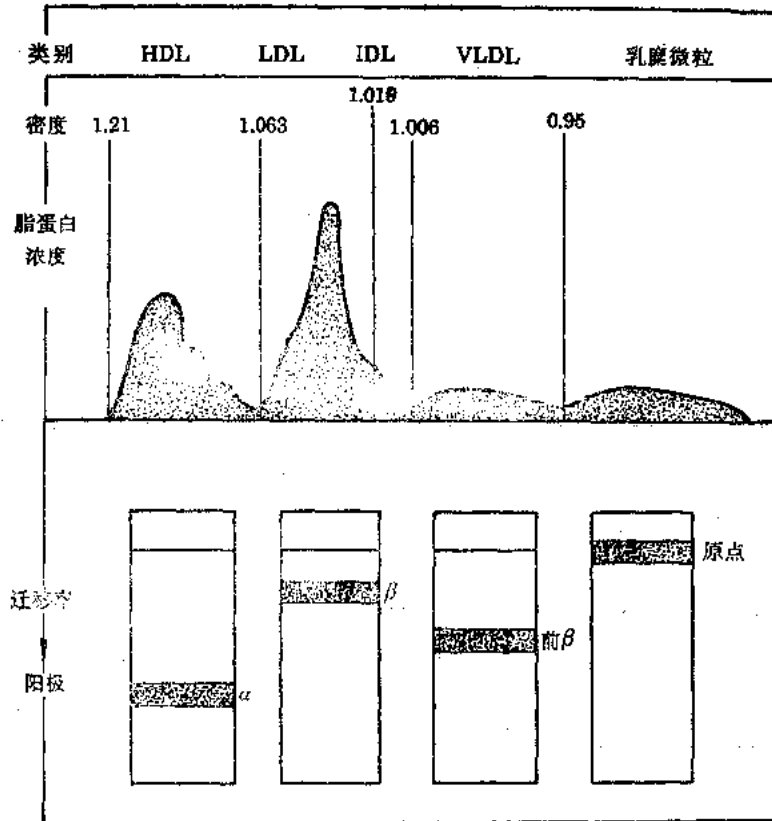


图2-5 血浆脂蛋白密度和电泳迁移率间的一致性

上图表明血浆超速离心脂蛋白纹影图象, 下图表明血浆纸电泳主要血浆脂蛋白迁移率类型。

乳糜微粒是小肠上皮细胞合成的。主要成分来自食物脂肪, 还有少量蛋白质。由于它的颗粒大, 使光散射呈乳浊状, 这是餐后血清混浊的原因。也由于它的颗粒大、比重轻, 当放置在4°C冰箱过夜时, 它上浮, 形成乳白色“奶油”样层, 这是临床检查病理性乳糜微粒存在的简易方法。

极低密度脂蛋白(VLDL, 又称LDL₁)是肝细胞合成的, 其主要成分也是脂肪。当血液流经脂肪组织、肝和肌肉等组织的毛细血管时, 乳糜微粒和VLDL为毛细血管管壁脂蛋白脂酶所水解, 所以在正常人空腹血浆中几乎不易检查出乳糜微粒和VLDL。

低密度脂蛋白, LDL, 来自肝脏, 富含胆固醇, 磷脂含量也不少。

高密度脂蛋白, HDL, 也来自肝脏, 其颗粒最小, 其主要脂类组分为磷脂和胆固醇, 它们分别约占总血浆脂类的 45 和 38%。

极高密度脂蛋白, VHDL, 属清蛋白-游离脂肪酸性质。清蛋白由肝脏合成, VHDL 在脂肪组织中组成。

为了改善涉及血浆脂蛋白升高疾病的诊断, Fredrickson(1970) 将遗传性和后天获得性高脂蛋白血症分为五种类型(表 2-11)。

2. 脑蛋白脂 从脑组织中分离得到。它不溶于水。分为三种(表 2-12)。

表 2-11 高脂蛋白血症分型

分 型	I	II	III	IV	V
1. 发生率	极少	常见	较少	常见	不常见
2. 区带电泳	乳糜微粒, β -脂蛋白 \uparrow	β -脂蛋白 \uparrow , 前 β -脂蛋白 \uparrow	宽 β -带 \uparrow	前 β -脂蛋白 \uparrow	乳糜微粒, 前 β -脂蛋白 $\uparrow\uparrow$
3. 胆固醇	正常或上升	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	正常或上升	\uparrow 或正常
4. 甘油三酯	$\uparrow\uparrow$	正常或 \uparrow	\uparrow (多数病例)	$\uparrow\uparrow$	\uparrow 或 $\uparrow\uparrow$
5. 发生年龄	儿童期	儿童期	成年 > 20 岁	成年	成年
6. 需除外的主要情况	糖尿病	膳食胆固醇过多, 粘液性水肿, 肾病, 阻塞性肝病	粘液性水肿	糖尿病 肾病	糖尿病 肾病
7. 代谢紊乱	外源性脂血症, 不易发生冠心病	家族性高胆固醇血症, 易发生冠心病	宽 β 疾病, 易发生冠心病	内源性脂血症	混合型(I、IV)型

表 2-12 蛋白脂的分析数值(%)

	N	P	糖	磷脂	糖脂	蛋白质
蛋白脂 A	3.8—4.3	0.2—0.4	14	5—15	65—75	20
蛋白脂 B	8.2	1.30	4.0	30	20	50
蛋白脂 C	10.5—11.0	1.30	1	25—30		70—75

第五节 蜡

蜡(waxes)是不溶于水的固体, 是高级脂肪酸和长链、脂肪族一羟基醇或与固醇所形成的酯。

蜡酸(wax acids) 通式为 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$, 如月桂酸(C_{12}), 豆蔻酸(C_{14}), 软脂酸(C_{16}), 二十四碳(烷)酸(C_{24}), 蜡酸(cerotic acid, 即二十六碳(烷)酸, C_{26}), 褐煤酸(montanic acid, 即二十八碳(烷)酸, C_{28}), 蜂花酸(melissic acid, 即三十碳(烷)酸, C_{30})以及更高碳脂肪酸。

蜡醇(wax alcohols)通式为 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$, 如 C_{16} 、 C_{24} 、 C_{26} 和 C_{30} 醇。

温度稍高时,蜡是柔软的固体,温度低时变硬。蜡在皮肤、毛皮、羽毛、树叶、果实表面以及许多昆虫的外骨骼上都起保护作用。

蜂蜡(*beeswax*)是软脂酸和有26—34个碳原子蜡醇形成的酯。羊毛脂(*lanolin*)是脂肪酸和羊毛固醇所形成的酯。

提 要

脂类物质是细胞的不溶性组分,能用非极性溶剂如乙醚、氯仿、和苯进行提取。脂类的脂肪酸组分通常具有偶数碳原子,链长一般为12—22个碳原子。脂肪酸可以是饱和的,也可以是不饱和的。不饱和脂肪酸的双键一般是顺式的。在大多数不饱和脂肪酸中,有一个双键处于9—10位置(4⁹)。脂肪酸能借助气相色谱进行分离和分析。

脂类物质通常可分为:(1)单纯脂;(2)复合脂;(3)萜类、类固醇和前列腺素;(4)衍生脂和结合脂五类。

三脂酰甘油又称为甘油三酯,也称真脂或中性脂,是三个脂肪酸分子与甘油的三个羟基缩合形成的酯。简单的甘油三酯含有单一型式的脂肪酸。混合甘油三酯含有至少两种不同类型的脂肪酸。甘油三酯可发生皂化作用,也和不饱和脂肪酸一样,具有氢化、卤化、氧化作用以及乙酰化作用。通过测定天然油脂的皂化值、碘值、酸值和乙酰化值,可确定某种油脂的特性。三脂酰甘油主要作为贮存燃料,以脂肪小滴形式存在于细胞中。

自然界磷脂中以甘油磷脂含量最多,其结构是两个脂肪酸分子与 α -磷酸甘油的两个游离羟基缩合成酯,磷酸残基又分别与胆碱、乙醇胺、丝氨酸和肌醇各一分子相连。天然存在的甘油磷脂,如磷脂酰胆碱(卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)和磷脂酰丝氨酸等都属L-系。鞘氨醇磷脂不含甘油,却有长链脂肪族氨基醇,即鞘氨醇和与之以酰胺键相连的脂肪酸。

萜类、类固醇类(胆固醇酯除外)和前列腺素均是不含结合脂肪酸的脂类。萜类是异戊二烯的衍生物,有线状的,也有环状的,都含有两个以上的异戊二烯残基,它们都具有特殊的香味。类固醇类化合物是由萜类化合物——鲨烯演变来的。固醇是其中的醇。它有动物固醇、植物固醇和酵母固醇之分,它们各有代表物质,其中胆固醇在动物组织中含最丰富,生物作用广泛。其他类固醇类化合物尚有胆汁酸和固醇类激素(性激素和肾上腺皮质激素)和维生素D等。前列腺素是花生四烯酸的一组衍生物,具有调节活性的,它存在于大多数动物组织中。

蜡是长链脂肪酸和高级醇所形成的酯。蜡一般在生物体外表面,起保护作用。

结合脂有糖脂和脂蛋白两大类型。糖脂中,以脑苷脂和神经节苷脂最重要。它们共有糖及N-脂酰鞘氨醇,神经节苷脂分子中还有唾液酸。它们含量虽少,但具有多种生物功能。根据密度差异,血浆脂蛋白分为乳糜微粒、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白、高密度和极高密度脂蛋白五大类,可电泳分离,各能转运不同脂类。由于它与心血管疾患间关系,血浆脂蛋白、高脂蛋白血症及其分型研究,已取得许多重要成果。

习 题

1. 天然脂肪酸有哪些共性?
2. 脂酰甘油有哪些物理、化学性质? 试分析表 2-2 所列油脂分析数据, 你能获得什么样规律性认识?
3. 250mg 纯橄榄油样品完全皂化需 47.5mgKOH, 计算橄榄油中三脂酰甘油的平均分子量。
4. 上题中橄榄油与碘反应, 680mg 油刚好吸收碘 578mg, 试问
 - (1) 一个三脂酰甘油分子平均有多少个双键?
 - (2) 该油的碘值是多少?
5. 重要的甘油磷脂和鞘氨醇磷脂有哪些重要代表? 它们在结构上有何特点?
6. 将含有(a)心磷脂, (b)磷脂酰甘油, (c)磷脂酰乙醇胺, (d)磷脂酰丝氨酸和(e)O- 赖氨酰磷脂酰甘油的脂类混合物在 pH7 时进行电泳, 指出这些化合物各自在电场中移动的情况。
7. 萜类化合物和类固醇类化合物有何共同点?
8. 类固醇类化合物包括哪些物质? 有哪些共同特性? 胆固醇在这类化合物中占有什么样地位? 有何生理功能?
9. 血浆脂蛋白有哪几种? 各自特性如何?
10. 一种生物膜含蛋白质和磷脂重量分别为 60% 和 40%, 假设磷脂的平均分子量为 800, 蛋白质的平均分子量为 50 000, 求磷脂与蛋白质的摩尔比。

主要参考书

1. Lehninger, A. L., Principles of Biochemistry, 303—329, Worth Publishers, Inc., New York. 1982.
2. Stryer, L., Biochemistry, 283—312, W. H. Freeman and Co., New York. 1988.
3. Bohinski, E. C., Modern Concepts in Biochemistry, 224—253, 4th edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston. 1983.
4. Devlin, T. M., Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, 177—209, 357—360, 391—395, 402—405, 410—429, 2nd edition, John Wiley & Sons, New York. 1982.
5. Smith, E. L., Principles of Biochemistry, General Aspects, 107—125, 7th edition, McGraw-Hill Book Co., New York. 1983.
6. Zubay, G., Biochemistry, 471—476, 505—510, 527—529, 535—540, 545—547, 555—557, 560—563, 566—569, 573—600, Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Massachusetts. 1983.
7. Fasman, G. D., Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Carbohydrates, Lipids, Steroids, CRC Press, 1975—1976.
8. Jakubke, H. D. et al, Concise Encyclopedia of Biochemistry, Walter de Gruyter, Berlin. (1983).
9. 今堀和友等,《生化学辞典》东京化学同人, 1983.

(李建武)

第三章 蛋白质

蛋白质是一类重要的生物大分子,英文名称叫做 protein, 字源出自希腊文 *Πρωτο*, 它是“最原初的”,“第一重要的”意思。中文译为蛋白质,有些学者曾根据 protein 的原义建议设新字“阮”表示,但因蛋白质一词沿用已久,“阮”字未被广泛采用。

蛋白质在生物体内占有特殊的地位。蛋白质和核酸是构成细胞内原生质 (protoplasm) 的主要成分。原生质是生命现象的物质基础。早在 1878 年,恩格斯就在《反杜林论》中指出:“生命是蛋白体的存在方式,这种存在方式本质上就在于这些蛋白体的化学组成部分的不断的自我更新。”从恩格斯的这一光辉论断中,可以引出下列三点:第一,蛋白体是生命的物质基础;第二,生命是物质运动的特殊形式,是蛋白体的存在方式;第三,这种存在方式的本质就是蛋白体与其外部自然界不断的新陈代谢。现代生物化学的实践完全证实并发展了恩格斯的论断。

第一节 蛋白质通论

一、蛋白质的化学组成与分类

许多蛋白质已经获得结晶的纯品。根据蛋白质的元素分析,发现它们的元素组成与糖和脂质不同,除含有碳、氢、氧外,还有氮和少量的硫。有些蛋白质还含有其他一些元素,主要是磷、铁、铜、碘、锌和钼等。这些元素在蛋白质中的组成百分比约为:

碳	50%
氢	7%
氧	23%
氮	16%
硫	0—3%
其他	微量

蛋白质的平均含氮量为 16%,这是蛋白质元素组成的一个特点,也是凯氏(Kjeldahl)定氮法测定蛋白质含量的计算基础:

$$\text{蛋白质含量} = \text{蛋白氮} \times 6.25$$

式中 6.25,即 16% 的倒数,为 1 克氮所代表的蛋白质量(克数)。

蛋白质就其化学结构来说,是由 20 种 L-型 α 氨基酸(amino acids)组成的长链分子。有些蛋白质完全由氨基酸构成,称为简单蛋白质(simple protein),如核糖核酸酶,胰岛素等。有些蛋白质除了蛋白质部分外,还有非蛋白质成分,这种成分称辅基(prosthetic group)或配基(ligand),这类蛋白质称为结合蛋白质(conjugated protein),如血红蛋白,核蛋白。简单蛋白质可以根据其物理化学性质如溶解度进行分类(表 3-1)。结合蛋白质可以按其辅基成分进行分类(表 3-2)。

表 3-1 简单蛋白质的分类

1. 清蛋白(albumin): 溶于水及稀盐、稀酸或稀碱溶液。为饱和硫酸铵所沉淀。广泛存在于生物体内,如血清清蛋白、乳清蛋白等。
2. 球蛋白(globulin): 为半饱和硫酸铵所沉淀。不溶于水而溶于稀盐溶液的称优球蛋白(euglobulin); 溶于水的称拟球蛋白(pseudoglobulin)。普遍存在于生物体内,如血清球蛋白、肌球蛋白和植物种子球蛋白等。
3. 谷蛋白(glutelin): 不溶于水、醇及中性盐溶液,但易溶于稀酸或稀碱。如米谷蛋白(oryzenin)和麦谷蛋白(glutenin)等。
4. 醇溶谷蛋白(prolamine): 不溶于水及无水乙醇,但溶于70—80%乙醇中。组成上的特点是脯氨酸和酰胺较多,非极性侧链远较极性侧链多。这类蛋白质主要存在于植物种子中。如玉米醇溶蛋白(zein)、麦醇溶蛋白(gliadin)等。
5. 组蛋白(histone): 溶于水及稀酸,但为稀氨水所沉淀。分子中组氨酸、赖氨酸较多,分子呈碱性。如小牛胸腺组蛋白等。
6. 鱼精蛋白(protamine): 溶于水及稀酸,不溶于氨水。分子中碱性氨基酸特别多,因此呈碱性。如鲑精蛋白(salmin)等。
7. 硬蛋白(scleroprotein): 不溶于水、盐、稀酸或稀碱。这类蛋白质是动物体内作为结缔及保护功能的蛋白质。例如,角蛋白(keratin)、胶原(collagen)、网硬蛋白(reticulin)和弹性蛋白(elastin)等。

表 3-2 结合蛋白质的分类

1. 核蛋白(nucleoprotein): 辅基是核酸,如脱氧核糖核蛋白、核糖体、烟草花叶病毒等。
2. 脂蛋白(lipoprotein): 与脂质结合的蛋白质。脂质成分有磷脂、固醇和中性脂等。如血中的 β_1 -脂蛋白、卵黄球蛋白(lipovitellin)等。
3. 糖蛋白(glycoprotein)和粘蛋白(mucoprotein): 辅基成分为半乳糖、甘露糖、己糖胺、己糖醛酸、唾液酸、硫酸或磷酸等。如卵清蛋白、 γ -球蛋白,血清类粘蛋白(seromuroid)等。
4. 磷蛋白(phosphoprotein): 磷酸基通过酯键与蛋白质中的丝氨酸或苏氨酸残基侧链相连。如酪蛋白、胃蛋白酶等。
5. 血红素蛋白(hemoprotein): 辅基为血红素,它是卟啉类化合物,卟啉环中心含有金属。含铁的如血红蛋白、细胞色素c,含镁的有叶绿蛋白,含铜的有血蓝蛋白(hemocyanin)等。
6. 黄素蛋白(flavoprotein): 辅基为黄素腺嘌呤二核苷酸。如琥珀酸脱氢酶、D-氨基酸氧化酶等。
7. 金属蛋白(metalloprotein): 与金属直接结合的蛋白质。如铁蛋白(ferritin)含铁,乙醇脱氢酶含锌,黄嘌呤氧化酶含钼和铁等。

蛋白质按其分子外形的对称程度可以分为球状蛋白质(globular protein)和纤维状蛋白质(fibrous protein)两大类。球状蛋白质,分子对称性佳,外形接近球状或椭球状,溶解度较好,能结晶;大多数蛋白质属于这一类。纤维状蛋白质,对称性差,分子类似细棒或纤维。它又可分成可溶性纤维状蛋白质,如肌球蛋白(myosin)、血纤维蛋白原(fibrinogen)等和不溶性纤维状蛋白质,包括胶原、弹性蛋白、角蛋白以及丝心蛋白等。

近年来有些学者提出依据蛋白质的生物功能进行分类。把蛋白质分为酶、运输蛋白质,营养和贮存蛋白质,收缩蛋白质或运动蛋白质,结构蛋白质和防御蛋白质。

二、蛋白质的大小与分子量

蛋白质是分子量很大的生物分子。对任一种给定的蛋白质来说,它的所有分子在氨基酸的组成和顺序以及肽链的长度方面都应该是相同的,即所谓均一的蛋白质。利用本章后面所介绍的物理化学方法可以测定出均一蛋白质的分子量。蛋白质分子量变化范围很大,从大约6 000到1 000 000道尔顿(dalton)或更大一些(表3-4)。蛋白质分子量的上下限是人为规定

的,因为这决定于蛋白质和分子量概念的定义。某些蛋白质是由两个或更多个蛋白质亚基(多肽链)通过非共价结合而成的,称寡聚蛋白质(oligomeric protein)。有些寡聚蛋白质的分子量可高达数百万甚至数千万。例如烟草花叶病毒(TMV),是由许多蛋白质亚基和核糖核酸组成的超分子复合物(supramolecular complex),“分子量”约为 4×10^7 。这些寡聚蛋白质或复合物虽然不是由共价键连接成的整体分子,而在一定条件下可以解离成它们的亚基,但是它们在生物体内是相当稳定的,可以从细胞或组织中以均一的甚至结晶的形式分离出来,并且有一些蛋白质只有以这种寡聚蛋白质的形式存在,其活性才能得到或充分得到表现。

对于那些不含辅基的简单蛋白质,用110除它的分子量即可约略估计其氨基酸残基的数目。蛋白质中20种氨基酸的平均分子量约为138,但在多数蛋白质中较小的氨基酸占优势。因此平均分子量接近128。又因每形成一个肽键将除去一分子水(分子量18),所以氨基酸残基的平均分子量约为 $128 - 18 = 110$ 。表3-3中给出各种蛋白质的氨基酸残基数目。

表3-3 一些蛋白质的分子量

蛋 白 质	分 子 量	残基数目	肽链数目
胰岛素(牛)	5 733	51	2
核糖核酸酶(牛胰)	12 640	124	1
溶菌酶(卵清)	13 930	129	1
肌红蛋白(马心)	16 890	153	1
糜蛋白酶(牛胰)	22 600	241	1
血红蛋白(人)	64 500	574	4
血清清蛋白(人)	68 500	~550	1
己糖激酶(酵母)	102 000	~800	2
γ -球蛋白(马)	149 900	~1250	4
谷氨酸脱氢酶(牛肝)	1 000 000	~8300	~40

三、蛋白质的构象

蛋白质分子是由氨基酸首尾相连而成的共价多肽链(polypeptide chain),但是天然的蛋白质分子并不是一条走向随机的松散肽链。每一种天然的蛋白质都有自己特有的空间结构,这种空间结构通常称为蛋白质的构象(conformation)。前面曾经谈到根据其外形可以把蛋白质分成两大类:纤维状蛋白质和球状蛋白质。纤维状蛋白质不溶于水,在生物体内作为结构成分存在。纤维状蛋白质中,多肽链沿着纤维纵轴的方向借助链内氢键卷曲成 α -螺旋,或借助链间氢键连接成伸展的 β -折叠片。球状蛋白质多数溶于水,在细胞内通常承担动态的功能(dynamic function)。天然的球状蛋白质中,多肽链盘绕成紧密的球状结构(图3-1)。

为了表示蛋白质结构的不同组织层次,一般采用下列的专门术语。一级结构(primary structure)指的是多肽链共价主链(covalent backbone)的氨基酸顺序。二级结构(secondary structure)指的是多肽链借助氢键排列成沿一维方向具有周期性结构的构象,如纤维状蛋白质中的 α -螺旋和 β -折叠片。这两种构象也存在于球状蛋白质中。三级结构(tertiary structure)是指多肽链借助各种次级键(非共价键)盘绕成具有特定肽链走向的紧密球状构象。三级结构中,除了属于二级结构的 α -螺旋和 β -折叠片等有规则的构象之外,还有无规则的松散肽段。

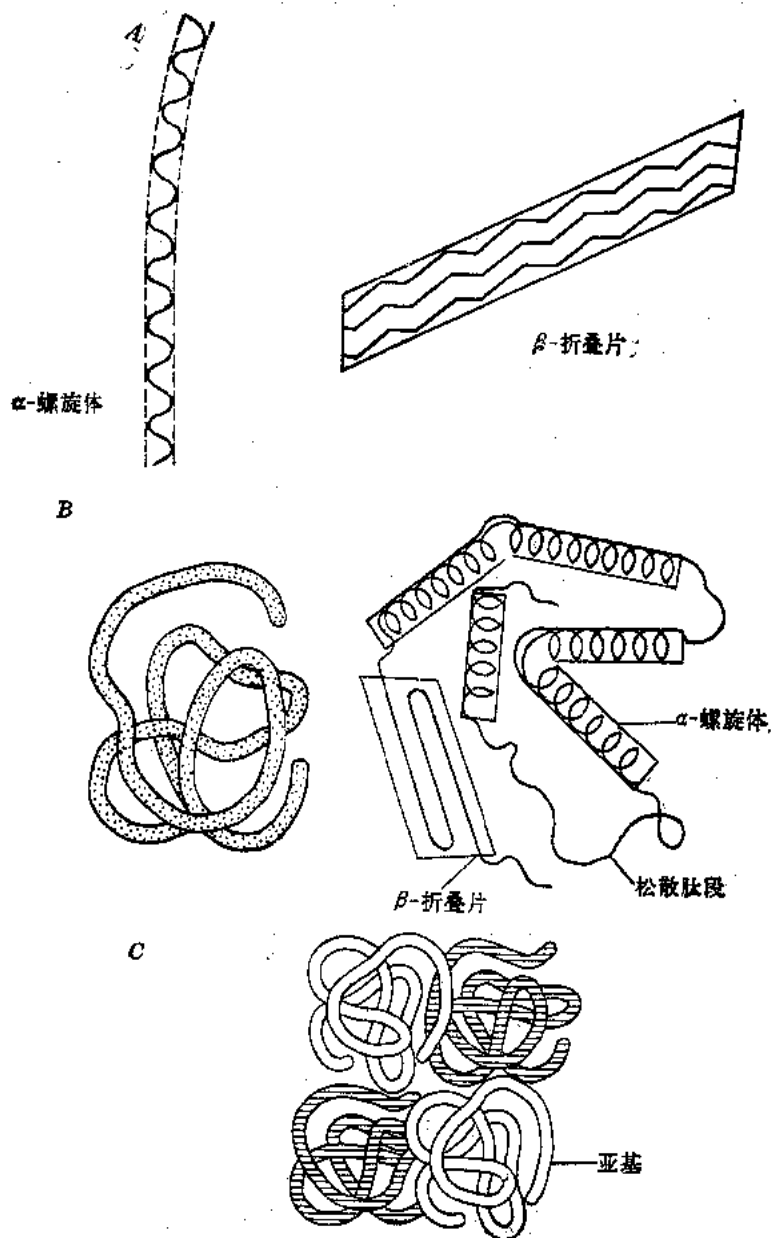


图 3-1 蛋白质分子的构象示意图

A、纤维状蛋白质(示二级结构)， B、球状蛋白质(示三级结构)， C、蛋白质四聚体(示四级结构)

四级结构(quarternary structure)是指寡聚蛋白质中各亚基之间在空间上的相互关系或结合方式。当然寡聚蛋白质中各个亚基又有自己特定的三维构象(图 3-1)。

四、蛋白质功能的多样性

生物界蛋白质的种类估计在 10^{10} — 10^{12} 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的排列顺序不同所引起的。根据排列理论,由 20 种氨基酸组成的二十肽,其顺序异构体有: $A_{20}^{20} = 20! = 2 \times 10^{18}$ 种。如果一个分子量为 34 000 的蛋白质含 12 种氨基酸,并假设每种氨基酸在该蛋白质分子中的数目相等,则不难算出,其顺序异构体数

目为 10^{200} 。蛋白质的这种顺序异构现象是蛋白质生物功能多样性和种属特异性的结构基础。

蛋白质的一最重要的生物学功能是作为有机体新陈代谢的催化剂——酶。几乎所有的酶都是蛋白质。有些酶除了蛋白质以外,还含有其他成分,叫做辅酶。生物体内的各种化学反应几乎都是在相应的酶参与下进行的。例如,淀粉酶催化淀粉的水解;脲酶催化尿素分解为二氧化碳和氨。

蛋白质另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外结构蛋白,参与结缔组织和骨骼作为身体的支架。细胞里的片层结构,如细胞膜、线粒体、叶绿体和内质网等都是由不溶性蛋白质与脂质组成的。

另一类蛋白质有贮藏氨基酸的功能,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的功能。脊椎动物红细胞里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输送氧气的作用。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。

有些蛋白质,例如肌纤维中的肌球蛋白(myosin)和肌动蛋白(actin)是肌肉收缩系统的必要成分。肌动蛋白可以和腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)相互作用而引起机械弹性的改变,伴随着肌原纤维的收缩而产生运动的功能。细菌的鞭毛或纤毛蛋白也能产生类似的活动。近年来发现,在非肌肉的运动系统中普遍存在着运动蛋白。

还有一些蛋白质具有激素的功能,对生物体内的新陈代谢起调节作用。例如胰岛兰氏小岛细胞分泌的胰岛素参与血糖的代谢调节,能降低血液中葡萄糖的含量。

高等动物的免疫反应(immune response)是有机体的一种防御机能。免疫反应主要也是通过蛋白质来实现的。这类蛋白质称为抗体(antibody)或免疫球蛋白(immunoglobulin)。抗体是在外来的蛋白质或其他的高分子化合物即所谓抗原(antigen)的影响下产生的,并能与相应的抗原结合而排除外来物质对有机体的干扰。

起接受和传递信息作用的受体也是蛋白质,例如接受各种激素的受体蛋白,接受外界刺激的感觉蛋白如视网膜上的视色素;味蕾上的味觉蛋白都属于这一类。

蛋白质的再一个重要的功能是调节或控制细胞的生长、分化和遗传信息的表达。例如组蛋白、阻遏蛋白等就是属于这类蛋白质。

第二节 蛋白质的基本结构单位——氨基酸

一、蛋白质的水解

一百多年前就开始了关于蛋白质的化学研究。在早期的研究中,水解作用提供了关于蛋白质组成和结构的极有价值的资料。蛋白质可以被酸、碱或蛋白酶催化水解,在水解过程中,逐渐降解成分子量越来越小的肽段(peptide fragment),直到最后成为氨基酸的混合物。

根据蛋白质的水解程度,可分为完全水解和部分水解两种情况。完全水解或称彻底水解,得到的水解产物是各种氨基酸的混合物。部分水解即不完全水解,得到的产物是各种大小不

等的肽段和氨基酸。下面简略地介绍酸、碱和酶三种水解方法及其优缺点:

酸水解:常用硫酸或盐酸进行水解。使用盐酸,浓度为6 mol/L,硫酸4 mol/L;回流煮沸20小时左右可使蛋白质完全水解。酸水解的优点是不引起消旋作用(racemization),得到的是L-氨基酸。缺点是色氨酸完全被沸酸所破坏,羟基氨基酸(丝氨酸及苏氨酸)有一小部分被分解,同时天冬酰胺和谷氨酰胺的酰胺基被水解下来。

碱水解:一般与5 mol/L氢氧化钠共煮10—20小时,即可使蛋白质完全水解。水解过程中多数氨基酸遭到不同程度的破坏,并且产生消旋现象,所得产物是D型和L型氨基酸的混合物,称消旋物(见本节氨基酸的旋光性部分)。此外,碱水解引起精氨酸脱氨,生成鸟氨酸和尿素。然而在碱性条件下色氨酸是稳定的。

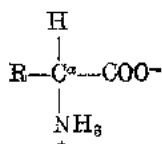
酶水解:不产生消旋作用,也不破坏氨基酸。然而使用一种酶往往水解不彻底,需要几种酶协同作用才能使蛋白质完全水解。此外,酶水解所需时间较长。因此酶法主要用于部分水解。常用的蛋白酶有胰蛋白酶(trypsin)、糜蛋白酶(chymotrypsin)以及胃蛋白酶(pepsin)等,它们主要用于蛋白质一级结构分析以获得蛋白质的部分水解产物。

二、氨基酸的分类

从各种生物体中发现的氨基酸已有180多种,但是参与蛋白质组成的常见氨基酸或称基本氨基酸只有二十种。此外在某些蛋白质中还存在若干种不常见的氨基酸,它们都是在已合成的肽链上由常见的氨基酸经专一酶催化的化学修饰转化而来的。180多种天然氨基酸大多数是不参与蛋白质组成的,这些氨基酸被称为非蛋白质氨基酸。前面的二十多种氨基酸称为蛋白质氨基酸。

(一)常见的蛋白质氨基酸

从蛋白质水解物中分离出来的常见氨基酸有二十种,除脯氨酸外,这些氨基酸在结构上的共同点是与羧基相邻的 α -碳原子上都有一个氨基,因而称为 α -氨基酸。结构通式如下:



α -氨基酸除甘氨酸之外,其 α 碳原子是一个不对称碳原子(asymmetric carbon)或称手性中心(chiral center),因此都具有旋光性。 α -氨基酸都是白色晶体,熔点很高,一般在200°C以上。每种氨基酸都有特殊的结晶形状。利用结晶形状可以鉴别各种氨基酸。除胱氨酸和酪氨酸外,一般都能溶于水。脯氨酸和羟脯氨酸还能溶于乙醇或乙醚中。

为表达蛋白质或多肽结构的需要,氨基酸的名称常使用三字母的简写符号表示,有时也使用单字母的简写符号表示,后者主要用于表达长多肽链的氨基酸顺序。这两套简写符号见于表3-4。

从 α -氨基酸的结构通式可以知道,各种 α -氨基酸的区别就在于侧链R基的不同。这样,组成蛋白质的20种常见氨基酸可以按R基的化学结构或极性大小进行分类。

按R基的化学结构,20种常见氨基酸可以分为脂肪族,芳香族和杂环族三类,其中以脂肪

表 3-4 氨基酸的简写符号

名 称	三字母 符 号	单字母 符 号	名 称	三字母 符 号	单字母 符 号
丙氨酸 (alanine)	Ala	A	亮氨酸 (leucine)	Leu	L
精氨酸 (arginine)	Arg	R	赖氨酸 (lysine)	Lys	K
天冬酰胺 (asparagine)	Asn	N	甲硫氨酸(蛋氨酸) (methionine)	Met	M
天冬氨酸 (aspartic acid)	Asp	D	苯丙氨酸 (phenylalanine)	Phe	F
Asn 和/或 Asp	Asx	B	脯氨酸 (proline)	Pro	P
半胱氨酸 (cysteine)	Cys	C	丝氨酸 (serine)	Ser	S
谷氨酰胺 (glutamine)	Gln	Q	苏氨酸 (threonine)	Thr	T
谷氨酸 (glutamic acid)	Glu	E	色氨酸 (tryptophan)	Trp	W
Gln 和/或 Glu	Glx	Z	酪氨酸 (tyrosine)	Tyr	Y
甘氨酸 (glycine)	Gly	G	缬氨酸 (valine)	Val	V
组氨酸 (histidine)	His	H			
异亮氨酸 (isoleucine)	Ile	I			

族氨基酸为最多。

1. 脂肪族氨基酸

含一氨基一羧基的中性氨基酸(图 3-2)。

- (1) 甘氨酸(氨基乙酸) 是唯一不含手性碳原子的氨基酸, 因此不具旋光性。
- (2) 丙氨酸(α -氨基丙酸)
- (3) 缬氨酸(α -氨基异戊酸)
- (4) 亮氨酸(α -氨基异己酸)
- (5) 异亮氨酸(α -氨基- β -甲基戊酸)

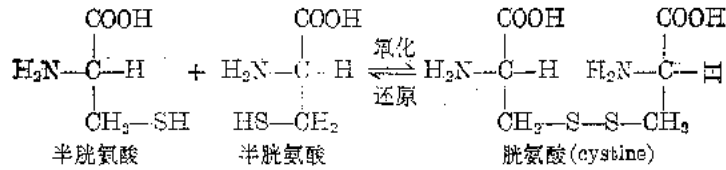
含羟基氨基酸(图 3-3)。

(6) 丝氨酸(α -氨基- β -羟基丙酸) 在某些蛋白质, 如酪蛋白, 卵黄磷蛋白中以磷酸酯形式存在, 称磷酸丝氨酸。

(7) 苏氨酸(α -氨基- β -羟基丙酸)

含硫氨基酸(图 3-4)。

(8) 半胱氨酸(α -氨基- β -巯基丙酸) 在蛋白质中经常以其氧化型的胱氨酸存在。胱氨酸是由两个半胱氨酸通过它们侧链上的 $-SH$ 基氧化成共价的二硫桥(disulfide bridge) 连接而成的。



(9) 甲硫氨酸或称蛋氨酸(α -氨基- γ -甲硫基丁酸) 它是体内代谢中甲基的供体。

含酰胺基氨基酸(图 3-5):

(10) 天冬酰胺

(11) 谷氨酰胺

含一氨基二羧基的酸性氨基酸(图 3-6):

(12) 天冬氨酸(α -氨基丁二酸)

(13) 谷氨酸(α -氨基戊二酸)

含二氨基一羧基的碱性氨基酸(图 3-7):

(14) 赖氨酸(α, ϵ -二氨基己酸)

(15) 精氨酸(α -氨基- δ -胍基戊酸) 在蛋白质代谢中很重要, 它是动物体内尿素形成中的中间物。

2. 芳香族氨基酸(图 3-8)

(16) 苯丙氨酸(α -氨基- β -苯基丙酸)

(17) 酪氨酸(α -氨基- β -对羟苯基丙酸)

3. 杂环族氨基酸(图 3-9)

(18) 色氨酸(α -氨基- β -吲哚基丙酸) 在植物和某些动物体内能转变为尼克酸(维生素

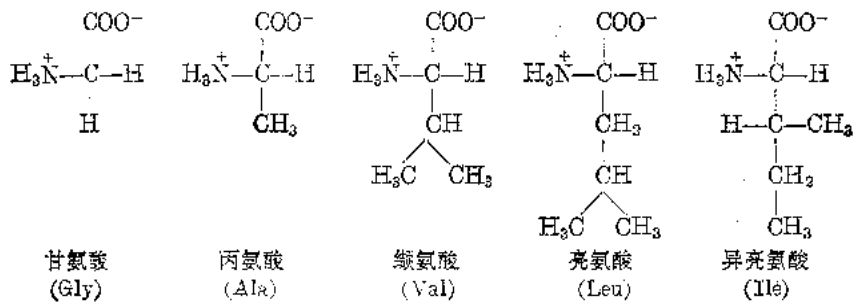


图 3-2 含一氨基一羧基的中性氨基酸

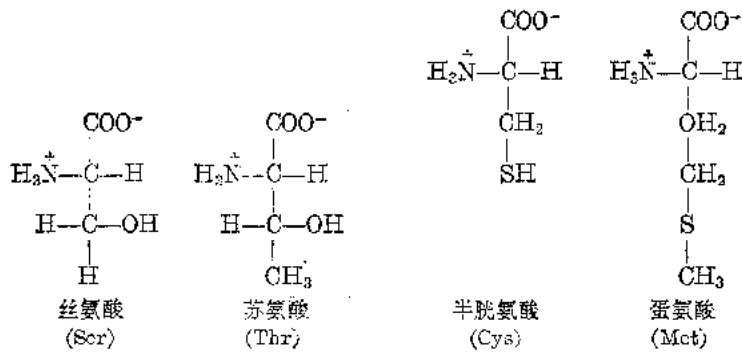


图 3-3 羟基氨基酸

图 3-4 含硫氨基酸

PP)。

(19) 组氨酸(α -氨基- β -咪唑基丙酸) 也属于碱性氨基酸。大量存在于珠蛋白(globin)内。

(20) 脯氨酸(β -吡咯烷基- α -羧酸) 它与一般的 α -氨基酸不同, 没有自由的 α -氨基, 它是一种 α -亚氨基酸, 后者可以看成是 α -氨基酸的侧链取代了自身氨基上的一个氢原子而形成的杂环结构。

按 R 基的极性性质, 20 种常见氨基酸可以分成以下四组: 1. 非极性 R 基氨基酸; 2. 不带电荷的极性 R 基氨基酸; 3. 带正电荷的 R 基氨基酸; 4. 带负电荷的 R 基氨基酸(指在 pH7 左右, 即细胞内的 pH 范围时的解离状态)(表 3-5)。

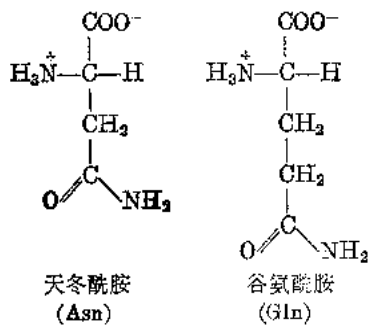


图 3-5 含酰胺基氨基酸

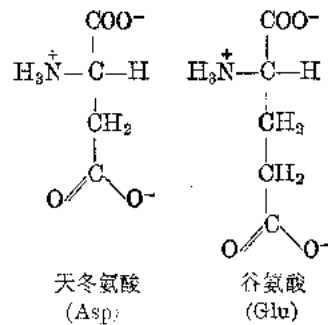


图 3-6 酸性氨基酸

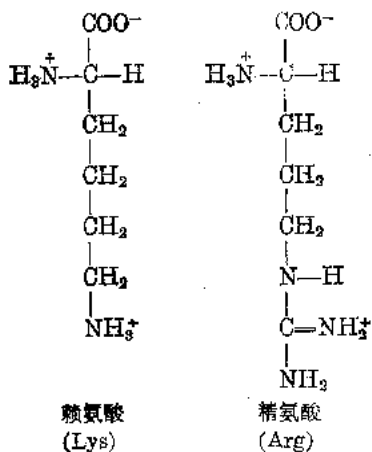


图 3-7 碱性氨基酸

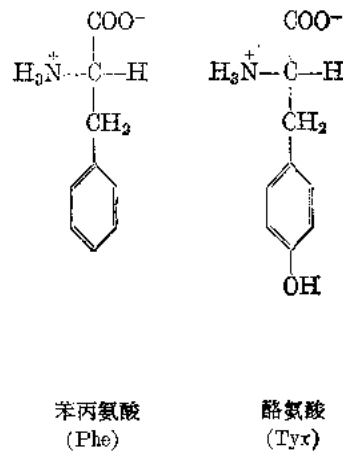


图 3-8 芳香族氨基酸

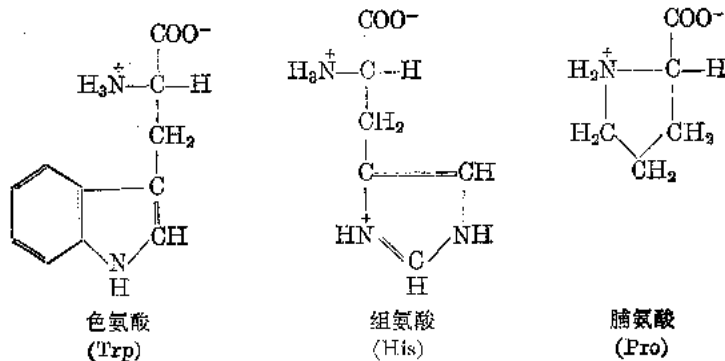


图 3-9 杂环氨基酸

表 3-5 氨基酸按其 R 基的极性分类(在 pH 7)

非极性 R 基:	不带电荷的极性 R 基:
丙氨酸	甘氨酸
缬氨酸	丝氨酸
亮氨酸	苏氨酸
异亮氨酸	半胱氨酸
脯氨酸	酪氨酸
苯丙氨酸	天冬酰胺
色氨酸	谷氨酰胺
甲硫氨酸	
带正电荷的 R 基:	带负电荷的 R 基:
赖氨酸	天冬氨酸
精氨酸	谷氨酸
组氨酸	

1. 非极性 R 基氨基酸

这一组共有八种氨基酸。四种带有脂肪烃侧链的氨基酸,即丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(图 3-2);两种含芳香环氨基酸:苯丙氨酸和色氨酸(图 3-8、3-9);一种含硫氨基酸即甲硫氨酸(图 3-4)和一种亚氨基酸,脯氨酸(图 3-9)。这组氨基酸在水中的溶解度比极性 R 基氨基酸小。这组氨基酸中以丙氨酸的 R 基疏水性为最小,它介于非极性 R 基氨基酸和不带电荷的极性 R 基氨基酸之间。

2. 不带电荷的极性 R 基氨基酸

这一组中有七种氨基酸。这组氨基酸比非极性 R 基氨基酸易溶于水。它们的侧链中含有不解离的极性基,能与水形成氢键。丝氨酸、苏氨酸(图 3-3)和酪氨酸(图 3-8)中侧链的极性是由于它们的羟基造成的;天冬酰胺和谷氨酰胺(图 3-5)的 R 基极性是它们的酰胺基引起的;半胱氨酸(图 3-4)则是由于含有巯基($-SH$)的缘故。甘氨酸的侧链介于极性与非极性之间,有时也把它归入非极性类,但是它的 R 基只不过是一个氢原子,对极性强的 α -氨基和 α -羧基影响很小。这一组氨基酸中半胱氨酸和酪氨酸的 R 基极性最强。半胱氨酸中的巯基和酪氨酸中的酚羟基,虽然在 pH 7 时电离很弱,但与这组中的其他氨基酸侧链相比失去质子的倾向要大得多。

3. 带正电荷的 R 基氨基酸

这是一类碱性氨基酸,在 pH 7 时携带净正电荷。属于碱性氨基酸的有赖氨酸、精氨酸和组氨酸(图 3-7 和 3-9)。赖氨酸除 α -氨基外,在脂肪链的 ϵ 位置上还有一个氨基;精氨酸含有一个带正电荷的胍基;组氨酸有一个弱碱性的咪唑基。在 pH 6.0 时,组氨酸分子 50% 以上质子化,但在 pH 7.0 时,质子化的分子不到 10%。组氨酸是 R 基的 pK 值在 7 附近的唯一的氨基酸。

4. 带负电荷的 R 基氨基酸

属于这一类的是两种酸性氨基酸,天冬氨酸和谷氨酸(图 3-6)。这两种氨基酸都含有两个羧基,并且第二个羧基在 pH 6—7 范围内也完全解离,因此分子带负电荷。

(二) 不常见的蛋白质氨基酸

蛋白质组成中，除了上面 20 种常见的基本氨基酸之外，从少数蛋白质中还分离出一些不常见的特有的氨基酸(图 3-10)。这些特有的氨基酸都是由相应的常见氨基酸衍生而来的。其中有 4-羟脯氨酸(4-hydroxyproline)和 5-羟赖氨酸(5-hydroxylysine)都可在结缔组织的纤维状蛋白质胶原中找到。N-甲基赖氨酸(N-methyllysine)存在于肌球蛋白，一种行使收缩功能的肌肉蛋白质。另一个重要的特有氨基酸是 γ -羧基谷氨酸(γ -carboxyglutamic acid)，

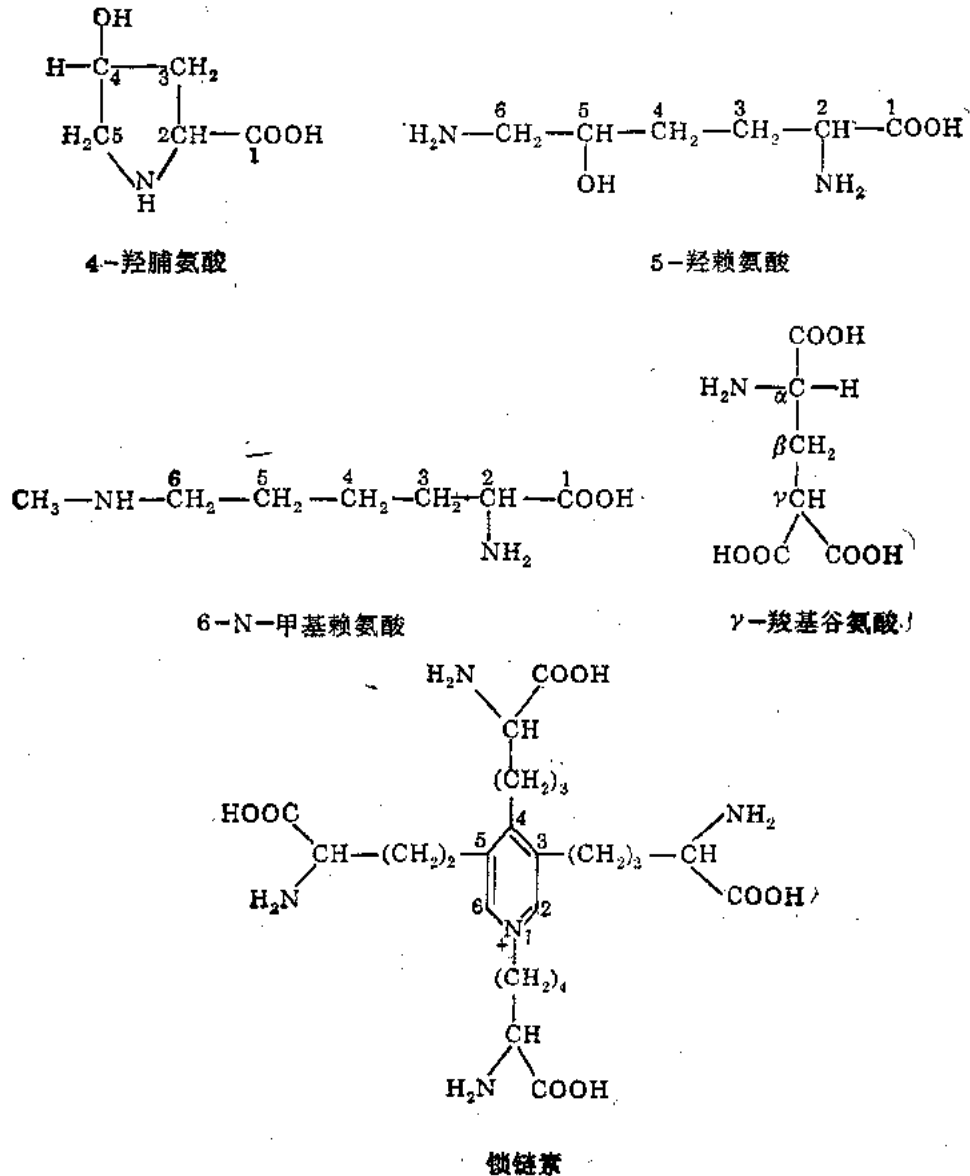
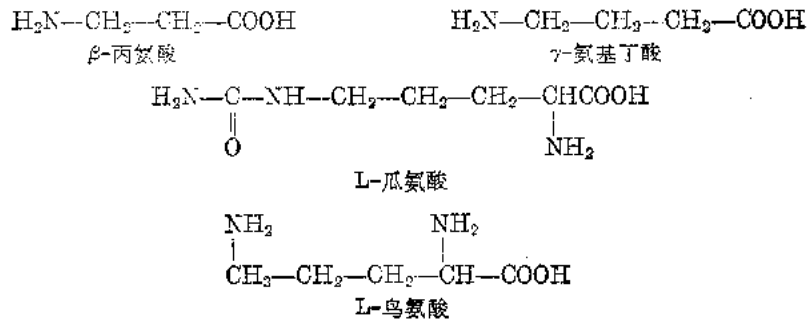


图 3-10 某些不常见的蛋白质氨基酸

首先在凝血酶原(prothrombin)中发现，它也存在于某些具有结合 Ca^{2+} 离子功能的其他蛋白质。一个结构复杂的特有氨基酸叫做锁链素(desmosine)，它是赖氨酸的衍生物，中央的吡啶环结构是由 4 个赖氨酸分子的侧链组成的。此氨基酸只存在于弹性蛋白(elastin)中。此外，从甲状腺蛋白中分离出 3, 5-二碘酪氨酸(3, 5-diiodotyrosine)和甲状腺素(thyroxine)等，它们都是酪氨酸的衍生物，结构式见“激素”章。

(三) 非蛋白质氨基酸

除了参与蛋白质组成的 20 多种氨基酸之外,还在各种组织和细胞中找到 150 多种其他氨基酸。这些氨基酸大多是蛋白质中存在的那些 L 型 α -氨基酸的衍生物。但是有一些是 β 、 γ 或 δ -氨基酸,并且有些是 D 型氨基酸,如参与细菌细胞壁组成的肽聚糖中发现有 D-谷氨酸和 D-丙氨酸;在一种抗生素短杆菌肽 S(gramicidin S)中含有 D-苯丙氨酸。这些氨基酸中有一些是重要的代谢物前体或中间产物。例如, β -丙氨酸是遍多酸(一种维生素)的前体;瓜氨酸(L-citrulline)和鸟氨酸(L-ornithine)是尿素循环的中间体(见“蛋白质分解及氨基酸代谢”章)。有些氨基酸,象 γ -氨基丁酸是传递神经冲动的化学介质。但是不少这类氨基酸其生物学意义还不清楚,有待进一步研究。



三、氨基酸的旋光性和光吸收

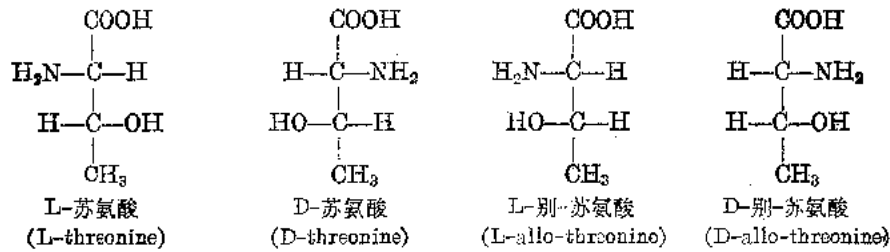
从前面的 α -氨基酸的结构通式可以看出,除 R 基为氢原子外,即除甘氨酸外, α -氨基酸中的 α -碳原子是一个不对称碳原子,即与 α -碳原子键合的四个取代基各不相同:羧基、氨基、R 基和一个氢原子。由于 α -碳原子周围的价键是取四面体的排布,这样,四个不同的取代基在空间的排列可以有两种不同的方式, L 型和 D 型,它们彼此是一种不能叠合的物体与镜像关系或左右手关系(图 3-11)。分子的这两种形式称为光学异构体(optical isomers)、对映体(enantiomorphs)或立体异构体(stereoisomers)。给定氨基酸的一个异构体的溶液在旋光计上使偏振光平面向左(逆时针方向)旋转[记为(-)],另一个异构体则使偏振光平面向右(顺时针方向)旋转[记为(+)],但旋转程度相等。 α -氨基酸所具有的这种性质称为旋光性(rotation)或光学活性(optical activity),也称分子的手性(chirality)。光学异构体除了在旋光计上引起偏振光平面旋转的方向不同之外,所有的化学性质和物理性质都是一样的。

氨基酸的光学异构体是根据它们的绝对构型(absolute configuration)区分和命名的(L 型和 D 型),也就是说根据与构型的标准物——甘油醛进行比较而确定(图 3-12)。而甘油醛的构型(D-, L-异构体)是由 X-射线结构分析确立的。从蛋白质温和水解得到的 α -氨基酸都属于 L 型。但是正如前面说过的,在某些生物体内特别是细菌中 D 型氨基酸还是广泛存在的。

旋光性物质在化学反应中,只要其不对称原子经过对称状态的中间阶段,即将发生消旋作用并转变为 D 型和 L 型的等当量混合物,称消旋物(racemate)。蛋白质与碱共热进行水解时,或用一般的有机合成方法人工合成氨基酸时,得到的氨基酸都是无旋光性的 DL-消旋物。

苏氨酸、异亮氨酸,羟脯氨酸和羟赖氨酸除了 α -碳原子是一个不对称碳原子外,还有第二个不对称碳原子。因此在实验室里可以存在四种光学异构体,它们分别称为 D-、L-、D-别-和

L-别-氨基酸。苏氨酸的四个异构体如下:



L-和 D-、L-别-和 D-别-各为一对对映体, 分别组成一个外消旋物(或称消旋物)。苏氨酸和别-苏氨酸之间不存在互成物体与镜象的关系。这种不互成物体与镜象关系的化学异构体, 称为非对映体(diastereoisomers)。实验表明四种异构体, 在蛋白质中只发现其中一种, 即 L-苏氨酸。

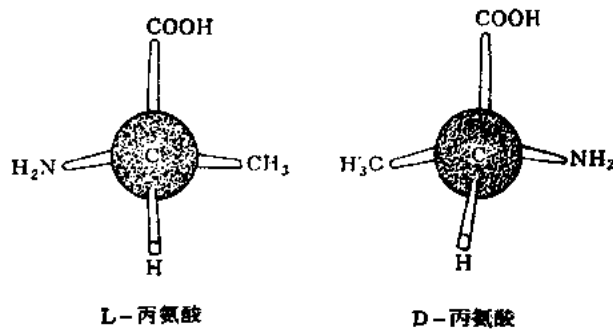


图 3-11 丙氨酸的二个光学异构体。羧基作为参考基团, 连接它的价键垂直于手性碳原子。D-和 L-丙氨酸彼此互为镜象, 不能叠合。

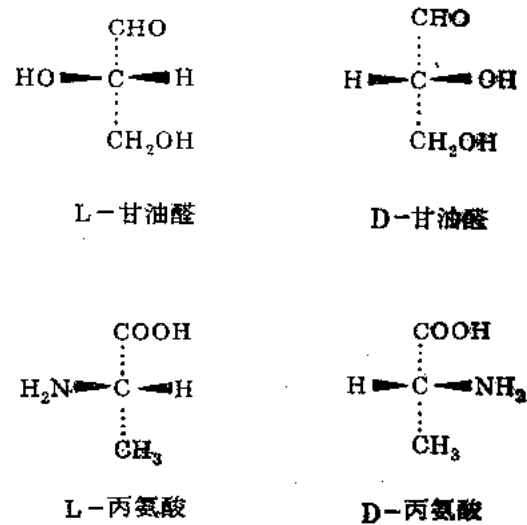
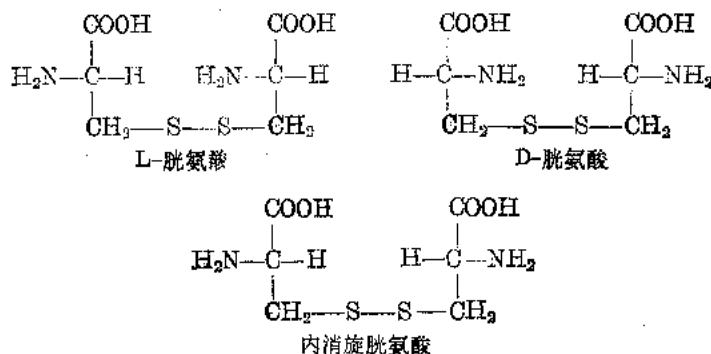


图 3-12 丙氨酸的一对对映体与 L-和 D-甘油醛的绝对构型的立体关系

胱氨酸是一种特殊情况, 因为两个不对称中心是相同的。在这种情况下两个不对称中心的构型可以是相同的, 这时产生 D 型和 L 型两个异构体; 也可以是不相同的, 这时一个不对称中心的构型将是另一个不对称中心的构型的镜象, 这样, 分子内部互相抵消而无旋光性。这种胱氨酸异构体称为内消旋胱氨酸(meso-cystine)。



氨基酸的旋光符号和大小取决于它的 R 基性质, 并且与测定时的溶液 pH 有关, 这是因为在不同的 pH 条件下氨基和羧基的解离状态不同(图 3-13)。

比旋光度是 α -氨基酸的物理常数之一,也是鉴别各种氨基酸的一种根据。L型 α -氨基酸的比旋光度见表3-6。

参与蛋白质组成的20多种氨基酸,在可见光区域都没有光吸收,但在远紫外区($<220\text{ nm}$)均有光吸收。在近紫外光区域($220\text{--}300\text{ nm}$)只有酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸有吸收光的能力。因为它们的R基含有苯环共轭双键系统。酪氨酸的最大光吸收波长(λ_{max})在 275 nm ,在该波长下的摩尔消光系数(molar extinction coefficient) $\epsilon_{275} = 1.4 \times 10^3$;苯丙氨酸的 λ_{max} 在 257 nm , $\epsilon_{257} = 2.0 \times 10^3$;色氨酸的 λ_{max} 在 280 nm , $\epsilon_{280} = 5.6 \times 10^3$ 。

蛋白质由于含有这些氨基酸,所以也有紫外吸收能力,一般最大光吸收在 280 nm 波长处,因此能利用分光光度法很方便地测定蛋白质的含量。但是在不同的蛋白质中这些氨基酸的含量不同,所以它们的消光系数(或称吸收系数)是不完全一样的。

分光光度法定量分析所依据的是 Lambert-Beer 定律:

$$A \text{ 或 } D = \lg \frac{I_0}{I} = \lg \frac{1}{T} = \epsilon CL$$

表3-6 蛋白质中常见L型氨基酸的比旋光度

名称	分子量	$[\alpha]_D^{25}(\text{H}_2\text{O})$	$[\alpha]_D^{25}(5\text{ mol/L HCl})$	名称	分子量	$[\alpha]_D^{25}(\text{H}_2\text{O})$	$[\alpha]_D^{25}(5\text{ mol/L HCl})$
甘氨酸	75.05			精氨酸	174.4	+12.5	+27.6
丙氨酸	89.06	+1.8	+14.6	赖氨酸	146.13	+13.5	+26.0
缬氨酸	117.09	+5.6	+28.3	组氨酸	155.09	-38.5	+11.8
亮氨酸	131.11	-11.0	+16.0	胱氨酸	240.33		-232
异亮氨酸	131.11	+12.4	+39.5	半胱氨酸	121.12	-16.5	+6.5
丝氨酸	105.06	-7.5	+15.1	甲硫氨酸	149.15	-10.0	+23.2
苏氨酸	119.18	-28.5	-15.0	苯丙氨酸	165.09	-34.5	-4.5
天冬氨酸	133.6	+5.0	+25.4	酪氨酸	181.09		-10.0
天冬酰胺	132.6	-5.3	+33.2 (3 mol/L HCl)	色氨酸	204.11	-33.7	+2.8 (1 mol/L HCl)
谷氨酸	147.08	+12.0	+31.8	脯氨酸	115.08	-86.2	-60.4
谷氨酰胺	146.08	+6.3	+31.8 (1 mol/L HCl)	羟脯氨酸	131.08	-76.0	-50.5

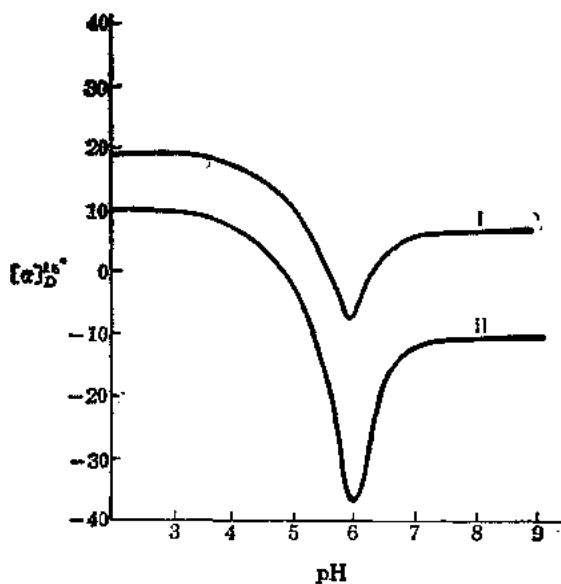


图3-13 pH对L-亮氨酸(I)和L-组氨酸(II)的 $[\alpha]_D^{25}$ 值的影响

这里,

A 或 D = 光吸收或光密度;

ϵ = 摩尔消光系数;

C = 摩尔浓度;

L = 吸收杯的内径长度 (cm);

I_0 = 入射光强度

I = 透射光强度

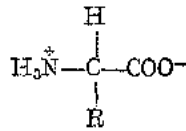
T = 透光率 (transmittancy, $= \frac{I}{I_0}$)

四、氨基酸的酸碱性质

掌握氨基酸的酸碱性质的知识是极其重要的, 因为这些知识是了解蛋白质的很多性质的基础, 也是氨基酸的分析分离工作的基础。而氨基酸的分析分离是测定蛋白质的氨基酸组成和顺序的必要步骤。

(一) 氨基酸的兼性离子形式

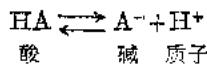
过去曾长期认为, 氨基酸在晶体甚至水溶液中是以不解离的中性分子形式 $H_2NCH(R)COOH$ 存在的。后来发现氨基酸晶体的熔点很高, 一般在 $200^\circ C$ 以上, 例如甘氨酸在 $233^\circ C$ 熔解并分解, L-酪氨酸的熔点更高, $344^\circ C$, 但是普通的有机化合物如二苯胺 (diphenylamine), 熔点为 $53^\circ C$ 。此外还发现氨基酸能使水的介电常数 (dielectric constant) 增高, 而一般的有机化合物如乙醇、丙酮等却使水的介电常数降低。如果氨基酸在晶体或水中主要是以兼性离子 (zwitterion) 亦称偶极离子 (dipolarion) 的形式存在:



不带电荷的中性分子为数极少, 那末上述的两个事实就很容易解释。也就是说氨基酸晶体是以离子晶格组成的, 象氯化钠晶体一样, 维持晶格中质点的作用力是强大的异性电荷之间的静电吸引, 因此熔点高; 而一般的有机化合物晶体是由分子晶格组成的, 分子晶格中质点的维系是靠范德华力 (van der Waals force), 这种力比静电引力要弱得多, 因此它们的熔点低。介电常数与电解质分子的极性结构有关, 极性分子的介电常数高, 非极性分子的介电常数低。显然, 偶极离子形式的氨基酸是强极性分子, 这样自然就增大了水的介电常数。在 $20^\circ C$, 水的介电常数为 80, 而一个摩尔浓度的 α -氨基酸水溶液, 其介电常数为 102---108。

(二) 氨基酸的两性解离

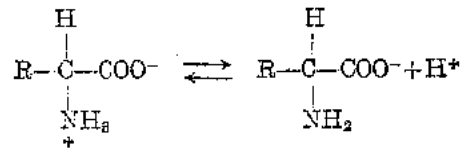
依照 Bronsted-Lowry 的酸碱质子理论, 酸是质子 (H^+) 的供体 (donor), 碱是质子的受体 (acceptor)。酸碱的相互关系如下:



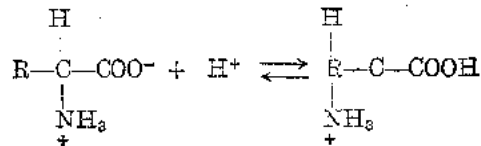
这里原始的酸 (HA) 和生成的碱 (A^-) 被称为共轭酸-碱对。酸和碱有同一性, 互为存在的条

件,在一定条件下,又各向着和自己相反的方面转化,这一理论是符合辩证法的。

根据这一理论,氨基酸在水中的偶极离子既起酸(质子供体)的作用,

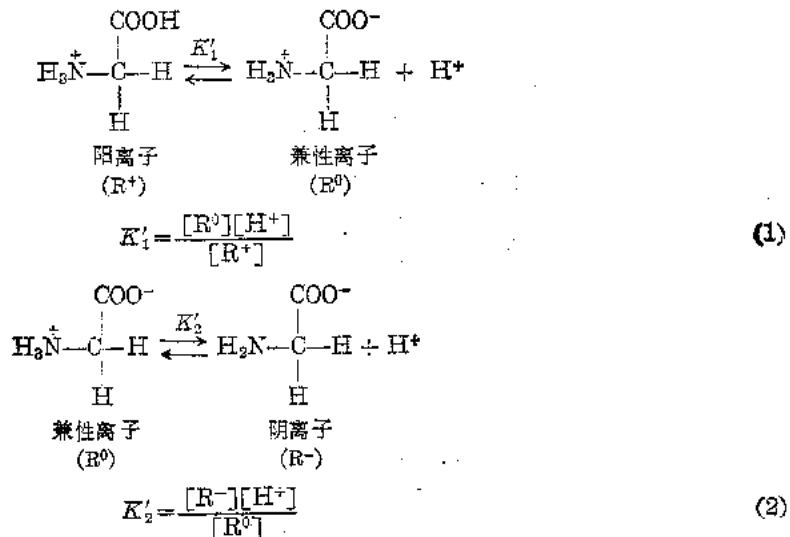


也起碱(质子受体)的作用,



因此是一类两性电解质。

氨基酸完全质子化时,可以看成是多元酸,侧链不解离的中性氨基酸可看作二元酸,酸性氨基酸和碱性氨基酸可视为三元酸。现以甘氨酸为例,说明氨基酸的解离情况。它分步解离如下:



在上列公式中, K'_1 和 K'_2 分别代表 α 碳原子上的 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{NH}_3^+$ 的表观解离常数*。如果侧链 R 基上有可解离的基团,其表观解离常数用 K'_x 表示。

物质的表观解离常数可以用测定滴定曲线的实验方法求得。当 1 mol 甘氨酸溶于水时,溶液的 pH 约等于 6, 如果用标准氢氧化钠进行滴定, 以加入的氢氧化钠的摩尔数对 pH 作图, 则得滴定曲线 B(图 3-14), 在 pH 9.6 处有一拐点。从甘氨酸的解离公式 (2) 可知, 当滴定至 $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ 有一半变成 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$, 即 $[\text{R}^0] = [\text{R}^-]$ 时, 则 $K'_2 = [\text{H}^+]$, 两边各取负对数得 $\text{p}K'_2 = \text{pH}$, 这就是曲线 B 拐点处的 pH(9.6)。如果用标准盐酸滴定, 以加入

* 在生物化学中,应用解离常数时习惯于在特定的条件下进行测定(如一定的溶液浓度, pH 和离子强度等)。因此,将在这种条件下测得的常数称为表观解离常数(apparent dissociation constant), 也称浓度解离常数(concentration dissociation constant), 用符号 K' 表示, 以区别物理化学中常用的真实解离常数 K (true dissociation constant) 或称热力学解离常数(thermodynamic dissociation constant)。 K 值是校正值, 是对由浓度和离子强度所造成的偏离经校正后的数值。

的盐酸摩尔数对 pH 作图, 则得滴定曲线 A, 在 pH 2.34 处有一拐点。同样, 从解离公式(1)可知, $pK'_1 = 2.34$, 这里 $\overset{+}{H}_3N-CH_2-COO^-$ 和 $\overset{+}{H}_3N-CH_2-COOH$ 的摩尔浓度相等, 即 $[R^+] = [R^0]$ 。如果利用 Handerson-Hasselbalch 公式,

$$pH = pK' + \lg \frac{[\text{质子受体}]}{[\text{质子供体}]}$$

以及所给的 pK'_1 和 pK'_2 等数据, 即可计算出在任一 pH 条件下一种氨基酸的各种离子的比例。

为了判断滴定曲线上的两个拐点, pH 2.34 和 9.60, 究竟代表甘氨酸中哪个基团的解离, 可以把它们与脂肪酸和脂肪胺的 pK' 值进行对比。脂肪酸中的 $-COOH$ 基 pK' 值一般在 4—5, 脂肪胺中的 $-\overset{+}{N}H_3$ pK' 值一般在 9—10。所以最可能的是 $pK'_1 = 2.34$ 代表甘氨酸中 $-COOH$ 基的解离, $pK'_2 = 9.60$ 代表甘氨酸中 $-\overset{+}{N}H_3$ 基的解离。甘氨酸中的 $-COOH$ 基酸性要比醋酸 ($pK' = 4.76$) 强 100 多倍, 这是因为邻近的 $-\overset{+}{N}H_3$ 基的正电荷对 $-COOH$ 的质子 (H^+) 产生静电排斥因而增加了 $-COOH$ 基释放质子的趋势, 如下式所示:

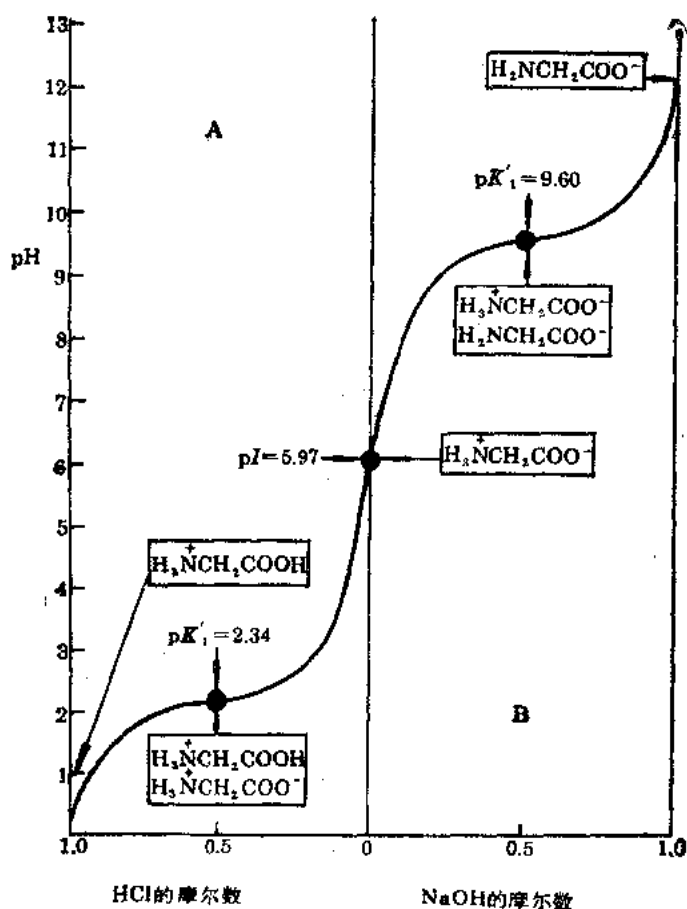
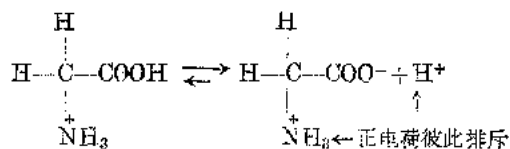


图 3-14 甘氨酸的解离曲线(方框内表示在解离曲线拐点处的 pH 时所具有的离子形式)

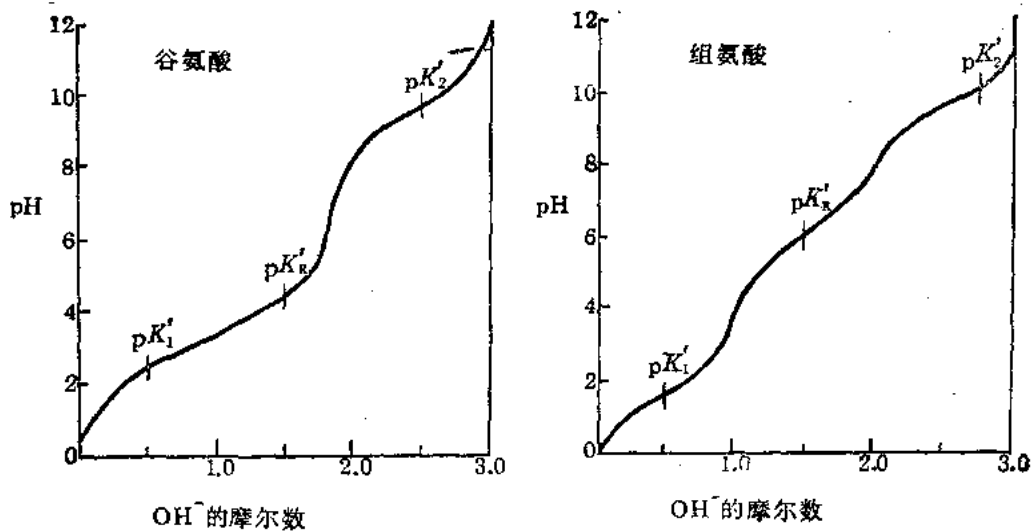


图 3-15 谷氨酸和组氨酸的滴定曲线。图中 pK'_R 为 R 基在拐点处的 pH

含一氨基一羧基和不解离 R 基的氨基酸都具有类似甘氨酸的滴定曲线。这类氨基酸的 pK' 值相当 pK'_1 的范围为 2.0—3.0, pK'_2 为 9.0—10.0 (见表 3-7)。带有可解离 R 基的氨基酸, 相当于三元酸, 有三个 pK' 值, 因此滴定曲线比较复杂。这类氨基酸中的二个代表, 完全质子化的谷氨酸和组氨酸的滴定曲线见图 3-15。

二十种基本氨基酸, 除组氨酸外, 在生理 pH (pH 7 左右) 下都没有明显的缓冲容量, 因为这些氨基酸的 pK' 值都不在 pH 7 附近 (表 3-7), 而缓冲容量只在接近 pK' 值时才显现出来。从表 3-7 和图 3-15 可见, 组氨酸咪唑基的 pK'_R 值为 6.0, 在 pH 7 附近有明显的缓冲作用。红细胞中运载氧气的血红蛋白由于含有较多的组氨酸残基, 使得它在 pH 7 左右的血液中具有显著的缓冲能力, 这一点对红细胞在血流中起运输氧气和二氧化碳的作用来说是重要的。

从甘氨酸的解离公式或解离曲线可以看到, 氨基酸的带电状况与溶液的 pH 值有关, 改变 pH 可以使氨基酸带上正电荷或负电荷, 也可以使它处于正负电荷数相等即净电荷为零的兼性离子状态。图 3-14 中曲线 A 和曲线 B 之间的拐点 (pI 5.97) 就是甘氨酸处于净电荷为零时的 pH, 称为等电点 (isoelectric point, 缩写为 pI) 或等电 pH (pH_I)。在等电 pH 时, 氨基酸在电场中既不向正极也不向负极移动, 即处于兼性离子 (极少数为中性分子) 状态, 少数解离成阳离子和阴离子, 但解离成阳离子和阴离子的数目和趋势相等。

对侧链 R 基不解离的中性氨基酸来说, 其等电点是它的 pK'_1 和 pK'_2 的算术平均值:

$$pI = \frac{1}{2}(pK'_1 + pK'_2),$$

这可由氨基酸的解离公式推导出来。将前面所列的 K'_1 和 K'_2 的等式:

$$K'_1 = \frac{[R^0][H^+]}{[R^+]}$$

$$K'_2 = \frac{[R^-][H^+]}{[R^0]}$$

相乘得:

$$K'_1 \cdot K'_2 = [H^+]^2 \frac{[R^-]}{[R^+]}$$

表 3-7 氨基酸的表现解离常数和等电点

氨基酸*	$pK'_1(-COOH)$	$pK'_2(-NH_3^+)$	$pK'_R(\text{R基})$	pI
甘氨酸	2.34	9.60		5.97
丙氨酸	2.34	9.69		6.02
缬氨酸	2.32	9.62		5.97
亮氨酸	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸	2.36	9.68		6.02
丝氨酸	2.21	9.15		5.68
苏氨酸	2.63	10.43		6.53
天冬氨酸	2.09	9.82	3.86(β COOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(γ COOH)	3.22
谷氨酰胺	2.17	9.13		5.65
精氨酸	2.17	9.04	12.48(胍基)	10.76
赖氨酸	2.18	8.95	10.53(ϵ NH ₃ ⁺)	9.74
组氨酸	1.82	9.17	6.00(咪唑基)	7.59
半胱氨酸	1.71	8.33	10.78(SH)	5.02
甲硫氨酸	2.28	9.21		5.75
苯丙氨酸	1.83	9.13		5.48
酪氨酸	2.20	9.11	10.07(OH)	5.66
色氨酸	2.38	9.39		5.89
脯氨酸	1.99	10.60		6.30

* 除半胱氨酸是 30°C 测定数值外,其他氨基酸都是 25°C 测定数值。

在等电点时, $[R^-] = [R^+]$, 因此,

$$[H^+]^2 = K'_1 \cdot K'_2$$

$$[H^+] = (K'_1 \cdot K'_2)^{\frac{1}{2}}$$

如以 I 代表等电点的氢离子浓度, 则:

$$I = (K'_1 \cdot K'_2)^{\frac{1}{2}}$$

等式两边取负对数得:

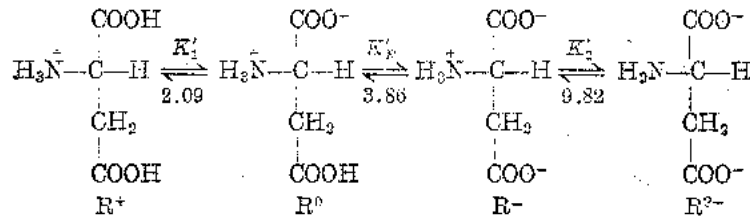
$$pI = \frac{1}{2}(pK'_1 + pK'_2)。$$

例如, 甘氨酸的等电点:

$$pI = \frac{1}{2}(2.34 + 9.60) = 5.97。$$

从上式可以看出, 等电 pH 值与离子浓度无关, 只决定于兼性离子(R^0)两侧的 pK' 值。

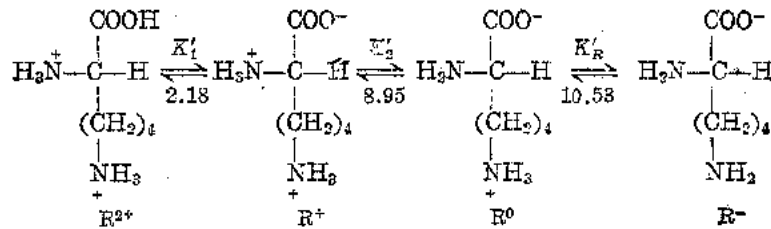
同样，对有三个可解离基团的氨基酸例如天冬氨酸和赖氨酸来说，只要写出它的解离公式，然后取兼性离子两边的 pK' 值的平均值，则得其 pI 值。天冬氨酸解离如下：



等电点时，天冬氨酸主要以兼性离子 (R^0) 存在， $[R^+]$ 和 $[R^-]$ 很小而且相等， R^{2-} 的量可忽略不计，因此：

$$\begin{aligned}
 pI_{\text{Asp}} &= \frac{1}{2}(pK'_1 + pK'_2) \\
 &= \frac{1}{2}(2.09 + 3.86) = 2.98
 \end{aligned}$$

赖氨酸的解离情况是：



在这里 $[R^{2+}]$ 的影响极小， R^0 是等电 pH 时的主要形式，因此

$$\begin{aligned}
 pI_{\text{Lvs}} &= \frac{1}{2}(pK'_2 + pK'_3) \\
 &= \frac{1}{2}(8.95 + 10.53) = 9.74。
 \end{aligned}$$

在等电点以上的任何 pH ，氨基酸带净负电荷，并因此在电场中将向正极移动。在低于等电点的任一 pH ，氨基酸带有净正电荷，在电场中将向负极移动。在一定 pH 范围内，氨基酸溶液的 pH 离等电点愈远，氨基酸所携带的净电荷愈大。

(三) 氨基酸的甲醛滴定

氨基酸虽然是一种两性电解质，既是酸又是碱，但是它却不能直接用酸、碱滴定来进行定量测定。这是因为氨基酸的酸、碱滴定的等当点 pH 或过高(12—13)或过低(1—2)，没有适当的指示剂质可被选用。然而向氨基酸例如甘氨酸溶液中加入过量的甲醛，用标准氢氧化钠滴定时，由于甲醛与氨基酸中的一 NH_2 作用形成 $-\text{NH}\cdot\text{CH}_2\text{OH}$ ， $-\text{N}(\text{CH}_2\text{OH})_2$ 等羟甲基衍生物(图 3-16)而降低了氨基的碱性，相对地增强了一 NH_3^+ 的酸性解离，使 pK'_2 减少 2—3 个 pH 单位(见图 3-17)。氢氧化钠滴定的曲线 A

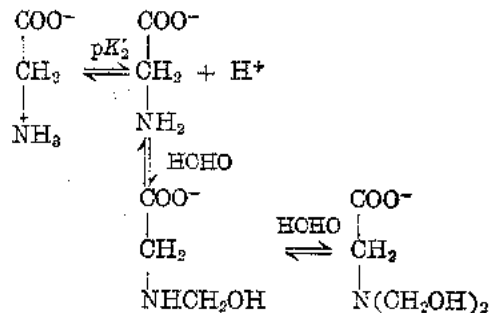


图 3-16 甲醛与氨基酸的氨基作用形成羟甲基衍生物

向 pH 低的方向转移(曲线 C), 滴定终点也移到 pH 9 附近。在有甲醛存在的情况下, 滴定曲线发生显著变动的原

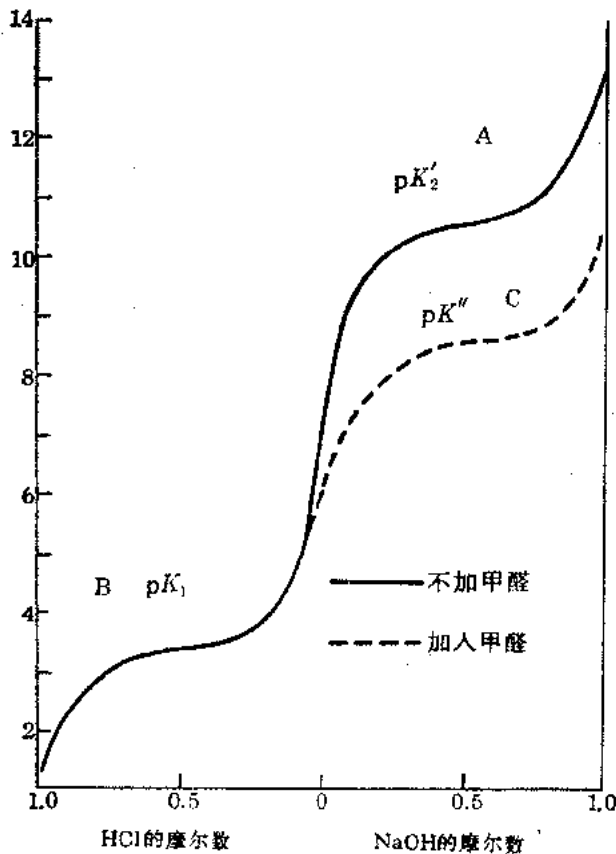


图 3-17 加甲醛和不加甲醛的甘氨酸滴定曲线

因也可以这样来解释。从下面的关系式:

$$\text{pH} = \text{p}K'_2 + \lg \frac{[\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-]}{[\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-]}$$

看出, 甲醛与 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ 结合, 有效地减低了后者的浓度, 所以对于加入任何量的碱, $[\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-]/[\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-]$ 的比值总要比不存在甲醛的情况下小得多。加入甲醛的甘氨酸溶液用标准盐酸滴定时, 滴定曲线 B 并不发生改变。由此可见用氢氧化钠滴定是和 $-\text{NH}_3^+$ 的氢离子发生反应, 在没有加入甲醛的条件下, $\text{p}K'_2=9.60$ 代表甘氨酸中 $-\text{NH}_3^+$ 的解离。

氨基酸的甲醛滴定 (formol titration) 是测定氨基酸的一种常用方法。当氨基酸溶液中存在 1 mol/L 甲醛时, 滴定终点由 pH 12 左右移至 9 附近, 亦即

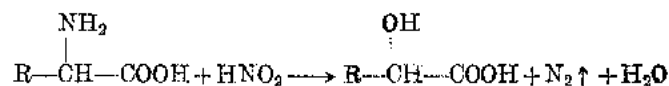
酚酞指示剂的变色区域。这就是 Sørensen 甲醛滴定法的基础。

五、氨基酸的化学反应

氨基酸的化学反应主要是指它的 α -氨基和 α -羧基以及侧链上的功能团所参与的那些反应。下面我们着重讨论在蛋白质化学中具有重要意义的氨基酸化学反应。

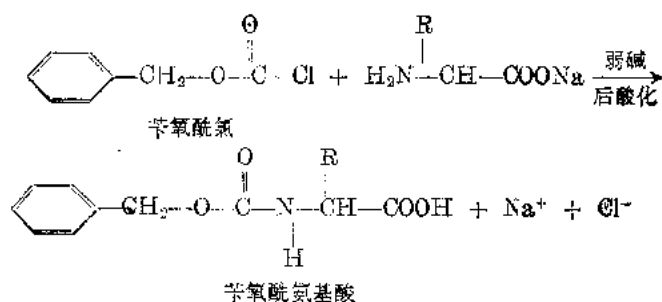
(一) α -氨基参加的反应

(1) 与亚硝酸反应: 氨基酸的氨基也和其他的伯胺一样, 在室温下与亚硝酸作用生成氮气, 其反应式如下:

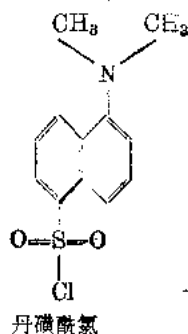
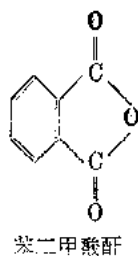
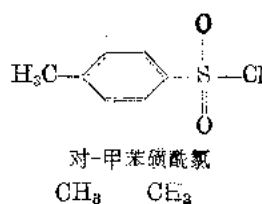
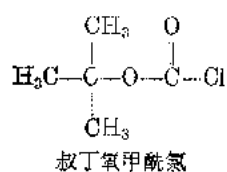


在标准条件下测定生成的氮气体积, 即可计算出氨基酸的量。这是 Van Slyke 法测定氨基氮的基础。此法可用于氨基酸定量和蛋白质水解程度的测定。这里值得注意的是生成的氮气 (N_2) 只有一半来自氨基酸。此外应该指出, 除 α - NH_2 外, 赖氨酸的 ϵ - NH_2 也能与亚硝酸反应, 但速度较慢; α - NH_2 作用 3—4 分钟即反应完全。

(2) 与酰化试剂反应: 氨基酸的氨基与酰氯或酸酐在弱碱溶液中发生作用时, 氨基即被酰基化。例如与苄氧(苯甲氧)甲酰氯 (carbobenzyloxychloride) 反应:

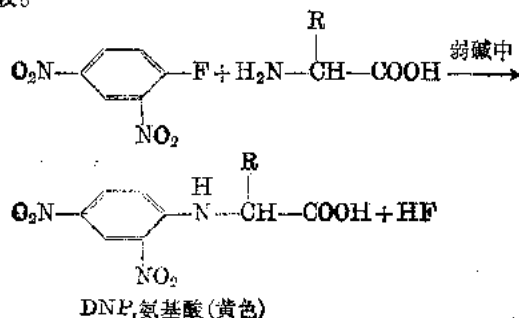


这里—NH₂中的一个H被苄氧甲酰基(简称为Cbz)取代生成Cbz—NH— $\overset{\text{R}}{\text{CH}}$ —COOH。除苄氧甲酰氯外,酰化试剂还有叔丁氧甲酰氯(tertiary butyloxycarbonyl chloride),对-甲苯磺酰氯(p-toluenesulfonyl chloride)以及邻苯二甲酸酐(phthalic anhydride)等。这些酰化试剂在多肽和蛋白质的人工合成中被用作氨基的保护试剂。它们的化学结构如下所示:

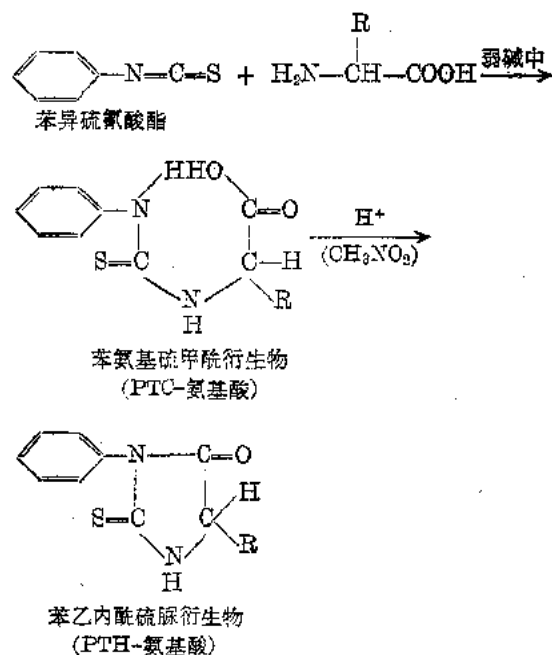


另一个酰化试剂是丹磺酰氯(dansyl chloride),它是5-二甲基氨基萘-1-磺酰氯(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride)的简称,被用于多肽链NH₂末端氨基酸的标记和微量氨基酸的定量测定。

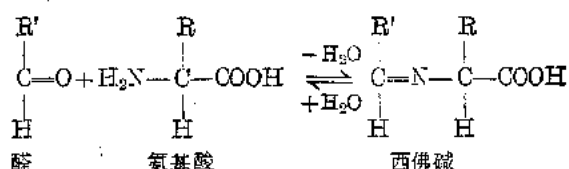
(3) 烃基化反应:氨基酸氨基的一个H原子可被烃基(包括环烃及其衍生物)取代,例如与2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene或1-fluoro-2,4-dinitrobenzene,简称为DNFB或FDNB)在弱碱性溶液中发生亲核芳环取代反应而生成二硝基苯基氨基酸(dinitrophenyl amino acid,简称为DNP氨基酸)。这个反应首先被英国的Sanger用来鉴定多肽或蛋白质的NH₂末端氨基酸。



α -氨基另一个重要的烃基化反应是与苯异硫氰酸酯(phenylisothiocyanate, 缩写为PITC)在弱碱性条件下形成相应的苯氨基硫甲酰(phenylthiocarbonyl, 缩写为PTC)衍生物。后者在硝基甲烷中与酸作用发生环化, 生成相应的苯乙内酰硫脲(phenylthiohydantoin, 缩写为PTH)衍生物。这些衍生物是无色的, 可用层析法加以分离鉴定(层析法基本原理见本节后面)。这个反应首先为Edman用于鉴定多肽或蛋白质的N-末端氨基酸。它在多肽和蛋白质的氨基酸顺序分析方面占有重要地位。



(4) 形成西佛碱反应: 氨基酸的 α -氨基能与醛类化合物反应生成弱碱, 即所谓西佛碱(Schiff's base)。



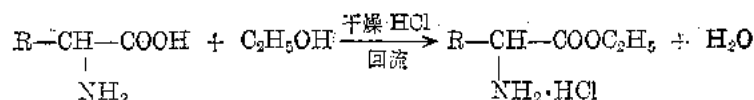
西佛碱是以氨基酸为底物的某些酶促反应例如转氨基反应的中间物。

(5) 脱氨基反应: 氨基酸在生物体内经氨基酸氧化酶(amino acid oxidase)催化即脱去 α -氨基而转变成酮酸(参看“氨基酸代谢”章的氧化脱氨基作用)。

(二) α -羧基参加的反应

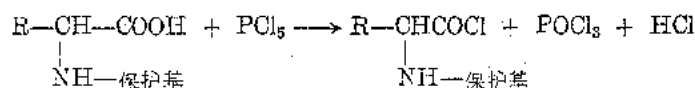
氨基酸的 α -羧基和其他有机酸的羧基一样, 在一定的条件下可以发生成盐、成酯、成酰氯、成酰胺以及脱羧和叠氮化等反应。

(1) 成盐和成酯反应: 氨基酸与碱作用即生成盐, 例如与氢氧化钠反应得氨基酸钠盐, 其中重金属盐不溶于水。氨基酸的羧基被醇酯化后, 形成相应的酯。例如氨基酸在无水乙醇中通入干燥氯化氢气体或加入二氯亚砷, 然后回流, 生成氨基酸乙酯的盐酸盐。氨基酸酯是制备氨基酸的酰胺或酰肼的中间物。



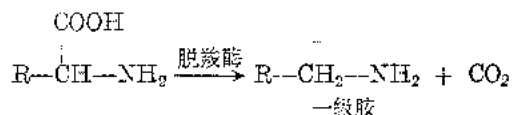
当氨基酸的羧基变成甲酯、乙酯或钠盐后,羧基的化学反应性能即被掩蔽或者说羧基被保护,而氨基的化学反应性能得到加强或说氨基被活化,容易和酰基或烃基结合,这就是为什么氨基酸的酰基化和烃基化需要在碱性溶液中进行的原因。

(2) 成酰氯反应:氨基酸的氨基如果用适当的保护基,例如苄氧甲酰基保护后,其羧基可与二氯亚砷或五氯化磷作用生成酰氯:



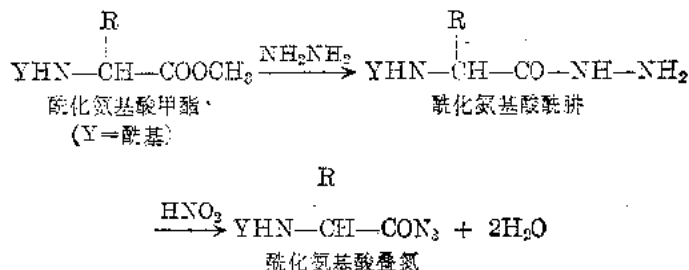
这个反应可使氨基酸的羧基活化,使它容易与另一氨基酸的氨基结合,因此在多肽人工合成中是常用的。

(3) 脱羧基反应:在生物体内氨基酸经氨基酸脱羧酶 (amino acid decarboxylases) 作用,放出二氧化碳并生成相应的一级胺:



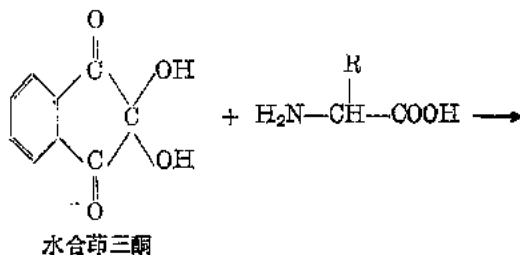
谷氨酸脱羧后形成γ-氨基丁酸,详细情况见“氨基酸代谢”章。

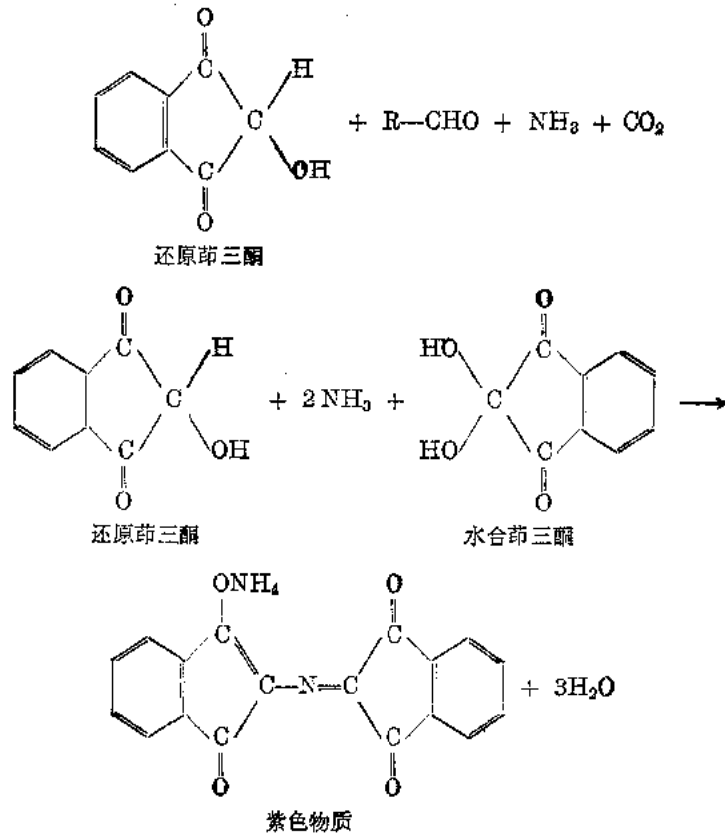
(4) 叠氮反应:氨基酸的氨基通过酰化加以保护,羧基经酯化转变为甲酯,然后与肼和亚硝酸反应即变成叠氮化合物。此反应使氨基酸的羧基活化。氨基酸叠氮化合物常用于肽的人工合成。



(三) α-氨基和 α-羧基共同参加的反应

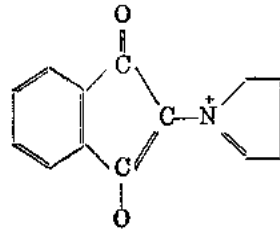
(1) 与茚三酮反应:在氨基酸的分析化学中,具有特殊意义的是氨基酸与茚三酮 (ninhydrin) 的反应。茚三酮在弱酸性溶液中与α-氨基酸共热,引起氨基酸氧化脱氨、脱羧反应,最后茚三酮与反应产物——氨和还原茚三酮 (hydrindantin) 发生作用,生成紫色物质。其反应如下:



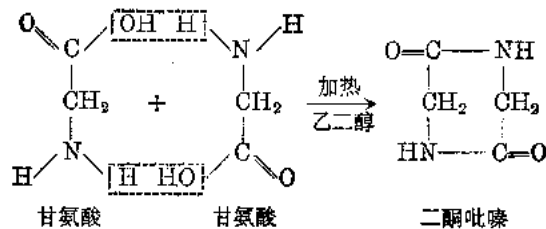


用纸层析或柱层析把各种氨基酸分开后,利用茛三酮显色可以定性或定量测定各种氨基酸。定量释放的 CO_2 可用测压法测量,从而计算出参加反应的氨基酸量。

两个亚氨基酸——脯氨酸和羟脯氨酸与茛三酮反应并不释放 NH_3 , 而直接生成黄色化合物,其结构式如下所示:



(2) 成肽反应: 一个氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基可以缩合成肽,形成的键称肽键。例如甘氨酸在乙二醇中加热缩合,生成二酮吡嗪(diketo-pyrazine)或称甘氨酸酐。

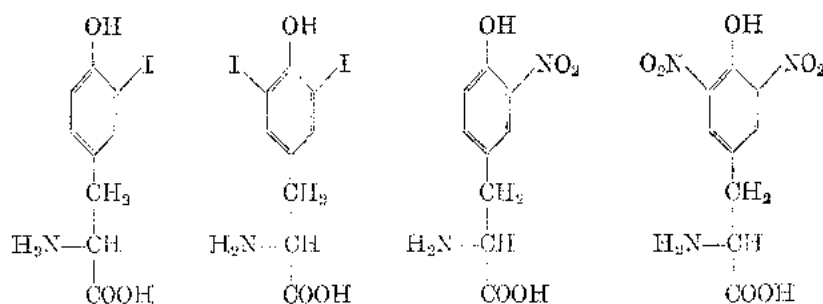


(四) 侧链 R 基参加的反应

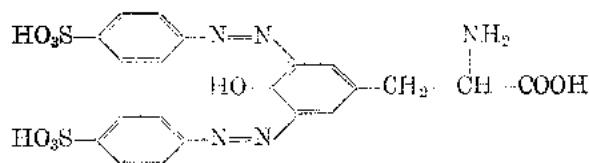
氨基酸侧链具有功能团时也能发生化学反应。这些功能团有羟基、酚基,巯基(包括二硫

键), 咪唑基, 咪唑基, 胍基、甲硫基以及非 α -氨基和非 α -羧基等。每种功能团都可以和多种试剂起反应。其中有些反应是蛋白质化学修饰的基础。所谓蛋白质的化学修饰就是在较温和的条件下, 以可控制的方式使蛋白质与某种试剂(称化学修饰剂)起特异反应, 以引起蛋白质中个别氨基酸侧链或功能团发生共价化学改变。化学修饰在蛋白质的结构与功能的研究中是很有用的。关于侧链基团的反应仅举几个重要例子加以说明。

酪氨酸的酚基在 3 和 5 位上容易发生亲电取代反应, 例如发生碘化或硝化, 分别生成一碘酪氨酸和二碘酪氨酸或一硝基酪氨酸和二硝基酪氨酸:

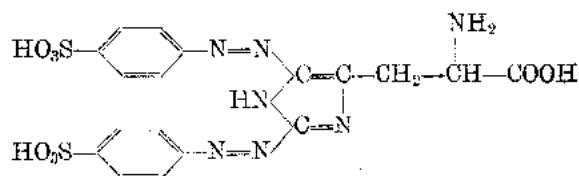


酪氨酸的酚基还可以与重氮化合物(例如对氨基苯磺酸的重氮盐)结合生成桔黄色的化合物:

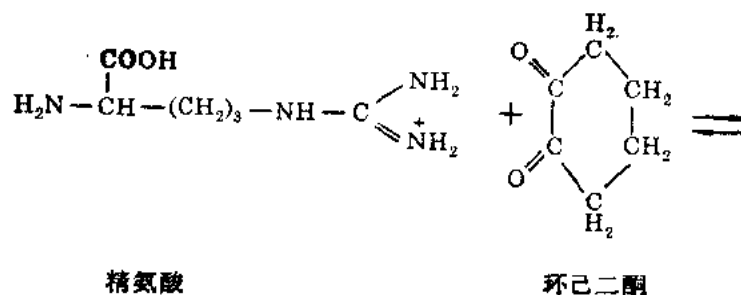


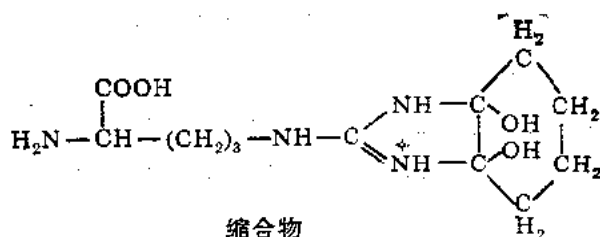
这就是 Pauly 反应, 可用于检测酪氨酸。

组氨酸的侧链咪唑基与重氮苯磺酸也能形成相似的化合物, 但颜色稍有差异, 呈棕红色。此化合物的结构如下:



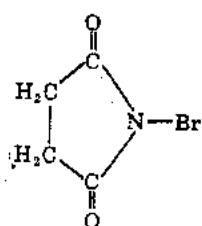
精氨酸的侧链胍基在硼酸钠缓冲液(pH 8—9, 25—35°C)中, 与 1,2-环己二酮(cyclohexanedione)反应, 生成缩合物:



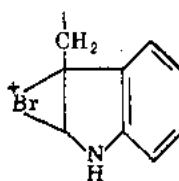


此缩合物在该反应条件下是稳定的,但在羟胺缓冲液中反应可逆转,重新生成精氨酸。此反应曾用于氨基酸顺序分析以及结构与功能的研究。

色氨酸的侧链吲哚基在温和条件下可被 N-溴代琥珀酰亚胺 (N-bromosuccinimide) 氧化。此反应可用于分光光度法测定蛋白质中色氨酸的含量,并能在色氨酸和酪氨酸残基处选择性化学断裂肽键。N-溴代琥珀酰亚胺和色氨酸氧化产物的结构如下:

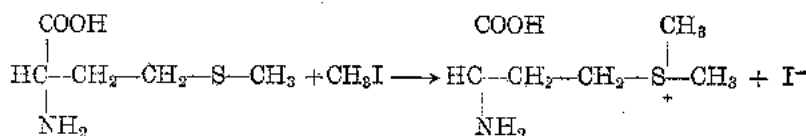


N-溴代琥珀酰亚胺



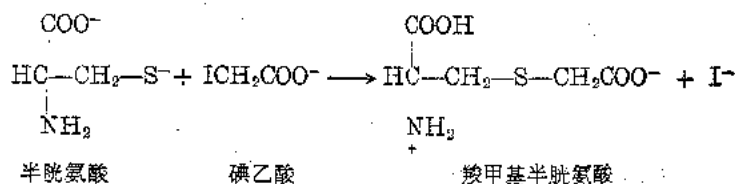
色氨酸氧化产物
(在一定条件下可发生重排)

蛋氨酸侧链上的甲硫基是一个很强的亲核基团,与烃化试剂如甲基碘容易形成磺盐 (sulfonium salt):

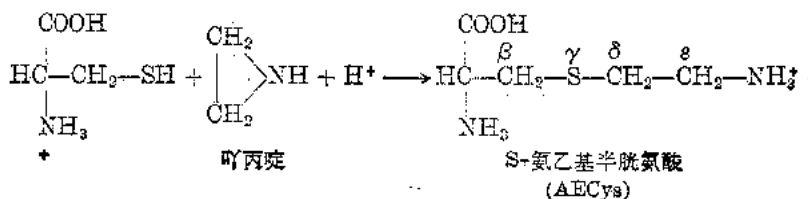


此反应可被巯基试剂逆转。在逆转反应中,原有的甲基和新加入的甲基除去的机会是相等的,因此当用 ^{14}C 标记的甲基碘处理时,获得的蛋氨酸将有 50% 是同位素标记的。

半胱氨酸侧链上的巯基(-SH),反应性能很高,在微碱性 pH 下,-SH 基发生解离形成硫醇阴离子(-CH₂-S⁻)。此阴离子是巯基的反应形式,能与卤化烷例如碘乙酸,碘乙酰胺,甲基碘等迅速反应,生成相应的稳定烷基衍生物:

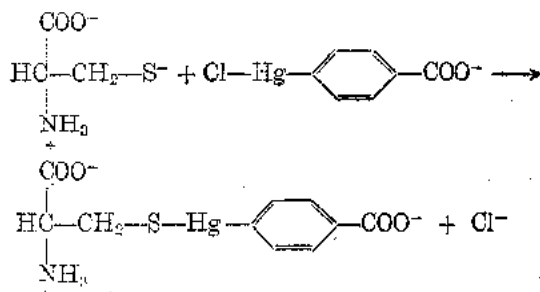


半胱氨酸的巯基能打开乙撑亚胺(ethyleneimine),即吡丙啶(aziridine)的环:



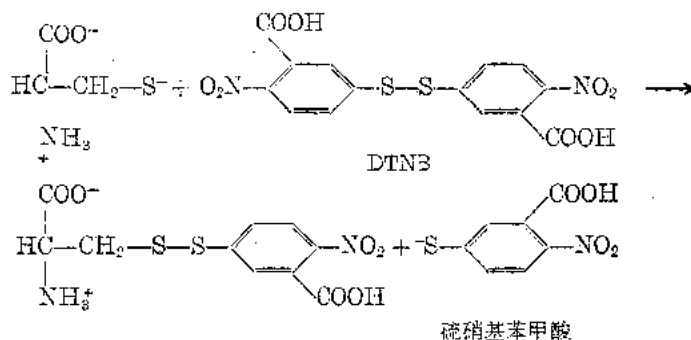
生成的侧链带有正电荷($\epsilon\text{-NH}_3^+$),它为胰蛋白酶水解肽链提供了一个新位点,这对氨基酸顺序测定是很有用的。同时此反应也可用来保护肽链上的 $-\text{SH}$ 基,以防止被重新氧化为二硫键。

巯基能和各种金属离子形成稳定程度不等的络合物。常用的有 R-Hg^+ 型的一价有机汞制剂,例如与对氯汞苯甲酸(*p*-chloromercuribenzoic acid)形成络合物:



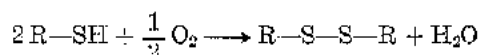
此反应是蛋白质结晶学中制备重原子衍生物最常用的方法之一。由于许多蛋白质,如 SH 酶,其活性中心涉及 $-\text{SH}$ 基,当遇到重金属离子而生成硫醇盐时,将导致酶的失活,因此制备这类蛋白质时应避免进入重金属离子。

半胱氨酸可与二硫硝基苯甲酸(dithionitrobenzoic acid,缩写为DTNB)或称Ellman氏试剂发生硫醇-二硫化物交换反应:



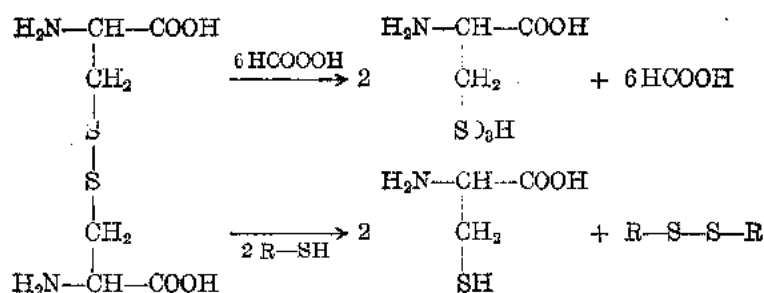
反应中1分子的半胱氨酸引起1分子的硫硝基苯甲酸的释放。它在 $\text{pH} 8.0$ 时,在 412 nm 波长处有强烈的光吸收,因此可利用比色法定量测定 $-\text{SH}$ 基。

巯基很容易受空气或其他氧化剂氧化。当有痕量的金属离子如 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} 和 Mn^{2+} 存在下,巯基的空气氧化将显著提高。这些离子可能是反应所需的催化剂,巯基的这些金属络合物可能是与氧作用的真正反应物。硫醇一般遇到的只有两种氧化衍生物:二硫化物和磺酸。前者是硫醇的空气氧化产物:

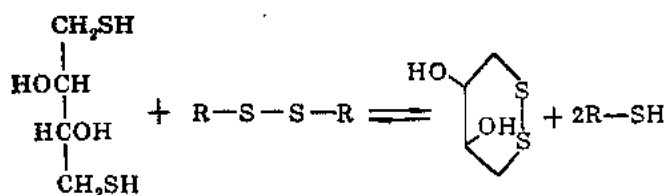


例如半胱氨酸氧化成胱氨酸(见本节氨基酸分类部分)。后者是在更加强的氧化剂作用下产生的,例如用过甲酸(performic acid)处理, $-\text{SH}$ 基和 $-\text{S-S-}$ (二硫键)被氧化成磺基($-\text{SO}_3\text{H}$)。

胱氨酸中的二硫键在稳定蛋白质的构象上起很大的作用。氧化剂和还原剂都可打开二硫键。过甲酸可以定量地打开二硫键,生成磺基丙氨酸(cysteic acid)残基。还原剂如巯基化合物(R-SH)也能打开二硫键,生成半胱氨酸残基及相应的二硫化物:



这里使用的还原剂有巯基乙醇(mercaptoethanol), 巯基乙酸(mercaptoacetic acid), 二硫苏糖醇(dithiothreitol, 缩写为 DTT)等。其中最有用的是二硫苏糖醇及其异构体二硫赤藓糖醇(dithioerythritol):



反应中,二硫苏糖醇形成一个含分子内二硫键的稳定六元环,因此平衡向右方移动。

由于半胱氨酸中的巯基很不稳定,极易被氧化成二硫键,因此利用还原剂巯基乙醇等打开二硫键时,需要进一步用上面已述及的卤化烷如碘乙酰胺、氯化苄、N-乙基丁烯二亚酰胺和对氯汞苯甲酸等试剂与巯基作用把它保护起来,防止它的重新氧化。

六、氨基酸的分析分离

为了测定蛋白质的氨基酸组成或从蛋白质水解液中制取氨基酸,都需要对氨基酸混合物进行分析分离工作。

(一) 分配层析法的一般原理

层析法即色层分析法(chromatography),最先由俄国植物学家 M. C. Ивер 于 1903 年提出来的。他所进行的色层分析法实际上是一种吸附层析法(adsorption chromatography)。1941 年英国学者 Martin 与 Synge 提出分配层析法。此后这种方法得到了很大的发展,至今已有很多种形式的分配层析法。但是它们的基本原理是一样的。

所有的层析系统通常都由二个相组成,一个为固定相或静相(stationary phase),一个为流动相或动相(mobile phase)。混合物在层析系统中的分离决定于该混合物的组分在这两相中的分配情况,一般用分配系数(partition or distribution coefficient)来描述。1891 年 Nernst 提出了分配定律(partition law):当一种溶质在两种一定的互不相溶的溶剂中分配时,在一定温度下达到平衡后,溶质在两相中的浓度比值为一定常数,即分配系数(K_d)。

$$K_d = \frac{C_A}{C_B}$$

这里, C_A 和 C_B 分别代表某一物质在互不相溶的两相, A 相(动相)和 B 相(静相)中的浓度。

物质分配不仅可以在互不相溶的两种溶剂即液相-液相系统中进行,也可以在固相-液相

间或气相-液相间发生。层析系统中的静相可以是固相、液相或固-液混合相(半液体);动相可以是液相或气相,它充满于静相的空隙中,并能流过静相。

这里需要提出有效分配系数(K_{eff})的概念,因为某一物质在层析系统中的行为并不直接决定于它的分配系数 K_d 而是取决于有效分配系数 K_{eff} 。

$$K_{\text{eff}} = \frac{\text{某一物质在 A 相中的总量}}{\text{某一物质在 B 相中的总量}}$$

对液相-液相层析系统来说:

$$K_{\text{eff}} = \frac{C_A \times V_A}{C_B \times V_B} = K_d \times R_V$$

这里, C_A 和 C_B 的意义同前; V_A 和 V_B 分别为 A 相和 B 相的体积; R_V 为 A, B 两相的体积比。由此可见, K_{eff} 是 R_V 的函数,溶质的有效分配系数可以调整两相的体积比而加以改变。

利用层析法分离混合物例如氨基酸混合物,其先决条件是各种氨基酸成分的分配系数要有差异,哪怕是很小的差异。一般差异越大,越容易分开。

现在我们举逆流分溶或逆流分配 (countercurrent distribution) 的方法作为分配层析原理的说明。此方法的基本原理如图 3-18 所示。取一系列试管(称为分溶管),向其中第 1 号管加入互不相溶的两种溶剂, A 溶剂为上相,图中作为动相, B 溶剂为下相,作为静相,并假设上下两相的体积相等。然后加入物质 Y ($K_d=1$) 和物质 Z ($K_d=3$) 的混合物(假设总量各为 64 份),各组分物质将按自身特有的分配系数在上下相中进行分配。达平衡后,将上相转移到第 2 号管内,其中含有相同体积的新下相。从第 1 号管转移来的样品将在第 2 号管的上下相中再分配。与此同时,向第 1 号管内加入新的上相,这里也将发生样品的再分配。这样完成了第 1 次转移。如是上相(动相)将连续地向第 3, 4, 5, ……号管作第 2, 3, 4, ……次的转移。一般说来,转移 n 次后,某一物质在 $(n+1)$ 个管中分布的分数含量是 $(p+q)^n = 1$ 展开式的相应项的值。这里, p 和 q 分别为某一物质在静相(下相)和动相(上相)中的分数含量,即 $p+q=1$ 。例如物质 Y 的

$$K_d = \frac{q(\text{动相})}{p(\text{静相})} = 1$$

即

$$p+q = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$$

转移 n 次后,在第 k 号管中某一物质的含量可由下式计算:

$$T_{n,k} = \frac{n! \cdot p^{n-k+1} \cdot q^{k-1}}{(n-k+1)! \cdot (k-1)!}$$

例如,物质 Z, 转移 4 次后在第 4 号管中的含量为:

$$\begin{aligned} T_{4,4} &= \frac{4! \cdot \left(\frac{1}{4}\right) \cdot \left(\frac{3}{4}\right)^3}{3!} = \frac{4 \times 3 \times 2 \times \frac{1}{4} \times \frac{27}{64}}{3 \times 2} \\ &= \frac{27}{64} \end{aligned}$$

因为物质 Z 的总量为 64, 所以该管中的含量应是:

$$\frac{27}{64} \times 64 = 27$$

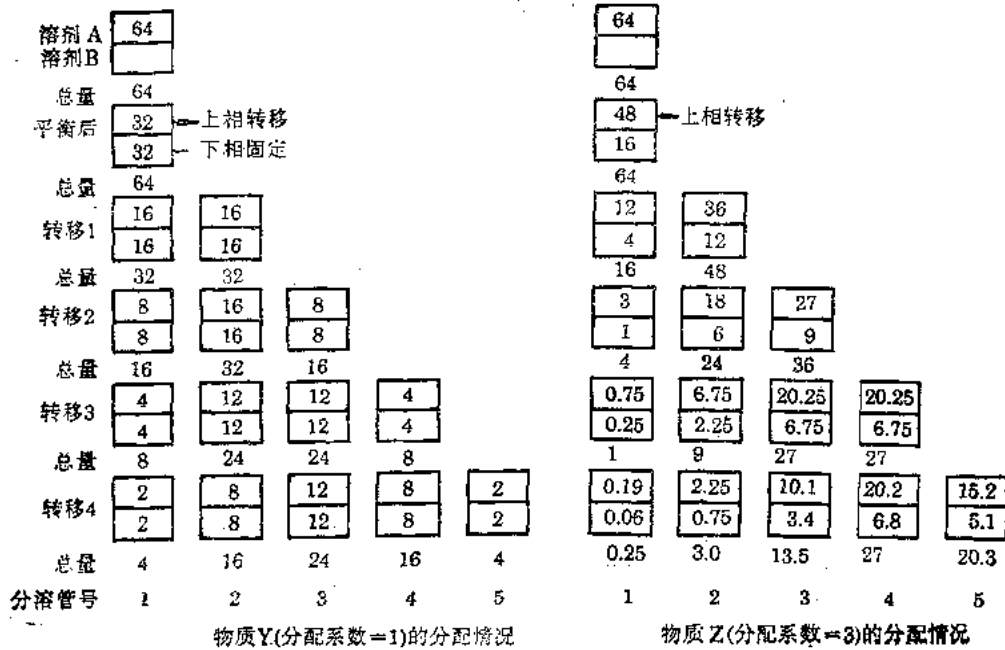
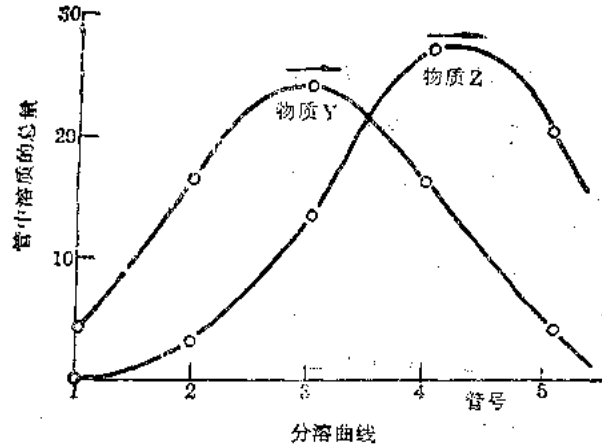


图 3-18 逆流分溶原理

从图 3-19 中的分溶曲线可以看出,分配系数大的物质 Z($K_d=3$)沿一系列分溶管的“移动”速度,要比分配系数小的物质 Y($K_d=1$)快。从分溶曲线还可以看出,每一种物质在一系列分溶管中是相当集中的,分溶曲线呈峰形,因此只要使用足够数目的分溶管,继续进行分配,就可以使两个峰彼此完全分开。一定量的某一溶质在一定量的溶剂系统中分配时,转移次数(或称理论板数,这是借用蒸馏技术中的术语)越多,即分溶管数越多,其分溶曲线越集中,即峰形越窄而高(图 3-19),这样有利于混合物中各物质的完全分离。

上述的这种连续分配操作可以在完全自动化的逆流分溶仪上进行。逆流分溶仪一般只用于制备分离,特别是用于蛋白质、肽、核酸和抗生素等的分离提纯。

目前在分析分离上使用较广的分配层析法(partition chromatography),包括柱层析、纸层析和薄层层析等都是在上述的分配分离的基础上发展起来的。方法的基本原理与逆流分溶法相同。

(二) 分配柱层析

层析柱中的填充物或称支持剂(图 3-20)都是一些具有亲水性的不溶物质, 如纤维素、淀粉、硅胶等。支持剂吸附着一层不会流动的结合水, 可以看作固定相, 沿固定相流过的与它不互溶的溶剂(如苯酚、正丁醇等)是流动相。由填充料构成的柱床可以设想为由无数的连续板层组成(图 3-20), 每一板层起着微观的“分溶管”作用。当用洗脱剂(eluent)洗脱时, 即流动相移动时, 加在柱上端的氨基酸混合物样品在两相之间将发生连续分配, 混合物中具有不同分配系数的各种成分沿柱以不同的速度向下移动。分部收集柱下端的洗出液(eluate)。收集的组分分别用茚三酮显色定量。以氨基酸量对洗出液体积作图, 得洗脱曲线。曲线中的每个峰相当于某一种氨基酸(参看图 3-25)。

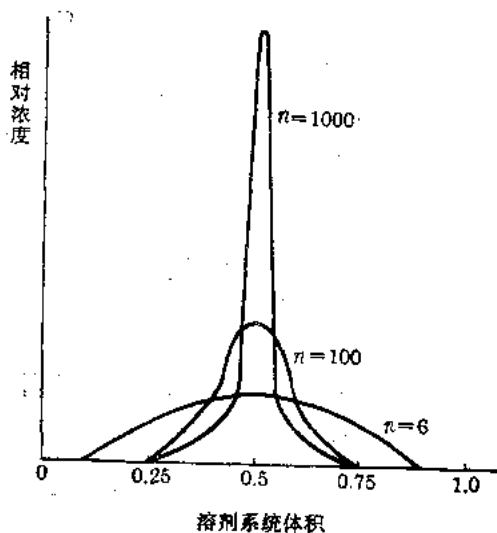


图 3-19 分溶曲线与转移次数
(理论板数) n 的依赖关系

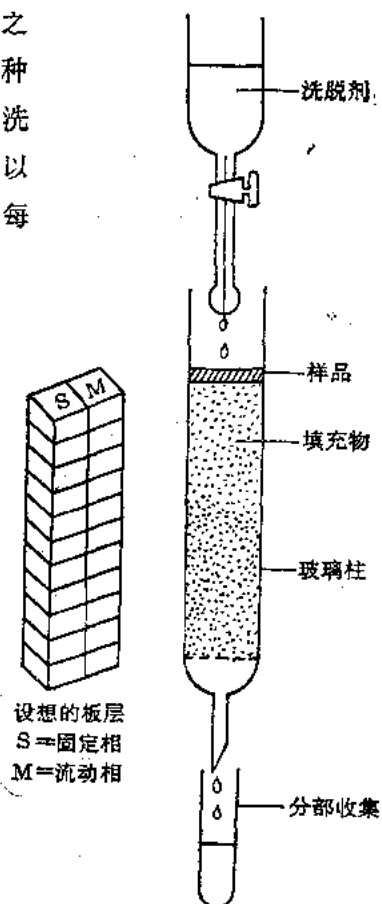


图 3-20 柱层析

(三) 滤纸层析

滤纸层析(filter-paper chromatography)也是分配层析的一种。这里, 滤纸纤维素上吸附的水是固定相, 展层用的溶剂是流动相。层析时, 混合氨基酸在这两相中不断分配, 使它们分布在滤纸的不同位置上。

滤纸层析也是分离、鉴定氨基酸混合物的常用技术, 可用于蛋白质的氨基酸成分的定性鉴定和定量测定。将氨基酸混合物点在滤纸的一个角上, 称原点。然后在密闭的容器中用一个溶剂系统(如丁醇-乙酸)沿滤纸的一个方向进行展层(development)。烘干滤纸后, 旋转 90° , 再用另一个溶剂系统(如苯酚-甲酚-水)进行第二向展层。由于各种氨基酸在两个溶剂系统中具有不同的 R_f 值, 因此就彼此分开, 分布在滤纸的不同区域。当用茚三酮溶液显色时, 得到一个双向滤纸层析谱(two-dimensional paper chromatogram)(图 3-21)。如果混合物中所含的氨基酸种类较少, 并且其 R_f 值彼此相差较大, 则在一个溶剂系统中进行单向层析即可。

在滤纸层析中,从原点至氨基酸停留点的距离(X)与原点至溶剂前沿的距离(Y)之比,即 $\frac{X}{Y}$ 称为 R_f 值(图 3-22)。只要溶剂系统、温度、湿度和滤纸型号等实验条件确定,则每种氨基

酸的 R_f 值是恒定的。

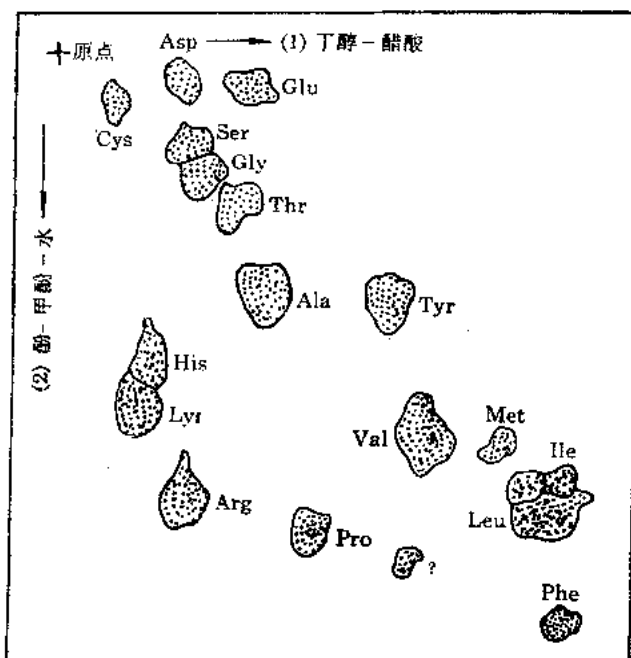


图 3-21 氨基酸的双向滤纸层析图谱

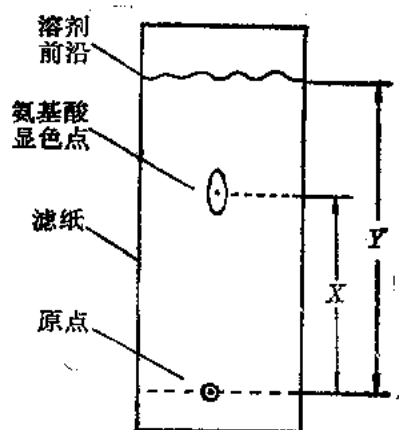


图 3-22 滤纸层析中的 R_f 值, $R_f = \frac{X}{Y}$

(四) 薄层层析

薄层层析(thin-layer chromatography)分辨率高,所需样品量微,层析速度快,可使用的支持剂种类多。如纤维素粉、硅胶和氧化铝等,因此应用比较广泛。薄层层析的大体步骤如下:把支持剂涂布在玻璃板上使成一个均匀的薄层,把要分析的样品滴加在薄层的一端,然后用合适的溶剂在密闭的容器中进行展层(图 3-23),使样品中各个成分分离开来,最后进行鉴定和定量测定。

(五) 离子交换层析

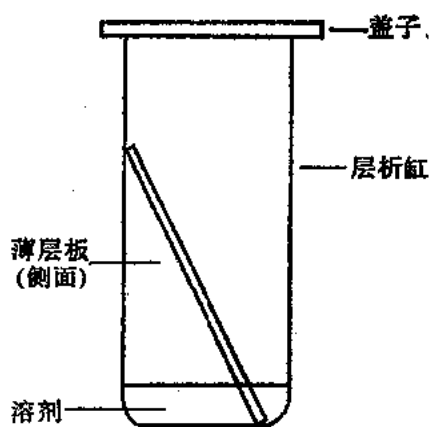


图 3-23 薄层层析装置

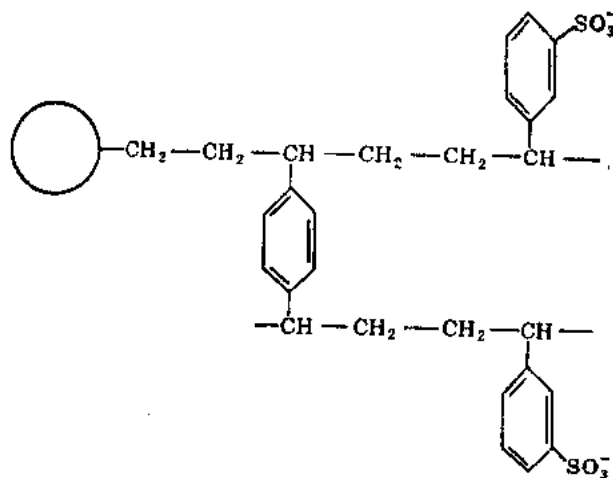
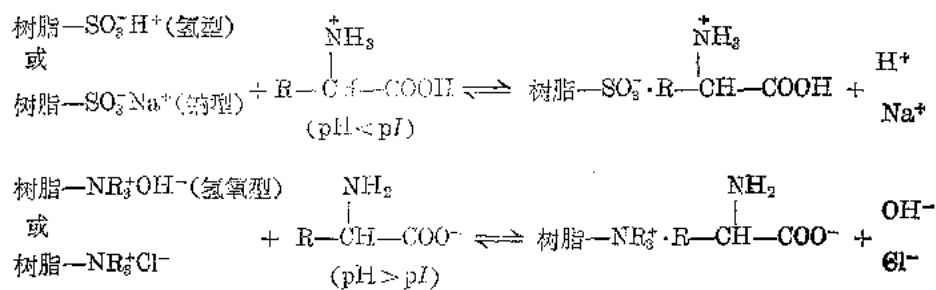


图 3-24 磺酸型阳离子交换树脂的部分结构

离子交换柱层析 (ion-exchange column chromatography) 是一种用离子交换树脂作支持剂的层析法。

离子交换树脂是具有酸性或碱性基团的人工合成聚苯乙烯-苯二乙烯 (polystyrene-divinylbenzene) 等不溶性高分子化合物。聚苯乙烯-苯二乙烯是由苯乙烯(单体)和苯二乙烯(交联剂)进行聚合和交联反应生成的具有网状结构的高聚物。它是离子交换树脂的基质(matrix)带电基团是通过后来的化学反应引入基质的(图 3-24)。树脂一般都制成球形的颗粒。

阳离子交换树脂含有的酸性基团如—SO₃H(强酸型)或—COOH(弱酸型)可解离出 H⁺ 离子,当溶液中含有其他阳离子时,例如在酸性环境中的氨基酸阳离子,它们可以和 H⁺ 发生交换而“结合”在树脂上。同样地阴离子交换树脂含有的碱性基团如—N(CH₃)₃OH(强碱型)或—NH₂OH(弱碱型)可解离出 OH⁻,能和溶液里的阴离子,例如和碱性环境中的氨基酸阴离子发生交换而结合在树脂上。



分离氨基酸混合物经常使用强酸型阳离子交换树脂。在交换柱中,树脂先用碱处理成钠型,将氨基酸混合液(pH 2—3)上柱。在 pH 2—3 时,氨基酸主要以阳离子形式存在,与树脂上的钠离子发生交换而被“挂”在树脂上。氨基酸在树脂上结合的牢固程度即氨基酸与树脂间的亲和力,主要决定于它们之间的静电吸引,其次是氨基酸侧链与树脂基质聚苯乙烯之间的疏水相互作用。在 pH 3 左右,氨基酸与阳离子交换树脂之间的静电吸引的大小次序是碱性氨基酸(R²⁺) > 中性氨基酸(R⁺) > 酸性氨基酸(R⁰)。因此氨基酸的洗出顺序大体上是酸性氨基酸,中性氨基酸,最后是碱性氨基酸。由于氨基酸和树脂之间还存在疏水相互作用,所以氨基酸的全部洗出顺序如图 3-25 所示。为了使氨基酸从树脂柱上洗脱下来,需要降低它们之间的亲和力,有效的方法是逐步提高洗脱剂的 pH 和盐浓度(离子强度),这样各种氨基酸将以不同的速度被洗脱下来。目前已有全部自动化的氨基酸分析仪(amino acid analyzer)。氨基酸分析仪的图解见图 3-26。氨基酸混合物的分离图谱见图 3-25。

(六)气相色谱

当层析系统的流动相为气体,固定相为涂渍在固体颗粒表面的液体时,此层析技术称为气-液色谱(gas-liquid chromatography)或简称为气相色谱。利用气相色谱法进行分离也是基于分配过程,即利用样品组分在流动的气相和固定在颗粒表面的液相中的分配系数不同达到分离组分的目的。涂有薄层液体的惰性颗粒(固定相)被装在一根长的不锈钢管或玻璃管

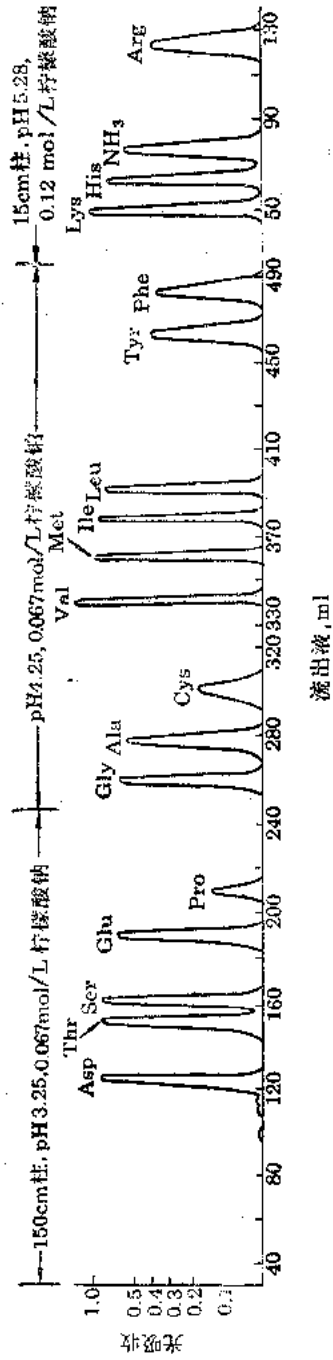


图 3-25 氨基酸自动分析仪记录用氨基酸混合物分析结果

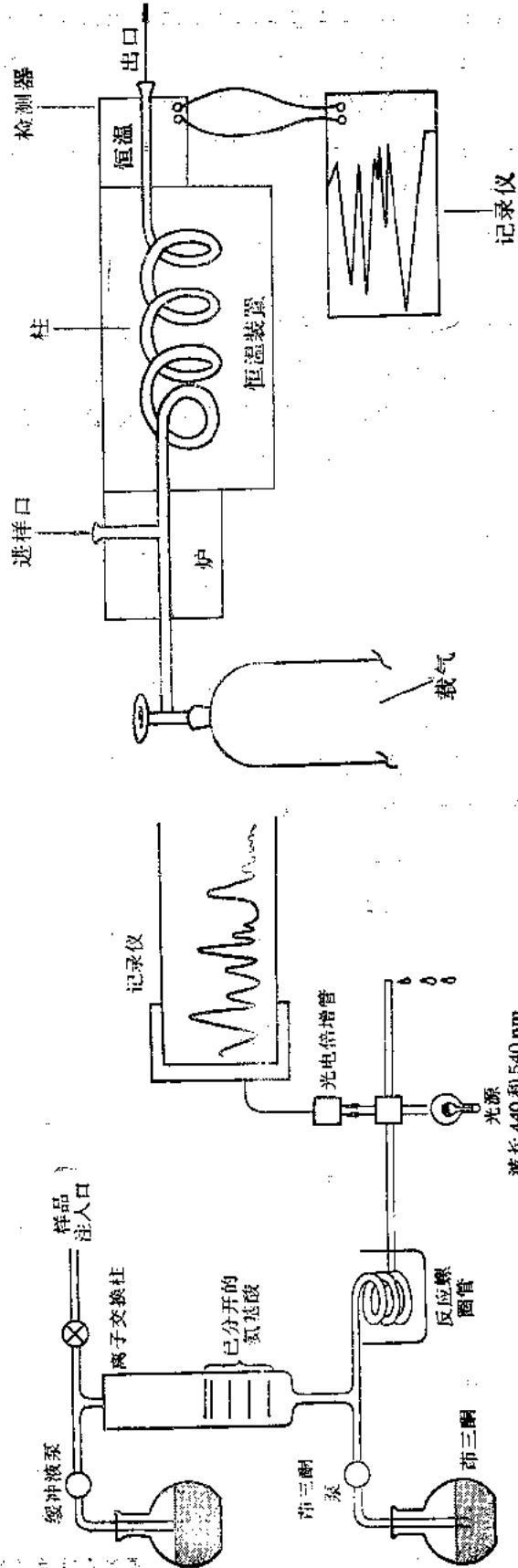


图 3-27 气相色谱仪的基本组件

图 3-26 氨基酸分析仪的图解

中,称色谱柱(chromatographic column),保持在适当的温度下,令高压的气体(流动相)连续地通过色谱柱。待分析的样品注入进样室后经气化导入气相,流经固定相。此时,气化的样品将在流动的气相和固定的液相之间发生分配,把组分分离开来。被分开的组分和载气直接进入检测器。在这里组分的量变化转变为易测量的电信号,并被送入记录仪而记录下来,这就是气相色谱洗脱曲线。

气相色谱分析需用气相色谱仪(gas chromatograph)进行。气相色谱仪的基本组件如图 3-27 所示。

气相色谱法具有微量快速的优点。它在分析生物成分方面的一个限制是要求样品能气化和热稳定性高。氨基酸由于含有各种极性基团,气化十分困难,必须把它转变成容易挥发的化合物才能进行气相层析。氨基酸与苯异硫氰酸酯反应生成 PTH-氨基酸(见氨基酸的化学反应部分),然后经三甲基硅烷基化(trimethylsilylation),可得能很好气化的氨基酸衍生物。

(七) 高效液相色谱

高效液相色谱(high performance liquid chromatography,简称HPLC)曾称高压液相色谱(high pressure liquid chromatography),这是近十几年内发展起来的一项快速、灵敏、高效的分离技术。

HPLC的特点是:(1)使用的固定相支持剂颗粒很细,因而表面积很大;(2)溶剂系统采取高压,因此洗脱速度增大。因此多种类型的柱层析都可用 HPLC 来代替,例如分配层析、离子交换层析、吸附层析以及凝胶过滤(见“蛋白质的分离和提纯”节)等。

高效液相色谱的图解见图 3-28。

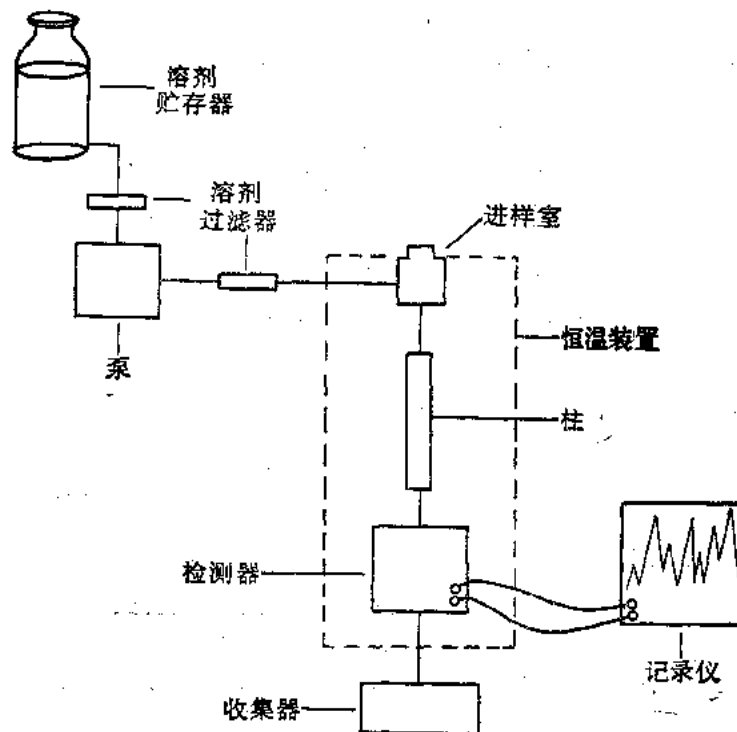


图 3-28 高效液相色谱的图解

第三节 蛋白质的共价结构

蛋白质的共价结构有时也称蛋白质的一级结构(primary structure),但多数场合把蛋白质的一级结构看成是氨基酸顺序的同义语。1969年,国际纯化学和应用化学协会(International Union of Pure and Applied Chemistry)就曾规定蛋白质的一级结构只指肽链中的氨基酸顺序。

蛋白质是高分子量的多肽。除蛋白质之外,蛋白质的部分水解产物和生物体内游离存在的一些激素和抗生素等也是多肽,不过与蛋白质分子相比,它们是比较小的多肽。下面将以较小的多肽为例讲述蛋白质的共价结构。

一、肽和肽键的结构

现在公认蛋白质分子中氨基酸连接的基本方式是肽键(peptide bond) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—N—} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ 。这主要

有下列一些实验根据:

(1) 蛋白质分子中游离 α -氨基和 α -羧基是很少的。在蛋白质水解过程中,游离 α -氨基和 α -羧基以等摩尔数的数值增加。这表示氨基酸中的 α -氨基和 α -羧基在构成蛋白质分子时,参与某种结合,而当蛋白质水解时,这种结合又断开而重新形成 α -氨基和 α -羧基。

(2) 某些人工合成的多肽能被水解蛋白质的蛋白酶所水解。更进一步,还发现同样这些蛋白酶不但能够水解肽键,而且也能催化它的逆转,即在氨基酸或多肽之间形成肽键。

(3) 包含 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—N—} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ 基团的化合物如双缩脲(biuret) $\text{H}_2\text{N—CO—NH—CO—NH}_2$ 能与

硫酸铜-氢氧化钠溶液产生双缩脲颜色反应。天然蛋白质也有同样的反应。

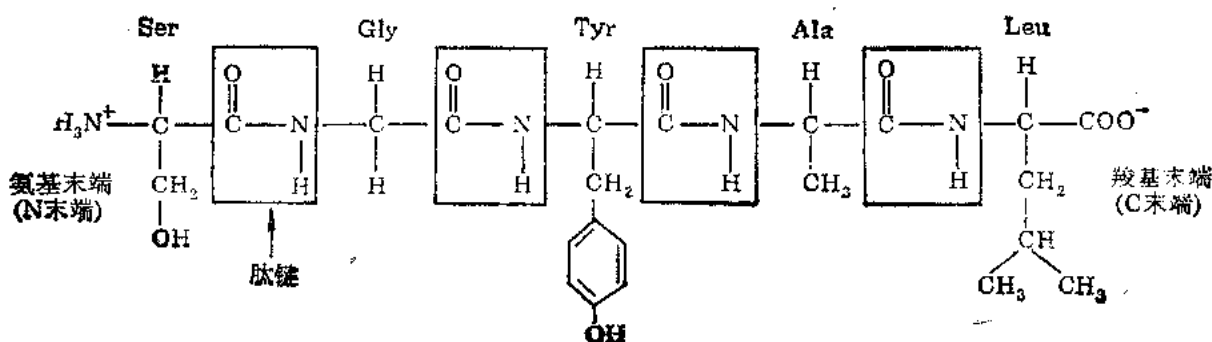
(4) 人工合成的多聚氨基酸的X射线衍射图案和红外吸收光谱与天然的纤维状蛋白质十分相似。

(5) 我国在世界上首次人工合成蛋白质——结晶牛胰岛素的成功,完全证明了蛋白质的肽链结构学说的正确性。

在蛋白质和多肽分子中连接氨基酸残基的共价键除了肽键之外,还有一个较常见的是两个半胱氨酸残基的侧链之间形成的二硫键(disulfide bond),即胱氨酸残基中的二硫键。二硫键也叫做二硫桥(disulfide bridge)。它可以使两条单独的肽链共价交联起来(链间二硫键),或使一条链的某一部分形成环(链内二硫键)。

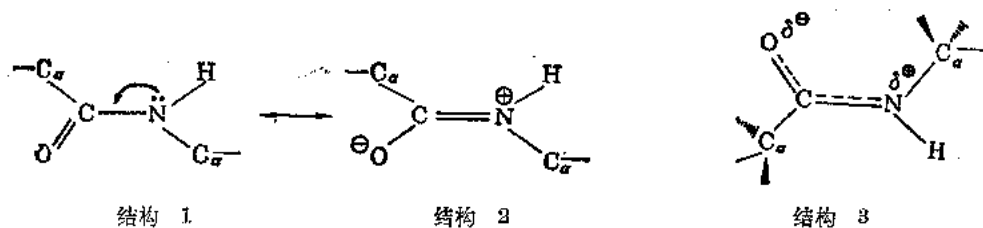
最简单的肽由两个氨基酸组成,称为二肽(dipeptide)其中包含一个肽键。含有三个、四个、五个等氨基酸的肽分别称为三肽、四肽、五肽等。肽链中的氨基酸由于参加肽键的形成已经不是原来完整的分子,因此称为氨基酸残基(amino acid residue)。多肽链中每一氨基酸单

位在形成肽键时丢失一分子水。严格地说每形成一个肽键丢失一分子水，因此丢失的水分子数应比氨基酸残基数少一个。一条多肽链通常在一端含有一个游离的末端氨基，在另一端含有一个游离的末端羧基。这两个游离的末端基团有时连接而成环状肽(cyclic peptide)。肽的命名是根据参与其组成的氨基酸残基来确定的，规定从肽链的 NH_2 末端氨基酸残基开始，称为某氨基酸酰某氨基酸酰……某氨基酸。例如，具有下列化学结构的五肽命名为丝氨酸酰甘氨酸酰酪氨酸酰丙氨酸酰亮氨酸(serylglycyltyrosylalanylleucine)，简写为 Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu。应指出，肽链也象氨基酸一样具有极性，通常总是把 NH_2 末端氨基酸残基放在左边， COOH 末端氨基酸残基放在右边，除特别指明者外。上面举例的五肽丝氨酸残基侧为 NH_2 末端，亮氨酸残基侧为 COOH 末端。注意，反过来书写的 Leu-Ala-Tyr-Gly-Ser 是一个不同的五肽。



从上面的五肽化学结构中可以看出，肽链中的骨干是由 $-\text{N}-\text{C}-\text{C}-$ 单位规则地重复排列而成，称之为共价主链(main chain 或 backbone)。各种肽链的主链结构都是一样的，但侧链 R 基的顺序即氨基酸残基顺序不同。

肽键可以看作是一种酰胺键，它和一般的酰胺键一样，由于酰胺氮上的孤电子对与相邻羰基之间的共振相互作用(resonance interaction)，表现出高稳定性。肽键的亚氨基($-\text{NH}-$)在 $\text{pH} 0-14$ 的范围内，没有明显的解离和质子化的倾向。共振是在两种形式的肽键结构之间发生的：



在结构 1 中 $\text{C}-\text{N}$ 键是单键，这时氮原子上的孤电子对与羰基碳之间没有电子云重叠；羰基碳是 sp^2 杂化，它是平面结构，而酰胺氮是 sp^3 杂化，因而是棱锥形结构。在结构 2 中，羰基碳和酰胺氮之间是一个双键，氮原子带一正电荷，羰基氧带一负电荷；羰基碳和酰胺氮都是 sp^2 杂化，两者都是平面的，所有 6 个原子都处于同一平面内。肽键的实际结构是一个共振杂化体(resonance hybrid)，如结构 3 所示。这是介于结构 1 和 2 之间的平均中间态(compromise)。

已知 C—N 单键的键长是 0.148 nm; C=N 双键的键长是 0.127 nm, 据预料肽键(共振杂化

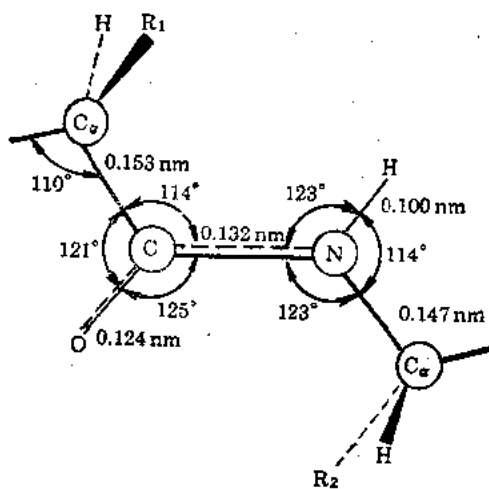


图 3-29 反式构型的肽键

体)中的 C=N 的键长应介于这两者之间, X-射线衍射分析证实, 肽键中 C=N 的键长为 0.132 nm。常见的反式构型肽键的键长与键角见图 3-29。肽键中 C—N 单键具有约 40% 双键性质, C=O 双键具有约 40% 单键性质。因为 C—N 键具有双键性质, 所以肽键是一个平面, 结构 3 中的 6 个原子差不多处于同一平面内。肽键的平面性质在肽链折叠成三维构象的过程中是很重要的。由于 C—N 键具有双键性质, 绕键旋转能障 (energy barrier) 比较高, 约为 75kJmol^{-1} (千焦/摩尔)。对于肽链来说, 这一能障在室温下足以有效防止旋转。在肽平面内, 两个 C_{α} 可以处于顺式构型或反式构型。在反式构型(图 3-29)中, 两个 C_{α} 原子及其取代基团互相远离, 而在顺式构型中它们彼此接近, 引起 C_{α} 上的 R 基之间的空间位阻。这里反式构型比顺式稳定, 两者相差 8kJmol^{-1} 。因此, 肽链中肽键都是反式构型, 写为 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}-$ 。这里有一个重要的例外, 就是含有脯氨酸的肽键, 它可以是反式的, 也可以是顺式的, 因为四氢吡咯环引起的空间位阻消去了反式构型的优势(见图 3-30)。

是含有脯氨酸的肽键, 它可以是反式的, 也可以是顺式的, 因为四氢吡咯环引起的空间位阻消去了反式构型的优势(见图 3-30)。

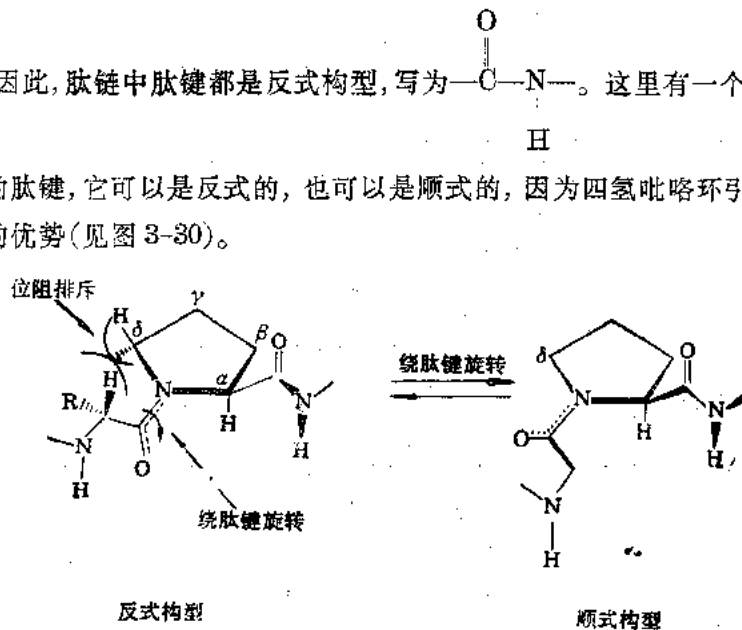


图 3-30 有脯氨酸参与形成的肽键

二、肽的物理和化学性质

许多短肽已经得到晶体。晶体的熔点都很高, 这说明短肽的晶体是离子晶格, 在水溶液中以偶极离子存在。在 pH0—14 范围内, 肽键中的亚氨基不能解离, 因此肽的酸碱性质主要决定于肽键中的游离末端 $\alpha\text{-NH}_2$ 、游离末端 $\alpha\text{-COOH}$ 以及侧链 R 基上的可解离功能团。在长肽或蛋白质中, 可解离的基团主要是侧链上的。

肽键中游离 α -氨基和游离 α -羧基的间隔一般比氨基酸中的大, 因此它们之间的静电引力

较弱。肽中的末端 α -羧基的 pK' 值要比游离氨基酸中的大一些，而末端 α -氨基的 pK' 值要比氨基酸中的小一些(表 3-8)。R 基的 pK' 值在两者之间区别不大。

小肽的滴定曲线和氨基酸的滴定曲线很相似。随着电离基团的增加，滴定曲线迅速变得复杂，以致很难用单个侧链基团的解离来分析，因为在同一 pH 范围内可以有几个侧链解离。但是在给定的 pH 下，根据 Henderson-Hasselbalch 方程不准确定出每个侧链占优势的电离态。我们只需应用这样一个规则：当溶液 pH 大于解离侧链的 pK' 值，占优势的离子形式是该侧链的共轭碱，当溶液的 pH 小于解离侧链的 pK' 值，占优势的离子形式是它的共轭酸，即

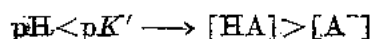
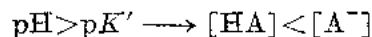
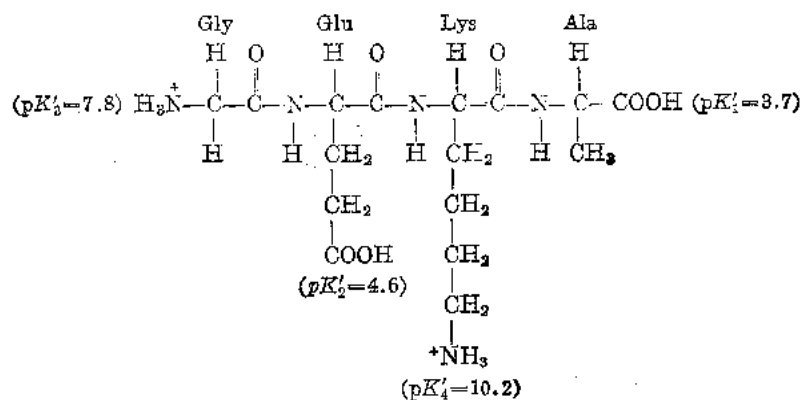


表 3-8 某些肽的 pK'

肽	$pK' \alpha\text{-COOH}$	$pK' \alpha\text{-NH}_2$	$pK' \text{R 基}$	pI
Gly-Asp	3.81	8.60	4.45	3.63
Gly-Gly	3.06	8.13	—	5.59
Ala-Gly	3.16	8.23	—	5.70
Gly-Ala	3.17	8.23	—	5.70
Gly-Gly-Gly	3.26	7.91	—	5.58
Ala-Ala-Ala	3.42	7.94	—	5.68
Ala-Ala-Lys-Ala	3.58	8.01	10.58	9.30




上面结构为全部质子化的离子形式

溶液的 pH	功能团解离 (带电) 状况				占优势离子的净电荷
	$\alpha\text{-COOH}$	侧链 COOH	$\alpha\text{-NH}_2$	$\epsilon\text{-NH}_2$	
<3.5	-COOH	-COOH	-NH ₃ ⁺	-NH ₃ ⁺	+2
3.5-4.5	-COO ⁻	-COOH	-NH ₃ ⁺	-NH ₃ ⁺	+1
4.5-7.8	-COO ⁻	-COO ⁻	-NH ₃ ⁺	-NH ₃ ⁺	0
7.8-10.2	-COO ⁻	-COO ⁻	-NH ₂	-NH ₃ ⁺	-1
>10.2	-COO ⁻	-COO ⁻	-NH ₂	-NH ₂	-2

图 3-31 四肽甘氨酸谷氨酰胺赖氨酸丙氨酸的酸碱性质。

例如,甘氨酸谷氨酰赖氨酸丙氨酸(glycylglutamyllysylalanine)的解离状况(图 3-31),利用表 3-9 中所列的可解离功能团的 pK' 值和 Henderson-Hasselbalch 方程可推断出,当 pH 小于 3.5 时,可解离基团全部质子化,溶液中占优势的离子形式携带的净电荷为 +2; 当 pH 在 3.5—4.5 的范围内,占优势的离子形式所带净电荷为 +1,因为这时 C_α 末端羧基大部分被解离; pH 介于 4.5 和 7.8 之间时,占优势的离子形式所具的净电荷为零;净电荷为零时的溶液 pH 就是该肽的等电点(pI),这里 $pI = \frac{1}{2}(4.5+7.8) = 6.15$; pH 在 7.8 和 10.2 之间时,占优势的离子形式所带净电荷为 -1; 当 pH 大于 10.2 时,此肽所携带的净电荷为 -2。

表 3-9 根据从模型化合物得到的数据推测的多肽链中可解离功能团的 pK' 值

可解离功能团	推测的 pK' 值
α -COOH	3.7
侧链 COOH (Glu 或 Asp)	4.6
咪唑基 (His)	7.0
α -NH ₃ ⁺	7.8
-SH (Cys)	8.8
 -OH (Tyr)	9.6
ϵ -NH ₃ ⁺ (Lys)	10.2
胍基 (Arg)	>12

肽的化学反应也和氨基酸一样,游离的 α -氨基、 α -羧基和 R 基可以发生与氨基酸中相应的基团类似的反应。NH₂ 末端的氨基酸残基也能与茚三酮发生定量反应,生成呈色物质。这一反应广泛地应用于肽的定性和定量测定。双缩脲反应(biuret reaction)是肽和蛋白质所特有的,而为氨基酸所没有的一个颜色反应。一般含有两个或两个以上的肽键化合物与 CuSO₄ 碱性溶液都能发生双缩脲反应而生成紫红色或蓝紫色的复合物,利用这个反应借助分光光度计可以测定蛋白质的含量。

蛋白质部分水解后所得的各种肽,只要水解过程中不对称碳原子不发生消旋,就具有旋光性。一般短肽的旋光度约等于组成该肽中各个氨基酸的旋光度的总和。但是较长的肽或蛋白质的旋光度则不等于其组成氨基酸的旋光度的简单相加。

三、天然存在的活性肽

除了蛋白质部分水解可以产生长短不一的各种肽段(peptide fragment)之外,生物体内还有很多活性肽(active peptide)游离存在。它们具有各种特殊的生物学功能。已知很多激素是属于肽类物质,如催产素、加压素和舒缓激肽等(图 3-32)。有关它们的生理功能见“激素”章。

有些抗生素(antibiotics)也属于肽类或肽的衍生物,例如短杆菌肽 S(gramicidin S)、多粘菌素 E(polymyxin E)和放线菌素 D(actinomycin D)等。其结构式见“抗生素”章。

在小的活性肽中一类称脑啡肽(enkephalins)的物质,近年来很引人注意。它们在中枢神经系统中形成,是体内自己产生的一类鸦片剂(opiate)。

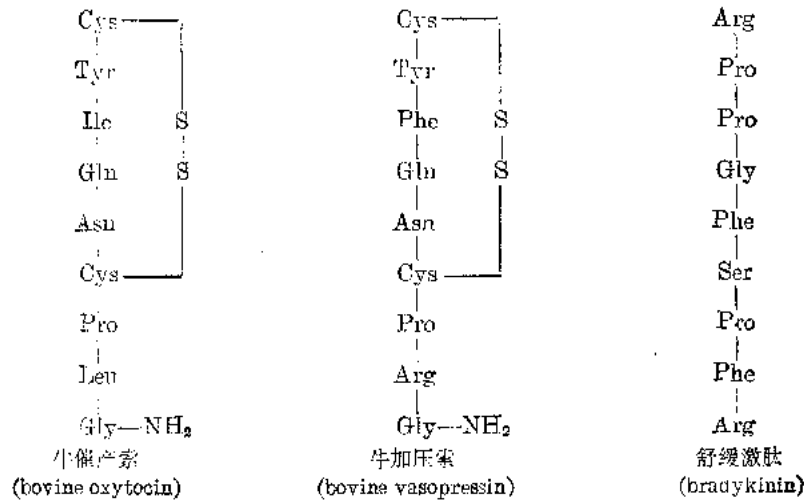


图 3-32 一些肽类激素

某些蕈(mushrooms)产生的剧毒毒素也是肽类化合物, 例如 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin), 它是从鹅膏蕈属或称捕蝇蕈属的鬼笔鹅膏(*Amanita phalloides*)中分离出来的, 是一个环状八肽(图 3-33)。 α -鹅膏蕈碱能与真核生物的 RNA 聚合酶 (RNA polymerase) II 和 III 牢固结合而抑制酶的活性, 因而使 RNA 的合成不能进行, 但不影响原核生物的 RNA 合成。

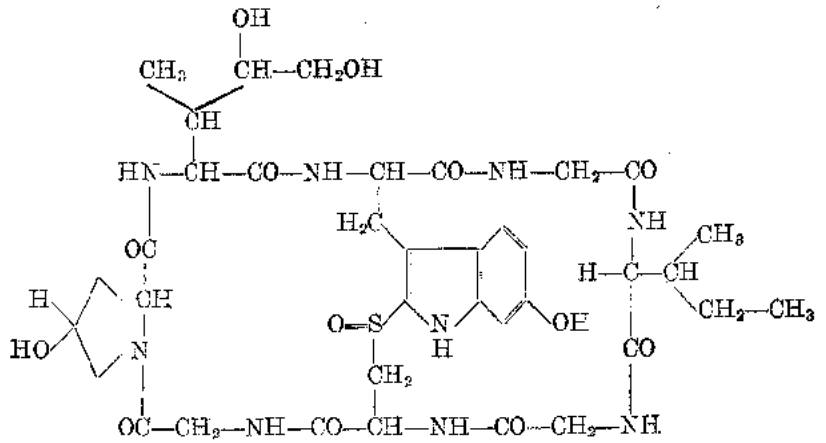
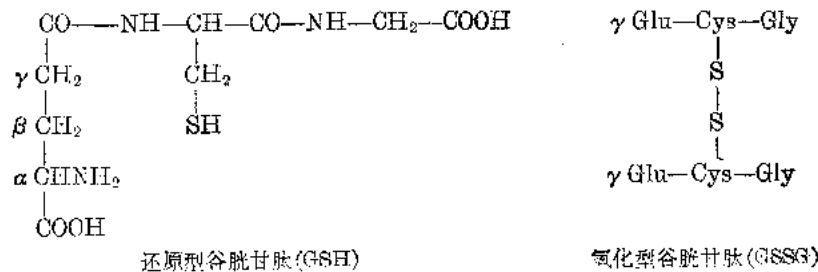


图 3-33 α -鹅膏蕈碱的化学结构

动植物细胞中都含有一种三肽, 称还原型谷胱甘肽(reduced glutathione)即 γ -谷氨酰半胱氨酸甘氨酸, 因为它含有游离的 SH 基, 所以常用 GSH 来表示。它的结构式如下:



还原型谷胱甘肽在红细胞中作为巯基缓冲剂存在, 维持血红蛋白和其他红细胞蛋白质的半胱氨酸残基处于还原态。

肌肉中存在的鹅肌肽(anserine)和肌肽(carnosine)都是二肽,前者是 β -丙氨酸-L-甲基组氨酸,后者是 β -丙氨酸组氨酸。它们在骨骼肌中的含量很高,每千克肌肉达到20—30毫摩尔。虽然它们在肌肉中如此丰富,但是它们的功能至今尚不清楚,有人认为可能与肌肉收缩有关。

某些天然肽中含有的 γ -肽键、 β -氨基酸和D型氨基酸等在蛋白质中是不存在的。很可能结构上的这些变化使分化了的肽可以免受蛋白水解酶的作用。蛋白酶一般只水解L-氨基酸形成的 α -肽键。

四、氨基酸顺序测定的一般步骤

测定蛋白质的一级结构,要求样品必须是均一的(homogeneous),纯度应在97%以上,同时必须知道分子量,其误差允许在10%左右。关于蛋白质的分离、提纯和分子量测定的问题将在本章后两节讨论。

多肽链的氨基酸顺序主要是根据英国F. Sanger实验室中发展起来的方法进行测定的,这个方法首先应用于胰岛素的氨基酸顺序测定并于1954年取得成功。虽然测定每种蛋白质的一级结构都有自己特殊的问题需要解决,然而一般的测定步骤可以概括为:

(1) 测定蛋白质分子中多肽链的数目。根据蛋白质末端残基(氨基末端或羧基末端)的摩尔数和蛋白质的分子量可以确定蛋白质分子中的多肽链数目。

(2) 拆分蛋白质分子的多肽链。如果蛋白质分子是由几条不同的多肽链构成的,则必须设法把这些多肽链拆开并单独分离出来,然后测定每条多肽链的氨基酸顺序。

(3) 测定多肽链的氨基酸组成。经分离提纯的多肽链一部分样品进行完全水解,测定它的氨基酸组成(amino acid composition),并计算出氨基酸成分的分子比。

(4) 分析多肽链的N末端和C末端残基。多肽链的另一部分样品进行N末端和C末端残基的鉴定,以便建立两个重要的氨基酸顺序参考点。

(5) 断裂多肽链内的二硫键。这可以用过甲酸氧化或用巯基化合物还原来实现。

(6) 多肽链断裂成肽段。用两种或几种不同的断裂方法(指断裂点不一样)将多肽链样品降解成两套或几套肽段或称肽碎片(peptide fragment),并将这些肽段分离开来。

(7) 测定各个肽段的氨基酸顺序。目前最常用的是Edman降解法,此外尚有酶解法、气相色谱-质谱联用法等。

(8) 确定肽段在多肽链中的次序。利用两套或几套肽段的氨基酸顺序彼此间有交错重叠,可拼凑出整条多肽链的氨基酸顺序。

(9) 确定原多肽链中二硫键的位置。

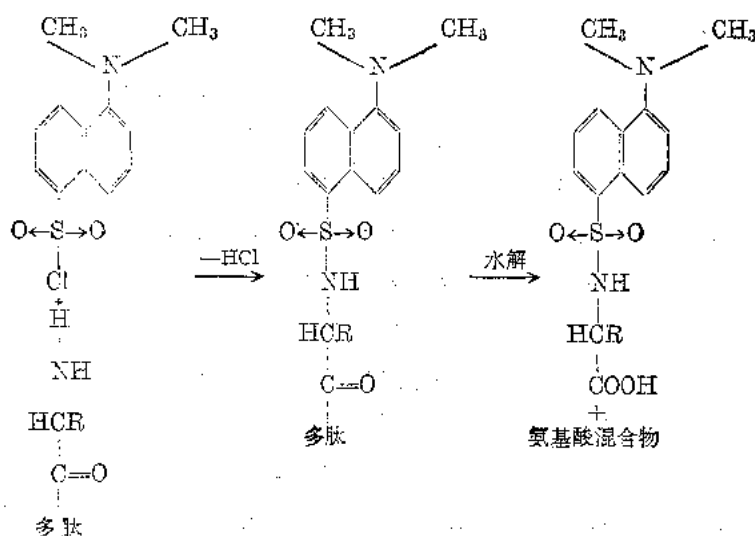
应该指出,顺序测定中不包括辅基成分分析,但是它应属于蛋白质化学结构内容。下面介绍氨基酸顺序测定中的几个重要方法。

五、N末端和C末端氨基酸残基的测定

用于N末端分析的方法很多,下面介绍几个最常用的方法。

二硝基氟苯(DNFB 或 FDNB)法: 在前面的氨基酸化学反应中曾提到 DNFB 与氨基酸 α -NH₂ 发生的反应广泛地用于测定多肽或蛋白质中的 N-末端氨基酸。多肽或蛋白质的游离末端 NH₂ 与 DNFB(称 Sanger 试剂)反应后,生成 DNP-多肽或 DNP-蛋白质。由于 DNFB 与氨基形成的键对酸水解的稳定性远比肽键高,因此 DNP-多肽经酸水解后,只有 N 末端氨基酸为黄色 DNP-氨基酸衍生物,其余的都是游离氨基酸。只要鉴别所生成的 DNP-氨基酸,便可得知多肽链的 N 末端残基。虽然多肽侧链上的 ϵ -NH₂、酚羟基等也能与 DNFB 反应,但生成的侧链取代 DNP 衍生物如 ϵ -DNP 赖氨酸当用有机溶剂(如乙酸乙酯)抽提时将与游离氨基酸一起留在水相,因而容易和 α -DNP 氨基酸区分开来。待分析的 DNP-氨基酸可用纸层析、薄层层析或高效液相色谱进行分离鉴定和定量测定。

丹磺酰氯(DNS)法: 丹磺酰氯(dansyl chloride)是二甲氨基萘磺酰氯(dimethylaminonaphthalene sulfonyl chloride)的简称,缩写为 DNS。方法的原理与 DNFB 法相同,只是用 DNS 代替 DNFB 试剂。由于丹磺酰基具有强烈的荧光,灵敏度比 DNFB 法高 100 倍,并且水解后的 DNS-氨基酸不需要提取,可直接用纸电泳(见本章第 6 节)或薄层层析加以鉴定。



苯异硫氰酸酯(PITC)法: 多肽或蛋白质的末端氨基也和氨基酸的 α 氨基一样能与 PITC 作用(见本章第二节氨基酸的化学反应部分),生成苯氨基硫甲酰多肽或蛋白质,简称 PTC-多肽或蛋白质。后者在酸性有机溶剂中加热时, N 末端的 PTC-氨基酸发生环化,生成苯乙内酰硫脲的衍生物并从肽链上掉下来,除去 N 末端氨基酸后剩下的肽链仍然是完整的,因为 PTC 基的引入只使第一个肽键的稳定性降低。反应液中代表 N 末端残基的 PTH-氨基酸,经有机溶剂抽提干燥后,可用薄层层析(如硅胶薄膜和聚酰胺薄膜等)、气相色谱和高效液相色谱等方法进行鉴定。此方法还可以用来测定氨基酸顺序,详见后面肽的氨基酸顺序测定。

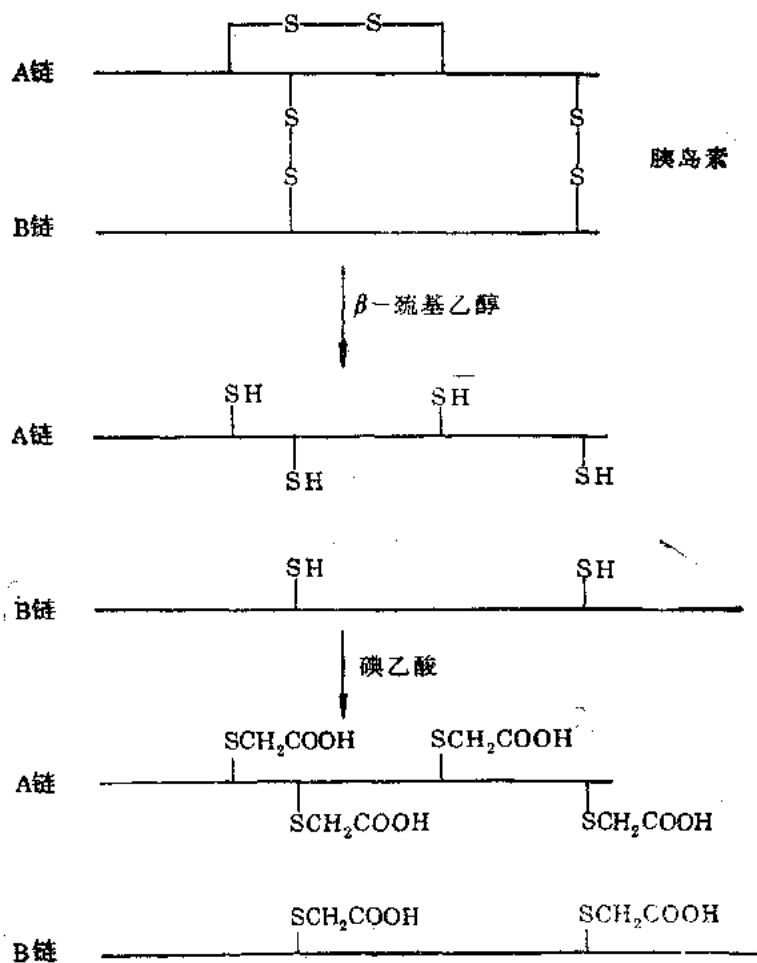
氨基酶法: 氨基酶(amino peptidases)是一类肽链外切酶(exopeptidases)或叫外肽酶,它们能从多肽链的 N 端逐个地向里切。根据不同的反应时间测出酶水解所释放的氨基酸种类和数量,按反应时间和残基释放量作为动力学曲线,就能知道该蛋白质的 N 末端残基顺序。实际上此法用于测定 N 末端和末端残基顺序有许多困难,因为酶对各种肽键敏感性不一样,常常

(carboxypeptidase)是一类肽链外切酶,它专一地从肽链的C端开始逐个降解,释放出游离氨基酸。被释放的氨基酸数目与种类随反应时间而变化。根据释放的氨基酸量(摩尔数)与反应时间的关系(见图3-34),便可以知道该肽链的C末端氨基酸顺序。这是理想的情况,实际上应用时有不少困难,例如当几个氨基酸以相近的速度释放或两个以上相同氨基酸相邻时,结果难以解释。

目前常用的有四种羧肽酶: A、B、C及Y。前两种来自胰脏, C得自柑桔叶, Y取自面包酵母。研究得最多使用得最广泛的是羧肽酶A和B。羧肽酶A能释放除Pro, Arg和Lys之外的所有C末端残基,而羧肽酶B只水解以碱性氨基酸Arg和Lys为C末端残基的肽键。

六、二硫键的断裂和多肽链的分离

由几条多肽链构成的蛋白质分子,有二种情况,一种是几条多肽链借助非共价键连接起来的,如血红蛋白(四聚体)、烯醇化酶(二聚体)等寡聚蛋白质;另一种是几条多肽链通过共价二硫键交联在一起,如胰岛素(二条)和 α -糜蛋白酶(三条)。如果是寡聚蛋白质,可用变性剂(denaturant),如8mol/L尿素或6mol/L盐酸胍处理就能使寡聚蛋白质分子中的亚基(多肽链)拆开。如果多肽链之间由二硫键交联,或者虽然蛋白质分子只由一条多肽链构成,但有链内二硫键,则必须先将二硫键打开。最普遍的方法是用过量的 β -巯基乙醇处理(pH8-9,室



温下放置数小时),可以使—S—S—定量还原为—SH。与此同时反应系统中还需要有 8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍存在,使蛋白质变性,多肽链松散而成无规则的构象,这样还原剂才能作用于原来处在分子内部的二硫键。然后用烷基化试剂如碘乙酸保护还原时生成的半胱氨酸残基上的—SH,以防止它重新被氧化。例如胰岛素经巯基乙醇还原和碘乙酸保护,得到 A 链和 B 链的羧甲基衍生物(见 119 页)。

多肽链的分离提纯与蛋白质的分离提纯基本相同。

七、氨基酸组成的测定

用于蛋白质的氨基酸组成测定的水解方法主要是酸水解,同时辅以碱水解。酸水解中使

表 3-10 几种代表性蛋白质的氨基酸组成
(以一个分子中的残基数表示)

氨基酸	A ^a	B	C	D	E	F	G	H
Ala	12	15	9	14	6	12	19	45
Val	6	9	7	14	3	9	17	9
Leu	8	21	8	12	6	2	20	2
Ile	6	10	4	9	6	3	10	1
Pro	2	8	4	8	4	4	17	7
Met	2	4	0	0	2	4	2	0
Phe	3	4	2	8	4	3	11	4
Trp	6	2	1	8	1	0	6	1
Gly	12	3	6	6	12	3	16	74
Ser	10	7	7	16	0	15	30	17
Thr	7	8	8	16	10	10	14	2
Cys	8	5	5	1	2	8	1	2
Tyr	3	4	4	4	4	6	8	23
Asn	13	5	2	10	5	10	17	1
Gln	3	9	4	9	3	7	9	0
Asp	8	11	11	8	3	5	14	4
Glu	2	16	9	7	9	5	13	4
Lys	6	14	4	2	19	10	18	5
Arg	11	3	1	11	2	4	7	3
His	1	2	1	0	3	4	11	2
残基总数	129	160	97	158	104	124	260	206

^a A. 鸡溶菌酶; B. 牛β乳球蛋白; C. 菠菜铁氧还蛋白(ferredoxin); D. 烟草花叶病毒外壳蛋白; E. 马细胞色素 c; F. 牛核糖核酸酶; G. 人碳酸酐酶(carbonic anhydrase); H. 蚕丝心蛋白。

用最广泛的是盐酸，一般用 6 mol/L HCl 于 110°C 在真空的或充氮的安瓶瓶内进行水解，时间 10—24 小时，水解后除去 HCl。所得氨基酸不消旋，但色氨酸全部被破坏，丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸也遭到部分破坏，同时天冬酰胺和谷氨酰胺的酰胺基被水解下来，生成相应的游离氨基酸和铵离子。蛋白质中的酰胺基总量可由水解液中的氮量算出。为测定色氨酸含量，蛋白质可用碱水解，虽然很多种氨基酸遭受破坏，但色氨酸能定量回收。碱水解通常用 5 mol/L NaOH，于 110°C，在真空或充氮条件下进行，时间 20 小时左右。近年来用甲基磺酸代替盐酸水解蛋白质，由于它具有许多优点，已被广泛应用。

水解中氨基酸遭破坏的程度与保温时间有线性关系，因此该氨基酸在蛋白质中的真实含量可通过在不同的保温时间测出样品中该氨基酸的含量并外推至零时间的方法求出。

蛋白质的氨基酸组成一般用每摩尔蛋白质中含氨基酸残基的摩尔数表示，或用每 100 克蛋白质中含氨基酸的克数表示。很多种蛋白质的氨基酸组成已被测定，表 3-10 列出几种代表性蛋白质的氨基酸组成。

八、多肽链的部分断裂和肽段的分离

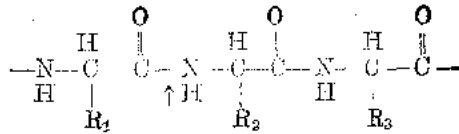
目前用于顺序分析的方法一次能测定的顺序都不太长，最常用的也是最有效的 Edman 化学降解法一次只能连续降解几十个残基。然而天然的蛋白质分子多在 100 个残基以上，因此必须设法将多肽断裂成较小的肽段，然后把它们分离开来，测定每一肽段的氨基酸顺序。为此，经分离提纯并打开二硫键的多肽链选用专一性强的蛋白水解酶或化学试剂进行有控制的裂解。裂解时要求断裂点少，专一性强，反应产率高。

酶裂解法：目前用于肽链断裂的蛋白水解酶 (proteolytic enzyme) 或称蛋白酶 (proteinase) 已有十多种，并且不断有新的蛋白酶发现并投入使用。最常用的蛋白水解酶有胰蛋白酶、糜蛋白酶 (也称胰凝乳蛋白酶)、嗜热菌蛋白酶、胃蛋白酶以及几种近年来发现的蛋白酶。上面这些蛋白酶都是肽链内切酶或叫内肽酶 (endopeptidase)。

胰蛋白酶 (trypsin) 这是最常用的蛋白水解酶，专一性强，只断裂赖氨酸或精氨酸的羧基参与形成的肽键 (图 3-35)。用它断裂多肽链经常可以得到合适的肽段。特别是用固相法测序时，用胰蛋白酶裂解得到的肽段可以通过双功能基交联剂——对苯二异硫氰酸 (phenylene diisothiocyanate, 缩写为 PDITC 或 DITC) 直接偶联到固相载体上 (参看后面肽段的氨基酸顺序测定)。

有时待测的多肽链中赖氨酸残基和 (或) 精氨酸残基的数量较多，为了减少胰蛋白酶的作用位点，可以通过化学修饰将其侧链基团保护起来。例如用马来酸酐 (maleic anhydride) 即顺丁烯二酸酐可以保护 Lys 残基侧链上的 ϵ -NH₂，这样胰蛋白酶就不会水解 Lys 羧基参与形成的肽键，只能断裂精氨酸羧基所形成的肽键。反之，如果用 1, 2-环己二酮 (1, 2-cyclohexanedione) 修饰 Arg 的胍基 (参见本章第二节中氨基酸的化学反应)，则胰蛋白酶只能裂解赖氨酸羧基所形成的肽键。

如果想增加多肽链中胰蛋白酶的断裂点，可以用 γ 丙酮处理多肽链样品，这时 Cys 残基侧链被修饰成类似 Lys 的侧链，也具有 ϵ -NH₂ (见氨基酸的化学反应)。这样，胰蛋白酶便能断



- 胰蛋白酶 $R_1 = \text{Lys}$ 或 Arg (侧链(专一要求, 水解速度快); AECys (能水解, 速度较慢)
 $R_2 = \text{Pro}$ (抑制水解)
- 糜蛋白酶 $R_1 = \text{Phe}$, Trp 或 Tyr (水解速度快); Leu , Met 或 His (水解速度次之)
 $R_2 = \text{Pro}$ (抑制水解)
- 嗜热菌蛋白酶 $R_2 = \text{Leu}$, Ile , Phe , Trp , Val , Tyr 或 Met (疏水性强的残基, 水解速度快)
 $R_3 = \text{Gly}$ 或 Pro (不水解)
 R_1 或 $R_3 = \text{Pro}$ (抑制水解)
- 胃蛋白酶 R_1 和 $R_2 = \text{Phe}$, Leu , Trp , Tyr 以及其他疏水性残基 (水解速度好)
 $R_3 = \text{Pro}$ (不水解)

图 3-35 几种蛋白水解酶(内肽酶)的专一性

裂 Cys 羧基侧的肽键。

糜蛋白酶(chymotrypsin) 此酶的专一性不如胰蛋白酶。它断裂 Phe、Trp 和 Tyr 等疏水氨基酸的羧基参与形成的肽键。断裂键邻近的基团是碱性的, 裂解能力增加; 是酸性的, 裂解能力将减弱。

嗜热菌蛋白酶(thermolysin) 它是一个含金属锌和钙的蛋白酶。Zn 是酶活力必需的, Ca 与酶的热稳定性有关。此酶的作用专一性较差(图 3-35), 常用于断裂较短的多肽链或大肽段。

胃蛋白酶(pepsin) 它的专一性与糜蛋白酶类似, 但它要求被断裂键两侧的残基都是疏水性氨基酸, 如 Phe-Phe。此外与糜蛋白酶不同的是酶作用的最适 pH, 前者是 pH 2, 后者是 pH 8-9。由于二硫键在酸性条件下稳定, 因此确定二硫键位置时, 常用胃蛋白酶来水解。

近年来发现的几种高专一性肽链内切酶, 在蛋白质顺序测定中很有前途, 对分子量比较大的多肽链采用逐级专一性降解是相当理想的。金黄色葡萄球菌蛋白酶(Staphylococcal protease)和梭状芽孢杆菌蛋白酶(clostripain)就是其中的二个。

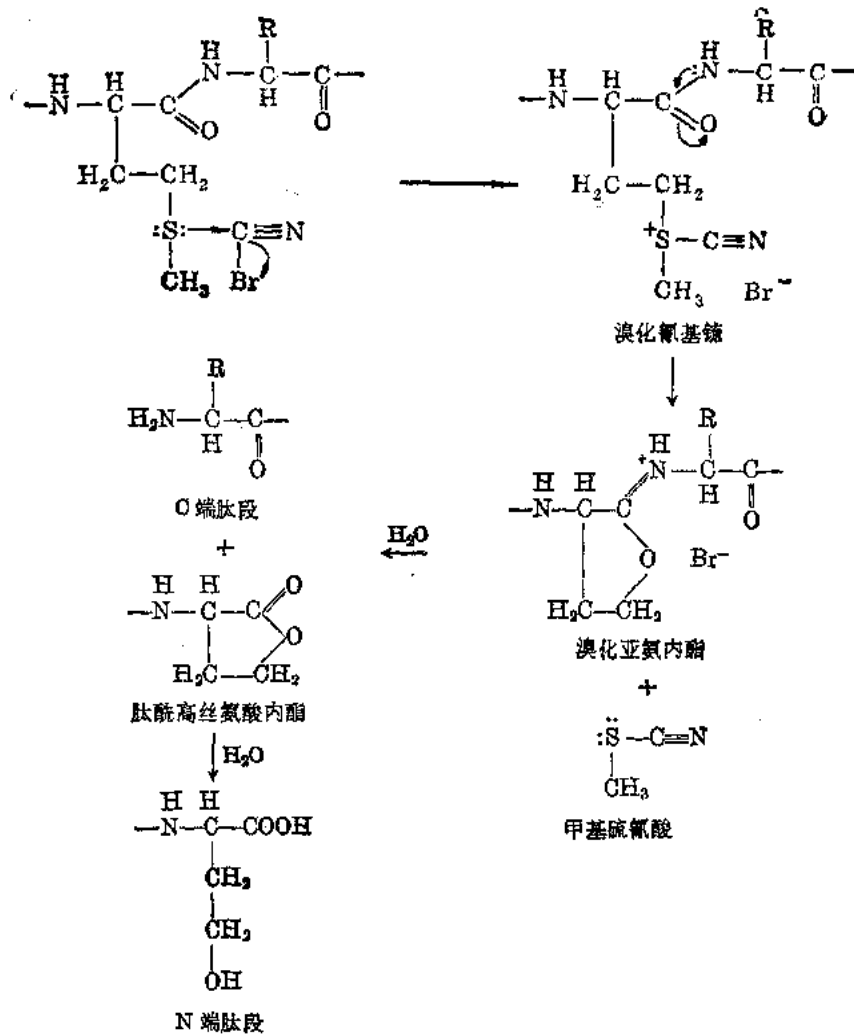
金黄色葡萄球菌蛋白酶亦称 Glu 蛋白酶, 它是从金黄色葡萄球菌菌株 V_8 (Staphylococcus aureus, strain V_8) 中分离得到的, 是近来发现的最有效、应用最广泛的一种蛋白酶。酶分子量为 12,000 道尔顿。当裂解在磷酸缓冲液 (pH 7.8) 中进行时, 它能在谷氨酸残基和天冬氨酸残基的羧基侧断裂肽键。如果改用碳酸氢铵缓冲液 (pH 7.8) 或醋酸铵缓冲液 (pH 4.0) 时, 则只能断裂谷氨酸残基的羧基侧肽键。

梭状芽孢杆菌蛋白酶, 或称 Arg 蛋白酶, 它是从溶组织梭状芽孢杆菌 (Clostridium histolyticum) 中分离出来的。此酶专门裂解精氨酸残基的羧基所形成的肽键。即使在 6 mol/L 尿素中 20 小时内仍具活力, 这样对不溶性蛋白质的长时间裂解将是很有有效的。

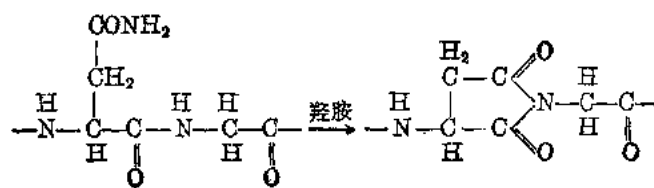
化学裂解法: 用化学裂解法获得的肽段一般都比较小, 适合在自动顺序仪中测定顺序, 因此化学法对大分子量的蛋白质顺序测定是很重要的。

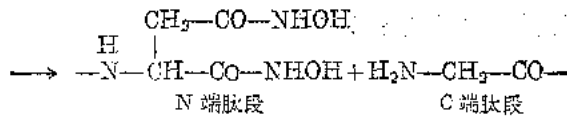
用溴化氰断裂 溴化氰(cyanogen bromide)只断裂由甲硫氨酸残基的羧基参加形成的肽

键。由于大多数蛋白质只含有很少的甲硫氨酸，因此 CNBr 裂解产生的肽段不多。这些肽段可以用胰蛋白酶处理使成更小的肽段。断裂反应在 70% 甲酸中进行，这样可以使卷曲的多肽链松散开来，以便暴露甲硫氨酸侧链，有利于和 CNBr 发生作用。反应的第一步是甲硫氨酸硫原子的孤电子对对溴化氰的碳发生亲核攻击生成溴化氰基磺(cyanosulfonium bromide) 中间物。然后自发环化产生溴化亚氨内酯(iminolactone bromide)，后者水解给出一个 C 末端残基为肽酰高丝氨酸内酯(peptidyl homoserine lactone) 的肽。这个环酯之所以称高丝氨酸内酯是因为它可以看成是由带有 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ 侧链的高丝氨酸(丝氨酸的一个同系物) 衍生而来的。CNBr 裂解甲硫氨酸残基的羧基侧肽键的反应机理如下所示：



用羟胺断裂 NH_2OH 能专一性地断裂 $-\text{Asn}-\text{Gly}-$ 之间的肽键。但专一性不很强， $\text{Asn}-\text{Leu}$ 及 $\text{Asn}-\text{Ala}$ 键也能部分裂解。反应式如下：





由于各种蛋白质中 Asn—Gly 键出现的几率是很低的,平均每 150 个肽键也不一定出现一次。因此用这个方法得到的肽段都很大,这对分子量大的蛋白质的顺序测定是十分有用的。

肽段的分离提纯 多肽链用上述方法断裂后,所得的肽段混合物通常使用凝胶过滤、凝胶电泳、离子交换纤维素和离子交换葡聚糖柱层析、高效液相色谱(HPLC)、高效薄层层析等方法进行分离提纯。这些方法参见本章氨基酸的分析分离和蛋白质的分离提纯部分。

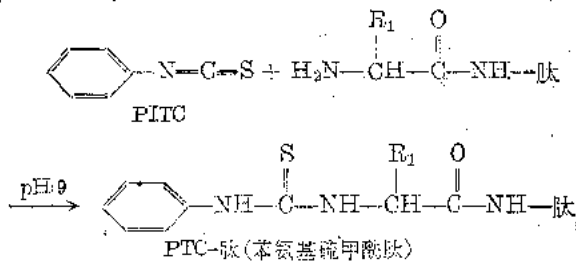
九、肽段的氨基酸顺序测定

多肽链经降解和分离后得到的大小合适、纯度合格的肽段,即可进行它的氨基酸顺序测定。肽的氨基酸顺序测定主要使用 Edman 化学降解法,此外还有酶解法、酶解-肽谱重叠法以及气谱-质谱联用法等。

Edman 化学降解法:

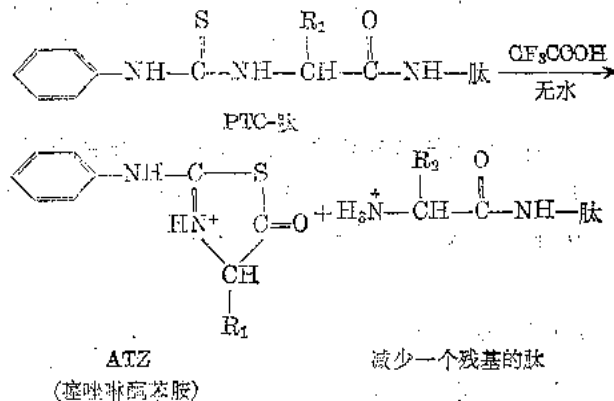
Edman 降解法(Edman degradation)是 P. Edman 于 1950 年首先提出来的。最初用于 N 末端基分析,即苯异硫氰酸酯(PITC)法(见前面的 N 末端氨基酸残基的分析)。Edman 降解试剂(PITC)与多肽链的游离末端氨基作用,降解反应可分为三步。

第一步是偶联反应:



反应在弱碱性介质中进行,因为 PITC 只能与未质子化的 -NH_2 起作用。

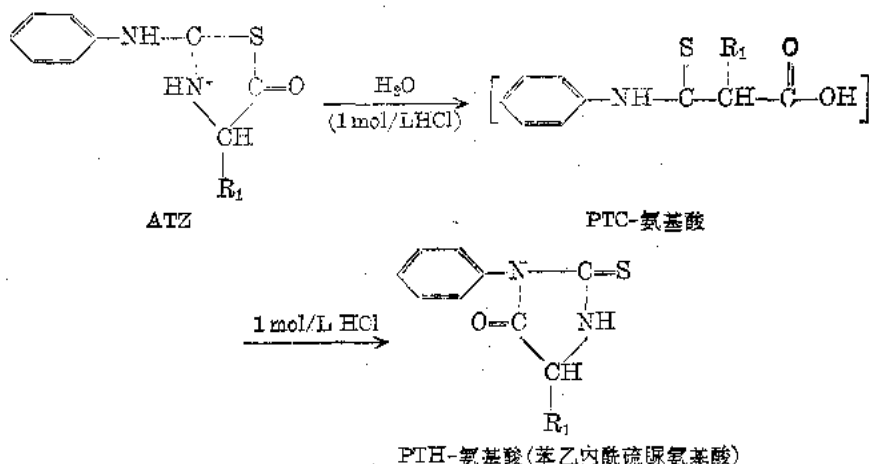
第二步是环化断裂反应:



第一步反应中形成的 PTC-肽在无水强酸介质如三氟乙酸中,最靠近 PTC 基的肽键将发生断裂,同时 PTC-氨基酸残基环化成噻唑啉酮苯胺(aniline thiazolinine)衍生物。反应必

须在无水条件下进行, 否则其他肽键也将被水解。

第三步是转化反应:



第二步中生成的 ATZ 不稳定, 难于用来鉴定该氨基酸, 因此在酸性水溶液中将它转变为 PTH-氨基酸。转化过程中实际又分二步进行, 首先水解生成 PTC-氨基酸, 然后环化成 PTH-氨基酸。这是一个非常稳定的化合物。所有 PTH-氨基酸在紫外区有强吸收, 最大吸收值在 268 nm 处。PTH-氨基酸可利用各种层析技术分离。由于 PITC 与肽链的游离 α 末端氨基结合后, 只是减弱紧挨 PTC 基的末端残基羧基侧的肽键, 因此在无水酸作用下, 只切下与 PITC 反应的那个氨基酸残基。这时剩下的减少了一个残基的肽链便在它的 N 端暴露出一个新的游离 α 末端氨基, 又可参加第二轮反应。然后再切下第二个残基, 以此循环。这样如果进行 n 轮反应, 就能测出 n 个残基的顺序。

Edman 降解法现在已有多种改进形式, 例如 DNS-Edman 测序法, 它是用前述的 DNS 法测定肽链的 N 末端残基, 用 Edman 降解法提供逐次减少一个残基的肽链样品。这样既能提高检出被释放残基的灵敏度(比 Edman 法高出几倍到十几倍), 又能使氨基酸释放依次连续进行。此外为提高检出被释放残基 (PTH-氨基酸) 的灵敏度, 采用荧光基团或有色基团等标记的 PITC 试剂, 如 4-N, N-二甲氨基偶氮苯-4'-异硫氰酸酯 (4-N, N-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate, 缩写为 DABITC) 就是改进的有色 Edman 降解试剂。

利用 Edman 降解, 一次能连续测出 60—70 个残基的肽段顺序, 也有报导一次测出 90—100 个残基顺序的。

Edman 降解法测定顺序操作程序非常麻烦, 工作量大。蛋白质顺序仪 (protein sequenator 或 sequencer) 的出现既免除了手工测定的麻烦, 又满足了蛋白质微量顺序分析的需要。该仪器的灵敏度高, 蛋白质样品的最低用量在 5 皮摩尔 (p mol) 水平。

酶解法:

蛋白水解酶中有一类是肽链外切酶或称外肽酶 (exopeptidases), 例如氨肽酶和羧肽酶, 它们分别从肽链的 N 端和 O 端逐个地向里切。因此, 原则上只要能跟随酶水解的过程分别定量测出释放的氨基酸, 便能确定肽的顺序。然而这种方法实际上有许多困难, 局限性很大, 它只能用来测定末端附近很少几个残基的顺序。

气谱-质谱联用法:

质谱法(mass spectrography)和气谱-质谱(GC-MS)联用法也已用于肽的氨基酸顺序测定。这是一种不同于Edman降解和酶解的物理化学方法。由于篇幅限制,方法的原理此处不作介绍。目前质谱法一次能测的氨基酸残基数尚不多,一般10个残基左右。但质谱法具有样品用量少,分析速度快的优点。

用质谱仪分析化合物的结构要求样品有较高的纯度,因此质谱仪与气相色谱仪联用是比较理想的,因为气谱的分辨率极高,适于获得纯净的化合物,而且它们分离组分的数量级大小和对分子性质(气态分子)的要求也是吻合的。利用GC-MS联用法测定肽的顺序已有不少成功的报导。它是一种很有发展前途的方法。

用测定核酸的顺序推测蛋白质的顺序是当前很有发展前途的一种方法。这是基于蛋白质的氨基酸顺序是由核酸的核苷酸顺序或三联体密码规定的道理。方法是用待测蛋白质作抗原免疫动物,得相应抗体,并用此抗体去沉淀合成此种蛋白质的多核糖体(polysome),因为在这种多核糖体上含有该蛋白质的模板mRNA和与其相联而未被释放的蛋白质多肽链。后者将与加入的抗体发生结合而使多核糖体沉淀;再从沉淀中分离出该mRNA,并将它反转录成cDNA(互补DNA, complementary DNA)。然后测出cDNA的核苷酸顺序,并从它推测出蛋白质的顺序。由于目前测定DNA顺序的技术相当成熟,因此对于用传统的蛋白质化学方法难以测定的大分子量(100,000道尔顿以上)的或生物体内含量很低的蛋白质,此方法将是十分有效的。

十、肽段在多肽链中次序的决定

一般来说,如果多肽链只断裂成两段或三段便能测出它们的氨基酸顺序,我们就不难推断出它们在原多肽链中的前后次序,只要知道原多肽链的C端和N端的氨基酸残基即可,除非末端残基恰好与切口的氨基酸一样才不能得出结论。然而多数场合,断裂得到的肽段多于此数

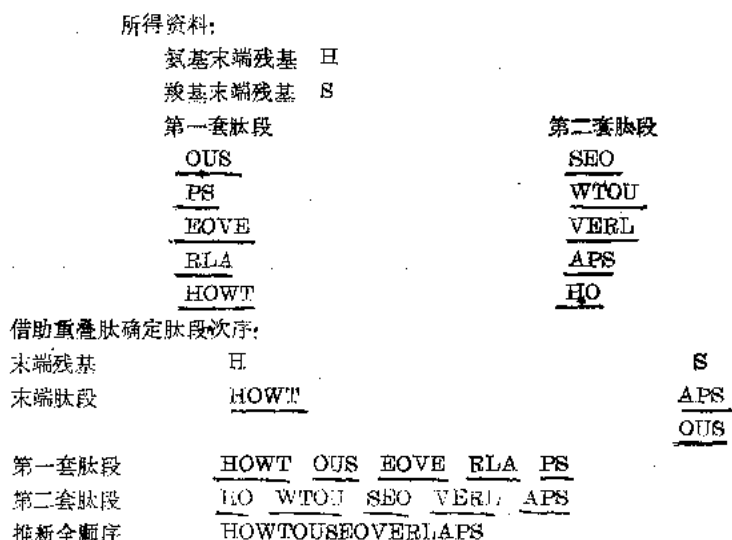


图 3-36 借助重叠肽确定肽段在原多肽链中的次序示意图。图中字母代表氨基酸残基(但这里不是氨基酸的单字母符号),底下用黑线连接表示是一个肽段。

目,因此除了能确定C端肽段和N端肽段的位置之外,中间那些肽段的次序还是不能肯定。为此,需要用两种或两种以上的不同方法断裂多肽样品,使成两套或几套肽段。不同的断裂方法是指断裂的专一性不同,即切口是彼此错位的,因此两套肽段正好相互跨过切口而重叠(overlap),这种跨过切口而重叠的肽段称重叠肽(overlapping peptide)。

借助重叠肽可以确定肽段在原多肽链中的正确位置,拼凑出整个多肽链的氨基酸顺序(图3-36)。同时,两套肽段可以互相核对各个肽段的氨基酸顺序测定中是否有差错。如果两套肽段还不能提供全部必要的重叠肽,则必须使用第三种甚至第四种断裂方法以使得得到足够的重叠肽,用于确定多肽链的全顺序。

十一、二硫键位置的确定

如果蛋白质分子中存在链间或链内二硫键,则在完成多肽链的氨基酸顺序分析以后,需要对二硫键的位置加以确定,这是因为在测定多肽链的氨基酸顺序时,首先需要把蛋白质分子中的全部二硫键拆开。确定二硫键的位置一般采用胃蛋白酶水解原来的含二硫键的蛋白质。选用胃蛋白酶水解是因为它的专一性比较低,切点多,这样生成的肽段包括含有二硫桥的肽段都比较小,对后面的分离、鉴定比较容易;其次是胃蛋白酶的作用pH在酸性范围(~ 2),这有利于防止二硫键发生交换反应而造成的麻烦。所得的肽段混合物可以使用Brown及Hartley的对角线电泳技术进行分离。对角线电泳是:把水解后的混合肽段点到滤纸的中央,在pH 6.5的条件下,进行第一向电泳,肽段将按其大小及电荷的不同分离开来。然后把滤纸暴露在过甲酸蒸气中,使 $-S-S-$ 断裂。这时每个含二硫键的肽段被氧化成一对含半胱氨酸的肽。滤纸旋转 90° 角在与第一向完全相同的条件下进行第二向电泳。在这里,大多数肽段的迁移率未变,并将位于滤纸的一条对角线上(图3-37),而含半胱氨酸的成对肽段比原来含二硫键的肽小而负电荷增加,结果它们都偏离了对角线。肽斑可用茚三酮显色确定。将每对含半胱氨酸的肽段(未用茚三酮显色的)分别取下,进行氨基酸顺序分析,然后与多肽链的氨基酸顺序比较,即可推断出二硫键在肽链间或(和)肽链内的位置。

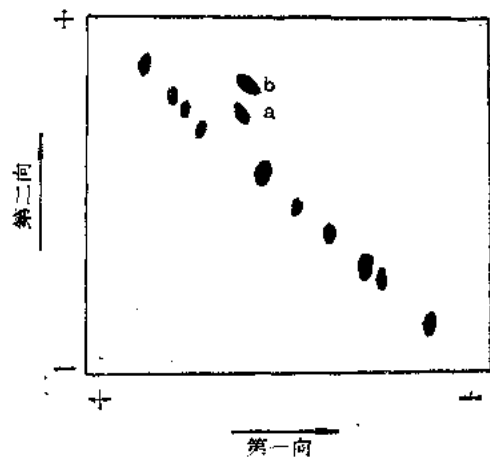


图3-37 对角线电泳图解
图中a、b两个斑点是由一个二硫键断裂产生的肽段

十二、蛋白质的一级结构举例

胰岛素:英国Sanger等人于1953年首先完成了牛胰岛素的全部化学结构的测定工作。

这是蛋白质化学研究史上的一项重大成就。牛胰岛素的分子量为5700道尔顿(dalton),分子含有两条多肽链,一条称A链(含21个残基)另一条称B链(含30个残基);这两条多肽链通过二个链间二硫键连接起来,其中一条多肽链(A链)上还有一个链内二硫键。牛胰岛素分

子的整个化学结构如图 3-38 所示。

核糖核酸酶：五十年代末，美国学者 Stanford Moore 等人完成了牛胰核糖核酸酶的全顺序分析(图 3-39)。它是测出一级结构的第一个酶分子，由一条含 124 个残基的多肽链组成，分子内含有 4 个链内二硫键，分子量为 12 600。这是水解核糖核酸磷酸二酯键的一个酶。

血红蛋白：研究蛋白质化学结构的另一重大成就是血红蛋白(hemoglobin)分子的全部一级结构的测定。血红蛋白分子是一个四聚体，它由四条称珠蛋白(globin)的多肽链(亚基)借非共价键连接聚集而成，其中两条是相同的 α 链(141 个残基)，另两条是相同的 β 链(146 个残基)。 α 链和 β 链在许多位置上含有相同的氨基酸残基(图 3-40)。

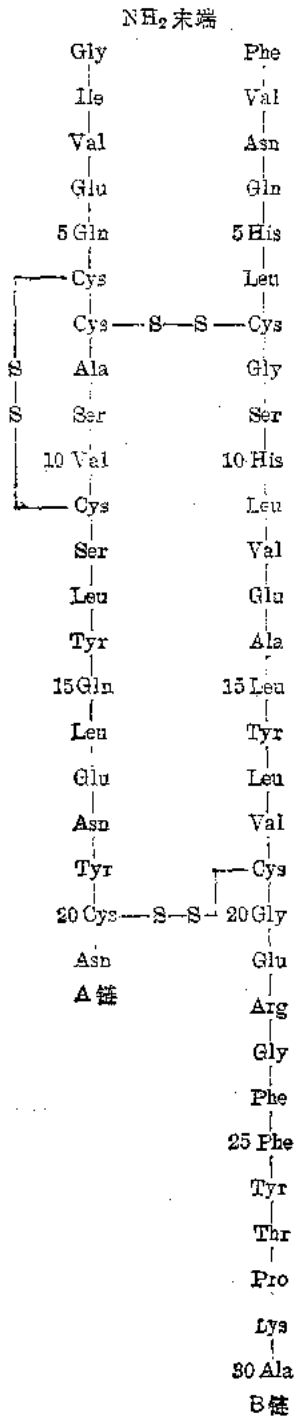


图 3-38 牛胰岛素的化学结构

除上述几种蛋白质之外，肌红蛋白(myoglobin)、细胞色素 c(cytochrome c)、溶菌酶(lysozyme)以及烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, 简称为 TMV)的外壳蛋白等也已测定。现在已经确定了上千种蛋白质的一级结构。其中最大的有 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)(1021 个残基)和大肠杆菌 RNA 聚合酶(*E. coli* RNA polymerase)(1407 个残基)，后者的顺序是根据 cDNA 方法推导而来的。

除上述几种蛋白质之外，肌红蛋白(myoglobin)、细胞色素 c(cytochrome c)、溶菌酶(lysozyme)以及烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, 简称为 TMV)的外壳蛋白等也已测定。现在已经确定了上千种蛋白质的一级结构。其中最大的有 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)(1021 个残基)和大肠杆菌 RNA 聚合酶(*E. coli* RNA polymerase)(1407 个残基)，后者的顺序是根据 cDNA 方法推导而来的。

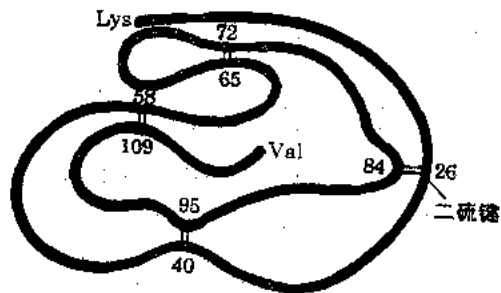
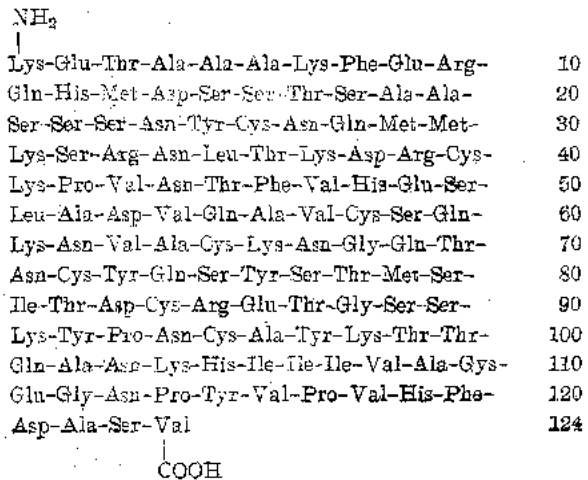


图 3-39 牛胰核糖核酸酶的化学结构

NH ₂ 末端									
α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Val	Val	30 Glu	Gly	Gln	Lys	Ser	Ser	Pro	Gly
	His	Arg	Arg	Val	Val	Asp	Glu	Ala	Lys
Leu	Leu	Met	Leu	Lys	Lys	Leu	Leu	110 Glu	Glu
Ser	Thr	Phe	Leu	Gly	Ala	His	His	Phe	Phe
Pro	Pro	Leu	Val	His	His	Ala	Cys	Thr	Thr
Ala	Glu	Ser	Val	Gly	Gly	His	Asp	Pro	Pro
Asp	Glu	Phe	Tyr	60 Lys	Lys	90 Lys	Lys	120 Ala	Pro
Lys	Lys	Pro	Pro	Lys	Lys	Leu	Leu	Val	Val
Thr	Ser	Thr	Trp	Val	Val	Arg	His	His	Gln
Asn	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Val	Val	Ala	Ala
10 Val	Val	40 Lys	Gln	Asp	Gly	Asp	Asp	Ser	Ala
Lys	Thr	Thr	Arg	Ala	Ala	Pro	Pro	Leu	Tyr
Ala	Ala	Tyr	Phe	Leu	Phe	Val	Glu	Asp	Gln
Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ser	Asn	Asn	Lys	Lys
Trp	Trp	Pro	Glu	Asn	Asp	Phe	Phe	Phe	Val
Gly	Gly	His	Ser	Ala	Gly	Lys	Arg	Leu	Val
Lys	Lys	Phe	Phe	70 Val	Leu	100 Leu	Leu	130 Ala	Ala
Val	Val		Gly	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Gly
Gly	Asn	Asp	Asp	His	His	Ser	Gly	Val	Val
Ala		Leu	Leu	Val	Leu	His	Asn	Ser	Ala
20 His		Ser	Ser	Asp	Asp	Cys	Val	Thr	Asp
Ala	Val	50 His	Thr	75 Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Ala
Gly	Asp	Gly	Pro	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Leu
Glu	Glu	Ser	Asp	Pro	Lys	Val	Cys	Thr	Ala
Tyr	Val	Ala	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Ser	His
Glv	Glv		Val	Ala	Thr	Leu	Leu	Lys	Lys
Ala	Gly		Met	80 Leu	Phe	110 Ala	Ala	140 Tyr	Tyr
Glu	Glu		Gly	Ser	Ala	Ala	His	Arg	His
Ala	Ala		Asn	Ala	Thr	His	His	COOH 末端	
Leu	Leu		Pro	Leu	Leu	Leu	Phe		

图 3-40 人血红蛋白 α -和 β -链的氨基酸顺序

α -链和 β -链中相同的残基用粗体字表示,方框中的残基表示 α -链、 β -链以及别红蛋白三者中都是相同的

十三、蛋白质的一级结构与生物功能

(一) 同源蛋白质的种属差异与生物进化

同源蛋白质 (homologous protein) 是指在不同的有机体中实现同一功能的蛋白质。例如血红蛋白在不同的脊椎动物中行使相同的输氧功能。不同种属来源的同源蛋白质一般具有相同长度或接近相同长度的多肽链。同源蛋白质的氨基酸顺序中有许多位置的氨基酸对所有的种属来说都是相同的, 因此称不变残基 (invariant residue)。但是其它位置的氨基酸对不同种属有相当大的变化, 因此称可变残基 (variable residue)。同源蛋白质的氨基酸顺序中这样的相似性被称为顺序同源 (sequence homology) 现象。这表明从中分离同源蛋白质的这些动物在进化上有着共同的祖先。

顺序同源的生物学意义从细胞色素 c 分子上看得最清楚。细胞色素 c (cytochrome c) 是线粒体膜内的一种含铁蛋白质, 在真核细胞的生物氧化过程中起传递电子的作用。大多数种属的细胞色素 c, 分子量约为 12,500, 含 100 个残基左右。60 个以上种属的细胞色素 c 氨基酸顺序已被测定。肽链中 27 个位置的氨基酸残基对所有已测试的种属都是相同的, 表明这些残基是规定细胞色素 c 的生物活性所必需的。

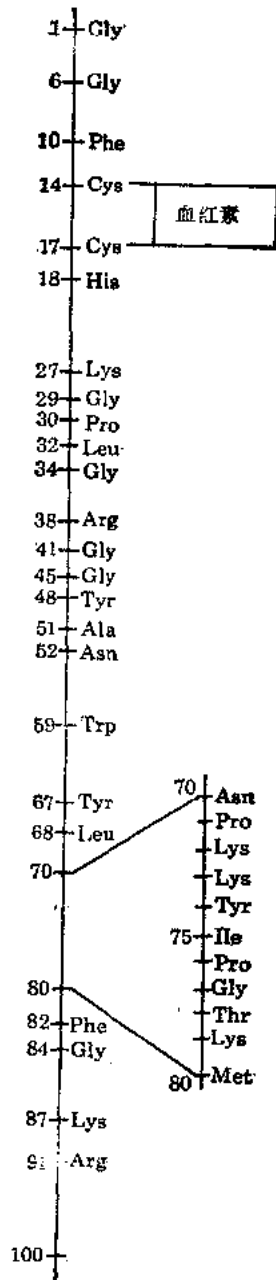


图 3-41 25 种不同生物来源的细胞色素 c 中不变的氨基酸残基 (35 个)。随着被测的细胞色素 c 数目增多, 不变的残基数可能减少。25 种有机体是: 人、黑猩猩、猕猴、兔、袋鼠、马、驴、猪、牛、绵羊、狗、鸭、鸽、火鸡、鸡、企鹅、啮齿、响尾蛇、鲑、沙鱼、蛾 (*Samira cythia*)、蛆 (*Chrysomyia macellaria*)、粗糙链孢霉、酵母和小麦。脊椎动物的细胞色素 c 含 104 个残基, 无脊椎、植物和真菌的细胞色素 c 在 N 末端另含有 4—8 个残基。

例如第 14 和第 17 位置上的 Cys 残基可能保证与辅基血红素连接的必要位置, 第 70 到 80 位

置上的不变肽段可能是细胞色素 c 与酶相结合的部分(图 3-41)。肽链中的可变残基可能是一些“填充”或间隔的区域,氨基酸的变换不影响蛋白质的功能。

在不同种属来源的细胞色素 c 中,可以变换的氨基酸残基数目与这些种属在系统发生上的位置有密切关系,即在进化位置上相距愈远,则氨基酸顺序之间的差别愈大(表 3-11)。人的细胞色素 c 和黑猩猩、猴、狗、金枪鱼、飞蛾、酵母的细胞色素 c 比较,则可变换的氨基酸残基数目依次为 0、1、10、21、31 和 44。细胞色素 c 的氨基酸顺序分析资料已被用来核对各个物种之间的分类学关系,以及绘制进化树 (evolutionary tree) 即系统发生树 (phylogenetic tree) (图 3-42)。根据进化树不仅可以研究从单细胞有机体到多细胞有机体的生物进化过程,而且可以粗略估计现存的各类种属生物的分歧 (divergence) 时间。

表 3-11 各种有机体的细胞色素 c 中氨基酸顺序的差异及分歧时间

	氨基酸顺序中 差异的数目	分歧时间 (单位:百万年)		氨基酸顺序中 差异的数目	分歧时间 (单位:百万年)
人-猴	1	50—60	哺乳类-鸡	10—15	280
人-马	12	70—75	哺乳类-鳕	17—21	400
人-狗	10	70—75	脊椎动物-	43—48	1100
猪-牛-羊	0		酵母		
马-牛	3	60—65			

(二) 一级结构的局部断裂与蛋白质的激活

在动物体内的某些生物化学过程中,蛋白质分子的部分肽链必须先按特定的方式断裂,然后才呈现生物活性。例如,血液凝固时血纤维蛋白原 (fibrinogen) 和凝血酶原 (thrombinogen 或 prothrombin) 的复杂变化,消化液中一系列蛋白水解酶原的激活 (activation) 以及许多多肽或蛋白质激素前体转变为活性的激素形式等都属于这种情况。蛋白质分子的这一特性具有它的重要生物学意义。它是在生物进化过程中发展起来的,是蛋白质分子的结构与功能具有高度统一性的表现。

1. 血液凝固的生物化学机理

血液中包含着对立统一两个系统:凝血系统和溶血系统。这两个系统的相互制约,既保证血液在血管中畅通无阻,又保证一旦血管壁破损能及时堵漏。凝血系统包括 13 个凝血因子。可以设想一下,如果凝血因子都处于活性状态岂不是血液有随时凝固而被阻流的危险;但是如果血液中没有凝血因子存在,那么动物一旦受到创伤将会流血不止。有机体解决这个矛盾的办法就是凝血因子以前体 (precursor) 的形式存在。动物体受到创伤而流血时,这些前体将在其他因子作用下被激活,使血液迅速凝固而将创伤处封闭,这样就能防止继续流血,起着保护机体的作用。

血液凝固是一系列复杂的生物化学过程。这一过程的主要环节有二:一是血浆中的凝血酶原受到血浆和血小板中一些因子的激活而形成凝血酶 (thrombin);二是血浆中的纤维蛋白原在凝血酶的激活下转变为不溶性纤维蛋白 (fibrin) 网状结构,使血液变成凝胶。凝血系统具

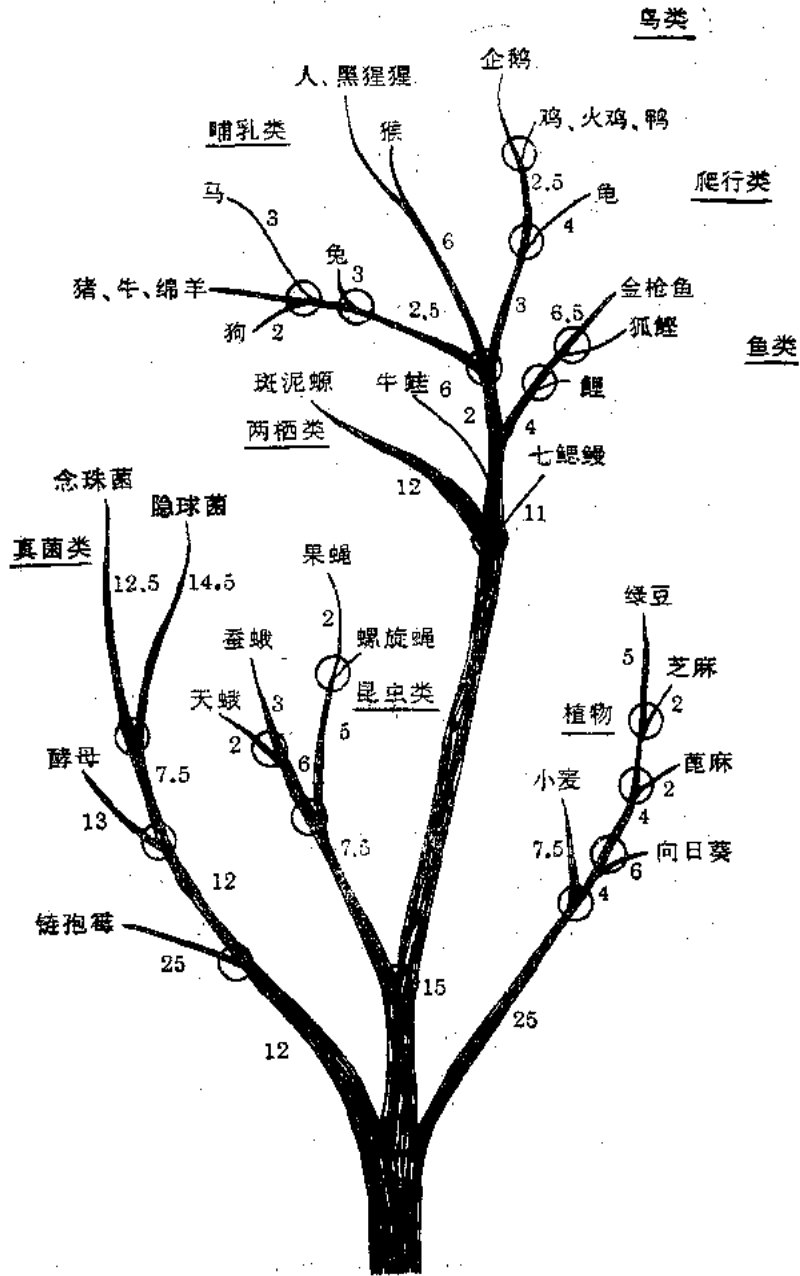


图 3-42 根据细胞色素 c 的顺序和属差异建立起来的进化树

圆圈代表进化中的分歧点, 支干旁的数字是给定有机体谱系的细胞色素 c 与其祖先差异的残基数

有保护机体的作用, 这是其一, 但事物总是一分为二的, 凝血功能失调时, 确有凝血而堵塞血管的危险, 因此血液中还存在另一个系统, 即纤维蛋白溶酶原, 被激活后转变成纤维蛋白溶酶 (fibrinolysin 或 plasmin), 它的作用是使纤维蛋白溶解。这种与凝血相反的过程对于保持血液的流动性有重要意义。上面这三个激活过程都是专一性很高的一级结构的局部水解作用。肽链的局部断裂导致蛋白质生物功能的出现。

凝血酶原是一种糖蛋白, 分子量为 66 000, 含 582 个氨基酸残基。在凝血酶原致活物的催化下, 凝血酶原分子中的二个肽键 (Arg 274-Thr 275 和 Arg 323-Ile 324) 发生断裂, 释放出

分子量为 32 000 的氨基末端片段, 形成有活性的凝血酶。凝血酶, 分子量为 34 000, 由二条肽链通过一个二硫键交联而成, 一条肽链(A 链)含 49 个残基, 另一条肽链含 259 个残基(图 3-43)。凝血酶, 很象胰蛋白酶, 也属于丝氨酸蛋白水解酶类, 但它的作用专一性比胰蛋白酶还强, 凝血酶只断裂某些 Arg-Gly 键, 而胰蛋白酶能断裂所有 Arg 和 Lys 的羧基参与形成的肽键(图 3-35)。

纤维蛋白原分子长 46 nm, 分子量为 340 000, 就其分子形状来说, 也属于纤维状蛋白质。每一分子含 6 条肽链, 根据 N 末端基分析表明, 这 6 条肽链两两相同, 分三种类型, 分别称为 α 链(含 600 个残基左右)、 β 链(461 个残基)和 γ 链(410 个残基)。整个分子由对称的两部分组成, 6 条肽链的 N 末端部分集中在中间, 在这里包括纤维肽(fibrinopeptide)A 和 B, 即能被凝血酶切断的部分; 它们的 C 末端对称地分布在分子的两端。纤维蛋白原分子共含 29 个二硫键, 6 条肽链由这些二硫键交联成一个整体分子(图 3-44)。肽链的氨基酸顺序已经知道, 并表明它们之间有顺序同源现象。在 β 链的 Asp 364 上和 γ 链的 Asp 52 上连有糖基。

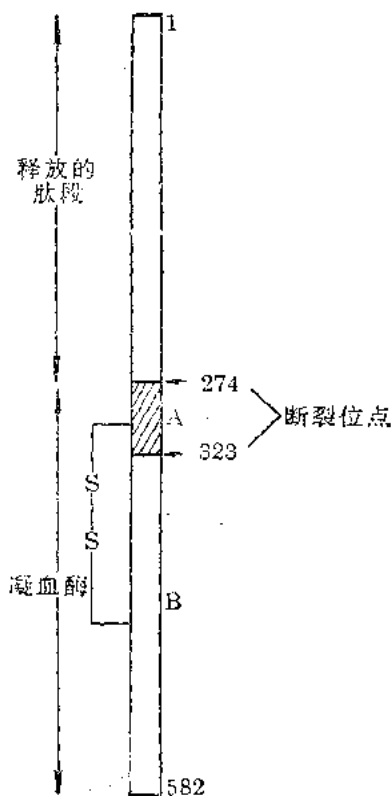


图 3-43 凝血酶原的结构

纤维蛋白原转变为纤维蛋白的过程是在凝血酶的作用下, 从二条 α 链和二条 β 链的 N 末端各断裂一个特定的肽键(—Arg—Gly—), 释放出二个纤维肽 A 和二条纤维肽 B。纤维肽 A 是 19 肽, 纤维肽 B 是 21 肽, 它们都含有较多的酸性氨基酸残基。

纤维肽 A: $\text{Glu—Asp—Gly—Ser—Asp—Asp—Pro—Pro—Ser—Gly—Phe—Leu—Thr—Glu—Gly—Gly—Gly—Val—Arg}$

纤维肽 B: $\text{CH}_3\text{CO—Thr—Glu—Phe—Pro—Asp—Tyr—Asp—Glu—Gly—Glu—Asp—Asp—Arg—Pro—Lys—Val—Gly—Leu—Gly—Ala—Arg}$

纤维肽 B 中的 Tyr 残基是酪氨酸—O—硫酸酯($\text{—CH}_2\text{—C}_6\text{H}_4\text{—O—SO}_3^-$)。A、B 肽切除后, 减少了蛋白质分子的负电荷, 促进了纤维蛋白分子的直线聚合和侧向聚合, 从而形成网状

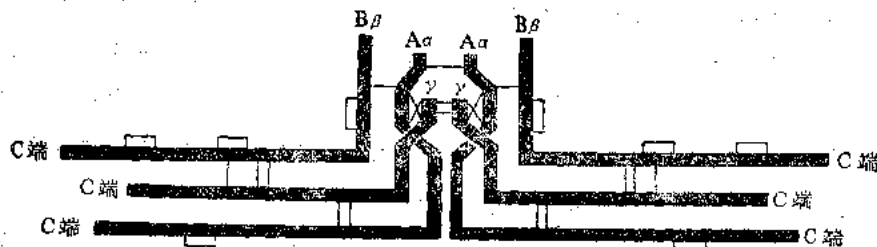
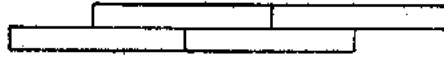
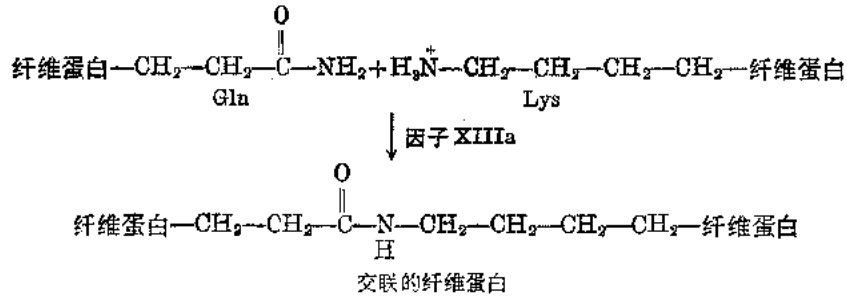


图 3-44 纤维蛋白原一级结构示意图

结构的纤维蛋白。电子显微镜观察表明，纤维蛋白单体的聚合是按1/2错位的方式进行



由纤维蛋白单体借助一些非共价键聚合而成的聚合体是相当脆弱的，如在6mol/L尿素溶液中即被解聚而溶解，但是这种聚合体在凝血因子XIIIa（纤维蛋白稳定因子）的催化下，将转变为不溶性的血凝块。现在已知这种变化是由于肽链之间发生共价交联：



共价交联反应是由转酰胺酶催化的，它是因子XIIIa的主要成分。

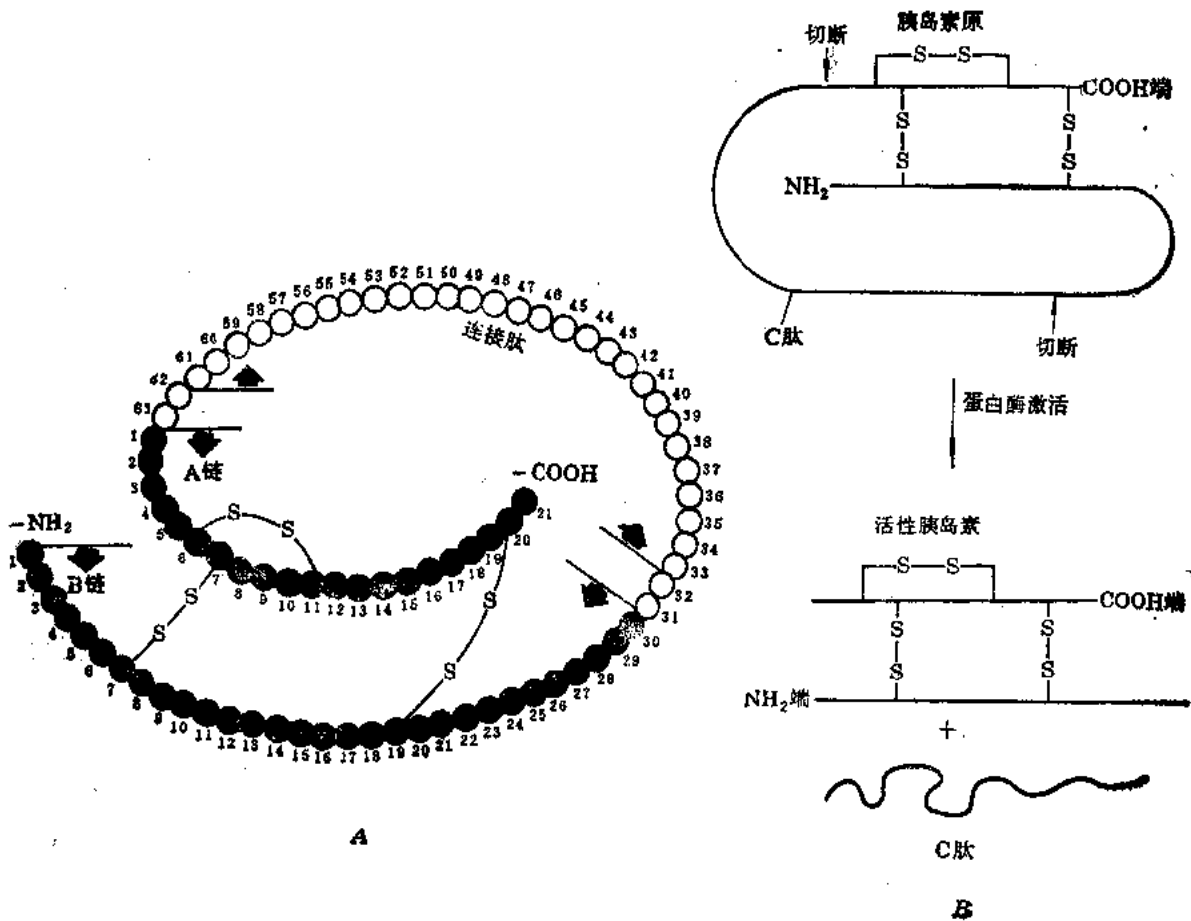


图3-45 胰岛素原的激活

A 胰岛素原的一级结构示意图。每一个圆圈，不论黑白，都代表一个氨基酸。
B 胰岛素原激活过程示意图。

2. 胰岛素原的激活

胰岛素是在胰岛的 β 细胞内质网的核糖体(ribosome)上合成的。最初合成的是一个比胰岛素分子大一倍多的单链多肽,称前胰岛素原(preproinsulin),它是胰岛素原的前体。而胰岛素原是胰岛素的前体。胰岛素原可以看成是由一条连接肽(Connecting peptide),简称C肽的一端通过两个碱性氨基酸残基[如图3-45(A)中第62、63位]与胰岛素A链N末端相连,另一端通过另外两个碱性氨基酸残基[图3-45(A)中第31、32位]与B链C末端相连。不同种属动物的C肽不同,例如人的C肽为31肽,猪的C肽为29肽,牛的C肽为26肽。胰岛素原分子的折叠卷曲,保证了三个位置正确的二硫键形成。在核糖体上合成的最初产物是前胰岛素原,前胰岛素原比胰岛素原在N末端上多一段肽链,称信号肽(signal peptide),含20个残基左右,其中很多是疏水侧链残基。信号肽的主要作用是引导新生的多肽链进入内质网腔。待肽链进入腔后立即被信号肽酶(signal peptidase)切去“前”顺序。形成的胰岛素原被运输到高尔基体(Golgi apparatus)然后贮存在储存颗粒(storage granule)内,并在这里在特异的肽酶作用下转变为活性胰岛素,肽酶催化胰岛素原的二个特定肽键的断裂,释放出一段中间的肽链;这段肽链又在肽酶的作用下从链的二端各除去二个氨基酸残基而生成C肽(图3-45B)。

十四、多肽与蛋白质的人工合成

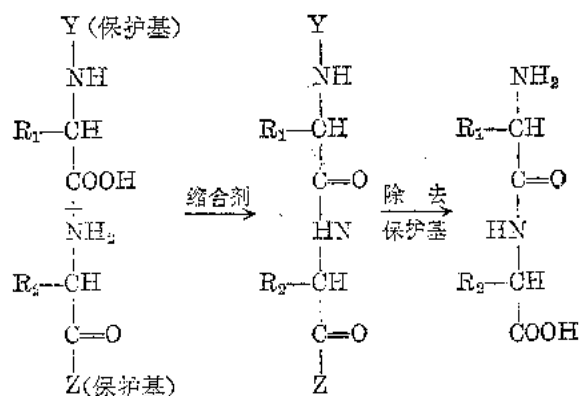
恩格斯指出:“生命的起源必然是通过化学的途径实现的。”“如果化学有一天能够用人工方法制造蛋白质,那么这样的蛋白质就一定会显示出生命现象,即使这种生命现象可能还很微弱。”由于一些多肽和蛋白质的化学结构的陆续阐明,通过人工方法来合成具有生物学活性的多肽和蛋白质的任务就提到了科学工作者的面前。1958年,北京大学生物系在国内首次合成了具有生物活性的八肽——催产素。接着于1965年9月,中国科学院生物化学研究所、有机化学研究所和北京大学化学系协作,在世界上首次人工合成了结晶牛胰岛素,与此同时美国、西德也合成了胰岛素,这标志着人类在研究生命起源的历程中迈进了一大步。

这些年来,多肽与蛋白质的人工合成,以及在此基础上进一步研究它们的结构与功能的关系已经成为蛋白质化学中一个十分活跃的领域,下面简单地介绍多肽和蛋白质的人工合成方法。

(一) 多肽的人工合成

多肽的人工合成有两种类型。一种是由不同氨基酸按照一定顺序的控制合成,另一种是由一种或两种氨基酸聚合或共聚(copolymerization)。

实现控制合成的一个困难是进行接肽反应所需的试剂,能同时和其他不应参加接肽的功能团发生作用,例如N末端氨基酸残基的游离氨基、C末端残基的游离羧基和侧链上的一些活泼基团,特别是SH基等均能同接肽试剂发生作用。因此接肽以前必须首先把这些基团加以封闭或保护,以免和接肽试剂发生作用而生成不需要的肽键或其他键。肽键形成之后,再将保护基除去。因此在多肽链合成过程中,每连接一个氨基酸残基,都要经过几个步骤。自然,要想得到一个足够长的多肽就必须每步都有较高的产率。

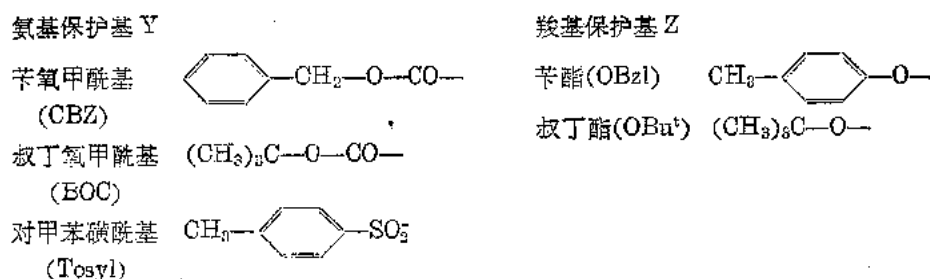


作为保护基,必须符合这样的条件,即在接肽时能起保护作用,而在接肽以后又很容易除去,但又不致引起肽键的断裂。

最广泛应用的氨基保护基 Y 是苄氧甲酰基,它可以催化加氢或用金属钠在液氨中处理除去。其他可以用作氨基保护基的还有三苯甲基(trityl)、叔丁氧甲酰基(tertiary butyloxycarbonyl)、对甲苯磺酰基(tosyl)等,这些基团可用 HBr/CH₃COOH 在室温下除去。

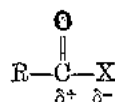
羧基一般以盐或酯的形式加以保护。盐是对羧基的临时性保护,常用的有钾盐、钠盐、三乙胺盐及三丁胺盐等。酯有甲酯(OMe)、乙酯(OEt)、苄酯(OBzl)和叔丁酯(OBu^t)。甲酯和乙酯可用皂化法除去,但易引起消旋。苄酯可用 H₂/Pd 法或金属钠-液氨法除去。叔丁酯可在温和条件下用酸除去。

一些常用保护基的结构式如下:

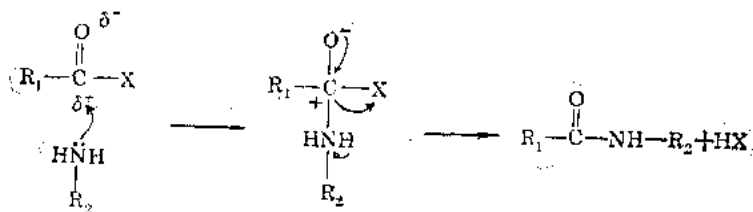


侧链上的活泼功能团也必须给予保护,如 Asp 和 Glu 的 β,γ 羧基, Ser 和 Thr 的侧链羟基, Cys 的 SH 基和 Lys 的 ε-NH₂。后二个基团需要保护到肽链合成为止。因此要求它们的保护基在切除 N 末端 α-NH₂ 的保护基时不致脱落。Cys 的 -SH 常用苄基(Bzl)或对甲氧苄基(MBzl)保护,前者用 Na-液 NH₃ 处理可以除去,后者在液态氟化氢中于 0°C 处理 30 分钟即可切除。Lys 的 ε-NH₂ 常用 Tosyl 保护,它在 Na-液 NH₃ 中可被除去。其他一些常见的氨基酸侧链保护基有: Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Tyr(Bzl)、Arg(N^ε-Tosyl)、Glu(OMe)、Asp(OBzl)等。

在正常条件下,羧基和氨基之间形成肽键是不会自发发生的。因此这两个基团中必须有一个转变为更加活泼的形式;通常总是把羧基活化。在这样的羧基活化中,共同的驱动力就是碳原子亲电特性的加强,由于活化取代基 X 的负诱导效应(negative inductive effect),使得被活化的基团中原来的低电子密度进一步降低;



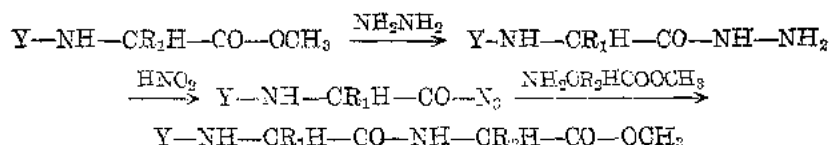
这样形成的亲电中心允许亲核的非离子化氨基对它进行攻击:



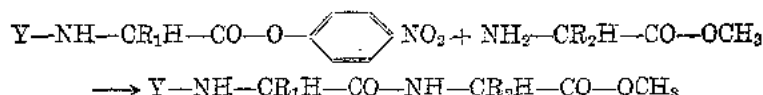
羧基的活化最早采用的方法是酰氯法(acid chloride)即把氨基被保护后的氨基酸用五氯

化磷处理,生成酰氯(—C—Cl)。这个方法因反应条件剧烈,现在已不大采用。比较温和的方法如叠氮法、混合酸酐法和活化酯法,现已广泛地被用于肽的合成。

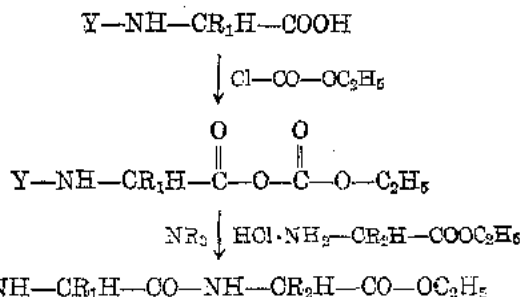
叠氮(azide)法:由小肽段进一步缩合成大肽时,常用叠氮法。此法不引起消旋,因此产物的光学纯度较高。



活化酯(activated ester)法:氨基被保护的氨基酸对硝基苯酯(一种活化酯)能与另一个氨基酸的氨基缩合成肽。此法作用温和,产率较高。

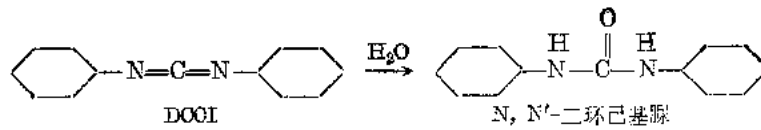


混合酸酐(mixed anhydride)法:氨基被保护的氨基酸,在低温且有叔胺的存在下与氯甲酸乙酯生成混合酸酐能与另一氨基酸酯缩合成肽。缺点是容易产生消旋,但在无水溶剂中消旋可以保持较低水平。

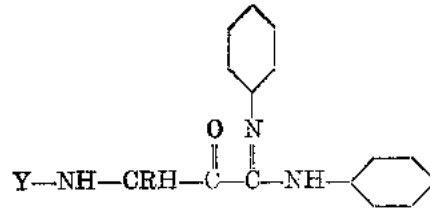


上面介绍的这些羧基活化方法,都是在接肽前预先对反应物进行处理,然后进行缩合反应。除事先活化羧基的方法之外,接肽还可以使用缩合剂。缩合剂可以直接与一个羧基被保护的和一个氨基被保护的氨基酸一起进行反应。最有效的接肽缩合剂是N,N'-二环己基碳二亚胺(N,N'-dicyclohexylcarbodiimide,缩写为DCCl)。在接肽反应中,DCCl从两个

氨基酸残基中夺取一分子 H_2O ，自身转变为不溶的 N, N' -二环己基脲 (N, N' -dicyclohexylurea) 而从反应液中沉淀出来，很容易过滤除去，下面将要叙述的固相合成法中就是应用 DCCI 作缩合剂的。在缩合反应中 DCCI 的变化如下：



用缩合剂 DCCI 接肽实际上也是一种活化羧基的方法。缩合反应的中间物可看成是活化酯：



氨基的活化一般不需要特殊的手段，通常是在接肽时加入有机碱，如三乙胺以保证氨基处在自由状态即可。

随着一些天然多肽的化学结构的阐明以及多肽合成方法的改进，人工合成多肽的工作在近二十年来有了很快的发展。有些合成方法已经在医药工业上得到应用。

(二) 胰岛素的人工合成

1965 年我国科学工作者完成了牛胰岛素的全合成。他们合成牛胰岛素的主要途径是先分别合成 A 链二十一肽和 B 链三十肽，再将 A、B 两条肽链经还原、氧化连接成牛胰岛素 (图 3-38)。

A 链合成采取下列途径，先分别获得 N 端九肽和 C 端十二肽，然后脱去十二肽 N 端的保护基，与九肽以叠氮法缩合成带保护基的 A 链。

B 链的合成采取 8+22 的途径，为了避免大肽连接时发生消旋，特意在 B_8, B_{20}, B_{23} 的甘氨酸残基处分段，合成了以甘氨酸为羧端的肽段： $B_{1-8}, B_{17-20}, B_{21-23}$ 。在不得不用其他氨基酸为 C 末端时，便尽量用叠氮法或者活化酯法接肽以保证光学纯度。

在合成 A、B 链的基础上进行全合成。带保护基的二十一肽和三十肽衍生物分别用 NaOH 液 NH_3 处理后，再用连四硫酸钠 (sodium tetrathionate) 和亚硫酸钠进行 S-磺酸化，经初步提纯后得到二十一肽和三十肽的 SSO_3^- 衍生物。A 链和 B 链按 1.2:1.0 的分子比混合，以摩尔的巯基乙酸还原，然后在空气中氧化。其产物用小白鼠惊厥法测定活力，为天然胰岛素的 1.2—2.5%。此粗制品经酸性仲丁醇提取两次后，纯度达到 50%。产物在含锌离子的缓冲液中结晶。得到的人工合成牛胰岛素在结晶形状、电泳与层析行为、酶解图谱以及生物活性 (降血糖性能与免疫性能) 等方面与天然牛胰岛素完全相同。这充分证明了合成的结晶产物就是胰岛素。

蛋白质的人工合成不仅在哲学上、理论上具有重大意义，而且为医药工业合成比天然产物更为有效的多肽抗生素、激素等药物开辟了广阔的前景。

(三) 固相多肽合成

近年来发展起来的固相多肽合成(solid-phase synthesis of polypeptide)是控制合成技术上的一个重要进展。在固相合成中,肽链的逐步延长是在不溶性聚苯乙烯树脂小圆珠上进行的。合成多肽的羧基端氨基酸先和氯甲基聚苯乙烯树脂反应,形成苯酯。除去该氨基酸的N端保护基后,第二个氨基酸,其氨基用叔丁氧甲酰基(BOC)保护后,以DCCI为缩合剂,接到第一个氨基酸的氨基上。重复上述步骤,可以使肽链按控制顺序从C端向N端延长。多肽链合

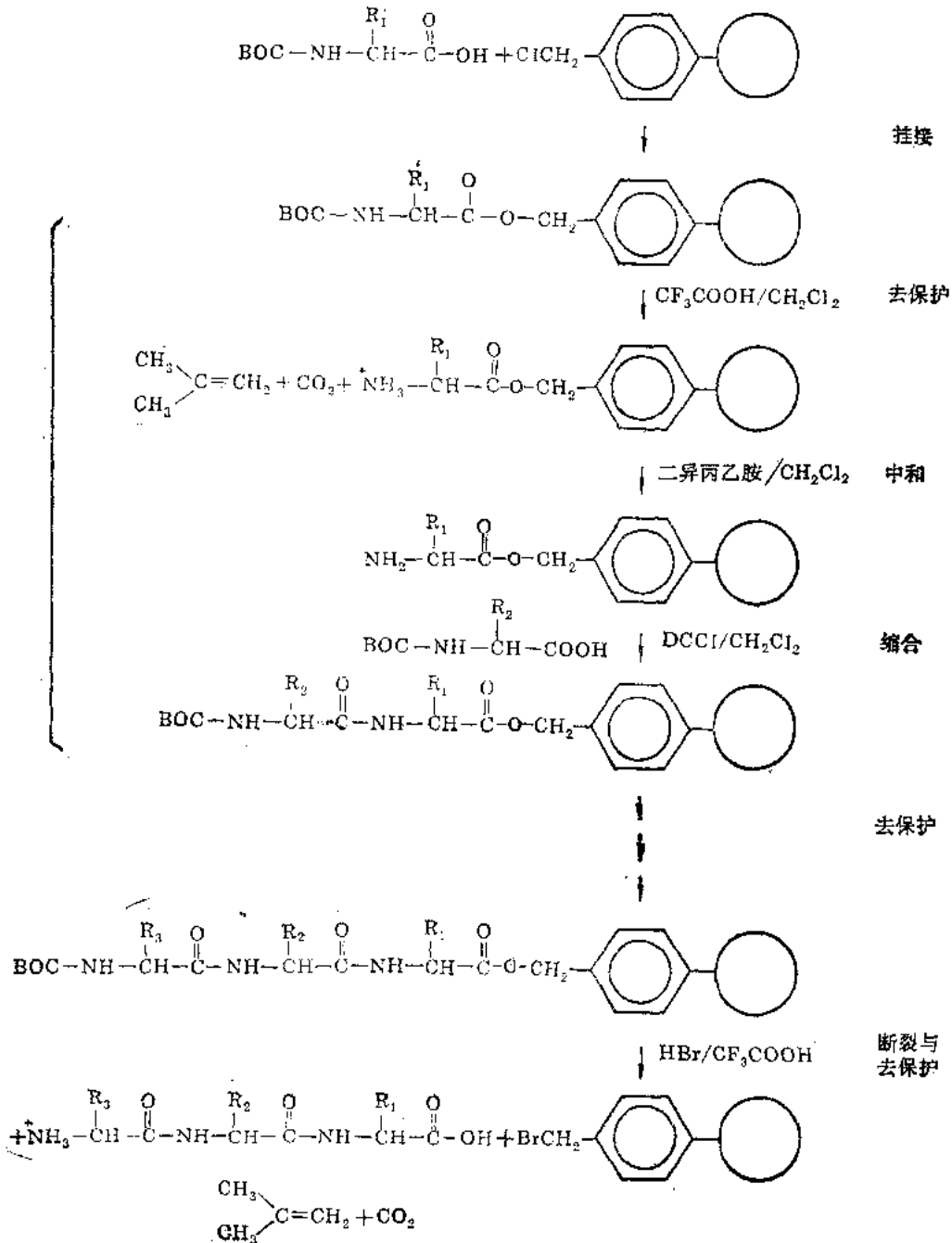


图 3-46 三肽固相合成简图
(右边圆圈代表树脂)

成到最后一步时,把树脂悬浮在无三氟乙酸中,通入干燥的 HBr,使多肽与树脂脱离,同时一些保护基也被切除(图 3-46)。整个合成过程现在已经可以在程序控制的自动化固相多肽合成仪上进行。美国 Merrifield 等人报导,利用这种自动化的多肽合成仪成功地合成了九肽——舒缓激肽(图 3-32),总产率达 85%。合成一条舒缓激肽共花 27 小时,平均合成每个肽键只需要 3 个小时。他们还合成了胰岛素的 A 和 B 两条肽链, A 链(21 个残基)全部用 8 天时间, B 链(30 个残基)用 11 天。1969 年他们成功地应用合成仪完成了含有 124 个氨基酸残基的牛胰核糖核酸酶(图 3-39)的人工合成,这是第一个人工合成的酶。

固相多肽合成在我国医药工业已经得到应用。人工合成的催产素没有混杂的加压素。因此比提取的天然产品还要好。

第四节 蛋白质的二级结构和纤维状蛋白质

蛋白质的二级结构是指它的多肽链中有规则重复的构象。二级结构可涉及少至三个氨基酸残基或多至肽链中的大部分残基。氢键是稳定二级结构的主要作用力。在一个简单蛋白质中,二级结构的一定组合能形成可辨认的花样(pattern)。这些特定的二级结构组合体被称为超二级结构(supersecondary structure)。

本节主要介绍蛋白质二级结构的形成,二级结构的基本类型以及与二级结构紧密相关的纤维状蛋白质。

一、构型与构象

讨论蛋白质构象前,有必要先叙述一下两个容易混淆的概念,即构型(configuration)和构象(conformation)。

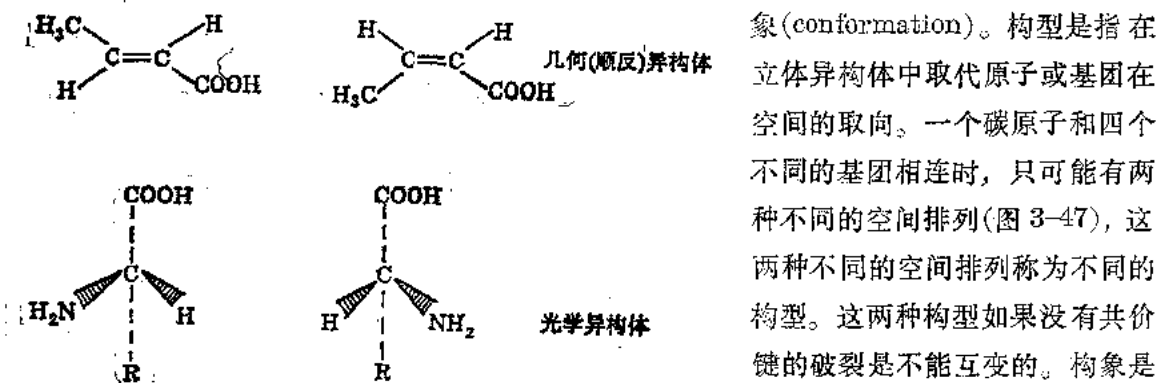


图 3-47 立体异构体的构型
(这种异构体没有共价键的断裂不能互变)

构型是指 在立体异构体中取代原子或基团在空间的取向。一个碳原子和四个不同的基团相连时,只可能有两种不同的空间排列(图 3-47),这两种不同的空间排列称为不同的构型。这两种构型如果没有共价键的断裂是不能互变的。构象是指这些取代基团当单键旋转时可能形成的不同的立体结构。这种

空间位置的改变并不涉及共价键的断裂。例如乙烷,如果两个 CH_3 基的 $\text{C}-\text{C}$ 单键完全可以自由旋转,将产生无数种分子构象。但是事实上,交叉型的构象比其他任何一种都稳定,这种构象是主要的存在形式,而重叠型的构象是最不稳定的(图 3-48)。

多肽链的共价主链形式上都是单键。因此,可以设想一个多肽主链将可能有无限多种构象,并且由于热运动,任何一种特定的多肽构象还将发生不断的变化。然而目前已知,一个蛋

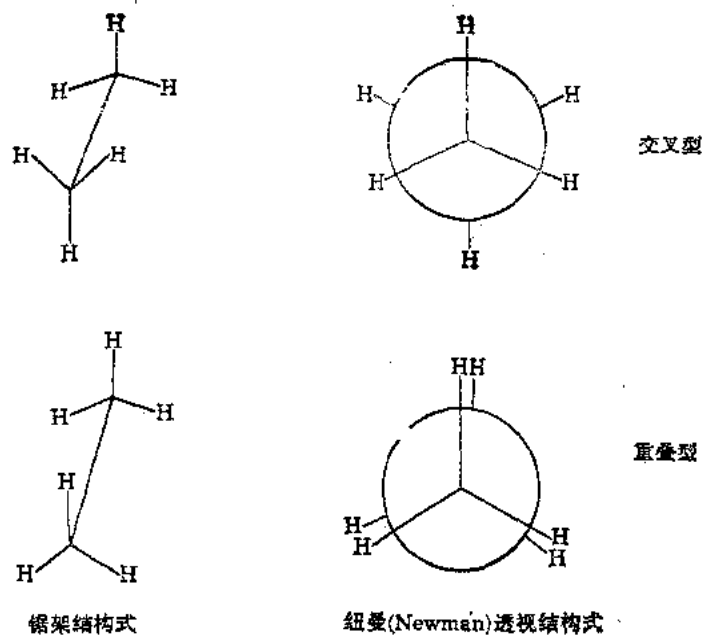


图 3-48 乙烷的构

(不同的构象由于绕单键旋转可以迅速互变)

白质的多肽链在生物体正常的温度和 pH 条件下，只有一种或很少几种构象。这种天然构象保证了它的生物活性，并且相当稳定，甚至蛋白质被分离出来以后，仍然保持着天然状态。这一事实说明了，天然蛋白质主链上的单键并不能自由旋转。

二、研究构象的方法

目前还没有一种工具能够用来直接观察蛋白质分子的原子和基团的排列。至今研究蛋白质的空间结构所取得的成就主要是应用间接的 X-射线衍射法(X-ray diffraction method)取得的。

X-射线衍射技术与光学显微镜或电子显微镜技术的基本原理是相似的。使用光学显微镜时，来自点光源的光线($\lambda = 500 \text{ nm}$, \AA 为 Angström 的缩写, $10 \text{\AA} = 1 \text{ nm}$)投射在被检物体上，光波将由此散射，物体的每一小部分都起着一个新光源的作用。来自物体的散射光波含有物体构造的全部信息，因此可以用透镜收集和重组散射波而产生物体的放大图象。X-射线衍射技术与显微镜技术的主要区别是：第一，光源不是可见光而是波长很短的 X-射线($\lambda = 0.154 \text{ nm}$)；其次，经物体散射后的衍射波，没有一种透镜能把它收集重组成物体的图象，而直接得到的是衍射图案(diffraction pattern)。衍射图案需要用数学方法(如电子计算机)代替透镜进行重组，绘出电子密度图(electron density map)，从中构建出三维分子图象——分子结构模型(图 3-49)。光学显微镜不可能在原子水平上观察到分子结构，因为它的分辨率最大不过 $0.2 \mu\text{m}$ ，约等于可见光($\lambda = 400\text{--}700 \text{ nm}$)最短波长的 $1/2$ 。分子内原子之间的距离在 0.1 nm 的数量级，因此只有 X-射线($\lambda = 0.01\text{--}10 \text{ nm}$)能达到这样高的分辨率($< 0.1 \text{ nm}$)。

X-射线衍射法只能用于测定晶体结构并因此称这门技术为 X-射线结晶学(X-ray crystallography)。它不能直接用来测定单个分子的结构，因为想获得蛋白质的三维图象，就

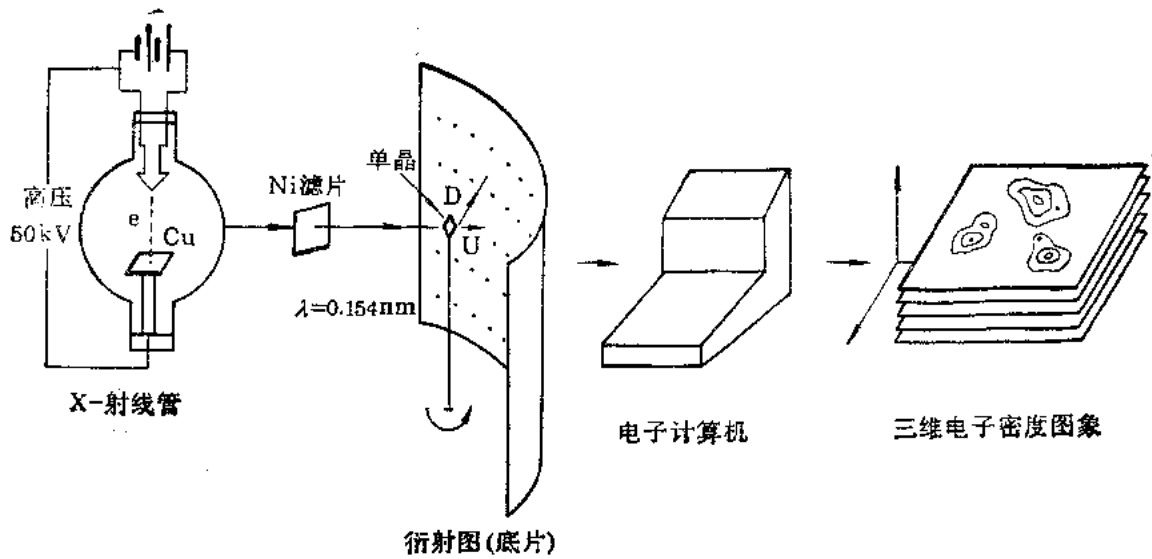


图 3-49 X-射线衍射晶体结构分析示意图

Cu: 阳极靶, 产生 X-射线; e: 高速电子; Ni: 镍滤片, 获得单色 X-射线 ($\lambda=0.154\text{nm}$);
D: 衍射光束; U: 未衍射光束

必须从所有可能的角度对蛋白质进行观测。此外, 当 X-射线与蛋白质相互作用时, 只有一小部分射线被散射, 大部分穿过蛋白质, 相当一部分破坏性地与蛋白质相互作用, 结果在尚无足够的 X-射线被散射以形成有用的图象之前, 蛋白质分子已被破坏。用于衍射分析的球状蛋白质的典型晶体每边约为 0.5mm, 含有大约 10^{12} 个蛋白质分子(沿晶体每边排列 10^4 个分子)。

用 X-射线衍射法测定晶体结构是根据晶体中原子重复出现的周期性结构。当 X-射线穿过晶体的原子平面层时, 只要原子层的距离 d 与入射的 X-射线波长 λ 、入射角 θ 之间的关系能够满足布拉格(Bragg)方程式(图 3-50):

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad (n = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots)$$

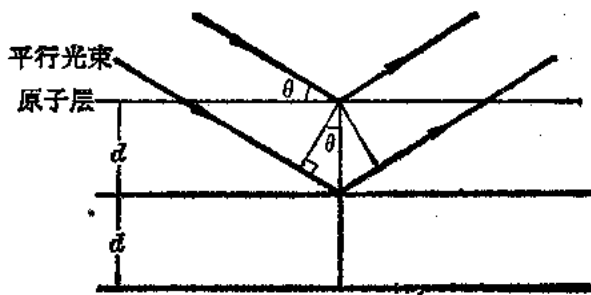


图 3-50 布拉格方程的图解

则反射波可以互相叠加而产生衍射, 形成复杂的衍射图案 (diffraction pattern)。不同物质的晶体形成各自独特的衍射图案。X-射线结构分析主要是根据衍射线的方向与强度, 即衍射图上斑点的位置与黑度。根据衍射线的方向, 可以确定晶胞(晶体的重复单位)的大小和形状, 根据衍射的强度可以确定晶胞中的原子排布。

不同的晶体样品要求用不同的分析方法。微晶的纤维状蛋白质采用纤维法, 单晶的球状蛋白质使用单晶回转法。X-射线结构分析是较专门的研究技术, 这里不予详述。

蛋白质在溶液中的构象与晶体状态多少有些差别, 并且在表现功能过程中, 经常发生构象变化, 因此研究蛋白质在溶液中的构象是一项重要的工作。利用重氢交换法可以测定蛋白质分子中 α -螺旋 (α -helix) 的含量。核磁共振光谱法 (nuclear magnetic resonance spectroscopy) 可以测定蛋白质分子中哪个氨基酸残基发生构象变化。圆二色性 (circular dichroism) 可用

来测定 α -螺旋和 β -折叠片的含量。荧光偏振 (fluorescence polarization) 可测定疏水微区, Trp 或 Tyr 微区。喇曼光谱 (Raman spectroscopy) 用于研究主链构象。此外, X-射线和中子小角散射等技术也是研究溶液中蛋白质构象的重要方法。

三、多肽链折叠的空间限制

在本章第三节的肽和肽键的结构中讲过, 肽键的实际结构是一个共振杂化体。由于氧电子离域 (oxygen electron delocalization) 形成了包括肽键的羰基氧、羰基碳和酰胺氮在内的 $O-C-N$ π 轨道系统, 因此主链肽键 $O-N$ 具有双键性质而不能自由旋转, 结果肽键的所有 4 个原子和与之相连的两个 α 碳原子 (习惯上标为 C_α) 都处于同一个平面内, 此刚性结构的平面称肽平面 (peptide plane) 或酰胺平面 (amide plane) (图 3-51)。肽链主链上的重复结构称肽单位 (peptide unit) 或肽基 (peptide group)。每一个肽单位实际上就是肽平面。肽平面内的 $C=O$ 与 $N-H$ 呈反式排列, 各原子间的键长和键角都是固定的。肽链主链上只有 α 碳原子连接的两个键, 如 $C_\alpha-N_1$ 键和 $C_\alpha-C_2$ 键是单键, 能自由旋转。绕 $C_\alpha-N_1$ 键旋转的角度称 ϕ (角), 绕 $C_\alpha-C_2$ 键旋转的角度称 ψ (角) (图 3-51)。原则上, ϕ 和 ψ 可以取 -180° — $+180^\circ$ 之间的任一值。这样, 多肽链的所有可能构象都能用 ϕ 和 ψ 这两个构象角 (conformational angle) 称二面角 (dihedral angle) 来描述。

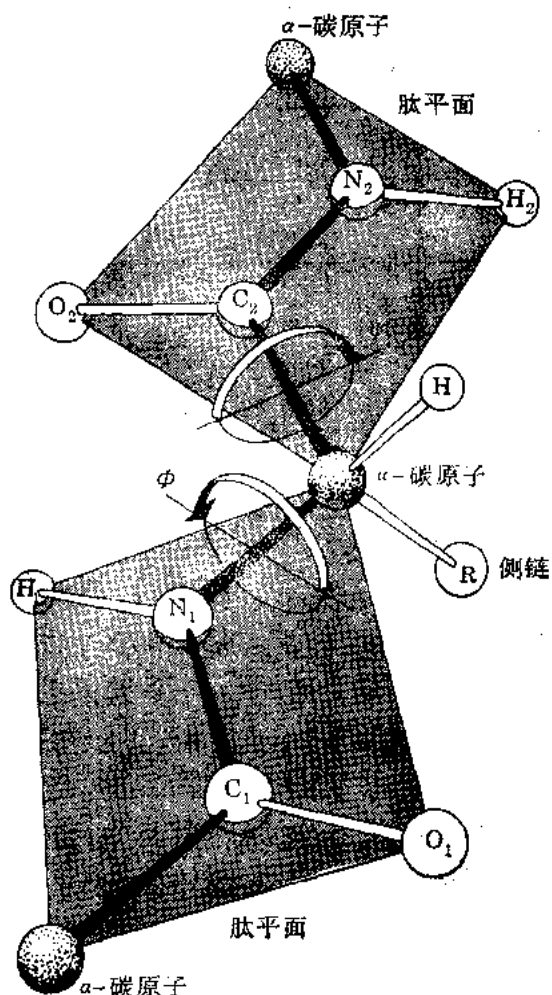


图 3-51 完全伸展的肽链构象 (并示出肽平面)

(角), 绕 $C_\alpha-C_2$ 键旋转的角度称 ψ (角) (图 3-51)。原则上, ϕ 和 ψ 可以取 -180° — $+180^\circ$ 之间的任一值。这样, 多肽链的所有可能构象都能用 ϕ 和 ψ 这两个构象角 (conformational angle) 称二面角 (dihedral angle) 来描述。

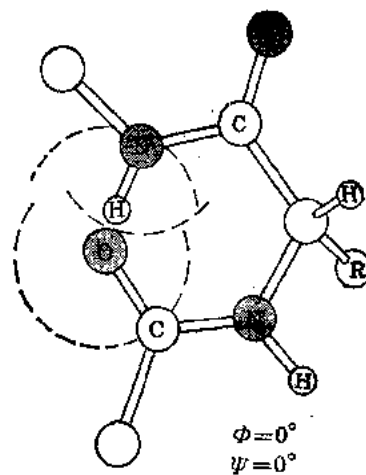


图 3-52 相当于 $\phi=0^\circ$, $\psi=0^\circ$ 时的构象

由于相邻肽平面的 H 原子和 O 原子之间的空间重叠, 此构象实际上不允许存在, ϕ 和 ψ 同时旋转 180° , 则转变为完全伸展的肽链构象 (见图 3-51)

当 Φ 的旋转键 N_1-C_α 两侧的 N_1-C_1 和 $C_\alpha-C_2$ 呈顺式时, 规定 $\Phi=0^\circ$; 同样, Ψ 的旋转键 $C_\alpha-C_2$ 两侧的 $C_\alpha-N_1$ 和 C_2-N_2 呈顺式时, 规定 $\Psi=0^\circ$ (图 3-52)。从 C_α 向 N_1 看, 沿顺时针方向旋转 $C_\alpha-N_1$ 键所形成的 Φ 角度规定为正值, 反时针旋转为负值; 从 C_α 向 C_2 看, 沿顺时针方向旋转 $C_\alpha-C_2$ 键所形成的 Ψ 角度规定为正值, 反时针旋转为负值。

当 C_α 的一对二面角 $\Phi=180^\circ$ 和 $\Psi=180^\circ$ 时, C_α 的两个相邻肽单位将呈现充分伸展的肽链构象 (图 3-51)。然而当 Φ 和 Ψ 同时等于 0° 时的构象 (图 3-52) 实际上并不能存在, 因为两个相邻平面上的酰胺基 H 原子和羰基 O 原子的接触距离比其范德华半径之和, 因此将发生空间重叠 (steric overlap)。虽然 C_α 原子的两个单键 ($C_\alpha-N_1$ 和 $C_\alpha-C_2$) 可以在 -180° — $+180^\circ$ 范围内自由旋转, 但不是任意二面角 (Φ, Ψ) 所决定的肽链构象都是立体化学所允许的, 例如上面讲到的 $\Phi=0^\circ, \Psi=0^\circ$ 时那样的构象就不存在。二面角 (Φ, Ψ) 所决定的构象能否存在, 主要取决于两个相邻肽单位中, 非键合原子 (non-covalently-bonded atom) 之间的接近有无阻碍。

Ramachandran 等人对这一复杂问题作了近似的处理。他们把肽链的原子看成是简单的硬球, 根据它们的范德华半径确定了非键合原子之间的最小接触距离 (允许距离) (表 3-12)。

表 3-12 蛋白质中非键合原子之间的最小接触距离 (Å)

	C	N	O	H
C	3.20* (3.00)	2.90 (2.80)	2.80 (2.70)	2.40 (2.20)
N		2.70 (2.60)	2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
O			2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
H				2.00 (1.90)

* 这是一般可接受的范德华距离, 括号内是 Ramachandran 在小分子结构中发现的最小允许距离。

Ramachandran 根据非键合原子之间的最小接触距离, 确定哪些成对二面角 (Φ, Ψ) 所规定的两个相邻肽单位的构象是允许的, 哪些是不允许的, 并在 Φ (横坐标) 对 Ψ (纵坐标) 所作的 Φ - Ψ 图上标出。此图常称 Ramachandran 构象图 (图 3-53)。图上的一个点对应于一对二面角 (Φ, Ψ), 代表一个 C_α 的两个相邻肽基的构象。如果将一个蛋白质多肽链上的所有 C_α 的成对 Φ 和 Ψ 都画在图上, 那么蛋白质主链的构象将清楚地表示在 Ramachandran 图上。这样, 蛋白质多肽链折叠的特点可以方便地运用 Ramachandran 图来进行研究。结果发现肽链的折叠具有相当大的局限性, 在 Φ - Ψ 平面上只取有限范围值。图 3-53 中用实线封闭的区域是一般允许区。这个区域内的任何二面角 (Φ, Ψ) 所决定的肽链构象, 都是立体化学所允许的。因为在构象中, 非键合原子间的距离不小于一般允许距离 (范德华距离), 二者之间没有斥力, 构象能量最低, 所以此肽链构象最稳定。虚线封闭的区域是最大允许区 (临界限制区), 这个区域内的任何二面角 (Φ, Ψ) 所规定的肽链构象, 虽是立体化学可以允许的, 但不够稳定。因

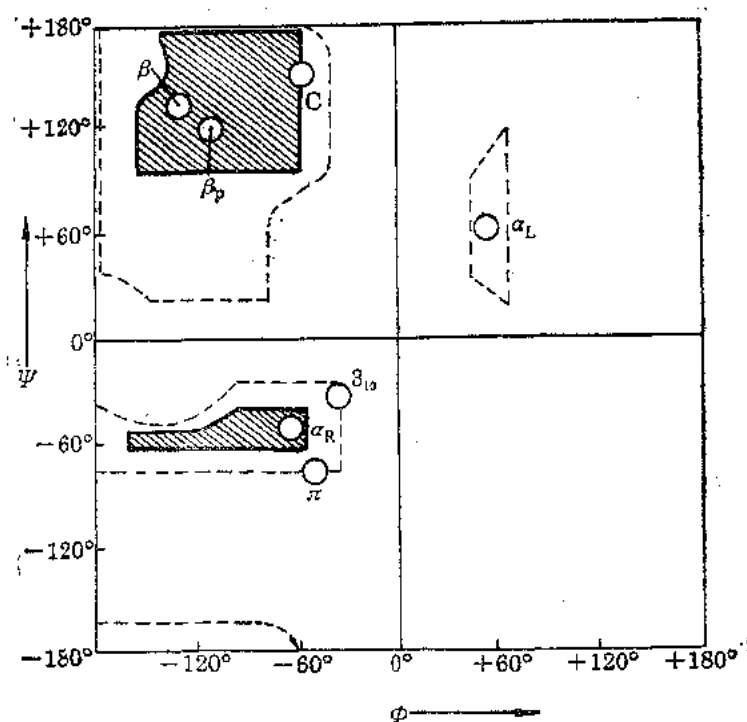


图 3-53 Ramachandran 构象图

C=胶原螺旋; β =反平行式 β -折叠; β_p =平行式 β -折叠; α_R 和 α_L =右手和左手 α -螺旋; 3_{10} = 3_{10} -螺旋; π = π -螺旋。

为在此构象中,非键合原子之间的距离小于一般允许距离,但大于最小允许距离。虚线外的区域是不允许区。该区域内的任何二面角(Φ, Ψ)所规定的肽链构象,都是立体化学所不允许的,因为在此构象中,非键合原子之间的距离小于最小允许距离,斥力很大,构象能量很高,因此肽链构象是极不稳定的。上面所说的一般允许区和最大允许区都是针对非甘氨酸残基来说的,如果是甘氨酸残基,这一范围会扩大很多,因为甘氨酸侧链 R 基只是一个 H 原子。总之,由于多肽链的几何学原因,存在着上述的原子基团之间的不利空间相互作用,所以相对于肽链的可能构象来说,肽链实际所取构象的范围是很有限的,对非甘氨酸残基的一般允许区,只占全平面的 7.7%,对最大允许区来说也只占 20.3%。

由于 X-射线衍射技术成功地应用于蛋白质结构测定,人们已经掌握了不少种类蛋白质的精细结构;因而不仅能从理论上而且可以从实际测得的结构来研究肽链折叠的特点。图 3-54 是实验测得的 8 种蛋白质近 1000 个非甘氨酸残基的主链二面角 Φ 和 Ψ 值在构象图上的分布,与图 3-53 比较可以清楚地看到肽链实际所取的构象与理论推测的允许区基本吻合。例如糜蛋白酶原 245 个氨基酸残基除 28 个外,全部的成对 Φ 和 Ψ 值都落在允许区之内。

四、二级结构的基本类型

一般认为,驱使蛋白质折叠的主要动力来自为使暴露溶剂中的疏水基团降低至最少程度的需要。但是同时需要保持处于伸展状态的多肽链和周围水分子之间形成的氢键相互作用的可利能量状态。为满足第一个需要,多肽链将发生折叠使多数疏水基团躲开与溶剂水接触。为

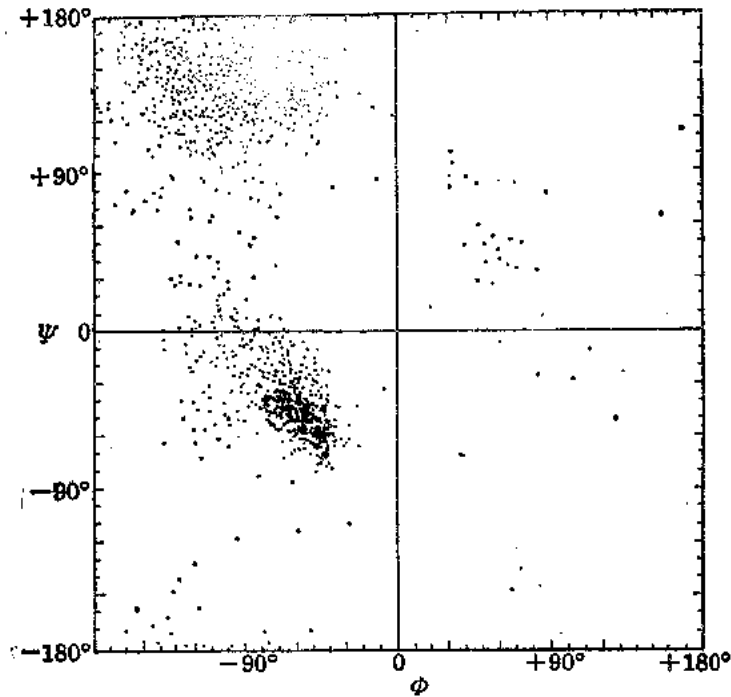


图 3-54 实验测得的 8 种蛋白质近 1000 个非甘氨酸残基的主链二面角 ϕ 、 ψ 值在构象图上的分布

维持系统的能量平衡，要求在折叠状态的多肽主链的基团之间形成氢键相互作用。这一要求对蛋白质的折叠产生一个由氢键维系的有规则的重复构象。因为主链肽键上的羰基 ($\text{C}=\text{O}$) 和酰氨基 ($-\text{NH}$) 是沿多肽主链有规则排列的，因此在最适状态时将在多肽链内或多肽链之间出现周期性排列的氢键相互作用，从而形成蛋白质的二级结构。从构象图的角度来研究，当多肽链中的一段连续的 C_α 成对二面角 (ϕ 和 ψ) 分别取相同的数值，那么这一段肽链的构象就成二级结构。

下面介绍二级结构的三种基本类型， α -螺旋， β -折叠和 β -转角。它们广泛地存在于球状蛋白质内。但是各种类型的二级结构并不是均匀地分布在蛋白质中。某些蛋白质，如血红蛋白和肌红蛋白含有大量的 α -螺旋，而另一些蛋白质如铁氧还蛋白 (ferredoxin) 则不含任何的 α -螺旋。不同蛋白质中 β -折叠的含量和 β -转角的数目也有很大的变化。某些纤维状蛋白质，例如 α -角蛋白完全由 α -螺旋构成 (图 3-63)，而丝心蛋白 (fibroin) 是具有 β -折叠片的典型代表。

(一) α -螺旋

α -螺旋 (α -helix) 是蛋白质中最常见，含量最丰富的二级结构。 α -螺旋中每个残基 (C_α) 的成对二面角 ϕ 和 ψ 各自取同一数值， $\phi = -57^\circ$ 、 $\psi = -48^\circ$ ，即形成具有周期性规则的构象。多肽主链可以按右手方向或左手方向盘绕形成右手螺旋或左手螺旋。每圈螺旋占 3.6 个氨基酸残基，沿螺旋轴方向上升 0.54 nm，每个残基绕轴旋转 100° ，沿轴上升 0.15 nm (图 3-55)。 α -螺旋中氨基酸残基的侧链伸向外侧。相邻螺圈之间形成链内氢键，氢键的取向几乎与中心轴平行。氢键是由肽键上的 N-H 氢和它后面 (N 端) 第四个残基上的 $\text{C}=\text{O}$ 氧之间形成的。

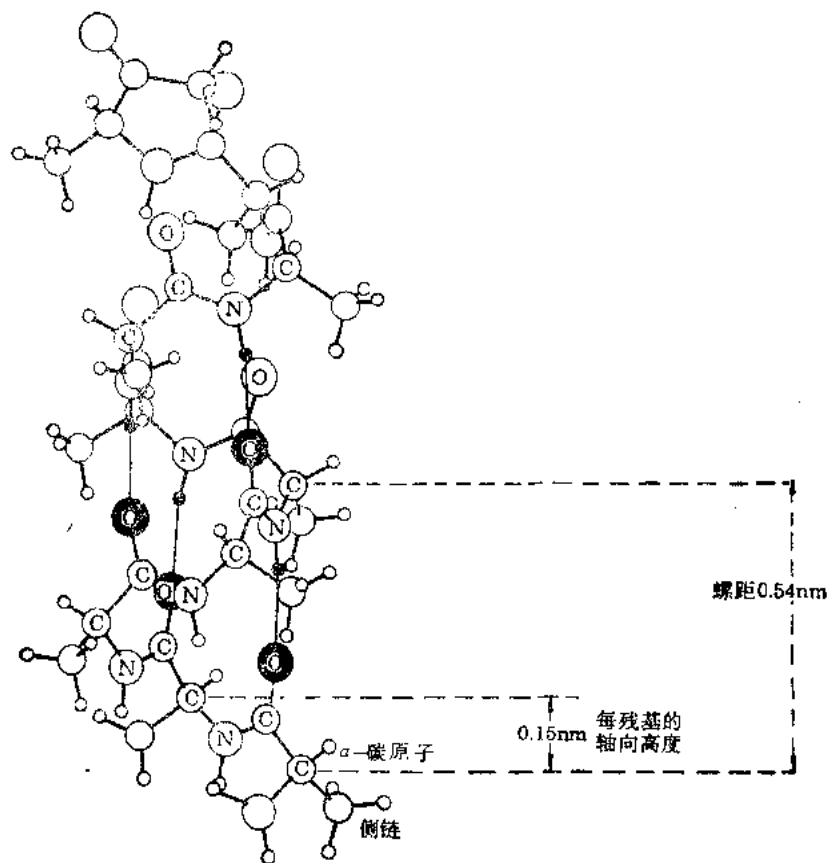
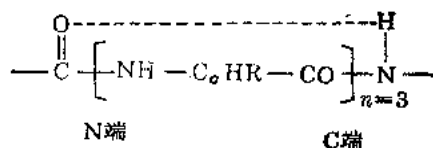


图 3-55 α -螺旋的尺寸



这里, $n=3$ 表示氢键封闭的环共包含 $13(3 \times 3 + 4)$ 个原子。常用 3.6_{13} -螺旋 ($n=3$) 代表 α -螺旋, 其中 3.6 指每圈螺旋含 3.6 个残基(非整数螺旋), 3.6 的右下角 13 表示氢键封闭的环内含 13 个原子。 3_{10} -螺旋 ($n=2$) 表示该螺旋每圈含 3 个残基(整数螺旋), 氢键所封闭的环含 $10(3 \times 2 + 4)$ 个原子。这个螺旋是当成对二面角取 $\phi = -49^\circ$, $\psi = -26^\circ$ 时的构象, 它只存在于蛋白质的类型 III β -转角 (β -turn) 中。

蛋白质中的 α -螺旋几乎都是右手的, 右手的比左手的稳定。这里讲的不论是左手的还是右手的螺旋都是由 L-型氨基酸残基构成的, 因此右手 α -螺旋和左手 α -螺旋不是对映体(图 3-56)。在左手 α -螺旋中 L-型氨基酸残基侧链的第一个碳原子 (C_β) 过分接近主链上的 C=O 氧原子, 以致结构不舒适, 能量较高, 构象不稳定。而右手 α -螺旋, 空间位阻较小, 比较符合立体化学的要求, 因而在肽链折叠中容易形成, 构象稳定。左手 α -螺旋虽然很稀少, 但也偶有出现。例如, 在嗜热菌蛋白酶中就有很短一段左手 α -螺旋, 由 Asp-Asn-Gly-Gly (226—229) 组成。

引起偏振光的振动面旋转的原因是分子的不对称因素, 由于 α -螺旋是一种不对称的分子

结构(左手型和右手型),因此必然具有旋光能力。事实上, α -螺旋的比旋不等于构成其本身的氨基酸比旋的加和,但无规卷曲的肽链比旋则与这种简单的加和相等。 α -螺旋的旋光性是其中的 α -碳原子的不对称因素和这种构象本身的不对称因素的总反映。天然 α -螺旋的不对称因素引起偏振面向右旋转。利用 α -螺旋的这种旋光性,可以测定蛋白质或多肽中 α -螺旋的相对量,也可以用于研究影响 α -螺旋与无规卷曲(random coil)这两种构象之间互变的因素。测定蛋白质的比旋特别是它的旋光色散(optical-rotatory dispersion)是研究蛋白质二级结构的重要方法之一。

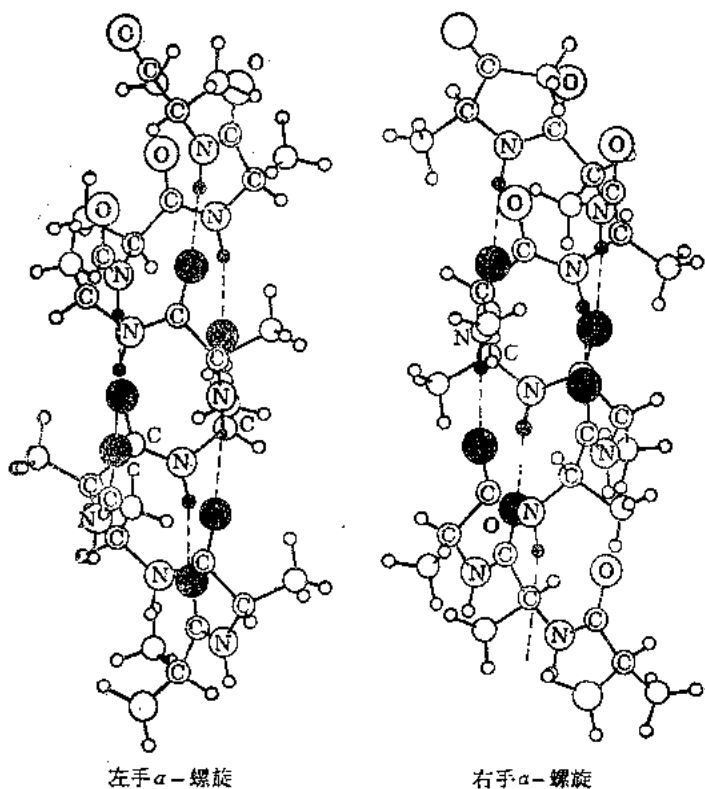


图 3-56 左手螺旋和右手螺旋

由于它的构象具有规则而引起的一个重要性质,就是折叠中的协同性(cooperativity)。例如,一旦形成了一圈 α -螺旋,随后逐个残基的加入就会变得更加容易而迅速,这是因为第一圈螺旋成为一个为安装相继的螺旋残基所需的模板。由于空间限制,对每个加入的残基来说,构象角 ϕ 大体上都是正确的,因此残基的加入主要涉及 ψ 的挑选,以便把残基安置成正确的构象,并借助氢键与已形成的螺旋构象上的基团相联接。

一条多肽链能否形成 α -螺旋,以及形成的螺旋是否稳定,与它的氨基酸组成和排列顺序有极大的关系。关于这方面的知识很大一部分来自对多聚氨基酸的研究。发现R基小,并且不带电荷的多聚丙氨酸,在pH7的水溶液中能自发地卷曲成 α -螺旋。但是多聚赖氨酸在同样的pH条件下却不能形成 α -螺旋,而是以无规卷曲形式存在。这是因为多聚赖氨酸在pH7时R基具有正电荷,彼此间由于静电排斥,不能形成链内氢键。事实正是如此,在pH12时,多聚赖氨酸即自发地形成 α -螺旋。同样,多聚谷氨酸也与此类似(图3-57)。

除R基的电荷性质之外,R基的大小对多肽链能否形成螺旋也有影响。多聚异亮氨酸由于在它的 α -碳原子附近有较大的R基,造成空间阻碍,因而不能形成 α -螺旋。多聚脯氨酸的 α -碳原子参与R基吡咯的形成,环内的 $C_{\alpha}-N$ 键和 $C-N$ 肽键都不能旋转,而且多聚脯氨酸的肽键不具亚氨基,不能形成链内氢键。因此,多肽链中只要存在脯氨酸(或羟脯氨酸), α -螺旋即被中断,并产生一个“结节”(kink)。

(二) β -折叠

β -折叠或 β -折叠片(β -pleated sheet)也称 β -结构(β -structure)或 β -构象(β -con-

formation),它是蛋白质中第二种最常见的二级结构(图 3-58)。两条或多条几乎完全伸展的多肽链侧向聚集在一起,相邻肽链主链上的—NH和C=O之间形成有规则的氢键,这样的多肽构象就是 β -折叠片。在 β -折叠片中,所有的肽键都参与链间氢键的交联,氢键与肽链的长轴接近垂直,在肽链的长轴方向上具有重复单位,因此也是一种二级结构。除作为某些纤维状蛋白质的基本构象之外, β -折叠也普遍存在于球状蛋白质中。 β -折叠可分两种类型,一种是平行式(parallel),肽链的排列极性(N \rightarrow C)是一顺的,即所有肽链的N末端都在同一方向;另一种是反平行式(antiparallel),肽链的极性一顺一倒,N末端间隔同向(图 3-59)。

在 β -折叠中,多肽主链取锯齿状折叠构象。侧链的C α -C β 键几乎垂直于折叠片平面,侧链R基交替地分布在片层平面的两侧。反平行式 β -折叠在纤维轴上的重复周期为7.0Å,而平行式 β -折叠是6.5Å,因此平行式的折叠程度略大于反平行式的。平行式构象中 $\Phi = -119^\circ$, $\Psi = +113^\circ$,反平行式中 $\Phi = -139^\circ$, $\Psi = +135^\circ$ 。在纤维状蛋白质中 β -折叠主要是反平行式,而在球状蛋白质中反平行

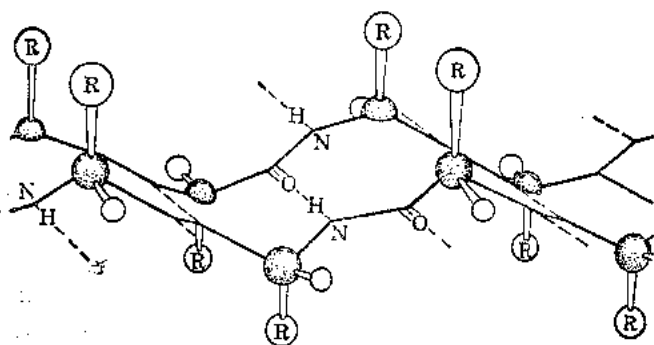


图 3-58 β -折叠构象(反平行式)

和并行两种方式几乎同样广泛地存在。此外,在纤维状蛋白质的 β -折叠中,氢键主要是在肽链之间形成;而在球状蛋白质中, β -折叠既可以在不同肽链或不同分子之间形成,也可以在同一肽链的不同部分之间形成。

(三) β -转角

β -转角(β -turn)也称回折

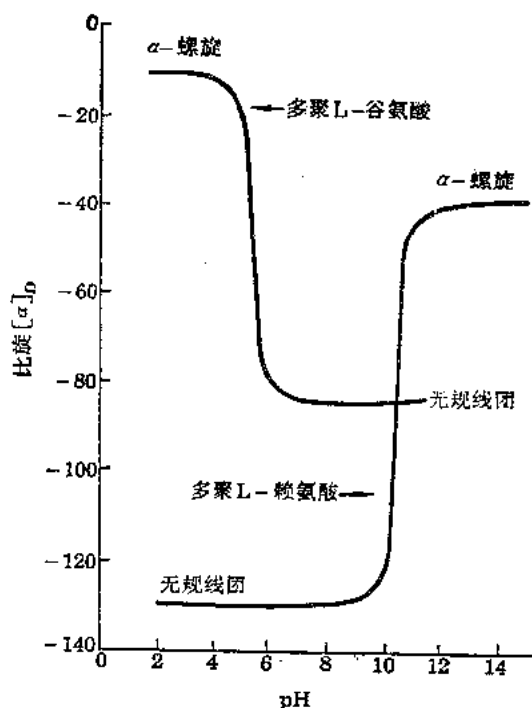


图 3-57 pH 对多聚 L-谷氨酸和多聚 L-赖氨酸的构象互变的影响; α -螺旋-无规卷曲。

reverse turn)、 β -弯曲(β -bend)或发夹结构(hairpin structure),它是球状蛋白质中发现的又一种二级结构。 β -转角有三种类型,每种类型都有 4 个氨基酸残基(图 3-60)。在所有这三种类型的 β -转角中,弯曲处的第一个残基的 C=O 和第四个残基的 NH 之间形成一个 4 \rightarrow 1 氢键,产生一种不很稳定的环形结构。类型 I 和类型 II 的关系在于中心肽单位旋转了 180 $^\circ$ 。类型 II 中 C β 几乎无例外地是甘氨酸残基,否则由于空间位阻,不能形成氢键。类型 III 是在第一个和第三个残基之间形成的一小段 β_{10} -螺旋。类型 I 和类型 III 几乎没有区别,因为它们的 C β 的构象是相同的,并且 C α 的构象也相差很小。目前发现的 β -转角多数都处在球状蛋白

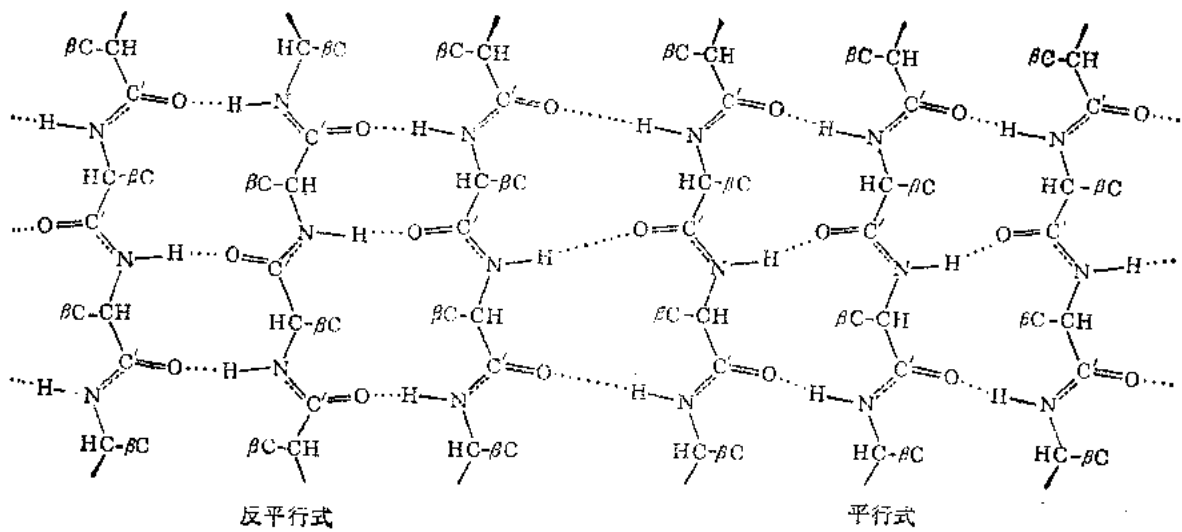


图 3-59 β -折叠的平行式和反平行式

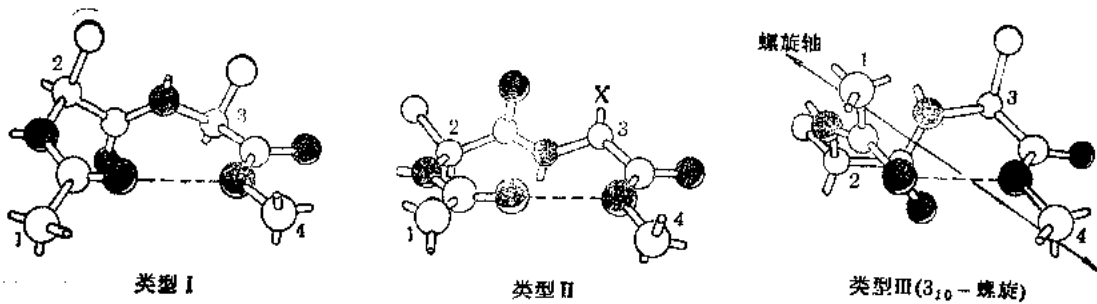


图 3-60 β -转角的三种类型

质分子的表面，在这里改变多肽链的方向阻力比较小。经考查， β -转角在球状蛋白质中含量是十分丰富的，约占全部残基的四分之一。 β -转角的构象是由第二残基(C_2^o)和第三残基(C_3^o)的二面角($\phi_2, \psi_2; \phi_3, \psi_3$)所规定的；类型 I, II, III 的特征二面角分别为：

类 型	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3
I	-60°	-30°	-90°	0°
II	-60°	$+120^\circ$	$+80^\circ$	0°
III	-60°	-30°	-60°	-30°

五、二级结构的预测

氨基酸残基并不是均匀地分布在所有类型的二级结构中。谷氨酸残基主要出现在 α -螺旋；天冬酰胺和甘氨酸主要分布在 β -转角；脯氨酸有时在 α -螺旋的C末端发现，但在螺旋内部决不存在，然而它在 β -转角中是常见的。表 3-13 列出了从 15 种蛋白质中统计得到的氨基酸在二级结构中的分布。发现样品中 33.2% 的氨基酸残基处在 β -转角，17.1% 分布在 β -折叠，34.3% 出现在 α -螺旋。因此多肽主链的这三种构象占假想的“平均”蛋白质中的 85% 残基。

表 3-13 说明各种氨基酸在不同的二级结构中出现的频率不一样，也就是说它们形成各种

表 3-13 氨基酸在 15 种蛋白质的二级结构
(β -转角、 α -螺旋和 β -折叠)中的分布(摩尔%)

氨基酸	β -转角	α -螺旋的 N 端	α -螺旋的内部	α -螺旋的 C 端	β -折叠
Asp	41.3	13.9	13.9	5.6	15.3
Glu	21.4	20.3	24.1	12.7	6.3
Lys	36.6	4.2	16.0	15.1	20.2
Arg	36.3	1.6	11.1	14.3	12.7
His	31.5	10.2	22.4	18.4	6.1
Asn	47.2	8.9	7.9	7.9	12.9
Gln	30.6	9.5	21.6	17.6	14.9
Cys	42.8	8.5	8.5	14.9	17.0
Thr	34.8	11.6	14.3	6.2	19.7
Ser	41.0	10.5	9.9	7.9	11.2
Tyr	44.5	7.2	6.0	3.6	24.1
Trp	40.7	17.1	25.7	2.9	14.3
Gly	45.8	6.4	7.1	6.4	9.6
Ala	20.0	8.5	28.1	9.1	17.1
Val	15.8	5.3	21.4	6.1	27.5
Leu	23.1	6.6	28.7	9.0	26.2
Ile	22.3	8.3	22.2	3.3	30.0
Phe	35.0	5.9	23.6	9.8	21.6
Pro	48.3	15.4	—	1.5	6.1
Met	22.2	4.0	23.0	16.0	24.0
平均值	33.2	8.8	16.7	8.8	17.1

二级结构的倾向性是不同的。

蛋白质的二级结构是它的氨基酸顺序和三维构象之间的桥梁。能从蛋白质的一级结构预测它的三维构象这是一件好事，虽然这一目标至今尚未达到。但是从一级结构预测二级结构的起始阶段已取得长足进展。

最成功的二级结构预测是利用概率统计学方法获得的。Chou 和 Fasman 所采用的经验参数法就是其中最突出的例子。他们首先对几十种已知氨基酸顺序和二级结构的蛋白质进行统计处理，计算出各种氨基酸在二级结构(α -螺旋、 β -折叠和 β -转角)中的实际分布(如表 3-13)，并从中获得 20 种基本氨基酸在 α -螺旋、 β -折叠和 β -转角结构中出现的构象参数 P_{α} 、 P_{β} 和 P_t 。然后再将这些 P_{α} 、 P_{β} 和 P_t 值按大小顺序排列编组，细分为 6 组。例如把 P_{α} 分为 H_{α} (形成 α -螺旋能力最强)、 h_{α} (形成 α -螺旋能力中等)、 L_{α} (形成 α -螺旋能力弱)、 l_{α} (α -螺旋的中立者)、 b_{α} (破坏 α -螺旋能力中等)和 B_{α} (破坏 α -螺旋能力最强)等。当五肽或六肽中形成 α -螺旋或 β -折叠结构的中等以上的氨基酸残基超过 3 个或 4 个，则被定位并形成结构核。结构核可向两边延伸，形成相应的结构片段，直至遇到破坏者为止。此方法简便，成功率高达 70% 左右。

构象预测除概率统计方法之外，还有物理化学方法，它是以立体化学原则为基础的。例如，考虑到侧链基团的大小，电荷与疏水性等，推测可以形成 α -螺旋或 β -折叠的有利残基类型。这种方法不仅考虑短程相互作用(short-range interaction)而且在一定程度上也考虑到

长程相互作用 (long-range interaction)。长程相互作用和短程相互作用的结果将决定一个给定顺序折叠成什么样的三维构象。所谓短程相互作用也就是弱相互作用 (weak interaction), 包括范德华引力、氢键和疏水相互作用等, 发生这类相互作用的原子与原子间或分子与分子间的吸引力或排斥力将随距离的增加而迅速减弱。长程相互作用即强相互作用 (strong interaction), 指共价键和离子键等; 形成共价键或离子键的原子间或分子间的吸引力和离子间相互作用的排斥力不因距离加大而迅速下降。区别这两类相互作用的标准是根据对热运动的稳定程度。在体温 (310K) 下, 平均热能的数量级约为 0.6 千卡/摩尔。强相互作用比此数值大很多倍, 因此它不可能被热运动所破坏, 生物大分子的一级结构就是由这类强相互作用决定的。弱相互作用决定高级结构, 它与平均热能同数量级, 当生物大分子受热时, 这些弱相互作用首先被破坏, 并以四级、三级、二级结构的次序丧失分子的高级结构。

六、超二级结构

在蛋白质中, 特别是球状蛋白质中, 经常可以看到由若干相邻的二级结构单元 (secondary structure element) (即 α -螺旋, β -折叠片和 β -转角等) 组合在一起, 彼此相互作用, 形成有规则、在空间上能辨认的二级结构组合体 (combination) 充当三级结构的构件 (block-building) 称为超二级结构 (super-secondary structure)。超二级结构在结构的组织层次上高于二级结构, 但没有构成完整的结构域 (structural domain)。结构域的组织层次介于超二级结构和三级结构之间。关于结构域见下一节。

已知的超二级结构有三种基本组合形式: ($\alpha\alpha$), ($\beta\alpha\beta$) 和 ($\beta\beta\beta$)。

$\alpha\alpha$ 这是一种由两股或三股右手 α -螺旋彼此缠绕而成的左手超螺旋 (superhelix), 重复距离约为 140 Å。它是 α -角蛋白, 肌球蛋白, 原肌球蛋白 (protomyosin) 和纤维蛋白原 (fibrinogen) 中的一种超二级结构 (图 3-61A)。由于超卷曲, 螺旋主链的 ϕ 和 ψ 角与正常的 α -螺旋略有偏差, 每圈螺旋为 3.5 个残基, 而不是通常的 3.6 个残基。 α -螺旋沿轴有相当的倾斜, 重复距离从 5.4 Å 缩短到 5.1 Å。螺旋之间的相互作用是由侧链的装配所控制的。螺旋之间可能作用的侧链是非极性侧链, 它们向着超螺旋的内部, 躲开与水接触, 其他的是极性侧链, 处于蛋白质分子的表面, 与水接触。单个的 α -螺旋链每隔 7 个残基重复一次。疏水侧链处于螺旋的一侧, 位于每第三至第四个残基。非极性残基的这种重复顺序可在它们的一级结构中观察到。螺旋链之间的侧链是彼此适配的, 非极性侧链互相装配紧密, 超螺旋的稳定性主要是由于非极性侧链间的范德华相互作用的结果。

$\beta\alpha\beta$ 最简单的 $\beta\alpha\beta$ 组合是由二段平行式的 β -链 (单股的 β -折叠) 和一段连接链组成, 此超二级结构称 $\beta\times\beta$ -单位 (图 3-61B)。连接链或是 α -螺旋或是无规则卷曲 (nonregular coil), 它大体上反平行于 β -链。最常见的 $\beta\alpha\beta$ 组合是由三段平行式的 β -链和二段 α -螺旋链构成 (图 3-61C), 此超二级结构称为 Rossmann-折叠 (Rossmann-fold)。几乎在所有的实例 (已知有一个例外) 中连接链都是以右手交叉连接方式处于 β -折叠片的一侧。这是一种拓扑现象, 它是由于 β -链倾向于右手扭转 (twisting) 而产生的 (图 3-62)。这一现象可以用一条带子加以直观的演示 (扭转带子, 然后把带子的两头搭在一起)。

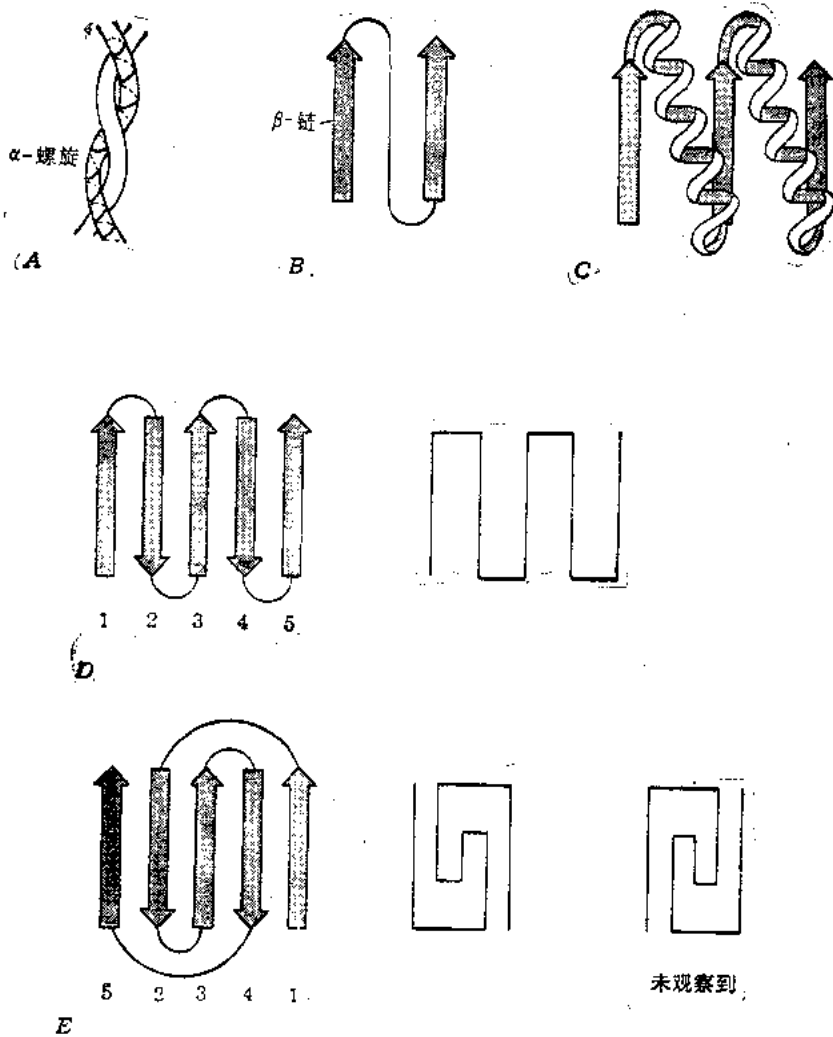


图 3-61 蛋白质中的几种超二级结构(条带表示 β -链)

A. α ; B. $\beta \times \beta$ -单位; C. $\beta\alpha\beta$ 或称 Rossmann-折叠, α -螺旋在平行式 β -折叠片的上面; D. β -曲折(β -meander); E. 回形拓扑结构(Greek Key topology), 只有一种“手性”形式存在。

$\beta\beta\beta$ β -曲折和回形拓扑结构是($\beta\beta\beta$)组合的二种超二级结构。

β -曲折(β -meander)是另一种常见的超二级结构,由在一级结构上连续,在 β -折叠中相邻的三条反平行式 β -链通过紧凑的 β -转角连接而成(图 3-61 D)。 β -曲折含有与 α -螺旋相近数目的氢键(约占全部可能形成的链内氢键的 2/3)。 β -曲折的这种高稳定性无疑说明它的广泛存在。

回形拓扑结构(“Greek Key” topology)也是反平行式 β -折叠片中常出现的一种超二级结构(图 3-61 E)。这种结构直接用希腊陶瓷花瓶上的一种常见图案命名,称“Greek key”拓扑结构。这种拓扑结构有两种可能的回旋方向,但实际上只存在其中的一种。这种选择的基础尚未确定。

蛋白质的构象看来是由二级结构片段(segment of secondary structure)装配在一起而成的,因此目前致力于了解 α -螺旋之间, β -折叠片之间以及螺旋与折叠片之间相互作用的基础。

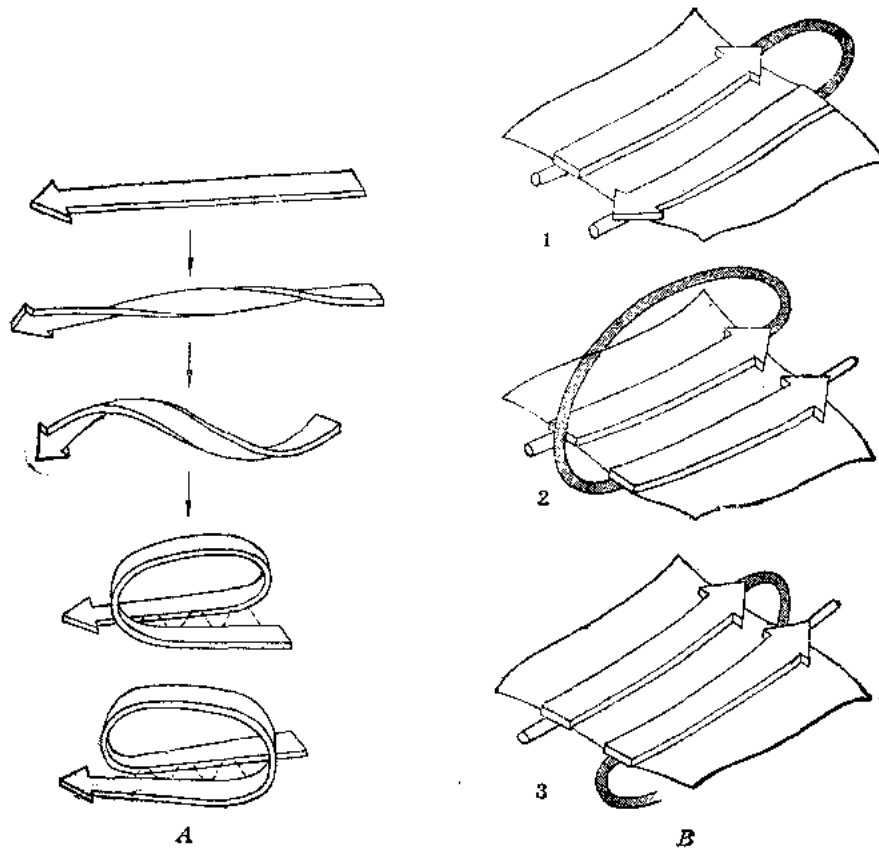


图 3-62 由于多肽链倾向右手方向扭转，因此产生右手连接的结构
 A 示出右手扭转怎样导致右手连接；底部结构是左手连接的例子，以便比较。
 B 示出连接 β -链的三种方式：(1) 发夹末端连接，(2) 右手交叉连接，(3) 左手交叉连接。

在多数情况下，只有非极性氨基酸侧链参与这些相互作用，而亲水侧链多在分子的外表面。

七、纤维状蛋白质

纤维状蛋白质(fibrous protein)广泛地分布于脊椎和无脊椎动物体内，它是动物体的基本支架和外保护成分，占脊椎动物体内蛋白质总量的一半或一半以上。这类蛋白质外形呈纤维状或细棒状，分子轴比(长轴/短轴)大于10(小于10的为球状蛋白质)。分子是有规则的线型结构，这与其多肽链的有规则二级结构有关，而有规则的线型二级结构是它们的氨基酸顺序的规则性反映。

纤维状蛋白质可分为不溶性(硬蛋白)和可溶性二类，前者有角蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白等；后者有肌球蛋白和纤维蛋白原等，但不包括微管(microtubule)、肌动蛋白细丝(actin filament)或鞭毛(flagella)，它们是球状蛋白质的长向聚集体(aggregate)。下面主要介绍不溶性纤维状蛋白质。

(一)角蛋白

角蛋白(keratin)来源于外胚层细胞，包括皮肤以及皮肤的衍生物：发、毛、鳞、羽、鬃、甲、

蹄、角、爪、喙、丝等。角蛋白是外胚层细胞的结构蛋白质(structural protein)。角蛋白可分为两类，一类是 α -角蛋白，另一类是 β -角蛋白。

α -角蛋白 α -角蛋白是角蛋白中的优势形式。它主要是由 α -螺旋构象的多肽链构成的，多肽链大体上与角蛋白的长向平行。 α -角蛋白纤维的衍射图案中观察到的0.5—0.55 nm的大周期(major periodicity)与 α -螺旋模型中的螺距(0.54 nm)相当；图案中观测到的0.15 nm小周期(minor periodicity)与 α -螺旋中每个残基绕轴旋转 100° 时轴向平移距离(0.15 nm)相当。 α -角蛋白是 α -螺旋的典型实例。

α -角蛋白中，三股右手 α -螺旋向左缠绕，拧成一根称为原纤维(protofibril)的结构，直径为2 nm，这就是 $\alpha\alpha$ 组合的超二级结构。原纤维再排列成“9+2”的电缆式结构，称微纤维(microfibril)，直径为8 nm(图3-63)。微纤维包埋在硫含量很高的无定形基质中。成百根这样的微纤维又结合成一不规则的纤维束，称大纤维(macrofibril)，其直径为200 nm。

一根毛发周围是一层鳞状细胞(scale cell)，中间为皮层细胞(cortical cell)。皮层细胞横截面直径约为20 μm 。在这些细胞中，大纤维沿轴向排列。所以一根毛发具有高度有序的结构(图3-63)。毛发性能就决定于 α -螺旋结构以及这样的组织方式。

α -角蛋白的伸缩性能很好，一根毛发可以拉长到原有长度的二倍，这时 α -螺旋被撑开，各圈间的氢键被破坏，转变为 β -构象。当张力除去后，单靠氢键不能使纤维恢复到原来的状态。螺旋是由被包埋在基质中的半胱氨酸残基间的二硫键交联起来的，一般认为每四个螺圈就有一个交联键(图3-64)。这种交联键既可以抵抗张力，又可以作为外力除去后使纤维复原的恢复力。结构的稳定性主要是由这些二硫键保证的。

二硫键的数目越大，纤维的刚性越强。根据含硫量大小， α -角蛋白可分成硬角蛋白和软角蛋白

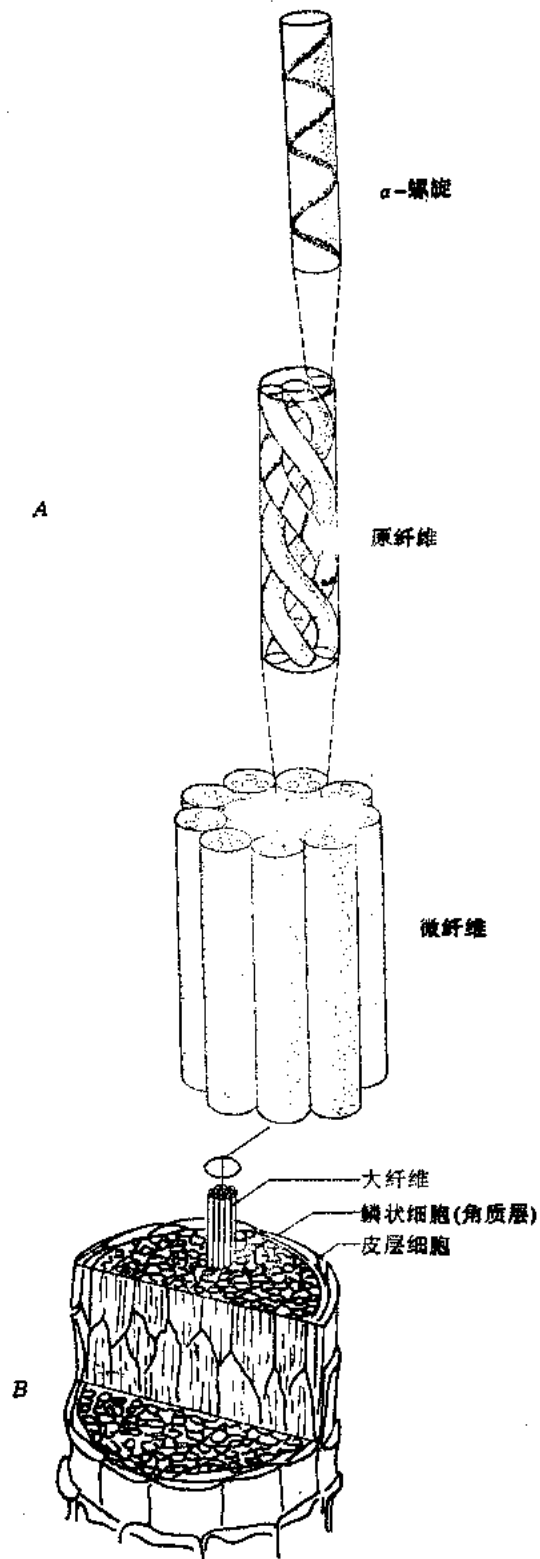


图3-63 头发(B)和头发角蛋白(A)的结构

二种类型。蹄、爪、角、甲中的角蛋白是高硫硬角蛋白，质地硬、难拉伸。皮肤和膀胱中的角蛋白是低硫软角蛋白，它的伸缩性比硬角蛋白好。

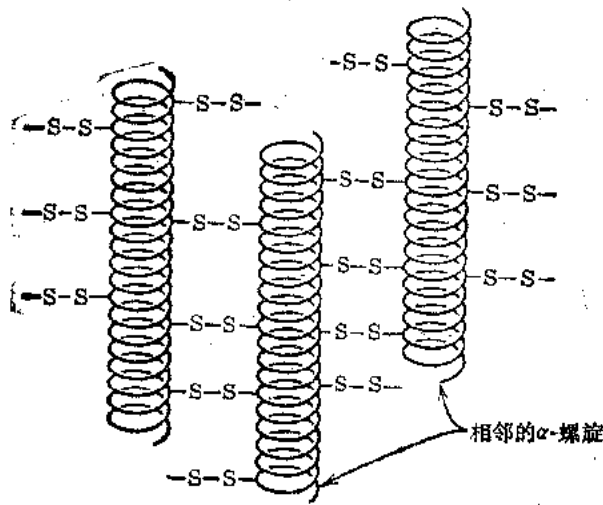


图 3-64 角蛋白分子间的二硫键

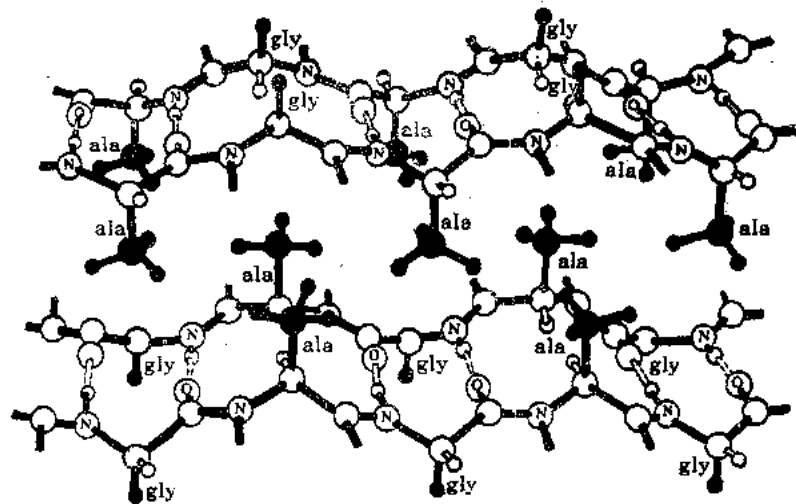
永久性卷发(烫发)是一项生物化学工程 (biochemical engineering)。α-角蛋白在湿热条件下可以伸展转变为β-构象，但在冷却干燥时又可自发地恢复原状。如前面所指出，这是因为α-角蛋白的侧链R基一般都比较大会，不适于处在β-构象状态，此外α-角蛋白中的螺旋多肽链间有着很多的二硫键交联，这些交联键也是当外力解除后使肽链恢复原状(α-螺旋构象)的重要力量。这就是卷发行业的生化基础。首先，把头发卷成一定的形状 然后涂上还原剂(一般是含巯基的化合物)溶液并加热。还原剂可以打开链间的二硫键。湿热破坏氢键使头发α-角蛋白的螺旋结构展开并伸直。过一些时候，除去还原剂，涂上氧化剂以便在相邻多肽链的半胱氨酸残基对，但不是处理前原来存在的残基对之间建立新的二硫键。当洗涤并冷却头发时，多肽链回到原来的α-螺旋构象。这时头发将以所希望的形式卷曲，因为新的二硫交联键的形成使得头发纤维的α-螺旋束发生扭曲。

β-角蛋白 除了上述的α-角蛋白充分伸展后可逆地转变为β-角蛋白之外，自然界中还存在天然的β-角蛋白，例如丝心蛋白(fibroin)这是蚕丝和蜘蛛丝的一种蛋白质。丝心蛋白具有抗张强度高，质地柔软的特性，但不能拉伸。它具有0.7nm周期，这与α-角蛋白在湿热中伸展后形成的β-角蛋白很相似(0.65nm周期)。丝心蛋白是典型的反平行式β-折叠片，多肽链取锯齿状折叠构象，酰胺基的取向使相邻的C_α为侧链腾出空间，从而避免了任何空间位阻。在这种结构中，侧链交替地分布在折叠片的两侧。

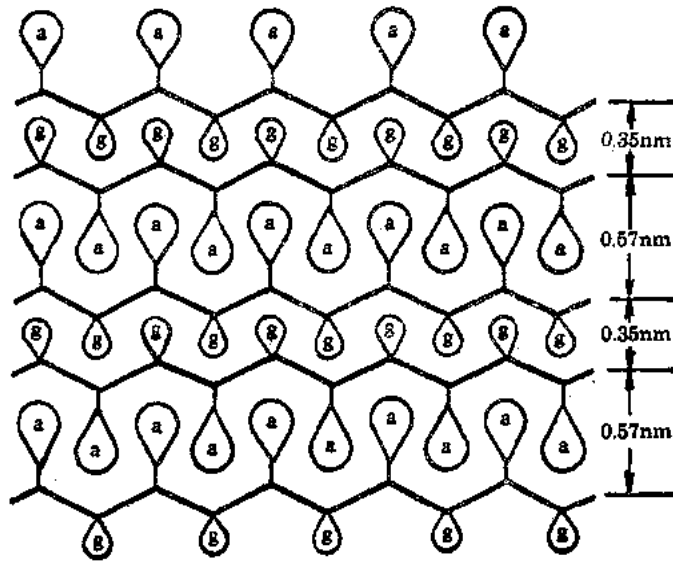
丝心蛋白分子取片层结构即反平行式β-折叠片以平行的方式堆积成多层结构。链间主要以氢键连接，层间主要靠范德华力维系(图3-65A)。丝心蛋白的一级结构分析揭示，它主要是由具有小侧链的甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸组成，每隔一个残基就是甘氨酸。这就意味着所有的甘氨酸位于折叠片平面的一侧，丝氨酸和丙氨酸等都在平面的另一侧(图3-65A)。同一多肽链一侧的两个侧链间距离(重复距离)是0.7nm；在层中反平行的链间距离是0.47nm。若干这样的折叠片，按Gly对Gly,Ala(或Ser)对Ala(或Ser)的方式堆积起来。这种交替堆积层之间的距离，分别为0.35nm和0.57nm(图3-65B)。结构中相邻的Gly取代片层表面或Ala(或Ser)取代片层表面彼此联锁起来。由于这种结构方式使得丝所承担的张力并不直接放在多肽链的共价键上，因此使丝纤维具有很高的抗张强度。又由于堆积层之间是由非键合的范德华力维系的，因而使丝具有很柔软的特性。但是因为丝蛋白的肽链已经处于相当伸展的状态，所以不能拉伸。

实际上丝蛋白分子除上述三种基本残基之外，还有一些大侧链的氨基酸残基如Tyr、Val和Pro等，由它们构成的区域是无规则的非晶状区，分子中有序的晶状区和无序的非晶状区交

实际上丝蛋白分子除上述三种基本残基之外，还有一些大侧链的氨基酸残基如Tyr、Val和Pro等，由它们构成的区域是无规则的非晶状区，分子中有序的晶状区和无序的非晶状区交



A



B

图 3-65 丝心蛋白的结构

A. 层状结构的原子模型；B. 残基的堆积方式。

替出现。无序区的存在,赋予丝心蛋白以一定的伸长度。

(二) 胶原蛋白

胶原蛋白或称胶原 (collagen) 是很多脊椎动物和无脊椎动物体内含量最丰富的蛋白质,它也属于结构蛋白质,使骨、腱、软骨和皮肤具有机械强度。胶原蛋白至少包括四种类型,称胶原蛋白 I、II、III 和 IV。下面主要讨论胶原蛋白 I。腱的胶原纤维具有很高的抗张强度 (tensile strength), 约为 $20-30 \text{ kg/mm}^2$, 相当于 12 号冷拉铜丝的拉力。骨骼中的胶原纤维为骨骼提供基质, 在它的周围排列着羟磷灰石 (hydroxyapatite) [磷酸钙聚合物 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] 结晶。脊椎动物的皮肤含有编织比较疏松, 向各个方向伸展的胶原纤维, 血管亦含有胶原纤维。

胶原蛋白在体内以胶原纤维的形式存在。其基本组成单位是原胶原蛋白分子 (tropo-

collagen), 长度为 280 nm, 直径为 1.5 nm, 分子量约为 300 000。原胶原蛋白分子经多级聚合形成胶原纤维。在电子显微镜下, 胶原纤维呈现特有的横纹区带, 区带间距为 60—70 nm, 其大小取决于胶原的类型和生物来源。原胶原蛋白分子在胶原纤维中都是有规则地按四分之一错位, 首尾相接, 并行排列组成纤维束。由于原胶原肽链上残基所带电荷不同, 因而电子密度不同, 这样通过 1/4 错位排列便形成间隔一定的 (~70 nm) 电子密度区域, 而呈现横纹区带(图 3-66)。

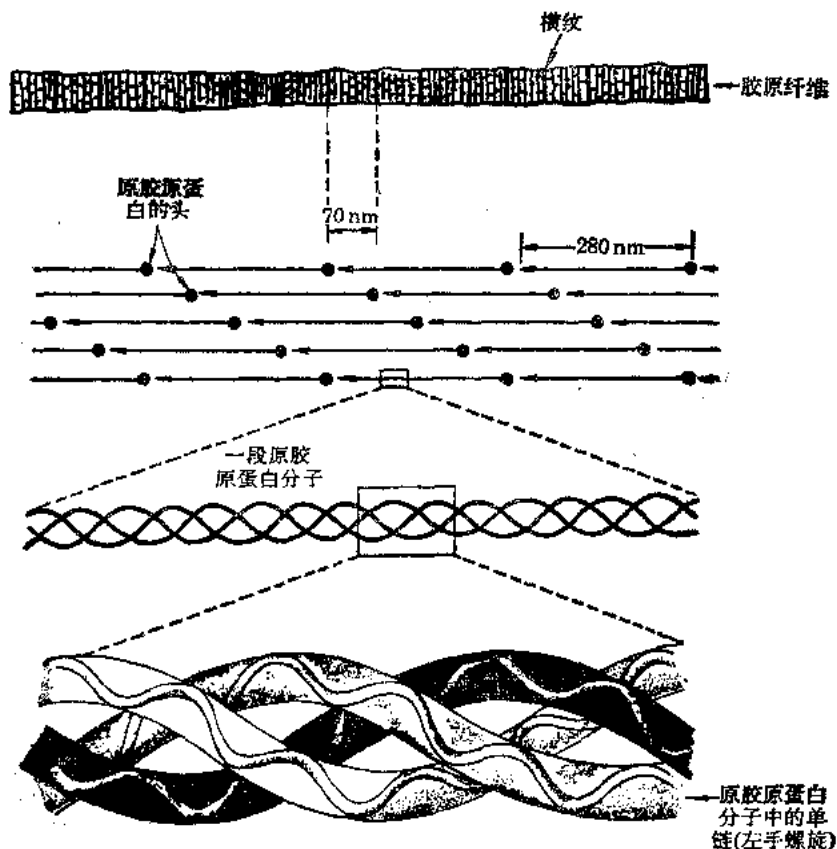
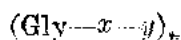


图 3-66 胶原纤维中原胶原蛋白分子的排列

胶原蛋白的 X-射线衍射图案与 α -角蛋白和 β -角蛋白的不同。Rich 等人认为胶原蛋白的二级结构是由三条肽链组成的三股螺旋, 它的二面角 (Φ, Ψ) 值基本上分布在 -60° 和 $+140^\circ$ 。这是一种右手超螺旋结构。螺距为 8.6 nm, 每圈每股包含 30 个残基。其中每一股螺旋又是一种特殊的左手螺旋, 螺距为 0.95 nm, 每一螺圈含 3.3 个残基。每一残基沿轴向的距离为 0.29 nm。胶原三螺旋只存在于胶原纤维中, 至今没有在球状蛋白质中发现, 唯一可能出现这种结构的另一蛋白质是人补体系统的 C_{3a} 。组成原胶原蛋白分子的 α 肽至少有五种, $\alpha 1(I)$, $\alpha 1(II)$, $\alpha 1(III)$, $\alpha 1(IV)$ 和 $\alpha 2$ 。胶原蛋白 I 是由两条 $\alpha 1(I)$ 和一条 $\alpha 2$ 组合而成的三螺旋, $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ 。这五种 α 肽链虽然氨基酸顺序不同, 但仍有不少共同点, 它们的分子量介于 95 000 到 100 000 之间, 含 1000 个残基左右, 一级结构分析表明, α 肽链的 96% 都是按三联体的重复顺序:

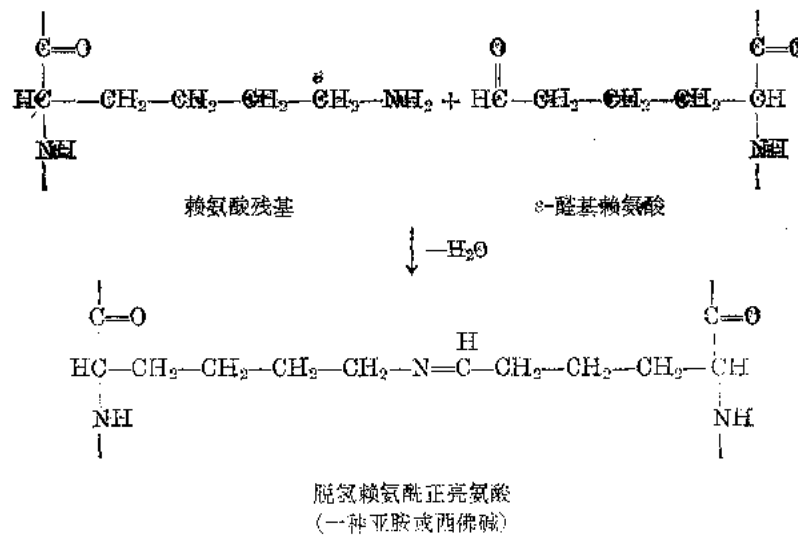


排列而成的。Gly 数目占残基总数的三分之一, x 常为 Pro, y 常为 Hyp (羟脯氨酸) 和 Hy¹

(羟赖氨酸), 后两种氨基酸在其他蛋白质中很少发现。它们分别由 Pro 和 Lys 经翻译后修饰 (posttranslational modification) 羟基化转变而来。催化脯氨酸羟基化的酶是脯氨酸羟化酶 (prolylhydroxylase), 催化赖氨酸羟基化的是赖氨酸羟化酶 (lysylhydroxylase)。这两个酶有许多性质相似。它们都需要分子氧, 抗坏血酸 (维生素 C), α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 作为催化的辅助因子。羟脯氨酸残基的羟基能参与链间的氢键形成。羟赖氨酸残基的羟基是糖基的连接部位。

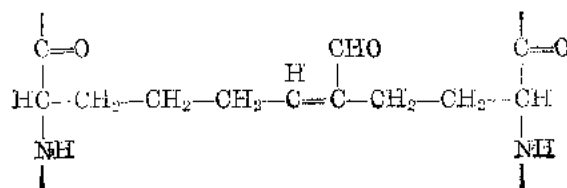
稳定原胶原三螺旋的力, 一是螺旋链间的范德华力, 二是螺旋链间的氢键, 三是链间的共价交联键。除这三种力之外, 稳定三螺旋结构还要三联体的每第三个位置必须是 Gly。单股螺旋每圈是 3.3 个残基, 而三股的超螺旋每圈每股是 10 个三联体, 因此每第三个 $C\alpha$ 就必然靠近超螺旋中心轴, 只有在轴上没有侧链出现, 也即只有是 Gly (其侧链就是一个 H 原子), 才能得到致密的有氢键键合的稳定结构, 这样也就解释了为什么在胶原中存在 (Gly-x-y)_n 的氨基酸顺序。链间氢键主要是在一条链的三联体 (Gly-x-y) Gly 的酰胺氢与另一条链的相邻三联体 x 位上的羰基氧之间形成的, 此外羟脯氨酸的羟基也参与链间的氢键形成。链间的共价交联键主要是在赖氨酸残基或羟赖氨酸残基的侧链间形成的, 在 III 型胶原蛋白中, 链间还有二硫键。

胶原的某些赖氨酸残基在含铜的赖氨酸氧化酶 (Lysine oxidase) 作用下发生氧化脱氨, 生成 ϵ -醛基赖氨酸 (ϵ -allysine) 残基, 后者再与相邻链的赖氨酸残基的 ϵ -氨基发生反应形成共价交联键:

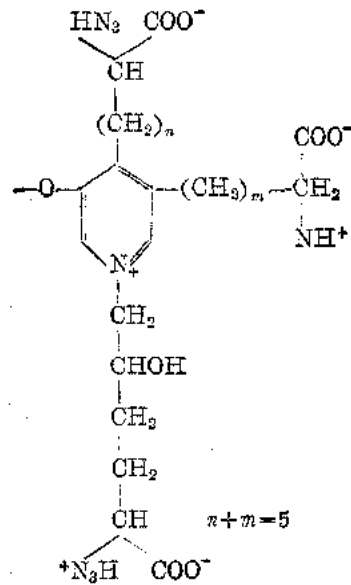


形成的残基是脱氢赖氨酸酰正亮氨酸 (dehydrolysinonorleucine)。经这样交联之后的胶原纤维韧性很强, 可以耐受很大的拉力。

此外, 两个 ϵ -醛基赖氨酸残基可以彼此发生醇醛缩合 (aldol condensation) 反应形成另一种形式的共价交联键:



除上述两种共价交联键之外，在胶原中还发现多种其他形式的交联键。有一种交联键被交联的残基类似锁链素，称吡啶啉(pridinoline)。这一结构对热和酸都很稳定。



随着年龄的增长，在原胶原三螺旋内和三螺旋之间的共价交联键形成得越来越多，因此使得结缔组织中的胶原纤维越来越硬而脆，结果改变了肌腱、韧带、软骨的机械性能，使骨头变脆，眼球角膜透明度减小。

胶原蛋白不易被一般的蛋白酶水解，但能被动物胶原酶断裂。断裂的碎片自动变性，可被普通蛋白酶水解。胶原于水中煮沸即转变为明胶(gelatin)，它是一种可溶性的多肽混合物。

(三)弹性蛋白

弹性蛋白(elastin)是结缔组织的另一个蛋白质组分，它的最重要性质就是弹性，并因此得名。弹性蛋白在血管和韧带中特别丰富。弹性蛋白纤维的基本亚基是弹性蛋白原(tropoelastin)。弹性蛋白原含800个氨基酸残基，分子量为72 000，富含甘氨酸和丙氨酸，缬氨酸和脯氨酸。与原胶原蛋白不同，弹性蛋白原不含羟赖氨酸，羟脯氨酸含量也很低。分子中发现有两个重复顺序，Lys-Ala-Ala-Lys和Lys-Ala-Ala，这些顺序与弹性蛋白的结构有什么关系还不知道。弹性蛋白原形成的螺旋既不同于 α -螺旋，也不同于胶原蛋白的螺旋。弹性蛋白原螺旋由二种区段组成。一种是富含甘氨酸、脯氨酸和缬氨酸的，这一区段控制弹性蛋白的伸展性，是宽的左手螺旋。另一种区段富含丙氨酸和赖氨酸，这是右手 α -螺旋，与分子的交联有关。

弹性蛋白按两种方式交联在一起。一种方式是象胶原蛋白中一样，赖氨酸残基的侧链经脱氨氧化生成醛基，后者与另一赖氨酸残基的 ϵ -氨基缩合，形成的亚胺双键被还原产生赖氨酰正亮氨酸(lysinnorleucine)。反应式如下(见下一页)：

另一种交联方式是三个 ϵ -醛基赖氨酰残基与赖氨酰残基缩合生成锁链素残基(图3-10)或异锁链素(isodesmosine)残基。两者的区别只是吡啶环上的一个侧链位置不同，对锁链素来

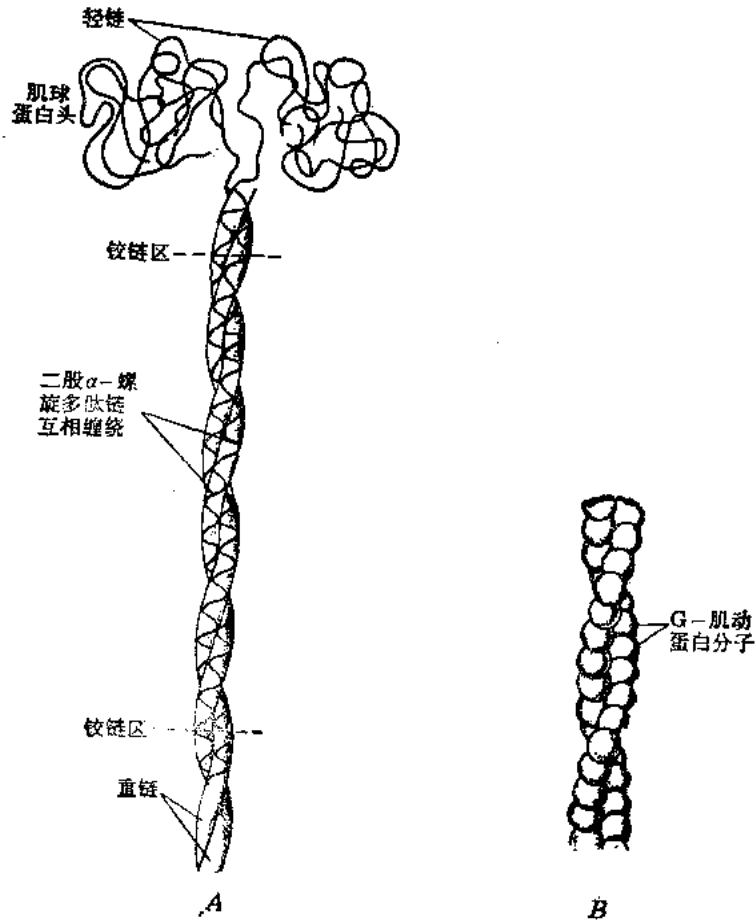


图3-68 肌球蛋白分子(A)和F-肌动蛋白分子(由二条G-肌动蛋白分子组成的链构成)(B)的示意图。

滑动的结果。ATP 是这一滑动作用所必需的。在收缩过程中滑动使得骨骼肌缩短。

另一些长的丝状蛋白质系统以微管为代表,虽然这类蛋白质不属纤维状蛋白质,但他们的功能与其单体的纤维状排列有关。而且也比较重要,因此在这里提一下。它是长的中空管,由13条蛋白质细丝沿中空的管心平行排列而成。每一细丝是由二种球状蛋白质: α -微管蛋白(α -tubulin)和 β -微管蛋白(β -tubulin)交替组成。微管在真核生物(eukaryote)的纤毛(cilia)和鞭毛(flagella)中存在,微管彼此滑动和扭动的结果,使得纤毛或鞭毛产生特有的螺旋式转动式或鞭打式的推进运动。微管参与许多其他的细胞活动,如细胞分化。微管的活动也需要来自ATP的能量。

第五节 球状蛋白质的结构与功能

在前面已经介绍了蛋白质结构的二个较低级的组织水平:一级结构(氨基酸顺序)和二级结构包括超二级结构,本节将介绍二个较高级的组织层次:三级结构包括结构域和四级结构(亚基的聚集)及其与生物功能的关系。

在球状蛋白质中多肽链被折叠成致密的球形构象。球状蛋白质的构象要比纤维状蛋白质

的构象复杂得多,它们具有多种多样的生物功能,它们的活性是动态的(dynamic)而不是静态的(static)。二千多种酶都是球状蛋白质,血液中输送氧、营养料和无机离子的蛋白也是球状蛋白质,另外一些是作为抗体、激素等蛋白存在的,还有一些是生物膜(biomembrane)和核糖体(ribose)的成分。

一、氨基酸顺序决定蛋白质的三级结构

从前面的 α -螺旋和 β -折叠的形成中已经看到,多肽链的二级结构是由它的氨基酸顺序决定的。只有当一组在肽链上相邻的氨基酸残基具有适当的侧链R基顺序时才能自发地形成 α -螺旋和 β -构象并处于稳定的状态。球状蛋白质的三级结构也是决定于氨基酸顺序。只不过多肽链的二级结构是决定于R基的短程顺序(short-range sequence)而三级结构是决定于氨基酸的长程顺序(long-range sequence)。多肽链转弯的形成和这些转弯的方向和角度都决定于产生特异转弯的氨基酸残基(如脯氨酸,苏氨酸和丝氨酸)的精确位置。

同源蛋白质的很多氨基酸残基不管种属怎样总是在肽链的特异部位上出现,这些残基称不变残基(invariant residue)。这些不变残基有些处在链的拐弯处,有一些如半胱氨酸残基处在三级结构中环之间的交联点,还有一些出现在酶的活性中心部位或辅基的结合部位如细胞色素c的血红素结合部位。

三级结构决定于它的氨基酸顺序这一结论最直接最有力的证据来自某些蛋白质的可逆变性(reversible denaturation)实验,特别是六十年代White和Antinsen进行的牛胰核糖核酸酶(RNase)复性(renaturation)的经典实验。当天然的RNase(其一级结构见图3-39)在8 mol/L尿素存在下用 β -巯基乙醇处理后,分子内的四个二硫键即被破裂,整个肽链伸展而成无规卷曲,同时酶活性完全丧失。但是当用透析方法将尿素和巯基乙醇除去后,RNase活性又可逐渐恢复,最后达到原来活性的95—100%(图3-69)。在恢复过程中形成若干二硫键随机分布的无活性中间体,此时如若加入极微量的巯基乙醇可以催化二硫键的重排,加速RNase的完全复性。

经多方面的分析表明复性后的产物与天然的RNase并无区别,所有正确配对的二硫键都获得重建。值得注意的是,在复原过程中,肽链上的8个SH基借空气中的氧重新氧化成4个二硫键时,它们的配对完全与天然的相同,准确无误。如果在随机重组的情况下,8个SH基形成4个正确二硫键的机率是 $1/7 \times 1/5 \times 1/3 = 1/105$ 。因为第一个二硫键的形成有7种可能,第二个二硫键有5种可能,第三个有3种可能,第四个只有一种可能。如果RNase的124个残基允许它们的每一 C_{α} 的二面角(Φ, Ψ)绕多肽主链有二个旋转角度,则有 2^{124} 种可能构象,如果再加上因侧链旋转而造成的可能构象,将是难以想象的天文数字。它们的倒数便是天然构象随机形成的机率。如果天然构象真是随机形成的,那末RNase的复性简直是不可能的。然而实际上随机松散的RNase肽链在复原过程中却只选择其中的一种方式。这说明了RNase肽链上的线性一维信息(氨基酸顺序)控制着肽链本身折叠盘绕而成特定的天然构象的方式并由此确定了Cys残基二二相互接近的正确位置。

现在可以比较肯定地说,蛋白质的三维构象归根结底是由一级顺序决定的。也就是说三

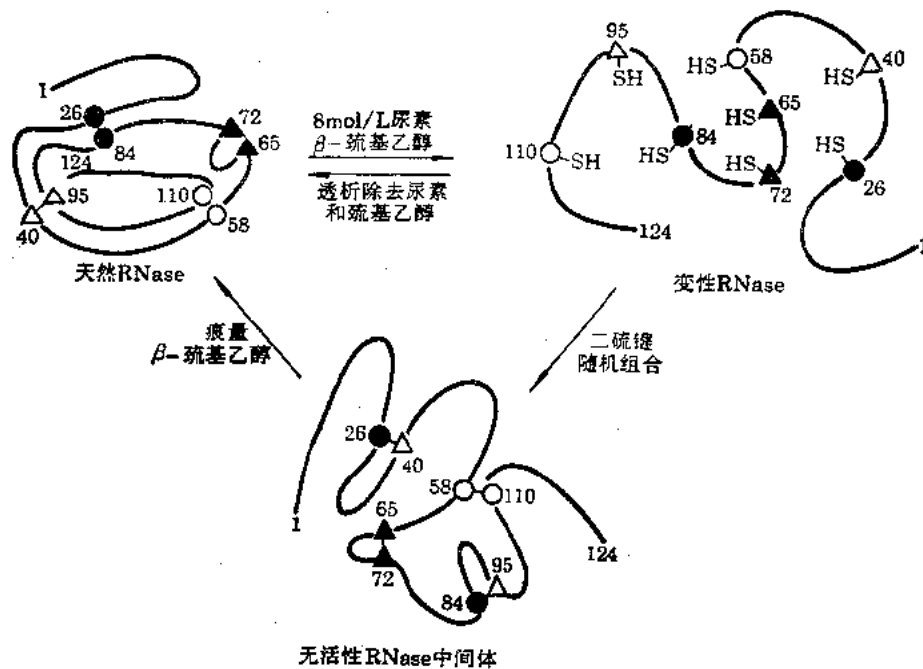


图 3-69 RNase 的变性与复性示意图

维构象是多肽链上的各个单键的旋转自由度受到各种限制的总结果。这些限制包括肽键的硬度即肽键的平面性质、 $C_{\alpha}-C$ 键和 $C_{\alpha}-N$ 键旋转的许可角度、肽链中疏水基和亲水基的数目和位置、带正电荷和带负电荷的 R 基的数目和位置以及溶剂和其他溶质等。在这些限制因素下,通过 R 基团的彼此相互作用以及 R 基团与溶剂和其他溶质的相互作用,最后达到平衡,形成了在一定条件下热力学上最稳定的空间结构。这样就实现了复杂生物大分子的“自我装配 (selfassembly)”原则。

二、维持蛋白质三级结构的作用力

维持蛋白质三级结构的作用力主要是一些所谓弱的相互作用或称非共价键或次级键,包括氢键、范德华力、疏水相互作用和盐键(离子键)。这些弱的相互作用也是维持核酸构象、生物膜结构的作用力,因此把标题扩大为“维持生物系统结构的作用力”也不过分。此外共价二硫键在维持某些蛋白质的构象方面也起着重要作用(图 3-70)。

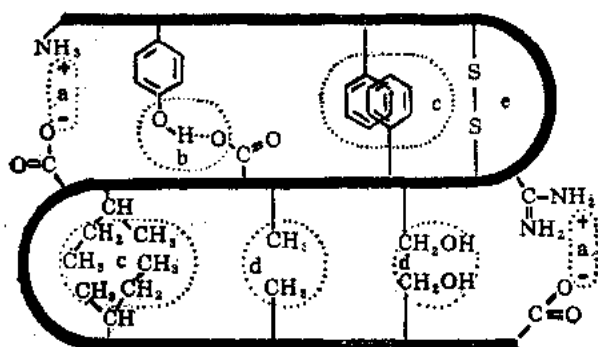


图 3-70 维持蛋白质三级结构的各种作用力
a. 盐键, b. 氢键, c. 疏水相互作用, d. 范德华力, e. 二硫键。

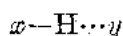
(一) 氢键

氢键 (hydrogen bond) 在维持蛋白质的结构中起着极其重要的作用。前面我们曾经讨论过多肽主链上的羰基氧和

酰胺氢之间形成的氢键,它们是维持蛋白质二级结构的主要作用力。除此之外,氢键还可以在

侧链与侧链、侧链与介质水、主链肽基与侧链或主链肽基与水之间形成。

由电负性原子与氢形成的基团如 N—H 和 O—H 具有很大的偶极距，成键电子云分布偏向负电性大的重原子核，因此氢原子核周围的电子分布就少，正电荷的氢核(质子)就在外侧裸露。这一正电荷氢核遇到另一个电负性强的原子时，就产生静电吸引，即所谓氢键。



这里 x 、 y 是电负性强的原子(N、O、S 等)， $x-H$ 是共价键， $H \cdots y$ 是氢键。 x 是氢(质子)供体， y 是氢(质子)受体。氢键具有两个重要特征，一个是方向性，相互吸引的方向沿氢受体 y 的孤电子对轨道轴，受体 y 与供体 x 之间的角度接近 180° ；另一个是饱和性，表现在一般情况下 $x-H$ 只能和一个 y 原子相结合。饱和性是由于 H 原子非常小，而供体和受体的原子都相当大，这样它们将排斥另一个受体原子再与氢结合。

大多数蛋白质所采取的折叠策略是使主链肽基之间形成最大数目的分子内氢键(如 α -螺旋， β -折叠)，与此同时保持大部分能成氢键的侧链处于蛋白质分子的表面将与水相互作用。

(二) 范德华力

范德华力包括三种较弱的作用力，即定向效应、诱导效应和分散效应。定向效应(orientation effect)发生在极性分子或极性基团之间。它是永久偶极间的静电相互作用，氢键可被认为属于这种范德华力。诱导效应(induction effect)发生在极性物质与非极性物质之间，这是永久偶极与由它诱导而来的诱导偶极之间的相互作用。分散效应(dispersion effect)是在多数情况下起主要作用的范德华力；它是非极性分子或基团间仅有的一种范德华力，也称为 London 分散力。这是瞬时偶极间的相互作用，偶极方向是瞬时变化的。瞬时偶极是由于所在分子或基团中电子电荷密度的波动即电子运动的不对称性造成的。瞬时偶极可以诱导周围的分子或基团产生诱导偶极，诱导偶极反过来又稳定了原来的偶极，因此在它们之间产生了相互作用。范德华力一般为 $0.418 \sim 0.836 \text{ kJ/mol}$ 。这是很弱的作用力，而且随非共价键合原子或分子间距离(R)的六次方倒数即 $1/R^6$ 而变化。当非共价键合原子或分子相互挨得太近时，由于电子云重叠，将产生范德华斥力。实际上范德华力包括吸引力和斥力两种相互作用。因此范德华力(吸引力)只有当两个非键合原子处于一定距离时才能达到最大，这个距离称为接触距离(contact distance)或范德华距离，它等于两个原子的范德华半径之和。某些生物学上重要原子的范德华半径及共价键半径见表 3-14。虽然就其个别来说范德华力是很弱的，但是范德华相互作用数量大并且具有加和性，因此就成为一种不可忽视的作用力。

表 3-14 几种生物学上重要原子的范德华半径和共价键半径

原 子	接触半径(am)	共价半径(am)
H	0.12	0.030
C	0.20	0.077
N	0.15	0.070
O	0.14	0.066
S	0.18	0.104
P	0.19	0.110

(三) 疏水相互作用

前面曾经谈到,水介质中球状蛋白质的折叠总是倾向于把疏水残基埋藏在分子的内部。这一现象被称为疏水相互作用(hydrophobic interaction)或疏水效应,也曾称为疏水键。它在维持蛋白质的三级结构方面占有突出的地位。疏水相互作用其实并不是疏水基团之间有什么吸引力的缘故,而是疏水基团或疏水侧链出自避开水的需要而被迫接近。当然,当疏水基团接近到等于范德华距离时,相互间将有弱的范德华引力,但这不是主要的。

蛋白质溶液系统的熵增是疏水相互作用的主要动力。看来熵增主要涉及介质水的有序度改变,因为疏水基团的聚集(相互作用)本身是有序化过程(造成熵减)。为进一步了解熵增的原因我们简单地回忆一下水的液态结构。

水分子中氧原子的四个轨道是不等性 sp^3 杂化的,这与碳四面体的不同。由于这种不等性杂化使水分子具有极性,两个水分子间可以发生静电吸引,形成氢键。冰中每个水分子(中心分

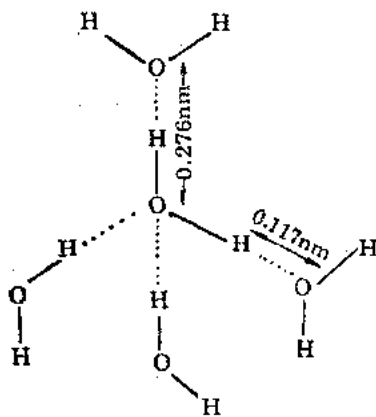


图 3-71 冰中水分子的四面体氢键

子)与邻近水分子形成四个氢键(图 3-71)。冰中氧-氧之间的平均距离是 0.276 nm。液态水中, 0°C 时每个水分子在任一给定时刻平均形成 3.4 个氢键,氧-氧之间的距离略比冰中的大,为 0.290 nm。(15°C)。冰和液态水之间氢键的数量差别不大,但是每个氢键的半寿期只有 10^{-10} — 10^{-11} 秒。因此液态水的结构是一种空间和时间的统计结果。液态水既是流动的(氢键破坏时)又是固定的(氢键形成时)。这是液态水不同于冰,也不同于汽气的结构特点。当疏水化合物或基团进入水中时,它周围的水分子将排列成刚性的有序结构,即所谓笼形结构(clathrate structure)(图 3-72)这种结构被认为比冰结构更加有序化。与此相反的过程(疏水相互作用),排列有序的水分子笼形结构将被破坏,水分子被排入自由水中,这样水的混乱度增加,即熵增加,因此疏水相互作用是熵驱动的自发过程。

疏水相互作用在生理温度范围内随温度升高而加强,但超过一定温度(50 — 60°C ,因侧链而异)后,又复减弱。因为超过这个温度,水的有序结构逐渐破坏,随之给的变化有利于疏水基团进入水中。非极性溶剂、去污剂是破坏疏水相互作用的试剂,因此是变性剂。脲和盐酸胍既能破坏氢键,又能破坏疏水相互作用,因此是强变性剂。

(四) 盐键

盐键或称离子键,它是正电荷与负电荷之间的一种静电相互作用。吸引力 F 与电荷电量的乘积(Q_1Q_2)成正比,与电荷质点间的距离平方(R^2)成反比,在溶液中此吸引力随周围介质的介电常数 ϵ 增大而降低:

$$F = \frac{Q_1Q_2}{\epsilon R^2}$$

在生理 pH 下,蛋白质中的酸性氨基酸(Asp 和 Glu)的侧链可解离成负离子,碱性氨基酸(Lys、Arg 和 His)的侧链可离解成正离子。在多数情况下这些基团都分布在球状蛋白质分

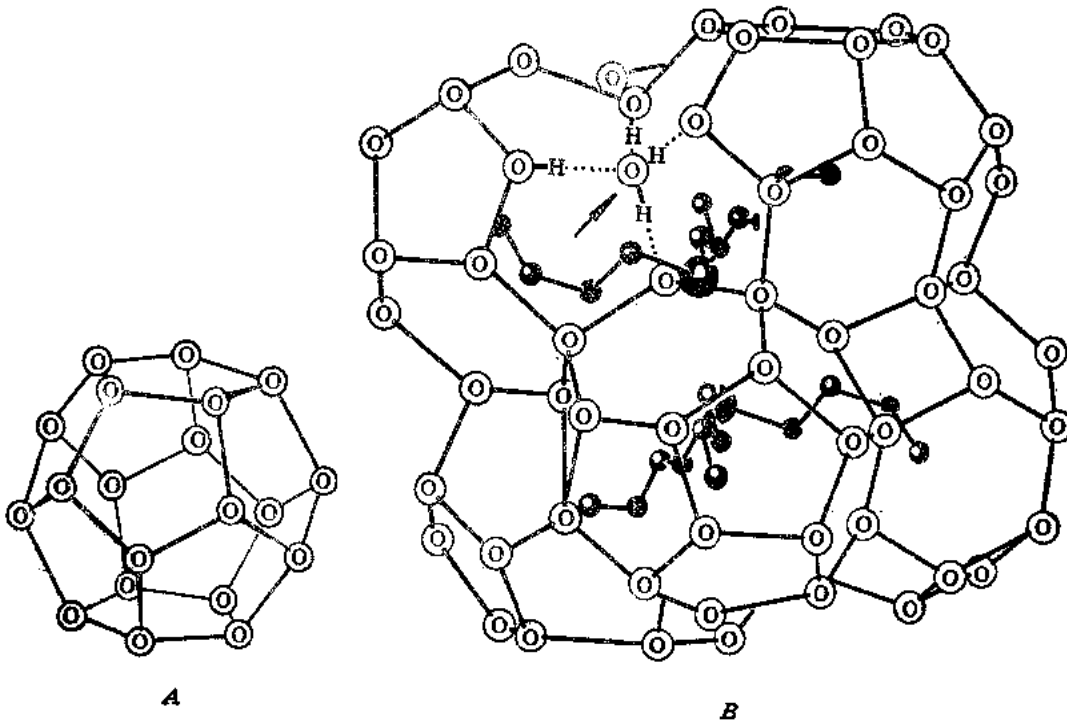


图 3-72 碳氢化合物周围水分子构成的有序笼形化合物结构

A. 水分子组成的二十面体笼形结构,它是笼形化合物中常见的构件。B. 三烷基硫离子的笼形结构的一部分三烷基硫离子窝藏在水分子的氢键网内,在完整的网上,每个水分子与其他水分子形成四面体氢键(图中箭头所示)。

子表面,而与介质水分子发生电荷-偶极之间的相互作用,形成排列有序的水化层,这对稳定蛋白质的构象有着一定的作用。

荷电的侧链也在蛋白质分子内部出现,它们一般与其他基团形成强的氢键。但是偶而也有少数带相反电荷的侧链在分子的疏水内部形成盐键(或称盐桥)。在疏水环境中,介电常数比在水中低,相反电荷间的吸引力相应增大。当荷电侧链从水中转移到分子内部时,它周围有序排列的水分子被释放到介质水中。因此盐键的形成不仅是静电吸引而且也是熵增的过程。升高温度时,由于对 $T\Delta S$ 一项有利,因而增加盐桥的稳定性,此外,盐键因加入非极性溶剂而加强,加入盐类而减弱。

(五)二硫键

我们在 RNase 复性实验中看到,在二硫键形成之前蛋白质分子已采取了它特有的三级结构。二硫键的形成并不指令多肽链的折叠。然而一旦蛋白质采取了它的三级结构则二硫键的形成将对此构象起稳定作用。假如蛋白质中所有的二硫键相继被还原,将引起蛋白质的天然构象改变和生物活性丢失。在许多情况下,二硫键可以选择性地被还原,这些实验证明,某些二硫键是生物活性所必需的,另一些二硫键则不是生物活性所必需的,但与维持蛋白质的稳定有关。在绝大多数情况下,二硫键是在多肽链的 β -转角附近形成的。

三、蛋白质的变性作用

天然蛋白质分子受到某些物理因素如热、紫外线照射,高压和表面张力等或化学因素如有

机溶剂、脲、胍、酸、碱等的影响时,生物活性丧失,溶解度降低,不对称性增高以及其他的物理化学常数发生改变,这种过程称为变性作用(denaturation)。蛋白质变性作用的实质就是蛋白质分子中的次级键被破坏,引起天然构象解体。变性不涉及共价键(肽键和二硫键等)的破裂,一级结构保持完好。

蛋白质变性过程中,往往有下列现象出现:

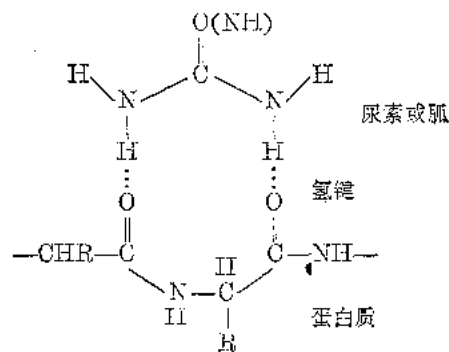
(1) 生物活性的丧失 蛋白质的生物活性是指蛋白质所具有的酶、激素、毒素(toxin)、抗原与抗体等活性,以及其他特殊性质如血红蛋白的载氧能力,肌球蛋白与肌动蛋白相互作用时的收缩能力等。生物活性的丧失是蛋白质变性的主要特征。有时空间结构只有轻微的局部改变,而且这些变化还没有反映到其他物理化学性质上时,生物活性就已经丧失。

(2) 一些侧链基团的暴露 蛋白质在变性时,有些原来在分子内部包藏而不易与化学试剂起反应的侧链基团,由于结构的伸展松散而暴露出来。

(3) 一些物理化学性质的改变 蛋白质变性后,疏水基外露,溶解度降低,一般在等电点区域不溶解,分子相互凝集,形成沉淀。但在碱性溶液中,或有尿素、胍等变性剂存在时,则仍保持溶解状态,透析除去这些变性剂后,又可沉淀出来。球状蛋白质变性后,分子形状也发生改变,蛋白质分子伸展,不对称程度增高,反映在粘度增加、扩散系数降低。

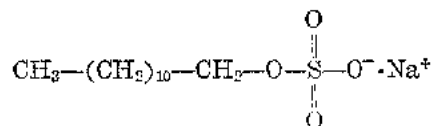
(4) 生物化学性质的改变 蛋白质变性后,分子结构伸展松散,易为蛋白水解酶分解。变性蛋白质比天然蛋白质更易受蛋白水解酶作用。这就是熟食易于消化的道理。

变性剂(denaturing agent)尿素和胍能与多肽主链竞争氢键,因此破坏蛋白质的二级结构。尿素或胍与多肽主链之间相互作用的一种可能方式如下所示:



可能更重要的原因是尿素或胍增加非极性侧链在水中的溶解度,因而降低了维持蛋白质三级结构的疏水相互作用。

去污剂(detergent),如十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,缩写为SDS)也是蛋白质的变性剂。其结构式如下:



SDS能破坏蛋白质分子内的疏水相互作用使非极性基团暴露于介质水中。去污剂降低非极性侧链从水介质到疏水内部的转移自由能。

变性是一个协同过程。它是在所加变性剂的很窄浓度范围内或很窄的 pH 和温度间隔内突然发生的。

关于蛋白质变性的学说,我国生物化学家吴宪在三十年代就已提出,天然蛋白质分子因环境的种种关系,从有秩序而紧密的构造,变为无秩序而松散的构造,这就是变性作用。他认为天然蛋白质的紧密构造及晶体结构是由分子中的次级键维系的,所以容易被物理的和化学的因素所破坏。这种观点基本上反映了蛋白质变性的本质。

当变性因素除去后,变性蛋白质又可重新回复到天然构象,这一现象称为蛋白质的复性(renaturation)。是否所有的蛋白质变性都是可逆的,这一问题至今仍有疑问。至少实践中未能使所有蛋白质在变性后都重新恢复活力。然而多数人都接受变性是可逆的概念,认为天然构象是处于能量最低的状态,有些蛋白质变性后之所以不能逆转,主要是所需条件复杂,不易满足的缘故。

四、球状蛋白质的结构域和三级结构

结构域(structural domain)或称辖区,它也是蛋白质三维折叠中的一个层次。多肽链首先是在某些区域相邻的氨基酸残基形成有规则的二级结构(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等);然后,主要又是相邻的二级结构片段集装在一起形成超二级结构,在此基础上,多肽链折叠成近乎球状的三级结构(tertiary structure)(图 3-73)。对于较大的蛋白质分子或亚基,多肽链往往由两个或两个以上相对独立的三维实体缔合而成三级结构。这种相对独立的三维实体就称结构域。最常见的结构域约含 100—200 个氨基酸残基,少至 40 个左右,多至 400 个以上。结构域是球状

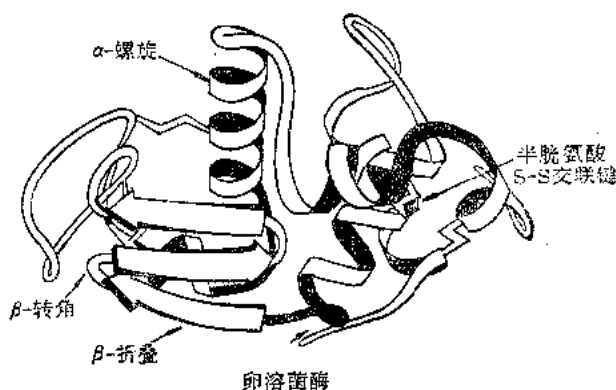


图 3-73 卵溶菌酶(egg lysozyme)的三级结构

蛋白质的折叠单位,多肽链折叠的最后一步是结构域的缔合(association)。对于那些较小的蛋白质分子或亚基来说结构域和三级结构往往是一个意思,也就是说这些蛋白质是单结构域的。

看来结构域这一结构层次的出现也不是偶然的。从结构形成的角度看,一条长的多肽链,先分别折叠成几个相对独立的区域,再缔合成三级结构要比整条多肽链直接折叠成三级结构在动力学上是更为合理的途径。从功能角度看,很多多结构域的酶其活性中心都位于结构域之间。通过结构域容易构建具有特定三维排布的活性中心。由于结构域之间常常只有一段肽链相连,形成所谓“铰链区(hinge region)”,使结构域容易发生相对运动,但这种柔性的铰链不可能在亚基之间存在,因为它们之间没有共价连接,如作较大的运动亚基将完全分开。结构域之间的这种柔性(flexibility)将有利于活性中心结合底物和施加应力,有利于别构中心结合调节物和发生别构效应。

结构域是多肽链在超二级结构的基础上组装而成的,也和超二级结构一样,组装的基本

方式种类有限。多肽链的手性(chirality)对蛋白质结构的组织(organization)产生很大影响。精细构象能的计算表明,最稳定的 β -链构象具有轻度右手扭转的倾向。 β -链的这种右手扭转倾向实际上给所有已知的蛋白质带来两个不同但又有联系的结构效果。这些效果对蛋白质结构的组织是十分重要的,因为扭转的 β -链常是构成蛋白质结构的骨架。一个效果反映在球状蛋白质中平行 β -折叠片的 β -链间的交叉连接(crossover connection)都是右手的,这一点曾在超二级结构 $\beta\alpha\beta$ 组合中看到;另一个效果反映在对球状蛋白质中平行 β -折叠片的几何形状的影响。球状蛋白质中大的平行 β -折叠片是由多个 $\beta\alpha\beta$ 超二级结构组装而成的,组装后 β -折叠片的形状取决于相邻 β -链间氢键的排列式样。有的形成 β -圆桶(β -barrel)或称圆柱(cylinder),如丙糖磷酸异构酶(triose phosphate isomerase)和丙酮酸激酶结构域1(pyruvate kinase domain 1)的结构所示(图3-74A),它们的中心部分是平行的 β -链组成的内桶,周围由 α -螺旋链组成的外桶,内外桶紧挨在一起,中心空间只能容纳折叠片的疏水侧链。有的形成马鞍形(saddle shape),如乳酸脱氢酶结构域1(lactate dehydrogenase domain 1)和黄素氧还蛋白(flavodoxin)的结构所示(图3-74B),这里,马鞍形平行 β -折叠片的两侧各有一层 α -螺旋和环(loop)。

球状蛋白质中一个稳定的 α -螺旋组装方式是4- α -螺旋索(4- α -helical bundle)。在此排布中4个约等长的 α -螺旋依次与其最近邻的螺旋相连,螺旋索的横截面大体呈方形。如蚯蚓

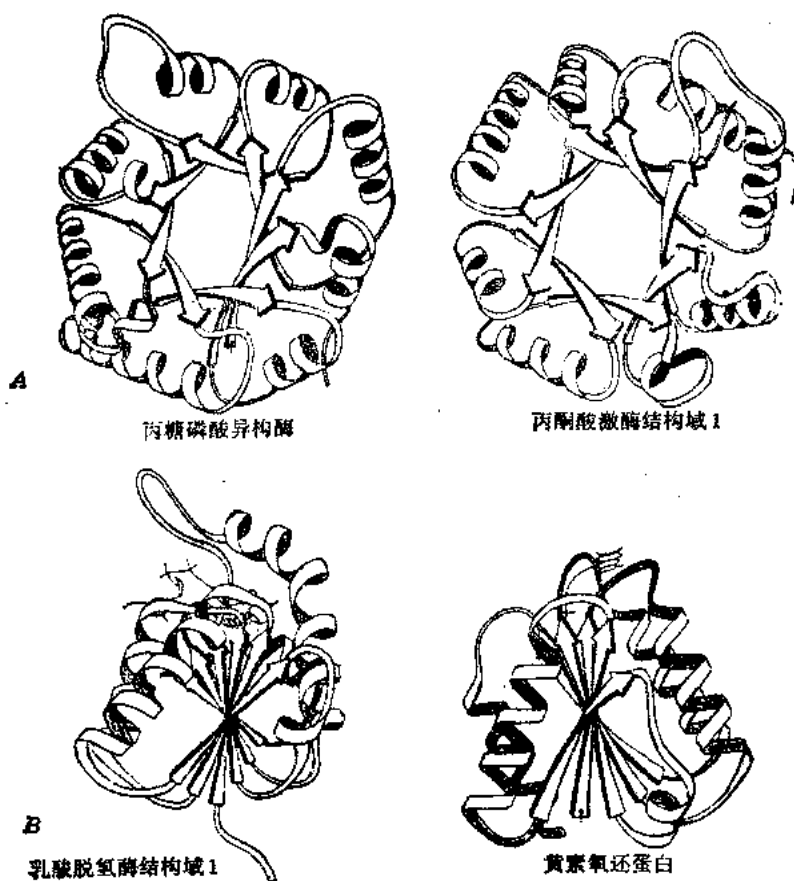


图3-74 在不同酶中成为骨架结构的平行式 β -折叠片
A. β -桶状结构; B. 马鞍形结构。

血红蛋白(hemerythrin)(一种含Fe的非血红素蛋白质)的结构所示(图3-75)。

上面介绍了结构域的一些组织式样。有时,一种蛋白质中的结构域彼此十分不同,例如木瓜蛋白酶(papain)中的两个结构域,但在有些蛋白质如硫氰酸酶(rhodanase)中结构域彼此极其相似。两个相似的结构域经常是二重对称轴的关系。一个亚基中两个结构域之间的紧密程度不一,有的两个结构域各自独立成球状实体,中间仅由一段柔性的肽链连接;有的相互间接触面宽而紧密,整个亚基的外表是一个平整的球面。此外还有一些中间类型也是常见的,例如磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase),整个亚基形状伸长,结构域之间有一裂沟。



二个铁原子
图3-75 蚯蚓血红蛋白的结构示出由四个 α -螺旋组成的常见结构域

五、肌红蛋白的结构与功能

(一)肌红蛋白的三级结构

肌红蛋白(myoglobin)是哺乳动物肌肉中储氧的蛋白质。

在潜水哺乳类如鲸、海豹和海豚的肌肉中肌红蛋白含量特别丰富,以致使它们的肌肉呈棕色。由于肌红蛋白储氧使这些动物能长时间潜在水下。肌红蛋白是由一条多肽链和一个血红素(heme)辅基构成,分子量为16700,含153个氨基酸残基。它和血红蛋白的亚基在氨基酸顺序上具有明显的同源性,它们的构象和功能也十分相似。

球状蛋白质的X-射线衍射图是极为复杂的,往往有几百、几千甚至几万个衍射点。分析球状蛋白质的晶体结构必须向待分析的蛋白质晶体中引进适当的重金属原子,以便得到同晶置换晶体。制备合适的同晶置换晶体是X-射线结构分析技术测定球状蛋白质晶体结构的关键性工作之一。

肌红蛋白的空间结构测定是由Kendrew及其同事们于1963年完成的。Kendrew等人测定的抹香鲸(sperm whale)肌红蛋白晶体的衍射图约有25000个衍射点(图3-76A),要求很多复杂的计算机运算。肌红蛋白的X-射线结晶学分析分三个阶段完成,第一个阶段的分析,分辨率为0.6nm,可以辨认出肌红蛋白分子的多肽主链的折叠和走向;第二阶段的分析,分辨率达到0.2nm水平,分子的侧链基团都能辨认出来;第三阶段,分辨率为0.14nm,所有氨基酸残基都能识别。观察到的残基顺序与化学分析得到的结果完全一致。

肌红蛋白分子呈扁平的棱形,分子大小为 $4.5 \times 3.5 \times 2.5$ nm。如图3-76B所示,分子中多肽主链由长短不等的8段直的 α -螺旋组成,最长的螺旋含23个残基,最短的7个残基,分子中几乎80%的氨基酸残基都处于 α -螺旋区内。这8段螺旋分别命名为A、B、C、……H。相应的非螺旋区肽段称为NA、AB、BC、……FG、GH、HC。这里N与最末的C字母表示N-和C-末端。因此各残基除了有一套从N-端开始计算的顺序号码外,还按在各螺旋段中的位置另外给出编号。如93位His又编为F8,表示该His在螺旋F的第8位置上。

8个螺旋段大体上组装成二层,构成肌红蛋白的单结构域。拐弯处 α -螺旋受到破坏,在这里有1—8个残基组成的松散肽链,在C-末端也有一段5残基的松散肽链。肌红蛋白中四个

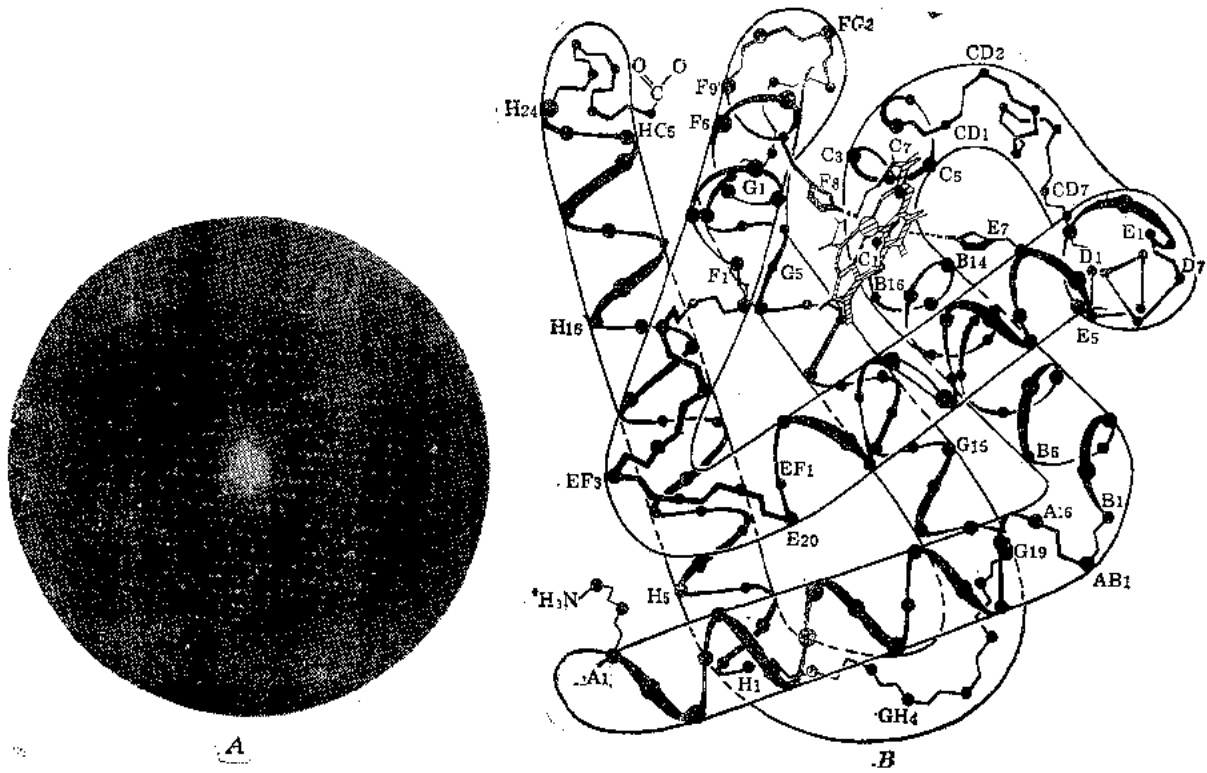
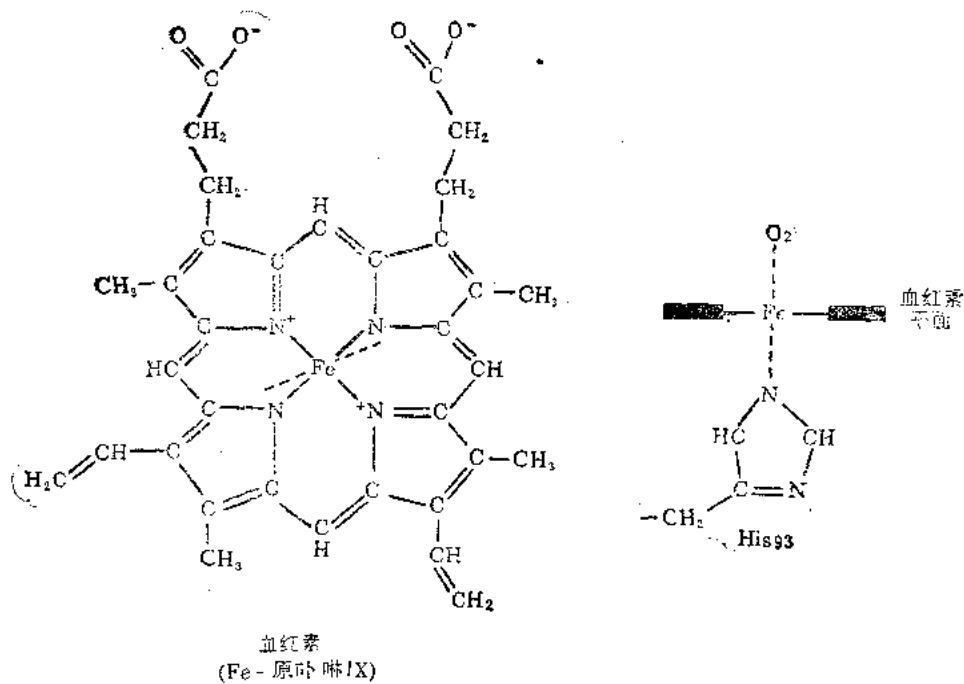


图 3-76 A. 抹香鲸肌红蛋白的 X-射线衍射图案; B. 肌红蛋白的三级结构(根据 0.2 nm 分辨率的资料分析所得的结构)

脯氨酸残基各自处在一个拐弯处;处在拐弯处的残基还有 Ser, Thr, Asn 和 Ile, 它们如果在肽链上连续紧挨排列, 则由于其侧链的形状或体积原因不利于形成 α -螺旋。肌红蛋白的整个分子显得十分致密结实, 分子内部只有一个能容纳 4 个水分子的空间。含亲水基团侧链的氨基酸残基几乎全部分布在分子的外表面, 疏水侧链的氨基酸残基几乎全部被埋在分子内部, 不与水接触。在分子表面的侧链亲水基团正好与水分子结合, 使肌红蛋白成为可溶性蛋白质。一些介于亲水和疏水之间的残基(Pro, Thr, Ser, Cys, Ala, Gly 和 Tyr)可以在球状蛋白质分子的内部和外表面找到。

平面的辅基血红素处在肌红蛋白分子表面的一个洞穴内。血红素或称铁卟啉(iron-porphyrin)也是血红蛋白和许多其他血红素蛋白质的辅基, 它是二价铁 Fe(II) 的螯合物, 由原卟啉 IX(proto-porphyrin IX)与一个 Fe(II) 离子所组成(图见下页)。

卟啉环中心的亚铁态铁原子有六个配位键, 四个与平面卟啉分子的 N 结合, 另外两个与卟啉面垂直, 其中一个(第 5 个配位键)与 93 位上的 His(F8)残基的咪唑环 N 结合; 另一个(第 6 个配位键)处于“开放”状态, 用作 O_2 的结合部位; 64 位 His(E7)就在它的附近, 中间的空隙正好容纳一个 O_2 分子。血红素与蛋白质结合后, 血红素中的 Fe(II) 能进行可逆氧合作用(oxygenation)。血红素中的铁原子如果处在水环境中就很容易被氧化成三价铁 Fe(III) , 并因此失去氧合能力。蛋白质正为血红素提供一个疏水洞穴, 避免 Fe(II) 原子发生氧化, 以保证血红素的氧合功能。一氧化碳能与氧竞争血红素中那个“开放”的配位键, 在这里 CO 的结合能力约比 O_2 大 200 倍。CO 中毒时, 血红蛋白包括肌红蛋白在内的大部分都以 CO-血红



蛋白和 CO-肌红蛋白的形式存在。

(二) 肌红蛋白的氧合曲线

肌红蛋白(Mb)与氧分子(O₂)结合的化学计量关系如下:



根据生物化学中的习惯,把氧合平衡,写成解离式, K 代表解离平衡常数,即

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]} \quad (2)$$

由于氧的浓度与氧分压(P_{O_2})成正比,可以将(2)式改写为:

$$K = \frac{[\text{Mb}]P_{\text{O}_2}}{[\text{MbO}_2]} \quad (3)$$

脱氧肌红蛋白和氧合肌红蛋白的浓度难于测定,因此设法引进一个新的参数 Y 以消去 $[\text{Mb}]$ 和 $[\text{MbO}_2]$ 两个参数。 Y 代表在给定的氧压下肌红蛋白的氧饱和度,即氧合肌红蛋白分子数占肌红蛋白分子总数的分数或百分数:

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]} \quad (4)$$

将(4)式代入(3)式得:

$$K = \frac{(1-Y)P_{\text{O}_2}}{Y} \quad \text{或} \quad Y = \frac{P_{\text{O}_2}}{K + P_{\text{O}_2}} \quad (5)$$

方程(5)中消去含肌红蛋白的任何项,肌红蛋白的氧饱和度 Y 只由解离常数 K 和氧分压 P_{O_2} 两项表达。如图 3-77 Δ 所示, Y 和 P_{O_2} 的关系为一双曲线,此双曲线的二条渐近线为 $Y=1$ 和 $P_{\text{O}_2} = -K$ 。

当 $Y=1$ 时,所有肌红蛋白的氧合位置(血红素)均被占据,即肌红蛋白为氧所饱和。当

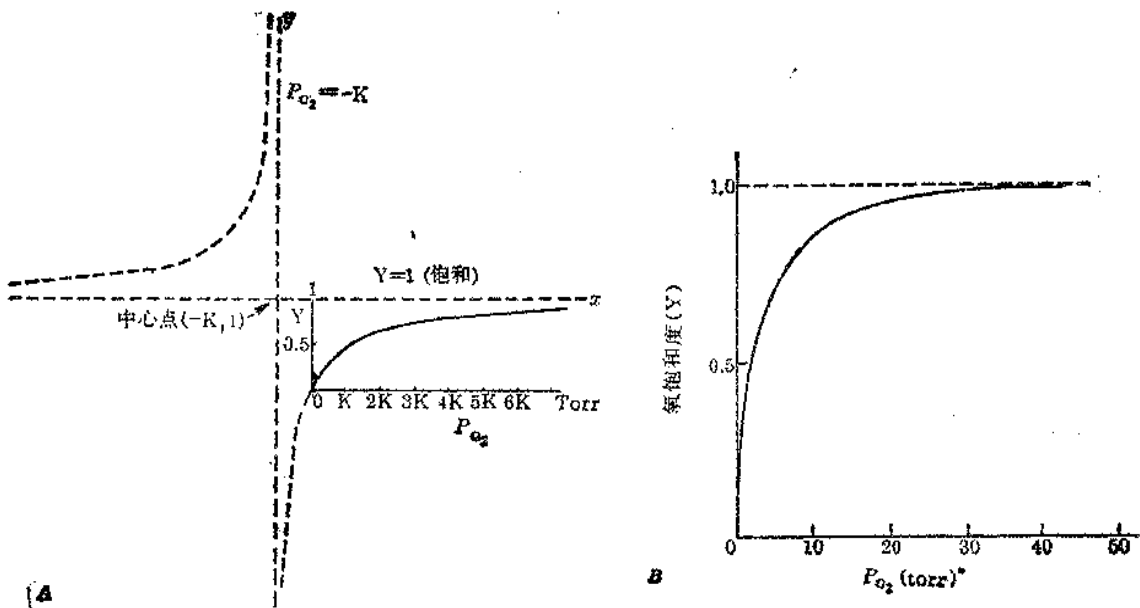


图 3-77 肌红蛋白的氧合曲线。A. 示双曲线形氧合曲线，B. 实验测得的氧合曲线即 A 图中的实线部分。

* torr 为压力单位，1 torr 等于在 0°C 和标准重力下 1 mmHg 柱高所加的压力即 torr=1 mmHg。torr 是以水银压力计的发明者 Evangelista Torricelli (1608—1647) 命名的。

$Y=0.5$ ，肌红蛋白的一半被饱和，此时的 $P_{O_2}=K$ ，解离常数 K 常被称为 P_{50} ，即肌红蛋白一半被饱和时的氧压。方程(5)如用图中的 x, y 新坐标表示即转换成：

$$xy = -K$$

这个方程是大家熟知的，其图形是以坐标轴为渐近线的等边双曲线。

由于当氧压高时 Y 逐渐趋近于 1，因此实验上用双曲线方程作图求 Y 和 K 值是不方便的。通常把它线性化，将方程(5)改写为：

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{P_{O_2}}{K} \quad (6)$$

方程(6)的两边各取对数得：

$$\log \frac{Y}{1-Y} = \log P_{O_2} - \log K \quad (7)$$

$\log \frac{Y}{1-Y}$ 对 $\log P_{O_2}$ 作图得一直线，称 Hill 曲线；斜率称 Hill 系数，为

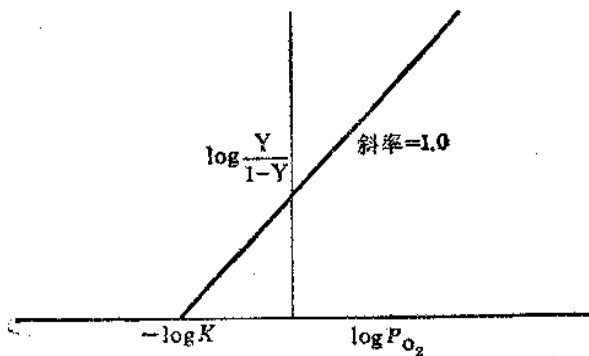


图 3-78 肌红蛋白氧合过程的 Hill 曲线

1.0；在 $\log P_{O_2}$ 轴上的截距为 $-\log K$ (图 3-78)。当 $\log \frac{Y}{1-Y} = 0$ 时， $\log K = \log P_{O_2}$ ，即 $K = P_{O_2} = P_{50}$ 。Hill 系数为 1.0，蛋白质或是只含一个结合位点，或是含有多个结合位点，而这些结合位点彼此完全独立并有相同的 K 值。Hill 系数不等于 1.0，表明蛋白质多于一个结合位点，并且各位点彼此有相互作用。

六、胰岛素的结构与功能

胰岛素的空间结构研究很早就受到人们的重视。我国科学工作者于1967年,成功地制备了几个质量较好的含汞、含铅胰岛素重原子衍生物,解决了测定胰岛素晶体结构的一个关键问题。1971年后相继完成了分辨率为0.25nm, 0.18nm至0.12nm的猪胰岛素晶体结构分析工作。

图3-79是我国测定绘制的猪胰岛素空间结构示意图。从图中可以看到, A链(21个残基)中A12—A15是一个非标准的右手螺旋,其他残基为不同伸展程度的肽链构象; B链(30个残基)中B1—B6是伸展的折叠肽链。B8是Gly, 肽链在这里发生转折, 然后进入螺旋构象。B9—B19是右手螺旋, 其中两圈是标准的 α -螺旋, B12—B23肽链呈现U形转折(β -转角), B23—B27为一段伸展的 β -构象。在整个B链中, B9—B19螺旋段构成肽链的基本骨架。

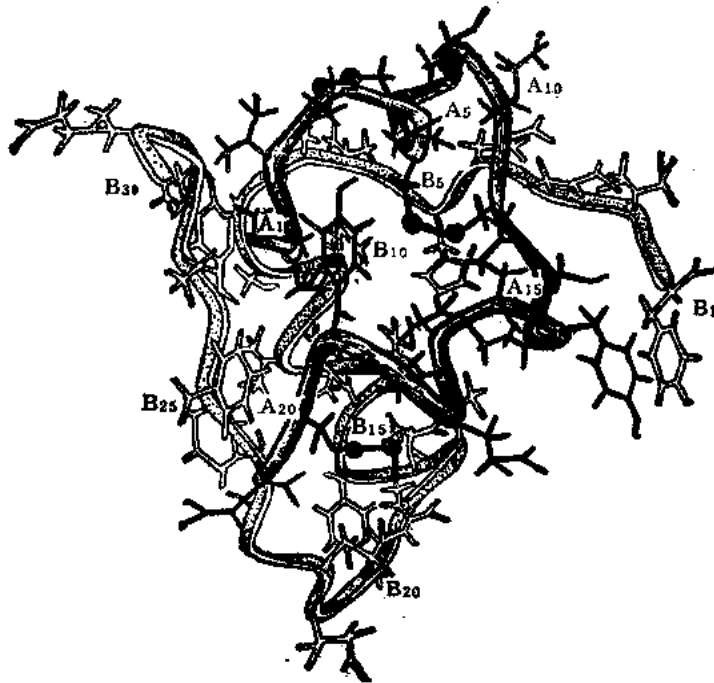


图3-79 猪胰岛素空间结构示意图

胰岛素分子内部, 由非极性侧链占据形成一个疏水核, 它对稳定胰岛素分子的构象起重要作用。全部极性侧链分布在分子外表面。据推测, 胰岛素分子与受体的结合可能主要发生在分子的一个表面上。这个表面由二个部分组成, 一个是具有相当面积的疏水区, 一个是分散于疏水区周围的一些携带电荷的或极性的基团(图3-80)。疏水区是这个表面的主体, 其中的芳香环十分重要, 它们除承担疏水相互作用外, 很可能还有一些其他作用, 如识别受体以及结合过程中和结合后诱发受体分子的构象变化等。很多实验表明, 其他基团或主链部分的变换只要这个疏水表面仍能维持 1.5nm^2 左右, 则不会过于严重影响胰岛素分子受体的相互作用。这个疏水表面就其区域的整体性来说在空间结构上具有很大的保守性。

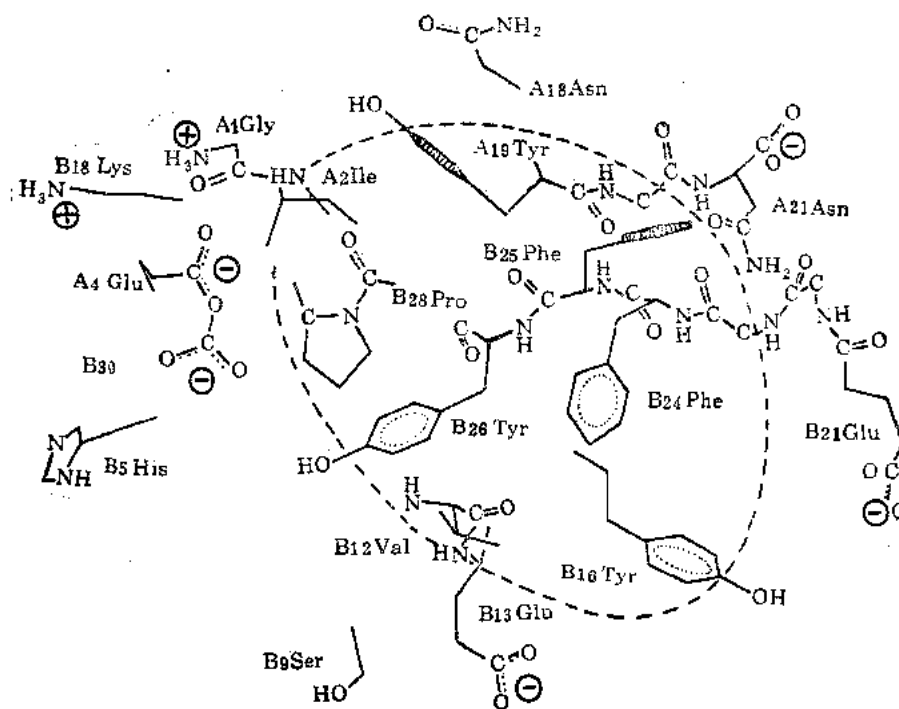


图 3-80 胰岛素分子中可能与其受体结合的一个表面
虚线包含部分为疏水区域,周围分散着一些极性基团。

特别有趣的是在此保守的疏水表面上, B25 Phe 被 Leu 取代(在天然的 Chicago 变异胰岛素中)或被 Ser 取代(在半合成的 [B25Ser] 胰岛素中)虽然构象变化不大,但使分子的生物活力严重丧失,降低到 1% 左右;而 B24 Phe 无论为 Leu(半合成的 [B24Leu] 胰岛素中)还是为 Ser(在天然的 Los Angeles 变异胰岛素中)所取代,总可维持 20% 左右的生物活力。这可能是因为 B25 Phe 在胰岛素分子的局部构象中有很大的柔性(flexibility)的缘故。因此它的芳香侧链被烷基取代对周围构象无明显影响,但苯环共轭平面上的 π 电子云的丢失则可能影响整个分子识别受体分子以及与受体结合后的构象变化和相互作用,所以生物活性几乎丧失。而 B24 Phe 的构象可能是十分保守的,因而它的苯环被取代后,显然会影响疏水表面的结构,并致使与受体结合能力丧失 70—80%。

生物大分子结构的可变性或称柔性和它的结构的精确性或称刚性是保证生物大分子行使其特有生物功能的两个既对立又统一的性质。胰岛素和它的受体也是如此。结构的刚性是它们相互识别和结合的基础,而结构的柔性则允许并保证它们在结合过程中和结合后发生各种需要的构象变化。胰岛素分子的 B29—30 的主链可以发生较大的移动而使分子疏水内核的某些疏水基团外露以形成足够的疏水表面。疏水表面的一些非极性侧链基团的位置可能会作适当的调整,如芳香环共轭平面可以转向与疏水表面平行,以提供更充分的疏水接触,也可以转到与受体的结合面上某些芳香环的共轭平面相平行的方向,以实现一些特殊的相互作用。疏水表面周围的一些极性基团如 B13 Glu, B29 Lys, A4 Glu 等也会发生较大的构象变化,以满足与受体之间的极性相互作用。1972 年以后的相当长一段时期内,曾观察到胰岛素与受体(receptor)结合和它的生物活性有平行的关系。

1977年第一次发现某些胰岛素与受体结合和它的生物活性不一致的异常现象。这一矛盾的发现迫使人们对过去的认识作重新考虑。胰岛素发挥生物功能首先是与靶细胞膜上的受体结合,然后启动一系列从分子水平到细胞水平的生物化学变化,最后产生特定的生物效应。

七、球状蛋白质的聚集体

(一)有关四级结构的一些概念

很多蛋白质是以三级结构的球状蛋白质的聚集体(aggregate)形式存在的。这些球状蛋白质通过非共价键彼此缔合在一起。这样的聚集体称为蛋白质的四级结构。四级结构的蛋白质(quaternary protein)中每个球状蛋白质称为亚基或亚单位(subunit)。亚基一般只是一条多肽链,但有的亚基由二条或多条多肽链组成,这些多肽链相互间以二硫键相连。有时亚基也称为单体(monomer)。由二个亚基组成的称为二(聚)体蛋白质,由四个亚基组成的称四(聚)体蛋白质,由二个或多个亚基组成的蛋白质统称寡聚蛋白质或多体蛋白质(multimeric protein)。无四级结构的蛋白质如溶菌酶、肌红蛋白等称为单体蛋白质。对称的寡聚蛋白质分子是由二个或多个不对称的等同结构成分组成的,这种等同结构成分被称为原体(protomer)。原体一般就是亚基,但是原体可以是二个或多个亚基的聚集体,例如血红蛋白分子是由二个原体组成的对称二体。其中每个原体是由 α 亚基(一条 α 珠蛋白链)和 β 亚基(一条 β 珠蛋白链)所构成的聚集体($\alpha\beta$)。这里把原体看作单体,所以称血红蛋白为二体。如果以亚基为单体,血红蛋白则称为四体。

在生物分子缔合的研究中亚基、单体、原体和分子这几个词,目前尚无严格的含义,它们都是一词多义,有时它们等同,有时各异。多数人认为分子是一个完整的独立功能单位。例如作为四聚体的血红蛋白才具有输氧及其他功能,而它的任一亚基(α 链或 β 链)或原体($\alpha\beta$ 聚集体)都不具有这种功能,因此对血红蛋白来说,四体是它的分子。寡聚蛋白质分子是亚基(不是独立的功能单位)的聚集体。

胰岛素(Ins)也可以发生缔合,生成二体和六体。然而,胰岛素的功能单位是单体,因此对胰岛素来说,单体是它的分子。二体和六体是蛋白质分子的聚集体。

蛋白质的四级结构涉及亚基的种类和数目以及各亚基或原体在整个分子中的空间排布包括亚基间的接触位点(结构互补)和相互作用(非共价作用力)。大多数寡聚蛋白质的亚基数目为偶数,个别的为奇数,例如萤火虫荧光素酶(luciferase)分子含三个亚基。蛋白质分子亚基的种类一般是一种或二种。由亚基或单体缔合成聚集体原则上也和由结构域折叠成单体构象一样,是一个自发的也就是熵驱动的过程。

(二)四级结构的对称性

亚基在蛋白质分子中的空间排布问题是四级结构研究的重要内容。根据X-射线结构分析和电子显微镜的观察,多数寡聚蛋白质分子其亚基的排列是对称的。对称性是四级结构蛋白质分子的最重要的性质之一。

任何物体旋转 360° 都能使它复原。只有旋转 360° 才能复原的物体称为不对称物体。所有亚基和单体蛋白质分子都是不对称的。由各不相同的亚基构成的蛋白质分子也是不对称

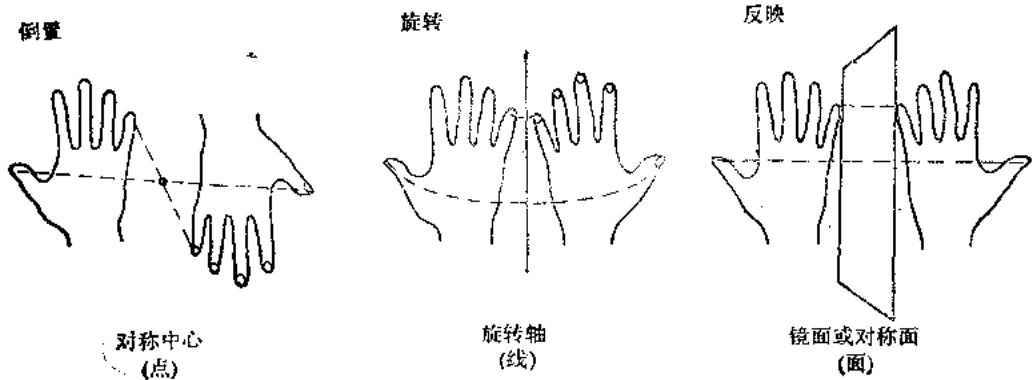


图 3-81 三种对称动作

的。对称性是那些含有二个或二个以上原体的聚集体的性质。

所谓对称就是物体等同部分有规律的重复。能使对称物体复原的操作称为对称动作 (symmetry operation) (图 3-81)。例如, 旋转动作 (rotation operation), 一个正三角形旋转

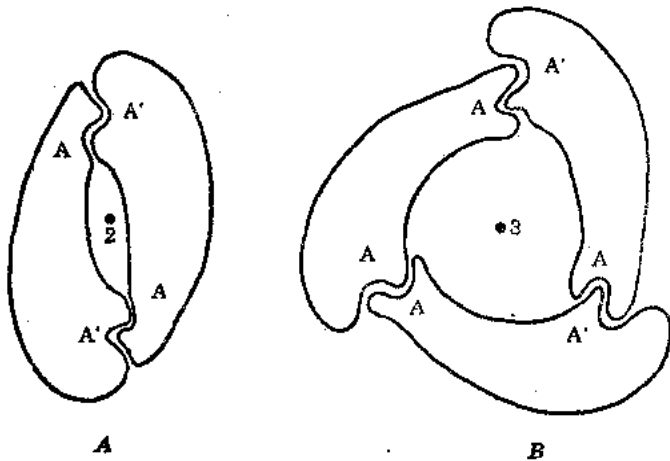


图 3-82 具有 2-重(A)和 3-重(B)旋转轴对称的聚集体

120° 能使它复原。又如反映动作 (reflection operation), 我们的左右手通过镜面反映能复原。进行对称动作所依据的几何元素(点、线、面)称为对称元素 (symmetry element), 例如进行旋转动作时的旋转轴(线), 作镜面反映时的对称面(平面), 以及作倒置动作 (inversion operation) 时的对称中心(点)等。

聚集体的对称性质可以通过对称动作予以确定。根据旋转轴、镜

面和对称中心等几种对称元素及其相应的对称动作可以确定几乎所有的聚集体结构的对称性质。但与蛋白质聚集体结构有关的对称元素只有旋转轴。其他几种对称元素在蛋白质聚集体中不可能存在, 因为它们都要求聚集体中存在单体的对映体, 而蛋白质分子是手性分子。旋转轴是对称寡聚蛋白质唯一可能存在的对称元素。进行旋转动作时, 旋转轴不动, 物体中每个点都绕轴线旋转一定角度。能使物体复原的最小旋转角(α)称基转角。 $\frac{2\pi}{\alpha} = n$, n 是旋转轴的轴次 (fold), 它是 2、3、4... 整数。相应的旋转轴称 n 重(旋转)轴, 图 3-82 示出一个 2-重轴聚集体和 3-重轴聚集体。

如果一个物体的所有对称元素都相交于一个不为任何对称动作所改变的固定点上, 则称该物体具有点群对称 (point group symmetry)。大多数四级结构蛋白质都具有这种类型的对称。最简单的点群对称是环状对称 (cyclic symmetry), 它存在于只有一个旋转轴的寡聚蛋白质中。环状点群对称用 c_n 表示, n 是轴次, 例如血红蛋白(含 2 个原体)具有 c_2 (2-重轴环状) 对称, 醛缩酶(含 3 个原体)具有 c_3 (3-重轴环状) 对称(图 3-82)。

如果寡聚蛋白质含有一个 c_n 旋转轴, 而且垂直于 c_n 轴的方向上还有 c_2 轴, 则必然存在着 n 个这样的 c_2 轴。含有这样一组旋转轴的分子称它为二面体 (dihedral) 点群对称分子, 用 D_n 表示, n 是 c_n 的轴次。例如, lac 阻遏蛋白, 含 4 个原体, 成正四面体排布, 呈 D_2 二面体对称, 具有 3 个 2-重轴, 一个纵轴二个横轴; 天冬氨酸转氨酰酶 (aspartate transcarbamylase), 由 6 个原体构成, 每三个原体组成一个具有 3-重对称的环, 两个这种环背靠背相叠, 见图 3-83, 如图所示 D_3 对称聚集体有一个 3-重轴和 3 个 2-重轴。二面体对称的聚集体可以看成是两个具有简单环状对称的等同小聚集体背靠背的缔合物。

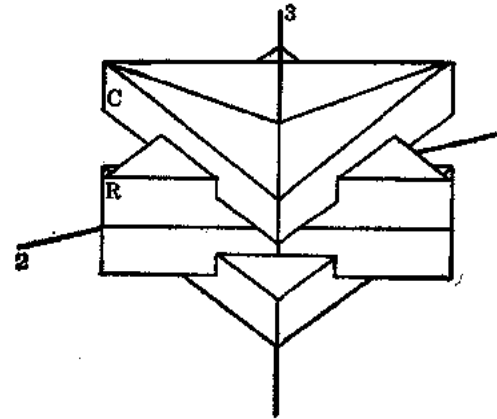


图 3-83 天冬氨酸转氨酰酶的 D_3 二面体点群对称, 图中每类旋转轴示出一个。其原体由一个催化亚基 C 和一个调节亚基 R 组成。

寡聚蛋白质除环状点群对称和二面体点群对称外, 还有立方体 (cubic) 点群对称, 如八面体 (octahedral) (O) 对称和二十面体 (icosahedral) (I) 对称 (图 3-84) 等。立方体点群对称的聚集体都具有立方体的四个 3-重旋转轴, 这些轴是立方体的对角线。二十面体对称的分子聚集体可以成为一个中空外壳, 用来包装多种病毒的遗传物质。

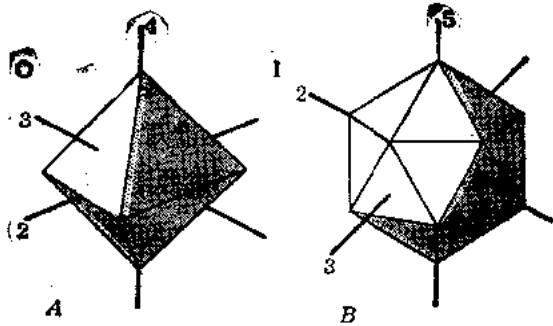


图 3-84 立方体点群对称。A. 八面体对称 (O), B. 二十面体对称 (I)。图中每一类对称轴示出一个代表。

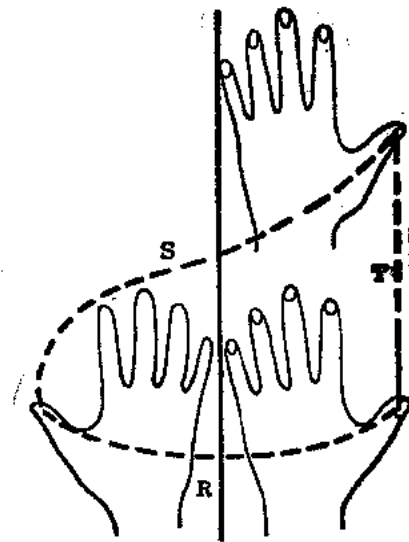


图 3-85 旋转 (R), 平移 (T) 和螺旋 (S) 之间的关系

上面谈到的以对称轴为对称元素通过旋转动作即可完全复原的聚集体, 其原体的排列是首尾相连的封闭环。某些蛋白质分子聚集体中虽然也是以对称轴为对称元素, 但是必需通过旋转加平移 (沿轴向) 对称动作才能复原, 旋转加平移 (或平移加旋转) 的联合动作就是螺旋旋转动作 (spiral operation) (图 3-85)。在螺旋旋转对称的聚集体中, 其原体排列是首尾相连的末端开口链。对于这类聚集体, 螺旋对称是以每圈的原体数目 (不必是整数的), 每周沿轴的距离 (螺距) 和手性来描述。烟草花叶病毒 (TMV) 是第一个被描述的螺旋分子聚集体, 每圈 16.3 个原体, 螺距为 2.3 nm, 为右手螺旋。F-肌动蛋白分子也是螺旋对称的聚集体, 由二条螺旋链构成, 它的亚基是 G-肌动蛋白分子 (图 3-68)。

第一大类的四级结构蛋白质是由二个相同的亚基组成的。这些蛋白质具有 C_2 对称。也有不少四级结构蛋白质是由二个不同的亚基组成的，这些蛋白质不会有对称元素。第二大类的四级结构蛋白质是四聚体。具有环状对称的四聚体只可能有两种结构类型：一种是正正方形，原体的排列是 C_4 对称，一种是正四面体，原体排列是 D_2 对称。大多数四聚体被发现是 D_2 对称的。

(三) 寡聚蛋白质与别构效应

细胞维持正常的活动要求有复杂精细的调节系统。一类称为别构蛋白质(allosteric protein)或称调节蛋白质(regulatory protein)的就是细胞内的最简单的调节成分。别构(或译变构)一词来自希腊文 allos(其他)和 stereos(部位或空位)。它的原义是指蛋白质分子不止有一个配基(ligand)的结合部位,除活性部位外还有别的配基的结合部位(别构部位)。

别构蛋白质具有别构效应(allosteric effect)。别构效应是指蛋白质与配基结合改变蛋白质的构象,进而改变蛋白质的生物活性的现象。

别构蛋白质都是寡聚蛋白质。分子中每个亚基都有活性部位(active site)或者还有别构部位(allosteric site)或称调节部位(regulatory site)。有些别构蛋白质,如天冬氨酸转氨甲酰酶,活性部位和别构部位分属不同的亚基(图 3-83)。单体蛋白质如肌红蛋白只含一个配基(例如 O_2)的结合部位,即活性部位,因此分子内部不存在活性部位之间的相互作用。这类蛋白质的配基结合曲线是一种双曲线(图 3-77)。然而别构蛋白质与此相反,一个分子至少含有二个活性部位或者还有别构部位,各部位之间存在着相互作用,一个部位上发生的过程对分子内的其他活性部位上发生的过程会产生影响。部位之间的影响是通过构象变化传递的,这种构象变化可以从一个原体传递给另一个原体,并能引起协同的相互作用(cooperative interaction)。如果相互之间发生作用的部位是相同的,即都是活性部位,则产生所谓同位或同种效应(homotropic effect),同位效应是指别构蛋白质与一种配基的结合对于和同种配基的结合能力的影响。这种影响一般是促进结合能力的加强,也即第一个配基的结合引起第二个、第三个……配基更容易结合。这样的同位效应称为正协同效应(positive cooperativity),正协同效应表现为 S 形配基结合曲线(图 3-93)。如果第一个配基的结合导致第二个、第三个……配基更难结合,这样的同位效应称为负协同效应(negative cooperativity),它产生的不是 S 形曲线。如果蛋白质分子中,相互之间发生作用的部位是不同的,也即活性部位上所发生的过程将受到别构部位与效应物结合的影响,这种影响称为异位或异种(heterotropic)效应,有人称它为“别构效应”,因为这种效应才符合“别构”的原义。如果别构效应物是降低为使活性部位达到饱和所需的配基(如酶的底物)浓度,则称它为正效应物或活化剂(activator)。如果是增加为使活性部位达到饱和所需的配基浓度,则称它为负效应物或抑制剂(inhibitor)。效应物不是别构蛋白质活性的开关,但类似于一种调光器。这种类型的调节几乎不耗费能量。别构效应物是细胞代谢库内的成分,其浓度的细微变化可以立即调节代谢的需求。

应该强调指出,别构蛋白质不管是否存在别构部位,活性部位之间的同位效应总是存在的。同位效应是别构效应的基础,异位效应可以看成是对同位效应的一种“修饰”。

八、血红蛋白的结构与功能

(一) 血红蛋白的结构

血红蛋白是一种寡聚蛋白质,由四个亚基组成。成人的红细胞中含有两种血红蛋白(Hb),一种是HbA,占血红蛋白总量的96%以上;另一种是HbA₂,占血红蛋白总量的2%左右。胎儿的红细胞中含有另外一种血红蛋白称HbF。这三种血红蛋白的亚基组成如下: HbA: $\alpha_2\beta_2$; HbA₂: $\alpha_2\delta_2$; HbF: $\alpha_2\gamma_2$ 。这三种血红蛋白分子都有2个共同的 α 亚基(141个残基)。 β 、 γ 和 δ 亚基,它们的氨基酸顺序也十分相似;并且有着共同的链长(146个残基)。

根据X-射线晶体结构分析揭示,血红蛋白分子接近于一个球体,直径5.5nm。四个亚基(二个 α 链和二个 β 链)占据相当于四面体的四个角,整个分子形成 c_2 点群对称。血红素辅基位于分子表面的空穴里,每个亚基一个。4个氧的结合部位彼此保持一定距离,两个最近的铁原子之间的距离为2.5nm。每个 α 链与每个 β 链接触,而两个 α 链或两个 β 链之间却很少有相互作用。

血红蛋白的 α 链和 β 链的三级结构与肌红蛋白的三级结构非常相似(图3-76,图3-86)。它们的主链能折叠得这样相似,这是未曾预料到的,因为这三种多肽链的氨基酸顺序有很大的不同。实际上,141个氨基酸残基位置中只有20多个位置的顺序对于三种肽链是一样的(图3-40)。这表明了,似乎十分不同的氨基酸顺序也能够规定出非常相似的三维结构。

比较了20多种不同的(从七鳃鳗到人)血红蛋白的氨基酸顺序,证明顺序中确有许多位置

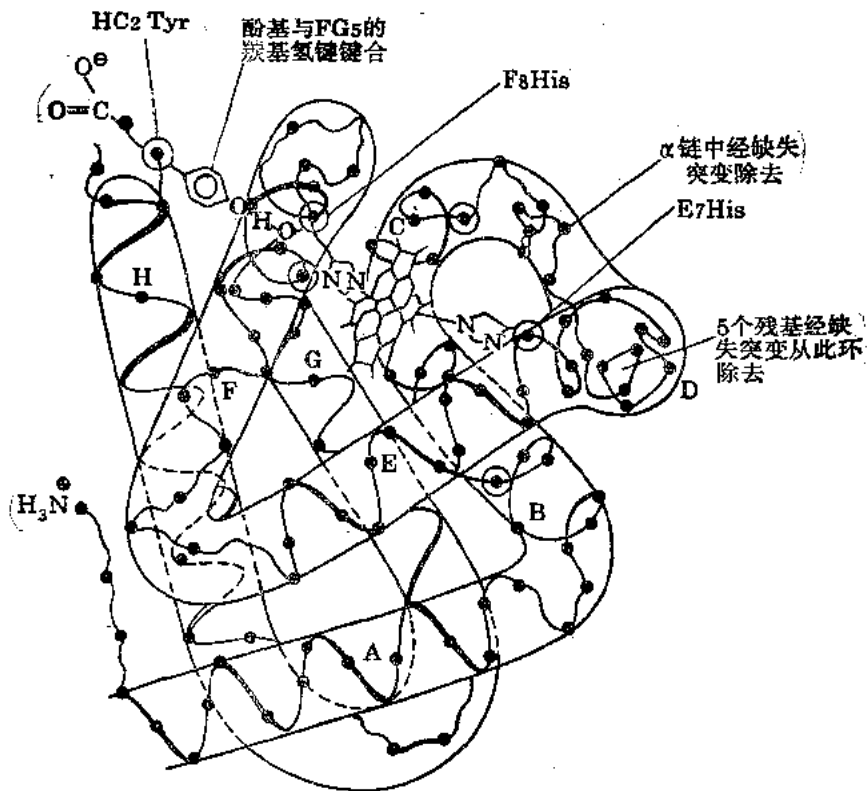


图3-86 脱氧血红蛋白 β -亚基的三级结构, α -亚基和肌红蛋白的三级结构与此极其相似

上的残基是可以被调换的。但是在顺序中有 9 个位置几乎对所有研究过的种属来说各含相同的氨基酸。这些保守位置对血红蛋白分子的功能有着特殊重要的意义。其中有几个直接参与氧合部位。F8 His(α 亚基中的 87 位或 β 亚基中的 92 位)在血红素的一侧与它的第 5 个配位键结合; E7 His 在血红素平面的另一侧,紧靠第 6 个配位键,中间仅留一个氧的结合位置; CD1 Phe 和 F4 Leu 与血红素分子接触。另一个保守残基是 HC2 Tyr,它通过在 H 和 F 螺旋之间形成一个氢键以稳定分子。B6 Gly 也是一个保守残基,这可能是由于它的体积小,因为大于氢原子的侧链将不允许 B 和 E 螺旋彼此接近得象原来这样紧密。C2 Pro 也很重要,因为它能引起 C 螺旋的终止。

血红蛋白内部非极性残基的位置变化相当大。但是这种变化只是一种疏水残基被换成另一种疏水残基(例如丙氨酸换成异亮氨酸)而已。因此,分子内部的疏水特性总是被保留下来。在讨论肌红蛋白时曾谈到,血红素的可逆氧合作用(Fe^{2+} 的价态应不变)有赖于一个非极性的微环境,因为处于这种环境可以避免与水接触,防止 Fe(II) 被氧化成 Fe(III) 。如果 Fe(II) 变成 Fe(III) ,血红蛋白便成高铁血红蛋白(ferrihemoglobin)或称氧化血红蛋白,以 HbM 表示。高铁血红蛋白无载氧功能。此外血红蛋白的疏水核对稳定它的三维结构也是十分重要的。

(二)氧合引起的血红蛋白构象变化

虽然血红蛋白的亚基(α 链和 β 链)与肌红蛋白在三级结构的安排上极为相似,这反映在它们的功能上的相似性;都能进行可逆的氧合作用,但是血红蛋白是一个四聚体,它的整个结构要比肌红蛋白复杂得多,并且出现了肌红蛋白所没有的新功能,也即除输氧之外还能运输 H^+ 和 CO_2 。此外,血红蛋白与氧的结合受到环境中其他分子的调节,如 H^+ 、 CO_2 和有机磷酸化合物。这些分子极大地影响血红蛋白的氧合性质,虽然它们在蛋白质分子上的结合部位离血红素很远。这种在空间上相隔的部位之间的相互作用在很多蛋白质中都存在,这就是别构效应。别构效应在生物系统分子过程的调控中起着关键作用。血红蛋白是至今了解最清楚的一个别构蛋白质。

在脱氧血红蛋白中,四个亚基是通过如图 3-87 所示的盐桥互相联接起来的。在二个 β 亚

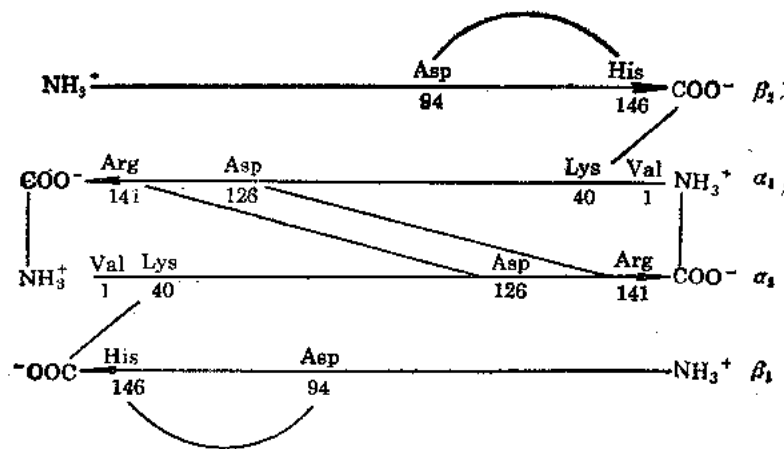
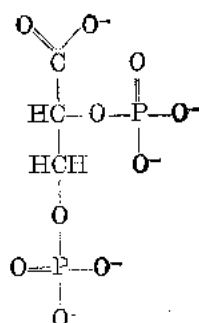


图 3-87 脱氧血红蛋白中不同亚基间的交联键(盐桥)。

基之间,夹着一分子的 DPG(2, 3-diphosphoglyceric acid)。DPG 分子的化学结构如下图所示:



2, 3-二磷酸甘油酸

DPG 分子中的三个负电荷基团与每个 β 亚基的三个正电荷基团[1 位 Val(NA1) 的 α -NH $_3^+$, 82 位 Lys(EF6) 的 ϵ -NH $_3^+$ 和 143 位 His(H21) 的咪唑基]互相吸引,共生成六个盐桥。此外,每个 β -亚基中还各有一个盐桥,即 C-末端 His 的咪唑基与 94 位 Asp(FG1) 的 β -COO $^-$ 基之间生成的盐桥。

由于上述这些盐桥的作用,使脱氧血红蛋白分子的构象受到很大的束缚,致使它对氧的亲合力远低于单独的 α 链、 β 链或肌红蛋白对氧的亲合力。PGC 分子的插入,使脱氧血红蛋白分子的四级结构更加固定,因而进一步降低了对氧的亲合力。

血红蛋白与氧结合时,其四级结构将发生相当剧烈的变化。上述四对联接亚基的盐桥被断裂,DPG 被排出血红蛋白分子,亚基间的相对位置发生改变。血红蛋白分子可以看成是 $\alpha\beta$ 二聚体的二聚体。如果设想一个二聚体被固定不动,那末发生构象转换 (conformational transition) 时,另一个二聚体将绕一个偏心轴 (off-center axis) 旋转 15° 。这时在两个 $\alpha\beta$ 二聚体的界面处某些原子将移动 0.6 nm 左右。旋转运动如图 3-88 所示。旋转的同时沿轴滑动 0.08 nm。氧合时, $\alpha_1\beta_1$ (或 $\alpha_2\beta_2$) 接触区 (contact region) 结构变化很小,但 $\alpha_1\beta_2$ (或 $\alpha_2\beta_1$) 接触区变化很大。 $\alpha_1\beta_2$ (或 $\alpha_2\beta_1$) 接触区的界面是一种燕尾形结构 (dove-tailed construction) (图 3-89),它允许两个亚基能够彼此迅速滑动,起着脱氧和氧合两种构象的转换开关作用。氧合后,两个 β 亚基彼此更加靠拢,它们的铁原子之间的距离由原来的 3.99 nm 减至 3.34 nm。这时脱氧血红蛋白转变为氧合血红蛋白,即血红蛋白由 T 态转变为 R 态。T 态即紧张态 (tense state),R 态即松弛态 (relaxed state)。T 态和 R 态通常用于描述别构蛋白质的两种能互变的四级结构。T 态是对底物亲合力低的构象。

氧合时血红蛋白的四级结构发生如此剧烈变化的问题已经成为很多人研究的课题,但至今仍未得到完全解决。氧合时发生的四级结构的变化可分为电子效应和空间效应两个方面。电子效应是由于 Fe(II) 原子的价电子层的电子构型变化引起的。脱氧血红蛋白中铁的配位数是 5,其中四个来自卟啉环的 N,另一个来自近侧组氨酸(F8)的第 3 位 N。此时配位场较弱,Fe(II) 与卟啉环的四个 N 是通过电价配位键连接的。Fe(II) 采取高自旋 (high-spin) 结构,具有 4 个不成对电子,分布在四个轨道,因此原子半径较大,突出在卟啉环平面的中央孔穴之外,与卟啉环平面保持 0.06 nm 的距离。

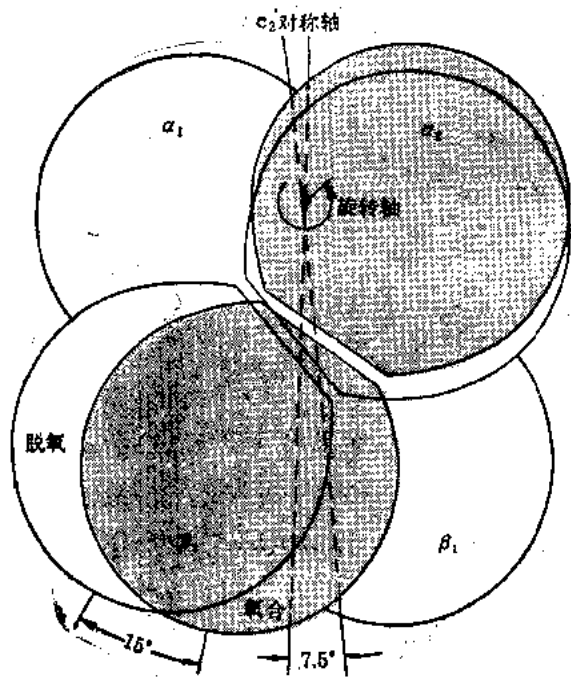


图3-88 血红蛋白四级结构的旋转变
氧合时一个二聚体相对于另一个二聚体旋转15°，
C₂对称轴自身倾斜7.5°。

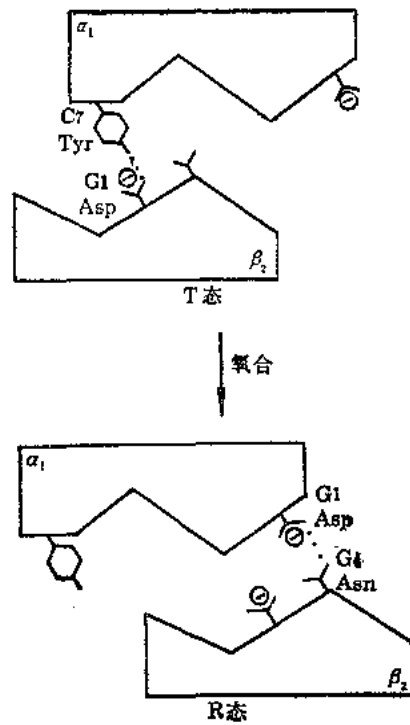


图3-89 血红蛋白四级结构的滑动变化
氧合时 α_1 和 β_2 链彼此滑动并更
换氢键的供受体。

血红蛋白氧合后，铁的配位数为6，O₂成为第6个配位体。分子氧使总配位场增强，此时

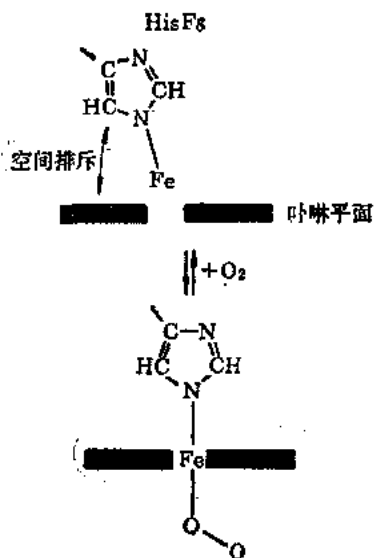


图3-90 氧合时铁原子进入
血红素平面

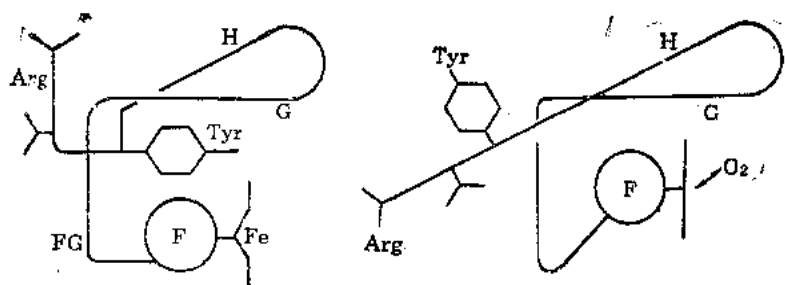
近侧组氨酸(F8)与铁原子一起被牵拉并使His的倾斜度减小铁原子离开平面是由于咪唑环的C原子和血红素的N原子之间的空间排斥引起的。

Fe(II)是通过共价配位键与卟啉环N结合的。Fe(II)采取低自旋(low-spin)结构，4个不成对电子被挤到二个轨道内，原子直径比脱氧时缩小，于是能进入卟啉环平面的中央孔穴，移动0.06 nm 距离(图3-90)。这一移动通过与铁原子络合的近侧组氨酸(F8)残基牵动了该残基所在的多肽链，进而影响亚基之间的相互接触，以致于整个分子的四级结构。Fe原子的移位，导致HC2Tyr袋穴(由螺旋F和H所构成)的缩小，并把HC2Tyr挤出袋穴之外(图3-91)。HC2Tyr的移动，拉断了维系脱氧血红蛋白四级结构的某些盐键。同时 β 亚基之间的空隙变窄，挤出DPG分子。盐桥的断裂，也引起 β 亚基的构象变化，从而排除了E11Val(67位)侧链对O₂结合部位的空间阻碍，使 β 亚基能顺利与O₂结合。

(三) 血红蛋白的氧合曲线

血红蛋白的氧饱和度(Y)定义为：

$$Y = \frac{\text{血红蛋白中被占的氧合部位}}{\text{血红蛋白中氧合部位总数}}$$



脱氧血红蛋白 氧合血红蛋白
图 3-91 氧合时血红蛋白中亚基构象变化的图解。

Y 值从 0 到 1 (100%)。Y=0, 表示所有氧合部位空着, Y=1, 表示所有部位被 O₂ 占据。Y 对 P_{O₂} 所作的图称氧合曲线、氧饱和曲线或氧解离曲线。作为单体蛋白质的肌红蛋白, 它的氧合曲线为双曲线(图 3-77, 3-92), 但作为寡聚蛋白质的血红蛋白, 氧合曲线是 S 形曲线 (sigmoidal curve) (图 3-92, 3-93)。在给定的氧压下, 肌红蛋白的 Y 值都比血红蛋白的高。P₅₀ (即 Y=0.5 时的氧分压) 可用作氧亲和力的指标。肌红蛋白 P₅₀=1 torr, 血红蛋白 P₅₀=26 torr (图 3-93)。

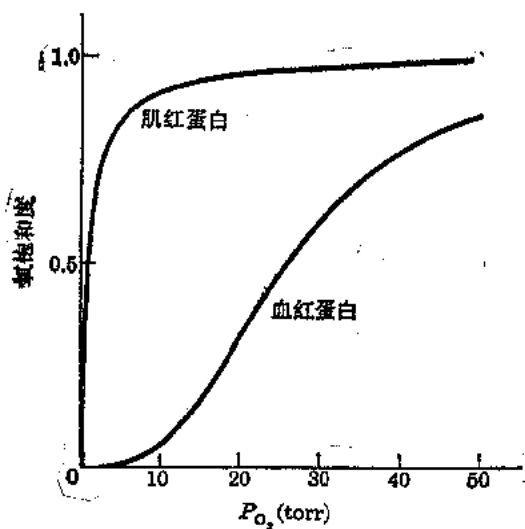


图 3-92 肌红蛋白和血红蛋白的氧合曲线的比较

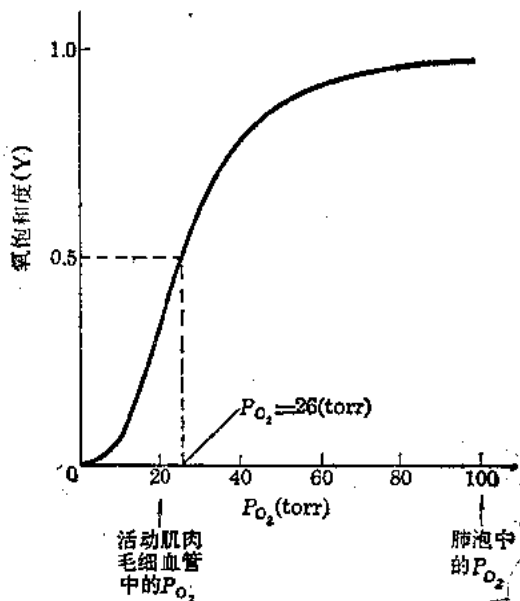


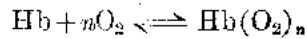
图 3-93 血红蛋白的 S 形氧合曲线
一般 S 形曲线表示寡聚蛋白质的亚基间的协同作用。

早在 1910 年血红蛋白的分子量还不知道的时候, Hill 就试图解释血红蛋白的 S 形氧合曲线。他指出下面的经验公式能与 S 形氧合曲线相吻合:

$$Y = \frac{[O_2]^n}{K + [O_2]^n}$$

式中 Y 为氧饱和度, [O₂] 为氧浓度, K 是一常数, n 是一个小的正数。后来 Hill 假定血红蛋白是一个寡聚蛋白质, 其中每个亚基都能结合一个氧分子, 而氧分子的逐个结合能提高其余亚基对氧的亲合力。但他又认为氧合过程是很快的, 实际上一下子就结合上 n 个氧分子 (n 为血

红蛋白寡聚体中的亚基数目), 于是结合过程看成是按下列反应式进行的:



如果上面的氧合平衡用解离式表示, 平衡常数:

$$K = \frac{[\text{Hb}] P_{\text{O}_2}^n}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}$$

又因

$$Y = \frac{n[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{n([\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_n])}$$

因此可推得:

$$Y = \frac{P_{\text{O}_2}^n}{K + P_{\text{O}_2}^n}$$

或改写成

$$\log \frac{Y}{1-Y} = n \log P_{\text{O}_2} - \log K$$

如果 Hill 的解释是对的, 则用 $\log \frac{Y}{1-Y}$ 对 $\log[\text{O}_2]$ 作图, 得到的是一条直线, 斜率为 n , 截距为 $-\log K$ 。作为含有 4 个氧合部位的血红蛋白, 其斜率应为 4。然而用血红蛋白的实验数据作图, 得到的不是一条直线, 最大斜率(n)为 2.8 左右(图 3-94)。虽然实验表明 Hill 的解释是错的, 但是上述方程能很好地适合血红蛋白的氧合曲线以及其他别构蛋白质的协同过程。因此他的数据处理方法, 即 $\log \frac{Y}{1-Y}$ 对 $\log P_{\text{O}_2}$ 作图法(被称为 Hill 作图法)具有普遍性,

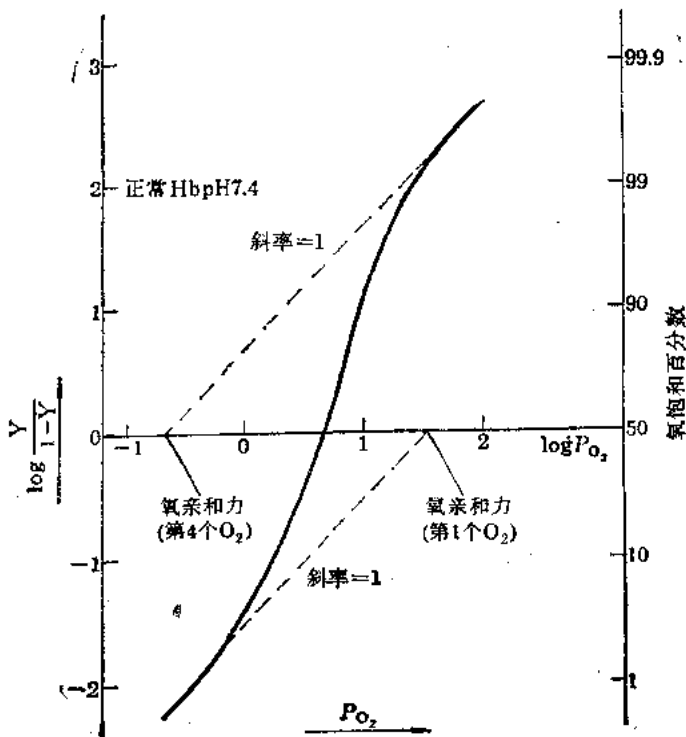


图 3-94 血红蛋白的 Hill 图

中间 S 形曲线是一条完整的 Hill 曲线, 曲线中间部分接近直线。在

$\log \frac{Y}{1-Y} = 0$ 时, 曲线的斜率 $=n$, n 即 Hill 系数。

常数($K_4=0.135$)和第 1 个 O_2 的解离平衡常数($K_1=41.6$)。因此血红蛋白对第 4 个 O_2 的亲

已被广泛采用。

如果血红蛋白的氧合过程确有很高的协同性, 那末在氧浓度极低和极高时都只可能结合一个氧分子, 因此预料 Hill 曲线两端斜率只可能是 1。从图 3-94 可以看到血红蛋白(实际上也包括其他协同系统)确实如此, 图中上下两条渐近线的斜率即 Hill 曲线两端的斜率均为 1。中间的氧浓度区协同性最大, $n=2.8$, 但 Hill 曲线的斜率总不会达到寡聚蛋白质中的亚基数目 n 这个值。Hill 系数是系统协同性的一个指标。对非协同性系统, 例如肌红蛋白(图 3-78), 血红蛋白的游离 α 链或 β 链, $n=1$ 。

上下两条渐近线在横轴的截距分别为第 4 个 O_2 的解离平衡

和力为第1个 O_2 的 300 倍。

血红蛋白氧合的协同效应使得它更有效地起着输送氧气的作用。如果没有协同效应，血红蛋白的氧合曲线将与肌红蛋白的相同，是一条双曲线。肺泡中的 P_{O_2} 为 100 torr，工作肌肉的毛细血管中 P_{O_2} 约在 20 torr，血红蛋白的 $P_{50}=26$ torr, $n=2.8$ 。从图 3-93 可见，在肺泡中 Y 是 0.97，肌肉毛细血管中 Y 是 0.25。释放的氧为两个 Y 值之差，即 $\Delta Y=0.72$ 。因此， ΔY 是血红蛋白输氧效率的指标。协同效应将增加 ΔY 。如果设想血红蛋白没有协同效应 ($n=1$)，则其氧合曲线与肌红蛋白的一样，呈双曲线。从图 3-92 的曲线可以看到，肌红蛋白输氧从肺泡 (100 torr) 到肌肉 (20 torr)，虽然 P_{O_2} 有相当大的改变，但 Y 值变化不大， ΔY 不到 0.1，因而到达肌肉后释放出来的 O_2 很少。这正如任何一种运输工具一样，不能只考虑装载量大而不顾卸货是否方便，这样运输效率是高不了的。要提高运输效率，就必须设法提高卸货能力。协同效应就是增加血红蛋白在肌肉中的卸 O_2 量。

关于别构蛋白质的作用机理(S形曲线的解释)有 MWC 模型和 KNF 模型等，这里不作介绍，参见本书酶章的别构酶部分。

(四) H^+ 、 CO_2 和 DPG 对血红蛋白结合氧的影响

1. H^+ 和 CO_2 促进 O_2 的释放(波耳效应)

1914 年 O. Bohr 发现 CO_2 能改变血红蛋白的氧合曲线。增加 CO_2 的压力能显著地提高血红蛋白亚基的协同效应，降低血红蛋白对氧的亲合力。并发现降低 pH 也能增加亚基的协同效应，促进血红蛋白释放氧 (图 3-95)。反之高浓度的 O_2 将促使脱氧血红蛋白分子释放 H^+ 和 CO_2 。这些互相有关的现象称为波耳效应(Bohr effect)。波耳效应可概括为下列过程：

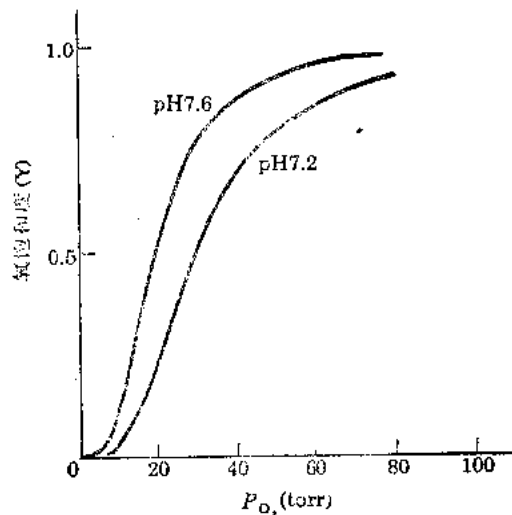
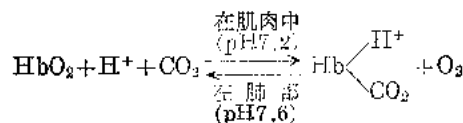
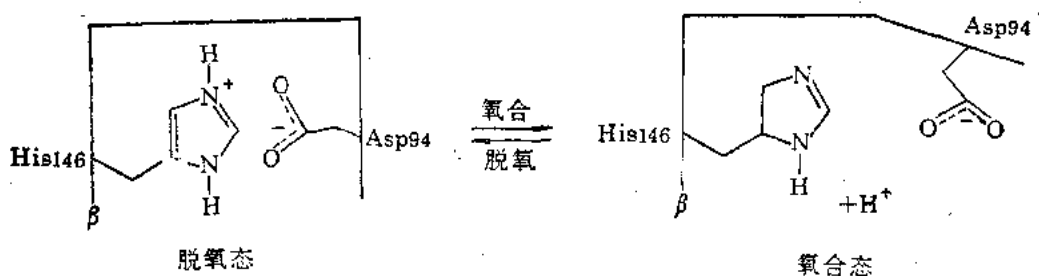


图 3-95 pH 对血红蛋白氧合的影响
降低溶液 pH 能增加血红蛋白亚基的协同性，降低对氧的亲合力

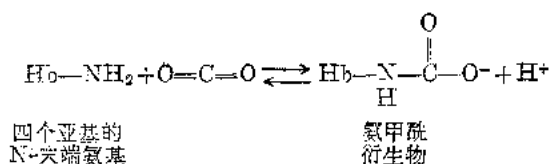


波耳效应具有重要的生理意义。当血液流经组织特别是代谢迅速的肌肉时，因为这里的 pH 较低， CO_2 浓度较高，这样有利于血红蛋白释放 O_2 ，使组织能比单纯的 P_{O_2} 降低时获得更多的氧，而氧的释放又促使血红蛋白与 H^+ 和 CO_2 的结合，以补偿由于组织呼吸形成的 CO_2 所引起的 pH 降低，起着缓冲血液 pH 的作用。当血液流经肺部时，由于肺泡 P_{O_2} 高，有利于血红蛋白与氧结合并因此促进了 H^+ 和 CO_2 的释放，同时 CO_2 的呼出又有利于氧合血红蛋白的生成。波耳效应的机理涉及血红蛋白的大约六个残基。在前面我们曾看到，血红蛋白发生氧合时，连接分子内各个亚基的盐桥全部断裂。 H^+ 在血红蛋白分子中的结合部位被认为是参与这类盐桥形成的 β 链 146 位的 His 咪唑基， α 链 N-末端 Val 的 α -氨基，此外可能还有 α 链 122

位 His 的咪唑基。血红蛋白在脱氧态时, β 链上 146 位(C-末端)His 的咪唑基(质子化)与 94 位(G1)的 Asp 侧链羧基形成盐桥(图 3-87), 反应式如下:

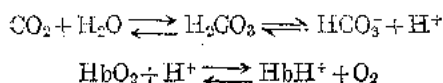


盐桥中咪唑基上的质子由于受到 94 位 Asp 侧链羧基的静电效应而结合得较牢, 其 pK_a 值较氧合态时高($pK_a=8.0$)。在生理 pH 下氧合时, 由于盐桥断裂, 94 位 Asp 侧链羧基远离, 咪唑基的 pK_a 值下降到 7.1, 咪唑基将释放出质子。现已证明, CO_2 在血红蛋白中的结合部位是 4 个亚基的 N-末端氨基。这四个氨基在脱氧态时, 都处于盐键之中, 但在氧合态时, 都以游离状态存在。这些游离末端氨基以不解离的形式参与和 CO_2 的结合, 生成血红蛋白的氨基酰衍生物:



这个反应是可逆的。

CO_2 对 Hb 氧合的影响的另一方式是通过 H^+ 起作用的, 如下面反应式所示:

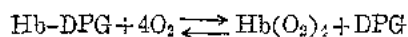


2. DPG 降低氧亲和力

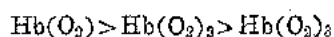
关于 DPG (二磷酸甘油酸) 的结构式以及它在血红蛋白分子中的位置和交联键已在前面谈及。

DPG 是血红蛋白的一个别构效应物。DPG 通过血红蛋白的两个 β 亚基形成盐桥稳定了它的脱氧态(T 态)构象, 因而降低脱氧血红蛋白对氧的亲和力。

O_2 和 DPG 与血红蛋白的结合是互相排斥的。为了更好地表示出这一事实, 在 DPG 存在下的血红蛋白的氧合作用可用下面方程表示:



DPG 对氧合血红蛋白的亲和力比对脱氧血红蛋白的亲和力至少低一个数量级。DPG 对氧合态血红蛋白的亲和力大小的顺序为:



DPG 不能与完全氧合的血红蛋白结合, 因为完全氧合的血红蛋白分子中央空穴太小不能容纳 DPG 分子。

DPG 在人红细胞中的含量约与 Hb 等摩尔数。当无 DPG 存在时, 血红蛋白的 P_{50} 为

1 torr, 与肌红蛋白的相同。当有 DPG(4.5 mmol/L)存在时, P_{50} 为 26 torr(图 3-96)。在肺部 P_{O_2} 超过 100 torr, 因此在这里血红蛋白被氧饱和与 DPG 是否存在无关系, 但在组织中 P_{O_2} 低, 如有 DPG 存在则能增强把氧转给肌红蛋白的效率。

图 3-96 示出在不同条件下, 血红蛋白的氧合曲线。在无 DPG 存在时, 血红蛋白完全能在低于 20 torr 的 P_{O_2} 条件下为氧所饱和。如果这样, O_2 就不能从血红蛋白转移给肌红蛋白。但是有 4.5 mmol/L 的 DPG 存在时, 血红蛋白对氧的亲合力剧烈下降, 在肺部摄取的氧大约 30% 将释放给肌红蛋白。

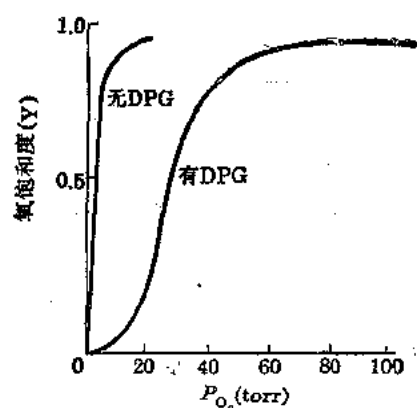


图 3-96 二磷酸甘油酸对血红蛋白氧合曲线的影响

人的某些生理性和病理性的缺氧可以通过红细胞中 DPG 的浓度改变来调节组织的获氧量。例如高山适应

(high-altitude adaptation)的代偿性变化。当正常人在短时间内由海平面上升到 4500 米高的高山或高空时, 红细胞中的 DPG 浓度在 2 天内可以由 4.5 mmol/L 增加到 7.0 mmol/L, 并伴随着氧亲和力的降低。动脉血的氧饱和度虽然由于亲和力减小而降低, 但是输氧量(ΔY)反而增加, 因为在毛细血管循环中卸氧量增大。又例如严重阻塞性肺气肿病人, 因肺部换气受阻, 动脉血 P_{O_2} 可降至 50 torr, 动脉血的氧饱和度也因此下降, 此时红细胞内的 DPG 浓度可代偿性地增加, 从正常的 4.5 mmol/L 增至 8.0 mmol/L, 使氧合曲线向右移动, 有利于组织获得较多的氧。

当用酸性柠檬酸葡萄糖(acid-citrate dextrose, 简称 ACD)溶液贮存血液时, 红细胞的 DPG 浓度在 10 天内从 4.5 mmol/L 下降到 0.5 mmol/L, 血红蛋白对氧的亲合力增加, P_{50} 从 26 torr 降到 16 torr。氧合曲线向左移动。病人输入这种血液, 虽然在 24 小时内有一半红细胞恢复到正常水平, 但往往不能满足危急病人对氧的急需。缺少 DPG 的红细胞不能靠加入 DPG 来恢复, 因为高度荷电的分子不能透过红细胞膜。如果贮存的血液中加入肌苷(inosine), 即可防止 DPG 水平的下降, 因为肌苷能通过红细胞膜并在胞内经一系列反应可以转变为 DPG。肌苷现已广泛用于血液的保存。

早已知道胎儿红细胞中的血红蛋白 HbF($\alpha_2\gamma_2$)对氧的亲合力比成人的 HbA 高。它的生理意义在于使胎儿血液流经胎盘时 HbF 能从胎盘的另一侧母体的 HbA 获得 O_2 。这是因为 γ 链的 143 位是丝氨酸(β 链的 143 是组氨酸), 它使得 HbF 与 DPG 结合的能力减弱, 因而增加了 HbF 对氧的亲合力。

氧的 S 形曲线结合, 波耳效应以及 DPG 效应物的调节使得血红蛋白的输氧能力达到最高效力。同时由于能在较窄的氧分压范围内完成输氧功能, 因此使机体内的氧水平不致有很大的起伏。此外血红蛋白使机体内的 pH 也维持在一个较稳定的水平。

血红蛋白的别构效应充分地反映了它的生物学适应性, 结构与功能的高度统一性。血红蛋白的这些特点是使脊椎动物以优胜类群出现于地球上的重要因素之一。

(五) 血红蛋白的分子病

1. 镰刀状细胞贫血病与血红蛋白分子的突变

镰刀状细胞贫血病 (sickle-cell anemia) 是最早被认识的一种分子病。这种疾病在非洲

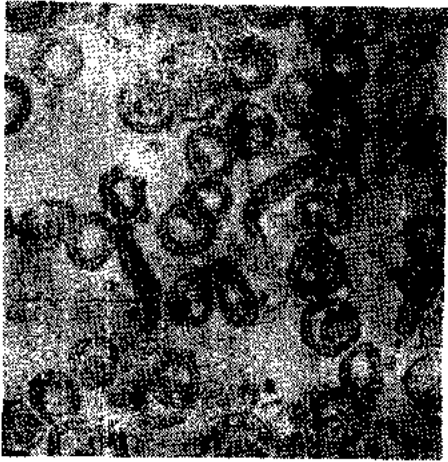


图 3-97 正常红细胞与镰刀形红细胞的扫描电镜图

的某些地区十分流行。它是由于遗传基因突变导致血红蛋白分子中氨基酸残基被更换所造成的。镰刀状细胞贫血病最清楚地反映出蛋白质的氨基酸顺序在决定它的二、三、四级结构及其生物功能方面的重大作用。

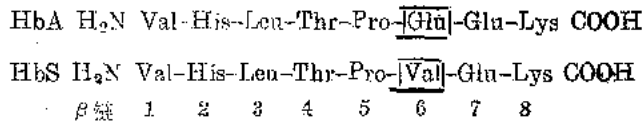
镰刀状细胞贫血病患者的血红蛋白含量仅为正常人(14—18 克/100 毫升)的一半,红细胞数目也是正常人($4.6-6.2 \times 10^6$ 个/毫升)的一半左右,而且红细胞的形态也不正常,除有非常大量的未成熟红细胞之外,还有很多长而薄,呈新月状 (crescentlike) 或镰刀状的红细胞(图 3-97)。当红细胞脱氧时,这种镰刀状细胞明显增加。镰刀状细胞贫

血病患者的红细胞之所以变形是由于不正常的血红蛋白引起的。这种血红蛋白称为血红蛋白 S。

镰刀状细胞贫血病是一种致死性疾病,它的纯合子患者有的在童年就死去。杂合子患者的寿命也不长,但他能抵抗一种流行于非洲的疟疾(malaria),后者也是一种致死性的疾病。对于携带正常血红蛋白基因的纯合子个体死于这种疟疾的机率很高,常常来不及繁殖后代就已死去,而杂合子患者对疟疾有一定的抗性,尚能繁衍下一代,这是因为疟原虫不能以镰刀状红细胞中的血红蛋白为食的缘故。

2. 镰刀状细胞血红蛋白的氨基酸顺序的细微变化

本世纪 40 年代后期, L. Pauling 和 H. Itano 曾指出,血红蛋白 S(HbS)和正常血红蛋白 A(HbA)电泳时都向正极移动,只是前者比后者稍慢。他们的结论是 HbS 必定比 HbA 略少几个带负电荷的基团。稍后, V. Ingram 等人将这两种血红蛋白都用胰蛋白酶在同样条件下切成肽段,进行电泳,然后对比滤纸层析电泳双向图谱(图 3-98),他们发现只有一个肽段位置不同。分析有差异的化学结构,其氨基酸顺序分别是:



这是 β 链 N 末端的一段肽链。HbS 和 HbA 的 α 链是完全相同的,所不同的只是 β 链上从 N 末端开始的第六位的氨基酸残基,在正常的 HbA 分子中是谷氨酸,病态的 HbS 分子中为缬氨酸所代替。值得注意的是,在血红蛋白分子的四条肽链的 574 个氨基酸残基中,只有两条 β 链中的两个谷氨酸残基分别为两个缬氨酸残基所代替,即能引起如此严重的病态。在人类中已发现有 300 多种不同的突变血红蛋白。绝大多数的突变体中都只有一个氨基酸残基被取代,或在 α 链或在 β 链上。对功能的影响程度不一,视取代的位置而异。取代氨基酸残基后

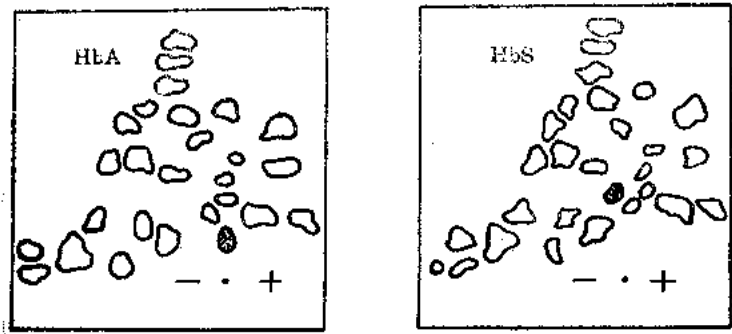


图3-98 血红蛋白 A 和 S 的胰蛋白酶消化液的指纹图谱
两种血红蛋白只有一个肽段不同。

对功能影响的细节,目前知道的还很少。

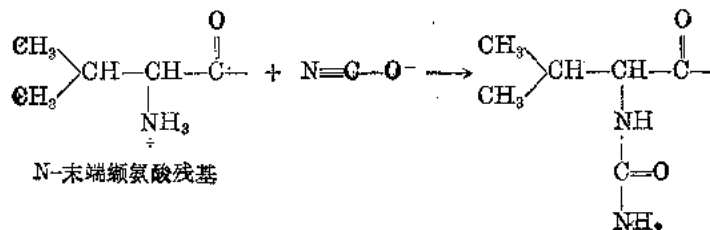
3. 镰刀状细胞血红蛋白的构象变化

HbA 突变为 HbS,从一级结构看,只是 $\beta 6\text{Glu}$ 被换成 $\beta 6\text{Val}$ 。Glu 侧链是一个带电基团,而 Val 是一个非极性基团。从三级结构看,由于 $\beta 6$ 位于分子表面,因此 Glu 被换成 Val,等于在 HbS 分子表面安上了一个非极性侧链。从四级结构看氧合 HbS 和 HbA 没有多大区别。然而在低氧浓度(脱氧)时, HbS 的溶解度剧烈下降(仅为脱氧 HbA 的 1/25), HbS 分子发生线性缔合,形成长链,由多条长链进一步聚集成多股螺旋的微管纤维束。发现其直径有 17 nm 的,更普通的是 21.5 nm 的,后者由 14 股链组成。看来这就是导致红细胞变形溶血的原因。

根据上述事实有人曾设想,在 HbS 分子中的 $\beta 6$ 附近有一个粘性小区(可能就是 $\beta 1\text{Val}-\beta 6\text{Val}$ 间出现的疏水结构)。与此相适应,第 2 个 HbS 在脱氧态时,在粘性区的另一侧有一个互补部位(也是疏水结构)。因此,一个 HbS 的粘性小区与第二个 HbS 的互补部位缔合(借助疏水相互作用),而第二个粘性小区又能继续与第三个 HbS 的互补部位缔合,如此继续可以形成长链缔合物。还设想粘性小区不因 HbS 的氧合与否而变,但氧合后上述互补部位或者是散失,或者藏到分子内部。因此氧合 HbS 不表现特性,而脱氧 HbS 就发生线性缔合,将整个红细胞挤扭成镰刀状。

4. 镰刀状细胞血红蛋白的治疗性矫正

不久前发现在体外用氰酸钾处理镰刀状贫血病患者的红细胞,可以防止它在脱氧状态下形成镰刀状。这种细胞生存时间比处理前要长,输氧能力也有好转。HbS 分子的一个氨基用 KCNO 修饰后就能抑制红细胞成镰刀状,这一反应同 CO_2 与 HbA 结合类似, CO_2 也能结合到 N 端 NH_2 上,只是反应可逆,而 KCNO 的修饰是不可逆的。KCNO 的修饰反应如下:



这里值得注意的是,一个N-末端缬氨酸氨基被修饰,就能够“矫正”它的构象,使分子重新获得输氧能力。

目前关于抗镰刀状化的药物研究给出了某些希望:通过适当的生物化学工程手段,可望设计出一种不仅能防止HbS镰刀状化而且对体内其他蛋白质无毒害的、安全的药物。

除血红蛋白S外,至今已发现三百多种突变血红蛋白。有些突变血红蛋白结构变化发生在血红素附近,或影响血红素与氧结合,或影响亚基与血红素结合,因而失去氧合的能力。这样的异常血红蛋白几乎全部都能产生临床症状。例如造成先天性青紫(congenital cyanosis)的几个异常血红蛋白M(methemoglobin)就是属于这一类。它们绝大多数是由于酪氨酸取代了血红素的近侧组氨酸残基(F8)或远侧组氨酸残基(E7)所形成的。由于酪氨酸残基的酚基负离子与 Fe^{2+} 结合稳定了正铁离子,因而使血红蛋白的异常亚基失去氧合能力。

基因的突变造成血红蛋白分子亚基中个别氨基酸的更换,并因此引起三、四级结构和生物功能的改变。对这一过程的认识导致今日蛋白质工程(protein engineering)的出现。所谓蛋白质工程就是利用基因工程的手段,包括基因的定点突变和基因表达来改造蛋白质分子,使之具有更完善的、甚至是新的性质和功能。蛋白质工程作为一种技术和学科正在蓬勃发展。

九、免疫球蛋白的结构与功能

(一)抗原与抗体的一般概念

免疫球蛋白是一类血浆糖蛋白(serum glycoprotein)。糖蛋白中的蛋白质与糖是共价连接的。免疫球蛋白是被脊椎动物作为抗体合成的。它的合成场所是网状内皮系统的细胞。这些细胞分布在脾、肝和淋巴结等组织中。当一类外来的被称为抗原的物质,如多糖、核酸和蛋白质等侵入机体时即引起抗体的产生,这就是所谓免疫反应。抗体就是免疫球蛋白。

抗体具有两个最显著的特点,一是高度特异性,二是多样性。高度特异性就是一种抗体一般只能与引起它产生的相应抗原发生反应。抗原-抗体复合物往往是不溶的,因此常从溶液中沉淀出来,此即“沉淀反应”。在体外,沉淀反应已被广泛用于研究抗原-抗体反应,并成为免疫学的基础。多样性就是它们可以和成千上万的各种抗原(天然的和人工的)起反应。一般说来,一个抗原与接受该抗原的动物关系愈远,则产生抗体所需的时间愈短,抗体反应也愈强。

某些低分子量的物质可以与抗体结合,但它们本身不能刺激抗体的产生。如果它们与大分子紧密结合,则能刺激抗体的产生。这些小分子物质称为半抗原(hapten)。几乎所有外来的蛋白质都是抗原,并且每种蛋白质都能诱导特异抗体的产生。一个人的体内在任何一个给定时刻大约有10 000种抗体存在。

(二)免疫球蛋白的分类

人的免疫球蛋白可分为五大类(表3-23),其分子量范围从150 000到950 000道尔顿。免疫球蛋白M(IgM)是对一个抗原作出反应时产生的第一个抗体。免疫球蛋白G(IgG)是一类最简单的免疫球蛋白。IgG含有两条相同的高分子量的重链(heavy chain)和两条相同的低分子量的轻链(light chain)。四条链通过二硫键共价连接成Y字形结构(图3-99)。每一免疫球蛋白分子含有二个抗原结合部位,它们位于Y形结构的二个顶点(图3-100)。如果抗原

表 3-23 人免疫球蛋白的分类

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
重链类别	γ	α	μ	δ	ϵ
分子量	53 000	64 000	70 000	58 000	75 000
轻链类别	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ
分子量	22 500	22 500	22 500	22 500	22 500
链的结构	$\kappa_2\lambda_2$ 或 $\lambda_2\lambda_2$	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ 或 $(\lambda_2\alpha_2)_n$	$(\kappa_2\mu)_5$ 或 $(\lambda_2\mu)_5$	$\kappa_2\delta_1$ 或 $\lambda_2\delta_1$	$\kappa_2\epsilon_2$ 或 $\lambda_2\epsilon_2$
总分子量	150 000	360 000-720 000	950 000	160 000	190 000
沉降系数(S)	7	10, 13, 16	18-20	7	8

注: IgA 链的结构中 $n=2-4$ 。

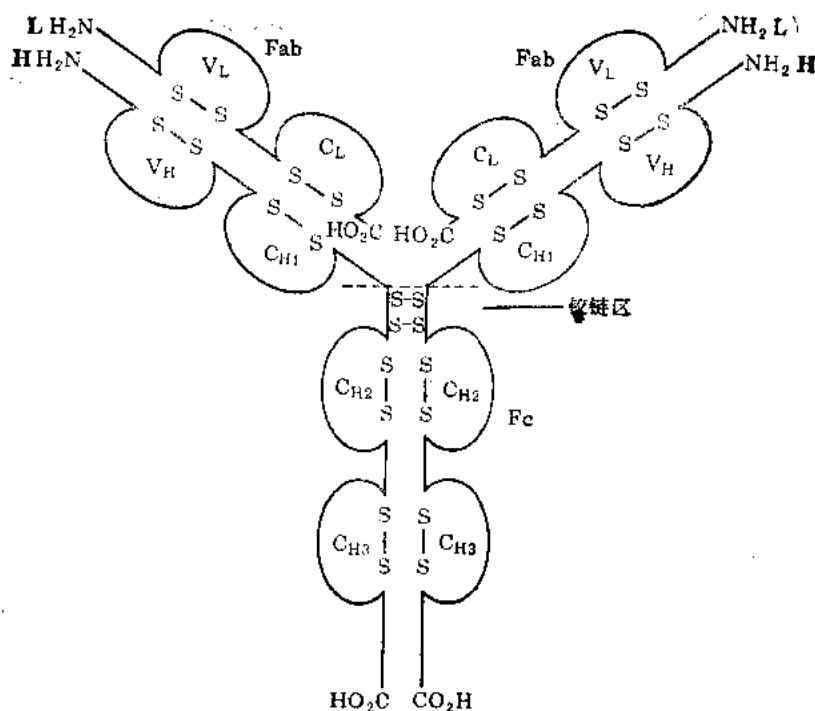


图 3-99 典型的免疫球蛋白结构图解

含有二个或二个以上的抗原决定簇(antigenic determinant)那末抗体可以形成一个抗体-抗原分子的交联晶格(cross-linked lattice)而沉淀(图 3-101)。抗原决定簇就是抗原分子中决定抗原特异性并能与和它互补的抗体结合部位结合的那部分结构。抗体是二价的,而抗原可以是多价的,这里讲的价数就是抗原与抗体的结合部位的数目。当抗体与抗原等价存在时,将发生最大的交联,产生最大量的免疫沉淀(immunoprecipitate)或称沉淀素(precipitin)。免疫球蛋白的轻链可以分为 κ (kappa) 和 λ (Lambda) 两大类。所有五种类型的免疫球蛋白都以含 κ 或 λ 的两种形式存在。重链可以分为五大类, γ 、 α 、 μ 、 δ 和 ϵ 。每种类型的免疫球蛋白只含其中一类重链, G、A、M、D 和 E 五类免疫球蛋白分别含有 γ 、 α 、 μ 、 δ 和 ϵ 。免疫球蛋白 A 和 M 的分子量较大,这是由于链的数目增多的缘故。这两类免疫球蛋白的功能尚未确切了解。免疫球蛋白 A 是分泌液(眼泪、粘液和唾液)中存在的一类主要抗体,并且是抵御入侵的细菌和

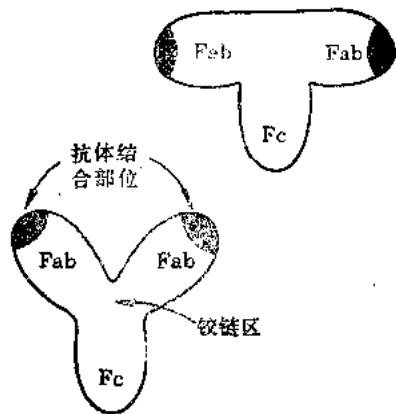


图 3-100 免疫球蛋白 G 分子呈 Y 形, 含有一个铰链区 (hinge area), 使它本身具有区段柔性

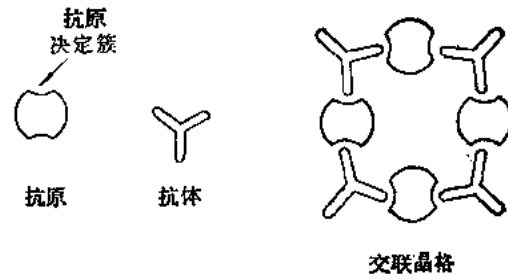


图 3-101 抗体与具有二个决定簇的抗原发生反应形成免疫沉淀的交联晶格

病毒的第一道防线。免疫球蛋白 D 和 E 的特有功能还不清楚。

在多发骨髓瘤 (multiple myeloma) 中, 有大量的称为 Bence-Jones 蛋白的免疫球蛋白被合成。这些蛋白质浓度很高, 并随尿排泄出体外。Bence-Jones 蛋白是由 κ 或 λ 链通过一个二硫键连接而成的二聚体。正常人的抗体含有几千种不同的顺序, 但是一种给定的骨髓瘤所产生的 Bence-Jones 蛋白却是相同的, 是均一的免疫球蛋白轻链。

(三) 免疫球蛋白的一级结构

免疫球蛋白 G 的轻链和重链的一级结构可以划分成若干结构域, 这些结构域根据它们的顺序同源进行分类。每种免疫球蛋白的轻链都含有可变区 (variable region) 和恒定区 (constant region)。可变区 (V_L) 内不同抗体之间氨基酸顺序是可变的, 恒定区 (C_L) 内抗体之间的氨基酸顺序近乎不变。同样, 重链也含有可变区和恒定区, 标为 V_H 、 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。在可变区内有所谓高变区 (hyper variable region), 几乎所有的顺序变化都发生在此区域内。可变区内剩余的顺序比较恒定, 这可能是形成免疫球蛋白的基本结构单位所要求的。 V_H 链的高变区与 V_L 链的高变区一起提供氨基酸残基以形成抗原-抗体结合部位, 每种抗体的特异性决定于轻链和重链的高变区内的氨基酸顺序。重链的 C_{H1} 和 C_{H3} 区通过一个“铰链区” (长约 30 个氨基酸残基) 连接。当用木瓜蛋白酶处理时, 在“铰链区”可发生断裂, 生成 Fab 片段 (图 3-99)。用胃蛋白酶处理产生 $F(ab')_2$ 片段。Fab 片段仍能与抗原结合表明轻链是抗原结合的部位。

抗体的恒定区 (C_L 、 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3}) 之间有不少同源顺序。轻链和重链的可变区也有同源顺序。一级结构的每一结构域, 不论是恒定区还是可变区在自己的辖区内都含有一个二硫键。另外还有四个二硫键是用于连接四个肽链使成一体。上面这些相似性表明了由一个原始基因经过几次连续复制形成了现在的抗体。

(四) 免疫球蛋白的三级结构

免疫球蛋白三级结构的最主要特点是所谓免疫球蛋白折叠 (immunoglobulin fold), 它是由二个 β -折叠片夹着疏水残基内核而形成的一种结构式样 (图 3-102)。 β -折叠片约涉及“免疫球蛋白折叠”的半数残基。由一个二硫键把二个 β -折叠片维系在一起。在 β -折叠片上

的这些氨基酸残基是很保守的。顺序的变化主要发生在连接 β -折叠片的环上。在更加复杂的结构中，如在小鼠的骨髓瘤的免疫球蛋白G的Fab片段中，只是重复出现“免疫球蛋白折叠”的结构(如果免疫系统的一个细胞发生癌变，细胞将发生失控的复制，形成骨髓瘤，由骨髓瘤产生的免疫球蛋白G可以大量地存在，甚至使血液变稠)。骨髓瘤IgG的结构可分成含有 V_H 和 V_L 链的可变区和含有 C_L 和 C_H 结构域的恒定区。连接可变区和恒定区的这股短的多肽链被称为开关区(switch region)。轻链和重链的高变区顺序是在彼此紧密接触的表面上。抗原的结合发生在可变区轻链和重链的高变区的袋穴($1.2 \times 1.5 \times 2.0\text{nm}$)中。

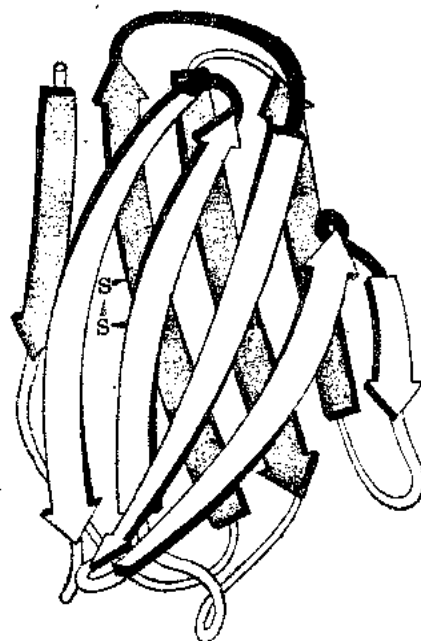


图3-102 免疫球蛋白 V_L 结构域
(免疫球蛋白折叠)

十、蛋白质的结构与功能的进化

自从有生命以来，蛋白质生物合成的程序经受了不断的改变。生物形态和分子结构在进化过程中，向着多样化和专一化的方向发展。例如血红蛋白是在动物进化到一定的阶段才出现的，在这以前并不存在。某些低等动物体内输送氧气的物质是另一些色素蛋白质(例如血蓝蛋白)，更低等的一些动物可以直接与外界交换氧和二氧化碳，并没有一种专门的蛋白质来完成这一功能。蛋白质的多样化和专一化是在生物进化过程中实现的。但是现代的蛋白质还保存着祖先留下来的结构与功能关系上的痕迹，为我们提供了研究进化过程的线索。

一般说来，在核酸控制下的蛋白质生物合成过程具有保守的一面。但是生物的环境是在不断地发生变化的。这些变化必将影响遗传信息携带者DNA，虽然DNA是较保守的，即化学反应性能较低，但毕竟不是绝对不变，同样也具有可分性，变化是不可避免的，这就是突变的必然性基础。当然突变还有偶然性的一面，即突变发生在哪个个体，哪个染色体(chromosome)或DNA分子的哪一部分，这是不确定的，至于什么样的外界因素引起什么样的突变，其规律性尚未完全掌握。DNA的突变必然影响蛋白质的生物合成，即使有些机理，例如一种氨基酸信息可不止一种三联体密码的事实起了部分的保护作用，但正如前面所看到的，突变引起蛋白质的某些氨基酸被取代，在漫长的进化历史中还是常有的事。若取代的部位并不影响蛋白质的生物学功能，则关系不大，这种蛋白质在进化过程中仍有可能被自然选择下来，例如象许多同源蛋白质的情况那样。如果取代的部位落在活性区，则生物功能可能受到影响或完全消失。若这种蛋白质在维持生命过程中是不可缺的，而来自亲代的基因又是相同的，即同型合子(homozygote)，则这种突变将是致命的，它将使这种有机体连同这种蛋白质在地球上消失。如果这种丧失功能的蛋白质在生命活动过程中并非绝对必需，那么突变只造成程度不同的疾病，例如各种遗传病。在这种情况下，自然界将通过汰劣留良的选择，把这种蛋白质逐渐淘汰掉。当然还有另一方面，突变的结果使产生的蛋白质功能更加完善化，或者甚至产生出具有适应改

变了的环境的新功能的新蛋白质。这种蛋白质将随同有机体被自然选择优选下来，这就是新蛋白质的来源之一。

现在知道在高度进化的细胞中，DNA 的含量远较原始的细胞为多，而它们的蛋白质种类也比较多。这种情况是怎样造成的呢？按一种假说，细胞经常会进行部分分裂，即只有一个染色体或它的一部分进行复制(replication)。此后，当进行正规的有丝分裂时，这一部分 DNA 也进行复制。因此，能够实现这种分裂的细胞就会有四个基因，而不是两个基因相当于一种蛋白质。但是两个基因已经足以维持正常生命，因此另外两个基因可以任意产生突变，从而造成功能上的变化。肌红蛋白和血红蛋白的 α 链和 β 链的氨基酸顺序(在肽链的某些位置上，它们的氨基酸残基是相同的)清楚地说明它们都是起源于一个共同的祖先，但现在已知这几种蛋白质至少有两个基因。此外象胰脏的胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶都有类似的化学结构，有半数的氨基酸残基是相同的，因此推测它们也有着共同的祖先，后来在进化过程中发生分化，表现在酶的特异性上的差别。上述的假说说明了新蛋白质的另一来源。

综上所述，新蛋白质都是在旧蛋白质的基础上，经过突变引起的结构和功能的改变、遗传和自然选择的进化过程产生和发展起来的。

最后还应该指出，蛋白质的结构与功能之间具有高度的统一性，适应性，这是事情的一个方面。事情的另一个方面，正如从蛋白质的发生、发展中可以看到，今天的适应性是由过去的不适应性转化而来的，并且今天生物体内的各种蛋白质在结构和功能上的适应性后面，仍然而且始终隐藏着不适应性，物质的运动和发展永远不会完结，也永远不会停止在一个水平上。

第六节 蛋白质的分离、提纯与鉴定

分离蛋白质的目的是多种多样的。研究蛋白质的分子结构、组成和某些物理化学性质，需要纯的均一的甚至是晶体的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物功能，需要样品保持它的天然构象，要尽量避免因变性而丢失活性。在制药工业中，需要把某种具有特殊功能的蛋白质提纯到规定的要求，特别要注意把一些具有干扰或拮抗性质的成分除去。总之，在实际工作中，具体情况要作具体分析，根据研究工作和生产的具体目的和要求，制订出分离和提纯的合理程序。下面将介绍蛋白质分离、提纯的一般原则和方法。

分离和提纯蛋白质的各种方法主要是利用蛋白质之间各种特性的差异，包括分子的大小和形状、酸碱性质、溶解度、吸附性质和对其他分子的生物学亲和力。因此讲述蛋白质的分离提纯之前，将适当地介绍一下蛋白质的性质主要是蛋白质在溶液中的性质以及蛋白质的含量测定和纯度鉴定。

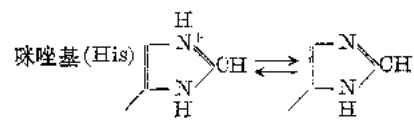
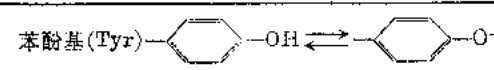
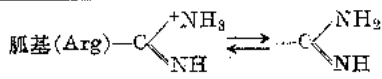
一、蛋白质的酸碱性质

蛋白质分子由氨基酸组成，在蛋白质分子中保留着游离的末端 α -氨基和 α -羧基以及侧链上的各种功能团。因此蛋白质的化学和物理化学性质有些是与氨基酸相同的，例如，侧链上功能团的化学反应，分子的两性电解质等。

蛋白质也是一类两性电解质,能和酸或碱发生作用。在蛋白质分子中,可解离基团主要来自侧链上的功能团(表 3-16),此外还有少数的末端 α -羧基和末端 α -氨基。如果是结合蛋白质,则还有辅基成分所包含的可解离基团。

蛋白质分子可解离基团的 pK' 值列于表 3-16。它们和游离氨基酸中相应基团的 pK' 值不完全相同,这是由于在蛋白质分子中受到邻近电荷的影响造成的。

表 3-16 蛋白质分子中可解离基团的 pK' 值

可解离基团	pK' (25°C)
α 羧基 $-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	3.0—3.2
β 羧基 (Asp) $-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	3.0—4.7
γ 羧基 (Glu) $-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^-$	4.4
咪唑基 (His) 	5.6—7.0
α 氨基 $-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2$	7.6—8.4
ϵ 氨基 (Lys) $-\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons -\text{NH}_2$	9.4—10.6
巯基 (Cys) $-\text{SH} \rightleftharpoons -\text{S}^-$	9.1—10.8
苯酚基 (Tyr) 	9.8—10.4
胍基 (Arg) 	11.6—12.6

天然球状蛋白质的可解离基团大部分可被滴定,某些天然蛋白质中有一部分可解离基团由于埋藏在分子内部或参与氢键形成而不能被滴定。例如肌红蛋白中,11 个组氨酸残基有 5 个 R 基在变性前不能被滴定。但是所有的天然球状蛋白质处于变性状态时,可解离基团全部可被滴定。

可以把蛋白质分子看作是一个多价离子,所带电荷的性质和数量是由蛋白质分子中的可解离基团的种类和数目以及溶液的 pH 值所决定的。对某一种蛋白质来说,在某一 pH 值,它所带的正电荷与负电荷恰好相等,也即净电荷为零,这一 pH 值称为蛋白质的等电点。表 3-17 列出几种蛋白质的等电点。蛋白质的等电点和它所含的酸性氨基酸和碱性氨基酸的数量比例有关。表 3-18 给出几种蛋白质中碱性氨基酸残基与酸性氨基酸残基(酰氨化的酸性氨基酸已减去)的数目和它们之间的比例,这个比例和等电点显示了一定的关系。

蛋白质的滴定曲线形状和等电点在有中性盐存在下可以发生明显的变化。这是由于蛋白质分子中的某些解离基团可以与中性盐中的阳离子如 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 或阴离子如 Cl^- 或 HPO_4^{2-} 相结合,因此观察到的蛋白质等电点在一定程度上决定于介质中离子的组成。没有其他盐类干扰时,蛋白质质子供体基团解离出来的质子数与质子受体基团结合的质子数相等时的 pH 称为等离子点(isoionic point)。等离子点是每种蛋白质的一个特征常数。

表 3-17 几种蛋白质的等电点

蛋 白 质	等 电 点 (pI)	蛋 白 质	等 电 点 (pI)
胃蛋白酶	1.0	α -糜蛋白酶	8.3
卵清蛋白	4.6	α -糜蛋白酶原	9.1
血清蛋白	4.7	核糖核酸酶	9.5
β -乳球蛋白	5.2	细胞色素 c	10.7
胰岛素	5.3	溶菌酶	11.0
血红蛋白	6.7		

表 3-18 蛋白质的酸性氨基酸和碱性氨基酸含量与等电点的关系

蛋 白 质	酸性氨基酸, 每 摩尔残基数	碱性氨基酸, 每 摩尔残基数	碱性/酸性	等电点(pI)
胃蛋白酶	37	6	0.2	1.0
血清蛋白	82	99	1.2	4.7
血红蛋白	53	88	1.7	6.7
核糖核酸酶	7	20	2.9	9.5

二、蛋白质分子的大小与形状

本章开始的时候就曾介绍过, 蛋白质分子的质量是很大的。它的分子量变化范围在 6000 到 1 000 000 道尔顿或更大一些。下面主要讨论测定蛋白质分子量的方法, 此外简单地讨论一下蛋白质分子的外形。

(一) 根据化学组成测定最低分子量

用化学分析方法测出蛋白质中某一微量元素的含量, 并假设蛋白质分子中只含有一个被测的元素原子, 则可以由此计算出蛋白质的最低分子量(minimum molecular weight)。例如, 肌红蛋白含铁 0.335%, 其最低分子量可按式算出:

$$\text{最低分子量} = \frac{\text{铁的原子量}}{\text{铁的百分含量}} \times 100 = \frac{55.8}{0.335} \times 100 = 16700$$

用其他物理化学方法测得的肌红蛋白分子量与此极为接近, 可见肌红蛋白分子中只含一个铁原子。真实分子量是最低分子量的 n 倍, 这里 n 是每个蛋白质分子中铁原子的数目。因为肌红蛋白中, $n=1$, 所以其真实分子量就是 16 700。又如血红蛋白含铁也是 0.335%, 即最低分子量亦为 16 700, 但根据其他方法测得的分子量是 68 000。可见每一分子血红蛋白含有四个铁原子, 即 $n=4$, 因此其真实分子量 = 16 700 \times 4 = 66 800。有时蛋白质分子中某一氨基酸的含量特别少, 应用同样的原理, 由这一氨基酸含量的分析结果, 也可以计算蛋白质的最低分子量。例如牛血清清蛋白含色氨酸 0.58%, 计算所得的最低分子量是 35 200。用其他方法测得的分子量是 69 000, 所以每一分子牛血清清蛋白含有两个色氨酸残基。

(二) 蛋白质的渗透压

当用一种半透膜(semipermeable membrane)将蛋白质溶液与纯水隔开时,只有水分子能自由地通过半透膜进入蛋白质溶液而蛋白质分子却不能透过它进入纯水中。这种溶剂分子由纯溶剂(或稀溶液)向溶液(或浓溶液)单方向的净扩散现象称为渗透(osmosis)。由于渗透的结果,溶液内的体积增加,液面升高,直至达到一定的静水压力时维持平衡。这时的静水压力就是溶液在平衡浓度时的渗透压(osmotic pressure)(图3-103)。渗透压是溶液的依数性质(colligative property)之一,它是单位体积内溶质质点数的函数,而与溶质的性质和形状无关。

在理想溶液中,溶液的渗透压与溶质浓度的关系可用范霍夫(van't Hoff)公式表示:

$$\pi = nRT/V = (g/M)RT/V$$

$$\pi = (g/V)RT/M = cRT/M$$

其中 π 是渗透压(以大气压为单位,一个大气压=760毫米汞柱); V 是溶液的体积(升); g 是溶质的重量(克); c 是溶质的浓度(克/升); T 是绝对温度; R 是气体常数(0.082升·大气压/摩尔/度); M 为溶质的摩尔质量。

从上式可以看出,在一种溶质的理想溶液中,渗透压是浓度的线性函数。但是实际的高分子溶液与理想溶液有较大的偏差。渗透压与浓度之间不是简单的线性关系。在浓度不大时,它们的关系可用下式表示。

$$\pi = RT\left(\frac{c}{M} + Kc^2\right)$$

或

$$\frac{\pi}{c} = \frac{RT}{M} + Kc$$

$$M = \frac{RT}{\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{c}}$$

因此,利用渗透压的测定来计算蛋白质分子量时,实际上都是测定几个不同浓度的渗透压,以 π/c 对 c 作图并外推到蛋白质浓度为零,得截距,即 $\lim_{c \rightarrow 0} \pi/c$ 值,以此代入上式求出蛋白质分子量。对于分子量在10 000至100 000范围的蛋白质利用渗透压法估算分子量可以给出可靠的结果。

测定渗透压的另一困难是蛋白质的渗透压受pH的影响。只有当蛋白质分子处于等电点时,测定的渗透压才不受缓冲溶液中无机离子的影响。在离开等电点的情况下,带电荷的蛋白质分子需要一些相反电荷的无机离子来平衡它的电荷,这样会由于唐南(Donnan)平衡造成半透膜两侧可渗透的无机离子的不均布分布,从而增加蛋白质溶液的渗透压。为了避免这种影响,在溶解度许可范围内,尽量采用等电点或接近等电点的缓冲溶液,并增高缓冲溶液中无机盐的浓度。

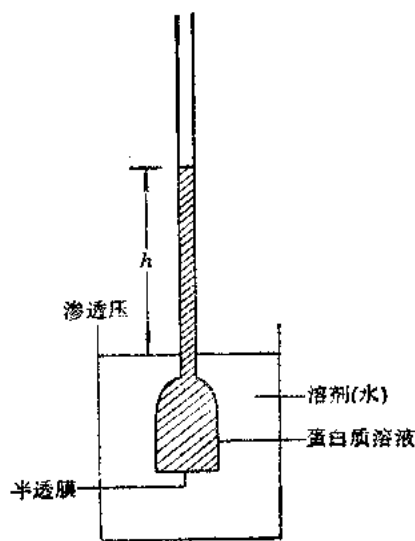


图3-103 渗透压

渗透压法测定蛋白质分子量的优点是：所用的实验装置简单，并且准确度也不亚于其他方法，因为溶液的渗透压不依赖于蛋白质分子的形状和水化程度。但是这个方法不能区别所测蛋白质溶液中蛋白质分子是否均一。如果蛋白质样品中含有其他杂质蛋白，那么由渗透压测得的结果实际上代表几种蛋白质的平均分子量。

(三)蛋白质的扩散

蛋白质溶液在平衡时，虽然它的分子仍然处于不断地热运动中，但是分子在整个溶液中的分布在统计上是均匀的。如果分子在蛋白质溶液中造成浓度差，例如小心地把纯水放在蛋白质溶液的上面，则蛋白质分子将从下面的高浓度区向上面的低浓度区迁移，直至达到平衡为止。这时，蛋白质分子将均匀地分布在整个溶剂系统中。由于浓度差引起的这种溶质分子的净迁移称为平移扩散(translational diffusion)或扩散。扩散的热力学驱动力是熵的增加。

溶质的扩散速率可依费克(Fick)第一扩散定律计算，即在 dt 时间内通过面积 A 所扩散的溶质量 dm 与该处的浓度梯度 dc/dx 成正比：

$$\frac{dm}{dt} = -DA \frac{dc}{dx}$$

比例常数 D 为扩散系数(diffusion coefficient)，它在数值上等于当浓度梯度为一个单位时，在一秒钟内通过 1 厘米² 面积而扩散的溶质量。因为扩散是向低浓度方向进行，所以在公式右边一项的前面加一负号。蛋白质的扩散系数与其分子大小和形状以及溶剂的粘度(viscosity)有关。

测定扩散系数主要是基于费克第二扩散定律：

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2}$$

积分上式得：

$$\frac{c_2}{c_1} = e^{-\frac{x_2^2 - x_1^2}{4Dt}}$$

因此，测定在两个不同部位的浓度，即可计算出 D 值。

扩散系数随分子量的增加而降低。但扩散系数对分子量的变化并不敏感。对球形的大分子来说，扩散系数与分子量的立方根成反比。例如形状相同的血清清蛋白和 β -乳球蛋白，前者的分子量为后者的二倍，但前者的扩散系数只比后者小 18% (表 3-19)。扩散过程是受到蛋白质分子与溶剂之间的内摩擦阻力所反抗的，而这种阻力的大小不仅取决于蛋白质分子的质量并且强力地取决于它的颗粒形状。因此扩散系数一般不单独用来决定分子量，但如后所说的和沉降系数结合，可以给出蛋白质的精确分子量。

表 3-19 中列出几种蛋白质的扩散系数。 $D_{20,w}^0$ 是校正到标准条件下的扩散系数，标准条件指实验温度为 20°C，溶剂为水，通常研究蛋白质时使用的溶剂是缓冲液。有时文献上可以看到 $D_{20,w}^0$ ， D^0 是表示无限稀释时溶液的扩散系数，可做一系列不同浓度的实验，外推至零浓度得 $D_{20,w}^0$ 值。如果测定时，使用的蛋白质溶液很稀，这样所得的 D 与 $D_{20,w}^0$ 将很近似。

(四)蛋白质的沉降分析

蛋白质分子在溶液中受到强大的离心力作用时，如果蛋白质的密度大于溶液的密度，蛋白质分子就会沉降。沉降的速度与蛋白质的分子大小和密度有关，而且也与分子形状、溶液的

表 3-19 一些蛋白质的物理常数

	量 分 子	扩 散 系 数 ($D_{20,w} \times 10^7$) cm^2s^{-1}	沉 降 常 数 ($S_{20,w} \times 10^{13}$) s	摩 擦 比 (f/f_0)
细胞色素 c(牛心肌)	13 370	11.4	1.17	1.19
肌红蛋白(马心肌)	16 900	11.3	2.04	1.11
糜蛋白酶原(牛胰)	23 240	9.5	2.54	1.19
β -乳球蛋白(羊乳)	37 100	7.48	2.85	1.26
血清蛋白(人)	68 500	6.1	4.6	1.29
血红蛋白(人)	64 500	6.9	4.46	1.16
过氧化氢酶(马肝)	247 500	4.1	11.3	1.25
纤维蛋白酶(人)	339 700	1.93	7.63	2.34
肌球蛋白(鲑鱼肌)	524 800	1.10	6.43	3.63
烟草花叶病毒	40 000 000	0.46	198	2.03

密度和粘度有关。在实验室中研究蛋白质的沉降作用，现在都采用能够产生强大离心力(每分钟转速 60 000—80 000 转，相当于地球重力 g 的 500 000—600 000 倍)的超速离心机(ultracentrifuge)。

利用超速离心机测定蛋白质或其它生物高分子的分子量，常用的有两种方法，一种是沉降速度法(sedimentation velocity)，另一种是沉降平衡法(sedimentation equilibrium)。

沉降分析不仅可以提供关于蛋白质分子量的数据，而且还可以作为鉴定蛋白质分子均一性的一种方法。纯的蛋白质溶液中只含有分子量和形状相同的蛋白质分子，在离心力作用下，它们都以同一沉降速度移动，因此在蛋白质溶液与溶剂之间有一清晰界面。在沉降分析图谱上呈现一个峰。如果蛋白质样品不纯而含有几种蛋白质时，在沉降分析图谱中就有几个峰出现。

1. 沉降速度法

把蛋白质样品溶液放在离心机内的特制离心池中，在离心力的作用下，蛋白质分子将沿旋转中心向外周方向移动，并产生沉降界面，界面的移动速度代表蛋白质分子的沉降速度。在界面处由于浓度差造成折射率不同，可借助适当的光学系统，如 schlieren 光学系统(或称暗线照相光学系统)，观察到这种界面的移动。在 schlieren 光学系统中，利用溶液的折射率梯度(dn/dx)和样品的浓度梯度(dc/dx)成正比这一特点，巧妙地设计光路，使移动的界面(形成浓度梯度处)以峰形曲线呈现在照相图谱上，峰顶代表最大的 dn/dx 或 dc/dx ，即移动界面。离心机的装置允许在离心机转头(centrifugal rotor)旋转时，对界面的移动进行观察和拍照(图 3-140)。

在离心场中蛋白质分子颗粒发生沉降时，它将受到三种力的作用：

$$F_c(\text{离心力}) = m_p \omega^2 x$$

$$F_b(\text{浮力}) = V_p \rho \omega^2 x = m_p \bar{v} \rho \omega^2 x$$

$$F_f(\text{摩擦力}) = f v = f \frac{dx}{dt}$$

这里, m_p 是分子颗粒的质量; ω 是转头的角速度, 以每秒的弧度表示; x 是界面离旋转中心的

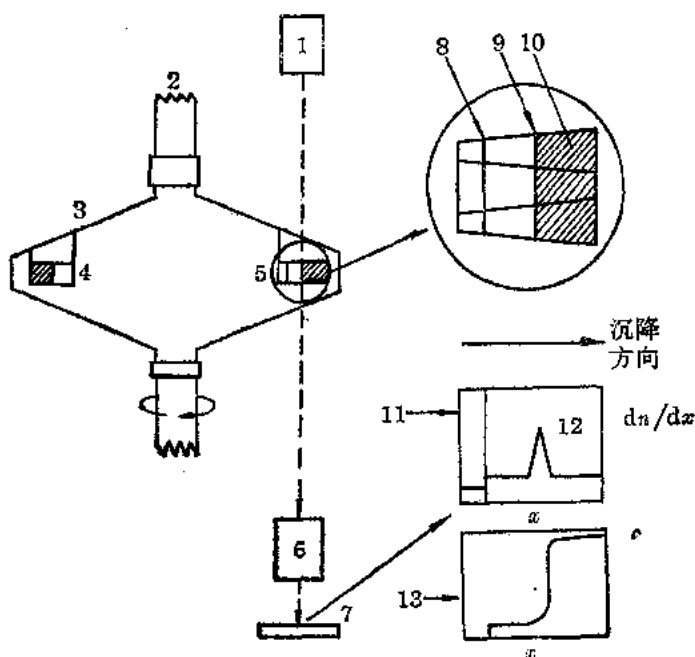


图 3-104 超速离心机工作原理图解

1. 光源, 2. 转轴, 3. 转头, 4. 平衡池, 5. 样品池, 6. 光学系统, 7. 底片, 8. 液面, 9. 沉降界面, 10. 沉降物质, 11. dn/dx (或 dc/dx) 对距离(x)的图谱, 12. 沉降界面峰, 13. 浓度(c)对距离(x)的图谱。

距离, 以厘米表示; $\omega^2 x$ 是离心加速度; V_p 是分子颗粒的体积; ρ 是溶剂的密度; \bar{v} 是蛋白质的偏微比容 (partial specific volume), 偏微比容的定义是: 当加入 1 克干物质于无限大体积的溶剂中时溶液体积的增量; $V_p \rho$ 或 $m_p \bar{v} \rho$ 是被分子颗粒排开的溶剂质量; f 是摩擦系数; v 是沉降速度, 即 dx/dt 。离心力减去浮力为分子颗粒所受到的净离心力:

$$F_c - F_b = m_p \omega^2 x - m_p \bar{v} \rho \omega^2 x = m_p \omega^2 x (1 - \bar{v} \rho)$$

式中, $(1 - \bar{v} \rho)$ 为浮力因子 (buoyancy factor)。当分子颗粒以恒定速度移动时, 净离心力与溶剂的摩擦力处于平衡:

$$F_c - F_b = F_f$$

即

$$m_p \omega^2 x (1 - \bar{v} \rho) = f \frac{dx}{dt}$$

或

$$\frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{m_p (1 - \bar{v} \rho)}{f}$$

此时, 单位离心力场的沉降速度为定值, 称沉降系数 (sedimentation coefficient) 或沉降常数, 用 s 表示:

$$s \equiv \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

将上式改写为:

$$\frac{d \log x}{dt} = \frac{s \omega^2}{2.303}$$

$d \log x/dt$ 是 $\log x$ 对 t 作图所得直线的斜率, 因此只要测得在 $t_1, t_2, t_3 \dots$ 时间相应的 $x_1, x_2, x_3 \dots$ 值, 求出斜率, 代入上式即得 s 值。式中角速度 (弧度/秒):

$$\omega = \text{转速 (r/min)} \times \frac{2\pi}{60}$$

转速是每分钟转头的旋转次数 (rotation per minute, 缩写为 r/min 或 rpm)。

蛋白质、核酸、核糖体和病毒等的沉降系数介于 1×10^{-13} 到 200×10^{-13} 秒的范围 (表

3-19)。为方便起见,把 10^{-13} 秒作为一个单位,称斯维得贝格(svedberg)单位,用 S 代表。例如人血红蛋白的沉降系数为 $4.46S$,即 4.46×10^{-13} 秒。由于测定时的温度和溶剂性质对 s 值产生影响,因此为了比较起见,在不同温度和溶剂中测得的沉降系数需要换算成标准条件下的 s 值。沉降系数的标准条件定为 20°C 溶剂为水。校正后的沉降系数符号用 $s_{20,w}$ 表示。根据斯笃克定律,球形分子颗粒的摩擦系数:

$$f = 6\pi\eta r$$

式中, r 为非水化球形颗粒半径,称斯笃克半径(stokes radius), η 为溶剂的粘度, π 为圆周率。又分子颗粒的体积:

$$V_P = m_P \bar{v} = \frac{4}{3} \pi r^3$$

所以,

$$m_P = \frac{4}{3} \pi r^3 \frac{1}{\bar{v}}$$

将上面的 f 和 m_P 值代入下式:

$$s = \frac{m_P(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

经整理得

$$s = \frac{2r^2}{9\eta}(\rho_P - \rho)$$

这里, $\rho_P(1/\bar{v})$ 是分子颗粒的密度。从上式可知,在温度 = t , 溶剂 = b (一般用缓冲液) 的实验条件下测得的沉降系数:

$$s_{t,b} = \frac{2r^2}{9\eta_{t,b}}(\rho_P - \rho_{t,b})$$

在 20°C , 溶剂为水(w) 的标准条件下,其沉降系数:

$$s_{20,w} = \frac{2r^2}{9\eta_{20,w}}(\rho_P - \rho_{20,w})$$

将上面两个式子相除:

$$\frac{s_{20,w}}{s_{t,b}} = \frac{\eta_{t,b}(\rho_P - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}(\rho_P - \rho_{t,b})}$$

即得校正公式如下:

$$s_{20,w} = s_{t,b} \left[\frac{\eta_{t,b}(\rho_P - \rho_{20,w})}{\eta_{20,w}(\rho_P - \rho_{t,b})} \right]$$

由于蛋白质浓度增加,分子间可能彼此干扰,摩擦系数增大,因此蛋白质的 s 值将减小。为校正因浓度造成的 s 值差异,可先测出一系列不同样品浓度的 $s_{20,w}$ 值,然后用外推法(extrapolation)求得浓度为零时的 $s_{20,w}^0$ 。

蛋白质分子颗粒的质量 m_P 等于它的分子量 M 除以阿伏伽德罗数 N , 即:

$$m_P = \frac{M}{N}$$

又知爱因斯坦-萨德兰德方程:

$$f = \frac{RT}{ND}$$

将上面 m_P 和 f 值代入下式:

$$s = \frac{m_P(1-\bar{v}\rho)}{f}$$

得

$$s = \frac{M}{N} \cdot \frac{ND}{RT}(1-\bar{v}\rho)$$

$$M = \frac{RTs}{D(1-\bar{v}\rho)}$$

此式称斯维得贝格方程 (Sved berg equation)。在相同的实验条件下测得蛋白质 s 值和 D 值,

以及偏微比容 (蛋白质溶于水的 \bar{v} 约为 0.74 厘米³/克) 和溶剂 (一般用缓冲液) 密度, 即可计算出蛋白质的分子量。

2. 沉降平衡法

利用沉降平衡法测定分子量是在较低速 (8000—20000 r/min) 的离心力场中进行的。离心开始时, 分子颗粒发生沉降, 由于沉降的结果

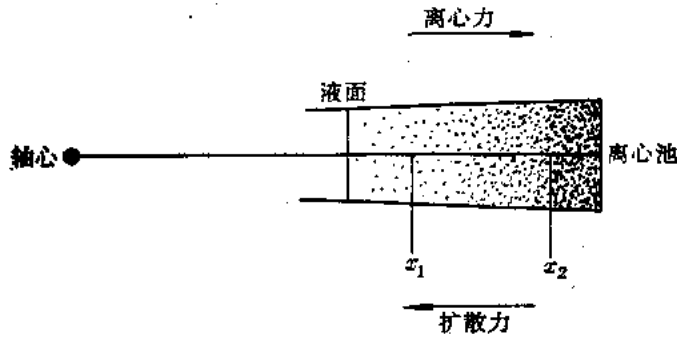


图 3-105 蛋白质的沉降平衡

造成浓度梯度。因而产生了扩散作用, 扩散力的作用方向正与离心力相反 (图 3-105)。在离心力作用下, 沉降速度为 dx/dt , 在时间 dt 内浓度为 c 的溶液越过横断面 A 的溶质量:

$$dm = cA \frac{dx}{dt} dt$$

因扩散作用沿相反方向越过横截面 A 的溶质量:

$$dm' = DA \frac{dc}{dx} dt$$

当净离心力与扩散力平衡时, 在离心池内从液面到液底形成一个由低到高的恒定浓度梯度, 因此:

$$dm = dm'$$

即

$$c \frac{dx}{dt} = D \frac{dc}{dx}$$

将

$$\frac{dx}{dt} = \frac{m_P}{f} (1-\bar{v}\rho) \omega^2 x$$

和

$$D = \frac{RT}{Nf}$$

代入上式得:

$$M = \frac{2RT}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2} \frac{d \ln c}{dx^2}$$

将此式自 x_1 至 x_2 积分得:

$$M = \frac{2RT \ln(c_2/c_1)}{(1-\bar{v}\rho)\omega^2(x_2^2 - x_1^2)}$$

这里, M , R , T , ω , \bar{v} , ρ 的意义与前面斯维得贝格方程中的相同。 c_1 和 c_2 是离旋转中心 x_1

和 x_2 处的蛋白质浓度。只要实验测得 c_1 和 c_2 以及 r 和 ρ , 即可算出蛋白质的分子量。近年来由于离心机性能的改进, 实验技术的发展, 加之理论比较完备, 沉降平衡法占了优势。

(五) 利用凝胶过滤法测定分子量

将在后面的蛋白质混合物的分离方法中看到, 利用凝胶过滤层析法 (gel filtration chromatography) 可以把蛋白质混合物按分子的大小分离开来。这种方法比较简便, 不要求复杂的仪器就能相当精确地测出蛋白质的分子量。从凝胶过滤的原理可知, 蛋白质分子通过凝胶柱的速度 (即洗脱体积的大小) 并不直接取决于分子的质量, 而是它的斯笃克半径。如果某种蛋白质与一理想的非水化球体具有相同的过柱速度即相同的洗脱体积, 则认为这种蛋白质具有与此球体相同的半径, 称斯笃克半径。因此利用凝胶过滤法测定蛋白质分子量时, 标准蛋白质 (已知分子量和斯笃克半径) 和待测蛋白质必须具有相同的分子形状 (接近球体), 否则不能得到比较准确的分子量。分子形状为线形的或与凝胶能发生吸附作用的蛋白质, 则不能用此方法测定分子量。

1966 年 Andrews 根据他的实验结果提出了一个经验公式:

$$\frac{V_e}{V_0} = a - b \log M$$

式中, V_e 为洗脱体积, V_0 为外水体积, M 为分子量, a 和 b 为常数。移项上式得:

$$\log M = \frac{a}{b} - \frac{1}{b} \frac{V_e}{V_0}$$

这里 $\frac{a}{b}$ 和 $\frac{1}{b}$ 均为常数, 在柱床条件确定后 V_0 也是常数, 令 $K_1 = \frac{a}{b}$, $K_2 = \frac{1}{bV_0}$ 因此:

$$\log M = K_1 - K_2 V_e$$

实验中, 只要测得几种标准蛋白质的 V_e , 并以它们的分子量对数 ($\log M$) 对 V_e 作图得一直线, 再测出待测样品的 V_e , 即可从图中确定它的分子量 (图 3-106)。利用凝胶过滤层析法测定分子量还有一个优点, 即待测样品可以是不纯的, 只要它具有专一的生物活性, 借助活性找出洗脱峰位置, 确定它的洗脱体积即可测定它的分子量。

测定蛋白质分子量一般用葡聚糖 (dextran), 其商品名称 Sephadex, 根据需要可选用 G-75 (分级范围 3000—80 000 道尔顿), G-100 (4000—150 000

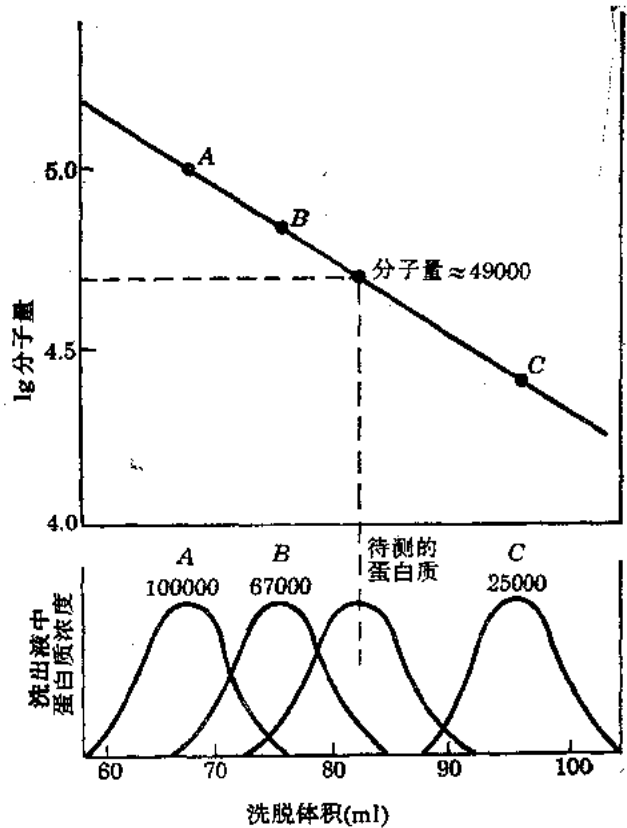


图 3-106 洗脱体积与分子量的关系

道尔顿)等型号的凝胶。

(六)利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定分子量

在后面将会谈到,蛋白质颗粒在各种介质中,包括在聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel)中电泳时,它的迁移率取决于它所带的净电荷以及分子大小和形状等因素。1967年 Shapiro 等人发现,如果在聚丙烯酰胺凝胶系统中加入阴离子去污剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, 缩写为 SDS)和少量的巯基乙醇,则蛋白质分子的电泳迁移率(electrophoretic mobility)主要取决于它的分子量,而与原来所带的电荷和分子形状无关。

SDS[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$]是一种有效的变性剂,它能破裂蛋白质分子中的氢键和疏水相互作用,而巯基乙醇能打开二硫键,因此在有 SDS 和巯基乙醇存在下,蛋白质分子或亚基(寡聚蛋白质同时解离成亚基)的多肽链处于展开状态。此时 SDS 以其烃链与蛋白质分子的侧链结合成复合物。在一定条件下,SDS 与大多数蛋白质的结合比为 1.4 克 SDS/1 克蛋白质,相当于每二个氨基酸残基结合一个 SDS 分子。SDS 与蛋白质的结合带来了两个后果:第一,由于 SDS 是阴离子,使多肽链复盖上相同密度的负电荷,该电荷量远超过蛋白质分子原有的电荷量,因而掩盖了不同种类蛋白质间原有的电荷差别,结果,所有的 SDS-蛋白质复合物,电泳时都以同样的电荷/蛋白质比向正极移动。实际上,SDS 凝胶电泳法是以电场作为驱动力用以代替大量溶剂流动的凝胶过滤。第二,改变了蛋白质单体分子的构象,SDS-蛋白质复合物在水溶液中的形状被认为是近似雪茄烟形的长椭圆棒,不同蛋白质的 SDS 复合物的短轴长度(直径)都是一样的约为 1.8 nm,而长轴长度则随蛋白质的分子量而成正比例地变化。不过 SDS-蛋白质复合物的真正本质尚不清楚。

由于不同蛋白质的 SDS 复合物具有相同的荷质比,并具有相似的构象,因而它们的净电荷量(q)与摩擦系数(f)之比(q/f)都接近一个定值(具有相近的自由迁移率),即不受各种蛋白质原有的电荷、分子形状等因素的影响。但在聚丙烯酰胺凝胶中由于引入凝胶的分子筛效应,电泳迁移率 μ 与多肽链分子量的对数有下列关系:

$$\log M = a - b \mu$$

或:

$$\log M = K_1 - K_2 \mu_R$$

式中 M 为分子量, a 、 b 和 K_1 、 K_2 都是常数, μ_R 是相对迁移率:

$$\mu_R = \frac{\text{样品迁移距离}}{\text{前沿(染料)迁移距离}}$$

实验测定时,以几种标准单体蛋白质分子量的对数值对其 μ_R 值作图,根据待测样品的 μ_R ,从标准曲线上查出它的分子量。

(七)蛋白质分子的形状

测定蛋白质分子的形状或构象最精确的方法是 X-射线晶体结构分析,但是这种方法只能给出晶体状态的蛋白质立体结构信息。关于蛋白质在溶液中的形状或构象的信息,到目前为止还只能借助间接的方法描写分子构象的轮廓即分子形状。

蛋白质分子在溶液中的摩擦系数一般可以根据实验测得的 D 值或 s 值计算出来,例如:

$$f = \frac{RT}{ND}$$

对于理想的非溶剂化的刚性球体(半径为 r), 它的摩擦系数(f_0)可以表达为:

$$f_0 = 6\pi\eta r = 6\pi\eta \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N} \right)^{\frac{1}{3}}$$

f/f_0 称为蛋白质分子的摩擦比(frictional ratio):

$$\frac{f}{f_0} = \frac{RT}{6\pi\eta ND} \left(\frac{4\pi N}{3M\bar{v}} \right)^{\frac{1}{3}}$$

这里, η 是溶剂的粘度, M 是分子量, N 是阿佛伽德罗数, \bar{v} 是偏微比容, D 是扩散系数, T 是绝对温度, R 是气体常数, π 为圆周率。当蛋白质的摩擦比 f/f_0 大于 1.0 时, 蛋白质分子的形状是不对称的或者是水化了的, 或者两者兼而有之。核糖核酸酶的形状接近于圆球形 ($f/f_0 = 1.04$)。另外一些蛋白质则是不对称的, 有的是椭圆柱体, 有的是细长的纺锤体。摩擦比越大, 反映蛋白质分子的不对称性越高, 因此摩擦比有时也称为蛋白质的不对称常数, 作为蛋白质分子形状偏离真正球体的程度的一种衡量。一些蛋白质的摩擦比见表 3-19。血纤维蛋白原的形状象一细长的纺锤体, 它的截面直径约为 3.8nm, 长度约 70nm。血液中一些蛋白质的分子大小与形状如图 3-107 所示。

三、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀

蛋白质的胶体性质 蛋白质溶液是一种分散系统 (disperse system)。在这种分散系统中, 蛋白质分子颗粒是分散相 (disperse phase), 水是分散介质 (disperse medium)。就其分散程度来说, 蛋白质溶液属于胶体系统 (colloidal system)。但是它的分散相质点是分子, 它是由蛋白质分子与溶剂(水)所构成的均相系统, 在这个意义上来说它又是一种真溶液。分散程度以分散相质点的直径来衡量。根据分散程度可以把分散系统分为三类: 分散相质点小于 1nm (纳米) 的为真溶液, 大于 100nm 的为悬浊液, 介于 1—100nm 的为胶体溶液。

分散相质点在胶体系统中保持稳定, 需要具备三个条件: 第一, 分散相的质点大小在 1—100nm 范围内, 这样大小的质点在动力学上是稳定的, 介质分子对这种质点碰撞的合力不等于零, 使它能在介质中作不断的布朗运动 (Brown movement); 第二, 分散相的质点带有同种电荷, 互相排斥, 不易聚集成大颗粒而沉淀; 第三, 分散相的质点能与溶剂形成溶剂化层, 例如与水形成水化层 (hydration mantle), 质点有了水化层, 相互间不易靠拢而聚集。

从蛋白质分子量的测定结果可以看到, 蛋白质的分子大小属于胶体质点的范围。蛋白

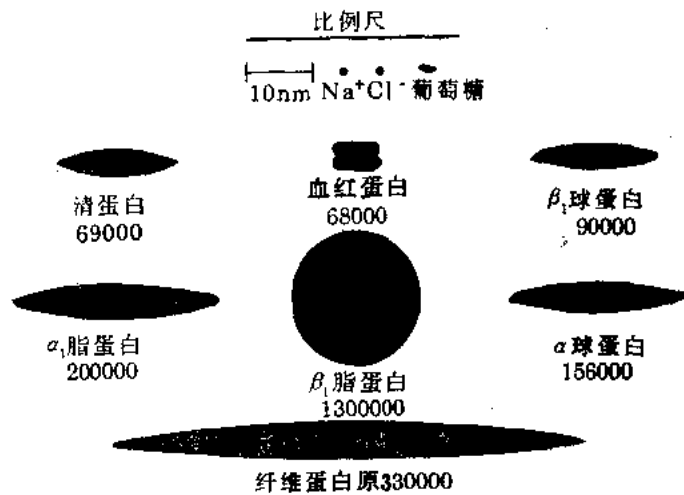


图 3-107 血浆中一些蛋白质的相对大小与近似形状

质溶液是一种亲水胶体 (hydrophilic colloid)。蛋白质分子表面的亲水基团, 如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 以及 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 等, 在水溶液中能与水分子起水化作用 (hydration), 使蛋白质分子表面形成一个水化层, 每克蛋白质分子能结合 0.3—0.5 克水。蛋白质分子表面上的可解离基团, 在适当的 pH 条件下, 都带有相同的净电荷, 与其周围的反离子构成稳定的双电层 (electric double layer)。蛋白质溶液由于具有水化层与双电层两方面的稳定因素, 所以作为胶体系统是相当稳定的, 如无外界因素的影响, 就不致互相凝集而沉淀。蛋白质溶液也和一般的胶体系统一样具有丁达尔效应 (Tyndall effect)、布朗运动以及不能通过半透膜等性质。

蛋白质的沉淀 蛋白质在溶液中的稳定性是有条件的、相对的。如果条件发生改变, 破坏了蛋白质溶液的稳定性, 蛋白质就会从溶液中沉淀出来。蛋白质溶液的稳定性既然与质点大小、电荷和水化作用有关, 那末很自然, 任何影响这些条件的因素都会影响蛋白质溶液的稳定性。例如在蛋白质溶液中加入脱水剂 (dehydrating agent) 以除去它的水化层, 或者改变溶液的 pH 达到蛋白质的等电点使质点失去携带相同净电荷或加入电解质破坏双电层, 那么蛋白质分子就会凝集成大的质点而沉淀 (precipitation)。

沉淀蛋白质的方法有以下几种:

1. 盐析法 向蛋白质溶液中加入大量的中性盐 (硫酸铵、硫酸钠或氯化钠等), 使蛋白质脱去水化层而聚集沉淀。盐析沉淀一般不引起蛋白质变性。

2. 有机溶剂沉淀法 向蛋白质溶液中加入一定量的极性有机溶剂 (甲醇、乙醇或丙酮等), 因引起蛋白质脱去水化层以及降低介电常数而增加带电质点间的相互作用, 致使蛋白质颗粒容易凝集而沉淀。有机溶剂沉淀法, 如果控制在低温下操作并且尽量缩短处理时间则可使变性速度减慢。

3. 重金属盐沉淀法 当溶液 pH 大于等电点时, 蛋白质颗粒带负电荷, 这样它就容易与重金属离子 (Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ag^+ 等) 结成不溶性盐而沉淀。误服重金属盐的病人可口服大量牛乳或豆浆等蛋白质进行解救就是因为它能和重金属离子形成不溶性盐, 后者再服用催吐剂排出体外。

4. 生物碱试剂和某些酸类沉淀法 生物碱试剂是指能引起生物碱 (alkaloid) 沉淀的一类试剂, 如鞣酸或称单宁酸 (tannic acid), 苦味酸 (picric acid) 即 2, 4, 6-三硝基酚, 钨酸 (tungstic acid, HWO_4) 和碘化钾等。某些酸类指的是三氯醋酸, 磺酰水杨酸 (sulfonyl salicylic acid) 和硝酸等。当溶液 pH 小于等电点时, 蛋白质颗粒带正电荷, 容易与生物碱试剂和酸类的酸根负离子发生反应生成不溶性盐而沉淀。这类沉淀反应经常被临床检验部门用来除去体液中干扰测定的蛋白质。

5. 加热变性沉淀法 几乎所有的蛋白质都因加热变性而凝固。少量盐类促进蛋白质加热凝固。当蛋白质处于等电点时, 加热凝固最完全和最迅速。加热变性引起蛋白质凝固沉淀的原因可能是由于热变性使蛋白质天然结构解体, 疏水基外露, 因而破坏了水化层, 同时由于蛋白质处于等电点也破坏了带电状态。我国很早就创造了将大豆蛋白质的浓溶液加热并点入少量盐卤 (含 MgCl_2) 的制豆腐方法, 这是成功地应用加热变性沉淀蛋白质的一个例子。

四、蛋白质分离提纯的一般原则

蛋白质在组织或细胞中一般都是以复杂的混合物形式存在, 每种类型的细胞都含有上千种不同的蛋白质。蛋白质的分离(separation)和提纯(purification)工作是生物化学中一项艰巨而繁重的任务。到目前为止, 还没有一个单独的或一套现成的方法能把任何一种蛋白质从复杂的混合蛋白质中提取出来。但是对于任何一种蛋白质都有可能选择一套适当的分离提纯程序以获得高纯度的制品(preparation)。现在已有几百种蛋白质得到结晶, 上千种蛋白质获得高纯度的制品。蛋白质提纯的总目标是增加制品纯度(purity)或比活性(specific activity), 即增加单位蛋白质重量中所要蛋白质的含量或生物活性(以活性单位/毫克蛋白表示)。设法除去变性的和不要的蛋白质, 并且希望所得蛋白质的产量达到最高值。

分离提纯某一特定蛋白质的一般程序可以分为前处理、粗分级和细分级三步。

第一步是前处理(pretreatment)。分离提纯某一蛋白质, 首先要求把蛋白质从原来的组织或细胞中以溶解的状态释放出来, 并保持原来的天然状态, 不丢失生物活性。为此, 应根据不同的情况, 选择适当的方法, 将组织和细胞破碎。动物组织和细胞可用电动捣碎机(waring blender)或匀浆器(homogenizer)破碎或用超声波处理法(ultrasonication)破碎; 植物组织和细胞, 由于具有由纤维素、半纤维素和果胶等物质组成的细胞壁, 一般需用与石英砂和适当的提取液一起研磨的方法破碎或用纤维素酶(cellulase)处理也能达到目的; 细菌细胞的破碎比较麻烦, 因为整个细菌细胞壁的骨架实际上是一个借共价键连接而成的称为肽聚糖(peptidoglycan)的囊状分子(sac-like molecule), 非常坚韧。破碎细菌细胞的常用方法有超声波振荡, 与砂研磨、高压挤压或溶菌酶处理(分解肽聚糖)等。组织或细胞破碎以后, 选择适当的介质(一般用缓冲液)把所要的蛋白质提取出来。

如果所要的蛋白质主要集中在某一细胞组分, 如细胞核、染色体、核糖体或可溶性的细胞浆等, 则可利用差速离心(differential centrifugation)方法将它们分开(表3-20), 收集该细胞组分作为下步提纯的材料。这样可以一下子除去很多杂蛋白质, 使提纯工作容易得多。如果碰上所要蛋白质是与细胞膜或膜质细胞器结合的, 则必须利用超声波或去污剂使膜结构解聚, 然后用适当的介质提取。

第二步是粗分级(rough fractionation)。当蛋白质混合物提取液获得后, 选用一套适当方

表3-20 在不同离心力下沉降的细胞组分

离心场*(g)	时间(分)	沉降的组分
1 000	5	真核细胞
4 000	10	叶绿体, 细胞碎片, 细胞核
15 000	20	线粒体, 细菌
30 000	30	溶酶体, 细菌细胞碎片
100 000	3—10(小时)	核糖体

* 离心场一般采用相对离心场(RCF), 以重力常数 $g(980 \text{ cm/s}^2)$ 的倍数表示。RCF 与每分钟的转数(r/min)以及离心机旋转轴到离心管中间的距离, 即平均半径 r (以厘米表示)的关系为:
$$\text{RCF} = \frac{4\pi^2(r/\text{min})^2 r}{3600 \times 980} = 1.11 \times 10^{-5} (r/\text{min})^2 r$$

法,将所要的蛋白质与其他杂蛋白质分离开来。一般这一步的分级用盐析、等电点沉淀和有机溶剂分级分离等方法。这些方法的特点是简便、处理量大,既能除去大量杂质,又能浓缩蛋白质溶液。

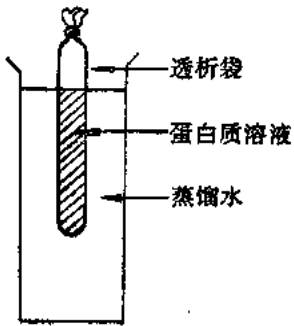


图 3-108 透析装置

第三步是细分级(fine fractionation),也就是样品的进一步提纯。样品经粗分级以后,一般体积较小,杂蛋白大部分已被除去。进一步提纯,一般使用层析法包括凝胶过滤,离子交换层析,吸附层析以及亲和层析等。必要时还可选择电泳法,包括区带电泳、等电聚焦等作为最后的提纯步骤。用于细分级的方法一般规模较小,但分辨率高。

结晶是蛋白质分离提纯的最后步骤。尽管结晶并不能保证蛋白质的均一性(homogeneity),但只有某种蛋白质在溶液中数量上占优势时才能形成结晶。结晶过程本身也伴随着一定程度的提纯,而重结晶又可除去少量夹杂的蛋白质。由于结晶中从未发现过变性蛋白质,因此蛋白质的结晶不仅是纯度的一个标志,也是断定制品处于天然状态的有力指标。

蛋白质纯度愈高,溶液愈浓就愈容易结晶。结晶的最佳条件是使溶液略处于过饱和状态,此时较易得到结晶。要得到适度的过饱和溶液,可借控制温度、加盐盐析、加有机溶剂或调节pH等方法来达到。接入晶种常能加速结晶过程。

五、蛋白质混合物的分离方法

这里将介绍几种根据蛋白质在溶液中的下列性质分离蛋白质混合物的方法:(1)分子的大小;(2)溶解度;(3)电荷;(4)吸附性质;(5)对其他分子的生物学亲和力等。

(一)根据分子大小不同的分离方法

蛋白质分子最明显的特征之一就是颗粒大,并且不同种类的蛋白质在分子大小方面有着一定的差别,因此可以利用一些简便的方法使蛋白质和其他小分子的物质分开,并使蛋白质混合物也得到分离。

1. 透析和超过滤 透析(dialysis)和超过滤(ultrafiltration)就是利用蛋白质分子不能通过半透膜的性质,使蛋白质和其他小分子物质如无机盐、单糖、水等分开。常用的半透膜是玻璃纸或称赛璐玢纸(cellophane paper),火棉纸或称赛璐玢纸(celloidin paper)和其他合成材料。透析是将待提纯的蛋白质溶液装在半透膜的透析袋里放在蒸馏水中进行的,透析外液可以更换,直至透析袋内无机盐等小分子物质降低到最小值为止(图3-108)。超过滤是利用压力或离心力,强行使水和其他小溶质分子通过半透膜,而蛋白质留在膜上(图3-109)。

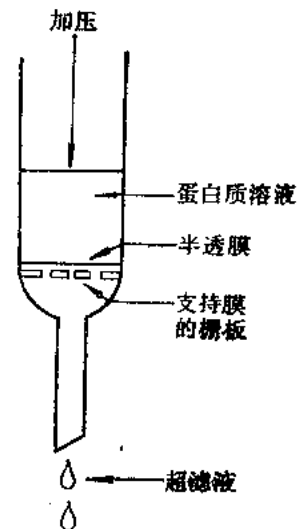


图 3-109 蛋白质的超过滤

2. 密度梯度(区带)离心 蛋白质颗粒的沉降不仅决定于它的大小,而且也取决于它的密度。如果蛋白质颗粒在具有密度梯度(density gradient)的介质中离心时,质量和密度大的颗粒比质量和密度小的颗粒沉降得快,

并且每种蛋白质颗粒沉降到与自身密度相等的介质梯度时,即停止不前,最后各种蛋白质在离心管(常用塑料的)中被分离成各自独立的区带(zone)。分成区带的蛋白质可以在管底刺一小孔逐滴放出,分部收集,每个组分进行小样分析以确定区带位置。

常用的密度梯度有蔗糖梯度(图 3-110),聚蔗糖梯度和其他合成材料的密度梯度。蔗糖便宜,纯度高,浓液(60%, W/W)密度可达 1.28 克/厘米³。聚蔗糖的商品名是 Ficoll, 它是由蔗糖和 1-氯-2, 3-环氧丙烷合成的高聚物,分子量约 400 000。需要高密度和低渗透压的梯度时,可用 Ficoll 代替蔗糖。

密度梯度在离心管内的分布是管底的密度最大,向上逐渐减小(图 3-110)。待分离的蛋白质混合物平铺在梯度的顶端,离心采用水平转头高速进行。使用密度梯度的主要原因是这种设计能起一种稳定作用,可以消除因对流和机械振动引起的区带界面的扰乱。

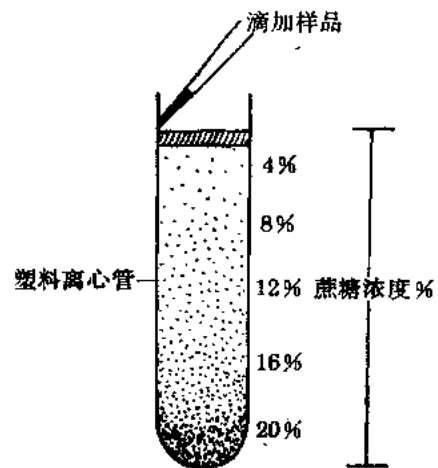


图 3-110 蔗糖密度梯度

3. 凝胶过滤 即凝胶过滤层析(gel filtration chromatography), 也称分子排阻层析(molecular-exclusion chromatography), 分子筛层析(molecular-sieve chromatography)或凝胶渗透层析(gel permeation chromatography)。这是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。

凝胶过滤的介质 凝胶过滤所用的介质是凝胶珠(gel bead), 其内部是多孔的网状结构。凝胶的交联度或孔度(网孔大小)决定了凝胶的分级范围(fractionation range), 即能被该凝胶分离开来的蛋白质混合物的分子量范围。例如 Sephadex G-50 的分级范围是 1500—30000。有时也用排阻极限(exclusion limit)来表示分级范围的上限, 它被定义为不能扩散进入凝胶珠微孔的最小分子的分子量, 例如 Sephadex G-50 的排阻极限是 30 000。凝胶的粒度与洗脱流速和分辨率有关。粒度通常用筛眼(目)数(mesh size)或珠直径(μm)表示。

目前经常使用的凝胶有交联葡聚糖(cross-linked dextran), 聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gel)和琼脂糖(agarose)等。交联葡聚糖是由线形 α -1, 6-葡聚糖与 1-氯-2, 3-环氧丙烷反应交联而成的化合物, 它的商品名(tradenname)为 Sephadex。聚丙烯酰胺凝胶(商品名为 Bio-gel P)是一种人工合成的凝胶, 它是由单体丙烯酰胺(acrylamide)和交联剂甲叉双丙烯酰胺(N, N' -methylenebisacrylamide)共聚而成的。琼脂糖是从一种海藻多糖——琼脂或种洋菜(agar)中分离制得的。琼脂糖凝胶的商品名称为 Sepharose 或 Bio-Gel A, 它是一种天然凝胶。琼脂糖凝胶的网状结构是借助氢键而不是共价交联键维持的, 这种凝胶的优点是孔径大, 排阻极限高。

凝胶过滤的原理 当不同分子大小的蛋白质混物流经凝胶层析柱时, 比凝胶网孔大的分子不能进入珠内网状结构, 而被排阻在凝胶珠之外, 随着溶剂在凝胶珠之间的孔隙向下移动并最先流出柱外; 比网孔小的分子能不同程度地自由出入凝胶珠的内外。这样由于不同大小

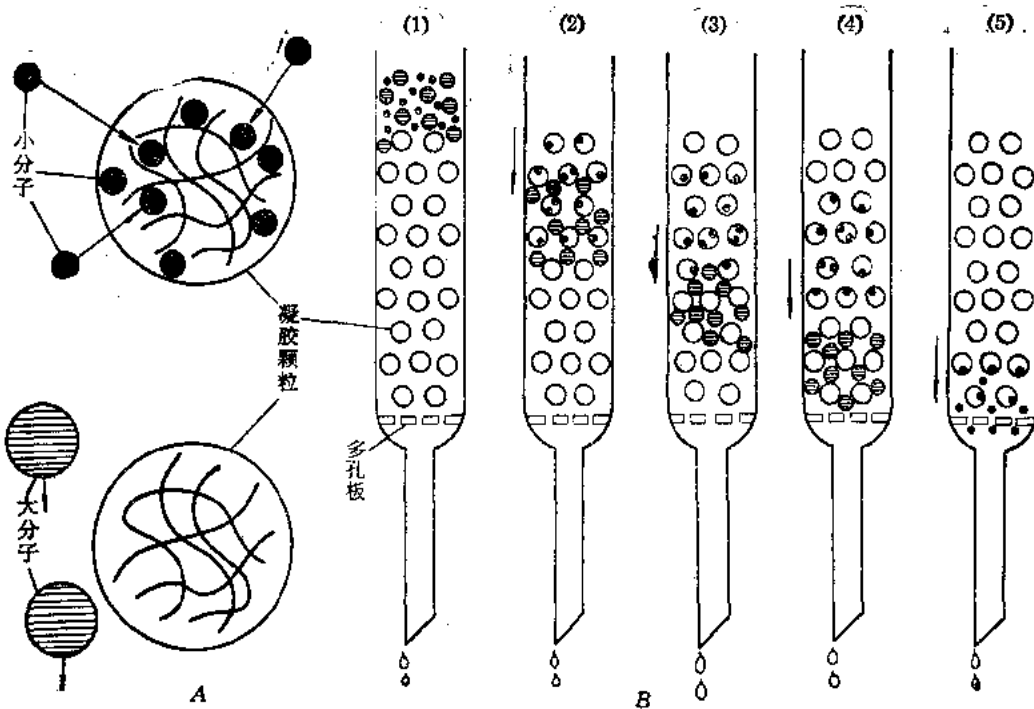


图 1-111 凝胶过滤层析的原理

A. 小分子由于扩散作用进入凝胶颗粒内部而被滞留；大分子被排阻在凝胶颗粒外面，在颗粒之间迅速通过。

B. (1) 蛋白质混合物上柱；(2) 洗脱开始，小分子扩散进入凝胶颗粒内；大分子则被排阻于颗粒之外；(3) 小分子被滞留，大分子向下移动，大小分子开始分开；(4) 大小分子完全分开；(5) 大分子行程较短，已洗脱出层析柱，小分子尚在行进中。

的分子所经的路径不同而得到分离，大分子物质先被洗脱出来，小分子物质后被洗脱出来。凝胶过滤的基本原理可用图 3-111 表示。

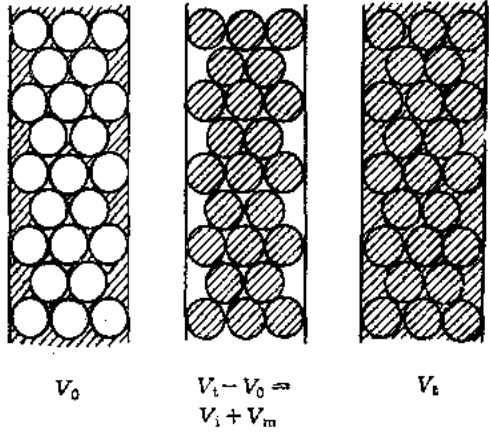


图 3-112 凝胶柱床中 V_t , V_0 等关系示意图

为了便于进一步讨论凝胶过滤的原理，下面先介绍几个有关凝胶柱体积的术语 (图 3-112)。

V_t 为凝胶柱床的总体积 (total volume)，常称柱床体积。它可以用水直接测量或按几何形状计算而得。

V_0 为某一溶质组分的洗脱体积 (elution volume)。它是自加样开始到该组分的洗脱峰或洗脱峰上升边缘的半高点出现时所流出的体积。

V_0 为孔隙体积 (void volume) 或称外体积 (outer volume) 或外水体积。测定不能被凝胶滞留的大分子溶质如蓝色葡聚糖 (blue dextran, 分子量约 200 000) 的洗脱体积可以决定 V_0 。直径均匀的刚性球形颗粒的柱床 V_0 约等于 $0.35 V_t$ 。

V_i 为内体积 (inner volume) 或称内水体积，它可由干胶克重乘其吸水值 (以毫升/克表示) 近似地表示，或直接测出凝胶柱小分子物质 (如 T_2O , tritium oxide) 通过的洗脱体积再减

去外体积得来。

V_m 为凝胶基质体积(matrix volume)。

凝胶床内各种体积之间的关系是:

$$V_t = V_0 + V_1 + V_m$$

其中, $(V_1 + V_m)$ 亦即 $(V_t - V_0)$ 是凝胶珠的总体积。

假定凝胶与待分离的溶质之间不存在相互作用, 那末凝胶过滤可以看成是一种液-液分配层析。凝胶珠内的水相是固定相(V_1), 凝胶珠外的水相是流动相(V_0), 溶质就在 V_1 和 V_0 之间分配。能进入 V_1 的溶质的量决定于它的大小和凝胶孔的大小。溶质在柱中的移动速度取决于它在两相之间的分配系数(K_d):

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_1}$$

K_d 是溶质分子大小的函数, 而与凝胶床的几何形状无关。对于完全被排阻在凝胶珠之外的大分子来说, 它们将在同一洗脱峰出现, $V_e = V_0$, $K_d = 0$; 对于完全能自由出入凝胶珠内外的小分子, $V_e = V_0 + V_1$, $K_d = 1$; 对于在分级范围内的中等分子, 凝胶珠内部的有些微孔它们能扩散进去, 有些则不能, 因此一般情况下, K_d 总是在 0 与 1 之间。但有时发现 $K_d > 1$, 这表明凝胶对溶质有吸附作用。整理上式得:

$$V_e = V_0 + K_d V_1$$

从这个式子可以看出, 某一溶质的 K_d 就是该溶质能扩散进入珠内的空间部分占其总空间(V_1) 的分数。

由于实际上测定 V_1 有困难, 所以上述的公式很少使用。经修正, 用凝胶珠内的总体积代替上式中的内体积(V_1) 来表示 K_d , 此时 K_d 改用 K_{av} , 称可用分配系数(available coefficient):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

只要测得 V_t , V_0 和 V_e , 即可计算 K_{av} 值。

对于两种不同分子量和不同 K_{av} 值(K'_{av} 和 K''_{av}) 的组分, 它们的洗脱体积之差:

$$V_s = V'_e - V''_e = (K'_{av} - K''_{av})(V_t - V_0)$$

因此, 为了完全分开两种组分, 样品的体积一定不能大于 V_s 。上面这个式子可以用来计算某一提纯过程的最适柱床体积。

(二) 利用溶解度差别的分离方法

利用蛋白质的溶解度的差别来分离各种蛋白质是实践中最常用的方法。影响蛋白质溶解度的外界因素很多, 其中主要有: (1) 溶液的 pH, (2) 离子强度, (3) 介电常数, (4) 温度。但在同一的特定外界条件下, 不同蛋白质具有不同的溶解度, 这是因为溶解度归根结底取决于它们本身的分子结构, 例如分子中极性的亲水基团与非极性的疏水基团的比例, 它们在蛋白质分子表面的排列以及由此而产生的偶极距等。

根据蛋白质分子结构的特点, 适当地改变上面所说的外界因素, 就可以选择性地控制蛋白质混合物中某一成分的溶解度, 作为分离和纯化蛋白质的一种手段。

1. 等电点沉淀和 pH 控制 蛋白质是带有正电荷和负电荷基团的两性电解质, 带电基团的电荷数量则因 pH 不同而变化。当蛋白质处于等电点 pH 时, 蛋白质的净电荷为零, 由于相邻蛋白质分子之间没有静电斥力而趋于结聚而沉淀, 因此它的溶解度达到最低点。在等电点以上或以下的 pH 时, 蛋白质分子携带同种符号(或正或负)的净电荷而互相排斥, 阻止了单个分子结聚成沉淀物, 因此溶解度都较大。图 3-113 说明 β -乳球蛋白的溶解度在 pH 5.2—5.3 时达到最低值, 在等电点两侧的 pH, 溶解度迅速上升; 并说明氯化钠浓度对 pH 与溶解度的关系无多大影响。不同的蛋白质具有不同的等电点, 利用蛋白质在等电点时溶解度最低的原理可以把蛋白质混合物彼此分开。当蛋白质混合物的 pH 被调到其中一种成分的等电点 pH 时, 这种蛋白质的大部或全部将沉淀下来, 那些等电点高于或低于该 pH 的蛋白质则仍被留在溶液中。这样沉淀出来的等电蛋白质保持着天然构象, 能重新溶解于适当的 pH 和一定浓度的盐溶液中。

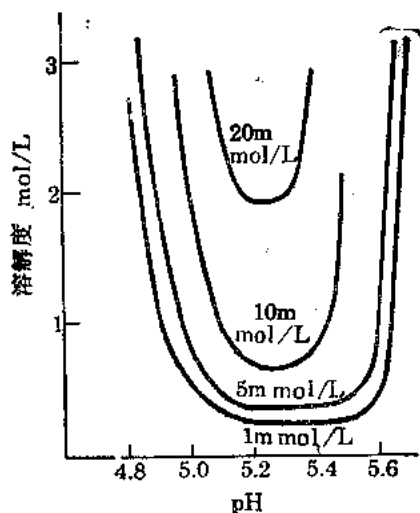


图 3-113 pH 和盐的浓度对 β -乳球蛋白溶解度的影响

图中曲线上的数值为氯化钠的浓度。

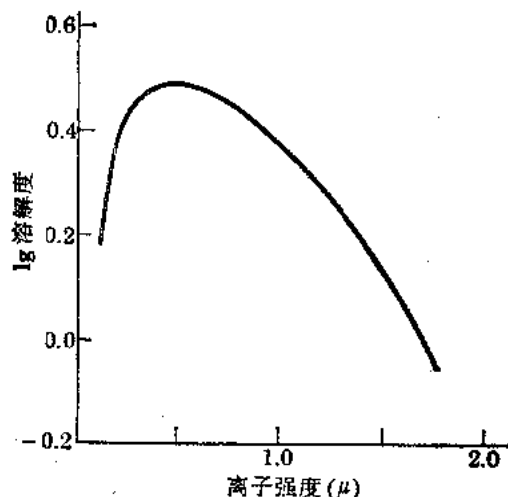


图 3-114 在等电点 pH 时, 中性盐(K_2SO_4)对碳氧血红蛋白溶解度的影响。

2. 蛋白质的盐溶和盐析 如图 3-113 和 3-114 所示, 中性盐对球状蛋白质的溶解度有显著的影响。低浓度时, 中性盐可以增加蛋白质的溶解度, 这种现象称为盐溶(salting in)。盐溶作用主要是由于蛋白质分子吸附某种盐类离子后, 带电表层使蛋白质分子彼此排斥, 而蛋白质分子与水分子间的相互作用却加强, 因而溶解度提高。球蛋白溶液在透析过程中往往沉淀析出, 这就是因为透析除去了盐类离子, 使蛋白质分子间的相互吸引增加, 引起蛋白质分子的凝集并沉淀。

应当指出, 同样浓度(摩尔数/升)的两价离子的中性盐, 如 $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ 对蛋白质溶解度的影响效果, 要比单价离子的中性盐如 $NaCl$ 、 NH_4Cl 大得多。中性盐影响蛋白质溶解度的能力是它们的离子强度的函数(图 3-114)。离子强度(ionic strength)可以定义为:

$$\frac{I}{2} = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$$

式中, m_i 为各种离子(i)的浓度(通常为重量摩尔浓度); z_i 为各种离子的净电荷(不考虑符号);

Σ 是表示“加和”的符号。计算溶液的离子强度，可将各种离子的浓度分别乘以各种离子所带的净电荷的平方，然后将所有乘积相加并除以2。例如2 mol/L 硫酸铵溶液的离子强度为：

$$\frac{(4 \times 1) + (2 \times 4)}{2} = 6$$

注意，计算离子强度时，仅用离子的净电荷，因为未解离的电解质(如未解离的醋酸)或携带正负电荷数相等的兼性离子(如中性氨基酸)并不增强溶液的离子强度。

从图 3-114 可以看出，当溶液的离子强度增加到一定数值时，蛋白质的溶解度开始下降。当离子强度增加到足够高时，例如饱和或半饱和的程度，很多蛋白质可以从水溶液中沉淀出来，这种现象称为盐析(salting out)。盐析作用主要是由于大量中性盐的加入，使水的活度降低，原来溶液中的大部分自由水转变为盐离子的水化水(water of hydration)，从而降低蛋白质极性基团与水分子间的相互作用，破坏蛋白质分子表面的水化层。盐析法是蛋白质制品的分离和纯化过程中最常用的方法之一。研究得最多的蛋白质——鸡蛋清里的卵清蛋白就是用盐析法得到的。鸡蛋清用水稀释后，加入硫酸铵至半饱和，其中的球蛋白立即沉淀析出，过滤后，酸化滤液至 pH 4.8，在 20°C 放置，即得卵清蛋白晶体。盐析沉淀的蛋白质保持着它的天然构象，能再溶解。用于盐析的中性盐以硫酸铵为最佳，因为它在水中的溶解度很高，而溶解度的温度系数则较低。

牛胰脏中水解蛋白质的酶原和酶都已经用硫酸铵和硫酸镁盐析的方法分离、提纯并结晶出来(图 3-115)。由于分离出来的大多数酶已经用几种鉴定方法证明是均一的，可见在一些情况下，盐析法是一种非常有效的分级方法。

下面介绍两个在盐析分级中很有用的公式。在 0°C 下，硫酸铵浓度由饱和度 S_1 增至 S_2 ，应向 1 升溶液中添加的固体硫酸铵的克数：

$$W = \frac{505(S_2 - S_1)}{1 - 0.285 S_2}$$

式中 S_1 和 S_2 分别为以小数表示的起始饱和度和终了饱和度，饱和度(degree of saturation)是在给定条件下以可能达到的最大浓度的百分数表示的盐浓度，505 是 0°C 时 1000 毫升饱和硫酸铵(100% 或 1.00 饱和度)溶液中所含的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的克数(即 505 克/1000 毫升溶液或 707 克/1000 克水)。考虑到大量的盐加入水溶液中所引起的体积变化，需要知道盐的比容 \bar{v} ，固体硫酸铵的 $\bar{v} = 0.565 \text{ ml/g}$ 。根据这里提供的数据读者可以自己推导出上面的公式。

100 毫升硫酸铵溶液，由饱和度 S_1 变为 S_2 ，应向其中加入饱和硫酸铵的体积毫升数 V ：

$$V = \frac{100(S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

3. 有机溶剂分级法 与水互溶的有机溶剂(如甲醇、乙醇和丙酮等)能使蛋白质在水中的溶解度显著降低。在室温下，这些有机溶剂不仅能引起蛋白质沉淀，而且伴随着变性。如果预先将有机溶剂冷却到 -40° 至 -60°C ，然后在不断地搅拌下逐滴加入有机溶剂以防局部浓度过高，那末变性问题在很大程度上可以得到解决。蛋白质在有机溶剂中的溶解度也随温度、pH 和离子强度而变化。在一定温度、pH 和离子强度条件下，引起蛋白质沉淀的有机溶剂的浓度不同，因此控制有机溶剂浓度也可以分离蛋白质。例如，在 -5°C 的 25% 乙醇中卵清蛋

白可以沉淀析出而与卵清的其它蛋白质分开。

有机溶剂引起蛋白质沉淀的主要原因之一是改变介质的介电常数 (dielectric constant)。水是高介电常数物质(20°C 时, 80), 有机溶剂是低介电常数物质(20°C 时, 甲醇 33, 乙醇 24, 丙酮 21.4), 因此有机溶剂的加入使水溶液的介电常数降低。从电学的库仑定律 (Coulomb's law) 可知, 介电常数的降低将增加两个相反电荷之间的吸引力。这样, 蛋白质分子表面可解离基团的离子化程度减弱, 水化程度降低, 因此促进了蛋白质分子的聚集和沉淀。有机溶剂引起蛋白质沉淀的另一重要方式可能与盐析相似, 与蛋白质争夺水化水, 致使蛋白质聚集体的形成并沉淀。

水溶性非离子聚合物如聚乙二醇 (polyethylene glycol) 也能引起蛋白质沉淀。聚乙二醇的主要作用可能是脱去蛋白质的水化层。蛋白质在聚乙二醇中的溶解度几乎与溶液中的盐浓度, pH 甚至蛋白质的绝对(水中)溶解度无关。这些观察表明聚乙二醇与蛋白质亲水基团发生相互作用并在空间上阻碍蛋白质与水相接近。蛋白质在聚乙二醇中的溶解度明显地依赖于聚乙二醇的分子量, 这个事实也支持了上述观点。

4. 温度对蛋白质溶解度的影响 在一定的温度范围内, 约 0—40°C 之间, 大部分球状蛋白质的溶解度随温度升高而增加, 但也有例外, 例如人的血红蛋白从 0 到 25°C 之间, 溶解度随温度上升而降低。在 40—50°C 以上, 大部分蛋白质变得不稳定并开始变性, 一般在中性 pH 介质中即失去溶解力。大多数蛋白质在低温下比较稳定, 因此蛋白质的分级分离操作一般都在 0°C 或更低的温度下进行。

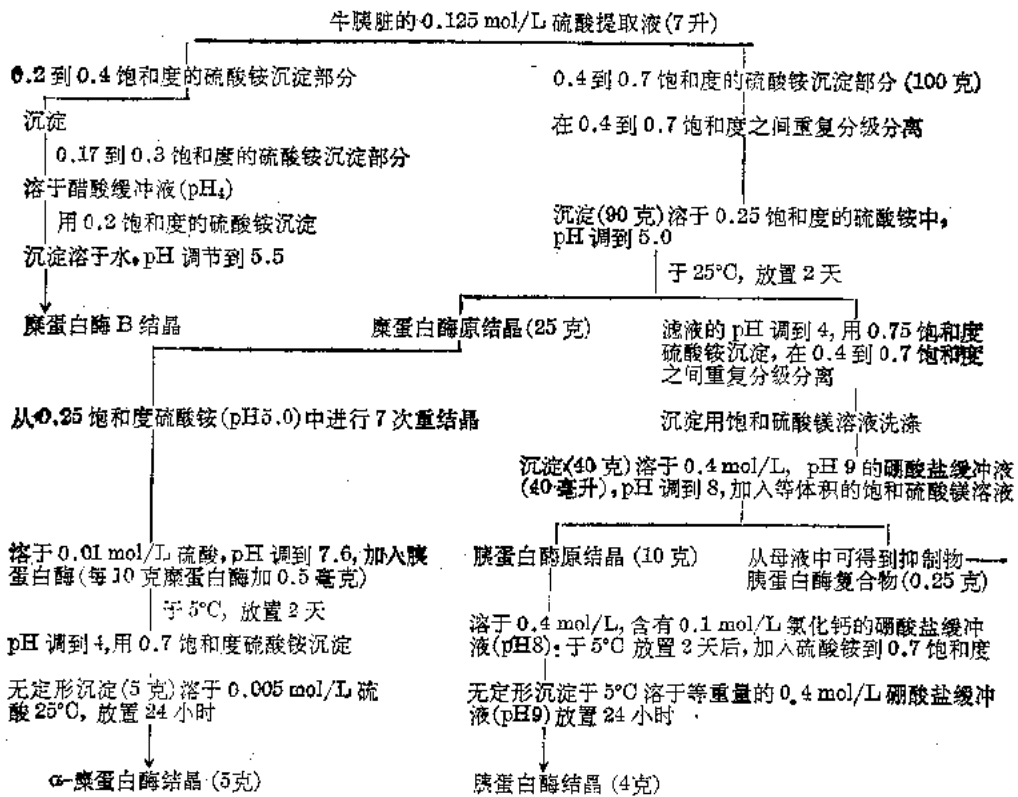


图 3-115 糜蛋白酶、胰蛋白酶及其前体的制备

控制影响蛋白质溶解度的上述四种基本因素使蛋白质混合物得到分离的最典型例子是血浆蛋白质的分级分离。分离血浆蛋白质的一个常用而有效的方法是调节 pH 使溶液从中性逐渐变成酸性，同时控制乙醇浓度和离子强度以扩大各种蛋白质溶解度的差别，使血浆中不同的蛋白质成分先后沉淀出来(图 3-116)。

(三) 根据电荷不同的分离方法

根据蛋白质的电荷不同即酸碱性质不同分离蛋白质混合物的方法有电泳和离子交换层析两类。

1. 电泳 在外电场的的作用下，带电颗粒，例如不处于等电状态的蛋白质分子，将向着与其电性相反的电极移动，这种现象称电泳 (electrophoresis) 或离子泳 (ionphoresis)。或从方法学的角度给电泳下定义，电泳是在外电场存在下，利用分子携带的净电荷不同分离分子混合物的一种实验技术。电泳技术可用于氨基酸、肽、蛋白质、核苷酸和核酸等生物分子的分离分析和制备。

带电颗粒在电场中的泳动速度主要决定于它所带的净电荷量以及颗粒的大小和形状。颗粒在电场中发生泳动时，将受到两种方向相反的力的作用：

$$F(\text{电场力}) = qE \left(-q \frac{U}{S} \right)$$

$$F_1(\text{摩擦力}) = f v$$

这里， q = 颗粒所带的电量

$$E = \text{电场强度或电势梯度} = \frac{U}{S}$$

U = 两电极间的电势差 (以伏特表示)

S = 两电极之间距离 (以厘米表示)

f = 摩擦系数 (与颗粒的形状、大小和介质的粘度有关)

v = 颗粒泳动速度 (以厘米/秒表示)

当颗粒以恒稳速度移动时，则 $F - F_1 = 0$ ，因此， $qE = f \cdot v$ ，即，

$$\frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$

在一定的介质中对某一种蛋白质来说， q/f 是一个定值，因而 v/E 也是定值，它被称为迁移率或泳动度：

$$\mu = \frac{v}{E}$$

μ 值可以通过实验测得，蛋白质的 μ 值为 $0.1 \times 10^{-4} - 1.0 \times 10^{-4}$ 厘米²·伏特⁻¹·秒⁻¹。蛋白质的泳动度以及 pH 和离子强度对泳动度的影响都反映某一特定蛋白质的特性。因此电泳不仅是分离蛋白质混合物和鉴定蛋白质纯度的重要手段，而且也是研究蛋白质性质很有用的

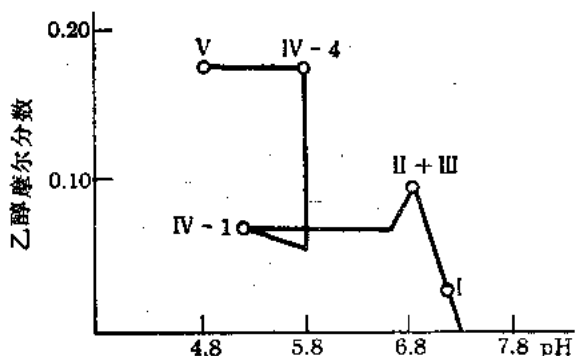


图 3-116 在乙醇中血浆蛋白质的分离图解

图中 I 是纤维蛋白原；II+III 是 γ 球蛋白、异凝集素和 β 球蛋白；IV-1 是 α 球蛋白；IV-4 是 α 、 β 球蛋白；V 是清蛋白。

一种物理化学方法。

目前电泳的类型很多，但是它们都是在经典的自由电泳或称移动界面电泳 (free or moving-boundary electrophoresis) 的基础上发展起来的。自由电泳首先是由瑞典的 Tiselius 于 1930 年设计出来的。此方法先在 U-形管内使蛋白质溶液和缓冲液之间形成清晰的界面，然后加一电场 (图 3-117)。

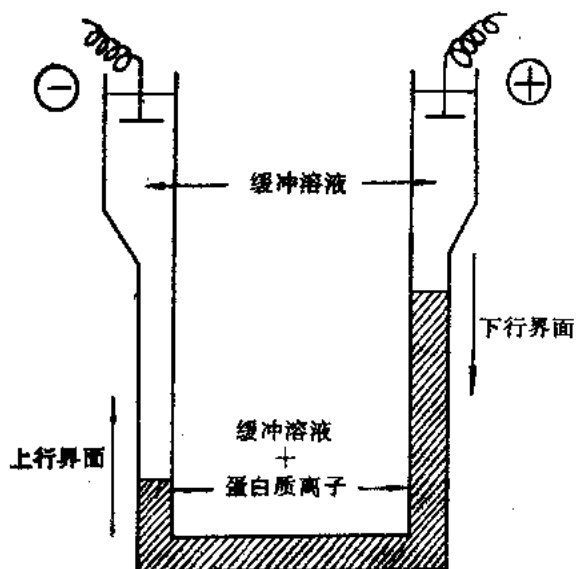


图 3-117 界面移动电泳的图解。选择适当的缓冲液 pH 使所有的蛋白质携带相同电荷，图中蛋白质假设为阳离子。

由于界面处存在浓度梯度，因而产生折射率梯度，利用适当的光学系统 (见沉降速度法) 可以观察到界面 (电泳照相谱中的峰) 的移动。在电泳过程中，每个移动界面 (峰) 相当于某一特定的蛋白质。根据界面移动的速度和电场强度即可算出某一蛋白质的泳动度。如果某一特定蛋白质在几种不同的 pH 下测出它的泳动度，可用外推法求出该蛋白质的等电点。界面移动电泳在相当长的时间内曾是定量分析蛋白质混合物成分的有力工具。例如

用于研究人血浆的蛋白质成分得到很有意义的结果。图 3-118 中不同的峰代表血浆中的主要蛋白质组分，它们是 γ 球蛋白，纤维蛋白原 (ϕ)， β 球蛋白， α_2 球蛋白， α_1 球蛋白和清蛋白 (A)。每个峰下的面积代表各个组分的相对量、对比正常和病人的血浆蛋白质的电泳图谱，有助于临床诊断。

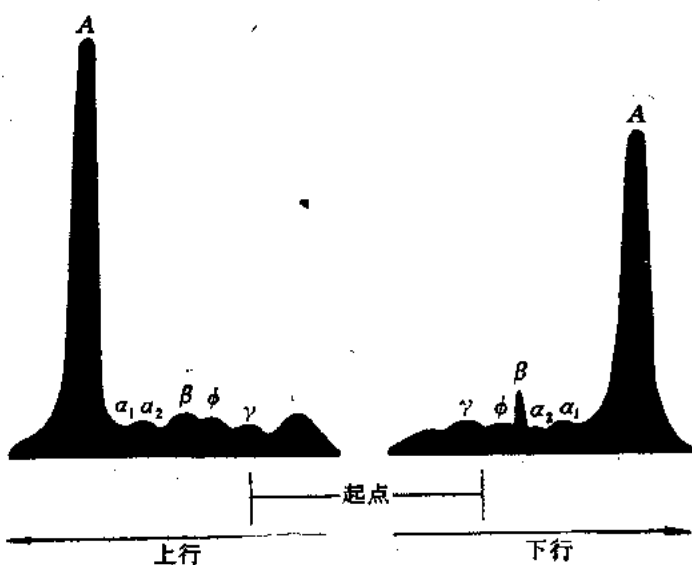


图 3-118 人血浆蛋白质的电泳图案 (磷酸缓冲液: pH=9.7, $\mu=0.20$)

区带电泳 (zone electrophoresis) 是由于在支持物上电泳时各组分因迁移速度不同分布成区带而得名。区带电泳按其支持介质的物理性状不同可以分成四类: (1) 滤纸电泳和薄膜电泳 (醋酸纤维薄膜电泳和聚酰胺薄膜电泳等); (2) 粉末电泳, 支持介质是淀粉、纤维素粉或硅胶粉等, 粉末与适当的溶剂调和, 铺设成平板; (3) 细丝电泳, 如尼龙丝和其他人造丝电泳, 这是一类微量电泳; (4) 凝胶电泳, 最常用的支持介质有聚丙烯酰胺和琼脂糖凝胶, 前者适于分离蛋白质和寡核苷酸, 后者适于分离核酸。这两种凝胶电泳的分辨率都很高。凝胶可以制作成平板或柱子。柱和平板凝胶电泳系统的

分辨率都很高。凝胶可以制作成平板或柱子。柱和平板凝胶电泳系统的

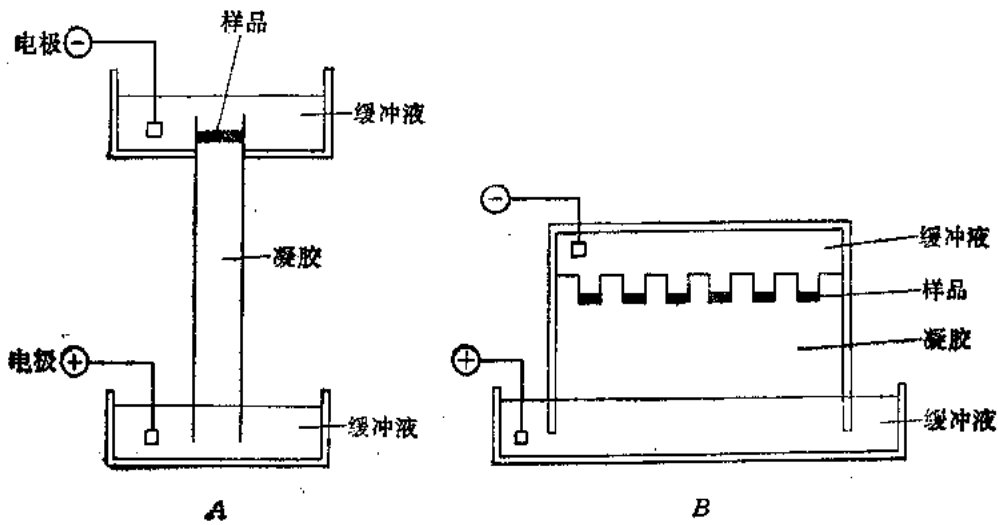


图 3-119 柱凝胶电泳(A)和平板凝胶电泳(B)的图解

图解见图 3-119。

电泳前支持物用缓冲液浸润(如薄膜、滤纸)或用缓冲液直接配制(如凝胶),将待分离的蛋白质样品施加它的一端,支持物的两端与电极联接,通电后,进行电泳。电泳完毕,各个组分分布在不同的区域,用显色剂显色后可以显示出各个组分。

氨基酸混合物特别是寡核苷酸混合物一次电泳往往不能完全分开。这种情况可以将第一次电泳分开的斑点通过支持介质间的接触吸印(blotting)转移到第二个支持介质上,旋转 90°,进行第二次电泳。这种方法被称为双向电泳(two-dimensional electrophoresis)。

区带电泳具有设备简单,操作方便,样品用量少等优点,它是蛋白质分析分离的常用技术。

盘状电泳(disc electrophoresis)是在区带电泳的基础上发展起来的。它以聚丙烯酰胺凝胶为支持物,一般制成凝胶柱,凝胶柱由相连的两节凝胶(小节浓缩胶和大节分离胶)组成,这两节凝胶的孔径大小、缓冲液离子成分和离子强度、pH 以及电场强度都是不同的,即不连续的,这样电泳时样品首先在不连续的两相间积聚浓缩而成很薄的起始区带(厚度约为 0.1 毫米),然后再进行电泳分离。在盘状电泳过程中有三种物理效应:(1)样品的浓缩效应;(2)凝胶对分子的筛选效应,(颗粒小的移动快,颗粒大的移动慢);(3)一般电泳分离的电荷效应。由于这三种物理效应,使样品分离效果好,分辨率高。例如人血清用纸电泳只能分成 5—7 个成分,用盘状电泳则可分成 30 个条带清晰的成分(图 3-120)。盘状电泳名称的来源是由于此法的原理是基于电泳支持物的不连续性(discontinuity),凑巧分离出来的区带也很象圆盘状(discoid shape)因此在英文中取“不连续性”和“圆盘状”的双关意思的英文字头 disc 来命名这种电泳,中文译为盘状电泳。



图 3-120 盘状电泳示意图谱

等电聚焦(isoelectric focusing)或称电聚焦(electrofocusing)。等电聚焦时,蛋白质混合物的分离是在具有pH梯度的蔗糖介质中进行的。在电场内,每种蛋白质成分将移向并“聚焦”(停留)在等于其等电点的pH梯度处,形成一个很窄的区带。它的分辨率很高,可以把人的血清分成40多个区带。此技术特别适用于同工酶(isozyme)的鉴定。只要它们的pI有0.02pH单位的差异就能分开。

凝胶等电聚焦是用聚丙烯酰胺凝胶代替原来的蔗糖溶液,由于介质固体化,操作方便,分离时间缩短(只需1—3小时)。此法适用于蛋白质的微量分析(10—50微克)。

2. 离子交换层析 离子交换层析的基本原理已在前面氨基酸混合物的分析分离中讲过。在这里,主要介绍一下广泛用于蛋白质和核酸这两类大分子层析的支持介质离子交换纤维素和离子交换交联葡聚糖的一些特性。

离子交换纤维素(cellulose ion exchanger)是采用纤维素作为交换剂基质的。离子交换纤维素之所以适用于大分子的分离,是由于它具有松散的亲水性网状结构,有较大的表面积,大分子可以自由通过。因此对蛋白质来说,它的交换容量比离子交换树脂大。同时纤维素糖残基上的羟基被取代的百分比较低,因而交换纤维素的电荷密度较少,所以洗脱条件温和,回收率高。此外,离子交换纤维素的品种较多可以适用于各种分离目的。总之它的出现对酶和其他蛋白质的分离提纯是个重大的改进。常用的离子交换纤维素的类型和结构列于表3-21。

离子交换葡聚糖(Sephadex ion exchanger)这类交换剂的类型和可电离基团的种类与离子交换纤维素差不多(表3-20),只是基质纤维素被换成交联葡聚糖。离子交换Sephadex每克干重具有相当多的可电离基团,容量比离子交换纤维素大3—4倍。这类交换剂的优点是,它们既能根据分子的净电荷数量又能根据分子的大小(分子筛效应)进行分离。

在离子交换层析中,蛋白质对离子交换剂的结合力取决于彼此间相反电荷基团的静电吸引,而后者又与溶液的pH有关,因为pH决定离子交换剂和蛋白质的电离程度。盐的存在可以降低离子交换剂的离子基团与蛋白质的相反电荷基团之间的静电吸引。特别是由于单位重量的离子交换纤维素所含的离子基团较少(0.3—1.0mmol/g),盐浓度的微小变化,就会直接影响它对蛋白质的吸附容量。因此蛋白质混合物的分离可以由改变溶液中的盐离子强度和pH来完成,对离子交换剂结合力最小的蛋白质首先由层析柱中洗脱出来。

层析洗脱,可以采用保持洗脱剂成分一直不变的方式洗脱,也可以采用改变洗脱剂的盐浓度或(和)pH的方式洗脱,后一种方式又可以分为两种:一种是跳跃式的分段改变,另一种是渐进式的连续改变。采用前一种方式洗脱称为分段洗脱(stepwise elution),后一种方式洗脱称为梯度洗脱(gradient elution)。梯度洗脱一般分离效果好,分辨率高,特别是使用交换容量小,对盐浓度敏感的离子交换剂,多用梯度洗脱。

为使样品组分能从离子交换柱上分别洗脱下来,必须控制洗脱剂体积(与柱床体积相比)和洗脱剂的盐浓度和pH。洗脱剂体积和盐浓度变化形式(梯度形式)直接影响层析柱的分辨率。

通常采用的梯度形式有线性(性),凸形,凹形和复合形四种,使用最多的是线性梯度。为获得这些梯度曾设计出多种梯度混合器(gradient mixer)。下面介绍两种常用混合器及其制

表 3-21 离子交换纤维素和离子交换 Sephadex

名称	可电离基团	结构(可电离基团)
阳离子交换剂 弱酸型 CM-纤维素 CM-Sephadex C-25 C-50	羧甲基(carboxymethyl)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$
强酸型 P-纤维素	磷酸酯(phosphate)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{P}-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
SE-纤维素 C-25 C-50	磺乙基(sulfoethyl)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$
SP-Sephadex	磺丙基(sulfopropyl)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$
阴离子交换剂 弱碱型 AE-纤维素 PAB-纤维素	氨基乙基 对氨基苯甲基 (<i>p</i> -aminobenzyl)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$
ECTEOLA-纤维素	三乙醇胺(通过表氯醇偶联到纤维素上)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{cases} \text{C}_2\text{H}_4\text{OH} \\ \text{C}_2\text{H}_4\text{OH} \end{cases}$
DEAE-纤维素	二乙基氨基乙基 (diethylaminoethyl)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{cases}$
DEAE-Sephadex A-25 A-50	同上	同上
强碱型 TEAE-纤维素 QAE-Sephadex A-25 A-50	三乙基氨基乙基 (triethylaminoethyl) 二乙基(2-羟丙基)季氨基 [diethyl(2-hydroxypropyl) quaternary amino]	$-\text{OC}_2\text{H}_4\cdot\text{N}^+\equiv(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ $-\text{OC}_2\text{H}_4-\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ $\quad \quad \quad \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$

作的梯度形式。

简单型混合器:如图 3-121 所示,该装置由二个容器组成,一个是贮液瓶(R),一个是混合瓶(M)。两个瓶都是柱形瓶,直径可以是相等的也可以是不等的。两个瓶底部彼此相联,它们的出口处各安有活塞。混合瓶配有搅拌装置,在此瓶内装入梯度洗脱的起始溶液(低浓度盐溶液),贮液瓶内装入高浓度的盐溶液,其浓度是梯度洗脱最后所需的浓度。两个瓶内的液面应处于同一水平。

C_R 和 V_R 分别为洗脱开始前贮液瓶内溶液的浓度和体积; C_M 和 V_M 分别为洗脱开始前混

合瓶内溶液的浓度和体积; $V_R + V_M = V$, V 为洗脱剂的总体积; v 为从层析柱中流出的洗出液体积(也即从混合瓶中流出的洗脱剂体积); c 为当洗出液体积为 v 时的洗脱剂浓度(即混合瓶内溶液的浓度)。

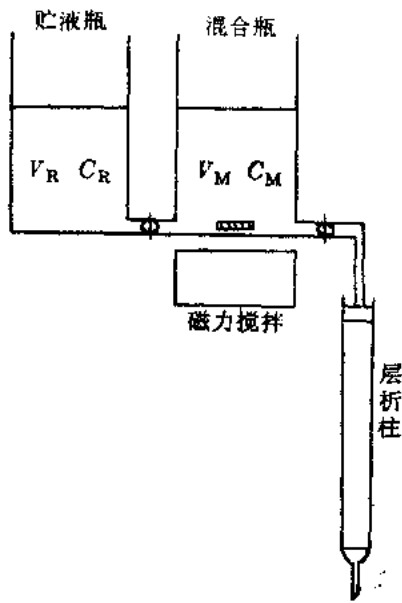


图 3-121 简单型梯度混合器

洗脱时打开贮液瓶和混合瓶的活塞。洗脱过程中洗脱剂浓度将随洗出液体积而变化。任一时刻当从混合瓶内流出 dv 体积的洗脱剂时,混合瓶内溶液浓度的微小改变量:

$$dc = \frac{(C_R - c) \frac{V_R}{V} dv}{V_M - \frac{V_M}{V} v}$$

改写为

$$\frac{dc}{C_R - c} = \frac{\frac{V_R}{V_M} dv}{V - v}$$

将上式从 $v=0$ 到 v , 从 $c=0$ 到 c 积分并整理得:

$$c = C_R - (C_R - C_M) \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{\frac{V_R}{V_M}}$$

设 $K = \frac{V_R}{V_M}$, 则

$$c = C_R - (C_R - C_M) \left(1 - \frac{v}{V}\right)^K$$

这是代表线性、凹形和凸形三种梯度洗脱的通式。当 $K=1$, 即 $V_R = V_M$ 时, 上面公式简化为:

$$c = \frac{C_R - C_M}{V} v + C_M$$

这是线性梯度洗脱公式。由此公式可以看出, 当洗脱条件确定后, C_R , C_M 和 V 是不变的, 因此盐浓度 c 是洗出液 v 的线性函数, 代表线性洗脱(图 3-122)。式中 $\frac{C_R - C_M}{V}$ 是斜率, 如果 C_R 和 C_M 确定后, 改变洗脱剂总体积 V , 可以控制盐浓度的变化速度。一般斜率低, 分辨率高, 但峰宽加大。 $K > 1$, 为凹形梯度, $K < 1$, 则为凸形梯度。

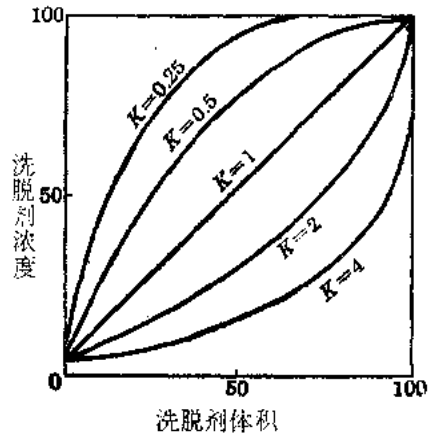


图 3-122 梯度洗脱曲线

复合型混合器: 如图 3-123 所示, 它与简单型混合器不同的地方只是把贮液瓶由圆柱形换成圆锥形, 也就是说, 二个瓶的横切面之比随混合器中的液体的流出而变化。这种混合器可以给出 S 形洗脱曲线, 其中包含了凹形, 线性 and 凸形三部分曲线。它的数学计算比较复杂, 这里不予介绍。

(四) 蛋白质的选择吸附分离

某些物质, 例如极性的硅胶和氧化铝以及非极性的活性炭等的粉末具有吸附能力, 能够将其他种类的分子吸附在其粉末颗粒的表面, 而吸附力的强弱又因被吸附的物质性质不同而异, 吸附层析法 (adsorption chromatography) 就是利用这种吸附力的强弱不同而达到分离的目的。蛋白质分子与各种吸附剂结合的真实性知道得很少。但认为与非极性吸附剂作用可能主要是靠范德华力和疏水相互作用, 而与极性吸附剂作用的主要的力可能是离子吸引和(或)氢

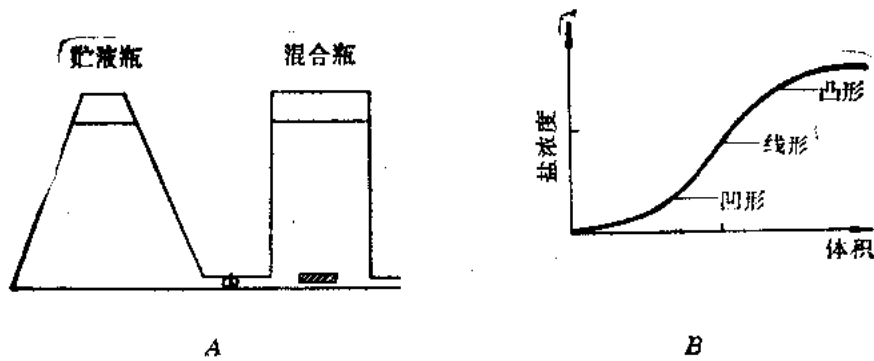


图 3-123 复合型混合器(A)及由它产生的洗脱曲线(B)。

键键合。

蛋白质提纯中使用最广和最有效的吸附剂是结晶磷酸钙 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ，即羟磷灰石(hydroxyapatite)。据推测，蛋白质分子中带负电荷的基团与羟磷灰石晶体的钙离子结合。蛋白质可用磷酸缓冲液从羟磷灰石柱上洗脱下来。羟磷灰石也用来分离核酸和纯化病毒。此外，活性炭、硅胶、氧化铝和磷酸钙凝胶也常用于吸附层析。

(五)根据对配基的生物学特异性的分离方法——亲和层析

亲和层析法(affinity chromatography)是分离蛋白质的一种极为有效的方法。它经常只需要经过一步的处理即可使某种待提纯的蛋白质从很复杂的蛋白质混合物中分离出来，并且纯度很高。前面讨论过的各种分离方法都是根据混合物中蛋白质之间的物理和化学性质上的差别，而这种方法是基于某种蛋白质所具有的生物学特异性，即它与另一种称配基的分子能特异而非共价地结合。所谓配基是指能被生物大分子所识别并与之结合的原子、原子团和分子，例如酶的作用底物、辅酶、调节效应物及其结构类似物。激素和受体蛋白，抗原与抗体互为配基。原则上任何一种蛋白质都能使用亲和层析法分离。已用此法分离得到的蛋白质有酶、抗体、运输蛋白以及完整的细胞器和病毒诱导的肿瘤细胞。

亲和层析的基本原理是：先把待提纯的某一蛋白质的特异配基，通过适当的化学反应共价地连接到象琼脂糖凝胶一类的载体表面的功能基上。一般在配基与多糖基质之间插入一段所谓连接臂或间隔臂(spacer arm)使配基与凝胶之间保持足够的距离，不致因载体表面的空间位阻妨碍待分离的大分子与其配基的结合。这类多糖材料在其他性能方面允许蛋白质自由通过(图 3-124)。当含有待提纯的蛋白质的混合样品加到这种多糖材料的层析柱上时，待提纯的蛋白质则与其特异的配体结合因而吸附在配体的载体——琼脂糖颗粒的表面上，而其它的蛋白质，因对这个配体不具有特异的结合位点(binding site)，将通过柱子而流出。被特异地结合在柱子上的蛋白质可用自由配体分子溶液洗脱下来。

六、蛋白质含量的测定与纯度鉴定

在蛋白质分离提纯的过程中，经常需要测定蛋白质的含量和检查某一蛋白质的提纯程度。这些分析工作包括：测定蛋白质的总量，测定蛋白质混合物中某一特定蛋白质的含量和鉴定最后制品的纯度。

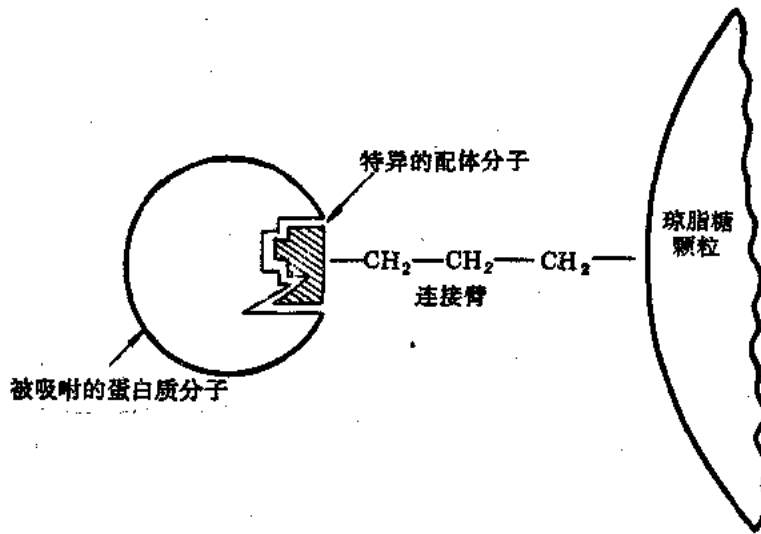


图 3-124 亲和层析原理

测定蛋白质总量常用的方法有：凯氏定氮法、双缩脲法、Folin-酚试剂法(lowry法)和紫外吸收法等, 这些方法在普通的实验手册中都有详细的描述。

测定蛋白质混合物中某一特定蛋白质的含量通常要用具有高度特异性的生物学方法。具有酶或激素性质的蛋白质可以利用它们的酶活性或激素活性来测定含量。有些蛋白质虽然没有酶或激素那样特异的生物学活性, 但是大多数蛋白质当注入适当的动物的血流中时, 会产生抗体; 因此, 利用抗体-抗原反应, 也可以测定某一特定蛋白质的含量。这些生物学方法的测定和总蛋白质测定配合起来, 可以用来研究蛋白质分离过程中某一特定蛋白质的提纯程度。提纯程度常用这一特定成分与总蛋白之比来表示, 例如每毫克蛋白质含多少活性单位(对酶蛋白来说, 这一比例称为比活性)。提纯工作一直要进行到这个比例不再增加为止。

蛋白质制品纯度的鉴定通常采用物理化学的方法, 例如电泳分析、沉降分析、扩散分析等。纯的蛋白质在它稳定的范围内, 在一系列不同 pH 条件下进行电泳时, 都以单一的泳动度移动, 因此在界面移动电泳中, 它的电泳图谱只有一个峰。同样地, 在沉降分析中, 纯的蛋白质在

离心力影响下, 以单一的沉降速度运动。由于沉降速度基本上是由分子大小和形状决定的, 而与化学组成无关, 因此作为鉴定纯度的方法, 它要比电泳分析差些。

纯的蛋白质在一定的溶剂系统中具有恒定的溶解度, 而不依赖于存在于溶液中未溶解固体的数量。用恒溶度法鉴定蛋白质纯度在理论上是严格的, 在实验方法上也是简便易行的。在严格规定的条件下, 以加入的固体蛋白质对溶解的蛋白质作图。如果蛋白质制品是纯的, 那么溶解度曲线

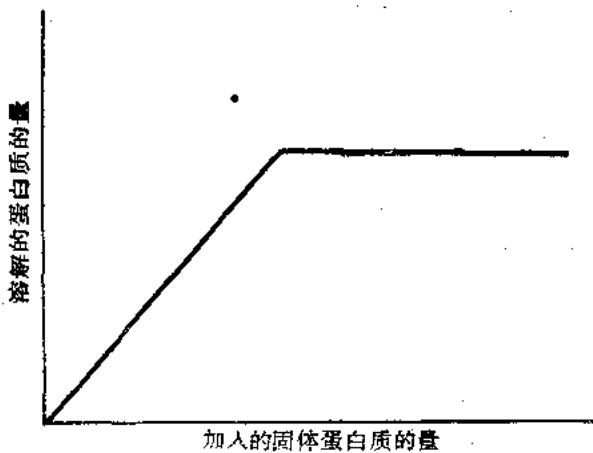


图 3-125 蛋白质的溶解度曲线

只呈现一个折点,在折点以前,直线的斜率为1,在折点以后,斜率为零(图3-125)。不纯的蛋白质的溶解度曲线常常呈现两个或两个以上的折点。

必须指出,任何单独一种鉴定只能认为是蛋白质分子均一性的必要条件而不是充分条件。事实上很少有几个蛋白质能够全部满足上面各种鉴定的严格要求,往往是在一种鉴定中表现为均一的蛋白质,在另一种鉴定中又表现为不均一的了。

提 要

蛋白质分子是由一条或多条多肽链构成的生物大分子。多肽链是由20种氨基酸通过肽键共价连接而成的,各种多肽链都有自己特定的氨基酸顺序。蛋白质的分子量介于6 000到1 000 000道尔顿或更高。

蛋白质分为两大类:简单蛋白质和结合蛋白质;根据蛋白质的构象可以分为纤维状蛋白质和球状蛋白质。

为了表示蛋白质结构的不同组织层次,经常使用一级结构、二级结构、三级结构和四级结构这样一些专门术语。一级结构就是共价主链的氨基酸顺序,有时也称化学结构,二、三和四级结构又称空间结构(即三维构象)或高级结构。

蛋白质的生物功能决定于它的高级结构,高级结构是由一级结构即氨基酸顺序决定的,而氨基酸顺序是由遗传物质DNA的碱基顺序所规定的。

蛋白质可被酸、碱或蛋白酶水解成它的基本构造单位 α -氨基酸。蛋白质中的氨基酸都是L型的。其中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸在紫外区有光吸收,这是紫外吸收法定量蛋白质的基础。

氨基酸是两性电解质。当pH接近1时,氨基酸的可解离基团全部质子化,当pH在13左右时,则全部去质子化。在这中间的某一pH(因不同氨基酸而异),氨基酸以中性的兼性离子($\text{H}_3\text{N}^+\text{CHR}\text{COO}^-$)状态存在。某一氨基酸处于净电荷为零的兼性离子状态时的介质pH称为该氨基酸的等电点或等离子点用pI表示。

所有的 α -氨基酸都能与茚三酮发生颜色反应。 $\alpha\text{-NH}_2$ 与2,4-二硝基氟苯(DNFB)作用产生相应的DNP-氨基酸(Sanger反应); $\alpha\text{-NH}_2$ 与苯异硫氰酸酯(PITC)作用形成相应氨基酸的苯氨基硫甲酰衍生物(Edman反应)。胱氨酸中的二硫键可用氧化剂(如过甲酸)或还原剂(如巯基乙醇)断裂。半胱氨酸的SH基在空气中氧化则成二硫键。这几个反应在氨基酸和蛋白质化学中占有重要地位。

氨基酸分析分离方法主要是基于氨基酸的酸碱性质和极性大小。

肽键($\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---N---} \\ | \\ \text{H} \end{array}$)是连接多肽链主链中氨基酸残基的共价键,是刚性平面结构。二硫键是

使多肽链间交联或链内成环的共价键。

多肽链可发生部分水解,形成长短不一的小肽段。除部分水解可以得到小肽之外,生物界

还有许多活性小肽游离存在,如谷胱甘肽等。

测定蛋白质分子一级结构的一般步骤包括:(1)测定N末端基的数目,由此确定蛋白质分子由几条多肽链构成;(2)将蛋白质分子中各条多肽链拆开并各自分离出来;(3)测定多肽链的氨基酸组成,由此确定各组成氨基酸的分子比;(4)分析多肽链的N末端基和C末端基氨基酸;(5)断裂多肽链内的二硫键;(6)多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断裂点不同的肽段;(7)将每套肽段中的各个肽段分离出来,用Edman方法测出各个肽段的氨基酸顺序;(8)比较两套或几套肽段的氨基酸顺序,拼凑出整个多肽链的氨基酸顺序;(9)确定原来多肽链中二硫键的位置。

同源蛋白质(来自不同生物执行同一生物功能的蛋白质)中有许多片段的氨基酸顺序相同,可互换的氨基酸残基数目与蛋白质来源的种属在进化上的位置有相关关系。同种蛋白质(来自同种生物行使同一生物功能的蛋白质)的氨基酸顺序有时发生个体差异,虽然差异是细微的,但有的造成严重的功能障碍,如镰刀形细胞贫血症。

在生物体内有些蛋白质常以前体形式合成,只有按一定方式裂解除去部分肽链之后才出现生物活性,这一现象称为蛋白质的激活作用。

近几十年来多肽和蛋白质的人工合成获得了很大发展。我国在六十年代初首次在上世界上人工合成了蛋白质——牛胰胰岛素。

每种蛋白质至少都有一种构象在生理条件下是稳定的,并具有生物活性,这种构象称为蛋白质的天然构象。研究蛋白质构象的主要方法是X-射线结构分析。

蛋白质的二级结构是指多肽链主链中有规则的重复构象。二级结构的基本类型有三种: α -螺旋, β -折叠片和 β -转角。天然蛋白质中的 α -螺旋都属于右手螺旋。 α -螺旋结构中每个肽键上的羰基氧和酰胺氮都参与氢键的形成,因此这种构象是相当稳定的。这些氢键大体上与螺旋的长轴平行。每一圈螺旋占3.6个氨基酸残基。 α -角蛋白几乎完全由 α -螺旋多肽链组成。这些链彼此缠绕形成螺旋的螺旋或称超螺旋。 β -折叠片中,肽链主链处于较伸展的曲折形式,肽链之间或一条肽链的肽段之间借助氢键彼此连成片层结构,所以称为 β -折叠片。这些氢键与肽链的长轴几乎成直角,肽链的走向可以是平行的,也可以是反平行的。大多数 β -折叠片略有扭转以缓解侧链之间的空间应变(steric strain)。蚕丝心蛋白几乎是完全由扭转的 β -折叠片组成。 α -螺旋和 β -折叠片也存在于球状蛋白质中。 β -转角是球状蛋白质中发现的第三种二级结构。

一个给定的肽键构象可由一对二面角(Φ, Ψ)来规定。如果规定了蛋白质中每一肽键的二面角,则确定了多肽链主链的构象。

在球状蛋白质中经常可以看到由若干二级结构元件(α -螺旋, β -折叠片等)组合在一起,形成有规则的组合体,如 $\beta\alpha\beta$ 组合, $\beta\beta\beta$ 组合等称为超二级结构。

胶原蛋白是动物结缔组织中最丰富的结构蛋白,它由原胶原蛋白分子组成,原胶原蛋白分子的二级结构是一种三螺旋,这是一种右手超螺旋结构。其中每一股又是一种特殊的左手螺旋。弹性蛋白是结缔组织中的另一种重要的蛋白质,它的基本亚基是弹性蛋白原。弹性蛋白中通过锁链素或异锁链素连接二条、三条或四条弹性蛋白原多肽链,形成一个多肽链网,能

向各个方向作可逆伸展。

纤维状蛋白质除 α -角蛋白、丝蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白之外，还有肌球蛋白和纤维状肌动蛋白，这两个蛋白是参与肌肉收缩活动的。

球状蛋白质的多肽链在三维空间中卷曲成十分紧密的球状结构。几乎所有的极性R基都分布在分子的外表面，而非极性的基团则被埋在分子的内部。

维持蛋白质三级结构的作用力主要是范德华力、氢键、静电相互作用和疏水相互作用，此外共价二硫键在维持某些蛋白质的构象方面也起着重要作用。

蛋白质分子的一级结构决定它的高级结构。蛋白质的三维构象是多肽链上各个单键的旋转自由度受到各种限制的总结果。天然构象(包括四级结构)是在一定条件下的热力学上最稳定的结构。

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。蛋白质受到某些物理或化学因素作用时，引起生物活性的丧失，溶解度的降低以及其它的物理化学常数的改变，这种变化称为蛋白质的变性作用。变性的实质是由于维持高级结构的次级键遭到破坏而造成的天然构象的解体，但未涉及共价键的断裂。有些变性是可逆的(能够复性)，有些则不可逆。

蛋白质的三级结构就是单体蛋白质分子或蛋白质分子亚基(它们只含一条多肽链)的空间结构。三级结构常是由两个或多个在空间上可明显区分的区域构建而成。这些区域被称为结构域或辖区。结构域是在超二级结构的基础上组装而成的。结构域也和超二级结构一样，它的基本式样种类不多。在结构域中大的 β -折叠片卷成桶状或扭成马鞍形， α -螺旋往往分布在外侧。

寡聚蛋白质是由多个亚基构成的，这些多亚基的聚集体就是四级结构。四级结构涉及亚基在整个分子中的空间排列以及亚基之间的接触位点和作用力。

肌红蛋白是骨骼肌的储氧蛋白质。氧的结合位点由血红素辅基提供。肌红蛋白的氧合曲线是一种双曲线。

血红蛋白是血液中的输氧蛋白质。它是一种四聚体，其中每个亚基都含有一个血红素分子。这四个亚基彼此相互作用给予四聚体以特有的而为任一单独的亚基或肌红蛋白所没有的性质。血红蛋白和许多其他四级结构蛋白质中的“远距离作用”(action at a distance)是别构作用的基础。别构蛋白质与其配基结合，例如血红蛋白与氧结合，呈S形曲线。

免疫球蛋白通常称为抗体。由二条相同的重链(H链)和二条相同的轻链(L链)组成。每条重链有4个结构域；每条轻链有2个结构域，共12个结构域。它们构成免疫球蛋白的三级结构。

测定蛋白质分子量的最重要的方法是利用超速离心机的沉降速度法和沉降平衡法。沉降系数(s)的定义是单位离心场强度的沉降速度。 s 也常用来近似地描述生物大分子的大小。凝胶过滤法是一种简便的测定蛋白质分子量的方法。SDS-凝胶电泳法用于测定蛋白质亚基的分子量。

蛋白质也是两性电解质。它的酸碱性质主要决定于肽链上可解离的R基团。各种蛋白质都有自己特定的等电点。在等电点以上的pH，蛋白质分子带负电荷，在等电点以下的pH，带

正电荷。蛋白质处于等电点时,溶解度最小。

蛋白质是亲水胶体。蛋白质分子周围的双电层和水化层是稳定蛋白质胶体系统的主要因素。

分离蛋白质混合物的各种方法主要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) 对其他分子(配基)的生物学亲和力。透析和超过滤是利用蛋白质不能通过半透膜的性质使蛋白质分子和其他小分子分开的常用方法。密度梯度离心和凝胶过滤层析都已成功地用于分离蛋白质混合物。等电点沉淀、盐析和有机溶剂分级沉淀等方法常用于蛋白质分离的头几步。移动界面电泳,各种形式的区带电泳,特别是圆盘凝胶电泳和等电聚焦具有很高的分辨率。纤维素离子交换剂和 Sephadex 离子交换剂的离子交换柱层析法已广泛地用于蛋白质的分离提纯。HPLC 及亲和层析也都是十分有用的分离提纯方法。

蛋白质制品的纯度的鉴定通常采用分辨率高的物理化学的方法,例如电泳分析、沉降分析和扩散分析等。如果制品是纯的,在这些分析的图谱上只呈现一个峰或一个条带。必须指出,任何单独一种鉴定只能认为是蛋白质分子均一性的必要条件而不是充分条件。

习 题

1. 如果一个分子量为 34 000 的蛋白质,含 12 种氨基酸,并假设每种氨基酸在该蛋白质分子中的数目相等,问这种蛋白质有多少种可能的排列顺序? [100⁰⁰⁴]

2. 根据表 3-7 中氨基酸的 pK' 值,计算下列氨基酸的 pI 值: 丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸和精氨酸。 [pI : 6.02; 5.66; 3.22; 10.76]

3. 向 1 升 1 mol/L 的处于等电点的甘氨酸溶液加入 0.3 mol HCl,问所得溶液的 pH 是多少? 如果加入 0.3 mol NaOH 以代替 HCl 时, pH 值将是多少? [pH: 2.71; 9.23]

4. 甘氨酸在溶剂 A 中的溶解度为在溶剂 B 中的 4 倍。利用在溶剂 A 和 B 之间的逆流分溶方法将甘氨酸和苯丙氨酸分开。在起始溶液中甘氨酸含量为 100 毫克,苯丙氨酸为 81 毫克。试回答下列问题:(1) 利用由 4 个分溶管组成的逆流分溶系统时,甘氨酸和苯丙氨酸各在哪一号分溶管中含量最高?(2) 在这样的管中每种氨基酸各为多少毫克? [(1) 第 4 管和第 3 管; (2) 51.2 mg Gly + 24 mg Phe 和 38.4 mg Gly + 36 mg Phe]

5. 将丙氨酸溶液(400 毫升)调节到 pH 8.0,然后向该溶液中加入过量的甲醛。当所得溶液用碱反滴定至 pH 8.0 时,消耗 0.2 mol/L NaOH 溶液 250 毫升。问起始溶液中丙氨酸的含量为多少克? [4.45 g]

6. 将含有天冬氨酸($pI=2.98$),甘氨酸($pI=5.97$),苏氨酸($pI=6.53$),亮氨酸($pI=5.98$)和赖氨酸($pI=9.74$)的 pH 3.0 柠檬酸缓冲液,加到预先用同样缓冲液平衡过的 Dowex-50 阳离子交换树脂中,随后用该缓冲液洗脱此柱,并分部地收集洗出液,这 5 种氨基酸将按什么次序洗脱下来? [Asp, Thr, Gly, Leu, Lys]

7. L-亮氨酸溶液(3.0 克/150 毫升 6 mol/L HCl)在 20 厘米旋光管中测得的旋光度为 +1.81°。计算 L-亮氨酸在 6 mol/L HCl 中的 (1) 比旋($[\alpha]$)和 (2) 摩尔旋光($[\alpha]_M$)。 [$[\alpha]=+15.1^\circ$; $[\alpha]_M=+1980^\circ$]

8. 指出在正丁醇:醋酸:水的系统中进行纸层析时,下列混合物中氨基酸的相对迁移率(假定水相的 pH 为 4.5): (1) Ile, Lys; (2) Phe, Ser; (3) Ala, Val, Leu; (4) Pro, Val; (5) Glu, Asp; (6) Tyr, Ala, Ser, His。 [Ile > Lys; Phe > Ser; Leu > Val > Ala; Val > Pro; Glu > Asp; Tyr > Ala > Ser = His]

9. (1) 当 Ala, Ser, Phe, Leu, Arg, Asp 和 His 的混合物在 pH 3.9 进行纸电泳时,哪些氨基酸移向正

极(+);哪些氨基酸移向负极(-)? (2) 纸电泳时,带有相同电荷的氨基酸常有少许分开,例如 Gly 可与 Leu 分开。试说明为什么? (3) 设 Ala、Val、Glu、Lys 和 Thr 的混合物 pH 为 6.0, 试指出纸电泳后氨基酸的分离情况。[(1) Ala, Ser, Phe 和 Leu 以及 Arg 和 His 移向负极; Asp 移向正极。(2) 电泳时,具有相同电荷的较大分子比较小分子移动得慢,因为电荷/质量之比较小,因而引起每单位质量迁移的驱动力也较小。(3) Glu 移向正极; Lys 移向负极, Val, Ala 和 Thr 留在原点。]

10. 说明用含一个结晶水的固体组氨酸盐酸盐(分子量=209.6; $pK'_a=6.0$)和 1 mol/L KOH 配制 1 升 pH 6.5 的 0.2 mol/L 组氨酸盐缓冲液的方法。[取组氨酸盐酸盐 41.92 g(0.2 mol), 加入 352 ml 1mol/L KOH, 用水稀释至 1 升]

11. 有一个 A 肽,经酸解分析得知由 Lys、His、Asp、Glu₂、Ala、以及 Val、Tyr 和两个 NH₂ 分子组成。当 A 肽与 FDNB 试剂反应后,得 DNP-Asp; 当用羧肽酶处理后得游离缬氨酸。如果我们在实验中将 A 肽用胰蛋白酶降解时,得到二种肽,其中一种(Lys、Asp、Glu、Ala、Tyr)在 pH 6.4 时,净电荷为零,另一种(His、Glu、以及 Val)可给出 DNP-His, 在 pH 6.4 时,带正电荷。此外, A 肽用糜蛋白酶降解时,也得到二种肽,其中一种(Asp、Ala、Tyr)在 pH 6.4 时呈中性,另一种(Lys、His、Glu₂、以及 Val)在 pH 6.4 时,带正电荷。问 A 肽的氨基酸顺序如何?[Asn—Ala—Tyr—Glu—Lys—His—Gln—Val]

12. 某多肽的氨基酸顺序如下: $\text{Glu}_1\text{—Val—Lys—Asn—Cys}_5\text{—Phe—Arg—Trp—Asp—Leu—Gly}_{13}\text{—Ser—Leu—Glu—Ala}_{15}\text{—Thr—Cys—Arg—His—Met}_{20}\text{—Asp—Gln—Cys—Tyr—Pro—Gly—Glu—Glu—Lys}_{29}$ 。(1) 如用胰蛋白酶处理,此多肽将产生几个肽?并解释原因(假设没有二硫键存在); (2) 在 pH 7.5 时,此多肽的净电荷是多少单位?说明理由(假设 pK'_a 值: $\alpha\text{-COOH}$ 4.0; $\alpha\text{-NH}_3^+$ 6.0; Glu 和 Asp 侧链基 4.0; Lys 和 Arg 侧链基 11.0; His 侧链基 7.5; Cys 侧链基 9.0; Tyr 侧链基 11.0); (3) 如何判断此多肽是否含有二硫键?假如有二硫键存在,请设计实验确定 5, 17 和 23 位上的 Cys 哪二个参与形成?[(1) 4 个肽; (2) -2.5 单位; (3) 如果多肽中无二硫键存在,经胰蛋白酶水解后应得四个肽段; 如果存在一个二硫键应得三个肽段并且各肽段所带电荷不同,因此可用离子交换层析、电泳等方法将肽段分开,鉴定出含二硫键的肽段,测定其氨基酸顺序,便可确定二硫键的位置。]

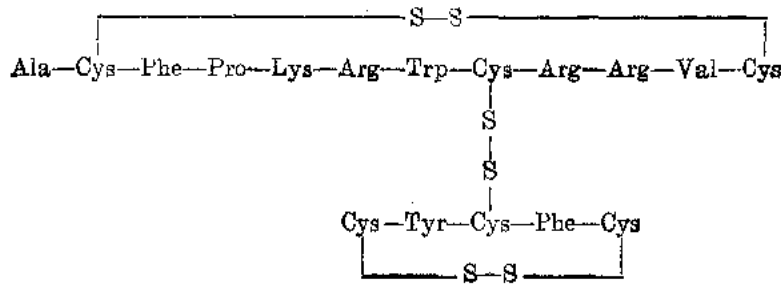
13. 今有一个七肽,经分析它的氨基酸组成是: Lys, Pro, Arg, Phe, Ala, Tyr 和 Ser。此肽未经糜蛋白酶处理时,与 FDNB 反应不产生 $\alpha\text{-DNP}$ -氨基酸。经糜蛋白酶作用后,此肽断裂成两个肽段,其氨基酸组成分别为 Ala, Tyr, Ser 和 Pro, Phe, Lys, Arg。这两个肽段分别与 FDNB 反应,可分别产生 DNP-Ser 和 DNP-Lys。此肽与胰蛋白酶反应,同样能生成两个肽段,它们的氨基酸组成分别是 Arg, Pro 和 Phe, Tyr, Lys, Ser, Ala。试问此七肽的一级结构是怎样的?[它是一个环肽,顺序为: —Phe—Ser—Ala—Tyr—Lys—Pro—Arg—]。

14. 今有一种植物的毒素蛋白。直接用 SDS 凝胶电泳分析时,它的区带位于肌红蛋白(分子量为 16 900)和 β -乳球蛋白(分子量为 37 100)两种标记蛋白之间。当这个毒素蛋白用巯基乙醇和碘乙酸处理后,在 SDS 凝胶电泳中仍得到一条区带,但其位置靠近标记蛋白细胞色素 c(分子量为 13 370)。进一步实验表明,该毒素蛋白与 FDNB 反应并酸水解后,释放出游离的 DNP-Gly 和 DNP-Tyr。关于此蛋白质的结构,你能作出什么结论?[该毒素蛋白由二条不同的多肽链通过链间二硫键交联而成,每条多肽链的分子量各在 13 000 左右]

15. 一种酶分子量为 300 000,在酸性环境中可解离为二个不同成分,其中一个成分分子量为 100 000,另一个为 500 000。大的占总蛋白的三分之二,具有催化活性;小的无活性。用 β -巯基乙醇(能还原二硫桥)处理时,大的颗粒即失去催化能力,并且它的沉降速度减小,但沉降图案上只呈现一个峰。关于该酶的结构可作出什么结论?[此酶含 4 个亚基,两个亚基的分子量为 50 000,两个催化亚基分子量为 100 000,每个催化亚基是由二条无活性的多肽链(分子量为 50 000)组成,彼此间由二硫键联结在一起]。

16. 三肽 Lys—Lys—Lys 的 pI 值必定大于它的任何一个个别基团的 pK'_a 值。这种说法是否正确?为什么? [正确。因为此三肽处于等电点时,其解离基团所处的状态应是: C 末端 COO^- ($pK'_a=3.0$), N 末端 NH_3^+ ($pK'_a=8.0$), 三个侧链 $3\left(\frac{1}{3} \epsilon\text{-NH}_3^+\right)$ ($pK'_a=10.53$), 因此 $pI >$ 最大的 pK'_a 值(10.53)]

17. 一个多肽可还原为两个肽段, 它们的顺序如下: 链1为 Ala—Cys—Phe—Pro—Lys—Arg—Trp—Cys—Arg—Arg—Val—Cys, 链2为 Cys—Tyr—Cys—Phe—Cys。当用嗜热菌蛋白酶消化原多肽(具有完整的二硫键)时可得下列各肽: (1) (Ala, Cys₂, Val); (2) (Arg, Lys, Phe, Pro); (3) (Arg₂, Cys₂, Trp, Tyr); (4) (Cys₂, Phe)。试指出在该天然多肽中二硫键的位置。[结构如下图]



18. (1) 计算一个含有 78 个氨基酸的 α -螺旋的轴长? (2) 此多肽的 α -螺旋完全伸展时有多长? [11.7 nm; 28.08 nm]

19. 某一蛋白质的多肽链在一些区段为 α 螺旋构象, 在另一些区段为 β 构象。该蛋白质的分子量为 240 000。多肽链外形的长度为 5.06×10^{-5} 厘米。试计算, α 螺旋体占分子的百分之多少? (假设 β 构象中重复单位为 0.7 nm, 即 0.35 nm 长/残基)[49%]

20. α -螺旋的稳定性不仅取决于肽键间的氢键形成, 而且还取决于肽链的氨基酸侧链性质。试预测在室温下的溶液中下列多聚氨基酸哪些种将形成 α -螺旋, 哪些种形成其它的有序结构, 哪些种不能形成有序结构, 并说明理由。(1) 多聚亮氨酸 pH=7.0; (2) 多聚异亮氨酸, pH=7.0; (3) 多聚精氨酸, pH=7.0; (4) 多聚精氨酸, pH=13; (5) 多聚谷氨酸, pH=1.5; (6) 多聚苏氨酸, pH=7.0。[(1), (4)和(5)能形成 α -螺旋; (2), (3)和(6)不能形成有序结构]

21. 多聚甘氨酸的右手或左手 α -螺旋中, 哪一个比较稳定? 为什么? [因为甘氨酸是一种在 α -碳原子上呈对称性的特殊氨基酸, 因此可以预料多聚甘氨酸的左右手 α -螺旋(它们是对映体)在能量上是相当的, 因而也是同等稳定的]

22. 测得一种血红素蛋白质含 0.426% 铁, 计算其最低分子量。一种纯酶按重量算含亮氨酸 1.65% 和异亮氨酸 2.48%, 问其最低分子量为多少?[13 110; 15 800]

23. 证明一个多阶段装配过程比一个单阶段装配过程更容易控制蛋白质的质量。考虑一个多体酶复合物的合成, 此复合物含 6 个拷贝(copy), 每个拷贝由二个多肽 A 和 B 所组成, 多肽 A 和 B 的长度分别为 300 个和 700 个氨基酸残基。假设从氨基酸合成多肽链, 多肽链组成二聚体, 再从二聚体聚集成多体酶(multimeric enzyme), 在这一建造过程中每次操作(operation)的错误频率为 10^{-8} , 如果氨基酸顺序没有错误的话, 多肽的折叠总是正确的, 并假设在每一装配阶段剔除有缺陷的亚结构效率为 100%, 试比较在下列情况下有缺陷复合物的频率: (1) 该复合物以一条 6000 个氨基酸长的连续多肽链一步合成, 链内含有 6 个多肽 A 和 6 个多肽 B。(2) 该复合物分三个阶段形成: 第一阶段, 多肽 A 和 B 的合成; 第二阶段, AB 二聚体的形成; 第三阶段, 6 个 AB 二聚体装配成复合物。[(1) 有缺陷复合物的平均频率是 $6000 \times 10^{-8} = 6 \times 10^5$, (2) 由于有缺陷的二聚体可被剔除, 因此有缺陷复合物的平均频率只是最后阶段的操作次数(5 次操作装配 6 个亚基)乘以错误频率, 即 5×10^{-8} 。因此它比一步合成过程所产生的缺陷频率约低 1000 倍。]

24. 超速离心机的转速为 58 000 r/min 时, (1) 计算角速度 ω , 以每秒的弧度表示, (2) 计算距旋转中心 6.2 cm 处的离心力, (3) 此离心力相当于重力“g”的多少倍? [(1) $\omega = 6070.7$ 弧度/秒; (2) $a = 2.284 \times 10^6$ 厘米/秒², (3) $a = 233, 061g$]

25. 一种蛋白质的偏微比容为 0.707 厘米³/克, 扩散系数, 当温度校正为 20°C, 溶剂校正为水时即 $D_{20,w}^0$ 为 13.1×10^{-7} 厘米²/秒, 沉降系数为 2.05 S, 20°C 时水的密度为 0.998 克/厘米³。根据斯维德贝格公式计算该蛋白质的分子量。[13 000]

26. 指出从分子排阻层析柱上洗脱下列蛋白质时的顺序。分离蛋白质的范围是 5 000 到 400 000: 肌红蛋白、过氧化氢酶、细胞色素 c、肌球蛋白、糜蛋白酶原和血清清蛋白(它们的分子量见表 3-19)。[肌球蛋白、过氧化氢酶、血清清蛋白、糜蛋白酶原、肌红蛋白细胞色素 c]

27. 26 题中所述的从分子排阻层析柱上洗脱细胞色素 c、 β -乳球蛋白、未知蛋白和血红蛋白时,其洗脱体积分别为 118、58、37 和 24 毫升,问未知蛋白的分子量是多少?假定所有蛋白质都是球形的,并且都落在柱的蛋白质分级分离范围内。[52 000 道尔顿]

28. 在下面指出的 pH 下,下述蛋白质在电场中将向哪个方向移动,即向阳极(A)、阴极(C)或不动(S)?(根据表 3-17 的数据判断)。(1) 卵清蛋白,在 pH 5.0; (2) β -乳球蛋白,在 pH 5.0 和 7.0; (3) 糜蛋白酶原,在 pH 5.0、9.1 和 11。[(1) A; (2) C, A; (3) C, S, A]

主要参考书

1. 王志珍、梁栋材,“胰岛素分子结构与功能关系的复杂性”,生物化学杂志,Vol. 1, No 1, 9. 1985。
2. 陶宗晋.《离心沉降分析技术》,科学出版社, T. G. 库珀(1977)生物化学工具,中译版,人民卫生出版社,1986。
3. W. B. Wood等,(1983),《生物化学——习题入门》,中译版,北京大学出版社 1987。
4. I. H. 西格尔,(1976),《生物化学计算》,中译版,科学出版社 1984。
5. Creighton, T. E., Proteins—Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman and Company, New York. 1984.
6. Hasehemeyer, R. H., and Hasehemeyer, A. E. V., Proteins—A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley, New York. 1973.
7. Rawn, J. D., Biochemistry, Harper and Row, Publishers, New York. 1983.
8. Zubay, G. L., Biochemistry, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1983.
9. Hemenway, C. et al, Biochemistry—Solutions Guide to Accompany Zubay, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1983.
10. Lehninger, A. R. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc. 1982.
11. van Eikeren, P., Guide to Lehninger's Principles of Biochemistry with Solutions to Problems, Worth Publishers, Inc. 1984.
12. Stryer, L., Biochemistry, 3rd ed., W. H. Freeman and Company, San Francisco. 1988.
13. Metzler, D. E., Biochemistry—The Chemical Reactions of Living Cells, Academic Press, Inc. 1977.
14. Boyer, R. F., Modern Experimental Biochemistry, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1986.

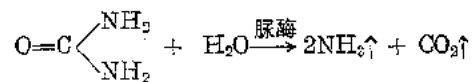
徐长法

第四章 酶

人们对酶(enzyme)的认识起源于生产实践。我国几千年前就开始制作发酵饮料及食品。夏禹时代,酿酒已经出现,周代已能制作饴糖和酱。春秋战国时期已知用曲治疗消化不良。西方国家 19 世纪初曾提取出能引起某些化学反应的物质,并对酒的发酵过程进行了大量研究。确定了发酵的总方程式:



1857 年微生物学家巴斯德(Pasteur)等人提出酒精发酵是酵母细胞活动的结果。1878 年提出了“酶”这个名称, Liebig 等人提出发酵现象是由溶解于细胞液中的酶引起的。1897 年 Büchner 兄弟成功地用不含细胞的酵母汁实现了发酵,证明了发酵与细胞的活动无关。1913 年 Michaelis 和 Menten 提出了酶促动力学原理——米氏学说,对酶反应机理的研究是一个重要突破。1926 年 Sumner 第一次从刀豆中提出了脲酶结晶,并证明具有蛋白质性质。它能催化下列反应:



30 年代 Northrop 又分离出结晶的胃蛋白酶、胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶,并进行了动力学探讨,确立了酶的蛋白质本质。

现已鉴定出 3000 种以上的酶,其中不少已得到结晶。人们相继弄清了溶菌酶(129 个氨基酸)、蛋白酶(241 个氨基酸)、羧肽酶(307 个氨基酸)等的结构及作用机理。1979 年 Kakudo 首次弄清了由 460 个氨基酸组成的多元淀粉酶这一“巨大”蛋白质的空间结构,并制出了放大两亿倍的立体模型。当前有关酶作用机理的研究还在不断发展。对酶在代谢中的地位、酶生物合成的遗传机理、酶的起源、酶系统的自我调节,以及在细胞分化过程中酶的作用等方面都已进行了大量工作。并且提出一些全新的见解。

随着酶学理论研究的不断深入,必将对生命本质的探索作出更大的贡献。

第一节 酶是生物催化剂

一、酶的生物学意义

生物体内不断地进行着各种化学变化。绿色植物和某些细菌能以十分简单的物质,如水、二氧化碳和无机盐为原料合成各种复杂的有机物,并把太阳能转变为化学能,贮存于有机物中;而其他生物又能分解这些复杂物质,从中取得能量,例如动物以植物体中的淀粉等复杂物质为食物,淀粉被降解成单糖,并在细胞内进一步分解成二氧化碳和水,同时释放出能量供动物生长、发育、运动等种种生命活动所用,在实验室中,复杂有机物的合成与分解必须要有高

温、强酸或强碱等剧烈的条件才能进行，而在生物体内虽然条件十分温和，许多复杂的化学变化却进行得极为顺利和迅速。例如，动物吃下的肉食在消化道内只需要几小时便被完全消化分解，细菌在合适的条件下，20分钟就增殖一代，在这20分钟内，合成了新细胞内全部的复杂物质。这种使化学反应变得容易和迅速进行的根本原因就是生物体内普遍地存在着生物催化剂——酶。酶与其他催化剂不同，能在机体中十分温和的条件下高效率地起催化作用，使生物体内的各种物质处于不断的新陈代谢之中。所以说，酶在生物体的生命活动中占有极其重要的地位，研究酶的化学性质及其作用机理，对于人们了解生命活动的规律，从而进一步指导有关的医学实践及工农业生产具有重大意义。

二、酶是生物催化剂

(一) 酶和一般催化剂的比较

酶作为生物催化剂(biological catalyst)和一般催化剂相比有以下的共性：

1. 用量少而催化效率高 酶与一般催化剂一样，虽然在细胞中的相对含量很低，却能使一个慢速反应变为快速反应。

2. 不改变化学反应的平衡点 和一般催化剂一样，酶仅能改变化学反应的速度，并不能改变化学反应的平衡点。酶本身在反应前后也不发生变化。例如肽键遇水自发地进行水解的反应极为缓慢，没有现实意义，当有蛋白酶存在时，这个反应则进行得十分迅速。

3. 可降低反应的活化能 在一个化学反应体系中，反应开始时，反应物(S)分子的平均能量水平较低，为“初态”(initial state)(A)。在反应的任何一瞬间反应物中都有一部分分子具有了比初态更高一些的能量，高出的这一部分能量称为活化能(activation energy)，使这些分子进入“过渡态”(transition state)(即活化态，A*)，这时就能形成或打破一些化学键，形成新的物质——产物(P)。即S变为P。这些具有较高能量、处于活化态的分子称为活化分子；反应物中这种活化分子愈多，反应速度就愈快。活化能的定义是在一定温度下一摩尔底物全部进入活化态所需要的自由能(free energy)，单位是焦耳/摩尔。

催化剂，包括酶在内，能降低化学反应的活化能，如图4-1所示。由于在催化反应中，只需较少的能量就可使反应物进入“活化态”，所以和非催化反应相比，活化分子的数量大大增加，从而加快了反应速度。例如 H_2O_2 的分解，当没有催化剂时需活化能75.24千焦耳/摩尔，用态把作催化剂时，只需活化能48.9千焦耳/摩尔，而当有过氧化氢酶催化时，活化能下降到8.36千焦耳/摩尔以下。

酶作为催化剂参加一次化学反应之后，酶分子立即恢复到原来的状态，继续参加反应。所以一定量的酶在短时间内能催化大量的底物发生反应。

(二) 酶作为生物催化剂的特性

1. 催化效率高 以分子比(molecular ratio)表示，酶催化反应的反应速度比非催化反应高 10^5 — 10^{20} 倍，比其他催化反应高 10^7 — 10^{13} 倍。以转换数(turnover number, k_{cat} ，每秒钟每个酶分子能催化多少个微摩尔(μmol)的底物发生变化)表示，大部分酶为1000，最大的可达几十万，甚至一百万以上。

2. 酶的作用具有高度的专一性 一种酶只能作用于某一类或某一种特定的物质。这就

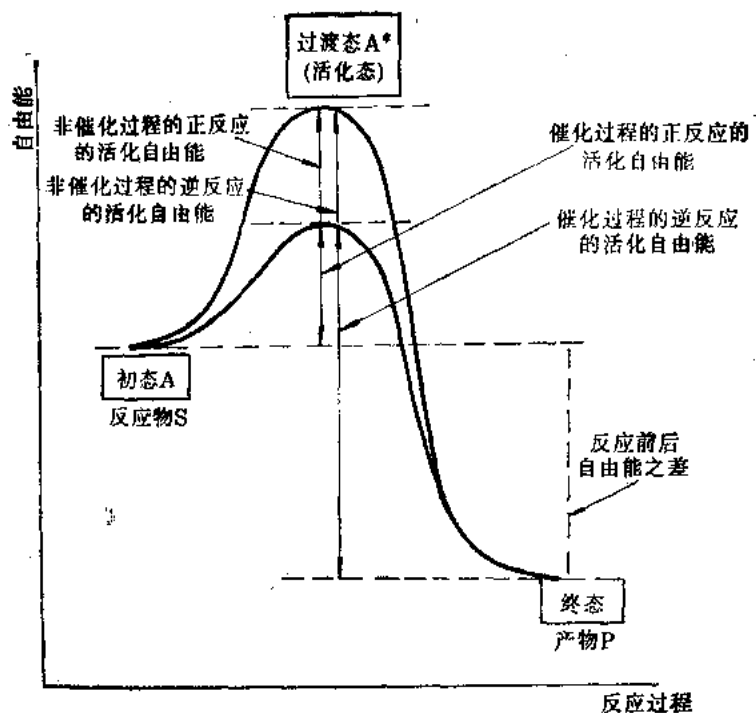


图 4-1 非催化过程及催化过程自由能的变化

是酶作用的专一性 (specificity)。通常把被酶作用的物质称为该酶的底物 (substrate)。所以也可以说一种酶只作用于一种或一类底物。如糖苷键、酯键、肽键等都能被酸碱催化而水解，但水解这些化学键的酶却各不相同，即它们分别需要在具有一定专一性的酶作用下才能被水解。

3. 酶易失活 一般的催化剂在一定条件下会因中毒而失去催化能力，而酶却较其他催化剂更加脆弱，更易失去活性。凡使蛋白质变性的因素，如强酸、强碱、高温等条件都能使酶破坏而完全失去活性。所以，酶作用一般都要求比较温和的条件，如常温、常压、接近中性的酸碱度等。

4. 酶活力的调节控制 酶活力是受调节控制的，它的调控方式很多，包括抑制剂调节、共价修饰调节、反馈调节、酶原激活及激素控制等，将在后面各节中详细讨论。

5. 酶的催化活力与辅酶、辅基及金属离子有关，有些酶是复合蛋白质，其中的小分子物质 (辅酶、辅基及金属离子) 与酶的催化活性密切相关。若将它们除去，酶就失去活性。

高效率、专一性以及温和的作用条件使酶在生物体内新陈代谢中发挥强有力的作用，酶活力的调控使生命活动中各个反应得以有条不紊地进行。

三、酶的化学本质

(一) 酶的蛋白质本质

所有的酶都是蛋白质。有的是简单蛋白质，有的是结合蛋白质。

酶同其他蛋白质一样，由氨基酸组成。因此，也具有两性电解质的性质。并具有一、二、三、

表 1-1 一些酶的辅助因子

某些含有或需要金属离子的酶	辅助因子(金属离子)
乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	Zn ²⁺
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	Zn ²⁺
羧肽酶(carboxypeptidase)	Zn ²⁺
磷酸水解酶(phosphohydrolases)	Mg ²⁺
磷酸转移酶(phosphotransferases)	Mg ²⁺ , Mn ²⁺
精氨酸酶(arginase)	Mn ²⁺
丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)	Mn ²⁺ , Zn ²⁺ (还需生物素)
细胞色素(cytochromes)	Fe ²⁺ 或 Fe ³⁺ , (铁离子在卟啉环中*)
过氧化物酶(oxidase)	Fe ²⁺ 或 Fe ³⁺ , (铁离子在卟啉环中)
过氧化氢酶(catalase)	Fe ²⁺ 或 Fe ³⁺ , (铁离子在卟啉环中)
琥珀酸脱氢酶(succinic dehydrogenase)	Fe ²⁺ 或 Fe ³⁺ , (还需 FAD)
铁氧还蛋白(ferredoxin dehydrogenase)	Fe(铁原子在铁硫晶格中, 这种蛋白存在于细菌代谢及光合作用中, 固氮酶中的这种蛋白质还含有钼原子。)**
铁黄素蛋白(Fe-flavoprotein)	Fe
酪氨酸酶(tyrosinase)	Cu ⁺ 或 Cu ²⁺
细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase)	Cu ⁺ 或 Cu ²⁺
漆酶(laccase)	Cu ⁺ 或 Cu ²⁺
抗坏血酸氧化酶(ascorbic acid oxidase)	Cu ⁺ 或 Cu ²⁺
丙酮酸磷酸激酶(pyruvate phosphokinase)	K ⁺ (也需要 Mg ²⁺)
细胞膜 ATP 酶(plasma membrane ATPase)	Na ⁺ (也需要 K ⁺ 及 Mg ²⁺)
固氮酶(nitrogenase)	Fe ²⁺ , Mo ²⁺

* 结构见图 5-2。

** 结构见图 5-3。

四级结构。也受某些物理因素(加热、紫外线照射等)及化学因素(酸、碱、有机溶剂等)的作用而变性或沉淀, 丧失酶活性。酶的分子量也很大, 其水溶液具有亲水胶体的性质, 不能通过透析膜。在体外, 酶能被胰蛋白酶等水解而失活。

显然, 不能说所有蛋白质都是酶, 只是具有催化作用的蛋白质, 才称为酶。

(二) 酶的组成分类

因酶的本质为蛋白质, 所以和其他蛋白质一样, 可以根据其组成成分分为简单蛋白质和结合蛋白质两类。

有些酶, 其活性仅仅决定于它的蛋白质结构, 这类酶属于简单蛋白质, 如原酶、蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶及核糖核酸酶等; 另一些酶在结合非蛋白组分(辅助因子 cofactor)后, 才表现出酶的活性, 这类酶属于结合蛋白质, 其酶蛋白(apoenzyme)与辅助因子结合后所形成的复合物称为“全酶”(holoenzyme), 即全酶 = 酶蛋白 + 辅助因子。

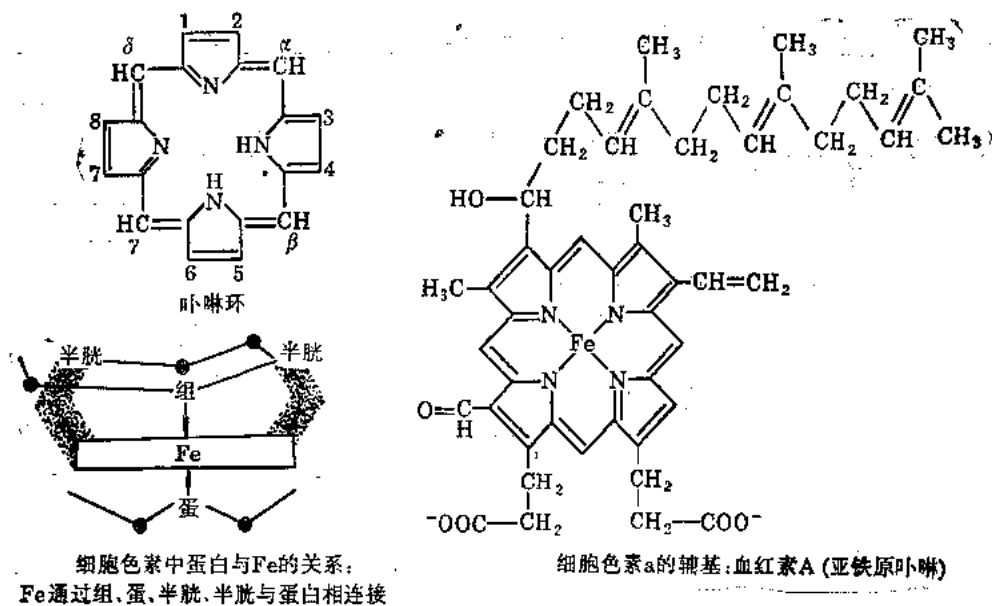


图 4-2 细胞色素 a 的结构

在催化反应中, 酶蛋白与辅助因子所起的作用不同, 酶反应的专一性取决于酶蛋白本身, 而辅助因子则直接对电子、原子或某些化学基团起传递作用。

(三) 根据酶蛋白分子的特点又可将酶分为三类

1. 单体酶 单体酶 (monomeric enzyme) 只有一条多肽链, 属于这一类的酶很少, 一般都是催化水解反应的酶, 分子量在 13000-35000 之间, 如溶菌酶、胰蛋白酶等。

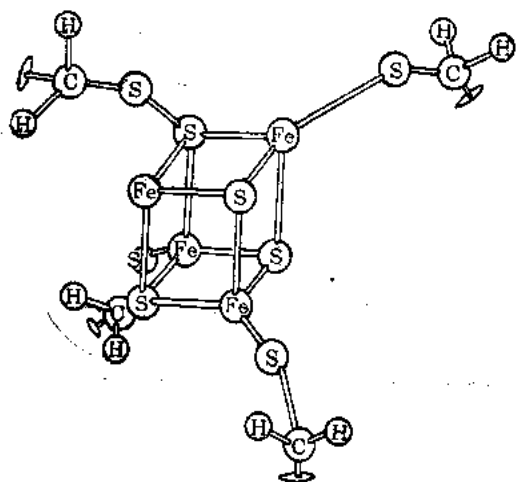


图 4-3 铁氧还蛋白 (ferredoxin) 中的铁硫晶格结构

2. 寡聚酶 寡聚酶 (oligomeric enzyme) 由几个甚至几十个亚基组成, 这些亚基可以是相同的多肽链, 也可以是不同的多肽链。亚基之间不是共价结合, 彼此很容易分开。寡聚酶的分子量从 35 000 到几百万, 例如磷酸化酶 a 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶等。

3. 多酶体系 多酶体系 (multienzyme system) 是由几种酶彼此嵌合形成的复合体。它有利于一系列反应的连续进行。这类多酶复合体, 分子量很高, 一般都在几百万以上。例如在脂肪酸合成中的脂肪酸合成酶复合体。

(四) 酶的辅助因子

酶的辅助因子包括金属离子及有机化合物。它们本身无催化作用, 但一般在酶促反应中运输转移电子、原子或某些功能基如参与氧化还原或运载酰基的作用。有些蛋白质, 也具有此种作用, 称为蛋白辅酶。在大多数情况下, 可以通过透析或其他方法将全酶中的辅助因子除去。例如, 酵母提取物有催化葡萄糖发酵的能力, 透析除去辅助因子 I (CoI) 后, 酵母提取物就失去了催化能力。这种与酶蛋白松散结合的辅助因子称为辅酶 (cofactor 或 coenzyme)。但是

在少数情况下,有一些辅助因子是以共价键和酶蛋白较牢固地结合在一起的,不易透析除去,这种辅助因子称为辅基(prosthetic group)。例如,细胞色素氧化酶与铁卟啉辅基结合较牢固,辅基铁卟啉不易除去。所以,辅基与辅酶的区别只在于它们与酶蛋白结合的牢固程度不同,并无严格的界限。一些可作为酶的辅助因子的金属离子见表 4-1,基团转移反应中的辅酶和辅基见表 4-2。

关于辅酶的结构与作用将在“维生素和辅酶”一章中介绍。

表 4-2 基团反应中的辅酶及辅基

转移的部分	辅助因子	
	辅酶	辅基
H原子、电子	NAD ⁺ (与维生素 PP 有关)	
H原子、电子	NADP ⁺ (与维生素 PP 有关)	
H原子		FMN(与维生素 B ₂ 有关)
H原子		FAD(与维生素 B ₂ 有关)
H原子	CoQ	
电子		铁卟啉
羧基	焦磷酸硫胺素(与维生素 B ₁ 有关)	
酰基	CoA(与泛酸有关)	
酰基	硫辛酸	
羧基	生物素	
氨基	磷酸吡哆醛(维生素 B ₆)	
甲基、次甲基、甲酰基及甲酰甲氨基等	四氢叶酸辅酶	

第二节 酶的分类及命名

一、习惯命名法

1961 年以前使用的酶的名称都是习惯沿用的,称为习惯名。习惯命名的原则是:

1. 绝大多数酶依据其底物来命名,如催化水解淀粉的称为淀粉酶,催化水解蛋白质的称为蛋白酶。
2. 某些酶根据其所催化的反应性质来命名,如水解酶催化底物分子水解,转氨酶催化一种化合物上的氨基转移至另一化合物上。
3. 有的酶结合上述两个原则来命名,例如琥珀酸脱氢酶是催化琥珀酸脱氢反应的酶。
4. 在这些命名的基础上有时还加上酶的来源或酶的其他特点,如胃蛋白酶及胰蛋白酶;碱性磷酸酯酶及酸性磷酸酯酶等。

习惯命名比较简单,应用历史较长,但缺乏系统性,有时出现一酶数名或一名数酶的情况。为了适应酶学发展的新情况,避免命名的重复,国际酶学会议于 1961 年提出了一个新的系统

命名及系统分类的原则, 已为国际生化协会所采用。

二、国际系统命名法

按照国际系统命名法原则, 每一种酶有一个系统名称(systematic name)和习惯名称(即推荐名称recommended name), 后一种名称应简单, 便于使用, 系统名称应当明确标明酶的底物及催化反应的性质。例如草酸氧化酶(习惯名称)写成系统名称时, 应将它的两个底物, 即“草酸”及“氧”同时列出, 并用“:”将它们隔开, 它所催化的反应的性质为“氧化”, 也需指明, 所以它的系统名称为“草酸: 氧化酶”。若底物之一是水时, 可将水略去不写, 如乙酰辅酶 A 水解酶(习惯名), 可以写成乙酰辅酶 A: 水解酶(系统名), 而不必写成乙酰辅酶 A: 水水解酶。

另外, 按照系统分类法, 每个酶还有一个特定的编号。(见本节“三”)。

这种系统命名原则及系统编号是相当严格的, 一种酶只可能有一个名称和一个编号。例如:

习惯名称	系统名称	催化的反应
谷丙转氨酶	丙氨酸: α -酮戊二酸氨基转移酶	丙氨酸 + α -酮戊二酸 \longrightarrow 谷氨酸 + 丙酮酸
己糖激酶	ATP: 己糖磷酸基转移酶	ATP + 葡萄糖 \longrightarrow 6-磷酸葡萄糖 + 丙酮酸

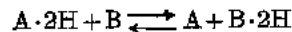
在国际科学文献中, 为严格起见, 一般使用酶的系统名称, 但是因某些系统名称太长, 为了方便起见, 有时仍使用酶的习惯名称。在《酶学手册》(“Enzyme Handbook, Thoms E. Barn 编, 1969 年)或某些专著中列有酶的一览表, 表中包括酶的编号、系统名称、习惯名称、反应式、酶的来源、酶的性质等各项内容, 必要时可以查阅。

三、国际系统分类法及编号

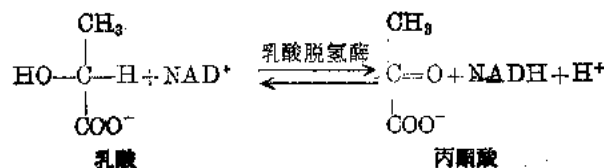
国际系统分类法中分类的原则是将所有的酶促反应按反应性质分为六大类, 分别用 1、2、3、4、5、6 的编号来表示。再根据底物中被作用的基团或键的特点将每一大类分为若干个亚类, 每一个亚类又按顺序编成 1、2、3、4... 等数字。每一个亚类可再分为若干个亚-亚类, 仍用 1、2、3、4... 编号。

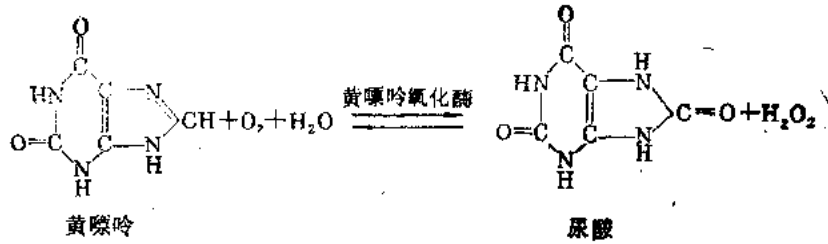
所以每一个酶的分类编号由四个数字组成, 数字间由“.”隔开; 第一个数字指明该酶属于六大类中的哪一类; 第二个数字指出该酶属于哪一个亚类; 第三个数字指出该酶属于哪一个亚-亚类; 第四个数字则表明该酶在一定的亚-亚类中的排号。编号之前往往冠以 EC(如 EC2.6.1.2), EC 为 Enzyme Commission(酶学委员会)之缩写。六大类及其亚类详细介绍如下:

1. 氧化还原酶类 氧化还原酶类(oxido-reductases)催化氧化还原反应。

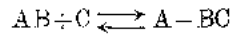


例如, 乳酸: NAD^+ 氧化还原酶(EC1.1.1.27, 习惯名为乳酸脱氢酶)及黄嘌呤: 氧化还原酶(EC1.2.3.2, 习惯名为黄嘌呤氧化酶)。

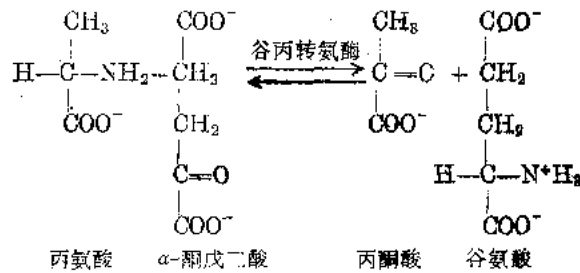




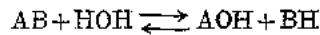
2. 移换酶类 移换酶类(transferases)催化功能基团的转移反应。



例如,丙氨酸:酮戊二酸氨基移换酶(EC2.6.1.2,习惯名为谷丙转氨酶或丙氨酸氨基移换酶);S-腺苷酰蛋氨酸:尼克酰胺甲基移换酶(EC2.1.1.1,习惯名为尼克酰胺转甲基酶)等。



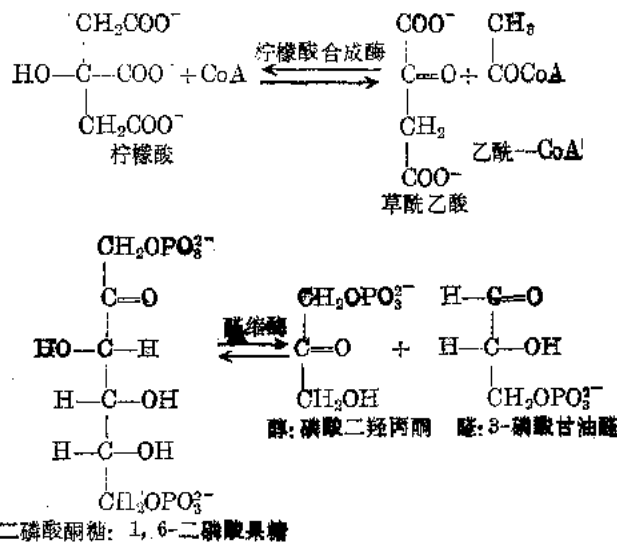
3. 水解酶类 水解酶类(hydrolases)催化水解反应。这类酶包括淀粉酶、核酸酶、蛋白酶及脂酶等。



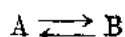
例如,亮氨酸氨基肽水解酶(EC3.4.1.1,习惯名为亮氨酸氨肽酶)。

4. 裂合酶类 裂合酶类(或称裂解酶类, lyases)催化从底物上移去一个基团而形成双键的反应或其逆反应。这类酶包括醛缩酶、水化酶及脱氨酶等。

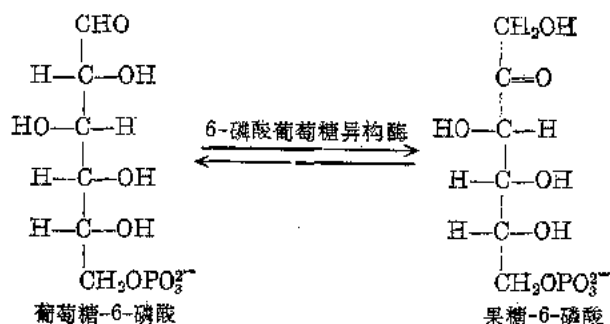
例如,二磷酸酮糖裂合酶(EC4.1.2.7,习惯名为醛缩酶);苹果酸裂合酶(EC4.2.1.2,习惯名为延胡索酸水化酶);丙酮酸:羧基裂合酶(EC4.1.1.1,习惯名为丙酮酸脱羧酶);柠檬酸裂合酶(EC4.1.3.7,习惯名为柠檬酸合成酶)。



5. 异构酶类 异构酶类(isomerases)催化各种同分异构体的相互转变。



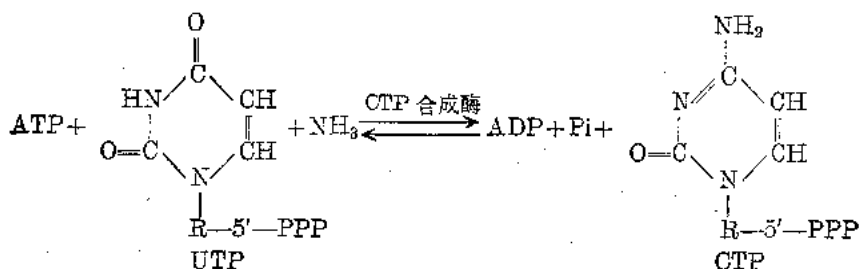
例如,葡萄糖-6-磷酸己酮醇异构酶(EC5.3.1.9,)习惯名为6-磷酸葡萄糖异构酶)。



其他,如催化D、L互变,α、β互变等的酶类均属此类。

6. 合成酶 合成酶(或称连接酶,ligases)能催化一切必须与ATP分解相偶联,并由两种物质(双分子)合成一种物质的反应。

例如,UTP; 氨连接酶(EC6.3.4.2,习惯名是CTP合成酶); L-酪氨酸; tRNA连接酶(EC6.1.1.1,习惯名是酪氨酸合成酶)等。



注:上式中“P”代表磷酸基团
部分亚类分别列于表4-3中:

第三个数字(表示亚亚类),更加精确地表明底物或反应物的性质,如:1大类中的亚亚类表示受体的类型:

1.1.1 表示氧化还原酶,作用于 >CHOH 基团,受体是 NAD^+ , NADP^+ ,

1.1.2 表示氧化还原酶,作用于 >CHOH 基团,受体是细胞色素,

1.1.3 表示氧化还原酶,作用于 >CHOH 基团,受体是分子氧。

当酶的编号仅有前三个数字时,就已清楚地表明了这个酶的特性:反应性质、反应物(或底物)性质、键的类型。

关于编号中第四个数字则没有什么特殊规定。例如

EC 1.1.1.27 为乳酸; NAD^+ 氧化还原酶。

EC 1.1.1.37 为苹果酸; NAD^+ 氧化还原酶。

EC 1.1.1.1 为乙醇; NAD^+ 氧化还原酶。

EC 6.1.1.1 为 L-酪氨酸; tRNA-连接酶(AMP)。

表 4-3 酶的国际分类表——大类及亚类
(表示分类名称, 编号, 催化反应的类型)

<p>1. 氧化还原酶类 (亚类表示底物中发生氧化的基团的性质)</p> <p>1.1 作用在 $\begin{array}{c} \\ -\text{CH}-\text{OH} \\ \end{array}$ 上</p> <p>1.2 作用在 $\begin{array}{c} \\ -\text{C}=\text{O} \\ \end{array}$ 上</p> <p>1.3 作用在 $\begin{array}{c} \\ -\text{CH}-\text{CH} \\ \end{array}$ 上</p> <p>1.4 作用在 $\begin{array}{c} \\ -\text{CH}-\text{NH}_2 \\ \end{array}$ 上</p> <p>1.5 作用在 $\begin{array}{c} \\ -\text{CH}-\text{NH} \\ \end{array}$ 上</p> <p>1.6 作用在 NADH, NADPH 上</p>	<p>4. 裂合酶类 (亚类表示分裂下来的基团与残余分子间的键的类型)</p> <p>4.1 C—C</p> <p>4.2 C—O</p> <p>4.3 C—N</p> <p>4.4 C—S</p>
<p>2. 移换酶类 (亚类表示底物中被转移基团的性质)</p> <p>2.1 一碳基团</p> <p>2.2 醛或酮基</p> <p>2.3 酰基</p> <p>2.4 糖苷基</p> <p>2.5 除甲基之外的烃基或酰基</p> <p>2.6 含氨基</p> <p>2.7 磷酸基</p> <p>2.8 含硫基</p>	<p>5. 异构酶类 (亚类表示异构的类型)</p> <p>5.1 消旋及差向异构酶</p> <p>5.2 顺反异构酶</p>
<p>3. 水解酶类 (亚类表示被水解的键的类型)</p> <p>3.1 酯键</p> <p>3.2 糖苷键</p> <p>3.3 醚键</p> <p>3.4 肽键</p> <p>3.5 其他 C—N 键</p> <p>3.6 酸酐键</p>	<p>6. 合成酶类 (亚类表示新形成的键的类型)</p> <p>6.1C—O</p> <p>6.2C—S</p> <p>6.3C—N</p> <p>6.4C—C</p>

EC 6.1.1.2 为 L-色氨酸: tRNA—连接酶(AMP)。

前三者都是氧化还原酶, 都是作用在 $-\text{CHOH}$ 基团上的第一个亚类, 又都是以 NAD^+ 为受体的, 但第四个数字不同, 分别为 27、37、1, 则说明它们所利用的底物不同, 分别为乳酸、苹果酸和乙醇。它们的习惯名称分别为乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶及醇脱氢酶。后两个酶则都是连接酶, 都要求 ATP 供给能量, 但催化不同的 tRNA 与不同的氨基酸之间的连接, 所以第四个数字不同。

一切新发现的酶, 都能按此系统得到适当的编号。

第三节 酶的分离提纯及活力测定

一、酶的分离提纯

对酶进行分离提纯有两方面的目的。一是为了研究酶的理化特性(包括结构与功能, 生物

学作用等),对酶进行鉴定,必须用纯酶;二是作为生化试剂及用作药物的酶,常常也要求有较高的纯度。

根据酶在体内作用的部位,可以将酶分为胞外酶及胞内酶两大类。胞外酶易于分离,如收集动物胰液即可分离出其中的各种蛋白酶及酯酶等。胞内酶存在于细胞内,必须破碎细胞才能进行分离。分离提纯步骤简述于下:

1. 选材 应选择酶含量高、易于分离的动、植物组织或微生物材料作原料。

2. 破碎细胞 动物细胞较易破碎,通过一般的研磨器、匀浆器、捣碎机等就可达到目的。

细菌细胞具有较厚的细胞壁,较难破碎,需要用超声波、细菌磨、溶菌酶、某些化学溶剂(如甲苯、去氧胆酸钠)或冻融等处理加以破碎。

植物细胞因为有较厚的细胞壁,也较难破碎。

3. 抽提 在低温下,用水或低盐缓冲液,从已破碎的细胞中将酶溶出。这样所得的粗提液中往往含有很多杂蛋白及核酸、多糖等成分。

4. 分离及提纯 根据酶是蛋白质这一特性,用一系列提纯蛋白质的方法,如盐析(用硫酸铵或氯化钠)、调节pH、等电点沉淀、有机溶剂(乙醇、丙酮、异丙醇等)分级分离等经典方法提纯

酶是生物活性物质,在提纯时必须考虑尽量减少酶活力的损失,因此全部操作需在低温下进行。一般在0—5°C间进行,用有机溶剂分级分离时必须零下15°—零下20°C下进行。为防止重金属使酶失活,有时需在抽提溶剂中加入少量EDTA螯合剂;为防止酶蛋白—SH基被氧化失活,需要在抽提溶剂中加入少量巯基乙醇。在整个分离提纯过程中不能过度搅拌,以免产生大量泡沫,使酶变性。

在分离提纯过程中,必须经常测定酶的比活力(见本节二),以指导提纯工作正确进行。

若要得到纯度更高的制品,还需进一步提纯,常用的方法有磷酸钙凝胶吸附、离子交换纤维素(如DEAE-纤维素,CM-纤维素)分离、葡聚糖凝胶层析、离子交换-葡聚糖凝胶层析、凝胶电泳分离及亲和层析分离等。

5. 保存 最后需将酶制品浓缩、结晶,以便于保存。酶制品一般都应在-20°C以下低温保存。

酶极易失活,绝不能用高温烘干,可用的方法是:(1)保存浓缩的酶液:用硫酸铵沉淀或硫酸铵反透析法使酶浓缩,使用前再透析除去硫酸铵。(2)冰冻干燥:对于已除去盐分的酶液可以先在低温冻结,再减压使水分升华,制成酶的干粉,保存于冰箱中。(3)浓缩液加入等体积甘油后,可于零下20°C下,长期地保存。

二、酶活力的测定

酶活力(enzyme activity)也称为酶活性,是指酶催化一定化学反应的能力。

检查酶的含量及存在,不能直接用重量或体积来表示,常用它催化某一特定反应的能力来表示,即用酶的活力来表示。酶活力的高低是研究酶的特性、进行酶制剂的生产及应用时的一项必不可少的指标。

1. 酶活力与酶反应速度。酶活力的大小可以用在一定条件下,它所催化的某一化学反应

的反应速度(reaction velocity 或 reaction rate)来表示,即酶催化的反应速度愈快,酶的活力就愈高,速度愈慢,酶的活力就愈低。所以测定酶的活力(实质上就是酶的定量测定)就是测定酶促反应的速度(用 v 表示)。

酶反应速度可用单位时间内、单位体积中底物的减少量或产物的增加量来表示,所以反应速度的单位是:浓度/单位时间。

将产物浓度对反应时间作图,反应速度即图 4-4 中曲线的斜率。从图中可知,反应速度只在最初一段时间内保持恒定,随着反应时间的延长,酶反应速度逐渐下降。引起下降的原因很多,如底物浓度的降低,酶在一定的 pH 及温度下部分失活,产物对酶的抑制、产物浓度增加而加速了逆反应的进行等。因此,研究酶反应速度应以酶促反应的初速度(initial velocity 或 initial speed)为准。这时上述各种干扰因素尚未起作用,速度保持恒定不变。

测定产物增加量或底物减少量的方法很多,常用的方法有化学滴定、比色、比旋光度、气体测压、测定紫外吸收、电化学法、荧光测定以及同位素技术等。选择哪一种方法,要根据底物或产物的物理化学性质而定。在简单的酶反应中,底物减少与产物增加的速度是相等的,但一般以测定产物为好,因为测定反应速度时,实验设计规定的底物浓度往往是过量的,反应时底物减少的量只占其总量的一个极小部分,测定时不易准确;而产物则从无到有,只要方法足够灵敏,就可以准确测定。

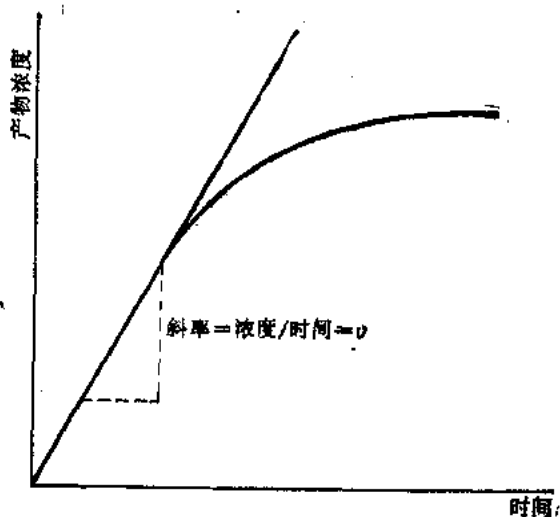


图 4-4 酶反应的速度曲线

2. 酶的活力单位(U, active unit) 酶的活力大小,也就是酶量的大小,用酶的活力单位来度量。

1961 年国际酶学会议规定:1 个酶活力单位,是指在特定条件下,在 1 分钟内能转化 1 微摩尔(μ mol)底物的酶量,或是转化底物中 1 微摩尔的有关基团的酶量。特定条件:温度选定为 25°C ,其他条件(如 pH 及底物浓度)均采用最适条件。这是一个统一的标准,但使用起来不如习惯用法方便。

被人们普遍采纳的习惯用法使用较方便。例如 α -淀粉酶,可用每小时催化 1 克可溶性淀粉液化所需要的酶量来表示,也可以用每小时催化 1 毫升 2% 可溶性淀粉液化所需要的酶量作为一个酶单位。不过这些表示法不够严格,同一种酶有好几种不同的单位,也不便于对酶活力进行比较。

3. 酶的比活力(specific activity) 比活力的大小,也就是酶含量的大小,即每毫克酶蛋白所具有的酶活力,一般用单位/毫克蛋白(U/mg 蛋白质)来表示。也有时用每克酶制剂或每毫升酶制剂含有多少个活力单位来表示(单位/克或单位/毫升)。它是酶学研究及生产中经常

使用的数据,可以用来比较每单位重量酶蛋白的催化能力。对同一种酶来说,比活力愈高,表明酶愈纯。

4. 酶的转换数 k_{cat} 转换数为每秒钟每个酶分子,转换底物的微摩尔数(μmol)。它相当于一分子产物-酶(ES)中间物形成后,酶将底物转换为产物的效率。在数值上, $k_{cat} = k_3$, 此处的 k_3 即米氏方程导出部分中的 k_3 , 是由 ES 形成产物的速度常数,例如表 4-4。

表 4-4 某些酶的最大转换数

酶	k_{cat} 转换数($\mu\text{mol}/\text{秒}$)
碳酸酐酶 carbonic anhydrase	600 000
3-酮固醇异构酶 3-ketosteroid isomerase	280 000
乙酰胆碱酯酶 acetylcholinesterase	25 000
青霉素酶 penicillinase	2 000
乳糖脱氢酶 lactate dehydrogenase	1 000
胰凝乳蛋白酶 chymotrypsin	100
DNA 聚合酶 I DNA polymerase I	15
色氨酸合成酶 tryptophan synthetase	2
溶菌酶 lysozyme	0.5

第四节 酶促反应的动力学

酶促反应的动力学(kinetics of enzyme-catalyzed reactions)。是研究酶促反应的速度以及影响此速度的各种因素的科学。

在酶的结构与功能关系以及酶作用机理的研究中,需要动力学提供实验证据。为了最大限度地发挥酶反应的高效率,寻找最有利的反应条件,为了解酶在代谢中的作用和某些药物的作用机理等等,都需要掌握酶促反应速度的规律。因此,酶促反应动力学是酶学研究中的一个既具有重要理论意义又具有实践意义的课题。

一、底物浓度对酶反应速度的影响——米氏学说的提出

在 20 世纪初,就已观察到了酶被底物所饱和的现象,而这种现象在非酶促反应中则是不存在的。

后来发现底物浓度(substrate concentration)的改变,对酶反应速度的影响比较复杂。在一定的酶浓度下如将初速度(v)对底物浓度($[S]^0$)作图(图 4-5)。可以看到当底物浓度较低时(底物浓度从 0 逐渐增高),反应速度与底物浓度的关系呈正比关系,表现为一级反应(first order reaction)。随着底物浓度的增加,反应速度不再按正比升高,在这一段,反应表现为混合级反应(mixed order reaction)。如果再继续加大底物浓度,曲线表现为零级反应(zero order reaction),这时,尽管底物浓度还可以不断加大,反应速度却不再上升,趋向一个极限,说明酶已被底物所饱和(saturation)。所有的酶都有此饱和现象,但各自达到饱和时所需的底物浓度并不相同,甚至差异极大。

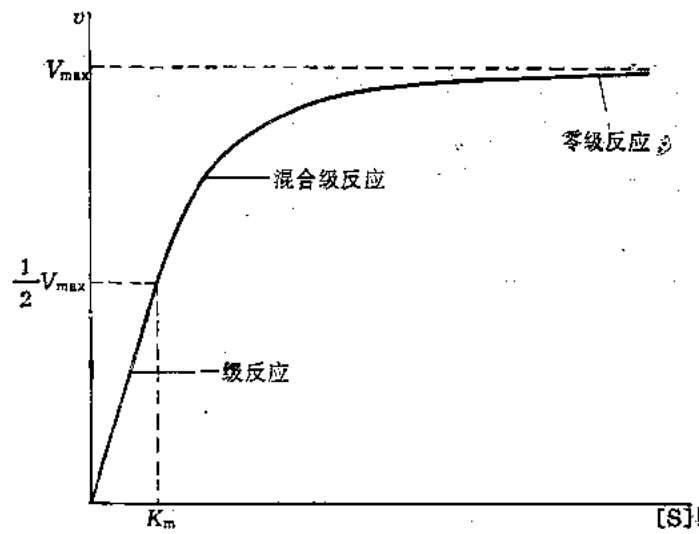


图 4-5 酶反应速度与底物浓度的关系

图中[S]代表底物浓度, v 代表反应速度, V_{max} 代表最大反应速度, K_m 代表米氏常数。

曾提出了各种假说, 试图解释上述现象, 其中比较合理的是“中间产物”假说。按此假说认为: 酶与底物先络合成一个络合物, 此中间产物亦被人们看作为稳定的过渡态物质。然后络合物再进一步分解, 成为产物和游离态酶。

1913 年前后 Michaelis 和 Menten 在前人工作的基础上, 作了大量的定量研究, 积累了足够的实验证据, 从而提出酶促动力学的基本原理, 并归纳为一个数学式加以表达:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

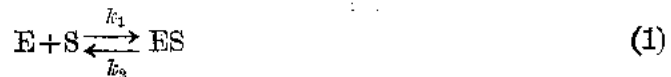
这个式子称为米氏方程, 它的前提是酶与底物反应的“快速平衡说”——开始, 两者反应速度较快, 迅速地建立平衡。米氏方程表明了底物浓度与酶反应速度间的定量关系。这就使“中间产物假说”得到了人们的普遍承认, 现在一般称为“米氏学说”。

二、米氏公式的导出

Michaelis 和 Menten 提出酶促动力学基本原理后, Briggs 和 Haldane 又加以补充与发展。把米氏公式推导如下:

从酶被底物饱和的现象出发, 按照“稳态平衡”假说(Steady-state theory)的设想, 推论酶促反应分两步进行:

第一步: 酶(E)与底物(S)作用, 形成酶-底物中间产物(ES):



第二步: 中间产物分解, 形成产物(P), 释放出游离酶(E):



这两步反应都是可逆的。它们的正反应与逆反应的速度常数分别为 k_1, k_2, k_3, k_4 。

由于酶促反应的速度与酶-底物中间物(ES)的形成及分解直接相关,所以必须先考虑 ES 的形成速度及分解速度。Briggs 及 Haldane 的发展就在于指出 ES 的量不仅与(1)式平衡有关,有时还与(2)式平衡有关,不能一概都把(2)式略去不计。

ES 的形成量与 E+S 及 P+E 有关。但 P+E 形成 ES 的速度极小(特别是在反应处于初速度阶段时, P 很小),故可忽略不计。因此, ES 的形成速度可用下式表示:

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1([\text{E}] - [\text{ES}]) \cdot [\text{S}] \quad (3)$$

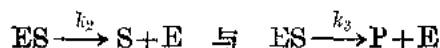
[E] 为酶的总浓度。

[ES] 为酶与底物所形成的中间产物的浓度。

[E] - [ES] 为游离状态的酶的浓度。

[S] 为底物浓度。

通常底物浓度比酶浓度过量很多,即 $[\text{S}] \gg [\text{E}]$, 因此被酶结合的 S 量, 亦即 [ES], 它与总的底物浓度相比, 可以忽略不计。所以 $[\text{S}] - [\text{ES}] \approx [\text{S}]$, 而 ES 的分解速度则是



此两式速度之和为 ES 分解的总速度:

$$-\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_2[\text{ES}] + k_3[\text{ES}] \quad (4)$$

当整个酶反应体系处于动态平衡, 即恒态(steady state)时, ES 的形成速度与分解速度相等, 即 [ES] 保持动态的恒定。所以 (3) = (4) 即

$$k_1([\text{E}] - [\text{ES}]) \cdot [\text{S}] = k_2[\text{ES}] + k_3[\text{ES}]$$

$$\frac{([\text{E}] - [\text{ES}]) \cdot [\text{S}]}{[\text{ES}]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (5)$$

令

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \text{并代入(5)}$$

则

$$\frac{([\text{E}] - [\text{ES}]) \cdot [\text{S}]}{[\text{ES}]} = K_m \quad (6)$$

由此式可得出动态平衡时的 [ES]:

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad (7)$$

因为酶反应的速度(v)与 [ES] 成正比, 所以:

$$v = k_3[\text{ES}] \quad (8)$$

将(7)的 [ES] 值代入(8)得:

$$v = k_3 \frac{[\text{E}][\text{S}]}{K_m + [\text{S}]} \quad (9)$$

当底物浓度很高时所有的酶都被底物所饱和, 而转变成 ES 复合物, 即 $[\text{E}] = [\text{ES}]$ 时, 酶促反应达到最大速度 V_{\max} (maximum velocity), 所以

$$V_{\max} = k_3[\text{E}] = k_3[\text{ES}] \quad (10)$$

(9)除以(10)得:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{k_3[E] \cdot [S]}{K_m + [S]} \cdot \frac{1}{k_3[E]}$$

因此

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

这就是米氏方程 (Michaelis-Menten equation), K_m 称之为米氏常数 (Michaelis-constant)。这个方程式表明了当已知 K_m 及 V_{\max} 时, 酶反应速度与底物浓度之间的定量关系。

三、米氏常数的意义

当酶促反应处于 $v = \frac{1}{2} V_{\max}$ 的特殊情况时:

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$\therefore [S] = K_m$$

由此可以看出 K_m 值的物理意义, 即 K_m 值是当酶反应速度达到最大反应速度一半时的底物浓度, 它的单位是摩尔/升, 与底物浓度的单位一样。

米氏常数是酶学研究中的一个极重要的数据, 关于 K_m 还可作以下几点分析:

1. K_m 值是酶的特征常数之一。一般只与酶的性质有关, 而与酶浓度无关。不同的酶, K_m 值不同, 如脲酶为 25 mmol/L, 苹果酸酶为 0.05 mmol/L。各种酶的 K_m 值在 1×10^{-8} —1 mmol/L 或更高一些的区间。

2. 如果一个酶有几种底物, 则对每一种底物, 各有一个特定的 K_m 值(表 4-5)。并且, K_m 值还受 pH 及温度的影响。因此, K_m 值作为常数只是对一定的底物、一定的 pH、一定的温度条件而言。测定酶的 K_m 值可以作为鉴别酶的一种手段, 但是必须在指定的实验条件下进行。

3. 表中数据指出, 同一种酶有几种底物就有几个 K_m 值, 其中 K_m 值最小的底物一般称为该酶的最适底物或天然底物, 如蔗糖是蔗糖酶的天然底物, N-苯甲酰酪氨酸胺是胰凝乳蛋白酶的最适底物。

$\frac{1}{K_m}$ 可近似地表示酶对底物亲和力的大小, $\frac{1}{K_m}$ 愈大, 表明亲和力愈大, 因为 $\frac{1}{K_m}$ 愈大, K_m 就愈小, 达到最大反应速度一半所需要的底物浓度就愈小。显然, 最适底物与酶的亲和力最大, 不需很高的底物浓度就可以很容易地达到 V_{\max} 。

K_m 值随不同底物而异的现象可以帮助判断酶的专一性, 并有助于研究酶的活性中心。

4. K_m 与 K_s 。 K_m 不等于 K_s , 只是在特殊情况 ($k_3 \ll k_{-1}, k_2$) 下, K_m 才可看作是 K_s 。

Michaelis 等曾规定 $K_m = \frac{[\text{反应物}]}{[\text{产物}]} = \frac{[E][S]}{[ES]}$, 但 1961 年国际酶学会议建议将这个早年

表 4-5 一些酶的 K_m 值

酶	底物	K_m (mmol/L)
过氧化氢酶(catalase)	H_2O_2	25
脲酶(urease)	尿素	25
己糖激酶(hexokinase)	葡萄糖	0.15
	果糖	1.5
蔗糖酶(sacchrase)	蔗糖	28
	棉子糖	350
胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)	N-苯甲酰酪氨酸胺	2.5
	N-甲酰酪氨酸胺	12.0
	N-乙酰酪氨酸胺	32.0
	甘氨酸酪氨酸胺	122.0
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	HCO_3^-	8.0—9.0
谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase)	谷氨酸	0.12
	α -酮戊二酸	2.0
	NAD ^{氧化型}	0.025
	NAD ^{还原型}	0.018
肌酸激酶(creatine kinase)	肌酸	0.6
	ADP	19
	磷酸肌酸	5
乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)	丙酮酸	0.017
丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)	丙酮酸	1.3
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucosyl-6-phosphate dehydrogenase)	6-磷酸-葡萄糖	0.058
磷酸己糖异构酶 (hexose-6-phosphate isomerase)	6-磷酸-葡萄糖	0.7
β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase)	乳糖	4.0
溶菌酶 (lysozyme)	6-N-乙酰-葡萄糖胺	0.006
苏氨酸脱氨酶 (threonine deaminase)	苏氨酸	5
青霉素酶 (penicillinase)	苄基青霉素	0.05
丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase)	丙酮酸 HCO_3^- ATP	0.4 1
精氨酸-tRNA 合成酶 (arginine-tRNA-synthetase)	精氨酸 tRNA ATP	0.06 0.003 0.0004 0.3

规定的 K_m 值改称为底物常数(substrate constant) K_s 。这个 K_s 值实际上是 ES 的解离平衡常数, 而不是 $E+S$ 生成 ES 反应的平衡常数, 所以 $K_s = \frac{k_2}{k_1}$ 。

Briggs 和 Haldane 推导米氏公式时, 是假定在理想的实验条件下, 严格地定义:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (1)$$

从某种意义上讲, K_m 是 ES 分解速度和 ES 形成速度的比值。所以, $\frac{1}{K_m}$ 表示形成 ES 趋势的大小。

然而, 在某些酶的酶促反应中, 形成 ES 的平衡迅速建立, ES 形成的速度大大地超过 ES 分解为产物的速度。如脲酶、胰蛋白酶、蔗糖酶、乳酸脱氢酶等, 因此 k_1 及 k_2 远远大于 k_3 , 在这种情况下 $ES \xrightarrow{k_3} P$ 是整个反应中最慢的一步, 也就是限制整个反应速度的一步。既然 k_3 相对地说是极小的, 就可忽略不计, 于是(1)式就可以简化为:

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

这个(2)式与早年 Michaelis 和 Menten 确立的式子形式上一样。

在过去的文献中常把 K_m 与 K_s 混用, 这是不严格的, 只有在 $k_3 \ll k_1, k_2$ 的特殊情况下, K_m 及 K_s 两者才有共同的涵义。上面提到 $\frac{1}{K_m}$ 可近似地表示酶与底物亲和力的大小, 严格地说应该用 $\frac{1}{K_s}$ 表示, 只是当相对地说, k_3 极小时, 才能用 $\frac{1}{K_m}$ 来近似地说明酶与底物结合的难易程度。

5. K_m 及 K'_m

在没有抑制剂(或仅有非竞争性抑制剂)存在时, ES 分解速度和 ES 形成速度的比值符合于米氏方程, 称为 K_m 。而在另外一些情况下, 它发生变化, 不符合于米氏方程, 此时的比值称为表观米氏常数: K'_m 。

6. K_m 值与米氏方程的实际用途: 可由所要求的反应速度(应到达 V_{max} 的百分数), 求出应当加入底物的合理浓度, 反过来, 也可以根据已知的底物浓度, 求出该条件下的反应速度。

如果要求反应速度到达 V_{max} 的 99%, 其底物浓度应为:

$$99\% = \frac{100\% [S]}{K_m + [S]}$$

$$99\% K_m + 99\% [S] = 100\% [S]$$

$$\therefore [S] = 99 K_m$$

如要求反应速度达到 V_{max} 的 90%, 其底物浓度应为:

$$90\% = \frac{100\% [S]}{K_m + [S]}$$

$$90\% K_m + 90\% [S] = 100\% [S]$$

$$\therefore [S] = 90 K_m$$

根据米氏方程, 以 v 对 $[S]$ 作图, 可得到与实验结果(见图 4-5)相符的曲线。这种一致性,

从一个方面反映了米氏学说的正确性。不过只有动力学的结果还是不够充分的，几十年来还积累了很多其他的证据，直接或间接地证明中间产物学说的正确性。这些证据包括：竞争性抑制现象，酶受底物保护不易变性等，特别是后来直接获得了 ES 复合物，如胰凝乳蛋白酶水解乙酰对硝基酚时形成乙酰化胰凝乳蛋白酶，又如它水解三氟乙酰对硝基酚时，形成三氟乙酰化胰凝乳蛋白酶。三氟乙酰化胰凝乳蛋白酶很稳定，可以得到结晶。又如醛缩酶，也可形成很稳定的 ES 复合物。但是，必须指出，现在的酶促动力学还只能较好地反映较为简单的酶作用过程，对于更复杂的酶作用过程，特别是对生物体中的多酶体系则还不能全面地概括和解释。米氏方程只假定形成一个 ES 中间物，但实际上许多酶在催化时包含有几个中间物： $E+S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EZ \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E+P$ 等。再加上许多酶促反应不只有一种底物，也不只产生一种产物，对这种过程进行动力学分析是很复杂的，必须借助电子计算机，才可能进行运算。

四、米氏常数的求法

从酶的 v -[S] 图上可以得到 V_{max} ，再从 $\frac{1}{2}V_{max}$ 可求得相应的 [S]，即 K_m 值。但实际上即使用很大的底物浓度，也只能得到趋近于 V_{max} 的反应速度，而达不到真正的 V_{max} ，因此测不到准确的 K_m 值。为了得到准确的 K_m 值，可以把米氏方程的形式加以改变，使它成为相当于 $y=ax+b$ 的直线方程，然后用图解法求出 K_m 值。

1. 双倒数作图法(double-reciprocal plot 法, Lineweaver-Burk 法)

这是最常用的方法。

将米氏方程改写成以下形式

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

实验时选择不同的 [S] 测定相对应的 v 。求出两者的倒数，以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图，绘出直线，外推至与横轴相交，横轴截距 ($-x$) 即为 $\frac{1}{K_m}$ 值， $K_m = -\frac{1}{x}$ 。此法因为方便而应用最广，但也有缺点：实验点过分集中于直线的左端，作图不易十分准确(见图 4-6)。

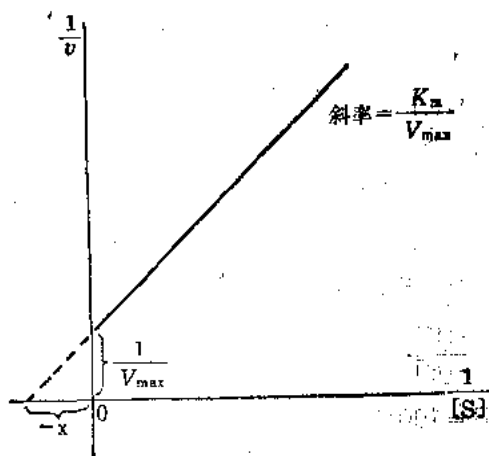


图 4-6 双倒数作图法

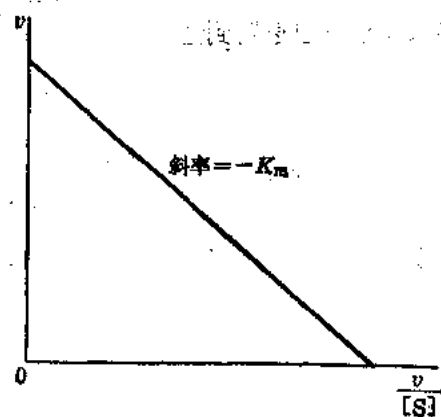
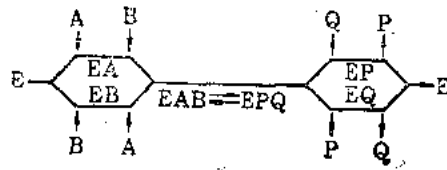
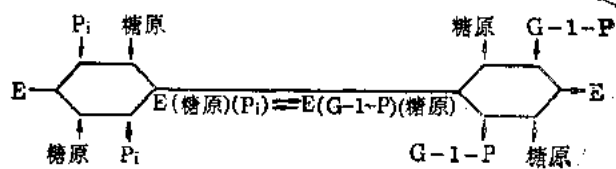


图 4-7 v 对 $v/[S]$ 作图法

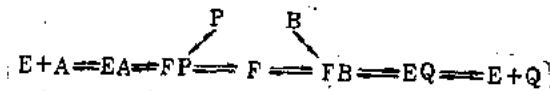
用图式来说明:



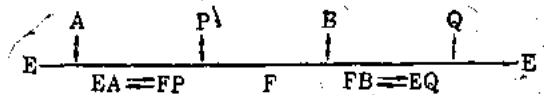
例如: 糖原 + P_i $\xrightleftharpoons{\text{磷酸化酶}}$ G-1-P* + 糖原



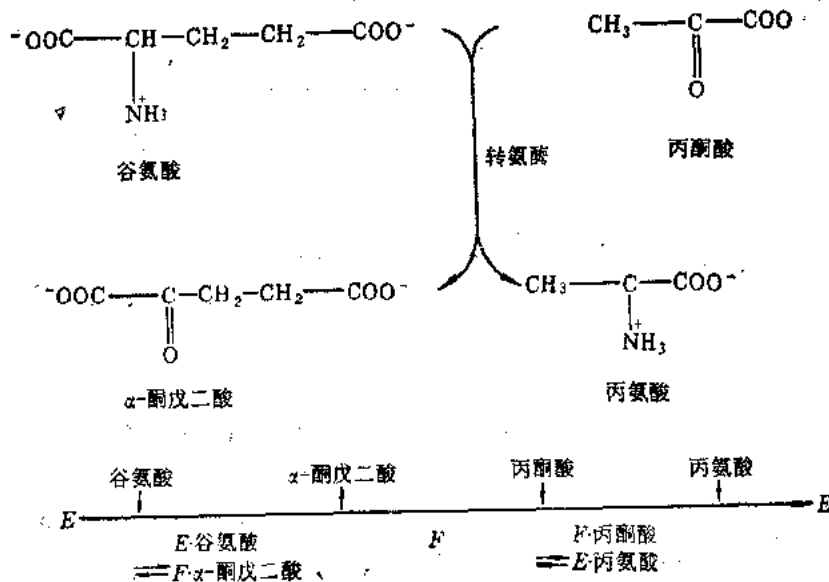
3. 乒乓反应机理 (ping pong mechanism)



用以下图式来说明:

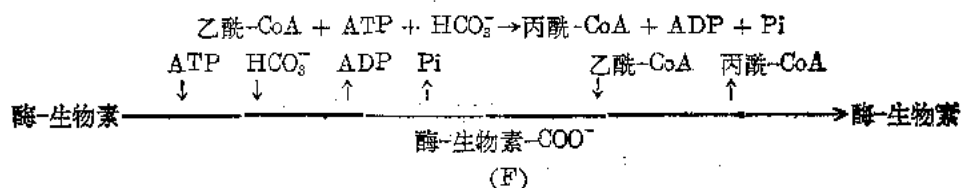


转氨酶是这种乒乓催化反应的典型, 转氨酶首先与氨基酸(底物 A)作用, 产生中间物 EA, 然后释放出 α -酮酸(产物 P); 其间有一个辅酶结构转变的阶段: 辅酶中的磷酸吡哆醛变为磷酸吡哆胺, 酶 E 转变成 F, 然后 F 再与底物 B(另一个酮酸)作用, 释放出产物(相应的氨基酸):



* G-1-P 代表 1-磷酸-葡萄糖

乙酰辅酶 A、ATP、 HCO_3^- 三个底物作用, 也属此类。



它们的动力学公式都已推导出来, 比较复杂, 可见于某些专门的著作中, 此处不作推导。

六、pH 对酶反应速度的影响

大部分酶的活力受其环境 pH 的影响, 在一定 pH 下, 酶反应具有最大速度, 高于或低于此值, 反应速度下降, 通常称此 pH 为酶反应的最适 pH (optimum pH) (图 4-9)。

最适 pH 有时因底物种类、浓度及缓冲液成分不同而不同。而且常与酶的等电点不一致, 因此, 酶的最适 pH 并不是一个常数, 只是在一定条件下才有意义。

几种酶的最适 pH 见表 4-6。一般在 pH 6—8 之间, 动物酶多在 pH 6.5—8.0 之间, 植物及微生物酶多在 pH 4.5—6.5 之间, 但也有例外, 如胃蛋白酶为 1.5, 精氨酸酶(肝脏中)为 pH 9.7。

pH 影响酶活力的原因可能有以下几个方面:

1. 过酸、过碱会影响酶蛋白的构象, 甚至使酶变性而失活。

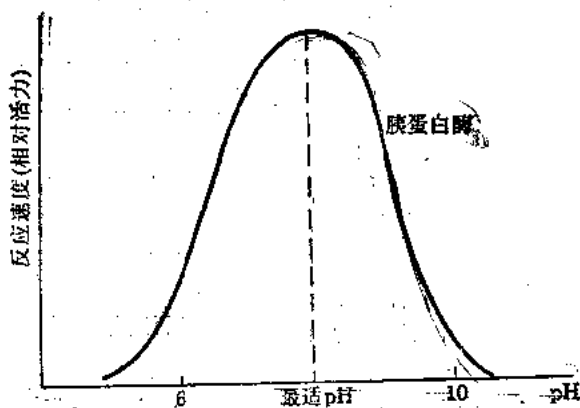


图 4-8 pH-酶活性关系图

表 4-6 几种酶的最适 pH 值

酶	与底物	最适 pH
胃蛋白酶(pepsin)	鸡蛋清蛋白	1.5
	血红蛋白	2.2
丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)	丙酮酸	4.8
延胡索酸酶(fumarase)	延胡索酸	6.5
	苹果酸	8.0
过氧化物酶(catalase)	H_2O_2	7.6
胰蛋白酶(trypsin)	苯甲酰精氨酸胺	7.7
	苯甲酰精氨酸甲酯	7.0
碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)	甘油-3-磷酸	9.5
精氨酸酶(arginase)	精氨酸	9.7

2. 当 pH 改变不很剧烈时, 酶虽不变性, 但活力受影响。因为 pH 会影响底物分子的解离状态(影响程度取决于底物分子中与酶结合的那些功能基的 pK' 值); 也会影响酶分子的解离状态, 最适 pH 与酶活力中心结合底物的基团及参与催化的基团的 pK 值有关, 往往只有一种解离状态最有利于与底物结合, 在此 pH 下酶活力最高; 也可能影响到中间产物 ES 的解离状态。总之, 都影响到 ES 的形成, 从而降低酶活性。

3. pH 影响分子中另一些基团的解离, 这些基团的离子化状态与酶的专一性及酶分子中活力中心的构象有关。

一般制作 pH-酶活性曲线时, 采用使酶全部饱和的底物浓度, 在此条件下再测定不同 pH 时的酶活力。由于酶活力受 pH 影响很大, 因此在酶的提纯或应用中测定酶活力时, pH 必须恒定, 所以测活反应最好在缓冲液体系中进行。虽然大部分酶的 pH-酶活性曲线如图 4-8 所示, 近于“钟”形, 但并不是所有的酶都如此, 有的只有“钟”形的一半, 有的甚至是直线, 如图 4-9 所示。木瓜蛋白酶的底物虽在环境 pH 影响下会发生电荷变化, 但此种变化对催化作用没有什么影响。又如蔗糖转化酶, 它作用于电中性的底物蔗糖时, 在 pH3.0—7.5 间酶活性几乎不变, 其 pH-酶活性曲线与木瓜蛋白酶的曲线极为相似。

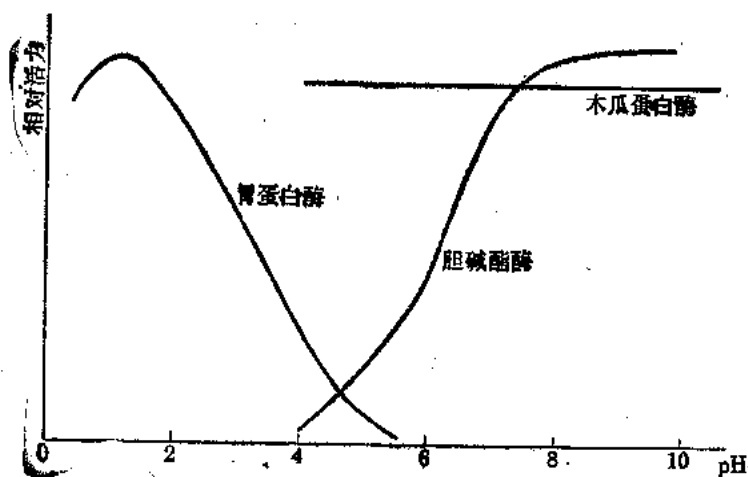


图 4-9 三种酶的 pH-酶活性曲线

应当指出的是酶在试管反应中的最适 pH 与它在正常细胞的生理 pH 值并不一定完全相同。这是因为一个细胞内可能会有几百种酶, 不同的酶对此细胞内的生理 pH 的敏感性不同; 也就是说此 pH 对一些酶是最适 pH, 而对另一些酶则不是, 不同的酶表现出不同的活性。这种不同对于控制细胞内复杂的代谢途径可能具有很重要的意义。

七、温度对酶反应速度的影响

温度对酶反应速度也有很大的影响, 如图 4-10 所示, 有一个最适温度(optimum temperature)。在最适温度的两侧, 反应速度(用 v 表示)都比较低, 也是钟形曲线。从温血动物组织中提出的酶, 最适温度一般在 35°C 至 40°C 之间, 植物酶的最适温度稍高, 在 40°C — 50°C 之间, 从细菌中分离出的某些酶(如 Taq DNA 聚合酶的最适温度可达 70°C)。

在达到最适温度之前提高温度,可以增加酶促反应的速度。反应温度提高 10°C ,其反应速度与原来的反应速度之比称为反应的温度系数(temperature coefficient),用 Q_{10} 表示,对于许多酶来说, Q_{10} 多为1-2,也就是说每增高 10°C ,酶反应速度为原反应速度的1-2倍。

温度对酶促反应速度的影响有两方面:一方面是当温度升高时,反应速度也加快,这与一般化学反应一样。另一方面,随温度升高而使酶逐步变性,即通过减少有活性的酶而降低酶的反应速度。酶反应的最适温度就是这两种过程平衡的结果,在低于最适温度时,前一种效应为主,在高于最适温度时,则后一效应为主,因而酶活性迅速丧失,反应速度很快下降。大部分酶在 60°C 以上变性,少数酶能耐受较高的温度,如细菌淀粉酶在 93°C 下活力最高,又如牛胰核糖核酸酶加热到 100°C 仍不失活。

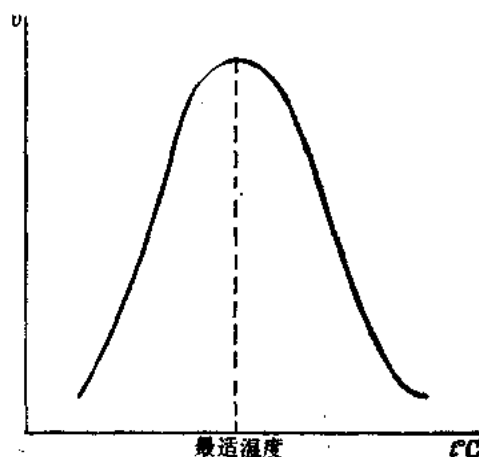


图 4-10 温度与酶反应速度的关系图

最适温度不是酶的特征物理常数,而是上述影响的综合结果,它不是一个固定值,而与酶作用时间的长短有关,酶可以在短时间内耐受较高的温度,然而当酶反应时间在已经规定的情况下,才有最适温度。

酶在干燥状态下,比在潮湿状态下,对温度的耐受力要高。这一点已用于指导酶的保藏。有些酶的干粉制剂可在室温下放置一段时间。而其水溶液则必须保存于冰箱中;制成冰冻干粉的酶制剂能放置几个月、甚至更长时间,而未制成这种干粉的酶溶液在冰箱中只能保存几周、甚至几天就会失活。

八、酶浓度对酶反应速度的影响

在酶促反应中,如果底物浓度足够大,足以使酶饱和,则反应速度与酶浓度成正比,这种正比关系也可以由米氏方程推导出来:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

又因为

$$V_{\max} = k_3 [E]$$

$$\therefore v = \frac{k_3 [E] [S]}{K_m + [S]}$$

$$v = \frac{k_3 [S]}{K_m + [S]} \cdot [E]$$

当[S]维持不变时, $v \propto [E]$

这里,使用的酶必须是纯酶制剂或不含抑制物的粗酶制剂。

九、激活剂对酶反应速度的影响

凡是能提高酶活性的物质,都称为激活剂(activator),其中大部分是离子或简单有机化

合物。

激活剂按分子的大小可以分为以下三类。

(一)无机离子,又可分为三种:

1. 金属离子 金属离子对酶的作用有两种,一是作为酶的辅助因子起作用(见第一节),二是作为激活剂起作用。

作为激活剂起作用的有 K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 及 Ca^{2+} 等离子,这些金属的原子序数在 11—55 之间,其中的 Mg^{2+} 是多种激酶及合成酶的激活剂。

2. 阴离子 在一般浓度下,阴离子的激活作用不明显。较突出的是动物唾液中的 α -淀粉酶受 Cl^- 激活, Br^- 也有激活作用,但作用稍弱。

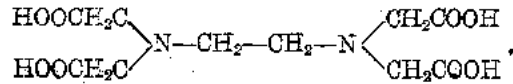
3. 氢离子

激活剂对酶的作用具有一定的选择性,即一种激活剂对某种酶能起激活作用,而对另一种酶可能起抑制作用。有时,离子之间有拮抗现象,例如 Na^+ 抑制 K^+ 的激活作用, Mg^{2+} 激活的酶则常为 Ca^{2+} 所抑制。有时金属离子间也可相互替代,如 Mg^{2+} 作为激酶等的激活剂,也可以被 Mn^{2+} 取代。另外,激活剂的浓度,对其作用也有影响,即同一种酶由于激活剂浓度升高,可以从被激活转化为被抑制,如对于 $NADP^+$ 合成酶, $[Mg^{2+}]$ 为 $5-10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时具激活作用,但在 $30 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 则酶活性下降;若用 Mn^{2+} 代替 Mg^{2+} ,则在 $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 起激活作用,高于此浓度,酶活性下降,不再有激活作用。多核苷酸磷酸化酶(PNPase)也有类似情况。

(二)中等大小的有机分子,可分为两种

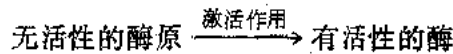
1. 某些还原剂,如牛胱氨酸、还原型谷胱甘肽、氰化物等能激活某些酶,使酶中二硫键还原成硫氢基,从而提高酶活性,如木瓜蛋白酶及 D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

2. EDTA(乙二胺四乙酸),



它是金属螯合剂,能除去酶中重金属杂质,从而解除重金属离子对酶的抑制作用。

(三)具有蛋白质性质的大分子物质,这类激活剂是指可对某些无活性的酶原起作用的酶。



关于酶原的激活,还要在第六节中详细讨论。

十、抑制剂对酶反应的影响

酶是蛋白质,凡可使酶蛋白变性而引起酶活力丧失的作用称为失活作用。凡使酶活力下降,但并不引起酶蛋白变性的作用称为抑制作用(inhibition)。所以,抑制作用与变性作用是不同的。

某些物质,它们并不引起酶蛋白变性,但能使酶分子上的某些必需基团(主要是指酶活性中心上的一些基团)发生变化,因而引起酶活力下降,甚至丧失,致使酶反应速度降低。能引起这种抑制作用的物质称为酶的抑制剂(inhibitor)。

研究抑制剂对酶的作用,是非常重要的,它有力地推动了对生物机体代谢途径、某些药物的作用机理、酶活性中心内功能基团的性质、维持酶分子构象的功能基团的性质、酶的底物专一性以及酶的作用机理等重要课题等研究的进展。

某些酶受到的细胞内特异化合物的抑制作用,可能是完整细胞中控制复杂的酶反应的一种重要因素。

(一)抑制作用的类型:根据抑制剂与酶的作用方式及抑制作用是否可逆,可将抑制作用分为两大类。

1. 不可逆的抑制作用 (irreversible inhibition) 这类抑制剂通常以比较牢固的共价键与酶蛋白中的基团结合,而使酶失活,不能用透析、超滤等物理方法除去抑制剂而恢复酶活性。

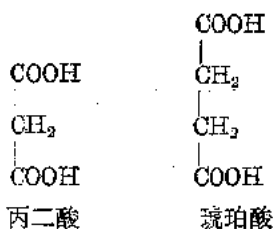
按照不可逆抑制作用的选择性不同,又可分为专一性的不可逆抑制和非专一性的不可逆抑制两类。专一性不可逆抑制仅仅和活性部位的有关基团反应,非专一性的不可逆抑制则可以和一类或几类的基团反应。但这种区别也不是绝对的,因作用条件及对象等不同,某些非专一性抑制剂有时会转化,产生专一性不可逆抑制作用。

比较起来,非专一性抑制剂(如烷化巯基的碘代乙酸)用途更广,它可以用来很好地了解酶有哪些必须基团。而专一性的不可逆抑制剂(如 TPCK, DFP 及 3,4-癸炔酰-N-乙酰半胱胺)则往往要在前者提供线索的基础上才能设计出来。另外,非专一性试剂还可用来探测酶的构象。

2. 可逆的抑制作用 (reversible inhibition) 这类抑制剂与酶蛋白的结合是可逆的,可用透析法除去抑制剂,恢复酶的活性。可逆抑制剂与游离状态的酶之间存在着一个平衡。

根据抑制剂与底物的关系,可逆抑制作用分为三种类型:

(1) 竞争性抑制 (competitive inhibition) 抑制剂与底物竞争,从而阻止底物与酶的结合。因酶的活性中心不能同时既与抑制剂(I)作用,又与底物(S)作用。这是最常见的一种可逆抑制作用。竞争性抑制剂具有与底物相类似的结构,与酶形成可逆的 EI 复合物。但 EI 不能分解成产物 P。酶反应速度因此下降。可以通过增加底物浓度而解除这种抑制。最典型的例子是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制,因为丙二酸是二羧酸化合物,与这个酶的正常底物琥珀酸结构上很相似:



(2) 非竞争性抑制 (noncompetitive inhibition) 酶可以同时与底物及抑制剂结合,两者没有竞争作用。酶与抑制剂结合后,还可以与底物结合, EI+S → ESI; 酶与底物结合后,也还可以与抑制剂结合 ES+I → ESI。但是中间物 ESI 不能进一步分解为产物,因此酶活性降低。这类抑制剂与酶活性中心以外的基团相结合(图 4-11),其结构可能与底物毫无相关之处,如亮氨酸是精氨酸酶的一种非竞争性抑制剂。大部分非竞争性抑制都是由一些可以与

酶的活性中心之外的巯基可逆结合的试剂引起的。这种-SH基对于酶活性来说也是很重要的，因为它们帮助维持酶分子的构象。这类试剂如含某些金属离子(Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ 等)的化合物，与酶反应时存在如下的平衡： $\text{E-SH} + \text{Ag}^+ \rightleftharpoons \text{E-S-Ag} + \text{H}^+$ 。此外，EDTA结合金属引起的抑制，也属于非竞争性抑制，例如它对需 Mg^{2+} 的己糖激酶的抑制。图4-11可说明竞争性抑制与非竞争性抑制的区别。

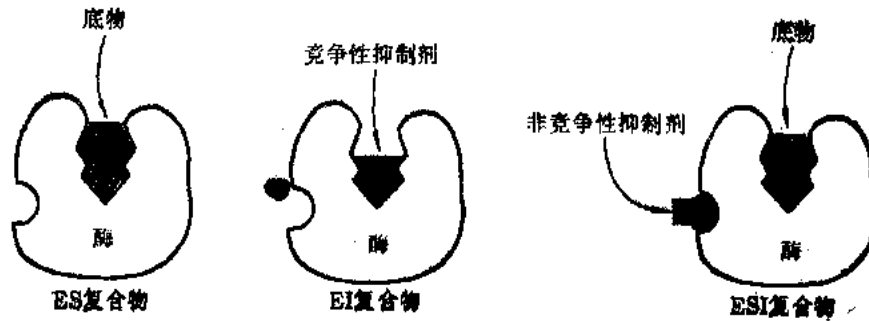


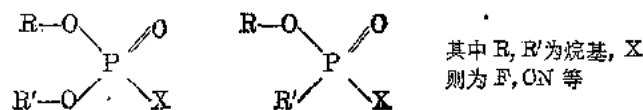
图4-11 酶与底物或抑制剂结合的中间物

(3) 反竞争性抑制(uncompetitive inhibition)酶只有在与底物结合后，才能与抑制剂结合，即 $\text{ES} + \text{I} \rightarrow \text{ESI}$, $\text{ESI} \rightarrow \text{P}$ 。比较起来，这种抑制作用最不重要。

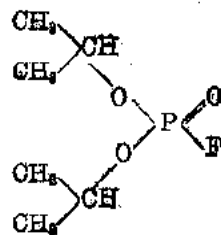
(二) 一些重要的抑制剂

1. 不可逆抑制剂 当这类抑制剂过量地加到酶溶液中后，随着受抑制酶分子的逐渐增多，抑制作用不断增强，甚至使酶反应停止。某些不可逆抑制剂通过对酶分子的化学修饰起到抑制作用，但有时修饰过的酶仍有活力，只是活力极低。不可逆抑制剂有 k_s 型及 k_{cat} 型两类，多数都属于 k_s 型；

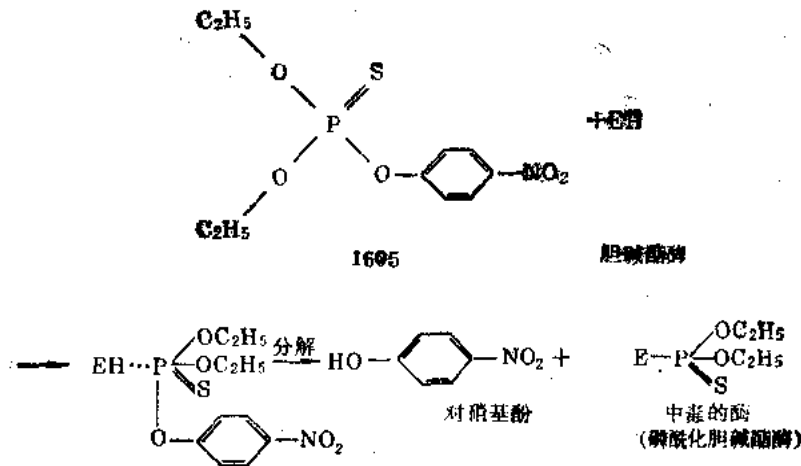
(1) 有机磷化合物 有机磷化合物能够与酶活性直接相关的丝氨酸上的羟基牢固地结合，从而抑制某些蛋白酶及酯酶。这类化合物强烈地抑制与中枢神经系统有关的胆碱酯酶，使乙酰胆碱不能分解为乙酸和胆碱。乙酰胆碱的堆积，引起一系列神经中毒的症状，因此这类物质又称为神经毒剂。第二次世界大战中曾使用过的毒气DFP(即DIPF，二异丙基磷酰氟，diisopropyl fluorophosphate)，以及一些有机磷杀虫剂(1605、敌百虫等)都属于此类化合物。它们的一般结构如下：



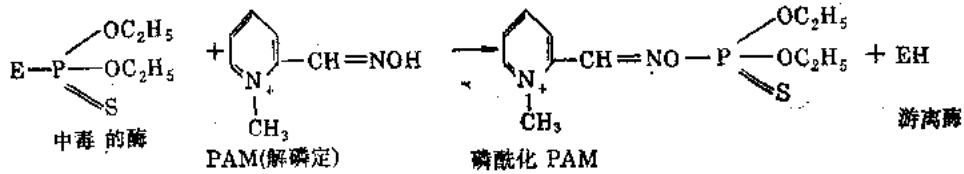
DFP的结构如下：



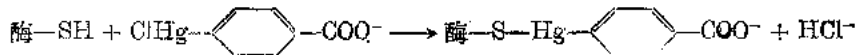
农药 1605 与胆碱酯酶的作用如下所述:



有机磷制剂与酶结合后虽不解离,但有时可用胍化物(含 $\text{CH}=\text{NOH}$ 基)或羟肟酸把酶上的磷酸根除去,使酶复活,临床上应用的解毒剂 PAM(解磷定)就是这类化合物,其解毒过程为:

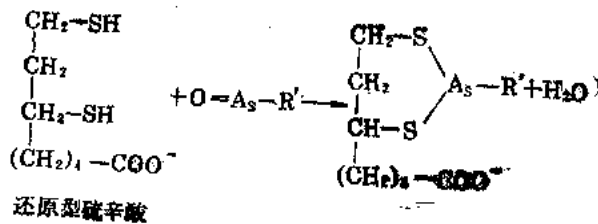


(2) 有机汞、有机砷化合物 这类化合物与巯基作用,抑制含巯基的酶,如对氯汞苯甲酸,其作用如下:

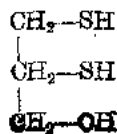


这种抑制可因加入过量的巯基化合物如半胱氨酸或还原型谷胱甘肽(GSH)而解除。

这类化合物还可与双巯基化合物作用生成环状硫醇化合物,如三价的有机砷化合物可与辅酶硫辛酸作用:



砷化物的毒理作用可能就在于破坏了硫辛酸辅酶,从而抑制了丙酮酸氧化酶系统。路易斯毒气($\text{O}=\text{CHCl}=\text{CHAsCl}_2$)也是有机砷化合物,它的毒理作用也如此,能抑制几乎所有的巯基酶。砷化物的毒性不能被单巯基化合物解除,但可被过量的双巯基化合物解除,如二巯基丙醇,其结构式如下:

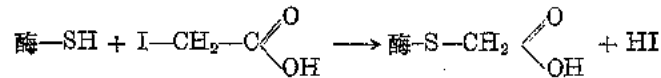


所以它是临床上砷化物及重金属中毒的重要解毒剂。

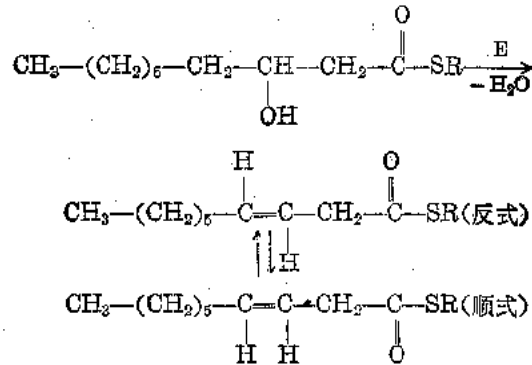
(3) 氰化物 氰化物与含铁卟啉的酶(如细胞色素氧化酶)中的 Fe^{2+} 结合,使酶失去活性而阻抑细胞呼吸。

(4) 重金属 Ag 、 Cu 、 Pb 、 Hg 等盐能使大多数酶失活,机理尚不完全清楚。加入 EDTA 螯合剂后可以解除。

(5) 烷化剂 其中最主要的是含卤素的化合物,如碘乙酸、碘乙酰胺及卤乙酰胺等,它们可使酶中—SH 基烷化,从而使酶失活,常用作鉴定酶中巯基的特殊试剂。其作用如下:



(6) 有活化作用的不可逆抑制剂 还有一类新近报导的独特的化合物,这类抑制剂是以潜伏状态(latent state)存在的,当它与某些酶的活性中心结合后,就被激活成有抑制活性的抑制剂,人们将这种不可逆抑制剂归入 k_{cat} 型不可逆抑制剂。例如大肠杆菌的 β -羟基癸酰硫酯脱水酶催化 β -羟基癸酰硫酯脱水,并催化所产生的双键化合物(3, 4-癸烯酰硫酯)的顺式和反式相互转变。大肠杆菌依靠这个酶提供不饱和脂肪酸合成的原料。



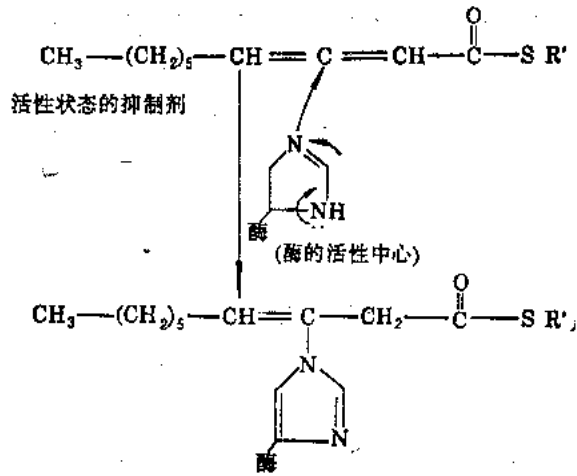
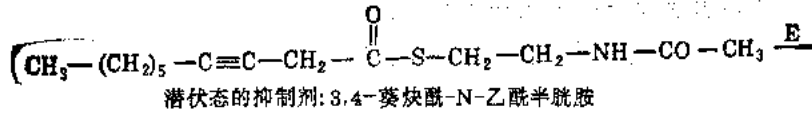
一个特殊的化合物, 3, 4-癸烯酰-N-乙酰半胱胺是这个酶的潜伏态的专一性的不可逆抑

制剂, 它的结构与 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CH=CH-CH}_2\text{-C-SR}$ 很相似, 只是硫醇的 R 被 R' ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_3$) 所取代, 并在 3, 4 位各脱去一个氢。在和酶起反应时, 它的炔基加氢转变成有高度反应能力的、具有连丙二烯的化合物, 此化合物能够烷化活性中心(也称活力中心)的有关基团, 如组氨酸残基等。

在反应中, 酶激活了这种无活力的、潜伏态的不可逆抑制剂, 而自身的活力则完全丧失。所以, 这种抑制剂又被看作是酶的“自杀性底物”。

这类抑制剂只是在遇到了对于它们来说是专一性的靶子酶时, 才从潜伏态转变成活性状态, 而在一般情况下则不转变。由于这种抑制作用的高度专一性, 以及这种作用是按化学计量进行的, 因此, 它们有可能成为对酶活性中心作高度专一性研究的良好试剂。

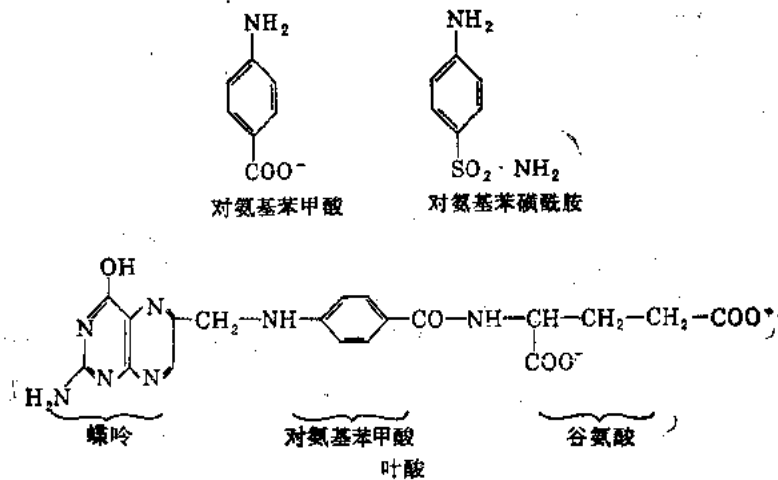
2. 可逆抑制剂 可逆抑制剂中最重要及最常见的是竞争性抑制剂, 它们的结构与正常底物极为相似, 但又有一些区别, 它与底物争夺酶, 但不能被酶作用。当有大量底物存在时, 底物先和酶的有关部位结合, 抑制作用便会减弱, 这种底物的保护作用是酶-底物中间产物学说的证



据之一。

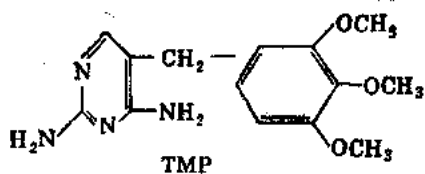
常见的可逆抑制剂有以下几种:

磺胺药, 以对-氨基苯磺酰胺为例, 它的结构与对-氨基苯甲酸十分相似, 是对-氨基苯甲酸的竞争性抑制剂。对-氨基苯甲酸是叶酸的一部分, 叶酸和二氢叶酸则是核酸的嘌呤核苷酸合成中的重要辅酶——四氢叶酸的前身, 如果缺少四氢叶酸, 细菌生长繁殖便会受到影响。



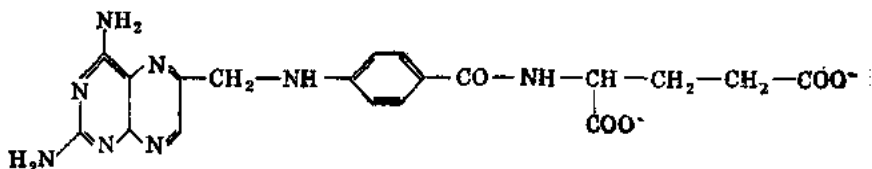
人体能直接利用食物中的叶酸, 某些细菌则不能直接利用外源的叶酸, 只能在二氢叶酸合成酶的作用下, 利用对-氨基苯甲酸合成二氢叶酸。而磺胺药物可与对-氨基苯甲酸相竞争, 抑制二氢叶酸合成酶, 影响二氢叶酸的合成, 最后抑制细菌的生长繁殖; 从而达到治病的效果。

抗菌增效剂 TMP (trimethoprim) 可增强磺胺药的药效。因为它的结构与二氢叶酸有类似之处, 是细菌二氢叶酸还原酶的强烈抑制剂, 但它很少抑制人体的二氢叶酸还原酶。它与磺胺药配合使用, 可使细菌的四氢叶酸合成受到双重阻碍, 因而严重影响细菌的核酸及蛋白质合成。



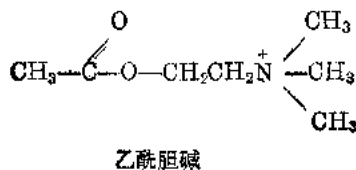
2,4-二氨基-5-(3',4',5'-三甲氧基苄基)-噻唑

氨基叶酸是叶酸的竞争性抑制剂,前者用氨基取代了正常叶酸中蝶呤上的羟基,所以氨基叶酸可用作抗癌药物。其结构如下:

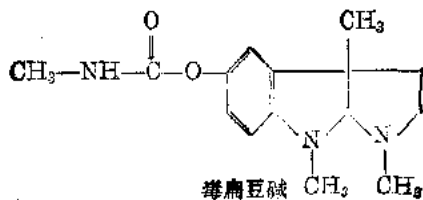


利用竞争性抑制是药物设计的根据之一,如抗癌药阿拉伯糖胞苷、5-氟尿嘧啶等都是利用竞争性抑制而设计出来的。

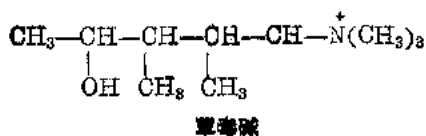
胆碱酯酶的竞争性抑制剂,其结构类似于正常底物乙酰胆碱。人们认为,过渡态底物部分的类似物可作为竞争性抑制剂。胆碱酯酶的抑制剂种类很多,都含有甲基化的季铵基团或碱性氮原子或类似的酯键。植物中的某些生物碱亦能抑制胆碱酯酶(如毒扁豆碱等),它们的结构如下:



乙酰胆碱



毒扁豆碱



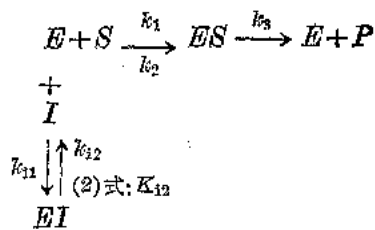
草毒碱

这类物质之所以具有毒性,可能是抑制胆碱酯酶,使神经冲动产生的乙酰胆碱不能除去。

(三)可逆抑制作用的动力学

可逆抑制剂与酶结合后产生的抑制作用,可以根据米氏学说原理加以推导,找出其定量关系,下面分为三种类型:

1. 竞争性抑制(见图 4-12A)在竞争性抑制中,底物或抑制剂与酶的结合都是可逆的,各存在着一个平衡,如下式:

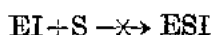
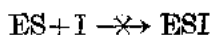


$[E_f]$ 为游离酶的浓度, $[E]$ 为酶的总浓度

K_i 为抑制剂常数(inhibitor constant), 见反应(2), $K_i = \frac{k_{12}}{k_{11}}$, 为EI的解离常数。

K_m 为ES的解离常数。

酶不能同时与底物(S)、抑制剂(I)结合:



所以, 有ES, 有EI, 而没有ESI

$$\therefore [E] = [E_f] + [ES] + [EI]$$

根据米氏学说原理:

$$V_{\max} = k_3[E]$$

$$v = k_3[ES]$$

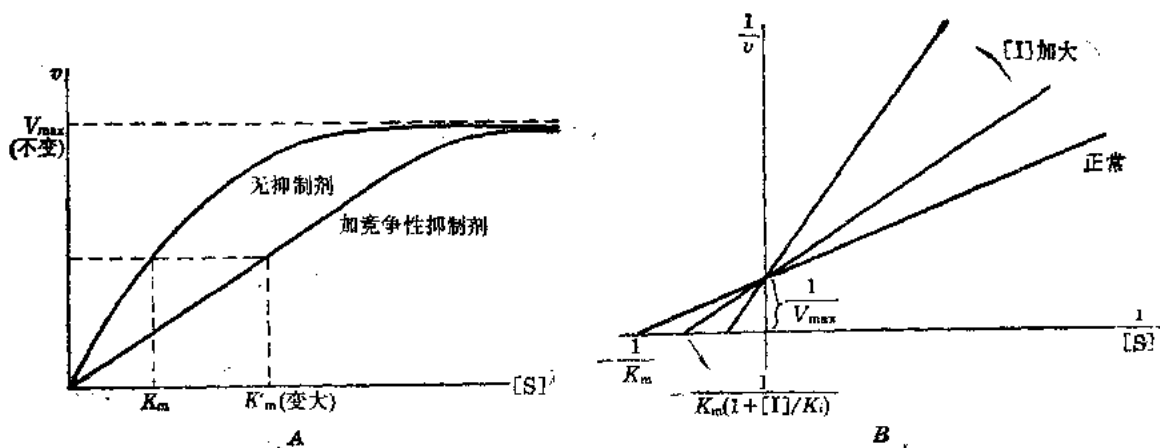


图4-13 竞争性抑制曲线

$$\therefore \frac{V_{\max}}{v} = \frac{[E]}{[ES]}$$

$$\therefore \frac{V_{\max}}{v} = \frac{[E_f] + [ES] + [EI]}{[ES]}$$

为了消去 $[ES]$ 项, 需先利用米氏公式求出 $[E_f]$ 项及 $[EI]$ 项:

$$\therefore K_m = \frac{[E_f][S]}{[ES]} \quad \therefore [E_f] = \frac{K_m}{[S]} [ES]$$

$$\therefore K_i = \frac{[E_f][I]}{[EI]} \quad \therefore [EI] = \frac{[E_f][I]}{K_i}$$

将 $[E_f]$ 代入 $[EI]$ 式中

$$\text{则 } [EI] = \frac{K_m}{[S]} [ES] \cdot \frac{[I]}{K_i} = \frac{K_m [I]}{K_i [S]} [ES]$$

再将 $[E_t]$ 及 $[EI]$ 代入 $\frac{V_{max}}{v}$ 的式子中:

$$\text{得: } \frac{V_{max}}{v} = \frac{\frac{K_m}{[S]} [ES] + [ES] + \frac{K_m}{K_i} \frac{[I]}{[S]} [ES]}{[ES]}$$

$$\therefore \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} \left(\frac{K_m}{[S]} + 1 + K_m \frac{[I]}{K_i} \cdot \frac{1}{[S]} \right)$$

$$\therefore \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

图 4-12(B) 表示以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图, 加入抑制剂后的斜率为:

$$\frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

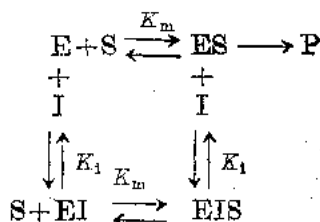
横轴截距为

$$-\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad \text{或} \quad -\frac{1}{K_m} \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

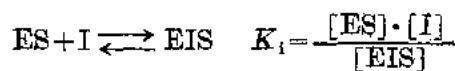
从图 4-12A、B 可以看出, 加入竞争性抑制剂后, V_{max} 不变, K_m 变大, 而且 $K'_m = K_m$ 。

2. 非竞争性抑制 (见图 4-13A)

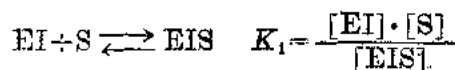
在非竞争性抑制中存在着如下的平衡:



酶与底物结合后, 可再与抑制剂结合, 酶与抑制剂结合后, 也可再与底物结合。



或



所以, 这种抑制有 ES, EI 及 ESI,

$$\therefore [E] = [E_t] + [ES] + [EI] + [ESI]^*$$

代入 $\frac{V_{max}}{v} = \frac{[E]}{[ES]}$, 再经过推导后, 得到:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

由图 4-13A 可见, 加入非竞争抑制剂后, K_m 值不变, V_{max} 变小, 而且 $K'_m = K_m$ 。

* $EIS = ESI$

将无抑制剂和有抑制剂各种情况下的最大酶促反应速度与 K_m 值归纳小结于表 4-7 中。

表 4-7 有无抑制剂存在时酶促反应进行的速度与 K_m 值

类 型	公 式	V_{max}	K_m
无抑制剂(正常)	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$	V_{max}	K_m
竞争性抑制	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$	不 变	增 加
非竞争性抑制	$v = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)(K_m + [S])}$	减 小	不 变
反竞争性抑制	$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]}$	减 小	减 小

凡符合米氏公式的 K_m , 就是米氏常数 K_m (在正常情况下及非竞争性抑制的情况下); 凡不符合米氏公式的 K_m , 被称为表观 K_m , 即 K_m' (在加入竞争性抑制剂和别构酶时)。

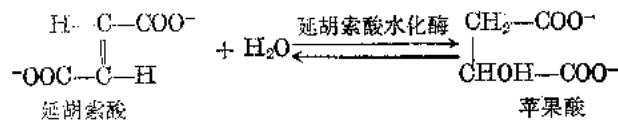
第五节 酶的专一性及活性中心

一、酶的底物专一性

酶的底物专一性即特异性(substrate specificity)是指酶对它所作用的底物有严格的选择性。一种酶只能催化某一类, 甚至只与某一种物质起化学变化。例如酯酶只能水解脂类, 肽酶只能水解肽类, 糖苷酶只能水解糖苷等。

(一) 酶的专一性分为两种类型:

1. 结构专一性 有些酶对底物的要求非常严格。只作用于一个底物, 而不作用于任何其他物质, 这种专一性称为“绝对专一性”(absolute specificity)。例如脲酶只能催化尿素水解, 而对尿素的各物衍生物(如尿素的甲基取代物或氯取代物)不起作用。又如延胡索酸水化酶只作用于延胡索酸(反丁烯二酸)或苹果酸(逆反应的底物), 而不作用于结构类似的其他化合物。有些类似的化合物只能成为这个酶的竞争性抑制剂或对酶全无影响。如表 4-8 所列。



此外, 如麦芽糖酶只作用于麦芽糖, 而不作用于其他双糖。淀粉酶只作用于淀粉, 而不作用于纤维素。碳酸酐酶只作用于碳酸。

有些酶对底物的要求比上述绝对专一性略低一些, 它的作用对象不只是一种底物, 这种专一性称为“相对专一性”。具有相对专一性的酶作用于底物时, 对键两端的基团要求的程度不同, 对其中一个基团要求严格, 对另一个则要求不严格, 这种专一性又称为“族专一性”或“基团

表 4-8 延胡索酸水化酶的底物及竞争性抑制剂

底物	竞争性抑制剂	对酶无影响的物质
$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COO}^- \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{CH} \\ \text{反丁烯二酸} \\ \text{(延胡索酸)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}-\text{COO}^- \\ \text{顺丁烯二酸} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COOCH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{COOC}-\text{CH} \\ \text{反丁烯二酸二甲酯} \end{array}$
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{HCOOC}-\text{CH} \\ \text{甲基反丁烯二酸} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COOCH}_3 \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{CH} \\ \text{反丁烯二酸甲酯} \end{array}$
	$\begin{array}{c} \text{HC}-\text{COO}^- \\ \\ \text{HOOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \alpha\text{-羧甲基反丁烯二酸} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{COO}^- \\ \text{丙烯酸} \end{array}$
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \text{丁二酸} \end{array}$	$^-\text{OOC}-\text{C}=\text{C}-\text{COO}^- \quad \text{丁炔二酸}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{L-}\alpha\text{-羟基丁二酸} \\ \text{(L-苹果酸)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{D-}\alpha\text{-羟基丁二酸} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{D-}\alpha\text{-氨基丁二酸} \end{array}$
	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{二羟基丁二酸(内消旋酒石酸)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{COO}^- \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{丁酮酸} \end{array}$
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{SO}_3^- \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{L-磺基-}\alpha\text{-羟基丙酸} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{SO}_3^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{CH} \\ \\ \text{COO}^- \\ \text{D-磺基-}\alpha\text{-氨基丙酸} \end{array}$

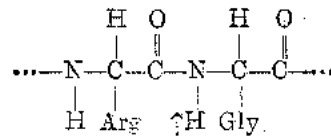
专一性”。例如 α -D-葡萄糖苷酶不但要求 α -糖苷键, 并且要求 α -糖苷键的一端必须有葡萄糖残基, 即 α -葡萄糖苷, 而对键的另一端 R 基团则要求不严, 因此它可催化含有 α -葡萄糖苷的蔗糖或麦芽糖水解, 但不能使含有 β -葡萄糖苷的纤维二糖(葡萄糖- β -1, 4-葡萄糖苷)水解。 β -D-葡萄糖苷酶则可以水解纤维二糖和其他许多含有 β -D-葡萄糖苷的糖, 而对这个糖苷则要求不严, 可以是直链, 也可以是枝链, 甚至还可以含有芳香族基团, 只是水解速度有些不同。

有一些酶, 只要求作用于一定的键, 而对键两端的基团并无严格的要求, 这种专一性是另一种相对专一性, 又称为“键专一性”。这类酶对底物结构的要求最低。例如酯酶催化酯键的水解, 而对底物 $\text{R}-\text{C}\begin{array}{l} \text{O} \\ // \\ \text{OR}' \end{array}$ 中的 R 及 R' 基团都没有严格的要求, 既能催化水解甘油脂类、

简单脂类, 也能催化丙酰、丁酰胆碱或乙酰胆碱等, 只是对于不同的脂类, 水解速度有所不同, 又如磷酸酯酶可以水解许多不同的磷酸酯。其他还有水解糖苷键的糖苷酶, 水解肽键的某些蛋白水解酶等。

各种蛋白水解酶都水解肽键, 但它们的专一性程度各不相同。细菌中的蛋白水解酶, 如枯草杆菌蛋白酶, 对于被作用肽键的两端没有严格的要求, 只要求组成肽。键的氨基端有一个疏水基团; 而血液凝固酶系统中的凝血酶, 它的专一性程度则相当高, 对被水解的肽键的羧基一

端要求 L-精氨酸残基, 氨基一端要求甘氨酸残基, 可用下式表示:



关于消化道中的几种蛋白酶的专一性, 见图 4-15 及表 4-9。如胰蛋白酶只专一地水解赖氨酸、精氨酸羧基形成的肽键, 胰凝乳蛋白酶专一地水解由芳香族氨基酸或带有较大非极性侧链的氨基酸羧基形成的肽键, 弹性蛋白酶专一地水解丙氨酸、甘氨酸及短脂肪链氨基酸的羧基形成的肽键, 胃蛋白酶水解芳香族或其他疏水氨基酸的羧基或氨基形成的肽键。蛋白质进入动物消化道后, 先受胃蛋白酶、胰蛋白酶及弹性蛋白酶的作用, 再受羧基肽酶、氨基肽酶和二肽酶的协同作用, 最终水解为氨基酸。

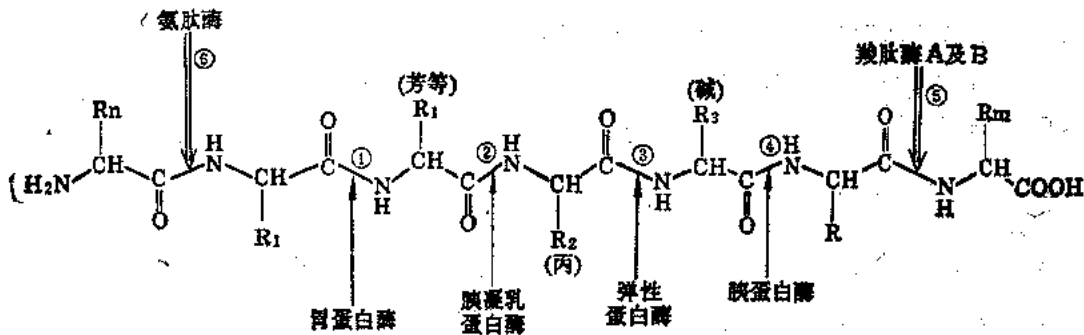


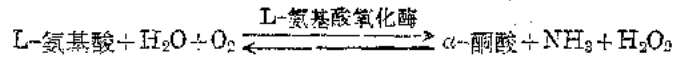
图 4-15 消化道中几种蛋白酶的专一性

表 4-9 消化道蛋白酶作用的专一性

酶	对 R 基团的要求	键作用部位	脯氨酸的影响
内 肽 酶	胃蛋白酶 R ₁ , R ₁ : 芳香族氨基酸及其他疏水氨基酸 (NH ₂ 端及 COOH 端)	↑①	对肽键提供—N—的氨基酸为脯氨酸时, 不水解
	胰凝乳蛋白酶 R ₁ : 芳香族氨基酸及其他疏水氨基酸 (COOH 端)	↑②	对肽键提供—C—的氨基酸为脯氨酸时, 水解受阻
	弹性蛋白酶 R ₂ : 丙氨酸, 甘氨酸, 丝氨酸等短脂肪链的氨基酸 (COOH 端)	↑③	
	胰蛋白酶 R ₃ : 碱性氨基酸 (COOH 端)	↑④	对肽键提供—C—的氨基酸为脯氨酸时, 水解受阻
外 肽 酶	羧基肽酶 A R _m : 芳香族氨基酸	↓⑤羧基末端的肽键	
	羧基肽酶 B R _m : 碱性氨基酸	↓⑥羧基末端的肽键	
	氨基肽酶	↓⑥氨基末端的肽键	
二肽酶	要求相邻两个氨基酸上的 α-氨基和 α-羧基同时存在		

2. 立体异构专一性(stereospecificity)

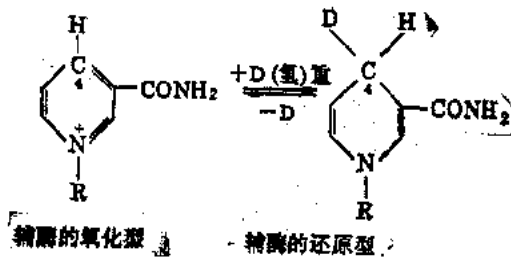
(1) 旋光异构专一性 当底物具有旋光异构体时, 酶只能作用于其中的一种。这种对于旋光异构体底物的高度专一性是立体异构专一性中的一种, 称为“旋光异构专一性”, 它是酶反应中相当普遍的现象。例如 L-氨基酸氧化酶只能催化 L-氨基酸氧化, 而对 D-氨基酸无作用:



生物体中天然的 D-氨基酸很少, 它只能被 D-氨基酸氧化酶催化, 而不受 L-氨基酸氧化酶的作用。又如胰蛋白酶只作用于与 L-氨基酸有关的肽键及酯键, 而乳酸脱氢酶对 L-乳酸是专一的, 谷氨酸脱氢酶对于 L-谷氨酸是专一的, β -葡萄糖氧化酶能将 β -D-葡萄糖转变为葡萄糖酸, 而对 α -D-葡萄糖不起作用。

(2) 几何异构专一性 有的酶具有几何异构专一性, 例如前面提到过的延胡索酸水化酶, 只能催化延胡索酸即反-丁烯二酸水合成苹果酸, 或催化逆反应生成反-丁烯二酸; 而不能催化顺-丁烯二酸的水合作用, 也不能催化逆反应生成顺-丁烯二酸。又如丁二酸脱氢酶只能催化丁二酸(琥珀酸)脱氢生成反-丁烯二酸或催化逆反应使反-丁烯二酸加氢生成琥珀酸, 但不催化顺-丁烯二酸的生成及加氢。

酶的立体异构专一性还表现在能够区分从有机化学观点来看属于对称分子中的两个等价的基团, 只催化其中的一个, 而不催化另一个。例如, 一端由 ^{14}C 标记的甘油, 在甘油激酶的催化下可以与 ATP 作用, 仅产生一种标记产物, 1-磷酸-甘油。甘油分子中的两个 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基团从有机化学观点来看是完全相同的, 但是酶却能区分它们。另外, 用氘标记的方法发现在脱氢酶的催化下, 底物和 NAD^+ 之间发生的氢的转移也有着严格的立体异构专一性, 这种专一性表现在对尼克酰胺环中 C_4 上的氢有选择性。如酵母醇脱氢酶在催化时, 辅酶的尼克酰胺环 C_4 上只有一侧是可以加氢或脱氢的, 另一侧则不被作用:



酵母醇脱氢酶的这种专一性被定为 A 型, 凡与酵母醇脱氢酶的辅酶中尼克酰胺环上氢的位置相似, 同处一侧, 具有同侧专一性的酶都称为 A 型专一性的酶, 如苹果酸脱氢酶及异柠檬酸脱氢酶以及有的乳酸脱氢酶等都是。凡是与酵母醇脱氢酶的辅酶中尼克酰胺环上氢的位置不同, 处于异侧, 具有另一侧专一性的称为 B 型专一性的酶, 如谷氨酸脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶等。

酶的立体专一性在实践中很有意义, 例如某些药物只有某一种构型才有生理效用, 而有机合成的药物只能是消旋产物, 若用酶便可进行不对称合成或不对称拆分。如用乙酰化酶制备

L-氨基酸: 有机合成的 D、L-氨基酸经乙酰化后, 再用乙酰化酶处理, 这时只有乙酰-L-氨基酸被水解, 于是便可将 L-氨基酸与乙酰-D-氨基酸分开。

(二)关于酶作用专一性的假说

早期 E. Fisher 曾用“模板”(template)或“锁与钥匙学说”(lock and key theory)来解释酶作用的专一性, 认为底物分子或底物分子的一部分象钥匙那样, 专一地楔入到酶的活性中心部位, 也就是说底物分子进行化学反应的部位与酶分子上有催化效能的必需基团间具有紧密互补的关系, 如图 4-16 所示:

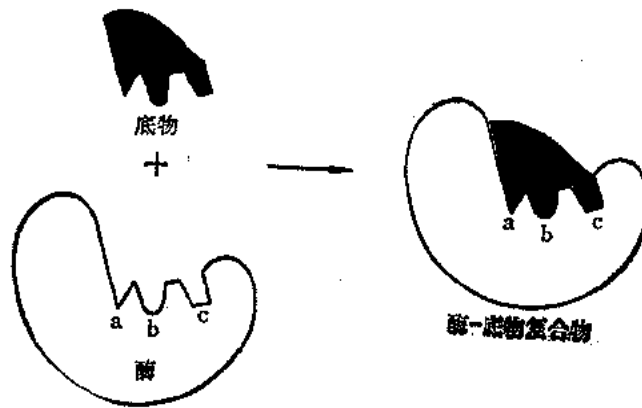


图 4-16 酶与底物的相互关系——酶与底物的“锁与钥匙关系”学说示意图

这个学说强调指出只有固定的底物才能楔入与它互补的酶表面, 用这个学说, 再结合所谓“酶与底物的三点附着”学说就可以较好地解释酶的立体异构专一性。“三点附着”学说指出, 立体对映的一对底物虽然基团相同, 但空间排列不同, 这就可能出现这些基团与酶分子活性中心的结合基团能否互补匹配的问题, 只有三点都互补匹配时, 酶才作用于这个底物(图 4-17 中 A), 如果因排列不同, 则不能三点匹配, 酶不能作用于它(图 4-17 中 B), 这可能是酶只对 L 型(或 D 型)底物作用的立体构型专一性的机理。前面曾提到的甘油激酶对甘油的作用, 即可用此学

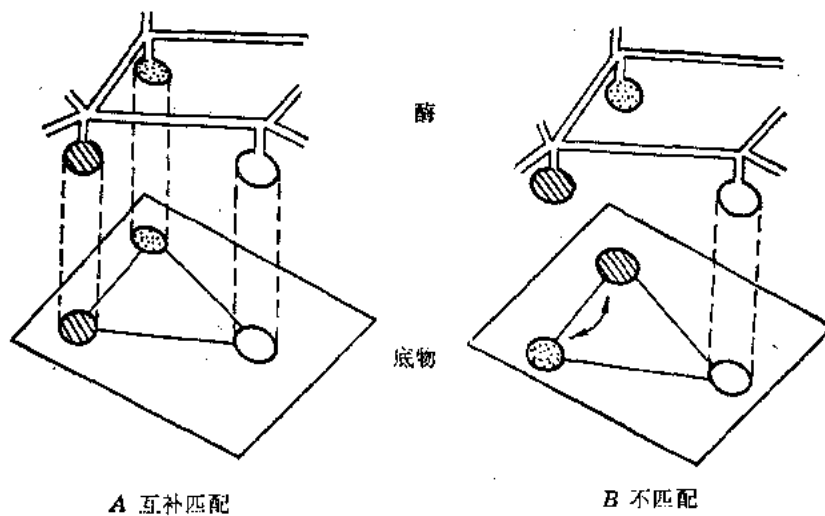


图 4-17 酶与底物“三点附着”学说示意图

说来分析: 甘油的三个基团以一定的顺序附着到甘油激酶分子“表面”的特定结合部位上, 由于酶的专一性, 这三个部位中只有一个是催化部位, 能催化底物磷酸化反应, 这就解释了为什么甘油在甘油激酶的催化下只有一个 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基能被磷酸化的现象。同样, 糖代谢中的顺-乌头酸酶作用于柠檬酸时, 底物中的两个 $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 对于酶来说也是不同的, 也可以用上述假说来解释。

以上的学说都属于“刚性模板学说”。但是还有一些问题是这些学说所不能解释的: 如果酶的活性中心是“锁和钥匙学说”中的锁, 那么, 那种结构不可能既适合于可逆反应的底物, 又适合于可逆反应的产物。而且, 也不能解释酶的专一性中的所有现象。

Koshland 提出了“诱导契合”假说(induced-fit hypothesis): 当酶分子与底物分子接近时, 酶蛋白受底物分子的诱导, 其构象发生有利于底物结合的变化, 酶与底物在此基础上互补契合, 进行反应。近年来 X 衍射分析的实验结果支持这一假说, 证明了酶与底物结合时, 确有显著的构象变化。因此人们认为这一假说比较满意地说明了酶的专一性。图 4-18 则表示酶构象在专一性底物及非专一性底物存在时的变化。图中黑线条表示带有催化基团 A②及结合基团 C③的肽段, 它与带斜线的“酶”共同组成酶分子, I 表示底物与酶分子活性中心的原有构象, II 表示专一性底物引入后, 酶蛋白构象改变, 诱导契合, 使催化基团 A②并列成有利于结合底物的状态, 并形成酶-底物复合物。但是, 如果引入了不正常的、非专一性的底物, 情况就不同了, III 表示在底物上加入了一个庞大的基团, 妨碍了酶的 A②基团的并列, 因此不利于酶与底物的结合。例如加入某些竞争性抑制剂等。IV 则表示在正常底物上切除某些基团后, 酶蛋白的带 B④基的肽链顶住了 A②基的肽链, 也阻止了 A②基的并列, 因此也不利于酶与底

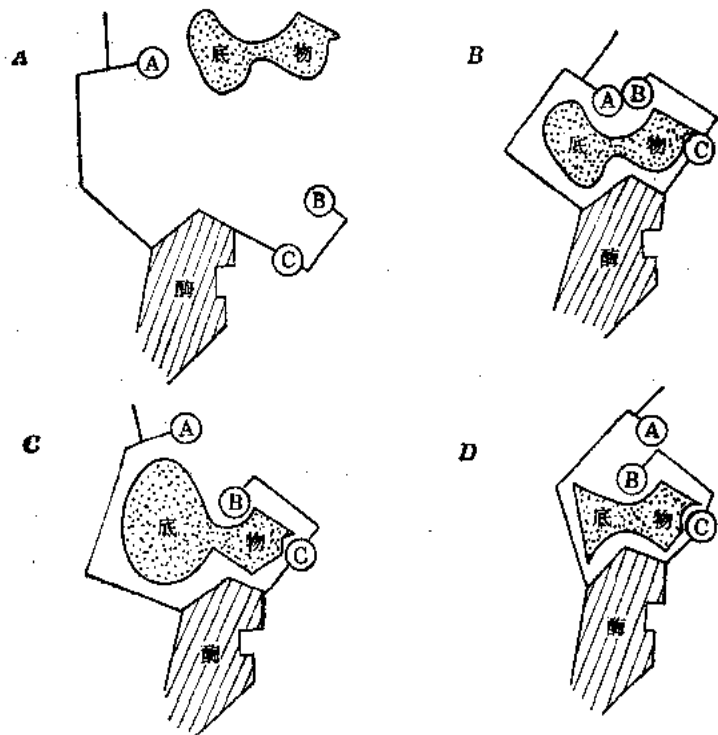


图 4-18 专一性、非专一性底物存在时, 酶的构象变化模型

物结合,这样,酶也不能起催化作用。

事实上通过旋光测定,了解到许多酶在它们的催化循环中确有构象的变化。特别是X射线衍射分析发现未结合底物的游离羧肽酶与结合了甘氨酸酪氨酸底物的羧肽酶在构象上有很大的区别。溶菌酶的X——射线衍射分析也得到了类似的结果。这些都是支持“诱导契合”假说的有力证明。

二、酶的活性中心

(一) 酶活性中心的概念

实验证明,酶的特殊催化能力只局限在它的大分子的一定区域。某些酶蛋白分子经微弱水解切去相当一部分肽链后,其残余的部分仍保留一定的活力,似乎除去的那部分肽链是与活力关系不大的次要结构。最初,把酶分子中与底物接触的或非常接近底物的部分称为酶的活性部位,而直接与酶催化有关的部位称为活性中心,这种活性中心概念不够严格,它只能说明,在一个很大的完整的酶蛋白分子中只有很小一部分是与底物结合的,并与催化作用直接有关。后来,大量的工作,特别是近十余年来,因X——射线衍射法的发展,再结合化学方法所得到的结果,使人们进一步明确了活性中心的概念:对于不需要辅酶的酶来说,活性中心就是酶分子在三维结构上比较靠近的少数几个氨基酸残基或是这些残基上的某些基团,它们在一级结构上可能相距甚远,甚至位于不同的肽链上,通过肽链的盘绕、折叠而在空间构象上相互靠近;对于需要辅酶的酶来说,辅酶分子,或辅酶分子上的某一部分结构往往就是活性中心的组成部分。一般还认为活性中心有两个功能部位:第一个是结合部位,一定的底物靠此部位结合到酶分子上,第二个是催化部位,底物的键在此处被打断或形成新的键,从而发生一定的化学变化。

活性中心的形成要求酶蛋白分子具有一定的空间构象,因此,酶分子中的其他部位的作用对于酶的催化来说,可能是次要的,但绝不是毫无意义的,它们至少为酶活性中心的形成提供了结构基础。所以酶的活性中心与酶蛋白的空间构象的完整性之间,是辩证统一的关系。当外界物理化学因素破坏了酶的结构时,首先就可能影响酶活性中心的特定结构,结果就必然影响酶活力。

(二) 用于判断和确定酶活性中心的主要方法

1. 酶的专一性研究 通过研究酶的专一性底物的结构特点,来判断和确定活性中心的结构特点,来判断和确定活性中心的结构。另外,研究酶的竞争性抑制剂的必需结构以及酶与专一性底物的相近关系也有助于了解酶活性中心的结构。

2. 酶分子侧链基团的化学修饰法(chemical modification) 寻找酶活性中心的另一个有效办法是使用一些对酶分子侧链功能基团可进行共价修饰的试剂作用于酶,以查出哪些基团是保持酶活力所必需的。当这种试剂与酶分子侧链上的功能基结合后,如果酶并不失活,则表明含有这个基团的氨基酸残基与酶的活性中心无关;如果酶全部失活,则表明它属于活性中心;如果酶部分地失去活力,则这个氨基酸残基可能属于活性部位,但可能只是其底物结合部位,并不是其催化部位。

酶分子中可以被化学修饰的基团很多,如巯基、羟基、咪唑基、氨基及羧基等。可以用作

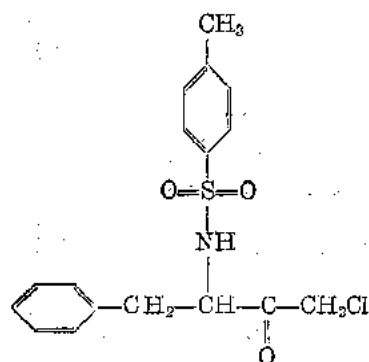
化学修饰的试剂也很多,目前已有七十多种,但是十分理想的并不多。

用得较多的有 DFP(DIFP)及 TPCK。DFP 这个毒性很大的试剂是有机磷抑制剂中较重要的一个(见本章第四节)。实验时先把 DFP(DIFP)加到酶中,再对磷酸化了的酶进行水解,然后对水解产生的肽段进行分离和鉴定,可以得到含有磷酸化丝氨酸残基的肽段,即 DIP 标记了的肽段,称为 DIP-肽。DIP 在水解中不被除去,这对于阐明酶活性中心的组成是很重要的。最后,进一步再对这种 DIP-肽段进行序列分析,可以得出一些酶活性中心的氨基酸顺序。表 4-10 中列举了一部分用 DFP 标记的酶的 DIP-肽段的氨基酸顺序,从表中可以看出许多酶活性中心都有丝氨酸,某些蛋白水解酶活性中心还有共同的天冬-丝-甘顺序。

表 4-10 一些蛋白质活性中心的氨基酸顺序

酶	氨基酸顺序
牛胰蛋白酶	……天冬、 <u>丝</u> 、半胱、甘、甘、 <u>天冬、丝、甘</u> 、脯、亮、缬、……
牛胰凝乳蛋白酶	…… <u>丝、丝、半胱、蛋、甘、天冬、丝、甘、甘</u> 、脯、亮、缬、……
猪弹性蛋白酶	…… <u>丝、甘、半胱、谷胺、甘、天冬、丝、甘、甘</u> 、脯、亮、组、……
猪凝血酶	…… <u>天冬、丝、甘</u> 、……
枯草杆菌蛋白酶	……天冬、 <u>甘、苏、丝、蛋、丙</u> 、……
乙酰胆碱酯酶	……谷、 <u>丝、丙</u> 、……
碱性磷酸酶	……天冬、 <u>丝、丙</u> 、……
大肠杆菌碱性葡萄糖变位酶	…… <u>苏、天冬、丝、组</u> 、天冬……
兔磷酸酶 ^a	…… <u>赖、谷胺、异亮、丝、缬、精</u> ……

TPCK(N-对-甲苯磺酰苯丙酰氯甲基酮, N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone)的结构如下:



它通过使组氨酸烷化而对酶进行亲和标记。亲和标记是辨认酶活性中心功能基团的另一种重要的方法。人工合成一些与正常底物相似的化合物,使其与酶反应,活性中心中与底物起反应的基团就和 TPCK 结合,从而找出活性中心中的氨基酸残基。DFP 与 TPCK 两个试剂结合使用,在胰凝乳蛋白酶活性中心的研究中起了很大的作用。

此外,碘乙酸、对-氯汞苯甲酸等可以与酶侧链中的巯基起作用,如果酶活力在加入上述试

剂之后受到抑制,则表明巯基属于活性中心。采用这类试剂时,还可配合使用抑制剂,例如丙二酸盐(琥珀酸的类似物)抑制琥珀酸脱氢酶,加入它可以保护酶,使酶免受不可逆的巯基抑制剂——碘乙酸的失活作用,这也表明巯基在某些酶的活性中心占有特殊的地位。表 4-11 还列举了一些试剂,用它们对酶进行修饰后证明,组氨酸的咪唑基、赖氨酸的 ϵ -氨基常常也都是酶活性中心中的必需基团。

此外,还有一些用来寻找酶活性中心的方法,例如用强还原剂硼氢化钠使醛缩酶的酶-底物复合体还原,对这个还原了的酶-底物复合体进行部分水解,可以得到一个含甘油酰衍生物的肽,其中有特异性的赖氨酸残基。

表 4-11 用作化学修饰的部分试剂

受作用的氨基酸残基	试 剂	受作用的氨基酸残基	试 剂
半胱氨酸	碘乙酸, 碘乙酰胺 N-乙基顺丁烯二酰亚胺 氟二硝基苯 N-(4-二甲氨基-3,5-二硝基苯) 顺丁烯二酰亚胺	色氨酸	2-羟-5-硝基溴苯
		组氨酸	重氮化合物 氟二硝基苯
酪氨酸	碘 重氮化合物 N-乙酰咪唑	赖氨酸	氟二硝基苯 乙酸酐

3. X-射线晶体衍射法 X-射线晶体衍射法对于探明酶的活性中心提供了许多直接和确切的实验结果。目前运用这一方法对几十种蛋白质的空间构象(三维结构)进行了研究,其中大部分为酶。例如许多蛋白水解酶类、脱氢酶类中的许多酶等。

实验表明,大多数酶分子的极大部分非极性侧链汇集成三维结构的“骨架”,而大部分极性侧链则位于酶分子表面,这样的结构是有利于进行酶的催化反应的。很有意义的是,酶侧链化学修饰法与 X 射线晶体衍射法的结果基本上是一致的。

此外,酶的反应速度常数的研究,以及 pH 对米氏常数和最大反应速度关系的研究等酶促动力学方面的工作,对于判断活性中心和阐明酶的作用机理,也有重要的参考价值。

第六节 酶的作用机理

酶催化反应机理的研究是当代生物化学的一个重要课题。它探讨酶作用高效率的原因以及酶反应的重要中间步骤。

酶原的激活(proenzyme activation)着重研究酶在激活——由无活性的酶原转变成有活性的酶时构象发生的变化。

一、与酶的高效率有关的因素

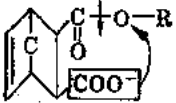
据现在所知,重要的因素有以下几个方面,

1. 底物与酶的“靠近”(proximity)及“定向”(orientation)

由于化学反应速度与反应物浓度成正比,若在反应系统的某一局部区域,底物浓度增高,则反应速度也随之增高。提高酶反应速度的最主要方法是使底物分子进入酶的活性中心区域,亦即大大提高活性中心区域的底物有效浓度。曾测到过某底物在溶液中的浓度为 0.001 mol/L,而在其酶活性中心的浓度竟达 100 mol/L,比溶液中的浓度高十万倍!因此,可以想象在酶的活性中心区域反应速度必定是极高的。

“靠近”效应对提高反应速度的作用可以用一个著名的有机化学实验来说明,如表 4-12,双羧酸的单苯基酯,在分子内催化的过程中,自由的羧基作为催化剂起作用,而连有 R 的酯键则作为底物,受 —COO^- 的催化,破裂成环而形成酸酐,催化基团 —COO^- 愈靠近底物酯键则反应速度愈快,在最靠近的情况下速度可增加 53 000 倍。

表 4-12 分子内“靠近”效应的有机模式实验

酯	酯水解相对速度
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{C}^+\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	1
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{C}^+\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_2-\text{COO}^- \end{array}$	20
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{C}^+\text{O}-\text{R} \\ \\ \text{CH}_2-\text{COO}^- \end{array}$	230
	53 000

但是仅仅“靠近”还不够,还需要使反应的基团在反应中彼此相互严格地“定向”,见图 4-19。只有既“靠近”又“定向”,反应物分子才被作用,迅速形成过渡态。



A. 反应物的反应基团和催化剂的催化基团既不靠近,也不彼此定向。



B. 两个基团靠近,但不定向,还不利于反应。



C. 两个基团既靠近,又定向,大大有利于底物形成转变态,加速反应。

图 4-19 轨道定向(orbital-steering)假说示意图

当底物未与酶结合时,活性中心的催化基团还未能与底物十分靠近,但由于酶活性中心的结构有一种可适应性,即当专一性底物与活性中心结合时,酶蛋白会发生一定的构象变化,使反应所需要的酶中的催化基团与结合基团正确地排列并定位,以便能与底物契合,使底物分子可以“靠近”及“定向”于酶,这也就是前面提到的诱导契合。这样活性中心局部的底物浓度才能大大提高。酶构象发生的这种改变是反应速度增大的一种很重要的原因。反应后,释放出产物,酶的构象再逆转,回到它的初始状态。对溶菌酶及羧肽酶进行的 X-衍射分析的实验结果证实了以上的看法。Jenck 等人指出“靠近”及“定向”可能使反应速度增长 10^8 倍,这与许多酶催化效率的计算是很相近的。

2. 酶使底物分子中的敏感键发生“变形”(或张力)(distortion 或 strain),从而促使底物中的敏感键更易于破裂。

前面曾经提到,当酶遇到它的专一性底物时,发生构象变化以利于催化。事实上,不仅酶构象受底物作用而变化,底物分子常常也受酶作用而变化。酶中的某些基团或离子可以使底物分子内敏感键中的某些基团的电子云密度增高或降低,产生“电子张力”,使敏感键的一端更加敏感,更易于发生反应。有时甚至使底物分子发生变形,见图 4-20 A,这样就使酶-底物复合物易于形成。而且往往是酶构象发生改变的同时,底物分子也发生形变,见图 4-20 B,从而形成一个互相契合的酶-底物复合物(见后面图 4-35—图 4-37)。羧肽酶 A 的 X-衍射分析结果就为这种“电子张力”理论提供了证据。

3. 共价催化(covalent catalysis)

还有一些酶以另一种方式来提高催化反应的速度,即共价催化。这种方式是底物与酶形成一个反应活性很高的共价中间物,这个中间物很易变成过渡态,因此反应的活化能大大降低,底物可以越过较低的“能阈”而形成产物。

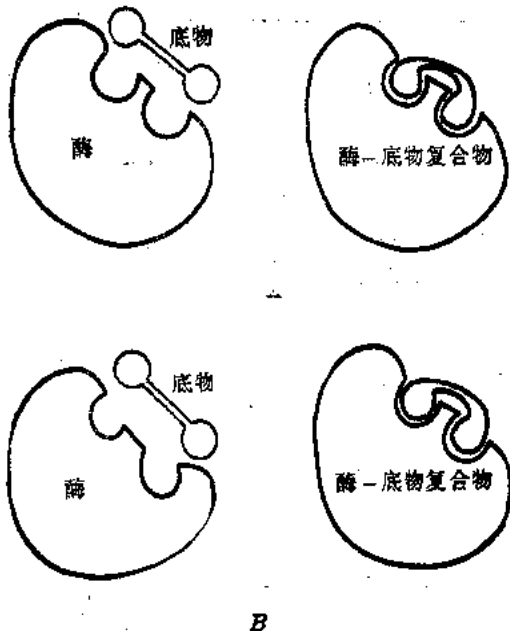


图 4-20 底物和酶结合时的构象变化示意图
A 底物分子发生变形, B 底物分子和酶都发生变形

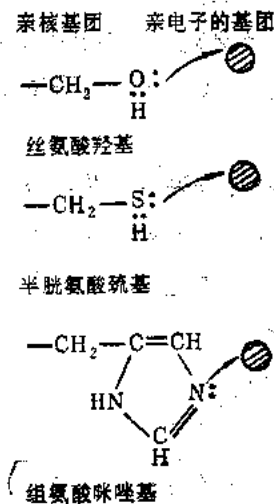
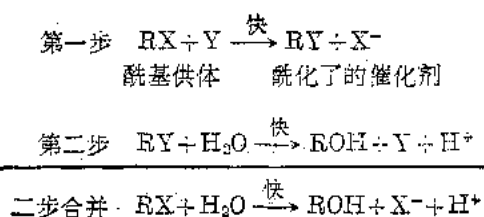


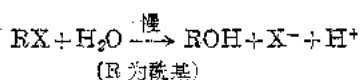
图 4-21 蛋白质中三种主要的亲核基团

共价催化可以提高反应速度的原因需要从有机模式反应的某些原理谈起。共价催化的最一般形式是催化剂的亲核基团(nucleophilic group)对底物中亲电子的碳原子进行攻击。亲核基团含有多电子的原子,可以提供电子。它是十分有效的催化剂。亲核基团作为强有力的催化剂对提高反应速度的作用可由下面亲核基团催化酰基的反应中看出:第一步,亲核基团(催化剂 Y)攻击含有酰基的分子,形成了带有亲核基团的酰基衍生物,这种催化剂的酰基衍生物作为一个共价中间物再起作用;第二步,酰基从亲核的催化剂上再转移到最终的酰基受体上,

(1) 亲核基团(Y)催化的反应:



(2) 非催化的反应:



这种受体分子可能是某些醇或水。第一步反应有催化剂参加,因此必然比没有催化剂时底物与酰基受体的反应更快一些;而且,因为催化剂是易变的亲核基团,因此如此形成的酰化催化剂与最终的酰基受体的反应也必然地要比无催化剂时的底物与酰基受体的反应更快一些,此两步催化的总速度要比非催化反应大得多。因此形成不稳定的共价中间物可以大大加速反应。酶反应中可以进行共价催化的、强有力的亲核基团很多,酶蛋白分子上至少就有三种,即图 4-21 中所指出的丝氨酸羟基、半胱氨酸巯基及组氨酸的咪唑基。此外,辅酶中还含有另外一些亲核中心。共价结合也可以被亲电子基团(electrophilic group)催化,最典型的亲电子基团就是 H^+ , 还有 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 及 Fe^{3+} 。蛋白质中的酪氨酸羟基及 $-\text{NH}_3^+$ 等也都属于此类,它们可以接受电子或供出电子。

下面将通过共价催化而提高反应速度的酶,按提供亲核(或亲电子)基团的氨基酸种类,分别归纳如表 4-13。

丝氨酸类酶与酰基形成酰基-酶;或与磷酸基形成磷酸酶,如磷酸葡萄糖变位酶。半胱氨酸类酶活性中心的半胱氨酸巯基与底物酰基形成含共价硫酯键的中间物。组氨酸类酶活性中心的组氨酸咪唑基在反应中被磷酸化。赖氨酸类酶的赖氨酸 ϵ -氨基与底物羰基形成西佛碱中间物。

4. 酸碱催化(acid-base catalysis)

有机模式反应指出,酸碱催化剂是催化有机反应的最普遍的最有效的催化剂。

有两种酸碱催化剂,一是狭义的酸碱催化剂(specific acid-base catalyst),即 H^+ 与 OH^- , 由于酶反应的最适 pH 一般接近于中性,因此 H^+ 及 OH^- 的催化在酶反应中的重要性是比较有限的。另一种是广义的酸碱催化剂(general acid-base catalyst),指的是质子供体及质子受体的催化,它们在酶反应中的重要性大得多,发生在细胞内的许多种类型的有机反应都

表 4-13 形成共价 ES 复合物的某些酶

酶	共价中间物的类型
丝氨酸类(—OH 基结合): 磷酸葡萄糖变位酶 乙酰胆碱酯酶 胰蛋白酶 胰凝乳蛋白酶 弹性蛋白酶	磷酸酶 酰基酶 酰基酶 酰基酶 酰基酶
半胱氨酸类(—SH 基结合): 甘油醛磷酸脱氢酶 木瓜酶 乙酰 CoA-转酰基酶	酰基酶 酰基酶 酰基酶
组氨酸类(咪唑基结合): 葡萄糖-6-磷酸酶 琥珀酰-CoA 合成酶	磷酸酶 磷酸酶
赖氨酸类(氨基结合): 果糖-二磷酸缩酶 转醛酶 D-氨基酸氧化酶	西佛碱 西佛碱 西佛碱

是受广义的酸碱催化的,例如将水加到羰基上、羧酸酯及磷酸酯的水解,从双键上脱水、各种分子重排以及许多取代反应等。

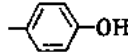
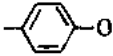
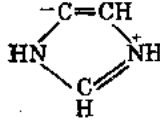
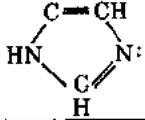
酶蛋白中含有好几种可以起广义酸碱催化作用的功能基,如氨基、羧基、硫氢基、酚羟基及咪唑基等。见表 4-14。其中组氨酸的咪唑基值得特别注意,因此它既是一个很强的亲核基团,又是一个有效的广义酸碱功能基。

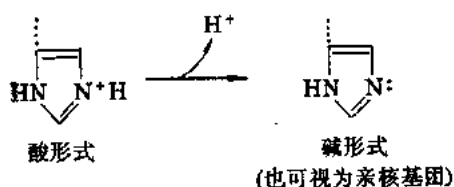
影响酸碱催化反应速度的因素有两个,第一个是酸碱的强度,在这些功能基中,组氨酸咪唑基的解离常数约为 6.0,这意味着由咪唑基上解离下来的质子的浓度与水中的 $[H^+]$ 相近,因此它在接近于生物体液 pH 的条件下,即在中性条件下,有一半以酸形式存在,另一半以碱形式存在。也就是说咪唑基既可以作为质子供体,又可以作为质子受体在酶反应中发挥催化作用。因此,咪唑基是催化中最有效最活泼的一个催化功能基。第二个是这种功能基供出质子或接受质子的速度,在这方面,咪唑基又是特别突出,它供出或接受质子的速度十分迅速,其半寿期小于 10^{-10} 秒。而且,供出或接受质子的速度几乎相等。由于咪唑基有如此的优点,所以虽然组氨酸在大多数蛋白质中含量很少,却很重要。推测它很可能在生物进化过程中,不是作为一般的结构蛋白成分,而是被选择作为酶分子中的催化结构而存在下来的。

广义的酸碱催化与共价催化可使酶反应速度大大提高,但是比起前面两种方式来,它们提供的速度增长较小。尽管如此,还必须看到它们在提高酶反应速度中起的重要作用,尤其是广义酸碱催化还有独到之处:它为在近于中性的 pH 下进行催化创造了有利条件。因为在这种接近中性 pH 的条件下, H^+ 及 OH^- 的浓度太低,不足以起到催化剂的作用。例如牛胰核糖核酸酶及牛凝乳蛋白酶等都是通过广义的酸碱催化而提高酶反应速度的。

5. 酶活性中心是低介电区域

表 4-14 蛋白质中可作为广义酸碱的功能基

广义酸基团(质子供体)	广义碱基团(质子受体)
-COOH	-COO ⁻
-NH ₃ ⁺	-N ⁻ H ₂
	
-SH	-S ⁻
	



上面讨论了提高酶反应速度的四个主要因素。此外,还有一个事实必须注意,即某些酶的活性中心穴内相对地说是非极性的,因此,酶的催化基团被低介电环境所包围,在某些情况下,还可能排除高极性的水分子。这样,底物分子的敏感键和酶的催化基团之间就会有很大的反应力,这是有助于加速酶反应的。酶活性中心的这种性质也是使某些酶催化总速度增长的一个原因。

为什么处于低介电环境中的基团之间的反应会得到加强?可以用水减弱极性基团间的相互作用来解释。水的极性和形成氢键能力使它成为一种具有高度作用力的分子,水的介电常数非常高(表 4-15)。它的高极性使它在离子外形成定向的溶剂层(oriented solvent shell),产生自身的电场,结果就大大减弱了它所包围的离子间的静电相互作用或氢键作用。

表 4-15 某些溶剂的介电常数

溶剂	介电常数(20°C)	溶剂	介电常数(20°C)
己烷	1.9	乙醇	24
苯	2.3	甲醇	33
乙醚	4.3	水	80
氯仿	5.1	氢氰酸	116
丙酮	21.4		

上面介绍了实现酶反应高效率的几个因素,但是并不能指出哪一种因素可以影响所有酶的全部催化活性。更可能的情况是:不同的酶,起主要影响的因素可能是不同的,各自都有其特点,可以受一种或几种因素的影响

二、某些酶的活性中心及其作用原理

(一) 溶菌酶

这是第一个主要用 X-射线衍射法阐明其全部结构与功能的酶。

溶菌酶[lysozyme(EC3.2.1.17)]存在于鸡蛋清及动物的眼泪中,其生物学功能是催化某些细菌细胞壁多糖的水解,从而溶解这些细菌的细胞壁。这种多糖是[N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)-N-乙酰氨基葡萄糖乳酸(NAM)]的共聚物,其中的NAG及NAM通过 β -1,4糖苷键而交替排列。溶菌酶的最适小分子底物为NAG-NAM交替的六糖,以A、B、C、D、E、F表示,其结构如下图4-22所示,图中R为 $\text{CH}_3-\text{CH}-\text{COO}^-$ 。

溶菌酶为具有129个氨基酸残基的单肽链蛋白质,含有四对二硫键(见图4-23)。

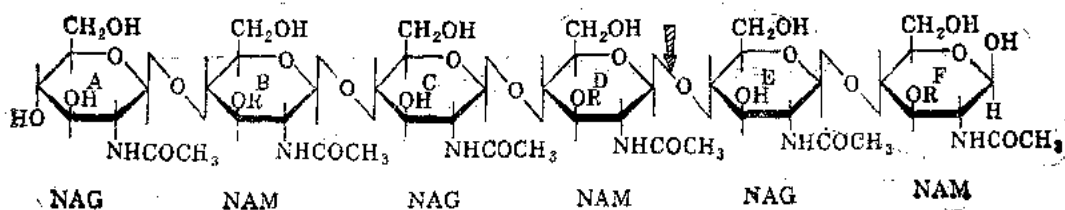


图4-22 溶菌酶的最适小分子底物

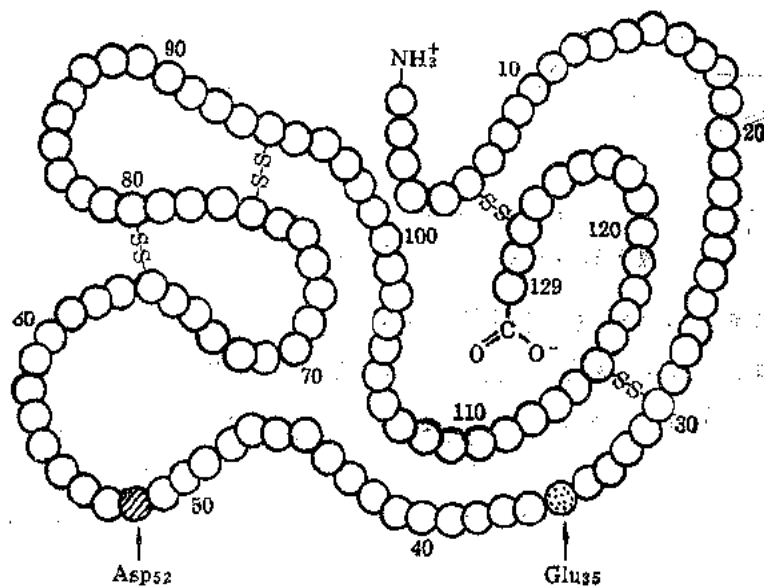


图4-23 鸡蛋清溶菌酶的氨基酸序列

从酶的表面构象来看,酶的结构不很紧密,大多数极性基分布在酶的表面,便于与溶剂(水)结合;而非极性基则隐藏在酶的内部,整个酶分子中有一狭长的凹穴。实验证明,最适小分子底物与酶相结合时,正好是与酶分子中的长形凹穴相嵌合,酶凹穴中的Glu₃₅及Asp₅₂是活性中心的氨基酸残基,见图4-24。

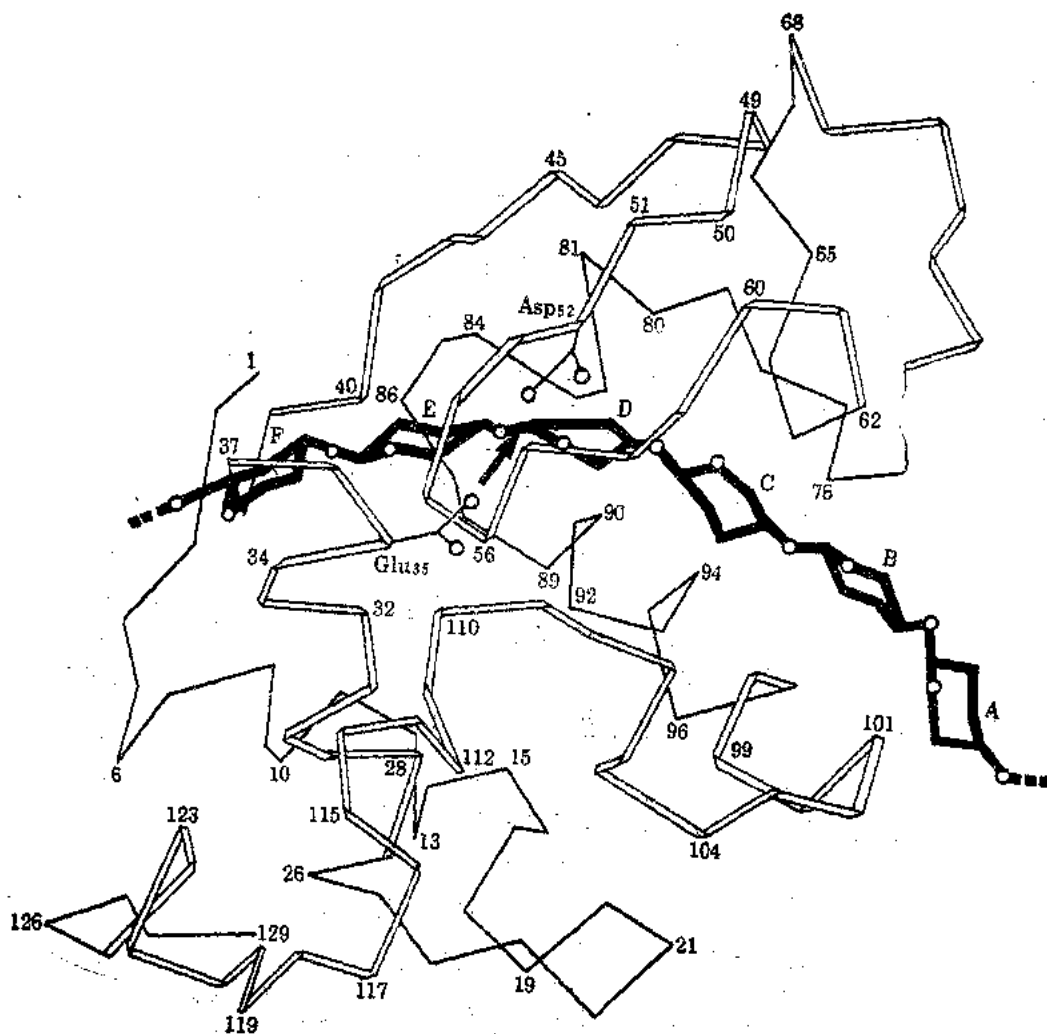


图 4-24 溶菌酶-底物复合物
(表示 Glu_{35} 及 Asp_{52} 对 D 环的作用及 D 环有变形)

经研究发现,溶菌酶在进行催化时有两大特点:

1. 当溶菌酶结合底物后,其构象发生较大的改变,这为“诱导契合”理论提供了强有力的实验证据,也表示了酶的催化是受底物的“靠近”及“定向”效应影响的。

2. 活性中心的 Asp_{52} 及 Glu_{35} 协同作用引起糖苷键的水解,水解时 Asp_{52} 上的一个氧原子距离 D 环上的 C_1 及 D 环上的氧原子只有 0.3nm , Glu_{35} 羧基上的一个氧原子距离糖苷键上的氧原子也只有 0.3nm ,见图 4-25。 Asp_{52} 及 Glu_{35} 的协同作用表现为两个方面:

(1) 广义的酸碱催化。酶的 Glu_{35} 处于非极性区,呈不解离状态,即使在 pH 较高的条件下,它也还是以非离子化的 $-\text{COOH}$ 形式存在,当与底物作用时,它提供一个质子进行酸碱催化。

(2) 酶使底物分子的 D 环发生变形,结果底物 D 环中的 C_1 变成正碳离子 C_1^+ ,底物因此而变成转变态。关于 D 环的变形可见图 4-26。

溶菌酶对细菌细胞壁的破坏过程如下:首先溶菌酶的分子接触细胞壁,与六个暴露在外的

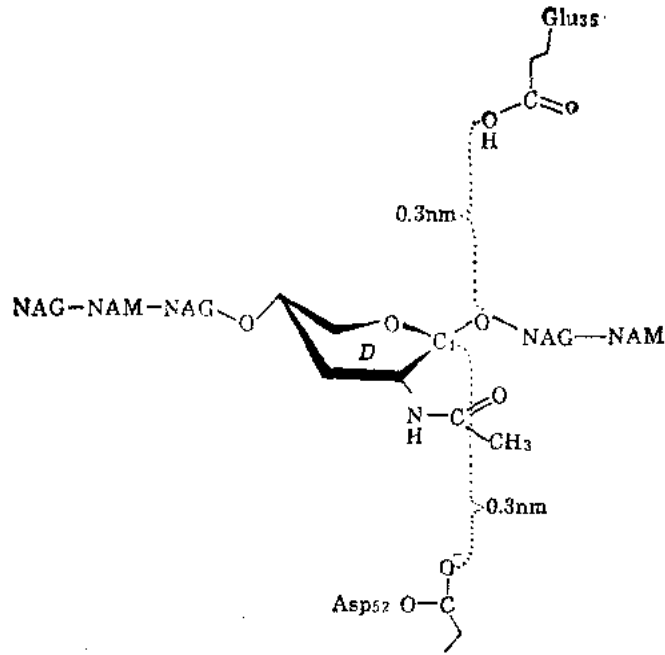


图 4-25 溶菌酶底物与酶活性中心的关系

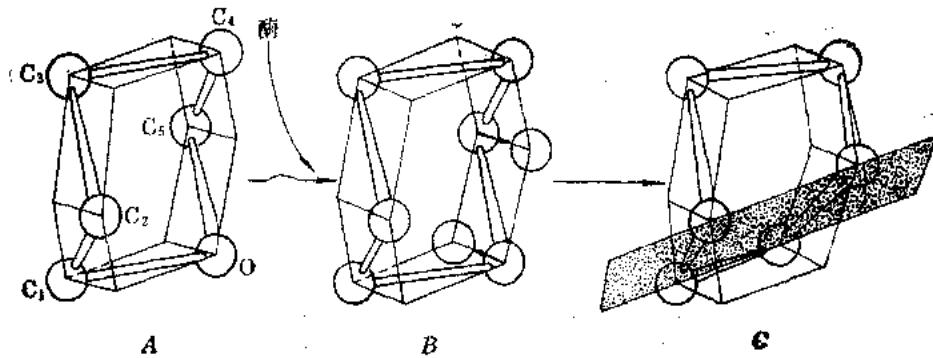


图 4-26 溶菌酶底物 D 环变形模型图

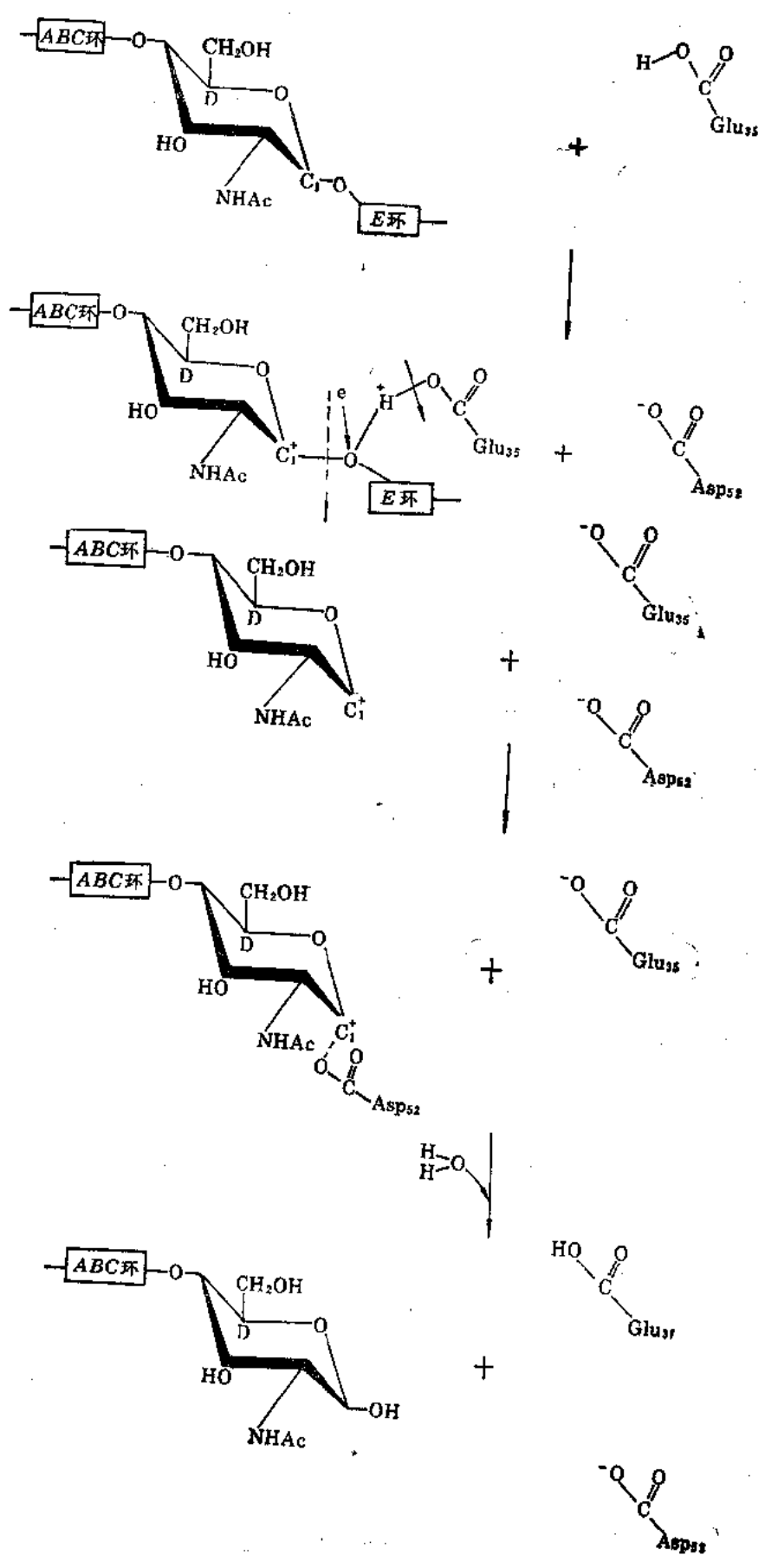
图中 A 为正常椅式 B 为结合酶后, C₁, O 移动 C 为半椅式, C₁, C₂, C₅, O 在一个平面上

氨基糖残基结合, 这时 D 糖构象发生变形, 从正常的椅式变形为能量较高的半椅式或船式构象。然后 Glu₃₅ 起着广义酸碱催化剂的作用, 提供一个质子给糖苷键的氧原子, 使得氧原子与 D 环 C₁ 间的糖苷键断开, 而 C₁ 带上正电荷, 成为一个正碳离子。

处于极性区的 Asp₅₂ 在通常的 pH 下都是以离子化的 $-\text{COO}^-$ 形式存在, 甚至在 pH 很低的情况下也是如此。Asp₅₂ 起着稳定 D 环正碳离子的作用, 协调 C₁-O 间糖苷键的断裂, 在 Asp₅₂ 的负电荷影响下, 正碳离子 C⁺ 可以稳定, 直到环境中水分子的 OH⁻ 与它结合时为止, 水中 H⁺ 则与 Glu₃₅ 结合, 使 Glu₃₅ 恢复非离子化形式。至此, 一次反应完成, 细胞壁被打开一个缺口。

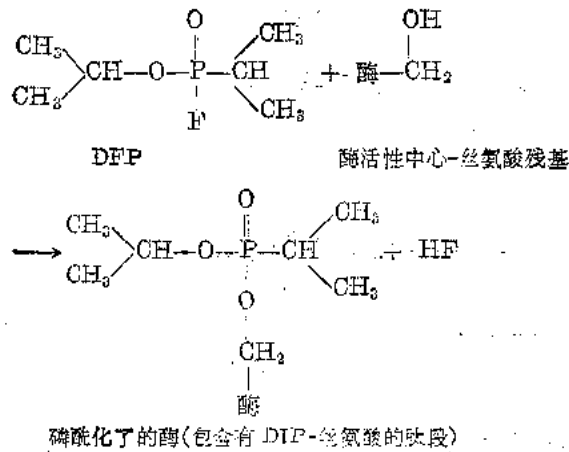
(二) 胰凝乳蛋白酶(又称糜蛋白酶 EC3.4.4.5)

胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)是研究得最早最彻底的一个酶, 它的活性中心由 Ser₁₃₅、

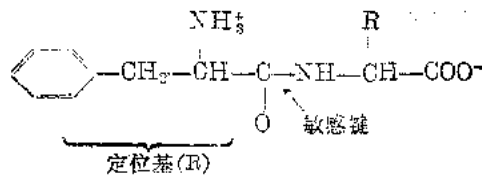


His₅₇ 及 Asp₁₀₂ 组成, 分子量为 25 000。

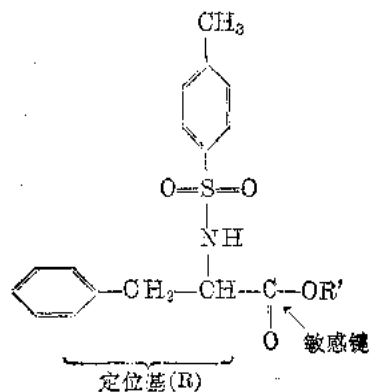
首先, 用 DFP(二异丙基氟磷酸)进行化学修饰。实验指出, 在温和条件下, 胰凝乳蛋白酶的全部丝氨酸(28个)中, 只有一个 Ser₁₉₅ 与 DFP 作用。而且, 当经修饰后, 酶活性也就丧失。可见, 这个 Ser₁₉₅ 残基处于酶活性中心的特殊结构中。进一步的分析还发现生成了 DIP-Ser₁₉₅-酶后, 酶再也不能与最适底物的类似物 TPCK 相结合。这就表明 Ser₁₉₅ 不仅处在活性中心之中, 而且就是酶活性中心的底物结合部位。只有具完整的空间结构, 并有完整的活性中心, 酶才能与底物正常结合。



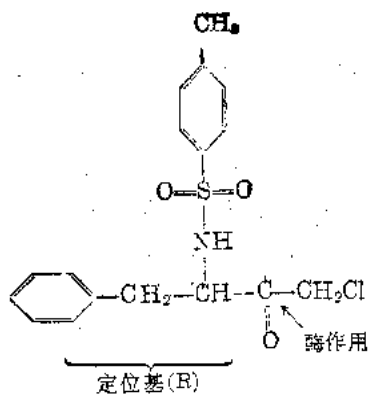
其次, 利用 TPCK 进行化学修饰, 胰凝乳蛋白酶选择性地水解由芳香族氨基酸羧基形成的肽键(正常底物):



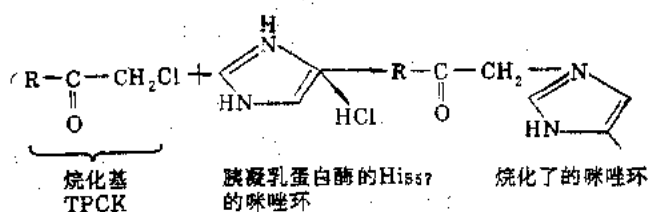
这个酶的最适底物是 N-对甲苯磺酰苯丙酰乙酯或甲苯磺酰胺苯丙酰胺。前者结构如下:



将此化合物的 --COOR 部分用氯甲基酮 --C(=O)--CH₂Cl 取代, 得到 N-对甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲基酮, 即 TPCK, 亦称 1-Cl-4-苯-3-甲苯磺酰胺-丁酮。



TPCK 与最适底物类似,对胰凝乳蛋白酶有专一性不可逆抑制作用,降低酶活性。实验又证明 TPCK 是与 His₅₇ 的咪唑基结合的:



这表明 His₅₇ 是胰凝乳蛋白酶的活性中心内的催化部位。人们进一步预言,这些氨基酸基团之所以能够形成活性中心,很可能是由于酶分子肽链卷曲盘绕成立体结构,使这些基团相互靠近之故,见图 4-27。近年来使用高分辨率的 X-射线衍射分析直接证明了 His₅₇、Ser₁₉₅、Asp₁₀₂ 在三维结构中确实是十分靠近的。见图 4-28。

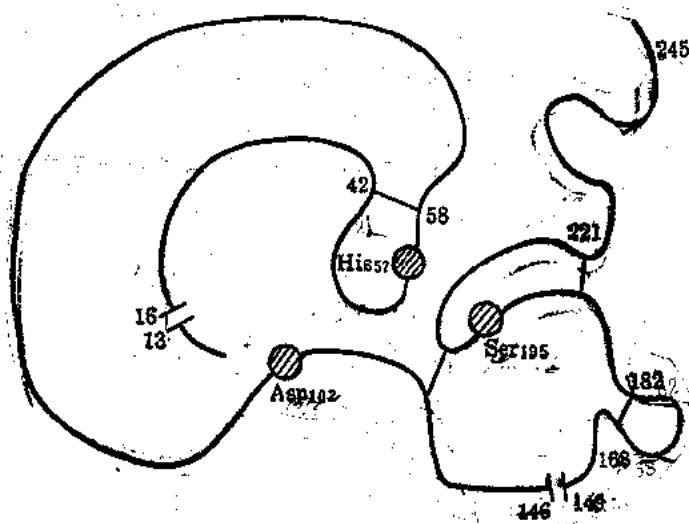


图 4-27 胰凝乳蛋白酶的肽链的折叠

这和化学修饰法所得的结果,以及动力学研究结果是一致的。此外,用 X-射线晶体衍射法还测出了此酶分子的大小为 $4.5 \times 3.5 \times 3.8 \text{ nm}$ 。并且,酶分子中只有 8 个氨基酸残基形成 α 螺旋构象,与血红蛋白、肌红蛋白相比,螺旋区少得多。

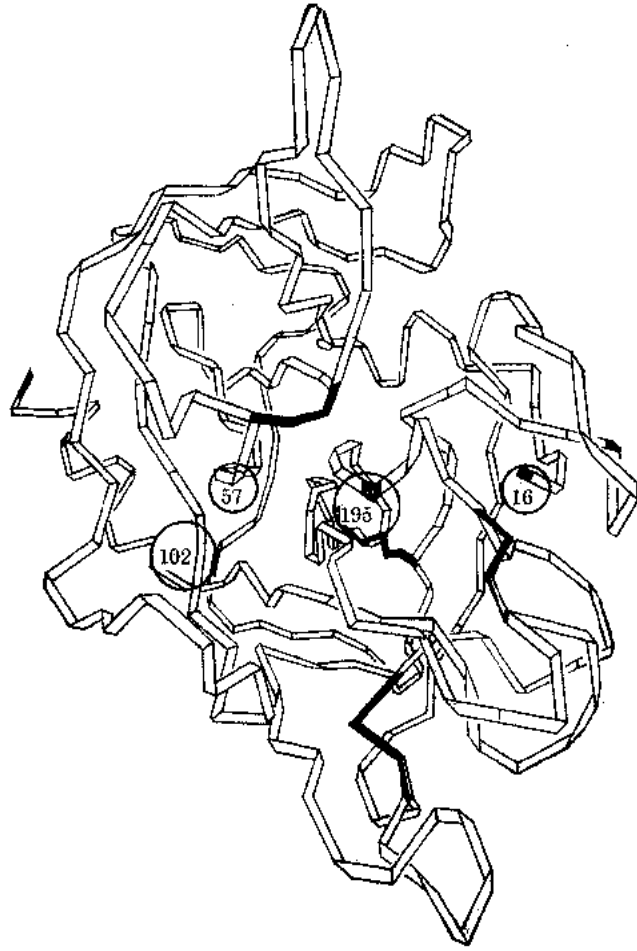


图 4-28 胰凝乳蛋白酶的肽链走向

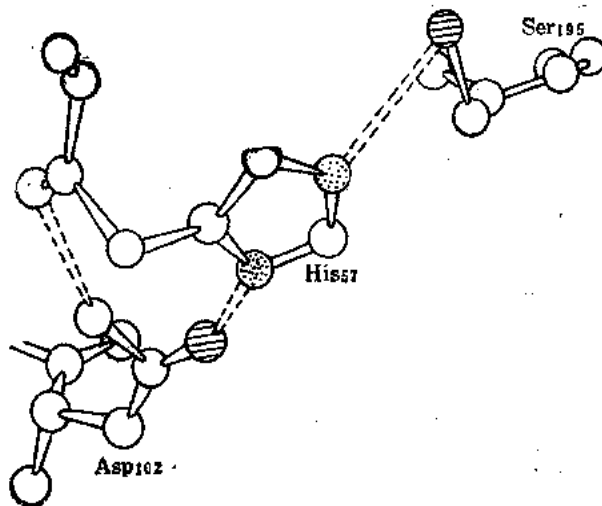


图 4-29 胰凝乳蛋白酶中电荷中继网的结构

关于胰凝乳蛋白酶的作用机理:

以上研究肯定了 Ser₁₉₅、His₅₇ 及 Asp₁₀₂ 组成胰凝乳蛋白酶的活性中心。进一步的研究又指出,三者构成一个氢键体系。它们的排列使 His₅₇ 的咪唑基成为 Asp₁₀₂ 羧基及 Ser₁₉₅ 羟基间的桥梁,见图 4-29。Ser₁₉₅ 由于 His₅₇

及 Asp₁₀₂ 的影响而成为很强的亲核基团,易于供出电子。这个氢键体系又可称为电荷中继网 (charge relay network),在大部分情况下,网中 Asp₁₀₂ 以离子化形式 $-\text{COO}^-$, Ser₁₉₅ 以非离子化形式 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 存在,如图 4-30 A 所示,在少数但也是重要的情况下,可以有 B 的阵势,这种阵势是由于 Asp₁₀₂ 从 Ser₁₉₅ 吸引一个质子所造成的,象接力

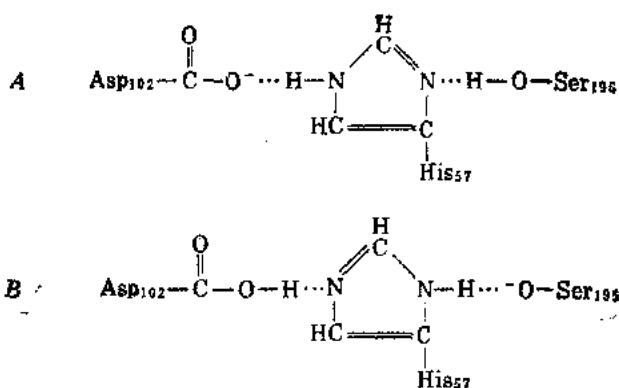


图 4-30 胰凝乳蛋白酶中的电荷中继网

赛跑那样,质子先从 Ser₁₉₅ 传递到 His₅₇ 上,再由 His₅₇ 传递到 Asp₁₀₂ 上。

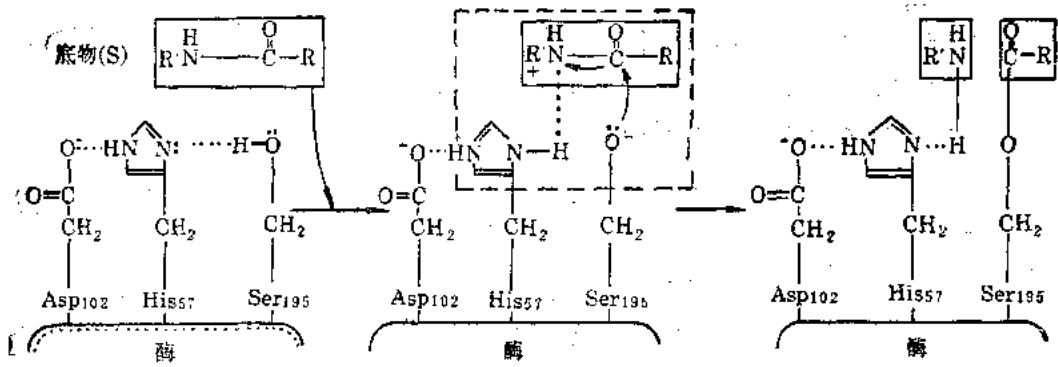
在这个酶的催化反应中,组氨酸咪唑基起着广义酸碱催化剂的作用,先促进 Ser₁₉₅ 的羟基亲核地附着到底物敏感肽键中的羰基碳原子上,形成共价的酰化中间物,再促进酰化的 ES 中间物上的酰基转移到水或其他酰基受体(如醇、氨基酸等)上。通过这个电荷中继网,进行酸碱催化及形成共价中间产物,增加的催化速度约为非催化水解反应的 10^8 倍。

胰凝乳蛋白酶对多肽底物水解的全过程可分为两大阶段(见图 4-31):

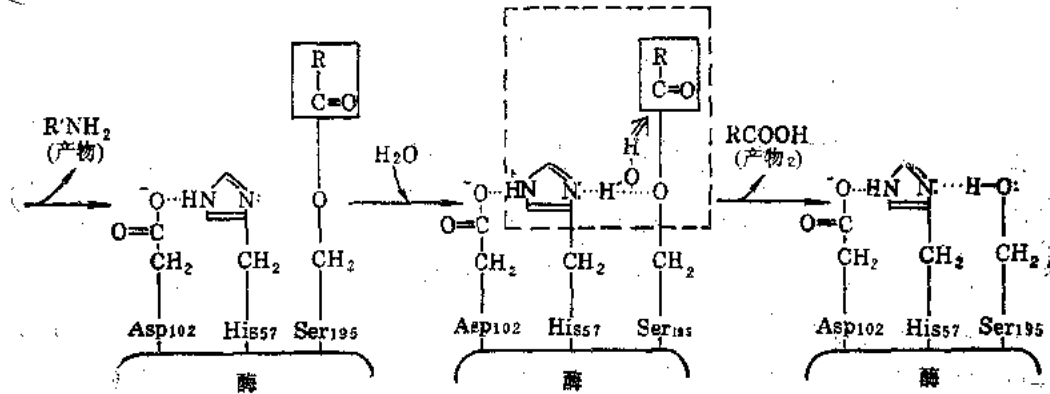
第一阶段——水解反应的酰化阶段。肽键水解是从 Ser₁₉₅ 羟基的氧原子对底物敏感肽键的羰基碳原子的攻击开始的,在这个亲核攻击下,形成了一个为时短暂的四联体过渡态 (Transition state), 见图 4-31B, 它包括 Ser₁₉₅ 的羟基, 底物的酰基部分, 底物的氨基部分及 His₅₇ 的咪唑基, 通过电荷中继网容易地发生了反应, 结果, 敏感肽键断裂, 底物中的胺成分通过氢键与酶的 His₅₇ 咪唑基相连, 底物的羧基部分酯化到 Ser₁₉₅ 的羟基上(见图 4-31C)。

第二阶段——水解反应的脱酰阶段。胺从底物中释放出来, 形成酰化胰凝乳蛋白酶(见图 4-31 中 D), 这是酶-底物中间复合物。接着水分子进入活性中心。其实脱酰阶段是酰化阶段的逆过程, 所不同的是水代替了胺。首先电荷中继网从水中吸收一个质子, 结果 OH⁻ 立即攻击已连在 Ser₁₉₅ 上的底物的羧基碳原子, 象酰化作用一样, 也形成了一个短暂的四联体过渡态, (见图 4-31 中的 E), 然后, His₅₇ 供出一个质子到 Ser₁₉₅ 的氧原子上, 结果, 底物中的酸成分从 Ser₁₉₅ 上释放出来, 这时酶又恢复自由状态, 再去进行下一轮催化。

除了胰凝乳蛋白酶外, 在催化中具有“天冬氨酸-组氨酸-丝氨酸”电荷中继网的酶还有胰蛋白酶、弹性蛋白酶及枯草杆菌蛋白酶等, 所以它们可能有很类似的催化机理; 此外, 来自胰脏的胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶及胰蛋白酶等的酶原在激活时发生相似的构象变化, 因此它们的酶原激活机理都可能是十分近似的。X-射线晶体衍射法及化学分析指出, 来自于胰脏的三种酶的三维结构也很相似, 一级结构中有 40% 的氨基酸的排列顺序也是相同的, 特别有意思的



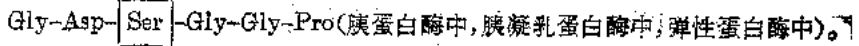
A. 自由胰凝乳蛋白酶(E) B. 形成四联体(框内) C. 底物肽键断开



D. 酰化胰凝乳蛋白酶(ES) E. 形成四联体₂(框内) F. 自由胰凝乳蛋白酶(E)

图 4-31 胰凝乳蛋白酶对多肽底物的水解过程

是三者活性中心的丝氨酸附近的氨基酸序列则是完全一样的,其序列均为:

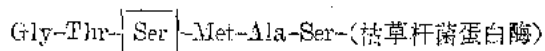


三者结构及机理上表现出极大的相似性,但是在专一性上又表现出很大的差异, X-射线衍射指出这种差异是由底物结合部位在结构上的微小差异引起的,三者的结合部位都有一个“口袋”,但是又有所不同:胰凝乳蛋白酶的非极性口袋可供芳香族(或大的非极性脂肪族)侧链伸入;胰蛋白酶也有一个口袋,口袋底部没有丝氨酸,而有一个天冬氨酸,它在非极性口袋的底部,可与伸入的带电荷的赖氨酸或精氨酸侧链形成一个较强的静电键;弹性蛋白酶的口袋稍短一些,而且因为口袋上部有两个较大的氨基酸缬氨酸及苏氨酸挡住,而不象胰凝乳蛋白酶口袋上方是两个甘氨酸,因此只能让丙氨酸这样的小分子进入如图 4-32。

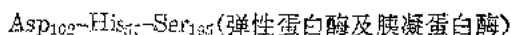
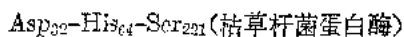


图 4-32 三种胰脏蛋白酶的底物结合部位

胰脏中分泌出来的三种酶在氨基酸序列等方面表现出极大的相似性,反映出它们起源于共同的祖先,但是又表现出不同的专一性。这种来自共同祖先,通过基因改变而得到不同专一性的结果,称为同源的“趋异进化”(divergent evolution)。而枯草杆菌蛋白酶的结构则与上述三个酶很不相同,活性中心丝氨酸附近的氨基酸序列也不同,其序列为:



组成电荷中继网的氨基酸所在位置也不同于胰脏分泌的弹性蛋白酶及胰凝乳蛋白酶中的情况:



这些酶来源各异(一个来源于细菌,而另一个来源于动物胰脏),但是它们的电荷中继网组成又相同,这种情况称为丝氨酸蛋白酶的异源的“趋同进化”(convergent evolution)。由此看来,自然界中可能只以少数方式,甚至多半只以一种方式来增加丝氨酸的亲核性,以促进催化。脊椎动物及细菌中的蛋白酶各自通过毫不相干的平行的过程,却同样都增加了丝氨酸的亲核性。

(三)羧肽酶 A (EC3.4.2.1)

羧肽酶A(carboxypeptidase A)是一个具有 307 个氨基酸残基的单链蛋白质,其中紧密地结合着一个 Zn^{2+} 离子,这个 Zn^{2+} 离子对于酶活性是很重要的。图 4-33 表示了这个酶的三维结构。

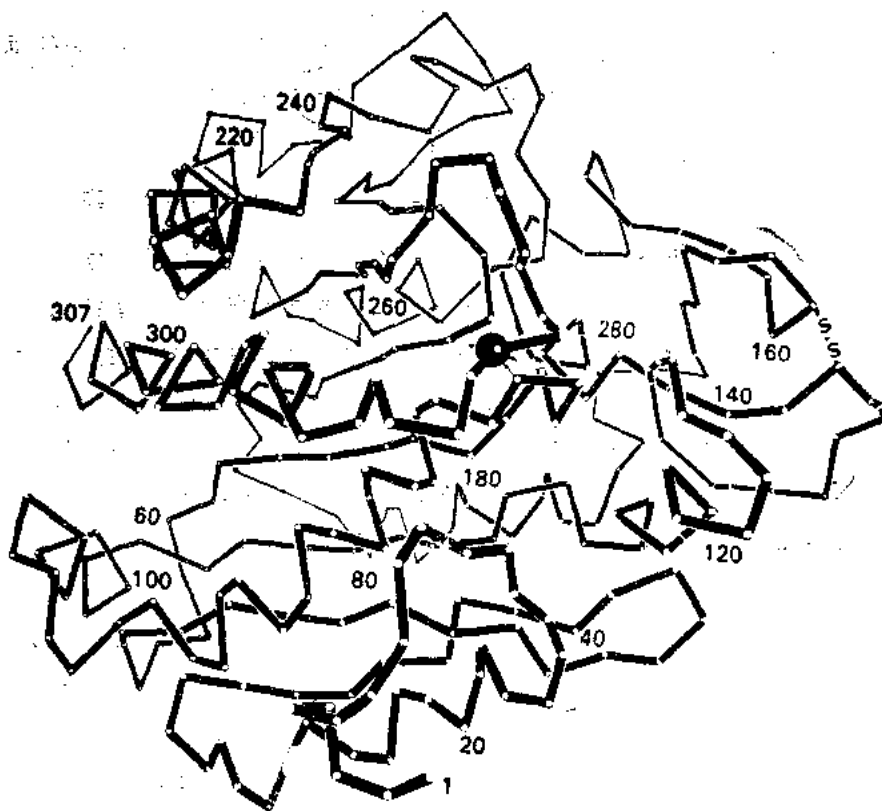


图 4-33 羧肽酶 A 的三维结构

Zn^{2+} 离子处在接近于酶表面的沟槽中,在此处,两个组氨酸侧链、一个谷氨酸侧链和一分子水形成了一个四面体, Zn^{2+} 离子就在这个四面体之中,与 His₁₅₆、His₆₉、Glu₇₂ 以配价键相连,如图 4-34 所示:

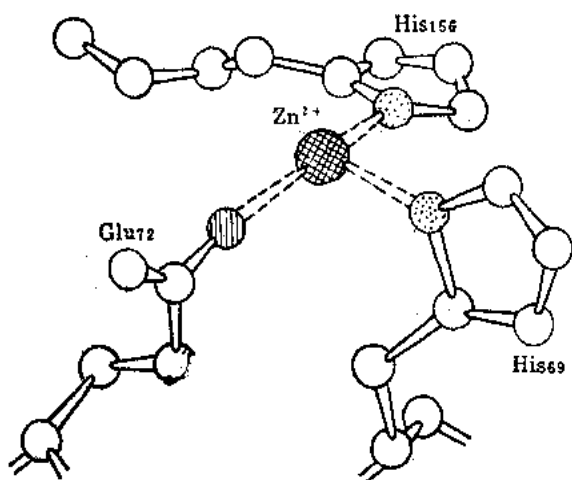


图 4-34 羧肽酶 A 活性中心的 Zn^{2+} 离子与三个氨基酸的侧链相联结

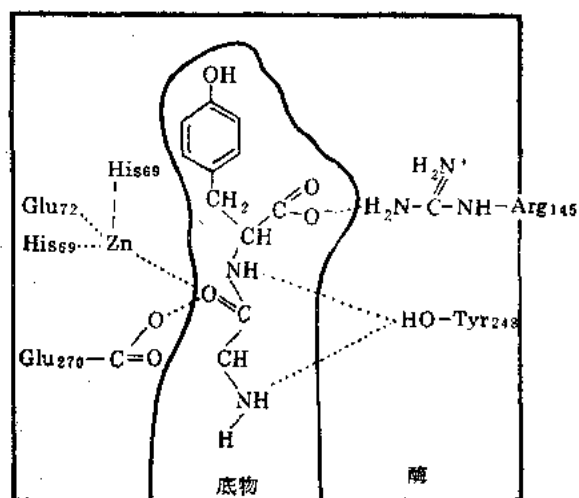


图 4-35 羧肽酶 A 活性中心示意图

离 Zn^{2+} 离子不远,还有一个“裂缝”,允许底物-末端的侧链伸入。

羧肽酶是一个外肽酶,它催化肽链 C-末端的肽键水解。为了详细了解羧肽酶的作用过程,人们曾选了一个作用很慢的底物(称为“钝化底物”)——甘氨酸酪氨酸。发现当此底物与酶结合时,它便楔入到酶的裂缝中去,裂缝顶部还有一个口袋,这个口袋可以接受 C-末端的 R 基团,酶的 Tyr₂₄₈、Arg₁₄₅、Glu₂₇₀ 及 Zn^{2+} 将底物分子适当地定位于活性中心中,(图 4-35)。

关于羧肽酶 A 的作用机理,现在认为有两个因素在催化中起着极其重要的作用,与前面所介绍的胰凝乳蛋白酶及溶菌酶相比,这两个因素有其不同的特点:

1. 在底物的诱导下,酶活性中心的结构发生巨大的改变。底物的“靠近”及“定向”效应十分显著。
2. 酶的 Glu₂₇₀ 使底物的敏感肽键发生电子张力(electronic strain),结果敏感肽键变得极易断裂。

底物结合的过程分五步进行。第一步,羧肽酶 A 侧链中 Arg₁₄₅ 上的正电荷与底物甘氨酸酪氨酸上的负电荷发生静电吸引作用(见图 4-35)。第二步,底物的酪氨酸残基进入酶的非极性口袋中。第三步,底物中待反应的敏感肽键的—NH—基上的 N 与酶中 Tyr₂₄₈ 的—OH 基联成氢键。第四步,底物敏感肽键上羰基中的氧与 Zn^{2+} 离子相并列。第五步,底物的末端氨基通过一个插入的水分子与酶中 Glu₂₇₀ 的侧链建立氢键。但这最后一步在形成 ES 复合物时可能不发生。

与甘氨酸酪氨酸的整个结合过程,必须通过活性中心的彻底重排才能实现。首先,结合底物时 Arg₁₄₅ 的胍基和 Glu₂₇₀ 的羧基都移动了 0.2nm;其次,底物羰基将结合在 Zn^{2+} 离子上的水分子推开,自身结合到 Zn^{2+} 离子上;同时,当底物的酪氨酸残基结合到酶上时,至少还从非

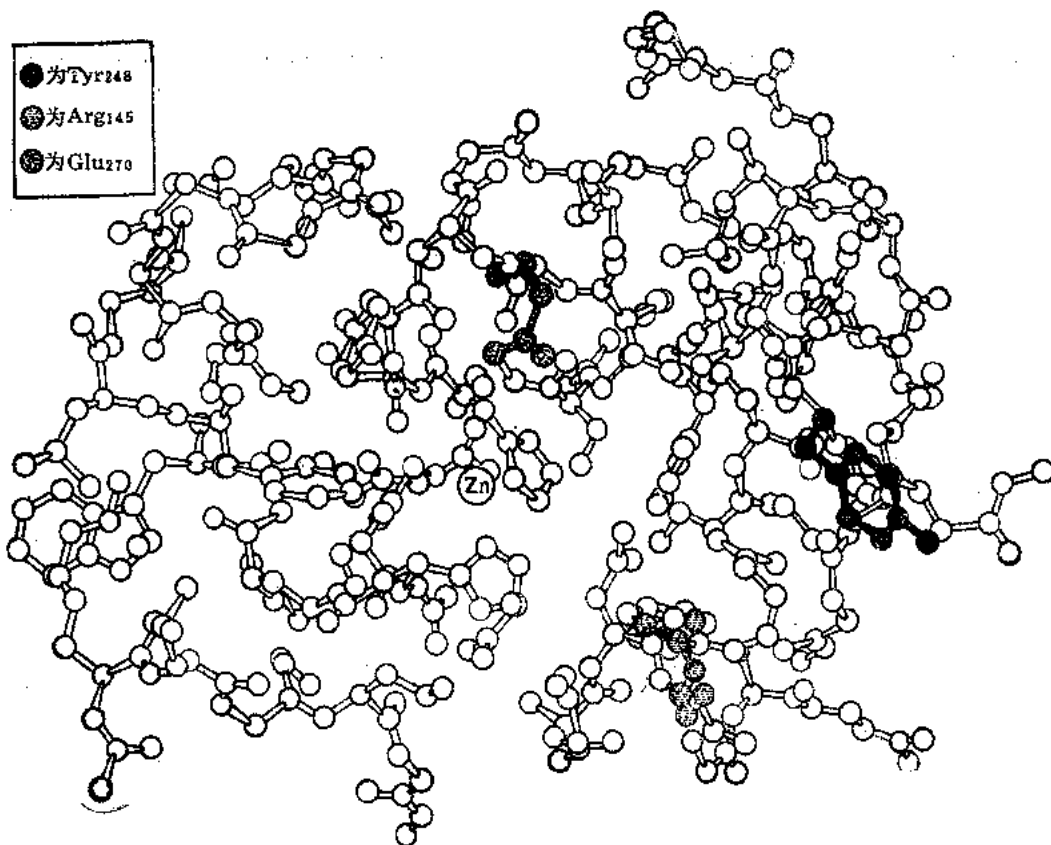


图 4-36 羧肽酶 A 结合底物前后构象变化图
表示未结合底物时酶的构象

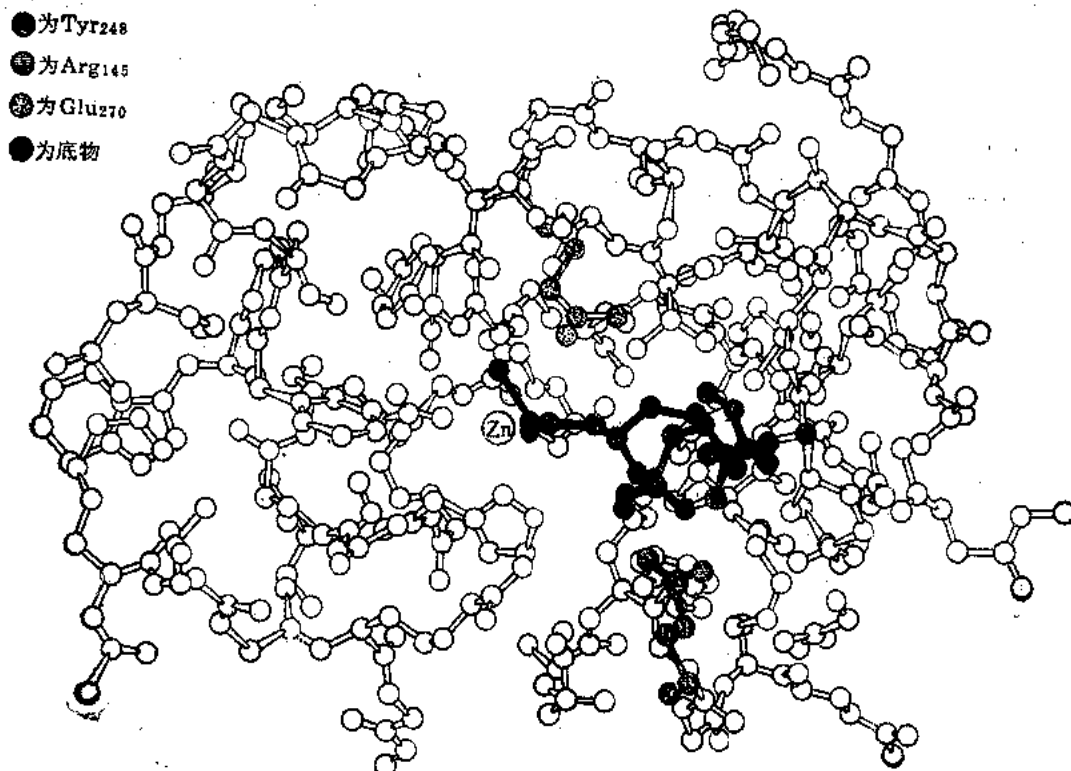


图 4-37 羧肽酶 A 结合底物前后构象变化图
表示结合了底物后酶的构象

极性的口袋中推走了另外 4 个水分子。除此之外，最重要的是发生了重大的构象改变，Tyr₂₄₈ 的酚羟基一下子移动了 1.2 nm，这个距离大约相当于整个蛋白质分子直径的 $\frac{1}{4}$ 。这个改变可由图 4-36 及 4-37 中看出。

这个结构改变可能是从 Arg₁₄₃ 结合到底物末端的羧基上而开始的，这样一来，Tyr₂₄₈ 的羟基从酶的表面移动到底物肽键附近，如此引起的重要结果是：关闭了活性中心的凹道，并且，活性中心从充满水的状态转变为疏水区。

酶与底物结合后，进一步的反应是如何的？以羧肽酶 A 为例，这种催化机理由于酶的活性中心部位内有好几个潜在的催化基团，并不容易一下子阐明，例如 Tyr₂₄₈ 及 Zn²⁺ 离子。利用 X-射线晶体衍射的结果对 Zn²⁺ 离子在电子张力机理中的作用作出了分析；亦对 Tyr₂₄₈ 在电子张力机理中的作用作出假定：认为 Tyr₂₄₈ 的 OH 基是切割步骤中底物中 NH 基团的质子的供体。最近，William Rutter 用当今的新手段——定点突变法 (Site-Mutagenesis) 对 Tyr₂₄₈ 作用的上述假定进行了检验。下面将分别加以介绍。

Zn²⁺ 离子在电子张力机理中起到使敏感肽键产生电子张力的作用。酶与底物靠近后，底物的敏感肽键指向酶的 Zn²⁺ 离子，由于 Zn²⁺ 离子的作用，底物羰基碳原子的电子云密度降低，而呈正电性。换言之，非极性区的 Zn²⁺ 离子使敏感肽键的诱导偶极增强，使该肽键中的羰基比别处的羰基更为极化，因而增加了这个羰基碳原子的有效电荷。结果，这个羰基碳原子在亲核攻击下更加脆弱。同时，Glu₂₇₀ 负电荷靠近肽键也使底物敏感肽键羰基的偶极矩加大，但并不抵消电子张力的作用。这样，Zn²⁺ 离子在底物中造成的电子张力就大大地促进了底物的水解过程。

关于羧肽酶 A 活性中心部位中几个氨基酸残基的作用，曾有两种说法试图用电子张力机理进行解释，它们都能一定程度地解释催化中发生的情况。

第一种说法，认为水先起作用，受 Glu₂₇₀ 激活的水分子释放出 OH⁻，直接攻击底物

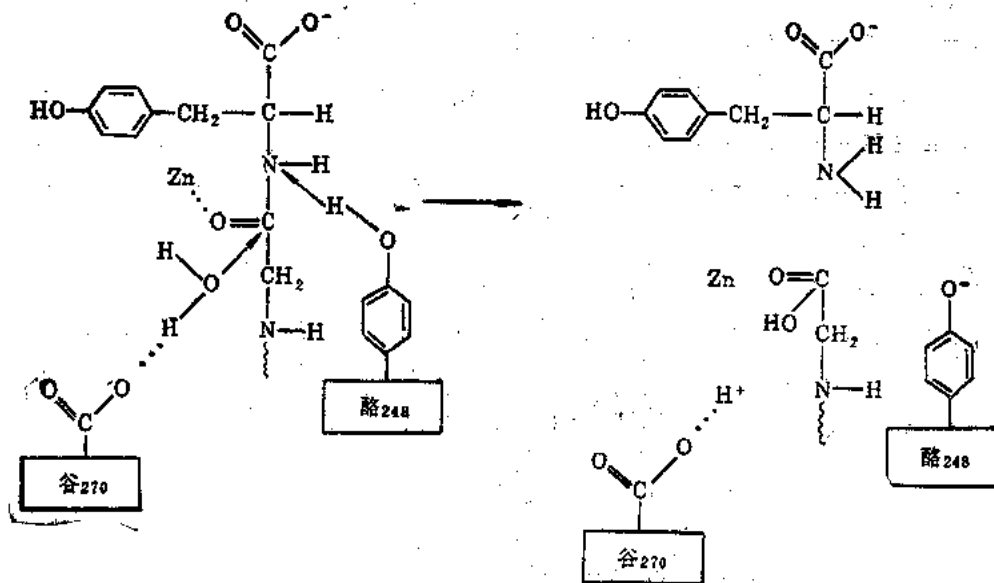


图 4-38 羧肽酶 A 电子张力机理

的敏感肽键羰基,与此同时,Tyr₂₄₈ 供出一个质子。这样,底物的肽键就直接水解(见图 4-38)。

第二种说法,认为 Glu₂₇₀ 直接攻击底物的敏感肽键的羰基碳原子,并且, Tyr₂₄₈ 向这个肽键的—NH—基提供一个质子。肽键断开,生成产物——胺, Glu₂₇₀ 则与底物羰基相连,形成酸酐。最后,水分子再使酸酐水解,生成产物——酸,酶的功能基本恢复原状。

Tyr₂₄₈ 的作用究竟是什么? 是否是催化反应绝对必须的? 如果酪₂₄₈ 是催化所必须的氨基酸,那么若用一个苯丙氨酸来取代这个酪氨酸,则此酶就应当失去活性。所以进行寡核苷酸定点突变实验时,先把第 248 位氨基酸的密码 TAT(酪氨酸的密码子)改成 TTT(苯丙氨酸的密码子),再把含有突变 TTT 的基因插入到质粒上,形成重组质粒,再通过转化,把重组质粒引入到酵母中,并使之在酵母中表达。这种表达产物:突变酶,并没有失去活性。而且,令人吃惊的是此突变酶与天然酶相比较, k_{cat} 值相同,但是 K_m 值高出六倍。这些结果指出, Tyr₂₄₈ 参与底物与酶的结合过程,但不是催化所必须的! 从这项实验研究也可以看出采用新手段的重要性。定点突变法可以灵敏而巧妙地勾画甚至确定某特定氨基酸残基在蛋白质和酶中的功能,大大地推动酶的结构和功能、酶的作用机理的研究,它也是创建工程化新酶的工具之一。

从羧肽酶 A 作用机理的研究中还发现,如果底物有末端羧基,就能与 Arg₁₄₅ 的正离子基团形成盐键,触发 Tyr₂₄₈ 移到酶活性中心,如果底物没有末端羧基,那么就不发生这种移动,酶则不表现活性。因此认为底物与酶的诱导契合是一个互相识别的动态过程。在这个过程中发生活性中心的重排,从而使底物有可能被酶的功能基包围,进行酶的催化反应。

(四) 木瓜蛋白酶(3.4.22.2)及胃蛋白酶(3.4.23.2)。

蛋白水解酶有几个大家族,前面已经介绍了含有丝氨酸的一族蛋白水解酶及含锌离子的一族水解酶,如羧肽酶 A。此外,还有含硫的一族蛋白水解酶,如木瓜蛋白酶及含羧基的一族蛋白水解酶,如胃蛋白酶。

含硫蛋白酶(thiol protease)也是一族分布很广泛的蛋白酶类。其中的一种木瓜蛋白酶由木瓜中分离得到,木瓜蛋白酶(papain)具有一个处于活性中心位点中的半胱氨酸,它起着与胰凝乳蛋白酶中的 Ser₁₉₅ 相类似的作用。催化首先通过一个硫酯中间物,并受到邻近的组氨酸的侧链的促进,见图 4-39。含羧基的蛋白酶(carboxyl protease)又被称为酸性蛋白酶(acid protease),这族酶中的大部分成员只在酸性环境中才有活性。胃蛋白酶(pepsin)是在酸性环境中由胃蛋白酶原自氨基端失去 44 个氨基酸残基而形成的、有活性的酶,分子量为 34.6kd。此酶与许多酶不同的一种性质为:其最适 pH 为 2。它的活性中心有两个天冬氨酸,当一个为离子化形式——COO⁻,另一个为非离子化形式——COOH 时,酶具有催化活性。

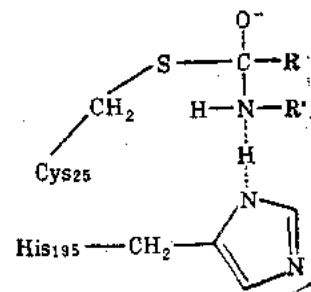


图 4-39 木瓜蛋白酶中的 Cys₂₅ 及 His₁₉₅

三、酶与抗体——抗体酶(abzyme)

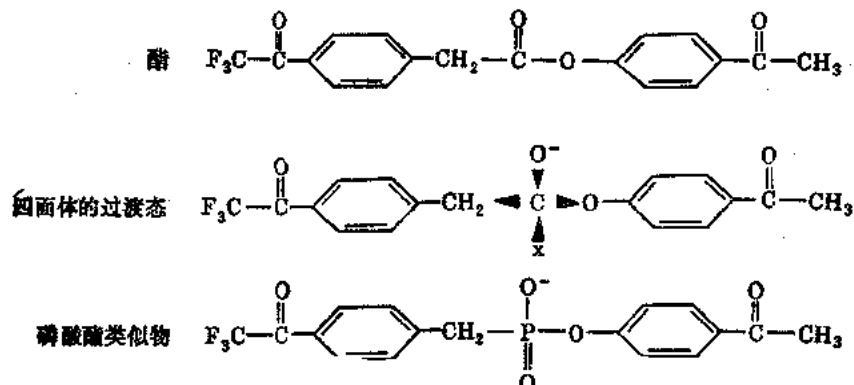
最近,有人提出“能否将抗体视作酶”的问题。

抗体,是专一于抗原分子的、有催化活性的一类具有特殊生物学功能的蛋白质。它由抗原

分子促进而大量地产生, 并与抗原分子之间有结合专一性。酶与其底物分子之间的结合也是专一性的。因而人们设想是否可以认为抗原分子促使产生了大量的、新颖的酶。

人们模拟酶与底物的过渡态结构合成一些类似物——称为半抗原, 用人工合成的半抗原对动物进行免疫, 再检查动物中是否能产生一些具有催化活性的抗体, 以求了解问题的答案。

研究工作正沿着这样的方向, 有了一个很有希望的开端——制备具有酯酶活性的抗体。



酯酶的水解过程为: 首先, 酯的羧基碳原子受到亲核攻击(X), 接着发生水解, 形成四面体的过渡态; 过渡态最终断裂, 形成水解产物。为了探讨抗体的特点, 制备共价连接着磷酸基的该过渡态的磷酸酯类似物, 这个稳定的类似物与酯水解的过渡态在几何学上极为相似。用它去免疫小鼠, 获得对这个酯水解反应有催化作用的抗体, 这个抗体专一性地结合在酯水解过渡态分子上。实际上, 专一于这个磷酸酯类似物的单克隆抗体可以催化酯的水解。在抗体的催化下, 反应速度比溶液中自发的水解速度高 1000 倍! 而且, 这个催化抗体服从于 Michaelis-Menten 动力学; 磷酸酯类似物对这个抗体所催化的反应, 表现出竞争性抑制; 这个酯水解反应也表现出高度的立体专一性。但是, 它与那些动力学上十分完善的酶比较, 还是有差别的, 它的 K_m 值为 $1.9\mu\text{mol}/\text{L}$, k_{cat} 值是 $2.7 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$, 其 k_{cat}/K_m 之比是 $1.4 \times 10 \text{L mol}^{-1} \text{秒}^{-1}$ 。它是小于后者的, 确切地说, 小三个数量级。

因此, 可以认为能够制备出一些特定的抗体, 例如, 某些可以切割病毒或肿瘤的、有催化活性的抗体, 催化某些天然酶所不可催化的反应, 为开拓有重要意义的新酶源作出贡献。

第七节 核糖酶(ribozyme)*

现在已经提纯并证明了几千种蛋白质具有酶活性。50 多年来, 人们认为所有的酶都是蛋白质。然而, 近年来的实验指出: RNA 分子也可以是高活性的酶! 最使人震惊的例子是 L19 RNA。它是原生动动物四膜虫 26S rRNA 前体经自身拼接所释放出的内含子的缩短的形式。1982 年 T. Cech 发现四膜虫(tetrahymena)的 26S rRNA 前体在没有蛋白质的情况下进行内

*Ribozyme 一词于 1982 年由 Thomas Cech 首次提出。1989 年诺贝尔化学奖的得主 S. Altman 等也曾于 1986 年将它与 enzyme 联系在一起。近几年来发现的 RNA 催化剂愈来愈多。最近, R. Symons 发现“锤头结构(hammer head)”中的 RNA 有催化活性, 并人工制造出许多 RNA 催化剂, 因此愈来愈受人们重视。在我国它的中文译名已有好几个: 核糖酶、核酶、类酶 RNA、酶性 RNA 以及酶 RNA; 此外, 另有建议以“核” (读音: 海) 命名。目前, 对以上各种译名尚无定论, 有待商榷。

含子(intron)的自我拼接。当时因为只发现它有这种自我催化的活性，所以并未把它与酶等同。随后，在1983年底 S. Altman 和 Pace 分别报导了把对于 E. Coli tRNA 前体加工过程起催化作用的酶：RNaseP (由 20% 蛋白质和 80% RNA 组成)的蛋白质部分除去，并提高 Mg^{2+} 浓度，则余留下来的 RNA 部分具有与全酶相同的催化活性，这是说明某些 RNA 具有酶活性的又一例证。

后来到了1986年 T. Cech 又发现 L19RNA 在一定条件下能够以高度专一性的方式去催化寡聚核糖核苷酸底物的切割与连接。五聚胞苷酸(C_5 , Pentacytidylate)能被 L19RNA 转化成或长或短的聚合物(见图 4-40)。特别是 C_5 可以降解成 C_4 及 C_3 ；同时，又能形成出 C_6 及更长些的甚至最大达到 30 个胞苷酸残基的寡聚核糖核苷酸片段的聚合物。因此，L19RNA 是既有核糖核酸酶(ribonuclease)活性，又有 RNA 聚合酶(RNA polymerase)活性的生物分子，可以看作是酶了。

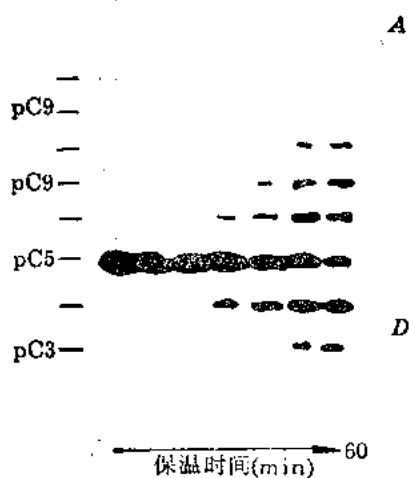


图 4-40 L19RNA 催化五连聚 C_5 的寡聚胞苷酸的切割及延长
底物与酶分子的比例为 6, C_5 的 5' 末端被 ^{32}P 标记

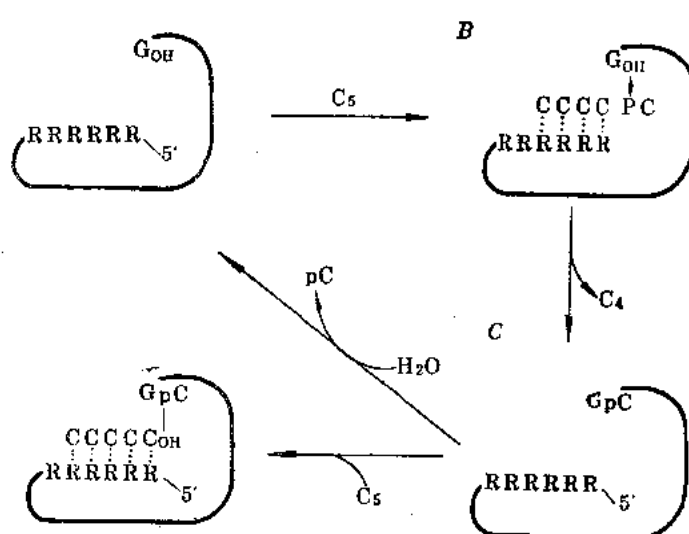


图 4-41 建议的 L19RNA 催化机理

A. 酶(L19RNA)单独存在 B. 底物 C_5 通过氢键连接到酶上，底物的末端 pC 共价连接到酶的末端 G 上。C. 上述 GpC，经水解，释放出 pC，酶恢复到它的起始状态(C→A)。D. 另一种情况，已被酶中 G 共价连接的 pC，可以被第二个 C_5 分子攻击，形成 C_6 分子(C→D)。

这个 RNA 在寡聚胞苷酸 C_5 上的作用比在寡聚尿苷酸 U_5 上快得多，而在 A_5 上及 G_5 上则一点也不起作用。此 RNA 酶服从于 Michaelis-Menten 动力学规律，对于 C_5 来说，其 K_m 值为 $42 \mu\text{mol/L}$ ， k_{cat} 值为 0.033 s^{-1} 。由于找到脱氧 C_5 是 C_5 的竞争性抑制剂，其 K_i 为 $260 \mu\text{mol/L}$ ，因而确定 L19RNA 的底物不可缺少 2' -OH 基。因此，L19 RNA 表现出经典酶促作用的好几种特征：要求高度的底物专一性，Michaelis-Menten 动力学，对竞争性抑制剂敏感。

这个具有 395 个核苷酸的 RNA 分子是怎样地又既起核糖核酸酶作用又起 RNA 聚合酶作用的？现在还不清楚它的三维结构，因此还不能确切地阐明作用机理。但是，对催化机理可以作出某些推断，见图 4-41。五聚胞嘧啶核苷酸结合到 L19 RNA 的专一性位点上；很可能这种底物的几个分子的五个胞嘧啶碱基与这个核糖酶的富 G 区进行碱基配对。配对后，五聚胞苷酸 C_5 的第四、第五胞苷酸之间的磷酸二酯键受到此酶的末端 G 残基上的 3'-OH 基的攻

击。于是,酶的末端 G 与底物末端 C 通过形成一个新的磷酸二酯键,而生成共价中间物 GpC。伴随这个酯基转移反应或转酯反应(transesterification reaction),释放出 C₄,新的磷酸二酯键是高度不稳定的,可以再因受到水的攻击而释放出 pC,酶则因此而得到再生。由图中 A 到 B、B 到 C 以及 C 到 A 的三步系列说明了 L19RNA 所具有的核糖核酸酶活性。

另一方面,它又是如何具有 RNA 聚合酶活性的呢?转酯反应所生成的共价中间物 GpC 可以再结合一分子五聚胞苷酸,第二个底物分子攻击 GpC,形成 C₆,酶从而得到再生。这样的过程(A→B, B→C, C→D, D→A)共五步,说明了 L19RNA 起到 RNA 聚合酶功能的作用机理。

因此,共价中间物 GpC 既可被水分子的 OH⁻ 攻击,又可受第二个底物分子的 3'-OH 基攻击。当环境的 pH 值较高时,反应倾向于水解过程;当环境中存在着高浓度的 C₅ 底物时,则有利于形成 C₆ 的转酯反应。如此生成的 C₆ 还可以连续地通过这种转酯反应,继续地延长,形成 C₇ 以及更长一些的聚合物,很可能 GpC 的磷酸二酯键有着不寻常的反应性能,因为它被静电激活形成五聚共价过渡态(Pentacovalent transition state)。

人们进一步要问,这个 RNA 酶与那些蛋白质酶相比,其催化效率如何?已知 RNA 可以形成严格的三维结构,这种结构可以与专一性底物结合,并稳定与底物所形成的过渡态。L19 RNA 的 k_{cat}/K_m 值是 $10^3 s^{-1}(mol/L)^{-1}$,与核糖核酸酶 A 极为相似,但比大部分常用的蛋白质酶低 5 个数量级。受这个 RNA 催化的 C₅ 的水解速度大约是未受它催化的 C₅ 水解速度的 10^{10} 倍。这就是说, RNA 分子象蛋白质分子一样,可以是非常有效的催化剂。但是大多数 RNA 还是不同于蛋白质。首先,因为它们不能形成大的非极性分子;而且,与蛋白质相比,它们的易变性也小得多。因为核酸只有四种不同的构建单位,而不象蛋白质那样有 20 种氨基酸作为基本的构建单位。

因此,自然界中大部分酶的本质是蛋白质。但是,也还必须注意到:蛋白质不是生物催化领域中唯一的物质。有些 RNA 分子也具有催化能力,我们称这些本质为 RNA 的酶为核糖酶(ribozymes),有时也称为 RNA。它们很适于去识别并转化单链核酸,因为它们与所作用的核酸底物享用着共同的碱基配对语言。

现已确认 L19 RNA 以及核糖核酸酶 P 的 RNA 组分具有酶活性。多少年来人们一直在争论:自然界中先有核酸还是先有蛋白质?因此,发现与确认上述这些 RNA 具有酶活性对于人们关切的生物进化、生命起源等的研究有着重要启示;并且打开了一个新的研究领域。

第八节 多酶体系

一、多酶体系及其分类

细胞中的许多酶常常是在一个连续的反应链中起作用。所谓连续的反应链是指前一个反应的产物是后一个酶反应的底物。多数的酶均以这种方式相互联系在一起。在完整细胞内的某一代谢过程中,由几个酶形成的反应链体系,称为“多酶体系(multienzyme system)”。多酶体系一般分为可溶性的、结构化的和在细胞结构上有定位关系的三种类型。

有些多酶体系中的酶,在细胞质中以可溶性形式各自作为独立的单体存在,它们之间没有

结构上的联系, 见图 4-42。

更多的多酶体系, 结构化程度较高, 体系中各个酶彼此有机地组合在一起, 精巧地镶嵌成一定的结构, 形成多酶复合体; 见图 4-43。目前有两个例子最能说明这类多酶体系的特点, 其一是细菌及动物组织中的丙酮酸脱氢酶复合体, 另一是酵母及动物组织中的脂肪酸合成酶复合体。

丙酮酸脱氢酶复合体 (pyruvic acid dehydrogenase complex) 由三种酶组成: 1) 丙酮酸脱氢酶 (E_1) (pyruvate dehydrogenase) 催化丙酮酸脱羧。2) 二氢硫辛酸转乙酰基酶 (E_2)

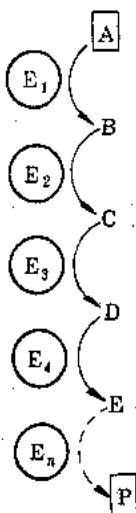


图 4-42 分散多酶体系与中间物示意图

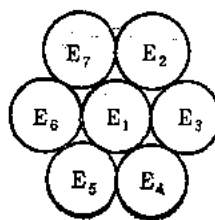
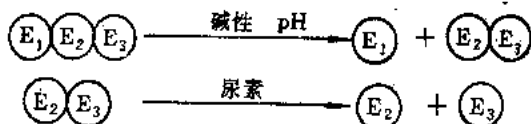


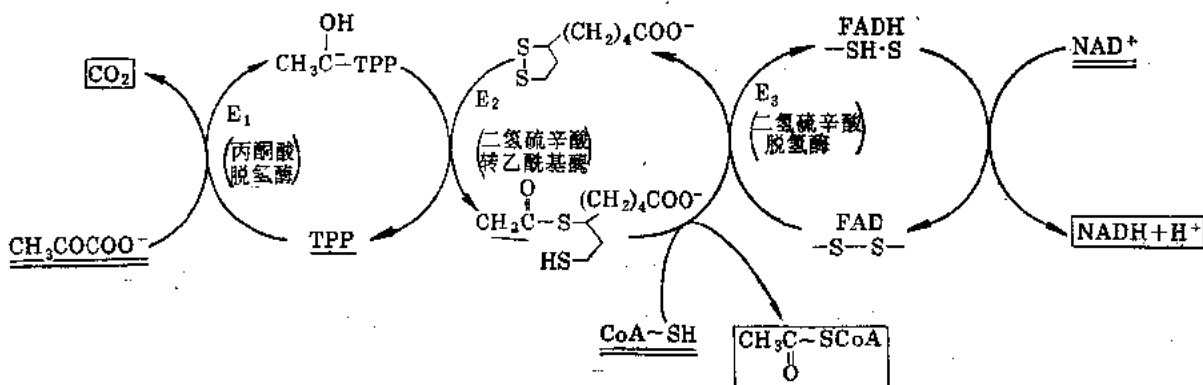
图 4-43 多酶复合体示意图

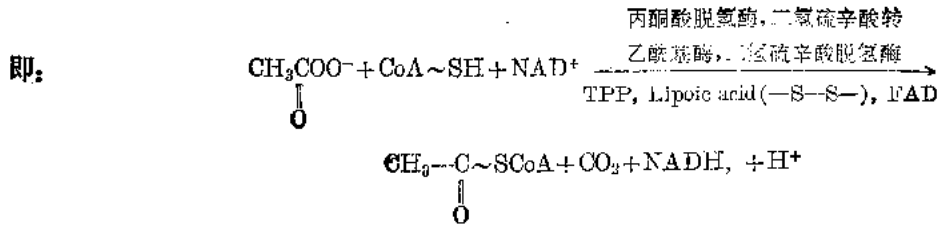
(dihydrolipoyl transacetylase)。3) 二氢硫辛酸脱氢酶 (E_3) (dihydrolipoyl dehydrogenase)。

这个复合体在碱性条件下及用尿素处理后可以逐步分开:



研究这三个酶的再结合, 发现 E_2 在 E_1 与 E_3 的联合中起着“桥梁”或“核心”的作用, 如果缺乏 E_2 , 则 E_1 与 E_3 不能再度结合。这三种酶联合起来, 共同催化丙酮酸的脱氢脱羧过程, 最后生成 CO_2 及乙酰辅酶 A, 其反应顺序可简列如下:





从大肠杆菌中以及从动物心肌和肾脏线粒体中分离的丙酮酸脱氢酶复合体的分子量都已经分别测出, 并已制出这些复合体的模型。大肠杆菌中的这种多酶复合体还在电子显微镜下拍出了清晰的照片, 这种复合体的模型分解示意如图 4-44。

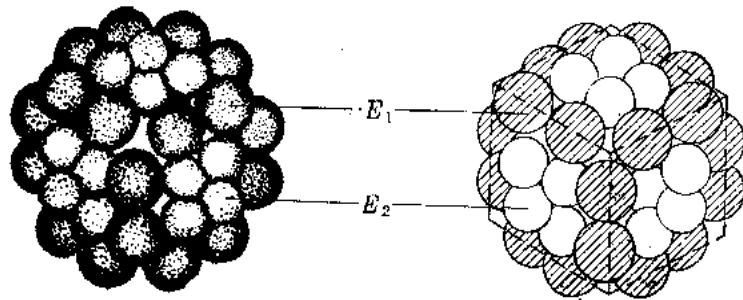


图 4-44 *E. coli* 丙酮酸脱氢酶复合体模型图

在这个多酶复合体中, 含有 24 个丙酮酸脱氢酶(E_1), 它们以二聚体形式存在, 二聚体分子量为 19.2 万; 含有 24 个二氢硫辛酸转乙酰基酶(E_2), 分子量为 7.0 万; 还含有 12 个二氢硫辛酸脱氢酶(E_3), 它们以二聚体形式存在, 二聚体分子量为 11.2 万。因此, 12 个 E_1 二聚体, 加上 24 个 E_2 , 再加上 6 个 E_3 二聚体, 使这个多酶复合体的总分子量约为 460 万。

另一个例子是脂肪酸合成酶复合体, 它不存在于植物细胞及细菌中, 只存在于酵母或动物细胞中, 酶分子的许多亚基间以非共价彼此连接。这个多酶体系含有 7 种不同的酶, 它们围绕着酰基载体蛋白(ACP)排列成紧密的复合体, 共同作用于小分子的前体(乙酰-辅酶 A 或丙二酰-辅酶 A), 催化合成脂肪酸(软脂酸, 见第十五章脂肪酸的生物合成), 这个复合体一般不易拆散成分离的酶链, 拆散后则失去活性。在脂肪酸合成酶体系中, 中间产物始终不能离开复合体。其生物学意义可能是在多酶体系的连续不断的反应中, 缩短每个产物与参与下一步反应的酶间的距离, 使反应以最高的效率进行。

还有一些结构化程度更高的多酶体系, 它们甚至定位于细胞器(如膜、核糖核蛋白体等)结构上, 例如呼吸链中的酶即是定位于线粒体的内膜上。

二、多酶体系的自我调节

生物体内的代谢过程包含着许多多酶体系的酶促反应。这些反应序列有的是直线式的, 有的是分枝式的, 还有的是循环式的。在完整细胞内, 这样种类繁多的多酶反应互不干扰, 有秩序地协调进行。各个代谢过程不仅按一定方向进行, 而且还根据内外条件的改变随时加以调节, 以避免某种代谢物过度积累而造成生命活动紊乱。

完整细胞内的许多多酶体系都具有自我调节的能力。这种多酶体系反应的总速度决定于

其中反应速度最慢的一个反应。这个速度最慢的酶限制着全部反应序列的速度,称为“限速步骤”(rate-limiting step)。大部分具有自我调节能力的多酶体系的第一步反应就是限速步骤。它控制着全部反应序列的总速度。催化第一步反应的酶大多都能被全部反应序列的最终产物所抑制;有时则是反应序列分叉处的酶受到最终产物的抑制(图4-45 A及B),这种过程称为反馈作用(feedback);第一步反应酶,或分叉处的酶处于调节酶中主要的一类——别构酶(allosteric enzyme,详见下一节)的控制中。换句话说,许多多酶体系的自我调节都是通过其体系中的别构酶来实现的。

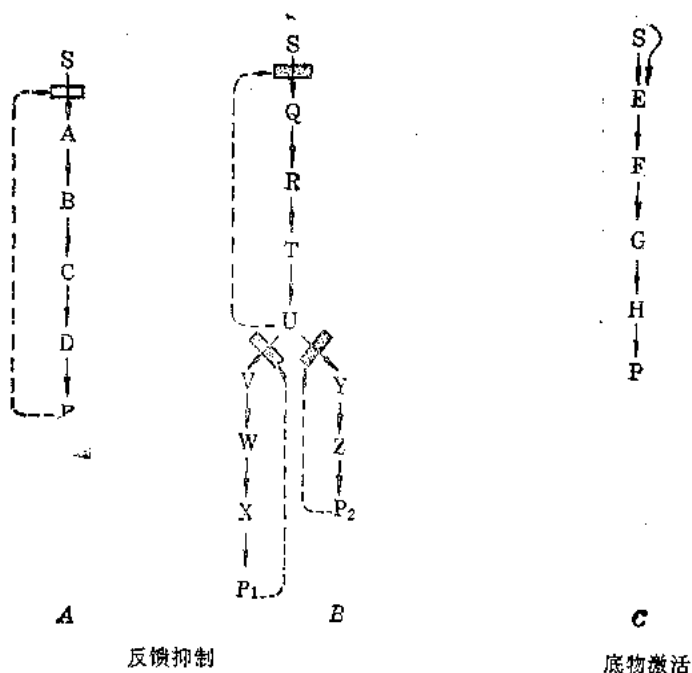
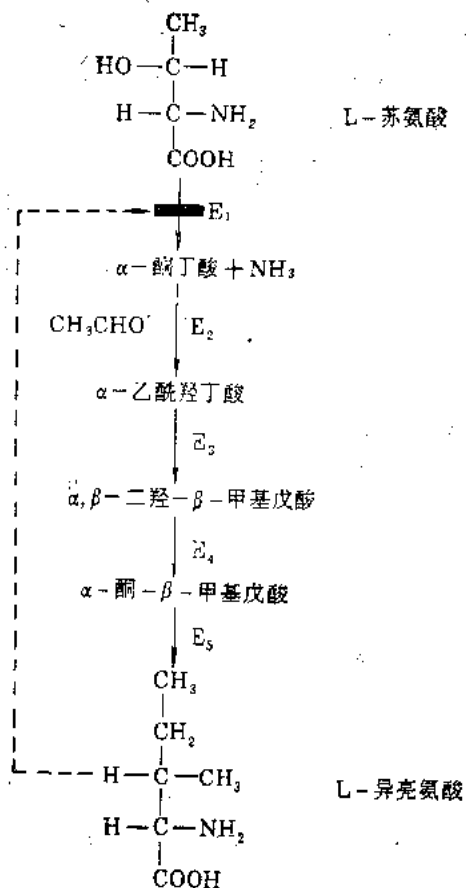


图4-45 多酶体系酶促反应的调节控制

典型的例子之一就是苏氨酸转变为异亮氨酸的多酶体系,它是一个五步催化的反应序列。这个序列的第一个酶是L-苏氨酸脱水酶(L-threonine dehydrase),它受最终产物L-异亮氨酸的强烈抑制,但是不受其他几个中间产物的抑制。异亮氨酸对于这个酶,既不是与苏氨酸发生竞争性抑制,又不是非竞争性或反竞争性抑制,但异亮氨酸确是这个酶的一个非常专一的抑制剂,其他的氨基酸及有关的化合物都不能抑制这个酶。这种抑制作用一般称为末端产物抑制、反馈抑制或制动抑制(retro inhibition)。此处的L-苏氨酸脱水酶就是一个别构酶。通过它可以调节总反应速度。异亮氨酸对于这个酶来说是抑制剂,也可称之为“负调节物”(negative modulator)或抑制性效应物(inhibitory effector)。

有的别构酶有“负调节物”,有的别构酶有激活剂,或称“正调节物”(positive modulator)或激活效应物(activatory effector);有的别构酶则正负调节物兼而有之。有的别构酶只有一个专一性的调节物,称之为单价别构酶(monovalent enzyme),有的别构酶则有两个或更多的专一性调节物,称为多价别构酶(polyvalent enzyme)。通过一个或一个以上的多价别构酶,可以将两个或多个多酶体系连接在一个控制网中进行调节。



正调节物一般是别构酶的底物，对酶不起反馈作用；负调节物一般是代谢序列的最终产物，当代谢的最终产物积累时，它作为负调节物抑制反应序列中别构酶的活性，从而使反应速度下降。这可以避免某些中间产物不必要的积累，防止代谢紊乱。通过这种自我调节（即反馈作用），可使代谢过程得以协调地、有条不紊地合理地进行。

因此，下一节我们集中地讨论酶活性的调节控制作用及调节酶。

第九节 酶活性的调节控制和调节酶

有一些酶称为调节酶(regulatory enzymes)，可以在多酶体系中对代谢反应起调节作用，它们本身的活性受到严格的调节控制。

现将酶的调节控制作用归纳为以下四类：

1. 别构效应的调控

这种调节控制作用由别构酶(allosteric enzyme)调节。别构酶有受调控的动力学特征，它的分子内、在不同空间位置上的特定位点有传递改变构象信息的能力，除了有活性中心(active site)外，还有别构中心(allosteric site)，当专一性代谢物非共价地结合到别构中心时，它的催化活性就发生改变，使这种酶能够适当而精巧地在准确的时间和正确的地点表现出它的催化活性。例如大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase, aspartate transcarbamoylase)，

它的特殊结构使它在不同外界环境条件时,能作出选择,进行代谢调节。

2. 可逆共价修饰调控(reversible covalent modification)

这种调控作用由共价调节酶(covalently modulated enzyme)起作用。

共价调节酶的催化性质因受到一个小基团的共价修饰而发生显著变化:有活性 \rightleftharpoons 无活性。例如:糖原磷酸化酶因它的一个专一性丝氨酸残基得失磷酸基而变化,大肠杆菌中的谷氨酰胺合成酶因专一性酪氨酸残基得失 AMP 而变化。这类酶严格地受着自我调控。

3. 酶原的激活(zymogens or proenzymes activation)

有的酶当其肽链在生物合成之后,即可自发地折叠成一定的三维结构,一旦形成了一定的构象,酶就立即表现出全部酶活性,例如溶菌酶。然而有些酶在生物体内首先合成出来的只是它的无活性的前体,称为酶原。这些酶原必须要在一定的条件下,去掉一个或几个特殊的肽键,从而使酶的构象发生一定的变化,才有活性。这种调节控制作用方式的特点是:无活性状态转变成有活性状态的过程是不可逆的。属于这种类型的有消化系统的酶(如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胃蛋白酶等)以及血液凝固过程的级联作用(blood clotting, a cascade of zymogen activation)中的一系列酶(因本书篇幅所限,这一组酶将不作详细介绍)。消化酶及凝血酶被不可逆地转变成活性状态,只有在不可逆地结合着专一性的抑制性蛋白分子时,酶才会失去其活性,同时酶分子本身也发生变化。

酶原通过酶促激活作用,由无活性的前体转变成有活性的酶是共价调节的一种特殊形式——共价键断裂,造成不可逆的酶活性变化;转变为有活性的酶。

4. 激促蛋白质或抑制蛋白质的调控

这一类调节不是由于结合某些小基团或断裂某些共价键,而是由于结合了专一性的激促蛋白质或抑制蛋白质(specific stimulatory or inhibitory proteins),而使得某些酶的活性受到调控。

属于这类的特殊蛋白质有钙调蛋白(Camodulin)、抗血友病因子(antihemophilic factor)等。钙调蛋白是真核细胞中的一种无所不在的调节蛋白(regulatory protein),它可以感受细胞外钙离子浓度的变化。当细胞外的钙离子浓度升高时,钙离子就与钙调蛋白结合,带有结合态钙离子的钙调蛋白结合到许多酶上,激活许多酶。关于钙调蛋白的结构及作用机理将在本书第八章激素的第四节磷酸肌醇级联中作较详细的讨论。抗血友病因子明显地促进与加速血液凝固过程,这种蛋白质增强含有丝氨酸的蛋白酶的活性。相反地,某些抑制蛋白质结合到酶上,使那些酶不具有酶活性,视觉激动过程就是受这种调节控制的——一个酶的抑制亚基的可逆释放调节着视觉激动过程。

一般被称为调节酶的,主要是指别构酶及共价调节酶,这两类酶可以在很短的时间内(几秒或几分钟内)对组织或细胞的代谢变化作出迅速的反应,给予调节。

下面分别讨论上面列举的几类调节控制作用。

一、别构效应的调控

这种调控作用由别构酶(allosteric enzyme)调节。

别构酶由于其本身结构及性质上的特点,能够调节酶反应速度,是调节酶中较为重要的一类。

(一)别构酶的性质、结构、别构效应及其调节物

迄今所有已知的别构酶都是寡聚酶,即含有两个或两个以上的亚基。因此,一般地说别构酶比没有调节作用的单体酶分子量更大,结构更复杂,提纯更困难。而且还表现出一些与一般酶不同的性质,如某些别构酶于 0°C 不稳定,而于室温下反而稳定。大多数别构酶还表现出非典型的初速度-底物浓度关系不遵循米氏方程,代谢调节物造成的抑制作用也不服从典型的竞争性、非竞争性或反竞争性抑制作用的数量关系。

已知的别构酶在结构上有以下特点:

1. 有多个亚基。
2. 有四级结构。
3. 除了有可以结合底物的酶的活性中心(active site)外,还有可以结合调节物的别构中心(allosteric site有时也称调节中心)。而且,这两个中心位于酶蛋白的不同部位上或处在不同的亚基上(如ATCase),或处在同一个亚基的不同部位上。

别构酶的活性中心负责酶对底物的结合与催化,别构中心则负责调节酶反应速度。

别构效应(allosteric effect)。调节物(或效应物)与酶分子中的别构中心(调节中心或控制中心)结合后,诱导出或稳定住酶分子的某种构象,使酶活动中心对底物的结合与催化作用受到影响,从而调节酶的反应速度及代谢过程,此效应称为酶的“别构效应”。酶的别构效应与酶的四级结构相关。这个概念还可以扩展到酶以外的蛋白质上,如血红蛋白结合氧的过程中也有别构效应。

不同的别构酶的调节物分子不同。有的别构酶具有同促效应(homotropic effect),或称同种协同效应,它的调节物分子就是底物分子,这种酶分子上有两个以上的底物结合中心,其调节作用取决于酶上有多少个底物结合中心被占据。有的别构酶具有异促效应(heterotropic effect),这种别构酶除去可与底物分子作用外,还可与其他的调节物分子结合,它的调节物分子不是底物分子。前述的苏氨酸脱水酶就是一例,它的底物是苏氨酸,而其调节物则是L-异亮氨酸。更多的别构酶是具有同促效应及异促效应的,它们既受底物分子的调节,又受底物以外其他代谢物分子的调节,即调节物之一是底物,调节物之二、之三等则是底物以外的代谢物。

(二)别构酶的动力学及别构酶对酶反应速度的调节

一般地说,大部分的别构酶的初速度-底物浓度的关系不符合典型的米氏方程,即不呈一般的 $v-[S]$ 曲线,而多数是S形的 $v-[S]$ 曲线,见图4-46。

这种S形曲线表明酶结合一分子底物(或效应物)后,酶的构象发生了变化,这种新的构象大大地有利于后续分子与酶的结合,大大地促进酶对后续的底物分子(或效应物)的亲合性。这是“正协调性”(positive cooperatively)的一个例子,又称为“协同结合”(cooperative binding)或正同促反应(positive homotropic response)。这种别构酶称为具有正协同效应的别构酶。

别构酶的S形动力学关系,十分有利于对反应速度的调节。为了讨论这个问题,下面将别

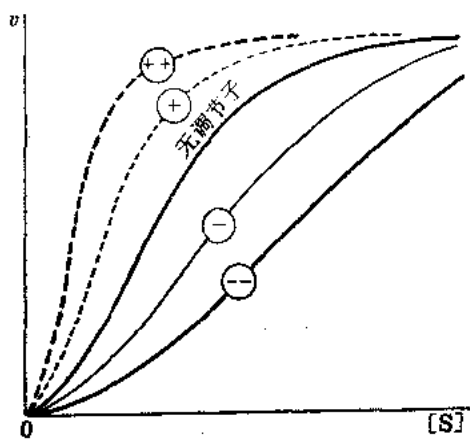


图 4-46 正协同别构酶的动力学曲线

当增加正调节物浓度时,表现 K_m 减小,亲和力增大,协同性减小;当增加负调节物浓度时,表现 K_m 增加,亲和力减小,协同性增大(对底物浓度的反应灵敏度增大)。此处“表现 K_m 值”也表示 $\frac{1}{2} V_{max}$ 时的底物浓度,但是不能用来计算别构酶的初速度,因为 $v-[S]$ 关系不是米氏方程中的关系。

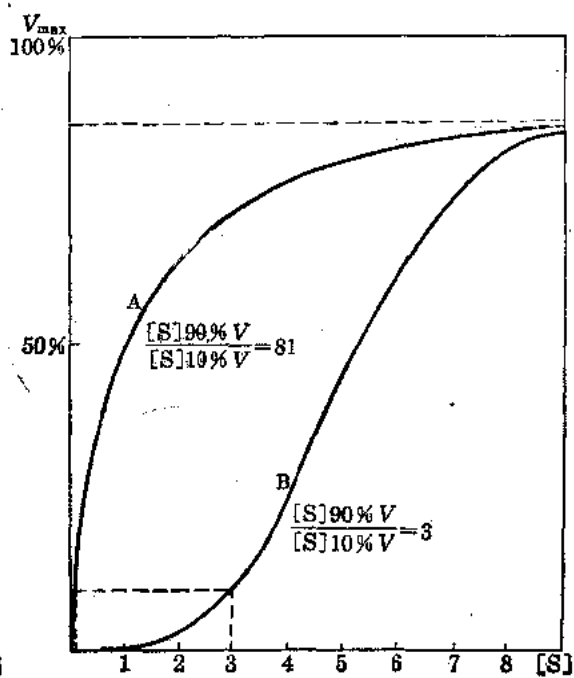


图 4-47 底物浓度对两种催化反应速度的影响
(A 为非调节酶的曲线; B 为别构酶的 S 形曲线)

别构酶的 S 形曲线与非调节酶的曲线合并于图 4-47 中,进行比较。从图 4-47 可以看出,在非调节酶曲线中(图 4-47 中 A),当 $[S]=0.11$ 时, v 达到 V_{max} 的 10%,当 $[S]=9$ 时, v 达到 V_{max} 的 90%,达到这两种速度的底物浓度之比为 81;而在 S 形曲线中(图 4-47 中 B),达到同样两种速度的底物浓度比仅为 3。这表明当底物浓度略有变化时,如上升 3 倍,别构酶的酶反应速度可以从 $10\% V_{max}$ 突然上升到 $90\% V_{max}$,而在典型的米氏类型的酶中,速度若发生这么大的变化,则必然要求底物浓度有大得多的改变——上升 81 倍才行。这就说明对于别构酶来说,底物浓度变化所引起的速度变化的反应几乎是“全”或“无”的,象电闸开关那样,而不是像在非调节酶那样,速度随着底物浓度的增或减而慢慢地起变化。因此,在中等速度或较低的底物浓度下,这种底物浓度在完整细胞中一般是存在的,这种 S 形的反应体现为当底物浓度发生较小变化时,别构酶可以极大程度地控制着反应速度,这就是别构酶可以灵敏地调节酶反应速度的原因所在。由于以上这种正协同效应,底物浓度对酶反应速度的影响极大。换言之,就是由于正协同效应,使得酶的反应速度对底物浓度的变化极为敏感。

另有一类具有负协同效应的酶,这类酶的动力学曲线在表观上与双曲线有些相似,见图 4-48 中的 3,但仔细分析却是不同的。在这种曲线中,在底物浓度较低的范围内(图 4-48 O—A)酶活力上升很快,但继续下去,(图 4-48 A—B),底物浓度虽有较大的提高,但反应速度升高却较小。也就是说负协同效应可以使酶的反应速度对外界环境中底物浓度的变化不敏感。

虽然大多数别构酶都表现出以上两种曲线,特别是大分别构酶都表现出 S 形的 $v-[S]$

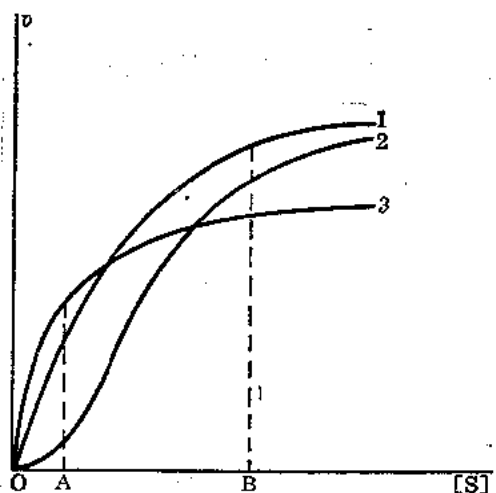


图 4-48 正、负协同别构酶与非调节酶的动力学曲线比较

曲线,但是,有一些没有别构效应而有其他比较复杂机理的酶也会产生以上图形。因此,作图法仅能提供一些线索,指出酶可能属于哪一种类型,但不能完全作为判定别构酶的依据。

对于某些酶的均一的制剂可以用加热、化学试剂或其他方式处理。经处理后,酶若仍保持其催化活力,但失去其调节性质(有人称这种现象为“脱敏作用”),则这种类型的酶很可能就是别构酶。用这种方法来判断别构酶是有一定的价值的。

Koshland 等人建议,用以下比例式定量地判断与区分三类酶:

$$R_s = \frac{\text{酶与底物(或配基)结合达 } 90\% \text{ 饱和度时的底物(或配基)浓度}}{\text{酶与底物(或配基)结合达 } 10\% \text{ 饱和度时的底物(或配基)浓度}}$$

典型的米氏类型的酶 $R_s = 81$

具有正协同效应的别构酶 $R_s < 81$ (只有同促效应;或兼有同促-异促效应)

具有负协同效应的别构酶 $R_s > 81$

国际上更常常使用 Hill 系数来判断酶属于哪一种类型。Hill 在研究血红蛋白与氧结合的关系时,用被氧饱和的百分比 \bar{Y}_s 对氧分压 S 作图,发现也具有 S 形曲线,并得出下列经验公式:

$$\bar{Y}_s = [S]^n / K + [S]^n$$

此式经过换算后可改写成:

$$\lg \frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s} = n \lg [S] - \lg K$$

K 为平衡常数,“酶”中可用 K_s 代替 K 。

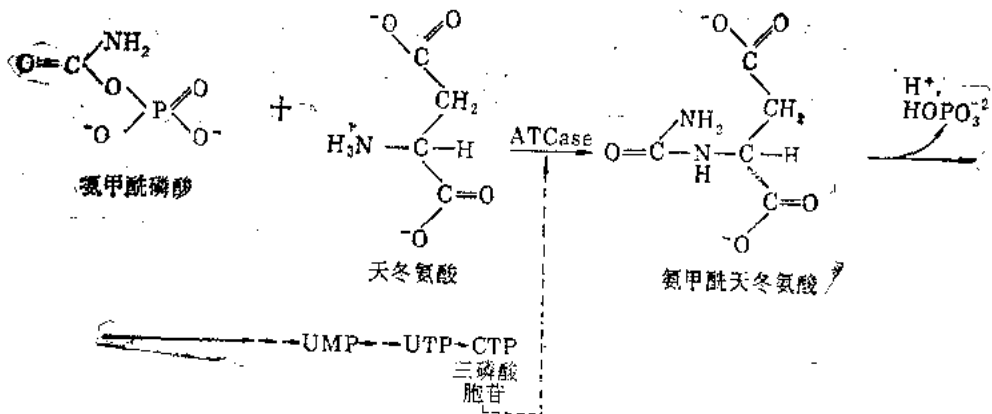
以 $\lg \frac{\bar{Y}_s}{1 - \bar{Y}_s}$ 对 $\lg [S]$ 作图(Hill 作图法作图),可得一条直线,该直线的斜率 n 称为 Hill 系数。将此作图法应用于酶学研究中,可以看到:在一般情况下 Michaelis-Menten 型酶的 Hill 系数等于 1,具有正协同效应的酶的 Hill 系数总是大于 1,而具有负协同效应的酶的 Hill 系数则小于 1。因此,Hill 系数可以作为判断协同效应的一个指标。

(三)别构酶举例

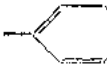
本节重点介绍最为人们所了解的别构酶:大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰酶,简称 ATCase (aspartate transcarbamoylase, 系统命名是 aspartate carbamoyltransferase) 及 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)。

ATCase 是嘧啶核苷酸生物合成-合成 CTP-多酶体系反应序列中的第一个酶。其正常底物为天冬氨酸及氨甲酰磷酸。它受 CTP 的反馈抑制,CTP 是它的负调节物,它的正调节物是

ATP。它可作为一类别构酶的代表,但不能作为所有别构酶的典型代表。它所催化的反应如下:

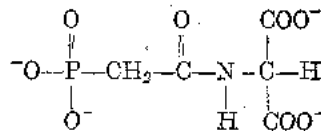


氨甲酰磷酸及天冬氨酸在反应速度与底物浓度的关系上都是协同的。协同作用使反应底物浓度只在一个很窄的范围内开启氨甲酰天冬氨酸的合成。CTP在不影响酶的 V_{max} 的情况下通过降低酶与底物的亲合性来抑制 ATCase。抑制程度可能达到 90%，具体情况视底物浓度而定。ATP 则相反，它增强酶与底物的亲合性，也不影响其 V_{max} 。这种调节的生物学意义是：ATP 作为信号表明有能量供 DNA 复制使用并引发需求嘧啶核苷酸的生物合成；CTP 则保证在嘧啶核苷酸已丰足时，不再进行不必要的氨甲酰天冬氨酸及其他后续中间物的合成。

天然的 ATCase 沉降常数为 11.6S，分子量为 31 000，用对羟基汞-苯甲酸 HO—Hg⁺——COO⁻ 处理，酶解离，借所负电荷的显著不同或大小不同，可通过离子交换柱层析法或蔗糖梯度超离心法将解离了的酶分离，得到十二条肽链：六条为形成催化亚基的催化链 C，5.8S，分子量为 34 000。六条为形成调节亚基的调节链 R，2.8S，分子量为 17 000，每个 R 链结合一个 Zn²⁺。分离后，加入过量的巯基乙醇，可以除去上述汞化物，恢复亚基的调节功能。

C 亚基 (catalytic subunit) 可与底物作用，有活性中心，但活性中心对调节物分子 CTP 及 ATP 没有反应；R 亚基 (Regulatory subunit) 上有可以结合 CTP 及 ATP 的别构中心，但却无催化活性。因此结合底物与结合调节物的中心分布在不同的亚基上。将两类亚基混合，迅速地形成与天然酶结构相同的复合物。这个重新组构的酶与天然酶具有基本相同的性质。

William Lipscomb 等人于 1985 年通过分辨率为 0.26nm 的 X 晶体衍射研究，阐明了 ATCase 的三维结构，也解决了底物类似物 PALA，即 N-(磷乙酰)-L-天冬氨酸与 ATCase 所形成的复合物的结构。PALA 的分子式如下：



ATCase 的三维结构 (见图 4-49) 是很独特的。一个催化三聚体 (C₃) 在上，另一个催化三聚体 (C₃) 在下，其间为三个调节二聚体亚基 (R₂)，它们以一上一下的排列像腰带般地夹绕在两个 C₃ 中间。ATCase 具有一个很大的中央空腔。球状的紧密排列的 ATCase 的直径为 13.0nm，是血红蛋白直径的两倍。

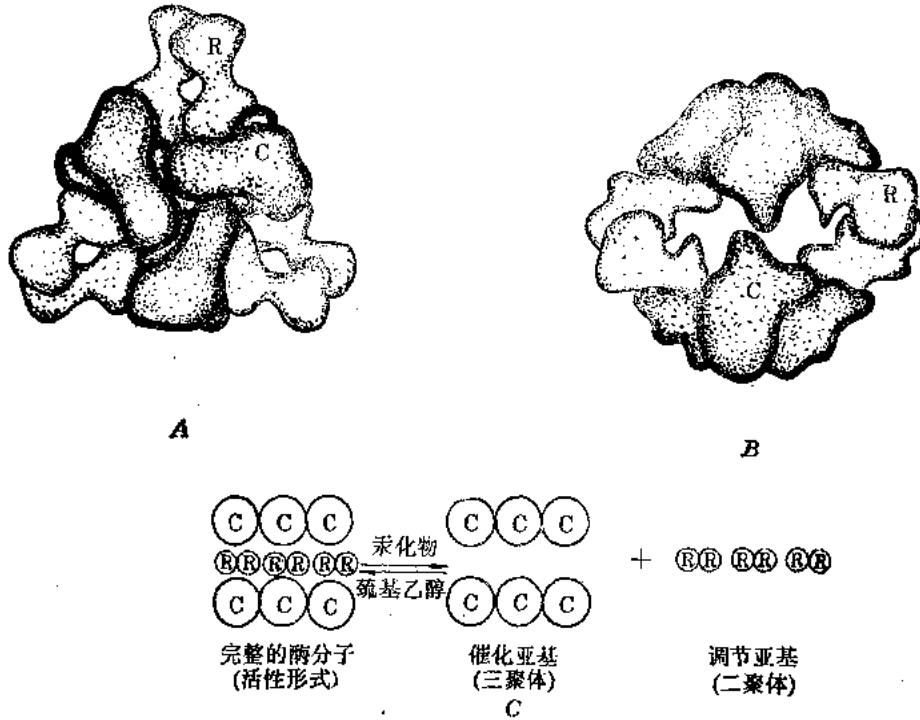
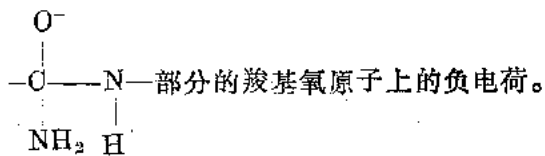


图 4-49 *E. coli* 的 ATCase 中亚基的排列及全酶与亚基的关系
 A. ATCase 的顶面观 B. ATCase 的前面观 C. ATCase 与亚基的关系
 O 代表催化肽链 R 代表调节肽链

如果把把这个球状体小心地横剖，得到两个半酶分子(C_3R_3)。半酶分子由三个相同的 OR 部分分别以 120° 的方位分布而组成，C 链在内，R 链在外，见图 4-50。R 链又可分为两个结构域(Domain)——接近 C 链的结构域小一些，远离 C 链的结构域大一些。 Zn^{2+} 离子在 R 链的近端结构域中，通过协调 4 个半胱氨酸残基中的 S 原子而稳定酶的结构；别构中心在 R 链的远端结构域中；6 个活性中心则都处在催化链与催化链之间的表面上，由分属于相邻的两个 C 链的氨基酸残基组成。PALA 类似于底物氨甲酰磷酸及天冬氨酸，抑制酶活性，可以把它看作是一个二底物的复合物或过渡态分子，见图 4-51。它牢固地结合在 ATCase 上，解离常数为 10 nmol/L ，但不进行反应。1986 年证明 PALA 在 ATCase 的研究中起着难以估量的重要作用，通过它已查找出形成活性中心的各个氨基酸残基并弄清楚结合底物后酶的三级及四级结构发生的变化。因为 PALA 带有很强的负电荷，所以它静电结合到活性中心内的精氨酸及赖氨酸上。PALA 也通过许多氢键与酶结合。组₁₃₄ 的咪唑侧链的氢键连到 PALA 的羧基氧原子上也是值得注意的。由此推想，活性中心的组₁₃₄ 可以提供质子以稳定过渡态分子中



现在已经证明，ATCase 中的两种亚基各有两种状态。调节亚基 RR 结合 ATP 后由抑制构象状态($\boxed{R|R}$)转变为非抑制构象状态($\textcircled{R}\textcircled{R}$)。然后，可能这种构象的转变再传达给邻近

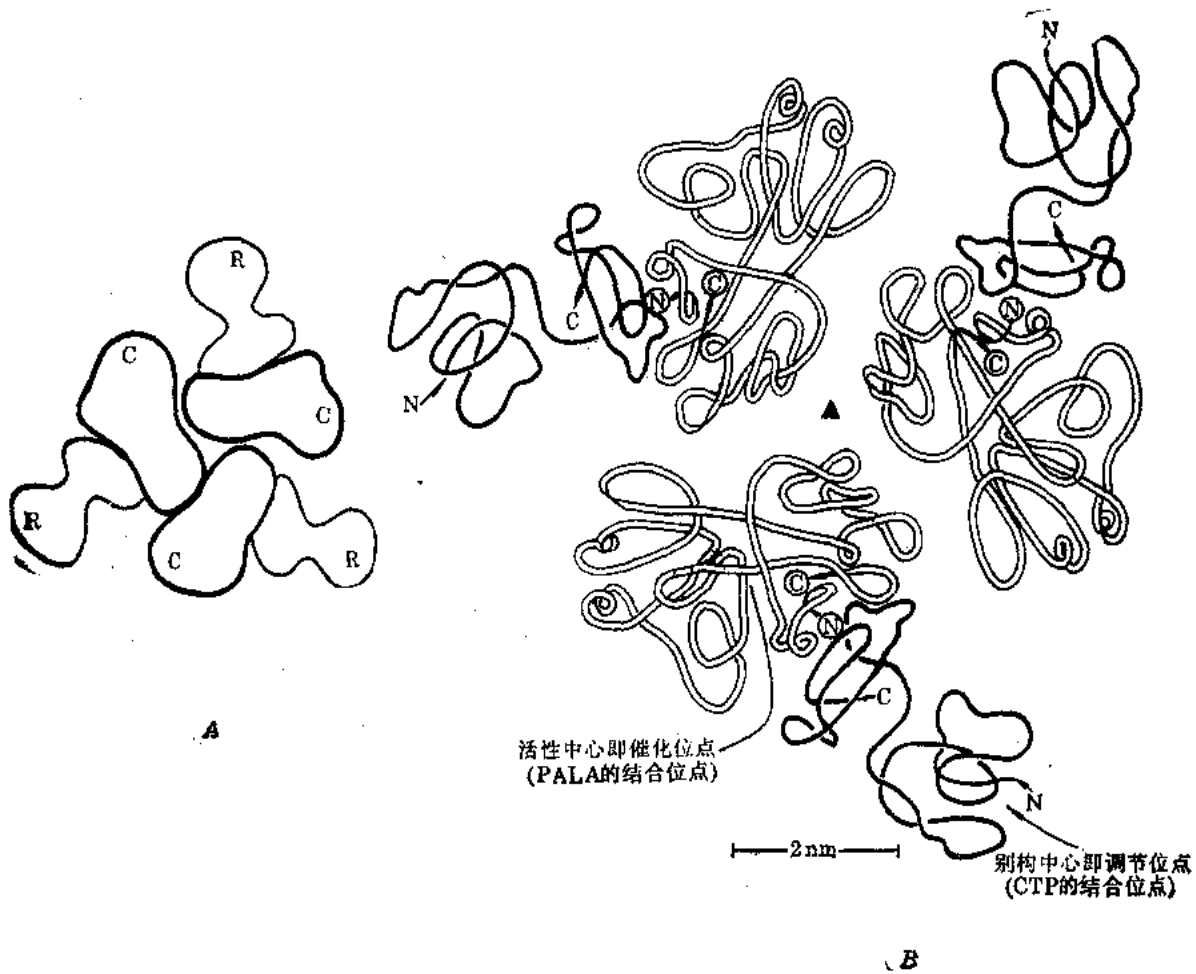


图 4-50 ATCase 的半分子(C₃R₃)的结构

A ATCase 横剖示意图 B ATCase 半分子的三维结构——表示活性中心(在催化亚基上)及别构中心(在调节亚基上)。

的催化亚基,使催化亚基由无催化活性的构象 T(即“关”, Tense 态)转变为有催化活性的构象 R(即“开”, Relax 态)。CTP 的抑制效应是上述激活过程的逆转。这种变化过程示意如图 4-52。

超速离心研究指出,ATCase 对底物的结合使得此酶的沉降系数下降 3%。这项结果表明 ATCase 因结合底物而舒展了。用 X-射线晶体衍射法比较了不带配基的游离 ATCase 及 PALA-ATCase 的复合物,测出在结合了 PALA 这个二底物的复合物后,酶的四级结构发生重大变化:两个催化亚基三聚体(C₃)移开 1.2 nm,扭转 10°;每个调节亚基二聚体(R₂)转动 15°。见图 5-53,酶由 T 型→R 型。不仅全酶的构象发生改变,而且每一条催化链的四级结构在结合了 PALA 后也发生着很有意义的变化:几个泡(loop)改变位置,赖氨酸残基(赖₆₄)及丝氨酸残基(丝₃₀)移动,落到由相邻的催化链所形成的各个活性中心里。这样,通过上述别构过渡作用,在每个催化链中都形成了很理想的活性中心。在此别构过渡转变过程中,C₃ 三聚体中的催化链被引导得更加相互接近,并使它们都能形成很好的活性中心。

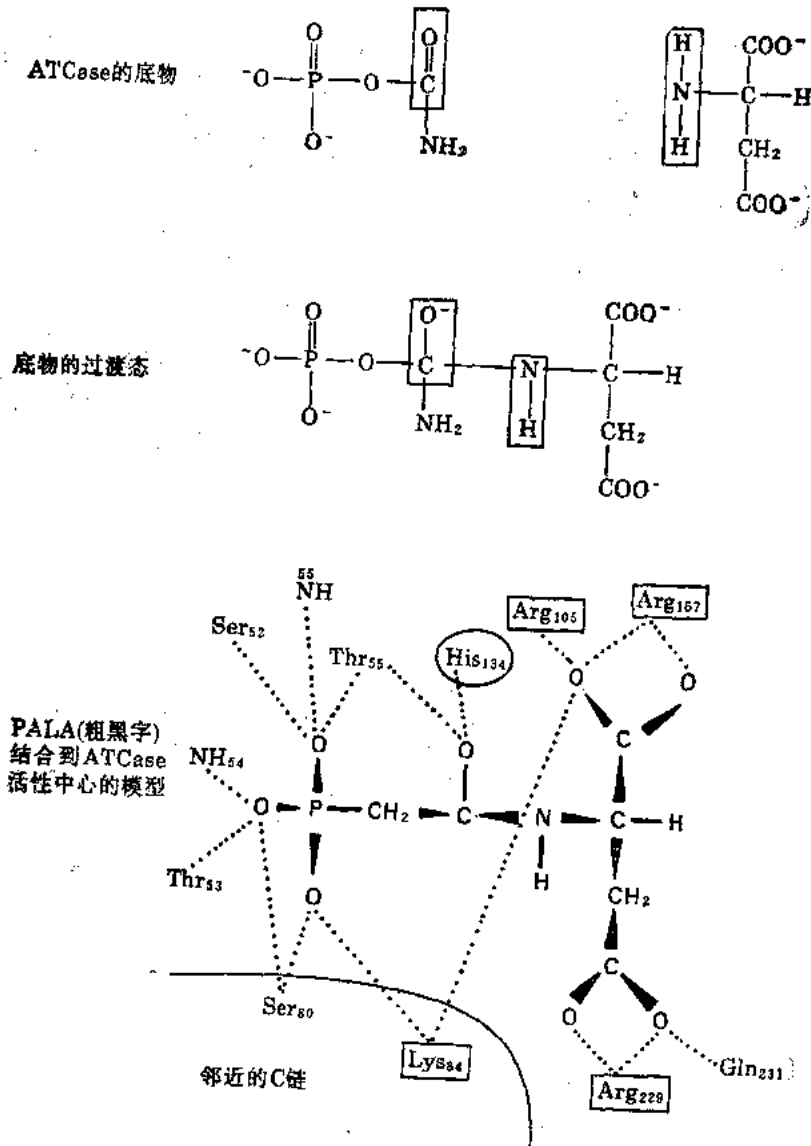


图 4-51 ATCase 的底物 ATCase 的底物过渡态与 PALA 的结构

ATCase 是一个既有同促效应又有异促效应的别构酶。当 CTP 尚未产生, 只有天冬氨酸结合到催化亚基的活性中心时, 即反应刚开始时, 就有同促效应。此时一个分子的天冬氨酸结合到活性中心, 就增加其他亚基对底物的亲和力, 因此大大地增大了反应速度, 表现出 S 形特征。这种同促过渡作用 (Homotropic transition) 属于完全地齐变类型, 与氧对血红蛋白的作用一样, 符合 MWC 模型 (见后)。前面提到过 ATCase 用汞化物处理后可将两类亚基分开, 在分离调节亚基后, 剩下的催化亚基仍有催化活性, 但是只呈现典型的米氏催化曲线特征, 而不显示 S 形动力学曲线。但是, 一旦反应生成 CTP, 就有了天冬氨酸及 CTP 两种分子, 这

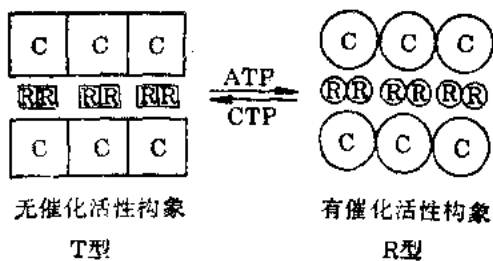


图 4-52 ATCase 的构象转变

图 4-52 ATCase 的构象转变

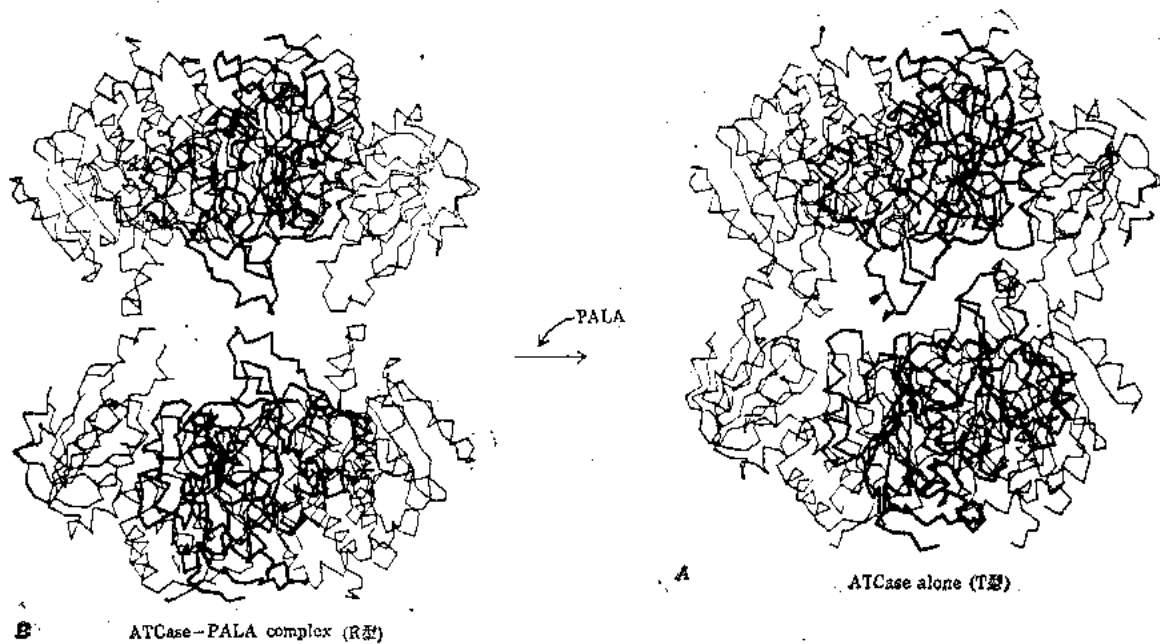


图 4-53 ATCase 催化链的别构过渡作用

A. ATCase 单独存在 B. ATCase-PALA 复合物 (为清晰起见, 图中已将调节链略去)

时就产生出异促效应。究竟在一定阶段时 ATCase 倾向于同促效应还是异促效应, 则是由酶的不同的别构过渡态所决定并进行调解的。在底物天冬氨酸过多, 而又要保持反应速度不变, 以避免 CTP 积累过多时, 便发生 CTP 的反馈抑制作用, 在这种作用开始后调节亚基与催化亚基便发生上述构象变化, 图 4-54 显示了 ATCase 经“协调构象改变”受正调节物 ATP 及负调节物 CTP 调节的 S 形动力学过程。

人们进一步了解到 ATCase 的别构效应是在相当大的立体空间范围内起着调节酶活性的作用的。在同一个 C_3 中, 各个亚基上的活性中心与中心轴都相距 2.2 nm; 分布在各个调节亚基上的别构中心则都处于远端的球形囊腔之中, 各自与最近的一个活性中心相距达 6.0 nm 之遥。因此, CTP 反馈抑制对底物的协同结合的调节必须通过一个很大的空间范围的相互作用才有可能实现。事实上, 信息是经过很长的距离, 从一个 C_3 中的各活性中心传递到另一个 C_3 的活性中心的。在这个长距离的传递过程中, 通过肽链之间的各个表面的相互作用, 就在如此大的空间范围内发生着别构相互作用。所以, 也像血红蛋白一样, 在 ATCase 的别构调节效应中, 此酶的各个不同肽链之间的表面起着严格的“分子开关”的作用。

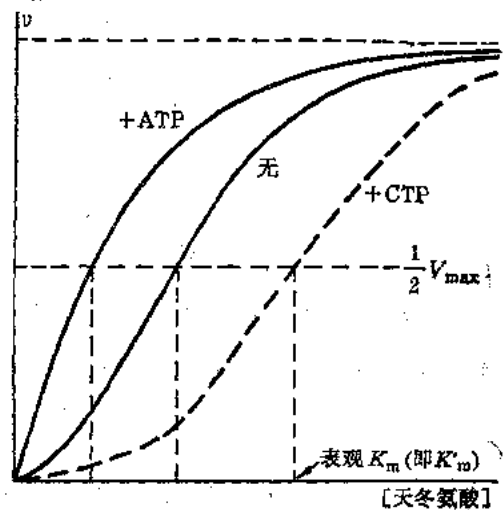
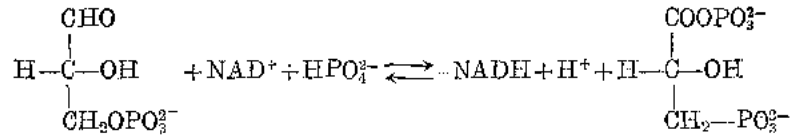


图 4-54 ATCase 动力学曲线

ATCase 和其他的别构酶还有一个重要的性质, 那就是别构调节方式是有种属特异性的。

大肠杆菌和某些细菌的 ATCase 受 CTP 的强烈抑制, 并受 ATP 激活, 但是某些动物组织中相应的 ATCase 却不受这些核苷酸影响。来源于不同种属生物的同一种别构酶可能是受着极不相同的别构调节物的作用。

3-磷酸甘油醛脱氢酶则是另一类具有负协同效应的别构酶的代表, 它催化下列反应,



此酶具有四个亚基, 可以和四个 NAD^+ 结合, 但结合常数不同, 它结合 NAD^+ 后的解离常数见表 4-16, 酶结合 NAD^+ 后, 发生构象变化。 NAD^+ 和酶结合的解离常数很小, 因此, 虽然底物 NAD^+ 浓度很低, 也能顺利地酶结合, 但是当 NAD^+ 浓度升高时, 酶结合了两个 NAD^+ 后, 再要结合第三、第四个 NAD^+ 就不那么容易。除非 NAD^+ 的浓度高出两个数量级, 才会有进一步地结合。也就是说这时候再要提高酶反应速度是较难的, 需要浓度大大提高才行。在一定的底物浓度范围内, 底物浓度的变化不足以影响酶反应速度。这就是负协同别构酶对底物浓度变化的不敏感性。

表 4-16 3-磷酸甘油醛脱氢酶与 NAD^+ 结合的解离常数表(单位 mol/L)

解离常数	兔		乳	
	平衡透析测定	超离心测定	超离心测定	平衡透析测定
K_1	$<5 \times 10^{-9}$	$<5 \times 10^{-8}$	$<5 \times 10^{-8}$	$<10^{-10}$
K_2	$<5 \times 10^{-9}$	$<5 \times 10^{-8}$	$<5 \times 10^{-8}$	$<10^{-9}$
K_3	6×10^{-7}	4×10^{-6}	4×10^{-6}	3×10^{-7}
K_4	13×10^{-6}	35×10^{-5}	35×10^{-5}	26×10^{-6}

在有机体中有许多需要 NAD^+ 的代谢途径, 其中酵解过程特别重要, 在供氧不足的情况下, 它仍以一定的速度稳定地进行反应。因为 3-磷酸甘油醛脱氢酶为此过程的负协同别构酶, 对底物(NAD^+)浓度变化不敏感, 所以当 NAD^+ 浓度很低(缺氧情况下), 其他需要 NAD^+ 的代谢反应都随之减缓时, 酵解过程仍然能以一定的速度顺利地进行。由此可以看到负协同效应别构酶的重要生理功能。

(四) 别构酶调节酶活性的机理

前面讨论了别构酶的性质、结构与动力学特点, 特别是指出了催化的活性中心与调节的别构中心是分开的, 甚至可以分属于两个亚基。在此基础上, 进一步需要探讨的是别构中心上的调节物是怎样具体地调节别构酶的催化活性的? ATCase 的结构研究指出, 底物类似物 PALA 结合到酶的特定部位后, 引起酶分子三维结构改变。由此推论, 回答前述问题可能有几种答案, 但它们的共同要点都是通过引起酶分子的三维结构变化而改变酶的活性。现在所面临急待解决的问题是: 调节物分子(如 ATCase 的 ATP 及 CTP)是怎样使得酶的四级结构发生巨大变化的? 换言之, 催化活性是怎样地因四级结构的变化而改变的? 目前这方面的结构研究正

在进行之中。

别构酶的 S 形动力学曲线是一种复杂的动力学曲线,为了解释 S 形曲线,至今已提出了多种假说,并且设计了多种酶分子模型,其中最重要的有两种,都是以别构酶为寡聚酶的事实为根据,又受到血红蛋白接受氧的机理——也有 S 形相互关系——的启发而提出的。

1. 序变模型(Sequential or progressive interaction model 也称 KNF 模型, Koshland-Nemethy and Filmer model)这种假说主张酶分子中的亚基结合小分子物质(底物或调节物)后,亚基构象逐个地依次变化,因此亚基有各种可能的构象状态,见下面的模式图(图 4-55)。

图 4-55 表示了一个有 4 个亚基的酶分子模型,其中“R”型为“开”形构象,它有利于结合底物或调节物,“T”型为“关”形构象,它不利于结合底物或调节物。当底物(或正调节物)浓度上升,升到可以与其中的一个亚基牢固地结合时,这时剩下的亚基就会按次序迅速地改变构象,形成一个有活性的 4 聚体,给出 S 形动力学曲线。

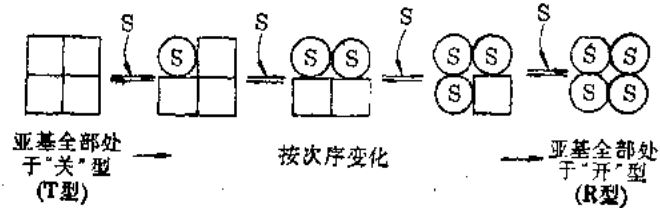


图 4-55 别构酶序变模型变化图

在序变模型中,既可有正调节物分子的作用,又可有负调节物分子的作用。第二种分子与酶的结合与第一种分子(底物)的结合相比,可能更紧密些,也可能更松散些,这取决于第一种分子结合所引起的形变。

由于这个序变模型可以表示酶分子的许多中间构象状态,因此用来解释别构酶的酶活性调节作用比下面介绍的齐变模型更好一些,适用于大多数别构酶。特别是在描述异促效应时,一般认为用序变模型更好一些。

2. 齐变模型或对称模型(Concerted or Symmetry model 也称 MWC 模型, monod-Wyman-Changeux model)这种模型主张别构酶的所有亚基,或者全部呈坚固紧密的、不利于结合底物的“T”状态,或者全都是松散的、有利于结合底物的“R”状态。这两种状态间的转变对于每个亚基都是同时、齐步发生的。“T”状态中亚基的排列是对称的,变成“R”状态后亚基的排列仍然是对称的,见图 4-56。

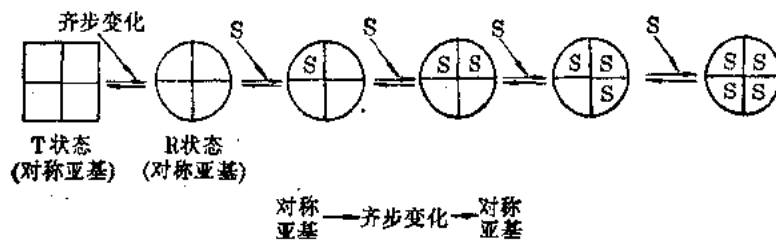


图 4-56 别构酶齐变模型变化图

正调节物(如底物)与负调节物浓度的比例决定别构酶究竟处于哪一种状态。当无小分子调节物存在时,平衡趋向于“T”状态,当有少量底物时,平衡即向“R”状态移动,当构象已转为“R”状态后,又进一步大大地增强对底物的亲合性,给出 S 形动力学曲线。

这个模型可以很容易地解释正负调节物的作用；可以假定“R”状态有利于与正调节物结合；“T”状态有利于与负调节物作用。在齐变模型中，同促效应必然是有正的(协同的)效果，而异促效应则可能有正的、也可能有负的效果。例如 ATCase 结合 N-氨甲酰磷酸和天冬氨酸是同促效应；CTP 的抑制作用是负异促效应，ATP 的激活作用，是正异促效应。血红蛋白的情况则为：协同结合氧是同促效应；H₂、CO₂、二磷酸甘油酸(DPG)降低对氧的亲合性，是负异促效应。

目前认为齐变模型不适用于负协同反应。

还有许多的别构酶有更为复杂的调节过程，为了说明各种别构酶的特殊调节作用及动力学，还提出了其他一些模型。

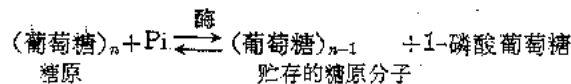
有人认为不能用一种模型去解释所有别构酶的行为，从现有的实验数据来看，很可能某些别构酶的行为符合于序变模型，而另一些酶的行为符合于齐变模型，有的酶则在这种条件下其行为符合齐变模型，而在另一种条件下又符合序变模型，它们有着不同的调节机理，也有人认为可以期望将来有可能只用一种模型来解释。关于这些，由于研究工作所提供的实验数据还不丰富，尚不能作出结论。但不管构象变化及调节机理如何，可以肯定的是许多别构酶所表现的 S 形动力学性质在细胞代谢中可能有十分重要的意义：在十分狭窄的底物或调节物浓度范围内严格地控制酶的活力。

二、共价调节酶(covalent regulatory enzyme)

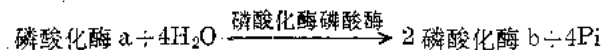
(一)共价调节酶的两个特点

还有一类调节酶，它们可由于其他的酶对其结构进行共价修饰，而使其在活性形式与非活性形式之间相互转变。

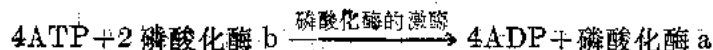
这类酶的最典型的例子是动物组织的糖原磷酸化酶，它催化组织中储存的多聚葡萄糖分解产生 1-磷酸葡萄糖：



这个酶有两种形式：活性较高的形式——磷酸化酶 a(phosphorylase a)；活性较低的形式——磷酸化酶 b(phosphorylase b)。磷酸化酶 a 是一个具有四个亚基的寡聚酶，其中的每一个亚基含有一个其羟基被磷酸化了的丝氨酸残基。亚基上的这些磷酸基是酶表现催化活性所必需的，它们可以被磷酸化酶的磷酸酶水解而除去，见图 4-57 及以下反应：



磷酸化酶 a 上的磷酸基被酶水解除去，于是磷酸化酶 a 解离成两个低活性的半分子——磷酸化酶 b。而这种相对地说无活性的磷酸化酶 b 又可以在磷酸化酶激酶的作用下重新“复活”成有活性的磷酸化酶 a。磷酸化酶的激酶催化磷酸化酶 b 的丝氨酸残基接受 ATP 给出的磷酸基：



因此,糖原磷酸化酶的活性形式及非活性形式间的平衡,使磷酸基共价地结合到酶上或从酶上脱下,从而控制调节磷酸化酶的活性。

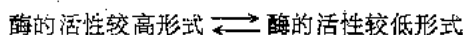
糖原磷酸化酶及其他受共价修饰调节的调节酶还有第二个显著的特点,那就是它们可以将化学信号极大地放大,即一个酶分子可以在一定时间内催化形成几千个分子产物。例如一分子磷酸化酶的激酶可以催化几千个无活性的磷酸化酶 b 分子变为有活性的磷酸化酶 a,从而催化糖原形成几千个分子的 1-磷酸葡萄糖,这样磷酸化酶的激酶与磷酸化酶就形成了具有两步的级联放大(amplification cascade)。实际上这两个酶是肾上腺素激素分子化学信号造成组织中糖原急剧分解的一个更长的级联放大中的一部分。

(二)共价调节酶的两种类别。

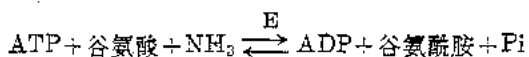
共价调节酶有两种很不相同的类型。

第一种类型是磷酸化酶及其他的一些酶,它们受 ATP 转来的磷酸基的共价修饰,或脱下磷酸基,来调节酶活性:酶的无活性形式 \rightleftharpoons 酶的有活性形式(在(一)中已介绍)。

第二种类型是大肠杆菌谷氨酰胺合成酶及其他的一些酶,它们受 ATP 转来的腺苷酰基的共价修饰,或酶促脱腺苷酰基,而调节酶活性:



谷氨酰胺合成酶催化下列反应:



它有 12 个亚基,腺苷酰基从 ATP 掉下后连接到每一个亚基的专一性酪氨酸残基上,产生低活性形式的酪氨酸酰基的腺苷酰衍生物。

三、酶原的激活

下面以消化系统中的胰凝乳蛋白酶原等为例讨论酶原的激活。

(一)胰凝乳蛋白酶原(chymotrypsinogen)的激活

胰凝乳蛋白酶原是由 245 个氨基酸残基组成的,具有 5 对二硫键的单肽链蛋白质,当它受到胰蛋白酶作用后,Arg₁₅ 与 Ile₁₆ 间的肽链断开,才具有酶活性,这种酶称为 π -胰凝乳蛋白酶, π -胰凝乳蛋白酶活性最高,但不稳定。它再作用于其他的 π -胰凝乳蛋白酶分子上,使另一分子 π -胰凝乳蛋白酶失去两个二肽(Ser₁₄-Arg₁₅ 及 Thr₁₄₇-Asn₁₄₈),而形成酶的稳定形式: α -胰凝乳蛋白酶,A、B 两链及 B、C 两链间各通过一对大的二硫键相连,其活性只有 π -胰凝乳蛋白酶的 2/5,见图 4-58。酶活性中心的氨基酸残基来自 B、C 二链,见图 4-59。

胰凝乳蛋白酶原受胰蛋白酶作用后,Arg₁₅-Ile₁₆ 间的肽键被打断,形成了新的 Ile₁₆ 末端,

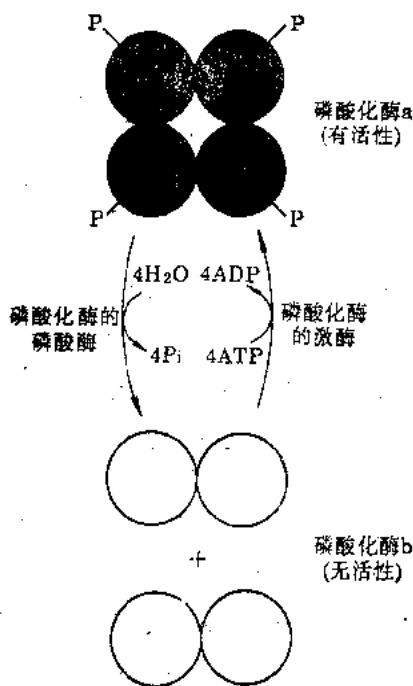


图 4-57 磷酸化酶的两种类型的互变过程

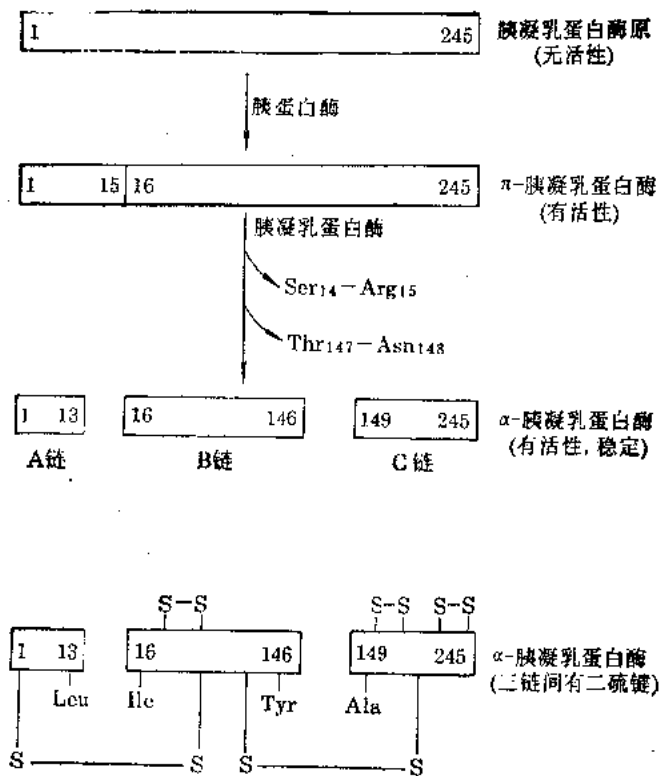


图 4-58 胰凝乳蛋白酶原的激活

这个新末端的氨基再与酶分子内部的 Asp₁₉₄ 发生静电作用, 见图 4-60, (这对于胰凝乳蛋白酶原的活化是十分重要的)。从而触发一系列的构象变化: Met₁₉₂ 从酶分子的深层移动到酶分子的表面, 第 187 及第 193 残基更加舒展等, 这些改变的总结果是造成一个口袋——允许带芳香族的底物(如酪氨酸、色氨酸及苯丙氨酸)或带一个较大的非极性脂肪族链的底物(如蛋氨酸)进入专一性部位。显然, 这样的口袋, 在酶原中是不存在的。

(二) 消化系统其他蛋白水解酶原的激活

哺乳动物消化系统中的几种蛋白酶都是先以无活性的酶原形式分泌出来, 然后才被激活的。这具有保护消化道本身的意义。

胃蛋白酶原(pepsinogen)由胃壁细胞分泌出来; 分子量为 38.9kd, 由 392 个氨基酸残基组成。在胃酸 H⁺ 作用下, 低于 pH5 时, 酶原自动激活, 失去 44 个氨基酸残基——碱性的前体片段后, 转变为高度酸性的、分子量为 34.6kd 的、有活性的胃蛋白酶。酶的活性中心区域早已存在于胃蛋白酶原中, 但是因为前体片段中的 6 个赖氨酸和精氨酸残基的侧链与胃蛋白酶分子中谷氨酸和天冬氨酸残基的羧基侧链之间形成盐桥, 尤其是前体中的一个赖氨酸侧链与活性中心内的一对天冬氨酸: Asp₂₁₅ 和 Asp₃₂₃ 之间的静电相互作用, 使得前体片段中的碱性氨基酸将活性中心堵塞, 所以酶原不表现催化活性。H⁺ 激活产生的胃蛋白酶还可以进一步再去激活其他的胃蛋白酶原。

羧肽酶原 A(procarboxy peptidase A)的分子量约在 95 000—96 000 之间, 可被胰蛋白酶激活成分子量为 34 000 的羧基肽酶。羧肽酶原的激活作用比胰凝乳蛋白

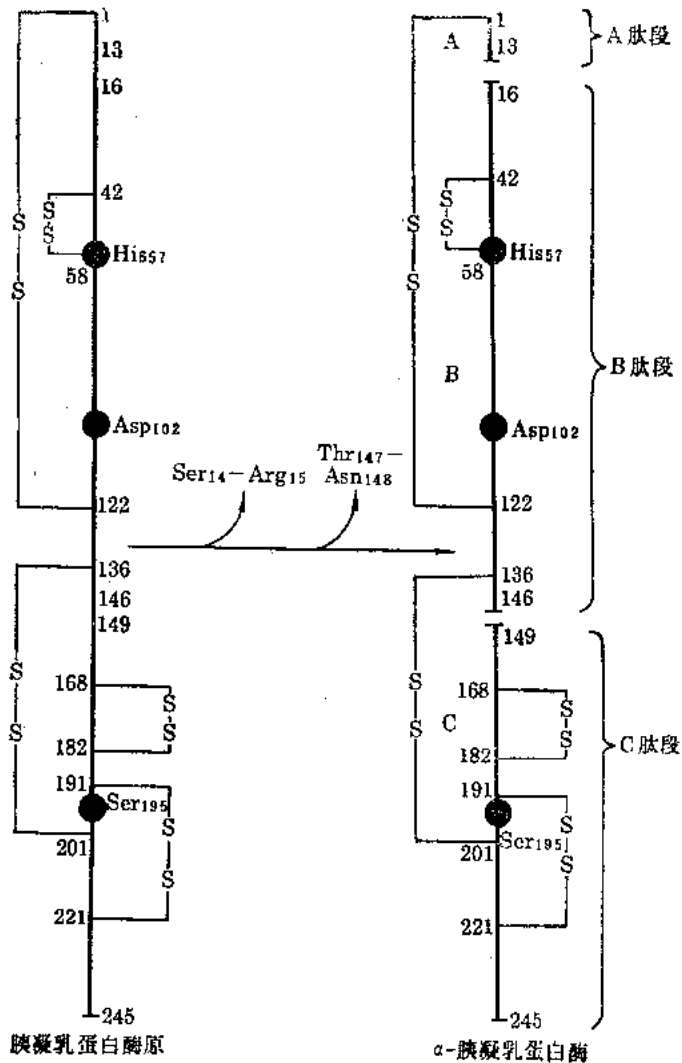


图 4-59 胰凝乳蛋白酶原转变的一级结构示意图

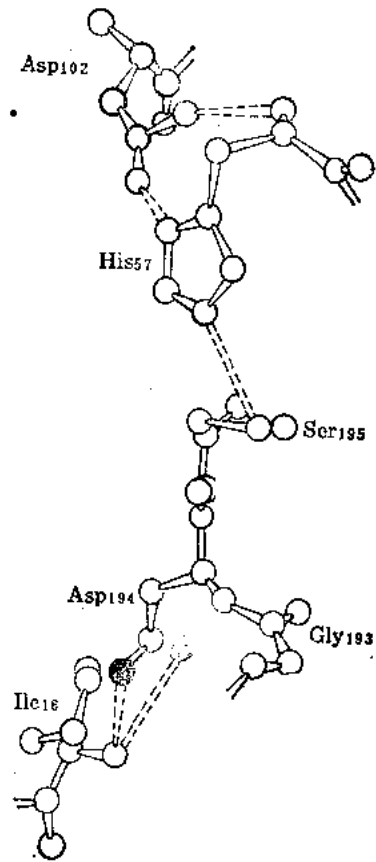


图 4-60 胰凝乳蛋白酶原激活时, Asp₁₀₂ 的羧基与 Ile₁₆ 的氨基发生静电相互作用

酶及胰蛋白酶要复杂得多,现在还不能很肯定地描述它的激活过程。羧肽酶原 A 以亚基聚合体的形式存在,激活时失去将近 60 个氨基酸的肽段。Brown 等提出了一种激活机理,他将激活过程分为两步:第一步,酶原,称为 A-S₅ 中的一个亚基(亚基 I)的肽链被胰蛋白酶切开;第二步,被切开肽链的亚基 I 作为内肽酶,与胰蛋白酶一起,再去切开亚基 II 的肽链,使亚基 II 转变成有活性的羧肽酶 A,见图 4-61。若酶原以三个亚基聚合体存在,称为羧肽酶原 A 的 A-

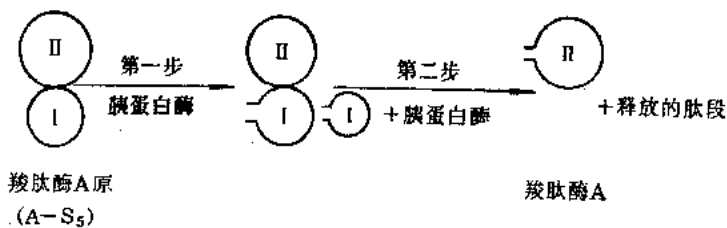


图 4-61 羧肽酶 A 原(A-S₅)激活作用示意图

S₀, 则聚合物中还有一个与亚基 I 相同的亚基 III, 但它的肽链在第一步中不被切断, 在第二步中与切断肽链的亚基 I 一起丢失, 而使亚基 II 变成有活性的羧肽酶 A。

弹性蛋白酶原(proelastase)激活过程也有类似之处, 激活时释放出一个肽段, 新的埋藏在分子内部的 N-末端缬氨酸残基与接近于活性中心丝氨酸残基的天冬氨酸侧链羧基形成一个离子对。

胰蛋白酶原(trypsinogen)进入小肠后, 在有 Ca²⁺ 的环境中受到肠激酶的激活, 赖氨酸-异亮氨酸之间的肽键被打断, 水解失去一个 6 肽(图 4-62), 使构象发生一定变化后, 成为有活性的胰蛋白酶, 酶原分子量为 24 000 左右, 酶的分子量与酶原相近, 活性中心由 His₄₀、Asp₈₄、Ser₁₇₇ 及 Trp₁₉₃ 组成(由于失去 6 肽, 氨基酸的序号依次减少 6)。

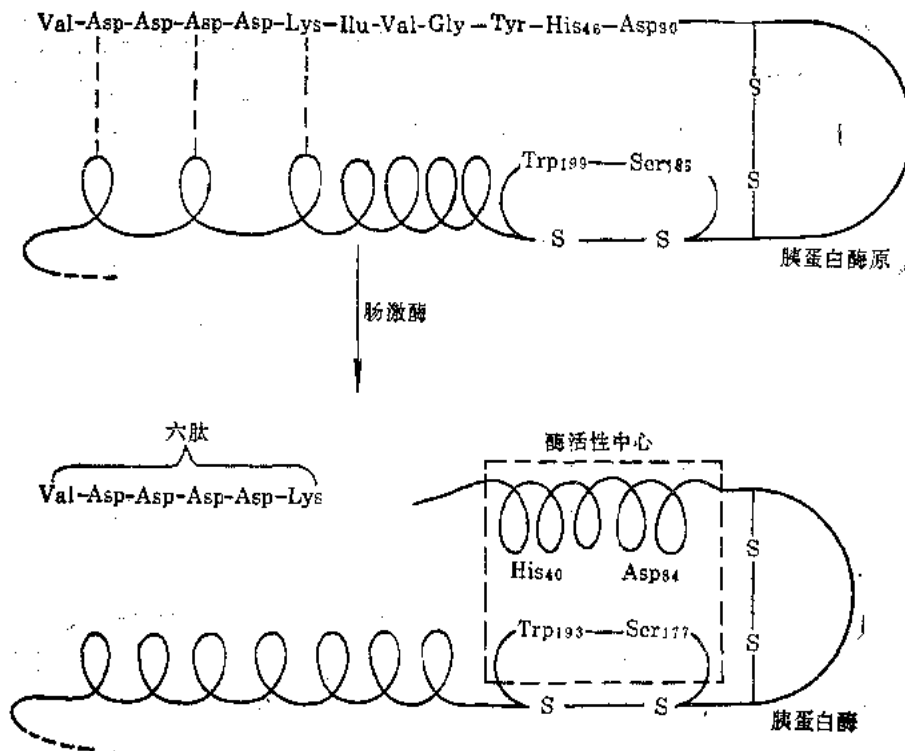


图 4-62 胰蛋白酶原的激活

由于胰蛋白酶只水解赖、精氨酸的羧基形成的肽键、胰凝乳蛋白酶只水解芳香族氨基酸的羧基(或带有大的非极性侧链的氨基酸的羧基)形成的肽键以及弹性蛋白酶只水解丙氨酸羧基形成的肽键, 因此在小肠中消化蛋白质时需要几种蛋白酶同时起作用。胰蛋白酶不仅可以激活胰蛋白酶原, 而且还激活胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶原及羧肽酶原。因此, 被肠激酶激活形成的胰蛋白酶是所有的胰脏蛋白酶原的共同激活剂, 在它的操纵控制下

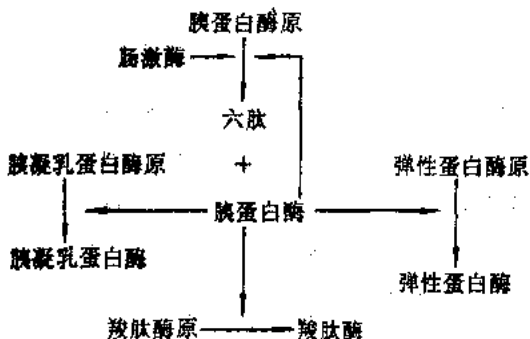


图 4-63 胰蛋白酶对各个胰脏蛋白酶原的激活作用

可以使所有的胰脏蛋白酶同时作用起来。这些酶的相互作用如图 4-63 所示:

第十节 寡聚酶、同工酶及诱导酶

一、寡聚酶

寡聚酶(oligomeric enzymes)的分子量从 35 000 到几百万以上, 它们由两个以上, 甚至 60 或更多个亚基组成。

这类酶中相当一部分是前面已经讨论过的多酶体系中的调节酶, 下面将着重地讨论其他一些寡聚酶的性质以及意义。

(一)寡聚酶的几个类别

除了多酶体系调节酶外, 还有以下几种寡聚酶:

1. 含相同亚基的寡聚酶, 目前人们倾向于支持这种看法: 单体酶(如胃酶、胰蛋白酶等水解酶, 特别是一些蛋白水解酶, 其分子量为 13 000—35 000)是例外的现象, 寡聚酶则是更为普遍的, 以糖酵解为例, 其中每一个酶都不是简单的单体酶蛋白, 而是寡聚酶, 都含有不同数目的亚基。见表 4-17。

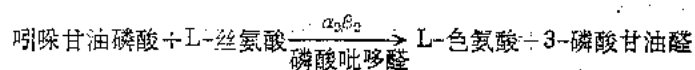
表 4-17 糖酵解过程中各酶的亚基

糖酵解过程中的酶	亚基		酶分子量
	数	目	
磷酸化酶 a	4	92 500	370 000
己糖激酶	4	27 500	102 000
磷酸果糖激酶	2	78 000	190 000
果糖二磷酸酶	2	29 000	130 000
	2	37 000	
肌肉醛缩酶	4	40 000	160 000
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	2	72 000	140 000
烯醇化酶	2	41 000	82 000
乳酸脱氢酶	4	35 000	150 000
丙酮酸激酶	4	57 200	237 000

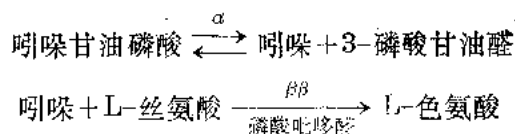
2. 含有不同亚基的寡聚酶又分为几种:

(1) 双功能寡聚酶, 这种酶的最典型例子是大肠杆菌中的色氨酸合成酶。这个酶含有 A 及 B 两种蛋白质。蛋白质 A, 分子量为 29 500, 含有一个亚基 α , 蛋白质 B, 含有两个分子量为 45 000 的亚基 β , 每一个亚基上, 各有一个磷酸吡哆醛结合中心。

当两个 A 蛋白与一个 B 蛋白结合, 形成 $\alpha_2\beta_2$ 联合体时, 就成为完整的色氨酸合成酶, 才具有完全的酶活性, 天然的色氨酸合成酶($\alpha_2\beta_2$)催化如下总反应:



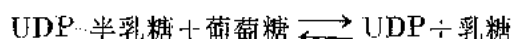
而 α 亚基及 $\beta\beta$ 亚基则各自催化下列分反应:



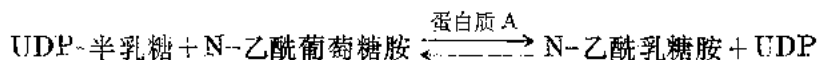
当 α 催化反应(1)后,吲哚并不从 α 亚基上释放出来,只有当 $\beta\beta$ 加入,反应(2)与反应(1)偶联成总反应时,吲哚才从 α 上释放,进一步与 L-丝氨酸结合。

因此,这个酶只有当它的两种功能性亚基以复合物形式存在,联合起作用时,才能完成色氨酸的合成。

(2) 含有专一性的非酶蛋白亚基的寡聚酶,这种寡聚酶的酶蛋白可以分为两部分,酶的专一性只受其中的非酶蛋白质部分影响。例如,乳糖合成酶催化在乳腺中形成乳糖的反应:



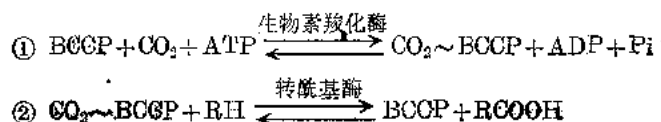
该酶可从生牛奶中分离得到,并很容易解离成蛋白质 A 及蛋白质 B,单是 A 或 B 都不能催化上述反应。然而,其中的 A 却能催化下列反应:



因此,蛋白质 A 又称为催化亚基或半乳糖基转移酶,蛋白质 B 就是乳清蛋白,又称改性亚基,它是一个很特殊的非酶蛋白质。若在 A 所催化的上述反应中加入 B 后, B 与 A 联结,这时 UDP-半乳糖与 N-乙酰葡萄糖胺的反应受到抑制,而与葡萄糖的反应则受到促进,即具有酶活性的蛋白质 A 的底物专一性在非酶的蛋白质 B 影响下,由作用于 N-乙酰葡萄糖胺变为作用于葡萄糖。

蛋白质 A 广泛地存在于动物的各组织中,参与糖蛋白中糖基的合成过程,而蛋白质 B 却仅存在于乳腺中。而且,只在妊娠期开始生成,分娩后大量合成,所以只有在激素作用下乳腺中才能合成乳糖。

(3) 具有底物载体亚基的寡聚酶,在某些酶体系中,亚基作为底物载体而起作用。这种体系可以看作是由具有酶活性的蛋白部分和作为底物载体的蛋白部分组成的寡聚酶。例如,大肠杆菌的乙酰辅酶 A 羧化酶,由三个蛋白质部分组成:两个具有催化活性的蛋白质——生物素羧化酶及转酰基酶,一个具有专一性的生物素羧基载体蛋白亚基(BCCP)。这个载体亚基的分子量为 20 000,它专一性地运载底物 CO_2 。这三部分联结起来催化的反应分两步进行:



(二)寡聚酶中亚基聚合的作用

首先,亚基聚合与酶的专一性有关。因为亚基的聚合可以维持酶的专一性构象,所以当寡聚酶解聚成亚基以后,活性便会丧失。其次,与酶活性中心的形成有关。单体酶的活性中心是由一级结构中相距甚远的几个氨基酸残基组成,而寡聚酶的活性中心则是由聚合在一起的几个亚基上的几个相距甚远的氨基酸残基组成。

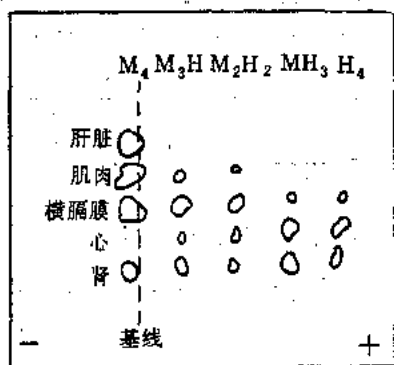


图 4-64 乳酸脱氢酶同工酶的电泳图谱

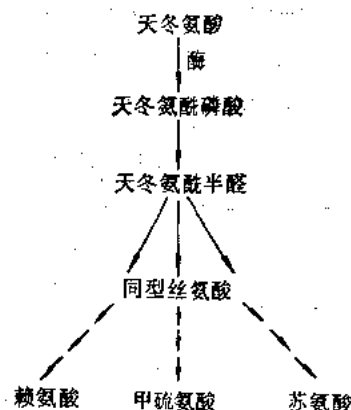


图 4-65 大肠杆菌中天冬氨酸与赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸的前体关系

关于同工酶对代谢调节的重要作用，研究得较清楚的是微生物中的某些同工酶在分枝代谢的调节中所起的重要作用。例如，大肠杆菌中，天冬氨酸是合成苏氨酸，赖氨酸及蛋氨酸的共同前体，反应的主要步骤如图4-65。如果催化第一步反应的酶——天冬氨酸激酶受到任一个最终产物(这三种氨基酸中的任何一种)的反馈抑制，则另两种氨基酸便会合成不足，这显然使微生物的正常生长受到影响。现在已经在大肠杆菌中发现了三种天冬氨酸磷酸激酶的同工酶，其中第一种受赖氨酸的专一性抑制，第二种受苏氨酸的专一性抑制，第三种存在量较小，可能受蛋氨酸的特异抑制，三者协同作用，并与其他调节环节相互配合，便不会因一种产物过剩而影响其他两种产物的生成。因此，同工酶可能是有机体对环境变化或代谢变化的另一种调节方式，即当一种同工酶受到抑制或破坏时，其他的同工酶仍然起作用，从而保证代谢的正常进行。

同工酶分析法在农业上已开始用于优势杂交组合的预测，例如番茄优势杂交组合种子与弱优势杂交组合的种子中的脂酶同工酶是有差异的，从这种差异中可以看出杂种优势。在临床上也已应用同工酶作诊断指标：例如冠心病及冠状动脉血检引起的心肌受损患者血清中LDH(H₄)及LDH₂(MH₂)含量增高，而肝细胞受损患者血清中LDH₅(M₄)增高。当某种组织发生病变时，就有某种特殊的同工酶释放出来，对病人及正常人同工酶电泳图谱进行比较，有助于上述疾病的诊断。

三、诱导酶

1. 诱导酶与结构酶 根据酶的合成与代谢物的关系，人们把酶相对地区分为结构酶(structural enzyme)和诱导酶(induced enzyme)。细胞内结构酶是指细胞中天然存在的酶，它的含量较为稳定，受外界的影响很小。诱导酶是指当细胞中加入特定诱导物后诱导产生的酶，它的含量在诱导物存在下显著增高，这种诱导物往往是该酶底物的类似物或底物本身。诱导酶在微生物中较多见，例如大肠杆菌平时一般只利用葡萄糖，当培养基不含葡萄糖，而只含乳糖时，开始时代谢强度大大低于培养基含有葡萄糖的情况，继续培养一段时间后，代谢强度慢慢提高，最后达到与含葡萄糖时一样，因为这时大肠杆菌中已产生了属于诱导酶的半乳糖苷酶。

2. 酶的生成受代谢物和遗传基因的双重控制 结构酶和诱导酶的区别是相对的,只是数量的区别,而不是本质的差别。事实证明,酶的生物合成受遗传基因和代谢物的双重控制。一定种类的酶,只有当细胞核中存在某种相应的基因时,才能形成,如果缺少这种基因,或者基因遭受突变,就不能生成相应的酶。另外,若细胞在遗传上能够产生某种诱导物,则细胞中生成这种酶的速度就显著增加,这种酶的含量也就大大增加。也就是说,相应的遗传基因的存在是形成酶的内因及根据。但是,酶的形成还受到代谢物(酶反应的底物、产物或它们的类似物)的控制与调节。当特定的诱导物存在时,酶的生成量可以几倍乃至几百倍地增加。相反,某些酶的反应产物,特别是末端产物,又能产生阻遏作用,使酶的生成量大大减少。所以说代谢物(包括诱导剂)可控制和调节细胞中酶的生成速度及数量。关于酶的合成机理,现在已经有了一些比较满意的理论——把基因和代谢物的双重控制统一起来加以解释的假设,这一部分内容将在“代谢的调节控制”一章中加以介绍。

第十一节 酶工程简介

一、酶工程的定义及分类

“酶工程”是指酶制剂在工业上的大规模生产及应用。

虽然现在世界上已发现和鉴定的酶有 4000 种以上。但是由于分离和提纯酶的技术比较复杂、繁琐,因而酶制剂的成本高,价格贵,不利于广泛应用。所以,到目前为止,投入大规模生产和应用的商品酶只有 16 种,小批量生产的商品酶也只有几百种。为了解决这个问题,人们把对自然酶的注意力转向对自然酶进行适当的加工与改造。根据研究和解决问题的手段不同,为求得大规模生产及应用酶而应运而生的酶工程可以分为两大类:化学酶工程和生物酶工程。

二、化学酶工程

化学酶工程亦可称为初级酶工程(Primary enzyme engineering),它主要由酶学与化学工程技术相互结合而形成。

通过化学修饰、固定化处理、甚至通过化学合成法等手段,改善酶的性质以提高催化效率及降低成本。它包括自然酶、化学修饰酶、固定化酶及化学人工酶的研究和应用。

食品工业、制药工业、制革工业、酿造工业及纺织工业使用酶制剂后可以大大地改造、革新工艺流程并降低成本。主要使用自然酶,多数使用微生物来源的酶的粗制剂。

医学上进行治疗以及基础酶学研究要求纯度高、性能稳定、治疗上还需要低或无免疫原性,所以常常对纯酶进行化学修饰以改善酶的性能。如抗白血病药物天冬酰胺酶的游离氨基经过脱氨基作用,酰化反应或羰基亚胺反应进行修饰后,该酶在血浆中的稳定性得到很大的提高;人的 α -半乳糖苷酶 A 经交联反应修饰后,酶活性比自然酶稳定;酶与聚乙二醇、多糖、某些蛋白质结合后酶的性质亦可得到改善, α 淀粉酶与葡聚糖结合后,热稳定性显著增加,该自然酶的半寿期只有 2.5 分钟,结合酶则为 63 分钟。

固定化酶是指被结合到特定的支持物上并能发挥作用的一类酶,是化学酶工程中具有强

大生命力的主干。它在应用上和理论上的巨大潜力吸引了生物化学、微生物学、医学、化学工程、高分子等各个领域的科研机构及企业科技部门的研究人员的注意力。酶的固定化技术包括吸附、交联、共价结合及包埋等四种方法。固定化酶的优点是(1)可以用离心法或过滤法很容易地将酶与反应液分离开来,在生产中十分方便有利;(2)可以反复使用,在某些情况下甚至可以使用达千次以上,可极大地节约成本;(3)稳定性能好。国外工业上已制备固定化氨基酰化酶用以分析D、L型氨基酸;已把烯烃转变成石油化学产品的重要原料——环氧烷类;已用固定化的葡萄糖异构酶生产高果糖玉米糖浆。近年来国内已用固定化酶技术半合成新青霉素、生产高果糖糖浆以及增产啤酒等。60年代以来,人们还制造出带有固定化酶的各种电极用来检测和调节体液中代谢物的浓度。其中应用的电极部分包括各种离子电极、氧电极及二氧化碳电极等这样的电极称为酶电极,酶电极兼有酶的专一性、灵敏性及电位测定的简单性的双重优点,目前已有20多种固定化酶用于酶电极中。模拟生物体内的多酶体系,将完成某一组反应的多种酶和辅助因子固定化,可以制成特定的反应器。高效、专一、实用的生物反应器可通过将含酶的微生物、细胞,细胞器固定化而制得。近年来,以固定化微生物组成的生物反应器已获工业应用。生物反应器的研究不仅具有使生物工业革新的实际意义,而且对推进生物化学、细胞生物学、生理学、仿生学等基础生物科学的研究具有重要的理论意义。

以上化学修饰酶和固定化酶都是在自然酶的基本结构上加以一些改变,从而改善酶在工业及医学上的应用。近年来,有许多科学家模拟酶的生物催化功能,用化学半合成法或化学全合成法合成了称之为人工酶(artificial enzyme)的催化剂。例如用电子传递催化剂 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 与巨头鲸肌红蛋白结合,产生一种“半合成的无机生物酶”,这样就与 O_2 结合,无催化功能的肌红蛋白转变成能氧化各种有机物(如抗坏血酸)的半合成酶了,它接近于天然的抗坏血酸氧化酶的催化效率。全合成酶不是蛋白质,而是小分子有机物,它们掺入到酶的催化基因并控制酶的空间构象,从而像自然酶那样专一性地催化化学反应。例如,由环糊精制成的人工转氨酶能催化 α -酮酸与磷酸吡哆胺专一性地合成氨基酸。目前,这类全合成的人工酶因为催化效率很低,还并不具有实用价值。

三、生物酶工程

生物酶工程是在化学酶工程基础上发展起来的,是以酶学和DNA重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物。因此它亦可称为高级酶工程(advanced enzyme engineering)。

自从70年代初DNA重组技术问世以来,把酶学推进到一个十分重要的发展时期,使它的基础研究和应用研究领域发生着巨大的革命性变化,产生了生物酶工程。

生物酶工程主要包括三个方面:(1)用DNA重组技术(即基因工程技术)大量地生产酶(克隆酶);(2)对酶基因进行修饰,产生遗传修饰酶(突变酶);(3)设计新的酶基因,合成自然界不曾有过的、性能稳定、催化效率更高的新酶。

酶基因的克隆和表达技术的应用使我们有可能克隆各种天然的蛋白基因或酶基因。先在特定的酶的结构基因前加上高效的启动基因序列和必要的调控序列,再将此片段克隆到一定的载体中,然后将带有特定酶基因的上述杂交表达载体转化到适当的受体细菌中,经培养繁

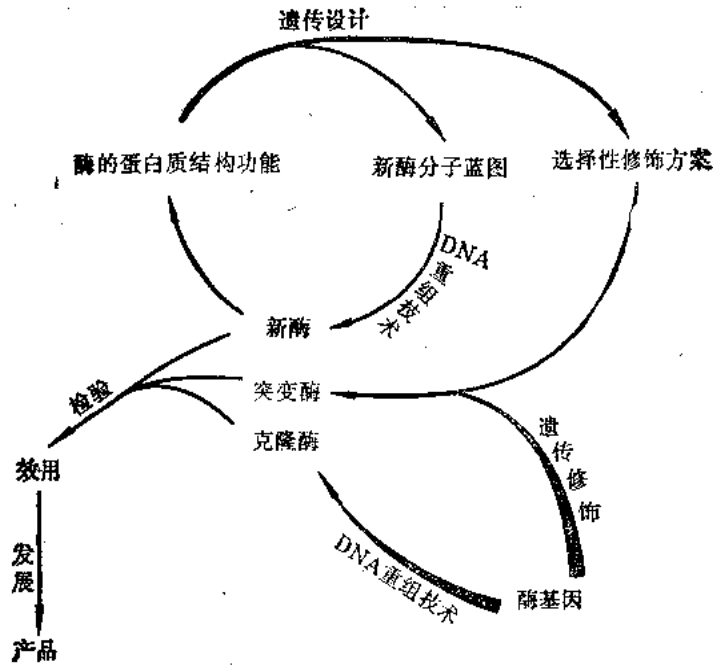


图 4-66 生物酶工程示意图

殖,再从收集的菌体中分离得到大量的表达产物——我们所需要的酶。一些来自于人体的酶制剂,如治疗血栓栓塞病的尿激酶原,就可以用此法取代从大量的人尿中的提取。此外还有组织纤溶酶原激活剂(TPA)与凝乳酶等一百多种酶的基因已经克隆成功,其中一些还进行了高效的表达。此法产生出大量的酶,并易于提取分离纯化。近几年兴起着另一个新研究领域:酶的选择性遗传修饰,即酶基因的定点突变。研究者在分析氨基酸序列弄清酶的一级结构及X线衍射分析弄清酶的空间结构的基础上,再在由功能推知结构或由结构推知功能的反复推敲下,设计出酶基因的改造方案,指出选择性遗传修饰的修饰位点,下面介绍几种经定点突变后酶性质发生改变的例子(见表4-18):

表 4-18 酶的选择性修饰

酶	修 饰		酶性质的改变
	修饰部位	原氨基酸残基 新氨基酸残基	
酪氨酸-tRNA合成酶	51	苏→丙	对底物ATP的亲合力提高100倍
	51	苏→脯	
β-内酰胺酶	70-71	丝·苏→苏·丝	完全失活
	70-71	苏·丝→丝·丝	恢复活性
二氢叶酸还原酶	27	天冬→天胺	活性降低为正常酶的0.1%

现在人们已掌握技术,所以只要有遗传设计蓝图,就能人工合成出所设计的酶基因。酶遗传设计的主要目的是创制优质酶,用于生产昂贵特殊的药品和超自然的生物制品,以满足人类的特殊需要。

需要改善的酶学性质包括:对热、氧化剂、非水溶剂的稳定性;对蛋白水解作用的敏感性;

免疫原性; 最适 pH、离子强度及温度; 催化效率; 对底物和辅助因子的专一性与亲合力; 反应的主体化学选择性; 催化效率; 别构效应; 反馈抑制; 多功能性; 在纯化或固定化过程中酶的功能和理化性质等。

目前的关键问题在于如何设计超自然的优质酶基因, 即如何作出优质酶基因的遗传设计蓝图。现在还不可能根据酶的氨基酸序列预言其空间结构, 但随着计算机技术和化学理论的进步, 酶或其他大分子的模拟在精确度、速度及规模上都会得到改善, 这将导致产生有关酶行为的新观点或新理论, 酶的化学修饰及遗传修饰也将提供更多的实验依据及数据, 有助于解决关于酶的结构与功能的关系, 因而将促进酶的遗传设计的发展。设计酶或蛋白质分子能力的发展将开创从分子水平根据遗传设计理论制造超自然生物机器的新时代。

提 要

生物体内的各种化学变化都在酶的催化下进行, 酶作为生物催化剂, 不同于一般的催化剂: 催化效率极高, 具有高度的专一性, 作用条件温和, 但很不稳定。

某些酶是简单蛋白质, 另一些则是结合蛋白质: 由不表现酶活力的酶蛋白及辅助因子(包括辅酶、辅基及某些金属离子)两部分组成。辅酶(或辅基)起传递电子、原子或某些化学基团的作用, 许多辅酶含有维生素。酶是蛋白质, 所以它比其他催化剂脆弱, 酶蛋白的构象的不同决定了各种酶具有不同的底物专一性。近年来的实验结果指出了—个惊人的事实, 即: RNA 分子也可以是酶! 人们称它们为核糖酶。抗体是一类专一于抗原分子的、有催化活性的、具有特殊生物学功能的蛋白质, 人们正在对又一个新命题: “是否可将抗体视作为酶”进行研究。根据酶所催化的反应的性质, 已对 3 000 多种酶作了分类及命名。

影响酶反应速度的主要因素有 6 个方面: 底物浓度、pH、温度、酶浓度、激活剂及抑制剂。酶促动力学的研究认为酶反应中存在有 ES 中间物。催化作用的本质是酶, 通过专一性结合的相互作用, 而对于与受作用的底物所形成的过渡态分子予以稳定, 从而起到加速反应的作用。根据酶反应中存在有 ES 中间物, Michaelis 等提出了米氏学说并导出了米氏方程, 米氏方程给出了 K_m 、 $[S]$ 及 V_{max} 间的数量关系。一般测定酶活力选用如下的条件: 在最适 pH、最适温度, 底物极大地过量(即 $[S] \gg [E]$)的条件下, 测定酶反应的初速度。一个酶的活力单位定义为: 25°C 下, 每分钟转变 1 微克分子底物的酶量。比活力定义为每毫克酶蛋白所具有的酶活力单位数。

酶的可逆抑制中最重要的是竞争性抑制, 其抑制可以通过加大底物浓度而得到逆转, 竞争性抑制剂的结构与底物十分类似, 它与底物争夺酶的活性中心; 非竞争性抑制剂则是抑制剂与酶分子活性中心之外的重要基团(如 —SH 基)作用而造成的抑制。不可逆抑制剂使酶分子中一些重要基团发生持久的、不可逆的变化。

酶的活性中心对于不需要辅酶的酶来说, 活性中心就是酶分子中在三维结构上比较靠近的少数几个氨基酸残基或这些残基上的某些基团所形成的一种特殊结构; 对于需要辅酶的酶来说, 辅酶分子或辅酶分子上的某一部分, 往往也是活性中心的组成部分。酶蛋白中的丝、组、赖、半胱氨酸的 R 基团常常处于酶活性中心的催化部位。酶活性中心主要通过研究酶的专一

性, 酶分子侧链基团的化学修饰及 X-射线衍射分析而测得, 近年来新发展的技术——“核苷酸定点突变”为研究酶的结构与功能, 特别是活性中心, 提供了又一种强有力的手段。

酶反应速度极高的原因目前认为有 5 个方面, 其中最主要的可能是酶与底物结合时, 两者构象的改变使它们互相嵌合, 底物分子适当地向酶分子活性中心靠近, 并且趋向于酶的催化部位, 使活性中心这一局部地区的底物浓度大大提高, 并使底物分子发生扭曲, 易于断裂。在另一些情况中, 可能还有一些其他的因素使酶反应速度稍有一些增高, 如酶与底物形成有一定稳定度的过渡态中间物——共价的 ES 中间物, 这种 ES 中间物又可迅速地分解成产物; 又如酶活性中心的质子供体和质子受体对底物分子进行了广义的酸碱催化等。现在已经对少数的几种酶的作用机理有了一定的了解, 如溶菌酶、胰凝乳蛋白酶及羧肽酶 A 等。

在多酶体系中, 酶反应速度不仅受 pH、底物浓度、金属离子及辅酶等的影响, 而且受调节酶的影响。调节酶主要指别构酶及共价调节酶两种类型。

通过对许多种酶的研究, 目前认为生物机体中对于酶活性大致有四种类型的调控作用: 1. 别构相互作用的调控, 例如 ATCase。2. 可逆共价修饰的调控, 如糖原磷酸化酶。3. 酶原的激活(即不可逆共价修饰的调控), 如一系列作用于消化过程的蛋白酶原及血液凝固过程中的蛋白酶原。4. 激促蛋白质或抑制蛋白质的调控, 如钙调蛋白等。通过以上作用, 使那些在代谢上十分重要的酶能在准确的时间和正确的地点表现出它们的活性。别构酶一般催化多酶体系的第一步反应, 也常受反应序列的最终产物抑制, 最终产物可以非共价地结合到别构中心(又称调节中心)上, 然后别构酶再调节多酶体系的反应速度。别构酶表现出非典型性的动力学特征, 它不符合于米氏公式, 其中许多别构酶表现出 v -[S] 的 S 形曲线, 另一些则表现为其他形式。现在已知, 所有的别构酶都有多个亚基, 在某些情况下是两种类型: 催化型和调节型。ATCase 的三维结构已经测出, 并已建立模型, 也已测出此酶结合底物后, 因别构过渡作用而引起的构象改变。对于解释别构酶的作用机理, 目前已有两种模型受人们考虑, 它们是序变模型和齐变模型。当其他酶对共价调节酶进行共价修饰时(指可逆共价修饰的调控中的酶), 这种调节酶能在非活性形式及活性形式之间相互转变。

寡聚酶是一类具有多个亚基的酶, 包括别构酶等, 它在代谢中有很重要的意义。同工酶是指能催化同一种化学反应, 但其酶分子结构有所不同的一组酶, 这类酶在细胞发育分化及代谢调节中很重要。诱导酶是在有诱导物存在时才形成的酶, 它不同于细胞中原有的结构酶, 但是这两种酶并无本质区别。抗体酶和核糖酶是近几年提出的新名词, 它们在人们对酶本质的认识上有概念性的突破。

现在对于大多数的细胞基本代谢过程的酶已经有了较多的了解。对于遗传学领域中的酶也有了一定的了解: 各种核酸水解酶、聚合酶、连接酶, 只改变底物的几何形状及结构, 而不改变底物化学组成的拓扑酶(见“DNA 复制”一章), 以及参与 RNA 加工成熟的化学本质为 RNA 的核糖酶等, 但是还有许多问题有待于研究, 特别是遗传工程、蛋白质工程的兴起以及分子生物学、分子免疫学的蓬勃发展与需求为酶学的发展开拓了广阔的前景。近几年来细胞分子生物学的迅猛发展也对酶学提出了众多的新任务, 人们通过酶学研究对于酶在细胞生物学中的作用有了新看法。这些新任务、新领域包括: 酶合成的遗传控制与遗传病、许多酶系统的自我调

节性质、生长发育及分化中酶的作用与肿瘤和衰老的关系、细胞相互识别过程中酶的作用等等。

酶工程是近 20 年来发展起来的一个新的应用技术。它对于酶的结构与功能的理论研究,以及酶的更广泛的应用都有不可估量的价值。

习 题

1. 酶的化学本质是什么?如何证明?它作为生物催化剂有何特点?近年来对酶的化学本质有何新看法?
2. 辅基与辅酶有何不同?它们与激活剂有何区别?列表写出:
 - (1) 维生素(五种以上)与辅酶(或辅基)的关系。
 - (2) 这些辅酶(或辅基)在酶反应中的作用。
3. 影响酶促反应速度的因素有哪些?用曲线表示并说明它们各有什么影响。
4. 进行酶活力测定时应注意什么?为什么测定酶活力时以测初速度为宜,并且底物浓度应大大地超过酶浓度?
5. 说明米氏常数(K_m)及最大反应速度(V_{max})的意义及应用。
6. 何谓竞争性和非竞争性抑制作用?举例说明不可逆抑制剂及可逆抑制剂。研究抑制作用的理论意义及实践意义何在?
7. 何谓酶的专一性?酶的专一性有哪几类(举例说明)?如何解释酶作用的专一性?研究酶的专一性有何意义?
8. 阐明酶活性中心的概念。指出用哪些主要的方法研究酶的活性中心?新技术“定点突变”是怎样适用于此类研究的?
9. 实现酶反应高效率的因素是哪些因素?它们是怎样提高酶反应速度的?其中最主要的是哪一个因素?
10. 为什么酶反应的酸碱催化主要不是依靠 H^+ 及 OH^- ? 它们是怎样提高酶反应速度的?酶反应中有哪些常见的亲核基团及亲电子基团?酶蛋白中既能作为质子供体又能作为质子受体的、最有效又最活泼的催化基团是什么?活性中心是疏水区有何意义?
11. 指出下列几个酶:溶菌酶、羧肽酶 A 及胰凝乳蛋白酶中:
 - (1) 哪个酶的催化活性需要金属离子?
 - (2) 哪个酶是单条的多肽链?
 - (3) 哪个酶被 DFP 迅速地失活?
 - (4) 哪个酶是被一种蛋白酶切割其酶原而形成的?
12. 上题中三个酶的催化机理中是否有从酶到底物的质子转移过程?若有,请指出它(或它们)的质子供体是什么?
13. 酶活性的调控作用有哪几种类型?对各种类型举例说明。
14. 何谓调节酶?各类调节酶在结构上及调节性质上有什么特点?
15. 解释下列名词概念
 - (1) 活力、比活力
 - (2) 酶的转换数
 - (3) 全酶
 - (4) 多酶体系
 - (5) 反馈作用
 - (6) 别构效应
 - (7) 别构酶
 - (8) 寡聚酶
 - (9) RNA 酶
 - (10) 诱导酶
 - (11) 同工酶
 - (12) 酶原的激活
 - (13) 固定化酶
 - (14) 别构酶的序变模型及齐变模型
- ①16. 设计一种实验方法定性测定下列各种酶的活力;并说明该酶所催化的反应:
 - (1) 蔗糖酶
 - (2) 谷-丙转氨酶

① 第 16 题中的第 (11)、(12) 题可留待学完第十章生物氧化后再做。

- (3) 淀粉酶 (4) 葡萄糖氧化酶
 (5) 脂肪酶 (6) 乳酸脱氢酶
 (7) 磷酸单酯酶 (8) 脲酶
 (9) ATP 酶 (10) 过氧化氢酶
 (11) 胰蛋白酶 (12) 细胞色素氧化酶

17. 用 AgNO_3 对在 10 毫升含有 1.0 毫克/毫升蛋白质的纯酶溶液进行全抑制, 需用 0.342 微摩尔 AgNO_3 , 求该酶的最低分子量。(2.90×10^4)。

18. 焦磷酸酶可以催化焦磷酸水解成磷酸, 它的分子量为 120 000, 由 6 个相同的亚基组成。纯酶的 V_{\max} 为 2 800 单位/毫克酶。它的一个活力单位规定为: 在标准的测定条件下, 37°C , 15 分钟内水解 10 微克焦磷酸所需要的酶量。问:

- (1) 每毫克酶在每秒钟内水解了多少摩尔底物 [3.11×10^{-5} 摩尔/秒/毫克酶]?
 (2) 每毫克酶中有多少摩尔的活性中心(假设每个亚基上有一个活性中心)(5×10^{-8} 摩尔的活性中心)?
 (3) 酶的转换数是多少(622/秒或 622 摩尔焦磷酸/秒/摩尔酶活性中心)?

19. 有 1 克淀粉酶制剂, 用水溶解成 1000 毫升, 从中取出 1 毫升测定淀粉酶活力, 测知每 5 分钟分解 0.25 克淀粉。计算每克酶制剂所含的淀粉酶活力单位数(3 000 单位)。

(淀粉酶活力单位的定义: 在最适条件下每小时分解 1 克淀粉的酶量称为 1 个活力单位)。

20. 称取 25 毫克蛋白酶粉配制成 25 毫升酶溶液, 从中取出 0.1 毫升酶液, 以酪蛋白为底物, 用 Folin-酚比色法测定酶活力, 得知每小时产生 1 500 微克酪氨酸。另取 2 毫升酶液, 用凯氏定氮法测得蛋白氮为 0.2 毫克。若以每分钟产生 1 μg 酪氨酸的酶量为 1 个活力单位计算, 根据以上数据, 求出:

- (1) 1 毫升酶液中所含的蛋白质量及活力单位。(0.625 毫克蛋白质, 250 单位)。
 (2) 比活力(400 单位/毫克蛋白质)。
 (3) 1 克酶制剂的总蛋白含量及总活力(0.625 克, 2.5×10^5 单位)。

21. 当一酶促反应进行的速度为 V_{\max} 的 80% 时, 在 K_m 及 $[S]$ 之间有何关系? ($K_m = 0.25[S]$)。

22. 当过氧化氢酶的 K_m 值为 2.5×10^{-2} 摩尔/升, 当底物过氧化氢浓度为 100 毫摩尔/升时, 求在此浓度下, 过氧化氢酶被底物所饱和的百分数(80%)。

23. 用下表列出的数据, 确定此酶促反应:

(1) 无抑制剂时和有抑制剂时的 V_{\max} 和 K_m 值。(无抑制剂时: $K_m = 1.1 \times 10^{-5}$ mol/L, $V_{\max} = (50 \mu\text{mol/L})/\text{分钟}$; 有抑制剂时, $K_m = 3.1 \times 10^{-5}$ mol/L, $V_{\max} = (50 \mu\text{mol/L})/\text{分钟}$)。

(2) 抑制的类型(竞争性抑制)。

(3) EI 复合物的解离常数 K_i ($K_i = 1.10 \times 10^{-3}$ mol/L)。

[S]	速度 ($\mu\text{mol/L}$)/分	
	无抑制剂	有抑制剂 (2×10^{-3} mol/L)
0.3×10^{-5} mol/L	10.4	4.1
0.5×10^{-5} mol/L	14.5	6.4
1.0×10^{-5} mol/L	22.5	11.5
3.0×10^{-5} mol/L	33.8	22.6
9.0×10^{-5} mol/L	40.5	33.8

24. 在问题 23 中, 若用另一种抑制剂, 给出下表数据, 请确定:

(1) 没有抑制剂及有抑制剂的 K_m 及 V_{\max} 值。(无抑制剂时: $K_m = 1.1 \times 10^{-5}$ mol/L, $V_{\max} = (50 \mu\text{mol/L})/\text{分钟}$ 。有抑制剂时: $K_m = K_m$, $V_{\max} = (9.5 \mu\text{mol/L})/\text{分钟}$)。

(2) 抑制的类型(非竞争性抑制)。

(3) EI 的解离常数 K_i ($K_i = 2.40 \times 10^{-5}$ mol/L)。

[S]	速 度	($\mu\text{mol/l}$)/分
	无抑制剂	有抑制剂($1 \times 10^{-4} \text{mol/L}$)
同第 23 题	同第 23 题	2.1
		2.9
		4.5
		6.8
		8.1

25. TPCK 是胰凝乳蛋白酶的一个亲和标记试剂,它通过酰化 His₅₇ 而使酶失去活性,借鉴它,进一步考虑:

- (1) 为胰蛋白酶设计出一个类似于 TPCK 的亲和标记试剂。
- (2) 怎样测试它的专一性?

26. ATCase 的活性中心内的一个组氨酸残基被认为对于结合状底物的过渡态的稳定起重要作用,假设这个反应是极为重要的,而且更加突出酶活性-pH 的相关关系。

请指出在这种情况下酶催化速度对 pH 的依赖性。

27. 何谓核糖酶抗体酶和克隆酶?

28. 酶的定点突变技术的理论意义及实用价值如何?

主要参考书

1. 袁胜和,生物化学及生物物理进展, vol. 1, 2—6. (1986).
2. 袁中一, 生物科学动态, Vol. 4, 1—19. (1979).
3. 袁中一等,《固相酶与亲和层析》,科学出版社,(1975).
4. Lehninger, A. L. Biochemistry—The Molecular Basis of Cell Structure and Function, 3rd edition. Worth Publishers, Inc. (1983).
5. Orten, J. M. and Neuhaus, O. W. Human Biochemistry, 9th edition St. Louis Mosby, (1975).
6. Conn, E. F. and Stumpf, P. K. Outlines of Biochemistry, 4th edition Wiley, (1976).
7. McGilvrey, R. W. Biochemical Concept. (1975).
8. Stryer, L. Biochemistry, W. H. Freeman and Company. (1987).
9. Chibata, I. et al Enzyme Engineering, vol. 6, Pt, Plenum Press, New York, (1982).
10. 祁国荣,生命的化学, Vol. 10, No. 3, 34(1990).

(俞梅敏)

第五章 核 酸

核酸是重要的生物大分子。核酸研究是分子生物学的重要领域。核酸 (nucleic acid) 的研究已有一百多年历史。早在 1868 年, 瑞士的一位年青科学家 F. Miescher 从外科绷带上脓细胞的细胞核中分离出了一种有机物质, 它的含磷量之高超过任何当时已经发现的有机化合物, 并且有很强的酸性。由于这种物质是从细胞核分离出来的, 当时就称它为核素 (nuclein)。Miescher 所分离到的核素就是我们今天所指的脱氧核糖核蛋白。核素中脱氧核糖核酸的含量为 30%。以后陆续证明, 任何有机体, 包括病毒、细菌、动植物等, 都无例外地含有核酸。核酸占细胞干重的 5—15%。

核酸分脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 和核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 两大类。所有生物细胞都含有这两类核酸。DNA 主要集中在细胞核内。线粒体、叶绿体也含有 DNA。RNA 主要分布在细胞质中。但是对于病毒来说, 要么只含 DNA, 要么只含 RNA。还没有发现既含 DNA 又含 RNA 的病毒。所以可按照所含核酸的类型, 将病毒分为 DNA 病毒和 RNA 病毒两大类。

核酸的生物学作用是在发现核酸以后 70 多年才被证明的。这就是 1944 年由 Avery 等所完成的著名肺炎球菌转化试验, 它证明了使肺炎球菌的遗传性发生改变的转化因子是 DNA, 而不是蛋白质。这一发现极大地推动了对核酸结构与功能的研究。

1950 年以前, 四核苷酸结构学说流行。按照这种学说, 认为任何核酸分子都是由等摩尔的四种核苷酸组成。因此, 认为核酸不大可能具有重要的生理功能。这样, 尽管 Avery 等的实验已有力地证明了 DNA 是重要的遗传物质, 而反对者仍然认为蛋白质才是转化因子。直到 1950 年前后, Avery 等的发现才算得到公认。

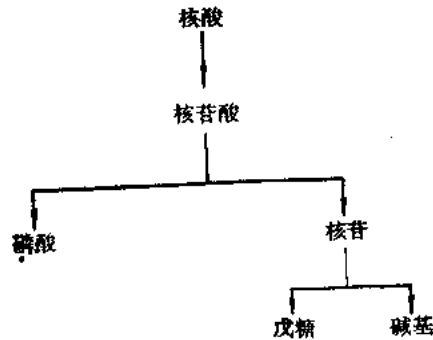
1950 年以后, Chargaff, Markham 等应用纸层析及分光光度计大量测定了各种生物的 DNA 碱基组成后, 发现不同生物的 DNA 碱基组成不同, 有严格的种的特异性, 这给四核苷酸学说以致命的打击。同时, 他们还发现, 尽管不同生物的碱基组成不同, 但总是 $A=T$, $G=C$, 提示了 A-T, G-C 之间互补的概念。这一极其重要的发现, 为以后 Watson-Crick 建立 DNA 双螺旋结构模型提供了重要依据。

1953 年 DNA 双螺旋结构模型的提出, 被认为是本世纪在自然科学中的重大突破之一。它揭开了分子生物学研究的序幕, 为分子遗传学的研究奠定了基础。此后, 分子生物学所取得的突飞猛进的发展与 DNA 双螺旋结构模型的建立是分不开的。

70 年代初建立起来的 DNA 重组技术是生命科学发展中的又一重大突破。一门崭新的学科——基因工程诞生了。人们终于可以按照拟定的蓝图设计出新的生物体了。在工业、农业、医学、药学等应用领域, 基因工程技术得到了广泛的应用并已经创造了巨大的财富。同时, 基因工程技术又是进一步揭露生命奥秘的有力武器。它大大推动了分子生物学与分子遗传学等学科的飞速发展。

第一节 核苷酸

核酸是一种线形多聚核苷酸(polynucleotide),它的基本结构单位是核苷酸(nucleotide)。在核酸的最早期研究工作中,曾把注意力集中在对核酸降解产物的研究。采用不同的降解法,可以将核酸降解成核苷酸。核苷酸还可以进一步分解成核苷(nucleoside)和磷酸。核苷再进一步分解生成碱基(base)和戊糖。碱基分两大类:嘌呤碱与嘧啶碱。所以,核酸是由核苷酸组成的,而核苷酸又由碱基、戊糖与磷酸组成。



核酸中的戊糖有两类: D-核糖(D-ribose)和 D-2-脱氧核糖(D-2-deoxyribose)。核酸的分类就是根据核酸中所含戊糖种类不同而分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)的。

RNA 中的嘌呤碱主要有四种:腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶, DNA 中的碱基主要也是四种,三种与 RNA 中的相同,只是胸腺嘧啶代替了尿嘧啶。现将两类核酸的基本化学组成列于表 5-1 中。

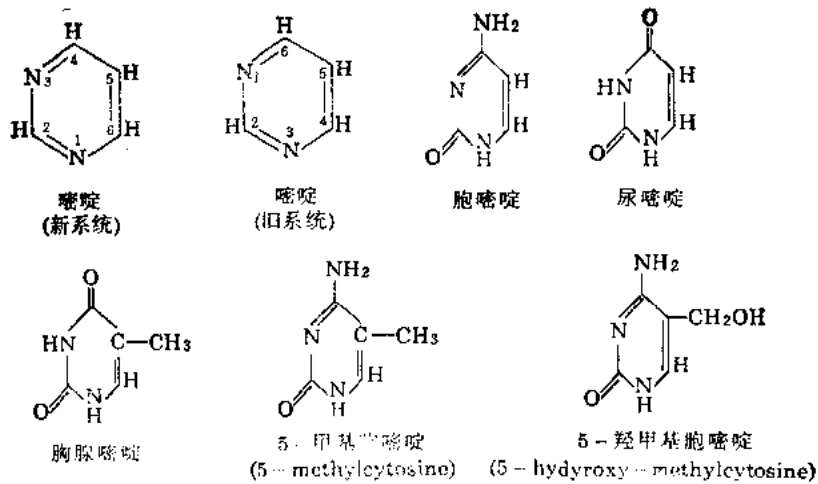
表 5-1 两类核酸的基本化学组成

	DNA	RNA
嘌呤碱 (purine bases)	腺嘌呤 (adenine) 鸟嘌呤 (guanine)	腺嘌呤 鸟嘌呤
嘧啶碱 (pyrimidine bases)	胞嘧啶 (cytosine) 胸腺嘧啶 (thymine)	胞嘧啶 尿嘧啶 (uracil)
戊糖	D-2-脱氧核糖	D-核糖
酸	磷酸	磷酸

一、碱基

核酸中的碱基分两类:嘧啶碱和嘌呤碱。

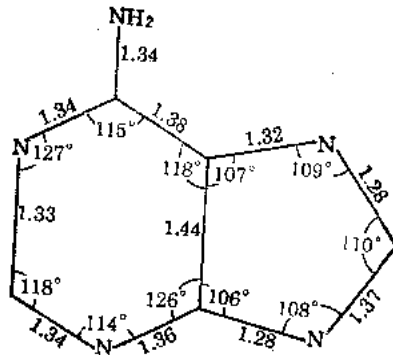
嘧啶碱 嘧啶碱是母体化合物嘧啶的衍生物。嘧啶上的原子编号有新旧两种方法。国际上“有机化学物质的系统命名原则”中采用的是新系统。所以本书也采用这个系统。但旧的系统在书本中也常出现。核酸中常见的嘧啶有三类:胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶。植物 DNA 中有相当量的 5-甲基胞嘧啶。一些大肠杆菌噬菌体核酸中,5-羟甲基胞嘧啶代替了胞嘧啶。



嘌呤碱 核酸中常见的嘌呤碱有两大类，腺嘌呤及鸟嘌呤。嘌呤碱是由母体化合物嘌呤衍生而来的。



应用 X 光衍射分析法已证明了各种嘌呤和嘧啶的三度空间结构。嘧啶是平面分子，嘌呤也很接近平面，但稍有挠折。下图为腺嘌呤分子的立体结构(图中长度单位是 nm) $\text{\AA}(1 \text{\AA} = \frac{1}{10} \text{nm})$ 。



稀有碱基 除了表 5-1 中所列五类基本的碱基外，核酸中还有一些含量甚少的碱基，称为稀有碱基。稀有碱基种类极多，大多数都是甲基化碱基。tRNA 中含有较多的稀有碱基。

二、核苷

核苷(核糖苷)由戊糖和碱基缩合而成，并以糖苷键相连接。糖环上的 C_1 与嘧啶碱的 N_1 或与嘌呤碱的 N_9 相连接。所以糖与碱基之间的连键是 N—C 键，称为 N-糖苷键。

核苷中的 D-核糖与 D-2 脱氧核糖均为呋喃型环状结构。糖环中 C_1 是不对称碳原子，所

以有 α -及 β -两种构型。但核酸分子中的糖苷键均为 β -糖苷键。

应用 X-光衍射分析已证明,核苷中的碱基与糖环平面互相垂直。

核苷可以分成核糖核苷与脱氧核糖核苷两大类。腺嘌呤核苷、胞嘧啶脱氧核苷的结构如下(糖环中的碳原子标号用 1', 2'...表示):

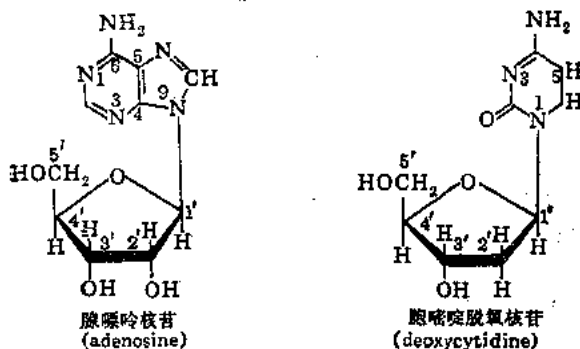


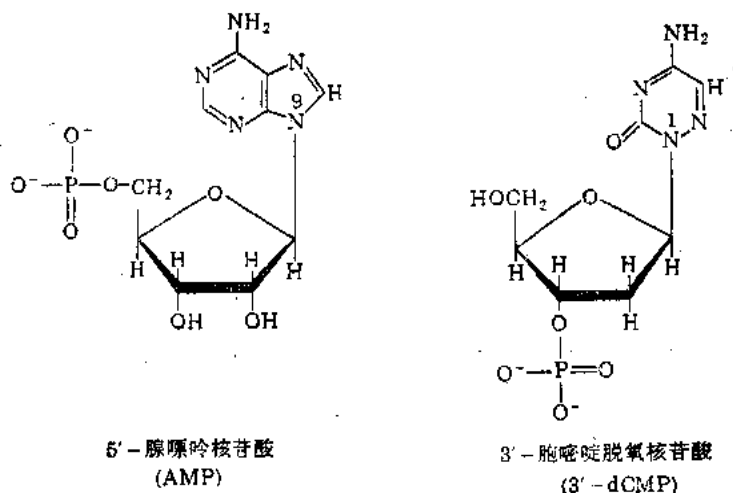
表 5-2 为常见核苷的名称。

表 5-2 各种常见核苷

碱 基	核 糖 核 苷	脱 氧 核 糖 核 苷
腺 嘌 呤	腺嘌呤核苷 (adenosine)	腺嘌呤脱氧核苷 (deoxyadenosine)
鸟 嘌 呤	鸟嘌呤核苷 (guanosine)	鸟嘌呤脱氧核苷 (deoxyguanosine)
胞 嘧 啶	胞嘧啶核苷 (cytidine)	胞嘧啶脱氧核苷 (deoxycytidine)
尿 嘧 啶	尿嘧啶核苷 (uridine)	—
胸 腺 嘧 啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxythymidine)

三、核苷酸

核苷中的戊糖羟基被磷酸酯化,就形成核苷酸。核苷酸分成核糖核苷酸与脱氧核糖核苷酸两大类。下面为两种核苷酸的结构式。



生物体内存在的游离核苷酸多是 5'-核苷酸。用碱水解 RNA 时,可得到 2'-与 3'-核糖核苷酸的混合物。

常见的核苷酸列于表 5-3 中。

表 5-3 常见的核苷酸

碱 基	核 糖 核 苷 酸	脱 氧 核 糖 核 苷 酸
腺 嘌 呤	腺嘌呤核苷酸 (adenosine monophosphate, AMP)	腺嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyadenosine monophosphate, dAMP)
鸟 嘌 呤	鸟嘌呤核苷酸 (guanosine monophosphate, GMP)	鸟嘌呤脱氧核苷酸 (deoxyguanosine monophosphate, dGMP)
胞 嘧 啶	胞嘧啶核苷酸 (cytidine monophosphate, CMP)	胞嘧啶脱氧核苷酸 (deoxycytidine monophosphate, dCMP)
尿 嘧 啶	尿嘧啶核苷酸 (uridine monophosphate, UMP)	—
胸 腺 嘧 啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (deoxythymidine monophosphate, dTMP)

第二节 脱氧核糖核酸 (DNA)

一、DNA 的碱基组成

参与 DNA 组成的主要有四种碱基即：腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。此外，在 DNA 分子中也还含有少量稀有碱基。Chargaff 等在 50 年代应用纸层析及紫外分光光度计对各种生物 DNA 的碱基组成 (base composition) 进行了定量测定，发现如下规律：

1. 所有 DNA 中腺嘌呤与胸腺嘧啶的摩尔含量相等，即 $A = T$ ；鸟嘌呤与胞嘧啶的摩尔含量相等，即 $G = C$ 。因此，嘌呤的总含量与嘧啶的总含量相等，即 $A + G = C + T$ 。

2. DNA 的碱基组成具有种的特异性，即不同生物种的 DNA 具有自己独特的碱基组成。但 DNA 的碱基组成没有组织和器官的特异性。生长发育阶段、营养状态和环境的改变都不影响 DNA 的碱基组成。

所有 DNA 中碱基组成必定是 $A = T$ ， $G = C$ 。这一规律的发现，提示了 A 与 T，G 与 C 之间碱基互补的可能性，为以后 DNA 双螺旋结构的建立提供了重要根据。表 5-4 中列出了一些生物的 DNA 碱基组成。

二、DNA 的一级结构

DNA 的一级结构是由数量极其庞大的四种脱氧核糖核苷酸即：脱氧腺嘌呤核苷酸、脱氧鸟嘌呤核苷酸、脱氧胞嘧啶核苷酸和脱氧胸腺嘧啶核苷酸，通过 3', 5'-磷酸二酯键连接起来的直线形或环形多聚体。由于脱氧核糖中 C-2' 上不含羟基，C-1' 又与碱基相连接，所以唯一可以形成的键是 3', 5'-磷酸二酯键。所以，DNA 没有侧链。图 5-1 表示 DNA 多核苷酸链的一个小片段。

图的右侧是多核苷酸的几种缩写法。B 为线条式缩写，竖线表示核糖的碳链，A、C、T、G 表示不同的碱基，P 代表磷酸基，由 P 引出的斜线一端与 C_3' 相连，另一端与 C_5' 相连。U 为文

表 5-4 不同生物的 DNA 的碱基组成

来源	碱基的相对含量(摩尔%)				来源	碱基的相对含量(摩尔%)			
	腺嘌呤	鸟嘌呤	胞嘧啶*	胸腺嘧啶		腺嘌呤	鸟嘌呤	胞嘧啶*	胸腺嘧啶
人	30.9	19.9	19.8	29.4	扁豆	29.7	20.6	20.1	29.6
牛胸腺	28.2	21.5	22.5	27.8	酵母	31.3	18.7	17.1	32.9
牛脾	27.9	22.7	22.1	27.3	大肠杆菌	24.7	26.0	25.7	23.6
牛精子	28.7	22.2	22.0	27.1	金黄色葡萄球菌	30.8	21.0	19.0	29.2
大鼠(骨髓)	28.6	21.4	21.5	28.4	结核分枝杆菌	15.1	34.9	35.4	14.6
母鸡	28.8	20.5	21.5	29.2	φ×174(单链)	24.6	34.1	18.5	32.7
蚕	33.6	22.5	21.9	27.2	φ×174(复制型)	23.3	22.3	22.3	26.4
小麦(胚)	27.3	22.7	22.8	27.1	噬菌体λ	21.3	28.6	27.2	22.9

* 包括 5-甲基胞嘧啶

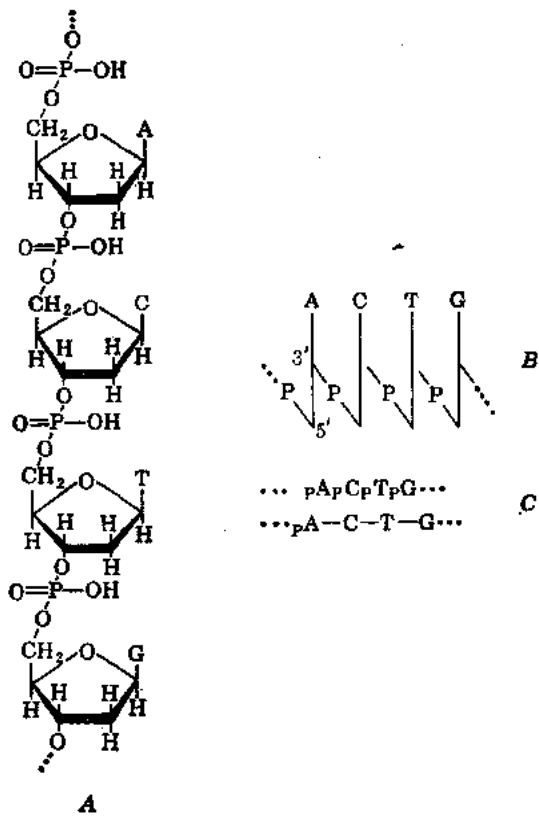


图 5-1 DNA 中多核苷酸链的一个小片段及缩写符号

A. DNA 中多核苷酸链的一个小片段, B. 为线条式缩写, C. 为文字式缩写

字式缩写, P 在碱基之左侧, 表示 P 在 C_{5'} 位置上。P 在碱基之右侧, 表示 P 与 C_{3'} 相连。有时, 多核苷酸中磷酸二酯键上的 P 也可省略, 而写成...pA-C-T-G...。这两种写法对 DNA 和 RNA 分子都适用。

DNA 分子上四种核苷酸排列顺序(序列)的问题, 是分子生物学家多年来要解决的重要问题, 因为生物的遗传信息贮存于 DNA 的核苷酸序列中, 生物界物种的多样性即寓于 DNA 分子四种核苷酸千变万化的不同排列之中。测定 DNA 上核苷酸排列顺序的问题曾经是一个较为困难的问题。但是随着分子生物学的发展, 现在测定 DNA 的序列已成为分子生物学实验室的一种常规方法。

三、DNA 的空间结构

目前公认的 DNA 双螺旋结构模型的建立, 主要有两方面的根据: 一是 DNA 碱基组成的定量分析; 二是对 DNA 纤维和 DNA 晶体的 X 光衍射分析。Watson 和 Crick 两人在 1953 年提出的 DNA 分子双螺旋结构模型在分子生物学发展上具有划时代的贡献, 为分子生物学和分子遗传学的发展奠定了基础。由于当时还不可能获得 DNA 分子结晶, Watson 和 Crick 所用的资料来自在相对湿度为 92% 时所得到的 DNA 钠盐纤维。这种 DNA 称为 B 型 DNA

(B-DNA)。在相对湿度低于 75% 时获得的 DNA 钠盐纤维,其结构有所不同,称为 A-DNA。此外还有 Z-DNA 还将在后面讨论。在这里,我们将比较详细的讨论 B-DNA,因为生物体内天然状态的 DNA 几乎都以 B-DNA 存在。

(一) B-DNA 的结构

根据 Watson 和 Crick 所提出的模型(图 5-2), B-DNA 具有以下特性:

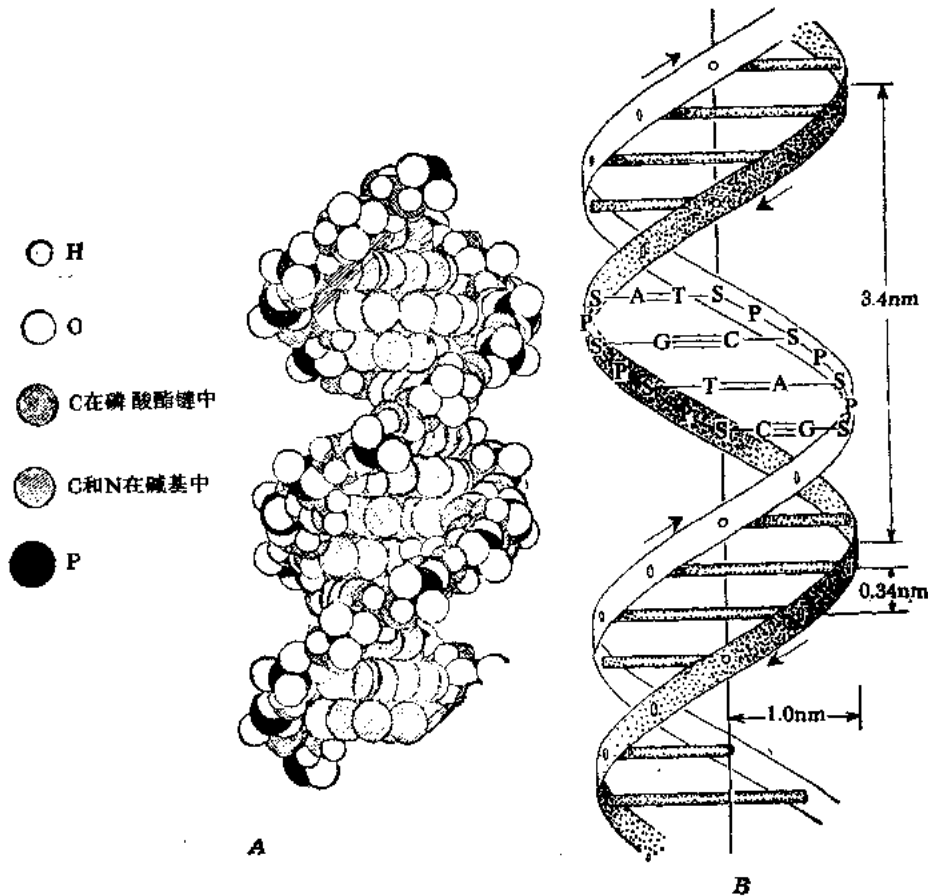


图 5-2 DNA 分子双螺旋结构模型(A)及其图解(B)

1. 两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴相互缠绕;

2. 嘌呤与嘧啶碱位于双螺旋的内侧。磷酸与核糖在外侧,彼此通过 3', 5'-磷酸二酯键相连接,形成 DNA 分子的骨架。碱基平面与纵轴垂直,糖环的平面则与纵轴平行。多核苷酸链的方向取决于核苷酸间磷酸二酯键的走向。习惯上以 C_{3'}→C_{5'} 为正向(图 5-3)。两条链均为右手螺旋。双螺旋结构上有二条螺形凹沟,一条较深,一条较浅。较深的沟称大沟(major groove),较浅的称小沟(minor groove)。大沟的宽度为 1.2nm,深度为 0.85nm。小沟的宽度为 0.6nm,深度为 0.75nm。

3. 双螺旋的平均直径为 2nm,两个相邻的碱基对之间相距的高度,即碱基堆积距离为 0.34nm,两个核苷酸之间的夹角为 36°。因此,沿中心轴每旋转一周有 10 个核苷酸。每一转的高度(即螺距)为 3.4nm。

4. 两条核苷酸链依靠彼此碱基之间形成的氢键相连系而结合在一起。根据分子模型的计算,一条链上的嘌呤碱必须与另一条链上的嘧啶碱相匹配,其距离才正好与双螺旋的直径相吻合。碱基之间所形成的氢键,根据对碱基构象研究的结果,A 只能与 T 相配对,形成两个氢键;G 与 C 相配对,形成三个氢键。所以 GC 之间的连接较为稳定(图 5-4)。上述碱基之间配对的原则称为碱基互补 (base complementary)。根据碱基互补原则,当一条多核苷酸链的序列被确定以后,即可推知另一条互补链的序列。碱基互补原则具有极重要的生物学意义。DNA 复制、转录、反转录等的分子基础都是碱基互补。

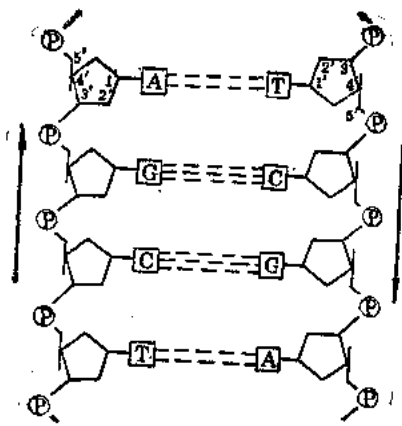


图 5-3 DNA 分子中多核苷酸链的方向

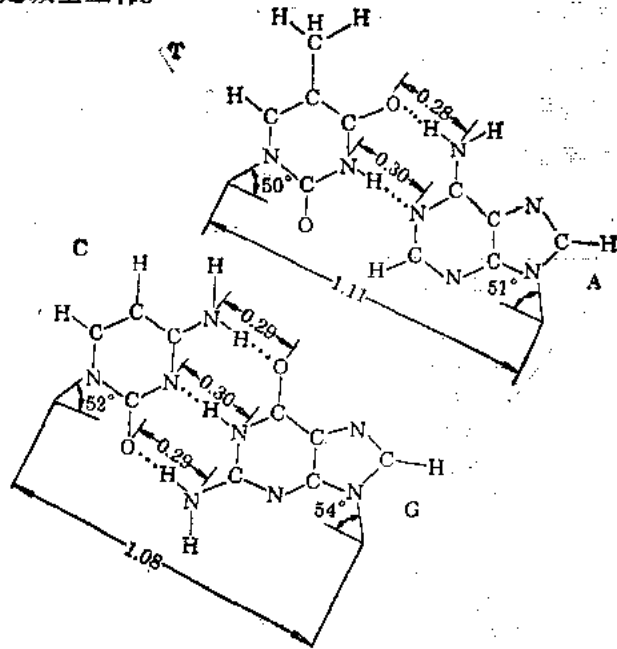


图 5-4 DNA 分子中的 A-T, G-C 配对
(图中长度单位为 nm)

由于 Watson 和 Crick 的模型是根据 Franklin 和 Wilkins 所提供的 DNA 纤维的 X-光衍射分析资料推导出来的。它所提供的只是 DNA 结构的平均特征。后来,对 DNA 晶体所作的 X-光衍射分析才提供了更为精确的信息。K. Dickerson 等人用人工合成的多聚脱氧核糖核苷酸(十二聚体)晶体进行 X-光衍射分析后,认为这种十二聚体的结构与 Watson 和 Crick 模型所提供的结构十分相似,但在结构上并不象 Watson-Crick 模型所说的那样均一。这是由于碱基序列的不同,以致在局部结构上有较大的差异。这些差异是:

1. Watson-Crick 模型认为每一螺周含有 10 个碱基对,所以两个核苷酸之间的夹角是 36° 。但在 Dickerson 的十二聚体中,两个碱基间的夹角可自 28° 至 42° 不等。

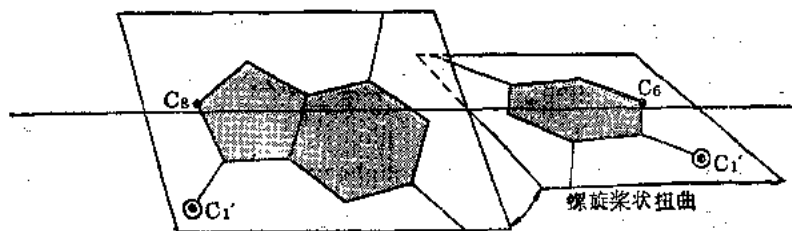


图 5-5 碱基对的螺旋桨状结构

2. Dickerson 所研究的十二聚体结构中, 组成碱基对的两个碱基的分布并非在同一平面上, 而是碱基对沿长轴旋转一定角度, 从而使碱基对的形状象螺旋桨叶片的樣子(图 5-5), 故称为螺旋桨状扭曲(propeller twisting)。这种结构可提高碱基堆积力, 使 DNA 结构更稳定。

在生物体内, 绝大部分 DNA 是以 B-DNA 形式存在的。DNA 作为一种在生命活动中非常重要的生物大分子, 有必要对其某些重要特性在这里加以讨论。

1. DNA 分子的长度 天然 DNA 分子的长度往往是很长的。以大肠杆菌染色体 DNA 为例, 分子量为 2.6×10^9 或由 4×10^8 碱基对(bp)组成, 长度为 1.4×10^6 nm。就其长度与直径之比而言, 这是一种极其不对称的分子。如此细长的分子对任何机械力的作用都十分敏感, 难怪用一般方法所制备的 DNA 样品往往是降解了的 DNA 片段。DNA 的长度可用电子显微镜直接测量。表 5-5 列出了一些 DNA 的长度。

表 5-5 DNA 分子的长度

生物体	千碱基对(kb)	长度(微米)
病毒		
多瘤病毒或 SV-40	5.1	1.7
λ 噬菌体	48.6	17
T ₂ 噬菌体	166	56
牛痘病毒	190	65
细菌		
枝原体	760	260
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	4 000	1 360
真核生物		
酵母	13 500	4 600
果蝇	165 000	56 000
人	2 900 000	990 000

2. DNA 分子结构中的碱基互变异构体(tautomeric form) DNA 分子的某些化学性质与其碱基上氢原子的位置有关。1953 年以前, 许多人认为这些氢原子可以在嘌呤或嘧啶环上的氮或氧原子之间随便移动而无固定位置, 使碱基处于它们的互变异构作用的平衡之中。但是现在已公认, 虽然这种氢原子的移动也是可以发生的, 但事实上碱环上的氢原子有其较为固定的位置: 腺嘌呤和胞嘧啶环上的氮原子常处于氨基(NH₂)状态, 只有极少数处于亚胺基(NH)状态(图 5-6)。同样, 鸟嘌呤和胸腺嘧啶环上 C₆ 上的氧原子常为酮式(C=O), 很少有烯醇式(COH)(图 5-6)。

氢原子在碱基上具有较固定的位置具有重要意义。试设想一下, 如果 DNA 分子的碱基上的氢原子没有固定位置的话, A 就极易与 C 配对, G 则极易与 T 配对。这样 DNA 双螺旋结构中 A-T, G-C 碱基互补的原则就不复存在。DNA 分子也就难以成为遗传物质了。从另一方面也应看到, A 与 C 上的氢原子偶而也可形成亚胺基, G 与 T 上的氧原子偶而也可形成烯醇式。可能这就是 DNA 复制时引起突变的原因之一。这种突变是生物进化的动力。

3. DNA 分子的稳定性 DNA 双螺旋结构在生理状态下是很稳定的。维持这种稳定性的主要因素是碱基堆积力(base stacking force)。嘌呤与嘧啶碱形状扁平 呈疏水性, 分布于

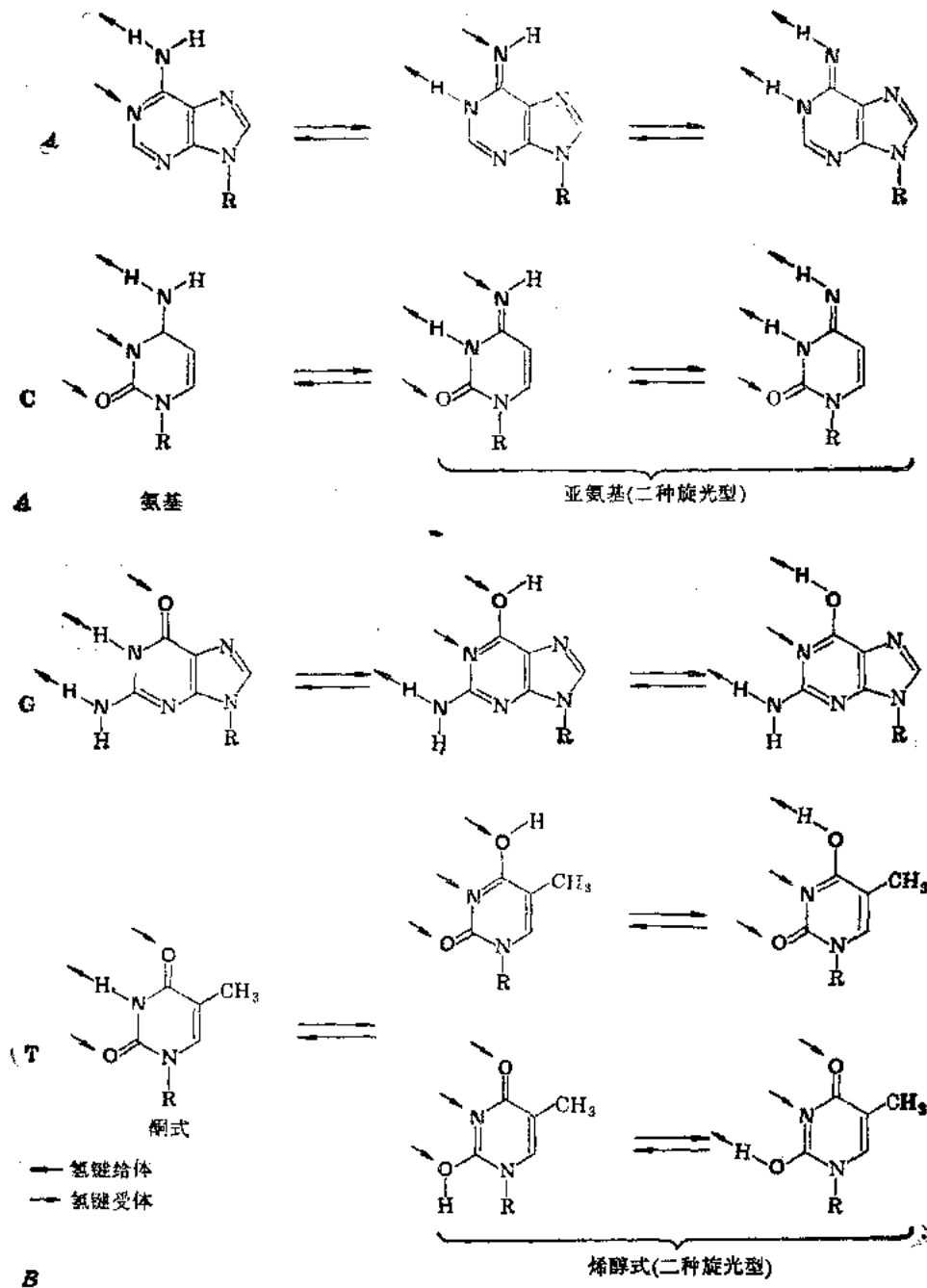


图 5-6 碱基的互变异构作用
以粗体字表示的原子可以参与氢键的形成

双螺旋结构内侧。大量碱基层层堆积，两相邻碱基的平面十分贴近，于是使双螺旋结构内部形成一个强大的疏水区，与介质中的水分子隔开。其次，大量存在于 DNA 分子中的其他弱键在维持双螺旋结构的稳定上也起一定作用。这些弱键包括：互补碱基对之间的氢键；磷酸基团上的负电荷与介质中的阳离子之间形成的离子键；范德华引力(van der waal's force)。

4. DNA 分子的可塑性 在溶液中 DNA 分子具有较大的可塑性。由于分子上局部区域

受热力学的作用,往往使 DNA 分子发生弯曲,缠绕或伸展。这种分子变形并不是由于互补碱基对之间的氢键瞬间断裂的结果,而是由于 DNA 分子多核苷酸链的骨架上的共价键的转角改变所引起的。

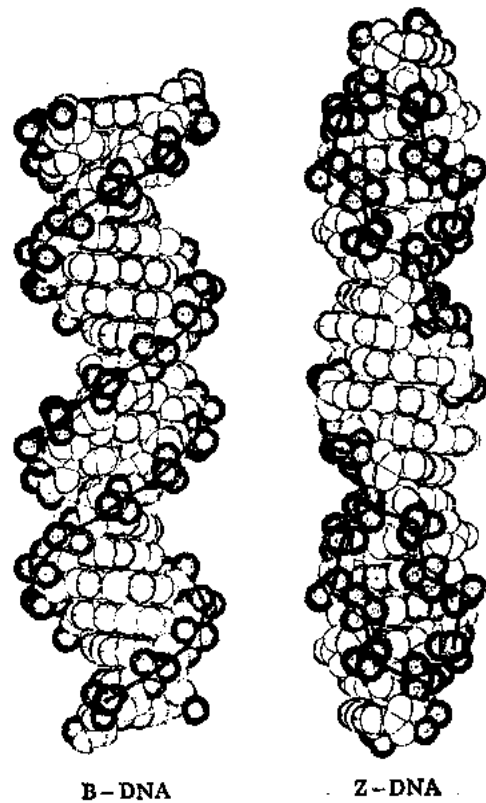
(二) A-DNA 的结构

在相对湿度为 75% 以下所获得的 DNA 纤维的 X-光衍射分析资料表明,这种 DNA 纤维具有不同于 B-DNA 的结构特点,称为 A-DNA。A-DNA 也是由反向的两条多核苷酸链组成的双螺旋,也为右手螺旋,但是螺体较宽而短,碱基对与中心轴之倾角也不同,呈 19° 。RNA 分子的双螺旋区以及 RNA-DNA 杂交双链也具有与 A-DNA 相似的结构。RNA 分子由于在糖环上有 2'-OH 存在,从空间结构上说不可能形成 B-型结构。

(三) Z-DNA 分子的结构 除了 A-DNA 和 B-DNA 以外,自然界中还发现有一种 Z-DNA。A. Rich 在研究 CGCGCG 寡聚体的结构时发现了这类 DNA。虽然,CGCGCG 在晶体中也呈双螺旋结构,但它不是右手螺旋,而是左手螺旋。所以这种 DNA 称左旋 DNA。那么 Z-DNA 的名称是从何而来的呢?在 CGCGCG 晶体中,磷酸基在多核苷酸骨架上的分布呈 Z 字形(图 5-7),所以也称它 Z-DNA。Z-DNA 只有一条大沟,而无小沟。

天然 B-DNA 的局部区域可以出现 Z-DNA 结构,说明 B-DNA 与 Z-DNA 之间是可以互相转变的。目前仍然不清楚 Z-DNA 究竟具有何种生物学功能。

表 5-6 中比较了 A-, B-, Z-DNA 的一些主要特性。



B-DNA Z-DNA
图 5-7 Z-DNA 与 B-DNA 之比较

表 5-6 A-, B-和 Z-DNA 的比较

	螺旋类型		
	A	B	Z
外形	粗短	适中	细长
每对碱基之距离	0.23 nm	0.34 nm	0.38 nm
螺旋直径	2.55 nm	2.37 nm	1.84 nm
螺旋方向	右手	右手	左手
糖苷键构型	反式	反式	C, T 反式 G 顺式
每匝螺旋碱基对数目	11	10.4	12
螺距	2.46 nm	3.32 nm	4.56 nm
碱基对与中心轴之倾角	19°	1°	9°
大沟	狭,很深	宽,深	平坦
小沟	很宽,浅	狭,很深	很狭,深

引自 Stryer, L., Biochemistry, 3rd ed. 1988.

四、环形 DNA

生物体内有些 DNA 是以双链环形 DNA 形式存在的，如某些病毒 DNA，某些噬菌体 DNA，细菌质粒 DNA，真核细胞中的线粒体 DNA，叶绿体 DNA 等。许多细菌染色体 DNA 也是环形的。

λ 噬菌体 DNA 在不同的生活周期中可以环形或线形存在。线形结构 DNA 的两端有粘

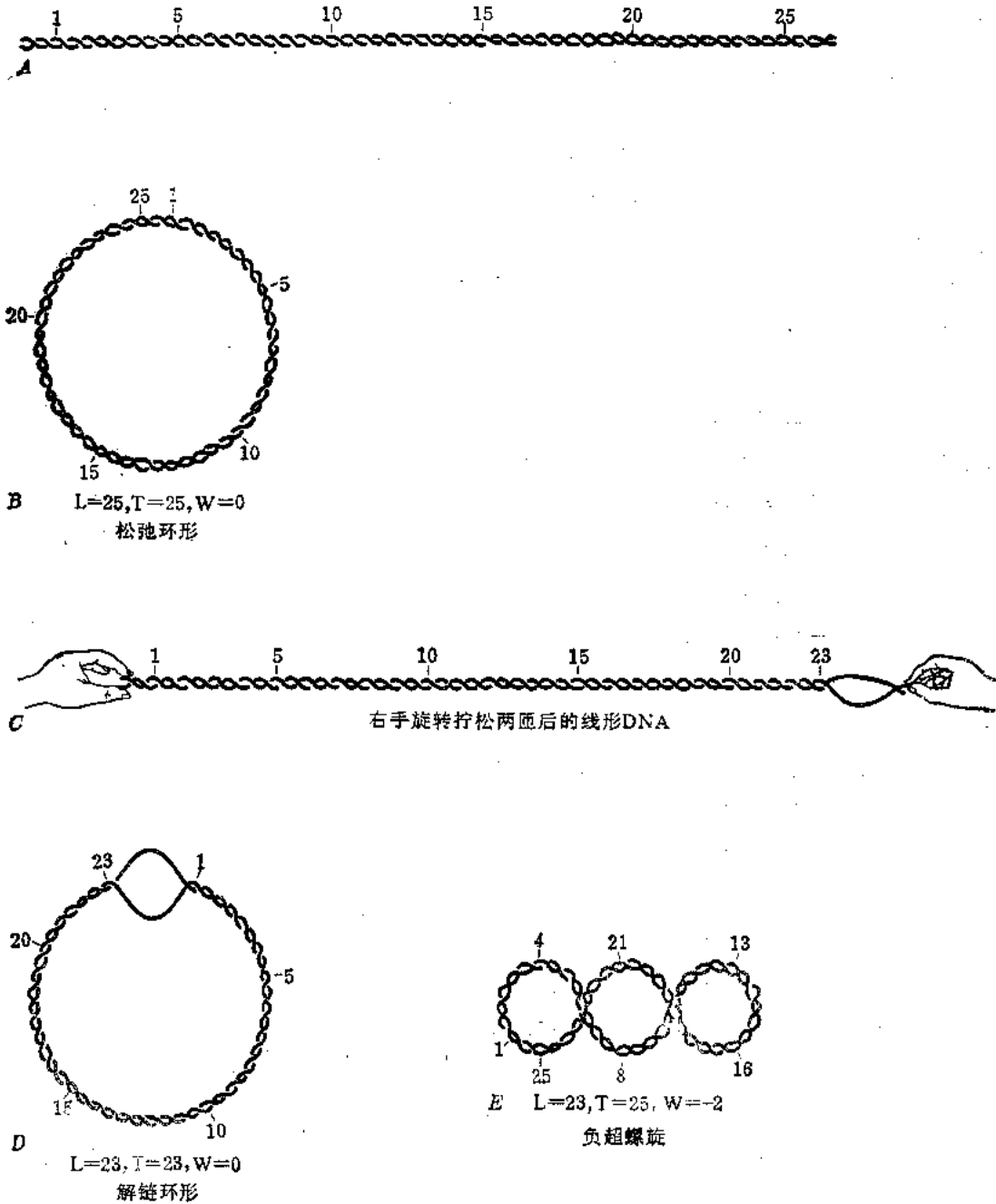


图 5-8 环形 DNA 的不同构象

末端,可以借助于 DNA 连接酶将互补的粘末端连接起来,成为环形 DNA。

J. Vinograd 在环形 DNA 的研究上有很大贡献。下面就环形 DNA 的基本性质作一些讨论。

应用拓扑学(topology)知识可以加深对 DNA 分子构象的了解。拓扑学是数学的一个分支,专门研究物体变形后仍然保留下来的结构特性。为了说明问题起见,以一段由 260 碱基对组成的线形 B-DNA 为例来加以讨论。图 5-8A 中为一段长 260 碱基对的 B-DNA。这段 DNA 的螺周数应为 $25(260/10.4=25)$ 。当将此线形 DNA 连接成环形时,此环形 DNA 称为松弛型 DNA (relaxed DNA)(图 5-8B)。但是若将上述线形 DNA 的螺旋先拧松两周再连接成环形时,可以形成两种环形 DNA。一种称解链环形 DNA(unwound circle DNA)(图 4-8D),它的螺周数为 23,还含有一个解链后形成的突环。另一种环形 DNA 称超螺旋 DNA (superhelix DNA)(图 4-8E),它的螺周数仍为 25,但同时具有两个超螺旋周。从力能学的观点来说,超螺旋 DNA 更易形成。超螺旋 DNA 具有更为致密的结构,可以将很长的 DNA 分子压缩在一个极小的体积内。在生物体内,绝大多数 DNA 确是以超螺旋形的形式存在的。由于超螺旋形 DNA 有较大的密度,在离心场中移动较线形或开环形 DNA 要快,在凝胶电泳中泳动的速度也较快。应用超离心及凝胶电泳可以很容易地将不同构象的 DNA 分离开来。

下面讨论环形 DNA 的一些重要的拓扑学特性。

1. 连环数(linking number) 这是环形 DNA 的一个很重要的特性。连环数指的是:在双螺旋 DNA 中,一条链以右手螺旋绕另一条链缠绕的次数,以字母 L 表示。在上述松弛环形 DNA 中, $L=25$,在解链环形分子中及超螺旋分子中 L 值皆为 23。这三种环形 DNA 分子具有相同的结构,但 L 值不同,所以称它们为拓扑异构体(topoisomer)。拓扑异构酶可以催化拓扑异构体之间的转换。

2. 缠绕数(twisting number) 指 DNA 分子中的 Watson-Crick 螺旋数目,以 T 表示。上述解链环形与超螺旋形 DNA 虽都具有相同的 L 值,但它们却具有不同的 T 值。前者 $T=23$,后者为 25。

3. 超螺旋周数(number of turns of superhelix)或扭曲数(writhing number) 以 W 表示。上述解链环形和超螺旋形 DNA 的 W 值也是不同的,前者为 0,后者为 -2。

L, T, W 三者之间的关系为:

$$L = T + W。$$

T 与 W 值可以是小数,但 L 值必须是整数。

L 值相同的 DNA 之间可以不经链的断裂而互相转变。

拓扑异构体之间的 L 值相差为 1 时,即可以用琼脂糖凝胶电泳将它们分开。

4. 比连环差(specific linkiny difference) 以 λ 表示。它用来表示 DNA 的超螺旋程度。

$$\lambda = (L - L_0) / L_0$$

上式中, L_0 是指松弛环形 DNA 的 L 值,如上述超螺旋 DNA 的 $L=23$, $L_0=25$,所以 $\lambda = -0.08$ 。也可以将 λ 值视为超螺旋密度(superhelix density)。天然 DNA 的超螺旋密度一般在 -0.03 到 -0.09 之间。负号代表超螺旋周为左手螺旋。上面已经提到,负超螺旋

DNA 是由于两条链的缠绕不足引起的。负超螺旋 DNA 很易解链,易于投入 DNA 的复制、重组和转录等需要将两条链分开才能进行的反应。

DNA 的拓扑异构体之间的转变是通过拓扑异构酶(topoisomerase)来实现的。J. Wang 和 M. Gellert 首先发现了这类酶。这种酶可以改变 DNA 拓扑异构体的 L 值。拓扑异构酶有两类。I 类能使双链超螺旋 DNA 转变成松弛形环状 DNA,每一次催化作用可使 L 值增加 1。II 类酶刚好相反,可使松弛形环状 DNA 转变成超螺旋形 DNA,每次催化作用,使 L 值减少 2。拓扑异构酶 II 也称促旋酶(gyrase)。这两种拓扑异构酶的作用刚好相反,所以细胞内两种酶的含量受严格的控制,使细胞内 DNA 保持在一定的超螺旋水平。关于拓扑异构酶还将在 DNA 复制一章详述。

五、DNA 的生物学功能

DNA 是遗传物质,是遗传信息的载体。

尽管间接的证据早就提示 DNA 可能是遗传物质,但是直接证明 DNA 的遗传功能还是由 Avery 在 1943 年用细菌转化作用的实验完成的。间接的证据包括:

1. DNA 分布在染色体,是染色体的主要成分,而染色体是直接遗传有关的;
2. 细胞核内 DNA 含量十分稳定,而且与染色体数目的多少有平行关系,体细胞(双倍体)DNA 含量为生殖细胞(单倍体)DNA 含量的两倍;
3. DNA 在代谢上较稳定,不受营养条件,年龄等因素影响;
4. 可作用于 DNA 的一些物理和化学因素,如紫外线、X-射线、氮芥等都可以引起遗传特性的改变。

1944 年 Avery 等人第一次证明了 DNA 是细菌的转化因子。这项研究在分子遗传学上有极其重要的意义。Avery 从光滑型肺炎球菌(有荚膜,菌落光滑)分别提取 DNA、蛋白质及多糖物质,并分别与粗糙型肺炎球菌(无荚膜,菌落粗糙)一起培养,发现只有 DNA 能使一部

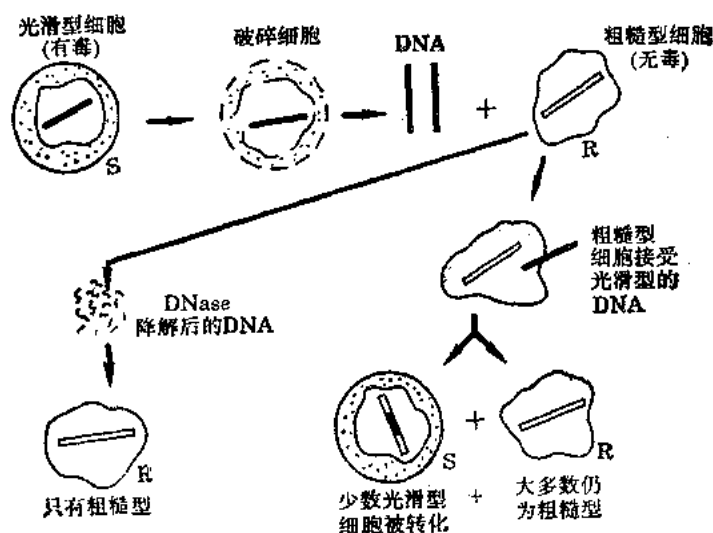


图 5-9 肺炎球菌转化作用图解

分粗糙型细菌转变成光滑型,而且转化率与 DNA 的纯度有关, DNA 越纯,转化率越高。若将 DNA 事先用脱氧核糖核酸酶降解,转化作用就不复存在(图 5-9)。这一实验有力地说明了 DNA 是转化因子。这种从一个供体菌得到的 DNA 通过一定途径授与另一种细菌,从而使后者(受体菌)的遗传特性发生改变的作用称转化作用(transformation)。转化作用的实质是外源 DNA 与受体细胞基因组间的重组,使受体细胞获得新的遗传信息。近年来已将转化作用应用于动植物细胞的转化,为育种工作提供了新途径。

第三节 核糖核酸(RNA)

一、RNA 的结构

RNA 也是无分支的线形多聚核糖核苷酸,主要由四种核糖核苷酸组成,即腺嘌呤核糖核苷酸,鸟嘌呤核糖核苷酸,胞嘧啶核糖核苷酸和尿嘧啶核糖核苷酸。这些核苷酸中的戊糖不是脱氧核糖,而是核糖。RNA 分子中也还有某些稀有碱基。图 5-10 为 RNA 分子中的一小段,

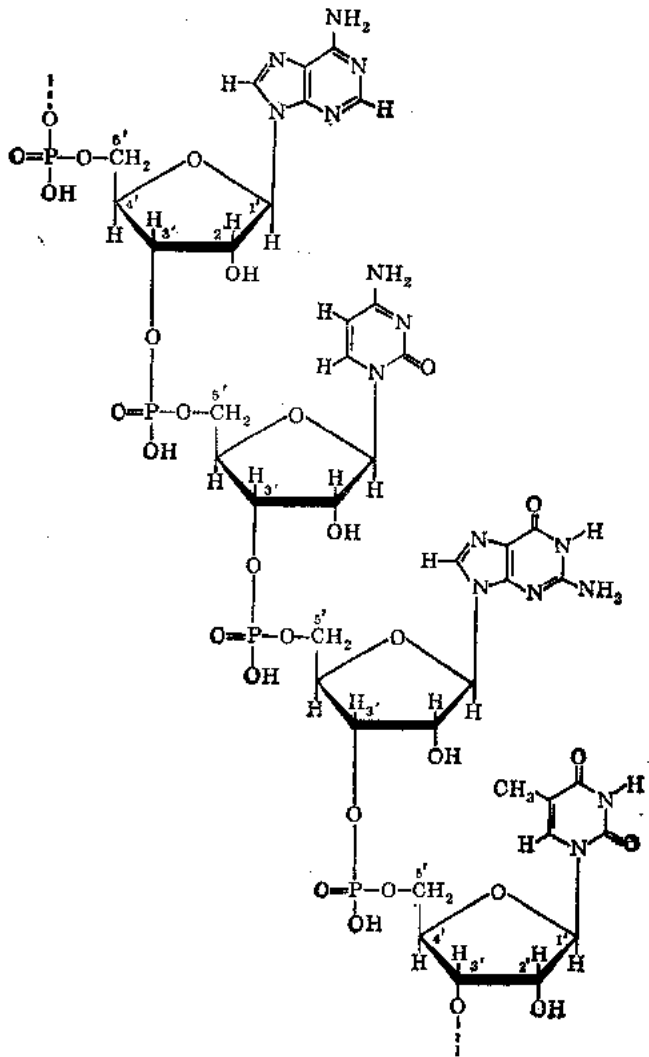


图 5-10 RNA 分子中一小段结构

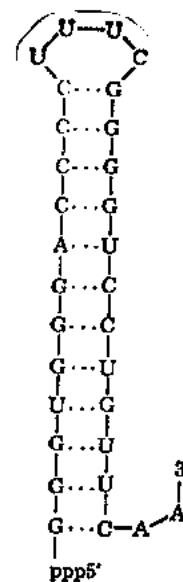


图 5-11 RNA 分子自身回折形成双螺旋区

以示 RNA 之结构。

组成 RNA 的核苷酸也是以 3', 5'-磷酸二酯键彼此连接起来的。尽管 RNA 分子中核糖环 C₂ 上有一羟基, 但并不形成 2', 5'-磷酸二酯键。用牛脾磷酸二酯酶降解天然 RNA 时, 降解产物中只有 3'-核苷酸, 并无 2'-核苷酸, 就支持了上述结论。

生物体内 RNA 一般都是以 DNA 为模板合成的。某些 RNA 病毒中, RNA 复制酶也可催化以 RNA 为模板的 RNA 合成。这在以后的章节中将详细讨论。

天然 RNA 并不象 DNA 那样都是双螺旋结构, 而是单链线形分子。只有局部区域为双螺旋结构。这些双链结构是由于 RNA 单链分子通过自身回折使得互补的碱基对相遇, 形成氢键结合而成的, 同时形成双螺旋结构。不能配对的区域形成突环(loop), 被排斥在双螺旋结构之外(图 5-11)。RNA 中的双螺旋结构为 A-DNA 类型的结构。每一段双螺旋区至少需要有 4—6 对碱基才能保持稳定。一般说, 双螺旋区约占 RNA 分子的 50%。

二、RNA 的类型

动物、植物和微生物细胞内都含有三种主要 RNA, 即核糖体 RNA (ribosomal RNA, 缩写成 rRNA), 转运 RNA (transfer RNA, 缩写成 tRNA), 信使 RNA (messenger RNA, 缩写成 mRNA)。表 5-7 中列出了大肠杆菌中三类 RNA 的主要特性。此外, 真核细胞中还有少量核内小 RNA (small nuclear RNA, 缩写成 snRNA)。

表 5-7 大肠杆菌中的 RNA

RNA 类型	相对含量 (%)	沉降系数 (S)	分子量 (kd)	分子长度 (核苷酸)
rRNA	80	23	1.2×10^6	3700
		16	0.55×10^6	1700
		5	3.6×10^4	120
tRNA	15	4	2.5×10^4	75
mRNA	5	—	变化范围很大	—

(一) tRNA

tRNA 约占全部 RNA 的 15%。tRNA 的分子量较小在 2.5×10^4 左右, 由 70—90 个核苷酸组成。tRNA 在蛋白质生物合成过程中具有转运氨基酸的作用, 它的名称也是由此而来。但 tRNA 的生理功能不仅仅是转运氨基酸。它在蛋白质生物合成的起始作用中, 在 DNA 反转录合成中及其他代谢调节中也起重要作用。这在以后各章中都将讲到。细胞内 tRNA 的种类很多, 每一种氨基酸都有其相应的一种或几种 tRNA。许多 tRNA 的一级结构早就被阐明, 对 tRNA 的二级结构和三级结构也比较清楚。所以可以将 tRNA 的结构特点作一概括:

1. 分子量在 25kd 左右, 由 70—90 个核苷酸组成, 沉降系数在 4S 左右;
2. 碱基组成中有较多的稀有碱基;
3. 3'末端都为 $\cdots C_p C_p AOH$, 用来接受活化的氨基酸。所以这个末端称接受末端;
4. 5'-末端大多为 $pG\cdots$, 也有 $pC\cdots$ 的;
5. tRNA 的二级结构都呈三叶草形(图 5-12)。双螺旋区构成了叶柄, 突环区好象是三

叶草的三片小叶。由于双螺旋结构所占比例甚高, tRNA 的二级结构十分稳定。三叶草形结构由氨基酸臂、二氢尿嘧啶环、反密码环、额外环和 T ψ C 环等五个部分组成。

氨基酸臂(amino acid arm) 由 7 对碱基组成, 富含鸟嘌呤, 末端为一 CCA, 接受活化的氨基酸。

二氢尿嘧啶环(dihydrouridine loop) 由 8—12 个核苷酸组成, 具有两个二氢尿嘧啶, 故得名。通过由 3—4 对碱基组成的双螺旋区(也称二氢尿嘧啶臂)与 tRNA 分子的其余部分相连。

反密码环(anticodon loop) 由 7 个核苷酸组成。环中部为反密码子, 由 3 个碱基组成。次黄嘌呤核苷酸(也称肌苷酸, 缩写成 I)常出现于反密码子中。反密码环通过由 5 对碱基组成的双螺旋区(反密码臂)与 tRNA 的其余部分相连。

额外环(extra loop) 由 3—18 个核苷酸组成。不同的 tRNA 具有不同大小的额外环, 所以是 tRNA 分类的重要指标。

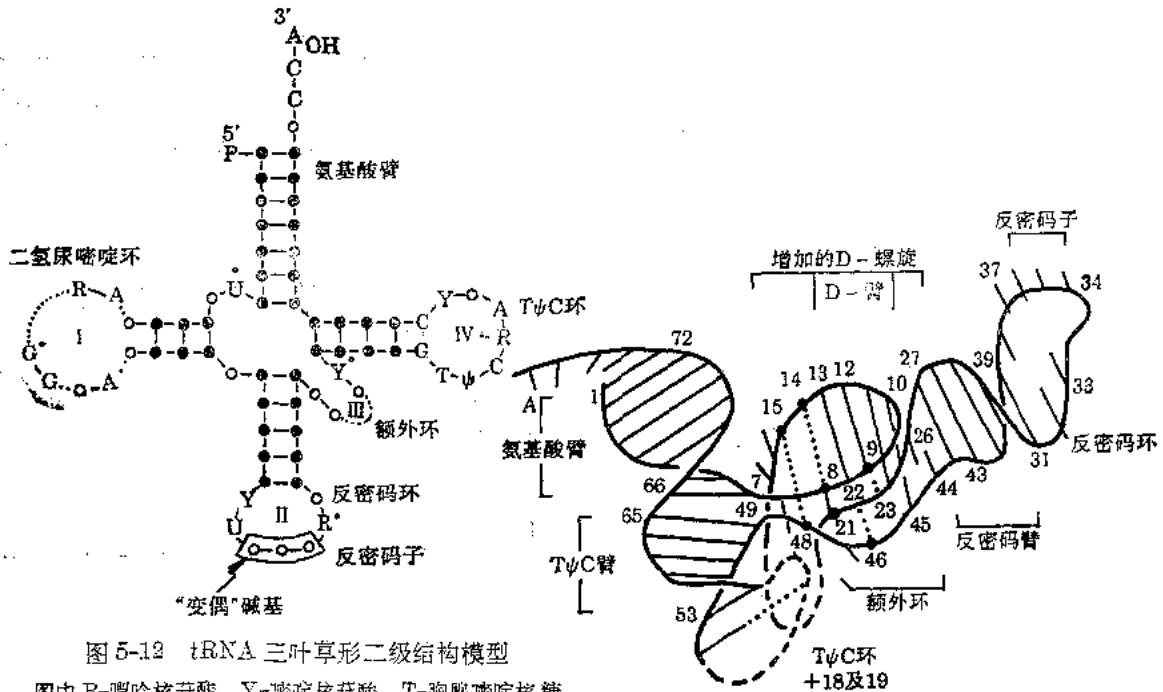


图 5-12 tRNA 三叶草形二级结构模型

图中 R-嘌呤核苷酸, Y-嘧啶核苷酸, T-胸腺嘧啶核糖核苷酸, ψ -假尿嘧啶核苷酸。带星号*的表示可以被修饰的碱基, 黑的圆点代表螺旋区的碱基, 白色圈代表不互补的碱基。

图 5-13 酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构

(按 Robertus 等 1974 年提出的模型)

假尿嘧啶核苷-胸腺嘧啶核糖核苷环(T ψ C 环)由 7 个核苷酸组成, 通过由 5 对碱基组成的双螺旋区(T ψ C 臂)与 tRNA 的其余部分相连。除个别例外, 几乎所有 tRNA 在此环中都含有 T ψ C。

6. tRNA 的三级结构 tRNA 三级结构的形状象一个倒写的 L 字母(图 5-13)。Kim (1973) 和 Robertus(1974)应用 X-光衍射分析对 tRNA 晶体进行研究并先后阐明了 tRNA 的三级结构。

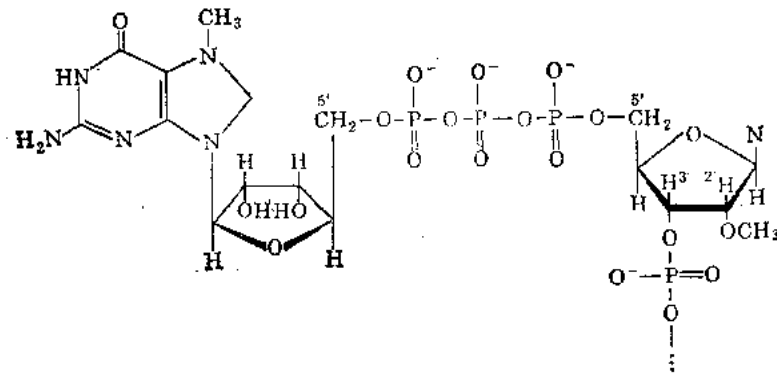
(二) mRNA

mRNA 是以 DNA 为模板合成的。mRNA 又是蛋白质合成的模板。这两部分将在第二十一章中详细讨论到。每一种多肽都有一种特定的 mRNA 负责编码,所以细胞内 mRNA 的种类是很多的。但就每一种 mRNA 的含量来说又十分低。这也解释了为什么 mRNA 的发现比 rRNA 与 tRNA 要迟。

真核细胞 mRNA 的结构有某些特点:

极大多数真核细胞 mRNA 在 3'-末端有一段长约 200 核苷酸的 polyA (polyadenylic acid)。polyA 是在转录后经 polyA 聚合酶的作用而添加上去的。polyA 聚合酶对 mRNA 专一,不作用于 rRNA 和 tRNA。原核生物的 mRNA 一般无 3'-polyA,但某些病毒 mRNA 也有 3'-polyA。polyA 可能有多方面功能,与 mRNA 从细胞核到细胞质的转移有关;与 mRNA 的半寿期有关。新合成的 mRNA, polyA 链较长,而衰老的 mRNA, polyA 链缩短。

真核细胞 mRNA 5'-末端还有一个特殊的结构:



3'-mG-5'ppp5'-N^m-3'-P, 称为 5'-帽子 (cap)。5'-末端的鸟嘌呤 N₇ 被甲基化。鸟嘌呤核苷酸经焦磷酸与相邻的一个核苷酸相连,形成 5', 5'-磷酸二酯键。这种结构有抗 5'-核酸外切酶降解的作用。目前认为 5'-帽子可能与蛋白质合成的正确起始作用有关,它可协助核糖体与 mRNA 相结合,使翻译作用在 AUG 起始密码子处开始。某些真核细胞病毒也有 5'-帽子结构。

(三) rRNA

rRNA 含量大,占细胞 RNA 总量的 80% 左右。是构成核糖体的骨架。大肠杆菌核糖

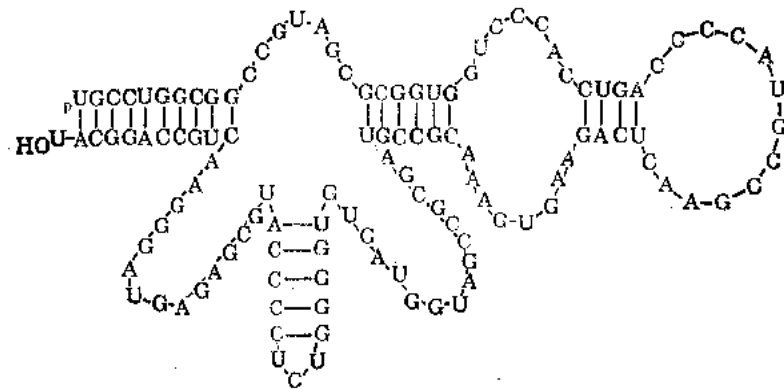


图 5-14 大肠杆菌 5S rRNA 的结构

体中有三类 rRNA: 5SrRNA, 16SrRNA, 23SrRNA。动物细胞核糖体 rRNA 有四类: 5SrRNA, 5.8SrRNA, 18SrRNA, 28SrRNA。许多 rRNA 的一级结构及由一级结构推导出来的二级结构都已阐明, 但是对许多 rRNA 的功能迄今仍不十分清楚。图 5-14 为大肠杆菌 5SrRNA 的结构。

第四节 核酸的某些物化性质与最常用的研究方法

这一章可以包括的内容十分庞杂, 非本书的篇幅所能及。已经有不少出版物提供这方面的内容, 必要时读者可以参考。本书只可能对若干比较重要的核酸物化性质和研究方法作概要叙述。

一、核酸的紫外吸收

嘌呤碱与嘧啶碱具有共轭双键, 使碱基、核苷、核苷酸和核酸在 240—290 nm 的紫外波段有一强烈的吸收峰, 最大吸收值在 260 nm 附近。不同核苷酸有不同的吸收特性。所以可以用紫外分光光度计加以定量及定性测定。

实验室中最常用的是定量测定小量的 DNA 或 RNA。对待测样品是否纯品可用紫外分光光度计读出 260 nm 与 280 nm 的 OD 值, 从 OD_{260}/OD_{280} 的比值即可判断样品的纯度。纯 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 应为 1.8, 纯 RNA 应为 2.0。样品中如含有杂蛋白及苯酚, OD_{260}/OD_{280} 比值即明显降低。不纯的样品不能用紫外吸收法作定量测定。对于纯的样品, 只要读出 260 nm 的 OD 值即可算出含量。通常以 1 OD 值相当于 50 微克/毫升双螺旋 DNA, 或 40 微克/毫升单螺旋 DNA(或 RNA), 或 20 微克/毫升寡核苷酸计算。这个方法既快速, 又相当准确, 而且不会浪费样品。对于不纯的核酸可以用琼脂糖凝胶电泳分离出区带后, 经吡啶溴红染色而粗略地估计其含量。

在有的书上还介绍用测定核酸溶液中的磷含量及紫外吸收值, 然后求出摩尔磷消光系数 $\epsilon(P)$ 来表示溶液中核酸的含量。

$$\epsilon(P) = \frac{A}{cL}$$

A 为光密度, c 为每升溶液中磷的摩尔数, L 为比色杯内径。由于

$$c = \frac{\text{每升中磷的重量(克)} W}{\text{磷的原子量}(30.98)}$$

所以上式可写成:

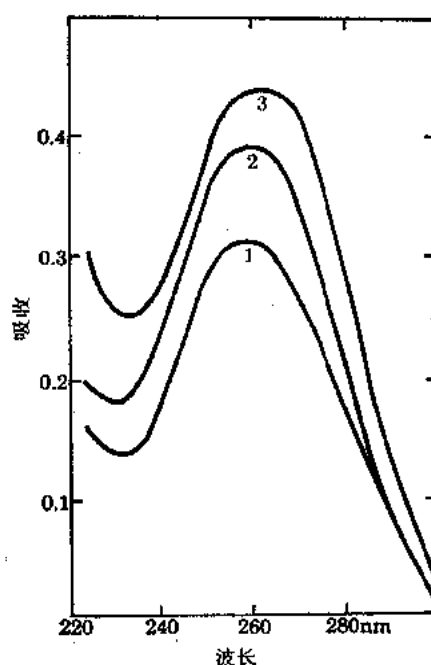


图 5-15 DNA 的紫外吸收光谱

1. 天然 DNA, 2. 变性 DNA, 3. 核苷酸总吸收值

$$\epsilon(P) = \frac{30.98A}{WI}$$

这个方法显然较麻烦。但在必要时可以对不含其他有紫外吸收杂质的样品进行准确测定。

一般 DNA 的 $\epsilon(P)$ 为 6 000—8 000, RNA 为 7 000—10 000。

核酸的 $\epsilon(P)$ 值较所含核苷酸单体的 $\epsilon(P)$ 要低 20—60%。单链多核苷酸的 $\epsilon(P)$ 值比双螺旋结构多核苷酸的 $\epsilon(P)$ 值要高。所以核酸发生变性时, $\epsilon(P)$ 值升高, 此现象称为增色效应 (hyperchromic effect) (图 5-15)。复性后 $\epsilon(P)$ 值又降低, 这现象称减色效应 (hypochromic effect)。

二、核酸的沉降特性

溶液中的核酸分子在引力场中可以下沉。不同构象的核酸(线形, 开环, 超螺旋结构), 蛋白质及其他杂质, 在超离心机的强大引力场中, 沉降的速率有很大差异, 所以可以用超离心法纯化核酸; 或将不同构象的核酸进行分离, 也可以测定核酸的沉降常数与分子量。

应用不同介质组成密度梯度进行超离心分离核酸时, 效果较好。RNA 分离常用蔗糖梯度。分离 DNA 时用得最多的是氯化铯梯度。氯化铯在水中有很大的溶解度。可以制成浓度很高(80 mol/L)的溶液。

应用吖啶溴红-氯化铯密度梯度平衡超离心, 很容易将不同构象的 DNA, RNA 及蛋白质分开。这个方法是目前实验室中纯化质粒 DNA 时最常用的方法。如果应用垂直转头, 每分钟 65 000 转(Beckman L-70 超离心机), 只要 6 小时可以完成分离工作。但是如果采用角转头, 转速为每分钟 45 000 转时, 则需 36 小时。离心完毕后, 离心管中各种成分的分布可以在紫外光照射下显示得一清二楚(图 5-16)。蛋白质漂浮在最上面, RNA 沉淀在底部。超螺旋 DNA 沉降较快, 开环及线形 DNA 沉降较慢。用注射针头从离心管侧面在超螺旋 DNA 区带部位刺入, 收集这一区带的 DNA。用异戊醇抽提收集到的 DNA 以除去染料, 然后透析除去 CsCl, 再用苯酚抽提 1—2 次, 即可用乙醇将 DNA 沉淀出来。这样得到的 DNA 有很高的纯度, 可供 DNA 重组, 测定序列及限制酶图谱等之用。在少数情况下, 需要特别纯的 DNA 时, 可以将此 DNA 样品再进行一次氯化铯密度梯度超离心分离。

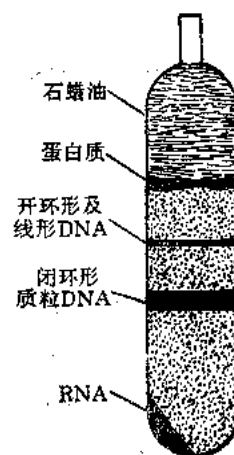


图 5-16 经染料-氯化铯密度梯度超离心后, 质粒 DNA 及各种杂质的分布

三、凝胶电泳

凝胶电泳可算是当前核酸研究中最常用的方法了。它有许多优点: 简单、快速、灵敏、成本

低。常用的凝胶电泳有琼脂糖(agarose)凝胶电泳和聚丙烯酰胺(polyacrylamide)凝胶电泳。可以在水平或垂直的电泳槽中进行。凝胶电泳兼有分子筛和电泳双重效果,所以分离效率很高。

(一) 琼脂糖凝胶电泳

以琼脂糖为支持物。电泳的迁移率决定于以下因素:

1. 核酸分子大小 迁移率与分子量对数成反比;
2. 胶浓度 迁移率与胶浓度成反比。常用1%胶分离DNA;
3. DNA的构象 一般条件下超螺旋DNA的迁移率最快,线形DNA其次,开环形最慢。但在胶中加入过多的吡啶溴红时,上述分布次序会发生改变;
4. 电流 一般不大于5V/cm。在适当的电压差时,迁移率与电流大小成正比;
5. 碱基组成 有一定影响,但影响不大;
6. 温度 4—30°C都可,常在室温。

琼脂糖凝胶电泳常用于分析DNA。由于琼脂糖制品中往往带有核糖核酸酶杂质,所以用于分析RNA时,必须加入蛋白质变性剂,如甲醛等。

电泳完毕后,将胶在荧光染料吡啶溴红的水溶液中染色(0.5微克/毫升)。吡啶溴红为一扁平分子,很易插入DNA中的碱基对之间。DNA与吡啶溴红结合后,经紫外光照射,可发射出红-橙色可见荧光。0.1 μ g DNA即可用此法检出,所以此法十分灵敏。根据荧光强度可以大体判断DNA样品的浓度。若在同一胶上加一已知其浓度的DNA作参考,则所测得的样品浓度更为准确。可以用灵敏度很高的鱼片将凝胶上所呈现的电泳图谱在紫外光照射下拍摄下来,作进一步分析与长期保留之用。图5-17即为凝胶电泳图谱。

应用凝胶电泳可以正确地测定DNA片段的分子大小。实用的方法是在同一胶上加一已知其分子量的样品(如图5-17中的 λ DNA/HindIII的片段)。电泳完毕后,经吡啶溴红染色,照相,从照片上比较待测样品中的DNA片段与标准样品中的那一条带最接近,即可推算出未知样品中各片段的大小。目前许多试剂公司都能提供各种不同分子量的标准样品。

凝胶上的样品,还可以设法回收,以供进一步研究之用。回收的方法很多,可参考其他资料。最常用的方法是将胶上某一区带在紫外光照射下,切割下来,将切下的胶条放在透析袋中,装上电泳液,在水平电泳槽中进行电泳,让胶上的DNA释放出来并进一步粘在透析袋内壁上,电泳3—4小时后,将电极倒转,再通电30—60秒钟,粘在壁上的DNA重又释放到缓冲液中。取出透析袋内的缓冲液(丢弃胶条),用苯酚抽提1—2次,水相用乙醇沉淀。这样回收的DNA纯度很高,可供进一步进行限制酶分析,序列分析或作末端标记。回收率在50%以上。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

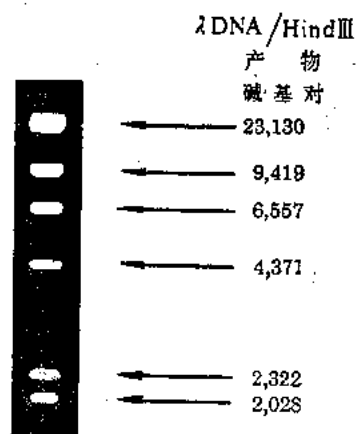


图5-17 (λ DNA/HindIII 片段)琼脂糖凝胶电泳图

以聚丙烯酰胺作支持物。单体丙烯酰胺在加入交联剂后, 就成聚丙烯酰胺。由于这种凝胶的孔径比琼脂糖凝胶的要小, 所以可用于分析分子量小于 1 000 bp 的 DNA 片段。聚丙烯酰胺中一般不含有 RNase, 所以可用于 RNA 的分析。但仍要留心缓冲液及其他器皿中所带的 RNase。常用垂直板电泳。

聚丙烯酰胺凝胶上的核酸样品, 经喹啉溴红染色, 在紫外光照射下, 发出的荧光很弱, 所以浓度很低的核酸样品不能用此法检测出来。

四、核酸的变性、复性及杂交

(一) 变性(denaturation)

变性作用是核酸的重要物化性质。核酸的变性指核酸双螺旋区的氢键断裂, 变成单链, 并不涉及共价键的断裂。多核苷酸骨架上共价键(3', 5'-磷酸二酯键)的断裂称核酸的降解。降解引起核酸分子量降低。

可以引起核酸变性的因素很多。由温度升高而引起的称热变性。由酸碱度改变引起的称酸碱变性。尿素是测定 DNA 序列时, 所用的聚丙烯酰胺凝胶电泳法中常用的变性剂。甲醛也常用于琼脂糖凝胶电泳, 测定 RNA 的分子大小。

当将 DNA 的稀盐溶液加热到 80°—100°C 时, 双螺旋结构即发生解体, 两条链分开, 形成无规线团(图 5-18)。一系列物化性质也随之发生改变: 260 nm 区紫外吸收值升高, 粘度降低, 浮力密度升高, 同时改变二级结构, 有时可以失去部分或全部生物活性。DNA 的变性的特点是爆发式的, 变性作用发生在一个很窄的温度范围内。通常把 DNA 的双螺旋结构失去一半时的温度称为该 DNA 的熔点或熔解温度(melting temperature), 用 T_m 表示。DNA 的

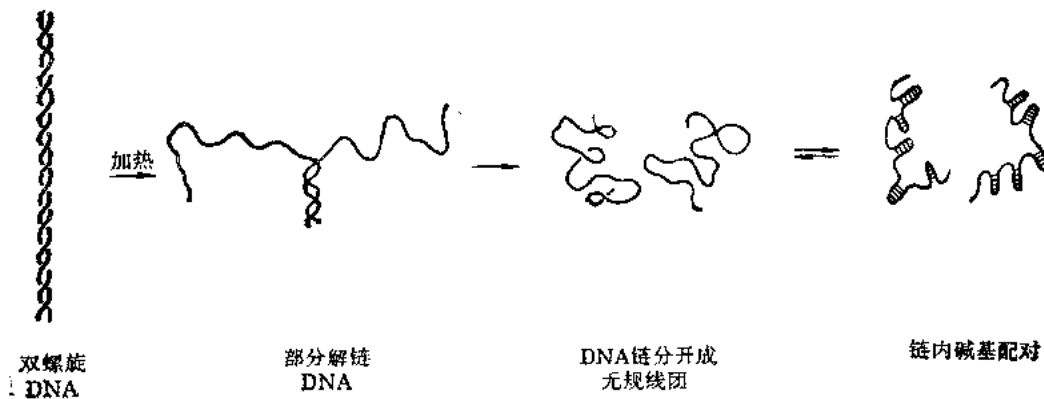


图 5-18 DNA 的变性过程

T_m 值一般在 70—85°C 之间(图 5-19)。

DNA 的 T_m 值大小与下列因素有关:

1. DNA 的均一性。均一性愈高的样品, 熔解过程愈是发生在一个很小的温度范围内。
2. G-C 之含量。G-C 含量越高, T_m 值越高, 成正比关系(图 5-20)。这是因为 G-C 对比 A-T 对更为稳定的缘故。所以测定 T_m 值可推算出 G-C 对之含量。其经验公式为:

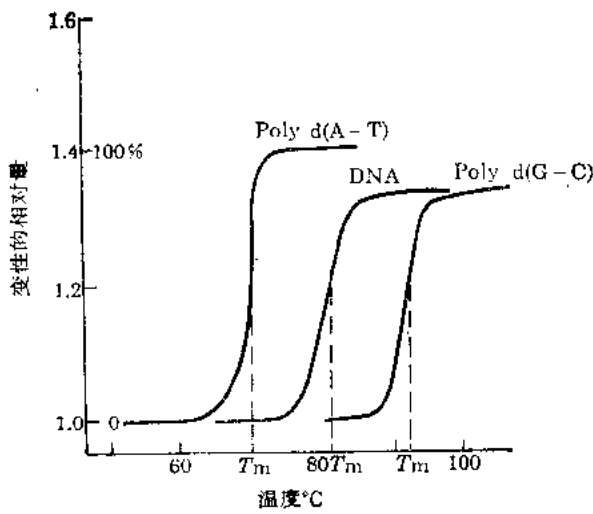


图 5-19 某些 DNA 的 T_m 值

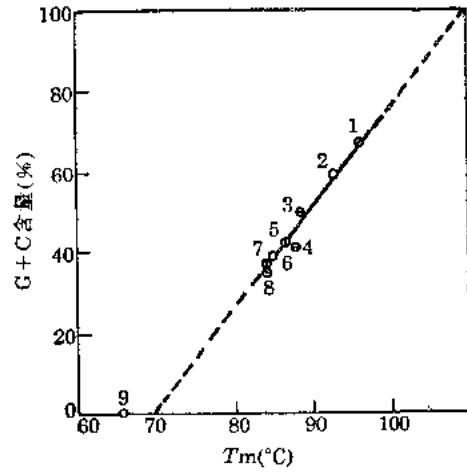


图 5-20 DNA 的 T_m 值与 G-C 含量之关系

DNA 来源: 1. 草分枝杆菌, 2. 沙门氏杆菌, 3. 大肠杆菌, 4. 鲑鱼精子, 5. 小牛胸腺, 6. 肺炎球菌, 7. 酵母, 8. 噬菌体 T_4 , 9. 多聚 d(A-T)

$$G-C\% = (T_m - 69.3) \times 2.44$$

3. 介质中的离子强度 一般说离子强度较低的介质中, DNA 的熔解温度较低, 熔解温度的范围也较窄。而在较高的离子强度的介质中, 情况则相反(图 5-21)。所以 DNA 制品应保存在较高浓度的缓冲液中或溶液中。常在 1 mol/L NaCl 中保存。

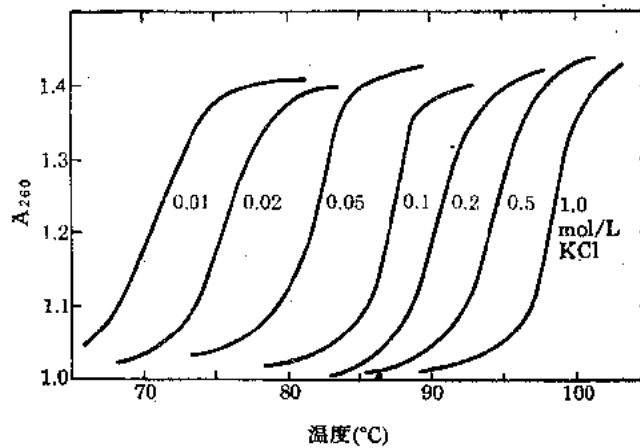


图 5-21 大肠杆菌 DNA 在不同浓度 KCl 中的熔解

RNA 分子中有局部的双螺旋区, 所以 RNA 也可发生变性, 但 T_m 值较低, 变性曲线也不那么陡。

(二) 复性(renaturation)

变性 DNA 在适当条件下, 又可使两条彼此分开的链重新缔合(reassociation)成为双螺旋结构, 这过程称复性。DNA 复性后, 许多物化性质又得到恢复。生物活性也可以得到部分恢复。复性过程基本上符合二级反应动力学。反应的进行与许多因素有关。将热变性的 DNA 骤然冷却时, DNA 不可能复性, 所以用同位素标记的双链 DNA 片段作为杂交的探针时, 在沸

水中加热数分钟后,要骤然在冰浴中冷却至低温,以防止复性。变性 DNA 在缓慢冷却时,可以复性。DNA 的片段越大,复性越慢。DNA 的浓度越大,复性越快。在一定条件下,复性反应的速度可以用 Cot 来衡量。 C_0 为变性 DNA 的原始浓度,以核苷酸的摩尔浓度表示, t 为时间,以秒表示。实验证明,两种浓度相同但来源不同的 DNA,复性时间的长短与基因组的大小有关(图 5-22)。具有很多重复序列的 DNA,复性也快。

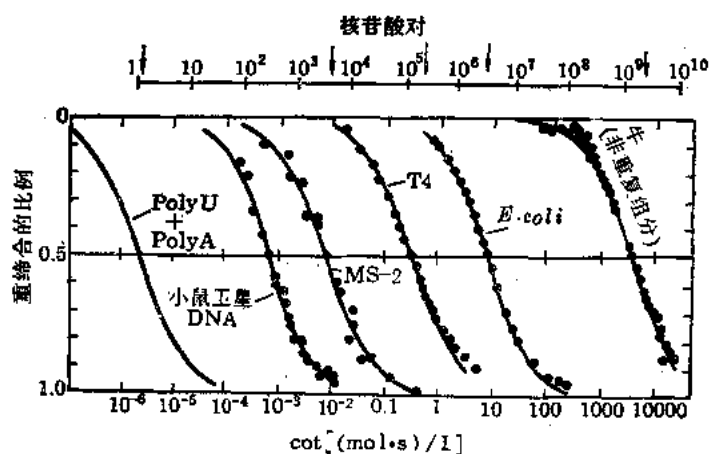


图 5-22 不同 DNA 的复性时间

(三) 核酸的杂交(hybridization)

将不同来源的 DNA 放在试管里,经热变性后,慢慢冷却,让其复性。若这些异源 DNA 之间在某些区域有相同的序列,则复性时,会形成杂交 DNA 分子。DNA 与互补的 RNA 之间也可以发生杂交。核酸的杂交在分子生物学和分子遗传学的研究中应用极广,许多重大的分子遗传学问题都是用分子杂交来解决的。

核酸杂交可以在液相或固相上进行。目前实验室中应用最广的是用硝酸纤维素膜作支持物进行的杂交。英国的分子生物学家 E. M. Southern 所发明的 Southern 印迹法 (southern blotting) 就是将凝胶上的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上后,再进行杂交的。这里以 DNA-DNA 杂交为例,较详细地介绍 Southern 印迹法。将 DNA 样品经限制性内切酶降解后,用琼脂糖凝胶电泳进行分离。将胶浸泡在碱 (NaOH) 中使 DNA 进行变性,然后将变性 DNA 转移到硝酸纤维素膜上(硝酸纤维素膜只吸附变性 DNA!),在 80°C 烤 4—6 小时,使 DNA 牢固地吸住在纤维素膜上。然后与放射性同位素标记的变性后的 DNA 探针进行杂交。杂交须在较高的盐浓度及适当的温度(一般 68°C)下进行数小时或十余小时,然后通过洗涤,除去未杂交上的标记物。将纤维素膜烘干后进行放射自显影。全部过程在图 5-23 中作了图解。

除了 DNA 外, RNA 也可用作探针(probe)。用 ^{32}P 标记核酸时(用作探针),可以在 3' 或 5' 末端标记,也可采用均匀标记。

应用类似的方法也可分析 RNA。即将 RNA 变性后转移到纤维素膜上再进行杂交。这方法称 Northern 印迹法 (Northern blotting)。用类似的方法,根据抗体与抗原可以结合的原理,也可以分析蛋白质。这个方法称 Western 印迹法 (Western blotting)。

应用核酸杂交技术,可以将含量极少的真核细胞基因组中的单拷贝基因钓出来。

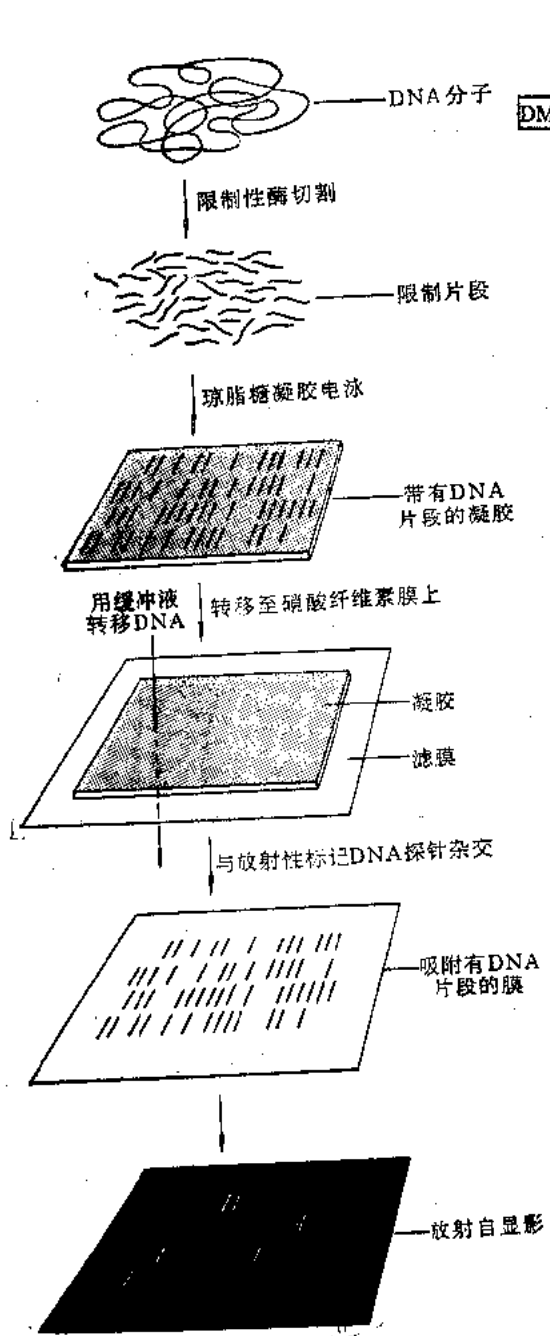


图 5-23 Southern 印迹法图解

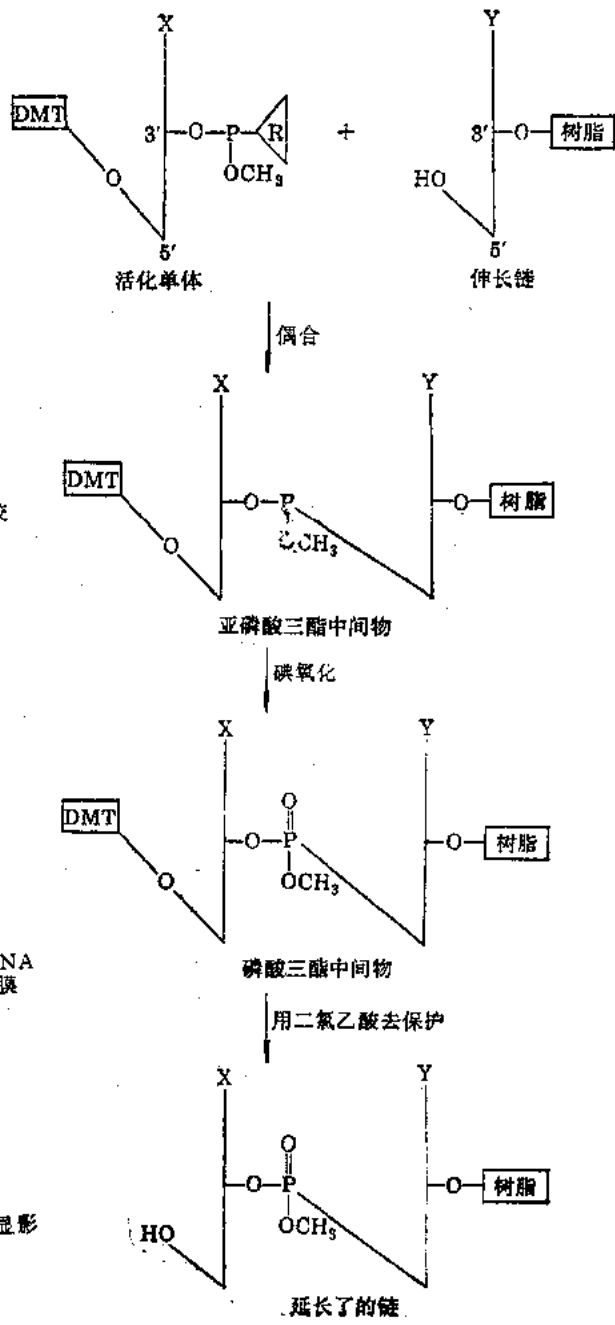


图 5-24 DNA 固相合成(亚磷酸三酯法)

五、DNA 的固相合成

随着基因工程的发展,定向地修改、设计生物基因组的日子已经到来了。快速的合成 DNA 片段的方法显得十分重要。可喜的是目前市场上已有完全自动化的固相合成 DNA 片段的仪器供出售了。这种仪器可以在几小时或一天内合成出长度为几十个核苷酸或 100 多个核苷酸的 DNA 片段,供实验室应用。

DNA 固相合成的原理如下:全部反应是在一个不大的固相柱子中进行的。首先要将待活化的核苷酸上的某些游离基团保护(封闭)起来,使反应按设计的方向进行。5'-OH 用二对甲氧三苯甲基(dimethoxytrityl, DMT)保护,碱基上的氨基用苯甲酸保护。然后对 3'-OH 则用氨基磷酸化合物(phosphoramidite)进行活化。从图 5-24 中可见:第一个核苷酸的 3'-OH 与固相(树脂)结合在一起,它的 5'-OH 与活化的单体(核苷酸)之间形成一个亚磷酸三酯,活化单体上的 5'-OH 及碱环上的氨基等由于受到保护而不会参与反应。在第二步反应中,亚磷酸三酯经碘氧化形成磷酸三酯;第三步反应中,加入二氯乙酸除去生长链中的 5'-OH 上的保护剂 DMT。至此,DNA 链已延伸了一个核苷酸单位,并可投入下一轮延伸反应。按事先输入的程序,整个 DNA 片段合成完毕后,用苯硫酚(thiophenol)除去 5'-OH 上的保护剂 DMT,用浓氢氧化铵将 DNA 片段与固相树脂酯断开,使 DNA 得以洗脱下来。再用浓氢氧化铵在加热条件下使碱基上的保护剂除去。最后除去氢氧化铵,在真空中抽干。样品即可溶于适量水中进行分析。由于合成反应不可能都是完全达到终点的,所获得的 DNA 片段长短不一。可用液相色谱,或用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化,收集分子是最大的部分。图 5-24 为 DNA 固相合成过程的图解。

六、DNA 的限制酶图谱

(一) 限制性内切酶

限制性内切酶(restriction endonuclease)也称限制性酶(restriction enzyme)是由 W. Arber, H. Smith 和 D. Nathans 等人发现的(1979 年)。这类酶主要在细菌中产生。限制酶具有极高的专一性,识别双链 DNA 上特定的位点,将两条链都切断,形成粘末端或平末端。对于研究 DNA 的分子生物学家来说,这真是一把天赐神刀,可以用来解剖纤细的 DNA 分子。限制酶在分析染色体结构、制作 DNA 的限制酶谱、测定较长的 DNA 序列、基因的分离、基因的体外重组等研究中是不可缺少的工具。

限制性酶的生物学功能在于降解外面侵入的 DNA,但不降解自身细胞中的 DNA,因为在自身 DNA 的酶切位点上经甲基化修饰而受到保护。

限制酶可以识别 DNA 上的特定位点。这些位点的长度在 4—8 碱基对范围内。通常具回文结构(palindromic structure),切割后形成粘末端(或平末端)。

限制酶的命名较为特殊。以 EcoRI 为例加以说明。第一个大写字母 E 为大肠杆菌 *E. coli* 的属名的第一个字母,第 2、3 两个小写字母 co 为它的种名的头两个字母。第四个字母用大写 R,表示所用大肠杆菌的菌株。最后一个罗马字表示从该细菌中分离出来的这一类酶的编号。

目前已提纯的限制酶已很多,常用的约有100多种,并且已转化成为商品。大大节约了研究人员的时间。

限制酶较为稳定。作用时需要镁离子及一定的盐浓度。

表5-8中列出了若干限制酶的切割位点。

表5-8 限制性内切酶识别的位点

酶	来源	识别位点
EcoRI	<i>E. coli</i> B	$\begin{array}{c} \downarrow \\ -N-C-T-T-A-A-G-N-5' \\ 5'-N-G-A-A-T-T-C-N- \\ \uparrow \end{array}$
EcoRII	<i>E. coli</i> B	$\begin{array}{c} \downarrow \\ N-G-G-A-C-C-N-5' \\ 5'-N-C-C-T-G-G-N- \\ \uparrow \end{array}$
HindII	<i>Hemophilus influenzae</i> D	$\begin{array}{c} \downarrow \\ -C-A-R-Y-T-G-5' \\ 5'-G-T-Y-R-A-C \\ \uparrow \end{array}$
HindIII	<i>Hemophilus influenzae</i> D	$\begin{array}{c} \downarrow \\ T-T-C-G-A-A-5' \\ 5'-A-A-G-C-T-T- \\ \uparrow \end{array}$
HpaI	<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ -N-C-A-A-T-T-G-N-5' \\ 5'-N-G-T-T-A-A-C-N- \\ \uparrow \end{array}$
HpaII	<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ -N-G-G-C-C-N-5' \\ 5'-N-C-C-G-G-N \\ \uparrow \end{array}$
HaeIII	<i>Haemophilus aegypticus</i>	$\begin{array}{c} \downarrow \\ -N-C-C-G-G-N-5' \\ 5'-N-G-G-C-C-N- \\ \uparrow \end{array}$

R代表嘌呤核苷酸, Y代表嘧啶核苷酸。

(二) DNA的限制酶图谱

在研究某一种DNA时,弄清楚这种DNA分子有那些限制酶切点是很重要的,这就是制作DNA的限制酶图谱(restriction map)。建立限制酶图谱是进一步深入分析此DNA的基础。

图谱的制作十分简单。将纯化的DNA(往往用分子克隆法,从单一克隆中扩增而制备),用不同的限制酶切割,进行凝胶电泳分析。对环形DNA要先找出一个对该DNA只有一个切点的酶,以此点作为参考点。对于线形DNA就可免去这一步。根据测量凝胶电泳图上各酶切片段的长度,就可以决定各切点的位置。有时,需要用两种酶相继降解,有时需要用一种酶部分降解才能决定其酶切位点的位置。

如果将DNA的一端(3',或5'端都可)先进行放射性同位素标记,再用不同酶分头切割(完全降解,部分降解或双酶相继降解),各切点位置的确定就要容易得多了。

图5-25为SV-40基因组的限制酶图谱。

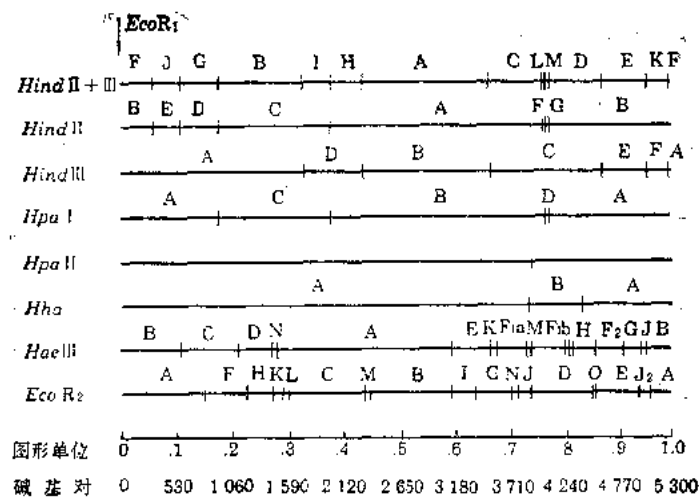


图 5-25 SV-40 病毒基因组限制酶图谱
参考点(零点)为 *EcoRI* 位点以箭头表示。

提 要

核酸分两大类, DNA 和 RNA。所有生物细胞都含有这两类核酸。但病毒则不同, DNA 病毒只含 DNA, RNA 病毒只含 RNA。核酸是分子生物学研究中的重要领域。

核酸是线形多聚核苷酸, 其基本结构单位是核苷酸。DNA 主要由四种脱氧核糖核苷酸组成。RNA 主要由四种核糖核苷酸组成。核苷酸又由含氮碱基、戊糖(核糖或脱氧核糖)及磷酸所组成。核酸中还有少量稀有碱基。

DNA 的空间结构模型是在 1953 年由 Watson 和 Crick 两人提出的。建立 DNA 空间结构模型的根据主要有两方面。一是 DNA 碱基组成的分析资料, 提示了 A-T, G-C 间碱基互补的可能性; 二是 DNA 纤维的 X-光衍射分析资料, 提示了双螺旋结构的可能性。DNA 是由两条反向直线形多核苷酸组成的双螺旋分子。单链多核苷酸中两个核苷酸之间的唯一连键是 3', 5'-磷酸二酯键。按 Watson-Crick 模型, DNA 的结构特点有: 两条反相平行的多核苷酸链围绕同一中心轴互绕, 碱基位于结构之内侧, 磷酸与糖基在外侧, 通过磷酸二酯键相连, 形成核酸的骨架。碱基平面与轴垂直, 糖环平面则与轴平行。两条链皆为右手螺旋。双螺旋的直径为 2nm, 碱基堆积距离为 0.34nm, 两核苷酸之间的夹角是 36°, 每对螺旋由 10 对碱基组成。碱基按 A-T, G-C 配对互补, 彼此以氢键相连系。维持 DNA 结构稳定的力量主要是碱基堆积力。双螺旋结构表面有两条螺形凹沟, 一大一小。

Watson-Crick 所阐明的是 B 型 DNA。此外还有 A 型 DNA 及左旋 DNA (Z-DNA)。它们在结构上有明显不同。应用核酸晶体的 X-光衍射分析技术, 发现 Watson-Crick 模型需要作某些补充才能反映 DNA 结构的真实情况。

DNA 是极其细长的生物大分子, 它的双螺旋结构是很稳定的, 但并不是不可改变的。溶液中的 DNA 可塑性很大, 主要是多核苷酸链骨架上的共价键旋转引起的变化, 使 DNA 分子

发生弯曲、缠绕、伸展。此外, DNA 碱基上的氢原子有较固定的位置, A, C 上的氮原子常处于氨基状态, G, T_C 上的氧原子常处于酮式状态的, 从而保证了 A-T, G-C 之间的稳定配对。

细胞内很多 DNA 是环形 DNA, 它具有一系列特点。多数 DNA 都是以超螺旋结构状态被包装在细胞器中。

DNA 的最主要的生物功能是: 它是遗传信息的载体。有名的 Avery 细菌转化实验最终确定了 DNA 的这种功能。

RNA 也是线形多核苷酸, 但不是双螺旋结构。RNA 分子自身曲折在局部区域可形成双螺旋区, 这些双螺旋区的结构很似 A-DNA 的结构。主要的细胞 RNA 分三类: tRNA, rRNA 及 mRNA。此外还有核内小分子 RNA, 病毒 RNA 等。

根据核酸的物化性质发展出了一系列研究核酸的重要方法。核酸在 240—290nm 区有一紫外吸收峰, 峰尖在 260nm 左右。利用这一特性, 可用分光光度计定量测定核酸浓度和定性的鉴定核酸纯度。

核酸大分子在引力场中的沉降速度因核酸大分子的构象不同而不同, 所以可以用超离心密度梯度技术将不同构象的 DNA 分开。氯化铯密度梯度平衡超离心技术是分离超螺旋 DNA 的最常用的方法。

凝胶电泳具有一系列优点, 几乎有代替超离心技术之势, 可用来分析(或制备)不同构象的 DNA 及不同大小的 DNA 片段(RNA 片段), 用吡啶溴红染色后可以用来估计 DNA (RNA) 的浓度。琼脂糖凝胶电泳主要用来分析分子量大于 1000bp 的核酸; 聚丙烯酰胺凝胶电泳用来分析分子量小于 1000bp 的核酸。

核酸可以变性, 这时氢键断裂, 形成无规线团, 也可以再复性, 重新形成双螺旋区。 T_m 是衡量核酸变性的重要指标。异源核酸之间, 只要有一定数量的碱基互补区域即可发生杂交。核酸杂交在分子生物学研究上应用极广。Southern 发明的将凝胶上的核酸转移至硝酸纤维素膜上, 再进行分子杂交的技术应用颇广。

DNA 的固相自动化合成装置为一种极重要的分子生物学研究手段, 可以按人们设计的序列快速合成 DNA 片段甚至较小的基因。

限制性酶是分析 DNA 的解剖刀, 是 DNA 体外重组技术的重要工具, 也是分析巨大的 DNA 分子的重要手段。建立 DNA 的限制酶图谱是深入分析 DNA 分子结构与功能的最基础的一步。

习 题

1. 比较 DNA、RNA 在化学组成上、大分子结构上、生物学功能上的特点。
2. DNA 双螺旋结构模型有哪些基本要点? 这些特点能解释哪些基本的生命现象?
3. 应用 DNA 晶体 X-光衍射分析技术分析 DNA) 有哪些新发现?
4. 如果人体有 10^{14} 个细胞, 每一细胞 DNA 含量为 6.4×10^9 bp, 试计算一下人体 DNA 的总长度为多少米? 它相当于地球到太阳的距离(2.2×10^8 米)之几倍? (2.2×10^{11} 米, 100 倍)。
5. RNA 有哪些主要类型? 比较其结构与功能。
6. 核酸有何紫外吸收特点? 在实验室如何利用这一特点研究核酸?

7. 核酸的热变性有何特点? T_m 值表示什么? Cot 值表示什么?
8. 核酸杂交技术的基础是什么? 有哪些应用价值? Southern 印迹法的基本步骤是什么?
9. 什么是限制酶, 有何特点? 为什么说它是解剖 DNA 的解剖刀?

主要参考书

1. Lehninger, L., Biochemistry-The Molecular Basis of cell Structure and Function. 2nd editionworth Publishers, Inc. New York. (1977).
2. Lehninger, L., Principles of Biochemistry, Worth Publishers, Inc, New York. (1982).
3. Stryer, L., Biochemistry 3rd edition W. H. Freeman and Co. New York, (1988).
4. Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J. and Steitz, J., Molecular Biology of the Gene (4th ed.), The Benjamin/Cummings Publishing Co, Inc. California. (1987).
5. Maniatis, T., Fritsch, F., Sambrook, J., Molecular Cloning (A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1982).

赵邦悌

第六章 维生素的结构与功能

维生素(vitamin)是一类有机化合物,在天然食物中含量极少;这些极微小的量对人体的生长和健康是必需的,人体不能合成它们,必须从食物中摄取;人体缺乏维生素时,会出现维生素缺乏症。

维生素可分为脂溶性维生素和水溶性维生素两大类。脂溶性维生素有维生素 A、D、E、K 等。水溶性维生素有维生素 C 和维生素 B₁、B₂、B₆、B₁₂ 等。各种维生素的化学结构、化学名称和生理功能等将在下列各节中叙述。

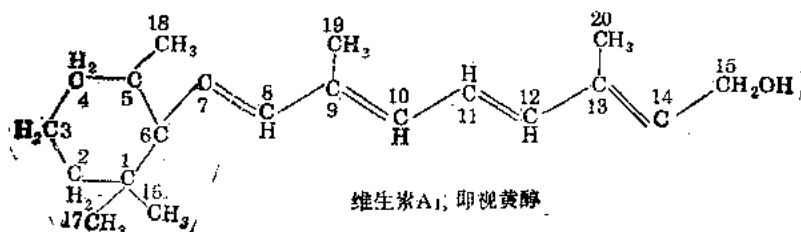
第一节 维生素的发现

人们对维生素的认识来源于医药实践和科学试验。中国唐代医学家孙思邈(公元 581—682 年)曾经指出,用动物肝防治夜盲病,用谷皮汤熬粥防治脚气病。现在我们知道,肝中多含维生素 A,可以防治维生素 A 缺乏症的夜盲病;谷皮中多含维生素 B₁,可以防治维生素 B₁ 缺乏症的脚气病。直到 1886 年荷兰医生艾克曼(Christian Eijkman, 1858—1930 年)在荷属东印度研究亚洲普遍流行的脚气病,最初企图找出引起该病的细菌,但未成功。1890 年,在他的实验鸡群中爆发了多发性神经炎,表现与脚气病极为相似。1897 年,他终于证明该病是由于用白米喂养而引起的,将丢弃的米糠放回饲料中就可治愈。他认为米壳中含有一种“保护因素”可对抗食物中过量的糖。后来格赖恩(G. Grijns)证明米糠含有一种营养因素,并首先提出营养缺乏症这个概念。日本海军于 1878—1882 年爆发脚气病,用大麦代替大部分的精米后,脚气病得到了控制。

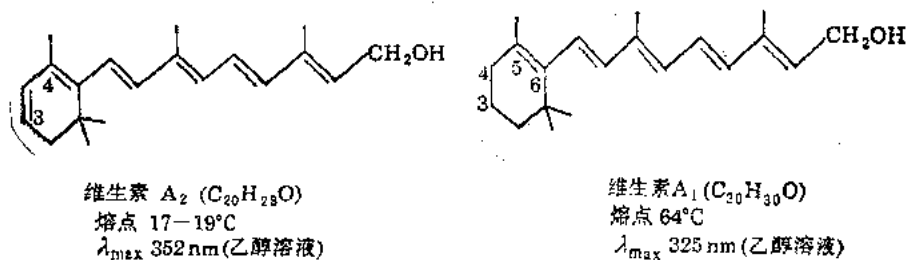
维生素是通过实验动物的科学饲养试验而发现。英国的霍普金斯(F. G. Hopkins)于 1906 年,发现大鼠饲以纯化的饲料,包括蛋白质、脂肪、糖类和矿质后,不能存活;如果在纯化饲料中增加极微量的牛奶后,大鼠就能正常生长。霍普金斯得出结论:正常膳食中除蛋白质、脂肪、糖类和矿质外,还有必需的食物辅助因子,即维生素。美国的生物化学家,门德尔和奥斯本(L. B. Mendel 和 T. B. Osborn),麦科勒姆和戴维斯(E. V. McCollum 和 M. Davis)于 1913 年发现脂溶性维生素 A 和水溶性维生素 B。其后,其他维生素被逐渐发现。

第二节 维生素 A 和胡萝卜素

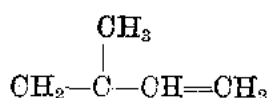
维生素 A 的化学名称为视黄醇(retinol)。它的化学结构式如下:



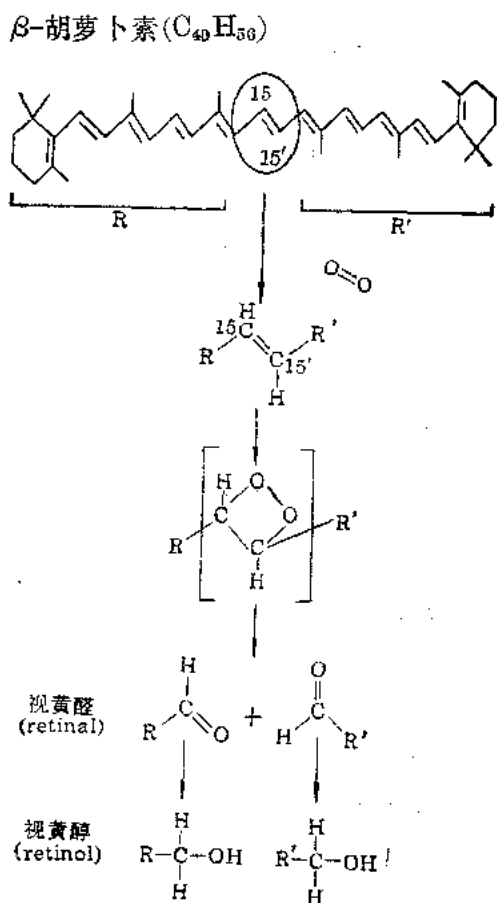
此外有维生素 A₂, A₂ 比 A₁ 在化学结构上多一个双键, 维生素 A₂ 只在淡水鱼中存在。维生素 A₁ 和 A₂ 的结构上的比较如下:



维生素 A 的化学结构和 β-胡萝卜素(β-carotene)的结构有联系。两者基本单位结构为异戊二烯(isoprene)



一个 β-胡萝卜素分子可以转化为两分子的视黄醇(维生素 A)这个转化过程图解如下。



β-胡萝卜素的 15=15' 碳原子的位置, 通过加氧酶(β-carotene-15, 15'-dioxygenase)的催化作用, 分裂为两分子的视黄醛; 经过还原过程, 形成两分子的视黄醇。这个一分子 β-胡萝卜素转化为两分子的视黄醇, 是在动物的肠粘膜及肝脏中进行。

此外一分子的 α-胡萝卜素, 一分子的 γ-胡萝卜素, 和一分子的黄玉米色素由于只有半个分子与视黄醇的结构相同, 所以只能转化为一分子的视黄醇

维生素 A 以国际单位(IU)定量, 经过定量的比较试验, 得知一个国际单位相当于 0.3 μg 的视黄醇。

维生素 A 的化学名称所以定名为视黄醇, 因为它跟视觉有关。视网膜中有棒状细胞

(rods), 含有视紫红质(rhodopsin 或 visual purple), 这是一种糖蛋白, 可以分解为视蛋白(opsin)和视黄醛(retinal)。棒状细胞分辨明暗光。下列图解表明: 视黄醛和视黄醇之间有氧化还原的转化, 并且它们的顺式和反式结构之间也有同分异构的转化。涉及的酶类有脱氢酶和辅酶, 以及同分异构酶。随着光明亮时视紫红质分解为视蛋白和视黄醛, 光暗时两者联合为视紫红质。

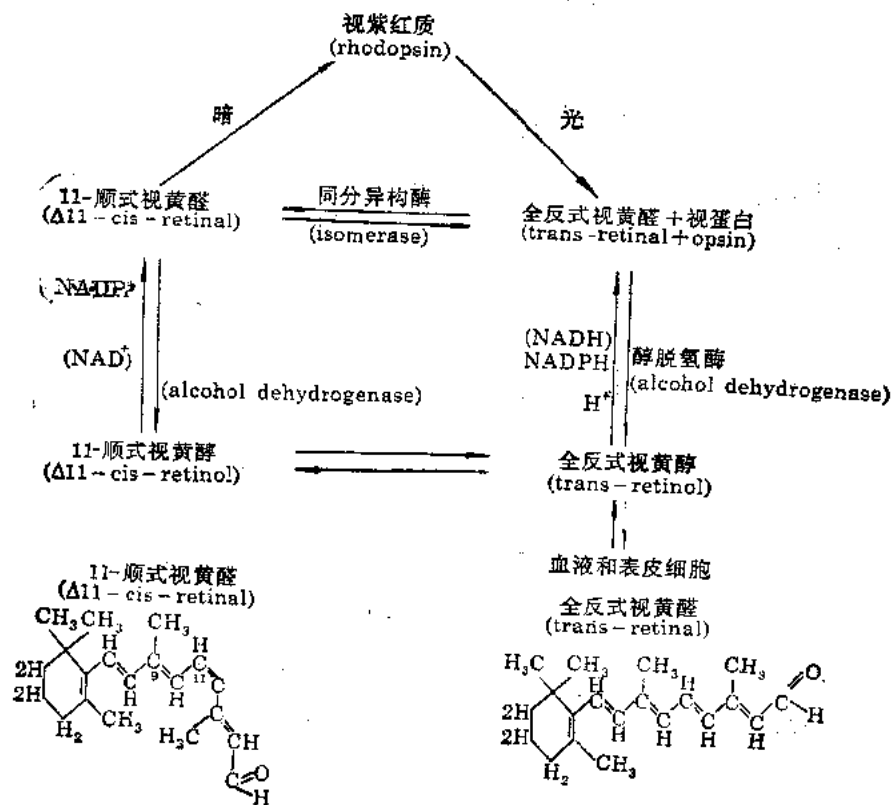
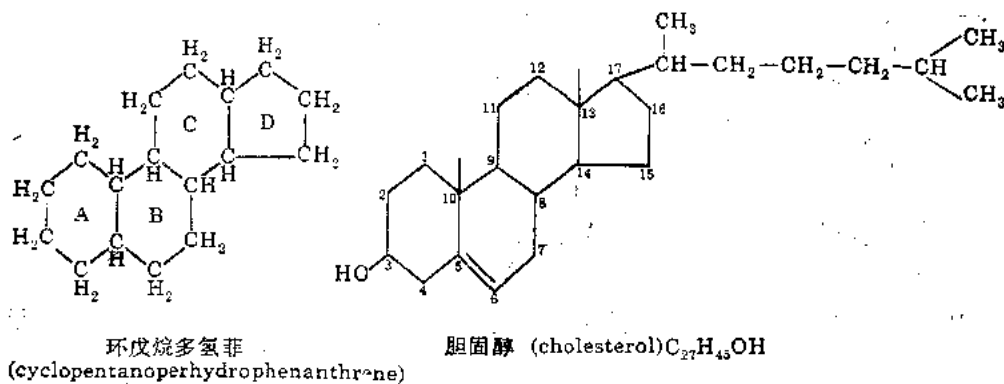


图 维生素 A (retinol) 在视觉中的作用

第三节 维生素 D 和紫外线

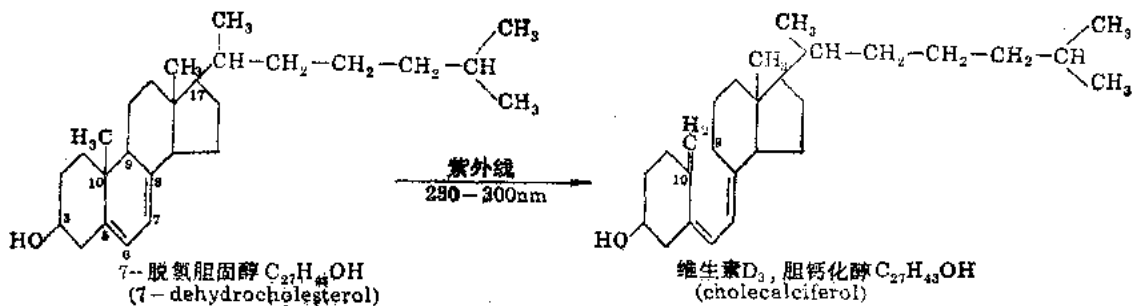
维生素 D 原和胆固醇的化学结构中都具有环戊烷多氢菲的结构:



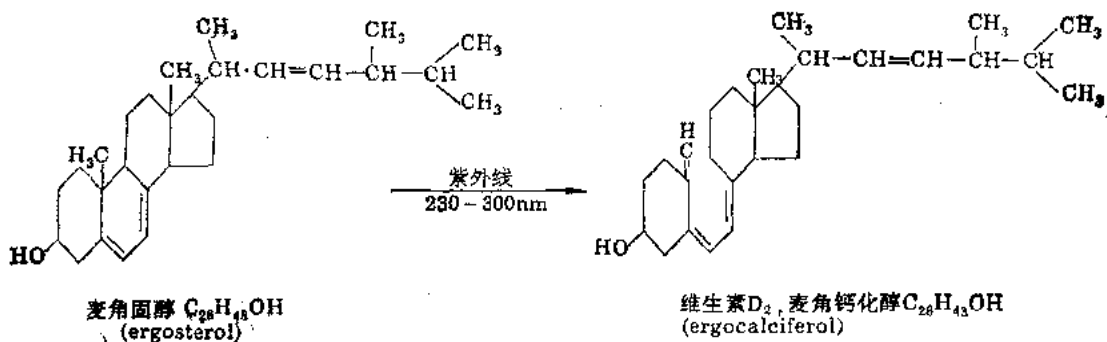
维生素 D 有维生素 D₃ 和维生素 D₂ 两种。它们的维生素原经过紫外线照射后激活为相

应的维生素 D₃ 或 D₂。

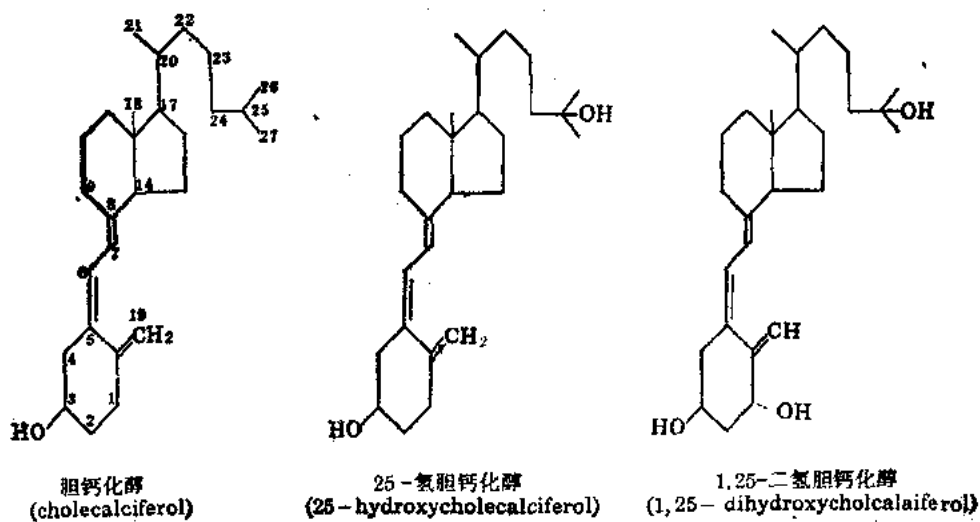
人的皮肤含有的维生素原为 7-脱氢胆固醇，得到阳光中的紫外线激活后转化为维生素 D₃，化学名称为胆钙化醇。



麦角、酵母或其他真菌中含有维生素 D₂ 原为麦角固醇，经过紫外线照射后，激活为维生素 D₂，化学名称为麦角钙化醇。

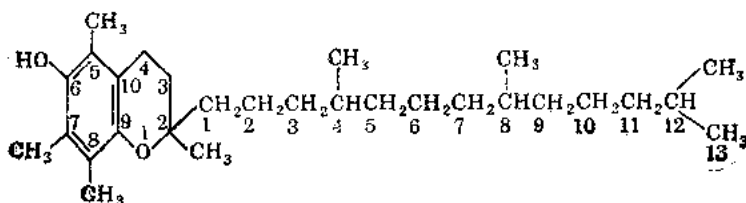


维生素 D₃，即胆钙化醇，在人体各器官中的转化表明：胆钙化醇可以从皮肤中的 7-脱氢胆固醇通过阳光中的紫外线而转化为胆钙化醇；还可以从膳食中取得，如膳食中的鸡蛋、猪肝都含有胆钙化醇。当胆钙化醇通过血液进入人体的肝脏后转化为 25-氢胆钙化醇；进入肾脏后转化为 1, 25-二氢胆钙化醇；也进入肠后促进 Ca²⁺ 的运输；进入骨时有钙的吸收和沉积。至于胆钙化醇如何促进 Ca²⁺ 的运输，还有跟 PO₄³⁻ 的关系，最后在骨中沉积等等，都尚待研究。



第四节 维生素 E

维生素 E, 化学名称为生育酚 (tocopherol)。1922 年伊文思 (H. M. Evans) 及其同事饲养大白鼠给以当时已知的全部营养素, 试验雌鼠能否正常生殖。多次试验结果表明受孕雌鼠都有死胎, 并被吸收掉。当在饲料中加入少量生菜、麦胚或干的首蓿叶后, 大鼠即能正常生殖。后来从麦胚油中提纯维生素 E, 并最后得到人工合成, 并命名为生育酚 (tocopherol)。天然有八种生育酚, 化学结构大同小异。阿尔法生育酚的化学结构如下:

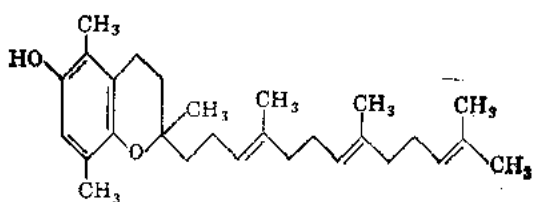


阿尔法生育酚 (α -tocopherol)

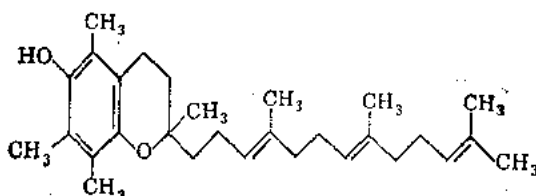
(2, 5, 7, 8-tetramethyl-2(4, 8, 12-trimethyltridecyl)-6-chromanol)

天然的生育酚共有八种, 其中六种甲基数目和位置上有差别, 另外的两种具有甲基差别之外, 具有双键, 即 7. 艾普西隆生育酚和 8. 截塔 1 生育酚。

1. 阿尔法生育酚 (α -tocopherol, 5, 7, 8-trimethyltolcol)
2. 贝塔生育酚 (β -tocopherol, 5, 8-dimethyltolcol)
3. 伽马生育酚 (γ -tocopherol, 7, 8-dimethyltolcol)
4. 德耳塔生育酚 (δ -tocopherol, 8-methyltolcol)
5. 截塔 2 生育酚 (ζ_2 -tocopherol, 5, 7-dimethyltolcol)
6. 艾塔生育酚 (η -tocopherol, 7-methyltolcol)
7. 艾普西隆生育酚 (ϵ -tocopherol,



8. 截塔 1 生育酚 (ζ_1 -tocopherol,

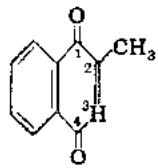


缺乏维生素 E 雌鼠生殖不育, 雄鼠睾丸退化, 大鼠、豚鼠、兔、犬和猴等则出现营养性肌肉萎缩, 猴缺乏维生素 E 时还出现贫血、血细胞和骨髓细胞形态异常。维生素 E 是一个抗氧化

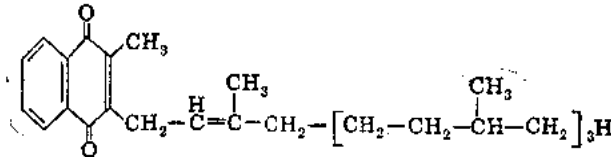
剂,对保护线粒体膜上的磷脂有抗自由基的作用。

第五节 维生素 K

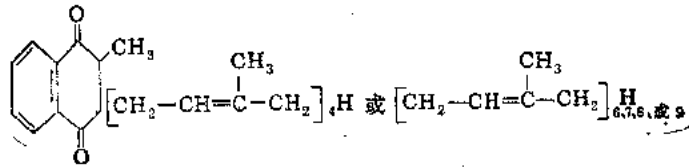
一位年轻的丹麦科学家 H. Dam 于 1929 到 1935 年间,在实验鸡群中发现新的脂溶性维生素,并命名为维生素 K (“Koagulation” vitamin) 意即血凝维生素。缺乏这个维生素时鸡的皮下及肌肉间出血;贫血;并且凝血时间延长。维生素 K 有多种。维生素 K 的主要化学结构为 2-甲基-1, 4-萘醌,也就是维生素 K₃ 的化学结构。此外,有维生素 K₁ 和 K₂ 类。它们的化学结构和化学名称列下:



2-甲基-1, 4-萘醌(维生素 K₃)
menadiione(vitamin K₃)
(2-methyl-1, 4-naphthoquinone)



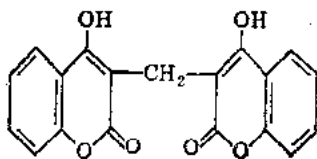
叶绿醌(维生素 K₁)
phyloquinone(vitamin K₁) (2-methyl-3-phytyl-1, 4-naphthoquinone)



甲基萘醌类(维生素 K₂类)
menadiione(vitamin K₂)

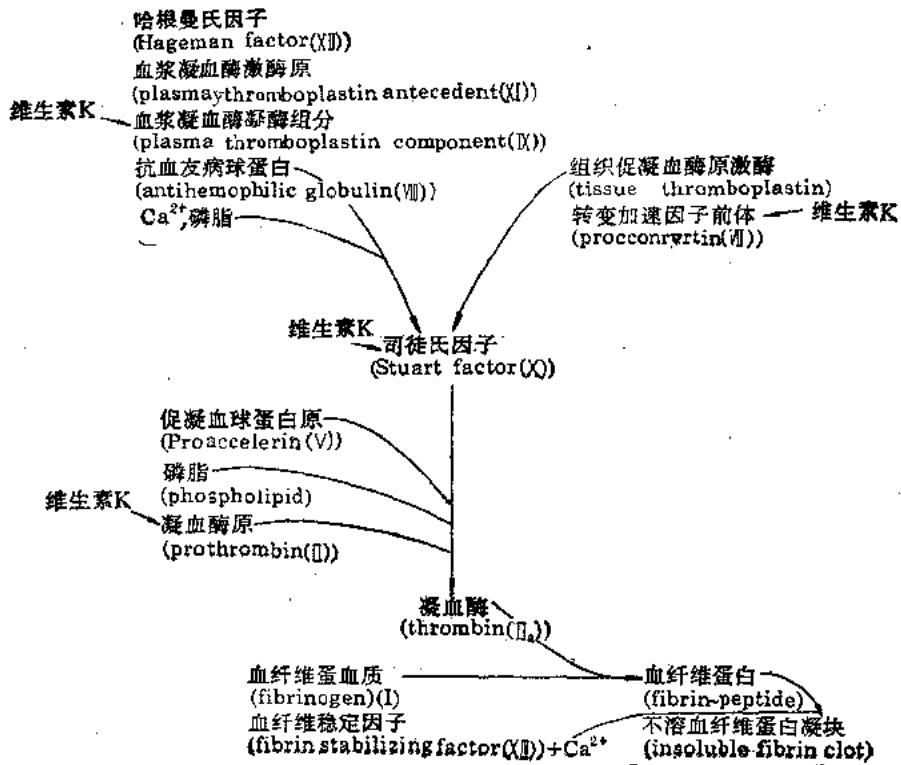
人体维生素 K 的来源,有食物来源和肠道微生物合成来源。食物中绿色蔬菜、动物肝和鱼等含有较多的维生素 K;牛奶、麦麸、大豆等也含有维生素 K。肠道中的大肠杆菌、乳酸菌等能合成维生素 K,可被肠壁所吸收。

维生素 K 的生理功能跟血凝有关。血凝过程中有许多血凝因子的生物合成跟维生素 K 有关。这些依赖维生素 K 的因子有:(1) 凝血酶原,即因子 II;(2) 转变加速因子前体,即因子 VII;(3) 血浆凝血酶激酶组分,即因子 IX;(4) 司徒氏因子,即因子 X。这些依赖维生素 K 而合成的因子,可以被三叶草中的双羟香豆素所抑制。双羟香豆素的化学结构和用途列下:



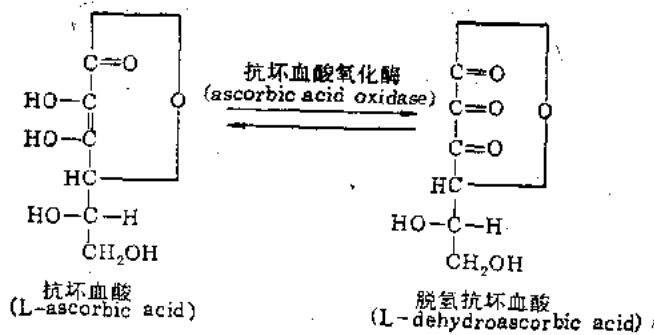
双羟香豆素(dicoumarol)(3, 3'-methylenebis 4-hydroxycoumarin)
[临床上用作抗凝剂;在科研上可用以测量凝血因子受到维生素 K 作用的位置。]

关于血液凝结的反应,可图解如下:

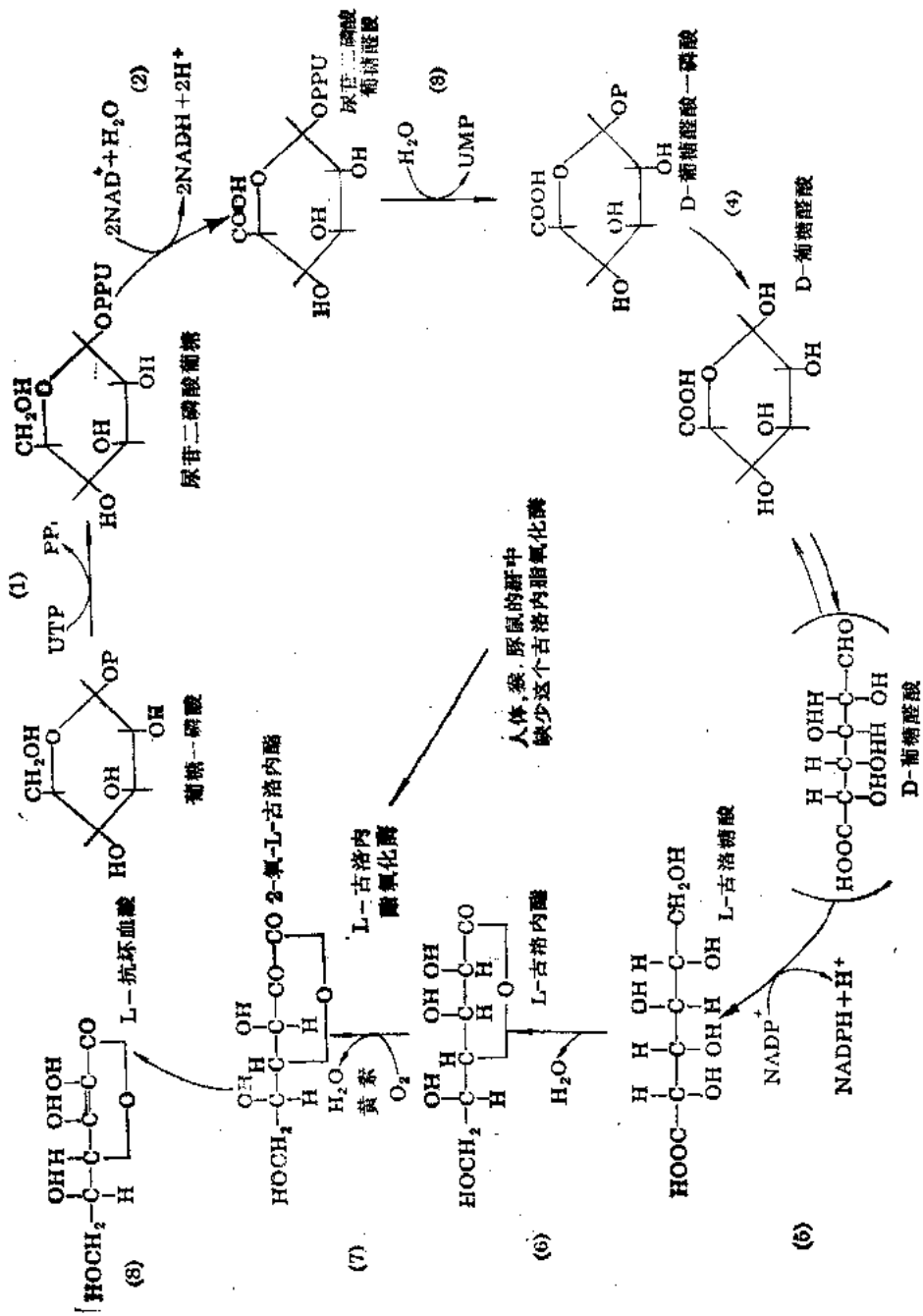


第六节 维生素 C

维生素 C 是水溶性维生素。它能防治坏血病 (scurvy), 化学名称为抗坏血酸 (ascorbic acid)。抗坏血酸在抗坏血酸氧化酶 (ascorbic acid oxidase) 作用下脱去氢, 转化为脱氢抗坏血酸, 这个脱氢反应是可逆的, 列式于下:



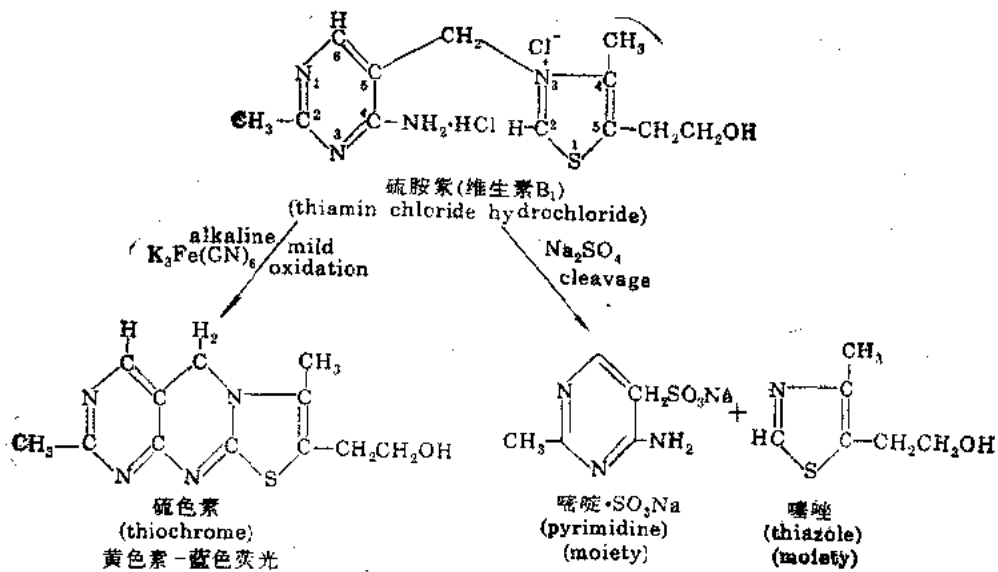
抗坏血酸在动物体内的生物合成反应如下:



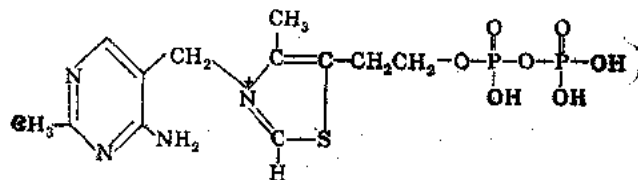
人、猴和豚鼠在肝脏中缺少一个古洛内酯氧化酶(L-gulonolactone oxidase),因此不能在体内合成抗坏血酸;人体、猴、豚鼠必须从食物中获得抗坏血酸,否则出现坏血病,表现为毛细血管脆弱,皮肤出现小血斑,牙龈发炎出血,牙齿动摇等。

第七节 维生素 B₁

维生素 B₁的化学名称为硫胺素(Thiamine 或 Thiamin)它是由 R. R. Williams 等于 1936 年测定化学结构,并于 1937 年人工合成。硫胺素的化学结构和它的分解产物和氧化产物,见下列化学结构式:

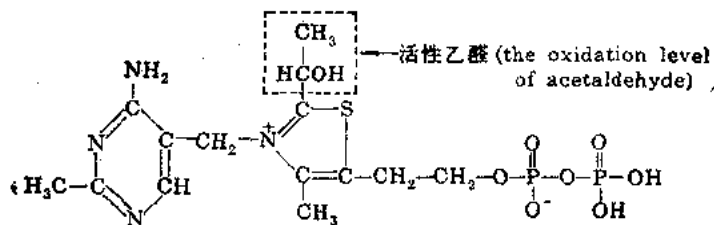


K. Lohmann 和 P. Schuster 于 1937 年获得硫胺素焦磷酸,并命名为脱羧辅酶(coccarboxylase),亦称硫胺素焦磷酸(thiamin pyrophosphate),缩写为 TPP 或 ThPP。



脱羧辅酶(coccarboxylase (Thiamin pyrophosphate) TPP 或 ThPP

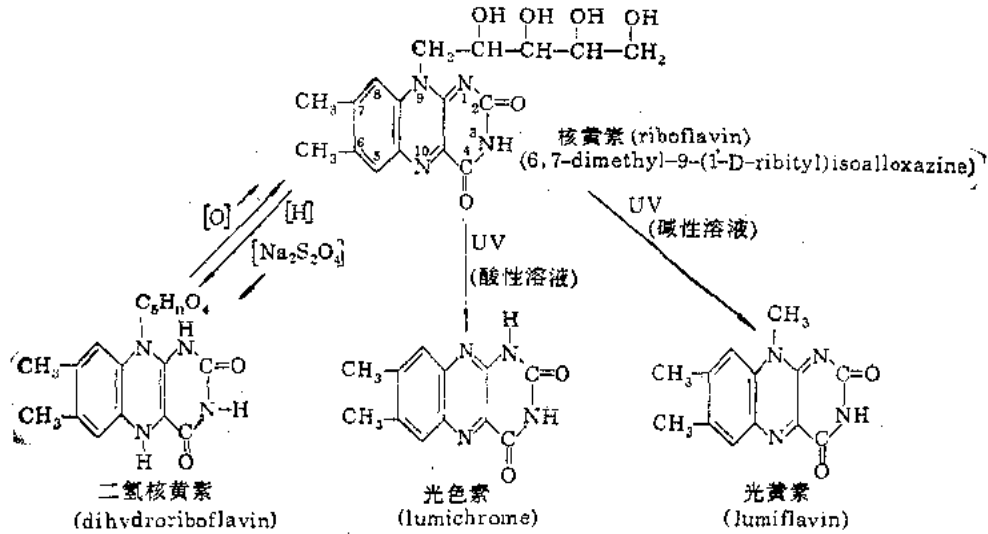
丙酮酸氧化的开始反应是释放 CO₂, 这要通过丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase)跟 ThPP 的联合,在释放 CO₂ 后,形成 2-α-羟乙基硫胺素焦磷酸,其结构如下:



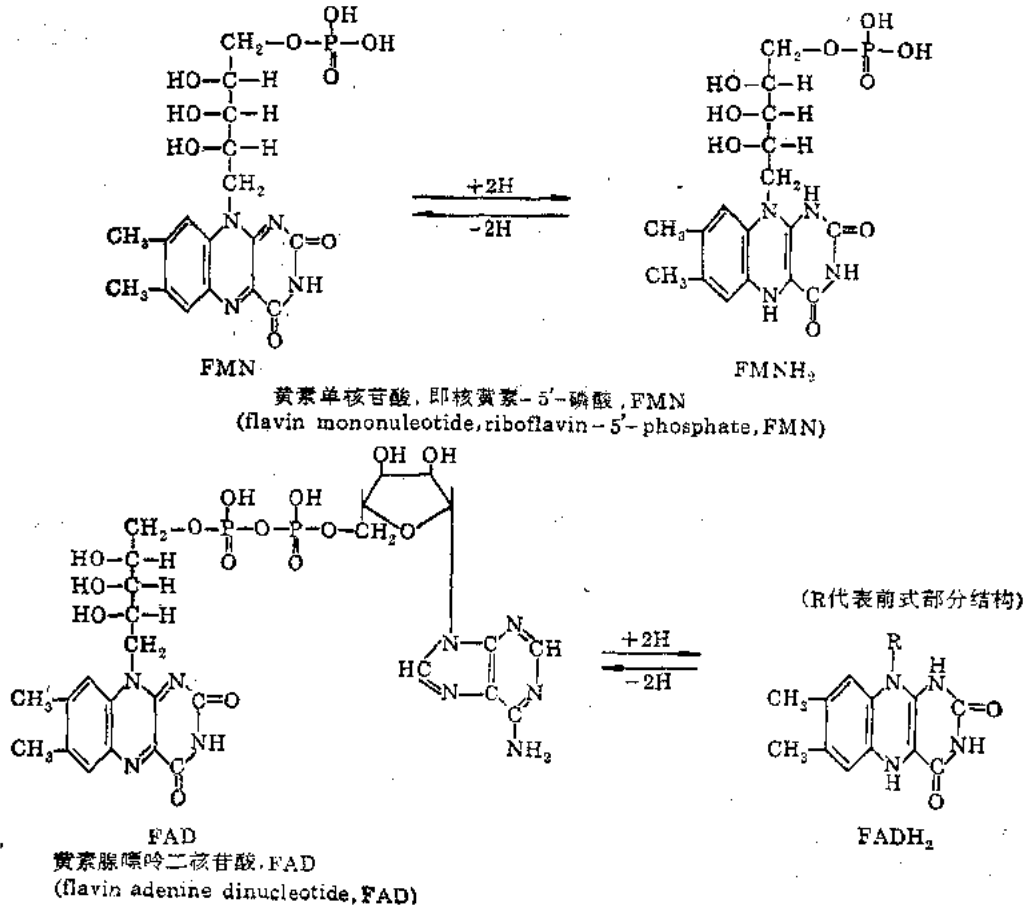
2-α-羟乙基硫胺素焦磷酸 (2-α-hydroxyethyl thiamin pyrophosphate)

第八节 维生素 B₂

维生素 B₂, 化学名称为核黄素(riboflavin)。它的化学结构式和其分解产物, 列式如下:



两个氧化还原型辅酶包含核黄素分子, 它们是黄素单核苷酸(flavin mononucleotide)缩写为 FMN, 和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide)缩写为 FAD; 这两个辅酶的还原型为 FMNH₂, 和 FADH₂。它们的化学结构如下:

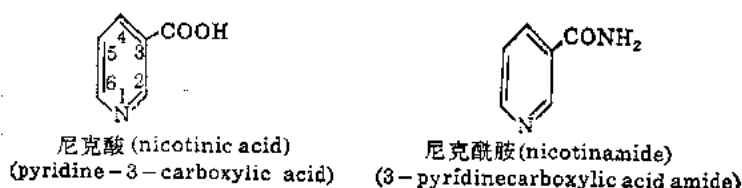


辅酶 FMN 和 FAD 都与酶蛋白结合称为黄素蛋白 (flavoprotein)。这两个辅酶和琥珀酸脱氢酶、细胞色素 C 还原酶等有联系。

动物肝脏及酵母含核黄素较多, 大豆和米糠中亦含有核黄素。人体缺乏核黄素时有口舌炎、眼球呈多血管等症状。

第九节 尼克酸与尼克酰胺

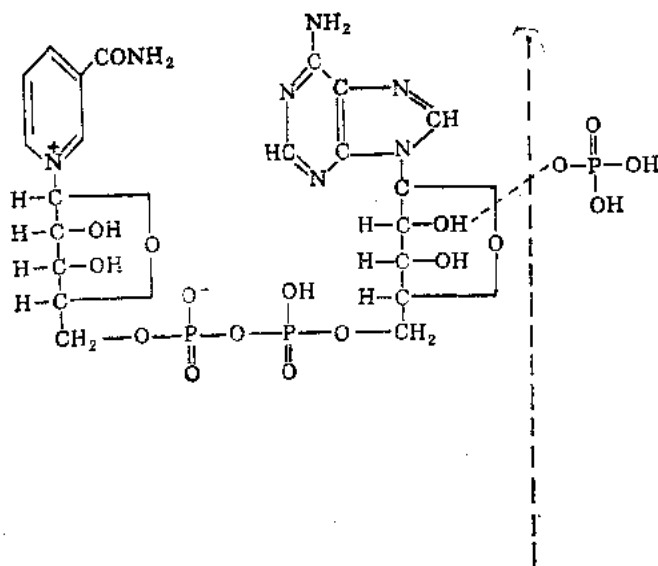
尼克酸(nicotinic acid 或 niacin)和尼克酰胺(nicotinamide)的化学结构式如下:



尼克酸亦可汉译为烟酸, 尼克酰胺可译为烟酰胺。

含有尼克酰胺的辅酶有两种, 它们是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide) 缩写为 NAD; 也可称为辅酶 I (coenzyme I, CoI), 以前的生化文献中曾用 DPN 这个缩写, 所以 NAD=CoI=DPN。现在都用 NAD 的缩写。另外一个尼克酰胺辅酶为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 缩写成 NADP。也可称辅酶 II (CoII), 旧时缩写用 TPN, 因此 NADP=CoII=TPN。

它们化学结构如下:



烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 NAD⁺
(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)

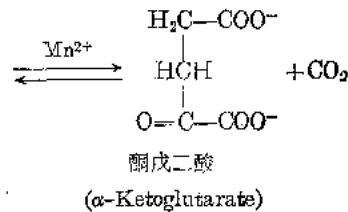
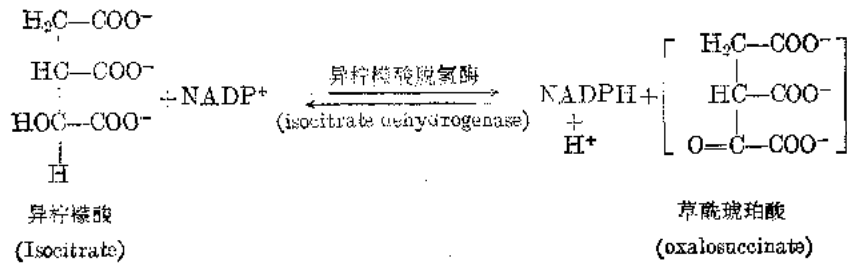
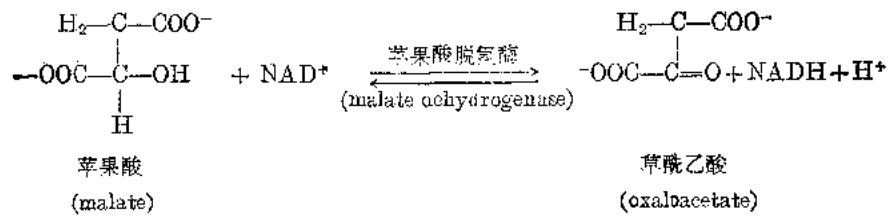
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, NADP⁺
(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)

辅酶 NAD 和辅酶 NADP 是各种脱氢酶的辅酶。这辅酶的作用可用下列的普遍公式中说明：



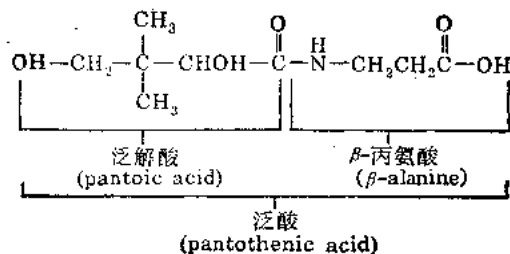
底物 MH_2 在脱氢酶的催化下，其中一个 H 被 NAD^+ 所接受生成 $NADH$ ，另一释放在溶液成为 H^+ 。

以下举两个具体的代谢反应：

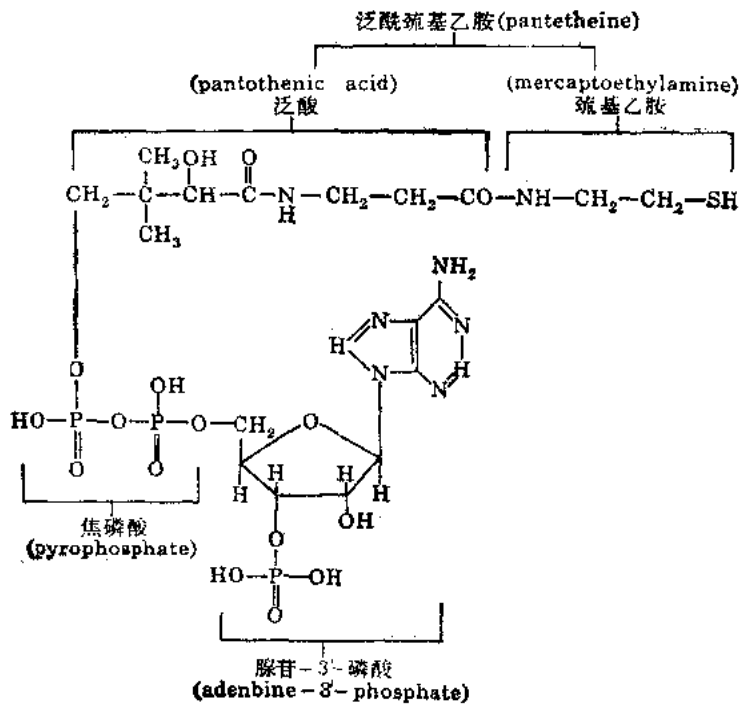


第十节 泛 酸

泛酸亦称遍多酸 (pantothenic acid) 这许多名称和英文名称“到处都有”的含义相似。它的化学结构式如下：

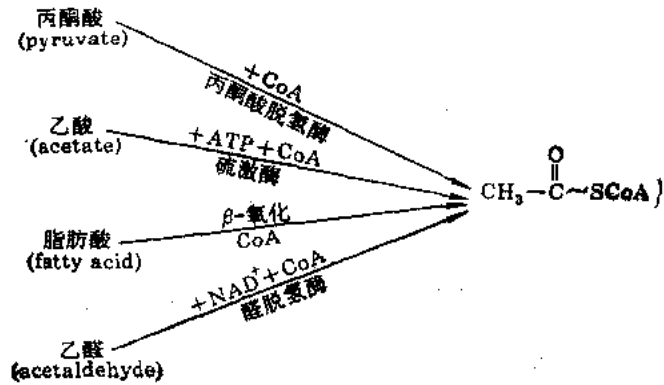


泛酸跟辅酶 A (coenzyme A) 有联系。辅酶 A 的结构式如下：



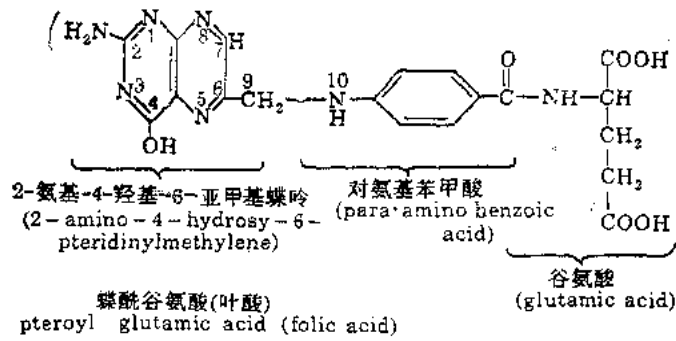
辅酶 A (Coenzyme A) 简称为 CoA-SH

乙酰化作用中, 辅酶 A 转运乙酰基, 成为乙酰辅酶 A (acetyl-CoA)。乙酰辅酶 A 跟脂肪代谢和糖代谢等有关; 下列图解, 说明乙酰辅酶 A 是这些代谢的“终点”:

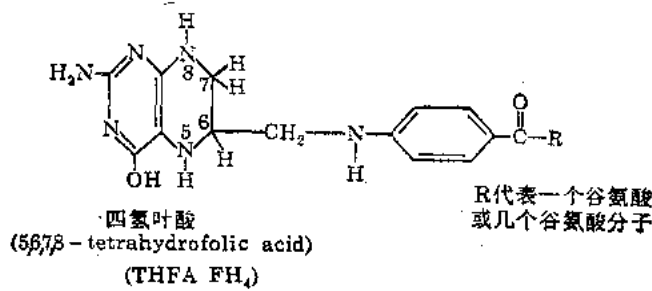


第十一节 叶 酸

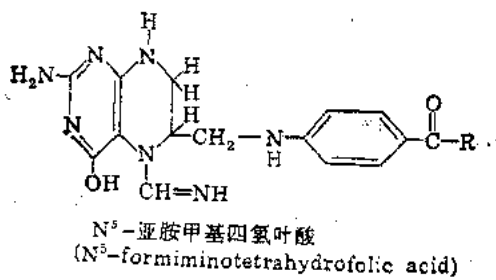
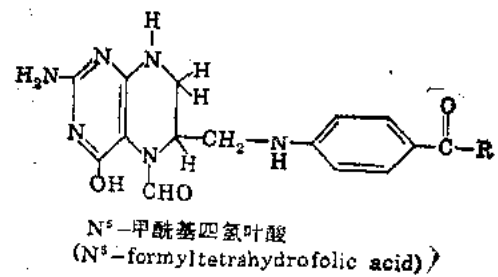
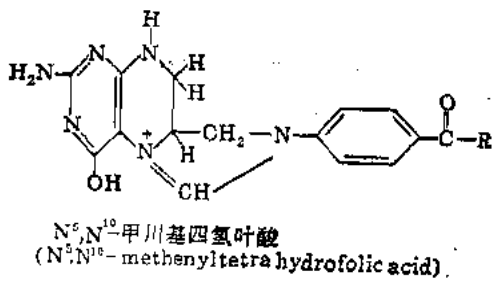
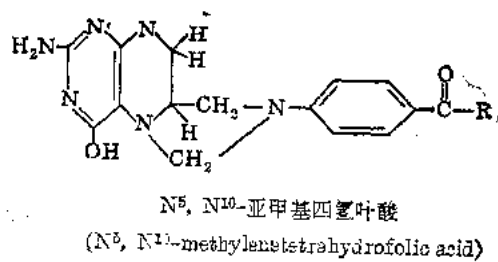
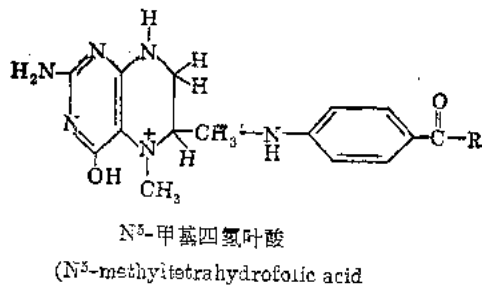
叶酸 (folic acid) 亦称蝶酰谷氨酸 (pteroyl glutamic acid) 简称为 PGA; 亦名 folacin。它的结构式如下:



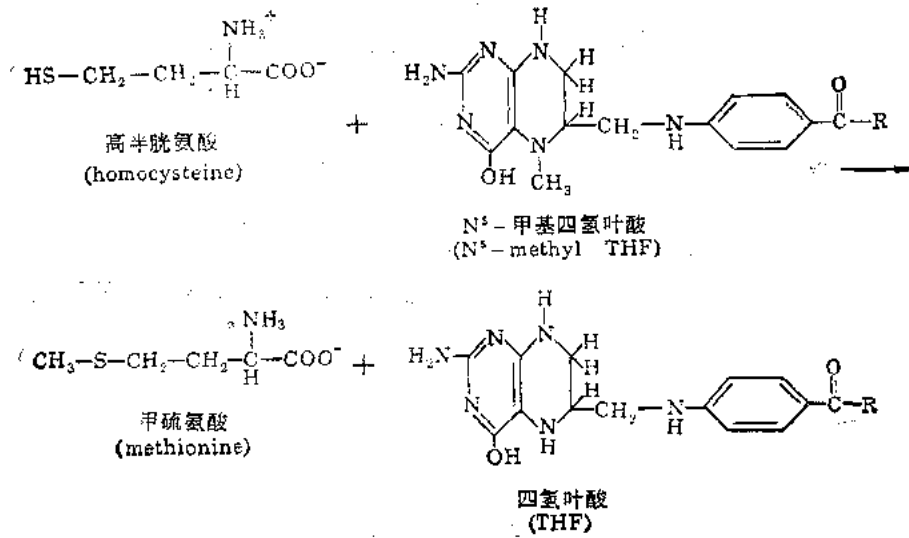
四氢叶酸(tetrahydrofolic acid)是一个传递一碳单位的辅酶,简称为 THFA 或 THF, 或 FH₄)



四氢叶酸所传递的一碳单位,可以是甲基、或亚甲基(甲叉基)、或甲川基、或甲酰基、或亚胺甲基,它们的结构式如下:

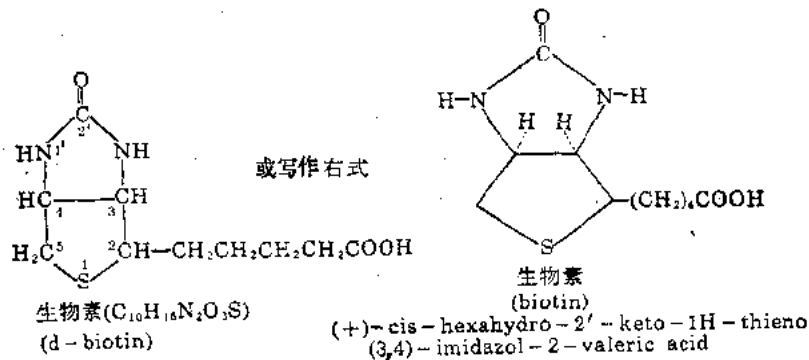


关于代谢中甲基的传递,可以用甲硫氨酸(methionine)的例子来说明,代谢反应式列下:

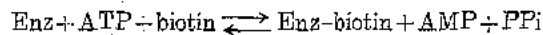


第十二节 生物素

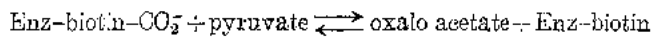
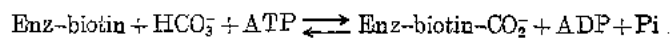
生物素的发现和分离纯化,经过曲折的探索过程,生物素曾有各种名称,由于酵母菌的生长因子,随后命名为生物素(biotin)。大量的生物素可从卵黄中提取得到。卵清中有一种抗生物素蛋白(avidin),至于抗生物素蛋白怎样跟生物素结合,尚不清楚。生物素的结构如下:



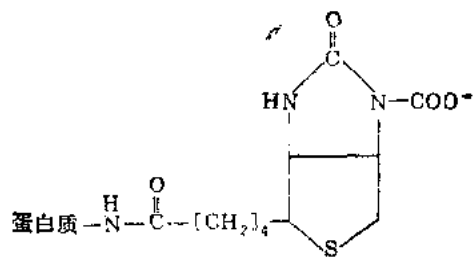
羧化酶(carboxylase,简称为 Enz)通过下列反应式,形成酶跟生物素的复合体(Enz-biotin):



丙酮酸的羧化可分为两步:第一步形成 Enz-biotin-CO₂,再一步,丙酮酸的羧化(carboxylation of pyruvate),反应式如下:



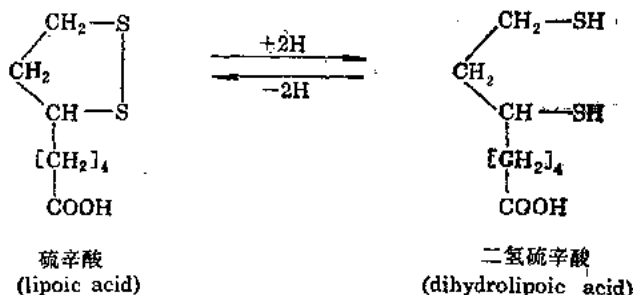
丙酮酸羧化后形成草酰乙酸(oxaloacetate)。羧基生物素跟羧化酶的复合体可用下式表示:



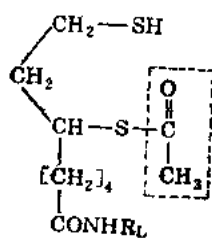
酶蛋白的赖氨酸残基的 ϵ -NH₂ 跟生物素的戊酸形成肽键

第十三节 硫 辛 酸

硫辛酸(lipoic acid)是酵母和微生物等的生长因素,而不是动物必需从食物中取得的维生素;但是硫辛酸是一个辅酶。硫辛酸与二氢硫辛酸相互转化,它们的化学结构式包含二个硫和八个碳原子,它们的化学结构式如下:



硫辛酰胺是与酶相结合的辅酶,传递氢,和传递乙酰基。与硫辛酰胺有关的两个酶为(一)硫辛酰胺转乙酰酶(lipoate transacetylase),分子量为 52 000。乙酰基与硫辛酰胺形成共价键;与酶蛋白的赖氨酸残基的 ϵ -氨基结合成为复合体:

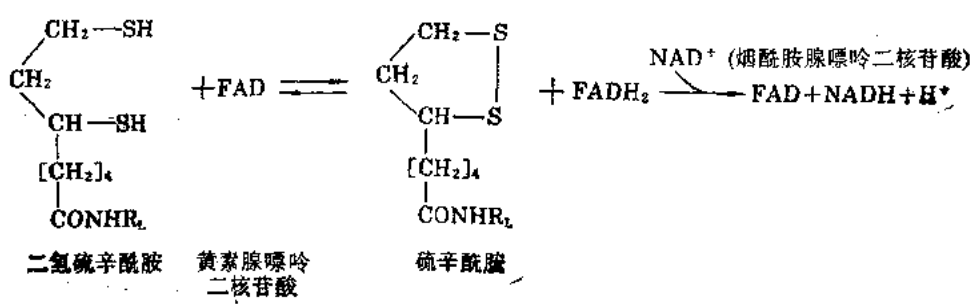
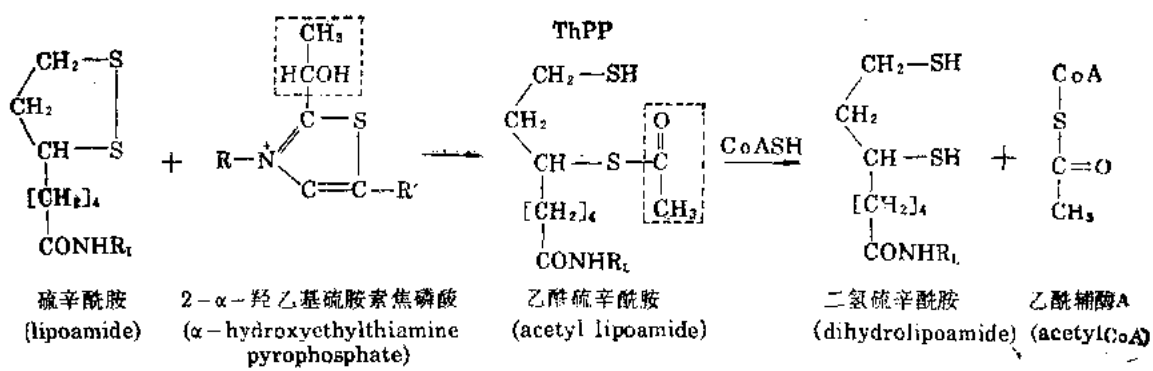


乙酰硫辛酰胺 (acetyl lipoamide)

R_L 表示酶蛋白的赖氨酸残基 乙酰基用虚线框出

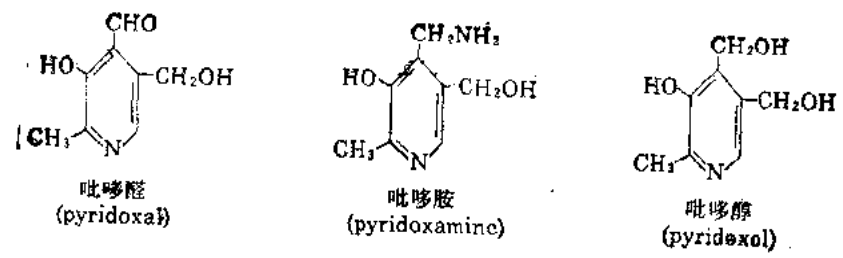
(二) 二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase)分子量为 110 000。这个酶催化二氢硫辛酰胺氧化为硫辛酰胺;而脱去的二氢将 FAD 还原为 FADH₂,再传递给 NAD⁺而形成 NADH, H⁺。

因此硫辛酰胺是丙酮酸脱酰氧化过程中的一个传递乙酰基和氢的辅酶。就有关反应列出于下:

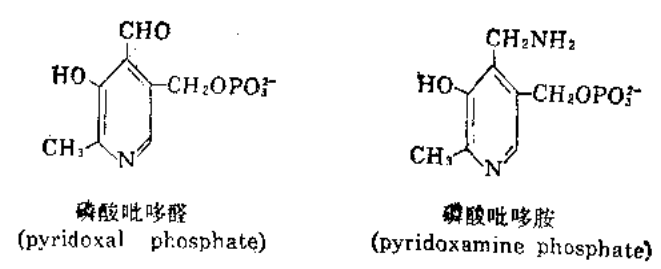


第十四节 吡哆醛

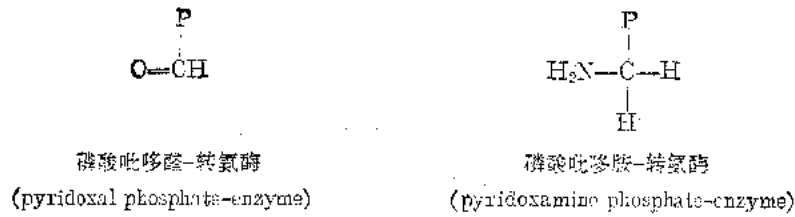
维生素B₆的化学名称为吡哆醛 (pyridoxal), 吡哆胺 (pyridoxamine) 和吡哆醇 (pyridoxol)。它们化学结构式如下:



它们的磷酸酯是转氨酶 (aminotransferases) 的辅酶



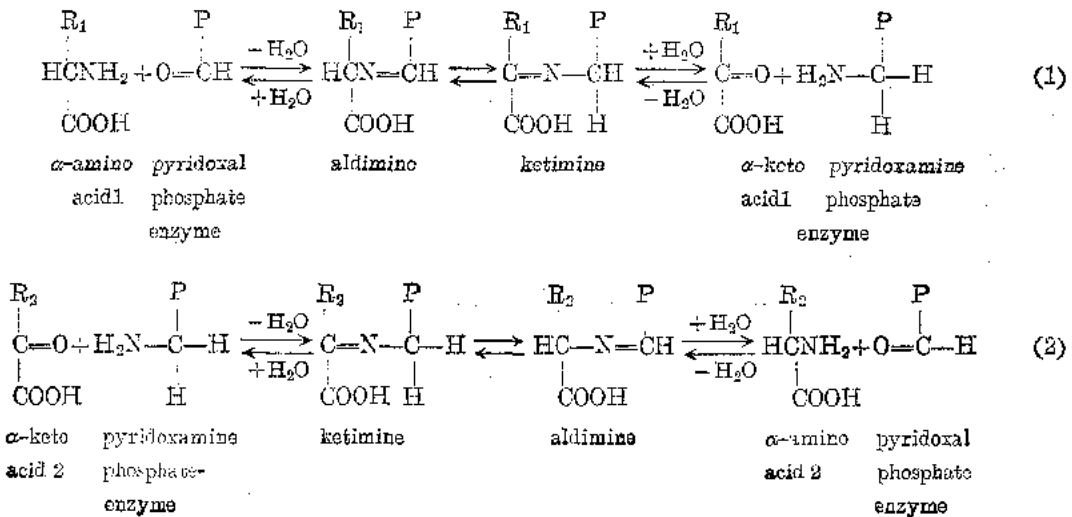
关于氨基酸的转氨作用 (transamination), 转氨酶跟磷酸吡哆醛或磷酸吡哆胺结合, 为了简化起见, 用下列两式表示它们:



转氨作用进行中的中间产物为希夫氏碱(Schiff's bases), 它们是醛亚胺(aldimine)和酮亚胺(ketimine), 它们的简化表示如下:



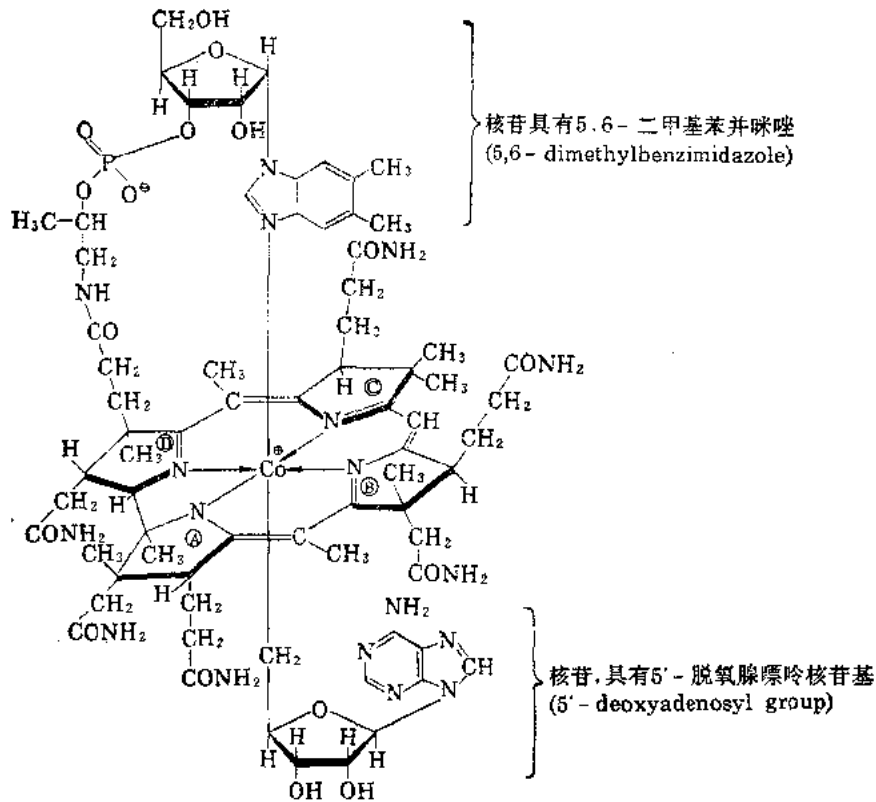
转氨时 α -氨基酸(1)的 α -氨基转移到 α -酮酸(2)的酮基上, 转氨的结果, 原来的 α -氨基酸变成 α -酮酸; 原来的 α -酮酸形成 α -氨基酸; α -氨基酸(1)如谷氨酸或天冬氨酸转氨后变成相应的 α -酮戊二酸和草酰乙酸, α -酮酸(2)如丙酮酸转氨后形成丙氨酸。简化的转氨基过程如下:



第十五节 钴胺素

维生素 B₁₂ 的化学名称为(氰)钴胺素(cyanocobalamin)。它是从微生物发酵中获得的, 是深红色吸水的结晶, 不熔, 加热至 210°C 颜色加深。氰钴胺素直到 1948 年才分离纯化, 1973 年才化学合成。

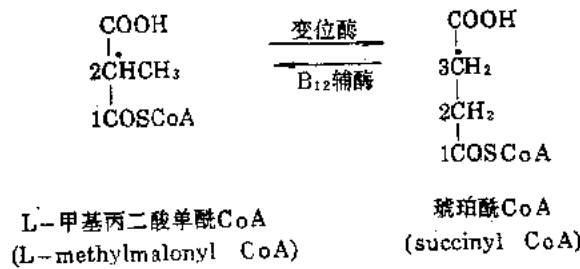
钴胺素去掉氰基, 换以 5'-脱氧腺嘌呤核苷基, 就成为维生素 B₁₂ 辅酶, 化学名称为 5'-脱氧腺嘌呤核苷钴胺素(5'-deoxyadenosylcobalamin), 它的化学结构式如下:



咕啉核心(corrin core)类如卟啉环, 但④⑤之间没有甲川桥(methene bridge)而是直接相连, 二价钴原子配价到咕啉核心的四个氮原子。

维生素 B₁₂ 辅酶 (vitamin B₁₂ coenzyme) 即 5'-脱氧腺嘌呤核苷钴胺素 (5'-deoxyadenosylcobalamin)。

维生素 B₁₂ 辅酶是一个变位酶称为甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶 (methylmalonyl CoA mutase) 的辅酶; 催化 L-甲基丙二酸单酰 CoA 跟琥珀酰 CoA 之间可逆反应;



B₁₂ 辅酶的作用在于从一个碳原子上的氢转移到邻近的碳原子上, 同时影响第二个基团的交换, 而这氢和基团并不进入溶液中; 从上述反应式中 C* 表示 ¹⁴C 标记, 可以观察到

2C*HCH₃, 基团 CH₃ 交换到 3C*H₂, 氢也转移到 3C*。可以用下列一般情况来说明,



缺乏维生素 B₁₂ 的病人在尿中排泄异常大量的甲基丙二酸和丙酸。这类病人患恶性贫血等贫血症。这类病人由于不能正常吸收 B₁₂。动物肝中有较多的维生素 B₁₂，此外肉、蛋、鱼、奶中都含有维生素 B₁₂。

第十六节 维生素 B 族与辅酶

这一节将就维生素 B 族与辅酶的联系做一个小结，列为简明的表格，另外补列了辅酶 Q 即泛醌(ubiquinone)。

B 族维生素	化学名称	辅 酶	酶	辅酶作用
B ₁	噻胺素(thiamin)	脱羧辅酶 (ThPP)	脱羧酶 (decarboxylase)	脱 CO ₂
B ₂	核黄素(riboflavin)	黄素单核苷酸 (FMN) 黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)	脱氢酶 (dehydrogenase)	传递 2H
B ₆	吡哆醛(pyridoxal)	磷酸吡哆醛 (pyridoxal phosphate)	转氨酶 (amino-transferase)	传递 -NH ₂
B ₁₂	钴胺素(cobalamin)	B ₁₂ 辅酶 (B ₁₂ co enzyme)	变位酶 (mutase)	转移 -H, -R
	尼克酰胺(nicotinamide) 或烟酰胺	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD ⁺) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 NADP ⁺	脱氢酶	传递 2H (-H, H ⁺)
	泛酸(pantothenic acid)	辅酶 A (CoA-SH)	脱氢酶 硫激酶 (thiokinase)	传递 $\text{CH}_3\text{-C}(=\text{O})\text{-}$ $\text{R-CH}_2\text{-C}(=\text{O})\text{-}$
	叶酸(folic acid)	四氢叶酸 (THFA)	转移酶 (transferase)	传递一碳单位
	生物素(biotin)	羧化酶-生物素 (Enz-biotin)	羧化酶 (carboxylase)	传递 CO ₂

$$\begin{array}{c}
 \text{泛醌(辅酶 Q)} \xrightleftharpoons[+2\text{H}]{-2\text{H}} \text{泛氢醌} \\
 \begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_2-\text{CH}_3 \\ | \\ \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_2-\text{O} \end{array} & \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{[CH}_2\text{CH}=\text{C}-\text{CH}_2\text{]}_n\text{H} \end{array} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_2-\text{CH}_2 \\ | \\ \text{H}_3\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_2-\text{OH} \end{array} \\
 \end{array}
 \end{array}$$

提 要

维生素是一类有机化合物，在天然食物中含量极少，人体缺乏维生素时，出现维生素缺乏症。维生素可分为脂溶性维生素和可溶性维生素两大类。脂溶性维生素有 A、D、E、K 等。水溶性维生素有维生素 C 和维生素 B 族。

维生素 A 的名称为视黄醇。β-胡萝卜素经过加氧酶的催化，可以产生两分子的视黄醇，

再还原为两分子的视黄醇。视网膜中棒状细胞，含有视紫红质，分辨明暗光。视紫红质可分解为视蛋白和视黄醛。视黄醛和视黄醇之间有氧化还原的转化，并且它们的顺式和反式结构之间也有同分异构的转化。有光时，视紫红质分解为视蛋白和视黄醛；无光时，两者联合为视紫红质。

人的皮肤含有7-脱氢胆固醇，经过紫外线激活后转化为维生素D₃，称为胆钙化醇。麦角、酵母含有麦角固醇，经过紫外线照射后，激活为维生素D₂，称为麦角钙化醇。

维生素E的化学名称为生育酚，它和实验动物的生育有关。猴、犬、兔等缺乏维生素E时出现营养性肌肉萎缩。猴缺乏维生素E时还出现贫血。维生素E具有抗氧化剂的作用。

维生素K跟凝血有关。维生素K₂为2-甲基1,4-萘醌。维生素K₃为甲基萘醌。维生素K₁为叶绿醌。

维生素C能防治坏血病，称为抗坏血酸。人体、猴和豚鼠在肝脏中缺少一个古洛内酯氧化酶，因此不能在体内合成抗坏血酸，必须从食物中获得抗坏血酸，否则出现坏血病，表现为毛细血管脆弱，皮肤出现小血斑，牙龈发炎出血等病征。

维生素B族为各类辅酶的组成部分。B₁为硫胺素。硫胺素焦磷酸为脱羧辅酶，缩写为TPP或ThPP。B₂为核黄素。两个氧化还原型辅酶都含核黄素成分；它们是黄素单核苷酸(FMN $\xrightleftharpoons[-2H]{+2H}$ FMNH₂)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD $\xrightleftharpoons[-2H]{+2H}$ FADH₂)。另一个B族维生素

为烟酰胺。含有烟酰胺的有两个脱氢酶的辅酶，它们是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD; NADH, H⁺)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP; NADPH, H⁺)。这两个脱氢酶的辅酶另有名称为辅酶I和辅酶II；它们还有旧的名称；可以归纳为下列表达方式：NAD=CoI=DPN; NADP=CoII=TPN。泛酸也属于B族维生素。辅酶A的结构中包含泛酸。辅酶A和乙酰辅酶A缩

写成CoA-SH和CH₃- $\overset{\text{O}}{\parallel}$ C~SCoA。乙酰辅酶A是脂肪酸氧化、丙酮酸脱氢等的代谢终点。叶酸也是B族维生素。四氢叶酸(THFA; THF或FH₄)传递一碳单位，如甲基、亚甲基等。B族维生素生物素是跟羧化酶形成复合体的辅酶。维生素B₆有吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺三种；它们的磷酸酯是转氨酶的辅酶。维生素B₁₂为钴胺素。它的5'-脱氧腺嘌呤核苷钴胺素是甲基丙二酸单酰CoA变位酶的辅酶。

习 题

1. 说明维生素A、D、E、K的结构和功能。
2. 举例说明维生素原和维生素之间的关系。
3. 为什么人体、猴和豚鼠必须从食物中获得抗坏血酸；而大鼠、小鼠、犬、兔等不需从食物中获得抗坏血酸？
4. 解释NAD、NADP、FMN、FAD。
5. 维生素B₆和转氨作用有什么联系？
6. 说明辅酶A的结构和功能。

7. 四氢叶酸在代谢中有什么作用?
8. 怎样防止夜盲症、脚气病和坏血症?

主要参考书

1. Sherman, H. C. and Smith, S. L., The Vitamins Chemical Catalog Company, Inc. 1931.
2. Wager, A. E. and Folkers, K., Vitamins and Coenzymes Interscience Publishers. 1963.
3. Smith, E. L., Hill, R. L., Lehman and Leikowitz, R. J. Principles of Biochemistry: General Aspects. Mc Graw-Hill Book Company. (1983).
4. Scott, M. L., Nutrition of Humans and Selected Animal Species John Wiley-Sons. 1986.

(沈 同)

第七章 抗 生 素

第一节 抗生素的概况

一、抗生素的定义

抗生素(antibiotics)是微生物在代谢过程中产生的,在低浓度下就能抑制它种微生物的生长和活动,甚至杀死它种微生物的化学物质。青霉素、链霉素和金霉素等都是人们所熟知的抗生素。

随着抗生素的研究和生产的发展,上述的抗生素定义显得不够全面,需作下面两点补充:第一、来源方面,不仅限于微生物产生的,也包括高等动、植物产生的代谢物,甚至包括用化学方法合成或半合成的化合物;第二、性能方面,不仅抗细菌的物质,某些抗肿瘤、抗原虫,抗病毒,抗真菌、抗藻类、抗寄生虫以及杀虫除草等的物质也都包括在抗生素这个范畴内。

目前已知的天然抗生素不少于9000种,其中近半数为放线菌所产生,如链霉素、金霉素、红霉素、创新霉素、争光霉素和春雷霉素等,细菌所产生的有杆菌肽、短杆菌肽、多粘菌素等;真菌所产生的有青霉素、灰黄霉素等。从绿色植物中提取的有蒜素(allicin)、常山碱(dichroin)、长春花碱(vinblastine)等;从动物组织中获得的有鱼素(ekmolin)和溶菌酶。

二、拮抗作用与抗生素的发现

一类微生物抑制或杀死它类微生物的作用称为微生物间的拮抗作用(antagonism)。拮抗作用是微生物界的普遍现象。

我国劳动人民,在2500多年前已知利用豆腐上的霉菌来治疗疮痍。欧洲、墨西哥和南美等地早期也曾利用发霉的面包、旧鞋等医治溃疡、肠道感染和创伤化脓等疾病。这都说明在民间很早以前就已有应用霉菌和微生物产物治疗疾病的实践,这是人们在实践中利用微生物间拮抗作用的初期。

随着近代工业的出现,显微镜的发明,细菌学迅速发展起来,对微生物间的拮抗作用的研究也日益深入。1877年,巴斯德(L. Pasteur)和J. F. Joubert发现给动物接种无害细菌和炭疽杆菌,结果抑制了炭疽病症状的发生,并观察到培养在同一培养基上的两种不同微生物,出现一种微生物损害另一种微生物生长的现象。巴斯德因此提出:“这些事实可能是治疗学的最大希望”。1890年Garperini最先报道了放线菌之间的拮抗作用。

本世纪初,陆续分离出了多种抗生素,但这些抗生素效力不高,提纯不易,毒性较大,因而没有实用价值。当时很多国家都围绕着寻找抑制致病菌的物质,进行了大量工作,这些工作使人们对拮抗作用的认识和利用逐渐地自觉起来。

1929年,英国人Flemming在培养葡萄球菌时,发现从空气中落到培养基上的一种青霉菌能抑制其周围的葡萄球菌生长,他进一步研究发现青霉菌分泌一种抗菌物质,它被命名为青

霉素(penicillin),它能阻抑葡萄球菌的生长,但对人畜无害。此后,经过许多人的研究,将青霉素从青霉菌的培养液中提取出来,并制成结晶,测定了它的化学结构,肯定了它的医疗效果,并在40年代初期投入了工业生产。

1943年,Waksman等从土壤中分离出链霉菌(streptomycetes)并从其培养液中获得链霉素。它对顽固的结核杆菌有明显的抑制作用。

继青霉素、链霉素之后,陆续地发现了氯霉素、金霉素、红霉素、博莱霉素等。在青霉素、链霉素等重要抗生素发现和应用以来,短短的40年间,抗生素的研究和生产有着飞速的发展,找到的抗生素已近万种之多,其中肯定临床效果,并已大量生产和广泛应用的也有近百种。抗生素已经成为一门独立的科学和独立的工业部门。

三、抗生素的抗菌性能

各种抗生素的抗菌效果,多数呈抑菌作用,少数具杀菌作用或溶菌作用。例如金霉素、土霉素、氯霉素等一般只具抑菌作用;青霉素和链霉素在低浓度时呈抑菌作用,浓度增高时,则有杀菌能力;多粘菌素、短杆菌肽等主要呈杀菌作用。

抗生素的抗菌作用和一般消毒剂有所不同。一般的消毒剂,如石炭酸、酒精等,主要是起物理化学变化,使菌体蛋白质沉淀或变性,从而把菌杀死。抗生素则主要是作用到菌类的生理方面,通过生物化学方式干扰菌类的一种或几种代谢机能,使菌类受到抑制或杀死。由于抗生素的这种特殊作用方式,使它的抗菌作用具有以下几个特点:

(一) 选择性作用 因为各种微生物各有固定的结构和代谢方式,各种抗生素的作用方式也不相同,所以一种抗生素只对一定种类的微生物有抗菌作用,即所谓抗菌谱。青霉素一般只对革兰氏阳性菌有抗菌作用,多粘菌素只对革兰氏阴性菌有作用,它们的抗菌谱较窄。氯霉素、四环素、金霉素等对多种革兰氏阳性和阴性细菌以及某些立克次氏体和大型病毒,均有不同程度的抑制作用,这类抗生素称为广谱抗生素。

(二) 选择性毒力 抗生素对人体及动、植物组织的毒力,一般远小于它对致病菌的毒力,这称为抗生素的选择性毒力。通常抗生素在极高的稀释度仍能有选择地抑制或杀死微生物。选择性毒力构成感染症的化学治疗的基础。

(三) 引起细菌的耐药性 细菌在抗生素的作用下,除了大批敏感菌被抑制或杀死外,常常会有一些菌株调整或改变代谢途径,从敏感菌变为不敏感菌,即产生细菌的耐药性。耐药菌的出现是医学上的严重问题。目前除设法寻找新的抗耐药菌的抗生素外,在临床上应该合理使用,避免滥用,以防止耐药菌的产生。

四、新抗生素的寻找

目前世界上寻找新抗生素的目标集中在以下几个方面:(1)抗肿瘤的抗生素;(2)抗耐药性金黄色葡萄球菌,大肠杆菌和结核杆菌的抗生素;(3)抗绿脓杆菌和变形杆菌的抗生素;(4)抗小型病毒的抗生素。

近年来,获得新抗生素的方法有了很大进展,除了继续从土壤中筛选拮抗菌以获得新的天

然抗生素外,还使用微生物或化学的方法改造已知抗生素的化学结构获得新的抗生素(如青霉素、头孢菌素的半合成)。前一种方法目前仍然是主要的,后一种方法是很有前途的。

从自然界中寻找新抗生素的主要步骤是:土壤拮抗菌的分离,抗菌谱的测定及抗生素的早期鉴别,在筛选工作中经常使用划线法和杯碟法。

划线法是把待测的拮抗菌划线接种到琼脂平板培养基的中央,培养二天后,将试验菌与拮抗菌作垂直划线,但不与拮抗菌接触,再培养一天左右,即可观察到拮抗菌附近有的试验菌没有生长,因为它被拮抗菌所产生的抗生素所抑制。由于试验菌对抗生素的敏感性不一,所以被抑制部分的长度也不等。

杯碟法是在接种有试验菌的琼脂平板上放上玻璃或不锈钢的无底小杯(常称牛津杯),向杯内滴入待检的拮抗菌发酵液,保温培养,抗生素由小杯渗透到周围的琼脂中,抑制细菌生长,因此在小杯周围形成一个透明圈。圈的直径决定于抗生素的浓度(图 7-1)。

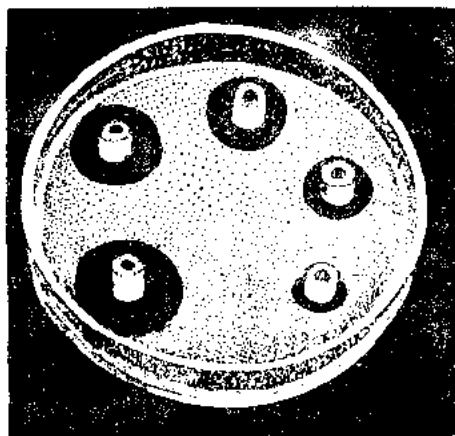


图 7-1 不同浓度青霉素所致的抑菌圈

杯碟法常用来测定抗生素的效价。效价即是用抗菌效力表示的抗生素有效含量。每种抗生素的效价单位都经国际会议统一规定,以便有一个统一标准。例如青霉素的效价规定 0.6 微克青霉素 G 钠盐结晶为一个国际单位,即 1 毫克青霉素 G 钠盐结晶为 1 670 单位,又如链霉素的效价,规定以链霉素碱 1 毫克为 1 000 单位,则 1 毫克链霉素硫酸盐的理论效价应为 798 单位。

第二节 细菌对抗生素耐药性的生物化学机理

关于细菌对抗生素的耐药性问题,在应用青霉素作为化学治疗剂不久就引起人们注意。发现有的细菌对青霉素不敏感,有的细菌能迅速地破坏青霉素,并发现耐药菌有逐年增加的趋势。例如青霉素 G 开始使用时,只有 8% 葡萄球菌对它有耐药性,到 1962 年,耐药的葡萄球菌增加到 70%。另一些抗生素也有类似的情况。产生耐药性在许多细菌中是普遍的现象,但也有少数例外,如链球菌 A 和螺旋菌,在使用青霉素 22 年后,仍然还是敏感的。

为什么自然界中会产生耐药菌?关于这个问题曾有过争论,有人主张“直接适应论”,有人主张“自然突变论”。实验证明,后一种理论是正确的。实验表明在某些细菌群体中,耐药性的传播主要是某种遗传特征的传播,关于耐药性遗传问题有两个方面,一是这些基因的性质和来源,二是这些基因从一个菌株传播到另一个菌株。

细菌耐抗生素的生化机理主要有三种类型:(1)产生导致抗生素失效的酶,(2)改变对抗生素敏感的部位,(3)降低细胞透过抗生素的能力。

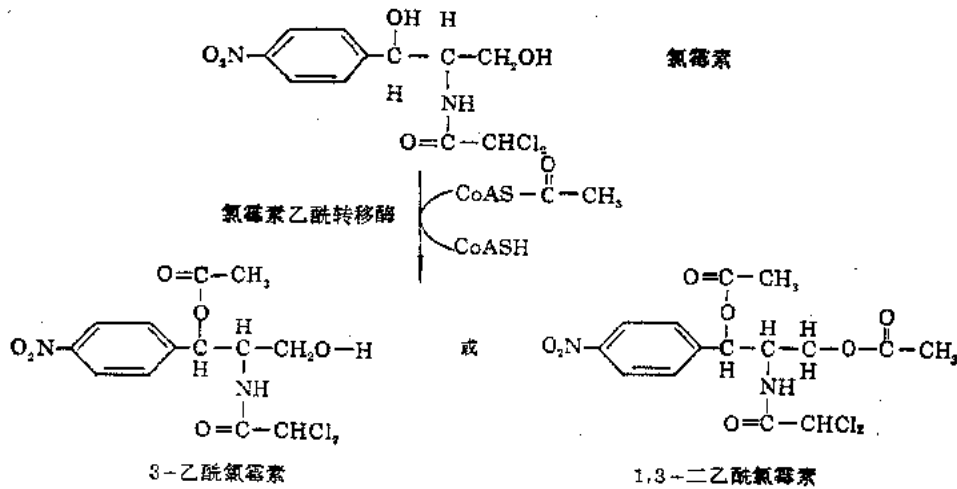
一、耐药菌产生导致抗生素失效的酶

(一) β -内酰胺环的破裂导致 β -内酰胺类抗菌素的失效

有些革兰氏阳性和阴性细菌能产生水解 β -内酰胺类抗生素(青霉素族和头孢菌素族)的 β -内酰胺环的 β -内酰胺酶, 致使这类抗生素失去活性。革兰氏阳性细菌中 β -内酰胺酶是诱导酶(induced enzyme)而且是胞外酶, 而革兰氏阴性细菌中 β -内酰胺酶是组成酶(constitutive enzyme), 一般是胞内酶。某些革兰氏阴性细菌如大肠杆菌和变形杆菌的 β -内酰胺酶也是诱导酶。在某些细菌中, 产生 β -内酰胺酶的基因存在于质粒(plasmid), 例如金黄色葡萄球菌, 这一基因存在于质粒的耐药决定因子中。同样某些革兰氏阴性细菌的 R 因子(能通过接合进行耐药性转移的细菌质粒)也常有 β -内酰胺酶标记。 β -内酰胺酶的基因除存在于质粒外, 某些细菌内也存在于染色体中。已有足够的证据说明, β -内酰胺酶的基因早在使用青霉素和头孢菌素之前已存在于细菌中。

(二) 乙酰化导致氯霉素的失效

耐氯霉素的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌耐药标记都在质粒中。氯霉素在这些耐药菌内经乙酰化转变为 3-乙酰和 1, 3-二乙酰衍生物, 反应如下:



引起氯霉素乙酰化的酶是氯霉素乙酰转移酶(chloramphenicol acetyltransferase)。此酶在金黄色葡萄球菌中是诱导酶, 而在大肠杆菌中是组成酶。

(三) 磷酸化、腺苷酰化或 N 乙酰化导致氨基环醇类抗生素的失效

带有 R 因子的革兰氏阴性细菌之所以耐氨基环醇类抗生素, 是由于这些药物的酶促钝化(enzymatic inactivation)。钝化作用可分三种类型: (1) 磷酸化, 由磷酸转移酶(phosphotransferase)催化, 磷酸供体是 ATP; (2) 腺苷酰化, 由腺苷转移酶(adenylyl transferase)催化; (3) N-乙酰化, 由乙酰基转移酶催化。磷酸化和腺苷酰化在 -OH 基上进行, 而乙酰化在 -NH₂ 上进行。

二、耐药菌改变对抗生素敏感的部位

例如链霉素由于核糖体(ribosome)30S 亚基中的 S₁₂ 蛋白质的改变而产生耐药性。S₁₂ 蛋白质的两个部位发生单一氨基酸置换, 这种置换是由于染色体基因突变的结果。S₁₂ 蛋白质中氨基酸的置换引起 30S 亚基结构的改变, 因而不再能与链霉素结合, 这样链霉素也就不能抑制

蛋白质的生物合成而起抑菌作用。

又如春日霉素(氨基环醇抗生素)的抑菌机理也是作用于 70S 核糖体的 30S 亚基,但不是作用于 30S 的蛋白质部分而是它的核酸部分。耐春日霉素的菌株丢失了一种甲基化酶,这种酶专门甲基化 16S RNA 3'-端附近 AACCUG 顺序中的二个腺苷酸残基使成二甲基腺苷酸。由于 16S RNA 的改变使得春日霉素不能与核糖体结合而发挥它的抑菌作用。

耐利福霉素的菌株,由于染色体突变,改变了复制酶(replicase)或称依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase)的 β -亚基,其结果使复制酶不能与抗生素结合。

三、耐药菌降低细胞透过抗生素的能力

细胞通透性降低的原因可能有:(1)合成一种通透障碍物。对某一种抗生素,革兰氏阴性细菌比阳性细菌不敏感,这可能与革兰氏阴性细菌的细胞壁外层是由脂蛋白和脂多糖组成通透障碍物有关。某些耐药性肺炎球菌减少对链霉素和红霉素的吸收则可用它们形成通透障碍物来解释。这种通透障碍物可能是非特异性的。(2)由于耐药菌基因突变影响通透系统的某一部分,因而使转运某抗生素的功能部分或全部丧失。(3)产生转运抗生素的拮抗系统。耐四环素的菌株,能诱导产生四环素转运的拮抗系统,此系统是染色体外基因所决定的。耐药性 R^+ 大肠杆菌(含 R 因子)的蛋白质合成对四环素的敏感性在该药物抑菌浓度(1—10 微克/毫升)时是敏感性 R^- 大肠杆菌(不含 R 因子)的 1/50—1/100。在更高的四环素浓度下才对 R^+ 细菌有抑制作用。实验证明, R^+ 细菌胞内四环素的积累比 R^- 细菌少。当耐药菌暴露在四环素亚抑制浓度下,会进一步提高耐药水平。耐药性的提高与细胞吸收四环素的下降相联系。

四、耐药性的遗传结构和传播

细菌的耐药基因有的位于染色体上,有的位于染色体外的遗传因子质粒中。染色体和质粒在细菌细胞中各自独立存在,都是复制子(replicon),也即都是能自我复制的遗传单位。因此耐药基因不论是在染色体还是质粒上都能遗传给后代。但是质粒的大小适宜于从一个细胞转移到另一个细胞,它们可以通过转导(transduction)或接合(conjugation)在细菌群体中进行耐药性的传播。所有质粒都能参入一种噬菌体,然后通过后者转移到另一种对噬菌体敏感的细菌,这种方式的转移称转导。但不是所有的质粒都能以接合方式进行转移的。只有那些携带有能使宿主制造质粒转移器官的基因的质粒,才能通过细胞接合进行转移。通过这种方式转移耐药性质粒的细菌都是革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌不仅能在同种之间,也能在不同种甚至不同属之间传递耐药性。

能通过细胞接合进行耐药性转移的质粒称为 R 因子。R 因子也能结合在染色体上,因此亦称附加基因或游离基因(episome)。R 因子能可逆性地解离成两个部分,一部分称耐药转移因子(RTF),另一部分称耐药决定因子(γ)它们也都是环状的 DNA 分子。RTF(分子量约为 $50-60 \times 10^6$ 道尔顿)能启动和控制细胞接合过程。 γ 因子(分子量小于 RTF,它决定于携带的基因数)是一系列相连的抗药基因,如抗氯霉素基因、抗链霉素基因和抗磺胺基因等。

带有 R 因子的“雄” R^+ 细菌能产生性腺毛,它可能就是质粒转移器官。当耐药的“雄” R^+

细菌与敏感的 R^- 细菌进行交配时, R^+ 细胞可能就是通过性腺毛, 把一个 R 因子拷贝转移给 R^- 细胞, 后者得到 R 因子后即变成 R^+ 细胞, 它又可以和其他 R^- 细胞接合, 使耐药性迅速在细菌群体中传播。

质粒与染色体既独立, 又互相联系。特别是在葡萄球菌中, 质粒与染色体进行遗传上的相互作用, 也即遗传重组 (genetic recombination), 质粒整合到染色体上。但整合作用经常是可逆的, 质粒又可从染色体上分离出来。在两者之间可以发生基因交换, 因此基因在质粒与染色体之间的分布是不断变化的。

第三节 抗生素的抗菌作用机理

研究抗生素的作用机理的目的就在于从分子水平上来理解抗生素的抗菌作用和对寄主的损害作用(即所谓副作用), 搞清楚选择性毒力的基本原理, 从而确定治疗的理论基础, 开发疗效更高的新药物。

抗生素作用机理的研究对分子生物学的发展也起着很大的推动作用。例如, 对青霉素作用机理的研究使构成细菌细胞壁基本结构的粘肽的结构和生物合成的研究获得迅速发展。又如, 当知道利福霉素作用于 RNA 聚合酶后, 反过来利用利福霉素搞清楚了转录作用的机理。

抗生素的抗菌作用, 主要是抑制微生物细胞新陈代谢的某些环节或某些酶系统。依照这些代谢环节在机体生活机能上的重要程度, 抗菌作用的效果很不相同。假如重要代谢环节被抑制, 则微生物的生长发生障碍, 甚至死亡。如果某些抗生素能阻抑微生物共同的基本代谢途径, 如蛋白质和核酸的合成, 则它们可以抑制许多不同种类细菌的生长, 广谱抗生素的抗菌机理即属于这一类。抗生素的抗菌作用, 除了干扰菌体的代谢之外, 有时也影响菌体的形态结构。例如, 青霉素抑制细胞壁的合成; 多粘菌素和短杆菌肽等破坏细胞膜的结构。关于抗生素的作用机理, 根据已有的资料, 将它归纳为下面几种主要类型:

(1) 抑制核酸的合成 (2) 抑制蛋白质的合成 (3) 改变细胞膜的通透性 (4) 干扰细胞壁的形成 (5) 作用于能量代谢系统和作为抗代谢物。

一、抑制核酸的合成

有些抗生素, 如放线菌素、丝裂霉素(自力霉素)、光神霉素(光辉霉素)、亚德里亚霉素(adriamycin)和色霉素 A_2 (chromomycin A_2) 等能和 DNA 结合, 使 DNA 失去模板功能, 从而抑制它的复制和转录。这些抗生素起着 DNA 模板功能的抑制剂作用。另一些抗生素, 象利福霉素、利福平和利链菌素(streptolydigin)等是通过与细菌 RNA 聚合酶的结合而抑制转录的起始(initiation)。现举例说明如下:

(一) 放线菌素 D 与我国生产的放线菌素 K_2 (亦称更生霉素) 相同, 分子含有一个发色团-吩噻嗪酮(phenoxazone)和两个环五肽(图 7-12)。放线菌素 D 特异性地与双链 DNA 非共价结合, 使之失去作为 RNA 合成的模板功能。

根据对放线菌素 D 和脱氧鸟苷(1:2 摩尔比)形成的模型复合物晶体的 X-射线结构分析

以及放线菌素 D 和 DNA 的复合物的光谱学和流体动力学的研究推测放线菌素 D 分子可沿 DNA 双螺旋小沟(minor groove)与 DNA 结合。它的吩噻嗪(phenoxazine)环平面嵌入两个相邻的 G-C 碱基对平面之间,吩噻嗪环平面通过范德华力与上下鸟嘌呤平面结合,两个环肽位于小沟内,一个环肽在吩噻嗪环上方,另一个在环的下方。两个环肽的 Thr 羰基分别与二个鸟嘌呤的 2-NH₂ 形成氢键。此外,环肽与脱氧鸟苷酸残基之间还可以形成其他氢键。如果忽略吩噻嗪环两个侧边有无基团(-NH₂和-O)的差别,放线菌素 D 以及放线菌素 D 与脱氧鸟苷形成的复合物都是一个以连接吩噻嗪环中央的 N 和 O 原子的直线为旋转轴的 2-重对称分子。此复合物的 2-重对称构象暗示了放线菌素 D 能识别 DNA 中也具有 2-重对称的 GpC 顺序。注意,如果沿一股 DNA 的顺序是 5'GpC3' 则其互补股的顺序必然是 3' CpG5' 放线菌素 D 的对称性与 DNA 中的 GpC 顺序的对称性是相匹配的,它们的对称轴是同一个。

放线菌素 D 能与双螺旋 DNA 结合,但不与单链 DNA 或 RNA 结合,也不与双链 RNA 或 RNA-DNA 杂交分子结合。放线菌素 D 与 DNA 结合时,由于它的环肽堵塞了小沟,妨害 RNA 聚合酶沿 DNA 模板继续移动,因而阻断 RNA 链的延长(elongation)。放线菌素 D 不影响 RNA 聚合酶与 DNA 的结合,也不影响细胞代谢的其他方面。DNA 复制对放线菌素 D 的敏感性要比转录低得多。

(二) 丝裂霉素 C 同于我国生产的自力霉素。结构式见图 7-11。丝裂霉素 C 在细胞内可被还原成氢醌衍生物。这种还原型产物是活性型的,反应性能高。当与 DNA 反应时引起 DNA 双链间的共价交联。因此丝裂霉素的作用方式与双功能基烷化剂的作用极为相似。比较了一系列丝裂霉素 C 衍生物的实验结果表明,参与形成交联的是氮丙啶基和氨甲酰基。从 DNA 角度来看,鸟嘌呤和胸腺嘧啶都参与和丝裂霉素 C 的结合,但鸟嘌呤更容易与丝裂霉素 C 结合。并查明了是鸟嘌呤的第 6 位上的氧原子参与结合。显然,由于丝裂霉素 C 与 DNA 形成交联,阻止了双链的拆开,因而抑制了 DNA 的复制。

(三) 利福霉素和利福平 这是一类含萘氢醌的大型内酯环的抗生素,利福平是一个半合成的利福霉素,结构式见图 7-10。利福霉素,特别是利福平是细菌的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的特效抑制剂。 2×10^{-8} mol/L 浓度的利福平即能抑制 50% 的酶活性。它们专门抑制转录的起始,但并不妨碍聚合酶与 DNA 模板的结合。利福平可能是由于和起始的嘌呤核苷 5'-三磷酸(PPP_G 或 PPP_A) 竞争与酶结合的部位,因而干扰 RNA 链的第一个磷酸二酯键的形成,但并不影响链的延长。利福平在抑制作用方面的这种高度选择性使它成为很有用的生化工具,用来阻断 RNA 新链的起始,但并不影响已在合成的 RNA 链的转录。利福平的作用位点可能在 RNA 聚合酶($\alpha_2\beta\beta'\sigma$)的 β -亚基上。抗利福平的大肠杆菌突变体(称 rif-r 突变体),它们的 RNA 聚合酶发生了改变。即使高于原来的酶抑制浓度 1000 倍的浓度下,这种酶也不受抑制,不再能和利福平结合,并已证明酶的改变发生在 β 亚基上(反映在电泳迁移率发生改变)。

利链菌素的作用方式也是与聚合酶的 β 亚基结合,但是它除了阻断转录起始之外同时阻断 RNA 链的延长。

二、抑制蛋白质的合成

蛋白质的生物合成(翻译)在细胞代谢中占有十分重要的地位。真核细胞与原核细胞的蛋白质合成机理大同小异。线粒体与叶绿体的蛋白质合成与原核细胞更为相似。蛋白质合成的部位在核糖体上。原核细胞的核糖体为 70S 的颗粒,它由 30S 和 50S 二个亚基组成。真核细胞的核糖体为 80S,它由 40S 和 60S 二个亚基组成。线粒体内的核糖体大小差异较大,高等生物线粒体的核糖体为 50S—60S,其亚基也相应地不同。人线粒体的核糖体亚基为 45S 和 35S。mRNA 是蛋白质合成的模板。蛋白质合成大体上可分为四个阶段:(1) 氨酰-tRNA 的合成;第一步氨基酸的活化;第二步活化氨基酸的转移;(2) 肽链合成的起始;(3) 肽链的延长;(4) 肽链合成的终止。关于蛋白质生物合成的细节见本书下册《蛋白质生物合成》章。细胞内蛋白质合成系统是十分复杂的,环节很多,除核糖体外,涉及蛋白质合成的大分子不下一百种,包括 mRNA、tRNA、活化酶、蛋白因子等,因此抗生素抑制蛋白质合成的作用点也是十分不相同的。

能抑制蛋白质生物合成的抗生素很多。下面介绍抑制蛋白质生物合成的几个主要环节的抗生素作用机理。

(一)抑制氨酰-tRNA 的形成

例如,活化反应中吲哚霉素(indolmycin)和色氨酸竞争与色氨酸激活酶(或称色氨酰-tRNA 合成酶)结合,因此抑制了氨酰-tRNA 的形成。

(二)抑制蛋白质合成的起始

大多数氨基环醇类抗生素都能引起原核细胞 mRNA 密码的错读(misreading),可能这类抗生素干扰密码子与反密码子的相互作用。例如用多聚 U 作模板合成多聚苯丙氨酸时发现除苯丙氨酸(UUU)之外,尚有异亮氨酸(AUU)参入,约占 40%。这类抗生素中链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素和巴龙霉素等能抑制 70S 合成起始复合体的形成以及引起 fMet-tRNA_f(N-甲酰-甲硫氨酰-tRNA_f)从 70S 合成起始复合体上的解离,因此阻碍蛋白质合成的起始。链霉素在核糖体上的作用部位已被确定。实验证明,对链霉素的敏感点是在 30S 亚基上。并进一步确定了对链霉素的敏感点是亚基的一种蛋白质即 S12 蛋白。

春日霉素(图 7-13)以及其他氨基环醇类抗生素则不相同,它不引起密码的错读,能专一地抑制 30S 合成起始复合体的形成(抑制 fMet-tRNA 的结合)。春日霉素的作用位点在 30S 亚基的 16S RNA 部分。

(三)抑制肽链的延长

肽链的延长,包括氨酰-tRNA 与 70S 核糖体 A 部位的结合,肽键的形成和移位(translocation)。

四环素族抗生素(图 7-9)由于它们封闭 30S 亚基上的 A 部位(氨酰基部位)使氨酰-tRNA 的反密码子不再能在 A 部位与 mRNA 结合,因而阻断了肽链的延长。大多数抗四环素的菌株都是由于改变了膜的通透性或产生了钝化抗生素的酶的结果。真核细胞核糖体本身也对四环素敏感。但四环素不能透过真核细胞膜,因而不能抑制活体真核细胞的蛋白质合成。

氯霉素选择性地与原核细胞 50S 亚基(或线粒体核糖体大亚基)结合, 抑制肽酰转移酶(peptidyl transferase)活性, 从而阻断肽键的形成。但它不抑制真核细胞线粒体外的蛋白质合成。氯霉素作为药物是有毒性的, 可能是因为线粒体的核糖体对它敏感的缘故。

环己亚胺作用于真核细胞的 60S 亚基而抑制肽酰转移酶活性, 但不抑制原核细胞和线粒体的蛋白质合成。

红霉素也与 50S 亚基结合, 但它抑制的是移位反应。抑制移位反应的抗生素还有其他的大环内脂抗生素(macrolide antibiotics)如麦迪霉素(midecamycin)和螺旋霉素(spiramycin)等以及梭链孢酸(fusidic acid)等。

(四)抑制蛋白质合成的终止

终止(termination)过程包括终止信号(终止密码子)的识别, 完工了的肽酰-tRNA 酯键的水解与释放。象氯霉素这样一些抑制肽键形成的抑制剂, 也能抑制终止过程。

嘌呤霉素(puromycin)对蛋白质生物合成具有独特的作用。它与 50S 亚基 A 部位结合, 抑制氨酰-tRNA 的进入, 从而引起肽链合成的过早终止。嘌呤霉素是氨酰-tRNA 3'-末端氨酰-腺苷酸部分的类似物(见图 7-2)。由于嘌呤霉素也含有一个 α 氨基, 在肽酰转移酶作用下, 能与正在增长的肽链羧基形成肽键, 并从核糖体上释放出来。产物是肽酰嘌呤霉素。嘌呤霉素曾用于确定核糖体的功能状态。实际上, 核糖体上的 A、P 部位的概念就是利用嘌呤霉素弄清肽酰 tRNA 的位置的结果。当肽酰 tRNA 处于 A 部位时(移位前), 它不能与嘌呤霉素起反应。

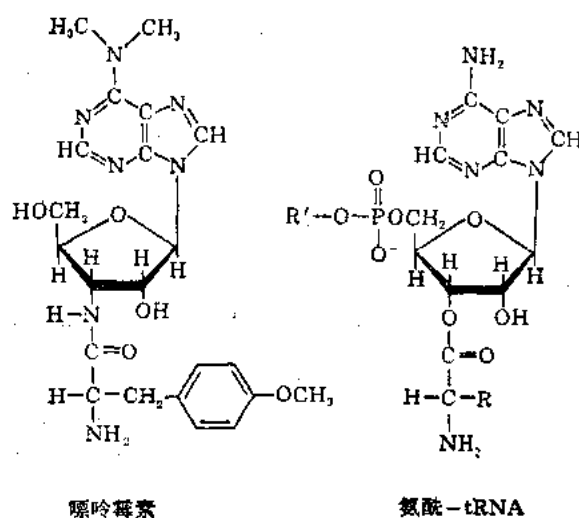


图 7-2 嘌呤霉素与氨酰-tRNA 3'-末端结构的相似性

三、改变细胞膜的通透性

细胞质膜(plasma membrane)是由双层脂蛋白组成的。真核细胞膜与原核细胞膜化学组成上的主要差别在于前者含有固醇类物质, 而后者不含这类物质。细胞膜的一个很重要的功能是转运物质。许多物质的跨膜运输都与膜的通透性有关。

多肽类抗生素如多粘菌素 E, 短杆菌肽 S 等都具有表面活性剂的作用, 能降低细菌细胞膜的表面张力, 因而改变了细胞膜的通透性, 甚至破坏膜的结构。结果使氨基酸、单糖、核苷酸、无机盐离子等外漏, 影响细胞正常代谢, 致使细菌死亡。这类抗生素靠损伤质膜而呈杀菌作用, 它们对人和动物细胞膜也起作用, 选择性毒力不高, 因此临床使用受到限制。

多烯类抗生素, 如制霉菌素, 两性霉素等能选择性地作用于含固醇的膜的微生物。显然多烯类抗生素的作用是由于它们与固醇具有亲和力, 因此能和这些微生物的膜结合, 结合程度与膜的固醇含量成正比。结合后形成膜-多烯化合物, 引起细胞质膜的通透性改变, 导致胞内

代谢物的泄漏。真菌和动物的细胞质膜都含有固醇物质，因此选择性毒力也不高，但对细菌不起作用。

某些抗生素如缬氨霉素(valinomycin)、短杆菌肽 A(gramicidin A)等是脂溶性物质，它们能结合并运载特定的阳离子通过双层膜，很象膜系统上的离子载体(ionophore)，因此，称

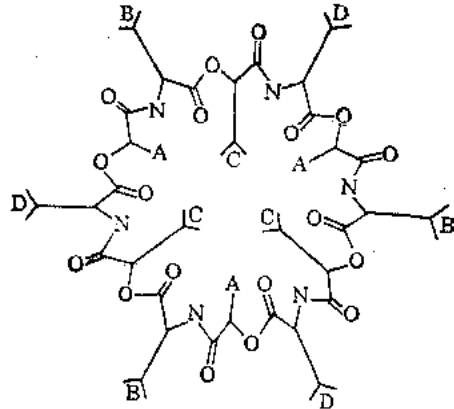


图 7-3 缬氨霉素-K⁺ 络合物的结构
A=L-乳酸; B=L-缬氨酸; C=D-羟基异戊酸; D=D-缬氨酸

它们为离子载体抗生素或转运离子抗生素(iontransporting antibiotics)。

缬氨霉素是由 6 个氨基酸和 6 个羧基酸交替结合而成的环状缩肽(cyclic depsipeptide)。在主链中肽键和酯键交替排列，分子具有疏水的外层和亲水的内层。K⁺ 正好通过 6 个配价键与缬氨霉素分子内的 6 个羰基氧结合(见图 7-3)。携有正电荷的缬氨霉素-K⁺ 络合物，由于外层是疏水的，使它能与脂膜融合并将 K⁺ 运送到膜的另一侧，在运载过程中，抗生素分子本身也由膜的一侧扩散到另一侧。充当 K⁺ 离子载体的抗生素还有大四环族抗生素

(macrotetralide antibiotics)如无活菌素(nonactin)和单活菌素(monoactin)等。

短杆菌肽 A 是一个开环的十五肽。结构上值得注意的是 L-和 D-氨基酸交替排列，并且此多肽的 NH₂-末端和 COOH-末端都被修饰，其结构式如图 7-4 所示。

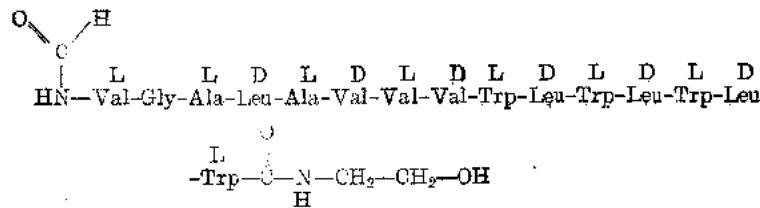


图 7-4 短杆菌肽 A

短杆菌肽 A 能形成通道(channel)横贯双层膜。被转运的离子从膜的一侧进入通道，经过它扩散到膜的另一侧。发生离子转运时这种抗生素(通道)本身不需要移动。

缬氨霉素专门转运 K⁺ 以通过线粒体内膜，而短杆菌肽 A 除能跨膜转运 K⁺ 外，还能转运 Na⁺ 和几个其他的一价阳离子。尼日利亚菌素(nigericin)也是 K⁺ 的专一性离子载体抗生素，它与缬氨霉素不同，由于它有一个负电荷，因此尼日利亚菌素-K⁺ 络合物是不带净电荷的。尼日利亚菌素促进 K⁺ 和 H⁺ 的交换，而缬氨霉素只促进 K⁺ 的通过。

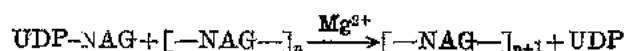
由于离子载体抗生素增加线粒体膜对 H⁺、K⁺ 或 Na⁺ 的通透性，为维持线粒体内正常的 K⁺ 浓度就必须使泵入 K⁺ 的速度与流出速度平衡。这样使得线粒体消耗能量用于泵入 K⁺，而不是用来形成 ATP，因此抑制了氧化磷酸化作用。

四、干扰细胞壁的形成

青霉素、头孢菌素、杆菌肽、D-环丝氨酸(D-cycloserine)、磷霉素(fosfomycin)和万古霉

素(vancomycin)等对细菌细胞壁合成具有抑制作用。但它们抑制生物合成的环节和方式可以不同。有关青霉素抑制细胞壁的合成见本章第四节。

此外有些抗真菌的抗生素也是通过抑制细胞壁的合成而起抗菌作用的。酵母和丝状真菌的细胞壁主要成分是葡聚糖(glucan),甘露聚糖(mannan)甲壳质(chitin),蛋白质和脂质。其中甲壳质在化学性质上类似于细菌的粘肽多糖链部分。甲壳质的生物合成是由单一的酶—甲壳质合成酶催化的。这个酶催化 NAG 从 UDP 转移到增长的甲壳质上,其反应如下:



很多作为抗病原真菌的和杀虫剂的抗生素,多半都具有抑制甲壳质生物合成的作用。例如多氧菌素 D 是真菌细胞壁甲壳质合成酶的最有效的抑制剂,这是由于多氧菌素 D 在化学结构上与 UDP-NAG 极为相似的缘故。

五、作用于能量代谢系统或作为抗代谢物

抗生素的作用机理除上述的四种类型之外,有些是作用于能量代谢系统,特别是作用于氧化磷酸化反应,这类抗生素有抗霉素 A(antimycin A),寡霉素(oligomycin)和短杆菌肽 S 等。抗霉素 A 是呼吸链的电子传递系统的抑制剂,它抑制细胞色素 b 与细胞色素 c₁ 之间的电子传递。短杆菌肽 S 和缬氨霉素是拆开电子传递和磷酸化的解偶联剂。在这些抗生素的作用下,呼吸照常进行,但不生成 ATP。寡霉素抑制线粒体的 ATP 酶。

还有一些抗生素作为抗代谢物,在结构上与初级代谢物相关,具有竞争性或非竞争性抑制物的性质。这些抗生素可以分别作为氨基酸的拮抗物、核苷的类似物或维生素的抗代谢物。

第四节 青霉素抑制细菌细胞壁的合成

一、细菌细胞壁的化学组成

细菌的细胞壁是一层坚韧的厚膜,用以抵抗外界的压力,维持细胞的形状。细胞壁的里面是细胞膜,它是一层半透性的薄膜,膜内裹着细胞质。

细菌的细胞壁主要是由多糖组成,也含有蛋白质和脂质。革兰氏阳性和阴性细菌的细胞壁成分和结构不相同。革兰氏阳性细菌细胞壁的组成是肽聚糖(peptidoglycan)占细胞壁干重的 50—80%,磷壁酸质(teichoic acid)、脂蛋白、多糖和蛋白质。革兰氏阴性细菌细胞壁的组成是:肽聚糖占细胞壁干重的 1—10%,脂多糖、多糖和蛋白质。

二、肽聚糖的结构

肽聚糖也称粘肽(mureopeptide)或胞壁质(murein,来自拉丁文 murus,意为墙壁)。肽聚糖可看成是由一种基本结构单位重复排列构成的,这种基本结构单位有人称它为胞壁肽(muropeptide),其结构式如图 7-5 所示。胞壁肽是一个由 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine,缩写为 NAG)和 N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuraminic acid,缩写为 NAM)组成。侧链中 L-Ala 有时为 L-Ser 或 Gly 取代;D-Glu 有时为 D-Gln 取代,应注意的是 D-Glu 和 R

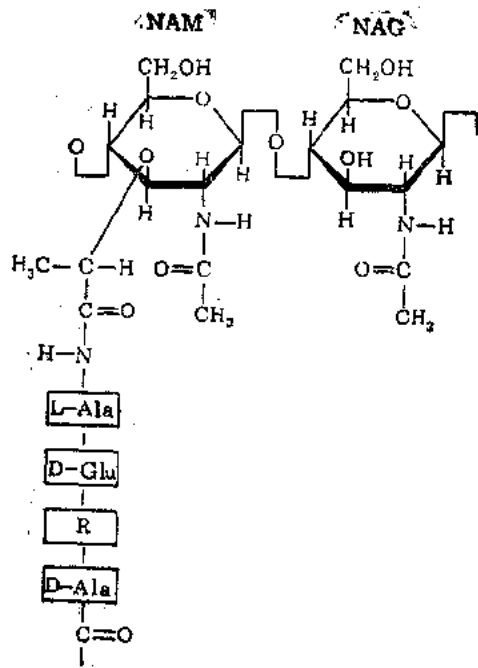


图 7-5 肽聚糖的基本结构单位

实际上, 肽聚糖是一个由共价键连接, 包裹着整个细菌细胞的囊状大分子(sac-likeed macromolecule)。

之间的肽键是由 D-Glu 的 γ -COOH 参与形成的; R 残基因细菌种属而异, 或是 meso-DPA (meso-二氨基庚二酸, meso-diaminopimelic acid) 或 L, L-DPA, L-Lys, L-Orn (L-鸟氨酸) 或二氨基丁酸等。

肽聚糖的骨架也可以看成是甲壳质链上的单糖残基交替地被乳酸取代, 并通过它连接着一个四肽侧链。肽聚糖中平行的多糖链通过四肽侧链而被交联在一起(图 7-6)。在大肠杆菌(*E. coli*)或其他革兰氏阴性细菌中, 侧链四肽与四肽直接相连, 即一条多糖链上的四肽 D-Ala 的 α -COOH 与相邻多糖链上的四肽 R 残基的侧链氨基如 L-Lys 的 ϵ -NH₂ 连接。但在许多细菌中四肽之间通过短肽连接。例如金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)中, 四肽之间的连桥是五聚甘氨酸(Gly)₅。

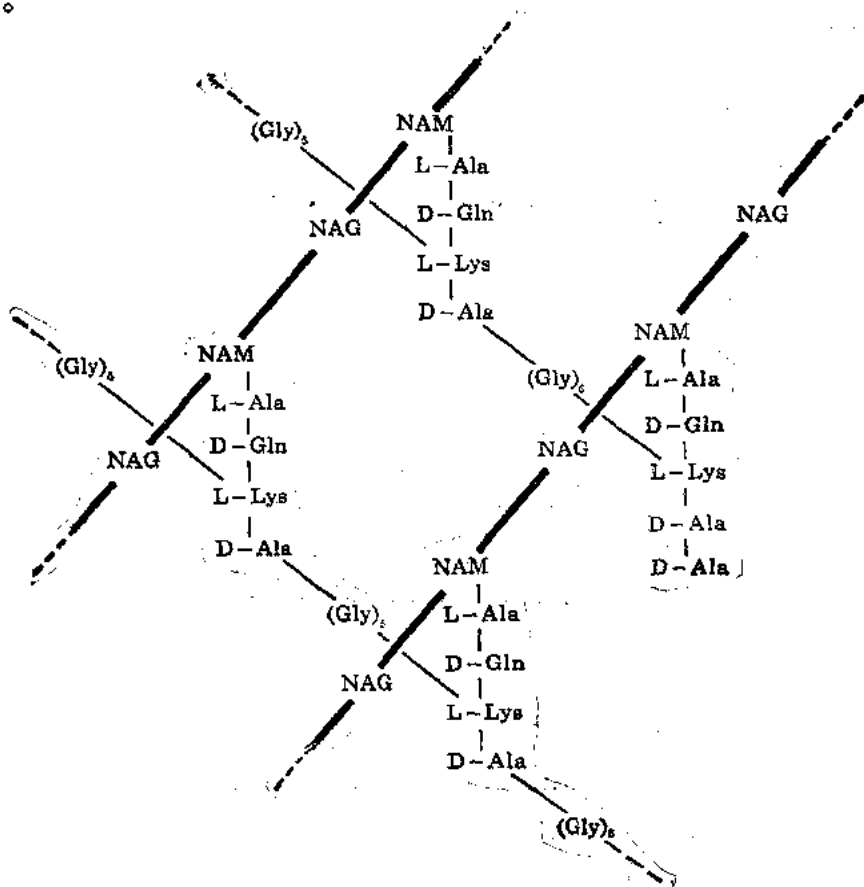


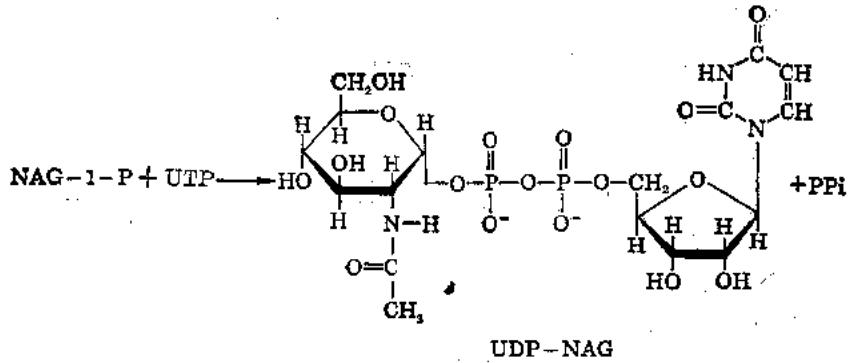
图 7-6 金黄色葡萄球菌肽聚糖结构的图解

三、肽聚糖的生物合成

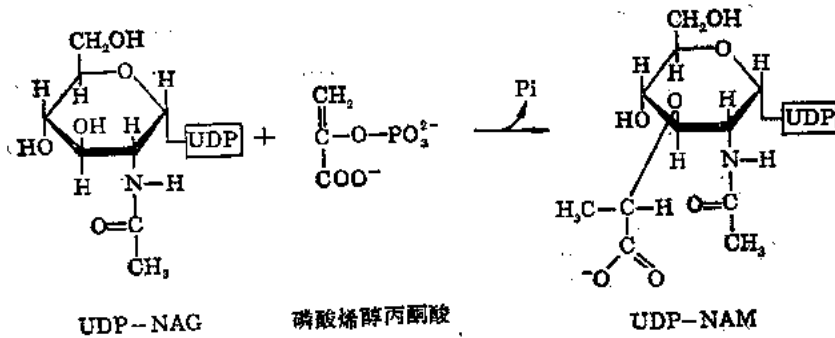
肽聚糖的生物合成可分为五步:

(一) UDP-糖-肽单位的合成

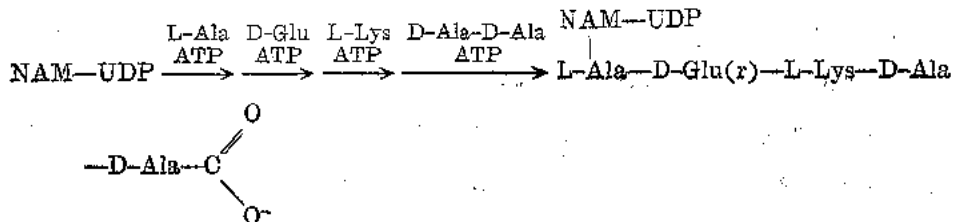
这一步反应是在细胞质中进行的。肽聚糖的生物合成从活化糖的形成开始。由 N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸(NAG-1-P)和 UTP 反应生成尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(UDP-NAG), 反应为 PPi 的水解所驱动:



由 UDP-NAG 和磷酸烯醇丙酮酸(phosphonolpyruvate)反应形成尿苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸(UDP-NAM):



肽链的增长是由 L-丙氨酸的氨基和 UDP-NAM 的 N-乙酰胞壁酸的羧基形成肽键开始。随后连续地加上 D-谷氨酸, L-赖氨酸和二肽 D-丙氨酰-D-丙氨酸:

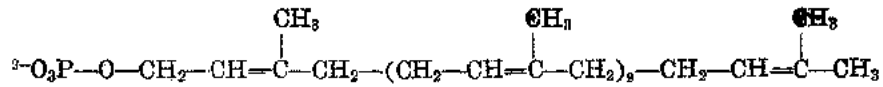


D-丙氨酸是由 L-丙氨酸经消旋酶(racemases)作用转变而来的。形成每一肽键需要一个 ATP。肽键的合成是由特殊的合成酶催化的, 不是通过核糖体的蛋白质合成途径完成。肽的合成无需 mRNA 作模板, 氨基酸顺序的信息由这些合成酶的特异性决定。

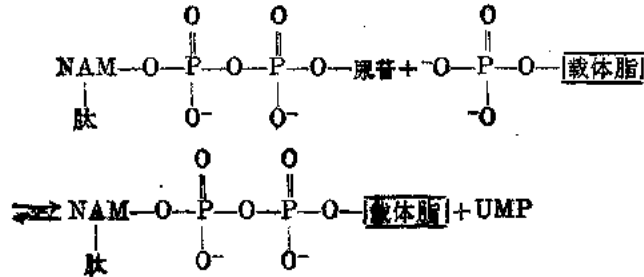
(二) 糖-肽单位向载体脂的转移

第2-4步反应是在细胞膜的载体脂和酶系统参与下进行的。

载体脂(carrier lipid)是一种磷酸化的长链醇,含有11个异戊烯单位(isoprene unit),因此是一个很强的疏水分子,其结构式如下所示:

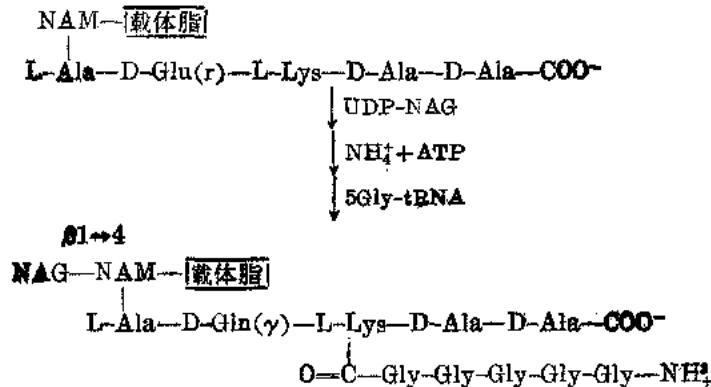


载体脂的这种疏水特性使得在细胞质中形成的 UDP-NAG 和 NAM-肽单位能够通过细胞膜的通透性屏障到达膜的外侧。活化的糖-肽单位从 UDP 转移到载体脂。反应如下:



(三) 二糖-肽单位的合成

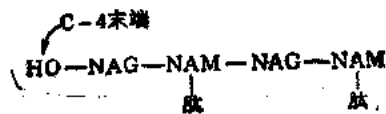
这一步反应是 NAG 加到连在载体脂上的 NAM-肽单位的 NAM 部分。UDP-NAG(活化糖供体)与 NAM 单位的 C-4 作用形成 β -1, 4 糖苷键:

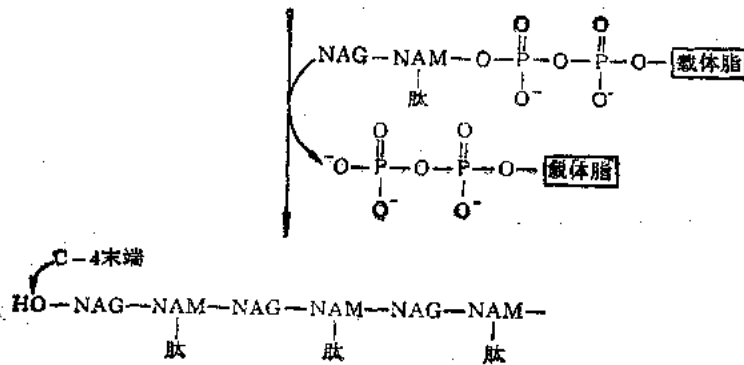


肽链中 D-Gln 残基的游离 α -COOH 被 NH_4^+ 酰胺化,反应需要 ATP。然后向肽链的 L-Lys 残基的 ϵ - NH_2 上加接五聚甘氨酸桥。五聚甘氨酸是由甘氨酸-tRNA 连续转移单个甘氨酸残基形成的。至此完成了细胞壁的基本结构单位的合成。

(四) 二糖-肽单位向增长的多糖链的转移

在这步反应中二糖-肽单位从载体脂转移到增长的多糖链的非还原性末端。NAM 部分的 C-1 由于它通过焦磷酸键与载体脂相连而被活化。被活化的 NAM 单位的 C-1 与增长的多糖链 NAG 末端的 C-4 反应形成一个 β -1, 4-糖苷键:





载体脂以焦磷酸形式被释放。然后在特异的磷酸酶作用下水解成单磷酸。脱磷酸 (dephosphorylation) 这一步是载体脂再生所必需的, 因为只有单磷酸形式的载体脂才能作为糖-肽的受体。一种肽类抗生素-杆菌肽 (bacitracin) 就是通过阻断这一步反应抑制细胞壁的生物合成。

(五) 多糖链通过转肽作用被交联

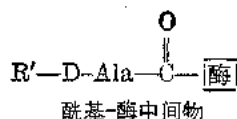
肽聚糖合成的最后一步是相邻的多糖链通过转肽作用 (transpeptidation) 形成一个大的囊状分子。一个五肽侧链的 L-Lys (或 DAP) 的 ϵ -NH₂ 或五聚甘氨酸桥的 N-末端氨基进攻相邻多糖链上五肽侧链的 D-Ala-D-Ala 残基之间的肽键, 结果在甘氨酸和其中一个 D-丙氨酸残基之间形成一个肽键 (见图 7-6), 另一个 D-丙氨酸被释放出来。此反应是在糖肽转肽酶 (glycopeptide transpeptidase) 催化下进行的。注意, 此交联键的形成不消耗 ATP。转肽反应是利用已存在于 D-Ala-D-Ala 键内的自由能。形成肽键的这种特殊方式看来是必要的, 因为反应是在细胞膜外发生的, ATP 不能到达这里。

四、青霉素抑制细菌细胞壁的合成

很早已有人观察到, 在青霉素的影响下, 大肠杆菌发生变形。细菌的外形决定于细胞壁的完整性, 细菌的变形是细胞壁受损的结果。由于青霉素专门作用生长时期的细菌, 可见青霉素的作用是抑制新的胞壁形成, 而不是破坏已经形成的细胞壁。细胞壁的合成受到抑制后, 细菌的抗渗透压能力降低, 引起菌体变形, 破裂而死亡。

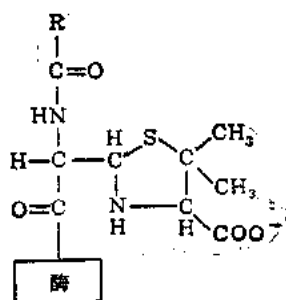
50年代后期阐明了粘肽的结构及其生物合成; 并确定了青霉素干扰细胞壁的形成主要是抑制粘肽合成的最后一步, 即转肽作用。关于青霉素抑制转肽反应的机理在60年代末曾提出了两种解释。一种是由 Jack Strominger 等人提出的, 他们认为青霉素抑制转肽作用是由于它和转肽酶发生结合引起的。另一种解释是 Rogers 提出来的, 他认为由于青霉素与底物五聚甘氨酸的游离氨基结合, 隔断了交联反应中肽键的形成, 因此青霉素抑制转肽作用。后来的实验事实似乎对 Strominger 的解释更为有利。

转肽酶正常情况下是先与底物五肽侧链倒数的第二个 D-丙氨酸残基形成酰基中间物 (acyl intermediate):



然后发生转肽反应。

现已证明青霉素内酰胺环上的高反应性肽键(图 7-8)受到酶活性部位上丝氨酸残基的羟基的亲核攻击形成了共价键。产生的青霉噻唑酰基-酶复合物 (penicillinoyl-enzyme complex):



青霉噻唑酰基-酶复合物

是无活性的,并且不再发生脱酰基作用(deacylation),因此青霉素抑制转肽酶是不可逆的。

根据分子模型揭示,青霉素之所以成为转肽酶的特异而有效的抑制剂是因为青霉素是转肽酶的底物之一的酰基-D-Ala-D-Ala 的结构类似物(图 7-7)。青霉素的低毒性是由于它具有高度特异性的缘故。还不知道人体内有哪个酶能识别 D-Ala-D-Ala 的结构,正因为这样,青霉素并不干扰人体的酶系统。它选择性地作用于细菌并引起溶菌作用,但几乎不损害人和动物的细胞,所以青霉素是一种比较理想的抗生素。

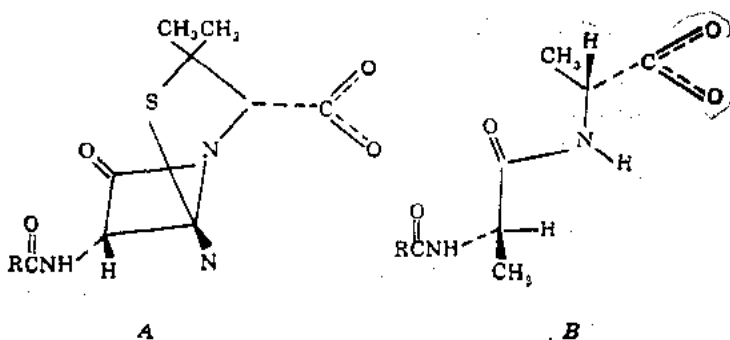


图 7-7 青霉素(A)和 D-丙氨酰-D-丙氨酸(B)的构象

近年来的研究表明,青霉素的作用比原来所想象的要复杂得多。青霉素的作用并不限于抑制转肽酶,它对某些细菌的 D-丙氨酸羧胺酶以及其他酶也有抑制作用。

第五节 几种重要抗生素的化学和医疗特性

一、青霉素

青霉素 (penicillin) 是青霉菌属 (*penicillium*) 的某些菌株产生的抗生素。青霉素疗效显

著,近半个世纪来一直是临床上应用的主要抗生素之一。

(一) 青霉素的化学结构

青霉素是含有青霉素母核的多种化合物的总称。青霉素发酵液中至少含有5种以上的不同青霉素(或称天然青霉素):青霉素F、青霉素G、青霉素X、青霉素K及二氢青霉素F等。青霉素的结构通式如图7-8所示。

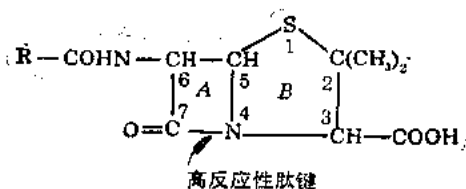
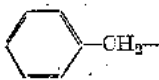
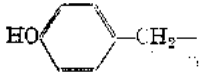
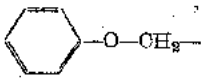


图7-8 青霉素通式

图7-8所示的青霉素结构,主要是由 β -内酰胺环(A环)所组成,而各型青霉素的区别只是侧链R的不同。几种青霉素的侧链及物理常数见表7-1。

表7-1 几种青霉素的侧链及物理常数

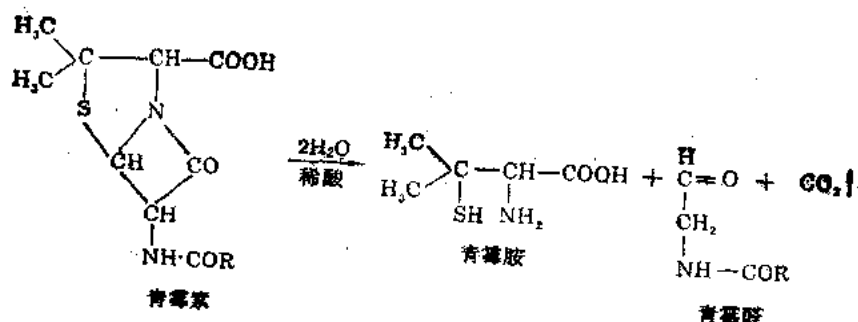
名称	审定名	侧链 R	分子量(钠盐)	熔点(分解)
青霉素F(或I)	戊烯[2]青霉素	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$	334.2	204—205°C
青霉素G(或II)	苄青霉素		356.4	215°C
青霉素X(或III)	对羟苄青霉素		372.4	228—235°C
青霉素K(或IV)	正庚青霉素	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_2-$	364.3	
二氢青霉素F	正戊青霉素	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-$	386.3	
青霉素V	苯氧甲基青霉素		372.4	120—128°C

(二) 青霉素的理化性质

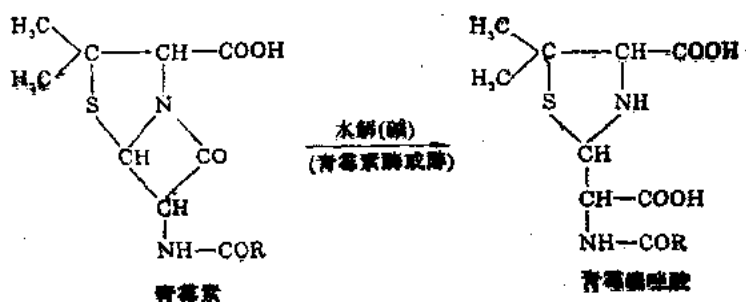
青霉素本身为一元酸,可与钾、钠、钙、镁、铝、铵等化合成盐类。青霉素盐易溶于水,游离酸易溶于醇、酮、醚、酯等一般有机溶剂,稍溶于芳香族碳氢化合物,不溶于脂肪族碳氢化合物。医药上常用钾盐和钠盐,纯品钠盐为白色结晶或鳞片状结晶,钙盐为无定形粉末。

青霉素游离酸或盐类的水溶液均不稳定,极易失去抗菌效力。青霉素不耐热,一般保存于冰箱中。但青霉素盐的结晶纯品,在干燥条件下可于室温保存数年。

青霉素的抗菌效力与其分子中的 β -内酰胺环有关,酸、碱、重金属或青霉素酶(penicillinase)等可使这一功能基团破裂,导致青霉素失效。酸可使青霉素完全水解而成青霉胺、青霉醛及二氧化碳,反应式如下:



青霉素在碱性溶液中水解为青霉噻唑酸 (penicilloic acid)。青霉素酶和醇类也能起同样的作用。其反应式如下:



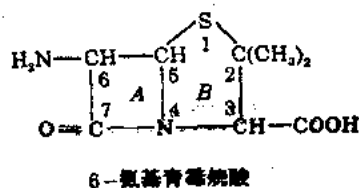
(三) 青霉素分子结构的改造

用生化或化学方法改造已知抗生素的化学结构是当前获得新抗生素的重要途径之一。

青霉素分子结构的改造,一是更换侧链 R,二是从羧基部分制成盐或连接其他化合物或基团,三是改造母核。

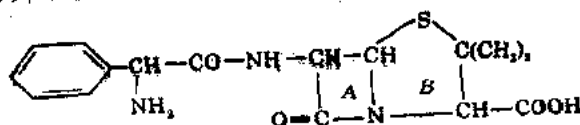
更换侧链常用生物合成法和半合成法。生物合成法是向发酵液中加入各种侧链前体(均为羧酸)以获得新型青霉素。青霉素 V,即是生物合成青霉素。其特点是耐酸、适于口服。青霉素 V 的侧链结构见图 7-1。

半合成法是以 6-氨基青霉烷酸(6-amino-penicillanic acid, 缩写为 6-APA)为中间体,用化学方法连接上各种侧链以获得新型的青霉素。6-APA 即青霉素母核,通称“无侧链青霉素”,其结构式如下:



6-APA 可从不加侧链前体的发酵液或苯青霉素的酶解液中获得。

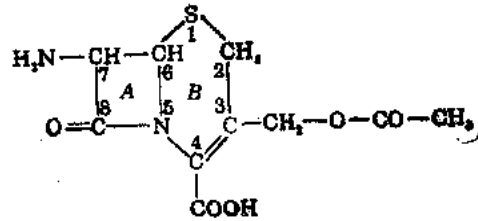
自 1959 年以来各国报道的各种新型半合成青霉素已达千种。其中有的抗菌谱较广,有的对酸和青霉素酶较稳定,如半合成的 α -氨基苄青霉素(ampicillin):



有广抗菌谱的特性,且对酸稳定,可口服,并对革兰氏阴性细菌也有较强的抗菌效力。

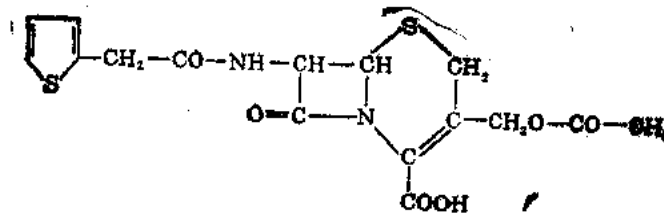
青霉素分子在羧基方面的改造,主要是与钾、钠、铵等结合成盐类,或与某些有机碱结合成复盐。钾盐和钠盐易溶于水,适于作肌肉、静脉或鞘内注射,作用快。普鲁卡因青霉素(procaine penicillin)复盐较难溶于水,注入肌肉内作“积贮剂”,以延长青霉素在血液中的持久性。

青霉素母核的改造工作,除直接重排母核的噻唑环(B环)外,近年来还利用和青霉素母核结构相似的其他抗生素母核,如头孢菌素(cephalosporin)母核7-氨基头孢烷酸(7-aminoccephalosporanic acid; 缩写为7-ACA),以制取新型青霉素。7-ACA含有 β -内酰胺(A)和二氢噻嗪(B)环系统,其结构式如下:

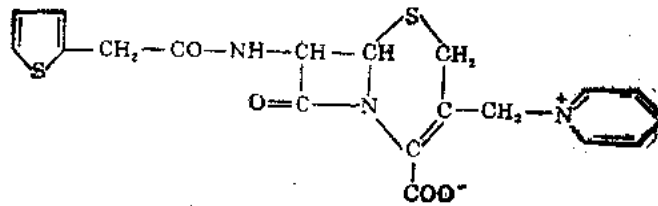


7-氨基头孢烷酸

7-ACA可以水解头孢菌素C而获得。目前利用7-ACA母核进行半合成已获得许多新型抗生素,如先锋霉素I或称头孢金素(cephalothin)和先锋霉素II或称头孢利素(cephaloridin)。这两个抗生素抗菌谱广,作用强、毒性低,副作用小,且对青霉素耐药菌也有强力作用。头孢金素和头孢利素的结构式如下:



头孢金素



头孢利素

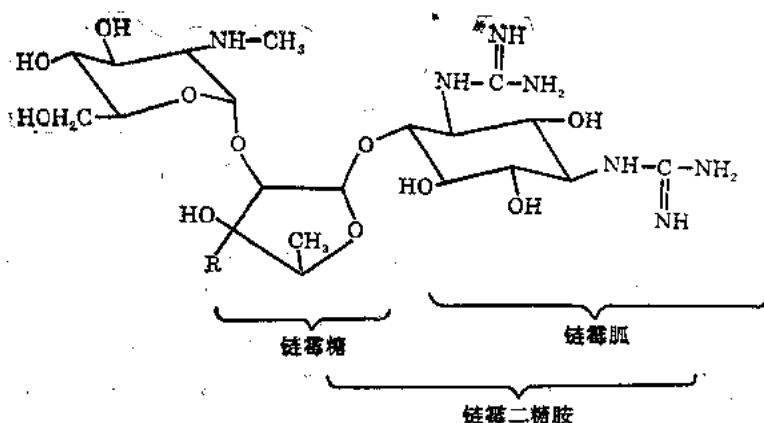
(四) 青霉素的抗菌作用和临床应用

青霉素主要抑制革兰氏阳性细菌,但对某些革兰氏阴性细菌,螺旋体及放线菌也有强大的抗菌作用。现有资料认为,青霉素的抗菌作用与抑制细胞壁的合成有关。

青霉素临床上用于治疗葡萄球菌感染症如脑膜炎、化脓症、骨髓炎等,溶血性链球菌感染症如腹膜炎、产褥热,以及肺炎、淋病、梅毒、炭疽等。青霉素中以G和X二型作用最强。G型对梅毒最有效,对葡萄球菌的作用也比X型强。X型对淋病、脑膜炎及肺炎则比G型有效。

二、链霉素

链霉素(streptomycin)为 Waksman 等人于 1944 年首先从灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的培养液中分离出来,它是第一个从放线菌中获得的抗生素。链霉素亦为多成分抗生素,通常临床应用的链霉素和二氢链霉素(由链霉素人工氢化制得)是其中的两种。它们的共同结构式如下,



链霉素和二氢链霉素的共同结构

上述链霉素和二氢链霉素的共同结构式中, R 基所代表的是:

链霉素: $R = -CHO$

二氢链霉素: $R = -CH_2OH$

链霉素的分子结构分为链霉胍(streptidine)和链霉二糖胺(streptobiosamine)两部分,后者系由链霉糖(streptose)和 2-氨基葡萄糖所构成。

一般化学反应只能将链霉素分子裂解为链霉胍和链霉二糖胺。链霉糖中的醛基是链霉素抗菌效能部分,它易被半胱氨酸、维生素 C、羟胺等所破坏,使链霉素失效。二氢链霉素无此醛基,不受这些试剂影响,所以比较稳定,这是它的优点。

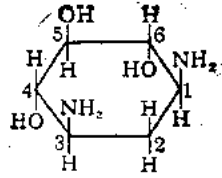
链霉素为氨基环醇化合物,碱性强,且不稳定,因此一般制成盐类(盐酸盐、硫酸盐等)。链霉素碱及其盐类均易溶于水,但不溶于有机溶剂如醇、醚、氯仿等。链霉素的盐类十分稳定,固体干燥状态可长期保存。

链霉素主要抑制革兰氏阴性细菌,特别是结核分枝杆菌。链霉素是临床上治疗各种结核病的最有效药物之一。此外,对膀胱炎、败血症等亦有良好的医疗效果。

三、氨基环醇类抗生素

氨基环醇类抗生素是一类在分子中含有一个环己醇型配基,以糖苷键与氨基糖(或中性糖)相结合的化合物,曾称氨基糖苷类抗生素。前面叙述的链霉素和本章第四节谈到的春雷霉素和有效霉素,都属于这一类。这类抗生素首先根据环己醇衍生物的结构进行分类,如链霉素归属于链霉胍衍生物类;春雷霉素和有效霉素属于肌醇-肌醇胺衍生物类;新霉素(neomycin)、巴龙霉

素(paromomycin)、卡那霉素(kanamycin)和庆大霉素(qingdameisu)等属于2-脱氧链霉素(2-deoxystreptomine);



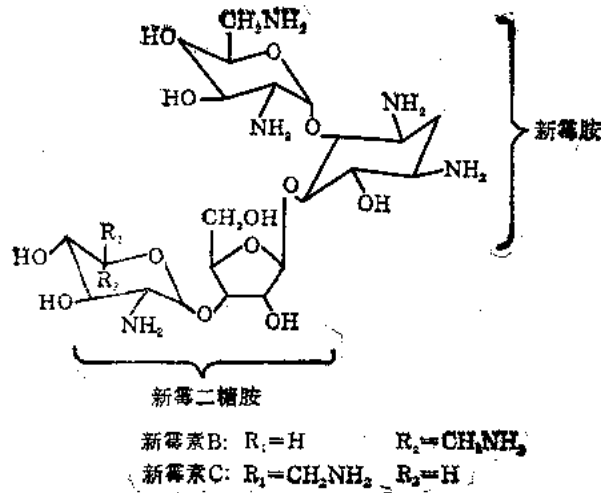
· 2-脱氧链霉素

链生物类。

(一) 新霉素

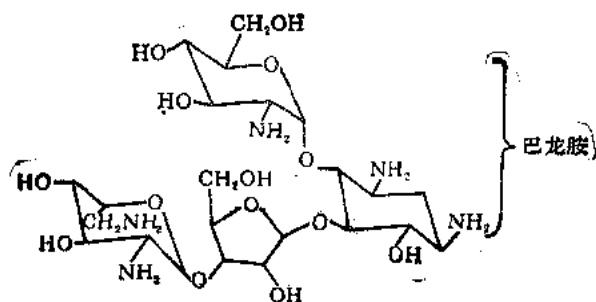
新霉素是一种链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生的广谱抗生素。发现于1949年。能抑制大多数革兰氏阴性细菌及阳性细菌、结核杆菌。由于新霉素口服后很少被吸收,所以临床上常用它治疗肠道疾病。

新霉素溶于水,不溶于有机溶剂,对酸、碱、热稳定。新霉素不是单一的化合物,它由新霉素A、B、C三个成分所组成。新霉素A即新霉胺(neamine)、抗菌作用弱,新霉素B和C是异构体,其结构式如下:



(二) 巴龙霉素

巴龙霉素是一种龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus forma paromomycinus*)分泌的广谱抗生素。它的化学结构和性质与新霉素B(或C)极相似,抗菌谱也差不多。临床上巴龙霉素用于治疗肠阿米巴,细菌痢及其他肠道细菌感染。该抗生素的特点是毒性低。副作用小,以口服为佳。

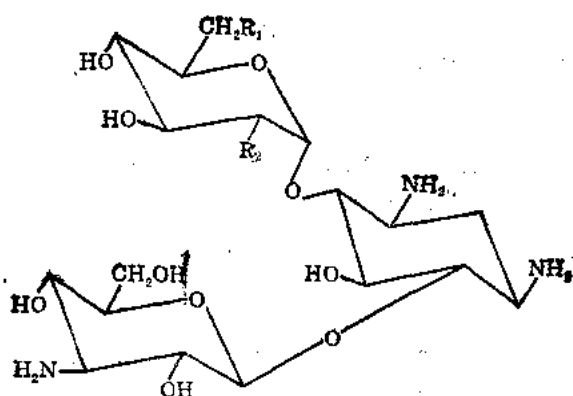


巴龙霉素

(三) 卡那霉素

卡那霉素为卡那链霉菌(*Streptomyces kanamyceticus*)产生的广谱抗生素, 于1957年发现。国产菌种从云南省西双版纳土壤中获得。卡那霉素的理化性质及抗菌谱和新霉素相似。临床上用于治疗耐药性金黄色葡萄球菌和一些革兰氏阴性杆菌所引起的各种严重感染以及耐链霉素结核杆菌所致的各种疾病。

卡那霉素制品含有A、B、C三种成分, 国产的主要成分为A。卡那霉素的结构式如下:



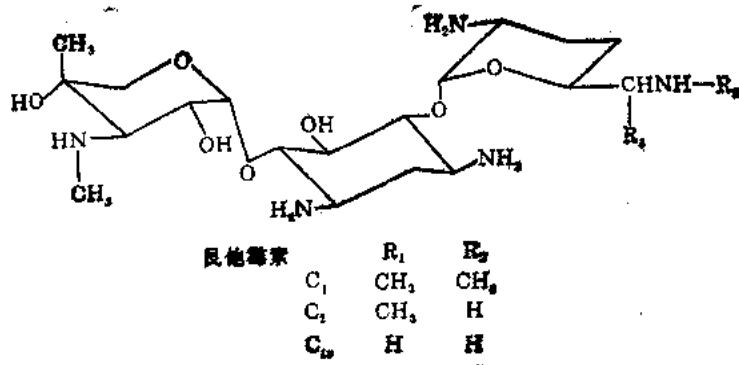
卡那霉素结构式

卡那霉素:	R ₁	R ₂
A	NH ₂	OH
B	NH ₂	NH ₂
C	OH	NH ₂

(四) 庆大霉素

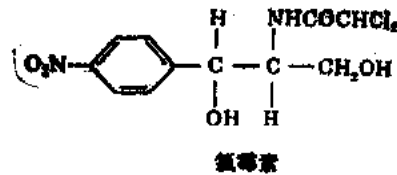
庆大霉素是从小单孢菌属(*Micromonospora purpurea*) F19-77 菌株中分离出来的广谱抗生素。它和国外报道的艮他霉素(gentamicin)系为同一抗生素。化学结构和性质与卡那霉素相似。庆大霉素对绿脓杆菌及某些耐药性细菌有较强的抗菌作用, 临床上用于肾盂肾炎、尿道炎、膀胱炎、盆腔炎、败血症等, 均有良好疗效。

艮他霉素为多成分抗生素, 一般制品系艮他霉素C₁, C₂和C_{1a}混合物。它们的结构式如下:



四、氯霉素

氯霉素(chloramphenicol)是在1947年从放线菌属委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuela*)中分离出来的。现在使用的都是化学合成的产品。氯霉素分子中含有对位硝基苯基团、丙二醇及二氯乙酰胺基,结构式如下:



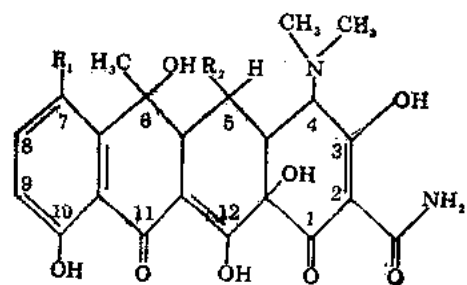
氯霉素分子中存在着两个不对称碳原子,所以有四个光学异构体,其中只有左旋异构体具有抗菌能力。临床上常用人工合成的外消旋氯霉素,称为合霉素(syntomycin)。

氯霉素为白色或无色的针状或片状结晶,熔点 149.7—150.7°C,易溶于甲醇、乙醇、丙醇及醋酸乙酯,微溶于乙醚及氯仿,不溶于苯及石油醚。氯霉素极稳定,其水溶液经 5 小时煮沸也不失效。

氯霉素为广谱抗生素,但一般说来,抑制革兰氏阴性细菌比抑制阳性细菌的效力强。氯霉素对于某些立克次氏体、大型病毒及革兰氏阴性细菌所引起的感染,如斑疹伤寒、肠伤寒、鹦鹉热、性病淋巴肉芽肿等均有疗效,特别是目前临床上治疗伤寒和斑疹伤寒是最有效的药物。

五、四环素族抗生素

临床上应用的四环素族抗生素主要是金霉素(aureomycin)、土霉素(terramycin)和四环素(tetracyclin)。金霉素是1948年从金色链霉菌(*Streptomyces aureofaciens*)中分离出来的;土霉素系龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)分泌的抗生素,于1950年发现;四环素可由金霉素去氯获得,但也可以从某些链霉菌菌株的发酵液中制取。



	R ₁	R ₂
四环素	H	H
土霉素	H	OH
金霉素	Cl	H

图 7-9 四环素族的化学结构

四环素族的化学结构具有共同的骨架,其关系如图 7-9 所示。

四环素是这一族抗生素中最基本的化合物。金霉素和土霉素都是四环素的衍生物，金霉素即氯四环素(chlortetracyclin)，土霉素即氧四环素(oxytetracyclin)。

四环素族均为酸碱两性化合物，本身及其盐类都是黄色或淡黄色的晶体，在干燥状态下极为稳定。除金霉素外，其他四环素族的水溶液相当稳定。四环素族能溶于稀酸、稀碱等，略溶于水 and 低级醇类。但不溶于醚及石油醚。几种四环素族抗生素的物理常数见表 7-2。

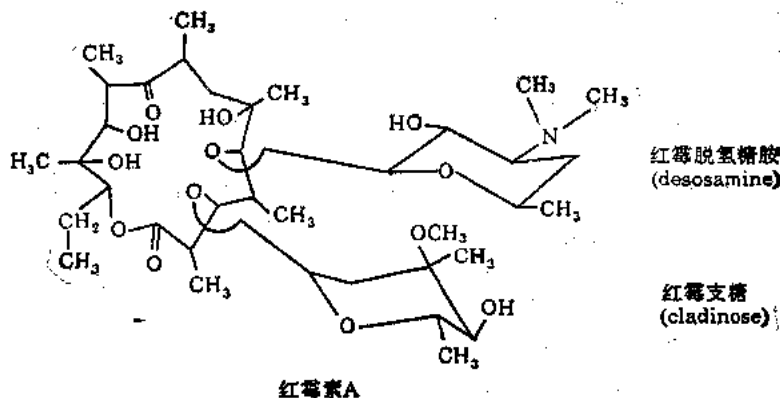
表 7-2 几种四环素族抗菌素的物理常数

名称	熔点	比旋度	紫外吸收峰 nm
金霉素	168—169°C	$[\alpha]_D^{25} - 274.9^{\circ}$ (甲醇)	230, 262.5, 367.5 (0.1 mol/L HCl)
土霉素 (含 2H ₂ O)	181—182°C	$[\alpha]_D^{25} - 196.6^{\circ}$ (0.1 mol/L HCl)	263, 353 (pH 1.7 磷酸)
四环素 (含 3H ₂ O)	170—173°C	$[\alpha]_D^{25} - 239^{\circ}$ (甲醇)	263, 355 (0.1 mol/L HCl)

四环素族的生物学性能相似，都有较广的抗菌谱，能抑制多种革兰氏阳性及阴性细菌，某些立克次氏体，大型病毒和一部分原虫。临床上多用于上述致病菌引起的各种感染。近年来，一些半合成的四环素族抗生素如甲烯土霉素(methacycline)、强力霉素(doxycycline)也在临床上得到应用，并收到较好效果。

六、红霉素

红霉素(erythromycin)是 1952 年从红链霉菌(*Streptomyces erythreus*)中获得的一种碱性抗生素。红霉素的分子结构中含有一个母核——大环内酯。具有大环内酯的抗生素，还有碳霉素(carbomycin)、竹桃霉素(oleandomycin)和麦迪霉素(midecamycin)等，总称大环内酯类抗生素。红霉素经逆流分配或纤维素柱层析可分出 A、B、C 三个组分。其中 A 的结构式如下：



红霉素 A 为无色结晶，不易溶于水，但极易溶于醇类、丙酮、乙醚、氯仿等有机溶剂。A 游离碱水合物的熔点为 133—138°C，在 280 毫微米有一个紫外吸收峰(pH 6.3)。红霉素在 pH 6—8 的溶液中稳定，低于 pH 5 时，则很快失效。

红霉素的抗菌谱类似青霉素 G，但比青霉素广。它对革兰氏阳性及阴性细菌、立克次氏体

性病淋巴肉芽肿病毒、阿米巴、阴道滴虫都有抑制作用。临床上主要用它治疗耐药性金黄色葡萄球菌所引起的各种严重感染、如肺炎、败血症等。

七、多肽类抗生素

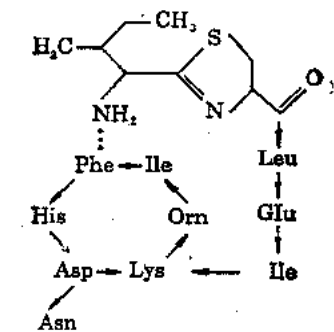
多肽类抗生素很多都是细菌产生的。在它们的结构中，含有环状多肽链。临床上应用的有杆菌肽、短杆菌肽和多粘菌素等。

(一) 杆菌肽

杆菌肽(bacitracin)是地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)产生的抗生素。它主要抑制革兰氏阳性细菌，抗菌谱与青霉素相似，但对耐青霉素的金黄色葡萄球菌有良好作用。杆菌肽的抗菌作用与它抑制细菌细胞壁的合成有关。由于杆菌肽毒性较大，临床应用受到限制。目前主要用于治疗皮肤和伤口感染，以及耐药性球菌引起的各种严重感染如败血症、肺炎和心内膜炎。

杆菌肽为淡黄色粉末，易溶于水，亦溶于醇类，但不溶于其他有机溶剂如乙醚、氯仿、丙酮和苯。在低于56°C时杆菌肽相当稳定，但其水溶液仍以保存于冰箱为好。酶和胃酸对杆菌肽作用很小，可供口服。

杆菌肽为多成分抗生素，其中杆菌肽A由9种氨基酸组成，结构式如下，

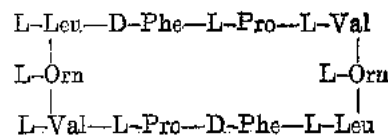


杆菌肽A
(Orn代表鸟氨酸；—为C-N连接)

(二) 短杆菌肽S

短杆菌肽S(gramicidin S)是1944年从短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*)的培养液中获得。对革兰氏阳性细菌有强大的抑制作用。但因有溶血现象，故不能供注射使用。在临床上局部用于治疗及预防化脓性病征。

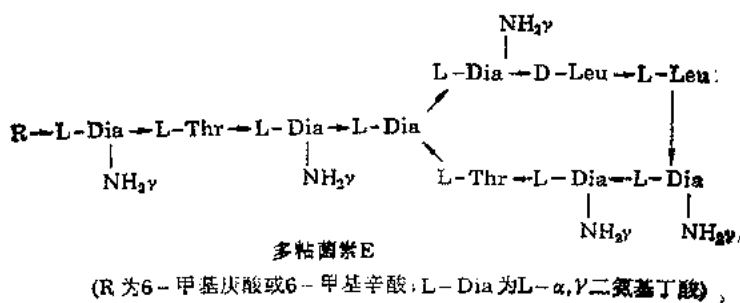
短杆菌肽S(环十肽结构)的结构式如下：



(三) 多粘菌素E

多粘菌素E(polymyxin E)为多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)所产生。它对革兰氏阴性细菌，特别是绿脓杆菌有强大的杀菌作用。

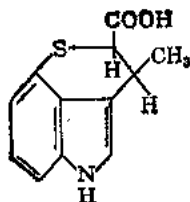
临床应用的多粘菌素 E 是它的硫酸盐、白色结晶状粉末、易溶于水,有吸湿性、微溶于甲醇、丙酮、乙醚及酯类。在酸性环境中较稳定,但在碱性溶液中易失效。经化学分析证明,多粘菌素 E 含有三种氨基酸、两种脂肪酸,其结构式如下:



八、创新霉素

创新霉素(creamyacin)是我国首创的新抗生素。它的产生菌是从山东济南地区土壤中分离出来的济南游动放线菌新种(*Actinoplanes jinanensis* n. sp.)3945。

创新霉素是一种酸性抗生素,对热稳定,水溶液在 pH2.6—9.2 条件下煮沸 3 小时,不影响活性。游离酸易溶于各种极性有机溶剂如醇、酯、丙酮、吡啶等,略溶于低级醚,不溶于非极性有机溶剂如苯、四氯化碳和石油醚,其钠盐极易溶于水。创新霉素游离酸为白色或浅黄色针状结晶,分子量为 233.2,熔点 192—192.5°C。分子结构中含有一个吡啶环和一个羧基。其结构式如下:



创新霉素

创新霉素体外抗菌试验表明,它主要对大肠杆菌和痢疾杆菌等有较强的抑制作用。临床上试用于大肠杆菌引起的败血症、胆囊炎、泌尿系统感染、婴儿腹泻等,有较显著的疗效。

九、利福霉素类抗生素

利福霉素(rifamycin)于 1957 年发现,最早从地中海链霉菌(*Streptomyces mediterranei*)的发酵液中获得。它是一种多组分的抗生素。目前临床上使用的有利福霉素 SV、利福霉素 B 二乙胺和利福平三种。

利福霉素 SV(rifamycin SV)为难溶的酸性化合物,橙黄色结晶;其钠盐为红橙色结晶,能溶于水,水溶液能在室温下保存三年。

利福霉素 B 二乙胺(rifamide)能溶于甲醇、乙醇、苯、丙酮、乙酸乙酯,难溶于水及石油醚。250°C 以上分解。其钠盐为橙黄色结晶,易溶于水。

利福平(rifampicin 或 rifampin)是一个半合成的利福霉素,是3-甲酰-利福霉素SV和1-甲基-4-氨基哌嗪(1-methyl-4-aminopiperazine)反应生成的N,N'双取代的脘化合物。利福平是一种砖红色结晶性粉末,熔点188--185°C。可溶于甲醇、乙酸乙酯、氯仿和其他有机溶剂。利福平对热相当稳定,100°C能保持其活性。

利福霉素的化学结构式如图7-10所示。

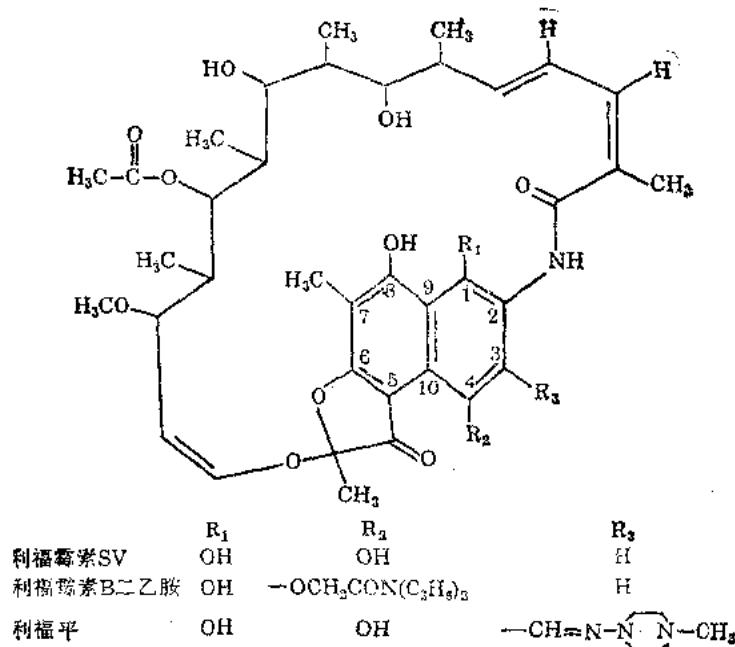


图7-10 利福霉素的化学结构

利福霉素族抗生素为广谱抗生素,对革兰氏阳性及阴性细菌以及结核分枝杆菌均有明显的抗菌作用,其中尤以利福平的作用最为显著。加上利福平可供口服,因此在临床上逐渐取代了前面两种利福霉素。近年来发现利福平对麻风杆菌也有抑菌作用。试验性治疗表明它对麻风病有一定的疗效。新近发展起来的利福喷丁(rifapentine)或称环戊哌嗪利福霉素,它的抗结核杆菌的作用比利福平强10倍,毒性低并且具有长效作用。

此外还发现3-甲酰利福霉素SV脘衍生物,例如利福平的哌嗪环上2,6位被甲基化,4位甲基为苄基取代的化合物可抑制小鼠肉瘤病毒的逆转录酶(reverse transcriptase)活性达86%。对化学致癌的大鼠体内给药,不但能推迟致癌时间,而且使肿瘤生长缓慢。

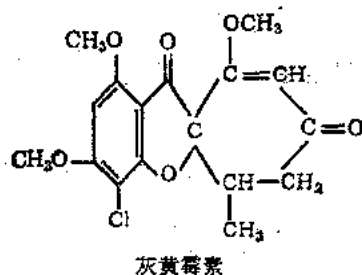
这类抗生素在临床上主要用于治疗结核病以及麻风病,但对金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌等感染也有明显疗效。

利福霉素族的作用机理是抑制细菌RNA聚合酶的活性,妨碍转录的起始。

十、灰黄霉素

灰黄霉素(griseofulvin)是1939年由Oxford等从灰黄青霉菌(*Penicillium griseofulvum*)的菌丝中分离出来的抗真菌抗生素。具有抗真菌性能的抗生素,在临床上应用的还有制霉菌素(nystatin)和曲古霉素(trichomycin)等。

灰黄霉素为无色菱形或针状结晶，熔点 220—221°C，难溶于水，略溶于甲醇、乙醇、丙酮和乙酸乙酯等。耐热，经高压灭菌 30 分钟，仍不丢失活性。其结构式如下：



灰黄霉素主要抑制皮肤癣菌，小芽孢癣菌和毛发癣菌。临床上多用于头癣、体股癣，迭瓦癣等。此外农业上用来防治多种霉菌引起的病害。

有人认为灰黄霉素的作用方式是抑制菌丝体的细胞壁合成，根据嘌呤和嘌呤衍生物能部分地逆转灰黄霉素的抑制作用，推测灰黄霉素可能干扰霉菌的核酸代谢。

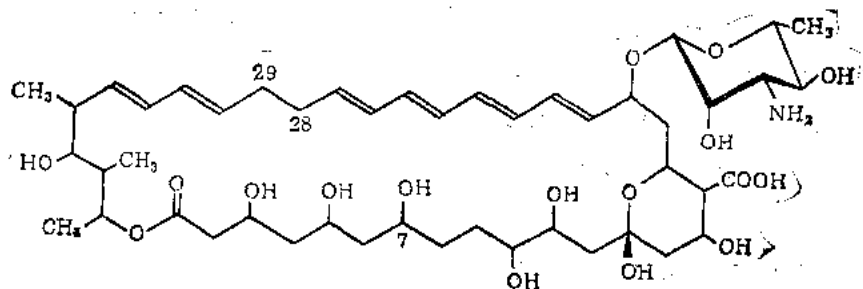
十一、制霉菌素

制霉菌素、曲古霉素和两性霉素 B (amphotericin B, 商品名 fungizon) 等都属于多烯大环内酯类 (polyene macrolides) 或称多烯类 (polyenes) 的抗真菌抗生素。多烯大环内酯类是主要的具有抗真菌性能的抗生素，其他则统称为非多烯结构的抗真菌抗生素，如灰黄霉素等。

多烯大环内酯类抗生素的结构特点是在分子中既有经内酯化作用而闭合的大碳环，又有一系列的共轭双键。正因为它们有一系列的共轭双键，所以与大环内酯类抗生素是有不同的生物学性质。

制霉菌素 (nystatin, mycostatin 或 fungicidin) 的生产菌是诺尔斯氏链霉菌 (*Streptomyces noursei*)。制霉菌素存在于菌丝体中，取菌丝体于 70°C 左右加热 10 分钟，用甲醇提取数次，合并甲醇提取液，浓缩、加乙酸乙酯沉淀制霉菌素，所得粗品，经脱色，多次重结晶，即得制霉菌素纯品，分子式为 $C_{47}H_{75}NO_{17}$ ，分子量为 925。

制霉菌素为淡黄色微细晶体；不溶于水、氯仿和丙酮等；稍溶于低级醇和二氧六环；溶于吡啶、冰醋酸及 NaOH 溶液，但均能使它破坏而失效；对较高和较低的 pH 以及光和热均不稳定。临床上使用的制霉菌素，其主要成分为制霉菌素 A₁，泛称制霉菌素。次要成分为制霉菌素 A₂、A₃ 等。制霉菌素 (即 A₁) 的化学结构式如下所示：



制霉菌素的化学结构式

它的氨基糖部分为氨基海藻糖(3-aminomycose 或 mycosamine), 即 3-氨基-3, 6-二脱氧-D-吡喃甘露糖, 非糖部分为 38 员的多烯大环内酯环, 含彼此分开的一组共轭四烯和一组共轭二烯; 并已证明分子中含有一个游离氨基和游离羧基, 是一个两性化合物。

制霉菌素能抑制多种致病真菌的生长。制霉菌素为局部最常用的多烯抗生素, 主要用于治疗假丝菌的感染, 特别是用于抗阴道假丝菌的感染。口服可减少肠道霉菌和酵母菌的数量。肺部感染可采用雾化吸入。至今尚未发现抗药的霉菌和酵母菌。此外制霉菌素是有效的杀阿米巴抗生素, 与四环素合用收效更大。在农业上制霉菌素用于真菌性植物病害及蔬菜霜霉病的防治均有效果, 也用于家畜病害的治疗及食品防腐。

第六节 抗肿瘤抗生素的探索

恶性肿瘤——癌是危害人类健康的严重疾病之一。迄今为止, 医药上尚无根治办法, 手术切除, 有一定疗效, 但早期诊断困难, 不易及时治疗。

近年来, 由于抗生素在疾病医治方面取得卓越效果, 试验抗生素的抗癌性能和寻找抑制肿瘤的抗生素成为抗生素研究工作的一个重要的新方向。一些动物试验报告指出, 金霉素和土霉素能抑制移植肿瘤的生长, 金霉素能使子宫颈癌萎缩。

文献中记载具有抗癌效能的抗生素逐年增多, 其中大部分都是放线菌属中分离出来的, 如自力霉素、放线菌素 K 和争光霉素等。

肿瘤是蛋白质异常合成和细胞恶性增生的结果。现在有趋势认为核酸分子的改变是细胞癌变最关键的原始环节。抗肿瘤抗生素的作用机理可能与它干扰癌变细胞的蛋白质和核酸的异常代谢有关。

抗肿瘤抗生素均具有相当毒性, 对骨髓的毒性尤强, 治疗效果远非理想, 目前只作为综合措施中的一种治疗手段。

下面介绍几个临床效果较好的抗癌抗生素:

一、自力霉素

自力霉素系放线菌(*Streptomyces caespitosus*) H2760 菌株分泌的代谢产物。国内的产生菌是 1965 年从江西鹰潭土壤中分离出来的。

自力霉素与国外报道的丝裂霉素(mitomycin)O 是同一物质。

丝裂霉素是一种吡啶的衍生物。分子中含有氮丙啶(aziridine), 氨甲酸酯和氨基苯醌等具有抗肿瘤活性的基团。丝裂霉素的结构式见图 7-11。

自力霉素制品为深蓝紫色针状结晶或柱状结晶。在 300°C 以上无明显熔点或分解点,

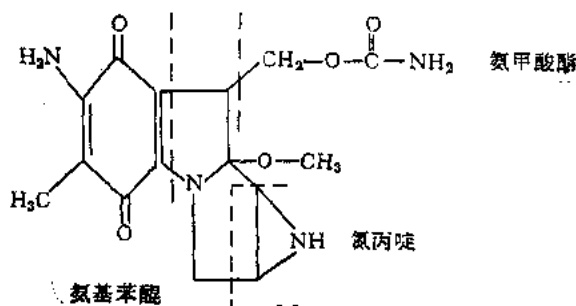


图 7-11 丝裂霉素的结构

其水溶液对酸、碱、日光、氧化剂敏感,对还原剂较稳定,结晶状态对热稳定,100°C 经 4 小时化学性质不变。自力霉素溶于水、甲醇、乙醇、丙酮、微溶于丁醇、乙酸乙酯、乙醚、苯和氯仿,不溶于石油醚。本品 0.001% 水溶液,在 365 毫微米及 218 毫微米波长处有两个紫外吸收峰,在 292 毫微米波长处为最小吸收值。

自力霉素治疗肺癌和乳腺癌效果较好,对何杰金氏病、网状细胞内皮癌、胃癌也有一定疗效。对个别胰腺癌、结肠癌以及子宫癌有明显的缓解作用。

二、放线菌素 K

放线菌素 K (actinomycin K), 亦称更生霉素是 1956 年从广西桂林土壤中分离的产黑色素链霉菌 (*Streptomyces lanochromogenes*) 1779 菌株产生的一种抗癌抗生素。放线菌素 K 经酸性氧化铝柱层析、用苯:甲醇(98:2)展层,可分出 K₁ 和 K₂ 两个组分。其中 K₂ 经多方面研究证明和国外报道的放线菌素 D 是同一种化合物。

放线菌素 K 为红色结晶。K₂ 的熔点为 247—248°C (分解)。易溶于丙酮、氯仿、苯,溶于甲醇、乙醇、乙酸乙酯,微溶于水,不溶于石油醚。放线菌素 D 的分子结构包括二部分,即发色团 (2-氨基-4, 6-二甲基-3-氧-吩嗪-1, 9-二羧酸) 和二个相同的环肽,其结构式如图 7-10 所示。环肽是一个 5 肽,由 L-甲基缬氨酸、肌氨酸(甲基甘氨酸)、L-脯氨酸、D-缬氨酸和 L-苏氨酸组成。苏氨酸的羟基和甲基缬氨酸的羧基之间形成一个酯键,因而成环肽。

放线菌素 D 通过与模板 DNA 相结合的方式妨害转录反应而抑制细菌生长。在低浓度时,

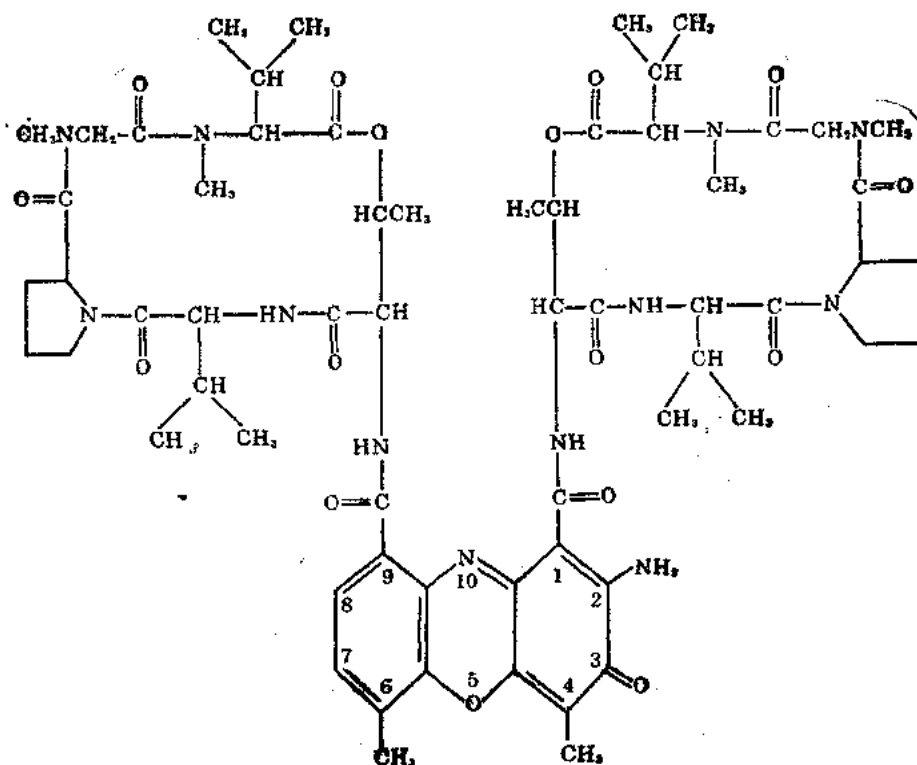


图 7-12 放线菌素 D 的结构

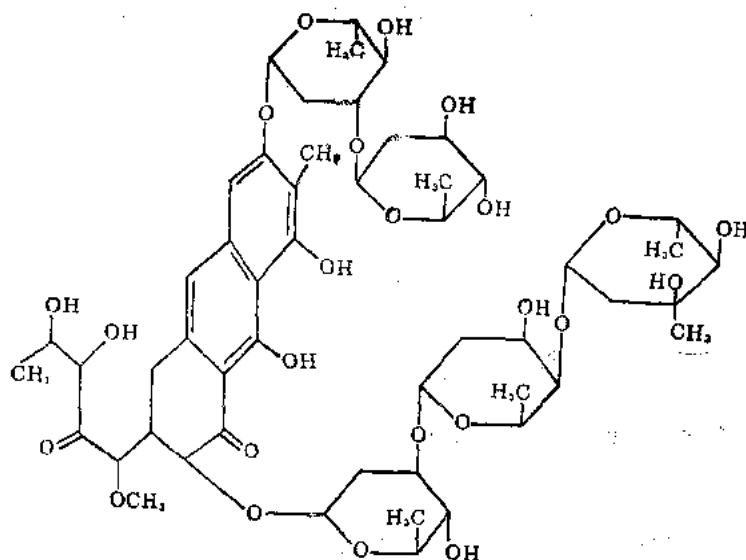
临床上用争光霉素治疗皮肤和头颈部的鳞状上皮细胞癌有显著效果。适应症包括上颌窦癌、唇癌、舌癌、鼻咽癌、喉癌、眼癌、阴茎癌等。它对脑瘤也有治疗作用。

四、光辉霉素

光辉霉素是从我国土壤中分离的放线菌 (*Strept. sp*) 684 号菌株培养液中提取的抗癌抗生素。它与国外报道的光神霉素 (mithramycin) 可能是同一物质。

光辉霉素为弱酸性物质, 可制得黄色结晶, 熔点 170—175°C (分解)。易溶于水、甲醇、乙醇及乙酸乙酯, 稍溶于氯仿, 不溶于石油醚及乙醚。于 pH 2.5—9, 50°C 1 小时稳定, 80°C 1 小时则几乎全部破坏。其钠盐水溶液在紫外光下呈鲜黄色荧光。

光神霉素的结构式如下:



光神霉素的结构

光神霉素对革兰氏阳性细菌和 HeLa 癌细胞有抑制作用。初步的临床结果表明, 光辉霉素对睾丸胚胎癌、脑瘤、恶性淋巴瘤等有一定疗效。光辉霉素的作用方式主要是抑制 RNA 聚合酶反应, 从而停止 RNA 的合成。

第七节 抗生素在农业中的应用

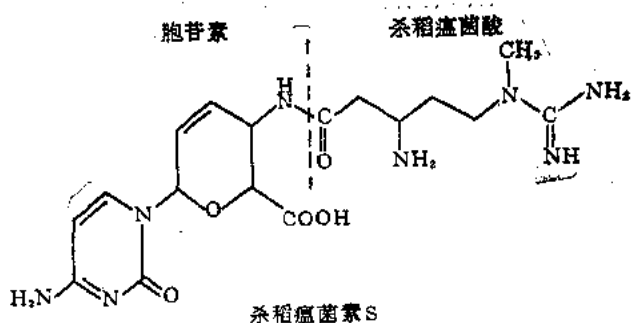
利用抗生素防治植物病害, 很早就有人研究。最早在农业上大面积应用的抗生素要推链霉素、土霉素及其混合液“农霉素”(agrimycin)。它们对苹果、梨、胡桃、柑桔、烟草、蔬菜、豆类等植物的细菌性病害都有特效, 对少数真菌性病害如霜霉、疫霉等也有防治作用。放线酮为内吸性强、杀菌力大的抗霉物质。灰黄霉素具有抑制植物病原真菌的作用, 特别对防治白粉病、苹果花腐病和西瓜枯萎病更为有效。杀稻瘟菌素是第一个在大面积上应用并得到十分成功的农用抗生素。它曾在日本稻瘟病大流行的 1963 年发挥了巨大作用。1964 年找到的新抗

生素——春日霉素,防治稻瘟病的效果比杀稻瘟菌素高数倍,对植物、动物和人体的药害较低。多氧霉素能抑制各种植物病原真菌是一个有前途的抗生素。此外还找到许多农用抗生素的新品种,如庆丰霉素、内疗霉素、多效霉素等。

现在世界各国除致力于寻找防治细菌性和真菌性植物病害的抗生素外,对抗病毒、抗衰老、杀虫甚至能除草的抗生素也很重视。目前已有高效杀虫的抗生素如四抗素、奥弗麦菌素(avermectin)和日光霉素(nikkomycin)等等。

一、灭瘟素

灭瘟素是一种放线菌产生的农用抗霉素。它的产生菌是从我国土壤中分离的灰色放线菌 AS. 4, 892 的两个菌株。我国生产的灭瘟素和日本于 1958 年从灰色链霉菌(*Streptomyces griseochromogenes*)中获得的杀稻瘟菌素(blasticidin)S 可能是同一物质。杀稻瘟菌素 S 的结构式如下:



灭瘟素结构中含有一个新的核苷——胞苷素(cytosinine)和一种新的酸——灭瘟酸(杀稻瘟菌酸)。

灭瘟素为白色针状结晶,游离碱的熔点 253—255°C(分解),可溶于水和乙酸,但不溶于有机溶剂。在 0.1 mol/L 盐酸中于 274 毫微米波长处有一个吸收峰。

灭瘟素能抑制革兰阳性及阴性细菌生长。灭瘟素对真菌的作用差别很大,稻瘟病梨形孢(*Piricularia oryzae*)对它特别敏感,最小抑制浓度为每毫升 5—10 微克,稻恶苗病菌(*Gibberella fujikuroi*)则需每毫升 400 微克。灭瘟素只要每毫升 0.05 微克即能抑制烟草花叶病毒(TMV)的繁殖。

灭瘟素为内吸性药剂,能渗入植物组织,因此可能有根治作用。据报道,其作用方式是抑制微生物细胞的蛋白质合成。

灭瘟素对植株有药害。使用浓度必须控制在每毫升 40 微克以下;对动物和人体也有毒性,特别对皮肤、粘膜、眼睛有刺激作用,因此生产和使用中必须注意防护。为了减低药害,现已将它制成苄胺基磺酸盐使用。

二、春雷霉素

春雷霉素是一种由放线菌产生的医农两用抗生素。它的生产菌种是 1964 年从江西泰和地区土壤中分离得到的,命名为小金色放线菌(*Actinomyces microaureus* n. sp.)。春雷霉素与

日本在 1964 年报告的从一种放线菌 (*Streptomyces kasugaensis*) 中获得的春日霉素 (kasugamycin) 相同。春日霉素的结构式如下:

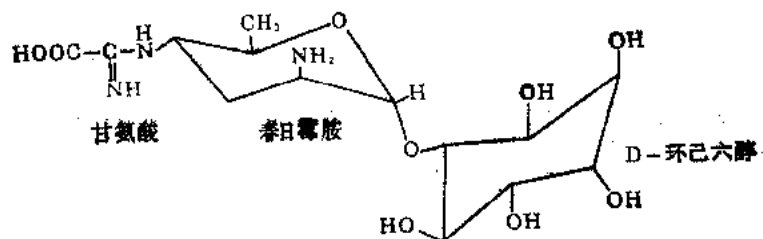


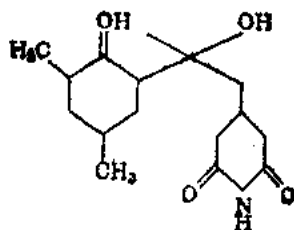
图 7-13 春日霉素的结构

春日霉素呈弱碱性, 其盐酸盐为白色针状或片状结晶, 熔点 210°C , 有甜味, 易溶于水, 不溶于甲醇、乙醇、丙酮、苯等有机溶剂, 在酸性溶液中稳定, 在碱性条件下 ($\text{pH} > 7.5$) 药效极易破坏。

春日霉素在临床上医治绿脓杆菌的感染有较高疗效; 农业上用于防治稻瘟病效果很好, 一般使用浓度为 20—40 微克/毫升。

三、放线酮

放线酮 (actidione) 首先于 1946 年从灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 中获得的。我国生产放线酮的菌种为金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*) S-7A-3 号菌株。放线酮的化学结构如下所示:



放线酮

放线酮为无色片状或针状结晶, 熔点 $116—117^{\circ}\text{C}$, 溶于水和普通有机溶剂, 但不溶于石油醚及四氯化碳。

放线酮是一种抗真菌范围较广的抗生素, 对酵母、霉菌都有很强的抑制作用, 对动植物和人也有较高的毒性, 但对细菌作用很小。放线酮的作用方式是干扰蛋白质的合成。

放线酮在农业上用于防治茶云纹叶枯病、白松疱锈病、水稻枯纹病和棉花角斑病等真菌引起的作物病害。临床上可用来治疗隐球菌病——一种霉菌所致的脑膜炎。

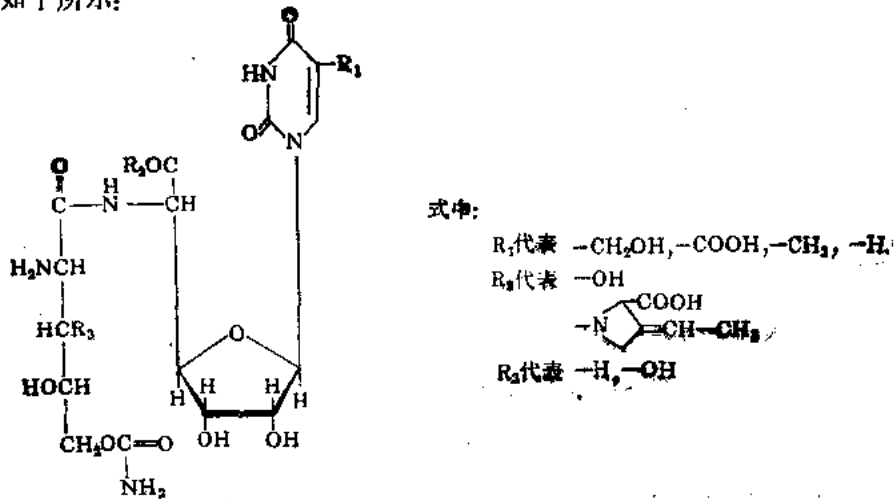
内疗素是多组分抗生素, 其中有两种组分与放线酮和异放线酮的理化性质相似。内疗素产生菌为来自我国海南岛土壤的刺孢吸水链霉菌 (*Strep. hygrosponus* n. sp.)。内疗素对光、热、酸较稳定。1—10ppm 的内疗素即能抑制多种致病真菌生长。对红麻炭疽病、甘薯黑斑病、橡胶白粉病、白菜霜霉病等都有良好疗效。

公主岭霉素的产生菌是从我国吉林省公主岭土壤中分离获得的不吸水链霉菌公主岭变种 (*Strep. ahgrosopitcus gangzhuilingensis* n. var.)。公主岭霉素的主要组分为: 脱水放线酮、异

放线菌、奈良霉素 B、制霉菌素和苯甲酸等。其中以放线菌活性较高，混合物的防病效果高，有协同增效作用。主要用于各种禾谷类的黑穗病，效果很好。

四、多氧菌素

多氧菌素 (polyoxin) 是一族新的肽酰-嘧啶核苷抗生素，它首先由日本人从可可链霉菌 (*Streptomyces cacaoi* var. *ascoensis*) 中提取出来的。目前已知它有 A-M13 种化合物。多氧菌素的通式如下所示：



所有的多氧菌素均由 R_1 、 R_2 和 R_3 组合而构成。

多氧菌素 B: $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$, R_2 , $R_3 = \text{OH}$

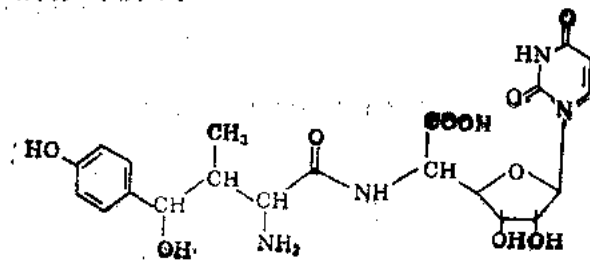
多氧菌素 D: $R_1 = \text{COOH}$, R_2 , $R_3 = \text{OH}$

多氧菌素 D 是防治植物病虫害最好的农用抗生素之一。多氧菌素为结晶形粉末，熔点 $>190^\circ\text{C}$ ，在 0.05 mol/L HCl 中最大吸收峰在 276 毫微米。在 0.05 mol/L NaOH 中最大吸收峰在 271 毫微米，溶于水，不溶于大部分有机溶剂。

多氧菌素除 C 和 I 组分外，对植物病原真菌有很强的抑制作用，但没有抗细菌活性。多氧菌素 A 对烟草花叶病毒有抑制作用，其效力比灭瘟素强。多氧菌素用于防治水稻纹枯病，苹果斑点落叶病及蔬菜丝核病有极好的效果，对人畜及鱼类无毒害，这是一种很有应用前途的抗生素。

五、日光霉素

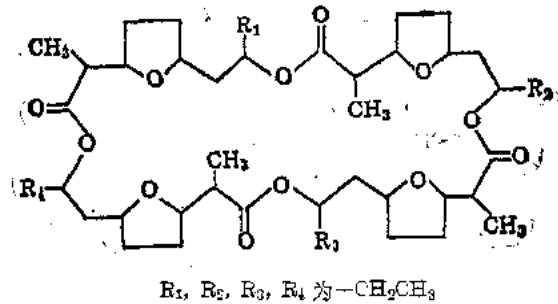
日光霉素 (nikkomycin) 为两性水溶性核苷类抗生素，其产生菌为 *Strep. tendae* Tu 901，来自日本日光土壤。该菌产生多组分杀虫杀菌抗生素，其中组分 C 和 CX 只对昆虫有杀灭效力。日光霉素的化学结构如下所示：



某些多氧菌素的产生菌也能同时产生日光霉素。

六、四抗生素

四抗生素(tetranactin)也称杀螨霉素,属于大四环内酯类抗生素,其生产菌为金色链霉菌(*Strep. aureus*),从日本埼玉县土壤中获得。此菌产生的抗生素有三个活性组分,其中组分O为四抗生素,它的含量占一半以上。四抗生素的化学结构如下:

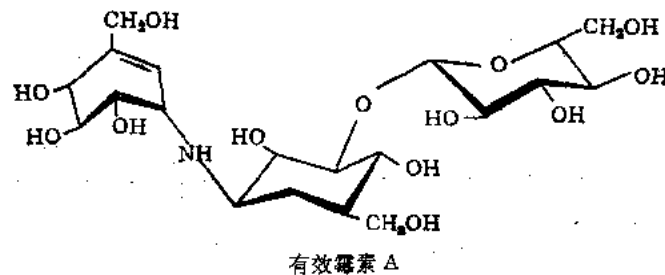


四抗生素为无色或微黄色的棱形结晶,对光、热、酸、碱都很稳定,易溶于醇类、丙酮、苯、氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂,但几乎不溶于水。

四抗生素对螨和红蜘蛛都有很强的杀灭功效。半衰期短(8—10天),最后的降解物为 CO_2 和 H_2O ,因此不污染环境,对温血动物几乎无害,使用安全。对黄瓜和十字花科蔬菜易形成药害。

七、有效霉素

有效霉素(validamycin)是由放线菌 T-7545,为吸水链霉菌的变种产生的抗生素,它对水稻纹枯病菌有抑制作用。1968年,日本人分离到有效成分 T-7545A,命名为有效霉素 A,产生菌为吸水链霉菌柠檬色变种(*Strep. hyg. roscopicus* var. *limonicus*)。有效霉素 A 对水稻纹枯病有极好的防治效果,并证明它对人、畜、鱼、鸟都是安全的。有效霉素 A 的结构式如下:



有效霉素属于氨基环醇类抗生素。用 Dowex 树脂分离可得 A-F 及有效氧胺 A, B 共 8 个组分。

有效霉素 A 喷施于接种病菌的病株 30 分钟后,降雨也不影响其防治效果。

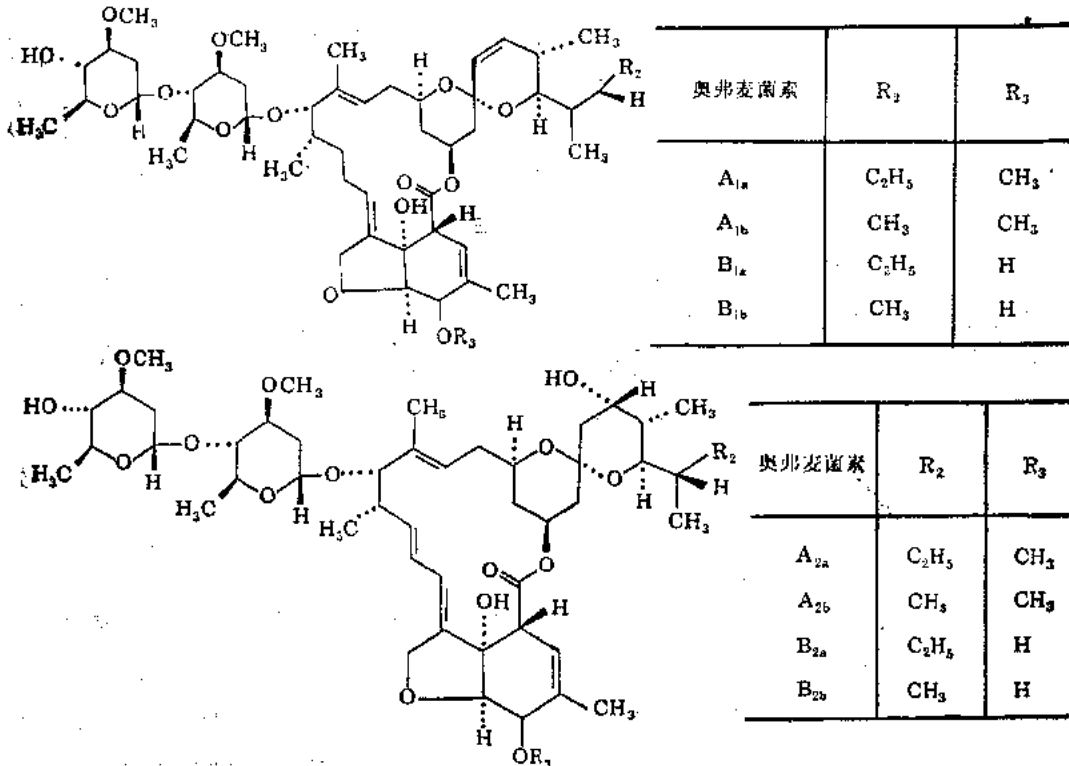
有效霉素的作用机理可能与阻碍丝核菌产生肌醇有关。

与有效霉素性质相似的井冈霉素,其产生菌是从我国井冈山土壤中分离得到的吸水链霉菌井冈变种(*Strep. hygrosopicus* var. *Jiנגgangensis* Yen)。它还能产生一种与萨腊菌素相似

的抗真菌抗生素。井冈霉素含 A→F6 种组分其中井冈霉素 A 和 B 的理化性质与有效霉素 A 和 B 相似。

八、奥弗麦菌素

奥弗麦菌素(ivermectin)的产生菌为 *Strep. avermitilis* 放线菌,菌丝中获得 8 个组分,对家畜线虫有特效。对土壤线虫也有很好的驱杀效果。此外它对多种有害昆虫如鳞翅目、鞘翅目、同翅目等有杀灭功效。奥弗麦菌素的化学结构如下:



近年来抗生素用于兽医学和作为动物饲料添加剂有了广泛的发展。一些长期来应用于人类临床的抗生素如青霉素、链霉素和多粘菌素 B 曾用于家畜人工受精,以预防和治疗各种感染,收到较好的效果。林可霉素(lincomycin)治疗猪痢疾,新生菌素治疗鸡霍乱,莫能菌素(monensin)治疗球虫病都有较好效果。氯林霉素能抑制反刍动物瘤胃中产生甲烷的细菌群,并能防止家畜急性肺气肿和水肿。螺旋霉素(spiramycin)和卡那霉素等广泛用于治疗因大肠杆菌、沙门氏杆菌引起的家畜肠道感染以及猪赤痢等疾病。

此外,国内外都曾将人类临床用抗生素如金霉素、土霉素和卡那霉素等作为动物饲料添加剂以防治家畜感染疾病促进生长,取得显著效果。但研究表明,人类临床抗生素兽用结果强化了耐抗生素菌株的传播和扩散。为此,各国开始将某些人类临床抗生素如杆菌肽,泰乐菌素(tylosin)等转为兽用并研制生产专门兽用抗生素如维及尼霉素(virginiamycin)、美加霉素(mikamycin)和硫链丝菌素(thiostreptone)等。作为饲料添加剂的抗生素,杆菌肽,泰乐菌素和黄霉素(flavomycin)的年产量已上千吨。预计今后抗生素兽用的广度和深度将会有更大的发展。

提 要

微生物分泌的、能杀死其他微生物或抑制其他微生物生长的物质称为抗生素。

一类微生物抑制或杀死另一类微生物的作用称为微生物间的拮抗作用。

抗生素的抗菌性能具有以下几个特点：(1) 选择性作用；(2) 选择性毒力；(3) 引起细菌的耐药性。

抗生素的作用机理可以归纳为四种类型：(1) 抑制核酸的合成；(2) 抑制蛋白质的合成；(3) 改变细胞膜的通透性；(4) 干扰细胞壁的合成。

寻找新抗生素的主要步骤是：土壤拮抗菌的分离，抗菌谱的测定及抗生素的早期鉴定。在筛选工作中经常使用划线法和稀释法。

青霉素是临床上应用最多的抗生素之一，它主要是抑制革兰氏阳性细菌。青霉素分子中含有由 β -内酰胺环和四氢噻唑环所组成的母核。青霉素的抗菌效力与其分子中的 β -内酰胺环有关。它的抗菌机理是干扰细菌细胞壁的形成。

链霉素为氨基环醇类抗生素，其分子结构由链霉胍和链霉二糖胺两部分组成。链霉素主要抑制革兰氏阴性细菌，特别是结核分枝杆菌。

新霉素族也是氨基环醇类抗生素包括新霉素、巴尤霉素，卡那霉素和庆大霉素等。这是一类广谱抗生素，能控制多数革兰氏阴性和阳性细菌。

氯霉素也是一种广谱抗生素。临床上常用的人工合成的氯霉素称为合霉素。

临床上应用的四环素族抗生素主要是金霉素、土霉素和四环素等。这一族抗生素都有较广的抗菌谱。

红霉素和麦迪霉素是大环内酯类抗生素。

多肽类抗生素是细菌产生的，如链霉素、短杆菌肽S和多粘菌素E等。

多烯大环内酯类抗生素是一类主要的抗真菌抗生素如制霉菌素、两性霉素等。

创新霉素是我国首创的新抗生素。

灰黄霉素是一种抗真菌抗生素，主要抑制皮肤、毛发等的癣菌。

利福霉素类抗生素，特别是其中的利福平，是抗结核杆菌的重要药物之一，后者对麻风杆菌也有杀菌作用。

抗癌抗生素有：自力霉素，它是一种吡啶化合物，结构中含有三个抗肿瘤基团，即氨基苯醌、氮甲酸酯和氮丙啶；放线菌素D，它的分子结构由发色团和两个环肽两部分组成；博莱霉素，它是一族与铜离子螯合的含硫配糖多肽抗生素，这种抗生素进入体内后，集中在皮肤、食道等组织里，这是其特点。

农业上防治植物病害的抗生素常用的有灭瘟素(即杀稻瘟菌素S)，春雷霉素，后者在临床上可用于医治绿脓杆菌的感染，农业上用于防治稻瘟病。此外还有放线酮和多氧霉素，它们对植物病原真菌有很强的抑制作用。

抗生素也用于治疗畜禽的感染症；同时也用于饲养畜禽，抗生素具有促进畜禽生长的作用。

习 题

1. 什么是抗生素? 抗生素是怎样被认识的? 它们对医药卫生和农牧业生产有何意义?
2. 细菌耐药性(耐抗生素)的生物化学机理有哪些类型?
3. 细菌耐药性的遗传结构是怎样的? 耐药性是通过什么方式在细菌群体中扩散的?
4. 抗生素的抗菌作用机理有哪些方式?
5. 试述青霉素的抗菌作用机理。
6. 离子载体抗生素的结构特点是什么?
7. 按化学结构和性质可将抗生素分成哪几类?
8. 抗生素今后发展方向是什么?

主要参考书

1. 马誉澂主编,《抗菌素》,第三版,人民卫生出版社,1965。
2. 戴自英主编,《实用抗菌素学》,第一版,上海人民出版社,1977。
3. 王嶽、方金瑞主编,《抗生素》,科学出版社,1988。
4. 田中信男著,《抗菌素的作用机制》,中译本第一版,科学出版社,1977。
5. Garrod, L. P. et al. *Antibiotic and Chemotherapy*. 4th Edition, Churchill Livingstone. 1973.
6. Lehninger, A. L., *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc. 1982.
7. Zubay, G. L., *Biochemistry*, Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1983.
8. Stryer, L., *Biochemistry*, 3rd Edition, W. H. Freeman and Company, San Francisco. 1988.

(徐长法)

第八章 激 素

第一节 概 述

激素(hormones)一词于1904年首先由 Bayliss, W. 及 Starling, E. 提出。但现在激素的概念已比当年的含意有了很大的发展。

激素是生物体内特殊组织或腺体产生的,直接分泌到体液中(若是动物,则指血液、淋巴液、脑脊液、肠液),通过体液运送到特定作用部位,从而引起特殊激动效应(调节控制各种物质代谢或生理功能)的一群微量的有机化合物。因此,也可以把这类化学物质看作是生物体内的“化学讯息”。

多年来人们对激素的功能进行了许多研究(内分泌学),但对激素的作用机理却了解得很少。60年代以来,开始陆续地分析了某些激素的分子结构,近20年,又发现激素与细胞膜或细胞核中受体结合,而对机体进行调节。这一发现指出了激素的功能与酶的作用及基因的表达是密切相关的,重组DNA技术又极大地促进了研究工作。于是,激素在生命现象中的重要性以及进行此研究的可行性都被提高到了一个新的水平。

一、激素的分泌

激素在机体的生命活动中起着重要的作用,它促使高等生物机体的细胞及组织器官既分工,又合作,形成一个统一的整体。

激素的分泌量随机体内外环境的改变而增减。正常情况下,各种激素的作用是相互平衡的。但任何一种内分泌腺机能发生亢进或减退,就会破坏这种平衡,扰乱正常代谢及生理功能,从而影响机体的正常发育和健康,甚至引起死亡。

产生激素的内分泌腺很多,以哺乳动物为例,参见表8-1及表8-2。

二、激素的化学本质

激素按其化学本质可分三类:(1)含氮激素(包括蛋白质激素、多肽激素、氨基酸衍生物激素)、(2)甾醇类激素、(3)脂肪酸衍生物激素(二十碳四烯酸)。前两类分别列于表8-1、8-2中。

由表8-1可见,垂体前叶、中叶及后叶、甲状旁腺、胰岛等分泌的激素为肽或蛋白质,甲状腺分泌的甲状腺素以及肾上腺髓质分泌的肾上腺素等为氨基酸的衍生物,均为含氮激素;最近查明肠、胃粘膜分泌的各种激素也都是肽类。下丘脑有调节垂体前叶的功能,下丘脑亦分泌一些肽类激素,如促肾上腺皮质激素释放因子、促性腺激素释放因子等。

此外,性腺和肾上腺皮质分泌的绝大多数都是甾醇类激素(表8-2)。而耻骨松弛素及绒毛膜促性腺激素则也是含氮激素。

表 8-1 含氮激素

内分泌腺	激素	简称	英文名称	化学本质	分子量(近似值)	生理效应
垂 体	生长激素	GH	growth hormone	蛋白质 (人, 191 个氨基酸)	21 000 (人)	促进生长、促进代谢(蛋白质合成、脂肪分解)
	促甲状腺激素	TSH	thyrotropic hormone	蛋白质(含糖, 约 220 个氨基酸)	2 830 (牛)	促进甲状腺发育及分泌
	促肾上腺皮质激素	ACTH	adrenocorticotrop hormone	39 肽	4 700	促进肾上腺皮质激素分泌
	催乳激素	LTH	luteotropic hormone	蛋白质 (198 个氨基酸)	24 000 (羊)	刺激乳腺分泌
	促黄体生成激素 (促间质细胞激素)	ICSH 或 LE	lutetizing hormone (in terstitial cell stimulating hormone)	蛋白质(含糖)	2 7400 (牛)	刺激性腺(睾丸的 间质细胞及卵巢)分 泌激素, 促进黄体生 成
	促卵泡激素	FSH	follicle stimulating hormone	蛋白质(含糖)	24 000 (人)	促进产生精子及 卵, 促进卵巢发育
	脂肪酸释放激素	LPH	lipotropin	蛋白质 (β: 91 个氨基 酸) (γ: 53 个氨基 酸)		水解酯类
	催产素	—	oxytocin	八肽	1070	促使妊娠子宫收缩
	加压素(抗利尿)	—	vasopressin	八肽	1070	升高血压并抗利尿
	中叶	促黑色素细胞激素	MSH	melanophore-stimulating hormone	α-MSH 13 肽 β-MSH 18 肽	
下 丘 脑	促肾上腺皮质激素释放因子	CRF	corticotropin releasing factor	9-11 肽		促进或抑制激素的 分泌
	促黄体生成激素释放因子	LRF	lutetizing hormone releasing factor	10 肽		
	促卵泡激素释放因子	FRF	follicle stimulating hormone releasing factor	多 肽		
	生长激素释放因子	GRF	growth hormone releasing factor	多 肽		
	生长激素释放抑制因子	GRIF	growth hormone release inhibitory factor	14 肽		
	催乳激素释放因子	PRF	prolactin releasing factor	多 肽		
	促黑色素细胞激素释放因子	MRF	melanophore-stimulating hormone releasing factor	多 肽		
	促黑色素细胞激素释放抑制因子	MRIF	melanophore-stimulating hormone releasing inhibitory factor	多 肽		
	促甲状腺激素释放因子	TRF	thyrotropin releasing factor	3 肽		

(续表)

内分泌腺	激素	简称	英文名称	化学本质	分子量 (近似值)	生理效应
胸腺	胸腺素 ^I 胸腺素 ^{II}		thymosin	蛋白质 (II: 49 个氨基酸)		增进免疫力等
甲状腺	甲状腺激素	—	thyroxine	含碘氨基酸		对动物代谢起较大的促进作用。增加基础代谢。(促进糖、蛋白质、脂、盐代谢); 促进智力与体质的发育
	三碘甲状腺原氨酸	—	triiodothyronine	含碘氨基酸		
	降钙素	CT	calcitonin	多肽 (32个氨基酸)	3800	调节钙磷的正常代谢, 降低血钙
甲状旁腺	甲状旁腺激素	PTH	parathormone	多肽 (84个氨基酸)	9500	调节钙磷的正常代谢, 升高血钙
肾上腺	髓质	肾上腺素	adrenaline (epinephrine)	酪氨酸的 衍生物		促进糖原分解, 使血糖升高。
		去甲肾上腺素 (正肾上腺素)	noradrenaline			也还可以促使脂肪、氨基酸分解
	皮质	(见表 8-2)				
肾	肾素			蛋白质		
胰岛	α - 细胞	胰高血糖素	glucagon	29肽	2485	促使血糖增高; 促使脂肪、蛋白质分解
	β - 细胞	胰岛素	insulin	蛋白质 (51个氨基酸)	5784	促使血糖降低; 促进脂肪、蛋白质合成及糖的氧化和贮存
十二指肠 肠粘 膜		促肠液激素	enterocrinin	蛋白质		促使肠液增多及酶含量增高
		缩胆囊肽- 肠促胰酶素	cholecystokinin pancreozymin	33肽		促使胆囊收缩并促使胰液中酶含量增高
		肠促胰液素	secretin	27肽		促使胰液分泌增多
		肠抑胃素	enterogastrone	43肽		抑制胃的收缩及分泌
胃粘膜* (幽门部)	促胃酸激素		gastrin	17肽		促进胃酸分泌
胎盘	绒毛膜促性腺激素	CG	chorionic gonadotropin	蛋白质 (含糖)		功能与孕酮相似。排于尿中可用采检查是否妊娠
卵巢黄体	耻骨松弛激素		relaxin	蛋白质 (含糖)		促使耻骨松弛

*十二指肠肠粘膜及胃粘膜分泌的激素是组织激素, 其他皆为内分泌激素。

表 8-2 甾醇类激素

内分泌腺	激素	简称	英文名称	化学本质	生理效应
肾上腺	一、肾上腺皮质激素:	—		甾醇 (固醇)	调节糖代谢、矿物质平衡(盐代谢)及保持体内Na ⁺ 浓度: 1. 糖皮质激素: 促使蛋白质转变为糖,抑制糖的氧化
	1. 糖皮质激素	—			
	1) 17-羟,11-脱氢皮质酮(皮质素)(可的松)	—	17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone (cortisone)		
	2) 17-羟-皮质酮(皮质醇,氢化可的松)	—	17-hydroxy-corticosterone (corticosterone)		
	3) 皮质酮		corticosterone	甾醇	2. 盐皮质激素: 促使体内保持钠,排出钾
	2. 盐皮质激素	—	aldosterone		
	1) 醛固酮	—			
	2) 11-脱氧皮质酮	DOC	11-deoxy-corticosterone		
	3) 17-羟,11-脱氧皮质酮(脱氧皮质醇)	—	deoxycortisol	甾醇	促进雄性动物发育、生长及维持雄性特征
	4) 皮质酮		corticosterone		
	二、性激素:				
	肾上腺雄酮		androstenedione		
	孕酮等		progesterone 等		
	髓质	(见表 8-1)			
睾丸	雄激素:			甾醇	促进雄性动物附性器官的发育、及维持雄性特征
	睾酮	—	testosterone		
	雄酮	—	androsterone		
卵巢	雌激素:			甾醇	促进雌性动物附性器官的发育及维持雌性特征
	雌二醇	—	estradiol		
	雌三醇	—	estriol		
	雌酮	—	estrone		
黄体	妊娠激素:			甾醇	促进子宫内膜增生,有安胎作用
	孕酮(黄体酮、妊娠素酮)	—	progesterone		
	耻骨松弛素		见表 8-1		
胎盘	雌激素:				
	孕酮		见上		
	促性腺激素		见表 8-1		
	耻骨松弛素		见表 8-1		
	绒毛膜促性腺激素		见表 8-1		

三、激素的作用机理

近年来在阐明激素的作用机理方面的研究有较大进展。

主要集中在四种作用机理,概括地加以介绍。

第一种,反应快(几分钟),通过生成 cAMP 而立刻作用于机体组织。大部分含氮激素都以这种方式起作用,如肾上腺素及胰高血糖素。这类激素常引起多种生理效应。

各种含氮激素作为第一信使与受它作用的细胞(靶细胞)膜中的特异受体结合,这个结合

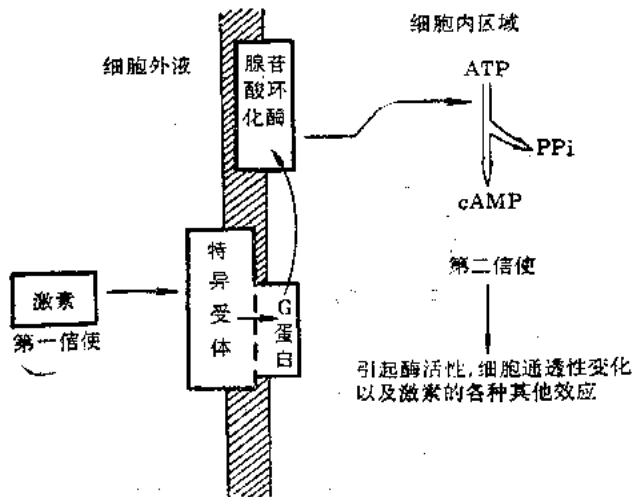


图 8-1 激素通过 cAMP 起作用示意图

触发已结合在生成 G_s 蛋白——GTP。受 G_s-GTP 活化的腺苷酸活化酶再去催化 ATP 形成 cAMP。作为第二信使的 cAMP 经一系列的相关反应——级联放大,即先激活细胞内的蛋白激酶(见本章第二节肾上腺素部分),再进一步诱发各种功能单位产生相应的反应, cAMP 起着信息的传递和放大作用。激素的这种作用方式称为第二信使学说(second messenger theory),示意如图 8-1。

第二种,激素通过结合到细胞表面的激素受体上,激活 G 蛋白, G 蛋白开启磷酸肌醇酶(phosphoinositidase,即一种磷脂酶——磷脂酶 c phospholipase c)的催化活性,通过导致磷酸肌醇的级联放大而起作用,从而在许多种细胞中引起广泛的不同反应。

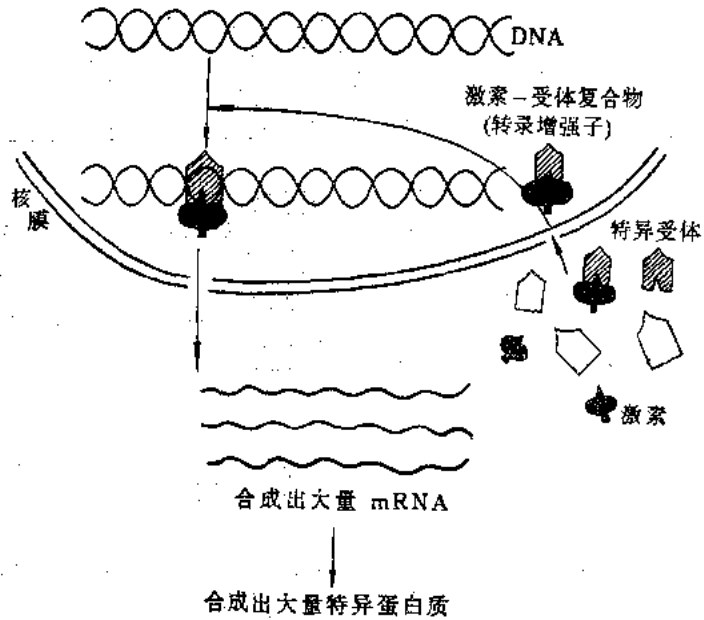
在磷酸肌醇酶催化下先产生二酰基甘油和肌醇三磷酸。二酰基甘油进一步活化蛋白激酶 c,促使靶蛋白质中的苏氨酸残基与丝氨酸残基磷酸化,最终改变一系列酶的活性;肌醇三磷酸则打开 Ca²⁺ 通道,升高细胞质内 Ca²⁺ 浓度,改变钙调蛋白(calmodulin)和其他的钙传感器(calcium sensors)的构象,使之变得更易于与其靶蛋白质结合改变,靶蛋白质的生物活性发生变化,从而完成激素的磷酸肌醇级联放大,在多种细胞内造成的广泛的生理效应。钙调蛋白及其他的钙传感器含有重度出现的螺旋区-泡区-螺旋区结构(recurring helix-loop-helix),这种结构亦被称为 EF 手图象(EF hand motif)。

第三种,激素结合到它的实质为酪氨酸激酶的受体上,激活此激酶的催化活性,使受体本身的酪氨酸残基磷酸化。受体中酪氨酸的磷酸化又进一步促进酪氨酸激酶的活性。因此,很可能激素的多倍效应的调节,是通过激素对所作用的细胞的靶蛋白质(target proteins)中的酪氨酸残基进行磷酸化作用而实现的。

胰岛素就是这样地起作用。表皮生长因子(epidermal growth factor 即 EGF)也类似地起作用。现在还发现许多致癌基因(oncogenes,也称昂可基因)也如此;几种致癌基因的蛋白

产物或具有酪氨酸激酶活性或触发这个级联放大过程。

第四种，反应慢(几小时甚至几天)。激素的作用与前几种截然不同。它必须首先进入细胞，作用于细胞核。按照这种作用机理发挥作用的激素的受体是结合着 DNA 的某些蛋白质，这些蛋白质还能结合金属。一旦激素结合到受体上，受体就转变成一种转录的增强子也称转录增强物。于是特定的基因就得到扩增地表达。这些激素的原发效应反应在基因表达上，而不表现在酶的激活或转运过程的变化上。由于这种作用是通过基因转录形成 mRNA 而实现的，因此作用过程较慢。见图 8-2。



甾醇类激素(如雌二醇、孕激素及皮质激素——糖皮质激素、醛甾酮等)及少数含氮激素即以这种方式作用于机体。

图 8-2 激素通过基因形成特异的蛋白质示意图

胰岛素则可能兼有不只一种作用方式，它对肌肉作用极快，几分钟就增加对葡萄糖的通透性，而对蛋白质合成则作用极慢，经过 24 小时才表现出刺激作用。

表 8-3 一些激素的作用方式

通过 cAMP 方式起作用的激素	通过激活基因、形成诱导酶起作用的激素	通过酪氨酸激酶起作用的激素	通过磷酸肌醇级联起作用的激素
促肾上腺皮质激素 (ACTH)	糖皮质激素	胰岛素	某些含氮激素等
促甲状腺激素 (TSH)	盐皮质激素: 醛甾酮	表皮生长因子	
促黄体生成激素 (LH)	性激素: 雌二醇、孕酮 雄激素: 睾酮		
促卵泡激素 (FSH)			
催乳激素 (LTH)			
绒毛膜促性腺激素 (CG)	生长激素		
甲状旁腺激素	甲状腺激素		
降钙素			
加压素			
胰高血糖素			
肾上腺素			
去甲肾上腺素			
促脂解素			
促黑色细胞素			

现将作用方式较为清楚的一些激素列于表 8-3 中。

此外, 前列腺素类和脑肽类激素的研究还处于新兴阶段, 可以期望在不久的将来能够阐明它们的作用机理。

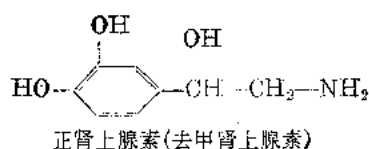
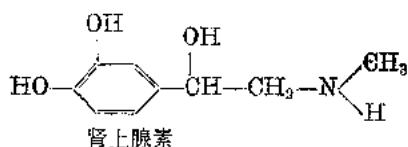
第二节 含氮激素(一)

——氨基酸衍生物类激素

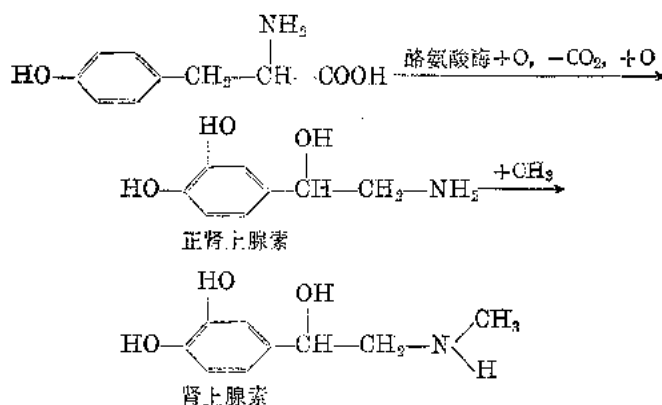
一、肾上腺髓质的激素——肾上腺素

肾上腺髓质分泌的激素有肾上腺素(epinephrine)及去甲肾上腺素(既正肾上腺素norepinephrine)。这两种物质也是交感神经末梢的化学介质。

(一) 化学结构、生成及生理功能



肾上腺素及正肾上腺素均由酪氨酸转变而来, 其过程为:



肾上腺素在生理上的作用与交感神经兴奋的效果很相似, 都对心脏、血管起作用, 可使血管收缩, 心脏活动加强, 血压急剧上升, 但它对血管的作用是不持续的。另一方面, 肾上腺素是促进分解代谢的重要激素。它对糖代谢影响最大, 可以加强肝糖原分解, 迅速升高血糖。这种作用是机体应付意外情况的一种能力。此外, 它还具有促进蛋白质、氨基酸及脂肪分解, 增强气体代谢, 升高体温等作用。

肾上腺素的作用与交感神经末梢的主要产物——正肾上腺素相比, 有所不同, 其不同点见表 8-4。

我国特产的药材麻黄所含的麻黄碱(麻黄素, ephedrine), 其化学结构和生理功能都与肾上腺素相似, 在药物上可以代替肾上腺素, 这类物质称为拟肾上腺素。麻黄素的结构为:

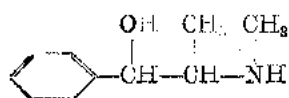


表 8-4 肾上腺素及正肾上腺素作用的比较

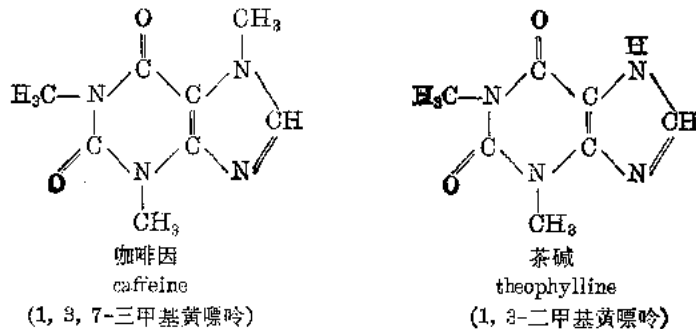
激 素	作 用	
	生 理 上	代 谢 上
肾 上 腺 素	对心脏作用大 强心剂(使心跳加速)	对糖代谢作用很大、升高血糖
正肾上腺素	对血管作用大 加压剂(使血管收缩)	对糖代谢作用比肾上腺素弱, 只有其作用的二十分之一

(二) cAMP 在肾上腺素生物学功能中的作用

当肾上腺素与细胞膜上专一性的蛋白质受体结合后, 细胞膜上与受体偶联的腺苷酸环化酶(adenyl cyclase)即催化 ATP 分解为 cAMP 和焦磷酸。由于细胞内 cAMP 浓度增高, 引起糖原分解, 使磷酸葡萄糖的含量急剧增加。

1. cAMP 的发现 实验证明, 肾上腺素作用于动物肝细胞匀浆的水不溶部分之后, 引起某种酶促反应, 产生一种对热稳定的小分子物质; 这种小分子物质作用于肝细胞匀浆的水溶部分时, 可使其中所含的磷酸化酶由无活性的形式(磷酸化酶 b)转变成有活性的形式(磷酸化酶 a)。经过分离鉴定, 确定这种小分子物质就是 3', 5'-cAMP。

咖啡因和茶碱这两种物质与那些利用 cAMP 为细胞内部信使的激素一起, 相互起着协同的作用, 它们都是磷酸二酯酶的抑制剂, 阻碍 cAMP 分解。



2. G 蛋白(guanyl-nucleotide-binding protein 结合鸟苷酸的蛋白) G 蛋白与激素的受体偶联, 将信息传递给腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)。实际上, G 蛋白参与许多种信号传导过程。

结合在专一性受体上的激素, 如肾上腺素和胰高血糖素等是如何活化环化酶的? 这个关键性问题是 Martin Rodbell 解决的, 他发现激素起作用时 GTP 的加入对于活化环化酶是至关重要的条件。同时还发现激素促进 GTP 水解。这些重要进展引导出另一项重要发现, 即在活化过程中有一个重要的中介物质——G 蛋白。

激素-受体复合物并不直接地活化环化酶, 信号传导过程在细胞膜上发生。首先活化 G 蛋白, G 蛋白再携带激动信号到环化酶上, 然后活化了环化酶再触发一系列由 cAMP 引起的级联反应。

Alfred Gilman 指出 G_s 蛋白(激活性 G 蛋白 Stimulatory G protein)是一个界面蛋白,

处于细胞膜内缘,由 α (45kd)、 β (35kd)和 γ (7kd)亚基组成。它变动于它的 GDP 形式(对环

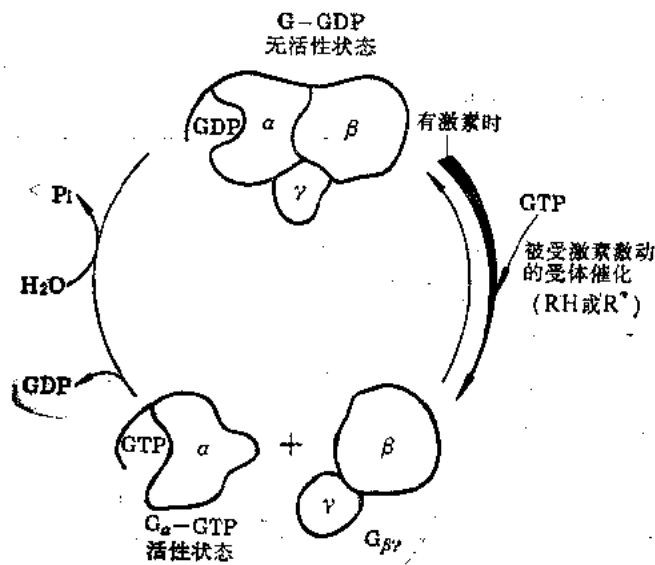


图 8-3 G_s 蛋白在它的活性状态(G_s -GTP)与无活性状态(G-GDP)之间进行转变

GTP 激活效应于蛋白质,结合态的 GTP 水解使得 G_s 蛋白回到它的无活性状态。无活性的 G_s 蛋白释出结合态 GDP,接受 GTP 后,又转变成它的活性状态

化酶无活性)及它的 GTP 形式(有活性)之间。无激素时,几乎所有的 G_s 蛋白都处于无活性的 GDP 形式。当激素结合到受体上时,触发 GTP 将结合态的 GDP 取代下来:激素-受体复合物(注意,不是空载的受体!)结合到 G_s 蛋白上,使得结合态的 GDP(指结合于 G 蛋白上、无活性形式时的 GDP)从 G_s 蛋白上释放, GTP 进入 G 蛋白:接着,负载着 GTP 的 α 亚基(G_s -GTP)从 β 、 γ 亚基上解离下来(见图 8-3),然后 G_s -GTP 活化环化酶。因此,信息流自激素-受体复合物到 G_s 蛋白,再到环化酶(见图 8-4)。关键的一点是 G_s 蛋白的活化是由激素-受体复合物催化的。每一个被受体结合的激素去促使形成许多

个分子 G_s -GTP,由此给出“放大”的效应。 G_s 蛋白进一步去激活环化酶,此后,结合着 α 亚基的 GTP 又在适当的条件下水解,最终关闭这个由激素所触发的循环。结合态 GTP 缓慢的水解表明 G 蛋白亦是一个 GTPase。也就是说这个调节蛋白具有一种内藏式的脱活化作用的设计(built-in device for deactivation)。当缺乏激素时, GTP-GDP 交换反应的速度大大地降低。最

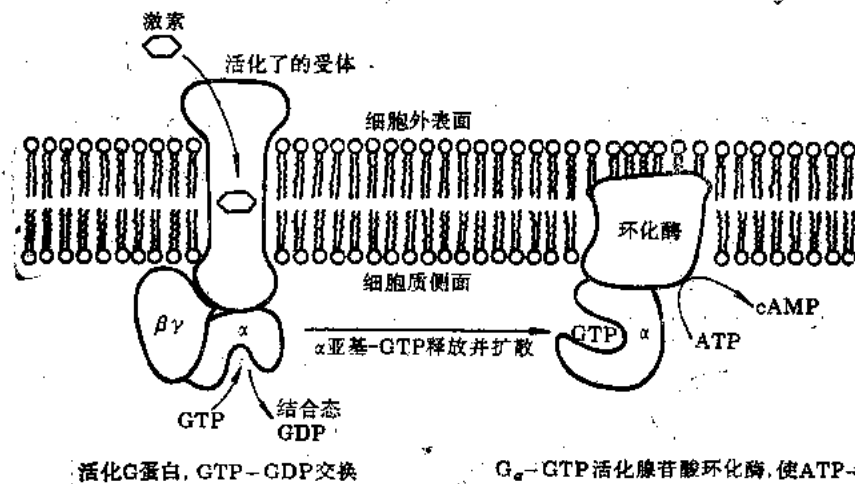


图 8-4 激素到 cAMP 的信息流中的 G_s 蛋白(stimulatory G protein)

G_s 蛋白在激素结合到它的特异受体与活化腺苷酸环化酶之间起调解作用,是一种调节蛋白。一个激素-受体复合物,催化形成许多个分子的 G_s 蛋白。被结合到 G_s 蛋白的 α 亚基上的 GTP 水解则终止环化酶的活化作用。

后,几乎所有的 G 蛋白均以结合着 GDP 的无活性的形式存在,接着,几乎所有的环化酶都转

变成无活性状态。

与环化酶相联系的 G_s 蛋白只是 G 蛋白家族中的一个成员, G 蛋白家族还对许多种激素的传导及刺激起作用。如 G_i 蛋白(抑制性 G 蛋白 inhibitory G protein), 它是另一个成员, 参与某些激素(如 α_2 -肾上腺素胺和鸦片制剂 opiates) 对腺苷酸环化酶的抑制效应并在发挥抑制这种效应时促进 GTP 水解。百日咳毒素(pertussis toxin) 则共价修饰已被证明为抑制性 G 蛋白的蛋白质, 使 G_i 蛋白的这种抑制效应失效, 从而阻断 G_i 蛋白对腺苷酸环化酶的抑制作用。大脑中还有另一个成员: G_o , 其 o 代表“其他”(other), 它的功能尚不很清楚。有的 G 蛋白与磷酸肌醇级联(见第四节)中的一个效应子酶——磷酸酶 C 的控制有关, 有的参与调节控制心肌细胞中的 K^+ 通道的活性, 有的则参与白细胞的化学趋向性 (leukocyte chemotaxis)、嗅觉 (olfaction) 以及无脊椎动物的简单形式的学习过程等。它们也都由 α 、 β 、 γ 亚基组成, 亦都有 GTP-GDP 交换反应。现将一些 G 蛋白参与的生理过程小结于表 8-5 中:

表 8-5 G 蛋白参与的一些生理过程

刺激物	受体	G 蛋白	效应子	生理效应
肾上腺素	β -肾上腺素受体	G_s	腺苷酸环化酶	糖原降解
5-羟色胺	5-羟色胺受体	G_s	腺苷酸环化酶	海兔的行为敏感性及学习过程
光	视紫质	传导素 (transducin)	cGMP 磷酸二酯酶	视觉激动作用
IgE-抗原复合物	肥大细胞的 IgE 受体	G_{PLC}	磷酸酶 c	分泌
t-蛋氨酸	化学趋向性受体	G_{PLC}	磷酸酶 c	化学趋向性
乙酰胆碱	蕈毒碱受体	G_K	K^+ 通道	减慢起搏活动

注: G_{PLC} 和 G_K 代表在这些级联中还未确定的 G 蛋白。

3. 具有七螺旋区结构图象的 β -肾上腺素受体 肾上腺素(epinephrine 或 adrenaline) 结合到专一性的 β -肾上腺素特异受体——(β -adrenergic receptor) 上后, 触发后续的环化酶活化作用(注意, α -adrenergic receptor 则与本章第四节中将介绍的磷酸肌醇级联相偶联)。

β -肾上腺素受体是一个跨膜的(transmembranic)受体蛋白, 64 kd, 横跨在靶细胞的细胞膜上。象其他一些与 G 蛋白偶联的受体, 如视紫质——光受体(一种在视网膜杆状细胞中的蛋白质)以及蕈毒碱的(muscarinic)乙酰胆碱受体(控制心脏细胞中的 K^+ 通道)等一样, 都是含有具七个螺旋区的受体, 见图 8-5。看来, 七螺旋区结构是激活 G 蛋白的跨膜受体所具有的普遍性质, 这种结构是各种 G 蛋白级联系列中多次重复出现的主旋律。肾上腺素的结合位点则处于跨膜螺旋所形成的一个“口袋”内。

与激素结合的 β -肾上腺素受体对 G 蛋白的激活不只取决于是否有激素结合于它(激素的绝对浓度), 而是更与激素浓度的变化增高有关。当把受体分子长时期地暴露于恒定水平的肾上腺素溶液中时, G 蛋白催化 GTP-GDP 交换反应的能力不再是很有效的。这种在接受刺激作出反应之间, 催化能力下降的变化关系, 被称为“适应”或“失敏感作用”(adaption or desensitization), 这是感受系统(sensory system)的一个普通性质。这种“适应”是有利的,

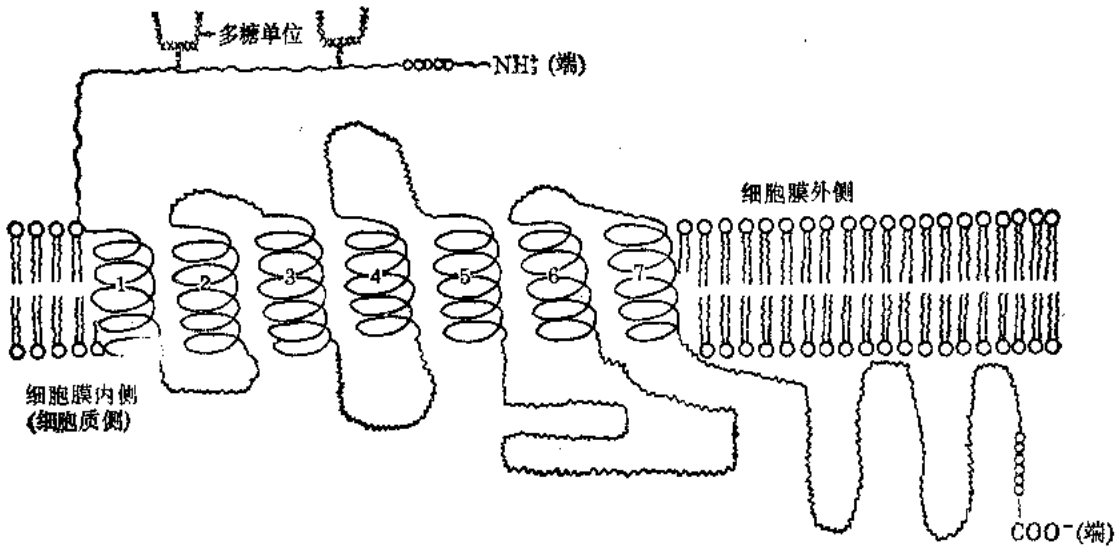


图 8-5 β -肾上腺素受体的结构图象——七螺旋区等

受体中部为七个镶嵌在脂双层细胞膜中的螺旋区。N-端有两个多糖单位，处于细胞膜的外侧；C-端有多个丝氨酸残基，在防止受体与 G 蛋白作用时它们被磷酸化；受体在细胞膜内侧的一个泡区参与活化 G 蛋白的过程

因为它使受体的功能不受很宽范围内的激素的本底浓度的影响，受体越过这个范围在应当并能够起作用的时候适时地发挥其应有的作用。然而当磷酸酶起作用，将受体 C-端的多个结合着的磷酸基移去时，信号传递不再被堵塞，受体敏感性又再度恢复，又能去激活 G 蛋白。这种调节设计与视觉激动过程的分子机理是相近的。

调节设计与视觉激动过程的分子机理是相近的。

4. 蛋白激酶 肾上腺素对腺苷酸环化酶催化 ATP 产生 cAMP 的反应有明显的促进作用。凡有 cAMP 的细胞，都有一类能催化蛋白质产生磷酸化反应的酶，称为蛋白激酶。cAMP 通过蛋白激酶，发挥它的作用。

cAMP 形成后立即去激活蛋白激酶，蛋白激酶又使磷酸化酶激酶磷酸化而被激活。所以蛋白激酶是 cAMP 与磷酸化酶系统联系中的一个关键酶，它是一个别构酶。

蛋白激酶的无活性形式含有两种类型的亚基（见图 8-6），一种是催化亚基（C），另一种是调节亚基（R），调节亚基抑制催化亚基。蛋白激酶的别构调节物就是 cAMP。当 cAMP 结合到调节亚基上时，就使无活性的催化亚基——调节亚基复合体解离，产生出有活性的、自由的催化亚基以及 cAMP——调节亚基复合体。也就是说 cAMP 消除了酶活性的抑制物，使磷酸化酶发生磷酸化作用，从而使它具有活性；或使糖原合成酶发生磷酸化作用，从而使糖原合成酶不具有活性。cAMP 就是以这种方式促进糖原分解，并停止糖原合成，最终导致血中葡萄糖含量的升高。

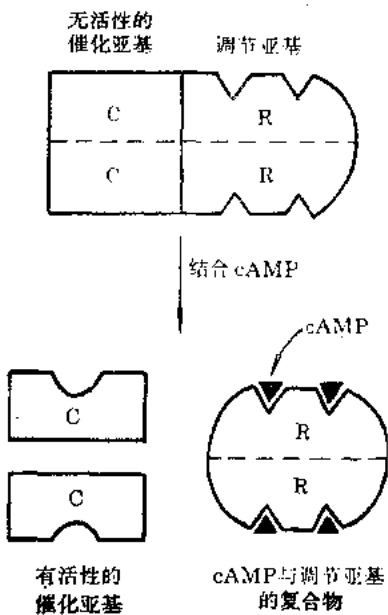


图 8-6 cAMP 激活蛋白激酶
cAMP 的激活作用表现在使催化亚基与调节亚基解离

蛋白激酶不只能使磷酸化酶激酶产生磷酸化作用，还可以使许多蛋白质(组蛋白、核糖体蛋白、脂肪细胞的膜蛋白、线粒体的膜蛋白、微粒体蛋白及溶菌酶等)产生磷酸化作用，在这些过程中蛋白激酶也需要由 cAMP 激活。

动物遇到意外情况时，随着肾上腺素的分泌，cAMP 的浓度极其迅速地增加，于是动物表现出一系列应急反应，一旦意外解除，肾上腺素分泌随之停止，结合在细胞膜上的肾上腺素脱离，cAMP 不再形成，遗留下来的 cAMP 则被磷酸二酯酶破坏。



于是，cAMP 的含量迅速地下降。

(三) 肾上腺素在促进糖原分解中的级联放大作用 (amplification cascade)

当肾上腺素以 10^{-8} — 10^{-10} mol/L 的浓度到达肝细胞表面时，迅速地与肝细胞表面上的肾上腺素受体结合，使此局部地区的结构发生变化，激活腺苷酸环化酶，形成 cAMP，在细胞内 cAMP 最高浓度可达约 10^{-6} mol/L。

形成 cAMP 后，再触发一系列的变化(见图 8-7)。

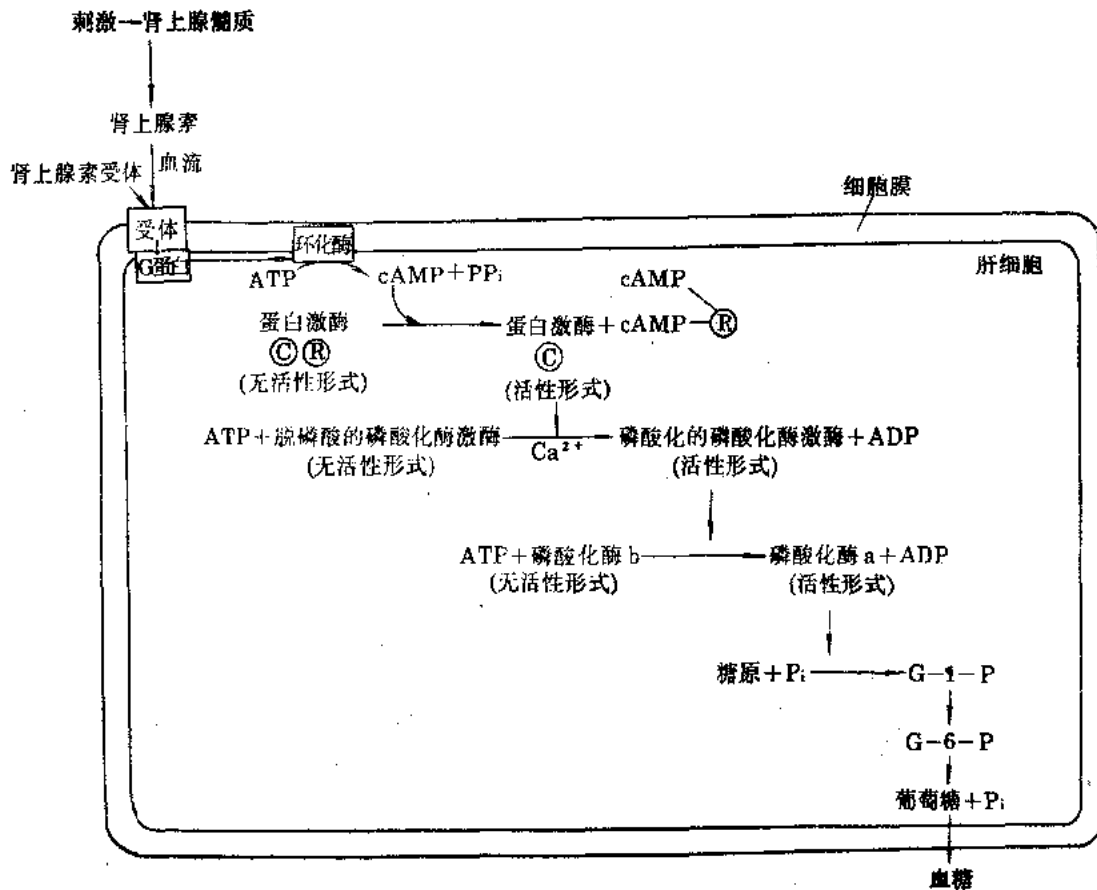


图 8-7 肾上腺素对提高血糖的级联放大作用
(图中 © 和 ® 分别代表蛋白激酶的催化亚基和调节亚基)

磷酸化酶激酶经过磷酸化作用，转变成有活性的磷酸化酶激酶时需要钙离子参加。如此形成的有活性的、磷酸化了的磷酸化酶激酶再去催化无活性的磷酸化酶 b 转变成成为与磷酸基

共价结合的、有活性的磷酸化酶 a, 磷酸化酶 a 又催化糖原转化成 1-磷酸葡萄糖, 然后, 1-磷酸葡萄糖再转变成葡萄糖。

在整个过程中, 虽然开始只结合了极少量的肾上腺素 (10^{-8} — 10^{-10} mol/L), 但到最后却引起了极强烈的效应, 能产生 5 mmol/L 葡萄糖, 反应过程中各个信号逐级放大了约 300 万倍, 这种作用称为级联放大作用, 它在几秒钟之内就可使磷酸化酶的活性达到最大值。

一旦肾上腺素停止分泌, 结合在肝细胞膜上的肾上腺素就解离下来, 随之发生一系列的变化: cAMP 不再形成; 遗留下来的 cAMP 被磷酸二酯酶分解; 蛋白激酶的两种亚基又再联成无活性的催化亚基和调节亚基的复合体 (即 CR 复合体); 有活性的磷酸化酶激酶的磷酸化形式遭到脱磷酸的作用, 变成无活性的形式; 磷酸化酶 a 受到磷酸化酶的磷酸酶 (phosphorylase phosphatase 的作用为脱磷酸, 它不属于这个级联放大体系) 的作用, 脱去磷酸变成无活性的磷酸化酶 b。于是, 上述的糖原分解体系恢复到正常的休止状态; 同时无活性的磷酸化形式的糖原合成酶经过脱磷酸作用, 又变得活跃起来, 继续合成糖原。

肾上腺素除了能在肝脏中促进肝糖原分解外, 也能促进骨骼肌及心肌中的糖原分解成乳酸, 这是因为肌肉中没有 6-磷酸葡萄糖酶, 因此肌糖原分解后不转变为血糖, 而转变为乳酸。还能促进脂肪细胞中的三脂酰甘油分解出游离脂肪酸。因为腺苷酸环化酶也促进形成有活性的甘油激酶, 甘油激酶再去激活三脂酰甘油脂肪酶, 有活性的三脂酰甘油脂肪酶就能将三脂酰甘油分解, 释放出游离脂肪酸。

除肾上腺素外, 虽然还有许多其他激素也通过形成 cAMP 而起作用, 但是每一种激素只能与其靶细胞膜上的、专一于这种激素的受体相结合, 而且所形成的 cAMP 只存留在这种细胞中, 并不随血液循环而影响其他细胞。因此, 不同的激素引起不同的生理效应。

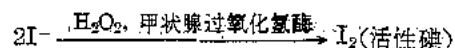
cAMP 在细胞中的作用受到 cGMP 的拮抗, 此外, 它在各种细胞中的作用还可能受两种细胞成分的影响: 这两种成分是游离的钙离子及前列腺素 (见本章第六节前列腺素)。钙离子在某些情况下可增强 cAMP 的作用, 而在另一些情况下却可减弱 cAMP 的作用。前列腺素则, 干扰或刺激腺苷酸环化酶对 ATP 的作用, 从而减少或增加 cAMP 的生成。

二、甲状腺的激素——甲状腺素及降钙素

甲状腺分泌的激素有三种: 甲状腺素 (thyroxine) 及三碘甲状腺原氨酸 (triiodothyronine), 前者产生的量大大超过后者, 但是就生物活性来说, 则三碘甲状腺原氨酸比甲状腺素高 5—10 倍。第三种是降钙素 (calcitonin 或 thyrocalcitonin, 即 TCT)。

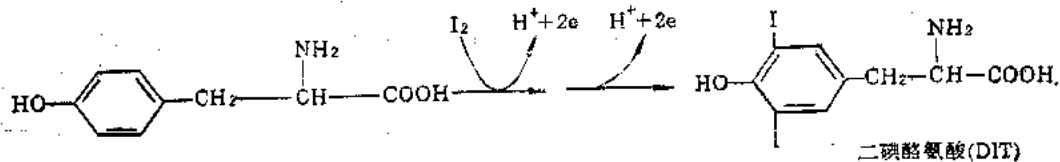
(一) 甲状腺素及三碘甲状腺原氨酸的结构及生成

甲状腺是体内吸收碘能力最强的组织, 能将体内 70—80% 的碘浓集于其中。细胞内, 在甲状腺过氧化物酶 (thyroid peroxidase) 及过氧化氢的作用下, 碘离子被氧化成活性碘:



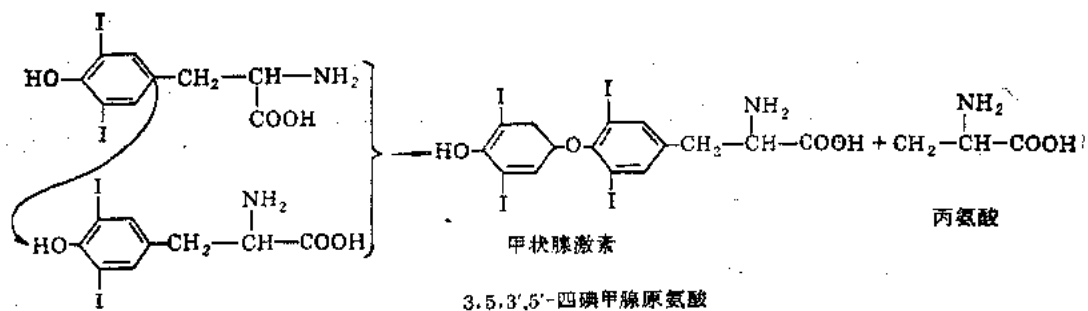
活性碘与酪氨酸作用, 产生一碘酪氨酸 (MIT), 进而产生 3, 5—二碘酪氨酸 (DIT)。

碘化过程不发生在游离酪氨酸上, 只发生在甲状腺球蛋白中原球蛋白的酪氨酸残基上。甲



甲状腺球蛋白是分子量约为 660 000 的含碘糖蛋白,其中含有约 120 个酪氨酸残基。

两分子 DIT 再作用形成甲状腺素:



甲状腺素的生物合成受硫脲(thiourea)及硫脲嘧啶(thiouracil)的抑制。

甲状腺素分泌受垂体前叶分泌的促甲状腺激素的促进和调节,同时也可直接受神经支配。

(二) 甲状腺素的生理作用

甲状腺素对动物的作用是多样而强烈的。它刺激糖、蛋白质、脂肪和盐的代谢;促进机体生长发育和组织的分化;对中枢神经系统、循环系统、造血过程、肌肉活动等都有显著的作用。总的表现是增强机体新陈代谢,引起耗氧量及生热量的增加,并促进智力与体质的发育。幼年动物若甲状腺机能减退或切除甲状腺时,发育迟缓,行动呆笨而缓慢;成年动物甲状腺机能减退时,出现厚皮病。这时动物心搏减慢,基础代谢降低,性机能降低。切除甲状腺的动物逐渐衰弱,最后死去。反之,甲状腺机能亢进或服用甲状腺素后,动物眼球突出,心搏加快,基础代谢增高,消瘦,神经系统兴奋性提高,表现为神经过敏等。

膳食中缺少碘时,常有甲状腺肿大和甲状腺素分泌不足的症状,服用碘化油、碘化盐和海带有预防和治疗的作。

(三) 甲状腺素的作用方式

当前比较受人们重视的有两种理论:一种认为甲状腺素主要作用在细胞的产能体系,特别是在线粒体中形成 ATP 的氧化磷酸化过程,这种作用关系到甲状腺素对基础代谢的生理效应。另一种认为甲状腺素的主要作用是增强 RNA(包括 tRNA、mRNA)的形成,这可能就是甲状腺素能促进个体生长发育及促进总的代谢效应的原因。然而,这两种理论都还不能完满地解释甲状腺素的全部效应。

(四) 降钙素

降钙素分子量为 3800,由 32 个氨基酸组成。尚未发现有降钙素分泌过多或分泌过少引起的疾病。降钙素可以用来治疗原因不明的婴儿高血糖症以及因甲状旁腺素分泌过多而引起的成人高血钙症。

第三节 含氮激素 (二)

——多肽及蛋白质激素

下丘脑、垂体、胰脏中胰岛素 α 及 β 细胞、甲状旁腺等分泌的激素都是多肽及蛋白质。其他还有肠胃粘膜、胎盘、肾脏、胸腺等器官也分泌一些多肽、蛋白质类的激素。

一、垂体激素、下丘脑激素及脑肽

垂体在神经系统的控制下,调节着全身各种内分泌腺,是各种内分泌腺的推动者。高等动物体内有一大部分激素属于“下丘脑神经内分泌体系”。

垂体分为前叶、后叶及中叶三部分,由垂体柄与下丘脑相连。关于下丘脑、垂体各叶以及各内分泌腺的关系见图 8-8。

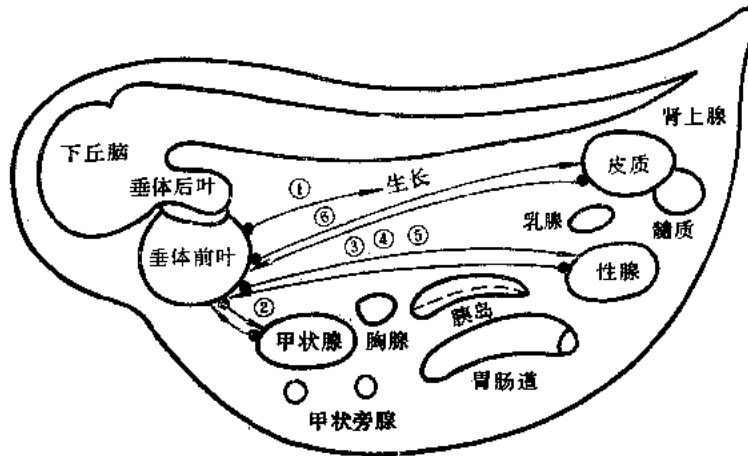


图 8-8 脊椎动物内分泌器官和下丘脑、垂体相互关系示意图

垂体的后叶为神经垂体 垂体的前、中叶为腺垂体

- ① 生长激素 ② 促甲状腺激素 ③ 促黄体生成激素 ④ 促卵泡激素
⑤ 催乳激素 ⑥ 促肾上腺皮质激素

前叶及中叶能自行合成激素,后叶仅贮存及分泌激素,后叶所分泌的激素是由下丘脑制造,再由血流带到后叶的。

(一) 垂体前叶激素

垂体前叶在内分泌系统中起主导作用,它直接受下丘脑分泌的物质刺激,并受神经管制;从而调节某些内分泌器官的发育及分泌,因此与动物的生长、性别及代谢密切相关。垂体前叶分泌的激素已经提纯的有 6 种,其中促肾上腺皮质激素、促甲状腺激素、促卵泡激素、促黄体生成激素等 4 种可以促进或抑制其他内分泌腺的发育和分泌。另外还有生长激素及催乳激素。其中催乳激素、促黄体生成激素及促卵泡激素又常统称为促性腺激素,与生殖机能有关。生长激素、促甲状腺激素及促肾上腺皮质激素,则直接或间接地影响代谢。割去脑下垂体前叶之后,许多内分泌腺就会萎缩,引起机体各种反常的生理现象。

1. 生长激素 生长激素(growth hormone, 即 GH, 或 somatotropin)为蛋白质, 并已提纯结晶。不同动物的生长激素分子量可以从 20 000 至 50 000 不等, 等电点 pH 也各异, 人的生长激素分子量为 21 500, 含 191 个氨基酸, 其一级结构已经弄清。各种种属来源的生长激素具有一部分序列相同的肽段, 这部分肽段与激素的生物活性有关。

生长激素的功能非常广泛, 它刺激骨及软骨的生长, 促进粘多糖及胶原的合成; 它还影响蛋白质、糖类、脂类的代谢, 最终影响体重的增长。

幼年动物若生长素分泌不足, 则生长矮小, 人若得此病就成为侏儒, 但智力不受影响, 称为侏儒症; 若分泌过多, 则过度高大, 人若得此病, 则成为畸形巨人, 称为巨人症; 成年动物(即在骨干、骨骺愈合之后), 若发生垂体机能亢进, 因骨干不能对称生长, 某一部分骨骼畸形长大, 则患肢端肥大症。垂体活性过高, 还会引起高血糖及糖尿现象, 这个效应是生长素促进肾上腺皮质分泌糖皮质激素所致。饥饿时生长素的分泌增高, 继而显示出血中葡萄糖利用的减少及脂肪利用的增高, 这时血浆中葡萄糖及自由脂肪酸含量上升。另外, 高垂体活性对于许多组织, 如软骨、结缔组织、肌肉组织及脂肪等都有较大的作用, 它对组织的作用发生在细胞核水平上, 生长激素能调节各种形式的 RNA 的生物合成, 可能增加 RNA 聚合酶的形成, 从而增加 RNA 的合成。

2. 促甲状腺激素 促甲状腺激素(thyrotropic hormone, 或 thyroid-stimulating hormone, 即 TSH)是一种糖蛋白。牛的促甲状腺激素已完全提纯, 其分子量为 28 300, 有两个亚基, 分子量为 13 600 的 TSH_α 及分子量为 14 700 的 TSH_β, 它们两者的一级结构也已弄清楚, 其中行使生理功能的是 β 链, 而 α 链与 LH、FSH(促黄体生成激素、促卵泡激素)的 α 链极相似, 含有 96 个氨基酸残基及两个糖侧链。

促甲状腺激素的生理功能是促进甲状腺的发育及分泌, 从而影响全身代谢。

促甲状腺激素的分泌受到下丘脑分泌的促甲状腺激素释放因子的促进。下丘脑通过释放因子控制垂体(前叶)——甲状腺系统。

3. 促黄体生成激素 促黄体生成激素(leuteinizing hormone, 即 LH, 或促间质细胞素 interstitial cell-stimulating hormone, 即 IOSH)是由 α 及 β 两个亚基组成的糖蛋白。其生理功能是促进卵泡发育成黄体, 促进胆固醇转变成孕酮并分泌孕酮, 阻止排卵, 抑制动情, 或促使睾丸的间质细胞发育, 刺激睾丸分泌激素。

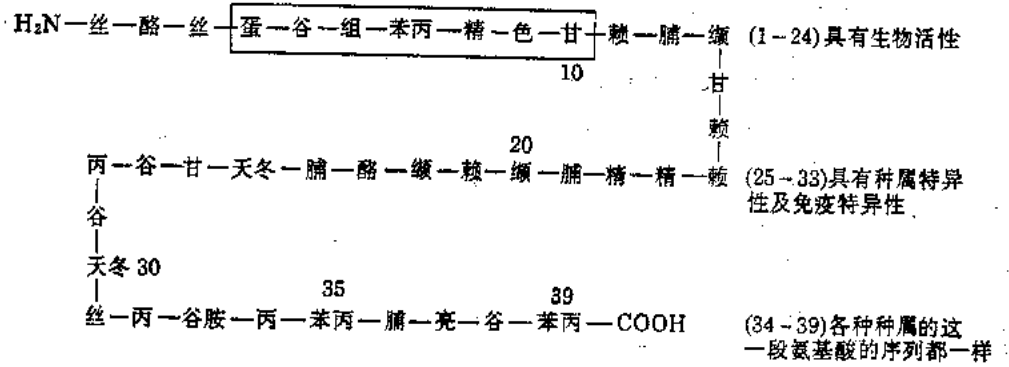
4. 促卵泡激素 促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, 即 FSH)也是一种由 α, β 两个亚基组成的糖蛋白。糖的部分是甘露糖或氨基己糖、半乳糖、海藻二糖等。其分子量因动物种属而异。它的生理功能是促使卵巢(或精巢)发育, 促进卵泡(或精子)生成和释放。

TSH、LH 及 FSH 三者的 α 亚基分子量相同, 可以互换, 它们的生理功能与 β 亚基有关。因此, 它们可能起源于共同的祖先结构基因(ancestral structural gene), 然后再分化出三种不同的激素。

5. 催乳激素 催乳激素(luteotropic hormone 即 LTH 或 prolactin, 或 luteotropin)是单链多肽, 其生理功能是刺激已发育完全的乳腺分泌乳汁, 刺激并维持黄体分泌孕酮。LTH 不仅大大地促进乳腺中 RNA 及蛋白质的合成, 而且还使乳腺中糖代谢及脂代谢中的许多酶

增加活性。

6. 促肾上腺皮质激素 促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotropin hormone 即 ACTH 或 corticotropin) 是一个含有 39 个氨基酸残基的直链多肽。羊、猪、牛的 ACTH 已提纯, 它们除第 25—33 个氨基酸外, 其他部分都相同。ACTH 的一级结构如下:



具有生物活性的序列即: 1—19 氨基酸残基, 已经人工合成。

促肾上腺皮质激素可促进体内储存的胆固醇在肾上腺皮质中转化成肾上腺皮质激素, 并刺激肾上腺皮质激素分泌。ACTH 首先作用于靶细胞膜上的受体部位, 从而促进 cAMP 的形成, cAMP 又增加细胞膜的葡萄糖通透性及 6-磷酸葡萄糖的转变, 还能激活糖原磷酸化酶, 这样, 就增加了一磷酸己糖支路的循环, 从而增加了还原型 NADP⁺ 的供给 (见图 8-9), 还原型

NADP⁺ 是皮质激素生成中起重要作用的辅助因子。

此外, 在 ACTH 作用下生成的 cAMP 还促进产生一个短寿命的蛋白质, 这个蛋白质发现于肾上腺皮质细胞的胞液及微粒体中, 它对皮质激素合成的作用尚不清楚。

在医学实践上应用 ACTH 来诊断肾上腺皮质的生理状况, 也用它来治疗痛风、气喘及皮肤痛等疾患。

7. 脂肪酸释放激素 β-脂肪酸释放激素 (β-LPH, lipotropin 即 LPH) 由 91 个氨基酸组成; γ-脂肪酸释放激素 (γ-LPH) 由 58 个氨基酸组成, 两者的氨基酸序列已清楚。它们可促进脂肪水解。

ACTH 族激素 (包括 α-促黑素

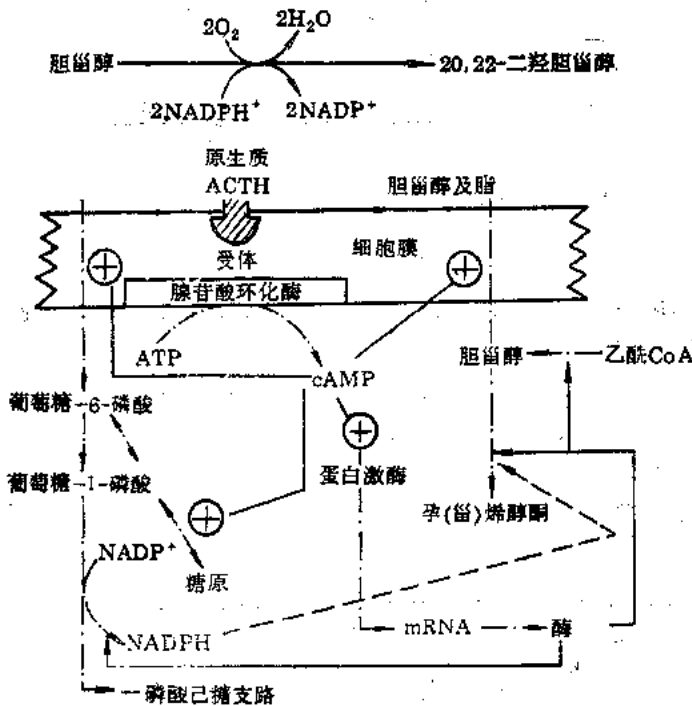


图 8-9 促肾上腺皮质激素作用的中间过程

细胞激素及肾上腺皮质激素样中间肽 corticotropin-like intermediate-lobe peptide, 即 CLIP) 及 β -LPH 族激素(包括 γ -LPH、 β -内啡肽及 β -促黑素细胞激素)很可能来源于同一物质, ACTH- β -LPH 前体 (ACTH- β -LPH precursor), 见图 8-10。图 8-10C、D 中各个活性受肽之间原来都由成对的碱性氨基酸相连。

由下图所表达的结果出发, 有人预测可能会继续分离出两种新的蛋白质、多肽激素及信号肽, 见图 8-10E 中左边。

(二) 垂体中叶激素——促黑素细胞激素

促黑素细胞激素(melanocyte stimulating hormone 即 MSH)有 α 、 β 两种, 均为直链

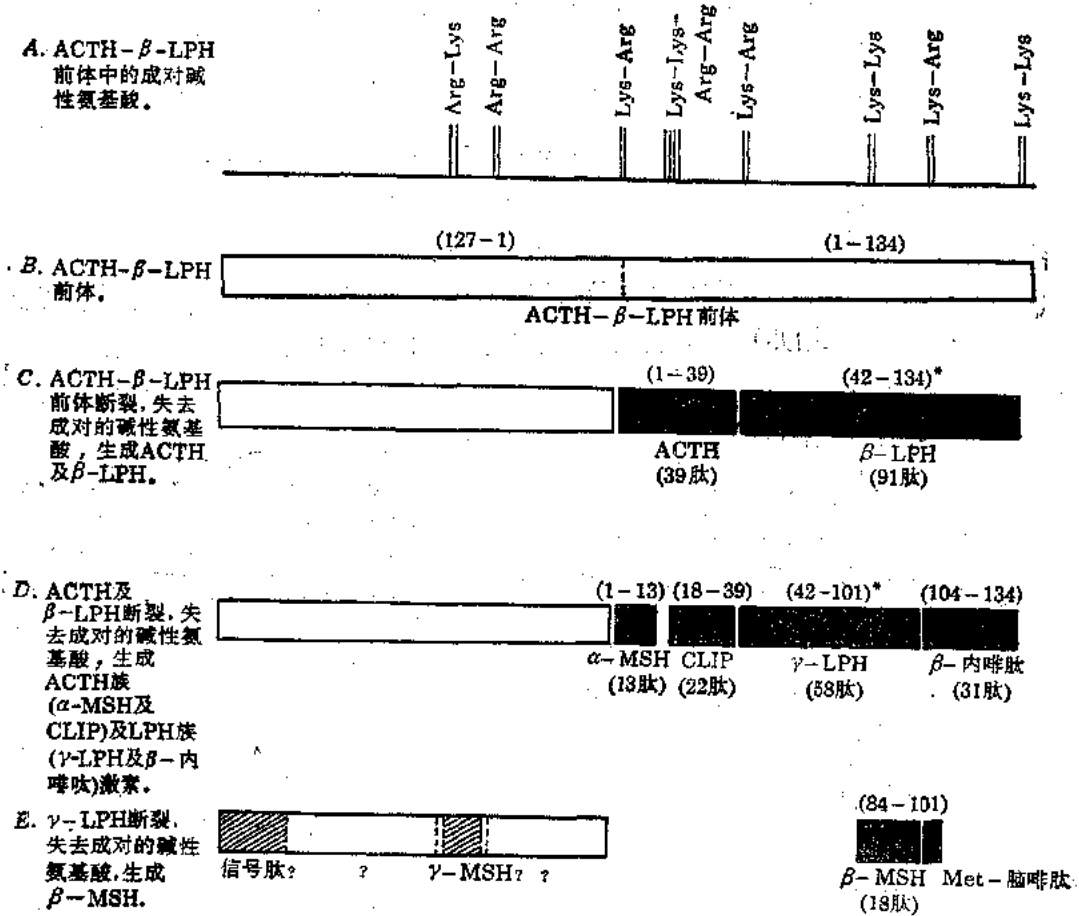
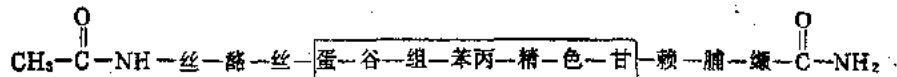


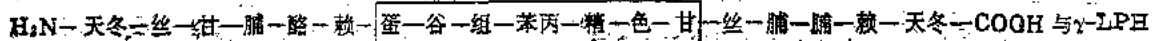
图 8-10 中 ACTH- β -LPH 前体及其断裂产物的结构示意图

* 图中 C(42-134) 及 D(42-101) 肽段与 B(1-134) 肽段比较, 少去第 73、74 两个氨基酸的原因不明。

多肽类激素。 α -MSH 是十三肽, 其氨基酸序列为:



这个结构与 ACTH 的一部分序列一样。牛的 β -MSH 是十八肽, 其氨基酸序列为:



的部分序列一样。其中,共同的七肽(方框中)是 MSH 活性所必需的。

MSH 的分泌受下丘脑分泌的促黑素细胞激素释放因子 (MRF) 及促黑素细胞激素释放抑制因子 (MRIF) 的控制。

人患阿狄森氏病 (Addison's disease, 一种慢性肾上腺皮质机能减退症) 时, MSH 及 ACTH 的分泌都过多, 结果使皮肤中色素沉着。MSH 调节鱼类、两栖类、爬虫类动物表皮细胞色素的增加及减少。

(三) 垂体后叶激素

垂体后叶激素系指催产素和加压素两种激素, 它们是由下丘脑(分别由下丘脑的室旁核和视丘核)产生, 再经轴突运输到垂体后叶, 然后分泌出来的。

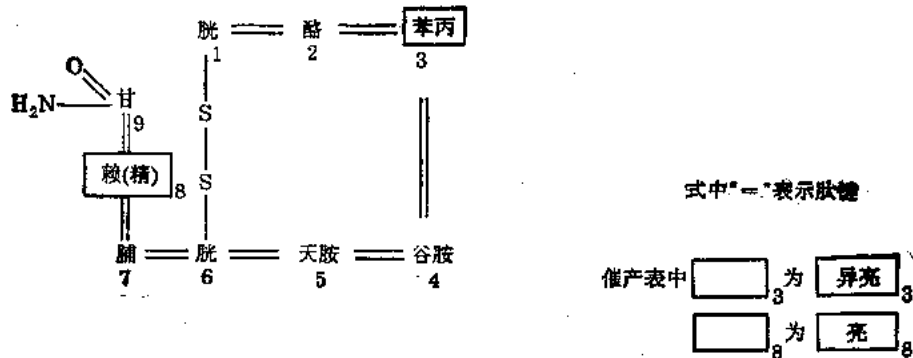
这两种激素都由 9 个氨基酸组成, 也称它为八肽, 因为九肽中的两个半胱氨酸合起来为一个胱氨酸。它们都是具有二硫键的二十元环。这两种多肽激素都可人工合成。两者的第 3、8 位氨基酸不同。它们的生物活性都可被胰蛋白酶破坏, 也都受半胱氨酸还原剂的影响。

1. 催产素 人、牛、羊、猪、马及鸡的催产素 (oxytocin) 的结构相同, 见图 3-21, 等电点为 pH 7.7。

催产素有种属特异性, 它的生理作用是能使多种平滑肌收缩(特别是子宫肌肉), 具有催产(使妊娠子宫收缩, 分娩胎儿)及使乳腺排乳的作用。使用 1:120 亿的剂量已能引起离体子宫的收缩。

孕酮可以抑制催产素的作用。

2. 加压素 加压素 (pitressin) 或称后叶加压素 (vasopression) 或称抗利尿激素 (antidiuretic hormone, 即 ADH), 人、猴、牛、马、羊、大鼠、狗及鱼的加压素含精氨酸; 猪的加压素则无精氨酸, 而有赖氨酸。等电点为 pH 9.0。加压素的氨基酸序列如下:



加压素无种属特异性, 它能使小动脉收缩, 从而增高血压, 并有减少排尿的作用, 所以也称为抗利尿激素。它是调节水代谢的重要激素。

催产素与加压素因其结构十分相似, 很可能来源于共同的祖先激素 (ancestral hormone)。

(四) 下丘脑激素

下丘脑分泌几种激素释放因子及释放抑制因子以调节垂体前叶的功能, 控制促甲状腺激素、促性腺激素、促肾上腺皮质激素及生长激素的分泌。举例如下:

1. 促甲状腺激素释放因子 促甲状腺激素释放因子 (thyrotropin releasing factor, 即

TRF)为焦谷-组-脯组成的三肽激素(见图 8-11),它促进促甲状腺激素(TSH)的分泌。

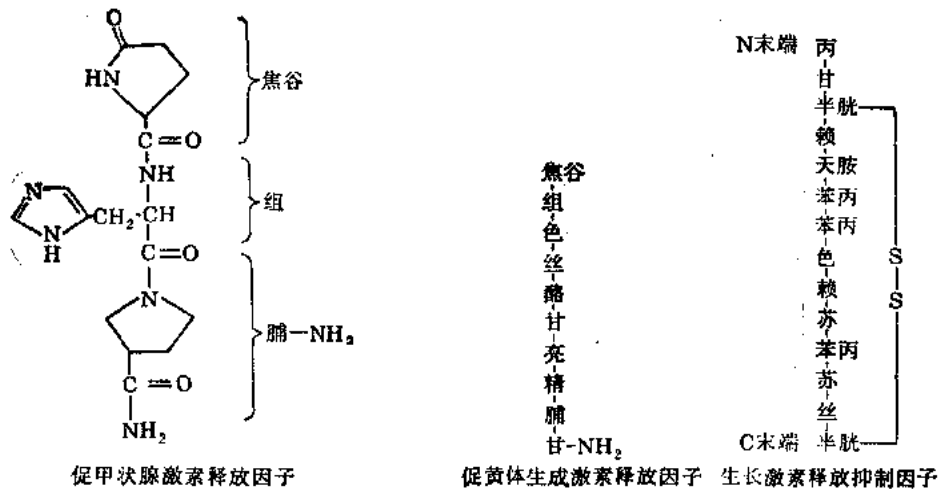


图 8-11 促甲状腺激素释放因子、促黄体生成激素释放因子及生长激素释放抑制因子的一级结构

分子中 N-端的焦谷氨酸残基可避免氨肽酶的破坏, C-端有酰胺, 可以防止羧肽酶的作用, 这是某些多肽激素的结构特征。

2. 促黄体生成激素释放因子(LRF) LRF 分子中第一位的焦谷和第 10 位的甘氨酸参与和受体的结合, 第 6 位的甘氨酸处于 β 转角处, 对维持激素的发卡式构象起关键性作用。

这种释放因子的分泌受卵巢功能的影响比受垂体的影响更明显和更直接。卵巢分泌的雌性激素(孕酮及雌二醇)对 LRF 等的分泌有负反馈抑制作用(见图 8-12)。

3. 促肾上腺皮质激素释放因子(CRF) CRF 是一个 9—11 肽, 它促进垂体前叶释放 ACTH。

4. 生长激素释放抑制因子(GRIF, 也称 somatostatin) GRIF 分布广泛, 首先从下丘脑分离得到, 是一个多功能的抑制因子, 不仅抑制生长激素的分泌, 而且抑制胰高血糖素及胃肠道激素, 并促进胰岛素的分泌。它是世界上第一个通过遗传工程手段, 从大肠杆菌中获得的人工多肽。我国现已成功地将它的基因克隆到猪、牛、鱼中。

GRIF 是由 14 个氨基酸残基组成的短肽, 带一个二硫键, 其氨基酸序列为: H_3N^+ -丙-甘-半胱-赖-天胺-苯丙-苯丙-色-赖-苏-苯丙-苏-丝-半胱- COO^- 。可用于治疗肢端肥大症及高血糖症。1977 年已将人工合成的 GRIF 的基因与细菌质体 DNA 重组后转化到大肠杆菌中, 生产大量的 GRIF。

(五) 脑肽

α 、 β 、 γ -内啡肽(endorphin)的一级结构分别相当于 β -LPH 的 61—71、61—91、61—77 的氨基酸序列, 它们具有很强的类吗啡活性。

Met- 及 Leu-脑啡肽(enkephalin), 都是五肽, 也都是具有类吗啡作用的活性肽。Met-脑啡肽氨基酸序列为: 酪-甘-甘-苯丙-蛋, Leu-脑啡肽第五个氨基酸不是蛋氨酸, 而是亮氨酸。

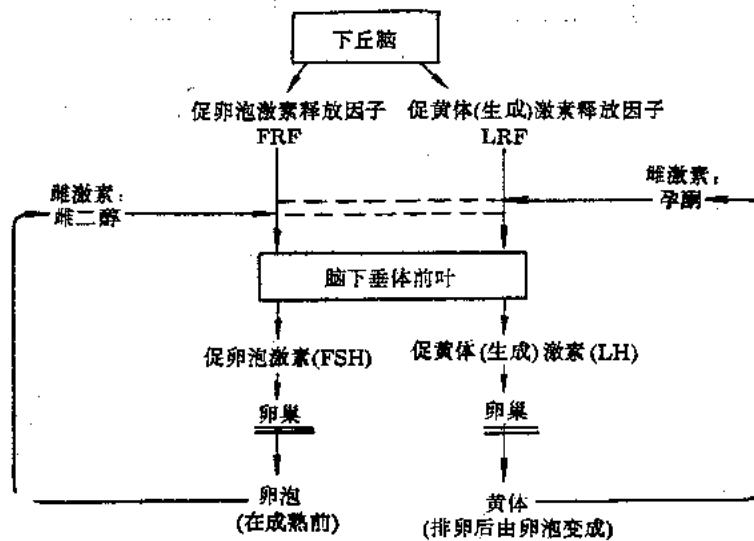
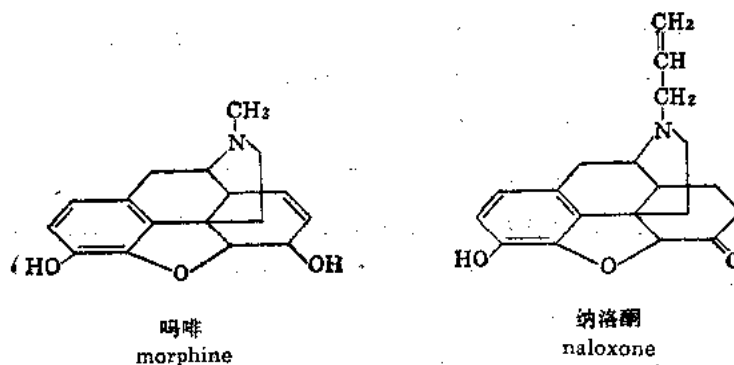


图 8-12 雌激素(孕酮及雌二醇)对某些下丘脑释放因子的反馈抑制作用

Met-脑啡肽与 β -内啡肽(31肽)的前五个氨基酸的序列相同;不过, β -内啡肽的这五个氨基酸后面没有成对的碱性氨基酸。所以,它们之间的关系目前尚不清楚。 β -内啡肽的氨基酸序列为: H_3N^+ -酪-甘-甘-苯丙-蛋-苏-丝-谷-赖-丝-谷胺-苏-脯-亮-缬-苏-亮-苯丙-赖-天冬胺-丙-异亮-缬-赖-天冬胺-丙-组-赖-赖-甘-谷胺- COO^- 。

对于这些肽类的生物学功能的研究,将我们带到目前正蓬勃开展的新领域——神经生物学和神经精神病学中。例如,向脑室中注射内啡肽,使实验动物发生十分显著的反应:引起全身在几小时期间深度地失去痛觉、在这段间隔中体温降低,更进一步,动物的行为变得木僵并呈现向外牵张的姿势(stretched-out posture),内啡肽的这些效应在几小时内会消失,动物又再表现出正常的行为。在对动物施以吗啡的拮抗剂纳洛酮(naloxone)几秒钟后,内啡肽的作用可以逆转,不再有上述失去痛觉等反应。



由内啡肽等诱导而出的行为效应表明这些肽可能正常地参与感情应答的调节作用。

二、胰岛及甲状旁腺等的激素

(一) 胰岛素(insulin) 胰岛 β 细胞直接由 mRNA 转译出来的产物,是前胰岛素原

(preproinsulin), 经专一性蛋白酶水解, 失去 N-端富含疏水性氨基酸的肽段(由 20—30 个氨基酸组成, 称为信号肽), 成为胰岛素原(proinsulin)。胰岛素原再经肽酶激活, 失去由约 30 个氨基酸组成的 C 肽, C 肽中含较多的谷氨酸及甘氨酸, 最后形成有很高生物活性的胰岛素。

已通过三条途径对胰岛素 A、B 链的基因(或胰岛素原, 即 ABC 链的基因)进行 DNA 重组克隆取得成功, 获得活性胰岛素。目前, 世界上遗传工程产品中有一半左右都是胰岛素等具有很高经济价值的蛋白质类激素及免疫产品。愈来愈多的任务摆在从事生物工程技术研究的科学家面前, 更进一步的改造任务——用蛋白质工程手段去改造和研究胰岛素, 也已在进行之中。

胰岛素最显著的生理功能是: 一方面提高组织摄取葡萄糖的能力; 另一方面抑制肝糖原分解, 并促进肝糖原及肌糖原的合成。因此胰岛素有降低血糖含量的作用。胰岛素的这种效应称为“低血糖(hypoglycemia)效应”。在正常情况下, 当出现血糖升高的信号时, 胰岛素的分泌在短时间内增加。如当饭后血糖升高时, (见图 8-13)胰岛素的分泌也略有升高; 当出现血糖过低的信号时, 则肾上腺素、胰高血糖素(还有糖皮质激素及生长激素)的分泌增多。当胰岛受到严重破坏, 胰岛素分泌显著减少时, 血糖升高, 尿中有糖排出, 发生糖尿病; 若胰岛机能亢进, 则出现血糖过低现象, 能量供应不足, 甚至能影响大脑机能。

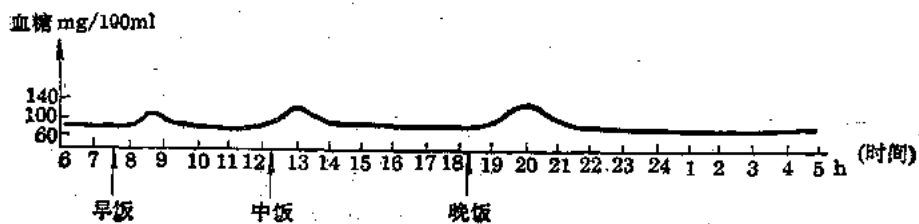


图 8-13 正常人一天内典型的血糖变化

胰岛素促进组织摄取葡萄糖的能力, 很可能是由于它具有影响细胞通透性的效应。而降低血糖的作用, 则由于胰岛素具有抑制细胞内腺苷酸环化酶的效应。肾上腺素与胰高血糖素引起 cAMP 的增加, 而胰岛素却相反, 引起细胞内 cAMP 的减少, 同时还引起 cGMP 的增加。

胰岛素促进肌肉、肝脏和脂肪组织中的合成代谢, 抑制其中的分解代谢。特别是增高糖原合成、脂肪酸合成和蛋白质合成的速度。它抑制糖原裂解、脂肪酸裂解等分解过程。胰岛素还降低一些酶的浓度, 如丙酮酸羧化酶和果糖 1, 6-二磷酸酶, 进而减少糖原异生作用。

胰岛素的生理效应早为人知, 对胰岛素的作用机理则一直还不为人们所认识。以前, 人们曾经常观察到这样的现象: 当胰岛素与肌肉细胞及脂肪细胞接触后, 葡萄糖分子就易于渗入。因此, 多年来曾设想过靶细胞的细胞膜上可能有胰岛素受体。后来, Cuatrecasas 等人的实验证明了这一点, 但发现细胞膜上胰岛素受体并不多, 一克肝的膜蛋白只有 30 微克胰岛素受体; 一个脂肪细胞仅结合 10 000 个胰岛素分子就已达饱和, 其密度为每平方微米细胞膜上约有 10 个胰岛素受体。用一种非离子去污剂(triton $\times 100$)可将受体自脂肪细胞膜中抽提出来, 再用胰岛素亲和层析柱分离, 纯度提高 25 万倍, 测知分子量为 300 000, 它与胰岛素结合非常紧密, 所形成的复合物的解离常数很低(约为 10^{-10} mol/L) 半寿约 16 分钟。胰岛素受体是整合

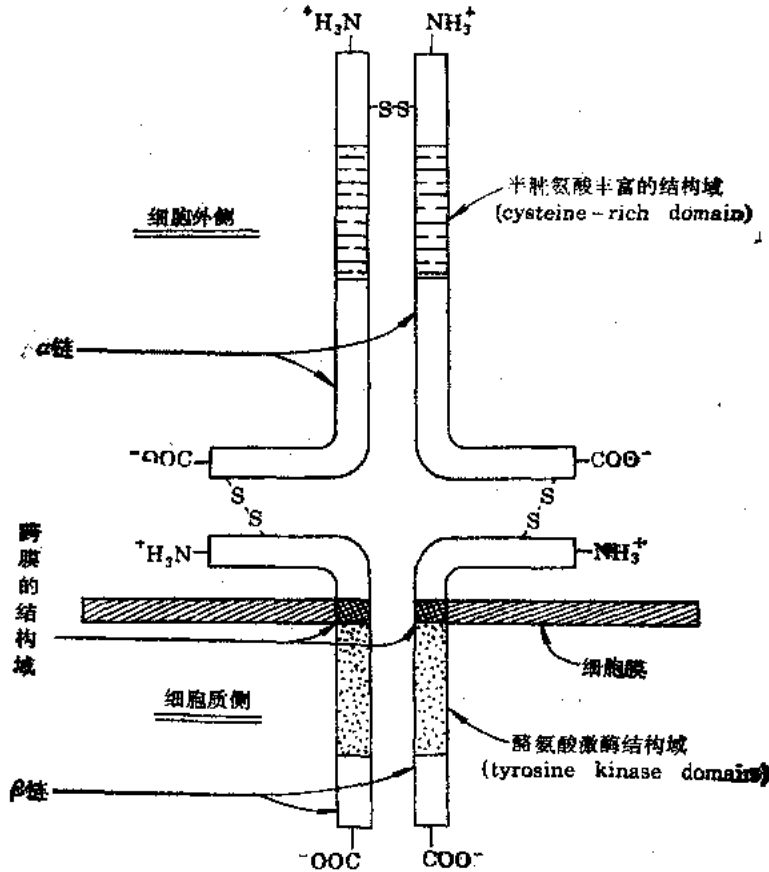


图 8-14 胰岛素的受体($\alpha\beta-\alpha\beta$)

注意 α 链及 β 链在细胞膜上的位置

在细胞膜上的一个糖蛋白，由两个 α 链(135kd)和两个 β 链(95kd)通过三个二硫键联结而成，见图 8-14。 α 链处于细胞膜外侧， β 链则穿过细胞膜。从纵剖图可以看到，此受体由左右各一个 $\alpha\beta$ 单位组成，每一个 $\alpha\beta$ 单位都从一个具有 1382 个氨基酸残基的单链前体衍生而成。这个前体由一段信号肽为起始端，后面接着 α 亚基的序列，再接着高度碱性的四肽，最后为 β 亚基的序列。当 Arg-Lys-Arg-Arg 序列被一种蛋白加工酶 (processing protease) 识别并进行加工，除去之后， α 链与 β 链得以分开。

在弄清胰岛素受体结构的基础上，近年来在受体研究中得到另一个重要的成就：发现胰岛素等激素的受体以及有些生长因子(如上皮生长因子 EGF 等)的受体也是酶——酪氨酸激酶。胰岛素受体本身所包含的酪氨酸激酶的结构域处于受体的 β 链的细胞质侧部分中。胰岛素的结合位点在受体的 α 链上，即在受体的细胞膜外的、外缘侧上面。一旦胰岛素结合到受体的结合位点上后，就打开了受体的酪氨酸激酶活性。接着，已活化了的受体就自动地对每条 β 链上的作为催化位点的两个酪氨酸残基进行磷酸化。这种自动自身磷酸化作用，增大了这个激酶对激素的靶细胞中靶蛋白质上的酪氨酸残基进行磷酸化的容量。自动磷酸化作用的另一个关键作用是在这种情况下，甚至如果胰岛素从受体上解离下来，激酶的活性仍不下降(见图 8-15)。但是，当 cAMP 级联反应起作用，活化蛋白激酶 A，以及当磷酸肌醇级联反应起作用

(见第四节), 活化蛋白激酶 c , 这两种激酶又再去磷酸化丝氨酸残基和苏氨酸残基时, 胰岛素受体的酪氨酸激酶的活性就大大降低。实验已经指出, 胰岛素通过其受体的促进磷酸化作用是与胰岛素发挥其生理效应是平行的。因此, 受体的酪氨酸激酶活性是发挥激素效应所必不可少的。

目前, 人们的研究方向转于研究受体的基因、受体的结构与功能, 以及胰岛素与受体的相互作用等方面。人们用胰蛋白酶对胰岛素受体进行酶解, 分析酶解片断, 得出氨基酸序列; 人们也人工合成相应于上述肽段的寡聚核苷酸。这些寡聚核苷酸可作为肽段的 cDNA, 进一步克隆到适当的载体中, 再转化到接收细胞(感受态细胞)中, 扩增, 以获取较大量的 DNA, 供深入研究使用; 这些寡聚核苷酸也可经放射性同位素标记, 用作分子杂交的探针, 探索受体的关键部位, 并研究不同来源的受体在结构上以及在结合激素的效率上的差别; 还可以对这些寡聚核苷酸片段进行定点突变, 以侧重于研究某些氨基酸残基在有功能的受体中的作用。随着研究的发展, 人们还提出许多深入的问题, 例如, 胰岛素结合到受体的膜外部分上, 它是如何诱导出受体膜内部分的酪氨酸激酶的活性的? 活化的受体对靶细胞中哪一些蛋白质进行磷酸化修饰? 这些磷酸化了的靶蛋白质如何地具有多重的促生长效应和多重的代谢效应的? 等等。

对于回答上述问题, 科学家在探索某些生长因子的结构与功能时, 受到启发。Rita Levi-Montalcini 研究了神经生长因子(nerve growth factor, NSF)。这是一种在脊椎动物的交感神经元和感觉神经元的发育中起着关键作用的、具有生物活性的蛋白质分子, 它由两条 13kd 的 β 链组成, β 链来自于颌下腺。最初合成出来的是无活性前体: $\alpha_2\beta_2$ 复合物, 经除去 γ 亚基-蛋白酶和 α 亚基-蛋白酶的抑制剂后, 才 $\beta\beta$ 聚合, 形成有活性的分子。

Stanley Cohen 在继续对 NSF 进行研究时, 偶然幸运地发现了另一种很有意义的、控制真核细胞生长的因子——表皮生长因子(EGF, epidermal growth factor)。通过对 EGF 的研究, 可以使人们对胰岛素分子如何使受体活化, 发挥出酪氨酸激酶活性有进一步的认识。Stanley 在将 NGF 粗制品注射到新生小白鼠之后, 发现此粗制品并不影响神经元的生长及分化, 而是使预先成熟的眼睑打开和预熟的牙齿冒出, 从而发现有一种新的生长因子——EGF 存在。EGF 为一个 6kd 的 53 肽, 它刺激表皮细胞及上皮细胞的生长。由一个有 1 168 个氨基酸残基的前体, 经对碱性氨基酸残基处(Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Arg)发生断裂衍生而成, 其氨基酸序列见图 8-16。

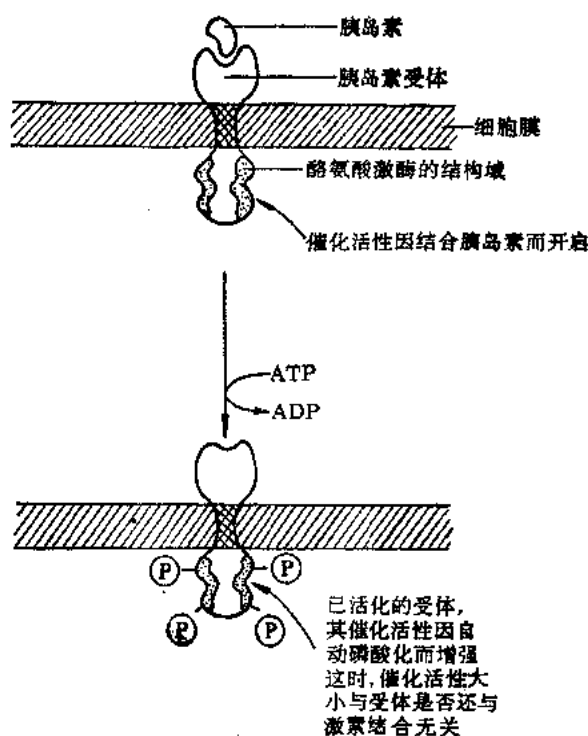


图 8-15 胰岛素受体的酪氨酸激酶活性因自动磷酸化作用而进一步增强激活

脏,并不促使肌糖原分解。它结合到肝细胞膜上的胰高血糖素结合位点后,激活腺苷酸环化酶,从而增加 cAMP 的浓度。cAMP 又促使肝中磷酸化酶 a 的浓度增高。这种连续反应的过程则与肾上腺素的级联放大是相同的。

胰高血糖素的受体不是糖蛋白而是脂蛋白。当未与受体结合时,激素分子的空间结构是易变的,没有特定的构象,而与受体结合时,则表现出与受体互补的构象。

(三) 甲状旁腺激素、降钙素及 1, 25-二羟胆钙化醇

甲状旁腺激素(parathyroid hormone, 即 PTH)是由甲状腺附近的甲状旁腺所分泌的,它和降钙素是另一对作用相反的多肽激素(降钙素,见 434 页,过去认为是由甲状旁腺产生的),都作用于骨基质及肾脏,共同调节钙磷代谢,使血中钙磷浓度相对稳定。前者的功能为升高血钙,后者为降低血钙。

牛甲状旁腺激素的分子量为 9500,由 84 个氨基酸组成,甲状旁腺机能减退时,血钙含量下降,患者肌肉痉挛,四肢抽搐。注射甲状旁腺激素后,恢复正常。相反,如果甲状旁腺机能亢进,则发生脱钙性骨炎及骨质疏松症。

降钙素分子量为 3800,由 32 个氨基酸组成。尚未发现有降钙素分泌过多或分泌过少引起的疾病。降钙素可以用来治疗原因不明的婴儿高血糖症以及因甲状旁腺素分泌过多而引起的成人高血钙症。

1, 25-二羟胆钙化(甾)醇(1, 25-dihydroxycholecalciferol)又称为 1, 25-二羟维生素 D₃,也是一个激素,由肾脏分泌,它是由 25-羟维生素 D₃受“促激素”(甲状旁腺激素)作用转变而成。它能促进小肠上皮细胞中钙离子携带蛋白的合成,从而增强小肠对钙离子的吸收。

(四) 胸腺素

胸腺素(thymosin)是由胸腺合成并分泌的一种蛋白质类激素。牛胸腺素有 I、II 两种形成。在体内 I 型含量比 II 型高,II 型为 49 肽,其一级结构已经测出。胸腺素的主要功能是增强免疫力,它促进胸腺中原始的干细胞或未成熟的 T 淋巴细胞分化成为成熟的、引起细胞免疫作用的 T 淋巴细胞。

初生婴儿血中的胸腺素含量最高,一直维持到 20 岁左右,才逐渐下降。这时胸腺重量也逐渐减轻。到 40 岁左右时,胸腺接近于萎缩。45 岁以后,血中胸腺素含量则极低。60—80 岁时,胸腺几乎完全退化。如果切除新生小鼠胸腺,其免疫功能下降,注射胸腺素则延长手术后小鼠的寿命。

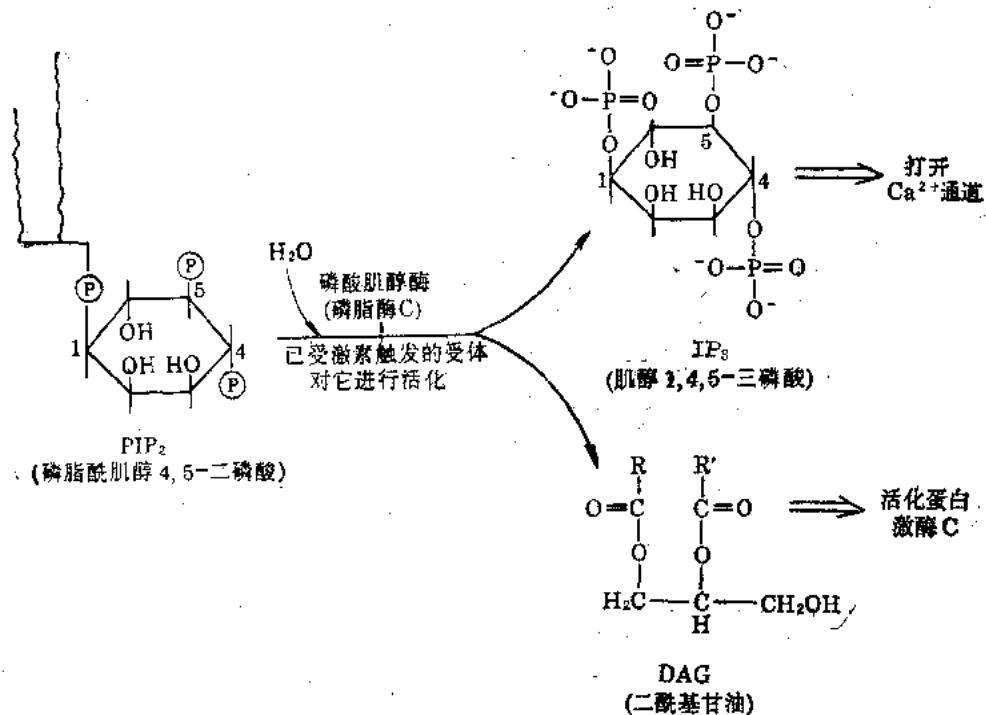
(五) 胎盘中的含氮激素。

1. 绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin, CG)是一种糖蛋白,排于尿中,可作为妊娠检查的指标。生理作用与孕酮相似。

2. 耻骨松弛素(relaxin)也是一种糖蛋白,分子量为 90 000。其主要作用是促使耻骨的联合松弛,便于分娩时胎儿通过。

耻骨松弛素、及胰岛素样生长因子(IGF)两者生理功能虽很不相同,但是它们的空间结构却十分相似,形成疏水内核的氨基酸残基也极其相似,一级结构中也都有带二硫键的 20 元环,

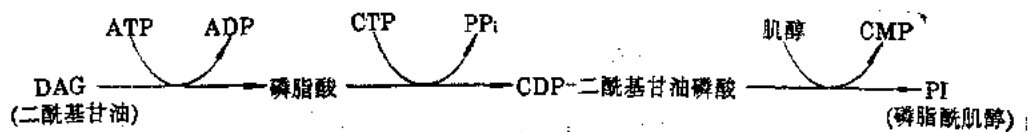
激素如 5-羟色胺, 结合到细胞表面的受体上, 引起结合在膜上的磷酸肌醇酶活化。此酶又称为磷脂酶 C 或磷酸肌醇磷酸二酯酶。它催化连接磷脂酰肌醇单位与酰基化甘油的磷酸二酯键水解, 使 PIP_2 裂解成 IP_3 及 DAG:



G 蛋白参与这个过程, 实验证据之一是白喉毒素 (pertussin toxin) 抑制这个级联作用 (见 429 页关于白喉毒素可见本书下册“转录”一章)。G 蛋白在活化的受体与磷酸肌醇酶之间传递信息, 开启酶的活性。

IP_3 是一个短寿命的信使, 只维持几秒钟。它可以在三个磷酸酶的顺次作用下形成肌醇, 首先失去 5-磷酸基, 随即失去它的信使作用; 然后再失去 1-磷酸, 最后失去 4-磷酸。另一方面, IP_3 又可以进一步磷酸化, 由 1, 4, 5- IP_3 转变为 1, 3, 4, 5-四磷酸肌醇, 这个产物可水解产生一个 IP_3 的异构物: 1, 3, 4-三磷酸肌醇; 这个 1, 3, 4- IP_3 进一步顺次脱去 1-, 4-, 3-磷酸基后也转变为肌醇。

DAG 一方面可以被磷酸化, 形成磷脂酸, 此磷脂酸再与 CTP 反应, 生成 CDP-二酰基甘油磷酸。另一方面, 它可以被水解; 生成甘油以及两个参与组成 DAG 的脂肪酸。通常, PIP_2 分子中占据在甘油部分的 2-位上是一个二十碳的不饱和脂肪酸——花生四烯酸 (arachidonate)。它是一系列前列腺素激素 (eicosanoid hormone 见本章第六节脂肪族激素) 的前体。因此, 由磷酸肌醇的代谢途径产生出许多分子, 这些分子具有信号的作用。



二、磷酸肌醇级联的两个细胞内信使——IP₃ 将钙离子释放到细胞质中, DAG 活化蛋白激酶 C。

IP₃ 打开细胞内部膜结构上的 Ca²⁺ 通道,使 Ca²⁺ 释放到细胞质中,引起一系列效应,例如平滑肌收缩等。

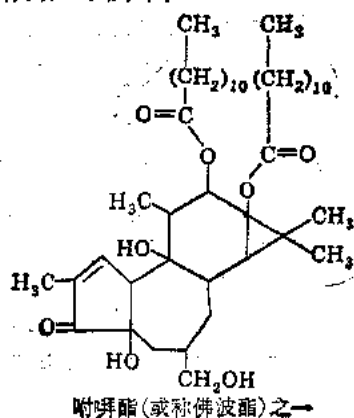
对 IP₃ 进行研究,将 IP₃ 由微注射加到细胞内或将 IP₃ 加到其细胞膜已经受过处理可以通透的细胞的外面之后,发现 Ca²⁺ 从细胞内的贮藏所——内质网以及肌肉中的肌质网中迅速地释放出来,致使细胞质中 Ca²⁺ 水平升高,由此又触发许多过程,例如前面提到过的平滑肌收缩以及糖原裂解和胞吐现象(exocytosis)等。事实上,注射 IP₃ 到非洲爪蟾的卵母细胞中,足够于激活许多受精作用的早期活动,例如释放颗粒(granules)和开启细胞膜上的离子通道等。微摩尔水平以下的 IP₃ 可使 Ca²⁺ 从细胞内的贮藏所,通过直接地打开内质网膜和肌质网膜上的钙通道移出到细胞质中。

DAG 活化蛋白激酶 c。活性蛋白激酶 c 将存在于许多种靶蛋白质中的丝氨酸残基和苏氨酸残基磷酸化,从而改变这些靶蛋白质的生物活性,失活或活化。例如糖原合成酶被蛋白激酶 c 磷酸化后,停止合成糖原。

在 IP₃ 作用下,细胞质中 Ca²⁺ 水平升高, Ca²⁺ 水平的升高进一步又促使糖原合成酶活性升高。然而,蛋白激酶 c 的作用却使 IP₃ 诱导增高糖原磷酸化酶活性的过程适宜地终止。事实上, DAG 与 IP₃ 的大部分效应都是协同的。

N. Yasutoni 发现,蛋白激酶 c 只有在有 Ca²⁺ 离子存在,并且有磷脂酰丝氨酸存在时,才具有酶促活性。二酰基甘油活化蛋白激酶 c 的实际机理是:由于 DAG 极大地增加了蛋白激酶 c 对于 Ca²⁺ 的亲合性,因此使得蛋白激酶能在 Ca²⁺ 离子的生理水平上被活化。蛋白激酶 c 是一个 77 kd 的酶,具有一个催化结构域及一个调节结构域。DAG 结合到蛋白激酶 c 上,逆转着酶的调节区造成的抑制作用,使酶能发挥其催化活性。

甾萜酯类(phorbol esters)的作用揭示了蛋白激酶 c 在控制细胞的分裂和增殖方面的重要性。甾萜酯类的结构如下所示,它们是巴豆油(croton oil)转变生成的多聚环状醇的衍生物。这些酯类是致癌的(carcinogenic)物质,是肿瘤的促进剂(tumor promotor)。它们类似于二酰基甘油,因此可以激活蛋白激酶 c;而又不像二乙酰基甘油那样容易降解,所以这种激活作用是持久的。甾萜酯类的结构如下所示:



三、具有螺旋区-泡区-螺旋区结构(EF手图象)的钙传感器家族的成员之一——钙调蛋白(Calmodulin, CaM)。

前面已经介绍了磷酸肌醇放大作用。由于蛋白激酶c可以激活许多酶,就不难理解 DAG 可以引起多重效应;那么, IP_3 怎样能引起多重效应呢?也就是说为什么要打开 Ca^{2+} 通道以及钙调蛋白的结构与功能是怎样的?

人们早已知道钙离子与许多生理活动过程有关,是许多信号传导途径(signal-transducing pathway)中的细胞内信使。100年前英国人就已发现只有在含 Ca^{2+} 的循环溶液中离体的蛙心才能继续搏动,以后几十年内人们又陆续地发现细胞收缩、胞吐、胞饮、糖原代谢、神经递质释放、染色体运动,乃至细胞死亡等都与 Ca^{2+} 有关。为什么自然界选择这个离子去介入如此多的生理过程和信号传递过程?

首先,细胞内 Ca^{2+} 离子的浓度可以大幅度地发生变化。细胞内 Ca^{2+} 的浓度必然是维持在很低的水平上,因为细胞内含有高度丰富的磷酸酯,而磷酸钙又是相当难溶解的。所有的细胞均有排挤 Ca^{2+} 的运输系统。平时,在未被激动的细胞内,细胞质中 Ca^{2+} 的水平典型地为 $0.1\mu\text{mol/L}$,比外环境中的浓度低几个数量级。这种十分悬殊的浓度差为细胞提供了接受信号的机会:为了达到传递信号的目的,可以于一瞬间内打开细胞膜中的或细胞内膜中的钙通道,骤然地升高细胞质中的 Ca^{2+} 的水平。

Ca^{2+} 还具有第二个特点,使它成为极其合适的细胞内信使:带负电荷的氧(来自于谷氨酸和天冬氨酸侧链)和不带电荷的氧(主链羰基上的)都能很好地结合于 Ca^{2+} 上。 Ca^{2+} 具有可以与多个配体——6至8个氧原子进行协合的能力,使 Ca^{2+} 能够和一个蛋白质的不同的片段发生交联,并使它能够诱导蛋白质发生巨大的构象改变。而且, Ca^{2+} 的结合还高度地受到选择。因为它的潜在竞争者 Mg^{2+} 与不带电荷的氧原子的亲和性较差;并且,不像 Ca^{2+} 那样地可以形成具有较大半径的、不对称的复合物。 Mg^{2+} 只倾向于形成小的、对称的壳状复合物。因此, Ca^{2+} 能很好地结合到蛋白质内的不规则形状的罅隙中,并能在比 Mg^{2+} 浓度低1000倍的情况下优先地受到选择。

X-射线晶体衍射法对那些结合钙的蛋白质进行研究的结果,阐明了这些传感器是如何发挥其功能的。有人从鲤鱼肌肉中提取出一种称为帕佛清蛋白(parvalbumin)的蛋白质,这个12kd的蛋白质有8个氧原子,分别地来自于三个天冬氨酸(提供4个羧基氧)、一个谷氨酸(提供2个羧基氧)、一个主链羰基(提供1个羰基氧)和一分子结合态水分子(提供1个水分子中的氧),这些氧原子等同地与每一个 Ca^{2+} 结合。这个蛋白具有两个相类似的结合 Ca^{2+} 的位点。在二级结构中这种位点由这个蛋白质的 E(α 螺旋)区和 F(α 螺旋)区以及结合着 Ca^{2+} 的泡区所构成,它们的相对位置就象右手的大拇指与食指夹着一个吸 Ca^{2+} 区那样。Robert Kretzweil称这种螺旋区-泡区-螺旋区的结构为EF手图象(如图8-20所示),并主张帕佛清蛋白的两个结合钙的位点是由同一个编码结合钙离子的泡的原始基因复制后形成的。他还发现肌钙蛋白(troponin)与帕佛清蛋白的氨基酸序列相似,并预言肌钙蛋白中也有EF手图象。后来,X-射线晶体衍射指出在肌钙蛋白和其他的结合钙的蛋白质中,确实都有EF手图象。所以,EF手图

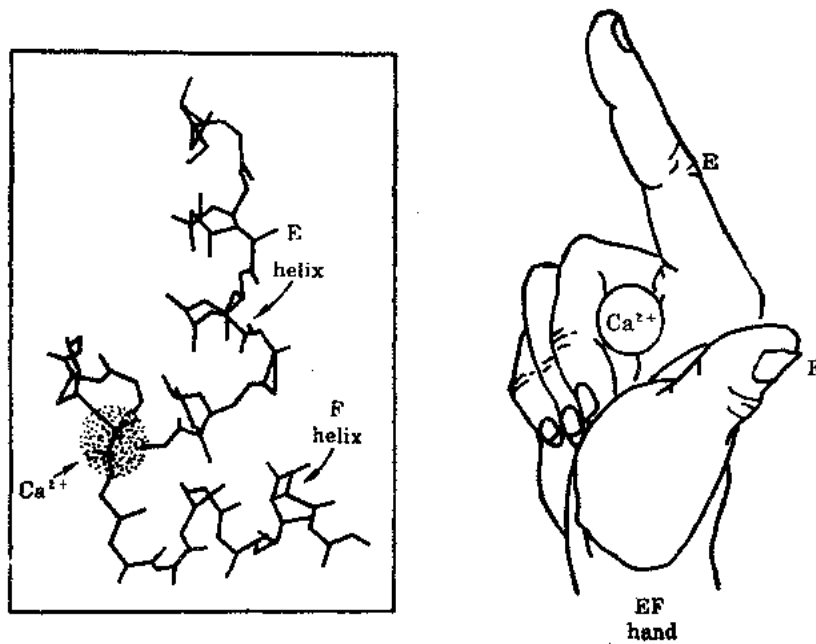


图 8-20 EF 手图象

许多钙结合蛋白中的钙结合位点都由一个“螺旋区-泡区-螺旋区”的结构单位组成

象与这类蛋白质的结合钙的功能相关。

钙调蛋白(CaM), 是钙传感器家族——结合钙的蛋白质中的一种约 17kd 的成员。它存在于几乎所有的真核细胞中, 对于任何微量的钙都能敏感地捕获。

CaM 的一级结构, 以牛脑的钙调蛋白为例, 它是一条由 148 个氨基酸残基组成的多肽链, 分子量 16 700。它的氨基酸序列已得到阐明(见图 8-21)。CaM 分子内有四个可以结合钙离子的结构域, 这些结构域的结构类似, 特别是 I, III, IV。此次是酸性蛋白质, 等电点为 4.0, 近 $\frac{1}{3}$ 的氨基酸是酸性的谷氨酸和天冬氨酸; 不含有易氧化的 Tyr、Cys, 因此分子相当稳定, 特别耐热, 190°C 下可以保留完全的活性; 缺乏二硫键及羟脯氨酸, 这可能为 CaM 的多功能提供了结构基础。脊椎动物的钙调蛋白在 115 位都含有一个三甲基赖氨酸, 这是翻译后的修饰产物, 它可能起着增加 CaM 与靶酶亲合力的作用。钙调蛋白的一级结构在进化上呈现很强的保守性; 不同真核生物的 CaM 显现免疫交叉反应, 即使原生动物如梨形四叶虫的 CaM 与脊椎动物的 CaM 相比, 也只有 11 个氨基酸残基被取代, 1 个缺失。这种惊人的保守性只在组蛋白中见到。对此可以从钙调蛋白具有多方面的生物功能加以解释, 人们推测, CaM 结构上若发生突变是很容易致死的, 因而在进化中它始终保持着结构上的保守性。

它的二级结构, 是两个类似的球状叶片通过一段肽链的连接而组成整个的分子。在每一个球叶中含有两个 Ca^{2+} -结合位点; 每个结合位点是 12 个氨基酸残基组成的腔式结构, 半径约 0.1nm, 两旁连接着两条相互垂直的由 8 个氨基酸残基组成的 α -螺旋, 此即前面提到过的 EF 手。两个 EF 手单位之间(I-II, III-IV)彼此相距 1.1nm。在一个球叶中的两个 Ca^{2+} -结合位点对 Ca^{2+} 具有很高的亲合性, 而在另一个球叶中的位点则亲合性较低。 Ca^{2+} 结合到亲

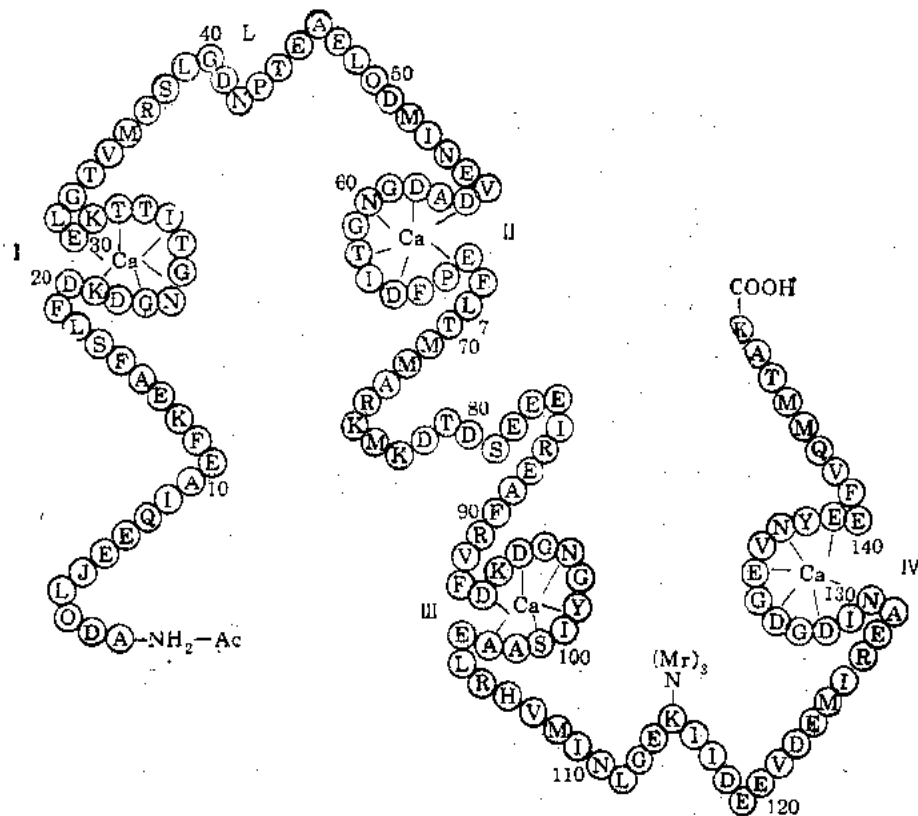


图 8-21 牛脑 CaM 的一级结构(氨基酸残基用单字母码表示)含有 I、II、III、IV 四个 Ca^{2+} 结合域; α -螺旋区用粗黑圈表示

合性较低的两个位点上, 激活钙调蛋白, 使钙调蛋白再去刺激促进其他的酶。分光光度研究和

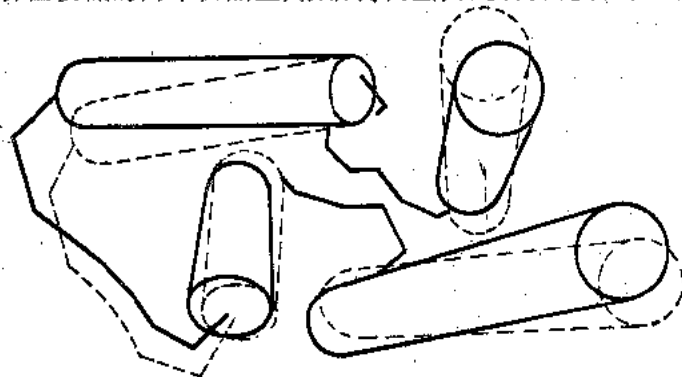


图 8-22 假设在 Ca^{2+} 结合到一对螺旋区-泡区-螺旋区 (EF 手) 单位之后诱导出的构象改变

图中虚线所表示的是在 Ca^{2+} 结合之前的假设结构

模型建构研究的结果给出这样的看法: 当 Ca^{2+} 结合到 E 螺旋区和 F 螺旋区之间的泡区时, 引起每个螺旋在它的轴线附近旋转并改变其所在位置(见图 8-22)。这种改变可能使得钙调蛋白转变为一种对于靶蛋白质具有很高亲和性的构象。

如上所述, 钙调蛋白只有在结合 Ca^{2+} , 形成 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 复合物后, 才有生物活性。 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 复合物可以以两种方式调节代谢: (1) 直接地与靶酶起作用;

(2) 通过活化依赖于 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 复合物的蛋白激酶起作用。

受钙调蛋白调控的酶目前已知至少有 15 种, 另外还有许多生理活动受它的协调, 分别介绍如下:

1. 调节环式核苷酸代谢

细胞内有多种类型的水解 cAMP、cGMP 的磷酸二脂酶, 其中被 CaM 活化的磷酸二脂酶

最近已被提纯。

依赖于 CaM 的腺苷酸环化酶已从脑神经胶质瘤等细胞中分离纯化。

钙调蛋白对磷酸二脂酶和腺苷酸环化酶的影响主要是增加最大反应速度 V_{max} ，而对 K_m 值则影响不大。

2. 调节 Ca^{2+} 的代谢

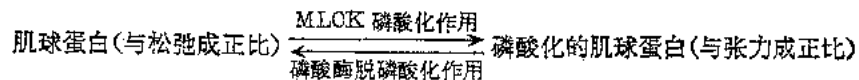
钙调蛋白不仅将 Ca^{2+} 信息传递给不同的酶，同时也通过它对 Ca^{2+} -ATPase 活性的控制来调节胞内 Ca^{2+} 浓度，CaM 增加 Ca^{2+} 泵对 Ca^{2+} 的亲合力及 Ca^{2+} 的吸收效率。

当细胞受激素或神经脉冲刺激后，质膜上的 Ca^{2+} 通道被打开，或 Ca^{2+} 同时也从胞内 Ca^{2+} 库（如线粒体或网膜系统中释放，致使胞内 Ca^{2+} 浓度于瞬间内极大地提高，形成 Ca^{2+} -CaM 复合物，此复合物与膜的 Ca^{2+} -ATPase 结合，酶活力因而提高 6—7 倍，活性运转 Ca^{2+} 的能力也大大增强，这样又降低 Ca^{2+} 浓度，使胞内 Ca^{2+} 迅速地又恢复到兴奋前的稳态水平。

3. 细胞运动、收缩体系与细胞形状

肌动蛋白与肌球蛋白是广泛分布的、与细胞收缩有关的蛋白质。肌球蛋白受 CaM 调节，它的可逆磷酸化影响平滑肌和非肌细胞如血小板、巨噬细胞的收缩。

CaM 作为 Ca^{2+} 的受体蛋白，活化 MLCK 酶（肌球蛋白轻链激酶），MLCK 使肌球蛋白轻链磷酸化后，发生构型变化，从而可以与肌动蛋白作用，触发产生 ATPase 活性，ATP 水解又为收缩提供必要的能量。



4. 糖原的代谢

CaM 不仅调节细胞收缩成分，也调节收缩时必要的能量供应。

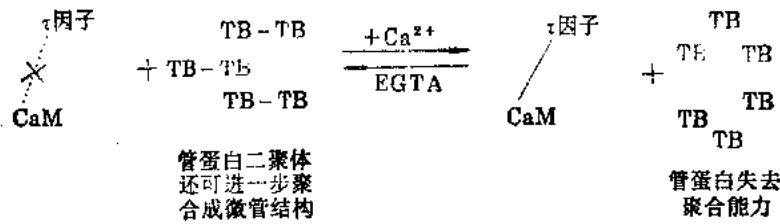
细胞兴奋时，胞内 Ca^{2+} 浓度于瞬间内有很大的提高，在触发收缩的同时， Ca^{2+} -CaM 也活化磷酸化酶激酶与糖原合成酶，这种双重调节作用，使糖原迅速分解成葡萄糖，为进一步收缩提供能量。

磷酸化酶激酶由 α 、 β 、 γ 和 δ 四个亚基组成。 α 、 β 是调节亚基， δ 亚基本身就是 CaM，它不依赖于 Ca^{2+} 地与其他亚基结合在一起。而另外有一分子 CaM，则以依赖于 Ca^{2+} 的形式结合在 α 、 β 亚基上一旦结合，使酶活性提高五倍。

5. 细胞分裂与核酸代谢

CaM 参与细胞分裂调控。CaM 的水平对 DNA 合成前期 (G_1 期) 向 DNA 合成期 (S 期) 的转变起关键作用，抑制 CaM 可使细胞生长阻断在 G_1 -S 期的转换上。进一步，有人发现在病毒、激素或化学致癌诱发的转化细胞中，CaM 的含量都增高 2—3 倍，而且 G_1 期大大地缩短了。

在细胞分裂的间期 (G_2 期)，CaM 主要与微丝束（含有肌动蛋白）结合，而进入有丝分裂期 (M 期) 后，则浓聚在极粒与染色体之间的半纺锤体上，促使微管解聚，这对于分裂后期染色体运动是必需的。CaM 可以通过翻转机制 (flip-flop)，调节微管解聚：在有 Ca^{2+} 存在时，CaM 与微管 τ 因子（一种蛋白质）与 CaM 结合，使管蛋白失去聚合能力；在无 Ca^{2+} 时， τ 因子不结合 CaM，而与管蛋白结合，管蛋白二聚体进一步再聚合形成微管结构。



这种翻转机制可能是 CaM 调节细胞的骨骼收缩成分的一般机理。

此外,发现 Ca^{2+} -CaM 还与受精过程有关。精子进入卵细胞后引起的第一个反应就是卵内 Ca^{2+} 浓度于瞬间之内突然地提高:受精后,早已注入卵中的水母发光蛋白的荧光强度增加 1500 倍(水母发光蛋白含有一个荧光生色团,结合了 Ca^{2+} 后发出荧光)。利用人工 Ca^{2+} 通道蛋白: A_{23187} 进行研究,认识到 Ca^{2+} 的导入也会导致卵活化。 Ca^{2+} -CaM 通过活化 NAD 激酶,活化一系列合成反应,为触发受精卵分裂、胚胎发育提供物质基础。

6. 神经递质的合成与释放

依赖于 Ca^{2+} -CaM 的蛋白激酶可以使得与神经递质合成有关的酶受到磷酸化,从而使它们得到活化。这些酶包括:与儿茶酚胺合成有关的酪氨酸-3-单加氧酶以及与 5-羟色胺合成有关的色氨酸-5-单加氧酶等合成反应的关键酶(限速酶)等。

兴奋使 Ca^{2+} 通道打开,神经、分泌组织中 CaM 含量往往很高, Ca^{2+} 与 CaM 形成 Ca^{2+} -CaM 复合物,复合物再与依赖 Ca^{2+} -CaM 的蛋白激酶结合,进一步磷酸化神经系统中的突轴体膜、突轴后膜、囊泡膜上的两个专一性蛋白质(I_A 、 I_B),从而刺激神经递质的释放。

CaM 还通过影响微管的解聚而调节分泌颗粒的运动。胞吐过程,例如胰岛素分泌,巨大细胞的组胺分泌、血小板 5-羟色胺分泌等也受 CaM 的影响。

7. 前列腺素与磷脂代谢

前列腺素的代谢也受 CaM 的调节。在血小板中, CaM 刺激磷脂酶 A_2 的活性,也调节血栓素 A_2 等的代谢,导致血小板聚集,血管收缩;另一方面,前列腺素降解的第一步反应的酶:15-羟基前列腺素脱氢酶也受 CaM 调节,这是至今发现的唯一一个酶活力受 CaM 抑制的酶。

Ca^{2+} -CaM 还调节甲基转移酶所催化的膜磷脂酰乙醇胺的甲基化,生成磷脂酰胆碱。

8. 调节植物细胞代谢

CaM 参与控制叶绿体光系统 II 的电子传递等。

9. 钙调蛋白是细胞代谢调控的综合剂

如上所述,目前已知至少有 15 种代谢上重要的酶受 CaM 调节。其中特别重要的是它对各种代谢调节剂,如激素(包括前列腺素)、神经递质、细胞内第二信使(cAMP, Ca^{2+})等的直接或间接的调控作用。

以上几种代谢调节剂在空间、时间上有互补作用。如激素负责细胞间通讯, Ca^{2+} 、cAMP 则为细胞内信使;从时间上来看,激素作用时间在分、小时,乃至以天计算,而环式核苷酸则在秒、分的范围。 Ca^{2+} 因无需重新合成,适于快速反应,反应时间在毫秒级。

鉴于 CaM 对这些代谢调节剂所起的修饰作用,有人称它为细胞代谢调控的综合剂。特别

是它作为细胞内 Ca^{2+} 的受体,既调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度,又媒介 Ca^{2+} 的功能,同时还调节第二信使 cAMP 的合成与分解。因此,在第二信使调节体系中, CaM 处于中心的地位。钙调蛋白就因它在代谢调控中如此重要的地位,被人誉为是自70年代发现与发展 DNA 重组以后,分子生物学中最重要的发现。

第五节 甾醇类激素

肾上腺皮质、性腺及胎盘分泌的激素都属于甾醇类激素。

各种甾醇类激素分别是妊娠炔(也称孕炔,如肾上腺皮质激素及黄体激素),雄炔(如雄激素)或雌炔(如卵泡激素)的衍生物,上述三种炔核的结构为带有不同侧链的环戊烷多氢菲的衍生物:

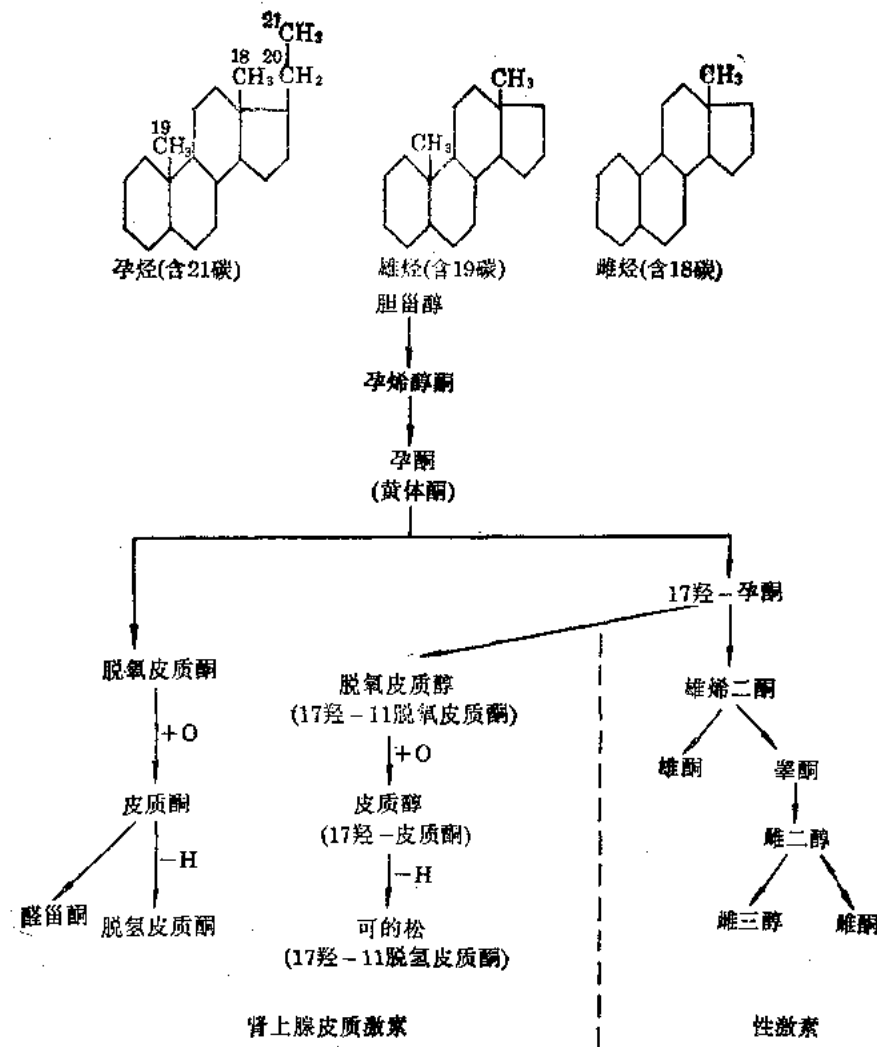


图 8-23 肾上腺皮质激素及性激素的生物合成途径

各种甾醇类激素的生成过程,开始时都相同,由胆甾醇(含27碳)转变成孕酮(含21碳),然后再由孕酮分别生成其他激素,见图 8-23。

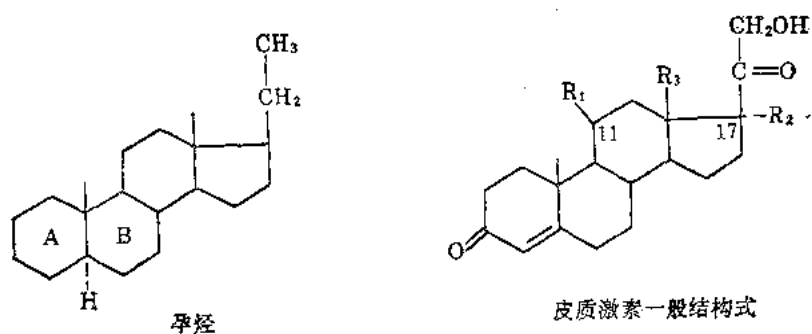
下面分别介绍几种激素。

一、肾上腺皮质激素

肾上腺皮质占肾上腺全重的三分之二左右，从中可提取出数十种甾醇类结晶。其中有7种成分统称为肾上腺皮质激素，它们可以矫正因切除肾上腺而出现的致死的症状。另外还有一些雄性激素(肾上腺雄酮)及雌性激素(孕酮及雌酮)。

(一) 结构

皮质激素是妊娠甾的衍生物(妊娠甾即孕甾，甾体母核中A、B环为反型，本应称为别孕甾，但在激素命名中，可不用别字)，7种皮质激素都含有21个碳原子。孕甾的结构及皮质激素的一般结构式如下：



式中： R_1, R_2 见表8-6， R_3 甾甾醇为 $-CHO$ ，其他均为 $-CH_3$ 。

表8-6 肾上腺皮质激素

皮质激素			侧链基团	
简称	化学名称	英文名称	R_1	R_2
1. 脱氢皮质酮(DOC)	11-脱氢皮质酮	deoxycorticosterone	$-H$	$-H$
2. 皮质酮	同左	corticosterone	$-OH$	$-H$
3. 脱氢皮质醇	11-脱氢皮质醇	11-dehydrocorticosterone	$=O$	$-H$
4. 醛甾酮	同左	aldosterone	$-OH$	$-H$
5. 脱氧皮质醇	17羟-11脱氧皮质醇	deoxycortisol	H	$-OH$
6. 皮质醇(氢化可的松)	17羟-皮质醇	cortisol	$-OH$	$-OH$
7. 可的松(皮质素)	17羟-11脱氢皮质醇	cortisone	$=O$	$-OH$

(二) 分类及功能

皮质激素按其生理功能可以分为糖皮质激素和盐皮质激素两类。这两类激素的化学结构相似，其调节糖代谢及水盐代谢的生理活性有所交叉(见表8-7)。

1. 糖皮质激素 主要生理功能是抑制糖的氧化，促使蛋白质转化为糖，调节糖代谢，升高血糖，并能利尿，大剂量的糖皮质激素还有减轻炎症及过敏反应的功能。这类激素主要有皮质醇及可的松，此外，皮质酮也有一定的作用。

表 8-7 几种皮质激素生理效价的比较

激 素	增皮质激素活性	盐皮质激素活性	抗 炎 作 用
可的松(皮质激素)	1	1	1
皮质醇	1.55	1.5	1.5
皮质酮	0.54	2.55	0.5
脱氧皮质酮(DOC)	0	15	0
醛甾酮	0.3	600	?

注：表中实验动物为去肾上腺皮质大鼠。皮质激素活性及抗炎作用的活性均以可的松为1。

2. 盐皮质激素 主要生理功能是促使体内保留钠及排出钾,调节水盐代谢。其中以醛甾酮的生理效应最强,脱氧皮质酮比它小30—120倍,皮质酮则效应更小,且兼有一定的糖皮质激素活性。

醛甾酮对钠的再吸收作用可以从图8-24中看出,当醛甾酮进入肾细胞后,与细胞质中的醛甾酮受体蛋白结合,这个复合物再移动到染色体上,形成特异的mRNA,这个mRNA又合成特异的蛋白质。醛甾酮诱导蛋白(称为AIP)。这个蛋白质对钠泵起作用,Na⁺由肾细胞向血液中移动。使Na⁺的平衡移向血液,达到储钠的作用。

切除肾上腺时,机体发生严重的蛋白质、糖、脂肪代谢障碍和严重的水、盐代谢障碍,钾在组织中积聚,肝糖原和血糖含量急剧降低。

给正常家畜注射肾上腺皮质激素时,蛋白质和脂肪迅速分解,葡萄糖在血中急剧积聚,甚至可发生典型的糖尿病现象。

给病畜注射肾上腺皮质激素时,能消除因肾上腺病变或割除而造成的大部分障碍。糖皮质激素(可的松、皮质醇及皮质酮)能恢复肝糖原和血糖的水平。

垂体前叶激素中的促肾上腺皮质激素能刺激促进肾上腺皮质激素的生成。

二、雌性性激素

卵巢能分泌两类雌激素:(1)卵泡在卵成熟前分泌雌二醇(或称求偶素、动情素)等。(2)排卵后卵泡发育成为黄体,黄体分泌孕酮(或称黄体酮、妊娠酮)。

胎盘亦能分泌此两类激素,并且是妊娠后期体内孕酮的主要来源。

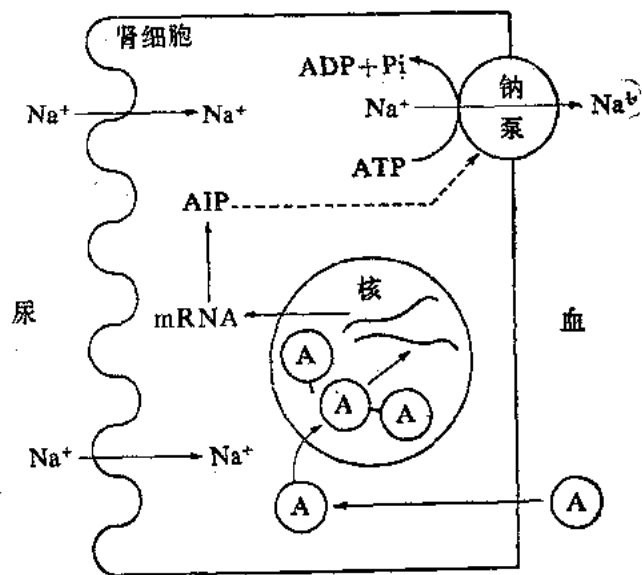
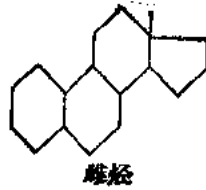


图 8-24 醛甾酮对储钠作用的示意图

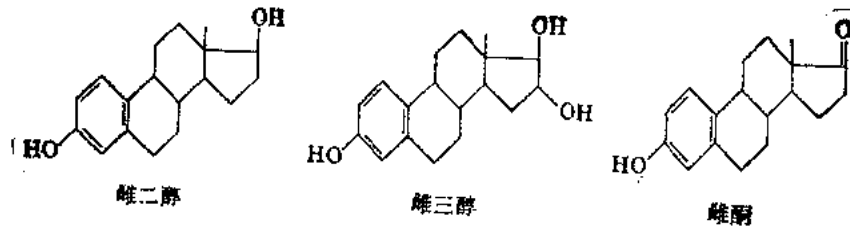
图中: A 为醛甾酮, A 为醛甾酮-受体蛋白复合物, AIP 为醛甾酮诱导蛋白

(一) 卵泡雌激素的结构及功能

卵泡雌激素是甾体的直接衍生物。



卵泡雌激素的结构如下:



雌二醇是卵泡激素中最重要的一个,它的激素作用最强;雌三醇活性最低。雌二醇的活性约为雌三醇的 200 倍、雌酮(又称卵泡素)的 6 倍,后两者可以看作是雌二醇的代谢产物,三种激素在体内可相互转变。

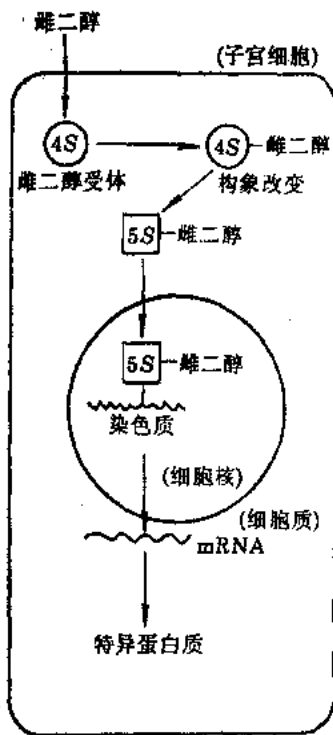


图 8-25 雌激素在子宫细胞中作用示意图

在脑下垂体前叶的促卵泡激素的控制下,卵泡发育成熟,排出卵子。卵泡本身形成雌激素,并于排卵前大量分泌出来。

雌激素的主要生理功能为: 促进雌性动物性器官的发育,使子宫肥大、动情、发生性欲; 促进副性器官(乳腺)的发育及产生月经等。卵巢切除后,输卵管、子宫、乳腺等器官即行萎缩。

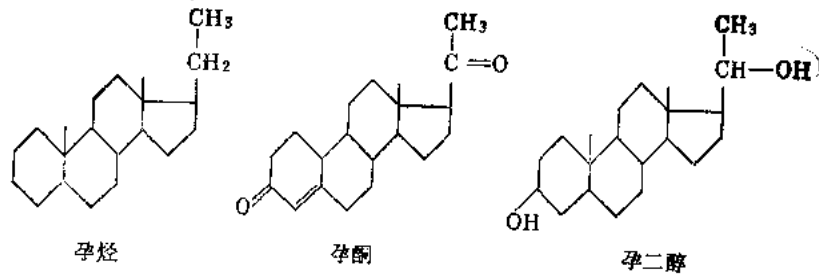
雌激素还对脑下垂体后叶分泌的催产素有协调作用。这类雌激素亦与体脂的分布和沉积有关。

雌二醇对子宫生长的促进作用的第一步是: 雌二醇穿过子宫细胞的细胞膜,与细胞质中的专一性受体相结合。这种受体已用亲和层析法提纯,其分子量为 200 000,沉降系数为 4S。雌二醇与受体结合得十分紧密,复合体的解离常数在 10^{-9} — 10^{-12} 之间,受体与激素结合后,其构象发生改变,沉降常数变为 5S。形成复合体后,雌二醇对 DNA 的亲合力大大增加。第二步,这个复合体从细胞质中移动到细胞核内,与染色质结合(见图 8-25),使原来转录活性不甚高的结构基因表现出极大的转录活性,合成出大量的专一性的 mRNA,再合成大量的特异蛋白质,从而

促进子宫生长。这种与受体作用的过程也见于其他甾醇类激素。

(二) 黄体的激素——孕酮的结构及功能

孕酮也称黄体酮(progesterone)是孕烯的衍生物,孕烯、孕酮及孕二醇(pregnanediol,无激素活性)结构如下:



孕酮由胆固醇转变而来,在体内可还原成无活性的孕二醇。孕酮是许多甾体激素的前身物质,见上图。

在研究鸡输卵管细胞中的孕酮受体时也发现,输卵管组织中孕酮受体与孕酮结合成复合体后,从细胞质中转移到染色质上,促使转录酶的活性升高,于是增加特异 mRNA 的形成,促进卵清蛋白(ovalbumin)及其他特异的卵蛋白质的合成。

机体内孕酮及雌二醇联合起作用,使月经及妊娠过程能够正常地完成。排卵前雌二醇分泌量出现高峰,于是子宫内膜迅速增厚,内膜血管迅速增生。排卵后垂体前叶的促黄体生成激素促使破裂的卵泡变成黄体,黄体分泌孕酮,于是孕酮分泌量出现高峰,孕酮又刺激子宫内膜形成适于接受受精卵的状态。此后,若卵子未受精,黄体即萎缩,子宫内膜增厚部分脱落,发生正常月经,此变化周期见图 8-26。若受孕,则孕酮继续分泌,这是受精卵安胎所必需的;同时还加快乳腺的发育,并阻止排卵、抑制动情、停止月经,减少子宫收缩等。孕酮对安胎的作用与脑下垂体后叶的催产素的作用相反。

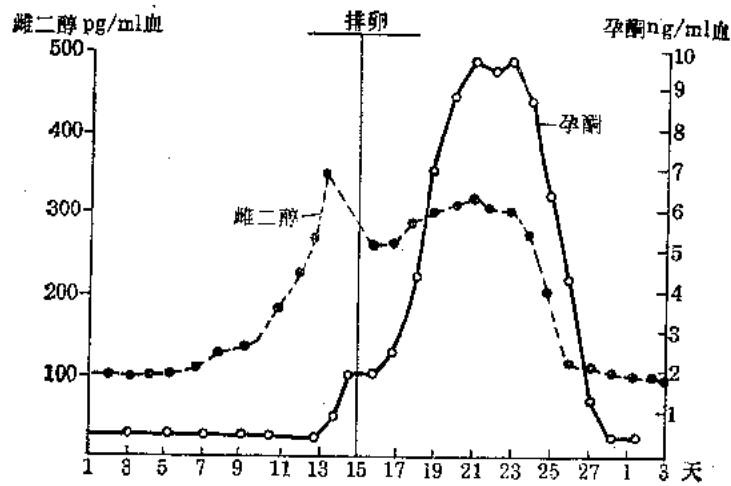


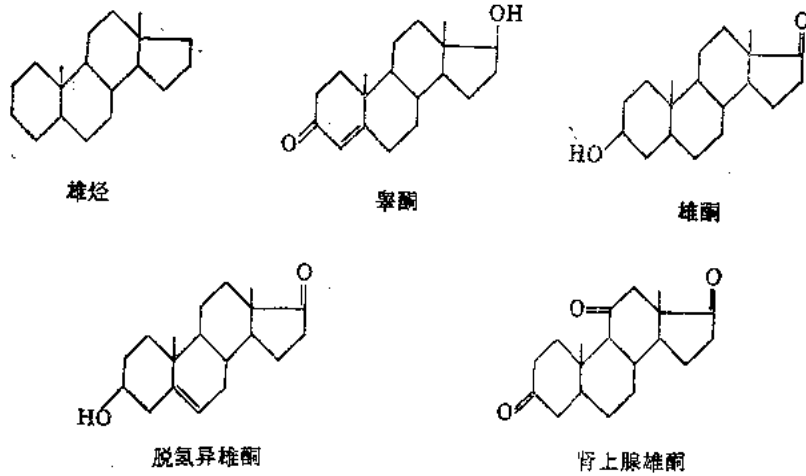
图 8-26 雌二醇及孕酮(人)分泌量的变化周期

三、雄性性激素

睾丸的间质细胞分泌的雄激素称之为睾酮(testosterone)。这是体内最重要的雄激素。它的主要代谢产物是雄酮(androsterone)。雄酮还可转变为脱氢异雄酮。

肾上腺皮质也分泌一种雄激素,称为肾上腺雄酮(androstenedione)。

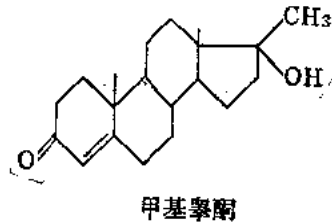
雄激素都是雄烃的直接衍生物。它们含 19 个碳原子(甲基睾酮除外),雄烃和这些激素的结构如下:



睾酮是活性最大的雄激素,它的激素活性约为雄酮的 6 倍。而脱氢异雄酮活性小,只有雄酮的 $\frac{1}{3}$ 。

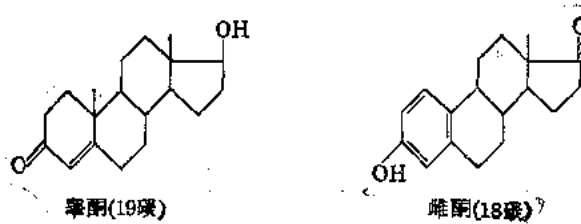
在正常动物中,睾酮和雄酮处于动态平衡状态,并不断相互转变,在肝脏可发生下列代谢:睾酮变成雄酮,再变成雄二酮最后生成脱氢异雄酮。

雄激素的生理功能为:注射给幼畜时可以促进其性器官的发育,促进精子生成和第二性特征的显现。在性成熟后注射雄性激素,能刺激动物发情,并维持雄性特征。在畜牧业中,普遍采用甲基睾酮作为天然睾酮的代用品,以治疗雄畜性机能不足等疾病。阉割公畜,公禽的睾丸,去除雄激素的分泌,可显著地减慢代谢氧化过程,沉着体脂,达到肥育的目的。



四、两类性激素间的相互关系

雄激素和雌激素在机体中作用虽然很不相同,但是它们在结构上是很相似的,特别是睾酮和雌酮之间更为相似:



二类性激素都是由胆固醇衍生而成的(中间经过孕酮),可以相互转变。雄性激素在机体内可变为雌性激素,由尿排出;雌性激素也可变为雄性激素,由尿排出。已经知道,不论雄性和雌性动物体内都存在着一定比例的雄激素和雌激素(如雄性动物的肾上腺皮质及睾丸能产生雄激素,亦能产生雌激素;雌性动物的肾上腺皮质及卵巢也能产生两类性激素)。这两类性激素之间存在一定平衡。在雄性中,平衡偏向于雄激素方面,所以在雄畜的尿中排出较多的雌酮;而在雌性中,平衡偏向于雌激素,所以在雌畜尿中雄性激素较多。这种规律已在医药和兽医方面得到实际应用。

第六节 脂肪族激素

我们在这节里介绍脂肪族激素——前列腺素。

几十年前,在人的精液中发现了前列腺素(prostaglandin 简称 PG),但只是在近十几年来才予以重视。发现它是对生理过程有着广泛影响的一类脂肪酸物质,有调节其他激素作用的功能。前列腺素广泛存在于哺乳动物的各种组织(如前列腺,子宫内膜,卵巢及脐带等)中,一些植物(如海藻、香蕉、甘蔗、椰子等)组织中也发现有不同种类的前列腺素或前列腺素前体。不过除在人和羊的精液中含量较高外(人:300 微克/毫升),在其他组织中含量均很低(约 1 微克/毫升)。

前列腺素(PG)实际上是一类具有生物活性的物质的总称,目前已发现的有几十种,它们的基本结构为含有一个环戊烷及两个脂肪酸侧链的二十碳脂肪酸,即前列腺烷酸(prostanoic acid)(详见第二章脂肪)。

由于环戊烷上的不饱和键位置或取代基不同,可将已知的前列腺素分为 E、F、A、B 四大类,其中在 C-9 有酮基、在 C-11 有羟基的称为 PGE,在这两处都有羟基的称为 PGF。 α 指 C-9 上羟基的构型,天然产生的 PGF 都是 α 型的。所有的 PG 都在 C-13 及 C-14 间有一个反式双键,在 C-15 处有一个羟基。右下角有时还标有小数字,表示侧链中双键的数目,如 PGF₁, PGE₂, PGE₃, PGF_{1 α} , PGF_{2 α} 及 PGF_{3 α} 。

前列腺烷酸及前列腺素的结构见图 8-27。

E₁ 及 F_{1 α} 二种前列腺素是从 48, 11, 14-二十碳三烯酸衍生出来的,见图 8-28;然而 E₂ 及 F_{2 α} 则是从 45, 8, 11, 14-二十碳四烯酸(花生四烯酸)衍生出来的,目前人工合成前列腺素,就是用花生四烯酸经环氧化酶 cyclo-oxygenase(羊胎精囊中含有此酶)作用,形成花生烷酸(见图 8-29),然而再衍生而成的。

近几十年来的研究发现,前列腺素是人体中分布最广、效应最大的生物活性物质之一。而且同一种前列腺素在不同组织中作用不同,同一种组织对不同的前列腺素反应也不同。前列腺素化学结构上微小的差异,所引起的生理效应却区别很大。前列腺素对全身各个系统,如生殖、心血管、呼吸、消化及神经等系统均有作用。例如,能使子宫及输卵管收缩,可用于引产;能溶解黄体可治疗持久性黄体,提高怀孕率;能使血管扩张或收缩;支气管平滑肌解痉;抑制胃酸分泌;还可调节各特殊器官血流量,控制离子对某些膜的穿透以及突触传递,抑制脂质分解等。

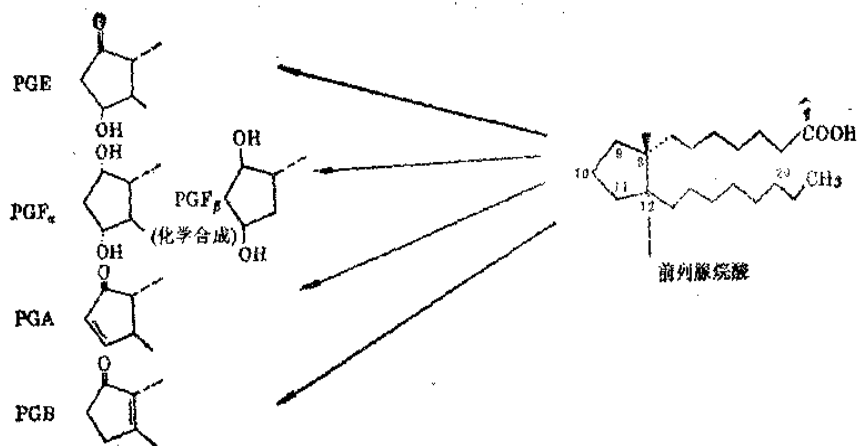


图 8-27 前列腺烷酸及各类前列腺素的化学合成

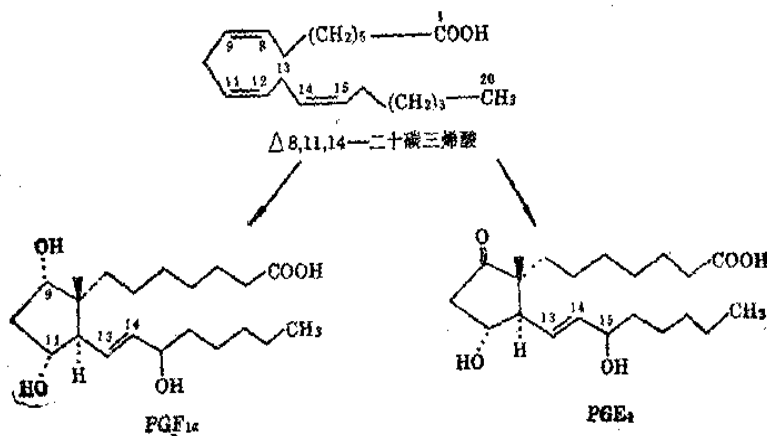


图 8-28 PGF_{1 α} 及 PGE₁ 的生成

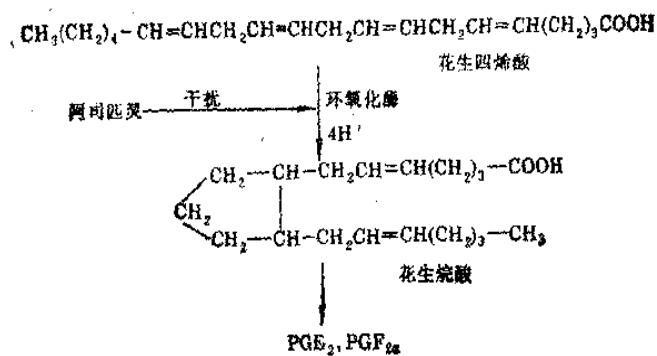


图 8-29 花生烷酸等的形成及阿司匹灵的干扰

前列腺素自身在机体内，并不作为激素起作用，而是通过对某些激素的调节来起作用。在机体各组织内，前列腺素是腺苷酸环化酶的抑制剂或激活剂。例如，前列腺素对脂解的抑制作用， PGF_2 通过抑制脂肪细胞中的腺苷酸环化酶，减少 cAMP 的形成，而限制了 TSH、ACTH、胰高血糖素、肾上腺素等激素的作用，从而抑制了脂肪的分解。而在另一些细胞中，则有增加形成 cAMP 的效应，如 ACTH 对肾上腺皮质的作用及 TSH 对甲状腺的作用就是通过前列腺素对环化酶的激活而增强的。

此外，还发现前列腺素有增加发炎的效应，而常用药物——阿司匹灵却可减少发炎，后来发现阿司匹灵可干扰前列腺素的酶促合成，见图 8-29。

至于前列腺素许多重要功能的分子生物学机理则有待于进一步研究。

第七节 激素分泌的调节

大多数激素对代谢过程有促进作用，也有少数激素具有抑制作用。在正常机体内，种类繁多、作用复杂的各种激素都有条不紊地发挥各自的效能。这种秩序依靠各种调节机能来实现。

一、上级内分泌腺对下级内分泌腺的调节，神经系统与内分泌的关系

垂体前叶可分泌四种促激素，它们分别对下级的肾上腺皮质、甲状腺及性腺具有刺激作用，见图 8-29。当后者分泌不足时，垂体前叶就加强分泌相应的促激素，这是一种调节。

现已知道，垂体前叶的分泌也不是自主的，它的分泌活动受到更上一级——下丘脑的控制。下丘脑正中隆起，附近的神经细胞末梢分泌几种促释放因子及抑制因子，这些因子进入下丘脑正中隆起的毛细血管，再经垂体门静脉系统进入垂体，起着促进或抑制垂体前叶的促激素的生成和分泌作用，人们称这样的一个过程为神经分泌作用（所产生的激素称为神经激素）。所以人们认为下丘脑既是植物性神经系统的较高级的中枢，自身又是一个内分泌器官。

当然，下丘脑的作用也不是完全自主的，而是受到更高级——大脑皮层的控制。例如，寒冷的刺激可以通过大脑皮层发出信号，使下丘脑产生和分泌 ORF（促肾上腺皮质激素释放因子），进而使 ACTH 分泌增加，最后导致肾上腺皮质激素分泌的增多。又如情绪长期过分紧张，可引起下丘脑分泌 TRF 的增加，致使甲状腺机能亢进，分泌过多的甲状腺素。以上整体调控作用见图 8-21。

上面讲了内分泌器官直接或间接地受神经系统的支配，同时内分泌器官所分泌的激素也可以反过来影响神经系统。明显的例子就是甲状腺激素及生长激素分泌不足或分泌过多，既影响机体的生长，也影响神经系统特别影响大脑的发育和机能。

三、负反馈作用

受激素调节的部位一般都冠以“靶”字，如肾上腺皮质是 ACTH 作用的靶腺体，肌肉细胞为胰岛素作用的靶细胞等，见图 8-30。

内分泌腺分泌的激素对靶细胞的代谢或功能有调节作用已如前述。靶细胞代谢活动的结

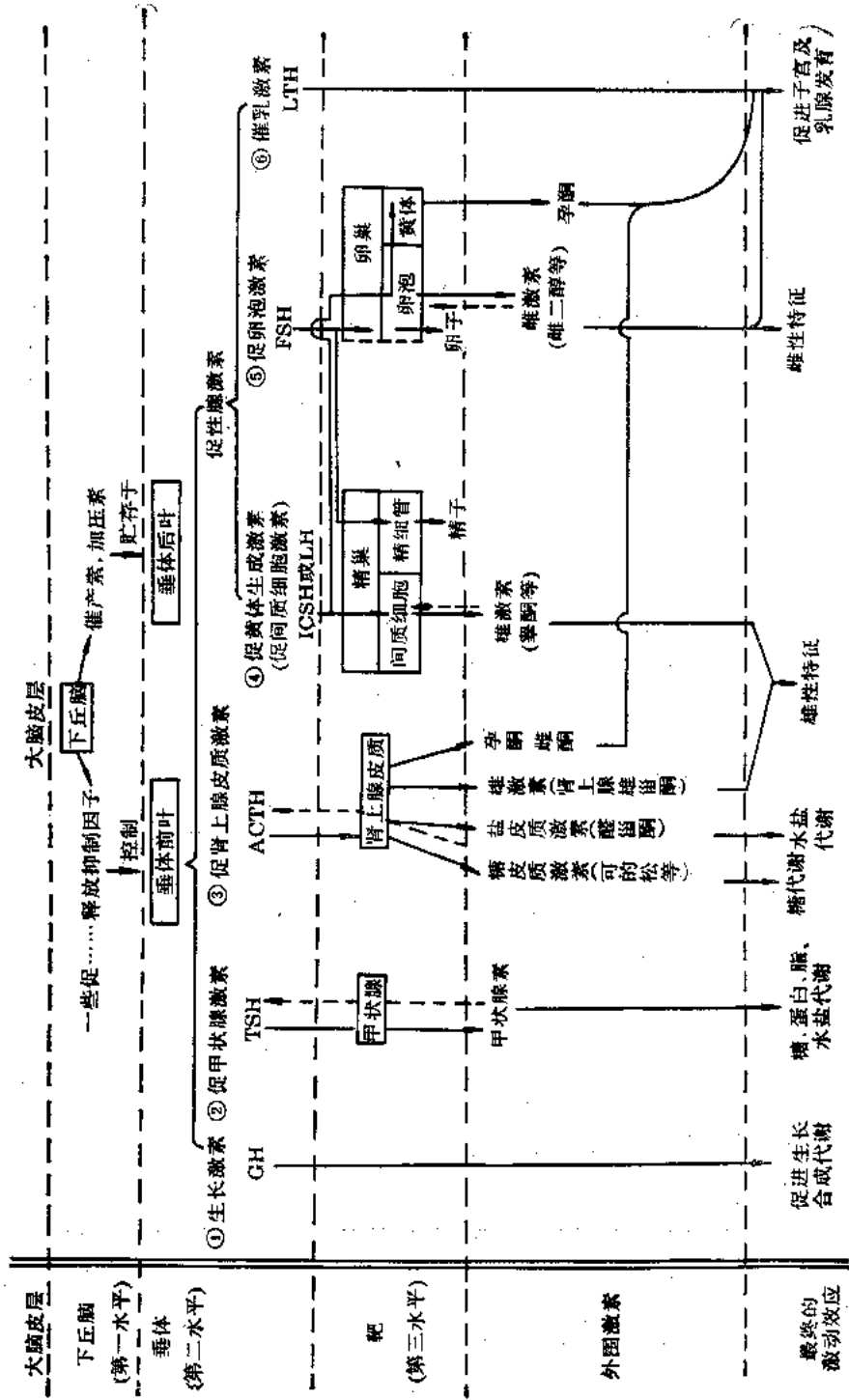


图 8-30 下丘脑-脑下垂体系统激素分泌的调节及最终效应 (↑虚线箭头为负反馈作用, 表示激素可以反向地抑制下丘脑的促... 释放抑制因子的分泌)

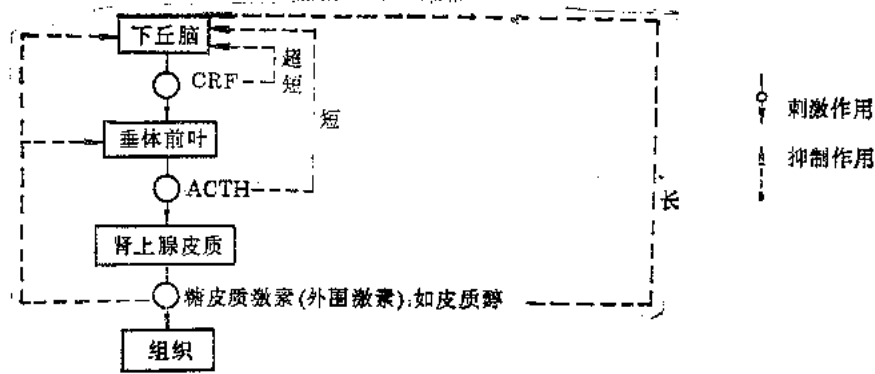


图 8-31 皮质醇对垂体前叶及下丘脑激素分泌的负反馈作用

果,如血液中代谢物浓度的变化,又反过来对内分泌腺的代谢或功能(例如激素的分泌)起调节作用。如血液中代谢物浓度的变化,又反过来对内分泌腺的代谢或功能(例如激素的分泌)起调节作用。这种作用称为反馈作用,由于这种作用往往是抑制性的,故称为负反馈作用。例如胰岛素引起血糖降低(因促进肌肉细胞对糖的利用),低血糖又反过来抑制胰岛分泌胰岛素(以降低糖的作用);又如甲状旁腺引起血钙升高,高血钙又抑制甲状旁腺的分泌。

以上这种负反馈作用不仅存在于内分泌腺与靶细胞之间,而且高级内分泌腺对它的低一级的靶腺体也需通过这种方式进行调节。例如肾上腺皮质分泌的皮质醇过多时,就可以反过来抑制下丘脑的 CRF(促肾上腺皮质激素释放因子)以及抑制垂体前叶的 ACTH(促肾上腺皮质激素)的分泌;同样,若血液中 ACTH 含量增加,也可以抑制下丘脑的 CRF 的分泌,这种作用可图解如图 8-31 人们把外围激素对下丘脑或垂体的调节称为长(负)反馈;将促激素对下丘脑的调节称为短(负)反馈;而下丘脑本身产生的激素对下丘脑的调节称为超短(负)反馈作用。

负反馈作用是机体对激素的产生和分泌进行调节的基本方式之一,通过这种方式维持激素浓度的相对稳定,保持对激素效应的控制。

关于一部分激素分泌的调节及最终效应见图 8-30。

三、酶的分步剪裁调控

有的激素经几个酶的作用,在不同水平上被分步剪裁而逐步被激活,激素的效应也就因酶的分步剪裁而得到调控。例如血管紧张素原,是一个十三肽。它通过肾素、转换酶的作用,生成血管紧张素 II(angiotensin II, 八肽)。血管紧张素 II 主要作用于血管平滑肌,使血管收缩。再经氨肽酶作用,生成血管紧张素 III(七肽)。后者对合成醛甾酮有较专一的作用,与水盐代谢有关。

四、多元调控

除以上三种调控外,有的激素还通过激素间的相互制约、依赖而受到调控,这种调控称为多元调控。

胰高血糖素、胰岛素分别由胰岛的 α 及 β 细胞分泌, 再加上下丘脑分泌的生长激素释放抑制因子, 三者相互制约、协调, 使体内血糖维持在较为恒定的水平上。

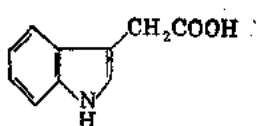
第八节 植物激素

植物激素是指一些对植物生长发育(发芽、开花、结实和落叶等)及代谢有控制作用的有机化合物。自 1934 年首次由植物中分离出化学纯的植物激素以来, 现在不仅已从植物中提取出许多植物激素, 而且还用化学合成方法制备了许多具有调节生长能力的化合物, 因此也常用含义更广泛的“植物生长调节物质”来代替“植物激素”的名称。

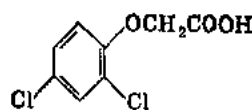
目前国际上公认的高等植物激素有五大类。

一、植物生长素

高等植物中最普遍存在的植物生长素(auxin)为吲哚乙酸(简称 IA 或 IAA)。扦插植物时用它处理后可大大提高存活率。但在农业上广泛使用的多为合成的植物生长素, 这些生长素包括萘乙酸(简称 NA 或 NAA), 低浓度使用可防止棉花及果树(除苹果)过早落花落叶; 2, 4-二氯苯氧乙酸(简称 2, 4-D), 低浓度处理蕃茄等花可提早结实, 增高产量; 吲哚丙酸(IPA); 吲哚丁酸(IBA); β -萘氧乙酸(β -NOAA)及 2, 4, 5-三氯苯乙酸(2, 4, 5-T)等。两种生长素的结构如下:



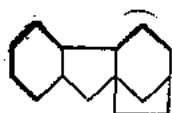
吲哚乙酸 (IAA)



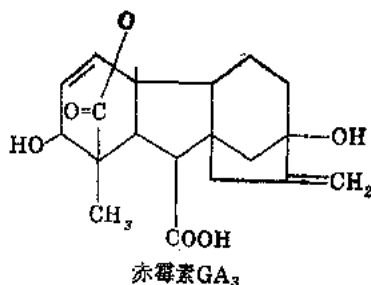
2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)

二、赤霉素

目前已发现有 40 多种赤霉素(gibberellin)。它们的化学结构都有一个赤霉核。赤霉核及赤霉素 GA_3 的化学结构式为:



赤霉核

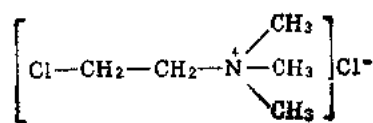


赤霉素 GA_3

赤霉素可以促进高等植物的发芽、生长、开花和结实。

云苔素, 其效力比赤霉素更高些。

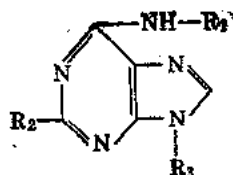
矮壮素(简称 CCC)是“抗赤霉素物质”,其结构式为:

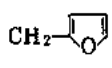
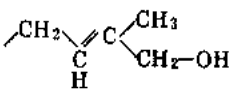
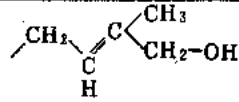


三、细胞分裂素

细胞分裂素(cytokinin)或称细胞激动素,是泛指具有与激动素有同样生理活性的一类嘌呤衍生物,它们促进细胞分裂和分化,普遍存在于植物体中。

激动素(kinetin 或 kinins, 即6-糠氨基嘌呤),它是早期在酵母中发现的化合物。玉米素(zeatin)是从受精15天的玉米种子中分离到的化合物,它们都是6-氨基嘌呤的衍生物。其结构为:

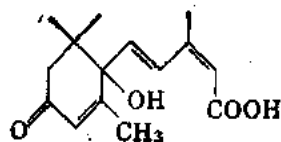


激动素	玉米素	ms-核糖基-玉米素
R ₁ 		
R ₂ H	H	H ₃ CS-
R ₃ H	H	核糖基

四、脱落酸

脱落酸(abscisic acid 简称 ABA)亦称离层酸。

年幼的绿色植物组织中,同时有脱落酸、赤霉素及细胞分裂素,而在衰老和休眠的器官中,只有脱落酸单独存在。脱落酸是植物生长抑制剂,可促使植物离层细胞成熟,从而引起器官脱落,其结构为:

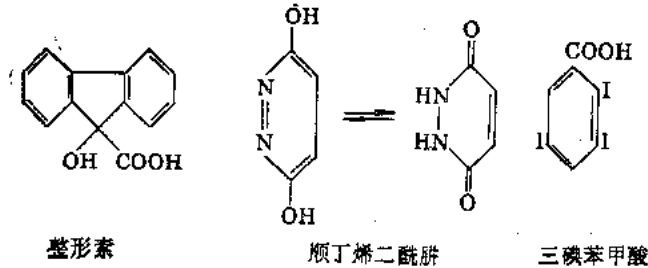


它也与赤霉素有拮抗作用。

五、乙烯

乙烯的作用是降低植物生长速度, 催促果实早熟。

此外, 还有一些合成的植物生长调节剂, 如乙烯利(ethrel)、整形素(morphactin)、石油助长剂、顺丁烯二酰肼(简称 MH, 又名青鲜素)及三碘苯甲酸(TIBA)等。



第九节 昆虫激素

昆虫激素发现得较晚(1937年), 但近十几年来这方面的研究工作发展十分迅速。

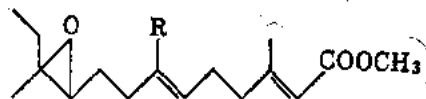
一、昆虫的内激素

昆虫的内激素是昆虫体腺体分泌的激素, 对昆虫的生长发育有很大的影响。

昆虫从卵到成虫的几个阶段都是受“返幼激素”和“蜕皮激素”两者协调的作用而控制的。这两者的化学结构都属于甾醇类物质, 它们又都受“脑激素”的控制。

(一) 返幼激素

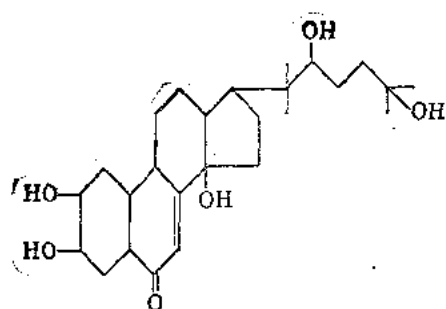
返幼激素又称保幼激素(juvenile hormone)由昆虫的咽侧体分泌, 主要作用为保持昆虫幼年时期的特性, 防止昆虫内部器官分化与变态, 即防止出现成虫的性状。一般快到化蛹时期, 昆虫就停止分泌返幼激素。若用返幼激素处理成虫, 常产生不孕现象。返幼激素及其类似物很可能成为防治害虫的比较理想的不孕剂。其化学结构为:



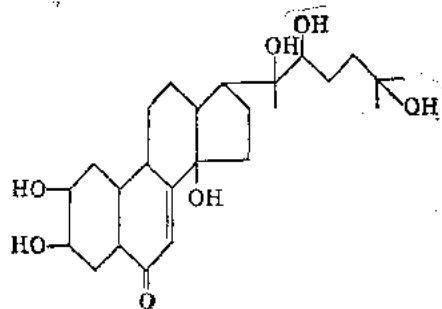
R: 在返幼激素 I 中是 C₂H₅, 在返幼激素 II 中是 CH₃。

(二) 蜕皮激素

蜕皮激素(molting hormone 或 ecdysone), 又称变态蜕皮激素。当返幼激素消失时, 它可使幼虫的内部器官分化、变态及蜕皮。成虫中不再有蜕皮激素存在。其化学结构如下:



α-蜕皮激素



β-蜕皮激素

(二) 脑激素

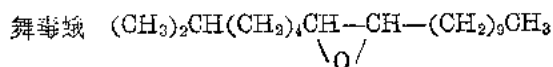
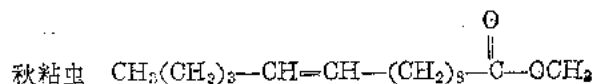
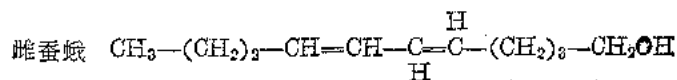
由前脑神经细胞分泌，促进蜕皮激素分泌，调节返幼激素及蜕皮激素作用，其化学本质尚未确定。

二、昆虫外激素

(一) 昆虫性外激素

它是由昆虫的成虫分泌的化学物质，分泌后分散在空气中，对同种的异性昆虫刺激与引诱。这种外激素被称为“性外激素”(sexpheromone)。因此，性外激素也是一种“性引诱剂”，可以用于防治害虫。

目前，已经弄清了家蚕、家蝇、蜜蜂、红铃虫等30种昆虫的性外激素的化学结构，有的是18碳烷烃的衍生物，如舞毒蛾的性外激素为顺-7,8环氧-2-甲基十八烷；有的是长链(12—18碳)不饱和醇的醋酸酯，如鳞翅目昆虫的性引诱剂，其中以12碳及14碳化合物为最多。这些激素中的十几种已能人工合成。几种昆虫外激素的结构如下：



(二) 其他

蜜蜂的蜂王产生的“母蜂物质”也属于外激素，它通过蜜蜂之间的相互接触，而粘染到幼蜂身上，从而抑制雌性幼蜂的卵巢发育，使这些幼蜂变成工蜂，其化学结构尚不清楚。

提 要

激素是生物体内产生的，通过体液或细胞外液运送到作用部位，产生特殊激动效应——调节控制各种物质代谢或生理功能，有利于多细胞的有机体统一成整体的一类微量的有机化合物。

激素按其化学本质主要可以分为两大类: 1. 含氮激素: 包括氨基酸衍生物类激素、多肽及蛋白质类激素; 2. 甾醇类激素: 肾上腺皮质激素、雌性性激素及雄性性激素。

多肽激素的分子常有以下几种特征: 1. 无游离的 N-端或 C-端, 2. 具有二硫键的二十元环, 3. 活性多肽两侧有成对的碱性氨基酸。

从激素的作用机理来看, 大多数的(也可能是全部的)激素都与它们的专一性的激素受体蛋白结合。激素的受体蛋白或是存在于细胞表面——细胞膜上, 或是存在于细胞质之中。激素与其受体的结合使细胞内产生讯息, 这种讯息促进或抑制某些物质的生物活性。

大部分激素结合到靶细胞的细胞膜的受体上, 形成激素-受体复合物。这种复合物再激活, 处于细胞膜内缘的 G 蛋白。G 蛋白家族是一组传递多种激素刺激和感觉的蛋白质。G 蛋白活化后, 进一步或是触发腺苷酸环化酶级联反应, 产生 cAMP 等一系列生化物质; 或是触发磷酸肌醇级联反应。

cAMP 作为一种调节分子, 在许多激素的作用机理中起着重要作用, 又称为第二信使。除肾上腺素、胰高血糖素外, AOTH、促性腺激素、甲状旁腺激素、降钙素及加压素也都是通过 cAMP 而起作用的, 反应极快。

钙调蛋白是一个存在于几乎所有的真核细胞中的、传感钙离子的蛋白质家族中的一个成员。某些激素作用触发磷酸肌酸级联, 这个级联反应的两种效应之一就是开启细胞内的膜系统上的 Ca^{2+} 通道, 升高细胞质中 Ca^{2+} 浓度, 钙调蛋白能结合 Ca^{2+} ——细胞内的另一种信使, 并被 Ca^{2+} 活化, 活化了的钙调蛋白再进一步去活化许多种酶, 完成多种生理效应, 如肌肉收缩、视觉传导等。

此外, 激素作用的第三种机理是通过刺激它受体中的酪氨酸激酶而起作用。现在通过对胰岛素-胰岛素受体的相互作用的研究对此机理已比较了解, 并又诱发出许多更令人感到兴趣的问题。某些致癌基因的作用机理也与此有类似之处, 进一步研究有助于揭露问题的本质。

甾醇类激素(如雌二醇、孕酮及皮质醇等)则是通过第四种机理而起作用的, 反应较慢。激素进入被作用的靶细胞内, 与受体结合, 激素-受体复合物由细胞质中转移到细胞核内。这种复合物本身是一种转录的增强物, 当它们结合到 DNA 中特定部位后, 引起大量地生成专一性的 mRNA, 导致合成出大量的特异蛋白质(如酶等), 从而调节代谢或生理功能。

前列腺素除作为激素外, 更被人们认为是另一种调节分子。它与 cAMP 一起, 共同调节着激素的作用, 它可能是受体与腺苷酸环化酶的中间介质。前列腺素是一类脂肪族化合物, 它引起的生理效应是十分广泛的。

从激素的生理效应来看, 肾上腺素是第一个在分子水平上已经了解其作用机理的激素, 通过“级联放大”作用不仅使血糖升高, 也使脂肪组织形成游离脂肪酸等。胰高血糖素的糖原异生作用与肾上腺素非常相似。

胰岛素与甲状腺素是两个极其重要、与生命有关的激素。胰岛素有降低血糖等效应, 它结合到专一性受体上后引起细胞内 cAMP 水平的下降及 GMP 水平的升高。甲状腺素对动物的作用是多种而强烈的, 它促进基础耗氧、促进各种代谢、促进生长发育及智力发展等, 但是目前对它作用的生物化学基础了解得还不多。

内啡肽和脑啡肽都是脑肽，它们起着鸦片制剂(如吗啡)的作用。 β -内啡肽由鸦片样肽促肾上腺皮质激素原(pro-opiocortin)衍生而成。近年来，在用遗传工程途径生产生长激素释放抑制因子和胰岛素的基础上，用DNA重组技术使脑肽类的结构功能研究以及实践应用有了飞跃的发展。

从激素的调节控制来看，大部分含氮激素及全部甾醇类激素都属于哺乳动物内分泌系统中的一个具有三级调节水平的体系。当接受到特异的神经讯息后，首先，大脑底部的下丘脑分泌释放因子及抑制因子——第一级激素，它们促进或抑制垂体前叶激素——第二级激素(如促肾上腺皮质激素 ACTH、促甲状腺激素 TSH、生长激素 GH 等)的分泌，而这些促激素又作用于靶器官，使靶器官(内分泌腺)分泌各种激素——第三级激素，这些激素再作用于最终的靶组织的细胞上，起到调节物质代谢及生理功能的效应。不属于此体系的多肽激素还有控制血钙、血磷及血糖的几个激素。

所有这些激素的分泌都不是按恒定或随意的速度进行的，而是受到严格控制，并十分短暂的。它们都是通过：1. 上级内分泌腺对下级内分泌腺的控制调节；2. 下级激素对上级激素的负反馈作用；3. 酶的分步剪裁调节；4. 多元调控，在机体内有节制地分泌，从而对外环境(如寒冷、意外事故)作出反应，使内环境保持平衡，如调节 Ca^{2+} 、 Na^+ 、血糖及血脂浓度变化、排卵、行经、泌乳等，以保证有机体总是处于正常状态。体内激素在作用后通过排泄、代谢等而失去，周转十分迅速。

根据对 ACTH 族、LPH 族、LH 族及胰岛素族等的一级结构和空间结构的比较研究，人们推测，众多的多肽、蛋白质激素，最初可能只有很少的几种原始祖先，即每一族激素可能起源于一个共同的祖先基因，随着进化才逐渐分化出一组功能不同的激素。这种分化使机体内部更加协调，对外界具有更强的适应性。

此外，在植物及昆虫中也发现了一些激素。

由于近年来发现激素的作用与 cAMP、基因表达、致癌基因等以及与感觉传递、神经感受等密切相关，因此对激素的认识已发展到一个新阶段，激素的生物化学已成为生物化学和分子生物学中的重要分支、神经分子生物学的重要组成部分遗传工程及生物工程技术发展的重要领域，日益受到重视，成为现代生物学研究的热点之一。

习 题

1. 何谓激素？按化学本质可将激素分哪几类？举例说明。
2. 举例简述激素的四种作用机理。激素有哪些调节方式？激素调节的重要性如何？
3. 试述 G 蛋白及钙调蛋白的功能。
4. 指出肾上腺素受体胰岛素受体及钙结合蛋白的结构特点。
5. 试述磷酸肌醇级联放大作用的简要过程。
6. 试述甲状腺素、肾上腺素、催产素及胰岛素的结构及功能。
7. 下丘脑-垂体前叶-靶腺体体系中包含哪些激素？它们的化学本质及功能是什么？
8. 列表指出甾醇类激素分哪几类？它们的结构特点及生理功能是什么？
9. 为什么对激素的研究日益受到重视？举例说明。

主要参考书

1. 冯佑民等,“近年来蛋白类激素研究的概况”生物化学及生物物理进展, Vol. 5. 1.1979。
2. 冯佑民,张友尚,“蛋白和多肽激素作用原理研究进展——激素与受体结合的后效应”生物化学及生物物理进展, Vol. 6. 2—7. 1986。
3. Lehninger, A. L., Biochemistry—The Molecular Basis of Cell Structure and Function 2nd edition Worth Publishers, Inc. 1983.
4. Orten, J. M. and Neuhaus, O. W., Human Biochemistry, 9th edition St. Louis Mosby, 1975.
5. Stryer, L., Biochemistry, W. H. Freeman and Company, San Francisco. 1987.
6. Kahn, C. R., J. Cell. Biol., 70, 261, 1976.
7. Czech, M. P., Ann. Rev. Physiol., 47, 357, 1985.
8. Cerione, R. A. et al, J. Biol. Chem., 259, 9970, 1984.

(俞梅敏)

第九章 生物膜的组成与结构

生物的基本结构和功能单位是细胞。任何细胞都以一层薄膜(厚度约 4—7 nm)将其内含物与环境分开,这层膜称细胞膜或外周膜,此外,大多数细胞中还有许多内膜系统,组成具有各种特定功能的亚细胞结构和细胞器,例如,细胞核、线粒体、内质网、溶酶体、高尔基体、过氧化物酶体等;在植物细胞中还有叶绿体等。与真核细胞相比,原核细胞的内膜系统不很丰富,只有少量的膜结构,如某些细菌的中隔体(mesosome),蓝绿藻中进行光合作用的囊状体膜等。细胞的外周膜和内膜系统称为“生物膜”。生物膜结构是细胞结构的基本形式,它对细胞内很多生物大分子的有序反应和整个细胞的‘区域化(compartmentation)’都提供了必需的结构基础,从而使各个细胞器和亚细胞结构既各自具有恒定、动态的内环境,又相互联系相互制约。从而使整个细胞活动有条不紊、协调一致地进行。

生物膜具有多种功能,生物学中许多重要过程(如物质运送、能量转换、细胞识别、细胞免疫、神经传导、代谢调控)以及激素和药物作用,肿瘤发生等等分析到最后无不与生物膜有关。

生物膜的研究不仅具有重要的理论意义,而且在工、农、医实践方面也有广阔的应用前景。在工业方面,生物膜的各种功能正在成为模拟对象。如果生物膜选择透性的功能一旦模拟成功,将大大提高污水处理、海水淡化以及回收有用的工业副产品的效率。在农业方面,从生物膜结构与功能的角度来研究农作物的抗寒、抗旱、耐盐、抗病等的机理正在进行,这方面的研究成果将为农业增产带来显著成效。

70年代以来,生物膜的研究已深入到生物学的很多领域,成为当前分子生物学,细胞生物学中最活跃领域之一。

第一节 生物膜的组成

生物膜主要由蛋白质(包括酶)、脂质(主要是磷脂)、多糖类组成,还有水、金属离子等。

生物膜的组分,尤其是蛋白质和脂质的比例,因膜的种类不同可以有很大的差异(表9-1)。例如神经髓鞘,蛋白质只占18%,脂质约占79%,而线粒体内膜和细菌质膜,蛋白质占75%左右,脂质仅占25%。一般讲,功能复杂或多样的膜,蛋白质占的比例较大,相反,膜功能愈简单,其膜蛋白的种类和含量愈少。神经髓鞘主要起绝缘作用,仅含3种蛋白质,而线粒体内膜,功能复杂,含有电子传递和偶联磷酸化等酶系,共约60种蛋白质。

一、脂质

(一) 脂质的种类

生物膜内含的脂质有磷脂、胆固醇、糖脂等,其中以磷脂为主要组分,分布很广泛。

表 9-1 各种生物膜内含蛋白质与脂质的比值

生物膜	蛋白质/脂质(重量/重量)	生物膜	蛋白质/脂质(重量/重量)
神经髓鞘	0.25	视网膜杆状细胞	1.5
肝细胞质膜	1.0—1.4	细菌	
红细胞	1.5—4.0	革兰氏阳性	2.0—4.0
内质网	0.7—1.2	革兰氏阴性	1.2
线粒体		支原体(mycoplasma)	2.2
外膜	1.2	嗜盐菌	1.8
内膜	3.6		

1. 磷脂

构成生物膜主要成分的磷脂，其分子中脂肪酸碳链的长短及其不饱和程度与生物膜的流动性有密切关系。磷脂中主要是磷酸甘油二酯，即以甘油为骨架，甘油中第1,2位碳原子的两个羟基分别与两个脂肪酸生成酯，第3位碳原子的羟基与磷酸生成酯，即磷脂酸。磷脂酸的含量虽不多，但它是其他甘油磷酸酯合成的前体，如磷脂酰胆碱，磷脂酰乙醇胺，磷脂酰丝氨酸，磷脂酰肌醇，二磷脂酰甘油(心磷脂)等(图9-1)。除了甘油磷酸酯外，生物膜还含有鞘磷脂组

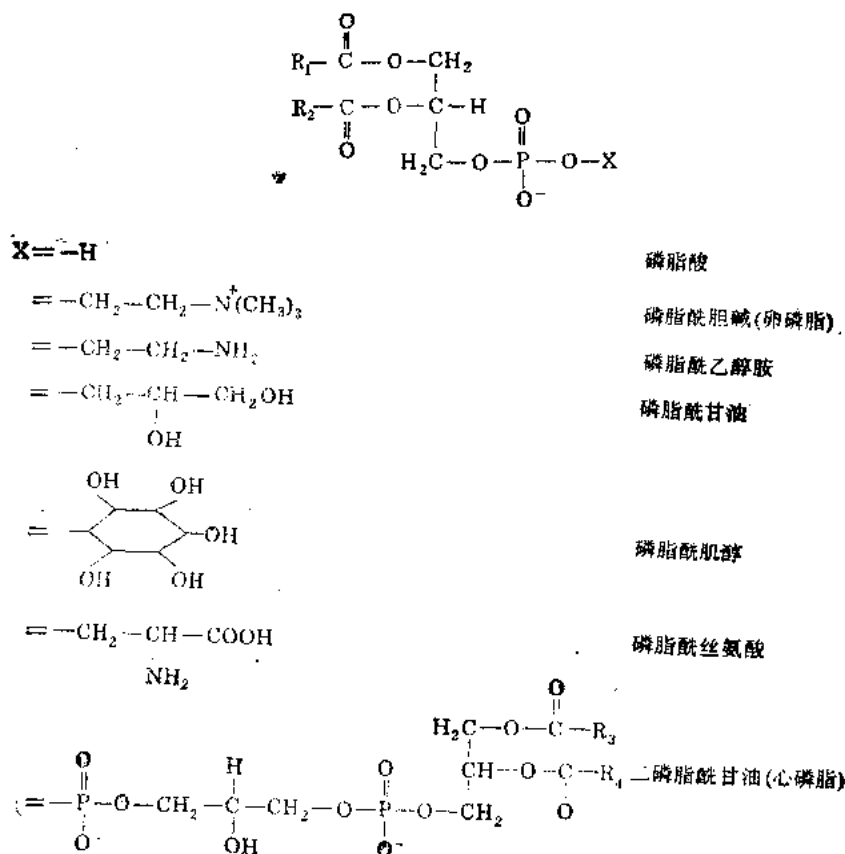


图 9-1 甘油磷脂结构

分磷脂分子结构的两性特征决定了它们在生物膜中的双分子层排列(称为脂双层)及其与各种蛋白质相结合的特性。

2. 胆固醇

一般讲动物细胞胆固醇的含量较植物细胞高，而质膜的胆固醇含量又比细胞器膜多。胆固醇的两性特点可能对生物膜中脂类的物理状态有一定调节作用。在相变温度以上时，胆固醇阻扰脂分子脂酰链的旋转异构化运动，从而降低膜的流动性(图9-2)。在相变温度以下时，胆固醇的存在又会阻止磷脂脂酰链的有序排列，从而防止向凝胶态的转化，保持了膜的流动性，降低其相变温度。

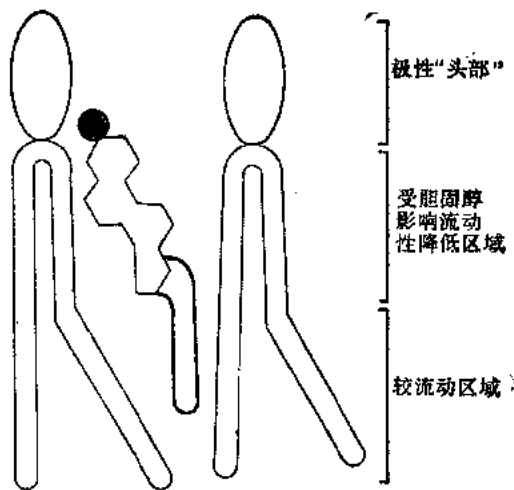


图9-2 在磷脂单分子层中插入的胆固醇与磷脂的相互作用

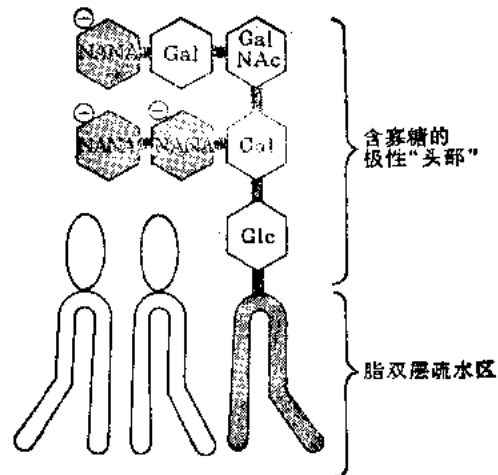


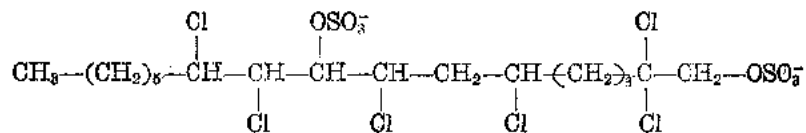
图9-3 一种神经节苷脂的结构示意图
NANA, 唾液酸; Gal, 半乳糖; GalNAc, N-乙酰半乳糖胺; Glc, 葡萄糖; ⊖, 负电荷

3. 糖脂

糖脂在膜上的分布是不对称的，仅分布在细胞外侧的单分子层，暴露在膜的表面。

细菌和植物细胞质膜的糖脂几乎都是甘油的衍生物，非极性部分以亚麻酸的含量较为丰富，极性部分则是糖残基，可以是一个(如半乳糖)、两个或多个。

动物细胞的质膜几乎也都含有糖脂，其含量约占外层膜脂的5%，这些糖脂几乎都是神经鞘氨醇的衍生物，例如，半乳糖脑苷脂(galactocerebroside)它的极性‘头部’含一个半乳糖残基。这种糖脂是神经髓鞘膜的主要糖脂，约占外层膜脂的40%。糖脂在质膜中大多含有1—15个糖残基。此外还有神经节苷脂，如图9-3。神经节苷脂具有受体的功能，如霍乱毒素，干扰素，促甲状腺素，破伤风素等的受体都是神经节苷脂类化合物。除磷脂、胆固醇和糖脂外，在叶绿体膜和嗜盐菌膜上还发现有含硫的脂质，嗜盐菌膜硫脂的化学结构式如下：



(二) 膜脂的不对称性分布

一般来说，脂质分子在膜两侧的分布是不对称的，例如，人红细胞膜的外层含磷脂酰胆碱和鞘磷脂较多，内层则含磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺较多。这种不对称分布会导致膜两层

电荷数量、流动性等的差异。脂质的不对称分布与膜蛋白的定向分布及其功能都有密切关系。天然生物膜脂质在两层之间的翻转运动是非常缓慢的。因此脂质在内质网合成时，这种不对称性分布看来已经形成，而且通过不断调节控制来维持其不对称性。

(三) 脂质的多形性 (polymorphism)

膜脂具有两性 (amphipathic)，已如前述。因此膜脂包括磷脂分子在水溶液中的

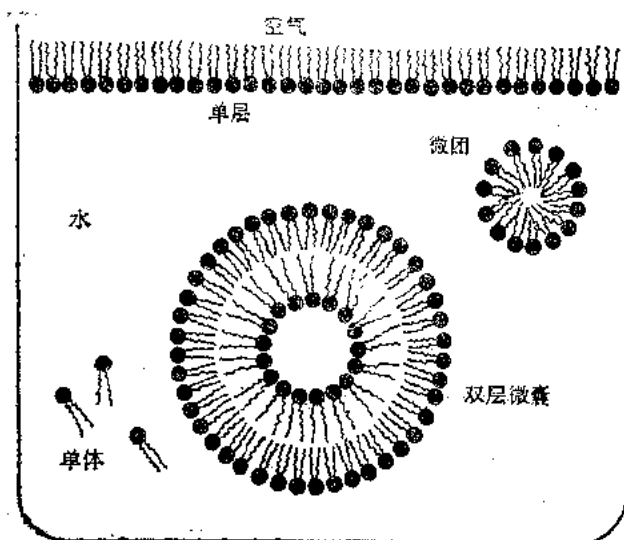


图 9-4 磷脂分子在水溶液中存在的几种结构形式

溶解度是很有限的。以磷脂为例，当磷脂加入水中以后，由于疏水部分的表面积较大，只有极少的分子以单体形式游离存在(图 9-4)。这些磷脂分子倾向于在水-空气界面形成单分子层。极性部分与水接触，烃‘尾部’伸向空气一侧(图 9-4)。如果加入较多量的磷脂分子，使水-空气界面达到饱和，磷脂分子就以微团 (micelles) 和双层 (bilayer) 形式存在。这两种形式都使磷脂分子的极性‘头部’与水相接触，并通过疏水键和范德华引力 (Van der Waal) 的作用使脂酰键尽可能靠近，将水从其邻近部位

排除。实际上磷脂双层结构在水溶液中是以微囊 (vesicles) 形式存在，它比平面脂双层形式的优越性在于使疏水烃链部分完全不与水相接触。至于磷脂分子在水溶液中究竟以微团还是脂双层微囊 (lipid bilayer vesicles) 形式存在，则取决于磷脂的组成。大多数天然磷脂分子倾向于后一种形式，因为这样更有利于分子的堆积，而只含一条脂酰链的溶血磷脂 (lysophospholipids) 游离脂肪酸和去垢剂 (detergents) 更容易形成微团结构，因为从整个分子来看，它们的疏水表面积仅占较小的比例。

在一定的条件下，磷脂分子还可以形成六角形相 H_{II} (hexagonal_{II}, H_{II}) 结构(图 9-5)，微团和 H_{II} 结构均称非脂双层结构 (non-bilayer lipid structure)。早在 1962 年 Luzzatti 用 X-线衍射技术就已观察到，脂质分子除形成脂双层结构外，还能形成多种结构。近年来由于核磁共振 (NMR)，电镜冰冻断裂技术的应用，非脂双层结构的研究得到进一步发展。1979 年荷兰学者 Verkleij 用 ^{31}P -NMR 测定含有不饱和脂酰链的磷脂酰乙醇胺 (PE) 脂质体，在低温时观察到 ^{31}P -NMR 谱绘出低场肩、高场峰的不对称线形(图 9-6)，这反映了典型的脂双层结构。当温度逐渐增加， ^{31}P -NMR 谱线形状逐渐改变，最后出现高场肩和低场峰的图形，这反映磷脂分子从脂双层转变为六角形相 H_{II} (H_{II}) 结构。

实验证明，磷脂酰胆碱，鞘磷脂等磷脂一般都形成稳定的脂双层结构，而不饱和脂肪酰链的磷脂酰乙醇胺 (PE)，单葡萄糖甘油二脂 (monoglucosyldiglyceride, MGDG) 及单半乳糖甘油二脂 (MGaLDG) 则容易形成六角形相 H_{II} (H_{II}) 结构，心磷脂 (diphosphatidylglycerol, DPG) 也容易形成 H_{II} 结构，尤其在 Ca^{2+} 诱发的条件下。上述几种磷脂一般称之为非脂双层 (non-

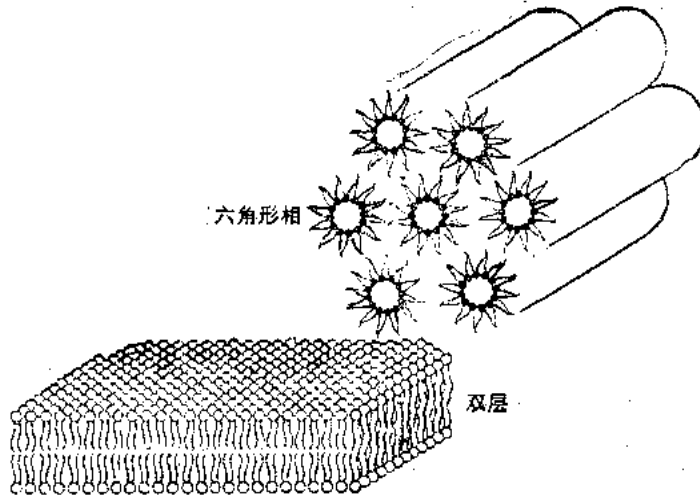


图 9-5 脂质的双层结构和六角形相 H_{II} 结构

bilayer lipid), 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)与磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol, PG)在中性与低温时,以脂双层结构存在,在酸性与高温时则可转变为六角形相 II 结构。

生物膜在一般条件下都呈现脂双层结构,但在某些生理条件下(如细胞的胞吞与外排,细胞融合,脂质分子的翻转运动,蛋白质跨膜运送等)均可能出现非脂双层结构。迄今为止非脂双层结构的存在是在人工膜体系中发现并得到证明的,生物膜中是否存在这类结构还需在检测的技术方法方面做进一步研究。

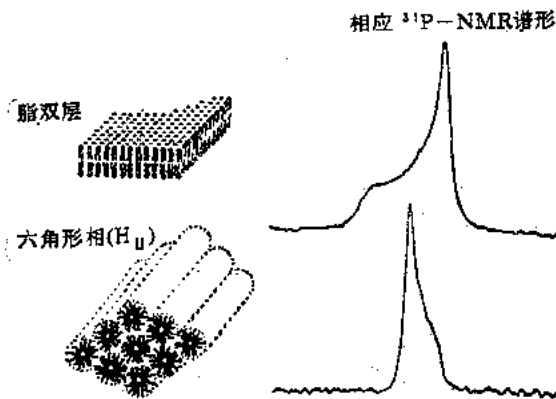


图 9-6 脂双层和六角形相(H_{II})结构的 ^{31}P -NMR 谱形

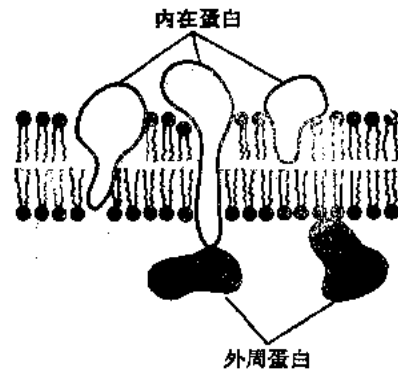


图 9-7 生物膜外周蛋白质、内在蛋白质示意图

二、膜蛋白

根据粗略计算,细胞中大约有 20—25% 的蛋白质是与膜结构相连系的,膜蛋白根据它们在膜上的定位可分为外周蛋白质和内在蛋白质(图 9-7)。

(一) 外周蛋白质

外周蛋白质分布于膜的脂双层表面,它们通过静电力或范德华(Van der Waal)引力与膜结合。前者如线粒体内膜的细胞色素 c , 后者如红细胞血影收缩蛋白(spectrin)。外周蛋白

质比较易于分离,通过改变离子强度或加入金属螯合剂即可提取。这类蛋白质都能溶于水。外周蛋白质一般约占膜蛋白质的 20—30%。

(二) 内在蛋白质

内在蛋白质一般占膜蛋白的 70—80% 左右,主要靠疏水效应与膜脂相结合。蛋白质分子上非极性基团的氨基酸侧链与脂双层的疏水部分都与水疏远,这些非极性基团之间存在一种相互趋近的作用(称为疏水相互作用)。内在蛋白质有的全部埋于脂双层的疏水区,有的部分嵌在脂双层中,有的横跨全膜(图 9-7)。这类蛋白质不易分离,只有用较剧烈的条件(如,去垢剂,有机溶剂,超声波等)才能把它们溶解下来。它们的特征是水不溶性,分离下来之后,一旦除掉去垢剂或有机溶剂又聚合成为不溶性的物质。

由于分离纯化比较困难,因此与水溶性蛋白质相比较,迄今经纯化并阐明其结构的内在蛋白质为数并不太多。

内在蛋白质与脂双层疏水区相接触的部分,由于水分子的排除,多肽分子本身形成氢键的趋向大大增加,因此它们往往以 α -螺旋或 β -折叠形式存在,其中尤其以前者更为普遍。例如,血型糖蛋白(glycophorin)它是一种跨膜蛋白,含 131 个氨基酸残基, N-端和 C-端含有较长的亲水片段, N-端还含有约 100 个糖残基(图 9-8)。跨脂双层的疏水片段约含 20 个氨基酸残基呈 α -螺旋结构。又如,嗜盐菌紫色膜的细菌视紫红质(又称菌紫质, bacteriorhodopsin)它可将光能转化为化学能,因而可以直接利用太阳能合成 ATP,菌紫质蛋白质部分的分子量为 26 000,由 235 个氨基酸组成。分辨率为 0.7nm 的电子衍射研究表明,每个跨膜分布的菌紫质分子含 7 条几乎平行的柱形多肽,它们呈 α 螺旋结构,长 3.5—4nm,相隔 1nm,首尾相接,垂直于膜平面,其 C-端暴露于细胞质一侧, N-末端则在细胞外一侧(图 9-9)。

此外,脊椎动物的视杆细胞外段盘状膜的视紫红质由视蛋白和视黄醛组成,前者的分子量为 39 048,由 348 个氨基酸残基组成,整个分子也系由 7 条呈 α -螺旋结构跨膜的多肽组成。最近研究还表明,红细胞膜的带 3 蛋白含 10 条 α -螺旋跨膜多肽,跨膜分布的 Na⁺-K⁺-ATP 酶含

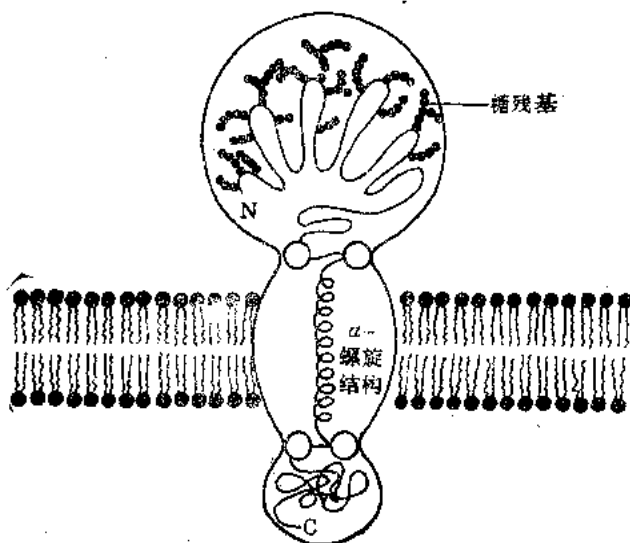


图 9-8 人红细胞膜血型糖蛋白跨膜分布示意图

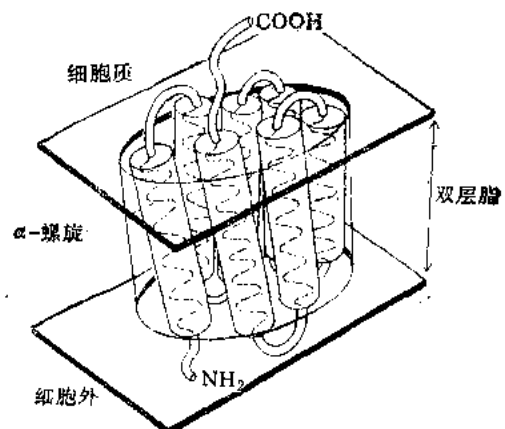


图 9-9 嗜盐菌细菌视紫红质(菌紫质, bacteriorhodopsin)跨膜分布示意图。每一分子含 7 条几乎平行的柱形多肽组成,首尾相接。每一多肽都呈 α -螺旋结构。

8条 α -螺旋多肽首尾相接等等。

三、糖类

生物膜中含有一定的糖类,在真核细胞中无论质膜和细胞内膜系都有分布,前者糖类约占质膜重量的2—10%。它们大多与膜蛋白结合,少量与膜脂结合(估计细胞质膜1/10的膜脂与糖类结合)。值得指出的是糖类在膜上的分布也是不对称的,无论质膜还是细胞内膜系的糖脂和糖蛋白的寡糖,全部分布在非细胞质的一侧。分布于质膜表面的糖残基形成一层多糖-蛋白质复合物(glycocalyx)或称细胞外壳(cell coat)(图9-10)。分布于细胞内膜系的糖类侧面向膜系的内腔。在生物膜中组成寡糖的单糖主要有:半乳糖,甘露糖,岩藻糖,半乳糖胺,葡萄糖胺,葡萄糖和唾液酸等,膜蛋白或膜脂寡糖侧链的功能尚未完全阐明。糖蛋白可能与大多数细胞的表面行为有关,细胞与周围环境的相互作用都涉及到糖蛋白,因此有人将细胞膜的多糖类部分比喻为细胞表面的天线在接受外界信息以及细胞间相互识别方面具有重要作用。

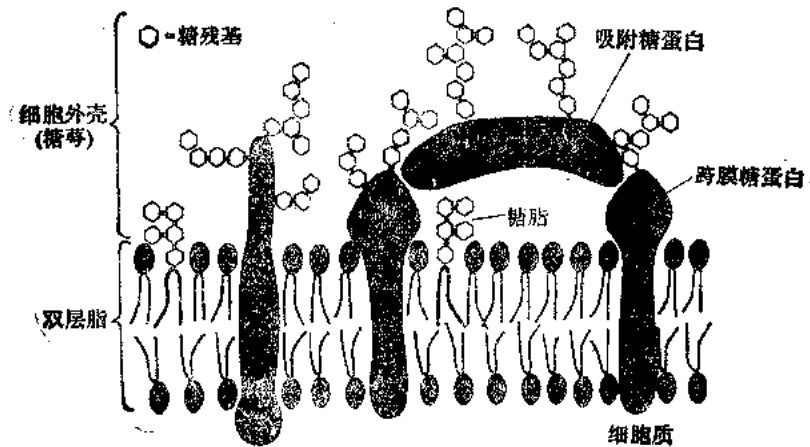


图9-10 细胞外壳(糖萼)示意图

第二节 生物膜的流动性

膜的流动性,既包括膜脂,也包括膜蛋白的运动状态。有时,也将膜蛋白的运动状态称为“运动性(mobility)”。

流动性是生物膜结构的主要特征。大量研究的结果表明,合适的流动性对生物膜表现其正常功能具有十分重要的作用。例如,能量转换、物质运送、信息传递、细胞分裂、细胞融合、胞吞(或称内吞)(endocytosis)、外排(exocytosis)以及激素作用等都与膜的流动性有密切关系。

一、膜脂的流动性

膜脂的基本组分是磷脂。因此膜脂的流动性主要决定于磷脂,在生理条件下,磷脂大多呈液晶态,当温度降至其相变温度时,即从流动的液晶态转变为类似晶态的凝胶状态。凝胶状态也可以“溶解”为液晶态(图9-11)。各种膜脂由于组分不同而具有各自的相变温度。生物膜脂质组成很复杂,其相变温度的范围就很宽,有时可宽达几十度。

(一) 膜脂运动的几种方式

在相变温度以上时, 磷脂的运动可归纳为下列几种方式:

1. 磷脂烃链围绕 C—C 键旋转而导致异构化运动。磷脂分子脂肪酸的 C—C 键具有全反式(all trans)和偏转(gauche)两种构型(图 9-12)。在低温条件下磷脂主要以全反式构型存在, 随着温度上升, 偏转构型增多, 流动性增大。

2. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴左右摆动, 而且从整个磷脂分子来看, 这种运动还表现出梯度现象。极性基团部分的运动较快, 甘油骨架的运动较慢, 脂肪酸烃链部分的运动又较快, 尤以“尾部”运动得最快。

3. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴作旋转运动。

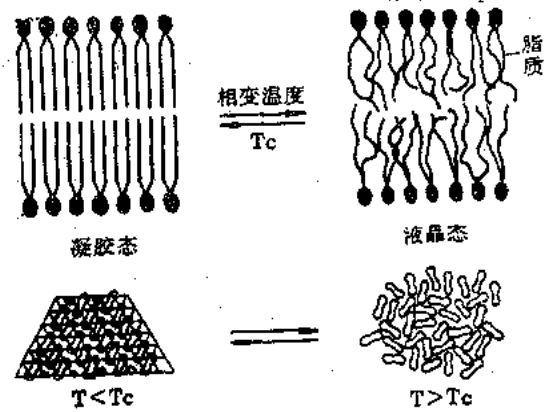


图 9-11 膜脂的相变

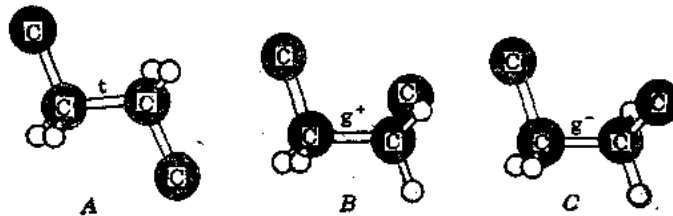


图 9-12 全反式(trans) gauche 构型示意图

A: 全反式(trans), B 与 C: A 旋转 120° 后形成的 gauche 构型: g^+ (顺时针方向旋转), g^- (逆时针方向旋转)

4. 磷脂分子在膜内作侧向扩散或侧向移动。

5. 磷脂分子在脂双层中作翻转(flip-flop)运动。由于磷脂分子是一种两性分子, 作翻转运动时必须通过脂双层的疏水区, 因此, 与其他运动方式相比较, 这种运动速度要慢得多。

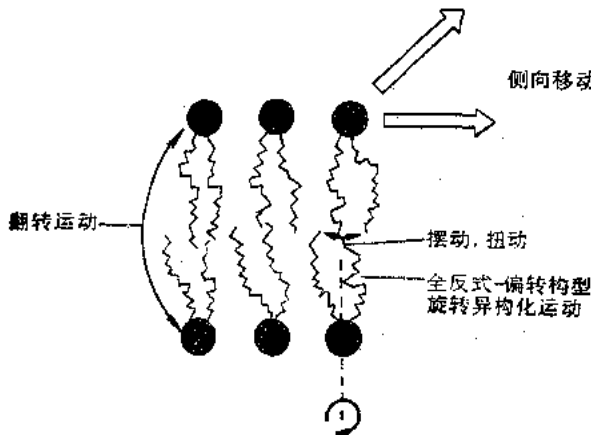


图 9-13 磷脂分子运动的几种方式

上述磷脂的几种运动形式总结于图 9-13。在相变温度以下, 有些方式的运动仍可进行, 但是速度变慢。

影响磷脂流动性的因素很多, 诸如: 磷脂脂肪酸烃链的不饱和程度和链长, 胆固醇、鞘磷脂的含量, 膜蛋白以及温度, pH, 离子强度, 金属离子等等。

(二) 膜脂的分相

两种或两种以上纯磷脂混合时, 由于它们的相变温度互不相同, 因此, 当温度降至某一值时, 有的已转变为凝胶态, 有的则仍处于液晶态, 处于凝胶态和液晶态的磷脂分子分别各自汇

集,这一现象称为分相(phase separation)。在生物膜中,由于脂质的组分比较复杂,又有膜蛋白以及其他各种因素的影响,因此,即使在生理温度,在一定条件下,也有可能产生分相的现象。

二、膜蛋白的运动性

(一) 膜蛋白的侧向扩散

系指膜蛋白在生物膜二维流体的侧向移动。首先证明膜蛋白具有这种运动方式的是Frye与Edidin,他们是在1970年将离体培养的小鼠和人细胞融合在一起,形成人、鼠杂交细胞,然后利用间接免疫荧光法通过细胞表面抗原分布的变化来研究膜蛋白的侧向扩散(图9-14)。具体的做法是把两种细胞表面膜抗原的抗体接上两种不同的荧光染料作为标记:发绿

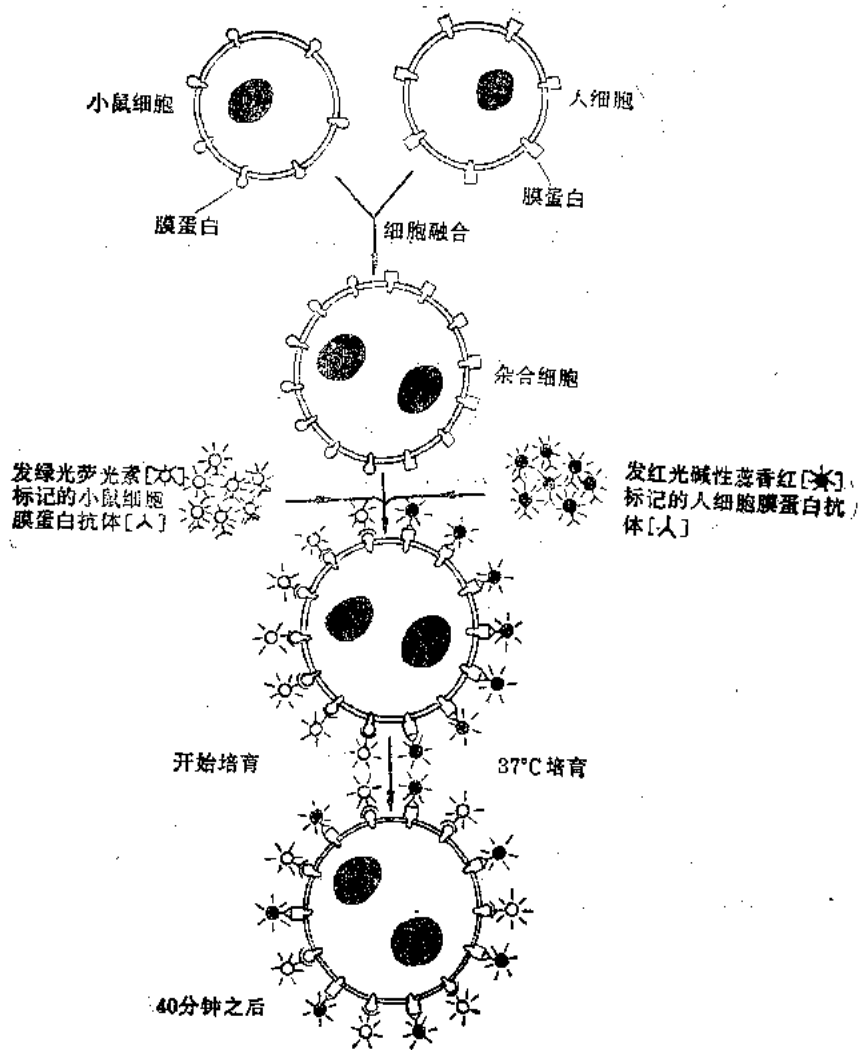


图 9-14 通过细胞膜融合证明膜蛋白运动性的示意图

人细胞与小鼠细胞融合后,开始对,它们的膜蛋白分布在各自的细胞膜上,待 37°C 培育一定时间后它们的膜蛋白就均匀分布于杂合细胞膜上

光的荧光素(fluorescein)和发红光的碱性蕊香红(rhodamine)。当小鼠和人细胞融合后形成一个新的杂交细胞时,由于连接有两种荧光标记的抗体分别与两种细胞的膜抗原相结合,因此,开始时一半呈绿色,另一半呈红色。但经37°C保温40分钟后,二种颜色的荧光点就呈均匀分布。这是原来各自分布于两种细胞表面的膜抗原运动的结果。Frye与Edidin的实验为膜蛋白的侧向扩散提供了一个有力的证据。目前,测定膜蛋白的侧向扩散常采用光致漂白荧光恢复法(Fluorescence Photobleaching Recovery, FPR)。这种方法利用激光使膜上某一微区内结合有荧光素的膜蛋白不可逆地漂白,然后当其他部位的膜蛋白由于侧向扩散而进入这个微区时,荧光又重新呈现,因此,通过光致漂白荧光恢复的监测,可以研究膜蛋白的侧向扩散情况。

此外,膜蛋白的侧向扩散也受到细胞骨架的很大制约,据报道红细胞如果由血影收缩蛋白(spectrin),肌动蛋白(actin)等组成的膜骨架发生缺陷(如球形红细胞),则内在膜蛋白的侧向扩散速率可能增加50倍左右。

(二) 膜蛋白的旋转扩散

除侧向扩散外,膜蛋白还可围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动。需要指出的是迄今为止的实验表明,膜蛋白似乎只能旋转而不能改变相对定位进行滚转运动。旋转扩散的快慢用旋转弛豫时间来表示,与侧向扩散相似,不同的内在膜蛋白由于本身及微环境的差别,它们的旋转扩散也有很大的差异。

内在膜蛋白的旋转扩散与周围脂质有密切关系,以视紫红质为例,如果视杆外段盘状膜经磷脂酶处理以去除磷脂则其旋转扩散将逐步减少,当70%脂质被去除时,旋转扩散就不再能进行。此外,内在膜蛋白的旋转扩散也受到微环境脂流动性的影响。

从已有测定的结果来看,膜蛋白的旋转扩散一般慢于侧向扩散,而膜蛋白的侧向扩散又显著慢于脂质的侧向扩散。

膜脂的流动性对生物膜的内在蛋白部分嵌入脂双层的深度有一定影响。当膜脂流动性降低时,嵌入的膜蛋白暴露于水相的部分就会增加。相反,如果膜脂流动性增加,嵌入的膜蛋白则更多地深入膜脂双层。因此,膜脂流动性的变化会影响膜蛋白的构象与功能。膜脂合适的流动性是膜蛋白正常功能表现的必要条件,在生物体内,可以通过细胞代谢,pH,金属离子(Mg^{2+} , Ca^{2+} 等)等因素对生物膜进行调控,使其具有合适的流动性从而表现其正常功能。如果超出调节范围,生物膜就会产生病变。已经发现很多疾病患者的病变细胞膜或红细胞膜的流动性有异常变化,例如,急性淋巴细胞白血病患者淋巴细胞膜的流动性明显高于正常人。也有报道,杜兴氏(Duchenne)型进行性肌肉营养不良症患者的红细胞、骨骼肌以及肝细胞膜的流动性都比正常要低。 β -脂蛋白缺乏症和遗传性球形红细胞症患者的红细胞膜的流动性也明显低于正常,我国学者也报道大骨节病患者的红细胞膜和克山病患者心肌线粒体膜的流动性都低于正常。

此外,植物的抗冷性与生物膜的流动性也存在一定的相关性,我国科学工作者报道,玉米或水稻等农作物的抗冷性与其线粒体膜的流动性具有一定的内在联系。

第三节 生物膜的分子结构

生物膜的主要组分是蛋白质、脂质和多糖类。因此,阐明生物膜的分子结构必须研究它们之间的相互关系。下面首先讨论一下膜组分之间的作用力问题,然后介绍有关生物膜结构的分子模型。

一、生物膜中分子间作用力的类型

一般认为,生物膜中分子之间主要有三种类型的力起作用:静电力、疏水力和范德华(Van der Waals)引力。

(一) 静电力

静电力存在于分子的一切极性和带电荷基团之间,它们相互吸引或排斥。在膜两侧的脂质和蛋白质的亲水极性基团通过静电力的相互吸引可形成很稳定的结构。静电力在膜蛋白之间的相互作用也很重要。膜中疏水区的介电常数较低,它可以使蛋白质分子的极性部分之间形成强烈的静电力。

(二) 疏水力

疏水力对维持膜结构起主要作用。蛋白质分子具有非极性基团的氨基酸侧链和脂双层的疏水脂肪酸侧链都有不与水接触的强烈倾向。这些非极性基团之间存在着一种相互趋近的力,称为疏水的相互作用,所以疏水力依赖于水的存在。而当非极性基团相互靠近时,范德华引力就成为疏水相互作用的主要因素。

(三) 范德华引力

范德华引力倾向于使膜中分子尽可能彼此靠近,所以,它们在膜结构中也是十分重要的,它和疏水力有相互补充的作用。

二、生物膜分子结构的模型

(一) 脂双层模型

1899年Overton在研究细胞膜的透性时已提出脂质和胆固醇类物质可能是构成细胞膜的主要组分。1925年荷兰Gorter与Grendel用丙酮抽提了红细胞膜的脂质并铺成单分子层,用Langmuir槽测定了其表面面积。并估算了红细胞膜的表面面积。结果发现,前者为后者的两倍,因而提出膜中脂质分子以双分子排列的模型。如果Gorter和Grendel的假设是正确的,必须满足下列三个条件:(a)红细胞的全部脂质都分布在膜上,(b)丙酮将所有的脂质分子都从膜中抽出,(c)红细胞的平均表面积估算准确。验证结果表明,他们的假设是符合实际的,但是,现在看来,依照Gorter与Grendel方法用丙酮只能抽出红细胞膜脂质的70—80%,他们对红细胞膜表面积的估算也比实际数值低。但是这两方面的误差恰好相互抵销,因而Gorter与Grendel的假设仍然是正确的。所以迄今为止,双脂层是生物膜结构主体的论点仍然被广泛接受(图9-15)。

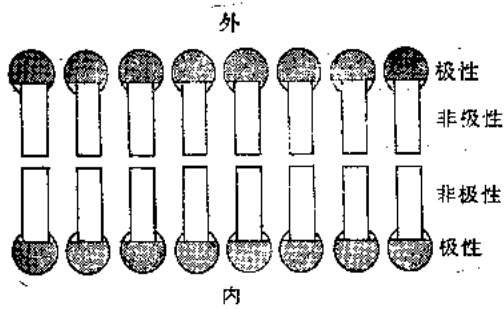


图 9-15 脂双层模型

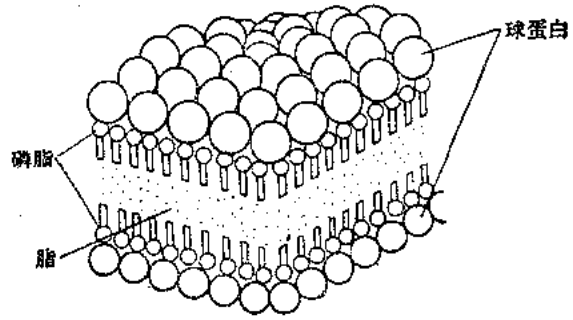


图 9-16 Danielli-Davson 模型

(二) Danielli 与 Davson ‘三夹板’模型

1935年 Danielli 与 Davson 在 Gorter 与 Grendel 的假设——连续的磷脂双分子层构成生物膜主体的基础上, 企图解释蛋白质定位的问题, 他们提出的模型认为, 两层磷脂分子的脂肪酸链伸向膜中心, 其极性端则面向膜两侧水相。蛋白质分子以单层覆盖两侧, 因而形成蛋白质-脂质-蛋白质的“三明治”(或“三夹板”)式结构(图 9-16)。这个模型曾得到电镜观察和 X-衍射分析等方面实验结果的支持。

(三) Robertson 单位膜模型

50 年代末期 Robertson 应用电子显微镜观察到膜具有三层结构, 即在两侧呈现电子密度

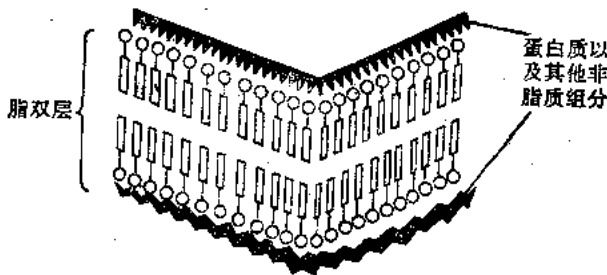


图 9-17 Robertson 单位膜模型

高, 中间电子密度低的现象, 经过大量实验数据的积累, Robertson 进一步发现除细胞质膜外, 其他如内质网、线粒体、叶绿体、高尔基体等在电镜观察下都呈现相似的三层结构。因此 1964 年 Robertson 提出了单位膜(Unit membrane)模型, 以反映这种结构具有普遍性。这一模型与 Danielli 与 Davson

模型不同之处在于双脂层两侧蛋白质分子系以 β -折叠形式存在, 而且呈不对称性分布(图 9-17)。

但是, 人们逐渐发现大多数生物膜所含的脂质并不全是连续的, 而且大多数膜蛋白都需要用比较剧烈的方法(如去垢剂, 有机溶剂, 超声等)才能从膜上分离下来, 这些都是 Robertson 的单位膜模型难以解释的。因此又提出了很多模型。

(四) “流体镶嵌”模型

在生物膜的流动性和膜蛋白分布不对称性等研究获得一系列重要成果的基础上, 1972 年美国 Singer 与 Nicolson 提出“流体镶嵌”模型。这个模型与过去提出的种种模型的主要差别在于: 一是突出了膜的流动性, 认为膜是由脂质和蛋白质分子按二维排列的流体; 二是显示了膜蛋白质分布的不对称性。有的蛋白质‘镶’在脂质双分子层表面, 有的则部分或全部嵌入其内部, 有的则横跨整个膜(图 9-18)。

迄今为止, 有关生物膜的模型先后提出已不下数十种, 其中“流体镶嵌”模型虽然得到比较

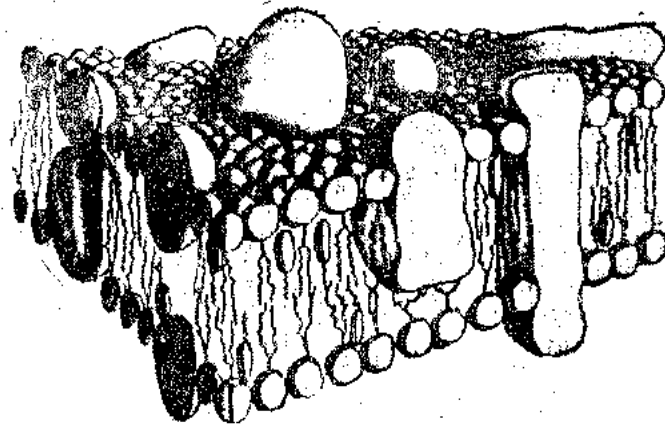


图 9-18 Singer & Nicolson 流体镶嵌模型

广泛的支持,但仍然存在很多的局限性,例如,近年来很多实验结果表明,膜的流动性是不均匀的。由于脂质组成的不同,膜蛋白-膜脂,膜蛋白-膜蛋白的相互作用以及环境因素(如温度, pH, 金属离子等等)的影响,在一定温度下有的膜脂处于凝胶态,有的则呈流动的液晶态。即使都处于液晶态,膜中各部分的流动性也不全相同。这样,整个膜可视为具有不同流动性的“微区”(domain)相间隔的动态结构。因而, Jain 与 White 提出了一种“板块镶嵌”模型。此外,也有人将非脂双层结构引入到膜的模型中去。但是,迄今为止,这些模型还没有象“流体镶嵌”模型那样受到广泛的支持。

提 要

细胞的外周膜(质膜)和内膜系统统称为“生物膜”。生物膜结构是细胞结构的基本形式。生物膜具有多种功能,生物学中许多重要过程(如物质运送,能量转换,细胞识别,信息传递,神经传导,代谢调控)以及药物作用、肿瘤发生等等分析到最后无不与生物膜有关。生物膜的研究已深入到生物学的各个领域,成为当前分子生物学、细胞生物学中最活跃的领域之一。

生物膜主要由蛋白质(包括酶),脂质(主要是磷脂)和糖类等组成。

一般来说,脂质分子在膜两侧的分布是不对称的,这与膜蛋白的定向分布及其功能都有密切的关系。糖类在膜上的分布也呈不对称性,无论质膜还是胞内膜系的糖脂和糖蛋白的寡糖全部分布在非细胞质的一侧。

生物膜在一般条件下都呈现脂双层结构,但在某些生理条件下(如细胞的胞吞与外排,细胞融合,蛋白质跨膜运送等)均可能会出现非脂双层结构(如,六角形 II, H₁₁₃ 微团等结构)。这称为脂的多形性(polymorphism)。

根据在膜上的定位,膜蛋白可分为外周蛋白质和内部蛋白质。前者能溶于水,较易分离,后者不溶于水,需要用较剧烈的手段(如,去垢剂,有机溶剂,超声等)才能把它们从膜上分离下来。

生物膜的流动性是生物膜结构的主要特征。它既包括膜脂,也包括膜蛋白的运动状态。合

适的流动性对生物膜表现正常功能具有十分重要的作用。磷脂的运动可归纳为下列几种方式：(1) 烃链围绕 C—C 键旋转而导致异构化运动，(2) 围绕与膜平面相垂直的轴左右摆动，(3) 围绕与膜平面相垂直的轴作旋转运动，(4) 在膜内作侧向扩散或侧向移动，(5) 在双脂层中作翻转运动。膜蛋白的运动可分为侧向扩散和旋转扩散两种形式。

生物膜中分子间作用力主要有三种类型：(1) 静电力，(2) 疏水力和 (3) 范德华引力。

迄今为止，有关生物膜分子结构的模型先后已提出不下数十种，其中“流体镶嵌”模型仍然得到比较广泛的支持，但仍然存在着局限性，有待进一步发展。

习 题



1. 什么是生物膜？研究生物膜的重要性。
2. 生物膜的主要组成是什么？分述它们的主要作用。
3. 试举例叙述生物膜膜脂分布的不对称性。
4. 试述膜脂的多形性，非双脂层结构的生理意义是什么？
5. 什么是生物膜的流动性，膜脂和膜蛋白有几种运动形式，生物膜流动性的生理意义是什么？
6. 生物膜分子结构的模型主要有哪几种？“流体镶嵌”模型的要点是什么？

主要参考书

1. 杨福愉，黄芬，王金凤，膜脂-膜蛋白的相互作用(上)，生物化学与生物物理进展，5，2—7，1985。
2. 杨福愉，黄芬，王金凤，膜脂-膜蛋白的相互作用(下)，生物化学与生物物理进展，6，7—13，1985。
3. Finean, J. B. Coleman, R. & Michell, R. H., Membrane and their Cellular Functions 2nd Ed Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1978.
4. Alberts, B. et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc. New York & London. 1983.
5. Lehninger, A. L., Biochemistry 2nd Ed. Worth Publishers Inc. 1975.

(中国科学院生物物理所杨福愉)