

面向 21 世纪课程教材
Textbook Series for 21st Century

生物化学

第三版 上册

王镜岩 朱圣庚 徐长法 主编



A0968667



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS

内容提要

本书是教育部“高等教育面向 21 世纪教学内容和课程体系改革计划”项目研究成果,是教育部推荐的“面向 21 世纪课程教材”,同时也是“九五”国家级重点教材。

全书共 40 章,上册为第 1~18 章,包括糖类、脂质、蛋白质、核酸、酶、维生素和辅酶、抗生素、激素和生物膜等。下册为第 19~40 章,包括代谢总论、生物氧化、糖代谢、脂质代谢、蛋白质分解及氨基酸代谢、核酸的降解与核苷酸代谢、核酸的生物合成、蛋白质的生物合成、物质跨膜运输、生物固氮和光合作用等。每章都附有摘要和习题,书后附有生物化学常用名词英汉对照、名词缩写、索引等,以便读者学习。本书吸收了生物化学国际、国内的最新进展,内容丰富,图文并茂,章节仍按“先静态、后动态”组织编排,符合国内的教学习惯,便于教师教学使用和学生自学。

本书是国内内容最为丰富的基础生物化学教材,适合于综合性院校、农林院校、医学院校及师范院校的生命科学类专业及相关专业的本科生使用,也可供教师、研究生及科研工作人员使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学.上册 / 王镜岩等主编.—3 版.—北京:高等教育出版社, 2002.9

ISBN 7-04-011088-1

I. 生... II. 王... III. 生物化学—高等学校—教材 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 037560 号

生物化学(第三版)(上册)

王镜岩 朱圣庚 徐长法 主编

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市东城区沙滩后街 55 号
邮政编码 100009
传 真 010-64014048

购书热线 010-64054588
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所
印 刷 北京民族印刷厂

开 本 850×1168 1/16
印 张 40.5
字 数 1 250 000

版 次 1980 年 4 月第 1 版
2002 年 9 月第 3 版
印 次 2002 年 9 月第 1 次印刷
定 价 56.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

《生物化学》(第三版)编写人员

主 编 王镜岩 朱圣庚 徐长法

编著者 (各章及编写人员)

第 1~7 章 徐长法

第 8~11 章 张庭芳

第 12~15 章 朱圣庚

第 16 章 徐长法 唐建国

第 17 章 俞梅敏 唐建国

第 18 章 杨福愉

第 19 章 王镜岩 文重

第 20 章 王镜岩

第 21 章 黄有国 张旭家

第 22~26 章 王镜岩

第 27 章 徐长法

第 28~29 章 文重 王镜岩

第 30~31 章 王镜岩 文重

第 32 章 唐建国

第 33~37 章 朱圣庚

第 38 章 唐建国

第 39~40 章 朱圣庚

深切怀念我们的导师

——敬爱的沈同教授

第三版序言

生命科学、信息科学等的发展正值腾飞时期,人类在认识世界和改造世界的漫长岁月中,又将面临一个重大的里程碑。其中,生物科学在近20年中出现了惊人的进展,它不仅吸引了学术界的极大关注,而且很大程度地影响了日常生活。生命科学所以成为带头学科,其核心是生物化学的引入瞩目的发展。只要翻翻文献,甚至看看现今的教科书,就可明白:生物科学、生物技术的进步和发展与基础领域生物化学的发展是不可分的。

今日的生物化学在广度和深度上都发生了巨大变化,从中发展出分子生物学并已成为独立学科就是一例。面对如此庞大的分量和广泛的内容更新,怎样写出好的教科书,是我们作者的重要课题。环顾国际上几本权威性的教科书,他们力求把重大的新成果收容到书中,内容越来越多,程度越来越深,这正是现代生物化学的本来面目。在此种背景下,一些基础的内容只得从略,但篇幅仍然不断扩充。另一方面,在动物学、植物学、遗传学、生理学、医学、农学、药学及食品等等的学科中,作为基础学科的生物化学,其学术吸引力越来越大。对于如此广泛领域的学科,学习生物化学,必须作为他们主修学科的重要补充。不论把它当作副科也好,主科也好,学生们面对这样庞大的新知识,新概念,时常会感到生物化学基础知识的不足,或感到不知怎样从那些外围知识中找出核心的东西。显然,解决这个问题关键在于与生物化学进展相称的教学安排,及课堂讲授和教科书的写作。

为此,我们认为,一方面,新的教科书必须与国际接轨,最新的重要内容不可忽视;另一方面,面对我国大、中学教育和广大师生的实际,必须以我为主,不能照搬。写出的教科书力求读了能懂,基本概念,基本问题,写得深入浅出,循序渐进,讲解明白。例如,涉及物理化学、有机化学的基础,还要作一些扼要的提示和解说;又如,在章节安排上,为使读者先认清构成生物体的各种物质的性质,打好基础,我们仍采取了受读者广泛认同的先“静态”后“动态”的安排,不仅如此,在静态方面的写作,我们还用了相当大的篇幅。第三版和前两版的主要区别在于从章节上进行了调整。从第二版23章扩展为第三版的40章。例如,在第二版,我们把蛋白质列为一章,第三版已经发展为五章;酶由原来的一章发展为三章;核酸由一章发展为四章;糖代谢由一章发展为四章,其中着重增加了寡糖和糖蛋白生物合成的内容;脂质代谢由一章发展为两章;在蛋白质的分解代谢中,增加了全新的内容;生物固氮作用从一节发展为一章;在核酸代谢中,由过去的內容扩展为五章;基因重排和遗传密码都分别单列为独立的两章。有些章节的名称和内容也都作了调整。在各章节中都增添新的内容,在深度、广度等方面都有所发展,并注意加入一些具有启发性的有关的历史内容。另外,为满足更多的读者,如研究生、教师、研究人员和技术人员等的需要,我们力求使本书带有工具书的性质。例如,书中关键词第一次出现,都给了英文名称,书后附有较详细的索引,英汉名词对照等。此外各章还附有:提要、习题、参考书及文献等等。书成之后,我不敢妄言上述的目的已经达到,摆出以上想法,只是略表作为主编的初衷。

本书缘起于20年前,沈同先生和我、赵邦悌以及其他同事为十年动乱后的教育复苏,编写了《生物化学》教科书第一版,于1980年由高等教育出版社出版。其后,为适应科学和教育的发展,又改写了第二版,于1990年出版。现又已度过生物化学大变化的十年,沈同先生已过世,我和朱圣庚、徐长法同志主持了这第三版的改写。没有前两版的出版,没有参加前两版编写的同仁们的辛勤耕作,没有全国各同行和学生们的鼓励和建议,就不可能有这第三版的出版。在第三版出版之际,现列出前两版的作者名单,表示我们对那些已辞世的同仁的深痛怀念,对因故不能再担负第三版写作的同仁表示深切谢意:

第一版 主编:沈同、王镜岩、赵邦悌

编写者:沈同、王镜岩、赵邦悌、李建武、徐长法、朱圣庚、俞梅敏

第二版 主编：沈同、王镜岩

编写者：沈同、王镜岩、赵邦悌、李建武、徐长法、朱圣庚、俞梅敏、杨端、杨福愉、黄有国

我们感谢高等教育出版社、北京大学生命科学学院和生物化学及分子生物学系的负责同志在第三版的编写过程中给予的人力、物力支持。还要感谢编者的家人们，首先是他们的精神支持，此外在幕后都为此书付出了许多辛勤劳动，例如，搜索资料，抄写稿件，互相联系以及家务劳动等等。他们是文重先生和王兰仙、王锦兰、洪朝阳、黄仪秀、陆庆芳等女士。我们还要感谢王世珍、杨兴文、刘志华和高教出版社的邓捷、田军等先生在本书编写过程中给予的大力支持和帮助。因时间仓促，书中出现的各种错误和问题，望读者见谅并请随时指正，以便加以修改。

王镜岩执笔

2002年4月

第二版序言

1980年由北京大学沈同、王镜岩、赵邦悌主编的《生物化学》上、下册,经过8年的试用,受到广大读者欢迎,1988年被评为国家优秀教材,并获得优秀教材奖。

鉴于生物化学发展迅速,新进展层出不穷,为了引进最新内容,故决定重新改编,作为《生物化学》第二版。

《生物化学》第二版改编的指导思想和第一版基本相同。力求反映生物化学领域的新进展;尽量包括较广泛的普通生物化学内容,为高等学校生化专业学生提供一本教科书,为广大读者提供较广博的生物化学基本知识;为便于读者学习,对有关重要的有机化学、物理化学等基础知识作扼要阐述;各章设有提要、习题及主要参考书;并附有生物化学方面的主要期刊、生物化学大事年表、常用生化名词缩写、生化名词英汉对照、索引等。

第二版的作者除第一版的作者沈同、王镜岩、赵邦悌、李建武、徐长法、朱圣康、俞梅敏等外,又增加了杨端,并约请了中国科学院生物物理所杨福愉、黄有国编写有关生物膜的两章。

全书分上、下两册,共23章。

在编写过程中,受到高等教育出版社和许多高等院校同行以及广大读者的热情鼓励和支持。1988年在厦门及1989年在大连召开的会议上进行了审稿,参加会议的有:复旦大学、南京大学、南开大学、吉林大学、武汉大学、厦门大学、兰州大学、南京大学医学院、北京师范大学、华东师范大学、东北师范大学、辽宁师范大学、陕西师范大学、高等教育出版社等单位。与会代表以极认真的态度阅读初稿,提出宝贵意见,甚至纠正个别错误,特此表示感谢。

应特别感谢张庭芳同志对蛋白质、酶、激素等章的认真审阅及建议;感谢吴相钰同志对光合作用的认真审阅及建议;感谢化学系物理化学教研室储德莹同志对生物能学和生物氧化二章的认真审阅及建议。

还应感谢使用过《生物化学》第一版的各校师生所提出的宝贵意见。北京大学生物系历届用过第一版教材的师生们,在认真钻研的基础上,对内容提出过中肯的意见,这些都对我们在编写第二版时起了很好的作用,特致谢意。我们还感谢王世珍同志在编写索引及抄稿中给予的大力支持。最后,我们还对北京大学生物系、生化教研室的全体同志表示谢意,没有他们的支持这本书是无法完成的。

高等教育出版社谭丽霞、田年担任本书责任编辑,在编辑加工中作了大量细致工作,对一些章节的修改提出了看法。高教出版社尹文君为本书描绘大部分插图,在此一并表示感谢。

《生物化学》第二版的编写及出版都是非常仓促的,书中错误和问题肯定不少,欢迎读者批评指正。

主编 沈同、王镜岩

1989年12月

第一版序

本书是根据教育部 1977 年 10 月在成都召开的高等学校生物学教材会议制订的《生物化学》教材大纲编写的。可供综合性大学、师范院校生物系生物化学专业学生的试用教材,也可供其他专业的学生及研究生、教师和科技工作者参考。

由于近几十年来生物化学的发展极其迅速,生物化学教材的篇幅也越来越大。为了在较短时间内编写出一本反映当代生物化学的面貌与水平的教材,我们组织了较多的人员参加本书的编写工作,并根据各人学术上的专长分别撰写有关章节。由于生物化学领域内各分支学科的发展速度并不是一致的,所以本书各章的篇幅大小也相差较为悬殊。本书力求在阐述各种生物化学物质的基本理化特性和生物化学知识的基础上,尽可能反映现代生物化学的新进展。蛋白质、核酸、酶等生物大分子的结构与功能在本书中占有较多的篇幅。

本书共分 17 章,分上、下两册出版。上册包括糖、脂类、蛋白质、核酸、酶、维生素与辅酶、抗菌素、激素等八章。下册包括代谢总论、生物氧化、糖代谢、脂类代谢、蛋白质分解及氨基酸代谢、核酸的降解与核苷酸代谢、核酸的生物合成、蛋白质的生物合成和物质代谢的相互联系和调节控制等九章。每章末尾都附有摘要和习题,本书所用术语的译名主要以科学出版社的《英汉生物化学词汇》为根据,重要的术语在书中第一次出现时都附有外文。各章末均列出主要参考书目。

参加本书编写的有北京大学生物系生物化学教研室沈同、王镜岩、赵邦悌、李建武、徐长法、朱圣赓、俞梅敏。全书的统一编校工作是在沈同教授领导下由王镜岩和赵邦悌二人完成的。

参加本书审稿工作的有:复旦大学和南京大学(主审单位),中国科技大学、南开大学、吉林大学、四川大学和厦门大学等单位的代表。他们对本书各章提出了许多宝贵的修改意见。

在本书编写过程中张庭芳同志对蛋白质、核酸、酶等章提出了修改意见,吴湘钰、茹炳根二同志对酶一章,顾孝诚、谭慎操二同志对蛋白质一章,马树义同志对核酸一章提出了修改意见。于彬同志在照相制版上给予很大协助。

人民教育出版社安名勋同志担任本书的责任编辑,在编辑加工过程中对本书一些章节作了修改、补充,并编写了本书索引、生化名词英汉对照及常用生化名词缩写等。本书大部分插图由人民教育出版社焦东立同志描绘。

由于编者水平所限,书中肯定会有不少错误,希望读者批评指正。

编 者

1980 年 8 月

目 录

第 1 章 糖类	1	(二) 糖链结构的多样性	56
一、引言	1	(三) 糖肽连键的类型	57
(一) 糖类的存在与来源	1	(四) 糖链的分类	58
(二) 糖类的生物学作用	1	(五) 糖链的生物学功能	60
(三) 糖类的元素组成和化学本质	1	(六) 糖链参与分子识别和细胞识别	61
(四) 糖的命名与分类	2	(七) 糖链与糖蛋白的生物活性	62
二、旋光异构	2	(八) 血型物质	63
(一) 有关旋光异构的几个概念	2	(九) 凝集素	65
(二) Fischer 投影式	4	十、糖胺聚糖和蛋白聚糖	66
(三) 构型的 RS 表示法	5	(一) 糖胺聚糖	66
三、单糖的结构	6	(二) 蛋白聚糖	69
(一) 单糖的链状结构	6	十一、糖链的结构分析	71
(二) D 系单糖和 L 系单糖	6	(一) 糖链结构分析的一般步骤	71
(三) 单糖的环状结构	8	(二) 用于糖链结构测定的一些方法	72
(四) 单糖的构象	11	提要	75
四、单糖的性质	13	习题	77
(一) 单糖的物理性质	13	主要参考书	78
(二) 单糖的化学性质	15	第 2 章 脂质	79
五、重要的单糖和单糖衍生物	22	一、引言	79
(一) 单糖	22	(一) 脂质的定义	79
(二) 单糖磷酸酯	25	(二) 脂质的分类	79
(三) 糖醇	26	(三) 脂质的生物学作用	80
(四) 糖酸	28	二、脂肪酸	82
(五) 脱氧糖	29	(一) 脂肪酸的种类	82
(六) 氨基糖	30	(二) 天然脂肪酸的结构特点	82
(七) 糖苷	31	(三) 脂肪酸的物理和化学性质	86
六、寡糖	34	(四) 脂肪酸盐与乳化作用	87
(一) 结构与性质	34	(五) 必需多不饱和脂肪酸	88
(二) 常见的二糖	36	(六) 类二十碳烷	89
(三) 其他简单寡糖	38	三、三酰甘油和蜡	91
(四) 环糊精	40	(一) 甘油取代物的构型	92
七、多糖	40	(二) 三酰甘油的类型及二酰甘油、单酰甘油	92
(一) 同多糖	41	(三) 烷醚酰基甘油	93
(二) 杂多糖	47	(四) 三酰甘油的物理和化学性质	93
八、细菌杂多糖	51	(五) 蜡	95
(一) 细菌细胞壁的化学组成	51	四、脂质过氧化作用	96
(二) 肽聚糖的结构	51	(一) 自由基、活性氧和自由基链反应	96
(三) 磷壁酸	53	(二) 脂质过氧化的化学过程	100
(四) 脂多糖	54	(三) 脂质过氧化作用对机体的损伤	101
(五) 荚膜多糖	55	(四) 抗氧化剂的保护作用	102
九、糖蛋白及其糖链	56	五、磷脂	103
(一) 糖蛋白的存在和含糖量	56	(一) 甘油磷脂的结构	103

(二) 甘油磷脂的一般性质	105	(三) 纸层析	151
(三) 几种常见的甘油磷脂	105	(四) 薄层层析	152
(四) 醚甘油磷脂	106	(五) 离子交换层析	152
(五) 鞘磷脂	107	(六) 气液层析	153
六、糖脂	108	(七) 高效液相层析	154
(一) 鞘糖脂	108	提要	155
(二) 甘油糖脂	110	习题	155
七、萜和类固醇	110	主要参考书	156
(一) 萜	110	第 4 章 蛋白质的共价结构	157
(二) 类固醇	112	一、蛋白质通论	157
(三) 胆固醇和非动物固醇	114	(一) 蛋白质的化学组成和分类	157
(四) 固醇衍生物	115	(二) 蛋白质的形状和大小	158
八、脂蛋白	116	(三) 蛋白质构象和蛋白质结构的组织层次	160
(一) 血浆脂蛋白的分类	116	(四) 蛋白质功能的多样性	160
(二) 血浆脂蛋白的结构与功能	117	二、肽	162
九、脂质的提取、分离与分析	119	(一) 肽和肽键的结构	163
(一) 脂质的有机溶剂提取	119	(二) 肽的物理和化学性质	165
(二) 脂质的色谱分离	119	(三) 天然存在的活性肽	167
(三) 混合脂肪酸的气液色谱分析	119	三、蛋白质一级结构的测定	168
(四) 脂质结构的测定	120	(一) 蛋白质测序的策略	168
提要	120	(二) N-末端和 C-末端氨基酸残基的鉴定	169
习题	121	(三) 二硫桥的断裂	171
主要参考书	121	(四) 氨基酸组成的分析	171
第 3 章 氨基酸	123	(五) 多肽链的部分裂解和肽段混合物的 分离纯化	173
一、氨基酸——蛋白质的构件分子	123	(六) 肽段氨基酸序列的测定	175
(一) 蛋白质的水解	123	(七) 肽段在多肽链中次序的决定	179
(二) α -氨基酸的一般结构	123	(八) 二硫桥位置的确定	179
二、氨基酸的分类	124	(九) 蛋白质测序举例	180
(一) 常见的蛋白质氨基酸	124	(十) 蛋白质序列数据库	181
(二) 不常见的蛋白质氨基酸	128	四、蛋白质的氨基酸序列与生物功能	181
(三) 非蛋白质氨基酸	129	(一) 同源蛋白质的物种差异与生物进化	181
三、氨基酸的酸碱化学	129	(二) 同源蛋白质具有共同的进化起源	184
(一) 氨基酸的兼性离子形式	130	(三) 血液凝固与氨基酸序列的局部断裂	185
(二) 氨基酸的解离	130	五、肽与蛋白质的人工合成	189
(三) 氨基酸的等电点	133	(一) 肽的人工合成	189
(四) 氨基酸的甲醛滴定	135	(二) 胰岛素的人工合成	192
四、氨基酸的化学反应	135	(三) 固相肽合成	192
(一) α 氨基参加的反应	135	提要	194
(二) α -羧基参加的反应	138	习题	194
(三) α -氨基和 α -羧基共同参加的反应	138	主要参考书	196
(四) 侧链 R 基参加的反应	140	第 5 章 蛋白质的三维结构	197
五、氨基酸的光学活性和光谱性质	143	一、研究蛋白质构象的方法	197
(一) 氨基酸的光学活性和立体化学	143	(一) X 射线衍射法	197
(二) 氨基酸的光谱性质	145	(二) 研究溶液中蛋白质构象的光谱学方法	198
六、氨基酸混合物的分析分离	148	二、稳定蛋白质三维结构的作用力	201
(一) 分配层析法的一般原理	148	(一) 氢键	202
(二) 分配柱层析	151		

(二) 范德华力(范德华相互作用)	202	(三) O ₂ 与肌红蛋白的结合	254
(三) 疏水作用(焓效应)	203	(四) O ₂ 的结合改变肌红蛋白的构象	255
(四) 盐键	204	(五) 肌红蛋白结合氧的定量分析(氧结合曲线)	255
(五) 二硫键	204	二、血红蛋白的结构与功能	257
三、多肽主链折叠的空间限制	204	(一) 血红蛋白的结构	257
(一) 酰胺平面与 α 碳原子的二面角(ϕ 和 ψ)	204	(二) 氧结合引起的血红蛋白构象变化	259
(二) 可允许的 ϕ 和 ψ 值;拉氏构象图	205	(三) 血红蛋白的协同性氧结合(Hb 氧结合曲线)	261
四、二级结构:多肽链折叠的规则方式	207	(四) H ⁺ 、CO ₂ 和 BPG 对血红蛋白结合氧的影响	263
(一) α 螺旋	207	三、血红蛋白分子病	266
(二) β 折叠片	209	(一) 分子病是遗传的	266
(三) β 转角和 β 凸起	211	(二) 镰刀状细胞贫血病	266
(四) 无规卷曲	212	(三) 其他血红蛋白病	269
五、纤维状蛋白质	212	(四) 地中海贫血	270
(一) α -角蛋白	212	四、免疫系统和免疫球蛋白	270
(二) 丝心蛋白和其他 β -角蛋白; β 折叠片	214	(一) 免疫系统	270
蛋白质	214	(二) 免疫系统能识别自我和非我	272
(三) 胶原蛋白:一种三股螺旋	215	(三) 在细胞表面的分子相互作用引发免疫反应	273
(四) 弹性蛋白	218	(四) 免疫球蛋白的结构和类别	275
(五) 肌球蛋白和原肌球蛋白	218	(五) 基于抗体-抗原相互作用的生化分析方法	278
六、超二级结构和结构域	220	五、肌球蛋白丝、肌动蛋白丝与肌肉收缩	279
(一) 超二级结构	220	(一) 肌纤维的结构	280
(二) 结构域	221	(二) 肌原纤维由粗丝和细丝构成	281
七、球状蛋白质与三级结构	224	(三) 骨骼肌的相关蛋白质	282
(一) 球状蛋白质的分类	224	(四) 肌肉收缩的机制:肌丝滑动模型	283
(二) 球状蛋白质三维结构的特征	228	六、蛋白质的结构与功能的进化	285
八、膜蛋白的结构	229	提要	286
(一) 膜内在蛋白	229	习题	287
(二) 脂锚定膜蛋白	231	主要参考书	289
九、蛋白质折叠和结构预测	233	第7章 蛋白质的分离、纯化和表征	290
(一) 蛋白质的变性	233	一、蛋白质的酸碱性质	290
(二) 氨基酸序列规定蛋白质的三维结构	234	二、蛋白质分子的大小与形状	291
(三) 蛋白质折叠的热力学	236	(一) 根据化学组成测定最低相对分子量	291
(四) 蛋白质折叠的动力学	237	(二) 渗透压法测定相对分子量	292
(五) 蛋白质结构的预测	239	(三) 蛋白质的扩散和扩散系数	293
十、亚基缔合和四级结构	242	(四) 沉降分析法测定相对分子量	294
(一) 有关四级结构的一些概念	242	(五) 凝胶过滤法测定相对分子量	297
(二) 四级缔合的驱动力	243	(六) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定相对分子	298
(三) 亚基相互作用的方式	243	质量	298
(四) 四级结构的对称性	246	(七) 蛋白质分子的形状	298
(五) 四级缔合在结构和功能上的优越性	247	三、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀	299
提要	248	(一) 蛋白质的胶体性质	299
习题	249	(二) 蛋白质的沉淀	300
主要参考书	250	四、蛋白质分离纯化的一般原则	300
第6章 蛋白质结构与功能的关系	252	五、蛋白质的分离纯化方法	301
一、肌红蛋白的结构与功能	252	(一) 根据分子大小不同的纯化方法	301
(一) 肌红蛋白的三级结构	252	(二) 利用溶解度差别的纯化方法	304
(二) 辅基血红素	253		

(三) 根据电荷不同的纯化方法	307	二、底物浓度对酶反应速率的影响	355
(四) 利用选择性吸附的纯化方法	312	(一) 中间络合物学说	355
(五) 利用对配体的特异生物学亲和力的纯化 方法	313	(二) 酶促反应的动力学方程式	356
(六) 高效液相层析和快速蛋白液相层析	314	(三) 多底物的酶促反应动力学	363
六、蛋白质的含量测定与纯度鉴定	315	三、酶的抑制作用	368
(一) 蛋白质含量测定	315	(一) 抑制程度的表示方法	368
(二) 蛋白质纯度鉴定	316	(二) 抑制作用的类型	368
提要	316	(三) 可逆抑制作用和不可逆抑制作用的鉴别	369
习题	317	(四) 可逆抑制作用动力学	370
主要参考书	317	(五) 一些重要的抑制剂	373
第 8 章 酶通论	319	四、温度对酶反应的影响	378
一、酶催化作用的特点	320	五、pH 对酶反应的影响	379
(一) 酶和一般催化剂的比较	320	六、激活剂对酶反应的影响	380
(二) 酶作为生物催化剂的特点	320	提要	380
二、酶的化学本质及其组成	323	习题	381
(一) 酶的化学本质	323	主要参考书	383
(二) 酶的化学组成	323	第 10 章 酶的作用机制和酶的调节	384
(三) 单体酶、寡聚酶、多酶复合体	325	一、酶的活性部位	384
三、酶的命名和分类	326	(一) 酶活性部位的特点	384
(一) 习惯命名法	326	(二) 研究酶活性部位的方法	385
(二) 国际系统命名法	326	二、酶催化反应的独特性质	387
(三) 国际系统分类法及酶的编号	327	三、影响酶催化效率的有关因素	388
(四) 六大类酶的特征和举例	329	(一) 底物和酶的邻近效应 (approximation, proximity) 与定向效应 (orientation)	388
四、酶的专一性	332	(二) 底物的形变 (distortion) 和诱导契合 (induced fit)	389
(一) 酶的专一性	332	(三) 酸碱催化 (acid-base catalysis)	390
(二) 关于酶作用专一性的假说	334	(四) 共价催化 (covalent catalysis)	392
五、酶的活力测定和分离纯化	335	(五) 金属离子催化	393
(一) 酶活力的测定	335	(六) 多元催化和协同效应	394
(二) 酶的分离和纯化	337	(七) 活性部位微环境的影响	394
六、核酶	339	四、酶催化反应机制的实例	394
(一) 核酶 (ribozyme) 的概念	339	(一) 溶菌酶 (lysozyme)	394
(二) 核酶的种类	341	(二) 胰核糖核酸酶 A (pancreatic ribonuclease A, RNase A)	399
(三) 核酶的研究意义及应用前景	342	(三) 羧肽酶 A (carboxypeptidase A)	402
七、抗体酶	343	(四) 丝氨酸蛋白酶 (serine proteases)	405
八、酶工程简介	344	(五) 天冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteases)	411
(一) 化学酶工程	345	五、酶活性的调节控制	413
(二) 生物酶工程	346	(一) 别构调控 (allosteric regulation)	413
提要	348	(二) 酶原的激活	421
习题	348	(三) 可逆的共价修饰 (reversible covalent modification)	424
主要参考书	349	六、同工酶	428
第 9 章 酶促反应动力学	351	提要	429
一、化学动力学基础	351	习题	430
(一) 反应速率及其测定	351	主要参考书	431
(二) 反应分子数和反应级数	352		
(三) 各级反应的特征	353		

第 11 章 维生素与辅酶	433	主要参考书	477
一、维生素概论	433	第 13 章 核酸的结构	478
(一) 维生素的概念	433	一、核苷酸	478
(二) 维生素的发现	433	(一) 碱基	478
(三) 维生素的分类和辅酶的关系	433	(二) 核苷	480
二、脂溶性维生素	434	(三) 核苷酸	481
(一) 维生素 A	434	二、核酸的共价结构	482
(二) 维生素 D	437	(一) 核酸中核苷酸的连接方式	482
(三) 维生素 E	438	(二) DNA 的一级结构	482
(四) 维生素 K	439	(三) RNA 的一级结构	483
三、水溶性维生素	440	三、DNA 的高级结构	485
(一) 维生素 B ₁ 和硫胺素焦磷酸	441	(一) DNA 碱基组成的 Chargaff 规则	485
(二) 维生素 PP 和烟酰胺辅酶	443	(二) DNA 的二级结构	486
(三) 维生素 B ₂ 和黄素辅酶	445	(三) DNA 的三级结构	490
(四) 泛酸和辅酶 A	447	(四) DNA 与蛋白质复合物的结构	492
(五) 维生素 B ₆ 和磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺	449	四、RNA 的高级结构	496
(六) 维生素 B ₁₂ (氰钴胺素)及其辅酶	450	(一) tRNA 的高级结构	496
(七) 生物素	454	(二) rRNA 的高级结构	497
(八) 叶酸和四氢叶酸	456	(三) 其他 RNA 的高级结构	498
(九) 硫辛酸	459	提要	499
(十) 维生素 C	461	习题	500
四、作为辅酶的金属离子	464	主要参考书	500
(一) 概论	464	第 14 章 核酸的物理化学性质	502
(二) 金属酶类与金属激活酶类	465	一、核酸的水解	502
(三) 含铁酶类	466	(一) 酸水解	502
(四) 含铜酶类	466	(二) 碱水解	502
(五) 含锌酶类	466	(三) 酶水解	503
(六) 其他金属酶类	467	二、核酸的酸碱性质	504
提要	467	三、核酸的紫外吸收	507
习题	468	四、核酸的变性、复性及杂交	508
主要参考书	469	(一) 变性	508
第 12 章 核酸通论	470	(二) 复性	509
一、核酸的发现和研究的简史	470	(三) 核酸的杂交	510
(一) 核酸的发现	470	提要	511
(二) 核酸的早期研究	470	习题	511
(三) DNA 双螺旋结构模型的建立	471	主要参考书	511
(四) 生物技术的兴起	472	第 15 章 核酸的研究方法	513
(五) 人类基因组计划开辟了生命科学新纪元	472	一、核酸的分离、提纯和定量测定	513
二、核酸的种类和分布	473	(一) DNA 的分离	513
(一) 脱氧核糖核酸(DNA)	473	(二) RNA 的分离	513
(二) 核糖核酸(RNA)	474	(三) 核酸含量的测定法	514
三、核酸的生物功能	475	二、核酸的超速离心	515
(一) DNA 是主要的遗传物质	475	三、核酸的凝胶电泳	516
(二) RNA 参与蛋白质的生物合成	476	(一) 琼脂糖凝胶电泳	516
(三) RNA 功能的多样性	476	(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳	517
提要	476	四、核酸的核苷酸序列测定	517
习题	477		

(一) DNA 的酶法测序	517	(一) 耐药菌产生导致抗生素失效的酶	547
(二) DNA 的化学法测序	518	(二) 耐药菌改变对抗生素敏感的部位	547
(三) RNA 的测序	519	(三) 耐药菌降低细胞透过抗生素的能力	548
五、DNA 聚合酶链反应(PCR)	519	提要	548
六、DNA 的化学合成	520	习题	549
提要	521	主要参考书	549
习题	522	第 17 章 激素	550
主要参考书	522	一、概述	550
第 16 章 抗生素	523	(一) 激素的分泌	550
一、抗生素的概况	523	(二) 激素的化学本质	553
(一) 抗生素的定义	523	二、激素的合成与分泌	554
(二) 拮抗作用与抗生素的发现	523	(一) 多肽激素合成后储存于分泌囊中	554
(三) 抗生素的抗菌性能	524	(二) 甲状腺激素和肾上腺激素是氨基酸衍生物	555
(四) 新抗生素的寻找	524	(三) 固醇类激素源自胆固醇	556
二、一些重要抗生素的化学和医疗特性	525	(四) 脂肪族激素——前列腺素	556
(一) 青霉素	525	三、重要激素举例	558
(二) 链霉素	527	(一) 氨基酸衍生物激素	558
(三) 氨基环醇类抗生素	528	(二) 重要多肽类激素	558
(四) 氯霉素	529	(三) 重要固醇类激素	565
(五) 四环素族抗生素	530	(四) 脂肪族激素	569
(六) 红霉素	531	四、激素的作用机制研究	570
(七) 多肽类抗生素	531	(一) 膜受体通过腺苷酸环化酶作用途径	571
(八) 创新霉素	532	(二) 钙及肌醇三磷酸作用途径	574
(九) 利福霉素类抗生素	532	(三) 受体的酪氨酸激酶途径	577
(十) 灰黄霉素	533	(四) 固醇类激素受体调节基因转录速度	580
(十一) 制霉菌素	534	五、激素分泌的调节	582
三、抗肿瘤抗生素的探索	534	(一) 上级内分泌腺对下级内分泌腺的调节,	582
(一) 自力霉素	535	神经系统与内分泌的关系	582
(二) 放线菌素 K	535	(二) 负反馈作用	583
(三) 争光霉素	535	(三) 酶的分步剪裁调控	583
(四) 光辉霉素	537	(四) 多元调控	583
四、抗生素在农业中的应用	537	六、植物激素	583
(一) 灭瘟素	538	(一) 植物生长素	584
(二) 春雷霉素	538	(二) 赤霉素	584
(三) 放线酮	538	(三) 细胞分裂素	584
(四) 多氧菌素	539	(四) 脱落酸	585
(五) 日光霉素	540	(五) 乙烯	585
(六) 四抗素	540	七、昆虫激素	585
(七) 有效霉素	540	(一) 昆虫的内激素	585
(八) 奥弗麦菌素	541	(二) 昆虫的外激素	586
五、抗生素的抗菌作用机制	542	提要	586
(一) 抑制核酸的合成	542	习题	588
(二) 抑制蛋白质的合成	543	主要参考书	588
(三) 改变细胞膜的通透性	544	第 18 章 生物膜的组成与结构	589
(四) 干扰细胞壁的形成	545	一、生物膜的组成和性质	589
(五) 作用于能量代谢系统或作为抗代谢物	546	(一) 膜脂	589
六、细菌对抗生素耐药性的生物化学机制	546		

(二) 膜蛋白	593	(四) 膜蛋白的三维结构	600
(三) 糖类	595	提要	604
二、生物膜的分子结构	595	习题	604
(一) 生物膜中分子间作用力	595	主要参考书	605
(二) 生物膜结构的几个主要特征	596	索引	606
(三) 生物膜分子结构的模型	599		

第 1 章 糖 类

糖类(carbohydrate)是四大类生物大分子之一。另外三大类是脂质、蛋白质和核酸,它们将在后面各章讨论。本章讨论糖的化学,包括糖的分类、结构、性质和分析方法,并涉及部分生物学功能。

一、引 言

(一) 糖类的存在与来源

糖类广泛地存在于生物界,特别是植物界。糖类物质按干重计占植物的 85%~90%,占细菌的 10%~30%,动物的小于 2%。动物体内糖的含量虽然不多,但其生命活动所需能量主要来源于糖类。

糖类物质是地球上数量最多的一类有机化合物。地球的生物量(biomass)干重的 50%以上是由葡萄糖的聚合物构成的。地球上糖类物质的根本来源是绿色细胞进行的光合作用。关于光合作用将在下册第 27 章专题讨论。

(二) 糖类的生物学作用

糖类是细胞中非常重要的一类有机化合物。概括起来主要有以下几个方面:

1. 作为生物体的结构成分

植物的根、茎、叶含有大量的纤维素、半纤维素和果胶物质等,这些物质构成植物细胞壁的主要成分。属于杂多糖的肽聚糖是细菌细胞壁的结构多糖。昆虫和甲壳类的外骨骼也是一种糖类物质,称壳多糖。

2. 作为生物体内的主要能源物质

糖在生物体内(或细胞内)通过生物氧化释放出能量,供生命活动的需要。生物体内作为能源贮存的糖类有淀粉、糖原等。

3. 在生物体内转变为其他物质

有些糖是重要的中间代谢物,糖类物质通过这些中间物为合成其他生物分子如氨基酸、核苷酸、脂肪酸等提供碳骨架。

4. 作为细胞识别的信息分子

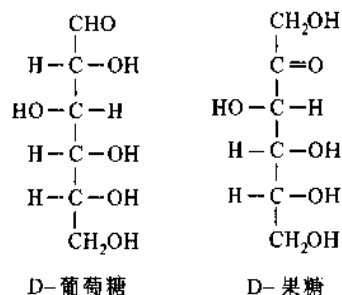
糖蛋白是一类在生物体内分布极广的复合糖。它们的糖链可能起着信息分子的作用,早在血型物质的研究中就有了一定的认识。随着分离分析技术和分子生物学的发展,近 10 多年来对糖蛋白和糖脂中的糖链结构和功能有了更深的了解。发现细胞识别包括粘着、接触抑制和归巢行为,免疫保护(抗原与抗体),代谢调控(激素与受体),受精机制,形态发生、发育、癌变、衰老、器官移植等,都与糖蛋白的糖链有关,并因此出现了一门新的学科,称糖生物学(glycobiology)。

(三) 糖类的元素组成和化学本质

大多数糖类物质只由碳、氢、氧三种元素组成,其实验式为 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 或 $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_m$ 。其中氢和氧的原子数比例是 2:1,犹如水分子中 H 和 O 之比,因此过去曾误认为这类物质是碳(carbon)的水合物(hydrate),碳水化合物(carbohydrate)也因之而得名。但后来发现有些糖,如鼠李糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$)和脱氧核糖($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$)等,它们的分子中 H、O 原子数之比并非 2:1,而一些非糖物质,如甲醛(CH_2O),乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)和乳酸($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$)等,它们的分子中 H、O 之比却都是 2:1,所以“碳水化合物”这一名称并不恰当。为此,1927 年国际化学名词重审委员会曾建议用“糖族(glucide)”一词以代替“碳水化合物”。但由于此名称沿用已久,至今西文中仍广泛使用它。英文中 carbohydrate 是糖类物质的总称,较简单的糖类物质常称为

sugar 或 saccharide(拉丁文, saccharum 即 sugar)。saccharide 一词常被冠以词头, 用作糖的类别名称, 如 monosaccharide(单糖), polysaccharide(多糖)等。汉文中“糖类”和“碳水化合物”两词通用, 但以前者为多。

糖从化学角度看, 它们是多羟基的醛或多羟基的酮。大家熟悉的简单糖如葡萄糖和果糖, 它们具有下面的结构式:



葡萄糖含 6 个碳原子、5 个羟基和 1 个醛基, 称己醛糖, 果糖含 6 个碳原子、5 个羟基和 1 个酮基, 称己酮糖。淀粉和纤维素也属于糖类, 它们是由多个葡萄糖分子缩合而成的聚合物。此外, 像 *N*-乙酰葡萄糖胺, 果糖-1,6-二磷酸这样一些糖的衍生物也归入糖类。因此从其化学本质给糖类下一个定义: 糖类是多羟基、多羟酮或其衍生物, 或水解时能产生这些化合物的物质。

(四) 糖的命名与分类

个别糖的命名, 多数是根据糖的来源给予一个通俗名称, 如葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、棉子糖和壳多糖等。

糖类物质根据它们的聚合度分类如下:

1. 单糖(monosaccharide)

单糖是不能被水解成更小分子的糖类, 也称简单糖, 如葡萄糖、果糖和核糖等。

2. 寡糖(oligosaccharide)

寡糖包括的类别很多, 双糖或称二糖(disaccharide), 水解时生成 2 分子单糖, 如麦芽糖、蔗糖等; 三糖(trisaccharide), 水解时产生 3 分子单糖, 如棉子糖; 以及四糖(tetrasaccharide), 五糖(pentasaccharide)和六糖(hexasaccharide)等。

3. 多糖(polysaccharide)

多糖是水解时产生 20 个以上单糖分子的糖类。包括:

- (1) 同多糖(homopolysaccharide) 水解时只产生一种单糖或单糖衍生物, 如糖原、淀粉、壳多糖等。
- (2) 杂多糖(heteropolysaccharide) 水解时产生一种以上的单糖或/和单糖衍生物, 如透明质酸、半纤维素等。

糖类与蛋白质、脂质等生物分子形成的共价结合物如糖蛋白、蛋白聚糖和糖脂等, 总称复合糖或糖复合物(glycoconjugate)。

单糖可根据分子中含醛基还是酮基分为醛糖(aldose)和酮糖(ketose), 实验式常写为 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 。自然界中最小的单糖 $n=3$, 最大的, 一般 $n=7$ 。依据分子中所含的碳原子数目(3~7)分别称为三碳糖或称丙糖(triose), 四碳糖或丁糖(tetrose), 五碳糖或戊糖(pentose), 六碳糖或己糖(hexose)和七碳糖或庚糖(heptose)。有时碳原子数目和含羰基的类型结合起来命名, 例如己醛糖、庚酮糖等。

二、旋光异构

(一) 有关旋光异构的几个概念

旋光异构[现象]在生物分子中普遍存在, 并具有重要的生物学意义。在讲述单糖结构与性质之前, 先

复习几个有关旋光异构化学的术语是必要的。

1. 异构现象

同分异构或称异构(isomerism),是指存在两个或多个具有相同数目和种类的原子并因而即具有相同相对分子质量的化合物的现象。同分异构有相同的组成(composition),故具有相同的分子式。同分异构主要有两种类型。一是结构异构(structural isomerism),这是由于分子中原子连接的次序不同造成的,包括碳架异构体、位置异构体和功能异构体。原子连接在一起的次序叫做化合物的构造(constitution),用结构式表示。二是立体异构(stereoisomerism),立体异构体具有相同的结构式,但原子在空间的分布不同。原子在空间的相对分布或排列称为分子的构型(configuration)。区分立体异构体之间的差别须用立体模型、透视式或投影式。

立体异构又可分为几何异构(geometric isomerism)和旋光异构或光学异构(optical isomerism)。几何异构也称顺反异构(*cis-trans* isomerism),这是由于分子中双键或环的存在或其他原因限制原子间的自由旋转引起的。旋光异构是由于分子存在手性(chirality)造成的,最常见的是分子内存在不对称碳原子。几何异构体是这样的一组立体异构体,它们当中不存在不可叠合的镜像对(mirror image pair),因而不具旋光性(除非异构体同时符合旋光异构体的手性要求)。旋光异构体是一组至少存在一对不可叠合的镜像体的立体异构体,一般都有旋光性(除非异构体出现对称元素而失去手性)。

由于单键基本自由旋转以及键角有一定的柔性,一种具有相同结构和构型的分子在空间里可采取多种形态,分子所采取的特定形态称为构象(conformation)。组成、构造、构型和构象四个术语有明确的不同含义,不应混用。

2. 旋光性(optical activity)

当光波通过尼科尔棱镜(Nicol prism)时,由于棱镜的结构只允许沿某一平面振动的光波通过,其他光波都被阻断,这种光称平面偏振光(plane-polarized light)。当这种光通过旋光物质(optically active substance)的溶液时,则光的偏振面(plane of polarization)会向右(顺时针方向或正向,符号+)旋转或向左(逆时针方向或负向,符号-)旋转。使偏振面向右旋的(dextrorotatory)称右旋光物质,如(+)-甘油醛,左旋的(levorotatory)称左旋光物质,如(-)-甘油醛。

旋光物质使平面偏振光的偏振面发生旋转的能力称旋光性、光学活性或旋光度。在一定条件下旋光度 α'_λ 与待测液的浓度(c)和偏振光通过待测液的路径长度(l)的乘积成正比:

$$\alpha'_\lambda = [\alpha]_\lambda' cl \quad \text{或} \quad [\alpha]_\lambda' = \frac{\alpha'_\lambda}{cl}$$

式中, $[\alpha]$ 是比例常数,称比旋或旋光率(specific rotation),即单位浓度和单位长度下的旋光度,比旋是旋光物质的特征物理常数; t 代表测定时的温度; λ 代表所用光波波长,一般用钠光($\lambda = 589 \text{ nm}$ 或 5890 \AA , \AA 为旧单位 angström 的缩写, $10 \text{ \AA} = 1 \text{ nm}$),此时可写作 $[\alpha]_D^t$; l 为样品管长度,以分米(dm, $1 \text{ dm} = 10 \text{ cm}$)表示;浓度 c ,用每毫升溶液中所含旋光物质克数(g/mL)表示。比旋数值前面加+号或-号,以指明旋光方向。某一物质的 $[\alpha]$ 值,甚至旋光方向,与测定时的温度、光波波长、溶剂种类、溶质浓度以及 pH 等有关。因此测定比旋时,必须标明这些因素。

3. 不对称碳原子

不对称碳原子(asymmetric carbon atom)是指与四个不同的原子或原子基团共价连接并因而失去对称性的四面体碳,也称手性碳原子、不对称中心或手性中心,常用 C^* 表示。

有机化合物的旋光性与分子内部的结构有关,根据对称性原理,凡是分子中存在对称面(镜面)、对称中心或四重交替对称轴这些对称元素(symmetry element)之一的,都可以和它的镜像叠合,因而都没有旋光性;凡分子中没有上述三种对称元素的,都不能与它的镜像叠合,因而都有旋光性。分子这种不能与自己的镜像叠合的关系,犹如人的左右手关系,因此称这种分子具有手性或称它为手性分子(chiral molecule)。手性与旋光性是一对孪生子。

4. 构型

构型对旋光异构体来说,是指不对称碳原子的四个取代基在空间的相对取向。这种取向形成两种而

且只有两种可能的四面体形式,即两种构型。下面以含一个不对称碳原子的甘油醛(2,3-二羟丙醛)为例说明构型概念。甘油醛分子中的C2是一个C*,因此甘油醛可以有两种构型。它们的立体模型和透视式如图1-1所示:

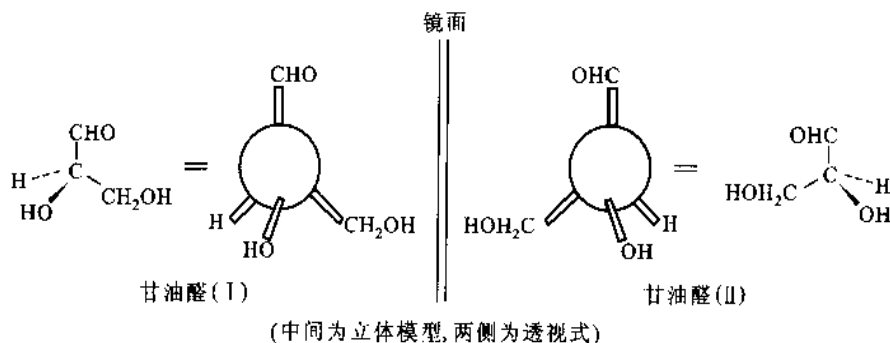


图1-1 甘油醛的构型

从图1-1可以看出一个不对称碳原子的取代基在空间里的两种取向是物体与镜像的关系,并且两者不能重叠。可见甘油醛(I)和(II)是两种旋光异构体,它们被称为对映体(enantiomer)。两个对映体除具有程度相等而方向相反的旋光性和不同的生物活性外,其他物理和化学的性质完全相同。

早期研究旋光物质时,虽然已知用上述对映体的模型来表示甘油醛的两个旋光异构体,但不知哪个模型代表左旋分子,哪个代表右旋分子。于是1906年人为规定右旋甘油醛具有甘油醛(I)的构型,并称为D型,这样甘油醛(I)就标为D(+)-甘油醛,而甘油醛(II)标为L(-)-甘油醛,并选定甘油醛作为其他旋光化合物构型的参考标准。根据这种人为规定的构型标准物确定的化合物构型称为相对构型。1951年前确定的化合物构型只能认为是相对构型。由于X射线衍射技术的发展,测定了某些对映体的真实空间结构,并证实原来人为规定的甘油醛构型与真实的构型,即绝对构型,是一致的。因此过去测得的构型也就成为绝对构型。

(二) Fischer 投影式

这种投影式是德国化学家 Fischer E 于 1891 年首次提出来的。投影式(projection formula)可看成是立体模型或透视结构在纸面上的投影,这是为了方便书写和比较,特别是对于含有多个手性碳原子的糖化合物。D(+)-甘油醛的透视式和投影式示于图1-2。透视式A和B中手性碳原子和实线键处于纸

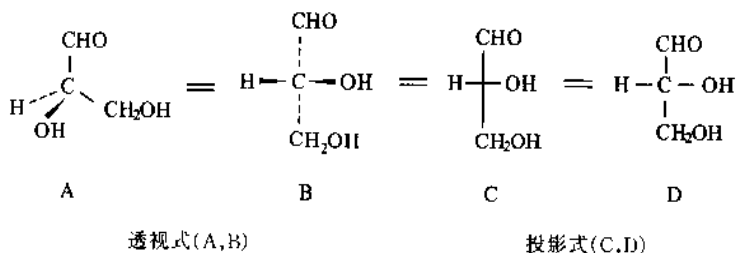
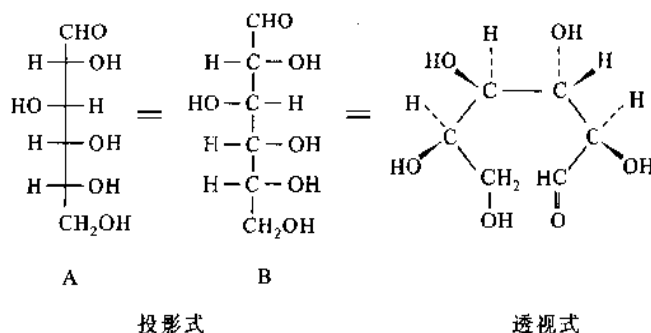


图1-2 D(+)-甘油醛的立体结构

面内,虚线键伸向纸面背后,楔形键凸出纸面,伸向读者,各个价键与纸面约取 $\pm 19^\circ 28'$ 的倾斜角。投影式C中两直线的交叉点相当于一个碳原子,水平方向的键伸向纸面前方,垂直方向的键伸向纸面后方。书写投影式时,通常规定碳键处于垂直方向,羰基写在链的上端,羟甲基写在下端,氢原子和羟基位于链的两侧。这样的投影式在纸面内可以转动 180° 而不改变原来的构型,但不允许旋转 90° 或 270° (如果未特别指出),更不能离开纸面加以翻转。下面示出D(+)-葡萄糖的投影式和透视式:



(三) 构型的 RS 表示法

虽然 DL 构型命名系统在反映旋光化合物之间的构型联系方面有它的优点,但是它也有很大的局限性。例如(-)-酒石酸(tartaric acid),根据与甘油醛的构型联系, C*2 和 C*3 一个是 D-构型,另一个则为 L-构型,然而实际上 C*2 和 C*3 的构型是相同的,见图 1-3。

1956 年 Cohn R, Ingold C 和 Prelog V 提出的 RS 构型命名系统可以明确无误地规定任何手性碳原子的绝对构型,具有普遍适用的优点。

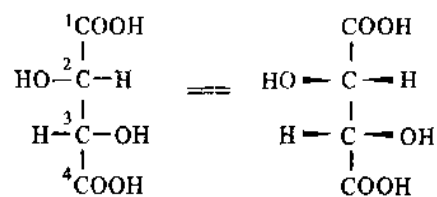


图 1-3 (-)-酒石酸的立体结构

应用 RS 表示法的第一步是指定与每个手性碳原子直接相连的 4 个取代基的优先性(priority)顺序。顺序规则(sequence rule)的基础是原子序数高的原子比原子序数低的原子优先性大。生物化学中重要基团的优先性顺序(从大到小)是—SH,—OCOR,—OR,—OH,—NHR,—NH₂,—COOR,—COOH,—CONH₂,—CHO,—CHROH,—CH₂OH,—C₆H₅,—CH₃,—T,—D,—H。第二步是旋转手性四面体碳,使那个优先性最小的取代基,离开观察者最远,另三个取代基面向观察者。最后一步,看一看,面向观察者的三个取代基按优先性大小的顺序是顺时针方向还是逆时针方向,如果是顺时针方向(右手),则为 R 构型(R 源自拉丁文 rectus,右),如果是反时针方向(左手),则为 S 构型(S 源自拉丁文 sinister,左)。

举投影结构式表示的(-)-甘油醛为例(图 1-4)说明 RS 表示法。首先标出手性中心的 4 个取代基的优先性顺序:(1) —OH,(2) —CHO,(3) —CH₂OH,(4) —H;然后使手性中心与—H 以价键取向位于视轴上,并使手性中心靠近观察者;最后观察处于手性中心和观察者之间的三个取代基从(1)到(2)到(3)的方向是顺时针还是逆时针的,本例中属于逆时针的(左手),为 S 构型,对映体(+)-甘油醛为 R 构型。应该指出 RS 和 DL 构型并不是相互对应的,例如(-)-酒石酸(图 1-3)根据与 D(+)-甘油醛的联系被规定为 D 构型,但它的 RS 构型命名是 2S,3S(-)-酒石酸。

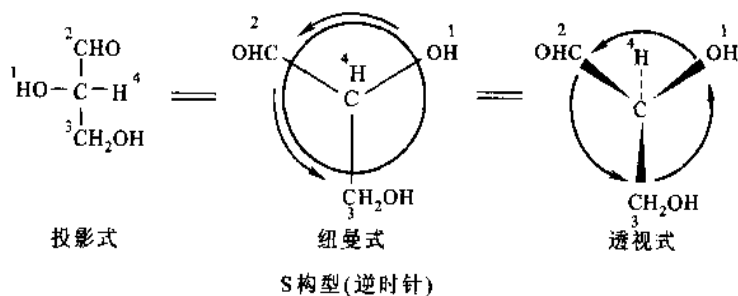


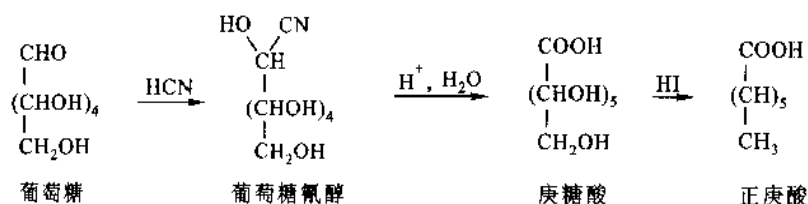
图 1-4 (-)-甘油醛的 RS 表示法

根据 RS 表示法,D-葡萄糖的 4 个手性碳原子:C2,C3,C4,C5 的构型分别为 R,S,R,R。因此 D-葡萄糖可称为 2R,3S,4R,5R-2,3,4,5,6-五羟己醛或 2R,3S,4R,5R-己醛糖。显然这样的名称太长,但它的立体结构能够清楚地表达出来。

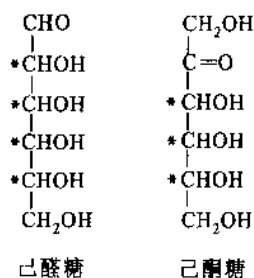
三、单糖的结构

(一) 单糖的链状结构

纯的葡萄糖经元素组成和相对分子质量测定,确定葡萄糖的分子式为 $(\text{CH}_2\text{O})_6$,即 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 。葡萄糖与乙酸酐加热,形成结晶的五乙酸酯,证明葡萄糖分子含有 5 个羟基。其次葡萄糖与无水氰化氢加成生成的氰醇衍生物,经水解和氢碘酸还原得正庚酸,表明葡萄糖只可能是一直链的己醛。又已知一个碳原子上只带一个羟基的结构是稳定的,因此葡萄糖除链端碳原子是醛基外,其他 5 个碳原子各带一个羟基,其余的价键与氢相结合。反应过程如下:



果糖的分子式也是 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$,进行上述同样的反应可得到五乙酸酯和 2-甲基己酸。可见葡萄糖和果糖分别具有 2,3,4,5,6-五羟基己醛和 1,3,4,5,6-五羟基己酮-2 的结构。前者是一个己醛糖,后者是一个己酮糖。它们的非立体链状结构如下图所示:



己醛糖含 4 个手性碳原子,己酮糖含 3 个手性碳原子,它们分别存在 8 对和 4 对对映体。在产物纯化的现代层析方法和结构测定的现代光谱技术尚未问世前,Fischer 根据当时有限的实验资料和立体化学知识进行逻辑推论,于 1891 年发表了有关葡萄糖立体化学(分子中各手性碳原子的构型)的著名论文,并利用与此类似的推理,论证了 16 个己醛糖旋光异构体(图 1-5)中的 12 个异构体的立体化学。由于这一巨大成就,1902 年 Fischer 获得诺贝尔化学奖。

读者可以参看有机化学教本或专著,利用 Fischer 当年推论葡萄糖立体结构所依据的实验事实自己练习推论。

(二) D 系单糖和 L 系单糖

单糖从丙糖到庚糖,除二羟丙酮外,都含有手性碳原子。甘油醛含一个 C^* ,有两个旋光异构体,组成一对对映体。丁醛糖含 2 个 C^* ,可有 4 个旋光异构体,组成两对对映体。依次类推,含 n 个 C^* 的化合物,旋光异构体的数目 $=2^n$ 。组成 2^{n-1} 对对映体。

所有的醛糖都可以看成是由甘油醛的醛基碳下端逐个插入 C^* 延伸而成。由 D-甘油醛衍生而来的称 D 系醛糖(D-family of aldoses)^{*} (图 1-5),由 L-甘油醛衍生而来的称 L 系醛糖(L-family of aldoses)。L 系醛

* 西文中表示构型的 D、L 的字号应较文中的大写字母的字号稍小,如 D-Glucose, L-Sorbose。

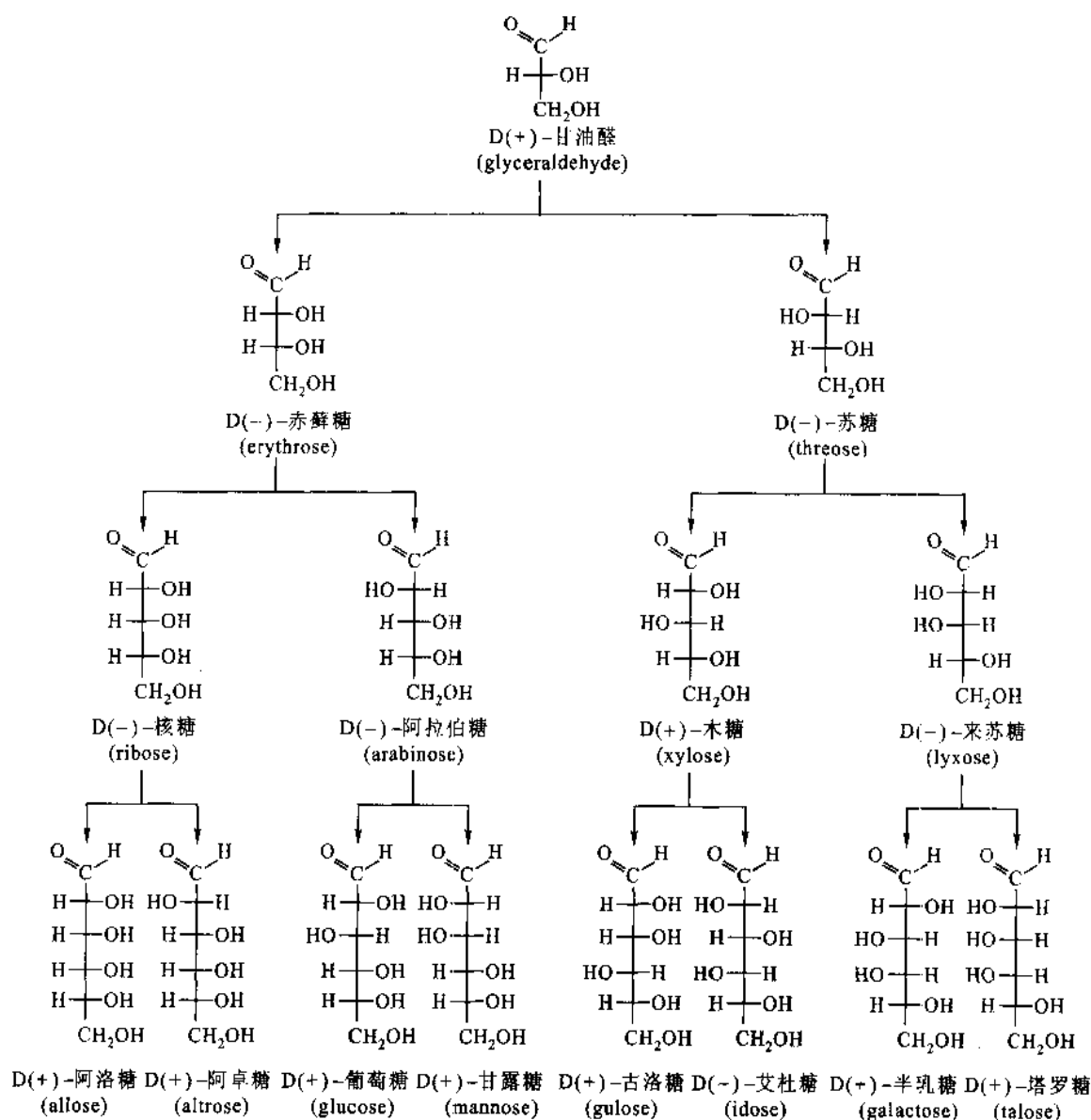
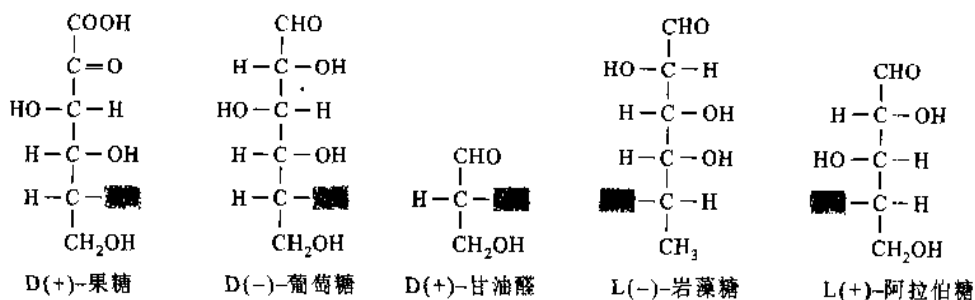


图 1-5 D系醛糖的立体结构

糖是相应的 D 系醛糖的对映体。同样各种酮糖可被认为是由二羟丙酮衍生而来(图 1-6)。

任一旋光化合物都只有一个对映体,它的其他旋光异构体在化学与物理性质方面都与之不同,这些不是对映体的旋光异构体称为非对映异构体(diastereoisomer)或非对映体(diastereomer)。例如,D(+)-葡萄糖的对映体只有 L(-)-葡萄糖,其余的 14 个己醛糖旋光异构体是它的非对映体。

通常所谓的单糖构型是指分子中离羰基碳最远的那个手性碳原子的构型。如果在投影式中此碳原子上的 -OH 具有与 D(+)-甘油醛 C2-OH 相同的取向,则称 D 型糖,反之则为 L 型糖,如下图中加有阴影的羟基所示:



必须指出,糖的构型(D,L)与旋光方向(+,-)并无直接联系。旋光方向与程度是由整个分子的立体结构(包括各手性碳原子的构型)而不是某一个C*的构型所决定的。

从下面几个结构可以看到,己醛糖的旋光异构体,葡萄糖和甘露糖或葡萄糖和半乳糖,两者之间除一个手性碳原子(对葡萄糖和甘露糖是C*2,对葡萄糖和半乳糖是C*4)的—OH位置不同外,其余结构完全相同。这种仅一个手性碳原子的构型不同的非对映异构体称为差向异构体(epimer)。

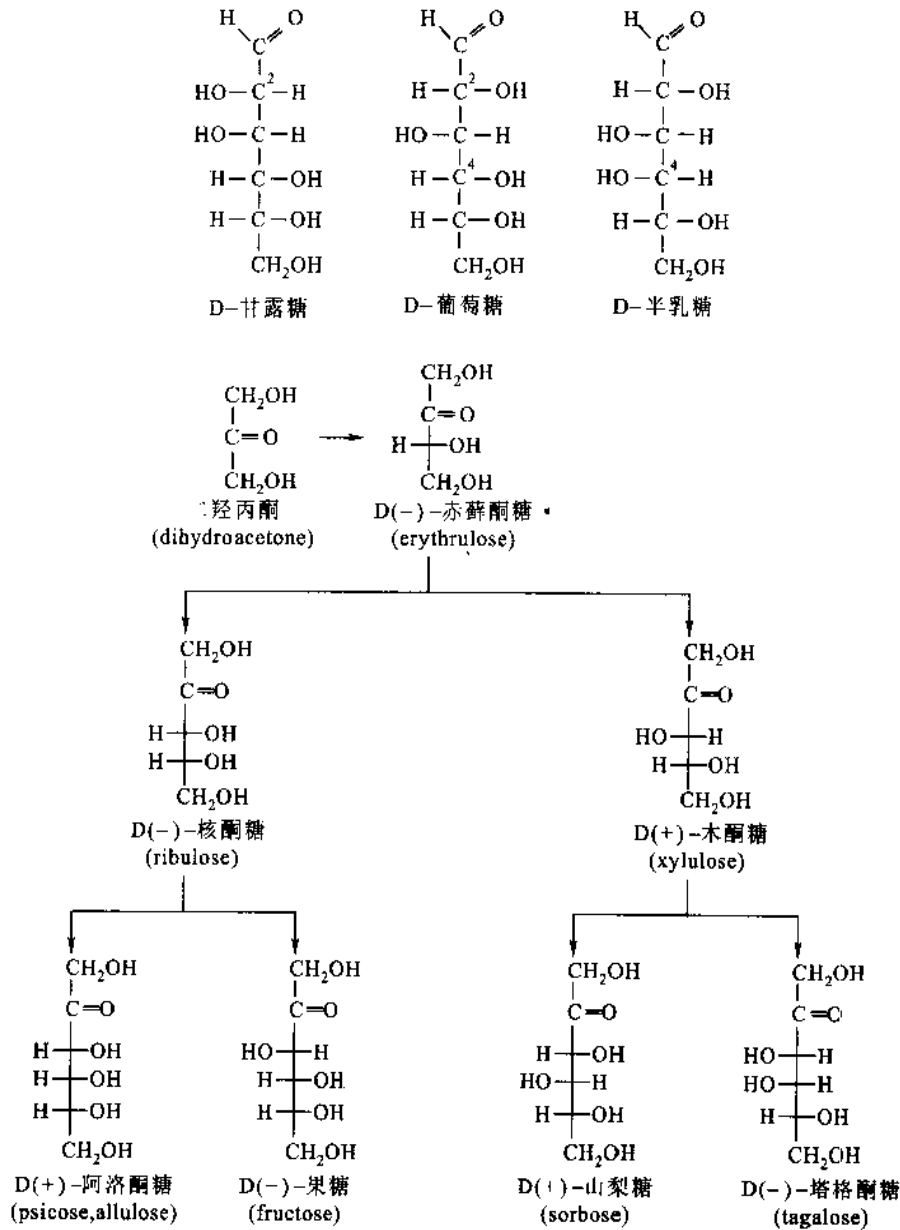


图 1-6 D系酮糖*的立体结构

(三) 单糖的环状结构

1. 变旋现象

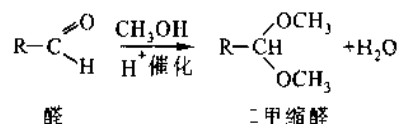
许多单糖,新配制的溶液会发生旋光度的改变,这种现象称变旋(mutarotation)。在不同条件下获得的D(+)-葡萄糖,其比旋值不同。从低于30℃的乙醇中结晶的,熔点146℃, $[\alpha]_D^{20} = +112.2^\circ$,称为 α -型;从

* 酮糖的命名也可用比该酮糖少一个碳原子(酮基碳)的相应醛糖名称的词干加该“碳数酮糖”字样构成,例如D-核酮糖(一种戊酮糖)比它少一个碳的相应醛糖是D-赤藓糖,取其词干“赤藓”加“戊酮糖”构成赤藓戊酮糖(erythropentulose),即核酮糖。

98℃吡啶中结晶的,熔点 148–155℃, $[\alpha]_D^{20} = +18.7^\circ$, 称为 β -型。这两种晶体分别溶于水中,放置一定时间后,其比旋达到同一恒定值, $+52.6^\circ$ 。变旋是由于分子立体结构发生某种变化的结果。

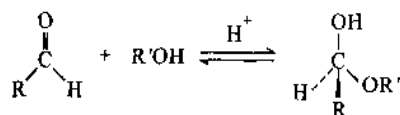
2. 环状半缩醛

葡萄糖是多羟基醛,应该显示醛的特性反应,但实际上不如简单醛类的特性那样显著,例如葡萄糖不能与 Schiff(品红-亚硫酸)试剂发生紫红色反应,也难与亚硫酸氢钠发生加成反应。又发现葡萄糖在无水甲醇中以氯化氢作催化剂时,得到的是只含一个甲基的化合物(见第 19 页),不像简单的醛类那样得到的是二甲缩醛:



但这个被称为 α -甲基葡萄糖苷的化合物却表现出缩醛特征:对碱稳定,无还原性和无羰基反应,但容易被酸水解。不久又分离出一个称为 β -甲基葡萄糖苷的化合物。这两个异构体都无变旋现象,但水解时都能生成 (+)-D-葡萄糖。

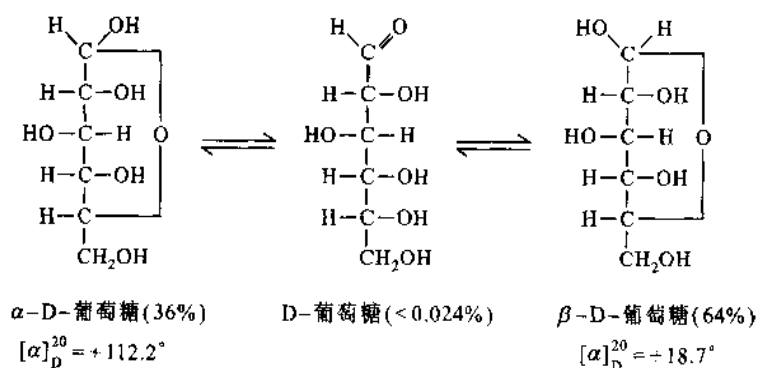
从羰基的性质可以了解到,醇与醛或酮可以发生快速而可逆的亲核加成(nucleophilic addition),形成半缩醛(hemiacetal):



如果羟基和羰基处于同一分子内,可以发生分子内亲核加成,导致环状半缩醛的形成。作为多羟基醛或酮的单糖分子完全可能形成这种环状结构(ring structure)。1893年 Fischer E 正式提出葡萄糖分子环状结构学说。

3. α 和 β 异头物

单糖由直链结构变成环状结构后,羰基碳原子成为新的手性中心,导致 C1 差向异构化(epimerization),产生两个非对映异构体。这种羰基碳上形成的差向异构体称异头物(anomer)。在环状结构中,半缩醛碳原子也称异头碳原子(anomeric carbon atom)或异头中心。异头碳的羟基与最末的手性碳原子的羟基具有相同取向的异构体称 α 异头物,具有相反取向的称 β 异头物。六元环 D-葡萄糖的两个异头物如下图所示:



因此标示异头碳的构型时,必须同时指出糖的构型(D系或L系)。异头物在水溶液中通过直链(开链)形式可以互变(差向异构化),经一定时间后达到平衡。这就是产生变旋现象的原因。应该指出, α 与 β 异头物不是对映体,平衡时两种成分不是一半一半。D-葡萄糖的情况,平衡后 α -D-葡萄糖约占 36%, β -D-葡萄糖占 64%,含游离醛基的开链葡萄糖占不到 0.024%,这便是为什么葡萄糖的醛基特性表现不明显的原因。葡萄糖成环时已由醛变成半缩醛,因此只能与一分子甲醇反应而生成甲基葡萄糖苷(一种缩醛),又由于异头碳上的羟基可以有两种取向,因而能形成 α 、 β 两种甲基葡萄糖苷。

4. 吡喃糖和呋喃糖

开链的单糖形成环状半缩醛时,最容易出现五元环和六元环的结构。例如 D-葡萄糖 C5 上的羟基与 C1 的醛基加成生成六元环的吡喃[型]葡糖(glucopyranose),又如 D-果糖 C5 上的羟基与 C2 的酮基加成形成五元环的呋喃[型]果糖(fructofuranose)。吡喃糖和呋喃糖的名称分别来自简单的环醚:吡喃(pyran)和呋喃(furan)。D-葡萄糖主要以吡喃糖存在,呋喃糖次之。对葡萄糖来说,吡喃型比呋喃型稳定;D-果糖也以两种形式存在(图 1-7)。

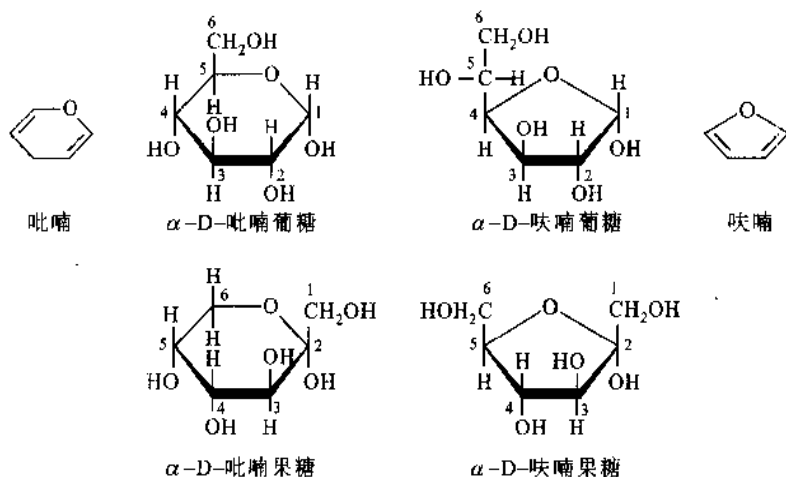


图 1-7 吡喃型和呋喃型的 D-葡萄糖和 D-果糖(Haworth 式)

用前面讲到的 Fischer 投影式表示单糖的环状结构,不能准确地反映环中氧桥(oxo bridge)的长度(太长)和成环时绕 C4 和 C5 之间的键发生旋转的事实(C4 氢和 C5 氢已不在同侧)。于是 1926 年英国化学家 Haworth W N 建议使用 1913 年 Boesken 首次提出的一种透视式来表示单糖的环状结构。这种透视式常称 Haworth 投影式或 Haworth 式。Haworth 式中已醛糖的吡喃环用一个垂直于纸平面的六角形环表示,环中省略了构成环的碳原子,粗线表示靠近读者的环边缘,细线(含氧桥)表示离开读者的环边缘(图 1-7)。

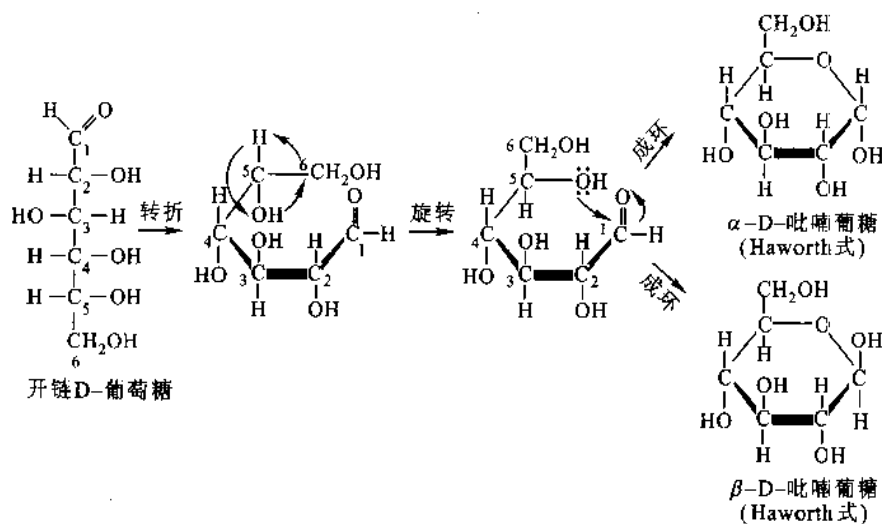


图 1-8 D-葡萄糖由 Fischer 式改写为 Haworth 式的步骤

举葡萄糖为例,由 Fischer 式改写为 Haworth 式时(图 1-8),Fischer 式中 C* 的右向羟基在 Haworth 式中处于含氧环面的下方,左向羟基在 Haworth 式中处于环面的上方。形成 1-5 型氧桥时,绕 C4-C5 之间的键将旋转约 109° ,结果 C5 上的羟甲基旋至环面上方,C5 氢转到环面下方。当决定糖构型的 C* 羟基参与成环时,在标准定位(即含氧环上的碳原子按序数顺时针排列)的 Haworth 式中羟甲基在环平面上方的为 D 型糖,在环平面下方的为 L 型糖;不论是 D 型糖还是 L 型糖,异头碳羟基与末端羟甲基是反式的为 α 异头物,顺式的

为 β 异头物。

(四) 单糖的构象

1. 构象及其描绘方法

由于绕单键旋转引起的组成原子的不同排列称为构象。一种特定的构象称构象体(conformer)或构象异构体(conformational isomer)。不像旋光异构体,不同的构象体通常不能分离出来,它们之间的互变太快。

构象体常采用锯架式(Sawhorse representation)或纽曼投影式(Newman projection)来表示。如图 1-9 所示,锯架式是从某角度观察分子,式中各直线表示碳原子的价键,为方便起见,长度是任意的。纽曼投影式是从碳-碳键的轴向观察分子,用圆圈表示被观察的碳原子,前后两个原子重叠,因而只画出前面一个,从圆心以 120° 的角距画出的直线表示离读者较近的碳键。从圆周画出的直线表示离读者较远的碳键。这两种表示方法各有优缺点,可根据需要选择使用。

2. 构象分析

传统观念中认为单键旋转是自由的,因而一种分子可以有无限种构象,然而实际上碳-碳单键的旋转受到相邻碳上的取代基之间的非共价相互作用(noncovalent interaction)的约束,只允许有机分子采取某种或某几种构象,即占优势的构象。从实验和理论两个方面对分子的构象进行探索,从中找出占优势的构象体,这一做法称构象分析(conformational analysis)。分析方法将在本章后面和有关蛋白质构象章节作进一步介绍。

分子内相邻碳上的取代基之间的距离小于范德华距离(van der Waals distance)时,非键合相互作用表现为斥力(repulsion)。下面以乙烷为例说明非键合相互作用对构象的影响。乙烷分子绕单键旋转可形成多种构象。图 1-9 示出的交叉型和重叠型构象体是其中的两种极端形式。可以预料到交叉型是乙烷中内能最低、稳定性最大的构象,因为分子内 6 个碳氢键彼此离得最远,相互作用最小;重叠型是内能最高、稳定性最小的构象,因为 6 个碳氢键两两挨得最紧,相互间的斥力最大。在室温下,乙烷分子内旋转之所以不完全自由就是因为旋转时需要越过内能较高的重叠型构象。这一较高内能所产生的阻力称为能垒(energy barrier)或张力(strain)。

相邻碳上取代基之间的非键合相互作用产生的张力可分为扭张力(torsional strain)和位阻张力(steric strain)。扭张力,多数学者认为是由于重叠键之间的电子云排斥造成的。例如重叠型构象体中 $-H$ 与 $-H$ 重叠相互作用的张力,能值为 4 kJ/mol 。 $-H$ 与 $-CH_3$ 重叠相互作用主要也是扭张力,能值为 6 kJ/mol 。位阻张力是两个较大的取代基靠得过近产生的一种斥力,例如交叉型构象体中 $-CH_3$ 与 $-CH_3$ 邻位相互作用的张力(4 kJ/mol)。重叠型中 $-CH_3$ 与 $-CH_3$ 重叠相互作用既有扭张力又有位阻张力(总张力 11 kJ/mol)。

在环烷中除扭张力和位阻张力外,尚有角张力(angle strain)。角张力是由于键角受到压缩或扩张而偏离四面体角(109.5°)时导入分子的一种张力。角张力在小的环烷中占有很大的量。角张力在环丙烷的总张力中占有很大的比例,在环丁烷环中所占比例也不小。

3. 吡喃糖的构象

20 世纪 40 年代环己烷的构象分析取得长足进展,燃烧热数据表明环己烷环是一种无张力环(strain-free ring)。这是因为环己烷与环丙烷和环丁烷不同,它的环不是平面结构,而是扭折成释放了全部角张力的三维构象,椅式(chair form)和船式(boat form)两种构象。

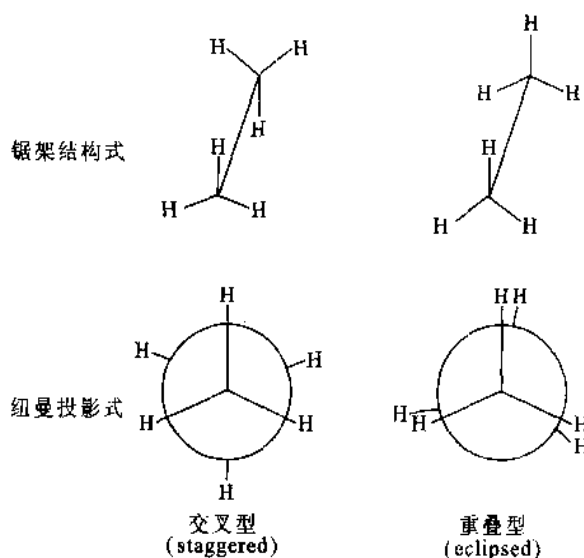


图 1-9 乙烷的构象
(不同的构象由于绕单键旋转可以迅速互变)

如图 1-10A 所示,椅式环己烷中 6 个碳原子交替地(C1,3,5 和 C2,4,6)分别处于距离约 0.05 nm 而相互平行的两个平面内,各 C—C—C 键角均为 109.5° ;取中轴线垂直于该平面,12 个碳氢键分为两组,6 个碳氢键(每碳原子一个)与中轴线平行,交替地垂直伸向平面的上方或下方,称直立键(axial bond)或 a 键.另 6 个碳氢键与中轴线取 -109.5° (与平面取 19.5°)倾斜角交替地伸向两平面的上方或下方,称平伏键(equatorial bond)或 e 键。从纽曼投影结构(图 1-10B)可以清楚地看出氢原子均以交叉型取向,亚甲基相互处于邻位交叉型构象。椅式环己烷只有位阻张力,没有角张力和扭张力。

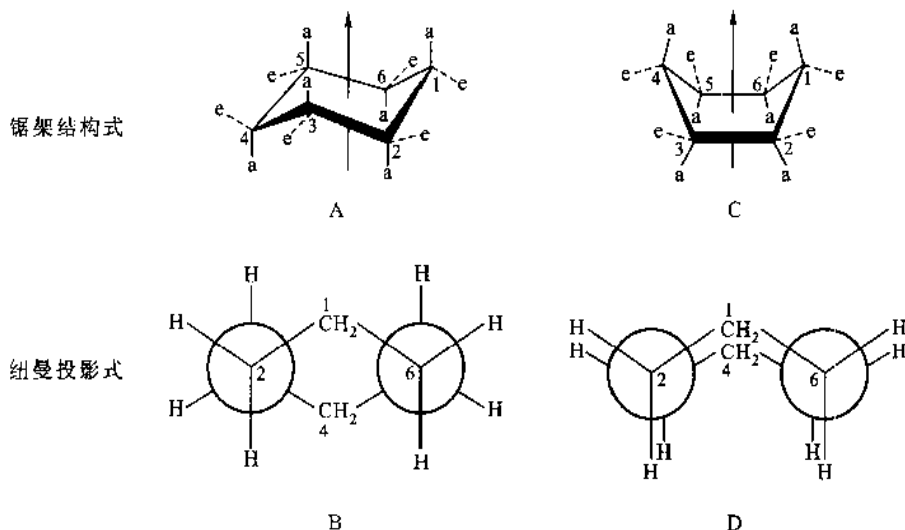


图 1-10 环己烷的椅式(A,C)和船式(B,D)构象

船式环己烷(图 1-10C)中两个互相对映的碳原子向上折起,其余 4 个碳原子处于同一平面内,C—C—C 键角也是 109.5° ,C2—C3 和 C5—C6 各取全重叠型构象(图 1-10D),C1 和 C4 与其相邻碳原子(C2 或 C6 和 C3 或 C5)处于邻位交叉型关系,此外 C1 和 C4 上的内向氢原子彼此靠得很近足以产生斥力。船式环己烷虽无角张力存在,但有位阻张力和扭张力。热力学测定表明船式不如椅式稳定,内能差约为 29 kJ/mol 。实际上船式环己烷多以扭曲船式(twist-boat form)存在。扭曲船式比船式内能低 6 kJ/mol ,但仍比椅式的高 23 kJ/mol 。因此椅式是环己烷的优势构象。在室温下,椅式与船式的分子之比约为 $1000:1$ 。

吡喃糖与环己烷在结构上有很多相似之处,它们都是六元环,前者的 C—O 键长和 C—O—C 键角与后者的 C—C 键长和 C—C—C 键角也相近,因此环己烷的构象分析很多适用于吡喃糖。D-吡喃葡萄糖可以有两种椅式构象(图 1-11 I 和 II)和 6 种船式构象。椅式 D-葡萄糖远比船式 D-葡萄糖稳定。D-吡喃葡萄糖的两种椅式构象可能经过船式进行互相转换,这种互换常称为环转向(ring-flip)。环转向的净结果是直立位置和平伏位置互换,一种椅式中的直立取代基变成另一种椅式(被转向了的)中的平伏取代基,反之亦然。显然经直立键相连的取代基要比经平伏键相连的取代基彼此靠得更紧,斥力也更大,因此占优势的构象应是比氢原子大的那些基团尽可能多地处于平伏位置上的构象, β -D-吡喃葡萄糖便是如此。 β -D-吡喃葡萄糖是 D-己醛糖中唯一一个能采取使所有比氢原子大的基团都处于平伏位置的构象。根据计算 β -D-葡萄糖的内能椅式 I 比椅式 II 约低 30 kJ/mol ,可见在这两种构象之间的环转向平衡中,椅式 I 占绝对优势*。许多实验,包括在纤维素和蔗糖晶体中 D-葡萄糖残基构象的测定都支持这一论断。

采取椅式 I 构象时, α 异头物中异头碳(C1)上的羟基处于直立位置, β 异头物中它是处于平伏位置。对 D-吡喃葡萄糖来说, β 异头物比 α 异头物稳定,因为 β 型能更好地被溶剂化。但在 β 异头物中存在 C1 羟基

(或取代基—OR, $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{R}$ 或卤素)偶极和环氧偶极之间的不利相互作用(图 1-12)。除葡萄糖外对几

* 根据方程 $K = e^{-\Delta E/RT}$ 可算出任何两种构象异构体平衡时的摩尔百分比,此处 K = 平衡常数, $e = 2.718$ 自然对数的底, ΔE = 异构体之间的内能差, T = 绝对温度(K, 开尔文)和 $R = 8.314 \text{ J mol}^{-1}$, K^{-1} (气体常数)。

图 1-11 β -D-吡喃葡萄糖的两种椅式构象(I和II)

乎所有的己醛糖,偶极效应均占优势并因此 α 异头物比 β 异头物更稳定。此现象称为异头效应(anomeric effect)。

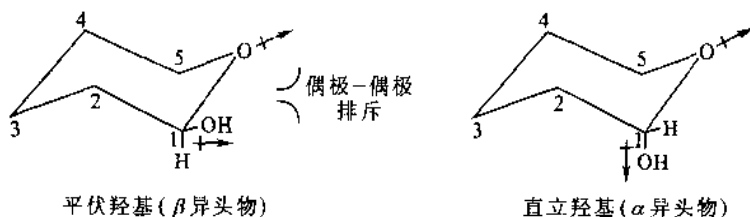


图 1-12 异头物的平行和反平行偶极。平伏羟基偶极和环氧偶极呈平行,它们之间产生排斥作用。直立羟基偶极和环氧偶极呈反平行,这种构象(α 异头物)较稳定

4. 呋喃糖的构象

回忆一下有机化学中对环戊烷的构象分析。环戊烷如果采取平面环构象,它将是一个接近于无张力环的结构,因为它的 C—C—C 键角是 108° ,与正常键角只差 1° 左右。然而燃烧值表明环戊烷具有 6.5 kJ/mol 的张力能。这是为什么?原因在于如果采取平面环结构,虽然无角张力,但是相邻碳上的氢处于重叠相互作用,因而引起相当可观的扭张力。结果是环戊烷采取突出平面的折叠构象,在增加角张力和降低扭张力之间达成平衡,使之处于最低的能态。环戊烷的 4 个碳原子大体上处在同一平面,第 5 个碳原子超出平面,这样相邻碳上的氢原子大多数都取近似交叉型的构象。

呋喃糖也是这样,环上的 3 个碳原子和 1 个氧原子接近于共平面,另 1 个碳原子向上折起,离开平面约 0.05 nm 。这种构象称信封式(envelope form),因为结构类似一个掀起了信封盖的开口信封(图 1-13)。大多数生物分子的核糖组分中,C2 或 C3 在 C5 的同一侧突出平面。这两种信封式构象分别称 C2'-内向型(C2'-endo)和 C3'-内向型(C3'-endo)。如果 C2'或 C3'向下折处于平面之下,构象分别称 C2'-外向型(C2'-exo)和 C3'-外向型(C3'-exo)。在 RNA 双螺旋区,A-DNA 以及 RNA-DNA 杂交分子中核糖和脱氧核糖残基都采取 C3'-内向型,而在 B-DNA 中则为 C2'-内向型。呋喃糖环在不同的构象态之间可以发生快速互换(环转向)。呋喃糖环比吡喃糖环具有更大的柔性,这可以说明为什么呋喃型核糖被选作 RNA 和 DNA 的组分。

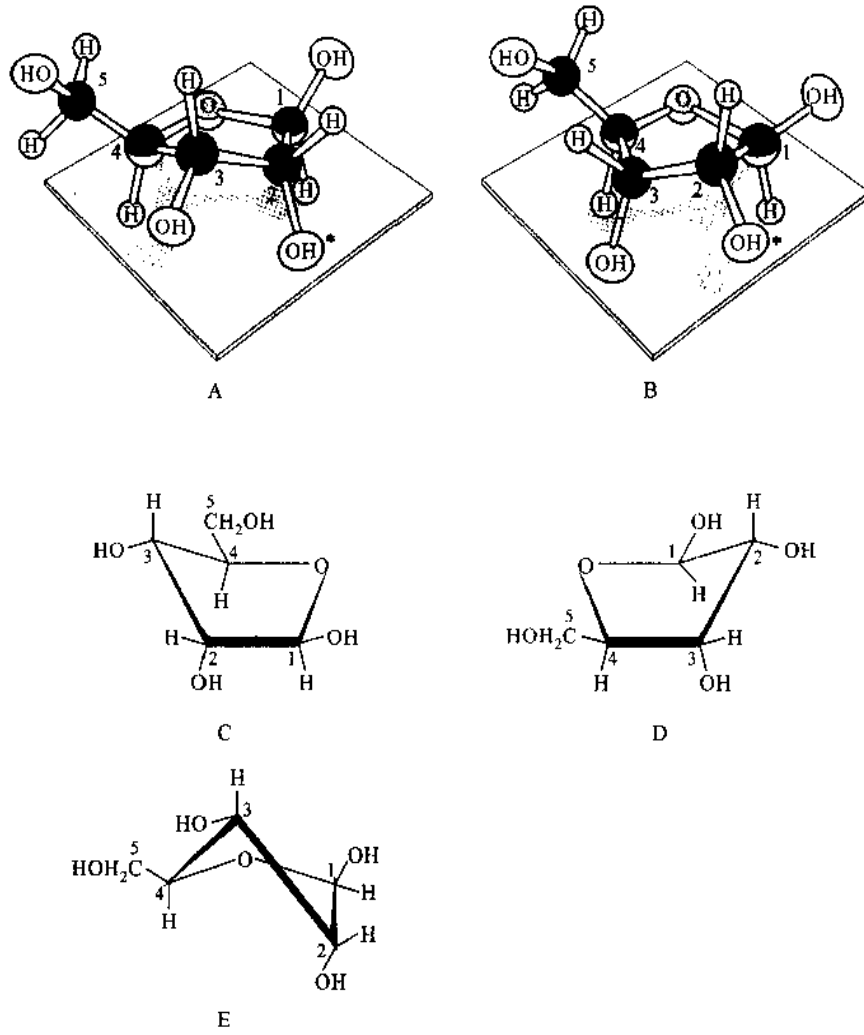
此外也曾提出呋喃糖的另一构象模型,称扭形构象(twisted conformation),认为呋喃环由氧原子和与其相邻的两个碳原子共平面,其余的两个碳原子分别在平面的上下方,如图 1-13E 所示。

四、单糖的性质

(一) 单糖的物理性质

1. 旋光性

几乎所有的单糖及其衍生物都有旋光性,许多单糖在水溶液中发生变旋现象。关于单糖的旋光性和变旋现象已在单糖的结构部分讲到。一些重要单糖的熔点和比旋值见表 1-1。

图 1-13 β -D-呋喃核糖的信封式构象

A和C是C3'-内向型;B和D是C2'-内向型;A和B是球棍模型,标星号的羟基脱氧后,则为2-脱氧核糖,C2'-和C3'-外向型,分别示于A和B图中的平面下方。E是扭形构象

表 1-1 一些重要单糖的熔点和比旋值^{*}

名 称	熔点/℃	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$	名 称	熔点/℃	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$
D-甘油醛		+9.4°	β -D-吡喃葡萄糖	148~150	+18.7° \rightarrow +52.6°
D-赤藓糖		-9.3°	α -D-吡喃甘露糖	133	+29.3° \rightarrow +14.5°
D-赤藓酮糖		-11°	β -D-吡喃甘露糖	132	-17° \rightarrow +14.5°
D-核糖	88~92	-19.7°	α -D-吡喃半乳糖	167	+150° \rightarrow +80.2°
2-脱氧-D-核糖	89~90	-59°	β -D-吡喃半乳糖	143~145	+52.8° \rightarrow 80.2°
D-核酮糖		-16.3°	D-果糖	119~122	-92°
D-木糖	156~158	+18.8°	L-山梨糖	171~173	-43.1°
D-木酮糖		-26°	L-岩藻糖	150~153	-75°
L-阿拉伯糖	160~163	+104.5°	L-鼠李糖	94(1H ₂ O)	+8.2°
α -D-吡喃葡萄糖	146(无水)	+112.2° \rightarrow +52.6°	D-景天庚酮糖	101(1H ₂ O)	+2.5°
	83(1H ₂ O)		D-甘露庚酮糖	151~152	+29.7°

* 除异头物外均指互变异构体平衡时的比旋值,异头物的比旋列出起始值 \rightarrow 平衡值。

2. 甜度

严格说甜度(sweetness)不是物理特性,它属于一种感觉,甜度的比较不可能十分精确。甜度通常用蔗糖作为参考物,以它为 100,果糖几乎是它的两倍,其他天然糖均小于它。某些糖、糖醇及其他增甜剂(sweetener)的相对甜度见表 1-2。

表 1-2 某些糖、糖醇及其他增甜剂的相对甜度

名 称	甜 度	名 称	甜 度
乳糖	16	蔗糖	100
半乳糖	30	木糖醇	125
麦芽糖	35	转化糖	150
山梨醇	40	果糖	175
木糖	45	天冬苯丙二肽	15 000
甘露醇	50	蛇菊苷	30 000
葡萄糖	70	糖精	50 000
麦芽糖醇	90	应乐果甜蛋白	20 000

糖醇类在体内比其他糖吸收慢,代谢途径也不同,并且不易被口腔细菌所利用,因此是一类低热量防龋齿的增甜剂。糖精(saccharin),天冬苯丙二肽(aspartame),蛇菊苷(stevioside)和应乐果甜蛋白(monellin 或译成 M 甜蛋白)是一类低热量或无热量的非糖增甜剂。其中糖精和天冬苯丙二肽是人工合成的。糖精问世至今已有百余年来,相继出现过多种合成增甜剂,由于发现不少合成增甜剂对哺乳动物有致癌和致畸作用,多数已被禁用。现在只有少数几种还在有争议地被使用,包括邻苯甲酰磺酰亚胺(糖精)和环己胺磺酸钠(cyclamate)后者的甜度为蔗糖的 30 倍。天冬苯丙二肽,即 L-天冬氨酰-L-苯丙氨酸甲酯,是天然物的衍生物,一般认为是安全的,但不适用于遗传性苯丙酮尿(phenylketonuria)患者。蛇菊苷和应乐果甜蛋白是无毒的非糖天然增甜剂;前者是存在于原产南美洲巴拉圭的一种菊科植物(*Stevia rebaudiana*)茎、叶中的一种二萜烯类糖苷($C_{38}H_{60}O_{18}$),后者是存在于原产西非尼日利亚的一种植物(*Discoreophyllum cumminisii*)果肉中的一种蛋白质(M_r^* 为 10 600)。非糖增甜剂可作为糖尿病、心血管病、肥胖病和高血压患者的医疗食品添加剂。

3. 溶解度

单糖分子有多个羟基,增加了它的水溶性,除甘油醛微溶于水,其他单糖均易溶于水,特别是在热水中溶解度极大。例如 β -D-葡萄糖在 15℃ 100 mL 水中溶解 154 g。单糖微溶于乙醇,不溶于乙醚、丙酮等非极性有机溶剂。

(二) 单糖的化学性质

单糖是多羟基的醛或酮,涉及功能团的性质有:醛基或/和伯醇基被氧化成羧基;羰基被还原成醇基;羰基与苯肼或氰化氢(HCN)等起加成反应,例如成脎反应;羰基在弱碱中发生分子重排(异构化);异头羟基参与成苷反应;一般羟基参与成酯、成醚、脱水、氨基化和脱氧等反应。某些单糖(如葡萄糖、果糖、甘露糖等)能被酵母发酵生成乙醇,有些(半乳糖、木糖、阿拉伯糖等)则不能。在实验室单糖碳链可以延长和缩短。生物体内在酶的催化下,单糖还会发生其他的化学反应,参见有关糖代谢章节。

1. 异构化(弱碱的作用)

单糖对稀酸相当稳定,但在碱性溶液中能发生多种反应,产生不同的产物。异构化是其中的一种。单糖的异构化是室温下碱催化的烯醇化作用的结果。例如 D-葡萄糖在氢氧化钡溶液中放置数天,从形成的混合液中可分离出 63.5% D-葡萄糖、21% D-果糖、2.5% D-甘露糖以及 10% 不能发酵的酮糖和 3% 其他物质。在碱性水溶液中单糖发生分子重排,通过烯二醇(enediol)中间物互相转化,称酮-烯醇互变异构(keto-enol tautomerism),见图 1-14。

* 相对分子质量(relative molecular mass)以前称分子量,符号为 M_r 。

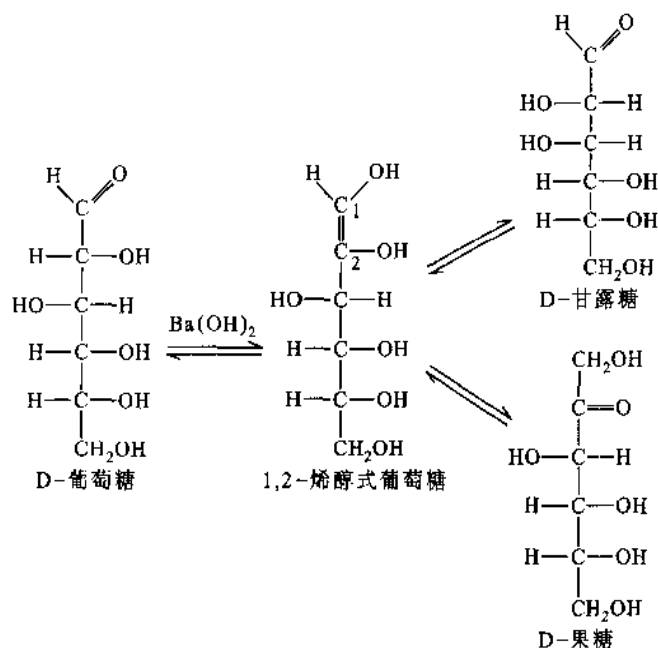
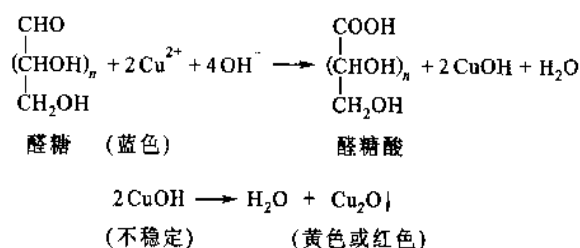


图 1-14 单糖在碱催化下的酮-烯醇互变异构

在强碱溶液中单糖发生降解以及分子内的氧化和还原反应。

2. 单糖的氧化

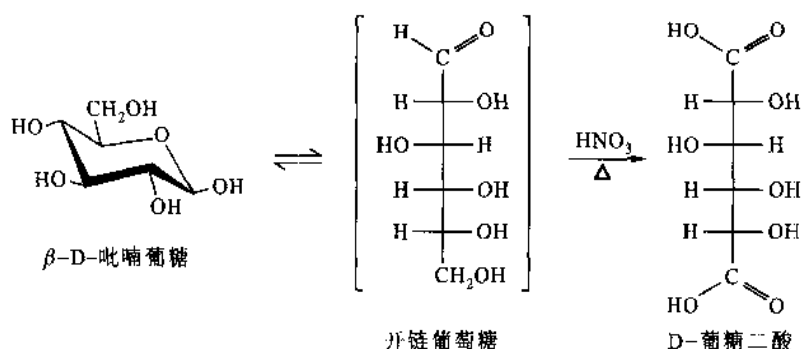
(1) 氧化成醛糖酸 醛糖含游离醛基,具有很好的还原性。碱性溶液中重金属离子(Cu²⁺, Ag⁺, Hg²⁺ 或 Bi³⁺ 等)如 Fehling 试剂(酒石酸钾钠,氢氧化钠和 CuSO₄)或 Benedict 试剂(柠檬酸,碳酸钠和 CuSO₄)中的 Cu²⁺ 是一种弱氧化剂,能使醛糖(还原剂)的醛基氧化成羧基,产物称醛糖酸(alonic acid),金属离子自身被还原。能使氧化剂还原的糖称还原糖(reducing sugar)。所有的醛糖都是还原糖;许多酮糖也是还原糖,例如果糖,因为它在碱性溶液中能异构化为醛糖(图 1-14)。Fehling 试剂或 Benedict 试剂常用于检测还原糖。试剂中的酒石酸钾钠或柠檬酸用作螯合剂,与 Cu²⁺ 络合以防止形成 Cu(OH)₂ 而使 Cu²⁺ 沉淀。1 分子醛糖氧化成醛糖酸需要 2 分子氢氧化铜的参与,反应如下:



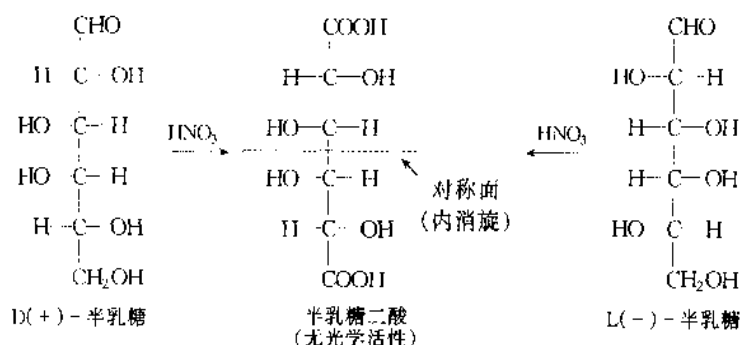
Benedict 试剂由于较稳定且不易受其他物质如肌酸和尿酸等的干扰,临床上常被用作尿糖(葡萄糖)的定性与半定量测试。药房出售的某些家庭用糖尿病自测试剂盒就是应用 Benedict 反应。尿中含有不少于 0.1% 葡萄糖,测试能给出阳性反应(黄红色)。未经治疗的糖尿病患者尿中的葡萄糖可达百分之几。

必须指出, Fehling 反应和 Benedict 反应虽然被用作还原糖的检验,但不能给出定量的醛糖酸产物,因为所用的碱性条件会引起糖碳架的断裂和分解。但缓冲的溴水溶液(pH6)能很好地氧化醛糖成为一羧酸,醛糖酸。此反应是醛糖专一的,酮糖则不能被溴氧化。

(2) 氧化成醛糖二酸 如果使用较强的氧化剂如热的稀硝酸,醛糖的醛基和伯醇基均被氧化成羧基,形成的二羧酸称醛糖二酸(aldaric acid)或糖二酸(saccharic acid,旧名),例如 β-D-葡萄糖被氧化成 D-葡萄糖二酸(D-glucaric acid):



D-和L-葡萄糖经硝酸氧化,得到相应的D-和L-葡萄糖二酸,它们也可以分别从L-和D-古洛糖(glucose)氧化获得;D-和L-甘露糖也分别给出有光学活性的甘露糖二酸(mannaric acid);但D-和L-半乳糖给出同一的半乳糖二酸(galactaric acid),也称粘酸(mucic acid),它是一个无光学活性的内消旋化合物(meso compound),分子内存在一个对称面,见下图。

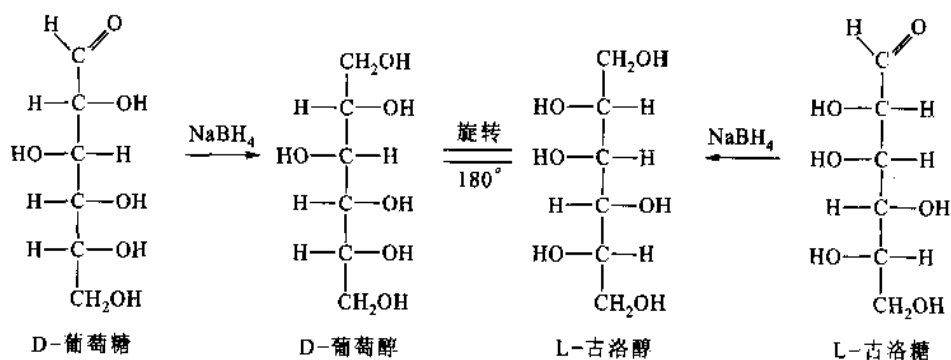


单糖氧化成糖二酸并测定其旋光性(是否内消旋)对推定单糖的手性碳原子构型有重要意义。

(3) 氧化成糖醛酸 某些醛糖在特定的脱氢酶作用下可以只氧化它的伯醇基而保留醛基。生成糖醛酸(uronic acid),例如葡萄糖醛酸(第28页)。

3. 单糖的还原

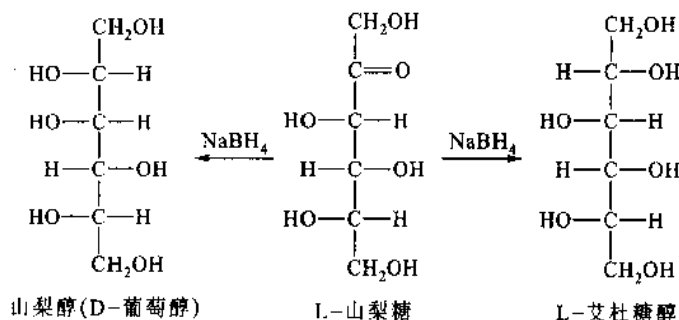
单糖的羰基在适当的还原条件下,例如用硼氢化钠处理醛糖或酮糖,则被还原成多元醇(polyol)。称糖醇,D-葡萄糖还原生成D-葡萄糖醇(D-glucitol)常称山梨醇(sorbitol),D-山梨醇或L-山梨醇^{*}。反应式如下:



D-葡萄糖醇也可由L-古洛糖(L-gulose)还原获得,因此D-葡萄糖醇也即L-古洛醇(L-gulitol)。D-葡萄糖醇

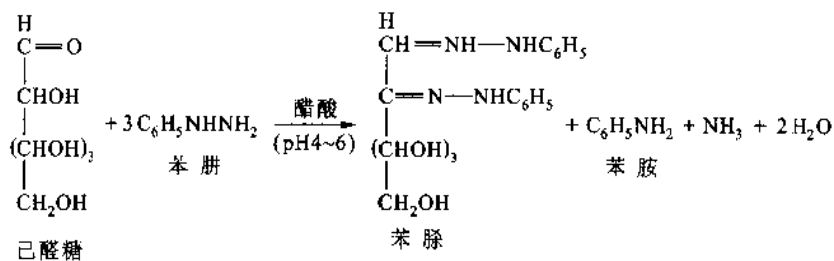
* 单糖衍生物通常根据亲本糖命名,但糖醇分子的两端都是伯醇基,这样同一糖醇可能有多个亲本糖,如D-葡萄糖,L-古洛糖,D-果糖和L-山梨糖都是山梨醇的直接前体。因此D-葡萄糖醇,L-古洛糖醇,“D-果糖醇”和L-山梨醇都指同一化合物。但实际上一般称它为山梨醇,因为它最初是从发酵过的山梨果汁中提取出来的;也叫D-葡萄糖醇,因为它可由自然界中最常见的单糖D-葡萄糖还原而来。编者认为山梨醇一词,最好不冠D-或L-词头,特别是不要冠D-,因为“D-山梨醇”容易误解为它是从D-山梨糖衍生而来的,虽然这里并不是这种意思。

也是D-果糖和L-山梨糖(L-sorbose)的还原产物之一。酮糖被还原时产生一对差向异构体的糖醇,例如D-果糖还原成D-葡萄糖醇和D-甘露醇,L-山梨糖还原成山梨醇(D-葡萄糖醇)和L-艾杜糖醇(L-iditol):



4. 形成糖脎

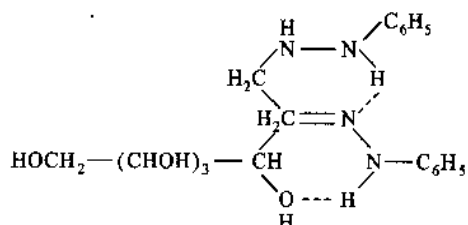
1887年Fischer E研究苯肼(phenylhydrazine)与醛、酮反应时,发现许多还原糖生成含有两个苯胺基($-\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_5$)的衍生物,称为糖的苯脎(phenylosazone)或脎(osazone),即糖脎。成脎反应的总方程式如下:



反应机制尚未十分确定。反应中1 mol糖要求3 mol苯肼。第一,苯肼与糖的羰基缩合形成苯腙(phenylhydrazone),缩合是一般的亲核过程;第二,苯肼把与羰基碳相邻的 CHOH (醛糖C2,酮糖C1)氧化成羰基(或亚胺基),并释放出苯胺(aniline);第三,另一苯肼与新形成的羰基(或亚胺基)缩合而成最后的产物糖脎。

反应中间物苯腙如葡萄糖腙一般都溶于水,并继续反应,不易分离。但是甘露糖脎不溶于水,在室温下即从水溶液中析出白色固体。

糖脎相当稳定,且不溶于水,从热水溶液中以黄色晶体析出。与苯肼的反应也就停止在脎的阶段,这主要是因为糖脎分子借氢键形成螯环结构(chelate ring structure):



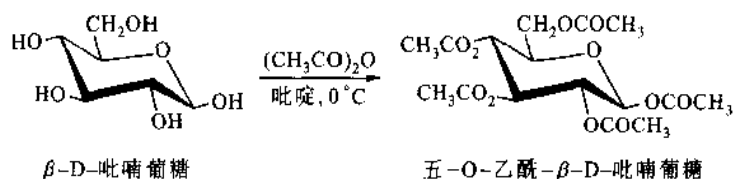
这种结构使得与羰基紧邻的 $-\text{OH}$ 和苯肼的反应受到抑制,其次由于糖分子中引进了两个苯胺基团(脎)和螯环结构,使脎在水中的溶解度极大地降低,一旦形成脎立即从溶液中析出,这也消除了脎进一步发生反应的可能性。

不同还原糖生成的脎,晶形与熔点各不相同,例如葡萄糖脎是黄色细针状,麦芽糖脎是长薄片形。因此成脎反应可用来鉴别多种还原糖。

5. 形成糖酯与糖醚

单糖的许多化学行为很像简单的醇,例如糖的羟基可以转变为酯基或醚基。

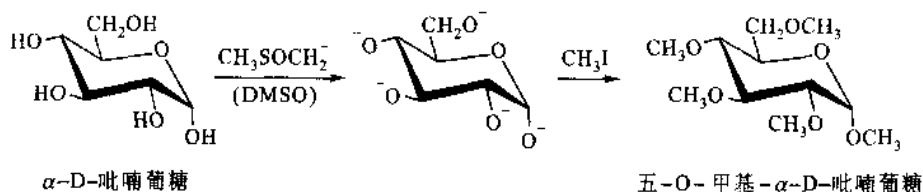
(1) 成酯 糖的酯化通常是在碱催化下用酰氯(acid chloride)或酸酐进行的。所有的羟基,包括异头碳羟基都能被酯化。例如, β -D-吡喃葡萄糖在吡啶溶液中用乙酸酐处理被转变为它的五乙酸酯:



葡萄糖的乙酰化是测定葡萄糖结构的重要步骤之一。

生物体内单糖与磷酸生成各种磷酸酯,如葡萄糖-1-磷酸、果糖-1,6-二磷酸等,它们都是重要的代谢中间物。在体外单糖的磷酸化不易发生,因为这是一个需能过程。在体内糖的磷酸化多由高能磷酸化合物,腺苷三磷酸(ATP)提供磷酸基团和所需能量(详见代谢部分有关章节)。

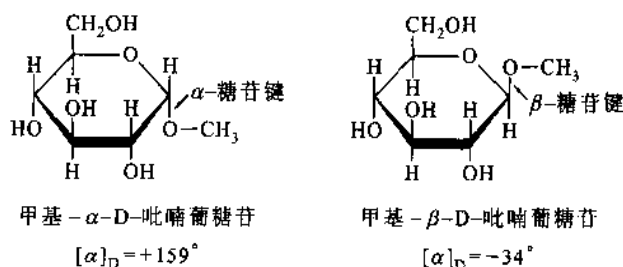
(2) 成醚 在甲基亚磺酰甲基钠($\text{CH}_3\text{SOCH}_2\text{Na}$,简称 SMSM)存在下用碘甲烷(CH_3I)或在碱性条件下用硫酸二甲酯 $[(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2]$ 处理糖或糖苷可得到它的甲醚衍生物,此反应也常称为糖的甲基化(methylation)。例如 α -D-吡喃葡萄糖在二甲亚砜(DMSO)中与 SMSM 作用,使糖基的自由羟基离子化,生成稳定的碳阴离子,再与碘甲烷反应生成五-O-甲基- α -D-吡喃葡萄糖:



在五甲基葡萄糖中 C1 上的甲氧基(methoxy)与其他的 4 个甲氧基不同,前者是缩醚甲氧基,通过酸水解很容易除去,后者是醚甲氧基,对酸稳定。糖的甲基化在环状结构及寡糖和多糖的结构分析中起重要作用。

6. 形成糖苷

环状单糖的半缩醛(或半缩酮)羟基与另一化合物发生缩合形成的缩醛(或缩酮)称为糖苷或苷(glycoside)也译作糖甙或甙。糖苷分子中提供半缩醛羟基的糖部分称糖基(glycone, glycosyl),与之缩合的“非糖”部分称糖苷配基(aglycone)或配基,这两部分之间的连键称糖苷键(glycosidic bond)。糖苷键可以通过氧、氮(或硫原子)起连接作用,也可以使碳碳直接相连,它们的糖苷分别简称为 O-苷, N-苷, S-苷或 C-苷,自然界中最常见的是 O-苷,其次是 N-苷(如核苷),S-苷和 C-苷少见。糖苷配基也可以是糖,这样缩合成的糖苷,即为寡糖(包括双糖)和多糖。由于一个环状单糖有 α 和 β 两种异头物,成苷时相应地也有两种形式。例如在无水甲醇中以氯化氢为催化剂制备甲基葡萄糖苷时(仅糖的异头羟基被甲基化),得到两个异构体: α -甲基-D-吡喃葡萄糖苷和 β -甲基-D-吡喃葡萄糖苷:

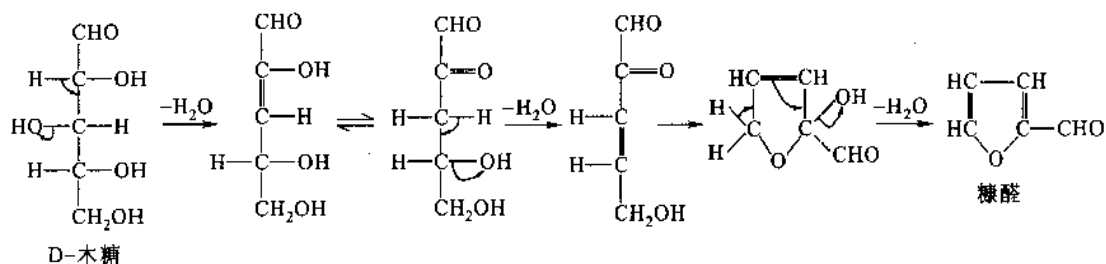


糖苷与糖的性质很不相同。糖是半缩醛,容易变成游离醛,从而给出醛的各种反应。糖苷属缩醛,一般不显示醛的性质,例如不与苯肼发生反应,不能还原 Fehling 试剂,也无变旋现象。糖苷对碱溶液稳定,但易被酸水解成原来的糖和配基。

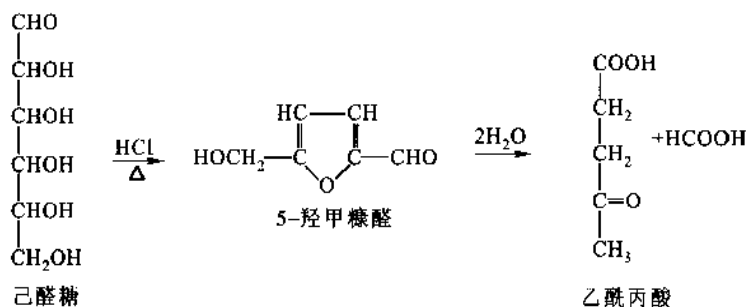
7. 单糖脱水(无机酸的作用)

戊糖与 12% 盐酸共热(蒸馏)时脱水生成糠醛(furfural)即呋喃醛(furaldehyde)。脱水是通过一系列

β 消除(β -elimination)和随后的环化进行的。例如 D-木糖的脱水:

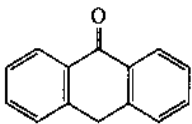


己糖与酸共热产生 5-羟甲基糠醛(5-hydroxy methyl furfural),但它比糠醛易溶于酸,并且不与蒸汽一起挥发,因而受热酸进一步作用,分解成乙酰丙酸(levulinic acid)、甲酸和暗色的不溶缩合物,称腐黑物(humin):



糠醛及其分解产物乙酰丙酸都是塑料和医药工业的重要原料。

不同的糠醛与多元酚作用产生特有的颜色反应。羟甲基糠醛与间苯二酚(resorcinol)反应生成红色缩合物(Seliwanoff 试验),这是鉴定酮糖(果糖)的方法,因为酮糖在酸的作用下易形成羟甲基糠醛,而醛糖则慢得多。戊糖脱水形成的糠醛与间苯三酚或称根皮酚(phloroglucinol)缩合生成朱红色物质(间苯三酚试验),与甲基间苯二酚或称地衣酚(orcein)缩合生成蓝绿色或橄榄绿色物质(Bial 试验),这两个试验都用于鉴别戊糖,Bial 反应常用来测定 RNA 的含量。此外糖脱水生成的糠醛及其衍生物能与 α -萘酚反应生成红紫色缩合物(Molisch 试验),此试验用于鉴定糖类物质,阴性反应确证无糖存在,但阳性反应只表明有糖存在的可能。糖

类物质脱水并与蒽酮(anthrone, )缩合生成蓝绿色复合物,称蒽酮反应,常用于总糖量的测定。

8. 糖的高碘酸氧化

高碘酸及其盐(IO_4^-)可以定量地氧化断裂邻二羟基、 α -羟基醛等的碳-碳键,并使碳原子的氧化态升高,产物是相应的羰基化合物, IO_4^- 本身还原为 IO_3^- ;顺式邻二羟基化合物比反式的氧化速度快。在高碘酸氧化中乙二醇生成 2 分子甲醛,丙三醇生成 2 分子甲醛和 1 分子甲酸。甲酸是由中间物乙醇醛的醛基转变而来的:

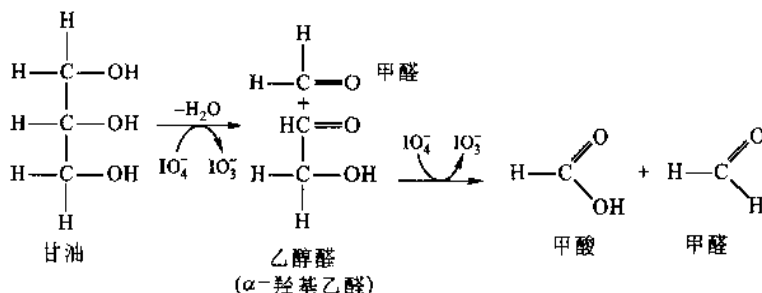


图 1-15 以 α -D-果糖苷(α -D-fructoside)为例说明高碘酸对糖的氧化。根据氧化过程中消耗 IO_4^- 或生成甲酸的摩尔数可确定该糖苷是呋喃型还是吡喃型的。高碘酸氧化还可测定直链多糖的平均相对分子质量(或聚合度)和支链多糖的非还原末端残基数,从而计算出多糖的分支数目。高碘酸氧化法在多糖结构测定方面起重要作用。

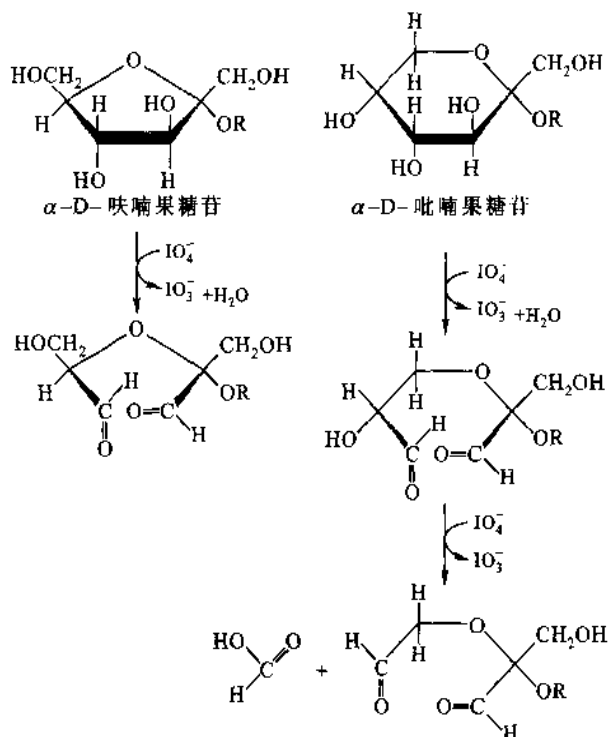


图 1-15 α -D-果糖苷的高碘酸氧化

9. 单糖链的延长与缩短

链的延长反应是 19 世纪 80 年代 Kiliani H 发现, Fischer E 实现的, 被称为 Kiliani-Fischer 合成, 它是阐明单糖间立体化学关系的最重要方法之一。合成的基本过程是由醛糖的醛基转变为氰醇腈基(cyanohydrin nitrile group), 再转变为链延长一个碳原子的醛糖。例如 D-阿拉伯糖经 Kiliani-Fischer 合成转变为 D-葡萄糖和 D-甘露糖的混合物(图 1-16)。

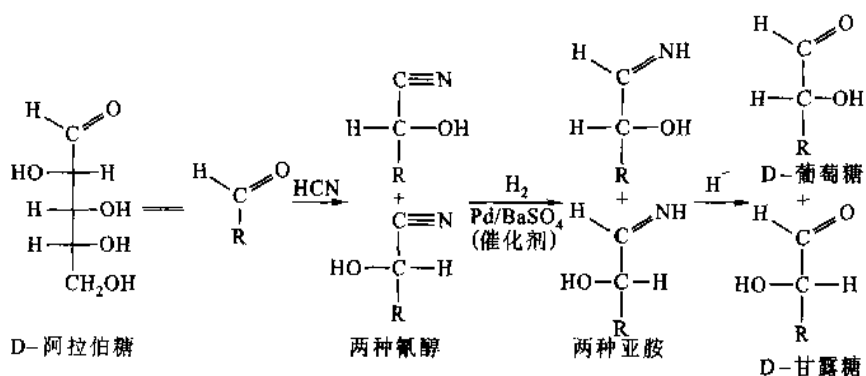
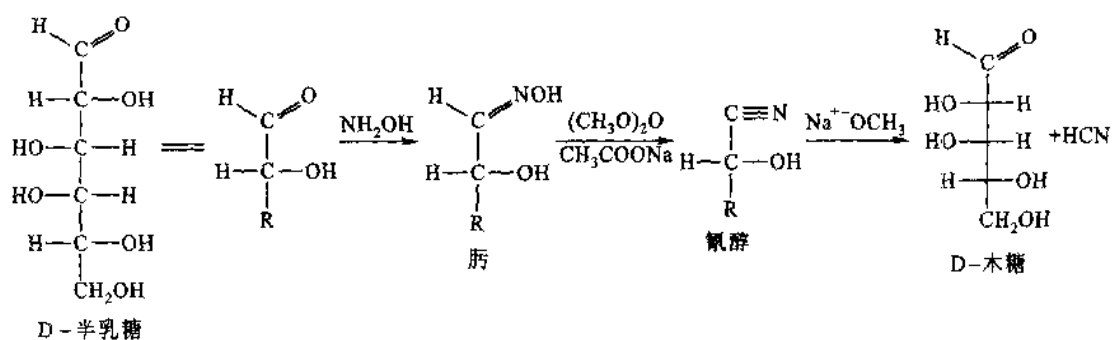


图 1-16 通过 Kiliani-Fischer 合成 D-阿拉伯糖转变为 D-葡萄糖和 D-甘露糖的混合物

新增的碳原子是手性的, 因此最初形成的氰醇就是 C2 构型不同的差向异构体混合物。

链的缩短反应 Wohl 降解, 其顺序几乎是 Kiliani-Fischer 反应的逆转。首先醛糖的醛基转变为腈基, 然后形成的氰醇在碱性条件下失去 HCN(亲核反应的倒转)转变为链缩短了一个碳原子的醛糖。醛转变为腈是通过下面两步完成的, 先是用羟胺处理醛糖, 随后生成的腈(imine)用乙酸酐脱水。Wohl 反应虽产量不高, 但适用于所有的戊醛糖和己醛糖。例如 D-半乳糖通过 Wohl 降解转变为 D-木糖:



五、重要的单糖和单糖衍生物

自然界中存在的单糖及其衍生物有数百多种,其中多数是作为聚糖(glycan)的单糖单位(构件分子)存在,水解聚糖可以得到相应的单糖或其衍生物,少数以游离状态存在。下面介绍某些生物学上重要的单糖及其衍生物。

(一) 单糖

1. 丙糖

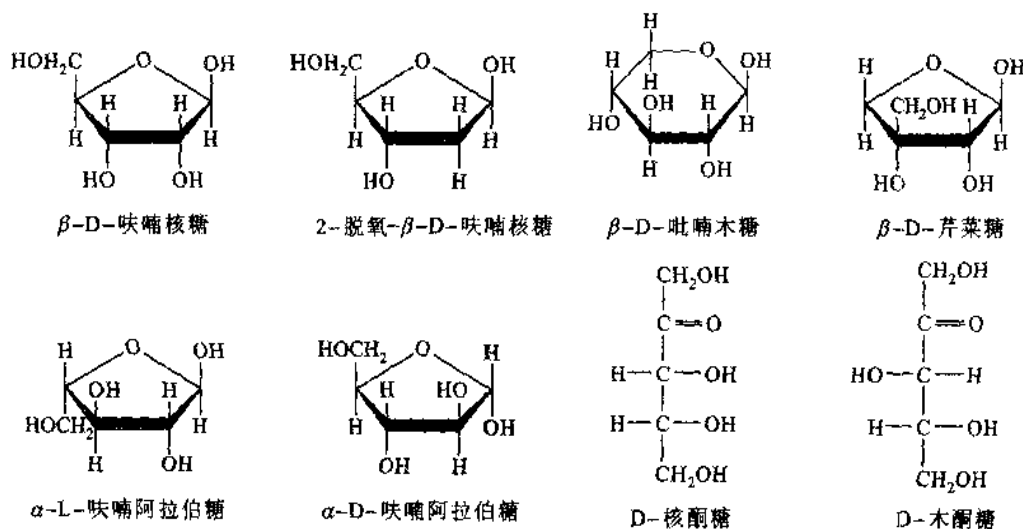
D-甘油醛和二羟丙酮 其结构式分别见图 1-5 和 1-6。它们的磷酸酯是糖酵解(见下册第 22 章)中的重要中间物。二羟丙酮无光学活性;甘油醛是具有光学活性的最简单的单糖,常被用作确定生物分子 DL 构型的标准物。

2. 丁糖

D-赤藓糖和 D-赤藓酮糖 其结构式分别见图 1-5 和 1-6。它们是丁糖的代表,常见于藻类、地衣等低等植物中。D-赤藓糖的 4-磷酸酯是戊糖磷酸途径(见下册第 25 章)和光合作用固定 CO_2 的 Calvin 循环(见下册第 27 章)中的重要中间物。D-赤藓酮糖是联系 D 系酮糖立体化学的重要一员。

3. 戊糖

自然界中存在的戊醛糖(aldopentose)主要有 D-核糖及其脱氧衍生物 2-脱氧-D-核糖、D-木糖、L-阿拉伯糖和少见的 D-阿拉伯糖、芹菜糖,戊酮糖(ketopentose)主要有核酮糖和木酮糖:



(1) D-核糖和 2-脱氧-D-核糖 分别是 RNA 和 DNA 的组成成分。成苷时它们以 β-呋喃糖形式参与。D-核糖的 5-磷酸酯也是戊糖磷酸途径和 Calvin 循环的中间物。

(2) D-木糖 多以戊聚糖(pentosan)形式存在于植物和细菌的细胞壁中,是树胶和半纤维素的组分。用酸水解法(8% H_2SO_4)可以从粉碎的秸秆、木材、玉米芯以及种子和果实的外壳(如棉籽壳、花生壳)中大量制

取 D-木糖。经还原可转变为 D-木糖醇。酵母不能发酵 D-木糖,但类酵母(如 *Torula*, *Monilia*)能在用玉米芯、秸秆等酸解制得的木糖溶液中生长和发育,使木糖溶液变成富含蛋白质和维生素的饲料。

(3) L-阿拉伯糖 也称果胶糖(pectinose),广泛存在于植物和细菌的细胞壁以及树皮创伤处的分泌物(树胶)中。它是果胶物质、半纤维素、树胶和植物糖蛋白的重要成分。可用酸解法从牧豆胶(mesquite gum)或甜菜渣中获取 L-阿拉伯糖。酵母不能使其发酵。

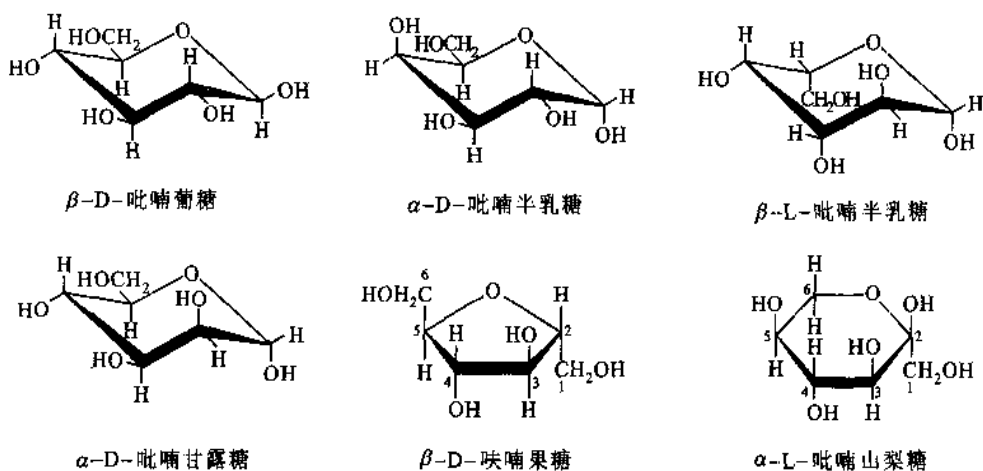
(4) D-阿拉伯糖 存在于某些植物和结核杆菌(*M. tuberculosis*)中,参与植物糖苷和细胞壁的组成。

(5) 芹菜糖(apiiose) 是一种支链戊糖,它以 D-赤藓呋喃糖形式存在于自然界。最先从芹菜苷(apiin)的水解液中获得,后来在其他糖苷和多种水生植物的某些多糖中也找到它。

(6) D-核酮糖和 D-木酮糖 存在于很多植物和动物细胞中,它们的 5-磷酸酯也参与戊糖磷酸途径和 Calvin 循环。

4. 己糖

常见的己糖有 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖和 D-果糖;偶见的有 L-山梨糖和 L-半乳糖等:



(1) D-葡萄糖 也称右旋糖(dextrose),其 α 和 β 异头物达平衡时的比旋为 $[\alpha]_D^{20} = +52.6^\circ$ 。在医学和生理学上常称它为血糖(blood sugar),它能被人体直接吸收并利用,正常人空腹时血液中葡萄糖浓度约为 5 mmol/L。D-葡萄糖是人体和动物代谢的重要能源,是植物中淀粉和纤维素等的构件分子。D-葡萄糖在工业上用盐酸水解淀粉的方法获取,是食品和制药工业的重要原料。酵母可使其发酵。

(2) D-半乳糖 是乳糖、蜜二糖和棉子糖等的组成成分,也是某些糖苷以及脑苷脂和神经节苷脂(见第 2 章)的组成成分。它主要以半乳聚糖形式存在于植物细胞壁中。在少数植物的果实,如常春藤(*Hedera*)果实,存在游离的 D-半乳糖,常在果实的表面析出半乳糖结晶。D-半乳糖只能被专门的“乳糖”酵母发酵。

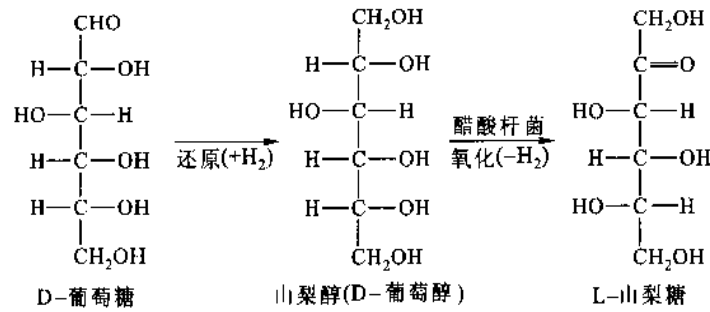
(3) L-半乳糖 作为构件分子之一存在于琼脂和其他多糖分子中。

(4) D-甘露糖 主要以甘露聚糖形式存在于植物的细胞壁中。用酸水解坚果外壳可制取 D-甘露糖。酵母能使其发酵。

(5) D-果糖 也称左旋糖(levulose),因为果糖 $[\alpha]_D^{20}$ 为 -92° 。D-果糖是自然界中最丰富的酮糖,以游离状态与葡萄糖和蔗糖一起存在于果汁和蜂蜜中,或与其他单糖结合成为某些寡糖(蔗糖、龙胆糖、松三糖等)的组成成分,或以果聚糖形式存在于菊科植物中,例如菊芋块茎的菊粉(inulin),它曾是用来制取 D-果糖的一种重要原料。现在多用 D-木糖异构酶(D-xylose isomerase),亦称葡糖异构酶,将葡萄糖糖浆(淀粉水解液)转化为果糖糖浆,这为食品工业开辟了一条制造果糖的新途径。

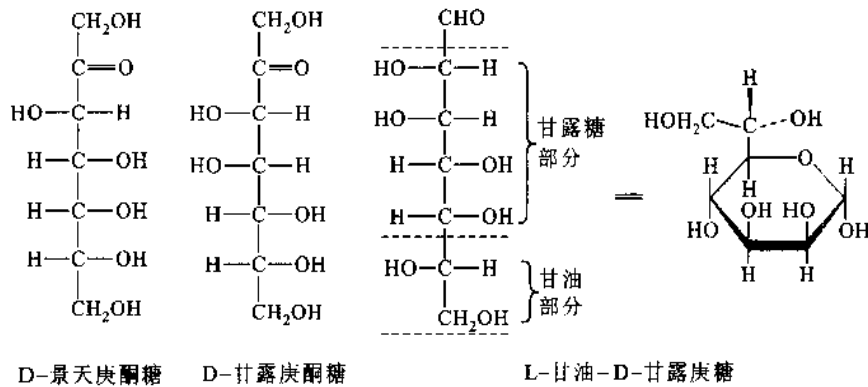
(6) L-山梨糖 是另一个容易获得的己酮糖。它存在于被细菌发酵过的山梨(mountain ash)果汁中。山梨是属于花楸属(*Sorbus aucuparia*)的植物。已证明,L-山梨糖是由醋酸杆菌氧化山梨果中的山梨醇而来的。L-山梨糖是工业上合成维生素 C(抗坏血酸)的重要中间物,因此它在维生素制造业中有着重要意义。

工业上先用催化加氢的方法将 D-葡萄糖还原为山梨醇,然后用一种醋酸杆菌(*Acetobacter suboxydans*)在充分供氧条件下氧化山梨醇为 L-山梨糖(但不产生 D-果糖),得率高达 90% 以上:



5. 庚糖和辛糖

天然存在的庚糖(heptose)和辛糖(octose)已发现的不多,对它们的功能了解也较少。庚糖主要有 D-景天庚酮糖(sedoheptulose)和 D-甘露庚酮糖(D-mannoheptulose),此外还有 L-甘油-D-甘露庚糖(L-glycero-D-mannoheptose):

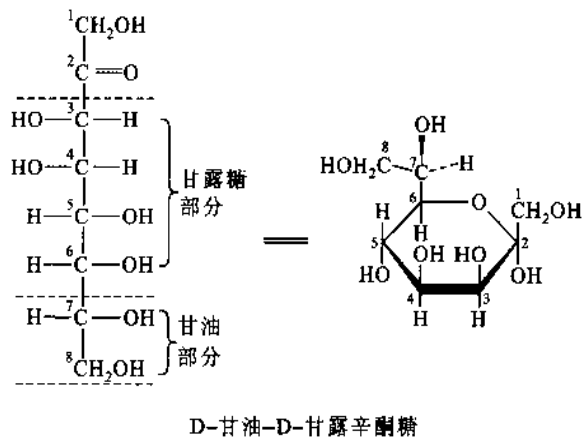


(1) D-景天庚酮糖 也称阿卓庚酮糖(D-altrioheptulose),大量存在于景天科(Crassulaceae)植物中。最先是常见的草本庭园植物景天(*Sedum spectabile*)中提取出来的。它的7-磷酸酯也是戊糖磷酸途径和Calvin循环中的重要中间物。

(2) D-甘露庚酮糖 在鳄梨(*Persea americana*)的果实中含量丰富。D-甘露庚酮糖被还原生成相应的糖醇称D-鳄梨醇(perseitol),在鳄梨的果实、叶片和种子内含有此醇。关于它们的生物学作用尚不清楚。

(3) L-甘油-D-甘露庚糖 这是一个七碳醛糖,存在于沙门氏杆菌(*Salmonella*)细胞壁外层的脂多糖结构中。

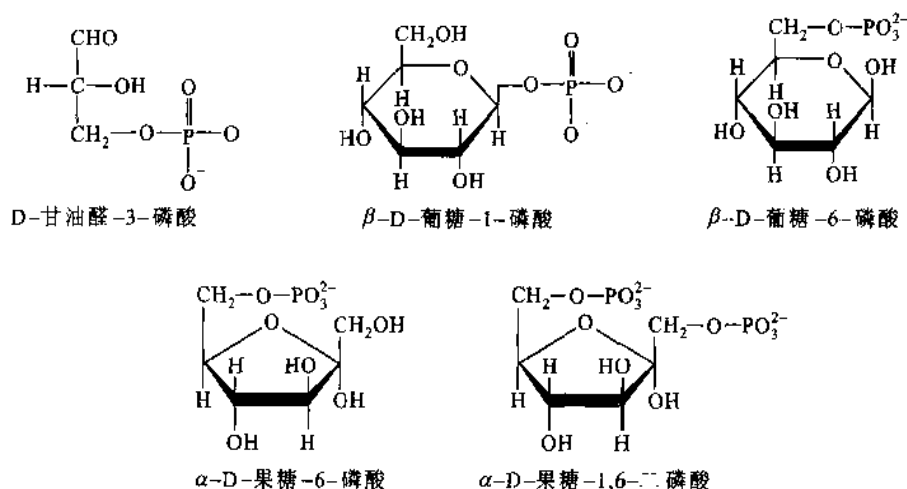
(4) D-甘油-D-甘露辛酮糖(D-glycero-D-mannoctulose) 这是一个八碳酮糖,也存在于鳄梨的果实中,其功能尚不清楚。它和D-甘露庚酮糖在人体内都不被代谢,但能从尿中排出,并给出尿糖(glycosuria)阳性反应(无葡萄糖存在)。如果此辛酮糖的C1羟甲基氧化成羧基,并C3位脱氧,则成为3-脱氧-D-甘油-D-甘露辛酮糖酸(3-deoxy-D-glycero-D-mannoctulosonic acid),亦称2-酮-3-脱氧辛糖酸(2-keto-3-deoxyoctonate, KDO)。它是沙门氏杆菌脂多糖的成分(见第54页脂质A的基本结构)。



(二) 单糖磷酸酯

单糖磷酸酯(sugar phosphate ester)或称磷酸化单糖(phosphorylated sugar),广泛地存在于各种细胞中,它们是很多代谢途径中的主要参加者。例如 D-葡萄糖-1-磷酸, D-葡萄糖-6-磷酸, D-果糖-6-磷酸, D-果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-bisphosphate,FBP,以前称 fructose-1,6-diphosphate, FDP), D-甘油醛-1-磷酸和二羟丙酮磷酸是糖酵解途径(见下册第 22 章)的中间物; D-赤藓糖-4-磷酸, D-核糖-5-磷酸, D-木酮糖-5-磷酸, D-核酮糖-5-磷酸和 D-景天庚酮糖-7-磷酸等是戊糖磷酸途径(见下册第 25 章)和光合作用的 Calvin 循环(见下册第 27 章)中的中间物。还有一类是核糖糖苷的磷酸酯,称核苷酸如腺苷-1-磷酸(AMP),腺苷二磷酸(ADP)和腺苷三磷酸(ATP)等,这类化合物将在“核酸”和“生物能学”等章节叙述。

生物学中最重要的几个单糖磷酸酯的结构式:



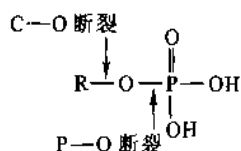
糖的磷酸酯酸性比正磷酸(H_3PO_4)还强,头两步解离的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 分别约为 1~2 和 6~7(表 1-3),这些化合物在细胞内(pH 约 7.2)是以 1 价阴离子和 2 价阴离子的混合物存在的。单糖磷酸酯以荷电形式存在的生物学作用之一是防止它们扩散到细胞外,因为荷电的分子一般不能穿越生物膜。

表 1-3 某些重要单糖磷酸酯的 $\text{p}K_{\text{a}}$

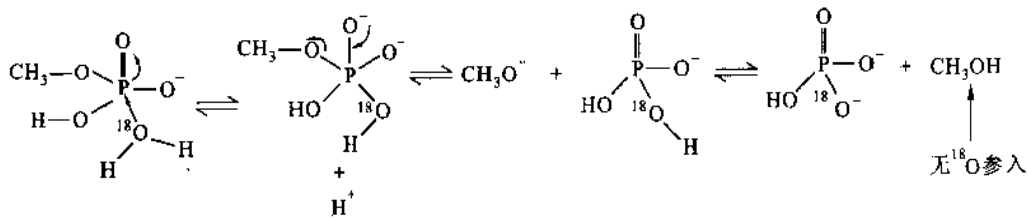
名 称	$\text{p}K_{\text{a}1}$	$\text{p}K_{\text{a}2}$	$\text{p}K_{\text{a}3}$
β -D-葡萄糖-1-磷酸	1.10	6.13	
D-葡萄糖-6-磷酸	0.94	6.11	
D-果糖-6-磷酸	0.97	6.11	
D-果糖-1,6-二磷酸	1.48	6.32	
D-甘油醛-3-磷酸	2.10	6.75	
二羟丙酮磷酸	1.77	6.45	
sn-甘油-3-磷酸	1.44	6.44	
正磷酸	1.97	6.82	12.4

用 Henderson-Hasselbalch 方程(见第 4 章)从表 1-3 中的数据可以计算出在某 pH 条件下一价阴离子对二价阴离子的摩尔比,在 $\text{pH}7.0$ 时从葡萄糖-1-磷酸的 8:1 到甘油醛-3-磷酸的 1.8:1。

磷酸酯的水解原则上可以是 C—O 键或 P—O 键发生断裂:



H_2^{18}O 中甲基磷酸(methyl phosphate)的水解表明,水解是 P—O 键断裂引起的,因为所有的 ^{18}O 都参入离开的磷酸基团中:



甲基磷酸水解的最适 pH 是 4.0,这表明发生水解的分子形式是 1 价阴离子。葡萄糖-1-磷酸的水解其反应速度随 pH 下降逐渐上升,说明葡萄糖-1-磷酸对水解的反应性来说完全质子化的形式比阴离子形式更强。

磷酸酯的水解和磷酸基团的转移有着相似的反应机制,称成线机制(in-line mechanism),如图 1-17 所示。图中进入基团, RO^- , 亲核物质(如果是 HO^- 基即为水解过程),它在反应物磷酸酯分子的离去基团 (OR') 的对面对磷原子发动亲核攻击(nucleophilic attack),形成五共价过渡态(pentacovalent transition state),随后脱掉离去基团,转变为产物(磷酸或另一种磷酸酯),同时磷的构型也发生变化,由原来如果是 S 型则转变为 R 型。此过程中磷的几何结构经历四面体(S 构型磷)到三角双锥体(trigonal bipyramid)到四面体(R 构型磷)的变化。三角双锥体是两个等同四面体共一平面形成的双锥体,它是五共价中间物的几何结构,磷占据中心,与 5 个氧暂时性键合,其中 3 个氧与磷同处于赤道面(equatorial plane),进入基团的氧占据一个顶端(apex),离去基团的氧占据另一顶端。三角双锥体中进入基团和离去基团处于一条线的几何学称“成线”(in-line)。

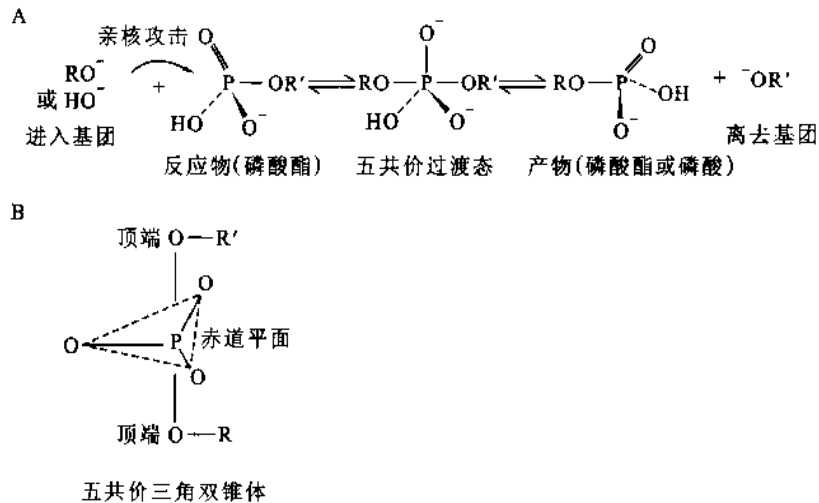
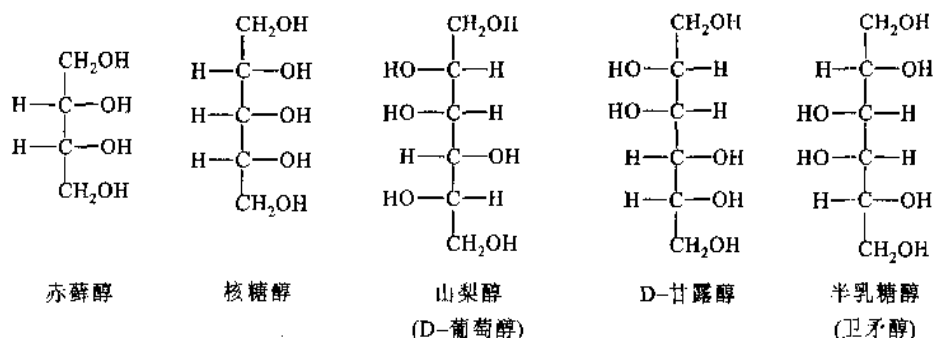


图 1-17 A. 四共价磷亲核取代中加成-消去的成线机制;B. 成线机制中五共价磷的三角双锥体几何学

(三) 糖醇

在前面曾谈到单糖的羰基被还原则生成糖醇(alditol 或 sugar alcohol),自然界广泛存在的己糖醇有山梨醇(D-葡萄糖醇)、D-甘露醇(D-mannitol)、半乳糖醇(galactitol)和与之有关的一种环醇,即肌醇(inositol),其他糖醇有丙三醇(甘油)、赤藓糖醇(erythritol)、木糖醇(xylitol)和核糖醇(ribitol)。糖醇是生物体的代谢产物,不少糖醇也是工业产品,并用于制药和食品工业。

几种糖醇的结构式示于下面:



(1) 山梨醇 也称 D-葡萄糖醇。它是植物中最普遍的一种糖醇,从藻类到高等植物都含有山梨醇,在蔷薇科(Rosaceae)植物如桃、李、杏、苹果、梨、樱桃和山梨等的果实中含量特别丰富。山梨醇是 1872 年首次从山梨的浆果中分离出来的。它是最重要的一种糖醇,工业上用葡萄糖催化加氢获得(见本章“单糖的化学性质”)。产品主要用于合成维生素 C,我国这项合成工艺在国际上处于领先地位。其次用于表面活性剂、食品、化妆品、制药以及其他多种工业。

糖尿病患者的眼球晶状体内发现积累山梨醇,并导致白内障(cataract)的形成。

(2) D-甘露醇 广泛分布于多种陆地和海洋植物中:橄榄树,糖栲(*Fraxinus ornus*)等的树皮上常分泌出大量的甘露醇,形成所谓甘露蜜(manna)的干性渗出物,柿饼表面上的白色柿霜就是甘露醇;藻类和真菌中含量也很丰富,如昆布属褐藻(*Laminaria digitata*)是提取甘露醇的良好原料。D-甘露醇化学上可由 D-甘露糖和 D-果糖还原获得。D-甘露醇在临床上用来降低颅内压和治疗急性肾功能衰竭。

(3) 半乳糖醇 也称卫矛醇(dulcitol),是半乳糖的还原产物,存在于红藻、卫矛属(*Euonymus*)等多种植物。

(4) 核糖醇 是核糖的还原产物。它参与核黄素(维生素 B₂)的组成。

(5) 木糖醇 可由木糖还原获得。木糖醇的甜度为 D-木糖的两倍,是葡萄糖-6-磷酸经糖醛酸途径代谢的一个中间物。

(6) 肌醇 即环己六醇(cyclohexanhexol)或称六羟环己烷,它是一种环多醇(cyclitol)。

1968 年国际纯化学与应用化学联合会(International union of pure and applied chemistry, IUPAC)提出了环多醇环内碳原子的编号规则:肌醇环一般按顺时针方向编号,选定一组尽可能小的数码作为那些带有伸向环面上方的羟基所在碳的编号顺序,例如肌肌醇,这一编号顺序为 1,2,3,5(图 1-18)。同时该联合会建议用分数形式表示肌醇的位置异构体,分子中的数码代表环面上方的羟基位置,分母中的数码代表环面下方的羟基位置,例如肌肌醇可用 1,2,3,5/4,6-肌醇来表示。

肌醇有 9 个立体异构体,其中 7 个是内消旋体,2 个是一对对映体。这些异构体的名称是由肌醇一词加词头合成。这些词头是顺(cis-)、表(epi-)、别(allo-)、新(neo-)、肌(myo-)、粘(muco-)、鲨(scyllo-)、1 L-手性(1 L-chiro-)和 1 D-手性(1 D-chiro-)。

肌醇分子虽无手性碳原子,但某些异构体因其整体结构缺乏对称因素,因此出现对映体关系的两种构型:1 L-手性肌醇(1,2,4/3,5,6)和 1 D-手性肌醇(1,2,4/3,5,6,逆时针方向编号,见图 1-18)。这里在 D 和 L 之前加数字 1 以表示与用于一般糖的 DL 构型规则是不同的。肌醇的 9 个异构体中最稳定的是鲨肌醇(1,3,5/2,4,6),因为它的所有 6 个羟基在一种椅式构象中都能处于平伏位置(图 1-18)。

肌肌醇(myo-inositol)或称肌醇,首次从心肌的提取液中分离获得,系无色单斜晶形,熔点 225℃。结构如图 1-18 所示。肌肌醇是肌醇中唯一具有生物活性的异构体,是酵母和某些动物(如白鼠)的重要生长因子(归属 B 族维生素),但人体能合成它,因此对人和某些动物为非必需维生素。肌肌醇是某些磷脂的组成成分(见第 2 章),肌肌醇的磷酸酯,肌醇-1,4,5-三磷酸(InsP₃),是人及动物体内的第二信使(见第 17 章)。肌肌醇在生物界广泛存在,以游离的状态存在于动物的肌肉、心、肝、肺等组织中。在植物中主要以六磷酸酯形式存在,称植酸(phytic acid)。后者常与钙、镁形成复盐,即植酸钙镁,商品名为菲丁(phytin)。菲丁多从生产玉米淀粉时的浸液(steeep water)中以不溶性的钙镁盐获得,也可从米糠、棉籽饼

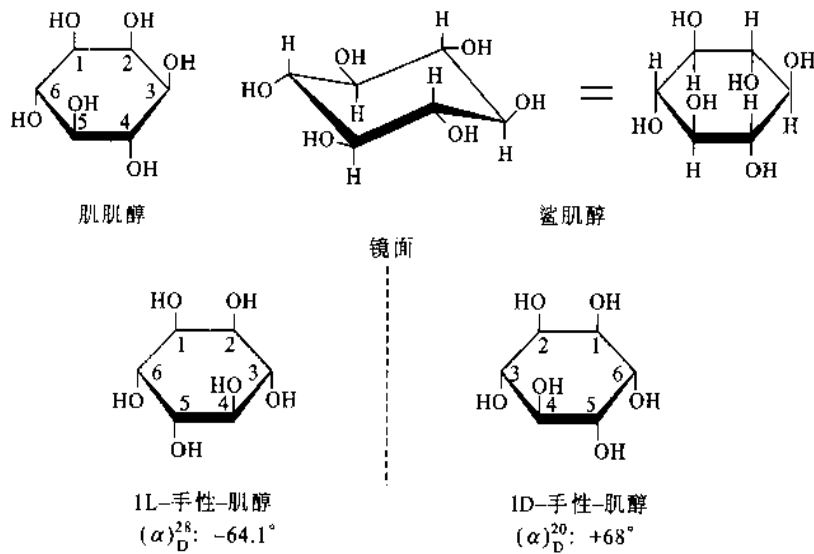


图 1-18 几个肌醇立体异构体的结构

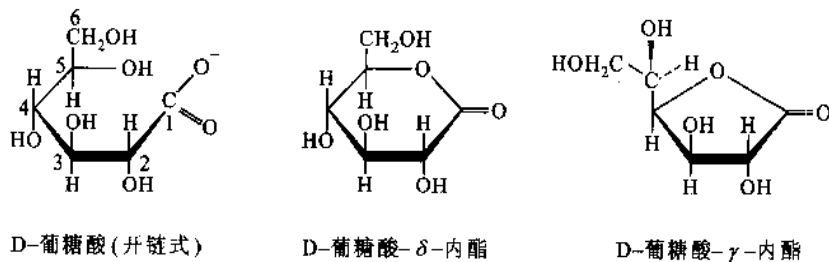
等的浸液中制取,供医药和微生物发酵用。

(四) 糖酸

依氧化条件不同,醛糖被氧化成 3 类糖酸(sugar acid),即醛糖酸、糖二酸和糖醛酸(见本章“单糖的化学性质”)。这里讲的糖酸是指其羧基在 pH7 下能解离,因此确切地应称之为糖羧酸。

糖二酸在自然界极少见,但植物界广泛存在的 L(+)-酒石酸可看成是 D-蔗糖的糖二酸。

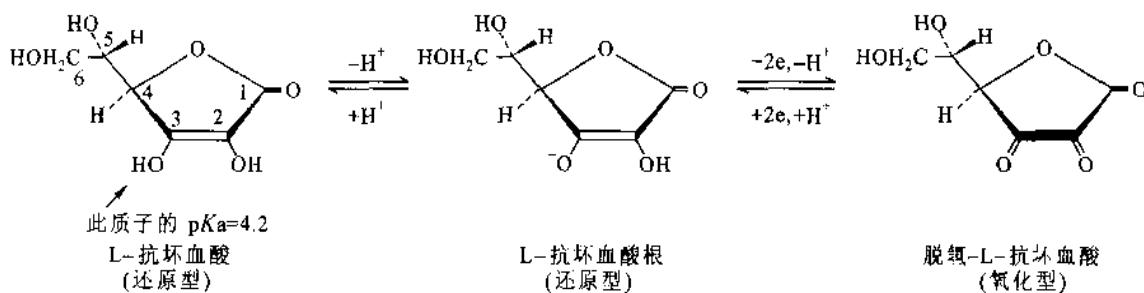
醛糖酸和糖醛酸都可形成稳定的分子内的酯,称内酯(lactone)。D-葡萄糖酸(D-gluconic acid)及其 δ 和 γ 两种内酯的结构如下所示:



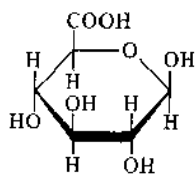
生物体内不存在游离的醛糖酸,但它们的某些衍生物,如 6-磷酸葡萄糖酸及其 δ -内酯是戊糖磷酸途径中的重要中间物(见下册第 25 章),3-磷酸甘油酸是很多糖代谢途径的中间物(见下册第 22~27 章)。

葡萄糖酸能与钙、铁等离子形成可溶性盐,作为药物,易被吸收,葡萄糖酸钙常用于治疗缺钙症和过敏性疾病。

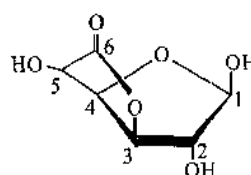
抗坏血酸(维生素 C,见第 15 章)是指苏糖型-2-烯醇己糖酸-1,4-内酯(threo-hex-2-enono-1,4-lactone),也可看成是烯醇化的 2-酮古洛糖酸- γ -内酯(2-keto-gulono- γ -lactone),分子中 C2 和 C3 是烯二醇结构,C4 和 C5 是手性碳原子。属苏糖型(threo),即 C4 和 C5 的取代基在相反的两侧(见图 1-5 中蔗糖结构)。一对对映体中,只有 L-抗坏血酸具有生物活性。抗坏血酸虽是醛糖酸的衍生物,但它的酸性不是来自羧基的解离,而是由于 C3 上烯醇式羟基氢的解离,解离的 pKa 约为 4.2。烯二醇的羟基容易脱氢而转化成羰基,这一反应是可逆的,因此维生素 C 是生物体内重要的抗氧化剂(antioxidant)之一。抗坏血酸的解离和氧化还原反应如下式所示:



常见的糖醛酸有 D-葡萄糖醛酸(D-glucuronic acid), D-半乳糖醛酸(D-galacturonic acid)和甘露糖醛酸(D-mannuronic acid)。它们是在本章后面将要讲到的很多杂多糖的构件分子或组成成分。D-葡萄糖醛酸还是糖醛酸途径中的重要中间物(见下册第 25 章)。 β -D-葡萄糖醛酸及其内酯(β -D-葡萄糖醛酸-6,3-内酯)的结构见下面:



β -D-葡萄糖醛酸

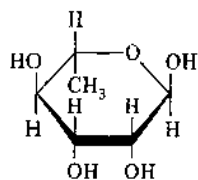


β -D-葡萄糖醛酸-6,3-内酯

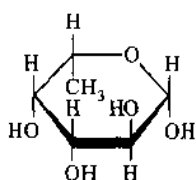
(五) 脱氧糖

脱氧糖(deoxy sugar)是指分子的一个或多个羟基被氢原子取代的单糖。它们广泛地分布在植物、细菌和动物中。一个重要的脱氧戊糖, 2-脱氧核糖, 已在前面述及。下面只介绍脱氧己糖。

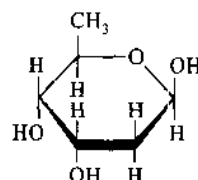
高等植物含有多种 6-脱氧己醛糖, 有时也称它们为甲基戊糖。某些细菌和植物还存在双脱氧己醛糖。下面是几种最常见脱氧己糖的结构式:



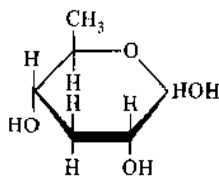
α -L-鼠李糖
(2-脱氧-L-甘露糖)



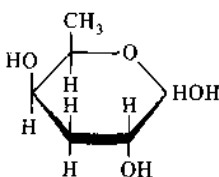
β -L-岩藻糖
(6-脱氧-L-半乳糖)



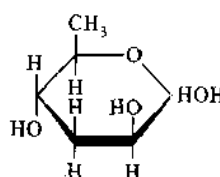
β -D-毛地黄毒素糖
(2,6-二脱氧-D-核己糖)



泊雷糖
(3,6-二脱氧-D-核己糖)



阿比可糖
(3,6-二脱氧-D-木己糖)



泰威糖
(3,6-二脱氧-D-阿拉伯己糖)

(注意: -HOH 表示异头碳构型可以是 α 或 β)

(1) L-鼠李糖(L-rhamnose) 是最常见的天然脱氧糖, 是很多糖苷和多糖的组成成分, 并发现以游离状态存在于毒葛(poison ivy)的花和叶中。

(2) L-岩藻糖(L-fucose) 是海藻细胞壁、西黄芪胶(gum tragacanth)和某些动物多糖(如血型物质)的水解产物之一。

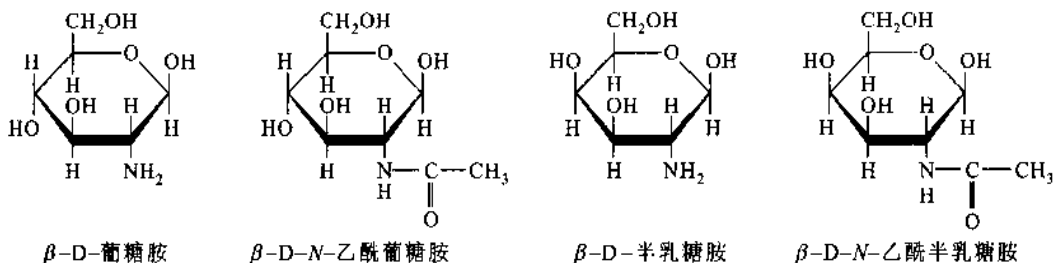
(3) D(+)-毛地黄毒素糖(digitoxose) 即2,6-二脱氧-D-阿洛糖,是毛地黄毒苷(digitoxin)和几种其他强心苷的组成成分。

(4) 泊雷糖(paratose)、阿比可糖(abcquose) 即3-脱氧-D-岩藻糖和泰威糖(lyvelose)即3,6-二脱氧-D-甘露糖,是革兰氏阴性细菌细胞壁上抗原性物质的成分。

此外,已发现的脱氧糖还有:D-岩藻糖;异鼠李糖(quinovose),即6-脱氧-D-葡萄糖;可立糖(colitose),即3,6-二脱氧-L-木己糖,也即3-脱氧-L-岩藻糖,是阿比可糖的对映体;和蛔糖(ascarylose),即3,6-二脱氧-L-阿拉伯己糖,也即3,6-二脱氧-L-甘露糖,是泰威糖的对映体等。

(六) 氨基糖

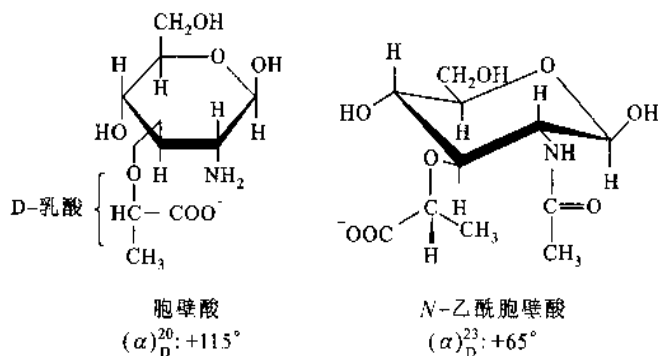
氨基糖(amino sugar)是分子中一个羟基被氨基取代的单糖,自然界中最常见的是C2上的羟基被取代的2-脱氧氨基糖。氨基糖的氨基有游离的,如人乳中有少量的游离氨基葡萄糖(葡糖胺);但多数是以乙酰氨基的形式存在。具有代表性的氨基糖及其衍生物是葡糖胺(glucosamine),N-乙酰葡糖胺(N-acetyl glucosamine),半乳糖胺(galactosamine),N-乙酰半乳糖胺:



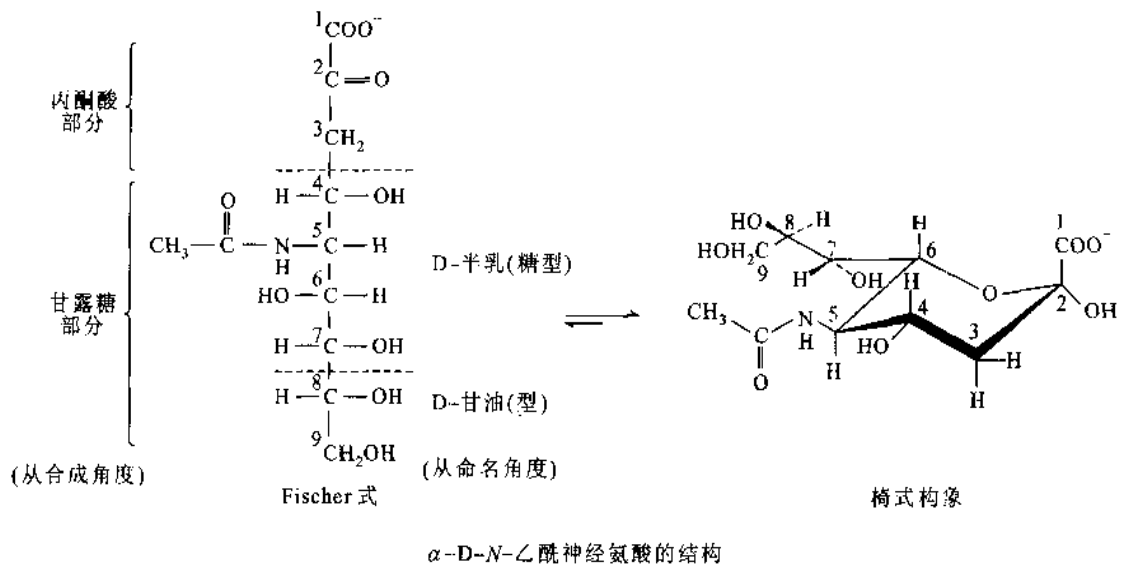
其他常见的氨基糖还有甘露糖胺,鼠李糖胺以及岩藻糖胺等。这些氨基糖及其衍生物是许多天然多糖的重要组成成分。

胞壁酸(muramic acid)和神经氨酸(neuraminic acid)也是氨基糖的衍生物,称酸性氨基糖或酸性糖(acidic sugar)。

N-乙酰胞壁酸是细菌细胞壁结构多糖的构件分子之一。它是由N-乙酰-D-葡糖胺和D-乳酸通过前者C3上的羟基与后者的羟基缩合形成的醚键连接而成的。胞壁酸和N-乙酰胞壁酸的结构式如下所示:



神经氨酸是含一个氨基的九碳糖酸,在生物体内它的碳架是由丙酮酸(C_3 单位)和D-甘露糖胺(C_6 单位)合成的。神经氨酸的全称为5-氨基-3,5-二脱氧-D-甘油-D-半乳壬酮糖酸(5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid)。自然界中以酰基化的形式存在,如N-乙酰(N-acetyl),N-羟乙酰(N-glycolyl)和N-乙酰-4-O-乙酰的神经氨酸,它们统称为唾液酸(sialic acid)。唾液酸是动物细胞膜上的糖蛋白和糖脂的重要成分。下面是N-乙酰神经氨酸的开链型结构和吡喃型结构,两种结构型式处于平衡中,但平衡常数远向吡喃型一方:



为方便书写复杂寡糖和多糖的结构,将使用缩写符号来代表构件单糖及其衍生物。一些最重要的单糖及其衍生物的缩写列于表 1-4。

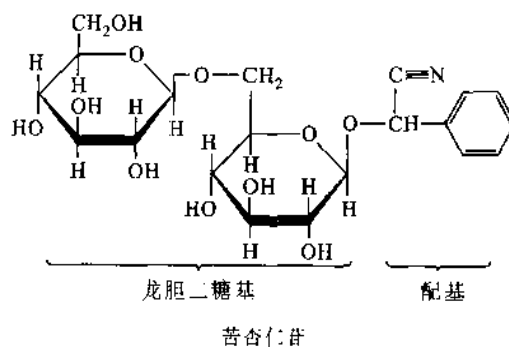
表 1-4 某些常见单糖残基的缩写

单 糖		单 糖 衍 生 物	
阿拉伯糖	Ara	葡糖酸	GlcA
果糖	Fru	葡糖醛酸	GlcUA
岩藻糖	Fuc	半乳糖胺	GalN
半乳糖	Gal	葡糖胺	GlcN
葡萄糖	Glc	N-乙酰半乳糖胺	GalNAc
来苏糖	Lyx	N-乙酰葡糖胺	GlcNAc
甘露糖	Man	胞壁酸	Mur
鼠李糖	Rha	N-乙酰胞壁酸	MurNAc
核糖	Rib	N-乙酰神经氨酸	NeuNAc
木糖	Xyl	(唾液酸)	Sia

(七) 糖苷

这里介绍的糖苷是那些糖苷配基为酚类、甾醇或含氮碱等的单糖或寡糖衍生物。这类糖苷大多都有苦味或特殊香气,不少还是剧毒的物质,但微量时可作药用。

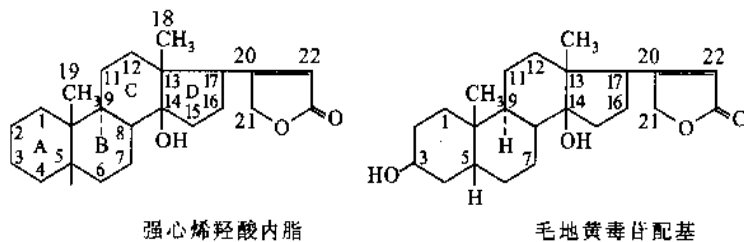
(1) 苦杏仁苷(amygdarin) 含于许多蔷薇科植物(如苦扁桃、杏、李、花楸等)的果核中,尤以苦扁桃(苦杏仁)中含量为多。苦杏仁苷的糖基是龙胆二糖残基,配基是由氰尿酸残基和苯甲醛残基组成的。配基借 β -糖苷键与糖基相连接:



在酸或 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)作用下,苦杏仁苷被水解为其组成成分:2分子葡萄糖,1分子苯甲醛和1分子HCN。由于人的小肠内含少量能产生 β -葡萄糖苷酶的细菌,因而食用较大量的苦扁桃等,会引起氰氨酸中毒。

在很多植物(如毛地黄属、毒毛旋花属)中含有一类医学上称为强心苷(cardiac glycoside)的物质,强心苷是治疗充血性心力衰竭和节律障碍的重要药物。强心苷常以单糖苷、双糖苷、三糖苷等多种形式存在,单糖残基大多是2,6-二脱氧己糖及其3-O-甲基糖,配基都是类固醇(甾体)。强心苷的生理活性主要是由配基决定的。

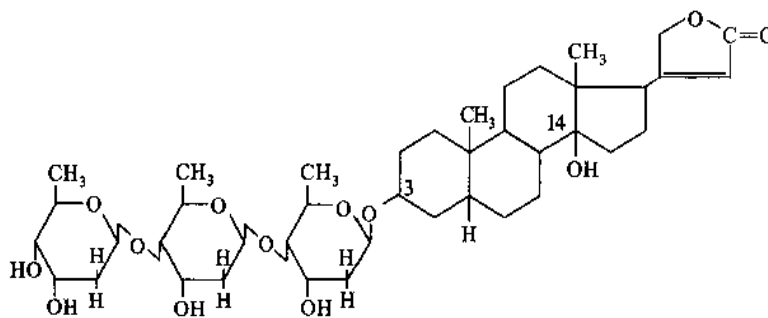
(2)毛(洋)地黄毒苷(digitoxin)是毛地黄类强心苷中的一种,它的前身是毛花洋地黄苷A(lanatoside A)。毛花洋地黄苷A、B和C分离自玄参科毛花洋地黄(*digitalis lanata*)的籽实和叶片。毛花洋地黄A($C_{49}H_{76}O_9$)水解除去一分子葡萄糖和一分子醋酸,即为毛地黄毒苷($C_{41}H_{64}O_{13}$)。毛地黄毒苷的糖基部分是一个由D-毛地黄毒素糖(见“脱氧糖”)通过 β -1,4糖苷键连接的三糖残基,配基部分称毛地黄毒苷配基(digitoxigenin),即 $3\beta,14\beta$ -二羟- $5\beta,20[22]$ -强心[烯羧酸]内酯($3\beta,14$ -dihydroxy- $5\beta,20[22]$ -cardenolide)。强心烯羧酸内酯是强心苷类配基的基本结构:



强心烯羧酸内酯

毛地黄毒苷配基

(虚线取代基为 α 取向,实线取代基为 β 取向,见第2章类固醇)

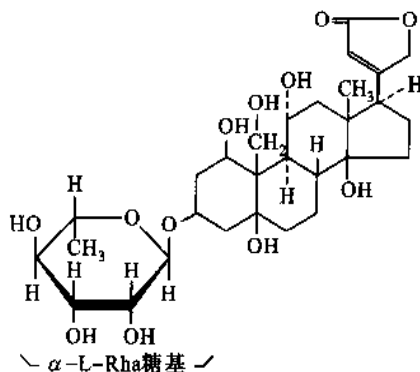


毛地黄毒苷

其特点是甾体中A、B环取顺式并合,B、C环取反式,C、D环取顺式;C14羟基总是 β 取向,C17 β 取向位置上有一个丁烯羧酸内酯(butenolide)。

(3)乌本苷(ouabain)也称G-毒毛旋花苷(G-strophanthin)。最初从东非洲的夹竹桃科苦毒毛旋花或苦羊角拗(*Strophanthus gratus*)中提取出来。过去索马里人用这类植物的浸出液作为箭毒,人们因而发现了它。乌本苷是 Na^+ 、 K^+

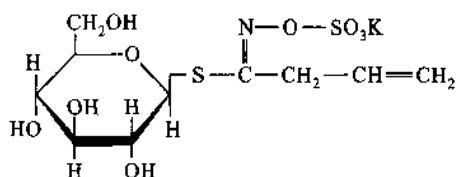
ATP酶的强抑制剂(K_i 约为 10 nmol/L),此酶催化 Na^+ 、 K^+ 离子的跨膜运送,以维持所需电解质的平衡(见下册第21章)。乌本苷的结构:



乌本苷

糖部分是L-鼠李糖残基,配基称乌本苷配基(ouabagenin),即 $1\beta,3\beta,5\beta,11\alpha,14,19$ -六羟, $5\beta,20[22]$ -强心烯羧酸内酯。

(4) 黑芥子硫苷酸钾(sinigrin) 存在于十字花科的很多植物,如芥属(*Brassica*)黑芥(*B. nigra*)、大芥(*B. Juncea*)的种子 and 辣根属(*Cochlearia*)西洋山菘菜(*C. Armoracia*)的根部。黑芥子硫苷酸钾分子中含有硫,其结构式如下:



黑芥子硫苷酸钾

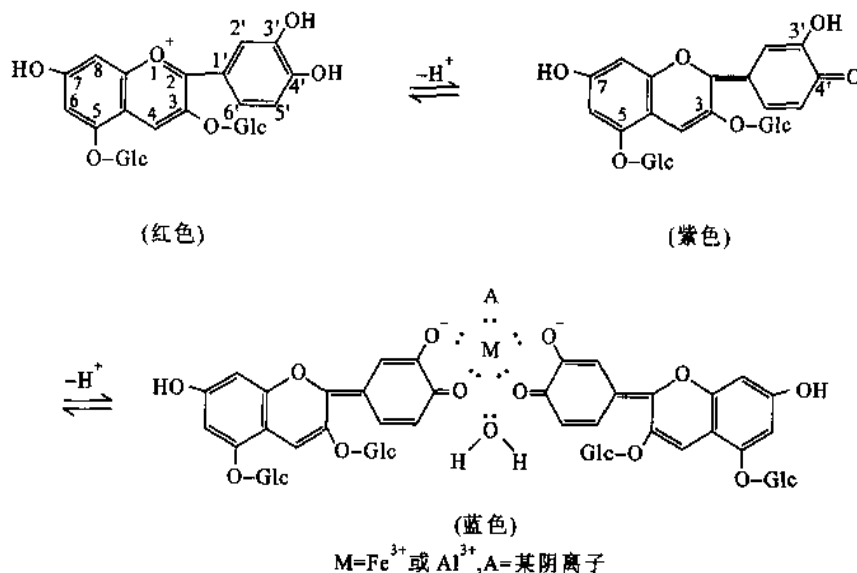
它是S-苷类的代表。黑芥子硫苷酸钾在辣根和芥菜籽内的酶作用下,水解为葡萄糖、硫酸氢钾和经重排的异硫氰酸烯丙酯(allyl isothiocyanate, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}$),后者是芥菜和辣根具有辛辣味的原因。

(5) 花色苷(anthocyanin) 是许多花和果实的着色物质,最常见的有花青苷或称矢车菊色素苷(cyanin),翠雀苷或称飞燕草色素苷(delphinin)和花葵苷或称天竺葵色素苷(pelargonin)。花色苷的配基称花色素(anthocyanidin)。各种花色素的名称源自用来提取它的那种花的名称,例如花青素(cyanidin)一词来自蓝色矢车菊(*Centaurea cyanus*)。花色素的母体化合

物是2-苯基苯并吡喃鎓(2-phenylbenzopyryllium ion),称花[色]鎓(flavylium ion):

青素是3,5,7,3',4'-五羟基花鎓,翠雀苷的配基翠雀素(delargonidin)只比花青素多一个5'-OH,花葵素(pelargonidin)比花青素少一个3'-OH。花色素难溶于水,在植物中主要以苷的形式存在。开花植物中花色苷的种类很多,3-和5-OH均可被Glc, Gal, Rha, Ara和多种寡糖糖基化(glycosylation)。

花色苷的颜色不仅决定于它的组成(羟基数目、甲基化和糖基化),而且和它的解离状态以及是否与金属离子(如 Fe^{3+} , Al^{3+})络合有关。例如花青苷(3,5-二葡萄糖基花青素)在酸性溶液中是红色的,当4'-OH解离时变成紫色,在更高的pH下由于另外的羟基解离并与金属离子配位变成蓝色:



(6) 橘皮苷(hesperidin)和芸香苷(rutin) 它们的糖苷配基分别是黄酮(flavone)和黄酮醇(flavonol)的衍生物,糖基都是一个二糖,称芦丁糖(rutinose), $\alpha\text{-L-Rhap}(1\rightarrow6)\beta\text{-D-Glc}$ 。如图1-19所示,黄酮即2-苯基-1,4-苯并吡喃酮(2-phenyl-1,4-benzopyrone),黄酮醇即3-羟黄酮,它们结构上与前述的花鎓很相似。花的黄色色素一般都是黄酮类。橘皮素(hesperetin)是5,7,3'-三羟-4'-甲氧黄酮,它的7-羟基与芦丁糖的 β 异头羟基缩合,则成橘皮苷。芸香苷(也称芦丁)的配基是3,5,7,3',4'-五羟黄酮或5,7,3',4'-四羟黄酮醇,称槲皮素或槲皮酮(queretin),它的3-羟基被芦丁糖糖基化成芸香苷。

橘皮苷在柑橘类的果皮中约占其干重的8%。芸香苷多含于芸香(*Ruta*)叶、荞麦、槐花和枣子等植物器官中,两者都属于维生素P。维生素P被认为是维持血管正常功能所必需的,它能改善微血管的脆性和通透性。

(7) 根皮苷(phlorbizin, phloridzin) 其配基根皮素(phloretin)是一种二氢查耳酮(dihydrochalcone)(图1-19),查耳酮是

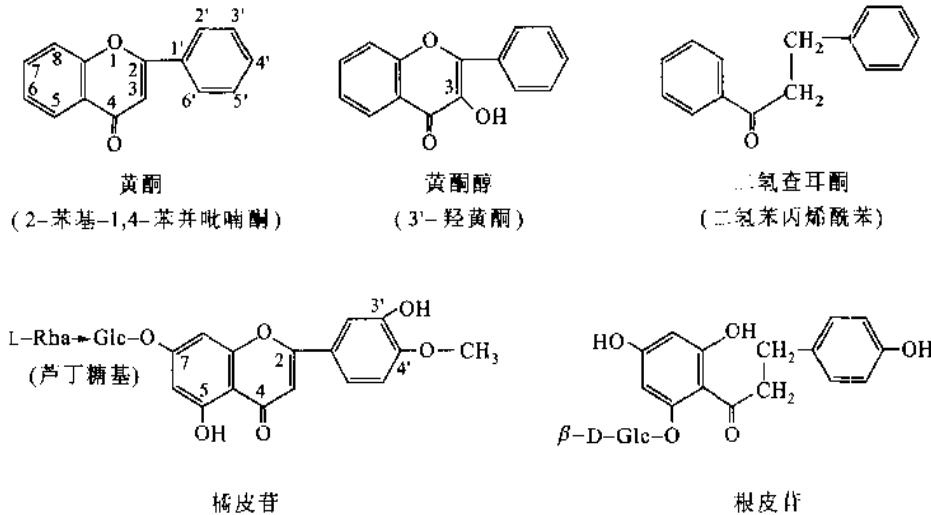


图 1-19 橘皮苷和根皮苷的结构

黄酮的前体。根皮苷存在于梨、苹果等蔷薇科植物的根皮中。它广泛地被用于生理学研究,因为它能阻断肾小管对葡萄糖的重吸收,造成强药物性糖尿病。它的作用机制尚不清楚,可能与变旋酶(mutarotase)受抑制有关。

(8) 皂苷(saponin) 是以类固醇和多环三萜(见第2章)为配基和寡糖为糖基组成的一类糖苷。由于分子中含有亲脂的配基和亲水的糖基而表现出去污剂的性能,其水溶液振荡时能形成稳定的泡沫。从这个意义上,上述的强心苷也可归于皂苷类。皂苷广泛存在于高等植物,其中许多是药用植物,如人参、柴胡、桔梗、甘草等都含有丰富的皂苷。

糖苷化合物还有很多。含氮碱为配基的核苷类将在核酸部分(见第13章)叙述。

六、寡 糖

寡糖是由2~20个单糖通过糖苷键连接而成的糖类物质,有的结构非常复杂。单糖残基的上限数目并不确定,因此寡糖与多糖之间并无绝对界线,寡糖与聚糖(glycan)常是同义的,聚糖又是多糖的同义词。根据Bailey 1965年的报道,已知的寡糖不下500种(主要存在于植物中)。有人把寡糖分成初生寡糖和次生寡糖两类。初生寡糖在生物体内有相当的量,游离存在,如蔗糖、乳糖、 α, α -海藻糖、麦芽糖(它也是次生寡糖)、棉子糖等。次生寡糖的结构相当复杂是高级寡糖。它们的功能主要是作为结构成分。

(一) 结构与性质

先从单糖单位的种类和糖苷键的类型考察一下图1-20中几个简单寡糖的结构式。从上面的考察可以知道,要把一个寡糖与其他寡糖区分开来需要考虑下面4个方面:

1. 参与组成的单糖单位

有些寡糖如麦芽糖(图1-20A)是由同一种单糖(葡萄糖残基)组成的,另一些寡糖是由两种或多种不同的单糖组成的,如蔗糖(图1-20E)中含葡萄糖和果糖两种残基。

2. 参与成键(糖苷键)的碳原子位置

两个单糖残基之间的连接可以有多种方式,但最常见的有1 \leftrightarrow 1(如海藻糖中,图1-20C)、1 \leftrightarrow 2(如蔗糖中,E)、1 \rightarrow 4(如纤维二糖中,B)和1 \rightarrow 6(如龙胆二糖中,D);1 \rightarrow 3和1 \rightarrow 5较少见,前者见于如海带二糖(表1-6)中,后者如明二糖(leucrose,吡喃果糖-5-葡糖苷),注意所有的二糖至少有一个单糖的异头碳参与成键。

3. 参与成键的每一异头碳羟基的构型(异头定向)

构型可以是 α 型如麦芽糖、海藻糖和蔗糖(图1-20A、C、E), β 型如纤维二糖、龙胆二糖和乳糖(图1-20B、D、F)。异头碳的构型对寡糖分子形状影响很大,而分子形状涉及能否被酶所识别,例如催化麦芽糖(含 α 糖苷键)和纤维二糖(含 β 糖苷键)水解需要不同的酶,虽然两者都是D-葡萄糖通过1 \rightarrow 4连接的

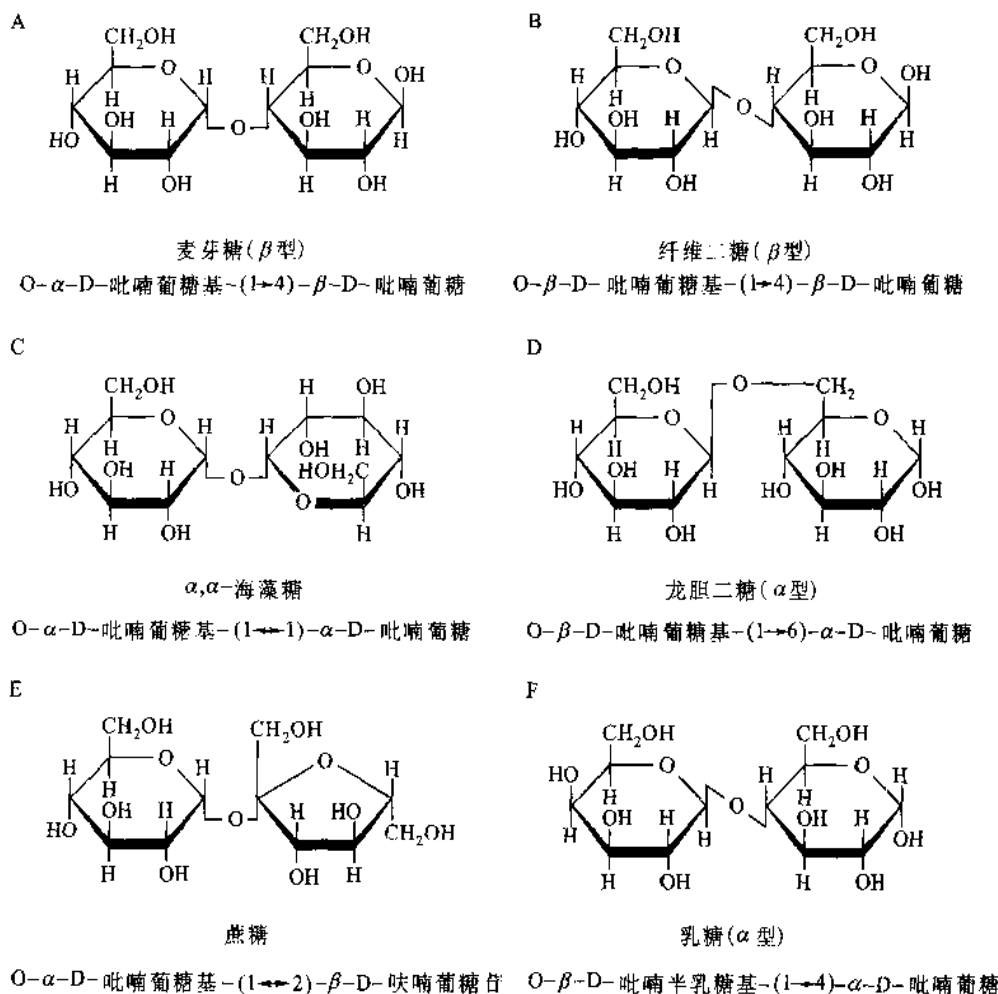


图 1-20 某些寡糖的结构式

二聚体。而且将会看到多糖中的异头定向(anomeric orientation)在决定多糖采取何种构象问题中起着关键性作用。

4. 单糖单位的次序(如果不是同一种单糖残基)

糖苷键在多数情况下只涉及一个单糖的异头碳,另一个单糖的异头碳是游离的。这样,分子的两个末端可以根据化学反应性的不同而区分开来,例如乳糖中葡萄糖残基有一个游离的异头碳,并因此具有一个潜在的游离醛基,能被 Fehling 溶液氧化,但半乳糖残基则不能。乳糖是一种还原糖,葡萄糖残基处于还原端(reducing end, RE),另一端称非还原端(nonreducing end, NRE)。在蔗糖中任一残基都不具有潜在的游离醛基,因此蔗糖是一种非还原糖。

为确切地命名二糖,特别是复杂的寡糖,需要遵循下面几条规则:

(1) 书写时,把寡糖的非还原端放在左边;在第一个单糖单位(左边)的名称前加一个 O,表示两个单糖单位之间的连键是通过氧原子的。

(2) 给出连接两个单糖单位的异头碳的构型(α 或 β)。

(3) 为区分五元环和六元环结构,在单糖单位的名称中插入吡喃或呋喃字样。

(4) 被糖苷键连接的两个碳原子常用括号内经箭头连接的两个序号来表示,例如(1 \rightarrow 4)表示第一个单糖单位(左边)的 C1 被连接到第二个单糖单位(右边)的 C4 上。如果有第三个单糖单位,可用同一惯例描述第二个糖苷键,依次类推。表示糖苷键的位置和构型有多种方式,见后面。

按此命名惯例,图 1-20A 所示的麦芽糖被称为 O- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)- β -D-吡喃葡萄糖(O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranose)或 4-O-(α -D-吡喃葡萄糖基)- β -D-吡喃葡萄糖(4-O-(α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranose)。为简化寡糖结构的描述,常采用表 1-5

中的单糖及其衍生物的三字母缩写符号,吡喃糖和呋喃糖的符号 p 和 f 采用斜体小写,此麦芽糖正规名称的简化形式为 $O-\alpha-D-Glcp-(1\rightarrow4)-\beta-D-Glcp$ 。

由于最常见的单糖多是 D-对映体,己醛糖占优势的形式是吡喃型以及游离的寡糖都是 O-苷等,因此可省去 D/L, p/f 和 O,麦芽糖的命名进一步简化为: $Glc\alpha(1\rightarrow4)Glc$ 。

(二) 常见的二糖

二糖(双糖)是最简单的寡糖,由 2 分子单糖缩合而成。由两个葡萄糖分子构成的二糖称葡二糖,葡二糖有 11 个异构体(未包括游离异头碳的 α 型和 β 型),它们都已在自然界中找到(见表 1-5)。由两个不同的单糖构成的二糖,异构体就更多。据 1970 年 Maher 等报道,已知的双糖有 140 多种。现对几种常见的二糖介绍如下:

表 1-5 葡二糖异构体的结构与存在

名 称	结 构	存 在
α, α -海藻糖(α, α -trehalose)	$Glc(\alpha1\leftrightarrow\alpha1)Glc$	藻类、酵母、其他真菌,昆虫血
异海藻糖(isotrehalose)	$Glc(\beta1\rightarrow\beta1)Glc$	酵母、真菌孢子
新海藻糖(neotrehalose)	$Glc(\alpha1\rightarrow\beta1)Glc$	蜂蜜、藻类、蕨类
曲二糖(kojibiose)	$Glc\alpha(1\rightarrow2)Glc$	米酒(saké), 蜂蜜,粪链球菌(<i>Streptococcus faecalis</i>)
槐糖(sophorose)	$Glc\beta(1\rightarrow2)Glc$	槐属(<i>Sophora</i>)植物
黑曲霉糖(nigerose)	$Glc\alpha(1\rightarrow3)Glc$	蜂蜜、米酒
海带二糖(laminaribiose)	$Glc\beta(1\rightarrow3)Glc$	海带、松针、酵母
麦芽糖(maltose)	$Glc\alpha(1\rightarrow4)Glc$	淀粉和糖原的酶解产物
纤维二糖(cellobiose)	$Glc\beta(1\rightarrow4)Glc$	纤维素的酶解产物
异麦芽糖(isomaltose)	$Glc\alpha(1\rightarrow6)Glc$	支链淀粉的酶解产物
龙胆二糖(gentiobiose)	$Glc\beta(1\rightarrow6)Glc$	龙胆属(<i>Gentiana</i>)植物

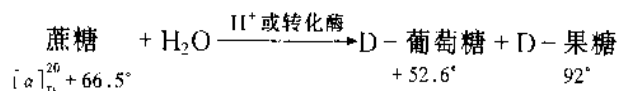
* 蜂蜜中的寡糖是蜜蜂肠道的包括微生物分泌的酶作用于花蜜(nectar)和蜜露(honeydew)而产生的。

1. 蔗糖

蔗糖(sucrose)俗称食糖,是最重要的二糖。它形成并广泛存在于光合植物(根、茎、叶、花和果实)中,不存在于动物中。蔗糖的主要来源是甘蔗(*Saccharum officinarum*),甜菜(*Beta vulgaris*)和糖枫(*Acer saccharinum*)。甘蔗糖,甜菜糖和枫树糖都是蔗糖。

蔗糖[$Glc(\alpha1\leftrightarrow\beta2)Fru$]的正规全称和结构式见图 1-20E。蔗糖经稀酸水解产生 1 分子 D-葡萄糖和 1 分子 D-果糖;蔗糖不能还原 Fehling 溶液,不能成脎,也无变旋现象,表明蔗糖分子中葡糖残基和果糖残基是通过两个异头碳被连接的。蔗糖甲基化形成八-甲基蔗糖(octamethylsucrose),后者能被水解为 2,3,4,6-四-O-甲基葡萄糖和 1,3,4,6-四-O-甲基果糖,蔗糖能被 α -葡糖苷酶(α -glucosidase)水解,而不被 β -葡糖苷酶所水解;蔗糖也能被蔗糖酶(sucrase)水解,此酶也称转化酶(invertase)或 β -呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase),它水解 β -呋喃果糖苷,但不水解 α -呋喃果糖苷;因此推定葡萄糖残基的异头碳是 α -构型,果糖残基的异头碳是 β 构型。此结构已被 X 射线分析所证实。

蔗糖在分离纯化过程中容易被结晶,晶体呈单斜晶形;属于非还原糖;酵母可使其发酵。某些寡糖的熔点和比旋值见表 1-6。蔗糖水解过程中比旋由正值变为负值。



旋光度的这一变化称转化(inversion);所得葡萄糖和果糖的等摩尔混合物称转化糖(invert sugar), $[\alpha]_D^{20} = -19.8^\circ$ 。蔗糖加热到 200℃ 左右,则变成棕褐色的焦糖(caramel),它是一种无定形多孔性的固体物,有苦味,食品工业中用作酱油、饮料、糖果和面包等的着色剂。

表 1-6 某些寡糖的熔点和比旋值^a

名 称	熔点/℃	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$	名 称	熔点/℃	$[\alpha]_D^{20}(\text{H}_2\text{O})$
蔗糖	185~187	+66.5°	α -龙胆二糖	189~195	+31°→+9.6°
转化糖		+19.8°	β -龙胆二糖	190~195	-0.8°→+10°
α -乳糖	202(1H ₂ O) ^b	+85°→+52.6°	α -蜜二糖	85(2H ₂ O)	+134°
β -乳糖	252	+34°→+52.3°		182(1H ₂ O)	+134.3°
β -麦芽糖	103(1H ₂ O)	+112°→130°	棉子糖	81(5H ₂ O)	+130°
	98(2H ₂ O)	+179.9°	松三糖	154(2H ₂ O)	+88.2°
α -纤维二糖	241	+68.7°→+35°	龙胆糖	212	+30.8°
β -纤维二糖	153	+16.2°→+35°	水苏糖	110(4H ₂ O)	+133°

a. 除异头物外均指平衡液的比旋值;异头物的比旋列出起始值→平衡值; α -蜜二糖的比旋系平衡值。b. 括弧内水分子数指结晶水。

蔗糖的溶解度很大(179 g/100 mL, 0℃, 487 g/100mL, 100℃),并且大多数的生物活性都不受高浓度的蔗糖影响,因此蔗糖适于作为植物组织间糖的运输形式。蔗糖的另一重要特点是它的水解自由能(ΔG° 约为-29 kJ/mol)比淀粉分子中的 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键的水解自由能(-17 kJ/mol糖苷键)高。蔗糖在酸性溶液中极易水解,其速度约为麦芽糖或乳糖的1000倍。

2. 乳糖

乳糖(lactose)存在于所有研究过的哺乳类乳汁中,含量约5%,但加利福尼亚海狮(*Zalophus californianus*)的乳汁中含的是葡萄糖,而不是乳糖。乳糖也存在于连翘属(*Forsythia*)花的雄性器官中,并已从人心果树(*Archras sapota*)的成熟果实中获得。工业上乳糖是从乳清中制取的,乳清是生产奶酪时经凝乳酶(rennin)作用沉淀除去蛋白质后的水溶液。

乳糖具有还原性、能成脎,有变旋现象。用酸或酶水解产生1分子D-半乳糖和1分子D-葡萄糖。如果乳糖先氧化成内酯酸(lactonic acid)再水解,产物是半乳糖和葡萄糖酸,因此葡萄糖单位是乳糖分子中的还原端部分。乳糖为 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)所水解,表明糖苷键是 β 型的。甲基化和降解实验最后确定乳糖的结构为Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Glc(图1-20F)。

乳糖的溶解度(17g/100 mL冷水,40g/100 mL热水)远比蔗糖小。乳糖结晶时以 α -乳糖或 β -乳糖存在,两者的差别仅在于分子还原端残基的异头碳构型。 α -乳糖比 β -乳糖易溶于水,甜度也稍大, β -乳糖可以从冰淇淋中结晶析出(当长时间储存时),使冰淇淋变成“沙质”结构。乳糖不被一般的酵母所发酵。

乳糖作为乳汁的成分,是婴儿的糖类营养的主要来源。近年来发现乳糖的碱异构化产物,乳糖醇(lactulose, Gal $\beta(1\rightarrow4)$ Fru)可从废乳清中获得,甜度为乳糖的两倍。

3. 麦芽糖

麦芽糖主要是作为淀粉和其他葡聚糖的酶促降解产物(次生寡糖)存在,但已证实在植物中有容量不大的从头合成的游离麦芽糖(初生寡糖)库(pool)。麦芽糖是俗称饴糖的主要成分,我国早在公元前12世纪就能制作饴糖。

使用与测定乳糖结构相似的程序推定出麦芽糖结构为Glc $\alpha(1\rightarrow4)$ Glc(图1-20A)。

麦芽糖也是一种还原糖。酵母能使其发酵。麦芽糖能被麦芽糖酶(maltase)也称 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase),水解成2分子的葡萄糖。通常得到的麦芽糖晶体是 β 型的;麦芽糖的溶解度为108g/100mL, 25℃;甜度为蔗糖的1/3。食品工业中麦芽糖用作膨松剂,防止烘烤食品干瘪,以及用作冷冻食品的填充剂和稳定剂。

4. α, α -海藻糖

α, α -海藻糖或称海藻糖(trehalose或称mycose),名称前的 α, α 表示其糖苷键的构型,以区别于 β, β -海藻糖(异海藻糖)和 α, β -海藻糖(新海藻糖),见表1-6。

α, α -海藻糖首次是从卷柏(*Selaginella lepidophylla*)中提取出来的。此后在蕨类、山毛榉属(*Fagus*)、芥属等的一些植物中找到。 α, α -海藻糖也广泛地分布于藻类、真菌、地衣和节肢动物中。

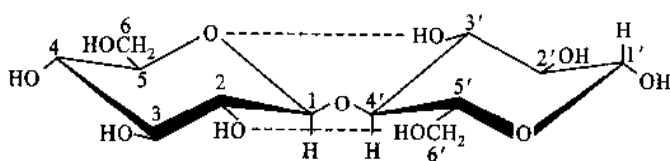
α 、 α -海藻糖的结构为 $\text{Glc}(\alpha 1 \leftrightarrow \alpha 1)\text{Glc}$ (图 1-20C),是一种非还原糖;在海藻糖酶(trichalase)作用下降解为 D-葡萄糖。

α 、 α -海藻糖属于初生寡糖。它是伞形科(Apiaceae)正成熟果实中主要的可溶性糖类。它在蕨类中代替蔗糖成为主要的可溶性储存糖类,在昆虫中它是用作能源的主要血循环糖。

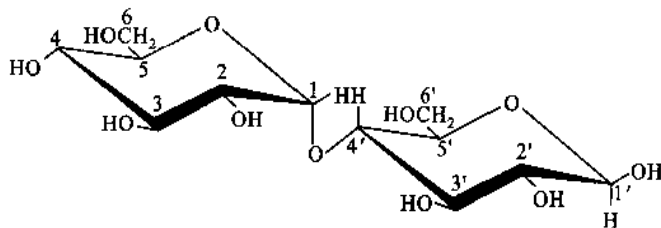
5. 纤维二糖

纤维二糖属次生寡糖,是纤维素的二糖单位。纤维素(棉花与纸浆)溶于醋酸酐和硫酸混合液中并于 35°C 放置 1 周后于冷处结晶,则得纤维二糖八醋酸酯,再经水解生成纤维二糖,主要为 β 型。

纤维二糖(图 1-20B)与麦芽糖的结构几乎相同,均为葡二糖,单糖单位间都是 1,4 连键(1,4-linkage)。不同的只是糖苷键的构型,前者是 β -1,4,后者是 α -1,4。纤维二糖不被人体消化(因缺乏 β 葡萄糖苷酶),也不被酵母发酵,而麦芽糖则不然。纤维二糖的两个糖环中所有的羟基和羟甲基都处在平伏位置,而麦芽糖由于是 α -1,4 连接,非还原端的糖环中不可能出现这种情况(图 1-21)。



纤维二糖, β -1,4 连接



β -麦芽糖, α -1,4 连接

图 1-21 β -纤维二糖和 α -麦芽糖的构象

6. 龙胆二糖

龙胆二糖主要作为多种糖苷化合物,如苦杏仁苷、藏[红]花素(crocin)的糖基部分而存在。龙胆二糖最先从龙胆属(*Gentiana lutea*)植物的根和根状茎中提取出来,并因而得名。当淀粉加酸水解或葡萄糖与酸作用,也产生龙胆二糖。

龙胆二糖的结构式见图 1-20E,这是通过 β -1,6 糖苷键连接起来的葡二糖;具有还原性和变旋现象;晶体分 α 型和 β 型。微溶于水。

除上述外,比较常见的二糖还有:蜜二糖(melibiose), $\text{Gal}\alpha(1 \rightarrow 6)\text{Glc}$ 是棉子糖(见下面)的组成部分;芦丁糖(见前面)是芸香苷和橘皮苷的糖基部分。

几种葡糖基果糖:松二糖(turanose, α -1,3 连接)、麦芽酮糖(maltulose, α -1,4)、明二糖(leucrose, α -1,5)和异麦芽酮糖(isomaltulose, α -1,6)都在蜂蜜中存在。其中明二糖已成工业产品,用明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)从蔗糖生产,甜度为蔗糖的一半,能防龋,不引起腹泻,用于糖果甜食制造和贮存。

寡糖的单糖单位有己糖,有些还有戊糖,例如樱草糖(primeverose), $\text{O}-\beta\text{-D-Xylp}(1 \rightarrow 6)-\text{D-Glcp}$, 中有 D-木糖,荚豆二糖(Vicianose), $\text{O}-\alpha\text{-L-Arap}(1 \rightarrow 6)-\text{D-Glcp}$, 中有 L-阿拉伯糖。

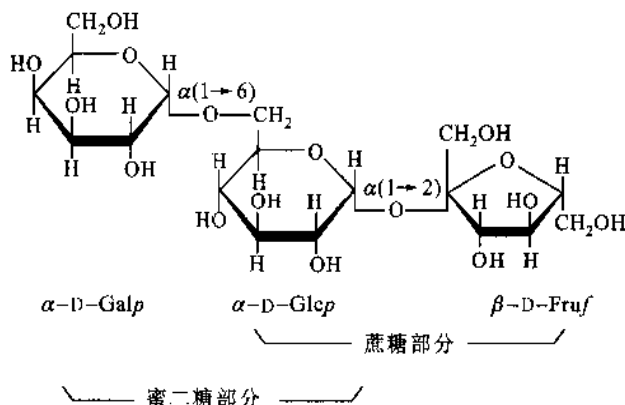
(三) 其他简单寡糖

常见的其他简单寡糖主要有三糖、四糖和五糖。

1. 三糖

棉子糖(raffinose)广泛地分布于高等植物界。

棉子糖完全水解产生葡萄糖、果糖和半乳糖各1分子。棉子糖是非还原糖,因此推定所有的异头碳都参与糖苷键的形成;当用 α -半乳糖苷酶水解时产生半乳糖和蔗糖,而用蔗糖酶水解产物是果糖和蜜二糖。因而确定棉子糖的结构是:



棉子糖五水合物是针形晶体。棉子糖用蜜二糖酶(melibiose)水解生成蔗糖和半乳糖。

棉子糖是所谓“棉子糖家族”的同系物寡糖的基础。棉子糖家族在植物体内是从头合成的,并以游离状态存在。

较常见的三糖还有:

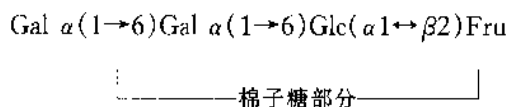
龙胆糖(gentianose), * $\text{Glc}\beta(1\rightarrow6)\text{Glc}(\alpha1\leftrightarrow\beta2)\text{Fru}$, 是一种非还原糖,作为贮存糖存在于龙胆属植物中。

龙胆三糖(gentiotriose), $\text{Glc}\beta(1\rightarrow6)\text{Glc}\beta(1\rightarrow6)\text{Glc}$, 是一种还原糖,作为糖基部分存在于糖苷中。龙胆糖和龙胆三糖都含龙胆二糖成分。

松三糖(melezitose), $\text{Glc}\alpha(1\rightarrow3)\text{Fru}(\beta2\leftrightarrow\alpha1)\text{Glc}$, 非还原糖,存在于很多种植物,特别是松科(Pinaceae)和椴科(Tiliaceae)的分泌物中。

2. 四糖、五糖和六糖

水苏糖(stachyose)是棉子糖家族中的一员。它的第二个半乳糖残基是通过 α -1,6糖苷键连接到棉子糖部分的半乳糖基上的:



通过这样的连键连续接上半乳糖残基则得系列棉子糖家族成员;五糖,毛蕊花糖(verbascode);六糖,筋骨草糖(ajugose);直至九糖(nonasaccharide)。

棉子糖系列也广泛分布于植物界,低级同系物如棉子糖和水苏糖几乎存在于植物的各个部分,高级同系物一般限制在贮存器官。棉子糖系列与蔗糖同为糖类的转运和贮存形式。蔗糖和棉子糖的低级同系物在植物的冷适应(cold acclimation)中起重要作用,在某些植物如裸子植物中后者的积累甚至超过蔗糖。

人乳中存在有从二糖到六糖等几十种寡糖,其中多数是含乳糖基的高级寡糖,如乳糖-N-新四糖(lacto-N-neo-tetraose**), β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc,乳糖-N-岩藻糖五糖 I (lacto-N-fucopentaose I), α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc 和乳糖-N-新六糖(lacto-N-neo-hexaose), β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 6)-[β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-

* gentianose 多译为“龙胆三糖”,编者建议译为龙胆糖,以免与 gentiotriose 混淆,而后者按词义应译为龙胆三糖。

** 注意, tetraose 即 tetrasaccharide 是四糖, tetrose 是丁糖(四碳糖)。

-Gal-(1→4)-D-Glc等,名称中的N表示此寡糖分子中有的单糖残基是乙酰氨基衍生物,如GlcNAc。这些高级寡糖主要是作为血型抗原(糖蛋白)的决定簇,如上述的乳糖-N-岩藻糖五糖是血型H活性五糖。

(四) 环糊精

环糊精是芽孢杆菌属(*Bacillus*)的某些种中的环糊精转葡萄糖基转移酶(cyclodextrin glucosyltransferase)作用于淀粉(以直链淀粉为佳)生成。环糊精也称Schardinger糊精或环直链淀粉(cycloamylose),一般由6、7或8个葡萄糖单位通过 α -1,4糖苷键连接而成,分别称 α -、 β -和 γ -环糊精或环六、环七和环八直链淀粉。环糊精无游离的异头羟基,属非还原糖。这些环状寡糖对酸水解较慢,对 α -和 β -淀粉酶有较大的抗性。

环糊精分子的结构像一个轮胎(图1-22),其特点是所有葡萄糖残基的C6羟基都在大环一面的边缘,而C2和C3的羟基位于大环的另一面的边缘。环糊精分子作为单体堆叠起来形成圆筒形的多聚体,环糊精分子及其多聚体,内部是疏水环境,外部是亲水的。它们既能很好地溶于水,又能从溶液中吸入疏水分子或分子的疏水部分到分子的空隙中,形成水溶性的包含络合物(inclusion complex)。通常被包含的物质对光、热和氧变得更加稳定,某些物理性质也发生改变,如溶解度和分散度增大。环糊精还能使食品的色、香、味得到保存和改善。因此在医药、食品、化妆品等工业中被广泛地用作稳定剂、抗氧化剂、抗光解剂、乳化剂和增溶剂等。在生化上 α -环糊精被用于层析分离和光谱学测定, β -环糊精能与丹磺酰氯形成水溶性的笼形物(clathrate)用于蛋白质的荧光标记。 α -和 β -环糊精能使某些化学反应加速,具有催化功能,例如 α -环糊精能使苯酯水解速度增加300倍, β -环糊精使焦磷酸酯水解速度增加200多倍。因此环糊精是研究模拟酶(mimetic enzyme)的材料。

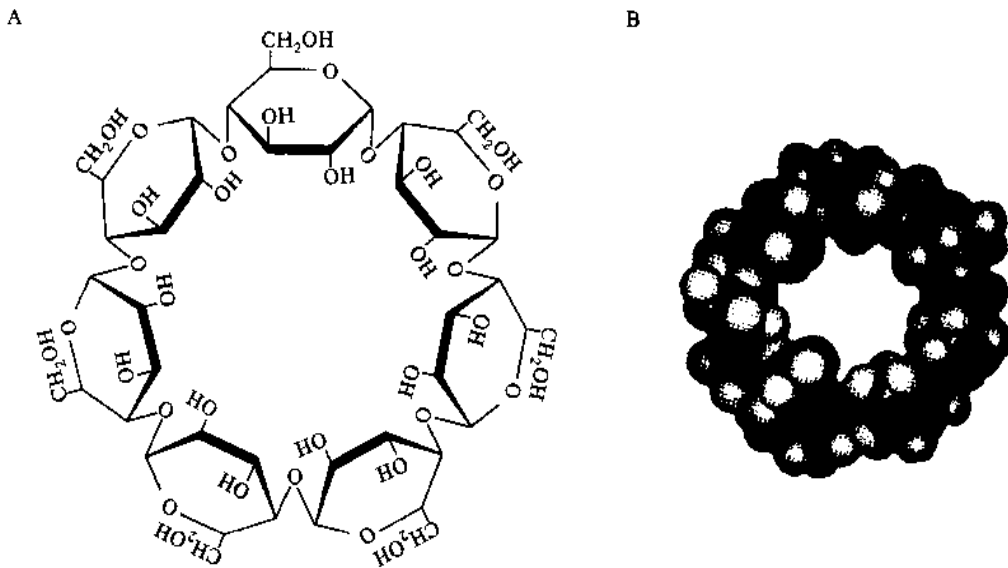


图1-22 A. β -环糊精分子的结构;B. β -环糊精分子的空间填充模型

七、多 糖

多糖也称聚糖,是由很多个单糖单位构成的糖类物质。自然界中糖类主要以多糖形式存在。多糖是高分子化合物,相对分子质量极大,从30 000到400 000 000。它们大多不溶于水,虽然酸或碱能使之转变为可溶性的,但分子会遭受降解,因此多糖的纯化是十分困难的。而且纯化了的产物在分子大小方面仍是不均一的,也即同样的物质可以由一系列不同相对分子质量的聚合分子组成。

多糖属于非还原糖(因为一个很大的多糖分子只有一个还原末端),不呈现变旋现象,无甜味,一般不能结晶。

根据生物来源的不同,有植物多糖、动物多糖和微生物多糖之分。如前所述,多糖根据是由一种还是多种单糖单位组成可分为同多糖和杂多糖。还可以按多糖的生物功能分为贮存或贮能多糖(storage or energy-storage polysaccharide)和结构多糖(structural polysaccharide)。属于贮存多糖的有淀粉、糖原、右旋糖酐和菊粉等。纤维素、壳多糖、许多植物杂多糖、细菌杂多糖和动物杂多糖(糖胺聚糖)都属于结构多糖。还有一些多糖,如细胞表面多糖是细胞专一的识别信号,起传递信息作用。这种功能要求多糖语言的确切“词汇”,因此这些多糖都有确定而复杂的序列。这类多糖大多与专一的糖蛋白共价结合。

(一) 同多糖

1. 淀粉(starch)

淀粉是植物生长期间以淀粉粒(granule)形式贮存于细胞中的贮存多糖。它在种子、块茎和块根等器官中含量特别丰富。

淀粉粒为水不溶性的半晶质(semi-crystalline),在偏振光下呈双折射(birefringence)。淀粉粒的形状(有卵形、球形、不规则形)和大小(直径 $1\sim 175\ \mu\text{m}$)因植物来源而异。

当干淀粉悬于水中并加热时,淀粉粒吸水溶胀(swelling)并发生破裂,淀粉分子进入水中形成半透明的胶悬液(colloidal suspension),同时失去晶态和双折射性质,这一过程称凝胶化或糊化(gelatinization)。当凝胶化的淀粉液缓慢冷却并长期放置时,淀粉分子会自动聚集并借助分子间的氢键键合形成不溶性微晶束而重新沉淀,此现象称退行(retrogradation)或老化(aging)。食品工业中为防止淀粉老化,可将淀粉食品速冻至 -20°C ,使食品中的水迅速结晶以阻碍淀粉分子聚结而沉淀。

淀粉除作为食物外主要用于食品和医药等工业用的增甜剂(如水解糖浆)和增稠剂(如糊精)。天然淀粉经适当处理,使它的某些物理或化学性质发生改变,以适应特定的需要,这种淀粉称为改型淀粉(modified starch),如用于纺织品精整的酸改型淀粉,用于造纸的阳离子淀粉等。实验室中常用的可溶性淀粉也属于这类,它是普通淀粉在 $7.5\%\text{HCl}$ 中室温下放置7天形成的。还有的改型淀粉在加工食品(processed food)中作为脂肪代用品。

天然淀粉一般含有两种组分:直链淀粉(amylose)和支链淀粉(amylopectin)。当淀粉胶悬液用微溶于水的醇如正丁醇饱和时,则形成微晶沉淀,称直链淀粉,向母液中加入与水混溶的醇如甲醇,则得无定形物质,称支链淀粉。多数淀粉所含的直链淀粉与支链淀粉的比例为(20%~25%):(75%~80%)。某些谷物如蜡质玉米(waxy corn)和糯米等几乎只含支链淀粉,而皱缩豌豆中直链淀粉含量高达98%。

直链淀粉和支链淀粉在物理和化学性质方面有明显差别。纯的直链淀粉仅少量地溶于热水,溶液放置时重新析出淀粉晶体(退行现象)。支链淀粉易溶于水,形成稳定的胶体,静置时溶液不出现沉淀。在天然淀粉溶液中支链淀粉是直链淀粉的保护胶体(protective colloid)。超离心(见第7章)研究表明,直链淀粉和支链淀粉都是不均一的。根据渗透压法(见第7章)测定,不同来源和不同方法制备的直链淀粉平均 M_r 为 1×10^5 到 2×10^6 (600~12 000个葡萄糖残基),支链淀粉平均 M_r 为 1×10^6 到 6×10^6 (6 000~37 000残基)。

甲基化和酶降解实验证明,直链淀粉是由葡萄糖单位通过 $\alpha-1,4$ 连接的线形分子(linear molecule),麦芽糖可视为它的二糖单位。也有报道认为直链淀粉是线形分子与轻微分支分子(约每1 000个葡萄糖单位1个分支点)的混合物,这里作为分支的是单个的 β -葡糖基。直链淀粉有极性(polarity)即方向性,一端是1'端(还原端),另一端是4'端(非还原端),书写结构时通常1'端放在右边,4'端在左边。支链淀粉分子是高度分支的,约每25~30单位有1个分支点,线形链段也是 $\alpha-1,4$ 连接,只是分支点处还存在 $\alpha-1,6$ 连接。淀粉的一级结构(指糖链中残基的序列和残基间的连接方式)见图1-23。显然,支链淀粉或糖原分子具有多个非还原端(在分子的周边),但只有一个还原端。

由于 $\alpha-1,4$ 连接,淀粉分子中的每个残基与下一个残基都成一定角度(图1-21),因此淀粉链倾向于形成有规则的螺旋构象。根据X射线衍射分析,直链淀粉的二级结构(指多糖链的折叠方式)是一个左

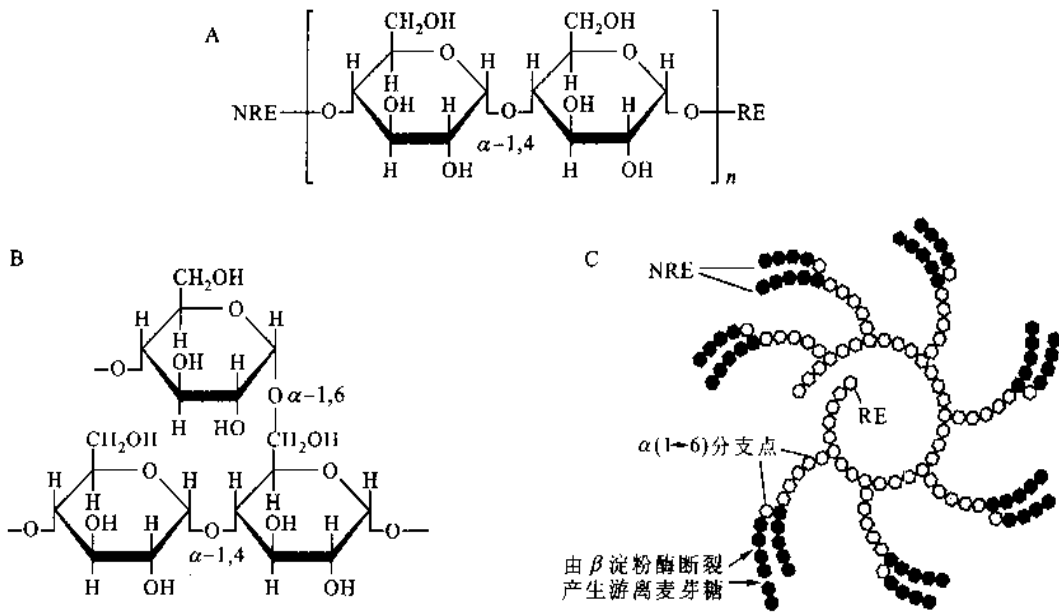


图 1-23 淀粉分子的一级结构

A. 直链淀粉; B. 支链淀粉分支点的结构; C. 支链淀粉或糖原分子的示意图(图中 RE 代表还原端, NRE, 非还原端)

手螺旋(left-handed helix), 每圈螺旋含 6 个残基, 螺距(pitch)0.8 nm, 直径 1.4 nm(图 1-24A)。直链淀粉是应用 X 射线衍射技术阐明结构的第一个生物聚合物。淀粉的螺旋结构并不十分稳定。当不与其他分子如碘相互作用时, 直链淀粉很可能是以无规卷曲(random coil)形式存在。碘分子正好能嵌入螺旋中心空道, 每圈可容纳一个碘分子(I_2), 通过朝向圈内的羟基氧(提供未共享电子对)和碘(提供空轨道)之间的相互作用形成稳定的深蓝色淀粉-碘络合物(图 1-24B)。产生特征性的蓝色需要约 36 个即 6 圈的葡萄糖残基。支链淀粉螺旋(约 25-30 个残基)中的短串碘分子比直链淀粉螺旋中的长串碘分子吸收更短波长的光, 因此支链淀粉遇碘呈紫色到紫红色。淀粉分子还可能以双螺旋(double helix)形式存在, 在淀粉粒中双螺旋进一步折叠成更致密的结构(图 1-25), 这与淀粉作为贮存分子的功能是一致的。

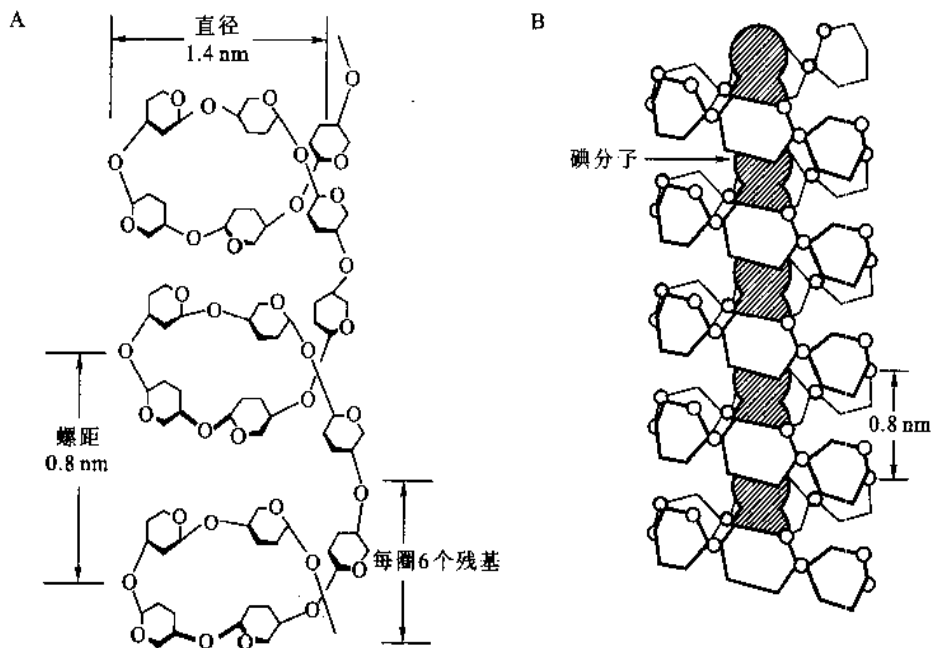


图 1-24 直链淀粉的螺旋结构(A), 直链淀粉-碘络合物(B)

淀粉在酸或淀粉酶作用下被逐步降解, 生成分子大小不一的中间物(intermediate), 统称为糊精。糊

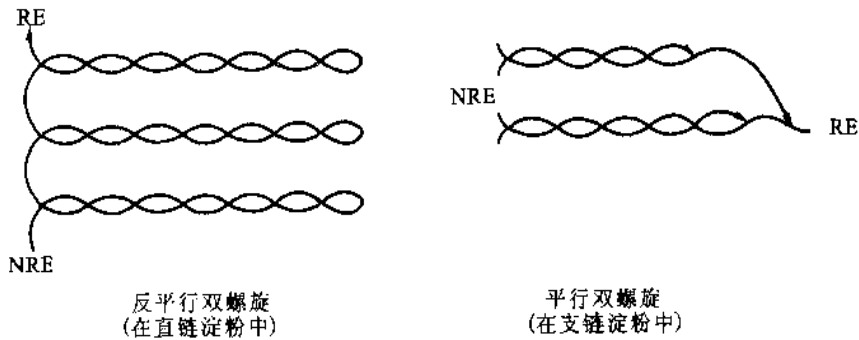


图 1-25 淀粉的双螺旋结构

精依分子质量的递减,与碘作用呈现由蓝紫色、紫色、红色到无色,例如淀粉糊精(amyloextrin)呈蓝紫色,红糊精(erythroextrin)红褐色,消色糊精(achroextrin)无色。

α -淀粉酶(α -amylase)广泛地存在于动植物和微生物中。它是一种内切葡糖苷酶(endoglucosidase),随机作用于淀粉链内部的 α -1,4糖苷键。在 $H_2^{18}O$ 中的水解实验证明,此酶断裂C1-O键,而不是O-C4键。 α -淀粉酶降解直链淀粉时生成葡萄糖,少量麦芽糖和麦芽三糖(maltotriose);降解支链淀粉或糖原,最终产物是葡萄糖,麦芽糖、麦芽三糖和 α -极限糊精(α -limit dextrin)或称 α -糊精,它是含有 α -1,6连键的短链聚糖(平均含8个残基)。 α -糊精的继续降解,需要寡-1,6-葡糖苷酶的参与,这是一种“脱支酶”(debranching enzyme),也称异麦芽糖酶或 α -糊精酶。

β -淀粉酶(β -amylase)主要存在于高等植物特别是发芽的种子如大麦芽中。它是一种外切(或端切)葡糖苷酶(exoglucosidase),专门从淀粉的非还原端开始断裂 α -1,4糖苷键,逐个除去二糖单位,原来的 α -连接被转型,产物是 β -麦芽糖,并因此该酶被称为 β -淀粉酶。由于 β -淀粉酶不能断裂 α -1,6连键,又不能越过分支点继续作用,因此当它作用于支链淀粉或糖原时,只能水解分子周边的 α -1,4糖苷键,形成占总量约50%的麦芽糖和一个大分子核心,称 β -极限糊精, β -极限糊精能被一种称为异淀粉酶(isoamylase)的脱支酶除去 α -1,6连键,使之继续能被淀粉酶水解。

2. 糖原(glycogen)

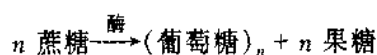
糖原又称动物淀粉,它以颗粒(直径10~40 nm)形式存在于动物细胞的胞液内。颗粒内除糖原外尚含调节蛋白和催化糖原合成与降解的酶类。体内糖原的主要存在场所是肝脏和骨骼肌。糖原在肝脏和骨骼肌中的含量分别约占湿重的5%和1.5%,但骨骼肌的糖原贮量比肝脏的多,因为一个平均70 kg体重的男子约有30 kg骨骼肌(约450 g糖原),但只有1.6 kg肝(约80 g糖原)。糖原也在细菌如大肠杆菌(*E. coli*)和个别植物如甜玉米中找到。糖原是人和动物餐间以及肌肉剧烈运动时最易动用的葡萄糖贮库。葡萄糖是体内各器官的重要代谢燃料,更是大脑可利用的燃料。

糖原可通过热碱液水解组织,中和以及醇沉淀等步骤分离获得。根据渗透压测定,糖原的 M_r 从 3×10^6 到 15×10^6 。无碱分离法得到的糖原 M_r 达 100×10^6 。糖原结构与支链淀粉很相似(图1-23C),所不同的只是糖原的分支程度更高,分支链更短,平均每8~12个残基发生一次分支。与碘作用呈红紫色至红褐色。支链淀粉和糖原的高度分支一可增加分子的溶解度,二则将有更多的非还原端同时受到降解酶(如 β -淀粉酶、磷酸化酶都是非还原端外切酶)的作用,加速聚合物转化为单体,有利于即时动用葡萄糖贮库以供代谢的急需。直链淀粉则不能即时动用,主要用作葡萄糖的长期贮存。

动员淀粉和糖原的酶主要是磷酸化酶(phosphorylase),植物中的称淀粉磷酸化酶、人及动物中的称糖原磷酸化酶。

3. 右旋糖酐(dextran)

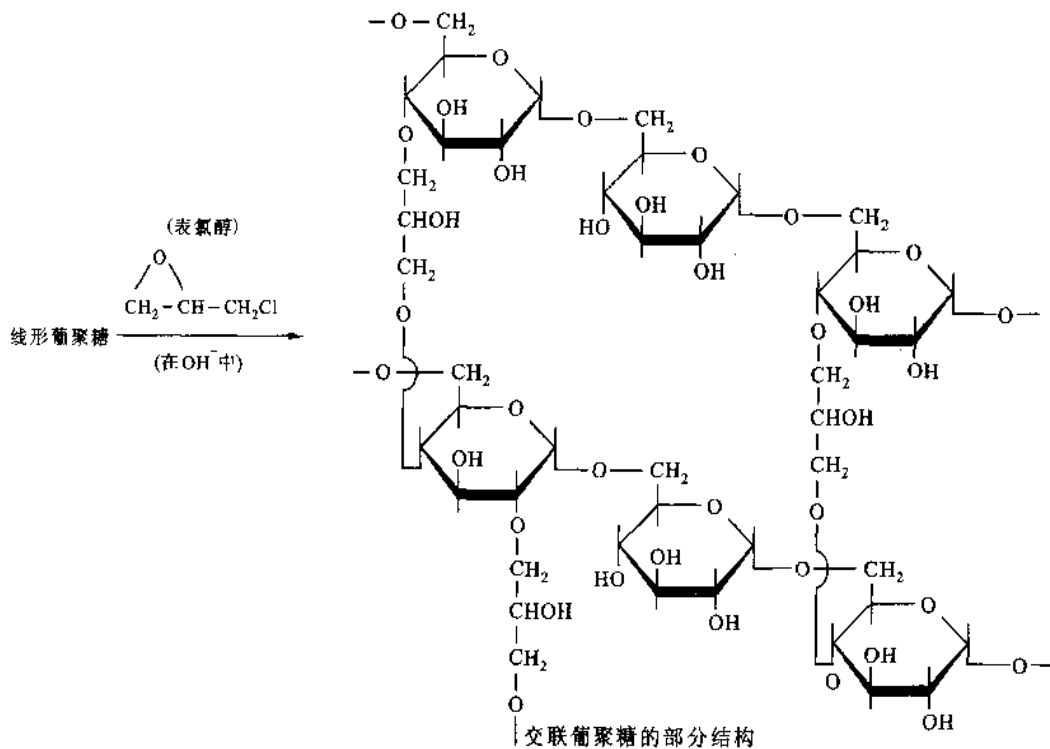
右旋糖酐或洋葡聚糖,但勿与glucan(也译葡聚糖)相混,后者的含义更广。右旋糖酐是酵母和细菌的贮存多糖。它可由某些细菌例如明串珠菌(*Leuconoto mesenteroides* B512菌株)发酵蔗糖产生:



这里,催化聚合反应的是右旋糖酐蔗糖酶(dextranucrase)也称蔗糖-6-葡萄糖基转移酶(sucrose-6-glucosyltransferase),形成的聚合物主链是 $\alpha-1,6$ 连接的葡聚糖(主链占95%),支链为 $\alpha-1,3$ 连接的单个葡萄糖基或异麦芽糖基(支链占5%)。因菌种或菌株的不同,还有 $\alpha-1,2$ 或 $\alpha-1,4$ 连接的分支。天然右旋糖酐含有各种大小的分子,从寡糖到 M_r 高达几亿的多糖,其水溶液的 $[\alpha]_D^{25} = +200^\circ$ 。

用部分水解的方法可以从天然右旋糖酐获得 M_r 介于50 000~100 000的产品,得率达90%。这种产品临床上用作血浆代用品,治疗因丢失体液而引起的休克(shock)。人口腔中生长的几种细菌能合成大量的右旋糖酐,它是牙斑(dental plaque)的主要成分,并因此营养学家十分关注饮食中蔗糖的消耗。

右旋糖酐经交联剂(crosslinking agent)例如表氯醇(epichlorohydrin),即1-氯-2,3-环氧丙烷处理,则被交联成具有立体网状结构的交联葡聚糖(crosslinked dextran),它的珠状凝胶的商品名为Sephadex,反应式如下所示:



通过控制葡聚糖与交联剂的比例可以得到不同网孔大小的交联凝胶,它们广泛地用于生化分离。向右旋糖酐(平均 $M_r \sim 2 \times 10^6$)引入一种多环发色团,活性蓝2(reactive blue 2)(图1-26),便成蓝色葡聚糖-2000,它常被用于凝胶过滤中孔隙体积测定和装柱质量核查(见第7章)。

4. 菊粉(inulin)

菊粉是一种果聚糖(fructan),在很多植物中代替淀粉成为贮存多糖。大量地存在于菊科(Compositae)植物中。在菊芋(*Helianthus*)、大丽菊(*Dahlia*)的块茎和菊苣(*Cichorium*)、旋覆花(*Inula*)的块根中含量尤为丰富,例如菊芋(*H. tuberosus*)的茎含12%~15%,菊苣(*C. inthybus*)的根含15%~20%。

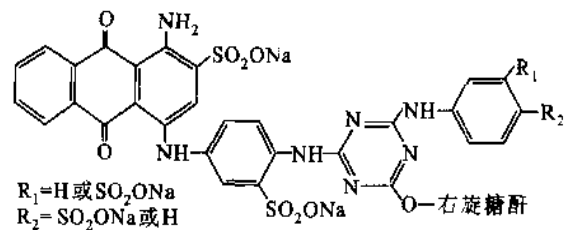
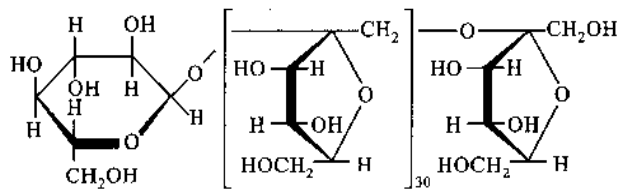


图1-26 蓝色葡聚糖的发色团

菊粉溶于热水,加乙醇便从水中析出,水溶液的 $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ$,与碘不发生反应。菊粉分子约由31个 β -呋喃果糖残基和1~2个吡喃葡萄糖残基聚合而成,果糖残基之间通过 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 连接,1个葡萄糖残基位于多糖链的末端,以蔗糖型连键($\alpha 1 \leftrightarrow \beta 2$)与之相连,另一个葡萄糖残基如果有,可能出现在链内。由于菊

粉含有少量葡萄糖,有的学者也把它归于杂多糖类,菊粉的结构示于下面:



菊粉

菊粉能被霉菌、酵母中含有的菊粉酶(inulase)水解成果糖。在稀酸作用下菊粉极易水解成果糖,这是所有果聚糖的特性。人和动物体内缺乏分解菊粉的酶类。菊粉曾是制备果糖的原料。在临床上用于肾功能(肾小球滤过量)的测定。

除菊粉外许多植物尚含 $\beta(2\rightarrow6)$ 连接的果聚糖作为贮存物质,聚合度一般为 30~40 个残基,禾木科(Gramineae)植物如小麦、大麦、黑麦和燕麦在成熟初期的种子中果聚糖丰富,随着种子的成熟逐渐转变为淀粉。

5. 纤维素(cellulose)

纤维素是生物圈里最丰富的有机物质。占植物界碳素的 50% 以上。纤维素是植物(包括某些真菌和细菌)的结构多糖,是它们的细胞壁的主要成分。纤维素组成叶干重的 ~10%,木材的 >50%,麻纤维的 70%~80%。棉纤维的 90%~98%。但纤维素不是植物界所独有的,海洋无脊椎动物被囊类(Tunicata)在其外套膜中含有相当多的纤维素,甚至有人报道在人的结缔组织中也有少量纤维素存在。但作为结构物质在动物进化中被选中的主要不是纤维素。真菌中 $\beta(1\rightarrow3)$ 或 $\beta(1\rightarrow6)$ 连接的葡聚糖被广泛地用作结构多糖。

纤维素是线性葡聚糖,残基间通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 糖苷键连接的纤维二糖可看成是它的二糖单位。 $\beta(1\rightarrow4)$ 连接给纤维素构象以深刻影响(图 1-21)。纤维素链中每个残基相对于前一个残基翻转 180° ,使链采取完全伸展的构象。相邻、平行的(极性一致的)伸展链在残基环面的水平向通过链内和链间的氢键网形成片层结构(sheet structure)(图 1-27),片层之间即环面的垂直向靠其余氢键和环的疏水内核间的范德华力(van der waals force)维系。这样若干条链聚集成紧密的有周期性晶格的分子束,称微晶(crystallite)或胶束(micelle)。多个这样的胶束平行地共处于在电镜下呈线状的微纤维(microfibril)中,胶束间是排列疏松无序的多糖链(图 1-28)。微纤维是在细胞质膜上的纤维素合成酶催化下合成的,此酶同时催化多条糖链的合成。微纤维长数微米,一般含 6 000--12 000 个残基;直径 3.5--10 nm,在某些海藻中直径达 30 nm。在植物细胞壁中,微纤维包埋在果胶物质、半纤维素、木质素、伸展蛋白等组成的基质(matrix)中。纤维素与基质粘合在一起更增强细胞壁的抗张强度(tensile strength)和机械性能,以适应植物抵抗高渗透压和支撑高大植株的需要。这与在硬树脂中加入玻璃纤维以提供坚固、强韧的玻璃纤维板的道理是一样的。木质素(lignin)是一种复杂的不溶性酚类聚合物,它抗化学、真菌和细菌攻击的能力强。伸展蛋白(extensin)是一种糖蛋白,约由 300 个氨基酸残基组成,富含羟脯氨酸残基(Hyp)。该肽链的一半以上由 Ser-Hyp-Hyp-Hyp 顺序占据,大多数 Hyp 被含 3 个或 4 个阿拉伯糖残基的糖链糖基化,丝氨酸残基(Ser)有半乳糖与之连接,糖成分约占伸展蛋白的 65%,在细胞壁中伸展蛋白以共价键与微纤维相连。

纤维素不溶于水及多种其他溶剂,加之原料中含有多种与之结合紧密的成分,这给纤维素纯化造成很大困难。纯纤维素最好是从棉花中用有机溶剂脱蜡,然后在无氧条件下用热的 1% NaOH 溶液除去果胶物质的方法制取。根据超离心法测定纤维素的 M_r 为 $(1\sim2)\times 10^6$ 。

人和哺乳类缺乏纤维素酶(cellulase),因此不能消化木头和植物纤维。某些反刍动物在肠道内共生着能产生纤维素酶的细菌,因而能消化纤维素。白蚁消化木头是依赖于消化道中的原生动物(protozoa)。

天然纤维素在工业上主要用于纺织和造纸。改性纤维素(modified cellulose)尚有其他用途。乙基纤维素是一种热塑塑料(thermoplastic)和黏合剂(binder);醋酸纤维素(cellulose acetate)是最重要的纤维素酯,能溶于二氯甲烷或丙酮,可用于制造胶片和薄膜,醋酸纤维素薄膜在生化实验中用作电泳支持物。羧

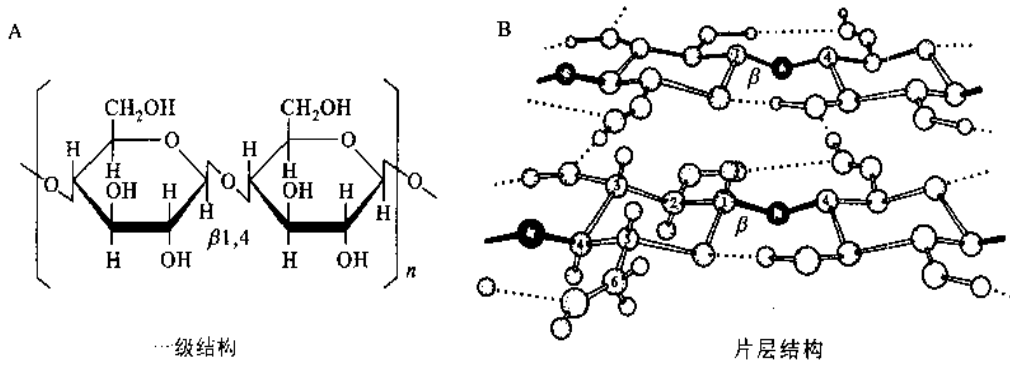


图 1-27 纤维素的结构

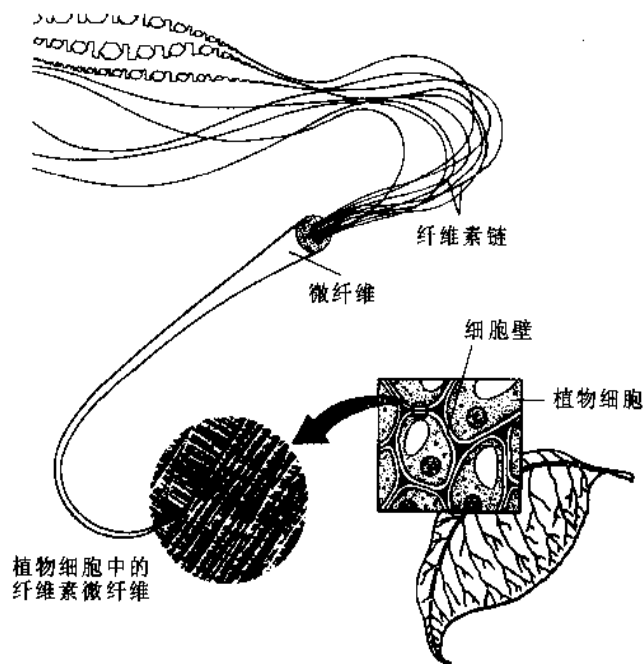
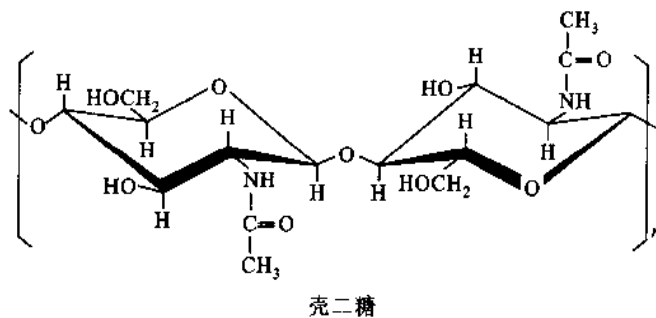


图 1-28 植物细胞壁与纤维素的结构

甲基纤维素和微晶纤维素(microcrystalline cellulose)在食品工业中分别用作粘稠剂和填充剂(filler),在生化中用作层析介质。人造丝(rayon)或粘胶丝(viscose)以及赛路玢或称玻璃纸(cellophane)也是改性纤维素。

6. 壳多糖(chitin)

壳多糖也称几丁质,是 N -乙酰- β -D-葡糖胺的同聚物(homopolymer), M_r 达数百万。壳多糖的结构与纤维素的极相似。只是每个残基的 C2 上羟基被乙酰化的氨基所取代:



壳多糖广泛地分布于生物界,是自然界中第二个最丰富的多糖。壳多糖是大多数真菌和一些藻类的一种成分,在这里常代替纤维素或其他葡聚糖。壳多糖也发现于正在分裂的酵母细胞的胞间中隔(sep-

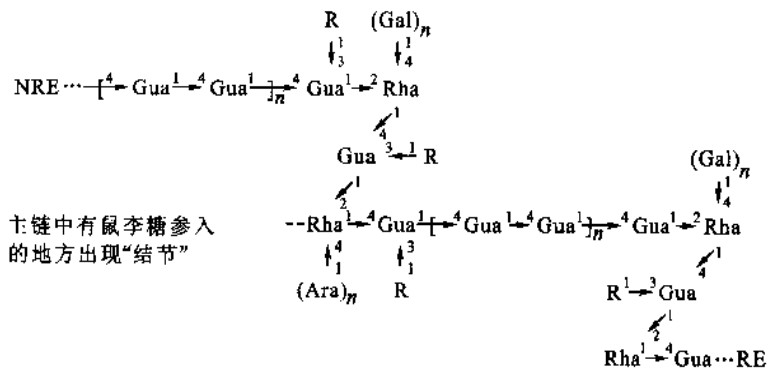
tum)中。但壳多糖主要是存在于无脊椎动物,如昆虫、蟹虾、螺蚌等。它是很多节肢动物(Arthropoda)和软体动物(Mollusca)外骨骼的主要结构物质。在很多这样的外骨骼中壳多糖是进行矿化(mineralization)的基质,这和脊椎动物骨骼中胶原蛋白是供矿质沉积的基质很像。有意思的是,在进化过程中脊椎动物在胶原蛋白基质上发展了内骨骼,无脊椎动物却在壳多糖基质上发展了外骨骼。

壳多糖去乙酰化形成聚葡萄糖胺或称脱乙酰壳多糖(chitosan)。由于脱乙酰壳多糖的阳离子性质和无毒性,近来被广泛地应用于水和饮料处理、化妆、制药、医学、农业(种子包衣)以及食品、饲料加工。

(二) 杂多糖

1. 果胶物质(pectic substance)

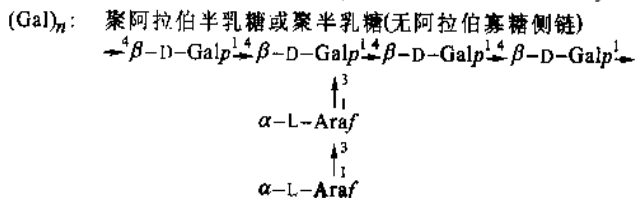
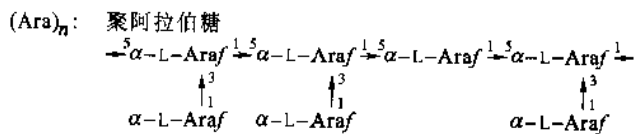
果胶物质主要存在于植物的初生细胞壁和细胞之间的中层(middle lamella)内。果胶物质是细胞壁的基质多糖。在浆果、果实和茎中最丰富。当植物材料经乙醇-苯(9:1)脱脂和亚氯酸(HClO₂)去木质素后,残留物用螯合剂(如草酸铵)水溶液提取得果胶物质。从结构角度看,果胶物质包括两种酸性多糖:聚半乳糖醛酸(galacturonan)和聚鼠李半乳糖醛酸(rhamnogalacturonan)和三种中性多糖:阿拉伯聚糖(arabanan),半乳聚糖(galactan)和阿拉伯半乳聚糖(arabinogalactan)。每种多糖随植物来源、组织和发育阶段的不同,其侧链中残基的数目、种类、连接方式以及其他取代基存在的情况都有相当大的变化。羧基不同程度被甲酯化的线形聚半乳糖醛酸或聚鼠李半乳糖醛酸称果胶(pectin),完全去甲酯化的果胶称果胶酸(pectic acid),羧基大部分被甲酯化的果胶称果胶酯酸(pectinic acid)。提取前存在于植物中与纤维素和半纤维素等结合的水不溶性的果胶物质称原果胶(protopectin)。原果胶受植物体内聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase)也称果胶酶(pectinase)的作用或提取过程中经稀酸处理,则转变为水溶性的果胶。果胶参与果实成熟期特别是采后成熟过程中果实组织的软化。果胶经果胶酯酶(pectinesterase)的去甲酯化转变为无黏性的果胶酸,此时果实则变成软病状态。上述的果胶酯酸术语含义不甚确切,现多用高甲氧基果



主链中, Gua: α-D-GalpUA 或其甲酯

Rha: β-L-Rhap

侧链中, R: β-D-Xylp¹, α-L-Araf¹, β-D-Galp^{1,4} D-Xylp¹, α-L-Fucp^{1,2}, D-Xylp¹



胶(甲酯化程度 $>45\%$)和低甲氧基果胶(甲酯化 $<45\%$)来表示果胶酯化的程度。阿拉伯聚糖、半乳聚糖和阿拉伯半乳聚糖在被提取前可能是作为侧链与果胶主链结合的。作为果胶侧链的还有含1~2个下列残基的短链:D-半乳糖,L-阿拉伯糖,D-木糖,L-岩藻糖、D-葡萄糖醛酸等。上面是果胶的模式结构。

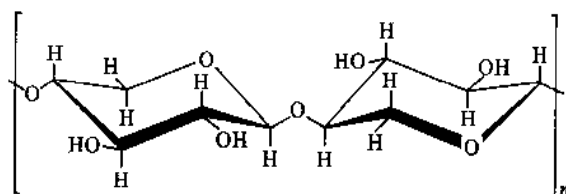
果胶的相对分子质量随来源而异,一般为25 000~50 000(相当于150~300个残基)。果胶溶液是亲水胶体,在适当的酸度(pH~3)和糖浓度(60%~65%蔗糖)条件下则形成凝胶。形成凝胶的机制中,糖使高度水化的果胶脱水,酸消除果胶分子的负电荷。果胶在糖果和食品工业中被用作胶凝剂(gelling agent)。

2. 半纤维素(hemicellulose)

半纤维素被定义为碱溶性的植物细胞壁多糖,也即除去果胶物质后的残留物能被15% NaOH提取的多糖。这些多糖大多数都具有侧链、分子大小为50~400个残基,在细胞壁中与微纤维非共价结合成为细胞壁的另一类基质多糖。属于这类多糖的有木聚糖(xylan),包括阿拉伯木聚糖和4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖、葡甘露聚糖(glucomannan)、半乳葡甘露聚糖(galactoglucomannan)、木葡聚糖(xyloglucan)和愈创葡聚糖(callose)即 β -1,3-葡聚糖等。所谓半纤维素就是这些多糖的总称。

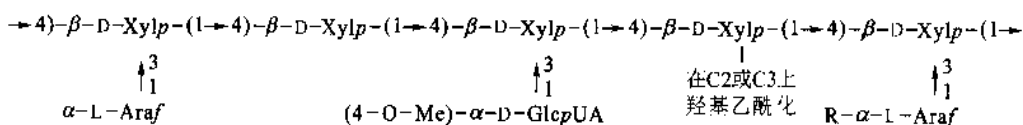
半纤维素大量存在于植物的木质化部分,如木材中占干重的15%~25%,农作物的秸秆中占25%~45%。

(1) 木聚糖 是半纤维素中最丰富的一类,在植物界分布也最广。在多数被子植物中木聚糖占木质组织干重的20%~30%。天冬草的木聚糖是由1,4连接的 β -D-吡喃木糖单位组成的线形同多糖,其结构与纤维素很像,除了氢取代羟甲基外,它也是以椅式存在,所有的羟基都处于平伏位置:



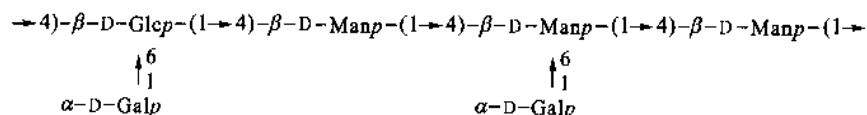
木聚糖主链

阿拉伯木聚糖、4-O-甲基-葡萄糖醛酸木聚糖以及其他木聚糖,主链结构都相同,只是还有其他单糖单位作为侧链存在,其中以L-阿拉伯糖最为常见,其次是D-葡萄糖醛酸及其4-甲醚。主链的部分木糖残基在C2或C3上常被乙酰化。下面是木聚糖的典型结构:



式中,Me:甲基,R: α -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-, β -D-Galp-(1 \rightarrow 5)等

(2) 葡甘露聚糖和半乳葡甘露聚糖 主链都是由D-葡萄糖和D-甘露糖通过 β -1,4连键聚合而成,是针叶树(裸子植物)细胞壁的主要成分,也存在于阔叶树中。半乳葡甘露聚糖中还有单个 α -D-吡喃半乳糖残基的侧链,以1,6-连键与主链的甘露糖或葡萄糖残基相连。结构通式示于下面:



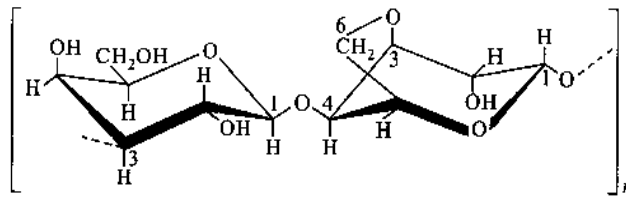
在象牙果(*Phytalephas macrocarpa*)的胚乳细胞壁中含有一种仅由 β -D-吡喃甘露糖通过1,4-连键构成的甘露聚糖(mannan),这在高等植物的细胞壁中是少见的。

(3) 木葡聚糖 广泛地存在于罗望子(*Tamarindus indica* 也称酸豆)等豆科植物的种子中,这些多糖中很多种可与碘反应产生典型的蓝色,并因此称其为类淀粉(amyloid),但这一名称容易误导,其实与淀粉并无结构上的关系。木葡聚糖的主链是纤维素式的 β -D-葡聚糖,主链中有一半以上的葡萄糖残基在

C6 位上有 1,6 连接的 α -D-Xylp-(1 \rightarrow 或 β -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylp-(1 \rightarrow 侧链。罗望子的木葡聚糖也称罗望子胶,有时归属于树胶类,它有类似果胶的性能,凝胶强度约为果胶的两倍,在食品工业中得到广泛应用。

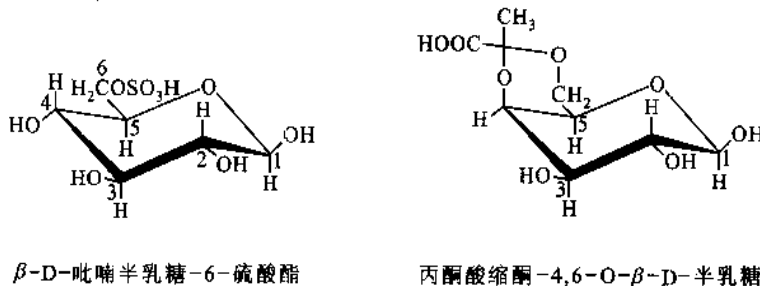
3. 琼脂(agar)

琼脂俗称洋菜,是从红藻类(Rhizophyta)石花菜属(*Gelidium*)及其他属的某些海藻中提取出来的一种多糖混合物。石花菜等的热提取液冷却形成凝胶,将凝胶冰冻并随后融化产生沉淀,滤出沉淀,干燥至含水量约为 35% 使成透明薄片,即所谓琼脂。从琼脂中分离出两个组分,一个称为琼脂糖(agarose),另一个称为琼脂胶(agarpectin)。琼脂糖是琼脂的主要组分,它是由 D-吡喃半乳糖和 3,6-脱水-L-吡喃半乳糖两个单位交替组成的线性链。D-半乳糖单位以 β 取向与 3,6-脱水-L-半乳糖单位的 C4 位相连,后一单位以 α -取向与 D-半乳糖单位的 C3 位相连:



琼脂糖

琼脂胶是琼脂糖的衍生物,单糖残基不同程度地被硫酸基、甲氧基、丙酮酸等所取代,例如 β -D-半乳糖残基 C6 被硫酸酯化或 C4 和 C6 形成丙酮酸缩酮(pyruvate ketal):



β -D-吡喃半乳糖-6-硫酸酯

丙酮酸缩酮-4,6-O- β -D-半乳糖

其实琼脂糖只是被这些基团取代最少的琼脂组分。琼脂这一概念应理解为多种具有相同主链但不同程度被荷负电基团取代的多糖混合物。

X 射线衍射分析表明琼脂糖的主体结构是平行链的左手双螺旋,具有三重螺旋轴,螺距为 1.90 nm。并已证明琼脂糖溶液冷却时单链分子交互组成双螺旋区段。这些区段交错连接并各自聚集束,形成一个具有刚性的交联凝胶网(cross-linked gel network)(图 1-29)。

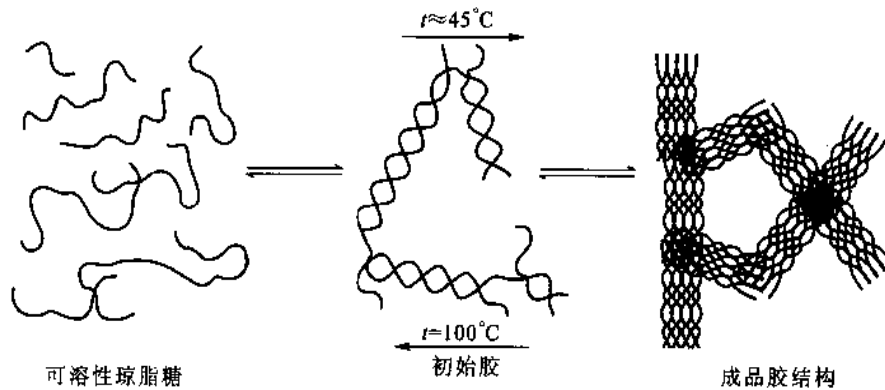
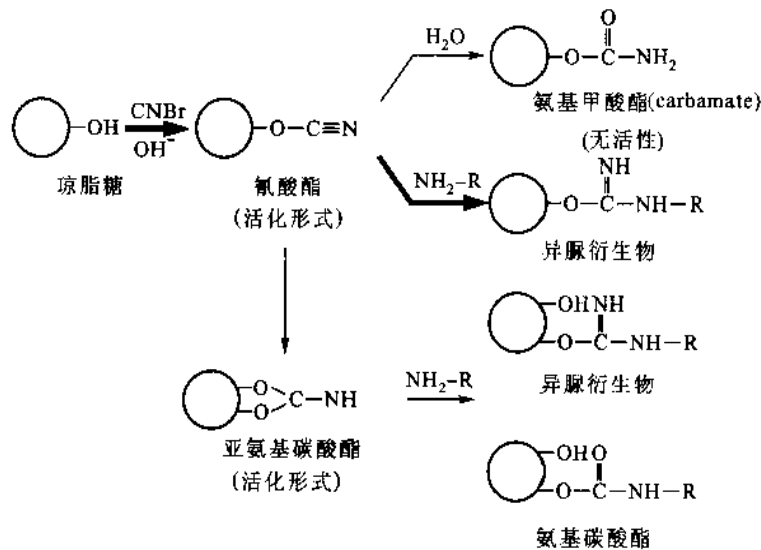


图 1-29 琼脂糖凝胶网的形成过程

琼脂不溶于冷水而溶于热水,1%~2%的溶液冷至40~50℃便可形成凝胶,加之不被微生物所利用,因此是微生物固体培养的良好支持物。琼脂在食品工业中用作果冻、果糕的胶凝剂以及果汁饮料的稳定剂。由于琼脂凝胶是透明的,生化上用作免疫扩散和免疫电泳的支持介质。

由于琼脂糖不含荷负电的硫酸根和羧基,用它代替琼脂凝胶作支持物可消除电泳和层析中的离子吸附作用。琼脂糖凝胶一般不需化学交联即可作为凝胶过滤层析的介质。珠状的琼脂糖凝胶商品名为Sephrose。琼脂糖凝胶也可用交联剂如二溴丙醇制成交联琼脂糖凝胶(珠状产品称Sephrose CL)以增加凝胶的机械强度和化学、物理抗性。

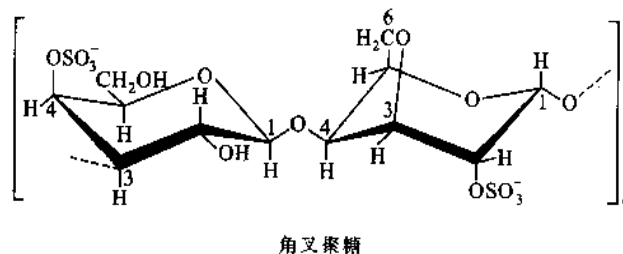
珠状琼脂糖凝胶(如Sephrose 4B,4B指含4%琼脂糖)也是亲和吸附的理想固相载体,经溴化氰, (N≡C-Br)或表氯醇等活化并与含氨基的配基(NH₂-R)反应即得亲和吸附剂(affinity adsorbent)。总反应式如下:



因为琼脂糖分子中没有能形成五元亚氨基碳酸酯环(imidocarbonate ring)的相邻羟基,经过亚氨基碳酸酯中间物(有可能形成4,6-β-D-半乳糖-亚氨基碳酸酯)生成异脲衍生物(isourea derivative)和氨基碳酸酯的概率大为减小,因此琼脂糖主要是通过氰酸酯(cyanate)直接与NH₂-R反应形成异脲衍生物(上图粗箭头所指途径)。

4. 角叉聚糖(carrageenan)

角叉聚糖也称卡拉胶,分离自红藻类皱波角叉菜(*Chondrus crispus*),其二糖单位的基本结构是-β-D-Gal-(1→4)-3,6-脱水-α-D-Gal-(1→,二糖单位上的羟基不同程度地被硫酸酯化,已知有χ-,λ-,ε-和μ-四种角叉聚糖,例如下图:



是ε-角叉聚糖。角叉聚糖形成右手双螺旋结构,每螺圈含3个二糖单位,螺距为2.6 nm。角叉聚糖凝胶,也是热可逆性凝胶,是琼脂的良好代用品,被广泛地用作肉制品中的脂肪代用品。

5. 藻酸或褐藻酸(alginic acid)

藻酸是褐藻类(Phaeophyta)墨角藻属(*Fucus*, 亦称岩藻属)和昆布属(*Laminaria*)等很多海藻中含有的多糖。它主要是β-D-甘露糖醛酸(β-D-ManUA)1,4连接的线形聚合物,少量是α-L-古洛糖醛

酸(α -L-GulUA)1,4连接的聚合物,还有 β -D-ManUA和 α -L-GulUA通过1,4聚合的杂多糖。通常都以钠盐形式存在,它有多种用途,但主要作为果胶和琼脂的代用品,用于食品胶凝。

6. 树胶或胶质(gum)

这类物质化学上类似于半纤维素,有时与半纤维素归为一类。但是它们比半纤维素更为复杂,物理性质也不同,通常不与纤维素结合,能溶于水并形成极黏稠的溶液,被广泛地用作黏合剂和增稠剂。桃树、李树等树干或树枝伤口处的分泌物就是典型的树胶。

(1) 阿拉伯胶(gum arabic)是工业上最重要的树胶之一,是豆科金合欢属(*Acacia*)的各种植物特别是阿拉伯胶树(*A. verec*或*A. senagal*)的分泌物。其主链是 β -D-半乳糖借1,3连接的聚合物,侧链含有L-阿拉伯糖,D-半乳糖、L-鼠李糖以及D-葡萄糖醛酸。

(2) 西黄芪胶或黄芪胶(gum tragacanth)是豆科黄芪属(*Astragalus*)植物树皮的分泌物,西黄芪胶树(*A. gummifer*)是西黄芪胶的主要来源。西黄芪胶由西黄芪胶素(tragacanthin)和黄芪胶糖(bassorin)组成。前者占70%,系阿拉伯半乳聚糖,溶于水形成黏性胶体;后者是酸性多糖,由D-半乳糖醛酸、L-岩藻糖和D-木糖组成、不溶于水,但能溶胀成凝胶。

(3) 瓜尔豆胶(guar gum),阿拉伯胶和西黄芪胶等都是亚热带豆科植物的天然产物。瓜尔豆胶分离自印度、云南等地的瓜尔豆(*Cyamopsis proraloides*或*C. tetragona*)种子。这是一种半乳甘露聚糖(galactomannan),主链是 β (1,4)连接的D-甘露糖聚合物,每隔一个甘露糖残基有一个 α -D-半乳糖以1,6连键与主链相连。

(4) 黄杆菌胶或黄原胶(xanthan gum)是被发现具有广泛工业用途的第一个细菌多糖,由甘蓝黑腐病黄杆菌(*Xanthomonas campestris*)发酵葡萄糖获得。主链是 α -1,4连接的D-葡萄糖聚合物,在主链的O3上交替地被含D-甘露糖、D-葡萄糖和6-O-乙酰-D-甘露糖残基的三糖所取代。黄杆菌胶能形成热稳定的凝胶。由于发酵生产的细菌多糖比天然树胶具有更好的结构重现性和来源的可靠性,市场上天然树胶有日渐被细菌多糖取代的趋势。

树胶在食品、制药、印染等工业中被广泛用作粘合剂、增稠剂、悬浮剂和成形剂等。

八、细菌杂多糖

有关细菌的多糖在上面已述及右旋糖酐和黄杆菌胶,这里主要介绍细菌的结构多糖,包括细胞壁的肽聚糖和磷壁酸,外膜的脂多糖以及多糖包被的多糖。

(一) 细菌细胞壁的化学组成

细菌细胞壁主要是由多糖组成,但也含有脂质和蛋白质。由于细胞壁的化学组成和结构不同将细菌分成两大类:能保留革兰氏染色(Gram stain,一种碱性染料结晶紫与碘的络合物)的称革兰氏阳性细菌(Gram-positive bacteria),不能保留的称革兰氏阴性细菌(Gram-negative bacteria)。革兰氏阳性细菌的细胞壁是由多层网状结构的肽聚糖所组成,并有磷壁酸与之相连(图1-30A)。革兰氏阴性细菌的细胞壁也含肽聚糖,但只是单层的,并且不含磷壁酸,此外在肽聚糖外面还覆盖着一层脂双层膜,称外膜(outer membrane)或外脂膜,由脂多糖、脂蛋白、膜孔蛋白(porin)和磷脂组成(图1-30B)。这一差异使革兰氏染色容易从革兰氏阴性细菌中被脱色剂(如95%乙醇)洗去。

(二) 肽聚糖的结构

肽聚糖(peptidoglycan)也称黏肽(mucopeptide)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,这种结构单位有人称它为胞壁肽(muropeptide),其结构式如图1-31所示。胞壁肽是一个含有四肽侧链的二糖单位,二糖单位由 β -1,4连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc或NAG)和N-乙酰胞壁酸(MurNAc或NAM)(见本章“氨基糖”部分)组成,四肽侧链的N端通过酰胺键与NAM残基上的乳酸基相连。四肽侧链中氨基酸以D型和L型交替存在。N端残基经

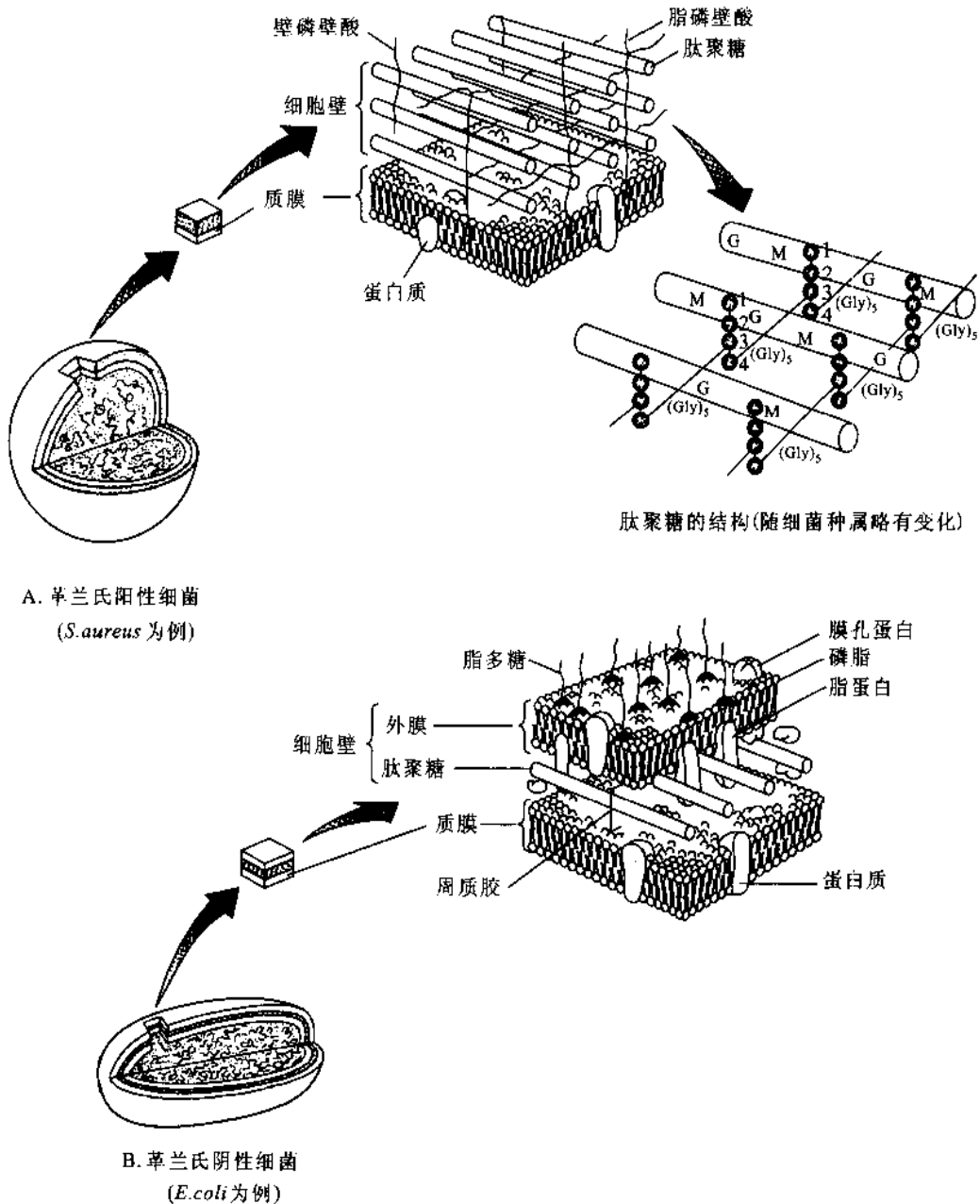


图 1-30 细菌细胞壁构造的示意图

肽聚糖的结构图中,圆柱代表多糖链,G = GlcNAc, M = MurNAc,圆点串代表四肽侧链,细横线代表它们之间的肽交联桥(Gly)₅

常是 L-丙氨酸(L-Ala),有时为 L-丝氨酸(L-Ser)或甘氨酸所取代,第二个是 D-谷氨酸(D-Glu),有时为 D-异谷氨酰胺(D-isoGln)所代替,应该注意的是 D-Glu 和下一个残基(R)之间的肽键是由 D-Glu 的 γ -COOH 参与形成的。R 残基随细菌种属而异,但多是二氨基酸,例如 L-Lys(L-赖氨酸),L-Orn(L-鸟氨酸),meso-DPA(meso-2,6-diaminopimelic acid,内消旋-2,6-二氨基庚酸)。L-DPA 和 L-2,4-二氨基丁酸等,有的细菌 R 是高丝氨酸。C 端残基是 D-Ala。

肽聚糖也可看成壳多糖链的单糖残基交替地被乳酸取代,并通过它连接着四肽侧链。肽聚糖分子中平行的多糖链通过四肽侧链被交联成网格结构(图 1-30)。在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)和其他革兰氏阴性细菌中,四肽侧链与四肽侧链直接相连,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 相连。但在革兰氏阳性细菌中四肽侧链之间通过由 1~5 个氨基酸组成的肽交联桥(peptide across bridge)连接,例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* 或 *S. Aureus*)中,四肽侧链之间的交联桥是五聚甘氨酸(Gly)₅,实际上肽聚糖是一个由共价键连接,包围着整个细菌细胞的囊状大分子(sac-like macromolecule)。

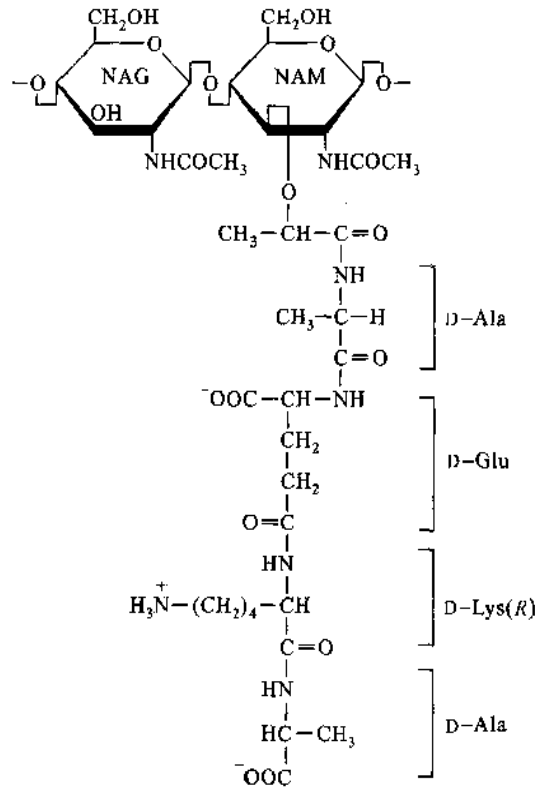
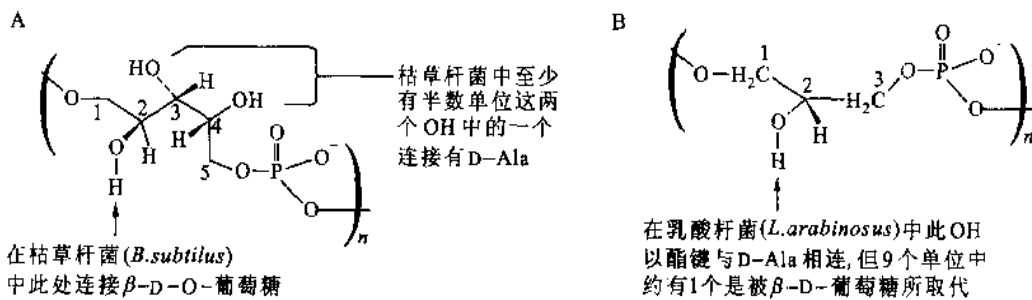


图 1-31 胞壁肽的结构

(三) 磷壁酸

革兰氏阳性细菌细胞壁除含肽聚糖外尚有磷壁酸(teichoic acid, 源自希腊文 teichos, 意为城壁), 在某些细菌中其含量达细胞壁干重的 50%。磷壁酸的主链是由醇(核糖醇或甘油)和磷酸分子交替连接而成, 侧链是单个的 D-Ala 或葡萄糖等, 分别以酯键或糖苷键相连。按磷壁酸所含的醇组分不同, 可分为核糖醇磷壁酸(核糖醇-5-磷酸的聚合物)和甘油磷壁酸(sn-甘油-3-磷酸的聚合物), 结构式分别见下图 A 和 B:



磷壁酸按其其在细胞表面上的固定方式又可分为脂磷壁酸和壁磷壁酸。脂磷壁酸跨过肽聚糖层, 以其末端磷酸共价连接于质膜中糖脂(例如二葡糖基二酰基甘油)的寡糖基部分。壁磷壁酸不深入质膜, 其末端以磷酸二酯键与肽聚糖的 N-乙酰胞壁酸残基相连。由于磷酸基的负电荷磷壁酸可结合正离子并调节其进出细胞的移动。磷壁酸也在细胞生长中起作用。细胞壁的生长需要一种称为自溶素(autolysin)的酶, 此酶切开细胞壁成分, 插入新的肽聚糖结构单位。磷壁酸调节自溶素的活性, 防止细胞壁大范围破裂和细胞溶解。磷壁酸也可能参与磷的贮存。最后磷壁酸还造成丰富的细胞壁抗原特异性, 并因此使得应用血清学方法鉴定细菌成为可能。

(四) 脂多糖

脂多糖(lipopolysaccharide)是革兰氏阴性细菌细胞壁的特有结构成分,构成外膜外表面的主要物质,并赋予这类细胞以亲水表面。因此外膜对许多物质如疏水抗生素、去污剂、染料和胆酸起着通透性屏障(permiability barrier)的作用。除此之外,从繁殖或破裂细菌中释放出的脂多糖在哺乳动物宿主中会引起多种生物效应,经常是毒性效应。这些效应被称为内毒活性(endotoxic activity),并因此“内毒素”(endotoxin)与脂多糖两个词可相互替用。

图 1-32 示出一个完整的沙门氏杆菌脂多糖分子结构图解。一般说脂多糖是由称脂质 A 的复脂和杂多糖两部分共价连接而成。此杂多糖又可分为核心寡糖和 O-特异链,后者由重复的寡糖单位构成。脂多糖的每一部分都具有生物学或生理学功能。

脂质 A(lipid A)组分是由两分子的 D-葡萄糖胺通过 $\beta-1,6'$ 连接的二糖重复单位构成,二糖单位的两端 C1' 和 C4 位各有一个磷酸基。重复单位通过 C1' 和 C4 间形成的焦磷酸桥(pyrophosphate bridge)被连接起来。二糖单位的 C3 或 C6 位与多糖链核心部分的 2-酮-3-脱氧辛糖酸(KDO,见本章“单糖”部分)残基相连;二糖单位的其他碳位被脂肪酸,多数是(R)-3-羟脂肪酸所酯化,C2 和 C2' 位以酰胺键连接,

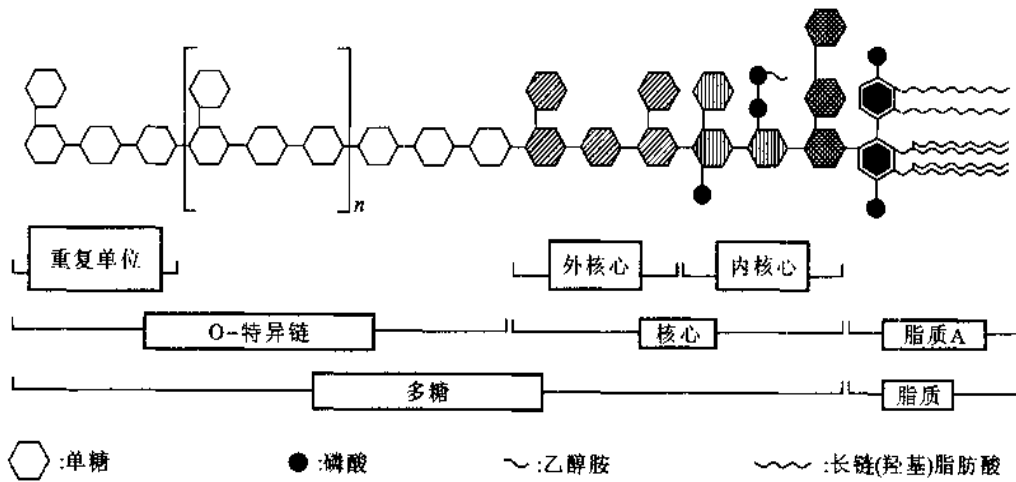


图 1-32 沙门氏杆菌脂多糖的化学结构示意图解
图中 n 平均约为 50

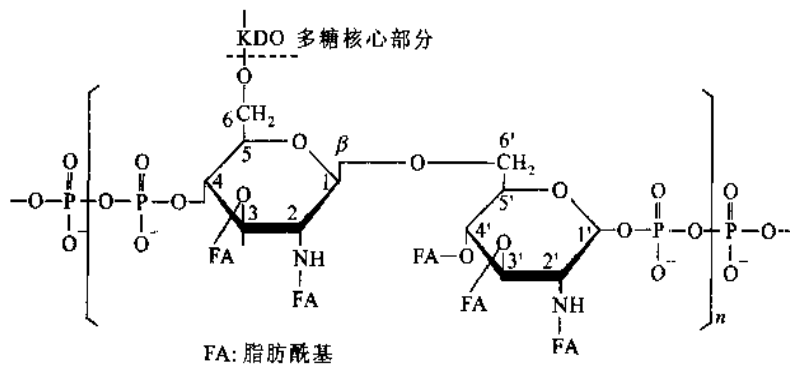
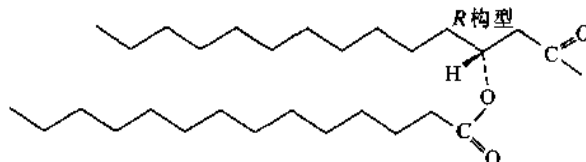


图 1-33 脂质 A 的基本结构

其他位置以酯键连接(图 1-33)。有些脂肪酸的羟基进一步被非羟基化脂肪酸所酯化,生成特有的 3-酰氧酰基结构(3-acyloxyacyl structure),例如肉豆蔻酰羟肉豆蔻酰基(myristoyl hydroxymyristoyl):



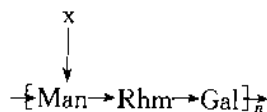
这种特殊结构一般认为是脂多糖能诱导宿主发烧的原因。上面的基本结构是许多细菌组型(bacterial group)的脂质所共有的。然而,在不同细菌来源(bacterial origin)的脂质 A 中,脂肪酸的类型和链长变化很大,在有些脂质 A 类型中,D-葡糖胺被 2,3-二氨基-2,3-二脱氧-D-葡糖所代替。脂质 A 是决定脂多糖内毒活性的部分。当出现在哺乳动物的血流和肠胃道时,会引起发烧,血压升高,血凝和血清补体系统的活化,甚至不可逆的休克。脂质 A 的脂肪酸链伸进外膜,并因此使整个脂多糖分子锚定在外膜中。在存活的细菌中最小的脂多糖结构是流感型嗜血杆菌(*H. influenzae*)的一个突变株(mutant strain)的脂多糖,它只由脂质 A 和一个磷酸化的 KDO 组成。不能合成正常脂质 A 的突变体则不能存活,表明脂质 A 对细胞存活是绝对必需的。

核心寡糖(core oligosaccharide)是通过酸性八碳糖(KDO)连接于脂质 A, KDO 经常以二糖或三糖形式存在。核心寡糖本身又分为内核心(inner core)和外核心(outer core)。在肠道细菌的脂多糖中,内核心除含 KDO 之外在其非还原端尚有中性七碳糖(L-甘油-D-甘露庚糖, Hep)并通过它与外核心相连;内核心有几个位置被磷酸化。外核心由中性糖,典型的是由常见的己糖组成如 —Glc—Glc—Gal—Glc— 。通

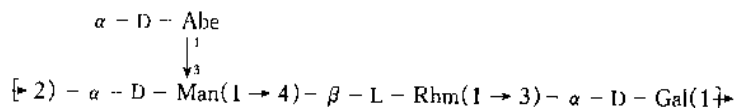
$$\begin{array}{c} | \\ \text{Gal} \end{array}$$

常核心寡糖的结构变化比脂质 A 的大。核心的功能作为特异噬菌体的受体(receptor),作为抗原,特别是缺乏 O-特异链时,并可调节脂质 A 的生物活性。

O-特异链(O-specific chain)或称 O-多糖,是脂多糖的最外层部分,由数十个相同的寡糖单位组成。O-特异链借糖苷键与外核心相连。因为它具有抗原性质,所以也称 O-抗原。相当于革兰氏阳性细菌的磷壁酸,O-抗原是借血清学方法鉴别革兰氏阴性细菌种类的根据。沙门氏杆菌已知有 1400 多种血清型(serotype)。有些血清型有相同的重复单位,它们可分为约 20 种基本组型。例如,组型 A、B 和 D 含下面所示的重复单位:



这里 x 是 3,6-双脱氧己糖,如 A 型中泊雷糖, B 型中阿比可糖(Abe)和 D 型中泰威糖(其结构式见本章“脱氧糖”部分。野生型鼠伤寒沙门氏杆菌 *S. typhimurium*)中的 O-抗原重复单位是:



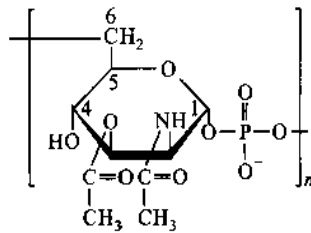
它属于 B 型。O-特异链对外膜的完整性并不是必需的,实际上不少细菌组型没有它。O-特异链覆盖在外膜(细胞表面),除决定脂多糖的血清特性外,还保护细菌免遭被宿主细胞吞噬(phagocytosis)和补体介导的杀伤。在一给定的细菌培养物中,O-特异链的聚合度可变动在 0 到 50 个重复单位之间。

含有带 O-特异链的脂多糖细菌称 S-型, S 是指在琼脂板上生长光滑菌落(smooth colony)。野生型肠道菌和沙门氏杆菌是典型的 S 型。许多突变体,包括人的病原菌嗜血杆菌属(*Hemophilus*)和奈瑟氏菌属(*Neisseria*)天然缺乏 O-特异链,这些细菌具有粗糙菌落(rough colony)的形态学,称它们为 R 型。R 型的沙门氏杆菌属于非病原菌,而 S 型菌株则常引起疾病。

(五) 荚膜多糖

荚膜多糖(capsular polysaccharide)是高相对分子质量的抗原, M_r 为 10^5 至 10^6 , 由几百个寡糖重复单位组成,重复单位一般含 1~6 个单糖残基。细菌能装配出数百种完全不同的线形和分支形荚膜多糖结构。结构中常有不常见的单糖残基和非糖取代基,如乙酸酯或磷酸酯和丙酮酸缩酮。最简单的荚膜多糖是同多糖,例如脑膜炎奈瑟氏菌(*N. meningitidis*)组型 A、B 和 C 的抗原;其中 B 和 C 的抗原是糖苷键连接的唾液酸($\alpha\text{-D-NeuNAc}$)同聚物,即多聚唾液酸(polysialic acid),它们在结构上的差别只是残基间的连接位置不同,组型 B 是 2→8 位连接, $\text{—}\{ 8\text{-}\alpha\text{-D-NeuNAc}\text{—}(2)\text{—}\}_n$, 组型 C 是 2→9 位连接;但它们在免疫学上是两个不同的抗原。组型 A 的抗原是很多荚膜多糖的代表,它是 N-乙酰- $\alpha\text{-D-甘露糖-1}$

-磷酸的同聚物,单糖残基间是借磷酸二酯键连接的。此同聚物的结构是:



磷酸二酯键连接相邻残基的 C1 和 C6 位,60%~70%的单糖残基 O3 位上乙酰化。多数荚膜多糖是杂多糖,例如胸膜肺炎双球菌(*Diplococcus pneumoniae*) III 型的荚膜多糖含重复单位, $\rightarrow 4) - \beta - D - \text{GlcUA} - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - \text{Glc} - (1 \rightarrow 3) - \text{Ac} -$, M_r 高达 140 000 由于荚膜容易接近并且有重复的表位结构(epitope structure),因而使荚膜能够产生显著的抗体响应。例如胸膜肺炎双球菌的情况估计单个细菌细胞上表达的荚膜抗原决定簇能与 4×10^6 个抗体分子结合。荚膜抗原与抗体的反应是细菌分型的又一根据。已知肺炎双球菌有 80 多个血清型。荚膜多糖是病原菌具有毒性(virulence)的重要原因。荚膜也是使病原菌免遭宿主细胞吞噬的保护层。

九、糖蛋白及其糖链

糖蛋白(glycoprotein)是一类复合糖或一类缀合蛋白质,糖链作为缀合蛋白质的辅基(见第 3 章)。糖蛋白中的糖链很少含多于 15 个单糖单位的,因此这里讲的糖链也称寡糖链或聚糖链。

(一) 糖蛋白的存在和含糖量

许多膜蛋白(membrane protein)和分泌蛋白(secretory protein)都是糖蛋白。属于膜糖蛋白的如血型抗原(A、B、O)、组织相容性抗原(histocompatibility antigen)和移植抗原(transplantation antigen);细胞膜中的免疫球蛋白,病毒和激素等的膜受体也常是糖蛋白。消化道上皮细胞分泌的粘液主要部分是糖蛋白,如颌下腺粘蛋白(mucin)、胃粘蛋白;从细胞分泌到胞外体液中的蛋白质也多是糖蛋白。这些糖蛋白包括血液中的激素蛋白质,如促滤泡激素、促黄体激素、绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin);血浆蛋白质,如血清清蛋白、血清类粘蛋白(orosomucoid),运铁蛋白(transferrin),血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin),参与凝血和纤溶的蛋白质(如凝血酶原、纤溶酶原等),以及免疫球蛋白和补体等。作为胞外基质的结构蛋白质,胶原蛋白,层粘蛋白(laminin)和纤连蛋白(fibronectin)也是糖蛋白。核糖核酸酶、卵清蛋白、鱼的抗冻蛋白都含有糖链。

不同的糖蛋白中含糖量变化很大,通常糖成分占糖蛋白重量的 1% 到 80%,例如胶原蛋白的含糖量一般不到 1%;免疫球蛋白 G(IgG)低于 4%;核糖核酸酶 B,8%;胎球蛋白(fetuin),20%;血清 α -酸性糖蛋白,约 38%;颌下腺粘蛋白,约 50%;人红细胞膜的血型糖蛋白(glycophorin),60%;人卵泡囊糖蛋白,70%;胃粘蛋白,82%。

糖蛋白中糖可以相当均匀地沿蛋白质的多肽链分布,或集中在多肽链的特定区域,例如在跨膜的人血型糖蛋白 A(glycophorin A)中糖部分在多肽链的质膜外侧的 N 末端那一半。沿多肽链的一个或多个位点结合的糖链一般含不多于 15 个单糖残基。在某些情况下糖链仅由 1~2 个单糖残基组成,例如颌下腺粘蛋白的糖链是 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}$ -,某些类型的哺乳类胶原蛋白,糖基仅由单个 $\alpha - D - \text{Gal}$ 残基组成。糖蛋白中所含的单糖残基,除 L-岩藻糖,L-阿拉伯糖和 L-艾杜糖醛酸外,一般都是 D 型的。

(二) 糖链结构的多样性

糖蛋白和糖脂中的糖链序列是多变的,结构信息丰富,甚至超过核酸和蛋白质。以一个最简单的链单位 A-B 为例,对 DNA 来说,只能形成一种结构,例如 G-C,当 A、B 分别代表鸟苷酸(G)和胞苷酸(C)时;对蛋白质来说,也只能形成一种结构,例如, Ser-Lys,如果 A、B 分别代表丝氨酸(Ser)和赖氨酸(Lys)。糖

链的情况则不同,假设 A 为甘露糖, B 为半乳糖, Man 可以和 Gal 的 C2, C3, C4 和 C6 四个位置中的任一个碳相连,因此 Man→Gal 可以形成 4 个异构体。由于 Man 与 Gal 连接时可以采取两种异头构型。 α 和 β , 此二糖可以有 8 个可能的异构体。而且甘露糖残基可以以呋喃糖或吡喃糖形式存在,这样二糖链可以有 16 个异构体。而且这里尚未考虑二糖链与蛋白质结合时,半乳糖残基的异头构型。当链中单位增加时(增至三糖、四糖等),一个确定的序列在蛋白质和核酸的情况都只有一种结构形式,因为它是线形序列,而糖链异构体的数目将以几何级数增加;因为除二糖外寡糖链还能形成支链。一个寡糖链中单糖种类,连接位置、糖苷键构型和糖环类型的可能排列组合数目是一个天文数字。由少数单糖组成的寡糖链,就能形成很多个异构体,例如 4 种不同的单糖可形成 36 864 个四糖异构体。

(三) 糖肽连键的类型

糖蛋白中寡糖链的还原端残基与多肽链的氨基酸残基以多种形式共价连接,形成的连键称为糖肽键(glycopeptide linkage)。糖肽键主要有两种类型:N-糖肽键和 O-糖肽键。

1. N-糖肽键

N-糖肽键是指 β -构型的 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)异头碳与天冬酰胺(Asn)的 γ -酰胺 N 原子共价连接而成的 N-糖苷键(图 1-34A)。这种键分布相当广泛,特别是在血浆蛋白和膜蛋白中。被连接的 Asn 经常处于多肽链的 Asn-X-Thr/Ser 序列中,其中 X 为除脯氨酸外的任一氨基酸残基。GlcNAc-Asn 连键对弱碱稳定,但在沸腾的 1mol/L NaOH 条件下则容易被水解。近来发现在盐细菌(Halobacteria)的细胞表面糖蛋白中除 GlcNAc-Asn 连键外,尚有 GalNAc-Asn 和 Glc-Asn 两种 N-连接方式。

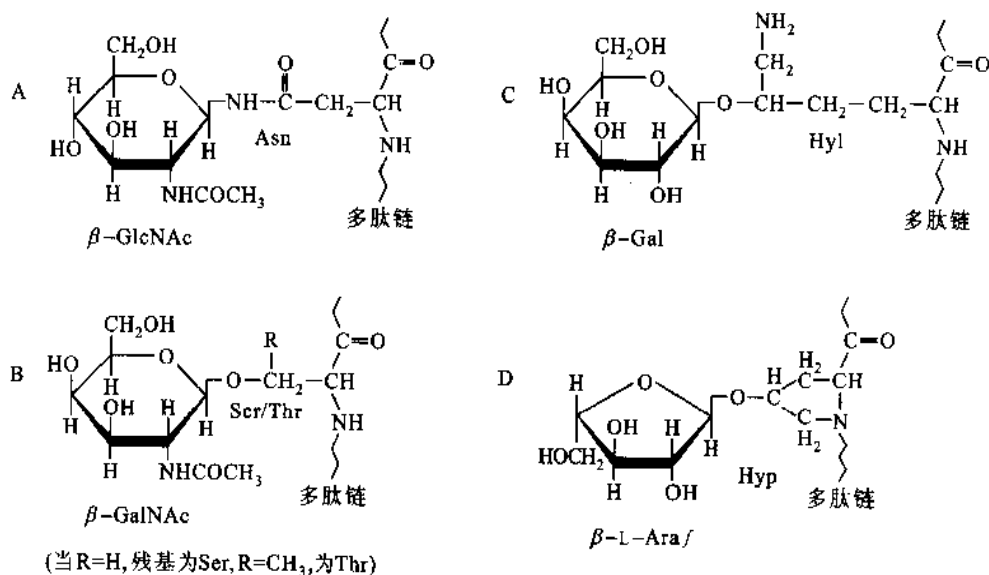


图 1-34 糖基与蛋白质连接的几种方式

A. N-糖肽键, B. 与 Ser 或 Thr 相连的 O-糖肽键, C 和 D 分别为与 Hyl 和 Hyp 相连的 O-糖肽键

2. O-糖肽键

O-糖肽键是指单糖的异头碳与羟基氨基酸的羟基 O 原子共价结合而成的 O-糖苷键。这类键包括:

(1) N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)缩合形成的 O-糖肽键(图 1-34B)。除 GalNAc 外,还有一些单糖如 GlcNAc, Gal, Man, Xyl 和 Ara 也可以与 Ser 或 Thr 相连。这类键最初从颌下腺、消化道、呼吸道等粘液糖蛋白中发现,因此又称粘蛋白型糖肽键。此后相继在免疫球蛋白、胎球蛋白等非粘液蛋白中找到。这类 O-糖肽键的特点是对碱不稳定,在碱性溶液中易发生 β -消去反应。

(2) 半乳糖与羟赖氨酸(Hyl)形成的 O-糖肽键(图 1-34C)。这种键几乎只存在于胶原蛋白中,虽然有人报道它可能也存在于一种藻状菌(Phycomycete)的细胞壁中。 β -Gal-(1→O)-Hyl 连键对碱稳定。

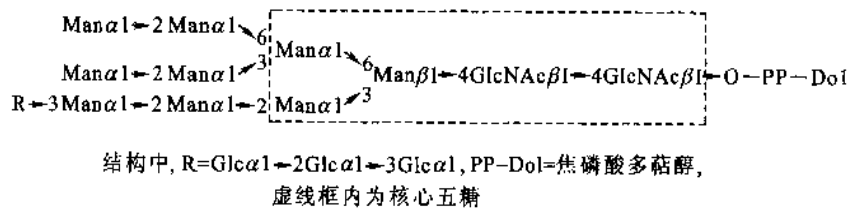
(3) L-呋喃阿拉伯糖与羟脯氨酸(Hyp)形成的 O-糖肽键(图 1-34D)。 β -L-Araf-(1 \rightarrow O)-Hyp 键存在于所有含 Hyp 的植物糖蛋白,包括细胞壁的伸展蛋白、马铃薯凝集素等。还有 Gal 与 Hyp 形成的 O-糖肽键存在于绿藻类(Chlorophyceae)和高等植物中。与 Hyp 缩合成的这两种键尚未在动物中发现。它们的特点也是对碱稳定。至今发现的糖肽连接方式,除上述外还有几种不常见的类型,如与半胱氨酸(Cys)连接的糖肽键(Gal-Cys, Glc-Cys),与天冬氨酸(Asp)的侧链羧基形成的糖肽键等。

(四) 糖链的分类

糖蛋白中的糖链可根据糖肽键的类型分为两大类:N-连接的糖链和 O-连接的糖链,分别简称为 N-糖链和 O-糖链。这两类糖链可单独或同时出现在同一糖蛋白中,它们在结构上各有自己的特点。此外还有以酰胺键连接的。现分述如下:

1. N-糖链(N-聚糖)

糖蛋白中糖链一般含 10~15 个单糖单位。显然如此大的糖链理论上将产生巨大数目的异构体,多至难以阐明糖链所含的生物学信息。幸运的是,研究表明糖链的变化区域只是糖链的一部分。所有的 N-糖链都含有一个共同的结构花式(motif),称为核心(core)五糖,也称三甘露糖基核心:Man α 1 \rightarrow 6(Man α 1 \rightarrow 3)Man β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc。此核心结构是在进入糖蛋白之前以前体形式合成的,此前体是一个多萜醇焦磷酸十四糖,称 G 寡糖:



G 寡糖作为一个整体被转移到新生肽链的 N-糖基化位点,它的合成,请参看下册第 25 章中糖蛋白的生物合成。根据连接于三甘露糖基核心上的糖基结构与位置,N-糖链又可分为三类(图 1-35)。

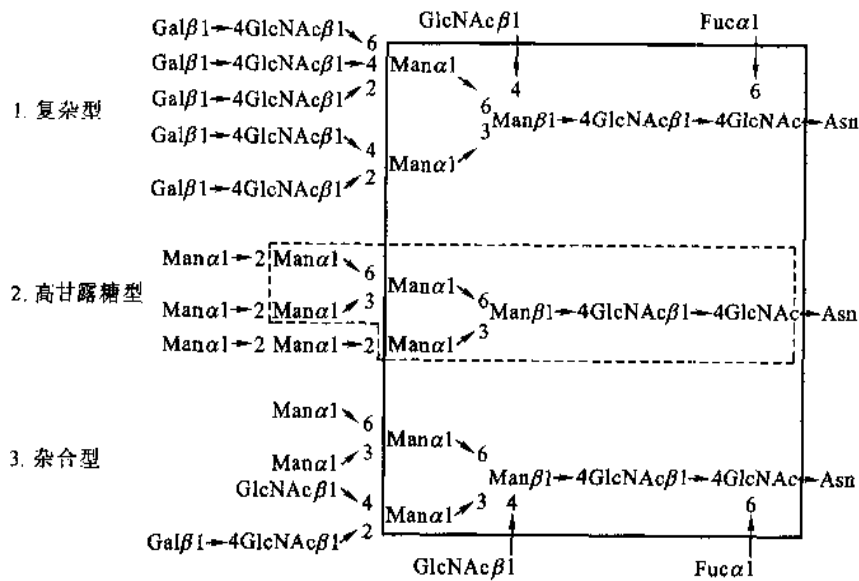


图 1-35 三类 N-连接的糖链

1. 复杂型;2. 高甘露糖型;3. 杂合型。实线框内结构为所有 N-糖链共同的三甘露糖基核心。虚线框内结构为高甘露糖型链共同的核心七糖。框外的结构随糖链而变化

(1) 复杂型(complex type) 这类 N-糖链,除三甘露糖基核心外,不含其他甘露糖残基。还原端残

基为 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ 的外链与三甘露糖基核心的两个 α -甘露糖残基相连。在三类 N-糖链中复杂型结构变化最大,这主要是由于两种结构因素造成的。一是外链的数目(即 N-糖链的分支)可以从 1 条多至 5 条,并借用电子学术语形象地称它们为天线(antenna),因此有单、双(或二)、三、四和五天线糖链结构(图 1-36)。单天线糖链很少遇见,但在人绒毛膜促性腺激素中有这种结构。二是外链的结构可以有多种多样,例如 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ 和 $\text{SO}_4 - \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow$ 等。这两者的组合,可以形成巨大数目的不同复杂型 N-糖链,这些糖链作为生物学识别信号对多细胞有机体来说是重要的。

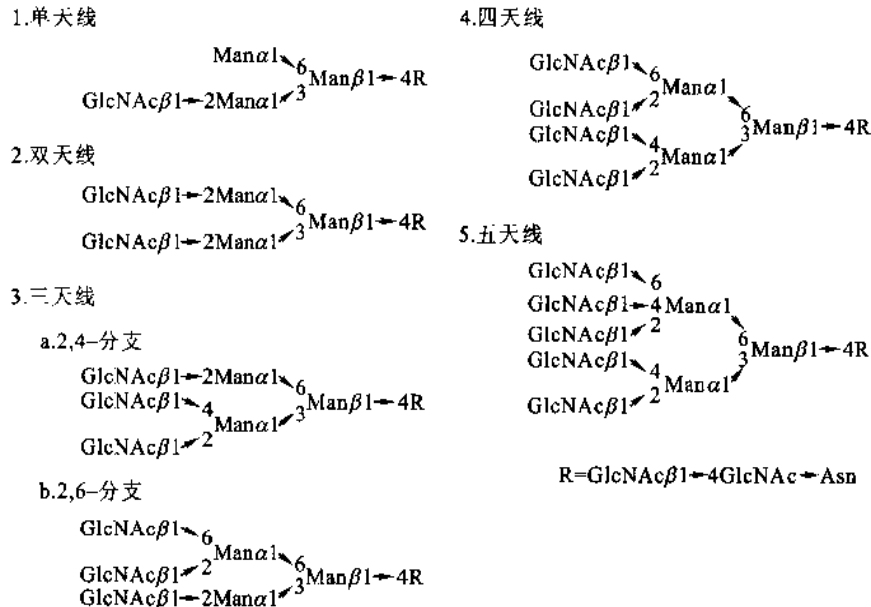


图 1-36 复杂型 N-糖链的分支和各种数目的天线

此外,复杂型 N-糖链常含一个岩藻糖残基和一个平分型(bisecting) N-乙酰葡萄糖胺残基,前者与近侧(指最靠近糖基化位点)的核心 GlcNAc C6 位相连,后者与核心 β -Man C4 位相连(图 1-35)。动物糖蛋白中许多复杂型 N-糖链的外链常含重复二糖单位($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$)即多聚-N-乙酰乳糖胺(poly-lactosamine),以线形或分支排列。这些重复单位允许展示出极多的可能结构,包括 ABH 和路易斯(Lewis)血型抗原,和与分化组织及肿瘤组织有关的抗原。复杂型 N-糖链可以高度岩藻糖基化、磷酸化或硫酸化,某些还富含多唾液酸成分。

(2) 高甘露糖型(high-mannose type) 此型 N-糖链除核心五糖外只含 α -甘露糖残基。带有两个分支的七糖结构常是它们的共同核心(见图 1-35 虚线框内)。与核心七糖三个非还原端 α -甘露糖成分连接的 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2$ 残基的数目和位置因糖链而异。在某些情况下,复杂型和高甘露糖型糖链可以连接于同一多肽链的不同天冬酰胺残基上。

(3) 杂合型(hybrid type) 此型糖链具有复杂型和高甘露糖型这两类糖链的结构元件。与高甘露糖的情况相似,有 1 到 2 个 α -甘露糖残基与核心五糖的 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ 成分连接。复杂型中存在的外链结构与核心五糖的 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ 成分相连。在核心五糖的 β -Man C4 位也常被插入 β -N-乙酰葡萄糖胺,近侧的 GlcNAc C6 位被岩藻糖基化。

2. O-糖链(O-聚糖)

O-糖链的结构比 N-糖链简单,但连接形式远比 N-糖链的多。已发现的有 $\text{GalNAc}-\text{Ser/Thr}$, $\text{GlcNAc}-\text{Ser/Thr}$, $\text{Man}-\text{Ser/Thr}$, $\text{Ara}-\text{Ser/Thr}$, $\text{Gal}-\text{Ser}$, $\text{Fuc}-\text{Ser}$, $\text{Xyl}-\text{Ser}$, $\text{Gal}-\text{Hyl}$ 和 $\text{Ara}-\text{Hyp}$ 等形式。O-糖链虽然没有共同的核心结构,但在 $\text{GalNAc}-\text{Ser(Thr)}$ 形式糖链中至少已发现 6 种核心结构,如 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3$, $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Ser(Thr)}$, $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{Ser(Thr)}$ 等。

表 1-7 列出几种糖蛋白的寡糖链。

表 1-7 几种糖蛋白的寡糖链

糖蛋白	糖链与连接位点	糖链数目 (每一蛋白分子中)
鱼抗冻蛋白	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Thr	4~50 条(不同的抗冻蛋白中)
羊颌下腺粘蛋白	Sia α 2 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr	>800 条
鸡卵清蛋白	<p>4GlcNAc β1\rightarrowAsn(许多变异体中的一种)</p>	1 条
人免疫球蛋白 G (IgG)	<p>4GlcNAc β1\rightarrow4GlcNAc β1\rightarrowAsn (30 多种变异体中的一种)</p>	~3 条

(五) 糖链的生物学功能

近年来由于糖链功能的研究方法取得长足进展,包括内切、外切糖苷酶和糖链合成抑制剂的应用,以及 DNA 定点突变技术和糖基转移酶基因工程技术的应用,对糖链功能已有相当了解。已知糖蛋白的糖链参与肽链的折叠和缔合;参与糖蛋白的转运和分泌;还参与分子识别和细胞识别,这可能是它最重要的生物学作用。下面举例说明。

1. 糖链在糖蛋白新生肽链折叠和缔合中的作用

糖蛋白 N-糖链参与新生肽链的折叠,维持蛋白质的正确构象已为不少事实所证实。例如,用基因定点突变方法获得的去糖基化 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 -antitrypsin)不能折叠成正确的构象,其圆二色性谱(反映二级结构)发生改变。又如宿主细胞 N 糖链前体(G 寡糖)合成的第一步,即 UDP-GlcNAc 与多萜醇磷酸的加成被衣霉素(tunicamycin)抑制后,流感病毒红细胞凝集素(HA,一种糖蛋白)多肽部分虽能合成但不含 N-糖链,缺失糖链的 HA 不能正常折叠,继而不能形成三聚体,因此不能被分泌到胞外。但是上述情况并不是普遍规律,不少去糖基化的糖蛋白如去糖基化核糖核酸酶 B 仍能维持正常的折叠和构象。

最近证明,G 寡糖中的葡糖基与肽链的折叠关系密切。在内质网中新生肽链的 G 寡糖迅速被葡糖苷酶 I(断裂 α 1 \rightarrow 2)和 II(断裂 α 1 \rightarrow 3)切去三个葡萄糖残基。但是如果肽链尚未折叠或折叠错误,则由葡糖基转移酶重新向此寡糖链加回一个葡萄糖,因为此酶能识别未折叠的或折叠错的肽链中靠近糖基化位点的疏水残基,对正确折叠的肽链此疏水残基被屏蔽而不为该酶所识别。重新葡糖基化的寡糖被锚定在内质网膜上的钙连蛋白(calnexin)所识别并结合,以引导肽链正确折叠和防止有缺陷的蛋白质运出内质网。实际上葡萄糖的加入和除去来回多次,直至糖蛋白完全折叠后糖基化才停止,并迅速被葡糖苷酶 II 剪去葡萄糖残基,导致糖蛋白从钙连蛋白中释放并进入高尔基体。

寡聚蛋白质中的糖链能影响亚基的缔合,如运铁蛋白受体(transferrin receptor)是一种二聚体跨膜蛋白,由两个亚基组成,每亚基(M_r 90 000)含 3 条 N-糖链。Asn 251 位点被突变去糖基化后,则不能形成正常的二聚体,并因而影响受体的转运和功能。糖链在亚基缔合中的作用可能是 ①维持亚基的正确构象,②亚基间通过糖链相互识别而发生缔合。

2. 糖链影响糖蛋白的分泌和稳定性

糖链也与糖蛋白分泌出细胞有一定关系。例如去 N-糖链的免疫球蛋白不能被分泌到胞外而留在内

质网中。又如基因工程中,在真核细胞中表达的糖蛋白因含有糖链而不发生聚集,故能分泌到胞外,在缺乏糖基化结构的原核细胞中表达的产物则常在细胞内聚集成包含体(inclusion body)。可见处于糖蛋白分子表面的极性糖链有助于蛋白质的溶解。成纤维细胞分泌的纤连蛋白中去糖基化的纤连蛋白对组织蛋白酶引起的降解比糖基化的纤连蛋白敏感,这说明糖链的加入能增强这种胞外基质蛋白的稳定性。

蛋白质的构象和稳定性也受 O-糖链的影响。例如低密度脂蛋白受体(LDL 受体)正常情况下约含 30 条 O-糖链。在缺失 O-糖链合成的培养细胞中形成的 LDL 受体虽能正常转运至质膜,但易被细胞表面的蛋白酶降解并释放到胞外。

(六) 糖链参与分子识别和细胞识别

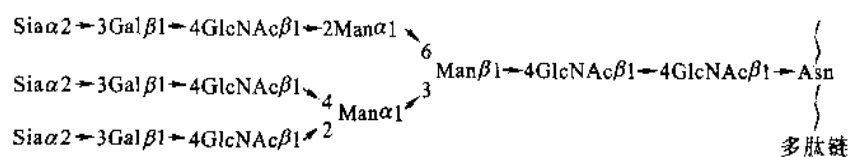
1. 有关的概念

(1) 分子识别和细胞识别 分子识别(molecular recognition)是指生物分子的选择性相互作用,例如抗体与抗原间、酶与底物或抑制剂间,激素与受体间的专一性结合。分子识别是通过两个分子各自的结合部位来实现的。要实现分子识别,一要求两个分子的结合部位是结构互补的,二要求两个结合部位有相应的基团,相互间能产生足够的作用力,使两个分子结合在一起。分子识别是一种普遍的生物学现象。糖链、蛋白质、核酸和脂质各自间以及它们相互之间都存在分子识别。至于细胞识别实际上就是细胞表面分子的相互识别。

(2) 受体与配体 分子识别常表现为受体与配体的相互作用。受体(receptor)是指位于细胞膜上、细胞质或细胞核中能与来自胞外的生物活性分子(信号分子)专一结合并将其带来的信息传递给效应器(如离子通道、酶等),从而引起相应生物学效应的生物大分子。这些大分子多数是蛋白质包括糖蛋白,少数是糖脂,蛋白聚糖或核酸。被受体识别并结合的生物活性分子称为配体(ligand),包括激素、神经递质(neurotransmitter),细胞粘着分子等内源性配体和药物、毒素、抗原和病原体等外源性配体。配体可能是小分子如乙酰胆碱等神经递质,也可能是大分子的蛋白质,蛋白质-核酸复合体如病毒。受体和配体有时很难分,特别是在细胞-细胞识别中。相互识别几乎总有糖链的参与。

2. 糖链与血浆中老蛋白的清除

血清中很多蛋白质是含有以唾液酸残基为末端的 N-糖链的糖蛋白,称唾液酸糖蛋白,如免疫球蛋白,蛋白质类激素,载体蛋白等。例如人血液中运载铜的血浆铜蓝蛋白是一种含 2,4-分支三天线 N-糖链的唾液酸糖蛋白:



当末端唾液酸残基被血管壁上的唾液酸酶(sialidase),也称神经氨酸酶(neuraminidase),切除并因而暴露出半乳糖残基后,这种去唾液酸的糖蛋白很快被肝细胞膜上的去唾液酸糖蛋白受体(也称半乳糖结合受体)所识别,糖蛋白-受体复合体通过胞吞(endocytosis)被肝细胞内化,糖蛋白在溶酶体内被降解。去唾液酸糖蛋白受体由三条跨膜的多肽链组成,两条是亚基 I 的拷贝,一条是亚基 II,每条多肽链含有一个半乳糖结合位点,这三个位点在空间上排列成能与配体糖链上的三个末端半乳糖残基进行最适的相互作用。受体与含三个末端半乳糖残基的糖蛋白结合最牢固(解离常数 $K_D = 10^{-9} \sim 10^{-8} \text{ mol/L}$),含两个的次之($K_D \approx 10^{-6} \text{ mol/L}$),含一个的结合极弱($K_D = 10^{-3} \text{ mol/L}$)。

血循环中糖蛋白在一段时间内,从几小时到若干周,末端 Sia 残基逐个地被断裂。糖蛋白循环越久, Sia 残基除去越多, Gal 残基暴露也越多,最终被肝细胞受体结合。实质上,这里糖链或唾液酸是糖蛋白在循环中已待了多久的标示物(marker),是给那些行将更替的“老”蛋白发信号的“定时器”。末端唾液酸残基从糖蛋白中除去的速率是由蛋白质结构本身决定的。因此蛋白质被设计成具有寿命的分子,从几小时到若干周,这取决于生理的需要。实验证明,从循环中清除老红细胞也采取类似的机制。

3. 糖链与精卵识别

受精是精子与卵子的融合。哺乳动物的卵子外面有一层透明的糖蛋白外衣,称透明带(zone pellucida,ZP)。透明带由 ZP-1、ZP-2 和 ZP-3 三种糖蛋白组成,受精中起主要作用的是 ZP-3,连接在 ZP-3 上的 O-GalNAc 糖链能被精子表面上的凝集素受体识别(有物种特异性)。O-GalNAc 糖链的非还原端是一个 α -连接的半乳糖残基,它可能在精卵识别中起关键作用。精卵结合引发精子头部的顶体(acrosome)释放蛋白酶和透明质酸酶使透明带水解、精卵质膜融合、精子核进入卵内。

4. 糖链与细胞粘着

细胞粘着(cell adhesion)是进化中随着多细胞生物出现的必然现象。多细胞生物中细胞有相互识别而聚集成细胞群的能力——细胞粘着。细胞群或组织(tissue)中细胞与细胞之间充满着由糖蛋白(胶原蛋白、纤连蛋白、层粘蛋白)、蛋白聚糖、透明质酸等组成的胞外基质(extracellular matrix,ECM)。在整个生物体中,ECM 形成一个连续的网状网络结构,所有的细胞都交织或浸泡在这一网状基质中,网络中细胞细胞粘着,细胞-ECM 粘着都是通过有关的膜内在蛋白质(integral membrane protein)完成的。这些膜蛋白称细胞粘着分子(cell adhesion molecule,CAM)或粘着蛋白,包括整联蛋白(integrin),钙粘着蛋白(cadherin),免疫球蛋白超家族(Ig superfamily),血管地址素(vesicular addressin),选择蛋白(selectin)等。CAM 绝大多数都是含 N-糖链的糖蛋白,例如整联蛋白是由 α -和 β -亚基组成的异二聚体,两个亚基上有多数 N-糖基化位点。去糖链的整联蛋白完全失去与纤连蛋白的粘着能力。

循环在血液中的淋巴细胞倾向于迁移到它们原先派生自那里的淋巴细胞部位,如淋巴结,这一回归现象称淋巴细胞的归巢(homing)。归巢行为是由淋巴细胞表面上的归巢受体(L-选择蛋白)和例如淋巴结高内皮微静脉(high endothelial venule,HEV)衬细胞上的糖链配体(血管地址素)之间的相互作用介导的。L-选择蛋白(见本章“凝集素”部分)含糖类识别域,专一识别配体上岩藻糖基化的寡糖链,特别是 sLe^a 和 sLe^x 抗原决定簇,两者都是酸性四糖,前者是唾液酸路易斯 a 抗原(sialyl Lewis a)的英文缩写,结构式为 NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3(L-Fuca1 \rightarrow 4)GlcNAc,后者是唾液酸路易斯 x 抗原(sialyl Lewis x)的缩写,结构式为 NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4(L-Fuca1 \rightarrow 3)GlcNAc。血管地址素是有组织特异性的粘着分子。不同的淋巴细胞群含有识别不同血管地址素的归巢受体,因此被导向(归巢)至特定的淋巴器官。例如 B 淋巴细胞主要归巢到粘膜结合淋巴组织。而 T 淋巴细胞归巢到淋巴结。研究表明,肿瘤细胞的转移和归巢(转移至靶组织)都与 CAM 及其介导的粘着行为的改变有关。

(七) 糖链与糖蛋白的生物活性

具有生物活性的糖蛋白包括某些酶和激素以及抗体。

1. 糖链与酶活性

糖链在酶的新生肽链折叠、转运和保护等方面普遍起作用。但糖链与成熟酶活性的关系因酶而异。有些酶除去糖链活性不受影响,如 UDP-葡萄糖醛酸酶、酵母羧肽酶等。有些酶的活力依赖其糖链的存在,如溶酶体 β -葡萄糖苷酶除去糖链后只有免疫原活性而完全没有酶活力。牛核糖核酸酶(RNase),含 124 个氨基酸残基,有 A、B 两种形式,A 型不含糖,B 型在它的 Asn 34 位上有一条 Man₅-GlcNAc₂ 的高甘露糖型 N-糖链。由于糖链对酶活性中心有屏蔽作用使 B 型活力比 A 型低,但对蛋白酶的抗性(稳定性)高于 A 型。组织型纤溶酶原激活剂(t-PA),由 527 个氨基酸残基组成,临床上用于治疗心肌梗塞。天然状态下人 t-PA 在 Asn 117,Asn 448 位各有一条 N-糖链,Thr 61 位还有一个 Fuc。根据 Asn 184 位糖基化与否可把 t-PA 分成 I 型(有)和 II 型(无)。比较两型的活性发现,I 型 t-PA 184 位上糖链的存在使酶的催化活性(活化纤溶酶原的能力)降低。

2. 糖链与激素活性

糖蛋白激素主要有腺垂体促激素类包括 FSH(促卵泡激素),LH(促黄体激素)和 TSH(促甲状腺激素)以及胎盘绒毛膜促性腺激素和肾脏红细胞生成素(erythropoietin,EPO)等(参见“激素”章)。FSH、LH 和 TSH 均由 α 亚基和 β 亚基组成,两个亚基都有 N-糖链。糖链呈高度不均一性,例如 LH 和 TSH 中糖链的外链末端有些是 SO₄⁻·4GalNAc β 1 \rightarrow 取代了典型的 Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow ,而 FSH 中的糖链都是以

Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 为末端的。已经证明,带有 SO $_4^-$ -4GalNAc β 1 \rightarrow 末端结构的激素对受体的亲和力比带有 Sia α 2 \rightarrow 3Gal \rightarrow 末端的激素高,但在体内的半寿期(half life,一种物质其质量的一半被代谢或排出所需的时间)前者比后者短,因为在肝脏网状细胞表面有特异结合 SO $_4^-$ -4GalNAc β 1 \rightarrow 为末端的糖链的受体,而 Sia 为末端的糖链则必须经唾液酸酶水解除去 Sia 从而暴露 Gal 后才能被半乳糖结合受体识别并清除。EPO 是促进骨髓红细胞成熟和增殖的激素,临床上用作治疗再生障碍性贫血的药物,由于天然 EPO 来源十分有限,现多采用基因工程方法生产。人 EPO 含 165 个氨基酸残基,在 Asn 24, Asn 38 和 83 三个位点各有一条 N-糖链,在 Ser 165 有一条 O-GalNAc 糖链,糖链的含量约占 EPO M $_r$ 的 40%。N-糖链以四天线复杂型为主,部分为三天线和二天线。四天线糖链越多、体内活性越高,这可能与四天线糖链的 EPO 被肾脏滤去较少或归巢至骨髓靶细胞较多有关。N-糖链的核心五糖部分为 EPO 表现活性所必需,可能它参与蛋白质部分的构象维持。EPO 属唾液酸糖蛋白,在体内的半寿期与 N-末端的唾液酸化程度有关。

3. 糖链与 IgG 活性

每分子 IgG 平均含糖链约三条,其中两条存在于 Fc 段每条重链的 Asn 297 位,其余位于 Fab 段的高变异区的 Asn-X-Ser/Thr 位点(IgG 结构见第 6 章)。几乎全部 N-糖链都是复杂型,非还原末端残基为 Sia 或 Gal(去 Sia),少数为 GlcNAc(去 Sia-Gal),结构式见表 1-7。IgG 的 N-糖链多达 30 余种,呈高度不均一性。含两个或一个末端 Sia 的糖链分布在 Fab 段;Fc 段的糖链多数不含 Sia,少数含一个 Sia 残基。Fc 段的糖链和 IgG 与巨噬细胞上 Fc 受体结合和补体(C $_1$ q)激活有关。IgG 的 N-糖链缺失外链 Gal(这种糖链称 G $_0$ 糖链)后,可成为一种自身抗原,被免疫系统识别而产生自身抗体。后者能与带有 G $_0$ 糖链的 IgG 生成免疫复合物,沉积于关节腔内,引起炎症。这种免疫复合物是由带 G $_0$ 糖链的 IgG Fc 段(作为抗原)和带末端 Sia 的 IgG(作为抗体)Fab 段结合而成,实际上是 IgG 的自身聚合物。类风湿性关节炎、红斑狼疮等都是一种与 IgG 的糖链结构改变有关的自身免疫病(autoimmune disease)。

(八) 血型物质

血型物质未被认识前,临床上输血是盲目的,常因血型不合,使患者产生输血反应,甚至死亡。1900 年奥地利医生 Landsteiner 首次发现了血型物质(血型抗原)并提出了 ABO 血型系统(ABO blood group system)。此后在人红细胞表面找到了 100 多种血型决定簇(抗原决定簇),其中很多是寡糖,分属 20 多个独立的血型系统。研究最多的 ABO 和与之关系密切的 Lewis 血型系统,其次是 Rh 血型系统。

从红细胞膜中提取的血型抗原称凝集原(agglutinin)。在 ABO 血型系统中,A 型血的红细胞具有凝集原 A,B 型具有凝集原 B,AB 型兼有凝集原 A 和 B,O 型既不具有凝集原 A 也不具有凝集原 B。凝集原 A 和 B 以糖脂和糖蛋白等形式存在。凝集原的血型决定簇(见表 1-9)是寡糖,它在鞘糖脂中通过乳糖基与神经酰胺(符号为 Cer,见第 2 章)C1 位上的羟基相连:血型决定簇 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer,在
 $\left[\begin{array}{c} \text{乳糖基} \\ \text{—} \end{array} \right]$
 糖蛋白中存在于 O-糖链,血型糖蛋白的 N-糖链和含有多聚 N-乙酰乳糖胺结构的 N-糖链。ABO 血型抗原在多数个体(约占人群的 85%)中除分布在红细胞膜和大多数其他细胞膜外,还以不同浓度存在于血浆、唾液、乳汁等体液中。

血清中含有另一些物质,称同种红细胞凝集素(isohemagglutinin)或凝集素,它是凝集原的抗体,一般为 IgM 类。A 型个体血清含有凝集素 β (或称抗 B 凝集素,简称抗 B),B 型者含有凝集素 α (抗 A 凝集素,抗 A),O 型者兼含 α 和 β ,AB 型者既无 α 也无 β 。凝集素是在生命早期由肠道微生物表面上的凝集原 A 样和 B 样表位(epitope,抗原决定部位)诱导产生的。例如 A 型者对微生物表面的 B 样表位发生应答(response)产生抗 B,但对微生物表面的 A 样表位不发生应答,因为体内存在自身耐受性(self-tolerance)机制(见第 6 章)。由于这些凝集素(如抗 A)尚未暴露在相应的凝集原(如 A)下就已存在,因此称它们为天然抗体。凝集素 α 可与凝集原 A 发生凝集(agglutination),凝集素 β 可与凝集原 B 发生凝集。输血时血型不合会引起红细胞聚集,因此临床上力求输同型血。ABO 血型与凝集原、凝集素的相互关系见表 1-8。

表 1-8 ABO 血型(表型)、基因型、凝集原与凝集素

血型 (表型)	基因型	凝集原 (红细胞表面抗原)	凝集素 (血清抗体)
A	$I^A I^A$ (AA)或 $I^A i$ (AO)	A	抗 B(β)
B	$I^B I^B$ (BB)或 $I^B i$ (BO)	B	抗 A(α)
AB	$I^A I^B$ (AB)	A 和 B	无抗 A 无抗 B
O	ii (OO)	无 A 无 B	抗 A 和抗 B

血型是遗传的,血型抗原受基因支配。基因支配的直接产物是专一性糖基转移酶,再由这些转移酶实现血型决定簇的合成。人 ABO 血型的抗原系统是 ABH。支配 H 抗原(常称 H 物质)的基因称 H 基因,它位于第 19 对染色体。H 基因编码 $\alpha-1,2-L$ -岩藻糖基转移酶($\alpha-1,2-L$ -fucosyl transferase, $\alpha-1,2$ FucT)。此酶催化 L-岩藻糖以 $\alpha-1,2$ 连键与血型前体糖链非还原端 Gal 残基连接,使前体转变为 H 物质。前体糖链是连接在蛋白质或脂质上的其非还原端为 N-乙酰乳糖胺基(Gal \rightarrow GlcNAc \rightarrow)的寡糖链。二糖基 N-乙酰乳糖胺是 ABH 和 Lewis 抗原决定簇中共有的结构。根据此二糖基中的连键位置不同,前体物质被分为 I 型($\beta 1\rightarrow 3$)和 II 型($\beta 1\rightarrow 4$)。人 ABH 抗原可由 I 型和 II 型衍生而来,而 Lewis 血型抗原 Le^a 和 Le^b 从 I 型前体合成。前体物质以及 ABH 和 Lewis 抗原决定簇结构见表 1-9。支配 ABO 血型的基因位于第 9 对染色体。这是典型的复等位基因(multiple allele),它们是 I^A (A 的基因)、 I^B (B 的基因)和 i (O 的基因)。对于一个个体来说一对同源染色体只能有其中的两个等位基因,例如 I^A 和 i ,或 I^A 和 I^B 。因此人群中三个复等位基因(I^A 、 I^B 、 i)可以组合成 6 种基因型($I^A I^A$ 、 $I^A i$ 等), I^A 或 I^B 对 i 是显性, I^A 和 I^B 是共显性,因而只呈 4 种表型(A、B、AB 和 O)(见表 1-8)。

表 1-9 人 ABH 和 Lewis 抗原决定簇的结构

血型物质	结 构
I 型前体	Gal $\beta 1\rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1\rightarrow R$
II 型前体	Gal $\beta 1\rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1\rightarrow R$
H 物质(O 抗原)	L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 2$ Gal $\beta 1\rightarrow 3/4$ GlcNAc $\beta 1\rightarrow$
A 抗原	GalNAc $\alpha 1\rightarrow 3$ (L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 2$)Gal $\beta 1\rightarrow 3/4$ GlcNAc $\beta 1\rightarrow$
B 抗原	Gal $\alpha 1\rightarrow 3$ (L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 2$)Gal $\beta 1\rightarrow 3/4$ GlcNAc $\beta 1\rightarrow$
Le^a	Gal $\beta 1\rightarrow 3$ (L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 4$)GlcNAc $\beta 1\rightarrow$
Le^b	L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 2$ Gal $\beta 1\rightarrow 3$ (L-Fuc $\alpha 1\rightarrow 4$)GlcNAc $\beta 1\rightarrow$

表中,R=蛋白质或脂质

A 的基因编码 $\alpha-1,3-N$ -乙酰半乳糖胺基转移酶($\alpha-1,3$ GalNAc T);B 基因编码 $\alpha-1,3$ -半乳糖基转移酶($\alpha-1,3$ Gal T);这两个转移酶均由 353 个氨基酸残基组成,它们的氨基酸序列只有 4 个残基不同,反映在其等位基因上是 4 个碱基差异:

氨基酸残基位数	176	235	266	268
$\alpha-1,3$ GalNAc T(A 基因密码子)	Arg(CGC)	Gly(GGC)	Leu(CTG)	Gly(GGG)
$\alpha-1,3$ Gal T(B 基因密码子)	Gly(GGC)	Ser(AGC)	Met(ATG)	Ala(GCG)

O 的基因与 A 的基因的差别只是在编码区的 5' 端缺失一个碱基(第 258 位 G),引起翻译时读框移位(reading frame shift),产生无糖基转移酶活性的蛋白质。由于 O 的基因不能表达任何能修饰 H 物质的酶,所以 H 抗原实际上就是血型 O 抗原。但是几乎所有个体都能产生 H 物质(只要 H 的基因是正常的),并且一般都不存在抗 H 抗体,因此 H 物质被认为是非抗原性的。

人第 19 对染色体还有一个基因是编码合成 Lewis 血型抗原的 $\alpha-1,3$ -岩藻糖基转移酶-III($\alpha-1,3$ Fuc T-III),此酶兼有 $\alpha-1,4$ Fuc T 活性。 $\alpha-1,4$ Fuc T 活性催化向 I 型前体的或 I 型 H 物质的 GlcNAc 碳 4 位转移 $\alpha-L$ -Fuc 残基,分别形成 Le^a 或 Le^b 。 Le^b 也可以由 H 基因编码的 $\alpha-1,2$ Fuc T 将 $\alpha-$

L-Fuc 转移至 Le^a 的 Gal 碳 2 位而形成。Le^a 和 Le^b 是可溶性血型物质,在血浆中能被红细胞吸附,使红细胞获得 Le^a 或 Le^b 抗原特异性,这样的红细胞能被抗 Le^a 或抗 Le^b 抗体所凝集。

(九) 凝集素

凝集素(lectin,源自拉丁文 Legare 的过去分词 Lectus,意为选择、聚集)也译为植物凝集素或外源凝集素,因为这类物质最先是植物中发现的,现已广泛地存在于动物、植物和微生物中。凝集素可定义为一类非抗体的蛋白质或糖蛋白,它能与糖类专一地非共价结合,并具有凝集细胞和沉淀聚糖和复合糖的作用。定义中把凝集素与一些以糖类为抗原的抗体区分开来,虽然后者也具有凝集素的一般性质。不过抗血型抗原的抗体仍习惯地称凝集素(见表 1-8)。凝集素结构含有糖类识别域(carbohydrate recognition domain,CRD),并因此能与糖类发生专一结合。凝集素对被结合的单糖残基的种类具有专一性,有些凝集素还对残基的异头构型、糖苷键类型以及寡糖链的结构或构象具有专一性。

凝集素按其来源可分为动物的、植物的和微生物的三大类;按单糖结合专一性可分为对 Man/Glc、GlcNAc、Gal、GalNAc、L-Fuc 或 Sia 专一的若干类。分离自刀豆(*Canavalia ensiformis*)的伴刀豆凝集素 A(concanavalin A, Con A)专一地结合糖链内部的或非还原端的 α -Man;花生凝集素(peanut agglutinin)专一识别二糖基 Gal α / β 1 \rightarrow 3GlcNAc;从红肾豆(*Phaseolus vulgaris*)提取的植物红细胞凝集素(phytohemagglutinin)识别寡糖 Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 2(Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6)Man。几乎所有已知的凝集素都是多价的,即含有两个或多个糖结合部位,因而具有交联(凝集)红细胞和其他细胞的能力。凝集素的生理作用之一可从豆科植物(如三叶草)和根瘤菌(*Rhizobium trifolii*)的共生固氮中得到启发。根瘤菌和宿主之间的选择有很强的专一性。它是由凝集素介导完成的。三叶草根毛分泌一种称三叶草蛋白 A 的凝集素,它能识别根瘤菌荚膜多糖。并能与三叶草根毛细胞壁上的多糖受体结合。

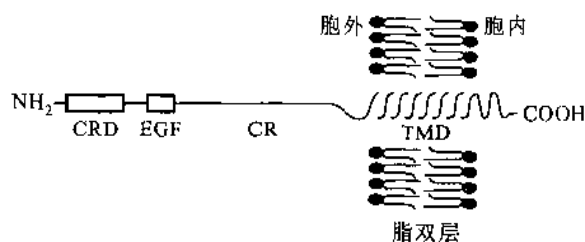
微生物对宿主的感染也是凝集素介导的。细菌凝集素能识别宿主细胞表面上糖蛋白或糖脂的寡糖链,这些凝集素存在于细菌表面的菌毛(fimbria)上。凝集素介导的细菌与靶细胞的粘着具有种和器官的专一性。感染上呼吸道的多数是链球菌,感染尿路的主要是大肠杆菌。淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)只感染人的生殖器和口腔粘膜,对人的其他部位和其他物种不起作用。因为这些细胞表面缺乏该病原菌能识别的糖类。近年来对胃溃疡的病因有新发现,认为它是由幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)感染引起的,初时是胃炎,继而成溃疡最终发生癌变。在螺旋杆菌表面也观察到凝集素的存在,通过凝集素病原菌粘附于胃粘液分泌细胞。某些病毒也是通过粘附于宿主细胞表面的糖类进入宿主细胞的。例如流感病毒含有血凝素(hemagglutinin),它能识别呼吸道衬细胞上的唾液酸,如果用唾液酸酶除去宿主细胞表面的 Sia 残基,流感病毒就无法感染。红细胞表面的血型糖蛋白 A(其糖链富含 Sia)也是凝集素的常见受体。

前面曾提及的肝细胞表面上的半乳糖结合受体是第一个被纯化的动物凝集素。此后发现了一系列膜结合的动物凝集素和可溶性的动物凝集素。目前动物凝集素大致可分为钙(Ca²⁺)依赖的 C 型,巯基(-SH)依赖的 S 型及其他。C 型凝集素虽因其活性与钙离子有关而被归于一类,但它们的糖结合专一性可以有所不同,有的对 Gal 专一,有的对 Man 或 Fuc 专一。近年发现 S 型凝集素的活性不一定与巯基有关,但多数都对 β -Gal 具有专一性。C 型凝集素含有一个由约 130 个氨基酸残基组成的糖类识别域(CRD),此 CRD 中有 18 个残基是不变的,其他残基也相当保守。CRD 和被它专一结合的糖一起结合 Ca²⁺。C 型凝集素的主要功能可能是通过与糖结合参与体内细胞与细胞、细胞与分子以及分子与分子的粘着、进而产生一系列生物学效应如免疫应答,炎症反应,肿瘤转移等。

C 型中一类与各类白细胞的粘着密切有关的凝集素称选择蛋白家族(selectin family)。此家族中已知有 L、E、P 三种选择蛋白。L-选择蛋白(LAM-1*)存在于淋巴细胞(lymphocyte)及其他白细胞,E-选择蛋白(ELAM-1)存在于内皮细胞(endothelial cell),P-选择蛋白(PADGEM)存在于血小板(platelet)及

* 每种选择蛋白都有多个同义词,这里不一一列举;例如 L-选择蛋白也称白细胞粘着分子-1(Leucocyte adhesion molecule-1, LAM-1)等;ELAM-1 是内皮细胞白细胞粘着分子-1 的英文缩写;PADGEM 是血小板活化依赖外膜蛋白的缩写。

内皮细胞。这三种选择蛋白有共同的结构形式,都由5个不同的结构域(domain)组成。其模式结构如下图所示:



在多肽链的N端是糖类识别域(CRD);紧接着的是表皮生长因子域(EGF),与糖结合活性有关;其次是补体调节域(CR),它由多个约含60个残基的补体调节蛋白组成,不同的选择蛋白中补体调节蛋白的数目是不一样的,此结构域的作用尚不清楚;最后是跨膜域(TMD)和胞质侧的C-末端域。已证实在P-选择蛋白中CRD除具糖结合活性外,尚有 Ca^{2+} 结合活性;可能在所有的选择蛋白中 Ca^{2+} 的配位位点与糖结合的位点是挨近的。选择蛋白的共同配体是四糖 sLe^x 和 sLe^a (见第62页),但大分子配体各有不同。L-选择蛋白的主要作用是使淋巴细胞“归巢”,因此它也称归巢受体(见前述“糖链与细胞粘着”)。硫酸化的肝素蛋白聚糖与L-选择蛋白结合力极强,它可能是L-选择蛋白的内源性配体之一。E-选择蛋白是在内皮细胞受到白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)及其他炎症细胞因子激活后的数小时内瞬时合成,并转运到细胞表面,在这里它粘着那些沿血管内壁滚动的中性细胞(neutrophil)及其他白细胞(其表面含有带 sLe^x 的糖蛋白),并把它们外渗到损伤部位。E-选择蛋白除在炎症反应中起作用外,还可能参与其他过程如癌细胞扩散。P-选择蛋白的功能与E-选择蛋白相似,也参与白细胞在内皮细胞的粘着,与炎症、肿瘤转移有关,存在于血小板表面的P-选择蛋白与血小板的激活有关,因而也与血小板的聚集、凝血、乃至血栓形成有关。看来抗炎、抗血栓形成药物的设计可以从更深入地了解选择蛋白是如何识别不同的糖链并与之结合入手,例如能抑制白细胞在内皮细胞表面的粘着,即可能达到抗炎的目的。

十、糖胺聚糖和蛋白聚糖

糖胺聚糖和蛋白聚糖是细胞外基质的重要成分。动物组织特别是结缔组织的胞外空间充盈着凝胶样的基质(matrix),它使组织的细胞维系在一起,并为营养物质和氧气扩散到各细胞提供了多孔通道。下面介绍糖胺聚糖和蛋白聚糖的结构和功能。

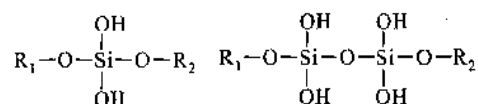
(一) 糖胺聚糖

糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)曾称粘多糖(mucopolysaccharide),氨基多糖和酸性多糖。近年来国际上多数刊物只采用糖胺聚糖一词。糖胺聚糖是动、植物,特别是高等动物结缔组织中的一类结构多糖,例如透明质酸,硫酸软骨素,硫酸角质素等。

1. 糖胺聚糖的一般结构和功能

糖胺聚糖属于杂多糖,为不分支的长链聚合物,由含己糖醛酸(角质素除外)和己糖胺成分的重复二糖单位构成。糖胺聚糖的通式为:[己糖醛酸→己糖胺] $_n$, n 随种类而异,一般在30到250之间。二糖单位中至少有一个单糖残基带有负电荷的羧基或硫酸基,因此糖胺聚糖是阴离子多糖链,呈酸性。在体内糖胺聚糖以蛋白聚糖形式存在,但透明质酸是例外。

结缔组织中某些糖胺聚糖如4-硫酸软骨素和硫酸乙酰肝素,约含0.04%硅元素,相当于每130~280个重复单位含一个硅原子。聚糖中硅原子以醚键与糖结合,这是原硅酸(orthosilicic acid), $\text{Si}(\text{OH})_4$,与糖链的单体糖羟基反应的结果。通过Si原子可以把两条或多条(下面结构式中尚有另外的游离羟基)糖链($\text{R}_1, \text{R}_2 \dots$)交联在一起:



糖胺聚糖的一般生物学作用:① 由于糖胺聚糖的亲水性强,对保持疏松结缔组织中的水分有重要意义;② 糖胺聚糖是多价阴离子,对 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等有较大的亲和力,因此能调节这些离子在组织中的分布;③ 糖胺聚糖,主要是透明质酸有很大的粘滞性,附在关节面上具有润滑和保护作用;④ 有促进创伤愈合的作用。

2. 糖胺聚糖的种类

按单糖残基,残基间连键的类型以及硫酸基的数目和位置,糖胺聚糖可分为 4 个主要类别:① 透明质酸,② 硫酸软骨素和硫酸皮肤素,③ 硫酸角质素,④ 硫酸乙酰肝素和肝素。

(1) 透明质酸(hyaluronic acid, HA) 是糖胺聚糖中结构最简单的,它的二糖重复单位见图 1-37。二糖单位中 D-葡萄糖醛酸以 β -1,3 糖苷键与 N-乙酰葡萄糖胺相连,二糖单位间以 β -1,4 糖苷键连接。HA 与其他糖胺聚糖有很大不同,它不被硫酸化,不与蛋白质共价结合,而是以游离形式或非共价复合体(蛋白聚糖聚集体)形式存在,它结构虽较简单但相对分子质量很大($M_r 10^5 \sim 10^7$, 约合 250~25 000 个二糖单位),它是唯一不限于动物组织并也产生于细菌中的糖胺聚糖。由于单糖残基间的 β 连键和大量的链内氢键,以及外伸的负电荷羧基之间的相互斥力,HA 在溶液中采取高度伸展的无规卷曲(random coil)构象,外形呈刚性的长棒状,一个分子可长达 20 μm 。由于分子表面含有很多亲水基团,HA 能结合大量的水,形成透明的高粘性水合凝胶。一个 HA 分子在水中将占据 1 000~10 000 倍于自身体积的空间。当 HA 处于封闭的间隙如细胞间基质时,将产生膨胀压,加上分子表面的 $-\text{COO}^-$ 因吸引了阳离子,更增加基质的渗透压。正是这些膨胀力使软骨、腱等结缔组织具有抗压和弹性。

HA 广泛存在于动物结缔组织的细胞外基质,在胚胎、滑液、玻璃体、脐带、鸡冠等组织中尤为丰富。牛玻璃体、人脐带和公鸡冠是提取 HA 的常用材料。业已证明,在形态发生或创伤修复期间局部组织 HA 大量合成,事件结束后过量的 HA 被透明质酸酶(hyaluronidase)所降解。这表明,局部 HA 之所以大量合成是由于它吸水能使胞外基质膨胀而有利于细胞迁移。HA 在关节滑液和眼球玻璃体液中起着润滑、防震和增稠剂的作用。某些病原菌能分泌透明质酸酶,水解待侵袭组织的 HA,使组织对细菌入侵更加敏感。

(2) 硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS) 其非硫酸化二糖单位是 $\rightarrow 4\text{GlcUA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow$ 。最常见的硫酸化部位是 GalNAc 残基上的 C4 或 C6,生成的聚糖链分别称 4-硫酸软骨素(曾称软骨素 A)或 6-硫酸软骨素(软骨素 C)(图 1-37)。实际上多数 CS 都是 4-硫酸和 6-硫酸二糖单位的共聚物。更复杂的还有非硫酸化的或(和)4,6-二硫酸化的二糖单位存在。CS 分子一般含 20~60 个重复二糖,在体内以蛋白聚糖聚集体形式存在于软骨、腱、韧带和主动脉等组织的基质中。

硫酸皮肤素(dermatin sulfate, DS),曾称软骨素 B,DS 与 CS 的差别在于 DS 中在量上占优势的糖醛酸单位是艾杜糖醛酸(L-IdoUA),并有不定数量的 D-葡萄糖醛酸存在。换言之,皮肤素中二糖单位多数是 $\rightarrow 4\text{IdoUA}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow$,少数是 $\rightarrow 4\text{GlcUA}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow$ 。L-IdoUA 是由 D-GlcUA 在羧基所在位 C5 差向异构化产生的,此时 L-IdoUA 与氨基糖的连键也由原来的 $\beta 1 \rightarrow 3$ 变成 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 。因此 DS 是 CS 的一种修饰形式。L-艾杜糖酸一旦形成,在它的 C2 位上即可发生硫酸化(图 1-37)。硫酸皮肤素作为结缔组织的大分子存在于皮肤、血管壁和心瓣膜中。

(3) 硫酸角质素(keratan sulfate, KS) 重复二糖是由半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成的,二糖单位之间是 $\beta 1 \rightarrow 3$ 连接。KS 是糖胺聚糖中唯一不含糖醛酸作为单体的杂多糖。由于此二糖单位在结构上与乳糖类似,只是 N-乙酰葡萄糖胺残基代替了葡萄糖残基,称为乳糖胺,并因此非硫酸化的角质素主链常称为聚乳糖胺, $[\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1]_n$,它存在于糖蛋白的复杂型 N-糖链的外链(见第 58 页)。生物合成时连接于核心蛋白的聚乳糖胺链在 Gal 或/和 GlcNAc 残基的 C6 位上硫酸化,即形成硫酸角质素。

(4) 硫酸乙酰肝素或硫酸类肝素(heparan sulfate, HS)和肝素(heparin, Hp) 两者具有相同的主链结构,二糖单位由葡萄糖醛酸或 L-艾杜糖醛酸和葡萄糖胺组成。生物合成糖链时主链发生一系列的修饰:一些

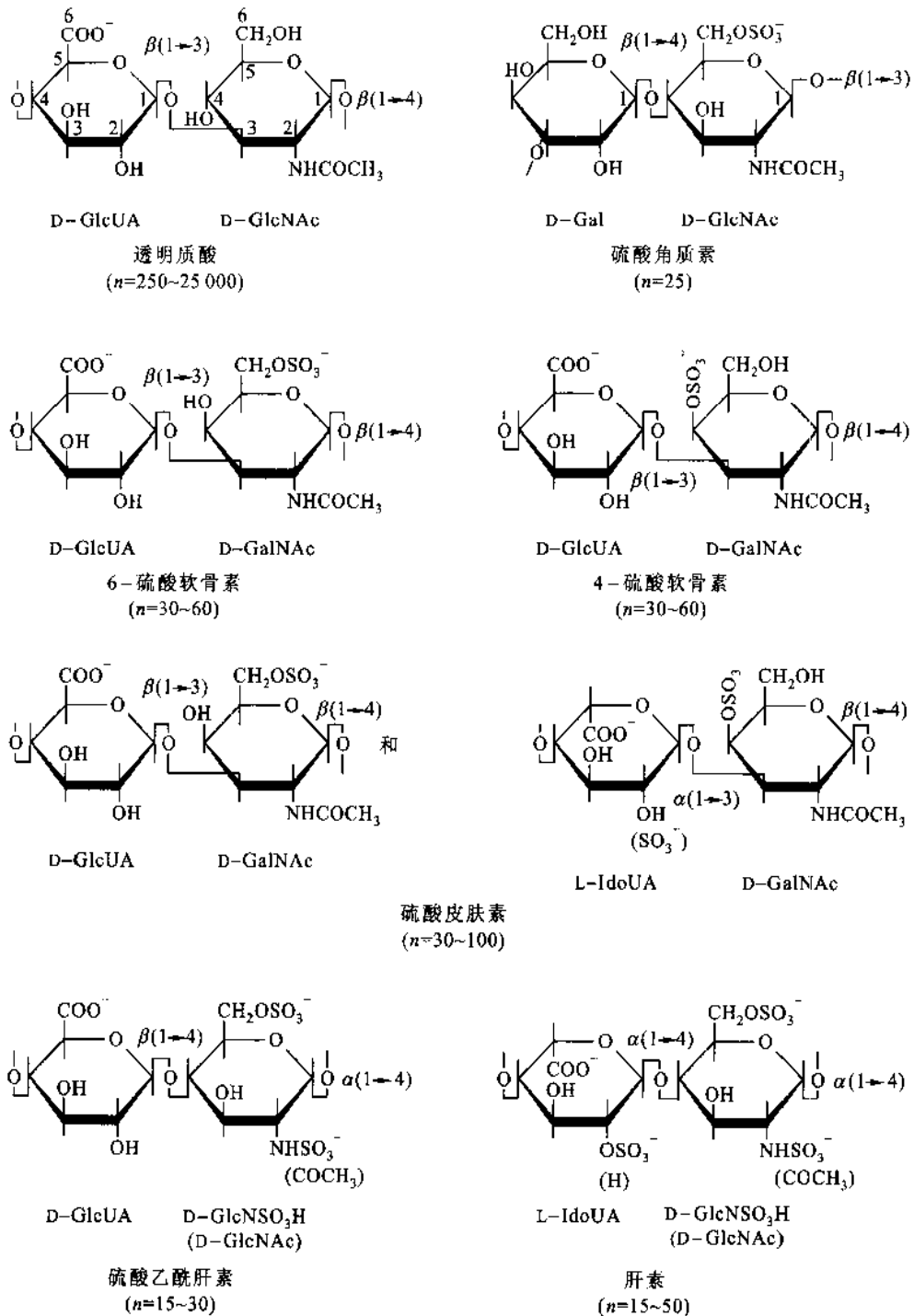


图 1 37 糖胺聚糖二糖重复单位的结构

N-乙酰基的除去,并磺化成 N-磺基(N-sulfo),也称 N-硫酸基(N-sulfate)*,以及葡糖胺 C6 位有时还有 C3 位的硫酸化。N-磺化(硫酸化)的程度是区别硫酸乙酰肝素和肝素的一个重要标志。前者 N-磺化不到 50%,后者常高于 70%,O-硫酸基*也是前者比后者少;当然 N-乙酰基前者比后者多。也像硫酸皮肤素,它们的一部分 D-葡糖醛酸被差向异构化成 L-艾杜糖醛酸,并紧接着在其 C2 位上发生硫酸化。C2 硫酸化对生成艾杜糖醛酸是有利的,因为它可阻止差向异构化的逆转。修饰后的肝素(Hp)结构是高度荷电的多聚阴离子,平均每一重复二糖含有 2.0~3.0 个硫酸基(包括 N-硫酸和 O-硫酸),而 HS 含 0.2

* R-NH-SO₃⁻ 常称为 N-硫酸,R-O-SO₃⁻ 称 O-硫酸,这些名称虽被广泛使用,但严格地说这是不正确的,因为连接在 N-或 O 上的不是硫酸基而是磺(酸)基。

~2.0个硫酸基。

肝素存在于肺、肝、皮肤和其他结缔组织的肥大细胞中。它是一种天然的抗凝血剂,临床上用作抗凝血酶Ⅲ(antithrombinⅢ,ATⅢ)的增强剂。AT-Ⅲ是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,能与具丝氨酸蛋白酶活性的凝血酶及其他活化的凝血因子(如IXa, Xa)结合而使它们失活。肝素的抗凝血机制可能是与血中的AT-Ⅲ结合诱导AT-Ⅲ的构象变化,因之增强了抑制剂与凝血酶间的相互作用。无肝素存在时,AT-Ⅲ需要10~30 min才能出现抑制作用。但在肝素存在下只需数秒钟就能使凝血酶失活。硫酸乙酰肝素分布于肺、动脉管等细胞表面,它也有抗凝血活性,但比肝素低得多。

(二) 蛋白聚糖

蛋白聚糖(proteoglycan, PG)是一类特殊的糖蛋白,由一条或多条糖胺聚糖和一个核心蛋白共价连接而成。蛋白聚糖除含糖胺聚糖链外,尚有一些N-或(和)O-连接的寡糖链。与糖蛋白比较,蛋白聚糖中按重量计算糖的比例高于蛋白质,糖含量可达95%或更高,糖部分主要是不分支的糖胺聚糖链,典型的每条约含80个单糖残基,通常无唾液酸。蛋白聚糖不仅分布于细胞外基质,也存在于细胞表面以及细胞内的分泌颗粒中。

1. 核心蛋白

与糖胺聚糖共价结合的多肽链称核心蛋白(core protein),它的种类很多, M_r 从约2万~25万,其中不少已测得其氨基酸序列。核心蛋白具有以下几个特点:①多数核心蛋白含有几个不同的结构域;②所有的核心蛋白都含有相应的糖胺聚糖结合结构域;③某些蛋白聚糖可通过核心蛋白中的特定结构域,锚定在细胞表面或细胞外基质的大分子上;④有些核心蛋白尚含有具特异相互作用的结构域。

2. 连接区(寡糖链)

除透明质酸外,所有糖胺聚糖链的延伸都是在一个与核心蛋白共价连接的所谓连接区(寡糖链)上进行的。连接区合成的起始和糖肽间连键类型与糖蛋白中的相同,只是寡糖链形式有所不同。CS/DS链和HS/Hp链的连接区是一个四糖链: $\text{GlcUA}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3)\text{Xyl}\beta(1\rightarrow3)\text{Ser}$,属O-寡糖链;聚糖的二糖单位(己糖醛酸→己糖胺)装配在它的非还原端GlcUA上。软骨可聚蛋白聚糖中的连接区是另一形式的O-寡糖链,即O-GalNAc糖链(见本章“糖肽连键的类型”),这是一个分支的六糖链, $\text{Sia}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow6)(\text{Sia}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow3))\text{GalNAc}\alpha(1\rightarrow3)\text{Ser/Thr}$ 。CS或KS就是取代其中一个分支末端的Sia残基与核心蛋白相连的。很多蛋白聚糖的连接区是N-寡糖链,例如存在于角膜中的小分子硫酸角质素蛋白聚糖(KSPG),其KS就是通过一个二天线复杂型N-寡糖链与核心蛋白连接的。

3. 蛋白聚糖的种类

由于核心蛋白分子的大小和结构不同和糖胺聚糖链的成分、数目、链长、硫酸化部位和程度不同,形成的蛋白聚糖种类极多。目前从各种组织中分离到的蛋白聚糖已有数十种,但尚无统一、理想的命名和分类方法。早期根据其组织来源或(和)聚糖成分,有软骨蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖、角膜硫酸角质素蛋白聚糖等名称。晚近Kjellen和Lindahl根据核心蛋白氨基酸序列的同源性,并综合各种分类的依据,包括按其在细胞内外的分布,把蛋白聚糖分成若干个家族,现举例如下:

(1) 大分子聚集型胞外基质蛋白聚糖 存在于细胞外基质中,其核心蛋白的 M_r 为20万~25万,含多个结构域,近氨基端的球状结构域含透明质酸结合区(HA-binding region, HBR),通过HBR约15~150个蛋白聚糖非共价地结合于一个HA分子,形成蛋白聚糖聚集体。这类蛋白聚糖包括可聚蛋白聚糖(aggrecan)、多能蛋白聚糖(versican)等。可聚蛋白聚糖存在于软骨组织, M_r ~250万,含CS/KS糖链,软骨中多以聚集体形式存在。多能蛋白聚糖原从人成纤维细胞分离获得,现已知许多组织的细胞外基质中存在, M_r 为78万~86万,糖链是CS/DS,不含KS;其功能与可聚蛋白聚糖相似,具有抵抗压力的作用,例如能使动脉平滑肌不断承受来自心脏的搏动力和血流冲击,维持血管的正常结构与功能。

(2) 小分子富含亮氨酸胞外基质蛋白聚糖 包括饰胶蛋白聚糖(decorin)、双糖链蛋白聚糖(biglycan)、纤调蛋白聚糖(fibromodulin)和光蛋白聚糖(lumican)等。它们存在于细胞外基质中,相对分子质量较小。其共同特征是核心蛋白的 M_r 约为4万。这类蛋白聚糖只含一条或几条糖胺聚糖链,位于核心蛋

白N端附近。饰胶蛋白聚糖因它能修饰I型和II型胶原而得名,其 M_r 为9万~14万,含一条CS或DS链和几条N-连接寡糖链,其功能之一是调节胶原纤维的形成和基质的组装。双糖链蛋白聚糖的 M_r 为15万~24万,含两条CS/DS链和两条N-连接寡糖链。纤调蛋白聚糖存在于关节软骨、肌腱、主动脉等组织; M_r ~6万;含有5条N-连接寡糖链,其中4个是KS结合部位;它能与I、II型胶原及纤连蛋白结合,调节胶原纤维的形成,故得名。光蛋白聚糖存在于角膜中,与纤调蛋白聚糖同属于小分子KSPG,但它N-连接的KS链只有2~3条。光蛋白聚糖对维持角膜的透明度具有重要作用,并因而得名。

(3) 跨膜胞内蛋白聚糖 例如串珠蛋白聚糖(perlecan),它是构成基底膜的主要蛋白聚糖,属于大分子HSPG, M_r 约为85万,其核心蛋白的 M_r 为46.7万,含3~4条HS链(M_r ~6万)和10~12条N-连接寡糖链。核心蛋白含5~7个连续的球状结构域,形似串珠,故名。串珠蛋白聚糖可通过彼此相互作用而聚集,并可与基底膜的其他成分如IV型胶原相互作用。串珠蛋白聚糖在肾小球基底膜中起滤膜作用,使血流中的分子滤向尿液。又例如粘结蛋白聚糖也称多配体蛋白聚糖(syndecan)和纤维蛋白聚糖(fibroglycan)是一类跨膜蛋白聚糖,存在于细胞表面;前者含3条HS链和2条CS链,后者只含HS链,它们能与胶原结合,并因此介导结缔组织细胞与胞外基质的粘着,可作为细胞骨架和细胞外基质之间的桥梁,在胚胎发生和器官形成中起重要作用。丝甘蛋白聚糖(Serglycan)是细胞内蛋白聚糖,存在于肥大细胞和许多造血细胞的贮存颗粒中。不同来源的丝甘蛋白聚糖,相对分子质量变动较大,所含糖胺聚糖链数目不等, M_r 7万~20万;但核心蛋白的 M_r 均在1.7万~1.9万范围。其核心蛋白富含Ser-Gly重复序列故得此名,糖胺聚糖链集中连接在此区间,糖链是肝素或过硫酸化的CS。所谓过硫酸化是指4,6-二硫酸化的GalNAc残基较多,超过平均每个二糖单位一个硫酸基的比例。由于分子具有多而密集的负电基团,在细胞贮存颗粒中,丝甘蛋白聚糖起阴离子交换介质的作用,参与带正电蛋白酶、羧肽酶及组胺等活性分子的浓缩贮存和缓慢释放。

4. 蛋白聚糖聚集体

前面述及软骨可聚蛋白聚糖能以HA分子为主干形成典型的蛋白聚糖聚集体(proteoglycan aggregate)(图1-38A)。每一可聚蛋白聚糖分子(平均 M_r ~250万)含KS链(M_r 1万~1.5万)约50条,CS链(M_r 2万~3万)约100条以及若干条O-连接寡糖链,它们分布在核心蛋白(M_r 20万~30万)的不同区域,整个分子形如一个“试管刷”。在HA(M_r ~200万)主干上有规则地每间隔约40nm结合一个蛋白聚糖单体(即一个核心蛋白加结合的糖胺聚糖,称单体是相对于聚集体而言)。如图1-38B所示,每个核心蛋白的HA结合区与HA的十糖序列(5个重复二糖)非共价结合,并由小分子(M_r 4万~4.8万)连接蛋白(link protein,至少有两种)使结合稳定化。连接蛋白也能通过自身的HA结合区与HA结合,同时通过连接蛋白和核心蛋白中各自的免疫球蛋白样折叠结构域(见第6章)之间的相互作用,使核心蛋白与HA的

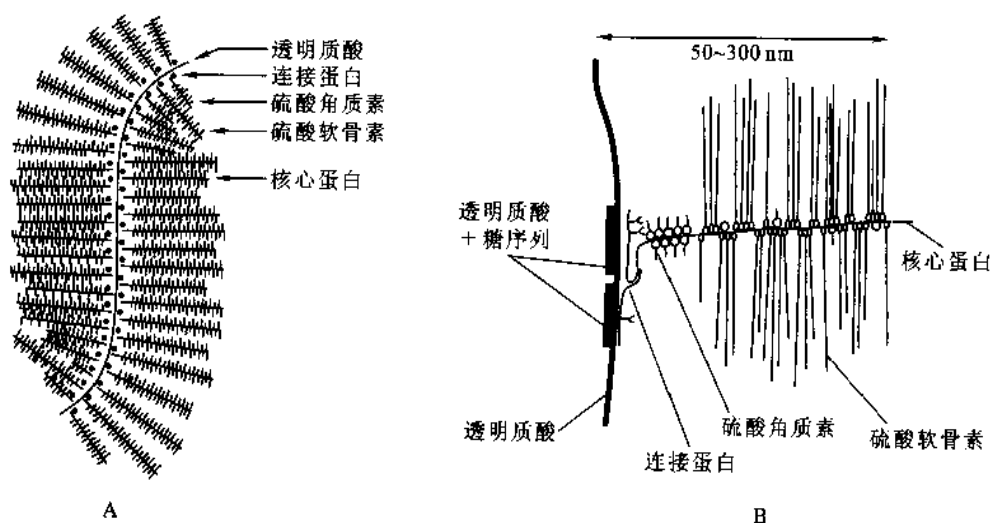


图1-38 软骨可聚蛋白聚糖聚集体结构示意图

A. 整个聚集体的分子结构;B. 蛋白聚糖单体与HA主链的非共价连接

另一个十糖序列结合。这样形成的聚集体含 100 或更多个蛋白聚糖单体,它是已知的最大分子之一, M_r 超过 2×10^8 ,分子长达 $4\mu\text{m}$,所占体积比一个细菌细胞还大,在电镜下可观察到分子的外形。软骨可聚蛋白聚糖每克干重能吸收 50mL 水,形成一个很大的水化区。但在软骨细胞外基质中蛋白聚糖的浓度可超过 10%,也即它所占的体积只有或不足 10 mL/g(干重),只相当于在水中充分伸展时体积的 1/5。这种被压缩的蛋白聚糖对网状结构的细胞外基质施以膨胀压,使软骨有抗变形的能力。可聚蛋白聚糖对维持软骨的形态和功能具有重要意义。

十一、糖链的结构分析

糖链结构分析中提出的方法与蛋白质序列测定遇到的问题相似,但难度更大。糖链分析是一项繁重而艰巨的任务。虽然测定每种糖链结构都有自己的特殊问题,但是糖链分析有必经的共同步骤和通用的方法与技术。

(一) 糖链结构分析的一般步骤

一般说,糖蛋白是含糖分子中最复杂的。因此下面就以糖蛋白的聚糖链结构测定作为糖链分析的例子。

1. 糖蛋白的分离纯化

糖蛋白的分离纯化可以采用分离提纯蛋白质的方法与技术来进行,从混合物中获得均一的糖蛋白纯品。这些方法和技术见第 7 章。

2. 从糖蛋白释放完整的聚糖

对 N-连接聚糖可用酶法如肽-N-糖苷酶 F(Peptide-N-Glycosidase F, PNG 酶 F)水解或用化学法如肼解(hydrazinolysis,干燥样品与无水 $\text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2$ 在 100°C 封管反应 ~ 10h)断裂糖肽, $\text{GlcNAc} \rightarrow \text{Asn}$ 之间的酰胺键(图 1-34)。对 O-连接聚糖目前只有一种酶,内切- α -N-乙酰半乳糖胺酶(endo- α -N-acetylglucosaminidase),也称 O-聚糖肽水解酶或 O-糖苷酶,能断裂 $\text{GalNAc} \rightarrow \text{Ser/Thr}$ 间的糖苷键(图 1-34)。断裂其他类型 O-糖肽键的酶未见报道。化学法断裂 O-糖肽键可在 $\text{NaOH}(0.05 \sim 0.10\text{mol/L}) - \text{NaBH}_4(1\text{mol/L})$ 溶液中通过 β -消去反应来完成。反应中断裂产生的聚糖还原端被氢硼化钠还原成对碱稳定的糖醇,以防止糖链被碱降解,被断裂的聚糖常用放射性示踪剂(如 NaB^3H_4)标记,以便纯化过程中对它进行跟踪。

糖基化位点可根据糖蛋白的肽图(peptide map)加以确定(见第 6 章)。

3. 聚糖的分离纯化

从一个糖蛋白纯品中释放出来的完整聚糖链,经常是糖链混合物,原因是很多糖蛋白不止含有一条糖链。即使只含一条糖链,也还存在微不均一性(microheterogeneity)。微不均一性是指一个糖基化位点上存在多种不同的糖链。这是糖链的生物合成特点造成的。糖链合成不像蛋白质、核酸,它不是模板化的,合成可以终止于不同阶段,因而一个糖基化位点上可以有大小、组成、结构各不相同的糖链。

从前一步得到的聚糖混合物先用凝胶渗透层析(GPC)除去蛋白质,然后用高效液相色谱(HPLC)特别是用 HPAEC-PAD 分离纯化聚糖。HPAEC-PAD 是配有脉冲电流检测器的高效阴离子交换色谱(high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detector)的英文缩写。它的基本原理是利用糖在高 pH(>12)介质中能解离成阴离子,使其在附聚薄壳型阴离子交换树脂柱上进行交换层析,分离后的糖组分进入 PAD 进行检测,从而达到高效、快速、微量(pmol ~ nmol)的分离与检测。此外凝集素亲和层析是分离不同类型聚糖的有力工具。例如使用固定化伴刀豆凝集素 A(商品名为 ConA-Sepharose B)亲和柱可以把 N-连接聚糖混合物分离成两组。一组亲和吸附于 ConA 柱:高甘露糖型、杂合型和不含平分型 GlcNAc 的二天线复杂型聚糖;一组不吸附于 ConA 柱:三天线、四天线和含平分型 GlcNAc 的二天线复杂型聚糖。每组可选择其他固定化凝集素进一步分离提纯。

4. 聚糖的纯度鉴定和相对分子质量测定

(1) 聚糖纯度的鉴定 可采用多种物理方法如超离心、电泳、高效凝胶渗透层析(HPGPC,它是 HPLC

的主要形式)等进行。如果是均一的纯品,在离心力场中应以单一沉降速度运动;在电场中以单一泳动度移动;洗脱过程中呈现单一、对称的洗出峰。

(2) 聚糖相对分子质量的测定 常用的方法有蒸气压法、渗透压法(两者均利用溶液的依数性质,如蒸气压降低、渗透压升高),端基法(条件是已知每一糖链分子只含一个可测末端残基;方法相当于蛋白质最低相对分子质量测定),粘度法、光散射法、质谱法、HPGPC 法等。方法的原理参看物理化学教本或专著,以及本书有关蛋白质、核酸的相对分子质量测定。

5. 单糖组成的测定

从第 3 步提纯得到的完整聚糖链,经鉴定为均一的纯品后,用酸(如 1mol/L HCl)加热彻底水解或在 1 mol HCl/L 无水甲醇(80~100℃)中进行甲醇解(methanolysis),生成的单糖混合物或单糖甲基糖苷混合物可用 HPLC, GLC(气液色谱)或 TLC(薄层层析)等方法(见第 3 章)作定性鉴定和定量测定。采用 GLC 分析时,待测样品,单糖或单糖甲基糖苷需要转变成易挥发、对热稳定的衍生物,如糖三甲基硅醚、糖醇乙酸酯、糖三氟乙酸酯等。几种糖醇乙酸酯衍生物的 GLC 出峰图见图 1-39。实验中与标准单糖对照,可得到聚糖链组分单糖的定性与定量结果。聚糖相对分子质量和单糖组成的测定将给出一个聚糖分子所含单糖残基分子数、残基种类及其分子数比(摩尔比)。

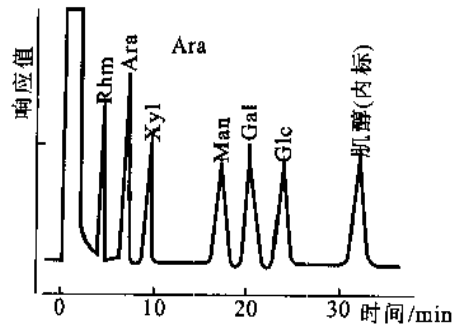


图 1-39 糖醇乙酸酯衍生物在 ECNSS-M(氰乙基甲基硅酮与聚乙二醇丁二酸酯的共聚物)柱上的出峰图

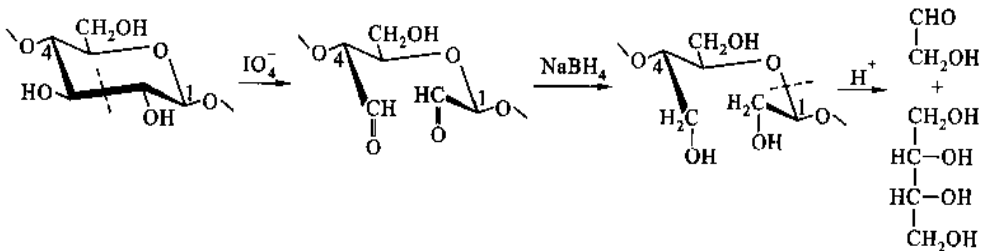
6. 完整聚糖链的序列测定

得到的完整聚糖,如果分子较大,可用专一性酶(如内切- β -D-半乳糖苷酶)或酸(控制酸浓度、水解温度和时间)进行部分水解,使之变成较小的寡糖片段,片段混合物如前用 HPLC 等方法分离纯化,以获得全套片段纯品。对这些寡糖片段逐个地进行序列测定,简称测序(Sequencing),包括确定单糖残基在寡糖链中的次序,单糖残基间连键的位置,连键的异头构型、链的分支情况以及单糖残基上羟基被非糖取代基(如硫酸基,乙酰基)取代情况。然后将这些片段序列进行合理拼接,推断出完整聚糖的一级结构。寡糖测序有化学法、酶法和仪器测定法(如质谱和核磁共振)等。

(二) 用于糖链结构测定的一些方法

1. 化学方法

(1) 高碘酸氧化 除可用于测定直链多糖的聚合度、支链多糖的分支数目(见本章“单糖的化学性质”)外,尚可以用来确定糖苷键的位置。后一用法与 Smith 降解结合进行,即糖链高碘酸氧化生成的双醛型产物,在水解前先用 NaBH_4 把它们还原为稳定的醇,再行酸解。由水解产物可以推断糖链中糖苷键的连接位点。以葡聚糖为例,1,4-连接的葡糖基经高碘酸氧化和 Smith 降解的产物是赤藓醇和乙醇醛:



1,2-连接的葡糖基氧化、还原、水解后的产物是甘油和 D-甘油醛;1,3-连接的葡糖基不与高碘酸起反应,经还原和水解后得到原来的葡萄糖;1,6-连接的或非还原末端的葡糖残基高碘酸氧化和 Smith 降解的终产物是甘油和乙醇醛,反应产物可借 GLC 或 TLC 进行鉴定。

(2) 甲基化分析 是确定寡糖和多糖中单糖单位间糖苷键位置的重要手段。它包括糖链的所有自由羟基转变为甲醚基(见本章“糖的化学性质”),通过水解释放出部分甲基化的单糖,再经 NaBH_4 还原成糖醇,进而乙酰化水解后生成的羟基,得到部分甲基化的糖醇乙酰衍生物混合物,后者用 GLC 或 GC-MS (气谱-质谱联用)进行定性和定量分析,从而确定各单糖的连接位置。

(3) 寡糖顺序降解 晚近提出一种从寡糖还原端进行顺序降解的方法,其设计思路与肽段氨基酸序列分析中的 Edman 降解(见第 4 章)十分相似。方法是首先用氢硼化钠将寡糖还原端还原为糖醇,再用四醋酸铅(-73°C)处理,在糖苷键附近引入一个羰基,然后与肼反应切断糖苷键,检测从还原端切下的衍生物,便可推断被降解的那一单糖结构。

2. 酶学方法

糖苷酶是研究糖链结构的一种有力工具。糖苷酶除用于从糖蛋白上断裂完整的聚糖链外,还能通过顺序降解,阐明糖链的一级结构,并能确定组成单糖的异头构型。糖苷酶可分为两类:① 外切糖苷酶(exoglycosidase),它们只能从糖链的非还原末端逐个切下单糖,并且对糖基组成和糖苷键类型有专一性要求,因此它降解糖链,可以提供有关单糖残基组成、排列顺序和糖苷键的 α 或 β 构型的信息;② 内切糖苷酶(endoglycosidase),它们水解糖链内部的糖苷键,释放糖链片段,包括从肽链上释放完整的聚糖链。

将糖苷酶用于糖链结构研究时,必须了解该糖苷酶对底物的专一性要求,特别是对糖苷配基一侧的要求。同一种糖苷酶由于来源不同它们对底物糖苷键的位置也有不同的专一性,例如不同来源的神经氨酸酶对 $\alpha(2\rightarrow6)$ 和 $\alpha(2\rightarrow3)$ 连接的唾液酸水解能力不同。常用的几种糖苷酶列于表 1-10。

表 1-10 用于寡糖测序的几种糖苷酶

酶名称	来源	专一性
外切糖苷酶		
α -L-岩藻糖苷酶	产气荚膜杆菌(<i>Clostridium perfringens</i>)	$\text{Fuca}1-\downarrow\rightarrow 2\text{Gal}$
β -半乳糖苷酶	肺炎双球菌(<i>Diplococcus pneumoniae</i>)	$\text{Gal}\beta 1-\downarrow\rightarrow 4\text{GlcNAc}$
α -甘露糖苷酶	刀豆(<i>Canavaliu ensiformis</i>)	$\text{Man}\alpha 1-\downarrow\rightarrow 2/6\text{Man}$ (水解 100%) $\text{Man}\alpha 1-\downarrow\rightarrow 3\text{Man}$ (水解 7%)
N-乙酰- β -D-葡萄糖胺酶	肺炎双球菌	$\text{GlcNAc}\beta 1-\downarrow\rightarrow$ 寡糖
神经氨酸酶	肺炎双球菌	$\text{Sia}\alpha 2-\downarrow\rightarrow 3/6\text{Gal}$ $\text{Sia}\alpha 2-\downarrow\rightarrow 6\text{GlcNAc}$
内切糖苷酶		
内切- β -D-半乳糖苷酶	脆弱拟杆菌(<i>Bacteroides fragillis</i>)	$\rightarrow\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3\text{Gal}\beta 1-\downarrow\rightarrow 3/4\text{GlcNAc}\rightarrow$
N-糖苷酶 F	产黄菌属(<i>Flavobacterium meningoseptium</i>)	$\text{X}-\text{Man}\begin{matrix} \searrow \\ \nearrow \end{matrix} \text{Man}\rightarrow\text{GlcNAc}\rightarrow$ $\text{X}-\text{Man}\begin{matrix} \searrow \\ \nearrow \end{matrix}$ $\text{GlcNAc}-\downarrow\rightarrow\text{Asn}-\text{肽}$ ($\text{X}=\text{H}$ 或单糖)
O-糖苷酶	肺炎双球菌	$\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1-\downarrow\rightarrow$ (Thr/Ser) 肽

a 肺炎双球菌也称肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)。

图 1-40 是专一性糖苷酶用于寡糖链测序的一个简例。图中所示寡糖是血清类粘蛋白上的几条寡糖链之一。根据表 1-10,如果此寡糖的非还原端残基能被神经氨酸酶断裂,释放出游离唾液酸,暗示末端唾液酸是以 $\alpha 2\rightarrow 3/6$ 糖苷键与 Gal 连接或以 $\alpha 2\rightarrow 6$ 与 GlcNAc 连接;当用肺炎双球菌 β -半乳糖苷酶切下第二残基(Gal)后,则排除 Sia 与 GlcNAc 连接的可能,并表明 Gal 以 $\beta 1\rightarrow 4$ 与第三残基 GlcNAc 连接的可能,当被 N-乙酰- β -D-葡萄糖胺酶(N-acetyl- β -D-glucosaminidase)释放出 GlcNAc(第三残基)时,

说明它是以 $\beta 1 \rightarrow$ 和剩余的寡糖部分相连。如是继续并结合其他方法,即可推断出完整的寡糖序列。

3. 仪器测定法

前面两种测序方法虽然常能提供可靠的结构信息,但是很麻烦而且也不总是有效。近些年来在糖结构研究中红外光谱(IR)、激光拉曼光谱(laser Raman spectroscopy)、质谱(MS)和核磁共振(NMR)等技术有了很大发展。

红外光谱和拉曼光谱都属于分子的振动和转动光谱。但红外光谱是吸收光谱,在红外波段拉曼光谱是散射光谱。红外光谱区一般是指波长(λ) $2.5 \times 10^{-4} \text{cm} - 2.5 \times 10^{-3} \text{cm}$ 或波数($\bar{\nu}$) $4\,000 \text{cm}^{-1}$ 、 400cm^{-1} 范围($\nu = 1/\lambda$)。当这样的红外光通过样品时,测量在各 λ (或 $\bar{\nu}$) 下透过样品的光强度(透光率),由仪器记录下来的曲线称红外光谱(infrared spectrum)。用激光作激发光的拉曼光谱波长范围与红外光谱相似,但激光拉曼光谱的灵敏度和分辨率比后者高。它们能够提供有关糖环上的取代基和异头碳构型的信息。

质谱法(mass spectrometry)的基本原理是使待测样品在质谱仪(图1-41A)的离子源中通过一定方式发生电离,形成带电的分子或分子碎片,再借助电场或磁场的作用使这些离子依质荷比(m/z)的不同获得分离,并按质荷比大小为序冲击检测器,在记录仪图纸横坐标上的相应 m/z 处以峰或线的形式出现,峰高反映给定 m/z 的离子数目,以纵坐标上的相对强度表示。所得质谱图示意于图1-41B。

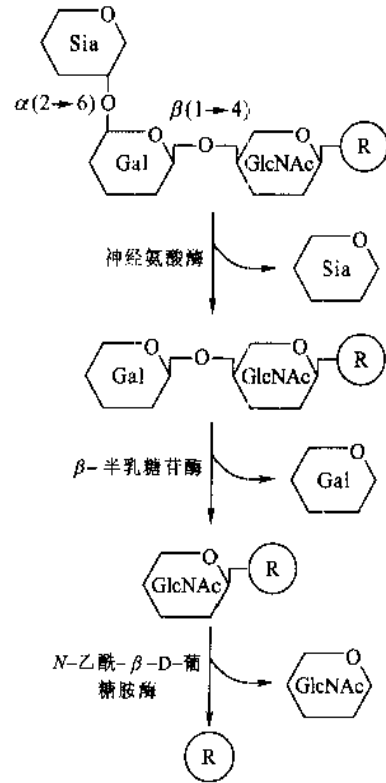


图1-40 血清类粘蛋白的一条寡糖链的部分测序
图中R代表剩下的寡糖链

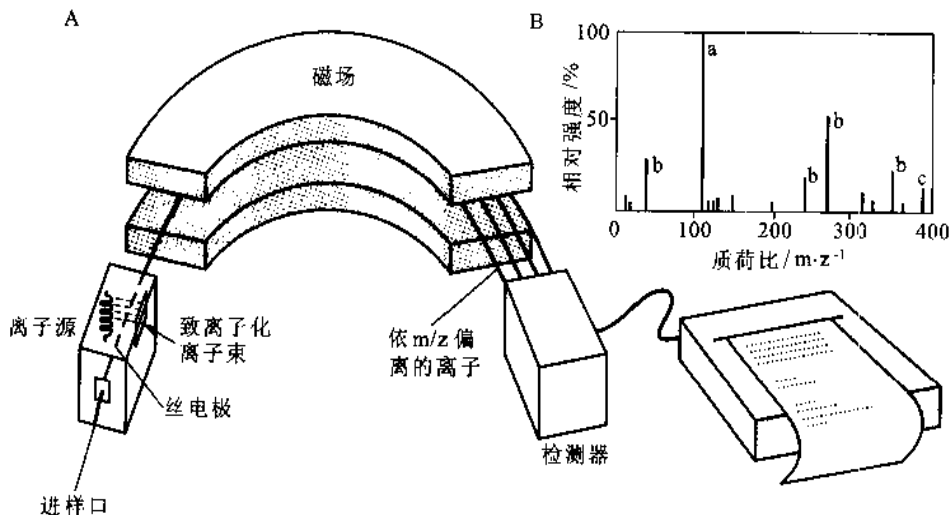
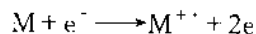


图1-41 A. 电子轰击-扇形磁质谱仪示意图;B. 质谱示意图,图中a为基本峰,即最高峰,以它的强度为100%,b为碎片离子峰,c为母体离子峰(m/z 最大)

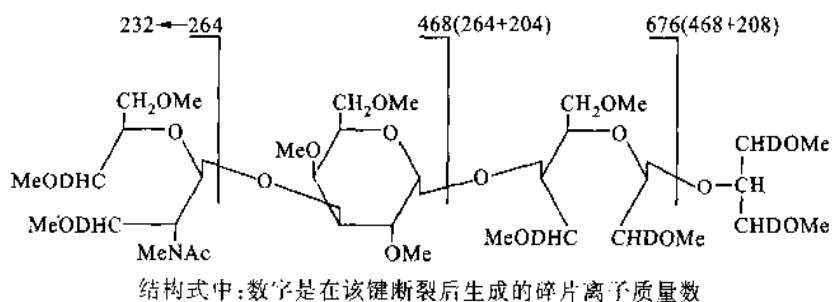
质谱分析的关键是使样品发生电离。最经典的电离方法是在高真空中用高能电子束(70eV或6700 kJ/mol)轰击电子源中的气化样品分子(M),打掉一个电子(e^-)使成正电子自由基($M^{\cdot+}$):



$M^{\cdot+}$ 称分子离子。被分子接受的过剩能量常引起 $M^{\cdot+}$ 的断裂,生成各种分子碎片。此外还有化学电离和解吸或解析电离(desorption ionization)。但化学电离都要求样品加热气化,因此应用上局限性较大,特别

难以用于热稳定性和挥发性差的生物分子。近年发展起来的解吸电离,如激光解吸,快速原子轰击(fast atom bombardment, FAB)无需高温就能使样品进入气相而被电离。在 FAB-MS 中,溶于非挥发性溶剂的生物分子样品在真空下用快速飞行的中性原子(如 Kr, Ar, Cs)使样品分子从溶液中解吸并电离。

FAB-MS 是一项测定寡糖乃至复杂聚糖一级结构的有用技术。在 FAB-MS 中离子化的分子由于内能的传递和分配致使一些糖苷键断裂形成初级离子,进而产生次级离子。这些碎片离子,主要是初级离子将提供有关糖基连接和顺序的信息。推测糖链序列主要依据这些碎片相邻两峰的质量差即糖基质量增加(mass increment)。FAB-MS 法糖链结构分析多采用衍生化样品(derivatized sample),因为它能够给出更多的结构信息。现以高碘酸氧化-FAB-MS 法测定四糖(GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc)的序列为例。质谱分析前,先对样品进行甲基化分析,从而可确定非还原端和还原端分别为 GalNAc 和 Glc,中间为 3-和 4-取代的 Gal。样品经高碘酸氧化,NaBD₄ 还原和全甲基化形成如下结构的衍生物:



此衍生物经 FAB-MS 分析,在质谱图中 m/z 264 和 232 碎片离子峰来自非还原端的 GlcNAc, m/z 232 离子由 m/z 264 离子消去 1 分子甲醇形成。下一个离子峰 m/z 468 是由 264 + 204 形成的,这表明第二残基是 C3 位取代的己醛糖,从标准物得知其质谱峰是 m/z 204,不同取代位置的单糖基会产生不同质量的特征质谱碎片。再下一个离子峰 m/z 676,与前一个峰相比,质量增加为 208,表明第三个残基是 C4 位取代的己醛糖。这样该四糖的序列即可确定。

现在用质谱法能测定高达 40 个残基的聚糖链序列,但一般不能区别残基的异头构型和连接位置。在这方面 NMR 技术是一种极好的互补,¹H NMR 和¹³C NMR 波谱学为解决糖链结构中糖苷键构型问题提供可靠信息。

提 要

糖类是四大类生物分子之一,广泛存在于生物界,特别是植物界。糖类在生物体内不仅作为结构成分和主要能源,复合糖中的糖链作为细胞识别的信息分子参与许多生命过程,并因此出现一门新的学科,糖生物学。

多数糖类具有 $(CH_2O)_n$ 的实验式,其化学本质是多羟醛、多羟酮及其衍生物。糖类按其聚合度分为单糖,1 个单体;寡糖,含 2~20 个单体;多糖,含 20 个以上单体。同多糖是指仅含一种单糖或单糖衍生物的多糖,杂多糖指含一种以上单糖或 / 和单糖衍生物的多糖。糖类与蛋白质或脂质共价结合形成的结合物称复合糖或糖复合物。

单糖,除二羟丙酮外,都含有不对称碳原子(C*)或称手性碳原子,含 C* 的单糖都是不对称分子,当然也是手性分子,因而都具有旋光性,一个 C* 有两种构型:D-和 L-型或 R-和 S-型。因此含 n 个 C* 的单糖有 2^n 个旋光异构体,组成 2^{n-1} 对不同的对映体。任一旋光异构体只有一个对映体,其他旋光异构体是它的非对映体,仅有一个 C* 的构型不同的两个旋光异构体称为差向异构体。

单糖的构型是指离羰基碳最远的那个 C* 的构型,如果与 D-甘油醛构型相同,则属 D 系糖,反之属 L 系糖,大多数天然糖是 D 系糖。Fischer E 论证了己醛糖旋光异构体的立体化学,并提出了在纸面上表示单糖链状立体结构的 Fischer 投影式。许多单糖在水溶液中有变旋现象,这是因为开链的单糖分子内醇基与醛基或酮基发生可逆亲核加成,形成环状半缩醛或半缩酮的缘故。这种反应经常发生在 C5 羟基和 C1

醛基之间,而形成六元环吡喃糖(如吡喃葡萄糖)或 C5 羟基和 C2 酮基之间,形成五元环呋喃糖(如呋喃果糖)。成环时由于羰基碳成为新的不对称中心,出现两个异头差向异构体,称 α 和 β 异头物,它们通过开链形式发生互变并处于平衡中。在标准定位的 Haworth 式中 D-单糖异头碳的羟基在氧环面下方的为 α 异头物,上方的为 β 异头物。实际上不像 Haworth 式所示的那样氧环面上的所有原子都处在同一个平面,吡喃糖环一般采取椅式构象,呋喃糖环采取信封式构象。

单糖可以发生很多化学反应。醛基或伯醇基或两者氧化成羧酸,羰基还原成醇;一般的羟基参与成酯、成醚、氨基化和脱氧等反应;异头羟基能通过糖苷键与醇和胺连接,形成糖苷化合物。例如,在寡糖和多糖中单糖与另一单糖通过 O-糖苷键相连,在核苷酸和核酸中戊糖经 N-糖苷键与嘧啶碱或嘌呤碱相连。

生物学上重要的单糖及其衍生物有 Glc、Gal、Man、Fru、GlcNAc、GalNAc、L-Fuc、NeuNAc(Sia)、GlcUA 等,它们是寡糖和多糖的组分,许多单糖衍生物参与复合糖聚糖链的组成。此外单糖的磷酸脂,如 6-磷酸葡萄糖,是重要的代谢中间物。

蔗糖、乳糖和麦芽糖是常见的二糖。蔗糖是由 α -Glc 和 β -Fru 在两个异头碳之间通过糖苷键连接而成,它已无潜在的自由醛基,因而失去还原,成脎、变旋等性质,并称它为非还原糖。乳糖的结构是 Gal β (1 \rightarrow 4)Glc,麦芽糖是 Gal α (1 \rightarrow 4)Glc,它们的末端葡萄糖残基仍有潜在的自由醛基,属还原糖。环糊精由环糊精葡萄糖基转移酶作用于直链淀粉生成,含 6、7 或 8 个葡萄糖残基,通过 α -1,4 糖苷键连接成环,属非还原糖,由于它的特殊结构被用作稳定剂、抗氧化剂和增溶剂等。

淀粉、糖原和纤维素是最常见的多糖,都是葡萄糖的聚合物。淀粉是植物的贮存养料,属贮能多糖,是人类食物的主要成分之一。糖原是人和动物体内的贮能多糖。淀粉可分直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉分子只有 α -1,4 连键,支链淀粉和糖原除 α -1,4 连键外尚有 α -1,6 连键形成分支,糖原的分支程度比支链淀粉高。纤维素与淀粉、糖原不同,它是由葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的,这一结构特点使纤维素具有适于作为结构成分的物理特性,它属于结构多糖。

肽聚糖是细菌细胞壁的成分,也属结构多糖。它可看成由一种称胞壁肽的基本结构单位重复排列构成。胞壁肽是一个含四肽侧链的二糖单位, $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)\text{MurNAc}$, 二糖单位间通过 β -1,4 连接成多糖链,相邻的多糖链通过转肽作用交联成一个大的囊状分子。青霉素就是通过抑制转肽干扰新的细胞壁形成而起抑菌作用的。磷壁酸是革兰氏阳性细菌细胞壁的特有成分;脂多糖是阴性细菌细胞壁的特有成分。

糖蛋白是一类复合糖或一类缀合蛋白质。许多膜内在蛋白质和分泌蛋白质都是糖蛋白。糖蛋白和糖脂中的寡糖链,序列多变,结构信息丰富,甚至超过核酸和蛋白质。一个寡糖链中单糖种类、连接位置、异头碳构型和糖环类型的可能排列组合数目是一个天文数字。糖蛋白中寡糖链的还原端残基与多肽链氨基酸残基之间的连接方式有: N-糖肽键,如 β -GlcNAc \rightarrow Asn 和 O-糖肽键,如 α -GalNAc \rightarrow Thr/Ser, β -Gal \rightarrow Hyl 和 β -L-Araf \rightarrow Hyp, N-连接的寡糖链(N-糖链)都含有一个共同的结构花式,称核心五糖或三甘露糖基核心, N-糖链可分为复杂型、高甘露糖型和杂合型三类,它们的区别主要在外周链, O-糖链的结构比 N-糖链简单,但连接形式比 N-糖链的多。

糖蛋白中的寡糖链在细胞识别包括细胞粘着、淋巴细胞归巢和精卵识别等生物学过程中起重要作用。

在人红细胞表面上存在很多血型抗原决定簇,其中多数是寡糖链。在 ABO 血型系统中 A、B、O(H) 三个抗原决定簇只差一个单糖残基, A 型在寡糖基的非还原端有一个 GalNAc, B 型有一个 Gal, O 型这两个残基均无。

凝集素是一类非抗体的能与糖类专一结合的蛋白质或糖蛋白,伴刀豆凝集素 A(ConA)、花生凝集素等属植物凝集素;细菌和病毒也有凝集素,如流感病毒含红细胞凝集素。作为各类白细胞 CAM 的选择蛋白家族也属于凝集素。此家族中已知有 L、E、P 三种选择蛋白,它们通过细胞粘着产生多种生物学效应,如免疫应答、炎症反应、肿瘤转移等。

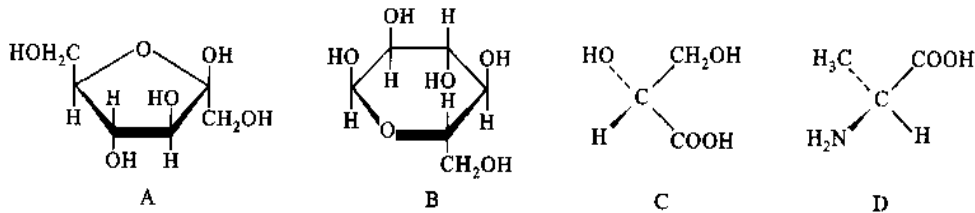
糖胺聚糖和蛋白聚糖是动物细胞外基质的重要成分。糖胺聚糖是由己糖醛酸和己糖胺组成的二糖单位重复构成。多数糖胺聚糖都不同程度地被硫酸化,如 4-硫酸软骨素、硫酸角质素等。糖胺聚糖多以蛋白聚糖形式存在,但透明质酸是例外。蛋白聚糖是一类特殊的糖蛋白,由一条或多条糖胺聚糖链和一个核

心蛋白共价连接而成。有的蛋白聚糖以聚集体(透明质酸分子为核心)形式存在。它们是高度亲水的多价阴离子,在维持皮肤、关节、软骨等结缔组织的形态和功能方面起重要作用。

寡糖链结构分析的一般步骤是:分离提纯待测定的完整糖链,对获得的均一样品用 GLC 法测定单糖组成,根据高碘酸氧化或甲基化分析确定糖苷键的位置,用专一性糖苷酶确定糖苷键的构型。糖链序列可采用外切糖苷酶连续断裂或 FAB-MS 等方法加以测定。

习 题

1. 环状己醛糖有多少个可能的旋光异构体?为什么? [$2^5=32$]
2. 含 D-吡喃半乳糖和 D-吡喃葡萄糖的双糖可能有多少个异构体(不包括异头物)?含同样残基的糖蛋白上的二糖链将有多少个异构体? [20;32]
3. 写出 β -D-脱氧核糖、 α -D-半乳糖、 β -L-山梨糖和 β -D-N-乙酰神经氨酸(唾液酸)的 Fischer 投影式, Haworth 式和构象式。
4. 写出下面所示的(A)、(B)两个单糖的正规名称(D/L, α/β , f/p),指出(C)、(D)两个结构用 RS 系统表示的构型(R/S)。



[(A) β -D-呋喃果糖;(B) α -L-吡喃葡萄糖;(C) R;(D) S]

5. D-葡萄糖的 α 和 β 异头物的比旋($[\alpha]_D^{20}$)分别为 $+112.2^\circ$ 和 $+18.7^\circ$ 。当 α -D-吡喃葡萄糖晶体样品溶于水时,比旋将由 $+112.2^\circ$ 降至平衡值 $+52.7^\circ$ 。计算平衡混合液中 α 和 β 异头物的比率。假设开链形式和呋喃形式可忽略。[α 异头物的比率为 36.5%, β 异头物为 63.5%]
6. 将 500 mg 糖原样品用放射性氰化钾($K^{14}CN$)处理,被结合的 $^{14}CN^-$ 正好是 $0.193 \mu\text{mol}$,另一 500 mg 同一糖原样品,用含 3% HCl 的无水甲醇处理,使之形成还原末端的甲基葡萄糖苷。然后用高碘酸处理这个还原端成为甲基葡萄糖苷的糖原,新产生的甲酸准确值是 $347 \mu\text{mol}$ 。计算(a)糖原的平均相对分子质量,(b)分支的程度(分支点%)。[(a) 2.59×10^6 ;(b) 11.24%]
7. D-葡萄糖在 31°C 水中平衡时, α 吡喃葡萄糖和 β 吡喃葡萄糖的相对摩尔含量分别为 37.3% 和 62.7%。计算 D-葡萄糖在 31°C 时由 α 异头物转变为 β 异头物的标准自由能变化。气体常数 R 为 $8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ 。 [$\Delta G^\circ = -1.31 \text{ kJ/mol}$]
8. 竹子系热带禾本科植物,在最适条件下竹子生长的速度达 0.3 m/d 高,假定竹茎几乎完全由纤维素纤维组成,纤维沿生长方向定位。计算每秒钟酶促加入生长着的纤维素链的单糖残基数目。纤维素分子中每一葡萄糖单位约长 0.45 nm 。 [7 800 残基/s]
9. 经还原可生成山梨醇(D-葡萄糖醇)的单糖有哪些? [L-山梨糖;D-葡萄糖;L-古洛糖;D-果糖]
10. 写出麦芽糖(α 型)、纤维二糖(β 型)、龙胆糖和水苏糖的正规(系统)名称的简单形式,并指出其中哪些(个)是还原糖,哪些(个)是非还原糖。
11. 纤维素和糖原虽然在物理性质上有很大的不同,但这两种多糖都是 $1 \rightarrow 4$ 连接的 D-葡萄糖聚合物,相对分子质量也相当,是什么结构特点造成它们在物理性质上的如此差别?解释它们各自性质的生物学优点。
12. 革兰氏阳性细菌和阴性细菌的细胞壁在化学组成上有什么异同?肽聚糖中的糖肽键和糖蛋白中的糖肽键是否有区别?
13. 假设一个细胞表面糖蛋白的一个三糖单位在介导细胞与细胞粘着中起关键作用。试设计一个简单试验以检验这一假设。[如果糖蛋白的这个三糖单位在细胞相互作用中是关键,则此三糖本身应是细胞粘着的竞争性抑制剂]
14. 糖蛋白中 N-连接的聚糖链有哪些类型?它们在结构上有什么共同点和不同点?
15. 举出两个例子说明糖蛋白寡糖链的生物学作用。
16. 写出人 ABH 血型抗原决定簇的前体结构,指出 A 抗原、B 抗原和 O 抗原(H 物质)之间的结构关系。[答案见表 1-9]

17. 具有重复二糖单位, $\text{GlcUA}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNA}$, 而单位间通过 $\beta(1\rightarrow4)$ 连接的天然多糖是什么? [透明质酸]
18. 糖胺聚糖如硫酸软骨素, 其生物功能之一与该分子在水中所占的体积远比脱水时大这一性质有关。为什么这些分子在溶液中所占体积会这样大?
19. 举例说明内切糖苷酶和外切糖苷酶在聚糖链结构测定中的作用。
20. 一种三糖经 β -半乳糖苷酶完全水解后, 得到 D-半乳糖和 D-葡萄糖, 其比例为 2:1。将原有的三糖用 NaBH_4 还原, 继而使其完全甲基化和酸水解, 然后再进行一次 NaBH_4 还原, 最后用醋酸酐乙酰化, 得到三种产物: ① 2,3,4,6-四甲基-1,5-二乙酰基-半乳糖醇, ② 2,3,4-三甲基-1,5,6-三乙酰基-半乳糖醇, ③ 1,2,3,5,6-五甲基-4-乙酰基-山梨醇。分析并写出此三糖的结构。[D-Gal $\beta(1\rightarrow6)$ D-Gal $\beta(1\rightarrow4)$ D-Glc]

主要参考书

1. 陈惠黎, 王克夷主编. 糖复合物的结构和功能. 上海: 上海医科大学出版社, 1997
2. 张惟杰主编: 糖复合物生化研究技术. 第二版. 杭州: 浙江大学出版社, 1999
3. Cadogan I I G, Ley S V, Pattenden G. Dictionary of Organic Chemistry 6th ed. London: Chapman & Hall (Electronic Publishing Division), 1996
4. Devlin T M. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., 1992
5. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
6. McMurry I. Organic Chemistry. 3rd ed. California: Brooks/Cole Publishing Company, 1992
7. Meyers R (ed). Molecular Biology and Biotechnology—a comprehensive Desk Reference. VCH Publishers, Inc., 1995
8. Preiss J (ed). Carbohydrates: Structure and Function, in "The Biochemistry of Plants". (Stumpf P K, Conn E F, eds-in-chief). New York: Academic Press, 1980, 3
9. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: Freeman W H and Company, 1995
10. Tortora G I, Funke B R, Case C L. Microbiology. 4th ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1992

(徐长法)

第2章 脂 质

一、引 言

(一) 脂质的定义

脂质(lipid,也译脂类或类脂),是一类低溶于水而高溶于非极性溶剂的生物有机分子。对大多数脂质而言,其化学本质是脂肪酸和醇所形成的酯类及其衍生物。参与脂质组成的脂肪酸多是4碳以上的长链一元羧酸,醇成分包括甘油(丙三醇)、鞘氨醇、高级一元醇和固醇。脂质的元素组成主要是碳、氢、氧,有些尚含氮、磷及硫。

(二) 脂质的分类

脂质是根据溶解性质定义的一类生物分子,在化学组成上变化较大,因此给这类物质的分类造成一定困难。按化学组成脂质大体上可分为三大类:

1. 单纯脂质(simple lipid)

单纯脂质是由脂肪酸和甘油形成的酯。它又可分为:

- (1) 三酰甘油或称甘油三酯 由3分子脂肪酸和1分子甘油组成;
- (2) 蜡 主要由长链脂肪酸和长链醇或固醇组成。

2. 复合脂质(compound lipid)

除含脂肪酸和醇外,尚有其他称为非脂分子的成分。复合脂质按非脂成分的不同可分为:

- (1) 磷脂 它们的非脂成分是磷酸和含氮碱(如胆碱,乙醇胺)。磷脂根据醇成分的不同,又可分为甘油磷脂(如磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺等)和鞘氨醇磷脂(简称鞘磷脂);
- (2) 糖脂 其非脂成分是糖(单己糖、二己糖等),并因醇成分不同,又分为鞘糖脂(如脑苷脂,神经节苷脂)和甘油糖脂(如单半乳糖基二酰基甘油、双半乳糖基二酰基甘油)。

鞘氨醇磷脂和鞘糖脂合称为鞘脂类(sphingolipid)。

3. 衍生脂质(derived lipid)

衍生脂质和其他脂质,由单纯脂质和复合脂质衍生而来或与之关系密切,但也具有脂质一般性质的物质,如:

- (1) 取代烃 主要是脂肪酸及其碱性盐(皂)和高级醇,少量脂肪醛、脂肪胺和烃;
- (2) 固醇类(甾类) 包括固醇(甾醇)、胆酸、强心苷、性激素、肾上腺皮质激素;
- (3) 萜 包括许多天然色素(如胡萝卜素),香精油,天然橡胶等;
- (4) 其他脂质 如维生素A、D、E、K,脂酰CoA(见第11章),类二十碳烷(前列腺素、凝血噁烷和白三烯),脂多糖(见第1章),脂蛋白等。

也有人把脂质分为两大类:一类是能被碱水解而产生皂(脂肪酸盐)的称可皂化脂质(saponifiable lipid);另一类是不被碱水解生成皂的称不可皂化脂质(unsaponifiable lipid),类固醇和萜是两类主要的不可皂化脂质。

根据脂质在水中和水界面上的行为不同,可把它们分为非极性(nonpolar)和极性(polar)两大类(表2-1)。

表 2-1 脂质的物理分类

类 别	界面性质	容积性质
非极性脂质	不能分散形成单分子层	不溶
极性脂质		
Ⅰ类:不溶性非膨胀两亲脂	能分散形成稳定的单分子层	不溶或溶解度很低
Ⅱ类:不溶性膨胀两亲脂	能分散形成稳定的单分子层	不溶,在水中膨胀形成液晶
ⅢA类:能形成液晶的可溶性两亲脂	能分散形成不稳定的单分子层,因为可溶于水基质	可溶,当高于 cmc* 时形成微团;低浓度时形成液晶
ⅢB类:不能形成液晶的可溶性两亲脂	能分散形成不稳定的单分子层,因为可溶于水基质	可溶并形成微团,但不形成液晶

* cmc——临界微团浓度

1. 非极性脂质

非极性脂质在水中的溶解度极低,即不具有容积(bulk)可溶性;也不能在空气-水界面或油-水界面分散成单分子层(monolayer),即不具有界面(surface)可溶性(图 2-1)。属于这类的有长链脂肪烃如植烷、胡萝卜素、鲨烯,有大芳香烃如胆甾烷、粪甾烷,长链脂肪酸和长链一元醇形成的酯,长链脂肪酸的固醇酯,长链醇的醚和固醇醚,甘油的长链三醚等。

2. Ⅰ类极性脂质

它具有界面可溶性,但不具有容积可溶性;能掺入膜,但自身不能形成膜(双分子层)。三酰甘油、二酰甘油、长链质子化脂肪酸(—COOH 不解离)、长链正醇和正胺、叶绿醇、视黄醇(维生素 A)、维生素 K 和 E、胆固醇、甾甾醇(24-脱氢胆固醇)、豆固醇、维生素 D、未电离的磷脂酸、短链酸的固醇酯、酸或醇部分小于 4 碳原子长度的蜡(如甲基油酸酯)、神经酰胺等属于这类脂质。

3. Ⅱ类极性脂质(磷脂和鞘糖脂)

它是成膜分子,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂、缩醛磷脂、鞘磷脂、脑苷脂、电离的磷脂酸;还有单酰甘油、 α -羟脂肪酸、甘油单醚、硫脑苷脂、鞘氨醇(碱式)等。它们能形成双分子层和微囊(图 2-1)。

4. Ⅲ类极性脂质(去污剂)

它是可溶性脂质,虽具有界面可溶性,但形成的单分子层不稳定。这类分子在水中低浓度时可单独存在,高于某一浓度[称临界微团浓度(critical micelle concentration, cmc)]时形成小的球状聚集体称微团(micelle)(图 2-1)。属于ⅢA类的有长链脂肪酸钠和钾盐,常见的阴离子去污剂、阳离子去污剂和非离子去污剂、溶血卵磷脂、软脂酰和油酰 CoA、神经节苷脂及鞘氨醇(酸式)等;属于ⅢB类的有结合和游离胆汁盐、硫酸化胆汁醇、梭链孢酸(fusidic acid)钠盐、皂苷、松香皂(rosin soap)和青霉素等。

(三) 脂质的生物学作用

脂质的生物学功能也和它们的化学组成和结构一样是极其多种多样的,按脂质的生物学功能可把脂质分为三大类:

1. 贮存脂质(storage lipid)

属于这一类的是三酰甘油和蜡。在大多数真核细胞中三酰甘油以微小的油滴形式存在于含水的胞质溶胶(cytosol)中。脊椎动物的专门化细胞,称脂肪细胞(adipocyte),贮存大量的三酰甘油,几乎充满了整个细胞。许多植物的种子中存在三酰甘油,为种子发芽提供能量和合成前体。很多生物中油脂是能量的主要贮存形式,它们是高度还原的化合物,1 g 油脂在体内完全氧化将产生 37 kJ(9 kcal),而 1 g 糖或蛋白质只产生 17 kJ 能量。以油脂作为贮存燃料还有一个好处是,有机体不必携带像贮存多糖那样的结合水(hydration water),因为三酰甘油是疏水的。肥胖人的脂肪组织(皮下、腹腔和乳腺中)中积储的三酰甘油可达 15~20 kg,足以供给一个月所需的能量。然而人体以糖原形式贮存的能量不够一天的需要。葡萄糖和糖原的优点是易溶于水,能快速提供代谢所需的能量。某些动物贮存在皮下的三酰甘油不仅作为能储,

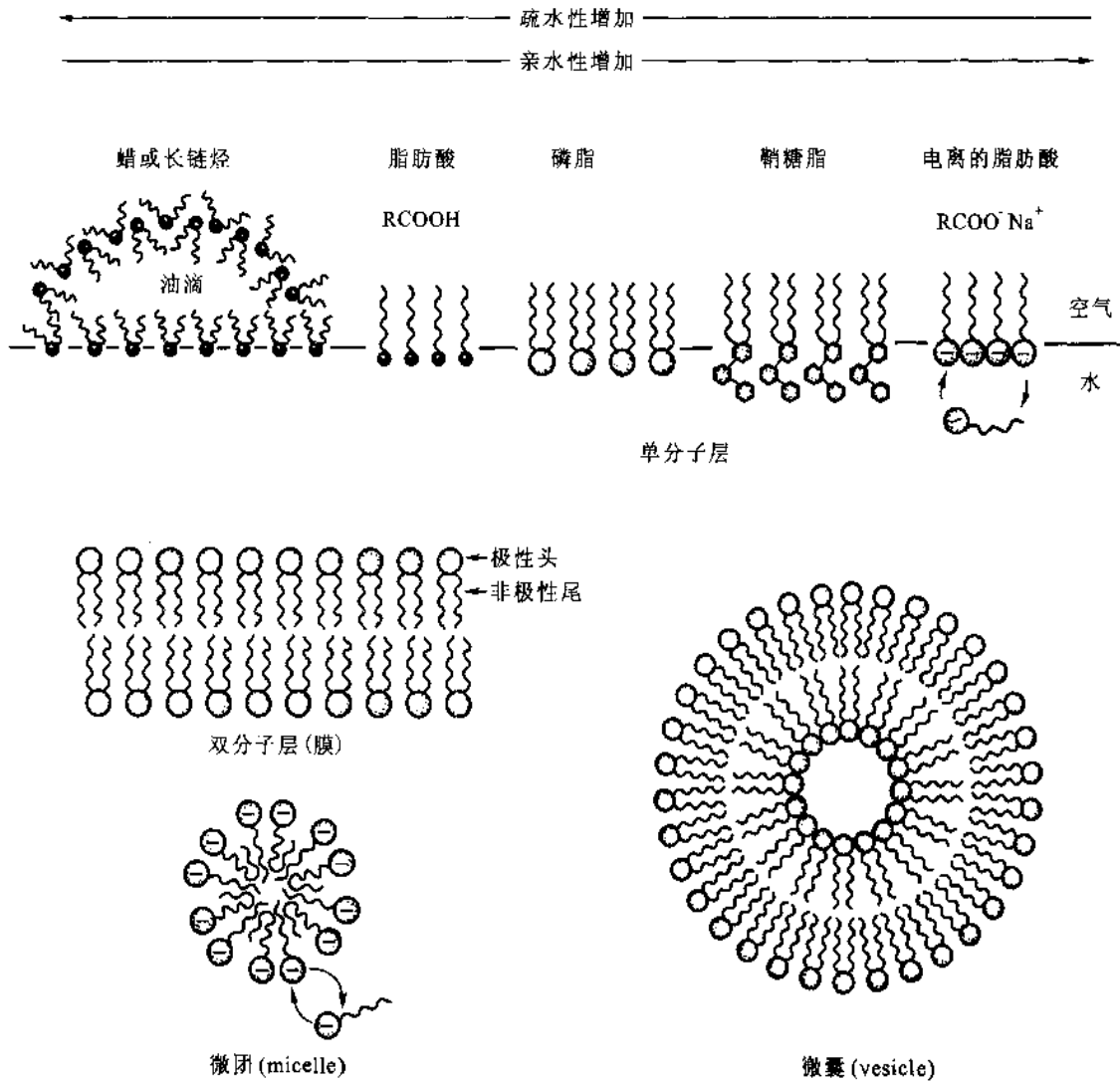


图 2-1 脂质在空气-水界面和水系统中自发形成的几种常见结构

非极性脂质(左上角)如蜡或长链烃形成不分散的油滴,形状似透镜,位于水面上。磷脂和鞘糖脂可形成封闭的微囊,中央是一个水腔。去污剂高浓度($>cmc$)时形成微团

而且作为抗低温的绝缘层。海豹、海象、企鹅和其他的南北极温血动物都填充着大量三酰甘油。冬眠动物(例如熊)在冬眼前积累大量脂肪也用作能储。人和动物的皮下和肠系膜脂肪组织还起防震的填充物作用。

在海洋的浮游生物中蜡是代谢燃料的主要贮存形式。蜡还有其他功能,这与它们排斥水和具有高稠度的性质有关。脊椎动物的某些皮肤腺分泌蜡以保护毛发和皮肤、使之柔韧、润滑并防水。鸟类,特别是水禽,从它们的尾羽腺分泌蜡使羽毛能防水。冬青、杜鹃花和许多热带植物的叶覆盖着一层蜡以防寄生物侵袭和水分的过度蒸发。

2. 结构脂质(structural lipid)

细胞的外周膜(质膜),核膜和各种细胞器的膜总称为生物膜(biomembrane)。各种生物膜的骨架是一样的,主要是由磷脂类构成的双分子层或称脂双层(lipid bilayer)(图 2-1)。参与脂双层构成的膜脂还有固醇和糖脂。这些膜脂在分子结构上的共同特点是具有亲水部分或称极性头(polar head)和疏水部分或称非极性尾(nonpolar tail)。这些具有极性头(亲水)和非极性尾(亲脂)的分子称两亲化合物(amphipathic compound)。极性头有醇基、含氮碱和磷酸基等;非极性尾主要是脂肪酸和脂肪胺(鞘氨醇)的烃链。在水介质中膜脂的极性头和非极性尾的定向,导致膜脂装配成脂双层;脂双层的表面是亲水部分,内部是疏水烃链。脂双层有屏障作用,使膜两侧的亲水性物质不能自由通过,这对维持细胞正常的结构和功能是很重要的,关于生物膜的结构和功能的详细介绍见第 18 章和下册第 21 章。

3. 活性脂质 (active lipid)

贮存脂质和结构脂质是较大量的细胞成分;活性脂质是小量的细胞成分,但具有专一的重要生物活性。它们包括数百种类固醇和萜(类异戊二烯)。类固醇中很重要的一类是类固醇激素,包括雄性激素、雌性激素和肾上腺皮质激素,关于它们的结构和功能见第 17 章。萜类化合物包括对人体和动物的正常生长所必需的脂溶性维生素 A、D、E、K(见第 11 章)和多种光合色素(如类胡萝卜素)。其他活性脂质,有的作为酶的辅助因子或激活剂,如磷脂酰丝氨酸为凝血因子的激活剂;有的作为电子载体(electron carrier)如线粒体中的泛醌(见下册第 24 章)和叶绿体中的质体醌(见下册第 27 章);有的作为糖基载体,如细菌细胞壁肽聚糖合成中的十一-异戊二烯醇磷酸和真核生物糖蛋白糖链合成中的多萜醇磷酸,这些载体有很长的烃链,能与膜脂发生强疏水相互作用,使与之相连的糖基锚定在膜上并参与糖基转移反应(见下册第 25 章);有的作为细胞内信号,例如真核细胞质膜上的磷脂酰肌醇及其磷酸化衍生物(磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸,PIP₂)是胞内信使的储库,PIP₂的水解产物,肌醇-1,4,5-三磷酸和二酰甘油,即是胞内信使(见第 17 章);类二十碳烷,如前列腺素具有很强的激素样作用。

二、脂 肪 酸

(一) 脂肪酸的种类

从动、植物和微生物中分离出来的脂肪酸已有百多种。在生物体内大部分脂肪酸都以结合形式,如甘油三酯、磷脂、糖脂等存在,但也有少量脂肪酸以游离状态存在于组织和细胞中。

脂肪酸(fatty acid, FA)是由一条长的烃链(“尾”)和一个末端羧基(“头”)组成的羧酸。烃链多数是线形的,分支或含环的为数很少。烃链不含双键(和三键)的为饱和脂肪酸(saturated FA),含一个或多个双键的为不饱和脂肪酸(unsaturated FA)。只含单个双键的脂肪酸称单不饱和脂肪酸(monounsaturated FA);含两个或两个以上双键的称多不饱和脂肪酸(polyunsaturated FA)。不同脂肪酸之间的主要区别在于烃链的长度(碳原子数目)、双键数目和位置。每个脂肪酸可以有通俗名(common name),系统名(systematic name)和简写符号(表 2-2)。简写的一种方法是,先写出脂肪酸的碳原子数目,再写双键数目,两个数目之间用冒号(:)隔开。如[正]十八[烷]酸(硬脂酸)的简写符号为 18:0,十八[碳]二烯酸(亚油酸)的符号为 18:2。双键位置用 Δ(delta)右上标数字表示,数字是指双键键合的两个碳原子的号码(从羧基端开始计数)中较低者,并在号码后面用 c(*cis*, 顺式)* 和 t(*trans*, 反式)标明双键的构型。例如顺,顺-9,12-十八烯酸(亚油酸)简写为 18:2Δ^{9c,12c}。

某些天然脂肪酸见表 2-2。

(二) 天然脂肪酸的结构特点

来自动物的脂肪酸结构比较简单,碳骨架(carbon skeleton)为线形,双键数目一般为 1~4 个,少数脂肪酸多达 6 个。细菌所含的脂肪酸绝大多数是饱和的,少数为单烯酸,多于一个双键的极少,有些含有分支的甲基,环丙烷环或环丙烯环。植物界特别是高等植物中不饱和脂肪酸比饱和脂肪酸丰富,植物脂肪酸除含烯键外,可含炔键、羟基、酮基、环氧基或环戊烯基等(表 2-2)。

天然脂肪酸骨架的碳原子数目几乎都是偶数,这是因为在生物体内脂肪酸是以二碳单位(乙酰 CoA 形式)从头合成的(见下册第 29 章)。奇数碳原子的脂肪酸在陆地生物中含量极少,但在某些海洋生物中有相当量存在。天然脂肪酸碳骨架长度为 4~36 个碳原子,多数为 12~24 个碳,最常见的为 16 和 18 碳,如软脂酸、硬脂酸和油酸等。低于 14 碳的脂肪酸主要存在于乳脂中。

* 词头 *cis* 和 *trans* 系拉丁文, *cis* 意思是“在同侧”, *trans* 是“交叉”即“在异侧”; *cis* 和 *trans* 也可分别用 Z(德文 *zusammen*, “一起”)和 E(德文 *entgegen*, “相对”)代替,特别是对二取代基和四取代基(不包括氮)的双键。

表 2-2 某些天然存在的脂肪酸

通俗名	系统名	简写符号	结 构	熔点/℃	存 在
1. 饱和脂肪酸					
酪酸 (butyric) ^a	<i>n</i> -丁酸 (<i>n</i> -butanoic)	4:0	CH ₃ (CH ₂) ₂ COOH	-7	[牛]乳脂
羊油酸 (caproic)	<i>n</i> -己酸 (<i>n</i> -hexanoic)	6:0	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	-3.4	乳脂、可可油
羊脂酸 (caprylic)	<i>n</i> -辛酸 (<i>n</i> -octanoic)	8:0	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	16.5	乳脂、可可油
羊蜡酸 (capric)	<i>n</i> -癸酸 (<i>n</i> -decanoic)	10:0	CH ₃ (CH ₂) ₈ COOH	31.6	棕榈油、乳脂
月桂酸 (lauric)	<i>n</i> -十二酸 (<i>n</i> -dodecanoic)	12:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	44.2	可可油
[肉]豆蔻酸 (myristic)	<i>n</i> -十四酸 (<i>n</i> -tetradecanoic)	14:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	53.9	肉豆蔻油、乳脂
棕榈酸(软脂酸) (palmitic)	<i>n</i> -十六酸 (<i>n</i> -hexadecanoic)	16:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	63.1	动、植物油脂
硬脂酸 (stearic)	<i>n</i> -十八酸 (<i>n</i> -octadecanoic)	18:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	69.6	动、植物油脂
花生酸 (arachidic)	<i>n</i> -二十酸 (<i>n</i> -eicosanoic)	20:0	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	76.5	花生油
山萘酸 (behenic)	<i>n</i> -二十二酸 (<i>n</i> -docosanoic)	22:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	81.5	山萘油 (benoil) ^b
木蜡酸 (lignoceric)	<i>n</i> -二十四酸 (<i>n</i> -tetracosanoic)	24:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	84.0	海红豆 ^c 籽油、花生油
蜡酸(蜂酸) (cerotic)	<i>n</i> -二十六酸 (<i>n</i> -hexacosanoic)	26:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₄ COOH	88.5	蜂蜡、植物蜡如亚麻蜡
褐煤酸 (motanic)	<i>n</i> -二十八酸 (<i>n</i> -octacosanoic)	28:0	CH ₃ (CH ₂) ₂₆ COOH	93-94	蜂蜡、巴西棕榈蜡、竹蜡
2. 单不饱和脂肪酸(单烯酸)					
肉豆蔻油酸 (myristoleic)	十四碳-9-烯酸(顺) (<i>cis</i> -9-tetradecenoic)	14:1Δ ^{9c}	CH(CH ₂) ₃ CH=CH ₂ CH ₃ (CH ₂) ₇ COOH	-4.5~-4	<i>Pycnanthus kombo</i> 种子油
棕榈油酸 (palmitoleic)	十六碳-9-烯酸(顺) (<i>cis</i> -9-hexadecenoic)	16:1Δ ^{9c}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₇ COOH	-0.5~-0.5	乳脂、海藻类
油酸(oleic)	十八碳-9-烯酸(顺) (<i>cis</i> -9-octadecenoic)	18:1Δ ^{9c}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₇ COOH	13.4	橄榄油等、分布广泛
顺型异油酸或称萝 摩酸(asclepic)	十八碳-11-烯酸(顺) (<i>cis</i> -11-octadecenoic)	18:1Δ ^{11c}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₉ COOH	13.4~14.4	乳酸杆菌 (<i>L. arabinosus</i>)
反型异油酸或称瓦 克岑酸(vaccenic)	十八碳-11-烯酸(反) (<i>trans</i> -11-octadecenoic)	18:1Δ ^{11t}	CH ₃ (CH ₂) ₅ C ^H = C(CH ₂) ₉ COOH H	43.5~44.1	牛及其他动物脂肪
鳕油酸(gadoleic)	二十碳-9-烯酸(顺) (<i>cis</i> -9-eicosenoic)	20:1Δ ^{9c}	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₇ COOH	23~23.5	鱼油
贡多酸(gondoic)	二十碳-11-烯酸(顺) (<i>cis</i> -11-eicosenoic)	20:1Δ ^{11c}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₉ COOH	23~24	十字花科种子油、鱼油
芥子酸(erucic)	二十二碳-13-烯酸(顺) (<i>cis</i> -13-docosenoic)	22:1Δ ^{13c}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₁₁ COOH	33~35	十字花科种子油、菜油
神经酸(nervonic)或 称鲨油酸(selacholeic)	二十四碳-15-烯酸(顺) (<i>cis</i> -15-tetracosenoic)	24:1Δ ^{15c}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH ₂ CH(CH ₂) ₁₃ COOH	42~43	神经组织、鱼肝油

续表

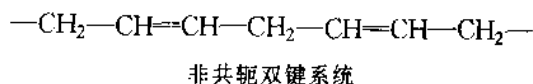
通俗名	系统名	简写符号	结 构	熔点/℃	存 在
3. 多不饱和脂肪酸(多烯酸和炔酸)					
乌柏酸 (stillingic)	十碳-2,4-二烯酸(反,顺) (<i>trans, cis</i> -2,4-decadienoic)	10:2 $\Delta^{2,4c}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-$ $\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{C}=\text{CCOOH} \\ \text{H} \end{array}$	—	乌柏油
亚油酸 (linolic)	十八碳-9,12-二烯酸(顺,顺) (<i>cis, cis</i> -9,12-octadecadienoic)	18:2 $\Delta^{9c,12c}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	5	大豆油、亚麻子油等
α -亚麻酸(亚麻酸) (α -linolenic)	十八碳-9,12,15-三烯酸(全顺) (all <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoic)	18:3 $\Delta^{9c,12c,15c}$	$\text{CH}_3(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	-11	亚麻子油等
γ -亚麻酸 (γ -linolenic)	十八碳-6,9,12-三烯酸(全顺) (all <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoic)	18:3 $\Delta^{6c,9c,12c}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	-14.4	月见草种子油、动物脂中有微量存在
α -桐油酸 (α -eleostearic)	十八碳-9,11,13-三烯酸(顺,反,反) (<i>cis, trans, trans</i> -9,11,13-octadecatrienoic)	18:3 $\Delta^{9c,11t,13t}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{C}=\text{C})_2\text{CH} \\ \text{H} \end{array}$ $=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	49	桐油、苦瓜子油
花生四烯酸 (arachidonic)	二十碳-5,8,11,14-四烯酸(全顺) (all <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoic)	20:4 $\Delta^{5c,8c,11c,14c}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-49	卵磷脂、脑磷脂
EPA	二十碳-5,8,11,14,17-五烯酸(全顺) (all <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoic)	20:5 $\Delta^{5c,8c,11c,14c,17c}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	-54 ~ -53	鱼油、动物磷脂
DHA	二十二碳-4,7,10,13,16,19-六烯酸(全顺) (all <i>cis</i> -docosahexaenoic)	22:6 $\Delta^{4c,7c,10c,13c,16c,19c}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$	-45.5 ~ -44.1	鱼油、动物磷脂
衣散酸(isanic)或称生红酸(erythrogenic)	十八碳-17-烯-9,11-二炔酸 (octadec-17-ene-9,11-diyonic)		$\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	39.5	<i>Onguekoagore</i> 种子
4. 含羟基和酮基的脂肪酸					
乳酸酸(lactarinic)	十八碳-6-酮酸 (6-oxo-octadecanoic)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	86	乳菇属(<i>Lactarius</i>)
蓖麻油酸(ricinoleic)	12-羟十八碳-9-烯酸(顺) (12-hydroxy- <i>cis</i> -9-octadecenoic)		$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\overset{\text{OH}}{\text{CH}}\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	5.5	蓖麻油

续表

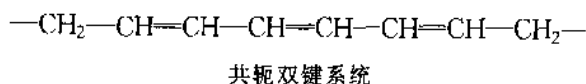
通俗名	系统名	结 构	熔点/°C	存 在
脑羟脂酸或称脑酮酸 (cerebronic)	2-羟二十四酸(R型) (2-hydroxytetraacosanoic) (R-form)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\overset{\text{OH}}{\text{C}}\text{HCOOH}$	99.5~100	鞘糖脂(脑、小麦、玉米等)
5. 含分支和环状结构的脂肪酸				
结核硬脂酸 (tuberculostearic)	10R-甲基十八酸 (10R-methyloctadecanoic)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	12.8~13.4	结核杆菌蜡
乳杆菌酸(lactobacillic)	11R,12S-亚甲基十八酸 (11R,12S-methyleneoctadecanoic)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}\text{H}-\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	33.6~35	干酪乳杆菌(L. casei)
(+)-斑鸠菊酸 (+)-(vernolic)	12S,13R-环氧-十八碳-9-烯酸(顺)(12S,13R-epoxycis-9-octadecenoic)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{H}-\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	32.5	驱虫斑鸠菊(Vernonia anthelmintica)
大风子酸(gynocardic) ^d	13-环戊基-十三烷酸(13-cyclopentyl-tridecanoic)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH} \\ \quad \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	—	大风子科 ^d 的Gynocardia属的种子油(大风子油)
大风子油酸(晁模酸)(chaulmoogric)	13-(2'-环戊烯基)-十三烷酸[13-(2'-cyclopentenyl)-tridecanoic]	$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH} \\ \quad \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	68.5 [(±)型]	大风子科的hydnocarpus属的种子油如晁模油
副大风子油酸(hydnocardic)	11-(2'-环戊烯基)-十一烷酸[11-(2'-cyclopentenyl)-undecanoic]	$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH} \\ \quad \diagdown \\ \text{CH}-(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH} \\ \quad \diagup \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$	58~59 [(±)型]	大风子科的hydnocarpus属的种子油

a. 表中脂肪酸的英文名省去 acid; b. 辣木属(Moringa)植物的种子油; c. 海红豆的拉丁名为 Adenanthera pavonina; d. gynocardic 和 chaulmoogric 常同译为大风子酸,它们存在于大风子科(Flacourtiaceae)某些植物的种子油中,前者是饱和酸,可译为大风子酸,后者含一烯键,可译为大风子油酸或音译晁模酸。hydnocardic 多译为副大风子酸,最好译为副大风子油酸,因为它也含一烯键。大风子油酸和副大风子油酸曾长期被用于治疗麻风病。

在大多数单不饱和脂肪酸中双键的位置在 C9 和 C10 之间(Δ^9)。在多不饱和脂肪酸中通常一个双键也位于 Δ^9 ,其余双键多位于 Δ^9 和烃链的末端甲基之间,如 Δ^{12}, Δ^{15} 。分子中双键安排的形式多数属于非共轭系统或称 1,4-戊二烯结构(1,4-pentadiene structure),如亚油酸、亚麻酸中二个双键之间插入一个亚甲基:



少数属于共轭系统(conjugated system),如乌柏酸和 α -桐油酸中,单、双键交替排列:



这两个双键系统在化学反应性上有明显差异。非共轭系统中二个双键之间的亚甲基可直接发生化学反应,形成自由基(radical)。共轭双键系统都很活泼,因为 π 电子有相当大的离域作用(delocalization)。具有

这种系统的脂肪酸很容易发生聚合作用。含桐油酸的桐油被用于油漆工业就是基于这一性质。视黄醇和胡萝卜素都是生物分子中具有共轭系统的突出例子,它们的双键系统在视网膜的视觉过程中起着重要作用(见第11章)。

天然脂肪酸中的双键多为顺式构型,少数是反式构型,如反式异油酸、乌柏酸和 α -桐油酸(表2-2)中存在的。

图2-2示出几个典型天然脂肪酸的立体结构。

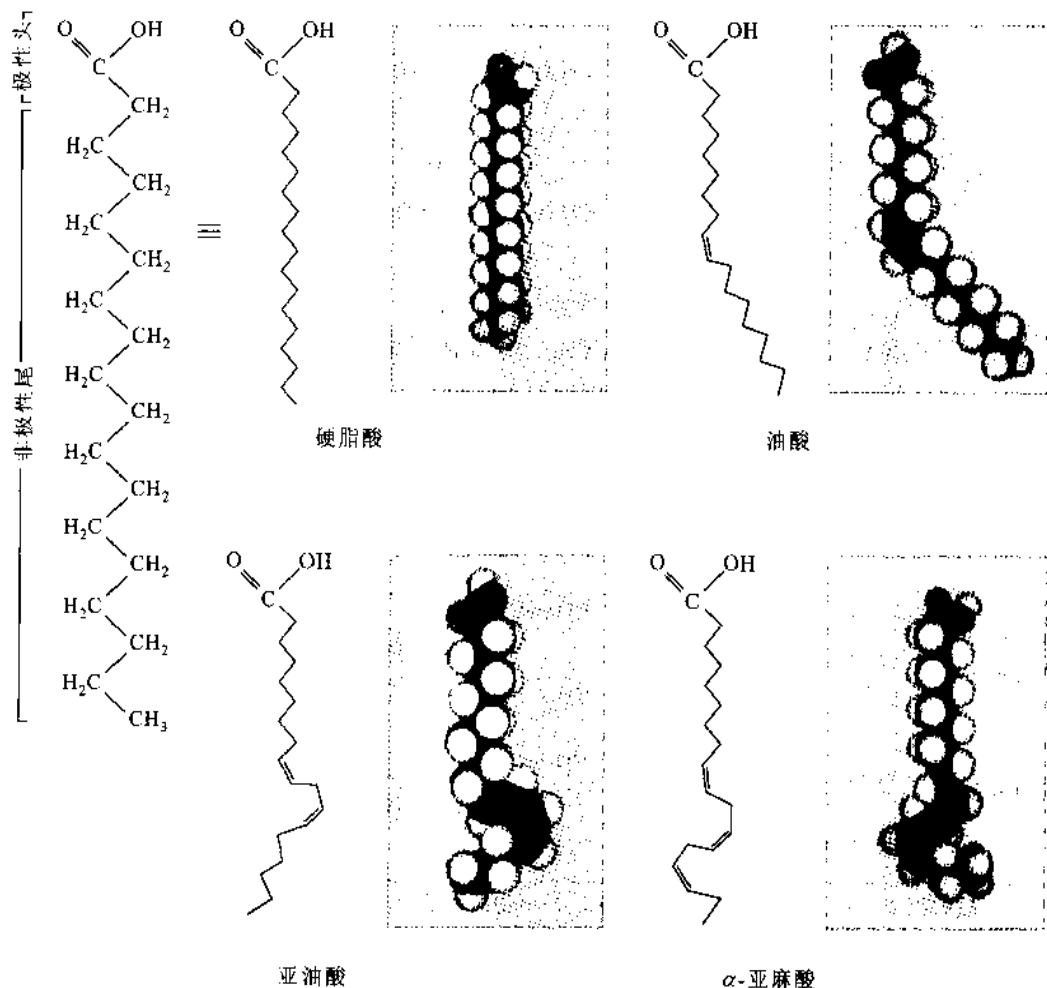


图2-2 几个典型脂肪酸的立体结构(空间填充模型)

饱和与不饱和脂肪酸有着十分不同的构象。饱和脂肪酸中烃链的柔性很大,能以很多种构象形式存在,因为碳骨架中每个单键可以完全自由旋转。完全伸展的烃链相邻原子的位阻(steric hindrance)最小,能量最低,是饱和脂肪酸最可能的构象,如图2-2中所示的硬脂酸。不饱和脂肪酸烃链由于双键不能旋转,出现一个或多个结节(kink)。一个顺式构型的双键在烃链中产生约 30° 的刚性弯曲(图2-2和图2-3),而反式构型与饱和链的伸展型更相似(图2-3)。

顺式不饱和脂肪酸与某些催化剂一起加热能变为反式,例如油酸在亚硝酸存在下容易转变为反油酸(elaidic acid, $18:1\Delta^9$),后者有较高的熔点($43\sim 45^\circ\text{C}$)。虽然反油酸不是天然存在的脂肪酸,但在植物油催化氢化时有相当量形成。

(三) 脂肪酸的物理和化学性质

脂肪酸和含脂肪酸化合物的物理性质很大程度上决定于脂肪酸烃链的长度与不饱和程度。非极性烃链是造成脂肪酸在水中溶解度低的原因;烃链愈长,溶解度愈低,例如 20°C 时己酸(6:0)9.7mg/g水,月桂

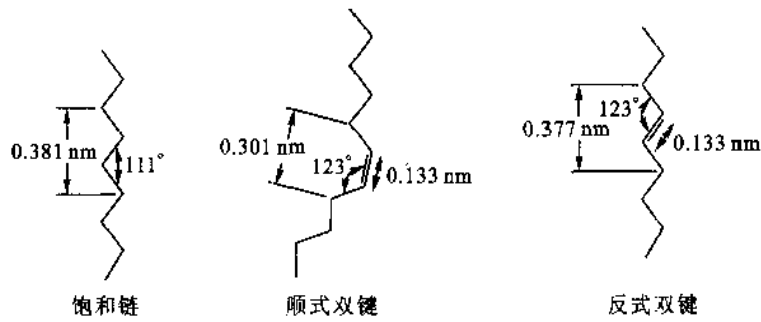


图 2-3 脂肪酸中双键的几何结构

酸(12:0)0.055mg/g 水,硬脂酸 0.003mg/g 水,远比葡萄糖(830mg/g 水)低。脂肪酸的羧基是极性的,在中性 pH 时电离,因此短链脂肪酸(少于 10 碳)略能溶于水。

脂肪酸和含脂肪酸化合物的熔点也受烃链长度和不饱和程度的影响。在室温(25℃)下,12:0 到 24:0 饱和脂肪酸为蜡状固体,同样链长的不饱和脂肪酸为油状液体。处于完全伸展型构象的脂肪酸能紧密地装配(package)成近乎晶状排列,所有的原子沿长向与相邻分子的原子处于范德华接触(见第 6 章)中,含一个或多个结节的不饱和脂肪酸不能像饱和脂肪酸那样紧密组装,因此分子间的相互作用被减弱。因为破坏有序性差的不饱和脂肪酸排列所需的热能较少,所以熔点比相同链长的饱和脂肪酸低,并且对相同链长的不饱和脂肪酸,双键愈多熔点愈低(表 2-2)。顺式异构体的熔点又比反式异构体低,例如前面提到的油酸和反油酸。

在脊椎动物中游离的脂肪酸是以与蛋白质载体(血清清蛋白)结合的形式参与血循环的。以酯或酰胺形式存在的脂肪酸(甘油三酯、磷脂、鞘脂等)其溶解度更小。

脂肪酸可以发生氧化和过氧化,不饱和脂肪酸在双键处可以发生加成如卤化和氢化。这些化学反应将在“三酰甘油的物理和化学性质”部分进一步叙述。

(四) 脂肪酸盐与乳化作用

脂肪酸盐(如钠皂和钾皂)属Ⅲ类极性脂质,具有亲水基(电离的羧基)和疏水基(长的烃链),是典型的两亲化合物,是一种离子型去污剂(ionic detergent)。属于离子型去污剂的还有天然的胆汁酸盐(脱氧胆酸钠),人工合成的十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)等(图 2-4)。去污剂都是两亲分子,在油水

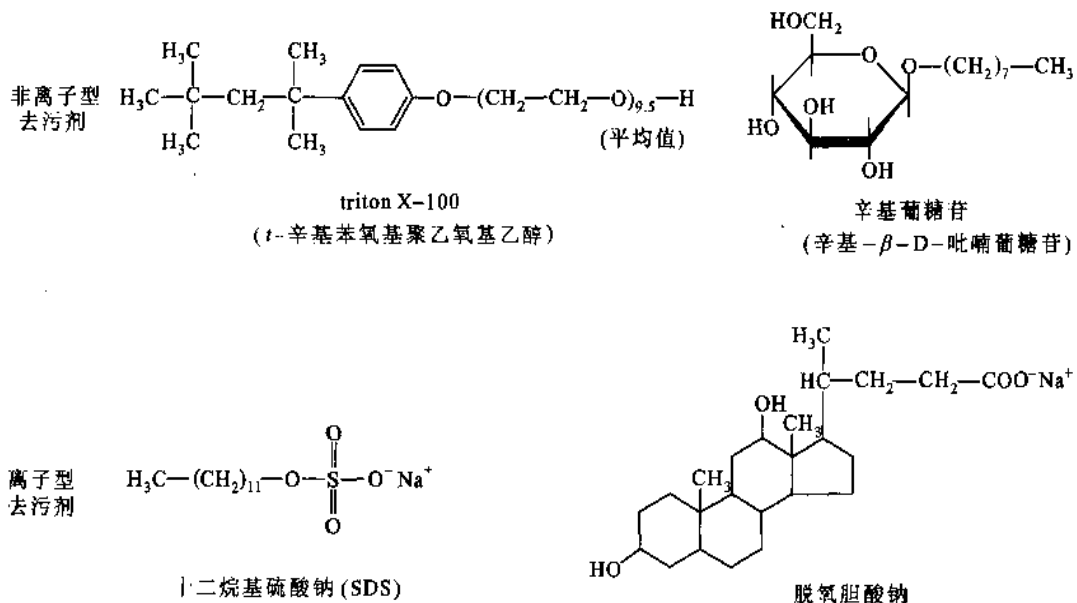


图 2-4 几种常用去污剂的结构

混合物中,疏水部分(hydrophobic part)被吸引到油(或烃类),亲水部分(hydrophilic part)被吸引到水,在油水界面处形成单分子层(图 2-5),由于去污剂是可溶性脂,当浓度增加(大于 cmc)时,在水中倾向于形成微团,亲水部分朝外,疏水部分聚集在中心。搅拌油水混合物时,大堆的油可分散成细小油滴,如果无去污剂存在,油滴很快聚集成原来的油层,然而有去污剂存在,油滴被裹上一层去污剂分子,即油滴处于微团中(图 2-5)。这样,油滴作为亲水物体悬于水中而成乳胶(emulsion),此过程称为乳化(emulsification)。去污剂也称乳化剂。用于清洁时,形成的乳胶(含油)则被濯去。从能量角度看,去污剂是一种表面活性剂(surfactant)。它能降低油滴的界面张力,也即在不改变界面积(即不改变分散度)的情况下能降低系统的表面能(界面张力与界面积的乘积),使分散系统得以稳定。

去污剂除用于清洁外,也用于生化实验。离子型去污剂如 SDS 在高浓度时能使蛋白质完全变性,多肽链处于伸展状态。SDS 凝胶电泳中变性蛋白质的迁移率是其相对分子质量的可靠量度(见第 7 章)。非离子型去污剂如 Triton X-100(商品名)和辛基葡糖苷(图 2-4)在不同浓度以不同方式起作用。这些物质在高于临界微团浓度(cmc)时,能使生物膜溶解,形成以去污剂为主并掺有膜脂、膜蛋白的混合微团;低于 cmc 时一般不引起蛋白质变性,不形成微团,但能从膜中溶解膜结合蛋白,有利于膜蛋白进行分离纯化。

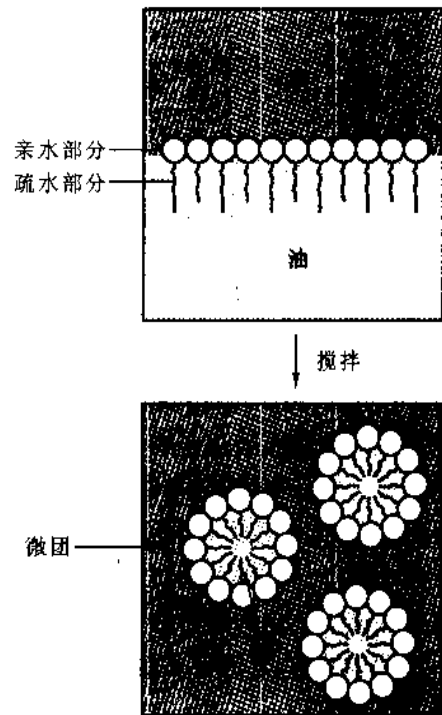


图 2-5 去污剂通过形成微团乳化油和烃

(五) 必需多不饱和脂肪酸

人体及哺乳动物能制造多种脂肪酸,但不能向脂肪酸引入超过 Δ^9 的双键,因而不能合成亚油酸和亚麻酸。因为这两种脂肪酸对人体功能是必不可少的,但必须由膳食提供,因此被称为必需脂肪酸(essential fatty acid)。

亚油酸和亚麻酸(α -亚麻酸)属于两个不同的多不饱和脂肪酸(PUFA)家族: $\omega-6$ ($\omega-6$)和 $\omega-3$ ($\omega-3$)系列。 $\omega-6$ 和 $\omega-3$ 系列*是分别指第一个双键离甲基末端6个碳和3个碳的PUFA。

亚油酸是 $\omega-6$ 家族的原初成员(primary member),在人和哺乳类体内能将它转变为 γ -亚麻酸,并继而延长为花生四烯酸(见下册第29章)。后者是维持细胞膜的结构和功能所必需的,也是合成一类生理活性脂质,类二十碳烷化合物的前体。如果发生亚油酸缺乏症,则必须从膳食中获得 γ -亚麻酸或花生四烯酸,因此在某种意义上它们也是必需脂肪酸。

α -亚麻酸是 $\omega-3$ 家族的原初成员。由膳食供给亚麻酸时,人体能合成 $\omega-3$ 系列中的20碳和22碳成员:二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。体内许多组织含有这些重要的 $\omega-3$ PUFA;DHA在眼的视网膜和大脑皮层中特别活跃。大脑中约一半DHA是在出生前积累的,一半是在出生后积累的,这表明脂质在怀孕和哺乳期间的重要性。

人体内 $\omega-6$ 和 $\omega-3$ PUFA不能互相转变。临床研究表明, $\omega-6$ PUFA能明显降低血清胆固醇水平,但降低甘油三酯的效果一般,而 $\omega-3$ PUFA降低血清胆固醇水平的能力不强,但能显著地降低甘油三酯水平。它们对血脂水平的不同影响的生化机制尚不清楚。膳食中 $\omega-6$ PUFA缺乏将导致皮肤病

* 化学上脂肪酸骨架碳的编号一般从羧基末端开始;但描述双键的取代,编号从甲基末端开始,这样第一个(仅此一个)双键的位置用 ω (omega)后面的一个数字表示,例如亚油酸可写成18:2 $\omega-6$,这是因为脂肪酸碳链的延伸发生在羧基端,而甲基端不变化,例如 $\omega-3$ 脂肪酸被延伸时,其衍生物仍属 $\omega-3$ 系列,因而方便脂肪酸的命名。

变, $\omega-3$ PUFA 缺乏将导致神经和视觉疑难症和心脏疾病。此外, PUFA 缺乏会引起生长停滞, 生殖衰退和肾、肝功能紊乱。

大多数人可以从膳食中获得足够的 $\omega-6$ PUFA(脂质形式), 但可能缺乏最适量的 $\omega-3$ PUFA。有些学者认为, 膳食中这两类脂肪酸的理想比例是 $4 \sim 10$ g $\omega-6$ PUFA:1 g $\omega-3$ PUFA。 $\omega-6$ 和 $\omega-3$ PUFA 的主要膳食来源见表 2-3。

表 2-3 $\omega-6$ 和 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸的来源

$\omega-6$	
亚油酸	植物油(葵花籽、大豆、棉籽、红花籽、玉米胚、小麦胚、芝麻、花生、油菜籽)
γ -亚麻酸和花生四烯酸	肉类, 玉米胚油等(或在体内由亚油酸合成)
$\omega-3$	
α -亚麻酸	油脂(芝麻、胡桃、大豆、小麦胚、油菜籽) 种子, 坚果(芝麻、大豆、胡桃)
EPA 和 DHA	人乳 海洋动物: 鱼(鲑、鲱、鲱、沙丁鱼)等, 贝类, 甲壳类(虾、蟹等) (或在体内由 α -亚麻酸合成)

(六) 类二十碳烷

类二十碳烷或称类二十烷酸(eicosanoid, eikosi 是希腊文的二十)是由 20 碳 PUFA(至少含三个双键)衍生来的, 因为它们都含 20 个碳原子, 因此得名。这些化合物包括几类信号分子: 前列腺素, 凝血噁烷和白三烯。人和哺乳动物的很多组织和细胞能合成它们。合成的前体主要是花生四烯酸($20:4\omega-6$), 少量是 γ -高亚麻酸(γ -homolinolenic acid, $20:3\Delta^{8c, 11c, 14c}$ 或 $20:3\omega-6$) 和 EPA($20:5\omega-3$)。花生四烯酸从膜磷脂释放而来, 当细胞受到某些外来信号(如组织损伤)作用时。前列腺素, 前列环素和凝血噁烷是经环加氧酶(cyclooxygenase)途径从前体合成; 白三烯及其他羟二十碳四烯酸(HETE)是经脂加氧酶(lipoxygenase)途径从前体衍生。关于类二十碳烷生物合成的细节见下册第 29 章。

类二十碳烷是体内的局部激素(local hormone), 效应一般局限在合成部位的附近, 半寿期(half-life)只有几十秒到几分钟。在很低浓度(n mol/L \sim p mol/L 数量级)则能起作用, 同一物质在不同的组织可以产生不同的效应。

前列腺素(prostaglandin, PG)是瑞典学者 Ulf von Euler 于 20 世纪 30 年代最先发现的。他观察到人精液的脂提取物中含有活性物质, 当把它注射到动物体内时, 引起平滑肌收缩和血压下降。因为当时他以为这些物质源自前列腺(prostate), 因此称它们为前列腺素。后来证明这类物质广泛地分布于人和动物组织。

最先被分离的两个前列腺素分别称前列腺素 E 和 F, 因为它们优先溶于乙醚(E, ether)和磷酸盐缓冲液(F, fosfat, 瑞典文)。现在分别用缩写 PGE 和 PGF 表示这两个化合物。所有其他的前列腺素也都在 PG 后面加一个大写字母来表示。前列腺烷酸可看作它们的母体化合物(parent compound), 含一个五碳饱和环和两条侧链; 带羧基的七碳链与环的 C8 相连, 虚楔形键表示突出环面之下, 八碳链连接于环的 C12, 实楔形键表示突出环面之上(图 2-6)。天然前列腺素中发现 7 种环的取代类型, 分别用 A、B、D、E、F、G(H) 和 I 表示。PGA 和 PGB 在环的 C9 含一个酮基和一个双键(分别在 10, 11 位和 12, 8 位); PGD 在 C9 有一个羟基; C11 一个酮基; PGE 与之相反, 在 C9 有一个酮基, C11 一个羟基; PGF 在 C9 和 C11 各有一个羟基。PGG 和 PGH 具有相同的环结构, 环戊烷内过氧化物(endoperoxide), 它们的不同仅在侧链 C15 上的取代基, PGG 取代的是一个过氧羟基($-OOH$), PGH 是一个羟基。PGI 具有一个双环结构, 环戊烷环 C9 上的氧与侧链的 C6 相连形成第二个五元环(图 2-6)。PGF 名称(如 $PGF_{2\alpha}$)中右下标的希腊字母 α 表示五碳环中 C9 上的羟基突出环面之下与羧基同侧; 希腊字母仅用于 F 类。天然存在的 F 类前列腺

素都是 α 构型的, 即 F_{α} 。右下标的数字指环外两条侧链上碳-碳双键的数目。在含 1 个双键的 PG(1-系列) 中双键处于 13,14 位(反式), 此系列由 γ -高亚麻酸衍生而来; 2-系列(衍生自花生四烯酸) 中双键位于 5,6(顺)和 13,14(反), 3-系列(来自 EPA) 中双键位置在 5,6(顺), 13,14(反)和 17,18(顺)。

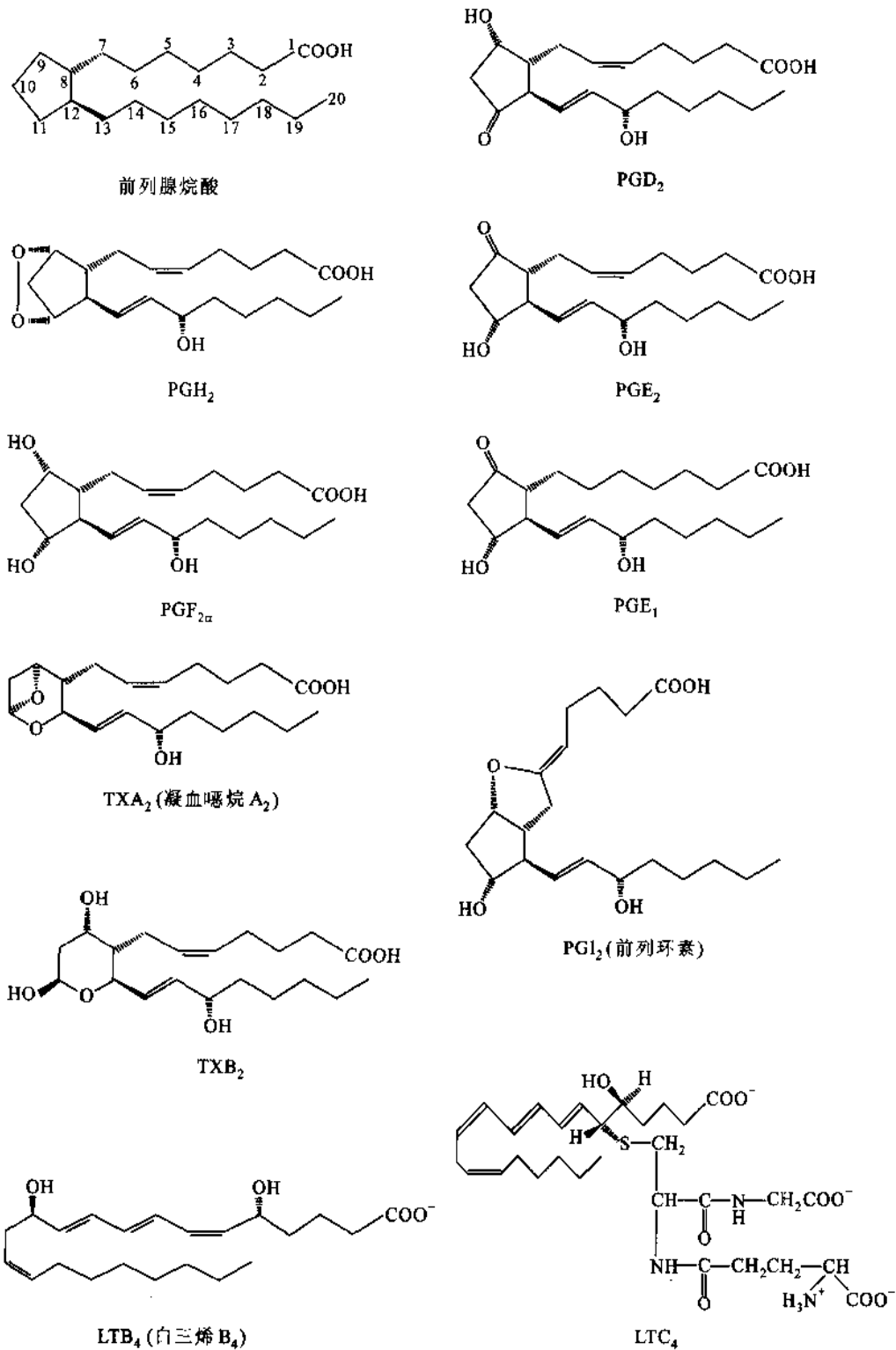


图 2-6 几种常见类二十碳烷的结构

前列腺素能升高体温(发烧), 促进炎症(并产生疼痛), 调节血流进入特定器官, 控制跨膜转运, 调整突触传递, 诱导睡眠, 刺激分娩和月经期间子宫肌肉收缩。已证实在许多组织中前列腺素是通过专一性细胞

受体调节胞内信使分子的合成而起作用的。例如 PGF_1 能促进某些细胞中腺苷酸环化酶的活性, PGF_2 可提高靶细胞中 $3',5'$ -环鸟苷酸(cGMP)的水平(见下册第 39 章)。虽然前列腺素作用的分子机制知道得还不多,但它们的生理作用已被用于实践。例如 PGF_2 被用于足月孕妇的引产,也用于诱导中期流产或死胎分娩。前列腺素还用于畜牧业,诱导一组雌畜同时进入发情期。

前列腺素 PGI_2 被称为前列环素(prostacyclin),它从花生四烯酸合成,是血管内皮产生的主要前列腺素。前列环素是一种血管扩张剂(vasodilator),特别是对冠状动脉;并能防止血小板聚集和血小板粘着于内皮表面。它被用于心肺分流手术中以减小凝血危险。前列环素不稳定,很快被转变为无活性产物,6-酮- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 。

凝血噁烷(thromboxane, TX)最先从血小板(也称凝血细胞)中分离获得。它与前列腺素不同在于有一个氧原子参与成环(含氧六元环),对 TXA 来说,另有一个氧原子以环氧丙烷形式存在于六元环中央,突出于环面之下(氧杂的饱和烃环俗称噁烷)。其他方面凝血噁烷的结构与前列腺素相似,合成途径和代谢性质两者也相似,因此凝血噁烷可被认为是前列腺素的类似物。 TXA_2 从花生四烯酸合成,是血小板产生的主要前列腺素类物质。 TXA_2 的效应与前列环素相反,它引起动脉收缩、诱发血小板聚集,促进血栓形成。 TXA_2 的半寿期只有 30 s,在水中迅速被水解为 TXB_2 ,这是一个无活性的代谢物(TX 的结构见图 2-6)。

白三烯(leukotriene, LT)最早在白细胞中找到,含 3 个共轭双键,因而得名。从花生四烯酸形成的白三烯含 4 个双键,其中 1 个是非共轭双键,缩写为 LT_4 ,右下标 4 表示碳-碳双键总数。在白细胞中花生四烯酸经 5-脂加氧酶途径转变为 5,6-环氧化物(5,6-epoxide),称 LTA_4 。后者在水解酶作用下,加水生成 5,12-二羟衍生物, LTB_4 ;或在还原型谷胱甘肽参与下打开环氧环(epoxide ring)形成 LTC_4 。然后酶促除去谷胱甘肽的谷氨酸残基,转变为 LTD_4 。再除去甘氨酸残基转变为 LTE_4 。 LTB_4 和 LTC_4 的结构见图 2-6。

白三烯能促进趋化性(chemotaxis),炎症和变态反应或称过敏反应(allergy)。 LTC_4 和 LTD_4 是过敏反应的慢反应物质(简称 SRS 或 SRS-A)的活性成分;它们的作用是引起平滑肌收缩,微血管通透性增大(渗出液增多)和冠状动脉缩小;引起肺气管缩小(发生哮喘)的作用比组胺(histamine)大 1 000 倍。 LTB_4 能吸引中性粒细胞和嗜酸性粒细胞(eosinophil),这些白细胞大量出现在炎症部位。

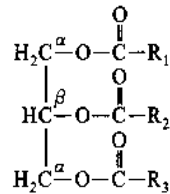
阿司匹林(aspirin,即乙酰水杨酸)在医学上用于消炎、镇痛、退热已逾百年,但它的作用机制一直不清楚,直至 1971 年 Vane J 发现阿司匹林通过抑制 PGH 合酶(PGH synthase)关闭前列腺素的合成。更确切地说,阿司匹林通过乙酰化活性中心的 Ser 530 羟基不可逆地抑制合酶的环加氧酶活性,即抑制前列腺素合成的第一步(详见下册第 29 章),因此它是一种强抗炎药。显然阿司匹林也抑制凝血噁烷(TXA_2)的形成,因此它又是一种抗凝剂(antithrombotics)被广泛地用于防止过度血凝。每天服用一次小剂量的阿司匹林则能有效地降低血小板聚集,因为血小板是无核细胞,不能合成新的 PGH 合酶分子。

有人认为 $\omega-3$ PUFA 能降低心脏病的危险(降低血小板聚集)是因为它们抑制花生四烯酸转变为 TXA_2 。但有人认为从二十碳五烯酸($\omega-3$ 系列)衍生来的 TXA_3 是一种弱聚集剂而 PGI_3 是一种强抗聚集剂,当膳食中增加 $\omega-3$ PUFA 来源时,则聚集(TXA_2)与抗聚集(PGI_3)之间的平衡移向抗聚集一方,因而有助于降低心脏病的危险。

三、三酰甘油和蜡

动、植物油脂的化学本质是酰基甘油(acylglycerol),其中主要是三酰甘油(triacylglycerol, TG)或称甘油三酯(triglyceride),此外还有少量二酰甘油和单酰甘油。常温下呈液态的酰基甘油称油(oil),呈固态的称脂(fat)。植物性酰基甘油多为油(可可脂例外),动物性酰基甘油多为脂(鱼油例外)。固、液态的酰基甘油统称为油脂也称中性脂(neutral fat)或真脂(true fat)。

三酰甘油是甘油和脂肪酸形成的三脂(triester),其化学通式如下:



式中甘油骨架两端的碳原子称为 α 位,中间的标为 β 位。

(一) 甘油取代物的构型

甘油分子中的 β 碳被称为手性原中心 (prochiral center), 因为当两个 α 碳 (CH_2OH 基团) 中的任何一个被脂肪酸或磷酸酯化或三酰甘油通式中 R_1 不等于 R_3 , β 碳则变成手性中心, 并产生一个容易被弄糊涂的事实。例如图 2-7 中的两个结构式, 当甘油骨架碳自上而下编号时, 左边结构应命名 L-甘油-3-磷酸, 右边结构为 D-甘油-1-磷酸。然而它们两个是完全等同的, 代表同一化合物。而 L-甘油-3-磷酸和 L-甘油-1-磷酸虽属同一构型, 它们却是一对光学对映体。为简单明确地命名甘油取代物, 1967 年国际纯化学及应用化学联合会-国际生物化学联合会 (IUPAC-IUB) 的生物化学命名委员会 (Commission on Biochemical Nomenclature) 推荐采用立体专一编号 (stereospecific numbering) 或称 sn-系统。该系统规定手性原中心的 S-原 (pro-S) 羟甲基碳为 1-位, 手性原中心 (β 碳) 为 2-位, R-原 (pro-R) 羟甲基碳为 3-位, 所谓 S-原或 R-原 CH_2OH 是指当设想增加该基团的优先性 (例如用 D 置换 H) 时, 手性原中心将分别变成 S-构型或 R-构型的手性中心的基团。当用 Fischer 投影式书写甘油结构时, β 碳的羟基应放在左边, 这样 3 个碳原子从上到下分别标为 C1, C2 和 C3:

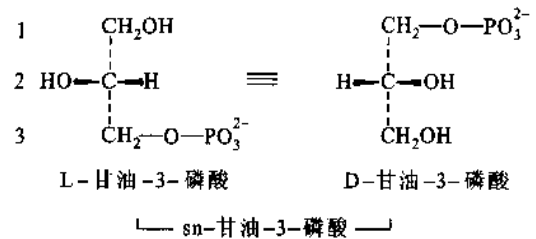
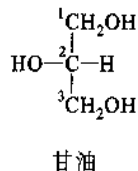


图 2-7 sn-甘油-3-磷酸的绝对构型



例如 C3 被棕榈酸酯化, 产物单酰甘油则命名为 3-棕榈酰-sn-甘油 (3-palmitoyl-sn-glycerol)。词头 sn 放在母体化合物名称之前, 表明采用这种编号系统命名。显然使用这一系统, 图 2-7 中的 L-甘油-3-磷酸或 D-甘油-1-磷酸应称为 sn-甘油-3-磷酸 (sn-glycerol-3-phosphate); L-甘油-1-磷酸应称为 sn-甘油-1-磷酸, 它是 sn-甘油-3-磷酸的对映体。实际上, sn 系统就是把甘油的手性 β 碳都看成是 L-构型的, 文献中至今仍见使用 L-甘油-3-磷酸或 L- α -甘油磷酸的名称。

(二) 三酰甘油的类型及二酰甘油、单酰甘油

上面的三酰甘油通式中 R_1 , R_2 和 R_3 相当于各种脂肪酸的烃链。当 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3$ 时, 该化合物称为简单三酰甘油 (Simple TG), 如棕榈酸甘油酯 (tripalmitin 或 palmitin), 油酸甘油酯 (triolein 或 olein), 硬脂酸甘油酯 (tristearin 或 stearin) (图 2-8); 当 R_1 , R_2 和 R_3 中任何两个不相同或 3 个各不相同, 称为混合三酰甘油 (mixed TG), 如 1-棕榈酰-2-硬脂酰-3-豆蔻酰-sn-甘油 (1-palmitoleoyl-2-stearoyl-3-myristoyl-sn-glycerol) (图 2-8)。混合三酰甘油中脂肪酸可以有不同的排列方式, 例如含两种脂肪酸 A 和 B 的三酰甘油存在 6 种不同的形式: ABB, BBA, BAB, BAA, AAB 和 ABA, 前三种和后三种各为异构体。

大多数天然油脂都是简单甘油三酯和混合甘油三酯的复杂混合物。

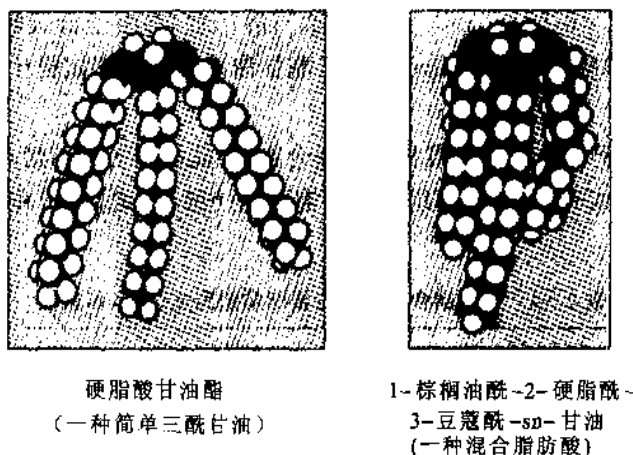
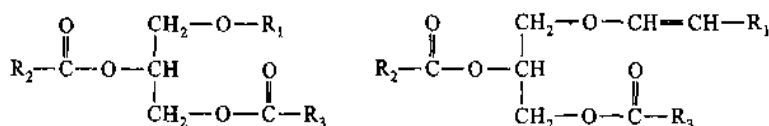


图 2-8 三酰甘油的立体模型

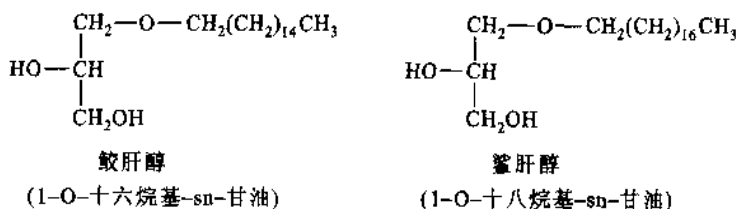
二酰甘油 (diacylglycerol) 或称甘油二酯 (diglyceride), 单酰甘油 (monoacylglycerol) 或称甘油单酯 (monoglyceride), 它们在自然界中存在量虽不大, 却是多种生物合成反应中的重要中间物 (见下册第 29 章)。它们, 特别是单酰甘油如单硬脂酰甘油 (monosteroylglycerol), 由于含有游离羟基, 在水中有形成分散态的倾向, 在食品工业中被用作乳化剂。

(三) 烷醚酰基甘油

烷醚酰基甘油在自然界中远不如三酰甘油丰富, 但分布广泛。其分子结构与三酰甘油很相似, 但甘油部分的 3 个羟基不是都被脂肪酸酯化, 其中一个 α 碳羟基与一个长链的烷基或烯基以醚键 (ether linkage) 相连, 另两个为脂肪酸所酯化。例如烷醚二酰甘油 (alkyl ether diacylglycerol) 和 α, β -烯醚二酰甘油 (α, β -alkenyl ether diacylglycerol), 其结构式如下:



这些脂质难与三酰甘油分开, 直至发展了精细的气液色谱技术后才被发现。温和条件下的碱水解或酶促水解, 可以除去烷醚酰基甘油中的脂肪酸而生成甘油醚 (glycerol ether)。例如鲛肝醇 (chimyl alcohol) 和鲨肝醇 (batyl alcohol) 都是甘油醚, 其结构如下所示:



(四) 三酰甘油的物理和化学性质

1. 物理性质

(1) 颜色和气味 纯的三酰甘油是无色、无嗅、无味的稠性液体或蜡状固体。天然油脂的颜色来自于其中的色素物质 (如类胡萝卜素); 气味少数是由于油脂中的挥发性短链脂肪酸所致, 一般是由于非油脂成分引起的。如棕榈油的香气相当一部分来自 β -萜香酮 (β -ionone, β -胡萝卜素分子中含有萜香酮环, 见第 11 章)。

(2) 密度和溶解度 三酰甘油的密度均小于 1 g/cm^3 , 除极少数如肉豆蔻油 (nutmeg oil) 密度高达

0.996 g/cm³ 外,一般为 0.91~0.94 g/cm³。三酰甘油不溶于水,略溶于低级醇,易溶于乙醚、氯仿、苯和石油醚等非极性有机溶剂,称脂溶剂(fat solvent)。三酰甘油能被乳化剂如胆汁酸盐所乳化(见本章“蜡和甾类”)。

(3) 熔点 天然油脂由于都是多种三酰甘油的混合物,因此没有明确的熔点,只有一个大概范围。三酰甘油的熔点与其脂肪酸组成有关,一般随组分中不饱和脂肪酸(双键数目)和低相对分子质量脂肪酸的比例增高而降低(表 2-4)。

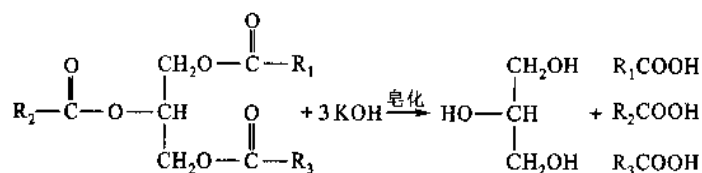
表 2-4 几种膳食油脂的主要脂肪酸组成、熔点和碘值

油脂	熔点/℃	碘值	脂肪酸组成/(g 数/100g 总脂肪酸)				
			棕榈酸	硬脂酸	油酸	亚油酸	其他
奶油(牛)	28~33	26~45	23~26	10~13	30~40	4~5	7~9 ^a , 4.6 ^b
牛油	40~50	31~47	24~32	14~32	35~48	2~4	2~3 ^a , 1~3 ^b
羊油	44~52	32~50	25 ^b	31	36	4.3	4.6 ^a
猪油	28~46	46~68	25~28	12~18	43~52	7~9	1~3 ^b , 2~3 ^c
沙丁鱼油	—	120~190	10~16	1~2	18		7 ^a , 12 ^b , 32 ^f
大豆油	-10~-16	122~134	7~10	2~5	22~30	50~60	5~9 ^a , 1~3 ^b
花生油	0~3	88~98	6~10	3~6	40~64	18~38	5~8 ^a
菜籽油	-10	94~103	3~10		14~29	12~24	1~10 ^a , 40~54 ^d
葵花籽油	-16~-18	129~136	10~13		21~39	51~68	
棉籽油	12~-13	103~111	17~23	1~3	18~44	34~55	
玉米油	-10~-20	111~128	8~13	1~4	24~50	34~61	0.6 ^a , 2 ^c
芝麻油	-4~-16	106~117	8~9	4~6	35~49	38~48	
可可油	27~34	33~42	24~25	34~36	38~40	2~3	

a. 豆蔻酸 b. 棕榈油酸 c. 亚麻酸 d. 芥子酸 e. 花生四烯酸 f. C₂₀₋₂₂PUFA g. C₂₀₋₂₄FA h. 未指出范围者为平均值

2. 化学性质

(1) 水解与皂化 三酰甘油能在酸、碱或脂酶(lipase)的作用下水解为脂肪酸和甘油。如果在碱溶液中水解,产物之一是脂肪酸的盐类(如钠、钾盐),俗称皂;油脂的碱水解作用称皂化作用(saponification):



皂化 1g 油脂所需的 KOH mg 数称为皂化值(价)(saponification value or number)。皂化值是三酰甘油中脂肪酸平均链长即三酰甘油(TG)平均相对分子质量的量度。

$$\text{TG 平均 } M_r = \frac{3 \times 56 \times 1\,000}{\text{皂化值}}$$

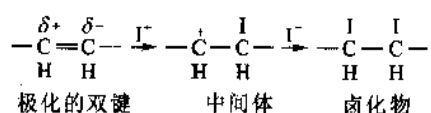
式中 56 是 KOH 的 M_r ; 中和 1 mol TG 需要 3 mol KOH, 因此皂化值 = 3 mol KOH/1 mol TG = 3 × 56 × 1 000/ M_r 。

1948 年以前,甘油几乎全部作为制皂工业的副产品获得的。甘油味甜,密度 1.26 g/cm³(20℃),熔点 18℃(但凝固点比熔点低得多),沸点 182℃/20 mm Hg,能与水或乙醇互溶,但不溶于乙醚、氯仿和苯。甘油可被过氧化氢氧化,形成二羟丙酮和甘油醛的混合物。甘油在脱水剂如硫酸氢钾存在下加热则脱水,生成具有刺激性臭味的气体丙烯醛(acrolein CH₂=CH-CHO),这是用于鉴定甘油的特征反应。

(2) 氯化 and 卤化(加成反应) 油脂分子中的不饱和脂肪酸也和游离不饱和脂肪酸一样,能与氢或卤素起加成反应(addition reaction)。

在催化剂如 Ni 的存在下油脂中的双键与氢发生加成称氢化(hydrogenation)。氢化作用可以将液态的植物油转变成固态的脂,在食品工业中被用于制造人造黄油(margarine)和半固体的烹调脂。

不饱和油脂与卤素中的溴或碘发生加成而成饱和的卤化脂,此过程称卤化(halogenation)。卤化机制属于离子型亲电加成,反应中碘分子(I₂)发生异裂(heterolysis)I-I,生成 I⁺ 和 I⁻,首先 I⁺ 进攻极化的烯键电子云密度较大的碳原子(δ⁻)形成不稳定的中间体正碳离子(carbonium ion),然后 I⁻ 与之结合完成反应:



卤化反应中吸收卤素的量反映不饱和键的多少。通常用碘值(价)(iodine value)来表示油脂的不饱和程度。碘值指 100 g 油脂卤化时所能吸收碘的克数。

(3) 乙酰化(acetylation) 含羟脂肪酸(如蓖麻油酸)的油脂可与乙酸酐或其他酰化剂作用形成乙酰化油脂或其他酰化油脂。油脂的羟基化程度一般用乙酰[化]值(价)(acetylation number)表示。乙酰值指中和从 1g 乙酰化产物中释放的乙酸所需的 KOH mg 数。蓖麻油(costor oil)含 88%~94%的蓖麻油酸(表 2-2 续表 2),因此它的乙酰价很高(124~150),但其他常见的油脂乙酰价在 2 和 20 之间。

(4) 酸败与自动氧化 天然油脂长时间暴露在空气中会产生难闻的气味,这种现象称为酸败(rancidity)。酸败的原因主要是油脂的不饱和成分发生自动氧化(autoxidation),产生过氧化物并进而降解成挥发性醛、酮、酸的复杂混合物;所谓自动氧化是指空气中的分子氧在常温常压下对化合物的直接作用,从而导致氧化的发生。其次是微生物的作用,它们把油脂分解为游离的脂肪酸和甘油,一些低级脂肪酸本身就有臭味,而且脂肪酸经系列酶促反应也产生挥发性的低级酮,甘油可被氧化成具有异臭的 1,2-环氧丙醛。

酸败程度一般用酸值(价)(acid value)来表示。酸值即是中和 1g 油脂中的游离脂肪酸所需的 KOH mg 数。

为防止自动氧化,可在新鲜油脂和含油脂食物中加入合成抗氧化剂如丁化羟基苯甲醚(butylated hydroxyanisole, BHA)和 2,6-二叔丁基对甲酚或称丁化羟基甲苯(butylated hydroxytoluene, BHT)或天然抗氧化剂如 α-生育酚(α-tocopherol)等。植物油的抗自动氧化能力比动物油脂强,就是因为存在天然的 α-生育酚和 β-胡萝卜素。此外,排除氧气(真空、充氮),降低温度(冷藏),消去其他促进自动氧化的因素(如光、高能辐射)也能防止和延缓酸败发生。

油脂自动氧化的结果之一是形成粘稠、胶状乃至固化的聚合物。油漆、涂料成分中的高不饱和油也称干性油(如我国特有的桐油、南美的亚麻子油)在干燥过程中变硬就是这种聚合作用的结果。

(五) 蜡

蜡(wax)是长链脂肪酸和长链一元醇或固醇形成的酯。长链是指烃基碳数为 16 或 16 以上者(表 2-2)。简单蜡酯的通式为 RCOOR'。实际上天然的蜡是多种蜡酯的混合物,还常含有烃类以及二元酸,羟基酸和二元醇的酯。蔗蜡甚至不含酯,主要是由蜂花醇(melissyl alcohol,即三十醇),C₃₅烃和聚合醛组成。蜡中发现的脂肪酸一般为饱和脂肪酸,醇可以是饱和醇和不饱和醇,或是固醇,如胆固醇(见本章后面)。蜡分子含一个很弱的极性头(酯基部分)和一个非极性尾(一般为两条长烃链),因此蜡完全不溶于水。蜡的硬度由烃链的长度和饱和度决定。

蜡的生物学功能见前述“脂质的生物学作用”部分。

(1) 蜂蜡(beewax) 是蜂建造蜂巢的物质,完全不透水,熔点为 60~82℃,皂化时主要产生 C₂₆和 C₂₈烷酸和 C₃₀和 C₃₂醇。总脂肪酸中 25%是羟基酸,其中有 14-羟棕榈酸,10%~14%是烃类,以 C₃₁为主。

(2) 白蜡(Chinese wax) 也称中国虫蜡,是胭脂虫属(Coccus)的一种昆虫(C. Cerifera)俗称白蜡虫

的分泌物,白蜡虫在我国西南地区放养在女贞树上,吸食叶汁为生。白蜡的主要成分为 C_{26} 醇和 C_{26} 、 C_{28} 酸所成的酯,熔点为 $80\sim 83^{\circ}\text{C}$ 。胭脂虫属中另一种昆虫紫胶虫(*C. lacca*)分泌的虫蜡(lac)主要成分为 $C_{26}\sim C_{34}$ 醇, $C_{30}\sim C_{34}$ 酸及其形成的酯。蜂蜡和虫蜡可用作涂料、润滑剂及其他化工原料。

(3) 鲸蜡(spermaceti wax) 为抹香鲸(sperm whale)头部的鲸油冷却时析出的一种白色晶体。抹香鲸也称巨头鲸,头部占全身总重量的 $1/3$,头部重量的 90% 由鲸蜡器构成,其中含鲸油约 4 t ,它是三酰甘油和蜡的混合物。鲸蜡主要成分是由棕榈酸和鲸蜡醇(cetyl alcohol,即十六烷醇)形成的酯,熔点为 $42\sim 47^{\circ}\text{C}$ 。

(4) 羊毛脂(lanolin) 从羊毛的洗涤中可以回收羊毛蜡(wool wax),它具有特殊的性质,能形成一种稳定的半固体乳胶,含水量高达 80% 。羊毛脂是从羊毛蜡中纯化获得的产品,被用作药品和化妆品软膏的底料。由于羊毛脂能使水溶性和脂溶性的物质“混溶”,因而使这些物质被人们皮肤同化吸收。羊毛蜡中可皂化部分含烷酸 60% ,羟基酸 35% ,不可皂化部分为羊毛固醇 44% ,胆固醇 31% ,烷醇 16% 及其他。所谓可皂化部分是指皂化后能溶于水的成分,不可皂化部分为不溶于水而溶于乙醚的成分。

(5) 巴西棕榈蜡(carnauba wax) 是天然蜡中经济价值最高的一种。它以覆盖形式存在于一种巴西棕榈树(*Corypha cerifera*)的叶片上。由于它的熔点高($86\sim 90^{\circ}\text{C}$)、硬度大和不透水性,被用作高级抛光剂,如汽车蜡、船蜡、地板蜡以及鞋油等。巴西棕榈蜡主要是 C_{24} 和 C_{28} 烷酸和 C_{32} 和 C_{34} 烷醇所成酯的混合物,此外还有 $C_{27}\sim C_{31}$ 烃和相当量的 ω -羟基酸。认为 ω -羟基酸与巴西棕榈蜡的特有物理性质有关,可能是因为这种蜡以高相对分子质量聚酯形式存在的缘故。

四、脂质过氧化作用

前面曾谈到油脂的酸败。酸败的根本原因是脂质发生自动氧化,产生过氧化物;脂质的自动氧化也称脂质过氧化作用(peroxidation)。脂质过氧化一般定义为多不饱和脂肪酸或脂质的氧化变质(oxidation deleriation)。

多不饱和脂肪酸不仅存在于不饱和油脂分子,并也广泛地参与磷脂组成。磷脂是构成生物膜的主要成分。生物膜的许多性质和功能与磷脂结构有关,例如其分子中脂肪酸烃链的长短及不饱和程度与生物膜的流动性有密切关系(第18章)。脂质过氧化将直接干扰和破坏膜的生物功能。人类的许多疾病如肿瘤、血管硬化以及衰老现象都涉及脂质过氧化作用。探讨脂质过氧化机制和防止脂质过氧化作用是生物科学和医学中的一个重要课题。

(一) 自由基、活性氧和自由基链反应

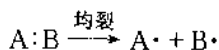
脂质过氧化作用是典型的活性氧参与的自由基链反应。因此讨论脂质过氧化之前,先复习几个有关的概念是必要的。

1. 自由基(free radical, radical)

(1) 定义 自由基也称游离基,是指含有奇数价电子并因此在一个轨道上具有一个未(不)成对电子(unpaired electron)的原子或原子团。

(2) 特征 自由基具有3个显著的特征,一是具有顺磁性,二是反应性强,三是寿命短。这些特点都与它存在未成对电子有关。分子成键过程中,电子都倾向于配对,自由基中的未成对电子也是如此。因此大多数自由基都是很活泼的,反应性极强,容易反应生成稳定分子,这是自由基的一个非常重要的性质。

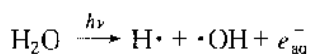
(3) 自由基的产生 产生自由基的途径很多,但一般是通过分子或离子的均裂(homolysis)获得的:



式中 A:B 是 A 和 B 两个原子或原子团通过一个共价键(:)形成的分子, $\text{A}\cdot$ 和 $\text{B}\cdot$ 是各带一个未成对电子的自由基。通常在自由基结构中带有未成对电子的原子符号上角,上方或近旁标上一个小圆点以表示自由基。

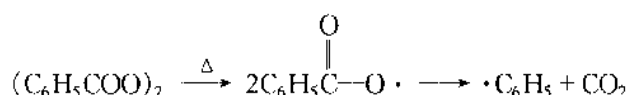
产生自由基的常见途径有:

① 辐射诱导 可见光、紫外线和电离辐射包括高能光子(X射线、 γ 射线)和高能粒子(β 射线、 α 射线、正子和中子)都可引起共价键均裂而产生自由基,例如:



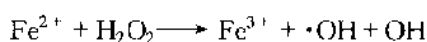
式中 $h\nu$ 是一个光量子的能量, h 为 Planck 常数(6.6×10^{-34} Js), ν 是辐射频率, e_{aq}^- 是水合电子。

② 热诱导 提高温度也能使共价键均裂,生成自由基,例如常用的聚合作用引发剂(initiator)过氧化苯甲酰(benzoyl peroxide)受热裂解为苯甲酰氧自由基,并进而失去二氧化碳转变为苯自由基:



这些自由基起着引发自由基反应的作用。

③ 单电子氧化还原 凡是能够单电子氧化还原的金属离子(属于过渡金属)都可以与过氧化氢反应,使其发生裂解,产生自由基,例如有名的 Fenton 反应:



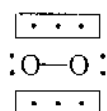
还有其他过渡金属如铜、钴、钛等离子。

2. 活性氧(reactive oxygen)

(1) 概念 氧或含氧的高反应活性分子,如 O_2^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$ (单线态氧)等统称为活性氧。氧对一切需氧生物是必不可少的生存条件,但是高浓度氧(特别是氧分压大于 0.6×10^2 kPa)对有机体是有害的,会引起氧中毒。实验已证明,氧中毒是由于氧在机体内大量地被转变为活性氧自由基,后者可以进攻和损害细胞膜(磷脂)、蛋白质、酶和 DNA,从而引起组织病变、器官功能失常。

(2) 普通氧和几种重要的活性氧

① 普通氧 普通氧分子的价电子排布可用分子轨道式表达为 $(\sigma 2s)^2(\sigma^* 2s)^2(\sigma 2p_z)^2(\pi 2p_x)^2(\pi 2p_y)^2(\pi^* 2p_x)^1(\pi^* 2p_y)^1$,此表达式中取 z 轴为键轴方向。因此 O_2 分子的结构可简单地写成:

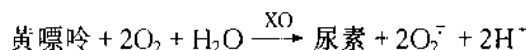


式中,两侧是对于成键无能量贡献的 $2s$ 未共享电子对(unshared electron pair);氧原子间的横线代表一个 σ 键即 $\sigma 2p_z$ 键(强键); $\boxed{\cdot\cdot\cdot}$ 是一个三电子 π 键(弱键)、它由两个成键 π 电子和一个反键 π^* 电子构成,净成键电子数是 $2 - 1 = 1$ (因为一个 π 电子的能量降低与一个 π^* 电子的能量升高相互抵消)。两个净成键电子折合一个共价单键或称键级(bond order)。 O_2 分子的价电子层共 12 个电子,8 个成键电子,4 个反键电子,其键级 = $(8 - 4) / 2 = 2$,相当于一个 σ 键和一个 π 键(或两个三电子 π 键)形成的 $\text{O}=\text{O}$ 双键(键长 0.121 nm,键能 494 kJ/mol)。

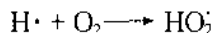
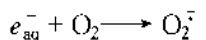
普通氧分子含两个未成对电子,各占一个轨道($\pi^* 2p_x$ 和 $\pi^* 2p_y$),平行自旋,具有顺磁性,是一种双自由基。然而普通氧分子存在着所谓自旋限制(spin restriction),即氧化一种物质,它要求该物质具有两个平行自旋的电子,这对多数物质来说不具备这种条件,不能与氧反应,因此氧气表现出一定的惰性。普通 O_2 分子中所有电子占 Pauli 不相容原理所允许的最低能级,即处于基态(ground state),因此它也称基态氧。普通氧的总自旋量子数(简称总自旋) $s = 1$,在磁场中自旋向量取向的多重性 $m_s = 2s + 1 = 3$ (即 $+1, 0, -1$),相应地呈现 3 个能级,因而常称三重态氧或三线态氧(triplet oxygen),记为 $^3\Sigma_g^- \text{O}_2$ 或 $^3\text{O}_2$ 。

② 超氧阴离子自由基(superoxide anion radical, O_2^-) 基态氧的 $\pi^* 2p$ 反键轨道接受一个电子后, O_2 则转变为 O_2^- 。 O_2^- 仅含一个未成对电子,仍具有顺磁性,键级为 1.5(一个 σ 键和一个三电子 π 键)。生物体内产生 O_2^- 的途径很多,有酶促反应,例如在黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)催化下,黄嘌呤可

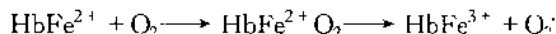
通过将单电子给予 O_2 的方式氧化为尿酸(uric acid),而 O_2 还原为 O_2^- (见下册第 33 章):



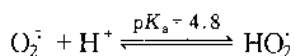
非酶促反应如电离辐射产生的水合电子 e_{aq}^- 和 $H\cdot$ (见前面)均可与周围的氧化合生成 O_2^- (HO_2^-):



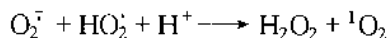
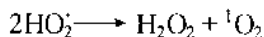
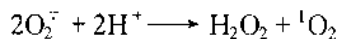
又如血红蛋白自动氧化时,先与氧结合生成氧合血红蛋白($HbFe^{2+}O_2$),后者将一个电子从 Fe^{2+} 转移到 O_2 ,高铁血红蛋白($HbFe^{3+}$)变成高铁血红蛋白($HbFe^{3+}$), O_2 变为 O_2^- :



超氧阴离子自由基在水中可视为碱,与一个 H^+ 结合形成过氧羟自由基或称氢过氧自由基(hydroperoxyl radical) $HOO\cdot$ 或 HO_2^- , $HOO\cdot$ 是 O_2^- 的共轭酸:



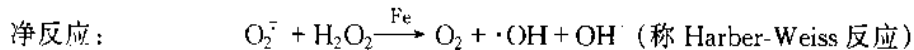
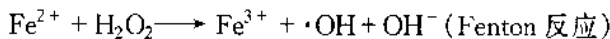
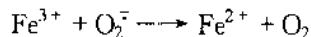
所谓超氧化物自由基应包括 O_2^- 和 HO_2^- 。根据 Henderson-Hasselbach 公式(见第 3 章)可以算得,在生理 pH (~7.0)条件下,超氧化物自由基几乎都以 O_2^- 形式存在。它们两者都能自发地发生歧化反应(dismutation reaction),即反应中它们既是还原剂又是氧化剂,一个分子被氧化,另一个分子被还原。它们的产物是 H_2O_2 和单线态氧(1O_2):



HO_2^- 的氧化能力远比 O_2^- 强,体内正是这少量的 HO_2^- 可使 O_2^- (本身是亲水的)进入膜脂,引起脂质过氧化。

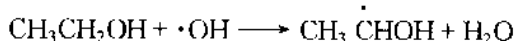
超氧阴离子自由基还能与许多化合物发生氧化还原反应;它的寿命长,在水中约为 1 s,在脂溶性介质中高达 1 h,加上它是生物体内生成的第一个氧自由基,是其他活性氧的前体,因此具有重要的生物学意义。

③ 羟基自由基($\cdot OH$) 这是已知的最强氧化剂,几乎能和所有的细胞成分发生反应,速度常数很高,寿命极短,在水中仅为 $10^{-6}s$ 。如前述及,辐射可引起水分子发生均裂、产生 $\cdot OH$ 。 O_2^- 和 H_2O_2 在铁离子参与下也能产生 $\cdot OH$:



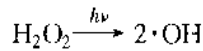
这些过渡金属离子的存在使原来反应活性不强的 O_2^- 和 H_2O_2 转变为 $\cdot OH$ 。由于 $\cdot OH$ 实际上不能扩散,它引起的损伤就发生在这些金属离子存在的部位,例如膜上的铁离子在脂质过氧化中起重要作用。但生物体内铁、铜这些离子多与蛋白质结合,如运铁蛋白,血浆铜蓝蛋白等,这样大大减少它们诱导产生自由基的机会。

羟基自由基可参与抽氢、加成和电子转移反应,其中抽氢(hydrogen abstraction)常见于脂质过氧化中。抽氢反应的典型例子是 $\cdot OH$ 与醇的反应, $\cdot OH$ 与被抽取的 α 氢结合成水, α 碳上留下一个不成对电子:



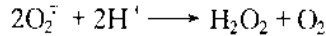
④ 过氧化氢 纯的过氧化氢是一种淡蓝色液体,与水互溶;它可被看成是 O_2 的二电子还原产物,分

子中的过氧键(—O—O—)键能较小(142 kJ/mol),不稳定,见光易均裂成羟基自由基:



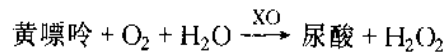
因此具有杀菌作用。

生物体内 H_2O_2 的重要来源是前面述及的超氧阴离子自由基的歧化反应:

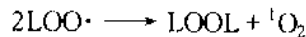


此反应若无超氧化物歧化酶(SOD)的存在, O_2^- 歧化产生的 O_2 是单线态氧,但有 SOD 存在时,不生成单线态氧,且反应速度提高 14 倍。 H_2O_2 能穿透细胞膜,这是 O_2^- 所不及的,进入细胞后, H_2O_2 通过 Fenton 反应生成反应性极强的 $\cdot\text{OH}$,因此说 O_2^- 对细胞的损伤常是由歧化反应形成的 H_2O_2 所介导的。

此外还有几种酶促反应(葡萄糖氧化酶、D-氨基酸氧化酶、黄嘌呤氧化酶等)不经由 O_2^- 而直接产生 H_2O_2 ,例如黄嘌呤氧化酶催化下,黄嘌呤可通过将双电子(而不是单电子)给予 O_2 的方式氧化为尿酸, O_2 还原为 H_2O_2 :



⑤ 单线态氧(singlet oxygen, $^1\text{O}_2$) 是普通氧($^3\text{O}_2$)的激发态(excited state),当 $^3\text{O}_2$ 吸收一定能量后,两个不成对电子由顺向(平行)自旋变成反向自旋、总自旋为零,无顺磁性。 O_2 激发态有两种形式,分别记为 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 和 $^1\Sigma_g\text{O}_2$,前者两个反向电子同占一个 $\pi^* 2p$ 轨道,后者两个反向电子分占两个 $\pi^* 2p$ 轨道。 $^1\Sigma_g\text{O}_2$ 的能量特别高,很不稳定,极易衰减为 $^1\Delta_g\text{O}_2$ 或 $^3\text{O}_2$ 。单线态氧虽不是自由基,但因解除了自旋限制所以反应性远比普通氧高。 $^1\text{O}_2$ 在许多自由基反应中可以形成,例如前面谈到的超氧化物自由基氧化为 $^1\text{O}_2$ (在歧化反应中);又如两个脂质过氧自由基($\text{LOO}\cdot$)化合时也产生 $^1\text{O}_2$:

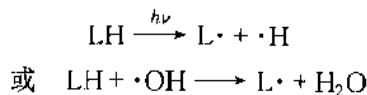


除上述几种活性氧外,脂质过氧化中间物($\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$ 和 LOOH),臭氧以及一氧化氮(亦称活性氮)也属活性氧。

3. 自由基链反应

自由基化学性质活泼,能发生抽氢、歧化、化合、取代、加成等多种反应,但是自由基反应的最大特点是倾向于进行链[式]反应(chain reaction),链反应一般包括 3 个阶段:引发、增长和终止。

(1) 引发(initiation) 引发阶段是由产生一个反应性足够强的起始自由基开始的。如前所述,自由基可由光、高能辐射等因子诱导产生,也可由其他自由基诱导产生,例如所有的活性氧都可直接或间接地引发脂质氧化的链反应。当脂质分子 LH 被抽去一个氢原子则生成起始脂质自由基 $\text{L}\cdot$:

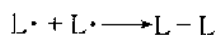


(2) 增长(propagation) 作为链反应的引发剂所需的量是很小的,因为反应一经引发,所生成的新自由基(如 $\text{L}\cdot$)就可通过加成、抽氢、断裂等任一种或几种方式使链反应增长:



上面(a)和(b)步骤可以反复进行,使整个过程成为链式反应。

(3) 终止(termination) 链反应中两个自由基之间可以发生偶联或歧化反应,生成稳定的非自由基产物,例如:



如果这些反应占优势,反应过程就会终止。然而在任何一个给定时刻反应中的自由基浓度都是很低的,两个自由基互相碰撞的概率极小,因此这样的终止步骤很少发生。但是只要有少量的能捕捉和清除自由基的抗氧化剂就可以有效地使链反应减慢或终止。

(二) 脂质过氧化的化学过程

脂质过氧化作用是典型的自由基链式反应。现举花生四烯酸为例,于图 2-9 列出脂质过氧化反应的总过程。

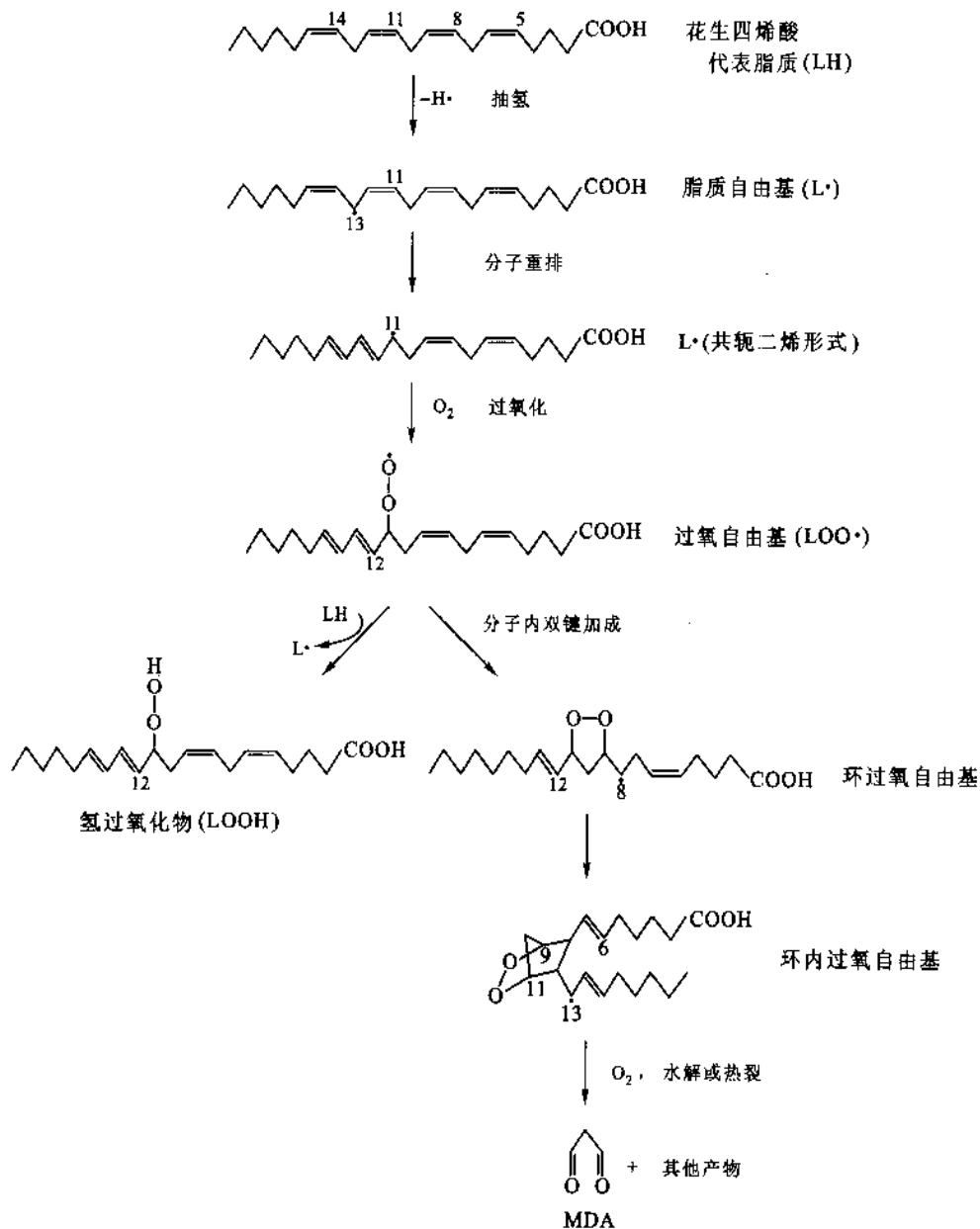
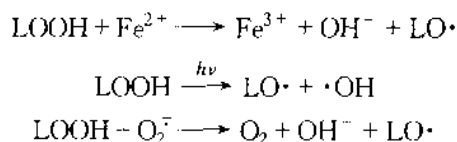


图 2-9 脂质过氧化的总过程

生物膜是生命系统中最容易发生脂质过氧化的场所,因为它具备脂质过氧化的两个必要条件,一是氧气;二是多不饱和脂肪酸(PUFA)。氧气为非极性物质,在膜脂中氧气浓度很高。很多 PUFA 如花生四烯酸是磷脂(主要膜脂)的组成成分,PUFA 比饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸更容易被氧化。PUFA 分子中与两个双键相连的亚甲基($-CH_2-$)上的氢比较活泼,这是因为双键减弱了与之连接的碳原子与氢原子之间的 C-H 键,使氢容易被抽去。能抽氢而引发脂质过氧化的因子很多,但最有效的是羟基自由基。

$\cdot\text{OH}$ 从两个双键之间的 $-\text{CH}_2-$ (如图2-9中LH的13位碳)抽去一个氢原子后,在该碳原子上留下一个未成对电子,形成脂质自由基 $\text{L}\cdot$ 。后者经分子重排、双键共轭化,形成较稳定的共轭二烯(conjugated diene)衍生物。在有氧条件下,共轭二烯自由基与氧分子结合生成脂质过氧自由基 $\text{LOO}\cdot$ 。 $\text{LOO}\cdot$ 能从附近另一个脂质分子LH抽氢生成新的脂质自由基 $\text{L}\cdot$ 。这样反应就形成循环,这就是脂质过氧化的链增长阶段。链增长的结果是导致脂质分子的不断消耗和脂质过氧化物如 LOOH 等的大量形成。

LOOH 可通过类Fenton反应,光解或其他反应生成脂质氧自由基 $\text{LO}\cdot$:



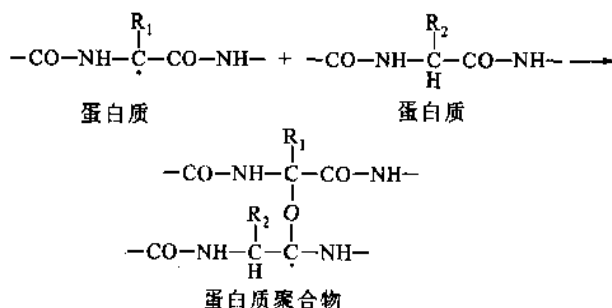
脂质过氧化过程中生成的 $\text{LO}\cdot$ 、 $\text{LOO}\cdot$ 等活性氧自由基也参与链引发和链增长反应。 $\text{LOO}\cdot$ 还可以通过分子内双键加成,形成环过氧化物和环内过氧化物自由基,最后断裂生成各种醛类主要是丙二醛(malondialdehyde, MDA)以及短链的酮、羧酸和烃类。丙二醛的量常被用作脂质过氧化的量度,硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法就是基于TBA可以与MDA反应,在pH3.0左右加热生成红色物质,于532nm处有一特征吸收。测量脂质过氧化程度的方法还有很多,它们的依据也各不相同,详见有关专著。

(三) 脂质过氧化作用对机体的损伤

脂质过氧化作用对机体损伤的机制十分复杂,是当前重要的研究课题之一。下面就脂质过氧化产物包括中间产物对生物大分子、细胞膜和组织的毒害和损伤作一简介。

1. 中间产物自由基导致蛋白质分子的聚合

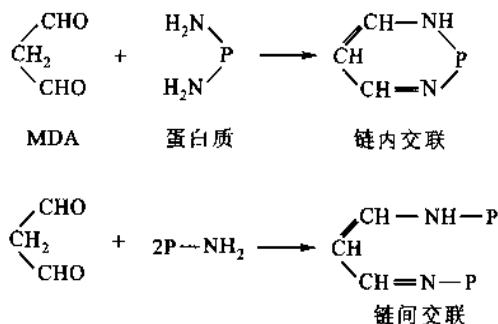
脂质过氧化的中间产物 $\text{L}\cdot$ 、 $\text{LO}\cdot$ 或 $\text{LOO}\cdot$ 作为引发剂通过抽氢使蛋白质分子变成自由基,后者可以引起聚合式链反应:



链增长的结果导致蛋白质的聚合。

2. 终产物丙二醛导致蛋白质分子的交联

脂质过氧化终产物二醛化合物如丙二醛可与蛋白质分子的氨基发生作用导致多肽链的链内交联和链间交联,反应是通过形成西佛碱(见第3章)和双键共轭化完成的:



醛类产物也能与蛋白质的巯基反应,修饰了的蛋白质和酶将失去它们的生物活性,导致代谢异常。

3. 脂质过氧化对膜的损害

生物膜是由脂质和蛋白质组成的流体镶嵌结构,流动性是生物膜结构的主要特征之一。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,细胞分裂与融合等都与膜的流动性有密切关系。而膜脂的不饱和程度对膜的流动性起重要的调节作用。脂质过氧化的直接结果是膜不饱和脂肪酸减少,膜脂的流动性降低。

膜蛋白多是功能蛋白如酶、受体、离子通道和呼吸链等。在正常情况下它们在二维流体膜上能自由侧向移动,并处于缔合与解离的动态过程中。但过氧化产物引起的膜蛋白共价交联与聚合,使膜蛋白处于永久性缔合状态,严重限制了膜蛋白在膜平面上的运动性,必然导致膜功能的异常。

4. 脂质过氧化与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种主要侵害大、中动脉,使血管内壁增厚、变硬、管腔狭窄的疾病。AS的发病机制非常复杂,大体过程是血管内皮受损,粘附,聚集在损伤处的巨噬细胞分泌生长因子,刺激平滑肌细胞增生并纤维化,同时吞噬并沉积大量血脂,形成动脉粥样硬斑。硬斑形成过程中在活性氧自由基和脂质过氧化的醛类产物进攻下生成的蛋白质聚合物如低密度脂蛋白(LDL)的脂质过氧化物起着重要的作用。

5. 脂质过氧化与衰老

老年斑或老年色素(age pigment)是衰老的重要标志之一。它出现在老年人的皮肤,特别是面部和手的背部,表现为褐色斑块或斑点。老年色素主要由脂褐素(ipofuscin)和黑色素组成。脂褐素是长期累积在老细胞内的不溶性有色物质,常以残留泡(即不能再消化的溶酶体)形式存在。脂褐素在化学上是不均质的,是氧化了的不饱和脂质、蛋白质和其他细胞降解物的聚合物,它是在自由基、酶和金属离子等的参与下膜分子发生裂解和过氧化的结果。脂褐素存在于所有细胞特别是神经元和肌肉细胞。脂褐素将影响RNA代谢,使细胞萎缩和死亡。黑色素(melanin)是在酪氨酸酶(一种含Cu的氧化酶)催化下形成的中间物多巴醌经环化、缩合等步骤形成的不溶性高分子聚合物(见下册第30章),颜色很深,常出现于皮肤的黑素细胞(melanocyte)中。

自由基在脂褐素和黑色素的形成中都起重要作用。实验证明,老年色素与年龄呈线性关系。一些清除自由基的抗氧化剂(如维生素E和C)能明显延缓老年色素的出现和增长。这说明,自由基、脂质过氧化与衰老有关。

(四) 抗氧化剂的保护作用

上面谈到脂质过氧化对机体的损伤,但体内存有抗氧化的保护系统。在正常情况下,过氧化与抗氧化处于平衡中,不致造成对机体的损害。但平衡失调时,脂质过氧化将加剧,此时给机体外加适量的抗氧化剂是必要的,以协助机体维持两者的平衡,使之处于健康状态。

1. 抗氧化剂的一般概念

凡具有还原性而能抑制靶分子自动氧化即抑制自由基链反应的物质称为抗氧化剂(antioxidant)。能与自由基反应使之还原成非自由基的抗氧化剂称为自由基清除剂(free radical scavenger)。

抗氧化剂按其作用性质可分为预防型和阻断型两大类。预防型抗氧化剂可以消除链反应引发阶段的自由基及其他引发剂,如SOD,过氧化氢酶,谷胱甘肽过氧化物酶以及金属离子螯合剂如柠檬酸。阻断型抗氧化剂可以捕捉和消除包括链反应中产生的自由基,中断或延缓链反应的进行,如维生素E,维生素C,还原型谷胱甘肽和 β -胡萝卜素。

按化学本质又可分为抗氧化酶类和小分子抗氧化剂。许多抗氧化剂是天然的,生物系统中存在的;有些是人工合成的,如用于防止食品酸败的BHA, BHT,以及去铁敏(deferoxamine mesylate),它是铁离子的螯合剂,能有效地抑制铁离子诱导的脂质过氧化。

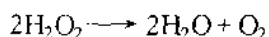
2. 几种重要的抗氧化剂

(1) 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 是体内催化下列歧化反应的一种抗氧化保护酶:

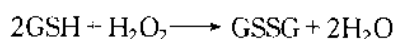


此酶广泛地存在于各种生物中。它属于金属酶类,按其活性中心所含金属离子的不同,可分为 Cu-Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。

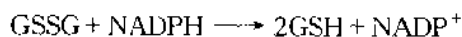
(2) 过氧化氢酶(catalase) 大多数需氧生物都含过氧化氢酶。在人和动物体内此酶以肝和红细胞中最为丰富,并主要集中在过氧化物酶体(peroxisome)中。过氧化氢酶是含血红素的酶,它负责催化下面反应:



谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSHPX) 这是人体内清除 H_2O_2 的最重要的酶,GSHPX 的组织分布比过氧化氢酶广泛,后者在脑和精子中几乎不存在。GSHPX 是唯一已知需要硒(Se)作为辅助因子的人体酶,它催化下列反应:

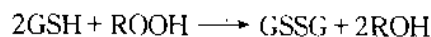


式中 GSH 和 GSSG 分别是还原型和氧化型谷胱甘肽的缩写(见第 4 章)。在正常细胞中由于一种称谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase)的黄素酶作用:



GSH/GSSG 比值很高。式中 NADPH 和 NADP^+ 分别是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原型和氧化型缩写(见第 11 章)。NADPH 是 GSH 还原力(reducing power)的来源。

GSHPX 也催化有机氢过氧化物(ROOH)包括脂质氢过氧化物(LOOH)的还原:



并认为清除脂质氢过氧化物是 GSHPX 的主要生物学作用。

(3) 维生素 E(生育酚) α -生育酚是维生素 E 中活性最强的一种,关于其结构和性质见第 11 章。由于维生素 E 是疏水的,所以在细胞内多集中在膜的脂双层中,例如在线粒体膜中每 2 100 个磷脂分子就有一个维生素 E 分子。维生素 E 是生物体内最重要的自由基清除剂,主要清除膜中的活性氧自由基包括脂质过氧化中产生的 $\text{LO}\cdot$ 和 $\text{LOO}\cdot$,保护膜的不饱和脂肪酸免遭过氧化作用。

维生素 E 作为抗氧化剂的作用机制是生育酚色满环(chromanyl ring)上 6-羟基(即酚羟基)的活泼氢使自由基还原为非自由基而中断脂质过氧化链反应:



反应中生成的生育酚自由基 $\text{ChrO}\cdot$ 可与维生素 C 反应获得复原。这就是维生素 E 和 C 的协同作用。GSH 可直接清除各种自由基以及作为 GSHPX 酶的底物。 β -胡萝卜素和维生素 E 都有淬灭(quench)单线态氧的功能。淬灭是指通过能量转移使一种分子(如单线态氧)从激发态回到基态。

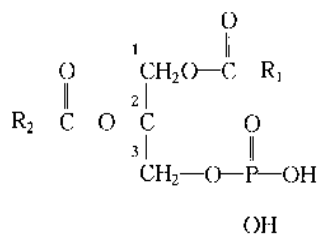
五、磷 脂

磷脂(phospholipid)包括甘油磷脂和鞘磷脂两类;它们主要参与细胞膜系统的组成,少量存在于细胞的其他部位。甘油磷脂是第一大类膜脂,包括鞘磷脂和鞘糖脂的鞘脂类(sphingolipid)是第二大类膜脂。下面主要介绍磷脂的结构和性质,关于它们在膜中的结构性的和功能性的作用将在下册第 18 和 21 章讨论。

(一) 甘油磷脂的结构

甘油磷脂(glycerophospholipid, glycerol phosphatide)也称磷酸甘油酯(phosphoglyceride)。最简单的磷酸甘油酯是由 sn-甘油-3-磷酸(图 2-7)衍生而来的,即它的甘油骨架 C1 和 C2 位被脂肪酸酯化形成

的产物,1,2-二酰基 sn 甘油-3-磷酸,称3-sn-(或L- α -)磷脂酸(3-sn-phosphatidic acid):



它是一个最简单的甘油磷脂,是其他甘油磷脂的母体化合物。磷脂酸少量地存在于大多数生物体内,是甘油磷脂生物合成的重要中间物。磷脂酸的磷酸基进一步被一个极性醇(X-OH)酯化,形成各种常见的甘油磷脂。X-OH一般为含氮碱如胆碱(choline)、乙醇胺(ethanolamine)、丝氨酸等,此外是肌醇、甘油和糖分子。各种甘油磷脂的名称是由3-sn-磷脂酸派生而来的,例如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine),磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine)等。甘油磷脂分子的结构通式和立体模型见图2-10。如图2-10所示,分子中磷酸基与这些酯化的醇部分一起构成极性头基,两条长的烃链组成非极性尾部。由于甘油磷

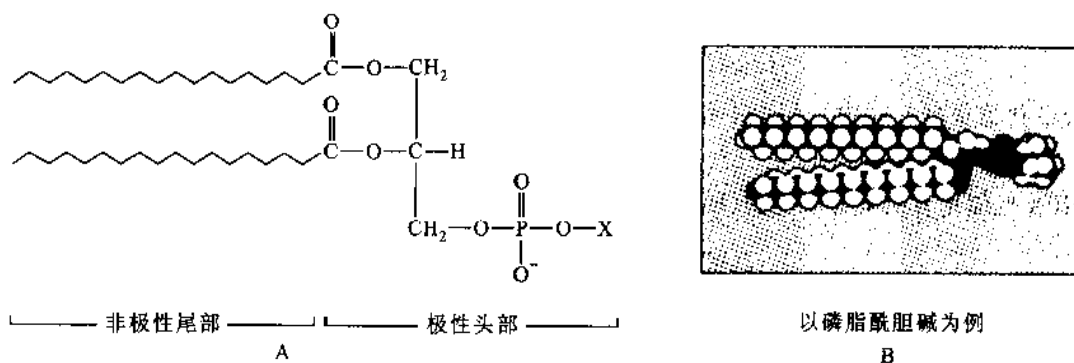


图2-10 甘油磷脂的结构通式(A)和立体结构模型(B)

脂分子中 sn-1 和 sn-2 位上酯化的是各种组合的天然脂肪酸,因此,任何一种给定的磷脂都是不均质的,实际上代表一族分子形式(molecular species)。一般说,C1 位上连接的是饱和脂肪酸,C2 位上是不饱和脂肪酸。例如,磷脂酰胆碱,C1 上主要是棕榈酸(16:0)或硬脂酸(18:0),C2 上主要是 18 碳不饱和脂肪酸,油酸(18:1),亚油酸(18:2)和亚麻酸(18:3)。几种常见的甘油磷脂的极性头基中 X 的名称和结构列于表 2-5。

表 2-5 几种常见甘油磷脂的极性头基及其净电荷

X 的名称	极性头基中 X 部分的结构	极性头基的净电荷(pH=7)
胆碱	$-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$	0
乙醇胺	$-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \overset{+}{\text{N}}\text{H}_3$	0
丝氨酸	$-\text{CH}_2 - \overset{+}{\text{C}}\text{H}(\text{NH}_3) - \text{COO}^-$	-1
肌醇	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{C}_6 \quad \text{C}_5 \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{C}_2 \quad \text{C}_3 \\ / \quad \backslash \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $	-1

续表

X 的名称	极性头基中 X 部分的结构	极性头基的净电荷 (pH=7)
甘油	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---} \\ \\ \text{CH---CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	-1
磷脂	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_2\text{---O---C---O---R}_1 \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{R}_2\text{---C---O---CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	-2
磷脂酰甘油	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{---CH}_2\text{---CH---CH}_2\text{---} \\ \\ \text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \\ \text{P---O} \\ \\ \text{O}^- \end{array}$	

(二) 甘油磷脂的一般性质

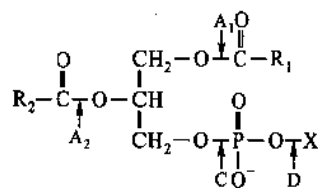
纯的甘油磷脂为白色蜡状固体。暴露于空气中由于多不饱和脂肪酸的过氧化作用,磷脂颜色逐渐变暗。甘油磷脂溶于大多数含少量水的非极性溶剂,但难溶于无水丙酮,用氯仿-甲醇混合液可从细胞和组织中提取磷脂。

磷脂属于两亲脂质,是成膜分子,在水中能形成双分子层的微囊(图 2-1)。

在生理 pH(7 左右)时,甘油磷脂分子的磷酸基带 1 个负电荷($pK'_a=1-2$);胆碱或乙醇胺部分带 1 个正电荷;丝氨酸部分带 1 个正电荷($pK'_a=9.2$)和 1 个负电荷($pK'_a=2.2$);肌醇和甘油基不带电荷。几种甘油磷脂分子的净电荷见表 2-5。

用弱碱水解甘油磷脂产生脂肪酸盐(皂)和甘油-3-磷酸醇(glycerol-3-phosphoryl alcohol)。用强碱水解则生成脂肪酸盐、醇(X-OH)和甘油-3-磷酸。磷酸与甘油之间的键对碱稳定,但能被酸水解。

甘油磷脂的酯键和磷酸二酯键能被磷脂酶(phospholipase)专一地水解。这些脂酶根据它们所水解的键(箭头所指者)分别命名为磷脂酶 A_1 , A_2 , C 和 D(见下册第 28 章):



磷脂酶 A_1 广泛分布于生物界;磷脂酶 A_2 主要存在于蛇毒、蜂毒和哺乳类胰脏(酶原形式);磷脂酶 C 来源于细菌及其他生物组织;磷脂酶 D 存在于高等植物中。磷脂酶 A_1 或 A_2 分别专一地除去甘油磷脂 sn-1 位或 sn-2 位上的脂肪酸,生成的仅含一个脂肪酸的产物称溶血甘油磷脂(lysophosphoglyceride)如溶血磷脂酰乙醇胺。它们是体内甘油磷脂代谢的中间产物,但在细胞或组织中含量很小,如果浓度高,则将对膜造成毒害。因为溶血甘油磷脂是一种很强的表面活性剂,能使细胞膜如红细胞膜溶解。菱背响尾蛇(*Crotalus adamanteus*)和印度眼镜蛇(*Naja naja*)的蛇毒含磷脂酶 A_2 。在印度眼镜蛇每年毒死数千人。

磷脂酶常作为工具酶与薄层层析技术一起用于磷脂的结构分析。

(三) 几种常见的甘油磷脂

(1) 磷脂酰胆碱 也称卵磷脂(lecithin)。系统名称为 1,2-二酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine)。它和磷脂酰乙醇胺两个是细胞膜中最丰富的脂质(表 2-6)。胆碱成分是一种季胺离子,碱性极强。胆碱在生物界分布很广,具有重要的生物学功能,是代谢中的一种

表 2-6 某些生物膜中主要脂质的百分组成(%)

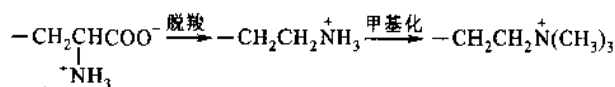
脂质	人红细胞质膜	人髓磷脂	牛心线粒体	大肠杆菌细胞膜
磷脂酸	1.5	0.5	0	0
磷脂酰胆碱	19.0	10.0	39.0	0
磷脂酰乙醇胺	18.0	20.0	27.0	65.0
磷脂酰丝氨酸	8.0	8.0	0.5	0
磷脂酰肌醇	1.0	1.0	7.0	0
磷脂酰甘油	0	0	0	18.0
心磷脂	0	0	22.5	12.0
鞘磷脂	17.5	8.5	0	0
糖脂	10.0	26.0	0	0
胆固醇	25.0	26.0	3.0	0

甲基供体;在某些条件下是膳食中必需的,因此有人把它归为 B 族维生素。乙酰化的胆碱,乙酰胆碱(acetylcholine)($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$),是一种神经递质,与神经冲动的传导有关。卵磷脂和胆碱被认为有防止脂肪肝形成的作用。卵磷脂在蛋黄和大豆中特别丰富,食品工业中广泛用作乳化剂。工业用卵磷脂主要是作为大豆油精炼过程中的副产品获得。

(2) 磷脂酰乙醇胺 也称脑磷脂(cephalin)。后一名称有时也包括磷脂酰丝氨酸在内。含氮碱部分是乙醇胺,也称胆胺(colamine)。磷脂酰乙醇胺、sn-1 位上也和卵磷脂一样主要是棕榈酸和硬脂酸,但 sn-2 位含有更多的 PUFA,包括花生四烯酸(20:4)和 DHA(22:6)。

(3) 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine) 血小板膜中带负电荷的酸性磷脂,主要是磷脂酰丝氨酸,称血小板第三因子。当血小板因组织受损而被激活时,膜中的这些磷脂转向外侧,作为表面催化剂与其他凝血因子一起致使凝血酶原活化。

磷脂酰丝氨酸与磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱的含氮碱(-X)之间的关系如下:



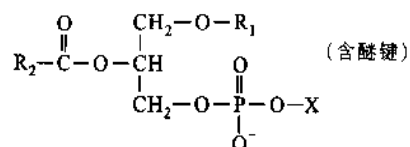
(4) 磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol) 存在于哺乳类的细胞膜中,磷脂酸的磷酸基与肌醇的 C1 位羟基(这里是逆时针方向编码,见第 1 章“糖醇”部分)以酯键相连接。在真核细胞质膜中常含有磷脂酰肌醇-4-单磷酸(PIP)和-4,5-双磷酸(PIP₂),后者是两个胞内信使肌醇-1,4,5-三磷酸(IP₃)和 1,2-二酰甘油(DAG)的前体,这些信使参与激素信号的放大(见第 17 和下册第 39 章)。

(5) 磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol) 在细菌细胞膜中含量丰富,并常以氨基酸(特别是 L-赖氨酸衍生物)的形式存在。磷脂酰甘油是心磷脂头基的 X 部分(见表 2-5)。

(6) 双磷脂酰甘油(diphosphatidylglycerol) 最先在心肌线粒体膜和细菌细胞膜中找到,因此又称心磷脂(cardiolipin)。它是由两个磷酸分子通过一个甘油分子共价连接而成。

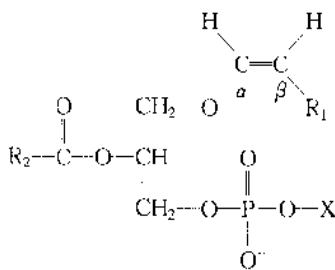
(四) 醚甘油磷脂

某些动物组织和某些单细胞生物富含醚甘油磷脂(ether phosphoglyceride)。它们与前面所述的甘油磷脂不同,其甘油骨架 sn-1 位碳上是 O-烷基,不是通常的 O-酰基:



醚甘油磷脂的结构通式

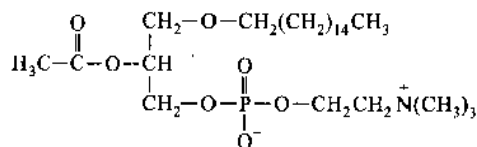
(1) 缩醛磷脂(plasmalogen) 是一族醚甘油磷脂,结构中 sn-1 位含顺- α, β -不饱和醚(O-顺- α, β -烯基):



缩醛磷脂通式

常见的缩醛磷脂的头基 X 部分包括胆碱,乙醇胺和丝氨酸,这些磷脂分别称缩醛磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline),缩醛磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine)和缩醛磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine)。脊椎动物的心脏富含缩醛磷脂,约占心脏磷脂的一半,其中又以缩醛磷脂酰胆碱含量较多。在髓磷脂(myelin)中缩醛磷脂酰乙醇胺相对地比较丰富。此外某些无脊椎动物以及嗜盐菌的膜含有高比例的缩醛磷脂。这些磷脂在膜中的功能意义尚不清楚,可能具有抗磷脂酶水解的作用。

(2) 血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF) 也是一种醚甘油磷脂,甘油部分的 sn-2 位羟基被乙酰化,它是 1-O-烷基-2-乙酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱,1-O-烷基典型地是十六烷基:



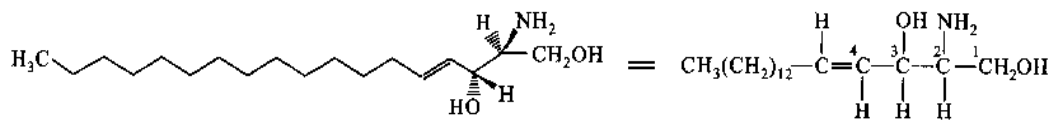
血小板活化因子

PAF 是嗜碱性粒细胞(basophil,一种白细胞)释放的,能引起血小板凝集和血管扩张,它是炎症和过敏反应中的有效介体(mediator),只要组织中它的浓度达到 10^{-12} mol/L 就能发生效应。sn-2 位上乙酰基代替长链酰基增加了 PAF 的水溶性,使它在水环境中更好发挥信使的作用。

(五) 鞘磷脂

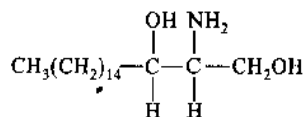
鞘磷脂(sphingomyelin)即鞘氨醇磷脂(phosphosphingolipid),在高等动物的脑髓鞘和红细胞膜中特别丰富,也存在于许多植物种子中。鞘磷脂由鞘氨醇、脂肪酸和磷酸胆碱(少数是磷酸乙醇胺)组成。

(1) 鞘氨醇(sphingosine) 至今发现的鞘氨醇已有 60 多种。哺乳动物的鞘磷脂中最常见的是 18 碳不饱和的 4-烯鞘氨醇(4-sphinganine),常称 D-鞘氨醇(D-sphingosine),其次是饱和的二氢鞘氨醇(sphinganine, dihydrosphingosine)和 4-羟二氢鞘氨醇(4-hydroxy-sphinganine),又称植物鞘氨醇(phyto-sphingosine),因为它是真菌和植物的鞘脂的主要鞘氨醇成分。它们的结构见下面:

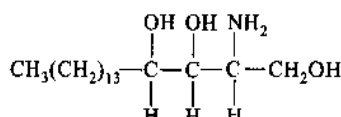


D-鞘氨醇

(反式-D-赤藓糖型-2-氨基-4-十八碳烯-1,3-二醇)

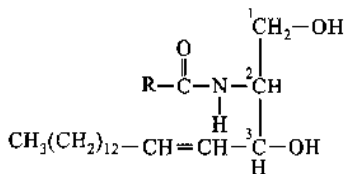


二氢鞘氨醇



植物鞘氨醇

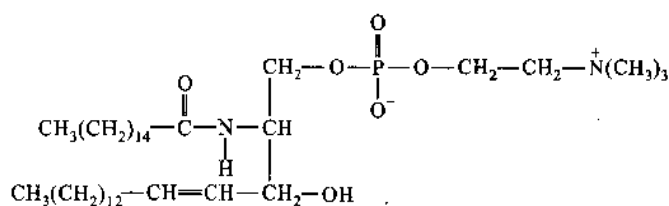
(2) 神经酰胺(ceramide, Cer) 鞘氨醇分子的 C1, C2 和 C3 携有 3 个功能基(-OH, -NH₂, -OH), 很像甘油分子的 3 个羟基。当脂肪酸通过酰胺键与鞘氨醇的 -NH₂ 相连, 则成神经酰胺, 结构上与二酰甘油相似:



神经酰胺的结构通式

神经酰胺是鞘脂类(鞘磷脂和鞘糖脂)共同的基本结构。

(3) 鞘磷脂 是神经酰胺的 1-位羟基(伯醇基)被磷酰胆碱或磷酰乙醇胺酯化形成的化合物, 例如胆碱鞘磷脂(choline sphingomyelin):



N-棕榈酰-D-鞘氨醇-1-磷酰胆碱

鞘磷脂也和甘油磷脂一样具有两条烃链和一个极性头基, 与 -NH₂ 连接的脂肪酸最常见的有 C₁₆, C₁₈, C₂₄ 烷酸如神经酸(表 2-2)。

植物鞘磷脂中与磷酸基连接的不是胆碱或乙醇胺而是一个通过肌醇相连的三糖或四糖。因为它们含有糖基, 所以也称植物糖鞘磷脂(phytoglycophosphosphingolipid)。

六、糖 脂

根据 IUPAC-IUB 命名委员会所下的定义, 糖脂是指糖通过其半缩醛羟基以糖苷键与脂质连接的化合物。前述的植物糖鞘磷脂虽含糖基但它并不是以糖苷键(而是糖脂键)与脂质相连, 因此不应归入糖脂类。鉴于脂质部分的不同, 糖脂可分为鞘糖脂、甘油糖脂以及由类固醇衍生的糖脂, 如第 1 章中提到的一些强心苷。作为膜脂主要的是前两类。

(一) 鞘糖脂

鞘糖脂(glycosphingolipid)也是以神经酰胺为母体的化合物, 因而可与鞘磷脂一起归入鞘脂类。鞘糖脂是神经酰胺的 1-位羟基被糖基化形成的糖苷化合物。动物鞘糖脂中的单糖成分主要是 D-葡萄糖、D-半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖和唾液酸。脂肪酸成分以 16~24 碳的饱和与低不饱和脂肪酸居多, 此外还有相当数量的 α -羟基脂肪酸。根据糖基是否含有唾液酸或硫酸基成分, 鞘糖脂又可分为中性鞘糖脂和酸性鞘糖脂两类。

1. 中性鞘糖脂

中性鞘糖脂的糖基不含唾液酸成分。常见的糖基有半乳糖、葡萄糖等单糖, 此外还有二糖、三糖等寡糖。第一个被发现的鞘糖脂是半乳糖基神经酰胺(galactosylceramide); 因为最先是从小脑中获得, 所以又称脑苷脂(cerebroside)(图 2-11)。脑苷脂一词现在被用来泛指半乳糖苷神经酰胺(Gal β 1 \rightarrow 1Cer)和葡萄糖基神经酰胺(Glc β 1 \rightarrow 1Cer)。属中性鞘糖脂的还有乳糖基神经酰胺(Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer)。ABH 和

Lewis 血型的细胞表面抗原物质也是鞘糖脂(有些是糖蛋白),由相应的抗原决定簇(表 1-10)与乳糖基神经酰胺共价连接而成的五糖基神经酰胺和六糖基神经酰胺。由于这些糖脂含有岩藻糖,因此也称它们为岩藻糖脂(fucolipid)。鞘糖脂的疏水尾部伸入膜的脂双层,极性糖基露在细胞表面,它们不仅是血型抗原而且与组织和器官的特异性,细胞-细胞识别有关。

2. 酸性鞘糖脂

(1) 硫酸鞘糖脂 指糖基部分被硫酸化的鞘糖脂,也称硫苷脂(sulfatide)。最简单的硫苷脂是硫酸脑苷脂(cerebroside sulfate)(图 2-11),其结构为 $\text{SO}_4^- - 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 1\text{Cer}$ 。已分离到的硫苷脂有几十种。它们广泛地分布于哺乳动物的各器官中,以脑中含量最为丰富。硫苷脂可能与血液凝固和细胞粘着有关。

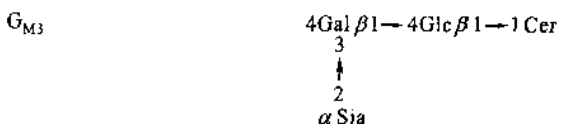
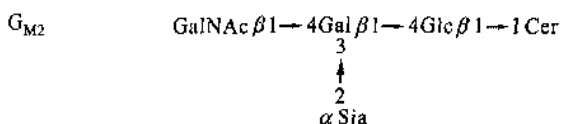
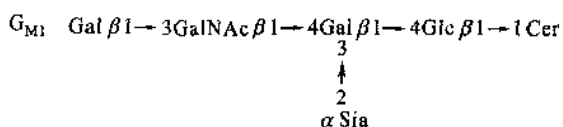
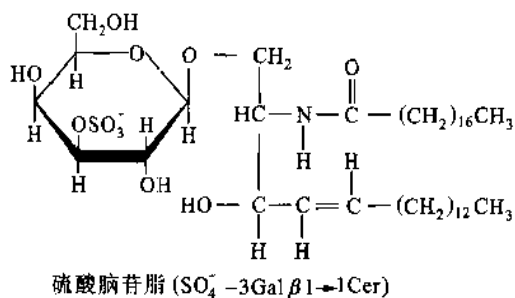
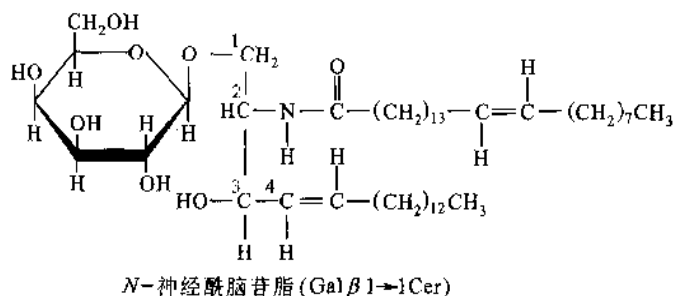


图 2-11 几种鞘糖脂的化学结构

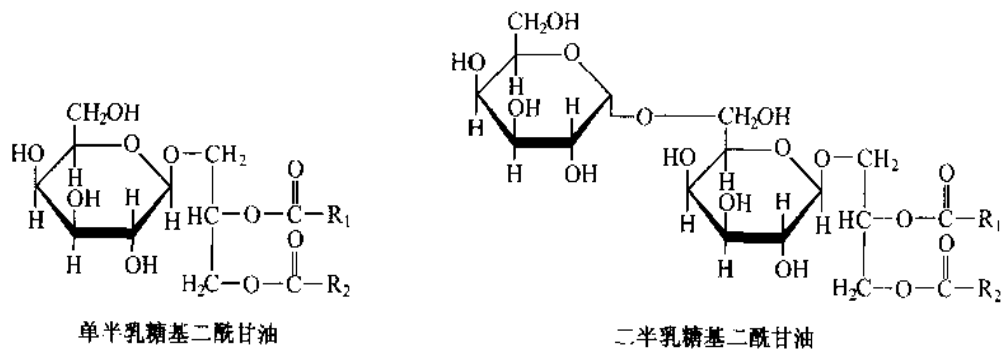
(2) 唾液酸鞘糖脂 糖基部分含有唾液酸的鞘糖脂,常称神经节苷脂(ganglioside)。神经节苷脂的糖基都是寡糖链,含一个或多个唾液酸。在人体内的神经节苷脂中几乎全部都是 N-乙酰神经氨酸。它们往往以 α2→3 连接于寡糖链内部的或末端的半乳糖残基上或以 α2→6 连接在 N-乙酰半乳糖胺残基上,或以 α2→8 连接在另一个唾液酸残基上。

唾液酸鞘糖脂的命名是,用字母G代表神经节苷脂,右下标M、D、T分别表示含1、2、3个唾液酸的神经节苷脂,下标1、2、3是指与神经酰胺相连的糖链顺序:1是Gal-GalNAc-Gal-Glc-Cer;2是GalNAc-Gal-Glc-Cer;3是Gal-Glc-Cer(图2-11)。

神经节苷脂是最重要的鞘糖脂,在神经系统特别是神经末梢中含量丰富,种类很多。它们可能在神经冲动传递中起重要作用。许多遗传性疾病涉及特异鞘糖脂的积累,例如一种叫Tay-sachs病,症状表现为进行性发育阻滞、麻痹、失明,出生后的3~4年内死亡。其病因是由于溶酶体内先天性缺乏 β -N-乙酰己糖胺酶A(β -N-acetylhexaminidase A),因而不能水解神经节苷脂极性头基中GalNAc和Gal残基之间的糖苷键而引起G_{M2}在脑中的非常积累。

(二) 甘油糖脂

甘油糖脂(glyceroglycolipid)也称糖基甘油酯(glycoglyceride)。它是二酰甘油分子sn-3位上的羟基与糖基以糖苷键连接而成。最常见的甘油糖脂有单半乳糖基二酰基甘油和二半乳糖基二酰基甘油。其结构如下:



甘油糖脂主要存在于植物界和微生物中。植物的叶绿体和微生物的质膜含有大量的甘油糖脂。哺乳类虽然含有甘油糖脂,但分布不普遍,主要存在于睾丸和精子的质膜以及中枢神经系统的髓磷脂中。

七、萜和类固醇

萜和类固醇与前述的各类脂质不同,一般不含脂肪酸,属不可皂化脂质。但在生物体内这两类脂质也是以乙酸为前体合成的。它们在生物体内含量虽不多,但不少是重要的活性脂质(见本章“脂质的生物学作用”)。

(一) 萜

萜(terpene)分子的碳架可看成是由两个或多个异戊二烯单位(isoprene unit),一种五碳单位(缩写为C₅),连接而成。异戊二烯的连接方式一般是头尾相连,但也有尾尾相接的(图2-12)。形成的萜类可以是直链的,也可以是环状分子;可以是单环、双环和多环化合物。

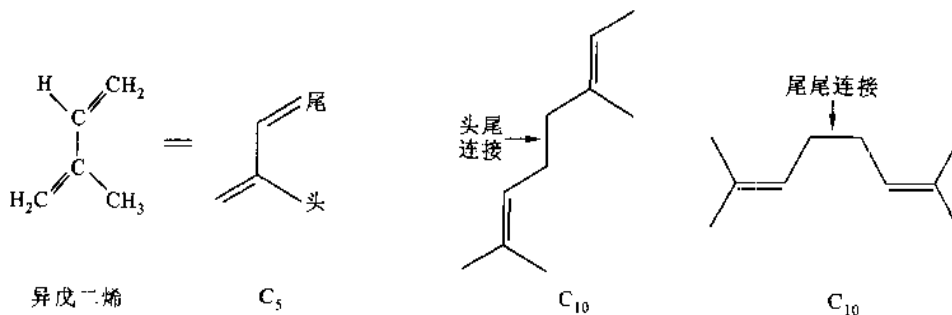


图2-12 异戊二烯(2-甲基-1,3-丁二烯)的结构和异戊二烯在萜中的连接方式

根据所含的异戊二烯的数目、萜可分为单萜、双萜、三萜和多萜等。由两个异戊二烯构成的萜称单萜，由3个异戊二烯构成的称倍半萜，由4个异戊二烯构成的称双萜，其余依此类推。

(1) 单萜(monoterpene) 碳原子数为 C_{10} ；存在于各种高等植物中，许多是植物精油(essential oil)的成分。链状单萜如香茅醇，存于香茅油中的是 $R-(+)$ 型，玫瑰油中的是 $S-(-)$ 型；环状单萜如柠檬中的柠檬烯(图2-13)。

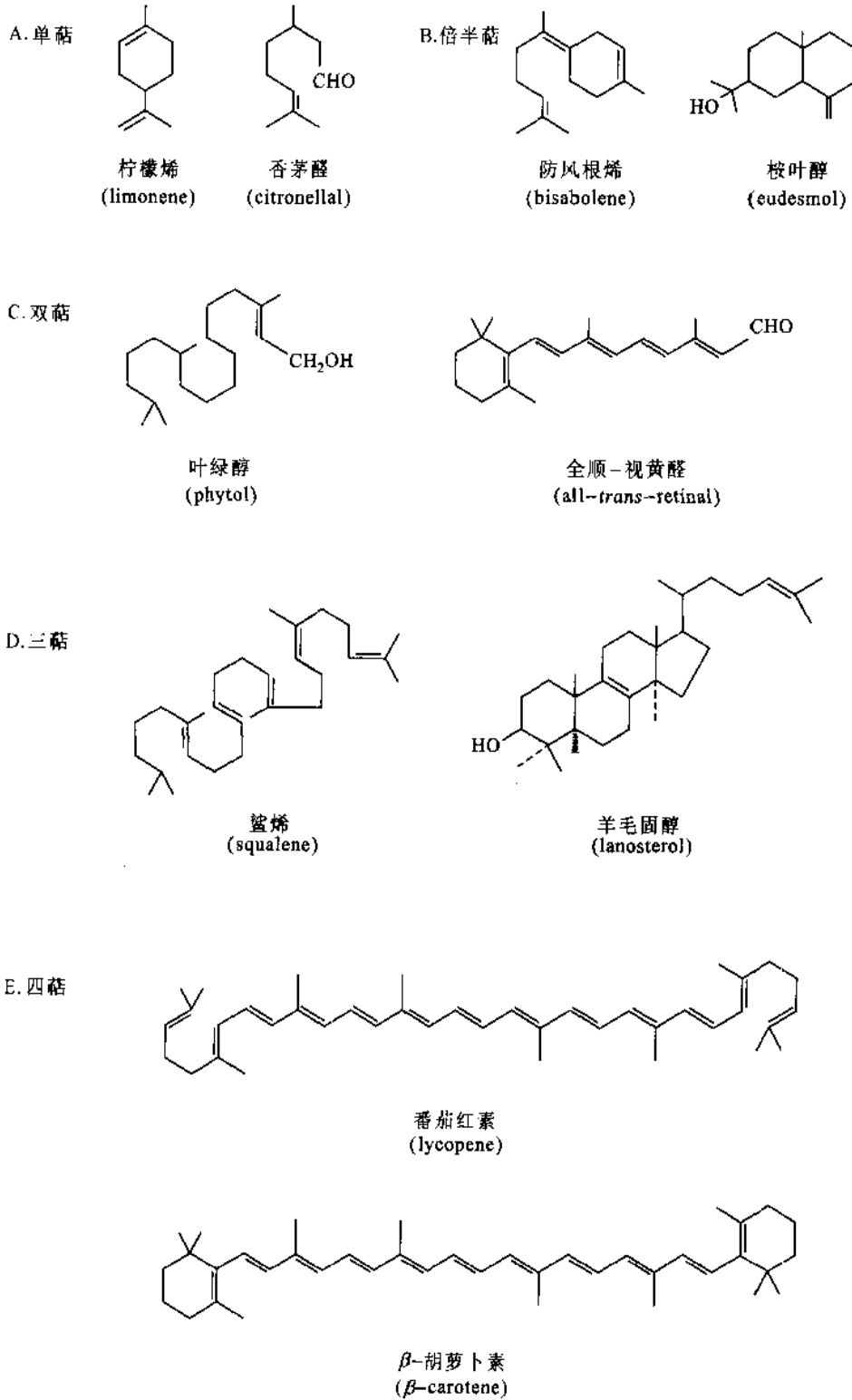


图2-13 某些萜类化合物的结构

(2) 倍半萜 (sesquiterpene) 碳数为 C_{15} ; 倍半萜结构形式多种; 虽知道得不甚多, 但有些是中草药中的研究对象, 如防风根烯、桉叶醇等。

(3) 双萜 (diterpene) 碳数 C_{20} ; 叶绿素分子的成分叶绿醇或称植醇、全顺视黄醛以及赤霉素 (一种植物激素, 见第 17 章)。

(4) 三萜 (triterpene) 碳数为 C_{30} ; 属这类萜的如鲨烯和羊毛固醇, 它们是胆固醇和其他类固醇 (见后面) 的前体。

(5) 四萜 (tetraterpene) 碳数为 C_{40} ; 除类胡萝卜素 (carotenoid) 外, 其他类型的四萜少见。类胡萝卜素是有色光合色素, 包括番茄红素、胡萝卜素 (carotene) 及其氧化物约 70 种。番茄红素是存在于番茄中的一种色素, 分子中有 11 个共轭双键 (图 2-13), 胡萝卜素的结构与番茄红素很相似, 只是前者在链的两端或一端含有一个环己烯环。胡萝卜素根据双键数目或位置不同, 有 α, β, γ 等 6 种异构体。其中 β 胡萝卜素是维生素 A 的前体 (见第 11 章)。存在于玉米、蛋黄中的玉米黄质 (zeaxanthin) 是 3,3'-二羟基- β -胡萝卜素; 节肢动物中的虾青素 (astaxanthin) 及其氧化产物虾红素 (astacin) 是 β -胡萝卜素的氧化物; 细菌中的紫菌素 (rhodomycetin) 也是一种类胡萝卜素。

(6) 多萜 (polyterpene) 如前面谈到过的多萜醇磷酸含 18~20 个异戊二烯单位; 细菌十一异戊二烯醇磷酸含 11 个异戊二烯单位; 泛醌 (辅酶 Q) 侧链含 10 个异戊二烯单位; 天然橡胶是由几千个异戊二烯单位头尾连接而成的大分子, 异戊二烯可由蒸馏天然橡胶产生。

植物经常散发出异戊二烯, 约占光合作用中被固定碳的 15%。全球从植被 (vegetation) 散发的异戊二烯估计达 3×10^{11} kg/年。散发出的异戊二烯形成气氛, 覆盖在植被上, 保护叶子免遭因高温 (炎夏) 引起的不可逆损伤。这可能是因为植物周围空气中的异戊二烯溶入叶细胞膜, 并改变脂双层和膜中脂质-蛋白质、蛋白质-蛋白质的相互作用而增加对热的耐受性。

(二) 类固醇

1. 类固醇的结构特点

类固醇也称甾类 (steroid), 这类化合物的结构以环戊烷多氢菲 (perhydrocyclopentanophenanthrene) 为基础。如图 2-14 所示它是由 3 个六元环 (A、B、C 环) 和一个五元环 (D 环) 稠合而成。D 环称环戊烷, ABC 稠合环是菲 (phenanthrene) 的衍生物, 称多氢菲 (perhydrophenan), 在环戊烷多氢菲的 A、B 环之间和 C、D 环之间各有一个甲基 (18, 19), 称角甲基, 带有角甲基的环戊烷多氢菲称甾核 (steroid nucleus) 是类固醇的母体。甾核碳原子的编号从 A 环开始。

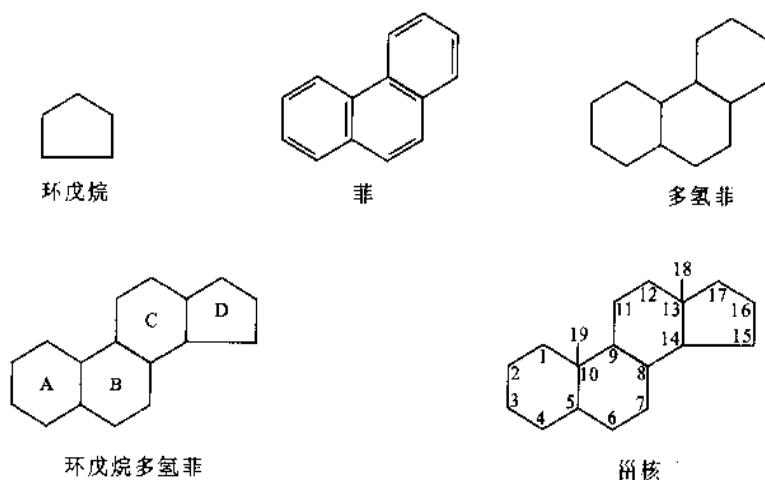


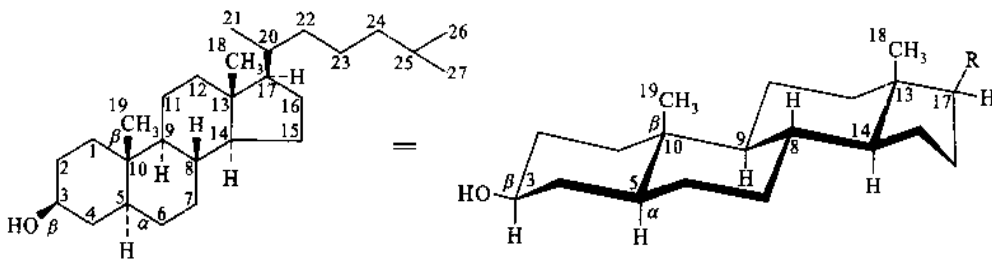
图 2-14 环戊烷多氢菲和甾核的结构

类固醇的结构特征是①甾核的 C3 上常为羟基或酮基; ② C 17 上可以是羟基、酮基或其他各种形式的

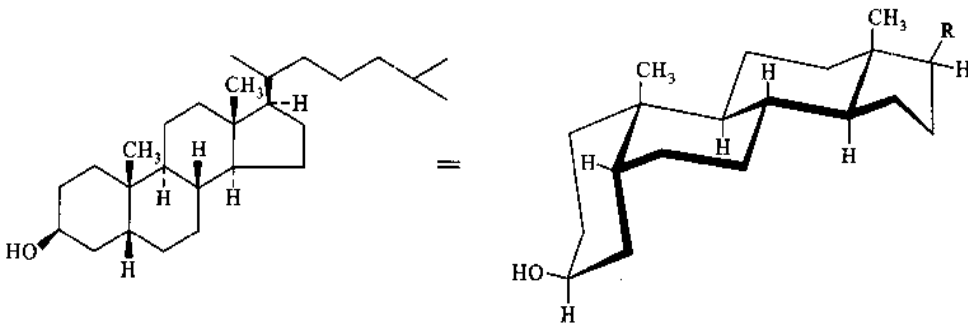
侧链；③ C4-C5 和 C5-C6 之间常是双键；④ A 环在某些化合物如雌酮(estrone)中是苯环,这些类固醇无 C19-角甲基。类固醇的种类很多,原因是①环上的双键数目和位置不同；②取代基的种类、数目、位置和取向(α, β)不同；③环和环耦合的构型(顺反异构)不同。

2. 类固醇的立体结构

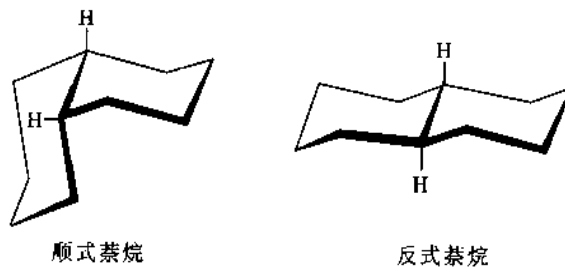
甾核中 3 个六元环可采取无张力的椅式构象(图 2-15)。与简单的环己烷不同,类固醇的六元环不能发生椅-椅互换(环转向)(见第 1 章“单糖的构象”)。甾核的构象基本上是一个刚性的平面。如图 2-15 所示,在顺式萜烷(*cis*-decalin)中环接合位置上的两个基团(如氢原子)处在环面的同侧;在反式萜烷中这两个角基分处在环面的上下两侧。同样在类固醇中 A 环和 B 环可以顺式耦合,也可以反式耦合;但其他环的耦合(B-C, C-D)是反式的。A-B 反式类固醇, C10 上的角甲基(C19)伸向分子平面的上方(称 β 取向),在投影式中用实线键表示; C5 位上的氢原子伸向分子平面的下方(称 α 取向),用虚线键表示。A-B 顺式类固醇, C10 上的角甲基和 C5 上的氢原子都伸向分子平面的上方(β 取向)。这两种类固醇的分子都比较长而扁平,两个角甲基直立地伸向分子平面的上方。



胆固醇(一个 A-B 反式类固醇)



类固醇(一个 A-B 顺式类固醇)



顺式萜烷

反式萜烷

图 2-15 类固醇的立体化学

类固醇分子平面上的取代基可以是直立的,也可以是平伏的。一般说,由于空间上的原因平伏取代比直立取代稳定。例如胆固醇的 C3 上的羟基是平伏的(图 2-15)。

(三) 胆固醇和非动物固醇

类固醇中有一大类称为固醇或甾醇(sterol)的化合物,其结构特点是在甾核的 C3 上有一个 β 取向的羟基, C17 上有一个含 8~10 个碳原子的烃链。固醇存在于大多数真核细胞的膜中,但细菌不含固醇类。固醇可游离存在,也可与脂肪酸成酯(蜡)存在。

1. 胆固醇(cholesterol)

胆固醇在脑、肝、肾和蛋黄中含量很高,它是最常见的一种动物固醇(zosterol)。此外还有羊毛固醇(图 2-13),胆甾烷醇(cholestanol)也称二氢胆固醇,粪固醇(coprostanol),它是二氢胆固醇的异构体(图 2-15),以及 7-脱氢胆固醇等。胆固醇的化学结构及其立体模型如图 2-16 所示。

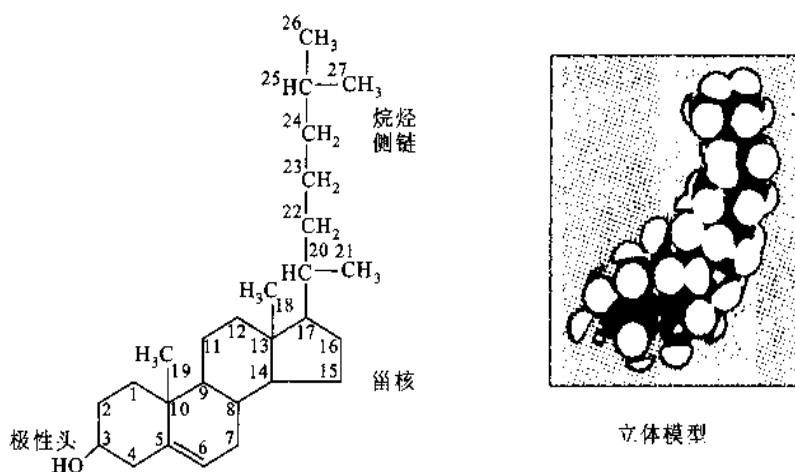


图 2-16 胆固醇(5 α -胆甾烯-3 β -醇)的结构

胆固醇也是两亲分子,但它的极性头基(C3 上的羟基)弱小,而非极性部分(甾核和 C17 上的烷烃侧链)大而刚性。此两亲特性使胆固醇对膜中脂质的物理状态具有调节作用(见第 18 章)。胆固醇主要存在于动物细胞,参与膜的组成(表 2-6),质膜中的含量比细胞器膜中的多。胆固醇也是血中脂蛋白复合体的成分;并与粥样硬化有关,它是动脉壁上形成的粥样硬化斑块成分之一。胆固醇也是类固醇激素和胆汁酸的前体。

在体内胆固醇从乙酸(乙酰 CoA 形式)经鲨烯、羊毛固醇、7-脱氢胆固醇合成,后者是胆固醇合成直接前体之一(见下册第 29 章)。存在于皮肤中的 7-脱氢胆固醇在紫外线作用下转化为维生素 D₃(见第 15 章)。

胆固醇除人体自身合成外,尚可从膳食中获取。胆固醇既是生理必需的,但过多时又会引起某些疾病。例如胆结石症的胆石几乎是胆固醇的晶体,又如冠心病患者血清总胆固醇含量很高,超过正常值(3.30~6.20 mmol/L)上限。因此必须控制膳食中的胆固醇量。

自 1784 年从胆石中提取出胆固醇以来,因致力于围绕胆固醇这种生物小分子的研究,已有十几位学者获得诺贝尔奖,足见胆固醇在生物学和医学上的重要性。

2. 非动物固醇

植物很少含胆固醇,但含有其他固醇,称植物固醇(phytosterol)。其中最丰富的是 β -谷固醇(β -sitosterol),存在于小麦、大豆等谷物中。 β -sitosterol 的结构几乎和胆固醇一样,只是在 C17 上的侧链是 C10 不是 C8,因为在侧链 C24 连有一个 β 取向的乙基(24 位碳为手性碳,属 R 构型),因此也称 24 β -乙基胆固醇。常见的植物固醇还有豆固醇(stigmasterol),菜油固醇(campesterol)等(图 2-17)。

植物固醇很少被人的肠粘膜细胞吸收,并能抑制胆固醇吸收。开发降低胆固醇用的植物固醇类药物,不仅与这些固醇本身的结构有关,而且取决于投药的剂型。例如谷固醇在人肠道内少量被吸收,但它的饱和类似物,谷甾醇(sitostanol),则完全不被吸收。此外,植物固醇在抑制胆固醇方面,以可溶性微团形式

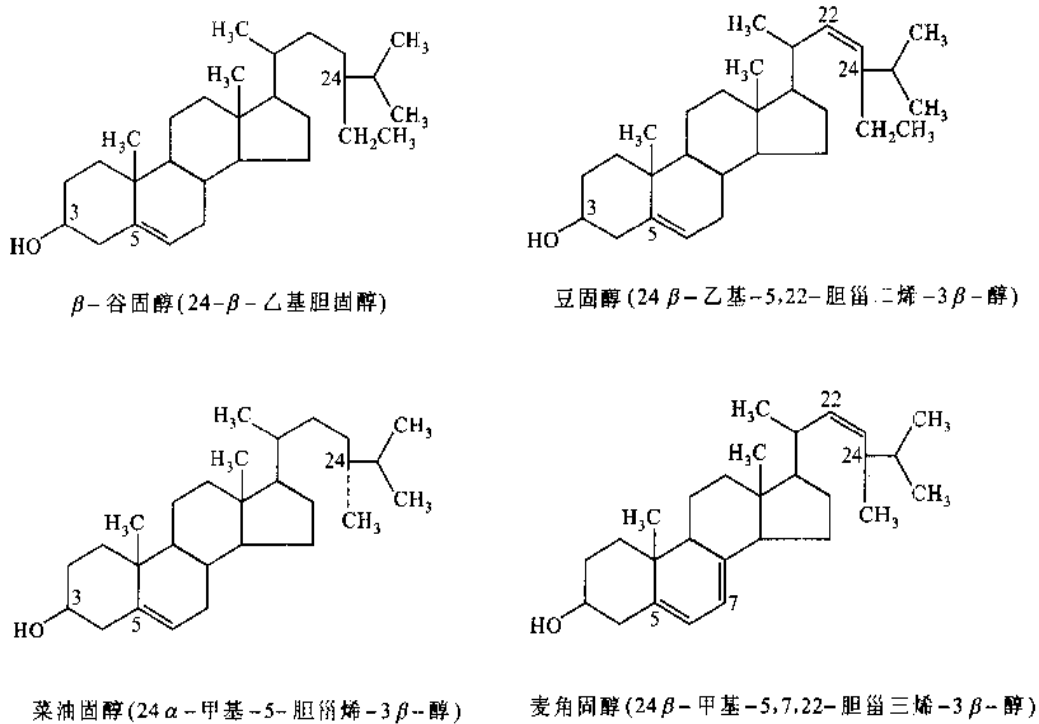


图 2-17 几种植物固醇和真菌固醇

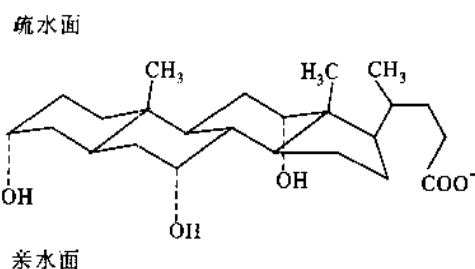
投药比固体结晶形式投药更为有效。

真菌类如酵母和麦角菌(*Claviceps*)产生的麦角固醇(ergosterol)(图 2-17)在紫外线照射下可转化为维生素 D₂ 前体,后者经加热转变成维生素 D₂(见第 11 章)。此外还有酵母产生的酵母固醇(zymosterol),即 8,24-胆甾二烯-3 β -醇,及其他。

(四) 固醇衍生物

动物中从胆固醇衍生来的类固醇包括 5 类激素:雄激素、雌激素、孕酮、糖皮质激素和盐皮质激素(见第 17 章),维生素 D 和胆汁酸。植物中的强心苷配基和某些皂苷的配基(见第 1 章“糖苷”),植物和昆虫产生的蜕皮激素(见第 17 章)、蟾蜍腮腺毒液中分离的蟾毒素(bufotoxin)都是类固醇物质,后者的生理作用与强心苷相似。

胆汁酸(bile acid)是在肝内由胆固醇直接转化而来。人体内每天合成胆固醇约 1~1.5 克,其中约 0.4~0.6 g 在肝内转变为胆汁酸。胆汁酸是机体内胆固醇的主要代谢终产物。人胆汁中含 3 种胆汁酸:胆酸(cholic acid),鹅[脱氧]胆酸(chenodeoxycholic acid)和脱氧胆酸(deoxycholic acid)。胆酸和鹅胆酸是在肝脏中合成的,称初级胆汁酸(primary bile acid);脱氧胆酸是胆酸在肠道中经细菌 7-脱羟作用衍生而来的,称次级胆汁酸(secondary bile acid)。由于在肠道内胆汁酸被重吸收并通过肠肝循环(enterohepatic circulation),初级和次级胆汁酸均在胆汁中出现。这 3 种胆汁酸的结构如图 2-18 所示。已证实,胆汁酸属 A-B 顺式类固醇(图 2-15);3,7,12 位上的羟基均为 α 取向,C 10 和 C 13 上的两个角甲基为 β 取向,羧基伸向羟基一侧,因而胆汁酸分子一个面是亲水的,另一个面是疏水的:



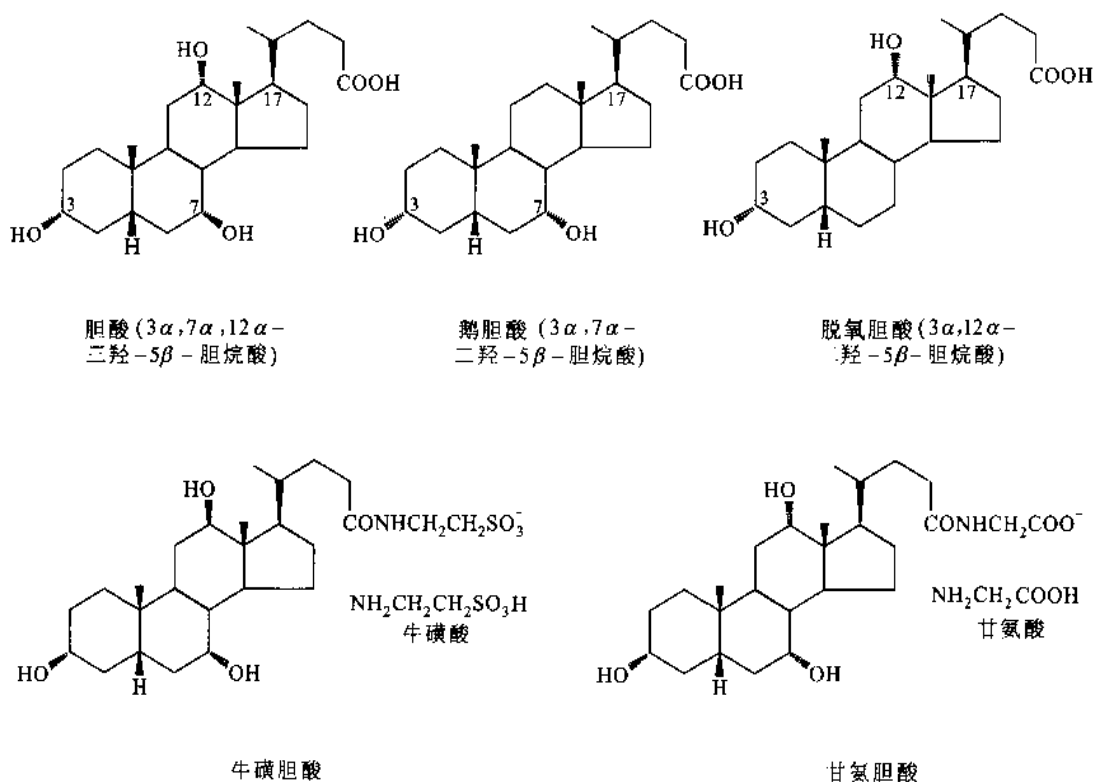


图 2-18 胆汁酸和结合胆汁酸

胆汁酸是去污剂,具有增溶作用,脱氧胆酸和胆酸都是实验室里用来增溶膜蛋白和酶的重要试剂。

在肝脏中胆汁酸的羧基通过酰胺键与牛磺酸(taurine)或甘氨酸连接,分别生成胆汁酸的牛磺结合物或甘氨酸结合物,如牛磺胆酸(taurocholic acid)、甘氨酸胆酸(glycocholic acid)。牛磺结合物和甘氨酸结合物是胆汁酸的主要形式。胆汁盐是这些结合物的钠盐或钾盐,它们是很强的去污剂,能溶于油-水界面处,以其疏水面与脂相接近,亲水面与水相接触,使油脂乳化,形成微团,便于水溶性脂酶发挥作用,因而促进肠道中油脂及脂溶性维生素的消化吸收。

八、脂 蛋 白

脂蛋白(lipoprotein)是由脂质和蛋白质以非共价键(疏水相互作用、范德华力和静电引力)结合而成的复合物。脂蛋白中的蛋白质部分称脱辅基脂蛋白或载脂蛋白(apolipoprotein, apo)。脂蛋白广泛存在于血浆中,因此也称血浆脂蛋白(plasma lipoprotein)。此外细胞的膜系统中与脂质融合的蛋白质也可看成是脂蛋白,并称为细胞脂蛋白,将在第6和第18章讨论。

(一) 血浆脂蛋白的分类

大多数脂质在血液中的转运是以脂蛋白复合物(lipoprotein complex)形式进行的。未酯化的脂肪酸仅与血浆中的血清清蛋白和其他蛋白质简单结合而被转运,但是磷脂、三酰甘油、胆固醇和胆固醇酯都是以更复杂的脂蛋白颗粒形式被转运的。

血浆脂蛋白中脂质和蛋白质的含量是相对固定的。而脂蛋白的密度与复合物中脂质和蛋白质的相对含量有关。因为大多数蛋白质的密度约为 $1.3 \sim 1.4 \text{ g/cm}^3$,脂质聚集体的密度一般约为 $0.8 \sim 0.9 \text{ g/cm}^3$,所以复合物中蛋白质愈多,脂质愈少,复合体的密度愈高。脂蛋白依密度增加为序可分为乳糜微粒(chylomicron),极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL),中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL),低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)(表 2-7)。

表 2-7 主要的人血浆脂蛋白的组成和性质

脂蛋白类别	密度 /(g·cm ⁻³)	颗粒直径 /nm	主要 载脂蛋白(apo)	组成/(%干重)				
				蛋白质	胆固醇	胆固醇酯	磷脂	三酰甘油
乳糜微粒	0.92~0.96	100~500	B-48,A,C,E	1~2	2	4	8	84~85
VLDL	0.95~1.006	30~80	B-100,C,E	10	8	14	18	50
IDL	1.006~1.019	25~50	B-100,E	18	8	22	22	30
LDL	1.019~1.063	18~28	B-100	25	9	40	21	5
HDL	1.063~1.21	5~15	A-1,A-2,C,F	50	3	17	27	3

血浆脂蛋白可利用密度梯度超速离心方法(见第7章)使之分离。5类脂蛋白中有的还存在亚类,如残留乳糜微粒(chylomicron remnant),它是由乳糜微粒形成的,其密度范围在0.9到1.006之间,因此残留乳糜微粒的密度与VLDL的重叠。此外,HDL也不是均一的,这可以从离心谱(图2-19A)上看出,HDL峰是一个多相峰,含HDL₂和HDL_{3c}。血浆脂蛋白也可利用更方便的电泳方法(第7章)把它们分开。如图2-19B中的电泳谱所示,得到4个条带:一条留在原点,含乳糜微粒;另一条称 β -脂蛋白,它与 β -球蛋白一起迁移,含LDL及IDL;第三条迁移在 β -区的前沿,称前 β -脂蛋白,含VLDL;第四条称 α -脂蛋白,和 α -球蛋白迁移在一起,含HDL;残留乳糜微粒分布在 β -和前 β -区。临床实验室血浆脂蛋白分析一般采用醋酸纤维薄膜电泳进行,含脂条带用油红O(oil red O)染色显示。

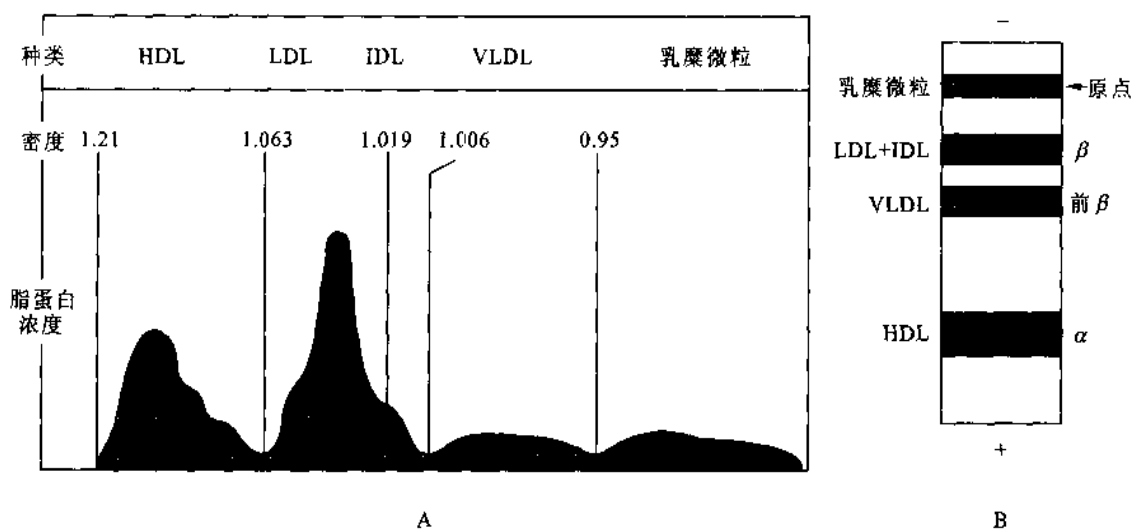


图 2-19 血浆脂蛋白密度(A)和电泳迁移率(B)之间的对应关系

(二) 血浆脂蛋白的结构与功能

血浆脂蛋白都是球状颗粒,由一个疏水脂(三酰甘油和胆固醇酯)组成的核心和一个极性脂(磷脂和游离胆固醇)与载脂蛋白参与的外壳层(单分子层)构成(图2-20)。极性脂的定向是,以其极性头基面向外部的的水相。外壳层将内部的疏水脂与外部的溶剂水隔离。载脂蛋白常富含疏水氨基酸残基,构成两亲的 α 螺旋区,一方面(疏水区)可以与脂质很好结合,另一方面(亲水区)可以与溶剂水相互作用。载脂蛋白的主要作用是:①作为疏水质体的增溶剂,②作为脂蛋白受体的识别部位(细胞导向信号)。至今已有10多种载脂蛋白被分离和鉴定(表2-8),它们主要是在肝和肠中合成并分泌的。

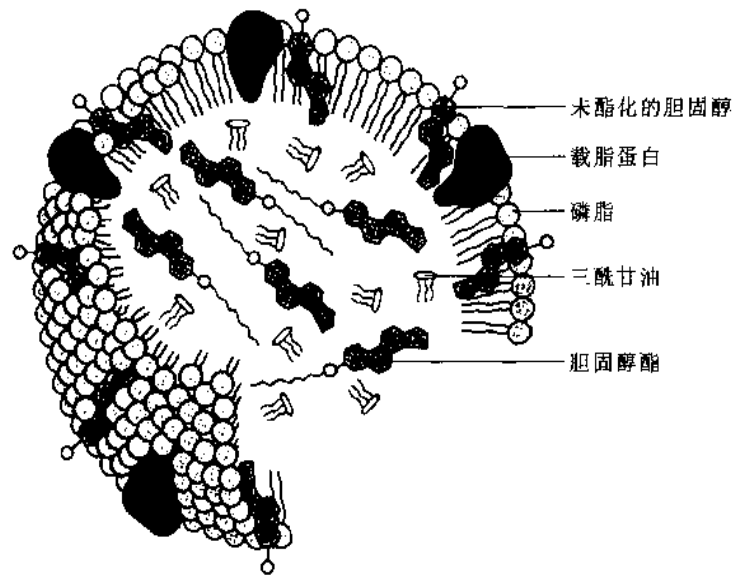


图 2-20 血浆脂蛋白的结构

表 2-8 人血浆脂蛋白的载脂蛋白

载脂蛋白	M_r	血浆中浓度/ (mg/dl)	主要合成地点	分 布
A-1	28 300	90~120	小肠、肝	HDL 中的主要蛋白
A-2	8 700	30~50	小肠、肝	在 HDL 中主要以二聚体形式存在
A-4	43 000	15	小肠	存在于乳糜微粒
B-100	500 000	80~100	肝	LDL 中的主要蛋白
B-48	240 000	<5	小肠	只在乳糜微粒中发现
C-1	7 000	4~7	肝	存在于乳糜微粒、VLDL 和 HDL
C-2	8 800	3~8	肝	存在于乳糜微粒、VLDL 和 HDL
C-3	8 800	8~15	肝	存在于乳糜微粒、VLDL、IDL 和 HDL
D	32 500	8~10	肾上腺、肾、脑、肝、小肠	存在于 HDL
E	34 100	3~6	肝、各器官中巨噬细胞, 星型胶质细胞	存在于乳糜微粒、VLDL、IDL 和 HDL

乳糜微粒是由小肠上皮细胞合成的。其核心是三酰甘油,它占乳糜微粒重量的 85%~95%,因此它是密度最小的脂蛋白。外层(磷脂和胆固醇)主要含 apo B-48 及其他 apo(表 2-7)。乳糜微粒的主要功能是从小肠转运三酰甘油、胆固醇及其他脂质到血浆和其他组织。乳糜微粒的三酰甘油被位于肌肉和脂肪组织中的毛细血管内壁上的脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase)所水解,水解产物脂肪酸被这些组织用作燃料和合成脂肪的前体。富含胆固醇的残留物,称残留乳糜微粒,它被肝所吸收。

VLDL 在肝细胞的内质网中合成,它的载脂蛋白主要是 apo B-100。apo B-100 是已知的最大蛋白质之一。apo B-100 和 B-48 是由同一个基因编码,同一个初始 RNA 转录物产生。在小肠中 RNA 编辑(RNA editing)修改了转录物,截短成 apo B-48 mRNA(见下册第 36 章)。VLDL 的功能是从肝脏运载内源性(肝所需之外的多余部分)三酰甘油和胆固醇至各靶组织。VLDL 的三酰甘油也和乳糜微粒一样被那里的毛细血管内壁上的脂酶所水解。剩下的颗粒称 IDL。

IDL 颗粒所含的三酰甘油和胆固醇的量介于 VLDL 和 LDL 之间。一部分 IDL 被肝直接吸收,其余部分转变为 LDL。肝细胞吸收 IDL 是被 LDL 受体所识别的,在 IDL 情况由 apo E 介导结合。而 LDL 是由 B-100 介导与受体结合。

LDL 是血液中胆固醇的主要载体。其核心约由 1 500 个胆固醇酯分子组成。胆固醇酯中最常见的脂酰基是亚油酸。疏水核心外面包围着磷脂和未酯化的胆固醇壳层,壳层中也含 apo B-100,它被靶细胞所

识别。LDL 的功能是转运胆固醇到外围组织,并调节这些部位的胆固醇从头合成(见下册第 29 章)。

HDL 是以称为新生 HDL 的前体形式在肝和小肠中合成的。肝分泌的新生 HDL 是扁圆形的,含磷脂、胆固醇和 apo E。分泌后,此扁圆形颗粒改型为球状 HDL,在改型过程中收集从死细胞、进行更新的膜、降解的乳糜微粒和 VLDL 释放到血浆中的胆固醇、磷脂、三酯甘油以及载脂蛋白。在 HDL 中酰基转移酶使胆固醇酯化,酯化的胆固醇由血浆脂质转移蛋白快速往复地送到 VLDL 或 LDL。

临床研究证明,脂蛋白代谢不正常是造成动脉粥样硬化的主要原因。血浆中 LDL 水平高而 HDL 水平低的个体容易患心血管疾病。

九、脂质的提取、分离与分析

脂质存在于细胞、细胞器和细胞外的体液如血浆、胆汁、乳和肠液中。欲研究某一特定部分(例如红细胞、脂蛋白或线粒体)的脂质,首先须将这部分组织或细胞分离出来。由于脂质不溶于水,从组织中提取和随后的分级分离都要求使用有机溶剂和某些特殊技术,这与纯化水溶性分子如蛋白质和糖是很不相同的。一般说,脂质混合物的分离是根据它们的极性差别或在非极性溶剂中的溶解度差别进行的。含酯键连接或酰胺键连接的脂肪酸可用酸或碱处理,水解成可用于分析的成分。

(一) 脂质的有机溶剂提取

非极性脂质(三酯甘油、蜡和色素等)用乙醚、氯仿或苯等很容易从组织中提取出来,在这些溶剂中不会发生因疏水相互作用引起的脂质聚集。膜脂(磷脂、糖脂、固醇等)要用极性有机溶剂如乙醇或甲醇提取,这种溶剂既能降低脂质分子间的疏水相互作用,又能减弱膜脂与膜蛋白之间的氢键结合和静电相互作用。常用的提取剂(extractant)是氯仿、甲醇和水(1:2:0.8, V/V/V)的混合液。此比例的混合液是混溶的,形成一个相(phase)。组织(例如肝)在此混合液中被匀浆(homogenizing)以提取所有脂质,匀浆后形成的不溶物包括蛋白质、核酸和多糖用离心或过滤方法除去。向所得的提取液(extract)加入过量的水使之分成两个相,上相是甲醇/水,下相是氯仿。脂质留在氯仿相,极性大的分子如蛋白质、多糖进入极性相(甲醇/水)。取出氯仿相并蒸发浓缩,取一部分干燥,称重。

(二) 脂质的色谱分离

被提取的脂质混合物可采用色谱(层析)方法进行分级分离。例如硅胶柱吸附层析可把脂质分成非极性、极性和荷电的多个组分。硅胶(silica)是硅酸 $\text{Si}(\text{OH})_4$ 的一种形式,一种极性的不溶物。当脂质混合物(氯仿提取液)通过硅胶柱时,由于极性和荷电的脂质与硅胶结合紧密被留在柱上,非极性脂质则直接通过柱子,出现在最先的氯仿流出液中,不荷电的极性脂质(例如脑苷脂)可用丙酮洗脱,极性大的或荷电的脂质(例如磷脂)可用甲醇洗脱。分别收集各个组分,再在不同系统中层析,以分离单个脂质组分。例如磷脂可分离成磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰乙醇胺等。

此外可采用更快速,分辨率更高的高效液相色谱(HPLC)和薄层层析(TLC)进行脂质分离。HPLC 和 TLC 方法的介绍见第 3 章。TLC 中层析板上被分离的脂质组分可喷上染料罗丹明(rhodamine)加以检测,因为它与脂质结合会发荧光;或用碘蒸气熏层析板,碘与脂肪酸中双键反应给出黄色或棕色,因而也能检测那些含不饱和脂肪酸的脂质。

(三) 混合脂肪酸的气液色谱分析

气液色谱(GLC)可用于分析分离混合物中的挥发性成分(见第 3 章)。除某些脂质具有天然挥发性外,大多数脂质沸点很高,6 碳以上的脂肪酸沸点都在 200℃ 以上。因此进行分析前必须先将脂质转变为衍生物以增加它们的挥发性(即降低沸点)。为分析油脂或磷脂样品中的脂肪酸,首先需要在甲醇/HCl 或甲醇/NaOH 混合物中加热,使脂肪酸成分发生转酯[基]作用(transesterification),从甘油酯转变为甲酯。然后将甲酯混合物进行气液色谱分析。洗脱的顺序决定于柱中固定液的性质以及样品中成分的沸点和其

他性质。利用 GLC 技术,具有各种链长和不饱和程度的脂肪酸可以得到完全分开。

(四) 脂质结构的测定

某些脂质对在特异条件下的降解特别敏感,例如三酰甘油,甘油磷脂和固醇酯中的所有酯键连接的脂肪酸只要用温和的酸或碱处理则被释放。而鞘脂中的酰胺键连接的脂肪酸需要在较强的水解条件下才能被释放。专一性水解某些脂质的酶也被用于脂质结构的测定。前面谈到过的磷脂酶 A_1 , A_2 , C 和 D 都能断裂甘油磷脂分子中的一个特定的键,并产生具有特别溶解度和层析行为的产物。例如磷脂酶 C 作用于磷脂,释放一个水溶性的磷酸醇如磷酸胆碱和一个氯仿溶的二酰甘油,这些成分可以分别加以鉴定以确定完整磷脂的结构。专一性水解及其产物的 TLC 或 GLC 相结合的技术常用来测定一个脂的结构。确定烃链长度和双键的位置,质谱分析特别有效。

提 要

脂质是细胞的水不溶性成分,能用有机溶剂如乙醚、氯仿等进行提取。

脂质按化学组成可分为单纯脂质、复合脂质和衍生脂质;按生物功能可分为贮存脂质、结构脂质和活性脂质。

天然脂肪酸通常具有偶数碳原子,链长一般为 12~22 碳。脂肪酸可分为饱和、单不饱和与多不饱和脂肪酸。不饱和脂肪酸的双键位置,有一个双键几乎总是处于 C9-C10 之间(Δ^9)并且一般是顺式的。脂肪酸的物理性质主要决定于其烃链的长度与不饱和程度。

必需脂肪酸是指对人体的功能不可缺少,但必须由膳食提供的两个多不饱和脂肪酸,亚油酸和 α -亚麻酸;前者属 $\omega-6$ 家族,后者属 $\omega-3$ 家族。

类二十碳烷主要是由 20 碳的花生四烯酸衍生而来并因此得名,包括前列腺素、凝血噁烷和白三烯,它们是体内的局部激素。

三酰甘油或甘油三酯(TG)是由脂肪酸与甘油形成的三酯。三酰甘油可分简单三酰甘油和混合三酰甘油。天然油脂是简单和混合三酰甘油的混合物。三酰甘油与碱共热可发生皂化,生成脂肪酸盐(皂)和甘油。三酰甘油也和游离脂肪酸一样,它的不饱和键能发生氢化、卤化和过氧化作用。测定天然油脂的皂化值、碘值、酸值和乙酰化值,可确定所给油脂的特性。三酰甘油主要作为贮存燃料,以油滴形式存在于细胞中。

蜡是指长链脂肪酸和长链一元醇或固醇形成的酯。天然蜡如蜂蜡是多种蜡酯的混合物。蜡是海洋浮游生物中代谢燃料的主要贮存形式。蜡还有其他的生物功能如防水、防侵袭等。

脂质过氧化定义为多不饱和脂肪酸或多不饱和脂质的氧化变质。它是典型的活性氧参与的自由基链式反应。活性氧(O_2 , $\cdot OH$, H_2O_2 , 1O_2 等)使生物膜发生脂质过氧化,造成膜的损伤、蛋白质和核酸等大分子的异常。脂质过氧化与多种疾病有关。体内的抗氧化剂如超氧化物歧化酶(SOD)、维生素 E 等是与脂质过氧化抗衡的保护系统。

磷脂包括甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂是由 sn-甘油-3-磷酸衍生而来,最简单的甘油磷脂是 3-sn-磷脂酸,它是其他甘油磷脂的母体。磷脂酸进一步被一个极性醇(如胆碱、乙醇胺等)酯化,则形成各种甘油磷脂如磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。鞘磷脂是由鞘氨醇代替甘油磷脂中的甘油形成的磷脂。鞘氨醇是一种长链的氨基醇。其 2-位氨基以酰胺键与脂肪酸连接形成神经酰胺,这是这类磷脂的母体。神经酰胺的 1-位羟基被磷酸胆碱或磷酸乙醇胺酯化则形成鞘磷脂。磷脂是两亲分子,有一个极性头基和一个非极性尾,在水介质中能形成脂双层;它们主要参与膜的组成。

糖脂主要是鞘糖脂,它也是神经酰胺的衍生物,在神经酰胺的 1-位羟基通过糖苷键与糖基连接而成鞘糖脂。重要的鞘糖脂有脑苷脂和神经节苷脂,后者含有唾液酸。作为膜脂的鞘糖脂与细胞识别以及组织、器官的特异性有关。

萜类可看成是异戊二烯(C5)的聚合物,有倍半萜、双萜、三萜、四萜等。萜的结构有线形的,也有环状

的。许多植物精油、光合色素和甾类的前体鲨烯都是萜。

类固醇或称甾类,是环戊烷多氢菲的衍生物。固醇或甾醇是类固醇中的一大类,其结构特点是在甾核的C3上有一个 β 羟基,C17上有一个含8~10个碳的烃链。固醇存在于大多数真核细胞的膜中,但细菌不含固醇。胆固醇是最常见的一种动物固醇,参与动物细胞膜的组成。胆固醇也是体内类固醇激素和胆汁酸(胆酸、鹅胆酸和脱氧胆酸)的前体。胆固醇与动脉粥样硬化有关。植物固醇如谷固醇、豆固醇,它们自身不易被肠粘膜吸收并能抑制胆固醇吸收。

脂蛋白是由脂质和蛋白质以非共价键结合而成的复合体。脂蛋白中的蛋白质部分称载脂蛋白。血浆脂蛋白是血浆中转运脂质的脂蛋白颗粒。由于各种血浆脂蛋白的密度不同可用超离心法把它们分成5个组分(按密度增加为序):乳糜微粒,极低密度脂蛋白(VLDL),中间密度脂蛋白(IDL),低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。血浆脂蛋白都是球形颗粒,有一个由三酰甘油和胆固醇酯组成的疏水核心和一个由磷脂、胆固醇和载脂蛋白参与的极性外壳。载脂蛋白的主要作用是增溶疏水脂质和作为脂蛋白受体的识别部位。

测定脂质组成时,脂质可用有机溶剂从组织中提取,用薄层层析或气液色谱进行分离。单个的脂质可根据其层析行为,对专一性酶水解的敏感性或质谱分析加以鉴定。

习 题

1. 天然脂肪酸在结构上有哪些共同的特点?

2. (a) 由甘油和三种不同的脂肪酸(如豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸)可形成多少种不同的三酰甘油(包括简单型和混合型在内)? (b) 其中定量上不同组成的三酰甘油可有多少种? [(a) 27种;(b) 10种]

3. (a) 为什么饱和的18碳脂肪酸——硬脂酸的熔点比18碳不饱和脂肪酸——油酸的熔点高? (b) 干酪乳杆菌产生的乳杆菌酸(19碳脂肪酸)的熔点更接近硬脂酸的熔点还是更接近油酸的熔点? 为什么?

4. 从植物种子中提取出1g油脂,把它等分为两份,分别用于测定该油脂的皂化值和碘值。测定皂化值的一份样品消耗KOH 65mg,测定碘值的一份样品消耗 I_2 510mg。试计算该油脂的平均相对分子质量和碘值。[1292;102]

5. 某油脂的碘值为68,皂化值为210。计算每个油脂分子平均含多少个双键。[2个]

6. (a) 解释与脂质过氧化有关的几个术语:自由基、活性氧、自由基链反应和抗氧化剂;(b) 为什么PUFA容易发生脂质过氧化?

7. 为解决甘油磷脂构型上的不明确性,国际生物化学命名委员会建议采取立体专一编号命名原则。试以磷酸甘油为例说明此命名原则。

8. 写出下列化合物的名称:

(a) 在低pH时,携带一个正净电荷的甘油磷脂;(b) 在中性pH时,携带负净电荷的甘油磷脂;(c) 在中性pH时,净电荷为零的甘油磷脂。

9. 给定下列分子成分:甘油、脂肪酸、磷酸、长链醇和糖。试问(a)哪两个成分在蜡和鞘磷脂中都存在?(b)哪两个成分在脂肪和磷脂酰胆碱中都存在?(c)哪些(个)成分只在神经节苷脂而不在脂肪中存在? [(a) 脂肪酸,长链醇;(b) 甘油,脂肪酸;(c) 糖,长链醇]

10. 指出下列膜脂的亲水成分和疏水成分:(a) 磷脂酰乙醇胺;(b) 鞘磷脂;(c) 半乳糖基脑苷脂;(d) 神经节苷脂;(e) 胆固醇。

11. (a) 造成类固醇化合物种类很多的原因是什么?(b)人和动物体内胆固醇可转变为哪些具有重要生理意义的类固醇物质?

12. 胆酸是人胆汁中发现的A-B顺式类固醇(图2-18)。请按图2-15所示椅式构象画出胆酸的构象式,并以直立键或平伏键标出C3,C7和C12上的3个羟基。

13. 一种血浆脂蛋白的密度为 $1.08g/cm^3$,载脂蛋白的平均密度为 $1.35g/cm^3$,脂质的平均密度为 $0.90g/cm^3$ 。问该脂蛋白中载脂蛋白和脂质的质量分数是多少? [48.6%载脂蛋白,51.4%脂质]

14. 一种低密度脂蛋白(LDL)含apo B-100(M_r 为500 000)和总胆固醇(假设平均 M_r 为590)的质量分数分别为25%和50%。试计算apo B-100与总胆固醇的摩尔比。[1:1695]

15. 用化学方法把鞘磷脂与磷脂酰胆碱区分开来。

主要参考书

1. 赵保路编著. 氧自由基和天然抗氧化剂. 北京: 科学出版社, 1999

2. 孙存普, 张建中, 段绍瑾主编. 自由基生物学导论. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999
3. Oxroby D W, Nachtrieb N H. Principles of Modern Chemistry. 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1990
4. McMurry I. Organic Chemistry. 3rd ed. California: Brooks/Cole Publishing Company, 1992
5. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
6. Meyers R. Molecular Biology and Biotechnology—a Comprehensive Desk Reference. VCH Publishers Inc, 1995
7. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
8. Matthews H R, Freedland R R, Miesfeld R L. Biochemistry—a Short Course. New York: John Wiley & Sons, Inc. Publication, 1997

(徐长法)

第3章 氨基酸

四大类生物分子中蛋白质是生物功能的主要载体,而氨基酸(amino acid)是蛋白质的构件分子。自然界中存在的成千上万种蛋白质,在结构和功能上的惊人的多样性归根结底是由20种常见氨基酸的内性质造成的。这些性质包括①聚合能力,②特有的酸碱性质,③侧链的结构及其化学功能的多样性,④手性。本章主要讲述这些性质,它们是讨论蛋白质和酶的结构、功能以及许多其他有关问题的基础。

一、氨基酸——蛋白质的构件分子

(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,逐渐降解成相对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3种水解方法及其优缺点:

(1) 酸水解 常用 H_2SO_4 或 HCl 进行水解。一般用 6 mol/L HCl , 4 mol/L H_2SO_4 ;回流煮沸 20 h 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。

(2) 碱水解 一般与 5 mol/L NaOH 共煮 10~20 h,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-和 L-氨基酸的混合物,称消旋物(见本章氨基酸的光学活性部分)。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。

(3) 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)、胰凝乳蛋白酶或称糜蛋白酶(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) α -氨基酸的一般结构

从蛋白质水解产物中分离出来的常见氨基酸只有20种(更确切地说为19种氨基酸和1种亚氨基酸即脯氨酸)。除脯氨酸及其衍生物外,这些氨基酸在结构上的共同点是与羧基相邻的 α -碳原子(C_α)上都有一个氨基,因此称为 α -氨基酸。连接在 α -碳上的还有一个氢原子和一个可变的侧链,称R基,各种氨基酸的区别就在于R基的不同。 α -氨基酸的结构通式见图3-1。

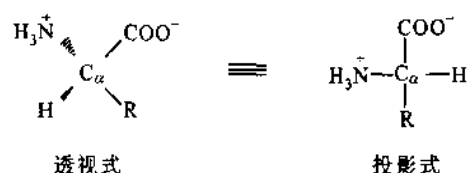
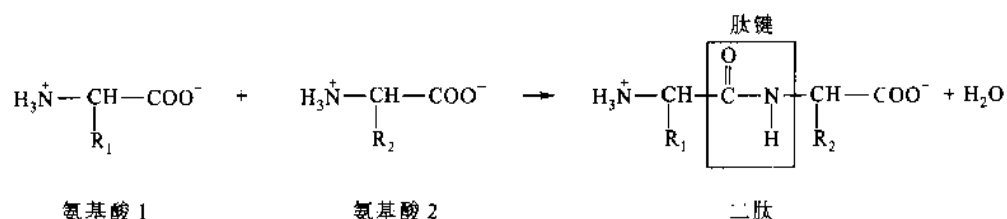


图3-1 α -氨基酸的结构通式

因为氨基酸同时含有氨基和羧基,所以它们能以首尾相连的方式进行聚合反应,除去一分子水形成一个共价酰胺键或称肽键:



在水溶液中此反应的平衡有利于肽键的水解,因此在生物系统或实验室中形成肽键都是以输入能量的间接方式进行的(见第4章和下册第38章)。

氨基酸在中性 pH 时,羧基以 $-\text{COO}^-$,氨基以 $-\text{NH}_3^+$ 形式存在。这样的氨基酸分子含有一个正电荷和一个负电荷,称为兼性离子。 α -氨基酸除 R 基为氢(甘氨酸)之外,其 α -碳原子是一个手性碳原子,因此都具有旋光性。并且蛋白质中发现的氨基酸都是 L 型的。 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。

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 20 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 多种天然氨基酸中,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。参与蛋白质组成的 20 种氨基酸称为蛋白质氨基酸。

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序列。这两套简写符号见于表 3-1。

表 3-1 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			

(一) 常见的蛋白质氨基酸

前面说过,各种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 种常见氨基酸可分为脂肪族、芳香族和杂环族 3 类,其中以脂肪族氨基酸为最多。

1. 脂肪族氨基酸

(1) 中性氨基酸(图 3-2):

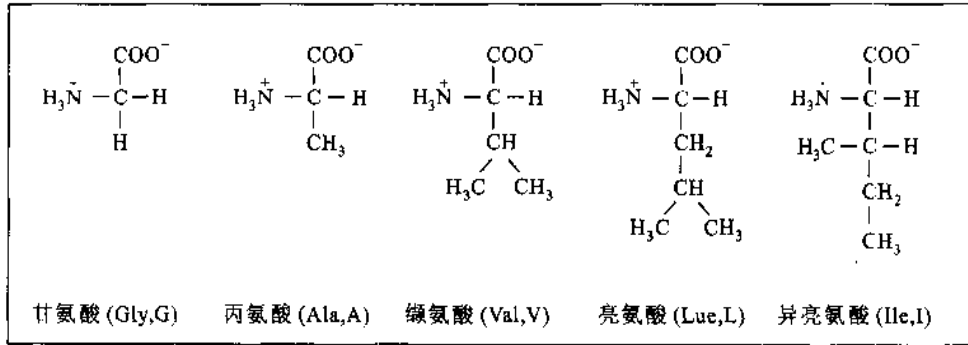


图 3-2 中性脂肪族氨基酸

- 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- β -甲基丁酸)
- ④ 亮氨酸(α -氨基- γ -甲基戊酸)
- ⑤ 异亮氨酸(α -氨基- β -甲基戊酸)

(2) 含羟基或硫氨基酸(图 3-3):

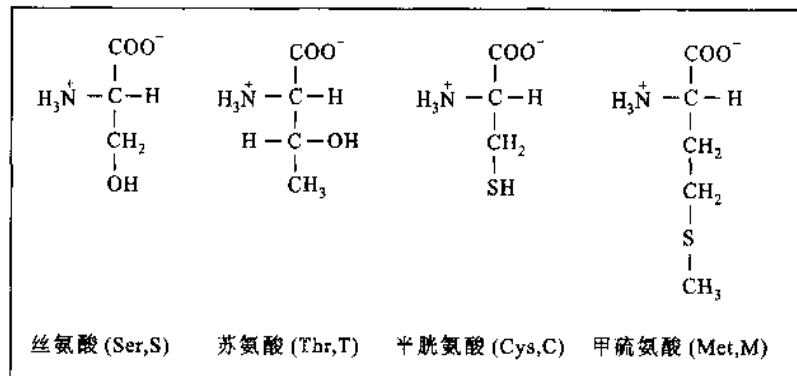


图 3-3 含羟基或硫氨基酸

⑥ 丝氨酸(α -氨基- β -羟基丙酸)⑦ 苏氨酸(α -氨基- β -羟基丁酸)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一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。

(3) 酸性氨基酸及其酰胺(图 3-4):

⑩ 天冬氨酸(α -氨基丁二酸)⑪ 谷氨酸(α -氨基戊二酸)

⑫ 天冬酰胺

⑬ 谷氨酰胺

这两个酰胺在生理 pH 范围内其酰胺基不被质子化,因此侧链不带电荷。

(4) 碱性氨基酸(图 3-5):

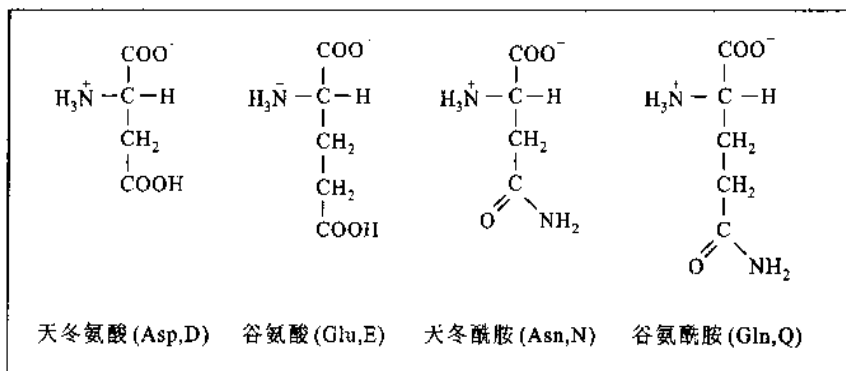


图 3-4 酸性氨基酸及其酰胺

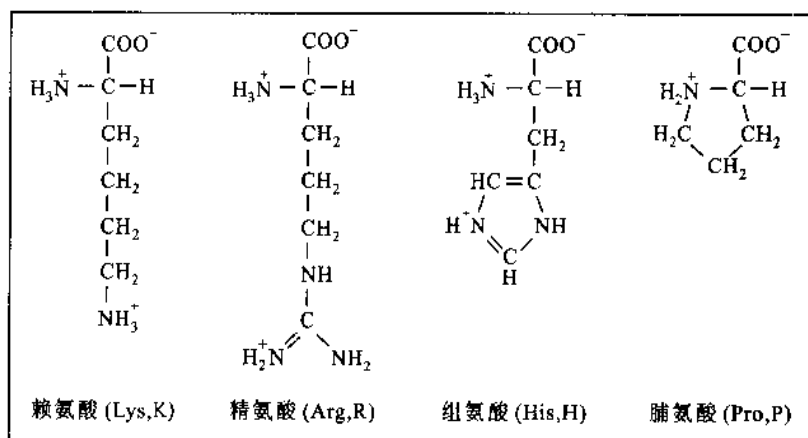


图 3-5 碱性氨基酸和杂环氨基酸

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 3-6)

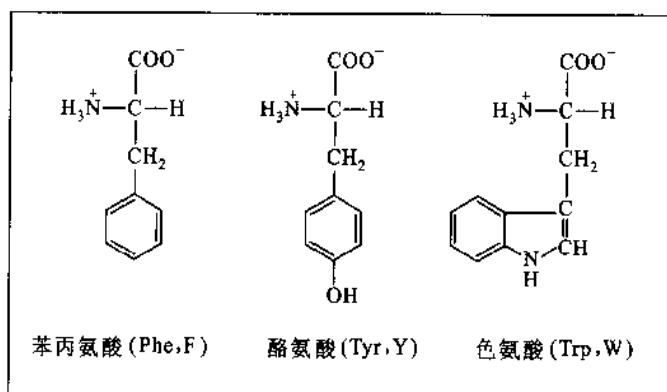


图 3-6 芳香族氨基酸

⑯ 苯丙氨酸(α -氨基- β -苯基丙酸) 血浆和尿中游离氨基酸浓度的测定被临床上用作诊断的指标,其中苯丙氨酸浓度的测定就被用于苯丙酮尿症(见下册第 30 章)的诊断。

⑰ 酪氨酸(α -氨基- β -对羟基苯基丙酸)

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 PP)。

3. 杂环族氨基酸(图 3-5)

① 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)中。

② 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 4 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(指在细胞内的 pH 范围即 pH 7 左右的解离状态)(表 3-2)。

表 3-2 氨基酸按其 R 基的极性分类(在 pH 7 时)

非极性 R 基氨基酸	不带电荷的极性 R 基氨基酸
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 基氨基酸	带负电荷的 R 基氨基酸
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 8 种氨基酸。4 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 3-6);一种含硫氨基酸即甲硫氨酸(图 3-3)和一种亚氨基酸,脯氨酸(图 3-5)。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

这一组有 7 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 3-6)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 3-4)的 R 基极性是它们的酰胺基引起的;半胱氨酸(图 3-3)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。半胱氨酸的巯基和酪氨酸的酚羟基,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,例如半胱氨酸的 -SH。

3. 带正电荷的 R 基氨基酸

这是一组碱性氨基酸,在 pH 7 时携带正净电荷。属于碱性氨基酸的有赖氨酸、精氨酸和组氨酸(图 3-5)。赖氨酸除 α -氨基外,在侧链的 ϵ 位置上还有一个 $-\text{NH}_3^+$;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%。组氨酸是唯一一个 R 基的 pK_a 值在 7 附近的氨基酸。

4. 带负电荷的 R 基氨基酸

属于这一组的是两种酸性氨基酸:天冬氨酸和谷氨酸(图 3-4)。这两种氨基酸都含有两个羧基,并且第二个羧基在 pH 7 左右也完全解离,因此分子带负电荷。

(二) 不常见的蛋白质氨基酸

有些氨基酸虽然不常见但在某些蛋白质中存在(图3-7)。它们都是由相应的常见氨基酸经修饰而来的。其中包括5-羟赖氨酸(5-hydroxylysine)和4-羟脯氨酸(4-hydroxyproline),它们存在于结缔组织的胶原蛋白中。某些肌肉蛋白如肌球蛋白含有甲基化的氨基酸,包括甲基组氨酸(methylhistidine)、 ϵ -N-甲基赖氨酸(ϵ -N-methyllysine)和 ϵ -N,N,N-三甲基赖氨酸(ϵ -N,N,N-trimethyllysine)。 γ -羧基谷氨酸(γ -carboxyglutamic acid)最先在凝血酶原中发现,它也存在于其他一些与血液凝固有关的蛋白质中。焦谷氨酸(pyroglutamic acid, p-Glu)在细菌紫膜质(bacteriorhodopsin)中找到,它是一种光驱动的质子泵蛋白质。某些涉及细胞生长和调节的蛋白质可以在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸

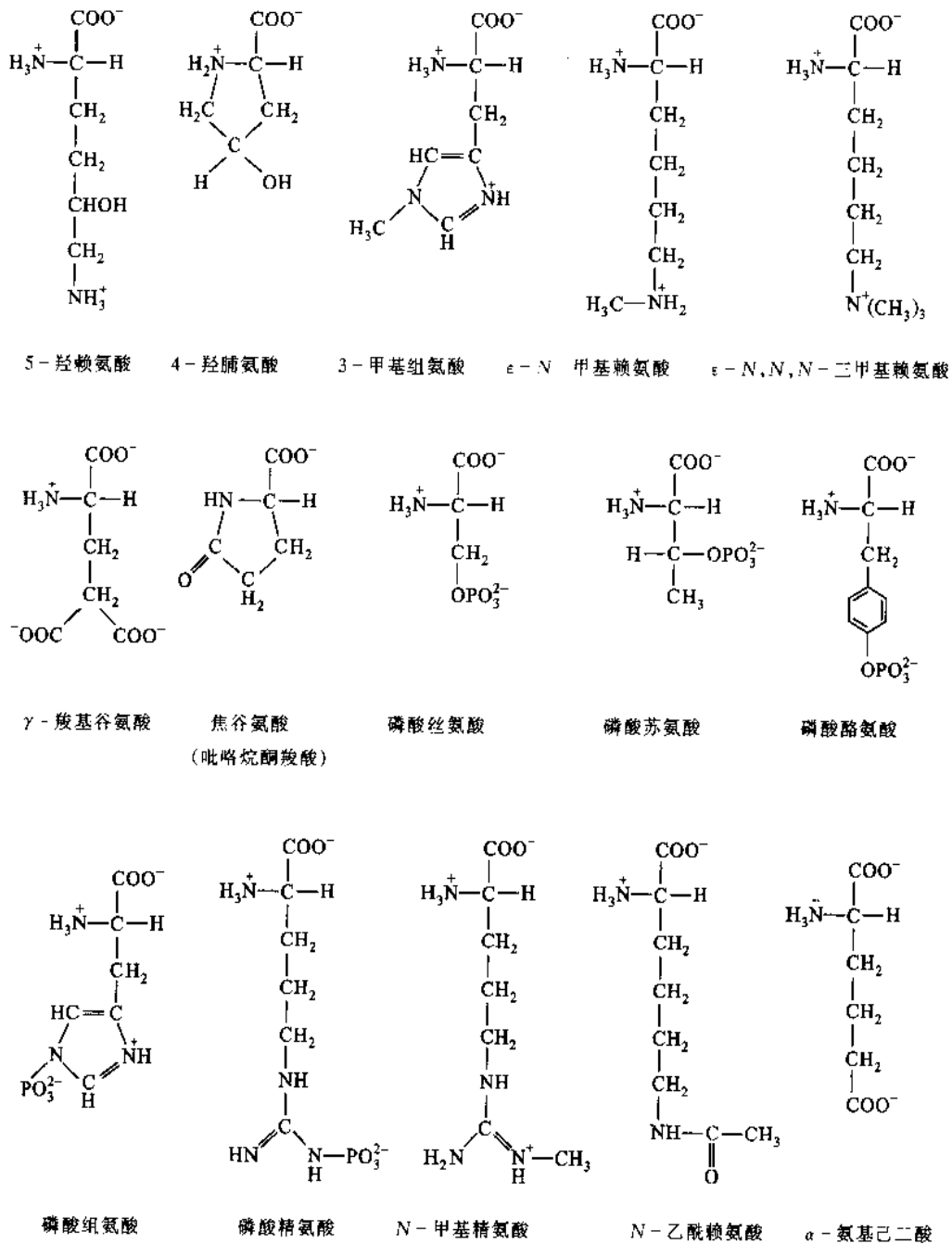


图3-7 某些不常见的蛋白质氨基酸

酸残基的—OH 上进行可逆性磷酸化,磷酸化的氨基酸还有组氨酸和精氨酸。从甲状腺球蛋白中分离出甲状腺素和 3,3',5-三碘甲腺原氨酸(3,3',5-triiodothyronine),它们是酪氨酸的碘化衍生物,其结构式见第 17 章。在与染色体缔合的组蛋白(histone)中发现 *N*-甲基精氨酸(*N*-methylarginine)和 *N*-乙酰赖氨酸(*N*-acetyllysine)。此外,从谷物中分离的蛋白质中存在 α -氨基己二酸(α -aminoadipic acid)。

(三) 非蛋白质氨基酸

除了参与蛋白质组成的 20~30 种氨基酸外,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 L 型 α -氨基酸的衍生物(图 3-8)。但是有一些是 β -、 γ -、或 δ -氨基

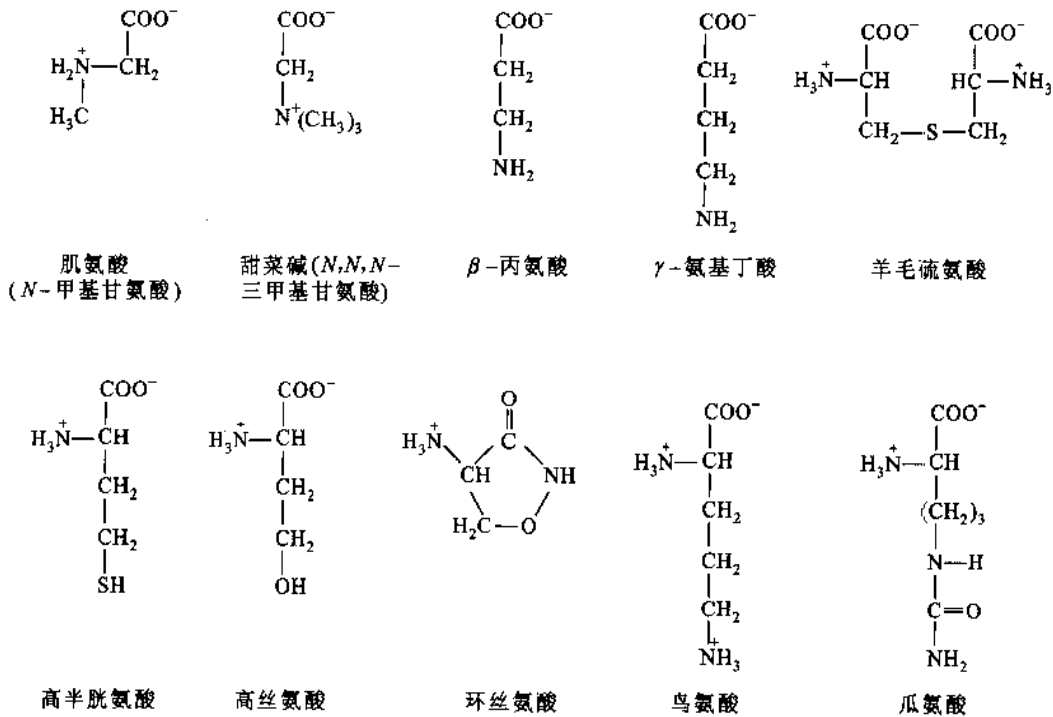


图 3-8 某些非蛋白质氨基酸

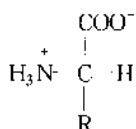
酸,并且有些是 D 型氨基酸。如细菌细胞壁的肽聚糖中发现有 D-谷氨酸和 D-丙氨酸;在一种抗生素短杆菌肽 S (gramicidin S) 中含有 D-苯丙氨酸。这些氨基酸中有一些是重要的代谢物前体或代谢中间物。例如存在于肌肽和鹅肌肽中的 β -丙氨酸是遍多酸(一种维生素)的一个成分; γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)由谷氨酸脱羧产生的,它是传递神经冲动的化学介质,称神经递质(neurotransmitter)。肌氨酸(sarcosine)是一碳单位代谢的中间物,它和 D-缬氨酸也是放线菌素 D 的结构成分(见第 16 章)。D-环丝氨酸(cycloserine)是一种链霉菌属(*Streptomyces*)细菌产生的抗生素,能抑制细菌细胞壁的形成,用作抗结核菌药物。羊毛硫氨酸(lanthionine)的内消旋体和外消旋体混合物可从羊毛的碱水解物中分离获得,它也是肽类抗生素枯草菌素(subtilin)和乳酸链球菌肽(nisin)的组成成分。瓜氨酸(L-citrulline)和鸟氨酸(L-ornithine)是尿素循环的中间物。此外,甜菜碱(betaine)、高半胱氨酸(homocysteine)、高丝氨酸(homoserine)等也都是重要的代谢中间物。

三、氨基酸的酸碱化学

掌握氨基酸的酸碱性质是极其重要的,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序列的必要步骤。

(一) 氨基酸的兼性离子形式

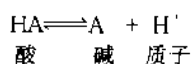
过去曾长期认为,氨基酸在晶体甚至在水溶液中是以不解离的中性分子形式 $\text{H}_2\text{NCHCOOH}$ 存在的。后来发现氨基酸晶体的熔点很高,一般在 200°C 以上,例如甘氨酸在 233°C 熔解并分解;L-酪氨酸的熔点更高, 344°C ;但是普通的有机化合物如二苯胺(diphenylamine),熔点为 53°C 。此外还发现氨基酸能使水的介电常数(dielectric constant)增高,而一般的有机化合物如乙醇、丙酮等却使水的介电常数降低。如果氨基酸在晶体或水中主要是以兼性离子(zwitterion)亦称偶极离子(dipolar ion)的形式存在:



不带电荷的中性分子为数极少,那么上述的两个事实就很容易解释。也就是说氨基酸晶体是由离子晶格组成的,像氯化钠晶体一样,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。介电常数与介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°C ,水的介电常数为 80,而 1mol/L 浓度的 α -氨基酸水溶液,其介电常数为 $102 \sim 108$ 。

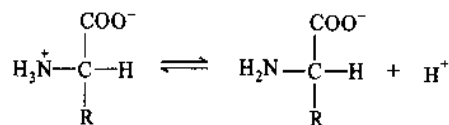
(二) 氨基酸的解离

依照 Brönsted-Lowry 的酸碱质子理论,酸是质子(H^+)^{*} 的供体(donor),碱是质子的受体或接纳体(acceptor)。酸碱的相互关系如下:

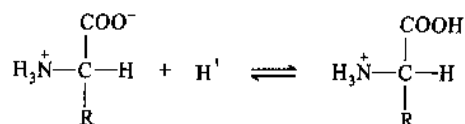


这里原始的酸(HA)和生成的碱(A^-)被称为共轭酸-碱对。酸和碱有同一性,互为存在条件;在一条件下,又各向着和自己相反的方面转化;这一理论是符合辩证法的。

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:



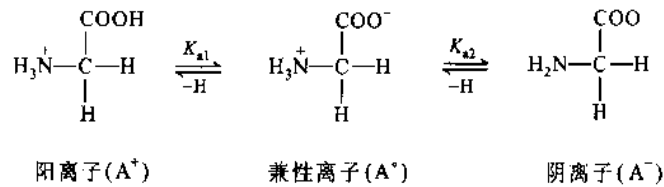
也起碱(质子受体)的作用:



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。甘氨酸盐酸盐是完全质子化的氨基酸,实质上是一个二元酸。它分部解离如下:

* H^+ 在水系统中更确切的应写为 H_3O^+ ,本书为简便计,以 H^+ 代替 H_3O^+ 。



第一步解离,

$$K_{a1} = \frac{[A^\circ][H^+]}{[A^+]} \quad (1)$$

第二步解离,

$$K_{a2} = \frac{[A^-][H^+]}{[A^\circ]} \quad (2)$$

解离的最终产物(A^-)相当于甘氨酸钠盐。

在上列公式中, K_{a1} 和 K_{a2} 分别代表 α -碳上的 $-\text{COOH}$ 和 $-\text{NH}_3^+$ 的解离常数^{*} (dissociation constant)。一般, 共轭酸的解离常数按其酸性递降顺序编号为 K_{a1} , K_{a2} 等。

氨基酸的解离常数可用测定滴定曲线的实验方法求得。滴定可从甘氨酸(或称等电甘氨酸)溶液、甘氨酸盐酸盐或甘氨酸钠溶液开始(图 3-9)。当 0.1 mol 甘氨酸溶于水时, 溶液的 pH 约等于 6.0。如果用

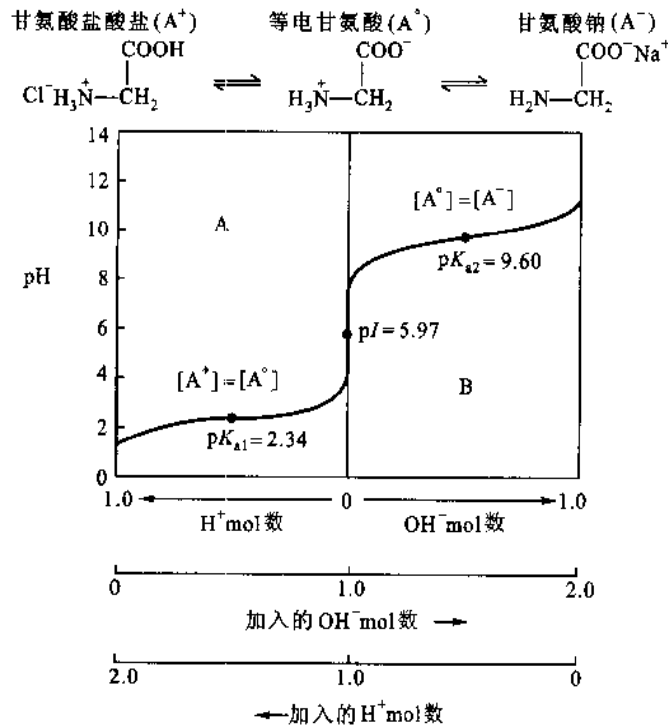


图 3-9 甘氨酸的滴定曲线(解离曲线)

标准氢氧化钠溶液进行滴定, 以加入的氢氧化钠的摩尔数对 pH 作图, 则得滴定曲线 B 段(图 3-9), 在 pH 9.60 处有一个拐点。从甘氨酸的解离公式(2)可知, 当滴定至甘氨酸的兼性离子有一半变成阴离子, 即 $[A^\circ] = [A^-]$ 时, 则 $K_{a2} = [H^+]$, 两边各取对数得 $pK_{a2} = \text{pH}$, 这就是曲线 B 段拐点处的 pH 9.60。如果用标准盐酸滴定, 以加入的盐酸的摩尔数对 pH 作图, 则得滴定曲线 A 段, 在 pH 2.34 处有一个拐点。同样, 从解离公式(1)可知, $pK_{a1} = 2.34$, 这里甘氨酸的等电兼性离子和阳离子的摩尔数相等, 即 $[A^\circ] = [A^+]$ 。如果利用 Handerson-Hasselbalch 公式:

* 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。但多数情况下, 两者相差不远, 因此现在生物化学中不特别强调 K' 和 K 的区别。

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{质子受体}]}{[\text{质子供体}]}$$

以及所给的 $\text{p}K_{a1}$ 和 $\text{p}K_{a2}$ 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 pH 9.60,各自代表甘氨酸分子中的哪个基团的解离,可以把它们与简单的脂肪酸和脂肪胺的 $\text{p}K_a$ 值进行对比。脂肪酸的 $-\text{COOH}$ 基 $\text{p}K_a$ 值一般为 4~5,脂肪胺中的 $-\text{NH}_3^+$ 基 $\text{p}K_a$ 值在 10~11。所以最可能的是 $\text{p}K_{a1} = 2.43$ 代表甘氨酸的 $\alpha-\text{COOH}$ 解离,而 $\text{p}K_{a2} = 9.60$ 代表它的 $\alpha-\text{NH}_3^+$ 解离。

甘氨酸中的 $\alpha-\text{COOH}$ 基的酸性 (acidity) 要比相应的脂肪酸——醋酸 ($\text{p}K_a = 4.76$) 强 200 多倍,这是因为甘氨酸中与羧基相邻的 $\alpha-\text{NH}_3^+$ 基是一个强吸引电子的基团,产生一个强场效应而稳定羧基阴离子。同样, $\alpha-\text{COO}^-$ 基的存在也影响 $\alpha-\text{NH}_3^+$ 的解离,甘氨酸的 α -氨基的碱性 (basicity) 明显低于乙胺 ($\text{p}K_a = 10.75$)。

R 基不解离的氨基酸都具有类似甘氨酸的滴定曲线。这类氨基酸的 $\text{p}K_a$ 值相当 $\text{p}K_{a1}$ 的范围为 2.0~3.0, $\text{p}K_{a2}$ 为 9.0~10.0 (表 3-3)。带有可解离 R 基的氨基酸,相当于三元酸,有 3 个 $\text{p}K_a$ 值,因此滴定曲线比较复杂。甘氨酸滴定曲线 (图 3-9) 中,两个解离基团的 $\text{p}K_a$ 值分得较开,两段 (A、B) 滴定曲线不重叠。当解离基团的 $\text{p}K_a$ 值比较接近时,两段曲线会发生重叠。这种情况在谷氨酸滴定曲线 (A、B 段) 和赖氨酸滴定曲线 (B、C 段) 中见到 (图 3-10)。

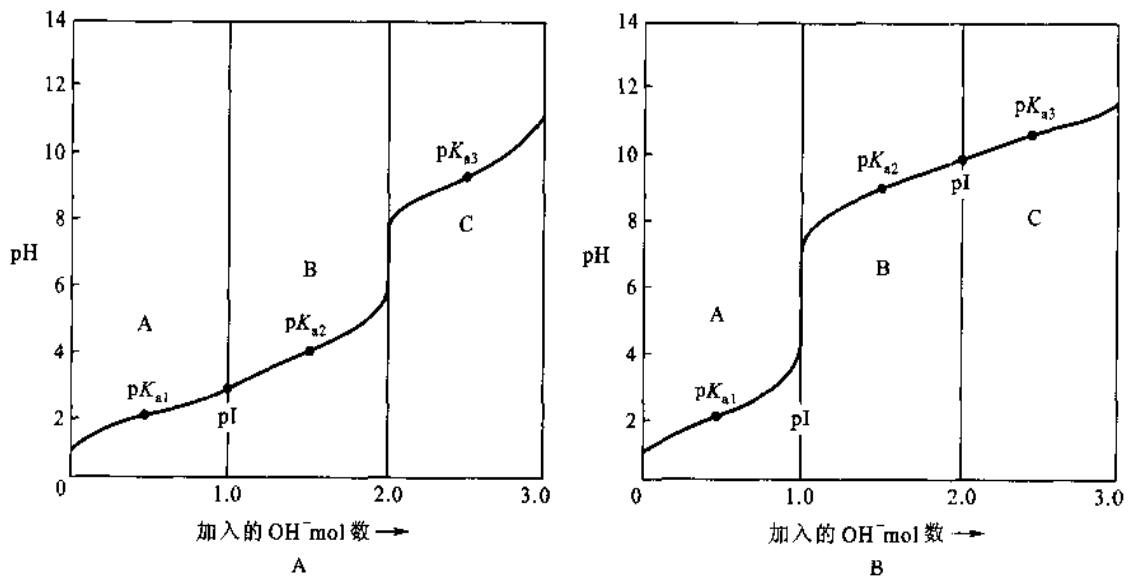


图 3-10 谷氨酸(A)和赖氨酸(B)的滴定曲线

20 种基本氨基酸,除组氨酸外,在生理 pH (7 左右) 下都没有明显的缓冲容量,因为这些氨基酸的 $\text{p}K_a$ 值都不在 pH 7 附近 (表 3-3),而缓冲容量只有在接近 $\text{p}K_a$ 值时才显现出来。从表 3-3 可知,组氨酸咪唑基的 $\text{p}K_a$ 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液中起运输氧气和二氧化碳的作用来说是重要的。

表 3-3 氨基酸的解离常数和等电点

氨基酸 ⁺	-COOH pK _a	-NH ₃ ⁺ pK _a	R 基 pK _a	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(βCOOH)	2.97
天冬酰胺	2.02	8.8		5.41
谷氨酸	2.19	9.67	4.25(γCOOH)	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	10.78	8.33(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℃ 测定数值外,其他氨基酸都是 25℃ 测定数值。

(三) 氨基酸的等电点

从甘氨酸的解离公式或解离曲线(图 3-9)可以看到,氨基酸的带电状况与溶液的 pH 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 3-9 中曲线 A 段和曲线 B 段之间的拐点(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)。在等电 pH 时,氨基酸在电场中既不向正极也不向负极移动,即处于等电兼性离子(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_{a1} 和 pK_{a2} 的算术平均值:

$$pI = \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2}),$$

这可由氨基酸的解离公式推导出来。将前面所列的 K_{a1} 和 K_{a2} 的等式,

$$K_{a1} = \frac{[A^{\circ}][H^+]}{[A^+]}$$

$$K_{a2} = \frac{[A^-][H^+]}{[A^{\circ}]}$$

相乘得：
$$K_{a1} \cdot K_{a2} = [H^+]^2 \frac{[A^-]}{[A^+]}$$

在等电点时， $[A^-] = [A^+]$ ，因此：

$$[H^+]^2 = K_{a1} \cdot K_{a2}$$

$$[H^+] = (K_{a1} \cdot K_{a2})^{\frac{1}{2}}$$

如以 I 代表等电点的氢离子浓度，则：

$$I = (K_{a1} \cdot K_{a2})^{\frac{1}{2}}$$

等式两边取负对数得：

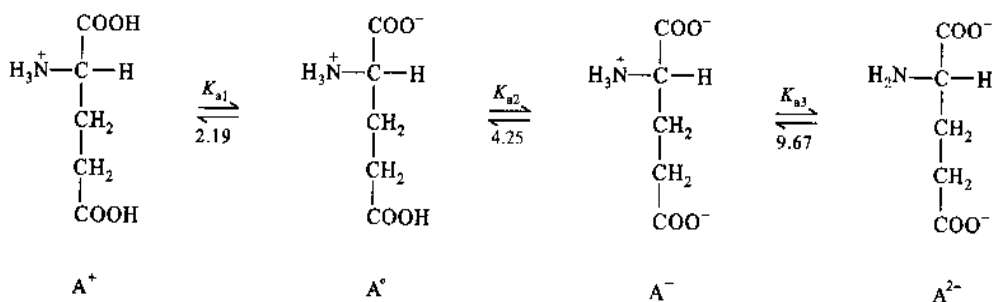
$$pI = \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2})$$

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， pI 值与该离子浓度基本无关，只决定于等电兼性离子(A^0)两侧的 pK_a 值。

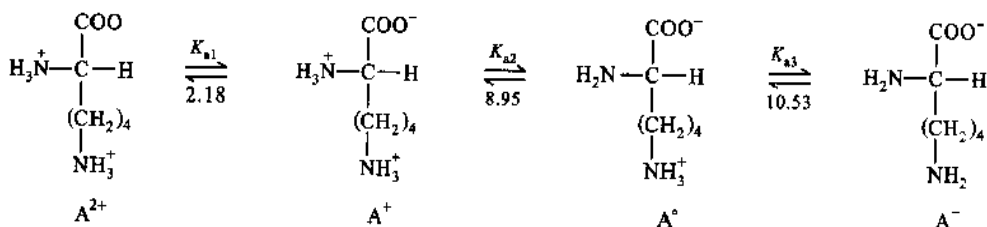
同样，对有 3 个可解离基团的氨基酸例如谷氨酸和赖氨酸来说，只要写出它的解离公式，然后取等电兼性离子两边的 pK_a 值的平均值，则得其 pI 值。谷氨酸解离如下：



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

$$\begin{aligned}
 pI_{\text{Glu}} &= \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2}) \\
 &= \frac{1}{2}(2.19 + 4.25) = 3.22
 \end{aligned}$$

赖氨酸的解离情况是：



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

$$\begin{aligned}
 pI_{\text{Lys}} &= \frac{1}{2}(pK_{a2} + pK_{a3}) \\
 &= \frac{1}{2}(8.95 + 10.53) = 9.74
 \end{aligned}$$

在等电点以上的任一 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。

(四) 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、碱滴定的等电点 pH 或过高(12~13)或过低(1~2), 没有适当的指示剂可被选用。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NH₂作用形成—NH·CH₂OH, —N(CH₂OH)₂等羟甲基衍生物(图 3-11)而降低了氨基的碱性, 相对地增强了一NH₃⁺的酸性解离, 使 pK_{a2}减少 2~3 个 pH 单位, pK_{a2}移至 7 附近(见图 3-12)。氢氧化钠滴定曲线 B 段向 pH 低的方向转移(变成曲线 C 段), 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由也可以这样来解释。从下面的关系式:

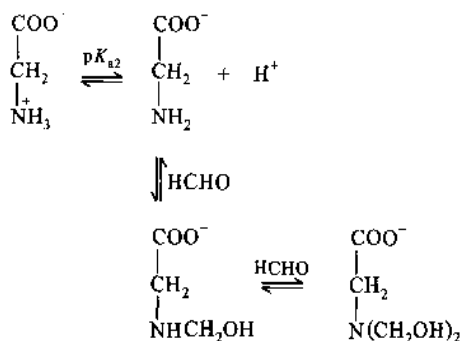


图 3-11 甲醛与氨基酸的氨基作用形成羟甲基衍生物

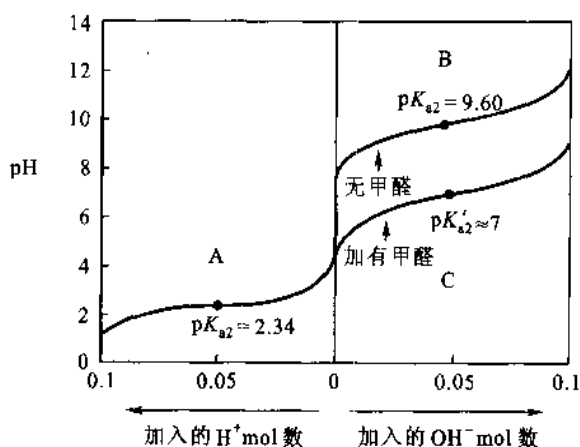


图 3-12 加甲醛和不加甲醛的甘氨酸滴定曲线

$$\text{pH} = \text{p}K_{a2} + \log \frac{[\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-]}{[\text{H}_3\text{NCH}_2\text{COO}^+]}$$

看出, 甲醛与 H₂NCH₂COO⁻ 结合, 有效地减低了后者的浓度, 所以对于加入任何量的碱, [H₂NCH₂COO⁻]/[H₃NCH₂COO⁺] 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 A 段并不发生改变。由此可见用氢氧化钠滴定是和 —NH₃⁺ 的氢离子发生反应, 在没有加入甲醛的条件下, pK_{a2} = 9.60 代表甘氨酸中 —NH₃⁺ 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 pH 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。

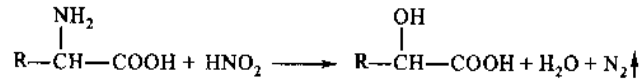
四、氨基酸的化学反应

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

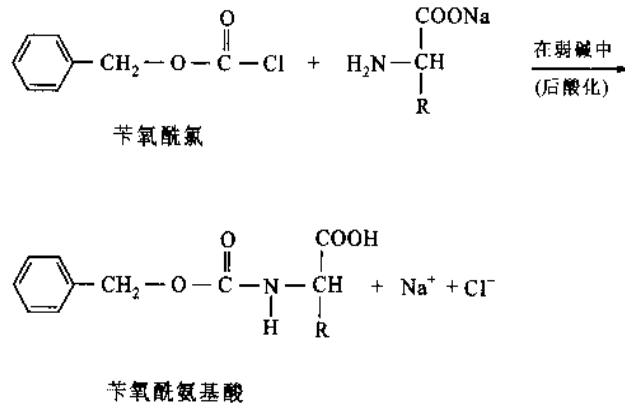
氨基酸的氨基也和其他的伯胺一样, 在室温下与亚硝酸作用生成氮气, 其反应式如下:



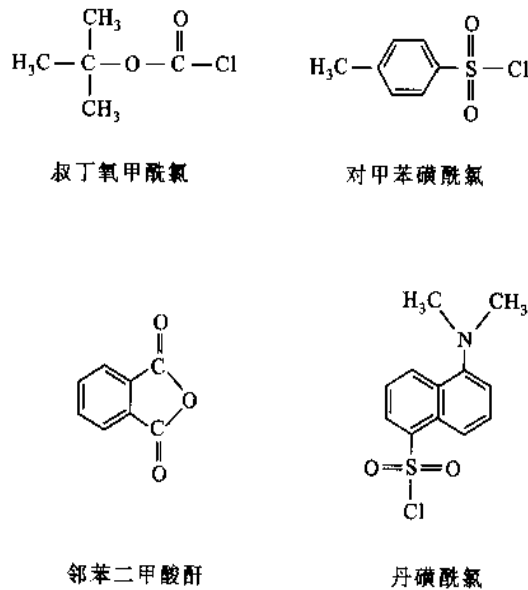
在标准条件下测定生成的氮气体积,即可计算出氨基酸的量。这是 Van Slyke 法测定氨基氮的基础。此法可用于氨基酸定量和蛋白质水解程度的测定。这里值得注意的是生成的氮气(N₂)只有一半来自氨基酸。此外应该指出,除 α-NH₂ 外,赖氨酸的 ε-NH₂ 也能与亚硝酸反应,但速度较慢;而 α-NH₂ 作用 3~4 min 即反应完全。

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(carbobenzyloxylchloride)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- $\underset{\text{R}}{\text{CH}}$ -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:

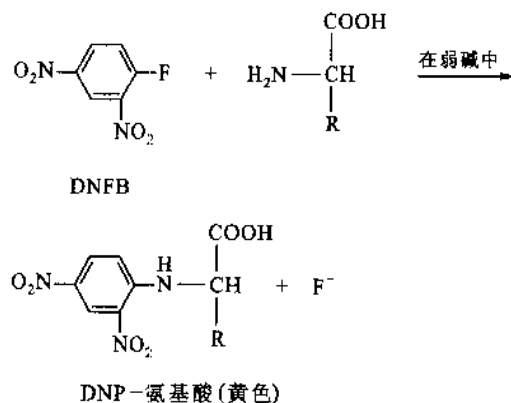


另一个酰化试剂是丹磺酰氯(dansyl chloride),它是 5-二甲基氨基萘-1-磺酰氯(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl chloride)的简称,被用于多肽链 N 末端氨基酸的标记和微量氨基酸的定量测定。

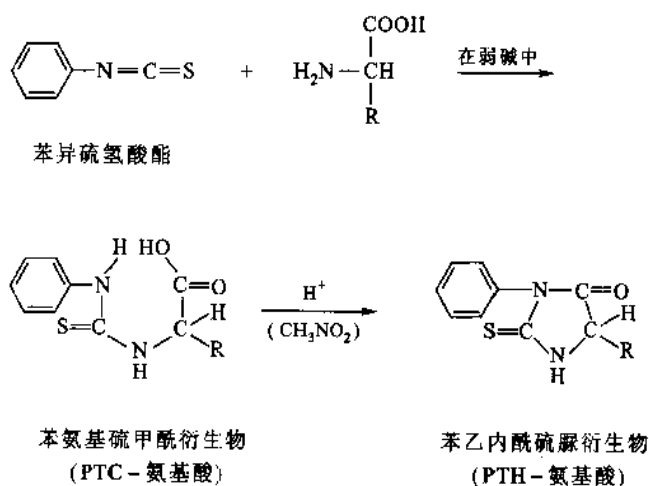
3. 烃基化反应

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 用来鉴定多肽蛋白质的 N 末端氨基酸。

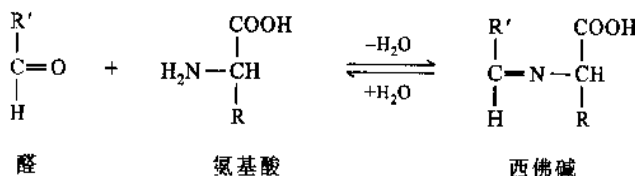


α -氨基另一个重要的烃基化反应是与苯异硫氰酸酯 (phenylisothiocyanate, 缩写为 PITC) 在弱碱性条件下形成相应的苯氨基硫甲酰 (phenylthiocarbonyl, 缩写为 PTC) 衍生物。后者在硝基甲烷中与酸 (如三氟乙酸) 作用发生环化, 生成相应的苯乙内酰硫脲 (phenylthiohydantoin, 缩写为 PTH) 衍生物。这些衍生物是无色的, 可用层析法加以分离鉴定 (层析法基本原理见本章后面)。这个反应首先被 Edman 用于鉴定多肽或蛋白质的 N 端氨基酸。它在多肽和蛋白质的氨基酸序列分析方面占有重要地位。



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

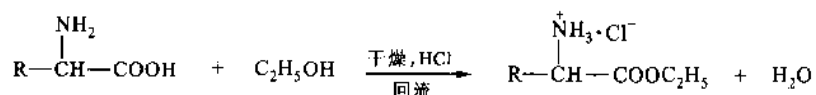
氨基酸在生物体内经氨基酸氧化酶 (amino acid oxidase) 催化即脱去 α -氨基而转变成酮酸 (见下册第 30 章)。

(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

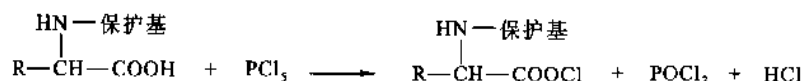
氨基酸与碱作用即生成盐,例如与氢氧化钠反应得氨基酸钠盐,其中重金属盐不溶于水。氨基酸的羧基被醇酯化后,形成相应的酯。例如氨基酸在无水乙醇中通入干燥氯化氢气体或加入二氯亚砷,然后回流,生成氨基酸乙酯的盐酸盐。氨基酸酯是制备氨基酸的酰胺或酰肼的中间物。



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者说氨基被活化,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

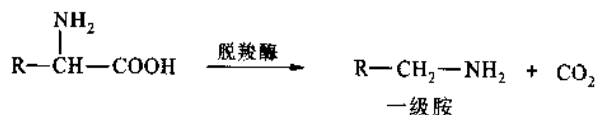
氨基酸的氨基如果用适当的保护基,例如苄氧甲酰基保护后,其羧基可与二氯亚砷或五氯化磷作用生成酰氯:



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

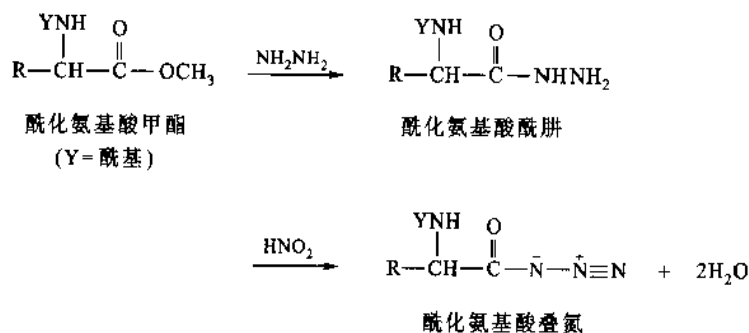
在生物体内氨基酸经氨基酸脱羧酶(amino acid decarboxylase)作用,放出二氧化碳并生成相应的一级胺:



谷氨酸脱羧后形成 γ -氨基丁酸,详见下册第30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——氨和还原茚二酮 (hydrindantin) 发生作用,生成紫色物质。其反应过程见图 3-13。用纸层析或柱层析把各种氨基酸分开后,利用茚三酮显色可以定性鉴定并用分光光度法在 570 nm 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。

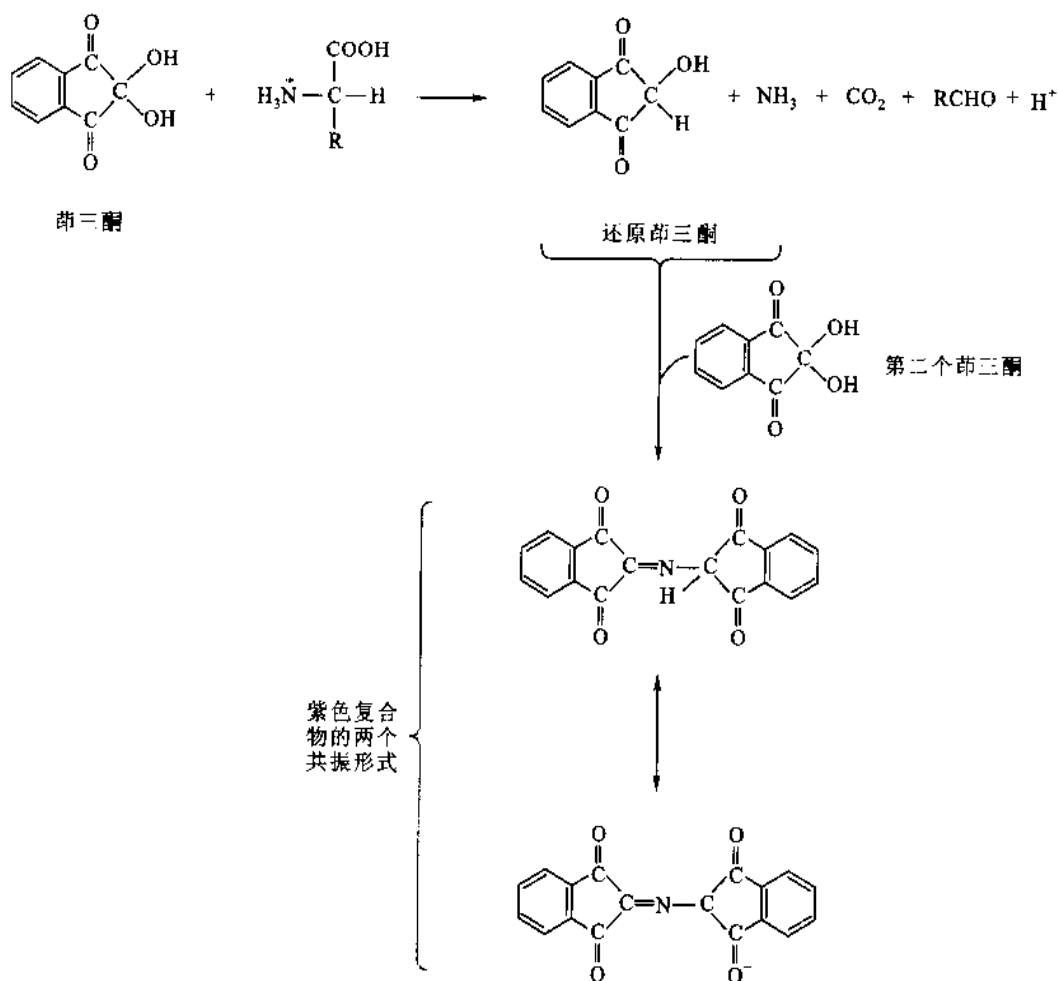
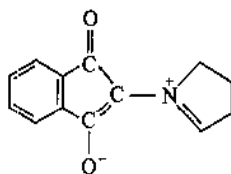


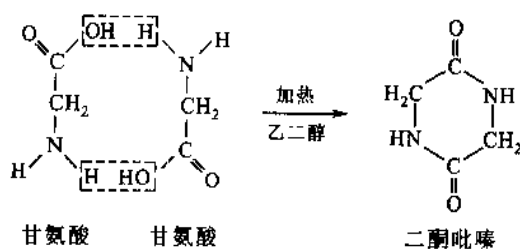
图 3-13 氨基酸与茚三酮反应的过程

两个亚氨基酸,脯氨酸和羟脯氨酸,与茚三酮反应并不释放 NH_3 ,而直接生成亮黄色化合物,最大光吸收在 440 nm。其结构式如下所示:



2. 成肽反应

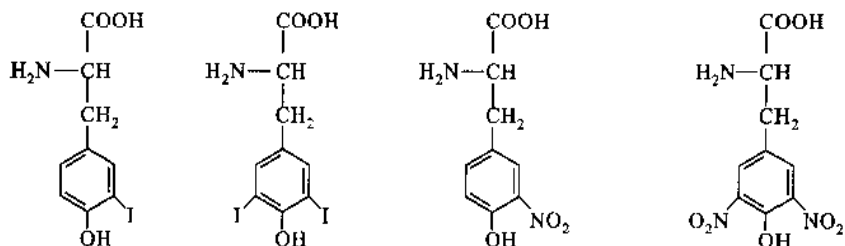
一个氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基可以缩合成肽,形成的键称肽键。例如甘氨酸在乙二醇中加热缩合,生成二酮吡嗪 (diketopiperazine)或称甘氨酸酐。



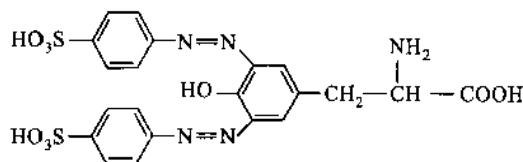
(四) 侧链 R 基参加的反应

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)、吡啶基、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:

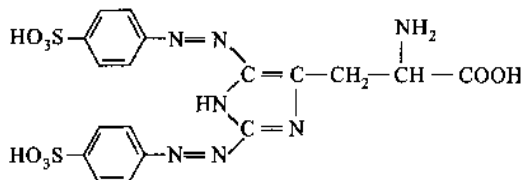


酪氨酸的酚基还可以与重氮化合物(例如对氨基苯磺酸的重氮盐)结合生成橘黄色的化合物:

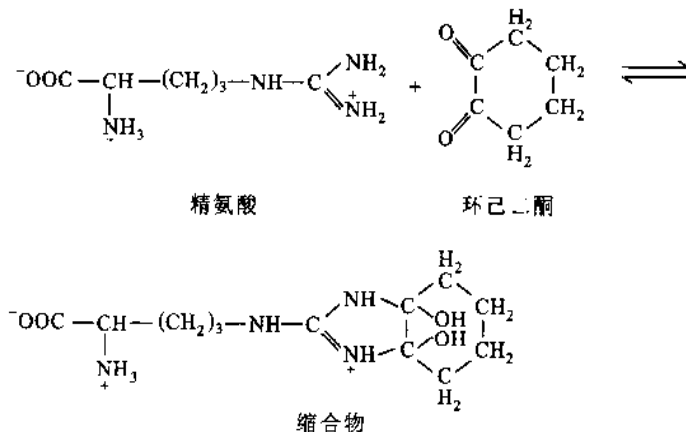


这就是 Pauly 反应,可用于检测酪氨酸。

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:



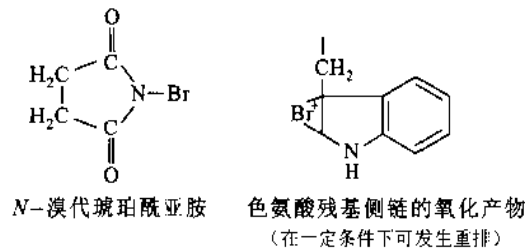
精氨酸的侧链胍基在硼酸钠缓冲液(pH 8~9, 25~35℃)中,与 1,2-环己二酮(cyclohexanedione)反应,生成缩合物:



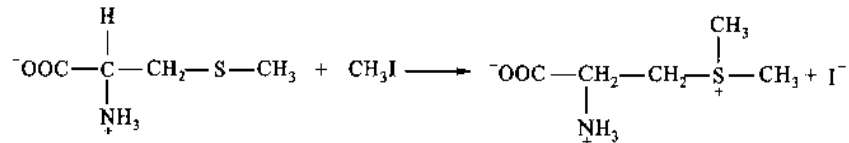
此缩合物在该反应条件下是稳定的,但在羟胺缓冲液中反应可逆转,重新生成精氨酸。此反应曾用于氨基酸序列分析以及结构与功能的研究。

色氨酸的侧链吡啶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:

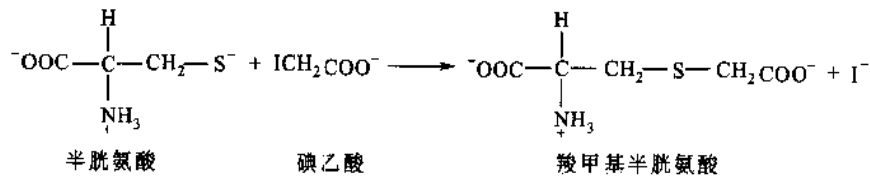


蛋氨酸侧链上的甲硫基是一个很强的亲核基团,与烃化试剂如甲基碘容易形成鎓盐 (sulfonium salt):

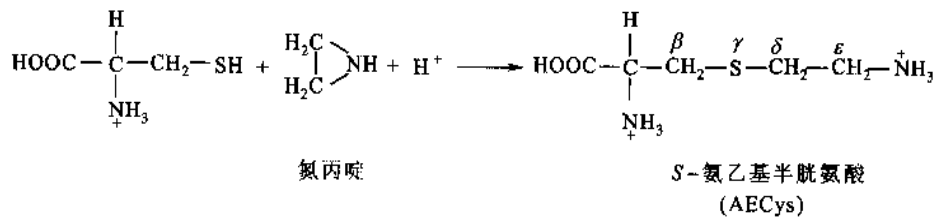


此反应可被巯基试剂逆转。在逆转反应中,原有的甲基和新加入的甲基除去的机会是相等的,因此当用 ^{14}C 标记的甲基碘处理时,获得的蛋氨酸将有 50% 是同位素标记的。

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:

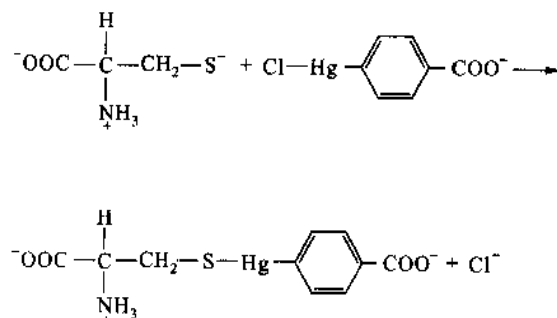


半胱氨酸的巯基能打开乙撑亚胺 (ethyleneimine), 即氮丙啶 (aziridine) 的环:



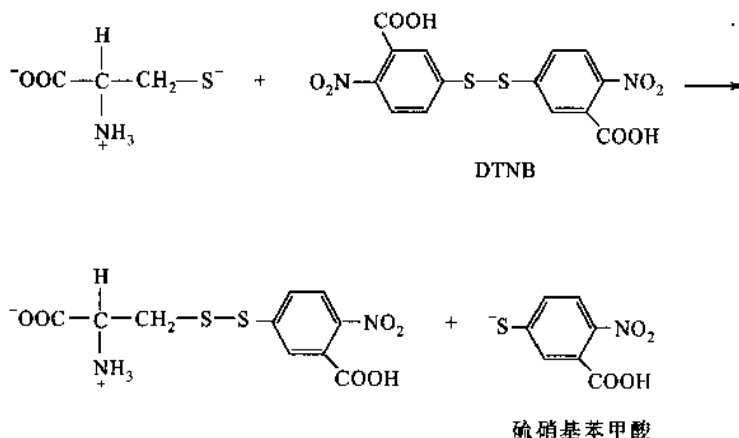
生成的侧链带有正电荷($\epsilon-\text{NH}_3^+$),它为胰蛋白酶水解肽链提供了一个新位点,这对氨基酸序列测定是很有用的。同时此反应也可用来保护肽链上的-SH 基,以防止被重新氧化为二硫键。

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 $\text{R}-\text{Hg}^+$ 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:



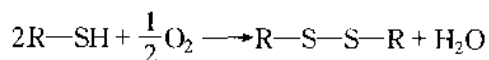
此反应是蛋白质结晶学中制备重原子衍生物最常用的方法之一。由于许多蛋白质,如 SH 酶,其活性中心涉及—SH 基,当遇到重金属离子而生成硫醇盐时,将导致酶的失活,因此制备这类蛋白质时应避免进入重金属离子。

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



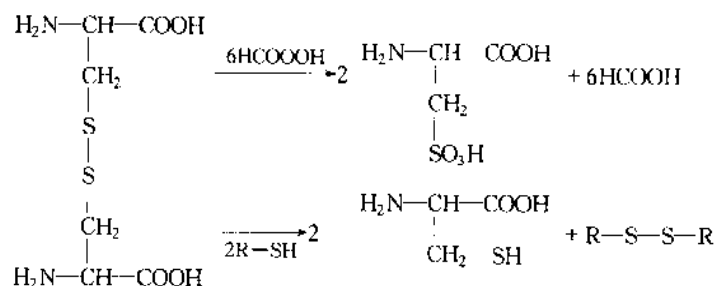
反应中 1 分子的半胱氨酸引起 1 分子的硫硝基苯甲酸的释放。它在 pH 8.0 时,在 412 nm 波长处有强烈的光吸收,因此可利用分光光度法定量测定—SH 基。

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+} 或 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。硫醇氧化中一般遇到的只有两种氧化衍生物:二硫化物和磺酸。前若是硫醇的空气氧化产物:

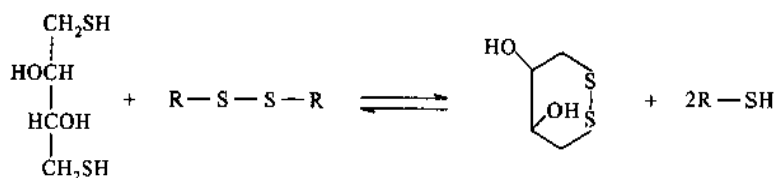


例如半胱氨酸氧化成胱氨酸(见本章氨基酸的分类部分)。后者是在更强的氧化剂作用下产生的,例如用过甲酸(performic acid)处理,—SH 基和—S—S—(二硫键)被氧化成磺基(— SO_3H)。

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($\text{R}-\text{SH}$)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、碘乙酸以及 3-溴丙胺(3-bromopropylamine)等试剂与巯基作用把它保护起来,防止它的重新氧化。

五、氨基酸的光学活性和光谱性质

(一) 氨基酸的光学活性和立体化学

前面曾谈到, α 氨基酸的 α -碳是一个不对称碳原子(手性碳原子),除非与它相连的 R 基为氢原子。不对称碳原子上的 4 个取代基在空间的取向可以有两种方式即两种构型,D 型和 L 型。氨基酸的构型(指 α -碳的构型)也和单糖一样以 D-甘油醛为参考物(图 3-14)。从蛋白质的酸水解液或酶促水解液中分离获得的氨基酸都是属 L 型。但是 D 型氨基酸也在自然界中找到,特别是作为某些肽抗生素和某些微生物细胞壁的成分存在(见本章“非蛋白质氨基酸”)。

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,便将发生消旋作用并转变为 D 型和 L 型的等摩尔混合物,称[外]消旋物(racemate)。蛋白质用碱进行水解时,或用一般的有机合成方法合成氨基酸时,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 4 种光学异构体,它们分别称为 L-,D-,L-别-(L-*allo*-)和 D-别(D-*allo*-)氨基酸,例如 L-苏氨酸,L-别苏氨酸(L-*allo*-threonine)和 D-别苏氨酸(D-*allo*-threonine)。苏氨酸的光学异构体示于图 3-15。L-和 D-,L-别和 D-别各为一对对映体;苏氨酸和别苏氨酸互为非对映体。实验证明,苏氨酸的 4 种异构体在蛋白质中只发现其中一种,即 L-苏氨酸。

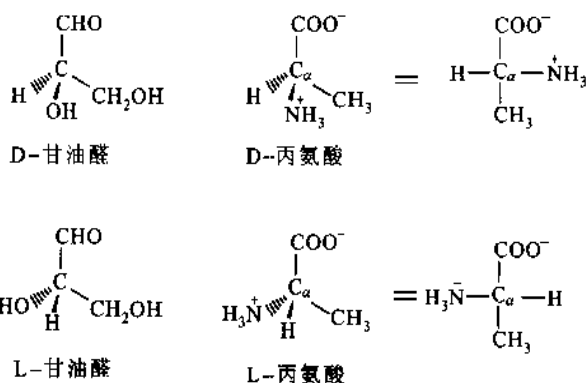


图 3-14 丙氨酸的一一对映体和甘油醛构型之间的立体关系

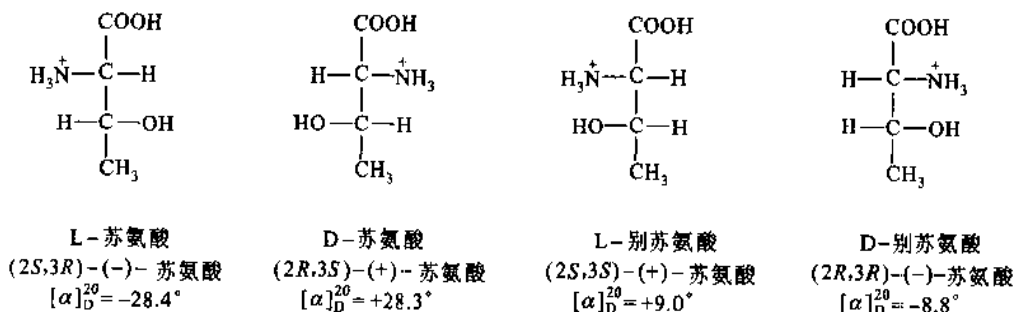
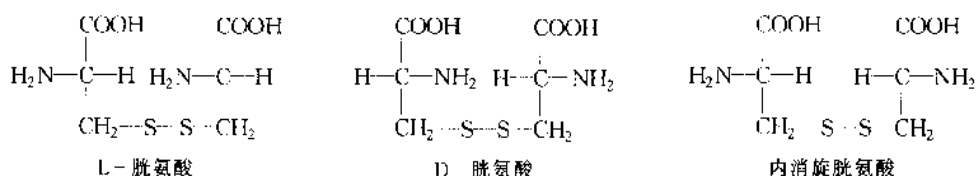


图 3-15 苏氨酸的光学异构体

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像,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3-16)。

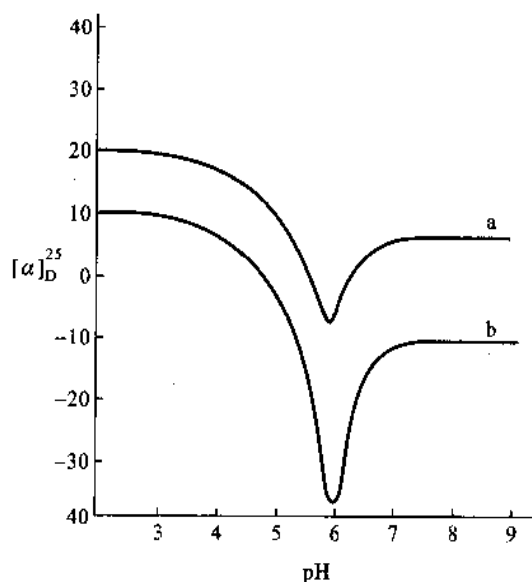


图3-16 pH对L-亮氨酸(a)和L-组氨酸(b)的 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 值的影响

比旋是 α -氨基酸的物理常数之一,是鉴别各种氨基酸的一种根据。L型 α -氨基酸的比旋见表3-4。

表3-4 蛋白质中常见L型氨基酸的比旋

名称	相对分子质量	$[\alpha]_{\text{D}}(\text{H}_2\text{O})$	$[\alpha]_{\text{D}}(5 \text{ mol/L HCl})$	名称	相对分子质量	$[\alpha]_{\text{D}}(\text{H}_2\text{O})$	$[\alpha]_{\text{D}}(5 \text{ mol/L HCl})$
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

(二) 氨基酸的光谱性质

现代生物化学中最重要和最令人振奋的进展之一是光谱学方法的应用,此方法能测定被分子和原子吸收或发射的不同频率的能量。蛋白质、核酸和其他生物分子的光谱学研究为深入了解这些分子的结构和动态过程提供了许多新的信息。

1. 紫外吸收光谱

氨基酸的光谱测定已阐明氨基酸的结构和化学方面的许多细节。参与蛋白质组成的 20 多种氨基酸在电磁波谱的可见光区都没有光吸收,在红外区和远紫外区($\lambda < 200 \text{ nm}$)都有光吸收。但在近紫外区(200 ~ 400 nm)只有芳香族氨基酸有吸收光的能力,因为它们的 R 基含有苯环共轭 π 键系统。酪氨酸的最大光吸收波长(λ_{max})在 275 nm,在该波长下的摩尔吸收系数(molar absorptivity 或 molar absorption coefficient) $\epsilon_{275} = 1.4 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$;苯丙氨酸的 λ_{max} 在 257 nm, $\epsilon_{257} = 2.0 \times 10^2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$;色氨酸的 λ_{max} 在 280 nm, $\epsilon_{280} = 5.6 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (图 3-17)。

蛋白质由于含有这些氨基酸,所以也有紫外吸收能力,一般最大吸收在 280 nm 波长处,因此能利用分光光度法很方便地测定样品中蛋白质的含量。但是不同的蛋白质中这些氨基酸的含量不同,所以它们的摩尔吸收系数是不完全相同的。

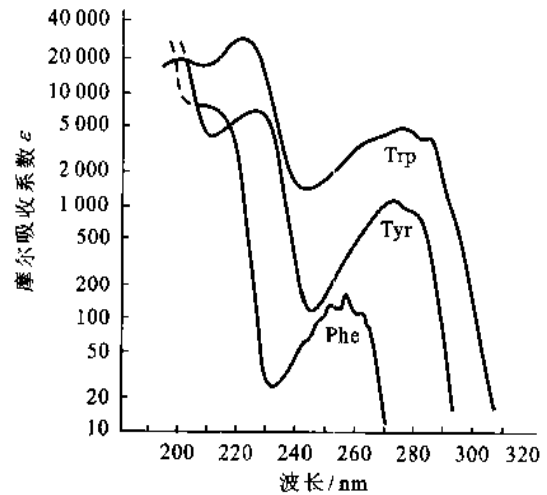


图 3-17 芳香族氨基酸在 pH6 时的紫外吸收光谱

分光光度法定量分析所依据的是 Lambert - Beer 定律:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T = \epsilon cl$$

式中, A = 吸光度 (absorbance), 也称光密度 (optical density, 符号 OD)

ϵ = 摩尔吸收系数, 旧称摩尔消光系数

c = 浓度 (mol/L)

l = 吸收杯的内径或光程厚度 (cm)

I_0 = 入射光强度

I = 透射光强度

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

芳香族氨基酸在紫外区呈现较弱的荧光 (fluorescence), 近来证明了色氨酸显现磷光 (phosphorescence), 一种寿命较长的发射光。这些荧光和磷光性质在研究蛋白质结构和动力学中特别有用。

2. 核磁共振波谱

20 世纪 50 年代发展起来的核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 是一项涉及在外磁场存在下某些原子核吸收射频 (radio frequency) 能量的波谱技术。

原子核带有正电荷, 只要自旋量子数不等于零, 其行为就像绕轴自旋 (spining) 的小磁体, 因而能与外加磁场相互作用。例如 ^1H , ^{13}C , ^2H , ^{14}N 和 ^{31}P 的核都属于这一类, 能发生核磁共振。

当无强的外磁场存在时, 磁核的自旋是随机的。然而当含有自旋核的样品置于强磁铁的两极之间时 (图 3-18), 核就采取特定的取向, 犹如指南针在地球磁场中有自己的取向那样。一个自旋的 ^1H 核或 ^{13}C 核取向的结果是使自己的小磁场与外磁场平行或与外磁场反平行。这两种取向的核能量是不同的, 因而两种磁核的数量是不等的。平行取向的能量稍低, 使这种自旋态比反平行取向的略多 (图 3-19)。

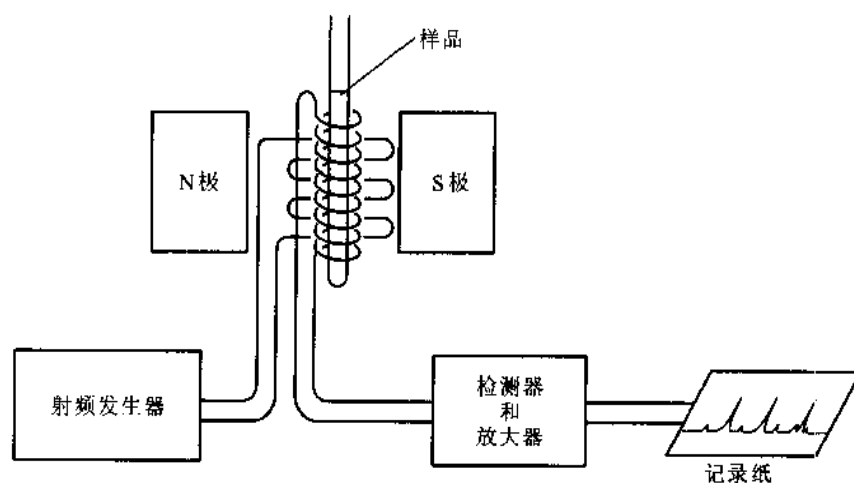


图 3-18 NMR 波谱仪运作示意图

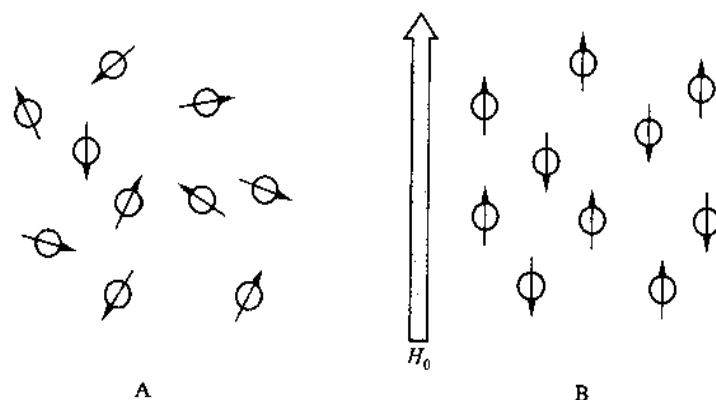


图 3-19 自旋核在外磁场中的取向

A. 在没有强的外磁场存在下(随机取向);B. 在强的外磁场存在下(平行或反平行取向)

如果现在已取向的核用一个合适频率的电磁辐射照射,则会发生能量吸收,从低能态“自旋翻转”(spin-flip)成高能态。当发生这种自旋翻转时,称此核处于与外加磁场共振,发生的能量吸收称为共振吸收,并因此得名核磁共振(NMR)。共振所需的射频能量,即相邻两个能级之间的能量差(ΔE)决定于外加磁场强度(H_0)和被照射原子核的旋磁比(magnetogyric ratio, γ)*,后者是原子核的特征常数,不同的核,其值不同。

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma}{2\pi} H_0$$

式中 h 为 planck 常数, ν 为共振频率,从上式可以看出当外加磁场强度一定时,该原子核的共振频率也是一定的。

实验中磁场强度一般用 14 100 高斯即 1.41T(特斯拉)。在此磁场强度下,为使 ^1H 核进入共振需要 60 MHz(1MHz = 1 兆赫兹 = 百万周/秒)范围的射频能量,要使 ^{13}C 核进入共振需要 15 MHz 频率的能量。

至此介绍的核磁共振是把原子核孤立起来看的。如果真是这样,一个分子中的所有 ^1H 核(质子)或 ^{13}C 核将在它们的 NMR 谱上只出现一个单一吸收峰。但是实际并不是如此,在分子中每个原子核的周围都有电子云和其他核的存在。绕核的环流电子云会产生自己的局部磁场(H_{loc}),在外加磁场中该磁场的方向与外加磁场的方向相反,致使原子核实际上受到的有效磁场强度(H)比外加磁场强度(H_0)小:

$$H = H_0 - H_{\text{loc}}$$

* 例如 ^1H 的 γ 值 = 26.7510×10^7 , ^{13}C 的 γ 值 = 6.7263×10^7 , 单位为 $\text{rad T}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。参见 John Emsley, 《元素手册》(李永昉译), 人民教育出版社, 1994。

这一现象称为电子云对核的屏蔽作用。

分子中即使同一种原子核,例如 $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{CH}_3$ 中 $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ 和 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 基团的 ^1H 核,由于所处的化学(电子)环境不尽相同,因而它们被屏蔽的程度也不一样。如果 NMR 仪器足够灵敏,就能在波谱上观察到这些细微差别,呈现不同的 NMR 信号(图 3-20)。这种由于环境差别引起外加磁场(H_0)或共振频率(ν)偏离标准值而产生移动的现象称化学位移(chemical shift)。在 NMR 波谱图上横坐标为化学位移,纵坐标为射频能量吸收强度。化学位移常用 δ 表示,为确定 δ 值大小常选用四甲基硅(TMS)作为 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱的参考物,规定它的化学位移为零。一个 δ 单位等于波谱仪工作频率的百万分之一(ppm,即 10^{-6})。例如用一台 60 MHz 的仪器测定样品的 ^1H NMR 谱,1 ppm = 60 Hz。一般说,化学位移:

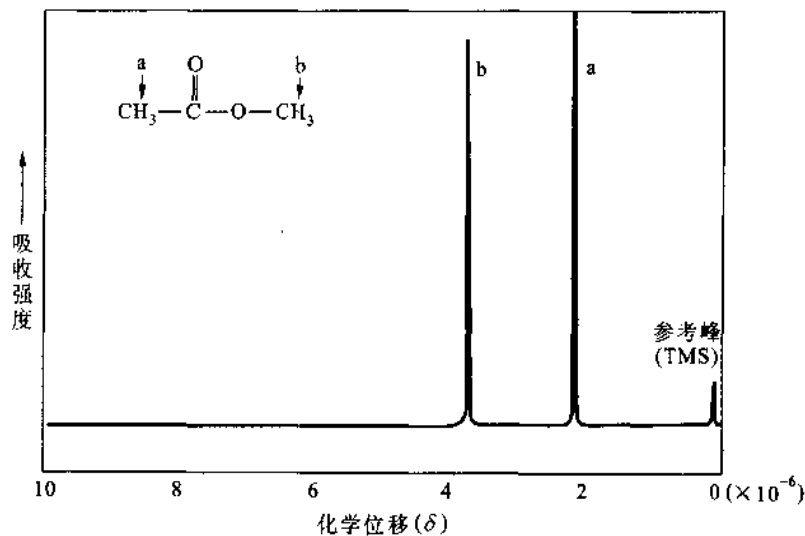


图 3-20 乙酸甲酯的 ^1H NMR 谱

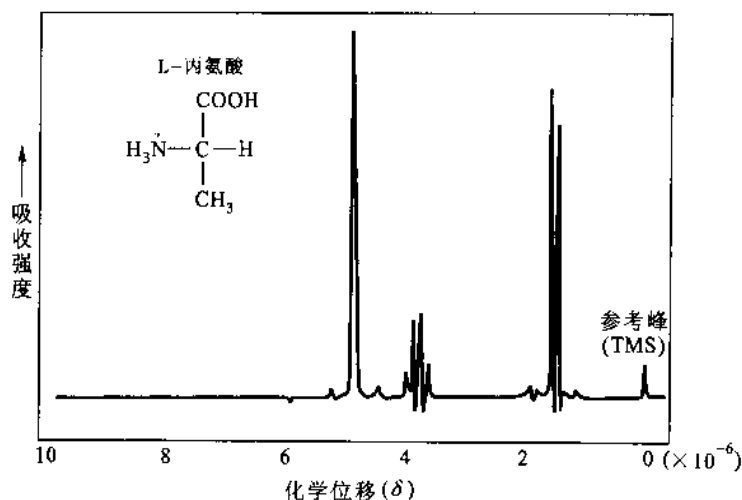
乙酸甲酯中每个甲基的 3 个质子都有相同的化学环境,被屏蔽的程度相同,被称为等效(equivalent)质子,呈现一个单一吸收峰(或称线)

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_{\text{ref}}}{\nu_{\text{ins}}} \times 10^6$$

式中 ν_s 和 ν_{ref} 分别为样品核和参考核的共振频率, ν_{ins} 为仪器的工作频率。大多数的 NMR 吸收都发生在很窄的范围。所有 ^1H NMR 吸收都在 0~12,几乎所有的 ^{13}C 吸收都在 1~250。

NMR 波谱的吸收峰经常会分裂成几个峰,这一现象称为自旋-自旋分裂或自旋-自旋偶合。这是由于基团间的核自旋相互作用(偶合)的结果。有相互作用和无相互作用时跃迁能量差称为偶合常数(coupling constant)。谱线的分裂一般服从 $n+1$ 的规律,当相邻基团上有 n 个质子时,则该基团的质子吸收峰将分裂成 $n+1$ 个峰(图 3-21)。

NMR 波谱技术在氨基酸和蛋白质化学表征方面起着重要作用。经过这些研究已提出几个重要原则。第一,氨基酸质子的化学位移决定于它的特定化学环境,并因而也决定于氨基酸的电离状态;第二,滴定时电子密度的变化将迅速传递到脂肪族氨基酸的整个碳链和芳香族氨基酸的脂肪链部分,这已被有关质子的化学位移发生变化所证实;第三,相邻碳上质子间的偶合常数大小在某些情况下取决于氨基酸的电离状态。这些测定已被用于研究蛋白质中氨基酸残基的电离行为。更先进的高磁场 NMR 也用于肽和小蛋白质的三维结构测定。

图 3-21 丙氨酸的 ^1H NMR 谱

六、氨基酸混合物的分析分离

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,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

层析即色层分析也称色谱 (chromatography), 最先由俄国植物学家 M. C. Ивтер 于 1903 年提出来的。他所进行的色层分析实际上是一种吸附层析 (adsorption chromatography)。1941 年英国学者 Martin 与 Syngc 提出分配层析。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, 但它们的基本原理是一样的。

所有的层析系统通常都由 2 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 或 distribution coefficient) 来描述。1891 年 Nernst 提出了分配定律 (partition law): 当一种溶质在两种给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_{df} 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。

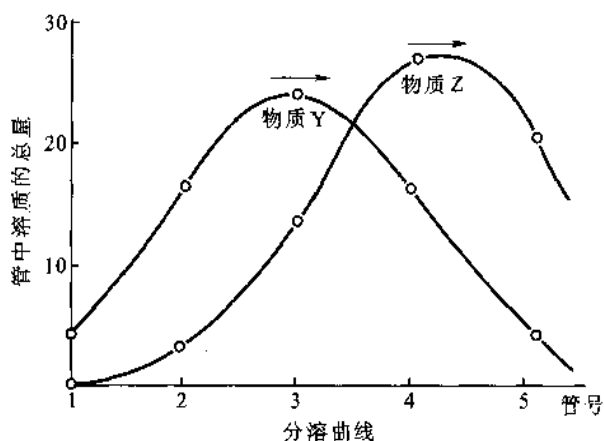
利用层析法分离混合物例如氨基酸混合物, 其先决条件是各种氨基酸成分的分配系数要有差异, 哪怕是很小的差异。一般差异越大, 越容易分开。

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 3-22 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

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



溶剂 A	64					64				
溶剂 B	0					0				
总量	64					64				
平衡后	32 (上相转移)					48 (上相转移)				
	32 (下相固定)					16				
总量	64					64				
转移 1	16	16				12	36			
	16	16				4	12			
总量	32	32				16	48			
转移 2	8	16	8			3	18	27		
	8	16	8			1	6	9		
总量	16	32	16			4	24	36		
转移 3	4	12	12	4		0.75	6.75	20.25	20.25	
	4	12	12	4		0.25	2.25	6.75	6.75	
总量	8	24	24	8		1	9	27	27	
转移 4	2	8	12	8	2	0.19	2.25	10.1	20.2	15.2
	2	8	12	8	2	0.06	0.75	3.4	6.8	5.1
总量	4	16	24	16	4	0.25	3.0	13.5	27	20.3
分溶管号	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

物质 Y ($K_d=1$) 的分配情况

物质 Z ($K_d=3$) 的分配情况

图 3-22 逆流分溶原理

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:

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

因为物质 Z 的总量为 64,所以该管中的含量应是:

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

从图 3-22 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,其分溶曲线的峰形越窄而高(图 3-23),这样有利于混合物中各物质的完全分离。

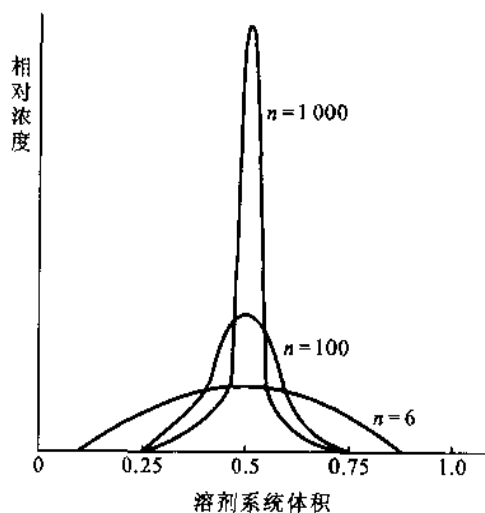


图 3-23 分溶曲线与转移次数
(理论板数) n 的依赖关系

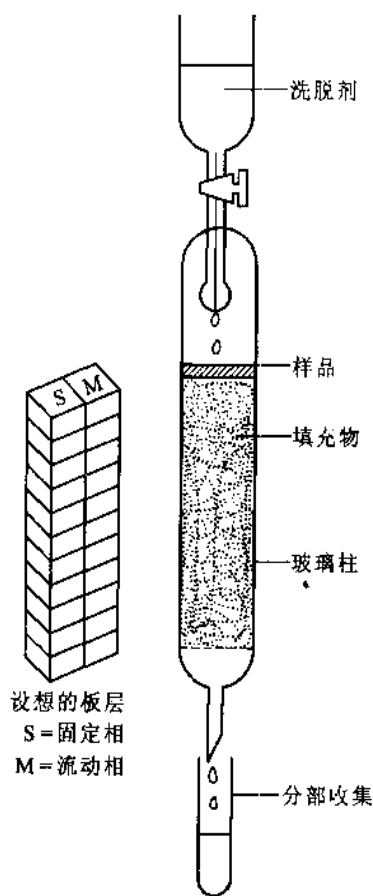


图 3-24 柱层析

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纯化。

目前在分析分离上使用较广的分配层析 (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 3-24)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 3-24),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 (eluante)。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(图 3-29)。

(三) 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。

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-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,得到一个双向纸层析谱 (two-dimensional paper chromatogram) (图 3-25)。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。

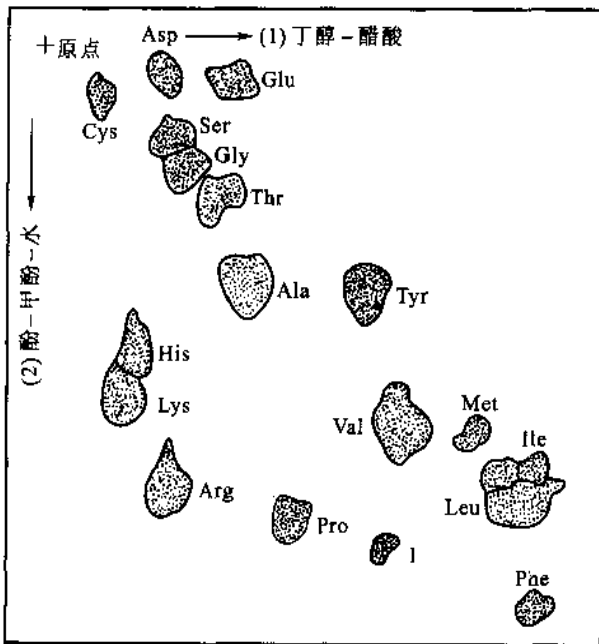


图 3-25 氨基酸的双向纸层析图谱

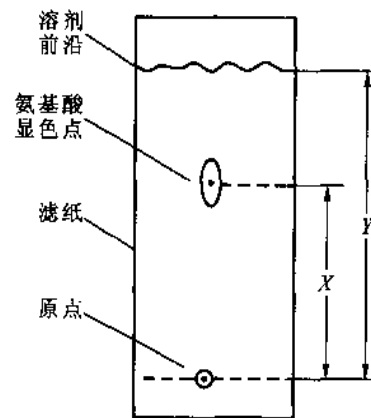


图 3-26 纸层析中的 R_f 值, $R_f = \frac{X}{Y}$

在纸层析中,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,即相对迁移率(图 3-26)。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。

(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、硅胶和氧化铝粉等, 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 3-27), 使样品中各个成分分离开, 最后进行鉴定和定量测定。

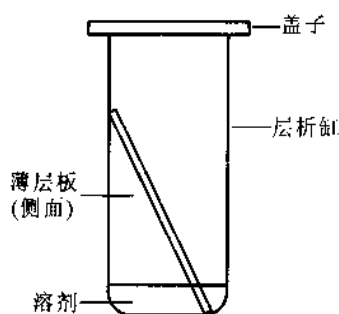


图 3-27 薄层层析装置

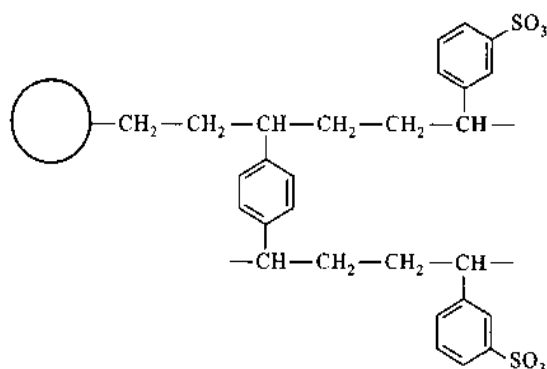


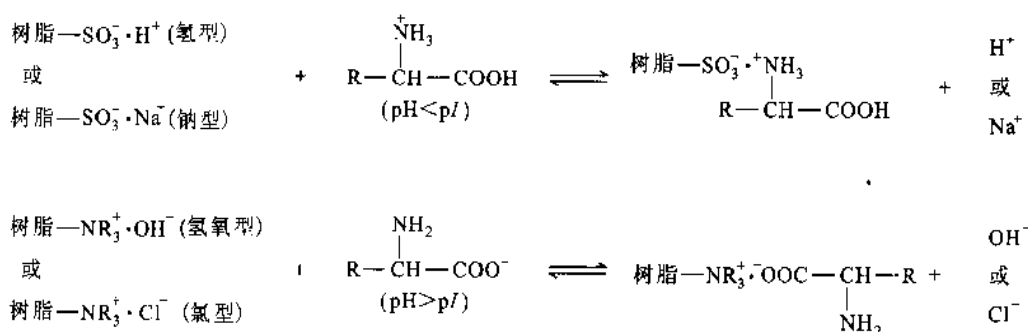
图 3-28 磺酸型阳离子交换树脂的部分结构

(五) 离子交换层析

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 3-28)。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 $-\text{SO}_3\text{H}$ (强酸型) 或 $-\text{COOH}$ (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 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$ (强碱型) 或 $-\text{NH}_2\text{OH}$ (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(A^{2+}) > 中性氨基酸(A^+) > 酸性氨基酸(A^0)。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(分离图谱)如图 3-29 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 3-30。

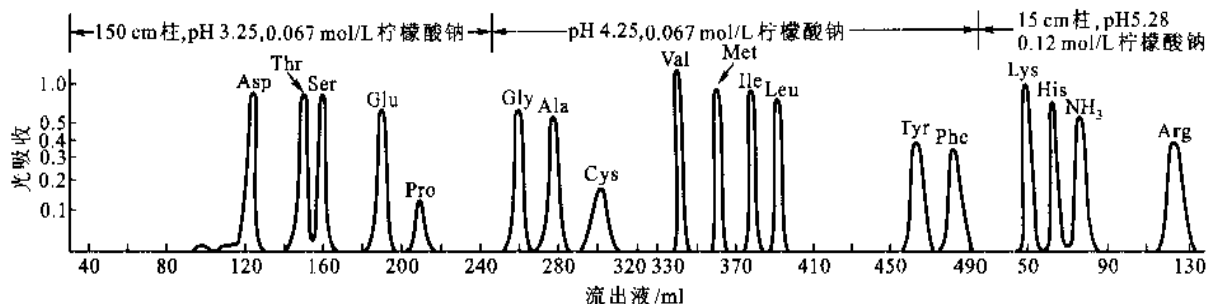


图 3-29 氨基酸自动分析仪记录的氨基酸混合物分析结果

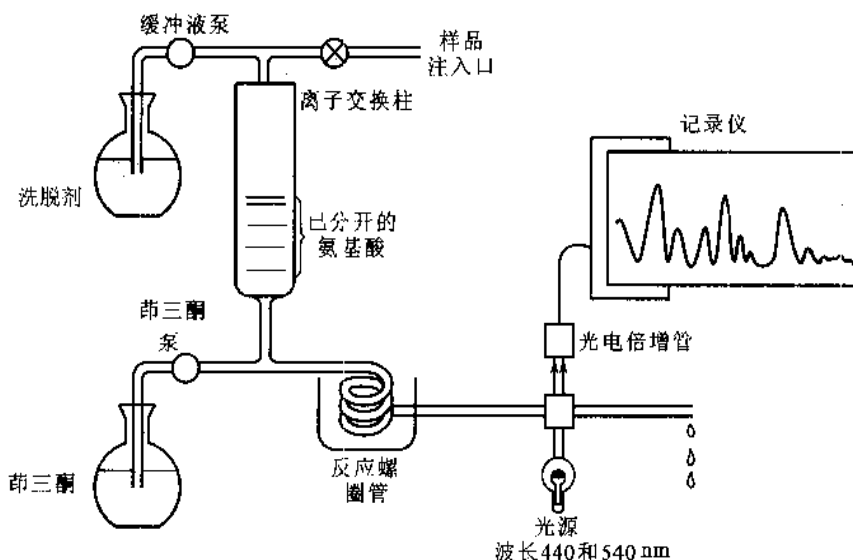


图 3-30 氨基酸分析仪的图解

(六) 气液层析

当层析系统的流动相为气体如氢、氮、氦, 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层析或气液色谱(gas-liquid chromatography), 简称为气相层析或气相色谱。利用气相层析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中, 称层析柱(chromatographic column), 保持在适当的温度下, 令高压的气体(流动相)连续地通过层析柱。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, 这就是气相层析洗脱曲线。

气相层析分析需用气相层析仪(gas-chromatograph)进行。气相层析仪的基本组件如图 3-31 所示。

气相层析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

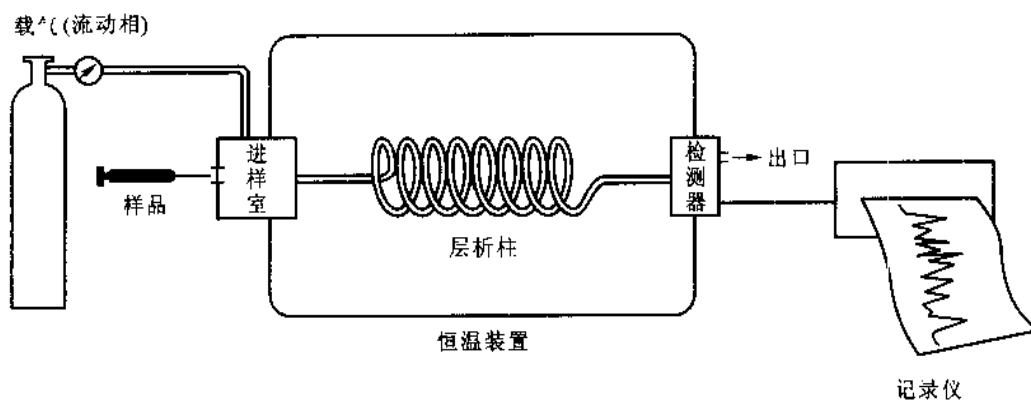


图 3-31 气相层析仪的基本组件

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(见本章氨基酸的化学反应部分), 然后经三甲基硅烷基化(trimethylsilylation), 便可得到能很好气化的氨基酸衍生物。

(七) 高效液相层析

高效液相层析(high performance liquid chromatography, 简称 HPLC)曾称高压液相层析(high pressure liquid chromatography)。这是近二十多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。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(见第 7 章)。

高效液相层析的图解见图 3-32。

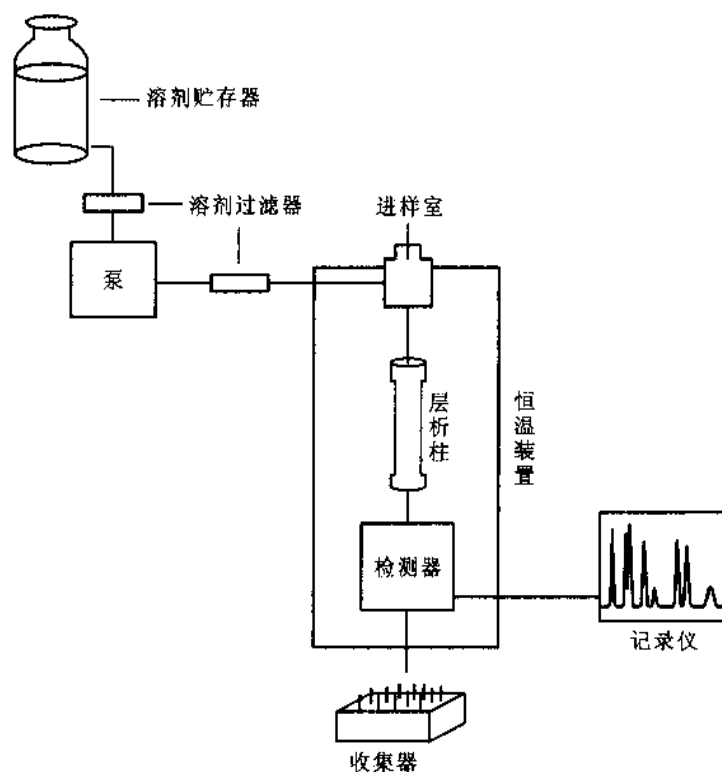


图 3-32 高效液相层析的图解

提 要

α -氨基酸是蛋白质的构件分子,当用酸、碱或蛋白酶水解蛋白质时可获得它们。蛋白质中的氨基酸都是L型的。但碱水解得到的氨基酸是D型和L型的消旋混合物。

参与蛋白质组成的基本氨基酸只有20种。此外还有若干种氨基酸在某些蛋白质中存在,但它们都是在蛋白质生物合成后由相应的基本氨基酸(残基)经化学修饰而成。除参与蛋白质组成的氨基酸外,还有很多种其他氨基酸存在于各种组织和细胞中,有的是 β -、 γ -或 δ -氨基酸,有些是D型氨基酸。

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),氨基酸以等电的兼性离子($\text{H}_3\text{N}^+\text{CHR}\text{COO}^-$)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,用pI表示。

所有的 α -氨基酸都能与茚三酮发生颜色反应。 α - 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); α - 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。

除甘氨酸外 α -氨基酸的 α -碳是一个手性碳原子,因此 α -氨基酸具有光学活性。比旋是 α -氨基酸的物理常数之一,它是鉴别各种氨基酸的一种根据。

参与蛋白质组成的氨基酸中色氨酸、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依据。核磁共振(NMR)波谱技术在氨基酸和蛋白质的化学表征方面起重要作用。

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。常用的方法有离子交换柱层析、高效液相层析(HPLC)等。

习 题

1. 写出下列氨基酸的单字母和三字母的缩写符号:精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。[见表3-1]
2. 计算赖氨酸的 ϵ - NH_3^+ 20%被解离时的溶液pH。[9.9]
3. 计算谷氨酸的 γ - COOH 三分之二被解离时的溶液pH。[4.6]
4. 计算下列物质0.3 mol/L溶液的pH:(a)亮氨酸盐酸盐,(b)亮氨酸钠盐和(c)等电亮氨酸。[(a)约1.46,(b)约11.5,(c)约6.05]
5. 根据表3-3中氨基酸的 pK_a 值,计算下列氨基酸的pI值:丙氨酸、半胱氨酸、谷氨酸和精氨酸。[pI:6.02;5.02;3.22;10.76]
6. 向1 L 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将是多少?[pH:2.71;9.23]
7. 将丙氨酸溶液(400 ml)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 ml。问起始溶液中丙氨酸的含量为多少克?[4.45g]
8. 计算0.25 mol/L的组氨酸溶液在pH 6.4时各种离子形式的浓度(mol/L)。 $[\text{His}^{2+}]$ 为 1.78×10^{-4} , $[\text{His}^+]$ 为0.071, $[\text{His}^0]$ 为0.179, $[\text{His}^-]$ 为 2.8×10^{-4}
9. 说明用含一个结晶水的固体组氨酸盐酸盐(相对分子质量=209.6;咪唑基 $\text{pK}_a=6.0$)和1 mol/L KOH配制1 L 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 1 mol/L KOH,用水稀释至1 L]
10. 为什么氨基酸的茚三酮反应也能用测压法定量氨基酸?
11. L-亮氨酸溶液(3.0 g/50 ml 6 mol/L HCl)在20 cm旋光管中测得的旋光度为 $+1.81^\circ$ 。计算L-亮氨酸在6 mol/L HCl中的比旋($[\alpha]$)。 $[[\alpha]] = +15.1^\circ$
12. 标出异亮氨酸的4个光学异构体的(R,S)构型名称。[参考图3-5]
13. 甘氨酸在溶剂A中的溶解度为在溶剂B中的4倍,苯丙氨酸在溶剂A中的溶解度仅为在溶剂B中的两倍。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 mg,苯丙氨酸为81 mg。

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]

14. 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]

15. 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强阳离子交换树脂中,随后用该缓冲液洗脱此柱,并分部收集洗出液,这5种氨基酸将按什么次序洗脱下来? [Asp, Thr, Gly, Leu, Lys]

主要参考书

1. I H 西格尔. 生物化学计算. 中译本(吴经才等译),北京:科学出版社,1984
2. 陶蔚孙,李惟,姜涌明主编. 蛋白质分子基础. 第二版. 北京:高等教育出版社,1995
3. 林克椿. 生物物理技术——波谱技术及其在生物学中的应用. 北京:高等教育出版社,1989
4. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry, 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
5. Barrett G C. Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. New York: Chapman and Hall, 1985
6. Meister A. Biochemistry of the Amino Acids, 2nd ed. Vol. 1. New York: Academic Press, 1965
7. Arcenstein J P, Winitz M. Chemistry of the Amino Acids. John Wiley & Sons, Inc., 1961
8. McMurry I. Organic Chemistry, 3rd ed. California: Brooks/Cole Publishing Company, 1992

(徐长法)

第4章 蛋白质的共价结构

一、蛋白质通论

蛋白质是一类最重要的生物大分子。英文名称叫做 protein, 源自希腊文 $\pi\rho\omicron\tau\omicron$, 它是“最原初的”, “第一重要的”意思。汉文译为蛋白质, 有些学者曾根据 protein 的原义建议设新词“朊”表示, 但因蛋白质一词沿用已久, “朊”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。而原生质是生命现象的物质基础。

(一) 蛋白质的化学组成和分类

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 (Kjedahl) 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 g 氮所代表的蛋白质量 (克数)。

许多蛋白质仅由氨基酸组成, 不含其他化学成分, 例如核糖核酸酶、肌动蛋白等。这些蛋白质称为单纯蛋白质 (simple protein)。但是许多其他蛋白质含有除氨基酸外的各种化学成分作为其结构的一部分。这样的蛋白质称为缀合蛋白质 (conjugated protein)。这些非蛋白质部分称为辅基 (prosthetic group) 或配体 (ligand)。也有人认为只有非蛋白质部分对蛋白质的功能是关键的关键的才能称辅基。如果非蛋白质部分是通过共价键连接于蛋白质的, 则必须对蛋白质进行水解才能释放它; 不是与蛋白质共价结合的, 则只要使蛋白质变性即可把它除去。

单纯蛋白质可以根据其物理性质如溶解度进行分类 (表 4-1)。缀合蛋白质可以按其非氨基酸成分进行分类 (表 4-2)。

表 4-1 单纯蛋白质的分类

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。
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); 溶于水的称假球蛋白(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)。
4. 谷醇溶蛋白(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)。
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)。
7. 硬蛋白(scleroprotein): 不溶于水、盐、稀酸或稀碱。这类蛋白是动物体内作为缔结及保护功能的蛋白质。例如, 角蛋白、胶原、网硬蛋白(reticulin)和弹性蛋白。

表 4-2 缀合蛋白质的分类

1. 糖蛋白: 含糖类。许多胞外基质蛋白质属糖蛋白, 如纤连蛋白、胶原蛋白和蛋白聚糖; γ -球蛋白。
2. 脂蛋白: 含三酰甘油、胆固醇、磷脂。如血浆脂蛋白, 包括 HDL(α -脂蛋白)、LDL(β -脂蛋白)等。
3. 核蛋白(nucleoprotein): 辅基为核酸。如核糖体(含 RNA)、AIDS 病毒(含 RNA)和腺病毒(adenovirus, 含 DNA)。
4. 磷蛋白(phosphoprotein): 含与 Ser、Thr 或 Tyr 残基的羟基酯化的磷酸基。如酪蛋白(casein)、糖原磷酸化酶_a。
5. 金属蛋白(metalloprotein): 如铁蛋白(ferritin)含 Fe, 乙醇脱氢酶含 Zn, 细胞色素氧化酶含 Cu 和 Fe, 固氮酶含 Mo 和 Fe, 丙酮酸羧化酶含 Mn。
6. 血红素蛋白(hemoprotein): 它实际上是金属蛋白的一个亚类; 辅基为血红素, 是卟啉化合物, 卟啉中心含 Fe 的如血红蛋白、细胞色素 c、过氧化氢酶和硝酸盐还原酶。
7. 黄素蛋白(flavoprotein): 含黄素, 辅基为 FMN 和 FAD。如琥珀酸脱氢酶(含 FAD)、NADH 脱氢酶(含 FMN)、二氢乳清酸脱氢酶(含 FAD 和 FMN)和亚硫酸盐还原酶(含 FAD 和 FMN)。

近年来有些学者提出依据蛋白质的生物学功能进行分类(表 4-3)。

表 4-3 蛋白质按生物学功能分类

1. 酶(enzyme): 如核糖核酸酶、胰蛋白酶、果糖磷酸激酶、乙醇脱氢酶、过氧化氢酶和苹果酸酶(malic enzyme)。
2. 调节蛋白(regulatory protein): 如胰岛素、促生长素(GH)、促甲状腺素(TSH)、乳糖阻抑物(*lac* repressor)、核[转录]因子 1(NFI)和分解代谢物激活剂蛋白(CAP)。
3. 转运蛋白(transport protein): 如血红蛋白、血清清蛋白和葡糖转运蛋白(glucosetransporter)。
4. 贮存蛋白(storage protein): 如卵清蛋白、酪蛋白、菜豆蛋白(phaseolin)和铁蛋白。
5. 收缩和游动蛋白(contractile and motile protein): 肌动蛋白、肌球蛋白、微管蛋白、动力蛋白(dynein)和驱动蛋白(kinesin)。
6. 结构蛋白(structural protein): 如 α -角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、丝蛋白和蛋白聚糖。
7. 支架蛋白(scaffold protein): 如胰岛素受体底物-1(IRS-1)、A 激酶锚定蛋白(AKAP)和信号传递转录激活剂(STAT)。
8. 保护和开发蛋白(protective and exploitive protein): 如免疫球蛋白、凝血酶、血纤蛋白原、抗冻蛋白、蛇和蜂毒蛋白、白喉毒素(diphtheria toxin)和蓖麻毒蛋白(ricin)。
9. 异常蛋白(exotic protein): 如应乐果甜蛋白(monellin)、节肢弹性蛋白(resilin)和胶质蛋白。

(二) 蛋白质的形状和大小

蛋白质根据形状和溶解度大体可分为三大类: ① 纤维状蛋白质(fibrous protein)具有比较简单、有规则的线性结构, 形状呈细棒或纤维状。这类蛋白质在生物体内主要起结构作用。典型的纤维状蛋白质, 如胶原蛋白、弹性蛋白、角蛋白和丝蛋白等, 不溶于水和稀盐溶液。有些纤维状蛋白质如肌球蛋白(myosin)和血纤蛋白原(fibrinogen)是可溶性的。② 球状蛋白质(globular protein)形状接近球形或椭球形。其多肽

链折叠紧密,疏水的氨基酸侧链位于分子内部,亲水的侧链在外部暴露于水溶剂。因此球状蛋白质在水溶液中溶解性好。细胞中的大多数可溶性蛋白质,如胞质酶类,都属于球状蛋白质。③膜蛋白[质](membrane protein)与细胞的各种膜系统结合而存在。为能与膜内的非极性相(烃链)相互作用,膜蛋白的疏水氨基酸侧链伸向外部。因此膜蛋白不溶于水但能溶于去污剂溶液。膜蛋白的组成特点是所含的亲水氨基酸残基比胞质蛋白质少。

蛋白质是相对分子质量很大的生物分子。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序列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。利用第7章所介绍的物理化学方法可以测定出均一蛋白质的相对分子质量。蛋白质相对分子质量变化范围很大,从大约6000到 1×10^6 或更大一些(表4-4)。蛋白质相对分子质量的上下限是人为规定的。因为这涉及到对蛋白质及其相

表4-4 蛋白质的大小

蛋白质	M_r	残基数目/链	亚基组织方式
胰岛素 ^a (牛)	5 733	21(A) 30(B)	$\alpha\beta$
细胞色素 c(马)	12 500	104	α_1
核糖核酸酶(牛胰)	12 640	124	α_1
溶菌酶(卵清)	13 930	129	α_1
肌红蛋白(马)	16 890	153	α_1
糜蛋白酶(牛胰)	22 600	13(α) 132(β) 97(γ)	$\alpha\beta\gamma$
血红蛋白(人)	64 500	141(α) 146(β)	$\alpha_2\beta_2$
血清清蛋白(人)	68 500	550	α_1
己糖激酶(酵母)	96 000	200	α_4
γ -球蛋白(马)	149 900	214(α) 446(β)	$\alpha_2\beta_2$
谷氨酸脱氢酶(肝)	332 694	500	α_6
肌球蛋白(兔)	470 000	1 800(重链 h) 190(α) 149(α') 160(β)	$h_2\alpha_1\alpha_2\beta_2$
核酮糖二磷酸羧化酶(菠菜)	560 000	475(α) 123(β)	$\alpha_3\beta_3$
谷酰胺合成酶(<i>E. coli</i>)	600 000	468	α_{12}

a. 胰岛素的两条链是以二硫键共价结合的。有的学者把这样的每条链也看成是一个亚基。

对分子质量概念的理解。下限一般认为从胰岛素开始,其相对分子质量为5700。有人认为应从核糖核酸酶开始,因此下限相对分子质量就是12600。有些蛋白质仅由一条多肽链构成,如溶菌酶和肌红蛋白,这些蛋白称为单体蛋白质(monomeric protein)。有些蛋白质是由两条或多条多肽链构成,如血红蛋白(两条 α 链和两条 β 链)和己糖激酶(4条 α 链),这些蛋白称为寡聚(oligomeric)或多聚(multimeric)蛋白质;其中每条多肽链称为亚基或亚单位(subunit),亚基之间通过非共价键相互缔合。如果把这些寡聚蛋白质看作一个分子,那么蛋白质相对分子质量可达百万,例如谷酰胺合成酶(12个亚基),相对分子质量600000。如果连同辅基也算进去,像烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)由2130个亚基和一条RNA链构成的超分子复合物(supramolecular complex),其相对分子质量约为 4×10^7 。这些寡聚蛋白质或复合体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。

对于不含辅基的简单蛋白质,用110除它的相对分子质量即可约略估计其氨基酸残基的数目。蛋白质中20种氨基酸的平均相对分子质量约为138,但在多数蛋白质中较小的氨基酸占优势。因此平均相对分子质量接近128。又因每形成一个肽键将除去一分子水(相对分子质量18),所以氨基酸残基的平均相对分子质量约为 $128 - 18 = 110$ 。表4-4中给出各种蛋白质亚基的氨基酸残基数目。

(三) 蛋白质构象和蛋白质结构的组织层次

蛋白质分子是由氨基酸首尾相连而成的共价多肽链,但是天然的蛋白质分子并不是走向随机的松散多肽链。每一种天然蛋白质都有自己特有的空间结构或称三维结构,这种三维结构通常被称为蛋白质的构象。在第1章曾谈到构象概念,并指出构象和构型两个术语不应混用。这里再次强调一下,构型是指在具有相同结构式的立体异构体中取代基团在空间的相对取向,不同的构型如果没有共价键的断裂是不能互变的。构象是指具有相同结构式和相同构型的分子在空间里可能的多种形态,构象形态间的改变不涉及共价键的断裂。一个给定的蛋白质理论上可采取多种构象,但在生理条件下,只有一种或很少几种在能量上是有利的。指导蛋白质多肽链折叠成能量上有利的构象的规律至今仍不完全清楚,寻找这些规律是当前奋力研究的课题之一。

为了表示蛋白质结构的不同组织层次(level, hierarchy),一般采用下列专门术语。一级(1°)结构(primary structure)是指多肽链的氨基酸序列。二级(2°)结构(secondary structure)是指多肽链借助氢键排列成自己特有的 α 螺旋和 β 折叠股片段。这些片段构成所谓规则结构(regular structure),这种结构像弹簧的螺圈沿一维方向伸展。 2° 结构是多肽链在空间的三维排列中的一个高级组织层次。三级(3°)结构(tertiary structure)是指多肽链借助各种非共价键(或非共价力)弯曲、折叠成具有特定走向的紧密球状构象。球状构象给出最低的表面积和体积之比,因而使蛋白质与周围环境的相互作用降到最小。 3° 结构是多肽链在三维排列中的另一高级组织层次。四级(4°)结构(quaternary structure)是指寡聚蛋白质中各亚基之间在空间上的相互关系和结合方式。当然其中各个亚基又有自己特定的 3° 结构(图4-1)。

蛋白质的一级结构是由多肽链主链(backbone)上共价连接的氨基酸残基决定的。二级结构和其他高级结构层次主要是由非共价力如氢键、离子键、范德华力和疏水作用决定的。必须强调指出,一个蛋白质分子为获得复杂结构所需的全部信息都含于 1° 结构即多肽链的氨基酸序列中。 1° 结构将在本章进一步讨论, 2° , 3° 和 4° 结构将在第5和第6章详细叙述。

(四) 蛋白质功能的多样性

生物界蛋白质的种类估计在 $10^{10} \sim 10^{13}$ 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,其序列异构体有: $A_{20}^{20} = 20! = 2 \times 10^{18}$ 种。如果一个相对分子质量为34000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,其序列异构体数目约为 10^{300} 。蛋白质的这种序列异构现象是蛋白质生物功能多样性和物种特异性的结构基础。

蛋白质是生物功能的载体。实际上每种细胞活性都依赖于一种或几种特定的蛋白质。归纳起来蛋白质的生物学功能有以下几个方面:

(1) 催化 蛋白质的一个最重要的生物功能作为生物体新陈代谢的催化剂——酶。酶是蛋白质中最大的一类,在国际生化委员会公布的《酶命名法》(Enzyme Nomenclature)中已列出3000多种不同的酶。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。酶的催化效率远大于合成的催化剂。酶催化的反应速率为非催化速率的 10^{16} 倍。

(2) 调节 许多蛋白质能调节其他蛋白质执行其生理功能的能力,这些蛋白质称为调节蛋白,最著名的例子是胰腺兰氏小岛(islet of Langerhans)及 β 细胞分泌的胰岛素($M, 5.7 \times 10^3$),它是调节动物体内血糖代谢的一种激素(第17章)。另一类调节蛋白参与基因表达的调控,它们是激活(正控制因子)或是抑制

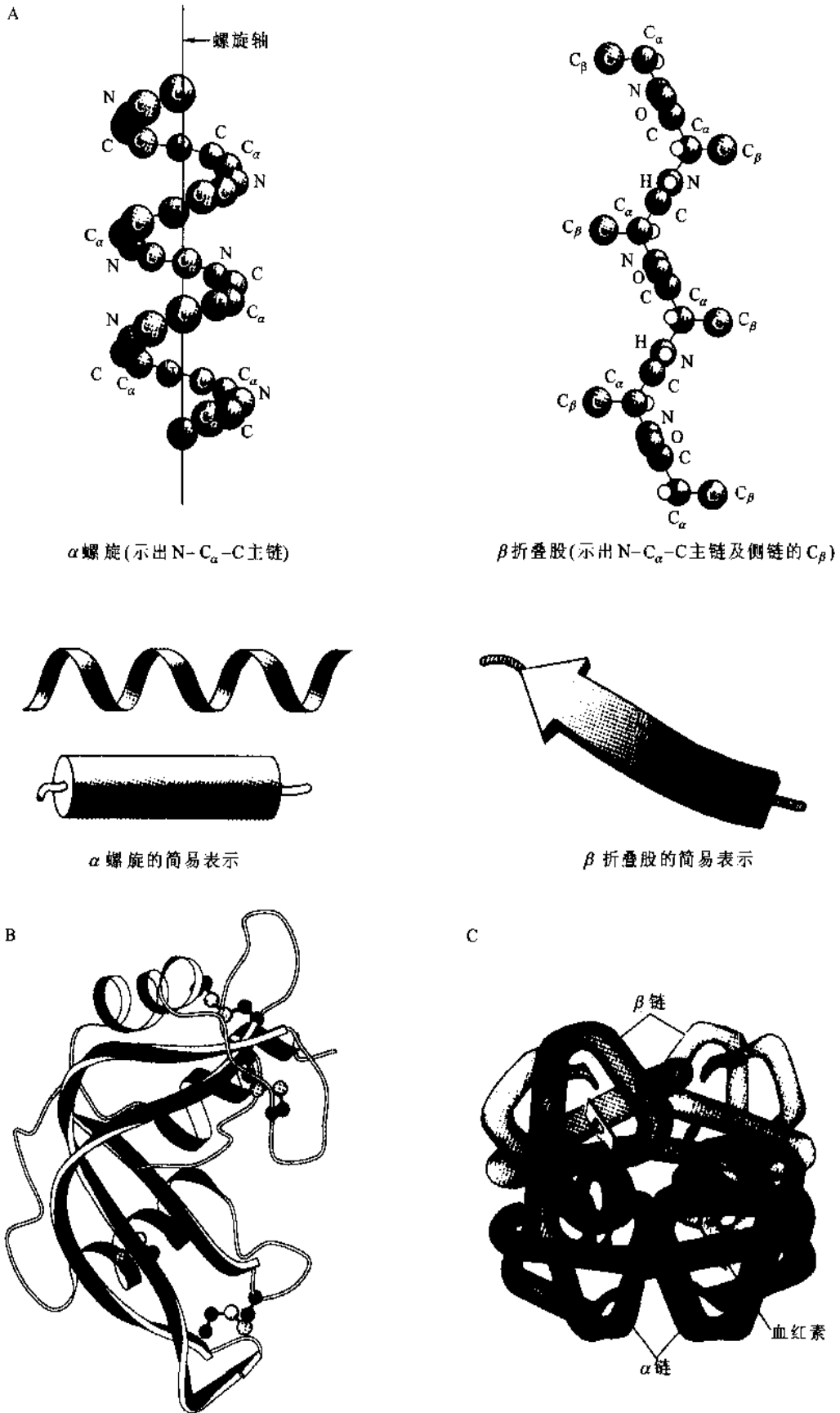


图4-1 蛋白质构象
A. α 螺旋和 β 折叠股(示2°结构); B. 核糖核酸酶(示3°结构); C. 血红蛋白(示4°结构)

(负控制因子)遗传信息转录为RNA,如大肠杆菌中的CAP($M_r 44 \times 10^3$)是正控制因子,原核生物中的乳

糖阻抑物($M_r 37 \times 10^3$)和哺乳类中的核因子1(60×10^3)是负控制因子(见下册第39章)。

(3) 转运 第三类是转运蛋白,其功能是从一地到另一地转运特定的物质。一类转运蛋白如血红蛋白,血清清蛋白,是通过血流转运物质的,前者将氧气从肺转运到其他组织(第6章),后者将脂肪酸从脂肪组织转运到各器官。另一类转运蛋白是膜转运蛋白,它们能通过渗透性屏障(细胞膜)转运代谢物和养分(葡萄糖、氨基酸等),如葡萄糖转运蛋白。至今研究过的所有天然膜转运蛋白都是在膜内形成通道,被转运的物质经过它进出细胞(见下册第21章)。

(4) 贮存 另一类蛋白质是氨基酸的聚合物,又因氮素通常是生长的限制性养分,所以生物体必要时就利用蛋白质作为提供充足氮素的一种方式,例如卵清蛋白为鸟类胚胎发育提供氮源,乳中的酪蛋白是哺乳类幼子的主要氮源。许多高等植物的种子含高达60%的贮存蛋白,为种子的发芽准备足够的氮素。蛋白质除为生物体发育提供C、H、O、N、S元素外,像铁蛋白还能贮存Fe,用于含铁蛋白如血红蛋白的合成。一分子铁蛋白($M_r 460 \times 10^3$)可结合4500个铁原子(占质量的35%)。

(5) 运动 某些蛋白质赋予细胞以运动的能力,肌肉收缩和细胞游动是细胞具有这种能力的代表。作为运动基础的收缩和游动蛋白具有共同的性质:它们都是丝状分子或丝状聚集体。例如形成细胞收缩系统的肌动蛋白(actin)和肌球蛋白以及作为微管(microtubule)主要成分的微管蛋白(tubulin)都属于这一类蛋白。细胞分裂期的有丝分裂纺锤体以及鞭毛、纤毛等都涉及微管蛋白。另一类参与运动的蛋白质称发动机蛋白质(motor protein),如动力蛋白和驱动蛋白(表4-3),它们可驱使小泡、颗粒和细胞器沿微管轨道移动。

(6) 结构成分 蛋白质另一重要功能是建造和维持生物体的结构。这类蛋白质称为结构蛋白,它们给细胞和组织提供强度和保护。结构蛋白的单体一般聚合成纤维(如毛发)或纤维状排列的保护层(如牛皮)。这类蛋白多数是不溶性纤维状蛋白质,如构成毛发、角、蹄、甲的 α -角蛋白,存在于骨、腱、韧带、皮的胶原蛋白。胶原蛋白还和蛋白聚糖等构成动物的胞外基质,后者是细胞的保护性屏障。

(7) 支架作用 新近发现某些蛋白质在细胞应答激素和生长因子的复杂途径中起作用,这类蛋白质称支架蛋白或接头蛋白(adapter protein)。支架蛋白都有一个组件组织(modular organization),蛋白质结构的特定部分(组件)通过蛋白-蛋白相互作用能识别并结合其他蛋白中的某些结构元件。例如,SH2组件(即肉瘤病毒基因表达产物Src蛋白及其家族成员中的SH2结构域)能与含有磷酸化酪氨酸残基的蛋白质结合,SH3组件能与富含脯氨酸残基的蛋白质结合。因为支架蛋白常含有多个不同的组件,在它上面可以将多种不同蛋白质装配成一个多蛋白复合体。这种复合体参与对激素和其他信号分子的胞内应答的协调和通讯。锚定(anchoring)或称导向(targeting)蛋白也属于这一类(见下册第39章)。

(8) 防御和进攻 与一些结构蛋白的被动性防护不同,一类确切地称为保护或开发蛋白的蛋白质在细胞防御、保护和开发方面的作用是主动的。保护蛋白中最突出的是脊椎动物体内的免疫球蛋白或称抗体。抗体是在外来的蛋白质或其他高分子化合物即所谓抗原的影响下由淋巴细胞产生,并能与相应的抗原结合而排除外来物质对生物体的干扰。另一类保护蛋白是血液凝固蛋白,凝血酶和血纤蛋白原等。南极鱼和北极鱼含有抗冻蛋白,能防止在深海低于零摄氏度水温下血液冷冻。此外起防卫和开发作用的一些蛋白,包括蛇毒和蜂毒的溶血蛋白和神经毒蛋白以及植物毒蛋白和细菌毒素。

(9) 异常功能 某些蛋白质具有上述以外的功能,如应乐果甜蛋白有着极高的甜度(见第1章“单糖的物理性质”)。昆虫翅膀的铰合部存在一种具有特殊弹性的蛋白质,称节肢弹性蛋白。某些海洋生物如贝类分泌一类胶质蛋白,能将贝壳牢固地粘在岩石或其他硬表面上。

二、肽

肽是氨基酸的线性聚合物,因此也常称肽链(peptide chain)。蛋白质是由一条或多条具有确定的氨基酸序列的多肽链构成的大分子。

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也是多肽,不过与蛋白质分子相比,它们是比较短的多肽。下面将以较短的多肽或称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。

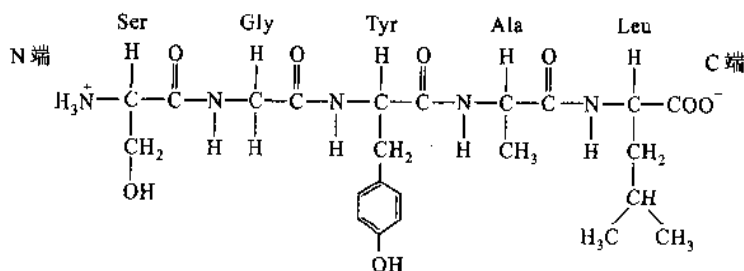
(3) 包含 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—N—} \\ | \\ \text{H} \end{array}$ 基团的化合物如双缩脲(biuret) $\text{H}_2\text{N—CO—NH—CO—NH}_2$ 能与硫酸铜-氢氧化钠溶液产生双缩脲颜色反应。天然蛋白质也有同样的反应。

(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),其中含一个肽键。含 3 个、4 个、5 个等氨基酸残基的肽分别称为三肽、四肽、五肽等。通常把含几个至十几个氨基酸残基的肽链统称为寡肽(oligopeptide),更长的肽链称为多肽(polypeptide)。有的学者把不多于 12 个残基的肽、直接称二肽、三肽、四肽等,把超过 12 个而不多于 20 个残基的称寡肽,含 20 个以上残基的称为多肽。必须指出,这些术语的差别是不严格的。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。一条多肽链的主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,称为某氨基酰某氨基酰……某氨基酸。例如,具有下列化学结构的五肽命名为丝氨酰甘氨酰酪氨酰丙氨酰亮氨酸(serylglycyltyrosylalanylleucine),简写为 Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu。应指出,肽链也像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(N 端),亮氨酸残基侧为 COOH 末端(C 端)。注意,反过来书写的 Leu-Ala-Tyr-Gly-Ser 是一个不同的五肽。



从上面的五肽结构可以看出,肽链的骨干是由 $-N-C_{\alpha}-C-$ 序列重复排列而成,称为共价主链(main chain 或 backbone),这里 N 是酰胺氮, C_{α} 是氨基酸残基的 α 碳,C 是羰基碳。各种肽的主链结构都是一样的,但侧链 R 基的序列(也即氨基酸序列)不同。

肽键是一种酰胺键,通常用羰基碳和酰胺氮之间的单键表示(图 4-2A)。肽链中的酰胺基($-CO-NH-$)称为肽基(peptide group)或肽单位(peptide unit)。因为主链上的 3 种键(N— C_{α} 键, C_{α} —C 键和 C—N 肽键)都是单键,所以原则上绕多肽主链上的任一共价键都可以发生旋转。由于酰胺氮上的孤电子对离域与羰基碳轨道重叠,因此在酰胺氮和羰基氧之间发生共振相互作用(resonance interaction)(图 4-2)。共振的两种极端形式之一是肽基的 C 和 N 原子处于平面的 sp^2 杂化(N 原子还可能处于 sp^3 杂化,这时酰胺氮是四面体结构),C 和 O 原子由一个 σ 键和一个 π 键(即一个完全的双键)连接,酰胺 N 上留有一个 2p 轨道的孤电子对,这种结构允许绕 C—N 键自由旋转(图 4-2A)。另一种共振形式是肽基的 C 和 N 原子参与 π 键形成,在羰基 O 上留下一个孤 e^- 对,带负电荷,酰胺 N 带正电荷,这种结构阻止绕 C—N 键的自由旋转,因为 C—N 键已成为一个双键(图 4-2B)。肽键的实际性质是介于这两种极端形式之间的平均中间态,也即肽键具有部分双键性质,如图 4-2C 所示。

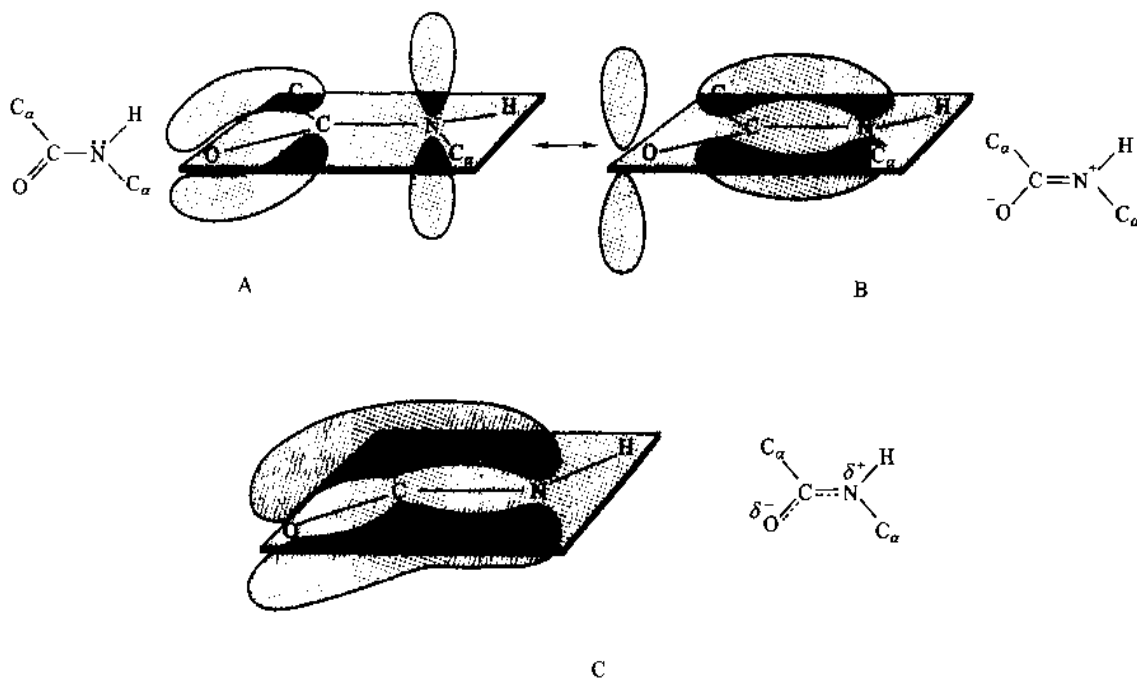


图 4-2 肽基的 C、O 和 N 原子间的共振相互作用

肽键共振产生几个重要结果。① 限制绕肽键的自由旋转,给肽主链的每一氨基酸残基只保留两个自由度:绕 N— C_{α} 键的旋转和绕 C_{α} —C 键的旋转(图 5-11)。② 组成肽基的 4 个原子和 2 个相邻的 C_{α} 原子倾向于共平面,形成所谓多肽主链的酰胺平面(amide plane)也称肽基平面或肽平面(peptide plane)(图 4-2,图 5-11)。肽键的这一平面性质在肽链折叠成三维结构中是很重要的。③ C=N 键的长度为 0.133 nm(图 4-3),比正常的 C—N 键(例如 C_{α} —N 键长为 0.145 nm)短,但比典型的 C—N(0.125 nm)长。估计 C—N 键具有约 40% 双键性质,而 C—O 键具有约 40% 单键性质。由于 C—N 键具有部分双键性质,绕键旋转的能障比较高,约为 88 kJ mol^{-1} 。对肽键来说,这一能障在室温下足以防止旋转,保持酰胺基处于平面。④ 如图 4-2C 所示,在杂化的中间态酰胺 N 带 0.28 净正电荷,羰基 O 带 0.28 净负电荷,这些部分电荷的存在表明肽键具有永久偶极。肽主链的化学反应性较低,在 pH 0~14 范围内,肽基没有明显的质子得失。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 4-3)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 8 kJmol^{-1} 。因此,肽链中肽键都是反式构型,写为 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---C---N---} \\ \text{H} \end{array}$ 。这里有一个重要的例外,就是在 X-Pro(X 可以是任一其他氨基酸残基)序列中的肽键,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(图 4-4)。

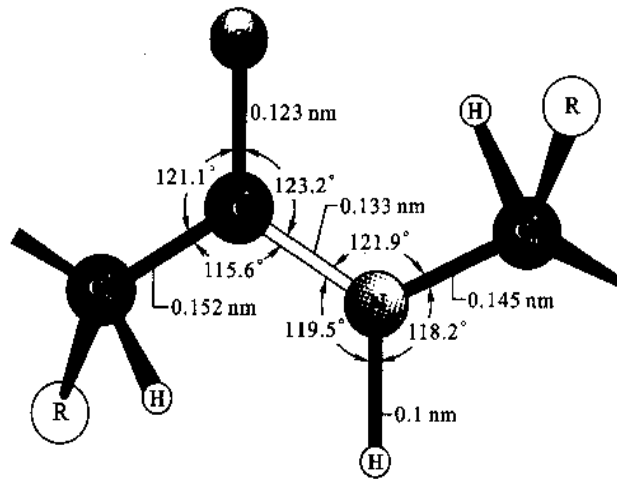


图 4-3 反式构型的肽键

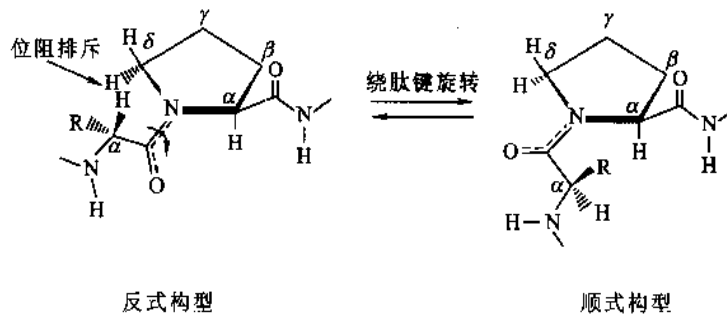


图 4-4 有脯氨酸参与形成的肽键

(二) 肽的物理和化学性质

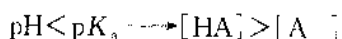
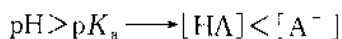
许多短肽已经得到晶体。晶体的熔点都很高,这说明短肽的晶体是离子晶格,在水溶液中以偶极离子存在。在 pH 0~14 范围内,肽键中的酰胺氢不解离,因此肽的酸碱性质主要决定于肽键中的游离末端 α -NH₂、游离末端 α -COOH 以及侧链 R 基上的可解离功能团。在长肽或蛋白质中,可解离的基团主要是侧链上的。

肽链中游离 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_a 值要比游离氨基酸中的大一些,而末端 α -氨基的 pK_a 值要比氨基酸中的小一些(表 4-5)。R 基的 pK_a 值在两者之间区别不大。

表 4-5 某些肽的 pK_a

肽	α -COOH pK_a	α -NH ₃ ⁺ pK_a	R 基 pK_a	pI
Gly-Asp	2.81	8.60	4.45	3.63
Gly-Gly	3.06	8.13	—	5.59
Ala-Gly	3.16	8.24	—	5.70
Gly-Ala	3.17	8.23	—	5.70
Gly-Gly-Gly	3.26	7.91	—	5.58
Ala-Ala-Ala-Ala	3.42	7.94	—	5.68
Ala-Ala-Lys-Ala	3.58	8.01	10.58	9.30

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 方程不难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_a 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_a 值,占优势的离子形式是它的共轭酸,即



例如,甘氨酸谷氨酰赖氨酸丙氨酸(glycylglutamyllysylalanine)的解离状况(表 4-6),可利用表 4-7 中所列的可解离功能团的 pK_a 值和 Henderson-Hasselbalch 方程推断出,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 3.7~4.5 的范围内,占优势的离子形式所带净电荷为 +1,因为这时 C 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带的净电荷为零;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 4-6)。

表 4-6 四肽甘氨酸谷氨酰赖氨酸丙氨酸的酸碱性质分析

溶液的 pH	功能团解离(带电)状况				占优势离子的净电荷
	α -COOH	侧链 COOH	α -NH ₂	ϵ -NH ₂	
<3.5	-COOH	-COOH	-NH ₃ ⁺	-NH ₃ ⁺	+2
3.7~4.5	-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

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。

表 4-7 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_a 值

可解离功能团	推测的 pK_a 值
α -COOH	3.7
侧链 COOH(Glu 或 Asp)	4.5
咪唑基(His)	7.0
α -NH ₃ ⁺	7.8
-SH(Cys)	8.8
酚 OH(Tyr)	9.6
ϵ -NH ₃ ⁺ (Lys)	10.2
胍基(Arg)	>12

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加和。

(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 4-5)。有关它们的生理功能见第 17 章。

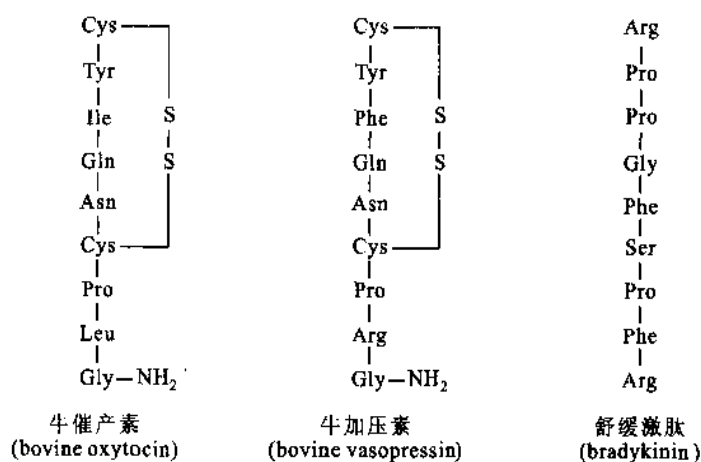


图 4-5 一些肽类激素的结构

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(其结构式见第 16 章)。

在小的活性肽中一类称脑啡肽(enkephalin)的物质,近年来很引人注目。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)。

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 4-6)。 α -鹅膏蕈碱能与真核生物的 RNA 聚合酶(RNA polymerase)II 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。

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 -谷氨酰半胱氨酰甘氨酸,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:

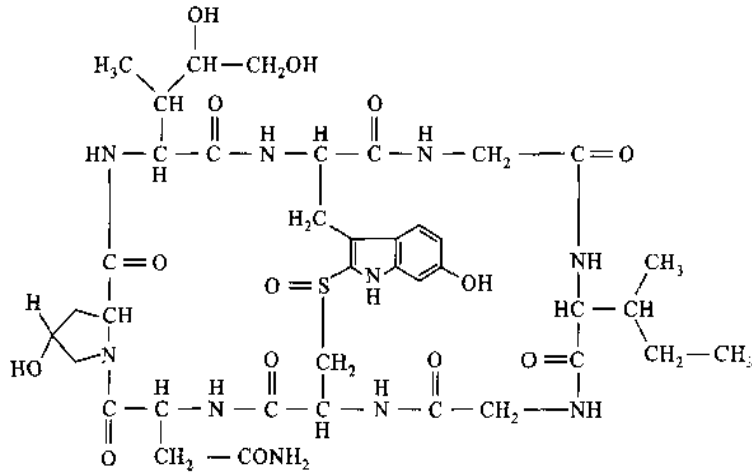
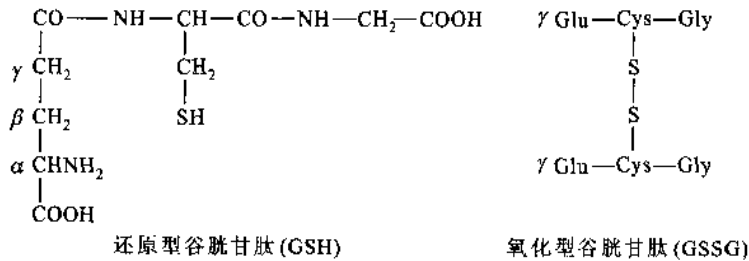


图 4-6 a 鹅膏蕈碱的化学结构



还原型谷胱甘肽在红细胞中作为巯基缓冲剂存在,维持血红蛋白和红细胞其他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 -丙氨酰-1-甲基组氨酸,后者是 β -丙氨酰组氨酸。它们在骨骼肌中的含量很高,每千克肌肉达到 20~30 mmol。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。

三、蛋白质一级结构的测定

蛋白质的共价结构有时也称蛋白质的一级结构,但多数场合把蛋白质的一级结构看成是氨基酸序列的同义语。1969 年国际纯化学和应用化学联合会(IUPAC)就曾规定蛋白质的一级结构只指多肽链中的氨基酸序列。

自 1953 年英国剑桥大学 Sanger F. 报告了牛胰岛素两条多肽链的氨基酸序列以来,至今已知约 100 000 个不同蛋白质的氨基酸序列,其中相当一部分序列是应用 Sanger 首先确立的原理测定得到的。但现在大多数是根据编码蛋白质的基因核苷酸序列推导出来的。下面介绍蛋白质氨基酸序列测定(简称蛋白质测序)的一般策略和涉及的一些重要方法与技术。

(一) 蛋白质测序的策略

测定蛋白质的一级结构,要求样品必须是均一的,纯度应在 97% 以上,同时必须知道它的相对分子量,其误差允许在 10% 左右。关于蛋白质的分离、纯化和相对分子量测定的问题将在第 7 章讨论。

多肽链的氨基酸序列测定主要根据 Sanger 实验室中发展起来的方法进行。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,然而测定的一般策略可以概括为以下几个步骤:

(1) 测定蛋白质分子中多肽链的数目 根据蛋白质 N-末端或 C-末端残基的摩尔数和蛋白质的相

对分子质量可以确定蛋白质分子中的多肽链数目。如果蛋白质分子只含一条多肽链,也即是单体蛋白质,则蛋白质的摩尔数应与末端基的摩尔数相等;如果后者是前者的倍数,说明该蛋白质分子是由多条多肽链组成。如果检测到的末端基多于一种,表明蛋白质由两条或多条不同的多肽链组成,即样品是杂多聚蛋白质(heteromultimeric protein)。

(2) 拆分蛋白质分子的多肽链 如果蛋白质分子是由一条以上多肽链构成的,则这些链必须加以拆分。如果是寡聚蛋白质,多肽链(亚基)是借助非共价相互作用缔合的,则可用变性剂如 8 mol/L 尿素,6 mol/L 盐酸胍或高浓度盐处理,就能使寡聚蛋白质中的亚基拆开。如果多肽链间是通过共价二硫桥(S—S)交联的,如胰岛素(含两条多肽链)和 α -胰凝乳蛋白酶(含 3 条多肽链)则可采用氧化剂或还原剂将二硫键断裂。

拆开后的单个多肽链可根据它们的大小或/和电荷的不同进行分离、纯化(见第 7 章)。

(3) 断开多肽链内的二硫桥 多肽链内半胱氨酸残基之间的 S—S 桥必须在进行第 4 步前予以断裂。

(4) 分析每一多肽链的氨基酸组成 经分离、纯化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或各种残基的数目。

(5) 鉴定多肽链的 N-末端和 C-末端残基 多肽链的另一部分样品进行 N-末端残基的鉴定,以便建立两个重要的氨基酸序列参考点。

(6) 裂解多肽链成较小的片段 用两种或几种不同的断裂方法(指断裂点不一样)将每条多肽链样品降解成两套或几套重叠的肽段或称肽碎片。每套肽段进行分离、纯化,并对每一纯化了的肽段进行氨基酸组成和末端残基的分析。

(7) 测定各肽段的氨基酸序列 目前最常用的肽段测序方法是 Edman 降解法,并有自动序列分析仪可供利用。此外尚有酶解法和质谱法等。

(8) 重建完整多肽链的一级结构 利用两套或多套肽段的氨基酸序列彼此间有交错重叠可以拼凑出原来的完整多肽链的氨基酸序列。

(9) 确定半胱氨酸残基间形成的 S—S 交联桥的位置 应该指出,氨基酸序列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。

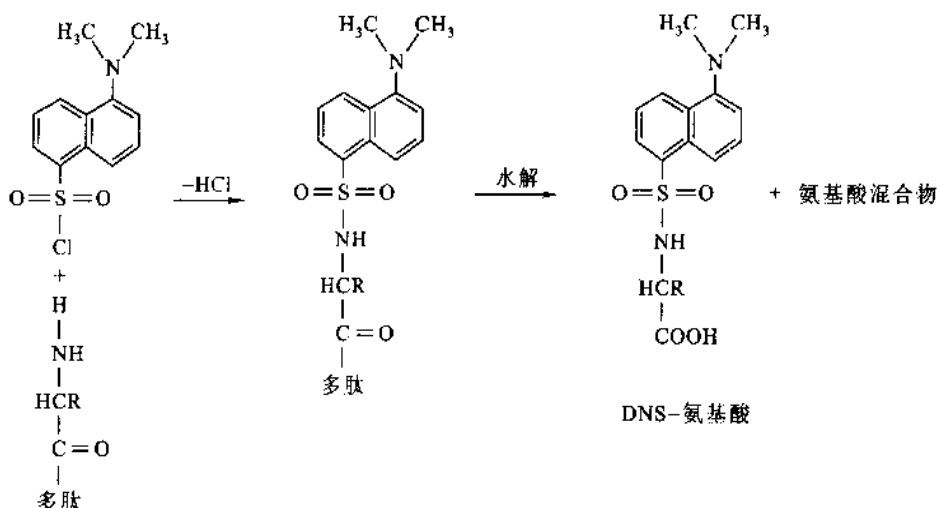
(二) N-末端和 C-末端氨基酸残基的鉴定

1. N-末端分析

用于 N-末端分析的方法很多,下面介绍几种最常用的方法。

(1) 二硝基氟苯(DNFB 或 FDNB)法 在第 3 章氨基酸的化学反应中曾提到 DNFB 与氨基酸 α -NH₂ 发生的反应广泛地用于测定多肽和蛋白质中的 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远比肽键稳定,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 OH 等也能与 DNFB 反应,但生成的侧链 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 HPLC 进行分离鉴定和定量测定。

(2) 丹磺酰氯(DNS)法 丹磺酰氯(dansyl chloride)是二甲氨基萘磺酰氯的简称,缩写为 DNS。此方法的原理与 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(见第 7 章)或薄层层析加以鉴定。

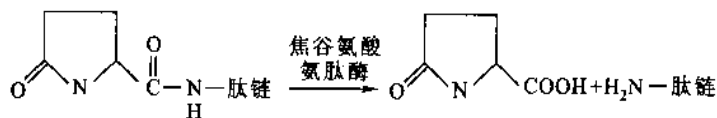


(3) 苯异硫氰酸酯(PITC)法 多肽或蛋白质的末端氨基也和氨基酸的 α -氨基一样能与 PITC(Edman 试剂)作用(见第3章氨基酸的化学反应部分),生成苯氨基硫甲酰多肽或蛋白质,简称 PTC-多肽或蛋白质。后者在酸性有机溶剂中加热时,N-末端的 PTC-氨基酸发生环化,生成苯乙内酰硫脲的衍生物并从肽链上掉下来,除去 N-末端氨基酸后剩下的肽链仍然是完整的,因为 PTC 基的引入只使第一个肽键的稳定性降低。反应液中代表 N-末端残基的 PTH-氨基酸,经有机溶剂抽提干燥后,可用薄层层析(如硅胶薄膜或聚酰胺薄膜等)、气相色谱和 HPLC 等进行鉴定。此方法还可以用来测定氨基酸序列(见后面肽的氨基酸序列测定)。

(4) 氨肽酶法 氨肽酶(amino peptidase)是一类肽链外切酶(exopeptidase)或叫外肽酶,它们能从多肽链的 N-末端逐个地向里切。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动力学曲线,就能知道该蛋白质的 N-末端残基序列。实际上此法用于测定 N-末端和末端残基序列有许多困难,因为酶对各种肽键敏感性不一样,常常难以判断哪个残基在前,哪个残基在后。

最常用的氨肽酶是亮氨酸氨肽酶(leucine amino peptidase,缩写为 LAP),亮氨酸氨肽酶不是只能水解以 Leu 为 N-末端残基的肽键,只是水解以 Leu 为 N-末端的肽键速度为最大。

在蛋白质或多肽的氨基酸序列测定中,经常会碰到 N-末端残基的氨基被封闭。因此,不能与 Edman 降解试剂(PITC)发生作用。N-末端残基受封闭的种类很多,例如焦谷氨酰环化、乙酰化以及某些环状肽(如短杆菌肽 S)N-末端和 C-末端连接成环等。如果遇上肽链 N-末端是焦谷氨酸残基时,可以使用焦谷氨酸氨肽酶(pyroglutamic acid peptidase)处理,它是专门裂解焦谷氨酰 N-末端的外肽酶,其裂解反应如下:

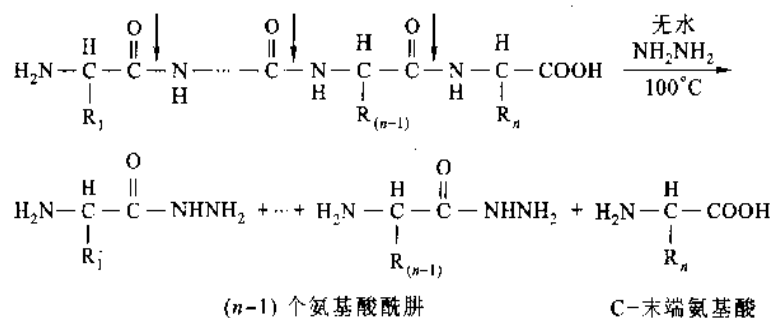


代表 N-末端残基的焦谷氨酸可用层析法加以鉴定。剩余的肽链可用正常的 Edman 降解法进行序列测定。

2. C-末端分析

用于 C-末端测定的方法也有很多种,这里介绍几种常用的方法:

(1) 肼解法 它是目前测定 C-末端残基的最重要的化学方法。蛋白质或多肽与无水肼加热发生肼解(hydrazinolysis),反应中除 C-末端氨基酸以游离形式存在外,其他的氨基酸都转变为相应的氨基酸酰肼化物。肼解反应如下:



反应中生成的氨基酸酰肼可与苯甲醛作用变为水不溶性的二苯基衍生物而沉淀。上清液中的游离 C-末端氨基酸借助 FDNB 法或 DNS 法以及层析技术进行鉴定。肼解过程中, 谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸等被破坏不易测出, C-末端的精氨酸转变为鸟氨酸。

(2) 还原法 肽链 C-末端氨基酸也可用硼氢化锂还原成相应的 α -氨基醇。肽链完全水解后, 代表原来 C-末端氨基酸的 α -氨基醇, 可用层析法加以鉴别。Sanger 早期就是采用这个方法鉴定胰岛素 A、B 链的 C-末端残基。

(3) 羧肽酶法 目前测定 C-末端残基的各种方法中, 以羧肽酶法最为有效, 也最常用。羧肽酶 (carboxypeptidase) 是一类肽链外切酶, 它专一地从肽链的 C-末端开始逐个降解, 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 (图 4-7), 便可以知道该肽链的 C-末端氨基酸序列。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毗邻时, 结果必须小心解释。

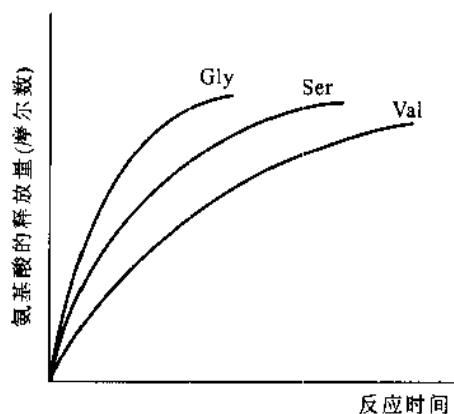


图 4-7 羧肽酶法鉴定 C-末端残基及 C-末端序列的示意图
序列是 Val-Ser-Gly

目前常用的有 4 种羧肽酶: A、B、C 及 Y, A 和 B 分别来自牛胰和猪胰, C 得自柑橘叶, 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。羧肽酶 A 和 B 的混合物能释放除 Pro 以外的任一 C-末端残基。羧肽酶 Y 可以作用于任何一个 C-末端残基, 现已用来设计类似 Edman 序列仪的自动化方案。

(三) 二硫桥的断裂

断裂二硫桥的方法有很多种, 但归结起来主要是过甲酸氧化法和巯基化合物还原法。有关的反应式见第 3 章氨基酸的化学反应部分。使用最普遍的方法是用过量的巯基乙醇处理 (pH 8~9, 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 (图 4-8)。

(四) 氨基酸组成的分析

待测样品经完全水解, 用氨基酸分析仪进行测定 (见第 3 章)。一个 $M_r 30 \times 10^3$ 蛋白质的氨基酸组成分析仅需 6 μg 样品, 时间不到 1 h。

用于蛋白质的氨基酸组成分析的水解方法主要是酸水解, 同时辅以碱水解。酸水解中使用最广泛的是盐酸, 一般用 6 mol/L HCl 于 110 $^\circ\text{C}$ 在真空的或充氮的安瓿瓶内进行水解, 时间 10~24 h, 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

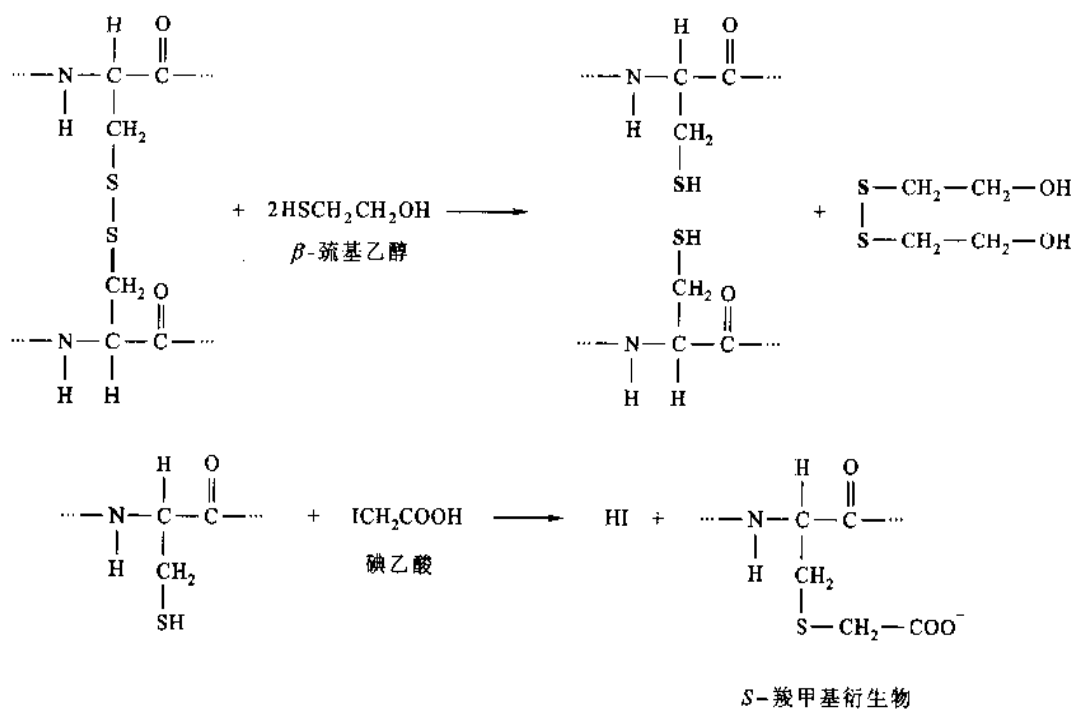


图 4-8 巯基乙醇还原法断裂多肽链的二硫桥

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℃,在真空或充氮条件下进行,时间 20 h 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(24, 48 和 72 h)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 g 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 4-8 列出几种代表性蛋白质的氨基酸组成。

表 4-8 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 [*]	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	3	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

续表

氨基酸	A*	B	C	D	E	F	G	H
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. 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。

(五) 多肽链的部分裂解和肽段混合物的分离纯化

目前用于序列分析的方法一次能测定的序列都不太长,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裂解成较小的肽段,然后把它们分离开来,测定每一肽段的氨基酸序列。为此,经分离纯化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。

1. 酶裂解法

用于肽链断裂的蛋白水解酶(proteolytic enzyme)或称蛋白酶(proteinase, protease)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、胰凝乳蛋白酶(也称糜蛋白酶)、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)。

(1) 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残基的羧基参与形成的肽键(图 4-9)。用它断裂多肽链得到的是以 Arg 和 Lys 为 C-末端残基的肽段。产生的肽段数目等于多肽链中 Arg 和 Lys 总数加 1(多肽链的 C-末端肽段)。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序列测定)。

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 残基的羧基端肽键,只能断裂 Arg 残基羧基端的肽键。反之,如果用 1,2-环己二酮修饰 Arg 的胍基(见第 3 章氨基酸的化学反应),则胰蛋白酶只能断裂 Lys 残基羧基端的肽键。

如果想增加多肽链中胰蛋白酶的断裂点,可以用氮丙啶处理多肽链样品,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,胰蛋白酶便能断裂 Cys 残基羧基端的肽键。

(2) 糜蛋白酶(chymotrypsin) 此酶的专一性不如胰蛋白酶。它断裂 Phe、Trp 和 Tyr 等疏水氨基酸残基的羧基端肽键。如果断裂点邻近的基团是碱性的,裂解能力增强;是酸性的,裂解能力将减弱。

(3) 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4-9),常用于断裂较短的多肽链或大肽段。

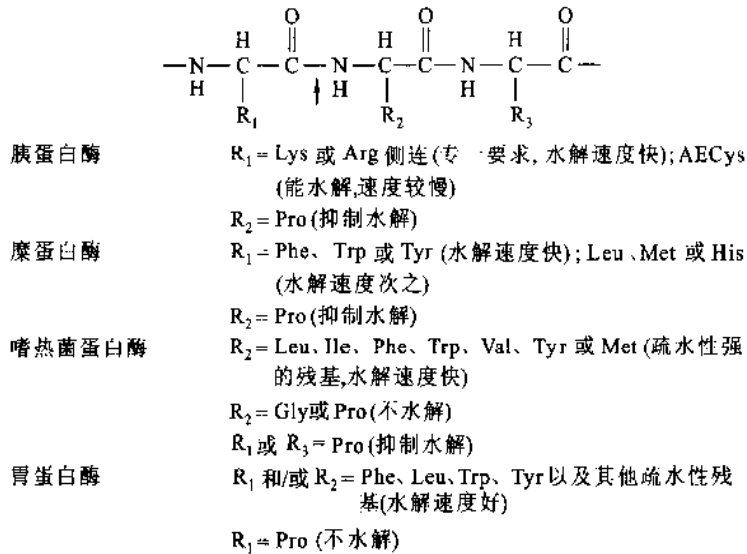


图4-9 几种蛋白水解酶(内肽酶)的专一性

(4) 胃蛋白酶(pepsin) 它的专一性与糜蛋白酶类似,但它要求断裂点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。

(5) 木瓜蛋白酶(papain) 专一性差,断裂位点与其附近的序列关系密切,它对 Arg 和 Lys 残基的羧基端肽键敏感。木瓜蛋白酶在番木瓜(*Carica papaya*)果中很丰富,另一个类似的蛋白酶是凤梨中的菠萝蛋白酶(bromelain)。

(6) 葡萄球菌蛋白酶和梭菌蛋白酶 近年来发现的几种高专一性肽链内切酶,在蛋白质序列测定中很有前途,对相对分子质量比较大的多肽链采用逐级专一性降解是相当理想的。葡萄球菌蛋白酶(*Staphylococcal protease*)和梭菌蛋白酶(*clostripain*)就是其中的两个。

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 Vs(*Staphylococcus aureus*, strain Vs)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。酶相对分子质量为 12 000。当在磷酸缓冲液(pH 7.8)中进行裂解时,它能在 Glu 残基和 Asp 残基的羧基端断裂肽键。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羧基端的肽键。

梭菌蛋白酶或称 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 Arg 残基的羧基端肽键。即使在 6 mol/L 尿素中 20 h 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。

2. 化学裂解法

用化学裂解法获得的肽段一般都比较大,适合在自动序列仪中测定序列,因此化学法对相对分子质量大的蛋白质序列测定是很重要的。

(1) 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,以便暴露出甲硫氨酸侧链,有利于和 CNBr 发生作用。反应的第一步是甲硫氨酸残基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硫(cyanosulfonium bromide)中间物并释放出 Br^- 离子。第二步是 Met 的羰基氧对侧链 R 基发生亲核攻击生成环化溴化亚氨内酯(iminolactone bromide)和甲基硫氰酸。第三步环化衍生物遇水, Met 残基的羧基端肽键发生断裂, C-末端为高丝氨酸内酯残基(N-末端肽段)和多肽链的原 C-末端肽段。前一肽段的 C-末端环酯之所以称高丝氨酸内酯是因为它可以看成是由带有一 $\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{OH}$

侧链的高丝氨酸(图 3-8)衍生而来的。CNBr 裂解甲硫氨酸残基的羧基端肽键的反应机制如图 4-10 所示。

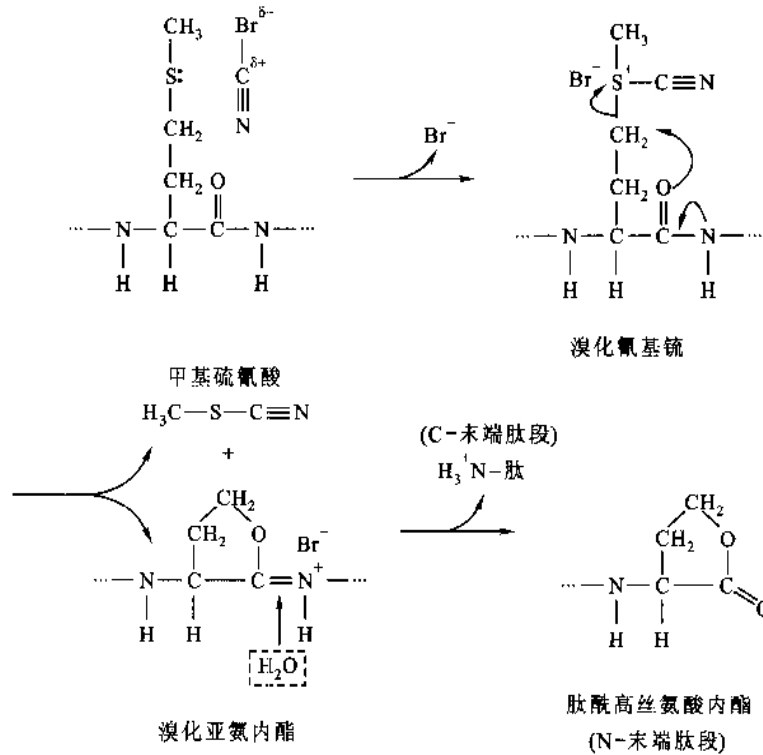
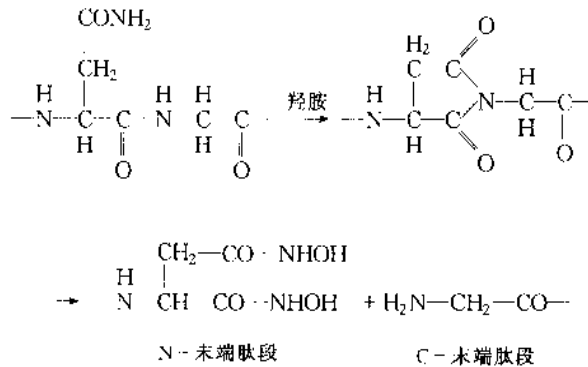


图 4-10 CNBr 裂解法断裂肽键的机制

(2) 用羟胺断裂 NH_2OH 在 pH 9 下能专一性地断裂 Asn—Gly 之间的肽键。但专一性不很强, Asn—Leu 及 Asn—Ala 键也能部分裂解。反应式如下:



由于各种蛋白质中 Asn—Gly 键出现的概率是很低的,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,这对相对分子质量大的蛋白质的序列测定是十分有用的。

(3) 肽段的分离纯化 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、凝胶电泳和高效液相色谱等方法进行分离纯化。这些方法参见第 3 章和第 7 章有关分离纯化部分。

(六) 肽段氨基酸序列的测定

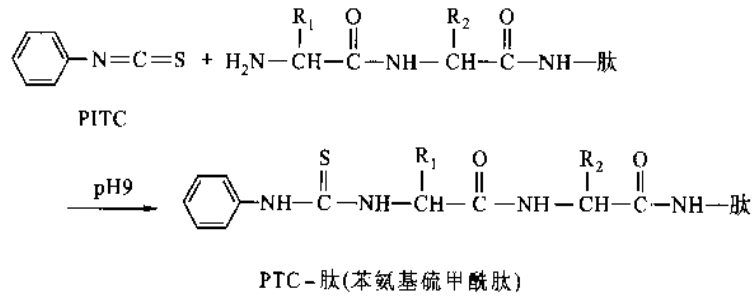
多肽链经降解和分离后得到的大小合适、纯度合格的肽段,即可进行它的氨基酸序列测定。氨基酸序列测定主要使用 Edman 化学降解法,此外还有酶降解法、质谱法和气谱-质谱联用法等。

1. Edman 化学降解法

Edman 化学降解法是 Edman P. 于 1950 年首先提出来的。最初用于 N-末端基分析,称苯异硫氰酸

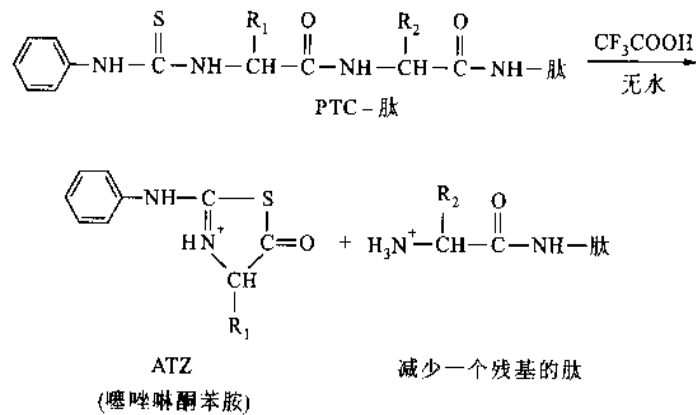
酯(PITC)法。反应时 Edman 降解试剂(PITC)与多肽链的游离氨基作用。降解反应分三步进行。

第一步是偶联反应:



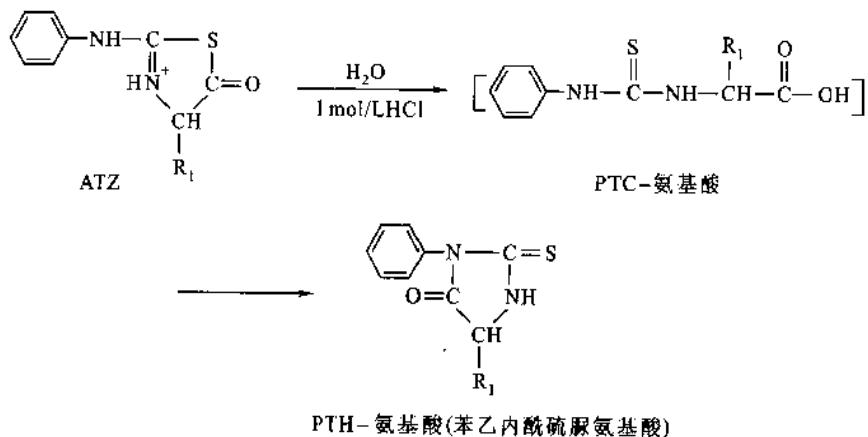
反应在弱碱性介质中进行,因为 PITC 只能与未质子化的一NH₂起作用。

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 thiazoline)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两步进行,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。实际上分析时常把肽链的

羧基端与不溶性树脂偶联,这样每轮 Edman 反应后,只要通过过滤即可回收剩余的肽链,以利反应循环进行。理论上讲,进行 n 轮反应就能测出 n 个残基的序列。

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-dimethylaminoazo-benzene-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 个残基的序列,也有报导一次测出 90~100 个残基序列的。

Edman 降解法测定顺序操作程序非常麻烦,工作量大。蛋白质序列仪(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序列分析的需要。该仪器的灵敏度高,蛋白质样品的最低用量在 5 皮摩尔(pmol)水平。

2. 酶降解法

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-末端和 C-末端逐个地向里切。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,便能确定肽的氨基酸序列。然而正如前面谈及这种方法实际上有许多困难,局限性较大,它只能用来测定末端附近很少几个残基的序列。

3. 质谱法

质谱法(MS)也已用于氨基酸序列测定。MS 的基本原理见第 1 章糖链的结构分析部分。由于 MS 测序要求样品是挥发性的,而蛋白质(以及核酸和糖类)这类生物大分子挥发度很低,加热又容易被分解,因此想获得用于 MS 分析的气相离子就要求有革新的方法,在糖链的结构分析中介绍了快速原子轰击法(FAB),这里介绍另一种使生物大分子离子化的新方法,称电喷射电离(electrospray ionization, ESI)。图 4-11 是电喷射电离串联质谱法(ESI tandem MS 或 MS/MS)测序装置和过程的图解。

电喷射电离的基本步骤是:① 蛋白质溶液在高电场(数千伏)中通过毛细管静电分散成携带高电荷[蛋白质平均每千相对质量单位获得一个正电荷(质子)]的微滴;② 蛋白质离子从这些微滴中被解吸进入气相(借助在热 N_2 气流中蒸发微滴水分);③ 蛋白质离子进入质谱仪分析(图 4-11B)。串联质谱法允许蛋白质离子在两台串联在一起的质谱仪上进行分析。第一台质谱仪(MS-1)用于从蛋白质水解液中分离寡肽,然后选出每一寡肽(P_1 、 P_2 或 P_3 等)进行下一步分析。在进入第二台质谱仪(MS-2)的途中,选出的寡肽于碰撞池(collison cell)通过与氮气或氩气分子碰撞裂解成离子碎片(F_1 、 F_2 、 F_3 等),这些碎片被引入第二台质谱仪进行分析(图 4-11C)。裂解主要发生在寡肽中连接相继氨基酸的肽键上。因此产生的碎片代表一套大小只差一个氨基酸残基的肽段。这样的两个碎片相对分子质量之差为 56[肽主链(NH-CH-CO)的质量]加被裂解掉的那个残基的 R 基相对分子质量,其范围从 1(Gly)到 130(Trp)。由于这个差值是各个氨基酸的特征值(残基质量),因此可根据整套离子碎片的质量差来推定氨基酸序列(Leu 和 Ile 需另作处理)。MS/MS 测序的优点是灵敏度高,所需的样品量少(可分析亚皮摩尔即 $<10^{-12}$ mol 水平的肽),测定速度快,特别是蛋白质的胰蛋白酶水解液经毛细管 HPLC 分离后的肽混合物即可直接进样串联质谱仪,这样可免去繁重的肽分离纯化工作。然而目前串联 MS 还限于一些较短的序列(一般不超过 15 个氨基酸残基)。

除串联质谱法外,气谱-质谱联用法也用于氨基酸序列分析,并有不少成功的报道。

4. 根据核苷酸序列的推定法

推定的依据是生物学上的“中心法则”,细胞内的遗传信息流是 DNA 到 RNA 到蛋白质,核酸分子的线性核苷酸序列决定蛋白质分子的氨基酸序列,即由三联体密码子规定氨基酸。具体的方法之一是用待测的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 和与其相连而未被释放的蛋白质多肽链。后者将与加

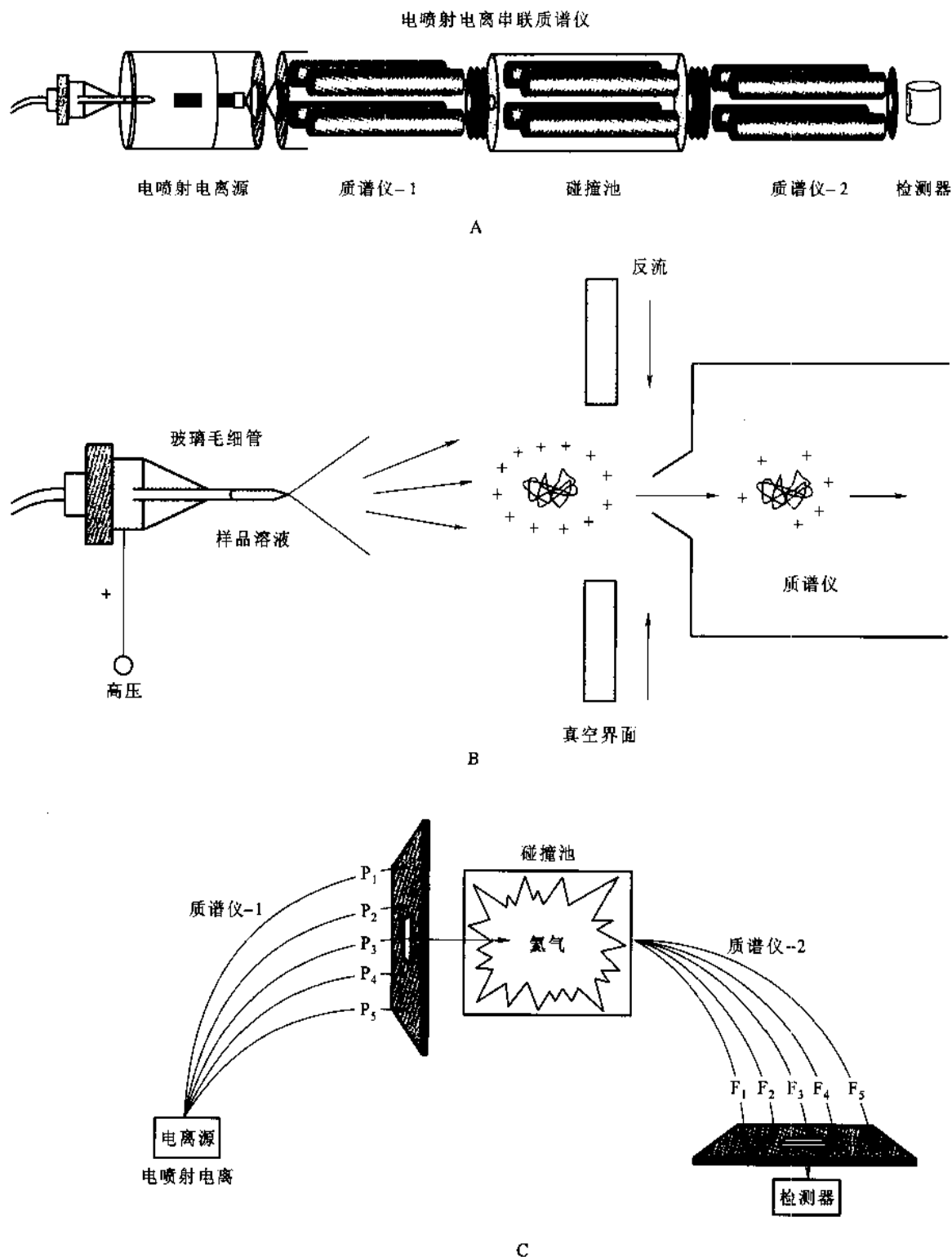


图4-11 电喷射串联质谱法测定氨基酸序列

A. 串联质谱仪外观; B. 喷射离子化的主要步骤; C. 串联质谱测序过程图解

人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 的核苷酸序列,并从它推测出蛋白质的氨基酸序列。由于目前 DNA 测序的技术相当成熟,因此对于用传统的蛋白质化学方法难以测定的相对分子质量大的 ($M_r > 100\ 000$) 或生物体内含量很低的蛋白质,此方法将是十分有效的。

虽然推定法很有发展前途,并已被实践所证实,但它仍然需要直接的氨基酸序列分析相配合。例如必须知道蛋白质的 N-末端和 C-末端的残基,否则不可能准确地找到编码序列(结构基因)。如果没有必

需的部分氨基酸序列分析,就不可能找出正确的密码读框(reading frame)。总之,核苷酸序列测定技术与氨基酸序列测定技术都需要发展,并把两者有机地结合起来。

(七) 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序列,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序列(图4-12)。同时,两套肽段可以互相核对各个肽段的氨基酸序列测定中是否有差错。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便得到足够的重叠肽,用于确定多肽链的全序列。

所得资料:

N-末端残基H	
C-末端残基S	
第一套肽段	第二套肽段
<u>OUS</u>	<u>WEO</u>
<u>PS</u>	<u>WTOU</u>
<u>EOVE</u>	<u>VERL</u>
<u>RLA</u>	<u>APS</u>
<u>HOWT</u>	<u>HO</u>

借助重叠肽确定肽段次序:

末端残基	H	S
末端肽段	<u>HOWT</u>	<u>APS</u>
		<u>OUS</u>
第一套肽段	<u>HOWTOUSEOVERLAPS</u>	
第二套肽段	<u>HOWTOUSEOVERLAPS</u>	
推断全序列	<u>HOWTOUSEOVERLAPS</u>	

图4-12 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

(八) 二硫桥位置的确定

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序列分析以后,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序列时,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Hartlay的对角线电泳(diagonal electrophoresis)进行分离(电泳技术见第7章)。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磺基丙氨酸的肽。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

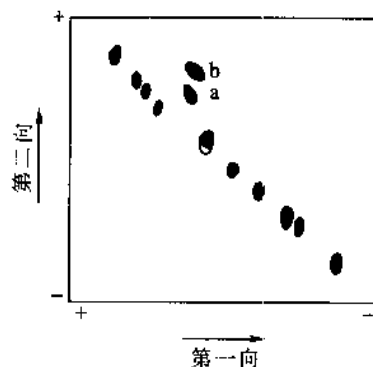


图4-13 对角线电泳图解

图中a,b两个斑点是由一个二硫键断裂产生的肽段

肽段的迁移率未变,并将位于滤纸的一条对角线上(图 4-13),而含磺基丙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。将每对含磺基丙氨酸的肽段(未用茚三酮显色的)分别取下,进行氨基酸序列分析,然后与多肽链的氨基酸序列比较,即可推断出二硫键在肽链间或(和)肽链内的位置。

(九) 蛋白质测序举例

英国 Sanger 等人在 1953 年首次完成了牛胰岛素(bovine insulin)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。牛胰岛素的相对分子质量为 5 700,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 2 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(图 4-14 中牛胰岛素分子)。胰岛素(B 链)的测序步骤示于图 4-14,二硫桥的定位(location)见图 4-15。

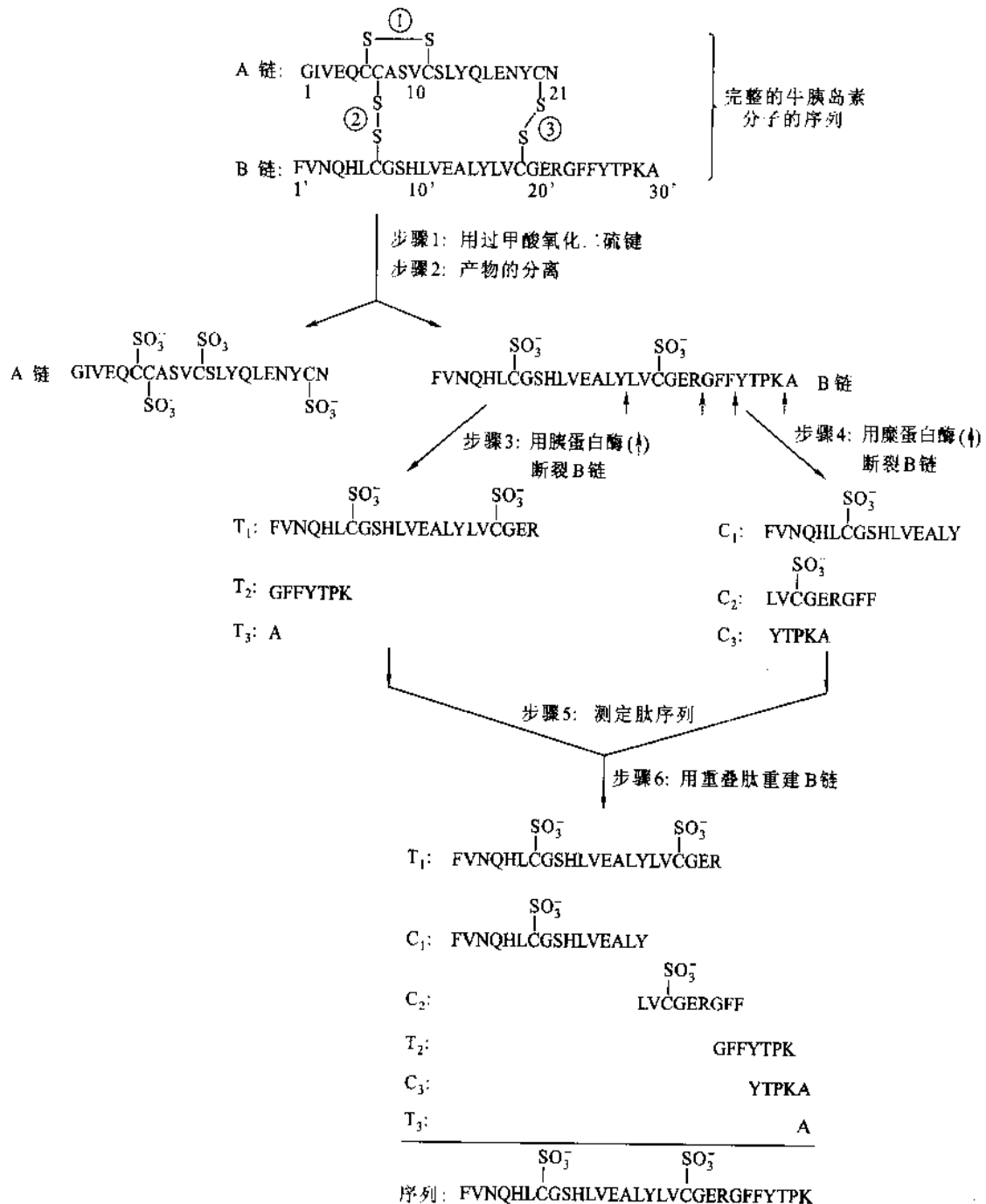


图 4-14 胰岛素(B 链)的测序

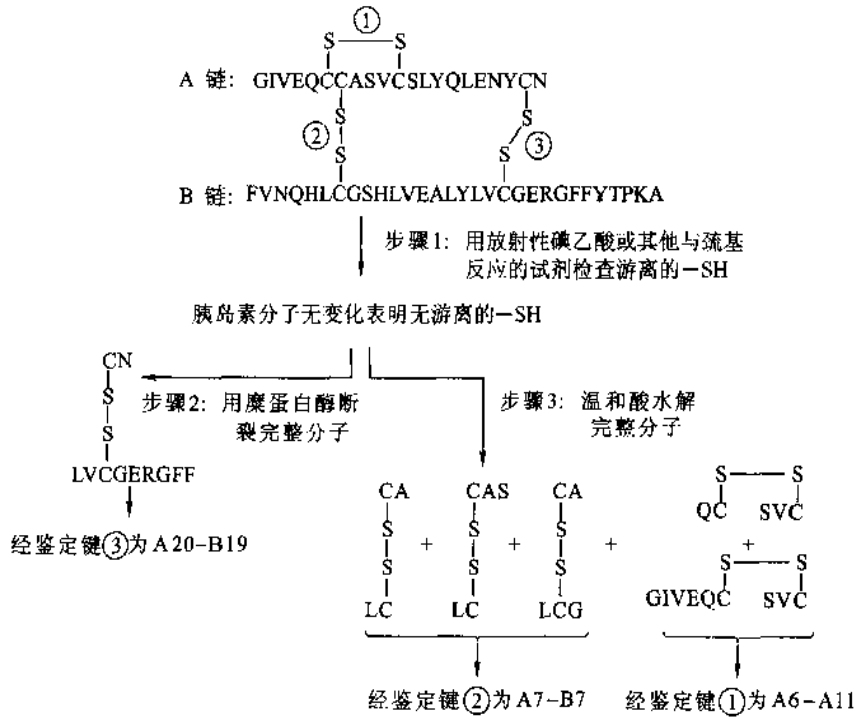


图 4-15 胰岛素中二硫桥的定位

(十) 蛋白质序列数据库

蛋白质化学家收集的一个蛋白质数据库(database, databank)可以在《蛋白质序列和结构图册》(“Atlas of Protein Sequence and Structure”, Dayhoff, M.O. (ed), 1972—1978, Vols 1-5, Washington, DC: National Biomedical Research Foundation)中找到。然而现在大多数蛋白质序列信息都是从基因的核苷酸序列(经密码子)翻译成氨基酸序列的(见下册第37和第38章)。由于测定克隆基因的核苷酸序列比测定蛋白质的氨基酸序列更快、更有效、信息更多,因此有不少电子数据库问世,储存的序列资料以惊人的速度不断扩充,并且个人电脑可以很方便地利用它。现在要确定一个新序列,研究者所作的第一件事就是将它与数据库中的其他已知的序列进行比较,确定其中是否存在同源性。这些数据库中较有名的有美国国家生物医学基金会(National Biomedical Research Foundation)主持的PIR[Protein Information Resource(蛋白质信息库)或Protein Identification Resource(蛋白质鉴定库)的缩写],美国政府支持的GenBank[Gene Sequence Data Bank(基因序列数据库)]和欧洲的EMBL[European Molecular Biology Laboratory Data Bank(欧洲分子生物学实验室数据库)]。

四、蛋白质的氨基酸序列与生物功能

(一) 同源蛋白质的物种差异与生物进化

1. 同源蛋白质

在不同生物体中行使相同或相似功能的蛋白质称同源蛋白质,例如各种脊椎动物中的氧转运蛋白——血红蛋白。同源蛋白质的氨基酸序列具有明显的相似性,这种相似性称序列同源[性](sequence homology)。具有明显序列同源的蛋白质也称同源蛋白质。同源蛋白质的氨基酸序列中有许多位置的氨基酸残基对所有已研究过的物种来说都是相同的,因此称为不变残基(invariant residue)。但是其他位置的氨基酸残基对不同物种有相当大的变化,因而称可变残基(variable residue)。同源蛋白质一般具有几乎相同长度的多肽链,并且它们的氨基酸序列与那些提取它们的物种的亲缘关系具有同一性。

2. 细胞色素 c

细胞色素 c (cytochrome c) 是一种含血红素的电子转运蛋白, 它存在于所有真核生物的线粒体中。细胞色素 c 序列的研究提供了同源性的最好例证。大多数细胞色素 c 含 1 百零几个氨基酸残基, 相对分子质量约为 12.5×10^3 。40 多种物种的细胞色素 c 的分析揭示, 多肽链中 28 个位置上的氨基酸残基对所有已分析过的样品都是相同的。看来这些不变残基对这种蛋白质的生物学功能是至关重要的, 因此这些位置不允许被其他氨基酸取代。细胞色素 c 除第 70 到 80 位之间的不变残基是成串存在的, 其他都是不规则地分散在多肽链的各处。所有的细胞色素 c 在第 17 位上含有一个 Cys 残基, 并且所有的细胞色素 c 除一个例外, 在第 14 位上都含有另一个 Cys 残基。这两个 Cys 残基是细胞色素 c 连接辅基血红素的, 第 70 到 80 位上的不变残基串可能是细胞色素 c 与酶结合的部位(图 4-16)。可变残基可能是一些“填充”或间隔的区域, 氨基酸残基的变换不影响蛋白质的功能。

可变残基提供了另一类信息。细胞色素 c 和其他同源蛋白质的序列资料分析得出了一个重要的结论: 来自任两个物种的同源蛋白质, 其序列间的氨基酸差异数目与这些物种间的系统发生差异是成比例的, 也即在进化位置上相差愈远, 其氨基酸序列之间的差别愈大(表 1-9)。例如人和黑猩猩的细胞色素 c 是相同的(差异残基数为零); 人和其他哺乳动物(绵羊)的细胞色素 c 相差 10 个残基。人的细胞色素 c 和响尾蛇(爬行类)、鲤鱼(鱼类)、蜗牛(软体动物)和天蛾(昆虫)分别差 14, 18, 29 和 31 个残基; 与酵母或高等植物的相比, 差数在 40 个以上。

3. 系统树

细胞色素 c 的氨基酸序列资料已被用来核对各个物种之间的分类学关系以及绘制系统[发生]树(phylogenetic tree)或称进化树(说明物种之间进化关系的图解)(图 4-17)。系统树是用计算机分析细胞色素 c 序列并找出连接分支的最小突变残基数的方法构建起来的。用其他计算机方法可推论出系统树分支点处的潜在祖先序列。这种系统树与根据经典分类学建立起来的系统树非常一致。过去进化(evolution)常被认为是可被接受, 但在实践中难于得到证实。根据系统树不仅可以研究从单细胞生物到多细胞生物的生物进化过程, 而且可以粗略估计现存的各类物种的分歧(divergence)时间。例如人和马的分歧时间是 70~75 百万年, 哺乳类和鸟 280 百万年, 脊椎动物和酵母 1100 百万年。

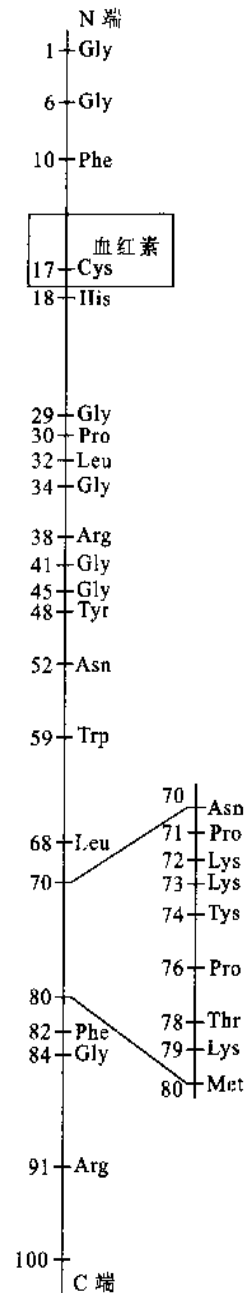


图 4-16 40 个物种的细胞色素 c 中不变氨基酸残基(28 个)

随着被测的细胞色素 c 数目增多, 不变残基数可能减少

表 4-9 不同生物体的细胞色素 c 序列间氨基酸差异数目的比较*

	黑猩猩	绵羊	响尾蛇	鲤鱼	蜗牛	天蛾	酵母	花椰菜	欧防风
人	0	10	14	18	29	31	44	44	43
黑猩猩		10	14	18	29	31	44	44	43
绵羊			20	11	24	27	44	46	46
响尾蛇				26	28	33	47	45	43
鲤鱼					26	26	44	47	46
花园蜗牛						28	48	51	50
烟草天蛾							44	44	41
啤酒酵母								47	47
花椰菜									13

a. 取自 Creighton, T.E., Protein Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1983.

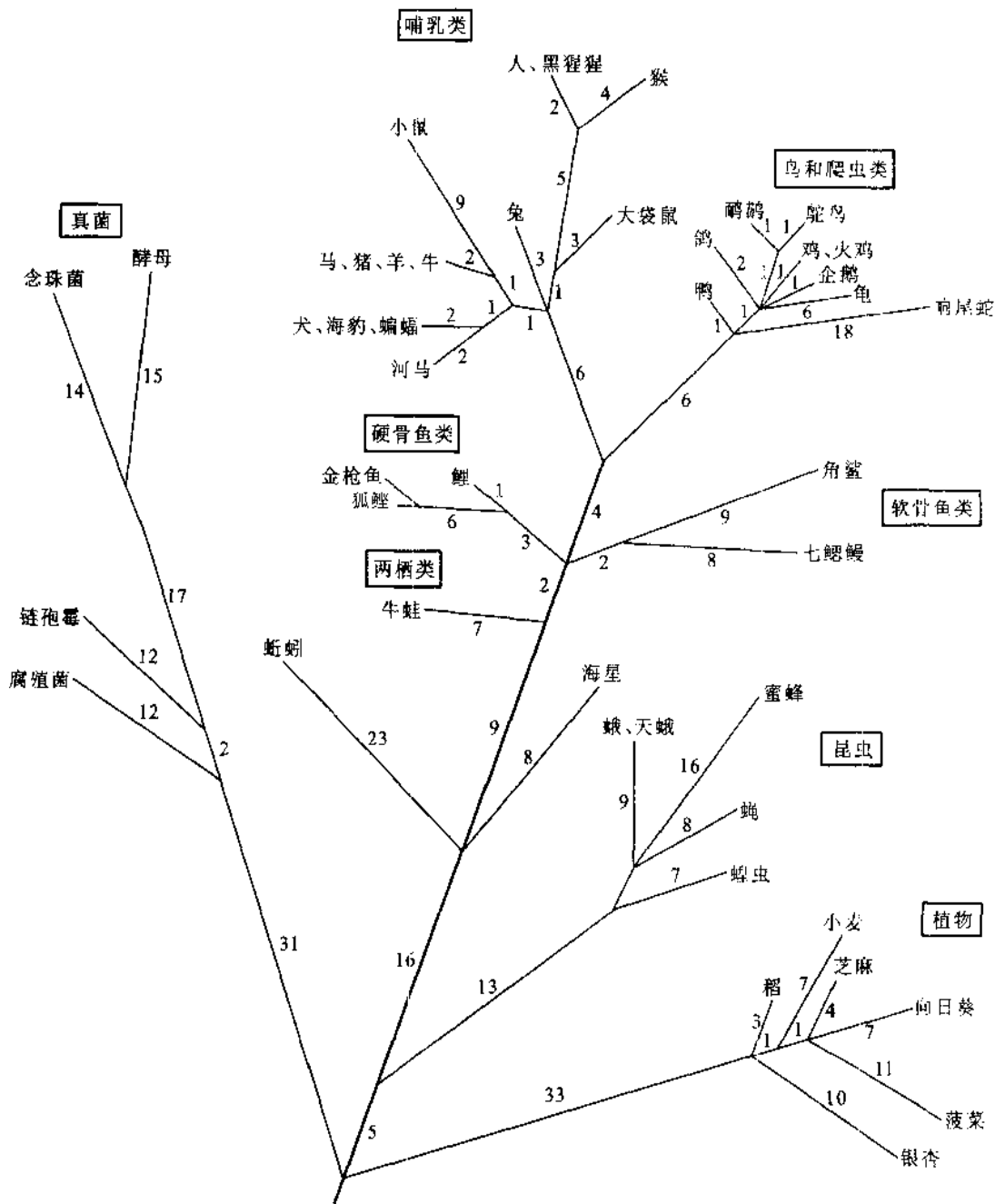


图 4-17 根据细胞色素 c 序列的物种差异建立的进化树
分支顶端是现存的物种。沿分支线的数字表示物种和潜在(假设)的祖先之间的氨基酸变化

(二) 同源蛋白质具有共同的进化起源

同源蛋白质的氨基酸序列分析揭示,这些蛋白质有着一个共同的进化祖先(evolutionary ancestry)。

1. 氧合血红蛋白

肌肉的氧合血红蛋白,肌红蛋白(myoglobin),是一条含 153 个氨基酸残基的多肽链。红细胞的氧转运蛋白,血红蛋白(hemoglobin)是一个由两条 α 链(每条141残基)和两条 β 链(每条146残基)组成的四

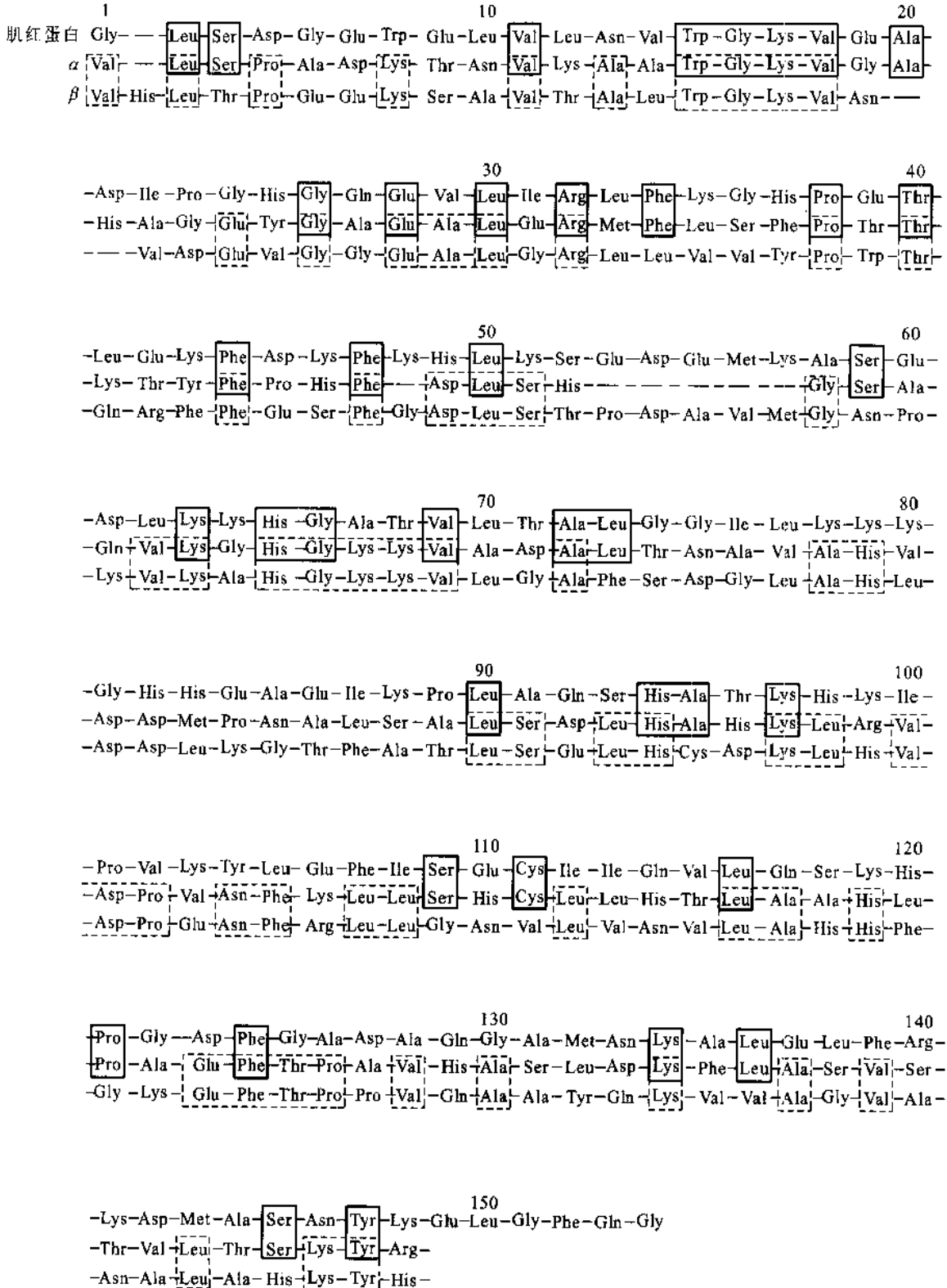


图 4-18 人肌红蛋白, α -珠蛋白链和 β -珠蛋白链的序列同源性

聚体。肌红蛋白、 α 链和 β 链是珠蛋白(globin),它们有很高的序列同源(图4-18)。人肌红蛋白和人 α -珠蛋白链有38个氨基酸是相同的,人 α -珠蛋白和人 β -珠蛋白有64个残基是共同的。这种同源关系表明随机突变导致一级结构方面氨基酸取代和分歧或趋异(divergence)事件的进化顺序。一个原始珠蛋白基因的复制(包括突变)产生了一个祖先肌红蛋白基因和一个祖先血红蛋白基因,因而祖先肌红蛋白基因是最先被歧化出来的。其后,祖先血红蛋白基因复制产生了今天 α -珠蛋白和 β -珠蛋白基因的祖先(图4-19)。然而通过血红素辅基结合 O_2 的能力都被这3种多肽链保留下来。

2. 丝氨酸蛋白酶类

上述珠蛋白提供了基因复制产生生物功能高度保守的蛋白质的例子。另一些蛋白质序列同源性很高,但显示出趋异的生物功能。胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶(图4-9)和弹性蛋白酶是一类蛋白水解酶,因为这些酶的活性中心的特异丝氨酸残基起关键性的作用,所以又称为丝氨酸蛋白酶(serine protease)。参与血液凝固的凝血酶以及溶解血纤蛋白(简称溶纤)的纤溶酶(plasmin)也都属于丝氨酸蛋白酶类。这类酶显示足够的序列同源性,可以得出结论:它们是经过祖先丝氨酸蛋白酶基因的复制而来的,虽然现在它们对底物的偏爱已十分不同。总之,基因的突变和复制是创造多样性的重要进化力。

3. 一些功能差异很大的蛋白质

一些生物活性和来源很不相同的蛋白质,如卵清中的溶菌酶(lysozyme)含129个残基和人乳中的 α -乳清蛋白(α -lactalbumin)含123个残基,前者的功能是水解细菌细胞壁的多糖成分(见第1章),后者是调节乳腺中乳糖的合成。两者除了都在涉及糖的反应中起作用外,它们的功能很少相似。不过它们的三级结构还是十分相似的。根据溶菌酶和 α -乳清蛋白的序列同源性(有48个位置上的残基是相同的)可以推论出它们的进化关系——具有共同的起源。这是可能的,许多蛋白质有着这种进化关系,但进化的时间和进程抹去了它们有共同祖先的大部分证据。

(三) 血液凝固与氨基酸序列的局部断裂

在生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才能呈现生物活性。例如血液凝固时血纤蛋白原和凝血酶原的复杂变化,消化液中很多蛋白水解酶原的激活(activation)以及许多蛋白质和多肽激素前体转变为有活性的激素都属于这种情况。蛋白质的这一特性有着它的重要生物学意义,它是在生物进化过程中发展起来的,是蛋白质结构与功能具有高度统一性的表现。

1. 血液凝固中的级联过程

生物体要求血液在血管中能畅流无阻,又要求一旦血管壁破损能及时凝固堵漏。血液中存在一个至少含有12种凝血因子(clotting factor)的凝血系统(表4-10)。可以设想一下,如果凝血因子都是处于活性状态,岂不是血液有随时凝固而被阻流的危险;但是如果血液无凝血因子存在,那么人和动物一旦受到创伤就会流血不止。生物体解决这个矛盾的办法是凝固因子以无活性的前体或酶原(zymogen)形式存在。当机体受伤流血时,这些前体立即被激活,使伤口血液凝固并把伤口封住,以阻止继续出血。

血液凝固是一个极其复杂的生物化学过程,它是涉及氨基酸序列断裂的一系列酶原被激活的结果(图4-20)。酶促激活的级联放大(cascade amplification)使血凝块迅速形成成为可能。血浆中12种蛋白质凝血因子(表4-10)有7种是丝氨酸蛋白酶:激肽释放酶, XI_a , XI_a , IX_a , VII_a , $XIII_a$ 和凝血酶(因子编号右下角字母a表示该因子是活化形式)。血液凝固存在两条途径:外在凝血途径(extrinsic clotting pathway)和内在凝血途径(intrinsic clotting pathway)。外在途径由损伤组织释放组织因子(因子III)和激活因子VII所引发,因子III和 VII_a 形成复合物,后者激活因子X。此途径可在数秒钟内生成少量凝血酶,利用凝血

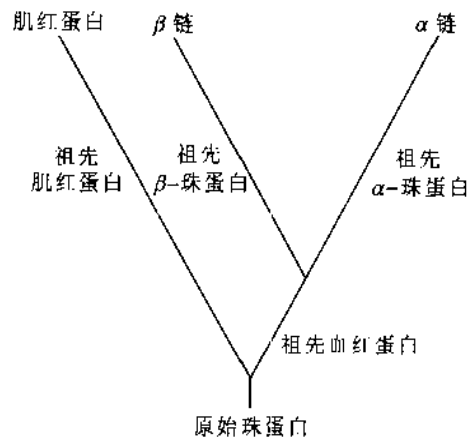


图4-19 氧合血红蛋白的进化树

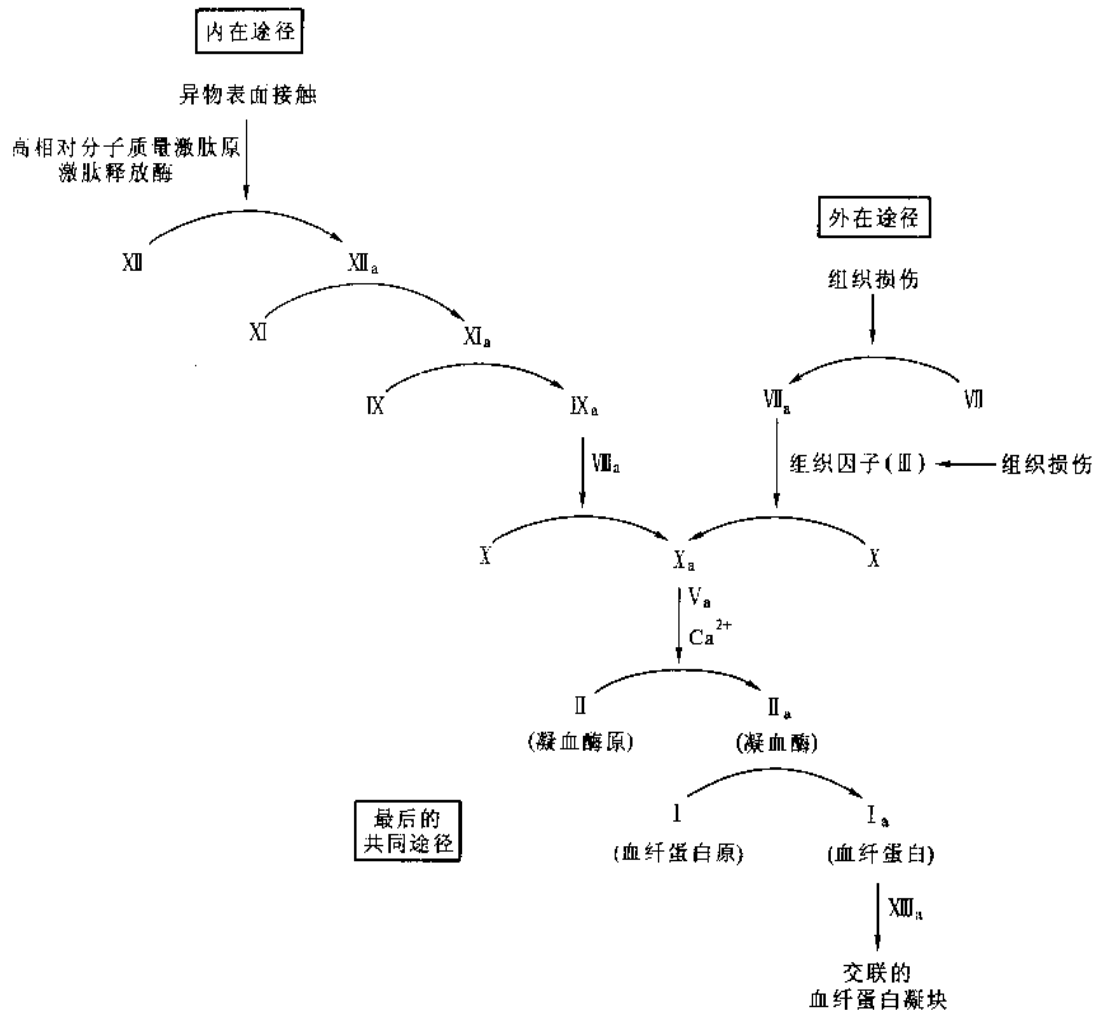


图 4-20 导致血液凝固的激活步骤的级联

表 4-10 凝血因子的编号及名称^a

因子编号	同义名称	英文名称
I	血纤蛋白原	fibrinogen
II	凝血酶原	prothrombin, thrombinogen
III ^b	组织促凝血酶原激酶	tissue thromboplastin
IV ^c	钙离子	
V	前加速素、易变因子	proaccelerin, labile factor
VI	前转变素、稳定因子	proconvertin, stable factor
VII	抗血友病球蛋白	antihemophilic globulin
IX	血浆促凝血酶原激酶组分	plasma thromboplastin component
X	司徒因子	Stuart factor
XI	血浆促凝血酶原激酶前体	plasma thromboplastin antecedent
XII	接触因子、哈根曼因子	contact factor, Hageman factor
XIII	血纤蛋白稳定因子、转谷酰胺酶	fibrin stabilizing factor, transglutaminase
—	前激肽释放酶	prekallikrein
—	高相对分子质量激肽原(HMWK)	high molecular weight kininogen

a. 凝血因子至今见到的编号只到XII,近年来发现的一些因子,如前激肽释放酶等未加编号。因子VI现已知是因子V的激活中间物不算独立的凝血因子。

b. 除因子III存在于组织中外,其他因子主要是由肝脏产生并释放到血浆中。

c. 除因子IV为钙离子外,其他均为蛋白质并大多数是糖蛋白。

酶的自我催化和对血小板的影响,有利于凝血和止血作用。内在途径起始于因子Ⅻ与损伤造成的异常表面或异物表面(如血管内皮下的基底膜、胶原或脂肪酸等)的物理接触,此时因子Ⅻ内部的 Val-Arg 之间的键发生断裂被激活成 Ⅻ_a。Ⅻ_a 在 高分子激肽原($M_r 180 \times 10^3$)存在下,将前激肽释放酶断裂成有活性的激肽释放酶,后者又加速 Ⅻ \rightarrow Ⅻ_a。因子Ⅻ和激肽释放酶之间的作用形成互促循环,极大地增强了它的生物效应。内在途径和外在途径汇合在因子Ⅹ,下面是最后的共同凝血途径(common clotting pathway)。此途径主要是两个环节:一是凝血酶原在因子Ⅴ_a和 Ca^{2+} 存在下,由因子Ⅹ_a催化断裂成凝血酶;二是血浆中的血纤蛋白原在凝血酶和因子Ⅻ_a的作用下转变为不溶性的血纤蛋白网状结构,使血液变成固态凝胶。

2. 凝血酶和血纤蛋白原在血凝中的作用

凝血酶原是一种糖蛋白,相对分子质量 66×10^3 ,含 582 个氨基酸残基;在其 N 端区含有 5~6 个 γ -羧基谷氨酸残基(图 3-7),这些残基与 Ca^{2+} 的结合能促进凝血酶原与受伤部位血小板磷脂膜表面结合,以利于和 Ⅹ_a、Ⅴ_a 形成复合物。在凝血酶原激酶(thrombokinase) Ⅹ_a 的催化下,凝血酶原分子中的两个肽键(Arg 275—Thr 275 和 Arg 323—Ile 324)发生断裂。释放出 $M_r 32 \times 10^3$ 的 N 端片段(274 个残基),形成有活性的凝血酶。凝血酶,相对分子质量 34×10^3 ,由两条多肽链通过一个二硫键相连,一条多肽链(A 链)含 49 个残基,另一条(B 链)含 259 个残基(图 4-21)。凝血酶,很像胰蛋白酶,但它的作用专一性比胰蛋白酶还强,它只断裂某些 Arg—Gly 键,而胰蛋白酶能断裂所有 Arg 和 Lys 的羧基端的肽键。

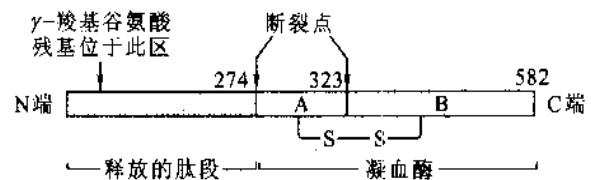


图 4-21 凝血酶原的结构示意图

凝血酶,相对分子质量 34×10^3 ,由两条多肽链通过一个二硫键相连,一条多肽链(A 链)含 49 个残基,另一条(B 链)含 259 个残基(图 4-21)。凝血酶,很像胰蛋白酶,但它的作用专一性比胰蛋白酶还强,它只断裂某些 Arg—Gly 键,而胰蛋白酶能断裂所有 Arg 和 Lys 的羧基端的肽键。

血纤蛋白原是一种大分子,约 $M_r 340 \times 10^3$ 。就外形而言,它属于纤维状蛋白质,长为 46 nm,分子中有 3 个球状区(结构域),由两个棒状区将它们分隔开来(图 4-22 A)。每一血纤蛋白原分子含 6 条多肽链。序列分析表明,这 6 条链两两相同,分 3 种类型: $A\alpha$ 链(约含 600 个残基) $B\beta$ 链(461 个残基)和 γ 链(410 个残基)。整个分子由等同的两部分: $A\alpha B\beta\gamma$ 和 $A\alpha' B\beta'\gamma'$ 对称地组成。6 条多肽链的 N 端区集中在中央球状区,并由一组二硫键交联起来,游离的 N 端肽段从中央球状区伸出,其中 $A\alpha$ 和 $B\beta$ 的末端肽段能被凝血酶切除(图 4-22B)。6 条多肽链的 C 端对称地分布在分子两端的球状区。棒状区是由 3 股 α 螺旋缠绕而成。血纤蛋白原分子共含 29 个二硫键,6 条多肽链由这些二硫键交联成一个整体分子。在 $B\beta$ 链的 Asp364 和 γ 链的 Asp52 连有糖基。氨基酸序列分析表明, $A\alpha$ 、 $B\beta$ 和 γ 链之间具有序列同源性。

凝血酶断裂血纤蛋白原中央球状区的 4 个 Arg—Gly 的肽键,从两条 $A\alpha$ 链各释放出一个 A 肽(18 个残基),从两条 $B\beta$ 链各释放出一个 B 肽(20 个残基)。这些 A 肽和 B 肽称血纤肽(fibrinopeptide)。除去血纤肽的血纤蛋白原分子称为血纤蛋白单体(fibrin monomer),其亚基结构为 $(\alpha\beta\gamma)_2$ 。血纤蛋白单体自发地聚集成有序的纤维状排列,称血纤蛋白(fibrin)。电子显微镜和低角 X 射线衍射图案表明,血纤蛋白具有 23 nm 重复的周期结构。因为血纤蛋白原的长度为 46 nm,所以血纤蛋白单体的聚集是按 1/2 错位的方式进行的(图 4-23)。

不同物种的脊椎动物其血纤肽的氨基酸组成和数目(14~21 个残基左右)有较大的差别,但都带有很大的负净电荷,其中富含 Glu 和 Asp 残基, Tyr 残基是酪氨酸硫酸酯($-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{SO}_3^-$), Ser 残基是磷丝氨酸(图 3-7),例如人血纤肽:

A 肽(16 肽) Ala—Asp—Ser—Gly—Glu—Gly—Asp—Phe—Leu—Ala—Glu—Gly—Gly—Gly—
Val—Arg

B 肽(14 肽) p—Glu—Gly—Val—Asn—Asp—Asn—Glu—Glu—Gly—Phe—Phe—Ser—Ala—Arg
[N-末端的 p—Glu 是焦谷氨酸(图 3-7)]

血纤肽的静电斥力阻止血纤蛋白原的聚集。一旦血纤肽从血纤蛋白原上被切去,电荷斥力被解除,同时原来被血纤肽掩盖的位点暴露,它们是与两端球状区的位点互补的(图 4-22B),因而允许生成的血纤蛋白单体借非共价相互作用聚集成血纤蛋白软凝块(Soft clot)。这种软凝块是相当脆弱的,例如在 6 mol/L

尿素溶液中则被解聚而溶解。然而在因子Ⅹ_a即转谷酰胺酶的作用下则转变为稳定的脲不溶性血纤蛋白凝块(图 4-24)。

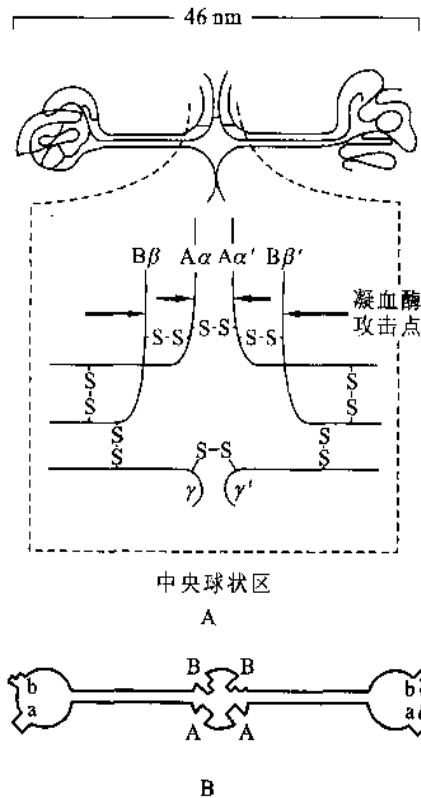


图 4-22 血纤蛋白原(图 A)和血纤蛋白单体(图 B)的结构示意图

(B)图中 a 和 A, b 和 B 分别是结构互补的位点

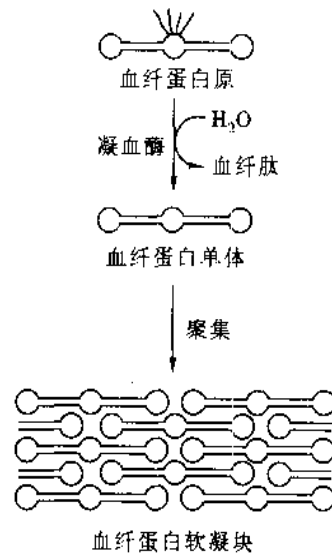


图 4-23 血纤蛋白原转变为软血纤蛋白凝块的图解

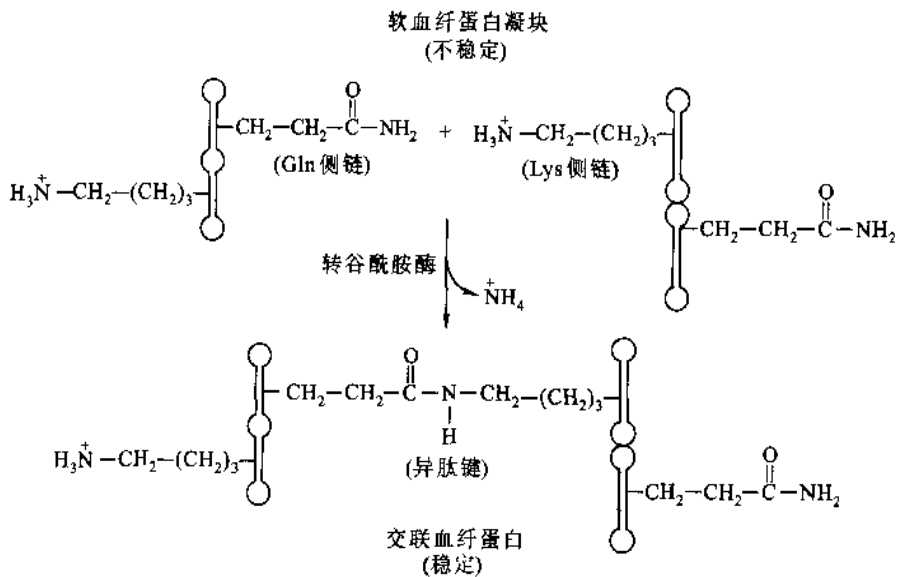


图 4-24 在转谷酰胺酶催化下软血纤蛋白交联成稳定的血纤蛋白凝块

3. 血纤蛋白溶解系统(纤溶系统)

凝血系统具有保护机体的作用,这是其一。但事物总是一分为二的,如果凝血机能“亢进”,即血凝过度,血液循环中的有形成分在血管内将形成异常的血凝块,称血栓(thrombus)。血栓有引起严重疾病的危

险,例如心肌梗塞、脑血栓和肺栓塞等。好在血液中还存在着一个所谓纤溶系统。该系统包括纤溶酶原(plasminogen),纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)及其他。纤溶酶原是单链糖蛋白,相对分子质量 92×10^3 ,由 790 个氨基酸残基组成,一级结构包含 5 个同源的环饼区(kringle region)和一个丝氨酸蛋白酶区(serine protease region)。体内 PA 主要是组织型 PA(tissue-type PA)简称 t-PA。此外还有尿激酶型 PA(简称 u-PA),双链 u-PA,称尿激酶(urokinase)。它们都是糖蛋白,属丝氨酸蛋白酶类。人 t-PA,相对分子质量为 70×10^3 ,含 527 个残基,分子由 5 个结构域(domain):指形(finger)区,生长因子(growth factor)区,两个环饼区和一个丝氨酸蛋白酶区组成(图 4-25)。

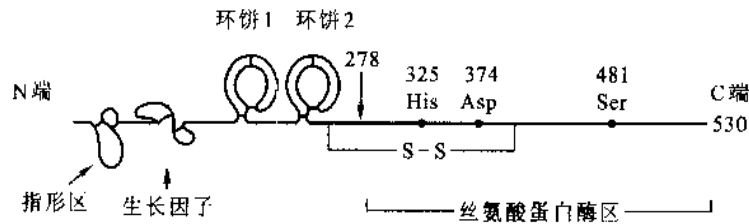


图 4-25 组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)的一级结构示意图

纤溶酶原经 PA 如 t-PA 作用,断去部分肽链转变为纤溶酶(plasmin)。纤溶酶专门断裂血纤蛋白棒状连接区中的肽键,此酶能通过水性通道进入血纤蛋白凝块内部,以接近其中的棒状连接区。t-PA 通过环饼区与血纤蛋白凝块结合,并能迅速地激活粘附在这里的纤溶酶原。相反游离的纤溶酶原被 t-PA 激活的速度则慢得多(图 4-26)。

编码 t-PA 的基因已被克隆并在培养的哺乳细胞中表达。重组 DNA 方法生产的 t-PA 已在临床上得到应用。采用静脉注射 t-PA 方法 1 h 内形成的冠状动脉血栓,可被溶开,明显地增加心肌梗塞病人的存活率。

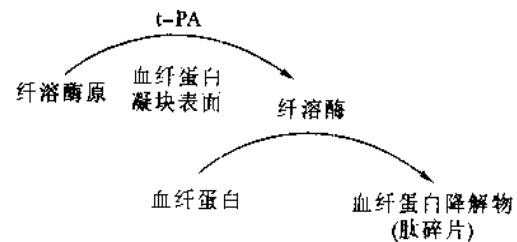


图 4-26 t-PA 激活纤溶酶原及纤溶酶降解血纤蛋白凝块

五、肽与蛋白质的人工合成

由于一些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、德国也合成了胰岛素,这标志着人类在研究生命起源的历程中迈进了一大步。

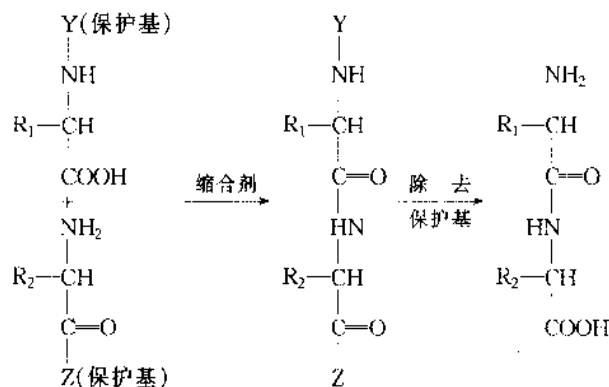
这些年来,肽与蛋白质的人工合成,以及在此基础上进一步研究它们的结构与功能的关系已经成为蛋白质化学中一个十分活跃的领域,下面简单地介绍肽和蛋白质的人工合成方法。

(一) 肽的人工合成

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合(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 端氨基酸残基的游离氨基、C 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。



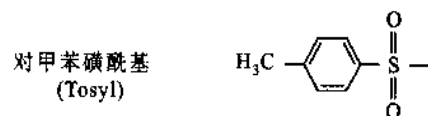
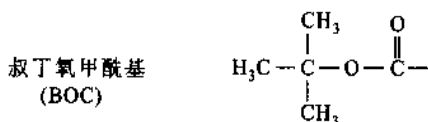
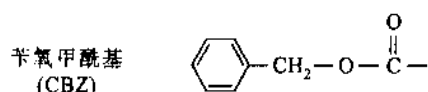
作为保护基,必须符合这样的条件,即在接肽时能起保护作用,而在接肽以后又很容易除去,不致引起肽键的断裂。

最广泛应用的氨基保护基 Y 是苄氧甲酰基,它可以用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。

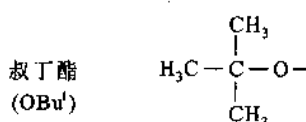
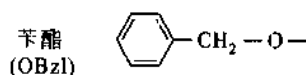
羧基一般以盐或酯的形式加以保护。盐是对羧基的临时性保护,常用的有钾盐、钠盐、三乙胺盐及三丁胺盐等。酯有甲酯(OMe)、乙酯(OEt)、苄酯(OBzl)和叔丁酯(OBu^t)。甲酯和乙酯可用皂化法除去,但易引起消旋。苄酯可用 H₂/Pd 法或金属钠-液氨法除去。叔丁酯可在温和条件下用酸除去。

一些常用保护基的结构式如下:

氨基保护基 Y:

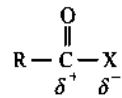


羧基保护基 Z:

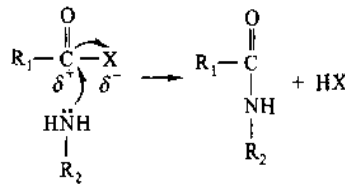


侧链上的活泼功能团也必须给予保护,如 Asp 和 Glu 的 β、γ 羧基, Ser 和 Thr 的侧链羟基, Cys 的 SH 基和 Lys 的 ε-NH₂。后两个基团需要保护到肽链合成为止。因此要求它们的保护基在切除 N-末端 α-NH₂ 的保护基时不致脱落。Cys 的 SH 常用苄基(Bzl)或对甲氧苄基(MBzl)保护,前者用 Na-液 NH₃ 处理可以除去,后者在液态氟化氢中于 0℃ 处理 30 min 即可切除。Lys 的 ε-NH₂ 常用 Tosyl 保护,它在 Na-液 NH₃ 中可被除去。其他一些常见的氨基酸侧链保护基有: Ser(Bzl)、Thr(Bzl)、Tyr(Bzl)、Arg(N^ε-Tosyl)、Glu(OMe)、Asp(OBzl)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:



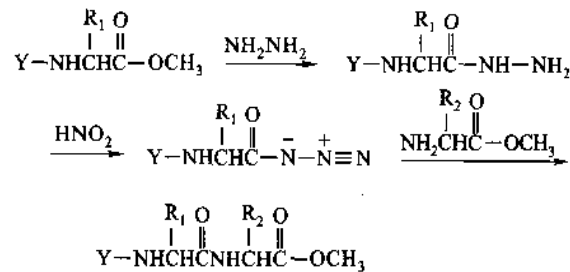
这样形成的亲电中心允许亲核的非离子化氨基对它进行攻击:



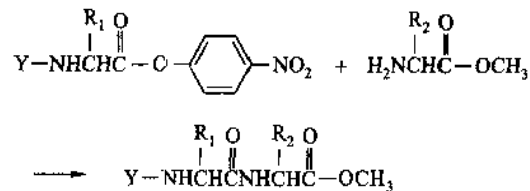
羧基的活化最早采用的方法是酰氯法(acid chloride)即把氨基被保护后的氨基酸用五氯化磷处理,生

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。

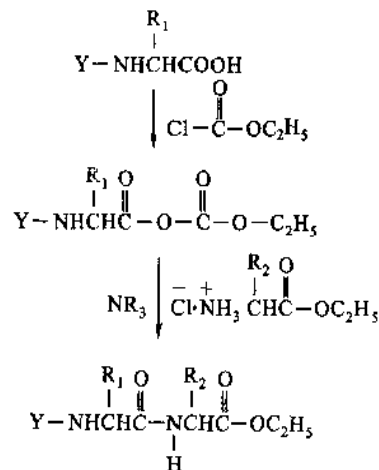
(1) 叠氮(azide)法 由小肽进一步缩合成大肽时,常用叠氮法。此法不引起消旋,因此产物的光学纯度较高。



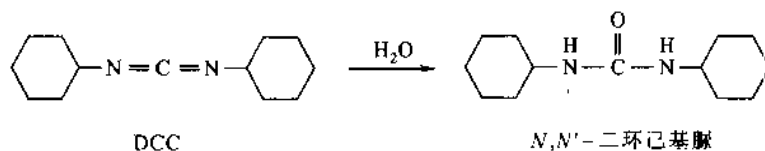
(2) 活化酯(activated ester)法 氨基被保护的氨基酸对硝基苯酯(一种活化酯)能与另一个氨基酸的氨基缩合成肽。此法作用温和,产率较高。



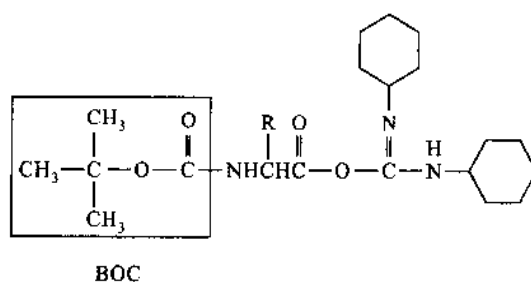
(3) 混合酸酐(mixed anhydride)法 氨基被保护的氨基酸,在低温且有叔胺(NR_3)的存在下与氯甲酸乙酯生成混合酸酐,能与另一氨基酸酯缩合成肽。缺点是容易产生消旋,但在无水溶剂中消旋可以保持较低水平。



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 O, O' -二环己基碳二亚胺(O, O' -dicyclohexylcarbodiimide, 缩写为 DCC)。在接肽反应中, DCC 从两个氨基酸残基中夺取一分子 H_2O , 自身转变为不溶的 O, O' -二环己基脲(O, O' -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 DCC 作缩合剂的。在缩合反应中 DCC 的变化如下:



用缩合剂 DCC 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。

(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 4-14)。

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 $\text{Na}-\text{液 NH}_3$ 处理后,再用连四硫酸钠(sodium tetrathionate)和亚硫酸钠进行 S-磺酸化,经初步纯化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) 固相肽合成

近二三十年发展起来的固相肽合成(solid-phase peptide synthesis)是控制合成技术上的一个重要进展。肽合成技术对分子生物学和基因工程研究具有重大影响和重要意义。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珠上进行的,这是为了反应后可通过简单的过滤回收被延长的产物,用于下

一步合成。为此待合成肽的羧基端氨基酸先和氯甲基聚苯乙烯树脂反应,共价地挂接在树脂上。除去该氨基酸的N-末端保护基后,第二个氨基酸(其氨基预先用叔丁氧酰基保护)以DCC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。肽链合成到最后一步时,把树脂悬浮在无水三氟乙酸中,通入干燥的HBr,使肽与树脂脱离,同时一些保护基也被切除(图4-27)。整个合成过程现在可以在程序控制的自动化固相肽合成仪上进行,反应杯中的试剂按程序泵入和除去。美国 Merrifield 等人报道,利用这种肽合成仪(peptide synthesizer)成功地合成了九肽——舒缓激肽(图4-5),总产率达85%,合成一条舒缓激肽共花27h,平均合成每个肽键只需要3h。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

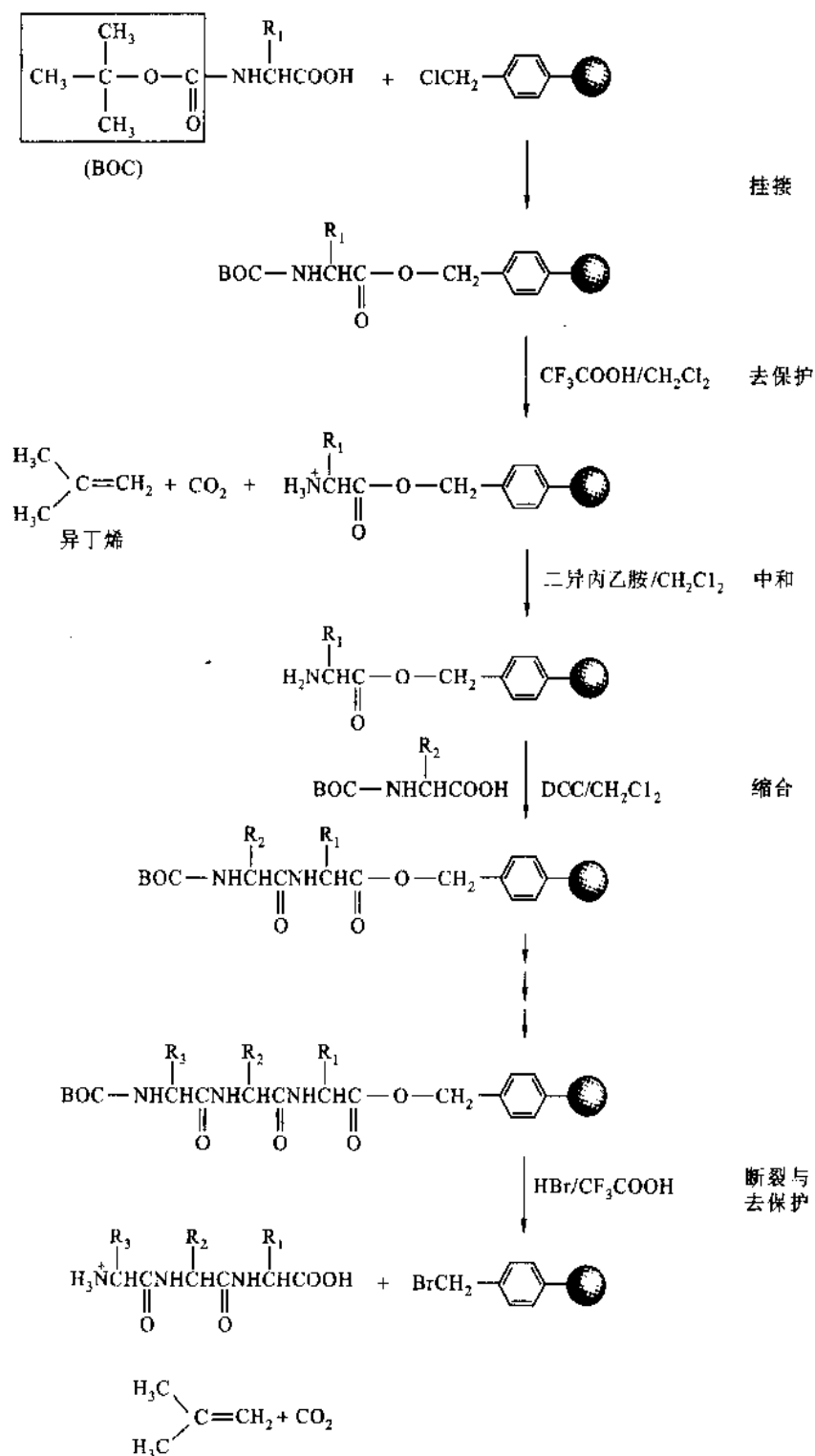


图4-27 肽的固相合成简图(右边圆珠代表树脂)

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 5-48)的人工合成,这是第一个人工合成的酶。

固相肽合成在我国医药工业上已经得到应用。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。

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序列。蛋白质的相对分子质量介于 6 000 到 1 000 000 或更高。

蛋白质分为两大类:单纯蛋白质和缀合蛋白质。根据分子形状可分为纤维状蛋白质、球状蛋白质和膜蛋白质。此外还可按蛋白质的生物学功能分类。

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序列,有时也称化学结构。二、三和四级结构又称空间结构(即三维结构)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序列决定的,而氨基酸序列是由遗传物质 DNA 的核苷酸序列规定的。

肽键(CO—NH)是连接多肽链主链中氨基酸残基的共价键,二硫键是使多肽链之间交联或使多肽链内成环的共价键。

多肽链或蛋白质当发生部分水解时,可形成长短不一的肽段。除部分水解可以产生小肽之外,生物界还存在许多游离的小肽,如谷胱甘肽等。小肽晶体的熔点都很高,这说明短肽的晶体是离子晶格、在水溶液中也是以偶极离子存在的。

测定蛋白质一级结构的策略是:(1)测定蛋白质分子中多肽链数目;(2)拆分蛋白质分子的多肽链;(3)断开多肽链内的二硫桥;(4)分析每一多肽链的氨基酸组成;(5)鉴定多肽链的 N-末端和 C-末端残基;(6)断裂多肽链成较小的肽段,并将它们分离开来;(7)测定各肽段的氨基酸序列;(8)利用重叠肽重建完整多肽链的一级结构;(9)确定半胱氨酸残基间形成的 S—S 交联桥的位置。

序列分析中的重要方法和技术有:测定 N-末端基的苯异硫氰酸酯(PITC)法,分析 C-末端基的羧肽酶法,用于多肽链局部断裂的酶裂解和 CNBr 化学裂解,断裂二硫桥的巯基乙醇处理,测定肽段氨基酸序列的 Edman 化学降解和电喷射串联质谱技术,重建多肽链一级序列的重叠肽拼凑法以及用于二硫桥定位的对角线电泳等。

在不同生物体中行使相同或相似功能的蛋白质称同源蛋白质。同源蛋白质具有明显的序列相似性(称序列同源)。两个物种的同源蛋白质,其序列间的氨基酸差异数目与这些物种间的系统发生差异是成比例的。并根据同源蛋白质的氨基酸序列资料建立起进化树。同源蛋白质具有共同的进化起源。

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,这一现象称蛋白质的激活。血液凝固是涉及氨基酸序列断裂的一系列酶原被激活的结果,酶促激活的级联放大使血凝块迅速形成成为可能。凝血酶原和血纤蛋白原是两个最重要的凝血因子。血纤蛋白原在凝血酶的作用下转变为血纤蛋白凝块(血块的主要成分)。

我国在 20 世纪 60 年代首次在世界上人工合成了蛋白质——结晶牛胰岛素。近二、三十年发展起来的固相肽合成是控制合成技术上的一个巨大进步,它对分子生物学和基因工程研究具有重要影响和意义。至今利用 Merrifield 固相肽合成仪已成功地合成了许多肽和蛋白质。

习 题

1. 如果一个相对分子质量为 12 000 的蛋白质,含 10 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? [10^{100}]

2. 有一个 A 肽:经酸解分析得知由 Lys、His、Asp、Glu、Ala 以及 Val、Tyr 和两个 NH_2 分子组成。当 A 肽与 FDNB 试剂

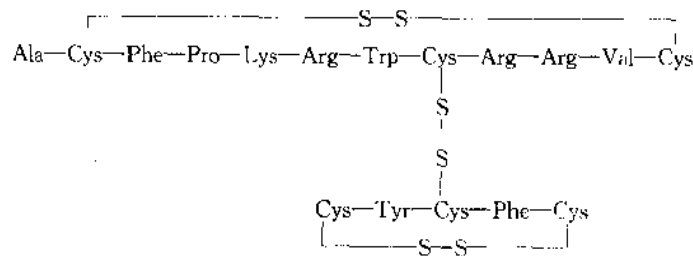
反应后,得 DNP-Asp;当用羧肽酶处理后得游离缬氨酸。如果我们在实验中将 A 肽用胰蛋白酶降解时,得到两种肽,其中一种(Lys,Asp,Glu,Ala,Tyr)在 pH 6.4 时,净电荷为零,另一种(His,Glu 以及 Val)可给出 DNP-His,在 pH 6.4 时,带正电荷。此外,A 肽用糜蛋白酶降解时,也得到两种肽,其中一种(Asp,Ala,Tyr)在 pH 6.4 时呈中性,另一种(Lys,His,Glu₂ 以及 Val)在 pH 6.4 时,带正电荷。问 A 肽的氨基酸序列如何? [Asn-Ala-Tyr-Glu-Lys-His-Gln-Val]

3. 某多肽的氨基酸序列如下:Glu₁-Val-Lys-Asn-Cys₅-Phe-Arg-Trp-Asp-Leu₁₀-Gly-Ser-Leu-Glu-Ala₁₅-Thr-Cys-Arg-His-Met₂₀-Asp-Gln-Cys-Tyr-Pro₂₅-Gly-Glu-Glu-Lys₃₀。(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:α-COOH 4.0; α-NH₃⁺ 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 哪两个参与形成? [(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 4 个肽段;如果存在一个二硫键应得 3 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]

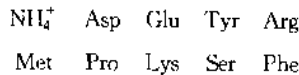
4. 今有一个七肽,经分析它的氨基酸组成是:Lys, Pro,Arg,Phe,Ala,Tyr 和 Ser。此肽未经糜蛋白酶处理时,与 FDNB 反应不产生 α-DNP-氨基酸。经糜蛋白酶作用后,此肽断裂成两个肽段,其氨基酸组成分别为 Ala,Tyr,Ser 和 Pro,Phe,Lys,Arg。这两个肽段分别与 FDNB 反应,可分别产生 DNP-Ser 和 DNP-Lys。此肽与胰蛋白酶反应,同样能生成两个肽段,它们的氨基酸组成分别是 Arg,Pro 和 Phe,Tyr,Lys,Ser,Ala。试问此七肽的一级结构是怎样的? [它是一个环肽,序列为:-Phe-Ser-Ala-Tyr-Lys-Pro-Arg-]

5. 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 NH₃⁺(pK_a ≈ 8.0),3 个侧链 3($\frac{1}{3} \epsilon-NH_3^+$)(pK_a = 10.53),因此 pI > 最大的 pK_a 值(10.53)]

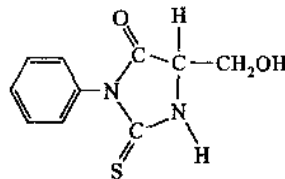
6. 一个多肽可还原为两个肽段,它们的序列如下:链 1 为 Ala-Cys-Phe-Pro-Lys-Arg-Trp-Cys-Arg-Arg-Val-Cys,链 2 为 Cys-Tyr-Cys-Phe-Cys。当用嗜热菌蛋白酶消化原多肽(具有完整的二硫键)时可得下列各肽:(1) (Ala, Cys₂, Val);(2) (Arg, Lys, Phe, Pro);(3) (Arg₂, Cys₂, Trp, Tyr);(4) (Cys₂, Phe)。试指出在该天然多肽中二硫键的位置。[结构如下图]



7. 一个十肽的氨基酸分析表明其水解液中存在下列产物:



并观察到下列事实:(1) 用羧肽酶 A 和 B 处理该十肽无效;(2) 胰蛋白酶处理产生两个四肽和游离的 Lys;(3) 梭菌蛋白酶处理产生一个四肽和一个六肽;(4) 溴化氢处理产生一个八肽和一个二肽,用单字母符号表示其序列为 NP;(5) 胰凝乳蛋白酶处理产生两个三肽和一个四肽。N-末端的胰凝乳蛋白酶水解肽段在中性 pH 时携带 -1 净电荷,在 pH 12 时携带 -3 净电荷;(6) 一轮 Edman 降解给出下面的 PTH 衍生物:



写出该十肽的氨基酸序列。[Ser-Glu-Tyr-Arg-Lys-Lys-Phe-Met-Asn-Pro]

8. 一个四肽,经胰蛋白酶水解得两个片段,一个片段在 280 nm 附近有强的光吸收,并且 Pauly 反应和坂口反应(检测胍基的)呈阳性。另一片段用溴化氰处理释放出一个与茚三酮反应呈黄色的氨基酸。写出此四肽的氨基酸序列。

[YRMP]

9. 蜂毒明肽 (apamin) 是存在蜜蜂毒液中的一个十八肽, 其序列为 CNCKAPETALCARRCQQH。已知蜂毒明肽形成二硫键, 不与碘乙酸发生反应。(1)问此肽中存在多少个二硫键?(2)请设计确定这些(个)二硫键位置的策略。[(1)两个;(2)二硫键的位置可能是 1-3 和 11-15, 或 1-11 和 3-15, 或 1-15 和 3-11。第一种情况, 用胰蛋白酶断裂将产生两个肽加精氨酸; 第二种和第三种情况, 将产生一个肽加精氨酸。通过二硫键部分氧化可以把后两种情况区别开来]

10. 叙述用 Merrifield 固相化学方法合成二肽 Lys-Ala。如果你打算向 Lys-Ala 加入一个亮氨酸残基使成三肽, 可能会掉进什么样的“陷阱”?

主要参考书

1. 金冬雁, 金奇, 侯云德. 核酸和蛋白质的化学合成与序列分析. 北京: 科学出版社, 1996
2. 徐秀璋. 蛋白质顺序分析技术. 北京: 科学出版社, 1988
3. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
4. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W H Freeman and Company, 1995
5. Yates J R. Section III: Protein Structure Analysis by Mass Spectrometry. Methods in Enzymology, Vol 271, Karger B L, Hancock W S, eds. New York: Academic Press, 1996
6. Croighton T E, ed. Protein Function — A Practical Approach. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 1997
7. Merrifield B. Solid Phase Synthesis. Science, 1986, 232: 341 ~ 347

(徐长法)

第5章 蛋白质的三维结构

上一章讨论了蛋白质的一级结构及其有关的问题。但是正常情况下蛋白质并不是以完全伸展的多肽链而是以紧密折叠的结构存在的,并且一个特定蛋白质行使其功能的能力通常是由它的三维结构或构象决定的。蛋白质的这种天然折叠结构决定于3个因素:①与溶剂分子(一般是水)的相互作用,②溶剂的pH和离子组成,③蛋白质的氨基酸序列,后一个是最重要的因素。前两个因素的影响明确、易理解;而氨基酸序列的作用则不那么直觉。实际上一级结构便于序列上相邻部分之间短程相互作用的形成,也便于相隔部分之间长程相互作用的出现。虽然蛋白质分子的整个结构初看起来像是无组织的随机排列,然而结构中无例外地有多种力处于精细的平衡中,正是它决定着蛋白质的独特构象。本章主要介绍多肽链折叠形成的三维结构以及驱动折叠和稳定这些结构的各种力。

一、研究蛋白质构象的方法

(一) X射线衍射法

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。至今研究蛋白质的三维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($\lambda = 500 \text{ nm}$)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像。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像,而直接得到的是—张衍射图案(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像——分子结构模型(图5-1)。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($\lambda = 400 \sim 700 \text{ nm}$)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($\lambda = 0.01 \sim 10 \text{ nm}$)能达到这样高的分辨率($< 0.1 \text{ nm}$)。

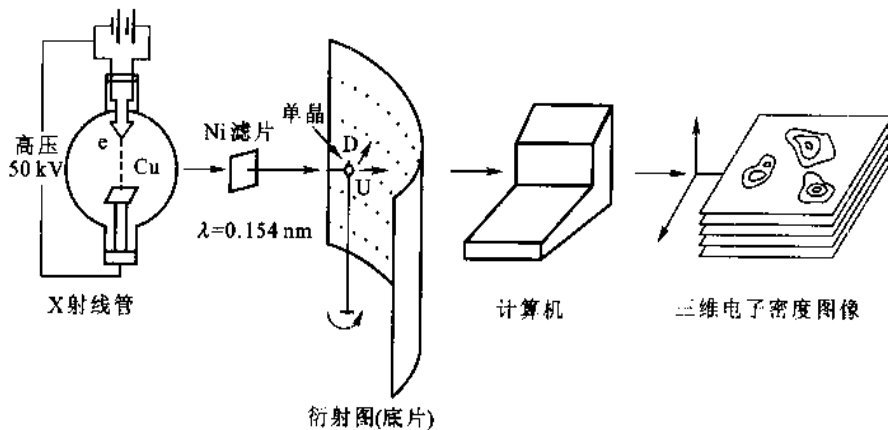


图5-1 X射线衍射晶体结构分析示意图

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

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射线晶体学(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像,就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像之前,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0.5 mm,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5-2):

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

则反射波可以互相叠加而产生衍射,形成复杂的衍射图案。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,即衍射图案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,可参考专著,这里不予详述。

(二) 研究溶液中蛋白质构象的光谱学方法

1. 紫外差光谱

蛋白质包括核酸在近紫外光区域之所以具有光吸收能力是因为它们的分子中含有芳香族和杂环族的共轭环系统(图3-17)。这些共轭环称发色团(chromophore)。发色团的吸光性质与其结构相关,而结构又受它的微环境影响。微环境因素包括溶液pH、溶剂及邻近基团的极性性质。当发色团(Trp、Tyr、Phe等)暴露在蛋白质分子表面时,pH和溶剂性质的影响是主要的,如果埋藏于分子内部,则以邻近基团的影响为主。发色团的微环境决定于蛋白质分子的构象,构象改变,微环境则发生变化,发色团的紫外吸收光谱也将随之变化,包括吸收峰的位置、强度和谱形状等。变化前后两个光谱之差称[示]差光谱(difference spectrum)。差光谱是两种不同条件下的比较,通常选用变性(多肽链伸展的)蛋白质或天然蛋白质作为参比。从对比实验中可以推断蛋白质在特定条件下溶液中的大致构象:芳香族残基是在分子表面还是在分子的内部,是处于极性环境还是非极性环境。一般说,环境极性增大、引起吸收峰向短波长移动,称为蓝移(blue shift)或称向紫效应(hypsochromic effect),反之吸收峰向长波长方向移动,称红移(red shift)或向红效应(bathochromic effect)。

测定紫外差光谱多是在双光束紫外分光光度计上进行。两个浓度完全相同只是条件(pH、溶剂、离子强度或温度)不同的蛋白质样品分别装在参考杯和试验杯中。实验时可自动记录它们的差光谱。

2. 荧光和荧光偏振

在大多数情况下由于吸收辐射能而被提升到激发电子态的分子都是通过激发能的非辐射转移给予周围分子而回复到基态。简言之,能量以热形式散失。但也有极少数分子吸收的激发能只转移一小部分,大部分将再辐射(在 $<10^{-8}$ s内),

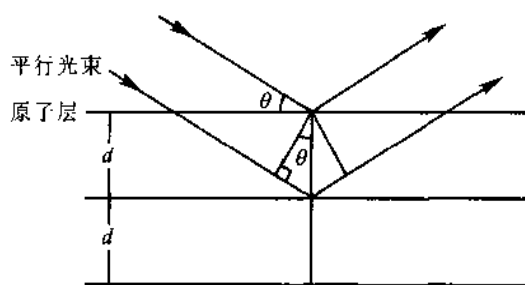


图5-2 布拉格方程的图解

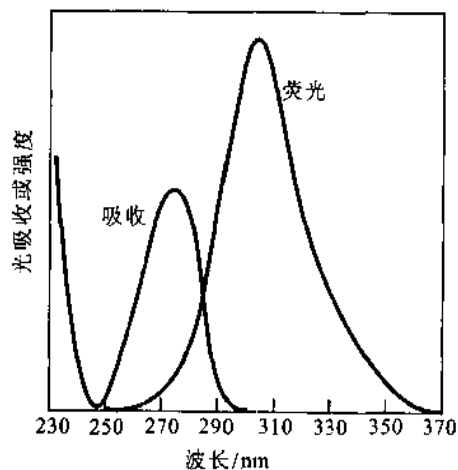


图5-3 酪氨酸的吸收光谱与荧光光谱

这种现象称荧光 (fluorescence)。以荧光再辐射的总能量总是小于原吸收的总能量,因此荧光波长比激发光波长。酪氨酸的吸收光谱与荧光发射光谱的对比见图 5-3。在蛋白质中 Trp 和 Tyr 残基是主要的荧光基团(内源荧光),其荧光峰位置(λ_{max})分别为 348 nm 和 303 nm。这些残基的微环境能明显地改变其荧光强度和荧光峰位置。根据经验性规律,应用荧光光谱技术,可以探索 Trp 和 Tyr 的微环境以及蛋白质分子构象的变化。有些蛋白质内源荧光很弱,这样可采用荧光探针技术(外源荧光法)研究蛋白质在溶液中的构象,用作荧光探针的如第 3 章中讲到的丹磺酰氯及其他,它们在紫外光照射下能发强荧光,并能与蛋白质共价或非共价结合。

此外用平面偏振光激发以产生荧光可提供一条研究蛋白质结构动态的途径。如果被激发的残基在荧光发射之前明显地发生移动或转动,则偏振荧光在一定程度上被消偏振 (depolarized)。荧光偏振 (fluorescence polarization) 与荧光探针结合常用于测定蛋白质的疏水微区,研究酶与底物、辅因子或抑制剂结合过程中蛋白质构象的变化,以及多亚基蛋白质的缔合和解离。荧光光谱的测定在荧光分光光度计 (Spectrofluorimeter) 上进行。

3. 圆二色性

虽然紫外差光谱和荧光技术有助于追踪大分子的变化,但是这些测定不易直接用二级结构的变化来解释。下面介绍一种有用的偏振光技术——圆二色性 (circular dichroism, CD)。

使光(电磁波)发生偏振的方式有多种。最熟悉的是平面偏振(见第 1 章旋光异构部分),这里辐射的场矢量(包括互相垂直的电场矢量和磁场矢量)振荡有固定的方向(图 5-4A)。不太熟悉,但又同样重要的是圆偏振(circular polarization)。圆偏振光的场矢量以辐射频率绕光传播方向旋转前进(图 5-4B)。当朝光源方向观察圆偏振光时,其电[场]矢量顺时针方向旋转的称为右[手]圆偏振光,逆时针方向旋转的称为左[手]圆偏振光。习惯上分别用这两种光的电矢量 E_R 和 E_L 来表示。圆偏振光可看成是由波长和振幅相等但相位差 $1/4$ 波长(90°)的两个平面偏振光叠加而成。左、右圆偏振光在 CD 光谱仪上是由同一平面偏振光通过一个以交流电的电光调制器(一种晶体)时交替产生的。

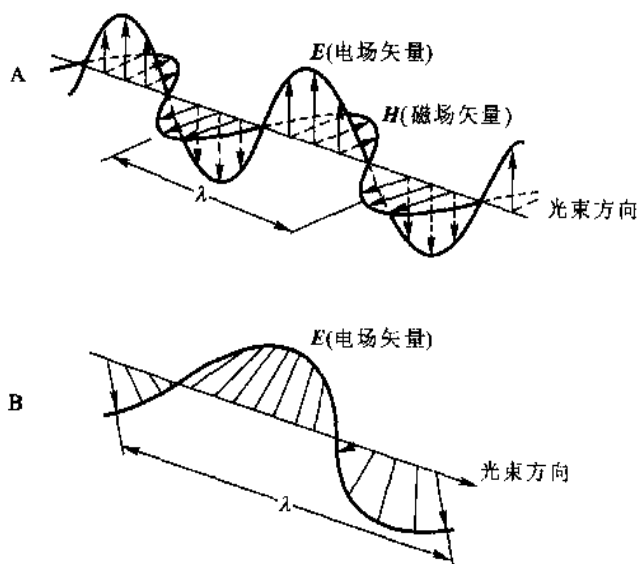


图 5-4 平面偏振和圆偏振(仅示出右圆偏振)

多数生物分子具有不对称性,有的是构型不对称性如 L-和 D-氨基酸,有的是构象不对称性如左手和右手蛋白质螺旋(图 5-14),左手和右手多糖螺旋(图 1-24)等。手性物质与左、右圆偏振光(E_L, E_R)的相互作用是不相同的,例如左手螺旋与 E_L 有更强的相互作用,因而对 E_L 和 E_R 的吸收也不相同。由于手性物质对 E_L 和 E_R 这两种光的吸收(振幅减小)不同,便使左、右圆偏振光叠合成椭圆偏振光 (elliptically polarized light),见图 5-5A。这种光学效应称圆二色性。若用 ϵ_L 和 ϵ_R 分别表示手性物质对 E_L 和 E_R 光吸收的摩尔吸收系数,则 $\Delta\epsilon = \epsilon_R - \epsilon_L$ 为圆二色性。圆二色性也用摩尔椭圆率 (molar ellipticity) $[\theta]_\lambda$ 表示, $\Delta\epsilon$ 和 $[\theta]_\lambda$ 的关系为:

$$[\theta]_\lambda = \frac{\theta_\lambda}{cl} \times 100 = 3300\Delta\epsilon$$

式中椭圆率 $\theta = \arctan(\text{短轴}/\text{长轴}) \approx \tan \theta \approx 33cl\Delta\epsilon$ (对于小的 θ 来说)(图 5-5), c = 摩尔浓度、 l = 光程厚度(cm)。 $[\theta]_\lambda$ 的单位为度·厘米²/分摩尔 (deg·cm²/dmol)。注意, $\Delta\epsilon$ 可以是正值或负值,所以 CD 光谱与一般的吸收光谱不同,在这里正和负值都是允许的。

图 5-6 示出 α 螺旋, β 折叠片和无规卷曲 (random coil) 构象的多肽圆二色性光谱。蛋白质的远红

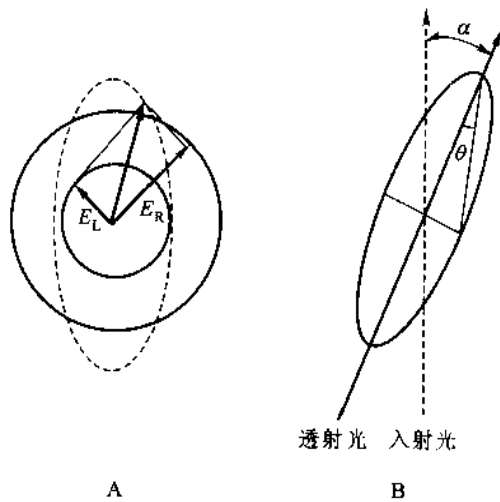


图 5-5 椭圆偏振和椭圆率

A. 当 $E_L \neq E_R$ 时, 左、右圆偏振光叠合成椭圆偏振光。虚线椭圆是椭圆偏振光 E 矢量的运动轨迹; 两个实线圆分别是圆偏振光 E_L 和 E_R 矢量的运动轨迹; B. θ 是椭圆率, α 是旋光度(对一般的光学活性物质, 圆二色性和旋光现象同时发生)

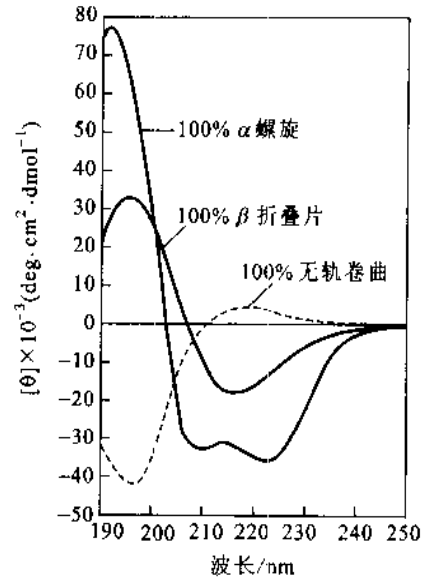


图 5-6 多聚 L-赖氨酸在不同构象条件下的标准远紫外 CD 光谱

外 CD 光谱反映主链构象。典型的 α 螺旋在 208 nm 和 222 nm 左右有两个负槽, 在 192 nm 有一个正峰。 β 折叠片也出现 190 nm 附近的正峰, 并位于 215 nm 的负槽。相反, 无规卷曲在 199 nm 处有一个负槽(图 5-6)。

圆二色性还能用于估算蛋白质中 α 螺旋、 β 折叠片和无规卷曲的含量。假设蛋白质分子全由这 3 种构象单元组成, 它们所含的残基数占蛋白质分子的总残基数的百分数分别为 f_α 、 f_β 和 f_R , 则

$$f_\alpha + f_\beta + f_R = 1 \quad (1)$$

再假设蛋白质分子中的各种构象单元在波长处的椭圆率也可以加和, 则

$$[\theta]_\lambda = f_\alpha [\theta]_{\alpha, \lambda} + f_\beta [\theta]_{\beta, \lambda} + f_R [\theta]_{R, \lambda} \quad (2)$$

式中 $[\theta]_\lambda$ 为实验样品 CD 曲线在波长 λ 处的摩尔椭圆率; $[\theta]_{\alpha, \lambda}$ 、 $[\theta]_{\beta, \lambda}$ 和 $[\theta]_{R, \lambda}$ 分别为 100% α 螺旋、100% β 折叠片和 100% 无规卷曲构象在波长 λ 处的摩尔椭圆率, 这些数据可由人工合成的多聚氨基酸获得(图 5-6)。因此利用公式(2), 理论上只要选择 3 个不同波长的 $[\theta]$, 即可得到一组三元一次方程, 并由此解出未知数 f_α 、 f_β 和 f_R , 现在实际上都是用现成的程序在计算机上完成的。

4. 核磁共振(NMR)

NMR 的基本原理已在第 3 章氨基酸的光谱性质部分介绍。

样品中由射频脉冲诱导的瞬时磁化将随时间衰减, 并弛豫至平衡态。弛豫过程给出丰富的有关大分子结构和动态信息, 因为弛豫过程对分子的几何学和运动都很敏感。特别的启示是核奥氏效应 (nuclear Overhauser effect, NOE), 这是原子核间的一种偶极-偶极相互作用, 其大小与核间距离的 6 次方成反比。如果核间距离小于 0.5 nm (图 5-7A), 磁化将从激发核转移到非激发核。二维核奥氏增强波谱法 (NOESY) 的波谱能够图解式地展示挨近的质子对。NOESY 谱的对角线相当于 1D NMR (化学位移) 谱。对角线以外的峰称交叉峰, 它代表距离不超过 0.5 nm, 有 NOE 联系的质子对。NOESY 谱中的重叠峰一般只要获得经 ^{15}N 和 ^{13}C 标记的蛋白质的 NMR 谱, 则可分辨开来。照射这样的原子核可以沿第三轴把 NOE 重叠峰分开, 这就是所谓多维 NMR 谱。蛋白质的三维结构根据大量的这种邻近关系可以重建。

NMR 和 X 射线晶体学是能够在原子水平上揭示蛋白质和其他生物分子三维结构的仅有的两种技术。X 射线方法能给出高分辨率的图像, 但需要晶体, 而 NMR 方法能研究溶液中的蛋白质结构, 只要提供高浓度的溶液(对一个 15×10^3 蛋白质约 15 mg/ml)。而且 NMR 谱还能提供大量有关动态的信息。实

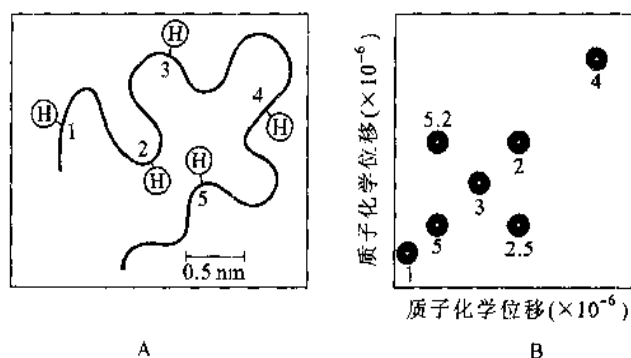


图 5-7 核奥氏效应(NOE)鉴定挨近的质子对

A. 标明 5 个特定质子的一个多肽链的图解, 质子 2 和质子 5 挨得很近(距离 ~ 0.4 nm), 其他质子相距较远; B. 简化的 NOESY 谱: 对角线示出 5 个峰, 对应于 A 中的 5 个质子。对角线上面的峰和下面对称位置的峰显示质子 2 与质子 5 接近

践证明, 用这两种方法测得的三维结构非常接近。因此 NMR 和 X 射线技术在研究结构方面彼此可以很好地互补。

除上述几种方法之外, 还有一些方法用于研究溶液中的蛋白质构象, 如重氢交换可以测定蛋白质中 α 螺旋的含量。拉曼光谱 (Raman Spectroscopy) 用于研究主链构象, 光散射 (light scattering) 可获得生物大分子的许多重要信息。

二、稳定蛋白质三维结构的作用力

稳定蛋白质三维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、疏水作用和盐键(离子键)。这些弱的相互作用也是稳定核酸构象、生物膜结构的作用力, 因此把标题扩大为“稳定生物系统结构的作用力”也不过分。此外共价二硫键在稳定某些蛋白质的构象方面也起着重要作用(图 5-8)。稳定蛋白质三维结构的几种键的键能见表 5-1。

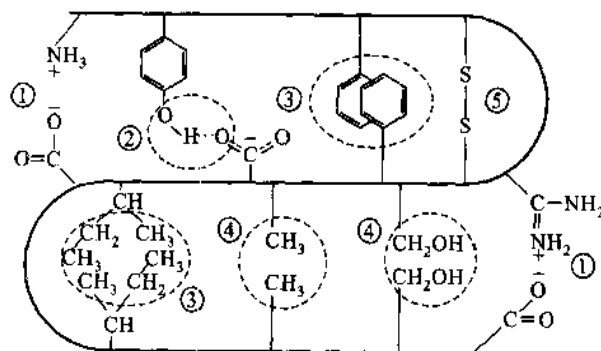


图 5-8 稳定蛋白质三维结构的各种作用力

① 盐键; ② 氢键; ③ 疏水作用; ④ 范德华力; ⑤ 二硫键

表 5-1 蛋白质中存在的几种键的键能

键	键能 ^a /(kJ·mol ⁻¹)
氢键	13~30
范德华力	4~8
疏水作用	12~20 ^b
盐键	12~30
二硫键	210

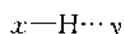
a. 键能是指断裂该键所需的自由能。

b. 此数值表示在 25℃ 非极性侧链从蛋白质内部转移到水介质中所需的自由能。它与其他键的键能不同, 此数值在一定温度范围内随温度升高而增加。实际上它并不是键能, 此能量的大部分并不用于伸展过程中键的断裂。

(一) 氢键

氢键(hydrogen bond)在稳定蛋白质的结构中起着极其重要的作用。后面我们将要讨论多肽主链上的羰基氧和酰胺氢之间形成的氢键,它们是稳定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 具有很大的偶极矩,成键电子云分布偏向负电性大的原子,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 折叠片),与此同时保持大多数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(范德华相互作用)

广义的范德华力(van der Waals force)包括3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静电相互作用。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—种范德华力即狭义的范德华力,也称为 London 分散力,通常范德华力就指这种作用力。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。狭义范德华力是一种很弱的作用力,而且随非共价键合原子或分子间距离(R)的6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5-2。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效应和位相效应(当分子或基团相同时,其瞬时偶极矩同位相,从而产生最大的相互作用),因此就成为一种不可忽视的作用力。

表5-2 几种生物学上重要原子的范德华半径和共价键半径

原子	范德华半径/nm	共价键半径/nm
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) 疏水作用(熵效应)

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作用(hydrophobic interaction)或疏水效应,也曾不正确地称为疏水键。它在稳定蛋白质的三维结构方面占有突出的地位。疏水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加(熵变化 ΔS 为正值)是疏水作用的主要动力。看来熵增加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)本身是有序化的过程,造成熵减少。为进一步了解熵增加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4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(中心分子)与邻近水分子形成4个氢键(图5-9)。冰中氧-氧之间的平均距离是0.276 nm。液态水中,0℃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℃)。液态水和冰之间氢键的数量差别不大,但是液态水中每个氢键的半寿期只有 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ s。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,也不同于蒸汽的结构特点。当疏水化合

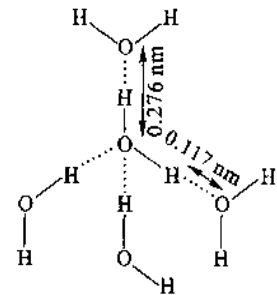


图5-9 冰中水分子的四面体氢键

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5-10)这种结构被认为比冰结构更加有序化。与此相反的过程(疏水作用),排列有序的水分子(笼形结构)将被破坏,这部分水分子被排入自由水中,这样水的混乱度增加,即熵增加,因此疏水作用是熵驱动的自发过程。

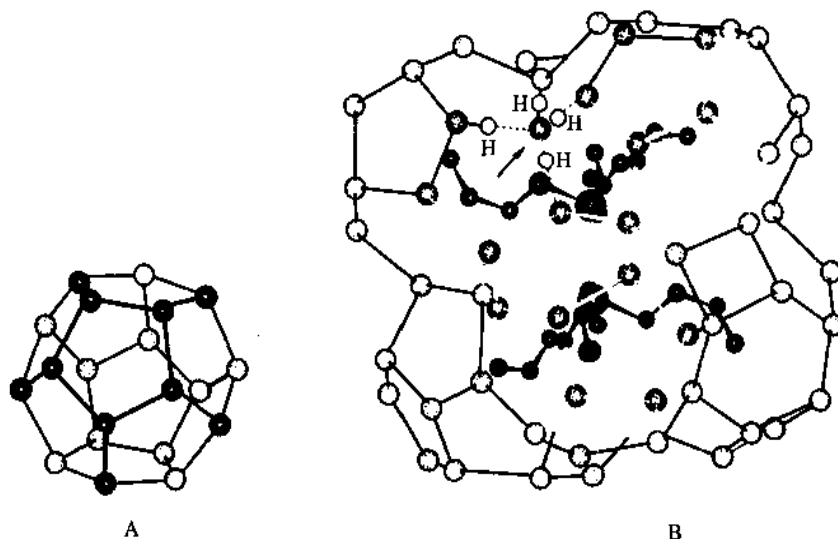


图5-10 笼形结构

A. 水分子组成的五角形十二面体笼形结构,中央是直径为0.5 nm的空腔,此十二面体是笼形化合物中常见的构件;B. $(C_4H_9)_3S^+F^- \cdot 23H_2O$ 的笼形结构的一部分,三丁烷基硫离子(以深色示出),窝藏在氢键连接的水分子网内,在完整的网上每个水分子氧与其他水分子形成四面体氢键(图中箭头所示)

疏水作用在生理温度范围内随温度升高而加强(方程 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 中, T 的升高与熵增加具有相

同的效果),但超过一定温度后(50~60℃,因侧链而异),又趋减弱。因为超过这个温度,疏水基团周围的水分子有序度降低(ΔS 正值减小),因而有利于疏水基团进入水中。非极性溶剂、去污剂是破坏疏水作用的试剂,因此是变性剂。尿素和盐酸胍既能破坏氢键,又能破坏疏水作用,因此是强变性剂。

(四) 盐键

盐键又称盐桥或离子键,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($Q_1 Q_2$)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:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon R^2}$$

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。但是偶尔也有少数带相反电荷的侧链在分子的疏水内部形成盐键。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 RNA 酶复性实验(图 5-49)中将看到,在二硫键形成之前蛋白质分子已采取了它特有的三维结构。二硫键的形成并不规定多肽链的折叠。然而一旦蛋白质采取了它的三维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、多肽主链折叠的空间限制

(一) 酰胺平面与 α -碳原子的二面角(ϕ 和 ψ)

在第 4 章讲过,肽键是一个共振杂化体(图 4-2)。共振的后果是肽键具有部分双键性质,不能绕键自由旋转;主链肽基成为刚性平面,称酰胺平面,平面内 $C=O$ 与 $N-H$ 呈反式排列,各原子间有固定的键角和键长(图 4-3)。如图 5-11 所示,肽链主链上只有 α -碳原子连接的两个键, $C_\alpha-N$ 和 $C_\alpha-C$,是纯的单键,能自由旋转; α -碳是两个相邻酰胺平面的连接点,酰胺平面虽然是刚性的,但酰胺平面之间的位置可以任意取向。绕 $C_\alpha-N$ 键轴旋转的二面角($C-N-C_\alpha-C$)称为 ϕ ,绕 $C_\alpha-C$ 键轴旋转的二面角($N-C_\alpha-C-N$)称 ψ 。原则上 ϕ 和 ψ 可以取 $-180^\circ \sim +180^\circ$ 之间的任一值。这样多肽链主链的各种可能构象都可用 ϕ 和 ψ 这两个二面角(dihedral angle)或扭角(torsion angle)来描述。二面角定义为在 $A-B-C-D$ 四原子依次连接的系统中,含 A,B,C 的平面和含 B,C,D 的平面之间的夹角。主链上还有绕肽键($C-N$)轴旋转的二面角($C_\alpha-C-N-C_\alpha$)称为 ω 角,但由于肽单位平面性的限制, ω 角只能是 180° (反式)或 0° (顺式)。

当 ϕ 或 ψ 旋转键所在酰胺平面的取向二等分 $H-C_\alpha-R$ (侧链)平面,且该旋转键两侧的主链处于顺式构型时,规定 $\phi = 0^\circ$ 或 $\psi = 0^\circ$ (图 5-12)。从 C_α 沿键轴方向观察,顺时针旋转的 ϕ 和 ψ 角度为正值(+),

逆时针旋转的为负值(-)。

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 5-11)。然而当 ϕ 和 ψ 同时等于 0° 时的构象(图 5-12)实际上并不能存在, 因为两个相邻肽单位上的酰胺基 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)。虽然理论上 C_{α} 原子的两个单键 ($C_{\alpha}-N$ 和 $C_{\alpha}-C$) 可以在 $-180^\circ \sim +180^\circ$ 范围内自由旋转, 但因空间位阻的存在, 实际上不是任意二面角 (ϕ, ψ) 所决定的肽链构象都是立体化学所允许的, 例如, 刚讲过的 ϕ 和 ψ 同时等于 0° 的那种构象就不存在。二面角 (ϕ, ψ) 所规定的构象能否存在, 主要取决于两个相邻肽单位中非共价键合原子 (non-covalently-bonded atom) 之间的接近有无阻碍。

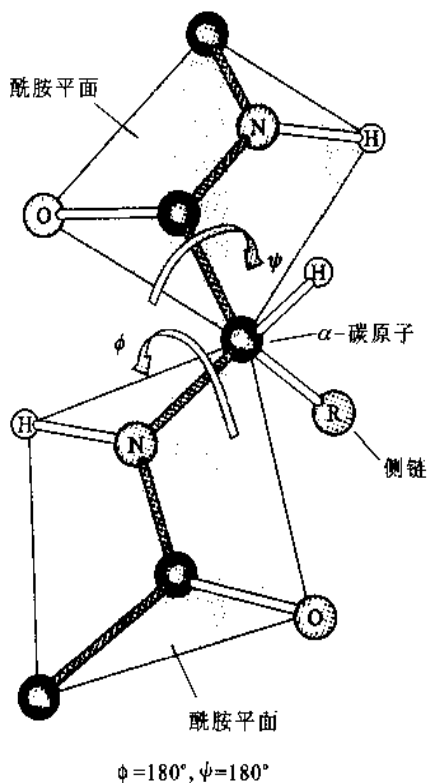


图 5-11 完全伸展的主链构象

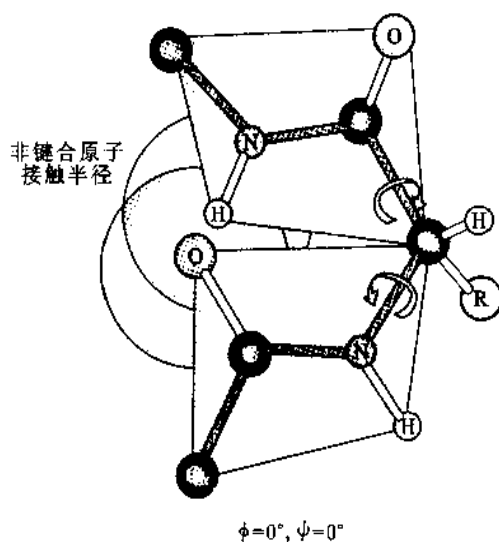


图 5-12 $\phi = 0^\circ$ 和 $\psi = 0^\circ$ 时的主链构象

(二) 可允许的 ϕ 和 ψ 值: 拉氏构象图

印度学者 Ramachandran G N 及其同事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, 根据原子的范德华半径确定了非共价键合原子之间的最小接触距离 (允许距离) (表 5-3)。并根据非共价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 $\phi-\psi$ 图上标出。此图称拉氏构象图或拉氏图 (Ramachandran plot) (图 5-13)。图上的一个点对应于一对二面角 (ϕ, ψ), 代表一个 C_{α} 的两个相邻肽基单位的构象。如果将一个蛋白质多肽链上的所有 C_{α} 的成对二面角 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拉氏图上。拉氏图不仅对蛋白质的构象研究起到了简化作用, 而且对于判断所得蛋白质结构模型的正误也有重要意义。运用拉氏图进行研究也发现, 肽链的折叠具有相当大的局限性, 在 $\phi-\psi$ 图上只取有限范围的值。图 5-13 中阴影部分用白线封闭的区域是允许区。这个区域内的任何成对二面角 (ϕ, ψ) 所规定的构象都是立体化学所允许的。因为在构象中, 非共价键合原子间的距离 \geq 最小接触距离, 两者无斥力, 构象能量最低, 所以构象是稳定的。例如平行 ($\uparrow\uparrow$) 和反平行 ($\uparrow\downarrow$) β 折叠片, 胶原蛋白三股螺旋 (C) 和右手 α 螺旋 (α) 都位于允许区内。阴影部分的其他区域为不完全允许区 (临界限制区)。这个区域内的任何二面角 (ϕ, ψ) 所规定的主链构象虽是主体化学可允许的, 但不够稳定, 因为在此构

表 5-3 蛋白质中非共价键合原子之间的最小接触距离(nm)

	C	N	O	H
C	0.320 ^a (0.300)	0.290 (0.280)	0.280 (0.270)	0.240 (0.220)
N		0.270 (0.260)	0.270 (0.260)	0.240 (0.220)
O			0.270 (0.260)	0.240 (0.220)
H				0.200 (0.190)

a. 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。

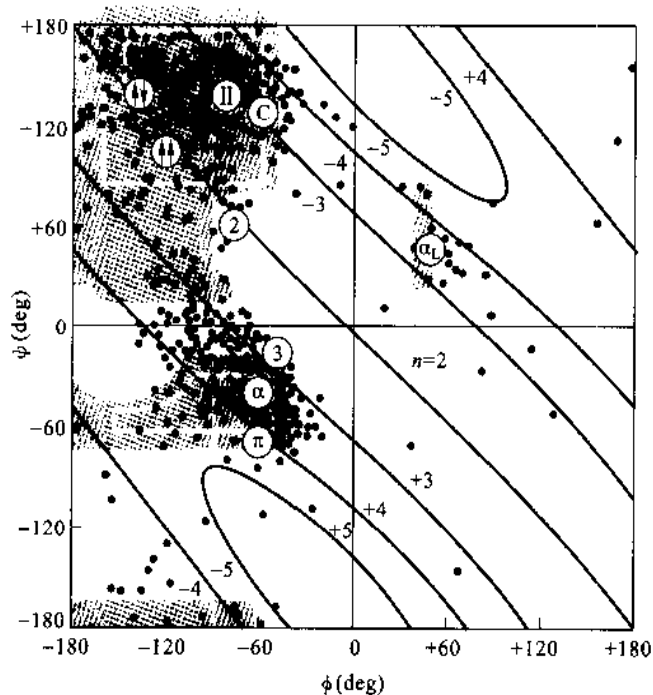


图 5-13 拉氏构象图

图中①和②分别为反平行和平行 β 折叠片,③为扭型 β 折叠片(平行或反平行),④为胶原蛋白的三股螺旋,⑤为二重带(twofold ribbon),⑥为 3_{10} 螺旋,⑦为右手 α 螺旋,⑧为 4.4_{16} 螺旋。跨图的等值线(从+5到2,从-5到-3)是指每一螺旋所含的氨基酸残基数(n);“+”号为右手螺旋,“-”号为左手螺旋; $n=2$ 的结构是无手性的

象中非共价键合原子之间的距离小于允许距离,但仍大于极限距离(比允许距离小 $0.1\sim 0.2\text{\AA}$)。阴影外的区域是不允许区。该区域内的任何二面角(ϕ, ψ)所规定的主链构象都是主体化学所不允许的,因为在此构象中非共价键合原子间的距离小于极限距离,斥力很大,构象能量很高,因此这种构象极不稳定,不能存在,例如 $\phi=180^\circ, \psi=0^\circ$ 的构象和 $\phi=0^\circ, \psi=180^\circ$ 的构象。上面所说的允许区和不完全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,对非甘氨酸残基的允许区,只占全平面的7.7%;对最大允许区(允许区加不完全允许区)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5-13中的黑点是对8种蛋白质近1000个非甘氨酸残基实验测得的二面角 ϕ 和 ψ 值,可以清楚地看到肽链主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。

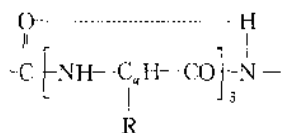
四、二级结构:多肽链折叠的规则方式

一般认为,驱动蛋白质折叠的主要动力是熵效应。折叠的结果是疏水基团埋藏在蛋白质分子内部,亲水基团暴露在分子表面。在形成分子疏水核心的同时,必然有一部分主链也被埋在里面。由于主链本身是高度亲水的,这样就产生矛盾。只有处于分子内部的主链极性基团(C=O, N-H)也被氢键中和,矛盾才能解决(分子表面的主链极性基团与溶剂水形成氢键)。正是在这种能量平衡中,蛋白质主链的折叠产生由氢键维系的有规则的构象,称为二级结构。因为主链肽键上的 C=O 和 N-H 是沿多肽主链有规则排列的,所以在主链内和主链间常出现周期性的氢键相互作用(C=O \cdots H-N)。下面介绍几种常见的二级结构元件(secondary structure element): α 螺旋、 β 折叠片、 β 转角和无规卷曲等。

(一) α 螺旋

1. α 螺旋的结构

α 螺旋(α -helix)是蛋白质中最常见、最典型、含量最丰富的二级结构元件。早在 1950 年 L. Pauling 等人就根据从小肽晶体结构中测得的多肽标准参数(图 4-3),预测出能够稳定存在的 α 螺旋结构,并很快由实验得到证实。 α 螺旋是一种重复性结构,螺旋中每个 α -碳的 ϕ 和 ψ 分别在 -57° 和 -47° 附近,每圈螺旋占 3.6 个氨基酸残基(即图 5-13 中的 n 数),沿螺旋轴方向上升 0.54 nm,称为移动距离或螺距(pitch)。每个残基绕轴旋转 100° ,沿轴上升 0.15 nm(图 5-14A)。残基的侧链伸向外侧。如果侧链不计在内,螺旋的直径约为 0.5 nm。相邻螺圈之间形成氢键,氢键的取向几乎与螺旋轴平行。从 N-末端出发,氢键是由每个肽基的 C=O 与其前面第 3 个肽基的 N-H 之间形成的。由氢键封闭的环是 13 元环:



因此 α 螺旋也称 3.6_{13} -螺旋。

2. α 螺旋的偶极矩和帽化

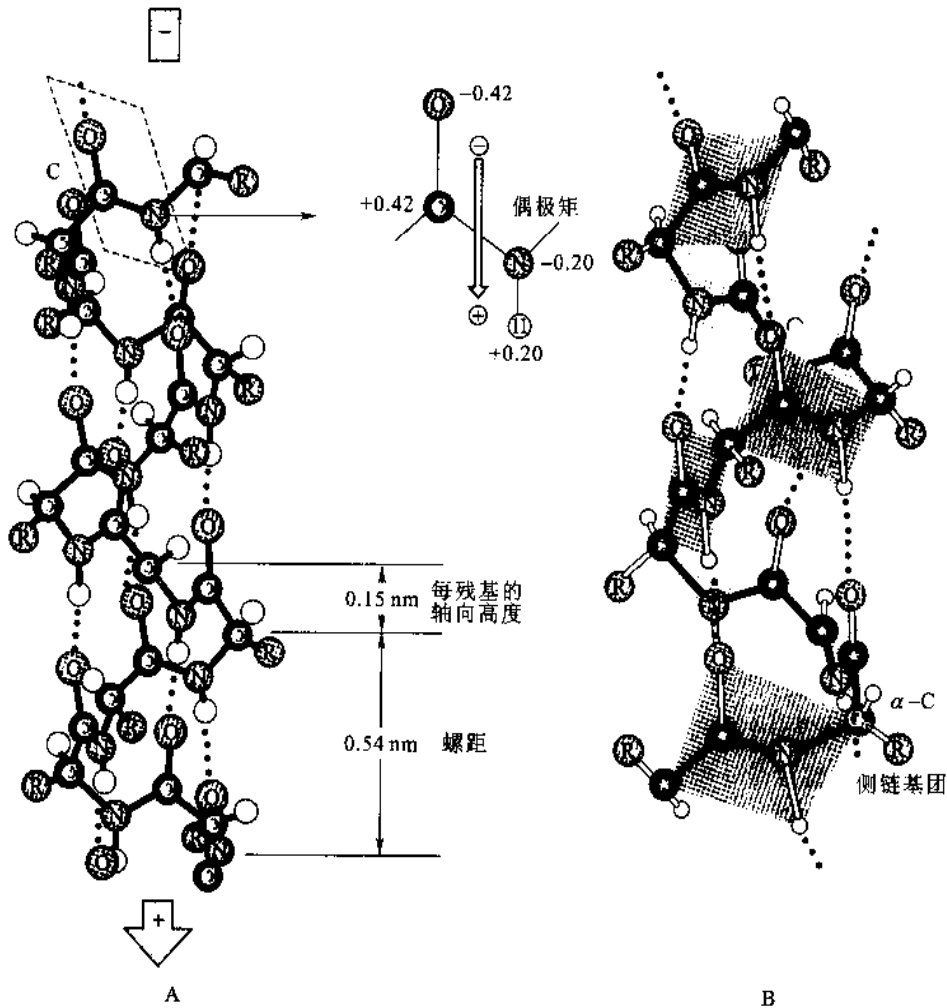
如图 5-14A 所示, α 螺旋中所有氢键都沿螺旋轴指向同一方向。每一肽键具有由 N-H 和 C=O 的极性产生的偶极矩。因为这些基团都是沿螺旋轴排列,所以总的效果是 α 螺旋本身也是一个偶极矩,相当于在 N-末端积累了部分正电荷,在 C-末端积累了部分负电荷。在 α 螺旋的 N-末端附近常有带负电荷的配基(例如磷酸基)与蛋白质结合。然而很少发现带负电荷的配基与 α 螺旋的 C-末端结合。

一个 12(或 n)个残基的典型 α 螺旋含 8(或 $n-4$)个氢键。螺旋的头 4 个酰胺氢和最后 4 个羰基氧不参与螺旋氢键的形成。此外在螺旋末端附近的非极性残基可暴露于溶剂。蛋白质经常通过螺旋帽化(helix capping)给予补偿。所谓帽化就是给末端裸露的 N-H 和 C=O 提供氢键配偶体(partner),并折叠蛋白质的其他部分以促成与末端暴露的非极性残基的疏水作用。

3. α 螺旋的手性*

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。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

* 确定螺旋结构手性的简单方法:用右手握住螺旋,伸直大拇指,紧靠螺旋,指向你的前方,如果此时螺旋按其他 4 个指头弯曲的方向(顺时针)旋转,螺旋将沿大拇指所指的方向前进,则结构为右手螺旋;如果用左手重复此操作,螺旋将逆时针旋转向前,则为左手螺旋。

图 5-14 α -螺旋结构

A. 示出螺旋参数和偶极矩; B. 螺旋可看成是以 α -碳为铰点的肽平面堆叠排列而成, 肽平面大体平行于螺旋轴

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。

α 螺旋是手性结构, 具有旋光能力。但 α 螺旋的比旋并不等于构成自身的氨基酸比旋的简单加和, 而无规卷曲的比旋与这种加和相等。事实上 α 螺旋的旋光性是 α 碳原子的构型不对称性和 α 螺旋的构象不对称性的总反映。应用旋光色散 (optical rotatory dispersion, ORD) 光谱 (测定作为波长函数的旋光能力的技术), 特别是圆二色性 (CD) 光谱可以研究蛋白质的二级结构。

α 螺旋是有规则的构象, 在折叠形成螺旋时具有协同性 (cooperativity)。一旦形成了一圈 α 螺旋, 随后逐个残基的加入变得容易而快速, 这是因为第一个螺圈成为相继螺圈形成的模板。

4. 影响 α 螺旋形成的因素

一条肽链能否形成 α 螺旋, 以及形成的螺旋是否稳定, 与它的氨基酸组成和序列有极大的关系。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 pH 7 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 pH 7 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 pH 12 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 5-15)。

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酰胺氢,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)。

5. 其他类型的螺旋

在蛋白质中还发现几种不常见的其他类型螺旋(图 5-16)。其中最常见的是 3_{10} -螺旋,每螺圈残基数(n)为 3.0,每个肽基的 $C=O$ 与其前面的第 2 个肽基的 $N-H$ 形成氢键,构成 10 员环,每残基高度 0.2 nm,螺距 0.6 nm,螺旋直径约为 0.4 nm。 ϕ 和 ψ 值分别在 -49° 和 -26° 左右。 3_{10} -螺旋比 α 螺旋紧密。由于 n 为整数(3.0),相邻螺圈中的 α -碳在一条直线上。由于 3_{10} -螺旋中的氢键几何结构及非键合相互作用并不处于最佳状态,在蛋白质结构中一般很短,通常作为 α 螺旋末端的最后一圈存在。其他螺旋结构包括 π 螺旋和 2_7 -二重带。 π 螺旋也称 $4,4_{15}$ -螺旋, $n=4.4$,残基高度 0.12 nm,螺距 0.52 nm,螺旋直径约为 0.6 nm。每个肽基的 $C=O$ 与其前面第 4 个肽基的 $N-H$ 形成氢键,并构成 16 元环。 π 螺旋不稳定,在蛋白质中极少存在。

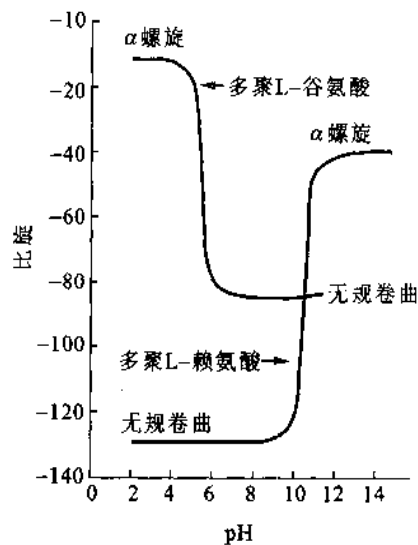


图 5-15 pH 对多聚 L-谷氨酸和多聚 L-赖氨酸在 α 螺旋和无规卷曲之间构象互变的影响

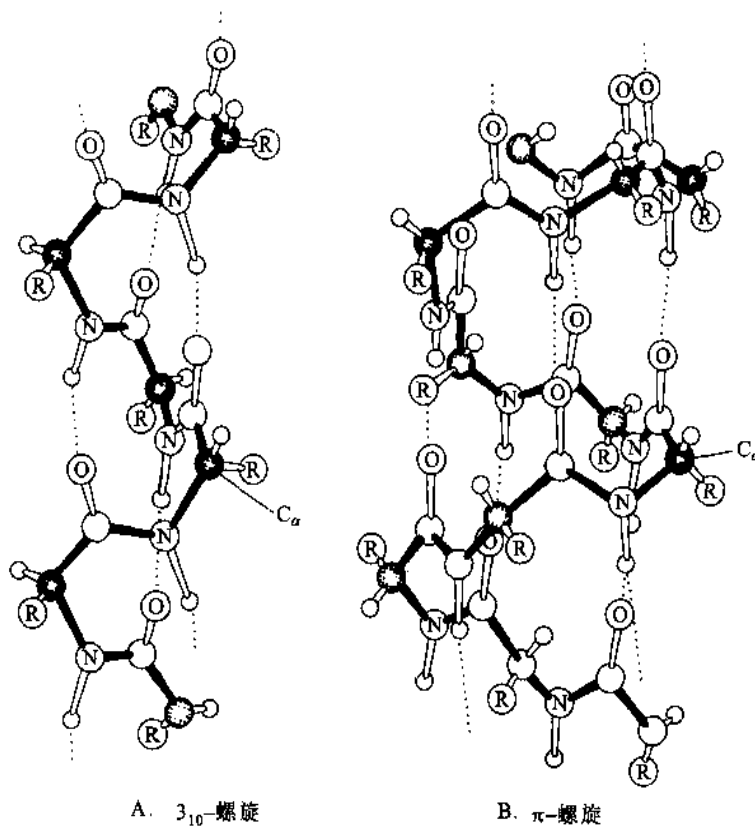


图 5-16 多肽链的其他两种类型的螺旋结构

(二) β 折叠片

由于局部的协同性氢键形成,蛋白质中还存在其他类型的常见二级结构,称 β 折叠片(β -pleated sheet)或 β 结构或 β 构象。此结构也是在 1951 年由 Pauling 等人首先提出来,现在已知在许多蛋白质中存

在。β 折叠片也是一种重复性的结构,可以把它想象为由折叠的条状纸片侧向并排而成(图 5-17),每条纸片可看成是一条肽链,在这里肽主链沿纸条形成锯齿状(zigzag),α-碳原子位于折叠线上。注意,在折叠片上的侧链都垂直于折叠片的平面,并交替地从平面上下二侧伸出。折叠片可以有两种形式,一种是平行式(parallel),另一种是反平行式(antiparallel),在平行β 折叠片中,相邻肽链是同向的(都是 N→C 或 C→N),在反平行β 折叠片中,相邻肽链是反向的(图 5-18)。

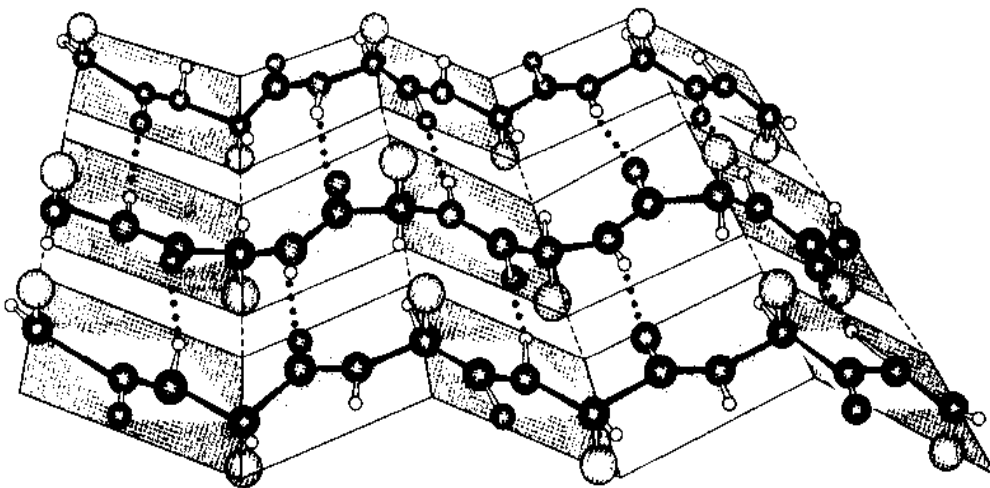


图 5-17 在纸“折叠片”上画出的反平行β 折叠片

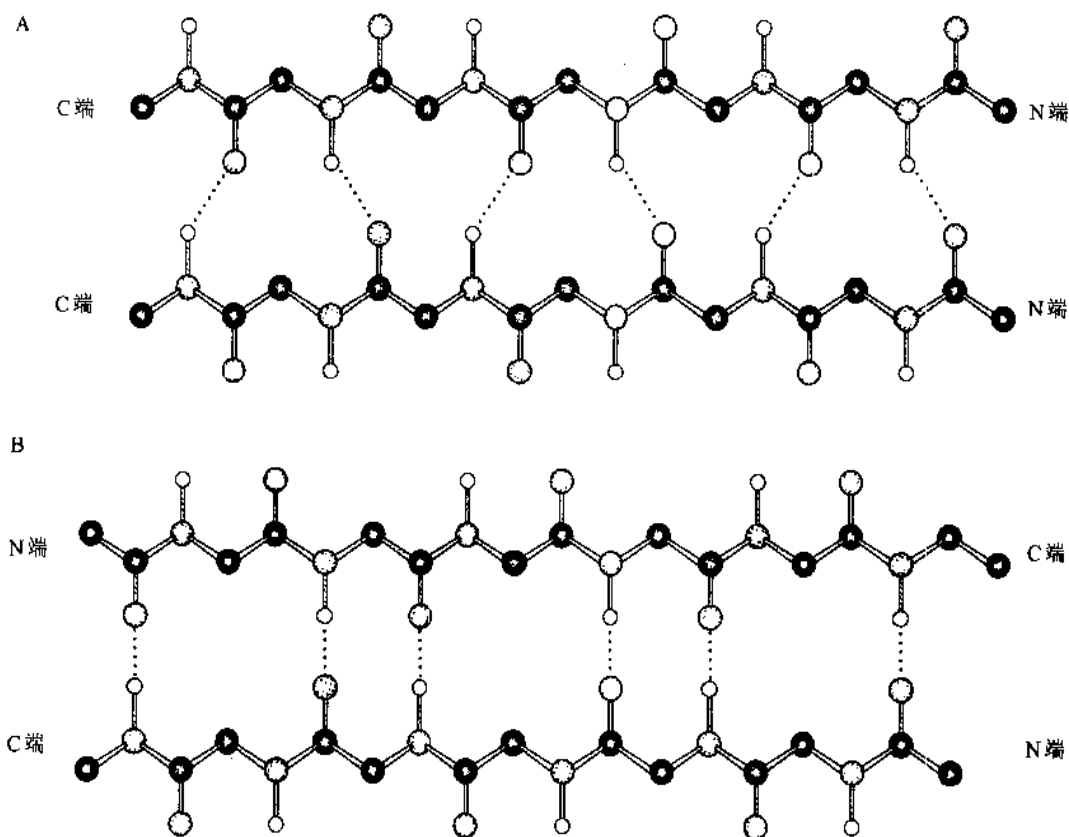


图 5-18 在平行(A)和反平行(B)β 折叠片中氢键的排列(图中未示出侧链)

β 折叠片中每条肽链称为β 折叠股或β 股(β-strand),它可设想为一个二重螺旋(twofold helix)或二重带,每螺圈含 2 个残基。由于α-碳原子的四面体性质,连续的酰胺平面排列成折叠形式。在此结构

中氢键主要是在股间 (interstrand) 而不是股内 (intrastrand) 形成。在 β 折叠片中肽主链处于最伸展的构象 (有时称为 ϵ 构象)。在平行折叠片中处于最适 H 键形成时,其伸展构象略小于反平行折叠片中的构象。因此在平行折叠片中形成的氢键有明显的弯折。反平行折叠片中重复周期 (肽链同侧两个相邻的同一基团之间的距离) 为 0.7 nm, 而平行折叠片中为 0.65 nm。图 5-18 示出平行和反平行 β 折叠片的结构。

平行 β 折叠片比反平行 β 折叠片更规则。平行式中 α -碳的 ϕ 和 ψ 值 (分别为 -119° 和 $+113^\circ$ 左右) 比反平行式中的 (分别为 -139° 和 $+135^\circ$ 左右) 小很多。平行折叠片一般是大结构。少于 5 个 β 股的很少见。然而反平行折叠片可以少到仅由两个 β 股组成。平行 β 折叠片中疏水侧链分布在折叠片平面的两侧。而反平行 β 折叠片中通常所有的疏水侧链都排列在折叠片的一侧。当然这就要求在参与反平行 β 折叠片的多肽序列中亲水残基和疏水残基交替排列, 因为交替的侧链伸向折叠片的同一侧。

在纤维状蛋白质中 β 折叠片主要是反平行式的, 而球状蛋白质中反平行和平行两种方式几乎同样广泛地存在。在纤维状蛋白质中, β 折叠片氢键主要是在不同肽链之间形成, 而球状蛋白质中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肽段 (β 股) 之间形成。

(三) β 转角和 β 凸起

自然界的蛋白质大多数是球状蛋白质。因此多肽链必须具有弯曲、回折和重新定向的能力, 以便生成结实、球状的结构。在很多蛋白质中观察到一种简单的二级结构元件, 称 β 转角 (β -turn), 或 β 弯曲 (β -bend) 或发夹结构 (hairpin structure), 这是一种非重复性结构。在 β 转角中第一个残基的 C=O 与第四个残基的 N-H 氢键键合, 形成一个紧密的环, 使 β 转角成为比较稳定的结构。如图 5-19 所示, β 转角能允许蛋白质倒转肽链的方向。图中示出 β 转角的两种主要类型, 它们之间的差别只是中央肽基旋转了 180° 。此外尚有若干种不太常见的类型也在蛋白质中发现。某些氨基酸如脯氨酸和甘氨酸经常在 β 转角序列中存在, 并且 β 转角的特定构象在一定程度上取决于它的组成氨基酸。由于甘氨酸缺少侧链 (只有一个 H), 在 β 转角中能很好地调整其他残基的空间阻碍, 因此是立体化学上最合适的氨基酸, 而脯氨酸具有环状结构和固定的 ϕ 角, 因此在一定程度上迫使 β 转角形成, 促进多肽链自身回折。这些回折有助于反平行 β 折叠片的形成。

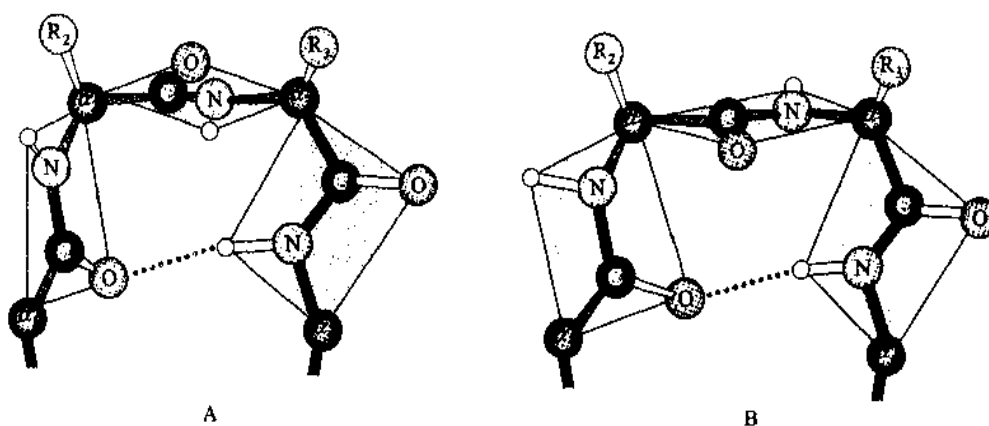


图 5-19 两种主要类型的 β 转角

目前发现的 β 转角多数都处在蛋白质分子的表面, 在这里改变多肽链方向的阻力比较小。 β 转角在球状蛋白质中的含量是相当丰富的, 约占全部残基的四分之一。 β 转角的构象是由第二残基 α -碳 (图 5-19 中 α_2) 和第三残基 α -碳 (α_3) 的二面角所规定的。

β 凸起 (β -buckle) 是一种小片的非重复性结构, 能单独存在, 但大多数经常作为反平行 β 折叠片中的一种不规则情况而存在。 β 凸起可认为是 β 折叠股中额外插入的一个残基, 它使得在两个正常氢键之间、在凸起折叠股上是两个残基, 而另一侧的正常股上是一个残基。图 5-20 示出一种典型的 β 凸起。造成凸起股主链额外伸长的额外残基之所以被规则的氢键网所容纳, 部分原因是凸起股产生微小弯曲。因

此 β 凸起可引起多肽链方向的改变,但改变的程度不如 β 转角。蛋白质结构中各种形式的 β 凸起已知有 100 多例。

至此所描述的二级结构单元都是在天然蛋白质中常见的。实际上,很难找到不含一种或几种这样的结构。 α 螺旋、 β 折叠片和 β 转角所提供的能量上的(主要是 H-键)稳定性对蛋白质是很重要的,蛋白质都尽一切可能地抓住机会形成这些结构。

(四) 无规卷曲

无规卷曲 (random coil) 或称卷曲 (coil) (图 5-42),它泛指那些不能被归入明确的二级结构如折叠片或螺旋的多肽区段。必须指出卷曲和无规卷曲这两个术语容易引起误解。实际上这些区段大多数既不是卷曲,也不是完全无规的,虽然也存在少数柔性的无序区段,例如在许多蛋白质中 Lys 侧链在 β -碳以外的碳链就是无序的。这些“无规卷曲”也像其他二级结构那样是明确而稳定的结构,否则蛋白质就不可能形成三维空间上每维都具周期性结构的晶体。但是它们受侧链相互作用的影响很大。这类有序的非重复性结构经常构成酶活性部位和其他蛋白质特异的功能部位,例如铁氧还蛋白和红氧还蛋白中结合铁硫串 (iron-sulfur cluster) 的肽环以及许多钙结合蛋白中结合钙离子的 E-F 手结构 (E-F hand structure) 的中央环(见下册第 39 章)。

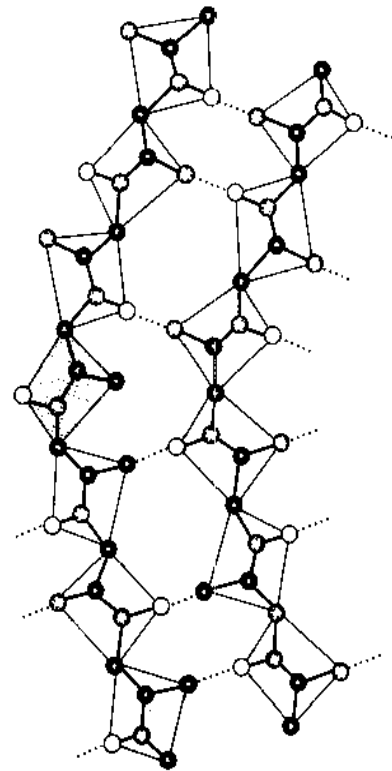


图 5-20 一种典型的 β 凸起

五、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。分子是有规则的线性结构,这与其多肽链的有规则二级结构有关。

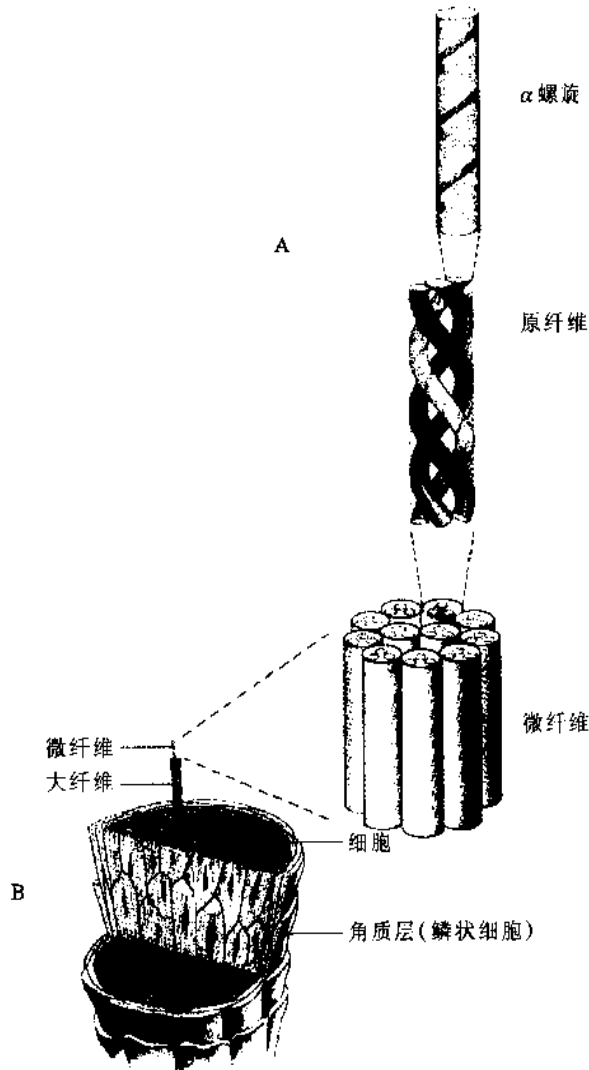
纤维状蛋白质可分为不溶性(硬蛋白)和可溶性两类,前者有角蛋白、胶原蛋白和弹性蛋白等;后者有肌球蛋白和血纤蛋白原(见第 4 章)等,但不包括微管 (microtubule)、肌动蛋白细丝 (actin filament) 和鞭毛 (flagella),它们是球状蛋白质的长向聚集体 (aggregate)。下面主要介绍不溶性纤维状蛋白质。

(一) α -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、喙等。角蛋白是外胚层细胞的结构蛋白质。角蛋白可分为 α -角蛋白和 β -角蛋白两类。

α -角蛋白是毛发中主要蛋白质。 α -角蛋白亚基的氨基酸序列是由富含 α 螺旋的中央棒状区(长度为 311~314 个残基)和两侧的非螺旋区构成。 α 螺旋轴向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° 时的轴向平移距离 (0.15 nm) 相当。 α -角蛋白是 α 螺旋的典型实例。

毛发 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) 的超螺旋结构,直径为 2 nm,原纤维再排列成“9+2”的电缆式结构,称微原纤维 (microfibril),直径为 8 nm (图 5-21)。成百根微原纤维再结合成一不规则的纤维束,称大原纤维 (macrofibril),其直径为 200 nm。它们是毛发的结构元件。

图 5-21 毛发横切面(B)和毛发 α -角蛋白(A)的结构

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 $20\ \mu\text{m}$ 。在这些细胞中, 大原纤维沿纤维轴向排列。所以一根毛发具有高度有序的结构(图 5-21)。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, 一根毛发纤维湿热时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。相邻分子的 α 螺旋是由它们的半胱氨酸残基间的二硫键交联起来的, 一般认为每 4 个螺圈就有一个交联键。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两种类型。蹄、爪、角、甲中的角蛋白是高硫硬角蛋白, 质地硬、不能拉伸。皮肤和胼胝中的角蛋白是低硫软角蛋白, 它的伸缩性比硬角蛋白好。

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 基一般都比较长, 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 -角蛋白的螺旋结构伸展成 β 构象。然后除去还原剂, 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。

(二) 丝心蛋白和其他 β -角蛋白: β 折叠片蛋白质

除了上述的 α -角蛋白充分伸展后可逆地转变为 β -角蛋白(β 构象)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0.7 nm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(0.65 nm周期)。丝心蛋白是典型的反平行 β 折叠片,多肽链取锯齿状折叠构象。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 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。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5-22A)。同一多肽链一侧的两个相邻侧链间距离(重复距离)是0.7 nm;在层

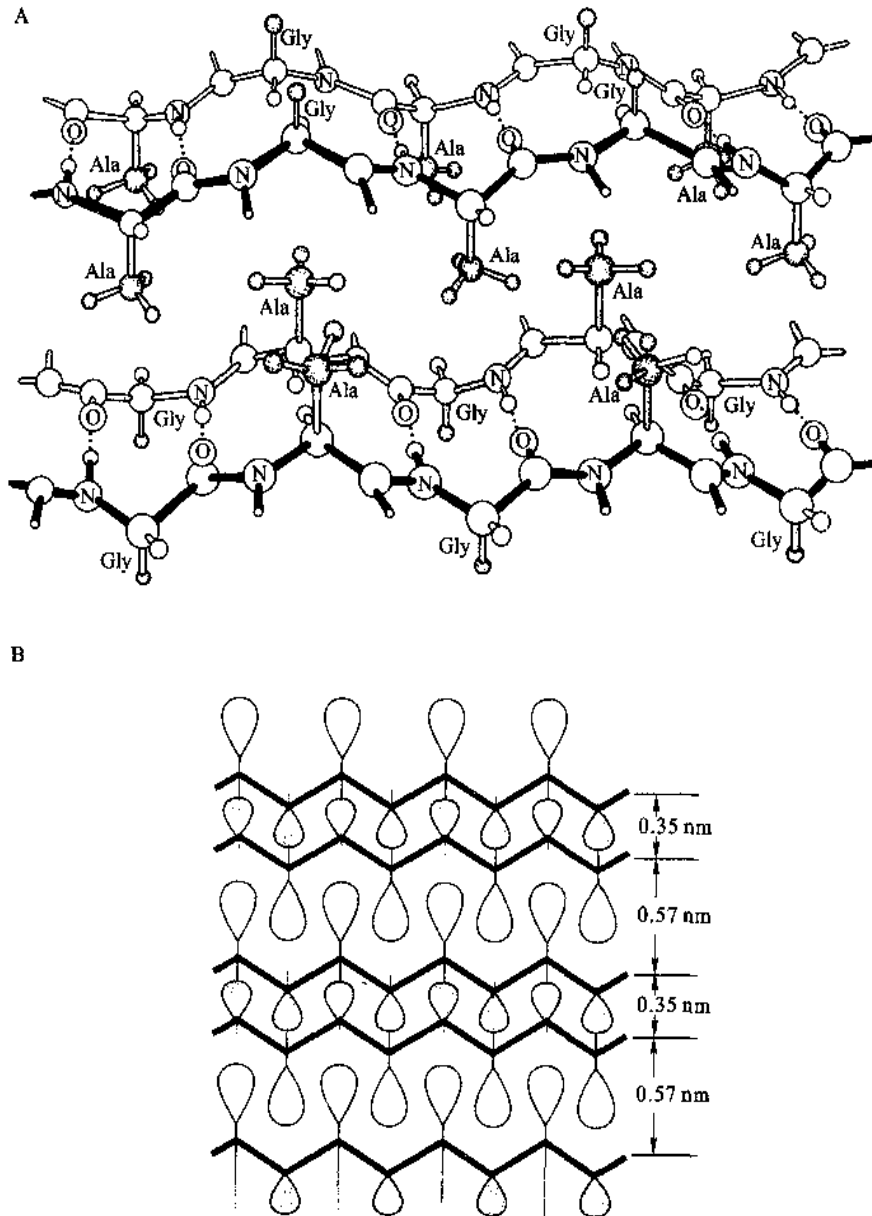


图5-22 丝心蛋白的结构

A. 堆积的 β 折叠片的三维结构; B. 交替层中丙氨酸(或丝氨酸)残基侧链和甘氨酸残基侧链(H原子)的连续

中反平行的链间距离是 0.47 nm。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 0.35 nm 和 0.57 nm(图 5-22B)。结构中相邻的 Gly 片层表面或 Ala (或 Ser)片层表面彼此连锁起来。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,因而使丝具有柔软的特性。但是因为丝心蛋白的肽链已经处于相当伸展的状态,所以不能拉伸。

实际上丝心蛋白分子除上述 3 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替出现。无序区的存在,赋予丝心蛋白以一定的伸展度。

天然的 β -角蛋白除丝心蛋白外,还在大多数的鸟类和爬行动物的羽毛、皮肤、爪、喙和鳞片中发现。这种 β -角蛋白有些类似丝心蛋白,但也有许多改变,以提供不同组织所需的最适物理性能。

(三) 胶原蛋白:一种三股螺旋

1. 胶原蛋白的组织分布与类型

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。它也属结构蛋白质,能使腱、骨、软骨、牙、皮和血管等结缔组织具有机械强度。例如腱胶原蛋白的抗张强度(tensile strength)约为 20~30 kg/mm²,相当于 12 号冷拉钢丝的拉力。骨折、腱和软骨损伤都涉及组织中胶原蛋白基质的撕裂或伸张过度。

胶原蛋白包括多种类型,分别称为 I 型, II 型, III 型等(已标到 XII 型)。I 型是在骨、皮肤、腱和角膜中占优势的胶原蛋白,由两条相同的标为 $\alpha_1(I)$ 的肽链和一条不同的标为 $\alpha_2(I)$ 的肽链构成,即 [$\alpha_1(I)$]₂ $\alpha_2(I)$ 。II 型存在于软骨、椎间盘和玻璃体中。III 型存在于血管、新生皮肤和瘢痕组织中,它们各自由 3 条相同的肽链组成,分别为 [$\alpha_1(III)$]₃ 和 [$\alpha_1(III)$]₃。IV 型参与基底膜组成,分子形式有 [$\alpha_1(IV)$]₂ $\alpha_2(IV)$ 、 $[\alpha_1(IV)]_3$ 和 [$\alpha_2(IV)$]₃。V 型发现于细胞表面和细胞外骨架(exocytoskeleton),它是由 3 条各不相同的肽链组成的, $\alpha_1(V)\alpha_2(V)\alpha_3(V)$ 。这里,希腊字母和阿拉伯数字表示各种类型胶原蛋白(罗马数字表示)的不同肽链。不同类型的胶原蛋白由于氨基酸组成和含糖量不同具有自己特有的物理性能。

2. 胶原蛋白的氨基酸组成

胶原蛋白的氨基酸组成与典型的球状蛋白质有很大的不同(表 4-8)。例如皮肤胶原蛋白(I 型)会有很高量的 Gly(33%)和 Pro(13%),并含有 3 个不常见的氨基酸(图 3-7):4-羟脯氨酸(9%)、3-羟脯氨酸(0.1%)和 5-羟赖氨酸(0.6%)。这些不常见的氨基酸都是在胶原蛋白多肽链合成后由通常的 Pro 和 Lys 修饰而成。修饰是在脯氨酰羟化酶(prolylhydroxylase)或赖氨酰羟化酶(lysylhydroxylase)催化下进行的。这两个酶的许多性质相似,它们都需要分子氧、抗坏血酸(维生素)和 α -酮戊二酸参与,Fe²⁺ 作为酶的辅助因子。因此人缺乏维生素 C 新的胶原蛋白难以合成。

胶原蛋白是糖蛋白,少量糖与 5-羟赖氨酸(Hyl)残基的 δ -碳羟基共价连接。糖的加入是在胶原多肽链合成之后,但在折叠成超螺旋之前发生的。

3. 胶原蛋白的结构

在体内,胶原蛋白以胶原原纤维(collagen fibril)或称胶原纤维(collagen fiber)的形式存在。胶原原纤维的基本结构单位是原胶原(proto collagen)分子,其相对分子质量为 285×10^3 ,由三股缠绕的多肽链组成,每股长度约 1 000 个氨基酸残基。原胶原分子长约 300 nm,直径约 1.5 nm。

胶原蛋白不能形成像 α 螺旋和 β 折叠片这样的传统结构。而代之以 3 条称为 α 肽链或 α 链的多肽链(亚基)缠绕成特有的三股螺旋(triple helix)。它的二面角 ϕ 和 ψ 值分别在 -60° 和 $+140^\circ$ 附近,这是一种右手超螺旋(superhelix cable),其中每股链自身是一种左手螺旋(图 5-23)。与 α 螺旋相比,胶原螺旋要伸展得多,每 - 残基沿三股螺旋轴升高 0.29 nm,而 α 螺旋只是 0.15 nm。右手螺旋的螺距为 8.6 nm,每圈每股包含 30 个残基,每股左手螺旋的螺距为 0.95 nm,每圈约含 3.3 个残基。

三股螺旋是一种能容纳胶原蛋白特有的氨基酸组成和序列的结构。一级结构分析表明,胶原蛋白多肽链很长的区段序列是由 Gly-x-y 氨基酸序列重复而成的。这里 x、y 是 Gly 之外的任何氨基酸残基,

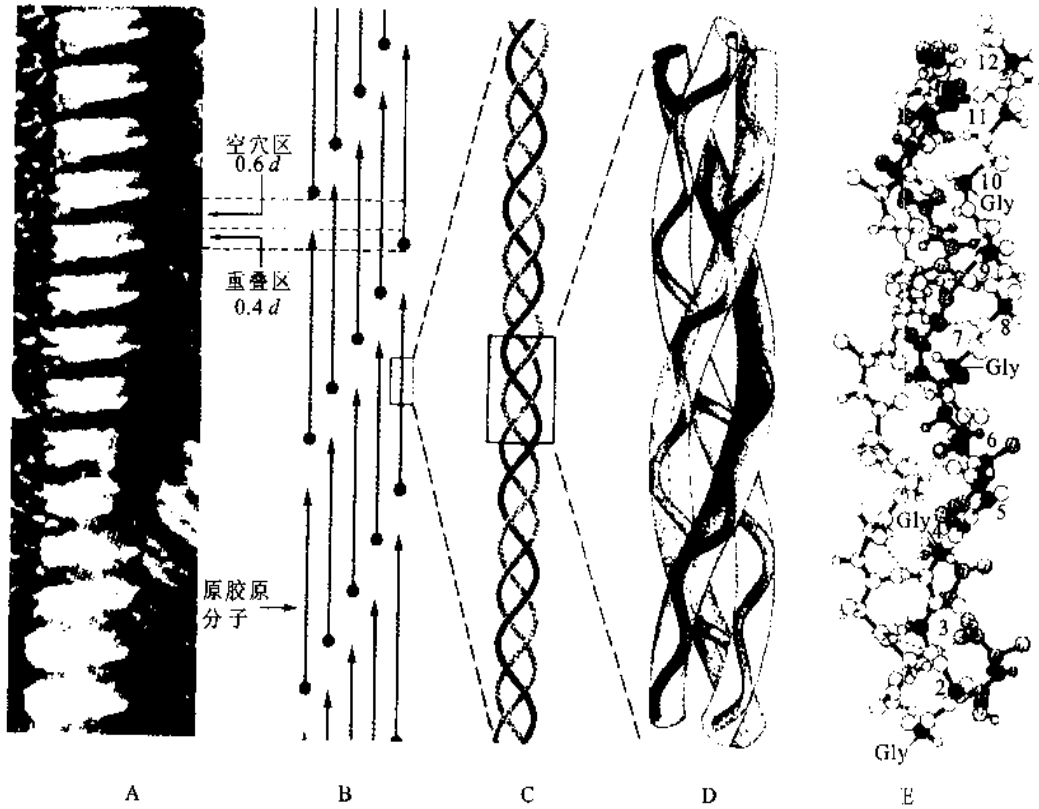


图 5-23 胶原纤维的结构

A. 电镜下胶原纤维呈明暗交替的条纹图案; B. 胶原纤维中原胶原分子的排列; C. 原胶原分子是一种右手三股螺旋; D. 三股螺旋中的每股链是左手螺旋; E. 三股螺旋的原子水平模型

但 x 经常是 Pro, y 经常是 Hyp(4-羟脯氨酸)。由于 Pro 和 Hyp 的侧链是环形的, 它们的 α -碳和酰胺氮之间的键不能旋转(ϕ 角固定在 -60° 左右), 因此高含量的这些氨基酸促进左手 α 肽链螺旋的形成。在三股螺旋中 α 肽链每隔两个残基即第三个残基面向或位于拥挤的中心轴处, 唯一能适合此位置的残基是 Gly, 其两端的残基位于螺旋轴的外侧。三股螺旋是一种错位的 (staggered) 结构, 因此来自三股链的 Gly 残基沿三股螺旋的中心轴堆积, 一股链上的 Gly 处于跟第二股的 x 残基和第三股的 y 残基相邻。这样允许每个 Gly 残基的 N-H 与相邻链的 x 残基的 C=O 形成氢键。由于 Hyp 残基的羟基也参与链间氢键的形成, 三股螺旋得到进一步稳定和增强。

I 型、II 型和 III 型胶原蛋白在体内形成有组织的原纤维。在电镜下, 胶原纤维呈明暗交替的条纹或区带的周期(重复距离, d)为 60~70 nm, 这取决于胶原的类型和生物来源。典型的区带图案(如 I 型胶原) $d = 68$ nm, 其中 $0.6d = 40$ nm 为空穴区, $0.4d = 28$ nm 为重叠区(图 5-23A, B)。因为胶原三股螺旋长 300 nm, 沿原纤维长轴每行中相邻原胶原分子之间存在 40 nm ($0.6d$) 的裂隙或空穴, 所以该图案是每 5 行重复一次 (5×68 nm = 340 nm)。也即原胶原分子在胶原原纤维中都是有规则地互相错位, 首尾相随, 平行排列而成纤维束。由于空穴区和重叠区的电子密度不同, 因而通过错位排列形成间隔一定的电子密度区, 而呈现条纹或区带。40 nm 的空穴区至少在两个方面有重要作用。第一, 发现糖(葡萄糖、半乳糖或葡糖基半乳糖)与此空穴区内的 5-羟赖氨酸残基通过 O-糖肽键共价

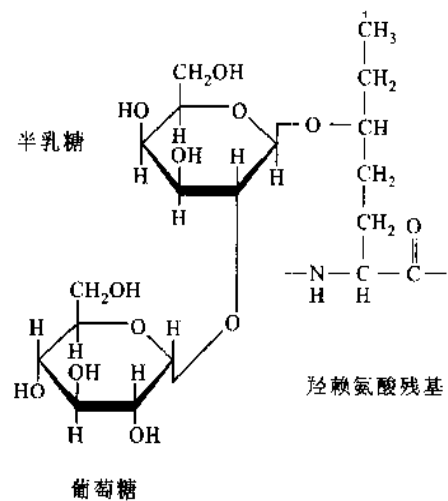


图 5-24 半乳糖和葡萄糖的二糖在半乳糖基转移酶和葡萄糖基转移酶作用下, 与胶原蛋白中 Hyl 残基的羟基共价连接

连接(图 5-24)。糖在此区域内可能起组织原纤维装配的作用。第二,空穴区可能在骨骼形成中起作用。骨是由埋藏在胶原纤维基质中的羟基磷灰石(hydroxyapatite) [磷酸钙聚合物, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] 的微晶组成。当新的骨组织形成时,新羟基磷灰石晶体的形成发生在 68 nm 的间隔区,胶原原纤维的空穴区可能是骨矿化成核(nucleation)部位。

4. 胶原蛋白中的共价交联

胶原纤维可以通过分子内(原胶原分子内)和分子间(原纤维中原胶原分子间)的交联得到进一步增强和稳定。分子内交联是在原胶原的 N-末端区(非螺旋区)内赖氨酸残基之间进行的。反应中含铜的赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase)在吡哆醛磷酸参与下催化赖氨酸侧链氧化脱氨,生成 ϵ -醛基赖氨酸(allysine)衍生物。两个这样的赖氨酸侧链醛基发生醛醇缩合(aldehyde condensation)而共价交联,这是一步自发的非酶促反应(图 5-25)。此外,可以在赖氨酸残基侧链的 ϵ -氨基和 ϵ -醛基赖氨酸残基侧链的醛基之间发生亲和加成,生成羟赖氨酸正亮氨酸(hydroxylysionorleucine)衍生物:

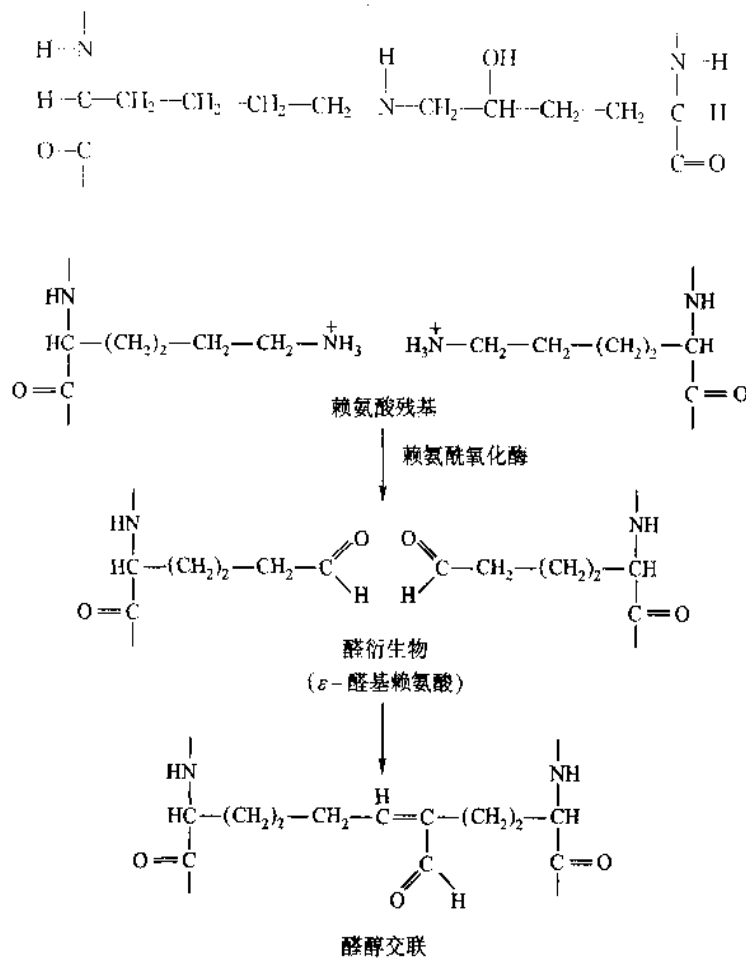


图 5-25 胶原纤维通过 Lys-lys 交联得到进一步稳定和增强

原胶原的分子间交联涉及一个特有的吡啉啉(pyridinoline)结构(图 5-26A)的形成。这种交联键是在一个原胶原的 N-末端区和一个相邻原胶原的 C-末端区之间形成的。这些共价交联对提高胶原蛋白的机械强度很重要。例如当动物或人咽下一种甜豆(Lathyrus adoratus)时,会发生山豆中毒(lathyrism)。其中的毒素是 β -氨基丙腈($\text{N}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$),它抑制 Lys 侧链转化为 ϵ -醛基的反应。因此形成的胶原纤维强度减弱,易引起关节、骨和血管的异常。

随着年龄的增长,在原胶原的三股螺旋内和三股螺旋之间形成的共价交联键越来越多,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、韧带和软骨的机械性能,使骨头变脆,眼球角膜透明度减小。

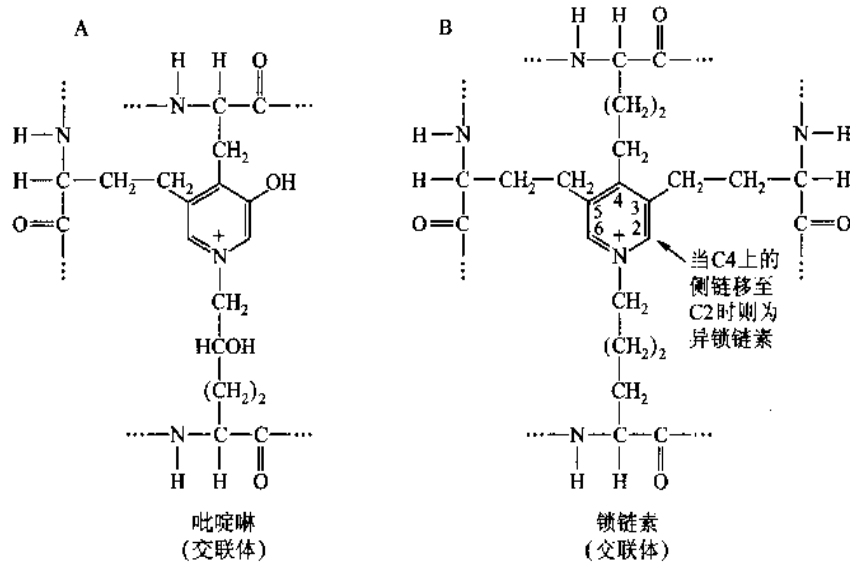


图 5-26 吡啶啉和锁链素的结构

胶原蛋白不易被一般的蛋白酶水解,但能被梭菌或动物的胶原酶(collagenase)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或称动物胶(gelatine),它是一种可溶性的多肽混合物。从营养角度看,胶原蛋白并不是理想的,因为它缺少很多人体所必需的氨基酸。

(四) 弹性蛋白

弹性蛋白(elastin)是结缔组织中的另一种蛋白质,它的最重要的性质就是弹性,并因此得名。弹性蛋白使肺、血管特别是大动脉管以及韧带等具有伸展性。弹性蛋白也是一种丰富的蛋白质,但不如胶原蛋白和肌球蛋白(见后面)那样普遍。弹性蛋白不同于胶原蛋白有几点:弹性蛋白只有一个基因,胶原蛋白每种亚基,如 $\alpha 1(I)$ 、 $\alpha 2(I)$ 等,都有自己的基因;弹性蛋白不含羟赖氨酸,不被糖基化,而胶原蛋白是一种糖蛋白;弹性蛋白不含 Gly-Pro-y 和 Gly-x-Hyp 重复序列,因而不能形成胶原蛋白那样的超螺旋。

弹性蛋白是由可溶性的单体合成的,它是弹性蛋白纤维的基本单位,称原弹性蛋白(tropoelastin)。原弹性蛋白约含 700 个氨基酸残基,相对分子质量 7 200,富含 Gly、Ala、Val 和 Pro,但不含羟赖氨酸,羟脯氨酸含量也很少。原弹性蛋白是由成纤维细胞(fibroblast)和其他结缔组织细胞分泌的。

弹性蛋白纤维中原弹性蛋白分子按两种方式交联在一起,一种与胶原蛋白中的一样,即通过羟赖氨酸正亮氨酸衍生物交联。另一种是原弹性蛋白中特定的 Lys 侧链赖氨酰氧化酶催化下氧化脱氨成醛基(图 5-25)后,由 3 个这样的醛基和一个未被修饰的 Lys 侧链形成类似吡啶啉的锁链素(desmosine)和异锁链素(isodesmosine)交联体(图 5-26B),它们是弹性蛋白的标志。通过锁链素或异锁链素 2、3 或 4 条原弹性蛋白链交联成橡皮样的肽链网,能作二维或三维可逆伸缩,交联后的成熟弹性蛋白是不溶性的,很稳定。弹性蛋白可能缺乏有规则的二级结构,但含有各种各样的无规卷曲构象,当施加张力时,卷曲可以拉伸,张力除去后卷曲又可复原。

(五) 肌球蛋白和原肌球蛋白

各种类型肌肉(横纹肌、平滑肌和心肌)以及许多其他收缩系统都含有两种构成肌纤维的主要蛋白质:肌球蛋白和肌动蛋白。

肌球蛋白(myosin)是一种很长的棒状分子,由 6 条多肽链组成,相对分子质量约为 540×10^3 。如图 5-27 所示,这 6 条多肽链包括两条 $Mr 230 \times 10^3$ 的重链和两对不同的轻链(每条约为 20×10^3)。重链由 N-末端的双头球状区(头)和 C-末端的棒状区(尾)组成,头和尾之间是一个柔性的铰链区(颈)。尾部由两条自身是右手 α 螺旋的链相互缠绕形成的左手超螺旋,称 α 螺旋卷曲螺旋(α -helix coiled coil),长约为 150 nm,直径为 2 nm。多个肌球蛋白分子通过它们的尾区间的离子相互作用(图 5-30)装配成骨骼

肌的粗丝(thick filament)。

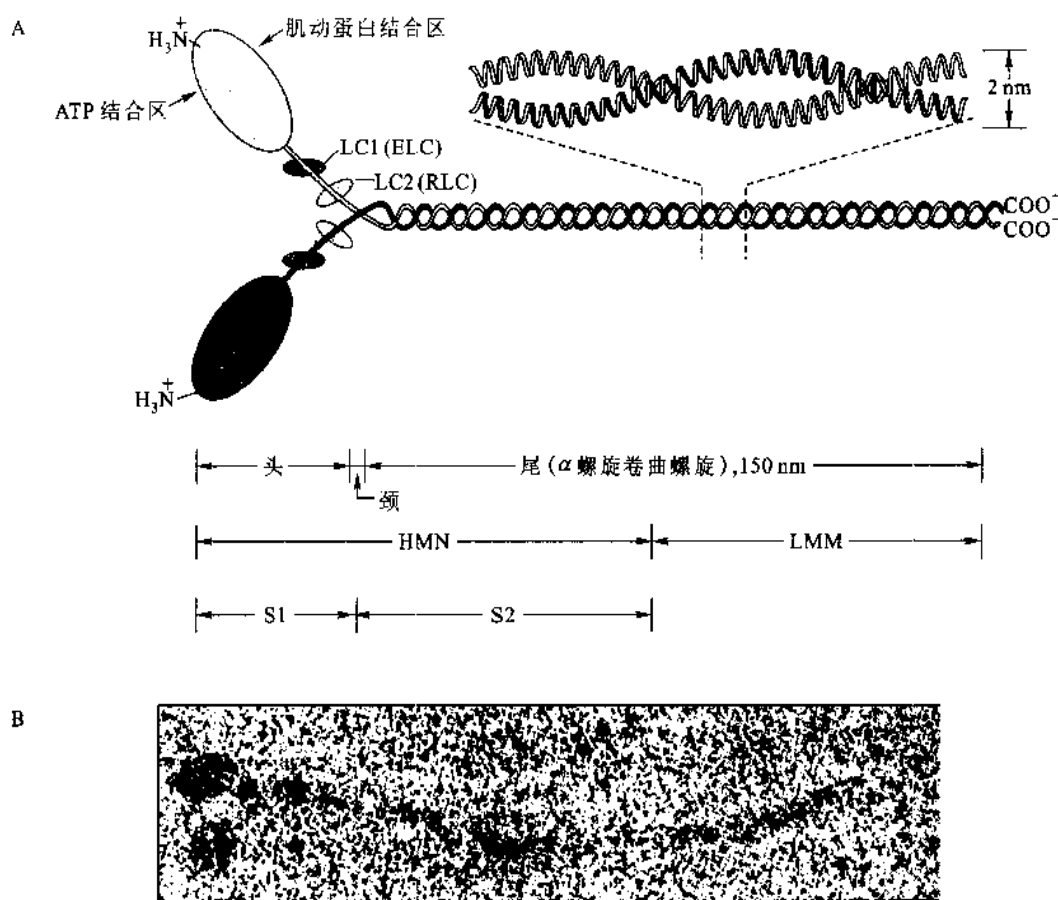
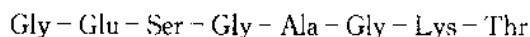


图 5-27 肌球蛋白分子图解(A) 和电镜照片(B)

肌球蛋白可用胰蛋白酶裂解成两个片段,称轻酶解肌球蛋白(light meromyosin, LMM)和重酶解肌球蛋白(heavy meromyosin, HMM)。LMM也和完整的肌球蛋白一样能形成粗丝,但无ATP酶活性,不能与肌动蛋白结合。HMM与之相反,能催化ATP水解,并能结合肌动蛋白,但不能形成粗丝。HMM进一步被木瓜蛋白酶在颈处水解成亚片段(subfragment),两个相同的称为S1的头片(球状亚片段)和一个称S2的棒状亚片段(图5-27)。每个头片由几个结构域组成,分别为N-末端域($M_r 25 \times 10^3$),中央域($M_r 50 \times 10^3$)和C-末端域($M_r 20 \times 10^3$)。肌动蛋白结合位点(actin binding site)和ATP结合位点(ATP binding site)位于中央结构域的相对两侧。两个不同的轻链(CL1和CL2)与邻接颈区的C-末端结构域(α 螺旋)结合。CL1也称必需轻链(essential light chain, ELC),CL2即调节轻链(regulatory light chain, RLC)。

肌球蛋白头片的820个氨基酸残基中约500残基在各物种之间是高度保守的。一个保守区约位于残基170到241处,这是ATP结合位点的组成部分。在这里有一个 β 折叠片- α 螺旋- β 折叠片的结构花式(β - α - β 结构)。所有已知的肌球蛋白在此区内的 β 折叠片都含有下面氨基酸序列:



此区段中的Gly-x-x-Gly-x-Gly在很多ATP结合酶和核苷酸结合酶中找到。区段中的Lys与被结合的ATP的 α -磷酸相互作用。

肌球蛋白作为粗丝与肌动蛋白作为细丝(thin filament),组成肌肉结构的重复单位,称为肌节(sarcomere)。关于肌动蛋白和肌节的结构及收缩机制将在下一章讨论。

原肌球蛋白(proto-myosin)也是一种纤维状蛋白质。它是由两条不同的 α 螺旋肽链互相缠绕而成的超螺旋。亚基相对分子质量约为 35×10^3 。原肌球蛋白以其全长沿细丝长轴与F-肌动蛋白细丝结合,而

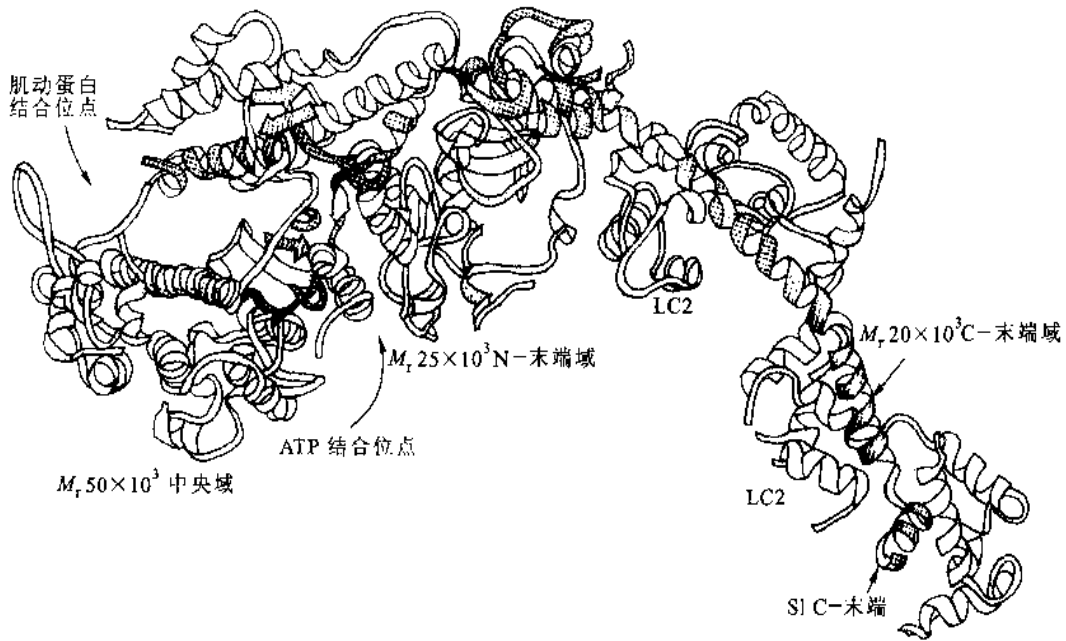


图 5-28 肌球蛋白 S1 头片结构(带式模型)

位于细丝的沟内。每个原肌球蛋白分子约与 F-肌动蛋白分子中的 7 个单体结合(图 6-36B)。原肌球蛋白能稳定并增强细丝强度;当细胞溶胶中钙离子水平降低时通过竞争肌球蛋白的结合位点而抑制肌肉收缩。

六、超二级结构和结构域

在上一章的蛋白质通论部分曾提到蛋白质结构可以分为 4 个组织层次(折叠层次)。但如果细分还可以在二级结构和三级结构之间增加两个层次:超二级结构和结构域。

(一) 超二级结构

在蛋白质分子中特别是在球状蛋白质分子中经常可以看到由若干相邻的二级结构元件(主要是 α 螺旋和 β 折叠片)组合在一起,彼此相互作用,形成种类不多的、有规则的二级结构组合(combination)或二级结构串(cluster),在多种蛋白质中充当三级结构的构件,称为超二级结构(super-secondary structure)、标准折叠单位(standard folding unit)或折叠花式(folding motif)。超二级结构概念是由 Rossman M.G. 于 1973 年首次提出。现在已知的超二级结构有 3 种基本的组合形式: $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 和 $\beta\beta$ 。

(1) $\alpha\alpha$ 这是一种 α 螺旋束,它经常是由两股平行或反平行排列的右手螺旋段互相缠绕而成的左手卷曲螺旋(coiled coil)或称超螺旋(图 5-29A)。 α 螺旋束中还发现有三股和四股螺旋。卷曲螺旋是纤维状蛋白质如 α -角蛋白(图 5-21)肌球蛋白(图 5-27)和原肌球蛋白的主要结构元件。 α 螺旋束也存在于球状蛋白质中,如蚯蚓血红蛋白(myohemerythrin),烟草花叶病毒外壳蛋白(TMV coat protein)等(图 5-36)。球状蛋白质中 α 螺旋束是由同一条链的一级序列上邻近的 α 螺旋组成,不像纤维状蛋白质中是由几条链的 α 螺旋区缠绕而成。由于超卷曲, α 螺旋主链的 ϕ 和 ψ 角与正常 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 螺旋沿超螺旋轴有相当的倾斜,重复距离从 54 nm 缩短到 0.51 nm。超螺旋的螺距约为 14 nm,直径为 2 nm。两股 α 螺旋的轴相距 1 nm,使两股 α 螺旋的侧链能紧密相互作用以增强螺旋结构。氨基酸序列分析表明,这些多肽链中存在七残基重复序列(heptad repeat), $a-b-c-d-e-f-g$,这是卷曲螺旋结构的特征。其中第 1 和第 4 个(a 和 d)是疏水残基,第 5 和第 7 个(e 和 g)是极性残基,第 2、3 和第 6 个(b、c 和 f)一般是荷电残基。因为七残基区段恰占两圈有变形的 α 螺旋($n=3.5$),所以疏水残基 a 和 d 将沿 α 螺旋一侧排列成非极性边缘(图 5-30) 在超螺旋中一股 α 螺旋

链的非极性边缘与另一股链的非极性边缘彼此啮合形成疏水核心,而荷电残基 *b, c, f* 组成的极性边缘位于超螺旋外侧,与溶剂水相互作用,以此稳定超螺旋结构。

(2) $\beta\alpha\beta$ 最简单的 $\beta\alpha\beta$ 组合也称 $\beta\alpha\beta$ 单元 ($\beta\alpha\beta$ -unit),它是由两段平行 β 折叠股和一段作为连接链(connector)的 α 螺旋组成, β 股之间还有氢键相连;连接链反平行地交叉在 β 折叠片的一侧, β 折叠片的疏水侧链面向 α 螺旋的疏水面,彼此紧密装配(图 5-29B)。作为连接链的除 α 螺旋外还可以是无规卷曲。最常见的 $\beta\alpha\beta$ 组合是由 3 段平行 β 股和两段 α 螺旋构成(图 5-29B),相当于两个 $\beta\alpha\beta$ 单元组合在一起,此结构称 Rossmann 折叠($\beta\alpha\beta\alpha\beta$)。几乎在所有实例中连接链都是右手交叉(right-hand crossover)的,只有两个例外,枯草杆菌蛋白酶和葡萄糖磷酸异构酶中是左手交叉连接的。这是一种拓扑学现象,是由于 L-氨基酸的伸展多肽链(β 股)倾向于采取右手扭曲结构(right-handed twist structure)而产生的(图 5-31)。这一现象可以用一条带子加以直观的演示(扭曲带子,然后把带子的两个头搭在一起)。

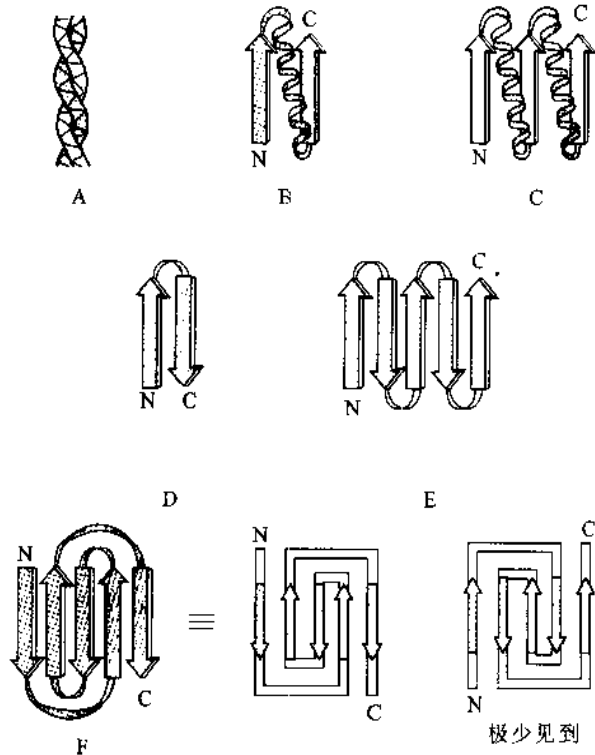


图 5-29 蛋白质中的几种超二级结构

A. α ; B. $\beta\alpha\beta$ 单元; C. Rossmann 折叠,其中 α 螺旋处于 β 折叠片上侧; D. β 发夹; E. β 曲折; F. 希腊钥匙拓扑结构,只有一种“手性”形式存在。(带子表示 β 股)

(3) $\beta\beta$ 实际上就是前面讲过的反平行 β 折叠片,只不过在球状蛋白质中多是由一条多肽链的若干段 β 折叠股反平行组合而成,两个 β 股间通过一个短环(发夹)连接起来(图 5-29 D~F)。最简单的 $\beta\beta$ 折叠花式是 β 发夹(β -hairpin)结构(图 5-29B),由几个 β 发夹可以形成更大更复杂的折叠片图案,例如 β 曲折和希腊钥匙拓扑结构。

β 曲折(β -meander)是一种常见的超二级结构,由氨基酸序列上连续的多个反平行 β 折叠股通过紧凑的 β 转角连接而成(图 5-29E)。 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主链氢键的 $2/3$)。 β 曲折的这种高稳定性无疑说明它的广泛存在。

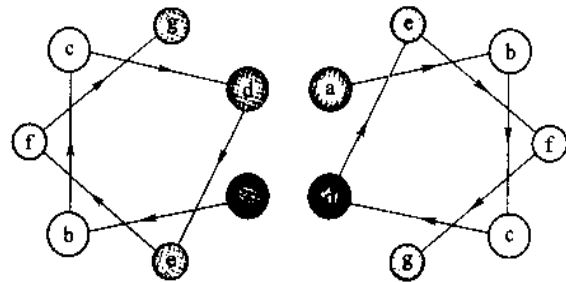


图 5-30 超螺旋结构中两股 α -螺旋链的非极性边缘的疏水相互作用

希腊钥匙拓扑结构(Greek key topology)也是反平行 β 折叠片中常出现的一种折叠花式(图 5-29F)。这种结构直接用古希腊陶器花瓶上的一种常见图案命名,称“希腊钥匙”(Greek key)。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。当折叠片的亲水面朝向观察者时,从 $N \rightarrow C$ 末端回旋几乎总是逆时针的。

看来蛋白质构象是由超二级结构装配在一起形成的,因此目前致力于了解 α 螺旋之间, β 折叠片之间以及螺旋和折叠片之间相互作用的基础。在多数情况下,只有非极性残基侧链参与这些相互作用,而亲水侧链多在分子的外表面。

(二) 结构域

(1) 结构域概念 多肽链在二级结构或超二级结构的基础上形成三级结构的局部折叠区,它是相对

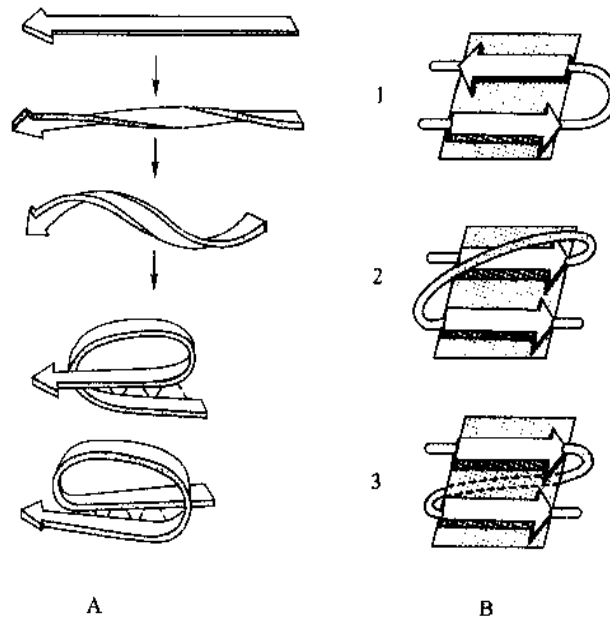


图 5-31 多肽链右手扭曲的天然倾向及由此产生的右手连接

A. 示出右手扭曲怎样导致右手连接;底部结构是左手连接,示出以便比较;B. 示出连接 β 股的3种方式:① 发夹末端连接,② 右手交叉连接,③ 左手交叉连接

独立的紧密球状实体,称为结构域(structural domain, domain)或域。最常见的结构域含序列上连续的100~200个氨基酸残基,少至40个左右,多至400个以上。结构域是球状蛋白质的独立折叠单位。对于那些较小的球状蛋白质分子或亚基来说,结构域和三级结构是一个意思,也就是说这些蛋白质或亚基是单结构域(single domain)的,如红氧还蛋白(rubredoxin)(图5-32),核糖核酸酶(图4-1B)、肌红蛋白(图6-1)等。对于较大的球状蛋白质或亚基,其三级结构往往由两个或多个结构域缔合而成,也即它们是多结构域(multidomain)的,例如免疫球蛋白的轻链含2个结构域(图6-29);t-PA含6个结构域,如指形区、丝氨酸蛋白酶区等(图4-25)。

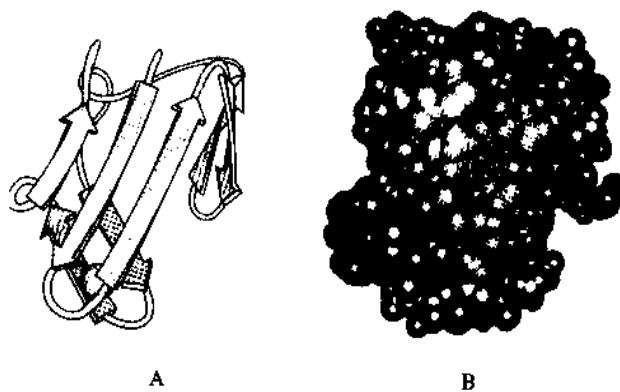


图 5-32 红氧还蛋白的三级结构(单结构域)

A. 带式图解(细带表示连接区或回环);B. 空间充满模型

结构域有时也指功能域(functional domain)。一般说,功能域是蛋白质分子中能独立存在的功能单位。功能域可以是一个结构域,也可以是由两个结构域或两个以上结构域组成,例如酵母己糖激酶(hexokinase)的功能域(活性部位)就是由两个结构域构成,并处于它们之间的交界处(图5-38)。

看来结构域这一折叠层次的出现也不是偶然的。高等真核生物的基因蛋白质分析揭示,多结构域蛋

白质的结构域经常是由它的基因的相应外显子(exon)编码的(见下册第36和38章)。从结构的角度看,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。从功能角度看许多多结构域的酶,其活性中心都位于结构域之间,因为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柔性的肽链连接,形成所谓铰链区,使结构域容易发生相对运动,这是结构域的一大特点。然而这种柔性铰链不可能在亚基之间存在,因为它们之间没有共价连接,如果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(参见第6章和第10章)。

(2) 多肽链折叠中的手性效应 氨基酸(α -碳)的手性对蛋白质结构产生很大的影响。前面曾谈到参与蛋白质组成的氨基酸是L-型的,多肽链折叠形成的螺旋结构大多数是右手的。精细结构能的计算表明,最稳定的 β 折叠股构象也具有轻度右手扭曲的倾向。这种倾向给蛋白质折叠带来了两种不同而又有联系的效应。一个效应反映在球状蛋白质中平行 β 折叠片的 β 股之间的右手交叉连接,这一点已在超二级结构Rossman折叠中看到(图5-31)。另一个效应反映在对平行 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 $\beta\alpha\beta$ 单元装配成的。当沿多肽链方向观察时,整个平行 β 折叠片也以右手方式扭曲,或形成一个大的缓慢扭曲的片,称马鞍形(saddle shape)扭曲片(图5-37B),或形成一个扭曲的圆筒,称平行 β 桶(parallel β -barrel)(图5-37A)。

(3) 结构域类型 结构域也和二级结构元件及超二级结构一样,基本类型数目有限。根据其所含的二级结构种类和组合方式,结构域大体可分为4类:反平行 α 螺旋结构域(全 α -结构)、平行或混合型 β 折叠片结构域(α, β -结构)、反平行 β 折叠片结构域(全 β -结构)和富含金属或二硫键结构域(不规则小蛋白结构)。关于这些结构域的细节将在后面“球状蛋白质的分类”中叙述。

有些蛋白质例如硫氰酸酶(rhodanase)中含有彼此极其相似的结构域(图5-33)。两个相似的结构域经常是二重对称轴的关系,有些蛋白质中结构域彼此十分不同,例如木瓜蛋白酶(papain)中的两个结构域(图5-34)。一个蛋白质(或亚基)中两个结构域之间的分隔程度各不相同,有的两个结构域各自独立成球状实体,中间仅由一段长短不一的肽链连接;有的相互间接面宽而紧密,整个分子(或亚基)的外表是一个平整的球面,甚至难以确定究竟有几个结构域存在。多数是中间类型的,分子(或亚基)外形偏长,结构域之间有裂沟(cleft)或密度较小的区域,例如己糖激酶(图5-35)。

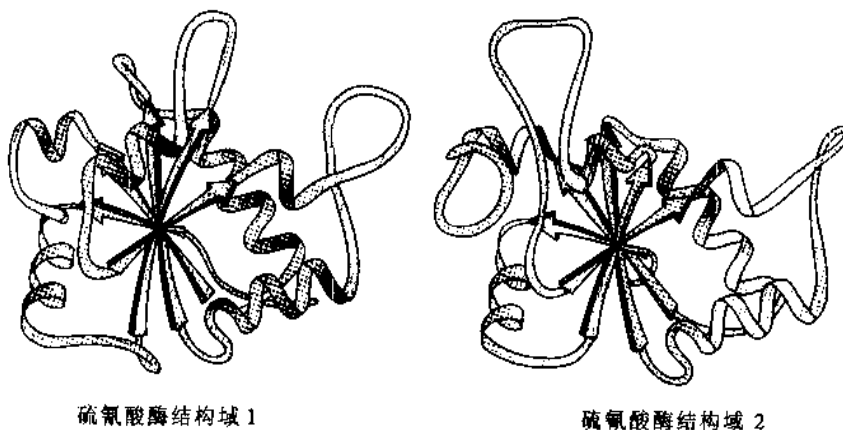


图5-33 硫氰酸酶含有两个相似的结构域1和结构域2

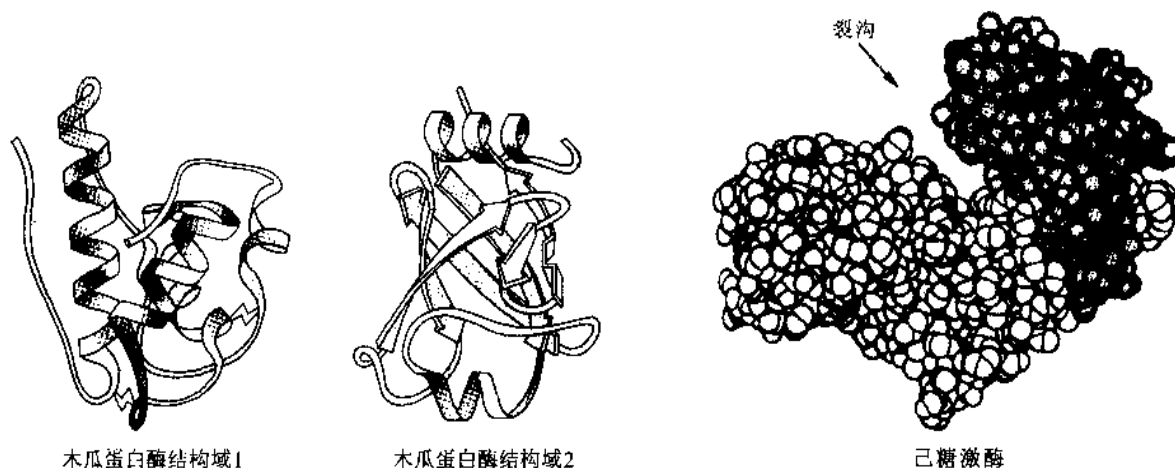


图 5-34 木瓜蛋白酶中两个彼此不相同的结构域 1 和结构域 2

图 5-35 酵母己糖激酶的三级结构两个结构域(阴影不同)之间有一裂沟

七、球状蛋白质与三级结构

虽然纤维状蛋白质在各种生物体内含量丰富也很重要,但是它们的种类只占自然界中蛋白质的很小一部分,球状蛋白质远比它们多得多。蛋白质结构的复杂性和功能的多样性也主要体现在球状蛋白质。一个蛋白质的三级结构是指由二级结构元件(α 螺旋, β 构象, β 转角和无规卷曲等)构建成的总三维结构,包括一级结构中相距远的肽段之间的几何相互关系和侧链在三维空间中彼此间的相互关系。

(一) 球状蛋白质的分类

球状蛋白质可根据它们的结构域类型分为 4 大类:全 α -结构、 α , β (或 α/β)-结构、全 β -结构以及小的富含金属或二硫键结构。除少数一些混合型结构之外,大多数已知结构的蛋白质都可以归入这 4 个类别中的一种。

1. 全 α -结构(反平行 α 螺旋)蛋白质

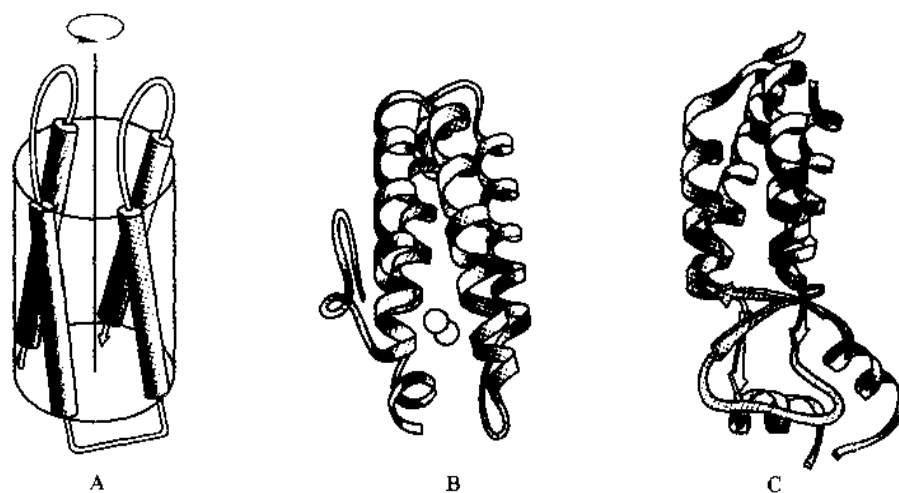
这类蛋白质是 α 螺旋占极大优势的结构。全 α -结构又可分为几个亚类。最简单的也是最大的亚类是反平行螺旋束。此结构中 α 螺旋一上一下地反平行排列,因此也称上下型螺旋束(up-and-down helix bundle)。相邻螺旋之间以环相连,形成近似筒形的螺旋束,最常见的是四螺旋束,如蚯蚓血红蛋白和 TMV 外壳蛋白(图 5-36)。这类螺旋束不少呈现轻微左手扭曲($+15^\circ$)。螺旋疏水面朝向内部、亲水面朝向溶剂。活性部位残基位于螺旋束的一端,由不同螺旋上的残基构成。多数螺旋束是规则均匀的结构。少数情况有螺旋突出束外。TMV 外壳蛋白在螺旋束的一端有小的扭曲的反平行 β 折叠片,片的一侧还有两个额外的 α 螺旋(图 5-36C)。

全 α -结构的另一亚类是珠蛋白型 α -螺旋蛋白。珠蛋白(globin)包括去血红素的肌红蛋白和血红蛋白(图 6-1 和图 6-8,9)。这类结构中一级结构上相邻的两个螺旋采取接近相互垂直的取向。整条多肽链折叠成两层 α 螺旋,两层螺旋交叉堆叠。

2. α , β -结构(平行或混合型 β 折叠片)蛋白质

第二大类的蛋白质结构是以平行或混合型(含平行和反平行 β 折叠股) β 折叠片为基础的。前面曾谈到,平行 β 折叠片的两侧都分布有疏水侧链,这意味着平行 β 折叠片的任一侧都不能暴露于溶剂,因此平行 β 折叠片一般存在于蛋白质的核心结构,很少与溶剂接触。

α , β -结构可分为两个亚类:一个亚类称为单绕平行 β 桶(singly wound parallel β -barrel)或称平行 β 桶,另一亚类称为双绕平行 β 片(doubly wound parallel β -sheet)或马鞍形扭曲片,也称核苷酸结合结构域(nucleotide-binding domain)。

图 5-36 反平行 α 螺旋结构域

A. 四螺旋束结构示意图; B. 蛇蚓血红蛋白; C. 烟草花叶病毒外壳蛋白(亚基)

如图 5-37A 中的磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)和丙酮酸激酶结构域 1(pyruvate kinase domain 1)的结构所示,单绕平行 β 桶是由 8 个平行 β 折叠股环形排列,在第 1 和第 8 两个折叠股之间借氢键键合形成的一个闭合式圆筒(cylinder),它是一种具有高度对称性的结构。这种结构是由肽链按 Rossman 折叠方式单向卷绕而成,也即由 $\beta\alpha\beta$ 单元通过交叉连接而成。作为右手交叉连接的 7 个 α 螺旋和 C-末端的一个 α 螺旋都在 β 折叠片的一侧,即在圆筒的外侧,组成一个与此圆筒(内桶)同轴的平行 α 螺旋圆筒(外桶)。内外桶都是右手扭曲的。两个桶紧挨在一起,它们之间是一个疏水夹心层(hydrophobic sandwich)。中央空间只能容纳 β 折叠片内侧的疏水侧链,构成这类结构域的疏水核心(hydrophobic core)。参与结合和催化的残基位于连接 β 股和螺旋的回环区域(loop region)。总之二级结构元件构成结构骨架,决定了蛋白质的稳定性;回环区构成活性中心决定了蛋白质的功能。

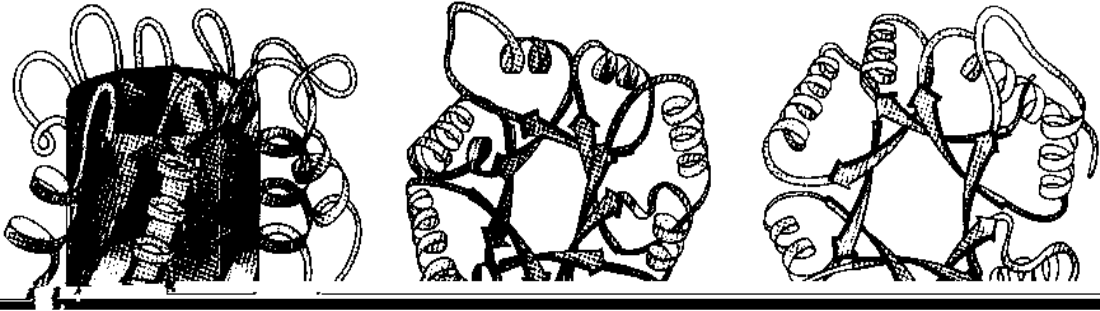
双绕平行 β 片见图 5-37B 中的实例乳酸脱氢酶结构域 1(lactate dehydrogenase domain 1)和磷酸甘油酸激酶结构域 2(phosphoglycerate kinase domain 2)。这种 α, β -结构的中间是由 4~9 个平行的 β 折叠股或混合型的 β 折叠股构成的开放 β 片(马鞍形扭曲片)。 β 折叠片的两侧由 α 螺旋和环状区段保护。这种结构虽然也由 $\beta\alpha\beta$ 单元装配成,但单元的连接方式与平行 β 桶不同,有的 $\beta\alpha\beta$ 单元是翻转 180° 后再与其他单元连接,这样就形成开放式扭曲片,而 α 螺旋分处扭曲片的两侧。这种结构之所以称为双绕平行 β 片是因为它可以看成是肽链从 β 折叠片的中部开始沿相反的两个方向向外卷绕,也即肽链从折叠片开始向一个方向卷绕形成 Rossman 折叠, α 螺旋覆盖在折叠片的一侧,然后改变方向回到折叠片的中部向相反的方向卷绕再形成 Rossman 折叠,此时 α 螺旋覆盖在折叠片的另一侧。有时尚有发夹末端连接的反平行 β 折叠股混杂在平行 β 折叠股之间,形成混合型 β 折叠片蛋白质。以核苷酸衍生物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、黄素腺嘌呤单核苷酸(FMN)等(见第 11 章)为辅基的蛋白质如糖酵解中的许多酶都含有核苷酸结合结构域。核苷酸结合部位位于 β 折叠片中肽链改变方向处的一个裂隙内,见图 5-37B。双绕平行 β 片蛋白是 3 个主链结构层和两个疏水区,而单绕平行 β 桶是 4 个主链层和 3 个疏水区。

3. 全 β -结构(反平行 β 折叠片)蛋白质

反平行 β 折叠片一般把疏水残基安排在折叠片的一侧,亲水残基在另一侧。因此一个反平行 β 折叠片蛋白质至少有两个主链结构层:两层 β 折叠片或一层 β 折叠片和一层 α 螺旋。两个 β 折叠片的疏水面相对合形成疏水区,相背的两面暴露于溶剂。这类结构域由 4~10 个 β 折叠股构成。它又可分为两个主要类型:反平行 β 桶(希腊钥匙型、果冻卷型和上下型)和反平行 β 片。

反平行 β 桶与单绕平行 β 桶比较,对称性差,氢键强度较小,但在自然界中出现频率高。反平行 β 桶通常由偶数 β 折叠股组成。其中最常见的一类是希腊钥匙 β 桶,如 Cu·Zn-超氧化物歧化酶亚基和免疫球蛋白结构域(图 5-38)的结构。这种 β -桶的三维拓扑图摊开后的二维拓扑图是“希腊钥匙”图案(图 5-29)。另一类反平行 β 桶含有类似“希腊钥匙”,但更为复杂的拓扑图案,称果冻卷 β 桶(jell roll β -bar-

A



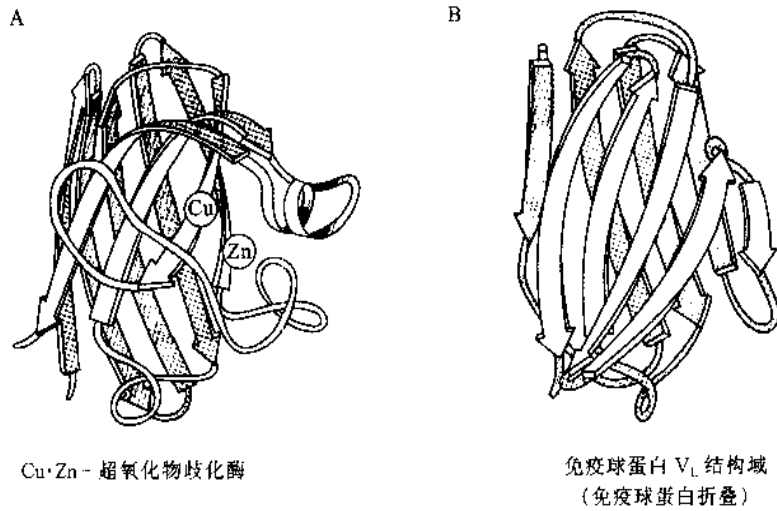


图 5-38 反平行 β 折叠片结构域

A. Cu·Zn-超氧化物歧化酶(亚基); B. 免疫球蛋白 V_L(轻链可变区)结构域

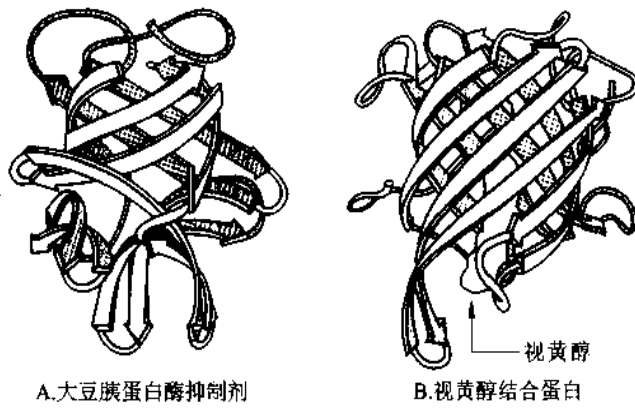


图 5-39 上下型 β 桶结构的实例

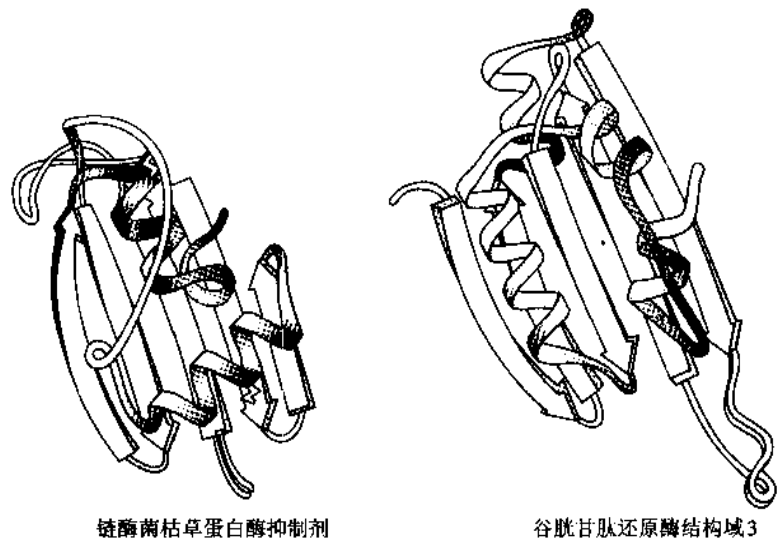


图 5-40 反平行 β 片(露面夹心结构)的实例

述几类结构有明显的相似性,例如 HiPIP 是一个变形的 β -桶结构,磷脂酶 A₂ 是变形的 α 螺旋串。然而有一些蛋白如胰岛素和二节荠蛋白则很难归入上述任何一个结构类别。

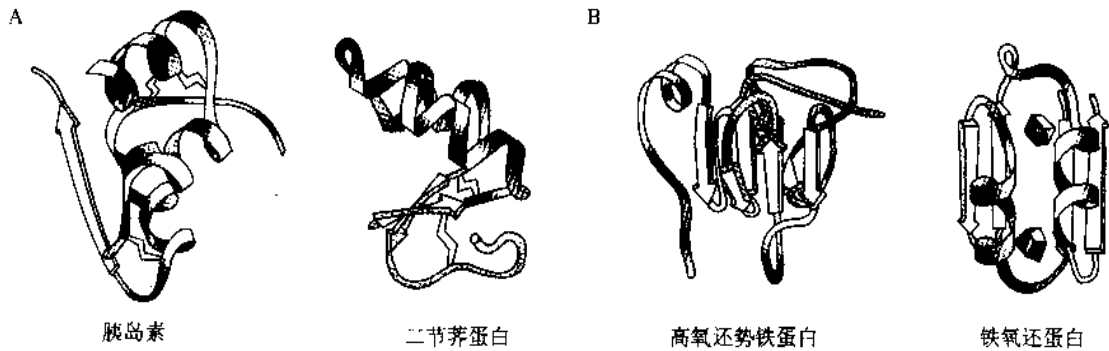


图 5-41 富含二硫键蛋白质(A)和富含金属蛋白质(B)的实例

(二) 球状蛋白质三维结构的特征

蛋白质晶体结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) 资料表明, 确定晶体结构的蛋白质已有 300 多种。虽然每种球状蛋白质都有自己独特的三维结构, 但是它们仍有某些共同特征。

(1) 球状蛋白质分子含多种二级结构元件 一种纤维状蛋白质 (肌球蛋白除外) 只含一种二级结构元件, 如 α -角蛋白含 α 螺旋, 丝心蛋白含反平行 β 折叠片。然而球状蛋白质分子含有两种或两种以上的二级结构元件, 例如溶菌酶 (lysozyme) 含有 α 螺旋、 β 折叠片、 β 转角和无规卷曲等 (图 5-42), 虽然不同的球状蛋白质中各种元件的含量是不一样的 (表 5-4)。

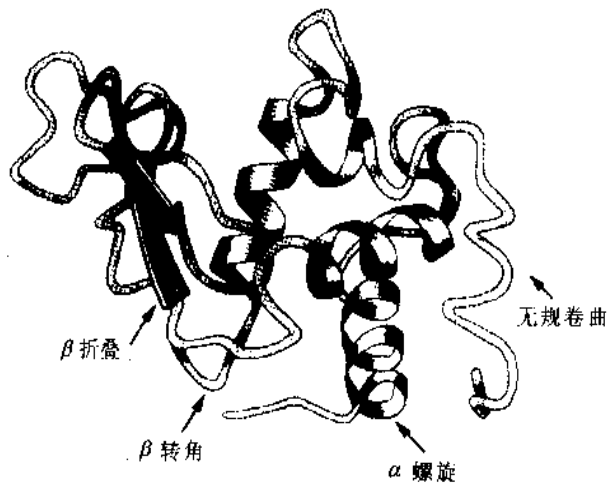


图 5-42 鸡卵清溶菌酶的三级结构

表 5-4 几种单链蛋白质或亚基中 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角的近似含量

蛋白质(总残基数)	残基/(%) ^a		
	α 螺旋	β 折叠	β 转角
肌红蛋白 (153)	78	0	16
溶菌酶 (129)	40	12	19
核糖核酸酶 A (124)	26	35	-
牛 Cu·Zn-SOD 亚基 (151)	14	47	17
胰凝乳蛋白酶 (247)	14	45	28
羧肽酶 A (307)	38	17	17

a. 多肽链的其余部分由无规卷曲等组成。

(2) 球状蛋白质三维结构具有明显的折叠层次 与纤维状蛋白质相比球状蛋白质的结构具有更加明显而丰富的折叠层次。多肽链主链在熵驱动下折叠成借氢键维系的 α 螺旋、 β 折叠片等二级结构。在一级序列上相邻的二级结构往往在三维折叠中彼此靠近并相互作用形成超二级结构 (图 5-29)。由超二级结构进一步装配成相对独立的球状实体——结构域或三级结构 (对于单结构域蛋白质或亚基) (图 5-32, 38A) 或再由两个或多个结构域 (对于多结构域蛋白质或亚基) 装配成紧密的球状或椭球状的三级结构如己糖激酶 (图 5-35)。如果这是亚基的三级结构, 将由三级结构的亚基缔合成四级结构的多聚体如血红蛋白 (图 4-1C)。

(3) 球状蛋白质分子是紧密的球状或椭球状实体。多肽链折叠过程中各种二级结构彼此紧密装配,它们之间也插入松散的肽段。如果一个蛋白质的组成氨基酸的范德华体积(van der Waals volume)总和(组成的原子依范德华作用范围所占的总体积)除以蛋白质所占的体积即得装配密度,一般为0.72~0.77。这意味着即使紧密装配,蛋白质总体积约25%不被蛋白质原子所占据。几乎这个空间的全部都处于很小的空腔形式。偶尔有水分子大小或更大的空腔存在,但它们仅构成蛋白质总体积的一小部分,例如在 α -胰凝乳蛋白酶晶体结构中发现有16个水分子。值得注意的是邻近活性部位的区域密度比平均值低得多,这可能意味着在这较松散的区域有较大的空间可塑性,使构象容易发生变化,可允许活性部位的结合基团和催化基团有较大的活动范围。这是酶与底物,别构酶与调节物,其他功能蛋白与效应物相互作用的结构基础(详见第10章)。

(4) 球状蛋白质疏水侧链埋藏在分子内部,亲水侧链暴露在分子表面。蛋白质折叠形成三级结构的驱动力是形成可能的最稳定结构。这里有两种力在起作用,一是肽链必须满足自身结构固有的限制,包括折叠中 α -碳的二面角的限制以及手性效应;二是肽链必须折叠以便埋藏疏水侧链,使之与溶剂水的接触降到最小程度(熵驱动)。从拓扑学角度看,所有的球状蛋白质必须有一个可以安排疏水核心的“内部”和一个被亲水基团所伸向的“外部”。隐藏疏水残基避免与水接触是安排二级结构单元(包括非重复性肽段)形成特定三级结构的主要动力。疏水核心几乎全部由 β 折叠片和 α 螺旋组成。它们的肽主链虽然是极性的,但由于这两种二级结构形成很好的氢键网,主链极性已被有效地中和,因而能稳定地处于疏水核心区域。球状蛋白质中,多数 α 螺旋都是两亲螺旋(amphipathic helix)。它们一个面向外暴露于溶剂,另一个面朝向蛋白质的疏水内部。两亲螺旋向外的一面主要由极性和带电残基组成,向内一面主要是非极性的疏水残基(图5-30)。平行 β 折叠片一般存在于蛋白质疏水核心;反平行 β 折叠片疏水一侧朝向分子内部,亲水一侧与溶剂接触。

球状蛋白质分子约80%~90%疏水侧链被埋藏,分子表面主要是亲水侧链,因此球状蛋白质是水溶性的。

(5) 球状蛋白质分子的表面有一个空穴(也称裂沟、凹槽或口袋)。这种空穴常是结合底物、效应物等配体并行使生物功能的活性部位。空穴大小约能容纳1~2个小分子配体或大分子配体的一部分。空穴周围分布着许多疏水侧链,为底物等发生化学反应营造了一个疏水环境(低介电区域)。

八、膜蛋白的结构

已知膜脂双层是所有生物膜的结构基础,而膜蛋白几乎负责膜的全部活性功能(参见第18和21章)。膜蛋白在外形上不同于纤维状蛋白质,也不同于球状蛋白质,三维结构上也有它们自己的特点。根据Singer和Nicolson的建议,大多数膜蛋白可以分为膜周边蛋白质和膜内在蛋白质两类。膜周边蛋白质(peripheral protein)实际上属于可溶性球状蛋白质,它们分布在膜双脂层的表面,主要是通过和膜内在蛋白质的静电相互作用和氢键键合相互作用与膜结合的;这类膜蛋白在这里不作进一步讨论。膜内在蛋白质(integral protein)或内在膜蛋白是与脂双层强缔合的膜蛋白,它们有的一部分或大部分埋入脂双层,有的横跨脂双层。还有一类膜蛋白是Singer和Nicolson未曾提出的,称脂锚定蛋白质(Lipid-anchored protein),它们在不同细胞和组织的多种功能中起着重要作用。这些蛋白质与膜的缔合是通过各种共价连接的脂锚钩(lipid anchor)实现的。

(一) 膜内在蛋白

膜内在膜蛋白大体可分为两种类型。第一种类型是通过一段小的疏水肽链锚定于膜,蛋白质的大部分位于膜的一侧或两侧伸展于水环境中。第二种类型则外形多少有些近似球状,大部分蛋白质埋在膜中,只有很小表面在膜外暴露于溶剂水中。一般说,脂双层疏水核心内的膜内在膜蛋白结构主要是由 α 螺旋或 β 折叠片构成。

1. 具有单个跨膜肽段的膜蛋白

这是第一种类型的膜内在膜蛋白。跨膜的疏水肽段经常是一个 α 螺旋棒, 亲水序列伸向细胞质或(和)胞外液。这类膜蛋白的最好例子之一是血型糖蛋白。血型糖蛋白分子的大部分定向在细胞的外表面暴露于水环境中(图 5-43)。各种亲水寡糖链连接在此胞外结构域。这些寡糖链构成红细胞 ABO 和 MN 血型抗原特异性(参见第 1 章血型物质部分)。胞外结构域也起流感病毒的受体作用。血型糖蛋白的蛋白质部分是一条含 131 个氨基酸残基的多肽链; 总相对分子质量为 31×10^3 , 蛋白质约占 40%, 其余是糖类。该多肽链含一个 19 个疏水残基的肽段, 它卷曲成一个 α 螺旋, 正好等于跨膜的厚度。N-末端侧是长的亲水序列, 即胞外结构域, C-末端侧是较短的亲水序列, 处于胞质中。

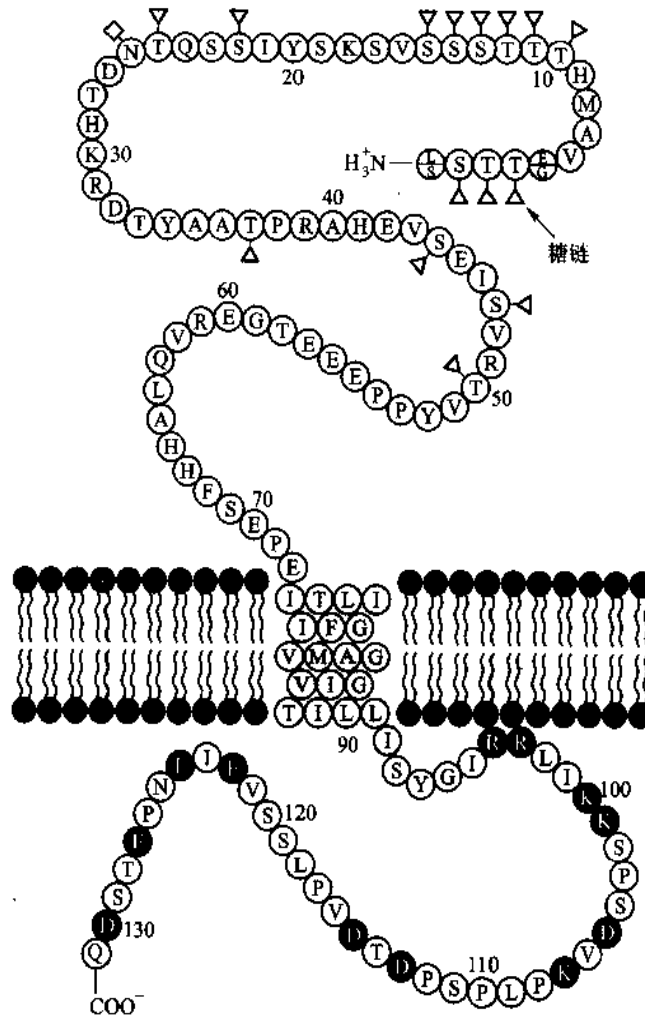


图 5-43 人血型糖蛋白的一级结构和跨膜分布

属于这一类的还有人白细胞结合 (HLA) 蛋白、B 淋巴细胞表面免疫球蛋白受体以及许多膜病毒的刺突蛋白 (spike protein)。它们的功能主要决定于胞外结构域, 并因而胞内亲水序列经常是较短的。

2. 具有 7 个跨膜肽段的膜蛋白

这是第二种类型的膜内在膜蛋白。一条多肽链来回跨膜折叠, 形成一个由多个经常是 7 个 α 螺旋段反平行装配的球状膜蛋白。相邻的 α 螺旋段之间由铰链区(回环)连接, 如细菌紫膜质 (bacteriorhodopin) 图 5-44, 它成簇地存在于盐细菌 (*H. halobium*) 膜的小紫片中。细菌视紫红质是一种 7-跨膜螺旋段膜蛋白, 主体部分埋于膜脂双层中, 只有两小段伸向膜两侧的水环境。N-末端在胞外侧, C-末端在胞质侧。细菌视紫红质是由一条 247 个残基的多肽链和一个视黄醛 (retinal) 分子组成。它具有光驱动的跨膜质子泵的功能(参见第 27 章)。质膜上起钾钠泵作用的 ATP 酶(含 8~10 个跨膜螺旋段), 大肠杆菌的

乳糖通道(含10~14个跨膜螺旋)等都属于这类膜蛋白。

3. β 桶型膜蛋白——膜孔蛋白

这也是第二类型的膜内在膜蛋白。在革兰氏阴性细菌的外膜中以及真核细胞的线粒体外膜中发现的膜孔蛋白都是以大 β 折叠片形式横跨膜的。这类蛋白最好的例子是麦芽糖膜孔蛋白(malto porin)也称LamB蛋白或lambda受体,它参与麦芽糖和麦芽糖糊精进入大肠杆菌(*E. coli*)。膜孔蛋白的活性形式是一个三聚体。含421个残基的单体是一个精致美观的18-股反平行 β 桶。相邻 β 股之间通过长的回环或 β 转角连接。

长回环发现于胞外侧的桶边, β 转角位于朝向胞内的桶边。3个回环折叠进入桶的中央。此 β 桶摊开后的二维拓扑图案如图5-45所示,它相当于球状蛋白质中的上下型 β 桶(图5-39)。不同的是,对膜孔蛋白 β 桶来说,其亲水侧链面向桶中央孔道或空腔,疏水侧链分布在桶的外侧,在这里与膜的疏水脂烃链相互作用。膜孔蛋白通道的最小直径为0.5 nm。因此麦芽糖糊精(含3个或更多个葡萄糖单位的寡糖)能通过膜孔蛋白。

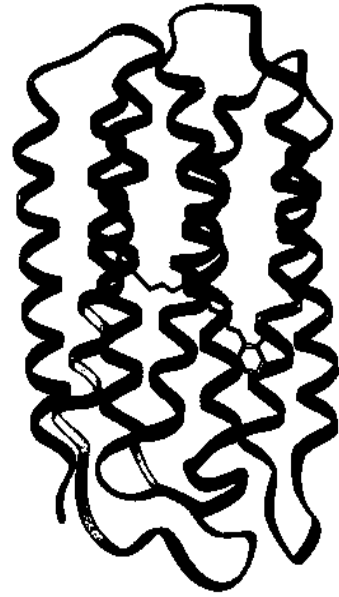


图5-44 根据冷冻电镜术(cryomicroscopy)三维重构方法建立的细菌视紫红质的三维模型

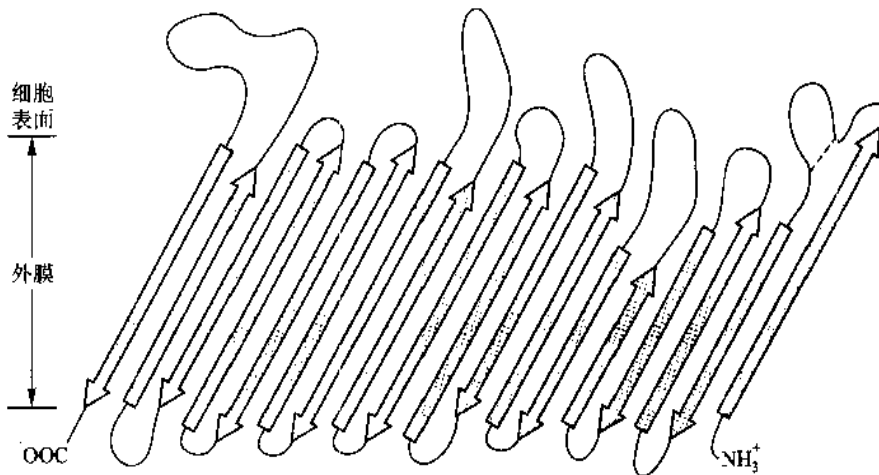


图5-45 大肠杆菌麦芽糖膜孔蛋白中肽链的排列

(二) 脂锚定膜蛋白

某些膜蛋白与脂质分子共价连接,脂质部分可插入脂双层,有效地把被连接的蛋白质锚定在膜上。某些带有共价连接脂质的蛋白质通常是水溶性的;其他一些是膜内在膜蛋白,即使共价连接的脂质被除去,它们仍与膜结合。第二类蛋白质中共价连接的脂质,能起不同于膜锚定的作用,在许多情况通过脂锚钩(lipid anchor)与膜连接是用来调节蛋白质活性的。

脂锚钩的另一重要性质是它的瞬时性。它能可逆地与蛋白质连接和脱离。这为改变蛋白质对膜的亲和性提供了一个“转换装置”。可逆性膜锚定是真核细胞中控制信号传导途径(signal transduction pathway)的一个因素。

至今已发现4种类型的脂锚定结构。它们是①酰胺-连接豆蔻酰锚钩,②硫酯-连接脂肪酰锚钩,③硫醚-连接异戊二烯基锚钩和④酰胺-连接糖基磷脂酰肌醇锚钩(图5-46)。这些锚钩结构的每一种都

被多种膜蛋白所利用,但它们都有自己的连接要求,包括专一酶的参与等。

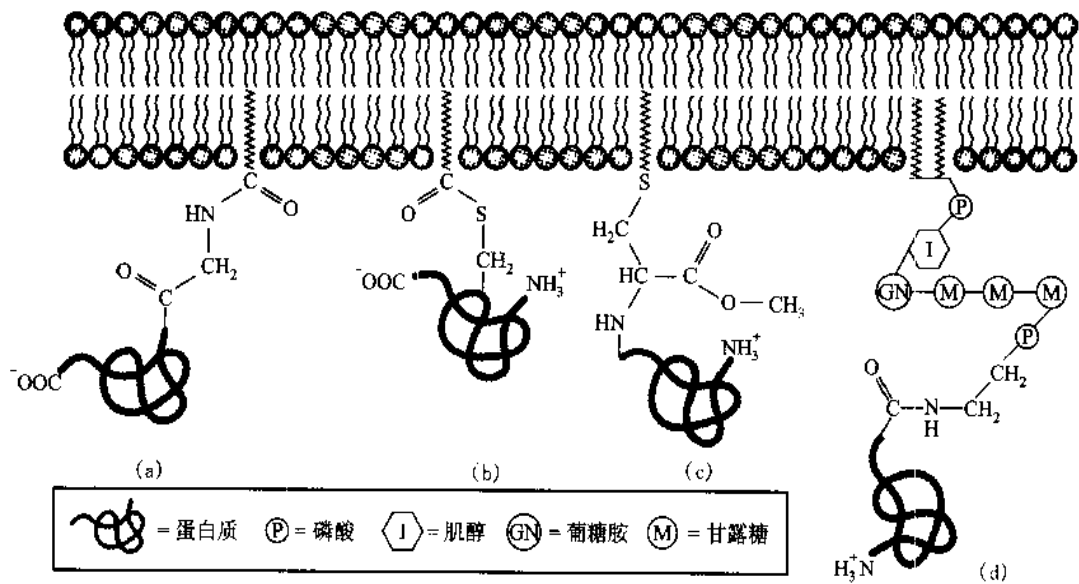


图 5-46 4 种脂锚定膜蛋白中蛋白质部分与脂质分子的连接方式

(a) *N*-豆蔻酰化;(b) *S*-脂肪酰化;(c) 硫醚异戊二酰化;(d) 蛋白质的 C 末端羟基通过酰胺键与 GPI 的乙醇胺残基连接

1. 酰胺连接的豆蔻酰锚钩

豆蔻酸可以通过酰胺键与被选蛋白(靶蛋白)的 N-末端甘氨酸残基的 α -氨基连接。此反应称为 *N*-豆蔻酰化(*N*-myristoylation),它由 *N*-豆蔻酰基转移酶(简称 NMT)催化。*N*-豆蔻酰锚定蛋白包括 cAMP 依赖蛋白激酶(cAMP dependent protein kinase)的催化亚基、G 蛋白 α -亚基(第 1 章),某些反转录病毒(retrovirus),包括 AIDS 的病原体 HIV-1(人免疫缺陷病毒-1)的 gag 蛋白(如 p24、p9、p7 等,见图 5-56)。

2. 硫酯连接的脂肪酰锚钩

各种细胞和病毒蛋白质含有通过酯键与多肽链的 Cys 残基侧链,有时与 Ser 或 Thr 残基侧链共价连接的脂肪酸。这些脂肪酸包括豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和油酸。通过脂肪酰硫酯键锚定于膜的蛋白质有 G 蛋白偶联受体,几种病毒的表面糖蛋白和转铁蛋白受体。

3. 硫醚连接的异戊二烯基锚钩

作为锚钩的聚异戊二烯基(萜类)有法尼基(farnesyl)和牻牛儿苗基(geranylgeranyl)。前者是一个倍半萜(C_{15}), $H_3C-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_3$; 后者是一个双萜(C_{20}), $H_3C-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_2-CH_3$,由两个牻牛儿基(单萜 C_{10})组成(见第 2 章)。异戊二烯基的加入

一般发生在靶蛋白 C-末端 CAAX 序列的 Cys 残基上,这里 C 是 Cys, A 是任一脂肪族氨基酸残基, X 是任一氨基酸残基。发生异戊二烯化(prenylation)反应时,一个专一蛋白酶断去 3 个 C-末端残基(AAX),新末端 Cys 的羧基被甲基化成酯。所有这些修饰对异戊二烯基锚定蛋白的随后活性都是必要的。异戊二烯基锚定蛋白包括酵母交配因子(yeast mating factor)和纤层蛋白(lamin),后者是内核膜中核纤层(nuclear lamin)的结构组分。

4. 糖基磷脂酰肌醇锚钩

糖基磷脂酰肌醇(GPI)是通过连接在一个寡糖上的磷酸乙醇胺残基修饰靶蛋白的 C-末端氨基酸。此寡糖又被连接在磷脂酰肌醇的肌醇部分(图 5-46)。寡糖一般由一个保守的四糖核心(Man-Man-Man-GlcNAc)组成,此核心可以通过修饰甘露糖残基,例如加入各种大小不同的半乳糖寡糖链,额外的

磷酸乙醇胺或 N -乙酰半乳糖胺等而改变。肌醇部分也可加入脂肪酸而得到修饰。GPI 基能把多种表面抗原、粘着分子和细胞表面水解酶锚定在真核生物的质膜上。GPI 锚钩在原核生物和植物中尚未被发现。

九、蛋白质折叠和结构预测

前面介绍了由多肽链折叠形成的二级结构和三级结构的各种花式。这里将讨论蛋白质折叠的信息、动力(热力学)和过程(动力学)以及根据氨基酸序列进行的蛋白质结构预测。为讲述方便起见,在讨论折叠之前先引入蛋白质变性的概念。

(一) 蛋白质的变性

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,这种过程称为蛋白质变性(denaturation)。蛋白质变性的实质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,一级结构仍保持完好。

蛋白质变性过程中,往往发生下列现象:

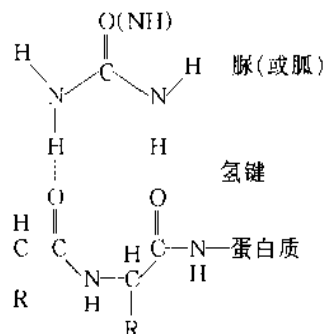
(1) 生物活性的丧失 蛋白质的生物活性是指蛋白质所具有的酶、激素、毒素(toxin)、抗原与抗体等活性,以及其他特殊性质如血红蛋白的载氧能力,肌球蛋白与肌动蛋白相互作用时的收缩能力等。生物活性的丧失是蛋白质变性的主要特征。有时空间结构只有轻微的局部改变,而且这些变化还没有反映到其他物理化学性质上时,生物活性就已经丧失。

(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、盐酸胍等变性剂存在时,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、扩散系数降低以及旋光和紫外吸收的变化。

(4) 生物化学性质的改变 蛋白质变性后,分子结构伸展松散,易被蛋白水解酶分解。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):尿素和盐酸胍(guanidine HCl),能与多肽主链竞争氢键,因此破坏蛋白质的二级结构。尿素或盐酸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盐酸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,如十二烷基硫酸钠(SDS)也是蛋白质的变性剂。其结构式见图 2-4。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疏水内部到水介质的转移自由能。

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 pH 或温度间隔内突然发生的,例如牛胰核糖核酸酶(也称核糖核酸酶 A 或核糖核酸酶)的变性(图 5-47)。

关于蛋白质变性的学说,我国生物化学家吴宪在 20 世纪 30 年代就已提出,天然蛋白质分子因环境的种种关系,从有序而紧密的结构,变为无序而松散的结构,这就是变性。他认为天然蛋白质的紧密结构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。

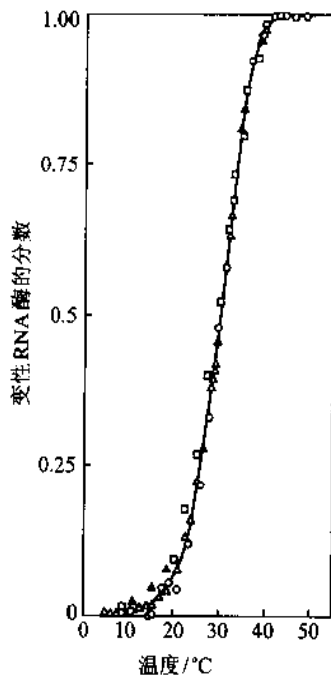


图 5-47 牛胰核糖核酸酶的变性

变性 RNA 酶的分數根据溶液特性粘度增加(□)、在 365 nm 旋光度变化(○)和在 287 nm 紫外吸收变化(△)测量。▲代表冷却后第二次变性。注意不同方法测得的结果是一样的。这里实验是在 pH2.1, 离子强度 0.019 mol/L 条件下进行的如果在生理条件下, RNA 酶更加稳定, 变性约在 70~80°C (变性的中点温度称熔点 T_m) 时才发生

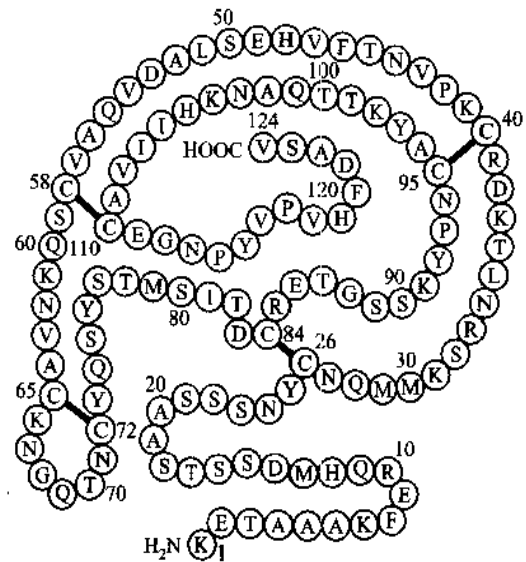


图 5-48 核糖核酸酶 A 的化学结构

RNA 酶 A 是由 124 个氨基酸残基组成的单个多肽链, 它由 4 个链内二硫桥在 Cys26 和 Cys84, Cys40 和 Cys95, Cys58 和 Cys110 以及 Cys65 和 Cys72 之间交链而成。图中短黑棒代表二硫桥

(二) 氨基酸序列规定蛋白质的三维结构

从本章前部分的讨论中多少知道蛋白质三维结构与其氨基酸序列有关。多肽链的二级结构决定于短程序列(short-range sequence), 三维结构主要决定于长程序列(long-range sequence)。

1. 核糖核酸酶的变性与复性实验

蛋白质的氨基酸序列规定它的三维结构这一结论最直接和最有力的证据来自某些蛋白质的可逆变性实验, 首先是 20 世纪 60 年代 Anfinsen C. 进行的牛胰核糖核酸酶(RNA 酶)复性的经典实验。当天然的 RNA 酶(图 5-48 和图 4-1)在 8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍存在下用 β -巯基乙醇处理后, 分子内的 4 个二硫键则被断裂, 紧密的球状结构伸展(unfold, 或译为解折叠)成松散的无规卷曲构象, 然而当用透析方法(见第 7 章)将尿素(或盐酸胍)和巯基乙醇除去后, RNA 酶活性又可恢复, 最后达到原来活性

的 95%~100% (图 5-49)。并发现如果不事先加入尿素或盐酸胍使酶变性,则 RNA 酶很难在 37°C 和 pH7 的条件下被 β -巯基乙醇还原。

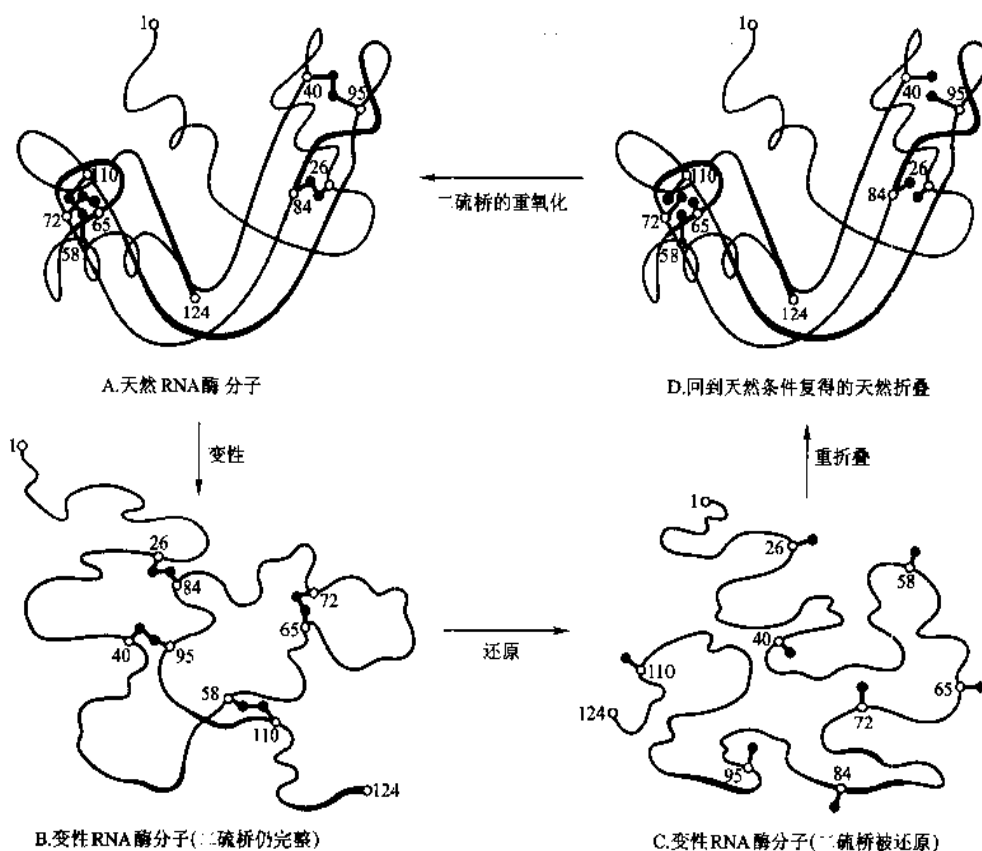


图 5-49 核糖核酸酶 A 的变性与复性示意图

2. 二硫桥在稳定蛋白质构象中的作用

经多方面的分析表明,复性后的产物与天然的 RNA 酶并无区别,所有正确配对的二硫键都获得重建。值得注意的是,在复性过程中肽链上的 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 个正确配对的二硫键的概率是 $1/7 \times 1/5 \times 1/3 = 1/105$ 。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 4 个只有一种可能。事实上,当还原后的 RNA 酶在 8 mol/L 尿素中被重新氧化时,只恢复原来天然酶活性的 1% 左右。这说明 RNA 酶肽链上的一维信息控制肽链自身折叠成特定的天然构象,并由此确定了 Cys 残基两两相互接近的正确位置。由此看来,二硫桥对肽链的正确折叠并不是必要的,但它对稳定折叠态结构作出贡献。含二硫桥的分子有较小的构象熵变化(因为可转变为伸展态构象的数目较少)并因此而稳定。既然二硫桥能稳定蛋白质结构,那么为什么大多数蛋白质不含二硫桥呢?确实二硫桥相对地较少,它主要存在于分泌到细胞外的蛋白质如核糖核酸酶和胰岛素等。这可能是因为大多数细胞内的环境是相当还原的,它倾向于保持巯基处于还原态。

现在可以比较肯定地说,蛋白质的三维结构归根结底是由一级序列决定的。也就是说三维结构是多肽链上的各个单键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刚性平面性质 $C_{\alpha}-C$ 和 $C_{\alpha}-N$ 键旋转的可允许角度、肽链中疏水基和亲水基的数目和位置、带正电荷和负电荷的 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。

(三) 蛋白质折叠的热力学

前面曾考虑了稳定蛋白质三维结构的各种非共价键及其键能。然而蛋白质折叠归根结底取决于在某温度 (T) 下折叠态 (F) 和伸展态 (U) 之间的吉布斯 (Gibbs) 自由能差 (ΔG):

$$\Delta G = G_F - G_U = \Delta H - T\Delta S = (H_F - H_U) - T(S_F - S_U) \quad (1)$$

在伸展态中多肽主链及其侧链是与溶剂水 (也称介质水或环境水) 相互作用的, 因此折叠时自由能变化 (ΔG) 的任何测量必须考虑多肽链和溶剂两者对焓变化 (ΔH) 和熵变化 (ΔS) 的贡献:

$$\Delta G_{\text{总}} = \Delta H_{\text{链}} + \Delta H_{\text{溶剂}} - T\Delta S_{\text{链}} - T\Delta S_{\text{溶剂}} \quad (2)$$

如果对方程 (2) 右边 4 项的每一项都理解, 那么对蛋白质折叠的热力学基础应该是清楚的。折叠态蛋白质与伸展态相比, 它是高度有序的结构, 因此 $\Delta S_{\text{链}}$ (构象熵变化) 是负数, 并因而方程中 $-T\Delta S_{\text{链}}$ 项是正值。其他各项取决于特定的全体侧链的本质。 $\Delta H_{\text{链}}$ 的本质, 决定于残基与残基的相互作用和残基与溶剂的相互作用。

折叠态蛋白质中疏水侧链主要是通过弱范德华力 (分散效应) 彼此相互作用。伸展态蛋白质中疏水侧链与溶剂相互作用, 其作用力比分散效应强, 因为极性水分子诱导疏水基团中的偶极, 产生明显的静电相互作用 (范德华力中的诱导效应)。结果是, $\Delta H_{\text{链}}$ 对疏水侧链是正值, 它有利于伸展态。然而 $\Delta H_{\text{溶剂}}$ 对疏水侧链是负值, 它有利于折叠态。这是因为折叠造成许多水分子彼此相互作用 (有利的) 代替水分子与疏水侧链相互作用 (不利的)。 $\Delta H_{\text{链}}$ 大小比 $\Delta H_{\text{溶剂}}$ 小, 但这两项都不大, 一般对折叠不起主要作用。然而 $\Delta S_{\text{溶剂}}$ (疏水熵变化) 疏水侧链是大的正值, 因此极有利于折叠态。这是因为在伸展态时疏水侧链强迫溶剂水有序化的结果。

对极性侧链 $\Delta H_{\text{链}}$ 是正值, 而 $\Delta H_{\text{溶剂}}$ 是负值。因为溶剂水分子在极性基团周围在一定程度上也是有序的, 所以 $\Delta S_{\text{溶剂}}$ 是小的正值。对蛋白质的极性侧链来说, $\Delta G_{\text{总}}$ 接近于零, 对蛋白质折叠不作实质性的贡献 (图 5-50)。

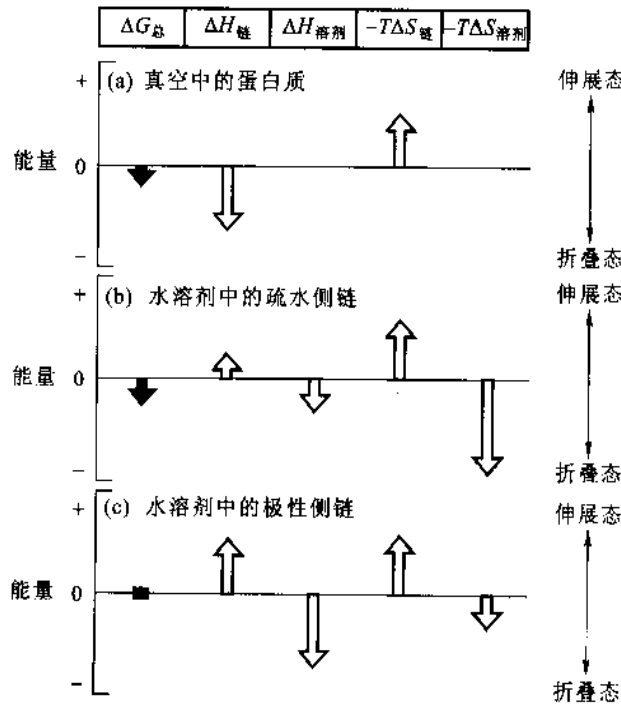


图 5-50 决定球状蛋白质折叠自由能的各项的贡献方式的图解

总之, 构象熵变化 ($\Delta S_{\text{链}}$) 是阻碍折叠, 而疏水熵变化 ($\Delta S_{\text{溶剂}}$) 和因分子内侧链相互作用引起的总焓

变化 ($\Delta H_{\text{链}} + \Delta H_{\text{溶剂}}$) 是有利于折叠; 对于典型的蛋白质来说, 对折叠结构的稳定性作出单项最大贡献的是疏水残基引起的 $\Delta S_{\text{溶剂}}$ (图 5-50)。在不同蛋白质中总熵变化 ($\Delta S_{\text{链}} + \Delta S_{\text{溶剂}}$) 和总焓变化对折叠结构的稳定性所做的贡献的份额是不同的 (表 5-5)。但总的结果一样, 折叠结构在生理条件下是自由能最低的构象, 因此多肽链的折叠是自发过程。

表 5-5 几种蛋白质折叠的热力学数据(25℃)

蛋白质	条 件	$\Delta G/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta H/(kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta S/(J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})$
核糖核酸酶 A	pH 2.5	-7.3	238	-774
胰凝乳蛋白酶原	pH 3.0	32	-163	439
肌红蛋白	pH 9.0	-57	-175	-397
β -乳球蛋白	5 mol/L 尿素	-1.7	+88	+301

(四) 蛋白质折叠的动力学

1. 蛋白质折叠不是通过随机搜索找到自由能最低的构象

Anfinsen 的重折叠实验和折叠热力学分析表明, 至少某些球状蛋白质的天然构象是生理条件下热力学上最稳定的状态。但是一个给定蛋白质是如何达到这样一种稳定状态的, 这是一件很复杂的事。Levinthal C. 在 1968 年曾指出, 对于一个典型的蛋白质, 它不可能有那么多的时间对所有可能的结构都搜索一遍以找出自由能最低的构象。他计算了一个含 100 个氨基酸残基的蛋白质, 如果每个残基可采取 3 个不同的位置, 那么其构象的总数为 3^{100} , 即 5×10^{47} 。如果一种构象转变为另一种构象, 也即每搜索一种可能的构象, 需要 10^{-13} s 时间, 那么总搜索时间是 5×10^{34} s 或 1.6×10^{27} 年! 显然计算的与实际的折叠时间 (一般不到 1 秒~几分钟) 相距太远。这一矛盾被称为“Levinthal 疑题”。

Levinthal 疑题迫使人们对蛋白质折叠的途径提出新的考虑, 并为此作了不少努力。发现此疑题的出路在于认识累积选择 (cumulative selection) 的力量。所谓累积选择就是在每次搜索时把正确折叠的那部分结构保留下来。因此蛋白质折叠的实质就是保留局部正确折叠的中间体。但研究这些中间体困难很多, 例如蛋白质的稳定性有限, 通常含 100 个残基的蛋白质, 其分子折叠态和伸展态之间的自由能差值仅为 40 kJ/mol 左右, 每个残基的平均稳定能只有 0.4 kJ/mol, 它少于无规热能 (2.5 kJ/mol, 在室温下)。这意味着正确的中间体, 特别是在折叠早期形成的中间体有可能被丢失。至今蛋白质折叠对理论家和实验家都还是有争论的问题。

2. 用于研究折叠中间体的一些方法

折叠是很快的, 许多蛋白质的折叠时间不到 1 s。折叠中间体是在很短时间内形成并存在的。例如细胞色素 c 中 44% 的 α 螺旋是在重折叠启动后的 4 ms 内形成, 其余的 56% 在 10 ms 到 1s 内完成。因此平衡条件下研究折叠虽然方便, 但是折叠过程中的很多信息将被丢失。现在使用快速动力学方法 (见第 9 章及所列参考书 [4, 9]), 如停流法 (stopped flow) 和温度跃迁法 (temperature jump), 并结合几种光谱性质如荧光、圆二色性等的监控, 已有可能分析折叠过程中的一些中间体。

用于中间体检测、捕获和表征的还有许多其他方法和技术, 例如脉冲标记 NMR (pulsed-label NMR), 即把脉冲氢-氘交换和核磁共振波谱结合起来使用。脉冲 H-D 交换 (脉冲是短间接触同位素的意思) 用于测定蛋白质中某些质子与周围溶剂中的质子发生交换的速率。蛋白质中可交换的质子主要是主链上的酰胺质子, 少数是侧链上的氨基、羧基等的质子。在伸展区或在折叠和伸展之间快速变动的区域, H-D 交换很快, 但在折叠区如 α 螺旋、 β 折叠片或 β 转角中由于许多这样的质子参与氢键形成, 交换就慢, 需要许多分钟, 甚至几小时。实验时, 蛋白质样品先在 D_2O -变性剂中解折叠, 使酰胺 NH 基转变为 ND 基 (图 5-51)。然后用 D_2O (重水) 稀释样品降低变性剂浓度以启动重折叠。开始时大多数 ND 基处于易交换的状态, 但随后由于形成二级结构和三级结构而受到保护, 因此不易被交换。被交换的程度通过用 H_2O 稀释在 D_2O 中的样品, 以 H 交换裸露位置上的 D 进行探测。选用高 pH (例如 pH 9) 加速交换的进

行(可接近的质子需 ~ 1 ms)。约 10 ms 后将 pH 降至 4 以停止标记(pH4 时,酰胺质子实际上不发生交换)。标记位置的图案用二维 NMR 谱进行测定。

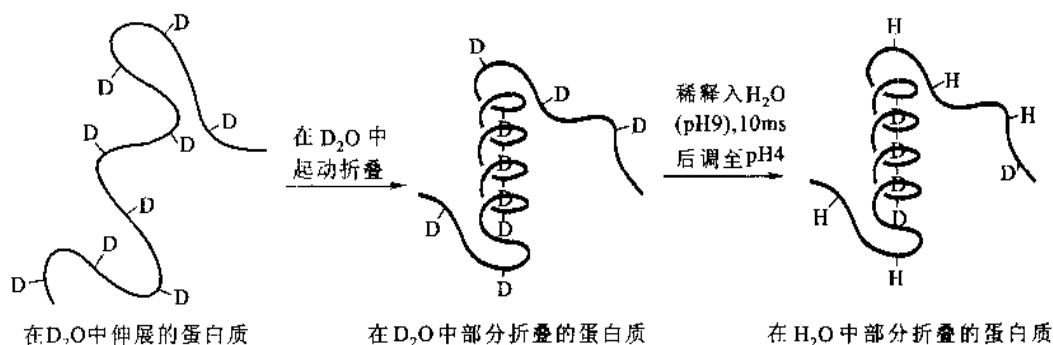


图 5-51 脉冲氘-氫交换用于监控蛋白质折叠中二级结构的形成

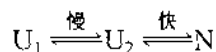
此外位点专一诱变(site specific mutagenesis)、蛋白质设计和蛋白质工程技术也已用于折叠的研究(见下册第 40 章)。

3. 蛋白质折叠经过熔球态的中间体阶段

大多数小的蛋白质例如牛胰核糖核酸酶在变性条件下能发生可逆伸展,过程是协同和突发的。当蛋白质构象的几个不同的指标(特性粘度、旋光度和紫外吸收)在平衡条件下被监控时,它们经常作为温度(或变性剂浓度)的函数一起发生变化(图 5-47);并且不论从低温到高温(变性)还是从高温到低温(复性),转换是一样的。这些观察表明只有两种构象——天然态 N 和伸展态 U,以可观测的量存在,并且它们处于快速平衡中:

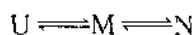


因此在热(或变性剂)诱导转换的中点,半数分子是完全的伸展态,另一半数分子是完全的折叠态。然而快速动力学研究揭示,RNA 酶的重折叠表现为快相(毫秒范围)和慢相(10~100 s)的双相动力学过程。认为这是由于存在两种不同的伸展态 U_1 和 U_2 的结果。其重折叠反应可表示为:



式中 U_1 是完全的伸展态,它以慢速率转换为另一种伸展态 U_2 ,后者以快速率完成折叠。虽然 U_1 和 U_2 表观上都是伸展形式,但 U_2 (中间态)易形成部分折叠的结构,并以此为核心折叠成天然构象(N)。

其他蛋白质例如 α -乳清蛋白在某些变性条件下平衡中呈现 3 种状态,除 U 和 N 外还有另一种状态。 α -乳清蛋白(相对分子质量为 14×10^3)能进行酸诱导的构象转换。远紫外 CD 光谱研究证明,在 pH4 时 α -乳清蛋白具有和天然蛋白一样的二级结构,然而近紫外 CD 光谱显示,许多芳香族侧链的相互作用被酸处理破坏,也像用 6 mol/L 盐酸胍或其他强变性剂处理时那样。流体动力学研究表明,pH4 时 α -乳清蛋白分子的凝缩程度与天然分子相近。相反,强变性剂产生的无规卷曲则伸展得多。这些平衡研究指出,蛋白质折叠过程中存在一个熔球态,它含有二级结构,但无完整的三级结构。这里,球字是突出它的凝缩状态,熔字是强调它的二级结构单元之间相互作用的变动性质。实际上,熔球态 M 是许多蛋白质中伸展态和天然态之间常见的中间体:



形成熔球的驱动力主要是侧链间的疏水相互作用(回忆前述),因此成球凝缩也称疏水收缩(hydrophobic collapse)。

熔球形成也受二级结构单元的形成所驱动。许多短肽在水中具有相当大的螺旋形成潜力。熔球的疏水内部通过屏蔽主链上酰胺基和羰基被水竞争吸引稳定了新生的螺旋。有许多螺旋含有疏水面,疏水面

间的相互作用又促进疏水收缩。因此疏水收缩和二级结构的稳定是熔球形成中交互增强的过程。目前已知球状蛋白质的折叠涉及以下几个步骤:①由完全的伸展态快速、可逆地形成局部二级结构(某些 α 螺旋和 β 折叠片段),此谓成核过程(nucleation);②通过折叠核(局部二级结构)的协同聚集形成初始的结构域;③并由这些结构域装配成熔球态;④对结构域的构象进行调整;⑤最后形成具有完整三级结构的蛋白质单体或天然蛋白质。

4. 体内蛋白质折叠有异构酶和伴侣蛋白质参加

如前面看到的,在体外蛋白质的重折叠不需要额外的分子参与。然而在体内蛋白质折叠却是另一种情形。在体外许多蛋白质的折叠要比在体内慢得多,效率很低。其原因就是体内蛋白质折叠是在催化剂的帮助下进行的。

新生蛋白质中正确配对的二硫键形成受蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)的催化。PDI与蛋白质底物的多肽主链结合,并优先与含半胱氨酸残基的肽发生相互作用。PDI广泛的底物专一性使它加速多种含二硫键蛋白质的折叠。通过二硫键的改组(shuffling)PDI能使蛋白质很快地找到热力学上最稳定的配对方式。PDI的催化机制如下:PDI含有两个-Cys-Gly-His-Cys-序列。这些Cys的巯基在生理pH下具有高度的反应性,因为它们pK(7.3)值比蛋白质中大多数巯基的pK(8.5)值低。蛋白质底物的二硫键受酶的RS⁻基攻击,形成共价的酶-底物中间体。此时被释放的底物巯基能自由攻击另一个底物二硫键,形成不同的配对。PDI在加速折叠中间体二硫键改组中起特别重要的作用,例如此酶使牛胰蛋白酶抑制剂中间体二硫键改组的速率提高6000倍。

蛋白质中肽键几乎总是反式构型的,但X-Pro肽键(X代表任一残基)是例外,其中6%或更多一些是顺式构型(图4-4)。脯氨酰异构化是体外许多蛋白质折叠的限速步骤。自发的异构化很慢,因为羰基碳和酰胺氮之间的键(肽键)具有部分双键性质(见第4章)。肽基脯氨酰异构酶(peptidyl prolyl isomerase)通过扭转肽键致使C、O和N原子不再是共平面的方式加速顺-反异构化。在此过渡态中,因为共振降到最小,C-N键的单键性质增强,因此,异构化的活化能降低。

伸展的和部分折叠的蛋白质在高浓度时倾向于聚集,变性蛋白质在体外的重折叠常是在稀溶液中进行,以便使分子间的接触和聚集降到最小。然而体内蛋白质折叠却在很浓稠的介质(细胞溶胶和内质网腔)中高效地发生。最近研究揭示,有一个称分子伴侣(molecular chaperone)的蛋白质家族涉及蛋白质折叠。它们通过抑制新生肽链不恰当的聚集并排除与其他蛋白质不合理的结合,协助多肽链的正确折叠。许多这类蛋白质最初被鉴定为热休克蛋白质(heat shock protein),它们在细胞中通过提高温度或其他逆境(例如自由基损伤)可诱导产生。其中研究得最透彻的是hsp70蛋白和所谓陪伴蛋白(chaperonin)。Hsp70是一类 $M_r 70 \times 10^3$ 的热休克蛋白质,它在进化上是高度保守的,大肠杆菌和人的这种蛋白,其氨基酸序列有50%是相同的。Hsp70蛋白由ATP酶结构域和肽结合结构域组成。陪伴蛋白也称cpn60或snp60,是一类 $M_r 60 \times 10^3$ 的热休克蛋白质。

分子伴侣在折叠过程中与多肽链的相互作用尚未完全了解。已清楚的是ADP-分子伴侣复合物能与部分折叠结构中暴露的疏水区有效地结合。可能伴侣蛋白质能识别靶蛋白上暴露的螺旋或其他二级结构元件。此相互作用使伴侣分子可指导和调节随后的折叠过程(详见下册第38章)。

(五) 蛋白质结构的预测

Anfinsen的RNA酶重折叠实验,为从氨基酸序列预测蛋白质的三维结构提供了实验依据。如果我们掌握了蛋白质折叠规律,那么只要从它的序列知识出发就可以描述任何一种蛋白质的三维结构。虽然今天离这一目标还有相当距离,但是预测工作已有很好的开端。特别是蛋白质结构的预测是全新蛋白质设计和蛋白质工程的重要内容之一,这更促进预测工作的发展。

1. 二级结构的预测

氨基酸残基在二级结构元件中出现频率的研究揭示,某些残基如Glu、Met、Ala和Leu在 α 螺旋中出现的频率比在其他二级结构元件中高。相反,Gly和Pro在 α 螺旋中频率很低。但它们在 β 转角中很高。另一些残基包括Val、Ile和芳香族氨基酸在 β 折叠片中频率很高,而Asp、Glu和Pro在 β 折叠片中则很

低。这表明各种残基形成各种二级结构的倾向性是不同的。

二级结构预测始于20世纪60年代,至今已有30多年的历史。在此期间提出了多种预测方法。其中相对简单并具有相当准确性(达60%~70%)的是Chou p. 和 Fasman G 于1974年提出的预测算法。Chou·Fasman算法是一种基于单残基统计的经验预测方法。通过统计获得的单残基构象倾向性因子(propensity)被用于二级结构预测。残基的倾向性因子被定义为:

$$P_i = A_i / T_i$$

式中下标*i*代表构象态(*i*= α 、 β 、c、t,分别为 α 螺旋、 β 折叠片、无规卷曲和 β 转角); T_i 是所有被统计残基处于第*i*种构象态的分数; A_i 是第*A*种残基的对应分数。如果*i*= α ,则 P_α 为形成 α 螺旋的倾向性因子; $P_i > 1.0$ 表示该残基倾向于形成第*i*种构象态, $P_i < 1.0$ 则表示倾向于形成其他构象态。

表5-6中的数据是根据对29种已知结构的蛋白质共4741个残基所作的统计分析结果。表中的 P_α 和 P_β 值按其大小顺序排列,可把20种残基分为6个组(H、h、I、i、b和B)。例如 P_α 分为 H_α (强螺旋形成者)、 h_α (螺旋形成者)、 I_α (弱螺旋形成者)、 i_α (螺旋形成不敏感者)、 b_α (螺旋中断者)和 B_α (强螺旋中断者)。

Chou和Fasman根据残基的倾向性因子提出二级结构预测的经验规则,其要点是沿蛋白质序列寻找二级结构成核位点和终止位点。经验规则是:

(1) α 螺旋预测 相邻的6个残基中若有至少4个残基倾向于形成螺旋,则被认为是螺旋核。螺旋核向两端延伸直至4个残基的 α 螺旋倾向性因子的平均值(P_α) < 1.0 为止,并且不允许在螺旋内部出现Pro,它也终止螺旋的延伸。如果延伸的片断(P_α) ≥ 1.03 , $P_\alpha > P_\beta$ 则被预测为 α 螺旋。

(2) 折叠片预测 相邻的5个残基中若有3个残基倾向于形成折叠片,则被认为是折叠核。折叠核向两端延伸直至4个残基的(P_β) < 1.0 ,如果延伸后的片段(P_β) < 1.05 ,则被测为 β 折叠片。

(3) β 转角预测 具有(P_i) > 1.0 ,且 $> (P_\alpha)$ 和(P_β),则被预测为 β 转角。虽然预测 β 转角的实际规则比这更复杂,但它在多数情况下是可行的。

2. 三级结构的预测——折叠的计算机模拟

与二级结构预测相比,三级结构预测成功率则少得多。这可能是因为高级结构折叠关键决定于序列中的间隔距离远的残基之间的特异侧链相互作用。第4章中曾谈到,在进化过程中由一个共同的祖先蛋白形成了一个蛋白质家族,如珠蛋白家族、丝氨酸蛋白酶家族等。同一个家族的蛋白质,即所谓同源蛋白质,具有相似的结构与功能。一般,氨基酸序列相似的蛋白质,它们的三维结构也相似,三维结构比一级结构更保守。因此利用已知类似物结构预测同源蛋白质结构的工作得到发展并取得很好成绩,例如利用溶菌酶的结构参数预测出 β -乳清蛋白的结构。许多蛋白质,如天冬氨酸蛋白酶、免疫球蛋白等结构也是利用这种方法预测获得的。同源蛋白质结构预测大多是在计算机图像工作站上进行的。此方法主要步骤有:结构保守性分析,主链和侧链结构预测以及模型优化。详见本章所列参考书[2]。

在少数实例中利用更直接的方法对小的球状蛋白质的总三维结构进行了预测。方法基于蛋白质自发折叠寻找能量最低点这一事实。计算机模拟中允许无规卷曲通过绕单键旋转对构象进行很多次小的更改。程序对可能的相互作用进行总能量进程的监控并寻找能量最低点。不过这样的搜索即使应用最大、最快的计算机,所需的计算时间量也是巨大的。

近年来由于预测方法和计算机程序的不断改进,在这方面也取得新的成功,例如Rose G和Srinivasan R的预测工作。他们从蛋白质折叠分局部的(local)和层次的(hierarchical)这一假设出发。“局部的”在这里的意思是每个氨基酸残基的折叠行为都受序列中相邻其他残基的影响。“系统的”意思是被折叠的结构是从最小结构单元发展并逐渐变成越来越复杂的实体。这些假设加上其他一些假设是被称为LINUS的计算机程序的基础。LINUS是结构的独立成核单元(Local Independently Nucleated Unit of Structure)的英文缩写。Rose和Srinivasan把LINUS程序用于若干小蛋白质结构的精确预测。图5-52示出LINUS用于几个已知结构的蛋白质结构域的计算结果。有关LINUS程序的细节见本章所列参考书[8]。

表 5-6 氨基酸的 Chou-Fasman 构象倾向性因子及形成螺旋和折叠片能力的分类^a

氨基酸 ^b	P_c	分类(螺旋)	P_β	分类(折叠片)	P_i
Glu	1.51	H _{ii}	0.37	B _β	0.74
Met	1.45		1.05	h _β	0.60
Ala	1.42		0.83	i _β	0.66
Leu	1.21		1.30	h _β	0.59
Lys	1.16		0.74	b _β	1.01
Phe	1.13		1.38	h _β	0.60
Gln	1.11		1.10		0.98
Trp	1.08		1.37		0.96
Ile	1.08		1.60	H _β	0.47
Val	1.06		1.70		0.50
Asp	1.01	L _α	0.54	b _β	1.46
His	1.00		0.87	i _β	0.95
Arg	0.98		0.93	i _β	0.95
Thr	0.83	i _α	1.19	h _β	0.96
Ser	0.77		0.75	b _β	1.43
Cys	0.70	b _α	1.19	h _β	1.19
Tyr	0.69		1.47	H _β	1.14
Asn	0.67		0.89	i _β	1.56
Pro	0.57	B _α	0.55	B _β	1.52
Gly	0.57		0.75	b _β	1.56

a. 该表源自 Chou P. Y. and Fasman G.D. (1978) *Annual Review of Biochemistry*, 47:258; P_c 在预测的经验规则中未被用到, 从略。

b. 表中数据在不同书籍中有出入, 这是因为统计范围有差别(15种、2种或更多种蛋白质), 但不影响用于结构预测。

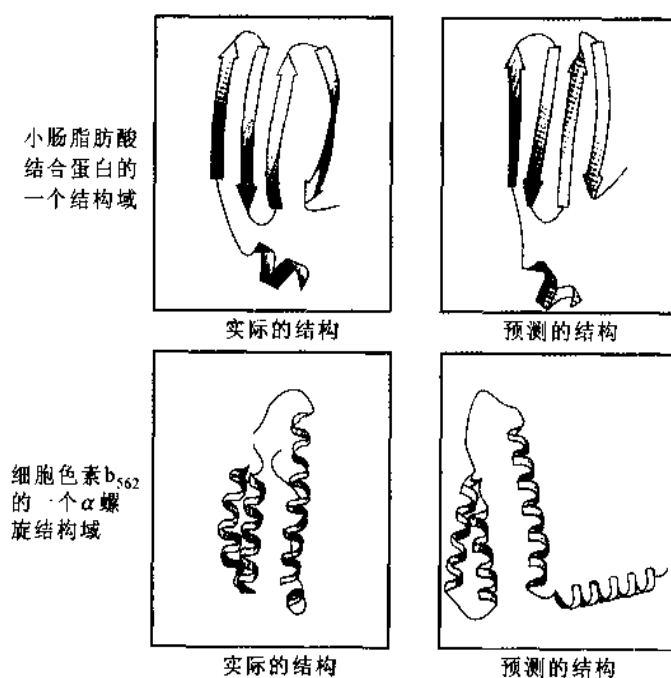


图 5-52 两个蛋白质结构域的实际结构和应用 LINUS 程序预测的结构比较

十、亚基缔合和四级结构

(一) 有关四级结构的一些概念

自然界中很多蛋白质是以独立折叠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。缔合形成聚集体的方式构成蛋白质的四级结构。四级结构的蛋白质中每个球状蛋白质称为亚基,亚基一般是一条多肽链。亚基有时也称单体(monomer),由两个亚基组成的称为二聚体蛋白,由4个亚基组成的称为四聚体蛋白。由两个或两个以上亚基组成的蛋白质统称为寡聚蛋白质、多聚蛋白质或多亚基蛋白质。寡聚蛋白质包括许多很重要的酶和转运蛋白。仅由一个亚基组成并因此无四级结构的蛋白质如核糖核酸酶等称为单体蛋白质。多聚蛋白质可以由单一类型的亚基组成,称为同多聚(homomultimeric)蛋白质,如肝乙醇脱氢酶(α_2)、酵母己糖激酶(α_4)等;或由几种不同类型的亚基组成,称为杂多聚(heteromultimeric)蛋白质,如血红蛋白($\alpha_2\beta_2$)、天冬氨酸转甲酰酶(Γ_6C_6)等。表5-7和表4-4列出几种蛋白质及其亚基的数目和组成。对称的寡聚蛋白质分子可视为是由两个或多个不对称的相同结构成分组成,这种相同结构成分被称为原聚体(protomer)。在同多聚体中原体就是亚基,但是在杂多聚体中原体是由两种或多种不同的亚基组成的。例如血红蛋白分子可看成是由两个原体组成的对称二聚体,其中每个原体是由一个 α -亚基(一条 α -珠蛋白链)和一个 β -亚基(一条 β -珠蛋白链)构成的聚集体($\alpha\beta$)。这里把原体看作单体,可称血红蛋白为二聚体。如果以亚基为单体,则称血红蛋白为四聚体。

表5-7 几种寡聚蛋白质的亚基数目

蛋白质	亚基数目
乙醇脱氢酶	2
苹果酸脱氢酶	2
磷酸葡萄糖异构酶	2
谷胱甘肽还原酶	2
醛缩酶 ^a (aldolase)	3
细菌叶绿素蛋白	3
虫荧光素酶(luciferase)	3
免疫球蛋白	2+2
伴刀豆凝集素A	4
乳酸脱氢酶	4
前清蛋白(prealbumin)	4
丙酮酸激酶	4
天冬氨酸转甲酰酶	6+6
TMV蛋白质盘	17
番茄从矮病毒外壳	180

a. 分离自假单胞杆菌属的一个种(*Pseudomonas putida*)。

在生物分子缔合的研究中亚基、单体、原聚体和分子这几个词,目前尚无明确界定,它们都是一词多义,有时它们等同,有时各异,视具体场合而定。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完全的转运氧及其他功能,而它的任一亚基(α 链或 β 链)或原聚体($\alpha\beta$ -聚集体或称半分子)都不具有这种功能,因此对血红蛋白来说四聚体是它的分子。胰岛素作为单体蛋白质(含二硫键交联的A、B两条链,也称 α 、 β 亚基,参见图4-14和表4-4注释)可以发生缔合,生成二聚体和六聚体。然而胰岛素的功能单位就是这种单体蛋白质,因此对胰岛素而言单体是分子,而二聚体和六聚体是分

子的聚集体。

蛋白质的四级结构涉及亚基种类和数目以及各亚基或原聚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)和作用力(主要是非共价相互作用)。大多数寡聚蛋白质分子中亚基数目为偶数,其中尤以2和4个的为多;个别的为奇数,例如荧光素酶分子含3个亚基。蛋白质分子亚基的种类一般是一种或两种,少数的多于两种(表4-4)。

(二) 四级缔合的驱动力

稳定四级结构的作用力与稳定三级结构的没有本质区别。在几种蛋白质中对这些作用力已作了计算。对于简单的二亚基缔合,典型的缔合常数(association constant)界于 10^{-8} 到 10^{-16} mol/L之间此值相当于缔合自由能50~100 kJ/mol,在37℃。亚基的二聚作用(dimerization)伴随着有利的相互作用包括范德华力、氢键、离子键和疏水作用。但是亚基相互作用会丢失相当量的熵。当两个亚基作为一个实体运动时,对一个亚基将丢失3个平移自由度,因为它被迫跟着另一个运动。此外在亚基界面处的许多残基侧链,原先在亚基表面上能自由运动,现在它们的运动受到亚基缔合的束缚。这种不利的缔合自由能,在25~37℃时约为80~120 kJ/mol。因此,为达到稳定性亚基的二聚作用必须涉及约130~220 kJ/mol有利相互作用。蛋白质界面处的范德华相互作用为数众多,对于一个单体-单体缔合经常达到数百。范德华相互作用可提供总数约150~200 kJ/mol的有利缔合自由能。然而当溶剂从蛋白质表面离开而形成亚基-亚基接触时,丢失的范德华相互作用几乎和形成的一样多。一个亚基只是简单地把水分子换成另一个亚基上的残基侧链。结果是,由于范德华相互作用引起的亚基缔合自由能对二聚体的稳定性实际贡献很小。然而疏水相互作用一般很有利。对许多蛋白质来说,二亚基的缔合过程有效地埋藏原来暴露于溶剂中的表面积高达20 nm²,形成100~200 kJ/mol的有利疏水相互作用。因此它加上亚基-亚基界面处的任一种极性相互作用就足以说明二亚基缔合时观察到的稳定作用。

对某些蛋白质对亚基缔合的稳定性作出贡献的还有一个重要因素是亚基之间二硫桥的形成。例如所有的抗体都是由两条重链($M_r(53\sim75)\times 10^3$)和两条轻链($M_r 23\times 10^3$)组成的四聚体($\alpha_2\beta_2$)。两个亚基间的二硫键将两条重链(α 或H)维系在一起,另两个亚基间的二硫键分别把两条轻链(β 或L)与两条重链连接(图6-29)。

(三) 亚基相互作用的方式

蛋白质亚基之间紧密接触的界面存在极性相互作用和疏水相互作用。因此相互作用的表面具有极性基团和疏水基团的互补排列。如前所述亚基缔合的驱动力主要是疏水相互作用,亚基缔合的专一性则由相互作用的表面上的极性基团之间的氢键和离子键提供。

亚基缔合可分为相同(identical)亚基之间和不相同(nonidentical)亚基之间的缔合。相同亚基之间的缔合可进一步分为同种缔合(isologous)和异种缔合(heterologous)。同种缔合中相互作用的表面是相同的,形成的结构一定是封闭的二聚体,并且具有一个2-重对称轴(图5-53B)。二聚体是四级结构中最常见的聚集体,例如前清蛋白的二聚体,示于图5-54。如果发生进一步的同种缔合使成三聚体或四聚体,则必须利用蛋白质表面上的不同界面。许多蛋白质包括伴刀豆凝集素A和前清蛋白可通过两套同种缔合形成四聚体,这样的结构具有3个不同的2-重对称轴(图5-53E)。

相同亚基的异种缔合中相互作用的表面是不相同的。异种缔合一定是开放末端的结构。许多蛋白质借异种缔合可以几乎无限聚合,形成线性或螺旋形的大聚集体,有些是病毒颗粒(如TMV)的外壳,有些是细胞和组织中具有重要功能的结构,例如微管蛋白(一种 $\alpha\beta$ -二聚体),它能聚合成管状纤维,称为微管。微管是纤毛(cilia)、鞭毛(flagella)和细胞骨架基础的基础(图5-55)。AIDS病的病原体人免疫缺陷病毒(HIV)是由几百个外壳蛋白亚基组成的球形壳包被的,球形壳是一个很大的四级结构聚集体(图5-56)。当然异种缔合由于几何上的原因也形成具有环状对称的封闭环结构,而且是更为常见的结构,例如天冬氨酸转甲酰酶(aspartate transcarbamylase,ATC酶)的催化亚基三聚体(图5-53C)以及神经氨酸酶和蚯蚓血红蛋白的四聚体(图5-53D)。

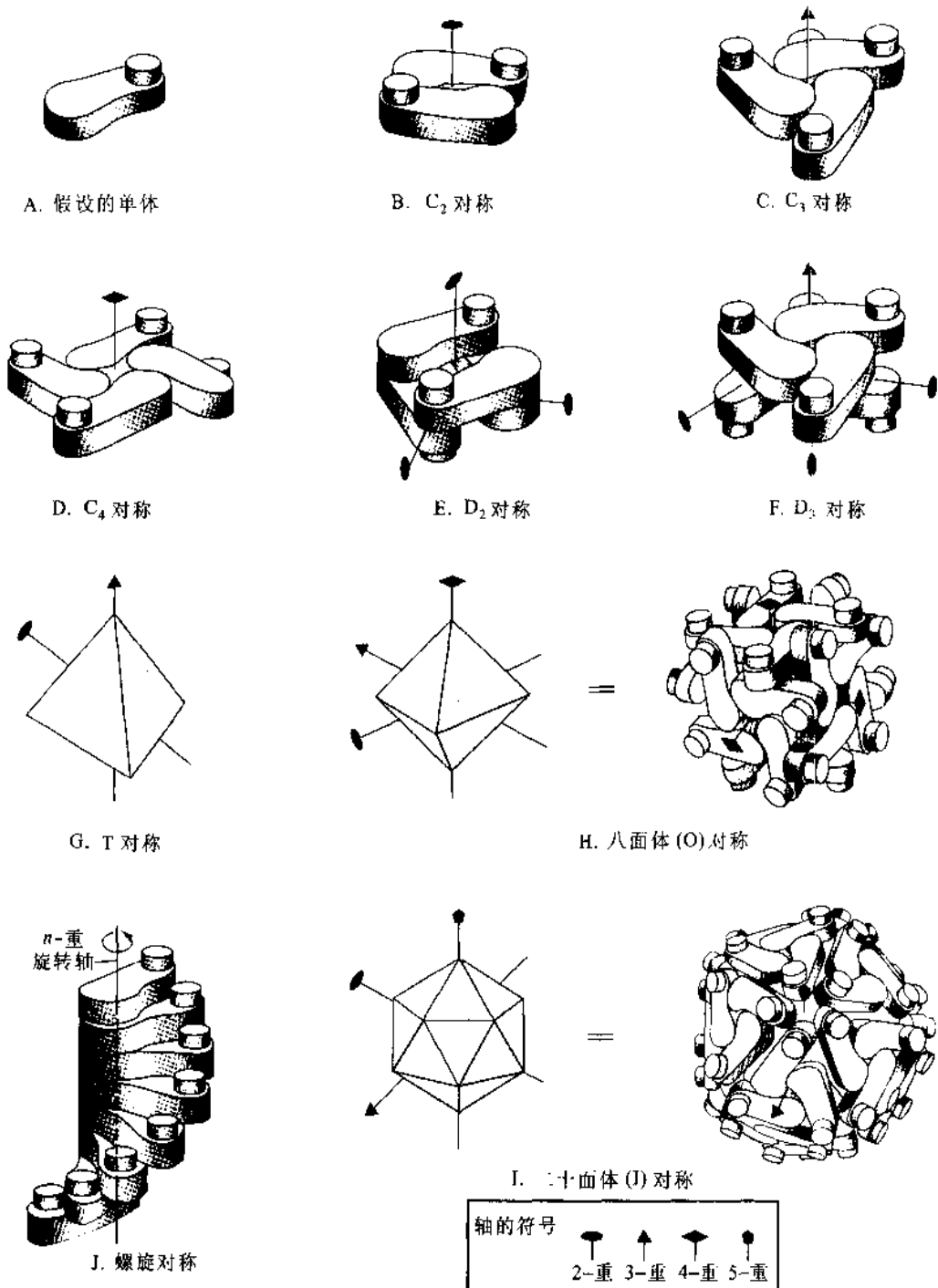


图 5-53 四级结构中相同单体亚基的几种可能的对称排列

A. 假设的不对称单体,为了形象化,采用一只右脚鞋表示;B~D. 环状对称;E和F. 二面体对称;G. 四面体对称;H. 六面体或八面体对称的24-聚体,含4-、3-、和2-重轴;I. 二十面体对称的60-聚体,含5-、3-和2-重轴;J. 螺旋对称,每单体相对前一个单体旋转 $360^\circ/n$ 形成的螺旋

当蛋白质仅由一种亚基组成时,亚基的相互作用和排列四级结构的方式相对地比较简单。但有时来自不同物种的同一种蛋白质呈现不同的四级结合方式。蚯蚓血红蛋白是某些海洋无脊椎动物的载氧蛋白,由紧密排列的四螺旋束构成(图5-36B);它能形成二聚体、三聚体、四聚体、八聚体,甚至更高的聚集体,因不同生物来源而异。

当聚集体涉及两种或多种不同的单体时,其相互作用的性质可以十分复杂。含两种或多种亚基的寡聚蛋白质在不同的亚基对之间呈现不同的亲和力。强变性剂可以使这些蛋白质解离成单体,温和的变性条件可以以有控制的分步方式解离寡聚结构。血红蛋白是一个很好的例证。强变性剂使血红蛋白解离成

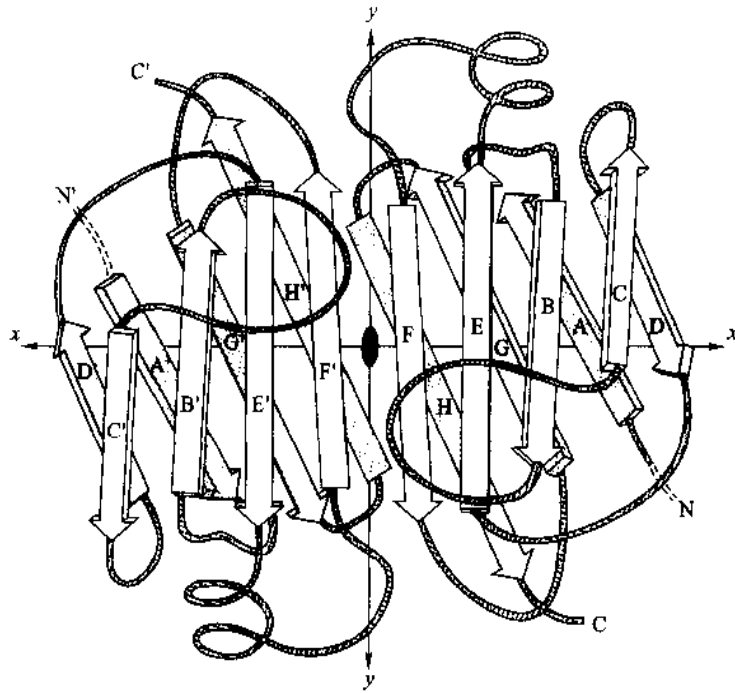


图 5-54 前清蛋白二聚体

它的 2-重对称轴是垂直于纸面上(中心点处)的 Z 轴(未示出)。通过在两个二聚体中的 β 折叠片(D'A'G'H'HGAD)上伸出的侧链之间的同种相互作用形成 D₂ 四聚体。两个二聚体几乎成直角地装配在一起

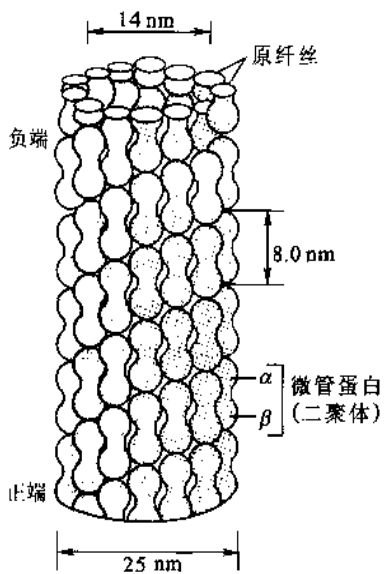


图 5-55 典型的微管结构

微管由 13 根平行的原纤丝(protofilament)排列而成,每根原纤丝由重复的微管蛋白二聚体首-尾连接组成,每个二聚体含一个 α - 和一个 β -微管蛋白分子

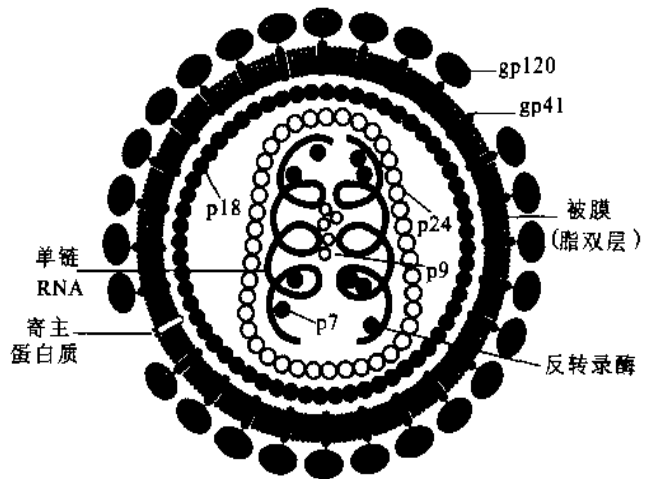


图 5-56 人免疫缺陷病毒(HIV-1)结构的剖面图解

HIV 病毒体(virion)包括核心、核壳和被膜 3 部分。核心含有由两个拷贝的单链 RNA(9.2kb/拷贝)组成的基因组以及反转录酶、整合酶、蛋白酶、调节蛋白、拟核蛋白(p9 和 p7)等。核壳包括由蛋白 p24 组成的内层和 p18 组成的外层。被膜含跨膜的糖蛋白 gp41 和与之非共价结合的 gp120,后者是作为宿主淋巴细胞上 CD4 分子的病毒受体

α - 和 β -亚基。但用温和的变性条件可使血红蛋白几乎完全解离成 $\alpha\beta$ -二聚体,而很少有甚至完全没有单体亚基存在。在这个意义上说血红蛋白像是一个二亚基蛋白质,每个“亚基”(原聚体)是一个 $\alpha\beta$ -二聚体。

(四) 四级结构的对称性

由于多肽链的所有 α -碳是不对称的,并且多肽链几乎总是折叠成不对称或低对称的结构,因此单体蛋白质和亚基都是手性分子。然而X射线结构分析和电子显微镜观察揭示,大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最重要的性质之一。

任何物体旋转 360° 都能使它恢复原状(与原物体叠合)。只有旋转 360° 才能复原的物体称为不对称物体。根据这一定义所有蛋白质亚基和单体都是不对称的,而且由两种或多种不相同的单拷贝亚基构成的寡聚体也是不对称的。对称性是那些含有两个或多个相同亚基或原聚体的聚集体的性质。

对称是物体结构的几何规律性。能使对称物体复原的动作称为对称操作(symmetry operation)。例如旋转(rotation)操作,一个正三角形沿垂直于它的中心轴旋转 120° 能使它复原。又如反映(reflection)操作,左右手通过镜面反映可复原。进行对称操作所依据的几何元素(点、线、面)称为对称元素(symmetry element)。例如进行旋转操作时的对称轴(线),作镜面反映时的对称面(平面),以及做倒置(inversion)操作时的对称中心(点)等。

寡聚体的对称性质可以通过对称操作给予确定。根据旋转轴、镜反映面和倒置对称中心等对称元素及其相应的对称操作可以确定几乎所有寡聚体结构的对称性质。但是与蛋白质聚集体结构有关的对称元素只有旋转轴;镜反映面和倒置对称中心都不可能在寡聚蛋白质中出现,因为它们要求聚集体中存在单体映体,而蛋白质单体都是手性分子。因此旋转轴是对称寡聚蛋白质中唯一可能存在的对称元素。进行旋转操作时,旋转轴不动,物体(如寡聚体)中每一点都绕轴旋转一定角度。能使物体复原的最小旋转角(α)称为基转角。 $2\pi/\alpha = n$, n 是物体绕轴旋转一圈时与原物体叠合的次数,定义为次或重(fold),它一般是2、3、4...的整数。对应的旋转轴称 n -重[对称]轴(图5-53)。

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操作所改变的固定点,则称该物体具有点群对称(point group symmetry)。大多数四级结构的蛋白质都具有这种类型的对称性。最简单的点群对称是环状(cyclic)对称,它存在于只含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,例如肝乙醇脱氢酶(含两个原聚体),血红蛋白(含两个原聚体)都具有 C_2 (2-重环状)对称(图6-8),假单胞杆菌醛缩酶(含3个原体)具有 C_3 (3-重环状)对称(图5-53C)。

具有两个或多个对称轴的聚集体属于高级点群对称,称为二面体(dihedral)点群对称和立方体(cubic)点群对称。如果寡聚蛋白质含有一个 C_n 旋转轴,并且在一个垂直该旋转轴的平面内存在着 n 个与该轴相交的 C_2 轴,则称它为具有二面体对称,用 D_n 表示, n 是 C_n 的轴次。例如伴刀豆凝集素A和前清蛋白的四聚体都呈 D_2 对称,具有3个相互垂直的2-重轴:一个纵轴两个横轴, D_2 对称是四聚体蛋白中最常见的结构(图5-53E和5-54)。天冬氨酸转甲酰酶(见第10章)是 D_3 对称分子,由6个原体组成,每个原体(rc)含一条催化链(c)和一条调节链(r),每3个原体构成一个具有3-重环状对称(C_3)的半酶分子,两个这种半分子背靠背相叠,如图5-57所示。 D_3 对称聚集体含一个3-重轴和3个2-重轴。二面体对称的聚集体可看成是两个相同的具有环状对称(C_n)的亚聚集体的缔合物。

立方体点群对称包括四面体(tetrahedral, T),八面体(octahedral, O)和二十面体(icosahedral, I)等对称(图5-53g, h, i)。立方体点群对称的聚集体呈现同种和异种缔合,具有立方体的4个3-重旋转轴,这些轴是立方体的对角线。二十面体是表面积-体积之比最有利的一种多面体,具有5-、3-和2-重对称。二十面体内接于一个球体中,本身接近于球形。许多球形病毒具有二十面体对称性,例如芜菁黄花叶病毒(turnip yellow mosaic virus)。二十面体是一个中空的外壳,可包裹病毒的遗传物质。

上面谈到的都是以轴线为对称元素,通过绕轴旋转即可复原的聚集体,原体排列成首尾相连的封闭环。某些蛋白质聚集体虽然也是以轴线为对称元素,但它们是通过与之相关的另外两种对称操作:绕轴螺旋旋转或沿轴平移得以复原的。因此聚集体除旋转对称外,尚可表征为螺旋(screw)对称和平移(translational)对称(图5-53j)。螺旋旋转可看成是先平移后旋转的联合操作。在螺旋对称的聚集体中,原体排列成首尾相连而末端开口的螺旋链。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)、螺距和手性来表征。烟草花叶病毒(TMV)是第一个被描述的螺旋聚集体,每3圈49个蛋白质亚基,螺距为

2.3nm,右手螺旋(图5-58)。F-肌动蛋白也是螺旋对称的聚集体,由两条螺旋链构成,它的亚基是G-肌动蛋白(见图6-36C)。平移对称的聚集体如微管中排列成线形的原纤丝(图5-55)。

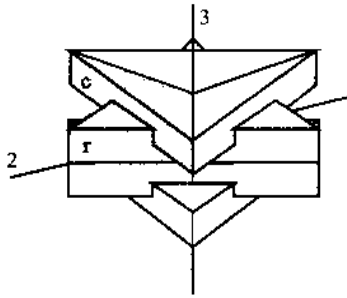


图5-57 天冬氨酸转甲酰酶(ATC酶)的 D_3 对称示意图
图中每轴旋转轴仅示出一个。ATC酶含6个原体,每个原体(深色部分)由一个催化链(c)和一个调节链(r)组成

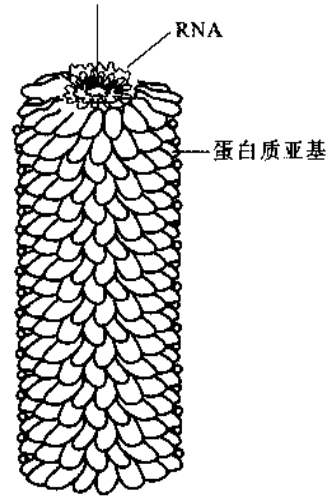


图5-58 TMV片段的结构模型
示出TMV外壳蛋白的螺旋聚集体

(五) 四级缔合在结构和功能上的优越性

1. 增强结构稳定性

亚基缔合的一个优点是蛋白质的表面积与体积之比降低。一个颗粒或球体的半径变大,表面积与体积之比则变小(因为表面积是半径平方的函数,体积是半径立方的函数)。因为蛋白质内部的相互作用在能量上一般有利于蛋白质的稳定,又因蛋白质表面与溶剂水的相互作用常不利于稳定,所以降低表面积与体积的比值总的结果是增强蛋白质结构的稳定性。亚基缔合还可以屏蔽亚基表面上的疏水残基以避免溶剂水。能识别自身或其他亚基的亚基由于结合亚基突变体的能力较弱,因而可排除在遗传翻译中产生的任何错误。

2. 提高遗传经济性和效率

蛋白质单体的寡聚体缔合对一个生物体在遗传上是经济的。编码一个将装配成同多聚蛋白质的单体所需的DNA比编码一条相对分子质量相同的大多肽链要少。决定寡聚体装配和亚基-亚基相互作用的所有信息也都包含于编码该单体所需的遗传物质中。例如,HIV蛋白酶是一个相同亚基的二聚体,它的催化功能与相对分子质量大一倍的单体同源细胞酶是相似的。

3. 使催化基团汇集在一起

许多酶(见第8~10章)至少它们的某些催化能力是来自单体亚基的寡聚缔合,因为寡聚体的形成可使来自不同单体亚基的催化基团汇集在一起以形成完整的催化部位。例如细菌谷氨酰胺合成酶的活性部位是由相邻的亚基对形成的,解离的单体则无活性。

寡聚酶还可以在不同的亚基上催化不同的但有关的反应。例如色氨酸合酶(tryptophan synthase)是一个由不同的亚基对组成的四聚体($\alpha_2\beta_2$)。纯化的 α -亚基催化吲哚甘油-3-磷酸生成吲哚和甘油醛-3-磷酸,而 β -亚基催化吲哚和L-丝氨酸加合而成L-色氨酸。吲哚是前一反应的产物和后一反应的底物,它直接由 α -亚基转移到 β -亚基而不能作为一个游离的中间物存在(见下册第31章)。

4. 具有协同性和别构效应

亚基之所以缔合成寡聚蛋白质还有一个重要原因。大多数寡聚蛋白质调节它们的生物活性(如酶的催化活性)都是借助于亚基相互作用。多亚基蛋白质一般具有多个结合部位,结合在蛋白质分子的特定部

位上的配体对该分子的其他部位所产生的影响(如改变亲和力或催化能力)称为别构效应(allosteric effect)。具有别构效应的蛋白质称为别构蛋白质,如别构酶。别构(或译作变构)一词来自希腊文 allos(其他)和 stereos(部位或空位)。其原义是指蛋白质分子含有不止一个配体结合部位,除活性部位外还有别的配体(如效应物或调节物)的结合部位,称别构部位或调节部位。别构蛋白质分子至少含有两个活性部位,或者还有别构部位。这两种部位可以在同一个亚基上,也可以在不同的亚基上(图 5-57),它们的数目可以相同,也可以不同。别构效应中亚基之间的信息传递是通过蛋白质构象的变化实现的,亚基之间的接触点提供了亚基之间的通讯机制。别构效应具有协同性(cooperativity)。别构效应可分为同促效应和异促效应。同促效应(homotropic effect)发生作用的部位是相同的(例如都是催化部位),也即一种配体(如底物)的结合对在其他部位的同种配体的亲和力的影响,这种影响一般是使亲和力加强,也即第一个配体的结合引起第二个、第三个……配体更容易结合。这样的同促效应被称为具有正协同性。正协同效应表现为 S 形配体结合曲线(图 6-14)。如果第一个配体的结合导致第二个、第三个……更难结合,这样的同促效应则称为具有负协同性,它不呈现 S 型曲线。异促效应(heterotropic effect)发生作用的部位是不同的,也即活性部位的结合行为将受到别构部位与效应物结合的影响。有人只认为异促效应是“别构效应”,因为它才符合“别构”的原义。如果效应物(effector)是降低为使活性部位达到饱和所需的配体(如底物)浓度的,则称它为正效应物或激活剂(activator);如果是升高为使活性部位达到饱和所需的配体浓度的,则称它为负效应物或抑制剂(inhibitor)。别构效应物是细胞代谢库的成分,其浓度的细微变化可以立即调节代谢的需求(见第 10 章和第 39 章)。

应该强调指出,别构蛋白质不管是否存在别构部位(有些别构酶不存在别构部位,只有同促效应),但活性部位之间的同促效应总是有的。同促效应是别构效应的基本,异促效应可看成是对同促效应的进一步调节。

提 要

每一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 射线晶体结构分析。此外紫外差光谱、荧光和荧光偏振、圆二色性、核磁共振和重氢交换等被用于研究溶液中的蛋白质构象。

稳定蛋白质构象的作用力有氢键、范德华力、疏水相互作用和离子键。此外二硫键在稳定某些蛋白质的构象中也起重要作用。

多肽链折叠成特定的构象受到空间上的许多限制。就其主链而言,由于肽链是由多个相邻的肽平面构成的,主链上只有 α -碳的二面角 ϕ 和 ψ 能自由旋转,但也受到很大限制。某些 ϕ 和 ψ 值是立体化学所允许的,其他值则不被允许。并因此提出了拉氏构象图,它表明蛋白质主链构象在图上所占的位置是有限(7.7%~20.3%)。

蛋白质主链的折叠形成由氢键维系的重复性结构称为二级结构。最常见的二级结构元件有 α 螺旋、 β 折叠片和 β 转角等。 α 螺旋是蛋白质中最典型、含量最丰富的二级结构。 α 螺旋结构中每个肽平面上的羧基氧和酰胺氢都参与氢键的形成,因此这种构象是相当稳定的。氢键大体上与螺旋轴平行,每圈螺旋占 3.6 个氨基酸残基,每个残基绕轴旋转 100° ,螺距为 0.54 nm。 α -角蛋白是毛、发、甲、蹄中的纤维状蛋白质,它几乎完全由 α 螺旋构成的多肽链构成。 β 折叠片中肽链主链处于较伸展的曲折(锯齿)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状结构,故称为 β 折叠片,每条肽链或肽段称为 β 折叠股或 β 股。肽链的走向可以有平行和反平行两种形式。平行折叠片构象的伸展程度略小于反平行折叠片,它们的重复周期分别为 0.65 nm 和 0.70 nm。大多数 β 折叠股和 β 折叠片都有右手扭曲的倾向,以缓解侧链之间的空间应力(steric strain)。蚕丝心蛋白几乎完全由扭曲的反平行 β 折叠片构成。胶原蛋白是动物结缔组织中最丰富的结构蛋白,由若干原胶原分子组成。原胶原是一种右手超螺旋结构,称三股螺旋。弹性蛋白是结缔组织中另一主要的结构蛋白质。

蛋白质按其外形和溶解度可分为纤维状蛋白质、球状蛋白质和膜蛋白。 α -角蛋白、丝心蛋白(β -角

蛋白)、胶原蛋白和弹性蛋白是不溶性纤维状蛋白质;肌球蛋白和原肌球蛋白是可溶性纤维状蛋白质,是肌纤维中最丰富的蛋白质。球状蛋白质是一类可溶性的功能蛋白,如酶、抗体、转运蛋白、蛋白质激素等。膜蛋白是一类与膜结构和功能紧密相关的蛋白质,它们又分为膜内在蛋白质、脂锚定蛋白质以及膜周边蛋白质。

蛋白质结构一般被分为4个组织层次(折叠层次),一级、二级、三级和四级结构。细分时可在二、三级之间增加超二级结构和结构域两个层次。超二级结构是指在一级序列上相邻的二级结构在三维折叠中彼此靠近并相互作用形成的组合体。超二级结构有3种基本形式: $\alpha\alpha$ (螺旋束)、 $\beta\alpha\beta$ (如Rossman折叠)、 $\beta\beta$ (β 曲折和希腊钥匙拓扑结构)。结构域是在二级结构和超二级结构的基础上形成并相对独立的三级结构局部折叠区。结构域常常也就是功能域。结构域的基本类型有:全平行 α 螺旋结构域、平行或混合型 β 折叠片结构域、反平行 β 折叠片结构域和富含金属或二硫键结构域等4类。

球状蛋白质可根据它们的结构域分为全 α -结构蛋白质、 α 、 β -结构蛋白质、全 β -结构蛋白质和富含金属或二硫键蛋白质等。球状蛋白质有些是单亚基的,称单体蛋白质,有些是多亚基的,称寡聚或多聚蛋白质。亚基一般是一条多肽链。亚基(包括单体蛋白质)的总三维结构称三级结构。球状蛋白质种类很多,结构也很复杂,各有自己独特的三维结构。但球状蛋白质分子仍有某些共同的结构特征:①一种分子可含多种二级结构元件,②具有明显的折叠层次,③紧密折叠成球状或椭球状结构,④疏水侧链埋藏在分子内部,亲水基团暴露在分子表面,⑤分子表面往往有一个空穴(活性部位)。

蛋白质受到某些物理或化学因素作用时,引起生物活性丢失,溶解度降低以及其他的物理化学常数的改变,这种现象称为蛋白质变性。变性实质是非共价键断裂,天然构象解体,但共价键未遭断裂。有些变性是可逆的。蛋白质变性和复性实验表明,一级结构规定它的三维结构。蛋白质的生物学功能是蛋白质天然构象所具有的性质。天然构象是在生理条件下热力学上最稳定的即自由能最低的三维结构。

蛋白质折叠不是通过随机搜索找到自由能最低构象的。折叠动力学研究表明,多肽链折叠过程中存在熔球态的中间体,并有异构酶和伴侣蛋白质等参加。

寡聚蛋白是由两个或多个亚基通过非共价相互作用缔合而成的聚集体。缔合形成聚集体的方式构成蛋白质的四级结构,它涉及亚基在聚集体中的空间排列(对称性)以及亚基之间的接触位点(结构互补)和作用力(非共价相互作用的类型)。

习 题

- (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? [11.7nm; 28.08nm]
- 某蛋白质的多肽链除一些区段为 α 螺旋构象外,其他区段均为 β 折叠片构象。该蛋白质相对分子质量为240 000,多肽链外形的长度为 5.06×10^{-5} cm。试计算, α 螺旋占该多肽链的百分数。(假设 β 折叠片构象中每氨基酸残基的长度为0.35nm)[59%]
- 虽然在真空中氢键键能约为20 kJ/mol,但在折叠的蛋白质中对蛋白质的稳定焓贡献却要小得多(<5 kJ/mol)。试解释这种差别的原因。[在伸展的蛋白质中大多数氢键的供体和接纳体都与水形成氢键。这就是氢键能量对稳定焓贡献小的原因]
- 多聚甘氨酸是一个简单的多肽,能形成一个具有 $\phi = -80^\circ$, $\psi = +120^\circ$ 的螺旋,根据拉氏构象图(图5-13),描述该螺旋的(a)手性,(b)每圈的残基数。[(a)左手,(b)3.0]
- 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,哪些种形成其他的有规则的结构,哪些种不能形成有规则的结构?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;(7)多聚脯氨酸,pH=7.0。[(1)、(4)和(5)能形成 α 螺旋;(2)、(3)和(6)不能形成有规则的结构;(7)能形成有规则的结构,但不是 α 螺旋]
- 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?[因为甘氨酸是在 α -碳原子上呈对称的特殊氨基酸,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]
- 考虑一个小的含101残基的蛋白质。该蛋白质将有200个可旋转的键。并假设对每个键 ϕ 和 ψ 有两个定向。问:(a)这个蛋白质可能有多少种随机构象(w)?(b)根据(a)的答案计算在当使1mol该蛋白折叠成只有一种构象的结构时构象熵的变化($\Delta S_{\text{折叠}}$)。(c)如果蛋白质完全折叠成由H键作为稳定焓的唯一来源的 α 螺旋,并且每mol H键对焓的贡献为

-5 kJ/mol。试计算 $\Delta H_{\text{折叠}}$ 。(d)根据你的(b)和(c)的答案,计算 25°C 时蛋白质的 $\Delta G_{\text{折叠}}$ 。该蛋白质的折叠形式在 25°C 时是否稳定? [(a) $W - 2^{200} = 1.61 \times 10^{60}$, (b) $\Delta S_{\text{折叠}} = 1.15 \text{ kJ/Kmol}$, (c) $\Delta H_{\text{折叠}} 100 \times (-5 \text{ kJ/mol}) = -500 \text{ kJ/mol}$; 注意, 这里我们没有考虑在螺旋末端处某些氢键不能形成这一事实, 但考虑与否差别很小。] (d) $\Delta G_{\text{折叠}} = -157.3 \text{ kJ/mol}$ 。由于在 25°C 时 $\Delta G_{\text{折叠}} < 0$, 因此折叠的蛋白质是稳定的]

8. 两个多肽链 A 和 B 有着相似的三级结构。但是在正常情况下 A 是以单体形式存在的, 而 B 是以四聚体 (B_4) 形式存在的。问 A 和 B 的氨基酸组成可能有什么差别。[在亚基-亚基相互作用中疏水相互作用经常起主要作用。参与四聚体 B_4 的亚基-亚基相互作用的表面可能比单体 A 的对应表面具有较多的疏水残基]

9. 下面的序列是一个球状蛋白质的一部分。利用表 5-6 中的数据和 Chou-Fasman 的经验规则预测此区域的二级结构。

1 5 10 15 20 25 30
RRPVVLMACLRPVVFITYGDGGTYHWHYH

[残基 4~11 是一个 α 螺旋, 残基 14~19 和 24~30 是 β 折叠片。残基 20~23 很可能形成 β 转角]

10. 从热力学考虑, 完全暴露在水环境中完全埋藏在蛋白质分子非极性内部两种多肽片段, 哪一种更容易形成 α 螺旋? 为什么? [埋藏在蛋白质的非极性内部时, 更容易形成 α 螺旋。因为在水环境中的多肽对稳定焓 ($\Delta H_{\text{折叠}}$) 的贡献要小些]

11. 一种酶相对分子质量为 300 000, 在酸性环境中可解离成两个不同组分, 其中一个组分的相对分子质量为 100 000, 另一个为 50 000。大的组分占总蛋白的三分之二, 具有催化活性; 小的组分无活性。用 β -巯基乙醇(能还原二硫桥)处理时, 大的失去催化能力, 并且它的沉降速度减小, 但沉降图案上只呈现一个峰(参见第 7 章)。关于该酶的结构可作出什么结论? [此酶含 4 个亚基; 两个无活性亚基的相对分子质量为 50 000, 两个催化亚基的相对分子质量为 100 000, 每个催化亚基是由两条无活性的多肽链(相对分子质量为 50 000)组成, 彼此间由二硫键交联在一起]

12. 今有一种植物的毒素蛋白。直接用 SDS 凝胶电泳分析(见第 7 章)时, 它的区带位于肌红蛋白(相对分子质量为 16 900)和 β -乳球蛋白(相对分子质量 37 100)两种蛋白之间, 当这个毒素蛋白用 β -巯基乙醇和碘乙醇处理后, 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(相对分子质量为 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。关于此蛋白的结构, 你能作出什么结论? [该毒素蛋白由两条不同的多肽链通过链间二硫键交联而成, 每条多肽链的相对分子质量各在 13 000 左右]

13. 一种蛋白质是由相同亚基组成的四聚体。(a) 对该分子说出两种可能的对称性。稳定缔合的是哪种类型的相互作用(同种或异种)? (b) 假设四聚体, 如血红蛋白, 是由两个相同的单位(每个单位含 α 和 β 两种链)组成的。问它的最高对称性是什么? [(a) C_4 和 D_2 , C_4 是通过异种相互作用缔合在一起, D_2 是通过同种相互作用缔合在一起, (b) C_2 因为每个 $\alpha\beta$ 二聚体是一个不对称的原聚体]

14. 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。考虑一个多聚体酶复合物的合成, 此复合物含 6 个相同的二聚体, 每个二聚体由一个多肽 A 和一个 B 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聚体酶, 在这一建造过程中每次操作的错误频率为 10^{-8} , 假设氨基酸序列没有错误的话, 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 6 000 个氨基酸连续的多肽链一步合成, 链内含有 6 个多肽 A 和 6 个多肽 B。(2) 该复合物分 3 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 $6 000 \times 10^{-8} = 6 \times 10^{-5}$, (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} 。因此它比一步合成所产生的缺陷频率约低 1 000 倍]

主要参考书

1. 卢光莹, 华子千. 生物大分子晶体学基础. 北京: 北京大学出版社, 1995
2. 来鲁华等. 蛋白质的结构预测与分子设计. 北京: 北京大学出版社, 1993
3. 李庆国, 汪和, 李安之. 分子生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 1992
4. 许根俊. 酶的作用原理. 北京: 科学出版社, 1984
5. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
6. Wilson K, Walker J M. Principles and Techniques of Practical Biochemistry. 5th ed. New York: Cambridge University Press, 2000
7. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995

8. Srinivansan R, Rose G D. LINUS:A hierarchic procedure to predict the fold of a protein, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 1995, 22:81~89
9. Mathews C K, van Holde K E. *Biochemistry* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1990

(徐长法)

第6章 蛋白质结构与功能的关系

在前一章中我们讨论了蛋白质的三维结构,了解三维结构是理解蛋白质如何行使其功能的基础。然而球状蛋白质的构象不是刚性、静止的,而是柔性、动态的。蛋白质功能总是跟蛋白质与其他分子相互作用相联系。相互作用中蛋白质构象有时发生些微的改变,有时发生剧烈的变化(肽段可能移动几个纳米)。在第5章中我们看到纤维状蛋白质作为细胞和组织结构元件的功能是基于相同多肽链之间稳定的长时间的四级相互作用。本章将介绍动态的球状蛋白质如何在与其他分子的相互作用中行使它们的生物功能,包括氧的运转、免疫应答和肌肉收缩。酶是具有另一重要功能——催化作用的特殊蛋白质,将在第8~10章专门介绍。

在蛋白质与其他分子的相互作用中能被它可逆结合的其他分子称为配体。配体可以是任何一种分子,包括另一种蛋白质分子。蛋白质-配体相互作用的瞬时性质对生命至关重要,因为它允许生物体在内、外环境发生变化时,能快速、可逆地作出反应。蛋白质上的配体结合部位和配体在大小、形状、电荷以及疏水或亲水性质方面都是互补的。

一、肌红蛋白的结构与功能

随着地球大气的不断变化,生物也在不停地进化。光合作用产生氧气是大气变化的主要因素。生物进化到以氧为基础的代谢是具有高度适应性的表现,例如糖的有氧代谢比相应的厌氧过程产生更多的能量。在进化过程中出现两个重要的氧结合蛋白质,肌红蛋白和血红蛋白(图4-19),这样有氧代谢过程不再受 O_2 在水中溶解度低的限制。肌红蛋白和血红蛋白是两个研究得最透彻的蛋白质,它们是蛋白质结构与功能的范例。

(一) 肌红蛋白的三级结构

肌红蛋白(myoglobin, Mb)是哺乳动物细胞主要是肌细胞贮存和分配氧的蛋白质。潜水哺乳类如鲸、海豹和海豚的肌肉中肌红蛋白含量十分丰富,以致使它们的肌肉呈棕红色。由于肌红蛋白贮存氧使这些动物能长时间地潜在水下。肌红蛋白是由一条多肽链和一个辅基血红素构成,相对分子质量为16700,含153个氨基酸残基。除去血红素的脱辅基肌红蛋白称珠蛋白(globin),它和血红蛋白的亚基(α -珠蛋白链和 β -珠蛋白链)在氨基酸序列上具有明显的同源性(图4-18),它们的构象和功能也极其相似。

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 J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,要求很多复杂的计算机运算。肌红蛋白的X射线晶体学分析分3个阶段完成:第一阶段的分析,分辨率为0.6 nm,可以辨认出肌红蛋白分子多肽主链的折叠和走向;第二阶段的分析,分辨率达到0.2 nm水平,分子的侧链基团都能辨认出来;第三阶段,分辨率为0.14 nm,所有氨基酸残基都能识别。观察到的残基序列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,分子大小约为4.5 nm×3.5 nm×2.5 nm。如图6-1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(N-末端段)、AB、BC、……FG、GH、HC(C-末端段)。因此各残基除了有一套从N端开始计算的序列号码外,还按在各螺旋段中的位置另外给出编号,如第93位His又编为F8,表示该His在F螺旋的第8位置上。

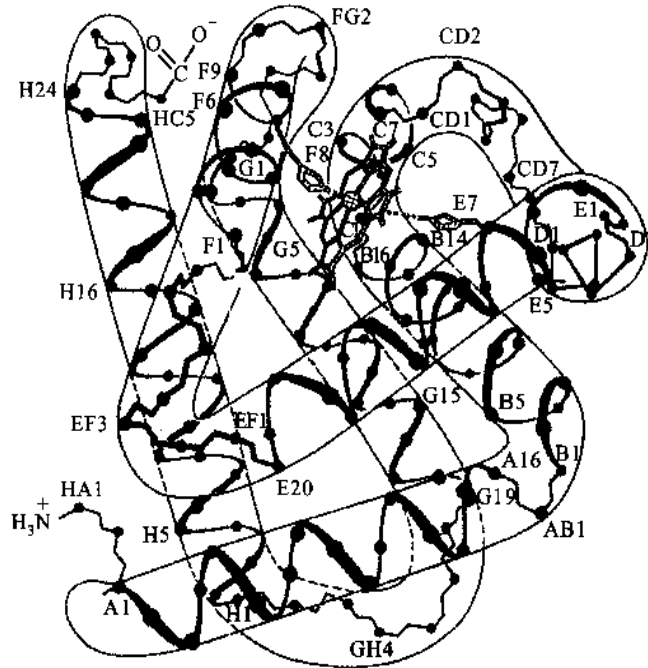


图 6-1 抹香鲸肌红蛋白的三级结构
(根据 0.2 nm 分辨率的 X 射线晶体学资料建立的模型)

8 个螺旋段大体上组装成两层,构成肌红蛋白的单结构域。拐弯处 α 螺旋受到破坏,拐弯是由 1~8 个残基组成的无规卷曲,在 C-末端也有一段 5 残基的松散肽链。肌红蛋白中 4 个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。

(二) 辅基血红素

作为有机化合物的蛋白质不能直接与氧发生可逆结合。但是某些过渡金属的低氧化态(特别是 Fe^{2+} 和 Cu^+)具很强的结合氧倾向。进化过程中肌红蛋白-血红蛋白家族选中了二价铁 $\text{Fe}(\text{II})$ 作为氧结合部位。某些节肢动物的血蓝蛋白(hemocyanin)中结合氧的是一价铜。

含铁的蛋白质固定 $\text{Fe}(\text{II})$ 的方式有许多种。在肌红蛋白-血红蛋白家族中铁是由称为原卟啉 IX (protoporphyrin IX) 的有机分子固定的。原卟啉 IX 由 4 个吡咯环组成,4 个吡咯通过甲叉桥(metheme bridge)连接成四吡咯环系统,与之相连的有四个甲基,两个乙烯基和两个丙酸基(图 6-2A)。原卟啉 IX 属于卟啉类(porphyrins),这类化合物在叶绿素、细胞色素以及其他一些天然色素中还将遇到。卟啉化合物有很强的着色力,血红蛋白中的铁卟啉(血红素)使血液呈红色,叶绿蛋白中的镁卟啉(叶绿素)是植物呈绿色的原因。

原卟啉 IX 与 Fe 的络合物铁原卟啉 IX 称血红素(heme)(图 6-2B)。卟啉环中心的铁原子通常是八面体配位,应该有 6 个配位键,其中 4 个与四吡咯环的 N 原子相连,另两个沿垂直于卟啉环面的轴分布在环面的上下,这两个键合部位分别称为第 5 和第 6 配位(图 6-2B 和图 6-3)。铁原子可以是亚铁(Fe^{2+})或高铁(Fe^{3+})氧化态,相应的血红素称为[亚铁]血红素(ferroheme, heme)和高铁血红素(ferriheme, hematin)。相应的肌红蛋白称为[亚铁]肌红蛋白(ferromyoglobin)和高铁肌红蛋白(ferrimyoglobin, met-

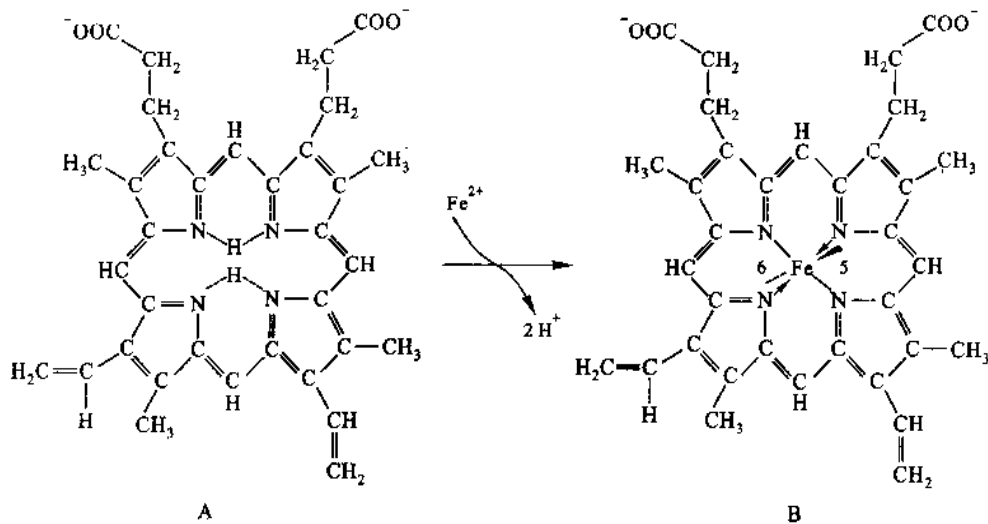


图 6-2 原卟啉Ⅳ(A)和血红素(B)的结构

由于卟啉环中的电子共振离域,血红素中与铁原子相连的所有的键都是等价的

myoglobin)。类似的命名也用于血红蛋白。其中只有亚铁态的蛋白质才能结合 O_2 。

(三) O_2 与肌红蛋白的结合

作为辅基的血红素非共价地结合于肌红蛋白分子的疏水空穴中,卟啉环上的两个丙酸基伸向空穴外侧(图 6-1)。肌红蛋白中血红素铁在第 5 配位键与珠蛋白第 93(或 F8)位 His 残基,称近侧(proximal)组氨酸的咪唑 N 结合,当肌红蛋白结合氧变成氧合肌红蛋白(oxy-myoglobin)时,第 6 配位被 O_2 分子所占据。但是 O_2 轴不是垂直于四吡咯环平面,而与 Fe—O 键(垂直于该平面)约有 60° 的倾斜(图 6-4A)。在去氧肌红蛋白(deoxy-myoglobin)中,第 6 个配位位置是空着的。在高铁肌红蛋白中氧结合部位失活, H_2O 分子代替 O_2 填充该部位,成为三价铁 $Fe(III)$ 原子的第 6 个配体。在血红素基的氧结合部位一侧,还有另一个 His 残基,即第 64 位(或 E7)残基,称远侧(distal)组氨酸。虽然 HisE7 的咪唑环与 Fe 原子距离远而不发生相互作用,但与 O_2 分子能紧密接触。被结合的 O_2 夹在远侧组氨酸咪唑环 N 和 $Fe(II)$ 原子之间。因此氧结合部位是一个空间位阻区域。

一些生物学上重要的性质就出自这种位阻。例如游离在溶液中的铁卟啉结合一氧化碳比结合 O_2 强 25 000 倍。但在肌红蛋白中的血红素对 CO 的亲合力仅比 O_2 约大 250 倍。X 射线晶体学和红外光谱对 CO 和 O_2 与肌红蛋白和铁卟啉形成的复合物的研究揭示,在与 CO 非常紧密结合的铁卟啉中,Fe、C 和 O 3 个原子是直线排列的(6-4C)。相反,在一氧化碳肌红蛋白(carbonmonoxymyoglobin)中 CO 轴与 Fe—C 键成一角度(图 6-4B),这与 O_2 在氧合肌红蛋白中的情形相仿(图 6-3A)。这里 CO 的直线结合受到阻碍主要是远侧组氨酸的空间位阻造成的。肌红蛋白和血红蛋白降低对 CO 的亲力的减低有效地防止代谢过程中产生的少量 CO(见下册第 31 章)占据它们的 O_2 结合部位。虽然如此,CO 仍是一种很强的毒物。空气中 CO 的含量达到 0.06%~0.08% 即有中毒的危险,达到 0.1% 则能窒息死亡。

通常情况下, O_2 分子与 $Fe(II)$ 紧密接触将使 $Fe(II)$ 氧化成三价铁 $Fe(III)$ 。血红素单独也不能使 $Fe(II)$ 免遭氧化,因为溶液中游离亚铁血红素很容易被氧化成高铁血红素。然而在肌红蛋白分子内部的疏水环境(His F8 和 His E7 除外)中,血红素 $Fe(II)$ 则不易被氧化。当结合 O_2 时发生暂时性电子重排,氧被释放后铁仍处于亚铁态 $Fe(II)$,能与另一 O_2 分子结合。因此,肌红蛋白和血红蛋白在进化中形成的多肽

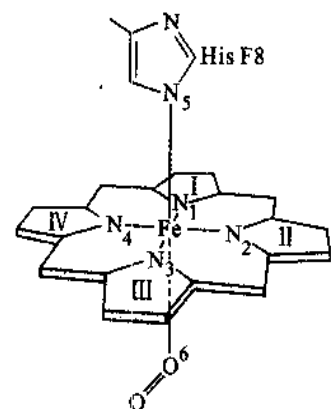


图 6-3 氧合肌红蛋白中血红素铁离子的 6 个配体

4 个是卟啉环中央的 4 个 N 原子,第 5 个是环面上方的 His F8,第 6 个是下方的 O_2

微环境至少有 3 个作用：①固定血红素基，②保护血红素铁免遭氧化，③为 O₂ 分子提供一个合适的结合部位。一般说，辅基的功能受多肽环境的调制。例如，同样的血红素基在细胞色素 c 中有着很不相同的功能，在这里血红素是可逆的电子载体(见下册第 24 章)。在过氧化氢酶中血红素又是另一种功能，催化过氧化氢转化为水和氧(见第 2 和第 8 章)。

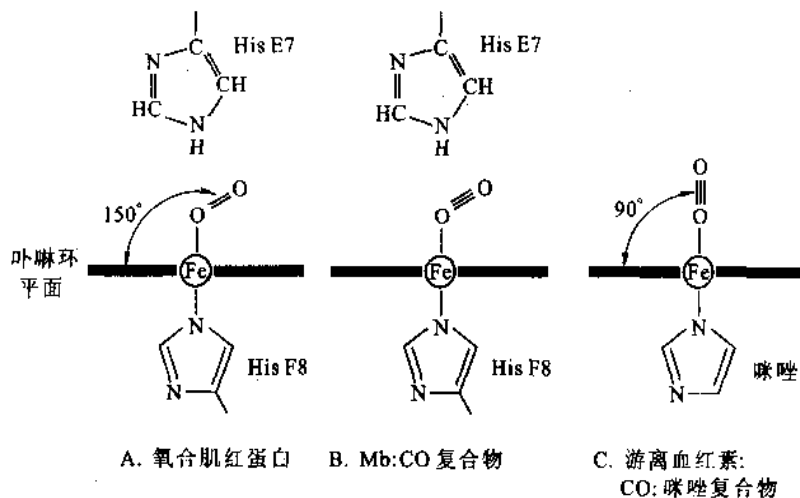


图 6-4 O₂ 与 CO 与肌红蛋白血红素 Fe(II) 的结合(CO 的 Lewis 结构是 $\overset{\ominus}{\text{C}}:::\overset{\oplus}{\text{O}}$)

(四) O₂ 的结合改变肌红蛋白的构象

肌红蛋白血红素与 O₂ 的结合将发生什么变化? X 射线晶体学分析揭示,铁原子的位置与卟啉环平面的关系发生关键性改变。在去氧肌红蛋白中 Fe(II) 离子只有 5 个配体,并且位于离卟啉环平面上方(His F8 一侧)0.055 nm 处。并因此铁卟啉呈圆顶状或凸形(图 6-5)。当与 O₂ 结合时,Fe(II) 离子被拉回到卟啉环平面,此时离卟啉环平面只有 0.026 nm,铁卟啉由圆顶状变成平面状。这一小小的位移对肌红蛋白的生物功能而言并没有什么。然而在后面将会看到,这一微小的移动却显著地影响血红蛋白的性质。它对 His F8 作用将通过多肽构象的变化而被放大,改变血红蛋白四聚体内的亚基-亚基相互作用。亚基关系上的这些变化是血红蛋白具有别构性质的基本原因。

(五) 肌红蛋白结合氧的定量分析(氧结合曲线)

具有肺或鳃的动物在血循环中红细胞(含血红蛋白)从肺或鳃带走 O₂。在组织中肌红蛋白接纳释放自血红蛋白的 O₂。当细胞中耗氧的细胞器(线粒体)大量需氧时,肌红蛋白便把贮存的 O₂ 分配给它们。为定量地理解这些功能,将在下面讨论肌红蛋白结合和解离 O₂ 是如何依赖于环境中的 O₂ 浓度的。

肌红蛋白与氧分子可逆结合的化学计量关系如下:

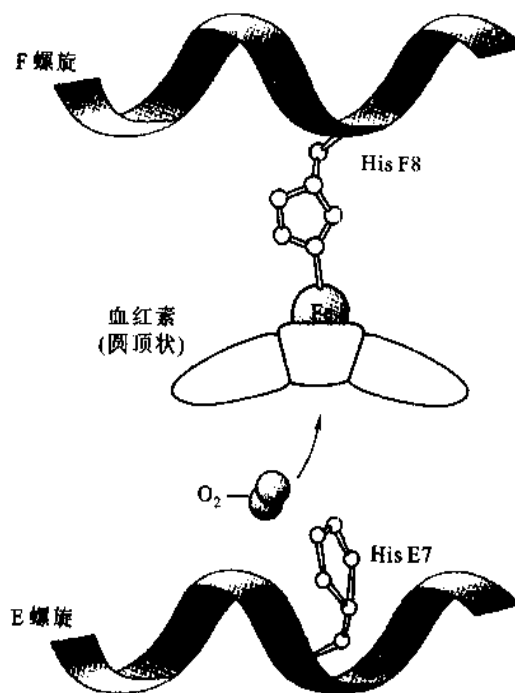
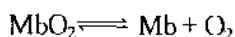


图 6-5 肌红蛋白的血红素 Fe 原子的位移
去氧肌红蛋白中由于 His F8 的拉动,Fe(II) 移出卟啉环平面;O₂ 的结合(形成 MbO₂),Fe(II) 将被拉回原位

式中 MbO_2 代表氧合肌红蛋白, Mb 代表去氧肌红蛋白。根据生物化学中的习惯, 把氧合平衡看成解离平衡, 并用 K 代表解离平衡常数:

$$K = \frac{[\text{Mb}][\text{O}_2]}{[\text{MbO}_2]} \quad (6-1)$$

或

$$\frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}]} = \frac{[\text{O}_2]}{K} \quad (6-2)$$

所以, MbO_2 与 Mb 浓度之比恰好与 $[\text{O}_2]$ 成正比。

由于 Mb 和 MbO_2 的浓度难于测定, 因此需要引进一个新的参数 Y 以便消去 Mb 和 MbO_2 两个参数。 Y 被定义为在给定的氧压下肌红蛋白的氧分数饱和度 (fractional saturation), 即 MbO_2 分子数占肌红蛋白 (Mb 和 MbO_2) 分子总数的百分数:

$$Y = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{MbO}_2] + [\text{Mb}]} \quad (6-3)$$

把方程(6-1)改写为 $[\text{MbO}_2] = [\text{Mb}][\text{O}_2] / K$ 并代入方程(6-2)得:

$$Y = \frac{[\text{O}_2]}{[\text{O}_2] + K} \quad (6-4)$$

根据 Henry 定律, 溶于液体的任一气体的浓度与液体上面的该气体分压成正比。因此 $[\text{O}_2]$ 可用分压 $p(\text{O}_2)$ 表示, 则方程(6-3)可改写为:

$$Y = \frac{p(\text{O}_2)}{p(\text{O}_2) + K} \quad (6-5)$$

实验中 $p(\text{O}_2)$ 值可以进行调节和测量, 氧分压常用 torr^* 作单位; Y 值可用分光光度计法测定, 因为肌红蛋白氧合时卟啉环中电子位移引起吸收光谱改变。 Y 对 $p(\text{O}_2)$ 作图所得的曲线称为氧结合曲线或解离曲线。如图 6-6A 所示, 肌红蛋白的氧结合曲线为一双曲线, 它的两条渐近线是 $Y=1$ 和 $p(\text{O}_2) = -K$ 。

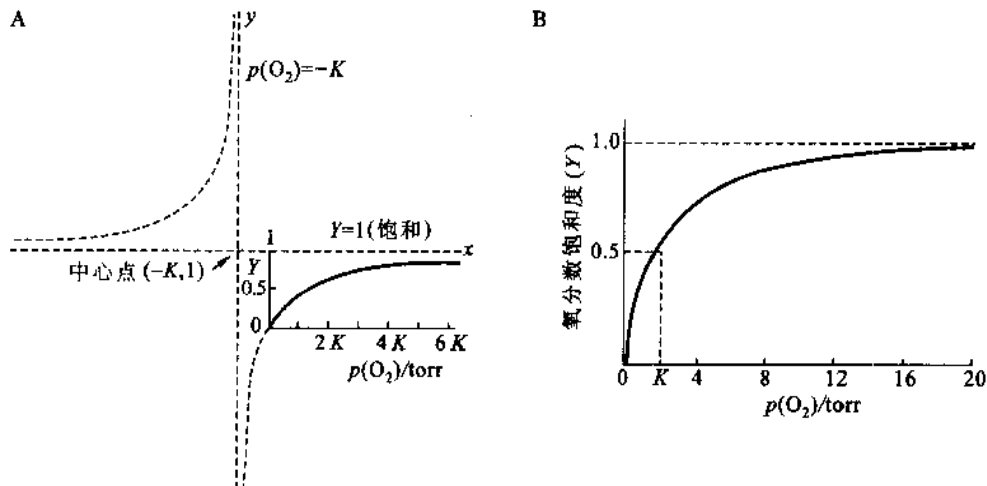


图 6-6 肌红蛋白的氧结合曲线

A. 示出双曲线形氧结合曲线; B. 根据实验数据制作的氧结合曲线, 即图 A 中的实线部分

* 1 torr = 1 mm Hg 即在 0°C 和标准重力下 1 mm Hg 柱高所加的压力。torr 是以水银压力计的发明者 Evangelista Torricelli (1608 ~ 1647) 命名的。torr 与国际单位制 Pa (帕) 的关系是 1 torr = 133.3 Pa (N/m²)。

当 $Y=1$ 时,所有肌红蛋白分子的氧结合部位均被 O_2 所占据,即肌红蛋白被氧完全饱和。当 $Y=0.5$ 时, $p(O_2) = K = P_{50}$ 或 $P_{0.5}$, P_{50} 定义为肌红蛋白被氧半饱和时的氧分压。这和方程(6-1)中当 $[MbO_2] = [Mb]$ 时 $K = [O_2]$ 的说法是一样的。

如果方程(6-5)用图 6-6A 中的 x, y 新坐标来表示,则变成:

$$xy = -K$$

此方程是大家所熟悉的,其图形是以该坐标轴为渐近线的等边双曲线。

由于当氧分压增高时 Y 是逐渐趋近于 1 的,因此实验上用双曲线方程作图求 K 值不方便。通常把它线性化,将方程(6-4)改写为:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{p(O_2)}{K} \quad (6-6)$$

注意,方程(6-5)与方程(6-2)的意义是一样的。方程(6-5)的两边取对数得:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \log p(O_2) - \log K \quad (6-7)$$

$\log(Y/(1-Y))$ 对 $\log p(O_2)$ 作图称为 Hill 图(Hill plot)。肌红蛋白的希尔图是一条直线(图 6-7)。当 $\log(Y/(1-Y)) = 0$, $p(O_2) = K = p_{50}$ 。在 $\log(Y/(1-Y)) = 0$ 这一点的斜率称为 Hill 系数,以 n_H 表示。肌红蛋白的 n_H 为 1.0。 $n_H=1.0$ 表示 O_2 分子彼此独立地与肌红蛋白结合。这一结论是正确的,因为每个 Mb 分子只能结合一个 O_2 。

线粒体中的氧浓度为 0~10 torr,静脉血中则为 15 torr,或更高些。肌红蛋白的 P_{50} 为 2 torr,因此大多数情况下,肌红蛋白是高度氧合的,是氧的贮库。如果由于肌肉收缩而线粒体中氧含量下降,它就可以立即供应氧。肌红蛋白也有利于细胞内的氧从细胞的内表面向线粒体转运,因为这种转运是顺浓度梯度的。细胞内表面约为 10 torr(肌红蛋白约为 80% 饱和),而线粒体约为 1 torr(肌红蛋白约为 25% 饱和),因此当需要迫切时,氧极易转运。

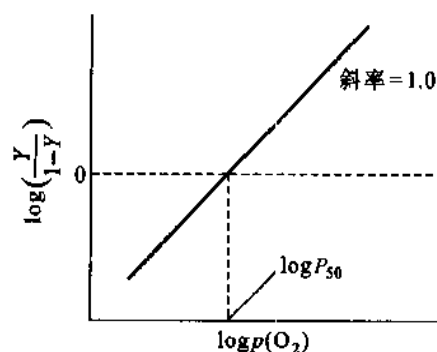


图 6-7 氧与肌红蛋白结合的 Hill 图
直线斜率是 Hill 系数($n_H=1.0$),在
 $\log(Y/(1-Y))=0, \log p(O_2)=\log P_{50}=K$

二、血红蛋白的结构与功能

血红蛋白(hemoglobin, Hb)的主要功能是在血液中结合并转运氧气。它存在于血液的红细胞(双凹圆盘状,直径 6~9 μm)中。在红细胞成熟期间产生大量的血红蛋白(每个红细胞约含 3 亿个 Hb 分子),并失去胞内的细胞器——核、线粒体和内织网。血红蛋白以高浓度(约为质量的 34%)溶解于红细胞溶胶中。在从肺部经心脏到达外周组织的动脉血中 Hb 约为 96% 氧饱和度。在回到心脏的静脉血中 Hb 仅为 64% 氧饱和度。因此每 100 ml 血经过组织约释放 Hb 携带的 1/3 氧或相当于大气压和体温下 6.5 ml 氧气。

下面介绍血红蛋白的结构、氧合过程中的构象变化、氧结合曲线和别构效应(协同性)等。

(一) 血红蛋白的结构

1. 血红蛋白的亚基组成

脊椎动物的血红蛋白由 4 个多肽亚基组成,两个是一种亚基,两个是另一种亚基。每个亚基都有一个血红素基和一个氧结合部位。

人在不同的发育阶段血红蛋白亚基的种类(至少有 7 种基因: $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ 和 ζ 为之编码)是不同

的(表6-1)。成人血红蛋白主要是Hb A(Hb, A_1), 其亚基组成为 $\alpha_2\beta_2$ 。在红细胞生活周期中, 由于和葡萄糖或其他化合物发生化学反应, 也会产生 Hb A 的变异形式, 例如 Hb A_{1a}、Hb A_{1b} 和 Hb A_{1c}。Hb A_{1c} 是 Hb A 的葡糖基化形式, 它的形成与血中的葡萄糖浓度有关。Hb A_{1c} 在总 Hb 中的比例是在红细胞生活周期(约 120 天)内平均葡萄糖浓度的量度, 临床上可作糖尿病人在两次就诊之间血糖控制的指标。成人血红蛋白中的次要组分是 Hb A₂(约占总 Hb 的 2%)。其亚基组成为 $\alpha_2\delta_2$ 。Hb A₂ 和 Hb A 的 α 链是完全相同的, 只是在 Hb A₂ 中 δ 链代替了 β 链。

表 6-1 人体内有正常功能的血红蛋白

发育阶段 ^a	名称	α 链或 α 样链	β 链或 β 样链	亚基组成
胚胎		ζ	ϵ	$\zeta_2\epsilon_2$
胎儿	Hb F	α	γ	$\alpha_2\gamma_2$
出生到死亡	Hb A	α	β	$\alpha_2\beta_2$
出生到死亡	Hb A ₂	α	δ	$\alpha_2\delta_2$

a 各阶段间有相当多的重叠。

胎儿血红蛋白简称 Hb F, 亚基组成为 $\alpha_2\gamma_2$ ($^A\gamma$ 和 $^G\gamma$ 均存在于 Hb F 中, 其差别仅在于第 136 位上的 Ala 改变为 Gly)。Hb F 的 γ 链和 β 链很相似, 也由 146 个氨基酸组成, 但 γ 链中的 H21(第 143 位)残基是 Ser, 而不是 β 链中的 His。这样就减少了 BPG(2,3-二磷酸甘油酸)分子结合部位的正电荷, 也即减低了对 BPG 的亲合力。Hb F 对 BPG 的亲合力减低使得它对氧的亲合力增高(见后面)。因此独立循环系统的胎儿能有效地通过胎盘从母体的血循环中吸收氧。

2. 血红蛋白的三维结构

Max Perutz 的 X 射线晶体学研究在原子水平上阐明了血红蛋白的三维结构。Hb 分子近似球形, $6.4 \text{ nm} \times 5.5 \text{ nm} \times 5.0 \text{ nm}$ 。4 个亚基占据相当于四面体的 4 个顶角, 整个分子形成 C_2 点群对称。所有研究过的脊椎动物的血红蛋白都显示与此基本相同的三维结构(图 6-8)。4 个血红素基分别位于每个多肽链的 E 和 F 螺旋之间的裂隙处, 并暴露在分子的表面。4 个氧结合部位彼此保持一定距离, 两个最近的铁离子(α_1 和 β_2 血红素 Fe 或 α_2 和 β_1 血红素 Fe)之间的距离为 2.5 nm。两个不同链之间的亚基相互作用最大, 而两个 α 链之间或两个 β 链之间的相互作用很小。两种不同类型的亚基(α 和 β)是为了获得协同性氧结合所必需的。 β 链(146 个残基)比肌红蛋白链(153 个残基)短, 主要是因为末端螺旋段(H 螺旋)比较短。 α 链(141 个残基)也有一个缩短的 H 螺旋, 并缺失一个很短的 D 螺旋。血红蛋白 α 链和 β 链的三级结构和肌红蛋白链的三级结构非常相似(图 6-9)。它们的主链折叠得如此相似, 这是未曾料到的, 因为这 3 种多肽链的氨基酸序列有很大的不同。实际上, 141 个氨基酸残基位置中只有 27 个位置的残基对于人的这 3 种多肽链是共有的(图 4-8)。这表明了, 似乎十分不同的氨基酸序列也能够规定出非常相似的三级结构。

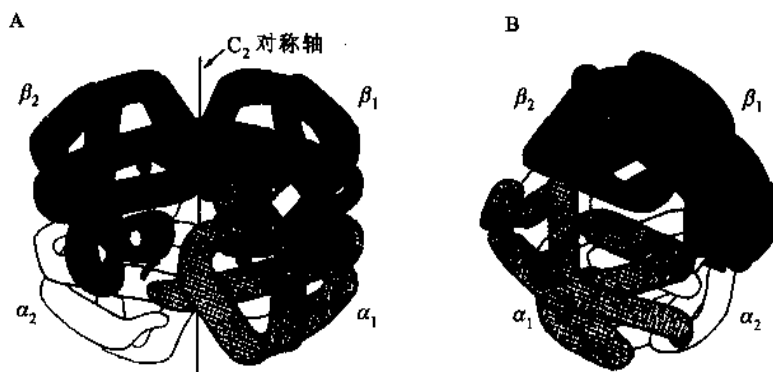
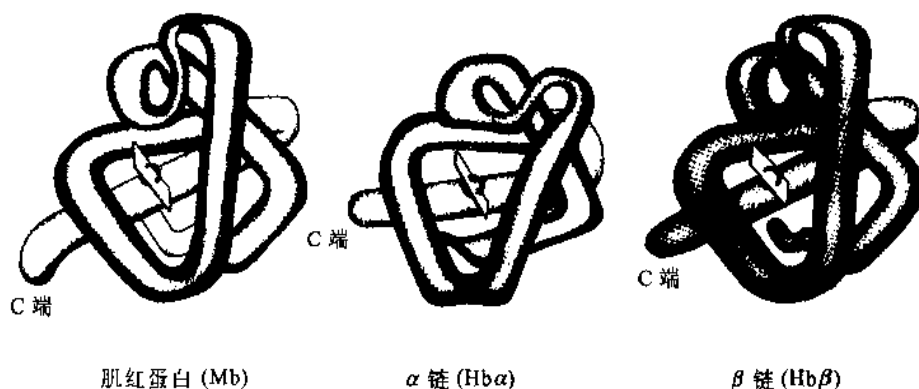


图 6-8 血红蛋白中亚基的排列

A. 正面观; B. 侧面观

图 6-9 Hb 的 α 链、 β 链和肌红蛋白链的构象相似性

比较了多种(从七鳃鳗到人)不同的血红蛋白的氨基酸序列,证明序列中确有许多位置的残基是可以调换的。但是在序列中有 9 个位置的残基是所有研究过的血红蛋白所共有的。这些高度保守的残基对血红蛋白分子的功能有着特殊重要的意义。其中几个直接参与氧结合部位,例如近侧组氨酸 His F8(α 链中第 87 位或 β 链中第 92 位)在血红素平面的一侧与它的第 5 个配位键结合;远侧组氨酸 His E7(α 链中第 58 位或 β 链中第 63 位)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;Phe CD1 和 Leu F4 与血红素基接触。另一个保守残基是 Tyr HC2,它通过在 H 和 F 螺旋之间形成一个链内氢键以稳定分子。Gly B6 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 螺旋彼此接近得如此紧密。Pro C2 也很重要,因为它能引起 C 螺旋的终止,因而规定了 C 螺旋的--端。

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 $\text{Fe}(\text{II})$ 被氧化成 $\text{Fe}(\text{III})$ 。如果 $\text{Fe}(\text{II})$ 变成 $\text{Fe}(\text{III})$,血红蛋白便成高铁血红蛋白(met-hemoglobin),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) 氧结合引起的血红蛋白构象变化

1. 氧合作用显著改变 Hb 的四级结构

X 射线晶体学分析揭示,氧合血红蛋白和去氧血红蛋白在四级结构上有显著的不同,特别是 $\alpha\beta$ 亚基的相互作用发生变化。 $\alpha\beta$ 接触有两类。一类是 $\alpha_1\beta_1$ 接触和相同的 $\alpha_2\beta_2$ 接触,这类接触被称为装配接触(packaging contact),它们涉及螺旋 B、G、H 和非螺旋区段 GH 拐弯(corner)的 30 多个残基,接触面积大,对亚基装配很重要;当血红蛋白从去氧形式变为氧合形式时它们保持不变。另一类是 $\alpha_1\beta_2$ 接触和 $\alpha_2\beta_1$ 接触称为滑动接触(sliding contact),它们主要涉及螺旋 C、G 和拐弯 FG 的 19 个残基(图 6-10)。当血红蛋白因氧合作用(oxygenation)而发生构象变化时,这些接触也发生改变(图 6-11)。血红蛋白作为构象动态分子,可看成是 $\alpha\beta$ -二聚体的二聚体或看成由两个相同的二聚体半分子组成: $\alpha_1\beta_1$ -亚基对和 $\alpha_2\beta_2$ -亚基对。每个 $\alpha\beta$ -二聚体作为一个刚体移动。当血红素基氧合时分子的这两个二聚体半分子彼此滑移。如果一个 $\alpha\beta$ -二聚体固定不动,则另一个 $\alpha\beta$ -二聚体将绕一个设想的通过两个 $\alpha\beta$ -二聚体的偏心枢轴旋转约 15° 并平移 0.08 nm,见图 6-11。此时在两个 $\alpha\beta$ -二聚体之间的界面上某些原子将移动多至 0.6 nm。

2. 血红素铁的微小移动导致血红蛋白构象的转换

氧合时血红蛋白四级结构发生剧烈变化的问题已成为很多人研究的课题,但至今尚未得到完全解决。氧合时发生的四级结构变化可分为空间效应和电子效应两个方面。去氧血红蛋白中 His F8 与血红素 $\text{Fe}(\text{II})$ 配位,但空间位阻迫使 $\text{Fe}-\text{N}$ 键从垂直于血红素平面变成略有倾斜(约 8°)。电子效应是由于 $\text{Fe}(\text{II})$

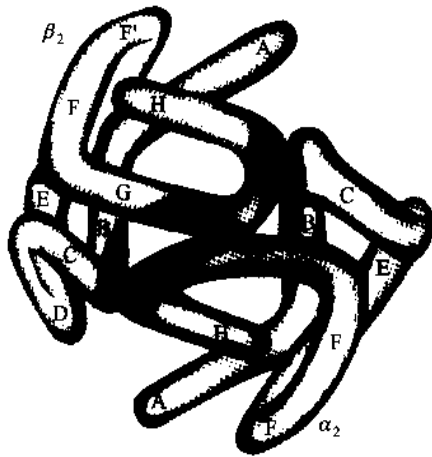
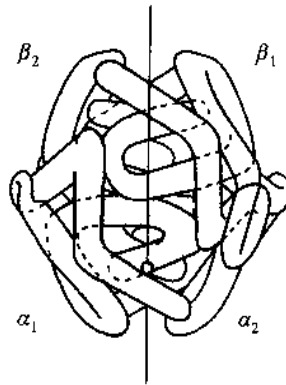
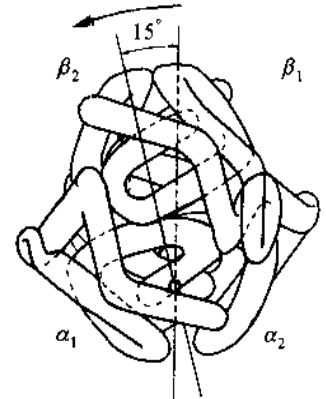


图 6-10 血红蛋白半分子
($\alpha\beta$ -二聚体)的侧面观

示出装配接触(深灰色)和滑动接触(白色)



A. 去氧血红蛋白



B. 氧合血红蛋白

图 6-11 血红蛋白由去氧形式转变为氧合形式时亚基的移动

离子的价电子层电子排布变化引起的。去氧血红蛋白中血红素 Fe^{2+} 的 6 个 d 电子是以 4 个不成对电子和 1 个电子对的形式存在,能容纳 5 个配体:卟啉环系统的 4 个 N 原子和 His F8。在此电子排布中,铁原子是顺磁性的,处于高自旋态(high-spin state)。高自旋 Fe^{2+} 的 4 个不成对电子占据 4 个轨道,因此它的原子体积较大,加上 His F8 和卟啉环系统的氮原子之间的空间排斥以及 $\text{Fe}(\text{II})$ 电子和卟啉环 π 电子之间的静电排斥,迫使铁原子向近侧组氨酸方向突出卟啉环面约 0.06 nm,结果血红素基也在同一方向凸起(图 6-12)。血红蛋白氧合时, O_2 成为 $\text{Fe}(\text{II})$ 的第 6 个配体,6 个 d 电子重排成 3 个电子对,原来的 4 个不成对电子挤在两个轨道,铁原子变成反磁性和低自旋态(low-spin state)。自旋态的变化使得 $\text{Fe}(\text{II})$ 离子和 His F8 之间的键缩短,并变成垂直于血红素平面。此外,卟啉环 N 原子和 $\text{Fe}(\text{II})$ 之间的相互作用被加强。低自旋 Fe^{2+} 的原子体积比去氧时缩小,加之其他空间和静电因素的变化,允许铁原子向卟啉环平面的中央孔穴靠拢约 0.039 nm,此时的 Fe^{2+} 处于平面上方仅 0.021 nm,血红素基也由圆顶状(凸形)变成平面状(图 6-12)。这很像是 O_2 分子牵引 Fe^{2+} 接近卟啉平面。这一微小的移动具有很深的生物学后果。当 Fe 原子移动时,它同时拖动 His F8 残基,并进而引起螺旋 F 和拐弯 EF 和 FG 的位移。这些移动传递到亚基的界面,在这里引发构象重调,导致维系去氧血红蛋白四级结构的链间盐桥断裂(图 6-13)以及 β -亚基之间的空隙变窄,并挤出 BPG 分子(图 6-18)等的变化。

3. 氧合血红蛋白和去氧血红蛋白代表不同的构象态

X 射线结构分析表明,血红蛋白存在两种主要构象态:T 态和 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换的构象。虽然 O_2 和两种构象态的血红蛋白都能结合,但对 R 态血红蛋白的亲合力明显高于 T 态,并且氧的结合更稳定 R 态。发现当实验性缺氧时 T 态更加稳定,因此 T 态是去氧血红蛋白的主要构象。作为 T 态的去氧血红蛋白有专一的氢键和盐桥起着稳定作用,4 个亚基的 C-末端处于受束缚的状态(图 6-13)。 O_2 与一个处于 T 态的血红蛋白亚基结合将引发构象由 T 态(去氧血红蛋白)转变为 R 态(氧合血红蛋白),此时稳定 T 态的那些相互作用被断裂,亚基的 C-末端处于几乎完全自由旋转的状态。 α 链和 β 链的 C-末端的倒数第二位都

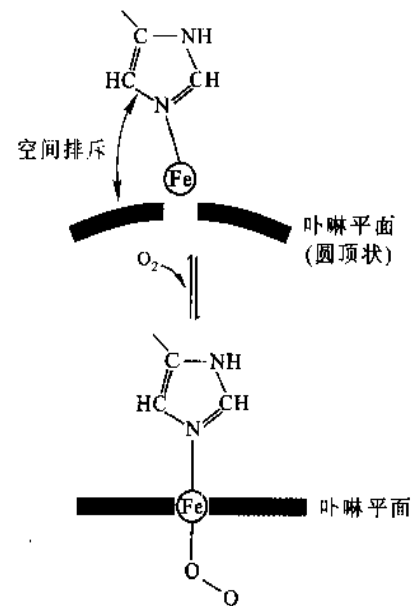


图 6-12 血红蛋白氧合时铁原子移近血红素平面

· 近侧组氨酸(F8)与铁原子一起被拉动, Fe-N 键被变成垂直于血红素平面

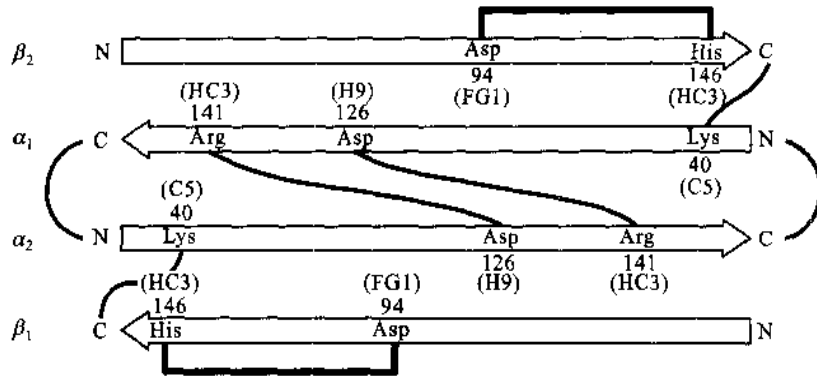
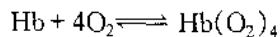


图6-13 去氧血红蛋白中各亚基间的盐桥(离子对)

是 Tyr HC2 残基(分别为 Tyr α 140 和 Tyr β 145)。在去氧血红蛋白中这些 Tyr 残基的酚—OH 与 Val FG5(分别为 Val α 93 和 Val β 98)提供的肽 C=O 形成链内氢键。氧合时由于 F 螺旋移动导致 Tyr HC2 和 Val FG5 之间的氢键断裂。进而连接 8 个亚基的盐桥也断裂。其中 6 个盐桥是在不同的亚基之间。这 6 个盐桥中的 4 个涉及链中的 C-末端或 N-末端残基:两个处于 α 链的 C-末端和 N-末端之间,两个连接 β 链的 C-末端和两个 Lys α 40(Lys C5)残基的 ϵ -NH₃⁺。另两个链间盐桥连接两条 α 链的 Asp α 126 和 Arg α 141 残基。此外在每条 β 链上 Asp β 94 和 His β 146 之间还形成一个链内盐桥。

(三) 血红蛋白的协同性氧结合(Hb 氧结合曲线)

虽然血红蛋白的 α 链和 β 链与肌红蛋白链在三级结构上极为相似,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性质,也即除输氧之外还能运输 H⁺ 和 CO₂。在第 5 章中曾提到大多数的寡聚蛋白质是通过亚基-亚基相互作用调节它们的生物活性的。血红蛋白是至今了解得最清楚的一个别构蛋白质。血红蛋白的氧合具有正协同性同促效应,也即一个 O₂ 的结合增加同一 Hb 分子中其余空的氧结合部位对 O₂ 的亲合力。这里 O₂ 既是正常的配体,也是正同促效应物或称正同促调节物(positive homotropic modulator)。Hb 氧结合曲线是 S 形的(sigmoid)而不是双曲线(图 6-14),方程(6-5)不能用来描述这种曲线。当然,每个血红蛋白分子都有 4 个血红素,能结合多至 4 个 O₂ 分子。暂且假设 O₂ 与 Hb 结合是一种“全或无”的现象,也即这里血红蛋白或是以完全无 O₂ 的形式存在,或是以结合 4 个 O₂ 分子的形式存在。换言之,如果一个 O₂ 与 Hb 分子结合,则该 Hb 分子中的剩余氧结合部位立即被 O₂ 占据,也即 4 个 O₂ 是同时与 Hb 结合的:



则解离常数 K 为:

$$K = \frac{[\text{Hb}][\text{O}_2]^4}{[\text{Hb}(\text{O}_2)_4]} \quad (6-8)$$

依方程(6-5)类推,Hb 的氧分数饱和度方程为:

$$Y = \frac{p^4(\text{O}_2)}{p^4(\text{O}_2) + K} \quad (6-9)$$

根据方程(6-9) Y 对 $p(\text{O}_2)$ 作图,所得曲线如图 6-15 中曲线 a($n=4.0$)所示。Hb 的氧结合曲线是特征性的 S 形曲线。半饱和时的 $p(\text{O}_2)$ 是 26 torr。当 $p(\text{O}_2)$ 低时,氧分数饱和度 Y 随 $p(\text{O}_2)$ 增加变化很小。其原因是在低氧分压时 Hb 对 O₂ 的亲合力小。然而当 $p(\text{O}_2)$ 达到某一阈值并结合了第一个 O₂ 分子后,分数饱和度 Y 则迅速增加。注意,在 $Y \approx 0.5$ 的附近曲线斜率的陡度最大。曲线的 S 形特性是 O₂ 与 Hb

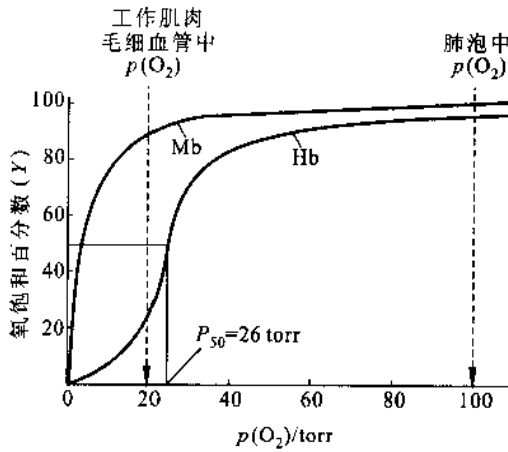
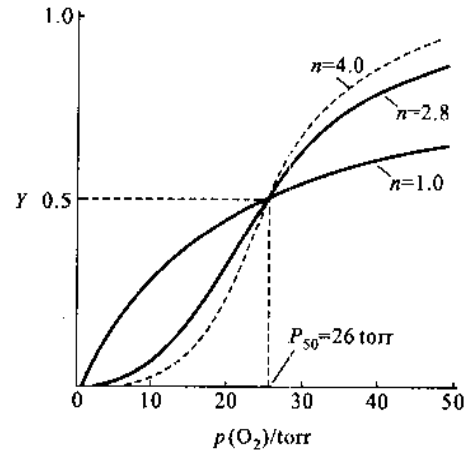


图 6-14 Hb 和 Mb 氧结合曲线的比较

图 6-15 $n=4$ (理论的)、 $n=1$ (无相互作用的 O_2 结合部位)和 $n=2.8$ (实验观察到的)Hb 氧结合曲线的比较

协同性结合的标志。

实验观察到的 Hb- O_2 结合曲线(图 6-15 中曲线 b($n=2.8$))并不精确符合图 6-15 中的曲线 a ($n=4$)。如果用代替指数 4 使方程(6-9)一般化为:

$$Y = \frac{p^n(O_2)}{p^n(O_2) + K} \quad (6-10)$$

重排方程(6-10)得:

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{p^n(O_2)}{K} \quad (6-11)$$

实际上此方程陈述氧合血红蛋白基(Y)与无氧血红蛋白基($1-Y$)的分子数之比等于 $p(O_2)$ 的 n 次方除以表观解离常数 K 。

早在 1910 年血红蛋白分子结构还不清楚的时候, Archibald Hill 就试图解释 Hb 氧合的 S 形曲线, 并指出可用方程(6-11)来描述它。如果 n 取 2.8 数值, 则方程(6-11)与实验观察到的 O_2 结合曲线能很好符合。如果 O_2 与 Hb 的结合是一种全或无的现象, 那么如上所述 n 应等于 4。如果 Hb 中各个 O_2 -结合部位之间完全没有相互作用, 也即如果一个 O_2 分子与 Hb 结合并不影响其余 O_2 分子与同一 Hb 的结合, 那么 n 应等于 1。图 6-15 比较这些极端情况。显然, 实际情况($n=2.8$)落在 $n=1$ 和 $n=4$ 这两种极端之间。问题的定性答案是 Hb 和 O_2 的结合是高度协同的, 第一个 O_2 的结合显著地提高随后 O_2 分子的结合亲和力, 但是这种结合不完全是全或无的现象。

方程(6-11)的两边各取对数得:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = n \log p(O_2) - \log K \quad (6-12)$$

此表达式是方程(6-7)的一般形式, 称 Hill 方程。 $\log(Y/(1-Y))$ 对 $\log p(O_2)$ 所作的 Hill 图, 在 $\log(Y/(1-Y))=0$ 的附近接近一直线。因为 O_2 与 Hb 结合是协同的, 所以 Hill 图实际上是 S 形的(图 6-16)。

在 $p(O_2)$ 极低和极高时都只可能结合一个 O_2 分子, 因此可预料 Hill 曲线两端的斜率均应为 1。图 6-16 表明, 情况确实如此。图中上、下两条渐近线的斜率即 Hill 曲线两端的斜率 n_H 均为 1。在中间的氧分压区域协同性最大, $n_H=2.8$ 。但 Hill 曲线的斜率 n_H 总不能到达寡聚蛋白质中的亚基数目 n 这个值, 例如 Hb 的 n 值总不能到

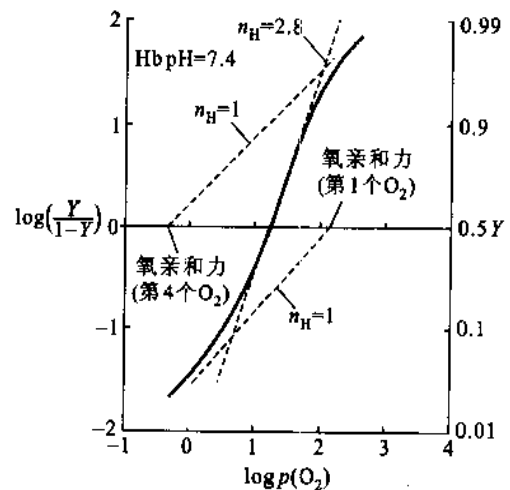


图 6-16 血红蛋白的 Hill 图(示出非线性性质)

达 4。Hill 系数 n_H 是协同性程度的一种量度。 $n_H = 1$ 表示配体结合是非协同性的,例如肌红蛋白(图 6-7)、血红蛋白的游离 α 链和 β 链。 $n_H > 1$ 表示配体结合是正协同性的,如 Hb。理论上, n_H 可到达它的上限,即 $n_H = n$ 。这种情况下,结合将是完全协同的,也即上面所假设的“全或无”的结合方式,但实际上并不存在。 $n_H < 1$ 表示负协同性,但确证了的例子极少。Hb 协同性是第一个 O_2 的解离常数 K_1 与最末一个(第 4 个) O_2 的解离常数 K_4 有很大差别的一种表现。Hill 图中上、下两条渐近线外推至 $\log(Y/(1-Y)) = 0$ 的轴,分别给出解离常数 K_4 (约为 0.50 torr)和 K_1 (约等于 148 torr)。因此 Hb 对第 4 个 O_2 的亲合力约为第 1 个 O_2 的 300 倍。

前面 P_{50} 曾被定义为肌红蛋白 50% 被氧饱和时的 $p(O_2)$ 。注意,在 50% 饱和度时 $Y = (1 - Y)$,则从方程(6-12)得:

$$0 = n[\log p(O_2)] - \log K - n(\log P_{50}) - \log K \quad (6-13)$$

因而,

$$\log K = n(\log P_{50}) \text{ 或 } K = (P_{50})^n \quad (6-14)$$

将 $K = (P_{50})^n$ 代入方程(6-11)得:

$$\frac{Y}{1-Y} = \left[\frac{p(O_2)}{P_{50}} \right]^n \quad (6-15)$$

也即肌红蛋白和血红蛋白的情况不同,对 HbP_{50} 和 K 不相等,因为 Hb 是具有多个的 O_2 结合部位的别构蛋白质。

血红蛋白氧合协同性使得它更有效地起着输送氧气的作用。肺泡中的 $p(O_2)$ 为 100 torr,工作肌肉的毛细管中 $p(O_2)$ 约 20 torr,血红蛋白的 $P_{50} = 26$ torr。从图 6-14 可见,在肺泡中 Y 是 0.97,肌肉毛细管中 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。协同性将增加 ΔY 值。如果设想血红蛋白没有协同性($n_H = 1$),则其氧结合曲线与肌红蛋白一样,呈双曲线。从图 6-14 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载是否方便,这样运输效率是高不了的。要提高运输效率,就必须设法提高卸载能力。协同效应,就是增加血红蛋白在肌肉中的卸 O_2 效率。

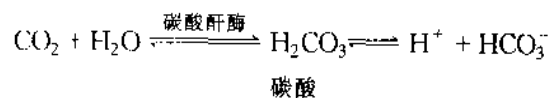
关于别构蛋白质的作用机制(S 形曲线的解释)有 MWC 模型和 KNF 模型等,这里不作介绍,参见本书第 10 章的别构酶部分。

(四) H^+ 、 CO_2 和 BPG 对血红蛋白结合氧的影响

血红蛋白与 O_2 的结合受环境中其他分子的调节,如质子、二氧化碳和代谢物 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphate glycerate, BPG)等。虽然它们在蛋白质分子上的结合部位离血红素基很远,但这些分子极大地影响 Hb 的氧合性质。这种在空间上相隔的部位之间的相互作用在很多寡聚蛋白质中存在,这就是别构效应(见第 5 和第 10 章)。

1. H^+ 和 CO_2 促进 O_2 的释放(Bohr 效应)

组织中的代谢作用既产生 H^+ ,也产生 CO_2 。代谢越旺盛的组织,需要的氧越多,产生的 H^+ 和 CO_2 也越多。细胞呼吸的终产物 CO_2 在体内被水合为碳酸氢盐:



此反应受碳酸酐酶(carbonic anhydrase)催化,该酶在红细胞中特别丰富。 CO_2 在水中的溶解度不大,如果不转变为碳酸氢盐,将在组织和血中形成气泡。从上面的方程可以看到, CO_2 水合的结果将增加组织中的 H^+ 浓度(pH 下降)。氧与血红蛋白结合深受 pH 和 CO_2 浓度的影响。去氧血红蛋白对 H^+ 的亲合力比氧

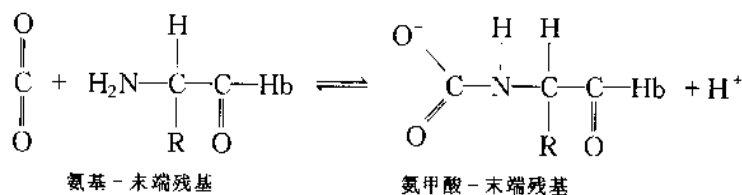
合血红蛋白大。因此,增加 H^+ 浓度(降低 pH)将提高 O_2 从血红蛋白中的释放。如果略去化学计量,此过程可用下面方程表示:



H^+ 可看成是血红蛋白氧合的拮抗物(antagonist)。从图 6-17 可见,当 H^+ 浓度增加(pH 下降)时,Hb 的氧分数饱和曲线向右移动。这种 pH 对血红蛋白对氧的亲和力的影响被称为 Bohr 效应,因 1904 发现此现象的丹麦生理学家 C.Bohr 而得名。

Bohr 效应具有重要的生理意义。当血液流经组织特别是流经代谢迅速的肌肉时由于这里的 pH 较低, CO_2 浓度较高,因此有利于血红蛋白释放 O_2 ,使组织能比因单纯的 $p(O_2)$ 降低获得更多的氧,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 $p(O_2)$ 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。Bohr 效应的机制涉及血红蛋白的大约 6 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是参与这些盐桥形成的 β 链 C-末端 His $\beta 146$ (HC3)的咪唑基和 α 链的 N-末端 Val $\alpha 1$ (NA1) α -氨基,以及可能还有 α 链 His $\alpha 122$ (H5)的咪唑基。血红蛋白处于 T 态时,His $\beta 146$ 被质子化,并与 Asp $\beta 94$ (G1)的侧链羧基形成链内盐桥(图 6-13)。该盐桥中咪唑基上的质子由于受到 Asp $\beta 94$ 侧链羧基的静电吸引,其 pK_a 值(=8.0)较正常值高。氧合时因盐桥断裂和 Asp $\beta 94$ 侧链羧基远离,咪唑基的 pK_a 值降至正常值($pK_a = 6$),在 pH7.6(肺部血的 pH)下,R 态血红蛋白的 His $\beta 146$ 残基大多数是去质子化的。 α 链的 N-末端残基、某些其他 His 残基以及其他基团也具有类似的效应。

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 α -氨基。这些氨基在 T 态时都处于盐桥中,但 R 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,生成氨基甲酸血红蛋白(carbaminohemoglobin)*:



反应是可逆的。反应中产生的 H^+ 贡献于 Bohr 效应。被结合的氨基甲酸也可形成额外的盐桥,有助于稳定 T 态,促进氧的释放。

血红蛋白除从肺到组织,转运细胞所需的几乎全部氧之外,还转运组织中形成的约 20% 总 H^+ 和 CO_2 到肺和肾,并在这里被排出体外。

2. BPG 降低 Hb 对 O_2 的亲合力

BPG(2,3-二磷酸甘油酸)是血红蛋白的一个重要的别构效应物。BPG 与 Hb 的相互作用提供了一个异促别构调节的实例。正常的人红血球约含有 4.5 mmol/L BPG,约与血红蛋白等摩尔数,也即维持

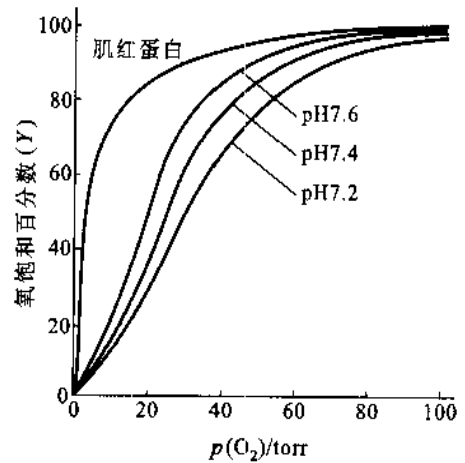


图 6-17 在不同 pH 下 Mb 和 Hb 的氧分数饱和度曲线

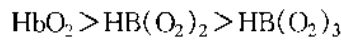
肺中血液 pH 为 7.6,组织中为 7.2,
Hb 氧合实验常在 pH7.4 下进行

* "carbaminohemoglobin" 一词的前缀 carbamino 在多本英汉词汇中将它与 carbamyl(carbamyl)同译为氨基酰基,编者以为不妥。"carbamino"以译为氨基甲酸基为宜,特此提出商榷。

Hb:BPG的化学计量。Hb四聚体分子只有一个BPG结合部位,位于由四个亚基缔合形成的中央孔穴内。高负电荷的BPG分子通过与每个 β 链的Lys $\beta 82$ (EF6)、His $\beta 2$ (NA2)、His $\beta 143$ (H21)和N-末端Val $\beta 1$ (NA1)等残基的荷正电基团的静电相互作用结合于Hb分子上,BPG把两个 β 链交联在一起(图6-18)。当血红蛋白被分离提取后,仍含有相当量的结合的BPG,它很难完全被除去。BPG和两个 β 链之间的这些离子键有助于稳定去氧形式(T态)的血红蛋白构象,促进氧的释放。在氧合形式(R态)的血红蛋白中,中央孔穴变得太小,容纳不了BPG,因为 O_2 的结合引起Hb构象变化,扰乱了BPG的结合部位。看来, O_2 和BPG与血红蛋白的结合是互相排斥的,虽然它们的结合部位相隔有一定距离。为了更好地表示出这一事实,在BPG存在下(实际上,前述的Hb氧结合曲线都是在结合的BPG存在下获得的)血红蛋白的氧合作用可用下方程表示:



BPG对R态Hb的亲合力至少比对T态Hb低一个数量级。BPG对R态Hb的亲合力大小顺序为:



BPG与 $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ 则完全不结合。

图6-19示出在不同的BPG浓度下血红蛋白的氧结合曲线。脱BPG的血红蛋白对 O_2 的亲合力很高,其 P_{50} 约为2 torr,这种Hb完全能在低于20 torr的 $p(\text{O}_2)$ 下为 O_2 所饱和,与肌红蛋白的氧结合曲线很相似(图6-14)。在肺部 $p(\text{O}_2)$ 大于100 torr,血红蛋白几乎全被 O_2 饱和,BPG是否存在与氧合关系不大。但在外围组织 $p(\text{O}_2)$ 低(< 30 torr),如果没有BPG存在,就会减少Hb对组织的氧供应。有BPG(4.5 mmol/L)的存在,血红蛋白对 O_2 的亲合力低,氧结合曲线呈正常的S形曲线。正常情况下供给组织的氧量(卸氧量)约为血液所能携带的最大氧量的40%(ΔY)。

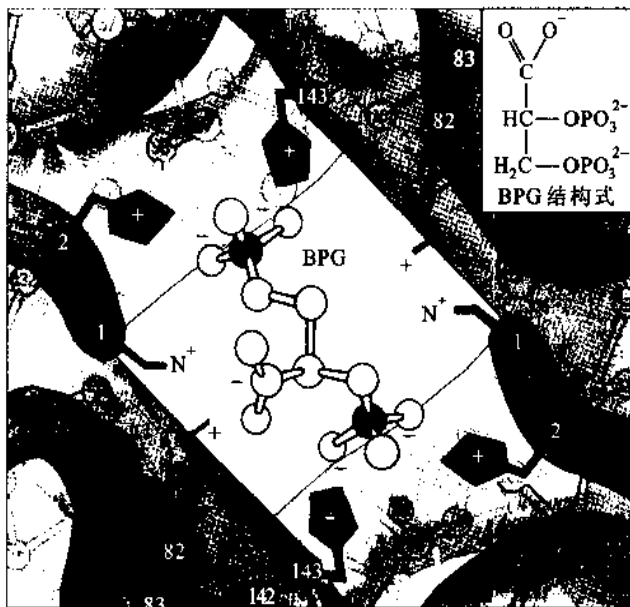


图6-18 BPG分子结构及其与Hb的两个 β -链的离子结合

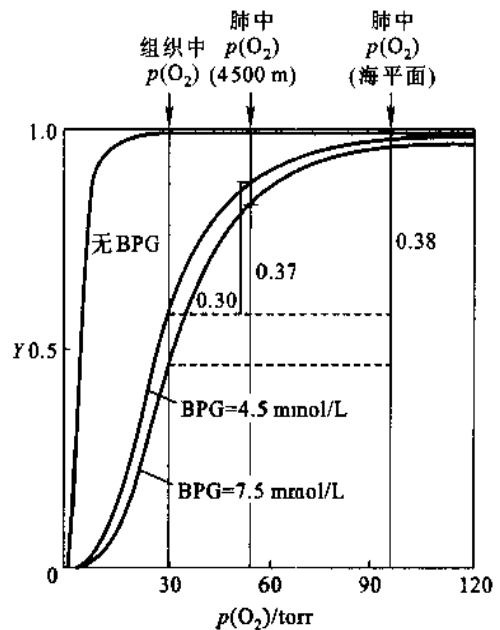


图6-19 BPG对Hb氧合曲线的影响

人的某些生理性和病理性的缺氧可以通过红细胞中BPG浓度的改变来调节对组织的供氧量,例如高空适应(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 m高的高山[这里 $p(\text{O}_2)$ 降低]时,红细胞中的BPG浓度几小时后就开始上升,两天内可由4.5 mmol/L增加到7.5 mmol/L,并伴随着对氧的亲合力下降。在高空(海拔4500米)肺的 $p(\text{O}_2)$ 不到55 torr,对组织的供氧量将减少1/4,即 $\Delta Y = 30\%$ 。BPG浓度水平的调节(升高浓度)对肺中 O_2 的结合影响不大,但对组织中 O_2 的释放影响不小。结果对组织的供氧量恢复到接近 $\Delta Y = 40\%$ 。又例如严重阻塞性肺气肿病人,因肺部

换气受阻,动脉血 $p(\text{O}_2)$ 可降至 50 torr,动脉血的氧饱和度也因此降低,此时红细胞内的 BPG 浓度可代偿性地升高,从正常的 4.5 mmol/L 增至 8.0 mmol/L,使氧结合曲线向右移动,因而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 BPG 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。氧结合曲线向左移动。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,但往往不能满足危重病人对氧的急需。缺少 BPG 的红细胞不能靠加入 BPG 来恢复,因为高度荷电的分子不能透过红细胞膜。如果存贮的血液中加入肌苷(inosine),即可防止 BPG 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 BPG。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 Hb F($\alpha_2\gamma_2$)对氧的亲合力比成人的 Hb A 高。它的生理意义在于使胎儿血液流经胎盘时 Hb F 能从胎盘的另一侧母体的 Hb A 获得 O_2 。如前面曾提及的这是因为 γ 链的第 143 位是丝氨酸(β 链的第 143 位是组氨酸),它使得 Hb F 与 BPG 结合的能力减弱,因而增加了 Hb F 对氧的亲合力。

氧的 S 形曲线结合,Bohr 效应以及 BPG 效应物的调节使得血红蛋白的输氧能力达到最高效率。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得脊椎动物以优胜类群出现于地球上的重要因素之一。

三、血红蛋白分子病

(一) 分子病是遗传的

血红蛋白的异常由基因突变引起,并通过遗传在群体中散布。这是血红蛋白进化的基础。但是许多突变是有害的,将产生遗传病(genetic disease)。在自然选择的条件下这些有害的突变最终将会消失。其他许多是无害的,经常被称为“中性”突变(neutral mutation),其中一些突变可能具有今天尚未被认识的优点,有朝一日将在群体中占优势。至今已知存在人类群体中的血红蛋白遗传变体(variant)有 300 多种。

除精子和卵子外,人的所有细胞在正常情况下均为二倍体(diploid),也即每个染色体都有两个拷贝(一对同源染色体)。因此每个基因至少也有两个拷贝,位于一对同源染色体的相同座位上。每种血红蛋白变体都是一个改变了的基因的产物。这些变体基因(一个基因由突变造成的多种可能的状态)被称为等位基因(allele)。在每个二倍体细胞中编码一个多肽链的基因或是以一个等位基因的两个拷贝存在,这是纯合的(homozygous)情况;或是以两个不同的等位基因存在,这是杂合的(heterozygous)情况。例如 β -珠蛋白基因对个体来说可以有两种类型:“正常”型(β)和一种“变体”型(β^*)。它们在一对同源染色体中可以有 3 种可能的组合:(A) $\beta + \beta$,正常的纯合;(B) $\beta^* + \beta^*$,变体的纯合;(C) $\beta + \beta^*$,杂合。只含正常型基因的个体 A 将只产生正常的 β -珠蛋白链。只含变体型基因的个体 B,只产生变体 β -珠蛋白链。个体 C 将产生正常和变体两种 β -珠蛋白。因此,如果有缺陷的基因(变体基因)仅由双亲中的一方遗传来的,也即杂合子患者,如果该基因又是隐性的,这种个体就没有或仅有轻微的症状;如果有缺陷的基因来自双亲,也即纯合子患者,症状就会充分表现,不论这种缺陷是否属于隐性。

与有缺陷的血红蛋白有关的疾病分为两类:一类称为血红蛋白病(hemoglobinopathy),是由于 α 或 β 链发生了变化,例如镰刀状细胞贫血病等;另一类称为地中海贫血(thalassemia),是由于缺少了 α 或 β 链,例如 α -和 β -地中海贫血病。

(二) 镰刀状细胞贫血病

1. 镰刀状细胞贫血病是血红蛋白分子突变引起的

镰刀状细胞贫血病(sickle-cell anemia)是最早被认识的一种分子病。这种疾病在非洲的某些地区十

分流行(高达40%)。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序列在决定它的二、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(15-16 g/100 ml)的一半,红细胞数目也是正常人[(4.6~6.2) × 10⁶ 个/ml]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,成新月状(crescentlike)或镰刀状的红细胞(图6-20)。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。

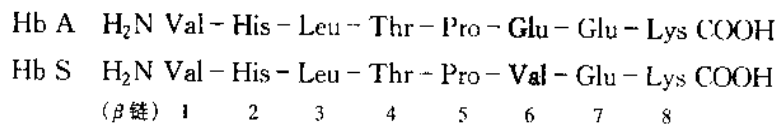


图6-20 正常的红细胞和镰刀状红细胞的扫描电镜图
(插图中示出一个典型的镰刀状红细胞)

镰刀状细胞贫血病是一种致死性疾病,它的纯合子患者(50%红细胞镰刀状化)有的在童年就死去。杂合子患者(1%红细胞镰刀状化)的寿命虽也不长,但它能抵抗一种流行于非洲的疟疾(malaria),它也是一种致死性疾病。甚至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概率也很高、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,这是因为杂合子患者加速被感染红细胞的破坏而中断疟原虫的生活周期的缘故。自然选择的结果是出现一个等位基因的群体,它使纯合状态的有害作用和杂合状态的抗疟疾作用处于平衡中。这是平衡多形现象(balanced polymorphism)的一个明显实例。

2. 镰刀状细胞血红蛋白的氨基酸序列的细微变化

20世纪40年代后期,L. Pauling 和 H. Itano 曾指出,血红蛋白S(Hb S)和正常成人血红蛋白A(Hb A)电泳时都向正极移动,只是Hb S比Hb A稍慢。他们的结论是Hb S必定比Hb A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水解成若干肽段(28个),进行双向滤纸层析-电泳,然后对比所得的图谱,称为指纹图谱(fingerprint)(图6-21),他们发现只有一个肽段位置不同。分析有差异肽段的化学结构,其氨基酸序列分别是:



血红蛋白 A



血红蛋白 S

图6-21 Hb A 和 Hb S 的胰蛋白酶消化液的指纹图谱

图中水平向为电泳,垂直向为层析,两个血红蛋白中有差异肽的位置用加圆圈示出

这是 β 链 N-末端的一段肽链。Hb S 和 Hb A 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 6 位的氨基酸残基,在 Hb A 分子中是谷氨酸, Hb S 分子中为缬氨酸所代替。值得注意的是:在血红蛋白分子的 4 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疾病。在人类中发现的 300 多种血红蛋白变体,绝大多数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可形成纤维状沉淀

Hb A 突变为 Hb S,从一级结构看,只是 $\beta 6$ Glu 被换成 $\beta 6$ Val。Glu 侧链在 pH 7.4 时是一个带负电基团,而 Val 侧链是一个非极性基团。从三级结构看,由于 $\beta 6$ 位于分子表面,因此 Val 取代了 Glu,等于在 Hb S 分子表面安上了一个疏水侧链。血红蛋白的氧亲和力和别构性质实际上不受这种变化的影响。然而,这一变化显著地降低去氧血红蛋白的溶解度,但对氧合形式并无影响。正如所料,伸出 Hb S 分子表面的 Val 侧链创造了一个“粘性”的突起,与另一 Hb S 分子上的互补口袋通过疏水相互作用而聚集沉淀(图 6-22)。互补口袋可能由 EF 拐弯附近的 Phe $\beta 85$ (F1)和 Leu $\beta 88$ (F4)形成,并暴露于去氧血红蛋白表面,但不存在于氧合血红蛋白中。电镜观察表明,沉淀由直径为 21.5 nm 的纤维组成,每根纤维是一个 14 股 Hb S 链的超螺旋。稳定纤维结构的,除“粘性”区的疏水相互作用外,还有许多极性相互作用。

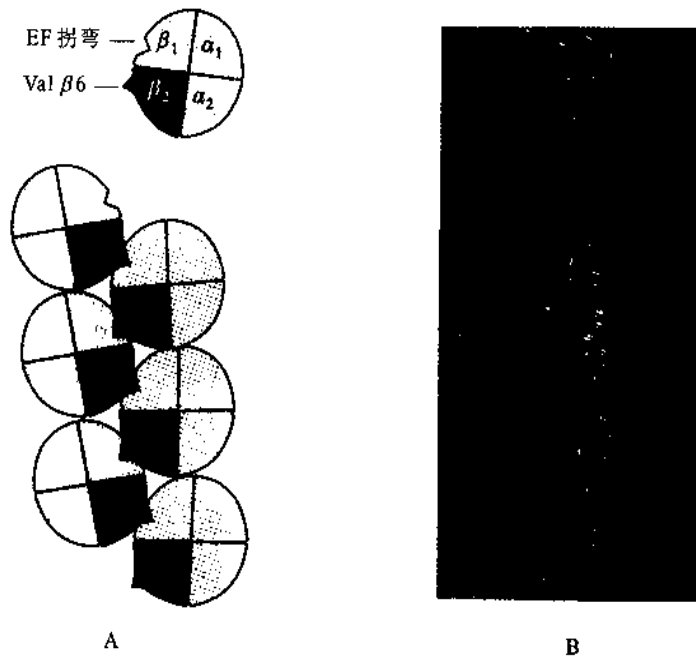


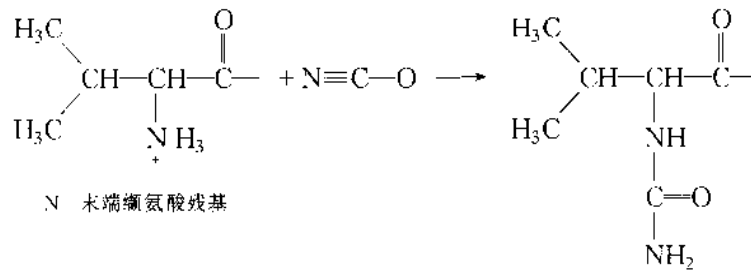
图 6-22 血红蛋白 S 线性缔合的分子基础

A. 两股 Hb S 链被连锁在一起; B. 由 14 股 Hb S 链(7 对连锁链)聚集成的 一根纤维(根据电镜图的计算机图像模型)

纤维沉淀的形成压迫细胞质膜,使它弯曲成镰刀状。镰刀状细胞不像正常细胞那样平滑而有弹性,因此不易通过毛细血管。如果氧压低,镰刀状化的程度将增加,某些细胞破裂在血管中形成冻胶状而限制血流。血流变慢又使组织中的氧压进一步下降,生成更多的去氧 Hb S,更加重细胞的镰刀状化,导致组织缺血受伤,影响器官的正常功能。这是镰刀状细胞贫血患者早死的主要原因。

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患者的红细胞,可以防止它在去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。Hb S 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 Hb A 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-末端区缬氨酸的氨基被修饰,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 Hb S 镰刀状化而且对体内其他蛋白质无毒害的、安全的药物。

(三) 其他血红蛋白病

血红蛋白突变会影响血红蛋白分子中下述 4 个关键区域之一者的都可能造成严重的后果,包括红细胞镰刀状化,血红蛋白氧亲和力改变,血红素基丢失和四聚体解离等。

(1) 突变发生在血红蛋白分子表面 这种突变一般是中性的,但有的造成血红蛋白的溶解度下降,如上述的镰刀状细胞贫血病那种情况。

(2) 突变发生在血红素基的附近 这种突变影响血红素与氧的结合,或影响亚基与血红素的结合,因而失去氧合能力。例如造成先天性青紫 (congenital cyanosis) 的几种血红蛋白 M 就是属于这一类。它们大多数是由于其他氨基酸取代了血红素附近的重要残基如近侧组氨酸(F8)或远侧组氨酸(E7)等而形成。例如 Hb M Osaka($\alpha_2^{58\text{His}\rightarrow\text{Tyr}}\beta_2$)是 His $\alpha 58$ (F8)突变为酪氨酸的结果,由于 Tyr 残基的酚基与 Fe 结合稳定了 Fe^{3+} 离子,因而血红蛋白的异常的 α 链失去氧合能力。

(3) 突变发生在特异的部位 例如由一个具有大侧链的残基取代了一个小侧链残基,因而造成空间位阻,影响正确的三级结构形成,例如 Hb Riverdale-Bronx ($\alpha_2\beta_2^{25\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}}$)。由于 α 螺旋间的疏水相互作用,多肽链的三级折叠变得紧密稳定,使水在蛋白质中无处容身。在此例中, β 链的 Gly $\beta 25$ (B7)为精氨酸所取代,原三级结构没有足够的空间来安排这样一个大的极性侧链,因而三级结构被扭曲而不稳定。影响血红素的必需环境,也影响四级结构的形成。

(4) 突变发生在亚基界面上 四级结构中亚基的相互作用是血红蛋白氧合的别构调节所必需的。例如 Hb Kempsey($\alpha_2\beta_2^{99\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}}$), β 链的 Asp $\beta 99$ (G1)突变为天冬酰胺。在正常的血红蛋白中 Asp $\beta 99$ 与 α 链的 Tyr $\alpha 42$ (C7)形成氢键,稳定 T 态构象(图 6-23)。但换成 Asn 则不能与 Tyr $\alpha 42$ 形成氢键以建立 T 态。因此, Hb Kempsey 对 O_2 的亲和力特别高,以致在组织中不能释放 O_2 。Hb Kansas($\alpha_2\beta_2^{102\text{Asn}\rightarrow\text{Thr}}$)的情况恰好相反,Asn $\beta 102$ (G4)为苏氨酸所取代,不能再与 α 链的 Asp $\alpha 94$ (G1)形成氢键以建立 R 态。结果是对 O_2 的亲和力异常低。

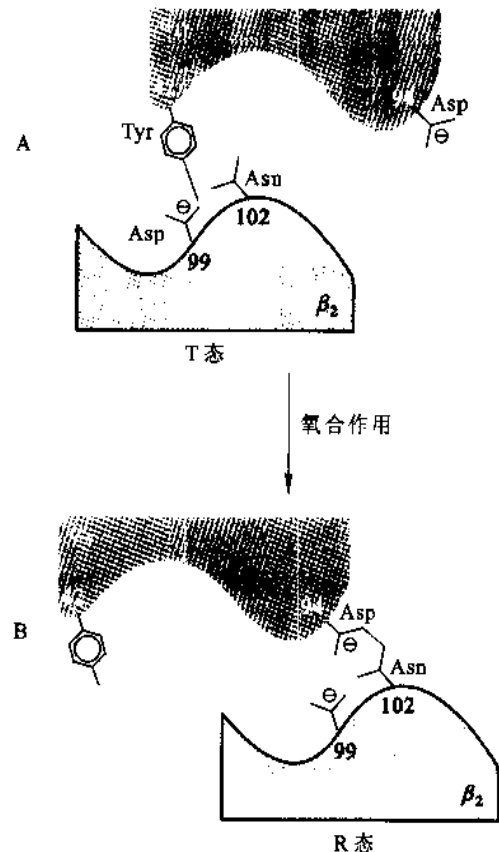


图 6-23 血红蛋白 α_1 -亚基和 β_2 -亚基的氢键形成

A. 血红蛋白在 T 态时, Tyr $\alpha 42$ 和 Asp $\beta 99$ 之间有一个氢键; B. Hb 结合氧成 R 态, 亚基彼此错位, Tyr $\alpha 42$ 和 Asp $\beta 99$ 之间的氢键被断裂, 在 Asp $\alpha 94$ 和 Asn $\beta 102$ 之间形成新的氢键

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。

(四) 地中海贫血

地中海贫血可以由几条途径产生:① 缺失一个或多个编码血红蛋白链的基因;② 所有基因都可能存在,但一个或多个基因发生无义突变(nonsense mutation),结果产生缩短了的蛋白链,或发生移码突变(frameshift mutation),致使合成的链含不正确的氨基酸序列;③ 所有基因都可能存在,但突变发生在编码区之外,导致转录被阻断或前体 mRNA 的不正确加工(见下册第 34~36 章)。

由于人类基因组含有若干个珠蛋白基因,对应于用在不同发育阶段的蛋白链,因而有多种不同的地中海贫血。这里仅讨论涉及成人血红蛋白 α 和 β 链的缺失或功能错误的两种病症。

1. β -地中海贫血

如果 β -珠蛋白基因丢失或不能被表达,此缺损的纯合子个体将产生最严重的症状。它们不能制造 β 链,必需依赖胎儿 γ 链的连续产生以形成有功能的血红蛋白, $\alpha_2\gamma_2$ 。在染色体上 δ 基因与 β 基因挨得很近,因而经常会同时失去 β 和 δ 链。虽然在这样的个体中 γ 链的产生可以继续到童年,但多数不到成熟就夭折了。杂合子患者症状较轻,这种人有一个 β 基因仍是正常的。在这些所谓 β -地中海贫血(或称 β -地中海贫血性状)中 β 链的产生受到限制,但不完全被关闭。

2. α -地中海贫血

涉及 α 链的地中海贫血有着更加复杂的情况,因为在每个染色体上有两个邻接的拷贝(α_1 和 α_2)。它们的蛋白质产物只差一个氨基酸残基,并且都是有功能的。因此一个人可以有 4、3、2、1 或 0 个 α 基因拷贝。含 4 个拷贝是正常的,3 个或 2 个拷贝是不对称的,仅含 1 个拷贝的可能表现出轻微的症状(α -地中海贫血性状)。0 个拷贝则是致命性的(α -地中海贫血)。 α -珠蛋白链的水平低下时,将形成同四聚体(homotetramer): β_4 血红蛋白(Hb H), γ_4 血红蛋白(Hb Bart's)或 δ_4 。它们能结合 O_2 ,但无血红蛋白的别构效应,总是处于 R 态,并且也不呈现 Bohr 效应。因此向组织卸氧的效率(ΔY)差。称为胎儿水肿(hydrops fetalis)的情况,所有 4 个拷贝均丢失(0 个拷贝),不能合成有功能的 α 链,因此不能形成 Hb F 和 Hb A₂。胎儿可能制造一种胎儿-胚胎血红蛋白($\zeta_2\gamma_2$)而存活下来,但通常会于出生前死去或出生后不久死亡。

α -和 β -地中海贫血性状(杂合子)一般对疟疾也有保护作用,因此这种突变会在疟疾高发区存在下来。

四、免疫系统和免疫球蛋白

免疫(immunity)是人类和脊椎动物最重要的防御机制,它是生物进化过程中逐步发展并完善起来的。免疫系统能在分子水平上识别“自我”和“非我”(外物),然后破坏那些被鉴定为非我的实体。免疫系统以这种方式消灭病毒、细菌等病原以及对生物体造成威胁的大分子。在生理水平上免疫系统对入侵者的反应或应答(response)是多种类型的蛋白质、分子和细胞之间的一套复杂而协调的相互作用。然而在个别蛋白质水平上免疫反应是配体与蛋白质可逆结合的一个生化系统。

(一) 免疫系统

免疫反应由两个互补的系统组成:体液免疫系统和细胞免疫系统。体液免疫系统(humoral immune system)是针对细菌感染,胞外病毒(存在于体液中)以及进入生物体的外来蛋白质等。细胞免疫系统(cellular immune system)是破坏被病毒感染的宿主细胞、某些寄生物和外来的移植组织。

免疫反应主要涉及淋巴细胞(lymphocyte)和巨噬细胞(macrophage)。淋巴细胞是白细胞中的一类,造血过程期间由骨髓中的造血干细胞(hematopoietic stem cell)分化而来。淋巴细胞离开骨髓,循环于血液和淋巴系统,并贮存于各种淋巴器官中。免疫系统的特异性、多样性、记忆和自我/非我的识别等特性都是由

淋巴细胞介导的。淋巴细胞通过对外来物质特异的膜受体识别抗原。淋巴细胞可分为两个细胞群：B 淋巴细胞或称 B 细胞和 T 淋巴细胞或称 T 细胞。巨噬细胞也是由骨髓干细胞分化而来，在骨髓中发育成幼单核细胞，进入血液中分化成单核细胞(monocyte)，然后迁移到组织，分化成组织特异的巨噬细胞。它们的功能是吞噬大颗粒和细胞以及作为抗原呈递细胞(antigen-presenting cell)。

B 细胞之所以称为 B 细胞是因为它们是在骨髓(bone marrow)中完成发育的。B 细胞表达独特的抗原结合膜受体(图 6-24A)。B 细胞受体是一种抗体分子(图 6-29)，是膜结合的糖蛋白。B 细胞遇上对它的膜结合受体特异的抗原时，开始迅速分裂，子代分化成记忆细胞(memory cell)和效应细胞(effector cell)，称为浆细胞(plasma cell)。记忆细胞是长寿命的，表达与原亲代细胞具有同一特异性的膜结合抗体。浆细胞不产生膜结合抗体，但产生分泌型的可溶性抗体。浆细胞(富含内质网膜)只存活几天，但在此期间合成并分泌大量的抗体。据估计一个浆细胞每秒能分泌 2 000 个抗体。分泌的抗体是体液免疫的主要效应分子。

T 细胞之所以称为 T 细胞是因为这些细胞是迁移到胸腺(thymus gland)中完成它们的后期发育。在胸腺内成熟期间 T 细胞表达抗原特异的膜受体，称为 T 细胞受体(图 6-24B 和 C)。它是一种异二聚体，由两条蛋白链($\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$)组成，它们由二硫键连接，两条链的 N-末端折叠在一起形成 T 细胞受体的抗原结合部位。B 细胞受体是单独识别抗原的，而 T 细胞受体只有当抗原与一个称为主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)的膜蛋白结合，才能识别它。一个 T 细胞，当遇上与一个细胞上的 MHC 蛋白结合的抗原，则被激活、增殖并分化成记忆 T 细胞和各种效应 T 细胞。

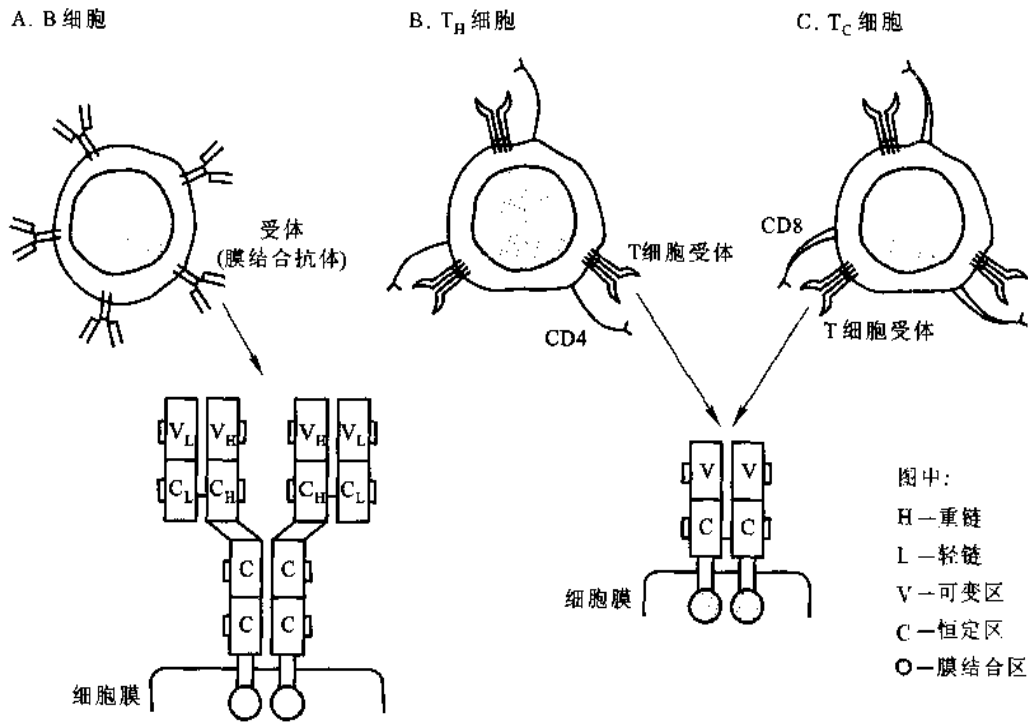


图 6-24 B 细胞和 T 细胞上抗原的膜受体

每个细胞上约有 10^5 个受体分子，每个细胞上的受体分子对抗原的特异性是相同的。注意，抗体、T 细胞受体以及 MHC-I 和 MHC-II 蛋白(图 6-25)都是免疫球蛋白超家族的成员

T 细胞又有两个亚群，T 助细胞或 T_H 细胞(T helper cell)和 T 胞毒细胞或 T_C 细胞(cytotoxic T cell)。 T_H 细胞和 T_C 细胞还含有辅受体(coreceptor)，一种膜糖蛋白， T_H 细胞含有 CD4， T_C 细胞含有 CD8[CD 是 cluster of differentiation (分化簇)的缩写，CD+ 编号代表一种膜分子]。 T_H 细胞在对抗原和 MHC 的免疫应答中，分泌各种生长因子，总称为细胞因子(cytokine)或更确切地称为淋巴因子(lymphokine)。当 T_H 细胞被激活时，它就变成效应细胞，分泌各种淋巴因子。这些淋巴因子在激活 B 细胞、 T_C 细胞、吞噬细胞和

其他各种参与免疫反应的细胞中起重要作用。当 T_C 细胞通过其表面上的 T 细胞受体识别与 MHC 蛋白结合的抗原时, T_C 细胞则被激活、增殖并分化成效应细胞。与 T_H 细胞不同, T_C 细胞一般不分泌淋巴分子, 但获得胞毒活性。 T_C 细胞在监视身体的细胞和消灭任何显示不正常抗原的细胞如病毒感染细胞、肿瘤细胞和外来的移植组织细胞方面有着重要作用。

免疫系统中的每种识别蛋白不论是一个 B 细胞产生的抗体还是一个 T 细胞表面上的受体都是特异地与某一特定的化学结构结合。人类能产生超过 10^8 种具有不同特异性的抗体。这种非常的多样性使得病毒或入侵细胞表面上的任一化学结构都能被一个或多个抗体所识别并结合。抗体的多样性是由一套免疫球蛋白基因片段经基因重排机制(见第 35 章)随机重装配而产生。

能引起免疫反应的任何分子或病原体称为抗原(antigen)。抗原可以是一种病毒、细菌细胞壁或蛋白质或其他大分子。一个复杂的抗原可以被若干个不同的抗体结合。一个单独的抗体或 T 细胞受体只能结合抗原内的一个特定的分子结构, 称为它的抗原决定簇(antigenic determinant)或表位(epitope)。抗原决定簇可以是例如蛋白质分子表面上的氨基酸基团或是多糖上的单糖残基。

免疫系统对小分子如细胞代谢的中间物或产物不能引起免疫反应。相对分子质量小于 5 000 的分子一般没有抗原性。然而小分子在实验室中可以共价连接到蛋白质上, 这种形式的小分子可以引起免疫反应。这种本身无抗原性, 与载体蛋白结合后有了抗原性的物质称为半抗原(hapten), 例如吗啡(其硫酸盐 M_r 668.5)就是一种半抗原。在应答与蛋白质连接的半抗原时产生的抗体能与游离的同一小分子(半抗原)结合。这样的抗体有时被用于开发分析试验或作为催化抗体或抗体酶(见第 10 章)。

(二) 免疫系统能识别自我和非我

免疫系统必须识别并破坏入侵的病原, 但也必须识别而不破坏生物体自身的正常蛋白质和细胞。宿主中蛋白质抗原的检测是由 MHC 蛋白介导的。MHC 蛋白与细胞内被消化的蛋白质的肽片段结合, 并将它们展示在细胞的外表面。这些肽正常情况下来自典型的细胞蛋白质的消化, 但在病毒感染期间病毒蛋白质也被消化, 并由 MHC 蛋白展出。由 MHC 蛋白展出的外来蛋白质的肽段是免疫系统识别为非我的抗原。T 细胞受体与这些片段的结合, 导致免疫反应的随后步骤。MHC 蛋白是内在膜蛋白, 是一种异二聚体分子, 它们分为 MHC - I (第 I 类 MHC) 蛋白和 MHC - II (第 II 类 MHC) 蛋白两类(图 6-25), 这两类在被分布的细胞类型和被展示的肽的蛋白质来源都不相同。

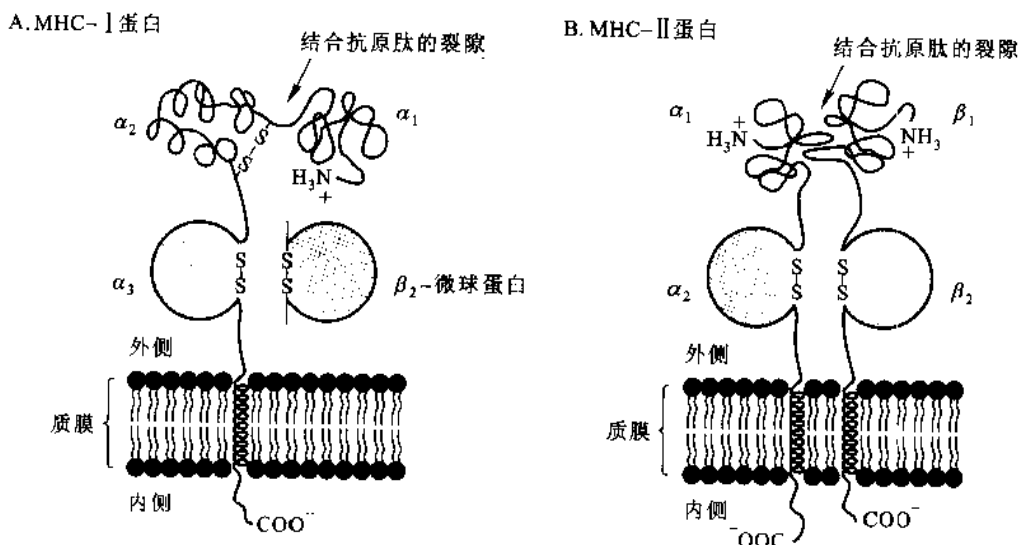


图 6-25 MHC 蛋白分子的图解(示出胞外结构域, 跨膜区段和胞浆区段)

A. MHC - I: 肽结合部位由 α 链高变区 α_1 和 α_2 两个结构域组成, 恒定的 α_3 结构域和 β_2 -微球蛋白(灰色球形)具有“免疫球蛋白折叠”如免疫球蛋白 V_L 结构域(图 5-18B); B. MHC - II: 由 α 链和 β 链组成, 近 N 末端区为可变区(α_1 和 β_1), α_2 和 β_2 结构域也具有“免疫球蛋白折叠”结构

MHC-I 蛋白(图 6-26)存在于几乎所有的脊椎动物细胞的表面。在人群中有无数种变体,它们是最多形的蛋白质之一。因为一个个体可产生多达 6 个 MHC-I 蛋白变体,所以两个个体不大可能有相同的一套 MHC-I 蛋白。MHC-I 蛋白结合并展示由细胞内随机发生的蛋白质降解和更新衍生来的肽。这些肽和 MHC-I 蛋白结合形成的复合体是细胞免疫系统中 T_C 细胞的 T 细胞受体的识别靶。

每个 T 细胞只含一种 T 细胞受体但有多个拷贝,它对特定 MHC-I 蛋白-肽复合体是特异的。为避免产生大批能结合和破坏自身的正常细胞的 T_C 细胞,在胸腺中 T_C 细胞的成熟包括一个严格的选择过程,消灭 95% 以上正在发育的 T_C 细胞,包括那些能与展示生物体自身蛋白质的肽的 MHC-I 蛋白结合的 T_C 细胞。存活并成熟的 T_C 细胞是那些具有不与生物体自身蛋白质结合的 T 细胞受体的 T_C 细胞。结果形成一个专门与连接在宿主细胞 MHC-I 蛋白上的外来肽结合的细胞群。这就是所谓免疫的自身耐受性(self-tolerance),也即免疫系统遇到外物时坚决消灭它,但对自身的细胞则“秋毫无犯”。这些结合相互作用导致寄生物和被感染细胞的破坏。当移植器官时,外来 MHC-I 蛋白也能被 T_C 细胞结合,并引起组织排斥。

MHC-II 蛋白存在于少数几种特化细胞的表面。这些特化细胞包括巨噬细胞和 B 淋巴细胞,它们作为抗原呈递细胞通过吞噬作用或胞吞作用将外来的抗原内化,经消化使成小的肽段。肽段与 MHC-II 蛋白结合并被展示在抗原呈递细胞的膜上。MHC-II 蛋白也是高度多形的,在人群中有很多变体。每个人可以产生多达 12 个变体,因此任何两个个体几乎不可能有一套相同的变体。MHC-II 蛋白结合并展示的肽不是来自细胞的蛋白质,而是被细胞摄入的外部蛋白质。形成的 MHC-II 蛋白-肽复合体是各种助 T 细胞的结合靶。

它们也和 T_C 细胞一样,在胸腺中进行严格的选择,消灭那些能与宿主自身的细胞蛋白质结合的 T_H 细胞。

尽管在胸腺的选择过程中消灭了大多数的 T_C 细胞,但是还有大量的细胞存活,并供给免疫反应。每个存活的细胞只有一个单一类型的 T 细胞受体,它能与一个特定化学结构结合。进入血流和组织中的 T 细胞群携带有几百万种不同结合特异性的 T 细胞受体。在高度变化的 T 细胞群中几乎总是有少数细胞能与出现的任一抗原特异地结合,而绝大多数细胞不会遇上它们能结合的外来抗原,它们一般在几天内就死去,并被新世代的 T 细胞所代替,新的细胞继续不断地巡逻,寻找引发免疫反应的抗原。

(三) 在细胞表面的分子相互作用引发免疫反应

一个新的抗原经常是一个感染的先兆,也即给免疫系统的一个信号:病毒或其他寄生物可能将在生物体内迅速生长。少数具有能与该抗原结合的受体或抗体的 T 细胞和 B 细胞必须迅速而有选择地增殖以消灭感染。

例如当一种病毒侵入一个细胞时,病毒就利用细胞原有功能和资源复制自己的核酸,合成病毒蛋白质。在细胞内的病毒大分子难以与体液免疫系统的抗体接近。然而,某些找到通往感染细胞表面去路的 MHC-I 蛋白通常将展示出病毒蛋白的肽片段,这样它们就能被 T_C 淋巴细胞识别。成熟病毒当从被感染细胞释放到胞外环境时,易受到体液免疫系统的攻击。某些病毒被巨噬细胞吞噬。释放的病毒肽段将与 MHC-II 蛋白结合并被展示在巨噬细胞和 B 细胞的表面,这些肽抗原将引发涉及 B 细胞、 T_C 细胞和

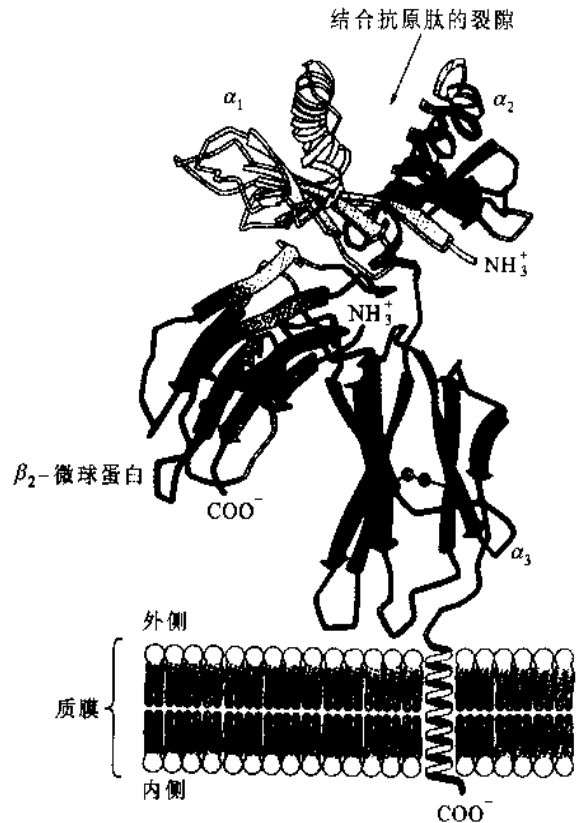


图 6-26 MHC-I 蛋白的三维结构

T_H 细胞的多途径反应(图 6-27)。

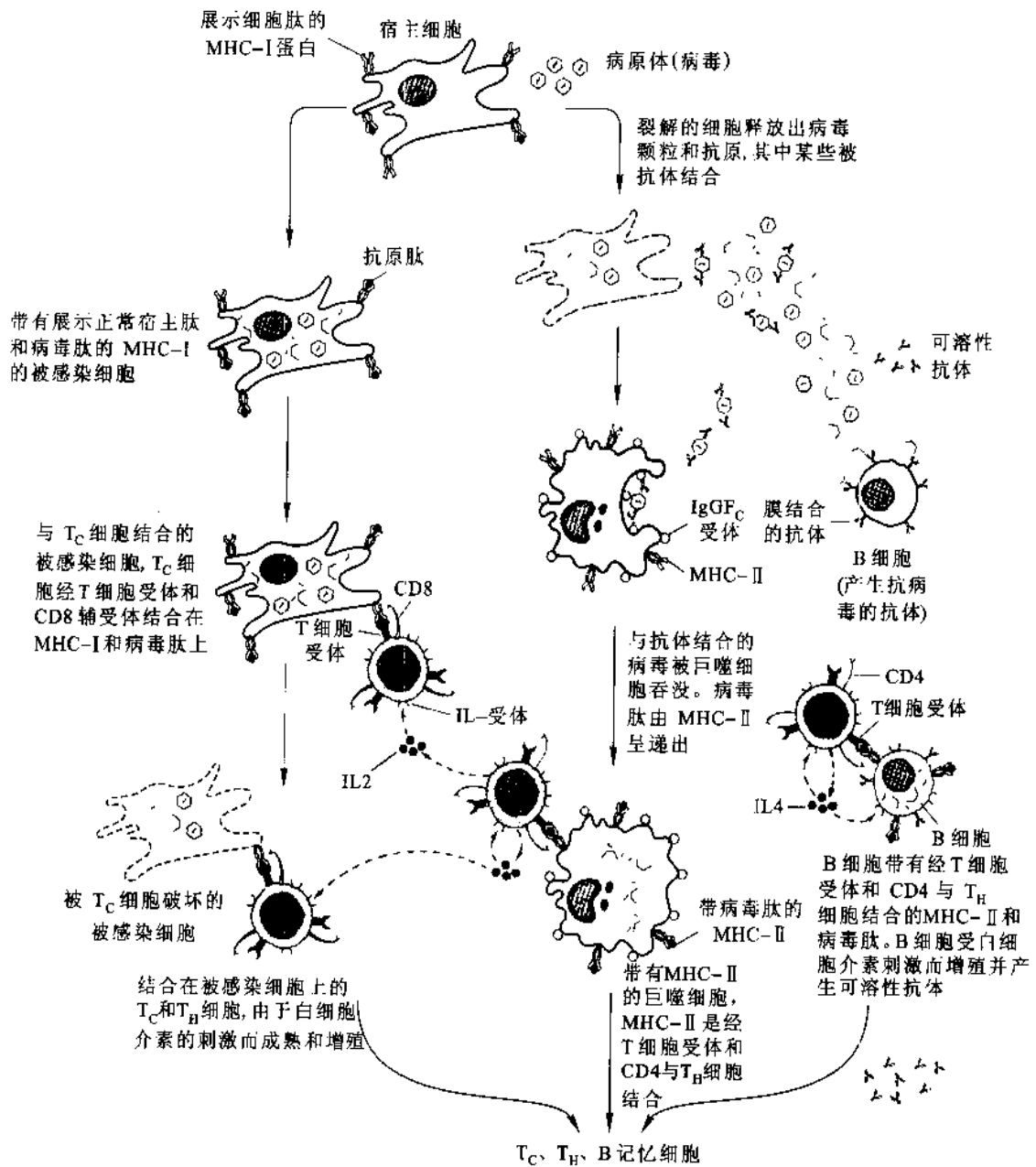


图 6-27 抗病毒感染的免疫反应图解(详细步骤见正文)

被感染细胞上的 MHC-I 蛋白-肽复合体将被那些具有合适结合特异性(结构互补)的 T 细胞受体的 T_C 细胞所识别并结合。这些 T 细胞受体只对那些与 MHC-I 蛋白结合的抗原肽作应答。 T_C 细胞还有一种辅受体 CD8, 它能提高 T 细胞受体和 MHC-I 蛋白的结合相互作用(图 6-28)。 T_C 细胞由于能破坏被病毒感染的细胞, 因而又称它为杀伤细胞。 T_C 细胞是通过它的 T 细胞受体与被感染细胞结合的。细胞死亡是由多种机制引起的, 现在尚未完全了解。一种机制是涉及一种称穿孔素(perforin)的蛋白质的释放, 它们与靶细胞的质膜结合, 形成分子孔道, 破坏细胞调节其内环境的能力。 T_C 细胞也诱导称为程序性细胞死亡(programmed cell death 或 apoptosis)的过程, 过程中与 T_C 细胞结合的细胞发生代谢变化, 迅速导致细胞死亡。

如果有大量病毒感染的细胞需要消灭, 则必须有选择地增殖具有合适特异性的 T_C 细胞。为此, 与被感染细胞结合的 T_C 细胞产生针对白细胞介素(信号蛋白)的细胞表面受体。各种细胞分泌的白细胞介素只刺激那些具有所要求的白细胞介素受体的 T 和 B 细胞。因为只有当 T 和 B 细胞与抗原结合时它们才

产生白细胞介素受体,所以只有那些增殖的免疫系统细胞是能与抗原发生反应的细胞。一个特定的祖先细胞通过刺激繁殖,产生一个有同样免疫能力的细胞群(包括效应细胞和记忆细胞)的过程称为克隆选择(clonal selection)。克隆是无性繁殖的意思。

结合并被展示在巨噬细胞和B细胞表面上的肽同样地被 T_H 细胞的合适T细胞受体所结合。 T_H 细胞也有一种辅受体,称CD4,它能提高T细胞受体与MHC-II蛋白-肽复合体的结合相互作用(图6-28)。这个总的结合相互作用,与目前正被鉴定的二级分子信号一起,活化 T_H 细胞。被活化的 T_H 细胞的一个亚群分泌一种小分子蛋白,称白细胞介素-2(IL-2, M_r 15 500),它能刺激具有合适的白细胞介素受体的 T_C 细胞和 T_H 细胞的增殖。这极大地增加了能识别并应答抗原的免疫系统细胞。另一个亚群分泌白细胞介素-4(IL-4, M_r 20 000),它刺激那些能识别抗原的B细胞增殖(图6-27)。应答中的B、 T_C 和 T_H 细胞的增殖一直继续到抗原的消失。

增殖中的B细胞促进任何胞外的病毒和细菌细胞的消灭。B细胞首先分泌大量的可溶性抗体,这些抗体或是通过抗体-抗原的沉淀反应消灭抗原,因为形成的抗体-抗原复合物沉淀能被巨噬细胞和粒细胞吞噬而被彻底清除,或是在称为补体(complement)的细胞系统(约含20种蛋白质)协助下,消灭那些细胞性质的抗原(如细菌),这类抗原只靠抗体的作用往往不能清除,必须有“补体”形成的破膜复合体的参加。破膜复合体能破坏多种病毒的外壳,使细菌细胞壁穿孔,由于渗透压震扰引起细菌细胞膨胀,破裂而死亡。

与T细胞不同,B细胞在胸腺中不进行选择以消灭那些识别生物体自身的蛋白质。然而,B细胞并不显著促进免疫反应,除非它们受到 T_H 细胞刺激而增殖。 T_H 细胞在胸腺中进行选择,不留下能刺激那些产生对宿主有潜在危险抗体的B细胞增殖的 T_H 细胞。

T_H 细胞本身只间接地参与被感染细胞和病毒的破坏,但它们的作用对整个免疫反应是关键。引起艾滋病的人免疫缺损病毒(HIV)清楚地说明这一点。HIV感染的第一靶就是 T_H 细胞。消灭这些细胞就会逐渐地破坏整个免疫系统。

一旦抗原耗尽,被激活的免疫细胞就通过程序性细胞死亡在几天内死去。然而,少数被刺激了的B和T细胞则成熟为记忆细胞。记忆细胞当第一次遇上抗原时,不直接参与初次免疫反应。它们成为血液中的永久性“居民”,准备应答同样的抗原再次出现。以后记忆细胞受到抗原挑战时,能进行再次免疫反应。再次免疫反应一般比初次免疫反应快得多,也强得多,因为事先已克隆扩大。通过这种机制,曾接触过病毒或其他病原的脊椎动物,当再次接触它们时就能很快地作出应答。这是疫苗提供长期免疫和同一病毒株重复感染产生天然免疫的基础。

(四) 免疫球蛋白的结构和类别

免疫球蛋白或称抗体,是一类可溶性的血清糖蛋白,是血清中最丰富的蛋白质之一。抗体具有两个显著的特点:一是高度的特异性,二是庞大的多样性。特异性是指抗体通常只能与引起它产生的相应抗原发生反应。多样性是指抗体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,一个抗原的来源动物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,免疫反应愈强。

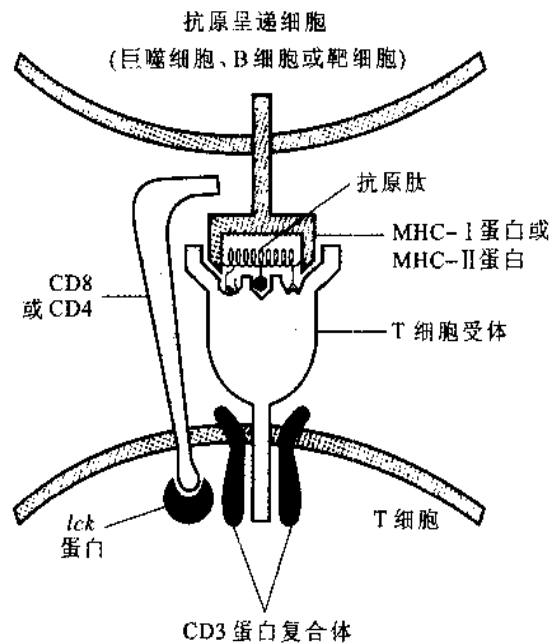


图6-28 抗原呈递细胞上的MHC蛋白-抗原肽复合体与T细胞上的T-细胞受体的相互作用
图中CD3蛋白复合体和lck蛋白是T细胞应答系统的一部分

1. 免疫球蛋白的结构

免疫球蛋白 G(IgG) 是血清中最基本的一类抗体, 在许多脊椎动物中只有 IgG 类的抗体。IgG 是由 4 条多肽链组成的, 两条大的链称为重链或 H 链, 两条小的链称为轻链或 L 链。它们通过非共价键和二硫键连接成 $M_r 150\ 000$ 的复合体。IgG 分子的两条重链在一端彼此相互作用, 在另一端分别与轻链相互作用, 形成 Y 形结构(图 6-29)。每一 IgG 分子含有两个抗原结合部位, 它们位于 Y 形结构的两个“臂”的顶端。如果抗原含有多个抗原决定簇, 那么抗体可以形成引发抗原-抗体的交联晶格而沉淀(图 6-30)。抗体分子(IgG) 是二价的而抗原分子可以是多价的, 这里讲的价数是指抗原与抗体的结合部位数目。当抗体和抗原在接近等当量(称为等价带)浓度时, 将发生最大的交联, 产生大量的免疫沉淀或沉淀素(precipitin)。体外的沉淀反应被广泛地用于研究抗原-抗体反应, 并已成为实验免疫学的基础。

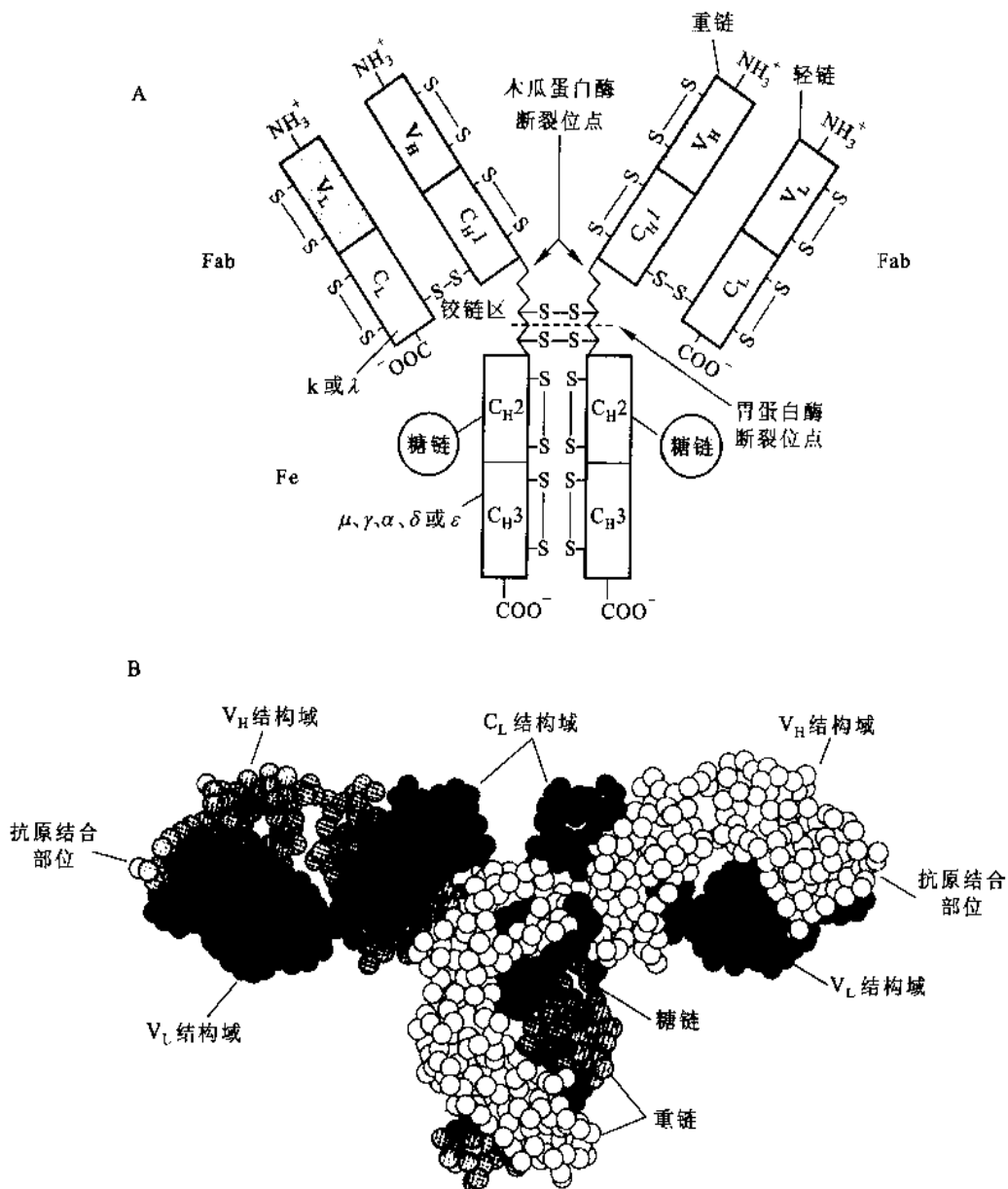


图 6-29 免疫球蛋白的结构

A. 分子结构图解; B. 三维结构(空间填充模型)

IgG 分子的 L 链和 H 链的一级结构可根据它们的序列同源性划分为若干区或结构域。每种免疫球蛋白的 L 链都含有可变区或 V 区(variable domain)和恒定区或 C 区(constant domain)。L 链的可变区(V_L)内的氨基酸序列各抗体之间是不同的; 恒定区(C_L)内的残基列所有抗体之间几乎是一样的。同样, H

链也含可变区和恒定区,标为 V_H 、 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} (对于 IgM 和 IgE 还有 C_{H4})。L 链和 H 链的可变区都在链的 N-末端区域,在 V_L 和 V_H 区内有所谓高变区(high variable region),它负责抗体分子对抗原的识别,是真正的抗原结合部位。可变区的其余序列相当恒定,这可能是形成特有的免疫球蛋白的结构域所要求的。IgG 分子的基部与它的两个臂的连接处称铰链区(hinge region),长度约 30 个氨基酸残基。当用木瓜蛋白酶处理时,在铰链发生断裂,释放基部片段(M_r 50 000)称为 F_C ,因为它通常容易结晶(crystallization)。两个单价的臂片段(M_r 45 000),称为 Fab,即抗原结合片段(图 6-29)。当用胃蛋白酶断裂时,产生一个称 $F(ab)_2$ 的二价片段(M_r 100 000)和若干小肽片段。

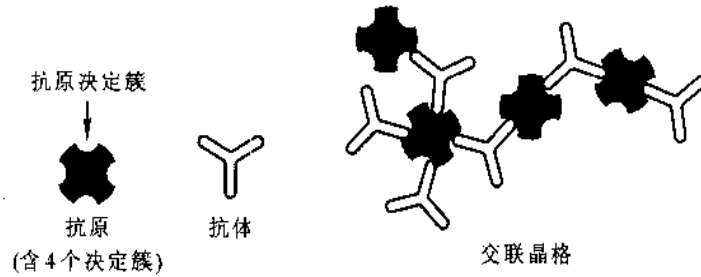


图 6-30 免疫沉淀的交联晶格

抗体的各恒定区(C_L 、 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})之间有不少同源序列。L 链和 H 链的可变区(V_L 和 V_H) 也有同源性。每个结构域(约含 110 个残基),不论是恒定区还是可变区都有一个二硫键。免疫球蛋白的特征性结构域是塌陷的反平行 β 桶,或看成是由两个反平行 β 折叠片形成的夹心式结构,称免疫球蛋白折叠(immunoglobulin-fold)。这是一种非常保守的结构花式,如免疫球蛋白 V_L 结构域(图 5-38b)所示。免疫球蛋白折叠中 β 折叠片的序列是保守的,序列变化主要发生在连接 β 折叠片的环(高变区)上; V_L 和 C_L 的 N 端环区构成抗原结合部位。

2. 免疫球蛋白的类别

人的免疫球蛋白除 IgG 外,尚有 IgA、IgM、IgD 和 IgE,共有 5 个类别,其相对分子量范围从 150 000 到 950 000(表 6-2)。Ig 分子轻链恒定区(C_L)的氨基酸序列可分为两种基本类型, κ (kappa) λ (lambda),它们存在于所有 5 类免疫球蛋白中;对一个 Ig 分子来说只有其中的一种,或是 κ 或是 λ 。重链恒定区(包括 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})的序列分为 5 种基本类型, γ 、 α 、 μ 、 δ 和 ϵ 。 α 、 γ 和 δ 类型的重链恒定区,长度约为 330 个氨基酸, μ 和 ϵ 类型的约为 440 个残基。每个类别的免疫球蛋白只含其中一种类型的重链,免疫球蛋白 G、A、M、D 和 E 分别含 γ 、 α 、 μ 、 δ 和 ϵ 。IgM 是在对入侵抗原作初次免疫反应的早期产生的。它或以单体(Y 形结构)的膜结合形式或以五聚体形式存在(图 6-31)。由于五聚体的分子很大,使它只限于存在于血流中。IgM 的主要功能是抑制、凝集、溶解入侵血液的细菌。IgA 主要存在于身体的分泌物,如唾液、泪和乳中,它是初乳和乳中的主要抗体;IgA 可以是单体,二聚体或三聚体。IgD 存在于 B 细胞表面,某些 B 细胞在免疫反应中很快产生 IgD(其抗原结合部位与同样细胞所产生的 IgM 是一样的),但 IgD 的功能尚不清楚。

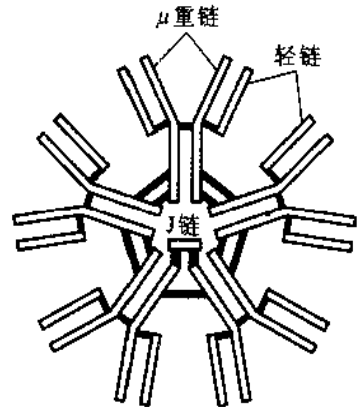


图 6-31 IgM 的结构
IgM 是 Y 形结构单位借二硫键交联而成的五聚体。J 链是一个 M_r 20 000 的多肽链,存在于 IgM 和 IgA 中

IgG 是记忆 B 细胞引发的再次免疫反应中的主要抗体。IgG 是血液中最丰富的免疫球蛋白。当 IgG 与入侵的细菌或病毒结合时它不仅激活了补体系统而且也激活了某些白细胞如巨噬细胞以吞噬并破坏入侵者。巨噬细胞表面上除 MHC-II 蛋白外还有一类受体能识别并结合 IgG 的 F_C 区。当这些受体结合了抗体-病原复合体时,巨噬细胞则通过吞噬作用吞没了复合体(图 6-27)。IgG 也是唯一能通过胎盘而进入体内的抗体。所以新生儿在前几周是依靠母体的 IgG 抵御细胞、病毒等外物入侵的。此外 IgG 的一

IgG 是记忆 B 细胞引发的再次免疫反应中的主要抗体。IgG 是血液中最丰富的免疫球蛋白。当 IgG 与入侵的细菌或病毒结合时它不仅激活了补体系统而且也激活了某些白细胞如巨噬细胞以吞噬并破坏入侵者。巨噬细胞表面上除 MHC-II 蛋白外还有一类受体能识别并结合 IgG 的 F_C 区。当这些受体结合了抗体-病原复合体时,巨噬细胞则通过吞噬作用吞没了复合体(图 6-27)。IgG 也是唯一能通过胎盘而进入体内的抗体。所以新生儿在前几周是依靠母体的 IgG 抵御细胞、病毒等外物入侵的。此外 IgG 的一

表 6-2 人免疫球蛋白的类别

免疫球蛋白类别	重链类型 (M_r)	轻链类型 (M_r)	多肽链成分	近似 M_r	沉降系数	含糖重量 /%	在血中的浓度 /($\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$)
IgG	γ (53 000)	κ 或 λ (22 500)	$\gamma_2\kappa_2$ $\gamma_2\lambda_2$	150 000 (单体)	7	2~3	600~1 800
IgA	α (64 000)	κ 或 λ	$(\alpha_2\kappa_2)_n$ $(\alpha_2\lambda_2)_n$ $n = 1, 2 \text{ 或 } 3$	320 000 (二聚体)	10	7~12	90~420
IgM	μ (70 000)	κ 或 λ	$(\mu_2\kappa_2)_n$ $(\mu_2\lambda_2)_n$ $n = 1 \text{ 或 } 5$	950 000 (五聚体)	18~20	10~12	50~190
IgD	δ (58 000)	κ 或 λ	$\delta_2\kappa_2$ $\delta_2\lambda_2$	185 000 (单体)	7		0.3~4.0
IgE	ϵ (75 000)	κ 或 λ	$\epsilon_2\kappa_2$ $\epsilon_2\lambda_2$	190 000 (单体)	8	10~12	0.01~0.1

种变体,是膜结合抗体,作为 B 细胞膜上的一种受体(图 6-24A)。

IgE 在变态或过敏反应(allergic reaction)中起重要作用。过敏反应是一种免疫反应。引起过敏反应的物质称过敏原(allegen);某些外物如花粉、蜂毒、青霉素以及蕈类和牡蛎中的某些成分对于敏感的人都是过敏原。过敏反应涉及 IgE 与血中的嗜碱性粒细胞和广泛分布于组织的肥大细胞(mast cell)。IgE 通过它们的 F_c 区与嗜碱性粒细胞或肥大细胞上的特殊的 F_c 受体结合。而 IgE 以这种形式作为抗原(过敏原)的一种受体。如果它结合了过敏原,则诱导细胞分泌组胺(histamine)和其他活性胺。组胺有使血管扩张,渗透性增大,促进免疫系统细胞和蛋白质向发炎部位移动,出现局部红肿、灼热、流涕、流泪和打喷嚏等症状。

(五) 基于抗体-抗原相互作用的生化分析方法

由于抗生物学物质的抗体容易制取并具有高度特异性,因此抗体成为许多分析和制备生化方法的核心。两种重要的生化分析试剂是多克隆抗体和单克隆抗体。多克隆抗体(polyclonal antibody)是由多个不同的 B 淋巴细胞在应答一个抗原,例如向一个动物注入一种蛋白质时产生的, B 淋巴细胞群中每个细胞产生结合抗原中特异的不同抗原决定簇的抗体。因此,多克隆抗体(简称多抗)制剂是识别一个蛋白质(抗原)的不同部分(表位)的多种抗体的混合物。单克隆抗体(monoclonal antibody)则不同,它是由生长在细胞培养物中的同一 B 细胞的群体(一个克隆)合成并分泌的。这些抗体是均一的,所有的抗体识别同一的表位。

抗体-抗原沉淀反应是某些经典分析技术,如免疫扩散和免疫电泳(电泳原理见第 7 章)的基础。扩散和电泳是在琼脂平板上进行的。琼脂板上所加的抗原(或抗体)样品或其电泳后的条斑,因扩散将与另加的相应抗体(或抗原)相遇发生反应,出现沉淀线或沉淀弧。这些方法被用于不同抗原的比较和定量。

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay),即酶联免疫吸附测定,它能快速筛查和定量一个抗原在样品中的存在(图 6-32)。由于 ELISA 操作简便、易于重复和灵敏度高,已被广泛用于分子生物学和临床诊断的常规检测。此方法虽有多种变型,但原理是一样的,都是以待测抗原(或抗体)和酶标抗体(或抗原)的特异结合反应为基础,然后通过酶活力测定来确定抗原(或抗体)含量。ELISA(以抗抗型为例)基本步骤包括:待测样品中的蛋白质(例如含 HIV 抗原的血清)被吸附到惰性表面,一般是 96-井的聚苯乙烯塑料板。表面加非特异性蛋白质(常用酪蛋白或牛血清蛋白)一起温育,封闭未被蛋白质覆盖的部位,以防止随后步骤中的蛋白质被吸附到表面。然后用含抗待测蛋白质的抗体(例如抗 HIV 外壳蛋白的兔 IgG)或称第一抗体的溶液处理。未被结合的抗体用缓冲液洗去,表面用含抗第一抗体的抗体(例如羊抗兔的抗抗体,也称羊抗兔 IgG)的溶液处理。未被结合的第二抗体洗去。第二抗体是与一个催化形成有色产物的酶共价连接的,例如辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG(goat antirabbit IgG-horseradish peroxidase)。最后加入

与第二抗体偶联的酶的底物。如果是辣根过氧化物酶标抗体,可加 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine),生成的产物黄色,在 450 nm 波长处有最大光吸收。有色产物的形成与样品中待测的抗原(或抗体)含量成正比。

免疫印迹测定(immunoblot assay)或称 Western 印迹(Western blot),因为它在操作上类似用于核酸分析的 Southern 印迹或 Southern 转移。对蛋白质样品进行凝胶电泳分离(图 7-14),然后凝胶板与硝酸纤维膜贴在一起,进行电泳转移,将凝胶上的蛋白条带转印到纤维膜上。如上面 ELISA 中所述,将纤维封闭,然后相继用第一抗体、酶标第二抗体以及底物进行处理。只有含待测蛋白质的条带显示颜色。免疫印迹能检测样品中的微量成分和近似相对分子质量(图 6-33)。

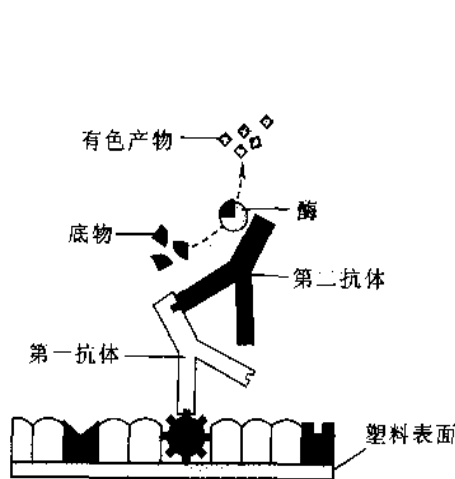


图 6-32 酶联免疫吸附测定(ELISA)步骤的图解

(1) 用样品包被表面,样品中含待检抗原(如 HIV 外壳蛋白)和其他蛋白; (2) 用非特异性蛋白质 封闭未被结合的部位; (3) 与抗待检抗原的第一抗体温育; (4) 与酶联的第二抗体温育; (5) 加入底物; (6) 形成有色产物表明待测抗原的存在

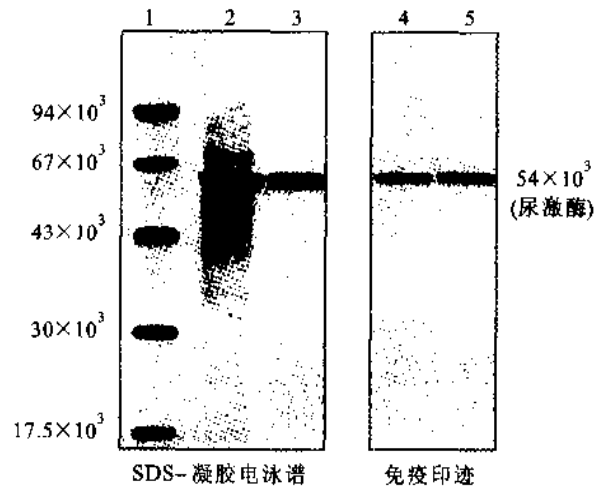


图 6-33 免疫印迹测定

SDS 凝胶电泳泳道 1 是标准蛋白质的分离条带。泳道 2 和 3 分别是尿激酶(抗原)制剂纯化前和纯化后样品的条带(考马斯亮蓝染色)。泳道 4 和 5 的样品分别与 2 和 3 相同,只是 4 和 5 是在凝胶电泳后被转印到硝酸纤维膜上用抗尿激酶的单克隆抗体“探测”

抗体的特异性具有实际用途。被选的抗体共价连接到载体如琼脂糖,用于如图 3-24 所示的层析柱。当蛋白质混合物加到柱上时,抗体将特异地结合靶蛋白(相应抗原)而被保留在柱上,其他蛋白质则流出柱外。靶蛋白可用盐溶液或其他溶剂从柱上洗脱下来。这是亲和层析的一种形式,是纯化蛋白质的一种有力工具(见第 7 章)。

如果用纯的抗体进行上述各项技术,那么它们的特异性、灵敏度和再现性都会有很大的提高。由于不同的抗体在化学结构上十分相似,用标准的蛋白质分级分离技术纯化抗体实际上是不可能的,然而用单克隆抗体能达到此目的。生产单克隆抗体的技术是 20 世纪 70 年代发展起来的。制备单克隆抗体的基本步骤是:① 用感兴趣的抗原(如尿激酶)免疫小鼠脾脏,制成 B 淋巴细胞悬液;② 繁殖小鼠骨髓瘤细胞(myeloma),白细胞的一种致瘤性增殖;③ 制得的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合,产生所谓杂交瘤(hybridomas)的细胞系,它在培养物中能不断增殖,但只合成一种抗体;④ 细胞转移到只有杂交瘤细胞才能生长的介质中进行选择性培养;⑤ 用 ELISA 筛查并找出分泌抗感兴趣的蛋白质的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;⑥ 对所得的细胞株进行扩大化培养,从培养物中纯化所需单克隆抗体。

上述免疫化学技术的细节参看本章主要参考书[2,9]。

五、肌球蛋白丝、肌动蛋白丝与肌肉收缩

真核生物的游动系统(motility system),包括高等真核生物的肌肉收缩系统,都是由两类蛋白质构成。一类是所谓发动机蛋白质(motor protein)也称分子发动机(molecular motor),这类蛋白质主要有肌球蛋

白、动力蛋白(dynein)和驱动蛋白(kinesin);另一类是作为分子发动机的基地或运动轨道的蛋白质,如微丝(microfilament)和微管(microtubule,图5-55),它们是细胞骨架的重要成分。发动机蛋白质是一类涉及移动或转运的机械化学酶,例如肌球蛋白实际上是一种ATP酶,酶的活性中心在它的头部(图5-28),这类酶能把核苷三磷酸(一般是ATP)形式的化学能转变为收缩、游动一类的机械能。ATP的水解驱动并控制蛋白质的构象变化,结果是一个分子(分子发动机)相对于另一个分子(微丝或微管)发生滑动或步行运动。真核细胞的纤毛和鞭毛的搏动是轴丝动力蛋白与微管相互作用引起的。驱动蛋白以及胞质动力蛋白参与细胞内的细胞器、小泡等“货物”的转运。转运时驱动蛋白或动力蛋白的一部分连在微管上,另一部分则与被转运的细胞器或小泡相连,由ATP水解推动分子发动机沿微管运动,同时将“货物”沿微管送到一端。细菌的鞭毛运动涉及一个位于鞭毛基部(质膜上)的复杂的旋转发动机(rotational motor),这种发动机以质子动势即质子梯度为动力而不是ATP。螺旋酶、聚合酶以及其他蛋白质在DNA复制、转录过程中行使功能时将沿DNA链运动(见下册第34~36章)。下面以脊椎动物骨骼肌的收缩蛋白为例,说明蛋白质如何把化学能转变为运动。

(一) 肌纤维的结构

脊椎动物的骨骼肌又称横纹肌或随意肌。图6-34示出典型骨骼肌的组织水平。肌肉由许多平行的肌纤维束或称肌束(fasciculus)组成。肌束中的每个肌纤维(muscle fiber 或 myofiber)就是一个骨骼肌细胞,它是长柱形的多核细胞,直径约在20~100 μm之间,长可达5 cm以上,人体的一些肌纤维甚至可达50 cm。肌纤维是由多个称为成肌细胞(myoblast)的肌肉前体细胞融合而成的。每个肌纤维含有约1 000个肌原纤维(myofibril),直径2 μm。这些肌原纤维溶于细胞质即肌浆(sarcoplasm)中。核一般处在细胞的外周,质膜的內面。肌纤维中含有许多线粒体,肌肉收缩时提供能源ATP,此外内质网,称为肌质网(sarcoplasmic reticulum),很发达,分布在各个肌原纤维的周围,肌肉收缩时由它提供所需的Ca²⁺。肌原纤维呈现一个很有规则的周期性结构,暗带和明带交替排列。明带折射率是各向同性的,因此又称各向同性带

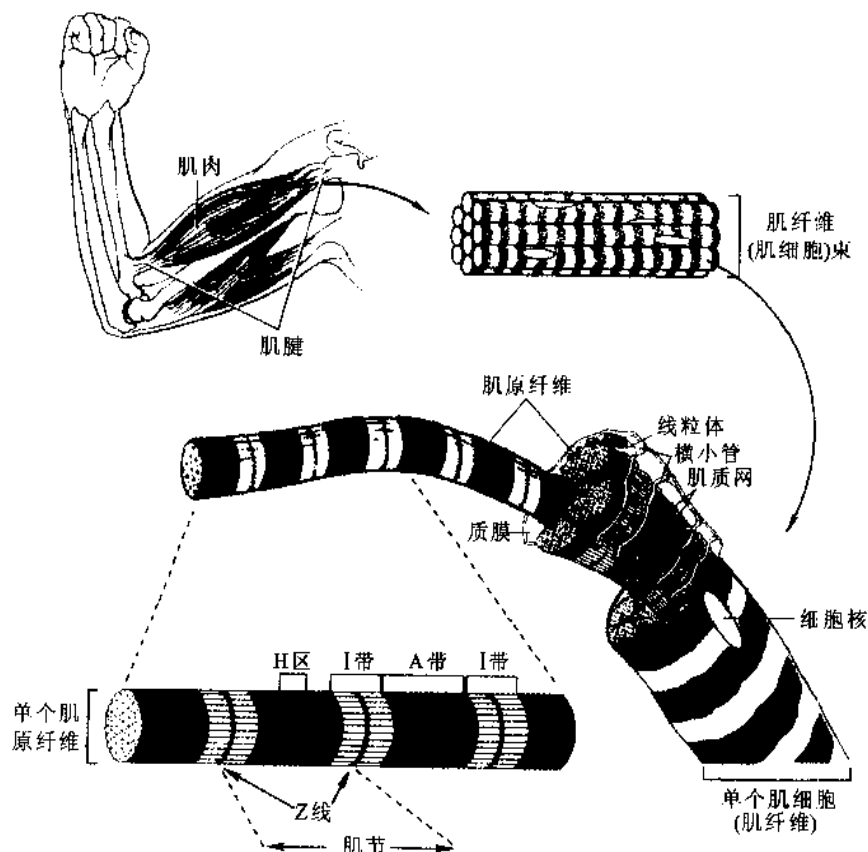


图6-34 骨骼肌的组织水平

(isotropic band), 简称 I 带; 暗带是各向异性的所以又称各向异性带 (anisotropic band), 简称 A 带; I 带被一条称为 Z 线 (Z line) 或 Z 盘 (Z disk) 的细线分成相等的两半。在 A 带中央有一个较明亮的区域称为 H 区 (H zone), H 区正中间有一个致密的横线, 称 M 线或 M 盘, 它将 H 区分成相等的两半, 一个肌原纤维可看成是由许多称为肌节 (sarcomere) 的重复单位构成的, 重复单位是一个 A 带加上前后各半个 I 带, 即从 Z 线到下一个 Z 线一段。一个肌节在松弛状态长度约为 $2.5 \mu\text{m}$ 。上述肌纤维的结构在光学显微镜下就能观察到。

(二) 肌原纤维由粗丝和细丝构成

电子显微镜观察和生物化学研究揭示, 每个肌原纤维是由许多纵向排列的肌丝 (myofilament) 组成 (图 6-35)。肌丝有粗、细两种, 粗丝 (thick filament) 只分布在高电子密度的 A 带, 并贯穿 A 带全长。A 带中央电子密度稍低的 H 区只有粗丝, 而 H 区的边缘到 A 带的两端则是粗丝和细丝重叠的部分。细丝 (thin filament) 从肌节两端的 Z 盘走向肌节的中央, 进入 A 带, 终止于 H 区的边缘, 所以 H 区没有细丝。而低电子密度的 I 带则只有细丝。I 带中央的 Z 盘是起固定细丝的锚钩作用。肌原纤维用适当的盐或去污剂溶液提取可以除去实际上全部的肌球蛋白, 提取过程中 A 带粗丝消失。此实验证明了粗丝和细丝的化学组成, 粗丝是肌球蛋白, 细丝主要是肌动蛋白。肌球蛋白作为纤维状蛋白质已在第 5 章叙述, 它的结构见图 5-27 和 5-28。

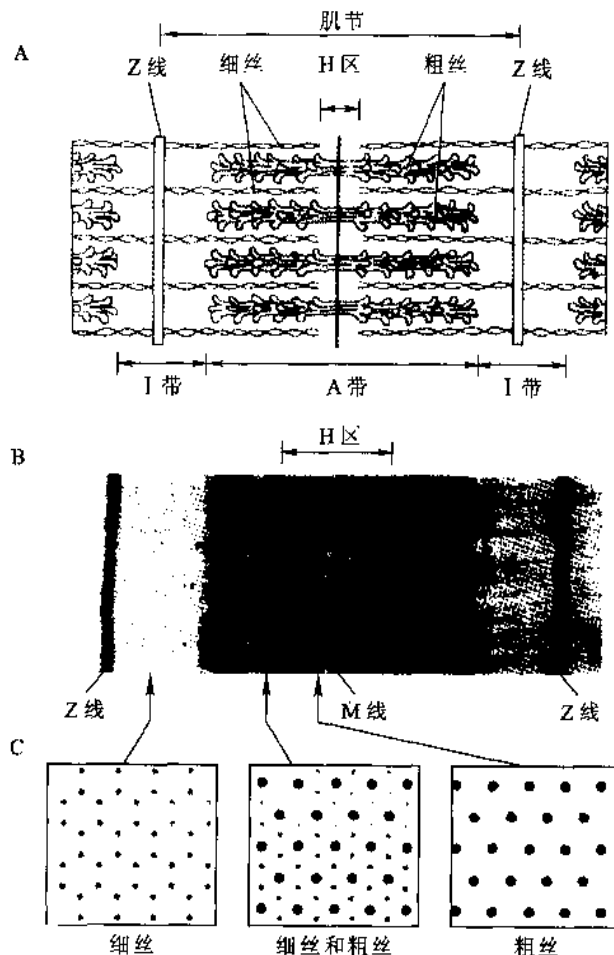


图 6-35 骨骼肌肌原纤维的电镜图 (纵切面)

A. 骨骼肌重复单位 (肌节) 的图解; B. 肌节的电镜照片; C. 肌节的横切面图解:
I 带横切面示出细丝的六角形排列, H 区示出粗丝的六角形排列

粗丝是由数百个肌球蛋白分子通过它们的尾部缔合而成的分子束, 直径约为 16 nm ; 束中分子的排列有一定的方向, 它们的尾都朝向 A 带的中央 (H 区), 头朝向 A 带的两端, 因此粗丝是一个长的双极结构

(bipolar structure), 长约为 $1.5 \mu\text{m}$ (图 6-36A)。结构中肌球蛋白的头部有规则地每间隔约 14 nm 在两端伸出。这种间隔是由于肌球蛋白尾部氨基酸序列的重复结构产生的。粗丝上伸出的头部与相邻的细丝接触, 这就是高分辨率电镜下能观察到的粗丝与细丝之间的所谓横桥(croze bridge)。

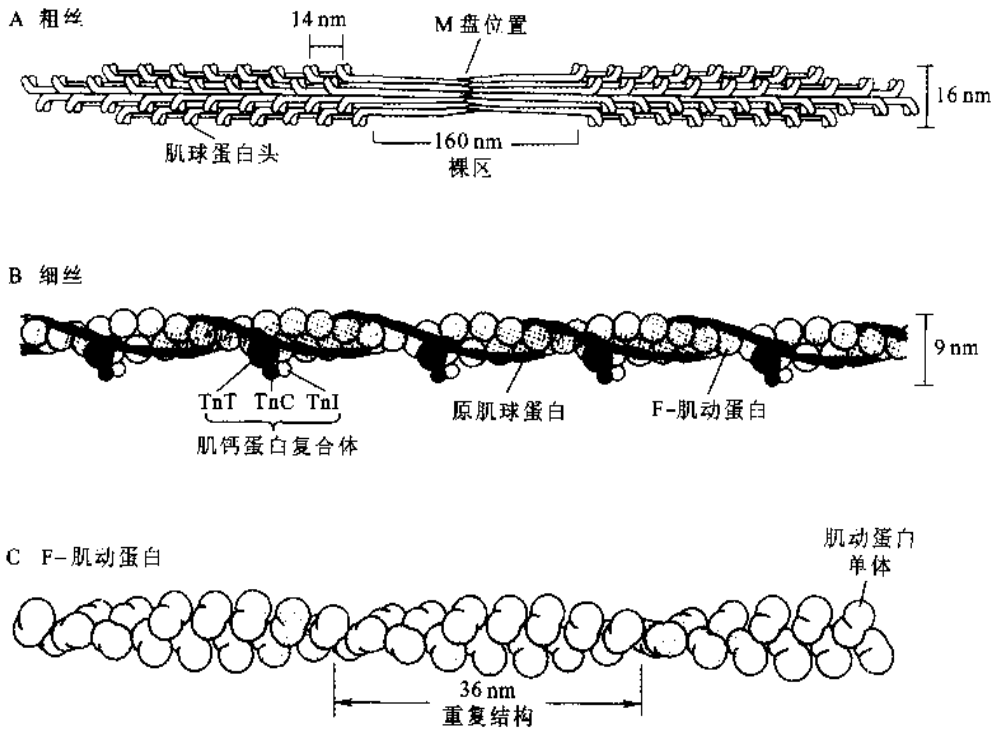


图 6-36 粗丝和细丝中的分子装配

A. 粗丝中邻接的分子错位约 14 nm , 此距离相当于卷曲螺旋中 98 个氨基酸残基; B. 细丝是 F-肌动蛋白和与之结合的调节蛋白; C. F-肌动蛋白中单体分子被装配成紧密的螺旋, 每圈约含两个肌动蛋白单体(每一单体相对于下一个单体旋转 166° , 沿轴平移 2.75 nm)。F-肌动蛋白外观上很像是由两股肌动蛋白分子链拧在一起的双螺旋(重复结构长为 36 nm)。这是误导, 因为这种假想的单股“肌动蛋白链”本身实际上并不存在。

细丝的主要成分是肌动蛋白(actin), 它存在于几乎所有的真核细胞中。在低离子强度条件下, 肌动蛋白以单体形式存在, 称为 G-肌动蛋白。G-肌动蛋白分子由两个主要结构域组成。在生理条件(高离子强度)下, G-肌动蛋白聚合成纤维状称 F-肌动蛋白。如图 6-36C 所示, F-肌动蛋白外观上像是右手双螺旋结构, 重复结构约 36 nm (螺距约 72 nm)。F-肌动蛋白螺旋是细丝的核心, 此外还有原肌球蛋白(见第 5 章纤维状蛋白质部分)和肌钙蛋白复合体(troponin complex)加入。每个原肌球蛋白约与 7 个肌动蛋白单体结合。通过原肌球蛋白使肌钙蛋白复合体定位于肌动蛋白丝上, 肌钙蛋白复合体由 3 个不同的蛋白质组成: 肌钙蛋白 T 或 TnT ($M_r 37\ 000$), 肌钙蛋白 I 或 TnI ($M_r 24\ 000$) 和肌钙蛋白 C 或 TnC ($M_r 18\ 000$)。TnT 与原肌球蛋白结合; TnI 与原肌球蛋白和肌动蛋白两者结合, 其功能是抑制肌动蛋白与肌球蛋白相互作用。TnC 显示与重要的 Ca^{2+} 信号蛋白, 钙调蛋白(calmodulin, 第 17 章和下册第 21 章)的序列有 70% 同源性。

(三) 骨骼肌的相关蛋白质

除骨骼肌的主要蛋白质外, 尚有多种蛋白质在维持肌肉结构和调节肌肉收缩方面起着重要作用。肌球蛋白和肌动蛋白共占总肌丝蛋白质的 65%, 原肌球蛋白和肌钙蛋白各占 5%, 因此其他的调节和结构蛋白约占肌丝蛋白质的 25%。

肌球蛋白相关蛋白质(myosin-associated protein)包括在 M 盘中发现的 3 种蛋白。M 盘主要由 M 蛋

白($M_r 165 \times 10^3$)、肌中蛋白^{*}($M_r 185 \times 10^3$)和肌酸激酶($M_r 42 \times 10^3$ 亚基的二聚体)组成。肌酸激酶促进肌肉收缩期间被消耗的 ATP 快速再生。这 3 种蛋白在 M 盘的缔合维持肌球蛋白丝的结构完整性。此外还有一些与粗丝有关的蛋白质已被发现,包括 C 蛋白、F 蛋白和 H 蛋白等。

肌动蛋白相关蛋白质(除原肌球蛋白和肌钙蛋白外)包括 α -辅肌动蛋白(α -actinin, $M_r 95 \times 10^3$ 亚基的均二聚体)和副原肌球蛋白(paratropomyosin, $M_r 34 \times 10^3$ 亚基的二聚体)等。肌动蛋白丝的一端是以有规则的方式连接在 Z 盘上的。与 Z 盘有关的蛋白质有 α -辅肌动蛋白,以及作为中间丝(intermediate filament, 细胞骨架的重要成分之一)的结蛋白(desmin, $M_r 53 \times 10^3$)和波形蛋白(vimentin, $M_r 55 \times 10^3$)等。

另两个细胞骨架蛋白,肌连蛋白(titin 或 connectin)和伴肌动蛋白(nebulin, M_r 约 800×10^3),占肌丝总蛋白的 15%。它们共同形成肌原纤维周围的柔性丝状网。肌连蛋白是一种弹性蛋白质,在张力下能伸展。它的发现结束了长达一个世纪的关于肌肉中可能存在弹性成分的争论。肌连蛋白是现在已知的最大的单链蛋白质,人的心肌肌连蛋白由 26 926 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 $2 993 \times 10^3$ 。肌连蛋白的氨基酸序列已被测定,其序列主要(90%)由 244 个免疫球蛋白(Ig)和纤连蛋白 3(FN3)结构域组成。在肌连蛋白分子中央是一个新的结构花式,由 PEVK(pro-Glu-Val-Lys)的重复单位组成。PEVK 花式可能起弹簧装置的作用,在肌肉伸展之后可拉动肌肉恢复原形,并且也可能在调节肌纤维的强度和弹性方面起作用。在强度特殊的肌肉中,如心肌,PEVK 区的长度只有 163 个残基,而在弹性大的骨骼肌中 PEVK 区超过 2 000 个残基。

在肌纤维中肌连蛋白形成长而柔软的细丝。一个这样的细丝,在松弛状态长 1 000 nm,在张力下它能伸长到 3 000 nm 以上。在肌肉中肌连蛋白起自 M 线的周边,沿肌球蛋白丝全长伸展至 Z 盘。在这里肌连蛋白的作用可能是把肌球蛋白丝连接到 Z 盘上,以及作为“分子尺”调节肌节的长度,防止肌肉过分伸张。当肌原纤维伸张超过粗、细丝的重叠部分,肌连蛋白丝则被动产生张力,使肌原纤维复原。肌球蛋白与肌连蛋白丝的分子比例约为 24:1。含 300 个肌球蛋白分子的粗丝每半个粗丝只有 6 个左右的肌连蛋白丝。

(四) 肌肉收缩的机制:肌丝滑动模型

肌肉收缩的机制可以从两个方面来理解,一是从肌肉结构细节如上面所述;二是从收缩时肌节的区、带宽度的变化。在一个完全的收缩中,每个肌节缩短约 $1.0 \mu\text{m}$ 。收缩时 I 带和 H 区几乎消失,Z 盘向 A 带靠拢,也即缩短是由 I 带和 H 区两者的宽度减小造成的(图 6-37),但 A 带宽度(即粗丝长度)和 Z 盘到 H 区边缘的距离(即细丝长度)并不改变。这说明粗丝和细丝长度在收缩期间是恒定的。此即所谓肌丝滑动模型(sliding-filament model)。

肌节的缩短(图 6-37)涉及在肌球蛋白粗丝两端相向方向的滑动。之所以在特定方向上发生净滑动是因为粗、细丝都有方向性,粗、细丝在肌节中的组织正是利用这种方向性。肌动蛋白丝总是以同样的方式从 Z 盘向外伸展,因此在两个 Z 盘之间,两套肌动蛋白丝的方向是相向的。另一方面肌球蛋白粗丝也装配成具有方向性的(如前所述它是一种双极结构)。粗丝的极性在 M 盘逆转。逆转的细节尚不完全清楚,据推测这可能涉及 M 盘上的蛋白质(如 M 蛋白和肌中蛋白)引起的结构限制。在 M 盘处的极性逆转意味着 M 盘两侧的肌动蛋白丝在收缩时被肌球蛋白头的滑动拉向 M 盘而引起肌节的净缩短。20 世纪 40 年代初,匈牙利学者 Szent-Györgyi 观察到,当肌球蛋白溶液和肌动蛋白溶液混合时,溶液的粘度剧烈增加。粘度增加是由于形成肌动球蛋白(actomyosin)复合体的缘故。Szent-Györgyi 进一步观察到,肌动蛋白溶液的粘度随 ATP 的加入而降低。这表明 ATP 能降低肌球蛋白对肌动蛋白的亲合力。动力学研究证明,肌球蛋白的 ATP 酶活性因肌动蛋白而显著增加。纯肌球蛋白的 ATP 酶转换数(见第 8 章)为 $0.05/\text{s}$,然而在肌动蛋白存在下,转换数增加到 $10/\text{s}$ 左右。此值更像是完整肌纤维的转换数。

如果仔细比较反应的产物释放步骤,肌动蛋白对肌球蛋白的 ATP 酶活性的特殊影响就会很清楚。在缺少肌动蛋白时,向肌球蛋白加入 ATP 将引起 H^+ 的快速释放, H^+ 是 ATP 酶反应的产物之一:

* 此名称系 myomesin 的暂译名——编者。

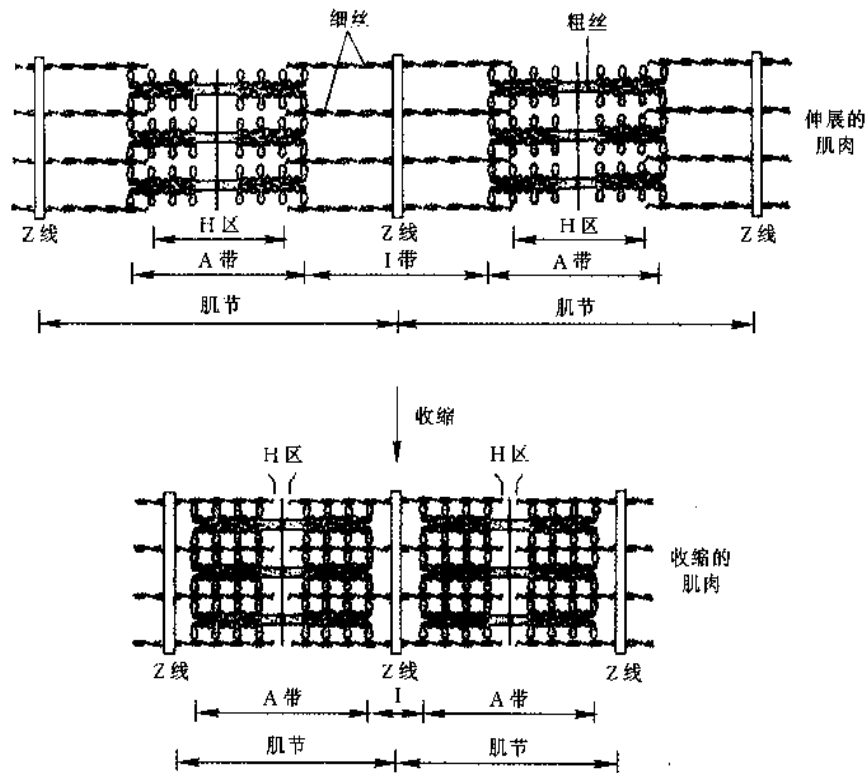
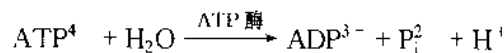


图 6-37 骨骼肌收缩的肌丝滑动模型

注意,肌肉收缩时,H区和I带宽度减小,但A带宽度保持不变



然而,从肌球蛋白释放 ADP 和 P_i (磷酸盐)则要慢得多。因此肌动蛋白活化肌球蛋白 ATP 酶活性是通过促进 P_i 、然后 ADP 的释放来实现的。随着产物的释放一个新 ATP 与肌动球蛋白复合体结合,引起肌动球蛋白解离成肌动蛋白和肌球蛋白。然后如图 6-38 所示重复 ATP 循环。此即 ATP 水解模型,此模型的关键点是 ATP 水解与肌动蛋白和肌球蛋白的缔合和解离是偶联的。正是这一偶联使 ATP 水解能够驱动肌肉收缩。

肌动蛋白-肌球蛋白结合与 ATP 水解的偶联是怎样引起肌丝滑动的? 换言之,ATP 水解模型与肌丝滑动模型是怎样关联的? 综合了生化、生物物理和结构方面的研究,提出了肌肉收缩的一个可能机制,如图 6-38 所示。

当 ATP 未与肌球蛋白结合时,肌球蛋白头与肌动蛋白紧密结合。当 ATP 与肌球蛋白头结合并被水解为 ADP 和 P_i 时,则发生循环式的系列构象变化,循环中肌球蛋白与 F-肌动蛋白的亚基解离,并沿细丝进一步与另一亚基结合。

循环可分为四个步骤。步骤 1,ATP 与肌球蛋白 S1 头片(图 5-28)结合,S1 头片上的裂沟打开,破坏肌动蛋白与肌球蛋白间的相互作用,导致 S1 头片从肌动蛋白丝上释放。步骤 2,结合的 ATP 被水解,引起肌球蛋白构象变化,转变为“高能”态,S1 头片竖起,改变它对肌动蛋白细丝的取向,并与一个比刚释放的亚基更接近 Z 盘的 F-肌动蛋白亚基发生弱结合。步骤 3,肌球蛋白-ADP- P_i 与肌动蛋白的结合引起 ATP 的水解产物 P_i 从肌球蛋白中释放,同时发生另一构象变化,肌球蛋白头片的裂沟关闭,肌球蛋白与肌动蛋白的结合得到加强。步骤 4,肌球蛋白头片发生最关键的构象变化,即所谓做功冲程(power stroke)。在此步骤中肌球蛋白头片对被结合的肌动蛋白的取向发生变化,结果肌球蛋白头片长轴与细丝长轴倾斜约 45° ,头片构象能降低约 29 kJ/mol ,并转变为低能态构象,同时肌球蛋白粗丝向 Z 盘靠近。然后释放 ADP,完成一个循环。在典型的骨骼肌收缩中,循环以 $5/\text{s}$ 速率进行重复。循环中发生的构象变化是能量偶联的秘密之所在,它使 ATP 的结合和水解得以驱动肌肉收缩。

因为粗丝上有许多肌球蛋白头片,粗丝沿细丝的滑动很像千足虫的行走,在任一给定的时刻总有一些

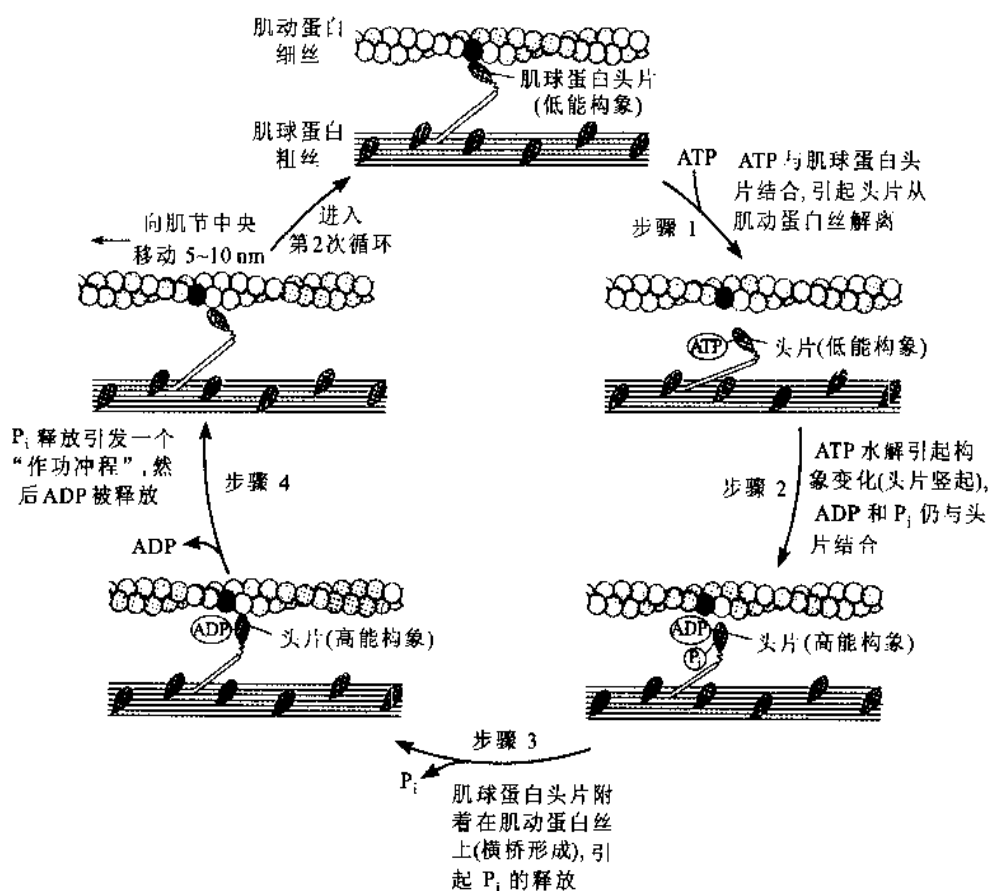


图 6-38 肌肉收缩的分子机制

ATP 水解自由能引起肌球蛋白头片的构象变化,结果肌球蛋白头沿肌动蛋白丝发生净移动

头片(约 1%~3%)与细丝接触,因此当肌球蛋白头从与之结合的细丝上解离时不致使粗丝往回滑:粗丝是主动地沿相邻的细丝向前滑行的。肌肉收缩是肌纤维中许多肌节之间的协调过程。

做功冲程中的构象变化已用冷冻电镜术(cryo-electron microscopy)并结合计算机图像分析和反馈增强激光光学捕获实验(laser optical trapping experiment)进行研究。并证在一次循环中一个肌球蛋白分子沿肌动蛋白丝的平均移动为 5~10 nm,产生的平均力为 3~4 pN($10^{-12} \times \text{kg m/s}^2$)。一次收缩循环所需的能量定义为收缩所完成的“功”(w):

$$w = F \cdot d$$

式中 F 是力, d 是距离。因此一次循环所需的能量 $w = (3 \text{ pN})(5 \text{ nm})$ 至 $(4 \text{ pN})(10 \text{ nm}) = 1.5 \times 10^{-20} \text{ J}$ 至 $4.0 \times 10^{-20} \text{ J}$ 。如果细胞内 ATP 的水解自由能为 -50 kJ/mol (见下册第 20 章),那么一个 ATP 分子的水解产生可利用的自由能 $\Delta G^{\ominus'} = (-50 \text{ kJ/mol}) / (6.022 \times 10^{23} / \text{mol}) = -8.3 \times 10^{-20} \text{ J}$ 。因此一个 ATP 分子的水解自由能足够驱动实验所观测到的做功所需能量(参看 Finer, J. T., et al, 1994. *Nature*, 368: 113~119)。

肌动蛋白和肌球蛋白之间的相互作用必定受到调节,以便只有在响应来自神经系统的适当信号时才发生收缩。调节是由原肌球蛋白和肌钙蛋白复合体介导的。原肌球蛋白与细丝结合关闭了细丝上肌球蛋白头的结合位点。肌钙蛋白 C 是 Ca^{2+} 结合蛋白。一个神经冲动引起 Ca^{2+} 从肌质网中释放。释放的 Ca^{2+} 与肌钙蛋白 C 结合并引起原肌球蛋白和肌钙蛋白复合体的构象变化,暴露出细丝上的肌球蛋白结合位点,因而引起收缩循环的发生。

六、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。

一般来说,在核酸控制下的蛋白质生物合成(第18章)过程具有保守的一面。但是生物的环境是不断地发生变化的,这些变化必将影响遗传信息携带者DNA。虽然DNA是较保守的,即化学反应能力较低,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,即使有些机制,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,但正如在前面(第4章)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,例如像许多同源蛋白的情况那样。如果取代部位落在活性区,则生物功能受到影响或完全消失。若这种蛋白质在维持生命活动过程中是不可缺的,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。它将使这种生物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环境的新功能的新蛋白质。这种蛋白质将随同生物体被自然界选择优选下来,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4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(在肽链的不少位置上,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。此外像胰脏的胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶和凝血酶都有相似的化学结构,有半数位置上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,表现在酶对底物的专一性上的差别。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、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和适应性,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适应性转化而来,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。

提 要

肌红蛋白(Mb)和血红蛋白(Hb)是脊椎动物中的载氧蛋白质。肌红蛋白便于氧在肌肉中转运,并作为氧的可逆性贮库。而血红蛋白是血液中的氧载体。这些蛋白质含有一个结合得很紧的血红素辅基。它是一个取代的卟啉,在其中有一个铁原子。亚铁(+2)态的血红素能结合氧,但高铁(+3)态的不能结合氧。血红素中的铁原子还能结合其他小分子如CO、NO等。

肌红蛋白是一个单一的多肽链,含153个残基,外形紧凑。Mb内部几乎都是非极性残基。多肽链中约75%是 α 螺旋,共分8个螺旋段。一个亚铁血红素基位于疏水的空穴内,它可以保护铁不被氧化成高

铁。血红素铁离子直接与一个 His 侧链的氮原子结合。此近侧 His(H8) 占据第 5 个配位位置。第 6 个配位位置是 O_2 的结合部位。在此附近的远侧 His(E7) 降低在氧结合部位上 CO 的结合, 并抑制血红素氧化成高铁态。

氧与 Mb 结合是可逆的。对单体蛋白质如 Mb 来说, 被配体(如 O_2) 占据的结合部位的分数是配体浓度的双曲线函数, 如 Mb 的氧结合曲线。血红蛋白由 4 个亚基(多肽链) 组成, 每个亚基都有一个血红素基。Hb A 是成人中主要的血红蛋白, 具有 $\alpha_2\beta_2$ 的亚基结构。四聚体血红蛋白中出现了单体血红蛋白所不具有的新性质, Hb 除运载氧外还能转运 H^+ 和 CO_2 。血红蛋白以两种可以相互转化的构象态存在, 称 T (紧张) 态和 R (松弛) 态。T 态是通过几个盐桥稳定的。无氧结合时达到最稳定。氧的结合促进 T 态转变为 R 态。

氧与血红蛋白的结合是别构结合行为的一个典型例证。T 态和 R 态之间的构象变化是由亚基-亚基相互作用所介导的, 它导致血红蛋白出现别构现象。Hb 呈现出 3 种别构效应。第一, 血红蛋白的氧结合曲线是 S 形的, 这意味着氧的结合是协同性的。氧与一个血红素结合有助于氧与同一分子中的其他血红素结合。第二, H^+ 和 CO_2 促进 O_2 从血红蛋白中释放, 这是生理上的一个重要效应, 它提高 O_2 在代谢活跃的组织如肌肉中的释放。相反地, O_2 促进 H^+ 和 CO_2 在肺泡毛细血管中的释放。 H^+ 、 CO_2 和 O_2 的结合之间的别构联系称为 Bohr 效应。第三, 血红蛋白对 O_2 的亲合力还受 2,3-二磷酸甘油酸(BPG) 调节, BPG 是一个负电荷密度很高的小分子。BPG 能与去氧血红蛋白结合, 但不能与氧合血红蛋白结合。因此, BPG 是降低血红蛋白对氧的亲合力的。胎儿血红蛋白($\alpha_2\gamma_2$) 比成年人的血红蛋白($\alpha_2\beta_2$) 有较高的氧亲合力, 就是因为它结合 BPG 较少。

导致一个蛋白质中氨基酸改变的基因突变能产生所谓分子病, 这是一种遗传病。了解最清楚的分子病是镰刀状细胞贫血病。这种病人的不正常血红蛋白称为 Hb S, 它只是在两条 β 链第 6 位置上的 Glu 被置换成 Val。这一改变在血红蛋白表面上产生一个疏水小区, 因而导致血红蛋白聚集成不溶性的纤维束, 并引起红细胞镰刀状化和输氧能力降低。纯合子的病人出现慢性贫血而死亡。地中海贫血是由于缺失一个或多个编码血红蛋白链的基因造成的。

免疫反应是由特化的白细胞——淋巴细胞和巨噬细胞及其相关的蛋白质之间的相互作用介导的。T 淋巴细胞产生 T 细胞受体, B 淋巴细胞产生免疫球蛋白, 即抗体。所有的细胞都能产生 MHC 蛋白, 它们在细胞表面展示宿主(自我) 肽或抗原(非自我) 肽。助 T 细胞诱导那些产生免疫球蛋白的 B 细胞和产生 T 细胞受体的胞毒 T 细胞均增殖。免疫球蛋白或 T 细胞受体能与特异的抗原结合。一个特定的祖先细胞通过刺激繁殖, 产生一个具有同样免疫能力的细胞群的过程称为克隆选择。

人类具有 5 个类别的免疫球蛋白, 每一类别的生物学功能都是不同的。最丰富的是 IgG 类, 它由 4 条多肽链组成, 两条重链, 两条轻链, 通过二硫键连接成 Y 形结构的分子。靠近 Y 的两“臂”顶端的结构域是多变区, 形成两个抗原结合部位。一个给定的免疫球蛋白一般只结合一个大抗原分子的一部分, 称为表位。结合经常涉及 IgG 的构象变化, 以便与抗原诱导契合。由于抗体容易制取并具有高度特异性, 它成为许多分析和制备生化方法的核心, 如酶联免疫吸附测定(ELISA)、Western 印迹和单克隆抗体技术等得到广泛应用。

在发动机蛋白质中蛋白质-配体相互作用上空间和时间的组织达到相当完善的程度。肌肉收缩是由于肌球蛋白和肌动蛋白“精心安排”的相互作用的结果。肌球蛋白是由纤维状的尾和球状的头组成的棒状分子, 在肌肉中被组织成粗丝。G-肌动蛋白是一种单体, 由它聚集成纤维状的 F-肌动蛋白, 后者是细丝的主体。由粗丝和细丝构成肌肉收缩单位——肌节。肌球蛋白上的 ATP 水解与肌球蛋白头片的系列构象变化相偶联, 引起肌球蛋白头从 F-肌动蛋白亚基上解离并与细丝前方的另一 F-肌动蛋白亚基再结合。因此肌球蛋白沿肌动蛋白细丝滑行。肌肉收缩受从肌质网释放的 Ca^{2+} 刺激。 Ca^{2+} 与肌钙蛋白结合导致肌钙蛋白-原肌球蛋白复合体的构象变化, 引发肌动蛋白-肌球蛋白相互作用的循环发生。

习 题

1. 蛋白质 A 和 B 各有一个配体 X 的结合部位, 前者的解离常数 K_d 为 10^{-6} mol/L, 后者的 K_d 为 10^{-9} mol/L。(a) 哪

个蛋白质对配体 X 的亲合力更高? (b) 将这两个蛋白质的 K_d 转换为结合常数 K_a 。[(a) 蛋白质 B; (b) 蛋白质 A 的 $K_a = 10^6 (\text{mol/L})^{-1}$, 蛋白质 B 的 $K_a = 10^{-9} (\text{mol/L})^{-1}$]

2. 下列变化对肌红蛋白和血红蛋白的 O_2 亲合力有什么影响? (a) 血浆的 pH 从 7.4 降到 7.2; (b) 肺中 CO_2 分压从 45 torr (屏息) 降到 15 torr (正常); (c) BPG 水平从 4.5 mmol/L (海平面) 增至 7.5 mmol/L (高空)。[对肌红蛋白: (a) 无; (b) 无; (c) 无。对血红蛋白: (a) 降低; (b) 增加; (c) 降低]

3. 在 37°C , pH 7.4, CO_2 分压 40 torr 和 BPG 正常生理水平 (4.5 mmol/L 血) 条件下, 人全血的氧结合测定给出下列数据:

$p(O_2)$	% 饱和度 (= $100 \times Y$)
10.6	10
19.5	30
27.4	50
37.5	70
50.4	85
77.3	96
92.3	98

(a) 根据这些数据, 绘制氧结合曲线; 估算在 (1) 100 torr $p(O_2)$ (肺中) 和 (2) 30 torr $p(O_2)$ (静脉血中) 下血的氧百分饱和度。

(b) 肺中 [100 torr $p(O_2)$] 结合的氧有百分之多少输送给组织 [30 torr $p(O_2)$]?

(c) 如果在毛细血管中 pH 降到 7.0, 利用图 6-17 数据重新估算 (b) 部分。

[(a) (1) 98%, (2) 58%; (b) 约 40%; (c) 约 50%]

4. 如果已知 P_{50} 和 n , 可利用方程 (6-15) $\frac{Y}{1-Y} = \left[\frac{p(O_2)}{P_{50}} \right]^n$ 计算 Y (血红蛋白氧分数饱和度)。

设 $P_{50} = 26$ torr, $n = 2.8$, 计算肺 (这里 $p(O_2) = 100$ torr) 中的 Y 。这些条件下输氧效率 ($Y_{\text{肺}} - Y_{\text{毛细血管}} = \Delta Y$) 是多少? 除 $n = 1.0$ 外, 重复上面计算。比较 $n = 2.8$ 和 $n = 1.0$ 时的 ΔY 值, 并说出协同性氧结合对血红蛋白输氧效率的影响。[$n = 2.8$ 时 $Y_{\text{肺}} = 0.98$, $Y_{\text{毛细血管}} = 0.77$, $\therefore \Delta Y = 0.21$; $n = 1.0$ 时 $Y_{\text{肺}} = 0.79$, $Y_{\text{毛细血管}} = 0.61$, $\therefore \Delta Y = 0.18$ 。两个 ΔY 之差 $0.21 - 0.18 = 0.03$, 似乎差值不大, 但在代谢活跃的组织中 $p(O_2) < 40$ torr, 因此潜在输氧效率不小, 参见图 6-15。]

5. 如果不采取措施, 贮存相当时间的血, 2,3-BPG 的含量会下降。如果这样的血用于输血可能产生什么后果? [贮存过时的红血球经酵解途径代谢 BPG。BPG 浓度下降, Hb 对 O_2 的亲合力增加, 致使不能给组织供氧。接受这种 BPG 浓度低的输血, 病人可能被窒息]

6. Hb A 能抑制 Hb S 形成细长纤维和红细胞在脱氧后的镰刀状化。为什么 Hb A 具有这一效应? [去氧 Hb S 含有一个互补部位, 因而它能加到去氧 Hb S 纤维上。这样的纤维不能继续延长, 因为末端的去氧 Hb S 分子缺少“粘性”区]

7. 一个单克隆抗体与 G-肌动蛋白结合但不与 F-肌动蛋白结合。这对于抗体识别抗原表位能告诉你什么? [该表位可能是当 G-肌动蛋白聚合成 F-肌动蛋白时被埋藏的那部分结构]

8. 假设一个 Fab-半抗原复合体的解离常数在 25°C 和 pH 7 时为 $5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

(a) 结合的标准自由能 (25°C 和 pH 7 时) 是多少?

(b) 此 Fab 的亲合力 (结合常数) 是多少?

(c) 从该复合体中释放半抗原的速度常数为 120 s^{-1} 。结合的速度常数是多少?

此说明在结合半抗原时抗体中的结构变化是大还是小?

[(a) $\Delta G^\ominus = 35.9 \text{ kJ/mol}$; (b) $K_a = 2 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{L}$; (c) 结合速度常数 $k = 2 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{L}$, 此值接近于小分子与蛋白质相遇 (结合) 的扩散控制限制 (10^8 至 $10^9 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{L}$)]

9. 抗原与抗体的结合方式与血红蛋白的氧结合相似。假设抗原是一价, 抗体是 n 价, 即抗体分子有 n 个结合部位, 且各结合部位的结合常数 K_a 值是相同的, 则可证明当游离抗原浓度为 $[L]$ 时, 结合到抗体上的抗原浓度 $[L_p]$ 与抗体的总浓度 $[P_T]$ 之比值:

$$\bar{N} = \frac{[L_p]}{[P_T]} = \frac{nK_a[L]}{1 + K_a[L]}$$

\bar{N} 实际上表示被一个抗体分子结合的抗原分子平均数。

(a) 证明上面的方程可重排为

$$\frac{\bar{N}}{[L]} = K_a n - K_a \bar{N}$$

此方程式称 Scatchard 方程。方程表明, $N/[L]$ 对 \bar{N} 作图将是一条直线。

(b) 根据 Scatchard 方程利用下列数据作图求出抗体-抗原反应的 n 和 K_a 值。

$[L]$ mol/L	\bar{N}
1.43×10^{-5}	0.5
2.57×10^{-5}	0.77
6.00×10^{-5}	1.20
1.68×10^{-4}	1.68
3.70×10^{-4}	1.85

[(a) 第一个方程两边各乘 $(1 + K_a[L])$, 然后两边各除以 $[L]$, 并重排得第 2 个方程; (b) 根据第二方程, $\bar{N}/[L]$ 对 \bar{N} 作图的斜率是 $-K_a$, $\bar{N}/[L]=0$ 时的截距给出 n 。利用数据作图得 $K_a = 2.2 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$, $n = 2.1$ 。因为结合部位数目只可能是整数, 所以 $n = 2$]

10. 一个典型的松弛肌节长约为 $3 \mu\text{m}$, 收缩时长约为 $2 \mu\text{m}$ 。肌节中细丝长约为 $1 \mu\text{m}$, 粗丝长约为 $1.5 \mu\text{m}$ 。

(a) 估算在松弛和收缩时粗丝和细丝的重叠情况。

(b) 一次循环中肌球蛋白沿细丝滑行一“步”移动约 7.5 nm , 问一次收缩中每个肌动蛋白纤维需要进行多少个步?

[(a) 约 0.75 nm , (b) 约 67 步]

主要参考书

1. 陈阅增主编. 普通生物学. 北京: 高等教育出版社, 1997
2. 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1996
3. H. R. 马休兹等. 生物化学简明教程. 吴相钰译. 北京: 北京大学出版社, 2001
4. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry, 2nd ed. USA: Saunders College Publishing, 1999
5. Kuby L. Immunology. New York: W. H. Freeman and Company, 1992
6. Stryer L. Biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
7. Mathews C K, van Holde K E. Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1990
8. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., Worth Publishers, USA, 2000
9. Wilson K, alker J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry, 5th ed. New York: Cambridge University Press, 2000

(徐长法)

第7章 蛋白质的分离、纯化和表征

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、均一的甚至是结晶的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物学功能,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纯化到规定的要求,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,制订出分离和纯化的合理程序。下面将介绍蛋白质分离、纯化的一般原则和方法。

分离和纯化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、吸附性质和对配体分子的特异生物学亲和力。因此讲述蛋白质的分离、纯化之前,将适当介绍蛋白质的性质,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,分子的两性电解质性质等。

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 7-1)。此外还有少数的末端 α -羧基和末端 α -氨基。如果是缀合蛋白质,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_a 值列于表 7-1。它们和游离氨基酸中相应基团的 pK_a 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 7-1 蛋白质分子中可解离基团的 pK_a 值

基 团	酸 \rightleftharpoons 碱 + H^+	$pK_a(25^\circ C)$
α 羧基	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3.0~3.2
β 羧基(Asp)	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	3.0~4.7
γ 羧基(Glu)	$-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$	4.4
咪唑基(His)	$\begin{array}{c} H \\ \\ \text{---}N^+ \text{---} \\ / \quad \backslash \\ \text{---}C \quad \text{---}CH \\ \backslash \quad / \\ \text{---}N \text{---} \\ \\ H \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} N \\ \\ \text{---}N \text{---} \\ / \quad \backslash \\ \text{---}C \quad \text{---}CH \\ \backslash \quad / \\ \text{---}N \text{---} \\ \\ H \end{array} + H^+$	5.6~7.0
α 氨基	$-\dot{N}H_3 \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	7.6~8.4
ϵ -氨基(Lys)	$-\dot{N}H_3 \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$	9.4~10.6
巯基(Cys)	$-SH \rightleftharpoons -S^- + H^+$	9.1~10.8
苯酚基(Tyr)	$\text{---} \langle \text{---} \rangle \text{---} OH \rightleftharpoons \text{---} \langle \text{---} \rangle \text{---} O + H^+$	9.8~10.4
胍基(Arg)	$\text{---}C \begin{array}{l} \nearrow NH_3 \\ \searrow NH \end{array} \rightleftharpoons \text{---}C \begin{array}{l} \nearrow NH_2 \\ \searrow NH \end{array} + H^+$	11.6~12.6

天然球状蛋白质的可解离基团大多数可被滴定,某些天然蛋白质中有一些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个侧链基团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 所决定的。对某一种蛋白质来说,在某一 pH,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 称为蛋白质的等电点。表 7-2 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目比例有关。表 7-3 给出几种蛋白质中碱性氨基酸与酸性氨基酸(酰胺化的酸性氨基酸已减去)的残基数目和它们之间的比例,这个比例和等电点之间有一定的关系。

表 7-2 几种蛋白质的等电点

蛋白质	等电点	蛋白质	等电点
胃蛋白酶	1.0	α -胰凝乳蛋白酶	8.3
卵清蛋白	4.6	α -胰凝乳蛋白酶原	9.1
血清清蛋白	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 7-3 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 (残基数/蛋白分子)	碱性氨基酸 (残基数/蛋白分子)	碱性残基数 酸性残基数	等电点
胃蛋白酶	37	6	0.2	1.0
血清清蛋白	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

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+} 、 Mg^{2+} 或阴离子如 Cl^- 、 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),等离子点是蛋白质的一个特征常数。

二、蛋白质分子的大小与形状

在第 4 章蛋白质通论部分曾介绍过,蛋白质分子的质量是很大的。它的相对分子质量变化范围在 6 000 到 1 000 000 或更大一些。下面主要讨论测定蛋白质相对分子质量的原理和方法,此外简单地讨论一下蛋白质分子的形状。

(一) 根据化学组成测定最低相对分子质量

用化学分析方法测定出蛋白质中某一微量元素的含量,并假设蛋白质分子中只有一个铁原子。则可以由此计算出蛋白质的最低相对分子质量(minimum relative molecular mass)。例如,肌红蛋白含铁量为 0.335%,其最低相对分子质量可按式算出:

$$\text{最低相对分子质量} = \frac{\text{铁的原子量}}{\text{铁的百分含量}} \times 100 = \frac{55.8}{0.335} \times 100 = 16\,700$$

用其他物理化学方法测得的肌红蛋白 M_r 与此极为接近,可见肌红蛋白分子中只含一个铁原子。真实 M_r 是最低相对分子质量的 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 M_r 就是 16 700。又如血红蛋白含铁也是 0.335%,其最低相对分子质量亦为 16 700,但根据其他方法测得的 M_r 是 68 000。可见每一个血红蛋白分子含有 4 个铁原子,即 $n=4$,因此其真实 $M_r=16\,700 \times 4$

= 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,由这一氨基酸含量分析的结果也可以计算蛋白质的最低相对分子质量。例如牛血清清蛋白含色氨酸 0.58%,计算所得的最低相对分子质量是 35 200。用其他方法测得的 M_r 是 69 000,所以每一个牛血清清蛋白分子含有两个色氨酸残基。

(二) 渗透压法测定相对分子质量

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,而蛋白质分子确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)单方向的净移动现象称为渗透(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。这时的净水压力就是溶液在平衡浓度时的渗透压(osmotic pressure),也即为了制止溶液与纯溶剂之间的净移动所需施加于溶液的压力(图 7-1)。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。

理想溶液中,溶液的渗透压与溶质浓度的关系可用范托夫(van't Hoff)公式表示:

$$\pi = nRT/V = (g/M_r)RT/V$$

$$\pi = (g/V) RT/M_r = cRT/M_r$$

式中 π 是渗透压(单位为 N/m^2 ,即 Pa); V 是溶液的体积(m^3); n 是溶液中溶质的摩尔数; g 是溶质的质量(g); c 是溶质的浓度(g/m^3); T 是绝对温度(K); R 是气体常数($8.314 \text{ J/(K}\cdot\text{mol)}$); M_r 为溶质的相对分子质量或摩尔质量(g/mol)。

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:

$$\pi = RT \left(\frac{c}{M_r} + Kc^2 \right)$$

$$\frac{\pi}{c} = \frac{RT}{M_r} + Kc$$

$$M_r = \frac{RT}{\lim_{c \rightarrow 0} \frac{\pi}{c}}$$

因此,利用渗透压的测定来计算蛋白质 M_r 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 0 时所得截距,即 $\lim_{c \rightarrow 0} \pi/c$ 值,以此代入上式求出蛋白质 M_r 。对于相对分子质量 10 000 至 100 000 范围的蛋白质利用渗透压法估算其 M_r 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。这样会由于唐南平衡(Donnan's equilibrium)造成半透膜两侧可渗透的无机离子的不均衡分布,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液用作膜内外的溶剂,并增加缓冲液中无机盐的浓度。

渗透压法测定蛋白质 M_r 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的蛋白质,那么由渗透压测得的结果实际上代表几种蛋白质的平均相对分子质量。

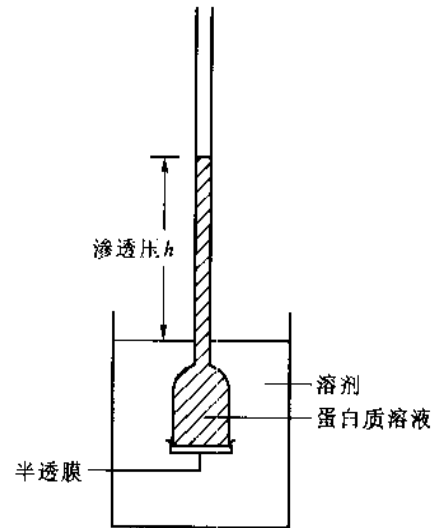


图 7-1 渗透压测定的示意图

(三) 蛋白质的扩散和扩散系数

蛋白质溶液在平衡时,虽然它的分子仍处于不断的热运动中,但是分子在整个溶液中的分布在统计学上是均匀的。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菲克(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 面积所扩散的溶质量。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上一个负号。扩散系数的单位为 $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。蛋白质的扩散系数与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菲克第二扩散定律:

$$\frac{dc}{dt} = D \frac{d^2c}{dx^2}$$

积分上式得:

$$\frac{c_2}{c_1} = e^{-\frac{x_2^2 - x_1^2}{4Dt}}$$

因此,测定两个不同部位的浓度,即可计算出 D 值。

扩散系数随 M_r 的增加而降低。但扩散系数对 M_r 的变化并不敏感。对球形的大分子来说,扩散系数与 M_r 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,前者的相对分子质量为后者的二倍,但前者的扩散系数只比后者小 18% (表 7-4)。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,因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 M_r ,但如后面所说的与沉降系数结合起来,可以给出蛋白质的精确相对分子质量。

表 7-4 一些蛋白质的物理常数

蛋白质	相对分子质量	扩散系数 ($D_{20,w} \times 10^7$) $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	沉降系数 ($s_{20,w} \times 10^{13}$) S	摩擦比 (f/f_0)
核糖核酸酶 A(牛)	12 600	11.9	1.85	1.14
细胞色素 c(牛心肌)	13 370	11.4	1.71	1.19
肌红蛋白(马心肌)	16 900	11.3	2.04	1.11
胰凝乳蛋白酶原(牛胰)	23 240	9.5	2.54	1.19
β -乳球蛋白(山羊乳)	37 100	7.48	2.85	1.26
血清清蛋白(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
血纤蛋白原(人)	339 700	1.98	7.63	2.34
肌球蛋白(鳕鱼肌)	524 800	1.10	6.43	3.63
烟草花叶病毒	40 590 000	0.46	198	2.03

表 7-4 中列出几种蛋白质的扩散系数。 $D_{20,w}$ 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℃,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 是表示溶液无限稀释时溶质的扩散系数。为此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^{\ominus} 将很近似。

(四) 沉降分析法测定相对分子质量

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。沉降的速率与蛋白质分子大小和密度有关,而且与分子形状、溶液的密度和粘度有关。在实验室中研究蛋白质沉降作用,都采用能够产生强大离心场(每分钟转速为 60 000~80 000 时,对于质量为 1g 的物质,位于 10 cm 处的分子受到的离心场相当于重力加速度 g 的 400 000~700 000 倍)的超速离心机(ultracentrifuge)。超速离心机是迄今应用最广泛的一项流体动力学技术,它是分析生物大分子的强有力的工具。

利用超速离心机测定蛋白质或其他生物大分子的相对分子质量,常用的有两种方法,一种是沉降速率法(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相对分子质量的数据,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质量和形状相同的蛋白质分子,在离心场作用下,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. 沉降速率法

把蛋白质样品溶液放在离心机内的特制离心池中,在离心场的作用下,蛋白质分子将沿旋转中心向外周方向(径向)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率。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(也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,使移动的界面以峰形曲线呈现在照相图片上,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 7-2)。

在离心场中蛋白质颗粒发生沉降时,它将受到三种力的作用:

$$\begin{aligned} F_c(\text{离心力}) &= m_p \omega^2 x \\ F_b(\text{浮力}) &= V_p \rho \omega^2 x = m_p \bar{v} \rho \omega^2 x \\ F_f(\text{摩擦力}) &= f v = f \frac{dx}{dt} \end{aligned}$$

这里, m_p 是分子颗粒的质量(g); ω 是转头的角速度(rad/s); x 是旋转中心至界面的径向距离(cm); $\omega^2 x$ 是离心加速度(也称离心场强度或离心场,是单位质量的力); V_p 是分子颗粒的体积; ρ 是溶剂的密度(g/cm^3); \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 是沉降速率,即 dx/dt 。离心力减去浮力为分子颗粒所受到的净离心力:

$$\begin{aligned} F_c - F_b &= m_p \omega^2 x - m_p \bar{v} \rho \omega^2 x \\ &\approx m_p \omega^2 x (1 - \bar{v} \rho) \end{aligned}$$

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,净离心力与摩擦力(阻力)处于稳态平衡中:

$$F_c - F_b = F_f$$

$$\text{即} \quad m_p \omega^2 x (1 - \bar{v} \rho) = f \frac{dx}{dt}$$

$$\text{或} \quad \frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{m_p (1 - \bar{v} \rho)}{f}$$

可见单位离心场的沉降速度是个定值。称为沉降系数(sedimentation coefficient)或沉降常数,用 s (小写)

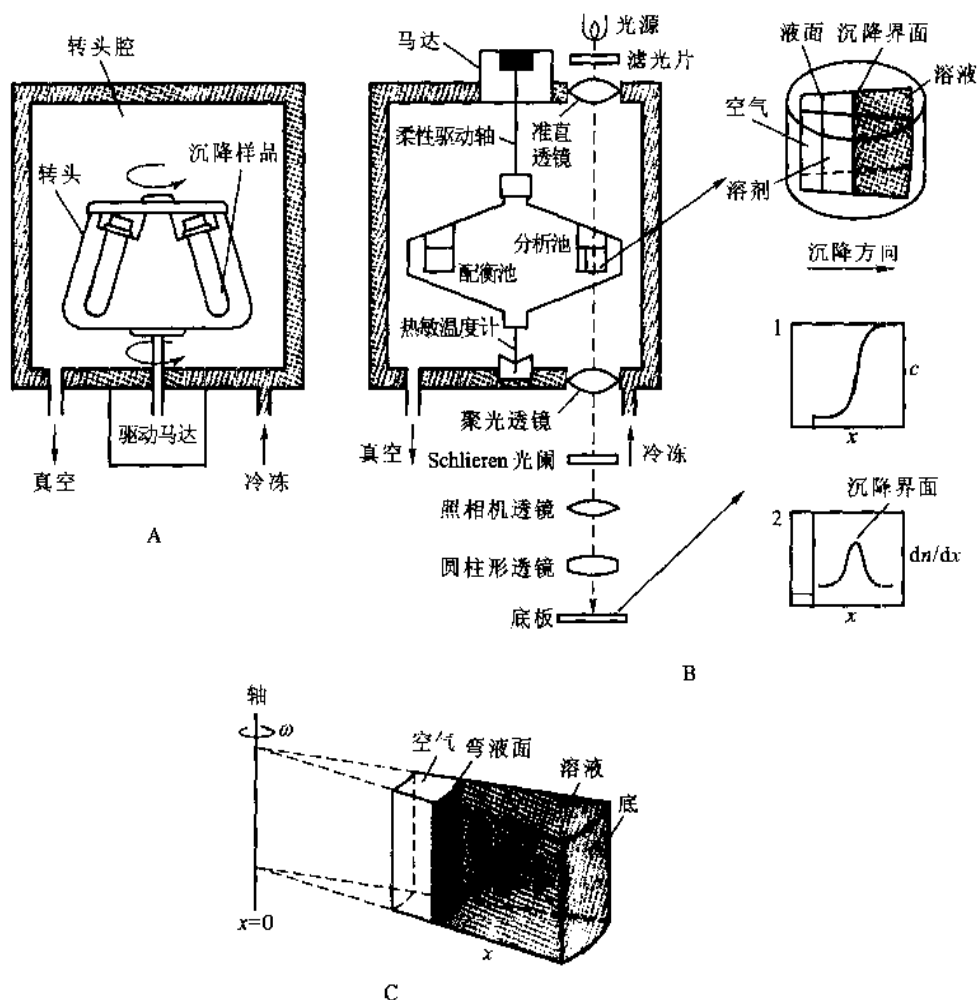


图 7-2 超速离心机工作原理图解

A. 制备型超速离心机; B. 分析型超速离心机, 1. 浓度 c 对距离 x 的作图, 2. 界面的 Schlieren 图谱, 即 dn/dx (dc/dx) 对距离 x 的作图; C. 扇形分析池与离心轴的关系

表示:

$$s = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

将上式改写为:

$$\frac{d \log x}{dt} \approx \frac{s \omega^2}{2.303}$$

$d \log x / dt$ 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 (rad/s):

$$\omega = \text{转速} \times \frac{2\pi}{60}$$

转速是每分钟转头的旋转次数 (rotation per minute, 缩写为 r/min , 曾简称为 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 7-4)。为方便起见, 把 10^{-13} 秒作为一个单位, 称为斯维得贝格单位 (Svedberg unit) 或称沉降系数单位, 用 S (大写) 表示。例如人血红蛋白的沉降系数为 $4.46 S$, 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。根据斯托克定律 (Stoke's law), 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, 称斯托克半径(stoke's radius); η 为溶剂粘度; 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 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℃, 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 等于它的相对分子质量除以阿伏加德罗常数 N_A ; 即

$$m_p = \frac{M_r}{N_A}$$

又知爱因斯坦 - 萨德兰德方程(Einstein - Sutherland equation):

$$f = \frac{RT}{ND}$$

将上面 m_p 和 f 值代入下式:

$$s = \frac{m_p(1 - \bar{v}\rho)}{f}$$

得

$$s = \frac{M_r}{N_A} \cdot \frac{ND}{RT} (1 - \bar{v}\rho)$$

$$M_r = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

此式称斯维得贝格方程, 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 $0.74 \text{ cm}^3/\text{g}$) 和溶剂(一般用缓冲液)密度, 即可计算出蛋白质的相对分子质量。

2. 沉降平衡法

利用沉降平衡法测定相对分子质量是在较低速度(8 000 ~ 20 000 r/min)的离心场中进行的。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7-3)。在离心力作用下,沉降浓度为 dx/dt ,在时间 dt 内浓度为 c 的溶液越过横截面 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:

$$dm + dm' = 0$$

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

$$D = \frac{RT}{Nf}$$

代入上式并整理得:

$$M_r = \frac{2RT}{(1 - \bar{v}\rho) \omega^2} \frac{d \ln c}{dx^2}$$

将此式积分得:

$$M_r = \frac{2RT d \ln(c_2/c_1)}{(1 - \bar{v}\rho) \omega^2 (x_2^2 - x_1^2)}$$

这里, $M_r, R, \omega, \bar{v}, \rho$ 的意义与前面斯维德贝格方程中的相同, 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 \bar{v} 和 ρ ,即可算出蛋白质的相对分子质量。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) 凝胶过滤法测定相对分子质量

将在后面的蛋白质纯化方法中看到,利用凝胶过滤(gel filtration)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相对分子质量。从凝胶过滤的原理可知,蛋白质分子通过凝胶柱的速度(洗脱体积的大小)并不直接取决于分子的质量,而是它的斯托克半径。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,称蛋白质分子的斯托克半径。因此利用凝胶过滤法测定蛋白质相对分子质量时,标准蛋白质(已知 M_r 和斯托克半径)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 M_r 。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 M_r 。

1966年Andrews根据他的实验结果提出了一个经验公式:

$$\frac{V_e}{V_o} = a - b \log M_r$$

式中, V_e 为洗脱体积, V_o 为外水体积, M_r 为相对分子质量, a 和 b 为常数。移项上式得:

$$\log M_r = \frac{a}{b} - \frac{1}{b} \frac{V_e}{V_o}$$

实验中,只要测得几种蛋白质相对分子质量标准物(marker或standard)的 V_e ,并以它们的相对分子质量的对数($\log M_r$)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相对分子质量(图7-

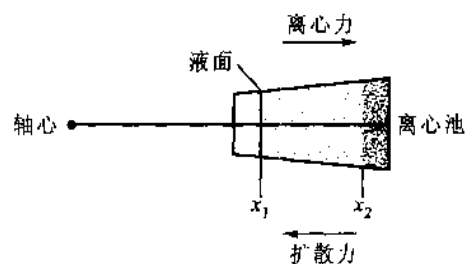


图7-3 蛋白质的沉降平衡

4)。利用凝胶过滤层析法测定 M_r 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,找出它的洗脱体积即可确定它的 M_r 。测定蛋白质相对分子质量一般用交联葡聚糖(见第1章),其商品名称为 Sephadex。根据需要可选用 Sephadex G-75(分级分离的 M_r 范围 3 000~80 000)和 G-100(M_r 范围 4 000~150 000)等型号的凝胶。

(六) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定相对分子质量

在后面会谈到的,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,它的迁移率决定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(SDS,见第2章)和少量巯基乙醇,则蛋白质分子的电泳迁移率(electrophoretic mobility)主要取决于它的相对分子质量,而与原来所带的电荷和分子形状无关。

SDS 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,单体蛋白质或亚基(寡聚蛋白质解离成亚基)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体。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,相当于每两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,使多肽链覆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,因而掩盖了不同蛋白质间原有的电荷差别,结果所有的 SDS-蛋白质复合体,电泳时都以同样的电荷/蛋白质比向正极移动。SDS 凝胶电泳可看成是以电场为驱动力代替溶剂流动(重力场)为驱动力的凝胶过滤。第二,改变了蛋白质单体分子的构象,SDS-蛋白质复合体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 复合体的短轴长度(直径)都是一样的约为 1.8 nm,而长轴长度则随蛋白质的相对分子质量成正比例变化。不过 SDS-蛋白质复合体的真正本质尚不十分清楚。

由于不同蛋白质的 SDS 复合体具有几乎相同的荷质比,并具有相同的构象,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。然而在聚丙烯酰胺凝胶中由于引入凝胶的分子筛效应,电泳迁移率与多肽链分子量的对数有下列关系:

$$\log M_r = a - b\mu_R$$

或

$$\log M_r = K_1 - K_2\mu_R$$

式中 M_r 为相对分子质量, 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,以几种相对分子质量标准物蛋白质的 M_r 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 M_r 。

(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

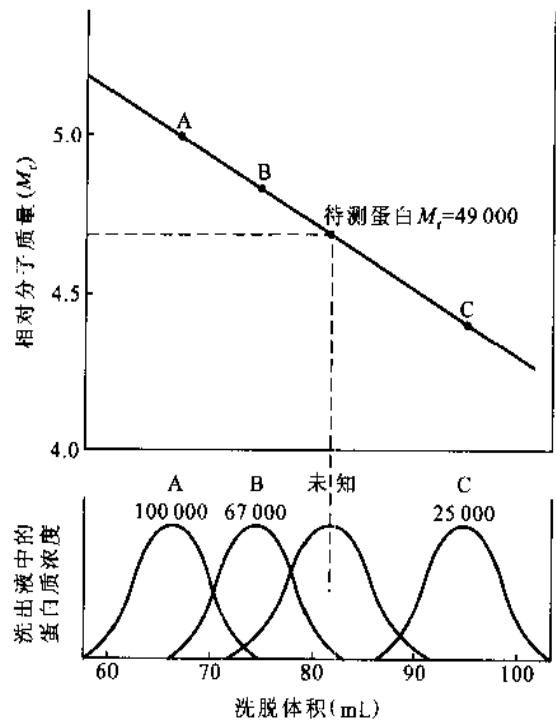


图 7-4 洗脱体积与相对分子质量的关系

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一些间接的方法(第5章)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:

$$f_0 = 6\pi\eta r = 6\pi\eta \left(\frac{3M_r \bar{v}}{4\pi N} \right)^{\frac{1}{3}}$$

f/f_0 称为蛋白质分子的摩擦比(frictional ratio):

$$\frac{f}{f_0} = \frac{RT}{6\pi\eta r ND} \left(\frac{4\pi N}{3M_r \bar{v}} \right)^{\frac{1}{3}}$$

这里, η 是溶剂的粘度, M_r 是相对分子质量, N 是阿伏加德罗常数, \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 $f/f_0 > 1.0$ 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。肌红蛋白和核糖核酸酶 A 的形状接近于圆球形。另外一些蛋白质则多是不对称的,有的是椭圆体,有的是细长纺锤体。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 7-4。血纤蛋白原的形状像一细长的纺锤体,它的截面直径约为 3.8 nm,长度约 46 nm,其直径与长度之比(称轴比)大于 10。

三、蛋白质的胶体性质与蛋白质的沉淀

(一) 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 3 类:分散相质点小于 1 nm 的为真溶液,大于 100 nm 的为悬浊液,介于 1~100 nm 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 3 个条件:第一,分散相的质点大小在 1~100 nm 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。

从蛋白质相对分子质量的测定和形状的观测知道,蛋白质的分子大小属于胶体质点的范围。蛋白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。

(二) 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,那么很自然,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。

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。当除去盐后,复可溶解。

(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的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)结合成不溶性盐而沉淀。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,然后再服用催吐剂排出体外。重金属盐常能使蛋白质变性,这可能是因为重金属盐水解生成酸或碱的缘故。

(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,如鞣酸也称单宁酸(tannic acid),苦味酸(picric acid)即 2,4,6-三硝基酚,钨酸(tungstic acid, H_2WO_4)和碘化钾等。某些酸类指的是三氯醋酸,磺基水杨酸(sulfosalicylic 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是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)的制豆腐的方法,这是成功的应用加热变性沉淀蛋白质的一个例子。

四、蛋白质分离纯化的一般原则

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, isolation)和纯化(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纯化出来。但是对于任何一种蛋白质都有可能选择一套适当的分离纯化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。蛋白质纯化的总目标是增加制品的纯度(purity)或比活(specific activity),以增加单位蛋白质重量中所要蛋白质的含量或生物活性(比活常以活力单位数/毫克蛋白质表示)。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。

分离纯化某一特定蛋白质的一般程序可以分为前处理、粗分级分离和细分级分离 3 步。

(1) 前处理(pretreatment) 分离纯化某一蛋白质,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,动物材料应先剔除结缔组织和脂肪组织,种子材料应先去壳甚至去种皮以免受单宁等物质的污染,油料种子最好先用低沸点的有机溶剂如乙醚等脱脂。然后根据不同的情况,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(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,一般需要用与石英砂或玻璃粉和适当的提取液

一起研磨的方法破碎或用纤维素酶处理也能达到目的。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肽聚糖囊状大分子,非常坚韧。破碎细菌细胞壁的常用方法有超声波震荡,与砂研磨、高压挤压或溶菌酶处理(以分解肽聚糖)等。组织和细胞破碎以后,选择适当的缓冲液把所要的蛋白质提取出来。细胞碎片等不溶物用离心或过滤等方法除去。

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质等,则可利用差速离心(differential centrifugation)方法将它们分开(表7-5),收集该细胞组分作为下步纯化的材料。这样可以一下子除去很多杂蛋白质,使纯化工作容易得多。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。

表7-5 在不同离心场下沉降的细胞组分

相对离心场 [*] /g	时间/min	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(h)	核糖体

* 相对离心场(relative centrifugal field, RCF),以重力加速度 $g(980.66 \text{ cm/s}^2)$ 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 cm 表示)的关系为: $\text{RCF} = \frac{4\pi^2(r/\text{min})^2 \cdot r}{3600 \times 980} = 11.19 \times 10^{-5} (r/\text{min})^2 r$ 。

(2) 粗分级分离(rough fractionation) 当蛋白质提取液(有时还杂有核酸、多糖之类)获得后,选用一套适当的方法,将所要的蛋白质与其他杂蛋白分离开来。一般这一步的分级分离用盐析、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(包括脱盐),又能浓缩蛋白质溶液。有些蛋白质提取液体积较大,又不适于用沉淀或盐析法浓缩,则可采用超过滤、凝胶过滤、冷冻真空干燥或其他方法(如聚乙二醇浓缩法)进行浓缩。

(3) 细分级分离(fine fractionation) 也就是样品的进一步纯化。样品经粗分级分离以后,一般体积较小,杂蛋白大部分已被除去。进一步纯化,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纯化步骤。用于细分级分离的方法一般规模较小,但分辨率很高。

结晶是蛋白质分离纯化的最后步骤。尽管结晶并不能保证蛋白质一定是均一的,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纯化,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。结晶也是进行 X 射线晶体学分析所要求的,只有获得蛋白质晶体才能对它进行 X 射线结构分析。

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、蛋白质的分离纯化方法

这里将介绍几种根据蛋白质在溶液中的下列性质分离纯化蛋白质的方法:① 分子大小;② 溶解度;③ 电荷;④ 吸附性质;⑤ 对配体分子的生物学亲和力等。

(一) 根据分子大小不同的纯化方法

蛋白质分子最明显的特征之一就是颗粒大,并且不同的蛋白质在分子大小方面是不同的,因此可以利用一些较简便的方法使蛋白质和小分子的物质分开,并使蛋白质混合物也得到分离。

1. 透析和超过滤

透析(dialysis)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)和其他改型的纤维素材料。透析是把待纯化的蛋白质溶液装在半透膜的透析袋里,放入透析液(蒸馏水或缓冲液)中进行的,透析液可以更换,直至透析袋内无机盐等小分子物质降低到最小值为止(图7-5)。超过滤或超滤(ultrafiltration)是利用压力或离心力,强行使水和其他小分子溶质通过半透膜,而蛋白质被截留在膜上,以达到浓缩和脱盐的目的(图7-6)。如果滤膜选择得当,还能同时进行粗分级。超过滤既可用于小量样品处理,也可用于生产规模。现在已有各种市售的超滤膜装置可供选用,有加压、抽滤和离心等多种形式。滤膜也有多种规格,它们截留相对分子质量不同的蛋白质。使用中最需要注意的问题是滤膜表面容易被吸附的蛋白质堵塞,以致超滤速度减慢,能被截留物质的 M_r 变小。当样品含量低时甚至因吸附而不能被回收。为此采用切向流过滤(tangential flow filtration)也称为交叉流过滤(cross-flow filtration)的方法可获得较理想的结果。所谓切向流过滤是指液体在泵驱动下沿着与膜表面相切的方向流动,在膜上形成压力,使部分液体透过膜,而另一部分液体切向地流过膜表面,将被膜截留的蛋白质分子冲走(反流回样品槽),避免它们在滤膜表面上堆积,造成膜堵塞。

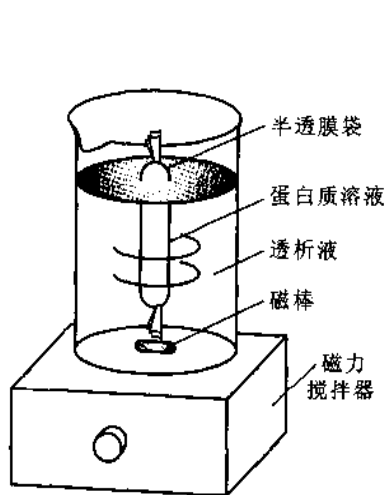


图7-5 透析装置

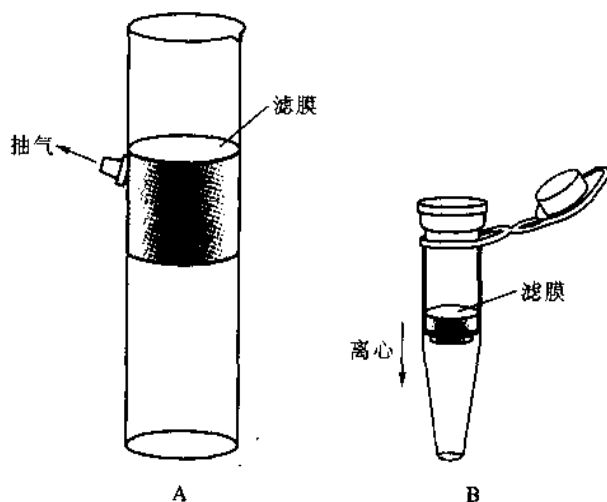


图7-6 利用压力(A)和离心力(B)的超过滤装置

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密度梯度时,即停止不前,最后各种蛋白质在离心管(常用塑料管)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个小孔逐滴放出,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7-7),聚蔗糖梯度和其他合成材料的密度梯度。蔗糖便宜,纯度高,浓溶液(60%, W/W)密度可达 1.28 g/cm^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, M_r 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7-7)。实验时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震动引起区带界面的

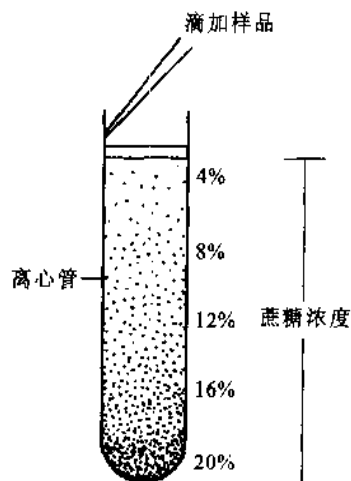


图7-7 蔗糖密度梯度

扰乱。

3. 凝胶过滤

即凝胶过滤层析,也称分子排阻(molecular-exclusion)层析或凝胶渗透(gel permeation)层析。这是根据分子大小分离蛋白质混合物的最有效方法之一。

(1) 凝胶过滤的介质 凝胶过滤所用的介质是凝胶珠(gel bead)或称凝胶颗粒,其内部是多孔的网状结构。凝胶的交联度或孔度(网孔大小)决定了凝胶的分级分离范围(fractionation range),即能被该凝胶分离开来的蛋白质混合物的相对分子质量范围。例如 Sephadex G-50 的分级分离范围是 1 500 ~ 30 000。有时也用排阻极限(exclusion limit)来表示分级分离范围的上限,它被定义为不能扩散进入凝胶珠微孔的最小分子的 M_r ,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。颗粒通常用筛眼数或目数(mesh size)或珠直径(μm)表示。

目前经常使用的凝胶有交联葡聚糖,聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖等。交联葡聚糖是由线形的 $\alpha-1,6$ 葡聚糖与 1-氯-2,3-环氧丙烷反应而成的化合物,它的商品名称为 Sephadex(见第 1 章)。聚丙烯酰胺凝胶(商品名称为 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。琼脂糖是从琼脂中分离制得的,琼脂糖(见第 1 章)凝胶的商品名称为 Sepharose 或 Bio-Gel A,这种凝胶的优点是孔径大,排阻极限高。

(2) 凝胶过滤的原理 当不同分子大小的蛋白质流经凝胶层析柱时,比凝胶孔径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 7-8 表示。

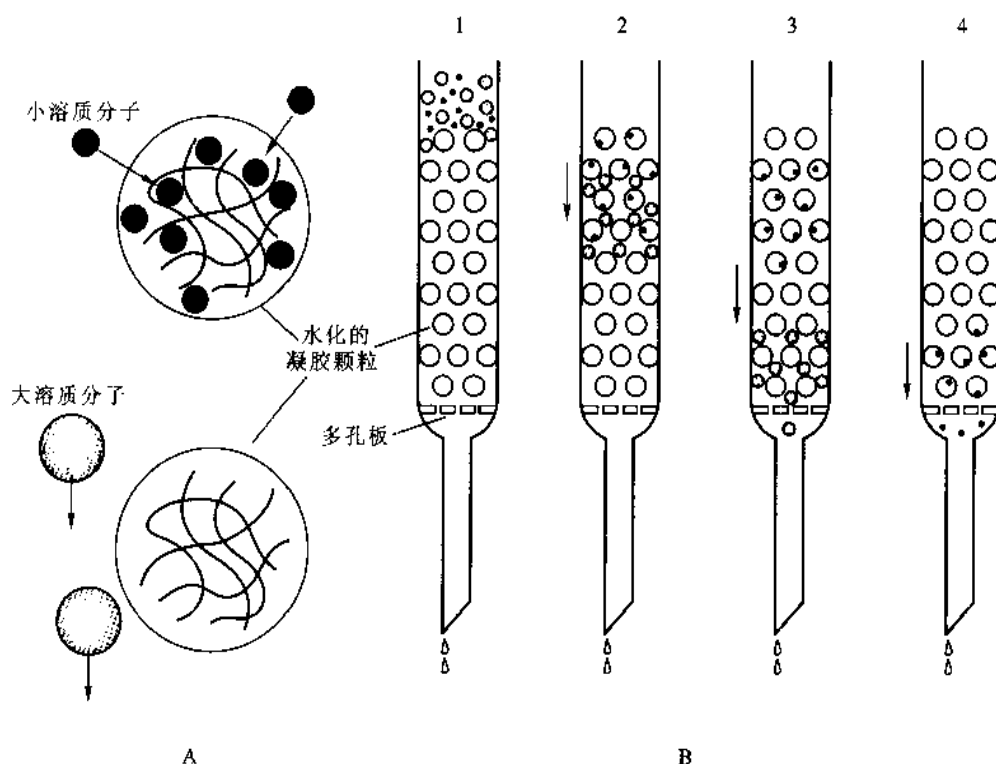


图 7-8 凝胶过滤层析的原理

- 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,在凝胶颗粒之间迅速通过;
 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部而被滞留,而大分子则被排阻于颗粒之外并向下移动,大、小分子开始分开;③ 大、小分子完全分开;④ 大分子因行程较短,已被洗脱出层析柱,小分子尚在行进中

为了便于讨论凝胶过滤层析的原理,下面先介绍几个有关凝胶体积的术语(图 7-9):

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_e 为某一溶质组分的洗脱体积(elution volume)。它是自加样品开始到该组分的洗脱峰(峰顶)或洗脱峰上升边缘的半高点出现时所流出的体积。

V_o 为孔隙体积(void volume)或外体积(outer volume)或外水体积,即存在于柱床中凝胶珠外孔隙的水相体积。测定出不能被凝胶滞留的大分子溶质如蓝色葡聚糖-2000(blue dextran-2000, M_r 约为 2 000 000,图 1-26)的洗脱体积可以决定 V_o 。

V_i 为内体积(inner volume)或称内水体积,即凝胶珠内部的水相体积。它可以由干胶重量(g)乘其吸水值(mL水/g干胶)近似地表示,或用直接测出小分子物质(如 T_2O , tritium oxide)通过凝胶柱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:

$$V_t = V_o + V_i + V_m$$

其中, $(V_i + V_m)$ 亦即 $(V_t - V_o)$ 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,那么凝胶

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_i),凝胶珠外的水相是流动相(V_o),溶质就在 V_o 和 V_i 之间分配(图 3-24)。能进入 V_i 的溶质的量决定于溶质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):

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i}$$

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, $V_i = V_o$, $K_d = 0$ 。对于完全能自由出入凝胶珠内外的小分子, $V_e = V_o + V_i$, $K_d = 1$;对于在分级分离范围内的中等分子,凝胶珠内部的有些微孔它们能扩散进去,有些微孔则不能,因此一般情况下,总是在 0 与 1 之间。因此在分级分离范围之外的物质($K_d = 0$ 或 $K_d = 1$),虽分子大小有所不同,但也不能被分开。实验中,有时出现 $K_d > 1$ 的现象,这表明凝胶对溶质有吸附作用。整理上式得:

$$V_e = V_o + K_d V_i$$

从这个式子可以看出,某一溶质的 K_d 就是该溶质能扩散入珠内的空间部分占其总空间(V_i)的分数。

由于实际上测定 V_i 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_i)来表示 K_d ,此时 K_d 改用 K_{av} ,称可用分配系数(available coefficient):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

只要测得 V_i 、 V_o 和 V_e ,即可计算 K_{av} 的值。

对于两种不同 M_r 和不同 K_{av} 值(K'_{av} 和 K''_{av})的组分,它们的洗脱体积之差:

$$V_s = V'_e - V''_e = (K'_{av} - K''_{av})(V_t - V_o)$$

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纯化过程的最适柱床体积。

(二) 利用溶解度差别的纯化方法

利用蛋白质溶解度的差别来分离纯化蛋白质是实践中最常用的方法。影响蛋白质溶解度的外部因素

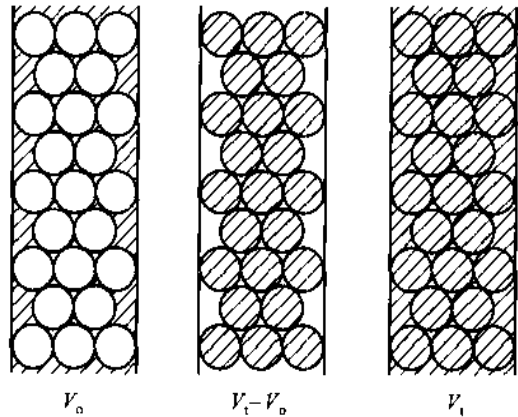


图 7-9 凝胶柱床中 V_i 、 V_o 等关系示意图
(阴影部分为所指体积)

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。但在同一的特定外部条件下,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,例如分子所带电荷的性质和数量、亲水基团与疏水基团的比例,它们在蛋白质分子表面的排列以及由此而产生的偶极矩等。

根据蛋白质分子结构的特点,适当地改变上面所说的外部因数,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。蛋白质处于等电点时,其静电荷为零,由于相邻蛋白质分子之间没有静电斥力而趋于聚集沉淀。因此在其他条件相同时,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的净电荷而相互排斥,阻止了单个分子聚集成沉淀,因此溶解度较大。图 7-10 说明 β -乳球蛋白的溶解度在其等电点(pH 5.2~5.3)时达到最低值,在等电点两侧的 pH 下,其溶解度迅速上升;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分开。当 pH 被调至蛋白质混合物中某种成分的等电点 pH 时,这种蛋白质的大部分或全部将沉淀下来,那些等电点高于或低于该 pH 的蛋白质则仍留在溶液中。这样沉淀出来的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。

2. 蛋白质的盐溶和盐析

中性盐对球状蛋白质的溶解度有显著的影响。低浓度时如图 7-11 所示,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,因而溶解度增高。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,同样浓度的二价离子中性盐,如 $MgCl_2$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 对蛋白质溶解度影响的效果,要比单价中性盐如 $NaCl$ 、 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 7-11)。离子强度(ionic strength)可以定义为:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i Z_i^2$$

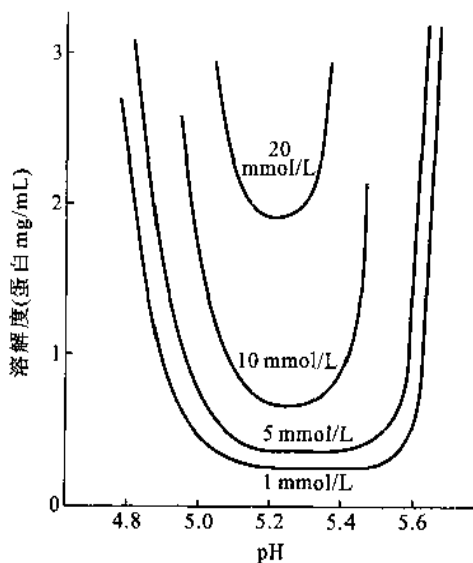


图 7-10 pH 和离子强度对 β -乳球蛋白溶解度的影响
(图中曲线上的数值为氯化钠的浓度)

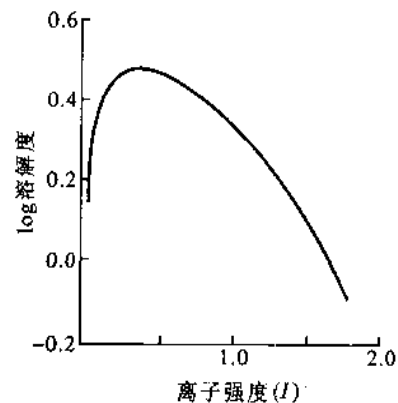


图 7-11 在等电点时,中性盐(K_2SO_4)对一氧化碳血红蛋白溶解度的影响

式中, c_i 为各种离子的浓度, 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。计算溶液的离子浓度, 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 7-11 可以看出, 当溶液的离子强度增加到一定数值时, 蛋白质溶解度开始下降。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(salt-ing 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甚至全部的自由水转变为盐离子的水化水(water of hydration)。此时那些被迫与蛋白质表面的疏水基团接触并掩盖它们的水分子成为下一步最自由地可利用的水分子(不是参与蛋白质表面极性基团溶剂化的水分子, 它们是通过静电作用被结合的, 远比那些与疏水基团接触的水分子牢固), 因此被移去以溶剂化盐离子, 留下暴露出来的疏水基团。随着盐浓度的增加, 蛋白质疏水表面进一步暴露, 由于疏水作用蛋白质聚集而沉淀。因此最先聚集的蛋白质是表面上疏水残基最多的蛋白质。盐析法是蛋白质混合物分离纯化过程中最常用的方法之一。研究得最多的蛋白质之一——鸡蛋清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(表 4-1), 过滤后, 酸化至 pH 4.6~4.8(卵清蛋白的等电点), 在 20℃ 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较低。

牛胰中蛋白水解酶及其酶原如胰凝乳蛋白酶原、 α -胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶都已经用硫酸铵和硫酸镁盐析的方法分离纯化并结晶出来。由于用此法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分离方法。

下面介绍两个在盐析分级分离中很有用的公式, 在 0℃ 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:

$$W = \frac{505(S_2 - S_1)}{1 - 0.285S_2}$$

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℃ 时 1 000 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(505 g/1 000 ml 溶液或 707 g/1 000 g 溶剂水)。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, 固体硫酸铵的偏微比容 $\bar{v} = 0.565$ 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毫升数 V :

$$V = \frac{100(S_2 - S_1)}{1 - S_2}$$

3. 有机溶剂分级分离法

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℃, 然后在不断地搅拌下加入有机溶剂以防止局部浓度过高, 那么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纯化蛋白质。例如, 在 -5℃ 的 25% 乙醇中卵清蛋白可以沉淀析出, 而与卵清中的其他蛋白质分开。

有机溶剂引起蛋白质沉淀的主要原因之一是改变了介质的介电常数(dielectric constant)。水是高介

电常数物质(20℃时,80),有机溶剂是低介电常数物质(20℃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。从电学的库伦定律(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,与蛋白质直接争夺水化水,致使蛋白质聚集而沉淀。

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

在一定温度范围内,约 0~40℃ 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℃,溶解度随温度上升而降低。在 40~50℃ 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℃ 或更低的温度下进行。

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先后沉淀出来。

(三) 根据电荷不同的纯化方法

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,这种现象称为电泳(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以分离混合物的一种实验技术。电泳技术可用于氨基酸、肽、蛋白质和核苷酸等生物分子的分析分离和制备。

带电颗粒在外电场中发生泳动时,将受到两种方向相反的力的作用:

$$F(\text{电场力}) = qE \left(= q \frac{U}{S} \right)$$

$$F_f(\text{摩擦力}) = fv$$

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(V)

S = 两电极间的距离(cm)

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(cm/s)

当颗粒以恒稳速度移动时,则 $F - F_f = 0$, 因此 $qE = fv$, 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,它被称为电泳迁移率或泳动度(electrophoretic mobility);

$$\mu = \frac{v}{E}$$

μ 值可以通过实验测得,蛋白质的 μ 值为 $0.1 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。蛋白质的泳动度以

及 pH 和离子强度对泳动度的影响都反应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,也是研究蛋白质性质很有用的一种物理化学方法。

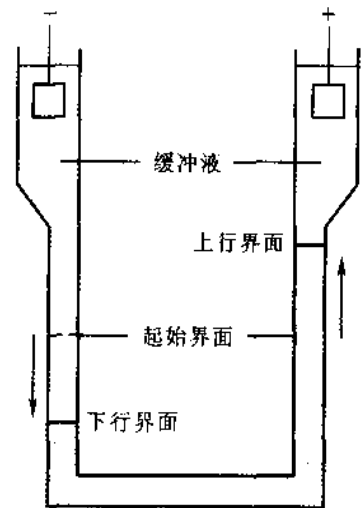
目前电泳的类型很多,但是它们都是在经典的自由电泳或称为移动界面电泳(moving-boundary electrophoresis)的基础上发展起来的。自由电泳首先是由瑞典的 Tiselius 于 1930 年设计出来的。此方法先是在 U 形管内使蛋白质溶液和缓冲液之间形成清晰的界面,然后加一外电场(图 7-12)。由于界面处存在浓度梯度因而产生折射率梯度,利用适当的光学系统(见沉降速度法)可以观察到界面的移动。在电泳过程中,每个移动界面(峰)相当于某一特定的蛋白质。根据界面移动的速度和电场强度即可算出某一蛋白质的泳动度。如果某一特定蛋白质在几种不同的 pH 下测出它的泳动度,可用外推法求出该蛋白质的等电点。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组分的有力工具,例如用于研究人血浆的蛋白质成分,得到很有意义的结果。对比正常的和病人的血浆蛋白质的电泳图谱,有助于临床诊断。

区带电泳(zone electrophoresis)由于在支持物上电泳时蛋白质混合物被分离成若干区带而得名。区带电泳按其支持物的物理性状不同可以分成 4 类:①滤纸电泳和薄膜电泳(如醋酸纤维素薄膜电泳和聚酰胺薄膜电泳);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多核苷酸,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,凝胶电泳装置的图解见图 7-13。

电泳前用缓冲液浸润薄膜或滤纸等支持物或用缓冲液直接配制凝胶,将待分离的蛋白质样品加在它的一端或中央,支持物的两端与电极连接,通电电泳。电泳完毕,各个组分分布在不同的区域,用显色剂(蛋白质可用考马斯亮蓝或氨基黑等染色)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印迹(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。



缓冲液加蛋白质负离子

图 7-12 界面移动电泳的图解
选择适当 pH 的缓冲溶液使蛋白质带同种电荷;这里假设蛋白质为负离子

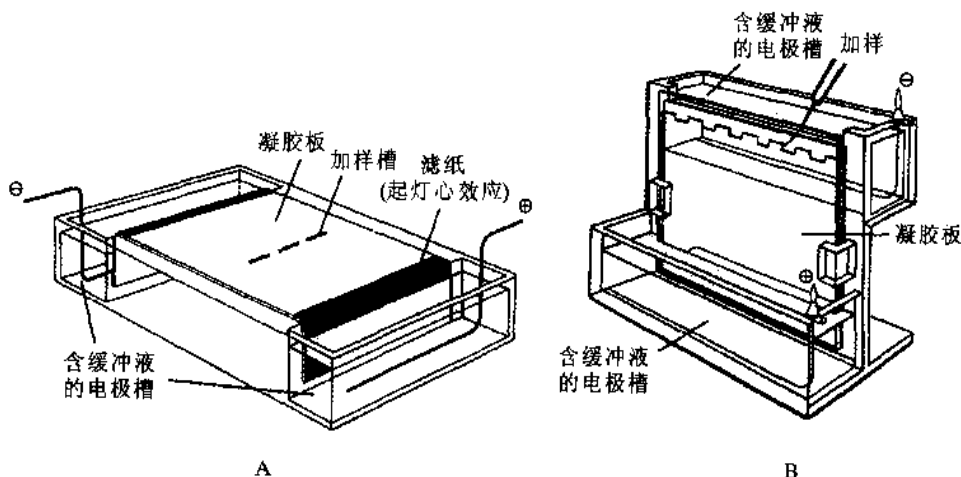


图 7-13 水平式(A)和垂直式(B)平板凝胶电泳图解

2. 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 PAGE), 也称圆盘凝胶电泳或圆盘电泳 (disc gel electrophoresis), 它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, 一般制成凝胶柱或凝胶板, 凝胶是由相连的二部分组成 (小的部分是浓缩胶, 大的部分是分离胶), 这二部分凝胶的浓度 (孔径大小)、缓冲液组分和离子强度、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 mm), 然后再进行电泳分离。在圆盘电泳过程中有 3 种物理效应: ①样品的浓度效应; ②凝胶对被分离分子的筛选效应 (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 3 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 个组分, 而圆盘电泳则可分成几十个清晰的条带 (图 7-14)。圆盘电泳名称的来源是由于此法的原理是基于电泳支持物 (凝胶) 和缓冲系统的不连续性 (discontinuity), 凑巧分离出来的区带也很像圆盘状 (discoid shape) 薄片, 因此在英文中取“不连续性”和“圆盘状”的双关意思的词头 disc 来命名这种电泳, 中文译为圆盘电泳。

3. 毛细管电泳

毛细管电泳 (capillary electrophoresis) 技术泛指高效毛细管电泳、毛细管区带电泳、自由溶液毛细管电泳和毛细管电泳, 但是毛细管电泳一词是当今最常见的。毛细管电泳能用于分离多种生物分子, 包括氨基酸、肽、蛋白质、DNA 片段 (例如合成的寡核苷酸) 和核酸以及多种小分子, 如药物、甚至金属离子。此方法也成功地用于手性化合物的分离 (一般在自由溶液中以环糊精作为选择剂进行毛细管电泳)。

正如毛细管电泳这一名称所示, 电泳是在微内径管 (一般为 50 μm 内径和 300 μm 外径) 中进行的。使用毛细管的一个优点是它减少了由于热效应产生的许多问题。因为管的孔径小, 面积与体积之比大, 这样可以提高热散失, 有助于消除由于热引起的扩散增加而造成的对流和区带变宽, 因此管中不需要加入稳定介质即可进行自由流动电泳。

毛细管电泳的主要装置如图 7-15 所示, 将微量样品液 (一般为 5~30 μL 的 1 mg/mL 溶液) 引入石英玻璃毛细管的正极端。加样可采用高压注射法或加压注射法。加样品时, 切断高压电源, 如果采用高压注射法, 取出正极的缓冲液贮槽, 换成样品槽并短时间通高压电流, 导入微量样品。然后移去样品槽, 放回缓冲液贮槽。通电进行电泳。一般毛细管长 50~100 cm, 电压 10~50 kV, 时间 10~30 min。电泳过程中, 样品的组分分子沿毛细管长向以不同的速度迁移。电泳迁移引起溶液中荷电分子向相反电荷的电极移动。由于电泳迁移, 正、负样品分子以不同的速度移动。虽然被分析样品因电泳迁移而分离, 然而电渗作用 (electroosmosis) 使它们向负极移动。由于电渗流很强, 其速度一般比样品的电泳速度大, 因此所有的正、负离子和中性分子都被推向负极。对荷正电的分子来说, 电泳迁移和电渗流效果是一致的, 因而移动最快, 最先达到负极。随着被分

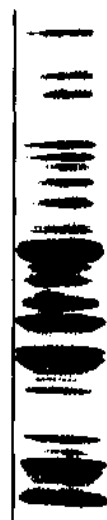


图 7-14 圆盘电泳示意图

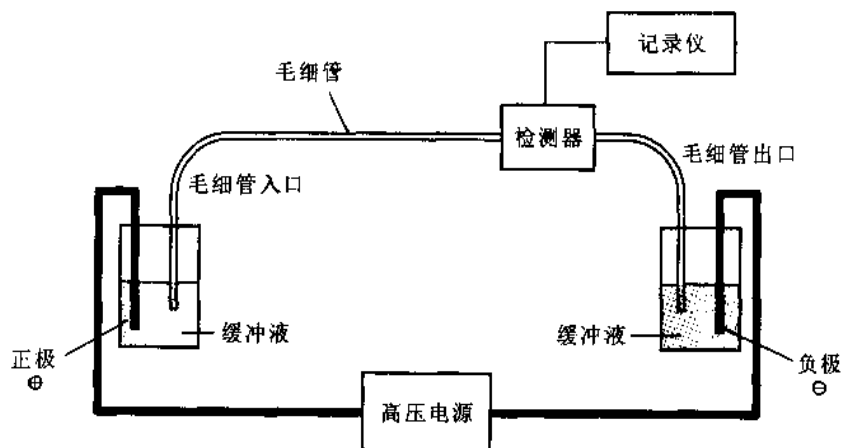


图 7-15 毛细管电泳仪图解

离的分子接近负极,它们都将通过紫外检测器并把信号传递给记录仪。所得结果是被分离组分的紫外吸收对时间的峰谱。

4. 等电聚焦

等电聚焦(isoelectric focusing, IEF)或称电聚焦(electric focusing, EF),是一种高分辨率的蛋白质分离技术,它也可用于蛋白质等电点的测定。从广义上说,等电聚焦是一种自由界面电泳。利用这种技术分离蛋白质混合物是在具有 pH 梯度的介质(如浓蔗糖溶液)中进行的。在外电场作用下各种蛋白质将移向并聚焦(停留)在等于其等电点的 pH 梯度处,并形成是一个很窄的区带。等电聚焦可以把人的血清分成 40 多个条带。此技术特别适用于同工酶(isoenzyme)的鉴定。只要它们的 pI 有 0.02(甚至 <0.02) pH 单位的差别就能分开。

pH 梯度制作一般利用两性电解质(ampholyte,商品名称为 ampholine),它是脂肪族多胺和多羧类的同系物,它们具有相近但不相同的 pK_a 和 pI 值。在外电场作用下,自然形成 pH 梯度。

凝胶等电聚焦(gel IEF)是用聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖或葡聚糖凝胶代替蔗糖溶液作介质。由于介质固体化,操作方便,分离量增大,分离时间缩短(1~3 h)。

5. 层析聚焦

层析聚焦或聚焦层析(chromatofocusing)是根据蛋白质的等电点差异分离蛋白质混合物的柱层析方法。它不需要聚焦电泳装置也不需要柱层析中常用的梯度混合器,但具有等电聚焦电泳的高分辨率和柱层析的操作简便的优点。聚焦层析的原理是:当用特种多缓冲液(商品名称 Polybuffer,含多种两性电解质)滴洗填充在柱中的特种多缓冲交换剂(Polybuffer exchanger)时,就会在层析柱中自上而下自动地建立起连续的 pH 梯度;同时加在柱上端的蛋白质样品也随多缓冲液的展开按各自的等电点聚焦在相应的 pH 区段。并在展开过程中随 pH 梯度下移,蛋白质混合物的各组分先后从柱中流出,达到分离纯化的目的。

6. 离子交换层析

离子交换层析的基本原理已在第 3 章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大分子层析的支持介质纤维素离子交换剂和交联葡聚糖离子交换剂的一些特性。

纤维素离子交换剂(cellulose ion exchanger)是采用纤维素作为交换剂的基质的。纤维素离子交换剂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。因此它对蛋白质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,因而纤维素离子交换剂的电荷密度较小,所以洗脱条件温和,蛋白回收率较高。此外纤维素离子交换剂的品种较多,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纯化是个重大的改进。常用的纤维素离子交换剂的类型和结构列于表 7-6。

表 7-6 一些常用的纤维素离子交换剂和 Sephadex 离子交换剂

离子交换剂	可电离基团	可电离基团结构
I. 阳离子交换剂		
CM-纤维素(弱酸型)	羧甲基	$\text{---O---CH}_2\text{COOH}$ O
P-纤维素(中强酸型)	磷酸基	---O---P---OH OH
SE-纤维素(强酸型)	磺乙基	$\text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---S---OH}$ O
SP-Sephadex(强酸型)	磺丙基	$\text{---O---(CH}_2\text{)}_3\text{---S---OH}$ O

续表

离子交换剂	可电离基团	可电离基团结构
II. 阴离子交换剂		
AE-纤维素(弱碱型)	氨基乙基	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
PAB-纤维素(弱碱型)	对氨基苯甲基	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$
DEAE-纤维素(中强碱型)	二乙基氨基乙基	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
DEAE-Sephadex(中强碱型)	二乙基氨基乙基	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
TEAE-纤维素(强碱型)	三乙基氨基乙基	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
QAE-Sephadex(强碱型)	二乙基(2-羟丙基)-氨基乙基	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$

OH

交联葡聚糖离子交换剂(Sephadex ion exchanger)这类交换剂的类型和可电离基团的种类与纤维素离子交换剂差不多(表7-6),只是基质纤维素换成交联葡聚糖。Sephadex离子交换剂每克干重具有相当多的可电离基团,容量比纤维素离子交换剂大3~4倍。这类交换剂的优点是,它们既可根据分子的净电荷数量又可根据分子的大小(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,而这又和溶液的pH有关,因为pH决定离子交换剂和蛋白质的电离程度。特别是由于单位重量的纤维素离子交换剂所含的离子基团较少(0.3~1.0 mmol/g),盐浓度的微小变化就会直接影响它对蛋白质电荷吸附容量。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从层析柱中洗脱出来。

层析洗脱,可以采用保持洗脱液成分一直不变的方式洗脱,也可以采用改变洗脱的盐浓度或(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,多采用梯度洗脱。

为使样品组分能从离子交换柱上分别洗脱下来,必须控制洗脱体积(与柱床体积相比)和洗脱液的盐浓度和pH。洗脱液体积和盐浓度变化形式(梯度形式)直接影响层析的分辨率。

通常采用的梯度形式有线性(形),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)。下面介绍两种常用的混合器及其制作梯度的方式。

(1) 简单型混合器 如图7-16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)。二个都是圆柱形瓶,直径可以是相等的也可以是不相等的,二个瓶的底部彼此相连,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(低盐浓度),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盐浓度。二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 为系统中洗脱液的总体积。洗脱时打开贮液瓶和混合瓶的活塞。洗脱过程中洗脱液浓度 c (即混合瓶内溶液的浓度)将随流到层析柱的洗脱液体积(v)而变化。任一给定时刻当从混合瓶中流出 dv 体积的洗脱液时,混合瓶内溶液浓度的微小改变量:

$$dc = \frac{(c - C_R) \frac{V_R}{V_M} dv}{v - V}$$

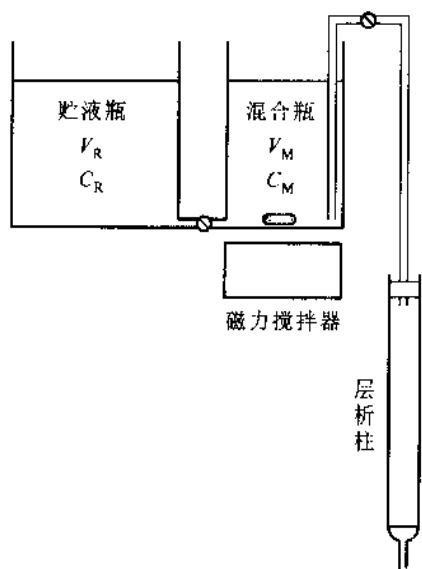


图 7-16 简单型梯度混合器

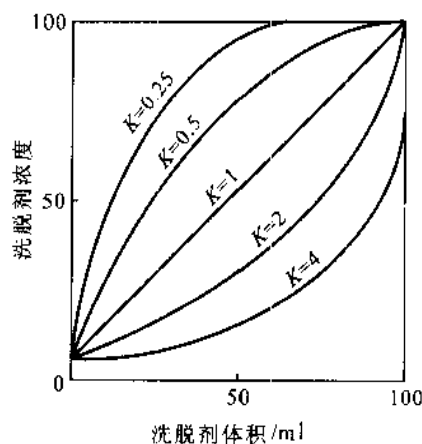


图 7-17 梯度洗脱曲线

改写为

$$\frac{dc}{c - C_R} = \frac{V_R}{V_M} \frac{dv}{v - V}$$

将上式从 $v=0$ 到 v , 从 $c=C_M$ 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 $K = \frac{V_M}{V_R}$ (即直线柱形瓶横截面面积之比), 则

$$c = C_R - (C_R - C_M) \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{\frac{1}{K}}$$

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, 上面公式可简化为:

$$c = \frac{C_R - C_M}{V} v + C_M$$

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 是洗脱液体积 v 的线性函数, 它代表线性洗脱(图 7-17)。式中 $(C_R - C_M)/V$ 是斜率, 如果 C_R 和 C_M 确定后, 改变洗脱液总体积 V , 可以控制盐浓度的变化速度。一般斜率低, 层析分辨率高, 但洗出峰宽加大。 $K > 1$, 为凹形梯度; $K < 1$, 则为凸形梯度。

(2) 复合型混合器 如图 7-18 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, 也就是说两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、线形和凸形三部分曲线。它的数学计算比较复杂, 这里不予介绍。

(四) 利用选择性吸附的纯化方法

某些称为吸附剂的固体物质具有吸附能力, 能够将其他种类的分子吸附在自己的表面, 吸附力的强弱因被吸物质的性质而异。吸附过程涉及范德华相互作用和氢键这些非离子吸引力。吸附层析就是利用待纯化的分子和杂质分子与吸附剂之间的吸附能力和解吸性质不同而达到分离目的的。典型的吸附剂有硅石 (silica)、氧化铝 (alumina) 和活性炭 (activated charcoal) 等。硅胶在其表面含有硅烷醇 (Si-OH), 呈微酸性, 它适用于分离碱性物质。氧化铝是微碱性的, 适于分离酸性物质。活性炭是一种非极性吸附剂。为了获得好的分离效果, 需要选择合适的洗脱液。一般选择其极性与待分离的混合物中极性最大组分的极性

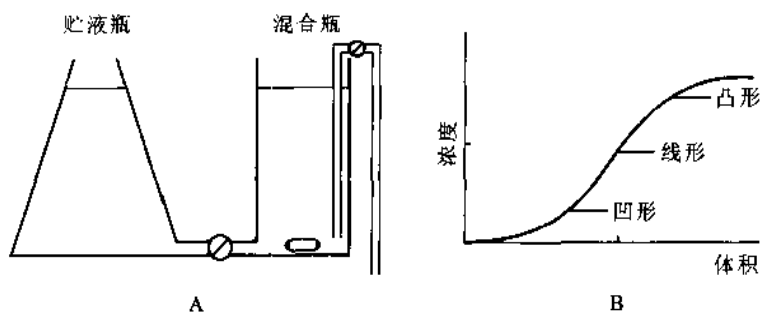


图 7-18 复合型混合器(A)和由它产生的洗脱曲线(B)

相当的洗脱液。因此,如果待分离物含羟基,则选用醇类,含羰基的选用丙酮或酯类。烃类如己烷、庚烷和甲苯则用于非极性物质的分离。

吸附层析可采用薄层(第3章)或柱方式进行。吸附层析主要用于分离非离子、水不溶性化合物如甘油三酯、PTH氨基酸(第4章)以及维生素、激素等。

1. 羟磷灰石层析

吸附剂羟磷灰石(hydroxylapatite)即结晶磷酸钙($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$),它用于分离蛋白质或核酸。羟磷灰石的吸附机制尚不完全清楚,但认为与其表面上的钙离子和磷酸根有关,涉及偶极-偶极相互作用,可能还有静电吸引。据推测,蛋白质中带负电基团与羟磷灰石晶体表面的钙离子结合,而带正电基团与磷酸基相互作用。羟磷灰石层析最重要的用途之一是把单链DNA和双链DNA分开。在低浓度磷酸盐缓冲液(10~20 mmol/L)中,这二种形式DNA都被结合,但随缓冲液浓度提高,单链DNA选择性地解吸下来;缓冲液浓度进一步提高(直至500 mmol/L),双链DNA被释放。羟磷灰石对双链DNA亲和力很大,以致用羟磷灰石层析能从含RNA和蛋白质的细胞提取液中选择性地除去DNA。羟磷灰石对蛋白质的吸附容量比较大,在一般吸附条件下(底离子强度,中性pH)可达50g蛋白/L柱床体积。

2. 疏水作用层析

蛋白质存在于分子表面的疏水氨基酸残基的数量是不同的。疏水作用层析(hydrophobic interaction chromatography)就是根据蛋白质表面的疏水性差别发展起来的一种纯化技术。这种差别也被用于盐分级分离(见前面)。在疏水作用层析中,不是暴露的疏水基团促进蛋白质与蛋白质之间的相互作用,而是连接在支持介质(如琼脂糖)上的疏水基团与蛋白质表面上暴露的疏水基团结合。市售的疏水吸附剂有苯基琼脂糖(phenyl-sephadex)、辛基琼脂糖(octa-sephadex)等。

由于疏水作用层析要求盐析化合物如硫酸铵的存在以促进蛋白质分子表面的疏水区暴露。为使吸附达到最大,可将蛋白质样品的pH调至等电点附近。一旦蛋白质吸附于固定相,则可利用多种方式进行选择洗脱,包括使用逐渐降低离子强度或增加pH的洗脱液(增加蛋白质的亲水性),或使用对固定相的亲和力比对蛋白质更强的置换剂进行置换洗脱。这类置换剂有非离子型去污剂(如triton X-100)、脂肪醇(如丁醇、乙二醇)、脂肪胺(如丁胺)。疏水作用层析的问题之一是某些洗脱条件可引起蛋白质变性。另一个实际问题是它的不可预测性,也即对某些蛋白质分离效果很好,对另一些则不好,因此预试性研究是不可少的。

(五) 利用对配体的特异生物学亲和力的纯化方法

亲和层析(affinity chromatography)是利用蛋白质分子对其配体分子特有的识别能力,也即生物学亲和力,建立起来的一种有效的纯化方法。它经常只需要经过一步的处理即可将某种所需蛋白质从复杂的混合物中分离出来,并且纯度相当高。亲和层析最先用于酶的纯化并从中得到发展,但现在已广泛地用于核苷酸、核酸、免疫球蛋白、膜受体、细胞器甚至完整的细胞的纯化。应用亲和层析需要有待纯化物质的结构和生物学特异性的知识,以便设计出最好的分离条件。纯化酶时配体可以是底物、可逆抑制剂或别构效应物。被选择的条件一般是对酶-底物的结合最适的,因为方法的成功有赖于复合体的可逆形成。

亲和层析的基本原理是把待纯化的某一蛋白质的特异配体通过适当的化学反应共价地连接到像琼脂

糖凝胶一类的载体表面的功能基(如 $-OH$)上。一般在配体和多糖载体之间插入一段长度适当的连接臂或称间隔臂(Spacer arm)如 ϵ -氨基己酸,使配体与凝胶之间保持足够的距离,不致因载体表面的位阻妨碍待分离的分子与配体结合。这类载体在其他性能方面允许蛋白质能自由通过。当蛋白质混合物加到填有亲和介质的层析柱时,待纯化的某一蛋白质则被吸附在含配体的琼脂糖颗粒表面上而其他的蛋白质(称杂蛋白)则因对该配体无特异的结合部位而不被吸附,它们通过洗涤即可除去,被特异结合的蛋白质可用含游离的相应配体溶液把它从柱上洗脱下来(称亲和洗脱)(图7-19)。

凝集素亲和层析、免疫亲和层析、金属螯合层析(metal chelate chromatography)、染料配体层析和共价层析等都属于亲和层析类。

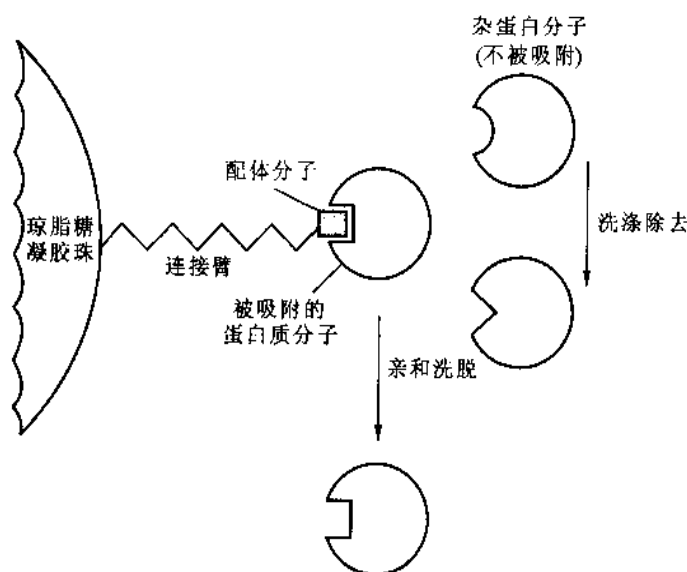


图7-19 亲和层析原理

(六) 高效液相层析和快速蛋白液相层析

高效液相层析(HPLC)在第3章中作过简要介绍(图3-32)。它实际上是离子交换、分子排阻、吸附和分配等层析技术的发展新阶段。因此一方面它以这些层析的原理为基础,另一方面在技术上作了很大改进,使这些层析有更高的效率、更高的分辨率和更快的过柱速度。HPLC已成为目前最通用、最有力和最多能的层析形式。对柱层析来说,载体的颗粒愈小,则分辨率愈高,但是洗脱液的流速也愈慢。为解决这一矛盾,采用高压和载体颗粒度小而均匀、机械性能强、化学性能稳定的固定相以及其他相应的设备。现在多配有计算机,可自动完成分离纯化过程。HPLC可用于蛋白质及其他生物分子的分析 and 制备。

反相HPLC(reversed-phase, HPLC)广泛用于分离非极性化合物如药物及其代谢物、杀虫剂、氨基酸和肽等。现在也广泛用于蛋白质的分离纯化。反相HPLC中固定相是非极性的,而流动相是相对极性的。最常用的固定相是键合相(bonded phase)形式,它们是由烷基硅烷(alkylsilane)与硅石通过化学反应连接而成。使用的烷基硅烷有丁基(C_4)、辛基(C_8)和十八烷基(C_{18})硅烷。流动相常用的有水或缓冲液、甲醇、乙腈或四氢呋喃及它们的混合物。反相液相层析与多数其他形式的层析不同之处在于固定相基本上是惰性的,固定相与被分离物只可能有疏水作用。反相技术吸引人的地方是流动相组成的小小变化,例如加入盐,改变pH或有机溶剂量就能成功地影响分离特性。

快速蛋白液相层析(fast protein liquid chromatography, FPLC)是专门用于蛋白质分离的。它没有自己特有的原理,只是基于反相、亲和、排阻、疏水作用、离子交换和等电聚焦等层析。微内径玻璃衬里的不锈钢柱,能用于分离微量样品,分离时间不到10 min。FPLC能分离直接上柱的胰蛋白酶消化液和微生物培养上清液中的蛋白质混合物。

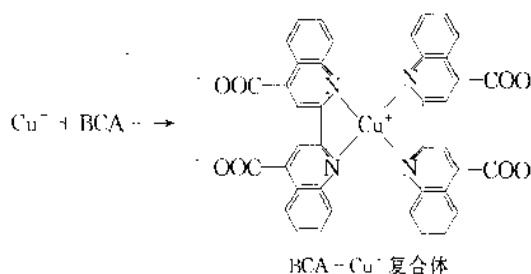
六、蛋白质的含量测定与纯度鉴定

在蛋白质分离纯化的过程中,经常需要测定蛋白质的含量和检查某一蛋白质的纯化程度。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以及鉴定最后制品的纯度等。

(一) 蛋白质含量测定

测定蛋白质总量的常用方法有:凯氏定氮法、双缩脲法、Folin-酚试剂法(Lowry法)、紫外吸收法、染料结合法(Bradford法)和胶体金测定法等。这些方法在普通的实验手册中都有详细的叙述。

凯氏定氮法是经典的标准方法,但现已不多用。双缩脲法常用于需要快速但并不十分精确的测定,如用于蛋白质纯化的头几个步骤的测定。Lowry法多年来被选为蛋白质标准测定方法,此法基于Folin-酚试剂能定量地与 Cu^+ 反应, Cu^+ 是由蛋白质的易氧化成分(如巯基、酚基)还原 Cu^{2+} 而产生的。新近开发的一个测定蛋白质的试剂,4,4'-二羧-2,2'-二喹啉(bisinchoninic acid,BCA),在碱性溶液中与 Cu^+ 反应形成紫色复合体,BCA与 Cu^+ 反应比Folin-酚试剂与 Cu^+ 反应更强,其反应式如下:



基于此反应的方法称为BCA法。紫外吸收(280 nm 波长)法,虽然精确度不高,但操作简便,样品可以回收,同时可以估算核酸含量。Bradford法(考马斯亮蓝结合法)灵敏度高,能检测一个微克的蛋白,重复性也好。胶体金测定法是几种方法中灵敏度最高的,检测量是纳克水平,胶体金是一种带负电荷的疏水胶体,呈洋红色,遇蛋白质转变为蓝色,颜色改变与蛋白质有定量关系,因此可用于蛋白质的定量。

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。生物活性的测定和总蛋白量的测定配合起来,可以用来表示蛋白质分离过程中某一特定蛋白质的纯化程度。纯化程度常用这一特定成分的含量(一般用活力单位)与总蛋白量(重量单位)之比来表示。对酶来说常以每毫克蛋白所含活力单位数表示,称为酶比活或比活力。纯化工作一直要进行到这个比活不再增加为止(表7-7)。

表7-7 蛋白质纯化过程的实例

步骤	体积/mL	蛋白质浓度/(mg/mL)	总蛋白/mg	活力 ^a /(U/mL)	总活力/U	比活力/(U/mg)	纯化倍数 ^b	回收率 ^c /%
匀浆液	8 500	40	340 000	1.8	15 300	0.045	1	100
硫酸铵沉淀(45%~70%)	530	194	103 000	23.3	12 350	0.12	2.7	81
CM-纤维素	420	19.5	8 190	25	10 500	1.28	28.4	69
亲和层析	48	2.2	105.6	198	9 500	88.4	1 964	62
DEAE-Sephacse	12	2.3	27.5	633	7 600	275	6 110	50

a. 酶活性单位定义为在标准试验条件下催化产生1 mol产物/min的酶量(第8章)

b. 纯化倍数=该步的比活力/匀浆的比活力

c. 回收率=该步的总活力/匀浆的总活力

(二) 蛋白质纯度鉴定

蛋白质纯度鉴定通常采用物理化学的方法,如电泳、沉降、HPLC和溶解度分析等。目前采用的电泳分析有等电聚焦、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和SDS-PAGE、毛细管电泳等。纯的蛋白质在一系列不同的pH条件下进行电泳时,都将以单一的速度移动,它的电泳图谱只呈现一个条带(或峰)。同样地,纯的蛋白质在离心场中,应以单一的沉降速度移动。由于沉降系数主要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。HPLC常用于多肽、蛋白质纯度的鉴定。纯蛋白质样品在HPLC的洗脱图谱上呈现出单一的对峰。

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。用恒浓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,那么溶解度曲线只呈现一个折点,在折点以前,直线的斜率为1,折点以后,斜率为零(图7-20)。不纯的蛋白质的溶解曲线常常呈现2个或2个以上的折点。

此外N-末端分析也用于鉴定纯度,因为均一的单链蛋白质样品中,N-端残基只可能有一种氨基酸。

必需指出,采用任何单独一种方法鉴定所得结果只能作为蛋白质均一性的必要条件而不是充分条件。事实上只有很少几个蛋白质能够全部满足上面的严格要求,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出不均一性。

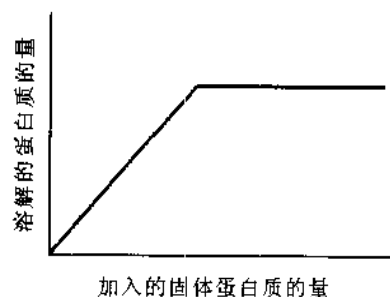


图7-20 蛋白质的溶解度曲线

提 要

蛋白质也是一种两性电解质。它的酸碱性质主要决定于肽链上可解离的R基团。对某些蛋白质来说,在某一pH下它所带的正电荷与负电荷相等,即净电荷为零,此pH称为蛋白质的等电点。各种蛋白质都有自己特定的等电点。在等电点以上的pH时蛋白质分子带净负电荷,在等电点以下的pH时带净正电荷。蛋白质处于等电点时溶解度最小。在无盐类干扰情况下,一种蛋白质的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是它的真正等电点,称为等离子点,它是该蛋白质的特征常数。

测定蛋白质相对分子质量(M_r)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。凝胶过滤是一种简便的测定蛋白质 M_r 的方法。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)用于测定单体蛋白质或亚基的 M_r 。

蛋白质溶液是亲水胶体系统。蛋白质分子颗粒(直径1~100 nm)是系统的分散相,水是分散介质。蛋白质分子颗粒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)对配体分子特异的生物学亲和力。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小分子分开,常用于浓缩和脱盐。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分离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、毛细管电泳以及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已广泛地用于蛋白质的分离纯化。HPLC和亲和层析是十分有效的分离纯化方法。

蛋白质制品的纯度鉴定通常采用分辨率高的物理化学方法,例如PAGE、等电聚焦、毛细管电泳、沉降分析和HPLC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. 测得一种血红素蛋白质含 0.426% 铁, 计算其最低相对分子质量。一种纯酶按重量计算含亮氨酸 1.65% 和异亮氨酸 2.48%, 问其最低相对分子质量是多少? [13 110; 15870]
2. 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 (rad/s) 表示; (2) 计算距旋转中心 6.2 cm 处的离心加速度 a ; (3) 此离心加速度相当于重力加速度“g”的多少倍? [(1) $\omega = 6\ 070.7$ rad/s; (2) $a = 2.284 \times 10^8$ cm/s²; (3) $a = 233\ 061$ g]
3. 一种蛋白质的偏微比容为 0.707 cm³/g; 当温度校正为 20℃, 溶剂校正为水时, 扩散系数 ($D_{20,w}$) 为 13.1×10^{-7} cm²/s; 沉降系数 ($s_{20,w}$) 为 2.05 S, 20℃ 时水的密度为 0.998 g/cm³。根据斯维德贝格公式计算该蛋白质的相对分子质量。 [13 000]
4. 一个层析柱中固定相体积 (V_s) 为流动相体积 (V_m) 的 1/5。假设某一化合物的分配系数, (a) $K_d = 1$; (b) $K_d = 50$ 。计算该化合物的有效分配系数 (K_{eff}), 也称容量因子 (capacity factor)。[(a) $K_{eff} = 0.2$; (b) $K_{eff} = 10$]
5. 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、胰凝乳蛋白酶原和血清清蛋白 (它们的 M_r 见表 7-4)。[肌球蛋白、过氧化氢酶、血清清蛋白、胰凝乳蛋白酶原、肌红蛋白、细胞色素 c]
6. 在第 5 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 mL, 问未知蛋白的 M_r 是多少? 假定所有蛋白质都是球形的, 并且都处在柱的分级分离范围内。 [M_r 为 52 000]
7. 在下面指出的 pH 下, 下述蛋白质在电场中向哪个方向移动, 即向正极, 负极还是不动? (根据表 7-2 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) 胰凝乳蛋白酶原, 在 pH 5.0、9.1 和 11。[(1) 正极, (2) 负极, 正极; (3) 负极, 不动, 正极]
8. (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 则留在原点]
9. 凝胶过滤层析中和凝胶电泳中的分子筛效应有什么不同? 为什么?
10. 配制一系列牛血清清蛋白 (BSA) 稀释液, 每一种溶液取 0.1 ml 进行 Bradford 法测定。对适当的空白测定 595 nm 波长处的光吸收 (A_{595})。结果如下表所示:

BSA 的浓度 / (mg·mL ⁻¹)	A_{595}
1.5	1.4
1.0	0.97
0.8	0.79
0.6	0.59
0.4	0.37
0.2	0.17

BSA 浓度对 A_{595} 作图得标准曲线。E. coli 的蛋白质提取液样品 (0.1 ml) 测得的 A_{595} 为 0.84。根据标准曲线算出 E. coli 提取液中的蛋白质浓度。[0.85 mg/mL]

主要参考书

1. 刘思职等编译, 蛋白质的生物化学, 北京: 科学出版社, 1955
2. 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编, 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1997
3. 陈石根, 周润琦编著, 酶学, 上海: 复旦大学出版社, 2001
4. 陶宗晋, 离心沉降分析技术, 北京: 科学出版社, 1986

5. Van Holde K E . Physical Biochemistry. New Jersey: Prentice - Hall Inc. 1971
6. Wilson K, Walker J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry, 5th ed., Cambridge: University Press, 2000

第8章 酶 通 论

新陈代谢是生命活动的基础,是生命活动最重要的特征。而构成新陈代谢的许多复杂而有规律的物质变化和能量变化,都是在酶催化下进行的。生物的生长发育、繁殖、遗传、运动、神经传导等生命活动都与酶的催化过程紧密相关,可以说,没有酶的参与,生命活动一刻也不能进行。因此从酶作用的分子水平上研究生命活动的本质及其规律无疑是十分重要的。

人们对酶的认识起源于生产与生活实践。我国人民在八千年以前就开始利用酶。约公元前 21 世纪夏禹时代,人们就会酿酒,公元前 12 世纪周代已能制作饴糖和酱,2000 多年前,春秋战国时期已知用曲治疗消化不良的疾病。凡此种种都说明,虽然我们祖先并不知道酶是何物,也无法了解其性质,但根据生产和生活的积累,已把酶利用到相当广泛的程度。西方国家 19 世纪对酿酒发酵过程进行了大量研究。1810 年 Joseph Gaylussac 发现酵母可将糖转化为酒精。1857 年微生物学家 Pasteur 等人提出酒精发酵是酵母细胞活动的结果,他认为只有活的酵母细胞才能进行发酵。Liebig 反对这种观点,他认为发酵现象是由溶解于酵母细胞液中的酶引起的。直到 1897 年, Büchner 兄弟用石英砂磨碎酵母细胞,制备了不含酵母细胞的抽提液,并证明此不含细胞的酵母提取液也能使糖发酵,说明发酵与细胞的活动无关。从而说明了发酵是酶作用的化学本质,为此 Büchner 获得了 1911 年诺贝尔化学奖。1833 年 Payen 和 Persoz 从麦芽的水抽提物中,用酒精沉淀得到了一种对热不稳定的物质,它可使淀粉水解成可溶性的糖。他们把这种物质称之为淀粉酶制剂(diastrase),其意思是“分离”,表示可以从淀粉中分离出可溶性糖来。尽管当时它还是一个很粗的酶制剂,但由于他们采用了最简单的提纯方法,得到了一个无细胞酶制剂,并指出了它的催化特性和热不稳定性,因而开始涉及到酶的一些本质性问题,所以人们认为 Payen 和 Persoz 首先发现了酶。1878 年 Kühne 才给酶一个统一的名词,叫 Enzyme,这个字来自希腊文,其意思“在酵母中”。1835—1837 年, Berzelius 提出了催化作用的概念,该概念的产生对酶学和化学的发展都是十分重要的。可见,对于酶的认识一开始就与它具有催化作用的能力联系在一起。1894 年 Fisher 提出了酶与底物作用的“锁与钥匙”学说,用以解释酶作用的专一性。1903 年 Henri 提出了酶与底物作用的中间复合物学说。1913 年 Michaelis 和 Menten 根据中间复合物学说,导出了米氏方程,对酶反应机制的研究是一个重要突破。1925 年 Briggs 和 Handane 对米氏方程作了一项重要修正,提出了稳态学说。1926 年美国化学家 Sumner 从刀豆提取出了脲酶并获得结晶,证明脲酶具有蛋白质性质。直到 1930—1936 年 Northrop 和 Kunitz 得到了胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶结晶,并用相应方法证实酶是一种蛋白质后,酶是蛋白质的属性才普遍被人们所接受。为此 Sumner 和 Northrop 于 1949 年共同获得诺贝尔化学奖。1963 年 Hirs, Moore 和 Stein 测定了 RNase A 的氨基酸顺序。1965 年 Phillips 首次用 X 射线晶体衍射技术阐明了鸡蛋清溶菌酶的三维结构。1969 年 Merrifield 等人工合成了具有酶活性的胰 RNase。80 年代初 Cech 和 Altman 分别发现了具有催化功能的 RNA——核酶(ribozyme),这一发现打破了酶是蛋白质的传统观念,开辟了酶学研究的新领域,为此 Cech 和 Altman 于 1989 年共同获得诺贝尔化学奖。1986 年 Schultz 与 Lerner 等人研制成功抗体酶(abzyme),这一研究成果对酶学研究具有重要的理论意义和广泛的应用前景。Boyer 和 walker 阐明了 ATP 合酶(ATP synthase)合成与分解 ATP 的分子机制,于 1997 年获得诺贝尔化学奖。近 20 年来有不少酶的作用机制被阐明。随着 DNA 重组技术及聚合酶链式反应(PCR)技术的广泛应用,使酶结构与功能的研究进入新阶段。现已鉴定出 4 000 多种酶,数百种酶已得到结晶,而且每年都有新酶被发现。

近几十年来酶学研究得到很大发展,提出了一些新理论和新概念。一方面在酶的分子水平上揭示酶和生命活动的关系,阐明酶在细胞代谢调节和分化过程中的作用,酶生物合成的遗传机制,酶的起源和酶的催化机制等方面取得进展。另一方面酶的应用研究得到迅速发展。酶工程已成为当代生物工程的重要支柱。酶的研究成果用来指导有关医学实践和工农业生产,必将会给催化剂的设计、药物的设计、疾病的诊断、预防和治疗、农作物品种选育及病虫害的防治等提供理论依据和新思想、新概念。除了酶已普遍使

用于食品、发酵、制革、纺织、日用化学及医药保健等部门,酶在生物工程、化学分析、生物传感器及环保方面的应用也日益扩大。

一、酶催化作用的特点

(一) 酶和一般催化剂的比较

酶作为生物催化剂和一般催化剂相比有其共同性,首先酶和其他催化剂一样,都能显著地改变化学反应速率,使之加快达到平衡,但不能改变反应的平衡常数。酶本身在反应后也不发生变化。这意味着一个酶对正、逆反应按同一倍数加速。例如 A 和 B 之间互相转化,假设在没有酶的情况下正向反应的速率常数(k_1)是 10^{-4}s^{-1} ,而逆向反应速率常数(k_2)为 10^{-6}s^{-1} 。平衡常数 K 可通过正、逆反应速率常数之比得出:

$$A \xrightleftharpoons[10^{-6}\cdot\text{s}^{-1}]{10^{-4}\cdot\text{s}^{-1}} B \quad K = \frac{[B]}{[A]} = \frac{k_1}{k_2} = \frac{10^{-4}}{10^{-6}} = 100$$

不论有没有酶起作用,B 的平衡浓度为 A 的 100 倍。但没有酶时达成平衡需要几个小时,而有酶的情况下,可能还不到 1 s 就能达成平衡。因此酶能加速达成平衡,但不能改变平衡常数。

在一个化学反应体系中,因为各个分子所含的能量高低不同,每一瞬间并非全部反应物分子都能进行反应。只有那些具有较高能量,处于活化态的分子即活化分子(activation molecule)才能在分子碰撞中发生化学反应。反应物中活化分子越多,则反应速率越快。活化分子要比一般分子高出一定的能量称为活化能(activation energy),活化能的定义为,在一定温度下 1 摩尔底物全部进入活化态所需要的自由能(free energy),单位为 kJ/mol 。反应所需的活化能愈高,相对地活化分子数就愈少,反应速率就愈慢。在有催化剂参与反应时,由于催化剂能瞬时地与反应物结合成过渡态,因而降低了反应所需的活化能。从图 8-1 可以看出,在有催化剂时反应所需活化能降低,只需较少的能量就可使反应物变成活化分子。和非催化反应相比,活化分子数量大大增加,因而使反应速率加快。

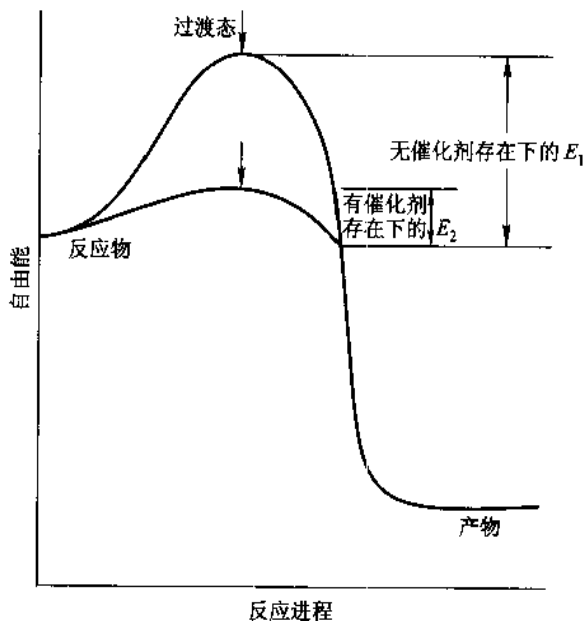


图 8-1 催化过程与非催化过程自由能的变化

例如在没有催化剂存在的情况下,过氧化氢分解所需活化能为 75.4kJ/mol ,用无机物液态钨作催化剂时,所需活化能降低为 48.9kJ/mol ,当用过氧化氢酶催化时,则活化能只需 8.4kJ/mol 。再如,无催化剂时使蔗糖水解所需活化能为 1339.8kJ/mol ,用 H^+ 作催化剂时,活化能降低为 104.7kJ/mol ,用蔗糖酶时只需要 39.4kJ/mol 。由此可见酶作为催化剂比一般催化剂更显著地降低活化能,催化效率更高。

(二) 酶作为生物催化剂的特点

酶是细胞所产生的,受多种因素调节控制的具有催化能力的生物催化剂,与一般非生物催化剂相比较有以下几个特点:

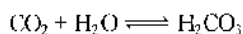
1. 酶易失活

酶是由细胞产生的生物大分子,凡能使生物大分子变性的因素,如高温、强碱、强酸、重金属盐等都能

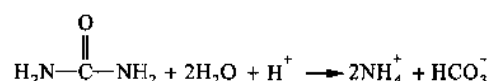
使酶失去催化活性,因此酶所催化的反应往往都是在比较温和的常温、常压和接近中性酸碱条件下进行。例如:生物固氮在植物中是由固氮酶催化的,通常在 27℃ 和中性 pH 下进行,每年可从空气中将 1 亿吨左右的氮固定下来。而在工业上合成氨,需要在 500℃,几百个大气压下才能完成。

2. 酶具有很高的催化效率

生物体内的大多数反应,在没有酶的情况下,几乎是不能进行的。即使像 CO₂ 水合作用这样简单的反应也是通过体内碳酸酐酶催化的。



每个酶分子在 1 s 内可以使 6×10^5 个 CO₂ 发生水合作用,这样以保证使细胞组织中的 CO₂ 迅速进入血液,然后再通过肺泡及时排出,这个经酶催化的反应,要比未经催化的反应快 10^7 倍。再如刀豆脲酶催化尿素水解的反应:



在 20℃ 酶催化反应的速率常数是 $3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, 尿素非催化水解的速率常数为 $3 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, 因此,脲酶催化反应的速率比非催化反应速率大 10^{14} 倍。据报道,如果在人的消化道中没有各种酶类参与催化作用,那么,在体温 37℃ 的情况下,要消化一餐简单的午饭,大约需要 50 年。经过实验分析,动物吃下的肉食,在消化道内只要几小时就可完全消化分解。再如将唾液淀粉酶稀释 100 万倍后,仍具有催化能力。由此可见,酶的催化效率是极高的。酶的催化活力,若以分子比(molecular ratio)表示,酶催化反应的反应速率比非催化反应高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍,比非生物催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。但应指出,酶催化的反应与非酶催化的反应历程不同,只能估计出一个下限。表 8-1 列出一些酶催化反应与它们非催化反应的比较。

表 8-1 酶催化反应与非催化反应的比较

反 应	酶	非催化速率, $v_u(\text{s}^{-1})$	催化反应 速率, $v_e(\text{s}^{-1})$	v_e/v_u
$\text{CH}_3-\text{O}-\text{PO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{HPO}_4^{2-}$	碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)	1×10^{-15}	14	1.4×10^{16}
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^-$	脲酶(urease)	3×10^{-10}	3×10^4	1×10^{14}
$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OCH}_2\text{CH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{HOCH}_2\text{CH}_3$	胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)	1×10^{-10}	1×10^2	1×10^{12}
糖原 + Pi \rightarrow 糖原 + 葡萄糖 - 1-P	糖原磷酸化酶 (glycogen phosphorylase)	$< 5 \times 10^{-15}$	1.6×10^{-3}	$> 3.2 \times 10^{11}$
葡萄糖 + ATP \rightarrow 葡萄糖 - 6-P + ADP	己糖激酶(hexokinase)	$< 1 \times 10^{-13}$	1.3×10^{-3}	$> 1.3 \times 10^{10}$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$	乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase)	$< 6 \times 10^{-12}$	2.7×10^{-3}	$> 4.5 \times 10^8$
$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)	10^{-2}	10^5	$> 1 \times 10^7$
肌酸 + ATP \rightarrow Cr-P + ADP	肌酸激酶 (creatine kinase)	$< 3 \times 10^{-9}$	4×10^{-5}	$> 1.33 \times 10^4$

通常用酶的转换数(turnover number, TN, 等于催化常数 k_{cat})来表示酶的催化效率,是指在一定条件下每秒钟每个酶分子转换底物的分子数,或每秒钟每微摩尔酶分子转换底物的微摩尔数。大多数酶对它们天然底物的转换数的变化范围为每秒 1 到 10^4 (表 8-2)。

表 8-2 一些酶的最大转换数

酶	转换数(k_{cat})/s ⁻¹
碳酸酐酶 (carbonic anhydrase)	600 000
3-酮类固醇异构酶 (3-ketosteroid isomerase)	280 000
乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase)	25 000
青霉素酶 (penicillinase)	2 000
乳酸脱氢酶 (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

3. 酶具有高度专一性

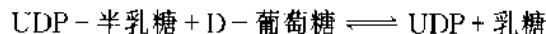
所谓高度专一性(specificity)是指酶对催化的反应和反应物有严格的选择性。被作用的反应物,通常称为底物(substrate)。酶往往只能催化一种或一类反应,作用于一种或一类物质。而一般催化剂没有这样严格的选择性。氢离子可以催化淀粉、脂肪和蛋白质的水解,而淀粉酶只能催化淀粉糖苷键的水解,蛋白酶只能催化蛋白质肽键的水解,脂肪酶只能催化脂肪酯键的水解,而对其他类物质则没有催化作用。酶作用的专一性,是酶最重要的特点之一,也是和一般催化剂最主要的区别。

4. 酶活性受到调节和控制

有机体的生命活动表现了它内部化学反应历程的有序性,这种有序性是受多方面因素调节控制的,一旦破坏了这种有序性,就会导致代谢紊乱,产生疾病,甚至死亡。酶活力受到调节和控制是区别于一般催化剂的重要特征。细胞内酶的调节和控制有多种方式,主要有:

(1) 调节酶的浓度 酶浓度的调节主要有2种方式:一种是诱导或抑制酶的合成;一种是调节酶的降解。例如乳糖操纵子(lac operon)可以合成 β -半乳糖苷酶、半乳糖苷通透酶和硫半乳糖苷转乙酰酶,它们可以受乳糖或诱导物异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)的诱导而促进合成。乳糖或IPTG可以与原来存在于该系统的阻遏物结合,使阻遏物和DNA的结合能力降低约1 000倍,解除抑制,使3种酶的合成加快,酶浓度提高。大肠杆菌有一种所谓的葡萄糖效应,就是当有葡萄糖存在下,不利用乳糖,表明葡萄糖抑制了上述3个酶的合成。

(2) 通过激素调节酶活性 激素通过与细胞膜或细胞内受体相结合而引起一系列生物学效应,以此来调节酶活性(见第17章)。有些酶的专一性是由激素调控的,乳腺组织合成乳糖是一个明显的例子。哺乳动物乳腺组织中合成乳糖是由乳糖合成酶催化的,该酶由两个亚基即催化亚基和调节亚基组成。催化亚基单独存在时不能催化合成乳糖,但能催化半乳糖以其价键的方式连接到蛋白质上形成糖蛋白。调节亚基实际上就是乳汁中的 α -乳清蛋白,其本身无催化活性,但当与催化亚基结合后,就可以改变催化亚基的专一性,催化半乳糖和葡萄糖反应生成乳糖:



调节亚基合成是受激素控制的。在怀孕期间,催化亚基和调节亚基在乳腺中合成,但调节亚基合成的很少,当分娩后,由于激素急剧增加,调节亚基大量合成,并和催化亚基结合成乳糖合成酶,大量合成乳糖以适应生理的需要。

(3) 反馈抑制调节酶活性 许多小分子物质的合成是由一连串的反应组成的,催化此物质生成的第一步的酶,往往被它们终端产物抑制。这种抑制叫反馈抑制(feedback inhibition)(图8-2)。例如由苏氨酸生物合成为异亮氨酸,要经过5步,反应第1步由苏氨酸脱氨酶(threonine deaminase)催化,当终产物异亮氨酸浓度达到足够水平时,该酶就被抑制,异亮氨酸结合到酶的一个调节部位上,通过可逆的别构作用对酶产生抑制。当异亮氨酸的浓度下降到一定程度,苏氨酸脱氨酶又重新表现活性,从而又重新合成异亮氨酸。

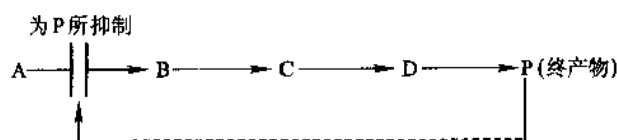
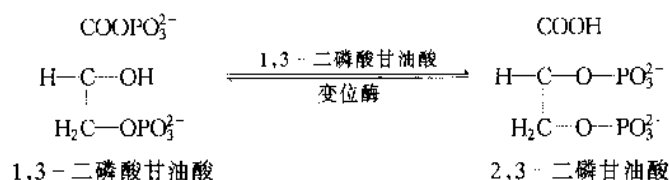


图 8-2 通过终产物可逆的结合对途径中的第一个酶进行反馈抑制

(4) 抑制剂和激活剂对酶活性的调节 酶受大分子抑制剂或小分子物质抑制,从而影响酶的活性。例如大分子物质胰蛋白酶抑制剂,可以抑制胰蛋白酶的活性。小分子的抑制剂如一些反应产物,像 1,3-二磷酸甘油酸变位酶的活性受到它的产物 2,3-二磷酸甘油酸的抑制,从而对这一反应进行调节。



此外某些无机离子可对一些酶产生抑制,对另外一些酶产生激活,从而对酶活性起调节作用。酶活性也可受到大分子物质的调节,例如抗血友病因子可增强丝氨酸蛋白酶的活性,因此它可明显地促进血液凝固过程。

(5) 其他调节方式 通过别构调控、酶原的激活、酶的可逆共价修饰和同工酶来调节酶活性,这些形式的调节将在第 10 章进行讨论。

二、酶的化学本质及其组成

(一) 酶的化学本质

酶的化学本质除有催化活性的 RNA 之外几乎都是蛋白质。到目前为止,被人们分离纯化研究的酶已有数千种,经过物理和化学方法的分析证明了酶的化学本质是蛋白质。主要依据是:① 酶经酸碱水解后的最终产物是氨基酸,酶能被蛋白酶水解而失活;② 酶是具有空间结构的生物大分子,凡使蛋白质变性的因素都可使酶变性失活;③ 酶是两性电解质,在不同 pH 下呈现不同的离子状态,在电场中向某一电极泳动,各自具有特定的等电点;④ 酶和蛋白质一样,具有不能通过半透膜等胶体性质;⑤ 酶也有蛋白质所具有的化学呈色反应。以上事实表明酶在本质上属于蛋白质。

但是,不能说所有的蛋白质都是酶,只是具有催化作用的蛋白质,才称为酶。

酶的催化活性依赖于它们天然蛋白质构象的完整性,假若一种酶被变性或解离成亚基就失活。因此,蛋白质酶的空间结构对它们的催化活性是必需的。

(二) 酶的化学组成

酶作为一类具有催化功能的蛋白质,与其他蛋白质一样,相对分子质量很大,一般从一万到几十万以致大到百万以上,见表 8-3。

表 8-3 一些酶的相对分子质量

名 称	相对分子质量/ $\times 10^3$	氨基酸残基数	肽链数
RNA 酶 A(牛胰)	13.7	124	1
溶菌酶(鸡蛋清)	13.93	129	1
胰凝乳蛋白酶(牛胰)	21.6	291	3
己糖激酶(酵母)	102.0	~800	2
RNA 聚合酶(<i>E. coli</i>)	450.0	~4 100	5
谷氨酸脱氢酶(牛心)	1 000.0	~8 300	~40

从化学组成来看酶可分为单纯蛋白质(simple protein)和缀合蛋白质(conjugated protein)两类。属于单纯蛋白质的酶类,除了蛋白质外,不含其他物质,如脲酶、蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶和核糖核酸酶等。属于缀合蛋白质的酶类,除了蛋白质外,还要结合一些对热稳定的非蛋白质小分子物质或金属离子,前者称为脱辅酶(apoenzyme 或 apoprotein),后者称为辅因子(cofactor),脱辅酶与辅因子结合后所形成的复合物称为“全酶”(holoenzyme),即全酶=脱辅酶+辅因子。在酶催化时,一定要有脱辅酶和辅因子同时存在才起作用,二者各自单独存在时,均无催化作用。酶的辅因子,包括金属离子及有机化合物,根据它们与脱辅酶结合的松紧程度不同,可分为两类,即辅酶(coenzyme)和辅基(prosthetic group)。通常辅酶是指与脱辅酶结合比较松弛的小分子有机物质,通过透析方法可以除去,如辅酶 I 和辅酶 II 等。辅基是以共价键和脱辅酶结合,不能通过透析除去,需要经过一定的化学处理才能与蛋白分开,如细胞色素氧化酶中的铁卟啉,丙酮酸氧化酶中的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD),都属于辅基。所以辅酶和辅基的区别只在于它们与脱辅酶结合的牢固程度不同,并无严格的界线。每一种需要辅酶(辅基)的脱辅酶往往只能与一特定的辅酶(辅基)结合,即酶对辅酶(辅基)的要求有一定的选择性,当换另一种辅酶(辅基)就不具活力,如谷氨酸脱氢酶需要辅酶 I,若换以辅酶 II 就失去活性。但生物体内辅酶(辅基)数目有限,而酶的种类繁多,故同一种辅酶(辅基)往往可以与多种不同的脱辅酶结合而表现出多种不同的催化作用,如 3-磷酸甘油醛脱氢酶、乳酸脱氢酶都需要辅酶 I,但各自催化不同的底物脱氢。这说明脱辅酶部分决定酶催化的专一性。辅酶(辅基)在酶催化中通常是起着电子、原子或某些化学基团的传递作用。一些可作为酶的辅因子的金属离子见表 8-4,转移电子、原子和基团反应中的辅酶和辅基见表 8-5。从表 8-5 可以看出许多维生素就是辅酶(辅基)的前体。

表 8-4 金属离子作为一些酶的辅因子

某些含有或需要金属离子的酶	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(phosphohydrolase)	Mg ²⁺
磷酸转移酶(phosphotransferase)	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)
细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase)	Fe ²⁺ 或 Fe ³⁺ (铁离子在卟啉环中) Cu ⁺ 或 Cu ²⁺
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)	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⁺
Cu·Zn-超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)	Cu ²⁺ 或 Zn 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⁺)
质膜 ATP 酶(plasma membrane ATPase)	Na ⁺ (也需要 K ⁺ 及 Mg ²⁺)
固氮酶(nitrogenase)	Fe ²⁺ , Mo ²⁺
脲酶(urcase)	Ni ²⁺

表 8-5 转移电子、原子和基团反应中的辅酶及辅基

转移的部分	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(与维生素 B ₆ 有关)	
甲基、亚甲基、次甲基、甲酰基及亚胺甲基等	四氧叶酸	

(三) 单体酶、寡聚酶、多酶复合体

根据酶蛋白分子的特点,又可将酶分为以下 3 类:

(1) 单体酶 单体酶(monomeric enzyme)一般是由一条肽链组成,例如,牛胰核糖核酸酶、溶菌酶、羧肽酶 A 等,但有的单体酶是由多条肽链组成,如胰凝乳蛋白酶是由 3 条肽链组成,肽链间二硫键相连构成一个共价整体。单体酶种类较少,一般多是催化水解反应的酶,相对分子质量在 $(13-35) \times 10^3$ 之间。

(2) 寡聚酶 寡聚酶(oligomeric enzyme)是由两个或两个以上亚基组成的酶,这些亚基可以是相同的,也可以是不相同的。绝大部分寡聚酶都含偶数亚基,但个别寡聚酶含奇数亚基,如荧光素酶、嘌呤核苷磷酸化酶均含 3 个亚基。亚基之间靠次级键结合,彼此容易分开。寡聚酶的相对分子质量一般大于 35×10^3 。大多数寡聚酶,其聚合形式是活性型,解聚形式是失活型。相当数量的寡聚酶是调节酶,在代谢调控中起重要作用。

表 8-6 列举了一些含相同亚基的寡聚酶,表 8-7 列举了一些含不同亚基的寡聚酶。

表 8-6 含相同亚基的寡聚酶

酶	来源	亚基数	相对分子质量/ 10^3
苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)	鼠肝	2	2×37.5
碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)	<i>E. coli</i>	2	2×40.0
肌酸激酶(creatine kinase)	鸡或兔肌	2	2×40.0
醛缩酶(aldolase)	酵母	2	2×40.0
己糖激酶(hexokinase)	酵母	4	4×27.5
醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	酵母	4	4×37.0
丙酮酸激酶(pyruvate kinase)	兔肝	4	4×57.2
过氧化氢酶(catalase)	牛肝	4	4×57.5

表 8-7 含不同亚基的寡聚酶

酶	来源	亚基数及类型	相对分子质量/ 10^3
果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-diphosphatase)	兔肝	2A	2×29.0
		2B	2×37.0
琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase)	牛心	α	70.0
		β	27.0
Na^+, K^+ -ATP酶(adenosine triphosphatase)	兔肾	2α	2×95.0
		2β	2×45.0
乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)	牛心、肝	4H 4M	4×35.0
RNA聚合酶(RNA polymerase)	<i>E. coli</i>	2α	2×39.0
		$\beta\beta'$	155.0, 165.0
		σ	95.0
组氨酸脱羧酶(histidine decarboxylase)	乳酸杆菌	A_5	5×29.9
		B_5	5×9.0
天冬氨酸转氨甲酰酶(aspartate transcarbamylase)	<i>E. coli</i>	$(C_3)_2$	6×34.0
		$(R_2)_3$	6×17.0
α -L-岩藻糖苷酶(fucosidase)	大鼠副睾	2α	2×60.0
		2β	2×47.0

(3) 多酶复合体 多酶复合体(multienzyme complex)是由几种酶靠非共价键彼此嵌合而成。所有反应依次连接,有利于一系列反应的连续进行。这类多酶复合体相对分子质量很高,例如脂肪酸合成中的脂肪酸合成酶(fatty acid synthase)复合体,是由7种酶和一个酰基携带蛋白构成,相对分子质量为 $2\,200 \times 10^3$; *E. coli* 丙酮酸脱氢酶复合体(*E. coli* pyruvate dehydrogenase complex)由60个亚基3种酶组成,相对分子质量约 $4\,600 \times 10^3$ 。

三、酶的命名和分类

迄今为止已发现约4 000多种酶,在生物体中的酶远远大于这个数量。随着生物化学、分子生物学等生命科学的发展,会发现更多的新酶。为了研究和使用的方便,需要对已知的酶加以分类,并给以科学名称。1961年前酶的分类和命名都很混乱,酶的名称往往是沿用下来的,缺乏系统性和科学性,有时会出现一酶数名或一名数酶的情况。1961年国际生物化学学会酶学委员会推荐了一套新的系统命名方案及分类方法,已被国际生物化学学会接受。决定每一种酶应有一个系统名称和一个习惯名称。

(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。主要依据两个原则:

(1) 根据酶作用的底物命名,如催化水解淀粉的酶叫淀粉酶,催化水解蛋白质的酶叫蛋白酶。有时还加上来源以区别不同来源的同一类酶,如胃蛋白酶,胰蛋白酶。

(2) 根据酶催化反应的性质及类型命名,如水解酶、转移酶、氧化酶等。有的酶结合上述两个原则来命名,如琥珀酸脱氢酶是催化琥珀酸脱氢反应的酶。

习惯命名比较简单,应用历史较长,尽管缺乏系统性,但现在还被人们使用。

(二) 国际系统命名法

国际系统命名法原则,是以酶所催化的整体反应为基础的,规定每种酶的名称应当明确标明酶的底物及催化反应的性质。如果一种酶催化两个底物起反应,应在他们的系统名称中包括两种底物的名称,并以“:”号将他们隔开。若底物之一是水时,可将水略去不写(见表8-8)。

表 8-8 酶国际系统命名法举例

习惯名称	系统名称	催化的反应
乙醇脱氢酶	乙醇:NAD ⁺ 氧化还原酶	乙醇 + NAD ⁺ → 乙醛 + NADH
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 → 谷氨酸 + 丙酮酸
脂肪酶	脂肪:水解酶	脂肪 + H ₂ O → 脂肪酸 + 甘油

(三) 国际系统分类法及酶的编号

国际酶学委员会,根据各种酶所催化反应的类型,把酶分为6大类,即氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和连接酶类。分别用1、2、3、4、5、6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亚亚类,仍用1、2、3、4……编号。每一个酶的分类编号由4个数字组成,数字间由“·”隔开。第一个数字指明该酶属于6个大类中的哪一类;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亚亚类中的排号。编号之前冠以EC(为Enzyme Commission的缩写)。例如:EC 1.1.1表示氧化还原酶,作用于CHOH基团,受体是NAD⁺或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;编号中第4个数字仅表示该酶在亚亚类中的位置。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。一切新发现的酶,都能按此系统得到适当的编号。从酶的编号可了解到该酶的类型和反应性质。表8-9列出了酶的分类,指明了酶的编号、系统名称、习惯名称及所催化的反应。

表 8-9 酶的分类

编号	系统名称	习惯名称	反应
1	氧化还原酶类		
1.1	作用于供体的CHOH基		
1.1.1	以NAD ⁺ 或NADP ⁺ 为受体		
1.1.1.1	醇:NAD ⁺ 氧化还原酶	醇脱氢酶	醇 + NAD ⁺ ⇌ 醛或酮 + NADH
1.1.3	以O ₂ 为受体		
1.1.3.4	β-D葡萄糖:氧氧化还原酶	葡萄糖氧化酶	β-D-葡萄糖 + O ₂ ⇌ D-葡萄糖酸-δ-内酯 + H ₂ O ₂
1.2	作用于供体的醛基或酮基		
1.2.1	以NAD ⁺ 或NADP ⁺ 为受体		
1.2.3	以O ₂ 为受体		
1.2.3.2	黄嘌呤:氧氧化还原酶	黄嘌呤氧化酶	黄嘌呤 + H ₂ O + O ₂ ⇌ 尿酸 + H ₂ O ₂
1.3	作用于供体的CH-CH基		
1.3.1	以NAD ⁺ 或NADP ⁺ 为受体		
1.3.1.1	4,5-二氢尿嘧啶: NAD ⁺ 氧化还原酶	二氢尿嘧啶脱氢酶	4,5-二氢尿嘧啶 + NAD ⁺ ⇌ 尿嘧啶 + NADH
1.3.2	以细胞色素为受体		
1.4	作用于供体的CH-NH ₂ 基		
1.4.3	以O ₂ 为受体		
1.4.3.2	L-氨基酸:氧氧化还原酶(脱氨基)	L-氨基酸氧化酶	L-氨基酸 + H ₂ O + O ₂ ⇌ 2-氧(代)酸 + NH ₃ + H ₂ O ₂

续表

编号	系统名称	习惯名称	反应
2	转移酶类		
2.1	转移 C1 基团		
2.1.1	甲基转移酶类		
2.1.1.2	S-腺苷甲硫氨酸:胍乙酸-N-甲基转移酶	胍乙酸转甲基酶	S-腺苷甲硫氨酸 + 胍乙酸 \rightleftharpoons S-腺苷高半胱氨酸 + 肌酸
2.1.2	羟甲基转移酶类和羟甲酰基转移酶类		
2.1.2.1	L-丝氨酸:四氢叶酸 5,10-羟甲基转移酶	丝氨酸转羟甲基酶	L-丝氨酸 + 四氢叶酸 \rightleftharpoons 甘氨酸 + 5,10-亚甲基四氢叶酸
2.1.3	羧基转移酶类和氨甲酰基转移酶类		
2.2	转移醛基或酮基		
2.3	酰基转移酶类		
2.4	糖基转移酶类		
2.6	转移含氮基团		
2.6.1	氨基转移酶类		
2.6.1.1	L-天冬氨酸: α -酮戊二酸氨基转移酶	天冬氨酸转氨基酶	L-天冬氨酸 + α -酮戊二酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸 + L-谷氨酸
2.7	转移含磷基团		
2.8	转移含硫基团		
3	水解酶类		
3.1	水解酯键		
3.1.1	羧酸酯水解酶类		
3.1.1.7	乙酰胆碱乙酰水解酶	乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱 + H ₂ O \rightleftharpoons 胆碱 + 乙酸
3.1.3	磷酸单酯水解酶类		
3.1.3.9	D-葡萄糖-6-磷酸磷酸水解酶	葡萄糖-6-磷酸酶	D-葡萄糖-6-磷酸 + H ₂ O \rightleftharpoons D-葡萄糖 + H ₃ PO ₄
3.1.4	磷酸二酯水解酶类		
3.1.4.1	正磷酸二酯磷酸水解酶	磷酸二酯酶	磷酸二酯 + H ₂ O \rightleftharpoons 磷酸单酯 + 醇
4	裂合酶类		
4.1	C-C裂合酶类		
4.1.1	羧基裂合酶		
4.1.1.1	2-氧(代)酸羧基裂合酶	丙酮酸脱羧酶	2-氧(代)酸 \rightleftharpoons 醛 + CO ₂
4.1.2	醛裂合酶		
4.1.2.7	酮糖-1-磷酸醛裂合酶	醛缩酶	酮糖-1-磷酸 \rightleftharpoons 磷酸二羟基丙酮 + 醛
4.2	C-O裂合酶类		
4.2.1	水解作用的裂合酶类		
4.3	C-N裂合酶类		
4.3.1	氨裂合酶类		
4.3.1.3	L-组氨酸氨裂合酶	组氨酸解氨酶	L-组氨酸 \rightleftharpoons 尿刊酸 + NH ₃

续表

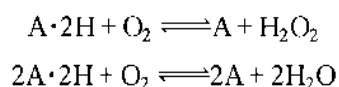
编号	系统名称	习惯名称	反应
5	异构酶类		
5.1	消旋酶类和差向异构酶类		
5.1.3	作用于糖		
5.1.3.1	D-核酮糖 5 磷酸-3-差向异构酶	磷酸核酮糖差向异构酶	D-核酮糖-5-磷酸 \rightleftharpoons D-木酮糖-5-磷酸
5.2	顺-反异构酶类		
5.3	分子内氧化还原酶类		
5.3.1	醛糖和酮糖互交		
5.4	分子内转移酶类		
6	连接酶		
6.1	形成 C—O 键		
6.1.1	氨基酸-tRNA 连接酶类		
6.1.1.1	L-酪氨酸:tRNA 连接酶(AMP)	酪氨酰-tRNA 合成酶	ATP + L-酪氨酸 + tRNA \rightleftharpoons AMP + 焦磷酸 + L-酪氨酰-tRNA
6.2	形成 C—S 键		
6.3	形成 C—N 键		
6.3.1	羧酸-氨连接酶类		
6.3.2	羧酸-氨基酸连接酶类		
6.4	形成 C—C 键		
6.4.1	羧化酶类		
6.4.1.2	乙酰 CoA:CO ₂ 连接酶(ADP)	乙酰-CoA 羧化酶	ATP + 乙酰-CoA + CO ₂ + H ₂ O \rightleftharpoons ADP + 正磷酸 + 丙二酰-CoA

(四) 六大类酶的特征和举例

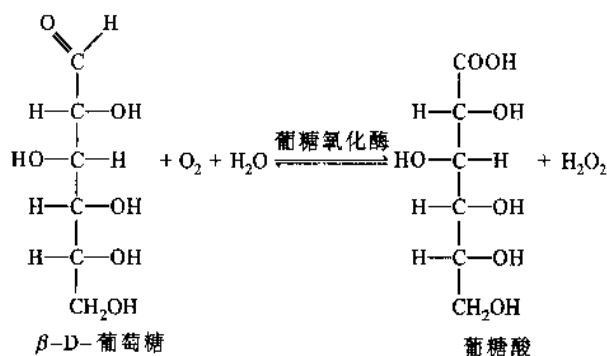
1. 氧化还原酶类

氧化还原酶类(oxido-reductases)是一类催化氧化还原反应的酶,可分为氧化酶和脱氢酶两类。

(1) 氧化酶类 催化底物脱氢,并氧化生成 H₂O₂ 或 H₂O



如葡萄糖氧化酶(EC 1.1.3.4)的每个酶分子中含有两分子 FAD 作为氢受体,催化葡萄糖氧化生成葡萄糖酸,并产生 H₂O₂:



以血红素为辅基的细胞色素 c 氧化酶(EC 1.9.3.1)催化底物脱氢,并氧化生成水。

(2) 脱氢酶类 催化直接从底物上脱氢的反应,即:



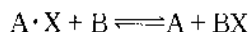
这类酶需要辅酶 I (NAD⁺) 或辅酶 II (NADP⁺) 作为氢供体或氢受体起传递氢的作用。例如:乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27)以 NAD⁺ 为辅酶将乳酸氧化成丙酮酸。



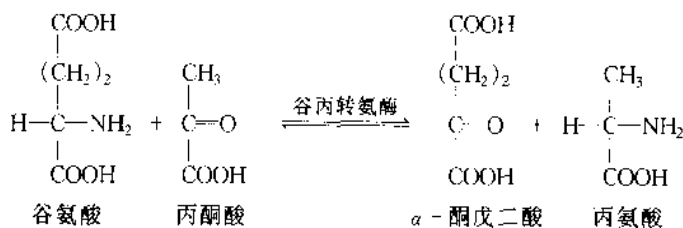
氧化还原酶类由于作用的供体不同,可分 18 个亚类。

2. 转移酶类

转移酶类(transfcrases)催化化合物某些基团的转移,即将一种分子上的某一基团转移到另一种分子上的反应。



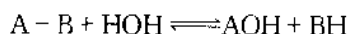
如谷丙转氨酶(EC 2.6.1.2)属于转移酶类中的转氨基酶。该酶需要磷酸吡哆醛为辅基,使谷氨酸上的氨基转移到丙酮酸上,使之成为丙氨酸,而谷氨酸成为 α-酮戊二酸。



这一大类中还有转移碳基、醛或酮基、酰基、糖苷基、磷酸基和含硫基的酶。

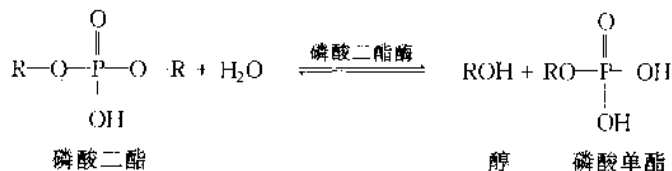
3. 水解酶类

水解酶类(hydrolases)催化水解反应,可用下面通式表示:



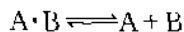
水解酶类大都属于细胞外酶,在生物体内分布最广,数量也多,包括水解酯键、糖苷键、醚键、肽键、酸酐键及其他 C—N 键共 11 个亚类,常见的有蛋白酶、淀粉酶、核酸酶和脂肪酶等。

例如磷酸二酯酶(EC 3.1.4.1)催化磷酸酯键水解。

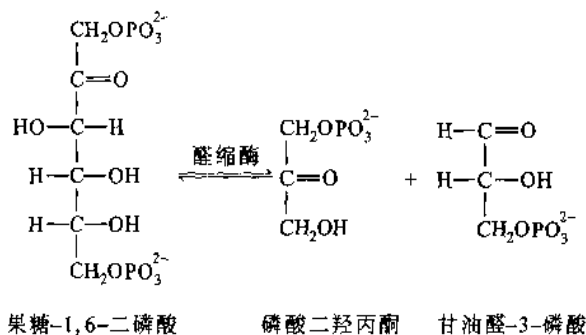


4. 裂合酶类

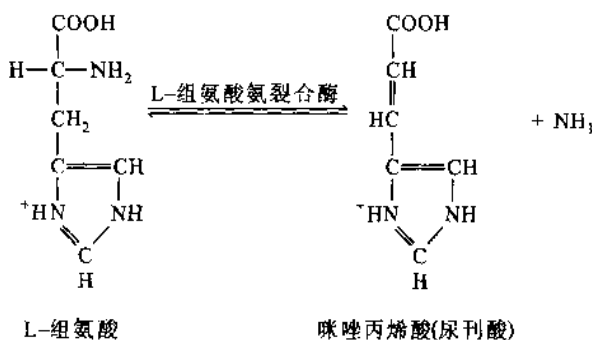
裂合酶类(lyases)催化从底物移去一个基团而形成双键的反应或其逆反应,用下式表示:



这类酶包括最常见的 C—C、C—O、C—N、C—S 裂解酶亚类。例如醛缩酶(EC 4.1.2.7)可催化果糖-1,6-二磷酸成为磷酸二羟丙酮及甘油醛-3-磷酸,是糖代谢过程中的一个关键酶。

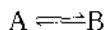


L-组氨酸氨裂合酶(EC 4.3.1.3)催化非氧化性、非水解性的脱氨反应,使组氨酸脱氨生成咪唑丙烯酸。

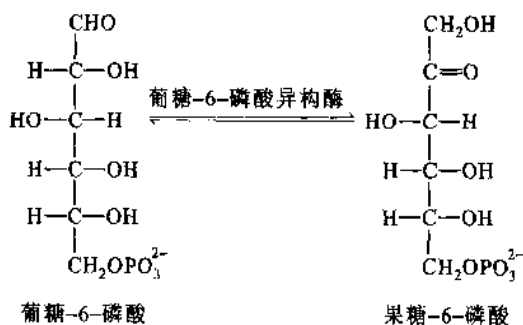


5. 异构酶类

异构酶类(isomerases)催化各种同分异构体之间的相互转变,即分子内部基团的重新排列,简式如下:



这类酶包括消旋酶、差向异构酶、顺反异构酶、分子内氧化还原酶、分子内转移酶和分子内裂解酶等亚类。例如葡糖-6-磷酸异构酶(EC 5.3.1.9)可催化葡糖-6-磷酸转变成果糖-6-磷酸。



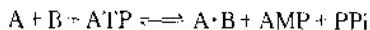
再如D-氨基酸消旋酶可使D-氨基酸变成L-氨基酸。

6. 连接酶类

连接酶类(ligases 或 synthetases 合成酶类)催化有腺苷三磷酸(ATP)参加的合成反应,即由两种物质合成一种新物质的反应。简式如下:



或



例如L-酪氨酰 tRNA 合成酶(EC 6.1.1.1)催化 L-Tyr-tRNA 的合成,这类酶在蛋白质生物合成中起重要作用。

于不同的酯类,水解速率有所不同。

蛋白酶可以催化肽键的水解,不同蛋白水解酶对底物的专一性各不相同。如凝血酶是参与血液凝固过程的一个酶,专一性程度相当高,它对于被水解的肽键羧基一端和氨基一端都有严格要求,只水解羧基端 L-精氨酸残基,氨基端为甘氨酸残基所构成的肽键(图 8-3)。

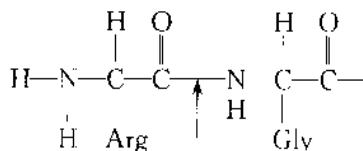


图 8-3 凝血酶的专一性(箭头表示作用点)

在动物消化道中几种蛋白酶专一性各不相同。如胰蛋白酶只专一地水解赖氨酸或精氨酸羧基形成的肽键,胰凝乳蛋白酶专一地水解由芳香氨基酸或带有较大非极性侧链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。羧基酶水解氨基末端氨基酸残基,羧基酶水解羧基末端氨基酸残基。当食物中的蛋白质进入动物消化道后,经过上述酶的联合作用,最终水解为氨基酸。图 8-4 表示消化道中几种蛋白酶的专一性。

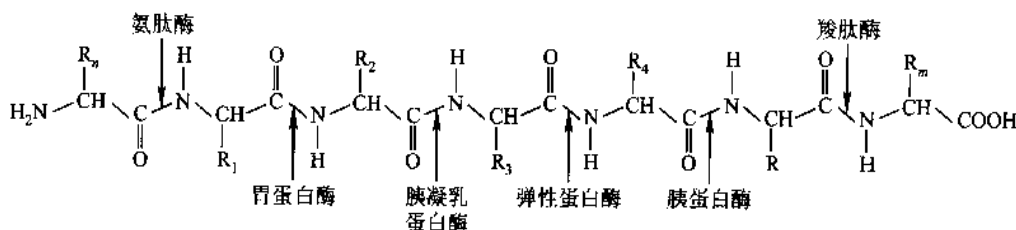


图 8-4 消化道中几种蛋白酶的专一性

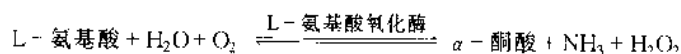
R_1, R_2 : 芳香氨基酸及其他疏水氨基酸;

R_3 : 丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸等短脂肪链氨基酸; R_4 : 碱性氨基酸

2. 立体异构专一性

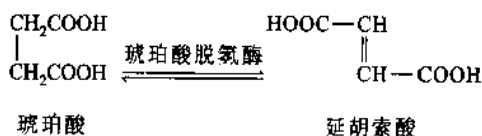
当底物具有立体异构体时,酶只能作用其中的一种,这种专一性称为立体异构专一性(stereospecificity)。酶的立体异构专一性是相当普遍的现象。

(1) 旋光异构专一性 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:



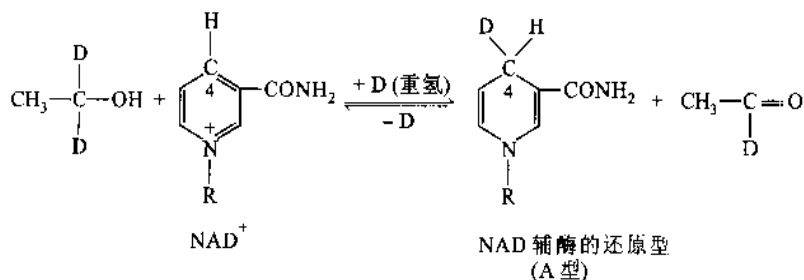
又如胰蛋白酶只作用于 L-氨基酸残基构成的肽键或其衍生物,而不作用于 D-氨基酸残基构成的肽键或其衍生物。 β -葡糖氧化酶仅能将 β -D-葡萄糖转变成葡糖酸,而对 α -D-葡萄糖不起作用。上述例子,均称为旋光异构专一性。

(2) 几何异构专一性 当底物具有几何异构体时,酶只能作用于其中的一种。例如,琥珀酸脱氢酶只能催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸,而不能生成顺丁烯二酸,称为几何异构专一性。



酶的立体异构专一性还表现在能区分从有机化学观点来看属于对称分子中的两个等同的基团,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,甘油-1-磷酸。甘油分子中的两个 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基团从有机化学观点来看完全相同,但是酶却能加以区分。另外,用氚标记的方法发现在脱氢酶催化下,底物和 NAD^+ 之间发生氢的转移也有

着严格的立体异构专一性,表现在对尼克酰胺环中 C4 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 C4 上只有一侧可以加氢或脱氢,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,凡具有与酵母醇脱氢酶同侧专一性的酶称为 A 型专一性的酶,如苹果酸脱氢酶及异柠檬酸脱氢酶等都属于此类型。凡是与酵母醇脱氢酶不同,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的产物,若用酶可进行不对称合成或不对称拆分。

(二) 关于酶作用专一性的假说

为了解释酶作用的专一性,曾提出过不同的假说,早在 1894 年 Fisher 提出“锁与钥匙”(lock and key)学说,即酶与底物为锁与钥匙的关系,以此说明酶与底物结构上的互补性(图 8-5)。该学说的局限性不能解释酶的逆反应,如果酶的活性中心是“锁和钥匙”学说中的锁,那么,这种结构不可能即适合于可逆反应的底物,又适合于可逆反应的产物。1958 年 Koshland 提出“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 射线晶体结构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 8-6 表示了酶构象在专一性底物及非专一性底物存在时的变化。

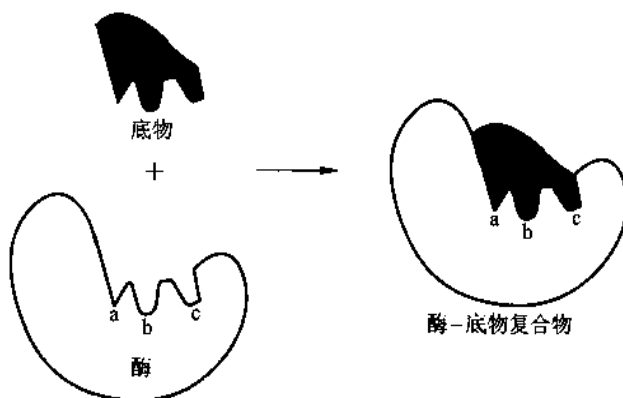


图 8-5 酶与底物的相互关系——酶与底物的“锁与钥匙”学说示意图

图中黑线条表示带有催化基团④⑤及结合基团③的肽段,它与带斜线的“酶”共同组成酶分子,A 图表示底物与酶分子活性部位的原有构象,B 图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④⑤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,C 图表示在底物上加入了一个庞大的基团,妨碍了酶的④⑤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。D 图则表示在正常底物上切除某些基团后,酶蛋白的带⑤基的肽链顶住了④基的肽链,也阻止了④⑤基的并列,因此不利于酶与底物结合,这样,酶也不能起催化作用。

近年来,通过对酶结构与功能的研究,确信酶与底物作用的专一性是由于酶与底物分子的结构互补,

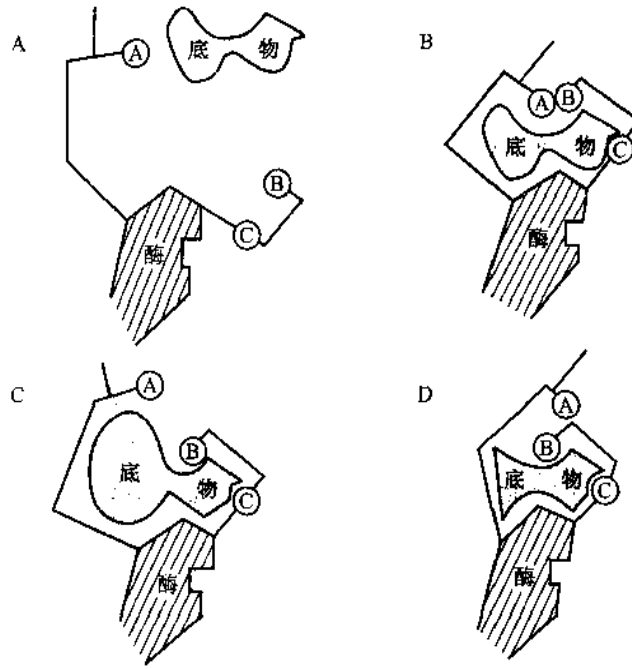


图 8-6 专一性、非专一性底物存在时,酶的构象变化模型

诱导契合,通过分子的相互识别而产生的。

五、酶的活力测定和分离纯化

(一) 酶活力的测定

酶活力(enzyme activity)也称为酶活性,酶的活力测定实际上就是酶的定量测定,在研究酶的性质、酶的分离纯化及酶的应用工作中都需要测定酶的活力。检查酶的含量及存在,不能直接用重量或体积来衡量,通常是用催化某一化学反应的能力来表示,即用酶活力大小来表示。

1. 酶活力

酶活力是指酶催化某一化学反应的能力,酶活力的大小可以用在一定条件下所催化的某一化学反应的反应速率(reaction velocity 或 reaction rate)来表示,两者呈线性关系。酶催化的反应速率愈大,酶的活力愈高;反应速率愈小,酶的活力就愈低。所以测定酶的活力就是测定酶促反应的速率。酶催化的反应速率可用单位时间内底物的减少量或产物的增加量来表示。在酶活力测定实验中底物往往是过量的,因此底物的减少量只占总量的极小部分,测定时不易准确,而相反产物从无到有,只要测定方法足够灵敏,就可以准确测定。由于在酶促反应中,底物减少与产物增加的速率相等,因此在实际酶活测定中一般以测定产物的增加量为准。

产物生成量(或底物减少量)对反应时间作图,如图 8-7 所示。曲线的斜率表示单位时间内产物生成量的变化,所以曲线上任何一点的斜率就是该相应时间的反应速率。从图中的曲线可看出在反应开始的一段时间内斜率几乎不变,但随着时间的延长,曲线逐渐变平坦,斜率发生改变,反应速率降低,显然这时测得的反应速率不能代表真实的酶活力。引起酶促反应速率随时间延长而降低的原因很多,如底物浓度的降低;产物浓度增加加速了逆反应的进行;产物对酶的

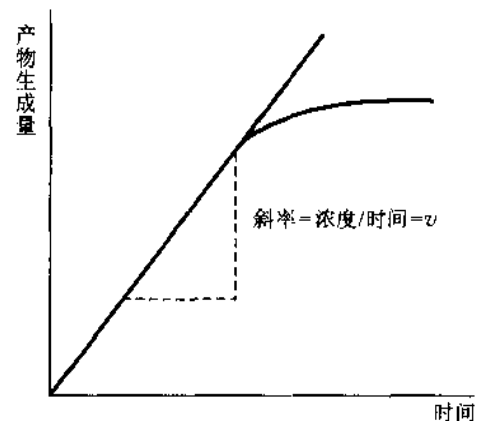


图 8-7 酶促反应的速率曲线

抑制或激活作用以及随着时间的延长引起酶本身部分分子失活等。因此测定酶活力,应测定酶促反应的初速率,从而避免上述种种复杂因素对反应速率的影响。反应初速率与酶量呈线性关系,因此可以用初速率来测定制剂中酶的含量。

2. 酶的活力单位(U, activity unit)

酶活力的大小即酶含量的多少,用酶活力单位表示,即酶单位(U)。酶单位的定义是:在一定条件下,一定时间内将一定量的底物转化为产物所需的酶量。这样酶的含量就可以用每克酶制剂或每毫升酶制剂含有多少酶单位来表示(U/g 或 U/ml)。

为使各种酶活力单位标准化,1961年国际生物化学协会酶学委员会及国际纯化学和应用化学协会临床化学委员会提出采用统一的“国际单位”(IU)来表示酶活力,规定为:在最适反应条件(温度 25℃)下,每分钟内催化 1 微摩尔(μmol)底物转化为产物所需的酶量定为一个酶活力单位,即 $1 \text{ IU} = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$ 。但人们仍常用习惯沿用的单位。例如 α -淀粉酶的活力单位规定为每小时催化 1 g 可溶性淀粉液化所需要的酶量,也有用每小时催化 1 ml 2% 的可溶性淀粉液所需要的酶量定为一个酶单位。不过习惯上沿用的单位表示方法不统一,同一种酶有几种不同的单位,不便于对同一种酶的活力进行比较。

1972年国际酶学委员会又推荐一种新的酶活力国际单位,即 Katal(简称 Kat)单位。规定为:在最适条件下,每秒钟能催化 1 摩尔(mol)底物转化为产物所需的酶量,定为 1Kat 单位($1 \text{ Kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$)。Kat 单位与 IU 单位之间的换算关系如下:

$$1 \text{ Kat} = 60 \times 10^6 \text{ IU}$$

$$1 \text{ IU} = \frac{1}{60} \mu\text{Kat} = 16.7 \text{ nKat}$$

酶的催化作用受测定环境的影响,因此测定酶活力要在最适条件下进行,即最适温度、最适 pH、最适底物浓度和最适缓冲液离子强度等,只有在最适条件下测定才能真实反映酶活力的大小。测定酶活力时,为了保证所测定的速率是初速率,通常以底物浓度的变化在起始浓度的 5% 以内的速率为初速率。底物浓度太低时,5% 以下的底物浓度变化实验上不易测准,所以在测定酶的活力时,往往使底物浓度足够大,这样整个酶反应对底物来说是零级反应,而对酶来说却是一级反应,这样测得的速率就比较可靠地反映酶的含量。

3. 酶的比活力

酶的比活力(specific activity)代表酶的纯度,根据国际酶学委员会的规定比活力用每 mg 蛋白质所含的酶活力单位数表示,对同一种酶来说,比活力愈大,表示酶的纯度愈高。

$$\text{比活力} = \text{活力 U}/\text{mg 蛋白} = \text{总活力 U}/\text{总蛋白 mg}$$

有时用每 g 酶制剂或每 ml 酶制剂含有多少个活力单位来表示(U/g 或 U/ml)。比活力大小可用来比较每单位质量蛋白质的催化能力。比活力是酶学研究及生产中经常使用的数据。

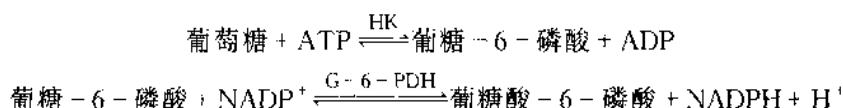
4. 酶活力的测定方法

通过两种方式可进行酶活力测定,其一是测定完成一定量反应所需的时间,其二是测定单位时间内酶催化的化学反应量。测定酶活力就是测定产物增加量或底物减少量,主要根据产物或底物的物理或化学特性来决定具体酶促反应的测定方法,现将最常用的方法介绍如下:

(1) 分光光度法(spectrophotometry) 这一方法主要利用底物和产物在紫外或可见光部分的光吸收的不同,选择一适当的波长,测定反应过程中反应进行的情况。这一方法的优点是简便、节省时间和样品,可检测到 nmol/L 水平的变化。该方法可以连续地读出反应过程中光吸收的变化,已成为酶活力测定中一种最重要的方法。几乎所有的氧化还原酶都可用此法测定,如脱氢酶的辅酶 NAD(P)H 在 340 nm 有吸收高峰,而氧化型则无(图 8-8),因此对于这类酶的活力测定,可以测定 340 nm 处光吸收的变化。

由于分光光度法有其独特的优点,因此把一些原来没有光吸收变化的酶反应,可以通过与一些能引起光吸收变化的酶反应偶联,使第一个酶反应的产物,转变成成为第二个酶的具有光吸收变化的产物来进行测量。例如,己糖激酶(hexokinase, HK)催化 ATP 和葡萄糖的磷酸化反应,它的活力测定可以在含有过量葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G-6-PDH)和 NADP^+ 存在下进行,通过

测定 NADPH 在 340 nm 光吸收值的增加来达到。



上述方法称为酶偶联分析法(enzyme coupling assay)。

(2) 荧光法(fluorometry) 主要是根据底物或产物的荧光性质的差别来进行测定。由于荧光方法的灵敏度往往比分光光度法要高若干个数量级,而且荧光强度和激发光的光源有关,因此在酶学研究中,越来越多地被采用,特别是一些快速反应的测定方法。荧光测定方法的一个缺点是易受其他物质干扰,有些物质如蛋白质能吸收和发射荧光,这种干扰在紫外区尤为显著,故用荧光法测定酶活力时,尽可能选择可见光范围的荧光进行测定。

(3) 同位素测定方法 用放射性同位素的底物,经酶作用后所得到的产物,通过适当的分离,测定产物的脉冲数即可换算出酶的活力单位。该方法的优点是灵敏度极高,可达 fmol 或更高水平。已知六大类酶几乎都可以用此方法测定。通常用于底物标记的同位素有³H、¹⁴C、³²P、³⁵S 和¹³¹I 等。例如测定蛋白激酶的活力,可以通过蛋白激酶催化组蛋白的磷酸化反应,用[γ-³²P]-ATP 作为底物,用三氯乙酸沉淀法把磷酸化的组蛋白和未反应的[γ-³²P]-ATP 分开,然后经洗涤烘干,计数。通过放射性同位素计数的改变就能计算出蛋白激酶的活力。

(4) 电化学方法(electrochemical method)

pH 测定法 最常用的是玻璃电极,配合一高灵敏度的 pH 计,跟踪反应过程中 H⁺ 变化的情况,用 pH 的变化来测定酶的反应速率。也可以用恒定 pH 测定法,在酶反应过程中,所引起的 H⁺ 的变化,用不断加入碱或酸来保持其 pH 恒定,用加入的碱或酸的速率来表示反应速率。用此法可以测定许多酯酶的活力。

另外还使用离子选择电极法测定某些酶的酶活力,用氧电极可以测定一些耗氧的酶反应,如葡糖氧化酶的活力就可用这个方法很方便地测定。

此外还有一些测定酶活力的方法,例如旋光法、量气法、量热法和层析法等,但这些方法使用范围有限,灵敏度较差,只是应用于个别酶活力的测定。

(二) 酶的分离和纯化

酶的分离纯化是酶学研究的基础。研究酶的性质、作用、反应动力学、结构与功能关系、阐明代谢途径,作为工具酶等都需要高度纯化的酶制剂以免除其他的酶或蛋白质的干扰。例如基因工程中所使用的各种工具酶都有高纯度的要求,内切酶中不能含有外切酶,反之一样,否则结果无法判断。再如,要区别一个酶催化两种不同的反应是酶本身的特点还是由于该酶制剂中污染了其他的酶杂质,可以用许多方法进行判断,但是必须是在该酶制剂纯化后才能得出结论。由于使用酶制剂的目的不同,对酶制剂的纯度要求不一样,要根据不同的需要采用不同的方法纯化酶制剂。

已知绝大多数酶是蛋白质,因此酶的分离提纯方法,也就是常用来分离提纯蛋白质的方法。酶的提纯常包括两方面的工作,一是把酶制剂从很大体积浓缩到比较小的体积,二是把酶制剂中大量的杂质蛋白和其他大分子物质分离出去。为了判断分离提纯方法的优劣,一般用两个指标来衡量,一是总活力的回收;二是比活力提高的倍数。总活力的回收是表示提纯过程中酶的损失情况,比活力提高的倍数是表示提纯方法的有效程度。一个理想的分离提纯方法希望比活力和总活力的回收率越高越好,但是实际上常常两者不可兼得。因此考虑分离提纯条件和方法时,不得不在比活力多提高一些和总活力多回收一些之间作适当的选择。

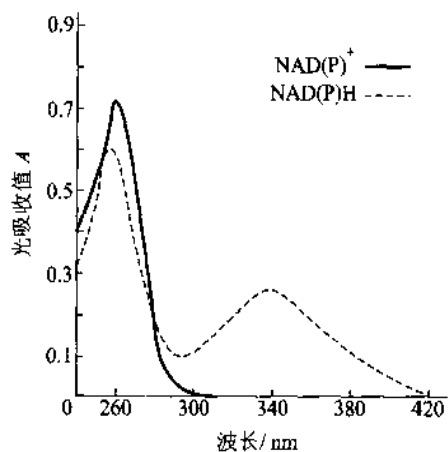


图 8-8 NAD(P)⁺ 和 NAD(P)H 的光吸收曲线

生物细胞产生的酶有两类,一类由细胞内产生然后分泌到细胞外进行作用的酶,称为胞外酶,这类酶大多都是水解酶类。另一类酶在细胞内合成后并不分泌到细胞外,而是在细胞内起催化作用的称为胞内酶,这类酶数量较多。一般而言,胞外酶比胞内酶更易于分离纯化。

分离纯化蛋白质的方法已在第7章详细介绍,这里不再赘述。根据酶的特点在分离纯化中应注意以下几点:

(1) 选材 选择酶含量丰富的新鲜生物材料,一种酶含量丰富的器官或组织往往和含量较低的器官或组织相差上千倍或上万倍。目前常用微生物为材料制备各种酶制剂。

酶的提取工作应在获得材料后立即开始,否则应在低温下保存, $-20 \sim -70^{\circ}\text{C}$ 为宜。或将生物组织做成丙酮粉保存。

(2) 破碎 动物组织细胞较易破碎,通过一般的研磨器、匀浆器、高速组织捣碎机就可达到目的。微生物及植物细胞壁较厚,需要用超声波、细菌磨、冻融、溶菌酶或用某些化学溶剂如甲苯、去氧胆酸钠、去垢剂等处理加以破碎,制成组织匀浆。

(3) 抽提 在低温下,以水或低盐缓冲液,从组织匀浆中抽提酶,得到酶的粗提液。

(4) 分离及纯化 酶是生物活性物质,在分离纯化时必须注意尽量减少酶活性损失,操作条件要温和,全部操作一般在 $0 \sim 5^{\circ}\text{C}$ 间进行。

根据酶大多属于蛋白质这一特性,用一系列分离蛋白质的方法,如盐析、等电点沉淀、有机溶剂分级、选择性热变性等方法可从酶粗提液中初步分离酶。然后再采用吸附层析、离子交换层析、凝胶过滤、亲和层析、疏水层析及高效液相色谱法等层析技术或各种制备电泳技术进一步纯化酶,以得到纯的酶制品。为了得到比较理想的纯化结果,往往采用几种方法配合使用。这要根据不同酶的特点,通过实验选择合适的方法。

盐析法是根据酶和杂蛋白在不同盐浓度的溶液中溶解度的不同而达到分离目的,盐析法简便安全,大多数酶在高浓度盐溶液中相当稳定,重复性好。

有机溶剂分级法分离酶时,最重要的是严格控制温度,要在 $-15 \sim -20^{\circ}\text{C}$ 下进行,冰冻离心得到的沉淀应立刻溶于适量的冷水或缓冲液中,以使有机溶剂稀释至无害的浓度,或将它在低温下透析。

选择性热变性方法是酶分离纯化工作中常用到的一类简便有效的方法,通过热变性可以除去大量杂蛋白。只要控制好 pH 和保温时间,应用得当,就可较大地提高酶的纯度。

使用各种柱层析技术分级分离酶时,要根据所分离酶的性质选择合适的层析介质,柱大小要适当,特别要注意作为洗脱用缓冲液的 pH 和离子强度,要控制一定的流速。

制备电泳多采用凝胶电泳,要选择好电泳缓冲液,根据电泳设备条件选择一定的上样量,电泳后及时将样品透析,冰冻干燥保存。

在过滤或搅拌等操作过程中,要尽量防止泡沫的生成,以避免酶蛋白在溶液的表面变性。

重金属离子对于某些酶有破坏作用,为此制备这类酶时,在提取液中加入少量金属螯合剂 EDTA 或 EGTA 以防止重金属离子对酶的破坏作用。有些含巯基的酶在分离提纯过程中,往往需要加入某种巯基试剂,如巯基乙醇、二巯苏糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)等,可防止酶的巯基在制备过程中被氧化。有时为了防止内源蛋白酶对酶的水解作用,在提取液加入少量蛋白酶抑制剂,如对甲苯磺酰氟(PMSF)、亮抑酶肽(Leupeptin)、抑蛋白酶肽(aprotinin)等。

在酶的制备过程中,每一步骤都应测定留用以及准备弃去部分中所含酶的总活力和比活力,以了解经过某一步骤后酶的回收率,纯化倍数,从而决定这一步的取舍。

总活力 = 活力单位数/ml 酶液 \times 总体积(ml)

比活力 = 活力单位数/mg 蛋白(氮) = 总活力单位数/总蛋白(氮)mg

纯化倍数 = $\frac{\text{每次比活力}}{\text{第一次比活力}}$

回收率(产率) = $\frac{\text{每次总活力}}{\text{第一次总活力}} \times 100\%$

(5) 结晶 通过各种提纯方法获得较纯的酶溶液后,就可能将酶进行结晶。酶的结晶过程进行得很

慢,如果要得到好的晶体也许需要数天或数星期。通常的方法是把盐加入一个比较浓的酶溶液中至微呈混浊为止。有时需要改变溶液的 pH 及温度,轻轻摩擦玻璃壁等方法以便达到结晶的目的。

(6) 保存 通常将纯化后的酶溶液经透析除盐后冰冻干燥得到酶粉,低温下可较长期保存。或将酶溶液用饱和硫酸铵溶液反透析后在浓盐溶液中保存。也可将酶溶液制成 25% 甘油或 50% 甘油分别贮于 25℃ 或 -50℃ 冰箱中保存。注意酶溶液浓度越低越易变性,因此切记不能保存酶的稀溶液。

六、核 酶

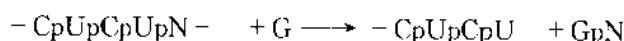
(一) 核酶(ribozyme) 的概念

自从 1926 年 Sumner 首次从刀豆中获得脲酶结晶并证明是蛋白质以来,现已有数千种酶经研究证明是蛋白质。因此长期以来人们一直认为酶的化学本质就是蛋白质。20 世纪 80 年代初期,美国 Cech 和 Altman 各自独立地发现 RNA 具有生物催化功能,从而改变了生物体内所有的酶都是蛋白质的传统观念。这个发现曾被认为是近十多年来生化领域内最令人鼓舞的发现之一。为此 Cech 和 Altman 共同获得了 1989 年度诺贝尔化学奖。

1982 年 Cech 等以原生动嗜热四膜虫(*tetrahymena thermophila*)为材料,研究 rRNA 的基因转录问题时发现:转录产物 rRNA 前体(约 6 400 个 nt)很不稳定,在鸟苷(或 5'-GMP)和 Mg^{2+} 存在下切除自身的 413 个核苷酸的内含子(intron,或称间插序列 intervening sequence, IVS),使两个外显子(exon)拼接起来,变成成熟的 rRNA 分子(图 8-9)。这个催化反应是在完全没有任何蛋白质酶的存在下发生的,称之为自我剪接(self-splicing),证明了 RNA 具有催化功能。为区别于传统的蛋白质催化剂的酶,Cech 给这种具有催化活性的 RNA 定名为 ribozyme(ribonucleic acid enzyme)。1985 年 Cech 等人通过对四膜虫 rRNA 前体自我剪接机制的深入研究,发现前体中的内含子具有催化功能,这个由 395nt 构成的线状 RNA 分子(称为 L19RNA 或 L19IVS),相当于四膜虫 rRNA 前体内含子的 3' 部分(切除 5' 部分 18 个 nt),这个 RNA 分子具有特征的三维结构,已测定了活性部位并进行了改造。在体外(*in vitro*)L19RNA 能催化一系列分子间的反应,例如,在一定条件下 L19RNA 能高度特异地催化寡聚核糖核苷酸底物的切割和连接。五聚胞苷酸(C_5 , pentacytidylate)能被 L19RNA 转化为或长或短的寡聚体,特别是能将 C_5 降解成 C_4 和 C_3 ,而同时形成 C_6 和更长的寡聚体(图 8-10)。因此说明 L19RNA 既有 RNA 酶活性,又有 RNA 聚合酶(RNA polymerase)活性。

这种 L19RNA 对 C_5 的作用比对 U_5 快得多,而对 A_5 和 G_5 则毫无作用。它遵循 Michaelis-Menten 动力学。对于 C_5 ,其 K_m 为 $42 \mu\text{mol/L}$ 和 k_{cat} 为 0.033s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 $7.9 \times 10^2\text{s}^{-1}\cdot\text{L}$ 与 RNaseA 类似。已发现脱氧 C_5 为 C_5 的竞争性抑制剂, K_i 为 $260\mu\text{mol/L}$,证明底物中的 2'-OH 是必需的。这样 L19RNA 表现出了经典的酶促催化的几个标志:高度的底物专一性, Michaelis-Menten 动力学和对竞争性抑制剂的敏感性。

1992 年 Piccirilli 等发现 L19RNA 具有氨酰酯酶(aminoacyl esterase)的活性,催化氨酰酯的水解(图 8-11),这是氨酰-tRNA 合成酶的逆反应。另外,发现 L19RNA 还有 RNA 限制性内切酶作用,如:



L19RNA 作用底物均是多聚嘧啶核苷酸,因此推测该 RNA 催化剂的活性部位是富含鸟苷酸的寡聚嘌呤核苷酸。催化剂和底物间通过碱基配对形成非共价键发生作用。已研究证明 L19RNA 分子的第 22~27 位的 5'-GGAGGG-3' 是其催化中心。改造这一序列,可以得到人工 RNA 催化剂。如 3' 端无 G,丧失反应能力,加入 G 后则恢复正常。

* ribozyme 一词于 1982 年由 Cech 首先提出。他的中文译名有几个尚不统一,如核酶、核糖酶、类酶 RNA、酶性 RNA、酶 RNA 等;还有人建议“酶”命名。直到目前,其译名尚无定论。我们暂时采用核酶的译名。

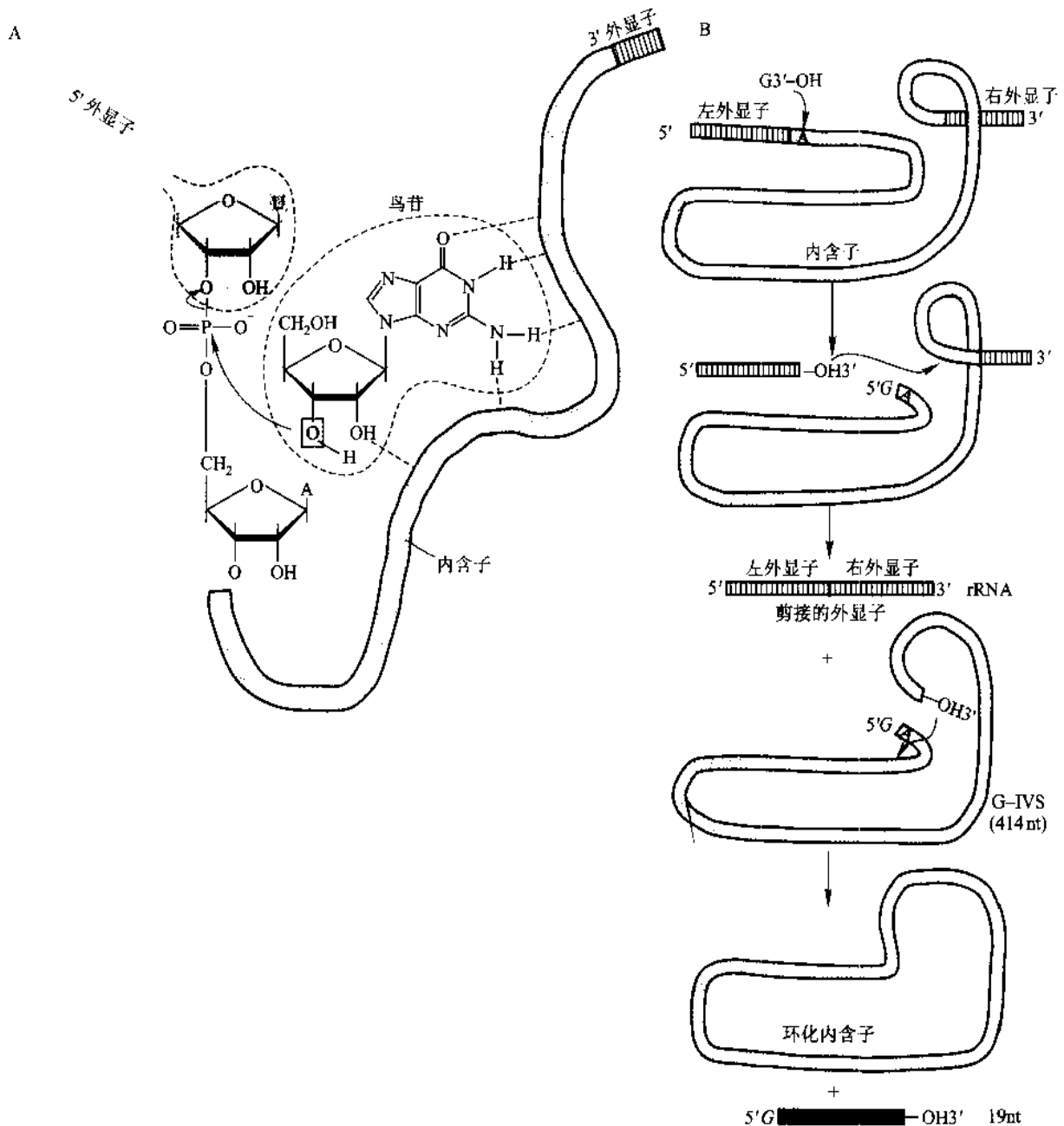


图 8-9 四膜虫 tRNA 成熟中 RNA 的剪接

A. 鸟苷介导的反应包括四膜虫 tRNA 内含子的自动催化切除; B. 整个剪接过程

1997 年 Zhang 和 Cech 得到了一组直接催化肽链生成的人造 RNA 分子,证明了 RNA 具有肽基转移酶活性。表明 RNA 与蛋白质生物合成有关。

RNase P 是催化 tRNA 前体 5' 端成熟的内切核酸酶,是由 RNA(称为 MIRNA,含 377 个 nt)和蛋白质(称为 C₅ 蛋白,含 119 个氨基酸残基)两部分组成,前者占全酶总重量的 77%,后者占 23%。1983—1984 年间 Altman 和 Pace 合作发现,用层析或电泳从 *E. coli* 的 RNase P 中分离出来的 MIRNA 组分,在高浓度 Mg²⁺ (20mmol/L 以上)存在下,可显示出催化 tRNA 前体成熟的活性,MIRNA 催化 *E. coli* tRNA^{phe} 前体的 K_m 值与 RNase P 的(5×10⁻¹mol/L)相同,k_{cat} 值为 33min⁻¹,k_{cat}/K_m 接近 10⁷ mol·L⁻¹·s⁻¹。而分离出的 C₅ 蛋白在任何条件下都无催化活性,只起维护 RNA 构象的作用,而真正的催化剂是 MIRNA。将 MIRNA 的基因进行体外转录,其转录产物 RNA 具有催化 tRNA 前体 5' 端成熟的活性,这一研究结果直接证明了 RNA 确有催化功能。但尚未测出真核生物 RNase P 的 RNA 具有催化活性。

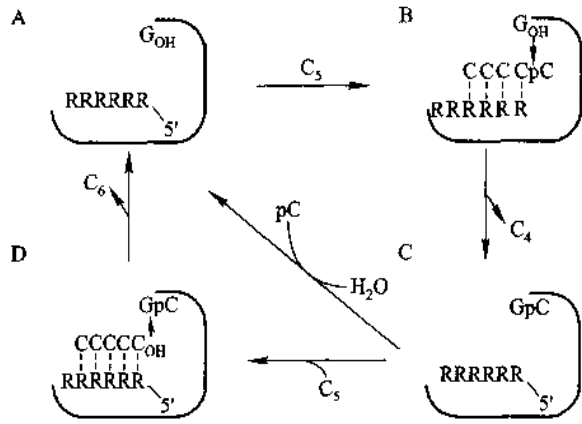


图 8-10 L19RNA 的催化作用

A. 单独的酶(L19RNA) B. C₅ 通过氢键与酶结合,末端的 pC 以共价键与酶的末端 G 结合。余下的 C₄ 部分可以自由地与酶结合 C. GpC 的水解使酶恢复到原来状态(C→A) D. 另一方式是,共价结合 pC 被另一 C₅ 分子攻击,形成 C₆ 分子(C→D)

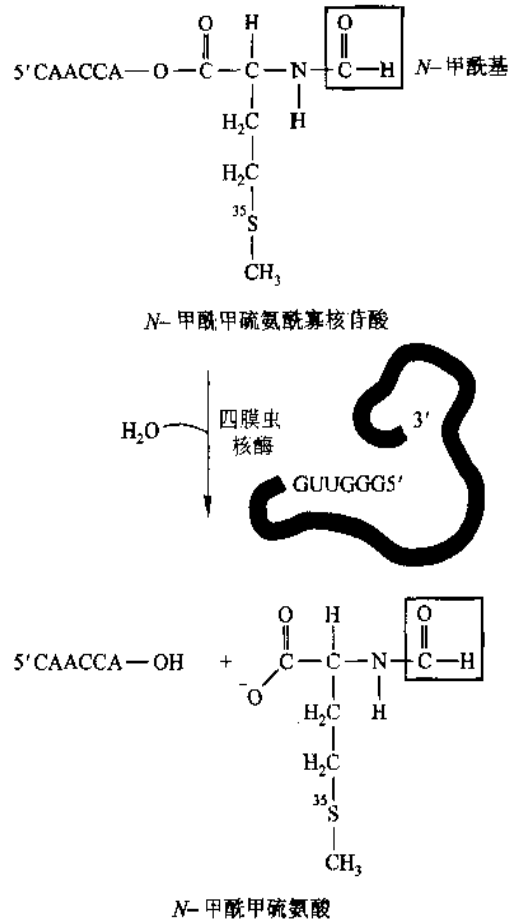


图 8-11 四膜虫核酶的氨酰酯酶活性

³⁵S-标记的 N-甲酰甲硫氨酸通过酯键与 RNA 寡核苷酸(5'-CAACCA)3'-OH 末端连接。核酶能够催化羧酸酯及磷酸酯的水解。注意氨酰 RNA 酯水解的逆反应是氨酰 RNA 酯的合成(这是蛋白质合成中氨基酸提供给核糖体的化学形式)。该反应提示了,由原始的 RNAs 能够催化形成氨酰-tRNAs 类似物

另一个蛋白质-RNA 复合物酶中 RNA 单独具有催化功能的例子是兔肌 1,4- α -葡糖分支酶(1,4- α -dextran branching enzyme),该酶中 RNA 共有 31 个核苷酸残基(31nt),其中含 8 种 10 个修饰成分,该 RNA 催化的底物是葡聚糖而非 RNA,这是一个很奇特的核酶,有待深入研究。1990 年还发现了以 DNA 为底物的核酶。

(二) 核酶的种类

按作用底物自然界现有催化分子内反应(*in cis*)(如自我剪接和自我剪切)的核酶,也有催化分子间(*in trans*)反应(如原核生物 RNase P 中的 RNA)的核酶。催化分子内反应的核酶又可分为自我剪接(*self-splicing*)核酶和自我剪切(*self-cleavage*)核酶两类。自我剪接有两种方式,是由于存在两类不同内含子 RNA(IVS)决定的。I 型 IVS 催化自我剪接需要鸟苷(G)和 Mg²⁺ 参与,结果得到剪接产物 G-IVS。II 型 IVS 催化自我剪接与 I 型不同,并不需要鸟苷参与。这类自我剪接是由 II 型 IVS 的特定结构决定的,并类似于细胞核 mRNA 前体的剪接方式。现已证实,无论 I 型或 II 型 IVS 的自我剪接反应都是可逆的,表明他们都能催化 IVS 移位和实现 RNA 重组。

自我剪切与自我剪接不同,后者包含剪切与连接两个步骤。1984 年美国 Apirion 曾报道,一种 T4 噬菌体 RNA 前体在没有别的酶参与下能进行自我剪切,将 215nt 的转录产物剪切成 139nt 的成熟 RNA 和另一 76nt 的片段。已知能进行自我剪切的 RNA 分子还有丁型肝炎病毒(HDV)RNA、烟草环斑病毒(sTRSV)等。剪切是转录后加工方式之一,是基因复制和表达所必需的。

Symons 在比较研究了一些植物类病毒、拟病毒和卫星病毒自我剪切规律后,于1986年提出锤头结构(hammer head structure)的二级结构模型,由13个保守核苷酸碱基和3个螺旋区构成(图8-12),是较小的核酶。自我剪切活性依赖于结构和构象的完整性,只要满足锤头结构的二级结构和13个核苷酸的保守序列,剪切反应就会在锤头结构右上方的GUN序列的3'端自动发生。1989年Koizumi等证明只要保证其中11个nt的保守序列不变,剪切反应就可发生。1992年报道小至10nt以及3nt的核酶即具有催化活性。例如:在 Mn^{2+} 存在下,UUU可切割(5')G↓AAA(3'),UUU便是3nt的ribozyme。有人报道5-羟基胞苷能催化氧化还原反应,扩展了核酶的定义。

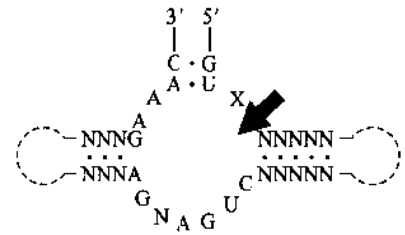


图8-12 核酶锤头结构

发夹结构核酶在负链sTRSV RNA中发现,它不同于正链sTRSV RNA和其他有关病毒RNA的自我剪切结构。丁型肝炎病毒(HDV)和链孢霉线粒体(VS)RNA自我剪切的結構特点,完全不同于锤头结构和发夹结构,表明自然界存在多式多样自我剪切加工方式。

催化分子间反应的核酶如前面已介绍过的L19RNA具有多种酶活性,可催化多种分子间反应。RNase P的MIRNA具有催化tRNA 5'端成熟的功能。还可利用定点突变的方法得到具有催化RNA分子间反应的核酶。

(三) 核酶的研究意义及应用前景

按已知自我剪切原理,剪切是高度专一的,把自我剪切转换成分子间(*in trans*)剪切,利用锤头结构就可以设计出自然界不存在的各种核酶。锤头结构由两部分组成,一部分是设计的核酶,另一部分是其底物。利用锤头结构核酶的RNA限制性内切酶活性,被设计定点切割tRNA、5S rRNA、28SRNA、mRNA、病毒RNA等任何一种靶RNA分子。再如1989年Hampl等提出的发夹结构核酶模式,在此模式里,含有GUC序列的RNA都可作为底物,再根据此底物序列设计出相应的核酶,共同组成一个发夹结构,剪切反应发生在底物识别序列GUC的5'端。

现有研究表明,核酶必须是RNA分子,可被体内RNase所破坏,从而限制了核酶的直接使用。根据锤头结构或发夹结构原理设计核酶基因,构建于特定的表达载体,在不同细胞内表达已经成功。结果表明核酶基因导入细胞或体内可以阻断基因表达,用作抗病毒感染,抗肿瘤的有效药物,前景是诱人的,应用将是广泛的。核酶基因导入已获得美国食品与药品管理局(FDA)批准,即将在临床上使用。我国已在体外用核酶成功地剪切了乙肝、甲肝病毒、蚕核多角体病毒及MTV等核酸片段。

在研究了核酶催化氨酯的水解可逆反应和转移反应后指出,核酶很可能具有氨酰tRNA合成酶和肽基转移酶活性,这些反应均与蛋白质生物合成有关,表明RNA在翻译过程和核糖体功能中起着非常重要的作用,问题的突破将是对分子生物学的重要贡献。

也应指出,核酶与蛋白质酶的差异不仅在于化学本质的不同,同时两者的催化活性也相差很大。已知核酶的转换数在0.1~5之间,比大多数蛋白质酶低几个数量级。从进化角度考虑,生物催化剂从核酶到蛋白质酶的转变,伴随着生物代谢高效率和生命现象的更趋复杂。

图8-13表示生物催化分子进化的可能过程,它表示生物催化功能从RNA到蛋白质的转移。现在,主要的生物催化剂是蛋白质-辅酶(辅基)。

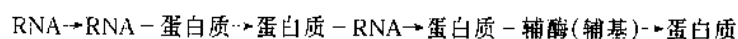


图8-13 生物催化分子进化的可能过程

具有催化功能RNA的重大发现,表明RNA是一种既能携带遗传信息又有生物催化功能的生物分子。因此很可能RNA早于蛋白质和DNA,是生命起源中首先出现的生物大分子,而一些有酶活性的内含子可能是生物进化过程中残存的分子“化石”。酶活性RNA的发现,提出了生物大分子和生命起源的新概念,无疑将促进对生物进化和生命起源的研究。

七、抗体酶

抗体酶(abzyme)是20世纪80年代后期才出现的一种具有催化能力的蛋白质,其本质上是免疫球蛋白,但是在易变区被赋予了酶的属性,所以又称为“催化性抗体”(catalytic antibody)。抗体酶是生物学与化学的研究成果在分子水平上交叉渗透的产物,是将抗体的多样性和酶分子的巨大催化能力结合在一起的蛋白质分子设计的新方法。人们早就注意到,酶与抗体这两种蛋白质之间尽管功能不同,但存在着惊人的相似之处,尤其是它们在与各自的配基特异的结合过程中,遵守同样的方式并表现出相似的动力学行为。人们不禁要问:抗体分子极其多样的结合专一性能被用来产生新的酶吗?催化作用的实质是专一结合的相互作用形成过渡态,因此,用过渡态的类似物作为半抗原(hapten)免疫动物将有可能产生有催化活性的抗体。这一设想已得到证实。

1986年Schultz与Lerner两个实验室同时在美国*Science*杂志发表论文,报道他们成功地得到了具有酶催化活性的抗体。这标志着抗体酶的研究进入了一个新阶段。Schultz等人认为对硝基苯酚磷酸胆碱酯(PNPPC)作为相应羧酸二酯水解反应的过渡态类似物(图8-14),推测用这个类似物作为半抗原诱导产生的单克隆抗体可能对羧酸二酯的水解反应有催化活性。通过对单克隆抗体的筛选,找到一株MOPC167单抗,可使水解反应速率加快 1.2×10^4 倍, K_m 值为 $208 \mu\text{mol/L}$, k_{cat} 值为 $6.7 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$,其 k_{cat}/K_m 是 $32.2 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。以后又筛选到另一

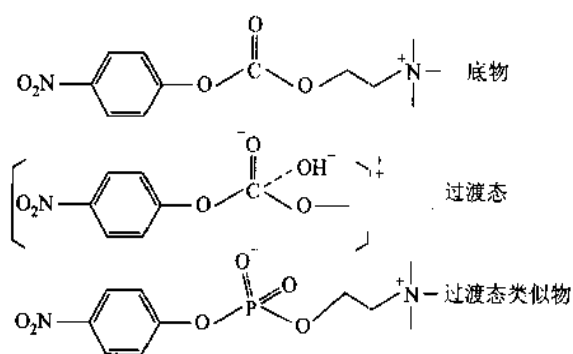
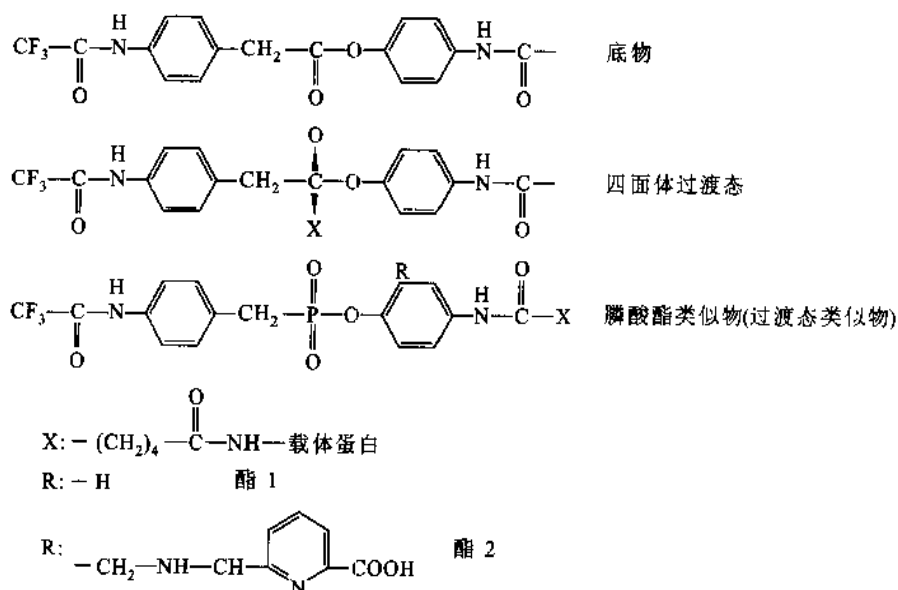


图8-14 酯酶的底物、过渡态及过渡态类似物的结构

株抗体酶T15,可以使反应加快 9.2×10^3 倍。证明该催化反应的动力学行为满足米氏方程,具有底物特异性及pH依赖性酶反应的特征。随后还初步确定了参与催化反应的氨基酸残基。同时证实,该抗体酶具有抗原结合位点的 F_{ab} 段单独具有全酶一样的催化效率。

Lerner等人,从金属肽酶的研究成果中得到启发,合成了一个含有吡啶甲酸的磷酸酯类似物为半抗原诱导产生一个单抗6D4,用来催化不含吡啶甲酸的相应羧酸酯化合物的水解反应,使反应加速近 10^3 倍,并表现出底物专一性和对介质pH的依赖性等。相关结构如下:

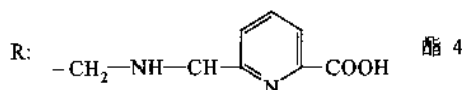


酯1和酯2用于免疫动物产生的单克隆抗体可以催化碳酸酯的水解反应。

X: CH_3

R: $-\text{H}$

酯 3



而酯 3 和酯 4 是抗体的抑制剂,竞争性抑制抗体的催化。酯 3 和酯 4 的抑制常数分别是 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.16 \mu\text{mol/L}$ 。

铁螯合酶(ferrochelatase)是血红素生物合成中最终端的酶,催化 Fe^{2+} 插入原卟啉区,为了 Fe^{2+} 的插入,平面状卟啉必须发生弯曲。而 *N*-甲基原卟啉由于 *N*-烷基化使卟啉发生弯曲,因此该化合物类似反应中的过渡态,也是铁螯合酶的强烈抑制剂。Schultz 等用 *N*-甲基原卟啉诱导产生抗体,可以催化平面状卟啉的金属螯合反应。所得抗体每小时每个抗体分子可使 80 个卟啉分子金属螯合,仅比金属螯合酶速率低 10 倍,非催化反应比抗体酶催化的反应慢 2 500 倍。相关结构式如图 8-15 所示。

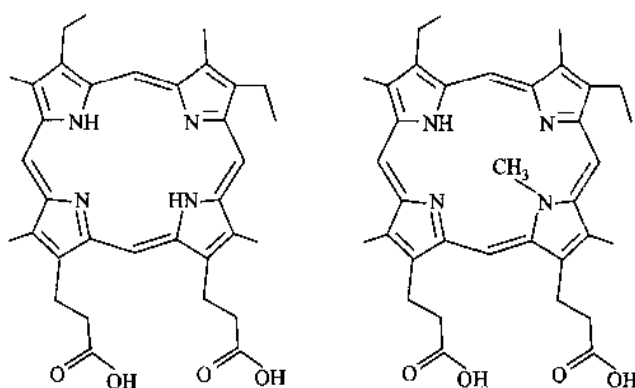


图 8-15 原卟啉及 *N*-甲基原卟啉结构

以上 3 个例子说明了抗体酶研制的原理及途径,为开展抗体酶的研究奠定了基础。

近年来,有关抗体酶的研究得到迅速发展,在有些情况下,抗体酶催化反应速率达到非催化速率的 10^7 倍。反应类型不仅是上面讨论过的水解反应和金属螯合反应。现已制备出可以催化酰胺键生成反应、光诱导裂解及聚合反应、氧化还原反应、脱羧反应、转酯反应、分子重排反应以及立体专一性抗体酶。抗体酶所催化的反应类型已达数十种之多。抗体酶的研究不仅有重要的理论价值,为酶的过渡态理论提供了有力的实验证据,而且抗体酶有令人鼓舞的应用前景。如果能制备出按照人们的设计对特定的肽键进行水解的抗体酶,则将为蛋白质结构的研究提供新的手段。在医学上这种抗体酶将有可能用来专一地破坏病毒蛋白质及专一地清除心血管病人血管壁上的血液凝块。正研究设计降解可卡因的催化性抗体,用于帮助治疗可卡因毒瘾。若将具有立体专一性的抗体酶用于制药工业,它有助于避免化学合成中遇到的对映体拆分的难题。抗体酶的固定化已取得成功,具有酯酶活力的抗体酶已用于生物传感器的制造上。抗体酶技术已受到高度重视,抗体酶的定向设计开辟了一个不依赖于蛋白质工程的真正酶工程的领域。

八、酶工程简介

酶的开发和利用是现代生物技术的重要内容。酶工程(enzyme engineering)是在 1971 年第一届国际酶工程会议上才得到命名的一项新技术。酶工程主要研究酶的生产、纯化、固定化技术、酶分子结构的修饰和改造以及在工农业、医药卫生和理论研究等方面的应用。天然酶在开发和应用中受到一定限制,一是酶的不稳定性;二是分离纯化难,成本高,价格贵。由于上述原因,尽管已被发现和鉴定的酶有数千种,但是目前国际上工业用和研究用的商品酶的种类也仅数百种。为了解决酶的应用和新酶开发,现采用两种方法。一是化学方法,即通过对酶的化学修饰或固定化处理,改善酶的性质以提高酶的效率和降低成本,

甚至通过化学合成法制造人工酶;另一种是用基因重组技术生产酶以及对酶基因进行修饰或设计新基因,从而生产性能稳定,具有新的生物活性及催化效率更高的酶。因此酶工程可以说是把酶学基本原理与化学工程技术及基因重组技术有机结合而形成的新型应用技术。根据研究和解决问题的手段不同将酶工程分为化学酶工程和生物酶工程。

(一) 化学酶工程

化学酶工程也可称为初级酶工程(primary enzyme engineering),是指天然酶、化学修饰酶、固定化酶及人工模拟酶的研究和应用。

1. 天然酶

工业用酶制剂多属于通过微生物发酵而获得的粗酶,价格低,应用方式简单,产品种类少,使用范围窄。例如,洗涤剂、皮革生产等用的蛋白酶;纸张制造、棉布退浆等用的淀粉酶;漆生产用的多酚氧化酶;乳制品用的凝乳酶等。天然酶的分离纯化随着各种层析技术及电泳技术的发展,得到长足的进展,目前医药及科研用酶多数从生物材料中分离纯化得到。

2. 化学修饰酶

通过对酶分子的化学修饰可以改善酶的性能,以适用于医药的应用及研究工作的要求。化学修饰的途径,可以通过对酶分子表面进行修饰,亦可对酶分子的内部修饰。其主要方法有:

(1) 化学修饰酶的功能基 最经常修饰的氨基酸残基既可是亲核的(Ser、Cys、Thr、Lys、His),也可是亲电的(Tyr、Trp),或者是可氧化的(Tyr、Trp、Met)。例如通过脱氨基作用,酰化反应可修饰抗白血病药物天冬酰胺酶(asparaginase)的游离氨基,使该酶在血浆中的稳定性提高若干倍。再如,将 α -胰凝乳蛋白酶(α -chymotrypsin)表面的氨基修饰成亲水性更强的一 NHCH_2COOH ,使酶抗不可逆热失活的稳定性在 60°C 时提高1 000倍,在更高温度下,稳定化效应更好,以致难以在同一温度下与天然酶比较。

(2) 交联反应 用某些双功能试剂能使酶分子间或分子内发生交联反应。如将人 α -半乳糖苷酶A(α -galactosidase A)经交联反应修饰后,其酶活性比天然酶稳定,对热变性与蛋白质水解酶的稳定性也明显增加。用戊二醛将胰蛋白酶和碱性磷酸酶(basic phosphatase)交联而成杂化酶,可作为部分代谢途径的有用模型,测定复杂的生物结构。若将两种大小、电荷和生物功能不同的药用酶交联在一起,则有可能在体内将这两种酶同时输送到同一部位,提高药效。

(3) 大分子修饰作用 可溶性高分子化合物如肝素(heparin)、葡聚糖(dextran)、聚乙二醇(polyethylene glycol)可修饰酶蛋白的侧链,提高酶的稳定性,改变酶的一些重要性质。如 α -淀粉酶(α -amylase)与葡聚糖结合后热稳定性显著增加,在 65°C 结合酶的半寿期为63 min,而天然酶的半寿期只有2.5 min。再如用葡聚糖修饰SOD,聚乙二醇修饰天冬酰胺酶,肝素、葡聚糖或聚乙二醇修饰尿激酶,修饰过的酶在血液中的半寿期无一例外的成几倍、几十倍的增长,抗原性消失,耐热性提高,并具有耐酸、耐碱和抗蛋白酶的作用。还有报道,将聚乙二醇联到脂肪酶(lipase)、胰凝乳蛋白酶上,所得产物溶于有机溶剂,可在有机溶剂中有效地起催化作用。

3. 固定化酶

固定化酶(immobilized enzyme)是20世纪60年代发展起来的一种新技术。通常酶催化反应都是在水溶液中进行的,而固定化酶是将水溶性酶用物理或化学方法处理,使之成为不溶于水的,但仍具有酶活性的状态。在1971年第一届国际酶工程会议上,正式建议采用“固定化酶”的名称。酶的固定化方法大致分为物理法和化学法,物理法有吸附法和包埋法;化学法有共价偶联法和交联法(图8-16)。经过固定化的酶不仅仍具有高的催化效率和高度专一性,而且固定化酶提高了对酸碱和温度的稳定性,增加了酶的使用寿命;可简化工艺,反应后易与反应产物分离,减少了产物分离纯化的困难,而提高了产量和质量。由于它具有上述优点,固定化酶已成为酶应用的一种主要形式,据报道,已有100多种酶进行了固定化。目前,固定化酶已经在工农业、医药、分析、亲和层析、能源开发、环保和理论研究等方面得到了广泛应用,取得了丰硕成果。例如我国已用固定化氨基酰化酶拆分DL-氨基酸,用固定化的葡糖异构酶生产高果糖玉米糖浆,用固定化酶法生产脂肪酸,半合成新青霉素等。自60年代以来,为了检测目的,制出了附有固定化酶

的酶电极,其中应用的电极部分包括各种离子电极、氧电极和 CO_2 电极等,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 80 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因子固定化,可制作特定的生物反应器。近年来,以固定化微生物组成的生物反应器已获得工业应用。例如固定化酵母细胞反应器连续发酵生产酒精、啤酒,该技术我国于 1982 年即研制成功并投入生产。现已可用固定化细胞生产有机溶剂、有机酸、氨基酸、抗菌素、单克隆抗体和酶等。生物传感器是利用生物高分子物质来检测特殊化合物的一种电子元件,利用酶组成的生物传感器已经使用 10 多年。它们由固定化酶和离子敏感型电极组成,可以用于测定由酶催化的反应底物。生物传感器工作时非常迅速,非常灵敏。近年来,在用酶制造生物传感器的基础上,又发展了利用微生物细胞或动、植物细胞组织形成的生物传感器。活细胞的利用,为生物传感器的再生提供了可能。生物传感器在近期必将获得更广泛的应用和发展。

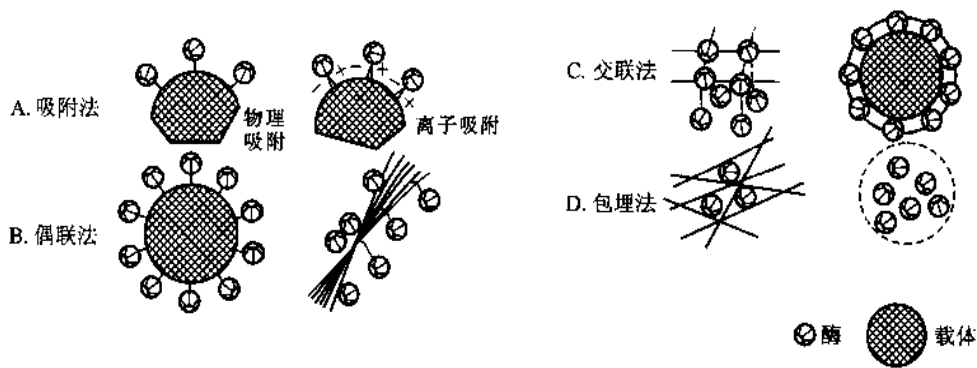


图 8-16 固定化酶制备方法

4. 人工模拟酶

在深入了解酶的结构和功能以及催化作用机制的基础上,近 10 多年来,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人工酶(artificial enzyme)催化剂。例如将电子传递催化剂 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3]^{3+}$ 与巨头鲸肌红蛋白结合,产生了一种“半合成的无机生物酶”,这样把能与 O_2 结合,而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,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,而是一些有机物。它们通过并入酶的催化基团与控制空间构象,从而像天然酶那样专一性地催化化学反应。利用环糊精成功地模拟了胰凝乳蛋白酶、RNase、转氨酶、碳酸酐酶等。例如 1985 年 Bender 等人利用 β -环糊精的空穴作为底物的结合部位,以连在环糊精侧链上的羧基、咪唑基及环糊精自身的一个羟基共同构成催化中心,制成了名为 β -benzyme 的胰凝乳蛋白酶模拟酶(图 8-17)。实验表明,模拟酶催化简单酯反应的速率与天然酶相近,但模拟酶的热稳定性与 pH 稳定性大大优于天然酶,模拟酶活力至少在 80°C 仍能保持,在 pH 2~13 的大范围内都是稳定的。1993 年曾报道了人工合成了两种“肽酶”(pepzyme),每种仅含有 29 个氨基酸,但分别具有胰凝乳蛋白酶及胰蛋白酶的催化活性。人工模拟酶的研究虽已取得一些可喜的成果,但是达到实际应用还有很长的距离。

(二) 生物酶工程

生物酶工程是酶学和以 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,亦可称为高级酶工程(advanced enzyme engineering)。主要包括 3 个方面内容:用基因工程技术大量生产酶(克隆酶);对酶基因进行修饰,产生遗传修饰酶(突变酶);设计新酶基因,合成自然界不曾有的新酶(图 8-18)。

酶基因的克隆和表达技术的应用,已有可能克隆各种天然的酶基因。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或酵母中,通过发酵方法可以大量地生产所需要的酶。目前,在酶生产的基因工程研究中,已成功地实现 α -淀粉酶基因的克隆,使产酶能力提高 3~5 倍,这是第一个获得

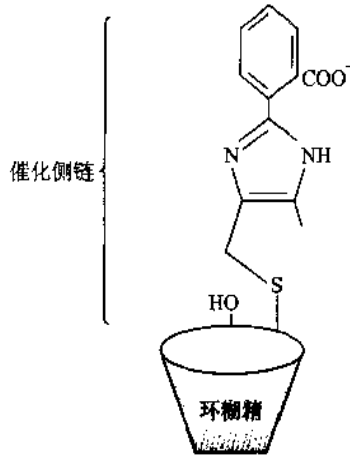


图 8-17 人工模拟酶 β benzoylase, 有一小的侧链连接到环糊精上, 可模拟胰凝乳蛋白酶

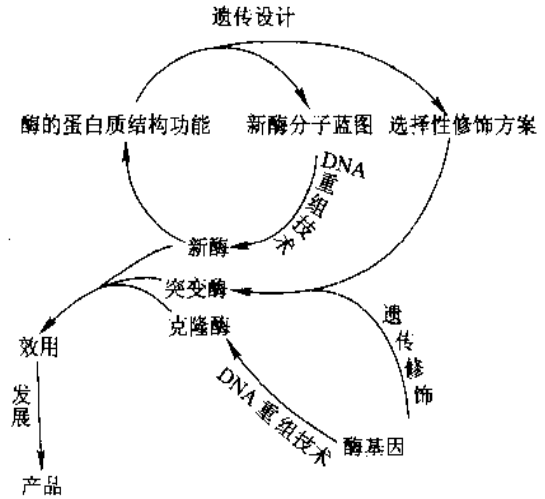


图 8-18 生物酶工程示意图

美国食品药品监督管理局(FDA)批准用基因工程菌生产的酶制剂。此外青霉素酰胺酶基因和耐热菌亮氨酸合成酶基因已在 *E. coli* 中表达成功。利用 DNA 重组技术, 提高葡萄糖异构酶、木糖异构酶、纤维素酶、糖化酶等酶活力的研究, 已取得初步成果。在医用酶方面, 继第一代溶血栓剂尿激酶、链激酶基因克隆表达以后, 现在第二代溶血栓剂尿激酶原及组织纤溶酶原激活物(tPA)表达成功, 已投入生产。据报道有近 200 种酶的基因已经克隆成功, 其中一些已进行了高效表达。

20 世纪 70 年代以来, 被称为第二代遗传工程的蛋白质工程(protein engineering)迅速兴起, 使得人们有可能根据蛋白质结构的研究结果, 按照既定的蓝图, 利用定点诱变技术, 改造编码蛋白质基因中的 DNA 顺序, 经过寄主细胞的表达, 能够产生被改造的具有特定氨基酸顺序、高级结构、理化性质和生物功能的新蛋白质。目前, 蛋白质工程技术在生产酶(遗传修饰酶)方面的应用, 已取得令人鼓舞的成果。通过对酶基因的遗传修饰, 可改变酶的催化活性、底物专一性、最适 pH; 改变含金属酶的氧化还原能力; 改变酶的别构调节功能; 改变酶对辅酶的要求; 可提高酶的稳定性。表 8-10 列举了一些基因遗传修饰酶。

表 8-10 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	
枯草杆菌蛋白酶	222	Met → Lys	最适 pH 由 8.6 变为 9.6 水解邻近 Glu 肽键能力提高 500 倍
	166	Gly → Lys	
T4 溶菌酶	3	Ile → lys	提高耐热性
天冬氨酸氨甲酰转移酶	165	Tyr → Ser	失去别构调节性质
胰蛋白酶	216	Gly → Ala	提高 Arg 底物的专一性 提高 Lys 底物的专一性
	226	Gly → Ala	
二氢叶酸还原酶	27	Asp → Asn	活性降低为正常酶的 0.1%
酪氨酰-tRNA 合成酶	51	Thr → Ala	对底物 ATP 的亲 和力提高 100 倍
	51	Thr → Pro	
β 内酰胺酶	70~71	Ser·Thr → Thr·Ser	完全失活 恢复活性
	70~71	Thr·Ser → Ser·Ser	

DNA合成技术的迅速发展为酶的遗传设计开创了令人鼓舞的美好前景。只要有遗传设计蓝图,就能人工合成酶基因。酶遗传设计的主要目的是创造优质酶,用于生产昂贵特殊的药品以满足人类的特殊需要。现在的关键问题是如何设计超自然的优质酶基因,即如何绘制优质酶基因的遗传设计图案。但随着计算机技术和化学理论的进步和发展,酶或其他生物大分子的模拟在精确度、速率及规模上都会得到大的改善。相信遗传设计新酶的研究在不久的将来,会受到人们的关注,并取得进展。

酶工程作为现代生物工程的支柱,有着广阔的发展前景。不论是早期发展的化学酶工程还是近年来发展起来的生物酶工程,随着酶学、分子生物学基础理论的研究,化学工程技术和基因工程技术的不断发展和更新,酶工程必将发展成为一个更大的生物技术产业。

提 要

生物体内的各种化学变化都是在酶催化下进行的。酶是由生物细胞产生的,受多种因素调节控制的具有催化能力的生物催化剂。与一般催化剂相比有其共同性,但又有显著的特点,酶的催化效率高,具有高度的专一性,酶的活性受多种因素调节控制,酶作用条件温和,但不稳定。

酶的化学本质除有催化活性的RNA分子之外都是蛋白质。根据酶的化学组成可分为单纯蛋白质和缀合蛋白质两类。缀合蛋白质是由不表现酶活力的脱辅酶及辅因子(包括辅酶、辅基及某些金属离子)两部分组成。脱辅酶部分决定酶催化的专一性,而辅酶(或辅基)在酶催化作用中通常起传递电子、原子或某些化学基团的作用。

根据各种酶所催化反应的类型,把酶分为六大类,即氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和连接酶类。按规定每种酶都有一个习惯名称和国际系统名称,并且有一个编号。

酶对催化的底物有高度的选择性,即专一性。酶往往只能催化一种或一类反应,作用于一种或一类物质。酶的专一性可分为结构专一性和立体异构专一性两种类型。用“诱导契合说”解释酶的专一性已被人们所接受。

酶的分纯化是酶学研究的基础。已知大多数酶的本质是蛋白质,因此用分离纯化蛋白质的方法纯化酶,不过要注意选择合适材料,操作条件要温和。在酶的制备过程中,每一步都要测定酶的活力和比活力,以了解酶的回收率及提纯倍数,以便判断提纯的效果。酶活力是指在一定条件下酶催化某一化学反应的能力,可用反应初速率来表示。测定酶活力即测酶反应的初速率。酶活力大小来表示酶含量的多少,通常用酶的国际单位数表示。每mg蛋白质所含酶的活力单位数叫做酶的比活力,代表酶的纯度。

20世纪80年代初Cech和Altman分别发现了某些RNA分子具有催化作用,定名为核酶(ribozyme)。有催化分子内和分子间反应的核酶。具有催化功能RNA的发现,开辟了生物化学研究的新领域,提出了生命起源的新概念。根据发夹状或锤头状二级结构原理,可以设计出各种人工核酶,用作抗病毒和抗肿瘤的防治药物将会有良好的应用前景。

抗体酶是一种具有催化能力的蛋白质,本质上是免疫球蛋白,但是在易变区赋予了酶的属性。根据酶催化的过渡态理论,设计各种过渡态类似物作为半抗原免疫动物,筛选具有催化活性的单抗。抗体酶具有酶的一切性质。现已研制出催化多种反应的抗体酶。抗体酶的发现,不仅为酶的过渡态理论提供了有力的实验证据,而且抗体酶将会得到广泛的应用。

酶工程是将酶学原理与化学工程技术及基因重组技术有机结合而形成的新型应用技术,是生物工程的支柱。根据研究和解决问题的手段不同将酶工程分为化学酶工程和生物酶工程。随着化学工程技术及基因工程技术的发展,酶工程发展更为迅速,必将成为一个很大的生物技术产业。

习 题

1. 酶作为生物催化剂有哪些特点?
2. 何谓酶的专一性?酶的专一性有哪几类?如何解释酶作用的专一性?研究酶的专一性有何意义?
3. 酶的活性受哪些因素调节,试说明之。

4. 辅基和辅酶有何不同? 在酶催化反应中起什么作用?
5. 酶分哪几大类? 举例说明酶的国际系统命名法及酶的编号。
6. 什么叫酶的活力和比活力? 测定酶活力应注意什么? 为什么测定酶活力时以测定初速率为宜, 并且底物浓度远远大于酶浓度?
7. 什么叫核酶和抗体酶? 它们的发现有什么重要意义?
8. 解释下列名词: (1)生物酶工程 (2)固定化酶 (3)活化能 (4)酶的转换数 (5)寡聚酶 (6)Kat 单位 (7)酶偶联分析法 (8)诱导契合说 (9)反馈抑制 (10)多酶复合体
9. 用 AgNO_3 对在 10 ml 含有 1.0 mg/ml 蛋白质的纯酶溶液进行全抑制, 需用 $0.342 \mu\text{mol AgNO}_3$, 求该酶的最低相对分子质量。[29.2×10^3]
10. $1 \mu\text{g}$ 纯酶 ($M_r: 92 \times 10^3$) 在最适条件下, 催化反应速率为 $0.5 \mu\text{mol}/\text{min}$, 试计算:
 - (1) 酶的比活力。[$500 \text{ U}/\text{mg}$] (2) 转换数。[766.7 s^{-1}]
11. 1 g 鲜重的肌肉含有 40 单位的某种酶, 其转换数为 $6 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, 试计算该酶在细胞内的浓度(假设新鲜组织含水 80%, 并全部在胞内)。[$8.33 \times 10^{-7} \text{ mol}/\text{L}$]
12. 焦磷酸酶可以催化焦磷酸水解成磷酸, 其相对分子质量为 120×10^3 , 由 6 个相同亚基组成。纯酶的 V_{max} 为 $2800 \text{ U}/\text{mg}$ 酶。它的一个活力单位规定为: 在标准测定条件下, 37°C , 15 min 内水解 $10 \mu\text{mol}$ 焦磷酸所需要的酶量。问:
 - (1) 每 mg 酶在每秒钟内水解多少 mol 底物? [$3.11 \times 10^{-5} \text{ mol}$]
 - (2) 每 mg 酶中有多少 mol 的活性部位(假设每个亚基上有一个活性部位)? [$5 \times 10^{-8} \text{ mol}$ 活性中心]
 - (3) 酶的转换数是多少? [622 s^{-1} 或 622 mol 焦磷酸/ $(\text{s} \cdot \text{mol})$ 酶活性中心]
13. 称取 25 mg 蛋白酶粉配制成 25 ml 酶溶液, 从中取出 0.1 ml 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 $1500 \mu\text{g}$ 酪氨酸。另取 2 ml 酶液, 用凯氏定氮法测得蛋白氮为 0.2 mg。若以每分钟产生 $1 \mu\text{g}$ 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 ml 酶液中所含蛋白质量及活力单位。[0.625 mg 蛋白质, 250 U]
 - (2) 比活力。[$400 \text{ U}/\text{mg}$ 蛋白质]
 - (3) 1 g 酶制剂的总蛋白含量及总活力。[0.625 g , $2.5 \times 10^5 \text{ U}$]
14. 有 1 g 淀粉酶制剂, 用水溶解成 1000 ml, 从中取出 1 ml 测定淀粉酶活力, 测知每 5 min 分解 0.25 g 淀粉。计算每 g 酶制剂所含的淀粉酶活力单位数? [3000 U]
(淀粉酶活力单位的定义: 在最适条件下每小时分解 1 g 淀粉的酶量称为 1 个活力单位)
15. 某酶的初提取液经过一次纯化后, 经测定得到下列数据; 试计算比活力、百分产量及纯化倍数。

	体积/ml	活力单位/(U/ml)	蛋白质/(mg/ml)
初提取液	120	200	10
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析	5	810	4

[比活力 $180 \text{ U}/\text{mg}$ 蛋白质, 百分产量 17%, 纯化倍数 9 倍]

主要参考书

1. Stryer L. Biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
2. Garrett R H and Grisham C M. Biochemistry. New York, London: Saunders College Publishing, Harcourt Brace College Publishers, 1995
3. Zubay G. Biochemistry. Reading, Massachusetts, London, Sydney: Addison-Wesley Publishing Company, 1983
4. Mathews C K, van Holde K E and Ahern K G. Biochemistry. 3rd ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc, 2000
5. Nelson D L and Cox M M, Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
6. 祁国荣. 核酸的催化功能. 前进中的生物化学论文集(二). 上海: 上海科学技术出版社, 1992
7. 石颖, 许根俊, 鲁子贤. 抗体酶. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17(3), 166~170
8. Smithrud D B and Benkovic S J. The state of antibody catalysis. Curr Opin Biotech, 1997, 8: 459~466
9. Gesteland R F, Cech T R and Atkins, J E. The RNA World. New York: Cold Spring Harbor Press, Gold Spring Harbor, 1999

10. Benkovic S J. Catalytic antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, 1992; 61, 29~54
11. Webb E. *Enzyme Nomenclature*. Orlando, Fla: Academic Press, 1992
12. 沈仁权, 顾其敏. *生物化学教程*. 北京: 高等教育出版社, 1993

(张庭芳)

第9章 酶促反应动力学

酶促反应动力学(kinetics of enzyme-catalyzed reactions)是研究酶促反应的速率以及影响此速率的各种因素的科学。在研究酶的结构与功能的关系以及酶的作用机制时,需要动力学提供实验证据;为了发挥酶催化反应的高效率,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制等,都需要掌握酶促反应速率的规律。因此,酶促反应动力学的研究既有重要的理论意义又具有一定的实践意义。为了掌握酶促反应动力学,有必要首先了解一些有关化学动力学的基本概念。

一、化学动力学基础

化学反应有两个方面的基本问题,一方面是反应进行的方向、可能性和限度;另一方面是反应进行的速率和反应机制。前者属于化学热力学的研究范围,后者属于化学动力学研究范围。在化学动力学的研究中,将确定各反应或反应步骤的速率,了解各种因素(如浓度、温度、pH和催化剂等)对反应速率的影响,并揭示化学反应的机制。由此可以看出化学动力学和化学热力学的不同之处。例如 O_2 和 H_2 化合成水的反应热力学上可能的,但是在室温下,这个反应的速率却慢到不可察觉的程度。再如, NO_2 聚合成 N_2O_4 的反应也是热力学上可能的,实际上,其反应速率却是快得无法测量。根据热力学的计算,前一反应在 $25^\circ C$ 时的标准自由能变化是 -237.35 kJ ,而后一反应的标准自由能变化仅为 -5.40 kJ ,同是热力学可能的两个反应,而且从热力学的观点,前一反应比后一反应更为有利,为什么实际上它们的反应速率相差悬殊?同是热力学可能的反应,为什么有些反应速率快,有些反应速率慢?这个问题不是化学热力学所能回答的。因为热力学只研究体系的状态改变,并不追究某一化学变化所需的时间和具体过程的机制,而这些问题正是化学动力学所研究的。

各种化学反应的速率可以相差很大,如爆炸反应、溶液中的离子反应等瞬时即可完成;而另外一些反应完成的时间以分、时、日,甚至年来计算;还有更慢的反应,在有限的时间内无从察觉。同一反应由于进行时的条件不同,反应速率也有很大差别。因此,我们常需要改变条件来控制反应速率。另外还有许多化学反应,常有副反应同时伴随进行,我们也需要设法减小其副反应的速率,而使主要的反应速率增大。由此可见,通过化学动力学的研究,在理论上能够阐明化学反应的机制,使我们能了解反应的具体过程和途径。在实际应用上,可以根据反应速率来估计反应进行到某种程度所需的时间;也可以根据影响反应速率的因素进一步对反应进行控制。因此,化学动力学的研究无论在理论上和实践中都是很重要的。

(一) 反应速率及其测定

反应速率是以单位时间内反应物或生成物浓度的改变来表示。随着反应的进行,反应物逐渐消耗,分子碰撞的机会也逐渐减小,因此反应速率也随着减慢(图 9-1)。因为每一瞬间的反应速率都不相同,所以用瞬时速率表示反应速率。设瞬时 dt 内反应物浓度的很小的改变为 dc ,则:

$$v = -\frac{dc}{dt}$$

上式中负号表示反应物浓度的减少。有时反应速率也可用单位时间内生成物浓度的增加来表示,即:

$$v = +\frac{dc}{dt}$$

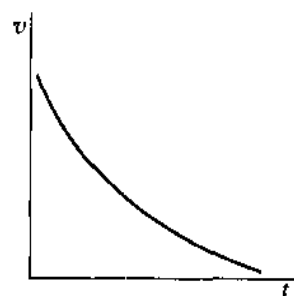


图 9-1 反应速率与时间的关系

上式中正号表示生成物随时间的延长而增多,至于反应速率用哪一种反应物或生成物浓度的改变来表示,则没有关系,可根据取得的实验数据来决定。

反应速率的测定,实际上是测定不同时间的反应物或生成物的浓度,可以通过化学方法或物理方法进行定量测定。

(二) 反应分子数和反应级数

在化学动力学中研究化学反应速率与反应物浓度的关系时,有两种分类方法:即以反应分子数及反应级数来分类。

1. 反应分子数

反应分子数是在反应中真正相互作用的分子的数目。仅有1个反应的分子参加的反应称为单分子反应,有两个反应物分子参加的反应称为双分子反应,依此类推。实际上,大多数反应都是以单分子或双分子反应的步骤进行的,3个分子同时反应的可能性很小,3分子以上的反应还没有被发现过。反应分子数显然都是简单整数。

放射性元素的蜕变,有机反应中的分子重排以及同分异构体的相互转变等反应属于单分子反应。



根据质量作用定律,单分子反应的速率方程式(或称动力学方程式)是:

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc$$

式中 c 代表反应物的浓度($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), k 是比例常数,称为反应速率常数,比值大小可作为反应速率大小的衡量。

乙酸的酯化反应, H_2 和 I_2 的化合反应等都属于双分子反应。



双分子反应的速率方程式是:

$$v = -\frac{dc}{dt} = kc_1c_2$$

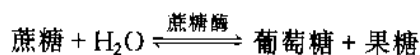
式中 c_1 和 c_2 分别代表两种反应物的浓度。

判断一个反应是单分子反应还是双分子反应,必须先了解反应机制,即了解反应过程中各个单元反应是如何进行的。反应机制往往是很复杂的,不容易弄清楚,然而反应速率与浓度的关系即可用实验方法来测量,从而可帮助推论反应机制。

2. 反应级数

根据实验结果,整个化学反应的速率服从哪种分子反应速率方程式,则这个反应即为几级反应。如有某反应,其总反应速率与浓度的关系能以单分子反应的速率方程式来表示,那么这个反应为一级反应。如能用双分子反应速率方程式来表示,则为二级反应,余类推。另外,我们把反应速率与反应物浓度无关的反应叫做零级反应。

反应分子数和反应级数这两种分类方法对很简单的反应来说是一致的,但对某些反应来说是不一致的。例如蔗糖的酶促水解作用:



是双分子反应,但却为一级反应。因为蔗糖的稀水溶液中,水的浓度比蔗糖浓度大得多,水浓度的减少与蔗糖比较可以忽略不计,故我们可将水的浓度当作常数。因此,反应速率只决定于蔗糖的浓度。

$$v = k' c_{\text{蔗糖}} \cdot c_{\text{水}} = kc_{\text{蔗糖}}$$

既然反应速率和浓度的关系采用单分子反应动力学方程式表示,所以是一级反应,有时叫做假单分子反应。一般来说,在一双分子反应中,如果有一反应物的存在量极大,则显然此反应可以按照一级动力学方程式进行,如各种水解反应。

复杂反应是由一连串简单反应所组成,所以确定反应级数比较复杂,并且,不一定是整数。实际上反应级数等于反应速率方程式中各个反应物浓度指数的总和,有时和分子数一致,有时不一致。

由上述可知,反应分子数和反应级数是2个不同的概念。前者表示实际参加反应的分子数,是一个反应机制的问题;后者是由实验测得的表示反应速率与反应物浓度之间的关系问题。

在实际应用上常采用反应级数,因为用反应级数时不必了解反应的机制,而只需由实验确定反应服从哪级反应,便可得到反应速率与反应物浓度的关系。

(三) 各级反应的特征

各级反应的特征实际上已经表现在各级反应的反应速率方程式里。由于研究化学动力学时实际所测得的是反应经过的不同时间 t 和相应于该时间的反应物或生成物浓度 c ,因此常以 c 和 t 的变化关系来表示各级反应的特征。这种 c 和 t 的关系,只要将反应速率式积分,就容易看出。

1. 一级反应

凡是反应速率只与反应物的浓度的一次方成正比的,这种反应就称为一级反应。这类反应的反应速率与反应物浓度的关系可用下式表示:

$$-\frac{dc}{dt} = kc$$

将上式移项后,积分得:

$$\ln c = -kt + B$$

式中 B 为积分常数,若反应开始时($t=0$)的浓度为 c_0 (初浓度),代入上式求得 $B = \ln c_0$,因而:

$$\ln c = -kt + \ln c_0 \tag{9-1}$$

整理

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c}$$

或

$$c = c_0 e^{-kt} \tag{9-2}$$

式(9-2)表示了一级反应的反应物浓度(或产物浓度)随时间变化的规律,如图9-2所示。图中 c 和 $[P]$ (产物浓度)两曲线交于一点,该点的纵坐标为 $c_0/2$,横坐标为 $t_{1/2}$, $t_{1/2}$ 叫半衰期,即有一半反应物转为产物所需的时间。

从式(9-1)可以看出,若以 $\ln c$ 对时间 t 作图应得一条直线,见图9-3,直线斜率的负值就是反应速率常数 k , k 的单位是时间的倒数。

当 $t = t_{1/2}$ 时,则 $c = \frac{1}{2}c_0$ 代入式(9-1)得:

$$k = (\ln 2)/t_{1/2}$$

或

$$t_{1/2} \approx 0.693/k \tag{9-3}$$

即速率常数与半衰期成反比,半衰期与反应物的初浓度无关。换言之,不管反应物的初浓度是多少,半衰期是一样的,这也是一级反应的一个特征。

2. 二级反应

凡是反应速率与反应物质浓度二次方(或两种物质浓度的乘积)成正比的,这种反应就称为二级反应。二级反应是最常见的。二级反应的速率与反应物浓度的关系可用下式来表示:

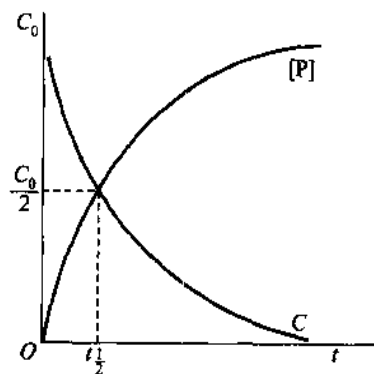


图9-2 一级反应的反应物消耗和产物形成与时间的关系曲线

$$-\frac{dc}{dt} = kc_1c_2$$

或
$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)(b-x) \quad (9-4)$$

式中 a, b 分别代表反应物 A、B 的初浓度, x 为反应 t 时已发生反应的物质浓度。 $(a-x)$ 与 $(b-x)$ 分别为反应 t 时的反应物 A 与 B 的浓度。若 A 与 B 的初浓度相同, 则可将上式写为:

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x)^2$$

移项, 积分后整理得:

$$k = \frac{1}{t} \cdot \frac{x}{a(a-x)} \quad (9-5)$$

若 A 和 B 的初浓度不同, 将式(9-4)移项积分后的结果为:

$$k = \frac{1}{t(a-b)} \cdot \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \quad (9-6)$$

从式(9-5)及(9-6)可以看出, 若以 $\frac{x}{a-x}$ 或 $\ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$ 分别对时间 t 作图, 皆为直线(图 9-4)。

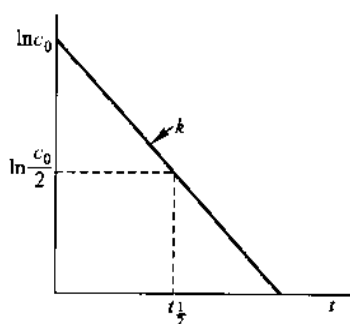


图 9-3 一级反应 $\ln c$ 与时间关系

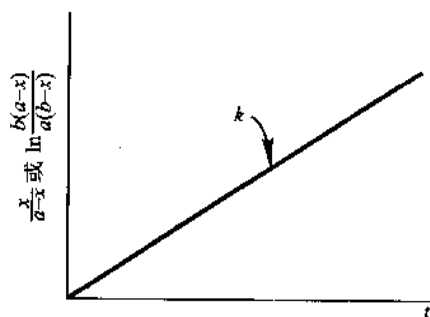


图 9-4 二级反应 $\frac{x}{a-x}$ 或 $\ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)}$ 与时间关系

其斜率等于速率常数 k , k 的单位是 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 这是二级反应的特征, 也是求 k 和决定是不是二级反应的一个方法。

当 $x = \frac{1}{2}a$ 时, t 即为半衰期 $t_{1/2}$, 代入式(9-5)得:

$$k = \frac{1}{at_{1/2}}$$

或

$$t_{1/2} = \frac{1}{ka} \quad (9-7)$$

上式表明二级反应的半衰期与初浓度成反比。换句话说, 初浓度愈大, 反应物减少一半所需的时间愈短, 这也是二级反应的一个特征。

3. 零级反应

凡是反应速率与反应物浓度无关而受它种因素影响而改变的反应称为零级反应, 即反应速率为一常数。可将零级反应的动力学方程式表示为:

$$-\frac{dc}{dt} = k, \text{ 或 } \frac{dx}{dt} = k$$

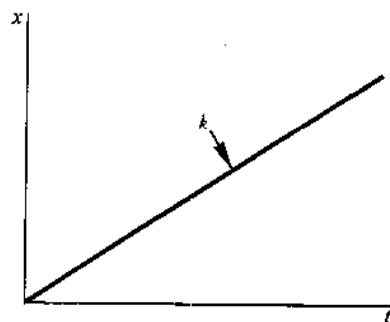


图 9-5 零级反应 x 与时间关系

积分后得：
$$x = kt, k = \frac{x}{t} \quad (9-8)$$

零级反应中 k 的单位是 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。若以 x 对 t 作图,得一直线,如图 9-5,其斜率为 k 。当 $x = \frac{1}{2}a$ 时,代入 9-8 式,其反应半衰期与初浓度成正比,即:

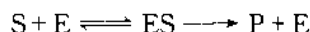
$$t_{1/2} = \frac{a}{2k} \quad (9-9)$$

上式说明,初浓度愈大,半衰期愈长。

二、底物浓度对酶反应速率的影响

(一) 中间络合物学说

1903 年 Henri 用蔗糖酶水解蔗糖做实验,研究底物浓度与反应速率的关系。当酶浓度不变时,可以测出一系列不同底物浓度下的反应速率,以反应速率对底物浓度作图,可得到图 9-6 双曲线。从该曲线可以看出,当底物浓度较低时,反应速率与底物浓度的关系呈正比关系,表现为一级反应。随着底物浓度的增加,反应速率不再按正比升高,反应表现为混合级反应。当底物浓度达到相当高时,底物浓度对反应速率影响变小,最后反应速率与底物浓度几乎无关,反应达到最大速率 (V_{\max}),表现为零级反应。根据这一实验结果,Henri 和 Wurtz 提出了酶底物中间络合物学说。该学说认为当酶催化某一化学反应时,酶首先和底物结合生成中间复合物(ES),然后生成产物(P),并释放出酶。反应用下式表示:



根据中间复合物学说可以解释图 9-6 实验曲线,在酶浓度恒定条件下,当底物浓度很小时,酶未被底物饱和,这时反应速率取决于底物浓度。随着底物浓度变大,根据质量作用定律,ES 生成也越多,而反应速率取决于 ES 的浓度,故反应速率也随之增高。当底物浓度相当高时,溶液中的酶全部被底物饱和,溶液中没有多余的酶,虽增加底物浓度也不会有更多的中间复合物生成,因此酶促反应速率与底物无关,反应达到最大反应速率 (V_{\max})。当底物浓度对反应速率作图时,就形成一条双曲线。需要指出的是只有酶催化反应才有这种饱和现象,与此相反,非催化反应无此饱和现象。

酶和底物形成中间复合物的学说,已得到许多实验证明:

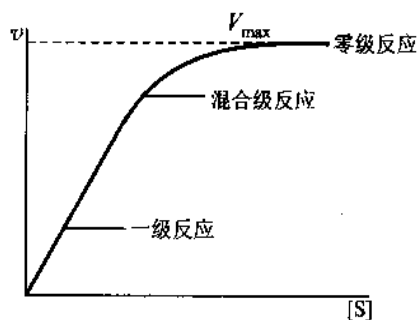


图 9-6 底物浓度对酶催化反应初速率的影响

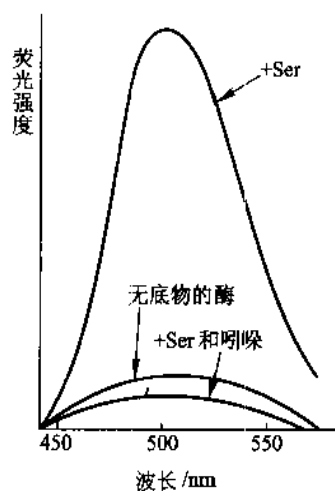


图 9-7 磷酸吡哆醛辅基在色氨酸合成酶的活性部位上产生的荧光强度随加入底物 L-Ser 和吲哚而改变的情况

(1) ES 复合物已被电子显微镜和 X 射线晶体结构分析直接观察到。如在电子显微镜下可观察到 DNA 聚合酶 I 可结合到它合成的 DNA 模板上。用 X 射线晶体结构分析,研究了羧肽酶 A 和它的底物 Gly-L-Tyr 的相互作用及其作用位置(见第 10 章)。

(2) 许多酶和底物的光谱特性在形成 ES 复合物后发生变化。例如色氨酸合成酶为一细菌酶,含有一个磷酸吡哆醛辅基,该酶催化 L-Ser 和吲哚合成 Trp,加 L-Ser 到酶中磷酸吡哆醛的荧光显著增加,随后加吲哚使荧光猝灭到低于单独酶的水平(图 9-7),因此荧光光谱揭示了酶-Ser 和酶-Ser-吲哚复合物的存在。其他光谱学方法,如核磁和顺磁共振,圆二色谱也能对 ES 的形成提供信息。

(3) 酶的物理性质,如溶解度或热稳定性,经常在形成 ES 复合物后发生变化。

(4) 已分离得到某些酶与底物相互作用生成的 ES 复合物,如已得到乙酰化胰凝乳蛋白酶及 D-氨基酸氧化酶和底物复合物的结晶。

(5) 超离心沉降过程中,可观察到酶和底物共沉降现象。平衡透析时观察到底物浓度在半透膜内外不同等。

(二) 酶促反应的动力学方程式

1. 米氏方程式的推导

1913 年 Michaelis 和 Menten 在前人工作的基础上,根据酶反应的中间复合物学说:



假定 $E + S \rightleftharpoons ES$ 迅速建立平衡,底物浓度远远大于酶浓度下,ES 分解成产物的逆反应忽略不计,以“快速平衡法”,推导出一个数学方程式,表示了底物浓度与酶反应速率之间的定量关系,通常称为米氏方程。

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \quad (9-11)$$

式中 v 为反应速率, V_{\max} 为酶完全被底物饱和时的最大反应速率, $[S]$ 为底物浓度, K_s 为 ES 的解离常数(底物常数)。

1925 年 Briggs 和 Haldane 提出了稳态(steady state)理论,对米氏方程做了一项很重要的修正,酶促反应分两步进行:

第一步:酶与底物作用,形成酶-底物复合物:



第二步:ES 复合物分解形成产物,释放出游离酶:



这两步反应都是可逆的。它们的正反应与逆反应的速率常数分别为 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 。

由于酶促反应的速率与 ES 的形成与分解直接相关,所以必须考虑 ES 的形成速率和分解速率。Briggs 和 Haldane 的发展就在于指出 ES 量不仅与式(9-12)平衡有关,而且还与式(9-13)平衡有关,用稳态代替了平衡态。

所谓稳态是指反应进行一段时间后,系统的复合物 ES 浓度,由零逐渐增加到一定数值,在一定时间内,尽管底物浓度和产物浓度不断地变化,复合物 ES 也在不断地生成和分解,但是当反应系统中 ES 的生成速率和 ES 的分解速率相等时,络合物 ES 浓度保持不变的这种反应状态称为稳态,即:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

图 9-8 表示实验所得各种浓度对时间的曲线,表示了底物浓度降低,产物形成及 ES 稳态过程。

在稳态下,ES的生成速率 $d[ES]/dt$ 应为 $E + S \xrightarrow{k_1} ES$ 和 $E + P \xrightarrow{k_4} ES$ 有关。但是在反应初速率阶段,产物浓度很低, $E + P \xrightarrow{k_4} ES$ 的速率极小,可以忽略不计。因此ES的生成速率只与 $E + S \xrightarrow{k_1} ES$ 有关,可用下式表示:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1([E] - [ES]) \cdot [S] \quad (9-14)$$

[E]表示酶的总浓度

[ES]表示酶与底物结合的中间复合物的浓度

[E] - [ES]表示未与底物结合的游离状态的酶浓度

[S]表示底物浓度

通常底物浓度远比酶浓度大很多,即 $[S] \gg [E]$,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 $[S] - [ES] \approx [S]$ 。ES的分解速率 $-d[ES]/dt$ 则与 $ES \xrightarrow{k_2} S + E$ 及 $ES \xrightarrow{k_3} P + E$ 有关。因此ES分解速率为两式速率之和。

$$-\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (9-15)$$

在稳态下,ES的生成速率和ES的分解速率相等,即[ES]保持动态平衡,式(9-14) = (9-15),即

$$k_1([E] - [ES]) \cdot [S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

移项得:

$$\frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (9-16)$$

用 K_m 表示 k_1, k_2, k_3 3个常数的关系,

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (9-17)$$

将式(9-17)代入式(9-16):

$$\frac{([E] - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = K_m \quad (9-18)$$

由式(9-18)可得到稳态时[ES]:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (9-19)$$

因为酶反应速率(v)与[ES]成正比,即:

$$v = k_3[ES] \quad (9-20)$$

将式(9-19)代入式(9-20)得:

$$v = k_3 \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (9-21)$$

由于反应系统中 $[S] \gg [E]$,当[S]很高时所有的酶都被底物所饱和形成ES,即 $[E] = [ES]$,酶促反应达到最大速率 V_{max} ,则:

$$V_{max} = k_3[ES] = k_3[E] \quad (9-22)$$

将式(9-22)代入式(9-21),即得:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (9-23)$$

这就是根据稳态理论推导出的动力学方程式,为纪念 Michaelis 和 Meten,习惯上把式(9-11),式(9-23)都称为米氏方程。 K_m 称为米氏常数,是由一些速率常数组成的一个复合常数。该方程式表明了当已知 K_m 及 V_{max} 时,酶反应速率与底物浓度之间的定量关系。若以 $[S]$ 作横坐标, v 作纵坐标作图,可得到一条双曲线(图 9-9),该曲线正好与实验所得的图 9-6 相符合。

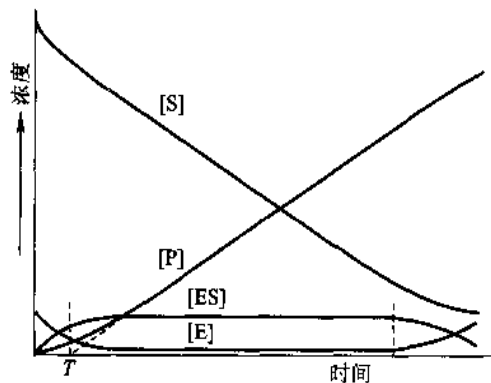


图 9-8 酶促反应过程中各种浓度与时间关系曲线(虚线之间为稳态)

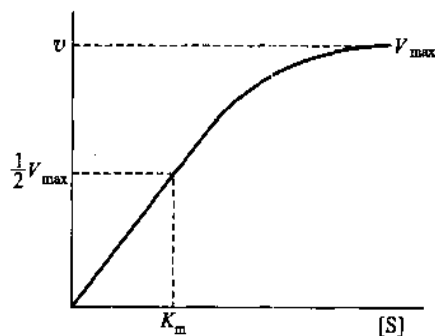


图 9-9 米氏方程曲线

从式(9-23)可以看出,当反应速率达到最大速率一半时,即 $v = \frac{V_{max}}{2}$,可以得到:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

则

$$[S] = K_m$$

由此可以看出 K_m 值的物理意义,即 K_m 值当酶反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度,单位是 mol/L,与底物浓度的单位一样。

根据米氏方程式可以说明以下关系:

(1) 当 $[S] \ll K_m$ 时,则(9-23)式变为:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m}$$

由于 V_{max} 和 K_m 为常数,两者的比可用一常数 K 表示,因此

$$v = \frac{V_{max}}{K_m} \cdot [S] = K[S]$$

即 $[S]$ 远远小于 K_m 时,反应速率与底物浓度成正比, v 与 $[S]$ 的关系符合一级动力学。这时由于底物浓度低,酶没有全部被底物所饱和,因此在底物浓度低的条件下是不能正确测得酶活力的。

(2) 当 $[S] \gg K_m$ 时,则式(9-23)变为:

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S]}$$

$$v = V_{max}$$

表示当底物浓度远大于 K_m 值时,反应速率已达到最大速率,这时酶全部被底物所饱和, v 与 $[S]$ 无关,符合零级动力学,只有在此条件下才能正确测得酶活力。

(3) 当 $[S] = K_m$ 时,由式(9-23)得:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}}{2}$$

也就是说,当底物浓度等于 K_m 值时,反应速率为最大速率的一半。因此 K_m 值就代表反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度。

2. 动力学参数的意义

(1) 米氏常数的意义

① K_m 是酶的一个特性常数: K_m 的大小只与酶的性质有关,而与酶浓度无关。 K_m 值随测定的底物、反应的温度、pH 及离子强度而改变。因此, K_m 值作为常数只是对一定的底物、pH、温度和离子强度等条件而言。故对某一酶促反应而言,在一定条件下都有特定的 K_m 值,可用于鉴别酶。例如对于不同来源或相同来源但在不同发育阶段,不同生理状况下催化相同反应的酶是否属于同一种酶。各种酶的 K_m 值相差很大,大多数酶的 K_m 值介于 $10^{-6} \sim 10^{-1} \text{mol/L}$ 之间。表 9-1 列举了某些酶的 K_m 值。

表 9-1 一些酶的 K_m 值

酶	底物	$K_m / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
过氧化氢酶(catalase)	H_2O_2	2.5×10^{-2}
脲酶(urease)	尿素	2.5×10^{-2}
己糖激酶(hexokinase)	葡萄糖	1.5×10^{-4}
	果糖	1.5×10^{-3}
蔗糖酶(sucrase)	蔗糖	2.8×10^{-2}
	棉子糖	3.5×10^{-1}
胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)	N-苯甲酰酪氨酰胺	2.5×10^{-3}
	N-甲酰酪氨酰胺	1.2×10^{-2}
	N-乙酰酪氨酰胺	3.2×10^{-2}
	甘氨酸酪氨酰胺	1.22×10^{-1}
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	HCO_3^-	$8.0 \sim 9.0 \times 10^{-3}$
	谷氨酸	1.2×10^{-4}
谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase)	α -酮戊二酸	2.0×10^{-3}
	NAD^+	2.5×10^{-5}
	NADH	1.8×10^{-5}
肌酸激酶(creatine kinase)	肌酸	6.0×10^{-4}
	ADP	1.9×10^{-2}
	磷酸肌酸	5×10^{-3}
乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)	丙酮酸	1.7×10^{-5}
丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)	丙酮酸	1.3×10^{-3}
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase)	葡萄糖-6-磷酸	5.8×10^{-5}
己糖-6-磷酸异构酶(hexose-6-phosphate isomerase)	葡萄糖-6-磷酸	7.0×10^{-4}
β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)	乳糖	4.0×10^{-3}
溶菌酶(lysozyme)	六-N-乙酰-葡糖胺	6.0×10^{-6}
苏氨酸脱氨酶(threonine deaminase)	苏氨酸	5.0×10^{-3}
青霉素酶(penicillinase)	苄基青霉素	5.0×10^{-5}
丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)	丙酮酸	4.0×10^{-4}
	HCO_3^-	1.0×10^{-3}
	ATP	6.0×10^{-5}
精氨酸-tRNA合成酶 (arginine-tRNA-synthetase)	精氨酸	3.0×10^{-6}
	tRNA ^{Arg}	4.0×10^{-7}
	ATP	3.0×10^{-4}

② K_m 值可以判断酶的专一性和天然底物。有的酶可作用于几种底物,因此就有几个 K_m 值,其中 K_m 值最小的底物称为该酶的最适底物也就是天然底物。如谷氨酸脱氢酶可作用于谷氨酸、 α -酮戊二酸、 NAD^+ 、 NADH ,它们的 K_m 值依次为 1.2×10^{-4} 、 2.0×10^{-3} 、 2.5×10^{-5} 和 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,显然 NADH 为谷氨酸脱氢酶的最适底物。 $\frac{1}{K_m}$ 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,则 K_m 愈小,达到最大反应速率一半所需要的底物浓度就愈小。显然,最适底物时酶的亲和力最大, K_m 最小。

K_m 值随不同底物而异的现象可以帮助判断酶的专一性,并且有助于研究酶的活性部位。

③ 由式(9-19)可知,当 $k_3 \ll k_2$ 时, $K_m = k_2/k_1$,即 $K_m = K_s$ 。换言之 ES 的分解为反应的限制速率时, K_m 等于 ES 复合物的解离常数(底物常数),可以作为酶和底物结合紧密程度的一个度量,表示酶和底物结合的亲和力大小。在不知道 K_m 确实等于 K_s 之前,用 K_m 表示酶和底物的亲和力是不确切的。上面提到的 $\frac{1}{K_m}$ 可近似地表示酶与底物亲和力的大小,严格地说应该用 $1/K_s$ 表示,只是当 k_3 极小时,才能用 $1/K_m$ 来近似地说明酶与底物结合的难易程度。

④ 若已知某个酶的 K_m 值,就可以计算出在某一底物浓度时,其反应速率相当于 V_{\max} 的百分率。例

如,当 $[\text{S}] = 3K_m$ 时,代入米氏方程式 $V = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$,得:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot 3K_m}{K_m + 3K_m} = 0.75 V_{\max}$$

达到最大反应速率的 75% 时,底物浓度相当于 $3K_m$ 。米氏方程 $[\text{S}]$ 和 v 的关系见表 9-2。

表 9-2 米氏方程 $[\text{S}]$ 与 v 关系

$[\text{S}]$	v
$1000 K_m$	$0.999 V_{\max}$
$100 K_m$	$0.99 V_{\max}$
$10 K_m$	$0.91 V_{\max}$
$3 K_m$	$0.75 V_{\max}$
$1 K_m$	$0.50 V_{\max}$
$0.33 K_m$	$0.25 V_{\max}$
$0.10 K_m$	$0.091 V_{\max}$
$0.01 K_m$	$0.01 V_{\max}$

当 $v = V_{\max}$ 时,反应初速率与底物浓度无关,只与 $[\text{E}_0]$ 成正比,表明酶的活性部位全部被底物占据。当 K_m 已知时,任何底物浓度下被底物饱和的百分数可用下式表示:

$$f_{\text{ES}} = \frac{v}{V_{\max}} = \frac{[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

当然这是一种简单的情况,在反应经历复杂的机制时, f_{ES} 并不代表酶活性部位被底物饱和百分数。

⑤ K_m 值可以帮助推断某一代谢反应的方向和途径:催化可逆反应的酶,对正逆两向底物的 K_m 值往往是不同的,例如谷氨酸脱氢酶(*glutamate dehydrogenase*), NAD^+ 的 K_m 值为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,而 NADH 为 $1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 。测定这些 K_m 值的差别以及细胞内正逆两向底物的浓度,可以大致推测该酶催化正逆两向反应的效率,这对了解酶在细胞内的主要催化方向及生理功能有重要意义。

当一系列不同的酶催化一个代谢过程的连锁反应时,如能确定各种酶的 K_m 及其相应底物的浓度,便

可有助于寻找代谢过程的限速步骤。例如酶 1、2、3 分别催化 $A \xrightarrow{1} B \xrightarrow{2} C \xrightarrow{3} D$ 三步连续反应,若它们对相应底物 A、B、C 的 K_m 分别为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L,而细胞内 A、B、C 的浓度均接近 10^{-4} mol/L,则可推知限速反应是 $A \rightarrow B$ 的一步。

生物体内的代谢作用往往是在多酶体系下进行的,同一种底物往往可以被几种酶作用,催化不同的反应,走不同的途径。如丙酮酸在体内至少可被乳酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和丙酮酸脱羧酶等 3 种酶催化,分别形成乳酸、乙酰辅酶 A 和乙醇。它们的 K_m 值分别为 1.7×10^{-5} 、 1.3×10^{-3} 和 1.0×10^{-3} mol/L。当丙酮酸浓度较低时,不能同时被几种酶作用。究竟走哪一条途径则决定于 K_m 值最小的酶,只有 K_m 值小的酶反应比较占优势。从上述 3 种酶的 K_m 值可以推断在丙酮酸浓度较低时容易走乳酸脱氢酶催化丙酮酸形成乳酸的途径。

(2) V_{max} 和 k_3 (k_{cat}) 的意义 在一定酶浓度下,酶对特定底物的 V_{max} 也是一个常数。 V_{max} 与 K_m 相似,同一种酶对不同底物的 V_{max} 也不同,pH、温度和离子强度等因素也影响 V_{max} 的数值。

当 [S] 很大时,根据式(9-22), $V_{max} = k_3[E]$ 。说明 V_{max} 和 [E] 成线性关系,而直线的斜率为 k_3 ,为一级反应速率常数,它的因次为 s^{-1} 。 k_3 表示当酶被底物饱和时每秒钟每个酶分子转换底物的分子数,这个常数又叫做转换数(简称 TN),通称为催化常数(catalytic constant, k_{cat})。 k_{cat} 值越大,表示酶的催化效率越高。

(3) k_{cat}/K_m 的意义 在生理条件下,大多数酶并不被底物所饱和。在体内 [S]/ K_m 的比值通常介于 0.01 到 1.0 之间。根据米氏方程:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

按照 $V_{max} = k_{cat}[E_T]$, $[E_T]$ 代表酶的总浓度。则:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E_T][S]}{K_m + [S]}$$

当 $[S] \ll K_m$ 时,自由酶浓度 $[E] = [E_T]$

$$\therefore v = \left(\frac{k_{cat}}{K_m} \right) \cdot [E][S]$$

即 k_{cat}/K_m 是 E 和 [S] 反应形成产物的表观二级速率常数(apparent second-order rate constant),有时也称为专一性常数(specificity constant)。因此,当 $[S] \ll K_m$ 时,酶反应速率取决于 k_{cat}/K_m 的值和 [S]。对于 k_{cat}/K_m 值,有没有什么物理限制? 注意,这个比值取决于 k_1 、 k_2 和 k_3 ,这儿 $k_{cat} = k_3$,将 K_m 取代后可以得出:

$$k_{cat}/K_m = \frac{k_3 k_1}{k_2 + k_3}$$

比值 k_{cat}/K_m 的上限为 k_1 ,即生成 ES 复合物的速率。换言之,酶的催化效率不能超过 E 和 S 形成 ES 的扩散控制的结合速率。扩散限制了 k_1 的数值,在水中扩散的速率常数大约为 $10^8 \sim 10^9$ mol $^{-1}$ ·L·s $^{-1}$,因此 k_{cat}/K_m 的上限为 $10^8 \sim 10^9$ mol $^{-1}$ ·L·s $^{-1}$ 。对酶来说,比值 k_{cat}/K_m 作为酶催化效率的参数是很恰当的。事实上,如乙酰胆碱酯酶和磷酸丙糖异构酶等许多酶的 k_{cat}/K_m 比值都介于 $10^7 \sim 10^8$ mol $^{-1}$ ·L·s $^{-1}$ 之间,说明它们都已达到酶催化效率的完整性。它们的催化反应速率只受它们与溶液中底物迁移速率的限制。如果要使催化速率进一步加快,只有减少扩散时间才有可能。表 9-3 列出了在这个范畴中几种酶的动力学参数。可见由 k_{cat}/K_m 值的大小,可以比较不同酶或同一种酶催化不同底物的催化效率(表 9-4)


3. 利用作图法测定 K_m 和 V_{max} 值

米氏常数可根据实验数据通过作图法直接求得。先测定不同底物浓度的反应初速率,以 $v \sim [S]$ 作图,如从图 9-9 可以得到 V_{max} ,再从 $\frac{1}{2} V_{max}$ 可求得相应的 [S],即 K_m 值。但实际上既使用很大的底物浓

表 9-3 k_{cat}/K_m 值接近扩散控制限制的酶

酶	底物	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/mol \cdot L^{-1}$	$k_{cat}/K_m/mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$
乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase)	乙酰胆碱	1.4×10^4	9×10^{-5}	1.6×10^8
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	CO_2	1×10^6	1.2×10^{-2}	8.3×10^7
	HCO_3^-	4×10^5	2.6×10^{-2}	1.5×10^7
过氧化氢酶(catalase)	H_2O_2	4×10^7	1.1	3.6×10^7
巴豆酸酶(crotonase)	巴豆酰-CoA	5.7×10^3	2×10^{-5}	2.8×10^8
延胡索酸酶(fumarase)	延胡索酸	8×10^2	5×10^{-6}	1.6×10^8
	苹果酸	9×10^2	2.5×10^{-5}	3.6×10^7
丙糖磷酸异构酶(triosephosphate isomerase)	甘油醛-3-磷酸	4.3×10^3	1.8×10^{-5}	2.4×10^8
β -内酰胺酶(β -lactamase)	苯基青霉素	2.0×10^3	2×10^{-5}	1×10^8

表 9-4 胰凝乳蛋白酶选择水解几种 N-乙酰氨基酸甲酯所测 k_{cat}/K_m

在酯中的氨基酸	氨基酸侧链	$k_{cat}/K_m/mol^{-1} \cdot L \cdot s^{-1}$
甘氨酸	-H	1.3×10^{-1}
正缬氨酸	$-CH_2CH_2CH_3$	3.6×10^2
正亮氨酸	$-CH_2CH_2CH_2CH_3$	3.0×10^3
苯丙氨酸	$-CH_2$ 	1.0×10^5

度,也只能得到趋近于 V_{max} 的反应速率,而达不到真正的 V_{max} ,因此得不到准确的 K_m 与 V_{max} 值。为了方便的测得准确的 K_m 与 V_{max} 值,可把米氏方程式的形式加以变换,使它成为直线方程,然后用图解法求出 K_m 与 V_{max} 值。

(1) Lineweaver - Burk 双倒数作图法

将米氏方程式两侧取双倒数,得到下面方程式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9-24)$$

以 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图,得一直线,如图 9-10。横轴截距为 $-\frac{1}{K_m}$,纵轴截距为 $\frac{1}{V_{max}}$ 。该作图缺点是:实验点过分集中在直线的左下方,而低浓度 S 的实验点又因倒数后误差较大,往往偏离直线较远,从而影响 K_m 和 V_{max} 的准确测定。

(2) Eadie - Hofstee 作图法

将米氏方程式改写成:

$$v = V_{max} - K_m \cdot \frac{v}{[S]} \quad (9-25)$$

以 $v \sim \frac{v}{[S]}$ 作图,得一直线,其纵轴截距为 V_{max} ,斜率为 $-K_m$,见图 9-11。

(3) Hanes - Woolf 作图法

将式(9-24)两边均乘以 $[S]$ 即得:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (9-26)$$

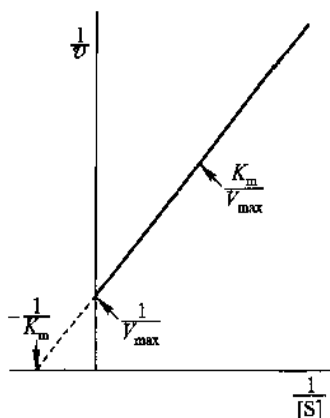


图 9-10 双倒数作图法

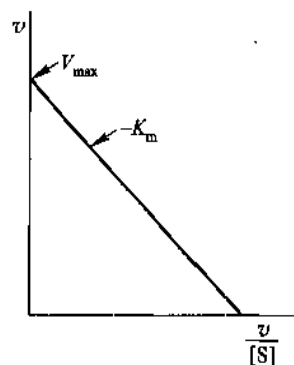


图 9-11 Eadie-Hofstee 作图法

以 $\frac{[S]}{v}$ - $[S]$ 作图, 得一直线, 横轴的截距为 $-K_m$, 斜率为 $\frac{1}{V_{\max}}$, 见图 9-12。

(4) Eisenthal 和 Cornish-Bowden 直接线性作图法

将米氏方程改写为:

$$V_{\max} = v + \frac{v}{[S]} \cdot K_m \quad (9-27)$$

把 $[S]$ 标在横轴的负半轴上, 测得的 v 数值标在纵轴上, 相应的 $[S]$ 和 v 联成直线, 这一簇直线交于一点, 这一点的坐标为 K_m 和 V_{\max} , 如图 9-13。直线性作图法有其优点, 不需要计算, 可直接读出 K_m 和 V_{\max} 值; 另外它使人们容易识别出那些不正确的观测结果, 这些结果将产生不通过靠近共同交叉点的直线。

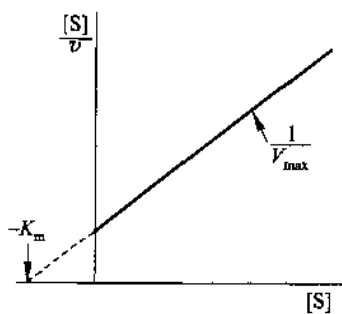


图 9-12 Hanes-Woolf 作图法

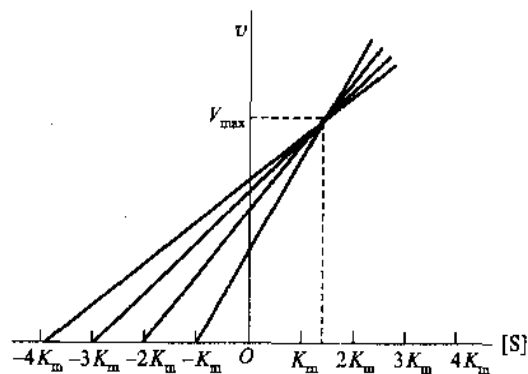


图 9-13 Eisenthal 和 Cornish-Bowden 直线性作图法

(三) 多底物的酶促反应动力学

上面主要讨论了单底物反应的动力学, 但在酶促反应中更常见的是两个或两个以上底物参加的反应, 称作多底物反应。其中双底物反应最为重要, 即底物 A 和 B 经酶催化生成产物 P 和 Q 的反应:



多底物反应动力学方程十分复杂, 推导也很繁琐, 这里仅就双底物反应机制及动力学方程作一简要介绍。

1. 酶促反应按底物分子数的分类

按照参加酶促反应底物分子数的多少可分为单底物、双底物和三底物反应, 见表 9-5。

表 9-5 酶促反应按底物分子数的分类

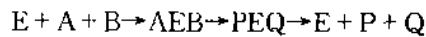
底物数	酶分类	催化反应	酶种类占总酶百分率
单底物	异构酶	$A \rightleftharpoons B$	5%
单向单底物	裂合酶	$A \rightleftharpoons B + C$	12%
假单底物	水解酶	$A \cdot B + H_2O \rightleftharpoons A \cdot OH + B \cdot H$	26%
双底物	氧化还原酶	$A \cdot H_2 + B \rightleftharpoons A + B \cdot H_2$	27%
		$A^{2+} + B^{3+} \rightleftharpoons A^{3+} + B^{2+}$	
三底物	转移酶	$A + B \cdot X \rightleftharpoons AX + B$	24%
	连接酶	$A + B + ATP \rightleftharpoons AB + ADP + P_i$ $A + B + ATP \rightleftharpoons A \cdot B + AMP + P_i$	

由表可见,前面介绍的动力学只适用于表中 1,3 两类反应及第 2 类中的正向反应。

2. 多底物反应按动力学机制分类

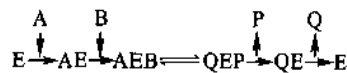
(1) 序列反应(sequential reactions)或单-置换反应(single-displacement reactions)

底物的结合和产物的释放有一定的顺序,产物不能在底物完全结合前释放。A 和 B 底物二者均结合到酶上,然后反应产生 P 和 Q:

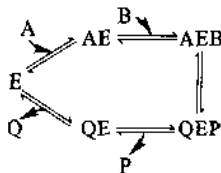


这种类型的反应称为序列反应,又可分为两种类型:

① 有序反应(ordered reactions)可写作 Ordered Bi Bi,前一个 Bi 表示 2 个底物有序反应,后一个 Bi 表示 2 个产物有序生成。A 定为领先底物(leading substrate),在结合 B 前首先与酶结合。严格地说,在缺少 A 时 B 不能结合自由的酶。反应在 A 和 B 之间产生三元复合物(ternary complex),随后有序的释放反应产物 P 和 Q。在下面的图解中,Q 是 A 的产物,最后被释放出来。

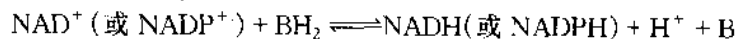


这一机制的另一种方式描述如下:

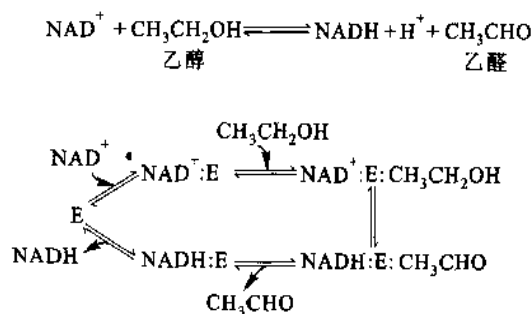


从上式可看出,A 和 Q 相互竞争地与自由酶结合,但是底物 A 和 B(或者 Q 和 B)互不竞争。

需要 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的脱氢酶就属于这种类型,这些脱氢酶的一般反应为:

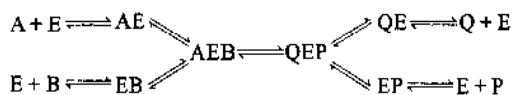


领先底物 A 是 NAD^+ (或 $NADP^+$),而 NAD^+ 和 $NADH$ (产物 Q)竞争酶的同-结合位点,用乙醇脱氢酶为例来说明:

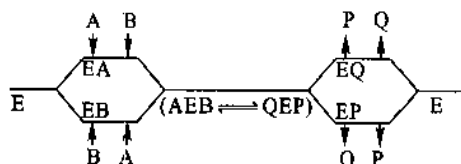


能够鉴别该有序机制在缺少 A(NAD⁺)时,没有 B(CH₃CH₂OH)结合到 E 上,证明不是下面所述的随机反应。

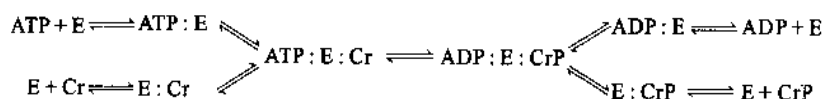
② 随机反应(random reactions)可写作 Random Bi Bi,前一个 Bi 表示 2 个底物随机结合,后一个 Bi 表示 2 个产物随机释放。可用下式表示:



也可用图式说明



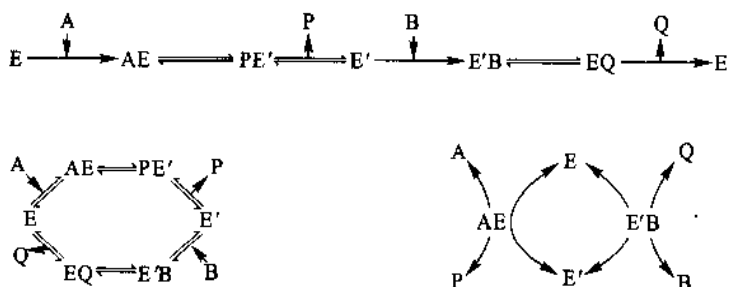
限速步骤是反应 AEB→QEP,不论 A 或 B 首先同 E 结合,还是 Q 或 P 首先从 QEP 释放都无关系。肌酸激酶(creatine kinase)使肌酸磷酸化的反应是随机反应机制的典型例子。肌酸(creatine, Cr)和磷酸肌酸(creatine phosphate, CrP)的结构式见下册第 20 章。



反应的总方向将决定于 ATP、ADP、Cr 和 CrP 的浓度和反应的平衡常数。可以认为,该酶有 2 个同底物(或产物)的结合位点:一个是腺苷酸位点,与 ATP 或 ADP 结合;另一个是肌酸位点,与 Cr 或 CrP 结合。在此反应机制中,ATP 和 ADP 在特异的位点上相互竞争,而 Cr 和 CrP 相互竞争 Cr 和 CrP 结合位点。注意:在该反应过程中,没有出现像是 E-PO₄ 中间物修饰酶形式。该反应的特点是迅速和可逆地形成 ES 二元复合物,随后加上剩余底物,形成的三元复合物决定反应速率。

(2) 乒乓反应(Ping Pong reactions)或双-置换反应(double-displacement reactions)

这类反应的特点是,酶同 A 的反应产物(P)是在酶同第二个底物 B 反应前释放出来,作为这一过程的结果,酶 E 转变为一种修饰酶形式 E',然后再同底物 B 反应生成第二个产物 Q,和再生为未修饰的酶形式 E:



从图解可知,A 和 Q 竞争自由酶 E 形式,而 B 和 P 竞争修饰酶形式 E',A 和 Q 不同 E'结合,而 B 和 P 也不与 E 结合。该反应历程中间形成 4 种二元复合物,而无三元复合物形成。乒乓反应按其底物和产物作用方式可写作 Uni Uni Uni Uni Ping Pong(Uni 表示单底物或单产物),但对双底物、双产物系统写 Ping Pong Bi Bi,也不会引起误解,因为只有这一种方式。

氨基转移酶是遵循乒乓反应机制的酶,这类酶催化从氨基酸转移氨基到酮酸,产生一种新的氨基酸和酮酸:



一个典型的例子是谷氨酸:天冬氨酸氨基转移酶(glutamate:aspartate aminotransferase)。反应机制的图解如图 9-14 所式:

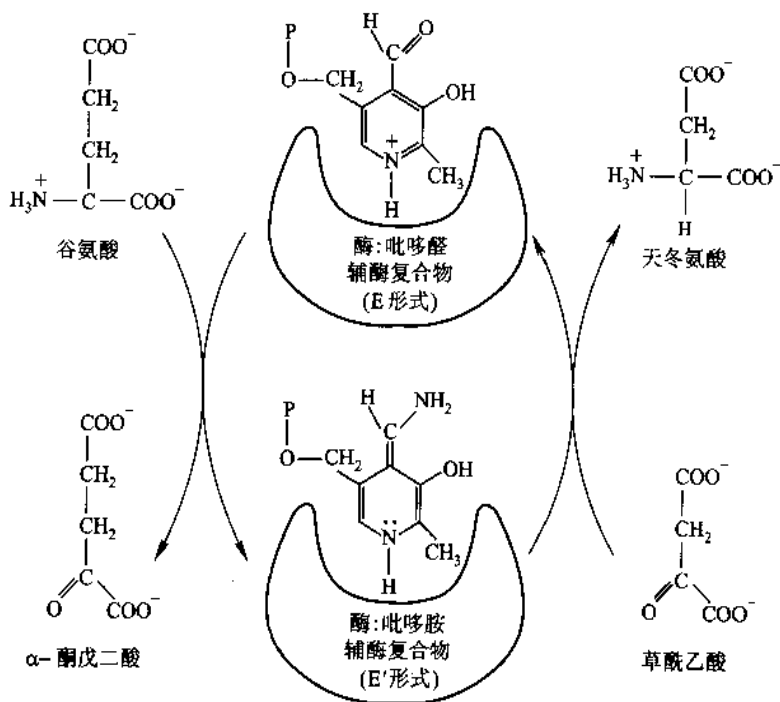


图 9-14 谷氨酸:天冬氨酸氨基转移酶是符合双-置换、双底物机制的酶

谷氨酸:天冬氨酸氨基转移酶是依赖于磷酸吡哆醛的酶。吡哆醛作为 $-NH_2$ 受体由谷氨酸形成吡哆胺。然后,吡哆胺作为氨基供体给草酰乙酸形成天冬氨酸,重新生成吡哆醛辅酶形式(吡哆胺:酶是 E'形式)

从图 9-14 可知,谷氨酸和天冬氨酸相互竞争 E,而草酰乙酸和 α -酮戊二酸彼此竞争 E'。在谷氨酸:天冬氨酸氨基转移酶中,一种酶结合的辅酶磷酸吡哆醛(一种维生素 B₆ 的衍生物),在酶促反应中作为氨基受体/供体。未修饰的酶 E,有吡哆醛形式的辅酶,而修饰的酶形式 E',实际上辅酶是磷酸吡哆胺(图 9-14)。

3. 双底物反应的动力学方程

以 A、B 双底物反应为例,如将底物 B 固定在几个浓度,在每一个固定的 B 浓度时,测定不同 A 浓度对反应速率的影响。反之,再在每一个固定的 A 浓度时,测定不同 B 浓度对反应速率的影响。然后分别作双倒数动力学图,则可区分乒乓机制和序列机制。

(1) 乒乓机制的动力学方程和动力学图 根据乒乓机制的反应历程及稳态学说,可推导出动力学方程为:

$$v = \frac{V_{\max}[A][B]}{K_m^A[B] + K_m^B[A] + [A][B]} \quad (9-28)$$

式中 $[A]$ 、 $[B]$ 分别为底物 A 和 B 的浓度, K_m^A 、 K_m^B 分别为底物 A 和 B 的米氏常数。在多底物反应中,一个底物的米氏常数往往可随另一底物的浓度变化而发生改变,故 K_m^A 是指在 B 的浓度达饱和浓度时 A 的米氏常数。而在 B 低于饱和浓度时所测得的随 $[B]$ 而变的 A 的各个 K_m 称为表观米氏常数。并且在 $[B]$ 不饱和时, $\frac{1}{[A]}$ 对 $\frac{1}{v}$ 作图求出的 V_{\max} 同样也随 $[B]$ 而变化。同理对 B 亦如此。式中 V_{\max} 是指 $[A]$ 、 $[B]$ 都达饱和浓度时的最大反应速率。

取式(9-28)的双倒数,则

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m^A}{V_{\max}[A]} + \left(1 + \frac{K_m^B}{[B]}\right) \frac{1}{V_{\max}} \quad (9-29)$$

当[B]固定或[A]固定时,式(9-29)均为直线方程式。如在几个不同而固定的[B]时, $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[A]}$ 作图得图9-15A,同样,在几个不同而固定的[A]时, $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[B]}$ 作图,得图9-15B。分别得到两组平行直线,这是乒乓机制的特点。

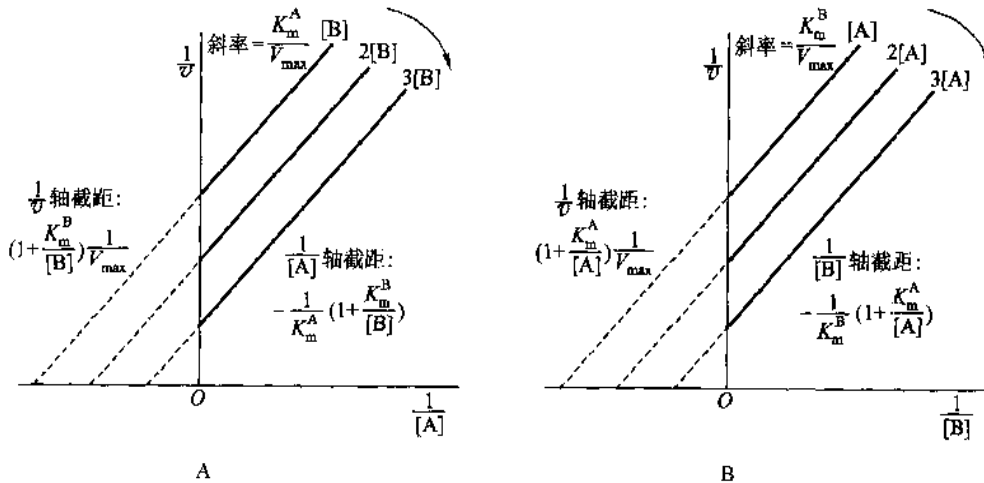


图9-15 乒乓机制 Lineweaver - Burk 作图法

A. $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[A]}$ 作图; B. $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[B]}$ 作图

由图9-15还不能求得各动力学常数,必须进一步采用第二次作图法。

(2) 序列机制的底物动力学方程和动力学图 序列机制的动力学方程为:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [A][B]}{[A][B] + [B]K_m^A + [A]K_m^B + K_s^A K_m^B} \quad (9-30)$$

取式(9-30)的双倒数方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} (K_m^A + \frac{K_s^A K_m^B}{[B]}) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{K_m^B}{[B]}) \quad (9-31)$$

式中[A]、[B]、 K_m^A 、 K_m^B 、 V_{max} 的含义与乒乓机制相同,而 K_s^A 为底物 A 与酶结合的解离常数。由方程(9-31)可知,当在不同固定的[B]将 $\frac{1}{[A]}$ 对 $\frac{1}{v}$ 作图,或在不同固定的[A],将 $\frac{1}{[B]}$ 对 $\frac{1}{v}$ 作图均可得一组直线(图9-16)。但和乒乓机制不同,这组直线相交于横坐标的负侧,这是序列机制的特点。直线的交点可以在横坐标上,也可以在横坐标以上或以下。如交于横坐标上,说明固定浓度的底物与酶的结合不影响变量底物的 K_m ,即 A 和 B 的浓度的大小彼此互不影响各自的 K_m ,此时表观 $K_m = K_m$ 。如直线的交点在横坐标以下,说明 A 的表观 K_m 随 B 浓度的增高而增高,反之,直线的交点在横坐标以上,说明 A 的表观 K_m 随 B 浓度的增加而减小。若求得各动力学常数,还需要第二次作图法。

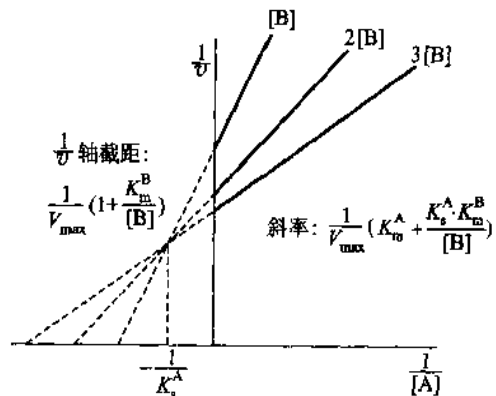


图9-16 序列机制 Lineweaver - Burk 作图法

上述作图方法,可适用于序列机制中有序机制及快速平衡的随机机制,但不能区分两者,需要进一步用产物抑制动力学的方法及同位素交换法才能把它们区别开来。

三、酶的抑制作用

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(inactivation)。由于酶的必需基团化学性质的改变,但酶未变性,而引起酶活力的降低或丧失而称为抑制作用(inhibition)。引起抑制作用的物质称为抑制剂(inhibitor)。变性剂对酶的变性作用无选择性,而一种抑制剂只能使一种酶或一类酶产生抑制作用,因此抑制剂对酶的抑制作用是有选择性的。所以,抑制作用与变性作用是不同的。

研究酶的抑制作用是研究酶的结构与功能、酶的催化机制以及阐明代谢途径的基本手段,也可以为医药设计新药物和为农业生产新农药提供理论依据,因此抑制作用的研究不仅有重要的理论意义,而且在实践上有重要价值。

(一) 抑制程度的表示方法

酶受抑制后活力降低的程度是研究酶抑制作用的一个重要指标,一般用反应速率的变化来表示。若以不加抑制剂时的反应速率为 v_0 ,加入抑制剂后的反应速率为 v_i ,则酶活力的抑制程度可用下述方法表示:

(1) 相对活力分数(残余活力分数)

$$a = \frac{v_i}{v_0}$$

(2) 相对活力百分数(残余活力百分数)

$$a \% = \frac{v_i}{v_0} \times 100 \%$$

(3) 抑制分数:指被抑制而失去活力的分数

$$i = 1 - a = 1 - \frac{v_i}{v_0}$$

(4) 抑制百分数

$$\begin{aligned} i \% &= (1 - a) \times 100 \% \\ &= \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100 \% \end{aligned}$$

通常所谓抑制率是指抑制分数或抑制百分数。

(二) 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,可把抑制作用分为两大类。

1. 不可逆的抑制作用

抑制剂与酶的必需基团以共价键结合而引起酶活力丧失,不能用透析、超滤等物理方法除去抑制剂而使酶复活,称为不可逆抑制(irreversible inhibition)。由于被抑制的酶分子受到不同程度的化学修饰,故不可逆抑制也就是酶的修饰抑制。

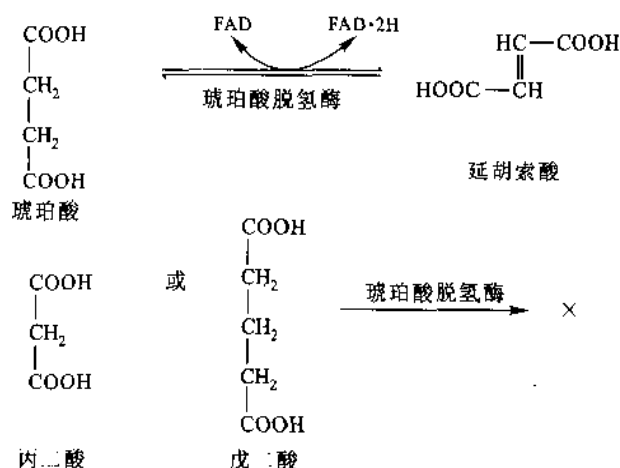
2. 可逆的抑制作用

抑制剂与酶以非共价键结合而引起酶活力降低或丧失,能用物理方法除去抑制剂而使酶复活,这种抑制作用是可逆的,称为可逆抑制(reversible inhibition)。

根据可逆抑制剂与底物的关系,可逆抑制作用分为3种类型:

(1) 竞争性抑制(competitive inhibition) 是最常见的一种可逆抑制作用。抑制剂(I)和底物(S)竞争

酶的结合部位,从而影响了底物与酶的正常结合(图 9-17)。因为酶的活性部位不能同时既与底物结合又与抑制剂结合,因而在底物和抑制剂之间产生竞争,形成一定的平衡关系。大多数竞争性抑制剂的结构与底物结构类似,因此能与酶的活性部位结合,与酶形成可逆的 EI 复合物,但 EI 不能分解成产物 P,酶反应速率下降。其抑制程度取决于底物及抑制剂的相对浓度,这种抑制作用可以通过增加底物浓度而解除。这类抑制最典型的例子是丙二酸和戊二酸对琥珀酸脱氢酶结合,但不能催化脱氢。



(2) 非竞争性抑制(noncompetitive inhibition) 这类抑制作用的特点是底物和抑制剂同时和酶结合,两者没有竞争作用。酶与抑制剂结合后,还可以与底物结合: $EI + S \rightarrow ESI$;酶与底物结合后,还可以与抑制剂结合: $ES + I \rightarrow ESI$ 。但是中间的三元复合物不能进一步分解为产物,因此酶活力降低。这类抑制剂与酶活性部位以外的基团相结合(图 9-17),其结构与底物无共同之处,这种抑制作用不能用增加底物浓度来解除抑制,故称非竞争性抑制。例如亮氨酸是精氨酸酶的一种非竞争性抑制剂。某些重金属离子 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 等对酶的抑制作用均属这类抑制剂。

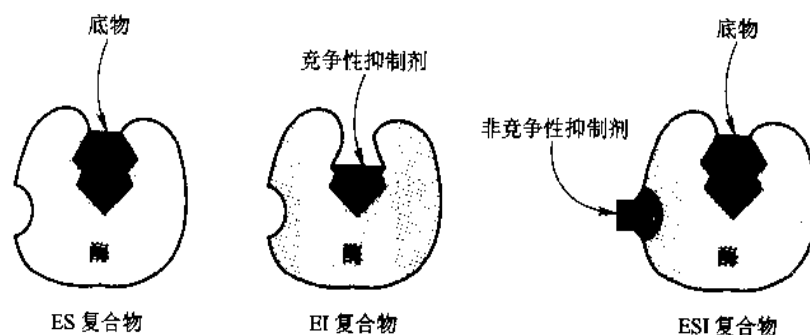


图 9-17 酶与底物或抑制剂结合的中间物

(3) 反竞争性抑制(uncompetitive inhibition) 酶只有与底物结合后,才能与抑制剂结合,即 $ES + I \rightarrow ESI$, $ESI \rightarrow P$ 。反竞争性抑制作用常见于多底物反应中,而在单底物反应中比较少见。有人证明,L-Phe,L-同型精氨酸等多种氨基酸对碱性磷酸酶的作用是反竞争性抑制,胍类化合物抑制胃蛋白酶,氰化物抑制芳香硫酸酯酶的作用也属于反竞争性抑制。

(三) 可逆抑制作用和不可逆抑制作用的鉴别

除了用透析、超滤或凝胶过滤等方法能否除去抑制剂来区别可逆抑制作用和不可逆抑制作用外,还可采用动力学的方法来鉴别。

在测定酶活力系统中加入一定量的抑制剂,然后测定不同酶浓度的反应初速率,以初速率对酶浓度作图。在测活系统中不加抑制剂时,初速率对酶浓度作图得到一条通过原点的直线(图 9-18 曲线 1);当测

活系统中加入一定量的不可逆抑制剂时,抑制剂使一定量的酶失活,只有加入的酶量大于不可逆抑制剂的量时,才表现出酶活力,不可逆抑制剂的作用相当于把原点向右移动(图9-18曲线2);在测活系统中加入一定量的可逆抑制剂后,由于抑制剂的量是恒定的,因此得到一条通过原点,但斜率低于曲线1的直线(图9-18曲线3)。如果在不同抑制剂浓度下,每一个抑制剂浓度都作一条初速率和酶浓度关系曲线,不可逆抑制剂可以得到一组不通过原点的平行线,而可逆抑制剂得到一组通过原点但斜率不同的直线。这样可逆抑制作用和不可逆抑制作用从图9-19更清楚地区分开来。

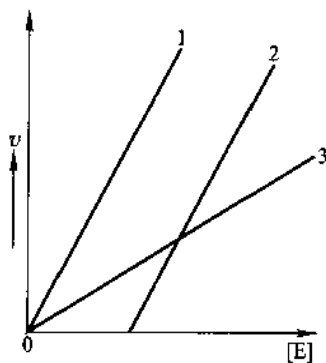


图9-18 可逆抑制剂与不可逆抑制剂的区别(一)
曲线1,无抑制剂;曲线2,不可逆抑制剂;曲线3,可逆抑制剂

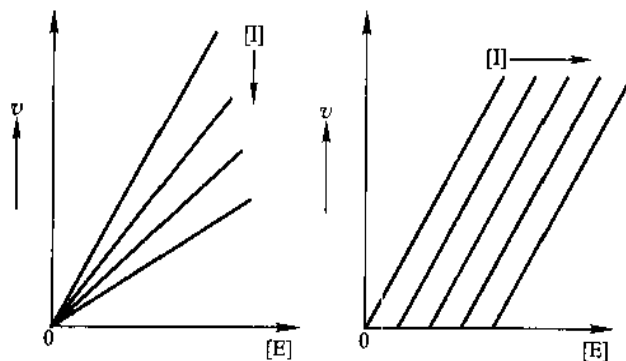


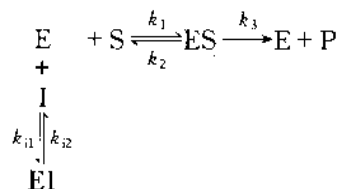
图9-19 可逆抑制剂与不可逆抑制剂的区别(二)
A. 可逆抑制剂的作用;B. 不可逆抑制剂的作用

(四) 可逆抑制作用动力学

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,定量说明抑制剂对酶促反应速率的影响,着重讨论下面3种可逆抑制类型的动力学。

1. 竞争性抑制

在竞争性抑制中,底物或抑制剂与酶的结合都是可逆的,存在着下面平衡式:



K_i : 为抑制剂常数(inhibitor constant), $K_i = \frac{k_{12}}{k_{11}}$, 为EI的解离常数。

K_m 为ES的解离常数。

酶不能同时与S、I结合,所以,有ES和EI,而没有ESI

$$[\text{E}] = [\text{E}_f] + [\text{ES}] + [\text{EI}] \quad (9-32)$$

$[\text{E}_f]$ 为游离酶的浓度, $[\text{E}]$ 为酶的总浓度。

根据式(9-22), (9-20):

$$\begin{aligned} V_{\max} &= k_3[\text{E}] \\ v &= k_3[\text{ES}] \end{aligned}$$

$$\text{所以 } \frac{V_{\max}}{v} = \frac{[\text{E}]}{[\text{ES}]} \quad (9-33)$$

$$\text{将式(9-32)代入式(9-33): } \frac{V_{\max}}{v} = \frac{[\text{E}_f] + [\text{ES}] + [\text{EI}]}{[\text{ES}]} \quad (9-34)$$

为了消去[ES]项,根据 K_m 和 K_i 的平衡式求出 $[E_f]$ 项及 $[EI]$ 项:

$$\text{因为 } K_m = \frac{[E_f][S]}{[ES]} \quad \text{所以 } [E_f] = \frac{K_m}{[S]}[ES]$$

$$\text{因为 } K_i = \frac{[E_f][I]}{[EI]} \quad \text{所以 } [EI] = \frac{[E_f][I]}{K_i}$$

$$\text{将 } [E_f] \text{ 代入 } [EI] \text{ 式中,则 } [EI] = \frac{K_m}{[S]} \cdot [ES] \cdot \frac{[I]}{K_i} = \frac{K_m[I]}{K_i[S]}[ES]$$

$$\text{再将 } [E_f] \text{ 及 } [EI] \text{ 代入式(9-34)得: } \frac{V_{\max}}{v} = \frac{\frac{K_m}{[S]}[ES] + [ES] + \frac{K_m[I]}{K_i[S]}[ES]}{[ES]}$$

$$\text{整理后得: } v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (9-35)$$

$$\text{双倒数式: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (9-36)$$

将式(9-35)以 v 对 $[S]$ 作图得图 9-20A 用式(9-36)以双倒数作图得图 9-20B。

从图 9-20A 可以看出,加入竞争性抑制剂后, V_{\max} 不变, K_m 变大, $K'_m > K_m$, 而且 K'_m 随 $[I]$ 的增加而增大。双倒数作图直线相交于纵轴,这是竞争性抑制作用的特点。抑制分数与 $[I]$ 成正比,而与 $[S]$ 成反比。

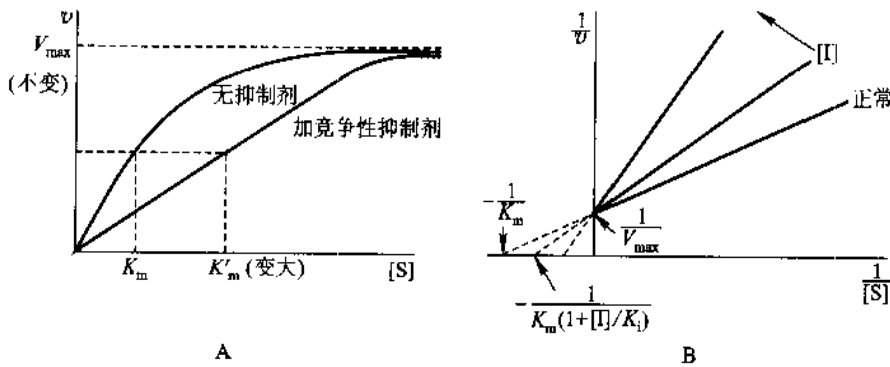
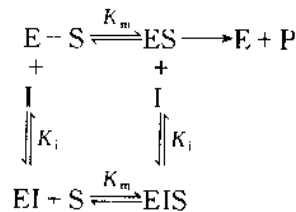


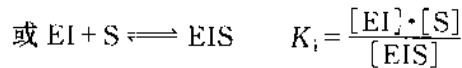
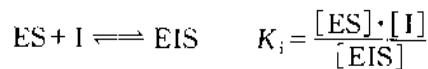
图 9-20 竞争性抑制曲线

2. 非竞争性抑制

在非竞争时抑制中存在如下的平衡:



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。



所以,与酶结合的中间产物有 ES, EI 及 EIS。

$$[E] = [E_f] + [ES] + [EI] + [EIS]$$

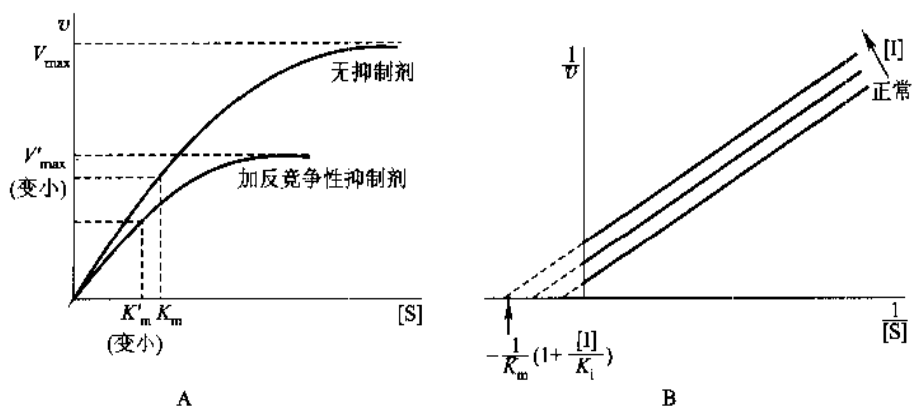


图 9-22 反竞争性抑制曲线

力学方程式, 得知 K_m 及 V_{max} 的变化, 在此不再赘述。

现将无抑制剂和有抑制剂时的米氏方程和 V_{max} 和 K_m 的变化, 归纳于表 9-6 中。

表 9-6 不同类型可逆抑制作用的米氏方程和常数

类型	方程式	V_{max}	K_m
无抑制剂	$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$	V_{max}	K_m
竞争性抑制	$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$	不变	增加
非竞争性抑制	$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{(K_m + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$	减小	不变
反竞争性抑制	$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]}$	减小	减小

用 Dixon 作图法, 求 K_i , 只要以 $[I]$ 为横坐标, 以 $\frac{1}{v}$ 为纵坐标, 采用一个以上的 $[S]$, 给出不同 $[S]$ 时的直线, 由这些直线的交点即可求得 K_i , 见图 9-23。

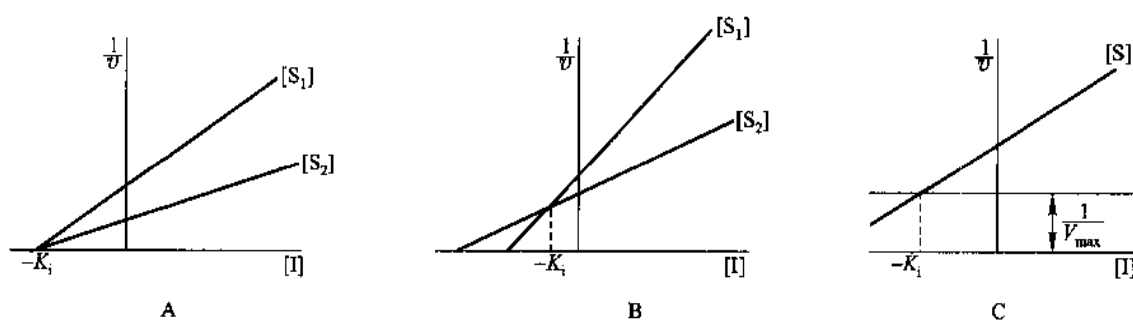


图 9-23 Dixon 作图法求 K_i ($[S_2] > [S_1]$)

A. 非竞争性抑制 B. 竞争性抑制 C. 反竞争性抑制

(五) 一些重要的抑制剂

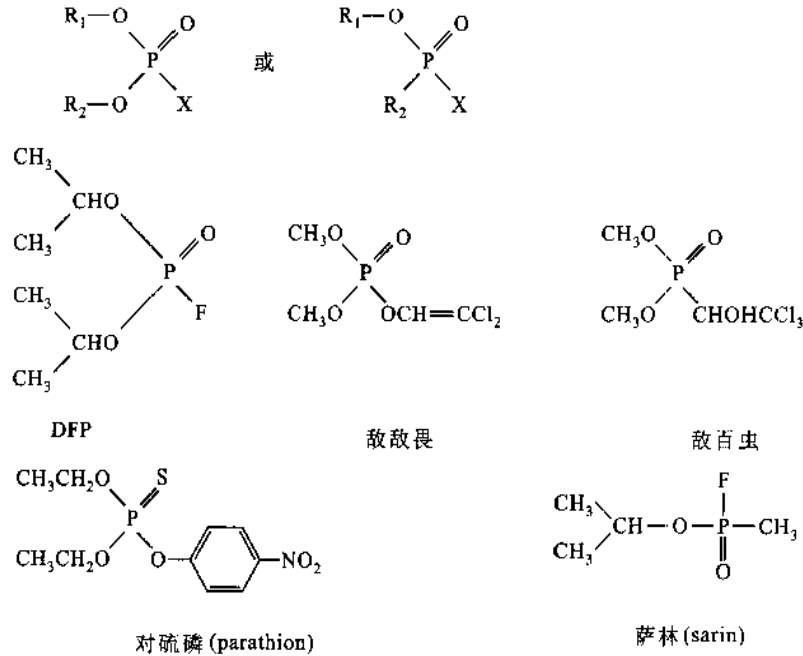
1. 不可逆抑制剂

按照不可逆抑制作用的选择性不同, 可将不可逆抑制剂分为两类, 非专一性不可逆抑制剂及专一性不

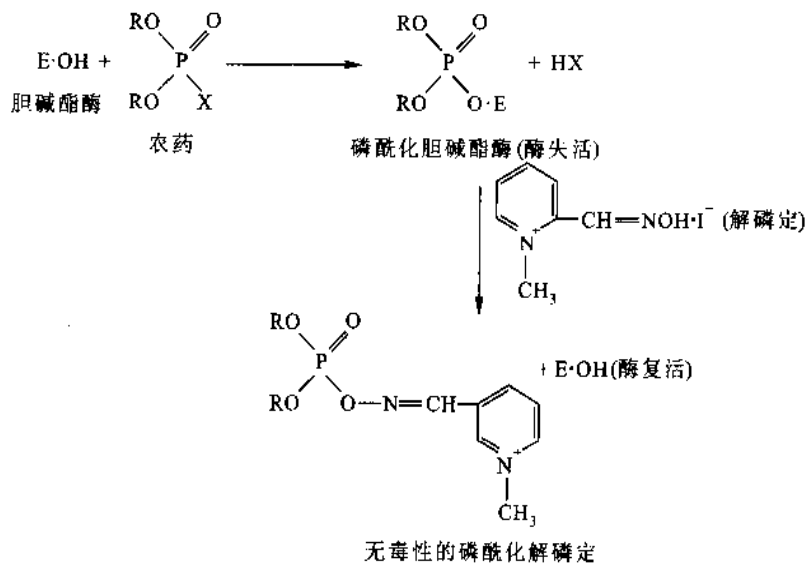
可逆抑制剂,前者作用于酶的一类或几类基团,这些基团中包含了必需基团,作用后引起酶的失活;后者专一地作用于某一种酶活性部位的必需基团而导致酶的失活,它是研究酶活性部位的重要试剂。

(1) 非专一性不可逆抑制剂 主要有以下几类:

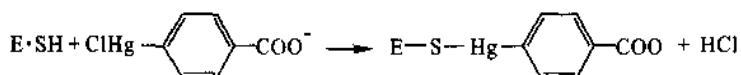
① 有机磷化合物 常见的有 DFP、农药敌敌畏、敌百虫、对硫磷等,它们的通式和结构式如下:



这些有机磷化合物能抑制某些蛋白酶及酯酶活力,与酶分子活性部位的丝氨酸羟基共价结合,从而使酶失活。这类化合物强烈地抑制对神经传导有关的胆碱酯酶活力,使乙酰胆碱不能分解为乙酸和胆碱,引起乙酰胆碱的积累,使一些以乙酰胆碱为传导介质的神经系统处于过度兴奋状态,引起神经中毒症状,因此这类有机磷化合物又称为神经毒剂。有机磷制剂与酶结合后虽不解离,但用解磷定(碘化肟肟甲基吡啶)或氯磷定(氯化肟肟甲基吡啶)能把酶上的磷酸根除去,使酶复活。在临床上它们作为有机磷中毒后的解毒药物。其作用过程如下:

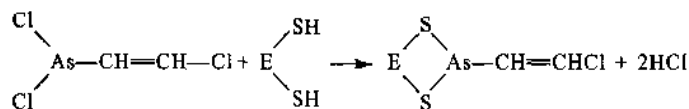


② 有机汞、有机砷化合物 这类化合物与酶分子中半胱氨酸残基的巯基作用,抑制含巯基的酶,如对氯汞苯甲酸(PCMB),其作用如下:

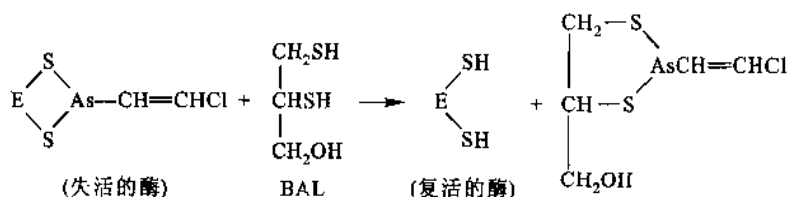


这类抑制可通过加入过量的巯基化合物如半胱氨酸或还原型谷胱甘肽(GSH)而解除。

有机砷化合物如路易斯毒气(Lewisite, $CHCl=CHAsCl_2$)与酶的巯基结合而使人畜中毒。

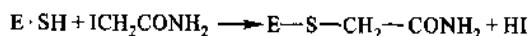


英国发明了一种能与 Lewisite 有更大亲和力的解毒剂,称 BAL(Britishanti - Lewisite)。可重新使酶恢复活性。



③ 重金属盐 含 Ag^+ 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 的重金属盐在高浓度时,能使酶蛋白变性失活。在低浓度时对某些酶的活性产生抑制作用,一般可以使用金属螯合剂如 EDTA、半胱氨酸等螯合除去有害的重金属离子,恢复酶的活力。

④ 烷化试剂 这一类试剂往往含有一个活泼的卤素原子,如碘乙酸、碘乙酰胺和 2,4-二硝基氟苯等,被作用的基团有巯基、氨基、羧基、咪唑基和硫醚基等。例如与巯基酶的作用:



⑤ 氰化物、硫化物和 CO 这类物质能与酶中金属离子形成较为稳定的络合物,使酶的活性受到抑制。如氰化物作为剧毒物质与含铁卟啉的酶(如细胞色素氧化酶)中的 Fe^{2+} 络合,使酶失活而阻止细胞呼吸。

⑥ 青霉素(Penicillin) 抗菌素青霉素是一种不可逆抑制剂,与糖肽转肽酶(glycopeptide transpeptidase)活性部位丝氨酸羟基共价结合,使酶失活。而该酶在细菌细胞壁合成中使肽聚糖链交联。一旦酶失活,细菌细胞壁合成受阻,细菌生长被损害。因此青霉素起到抗菌作用,是临床上常用的抗菌药。反应过程如图 9-24 所示。

(2) 专一性不可逆抑制剂 专一性的不可逆抑制剂可分为 K_S 型和 k_{cat} 型两大类。

① K_S 型不可逆抑制剂 这类抑制剂是根据底物的化学结构设计的,具有底物类似的结构,可以和相应的酶结合,同时还带有一个活泼的化学基团,能与酶分子中的必需基团反应进行化学修饰,从而抑制酶活性。因抑制是通过对酶的亲和力来对酶进行修饰标记的,故称为亲和标记试剂(affinity labeling reagent)。这种抑制剂虽然主要“攻击”酶活性部位的必需基团,但由于它的活泼基团也可以修饰酶分

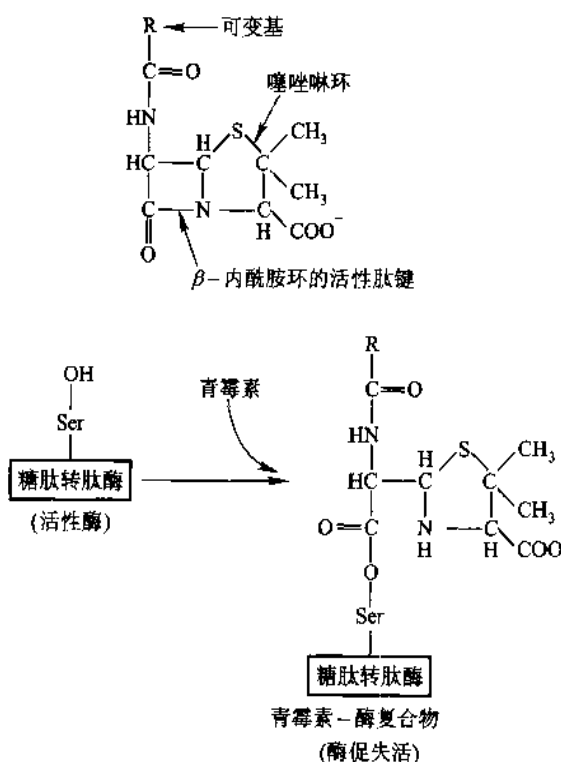


图 9-24 青霉素是糖肽转肽酶的不可逆抑制剂

子其他部位的同基团,因此其专一性有一定的限度。这取决于抑制剂与活性部位必需基团在反应前形成非共价络合物的解离常数以及非活性部位同类基团形成非共价络合物的解离常数之比,即 K_S 的比值,故这类抑制剂称为 K_S 型不可逆抑制剂。例如:胰蛋白酶要求催化的底物具有一个带正电荷的侧链,如 Lys、Arg 侧链。对甲苯磺酰-L-赖氨酸甲酯(TLME)和胰蛋白酶的底物对甲苯磺酰-L-赖氨酸甲酯(TLME)有相似的结构(图9-25),因此前者可以与胰蛋白酶活性部位必需基团 His₅₇ 共价结合,引起不可逆地失活。失活作用是以化学计算量进行,伴随着活性 100% 丧失。所以 TLCK 是胰蛋白酶的 K_S 型不可逆抑制剂。

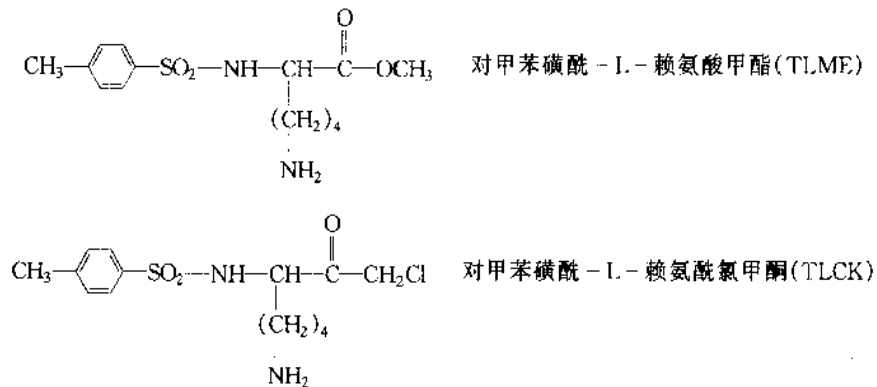


图9-25 胰蛋白酶底物与其 K_S 型不可逆抑制剂的化学结构比较

② k_{cat} 型不可逆抑制剂 是根据酶催化过程设计的,设计此类抑制剂,要求对酶的作用机制预先有一定的了解。 k_{cat} 抑制剂不但具有天然底物的类似结构,且本身也是酶的底物,能与酶结合发生类似于底物的变化。但抑制剂还有一个潜伏的反应基团(latent group),当酶对它进行催化反应时,这个潜伏反应基团被暴露或活化,并作用于酶活性部位的必需基团或酶的辅基,使酶不可逆失活。这类抑制剂是专一性极高的不可逆抑制剂。有人把这种抑制剂称为自杀性底物(suicide substrate)。例如 β -卤代-D-Ala 是细菌中丙氨酸消旋酶(alanine racemase, AR)的不可逆抑制剂,属于磷酸吡哆醛酶类的自杀性底物,作用机制如图9-26所示。因丙氨酸消旋酶能使 L-Ala 转变成为 D-Ala,而 D-Ala 是细菌合成胞壁肽聚糖的重要原料,丙氨酸消旋酶受抑制后可阻断肽聚糖的合成,则抑制细菌生长,故 β -卤代-D-Ala 是一种抗菌药物。

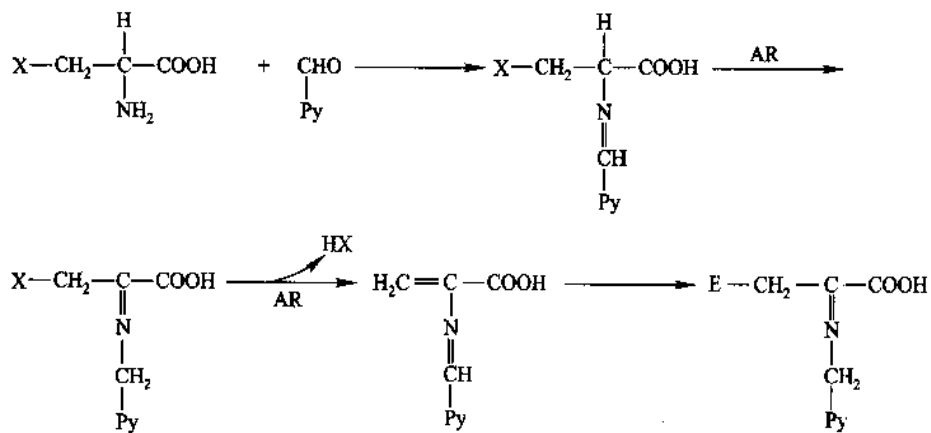
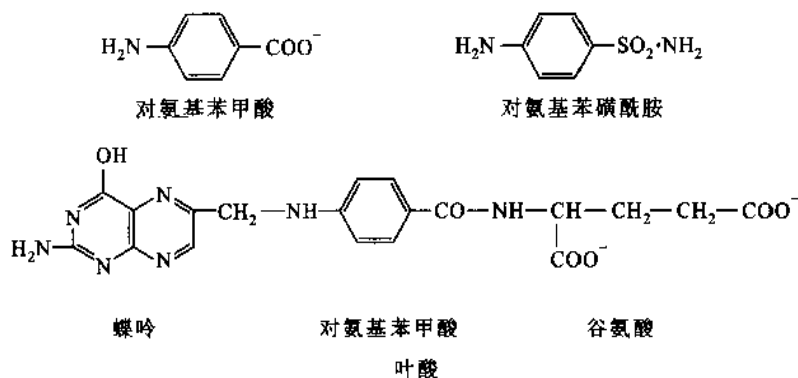


图9-26 β -卤代-D-丙氨酸抑制丙氨酸消旋酶的机制

2. 可逆抑制剂

可逆抑制剂中最重要和最常见的是竞争性抑制剂。如像一些竞争性抑制剂与天然代谢物在结构上十

分相似,能选择性地抑制病菌或癌细胞在代谢过程中的某些酶,而具有抗菌和抗癌作用。这类抑制剂可称为抗代谢物或代谢类似物。例如 5'-氟尿嘧啶是一种抗癌药物,它的结构与尿嘧啶十分相似,能抑制胸腺嘧啶合成酶的活性,阻碍胸腺嘧啶的合成代谢,使体内核酸不能正常合成,使癌细胞的增殖受阻,起到抗癌作用。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结构的一部分,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,利用对氨基苯甲酸为原料合成二氢叶酸。而磺胺药物可与对氨基苯甲酸相互竞争,抑制二氢叶酸合成酶的活性,影响二氢叶酸的合成,导致细菌的生长繁殖受抑制,从而达到治病的效果。

利用竞争性抑制的原理用来设计药物,如抗癌药物阿拉伯糖胞苷、氨基叶酸等都是利用这一原理而设计出来的。

过渡态底物类似物可作为竞争性抑制剂,所谓过渡态(transition state)底物是指底物和酶结合成中间复合物后被活化的过渡形式,由于能障小,和酶结合就紧密得多,这是酶具有高度催化效力的原因之一。可以设想,如抑制剂的化学结构能类似过渡态底物,则其对酶的亲和力就会远大于底物,可达到 $10^2 \sim 10^6$ 倍,从而引起酶的强烈抑制。由于酶作用机制研究的进展,目前已报道了各种酶反应的几百种过渡态底物类似物,它们都属于竞争性抑制剂,其抑制效率比其基态底物类似物高的多。

例如嘌呤腺苷水合形式是小牛肠腺苷脱氨酶(adenosine deaminase)反应过渡态的类似物,是该酶强的抑制剂, $K_i = 3 \times 10^{-13} \text{ mol/L}$ (图 9-27A)。酵母醛缩酶(aldolase)反应的过渡态类似物比对底物的结合能力大 4 万倍(图 9-27B)。

再如,催化 $\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$ 的腺苷酸激酶(adenylate kinase),经研究腺苷五磷酸(AP_5A)是底物过渡态类似物,对该酶有强烈地抑制作用。又如乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)、草酰乙酸脱羧酶(oxaloacetic decarboxylase)、丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)在催化各自底物(分别为乳酸、草酰乙酸、丙酮酸)变成产物的过程中,烯醇式丙酮酸是共有的过渡态,而草酸是烯醇式丙酮酸的类似物,故对 3 种酶都有强烈的抑制作用。 K_i 约为 $3.5 \times 10^{-6} \sim 1.1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$,和相应的底物有竞争作用。



过渡态底物类似物抑制剂的研究,具有很大的理论和实践意义,不但有利于对酶催化机制的了解,还可据此合成具有高效而特异的新药物。

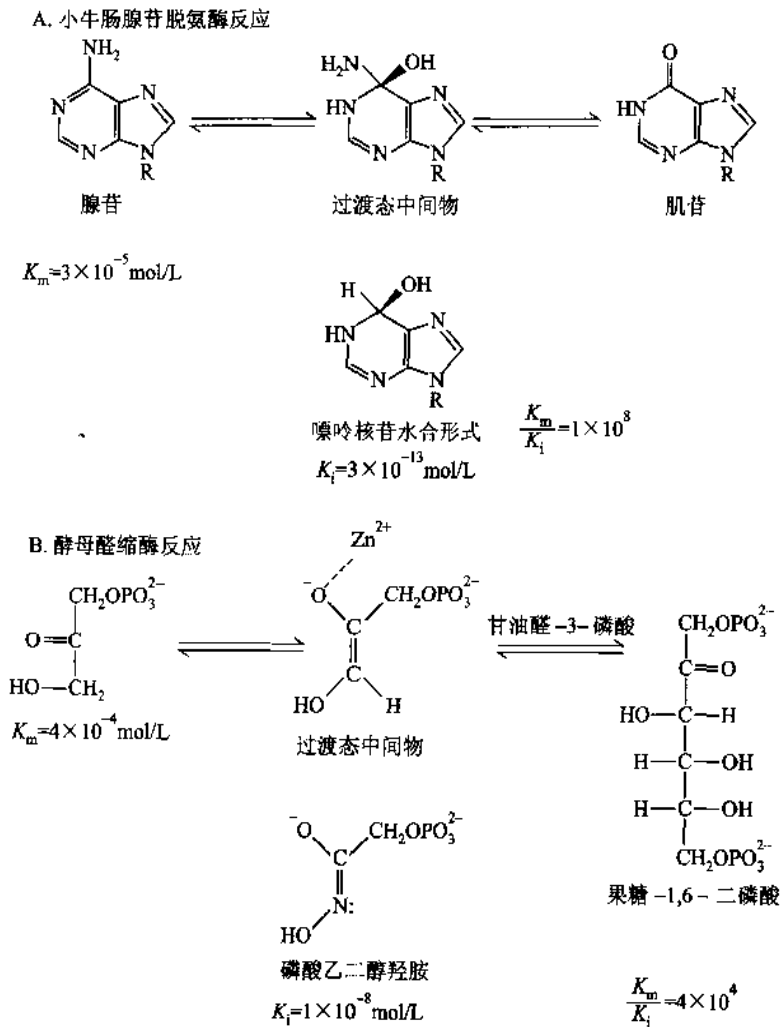


图 9-27 过渡态类似物举例

- A. 嘌呤核苷水合形式是小肠腺苷脱氨酶反应过渡类似物,是该酶有力的抑制剂
- B. 磷酸乙二醇羟胺(phosphoglycolhydroxamate)是酵母醛缩酶反应过渡态(enediolate)类似物

四、温度对酶反应的影响

大多数化学反应的速率,都和温度有关,酶催化的反应也不例外。如果在不同温度条件下进行某种酶反应,然后将测得的反应速率相对于温度作图,即可得到图 9-28 所示的钟罩形曲线。从图上曲线可以看出,在较低的温度范围内,酶反应速率随温度升高而增大,但超过一定温度后,反应速率反而下降,因此只有在某一温度下,反应速率达到最大值,这个温度通常就称为酶反应的最适温度(optimum temperature)。每种酶在一定条件下都有其最适温度。一般讲,动物细胞内的酶最适温度在 $35 \sim 40^\circ\text{C}$,植物细胞中的酶最适温度稍高,通常在 $40 \sim 50^\circ\text{C}$ 之间,微生物中的酶最适温度差别较大,如 Taq DNA 聚合酶的最适温度可高达 70°C 。

温度对酶促反应速率的影响表现在两个方面,一方面是当温度升高时,与一般化学反应一样,反应速率加快。反应温度提高 10°C ,其反应速率与原来反应速率之比称为反应的温度系数,用 Q_{10} 表示,对大多数酶来讲温度系数 Q_{10} 多为 2,也就是说,即温度每升高 10

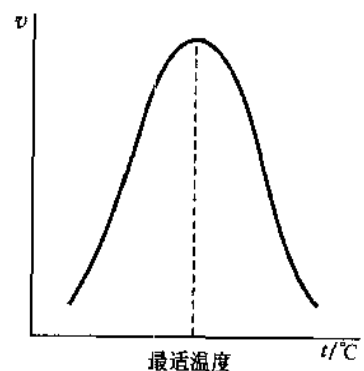


图 9-28 温度对酶反应速率的影响

℃,酶反应速率为原反应速率的2倍。另一方面由于酶是蛋白质,随着温度升高,使酶蛋白逐渐变性而失活,引起酶反应速率下降。酶所表现的最适温度是这两种影响的综合结果。在酶反应的最初阶段,酶蛋白的变性尚未表现出来,因此反应速率随温度升高而增加,但高于最适温度时,酶蛋白变性逐渐突出,反应速率随温度升高的效应将逐渐为酶蛋白变性效应所抵消,反应速率迅速下降,因此表现出最适温度。最适温度不是酶的特征物理常数,常受到其他条件如底物种类、作用时间、pH和离子强度等因素影响而改变。如最适温度随着酶促作用时间的长短而改变,由于温度使酶蛋白变性是随时间累加的。一般讲反应时间长,酶的最适温度低,反应时间短则最适温度就高,因此只有在规定的反应时间内才可确定酶的最适温度。

酶的固体状态比在溶液中对温度的耐受力要高。酶的冰冻干粉置冰箱中可放置几个月,甚至更长时间。而酶溶液在冰箱中只能保存几周,甚至几天就会失活。通常酶制剂以固体保存为佳。

五、pH对酶反应的影响

酶的活力受环境pH的影响,在一定pH下,酶表现最大活力,高于或低于此pH,酶活力降低,通常把表现出酶最大活力的pH称为该酶的最适pH(optimum pH)(图9-29)。

各种酶在一定条件下都有其特定的最适pH,因此最适pH是酶的特性之一。但酶的最适pH不是一个常数,受许多因素影响,随底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度的不同而改变,因此最适pH只有在一定条件下才有意义。大多数酶的最适pH在5~8之间,动物体的酶多在pH6.5~8.0之间,植物及微生物中的酶多在pH4.5~6.5左右。但也有例外,如胃蛋白酶的最适pH为1.5,肝中精氨酸酶最适pH为9.7。表9-7列举了几种酶的最适pH。

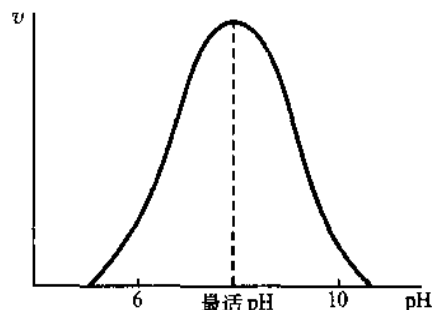


图9-29 pH对酶活力的影响

表9-7 一些酶的最适pH

酶	底物	最适pH
胃蛋白酶(pepsin)	鸡蛋白蛋白	1.5
	血红蛋白	2.2
丙酮酸羧化酶(pyruvate carborylase)	丙酮酸	4.8
脂肪酶(lipase)	低级酯	5.5~5.8
	延胡索酸	6.5
延胡索酸酶(fumarase)	苹果酸	8.0
	过氧化氢酶(catalase)	H ₂ O ₂
核糖核酸酶(ribonuclease)	RNA	7.8
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

pH影响酶活力的原因可能有以下几个方面:

(1) 过酸或过碱可以使酶的空间结构破坏,引起酶构象的改变,酶活性丧失。

(2) 当pH改变不很剧烈时,酶虽未变性,但活力受到影响。pH影响了底物的解离状态,或者使底物不能和酶结合,或者结合后不能生成产物;pH影响酶分子活性部位上有关基团的解离,从而影响与底物的结合或催化,使酶活性降低;也可能影响到中间络合物ES的解离状态,不利于催化生成产物。

(3) pH影响维持酶分子空间结构的有关基团解离,从而影响了酶活性部位的构象,进而影响酶的活性。

各种酶在最适pH时所处的某一种解离状态,最有利于与底物结合并发生催化作用,活力最高,如胆碱酯酶解离成两性离子,精氨酸酶呈负离子时活力最大。

由于酶活力受pH的影响很大,因此在酶的提纯及测活时要选择酶的稳定pH,通常在某一pH缓冲液中进行。一般最适pH总是在该酶的稳定pH范围内,故酶在最适pH附近最为稳定。虽然多数酶的pH-酶活性曲线为钟罩形,但有的酶并非如此,如胃蛋白酶和胆碱酯酶为钟形的一半,而木瓜蛋白酶的活性在较大的pH范围内几乎不受pH的影响(图9-30)。

应当指出酶在体外所测定的最适pH与它在生物体细胞内的生理pH并不一定相同。因为细胞内存在多种多样的酶,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,因而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重要的意义。

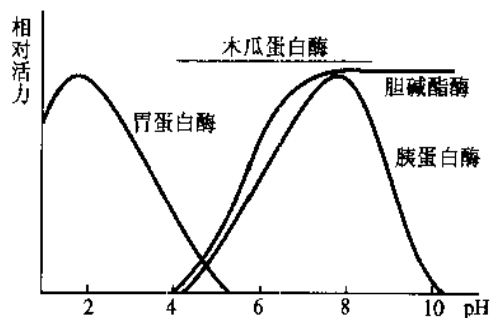


图9-30 4种酶的pH-酶活性曲线

六、激活剂对酶反应的影响

凡是能提高酶活性的物质都称为激活剂(activator),其中大部分是无机离子或简单的有机化合物。作为激活剂的金属离子有 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 及 Fe^{2+} 等离子,无机阴离子如: Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 CN^- 、 PO_4^{3-} 等都可作为激活剂。如 Mg^{2+} 是多数激酶及合成酶的激活剂, Cl^- 是唾液淀粉酶的激活剂。

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起激活作用,而对另一种酶可能起抑制作用,如 Mg^{2+} 对脱羧酶有激活作用而对肌球蛋白腺三磷酶却有抑制作用; Ca^{2+} 则相反,对前者有抑制作用,但对后者却起激活作用。有时离子之间有拮抗作用,例如 Na^+ 抑制 K^+ 激活的酶, Ca^{2+} 能抑制 Mg^{2+} 激活的酶。有时金属离子之间也可相互替代,如 Mg^{2+} 作为激酶的激活剂可被 Mn^{2+} 代替。另外,激活离子对于同一种酶,可因浓度不同而起不同的作用,如对于NADP⁺合成酶,当 Mg^{2+} 浓度为 $(5 \sim 10) \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时起激活作用,但当浓度升高为 $30 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时则酶活性下降;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。

有些小分子有机化合物可作为酶的激活剂,例如半胱氨酸,还原型谷胱甘肽等还原剂对某些含巯基的酶有激活作用,使酶中二硫键还原成巯基,从而提高酶活性。木瓜蛋白酶和甘油醛3-磷酸脱氢酶都属于巯基酶,在它们分离纯化过程中,往往需加上上述还原剂,以保护巯基不被氧化。再如一些金属螯合剂如EDTA(乙二胺四乙酸)等能除去重金属离子对酶的抑制,也可视为酶的激活剂。

另外酶原可被一些蛋白酶选择性水解肽键而被激活,这些蛋白酶也可看成为激活剂。关于酶原的激活将在第10章讨论。

提 要

酶促反应动力学是研究酶促反应的速率以及影响此速率各种因素的科学。它是以化学动力学为基础讨论底物浓度、抑制剂、pH、温度及激活剂等因素对酶反应速率的影响。化学动力学中在研究化学反应速率与反应物浓度的关系时,常分为一级反应、二级反应及零级反应。研究证明,酶催化过程的第一步是生成酶-底物中间产物,Michaelis-Menten根据中间产物学说的理论推导出酶反应动力学方程式,即米氏方程。并经Briggs和Haldane以稳态理论加以修正。从米氏方程得到几个重要的物理常数,即 K_m 、 V_{max} 、 k_{cat} 、 k_{cat}/K_m 。 K_m 是酶的一个特征常数,以浓度为单位, K_m 有多种用途,通过直线作图法可以得到 K_m 及 V_{max} 。 k_{cat} 称为催化常数,又叫做转换数(TN值),它的单位为 s^{-1} , k_{cat} 值越大,表示酶的催化速率越高。

k_{cat}/K_m 常用来比较酶催化效率的参数。酶促反应除了单底物反应外,最常见的为双底物反应,按其动力学机制分为序列反应和乒乓反应,用动力学直线作图法可以区分。

酶促反应速率常受抑制剂影响,根据抑制剂与酶的作用方式及抑制作用是否可逆,将抑制作用分为可逆抑制作用及不可逆抑制作用。根据可逆抑制剂与底物的关系分为竞争性抑制、非竞争性抑制及反竞争性抑制3类,可以分别推导出抑制作用的动力学方程。竞争性抑制可以通过增加底物浓度而解除,其动力学常数 K'_m 变大, V_{max} 不变;非竞争性抑制 K_m 不变, V'_{max} 变小;反竞争性抑制 K'_m 及 V'_{max} 均变小。通过动力学作图可以区分这3种类型的可逆抑制作用。可逆抑制剂中最重要的是竞争性抑制剂,过渡态底物类似物为强有力的竞争性抑制剂。不可逆抑制剂中,最有意义的为专一性 K_S 型及 k_{cat} 型不可逆抑制剂。研究酶的抑制作用是研究酶的结构与功能、酶的催化机制、阐明代谢途径以及设计新药物的重要手段。

温度、pH及激活剂都会对酶促反应速率产生重要影响,酶反应有最适温度及最适pH,要选择合适的激活剂。在研究酶促反应速率及测定酶的活力时,都应选择酶的最适反应条件。

习 题

1. 当一酶促反应进行的速率为 V_{max} 的80%时,在 K_m 和 $[S]$ 之间有何关系? [$K_m = 0.25[S]$]
2. 过氧化氢酶的 K_m 值为 $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当底物过氧化氢浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,求在此浓度下,过氧化氢酶被底物所饱和的百分数。[80%]
3. 由酶反应 $S \rightarrow P$ 测得如下数据:

$[S]/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$v/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
6.25×10^{-6}	15.0
7.50×10^{-5}	56.25
1.00×10^{-4}	60.0
1.00×10^{-3}	74.9
1.00×10^{-2}	75.0

- (1) 计算 K_m 及 V_{max} 。 [$K_m: 2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{max}: 75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
- (2) 当 $[S] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶催化反应的速率是多少? [$50.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
- (3) 若 $[S] = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,酶的浓度增加一倍,此时 v 是多少? [$100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]
- (4) 表中的 v 是根据保温 10 min 产物生成量计算出来的,证明 v 是真正的初速率。
4. 由酶反应 $S \rightarrow P$, 得到下列数据。用 Eisenthal 和 Cornish-Bowden 直接线性作图法,求 K_m 和 V_{max} 。

$[S]/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$v/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
8.33×10^{-6}	13.8
1.00×10^{-5}	16.0
1.25×10^{-5}	19.0
1.67×10^{-5}	23.6
2.00×10^{-5}	26.7

[$K_m: 4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{max}: 80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]

5. 某酶的 K_m 为 $4.7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, V_{max} 为 $22 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 底物浓度为 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 试计算(1) 竞争性抑制剂,(2) 非竞争性抑制剂,(3) 反竞争性抑制剂的浓度均为 $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的酶催化反应速率? 这3种情况的 K_i 值都是 $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。(4) 上述3种情况下,抑制百分数是多少?

[(1) $13.54 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 24%; (2) $6.68 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 62.5%; (3) $7.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 57.5%]

6. 今制得酶浓度相同,底物浓度不同的几个反应混合液,并测得反应初速率,数据见下表。请利用 Eadie-Hofstee 方程式,用图解法求出 K_m 值及 V_{max} 值。这种作图法与 Lineweaver-Burk 作图法比较有何优点?

$[S]/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$v/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
4.0×10^{-4}	130
2.0×10^{-4}	110
1.0×10^{-4}	89

续表

$[S]/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$v/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
5.0×10^{-5}	62
4.0×10^{-5}	53
2.5×10^{-5}	38
2.0×10^{-5}	32

$$[V_{\max} = 160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}, K_m = 8.0\times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$$

7. 对于一个遵从米氏方程的酶来说,当底物浓度 $[S] = K_m$,竞争性抑制剂浓度 $[I] = K_i$ 时,反应的初速率为多少?

$$[v = \frac{1}{3} V_{\max}]$$

8. 用下表列出的数据,确定此酶促反应:

(1) 无抑制剂和有抑制剂时的 V_{\max} 和 K_m 值。[无抑制剂时: $K_m = 1.1\times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$; 有抑制剂时: $K_m = 3.1\times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

(2) 抑制的类型。[竞争性抑制]

(3) EI 复合物的解离常数 K_i 。[$K_i = 1.10\times 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]

$[S]/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$v/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	
	无抑制剂	有抑制剂($2\times 10^{-3} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
0.3×10^{-5}	10.4	4.1
0.5×10^{-5}	14.5	6.4
1.0×10^{-5}	22.5	11.5
3.0×10^{-5}	33.8	22.6
9.0×10^{-5}	40.5	33.8

9. 在题8中,若用另一种抑制剂,给出下表数据,请确定:

(1) 有抑制剂时的 K_m 及 V_{\max} 值。[$K_m = 1.1\times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\max} = 9.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

(2) 抑制的类型。[非竞争性抑制]

(3) EI 的解离常数 K_i 。[$K_i = 2.40\times 10^{-5} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]

$[S]/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$v/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	
	无抑制剂	有抑制剂($1\times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
0.3×10^{-5}	10.4	2.1
0.5×10^{-5}	14.5	2.9
1.0×10^{-5}	22.5	4.5
3.0×10^{-5}	33.8	6.8
9.0×10^{-5}	40.5	8.1

10. 从速率对底物浓度作图所得图9-30中,求出下列参数(反应混合物中酶量为 $10^{-3} \mu\text{mol}$)。

(1) K_m (2) V_{\max} (3) k_{cat}/K_m (4) 转换数

[$K_m: 5\times 10^{-4} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $V_{\max}: 6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; $k_{\text{cat}}/K_m: 2\times 10^5 \text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$; 转换数: 100s^{-1}]

11. 下面的叙述哪一个是正确的? 胰凝乳蛋白酶的转换数是 100s^{-1} , DNA 聚合酶是 15s^{-1} 。

(1) 胰凝乳蛋白酶结合底物比 DNA 聚合酶有更高的亲和性。

(2) 胰凝乳蛋白酶反应速率比 DNA 聚合酶反应速率更大。

(3) 在特别的酶浓度和饱和底物水平下胰凝乳蛋白酶反应速率比 DNA 聚合酶在相同条件下更低。

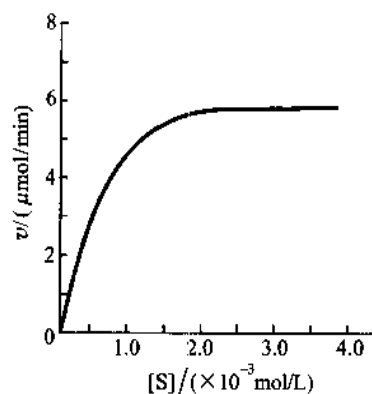


图9-31 反应速率对底物浓度作图

(4) 在饱和底物水平下,两种酶的反应速率,假若 DNA 聚合酶反应速率的 6.7 倍则与胰凝乳蛋白酶相等。

12. 今有一酶反应,它符合 Michaelis-Menten 动力学,其 K_m 为 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。底物浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,反应初速率为 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。试问,底物浓度分别为 $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的反应初速率是多少? [$1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]

13. 假设 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 [I] 抑制了一个酶催化反应的 75%, 计算这个非竞争性抑制剂的 K_i ? [$6.66 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

14. 如果 K_m 为 $2.9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, K_i 为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在底物浓度为 $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,要得到 75% 的抑制,需要竞争性抑制剂的浓度是多少? [$3.7 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

15. 举例说明什么是 K_S 型和 k_{cat} 型不可逆抑制剂。什么是过渡态底物类似物? 它属于何种类型抑制剂?

主要参考书

1. Voet D, Voet J G. Biochemistry. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2001
2. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and company, 1995
3. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. New York, London: Saunders College Publishing, Harcourt Brace College Publishers, 1995
4. Nelson D L and Cox M M, Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
5. Gumpert R I, Jonas A, Mintel R and Rhodes C. Student Companion for Stryer's Biochemistry. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
6. Wood W B, Wilson J H, Benbow R M and Hood L E. Biochemistry: A Problems Approach. 2nd ed. London, Sydney: The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1981
7. Mathews C K, van Holde K E and Ahern K G. Biochemistry. 3rd ed. San Francisco: Benjamin/Cummings, An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc, 2000
8. Schramm V L. Enzymatic transition states and transition state analog design. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 693-720
9. 陈惠黎, 李文杰. 分子酶学. 北京: 人民卫生出版社, 1983
10. 西格尔 I H 著. 生物化学计算. 吴经才, 张光兴, 静天玉等译. 北京: 科学出版社, 1983
11. Gutfreund H. Kinetics for the Life Sciences. Cambridge, UK: Cambridge University press, 1995

(张庭芳)

第 10 章 酶的作用机制和酶的调节

一、酶的活性部位

(一) 酶活性部位的特点

通过各种研究证明,酶的特殊催化能力只局限在大分子的一定区域,也就是说,只有少数特异的氨基酸残基参与底物结合及催化作用。这些特异的氨基酸残基比较集中的区域,即与酶活力直接相关的区域称为酶的活性部位(active site)或活性中心(active center)。通常又将活性部位分为结合部位和催化部位,前者负责与底物的结合,决定酶的专一性;后者负责催化底物键的断裂形成新键,决定酶的催化能力。对需要辅酶的酶来说,辅酶分子,或辅酶分子上的某一部分结构,往往也是酶活性部位组成部分。虽然酶在结构、专一性和催化模式上差别很大,就活性部位而言有其共同特点。

(1) 活性部位在酶分子的总体中只占相当小的部分,通常只占整个酶分子体积的 1%~2%。已知几乎所有的酶都由 100 多个氨基酸残基所组成,相对分子质量在 10×10^3 以上,直径大于 2.5 nm。而活性部位只有几个氨基酸残基所构成。酶分子的催化部位一般只由 2~3 个氨基酸残基组成,而结合部位的残基数目因不同的酶而异,可能是一个,也可能是数个。表 10-1 为某些酶活性部位的氨基酸残基。

表 10-1 某些酶活性部位的氨基酸残基

酶	氨基酸残基数	活性部位的氨基酸残基
核糖核酸酶 A(ribonuclease A)	124	His ₁₂ , His ₁₁₉ , Lys ₄₁
溶菌酶(lysozyme)	129	Asp ₅₂ , Glu ₃₅
胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)	241	His ₅₇ , Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅
胰蛋白酶(trypsin)	223	His ₅₇ , Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅
弹性蛋白酶(elatase)	240	His ₅₇ , Asp ₁₀₂ , Ser ₁₉₅
胃蛋白酶(pepsin)	348	Asp ₃₂ , Asp ₂₁₅
HIV-1 蛋白酶(HIV-1 proteinase)	99 × 2(二聚体)	Asp ₂₅ , Asp ₂₅
木瓜蛋白酶(papain)	212	Cys ₂₅ , His ₁₅₉
枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)	275	His ₆₄ , Ser ₂₂₁ , Asp ₃₂
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	259	His ₉₄ - Zn - Lys ₉₆ His ₁₁₉
羧肽酶 A(carboxypeptidase A)	307	Arg ₁₂₇ , Glu ₂₇₀ , Tyr ₂₄₈ , Zn ²⁺
肝乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	374 × 2(二聚体)	Ser ₄₈ , His ₉₁ , NAD ⁺ , Zn ²⁺

(2) 酶的活性部位是一个三维实体。酶的活性部位不是一个点,一条线,甚至也不是一个面。活性部位的三维结构是由酶的一级结构所决定且在一定外界条件下形成的。活性部位的氨基酸残基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、折叠而在空间结构上相互靠近。可以说没有酶的空间结构,也就没有酶的活性部位。一旦酶的高级结构受到物理因素或化学因素影响时,酶的活性部位遭到破坏,酶即失活。

(3) 酶的活性部位并不是和底物的形状正好互补的,而是在酶和底物结合的过程中,底物分子或酶分子,有时是两者的构象同时发生了一定的变化后才互补的,这时催化基团的位置也正好在所催化底物键的断裂和即将生成键的适当位置。这个动态的辨认过程称为诱导契合(induced-fit),如图 10-1 所示。

(4) 酶的活性部位是位于酶分子表面的一个裂缝(crevice)内。底物分子(或一部分)结合到裂缝内并发生催化作用。裂缝内是相当疏水的区域,非极性基团较多,但在裂缝内也含有某些极性的氨基酸残基,以便与底物结合并发生催化作用。其非极性性质在于产生一个微环境,提高与底物的结合能力有利于催化。在此裂缝内底物有效浓度可达到很高。

(5) 底物通过次级键较弱的力结合到酶上。酶与底物结合成 ES 复合物主要靠次级键:氢键、盐键、范德华力和疏水相互作用(见第 6 章)。ES 复合物的平衡常数可变化在 $10^{-2} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,相当于相互作用的自由能变化在 $-12.6 \sim -50.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 范围内。这些数值可与共价键的强度作个比较,共价键的自由能变化范围为 $-2.1 \times 10^{-4} \sim -4.6 \times 10^2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

(6) 酶活性部位具有柔性或可运动性。邹承鲁对酶分子变性过程中构象变化与活性变化进行了比较研究,发现在酶的变性过程中,当酶分子的整体构象还没有受到明显影响之前,活性部位已大部分被破坏,因而造成活性的丧失。说明酶的活性部位,相对于整个酶分子来说更具柔性,这种柔性或可运动性,很可能正是表现其催化活性的一个必要因素。

活性部位的形成要求酶蛋白分子具有一定的空间构象,因此,酶分子中其他部位的作用对于酶的催化作用来说,可能是次要的,但绝不是毫无意义的,它们至少为酶活性部位的形成提供了结构的基础。所以酶的活性部位与酶蛋白的空间构象的完整性之间,是辩证统一的关系。

(二) 研究酶活性部位的方法

1. 酶分子侧链基团的化学修饰法

这种方法需要选择一种化合物,当其与被研究的酶作用时能专门与活性部位氨基酸残基侧链基团共价结合,然后将这个带标记化合物的酶水解,肽键被打开,但标记化合物共价键不被打开,因此可以分离得到带有标签的肽段,即可分析出活性部位的氨基酸残基,由此可确定活性部位在一级结构上的位置,并为 X 射线晶体结构分析法提供资料。

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、羧基和胍基等。可以用做化学修饰的试剂也很多,目前已有 70 多种,但非常专一的并不多。

化学修饰法有一定的缺陷,因为化学修饰有可能使活性部位之外的某个氨基酸残基的侧链改变,而影响酶分子的正常空间结构,因而导致酶活性的丧失。为了排除这种可能,常常比较在底物或竞争性抑制剂存在与否进行化学修饰所得结果。如果底物或抑制剂存在下保护了活性部位,则一般可以认为该试剂是作用于活性部位的。

(1) 非特异性共价修饰 某些化学试剂能和酶蛋白中氨基酸残基的侧链基团反应而引起共价结合、氧化或还原等修饰反应,使基团的结构和性质发生改变。如果某基团修饰后不引起酶活力的变化,可以初步认为,此基团可能是非必需基团。反之,如修饰后引起酶活力的降低或丧失,则此基团可能是酶的必需基团。有两点可作为化学试剂已和活性部位基团结合的鉴别标准。其一是酶活力的丧失程度和修饰剂浓度成一定的比例关系,即修饰剂的浓度和酶活力丧失的速率常数 k 成正比。其二是底物或与活性部位结合的可逆抑制剂可保护共价修饰剂的抑制作用,此法不但可以肯定某种基团是必需基团,还可以确信此基团位于酶的活性部位。

(2) 特异性共价修饰 某一种化学试剂专一地修饰酶活性部位的某一氨基酸残基,使酶失活。通过水解分离标记的肽段,即可判断出被修饰的酶活性部位的氨基酸残基。例如二异丙基氟磷酸(DFP)能专一性地与酶活性部位的丝氨酸残基的羟基共价结合,使酶活力丧失。例如,DFP 与胰凝乳蛋白酶作用,标

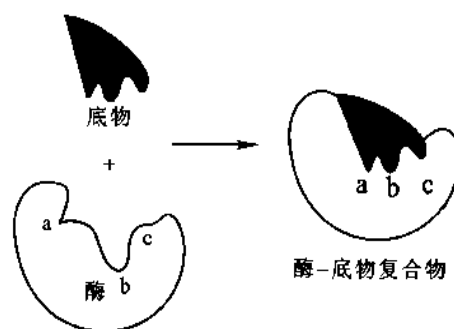
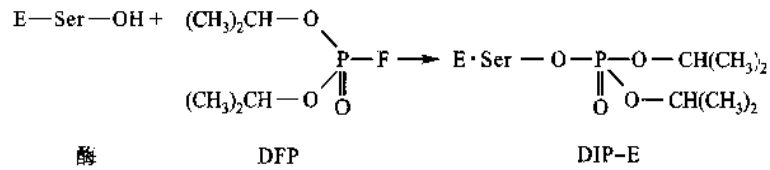


图 10-1 底物和酶相互作用的诱导契合模型

酶在与底物结合后改变了形状。活性部位在形状上只有在与底物结合后才与后者互补

记在特定的丝氨酸残基上,形成二异丙基磷酰化酶(DIP-酶),酶活性完全丧失,反应式如下:



DFP 一般不与蛋白质反应,也不与胰凝乳蛋白酶原和变性的胰凝乳蛋白酶反应,它也不和天然胰凝乳蛋白酶活性部位 Ser₁₉₅以外的 27 个 Ser 结合,可见活性部位 Ser 处于一个特殊的结构中,对 DFP 敏感。由于 DFP 与 Ser-OH 形成的酯键结合牢固,当用 6 mol/L HCl 对 DIP-酶进行部分水解,然后将水解产物进行分离,从中得到含有 DIP 基团的片段(DIP-O-Ser-肽),分析该片段的氨基酸顺序,并与已知的胰凝乳蛋白酶的氨基酸顺序相比较。不仅知道该酶活性部位附近的氨基酸顺序,也可得知 DIP 标记在该酶分子的 Ser₁₉₅残基上。类似的工作对其他蛋白水解酶及酯酶——弹性蛋白酶、凝血酶、胰蛋白酶及乙酰胆碱酯酶等进行了研究,这些酶的活性部位都含有 Ser,具有相似的肽段。表 10-2 列举了一部分用 DFP 标记酶的 DIP-肽段的氨基酸顺序。从表中可以看出许多酶活性部位都含有丝氨酸,某些蛋白水解酶活性部位有一个共同的 Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro 顺序。

表 10-2 一些酶活性部位的氨基酸顺序

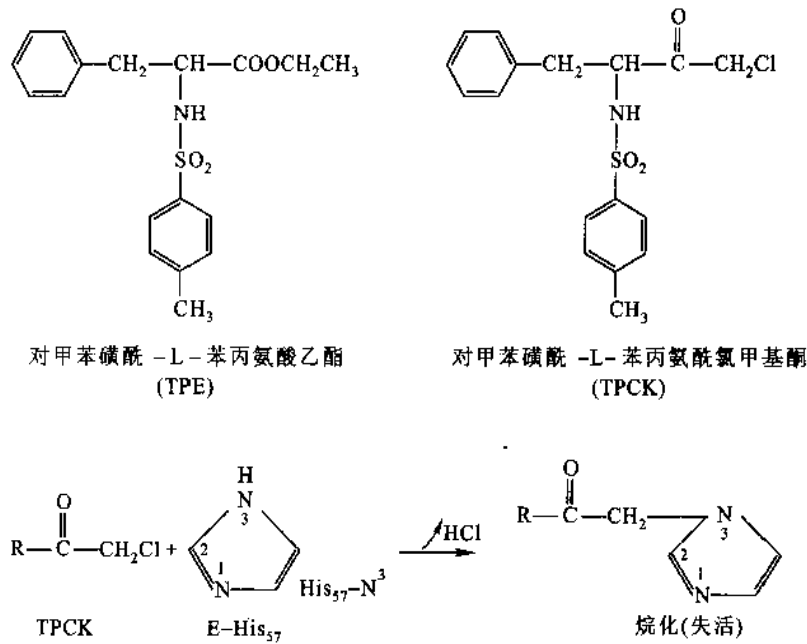
酶	氨基酸顺序
牛胰蛋白酶	……Ser·Cys·Gly·Gly·Asp·Ser·Gly·Gly·Pro·Val……
牛胰凝乳蛋白酶	……Ser·Cys·Met·Gly·Asp·Ser·Gly·Gly·Pro·Leu……
猪弹性蛋白酶	……Gly·Cys·Gln·Gly·Asp·Ser·Gly·Gly·Pro·Leu……
猪凝血酶	……Asp·Ala·Cys·Glu·Gly·Asp·Ser·Gly·Gly·Pro……

(3) 亲和标记(affinity labeling)法 上述特殊基团标记法往往专一性差,不太特异地标记活性部位。为了提高化学修饰剂对酶活性部位的专一性修饰作用,合成了一些与底物结构相似的共价修饰剂。这种修饰剂有两个特点:① 可以较专一地引入酶的活性部位,接近底物结合位点。② 具有活泼的化学基团可以与活性部位的某一基团结合形成稳定的共价键。因其作用机制是利用酶对底物的特殊亲和力将酶加以修饰标记,故称为亲和标记。亲和标记试剂又称“活性部位指示试剂”。用于胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶活性部位的亲和标记是两个非常成功的例子。对甲苯磺酰-L-苯丙氨酸乙酯(TPE)是胰凝乳蛋白酶的底物,而对甲苯磺酰-L-苯丙氨酰氯甲基酮(TPCK)是它的亲和试剂,结构相似。当胰凝乳蛋白酶与 TPCK 保温后,酶活力完全丧失,二者的结合是共价的与定量的。TPCK 不与胰凝乳蛋白酶原,变性的胰凝乳蛋白酶,也不和 DIP-胰凝乳蛋白酶结合,可见该酶必须有空间结构完整的活性部位才能与 TPCK 结合。与 TPCK 已结合的酶,也不再与 DFP 反应,说明烷化作用发生在活性部位上。胰凝乳蛋白酶分子中有两个 His 残基(40,57),与 TPCK 烷化后经水解,分析其水解肽段,发现只是与 His₅₇结合,发生在 N³-(咪唑环)上,说明 His₅₇是胰凝乳蛋白酶活性部位的一个氨基酸残基。TPE 及 TPCK 结构式及修饰反应如下:

邹承鲁研究了酶必需基团的化学修饰和酶活性丧失的定量关系,他从统计学上考虑,根据不同情况得出一系列公式。根据这些公式,就可以对实验结果进行处理得出关于必需基团数的结论。邹的公式、方法和作图,现已成为国际上通过侧链基团化学修饰和酶活性丧失定量关系来确定必需基团数的主要方法。

2. 动力学参数测定法

活性部位氨基酸残基的解离状态和酶的活性直接相关,因此通过动力学方法求得有关参数后,就可对酶的活性部位的化学性质作出判断。从 pK_m 或 $\log V_{\max}$ 相对 pH 的关系,可得到参与反应有关的解离基团的 pK 值,便可知道哪个氨基酸残基与酶活性有关。例如为确定 RNase 参与催化的氨基酸残基为



His₁₂, His₁₁₉, 动力学方法提供了重要依据。

3. X 射线晶体结构分析法

X 射线晶体结构分析法可以解析酶分子的三维结构,有助于了解酶活性部位氨基酸残基所处的相对位置与实际状态,以及与活性部位有关的其他基团。1965 年 Phillips 等人,首次用 X 射线晶体结构分析法,以 0.2 nm 的水平测定了溶菌酶(lysozyme)的空间结构及其作用机制。通过溶菌酶的三维结构可以看出:溶菌酶活性部位有关氨基酸的排列位置;酶-底物复合物中,底物周围氨基酸的排列状况;根据被水解的糖苷键邻近氨基酸残基的分析,确定了溶菌酶的催化基团为 Glu₃₅和 Asp₅₂。再如,通过 X 射线晶体结构分析,表明胰凝乳蛋白酶活性部位由 Ser₁₉₅、His₅₇、Asp₁₀₂组成,这 3 个氨基酸残基联在一起形成一个“电荷中继网”(charge relay network),使 Ser₁₉₅的羟基具有非常高的亲核性。Ile₁₆是凝乳蛋白酶原转变为酶的关键。X 射线晶体结构分析表明,其作用可能是通过 Ile₁₆氨基和 Ser₁₉₅邻近的 Asp₁₉₄羧基形成静电键,促成电荷中继网的建立。

由于第三代同步辐射的出现和实际应用,使 X 射线晶体结构分析达到一个新的水平。到 2001 年底为止已完成蛋白质和肽的晶体结构分析达 13 000 多个,其中酶为 3 000 多个。显然,用 X 射线晶体结构分析方法研究酶的活性部位及结构和功能的关系已成为重要手段。

4. 定点诱变法

迄今为止,已有几百个酶的基因被克隆。根据蛋白质结构研究的结果,可以利用定点诱变(site-directed mutagenesis)技术,改变编码蛋白质基因中的 DNA 顺序,研究酶活性部位的必需氨基酸。例如 1987 年 Craik 将胰蛋白酶 Asp₁₀₂诱变为 Asn₁₀₂,突变的 k_{cat} 比野生型低 5 000 倍,突变体水解酯底物的活性仅是天然胰蛋白酶的 $\frac{1}{10\ 000}$,可见 Asp₁₀₂对胰蛋白酶催化活性是必需的。再如,羧肽酶 A 中 Tyr₂₄₈原认为催化所必需,1985 年 Gardell 等人用寡核苷酸定位突变把 Tyr₂₄₈的密码子(TAT)变为 Phe 的密码子(TTT)。含有这一基因的重组质粒在酵母中进行表达,发现突变酶的 k_{cat} 值和天然酶一样,但其 K_m 值高出 6 倍。这一结果说明 Tyr₂₄₈参与底物的结合,与催化活性无关。由于 DNA 重组技术的日趋成熟,蛋白质晶体结构分析技术的发展,目前越来越多地利用定点诱变技术研究酶的结构和功能的关系。

二、酶催化反应的独特性质

酶催化反应的某些独特性质为许多反应所共有,可概括如下:

(1) 酶反应可分成两类,一类反应仅仅涉及到电子的转移,这类反应的速率或转换数在 10^8 s^{-1} 数量级;另一类反应涉及到电子和质子两者或者其他基团的转移,它们的速率在 10^3 s^{-1} 数量级。大部分反应属第二类。

(2) 酶的催化作用是由氨基酸侧链上的功能基团和辅酶为媒介的。主要的是 His, Ser, Cys, Lys, Glu 和 Asp 的侧链常常直接参加催化过程。辅酶或金属离子与酶协同在一起发挥作用,比只利用氨基酸侧链来说,为催化过程提供了更多种类的功能基团。将在第 11 章详细讨论。

(3) 酶催化反应的最适 pH 范围通常是狭小的。

(4) 与底物相比较,酶分子很大,而活性部位通常只比底物稍大一些。这是因为在大多数情况下,只有活性部位围着底物。此外,一个巨大的酶结构对稳定活性部位的构象是必要的。

(5) 酶除了具有进行催化反应所必需的活性基团外,还有别的特性,使上述反应的进行更有利,并使更复杂的多底物反应按一定途径进行,这些已超出了较简单催化剂的范畴。酶的复杂的折叠结构使这些作用成为可能。酶具有的 4 个主要有利条件是:

- ① 在活性部位存在 1 个以上的催化基团,所以能进行协同催化;
- ② 存在有结合部位,因此底物分子可以以反应中固有的方位结合在活性部位附近;
- ③ 在包含有 2 个或 2 个以上底物分子参加反应的情况中,存在着 1 个以上的底物分子结合的部位;
- ④ 有时,底物以某种方式被结合到酶分子上,使底物分子中的键产生张力,从而有利于过渡态复合物的形成。

三、影响酶催化效率的有关因素

酶是专一性强,催化效率很高的生物催化剂,这是由酶分子的特殊结构决定的。经各种途径的研究,发现有多种因素可以使酶反应加速,但很难确切地说它们的贡献有多大。现将影响酶高催化效率的有关因素讨论如下:

(一) 底物和酶的邻近效应 (approximation, proximity) 与定向效应 (orientation)

酶和底物复合物的形成过程既是专一性的识别过程,更重要的是分子间反应变为分子内反应的过程。在这一过程中包括两种效应:邻近效应和定向效应。

邻近效应是指酶与底物结合形成中间复合物以后,使底物和底物(如双分子反应)之间,酶的催化基团与底物之间结合于同一分子而使有效浓度得以极大的升高,从而使反应速率大大增加的一种效应。以有机化学模式实验为例说明,例如乙酸对硝基苯酯以咪唑催化水解的反应(图 10-2A),如果将咪唑连到该化合物分子上(图 10-2B),当分子间反应变为分子内反应后,因咪唑邻近羰基,亲核进攻的机会大为增加,两个速率常数之比,底物有效浓度增加 24 倍,也就是说使反应速率加快 24 倍。

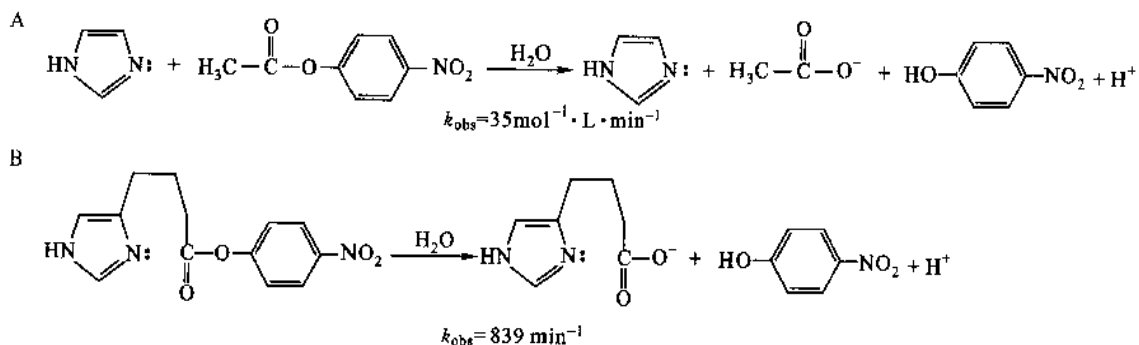
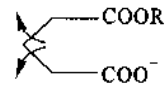
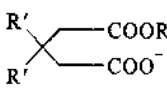
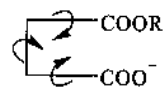
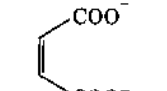
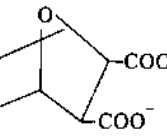


图 10-2 催化中邻近效应的一个例子

A. 咪唑催化乙酸对硝基苯酯是慢的;B. 变为分子内反应后要快 24 倍(在 A 中假设 [咪唑] = 1 mol/L)

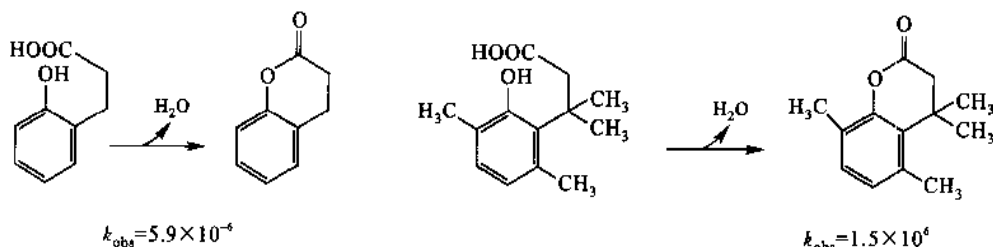
定向反应是指反应物的反应基团之间和酶的催化基团与底物的反应基团之间的正确取向产生的效应。正确定向取向问题在游离的反应物体系中很难解决,但当反应体系由分子间反应变为分子内反应后,这个问题就有了解决的基础。正确定向取向对加速反应的意义可以通过以分子内羧基催化酯水解的模型实验加以说明。表 10-3 列出了二羧酸单苯酯水解的相对速率和结构关系,该表说明了分子间反应和分子内反应有效浓度的关系,以及结构对分子内反应的影响。

表 10-3 二羧酸单苯酯水解相对速率和结构关系

结构	相对速率
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{CH}_3\text{COOR}$	1.0
	1.0×10^3
	$3.0 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^6$
	2.2×10^5
	1.0×10^7
	1.0×10^8

从表可看出,羧基和酯之间,自由度愈小,愈能使它们邻近,并有一定的取向,反应速率就愈大。然而对一个双分子反应来说,要使其中一个底物浓度达到 $10^3 \sim 10^8 \text{ mol/L}$ 时,才能和分子内的反应速率相同,这样大的浓度实际上是办不到的。例如在纯水中,水的浓度也不过是 55 mol/L 。

再如邻羟苯丙酸的内酯形成,当两个甲基取代了苯环邻近的碳原子上的氢,使羧基与羟基之间能更好地定向时,两个速率常数之比 $\frac{1.5 \times 10^6}{5.9 \times 10^{-6}} = 2.5 \times 10^{11}$ 。反应速率可提高 2.5×10^{11} 。



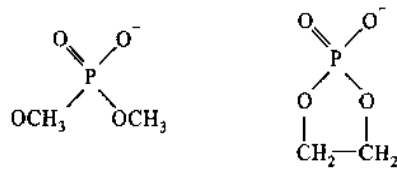
Pagc 和 Jencks 认为,邻位效应与定向效应在双分子反应中起的促进作用至少可分别达 10^4 倍,两者共同作用则可使反应速率升高 10^8 倍,这与许多酶催化效率的计算是很相近的。

酶促反应是因为酶的特殊结构及功能,使参加反应的底物分子结合在酶的活性部位上,使作用基团互相邻近并定向,大大提高了酶的催化效率。

(二) 底物的形变(distortion)和诱导契合(induced fit)

当酶遇到其专一性底物时,酶中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,底物分子发生形变,见图 10-3A,底物比较接近它的过渡态,降低了反应活化能,使反应易于发生。例如乙烯环磷酸酯的水解速率是磷酸二酯水解速率的 10^8 倍,这是因为环磷酸的构象更接近于过渡态。



相对水解反应速率

1

$\geq 10^8$

再如,溶菌酶与底物结合时引起 D-糖环构象改变,由椅式变成半椅式。当磷酸二羟丙酮与磷酸丙糖异构酶结合时,底物分子发生了扭曲。上述例子已为 X 射线晶体结构分析证实。

前已指出,酶与底物结合时,酶构象发生改变的同时,底物分子也发生形变,如图 10-3B 所示,从而形成一个互相契合的酶-底物复合物,进一步转换成过渡态,大大增加了酶促反应速率。

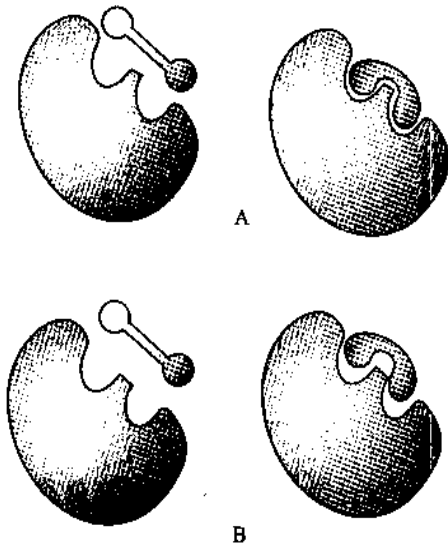


图 10-3 底物和酶结合时构象变化示意图
A. 底物分子发生形变; B. 底物分子和酶都发生形变

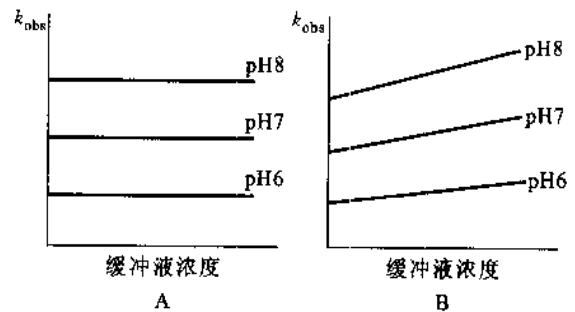


图 10-4 专一酸碱催化作用(A)和总酸碱催化作用(B)

(三) 酸碱催化 (acid - base catalysis)

酸碱催化是通过瞬时的向反应物提供质子或从反应物接受质子以稳定过渡态,加速反应的一类催化机制。在水溶液中通过高反应性的质子和氢氧离子进行的催化称为专一的酸碱催化 (specific acid - base catalysis) 或狭义的酸碱催化;而通过 H^+ 和 OH^- 以及能提供 H^+ 及 OH^- 的供体进行的催化称为总酸碱催化 (general acid - base catalysis) 或广义的酸碱催化。这两种酸碱催化类型通过图 10-4A 和 B 来区分,专一的酸碱催化的表观速率常数 (k_{obs}) 仅依赖于溶液的 pH 而不受缓冲液的浓度影响;总酸碱催化的 k_{obs} 除依赖于 pH 外,还与缓冲液的浓度成正比。

在生理条件下,因 H^+ 和 OH^- 的浓度甚低,故体内的酶反应以总酸碱催化作用较为重要。在很多酶的活性部位存在几种参与总酸碱催化作用的功能基,如氨基、羧基、巯基、酚羟基及咪唑基,它们能在近中性 pH 的范围内,作为催化性的质子供体或受体,即作为 Brønsted 酸或碱而参与总酸或总碱催化作用 (表 10-4)。总酸或总碱的催化可提高反应速率 10^2 到 10^5 倍。在生物化学中,这类反应有:羰基的加成作用,酮基和烯醇的互变异构,肽和酯的水解以及磷酸和焦磷酸参与的反应等。

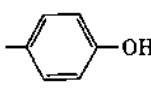
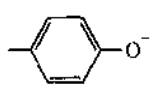
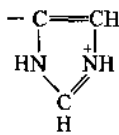
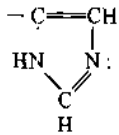
酸碱催化效率取决于总酸碱的解离常数 (pK),对于总酸催化作用,则:

$$\log k_a = C_A - \alpha(pK_a) \quad (10-1)$$

对于总碱催化作用,则:

$$\log k_b = C_B - \beta(pK_b) \quad (10-2)$$

表 10-4 酶分子中可作为总酸碱催化的功能基团

氨基酸残基	广义酸基团(质子供体)	广义碱基团(质子受体)
Glu, Asp	-COOH	-COO ⁻
Lys, Arg	-NH ₃ ⁺	-NH ₂
Tyr		
Cys	-SH	-S ⁻
His		

其中 C_A 和 C_B 为常数,是纵坐标上的截距,它的大小由反应类型、温度及溶剂系统等因素决定。 α 和 β 为直线的斜率,称为 Brønsted 系数(图 10-5A 和 B),它们是衡量酸碱强度对反应速率影响的灵敏度指标。 α 或 β 值的范围在 0 和 1 之间。具有 α 或 β 值接近 1 的反应对酸或碱的强度是最灵敏的。此时在水溶液中所有可能存在的组分中,只有 H^+ 和 OH^- 能强得足够使速率显著提高,故反应速率只取决于溶液的 pH。因此,具有 α 或 $\beta \approx 1$ 的总酸或总碱催化作用实际上是专一的酸碱催化作用。在另一方面,如果 α 或 β 接近于 0,则反应速率对催化剂的酸度或碱度几乎无关,因此具有 α 或 $\beta \approx 0$ 的一种总酸或总碱催化的反应实际上是未被酸或碱所催化的反应。上面式(10-1)及式(10-2)所表示的关系称为 Brønsted 催化作用定律。

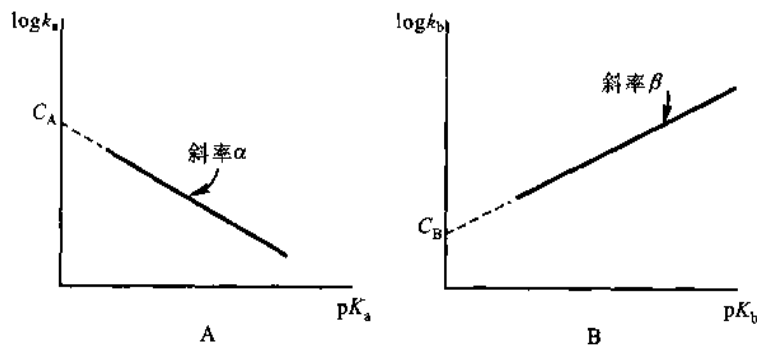


图 10-5 Brønsted 作图
A. 广义酸催化; B. 广义碱催化

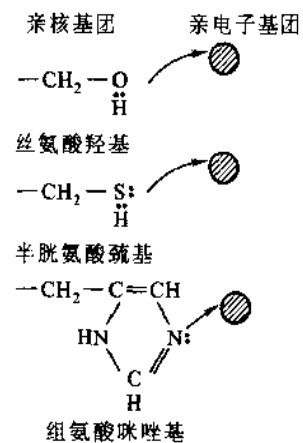


图 10-6 酶蛋白质上的重要亲核基团

影响酸碱催化反应速率的因素有两个,即酸或碱的强度(pK 值)及质子传递的速率。在表 10-4 所列的功能基中组氨酸咪唑基的解离常数约为 6.0,因此在接近于生物体液 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,即可作为质子供体,又可作为质子受体在酶反应中发挥催化作用。同时咪唑基接受质子和供出质子的速率十分迅速,其半衰期小于 10^{-10} s。由于咪唑基有如此特点,所以在很多蛋白质中 His 含量虽少,却占很重要地位。推测 His 很可能在进化过程中,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保留下来的。

参与总酸碱催化作用的酶很多,例如溶菌酶、牛胰核糖核酸酶、牛胰凝乳蛋白酶等。将在下一节中做详细讨论。

(四) 共价催化 (covalent catalysis)

共价催化又称亲核催化 (nucleophilic catalysis) 或亲电子催化 (electrophilic catalysis), 在催化时, 亲核催化剂或亲电子催化剂能分别放出电子或汲取电子并作用于底物的缺电子中心或负电中心, 迅速形成不稳定的共价中间复合物, 降低反应活化能, 使反应加速。

酶蛋白氨基酸侧链提供各种亲核中心, 图 10-6 表示了酶蛋白上最常见的 3 种亲核基团, 即丝氨酸羟基、半胱氨酸巯基、组氨酸咪唑基。这些基团容易攻击底物的亲电中心, 形成酶-底物共价结合的中间物。底物中典型的亲电中心, 包括磷酸基、酰基和糖基 (图 10-7)。形成的共价中间物在随后步骤中被水分子或第二种底物攻击给出所需的产物。共价亲电催化也在包含辅酶产生的亲电中心观察到。

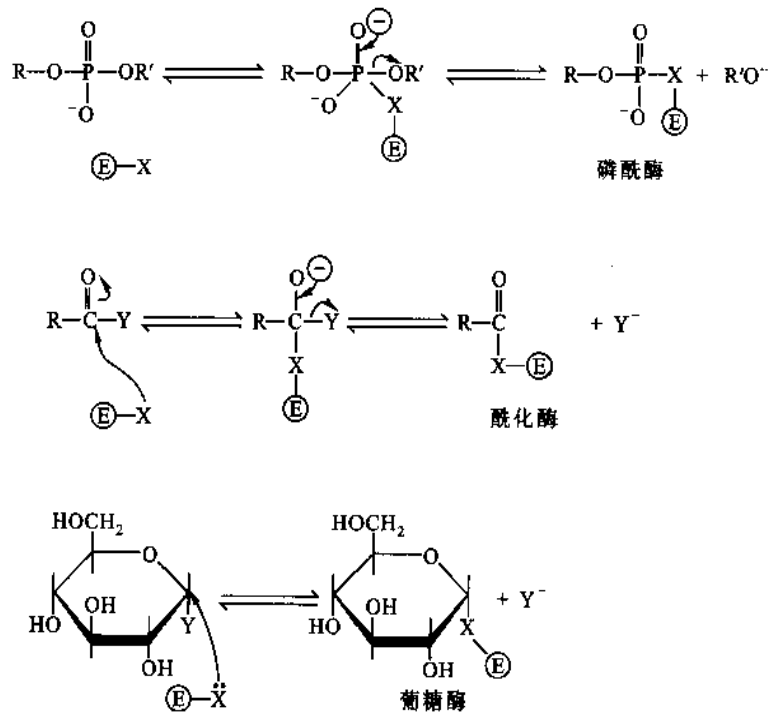


图 10-7 酶和底物间共价键形成的例子

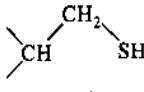
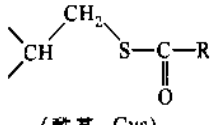
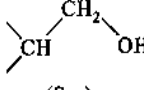
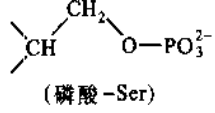
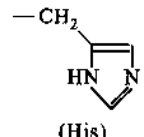
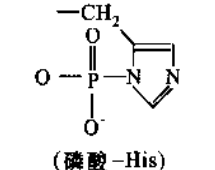
在每一情形中, 酶上的亲核中心 (X:) 攻击底物上的亲电中心

现已知 100 多种酶在催化过程中形成共价中间物, 表 10-5 列举了某些典型的例子。底物与酶分子中亲核基团分别形成酰基-丝氨酸、酰基-半胱氨酸、磷酸丝氨酸、磷酸组氨酸和西佛碱 (Schiff base)。

表 10-5 形成共价 ES 中间物的一些酶

酶	反应基团	共价中间物
1. 胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin) 弹性蛋白酶 (elastase) 酯酶类 (esterases) 枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin) 凝血酶 (thrombin) 胰蛋白酶 (trypsin)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH} \end{array}$ (Ser)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{O} \\ \\ \text{CH} \end{array} \text{---} \text{C} \begin{array}{l} \text{---} \text{R} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ (酰基-Ser)

续表

酶	反应基团	共价中间物
2. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) } 木瓜酶(papain)	 (Cys)	 (酰基-Cys)
3. 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase) } 葡糖磷酸变位酶(phosphoglucomutase) }	 (Ser)	 (磷酸-Ser)
4. 磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase) } 琥珀酰-CoA合成酶 (succinyl CoA synthetase) }	 (His)	 (磷酸-His)
5. 醛缩酶(aldolase) } 脱羧酶类(decarboxylases) } 依赖于磷酸吡哆醛酶类 (pyridoxal phosphate-dependent enzymes) }	$R-NH_3^+$ (氨基)	$R-N=C$ (西佛碱)

(五) 金属离子催化

1. 需要金属的酶分类

几乎 1/3 的酶催化活性需要金属离子, 根据金属离子-蛋白质相互作用强度可将需要金属的酶分为两类:

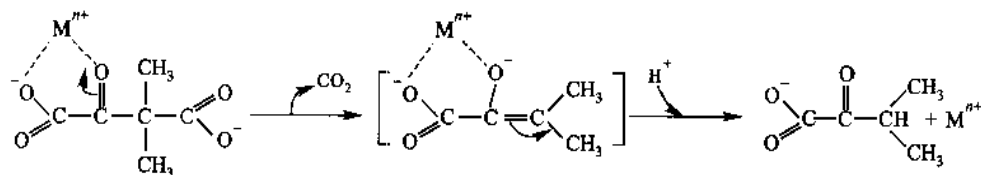
(1) 金属酶(metalloenzymes) 含紧密结合的金属离子, 多属于过渡金属离子如 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Co^{3+} 。

(2) 金属-激活酶(metal-activated enzyme) 含松散结合的金属离子, 通常为碱和碱土金属离子, 如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 。

2. 金属离子以 3 种主要途径参加催化过程

(1) 通过结合底物为反应定向;(2) 通过可逆地改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应;(3) 通过静电稳定或屏蔽负电荷。

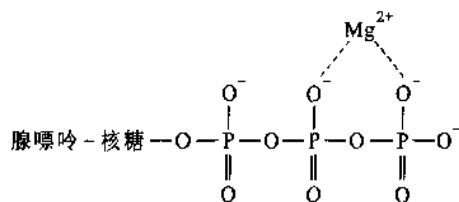
金属离子的催化作用往往和酸的催化作用相似, 但有些金属离子不止带一个正电荷, 作用比质子要强。另外, 不少金属离子有络合作用, 并且在中性 pH 溶液中, H^+ 浓度很低, 但金属离子却容易维持一定浓度。如 Cu^{2+} 和 Ni^{2+} 催化二甲草酰乙酸脱羧, 是被金属离子催化的非酶促反应例子:



二甲草酰乙酸

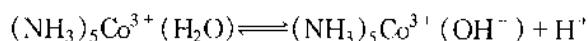
金属离子(M^{n+})被二甲草酰乙酸螯合, 静电稳定了过渡态烯醇离子。这个机制支持了乙酰乙酸不能形成这样的螯合物, 即金属离子不能催化脱羧。金属的催化还远远不能很好地解释酶的催化反应, 如 Mn^{2+} 的催化和含 Mn^{2+} 酶的催化速率可差 10^8 倍。

金属离子通过电荷的屏蔽促进反应, 如激酶的真正底物是 Mg^{2+} -ATP 复合物而不是 ATP, 如:



在这里, Mg^{2+} 的作用除了它的定向效应外, 是静电屏蔽磷酸基的负电荷。否则这些电荷将排斥特别是那些具有阴离子性质的电子对攻击亲核体。

金属离子通过水的离子化促进亲核催化。金属离子的电荷使它的结合水分子比游离水更具酸性, 因此甚至在低于中性 pH 下为 OH^- 离子的来源。例如, $(NH_3)_5Co^{3+}(H_2O)$ 的水分子根据下面反应离子化



产生的金属离子结合的羟基是一种有力的亲核体。

氧化还原反应中包含了金属离子价的变化, 许多氧化还原酶含有金属的辅基, 电子的转移和金属离子的配基数目, 性质有很大的关系。

(六) 多元催化和协同效应

在酶催化反应中, 常常是几个基元催化反应配合在一起共同起作用。例如胰凝乳蛋白酶是通过 Asp_{102} 、 His_{57} 、 Ser_{195} 组成的“电荷中继网”催化肽键水解, 包括亲核催化和碱催化共同作用。再如核糖核酸酶在水解其底物时, His_{12} 起着广义碱催化作用, 从核糖 2'-OH 上接受一个质子, 而 His_{119} 却起着广义酸的作用, 和磷酸的氧原子形成氢键。这种多元催化协同作用的结果, 是使酶反应加速的一个因素。

(七) 活性部位微环境的影响

在酶分子的表面有一个裂缝, 而活性部位就位于疏水环境的裂缝中。化学基团的反应活性和化学反应的速率在非极性介质与水性介质有显著差别。这是由于在非极性环境中的介电常数较在水介质的介电常数为低。在非极性环境中两个带电基团之间的静电作用比在极性环境中显著增高。当底物分子与酶的活性部位相结合, 就被埋在疏水环境中, 这里底物分子与催化基团之间的作用力将比活性部位极性环境的作用力要强得多。这一疏水的微环境大大有利于酶的催化作用。溶菌酶的例子就充分说明了微环境对酶催化反应的影响(下节详细讨论)。

上面讨论了与酶高催化效率有关的 7 个因素, 必须指出上述诸因素, 不是同时在一个酶中起作用, 也不是一种因素在所有的酶中起作用。更可能的情况是对不同的酶, 起主要作用的因素不同, 各自都有其特点, 可能分别受一种或几种因素的影响。

四、酶催化反应机制的实例

(一) 溶菌酶(lysozyme)

在 1922 年, 伦敦的一个细菌学家 Fleming, 有一次患了感冒。他是一点时间也舍不得浪费的人, 就利用感冒作为进行一次实验的机会。他把自己几滴鼻粘液掉在含有细菌的培养玻片上。过了一些时候, 当他发现粘液附近的细菌已被溶解掉时感到很激动, 就想到粘液中可能含有他正在寻找的那种普遍适用的抗生素。Fleming 揭示, 这种抗菌物质是一种酶, 被他命名为 lysozyme(溶菌酶) - Lyso 是指溶解细菌的能力, 而 Zyme 因为它是一种酶。他还发现一种小圆形细菌对溶菌酶特别敏感, 这种细菌是显示溶解的微球菌, 从而被命名为 *micrococcus lysodeikticus*。Fleming 发现, 眼泪是溶菌酶的一个丰富来源。但 Fleming 很失望, 他发现溶菌酶对最有害的细菌起不了什么作用。而在 7 年以后, 他便发现一种高效的抗生素: 青霉

素,生动地证实了 Pasteur 的名言:机会不辜负有心人。

溶菌酶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。细胞壁多糖是 *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(图 10-8)。

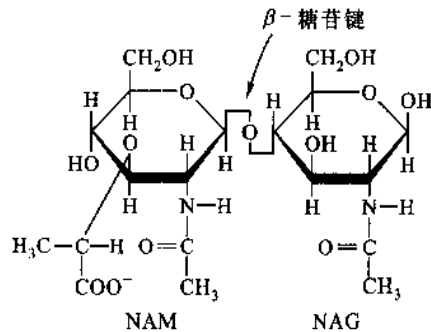
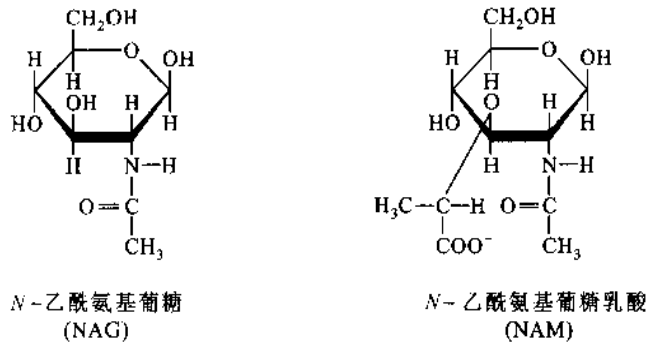


图 10-8 NAM 通过 β (1-4)糖苷键与 NAG 连接

溶菌酶相对分子质量为 14.6×10^3 ,由 129 个氨基酸残基组成的单肽链蛋白质,含有 4 对二硫键,其一级结构如图 10-9 所示。

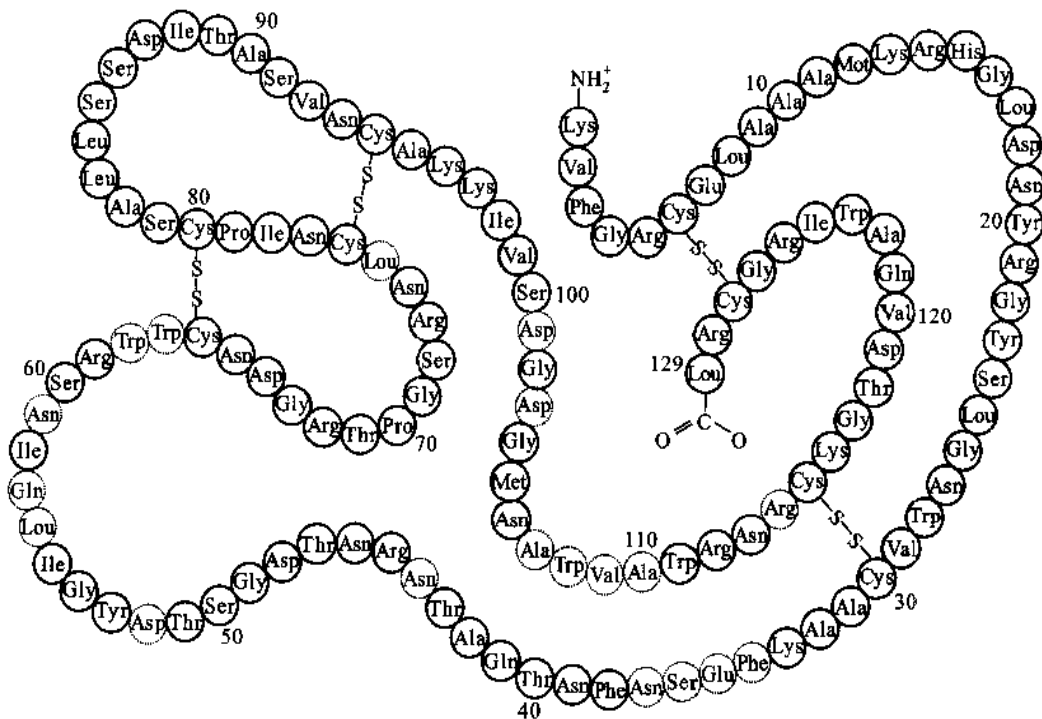


图 10-9 鸡蛋清溶菌酶的氨基酸顺序活性部位中的残基用小点圈出

溶菌酶是一种葡糖苷酶,能催化水解 NAM 的 C1 与 NAG 的 C4 之间的糖苷键(图 10-10),但不能水解 NAG C1 和 NAM C4 之间的 $\beta(1-4)$ 糖苷键。几丁质是甲壳类动物甲壳中所含的多糖,仅由 NAG 残基通过 $\beta(1-4)$ 糖苷键连接而成,几丁质也是溶菌酶的底物。

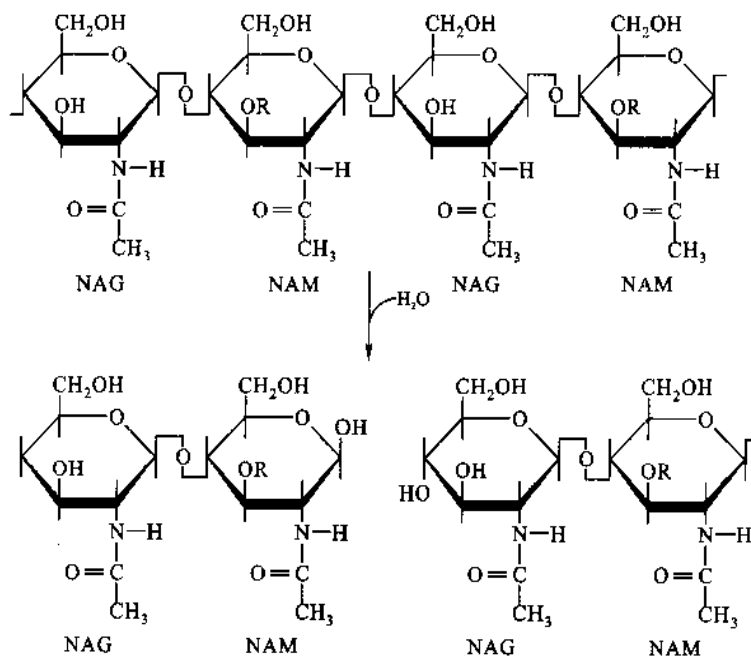
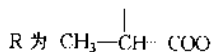


图 10-10 溶菌酶催化水解 NAM 及 NAG 间的糖苷键



底物与酶结合后,酶催化哪一个键水解呢?用大小不同的 NAG 寡聚体作底物测定被溶菌酶水解的相对速率,结果如表 10-6。从表中可见:少于 4 个糖的寡聚体水解速率甚小,当由四聚体增加到五聚体时,水解速率猛增 500 倍,五聚体增加到六聚体,速率增加近 8 倍,六聚体增加到八聚体,速率不再变化。这种情况与 X 射线晶体结构分析结果一致,活性部位所在的裂缝正好被 6 个糖残基所装满。

表 10-6 溶菌酶对不同 NAG 寡聚体的水解

底物/(浓度为 $10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	相对水解速率
(NAG) ₂	0
(NAG) ₃	1
(NAG) ₄	8
(NAG) ₅	4 000
(NAG) ₆	30 000
(NAG) ₈	30 000

(NAG)₃ 是溶菌酶的竞争性抑制剂,因此 A-B, B-C 糖苷键均不可能是被水解的键。而 C 环的空间对 NAM 来说体积太大,只能是 NAG。C-D 也不可能成为裂解的部位,而 NAM 不能适合到部位 C 中,进一步排除了另一个裂解部位: E-F 键。胞壁多糖是一个 NAM 和 NAG 交替的高聚物,从而 NAM 不能占据部位 C 时也就不能占据部位 E。细菌的细胞壁多糖恰好是具有 NAM-NAG 键,溶菌酶的作用专一性又要求作用在 NAM-NAG 键,而 C-D 和 E-F 都不是这种类型的键,所以水解部位只能发生在 D-E 之间(图 10-11)。

Phillips 等人 1965 年以 0.2 nm 分辨率的 X 射线晶体结构分析法阐明了溶菌酶的三维结构,如图 10-12。

溶菌酶分子近椭圆形,大小为 $4.5 \text{ nm} \times 3.0 \text{ nm} \times 3.0 \text{ nm}$ 。它的构象较复杂, α 螺旋仅占 25%,在分子

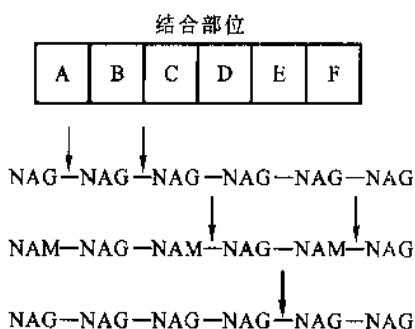


图 10-11 D 和 E 之间的糖苷键是溶菌酶的作用部位
 因为(NAG)₃ 稳定不可能是被水解的键, 因为 NAM 对 C 部位体积
 太大也不可能是被水解的键, 而 D-E 之间的键可能是被水解的键

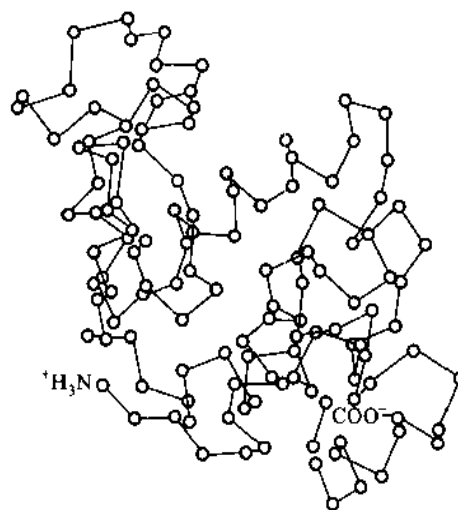


图 10-12 溶菌酶的三维结构

的一些区域有伸展着的 β 片层构象。溶菌酶的内部几乎全部是非极性的。疏水的相互作用在溶菌酶的折叠构象中起重要作用。在溶菌酶分子的表面, 有一个较深的裂缝, 其大小恰好能容纳多糖底物的 6 个单糖, 这是溶菌酶的活性部位。用 X 射线晶体结构分析法研究了竞争性抑制剂(NAG)₃ 对溶菌酶的抑制作用, 图像分析表明(NAG)₃ 仅仅占据了大约半个裂缝。从活性部位的几何大小看出酶的最小底物应该是(NAG)₆。实验中用(NAG)₆ 为底物, 确实能被酶迅速水解。图 10-13 显示了酶活性部位刚好能容纳一个六糖分子, A、B、C、D、E、F 表示 6 个糖残基的位置, 只是第 4 个糖残基 D 环因空间的原因必须由正常的椅式变形为能量较高的半椅式构象。因此糖苷键的稳定性降低, 键就容易从这里断裂。

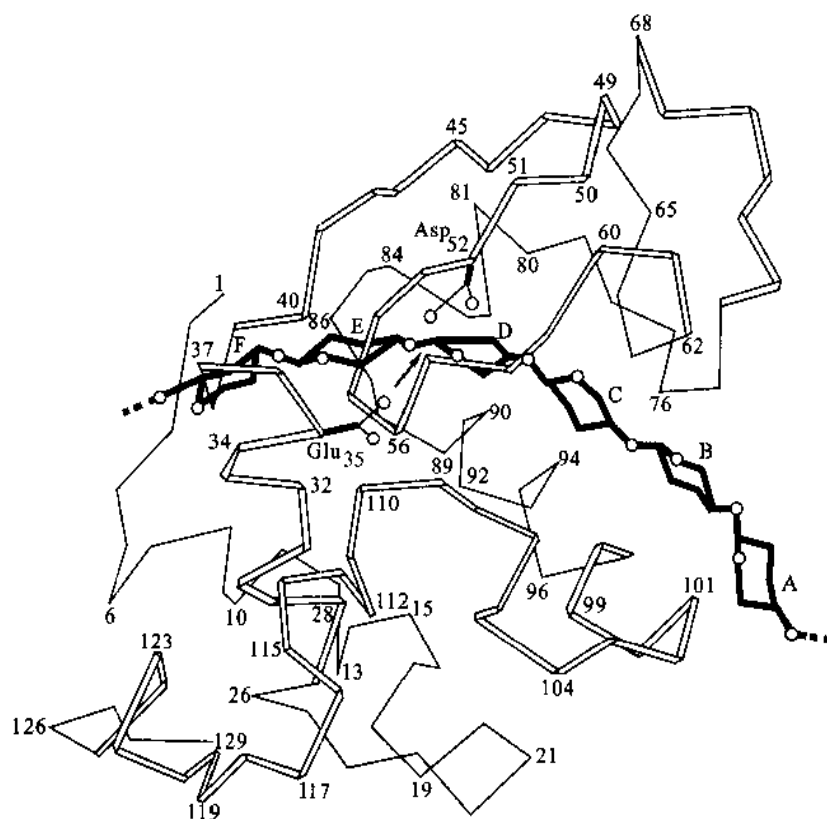


图 10-13 溶菌酶-底物复合物
 (表示 Glu₃₅ 及 Asp₅₂ 对 D 环的作用及 D 环有变形)

进一步问题是酶的催化作用,究竟键是在糖苷氧原子的哪一侧被裂解的? 回答这个问题,可以在 $H_2^{18}O$ 溶液中酶促水解底物(NAG)₆,发现只有 D 糖 C1 上含有¹⁸O,而 E 糖的 C4 羟基只含普通的 O,由此可知这个键断裂在 D 糖基的 C1 和 E 残基的糖苷键的 O 之间(图 10-14)。分析 D-E 键周围的微环境,最活泼的基团显然是 Asp₅₂和 Glu₃₅,它们分别位于糖苷键两侧。Asp₅₂位于糖苷键的一侧,而 Glu₃₅在另一侧。这两个酸性侧链具有明显不同的微环境。Asp₅₂是在一个明显的极性环境中,在那里它在一个复杂的氢键网络中起着氢键受体的作用。相反,Glu₃₅位于非极性区。这样在 pH5 下,这是溶菌酶水解几丁质的最适 pH。Asp₅₂侧链羧基为解离的 COO⁻形式,而 Glu₃₅则为质子化未电离的 COOH 形式。侧链基团的氧原子与这个糖苷键的距离大约为 0.3 nm(图 10-15)。

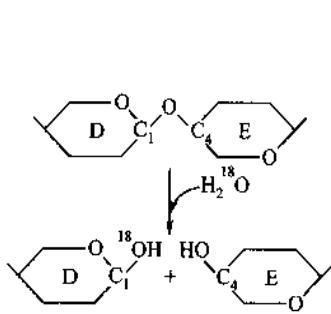


图 10-14 O^{18} 水中水解作用指出溶菌酶催化底物的 C₁-O 键裂解

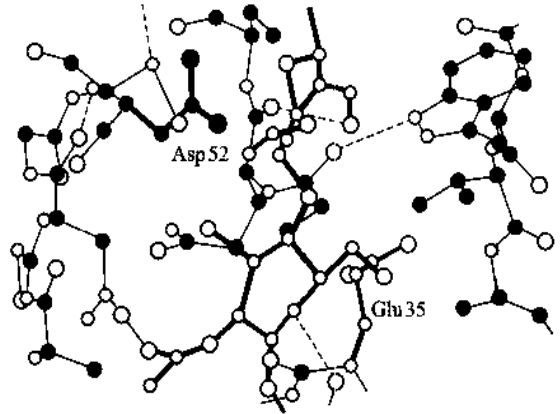


图 10-15 溶菌酶活性部位的部分结构

Phillips 等人根据上述研究资料提出了溶菌酶的催化作用机制,要点如下:

(1) Glu₃₅的-COOH 提供一个 H⁺ 到 D 环与 E 环间的糖苷键 O 原子上。H⁺ 的转移使 D 环的 C1 键与糖苷键 O 原子间的键断开,并形成正碳离子过渡态中间产物(图 10-16)。

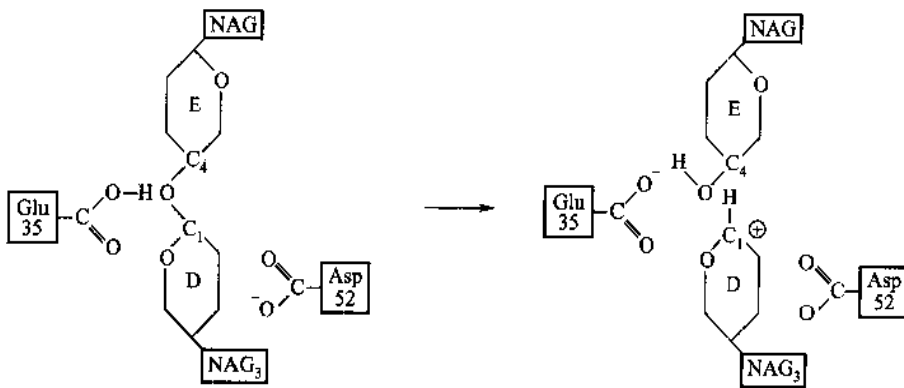


图 10-16 溶菌酶催化作用
第一步是质子转移,糖苷键被裂解,形成一个正碳离子中间物

(2) 含有 E 及 F 残基的 NAG 二聚体离开酶分子。

(3) 正碳离子中间产物进一步与来自溶剂的 OH 发生反应(图 10-17)。Glu₃₅质子化,由 A、B、C 和 D 残基组成的 NAG 四聚体通过扩散离开酶分子,然后溶菌酶为新一轮催化过程做好了准备。

上述的催化机制中,关键要素为:

(1) 广义的酸催化,Glu₃₅以酸的形式提供质子,它和糖苷键氧原子的距离为 0.3 nm,正是合适的作用距离。

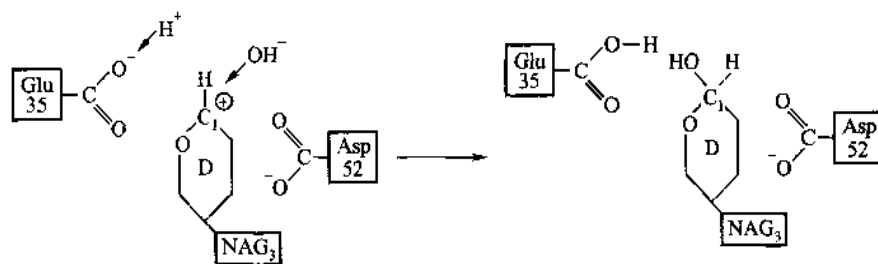


图 10-17 溶菌酶催化作用

第二步是 OH^- 和 H^+ 分别加合到正碳离子中间物和 Glu_{35} 的侧链后, 水解反应完成

(2) 正碳离子中间产物的形成与稳定, 一方面由于 Asp_{52} 带有负电荷的羧酸基通过静电相互作用稳定 D 环中 C_1 的正电荷; 另一方面由于 D 环的形变, 由椅式构象变为半椅式, 使 D 环上 C_1 、 C_2 、 C_5 和 O 都在一个平面上, 氧原子的负电性可以使正碳离子稳定。因此可以说, 在结合底物时, 酶迫使底物采取了接近于过渡态的构象。

Phillips 根据晶体学研究提出的底物结合方式和催化作用机制, 曾在各种化学实验中受到检验。所有实验结果都能支持这个晶体学假设。

(二) 胰核糖核酸酶 A (pancreatic ribonuclease A, RNase A)

核糖核酸酶 A 是一种水解 RNA 的磷酸二酯酶, 能专一性地切开嘧啶核苷酸 $3' \text{P}-\text{O}$ 键, 生成 $3'$ -嘧啶核苷酸或以 $3'$ -嘧啶核苷酸结尾的寡聚核苷酸。酶促水解过程与碱的水解一样, 先生成一个 $2', 3'$ -环磷酸酯中间物, 再经水解最后生成嘧啶核苷 $3'$ -磷酸 (图 10-18)。

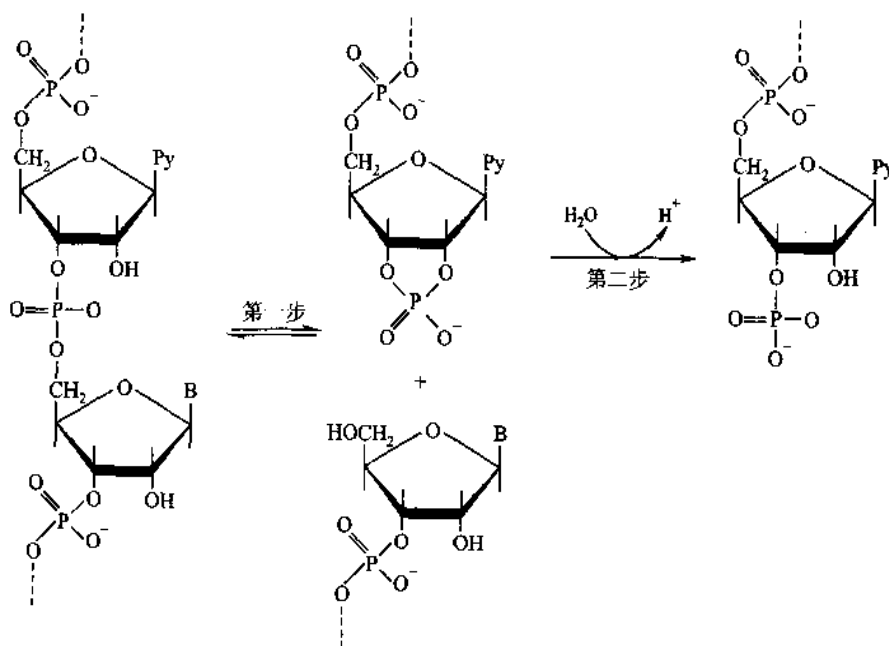


图 10-18 核糖核酸链受胰 RNase A 水解的位点

Pyr 为嘧啶, B 为嘌呤或嘧啶。反应分两步进行

RNase A 为由 124 个氨基酸组成的单肽链, 含 4 对二硫键。Moore 和 Stein 测定了 RNase A 的一级结构 (图 10-19)。这是被测定顺序的第二个蛋白质也即第一个酶。由于他们作出的贡献, 在 1972 年和 Anfinsen 一起获得了诺贝尔化学奖。

RNase A 容易分离纯化, 可制成结晶。有关该酶催化机制的研究, 大多是从化学修饰法和动力学方法推测而得, 而这种催化机制又进一步为 X 射线晶体结构研究结果所证实。

用枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)限制性水解 RNase, 在 20 和 21(Ala - Ser)氨基酸残基之间断裂, 得到 S 肽(20 肽)和 S 蛋白(104 肽), 在变性溶剂中用层析法分离, 所得产物在除去变性剂后仍无活性。若在中性 pH 下将 2 个肽段共同保温, 则 S 肽和 S 蛋白依靠次级键结合, 可恢复全部活性, 叫做 RNase S。具有 S 肽氨基末端的 13 个残基的合成肽和 S 蛋白合并时, 发现能恢复 70% 的活性, 说明氨基酸残基 14~20 对催化并非必需。但是若缺少 His₁₂ 和 Met₁₃ 只含有 11 个残基的肽, 则不能恢复活性。

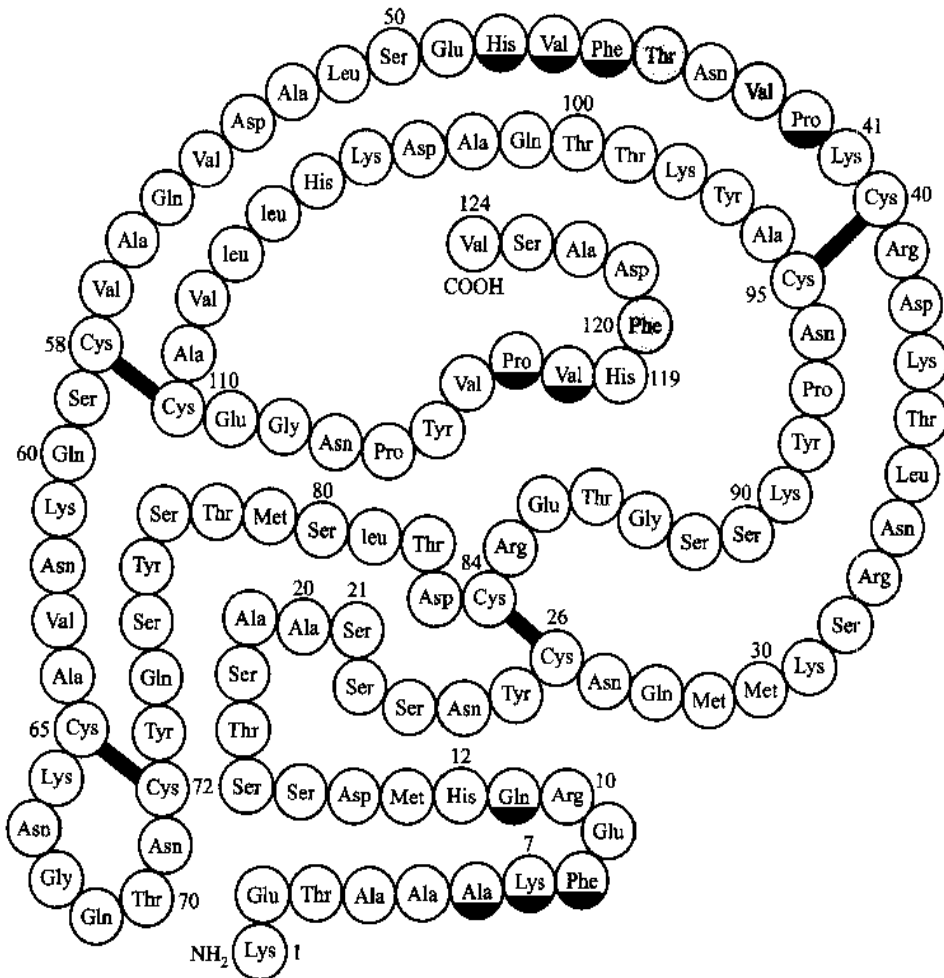


图 10-19 牛胰核糖核酸酶的氨基酸顺序

核糖核酸酶是第一个从氨基酸完全合成的酶, 最终产物与天然核糖核酸酶在酶学性质上毫无区别。4 个二硫键在图中以黑棒表示。在活性部位中有 3 个重要的残基 His₁₂、His₁₁₉ 和 Lys₅₁。参与底物与活性部位结合的其他基团有 Thr₄₅、Val₄₃ 和 Phe₁₂₀。

用化学修饰法研究 RNase A 活性的必需氨基酸残基。在 pH 5.5 下, 用等摩尔碘乙酸处理 RNase A, 羧甲基化的 His₁₁₉ 是主要产物, 而羧甲基化的 His₁₂ 产物较少(图 10-20)。RNase A 中其他组氨酸对这个试剂的反应性弱得多。所得 RNase A 的两个羧甲基化的衍生物均无活性, 因此可以推测 His₁₁₉ 和 His₁₂ 为酶活性的必需基团。

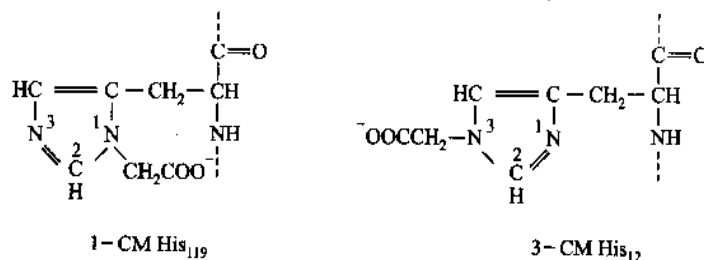


图 10-20 当 RNase A 以等摩尔量的碘乙酸处理时, 得到 2 个主要产物 His₁₁₉ 和 His₁₂ 的羧甲基化衍生物

用可结合到活性部位的小分子胞嘧啶核苷-3'-磷酸做实验,发现它可抑制上面的羧甲基化作用,进一步验证了上述实验结果。2,4-二硝基氟苯可选择性地同酶的 $\text{Lys } \epsilon\text{-NH}_2$ 反应(图 10-21)。酶引起失活。该结果表明 Lys_{41} 也是酶活性部位的必需氨基酸。通过以上研究结果可认为 His_{119} 、 His_{12} 、 Lys_{41} 构成了 RNase A 的活性部位。

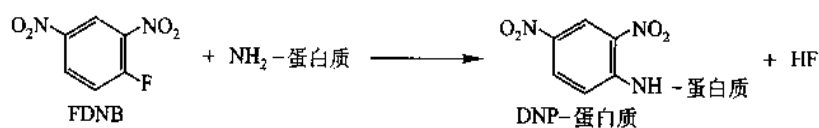


图 10-21 2,4-二硝基氟苯(FDNB)与 $\text{Lys } \epsilon\text{-NH}_2$ 的反应

图 10-22 表示合成的 2',3'-环核苷酸底物以及 RNA 水解对 pH 的依赖性。钟形曲线意味着催化是一种协同酸碱催化反应,其表观 $\text{p}K'_a$ 值与相关的 2 个 His 残基相当,1 个为带电荷形式时起广义酸的作用,而另 1 个为中性形式时起广义碱的作用。用 NMR 法测定 His_{12} 和 His_{119} 的 $\text{p}K'_a$ 值分别为 5.8 和 6.2。

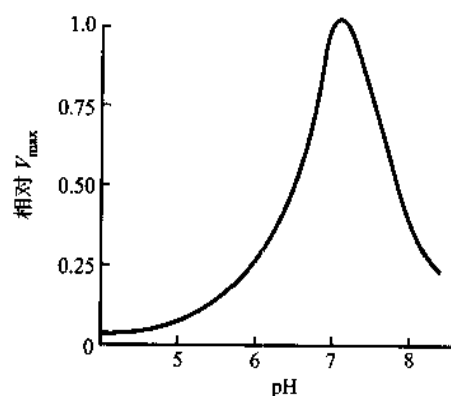


图 10-22 RNase A 催化 2',3'-环核苷酸水解时 V_{max} 对 pH 的依赖性

利用 RNase 和 RNase 与其专一抑制剂复合物晶体结构的研究,可更好地了解酶的作用机制。Richards 和 Wyckoff X 射线晶体结构分析 RNase 的三级结构证明, RNase 的 His_{119} 、 His_{12} 和 Lys_{41} 作为活性部位在空间结构上靠近(图 10-23), 这些功能基分布和环绕在 RNase 分子中心的裂缝中, 嘧啶环和嘌呤环适于进入酶表面的特异区域。嘧啶环与 Thr_{45} 的 OH 侧链和肽键上 -NH- 两者形成氢键, Phe_{120} 位于嘧啶环的一侧, 而 Val_{43} 于另一侧。由这些基团为嘧啶的结合形成一个沟。Richards 发现当嘧啶为嘌呤代替时, 该化合物仍结合在活性部位上, 但是 His_{12} 和核糖 C-2'OH 之间的距离增加了 0.15 nm, 这就解释了为什么 RNase 对处于这个位置的嘧啶基团——胞嘧啶或尿嘧啶具有专一性。

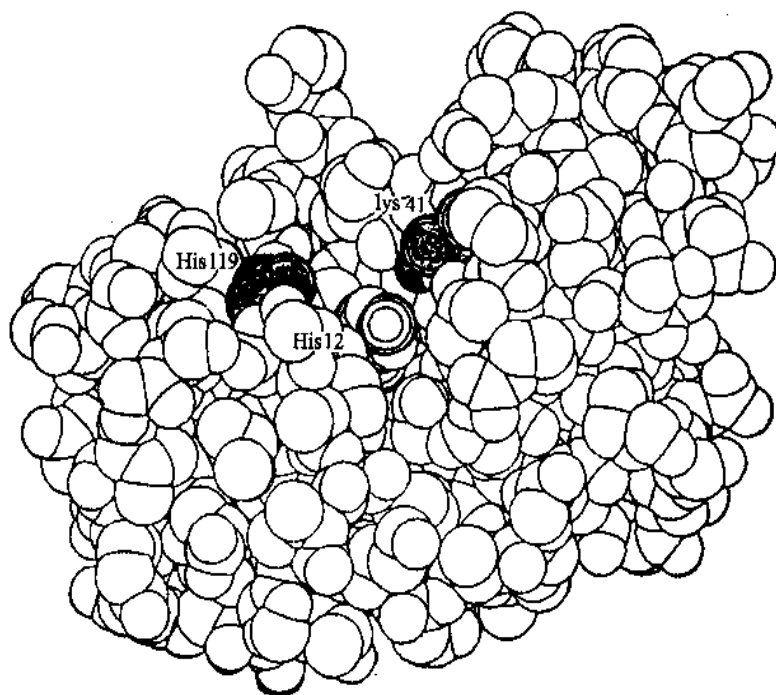


图 10-23 核糖核酸酶的实体模型
3 个关键性的侧链 His_{119} 、 His_{12} 和 Lys_{41}

由以上研究结果,提出了 RNase 的催化作用机制(图 10-24)。认为 His₁₂ 和 His₁₁₉ 是通过广义酸碱催化作用的。第一步生成环形磷酸酯, His₁₂ 作为碱(图 A 到 B), 以便于从核糖 C-2'OH 上除去一个质子, 与磷酸形成环形 2',3'-磷酸酯; His₁₁₉ 然后作为一种酸催化(B 到 C), 提供质子生成 C-5'OH。在第二步打开环形磷酸环, 这些作用正相反, His₁₂ 作为酸而 His₁₁₉ 作为碱, 水分子进入(D) 提供一个质子给 His₁₁₉, 一个 OH 给磷酸形成三角双锥结构(E), 此物质在 His₁₂ 协助下生成嘧啶核糖-3'-磷酸产物(F)。可认为 Lys₄₁ 正电荷基团起到稳定由一个 OH(在环化步骤中由 C-2'OH) 或者在开环步骤中由水瞬时形成的过渡态五价磷。

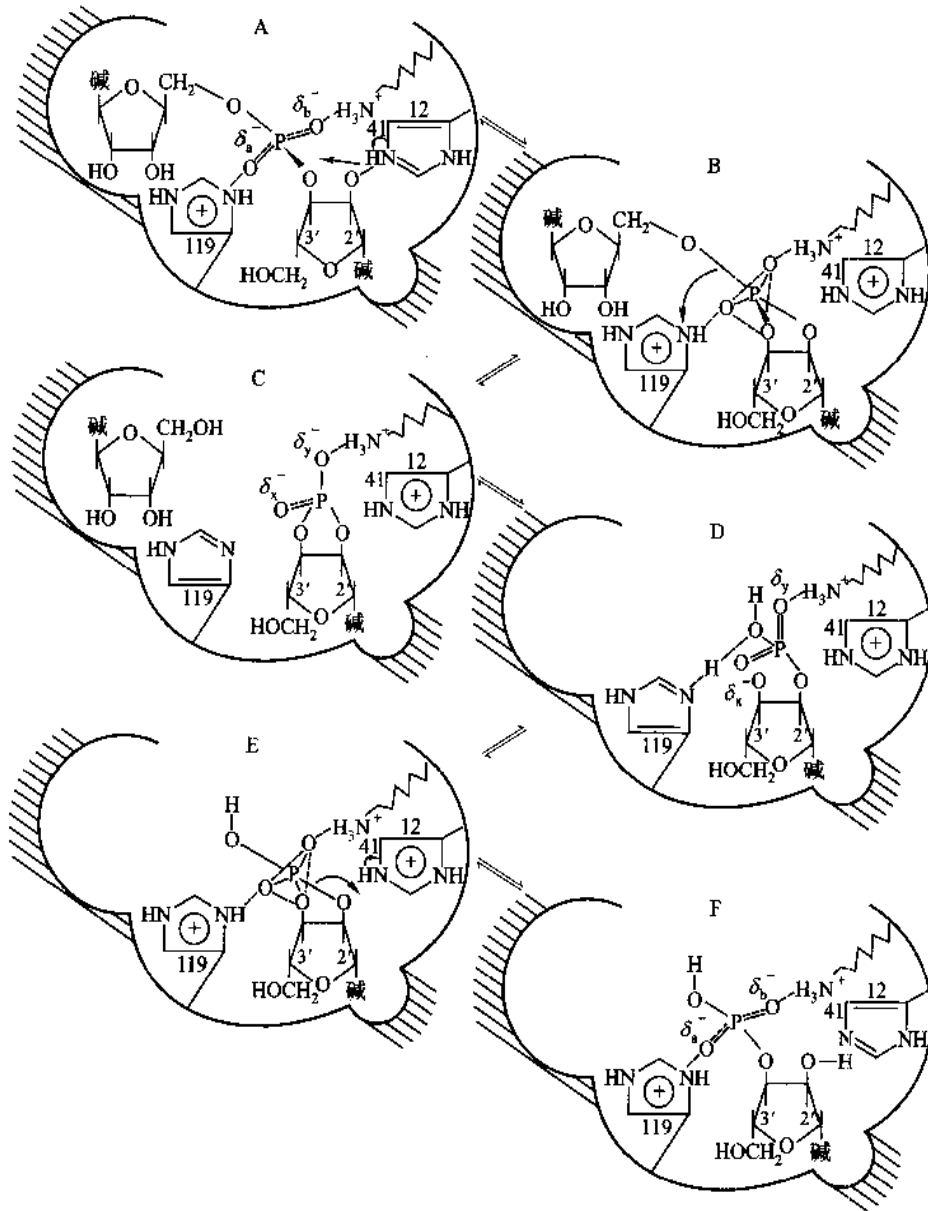


图 10-24 RNA 酶催化 RNA 水解的假设反应途径

(三) 羧肽酶 A(carboxypeptidase A)

羧肽酶 A 为一个外肽酶, 催化肽链 C 末端的肽键水解, 对羧基末端芳香族或大的脂肪族侧链较为敏感, 容易水解(图 10-25)。

羧肽酶 A 是由其前体羧肽酶原经胰蛋白酶水解部分肽段断裂加工而成。前体是由 3 个亚基构成的复合物, 经胰蛋白酶激活后变成由 307 个氨基酸残基组成的单肽链活性酶。1967 年 Lipscomb 以 0.2 nm 分辨率解析出了羧肽酶 A 的三维结构(图 10-26)。羧肽酶 A 具有紧密的外形, 是一个 5.0 nm × 4.2 nm × 3.8 nm 的椭球体。其中大约含有 38% α 螺旋, 17% β 折叠片, 还有一个结合紧密的 Zn²⁺, Zn²⁺ 对酶的

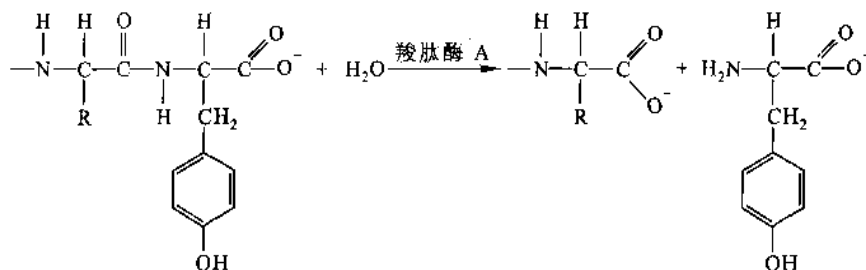


图 10-25 羧肽酶 A 催化的反应

活性很重要, Zn^{2+} 位于分子表面附近的一个裂缝中。 Zn^{2+} 同 His₆₉、His₁₉₆ 和 Glu₇₂ 的两个羧基氧配位, Zn^{2+} 在无底物时为 5 个配位价, 而且第五个配体是一个水分子(图 10-27)。当与底物结合时, 被裂解的肽键羧基氧与 Zn^{2+} 形成第六个配位。 Zn^{2+} 附近的口袋正好容纳底物羧基末端的侧链。对底物结合重要的残基包括 Arg₇₁、Arg₁₂₇、Asn₁₄₄、Arg₁₄₅、Tyr₂₄₈ 和 Glu₂₇₀。

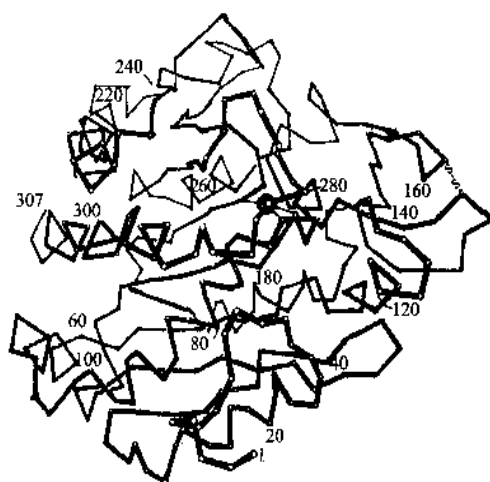


图 10-26 羧肽 A 的三维结构
只示出 α 碳原子和锌离子(中心附近黑色的圆)

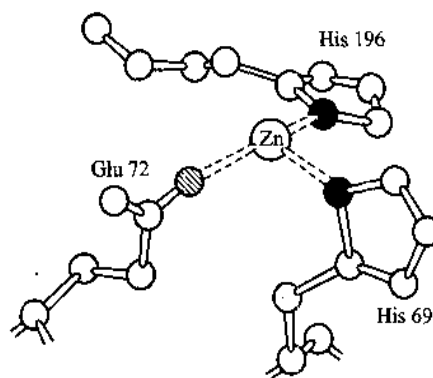


图 10-27 锌离子在羧肽酶 A 的活性部位上与两个组氨酸侧链和一个谷氨酸侧链相配位
与锌配位的一个水分子没有示出

羧肽酶对 L-氨基酸构成的肽专一, 并且存在第二个肽键是重要的。二肽是相当弱的底物, 但具有一个 N-乙酰基的二肽以正常速率水解。如像丝氨酸蛋白酶, 羧肽酶具有酯酶活性, 特别是假若 C 端侧链为芳香基和 C 端残基是 L 构型。羧肽酶催化速率是相当慢的酶, 水解肽底物 k_{cat} 大约为 $10^2 s^{-1}$, 水解酯的最大速率近 $10^3 s^{-1}$ 。

底物与羧肽酶 A 的结合方式已从甘氨酸酪氨酸与酶结合复合物的 X 射线晶体结构分析得到(图 10-28)。甘氨酸酪氨酸是一个水解缓慢的底物, 同酶的相互作用存在以下一些重要的方面(图 10-29):

(1) 二肽的 Tyr 侧链进入酶的疏水口袋, 该口袋适合于芳香侧链和大的脂肪族侧链, 这就解释了该酶选择的底物要有大的疏水侧链。

(2) 活性部位的 Zn 直接同断裂肽键羧基氧配位, 该底物有效的置换预先占据该位置的水分子。

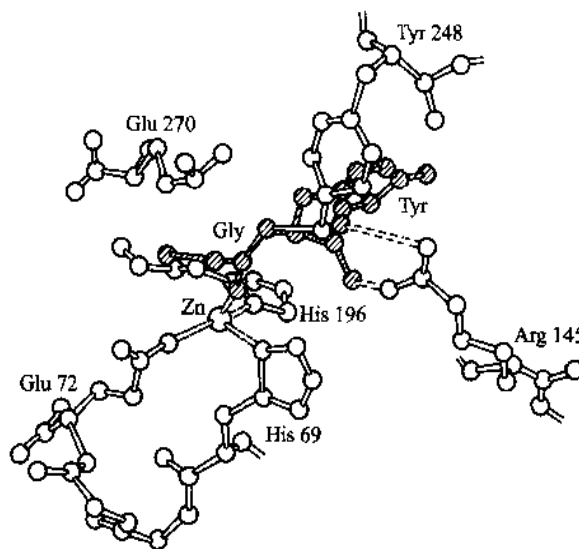


图 10-28 甘氨酸酪氨酸在羧肽酶 A 活性部位上的三维结构
底物甘氨酸酪氨酸以斜线球示出

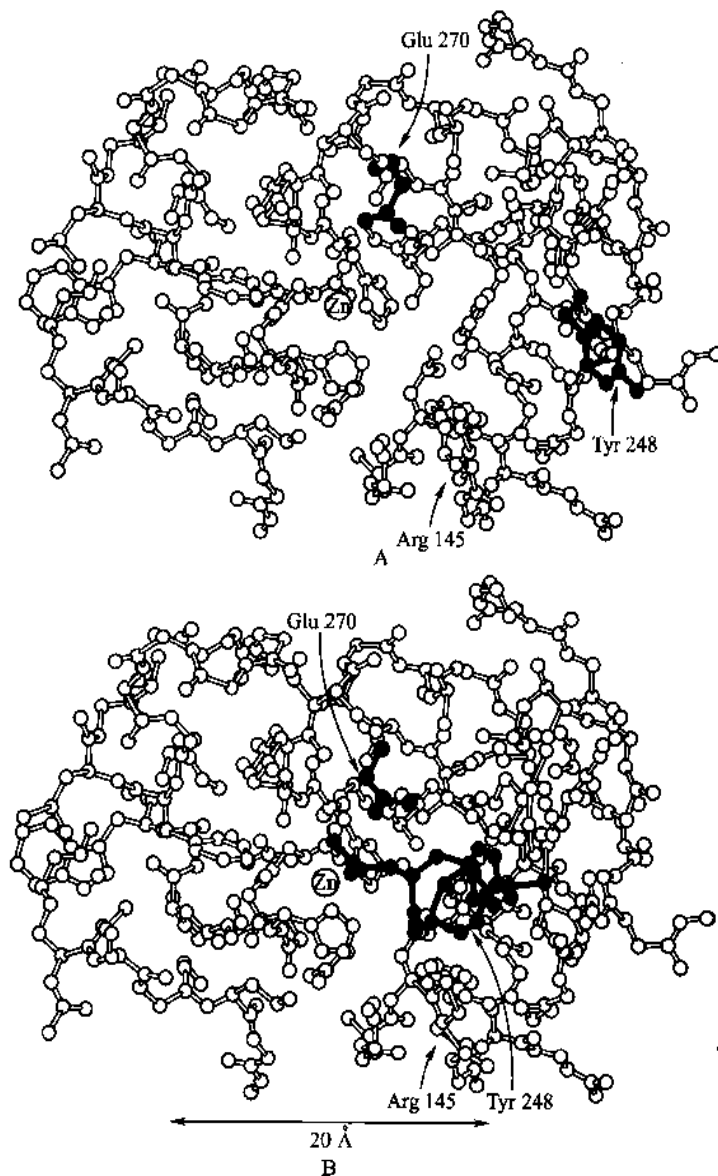


图 10-29 羧肽酶 A 的结构在结合底物后发生变化

A. 酶单独存在时; B. 酶底物复合物(底物甘氨酸酪氨酸以深灰色示出), 这里示出酶的一部分

(3) Arg₁₄₅的胍基移动大约 0.2 nm, 同底物末端羧基形成一个静电键, Glu₂₇₀与底物结合也经历了同样的位移。

(4) 当底物的 Tyr 侧链与活性口袋结合时, 至少有另外 4 个水分子从其中被置换出来。最大的构象变化是羧肽酶 Tyr₂₄₈的酚羟基移动了 1.2 nm, 大约相当于这个蛋白分子直径 1/4 的距离。这个移动主要是通过 Tyr₂₄₈的 C_α-C_β 单键转动而实现的。Tyr₂₄₈的羟基从分子表面移到底物肽键附近, 同底物敏感键 N 端侧链残基的氨基形成氢键。这个移动的一个重要后果是把活性部位的空腔关闭了, 并完成了这个空腔从由水充填的区域成为疏水区域的转化。这些结构的变化可能是通过 Arg₁₄₅结合到底物的末端羧基上引起的。羧肽酶 A 与底物结合, 引导起构象的改变, 正是诱导契合的典型例证。

甘氨酸酪氨酸不是羧肽酶 A 理想的底物类似物, 用底物类似物(一)-2-苄基-3-(*p*-甲氧苯甲酰)丙酸进行 X 射线晶体结构研究, 得到了羧肽酶 A 与底物相互作用的更好描述(图 10-30)。在这个复合物中, 羧基不同 Zn²⁺ 配位, 但是与 Arg₁₂₇胍基形成氢键。

根据 X 射线晶体结构分析和动力学的研究, 提出了关于羧肽酶 A 的催化机制(图 10-31)。假定产生的 ES 复合物如图所示, 则 3 个基团是催化作用所必需的: Zn²⁺、Arg₁₂₇的胍基和 Glu₂₇₀的羧基。羧肽酶 A 催化的第一步是活化水分子的亲核氧原子攻击底物羰基碳原子, 同时, Glu₂₇₀作为广义碱, 从 Zn²⁺-结合

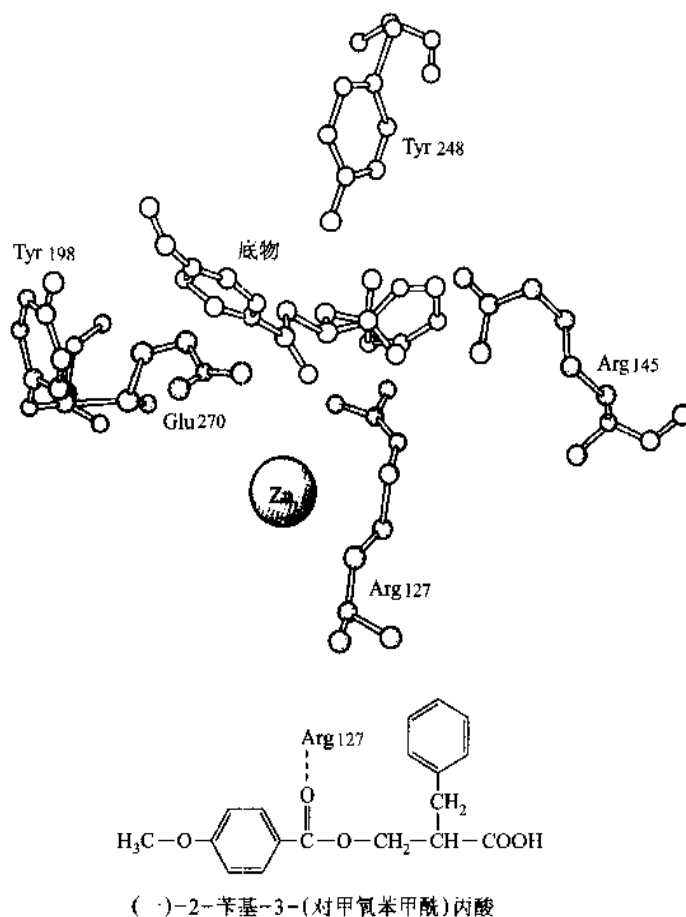


图 10-30 羧肽酶 A 抑制剂 (S)-2-苯基-3-(对甲氧苯甲酰)丙酸的羧基氧与羧肽酶 A 的 Arg₁₂₇ 氢键结合

水吸取一个质子,形成一个带负电荷四面体过渡态中间物,通过 Zn^{2+} 和 Arg₁₂₇ 带正电荷的侧链的静电相互作用给以稳定(A→B)。催化的第二步, Glu₂₇₀ 的 COOH 作为广义酸提供一个质子给肽的 -NH 基, 肽键随着断裂(B→C), 释放出氨基酸, 经扩散离开活性部位, 从而完成这一水解过程。

(四) 丝氨酸蛋白酶 (serine proteases)

丝氨酸蛋白酶是一类最有特色的酶家族。这个家族包括胰蛋白酶 (trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)、弹性蛋白酶 (elastase)、凝血酶 (thrombin)、枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)、纤溶酶 (plasmin)、组织纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 和其他有关的酶类。头 3 种酶为消化酶, 在胰腺中合成, 并以非活性的酶原形式分泌到消化道中, 在消化道中酶原通过除去部分肽链转变成活性酶形式。凝血酶在血凝级联 (blood clotting cascade) 中是一个重要的酶。枯草杆菌蛋白酶是一种细菌蛋白酶, 而纤溶酶能裂解血凝块的纤维多聚体。tPA 特异地裂解纤溶酶原产生纤溶酶, 由于它有刺激破坏血块的能力, 假若病人在 30 min 内服药, tPA 能使心脏受侵袭的有害后果减到最低。最后, 乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase) 虽然本身不是一种蛋白酶, 而是一种丝氨酸酯酶, 但具有丝氨酸蛋白酶的相关机制, 能降解神经递质乙酰胆碱。

1. 消化作用的丝氨酸蛋白酶

胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶执行着相同的反应——裂解肽键, 虽然它们结构和作用机制很相似, 但专一性明显不同。胰蛋白酶裂解碱性氨基酸 Arg 或 Lys 羧基侧链肽, 胰凝乳蛋白酶选择裂解芳香氨基酸如像 Phe 和 Tyr 羧基侧链, 弹性蛋白酶不像前 2 种酶的专一性, 它主要裂解小的中性氨基酸残基羧基侧链肽。这 3 种酶相对分子质量范围在 25×10^3 , 并且具有相似的顺序 (图 10-32) 和三级结构。胰凝乳蛋白酶的结构是个典型 (图 10-33)。此分子是一个紧密的椭球体, 大小为 $5.1 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm}$,

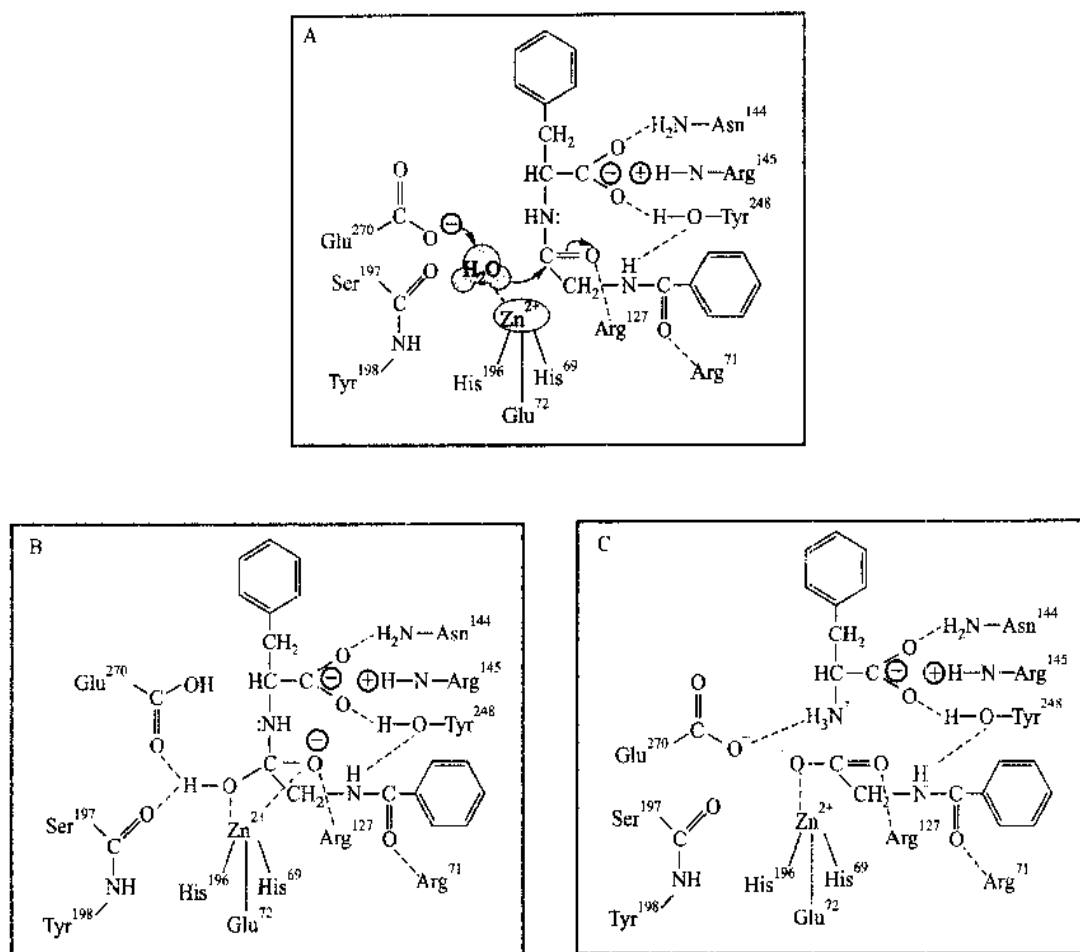


图 10-31 羧肽酶 A 裂解模式底物苯甲酰甘氨酸苯丙氨酸的机制

在 C 端含一个 α 螺旋(残基 230 到 245), 和几个 β 折叠域。多数芳香和疏水残基包埋在蛋白质内部, 而多数带电的或者亲水的残基分布在分子表面。3 个极性残基——His₅₇、Asp₁₀₂ 和 Ser₁₉₅ 在活性部位形成熟知的催化三联体(catalytic triad)(图 10-34)。这 3 个残基在胰蛋白酶和弹性蛋白酶也存在着。酶活性部位位于酶分子表面凹陷的小口袋中, 可用于鉴别酶对残基的专一性(图 10-35)。例如在胰凝乳蛋白酶中, 有一个被疏水氨基酸环绕的口袋, 人的足以容纳一个芳香残基。在胰蛋白酶口袋中, 有一个负电荷 Asp₁₈₉ 在底部, 有利于结合正电荷 Arg 和 Lys 残基。另一方面弹性蛋白酶有一个浅的口袋, 在开口处具有大的 Thr 和 Val 残基, 仅仅小的、不大的残基能够容纳在它的口袋中。肽底物的骨架以反平行的方式氢键结合到残基 215~219 上, 这样被裂解的弯曲肽键就靠近 His₅₇ 和 Ser₁₉₅ 结合。

2. 胰凝乳蛋白酶机制的动力学研究

胰凝乳蛋白酶机制可通过水解人工合成底物——简单的有机酯进行研究, 如乙酸-*o*-硝基苯酯、氨基酸类似物的甲酯如甲酰苯丙氨酸甲酯、乙酰苯丙氨酸甲酯和苯甲酰丙氨酸甲酯(图 10-36)。乙酸-*o*-硝基苯酯是一种特别有用的模式底物, 因为硝基酚产物在 400 nm 有强的吸收, 容易被观察。当大量凝乳蛋白酶用该底物进行动力学研究时, 反应分两个不同的阶段, 开始以突发速率生成 *p*-硝基苯酚, 随后成为一个慢的稳态速率(图 10-37)。第一步是乙酸-*o*-硝基苯酯与胰凝乳蛋白酶结合后形成一个酶-底物(ES)复合物(图 10-38), 底物的酯键被裂解。然后产物之一的 *p*-硝基苯酚从酶上释放出来, 而底物乙酰基就以共价键与酶的 Ser₁₉₅ 结合。随后水分子攻击乙酰-酶复合物, 释放出乙酸根离子, 并使酶再生(图 10-38)。*p*-硝基苯酚开始生成时的迅速突发阶段相当于乙酰-复合体的形成, 这步称为酰化作用。在慢的稳态阶段生成 *p*-硝基苯酚, 相当于乙酰-酶复合物通过水解再生为游离的酶, 第二步称为脱酰作用, 是胰凝乳蛋白酶水解酯的限速步骤。

实际上, 酰基-酶复合物是相当稳定的, 从而在适当条件下可以分离出来。

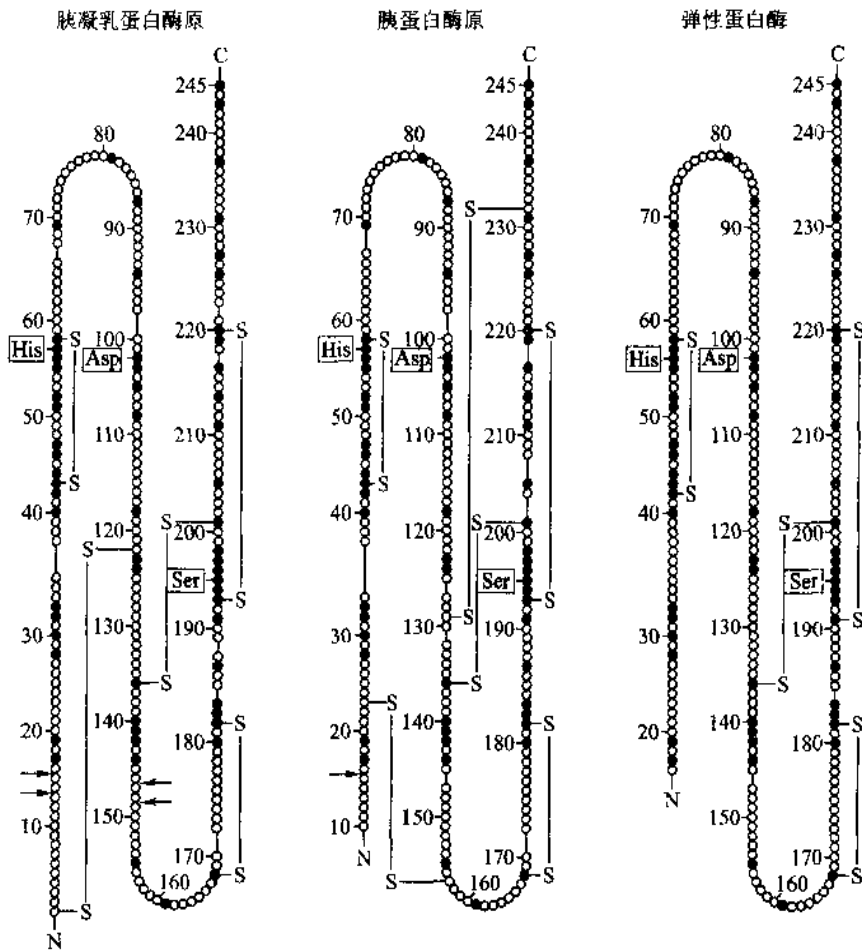


图 10-32 胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原和弹性蛋白酶氨基酸顺序的比较

每个圆圈代表一种氨基酸。号码是根据胰凝乳蛋白酶原的顺序。实圈表示所有 3 种蛋白质相同的残基。二硫键用黑线表示,3 种催化上重要的活性部位的残基(His₅₇、Asp₁₀₂、Ser₁₉₅)位置已指出



图 10-33 α -胰凝乳蛋白酶的三维结构

只表示出 α -碳原子,在催化中起重要作用的残基用圆圈标出

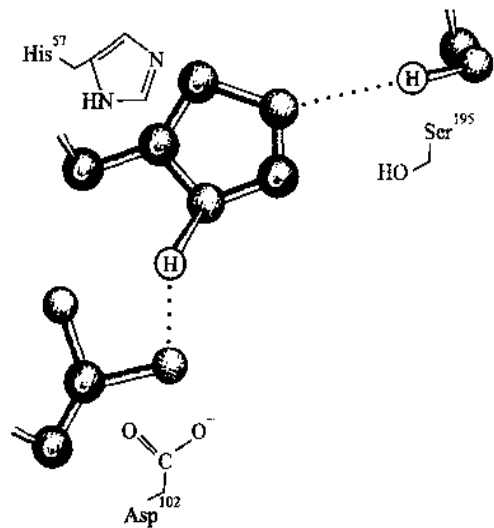


图 10-34 胰凝乳蛋白酶的催化三联体

3. 胰凝乳蛋白酶中的催化三联体

胰凝乳蛋白酶的催化活性依赖于 Ser₁₉₅ 的异常反应活性。在生理条件下, $-\text{CH}_2\text{OH}$ 基一般是很不活泼的。究竟什么原因使它在胰凝乳蛋白酶的活性部位中这样活泼呢? 从这个酶三维结构的 X 射线晶体结构研究中得出一个可能的解释。正如从亲和标记工作中可预料到的, His₅₇ 确与 Ser₁₉₅ 相邻近, Asp₁₀₂ 的

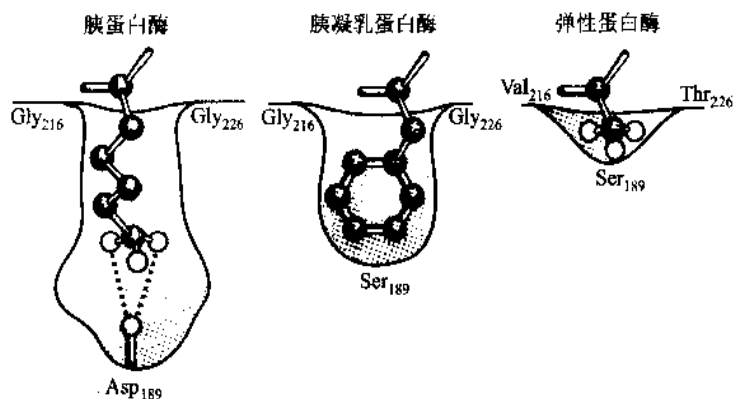


图 10-35 胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶底物结合口袋

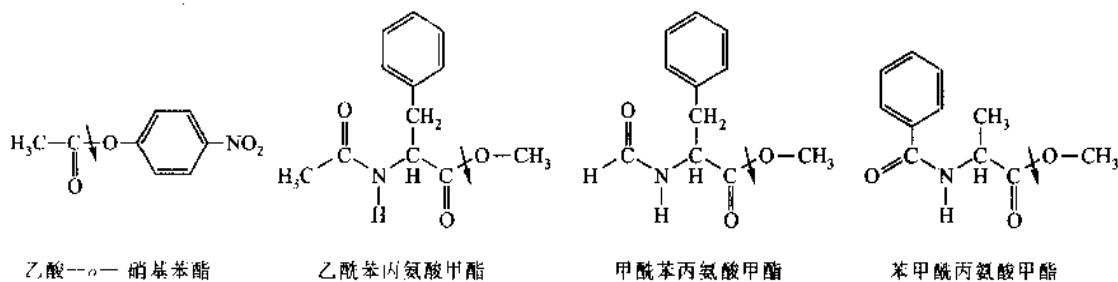


图 10-36 用于研究胰凝乳蛋白酶机制的人工底物

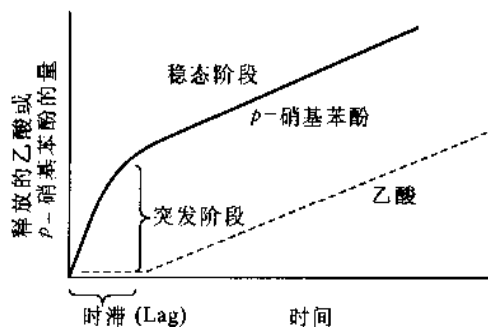


图 10-37 胰凝乳蛋白酶同底物反应的动力学曲线

突发地产生 *p*-硝基苯酚之后,紧接着是更慢的、稳态的释放。在一个初始的延缓周期之后,即观察到乙酸的释放。这个动力学模型与酰化-酶中间物的迅速形成是一致的。更慢的、稳态的释放产物相当于酰基-酶中间物限速的裂解

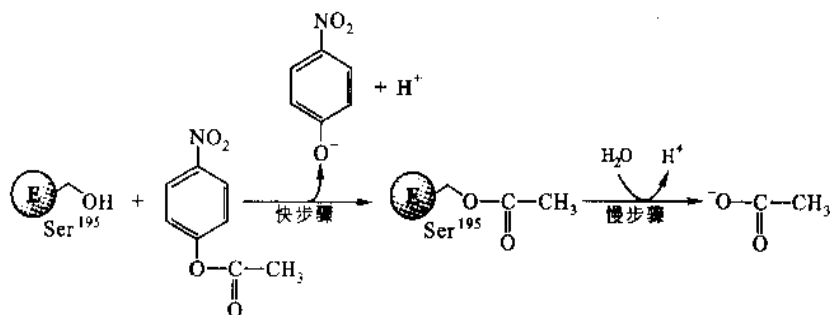


图 10-38 酰基-酶中间物的迅速形成,随后缓慢地释放产物

羧基侧链也在其附近(图 10-39)。这 3 个残基形成催化三联体(catalytic triad)。

在没有底物时,His₅₇是未质子化的(图 10-40),然而当 Ser₁₉₅羟基氧原子对底物进行亲核攻击时,它从 Ser₁₉₅接受一个质子,Asp₁₀₂的 COO⁻作用是稳定过渡态中 His₅₇的正电荷形式,此外,Asp₁₀₂定向 His₅₇并

保证从 Ser₁₉₅接受一个质子处于适当的互变异构形式。

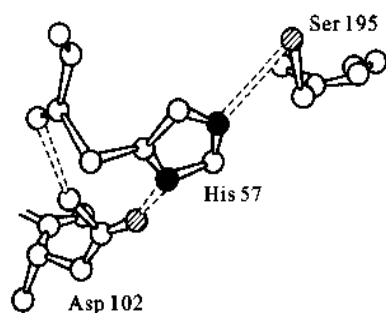


图 10-39 胰凝乳蛋白酶中 Ser-His-Asp 催化三联体的构象

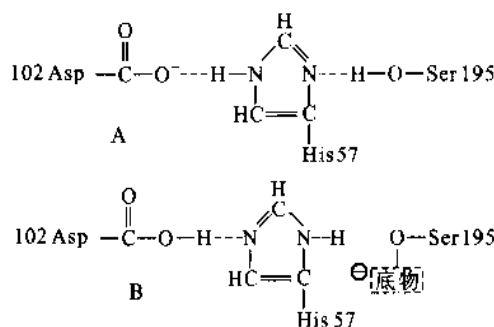


图 10-40 在胰凝乳蛋白酶中催化三联体的作用
A. 酶本身; B. 加上底物后, 从 Ser₁₉₅转移一个质子给 His₅₇, 带正电荷的咪唑环通过带负电荷的 Asp₁₀₂静电相互作用被稳定

胰凝乳蛋白酶与底物类似物复合物的晶体学研究已说明了专一性识别部位的位置以及敏感肽键的可能取向。甲酰色氨酸与胰凝乳蛋白酶结合, 将其吲哚侧链正好装进 Ser₁₉₅附近的口袋中(图 10-41)。这个较深的沟足以说明胰凝乳蛋白酶对芳香族和其他大的疏水性侧链的专一性。胰凝乳蛋白酶与多肽底物类似物复合体晶体结构分析指出了底物主链和酶的主链之间形成广泛的氢键。氢键的模式与反平行 β 折叠片中的相似。

4. 丝氨酸蛋白酶的催化机制

肽水解的可能机制如图 10-42 所示, 通过酰化和脱酰化两步进行。底物肽的骨架结合到邻近的催化三联体, 专一侧链进入它的口袋。催化三联体的 Asp₁₀₂通过一个氢键定位并固定 His₅₇。反应的第一步, His₅₇作为一个广义碱从 Ser₁₉₅吸取一个质子, 促进 Ser₁₉₅亲核攻击要断裂肽键的羰基碳。这是一个协调步骤, Ser₁₉₅攻击羰基碳前质子转移, 将留下一个相当不稳定的 Ser 氧的负电荷, 形成酰基酶共价复合物。在下一步骤中, 从 His₅₇质子供体给肽的酰胺氮, 得到

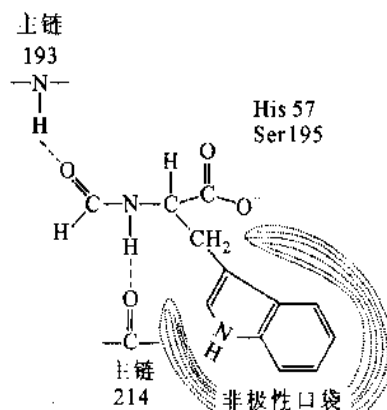
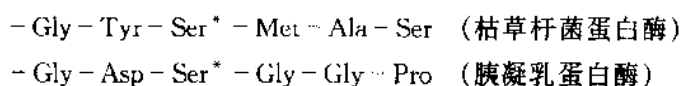


图 10-41 底物类似物甲酰-L-色氨酸与胰凝乳蛋白酶结合情况的示意图

共价的质子化胺, 形成四面体中间物, 随后促进键的断裂, 和产物胺的解离。肽上氧的负电荷是不稳定的, 这个四面体中间物是短暂的, 能迅速地断裂除去产物胺。酰基酶中间物有一定稳定性, 甚至用不能进一步反应的底物类似物能够分离出来。然而, 用正常的肽底物, 随后为脱酰化, 用水亲核攻击羰基碳, 产生另一个过渡态四面体中间物(图 10-42)。在这一步中 His₅₇作为广义碱从攻击的水分子接受一个质子。随后通过 His₅₇提供质子给 Ser 氧, 以协调的方式帮助四面体中间物瓦解。羧基失去质子, 并从活性部位脱离, 完成了整个反应。丝氨酸蛋白酶的催化机制说明了过渡态稳定性的原理, 也提供了一种典型的酸-碱催化和共价催化的例子。

5. 丝氨酸蛋白酶的趋异进化和趋同进化

胰腺分泌的胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶有相似的氨基酸排列顺序(大约有 40% 相同)和三维结构, 也有类似的催化机制, 反映出它们起源于共同祖先, 但是又表现出不同的底物专一性。这种通过基因突变, 从同一个祖先取得不同的专一性, 称为“趋异进化”(divergent evolution)。对此胰凝乳蛋白酶和一种细菌酶, 即枯草杆菌蛋白酶, 可以显示不同种类的进化过程。枯草杆菌蛋白酶也是一种丝氨酸蛋白酶。但是, 胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的氨基酸顺序很不相同, 这表明它们是在进化中独立发生的, 例如胰凝乳蛋白酶含有 5 个二硫键, 而枯草杆菌蛋白酶一个也没有。活性部位丝氨酸顺序为:



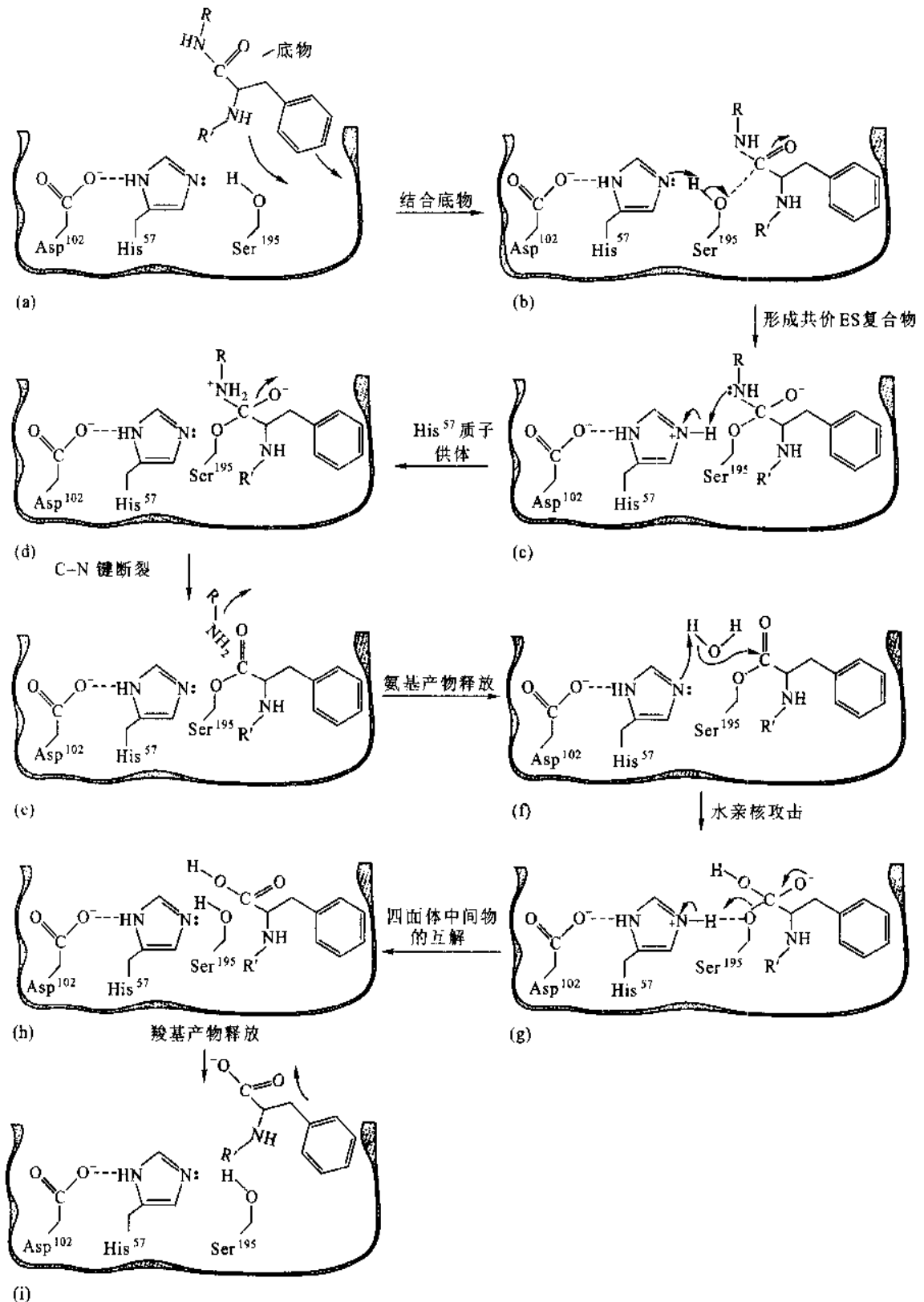


图 10-42 胰凝乳蛋白酶反应的详细机制

这些酶的三维结构完全不同。但令人惊异地发现,枯草杆菌蛋白酶有一个催化三联体,如像胰凝乳蛋白酶中一样,也是由一个 Asp, His 和 Ser 残基组成。这些酶来源各异,但是它们的催化三联体组成相同,有相似的催化机制,这种情况称为丝氨酸蛋白酶来源的“趋同进化”(convergent evolution)。为什么脊椎动物的胰腺丝氨酸蛋白酶和细菌的枯草杆菌蛋白酶会通过独立而平行的进化过程达到同一答案呢?经研究认为,有效地裂解肽键的方式看来只有少数几种。对数百种已知蛋白水解酶进行的研究表明,总共可能只

有 4 种主要的催化类型——丝氨酸蛋白酶、锌蛋白酶、巯基蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶，而丝氨酸蛋白酶特别普遍。

(五) 天冬氨酸蛋白酶 (aspartic proteases)

天冬氨酸蛋白酶作为一个蛋白水解酶家族产生于哺乳动物、霉菌和高等植物。这些酶在酸性 pH (或有时中性) 呈现活性, 并且在活性部位具有两个 Asp。天冬氨酸酶执行各种功能(表 10-7), 包括消化(胃蛋白酶和凝乳酶)。溶酶体蛋白的降解(组织蛋白酶 D 和 E)和调节血压(肾素是一种天冬氨酸蛋白酶, 包括产生血管紧张肽, 是一种刺激平滑肌收缩和降低盐及体液分泌的激素)。天冬氨酸蛋白酶具有多种底物专一性, 但它们通常是断裂两个疏水氨基酸之间的肽键。例如, 胃蛋白酶的选择性底物为被断裂肽键两侧为芳香族残基。

表 10-7 天冬氨酸酶的某些代表

名称	来源	功能
胃蛋白酶(pepsin)	动物胃	消化饮食蛋白
凝乳酶(chymosin)	动物胃	消化饮食蛋白
组织蛋白酶 D(cathepsin D)	脾、肝和许多其他动物组织	溶酶体蛋白消化
肾素(renin)	肾	转换血管紧张肽原成为血管紧张肽 I; 调节血压
HIV-1 蛋白酶(HIV-1 protease)	AIDS 病毒	加工 AIDS 病毒蛋白

多数天冬氨酸蛋白酶含有 323~340 个氨基酸残基, 相对分子质量为 35×10^3 。天冬氨酸蛋白酶多肽链含有两个相同的结构域, 折叠形成三级结构。每个结构域由 2 个 β 折叠片和 2 个短的 α 螺旋构成。这 2 个结构域通过 6 股反平行的 β 折叠片桥联起来。酶的活性部位是一个深宽的裂缝, 是由 2 个并列的结构域形成的, 大的足以容纳大约 7 个氨基酸残基。例如猪胃蛋白酶中 2 个催化的天冬氨酸残基 Asp₃₂ 和 Asp₂₁₅ 就位于活性部位裂缝的中心, N-结构域形成一个“活板”(flap) 延伸到活性部位上, 可以帮助活性部位固定底物。

根据胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和其他丝氨酸蛋白酶相比, 提出假设, 天冬氨酸蛋白酶可能的功能, 是通过包含活性部位天冬氨酸形成共价酶-底物中间物。假设有两种可能性: 一种是包含酸酐键的酰基-酶中间物, 另一种是包含一个酰胺(肽)键的氨基-酶中间物(图 10-43)。所有试图分离共价中间物的努力都失败了, 从而支持了天冬氨酸蛋白酶非共价酶-底物中间物和广义酸-广义碱催化机制。

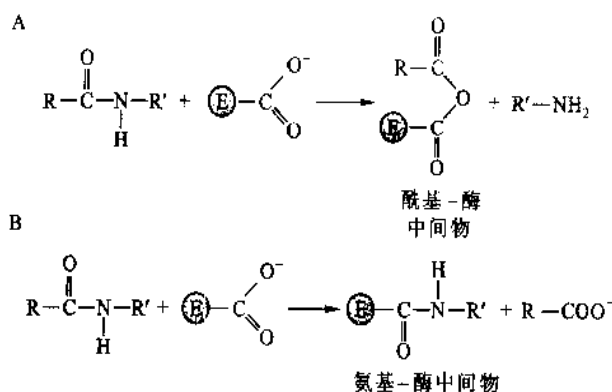


图 10-43 在丝氨酸蛋白酶酰基-酶中间物之后
对天冬氨酸蛋白酶最初假设的酰基-酶和氨基-酶中间物

A. 酰基-酶中间物; B. 氨基-酶中间物

1. 天冬氨酸蛋白酶的作用机制

蛋白酶活性的 pH 依赖性支持了广义酸-广义碱的催化模式, 酶学家假设天冬氨酸残基要么作为广义酸要么作为广义碱。这个模式要求当底物结合时, 一个天冬氨酸羧基质子化, 另一个脱质子。从天冬氨酸蛋白酶的 X 射线晶体结构分析资料表明, 2 个天冬氨酸附近的活性部位结构是高度对称的。这 2 个天冬氨酸表现为“催化二联体”(catalytic diad)的作用(类似于丝氨酸蛋白酶的催化三联体)。该二联体的质子在自由酶或酶-底物复合物中可以被共价结合到天冬氨酸基团的任何一个。例如: 胃蛋白酶中, Asp₃₂ 可以脱质子而 Asp₂₁₅ 质子化或者相反。

在最广泛接受的机制中(图 10-44), 随着底物的结合, 2 个协调的质子转移, 促进水对底物羰基碳的亲核攻击, 在该机制中显示, Asp₃₂ 作为一种广义碱从活性水分子接受一个质子, 而 Asp₂₁₅ 作为一种广义酸提供一个质子给肽羧基氧。由于 2 个质子的转移, 亲核攻击没有在活性部位明显地形成羟基离子。得到的中间产物称为酰胺二水合物(amide dihydrate)。注意这 2 种天冬氨酸残基的质子化状态现在与自由酶的正相反(图 10-44)。

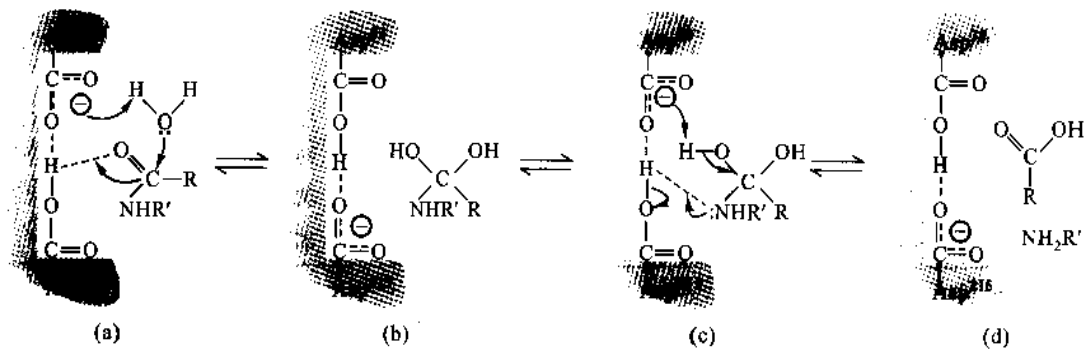


图 10-44 天冬氨酸蛋白酶的机制

在第一步中, 2 个协调质子的转移促进了水对底物羰基碳的亲核攻击。在第三步中, 一个天冬氨酸残基(在胃蛋白酶中 Asp₃₂)从酰胺二水合物中的一个羟基接受一个质子, 而另外一个天冬氨酸(Asp₂₁₅)提供一个质子给释放胺的氮

酰胺二水合物通过类似于它形成的机制被破坏, 离子化的天冬氨酸羧基(图 10-44 中 Asp₃₂)作为一种广义碱从酰胺二水合物一个羟基接受质子, 同时另外一个天冬氨酸(Asp₂₁₅)的质子化羧基作为一种广义酸提供一个质子给释放的肽产物之一的氮原子, 即完成这一水解过程。

2. AIDS 病毒 HIV-1 蛋白酶是一种天冬氨酸蛋白酶

获得性免疫缺陷综合征(AIDS, 艾滋病)和引起它的病毒介质, 人免疫缺陷病毒(HIV-1)的近期研究, 获得一种新的天冬氨酸蛋白酶。HIV-1 蛋白酶裂解 HIV-1 基因组的多聚蛋白(polyprotein)产物, 产生为病毒生长和细胞感染所需的几种蛋白(因此, 许多研究者正探索 HIV-1 蛋白酶抑制剂作为治疗 AIDS 有效药物的可能性)。

HIV-1 蛋白酶是哺乳动物天冬氨酸蛋白酶的一种异常的病毒仿制品, 是一个相同亚基的二聚体, 模仿胃蛋白酶和其他天冬氨酸蛋白酶的两个单体结构。HIV-1 蛋白酶亚基是 99 个残基、相对分子质量为 11×10^3 的多肽。同单体蛋白酶单独的结构域是相似的。X 射线晶体结构的研究显示, 在同型二聚体的分界面形成 HIV-1 蛋白酶的活性部位, 由 Asp25 和 Asp25' 两个天冬氨酸组成, 每个亚基贡献一个(图 10-45)。在同型二聚体中, 活性部位被两个相同的“活板”(flap)所覆盖, 每个亚基提供一个。与此相比, 而单体天冬氨酸蛋白酶仅具有一个活性部位“活板”。

Meek 等人所做酶促动力学的研究表明 HIV-1 蛋白酶的作用机制同其他天冬氨酸蛋白酶很类似。天冬氨酸羧基两个



图 10-45 HIV-1 蛋白酶同其抑制剂
乙酰-抑胃酶肽的复合物
活性中心天冬氨酸残基用白色表示

协调的质子转移促进了水对肽底物羰基碳的亲核攻击,形成酰胺二水合物。此步过渡态包括 2 个质子的转移——一个天冬氨酸作为广义酸提供一个质子给释放的氨基酸,而另一个天冬氨酸作为广义碱从羟基之一吸取一个质子,促进二水合物破坏形成一个羧基,底物被水解。

五、酶活性的调节控制

酶活性是受各种因素调节控制的,在第 8 章中曾做过初步介绍。下面主要讨论酶活性调节的其他方式。

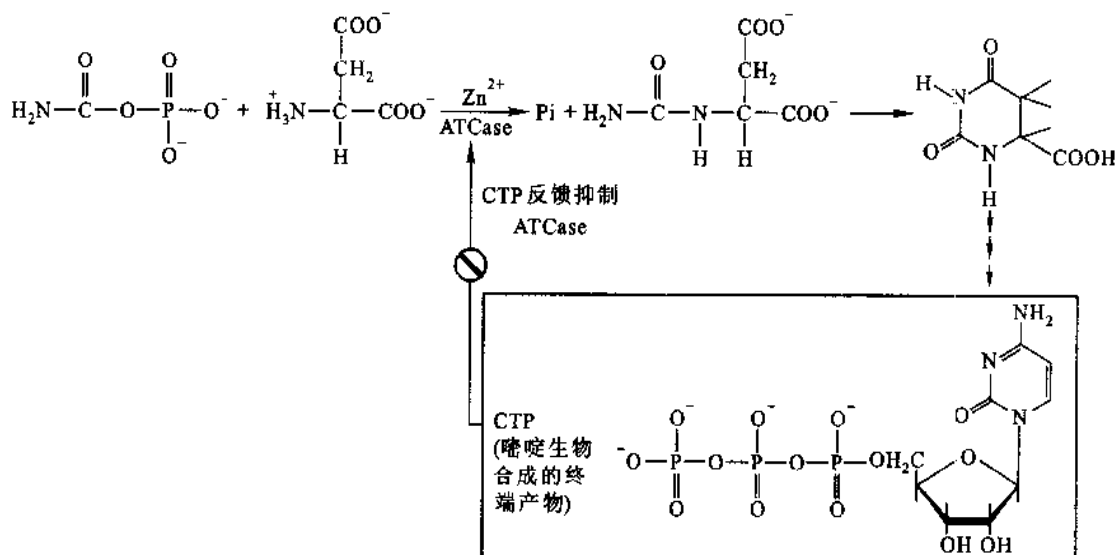
(一) 别构调控(allosteric regulation)

酶分子的非催化部位与某些化合物可逆地非共价结合后发生构象的改变,进而改变酶活性状态,称为酶的别构调节(allosteric regulation)。具有这种调节作用的酶称为别构酶(allosteric enzyme)。凡能使酶分子发生别构作用的物质称为效应物(effector)或别构剂,通常为小分子代谢物或辅因子。如因别构导致酶活性增加的物质称为正效应物(positive effector)或别构激活剂,反之称为负效应物(negative effector)或别构抑制剂。

别构调节普遍存在于生物界,许多代谢途径的关键酶利用别构调节来控制代谢途径之间的平衡。基因表达不论是调节蛋白(为 Lac 阻遏物,araC 蛋白)对转录水平的控制,还是转录后的加工(如 tRNA 的修饰成熟),或者是偶联的转录—翻译衰减机制的控制都直接或间接地与别构调节相关。因此研究别构调控具有重要的生物学意义。

1. 天冬氨酸转氨甲酰酶(aspartate transcarbamylase ATCase)

(1) 嘧啶途径的终产物反馈抑制 ATCase ATCase 是嘧啶核苷酸(CTP)生物合成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,ATCase 所催化的反应如下:



Gerhart 和 Pardee 发现了 ATCase 被该生物合成途径的终产物 CTP 反馈抑制,而且,他们发现 *N*-氨甲酰磷酸和天冬氨酸的结合是协同的,反映到反应速率对底物浓度的 S 曲线中(图 10-46)。协同结合使底物浓度只在一个很窄的范围内开启 *N*-氨甲酰天冬氨酸的合成。底物分子本身对别构酶的调节作用称为同促效应(homotropic effect)。CTP 在不影响酶的 V_{max} 的情况下,通过降低酶与底物的亲和性来抑制 ATCase。抑制程度可达到 90%,具体情况视底物浓度而定。ATP 则相反,它是 ATCase 的激活剂,可增强酶与底物的亲和性,也不影响 V_{max} 。ATP 与 CTP 相互竞争调节部位,高水平的 ATP 可阻止 CTP 对酶的抑制作用。这种非底物分子的调节物对别构酶的调节作用,称为异促效应(heterotropic effect)。

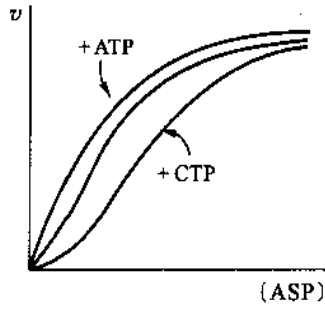


图 10-46 ATCase 的别构效应
ATP 是激活剂而 CTP 是抑制剂

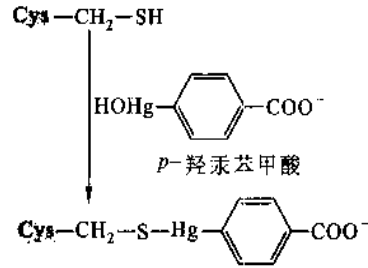


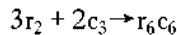
图 10-47 *p*-羟汞苯甲酸对 ATCase 中巯基的修饰作用

CTP 和 ATP 对 ATCase 调节的生物学意义有两个方面,首先 ATP 信号激活作用,提供 DNA 复制的能量,导致需求的嘧啶核苷酸的合成。其次,CTP 的反馈抑制,则保证当嘧啶核苷酸充足时,不需要该途径继续合成 *N*-氨甲酰天冬氨酸及其后续中间物。

(2) ATCase 由催化亚基和调节亚基构成 当用汞化物如 *p*-羟汞苯甲酸处理该酶时,同巯基反应则 ATCase 失去调节活性(图 10-47)。用汞化物处理过的 ATCase,ATP 和 CTP 不再影响其催化活性,而且底物结合变为无协同性。相反,修饰酶仍具有天然酶相同的最大催化活性。

Gerhart 和 Schachman 进行超离心研究,表明汞合物可使 ATCase 解离成两种亚基(图 10-48)。天然酶沉降常数为 11.6S,相对分子质量为 310×10^3 ,而解离的亚基是 2.8 S, 34×10^3 和 5.8 S, 100×10^3 。这二种亚基可借助电荷的显著不同或大小不同,可通过离子交换层析或蔗糖密度梯度离心分开,分离后加入过量的巯基乙醇,可从分离的亚基中除去结合的 *p*-羟汞苯甲酸基。

大的亚基叫催化亚基,有催化活性不与 ATP 和 CTP 结合;小的亚基叫调节亚基,无催化性能与 ATP 和 CTP 结合。催化亚基(c_3)含有 3 条 *c* 链(每条 34×10^3),而调节亚基含有 2 条 *r* 链(每条 17×10^3)。催化亚基和调节亚基混合时可迅速结合,得到的复合物具有天然酶相同的结构, c_6r_6 (含有 2 个催化亚基,3 个调节亚基)。



因而,重组的酶具有天然酶同样的别构性质。ATCase 是由分离的催化亚基和调节亚基构成的,在天然酶中相互作用产生别构行为。由于 ATCase 的催化和调节功能容易被分开,也易复原,因此 ATCase 被选择为研究对象。

(3) ATCase 及其与双底物类似物 PALA 复合物的三维结构 Lipscomb 及其同事曾以 0.26 nm 的分辨率阐明了 ATCase 的三维结构。他们也解决了 ATCase 与别构抑制剂 CTP 以及与一种底物类似物的复合物的结构问题。这个酶的图案是有特色的(图 10-49)。3 个调节二聚体(r_2)在一个赤道面上,1 个催化三聚体(c_3)在赤道面上边,另一个催化三聚体在赤道面下边。该酶有一个很大的居中的洞穴,可经由几个通道到达此洞。ATCase 球体的直径为 13 nm 左右,为血红蛋白大小的 2 倍。ATCase 是由 2 个 c_3 部分和 3 个 r_2 部分组成,

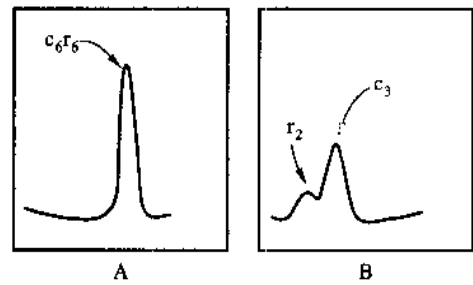


图 10-48 沉降速率模式

A. 天然 ATCase B. 通过汞化物解离成调节亚基和催化亚基的酶

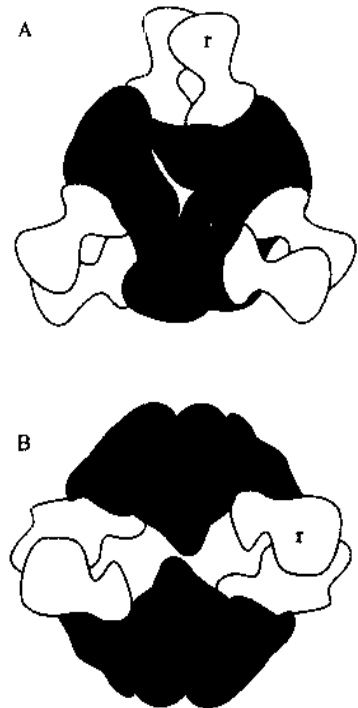


图 10-49 ATCase 中亚基的排列

A. ATCase 三重对称轴的俯视图
B. ATCase 的垂直观
c 代表催化肽链 *r* 代表调节肽链

其中一半是 c_3r_3 。所以从上面看去,便可看到它的一半,即 c_3r_3 (图 10-50)。这样可以看到了 3 个完全相同的 cr 单位,彼此关系是旋转 120 度。每一个在外周的 r 链上有 2 个结构域,外边的 1 个含有 CTP 的结合部位,里边的 1 个与相同三聚体中一个催化链相互作用。这样,正如图 10-49 所示,每条 r 链同 2 条 c 链接触,而每条 c 链同 2 条 r 链接触。每条 r 链的 C 端区域含有 1 个 Zn^{2+} ,通过与 4 个 Cys 残基(109, 119, 137 和 140)的硫原子相配位,形成四面体的几何构象起着结构作用。

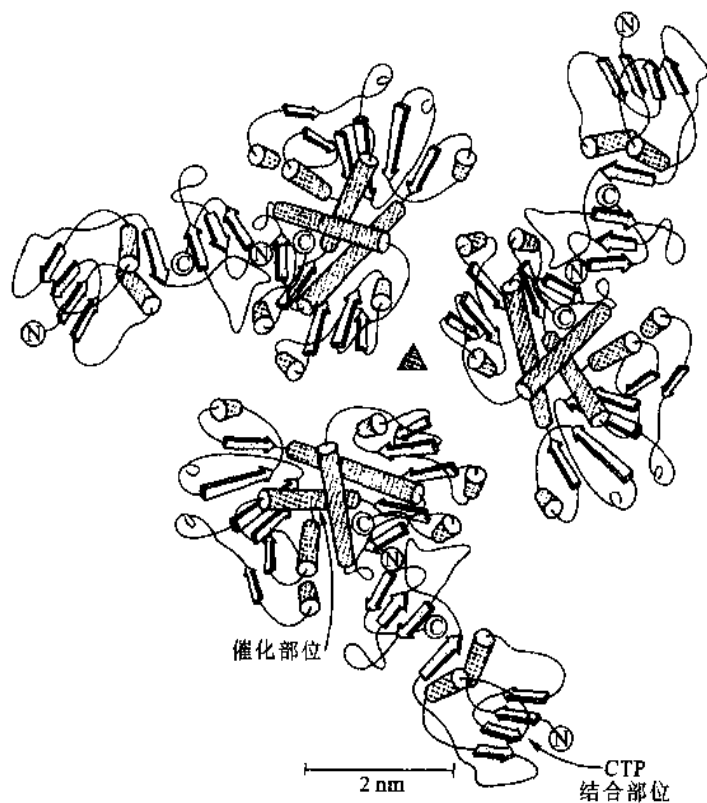


图 10-50 ATCase 半分子(c_3r_3)的三维结构
催化部位远离调节部位,黑三角表示 ATCase 三重对称轴

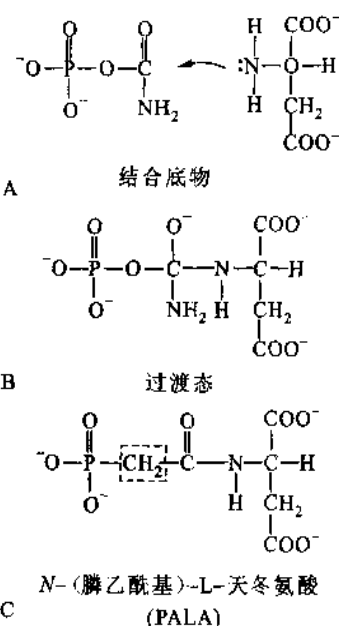


图 10-51 A. Asp 的氨基亲核攻击氨甲酰磷酸的羰基碳原子 B. 过渡态 C. PALA 类似于一对结合的底物和过渡态

活性部位在哪里呢? 在形成 N -氨甲酰天冬氨酸时,氨甲酰磷酸首先通过多个静电引力和氢键的相互作用结合,然后与天冬氨酸结合,其氨基则攻击氨甲酰磷酸的羰基碳(图 10-51A)。很像是形成了一个四面体的过渡态(图 10-51B)。 N -(膦乙酰基)- L -Asp(N -(phosphonacetyl)- L -aspartate, PALA)(图 10-51C)是该酶的强抑制剂,它与二底物的复合物及过渡态类似。PALA 与 ATCase 紧密结合,解离常数约为 10 nmol/L 。这种不发生反应的双底物类似物已被证明在 ATCase 的研究中是很有价值的。含有 PALA 的 ATCase 的 X 射线晶体结构分析证明 6 个活性部位中的每一个都位于催化链之间的界面附近。由于 PALA 带有很强的负电荷,以静电引力与活性部位中的 4 个 Arg 和 1 个 Lys 结合(图 10-52),也可通过许多氢键与酶结合。由属于 2 条催化链的残基形成活性部位。特别是一条链的许多残基与相邻链的 Ser 和 Lys 残基形成一个结合 PALA 的口袋。

His_{134} 的咪唑侧链与 PALA 的羰基氧原子之间的氢键也是值得注意的。当 Asp 的氨基攻击羰基碳原子时,氨甲酰磷酸的羰基氧原子就带负电荷。 His_{134} 质子化的形式能够稳定四面体过渡态中这一带负电荷的原子。

(4) ATCase 的别构作用通过四级结构大的变化来传达 超离心研究表明,与底物的结合导致 ATCase 的沉降系数降低 3%。这一发现表明 ATCase 与底物结合后就膨胀了。未与底物结合的 ATCase 及其与 PALA 复合物的 X 射线晶体结构研究揭示出:伴随着与此双底物类似物的结合,四级结构发生了大

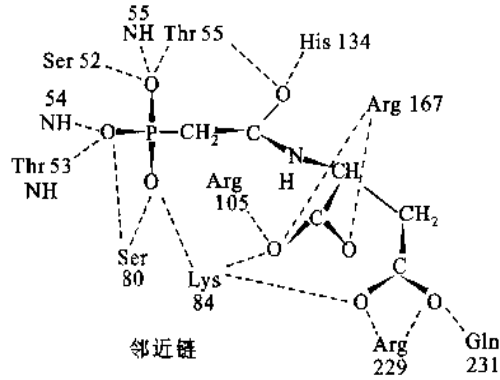


图 10-52 PALA 结合在 ATCase 催化部位上的方式
在此示意图中未画出所有已形成的静电键和氢键。His₁₃₄ 可以稳定过渡态中羰基氧原子上的负电荷。此结合部位在催化链的界面上。Ser₈₀ 和 Lys₈₄ 是由邻近的催化链贡献的残基

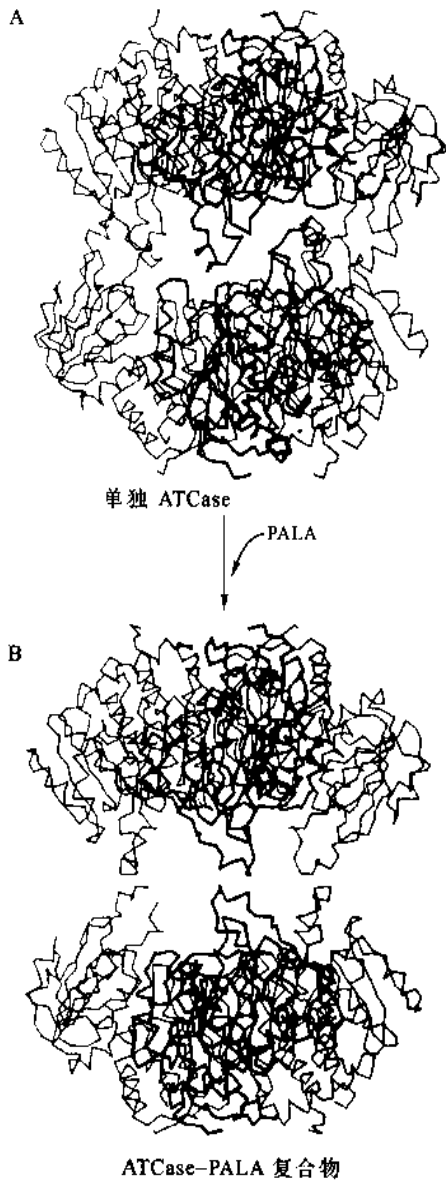


图 10-53 ATCase 催化链的别构转换
A. ATCase 无配基的 T 态; B. ATCase 配基结合的 R 态(为清晰起见,图中已将调节链省去。催化三聚体移开 1.2 nm, 旋转 10°, 转换成高亲和性 R 态)

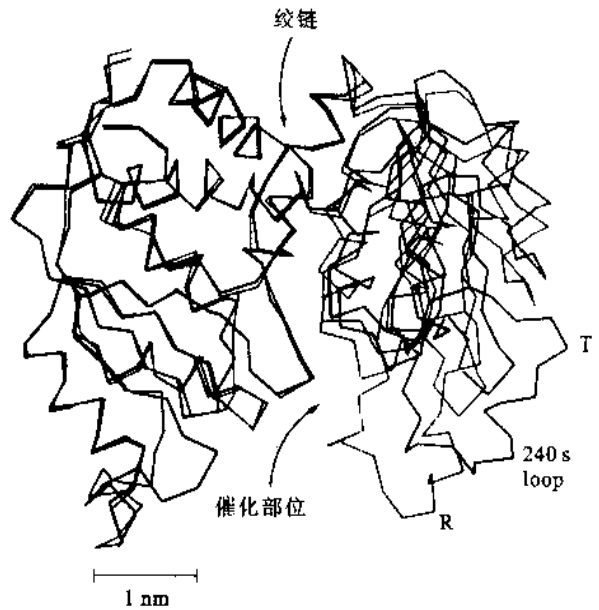


图 10-54 催化链从 T 态转换成 R 态时三级结构的变化
在 T→R 转变中铰链的移动导致两个结构域更靠近在一起, 注意, 氨甲酰磷酸结合结构域(左边)与天冬氨酸结合结构域(右边)相比变化小。240 s 环在位置上经历了更大的变化。活性部位位于结构域之间的裂缝中

的变化(图 10-53)。催化三聚体移开了 1.2 nm,并旋转了 10° 。此外,每一调节二聚体围绕其双重轴旋转了 15° 。PALA 的结合也导致每一条催化链的三级结构的重要变化(图 10-54),酶由 T 型变成 R 型。每一个催化链含有 1 个氨甲酰磷酸结合结构域(N 端)和 1 个天冬氨酸结合结构域(C 端),2 种底物的结合导致这些结构域靠近 0.2 nm,并引起它们转换为 R 构象。由 230-245 残基组成的称为 240 s 环在这个转换过程中经历了较大的重定向(图 10-54)。240 s 环的转动释放几个基团,使它们能够同底物相互作用并促进催化。在这一别构转变中, c_3 的催化链被拉得彼此靠近了,从而形成最优化的活性部位。

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活性的作用。在同一个 c_3 中,活性部位相距 2.2 nm。每一调节亚基的外面一半中的 CTP 结合部位距最近的活性部位 6.0 nm。因此,底物的协同结合和 CTP 的反馈抑制是通过长距离而传递的。实际上,信息是从一个 c_3 单位的活性部位传递到其他 c_3 的活性部位。在这个长距离的传递过程中,通过肽链之间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,正如在血红蛋白中那样,在 ATCase 中传递别构效应方面,不同多肽链之间的界面作为分子开关而起着关键作用。

(5) 底物结合到 ATCase 上引起高度协同的别构转变 含有颜色报告基团的 ATCase 光谱学研究提供了进一步观察别构转变的本质。ATCase 同硝基甲烷反应在它的每个催化链中生成一种有颜色的硝基酪氨酸基($\lambda_{\max} = 430 \text{ nm}$)(图 10-55),在每个催化部位上一个必需的 Lys 也被修饰,阻断了与底物的结合。然后将双倍修饰酶的催化三聚体同天然酶的三聚体组合形成杂交酶。琥珀酸结合到天然 c_3 部分的催化部位上,即改变了杂交酶另外 c_3 部分中的硝基酪氨酸的可见吸收光谱(图 10-55C)。因此,底物类似物结合到一个三聚体的活性部位就能改变另外三聚体的结构。

(6) ATP 和 CTP 通过改变 T 和 R 态之间的平衡来调节 ATCase 的活性 根据协同模型(下面讨论)别构激活剂使所有亚基构象平衡向 R 型转变,而别构抑制剂使它向 T 型变化。构建了不同的 ATCase 杂合体来检查这个预言。正常的调节亚基同含有硝基酪氨酸的催化亚基结合,在没有底物的情况下,加 ATP 则 430 nm 吸收增加,加琥珀酸也引起同样变化(图 10-56)。这样 ATP(一种别构激活剂)使平衡向 R 型改变。相反,在没有底物时加 CTP,则 430 nm 吸收降低,因此,别构抑制剂使平衡向 T 型改变。沉降速率实验进一步提供证据 ATP 和 CTP,像琥珀酸一样,诱导球形构象的变化。这样,协同模式说明了 ATP 诱导的,CTP 诱导的(异促),以及底物诱导的(同促)ATCase 的别构相互作用。

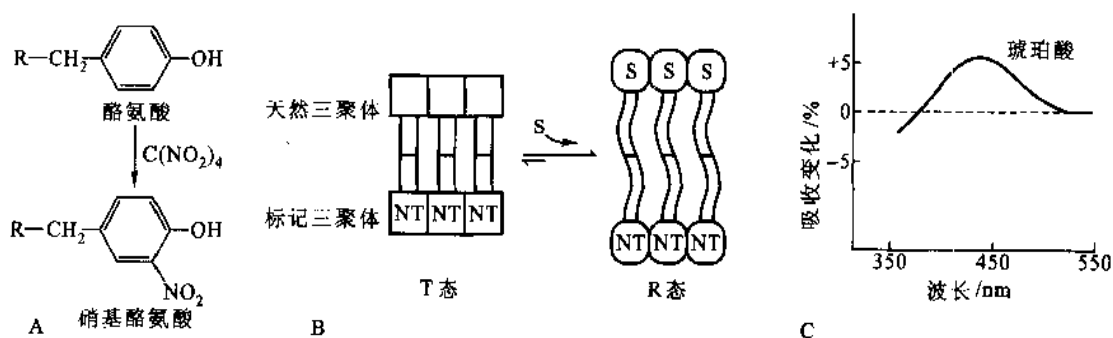


图 10-55 ATCase 长范围的别构效应

A. Tyr 的硝基化形成一个有颜色的硝基酪氨酸基作为一个报告基团;B. 制备含有硝基酪氨酸的 c_3 三聚体,天然 c_3 三聚体和天然 r 亚基杂合 ATCase 分子。琥珀酸(S)结合到一个三聚体的天然催化部位上,以硝基酪氨酸吸收光谱的变化作为证据,说明另外三聚体的硝基酪氨酸环境发生变化;C. 琥珀酸的结合导致协同的 T→R 转变

2.3-磷酸甘油醛脱氢酶(phosphoglyceraldehyde dehydrogenase)

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代表,它是糖分解途径中的重要酶,与供能有关,催化下列反应:

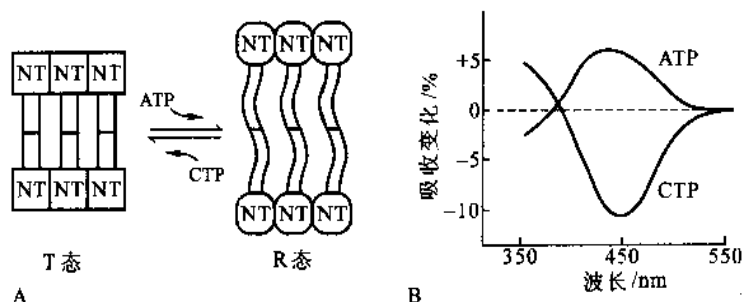
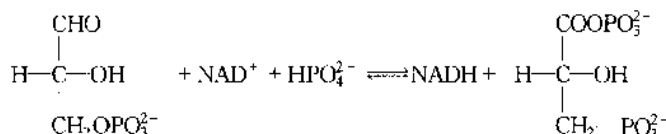


图 10-56 ATP 和 CTP 结合 ATCase 的调节亚基导致球形构象改变

A. 含有硝基酪氨酸催化亚基和天然调节亚基的杂合 ATCase; B. 加 ATP 激活剂使酶的别构平衡向 R 型改变, 可被硝基酪氨酸光谱的改变所证明。相反, CTP 抑制剂, 使别构平衡向 T 型改变



此酶具有 4 个亚基, 可以和 4 个 NAD^+ 结合, 但结合常数不同, 结合 NAD^+ 后的解离常数见表 10-8。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 and 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^+ 的浓度提高两个数量级, 才会有进一步的结合。也就是说这时再要提高酶反应速率是较难的, 需要底物浓度大大提高才行。实验结果发现 3-磷酸甘油醛脱氢酶只能结合两分子 NAD^+ , 即此酶结合 NAD^+ 的位点, 只有一半能与 NAD^+ 起反应, 叫半位反应性 (half site reactivity)。半位反应性是一种极端负协同效应。说明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率。这就是负协同别构酶的特点。

表 10-8 3-磷酸甘油醛脱氢酶与 NAD^+ 结合的解离常数表 ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

解离常数	虾 肌		兔 肌	
	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	1.3×10^{-5}	3.5×10^{-5}	3.5×10^{-5}	2.6×10^{-5}

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, 它们以一定的速率稳定地进行反应。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^+ 浓度的变化不敏感, 所以, 当 NAD^+ 浓度很低时, 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率顺利地进行。由此可以看到负协同效应别构酶的重要生理意义。

3. 别构酶的性质

(1) 别构酶一般都是寡聚酶, 通过次级键由多亚基构成。在别构酶分子上有和底物结合和催化底物的活性部位, 也有和调节物 (regulator) 或效应物 (effector) 结合的调节部位, 这两种部位可能同一亚基上, 也可能分别位于不同亚基上。每个别构酶分子可以有一个以上的活性部位和调节部位, 因此可以结合一个以上的底物分子和调节物分子。在同促别构酶中活性部位和调节部位是相同的。调节部位与活性部位虽然在空间上是分开的, 但这两个部位可相互影响, 通过构象的变化, 产生协同效应。可发生在底物-底物, 调节物-底物, 调节物-调节物之间, 可以是正协同也可以是负协同。

(2) 别构酶的动力学 因别构酶有协同效应, 故其 $[S]$ 对 v 的动力学曲线不是双曲线, 而是 S 形曲线

(正协同)或表观双曲线(负协同)(图 10-57),两者均不符合米氏方程。这种 S 形曲线表明酶结合一分子底物(或调节物)后,酶的构象发生了变化,这种新的构象大大地增加对后续底物分子的亲和性,促进后续分子与酶的结合,表现为正协同性(positive cooperativity),这种酶称为具有正协同效应的别构酶。表观双曲线表明,在底物浓度较低的范围酶活力上升很快,但随后底物浓度虽有较大的提高,但反应速率升高却很小,表现为负协同性(negative cooperativity),这种酶称为具有负协同效应的别构酶,如上面介绍的 3-磷酸甘油醛脱氢酶。负协同性可以使酶的反应速率对外界环境中底物浓度的变化不敏感。由于别构酶不符合米氏方程,因而被别构酶催化反应达到最大反应速率一半时的底物浓度用 $[S]_{0.5}$ 或 $K_{0.5}$ 代替。

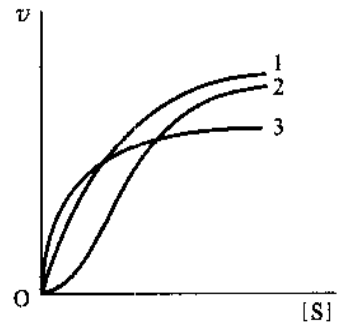


图 10-57 正、负协同别构酶与非别构酶的动力学曲线比较

1. 非别构酶 2. 正协同 3. 负协同

为了区分符合米氏方程的“正常”酶,具有正协同效应的别构酶和具有负协同效应的别构酶, Koshland 建议用协同指数(cooperativity index, CI)来鉴别不同的协同作用以及协同的程度。CI 是指酶分子中的结合位点被底物饱和 90% 和饱和 10% 时底物浓度的比值。故协同指数又称饱和比值(saturation ratio, R_s),即:

$$R_s = \frac{\text{位点被 90\% 饱和时的底物浓度}}{\text{位点被 10\% 饱和时的底物浓度}} = 81^{\frac{1}{n}}$$

n : 代表协同系数(Hill 系数)

典型的米氏类型的酶 $R_s = 81$

具有正协同效应的别构酶 $R_s < 81$, R_s 愈小,正协同效应愈显著。

具有负协同效应的别构酶 $R_s > 81$, R_s 愈大,负协同效应愈显著。

也常使用 Hill 系数(n)来判断酶属于哪一种类型。符合米氏方程的酶 $n = 1$,具有正协同效应的酶 $n > 1$,具有负协同效应的酶 $n < 1$,因此,Hill 系数可以作为判断协同效应的一个指标。

(3) K 型效应物和 V 型效应物:凡是改变底物的 $K_{0.5}$ 而不改变反应 V_{max} 的效应物称为 K 型效应物。反之,凡是改变 V_{max} 而不改变 $K_{0.5}$ 的效应物为 V 型效应物。如图 10-58 所示。

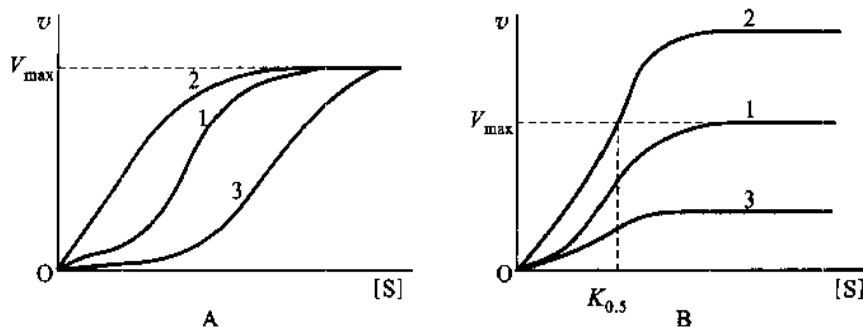


图 10-58 A 为 K 型效应物, B 为 V 型效应物

1. 未加效应物; 2. 加激活剂; 3. 加抑制剂

(4) 别构酶经加热或用化学试剂等处理,可引起别构酶解离,失去调节活性,称为脱敏作用(desensitization)。脱敏后的酶表现为米氏酶的动力学双曲线,如图 10-59 所示。

4. 别构模型(allosteric models)

为了解释别构酶协同效应的机制,曾提出多种酶分子模型,其中最重要的有两种,分别介绍如下:

(1) 协同模型或对称模型(concerted or symmetry model, 也称 WMC 模型) 1965 年 Monod、Wyman 和 Changeux 是用别构酶的构象改变来解释协同效应的最早分子模式。此模型的要点如下:

① 别构酶是由确定数目的亚基组成的寡聚酶,各亚基占有相等的地位,因此每个别构酶都有一个对称轴。

② 每一个亚基对一种配体(或调节物)只有一个结合位点。

③ 每种亚基有两种构象状态,一种为有利于结合底物或调节物的松弛型构象(relaxed state, R 型),另一种为不利于底物或调节物结合的紧张型构象(tensed state, T 型)。这两种型式在三级和四级结构上,在催化活力上都有所不同。这两种状态可以互变,要取决于外界条件,也取决于亚基间的相互作用。按此模式,构象的转变采取同步协同方式。或者说采取齐变方式,即各亚基在同一时间内均处于相同的构象状态。如果是一亚基从 T 态变为 R 态,则其他亚基也几乎同时转变成 R 态,不存在 TR 杂合态。

④ 当蛋白质由一构象状态转变至另一构象状态时,其分子对称性保持不变,因此,这一模式又称为对称模式。如图 10-60 所示。

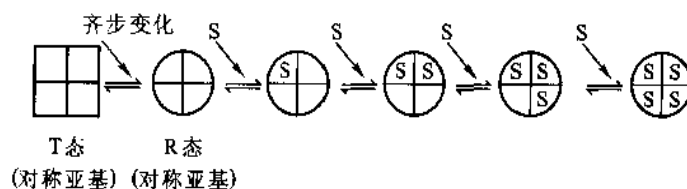


图 10-60 别构酶的齐变模型

根据此模式,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”态,当有少量底物时,平衡即向“R”态移动,当构象已转为“R”态后,又进一步大大地增强对底物的亲和力,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。假定“R”态有利于与正调节物结合,“T”态有利于与负调节物作用。在齐变模型中,同促效应必然是正协同的效果,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*-甲酰磷酸和 Asp 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。目前认为齐变模型不适用于负协同效应。由底物调节的效应,最好是用协同模型来说明。

(2) 序变模型(sequential model,也称 KNF 模型) 这是 Koshland, Nemethy 和 Filmer 于 1966 年提出来的模型。是 Adair 模型(血红蛋白与 O_2 结合的模型)与诱导契合学说在别构酶研究上的一种发展,此模型的要点如下:

① 当配体不存在时,别构酶只有一种构象状态存在(T),而不是处于 $R \rightleftharpoons T$ 的平衡状态,只有当配体与之结合后才诱导 T 态向 R 态转变。

② 别构酶的构象是以序变方式进行的,而不是齐变。当配体与一个亚基结合后,可引起该亚基构象发生变化,并使邻近亚基易于发生同样的构象变化,即影响对下一个配体的亲和力。当第二个配体结合后,又可导致第三个亚基类似变化,如此顺序传递,直至最后所有亚基都处于同样的构象。这种序变机制的特点有各种 TR 型杂合态。见图 10-61。

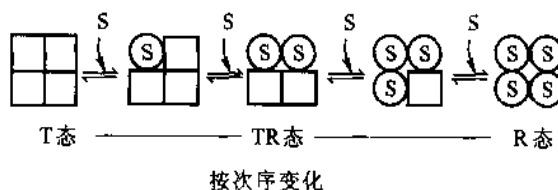


图 10-61 别构酶的序变模型

③ 亚基间的相互作用可能是正协同效应,也可能是负协同效应,前者导致下一亚基对配体有更大的亲和力,后者则降低亲和力。

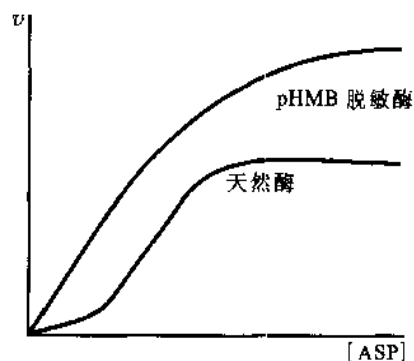


图 10-59 ATCase 用对羟苯甲酸(pHMB)处理失去别构性质,变为正常的米氏酶
脱敏的 ATCase 活性比天然酶大 50%

非底物调节的效应,用序变模式说明较好。例如钙调蛋白与 Ca^{2+} 的结合是以序变方式进行的正协同效应。该模型可适用于大多数别构酶。

还有许多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,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协同模型。这些模型从不同角度对别构酶的协同性和别构调节机制作了解释,并为进一步探讨别构酶的生理意义提供了讨论的基础和借鉴。不过这些模型都有一定的局限性,别构酶作用的真正机制可能更为复杂。

(二) 酶原的激活

体内合成出的蛋白质,有时不具有生物活性,经过蛋白水解酶专一作用后,构象发生变化,形成酶的活性部位,变成活性蛋白。这个不具生物活性的蛋白质称为前体(precursor)。如果活性蛋白质是酶,这个前体称为酶原(zymogen 或 proenzyme)。该活化过程,是生物体的一种调控机制。这种调控作用的特点,由无活性状态转变成活性状态是不可逆的。通过专一性的蛋白水解作用来活化酶和蛋白质,在生物体系中是经常发生的,例如:

① 使蛋白质水解的消化酶,在胃和胰脏中是作为酶原合成的(表 10-9),激活后成为蛋白水解酶。

表 10-9 胃和胰脏的酶原和有活性的酶

合成部位	酶 原	有活性的酶
胃	胃蛋白酶原	胃蛋白酶
胰脏	胰凝乳蛋白酶原	胰凝乳蛋白酶
胰脏	胰蛋白酶原	胰蛋白酶
胰脏	羧肽酶原	羧肽酶
胰脏	弹性蛋白酶原	弹性蛋白酶

② 血液凝固系统的许多酶都是以酶原形式被合成出来,被激活后起作用。

③ 有些蛋白激素也是以无活性的前体被合成的。例如胰岛素被合成出来是前胰岛素原(preproinsulin),经蛋白酶激活后变成有活性的胰岛素。

④ 存在于皮肤和骨骼中的纤维蛋白——胶原,是由可溶性前体前胶原(procollagen)激活而成。

⑤ 许多发育过程是由酶原激活调控的。蝌蚪变态成蛙时,在几天的过程中从尾巴吸收大量的胶原,同时分娩后许多胶原在哺乳动物子宫中被破坏,在此过程中,前胶原酶(procollagenase)转变成活性蛋白酶——胶原酶。蚕茧酶(cocoonase)是昆虫发育的一种关键酶,也是由非活性前体获得的。

首先讨论消化酶的激活,然后再讨论凝血机制。

1. 消化系统蛋白酶原的激活

胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶和羧肽酶等都具有很大的水解蛋白的能力,它们都是以酶原形式在胰脏中产生的。如果在胰脏中就以活化的形式存在,那么胰脏就会被它们水解而破坏,因此胰脏有一些保护措施,防止它们提早活化。胰脏中酶原的激活都要通过胰蛋白酶的作用,可见胰蛋白酶是一个关键,因此在胰脏中存在着较丰富的胰蛋白酶抑制剂,抑制胰蛋白酶的活性。酶原在胰脏中提早活化是胰腺炎的特征,严重得可以致命。胰蛋白酶抑制剂可以治疗胰腺炎。

(1) 胰凝乳蛋白酶原的激活 胰凝乳蛋白酶原(chymotrypsinogen)是由 245 个氨基酸组成的,具有 5 对二硫键的单肽链蛋白质。当受到胰蛋白酶作用后,Arg₁₅与 Ile₁₆间的肽键断开,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。它是由 3 条肽链组成,A、B 两链及 B、C 两链间各通过一对二硫键相连, α -胰凝乳蛋白酶的活性只有 π -胰凝乳蛋白酶的 40%,其激活过程见图 10-62。酶活性部位的氨基酸残基 His₅₇, Asp₁₀₂,和 Ser₁₉₅分别来自 B、C 二链。

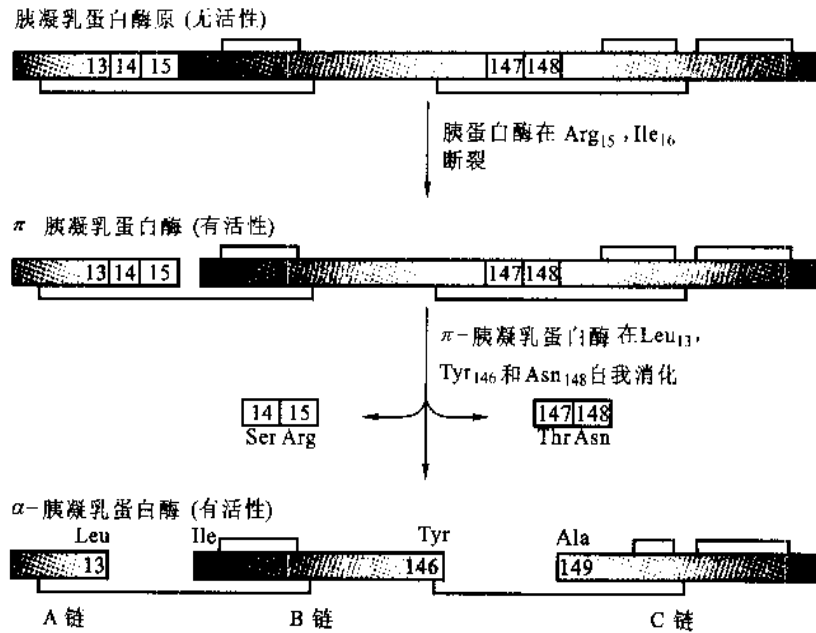
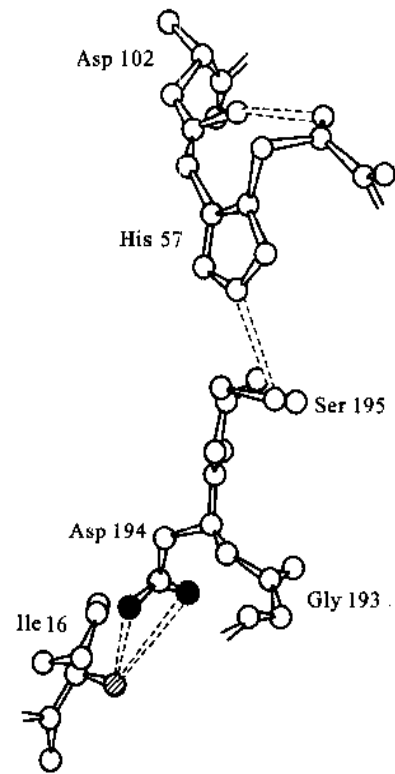


图 10-62 胰凝乳蛋白酶原的激活过程

胰凝乳蛋白酶原受胰蛋白酶作用后, Arg₁₅ - Ile₁₆ 间的肽键断开, 形成了新的 Ile₁₆ 末端, 这个新的末端氨基与酶分子内部的 Asp₁₉₄ 发生静电作用(图 10-63), 这个氨基的质子化稳定了胰凝乳蛋白酶的活性形式, 通过酶活性对 pH 的依赖性得到说明。由于静电的相互作用触发了一系列的构象变化, Met₁₉₂ 从酶原的深层移动到酶分子表面, 第 187 及第 193 残基更加舒展。这些构象变化的结果形成一个疏水口袋, 允许芳香基和大的非极性基结合于底物专一性部位。显然, 这样的口袋, 在酶原中是不存在的。

(2) 胃蛋白酶原的激活 胃蛋白酶原(pepsinogen)是由胃壁细胞分泌的, 相对分子质量为 38.9×10^3 , 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, 从氨基端失去 44 个氨基酸残基——碱性的前体片段后, 转变为高度酸性的, 相对分子质量为 34.6×10^3 , 有活性的胃蛋白酶。胃蛋白酶在胃中很酸的环境中消化蛋白质, 最适 pH 为 2。胃蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶家族其他成员在催化部位含 2 个天冬氨酸残基, 一个是以 -COOH 形式, 另一个是 -COO⁻ 形式。X 射线晶体结构研究说明, 在胃蛋白酶原中已形成活性部位, 在中性 pH 下前片段中的 6 个 Lys 和 Arg 的侧链与胃蛋白酶部分中 Glu 和 Asp 残基的羧基侧链之间形成盐桥, 尤其是前体中的 Lys 侧链与活性部位的一对天冬氨酸: Asp₂₁₅ 和 Asp₃₂ 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部位堵塞, 所以酶原不表现催化活性。当 pH 降低时, 由于几个羧基质子化, 破坏了前体碎片和胃蛋白酶部分的盐桥, 引起构象的重排, 暴露出的催化部位水解前体和胃蛋白酶部分间的肽键, 酶原被激活。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。

图 10-63 胰凝乳蛋白酶中 Asp₁₉₄ 和Ile₁₆ 的环境

Asp₁₉₄ 的羧基和 Ile₁₆ 的 α -NH₂ 之间的相互静电作用对胰凝乳蛋白酶的活性是必需的。这些基团邻近 Ser - His - Asp 催化三联体

(3) 胰蛋白酶原的激活 胰蛋白酶原(trypsinogen)是由胰腺细胞分泌的, 进入小肠后, 在有 Ca²⁺ 的环境中受到肠激酶(interokinase)的激活, Lys₆ - Ile₇ 之间的肽键被打断, 从氨基端水解下一个酸性 6 肽(图 10-64), 使构象发生变化, 形成胰蛋白酶的活性部位

(His₅₇, Asp₁₀₂, Ser₁₉₅), 由酶原转变成有活性的胰蛋白酶。胰蛋白酶不仅可以激活胰蛋白酶原, 而且还可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胰脏蛋白酶原的共同激活剂, 在它的控制下, 可以使所有的胰脏蛋白酶同时起作用。胰蛋白酶对各个胰脏蛋白酶原的激活作用如图 10-65 所示。

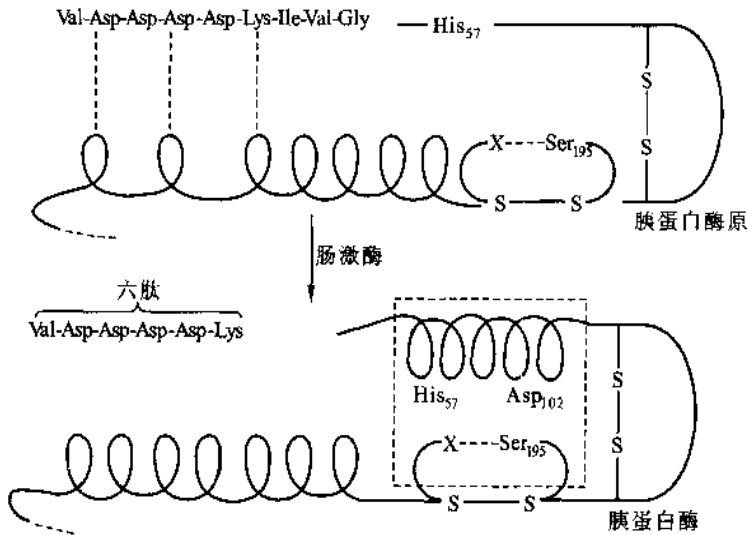


图 10-64 胰蛋白酶原的激活

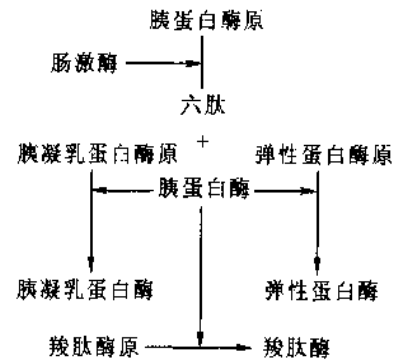


图 10-65 胰蛋白酶对各种胰脏蛋白酶原的激活作用

2. 凝血机制

生物体意外地被伤害会引起出血, 凝血作用是生物体适应外界条件的一种很重要的措施。体内凝血机制大致有 3 个方面: 被伤害的血管收缩以减少血液的流失; 血小板粘聚形成栓塞堵住伤口; 通过一连串酶原激活反应和凝血因子的作用使血液凝集。前面两个作用是很快的过程, 后面一个是所谓酶的“级联”

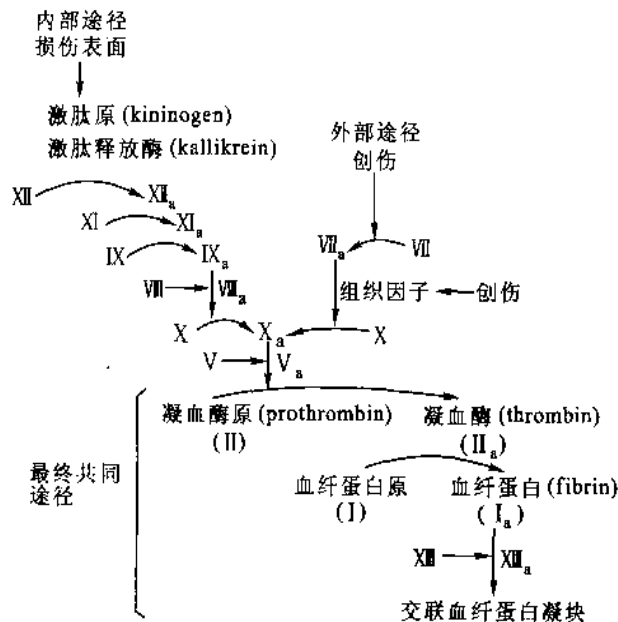


图 10-66 血液凝固的级联放大作用

血纤维凝块是通过内部、外部和共同途径形成的。内部途径是从激活因子 XII 开始的, 外部途径是激活因子 VII 触发的。V 前加速素 (proaccelerin), VII 前转变素 (proconvertin), VIII 抗血友病因子 (antihemophilic factor), IX 克里斯马斯因子 (christmas factor), X 斯图亚特因子 (stuart factor), XI 促凝血酶原激酶前质 (thromboplastin antecedent), XII Hageman 因子, XIII 纤维稳定因子 (fibrin stabilizing factor)

作用,即一个酶催化激活另一个酶,经过一系列的反应不断地放大,最后形成牢固的不溶性的血纤蛋白凝块。

参与形成血纤蛋白凝块的凝血因子经过鉴定有 13 种,凝血因子一般用罗马字母表示。

血液凝固的作用过程大体已研究清楚。它是由凝血酶原被激活成凝血酶后作用于血纤蛋白原,形成血纤蛋白,然后血纤蛋白聚合而形成血纤蛋白凝块。血液凝固的级联放大作用见图 10-66。凝血因子 II_a、XI_a、X_a 和 IX_a 都具有酶活性,可使一定的肽键被水解。VII_a 和 V_a 是活化的调节蛋白。II_a、XI_a、IX_a、X_a 是未活化的酶原, VII_a 和 V_a 是未活化的调节蛋白,到 X 以后内部途径和外部途径合并为一个共同途径。

(三) 可逆的共价修饰(reversible covalent modification)

这种调控作用通过共价调节酶(covalently modulated enzymes)进行。共价调节酶通过其他酶对其多肽链上某些基团进行可逆的共价修饰,使处于活性与非活性的互变状态,从而调节酶活性。目前已发现有几百种酶被翻译后都要进行共价修饰,其中一部分处于分支途径,对其代谢流量起调节作用的关键酶,属于这种酶促共价修饰系统。由于这种调节的生理意义广泛,反应灵敏,节约能量,机制多样,在体内显得十分灵活,加之它们常受激素甚至神经的指令,导致级联式放大反应,所以日益引人注目。目前已知至少有 5~6 种类型的可逆修饰的酶,如表 10-10 所示。

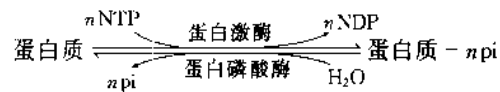
表 10-10 酶修饰反应的例子

共价修饰	已知的接受共价修饰的氨基酸残基
磷酸化(phosphorylation) $\text{Enz} \xrightarrow[\text{ADP}]{\text{ATP}} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2$	Tyr, Ser, Thr, His
腺苷酰化(adenylation) $\text{Enz} \xrightarrow[\text{PPi}]{\text{ATP}} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{adenine}$	Tyr
尿苷酰化(uridylylation) $\text{Enz} \xrightarrow[\text{PPi}]{\text{UTP}} \text{Enz}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{CH}_2-\text{ribose}-\text{uracil}$	Tyr
ADP-核糖基化 (ADP-ribosylation) $\text{Enz} \xrightarrow[\text{烟酰胺}]{\text{NAD}^+} \text{Enz}-\text{ribose}-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{ribose}-\text{adenine}$	Arg, Gln, Cys, 白喉酰胺(一种修饰的 His)
甲基化(methylation) $\text{Enz} \xrightarrow[\text{S-腺苷-同型半胱氨酸}]{\text{S-腺苷-Met}} \text{Enz}-\text{CH}_3$	Glu

1. 蛋白质的磷酸化

现已证明蛋白质的磷酸化与脱磷酸化过程是生物体内存在的一种普遍的调节方式,几乎涉及所有的生理及病理过程,如代谢调控、细胞的增殖及生长发育、转录调控、基因表达、肌肉收缩、神经递质的合成与释放,甚至癌变等,并在细胞信号的传递过程中占有极其重要的位置。真核细胞中 $\frac{1}{3}$ 到 $\frac{1}{2}$ 的蛋白质可以磷

酸化。在各个信号系统中,一个共同的环节就是由蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化的蛋白质的磷酸化与脱磷酸化反应。蛋白质的磷酸化是指由蛋白激酶催化的把 ATP 或 GTP γ 位磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基上的过程,其逆过程是由蛋白磷酸酶催化的,称为蛋白质的脱磷酸化。



一般认为在生理条件下,几乎所有的蛋白激酶都以 ATP 为磷酸基的供体,而且几乎所有的磷酸化反应都需要 Mg^{2+} ,其功能是 ATP 被利用前首先要与 Mg^{2+} 形成 $\text{ATP} - \text{Mg}^{2+}$ 的复合体。底物蛋白质被磷酸化的氨基酸残基有两类:

- (1) Thr、Ser、Tyr、Asp、Glu……“P-O”键连接;
- (2) Lys、Arg、His……“P-N”键连接。

主要是磷酸化 Ser、Thr,个别为 Tyr。被磷酸化的残基可以是一个、两个或多个。多数蛋白激酶表现出一定的底物特异性,但很少具有绝对特异性。一种蛋白质可作为几种蛋白激酶的底物和一种蛋白激酶有多种底物的情况是很常见的。底物蛋白质被磷酸化的氨基酸残基附近的氨基酸组成和顺序常常构成被蛋白激酶辨认的特殊区域(共有序列)(表 10-11)。例如,信使依赖性蛋白激酶(messenger dependent protein kinase)需要底物被磷酸化的 Ser 或 Thr 残基附近(N 端方向)有碱性氨基酸,即 Arg 或 Lys 残基,特定顺序是:

表 10-11 蛋白激酶的共有序列

蛋白激酶	共有序列和磷酸化残基*
蛋白激酶 A	X-R-(R/K)-X-(S/T)-B-
蛋白激酶 G	-X-R-(R/K)-X-(S/T)-X-
蛋白激酶 C	-(R/K)-(R/K)-X-(S/T)-B-(R/K)-(R/K)-
蛋白激酶 B	-X-R-X-(S/T)-X-K-
Ca^{2+} /钙调蛋白激酶 I	-B-X-R-X-X-(S/T)-X-X-X-B-
Ca^{2+} /钙调蛋白激酶 II	-B-X-(R/K)-X-X-(S/T)-X-X-
肌球蛋白轻链激酶(平滑肌)	-K-K-R-X-X-S-X-B-B-
磷酸化酶 b 激酶	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
依赖细胞周期蛋白的激酶(cdc2)	-X-(S/T)-P-X-(K/R)-
酪蛋白激酶 I	-(Sp/Tp)-X-X-(X)-(S/T)-B
酪蛋白激酶 II	-X-(S/T)-X-X-(E/D/Sp/Yp)-X-
胰高糖素受体激酶	-X-E-E-E-Y-M-M-M-M-K-K-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K-K-K-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
表皮生长因子(EGF)受体激酶	E-E-E-E-Y-F-E-L-V-

* Ser(s), Thr(T)或者 Tyr(y)残基是进行磷酸化残基;X 代表任何氨基酸;B 代表任何疏水氨基酸;Sp, Tp 和 Yp 表示已经磷酸化的 Ser, Thr 和 Tyr 残基。

- Arg-Arg-X-X-Ser(p)/Thr(p)-X-
 或 - Lys-Arg-X-X-Ser(p)/Thr(p)-X-
 (或一个 X, X 可以是任何氨基酸残基)

此外,蛋白质的高级结构也对蛋白激酶的底物特异性产生很大影响。

2. 蛋白激酶

蛋白激酶是一个非常大的家族,目前已经发现至少 200 多种蛋白激酶。据推测,哺乳动物的基因库可编码 2 000 多种不同的蛋白激酶,之所以把蛋白激酶称为一个家族,是因为各类蛋白激酶之间在结构上具

有很大的相似性,特别是催化亚基或催化部分。说明它们进化上的相关性,很可能有共同的原始祖先基因。根据底物蛋白质被磷酸化的氨基酸残基的种类可以分为:Ser/Thr型,目前发现的蛋白激酶多属于这一类;Tyr型,被磷酸化的底物 Tyr 残基,数目相对较少。还可根据它们是否有调节物来分,一类叫信使依赖性蛋白激酶,另一类为非信使依赖性蛋白激酶。前者又可分为胞内信使依赖性蛋白激酶如:cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA),cGMP 依赖性蛋白激酶(PKG), Ca^{2+} 、磷脂依赖的蛋白激酶(PKC)等;激素或生长因子依赖性蛋白激酶,如表皮生长因子依赖性蛋白激酶,胰岛素依赖性蛋白激酶(胰岛素受体)等。如酪蛋白激酶(I、II型)、组蛋白激酶II、糖原合成酶激酶等属于非信使依赖性蛋白激酶。

3. 几种重要的蛋白激酶

(1) 蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 或 cAMP 依赖性蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinase cAPK) 20 世纪 60 年代, Krebs 在研究糖原的代谢过程中发现的,是普遍存在于动物体内的一种蛋白激酶。PKA 全酶由 4 个亚基组成(R_2C_2),包括两种亚基,即对 cAMP 高亲和力的 $M_r 49 \times 10^3$ 的调节亚基(R)和 $M_r 38 \times 10^3$ 的催化亚基(C)。在没有 cAMP 时,调节亚基和催化亚基形成无酶促活性的 R_2C_2 复合物。PKA 可被 10 mol/L 的 cAMP 激活,每 2 分子 cAMP 与每 1 个调节亚基结合导致 R_2C_2 解离成 1 个 R_2 亚基和 2 个 C 亚基。然后自由的催化亚基具有了酶活性。cAMP 与调节亚基的结合解除了对催化亚基的抑制作用。

cAMP 是如何激活激酶的呢? 每个 R 链含有除了 Ala 代替 Ser 之外与磷酸化相一致的顺序 Arg-Arg-Gly-Ala-Ile,在 R_2C_2 复合物中,R 的假底物(pseudo substrate)顺序占据了 C 的催化部位,因而妨碍了蛋白质底物的进入,当 cAMP 结合到 R 链上时,假底物顺序从催化部位被别构移除,则释放的 C 链自由地结合磷酸化底物蛋白(图 10-67)。

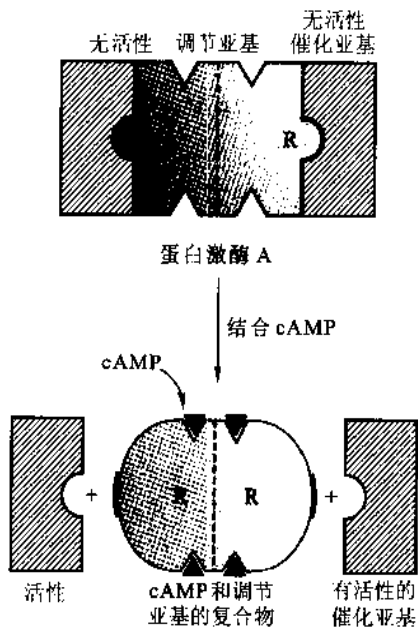


图 10-67 蛋白激酶 A 与 4 分子 cAMP 结合,解离抑制的全酶(R_2C_2)成为一个调节亚基(R_2)和 2 个催化活性亚基(2C)
每个 R 链的假底物顺序以黑线表示

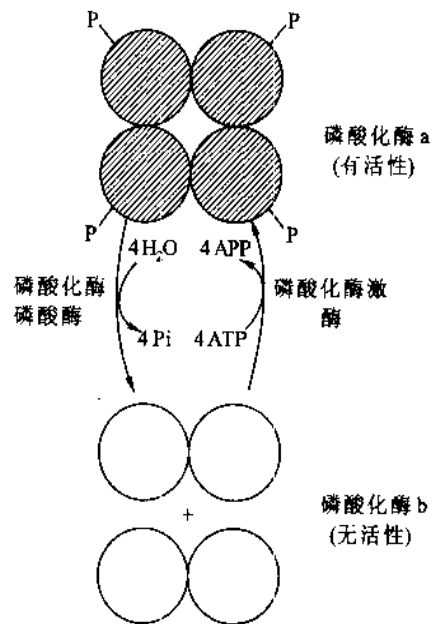


图 10-68 磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b 的互变过程

PKA 可以通过磷酸化激活多种酶,如磷酸化酶激酶、甘油三酯酶、酪氨酸羟化酶、RNA 聚合酶 II 等,也可通过催化蛋白磷酸化抑制多种酶活性,如糖原合成酶、乙酰 CoA 羧化酶、丙酮酸激酶等。

(2) 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) PKC 是 1977 年 Nishizuka 发现的,是广泛分布于真核细胞特别是哺乳动物细胞中的一种蛋白激酶,以无活性形式存在于胞液中,当被 Ca^{2+} 等激活后转移到膜上。

研究表明,PKC对调节细胞代谢、分化、生长、增殖乃至癌变以及细胞内生物信息的传递等均起着重要的作用。

通过分子克隆方法证明,PKC不是单一分子的酶,而是一组密切相关的大约有10种亚类组成的蛋白质家族。它由两组PKC基因编码,即A组: α 、 β 、 γ ;B组: δ 、 ϵ 、 ζ 。现只有A组的 α 、 β 、 γ 编码的PKCⅢ、PKCⅡ、PKCⅠ被纯化鉴定,其中PKCⅡ含有 β Ⅰ、 β Ⅱ两种,它们具有高度的顺序同源性,仅在羧基端氨基酸顺序上有所不同而已。PKC为一条多肽链,相对分子质量在 $(77\sim 90)\times 10^3$ 之间,大约含670个氨基酸残基,其结构可分为4个保守区($C_1\sim C_4$),5个可变区($V_1\sim V_5$)。羧基端1/2侧的两个保守区(C_3, C_4)为激酶活性区,该区域与其他蛋白激酶的相应区域有很高的同源性。 C_3 区含有结合ATP的特定结构,该区有酶的催化部位。 C_4 有一酸性区,起识别底物的作用。氨基端1/2侧的保守区(C_1, C_2)有 Ca^{2+} 、二酰基甘油(DAG)、佛波酯(phorbol ester)等的结合位点,是酶的调节区。 C_2 区可能是酶对 Ca^{2+} 的敏感性所必需的。各种PKC的 C_1 区包含一个“假底物序列”(pseudo-substrate sequence),使PKC在没有激活剂存在的条件下,保持无活性状态。此外 C_1 区内有富含Cys的随机重复序列,可能在控制PKC家族的基因表达中起重要作用。在催化区与调节区联结部分为蛋白水解酶的敏感位点,PKC可被(需)钙蛋白酶(calpain)的限制性蛋白水解而激活,这种水解发生在 V_3 区的一个或两个位点上,该蛋白水解可能与PKC分子本身的衰减调节有关。可以推测,在完整的PKC中,调节部分以某种方式抑制了催化部位的活性,而 Ca^{2+} 、磷脂、DAG对酶的活性是通过某种机制解除了这种抑制作用。

(3) 磷酸化酶激酶(phosphorylase kinase, PhK) PhK是糖原代谢中一个关键的调节酶,其催化的反应是通过磷酸化作用使无活性的磷酸化酶b(phosphorylase b)转化成有活性的磷酸化酶a,从而加强糖原的分解代谢。磷酸化酶a又可通过磷酸化酶磷酸酶的水解而脱去磷酸转变成无活性的磷酸化酶b,以此方式调节磷酸化酶的活性(图10-68)。

PhK在动物的肌肉组织和肝脏中都有存在,以兔子肌肉中的研究最为清楚。PhK由4个完全不同的亚基 α 、 β 、 γ 、 δ 组成(图10-69),一般认为全酶以 $[\alpha\beta\gamma\delta]$ 四聚体的形式存在,其中 δ 亚基为钙调蛋白(CaM),因此CaM作为一个整合亚基参与全酶的形成,其功能是作为调节亚基通过与 Ca^{2+} 结合而激活全酶的活性。有证据表明 γ 亚基具有催化功能,并且其氨基酸组成和顺序与其他蛋白激酶的催化部分有很高的相似性。PhK的活性几乎绝对依赖 Ca^{2+} ,因此 Ca^{2+} 、CaM(δ 亚基)是它的主要调节方式。有实验证明 α 、 β 亚基的磷酸化是该酶活性的另一种重要调节方式。 β 亚基被PKA磷酸化可以使 γ 亚基活化而具催化活性,随之, α 亚基也可被PKA缓慢磷酸化,结果使已磷酸化的 β 亚基发生构象的改变,使之变得对蛋白磷酸酶敏感而被脱磷酸化,结果使 γ 亚基回到被 β 亚基的抑制状态,通过 α 、 β 亚基的磷酸化状态而调节了PhK的活性水平和持续时间。

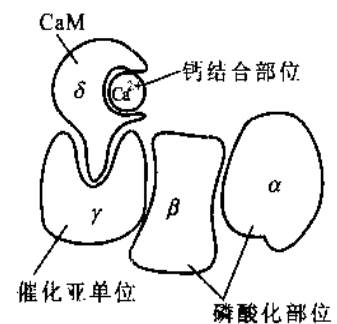


图10-69 PhK结构示意图

(4) 蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK) 目前已发现3种类型的PTK。第一类指由病毒癌基因(v-oncogene)和正常细胞癌基因(c-oncogene)编码的PTK,第二种类型与某些生长因子和激素受体有关,这些受体本身就是PTK,它们是介导传递相应生长因子和激素效应的质膜上的信号转换机构。第三类则包括与前两类不同的其他类型的PTK,如从大鼠肝脏得到的一种相对分子质量为 75×10^3 的PTK,称之为 P_{75} 。

PTK具有很高的底物特异性,只能磷酸化蛋白质中Tyr残基,而对Ser、Thr残基均无作用。据研究,在被磷酸化的Tyr附近的酸性氨基酸在底物特异性上可能具有一定作用。PTK有自身磷酸化现象,在具有受体功能的PTK中,自身磷酸化的结果常常导致其激酶活性或其相应配体结合功能或性质上的改变。

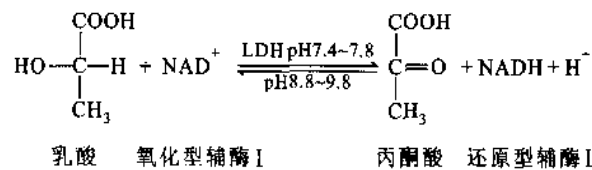
PTK与细胞正常发育、分化和癌变相关。在已知的18个逆转录病毒的癌基因产物中就有7个具有PTK活性,其相应的细胞癌基因产物也具有PTK活性。真核细胞中的生长因子如表皮生长因子(EGF)、血小板生长因子(PDGF),胰岛素的受体本身就具有PTK活性,而且氨基酸顺序分析的结果证明它们与某些癌基因产物具有密切关系。

在目前发现的蛋白酪氨酸激酶中,对具有受体功能的蛋白酪氨酸激酶(receptor protein tyrosine kinase, RTK)的结构与功能了解得最为清楚。

六、同工酶

1959年 Markert 首次用电泳分离法发现动物的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)具有多种分子形式,并将其称为同工酶(isozyme 或 isoenzyme)。同工酶是指催化相同的化学反应,但其蛋白质分子结构、理化性质和免疫性能等方面都存在明显差异的一组酶。至今已陆续发现了数百种具有不同分子形式的同工酶,几乎有一半以上的酶作为同工酶而存在。同工酶不仅存在于同一个体的不同组织中,甚至同一组织、同一细胞的不同亚细胞结构中。同工酶是研究代谢调节、分子遗传、生物进化、个体发育、细胞分化和癌变的有力工具,在酶学、生物学和医学中均占有重要地位。

在同工酶的研究中,研究得最多的是乳酸脱氢酶,它是糖酵解过程中的关键酶之一,催化下面反应:



从各种组织中得到的 LDH 相对分子质量约 140×10^3 ,都是由 4 个亚基聚合的四聚体,每个亚基的相对分子质量约 35×10^3 ,有 5 种同工酶。由两种不同的结构基因编码成 2 种蛋白亚基,即肌肉型(M)和心肌型(H)亚基。这两种亚基在氨基酸组成上有较大差别,H 型富含酸性氨基酸,而 M 型富含碱性氨基酸,因此在电场中很易分开,从阴极向阳极排列依次为 LDH₅(M₄)、LDH₄(M₃H)、LDH₃(M₂H₂)、LDH₂(MH₃)、LDH₁(H₄)。此外在动物睾丸及精子中还发现了另一种基因编码的 x 亚基组成了 LDH_x。

LDH 同工酶有组织特异性,LDH₁ 在心肌中相对含量高,而 LDH₅ 在肝、骨骼肌中相对含量高。因此,LDH 同工酶相对含量的改变在一定程度上更敏感地反映某脏器的功能状况,临床医学常利用这些同工酶在血清中相对含量的改变作为某脏器病变鉴别诊断的依据。例如心、肝病变将引起血清 LDH 同工酶酶谱的变化,一般规律是:

心脏疾病 LDH₁ 及 LDH₂ 上升,LDH₃ 及 LDH₅ 下降。

急性肝炎 LDH₅ 明显升高,随病情好转而逐渐恢复正常。

慢性肝炎一般处于正常范围,部分病例可见 LDH₅ 有所升高。

肝硬化 LDH₅、LDH₁ 和 LDH₃ 均升高。

原发性肝癌 LDH₃、LDH₄、LDH₅ 均上升,但 LDH₅ > LDH₄。

转移性肝癌 LDH₃、LDH₄、LDH₅ 均上升,但 LDH₄ > LDH₅。

人体某些脏器中 LDH 同工酶的相对含量见表 10-12。

表 10-12 人的 LDH 同工酶酶谱

LDH 同工酶	亚基组	LDH 活性的百分数/%								
		心肌	肝	肾	肺	脾	骨骼肌	红细胞	白细胞	血清
LDH ₁	H ₄	73	2	43	14	10	0	43	12	27.1
LDH ₂	H ₃ M	24	4	44	34	25	0	44	49	34.7
LDH ₃	H ₂ M ₂	3	11	12	35	40	5	12	33	20.9
LDH ₄	HM ₃	0	27	1	5	20	16	1	6	11.7
LDH ₅	M ₄	0	56	0	12	5	79	0	0	5.7

同工酶具有多种多样的生物学功能。① 同工酶作为遗传标志,已广泛被遗传学家用于遗传分析的研究,这是因为:同工酶是分子水平的指标,按照一个基因编码一个同工酶亚基的理论,可从同工酶的表现型

变异直接推测其基因型的变异,显然优于某些形态学的指标,后者往往是多个基因型的综合表现型。同工酶可用测定酶活力的方法鉴定,较非酶蛋白质分析方便。同工酶比其他指标灵敏,可以反映 DNA 上一个碱基的微小变异。② 同工酶和个体发育及组织分化密切相关,在个体发育过程中,从早期胚胎到胎儿组织,再从新生儿到成熟的成年,随着组织的分化和发育,各种同工酶也有一个分化或转变的过程。某些同工酶在个体发育时,往往在较晚期的胎儿组织中才开始发生,甚至到出生后才在特定的少数组织中生成,其活力随组织的分化和发育而逐渐增高。这些同工酶在成年动物中的分布常局限于少数组织。一般说来,它们对底物的 K_m 值较大,有些还受到激素或饮食成分的调节,与组织的特殊功能有关,如糖异生、尿素合成等。把这类同工酶称为分化型同工酶(differentiation type isozyme)或成年型同工酶(adult type isozyme)。反之,另一些同工酶在胎儿发育的较早期即有明显活性,出生后,在有些组织中,活性反而随分化和发育而逐渐降低,但也可在另一些组织中甚至多数组织中继续占主要地位。这些同工酶往往对底物的 K_m 值较小,不受饮食或激素的调节,只参与组织的一般性代谢或与细胞的增殖有关。把这类同工酶称为原始型同工酶(original type isozyme)或胎儿型同工酶(foetal type isozyme)。③ 同工酶与代谢调节:同工酶的产生可能是基因分化的产物,而基因的分化又可能是生物进化过程中为适应愈趋复杂的代谢而引起的一种分子进化,故体内存在同工酶的意义即在于适应不同组织或不同细胞器在代谢上的不同需要。实验结果表明,同工酶在各组织或亚细胞组分中分布的不同以及它们之间底物特异性和动力学的差别,决定了同工酶在体内的功能是不同的,同工酶只是做相同的“工作”,不一定有相同的功能。关于同工酶对代谢的调节,研究较清楚的是微生物的某些同工酶在分支代谢调节中所起的重要作用。例如 *E. coli* 中 Thr、Met、Lys 的合成均以 Asp 为原料,整个合成途径的第一个酶是天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK),共有 I~III 种同工酶。其中 AK-I 可受 Thr 的反馈抑制,AK-II 受 Met 的反馈阻遏,而 AK-III 则受 Lys 的抑制和阻遏。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氨基酸的合成,保证了 3 种氨基酸合成的平衡(图 10-70)。④ 同工酶与癌基因的表达:研究癌基因的表达在癌的发生机制及探索癌诊断的指标中具有重要的意义。大量的研究证明,癌基因表达发生紊乱,产生一些相应的正常分化组织所没有的或含量极微的基因表达产物,例如 α -甲胎蛋白(α -fetoprotein)及一些胎儿型同工酶。同时正常分化组织所特有的一些功能蛋白,例如清蛋白等血浆蛋白和某些成年型同工酶则降低或消失。这些改变往往和癌的增殖速率和恶性程度有平行关系。由于在组织分化或癌变过程中,同一种酶的同工酶常互相消长,一增一减,所以同工酶是研究基因表达的良好指标。

此外,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谱是有差异的,从这种差异分析中可以帮助判断杂交优势。

提 要

酶的活性部位对于不需要辅酶的酶来说,就是指酶分子中在三维结构上比较靠近的几个氨基酸残基负责与底物的结合与催化作用的部位,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,往往也是酶活性部位的组成部分。酶活性部位有 6 个共同特点。研究酶活性部位的方法有:酶分子侧链基团的化学修饰法,动力学参数测定法,X 射线晶体结构分析法和定点诱变法,这些方法可互相配合以判断某个酶的活性部位。

酶是催化效率很高的生物催化剂,这是由酶分子的特殊结构所决定的。经研究与酶催化效率的有关因素有 7 个,即底物和酶的邻近效应与定向效应,底物的形变与诱导契合,酸碱催化,共价催化,金属离子催化,多元催化和协同效应,活性部位微环境的影响。但这些因素不是同时在一个酶中起作用,也不是一

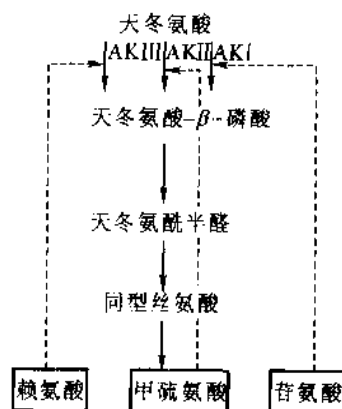


图 10-70 *E. coli* 中 Thr、Met 和 Lys 的合成
AK: 天冬氨酸激酶

种因素在所有的酶中起作用,对于某一种酶来说,可能分别主要受一种或几种因素的影响。

研究酶催化的反应机制,始终是酶学研究的一个重点,通过大量的研究工作,已经对一些酶的作用机制有深入了解,该章对溶菌酶、胰核糖核酸酶 A、羧肽酶 A、丝氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶等的催化作用机制进行了详尽的讨论。

酶活性是受各种因素调节控制的,除了在第 8 章中已介绍的几种因素外,主要还有① 别构调节,例如 ATCase。② 酶原的激活,如消化系统蛋白酶原的激活及凝血系统酶原的激活。③ 可逆共价修饰调控,如蛋白质的磷酸化,一系列蛋白激酶的作用。通过以上作用,使酶能在准确的时间和正确的地点表现出它们的活性。别构酶一般都是寡聚酶,有催化部位和调节部位,别构酶往往催化多酶体系的第一步反应,受反应序列的终产物抑制,终产物与别构酶的调节部位相结合,由此调节多酶体系的反应速率。别构酶有协同效应,[S]对 v 的动力学曲线呈 S 形曲线(正协同)或表现双曲线(负协同),两者均不符合米氏方程。ATCase 作为别构酶的典型代表,已经测定了其三维结构,详细研究了别构机制和催化作用机制。为了解释别构酶协同效应的机制,有两种分子模型受到人们重视,即协同模型和序变模型。酶原经过蛋白水解酶专一作用释放出肽段,构象发生变化,形成酶的活性部位,变成有活性的酶,这个活化过程,是生物体的一种调控机制。可逆地共价修饰调控作用是通过共价调节酶进行的,通过其他酶对其多肽链某些基团进行可逆地共价修饰,使处于活性与非活性的互变状态,从而调节酶活性。共价修饰的基团主要是磷酸化、腺苷酰化、尿苷酰化及 ADP-核糖基化等。

同工酶是指催化相同的化学反应,但其蛋白质分子结构、理化性质和免疫性能等方面不同的一组酶。同工酶是研究代谢调节、分子遗传、生物进化、个体发育、细胞分化和癌变的有力工具,在酶学、生物学及医学研究中占有重要地位。LDH 同工酶研究的比较清楚,是由两种不同亚基组成的四聚体,有 5 种同工酶,在不同组织中含量不同,反映了同工酶的组织特异性。

习 题

- 阐明酶活性部位的概念。可使用哪些主要方法研究酶的活性部位?
- 简要阐明胰 RNase A 的活性部位如何确定的?
- 与酶催化效率有关的因素有哪些?它们是怎样提高酶反应速率的?
- 推测下列寡聚糖被溶菌酶水解的相对速率(G: N-乙酰氨基葡萄糖, M: N-乙酰氨基葡萄糖乳酸):
 - M-M-M-M-M-M
 - G-M-G-M-G-M
 - M-G-M-G-M-G
- 假设在合成(NAG)₆时 D 和 E 糖残基之间的糖苷氧已为 ¹⁸O 所标记。当溶菌酶水解时 ¹⁸O 将出现在哪个产物中?
- 请比较溶菌酶、羧肽酶 A、胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶:
 - 哪种酶的催化活性需要金属离子?
 - 哪种酶只含一条多肽键?
 - 哪种酶被 DFP 迅速地失活?
 - 哪种酶是由酶原激活成的?
- 上题 4 种酶的催化机制中是否有从酶到底物的质子转移过程?若有,请指出它们的质子供体是什么?
- TPCK 是胰凝乳蛋白酶的亲和标记试剂,它对 His₅₇ 烷基化后使胰凝乳蛋白酶失活。
 - 为胰蛋白酶设计一个像 TPCK 那样的亲和标记试剂。
 - 你认为怎样可以检验它的专一性?
 - 能被胰蛋白酶的这个亲和标记试剂失去活性的还有哪个丝氨酸蛋白酶?
- 胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶作为催化剂,有哪些相似之处?有哪些不同之处?在酶的分子结构上,是哪些因素引起这些差异的?
- ATCase 是一种别构酶,其活性部位与别构效应物结合部位分别位于不同亚基上,有可能设想别构酶上这两种部位存在于同一亚基上吗?为什么?
- 对于 ATCase 来说,琥珀酸起着 Asp(两个底物中的一个)的竞争性抑制作用。 v 对 [Asp] 的依赖关系见图 10-71A (假设在这些实验中第二种底物是过量的,并可忽略)。在图 10-71B 中 [Asp] 维持在低水平(图 10-71A 中箭头所指处)不

变,并加入一系列含量递增的琥珀酸。琥珀酸不能作为底物参与反应。请解释这些结果。

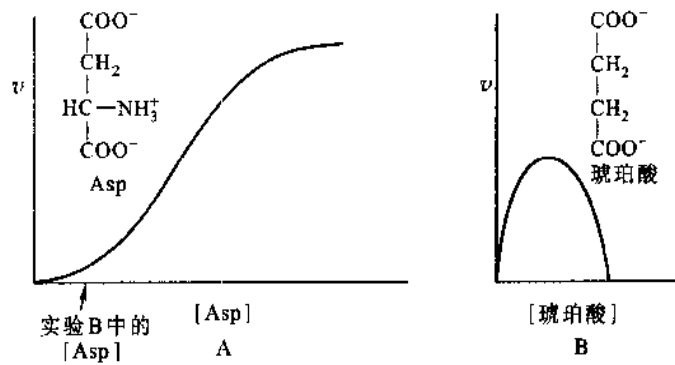


图 10-71 Asp 和琥珀酸浓度对 ATCase 催化速率的影响

12. 试解释为什么胰凝乳蛋白酶不能像胰蛋白酶那样自我激活?

13. 羧肽酶 A 促使底物的水解,下面哪个是其重要的机制:

- (1) 结构重排将必需氨基酸残基靠近敏感键。
- (2) 形成一个 C 端环肽的共价中间物。
- (3) 活性部位 Try 残基脱质子形成亲核作用。
- (4) 通过结合 Zn^{2+} 的活化水。

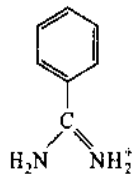
14. 左边列出的每一种酶,按照提出的催化机制,从右边选择出它们适当的过渡态或化学本质。

- | | |
|-------------|--------------------|
| (1) 溶菌酶— | (1) Zn^{2+} 活化水 |
| (2) RNA 酶— | (2) 氧阴离子(oxyanion) |
| (3) 羧肽酶 A— | (3) 五价磷 |
| (4) 胰凝乳蛋白酶— | (4) 碳正离子 |
| (5) 胃蛋白酶— | (5) 四面体肽键 |
| | (6) 天冬氨酸-活化水 |

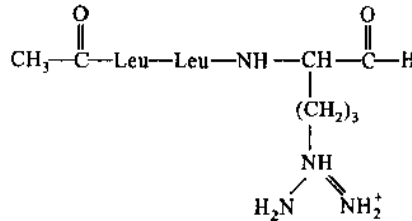
15. 对蛋白激酶 A 的叙述中哪一个是正确的?

- (1) 通过 ATP 活化。
- (2) 在没有激活剂时有 2 个催化亚基(C)和 2 个调节亚基(R)组成。
- (3) 激活剂结合后解离成一个 C_2 和 2 个 R 亚基。
- (4) 在 C 亚基中含有一个假底物顺序。

16. 苯甲脒 ($K_i = 1.8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 和亮抑蛋白酶肽 (Leupeptin, $K_i = 3.8 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) 是胰蛋白酶的两种特异竞争性抑制剂,试解释它们的抑制机制。设计亮抑蛋白酶肽的类似物抑制胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶。



苯甲脒



亮抑蛋白酶肽

主要参考书

1. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
2. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. New York, London: Saunders College Publishing, Harcourt Brace College Publisher, 1995
3. Nelson D L and Cox M M, Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers 2000
4. Zubay G, Biochemistry, Reading, London, Sydney: Addison - Wesley Publishing Company, 1993

5. Gumpert R I, Jonas A, Mintel R, Rhodes C. Student Companion for Stryer's Biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
6. Mathews C K, van Holde K E, Ahern K G. Biochemistry, 3rd ed. San Francisco: Benjamin/cummings, An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc., 2000
7. Voet D and Voet J G. Biochemistry 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001
8. Creighton T E. Proteins: Structure and Molecular Properties. New York: W. H. Freeman and Company, 1984
9. Page M I and Williams A. Enzyme Mechanisms. London, England: Royal Society of London, 1987
10. Lipscomb W N. Aspartate transcarbamylase from *Escheria coli*: Activity and regulation. Adv. Enzymol, 1994, 73: 67 ~ 151
11. Chipman D and Sharon N. Mechanism of Lysozyme action. Science, 1969, 165: 454 ~ 465
12. Christianson D and Lipscomb W. Carboxypeptidase A. Accounts of Chemical Research, 1989, 22: 62 ~ 69
13. Polgar L. The mechanism of action of aspartic proteases involves "Push Pull" Catalysis. FEBS Letters, 1987, 219: 1 ~ 4
14. Taylor S S, Knighton, D R, Zheng J, *et al.*. A template for the protein kinase family. Trends Biochem Sci, 1993, 18: 84 ~ 89
15. Stroud R M, Kossiakoff A A, and Chambers J L. Mechanism of Zymogen activation. Ann Rev Biophys Bioeng, 1977, 6: 177 ~ 193
16. 许根俊. 酶的作用原理. 北京: 科学出版社, 1983
17. Tsou C L. Conformational flexibility of enzyme active sites. Science, 1993, 262: 380 ~ 381
18. Fersht A. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. New York: W. H. Freeman and Company, 1999
19. 陈惠黎, 李文杰. 分子酶学. 北京: 人民卫生出版社, 1983

(张庭芳)

第 11 章 维生素与辅酶

一、维生素概论

(一) 维生素的概念

维生素是参与生物生长发育和代谢所必需的一类微量有机物质。这类物质由于体内不能合成或者合成量不足,所以虽然需要量很少,每日仅以 mg 或 μg 计算,但必须由食物供给。维生素在生物体内的作用不同于糖类、脂肪和蛋白质,它不是作为碳源、氮源或能源物质,不是用来供能或构成生物体的组成部分,但却是代谢过程中所必需的。已知绝大多数维生素作为酶的辅酶或辅基的组成成分,在物质代谢中起重要作用。

机体缺乏维生素时,物质代谢发生障碍。因为各种维生素的生理功能不同,缺乏不同的维生素产生不同的疾病,这种由于缺乏维生素而引起的疾病称为维生素缺乏症(avitaminosis)。

维生素是由 vitamin 一词翻译而来,其名称一般是按发现的先后,在“维生素”(简式用 V 表示)之后加上 A、B、C、D 等拉丁字母来命名。还有初发现的以为是一种,后来证明是多种维生素混合存在,便又在拉丁字母右下方注以 1、2、3...等数字加以区别,例如 B_1 、 B_2 、 B_6 及 B_{12} 等。

生物对维生素的需要量是非常小的,例如正常人每天所需 V_A 0.8~1.6 mg, V_{B_1} 1~2 mg, V_{B_2} 1~2 mg, 泛酸 3~5 mg, V_{B_6} 2~3 mg, V_{pp} 10~20 mg, 生物素 0.2 mg, 叶酸 0.4 mg, $V_{B_{12}}$ 2~6 μg , V_D 10~20 μg , V_C 60~100 mg。当然对维生素的需要量不是绝对的,在某些特殊情况下需要量也会相应变化。

(二) 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曾经指出,用动物肝防治夜盲症,用谷皮汤熬粥防治脚气病。现在我们知道,肝中多含 V_A ,所以防治 V_A 缺乏症的夜盲病;谷皮中多含 V_B ,可以防治 V_{B_1} 缺乏症的脚气病。直到 1886 年荷兰医生 Eijkman 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,将丢弃的米糠放回到饲料中就可治愈。他认为米壳中有一种“保护因素”可对抗食物中过量的糖。后来 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 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,大鼠能正常生长。Hopkins 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 Mendel 和 Osborni, McCollum 和 Davis 于 1913 年发现 V_A 和 V_B 。其后,其他维生素被陆续发现。

在微生物中也有和动物相似的情况,即它们本身不能合成所需要的维生素,而要外界供给。但也有一些微生物能合成某些维生素,如大肠杆菌能合成维生素 K、生物素等,核黄菌能合成 V_{B_2} 。一般说植物体内能够合成维生素。高等动物不能合成维生素也不是绝对的,例如人体能合成 V_D ;大小白鼠能合成 V_C 。

(三) 维生素的分类和辅酶的关系

维生素都是小分子有机化合物。它们在化学结构上无共同性,有脂肪族、芳香族、脂环族、杂环和甾类

化合物等。通常根据其溶解性质分为脂溶性和水溶性两大类。脂溶性有维生素 A、D、E、K 等,水溶性有维生素 B₁、B₂、烟酸和烟酰胺、B₆、泛酸、生物素、叶酸、B₁₂ 和维生素 C 等。在生物体内维生素多以辅酶和辅基形式存在,现将各种维生素的辅酶、辅基形式以及在酶促反应中的主要作用列于表 11-1。

表 11-1 各种维生素的辅酶(辅基)形式及酶反应中的主要功能

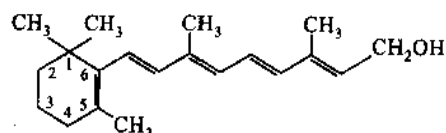
类 型	辅酶、辅基或其他活性形式	主要功能
水溶性维生素:		
维生素 B ₁ (硫胺素)	硫胺素焦磷酸(TPP)	醛基转移和 α -酮酸的脱羧作用
维生素 B ₂ (核黄素)	黄素单核苷酸(FMN) 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	氧化还原反应 氧化还原反应
维生素 PP (烟酸和烟酰胺)	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD) 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP)	氢原子(电子)转移 氢原子(电子)转移
泛酸	辅酶 A(CoA)	酰基转移作用
维生素 B ₆ [吡哆醛(醇、胺)]	磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺	氨基酸转氨基、脱羧作用
生物素	生物胞素	传递 CO ₂
叶酸	四氢叶酸	传递一碳单位
维生素 B ₁₂ (钴胺素)	脱氧腺苷钴胺素(辅酶 B ₁₂)、甲基钴胺素	氢原子 1,2 交换(重排作用),甲基化
硫辛酸	硫辛酸赖氨酸	酰基转移,氧化还原反应
维生素 C(抗坏血酸)	—	羟基化反应辅助因子
脂溶性维生素:		
维生素 A	11 顺视黄醛	视循环
维生素 D	1,25 - 二羟胆钙甾醇 [1,25 - (OH) ₂ D ₃]	调节钙、磷代谢
维生素 E		保护膜脂质、抗氧化剂
维生素 K		羧化反应的辅助因子,参与氧化还原反应

二、脂溶性维生素

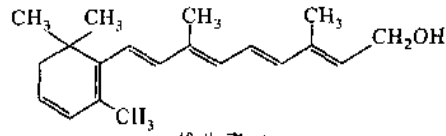
维生素 A、D、E、K 等不溶于水,而溶于脂肪及脂溶剂(如苯、乙醚及氯仿等)中,故称为脂溶性维生素。在食物中,它们常和脂质共同存在,因此在肠道吸收时也与脂质的吸收密切相关。当脂质吸收不良时,脂溶性维生素的吸收大为减少,甚至会引起缺乏症。吸收后的脂溶性维生素可以在体内,尤其是在肝内储存。

(一) 维生素 A

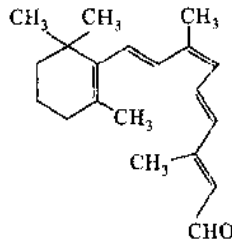
维生素 A 又名视黄醇(retinol)是一个具有脂环的不饱和一元醇,通常以视黄醇酯(retinol ester)的形式存在,醛的形式称为视黄醛(retinal 或 retinaldehyde)。像所有脂溶性维生素,视黄醇是一种类异戊二烯分子,是由异戊二烯构件分子生物合成的。视黄醇从动物饮食中吸收或由植物来源的 β -胡萝卜素合成。维生素 A 包括 A₁ 和 A₂ 两种。A₁ 存在于哺乳动物及咸水鱼的肝脏中,即一般所说的视黄醇;A₂ 存在于淡水鱼的肝脏中。A₁ 和 A₂ 的生理功能相同,但 A₂ 的生理活性只有 A₁ 的一半,A₂ 比 A₁ 在化学结构上多一个双键,维生素 A₁ 和 A₂ 的结构如下:

维生素 A₁

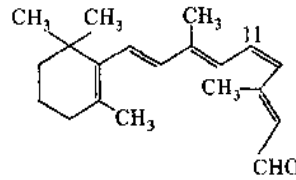
λ_{\max} 325 nm(乙醇溶液)

维生素 A₂ λ_{\max} 325 nm (乙醇溶液)

由于维生素 A 的侧链含有 4 个双键,故可形成 8 种顺、反异构体。在体内视黄醇可被氧化成视黄醛。视黄醛中最重要的为 9- 及 11- 顺视黄醛:

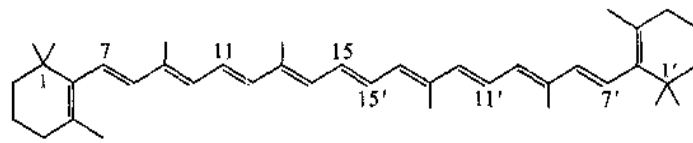


9-顺视黄醛



11-顺视黄醛

维生素 A 的化学结构和 β -胡萝卜素(β -carotene)的结构相关, β -胡萝卜素分子可被小肠粘膜的 β -胡萝卜素-15,15'-二加氧酶从其碳氢链中间断开生成两分子的视黄醇。因此, β -胡萝卜素是维生素 A 原。实际上胡萝卜素在体内的利用率较低, β -胡萝卜素仅相当于 1/6 维生素 A 活性,而 α 及 γ -胡萝卜素活性为 β 型的一半。

 β -胡萝卜素

食物中的维生素 A 在小肠粘膜细胞内与脂肪酸结合成酯后掺入乳糜微粒,通过淋巴液转运,并被肝脏所摄取。维生素 A 酯在肝脏的储脂细胞内贮藏,应机体需要向血中释放。血浆中的维生素 A 是非酯化型的,与特异的转运蛋白——视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, RBP)结合而被转运,RBP-视黄醇复合物的 K_D 值是很小的,大约 5×10^{-12} mol/L。

维生素 A 是构成视觉细胞内感光物质的成分。眼球视网膜上有两类感觉细胞,即圆锥细胞,对强光及颜色敏感;另一种为杆细胞,对弱光敏感,对颜色不敏感,与暗视觉有关。这是因为杆细胞内含有感光物质视紫红质(rhodopin)。视紫红质在光中分解,在暗中再合成。视紫红质是由 9,11-顺视黄醛和视蛋白内赖氨酸的 ϵ -氨基通过形成 schiff 碱缩合而成的一种结合蛋白质,而视黄醛是维生素 A 的氧化产物。眼睛对弱光的感光性取决于视紫红质的合成。当维生素 A 缺乏时,11-顺视黄醛得不到足够的补充,视紫红质合成受阻,使视网膜不能很好的感受弱光,在暗处不能辨别物体,暗适应能力降低,严重时可出现夜盲症。有关视紫红质的合成及杆细胞的视循环分别如图 11-1 和图 11-2 所示。

维生素 A 除了视觉功能之外,在刺激组织生长及分化中也起重要作用,这一方面还缺少了解。例如视黄酸能刺激实验动物生长,但在视觉过程中不能代替视黄醛。维生素 A 也能刺激许多组织中的 RNA 合成。视黄醇衍生物的功能,在特异的糖蛋白的合成中作为糖的携带者。被维生素 A 影响的其他分化过程是免疫反应,当维生素 A 缺乏时机体的免疫功能会降低。细胞的粘附也受维生素 A 的影响,当某些类型的细胞在无维生素 A 的介质中培养生长时,加入维生素 A,则恢复生长的接触性抑制,并提高细胞之间的粘附。

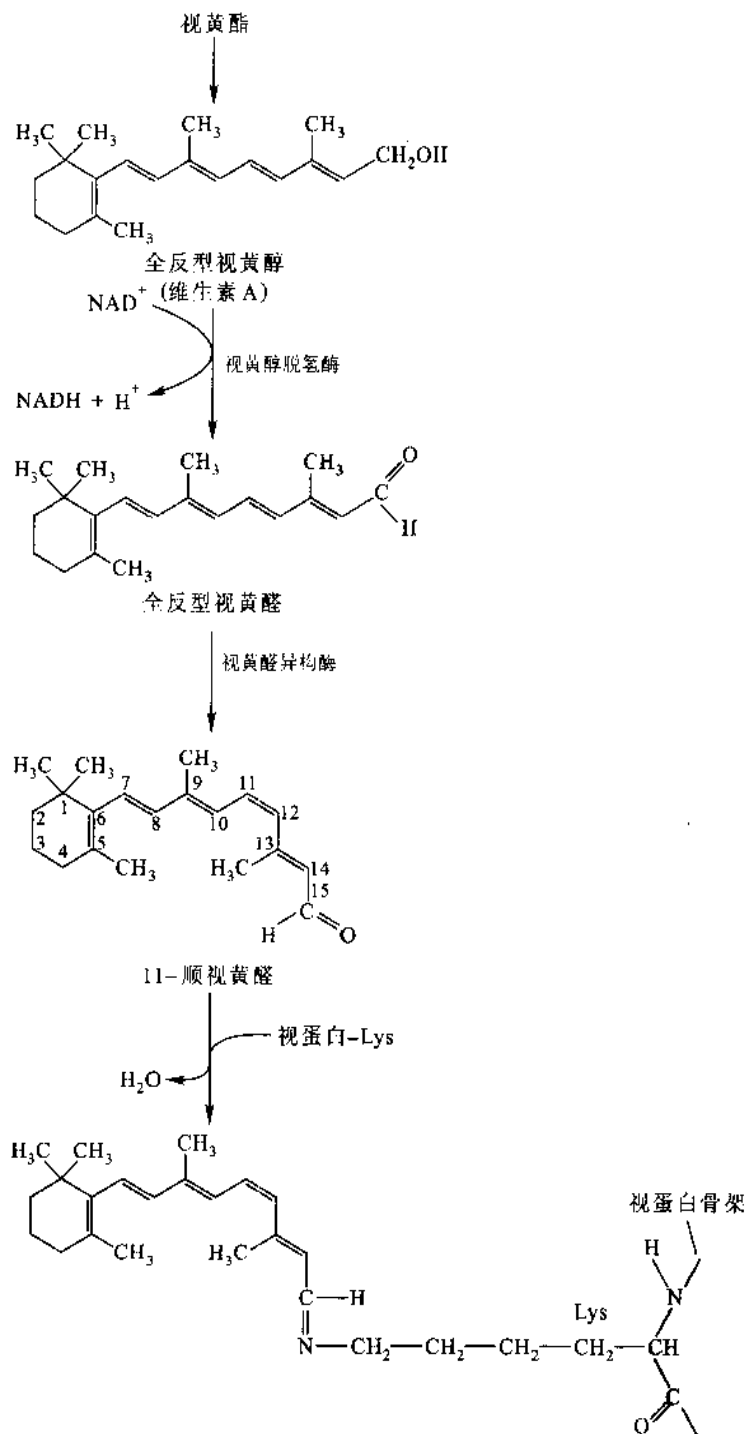


图 11-1 光敏感蛋白——视紫红质的合成步骤

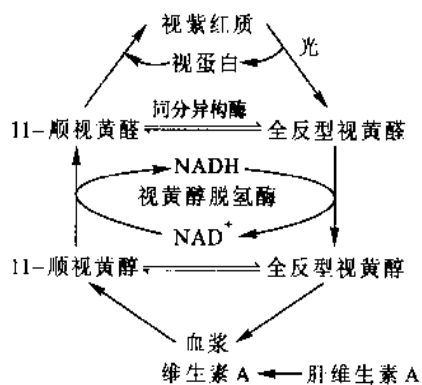


图 11-2 杆细胞的视循环

维生素 A 主要来自动物性食品,以肝脏、乳制品及蛋黄中含量最多。维生素 A 原主要来自植物性食品,以胡萝卜、绿叶蔬菜及玉米等含量较多。正常成人每日维生素 A 生理需要量为 2 600~3 300 国际单位(IU),过多摄入维生素 A,长期每日超过 500 000 国际单位可以引起中毒症状,严重危害健康。

(二) 维生素 D

维生素 D 为类甾醇衍生物,具有抗佝偻病作用,故称为抗佝偻病维生素。维生素 D 家族最重要的成员是麦角钙化(甾)醇(ergocalciferol,即维生素 D₂)及胆钙化(甾)醇(cholecalciferol,即维生素 D₃)。胆钙化醇是由动物的皮肤通过紫外光(例如太阳)作用,以其前体分子——7-脱氢胆甾醇而产生的(图 11-3)。吸收光能经过激发单线态引起光异构作用,使 9,10 碳键破坏而形成前维生素 D₃(previtamin D₃)。紧接着自发地异构作用产生维生素 D₃——胆钙化醇。麦角钙化醇仅侧链结构与胆钙化醇不同,它是通过太阳作用于植物甾醇——麦角甾醇而产生的。因为人类能通过太阳作用于皮肤产生维生素 D₃,因此“维生素 D”严格地说不是一种维生素。

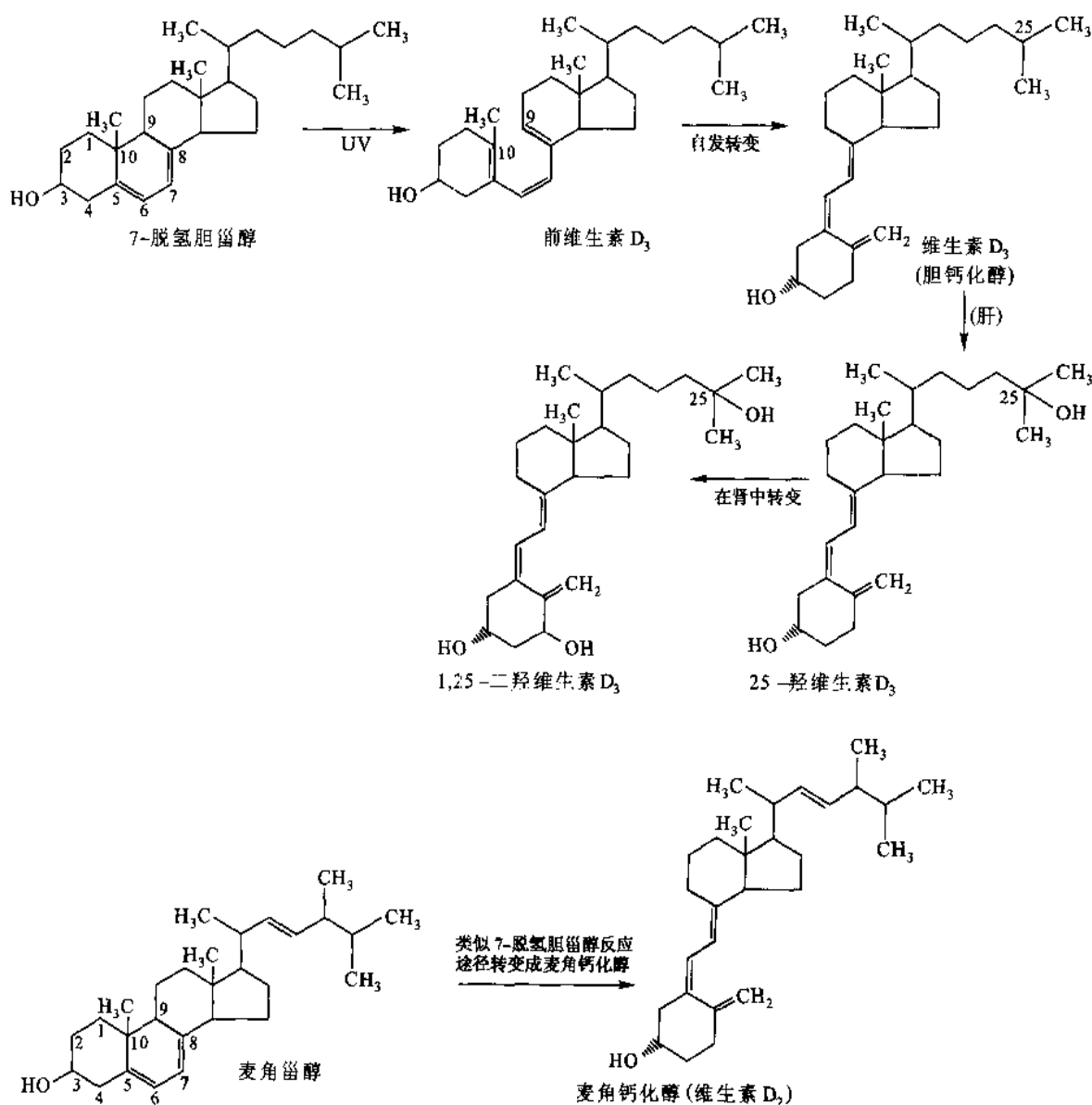


图 11-3 维生素 D₃ 通过阳光作用于 7-脱氢胆甾醇在皮肤中产生。在肝和肾中混合功能氧化酶的连续作用产生维生素的活性形式 1,25-二羟维生素 D₃。麦角钙化醇以类似的方式由麦角甾醇产生

根据在身体中的作用机制,胆钙化醇应当称为一种激素前体激素原(prohormone)。饮食形式的维生素 D 通过小肠中胆盐的帮助被吸收。不论是在小肠中吸收或是在皮肤光合成,胆钙化醇通过特异的维生素 D 结合蛋白(DBP)也称为转钙化蛋白(transcalciferin)转运到肝中。在肝中,胆钙化醇被一种混合功能氧化酶(mixed-function oxidase)在 C-25 位羟化生成 25-羟维生素 D₃(即 25-羟胆钙化醇)。尽管这是维生素 D 在身体内的主要循环形式,而 25-羟维生素 D₃ 比最终活性形式具有很低的生物活性。为了生成最终活性形式,25-羟维生素 D₃ 转运到肾中,C-1 被一种线粒体混合功能氧化酶羟化形成 1,25-二羟维生素 D₃(即 1,25-二羟胆钙化醇),即维生素 D 的活性形式,1,25-二羟胆钙化醇然后转运到靶组织,如同一种激素调节钙和磷的代谢。

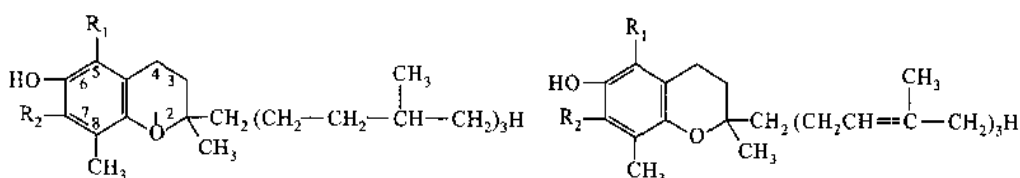
1,25-二羟维生素 D₃ 同两种肽激素降钙素(calcitonin)和甲状旁腺素(PTH),行使调节钙和磷的体内平衡。钙对许多生命过程包括肌肉收缩、神经冲动的传递、血液凝固和膜结构是重要的,而磷对 DNA、RNA、脂质和许多代谢过程起重要作用。蛋白质磷酸化对于许多生物过程是一种重要的调节信号。磷和钙对骨骼的形成起到关键作用。正常血清磷和钙的任何紊乱,像佝偻病时,骨的结构发生变更。1,25-二羟维生素 D₃ 的主要靶细胞是小肠粘膜、骨骼和肾小管,主要生理功能是促进小肠粘膜细胞对钙和磷的吸收。1,25-二羟维生素 D₃ 能诱导钙结合蛋白(CaBP)的合成和促进 Ca-ATP 酶的活性,这都有利于 Ca²⁺ 的吸收。它也能促进磷的吸收;促进钙盐的更新及新骨的生成;促进肾小管细胞对钙磷的重吸收,减少从尿中排出。因此,1,25-二羟维生素 D₃ 总的生理效应是提高血钙、血磷浓度,有利于新骨的生成与钙化。

维生素 D 主要含于肝、奶及蛋黄中,而以鱼肝油含量最丰。维生素 D 可防治佝偻病,软骨病和手足抽搐症等,但在使用维生素 D 时应先补充钙。

(三) 维生素 E

维生素 E 与动物生育有关,故称生育酚(tocopherol),主要存在于植物油中,尤以麦胚油、大豆油、玉米油和葵花籽油中含量为最丰富。豆类及蔬菜中含量也较多。

天然的生育酚共有 8 种,在化学结构上,均系苯骈二氢吡喃的衍生物。根据其化学结构分为生育酚及生育三烯酚两类,每类又可根据甲基的数目和位置不同,分为 α 、 β 、 γ 和 δ 几种。



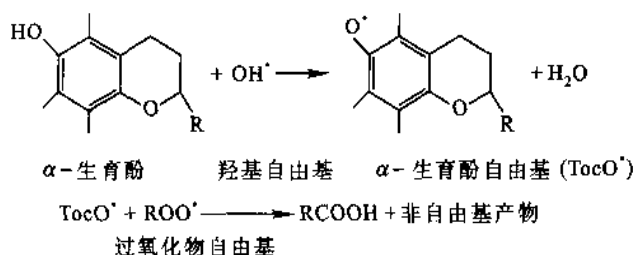
生育酚

生育三烯酚

	R ₁	R ₂
α -生育酚(α -生育三烯酚)	-CH ₃	-CH ₃
β -生育酚(β -生育三烯酚)	-CH ₃	-H
γ -生育酚(γ -生育三烯酚)	-H	-CH ₃
δ -生育酚(δ -生育三烯酚)	-H	-H

维生素 E 中以 α -生育酚生理活性最高,若以它为基准,则 β 及 γ -生育酚和 α -生育三烯酚的生理活性分别为百分之 40、8 及 20,其余活性甚微。但就抗氧化作用论, δ -生育酚作用最强, α -生育酚作用最弱。

维生素 E 极易氧化而保护其他物质不被氧化,是动物和人体中最有效的抗氧化剂。它能对抗生物膜磷脂中不饱和脂肪酸的过氧化反应,因而避免脂质中过氧化物产生,保护生物膜的结构和功能。机体代谢不断产生自由基,如羟基自由基(OH·),超氧离子自由基(O₂⁻),过氧化物自由基(ROO·)等。维生素 E 能捕捉自由基使其苯骈吡喃环上酚基失去一个氢原子而形成生育酚自由基。生育酚自由基又可进一步与另一自由基反应生成非自由基产物——生育醌。



维生素 E 还可与硒(Se)协同通过谷胱甘肽过氧化酶发挥抗氧化作用。

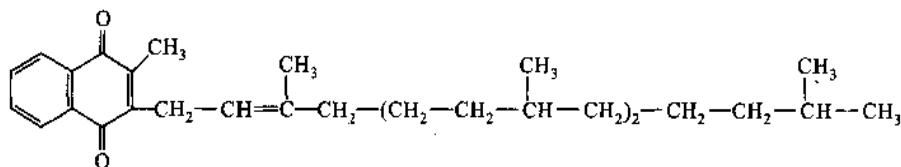
维生素 E 与动物生殖功能有关,动物缺乏维生素 E 时,其生殖器官受损而不育。雄鼠缺乏时,睾丸萎缩,不产生精子;雌鼠缺乏时,胚胎及胎盘萎缩而被吸收,引起流产。临床上常用维生素 E 治疗先兆流产和习惯性流产。

维生素 E 能提高血红素合成过程中的关键酶 δ -氨基 γ -酮戊酸(δ -amino γ -levulinic acid ALA)合成酶和 ALA 脱水酶的活性,从而促进血红素合成。研究证明,当人体血浆维生素 E 水平低时,红细胞增加氧化性溶血,若供给维生素 E 可以延长红细胞的寿命。这是由于维生素 E 具有抗氧化剂的功能,保护了红细胞膜不饱和脂肪酸免于氧化破坏,因而防止了红细胞破裂而造成溶血。

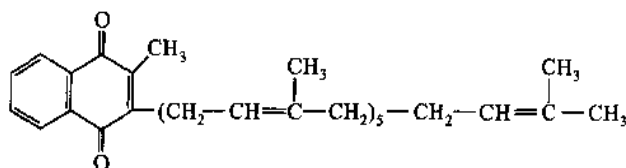
维生素 E 一般不易缺乏,正常血浆维生素 E 质量浓度为 0.9~1.6 mg/100 ml,若低于 0.5 mg/100 ml 则可出现缺乏症。主要表现为红细胞数量减少,寿命缩短,体外实验见到红细胞脆性增加,常表现为贫血或血小板增多症。

(四) 维生素 K

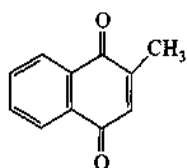
维生素 K 具有促进凝血的功能,故又称凝血维生素。天然的维生素 K 有两种:维生素 K₁ 和 K₂。K₁ 在绿叶植物及动物肝中含量较丰富。K₂ 是人体肠道细菌的代谢产物。它们都是 2-甲基-1,4-萘醌的衍生物。目前临床上最常用的为维生素 K₃,2-甲基萘醌的含氮类似物即 4-亚氨基-2-甲基萘醌的凝血活性比 K₁ 高 3~4 倍,称为 K₄。维生素 K₁、K₂、K₃、和 K₄ 的结构如下:



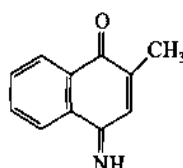
维生素 K₁



维生素 K₂



维生素 K₃



维生素 K₄

维生素 K 的主要生理功能是促进肝脏合成凝血酶原(prothrombin 凝血因子 II)。调节另外 3 种凝血因子 VII、IX 及 X 的合成。缺乏维生素 K 时,血中这几种凝血因子均减少,因而凝血时间延长,常发生肌肉

及肠胃出血。

在第 10 章中已提到血液凝固的关键步骤是凝血酶原转变成凝血酶,而这一步需要 Ca^{2+} 参加。凝血酶原要结合 Ca^{2+} 则要求它的肽链上具有 γ -羧基谷氨酸的结构。凝血酶原分子的 N 末端含有 10 个谷氨酸残基,经羧化而与 Ca^{2+} 螯合,并与膜中的磷脂结合后,为蛋白酶水解而转变为凝血酶。凝血酶原上一些特定谷氨酸残基的羧基化,是由依赖于维生素 K 的谷氨酰羧化酶(glutamyl carboxylase)催化下完成的(图 11-4)。当维生素 K 缺乏时,就不能形成正常含 γ -羧基谷氨酸的凝血酶原,影响了与 Ca^{2+} 的结合,酶原不能转变为凝血酶,因而影响了血液凝固。此外在一些组织中发现有依赖维生素 K 的羧化酶系统,参与合成其他含 γ -羧基谷氨酸的蛋白质。因此维生素 K 是凝血酶原和其他蛋白质中谷氨酸残基羧化作用的辅因子。

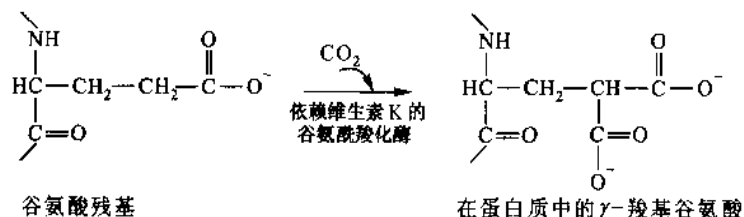


图 11-4 谷氨酰羧化酶反应依赖维生素 K

依赖维生素 K 的羧化反应是在肝细胞内质网进行,需要分子氧、 CO_2 及氢醌型维生素 K 参加,并认为羧化反应与维生素 K 的环氧化物生成相偶联。肝微粒体中有维生素 K 循环(图 11-5),首先单加氧酶催化氢醌型维生素 K 转化为 2,3-环氧化物,同时谷氨酸残基被谷氨酰羧化酶羧化为 γ -羧基谷氨酸(Gla);再由还原酶催化,以二硫苏糖醇为还原剂将维生素 K 的 2,3-环氧化物转变成醌型;然后再被 NADPH 还原为活性的氢醌型维生素 K,完成这一循环反应。双羟香豆素(dicumarol)能抑制环氧化物还原酶,从而抑制这一循环的进行,故双羟香豆素为一抗凝血剂。

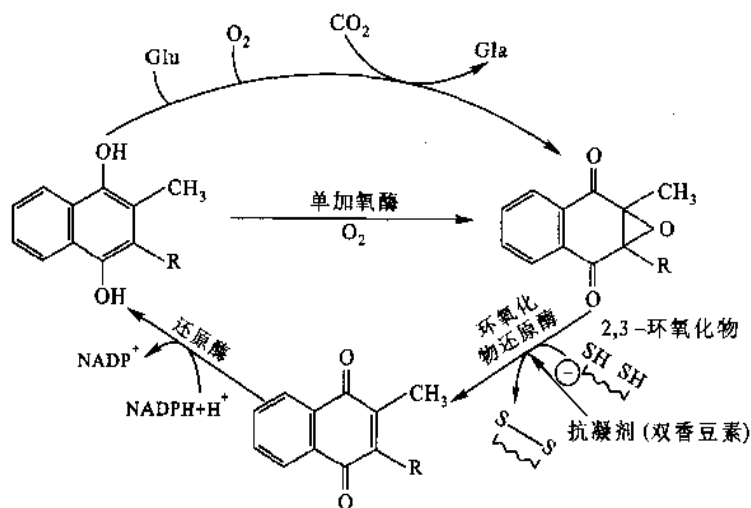


图 11-5 维生素 K 循环

一般情况下人体不会缺乏维生素 K,因为维生素 K 在自然界绿色植物中含量丰富,另一方面人和哺乳动物肠道中的大肠杆菌可以合成维生素 K。

三、水溶性维生素

水溶性维生素包括维生素 B 族、硫辛酸和维生素 C。属于维生素 B 族的主要有维生素 B_1 、 B_2 、PP、 B_6 、泛酸、生物素、叶酸及 B_{12} 等。

维生素 B 族在生物体内通过构成辅酶而发挥对物质代谢的影响。这类辅酶在肝脏内含量最丰富。与脂溶性维生素不同,进入体内的多余水溶性维生素及其代谢产物均自尿中排出,体内不能多储存。当机体饱和后,食入的维生素越多,尿中的排出量也越大。

(一) 维生素 B₁ 和硫胺素焦磷酸

维生素 B₁ 为抗神经炎维生素(又名抗脚气病维生素),化学结构是由含硫的噻唑环和含氨基的嘧啶环组成,故称硫胺素(thiamine)。在生物体内常以硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate, TPP)的辅酶形式存在,如图 11-6。硫胺素在氧化剂存在时易被氧化产生脱氢硫胺素(硫色素),后者在紫外照射下呈现蓝色荧光,利用这一特性可进行定性定量分析。

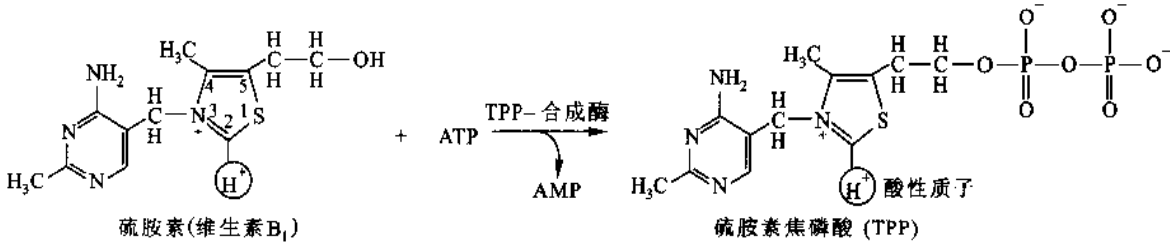


图 11-6 硫胺素焦磷酸(TPP),维生素 B₁ 的活性形式,是通过 TPP-合成酶的作用形成的

硫胺素焦磷酸(TPP)是涉及到糖代谢中羧基(醛和酮)合成与裂解反应的辅酶。特别是 α-酮酸的脱羧和 α-羟酮的形成与裂解都依赖于硫胺素焦磷酸。图 11-7 图解了这些反应,(A)丙酮酸通过酵母丙

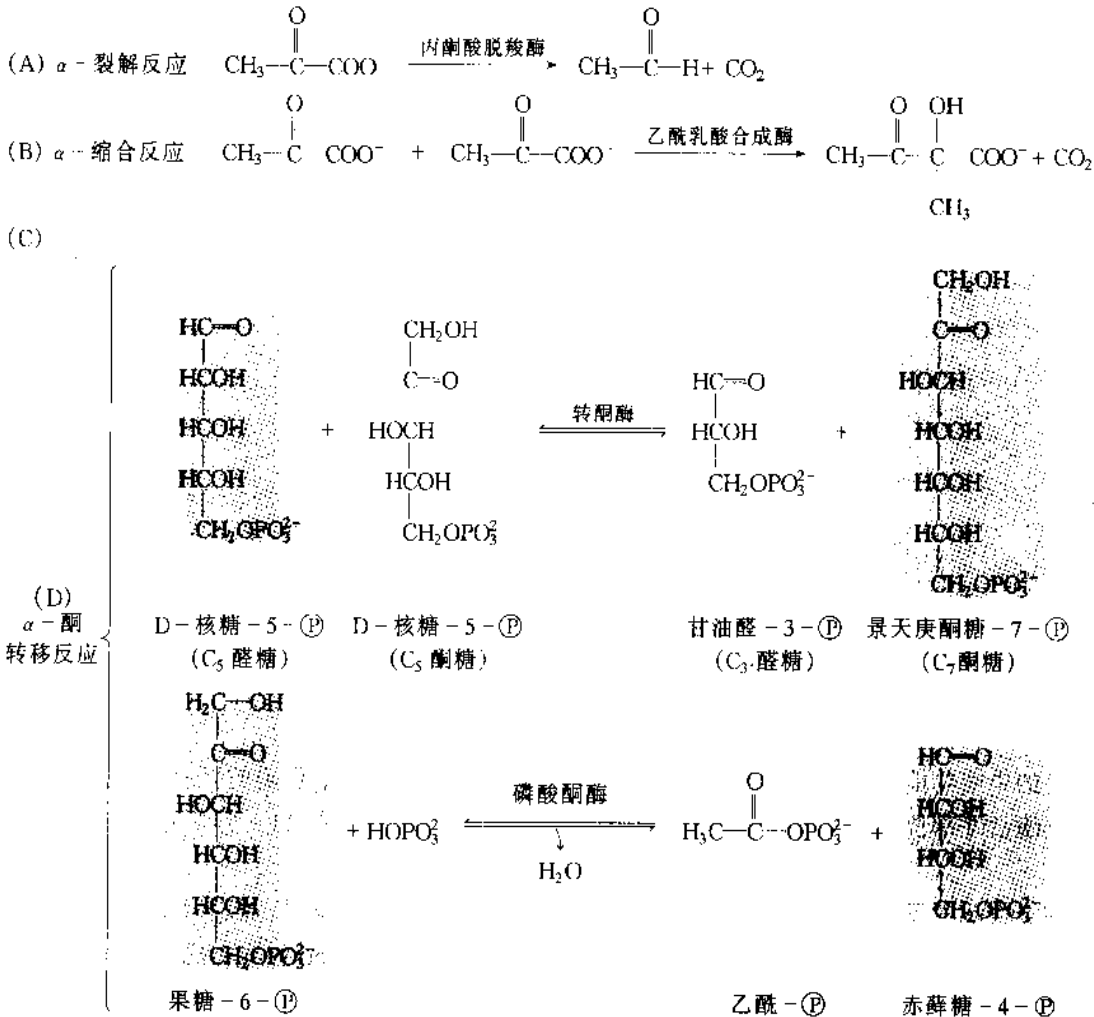


图 11-7 硫胺素焦磷酸参加(A)α-酮酸脱羧反应和(B~D)α-羟酮的形成和裂解。转酮酶和磷酸酮酶反应是 α-酮转移的例子

酮酸脱羧酶产生 CO_2 和乙醛；(B)在乙酰乳酸合成酶的反应中两分子丙酮酸缩合；(C)戊糖磷酸途径的一个反应称为转酮酶(transketolase)反应；(D)被厌氧微生物利用的反应，磷酸酮酶(phosphoketolase)反应。后面两个反应显然属于 α -酮转移。所有这些反应都依赖于产生裂解的羰基碳上负电荷的积累(图 11-8)。硫胺素焦磷酸通过稳定该负电荷促进这些反应。

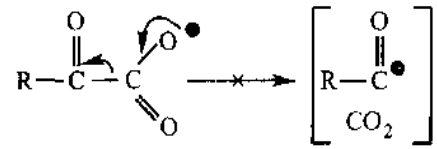


图 11-8 α -酮酸的脱羧作用导致在过渡态中羰基碳上不利的负电荷的积累
硫胺素焦磷酸的功能是稳定负电荷

这些反应的关键是硫胺素焦磷酸噻唑基的四级氮,如像酵母丙酮酸脱羧酶机制所示(11-9),在 TPP-催化的反应中,阳离子亚胺氮起着两种不同的和重要的作用:①为 C_2 质子的除去所形成的碳负离子提供了静电稳定作用,所形成的碳负离子通过与羰基碳的加成同底物如 α -酮酸(例如丙酮酸)和 α -酮醇反应(图 11-9)。②一旦发生 TPP 攻击底物,所产生中间物的稳定性,可通过氮原子双键共振相互作用达到(图 11-9)。

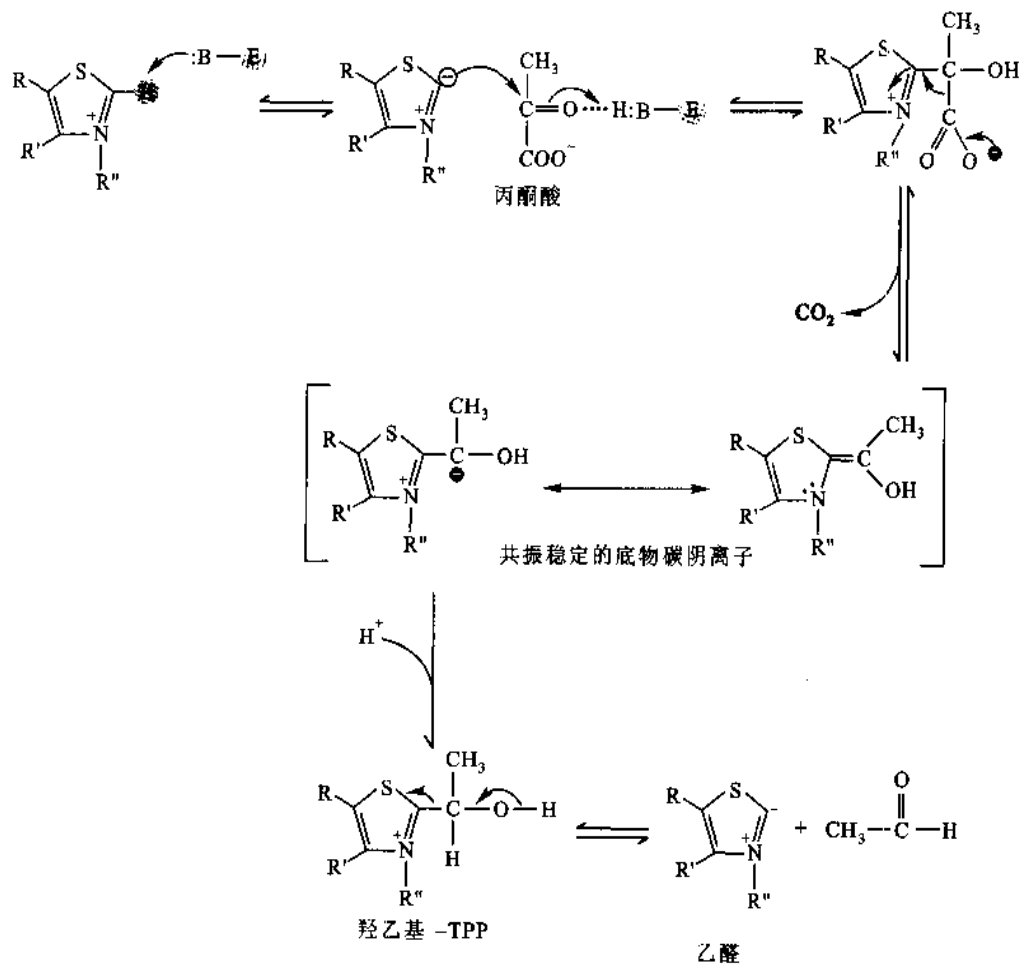


图 11-9 酵母丙酮酸脱羧酶反应机制

共振稳定的中间物能被质子化生成羟乙基-TPP。这一中间物是很不稳定的,因此不能被合成或分离出来。通过酶活性部位的碱基吸取一个质子,则由酶解离出产物乙醛(图 11-9)。这是一种非氧化脱羧作用。

乙酰乳酸合成酶的反应(图 11-10)是一个生成 α -羟酮的例子。在这里,通过丙酮酸脱羧作用生成的碳负离子能同另一分子丙酮酸作用生成 α -乙酰乳酸,是一种 Val 和 Leu 生物合成的中间物。在转酮酶和磷酸酮酶反应中 α -酮的转移是通过类似的机制产生的。转酮酶涉及到 2 个醛糖受体分子之间二碳酮基的交换。磷酸酮酶反应更为复杂,涉及到连接 TPP 的碳原子氧化和羟甲基还原成甲基。这属于一种

内部的氧化-还原反应。

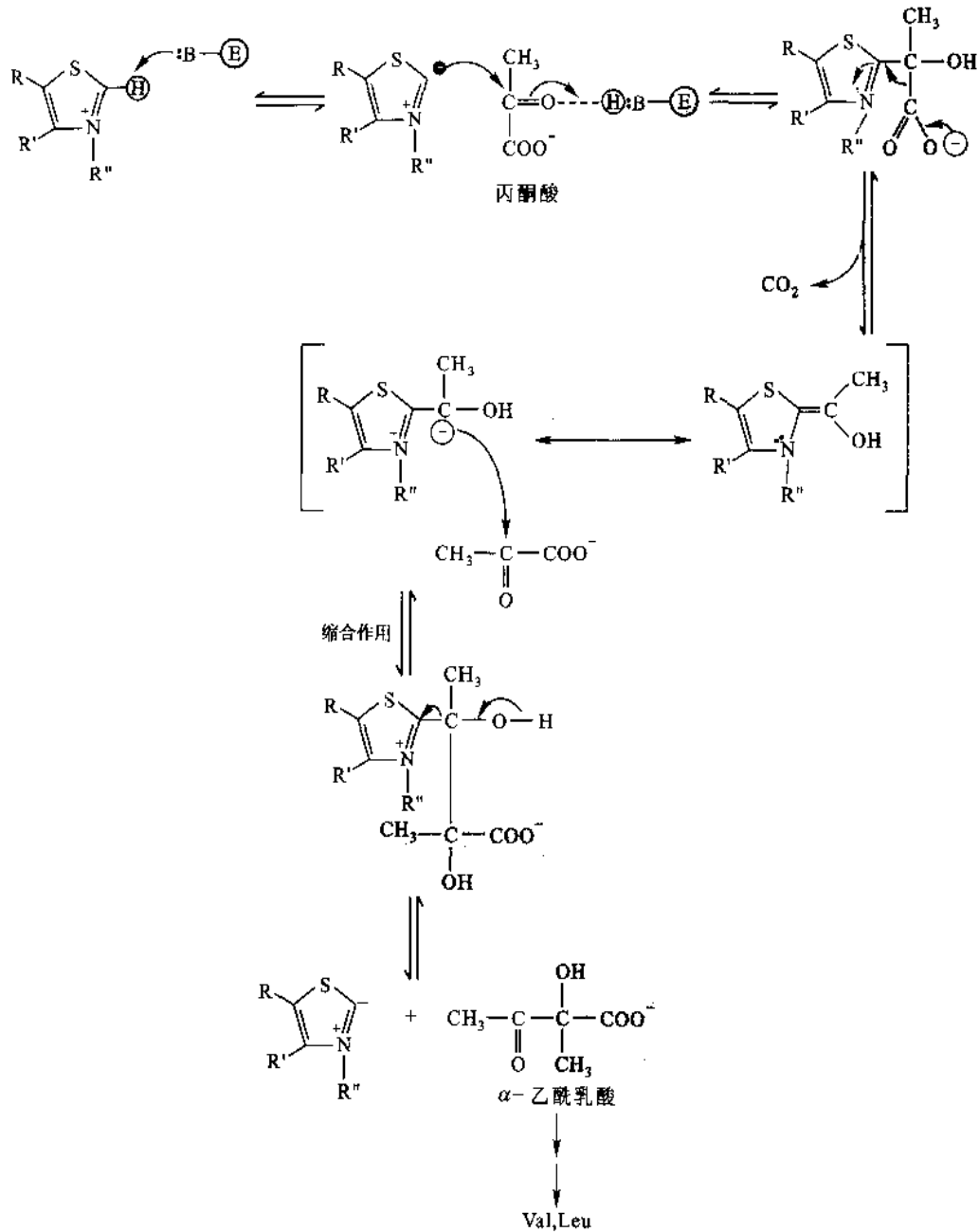


图 11-10 乙酰乳酸合成酶反应机制

由于维生素 B₁ 和糖代谢关系密切,因此多食糖类食物,维生素 B₁ 的需要量也相应增多。当维生素 B₁ 缺乏时,糖代谢受阻,丙酮酸积累,使病人的血、尿和脑组织中丙酮酸含量增多,出现多发性神经炎、皮肤麻木、心力衰竭、四肢无力、肌肉萎缩及下肢浮肿等症状,临床上称为脚气病。

根据研究,维生素 B₁ 可抑制胆碱酯酶的活性,当维生素 B₁ 缺乏时,该酶活性升高,乙酰胆碱水解加速,使神经传导受到影响,造成胃肠蠕动缓慢,消化液分泌减少,食欲不振,消化不良等消化道症状。

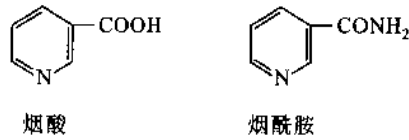
维生素 B₁ 主要存在于种子外皮及胚芽中、米糠、麦麸、黄豆、酵母、瘦肉等食物中含量最丰富。

维生素 B₁ 在酸性溶液中较稳定,中性和碱性中易破坏,维生素 B₁ 耐热,在 pH 3.5 以下虽加热到 120 ℃ 亦不被破坏,维生素 B₁ 极易溶于水,故米不易多淘洗以免损失。

(二) 维生素 PP 和烟酰胺辅酶

维生素 PP 包括烟酸(nicotinic acid)和烟酰胺(nicotinamide),又称抗癞皮病维生素,二者均属于吡啶

衍生物。



维生素 PP 广泛存在于自然界,以酵母、花生、谷类、豆类、肉类和动物肝中含量丰富,在体内色氨酸能转变为维生素 PP。

在体内烟酰胺与核糖、磷酸、腺嘌呤组成脱氢酶的辅酶,主要是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+ , 辅酶 I)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$, 辅酶 II),其还原形式为 $NADH$ 和 $NADPH$ (图 11-11)。烟酰胺辅酶是电子载体,在各种酶促氧化-还原反应中起着重要作用。 NAD^+ 在氧化途径(分解代谢)中是电子受体,而 $NADPH$ 在还原途径(生物合成)是电子供体。这些反应涉及到转移氢负离子给 NAD^+ ,或者从 $NADH$ 转移出。促进这种转移的酶类是熟知的脱氢酶类。氢负离子含两个电子,这样 NAD^+ 和 $NADP^+$ 起两个电子载体的作用。吡啶环的 C-4 位置是 NAD^+ 和 $NADP^+$ 的反应中心,能接受或给出氢负离子,如图 11-12 所示。分子中的腺嘌呤部分不直接参与氧化还原过程。

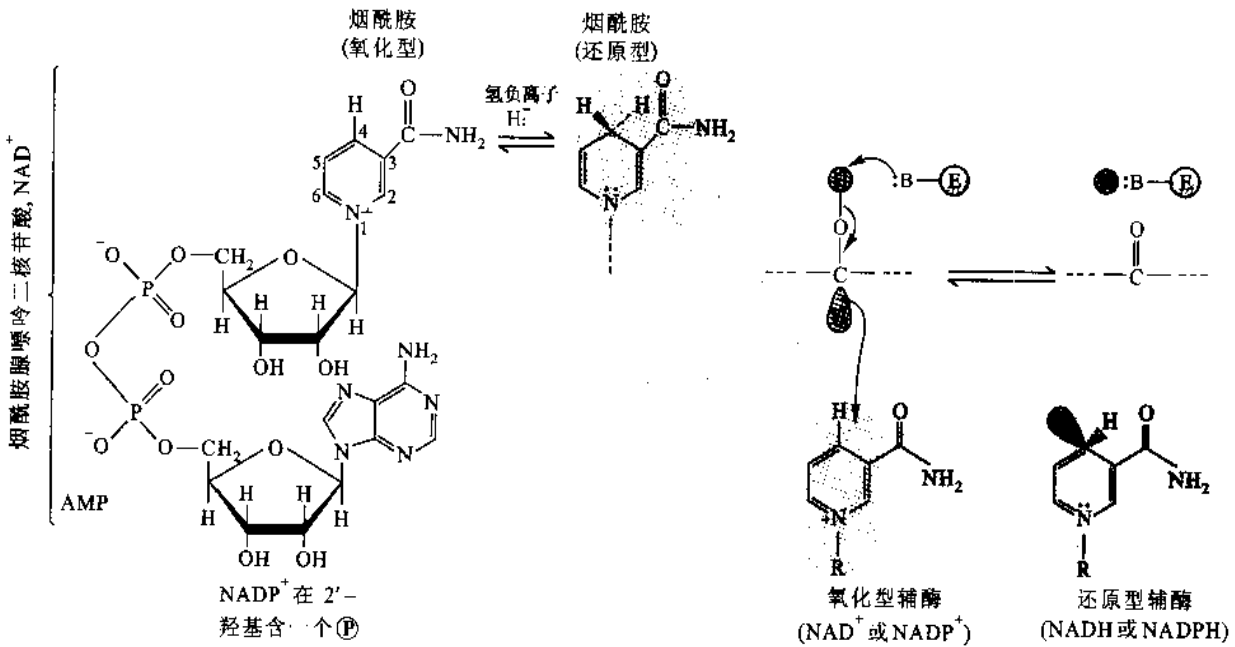


图 11-11 烟酰胺辅酶的结构和氧化-还原状态
氢负离子(H^- : 一个质子同两个电子)转移给 NAD^+ 产生 $NADH$

图 11-12 NAD^+ 和 $NADP^+$ 参加两个电子的转移反应
乙醇通过氢化物转移给 $NAD(P)^+$ 被氧化成酮或者醛

依赖于 NAD^+ 和 $NADP^+$ 的脱氢酶至少催化 6 种不同类型的反应:简单的氢转移,氨基酸脱氨生成 α -酮酸, β -羟酸氧化随后 β -酮酸中间物脱羧,醛的氧化,双键的还原,碳-氮键的氧化(像二氢叶酸还原酶)。这 6 种反应类型总结于图 11-13,并列出一类型酶促反应的例子。

NAD^+ 是呼吸链中传递氢过程中的一环,在多数情况下代谢物上脱下的氢先交给 NAD^+ ,使之成为 $NADH$ 和 H^+ ,然后再把氢交给黄素蛋白中的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN),再通过呼吸链的传递,最后交给氧。但也存在另一种情况,即代谢物上的氢先交给 NAD^+ 或 $NADP^+$,生成还原型的 $NADH$ 或 $NADPH$,后者再将氢去还原另一个代谢物。因此通过 NAD^+ 或 $NADP^+$ 的作用,可以使某些反应起偶联的作用。此外, NAD^+ 也是 DNA 连接酶的辅酶,对 DNA 的复制有重要作用,为形成 3',5'-磷酸二酯键提供所需要的能量。

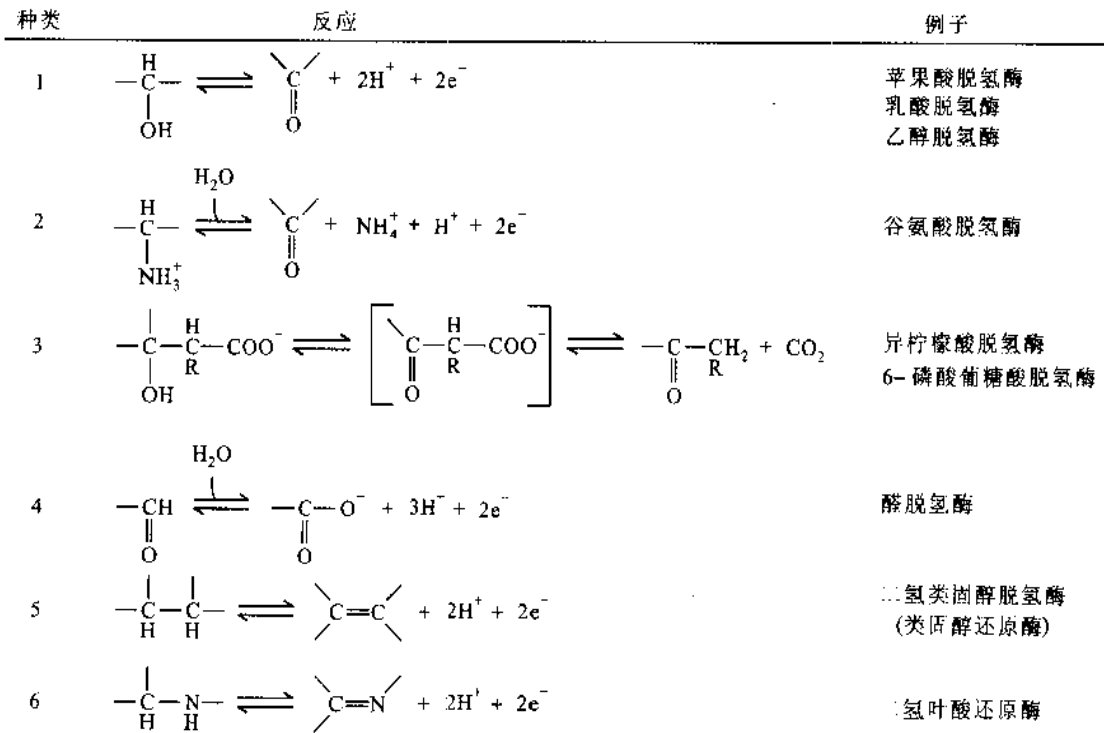


图 11-13 6类依赖 NAD(P)⁺的酶反应

(三) 维生素 B₂ 和黄素辅酶

维生素 B₂ 又名核黄素(riboflavin),是核醇与 7,8-二甲基异咯嗪的缩合物。由于在异咯嗪的 1 位和 5 位 N 原子上具有两个活泼的双键,易起氧化还原反应,故维生素 B₂ 有氧化型和还原型两种形式,在生物体内氧化还原过程中起传递氢的作用。

在体内核黄素是以黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)形式存在(图 11-14),是生物体内一些氧化还原酶(黄素蛋白)的辅基,与蛋白部分结合

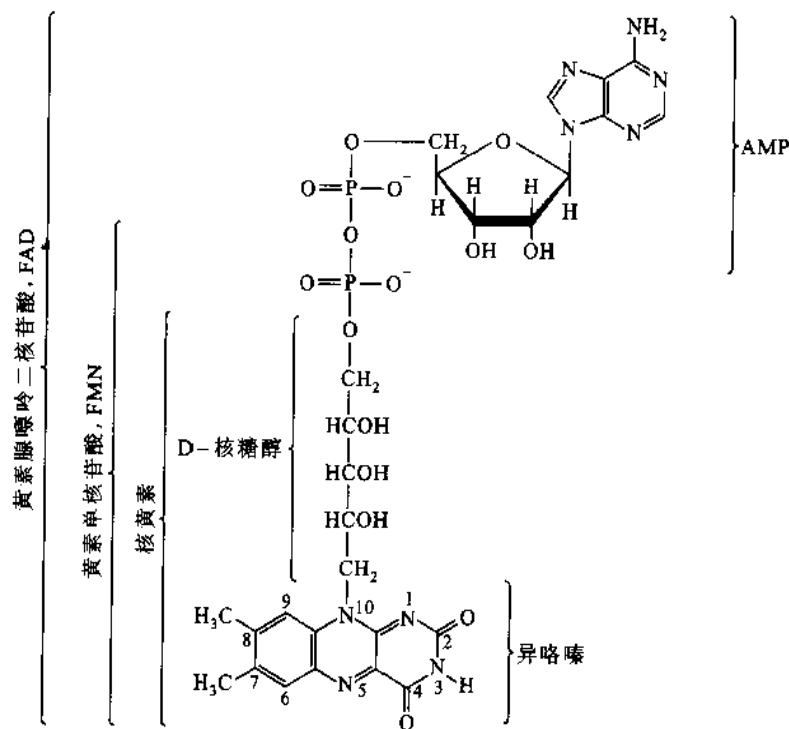
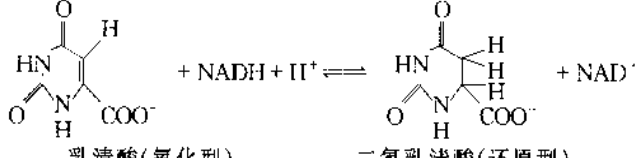


图 11-14 核黄素、黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)的结构

很牢。典型的解离常数在 $10^{-8} \sim 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 因此发现在大多数细胞中游离的黄素辅酶浓度水平很低。甚至在有机体许多依赖于烟酰胺辅酶(NADH 和 NADPH)的氧化还原循环中, 黄素辅酶也起到重要的作用。黄素是比 NAD^+ 和 NADP^+ 更强的氧化剂, 能被 1 个电子和 2 个电子途径还原, 并且很容易被分子氧重氧化。黄素蛋白可以进行许多种类的氧化-还原反应, 如表 11-2 所示。

表 11-2 黄素蛋白催化的反应

黄素蛋白类型	催化的反应
脱氢酶(dehydrogenase)	
酰基-CoA 脱氢酶(acyl-CoA dehydrogenase)	$\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\text{SCoA} + [\text{FAD}] \rightleftharpoons \text{RCH}=\text{CHCO}-\text{SCoA} + [\text{FADH}_2]$
谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase)	$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
双加氧酶(dioxygenase)	
2-硝基丙基双加氧酶(2-nitropropane dioxygenase)	$2(\text{CH}_3)_2\text{CHNO}_2 + \text{O}_2 \rightleftharpoons 2(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{O} + 2\text{NO}_2$
黄素氧化蛋白(flavodoxin)	
梭状芽孢杆菌黄素氧化蛋白(<i>Clostridium flavodoxin</i>)	1· 电子传递
金属黄素酶(metalloflavoenzyme)	
二氢乳酸脱氢酶(<i>Clostridium oroticum</i> dihydroorotate dehydrogenase)	
	
单加氧酶(monooxygenase)	
乳酸氧化酶(lactate oxidase)	$\text{H}_3\text{C}-\text{CHOH}-\text{COO}^- + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{H}_3\text{C}-\text{COO}^- + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$
氧化酶(oxidase)	
葡萄糖氧化酶(glucose oxidase)	$\text{D-葡萄糖} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{D-葡萄糖酸内酯} + \text{H}_2\text{O}_2$

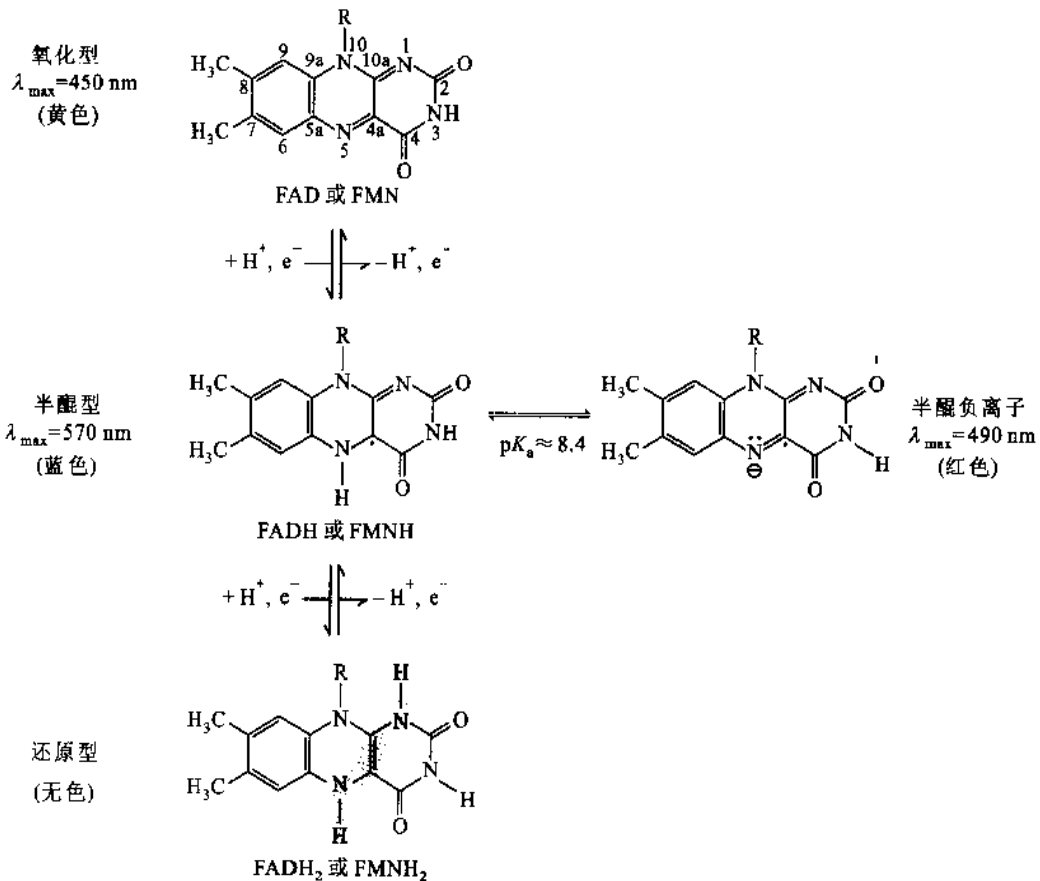


图 11-15 FAD 和 FMN 的氧化还原态

黄素辅酶能以 3 种不同氧化还原状态的任一种形式存在。通过 1 个电子转移将完全氧化型的黄素转变成半醌(semiquinone),如图 11-15。在生理 pH 时,半醌是一个中性基, λ_{\max} 570 nm 蓝色,半醌的 pK_a 大约 8.4。在高 pH 时,半醌失去 1 个质子,变成 1 个负离子基, λ_{\max} 490 nm 为红色。第二个电子转移将半醌变成完全还原型二氢黄素,如图 11-15 所示。

黄素辅酶通过 3 种不同的氧化还原状态可以参加 1 个电子和 2 个电子转移反应。在一定程度上,黄素蛋白催化生物系统中许多不同的反应,能和许多不同的电子受体和供体一同工作。包括如像 NAD^+ 和 $NADP^+$ 二电子受体/供体,醌(quinone) 一或二电子载体,再如细胞色素蛋白一电子受体/供体。呼吸电子传递链的许多成分是一电子受体/供体,黄素半醌状态的稳定性才使黄素蛋白在呼吸过程中作为有效的电子载体(见第 24 章)。

由于 FMN、FAD 广泛参与体内各种氧化还原反应,因此维生素 B_2 能促进糖、脂肪和蛋白质的代谢,对维持皮肤,粘膜和视觉的正常机能均有一定的作用。当维生素 B_2 缺乏时,引起口角炎、舌炎、唇炎、阴囊皮炎、眼睑炎、角膜血管增生等症状。临床上用于治疗因缺乏维生素 B_2 所引起的各种粘膜及皮肤的炎症等。

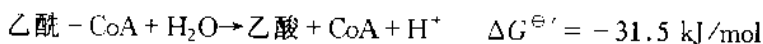
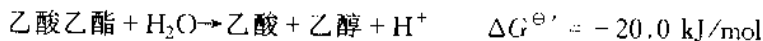
维生素 B_2 广泛存在于动、植物中。在酵母、肝、肾、蛋黄、奶及大豆中含量丰富。所有植物和很多微生物都能合成核黄素。

(四) 泛酸和辅酶 A

泛酸广泛存在于生物界,故又名遍多酸(pantothenic acid),是由 β -丙氨酸通过肽键与 α 、 γ -二羟基 β 、 β -二甲基丁酸缩合而成的一种有机酸。泛酸是辅酶 A(coenzyme A)和磷酸泛酰巯基乙胺的组成成分,辅酶 A 是泛酸的主要活性形式,常简称为 CoA,是由 3',5'-ADP 以磷酸酐键连接 4-磷酸泛酰巯基乙胺而成,而磷酸泛酰巯基乙胺由巯基乙胺连接 β 丙氨酸,再与支链二羧酸形成酰胺键(图 11-16)。如像烟酰胺和黄素辅酶,CoA 的腺苷酸部分作为识别部位的作用,增加结合 CoA 酶的亲和性和专一性。泛酸的另一种活性形式酰基载体蛋白(acylcarrier protein ACP),辅基 4-磷酸泛酰巯基乙胺以共价键与蛋白质分子上的丝氨酸羟基相连。

辅酶 A 主要起传递酰基的作用,是各种酰化反应中的辅酶。由于携带酰基的部位在 -SH 基上,故通常以 CoASH 表示。当携带乙酰基时形成 $CH_3CO-SCoA$,称为乙酰辅酶 A。当交出乙酰基后又恢复为 CoASH。辅酶 A 在糖代谢、脂质分解代谢、氨基酸代谢及体内一些重要物质如乙酰胆碱、胆固醇、叶啉和肝糖原等的合成中均起重要作用。酰基载体蛋白与脂肪酸的合成关系密切。

辅酶 A 的两个主功能是:通过亲核攻击转移活化的酰基;吸取一个质子活化酰基的 α -氢。这两种功能是通过 CoA 上活性的巯基来调节的,而巯基与酰基形成硫酯键。由 CoA 转移活化的酰基能够通过比较乙酰-CoA 硫酯键的水解与一种简单氧酯的水解来说明:



硫酯的水解比氧酯的水解更有利,可能是因为碳-硫键比相应的碳-氧键较少双键性质(图 11-17)。这意味着通过亲核由乙酰-CoA 转移乙酰基比从氧酯转移乙酰基更自发,因此可以说乙酰-CoA 具有高的基团转移能力(图 11-18)。

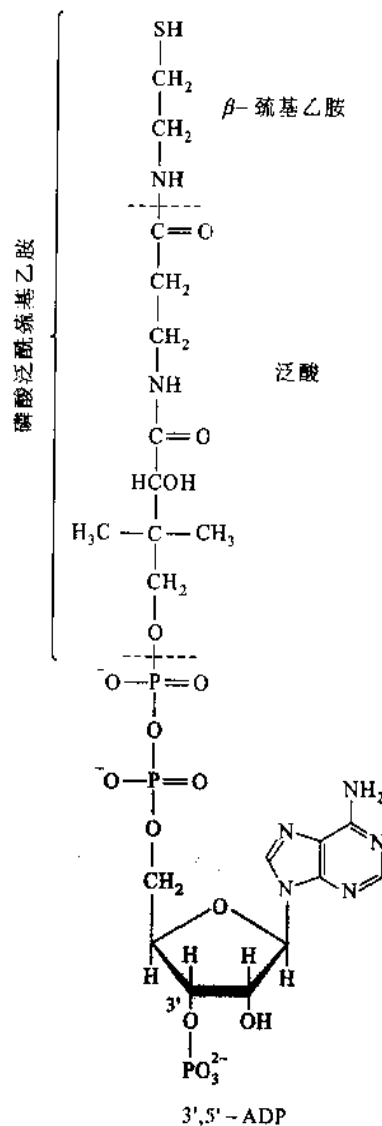


图 11-16 辅酶 A 的结构

酰基同 β -巯基乙胺部分的 -SH 基形成硫酯键

为了吸取硫酯活化的 α -氢,也可从图 11-17 共振形式得到了解。共振形式(2)以小的贡献使硫酯羰基处于相对不受干扰的状态(同氧酯相比较)。其结果,通过吸取质子形成的 α -碳负离子本身更容易共振稳定(图 11-19),这样烯醇负离子(enolate anion)对缩合反应起有效的亲核作用。

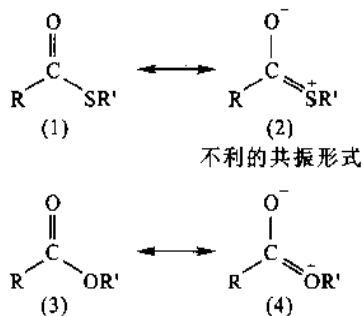


图 11-17 硫酯和氧酯的共振结构
碳-硫键比相应的碳-氧键较少双键性质

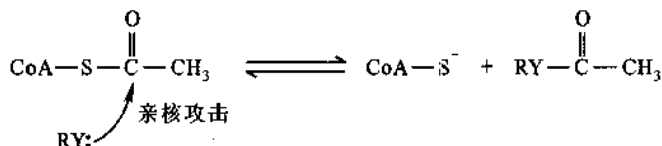


图 11-18 从酰基-CoA 转移酰基给亲核体
比从氧酯转移酰基更有利

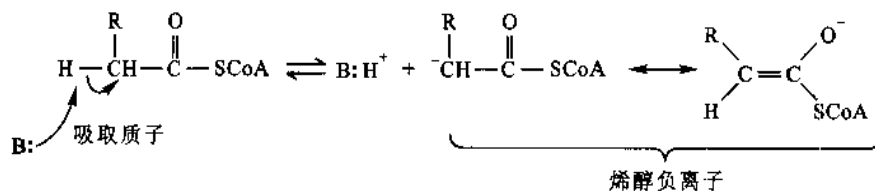


图 11-19 硫酯的 α -氢是酸性的,并且由于产生的碳负离子共振稳定容易被吸取。以此途径形成的烯醇负离子对于缩合反应容易亲核

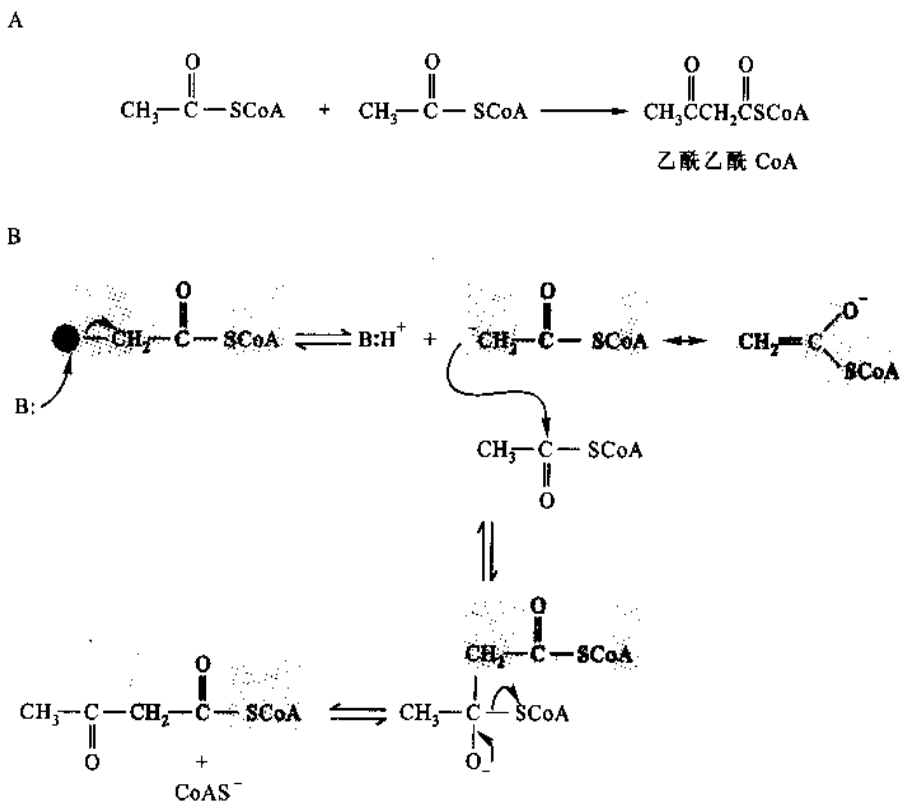


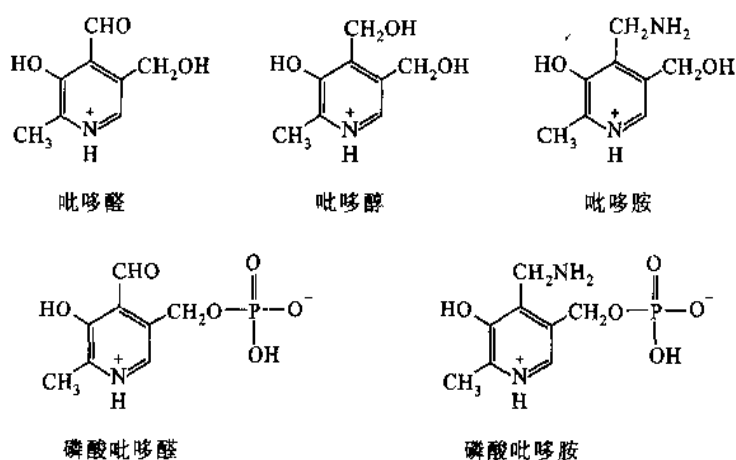
图 11-20 A. β -酮硫解酶的反应证明了酰基-CoA 的两种特殊性质:通过亲核攻击转移活化的酰基和 α -氢的酸性本质。B; 从一分子乙酰-CoA 除去 α -氢产生亲核的碳负离子,再攻击第二个分子乙酰-CoA 的羰基碳

酰基-CoA 的这两种特殊的性质在 β -酮硫解酶(β -ketothiolase)反应中一两分子乙酰-CoA 缩合成乙酰乙酰-CoA(acetoacetyl-CoA)是明显的(图 11-20)。从一分子乙酰-CoA 吸取质子产生容易攻击第二个乙酰 CoA 羰基碳的活性烯醇负离子,形成四面体中间物。CoA 硫酯负离子(CoA-S^-)从四面体中间物脱离产生需要的产物。

泛酸在酵母、肝、肾、蛋、小麦、米糠、花生和豌豆中含量丰富,在蜂王浆中含量最多。辅酶 A 被广泛用作各种疾病的重要辅助药物。

(五) 维生素 B₆ 和磷酸吡哆醛、磷酸吡哆胺

维生素 B₆ 包括 3 种物质,即吡哆醇(pyridoxine)、吡哆醛(pyridoxal)和吡哆胺(pyridoxamine),皆属于吡啶衍生物。维生素 B₆ 在体内以磷酸酯形式存在,磷酸吡哆醛(pyridoxal-5-phosphate, PLP)和磷酸吡哆胺(pyridoxamine-5-phosphate)是其活性形式,是氨基酸代谢中多种酶的辅酶。下面为维生素 B₆ 及其辅酶形式:



PLP 在生理条件下存在两种互变异构形式(图 11-21)。PLP 参加催化涉及氨基酸的各种反应,包括转氨作用, α -和 β -脱羧作用, β -和 γ -消除作用、消旋作用和羟醛反应(图 11-22)。这些反应包括断裂氨基酸 α -碳的任一键以及侧链的几种键。PLP 多方面的作用是由于能够(a)同氨基酸的 α -氨基形成稳定的 Schiff 碱(醛亚胺)加合物和(b)起一种有效电子减弱稳定反应中间物的作用。由 PLP 形成的 Schiff 碱和作为电子减弱的作用在图 11-23 中得到说明。在几乎所有依赖 PLP 的酶中,无底物时,PLP 同活性部位的赖氨酸 ϵ -NH₂ 基以 Schiff 碱结合,同到达的底物重排 Schiff 碱是一种转醛亚胺反应(transaldimination reaction)。对 PLP 的一个关键,是 Schiff 碱的质子化,通过 H 键合环氧而被稳定,增加了 C₅ 质子的酸性[图 11-23(3)所示]。失去 C₅ 质子所形成的碳负离子,由于电子离域作用进入吡啶环而被稳定,而吡啶环具有正电荷的环氮起电子减弱作用。另外重要的中间物就是通过 PLP 的醛碳质子化形成的,像图所示,产生一种新的底物——PLP Schiff 碱,它在转氨反应中起重要作用,并增加 C₃ 上质子的酸性,在 γ -消除反应中是很重要的。

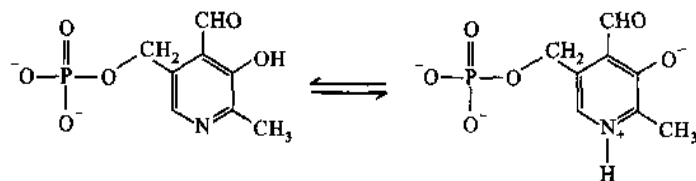


图 11-21 吡哆醛-5-磷酸(PLP)的互变异构形式

PLP-催化反应的各种机制中的每一个都应用了一个或多个中间物,如图 11-23 所显示的。例如,转氨作用是通过 C₅ 失去质子被促进的,随后经醛亚胺-酮亚胺同分异构,酮亚胺 Schiff 碱水解产生 α -酮酸和磷酸吡哆胺。再同第二个底物另外 α -酮酸形成 Schiff 碱,随后通过可逆的过程给出产物氨基酸。

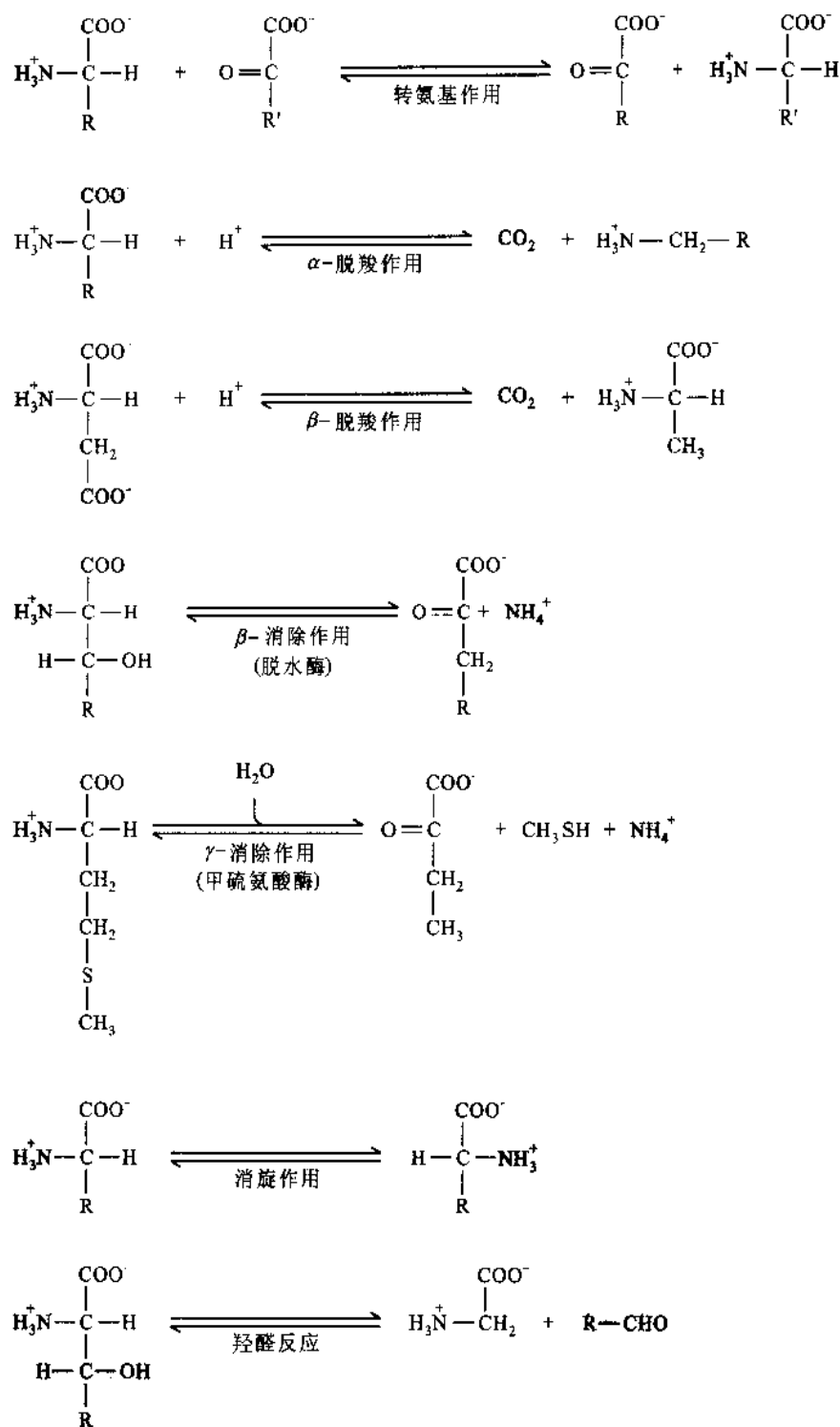


图 11-22 吡哆醛·5-磷酸催化的 7 种反应

多数普通氨基酸经历 α -脱羧反应,例如,在脑中重要的神经递质 γ -氨基丁酸、多巴胺和组胺都是通过谷氨酸,3,4-二羟苯丙氨酸(DOPA)和组氨酸分别 α 脱羧形成的。 α -脱羧是由电子离域作用进入吡啶环而促进的。在 α -脱羧中,原来氨基酸的 C_α 氢被保留,与此相反,在转氨作用中,这个质子被失去。

维生素 B_6 在动植物中分布很广,谷类外皮含量尤为丰富。因为食物中富含维生素 B_6 ,同时肠道细菌可以合成维生素 B_6 供人体需要,所以人类很少发生维生素 B_6 缺乏病。

(六) 维生素 B_{12} (氰钴胺素)及其辅酶

维生素 B_{12} 或称作氰钴胺素(cyanocobalamin)在体内转变成 2 种辅酶形式。主要辅酶形式是 5'-脱

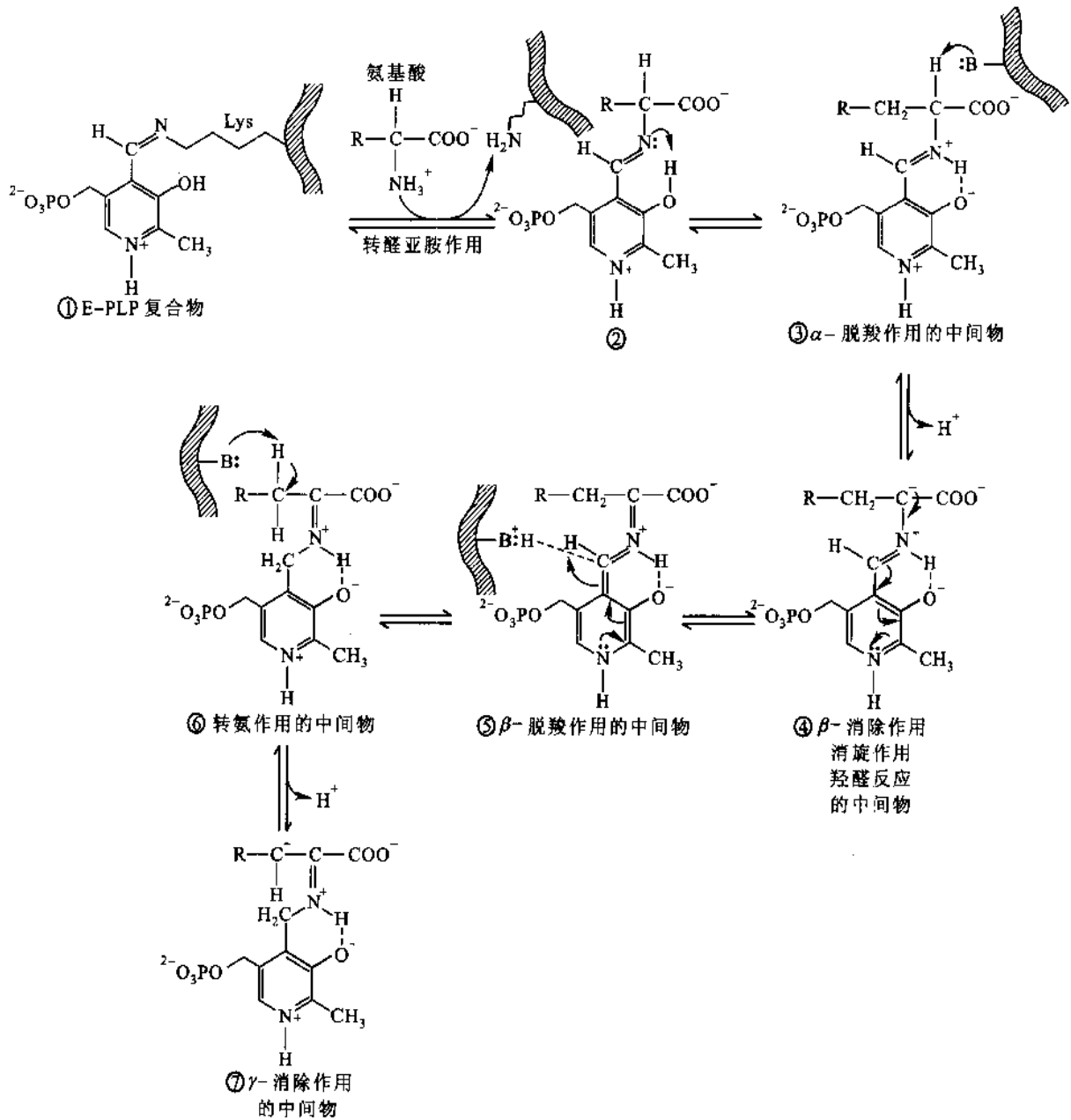


图 11-23 吡哆醛-5-磷酸同氨基酸形成稳定的 Schiff 碱加合物，
并起一种有效电子减弱稳定种种反应中间物的作用

氧腺苷钴胺素(5'-deoxyadenosylcobalamin)(图 11-24),而少量的甲基钴胺素(methylcobalamin)也存在于肝中。1961 年 Hodgkin 等人用 X 射线晶体结构分析方法,测定了 5'-脱氧腺苷钴胺素的晶体结构,1964 年 Hodgkin 获得诺贝尔化学奖。该结构由一个咕啉环和中心一个钴离子构成。具有 4 个吡咯基的咕啉环除了 2 个吡咯环直接相连外,与血红素卟啉环(heme porphyrin ring)相类似,如像卟啉次甲基形成另外的吡咯-吡咯连接。钴同 4 个吡咯氮相配位,钴轴向的一个配位是二甲基苯并咪唑基的氮,另一个轴向配位可以是一-CN、-CH₃、-OH 或者 5'-脱氧腺苷基的 5'-碳,由此决定辅酶的形式。5'-脱氧腺苷钴胺素 Hodgkin 结构的最显著特点是钴-碳键距离 0.205 nm。这个键是明显的共价键而且该结构事实上是烷基钴。Co-碳-碳键角为 130°,表明有部分离子特性。

维生素 B₁₂ 辅酶参与 3 种类型的反应(图 11-25):

① 分子内重排,② 核苷酸还原成脱氧核苷酸(在某些细菌中)和,③ 甲基转移。

头两种反应是由 5'-脱氧腺苷钴胺素调节的,而甲基转移是通过甲基钴胺素来实现的。核苷酸还原酶的机制将在第 33 章中讨论,以四氢叶酸作为辅酶的甲基转移将在本节后面叙述。

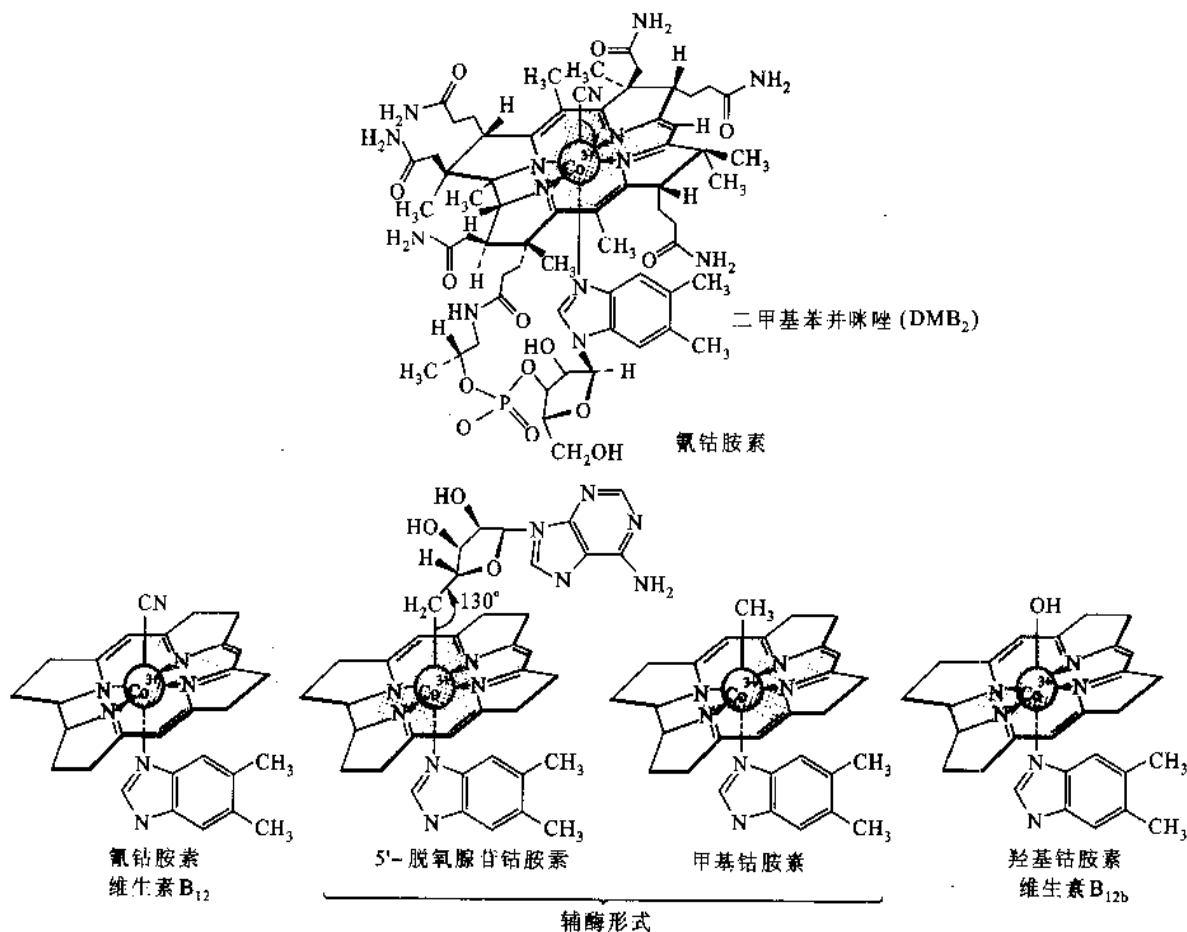


图 11-24 氰钴胺素的结构(上面)和几种维生素 B₁₂ 辅酶的简化结构

5'-脱氧腺苷钴胺素的 Co-C 键是明显的共价键但有某些离子特性

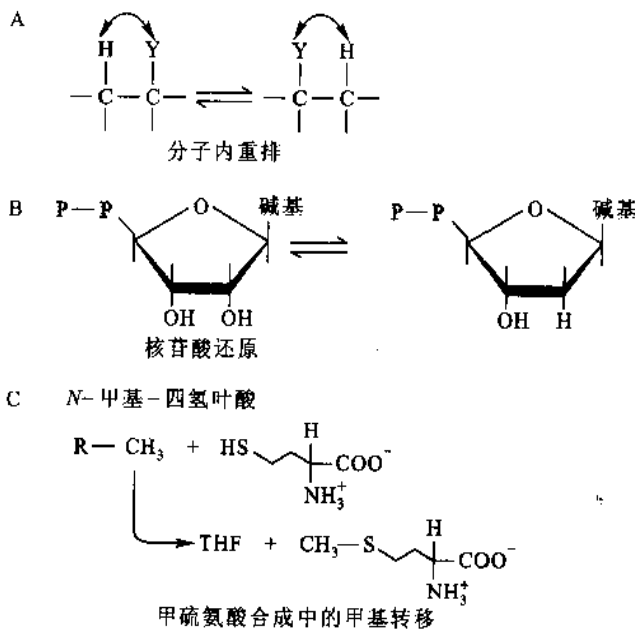


图 11-25 维生素 B₁₂ 作为辅酶在分子内重排、核苷酸还原和甲基转移中的功能

无活性的维生素 B₁₂ 转变成活性的 5'-脱氧腺苷钴胺素要通过 3 个步骤(图 11-26), 2 种黄素蛋白还原酶将氰钴胺素中的 Co³⁺ 顺序转换成 Co²⁺, 而后变成 Co⁺ 状态。Co⁺ 是一种极有力的亲核体, 它攻击

如图所示的 ATP 的 5'-碳, 除去三磷酸负离子形成 5'-脱氧腺苷钴胺素。由于 Co^+ 的 2 个电子供给 C_5 碳键, 在活性辅酶中转换成 Co^{3+} 的氧化态。这是在生物系统中所知道的腺苷转移中两个中的一个(即亲核攻击 ATP 的核糖 5'-碳), 另一个是 S-腺苷甲硫氨酸的形成(见下册第 31 章)。

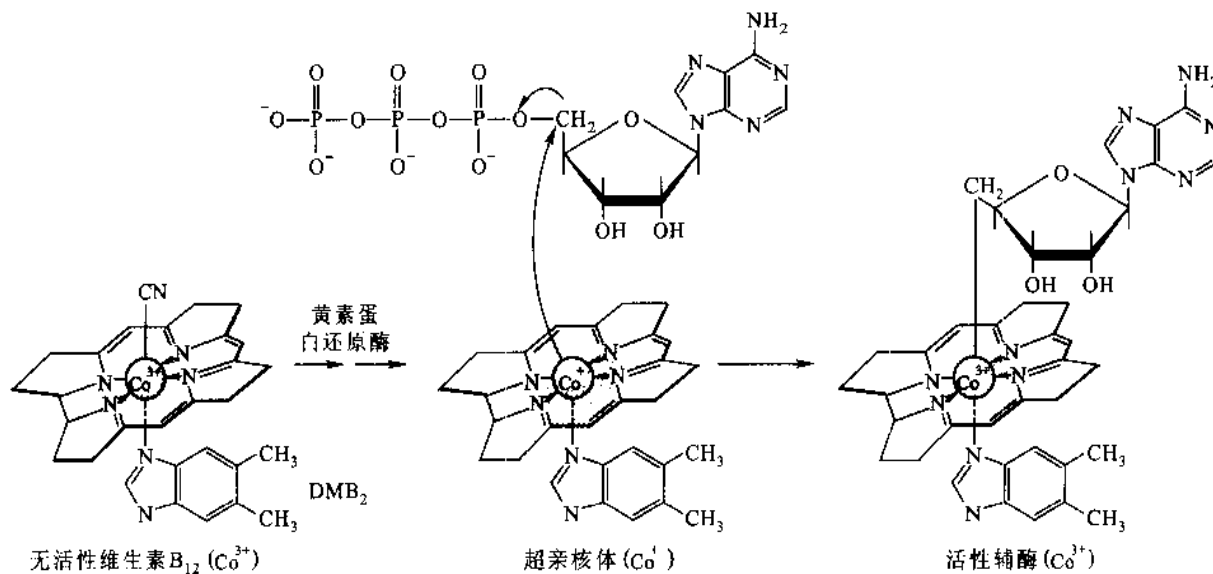


图 11-26 从无活性的维生素 B_{12} 生成活性 5'-脱氧腺苷钴胺素是通过黄素蛋白还原酶的作用起始的产生的 Co^+ 作为一种超亲核体在独特的腺苷转移中攻击 ATP 的 5'-碳

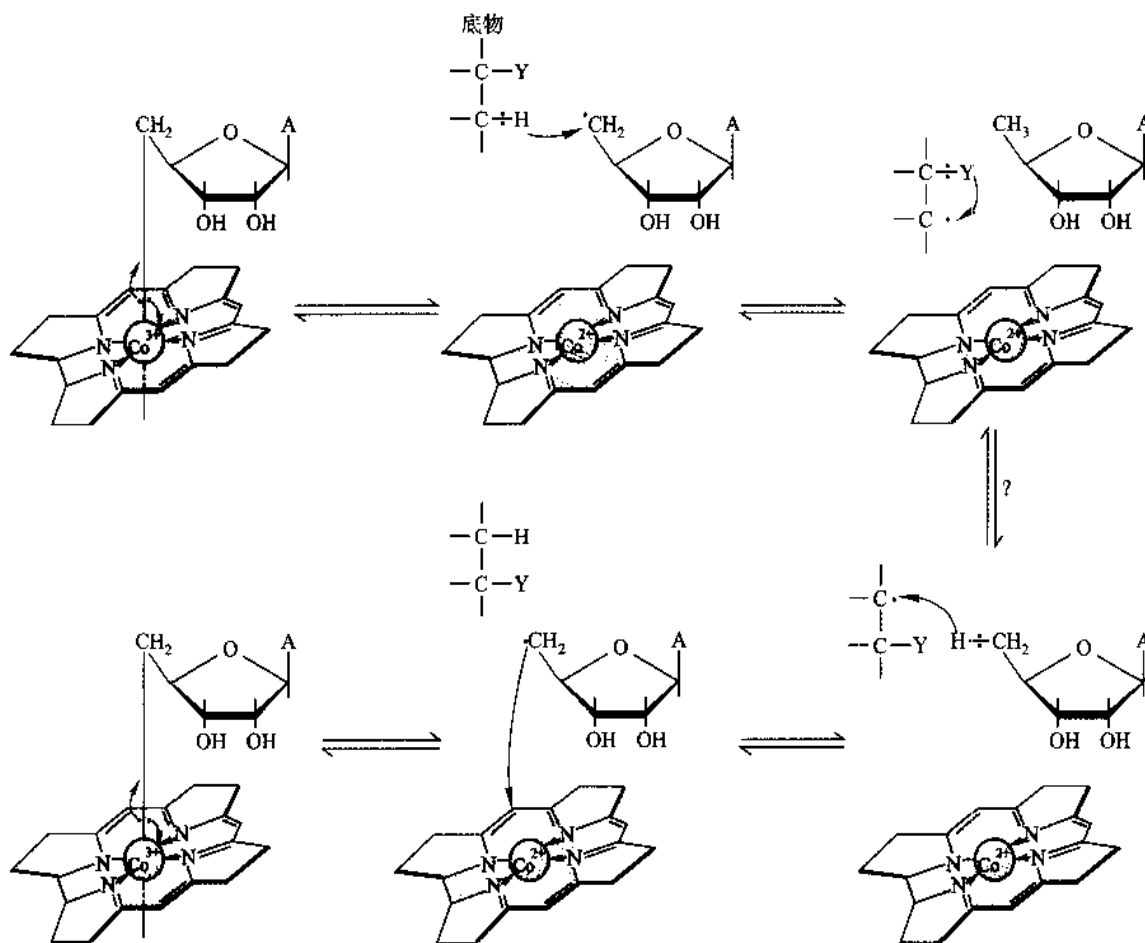


图 11-27 维生素 B_{12} 催化的分子内重排包括氢和邻近碳原子另外取代基的交换

被维生素 B₁₂ 催化的分子内重排包括氢和邻近碳上另外取代基的交换,重排的机制包括如图 11-27 所示的 C_α-C_β 键的裂解,钴还原成 Co²⁺ 状态,产生一个 -CH₂· 基,从底物吸取氢原子,形成 5'-脱氧腺苷,并脱离底物上的基团(未成对电子)。该中间物重排,·Y· 从一个碳原子移动到另一个碳原子,随后氢原子从 5'-脱氧腺苷的甲基转移,而 5'-脱氧腺苷钴胺素再生。这种重排的几个例子如表 11-3 所示。

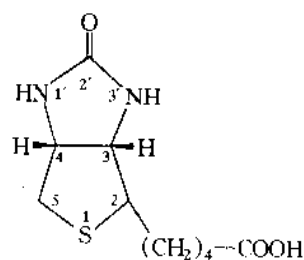
维生素 B₁₂ 参与 DNA 的合成,对红细胞的成熟很重要,当缺少维生素 B₁₂ 时,巨红细胞(见本章“(八)叶酸”倒数第 2 段)中 DNA 合成受到障碍,影响了细胞分裂不能分化成红细胞,易引起恶性贫血。维生素 B₁₂ 广泛来源于动物性食品,特别是肉类和肝中含量丰富。人和动物的肠道细菌都能合成,故一般情况下不会缺少维生素 B₁₂。

表 11-3 维生素 B₁₂ 催化的典型重排反应

酶	催化的反应
谷氨酸变位酶 (glutamate mutase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶 (methylmalonyl-CoA mutase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{SCoA} \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{SCoA} \end{array}$
α-甲烯戊二酸变位酶 (α-methyleneglutarate mutase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} \rightleftharpoons \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{C}-\text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$
二醇脱水酶 (diol dehydrase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O}$
甘油脱水酶 (glycerol dehydrase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O}$
乙醇胺氨裂合酶 (ethanolamine ammonia-lyase)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{OH} \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{O} \end{array} + \text{NH}_4^+$

(七) 生物素

生物素(biotin)是由噻吩环和尿素结合而成的一个双环化合物,左侧链上有一分子戊酸,结构如下:

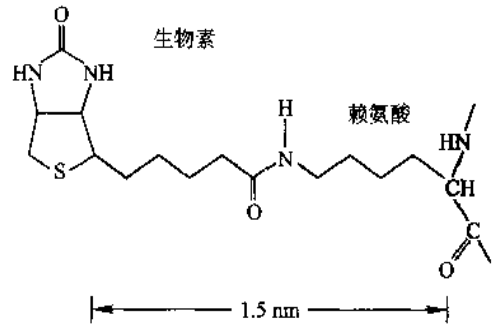


生物素在种种酶促羧化反应中作为活动羧基载体(mobile carboxyl group carrier)。生物素作为辅基通过蛋白质上赖氨酸残基的 ε-氨基共价结合到酶上(图 11-28)。生物素-赖氨酸功能系指生物胞素基

(biotin residue)。其结果生物素环被一个长的,柔性的链束缚到蛋白质上,在这个链中 10 个原子把生物素环和赖氨酸 α -碳原子分开大约 1.5 nm。该链允许生物素在酶活性部位的一个亚位(subsite)上接受羧基,并释放给另一个亚位上底物受体。

多数依赖生物素的羧化作用,用碳酸氢盐作为羧化剂并转移羧基给底物碳负离子(表 11-4)。碳酸氢盐在生物体液中含量丰富,但它是一种弱的亲核体,必须通过底物碳负离子的攻击被活化。活化作用是由 ATP 驱动的,并且包括形成羧基-磷酸中间体——一种碳酸和磷酸的混合酸酐(图 11-29)。

所有依赖生物素的酶类是多聚体,表现为乒乓(ping-pong)动力学。 N -羧基生物素的形成和它的破坏发生在酶活性部位的不同亚位(subsite)上。生物素结合酶的位置代表酶活性部位的第三亚位,某些依赖生物素的酶在一条多肽链上携带所有的 3 个亚位,但是许多生物素酶是由单功能亚基的聚集体构成,具有羧化作用的亚位,羧基载体亚位和羧基转移酶亚位,每一种存在于各自的蛋白质亚基上。例如:*E. coli* 乙酰-CoA 羧化酶是由 3 种亚基组成的,即生物素羧化酶(biotin carboxylase)是相对分子质量为 100×10^3 亚基的二聚体,生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein BCCP)

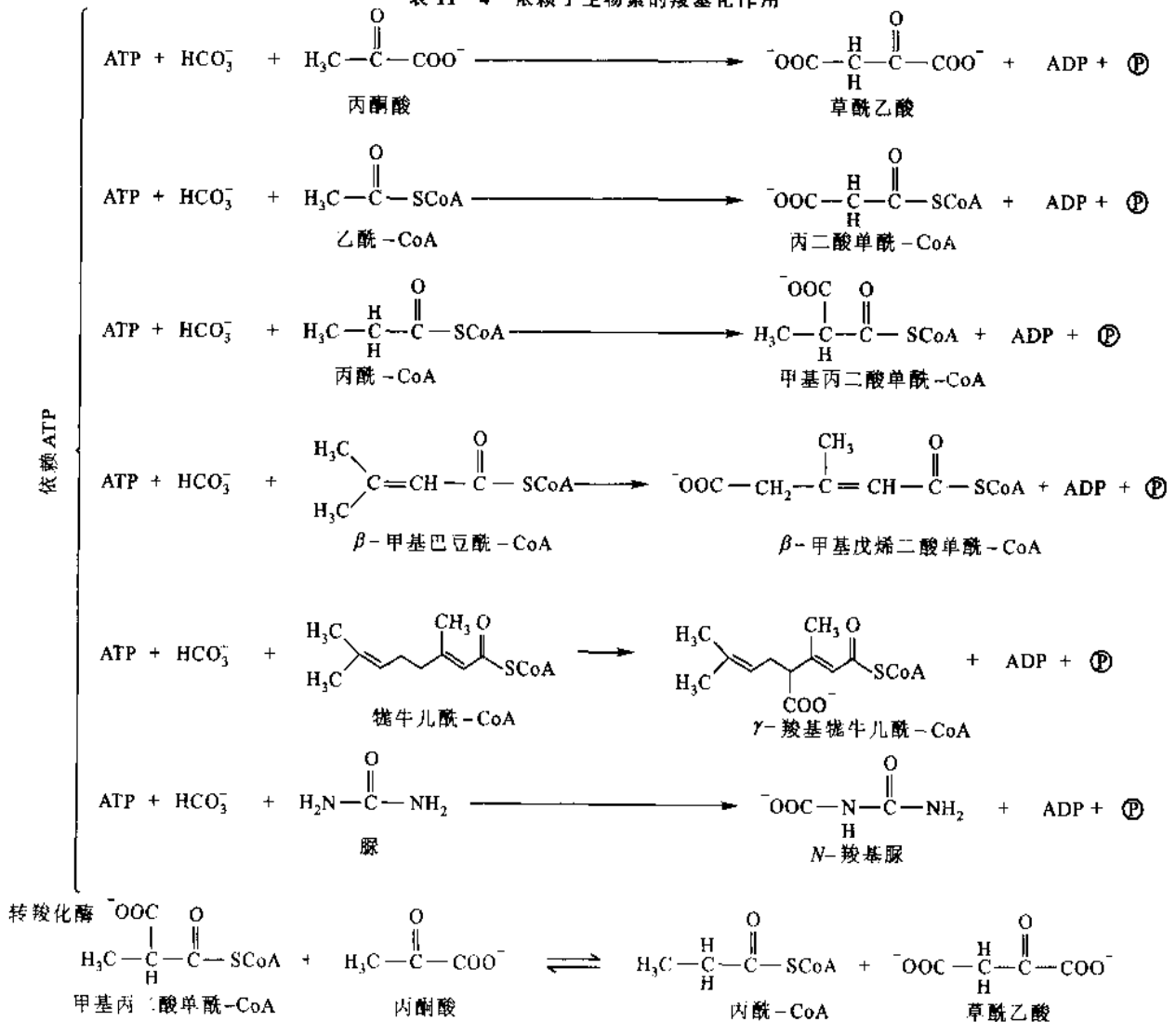


生物素-赖氨酸(生物胞素)复合物

图 11-28 生物素通过赖氨酸残基的 ϵ -氨基共价联结蛋白质

生物素环被 10 个原子链束缚到蛋白质上,依赖生物素的酶在此距离位置间行使携带羧基的功能

表 11-4 依赖于生物素的羧基化作用



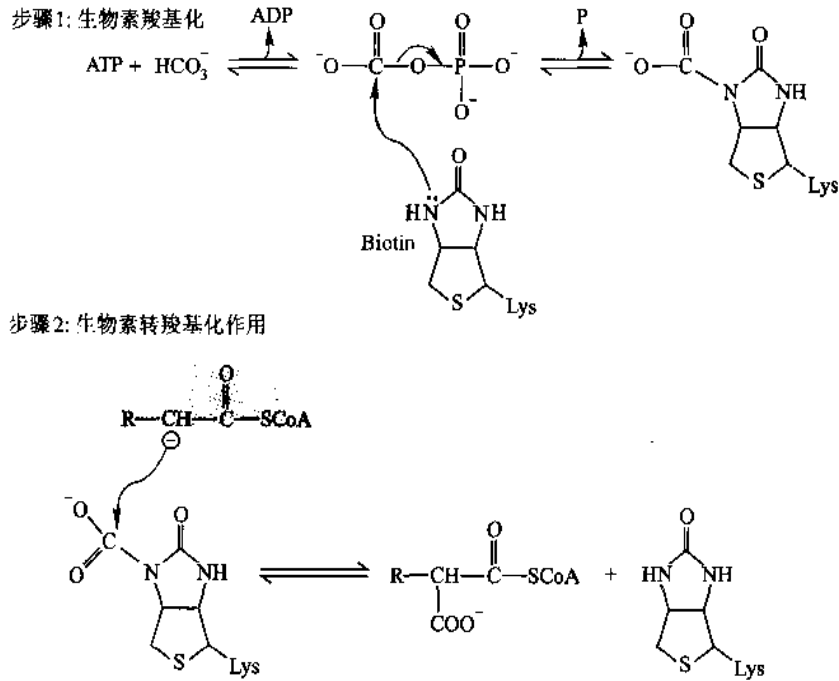


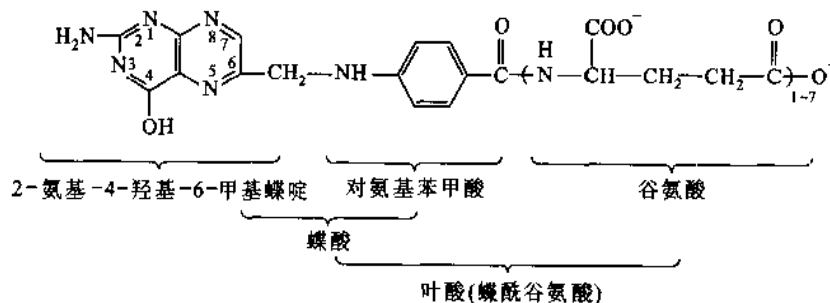
图 11-29 为了羧基化反应,碳酸氢盐通过形成 N -羧基生物素被活化。ATP 驱动反应向前,瞬间形成羧基-磷酸中间体(步骤 1)。在一个典型的依赖于生物素的反应中,亲核攻击 N -羧基生物素的羧基碳——一种转羧基化作用,产生羧基化产物(步骤 2)

是一个相对分子质量为 22×10^3 的单体,含有共价结合的生物素,而转羧化酶(transcarboxylase)是相对分子质量为 90×10^3 亚基的二聚体。因此生物素辅助因子通过 1.5 nm 长的柔性链攻击蛋白质,能够从羧化酶亚位携带活化的羧基到转羧化酶的亚位。

生物素来源广泛,如在肝、肾、蛋黄、酵母、蔬菜和谷类中都含有。肠道细菌也能合成供人体需要,故一般很少出现缺乏症。但大量食用生鸡蛋清可引起生物素缺乏。因为在新鲜鸡蛋白含有抗生物素蛋白(avidin),它能与生物素结合成无活性又不易消化吸收的物质,鸡蛋加热后这种蛋白质即被破坏。另外,长期服用抗生素治疗可抑制肠道正常菌丛,也可造成生物素缺乏。

(八) 叶酸和四氢叶酸

叶酸(folic acid)最初是由肝脏中分离出的,后来发现绿叶中含量十分丰富,因此命名为叶酸。它是由 2-氨基-4-羟基-6-甲基蝶啶、对氨基苯甲酸和 L-谷氨酸三部分组成,又称蝶酰谷氨酸。



叶酸除了 CO_2 之外,是所有氧化水平碳原子一碳单位的重要受体和供体。四氢叶酸(tetrahydrofolic acid, THF)是叶酸的活性辅酶形式,称为辅酶 F(CoF),是通过二氢叶酸还原酶连续的还原叶酸而成(图 11-30)。四氢叶酸典型地含有 1 个到 7 个(甚至更多)以 γ -羧酰胺连接的谷氨酸。3 种不同氧化态的一碳单位可以连接到四氢叶酸的 N^5 或 N^{10} 氮上。如像表 11-5 所示的被 THF 携带的一碳单位以甲醇、甲醛或甲酸的氧化水平存在(碳原子氧化态分别为 -2, 0 和 2)。

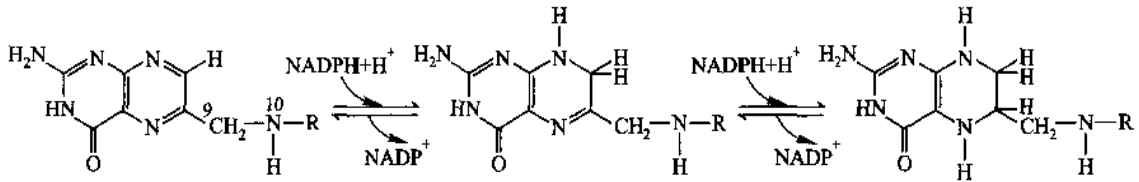


图 11-30 二氢叶酸还原酶反应

表 11-5 由四氢叶酸携带的一碳单位中碳的氧化态

氧化数目	氧化水平	一碳形式	四氢叶酸形式
-2	甲醇(最还原的)	-CH ₃	N ⁵ -甲基-THF
0	甲醛	-CH ₂ -	N ⁵ , N ¹⁰ -亚甲基-THF
2	甲醇(最氧化的)	-CH=O	N ⁵ -甲酰基-THF
		-CH=O	N ¹⁰ -甲酰基-THF
		-CH=NH	N ⁵ -亚胺甲基-THF
		-CH-	N ⁵ , N ¹⁰ -次甲基-THF

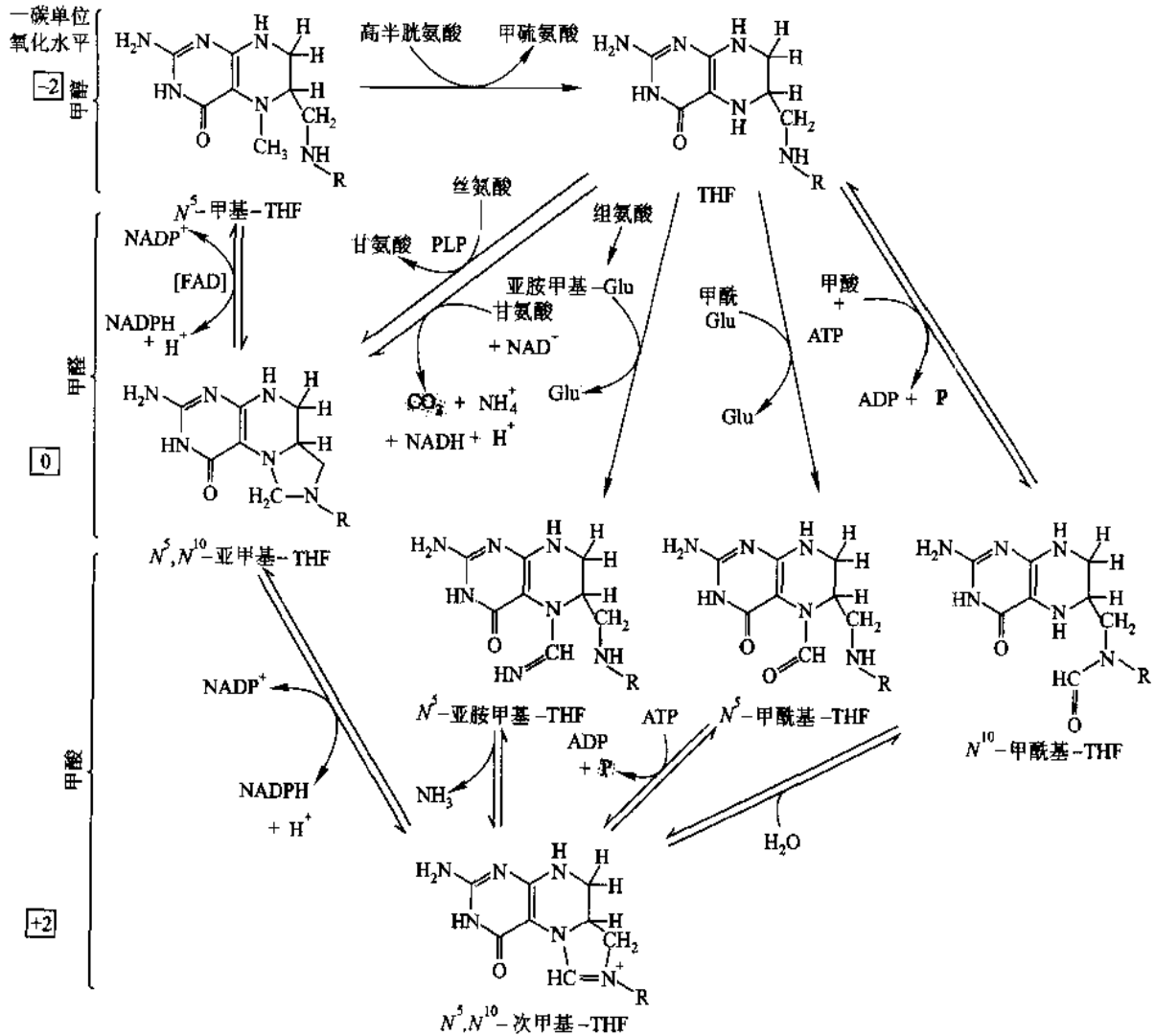


图 11-31 介绍一碳单位进入 THF 的反应

以 3 种不同的氧化态(-2, 0 和 +2)携带一碳单位连接成 7 种不同的叶酸中间体

图 11-31 详尽介绍了一碳单位进入 THF 和各种氧化态互变的全部酶促反应。 N^5 -甲基四氢叶酸能直接氧化成 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸, 再进一步氧化成 N^5, N^{10} -次甲基四氢叶酸。由 N^5, N^{10} -次甲基四氢叶酸形成 N^5 -亚胺甲基, N^5 -甲酰基和 N^{10} -甲酰基四氢叶酸(所有这些在同一氧化水平上), 或者能通过从四氢叶酸本身一碳加成反应形成。一碳单位并入四氢叶酸的主要途径是丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase)反应, 转换丝氨酸成甘氨酸和形成 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸。甘氨酸, 组氨酸和甲酸也是一碳单位的来源, 如图 11-31 所示。

对于甲硫氨酸, 嘌呤类和胸腺嘧啶的生物合成途径依赖于由四氢叶酸衍生物并入一碳单位(图 11-32)。甲硫氨酸的甲基是在依赖维生素 B_{12} 的反应中(见上)从 N^5 -甲基四氢叶酸得到的。胸苷酸合成酶(thymidylate synthase)的反应中在脱氧尿苷二磷酸(dUMP)的 C-5 位置上引入一个甲基而形成 dTMP。 N^{10} -甲酰基四氢叶酸和 N^5, N^{10} -亚甲基四氢叶酸是转甲酰酶(transferylase)反应的甲酰基供体。标出的嘌呤环的二个碳原子是来自 N^{10} -甲酰基四氢叶酸(图 11-32)。

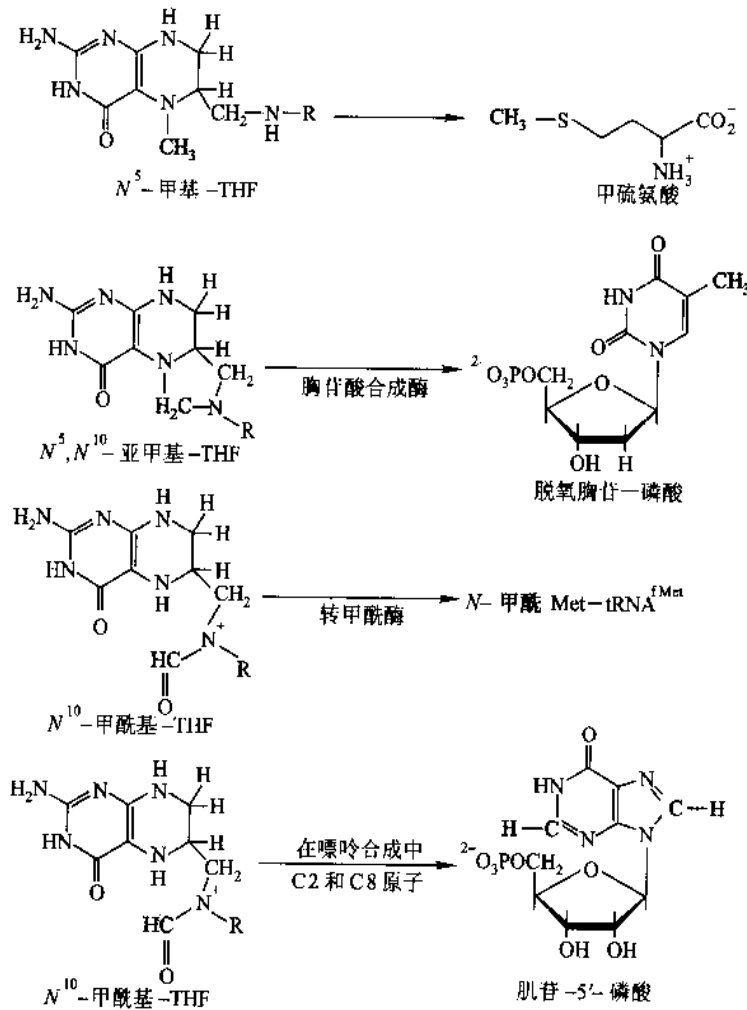


图 11-32 被 THF 形式催化的某些典型的一碳转移反应

能使叶酸、二氢叶酸和四氢叶酸相互转换的二氢叶酸还原酶近几年受到很大的注意, 因为它显然是几种抗肿瘤药物, 包括氨甲蝶呤(amethopterin 或 methotrexate)和氨基蝶呤的作用部位(图 11-33)。这些分子是二氢叶酸还原酶有力的抑制剂。因为细胞生长需要一碳单位 THF 化合物合成嘌呤和胸腺嘧啶, 氨甲蝶呤及其类似物是肿瘤生长的有效阻断物。这些药物对正常细胞也有毒性, 氨甲蝶呤也仅能用于短期治疗。

由于叶酸与核酸的合成有关, 当叶酸缺乏时, DNA 合成受到抑制, 骨髓巨红细胞中 DNA 合成减少, 细胞分裂速度降低, 细胞体积较大, 细胞核内染色质疏松, 称巨红细胞, 这种红细胞大部分在骨髓内成熟前就

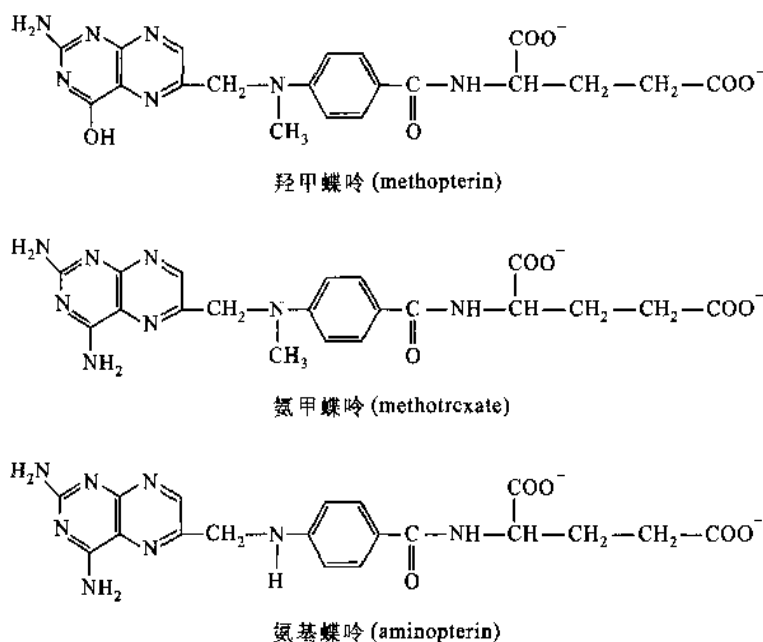


图 11-33 二氢叶酸还原酶的抑制剂是肿瘤生长的有效抑制剂

被破坏造成贫血,称巨红细胞性贫血(macrocytic anemia)。因此叶酸在临床上可用于治疗巨红细胞性贫血。

叶酸广泛存在于肝、酵母及蔬菜中,人类肠道细菌也能合成叶酸,故一般不易发生缺乏症。

(九) 硫辛酸

硫辛酸(lipoic acid)以闭环二硫化物形式和开链还原形式两种结构混合物存在(图 11-34),这两种形式通过氧化-还原循环相互转换,像生物素一样,硫辛酸事实上常常不游离存在,而是同酶分子中赖氨酸残基的 ϵ - NH_2 以酰胺键共价结合。催化形成硫辛酰胺键的酶需要 ATP,并且作为反应产物产生硫辛酰胺-酶偶联物,AMP 和焦磷酸。

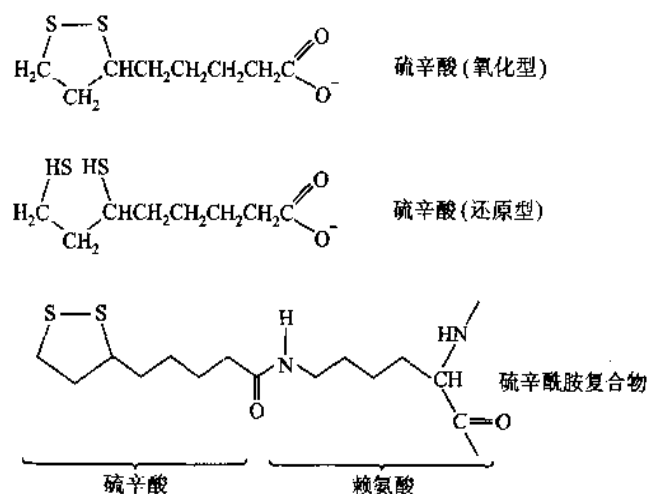
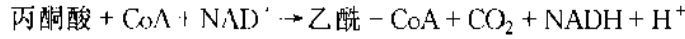


图 11-34 氧化型和还原型硫辛酸以及硫辛酸-赖氨酸偶联物的结构

硫辛酸是一种酰基载体。存在于丙酮酸脱氢酶(pyruvate dhydrogenase)和 α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase)中,是涉及糖代谢的两种多酶复合体。硫辛酸在 α -酮酸氧化作用和脱羧作用时行使偶联酰基转移和电子转移的功能。

被 Reed 广泛研究的 *E. coli* 丙酮酸脱氢酶是 60 个亚基构成的多酶复合体,包括 24 个丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase)(E_1)亚基(以每个相对分子质量为 192×10^3 的 12 个二聚体存在),它利用硫胺素焦磷酸为辅酶;24 个二氢硫辛酰转乙酰酶(dihydrolipoyl transacetylase)(E_2)亚基($M_r 70 \times 10^3$),每个亚基含一个赖氨酸连接的硫辛酰胺;和 12 个二氢硫辛酰脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase)(E_3)亚基(以 $M_r 112 \times 10^3$ 的 6 个二聚体存在),每个亚基含一个黄素辅基。转乙酰酶亚基形成一个立体核心,环绕排列着脱氢酶亚基。该多酶复合体通过丙酮酸氧化脱羧形成乙酰 CoA:



该反应机制涉及到 4 个不同的步骤(图 11-35)。第一步丙酮酸脱羧形成羟乙基-硫胺素焦磷酸(HETPP)。该中间物转移它的二碳单位到一个转乙酰酶亚基的硫辛酰胺基上。第二步,羟乙基被氧化形成乙酰二氢硫辛酰胺中间物,并释放出 TPP,该步涉及到 HETPP 共振稳定的碳负离子亲核攻击硫辛二硫化物,随后攻击的碳原子氧化给出乙酰-硫辛酰胺。第三步从硫辛酰胺转移乙酰基给 CoA 形成乙酰-CoA,离开还原的二氢硫辛酰胺。第四步,二氢硫辛酰胺被二氢硫辛酰脱氢酶重氧化(恢复二硫键形式),该反应涉及酶-结合 FAD(FAD 提供)和 E_3 亚基上活性二硫化物,结果 NAD^+ 最后还原成 NADH。整个反应是强的放能反应, $\Delta G^{\ominus'}$ 大约为 -33.5 kJ/mol 。

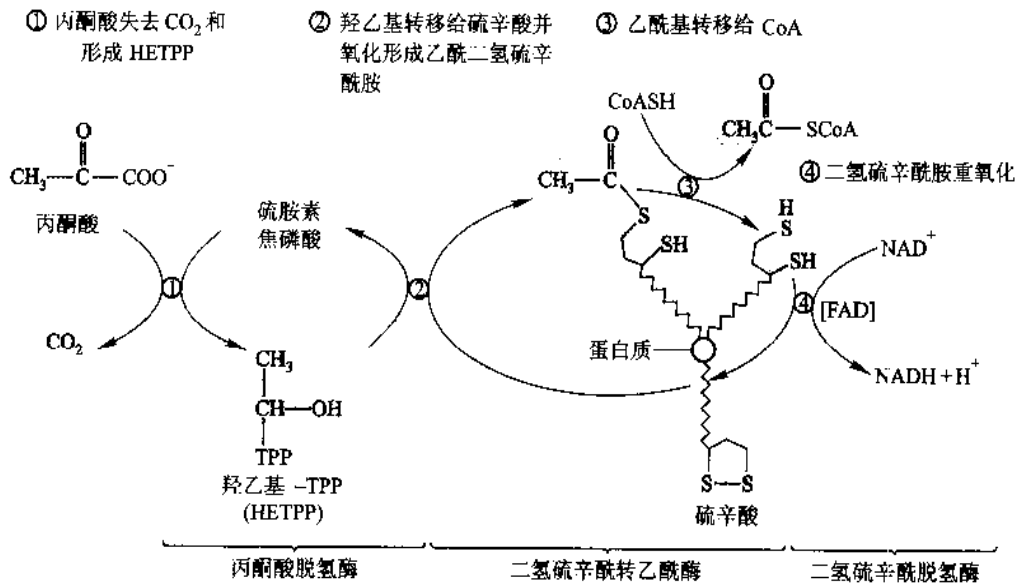
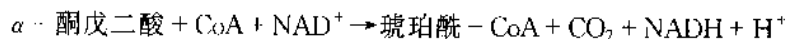


图 11-35 丙酮酸脱氢酶反应机制

丙酮酸脱羧产生羟乙基-TPP(步骤 1),在步骤 2 中转移二碳单位给硫辛酰胺,随后在步骤 3 中形成乙酰 CoA,在步骤 4 反应中硫辛酰胺重新氧化

在此复合物中硫辛酰胺基的作用是从 E_1 亚基上 TPP 携带乙酰基给 CoA。像是生物素的情况,硫辛酰胺基团伸出的侧链提供了可动性和柔性在该多酶复合体亚位(subsite)之间携带乙酰基。

在 *E. coli* 中一种类似的多酶复合体进行 α -酮戊二酸氧化脱羧作用:

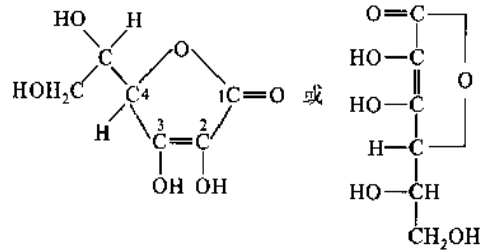


反应机制类似于上面所述的丙酮酸脱氢酶。 α -酮戊二酸脱氢酶由三种不同亚基组成,包括① α -酮戊二酸脱氢酶(α -ketoglutarate dehydrogenase),② 二氢硫辛酰转琥珀酰酶(dihydrolipoyl transsuccinylase)和③ 二氢硫辛酰脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase)。头两个是这个复合体独有的,但发现二氢硫辛酰脱氢酶亚基与丙酮酸脱氢酶复合体的完全相同。

硫辛酰胺在自然界广泛分布,肝和酵母中含量尤为丰富。在食物中硫辛酰胺常和维生素 B_1 同时存在。

(十) 维生素 C

维生素 C 具有防治坏血病的功能,故又称为抗坏血酸(ascorbic acid)。维生素 C 是一种含有 6 个碳原子的酸性多羟基化合物,分子中 C-2 及 C-3 位上两个相邻的烯醇式羟基易解离而释放 H⁺,所以维生素 C 虽无自由羧基,但仍具有有机酸的性质。维生素 C 的结构如下:



抗坏血酸于 1928 年首先由 Szent-Györgyi 分离得到的,Hirst 和 Haworth 在 1933 年测定了结构,同时,Reichstein 报道了它的合成,1937 年由于他们对维生素 C 的研究获得诺贝尔化学奖。

维生素 C 广泛分布于动物界和植物界,仅几种脊椎动物——人类和其他灵长类、豚鼠、一些鸟类和某些鱼类不能合成,所有这些有机体的肝脏中缺少 L-古洛糖酸-γ-内酯氧化酶(L-gulono-γ-lactone oxidase),因此不能合成抗坏血酸,必须从食物中获得抗坏血酸。如图 11-36 所示,抗坏血酸正常情况由葡萄糖醛酸经古洛糖酸和 L-古洛糖酸内酯合成。

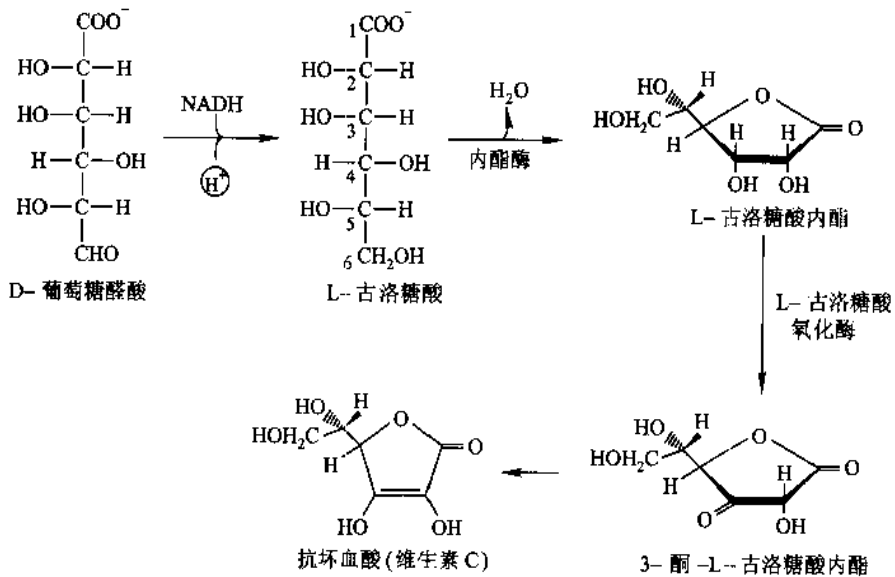
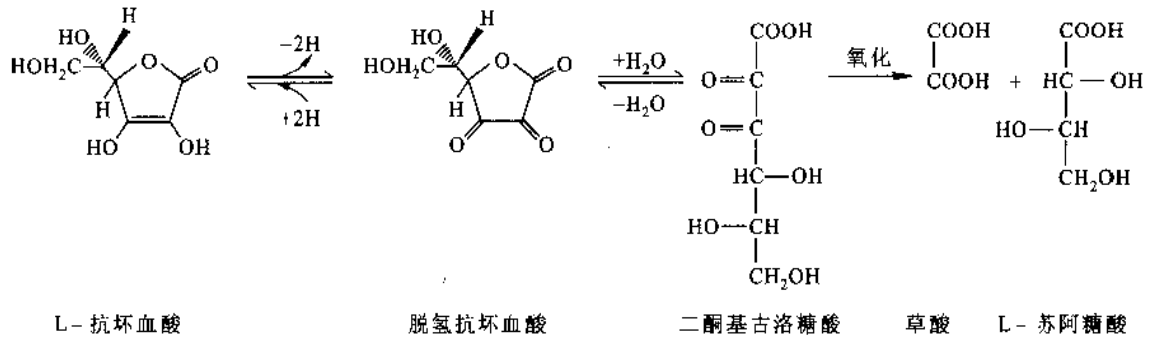


图 11-36 由葡萄糖醛酸合成抗坏血酸

肝脏产生 L-古洛糖酸-γ-内酯氧化酶的动物能合成抗坏血酸,而人类缺少这种酶

抗坏血酸是一种强的还原剂,抗坏血酸的生物化学和生理功能是由它的还原性质——作为一种电子载体所驱动的。由于同氧或者金属离子相互反应失去一个电子成为半脱氢-L-抗坏血酸(semidehydro-L-ascorbate),一种活性自由基,可被动物和植物中各种酶还原回 L-抗坏血酸(图 11-37)。抗坏血酸独特的反应是氧化成脱氢-L-抗坏血酸。抗坏血酸和脱氢抗坏血酸形式是一种有效的氧化还原系统。氧化型的抗坏血酸,仍具有维生素 C 的活力。但氧化型的抗坏血酸易水解,内酯环破坏而生成二酮基古洛糖酸,则失去维生素 C 的活性,如果继续氧化则生成草酸和 L-苏阿糖酸。

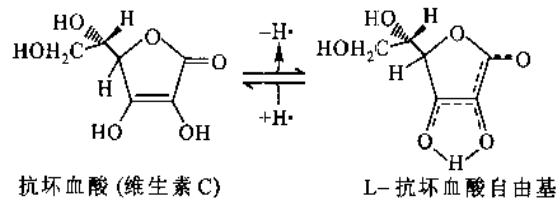


由于维生素 C 的 C-4 及 C-5 是两个不对称碳原子,因此有光学异构体,其中包括 D 型和 L 型。D 型维生素 C 一般不具抗坏血酸的生理功能,自然界存在的具有生理活性的是 L-型抗坏血酸。

维生素 C 的生理功能是多方面的,主要有:

1. 维生素 C 参与体内的氧化还原反应

由于维生素 C 既可以氧化型,又可以还原型存在于体内,所以它既可以作为氢供体又可作为氢受体,在体内极其重要的氧化还原反应中发挥作用。



(1) 保持巯基酶的活性和谷胱甘肽的还原状态,起解毒作用。已知许多含巯基的酶当存在自由巯基(-SH)时才发挥催化作用,而维生素 C 能使酶分子中的 SH 维持在还原状态,从而使巯基酶保持活性。维生素 C 还与谷胱甘肽的氧化还原有密切联系,它们在体内往往共同发挥抗氧化及解毒等作用。如膜脂的不饱和脂肪酸易被氧化成脂质过氧化物从而使细胞膜受损。还原型谷胱甘肽(GSH)可使脂质过氧化物还原,从而消除其对细胞的破坏作用。而维生素 C 在谷胱甘肽还原酶的催化下可使氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原,使 GSH 不断得到补充(图 11-38)。

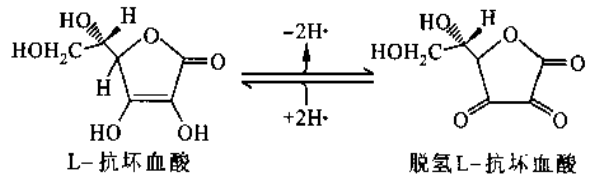


图 11-37 维生素 C 的生理效应是作为一种还原剂作用的结果,抗坏血酸的 2 个电子氧化产生脱氢抗坏血酸

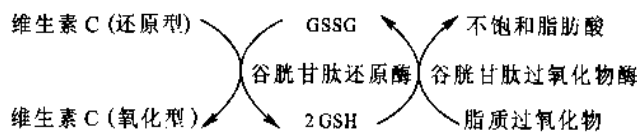


图 11-38 维生素 C 与谷胱甘肽的氧化还原反应

铅、汞等重金属离子(M^{2+})能与体内巯基酶类的 -SH 结合,使其失活,以致代谢发生障碍而中毒。维生素 C 可使 GSSG 还原为 GSH,后者与重金属离子结合排出体外,故维生素 C 能保护含巯基酶的一SH,具有解毒作用(图 11-39)。

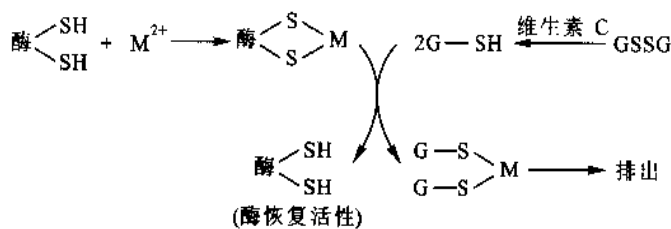


图 11-39 维生素 C 对重金属离子的解毒作用

(2) 维生素 C 与红细胞内的氧化还原过程有密切联系。红细胞中的维生素 C 可直接还原高铁血红蛋白(HbM)成为血红蛋白(Hb),恢复其运输氧的能力。

(3) 维生素 C 能促进肠道内铁的吸收,因为它能使难以吸收的三价铁(Fe^{3+})还原成易于吸收的二价铁(Fe^{2+});还能使血浆运铁蛋白中的 Fe^{3+} 还原成肝脏铁蛋白的 Fe^{2+} 。

(4) 维生素 C 能保护维生素 A、E 及 B 免遭氧化。还能促进叶酸转变为有生理活性的四氢叶酸。

2. 维生素 C 参与体内多种羟化反应

代谢物的羟基化是生物氧化的一种方式,而维生素 C 在羟基化反应中起着必不可少的辅助因子的作用:

(1) 促进胶原蛋白的合成 当胶原蛋白合成时,多肽链中的脯氨酸及赖氨酸等残基分别在胶原脯氨酸羟化酶及胶原赖氨酸羟化酶催化下羟化成为羟脯氨酸及羟赖氨酸残基。维生素 C 是羟化酶维持活性所必需的辅因子之一。羟脯氨酸在维持胶原蛋白三级结构上十分重要。羟赖氨酸的生理功能虽然还不很清楚,但已知胶原是一种糖蛋白,而这种糖蛋白链是连接在蛋白质的羟赖氨酸残基上。维生素 C 既与胶原合成中的羟化步骤有关,因而在缺乏时对胶原合成有一定的影响。胶原是结缔组织,骨及毛细血管等的重要组成成分,而结缔组织是伤口愈合的第一步。这说明维生素 C 缺乏将导致毛细血管破裂,牙齿易松动、骨骼脆弱而易折断及创伤时伤口不易愈合。

(2) 维生素 C 与胆固醇代谢的关系 正常情况下体内胆固醇约有 80% 转变为胆酸后排出。胆固醇转变为胆酸先将环状部分羟基化,而后侧链分解。缺乏维生素 C 可能影响胆固醇的羟基化,使其不能变成胆酸而排出体外。

(3) 维生素 C 参与芳香族氨基酸的代谢 维生素 C 在脑和中枢神经系统组织中起着几种重要的作用。在脑中 L-酪氨酸的代谢涉及到两种不同的依赖维生素 C 的混合功能氧化酶。*p*-羟苯丙酮酸双加氧酶(*p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase)能将酪氨酸转变为尿黑酸,中间物 *p*-羟苯丙酮酸的氧化和脱羧需要维生素 C。维生素 C 缺乏的个体则 *p*-羟苯丙酮酸分泌达异常高的水平。酪氨酸转变成儿茶酚胺也是依赖维生素 C 的过程。一系列的羟化和脱羧反应连续不断的形成多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素。多巴胺-去甲肾上腺素的转变是由依赖于维生素 C 的多巴胺- β -羟化酶(dopamine- β -hydroxylase)催化的。

3. 维生素 C 的其他功能

(1) 维生素 C 有防止贫血的作用,也可防止若干转运金属离子毒性的影响。离子从脾脏的转移(但不是肝脏)是一种依赖维生素 C 的过程。

(2) 维生素 C 可改善变态反应 维生素 C 另外一个重要作用是涉及组胺代谢和变态反应。在铜离子存在下,维生素 C 防止组胺的积累,有助于组胺的降解和清除。也有证据表明,维生素 C 可调节前列腺素的合成,以便调节组胺敏感性和影响舒张。

(3) 维生素 C 刺激免疫系统 因为维生素 C 影响刺激免疫系统,可防止和治疗感染。单核白细胞对免疫系统是重要的,维生素 C 抑制白血细胞的氧化破坏,增加它们的流动性。免疫球蛋白的血清水平在维生素 C 存在下增加。通过维生素 C 刺激免疫系统,因此 Pauling 曾提出维生素 C 可以有效的防止感冒,但随后的研究尚无定论。

以上介绍了脂溶性维生素和水溶性维生素及其辅酶的结构以及与代谢的关系,现将维生素的主要生理功能,来源及缺乏症总结于表 11-6。

表 11-6 重要维生素的生理功能、来源及缺乏症

名 称	主要生理功能	来 源	缺 乏 症
维生素 A(抗干眼病维生素,视黄醇)	1. 构成视紫红质	肝、蛋黄、鱼肝油、奶汁、绿叶蔬菜、胡萝卜、玉米等	夜盲症 干眼病 皮肤干燥
	2. 维持上皮组织结构健全与完整		
	3. 参与糖蛋白合成		
	4. 促进生长发育,增强机体免疫力		

续表

名 称	主要生理功能	来 源	缺乏症
维生素 D(抗佝偻病维生素, 钙化醇)	1. 调节钙磷代谢, 促进钙磷吸收 2. 促进成骨作用	鱼肝油、肝、蛋黄、日光照射皮肤可制造 D ₃	儿童: 佝偻病 成人: 软骨病
维生素 E(抗不育维生素, 生育酚)	1. 抗氧化作用, 保护生物膜 2. 与动物生殖功能有关 3. 促进血红素合成	植物油、苜蓿、豆类及蔬菜	人类未发现缺乏症, 临床用于习惯性流产
维生素 K(凝血维生素)	与肝脏合成凝血因子 II、VI、IX 和 X 有关	肝、鱼、肉、苜蓿、菠菜等, 肠道细菌可以合成	偶见于新生儿及胆管阻塞患者, 表现为凝血时间延长或血块回缩不良
维生素 B ₁ (硫胺素, 抗脚气病维生素)	1. α -酮酸氧化脱羧酶的辅酶 2. 抑制胆碱酯酶活性	酵母、豆、瘦肉、谷类外皮及胚芽	脚气病、多发性神经炎
维生素 PP(烟酸, 烟酰胺, 抗癞皮病维生素)	构成脱氢酶辅酶成分, 参与生物氧化体系	肉、酵母、谷类及花生等、人体可自色氨酸合成一部分	癞皮病
维生素 B ₂ (核黄素)	构成黄酶的辅基成分, 参与生物氧化体系	酵母、蛋黄、绿叶蔬菜等	口角炎、舌炎、唇炎、阴囊皮炎等
泛酸(遍多酸)	构成 CoA 的成分, 参与体内酰基转移作用	动植物细胞中均含有	人类未发现缺乏症
维生素 B ₆ (吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺)	1. 参与氨基酸的转氨作用, 脱羧作用 2. 氨基酸消旋作用 3. β -和 γ -消除作用	米糠、大豆、蛋黄、肉、鱼、酵母、肠道菌可合成	人类未发现典型缺乏症
维生素 B ₁₂ (钴胺素)	1. 参与分子内重排 2. 甲基转移 3. 促进 DNA 合成 4. 促进血细胞成熟	肝、肉、鱼、肠道菌可合成	巨红细胞性贫血
生物素(维生素 H)	构成羧化酶的辅酶参与 CO ₂ 的固定	肝、肾、酵母、蔬菜、谷类等, 肠道菌可合成	人类未发现缺乏症
叶酸	以 FH ₄ 辅酶的形式参与一碳基团的转移与蛋白质, 核酸合成, 与红细胞、白细胞成熟有关	肝、酵母、绿叶蔬菜等, 肠道菌可合成	巨红细胞性贫血
硫辛酸	转酰基作用	肝、酵母等	人类未发现缺乏症
维生素 C(抗坏血酸)	1. 参与体内羟化反应 2. 参与氧化还原反应 3. 促进铁吸收 4. 解毒作用 5. 改善变态反应, 提高免疫力	新鲜水果、蔬菜、特别是柑橘、番茄、鲜枣含量较高	坏血病

四、作为辅酶的金属离子

(一) 概论

动物和人为了生长和发育在饮食中除了维生素外, 还需要一些无机形式的化学元素。这些元素可分为两类: 大量元素和微量元素。大量元素包括钙、镁、钠、钾、磷、硫和氯, 需要相对大的量, 每天接近克, 它

们常具有一种以上的功能。例如,钙是骨矿物质或者羟基磷灰石($[Ca_3(PO_4)]_2Ca(OH)_2$)的结构成分,而游离钙在细胞液中作为重要的调节剂,它的浓度低于 10^{-6} mol/L。磷以磷酸盐形式是细胞内能量传递 ATP 系统的活性成分。

更关心的是关于酶作用必需的微量元素(表 11-7,8),类似于维生素的需要量,每天仅需要毫克或微量。已知 15 种微量元素在动物营养中是必需的。大多数必需微量元素是作为酶的辅因子或辅基起作用。

表 11-7 微量元素及其生物化学功能

元 素	生物化学功能的例子
铁	血红素酶(过氧化氢酶,细胞色素氧化酶)的辅基
碘	甲状腺激素结构中需要
铜	细胞色素氧化酶的辅基
锰	精氨酸酶和其他酶的辅因子
锌	脱氢酶类,DNA 聚合酶,碳酸酐酶的辅因子
钴	维生素 B ₁₂ 的组分
钼	黄嘌呤氧化酶的辅因子
硒	谷胱甘肽过氧化物酶和其他酶类的辅因子
钒	硝酸还原酶的辅因子
镍	脲酶的辅因子

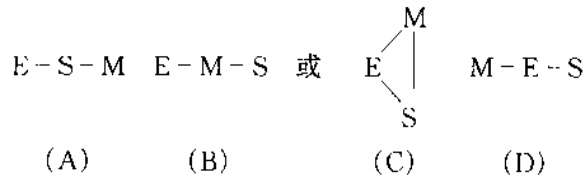
表 11-8 生物化学功能还不清楚的微量元素

元 素	明显的作用
铬	血糖的适当利用
锡	骨的形成
氟	骨的形成
硅	结缔组织和骨的形成
砷	不清楚

金属离子参与多种生物化学过程。估计有三分之一的酶在催化过程的一个或几个阶段中需要金属离子。金属离子通过使底物直接结合到活性部位,或者间接地使酶的结构保持在适合于结合的特殊构象下来控制催化作用。金属离子作为基本的结构组分参加氧化和水解反应,有时以氧化状态进行可逆变化。许多代谢物,特别是核苷酸类物质都是以金属复合物的形式存在,例如, $Mg^{2+} \cdot ATP$,而且酶反应的真正底物是这些复合物,而不是核苷酸本身。因此,金属离子能够通过改变尚未复合的底物的化学性质来发挥它们自己的催化效力。研究表明,某些酶-金属复合物通过对酶蛋白部分的合成、降解或两者速度的专一性控制能够调节酶活性的水平,说明金属离子对酶的表达和调控是很重要的。

(二) 金属酶类与金属激活酶类

虽然许多酶需要金属离子作为辅因子,但仍可以依据金属结合强度把这些酶再分成金属酶类(metalloenzymes)和金属激活酶类(metal-activated enzymes)。金属酶一般含有化学计量的金属辅因子,它们结合的相当牢固,而且加入游离金属离子后活性并不会增加。金属激活酶中其金属处于酶表面的结合基团平衡中,这种金属离子在酶的纯化过程中常常失去,必须再加入金属离子才能恢复催化活性,然而,金属激活酶类在酶的位点、受结合的金属和底物之间通常是 1:1:1 的简单化学计量关系。这种活化的三元复合物有以下各种构型:(A)底物桥复合物(substrate-bridge complex),其中底物-复合物与酶相结合;(B)金属桥复合物(metal bridge complex),其中金属处在同时与底物和酶两者结合的位置;(C)金属桥复合物可能再通过一个非金属键使底物与酶联结;(D)表现为金属仅仅与酶接触。除底物桥复合物外,其余的复合物可看作是金属酶。底物桥限定金属只与底物接触,当然就不可能是金属酶了。



(三) 含铁酶类

铁是关系到生物功能最熟悉的微量元素。铁是氧载体蛋白血红蛋白和肌红蛋白以及电子载体线粒体蛋白细胞色素 c 血红素基团的成分。几种重要的酶也都含有血红素辅基。一个最好的例子是细胞色素氧化酶,由营养分子来的电子催化还原分子氧成水。细胞色素氧化酶中的铁原子,经历高铁(Fe^{3+})和高铁(Fe^{2+})型式化合价的改变,行使从细胞色素 c 转移电子给氧的功能。细胞色素 P₄₅₀ 参加酶促羟化反应也能转移电子给氧。

其他血红素酶包括催化过氧化氢分解的过氧化氢酶和通过过氧化作用催化各种有机物质氧化的过氧化物酶。过氧化氢酶中铁原子本身在催化循环中就是一个积极参加者。简单的铁盐,如 $FeSO_4$ 在促进过氧化氢分解成水和 O_2 时已经具有某种催化活性。可能是卟啉基和过氧化氢酶的蛋白质部分极大的增强了铁所固有的催化活性。

铁硫酶是另一类重要的含铁酶类,这类酶在动物、植物和细菌细胞中也起电子转移反应的功能。在铁硫酶中没有血红素辅基,但独特地含有等量的铁和硫原子,以特别不稳定的形式被酸分解。一个例子是叶绿体的铁氧还蛋白(ferredoxin),它行使从光激发的叶绿素携带电子到各种电子受体的功能。其他铁-硫酶在线粒体电子传递反应中起作用。某些黄素蛋白除了黄素核苷酸之外还含铁。

(四) 含铜酶类

许多含铜酶属于羟化酶和氧化酶类(表 11-9),这意味着它们是与分子氧一起参与催化过程。铜在细胞色素氧化酶的催化活性中起重要作用,该酶在其辅基中含有铁和铜。细胞色素氧化酶的铜原子经历 $Cu^{2+} - Cu^+$ 化合价转换的循环,参与携带电子给氧。铜也存在于赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase)的活性基中,该酶可使胶原蛋白和弹性蛋白中多肽链之间进行交联。动物缺乏铜就发育成缺少交联的不完全的胶原蛋白分子,其结果主动脉壁中的胶原蛋白和弹性蛋白变的脆弱以致动脉趋向破裂。为了在身体中适当的利用铁,铜也是需要的。

表 11-9 含铜金属酶

酶	来源	相对分子质量/ 10^3	每分子的铜原子数
抗坏血酸氧化酶(ascorbic acid oxidase)	南瓜	140	8
血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)	血浆	134	6~7
细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase)	线粒体	340	1
二胺氧化酶(diamine oxidase)	肾	185	2
多巴胺- β -羟化酶 (dopamine- β -hydroxylase)	肾上腺	290	2
D-半乳糖氧化酶(D-galactose oxidase)	真菌	60	1
漆酶(laccase)	漆树	120	6
赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase)	鸡主动脉和软骨	60	1
超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)	肝	34	2
尿酸酶(uricase)	肝	12	1

(五) 含锌酶类

锌是近 300 种不同酶的必需成分,是目前唯一的在六大酶类中都发现存在的金属酶类。作为辅因子,锌是最通用的金属。由于锌完全以 Zn^{2+} 离子存在,因此和铜、铁或锰不同,没有氧化还原能力。锌最通常

的配位数是 4, 该金属最容易形成四面体的构型。锌常存在于酶的活性部位, 在酶和底物间起桥梁作用。

表 11-10 列出了一部分对其性质已相当了解的含锌金属酶。第一个发现的碳酸酐酶(Keilin 和 Mann, 1940)相对分子质量为 30×10^3 (各种来源的酶都相同), 有一个锌结合于酶的单肽链上。酵母菌和肝的醇脱氢酶, 每个分子结合 4 个锌。大肠杆菌碱性磷酸酯酶的稳定性和催化活性依赖于锌, 酶的 2 个亚基来源于同一基因, 但是在翻译后形成不均一性。其他细菌、真菌和较高等动物的碱性磷酸酯酶也是含锌金属酶, 高等植物中尚未发现这种酶, 它在红血球和肌肉细胞内也不存在。大肠杆菌天冬氨酸转氨甲酰酶, 每分子结合 6 个锌。大肠杆菌 DNA 聚合酶和依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶两者都是含锌酶, 它们是涉及参与遗传信息的复制和转录的重要酶。已证明由鸟类成髓细胞白血病病毒诱导的反向转录酶需要锌。至今鉴定过的所有细菌中性蛋白酶都表明至少有一个锌原子和紧密结合有钙离子的酶相缔合, 嗜热菌蛋白酶是这类酶的一个例子。最后, 近来的研究指出鼠肝延长因子 I(EF-1)需要锌, 高度纯化的因子含有 1 个锌。其中锌最有趣的作用是舌和鼻通道的味觉和嗅觉受体所持有的功能。

表 11-10 含锌金属酶

酶	来源	相对分子质量/ 10^3	每分子的锌原子数
醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	酵母	150	4
醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)	马肝	84	4
碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase)	大肠杆菌	80	4
碳酸酐酶(carbonic anhydrase)	红血球	30	1
羧肽酶 A(carboxypeptidase A)	胰	34.6	1
羧肽酶 B(carboxypeptidase B)	胰	34.3	1
谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase)	牛肝	1000	2~6
亮氨酸氨肽酶(leucine aminopeptidase)	猪肾	300	4~6
中性蛋白酶(neutral protease)	枯草杆菌	44.7	1~2
嗜热菌蛋白酶(thermolysin)	嗜热芽孢杆菌	37.5	4

(六) 其他金属酶类

精氨酸酶(arginase)是尿素循环中的一个酶(第 30 章), 与锰形成紧密的复合物, 金属在精氨酸酶中起着稳定和催化两种作用。鸡肝丙酮酸脱羧酶(pyruvate carboxylase)含有 4 个亚基, 4 个锰离子和 4 个生物素。锰也作为某些磷酸转移酶(phosphate transferring enzyme)的辅因子。微量的钴对生物合成维生素 B_{12} 是需要的。人们发现钼和钒在某种黄素脱氢酶的活性部位起作用。例如, 黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)有一个 FAD 辅基, 也含有钼和铁作为它的必需成分。钒在硝酸还原酶(nitrate reductase)中参与氧化还原反应。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)含硒, 它替代活性部位中一个半胱氨酸的硫。最近发现脲酶(urease)结合有 2 个镍原子, 不过这种镍的实际功能还没有确定。酶的结构中没有发现铬, 然而已证明这个金属是一种称为葡萄糖耐糖因子复合物的关键成分, 这个复合物促使肝外组织吸收糖, 其生物学功能与胰岛素的作用十分相似。锡对骨骼系统的发育可能在钙化过程中是需要的。也有报道某些植物需要两种另外的元素硼和铝。

提 要

维生素是维持生物体正常生长发育和代谢所必需的一类微量有机物质, 不能由机体合成, 或合成量不足, 必须靠食物供给。由于维生素缺乏而引起的疾病称为维生素缺乏症。维生素都是小分子有机化合物, 在结构上无共同性。通常根据其溶解性质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 B_1 、 B_2 、 B_6 、 B_{12} 、烟酸、烟酰胺、泛酸、生物素、叶酸、硫辛酸和维生素 C 等。现已知绝大多数维生素作为酶的辅酶或辅基的组成成分, 在物质代谢中起重要作用。

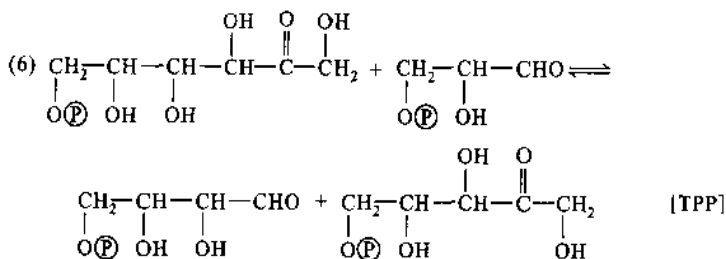
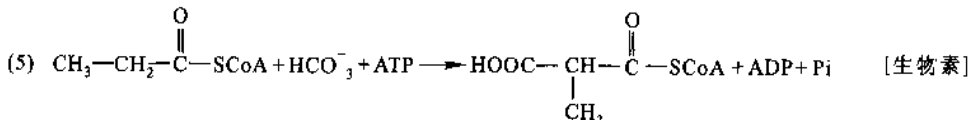
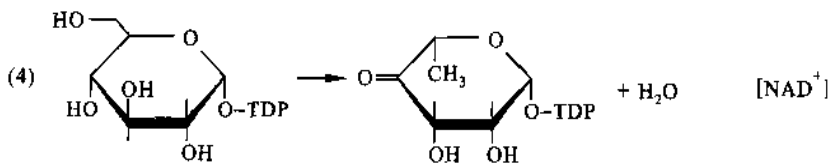
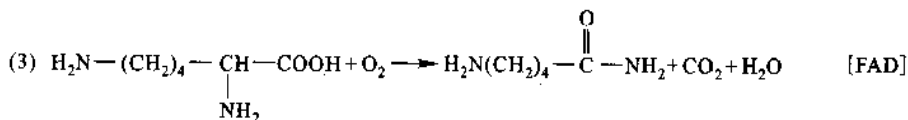
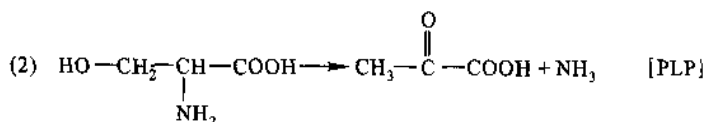
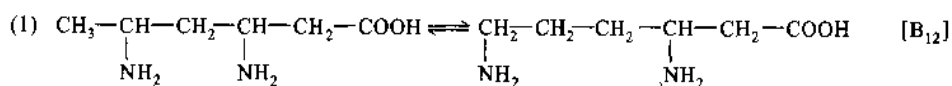
维生素 A 的活性形式是 11-顺视黄醛, 参与视紫红质的合成, 与暗视觉有关。此外维生素 A 还参与

糖蛋白的合成,在刺激组织生长分化中也起重要作用。维生素 D 为类甾醇衍生物,1,25-二羟维生素 D₃ 是其活性形式,用以调节钙磷代谢,促进新骨的生成与钙化。维生素 E 是体内最重要的抗氧化剂,可保护生物膜的结构和功能,维生素 E 还可促进血红素的合成。维生素 K 与肝脏合成凝血因子 II、VII、IX 和 X 有关,作为谷氨酰化酶的辅助因子参与凝血因子前体转变为活性凝血因子所必需的。除维生素 C 外,水溶性维生素主要为 B 族维生素,以辅酶和辅基的形式存在,参与物质代谢。硫胺素的辅酶形式为硫胺素焦磷酸(TPP),是 α -酮酸脱羧酶、转酮酶及磷酸酮酶的辅酶,在 α -裂解反应、 α -缩合反应及 α -酮转移反应中起重要作用。核黄素和烟酰胺是氧化还原酶类的重要辅酶,核黄素以 FMN 和 FAD 的形式作为黄素蛋白酶的辅基;而烟酰胺以 NAD⁺ 和 NADP⁺ 形式作为许多脱氢酶的辅酶,至少催化 6 种不同类型的反应。泛酸是构成 CoA 和 ACP 的成分,CoA 起传递酰基的作用,是各种酰化反应的辅酶,而 ACP 与脂肪酸的合成关系密切。磷酸吡哆醛是氨基酸代谢中多种酶的辅酶,参加催化涉及氨基酸的转氨作用, α -和 β -脱羧作用, β -和 γ -消除作用,消旋作用和醛醇裂解反应。生物素是几种羧化酶的辅酶,包括乙酰-CoA 羧化酶和丙酮酸羧化酶,参与 CO₂ 的固定作用。维生素 B₁₂ 存在 5'-脱氧腺苷钴胺素和甲基钴胺素两种活性形式,它们参与分子内重排、核苷酸还原成脱氧核苷酸及甲基转移反应。叶酸的辅酶是四氢叶酸 (THF),进行一碳单位的传递,参与甲硫氨酸和核苷酸的合成。硫辛酸是一种酰基载体,作为丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的辅酶参与糖代谢。抗坏血酸是一种水溶性抗氧化剂,参与体内羟化反应、氧化还原反应,有解毒和提高免疫力的作用。

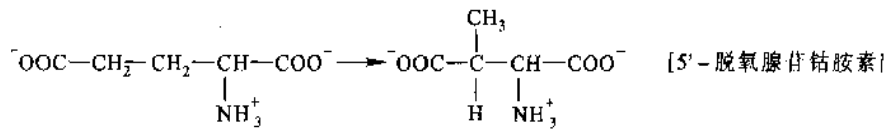
某些金属离子作为微量元素构成一些酶的必需成分参与酶的催化反应,有的金属离子作为酶的辅基构成金属酶类,有的作为酶的激活剂成为金属激活酶类。发现最多的是铁金属酶类、铜金属酶类和锌金属酶类。

习 题

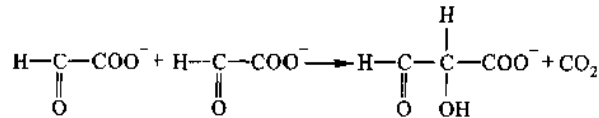
1. 列举水溶性维生素与辅酶的关系及其主要生物学功能。
2. 对下面每一个酶促反应,写出参与反应的辅酶。



3. 为谷氨酸变位酶反应选择一种适宜的辅酶并写出一个正确的机制:



4. 乙醛酸醛连接酶(glyoxylate carboligase)催化下面反应:



选择一种合适的辅酶并写出这个反应的机制。[TPP]

5. 天冬氨酸-β-脱羧酶可转换 L-天冬氨酸变成 L-丙氨酸,为该反应选择一种合适的辅酶,并写出一个适当的机制。[PLP]

6. 谷氨酸脱氢酶反应依赖于 NAD⁺ 或 NADP⁺ 存在,并被 ADP 刺激。设想 NAD(P)⁺ 和 ADP 的作用,并写出一个适当的机制。

7. 蛋清可防止蛋黄的腐败,将鸡蛋贮存在冰箱中 4~6 周不腐败。而分离出的蛋黄(没有蛋清)甚至在冷冻下也迅速腐败。

(1) 腐败是什么引起的?

(2) 你如何解释观察到的蛋清存在下防止蛋黄腐败?

8. 肾骨营养不良(renal osteodystrophy)也叫肾软骨病,是和骨的广泛脱矿物质作用相联系的一种疾病,常发生在肾损伤的病人中。什么维生素涉及到骨的矿质化?为什么肾损伤引起脱矿物质作用?

9. 一个临床病人由于代谢紊乱引起酸中毒,即低血和低尿 pH。病人体液的化学分析显示在尿中分泌大量的甲基丙二酸。将这种化合物饲喂正常动物时,可以转变成琥珀酸。对于这一观察你能提供营养上的解释吗?

10. 四氢叶酸(THF)都以何种形式传递一碳单位的?

主要参考书

1. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. New York, London: Saunders College Publishing Harcourt Brace College Publishers, 1995
2. Lehninger A L. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publishers, INC. 1982
3. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: worth Publishers, 2000
4. Mathews C K, van Holde K E, Ahern K G. Biochemistry. 3rd ed. San Francisco: Benjamin/cummings, An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc, 2000
5. Creighton T E. Proteins. 2nd ed. New York: W. H. Freeman, 1993
6. Zubay G. Biochemistry. Reading, Massachusetts, London, Sydney: Addison-wesley Publishing Company, 1983
7. Hemenway G, Jove R, *et al.* Solutions Guide to Accompany Zubay Biochemistry. Reading, Massachusetts, London, Sydney: Addison-Wesley Publishing Company, 1983
8. Walsh C T. Enzymatic Reaction Mechanisms. San Francisco: W. H. Freeman, 1979
9. Page M L, Williams A (eds). Enzyme Mechanisms. London: Royal Society of London, 1987
10. Boyer P D, Lardy H, Myrback K (eds). The Enzymes. 3rd ed. 14 Vols. New York: Academic Press, 1970—1981
11. 张迺衡主编. 生物化学. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社, 1997

(张庭芳)

第12章 核酸通论

核酸(nucleic acid)是重要的生物大分子,是生物化学与分子生物学研究的重要对象和领域。生物的特征是由生物大分子所决定的。生物大分子有4类:核酸、蛋白质、多糖和脂质复合物。糖和脂质物质是由酶(蛋白质)催化合成的,它们与蛋白质在一起,增加了蛋白质结构与功能的多样性。蛋白质的合成取决于核酸;然而生物功能需要通过蛋白质来实现,包括核酸合成也有赖于蛋白质的作用。核酸有两类,即脱氧核糖核酸(deoxynucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。因此,最重要的生物大分子是DNA、RNA和蛋白质。由生物大分子和有关生物分子与无机分子或离子共同构成生物机体不同层次的结构;生物大分子之间以及与其他分子之间的相互作用决定了一切生命活动。有关核酸的结构、功能、性质和研究方法将分四章予以介绍。

一、核酸的发现和研究的简史

由于核酸的结构与功能比较复杂,分子很不稳定,在4类生物大分子中,它的研究开始最晚。现代生物化学建立于18世纪下半叶。“蛋白质”一词最早于1838年由J.J. Berzelius所提出,该词是从希腊文“proteios”衍生而来,意思是首要的物质。“核酸”这个词的出现要晚半个世纪。然而对它的研究却改变了整个生命科学的面貌,并由此而诞生了分子生物学这一当今发展最迅速、最有活力的学科。

(一) 核酸的发现

1868年瑞士青年科学家F. Miescher由脓细胞分离得到细胞核,并从中提取出一种含磷量很高的酸性化合物,称为核素(nuclein)。他的导师F. Hoppe-Seyler对其发现十分惊讶,经过重复验证后才于1871年将原论文和证明与补充的论文一起发表在Med. chem. Unters.上。此后,Miescher转向研究鲑鱼精子头部的物质,除分离到高相对分子质量含磷酸性化合物(即现在所知的DNA)外,还提取出一种碱性化合物,称为鱼精蛋白(protamine)。Miescher被认为是细胞核化学的创始人和DNA的发现者。Miescher的工作为其继任者所继续。例如,R. Altmann发展了从酵母和动物组织中制备不含蛋白质的核酸的方法,核酸这个名称就是由Altmann在1889年最先提出来的。A. Kossel和A. Neuman于1894年报导了一种从胸腺中制备核酸的方法。

胸腺的细胞核特别大,酵母的细胞质很丰富,这是两种提取核酸的极好来源,因此这两种核酸也就研究得最多。O. Hammars于1894年证明酵母核酸中的糖是戊糖,15年之后即1909年由P. A. Levene和W. A. Jacobs鉴定是D-核糖。当时曾认为胸腺核酸中的糖是己糖,直至1929年才由Levene和Jacobs确定为2-脱氧-D-核糖。两类核酸的碱基也有差别,在19世纪末和20世纪初分别得到鉴定。这就是说在19世纪末已经发现有两类核酸存在,虽然对它们化学本质的差别还不清楚。

(二) 核酸的早期研究

Miescher的发现曾给生物学家带来巨大希望。Hoppe-Seyler认为,核素“可能在细胞发育中发挥着极为重要的作用”。1885年细胞学家O. Hertwig提出,核素可能负责受精和传递遗传性状。1895年遗传学家E. B. Wilson推测,染色质与核素是同一种物质,可作为遗传的物质基础。然而,随后核酸的化学研究却偏离了最初的正确方向。

核酸中的碱基大部分是由Kossel及其同事所鉴定。1910年因其在核酸化学研究中的成就而授予他诺贝尔医学奖,但他却认为决定染色体功能的是蛋白质,因而在获奖后转而研究染色体蛋白质。Levene在鉴定核酸中的糖以及阐明核苷酸的化学键中作出了重要贡献,但他的“四核苷酸假说”曾严重阻碍核酸

研究达 30 年之久。1912 年 Levene 提出核酸中含有等量的 4 种核苷酸,这 4 种核苷酸组成结构单位,核酸是由四核苷酸单位聚合而成。按照这一假说,核酸只是一种简单的高聚物,从而使生物学家失去对它的关注。当时还流行一种错误的看法,认为胸腺核酸代表动物核酸;酵母核酸代表植物核酸,这种观点也不利于对核酸生物功能的认识。

理论研究的重大发展往往首先从技术上的突破开始。20 世纪 40 年代 T. Caspersson 的显微紫外分光光度研究, J. Brachet 的组织化学实验, A. L. Dounce 的亚细胞部分的分离以及 J. N. Davidson 的化学分析结果都有力证明 DNA 存在于细胞核, RNA 存在于细胞质,它们都是动物、植物和细菌细胞共同的重要组成成分。碱基成分的精确测定推翻了“四核苷酸假说”,并证明了核酸的高度特异性。

(三) DNA 双螺旋结构模型的建立

20 世纪上半叶,数理学科进一步渗入生物学,生物化学本身是一门交叉学科,也就成为数理学科与生物学之间的桥梁。数理学科的渗入不仅带来了新的理论和思想方法,而且引入了许多新的技术和实验方法。1953 年 J. D. Watson 和 F. Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型,就是在学科融合的背景下产生的。该模型的提出被认为是 20 世纪自然科学中最伟大的成就之一,它给生命科学带来深远的影响,并为分子生物学的发展奠定了基础。

分子生物学的先驱者沿着三条思想路线去探讨生命的本质,并形成了三个学派:结构学派、信息学派和生化遗传学派。结构学派以英国物理学家 W. T. Astbury、J. D. Bernal 和他们的学生为代表,他们的兴趣在于用 X 射线结晶学技术研究生物大分子的三维结构,并认为这是解决生物学问题的根本途径。Astbury 曾用 X 射线衍射的方法研究蛋白质和 DNA 的结构,他于 1945 年最早使用分子生物学这一术语,他认为研究生物分子的三维结构,研究它们的起源和功能问题,是当代分子生物学的主旨。

信息学派以物理学家 M. Delbrück 与微生物学家 S. Luria 领导的“噬菌体小组”为代表。这一学派深受量子论思潮的影响,Delbrück 就是量子论奠基者 N. Bohr 的学生。量子论的另一奠基者 E. Schrödinger 在其《生命是什么》(What is life)一书中指出,生物学和物理学的真正问题并非有机体是否违抗热力学定律,而是信息传递问题:信息如何被编码?如何保持其稳定性?偶然的变异又是如何产生的?Schrödinger 的观点当时有很大影响力。噬菌体小组致力于揭示染色体上的信息编码,而他们认为噬菌体就是裸露的染色体。1952 年噬菌体小组的两个成员 A. Hershey 和 M. Chase 用³²P 标志噬菌体的 DNA,³⁵S 标志蛋白质,然后感染大肠杆菌。结果只有³²P-DNA 进入细菌细胞内,³⁵S-蛋白质仍留在细胞外,从而有力证明 DNA 是噬菌体的遗传物质。尽管 1944 年 O. T. Avery 的细菌转化实验已证明 DNA 是遗传物质,但当时的反对者仍然认为蛋白质才是转化因子。毕竟无荚膜肺炎双球菌经 DNA 转化产生荚膜只涉及个别现象,而证明携带噬菌体遗传信息的物质是 DNA 则更具普遍的意义。Watson 是噬菌体小组中最年轻的成员,1950 年在 Luria 指导下取得博士学位,其年 22 岁。他善于集思广益,博取众长,从别人的工作中吸取所需要的东西,对新事物敏感。1951 年在剑桥遇到正在 M. Perutz 小组作研究生的 Crick,两人便开始合作探求 DNA 的分子结构。

生化遗传学派包括一批用生物化学方法从事遗传学研究的科学家,他们试图阐明基因是如何行使功能而控制特定性状的。早在 1909 年 A. Garrod 就发表了“代谢的先天错误”的论文,表明孟德尔遗传因子很可能是通过代谢过程的特定步骤而发挥其功能。其后, G. W. Beadle 和 E. L. Tatum 利用红色面包霉的营养缺陷型突变体于 20 世纪 40 年代证明了“一个基因一种酶”的假说。

Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型的主要依据是:已知核酸的化学结构知识;E. Chargaff 发现的 DNA 碱基组成规律;M. Wilkins 和 R. Franklin 得到的 DNA X 射线衍射结果。此外, W. T. Astbury 对 DNA 衍射图的研究以及 L. Pauling 提出蛋白质的 α -螺旋结构也都有启发作用。DNA 双螺旋结构模型的建立说明了基因的结构、信息和功能三者之间的关系,因而使三个学派得到统一,并推动了分子生物学的迅猛发展。

20 世纪 50 年代许多实验室对 DNA 双螺旋结构模型进行验证。1956 年 A. Kornberg 发现 DNA 聚合酶,可用以在体外复制 DNA。1958 年 Crick 总结了当时分子生物学的成果,提出了“中心法则”(central

dogma),即遗传信息从DNA传到RNA,再传到蛋白质,一旦传给蛋白质就不再转移。

每当DNA研究取得理论上或技术上的重大进展,都会带动RNA研究出现一个高潮。60年代RNA研究取得大发展。1961年F. Jacob和J. Monod提出操纵子学说并假设了mRNA功能。1965年R. W. Holley等最早测定了酵母丙氨酸tRNA核苷酸序列。1966年由M. W. Nirenberg等的多个实验室共同破译了遗传密码。所有这些成果都是在“中心法则”的框架内取得的。虽然1970年H. M. Temin等和D. Baltimore等从致癌RNA病毒中发现了逆转录酶,但只看作是对“中心法则”的补充,并没有从根本上动摇“中心法则”的基础。

(四) 生物技术的兴起

20世纪70年代前期诞生了DNA重组技术(DNA recombinant technology)。这一技术系统是在三项关键技术的基础上建立起来的;即DNA切割技术、分子克隆和快速测序。W. Arber最早发现细菌细胞存在DNA限制性内切酶。1970年H. O. Smith分离纯化出特异的限制酶。次年D. Nathans用限制酶切割DNA绘制出酶切位点的图谱,即限制图谱。DNA的特异切割使得分离基因或基因片段成为可能。许多DNA修饰酶,包括DNA连接酶、DNA聚合酶、逆转录酶等,用于基因操作,这些酶统称之为工具酶。1972年P. Berg将外源DNA片段插入猴病毒SV40环状DNA分子内,获得第一个DNA体外重组体。由于SV40具有致癌的潜在危险,Berg未将其重组体进行克隆(克隆的意思是无性繁殖)。1973年S. Cohen等用细菌的质粒重组体得到克隆。1975年F. Sanger等建立了DNA的酶法测序技术。1976年A. M. Maxam和W. Gilbert建立了DNA的化学测序技术。此后,DNA重组技术不断获得改进和发展。

将DNA重组技术用于改变生物机体的性状特征、改造基因、以至改造物种统称为基因工程或遗传工程(genetic engineering)。工程一词原指大规模的建筑和制造,现用于表示对基因的分子施工。在DNA重组技术的带动下又发展出分子水平、细胞水平和个体水平的各种生物技术和生物工程。70年代DNA重组技术的出现,被认为是分子生物学的第二次革命。它改变了分子生物学的面貌,并导致一个新的生物技术产业群的兴起。

DNA重组技术的出现极大推动了DNA和RNA的研究。80年代RNA研究出现了第二个高潮,取得了一系列生命科学研究领域最富挑战性的成果。1981年T. Cech发现四膜虫rRNA前体能够通过自我拼接切除内含子,表明RNA也具有催化功能,称为核酶(ribozyme)。这是对“酶一定是蛋白质”的传统观点一次大的冲击。1983年R. Simons等以及T. Mizuno等分别发现反义RNA(antisense RNA),表明RNA还具有调节功能。其后发现一个基因转录产物通过选择性拼接可以形成多种同源异形体(isoform)蛋白质,从而使“一个基因一条多肽链”的传统观念也受到冲击。1986年R. Benne等发现锥虫线粒体mRNA的序列可以发生改变,称为编辑(editing),于是基因与其产物蛋白质的共线性关系也被打破。1986年W. Gilbert提出“RNA世界”的假说,这对“DNA中心”的观点是一次有力的冲击。1987年R. Weiss论述了核糖体移码,说明遗传信息的解码也是可以改变的。许多传统观点被打破, RNA已成为最活跃的研究领域之一。

(五) 人类基因组计划开辟了生命科学新纪元

1986年,著名生物学家、诺贝尔奖获得者H. Dulbecco在Science杂志上率先提出“人类基因组计划”(简称HGP)。人类细胞有23对染色体,单倍体基因组大约有 3×10^9 碱基对。完成人类基因组DNA全序列测定的意义是十分明显的,人类对自己遗传信息的认识将有益于人类健康、医疗、制药、人口、环境等诸多方面,并且对生命科学也将有极大贡献。但是投入大量人力、物力、时间去完成这项工作是否值得?其间还可能遇到许多事先想象不到的问题。经过3年多的激烈争论,1990年10月美国政府决定出资30亿美元,用15年时间(1991—2005年)完成“人类基因组计划”。“人类基因组计划”是生物学有史以来最巨大和意义深远的一项科学工程,它首先在美国启动,并很快便得到国际科学界的重视,英国、日本、法国、德国和中国科学家先后加入这个国际合作计划。中国是在1999年加入的,承担了1%的测序任务。美国Celera公司也用其自己的测序方法,独立绘制人类基因组图谱。由于技术上的突破,计划进度一再提前,全序列的测定现已基本完成。一些低等生物的DNA全序列也已陆续被测定。生命科学已经进入了后基

基因组时代(post genome era)。

在后基因组时代,科学家们的研究重心已从揭示基因组 DNA 的序列转移到在整体水平上对基因组功能的研究。这种转向的第一个标志就是产生了一门称为功能基因组学(functional genomics)的新学科。但是,生物功能是通过蛋白质来体现的,蛋白质有其自身活动规律,显然仅仅从基因角度来研究是远远不够的。因此,在功能基因组学的基础上产生了蛋白质组学(proteomics)。蛋白质组学是在整体水平上研究细胞内蛋白质组分及其活动规律的新学科。

“蛋白质组”这一概念是于 1994 年澳大利亚的学者 M. Wilkins 和 K. Williams 首先提出来的,是指细胞内基因组表达的所有蛋白质。这两位学者认为,生命科学的研究重点将转移到在蛋白质组水平上揭示细胞的生命活动规律。人类基因组中编码蛋白质的基因总数超过 3 万,能够产生蛋白质的数目是基因数的 10 倍,通常细胞内只有部分基因表达,合成的肽链需经加工修饰才成为有活性的蛋白。所以细胞基因组的转录谱,mRNA 或 cDNA 谱并不代表蛋白质组。另一方面蛋白质的许多性质和功能,不仅要在蛋白质的一级结构和表达水平的差异上来认识,而且还必须从蛋白质空间结构、动态变化以及分子间相互作用来加以阐明。自从 1997 年举行第一次国际“蛋白质组学”会议以来,在这个研究领域内基础研究和实际应用都得到了迅速发展。

由于生物功能是由结构决定的,功能基因组学需要从测定基因产物的结构入手进行研究,因此产生了结构基因组学(structural genomics)这一新的研究领域。结构基因组学的任务是系统测定基因组所代表全部大分子的结构,目前它仅关注于蛋白质的结构。然而 RNA 也是基因组产生的重要功能分子。近年来不断发现新的 RNA 功能和新的 RNA 基因,RNA 结构与功能的研究是功能基因组学的一个重要方面。与蛋白质组学和蛋白质结构基因组学相对应,形成了 RNA 组学(RNomics)或核糖核酸组学(ribonomics),以研究细胞全部功能 RNA 的结构和作用。RNA 结构基因组学的任务是研究所有编码 RNA(encoded RNA)以及与其作用的分子和形成复合物的结构特征。

随着人类基因组研究的迅速进展,生物技术产业也获得了空前规模的发展。据统计,信息技术对世界经济的贡献比率达到 18%,而生物技术对世界经济的推动作用将不亚于信息技术。

二、核酸的种类和分布

核酸分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两大类。所有生物细胞都含有这两类核酸。生物机体的遗传信息以密码形式编码在核酸分子上,表现为特定的核苷酸序列。DNA 是主要的遗传物质,通过复制而将遗传信息由亲代传给子代。RNA 与遗传信息在子代的表达有关。DNA 和 RNA 在结构上的差异与其不同的功能相关联。DNA 通常为双链结构,含有 D-2-脱氧核糖,并以胸腺嘧啶取代 RNA 中的尿嘧啶,使 DNA 分子稳定并便于复制。RNA 为单链结构,含有 D-核糖和尿嘧啶(另 3 种碱基两者相同),与其在表达过程中的信息加工机制有关。

(一) 脱氧核糖核酸(DNA)

原核细胞中 DNA 集中在核区。真核细胞中 DNA 分布在核内,组成染色体(染色质)。线粒体、叶绿体等细胞器也含有 DNA。病毒或只含 DNA,或只含 RNA,从未发现两者兼有的病毒。

原核生物染色体 DNA、质粒 DNA、真核生物细胞器 DNA 都是环状双链 DNA(circular double-stranded DNA)。所谓质粒是指染色体外基因,它们能够自主复制,并给出附加的性状。真核生物染色体是线型双链 DNA(linear double-stranded DNA),末端具有高度重复序列形成的端粒(telomere)结构。

病毒必须依赖宿主细胞才能生存,因此只能看作是一些游离的基因。病毒 DNA 种类很多,结构各异。动物病毒 DNA 通常是环状双链或线型双链。前者如乳头瘤病毒、多瘤病毒、杆状病毒和嗜肝 DNA 病毒等。嗜肝 DNA 病毒在繁殖过程必须经过 RNA 逆转录的阶段。后者如痘病毒、虹彩病毒、疱疹病毒和腺病毒的 DNA。痘病毒 DNA 的末端很特别,是封闭的,形成突环(loop)。微小病毒科的病毒,如小鼠微小病毒(Minute virus of mice, MVM),却是线型单链 DNA(linear single-stranded DNA),病毒粒子内正负

链数量不同,末端常形成发夹结构。植物病毒基因组大多是 RNA, DNA 较少见。少数植物病毒 DNA 或是环状双链,或是环状单链。噬菌体 DNA 多数是线型双链,如 λ 噬菌体、T 系列噬菌体,也有为环状双链如覆盖噬菌体 PM2,或环状单链如微噬菌体 ϕ X174 和丝杆噬菌体 fd 和 M13。某些病毒 DNA 的结构特征列于表 12-1。

表 12-1 一些病毒 DNA 的结构特征

种类	宿主	单链或双链	环状或线型	末端结构
动物病毒				
痘病毒	脊椎动物、昆虫	双链	线型	末端封闭成突环
杆状病毒	昆虫	双链	环状	
虹彩病毒	脊椎动物、昆虫	双链	线型	末端冗余
疱疹病毒	脊椎动物、软体动物、真菌	双链	线型	末端重复
腺病毒	哺乳类、鸟类	双链	线型	反向末端重复,5'-P 与特异蛋白联结
乳头瘤病毒	哺乳类	双链	环状	
多瘤病毒	哺乳类	双链	环状	
嗜肝 DNA 病毒	哺乳类、鸟类	双链	环状	5'端正向重复,3'端空缺
微小病毒	哺乳类、鸟类、昆虫	单链	线型	分叉发夹结构
植物病毒				
花椰菜花叶病毒	花椰菜、十字花科	双链	环状	
双粒病毒	种子植物	单链	环状	
噬菌体				
T ₂	大肠杆菌	双链	线型	交换成环
T ₅	大肠杆菌	双链	线型	单链缺口
T ₇	大肠杆菌	双链	线型	末端冗余
λ	大肠杆菌	双链	线型	5'互补粘性末端
ϕ X174	大肠杆菌	单链	环状	
P ₂₂	沙门氏菌	双链	线型	交换成环
PM2	海洋假单胞菌	双链	环状	

(二) 核糖核酸(RNA)

参与蛋白质合成的 RNA 有三类:转移 RNA (transfer RNA, tRNA),核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)和信使 RNA (messenger RNA, mRNA)。无论是原核生物或是真核生物都有这三类 RNA。两者 tRNA 的大小和结构基本相同,rRNA 和 mRNA 却有明显的差异。原核生物核糖体小亚基含 16 S rRNA,大亚基含 5 S rRNA 和 23 S rRNA;高等真核生物核糖体小亚基含 18 S rRNA,大亚基含 5 S、5.8 S 和 28 S rRNA;低等真核生物的小亚基含 17 S rRNA,大亚基含 5 S、5.8 S 和 26 S rRNA。原核生物的 mRNA 结构简单,由于功能相近的基因组成操纵子作为一个转录单位,产生多顺反子 mRNA (polycistronic mRNA)。真核生物 mRNA 结构复杂,有 5'端帽子,3'poly(A)尾巴,以及非翻译区调控序列,但功能相关的基因不形成操纵子,不产生多顺反子 mRNA。真核生物细胞器有自身的 tRNA、rRNA 和 mRNA。

20 世纪 80 年代以来,陆续发现许多新的具有特殊功能的 RNA,几乎涉及细胞功能的各个方面。这些 RNA 或是以大小来分类,如 4.5 S RNA、5 S RNA 等。在凝胶电泳中 7 S 位置分出两个 RNA 条带,分别称为 7SK RNA 和 7SL RNA。这些 RNA 分子大小大致在 300 个核苷酸左右或更小,常统称之为小 RNA (small RNA, sRNA)。或是以在细胞中的位置来分类,如核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA),核仁小 RNA (small nucleolar RNA, sno RNA),胞质小 RNA (small cytoplasmic RNA, SCRNA)。已知功能的 RNA 也可以用功能来命名和分类,如反义 RNA (antisense RNA)、核酶 (ribozyme) 等。

病毒和亚病毒 RNA 种类很多,结构也是多种多样。含有正链 RNA 的病毒,例如灰质炎病毒 (poliovirus) 和噬菌体 Q β 。含有负链 RNA 的病毒,如狂犬病病毒 (rabies virus) 和马水泡性口炎病毒 (vesicular stomatitis virus)。含有双链 RNA 的病毒,如呼肠孤病毒 (reovirus)。比病毒结构更简单的病原体称为亚病毒。类病毒 (viroid) 是已知最小的致病 RNA,不含蛋白质,如马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTV) 和柑橘裂

皮类病毒(CEV)。类病毒 RNA 约含 300 个左右核苷酸(相对分子质量 $\sim 1 \times 10^5$),环状单链并通过链内碱基配对形成棒状结构。卫星病毒或卫星 RNA 是指没有辅助性病毒(helper virus)的协助,在宿主细胞内不能复制的病毒或 RNA,例如烟草坏死病毒的卫星病毒。卫星病毒能够干扰辅助病毒的复制,可以看作是病毒的寄生物。

三、核酸的生物功能

G. Mendel 于 1865 年发现豌豆杂交后代性状分离和自由组合的遗传规律。F. Miescher 于 1868 年发现核素。当时的一些细胞学家和遗传学家曾猜测核素可能与遗传有关。19 世纪末开始知道有两类核酸,即胸腺型核酸和酵母型核酸。直到 20 世纪 40 年代才了解 DNA 和 RNA 都是细胞的重要组成部分,前者可引起遗传性状的转化,后者可能参与蛋白质的生物合成。半个世纪以来,核酸研究已成为生物化学与分子生物学的核心和前沿,其研究成果改变了生命科学的面貌,也促进了生物技术产业的迅猛发展,充分表明这类物质具有重要的生物功能。

(一) DNA 是主要的遗传物质

细胞学的证据早就提示 DNA 可能是遗传物质。DNA 分布在细胞核内,是染色体的主要成分,而染色体已知是基因的载体。细胞内 DNA 含量十分稳定,而且与染色体数目平行。一些可作用于 DNA 的物理化学因素均可引起遗传性状的变化。但直接证明 DNA 是遗传物质的证据则来自 Avery 的细菌转化实验。

1944 年 O. Avery 等人首次证明 DNA 是细菌遗传性状的转化因子。他们从有荚膜、菌落光滑的 III 型肺炎球菌(III S)(*Pneumococcus*)细胞中提取出纯化的 DNA,加到无荚膜、菌落粗糙的 II 型细菌(II R)培养物中,结果发现 DNA 能使一部分 II R 型细胞获得合成 III S 型细胞特有的荚膜多糖的能力。蛋白质及多糖物质没有这种转化能力。若将 DNA 事先用脱氧核糖核酸酶降解,也就失去转化能力(图 12-1)。这一实验不可能是表型改变,也不可能是恢复突变,因为 II R 型菌产生的是 III S 型的荚膜。它有力地证明 DNA 是转化物质。已经转化了的细菌,其后代仍保留合成 III 型荚膜的能力,说明此性状可以遗传给后代。DNA 转化可用于细菌、动物和植物各类细胞,现已成为实验室常用的方法。实际上供体细胞的 DNA 进入受体细胞而导入新的遗传信息这是一个自然的过程。

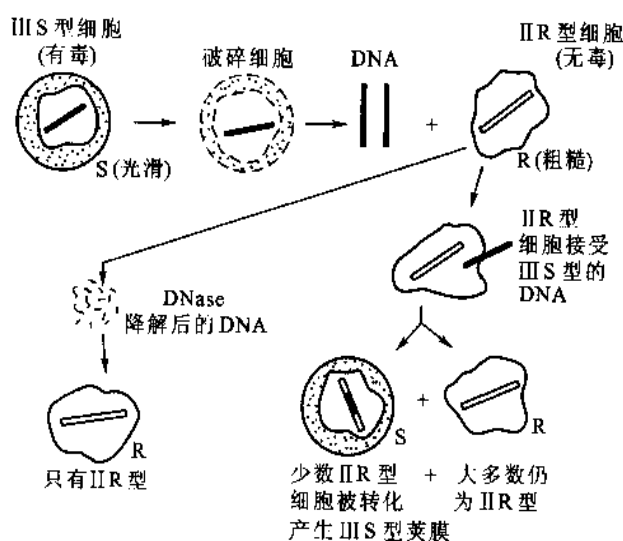


图 12-1 肺炎球菌转化作用图解

然而,当时大多数生物学家都还以为 DNA 只是简单聚合物,蛋白质才是遗传物质,并没有认识到 Avery 发现的重要意义。1952 年 A. D. Hershey 和 M. Chase 用 ^{35}S 和 ^{32}P 标记的噬菌体 T_2 感染大肠杆菌,

结果发现只有³²P 标记的 DNA 进入大肠杆菌细胞内,而³⁵S 标记的蛋白质仍留在细胞外。Hershey 和 Chase 的实验证明,噬菌体 DNA 携带了噬菌体的全部遗传信息。此时已经认识到 DNA 结构的复杂性和特异性。与 40 年代不同,50 年代初生物学家开始接受 DNA 是遗传物质的观点。及至 1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型,才从分子结构上阐明了其遗传功能。

按照遗传学的概念,基因是指在染色体上占有有一定位置的遗传单位。基因有三个基本属性:一是可通过复制,将遗传信息由亲代传递给子代;二是经转录对表型有一定的效应;三是可突变成各种等位基因。DNA 的研究充分表明,DNA 具有基因的所有属性,基因也就是 DNA 的一个片段。但有些病毒的基因组是 RNA,基因是 RNA 的一个片段。

(二) RNA 参与蛋白质的生物合成

早在 20 世纪 40 年代,T. Caspersson 使用显微紫外分光光度法、J. Brachet 使用组织化学法和 J. N. Davidson 等使用化学分析方法测定细胞的 RNA。实验表明,为生长和分泌而旺盛进行蛋白质生物合成的细胞中 RNA 含量特别丰富。这暗示 RNA 可能参与蛋白质的合成。

1958 年 Crick 提出“转换器”(adapter)假说,认为在蛋白质生物合成过程中信息由核酸到蛋白质必定有信号转换的中介物。当时已从细胞匀浆超速离心的上清液中提出一种可溶性 RNA(soluble RNA, sRNA),不久知道这类 RNA 就相当于 Crick 的转换器,其后又被称作转移 RNA(transfer RNA, tRNA)。用差速离心的方法除去细胞碎片和各种细胞器,然后在 $10^5 \times g$ 离心力作用下可将核糖体(ribosome)沉降下来。真核细胞核糖体常和内质网膜碎片在一起,称为微粒体(microsome)。核糖体是直径为 20 纳米的颗粒,含有大约 40% 的蛋白质和 60% 的 RNA。1959 年分离出核糖体 RNA(ribosomal RNA, rRNA)。1961 年 F. Jacob 和 J. Monod 提出信使 RNA(messenger RNA, mRNA)功能的假设,同时有几个实验室用放射性同位素脉冲标记的方法从感染噬菌体或未感染的大肠杆菌细胞中分离出 mRNA。

实验表明,由 3 类 RNA 共同控制着蛋白质的生物合成。核糖体是蛋白质合成的场所。过去以为蛋白质肽键的合成是由核糖体的蛋白质所催化,称为转肽酶。1992 年 H. F. Noller 等证明 23 S rRNA 具有核酶活性,能够催化肽键形成。rRNA 约占细胞总 RNA 的 80%,它是装配者(assembler)并起催化作用。tRNA 占细胞总 RNA 的 15%,它是转换器(adapter),携带氨基酸并起解译作用。mRNA 占细胞总 RNA 的 3%~5%,它是信使(messenger),携带 DNA 的遗传信息并起蛋白质合成的模板作用。

(三) RNA 功能的多样性

20 世纪 80 年代 RNA 的研究揭示了 RNA 功能的多样性,它不仅仅是遗传信息由 DNA 到蛋白质的中间传递体,虽然这是它的核心功能。归纳起来,RNA 有 5 类功能:① 控制蛋白质合成;② 作用于 RNA 转录后加工与修饰;③ 基因表达与细胞功能的调节;④ 生物催化与其他细胞持家功能;⑤ 遗传信息的加工与进化。病毒 RNA 是上述功能 RNA 的游离成分。

生物机体通过 DNA 复制,而使遗传信息由亲代传给子代;通过 RNA 转录和翻译而使遗传信息在子代得到表达。RNA 具有诸多功能,无不关系着生物机体的生长和发育,其核心作用是基因表达的信息加工和调节。

提 要

1868 年 Miescher 发现 DNA。Altmann 继续 Miescher 的研究,于 1889 年建立从动物组织和酵母细胞中制备不含蛋白质的核酸的方法。RNA 的研究开始于 19 世纪末,Hammar 于 1894 年证明酵母核酸中的糖是戊糖。核酸中的碱基大部分是由 Kossel 等所鉴定。Levene 对核酸的化学结构以及核酸中糖的鉴定作出了重要贡献,但是他的“四核苷酸假说”是错误的,在相当长的时间内阻碍了核酸的研究。

理论研究的重大发展往往首先从技术上的突破开始。20 世纪 40 年代新的核酸研究技术证明 DNA 和 RNA 都是细胞重要组成成分,并且是特异的大分子。其时,Chargaff 等揭示了 DNA 的碱基配对规律。

最初是 Astbury, 随后 Franklin 和 Wilkins 用 X 射线衍射法研究 DNA 分子结构, 得到清晰衍射图。Watson 和 Crick 在此基础上于 1953 年提出 DNA 双螺旋结构模型, 说明了基因结构、信息和功能三者之间的关系, 奠定了分子生物学基础。DNA 双螺旋结构模型得到广泛的实验支持。Crick 于 1958 年提出了“中心法则”。DNA 研究的成功带动了 RNA 研究出现一个新的高潮。20 世纪 60 年代 Helley 测定了酵母丙氨酸 tRNA 的核苷酸序列; Nirenberg 等破译了遗传密码; 阐明了 3 类 RNA 参与蛋白质生物合成的过程。

在 DNA 重组技术带动下生物技术获得迅猛发展。将 DNA 重组技术用于改造生物机体的性状特征、改造基因、改造物种, 统称之为基因工程或遗传工程。与此同时出现了各种生物工程。技术革命改变了分子生物学的面貌, 并推动了生物技术产业的兴起。在此背景下, RNA 研究出现了第二个高潮, 发现了一系列新的功能 RNA, 冲击了传统的观点。

人类基因组计划是生物学有史以来最伟大的科学工程。这一计划准备用 15 年时间(1990—2005 年), 投资 30 亿美元, 完成人类单倍体基因组 DNA 3×10^9 bp 全序列的测定。它首先在美国启动, 并得国际科学界的高度重视, 英国、日本、法国、德国和中国科学家先后加入这项国际合作计划。由于测序技术的改进, 人类基因组计划被大大提前完成, 生命科学进入了后基因组时代, 研究重点已从测序转向对基因组功能的研究。功能基因组学需要从基因产物的结构研究入手, 因此产生了结构基因组学。为研究蛋白质组和 RNA 组, 产生了蛋白质组学和 RNA 组学。生物化学与分子生物学已成为自然科学中最活跃, 发展最快的学科之一。

DNA 是主要的遗传物质, 分布在原核细胞的核区, 真核细胞的核和细胞器以及许多病毒中也含 DNA。DNA 通常是双链分子。原核细胞的染色体 DNA、质粒 DNA、真核细胞的细胞器 DNA 以及某些病毒 DNA 都是环状双链分子。真核细胞染色体 DNA 以及某些病毒 DNA 是线型双链分子。病毒 DNA 还有环状单链和线型单链的分子。细胞 RNA 通常都是线型单链分子, 但病毒 RNA 有双链、单链、环状、线型多种形式。

生物机体通过 DNA 复制而将遗传信息由亲代传递给子代; 通过 RNA 转录和翻译而使遗传信息在子代得以表达。DNA 具有基因的所有属性, 基因也就是 DNA 的一个片段。基因的功能最终需由蛋白质来执行, RNA 控制着蛋白质的合成。参与蛋白质合成的 RNA 有三类: rRNA 起装配和催化作用; tRNA 携带氨基酸并识别密码子; mRNA 携带 DNA 的遗传信息并作为蛋白质合成的模板。除参与蛋白质合成外, RNA 还有多种功能, 几乎涉及细胞功能的所有方面, 归根结底与遗传信息的表达和表达调控有关。

习 题

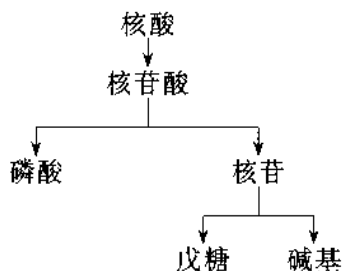
1. 核酸是如何被发现的? 为什么早期核酸研究的进展比蛋白质研究缓慢?
2. Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型的背景和依据是什么?
3. 为什么科学界将 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型评价为 20 世纪自然科学最伟大的成就之一?
4. 什么是 DNA 重组技术? 为什么说它的兴起导致了分子生物学的第二次革命?
5. 人类基因组计划是怎样提出来的? 它有何重大意义?
6. 为什么说生命科学已进入后基因组时代? 它的意思是什么?
7. 核酸可分为哪些种类? 它们是如何分布的?
8. 如何证明 DNA 是遗传物质?
9. 参与蛋白质合成的三类 RNA 分别起什么作用?
10. 如何看待 RNA 功能的多样性? 它的核心作用是什么?

主要参考书

1. L. N 玛格纳著(1979). 生命科学史(中译本). 武汉: 华中工学院出版社, 1985
2. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
3. Weaver R F. Molecular Biology. McGraw-Hill Companies Inc., 2000

第 13 章 核酸的结构

核酸是一种多聚核苷酸(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所含戊糖种类不同而分为核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)。

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 13-1 中。

表 13-1 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(adenine) 鸟嘌呤(guanine)
嘧啶碱 (pyrimidine bases)	胞嘧啶(cytosine) 胸腺嘧啶(thymine)	胞嘧啶(cytosine) 尿嘧啶(uracil)
戊糖 (pentose)	D-2-脱氧核糖 (D-2-deoxyribose)	D-核糖 (D-ribose)
酸 (acid)	磷酸 (phosphoric acid)	磷酸 (phosphoric acid)

一、核 苷 酸

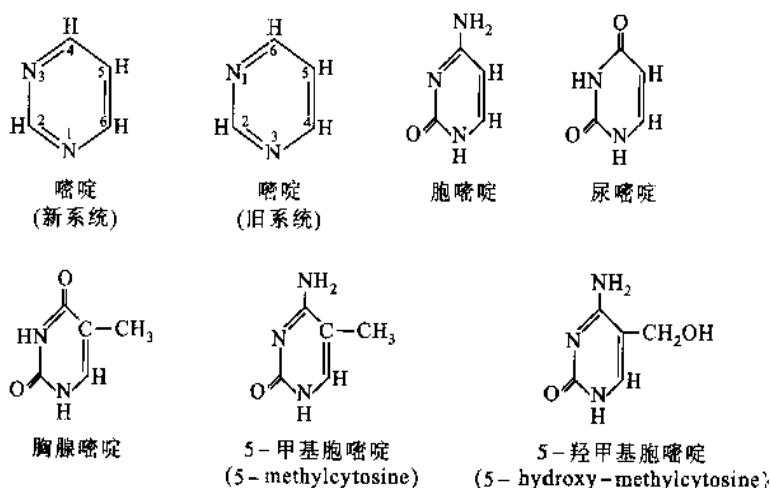
核苷酸可分为(核糖)核苷酸[(ribo) nucleotide]和脱氧(核糖)核苷酸[deoxy(ribo)nucleotide]两类。两者基本化学结构相同,只是所含戊糖不同。核糖核苷酸是核糖核酸的结构单位;脱氧核糖核苷酸是脱氧核糖核酸的结构单位。细胞内还有各种游离的核苷酸和核苷酸衍生物,它们具有重要的生理功能。由此可见,对于核酸和蛋白质系统来说,核苷酸相当于氨基酸,碱基相当于氨基酸的功能基。

(一) 碱基

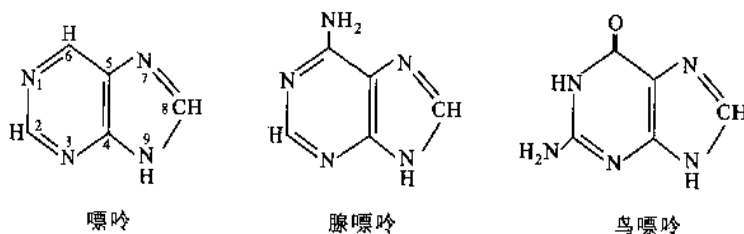
核酸中的碱基分两类:嘧啶碱和嘌呤碱。

1. 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“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、尿嘧啶和胸腺嘧啶。其中胞嘧啶为 DNA 和 RNA 两类核酸所共有。胸腺嘧啶只存在于 DNA 中,但是 tRNA 中也有少量存在;尿嘧啶只存在于 RNA 中。植物 DNA 中有相当

量的 5-甲基胞嘧啶。一些大肠杆菌噬菌体 DNA 中,5-羟甲基胞嘧啶代替了胞嘧啶。



2. 嘌呤碱 核酸中常见的嘌呤碱有两类: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。嘌呤和嘧啶环很接近平面,但稍有挠折。

自然界存在许多重要的嘌呤衍生物。一些生物碱,如茶叶碱(1,3-二甲基黄嘌呤)、可可碱(3,7-二甲基黄嘌呤)、咖啡碱(1,3,7-三甲基黄嘌呤)等都是黄嘌呤(2,6-二羟嘌呤)的衍生物。有些植物激素,如玉米素(N^6 -异戊烯腺嘌呤)、激动素(N^6 -咪喃甲基腺嘌呤)等也是嘌呤类物质。此外,还有些抗生素质也是嘌呤类衍生物(详见抗生素一章)。

3. 稀有碱基 除了表13-1中所列 5 种基本的碱基外,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,可高达 10%。表 13-2 为核酸中一部分稀有碱基的名称。目前已知稀有碱基和核苷达近百种。

表 13-2 核酸中的稀有碱基

DNA	RNA
尿嘧啶(U)*	5,6-二氢尿嘧啶(DHU)
5-羟甲基尿嘧啶(hm ⁵ U)	5-甲基尿嘧啶,即胸腺嘧啶(T)
5-甲基胞嘧啶(m ⁵ C)	4-硫尿嘧啶(s ⁴ U)
5-羟甲基胞嘧啶(hm ⁵ C)	5-甲氧基尿嘧啶(mo ⁵ U)
N^6 -甲基腺嘌呤(m ⁶ A)	N^4 -乙酰基胞嘧啶(ac ⁴ C)
	2-硫胞嘧啶(s ² C)
	1-甲基腺嘌呤(m ¹ A)
	N^6, N^6 -二甲基腺嘌呤(m ₂ ⁶ A)
	N^6 -异戊烯基腺嘌呤(iA)
	1-甲基鸟嘌呤(m ¹ G)
	N^1, N^2, N^7 -三甲基鸟嘌呤(m ₃ ^{2,2,7} G)
	次黄嘌呤(I)
	1-甲基次黄嘌呤(m ¹ I)

* 括号中为缩写符号

(二) 核苷

核苷是一种糖苷,由戊糖和碱基缩合而成。糖与碱基之间以糖苷键相连接。糖的第 1 位碳原子(C_1)与嘧啶碱的第一位氮原子(N_1)或与嘌呤碱的第九位氮原子(N_9)相连接。所以,糖与碱基间的连键是 N—C 键,一般称之为 N-糖苷键。

核苷中的 D-核糖及 D-2-脱氧核糖均为呋喃型环状结构。糖环中的 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 射线衍射法已证明,核苷中的碱基与糖环平面互相垂直。

根据核苷中所含戊糖的不同,将核苷分成两大类:核糖核苷和脱氧核糖核苷。对核苷进行命名时,必须先冠以碱基的名称,例如腺嘌呤核苷、腺嘌呤脱氧核苷等。糖环中的碳原子标号右上角加撇“'”,而碱基中原子的标号不加撇“'”,以示区别。腺嘌呤核苷和胞嘧啶脱氧核苷的结构式如下:

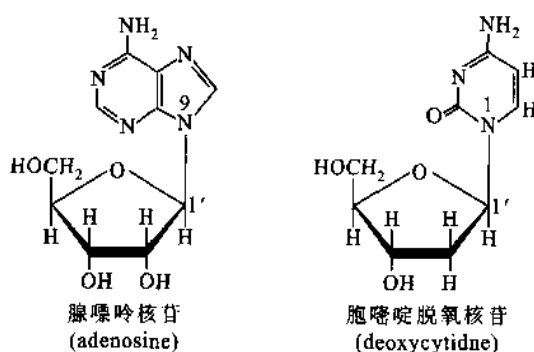
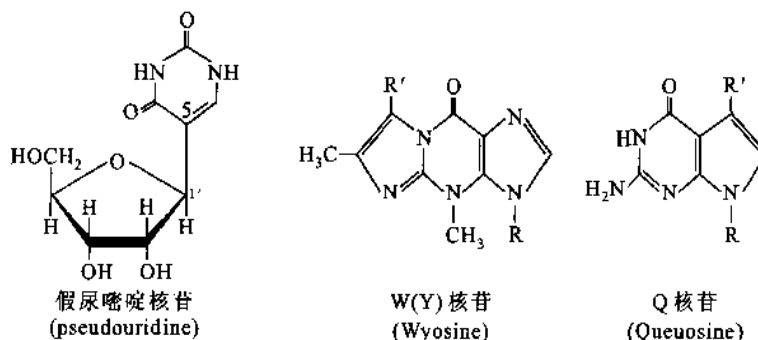


表 13-3 为常见核苷的名称。

表 13-3 各种常见核苷

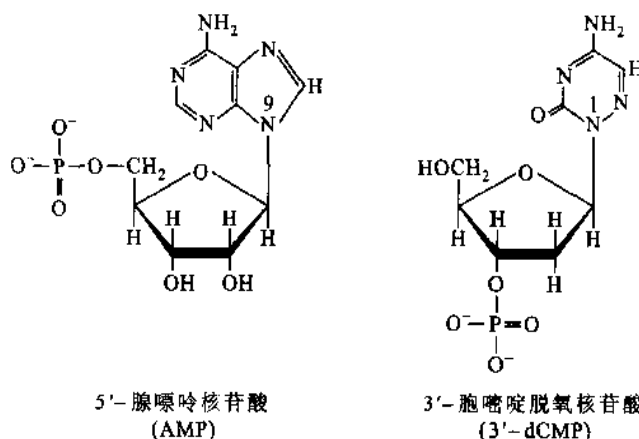
碱 基	核 糖 核 苷	脱 氧 核 糖 核 苷
腺 嘌 呤	腺嘌呤核苷 (adenosine)	腺嘌呤脱氧核苷 (deoxyadenosine)
鸟 嘌 呤	鸟嘌呤核苷 (guanosine)	鸟嘌呤脱氧核苷 (deoxyguanosine)
胞 嘧 啶	胞嘧啶核苷 (cytidine)	胞嘧啶脱氧核苷 (deoxycytidine)
尿 嘧 啶	尿嘧啶核苷 (uridine)	—
胸 腺 嘧 啶	—	胸腺嘧啶脱氧核苷 (deoxythymidine)

RNA 中含有某些修饰和异构化的核苷。修饰碱基如前所述。核糖也能被修饰,主要是甲基化。tRNA 和 rRNA 中还含有少量假尿嘧啶核苷(以符号 ψ 表示),它的结构很特殊,核糖不是与尿嘧啶的第一位氮(N_1),而是与第 5 位碳(C_5)相连接。细胞内有特异的异构化酶催化尿嘧啶核苷转变为假尿嘧啶核苷。有些 tRNA 中含有 W(Y)核苷和 Q 核苷,其碱基母核不是嘌呤环,但可以把它看作鸟嘌呤核苷的衍生物(见结构式)。从酵母苯丙氨酸 tRNA 中分离出一种荧光核苷 Y,后在其他来源的苯丙氨酸 tRNA 中也分离到这种核苷。这类核苷都含有二甲基三杂环部分,化学名为 1, N^2 -异丙烯-3-甲基鸟苷。不同来源该类核苷在碱基杂环上的侧链 R' 不同, R' 为核糖。Y 核苷后又被称为 W 核苷。Q 核苷的碱基骨架为 7-去氯鸟嘌呤,在第 7 位(C_7)上连以侧链 R' ,不同 Q 核苷的 R' 不同。假尿嘧啶核苷、W(Y)核苷和 Q 核苷的结构式如下:



(三) 核苷酸

核苷中的戊糖羟基被磷酸酯化,就形成核苷酸。因此核苷酸是核苷的磷酸酯。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。



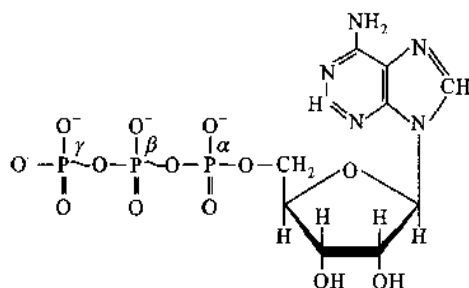
核糖核苷的糖环上有 3 个自由羟基,能形成 3 种不同的核苷酸:2'-核糖核苷酸,3'-核糖核苷酸和 5'-核糖核苷酸。脱氧核苷的糖环上只有 2 个自由羟基,所以只能形成两种核苷酸:3'-脱氧核糖核苷酸和 5'-脱氧核糖核苷酸。生物体内游离存在核苷酸多是 5'-核苷酸。用碱水解 RNA 时,可得到 2'-与 3'-核糖核苷酸的混合物。

常见的核苷酸列于表 13-4 中。

表 13-4 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)

细胞内有一些游离存在的多磷酸核苷酸,它们是核酸合成的前体、重要的辅酶和能量载体。5'-二磷酸核苷(5'-nucleoside diphosphate, 5'-NDP)是核苷的焦磷酸酯,5'-三磷酸核苷(5'-nucleoside triphosphate, 5'-NTP)是核苷的三磷酸酯。最常见的是腺苷三磷酸(5'-adenosine triphosphate, ATP)。ATP 的结构式如下:



环化核苷酸往往是细胞功能的调节分子和信号分子。重要的有 3',5'-环化腺苷酸(3',5'-cyclic adenylic acid,cAMP)及 3',5'-环化鸟苷酸(3',5'-cyclic guanylic acid,cGMP)。它们的功能分别在激素和信号转导部分中再作介绍。

二、核酸的共价结构

核酸是由核苷酸聚合而成的生物大分子,无分支结构。核酸的共价结构也就是核酸的一级结构,通常是指核酸的核苷酸序列。

(一) 核酸中核苷酸的连接方式

核酸可被酸、碱和酶水解。核酸水解产生各种寡核苷酸、核苷酸、核苷和碱基。这就表明,核苷酸是核酸的结构单位,核苷和碱基都是由核苷酸水解而来。核酸的酸碱滴定曲线显示,在核酸分子中的磷酸基只有一级解离,它的另两个酸基必定与糖环的羟基形成了磷酸二酯键。由此可见,核酸中的核苷酸以磷酸二酯键彼此相连。RNA的核糖上有3个羟基,即2'-、3'-和5'-羟基,核苷酸之间由哪两个羟基形成磷酸二酯键的?用磷酸二酯酶可以水解核酸的磷酸二酯键。牛脾磷酸二酯酶可从核酸的3'端逐个水解下3'-核苷酸;蛇毒磷酸二酯酶从核酸的5'端逐个水解下5'-核苷酸(见图13-1)。这就清楚说明RNA以3',5'-磷酸二酯键连接核苷酸。DNA的糖为2-脱氧核糖,只能形成3',5'-磷酸二酯键。实验也证明此结论。



图13-1 多核苷酸链被磷酸二酯酶水解
B代表碱基,竖线代表戊糖碳链,P代表磷酸基。
与P相连的斜线表示3',5'磷酸二酯键

核酸酶在核酸结构分析中十分有用。借助酶作用的特异性可用于鉴别共价键的性质。牛脾磷酸二酯酶和蛇毒磷酸二酯酶都是非专一性的核酸外切酶,但它们识别不同羟基形成的磷酸酯键。前者水解5'-羟基形成的磷酸酯键;后者水解3'-羟基形成的磷酸酯键。

核酸的共价结构(一级结构)有几种表示方法。上图为竖线式,用竖线代表戊糖,B为碱基,P为磷酸基。也可用文字式来表示,以字母代表核苷或核苷酸。原则上5'端在左侧,3'端在右侧,磷酸二酯键的走向为3'→5'。在文字式中,P在核苷之左表示与C_{5'}相连,在右表示与C_{3'}相连。有时,多核苷酸链中磷酸基P也可省略,仅以字母表示核苷酸的序列。这两种写法对DNA和RNA都适用。

(二) DNA的一级结构

DNA的一级结构是由数量极其庞大的4种脱氧核糖核苷酸即:腺嘌呤脱氧核苷酸、鸟嘌呤脱氧核苷酸、胞嘧啶脱氧核苷酸和胸腺嘧啶脱氧核苷酸,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DNA的脱氧核糖中C-2'上不含羟基,C-1'又与碱基相连接,唯一可以形成的键是3',5'-磷酸二酯键。所以DNA没有支链。图13-2表示DNA多核苷酸链的一个小片段。

DNA的相对分子量非常大,通常一个染色体就是一个DNA分子,最大的染色体DNA可超过10⁸bp,也即M_r大于1×10¹¹。如此大的分子能够编码的信息量是十分巨大的。为了阐明生物的遗传信息,首先要测定生物基因组的序列。迄今已经测定基因组序列的生物数以百计,其中包括病毒、大肠杆菌、酵

母、线虫、果蝇、拟南芥菜、玉米、水稻和人类的基因组。病毒基因组较小,但十分紧凑,有些基因是重叠的(overlapping)。细菌的基因是连续的,无内含子,功能相关的基因组成操纵子,有共同的调节和控制序列,调控序列所占比例较小,很少重复序列。真核生物的基因是断裂的,有内含子,功能相关的基因不组成操纵子,调控序列所占比例大,有大量重复序列。重复序列可分为低拷贝重复,中等程度重复和高度重复;回文结构也即反向重复。越是高等的真核生物其调控序列和重复序列的比例越大。

人类基因组的大小为 3.2 Gb(gigabases, 10^9 bp),其中 2.95 Gb 为常染色质(染色较弱,富含基因)。真正用于编码蛋白质的序列仅占基因组的 1.1% 到 1.4%;这就是说只有 28% 的序列能转录成 RNA,其中 5% 是编码蛋白质的序列。基因组中超过一半是各种类型的重复序列,其中 45% 为各种寄生的 DNA(包括转座子和逆转座子等),3% 为少数碱基的高度重复序列,5% 为近期进化中倍增的 DNA 片段。编码蛋白质的基因大约为 31 000 个。与人类基因组相比,酵母细胞的编码基因为 6 000,果蝇为 13 000,蠕虫 18 000,而植物为 26 000。

(三) RNA 的一级结构

RNA 也是无分支的线型多聚核糖核苷酸,主要由 4 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 13-3 为 RNA 分子中的一小段,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 C_2' 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。

RNA 的种类甚多,结构各不相同。酵母丙氨酸 tRNA 是第一个被测定核苷酸序列的 RNA,由 76 个核苷酸组成。tRNA 通常由 73 至 93 个核苷酸组成,相对分子质量都在 25 000 左右,沉降常数为 4 S。它含有较多稀有碱基,可达碱基总数的 10%~15%,因而增加了识别和疏水作用。3'端皆为 CpCpAOH;5'端多数为 pG,也有为 pC 的。tRNA 的一级结构中有一些保守序列,与其特殊的结构与功能有关。

细菌的 rRNA 有 5 S、16 S 和 23 S 三种,它们都是由 30 S rRNA 前体(pre-rRNA)切割而来。哺乳动物的 rRNA 有 5 S、5.8 S、18 S 和 28 S 四种,5 S rRNA 单独合成,18 S、5.8 S、28 S rRNA 由 45 S rRNA 前体切割而来。5 S rRNA 由 120 个核苷酸组成,无稀有碱基,可与 tRNA、大亚基的 rRNA 和蛋白质相识别和作用。5.8 S rRNA 由 160 个核苷酸组成,含有修饰核苷,如假尿嘧啶核苷(ψ)和核糖被甲基化的核苷(Gm、Um),它与细菌 5 S rRNA 有共同序列,表明它可能起着细菌 5 S rRNA 某些相似的功能。细菌的 16 S 和 23 S rRNA 分别有 10 个和 20 个甲基化核苷。真核生物 18 S 和 28 S rRNA 分别有 43 和 74 个甲基化核苷。此外,还有不少假尿嘧啶核苷和修饰的假尿嘧啶核苷。与 tRNA 不同,rRNA 的甲基化较多发生在核糖上,而且真核生物 rRNA 的修饰核苷比原核生物要多。rRNA 除作为核糖体的骨架外,还分别与 mRNA 和 tRNA 作用,催化肽键的形成,促使蛋白质合成的正确进行。

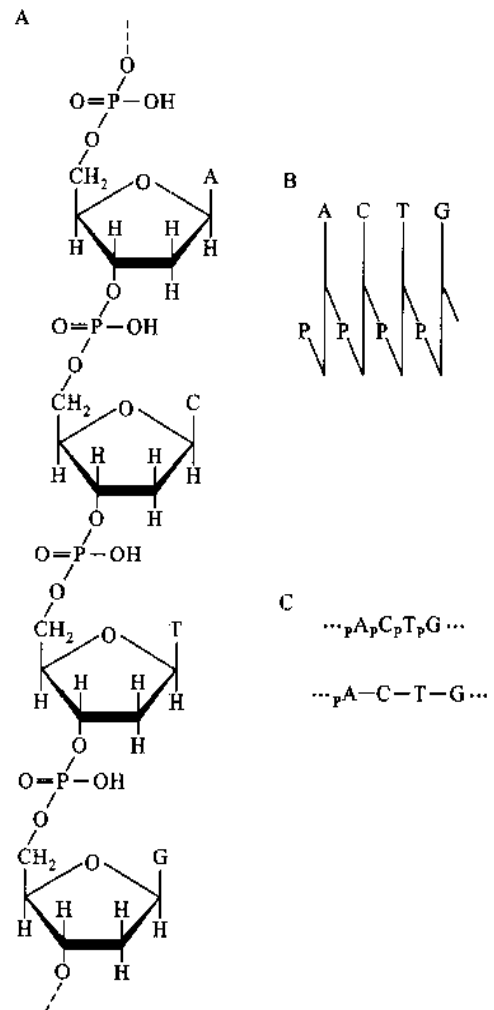


图 13-2 DNA 中多核苷酸链的一个小片段及缩写符号

- A. DNA 中多核苷酸链的一个小片段;
B. 为竖线式缩写;C. 为文字式缩写

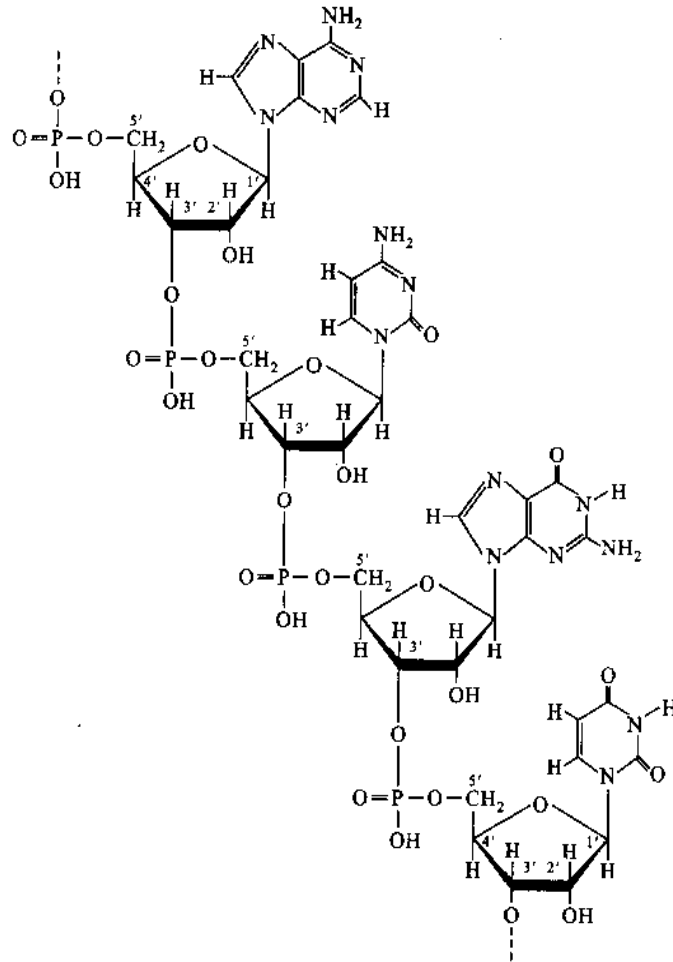


图 13-3 RNA 分子中一小段结构

原核生物以操纵子作为转录单位,产生多顺反子 mRNA(polycistronic mRNA),即一条 mRNA 链上有多个编码区(coding region),5'端和 3'端各有一段非翻译区(untranslated region,UTR)。原核生物 mRNA,包括噬菌体 RNA,都无修饰碱基。

真核生物的 mRNA 都是单顺反子,其一级结构的通式如图 13-4 所示。真核生物 mRNA 的 5'端有帽子(cap)结构,然后依次是 5'非编码区、编码区、3'非编码区,3'端为聚腺苷酸(polyadenylic acid,poly(A))尾巴。其分子内有时还有极少甲基化的碱基。

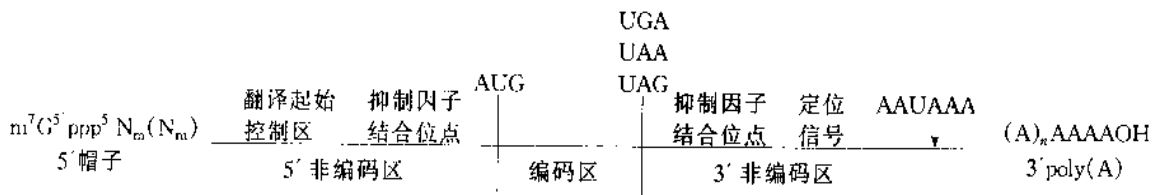
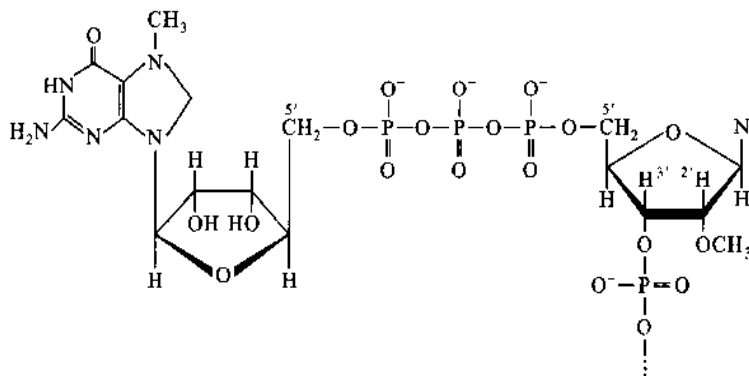


图 13-4 真核生物 mRNA 的共价结构

极大多数真核细胞 mRNA 3'端有一段长约 20~250 的聚腺苷酸。poly(A)是在转录后经 poly(A)聚合酶(poly(A) polymerase)的作用添加上去的。poly(A)聚合酶专一作用于 mRNA,对 rRNA 和 tRNA 无作用。poly(A)尾巴可能与 mRNA 从细胞核到细胞质的运输有关。它还可能与 mRNA 的半寿期有关,新生 mRNA 的 poly(A)较长,而衰老的 mRNA poly(A)较短。

5'端帽子是一个特殊的结构。它由甲基化鸟苷酸经焦磷酸与 mRNA 的 5'末端核苷酸相连,形成 5',5'-三磷酸连接(5',5'-triphosphate linkage)。帽子结构通常有三种类型($m^7G^5 ppp^5 N_p$, $m^7G^5 ppp^5 Nmp-N_p$ 和 $m^7G^5 ppp^5 NmpNmpN_p$),分别称为 O 型、I 型和 II 型。O 型是指末端核苷酸的核糖未甲基化,I 型指末端一个核苷酸的核糖甲基化,II 型指末端两个核苷酸的核糖均甲基化。在这里 G 代表鸟苷,N 代表

任意核苷, m 在字母左侧表示碱基被甲基化, 右上角数字表示甲基化位置, 右下角数字表示甲基数目, m 在字母右侧表示核糖被甲基化。这种结构有抗 5'-核糖外切酶的降解作用。在蛋白质合成过程中, 它有助于核糖体对 mRNA 的识别和结合, 使翻译得以正确起始。I 型帽子的结构如下:



U 系列的核内小 RNA (snRNA), 如 U_1 至 U_5 snRNA, 也有 5' 帽子结构。但它们的帽子是三甲基鸟苷三磷酸 ($m_3^{2,2,7} G^5 ppp^5 AmpNp$), 而不是 mRNA 的甲基鸟苷三磷酸 ($m^7 G^5 ppp^5 Np$)。此外, 动植物病毒 RNA 也有 5' 帽子结构和 3' 聚腺苷酸。但有的没有 5' 帽或 3' 聚腺苷酸。一些植物病毒 RNA 有类似 tRNA 的 3' 端结构, 可以接受氨基酸。

三、DNA 的高级结构

Watson 与 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型主要有三方面的依据: 一是已知核酸化学结构和核苷酸键长与键角的数据。二是 Chargaff 发现的 DNA 碱基组成规律, 显示碱基间的配对关系三是对 DNA 纤维进行 X 射线衍射分析获得的精确结果。DNA 双螺旋模型的建立不仅揭示了 DNA 的二级结构, 也开创了生命科学研究的新时代。

(一) DNA 碱基组成的 Chargaff 规则

参与 DNA 组成的主要有 4 种碱基, 即腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。Chargaff 等科学家在 20 世纪 40 年代应用纸层析及紫外分光光度技术测定各种生物 DNA 的碱基组成。结果发现, DNA 的碱基组成具有生物种的特异性, 不同物种的 DNA 有其独特的碱基组成。而且同一物种不同组织和器官的 DNA 碱基组成是一样的, 不受生长发育、营养状况以及环境条件的影响。不同生物来源的 DNA 碱基组成见表 13-5。

表 13-5 不同生物 DNA 的碱基组成

来 源	碱基的相对含量(x)				来 源	碱基的相对含量(x)			
	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	27.2	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 X174(单链)	24.6	24.1	18.5	32.7
蚕	28.6	22.5	21.9	27.2	ϕ X174(复制型)	26.3	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

Cargaff 首先注意到了 DNA 碱基组成的某些规律性。1950 年他总结出 DNA 碱基组成的规律,称为 Chargaff 规则。

- (1) 腺嘌呤和胸腺嘧啶的摩尔数相等,即 $A=T$ 。
- (2) 鸟嘌呤和胞嘧啶的摩尔数也相等,即 $G=C$ 。
- (3) 含氨基的碱基(腺嘌呤和胞嘧啶)总数等于含酮基的碱基(鸟嘌呤和胸腺嘧啶)总数,即 $A+C=G+T$ 。
- (4) 嘌呤的总数等于嘧啶的总数,即 $A+G=C+T$ 。

所有 DNA 中碱基组成必定是 $A=T, G=C$, 这一规律暗示 A 与 T, G 与 C 相互配对的可能性,为 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构提供了重要根据。

(二) DNA 的二级结构

比较直接测定生物大分子结构的方法是 X 射线晶体衍射。但是 DNA 分子太大,很难制得晶体。用针从浓的 DNA 溶液中抽出纤维,可使 DNA 分子成束整齐排列,即可用于衍射研究。1938 年 Astbury 等用小牛胸腺 DNA 纤维作 X 射线衍射分析,发现在子午线上有 3.34\AA 的衍射点。他认为这反映了 DNA 中扁平核苷酸间的距离;但是由于他认为核苷酸是直线排列的,无法解释其他衍射点,也与核酸的一些化学性质不符。稍后 Franklin 和 Wilkins 对 DNA 的 X 射线衍射进行了更多的研究,获得清晰的衍射图。

在前人研究工作的基础上, Watson 和 Crick 于 1953 年提出了 DNA 分子双螺旋结构模型(图 13-5)。该模型具有以下特征:

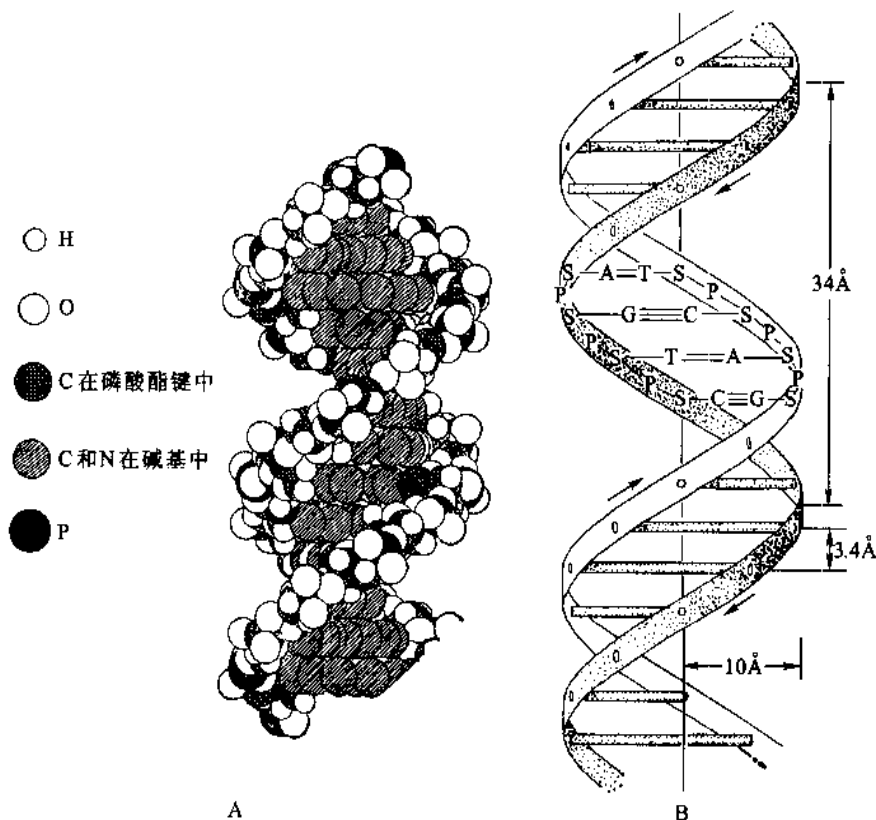


图 13-5 DNA 分子双螺旋结构模型(A)及其图解(B)

(1) 两条反向平行的多核苷酸链围绕同一中心轴相互缠绕;两条链均为右手螺旋。

(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 $C_3' \rightarrow C_5'$ 为正向(图 13-6)。两条链配对偏向一侧,形成一条大沟(major

groove)和一条小沟(minor groove)。

(3) 双螺旋的平均直径为 2 nm,两个相邻的碱基对之间相距的高度,即碱基堆积距离为 0.34 nm,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 3.4 nm。

(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 3 个氢键。所以 GC 之间的连接较为稳定(图 13-7)。

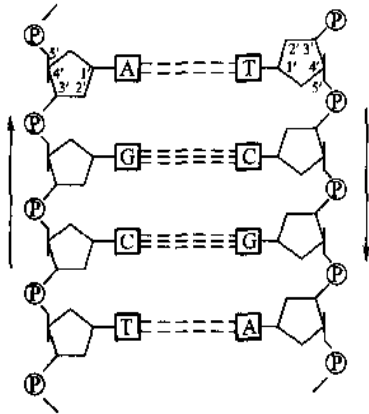


图 13-6 DNA 分子中多核苷酸链的方向

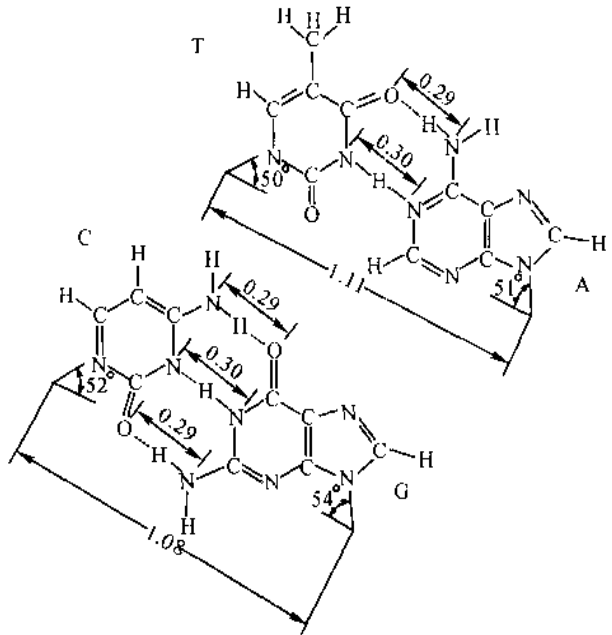


图 13-7 DNA 分子中的 A-T,G-C 配对
(图中长度单位为 nm)

(5) 碱基在一条链上的排列顺序不受任何限制。但是根据碱基配对原则,当一条多核苷酸链的序列被确定后,即可决定另一条互补链的序列。这就表明,遗传信息由碱基的序列所携带。

由于 Watson 和 Crick 的模型是根据 Franklin 和 Wilkins 所提供的 DNA 纤维的 X 射线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 射线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 射线衍射分析后,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,但在结构上并不像 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由 28°至 42°不等。实际平均每一螺周含 10.4 个碱基对。分子大小的各参数也随序列不同而有变动。

(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像螺旋桨叶片的样子(图 13-8),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。

DNA 的结构可受环境条件的影响而改变。Watson 和 Crick 所建议的结构代表 DNA 钠盐在较高湿度下(92%)制得的纤维的结构。该结构称为 B 型(B form)。由于它的水分含量较高,可能比较接近大部分 DNA 在细胞中的构象(conformation)。DNA 能以多种不同的构象存在,除 B 型外通常还有 A 型、C 型、D

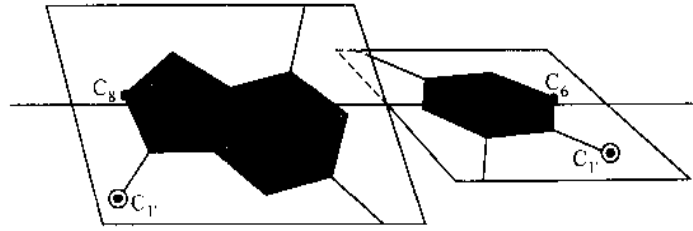


图 13-8 碱基对的螺旋桨状结构

型、E 型、和左手双螺旋的 Z 型。这里包括天然的和人工合成的各种双螺旋 DNA。其中 A 型和 B 型是 DNA 的两种基本的构象，Z 型则比较特殊。

在相对湿度为 75% 以下所获得的 DNA 纤维的 X 射线衍射分析资料表明，这种 DNA 纤维具有不同于 B 型(B-DNA)的结构特点，称为 A 型(A-DNA)。A-DNA 也是由两条反向的多核苷酸链组成的双螺旋，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。

比较 A-DNA 和 B-DNA 的构象显示，两者糖环的折叠方式有所不同。由于呋喃糖环并非平面，糖环上通常有一个或两个原子偏离平面，糖环因此而折叠。如若折叠偏向 C_5' 一侧称为内式(endo)；若偏向另一侧称为外式(exo)。A 型为 C_3' 内式，B 型为 C_2' 内式。碱基平面绕 N-糖苷键旋转就产生顺式(syn)和反式(anti)构象。反式构象是指嘌呤六元环或嘧啶的 O_2 指向远离糖的方向；顺式构象则指向糖。碱基与糖的旋转位置在立体结构上是受限制的。A 型和 B 型均为反式。除糖环折叠方式外，A 型与 B 型螺旋最重要的区别是碱基对的倾斜角和位移(碱基对离开螺旋轴的距离)。在 A 型 DNA 中，碱基对倾斜大，并偏向双螺旋的边缘，给出一个深且狭的大沟和一个宽且浅的小沟。B 型 DNA 中碱基对倾斜角甚小，螺旋轴穿过碱基对，其大沟比小沟宽，深度则相近。RNA 分子由于糖环上存在 $2'-OH$ ，从空间结构上说，它不形成 B 型构象。

自然界双螺旋 DNA 大多为右手螺旋，但也有左手螺旋。A. Rich 在研究人工合成的 $d(CGCGCG)$ 寡核苷酸结构时发现这种左手螺旋的构象。六聚体($dC \cdot dG$)的晶体结构中，自身互补的寡核苷酸排列成反平行，每转 12 个碱基对为一圈，螺距 4.56 nm，碱基对移向边缘，只有小沟，大沟被胞嘧啶的 C_5 和鸟嘌呤的 N_7 、 C_8 原子填充。与右手螺旋不同，在左手螺旋中糖环折叠和糖苷键的构象对嘧啶碱和嘌呤碱各不相同。 dC 是 C_2' 内式，碱基反式； dG 是 C_3' 内式，碱基顺式。因此，磷酸和糖的骨架呈现 Z 字形(zigzag)走向，Z 型名称即源于此(图 13-8)。随后发现天然 DNA 局部也有 Z 型结构。

总的来说，A 型螺旋比较粗短，碱基倾角大一些，大沟深度明显超过小沟；B 型比较适中；Z 型细长，大沟平坦，核苷酸构象顺反相间，使磷酸和糖骨架呈 Z 字形。其余各型 DNA(C 型、D 型和 E 型以及有关亚型)均接近 B 型，可看作与 B 型同一族。

共价结构的改变涉及共价键的断裂与连接。构象受环境条件的影响，它的改变不涉及共价键。DNA 的各型构象在一定条件下可以相互转变。除上述相对湿度能影响 DNA 纤维的构象外，溶液的盐浓度、离子种类、有机溶剂等都能引起 DNA 构象的改变。增加 NaCl 浓度可使 B 型转变为 A 型。当 DNA 是钠盐时，A、B、C 三种形态都能出现，改成锂盐时，只有 B 型和 C 型可能出现。Z 型 DNA 的序列必须含鸟嘌呤，

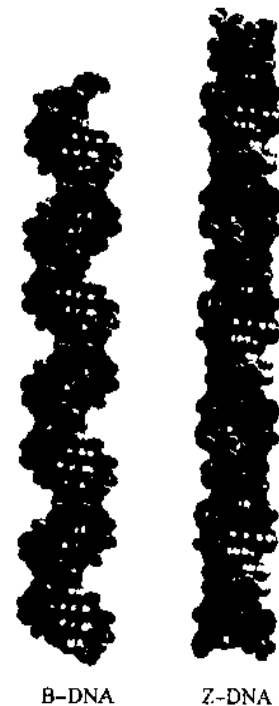


图 13-9 Z-DNA 与 B-DNA 之比较

并且嘌呤碱与嘧啶碱交替出现,在此条件下存在盐和有机溶剂有利于 Z 型的形成。DNA 的甲基化,使大沟表面暴露的胞嘧啶形成 5-甲基胞嘧啶,即可导致 B-DNA 向 Z-DNA 的转化。DNA 的变构效应可能与基因表达的调节有关。

表 13-6 列出了 A 型、B 型和 Z 型 DNA 的主要特征数据。由于各实验室测定样品的方法和条件各不相同,所得数据有较大出入,所列数据可作为了解各类构象特性的比较。

表 13-6 A 型、B 型和 Z 型 DNA 的比较

	螺旋类型		
	A	B	Z
外形	粗短	适中	细长
螺旋方向	右手	右手	左手
螺旋直径	2.55 nm	2.37 nm	1.84 nm
碱基轴升	0.23 nm	0.34 nm	0.38 nm
碱基夹角	32.7°	34.6°	60° ¹⁾
每圈碱基数	11	10.4	12
螺距	2.46 nm	3.32 nm	4.56 nm
轴心与碱基对的关系	不穿过碱基对	穿过碱基对	不穿过碱基对
碱基倾角	19°	1°	9°
糖环折叠	C _{3'} 内式	C _{2'} 内式	嘧啶 C _{2'} 内式,嘌呤 C _{3'} 内式
糖苷键构象	反式	反式	C、T 反式, G 顺式
大沟	很狭、很深	很宽、较深	平坦
小沟	很宽、浅	狭、深	较狭、很深

1) Z-DNA 的核苷酸交替出现顺反式,故以二个核苷酸为单位,转角为 60°。

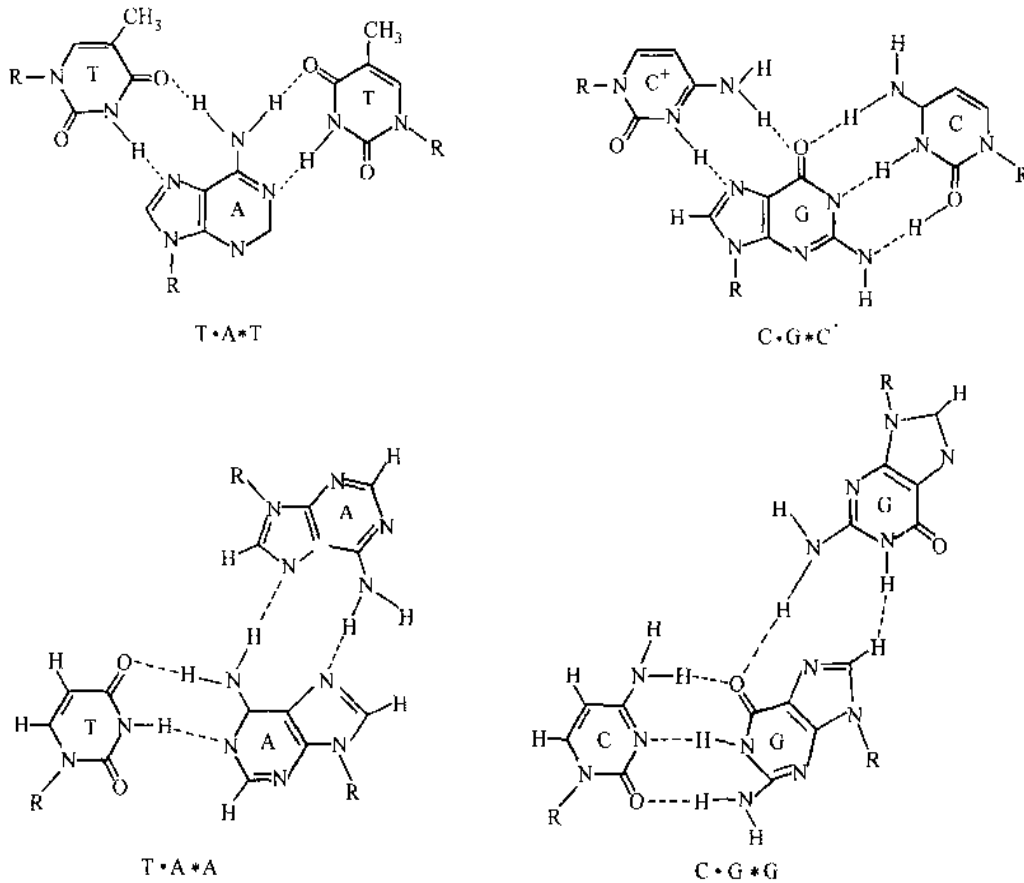


图 13-10 三股螺旋 DNA 中的碱基配对

图中右上角的碱基位于第三股

早在 20 世纪 50 年代双螺旋结构发现之后不久就已观察到一些人工合成的寡核苷酸能够形成三股螺旋(triplex),寡核苷酸包括核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸。K. Hoogsteen 于 1963 年首先描述了三股螺旋螺旋结构。在三股螺旋中,通常是一条同型寡核苷酸与寡嘧啶核苷酸-寡嘌呤核苷酸双螺旋的大沟结合。第三股的碱基可与 Watson-Crick 碱基对中的嘌呤碱形成 Hoogsteen 配对。第三股与寡嘌呤核苷酸之间为同向平行。根据第三股的组成和糖环构型可分为不同的型,例如:Py·Pu * Py、Py·Pu * Pu 和 Py·Pu * rPy 等。“·”表示 Watson-Crick 配对,“*”表示 Hoogsteen 配对。一般认为,三股中碱基配对方式必须符合 Hoogsteen 模型,即第三个碱基以 A 或 T 与 A=T 碱基对中的 A 配对;G 或 C 与 G=C 碱基对中的 G 配对,C 必须质子化,以提供与 G 的 N₇ 结合的氢键供体,并且它与 G 配对只形成两个氢键(图 13-10)。

三股螺旋中的第三股可以来自分子间,也可以来自分子内。绞链 DNA(hinged-DNA)是一种分子内折叠形成的三股螺旋。当 DNA 的一段多聚嘧啶核苷酸或多聚嘌呤核苷酸组成镜像重复(mirror repeat),即可回折产生 H-DNA,该重复序列又称为 H 回文结构(H-palindrome sequence)。例如,交替出现的 T 和 C 序列,其互补链为重复的 A 和 G 序列,就可能形成 H-DNA 结构(图 13-11)。在酸性 pH 或负超螺旋张力的情况下即发生 B→H-DNA 转变。酸性 pH 促使胞嘧啶的质子化,从而提高了形成三股螺旋时以 Hoogsteen 氢键与鸟嘌呤配对的能力。由于这种结构在形成分子内三股螺旋时胞嘧啶需发生 H⁺ 化过程,故称为 H-DNA。

H-DNA 存在于基因调控区和其他重要区域,从而显示出它具有重要生物学意义。实验表明,启动子的 S1 核酸酶敏感区存在一些短的、同向或镜像重复的聚嘧啶-嘌呤区,该区域可以形成 H-DNA,因而产生可被 S1 酶消化的单链结构。

(三) DNA 的三级结构

DNA 在二级结构基础上还可以产生三级结构。

DNA 的三级结构是指 DNA 分子(双螺旋)通过扭曲和折叠所形成的特定构象,包括不同二级结构单元间的相互作用、单链与二级结构单元间的相互作用以及 DNA 的拓扑特征。超螺旋是 DNA 三级结构的一种形式。

当 DNA 双螺旋分子在溶液中以一定构象自由存在时,双螺旋处于能量最低的状态,此为松弛态。如果使这种正常的 DNA 分子额外地多转几圈或少转几圈,就会使双螺旋中存在张力。当双螺旋分子的末端是开放的,这种张力可以通过链的转动而释放出来,DNA 将恢复正常的双螺旋状态。但如果 DNA 分子的两端是固定的,或者是环状分子,这种额外的张力就不能释放掉,DNA 分子本身就会发生扭曲,用以抵消张力。这种扭曲称为超螺旋,是双螺旋的螺旋。

20 世纪 60 年代,J. Vinograd 对环状 DNA 分子的拓扑结构进行了研究,有很大贡献。DNA 的拓扑学公式就是他提出来的。许多 DNA 是双链环状分子(double-stranded circular molecule),如细菌染色体 DNA、质粒 DNA、细胞器 DNA、某些病毒 DNA 等。细菌染色体 DNA 太大,很难分离出完整的 DNA 分子。但可以提取到相对分子质量不太大的天然环状 DNA。通常在这类制剂中可以观察到 3 种形式的 DNA:共价闭环 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA),这类 DNA 常呈超螺旋型(superhelical form);双链环状 DNA 的一条链断裂,称为开环 DNA(open circular DNA, ocDNA),分子呈松弛态;环状 DNA 双链断裂,成为线型 DNA(linear DNA)。

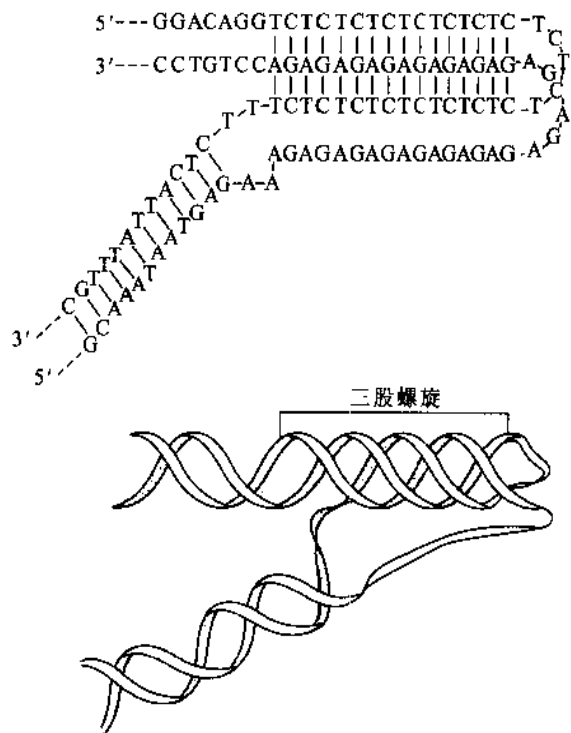


图 13-11 H-DNA 的结构

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 碱基对组成的线型 B-DNA 为例来加以讨论。图 13-12A 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)。当将此线型 DNA 连接成环状时,此环状 DNA 称为松弛型 DNA(relaxed DNA)(图 13-12B)。但是若将上述线型 DNA 的螺旋先拧松两周再连接成环状时,可以形成两种环状 DNA。一种称解链环状 DNA(unwound circle DNA)(图 13-12C),它的螺周数为 23,还含有一个解链后形成的突环。另一种环状 DNA 称超螺旋 DNA(superhelix DNA)(图 13-12D),它的螺周数仍为 25,但同时具有两个螺旋套螺旋,即超螺旋。从力学的观点来说,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 确是以超螺旋的形式存在的。由于超螺旋 DNA 有较大的密度,在离心场中移动较线型或开环 DNA 要快,在凝胶电泳中泳动的速度也较快。应用超速离心及凝胶电泳可以很容易地将不同构象的 DNA 分离开来。

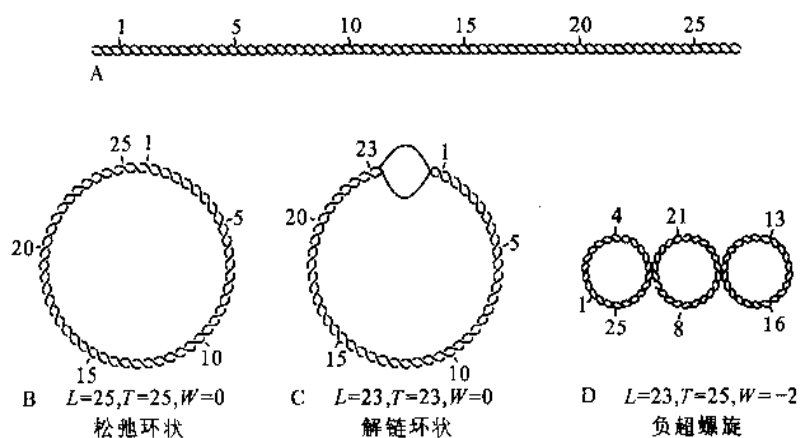


图 13-12 环状 DNA 的不同构象

下面讨论环状 DNA 的一些重要的拓扑学特性。

(1) 连环数(linking number) 这是环状 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。在上述松弛环状 DNA 中, $L=25$,在解链环状分子中及超螺旋分子中 L 值皆为 23。这三种环状 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) 扭转数(twisting number) 指 DNA 分子中的 Watson-Crick 螺旋数,以 T 表示。上述解链环状与超螺旋 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) 超螺旋数(number of turns of superhelix)或缠绕数(writhing number)以 W 表示。上述解链环状和超螺旋 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 linking difference) 以 λ 表示。它用来表示 DNA 的超螺旋程度。

$$\lambda = (L - L_0)/L_0$$

上述由数学拓扑学推导出的公式与 1966 年 Vinograd 在实验中得到的 DNA 超螺旋计算公式 $\alpha = \beta + \tau$ 是一致的。其中 α 是 DNA 两条链的互绕数(intertwining number),相当于拓扑学的连环数 L 。 β 是螺旋圈数(helical turn)由双螺旋构象所决定(B 型构象可取 10.4),相当于扭转数 T 。 τ 是超螺旋数,相当于缠绕数 W 。超螺旋密度(superhelix density) σ 相当于比连环差 λ 。

在上面所举的例中, DNA 的 $L = 23, L_0 = 25$, 所以 $\lambda = -0.08$ 。天然环状 DNA 一般都以负超螺旋构象存在, 超螺旋密度大约在 -0.05 左右。负超螺旋代表环状 DNA 分子的连环数小于构象决定的螺旋圈数, B 型 DNA 是右手螺旋, 其负超螺旋的扭曲方向与之相反, 应为左手螺旋。负超螺旋 DNA 易于解链。DNA 的复制、重组和转录等过程都需将两条链解开, 因此负超螺旋有利于这些功能的进行。但是这些生物学过程需要的负超螺旋程度是各不相同的, 可以通过 DNA 的拓扑结构来调节其功能。

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 W. 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。拓扑异构酶有两种类型。I 类能使双链超螺旋 DNA 转变成松弛型环状 DNA, 每一次催化作用可消除一个负超螺旋, 即使 L 值增加 1。II 类酶刚好相反, 可使松弛型环状 DNA 转变成负超螺旋型 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。

(四) DNA 与蛋白质复合物的结构

生物体内的核酸通常都与蛋白质结合形成复合物, 以核蛋白(nucleoprotein)的形式存在。基因组 DNA 与蛋白质结合形成染色体(染色质)。病毒可以看成是游离的染色体。DNA 分子十分巨大, 将它组装到有限的空间中需要高度组织, 这种组装可以用压缩比(compression ratio)来表示。所谓压缩比是指 DNA 分子长度与组装后特定结构长度之比。真核细胞在间期 DNA 组装成染色质, 它具有各种活性, 如复制和转录, 其压缩比为 $1\ 000 \sim 2\ 000$ 。在有丝分裂期, 染色质进一步组装成染色体, 以便于将 DNA 分配到子代细胞, 此时压缩比达 $8\ 000 \sim 10\ 000$, 提高 $5 \sim 10$ 倍。表 13-7 列出一些 DNA 分子长度和其组装空间的大小。

表 13-7 DNA 与其组装空间的大小

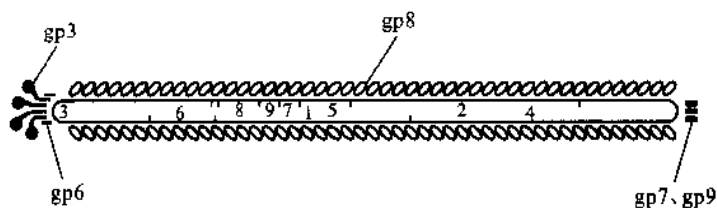
间 隔	外 形	大 小	DNA 类型	长 度
噬菌体 fd	丝状	$0.006 \times 0.85\ \mu\text{m}$	单链环状 DNA	$2\ \mu\text{m} = 6.4\ \text{kb}$
腺病毒	二十面体	$0.07\ \mu\text{m}$ 直径	双链线型 DNA	$11\ \mu\text{m} = 35.0\ \text{kb}$
噬菌体 T ₄	二十面体	$0.065 \times 0.10\ \mu\text{m}$	双链线型 DNA	$55\ \mu\text{m} = 170.0\ \text{kb}$
大肠杆菌	圆筒	$1.7 \times 0.65\ \mu\text{m}$	双链环状 DNA	$1.3\ \mu\text{m} = 4.2 \times 10^3\ \text{kb}$
线粒体(人类)	椭圆柱	$3.0 \times 0.5\ \mu\text{m}$	10 个相同双链环状 DNA	$50\ \mu\text{m} = 16.0\ \text{kb}$
核(人类)	球形	$6\ \mu\text{m}$ 直径	46 个染色体双链线型 DNA	$1.8\ \text{m} = 6 \times 10^6\ \text{kb}$

1. 病毒

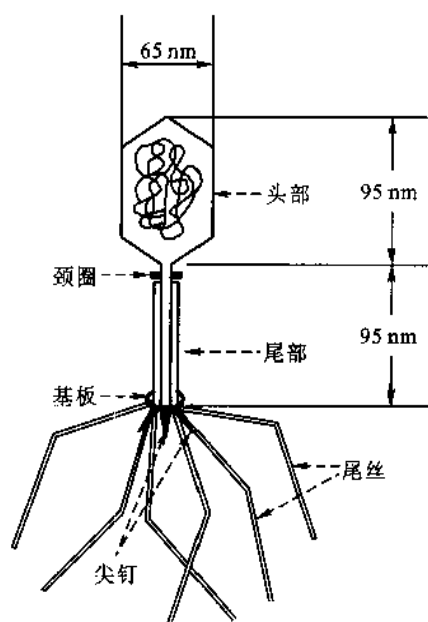
病毒基因组较小, 通常只有几个至几十个基因。病毒颗粒(virion)主要由核酸和蛋白质组成。有的病毒还含有脂质及糖类物质。在病毒颗粒中, 核酸位于内部, 蛋白质包裹着核酸, 这层蛋白质外壳称为衣壳(capsid), 衣壳由许多蛋白质亚基构成, 称为原聚体(protoimer)。有的还有脂蛋白被膜(envelope)。病毒的侵染性是由核酸决定的。病毒蛋白质的主要作用有两方面: 一是与病毒宿主的专一性有关; 二是保护核酸免受损伤。有些病毒蛋白还有附加的功能, 如酶、引物蛋白、运动蛋白等。

噬菌体(phage)是以细菌与放线菌为宿主的病毒。有的噬菌体含 DNA(如大肠杆菌 T 偶数噬菌体、 $\phi\text{X}1.74$ 、M13 等), 有的噬菌体含 RNA(如大肠杆菌噬菌体 MS2、R17、Q β)。单链环状 DNA 的噬菌体, 或为二十面体(如 $\phi\text{X}174$), 或为细丝状(如大肠杆菌噬菌体 fd)。双链 DNA 噬菌体具有特殊的蝌蚪状结构。T 系噬菌体都是蝌蚪形的, 包括一个二十面体的头部和一个尾部(图 4-32)。T 系噬菌体中以 T2 研究得最清楚。它的头部连接一个 $100\ \text{nm}$ 的尾部, 尾部末端有基板、尖钉和尾丝, T2 噬菌体粒重 $M_r\ 2 \times 10^6$, 含 55% DNA, 40% 蛋白质, 还有 5% 为非核酸碳水化合物。T2 入侵宿主细胞时, 只把 DNA 从尾端注射进细胞, 而将外壳留在细胞外面。一些噬菌体的结构见图 13-13。

植物病毒大多数为 RNA 病毒, 但花椰菜花叶病毒组(cauliflower mosaic virus group)和双粒病毒(Geminivirus)为 DNA 病毒。花椰菜花叶病毒(CaMV)基因组为双链环状 DNA, 病毒颗粒呈二十面体。双



A. 噬菌体 fd 结构



B. 噬菌体 T2 结构

图 13-13 一些噬菌体的结构

粒病毒由两个不完全的二十面体组成,含两种单链 DNA 分子,只有两种 DNA 分子同时存在才有感染性。

动物病毒 一般较植物病毒大,含 DNA 或 RNA。有的还有被膜,或叫套膜,如流感病毒、疱疹病毒等。被膜表面带有许多突起(图 13-14),其成分是糖蛋白,具有多种功能,如与宿主细胞的识别等。属于 RNA 病毒的有流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒、劳氏肉瘤病毒等。属于 DNA 病毒的有疱疹病毒、多瘤病毒、猴病毒 SV-40 等。有的病毒(如多瘤病毒、SV-40、腺病毒等)能引起侵染细胞的转化,而成为癌细胞。

2. 细菌的拟核

虽然细菌没有真核细胞的核结构,其遗传物质也不显示真核细胞染色体的形态特征,但细菌的染色体 DNA 并非完全散开的,它在细胞内紧密缠绕形成致密的小体,称为拟核(nucleoid),约占细胞体积的三分之一。细菌的基因组为双链环状 DNA,其上结合碱性蛋白和少量 RNA,组成许多突环(图 13-15)。其 DNA 分子长度大约是其菌体长度的 1 000 倍,所以必须以一定的组织结构压缩在细胞内。大肠杆菌和其他原核细胞基因组是以这种拟核形式在细胞中执行其各种功能。

3. 真核生物的染色体

原核生物的基因组比较简单,但也有一定的结构。如上所述,其 DNA 主要是通过与碱性蛋白结合并形成突环而组装成拟核。在这种缠绕和折叠过程中还有赖于 RNA 的作用。然而,真核生物的染色体就复杂得多,它具有不同层次的组装结构,压缩比达 10 000。在细胞分裂间期,基因组以染色质形式存在。染色质分为常染色质和异染色质两种。在常染色质中 DNA 的压缩比为 1 000~2 000,相对比较伸展,主要为单拷贝基因和中等重复序列,是基因活跃表达区域,其表达受各种调节因子的调节。异染色质是指在

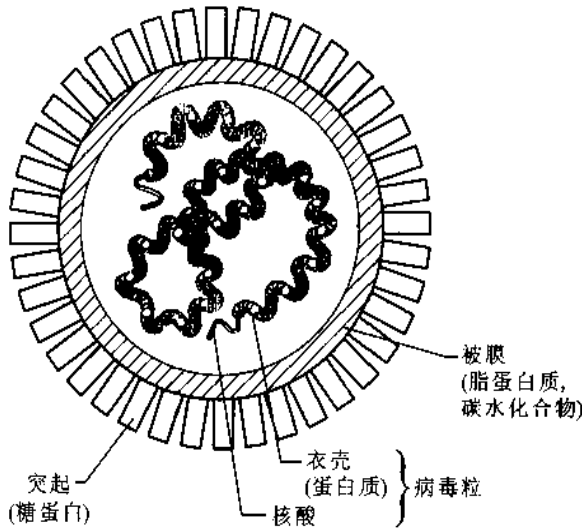


图 13-14 动物病毒切面模式图

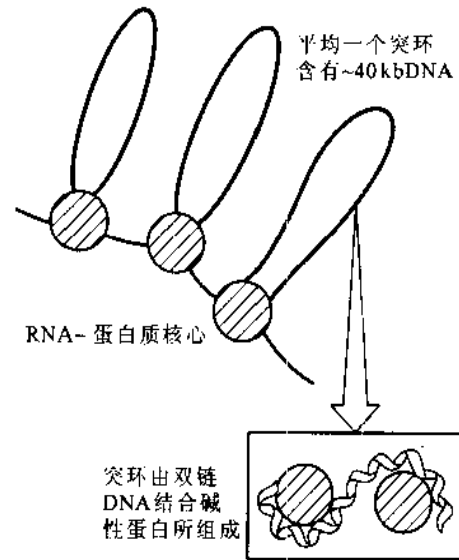


图 13-15 细菌拟核的突环结构

间期核中 DNA 折叠压缩程度较高,以凝集状态存在,对碱性染料着色较深的区域。着丝粒、端粒、次缢痕以及染色体的某些节段,由较短和高度重复的 DNA 序列组成永久性的异染色质。另一些染色质区域随细胞分化而进一步折叠压缩,以封闭基因活性,称为功能性异染色质。例如,哺乳类动物雄性个体的细胞含一条 X 染色体,呈常染色体状态;雌性个体的细胞含两条 X 染色体,其中一条在发育早期随机发生异染色质化而成为无活性的巴氏小体,而被永久封闭。此过程使雄性细胞和雌性细胞 X 染色体基因的活性水平相等,称为性分化的剂量补偿效应。

染色质的基本结构单位是核小体(nucleosome)。过去一般认为蛋白质是结合于 DNA 的大沟之中。但是,自从 1974 年 R. D. Kornberg 根据电镜观察和 X 射线衍射等资料,提出核小体的结构以后,上述结论已被否定。按照 Kornberg 的模型,核小体是由直径为 $110\text{\AA} \times 55\text{\AA}$ 的组蛋白核心和盘绕其上的 DNA 所构成。核心由组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各 2 分子组成,所以是一个八聚体;DNA 以左手螺旋在组蛋白核心上盘绕 1.8 圈,共 146 bp。核小体之间连接 DNA 的长度随不同核小体而略有不同,平均每个核小体重复单位约占 DNA 200 bp(图 13-16)。

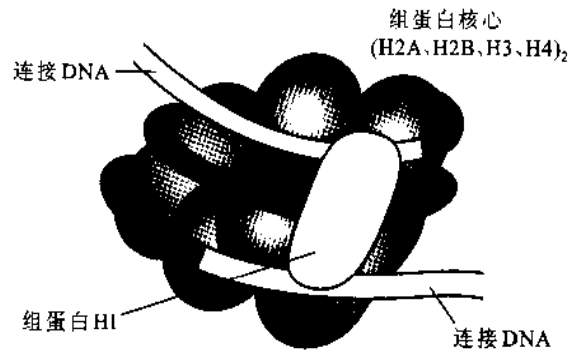


图 13-16 核小体的结构

DNA 组装成核小体,其长度缩短 7 倍。这种结构已得到广泛实验支持。组蛋白 H1 结合于连接 DNA 上,使核小体一个挨一个,彼此靠拢。组蛋白的性质列于表 13-8。

表 13-8 组蛋白的性质

种类	相对分子质量*	氨基酸残基数目	碱性氨基酸含量/%	
			Lys	Arg
H1	21 130	223	29.5	1.3
H2A	13 960	129	10.9	9.3
H2B	13 774	125	16.0	6.4
H3	15 273	135	9.6	13.3
H4	11 236	102	10.8	13.7

* H1、H2A、H2B 的分子大小随不同物种而异,这里列的是牛的组蛋白。

核小体由连接 DNA 相连,犹如一串念珠(beads-on-a-string)。核小体链可进一步盘绕成 30 nm 的染色质纤丝(chromatin fiber),每圈 6 个核小体。组蛋白 H1 是维系这种高级结构的重要成分。用温和的方法可以分离到 30 nm 的纤丝,并在电子显微镜下观察到它的结构。30 nm 纤丝是染色质第二级组织,它使 DNA 压缩大约 100 倍。更高级的组织目前还不清楚。可能是某些序列特异的 DNA 结合蛋白(非组蛋白)使 DNA 一定区域联结到核骨架上,DNA 被分成 20 000 至 100 000 碱基对的突环(平均 75 000 碱基对)。每一个突环含有若干功能相关的基因。例如,果蝇编码整套组蛋白的基因成簇分布在突环上,突环两侧为骨架附着位点。骨架含有多种蛋白质,其中包括拓扑异构酶 II,可见 DNA 的拓扑结构与染色质组装关系密切。

真核生物染色体还存在更高层次的组织,使 DNA 进一步被压缩。图 13-17 所示为一种目前比较广泛接受的组装模型:由染色质纤丝组成突环(loop),再由突环形成玫瑰花结(rosette)形状的结构,进而组装成螺旋圈(coil),由螺旋圈再组装成染色单体(chromatid)。简言之,染色体是由 DNA 和蛋白质以及 RNA 构成的不同层次缠绕线(plectonemic)和螺线管(solenoidal)结构。很可能不同物种的染色体,或是同一物种不同状态下的染色体,或是同一染色体的不同区域,其高级结构均有所不同。不能用一个简单的模型来描述染色体的结构。然而,在真核生物染色体中,DNA 压缩的基本原则看来是在螺旋上形成螺旋,再形成螺旋。

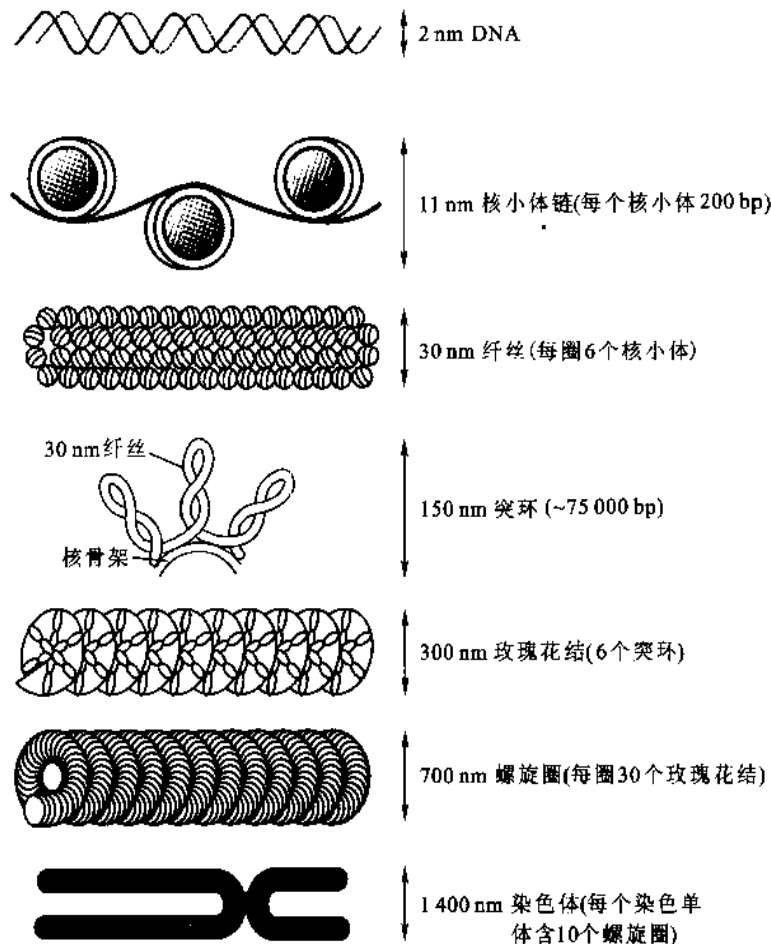


图 13-17 真核生物染色体 DNA 组装不同层次的结构

在病毒颗粒、细菌拟核和真核生物的染色体中,DNA 通常以超螺旋和其他三级结构的形式存在。DNA 与蛋白质等的复合物则属于四级结构。更高层次的组织结构则涉及到超分子结构和亚细胞结构了。

四、RNA的高级结构

RNA通常是单链线型分子,但可自身回折形成局部双螺旋(二级结构),进而折叠(三级结构)。除tRNA外,几乎全部细胞中的RNA都与蛋白质形成核蛋白复合物(四级结构)。RNA复合物承担着重要的细胞功能,如核糖体(ribosome)、信息体(informosome)、信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)、拼接体(spliceosome)、编辑体(editosome)等。RNA病毒是具有感染性的RNA复合物。

(一) tRNA的高级结构

tRNA在蛋白质生物合成过程中具有转运氨基酸和识别密码子的作用,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和基因表达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的空间结构特点作一概括。

tRNA的二级结构都呈三叶草形(图13-18)。双螺旋区构成了叶柄,突环区好像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5个部分组成。

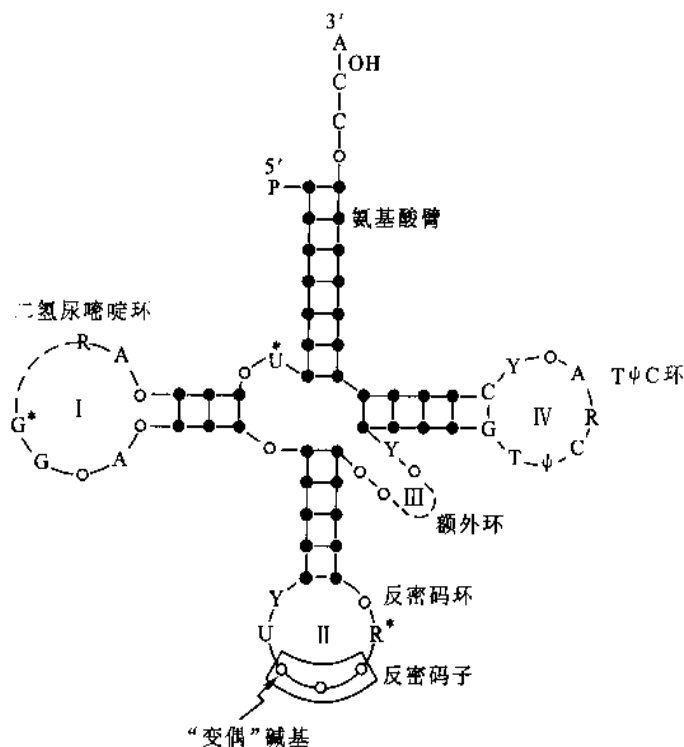


图13-18 tRNA三叶草形二级结构模型

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

- (1) 氨基酸臂(amino acid arm) 由7对碱基组成,富含鸟嘌呤,末端为CCA,接受活化的氨基酸。
- (2) 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。
- (3) 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。反密码子可识别信使 RNA 的密码子。

(4) 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。

(5) 假尿嘧啶核苷-胸腺嘧啶核糖核苷(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。

tRNA 的折叠形成三级结构。由于获得了酵母苯丙氨酸 tRNA 的晶体,应用高分辨率的 X 射线衍射仪, Kim(1973)及 Robertus(1974)证明 tRNA 具有倒 L 形的三级结构(图 13-19)。酵母苯丙氨酸 tRNA 三级结构的大小为 $65\text{\AA} \times 75\text{\AA} \times 25\text{\AA}$ 。在此 tRNA 的三级结构中,氨基酸臂与 T ψ C 臂形成一个连续的双螺旋区,构成字母 L 下面的一横。而二氢尿嘧啶臂与它相垂直,二氢尿嘧啶臂与反密码臂及反密码环共同构成字母 L 的一竖。反密码臂经额外环而与二氢尿嘧啶臂相连接。此外,二氢尿嘧啶环中的某些碱基与 T ψ C 环及额外环中的某些碱基之间形成额外的碱基对。这些额外的碱基对是维持 tRNA 三级结构的重要因素。

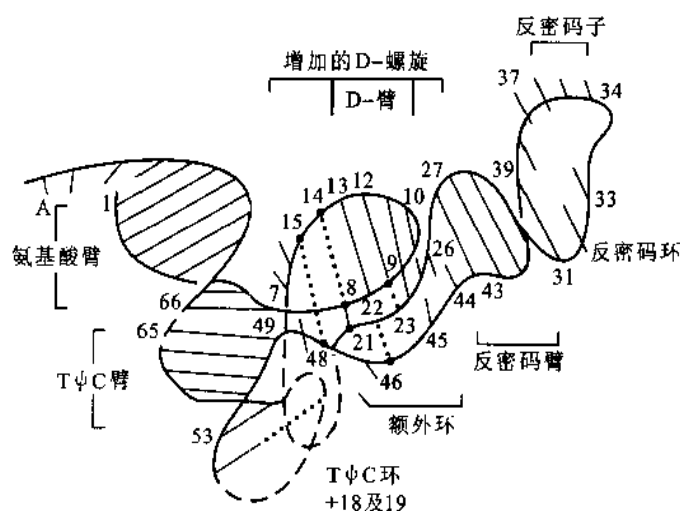


图 13-19 酵母苯丙氨酸 tRNA 的三级结构

tRNA 的生物学功能与其三级结构有密切的关系。目前认为氨酰 tRNA 合成酶是结合于倒 L 形的侧臂上的。tRNA 被甲基化修饰时,加甲基的部位也可能与其三级结构有关,并增加了 tRNA 的识别功能。

(二) rRNA 的高级结构

蛋白质生物合成是细胞代谢最复杂也是最核心的过程,其中涉及到 200 多种生物大分子参与作用。核糖体是蛋白质合成的工厂,其结构一直备受关注。20 世纪 70 年代,通过电子显微镜观察显示了核糖体大亚基和小亚基的粗略结构。其后用免疫电镜、中子衍射等技术,才得出核糖体更精细的结构。按照传统的看法,rRNA 是核糖体的骨架,蛋白质的肽键是由核糖体上的肽基转移酶(peptidyl transferase)催化下合成的。直到 90 年代初,H.F. Noller 等证明大肠杆菌 23 S rRNA 能够催化肽键的形成,才证明核糖体是一种核酶,从而根本改变了传统的观点。核糖体催化肽键合成的是 rRNA,蛋白质只是维持 rRNA 构象,起辅助的作用。

所有生物的核糖体都是由大小不同的两个亚基所组成,大小亚基分别由几种 rRNA 和数十种蛋白质组成。大肠杆菌的核糖体相对分子质量达 2.7×10^6 ;哺乳动物的核糖体相对分子质量达 4.2×10^6 。细菌和哺乳动物核糖体的组成列于表 13-9。

表 13-9 细菌和哺乳动物核糖体的组成

核糖体	大 小	亚 基	rRNA	蛋白质
细菌	70 S	30 S	16 S rRNA	21
	$M_r 2.7 \times 10^6$	$M_r 0.9 \times 10^6$	(1 540 nt)	
	RNA 含量 66%	50 S	5 S rRNA	33
	蛋白质含量 34%	$M_r 1.8 \times 10^6$	23 S rRNA	
			(3 200 nt)	
哺乳动物	80 S	40 S	18 S rRNA	33
	$M_r 4.2 \times 10^6$	$M_r 1.4 \times 10^6$	(1 900 nt)	
	RNA 含量 60%	60 S	5 S rRNA	49
			(120 nt)	
	蛋白质含量 40%	$M_r 2.8 \times 10^6$	5.8 S rRNA	
			(160 nt)	
			28 S rRNA	
			(4 700 nt)	

2000 年对核糖体晶体学研究取得划时代意义的成果,几个实验室分别解析了核糖体大亚基和小亚基高分辨率的结构。在核糖体中含有超过 4 500 个核苷酸的 rRNA 以及数十种蛋白质分子,如此复杂的复合物能够在原子水平上揭示其结构,这充分代表了当今科学达到的水平。这一成果不仅有助于阐明核糖体的作用机制,而且也揭示了 RNA-RNA 与 RNA-蛋白质相互作用的规律。图 13-20 所示为大肠杆菌 16 S rRNA 和 5 S rRNA 的二级结构。

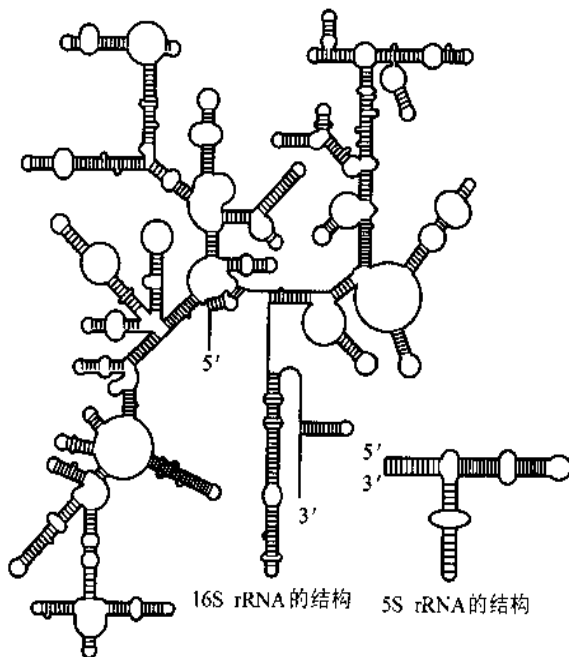


图 13-20 16S 和 5S rRNA 的结构

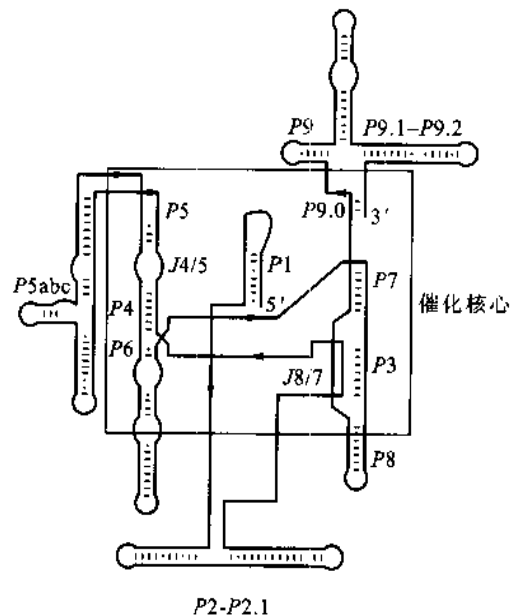


图 13-21 类型 I 自我剪接内含子的二级结构

P 表示碱基配对片段; *J* 表示连接区。

中间方框是催化的核心部位

(三) 其他 RNA 的高级结构

游离的 mRNA 可以产生高级结构,但在核糖体上翻译时必须解开。mRNA 产生高级结构的倾向将影响其翻译效率。

核酶(ribozyme)的催化功能与其空间结构密切相关。除 rRNA 外,迄今已知有 8 种核酶的结构:

RNase P 的 RNA 亚基(M1 RNA)、锤头型、发夹型、丁型肝炎病毒(Hepatitis delta virus, HDV)基因组和反基因组、Varkud 卫星(Vs)质粒、类型 I 和类型 II 自我剪接内含子。M1 RNA 和类型 I 自我剪接内含子是最早发现的核酶。锤头型、发夹型和 HDV 正负链核酶均能促使自身或底物 RNA 裂解,产生 2',3'环磷酸酯和 5'OH 末端。Vs 核酶是线粒体逆转录因子质粒,它具有类似的裂解功能。图 13-21 表示类型 I 自我剪接内含子的二级结构。

RNA 一般都与蛋白质形成复合物,而且总是以 RNA-蛋白质复合物的形式执行功能。在复合物中, RNA 与蛋白质何者是主体,何者只起辅助作用? 过去一直以为帮助分泌蛋白和膜蛋白跨膜运输的信号识别颗粒(SRP)中, RNA 只起简单的“衣架”(coat hangers)作用。直到最近通过动力学分析才发现,细菌 SRP 中的 4.5 S RNA 能够促进 SRP 蛋白(Ffh)和 SRP 受体(Fts Y)间的可逆结合。藉助核磁共振(NMR)和 X 射线晶体学研究,揭示了 4.5 S RNA 在与 Ffh 蛋白结合前后构象的变化(图 13-22)。由于 SRP RNA 能稳定 Ffh 与 Fts Y 结合的过渡态,因而具有催化作用。这个例子说明,某些表面看来“被动”的 RNA,很可能具有意想不到的功能性质。

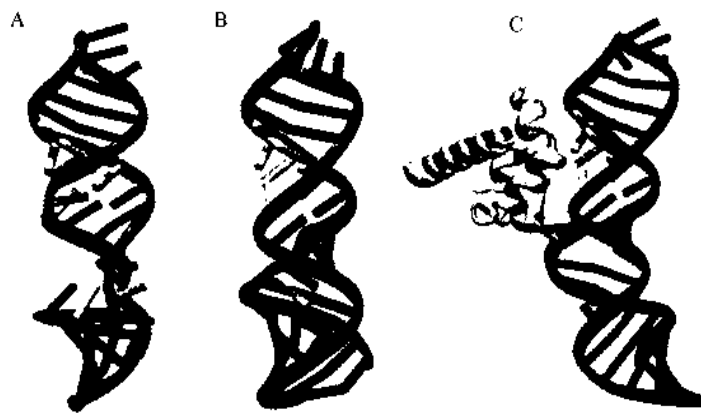


图 13-22 信号识别颗粒 4.5 S RNA 结构域 IV 的溶液和晶体结构

A 和 B 分别为 SRP RNA 结构域 IV 的溶液和晶体结构。C 表示该 RNA 与 Ffh 蛋白 M 结构域形成复合物时的结构。

当 RNA 与蛋白质结合时,其不对称突环发生大的构象变化

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。核酸的研究是生物化学与分子生物学研究的重要领域。

核酸是一种多聚核苷酸,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。

核酸的共价结构也就是核酸的一级结构,通常是指具核苷酸序列。利用磷酸二酯酶从 RNA 分子的两端逐个水解下核苷酸,得到 3'核苷酸和 5'核苷酸,证明 RNA 分子中核苷酸之间的连键为 3',5'-磷酸二酯键。DNA 无 2'OH 基,它的核苷酸连键只能是 3'→5'走向。原核生物基因序列是连续的,常组成操纵子,很少重复序列。真核生物基因序列是断裂的,不组成操纵子,含有较高比例的重复序列。RNA 有各种类型,常含有修饰核苷, tRNA 含有较多修饰碱基, rRNA 含有较多甲基化的核糖,两者均含有假尿嘧啶核苷。真核生物 mRNA 5'端有甲基化鸟嘌呤核苷酸形成的帽子;3'端有 poly(A)尾巴。

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三方面。一是已知核酸的化学结构。二是 DNA 碱基组成的分析资料,Chargaff 首先发现 A-T, G-C 之间相等的规律。三是 DNA 纤维的 X 射线衍射分析资料,提示了双螺旋结构的可能性。按照 Watson-Crick 的模型,DNA 是由两条反相平行的多核苷酸链围绕同一中心轴互相缠绕,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,形成双螺旋分子的骨架。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 2 nm,碱基堆积距离为 0.34 nm,两核苷酸之间的夹角是 36° ,每一螺旋由 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氢键和碱基堆积力。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 射线衍射分析技术研究发现,Watson-Crick 模型需要作某些补充才能反映 DNA 结构的真实情况。

DNA 的二级结构主要是形成双螺旋。但在某些情况下也能形成三股螺旋。Hoogsteen 最早发现寡聚嘌呤核苷酸-寡聚嘧啶核苷酸双螺旋的大沟可以结合第三条寡聚嘌呤或嘧啶核苷酸,形成 Hoogsteen 配对。H-DNA 是通过分子内折叠形成的三股螺旋,它存在于基因调控区,因而有重要生物学意义。

细胞内很多 DNA 是双链环状分子(cccDNA),一条链断裂可以形成开环分子(oc DNA),两条链断裂就成为线型分子(linear DNA)。DNA 分子的两端如是固定的,或是环状分子,增加或减少螺旋圈数,可引起超螺旋。拓扑学的公式 $L = T + W$ 可用以说明连环数(L)、扭转数(T)和缠绕数(W)之间的关系。比连环差(λ)= $(L_1 - L_0) / L_0$ 表示超螺旋的强度。DNA 超螺旋是 DNA 三级结构的一种形式。

DNA 与蛋白质复合物的结构是其四级结构。病毒、细菌拟核和真核生物的染色体都存在 DNA 的组装和一定程度的压缩。核小体是真核生物染色质的基本结构单位,它由 8 个组蛋白(H2A、H2B、H3、H4)₂ 核心和外绕 1.8 圈的 DNA 所组成。由核小体链形成纤丝,进而折叠、螺旋化,组装成不同层次结构的染色质和染色体。

不同类型 RNA 分子可自身回折形成局部双螺旋,并折叠产生三级结构,RNA 与蛋白质复合物则是四级结构。rRNA 的二级结构呈三叶草形,三级结构为倒 L 形。rRNA 组装成核糖体,其结构已获得解析。已知有 8 种类型的核酶,它们的催化功能与空间结构有密切关系。信号识别颗粒中的 4.5 S RNA 具有催化 SRP 的 Ffh 蛋白与 SRP 受体 Fts Y 可逆结合的功能。

习 题

1. 比较 DNA 和 RNA 在化学结构上、大分子结构上和生物学功能上的特点。
2. 从已经揭示的人类基因组结构有何特点?
3. 原核生物与真核生物 mRNA 的结构有何异同?
4. 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?
5. 应用 DNA 晶体 X 射线衍射技术分析 DNA 对 Watson-Crick 模型有何修正? 比较 A-DNA、B-DNA、Z-DNA 的主要特点。
6. 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(2.2×10^9 m)之几倍? [2.2×10^{11} m, 100 倍]。
7. 何谓 H-DNA? 它有何生物学意义?
8. 何谓 Hoogsteen 碱基对? 它与 Watson-Crick 碱基对有何不同?
9. 病毒 DNA 有哪些种类? 为什么病毒 DNA 的种类繁多、结构各异?
10. 细菌拟核的主要结构特点是什么?
11. DNA 绕在组蛋白八聚体核心上构成一个核小体,其 ΔL 平均为 -1.2,核小体链并无扭曲张力,为什么? 试计算此 DNA 的超螺旋密度(每圈碱基对按 10 计算)。 [$\lambda = 0.06$]
12. 简要叙述染色体的组装模型。
13. RNA 有哪些主要类型? 比较其结构与功能特点。
14. 核酶主要有哪几种类型? 它们各自催化什么反应?
15. 是否所有 RNA-蛋白质复合物中决定复合物功能的都是 RNA,蛋白质都只起辅助作用?

主要参考书

1. Nelson, D L, Cox, M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Weaver, R F. Molecular Biology. McGraw-Hill Companies, Inc., 2000

3. Lewin B. Gene VII. Oxford: Oxford University Press, 2000
4. Stryer L. Biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999

(朱圣庚)

第 14 章 核酸的物理化学性质

核酸的化学结构和作为高聚物决定着其物理化学性质。核酸的糖苷键和磷酸二酯键可被水解。核酸具有磷酸基和碱基,因此表现出酸碱性质。核酸的紫外吸收特性是因其所含碱基引起的。核酸的变性和复性则与其双螺旋结构有关。

一、核酸的水解

核酸嘌呤碱的 N9 和嘧啶碱的 N1 与戊糖的 C1 形成 N-糖苷键。有两种戊糖(核糖和脱氧核糖),所以可以形成 4 种糖苷,即嘌呤核苷、嘌呤脱氧核苷、嘧啶核苷、嘧啶脱氧核苷。磷酸基与两种糖分别形成核糖磷酸酯和脱氧核糖磷酸酯。所有这些糖苷键和磷酸酯键都能被酸、碱和酶水解。

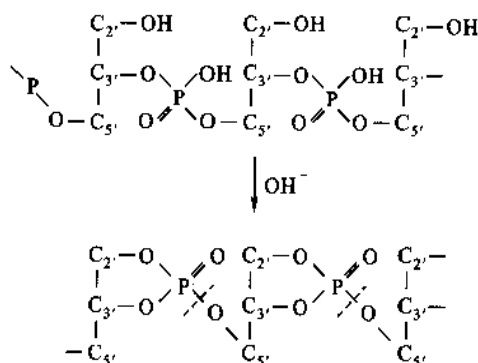
(一) 酸水解

糖苷键和磷酸酯键都能被酸水解,但糖苷键比磷酸酯键更易被酸水解。嘌呤碱的糖苷键比嘧啶碱的糖苷键对酸更不稳定。对酸最不稳定的是嘌呤与脱氧核糖之间的糖苷键。因此 DNA 在 pH 1.6 于 37 °C 对水透析即可完成除去嘌呤碱,而成为无嘌呤酸(apurinic acid);如在 pH 2.8 于 100 °C 加热 1 h,也可完全除去嘌呤碱。

为了水解嘧啶糖苷键,常需要较高的温度。用甲酸(98%~100%)密封加热至 175 °C 2 h,无论 RNA 或 DNA 都可以完全水解,产生嘌呤和嘧啶碱,缺点是尿嘧啶的回收率较低。改用三氟乙酸在 155 °C 加热 60 min(水解 DNA)或 80 min(对 RNA),嘧啶碱的回收率显著提高。

(二) 碱水解

RNA 的磷酸酯键易被碱水解,产生核苷酸。DNA 的磷酸酯键则不易被碱水解。这是因为 RNA 的核糖上有 2'-OH 基,在碱作用下形成磷酸三酯。磷酸三酯极不稳定,随即水解,产生核苷 2',3'-环磷酸酯。该环磷酸酯继续水解产生 2'-核苷酸和 3'-核苷酸。DNA 的脱氧核糖无 2'-OH 基,不能形成碱水解的中间产物,故对碱有一定抗性。RNA 被碱水解的过程如下:



用于水解 RNA 的碱有 NaOH、KOH 等,以 KOH 较好,水解后可用 HClO₄ 中和。由于 KClO₄ 溶解度较小,溶液中大部分 K⁺ 即被除去。碱浓度一般为 0.3~1 mol/L,在室温至 37 °C 下水解 18~24 h 就可完毕。如采用较高温度,则时间应缩短。在上述条件下水解 RNA 的产物为 2'-和 3'-单核苷酸,但也可能有少量核苷、2',5'-和 3',5'-核苷二磷酸。DNA 一般对碱稳定,如在 1 mol/L NaOH 中加热至 100 °C 4 h,可以得到小分子的寡聚脱氧核苷酸。

(三) 酶水解

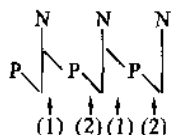
水解核酸的酶种类很多。非特异性水解磷酸二酯键的酶为磷酸二酯酶(phosphodiesterase),例如前述蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶。专一水解核酸的磷酸二酯酶称为核酸酶(nuclease)。

1. 核酸酶的分类

(1) 按底物专一性分类。作用于核糖核酸的称为核糖核酸酶(ribonuclease, RNase);作用于脱氧核糖核酸的称为脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease, DNase)。

(2) 按对底物作用的方式可分成核酸内切酶(endonuclease)与核酸外切酶(exonuclease)。内切酶的作用点在多核苷酸链的内部,而外切酶的作用点从多核苷酸链的末端开始,逐个地将核苷酸切下,从而对核酸进行降解。也有少数酶既可内切,也能外切,如小球菌核酸酶(micrococcal nuclease)。

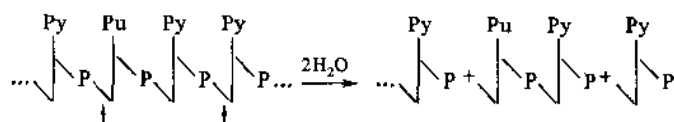
(3) 按磷酸二酯键断裂的方式可将核酸酶分成两类。一种是在3'-OH与磷酸基之间断裂,其产物是5'-磷酸核苷酸或寡核苷酸,如图中的(1)。另一种是在5'-OH与磷酸基之间断裂,其产物为3'-磷酸核苷酸或寡核苷酸,如图中的(2)。



(4) 其他分类标准还有:对底物二级结构的专一性,作用于双链核酸的叫双链酶,作用于单链的叫单链酶;核酸外切酶作用的方向性,3'→5'或5'→3';对磷酸二酯键两侧的碱基有无选择性等。

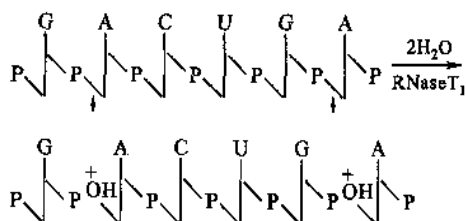
2. 核糖核酸酶类

(1) 牛胰核糖核酸酶(EC 2.7.7.16)。这个酶存在于牛胰中,所以叫牛胰核糖核酸酶(pancreatic ribonuclease),简称RNase I,于1940年时就制成结晶。它只作用于RNA,不作用于DNA。相对分子质量为13 700,最适pH为7.0~8.2,十分耐热。不但对这个酶的全部结构已经搞清楚,而且还成功地人工合成了它。RNase I是具有极高专一性的内切酶,其作用点为嘧啶核苷-3'-磷酸与其他核苷酸之间的连键,产物为3'-嘧啶核苷酸;或以3'-嘧啶核苷酸结尾的寡核苷酸。(下式中的Pu表示嘌呤碱,Py表示嘧啶碱)。



水解的机理与碱对RNA的降解十分相似。中间产物也是环形2',3'-核苷酸,最后产物为3'-核苷酸。

(2) 核糖核酸酶 T_1 (ribonuclease T_1)(EC 3.1.4.8)。这是从米曲霉 *Aspergillus oryzae* 中分离到的一种内切酶,相对分子质量较小,耐热,耐酸。具有比RNase I更高的专一性。它的作用点是3'-鸟苷酸与其相邻核苷酸的5'-OH之间的连键,产物为以3'-鸟苷酸为末端的寡核苷酸,或3'-鸟苷酸。



(3) 核糖核酸酶 T_2 (RNase T_2)。这个酶的来源同RNase T_1 ,主要作用点为Ap残基,可以将tRNA完

全降解成 3'-腺苷酸结尾的寡核苷酸。

3. 脱氧核糖核酸酶类

(1) 牛胰脱氧核糖核酸酶(pancreatic deoxyribonuclease, DNase I)(EC 3.1.4.5) 此酶切断双链 DNA 或单链 DNA 成为以 5'-磷酸为末端的寡聚核苷酸,平均长度为 4 个核苷酸。需镁离子(或 Mn^{2+} , Co^{2+}), 最适 pH 7~8,用 0.01 mol/L 柠檬酸盐可完全抑制被镁离子激活的活性。柠檬酸盐的作用在于螯合了镁离子而使酶失去活性,对锰离子无抑制作用。

(2) 牛脾脱氧核糖核酸酶(spleen deoxyribonuclease, DNase II)(EC 3.1.4.6) 此酶降解 DNA 成为 3'-磷酸末端的寡聚核苷酸,平均长度为 6 核苷酸。最适 pH 4~5,需 0.3 mol/L 钠离子激活,镁离子可以抑制此酶。所以 DNase II 的性质与 DNase I 的性质几乎是完全不同的。

(3) 链球菌脱氧核糖核酸酶(streptococcal deoxyribonuclease) 是一个内切酶,作用于 DNA,产物为 5'-磷酸为末端的碎片,其长度不一。最适 pH7,需镁离子。

(4) 限制性内切酶 在细菌中发现有这类酶,主要是降解外源的 DNA。具有很严格的碱基序列专一性。第一个发现的限制性内切酶(restriction endonuclease)是从大肠杆菌(*E. coli* K)中发现的(1968 年),相对分子质量在 300×10^3 以上,需要 ATP, Mg^{2+} , S-腺苷-L-甲硫氨酸,作用于双链 DNA,产物为带 5'-磷酸基末端的碎片。它在识别序列下游随机切割 DNA,这一缺陷限制了它的应用价值。另一类限制性内切酶,如 *EcoR* I,它的相对分子质量较小(58 000),不需要 ATP,只需要镁离子,专一性很强,能识别 DNA 链上 6 对碱基组成的序列,交错切割,形成的产物具有粘性末端。5'-磷酸基用碱性磷酸酯酶切除后,可以用多核苷酸磷酸激酶再接上带放射性同位素的磷酸残基。所有这些特性,从 DNA 的体外重组来说都是极有用的。目前已找到的限制性内切酶已有数千种,在基因工程中广为应用的也有几百种。限制性内切酶已成为基因工程最重要的工具酶。

限制性内切酶的命名较为特殊。以 *EcoR* I 为例,第一个字母 E 为大肠杆菌 *E. coli* 属名的第一个字母,第 2、3 两个字母 co 为它的种名的头两个字母,第 4 个字母 R 表示所用大肠杆菌的菌株。最后一个罗马字表示该细菌中已分离出的这一类酶的编号。

限制性内切酶往往与一种甲基化酶同时成对地存在,它们具有相同的底物专一性,具有识别相同碱基序列的能力。甲基化酶的甲基供体即为 S-腺苷甲硫氨酸,甲基受体为 DNA 上的腺嘌呤与胞嘧啶。当内切酶作用位点上的某一些碱基被甲基化修饰后,限制酶就不能再降解这种 DNA 了。所以甲基化酶使细菌自身的 DNA 带上标志,限制性内切酶专用于降解外来入侵的异种 DNA。

4. N-糖苷酶

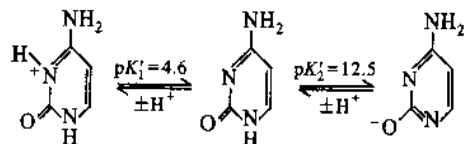
各种非特异的糖苷酶,或对碱基特异的 N-糖苷酶可水解糖苷键。

二、核酸的酸碱性质

核酸的碱基、核苷和核苷酸均能发生解离,核酸的酸碱性质与此有关。

1. 碱基的解离

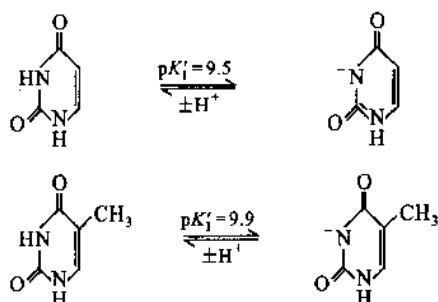
由于嘧啶和嘌呤化合物杂环中的氮以及各取代基具有结合和释放质子的能力,所以这些物质既有碱性解离又有酸性解离的性质。胞嘧啶环所含氮原子上有一对未共用电子,可与质子结合,使 $=N-$ 转变成带正电的 $=N^+H-$ 基团。此外,胞嘧啶上的烯醇式羟基与酚基很相像,具有释放质子的能力,呈酸性。因此,在水溶液中,胞嘧啶的中性分子,阳离子和阴离子之间,具有一定的平衡关系:



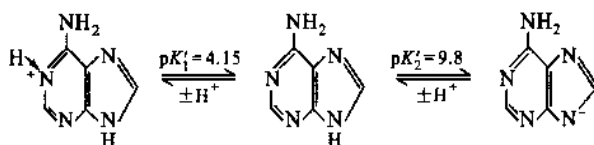
过去一直以为 pH 4.4 的解离与胞嘧啶的氨基有关。其实氨基在嘧啶碱中所呈的碱性极弱,这是因为嘧啶

环与苯环相似,具有吸引电子的能力,使得氨基氮原子上的未共用电子对不易与氢离子结合。氢离子主要是与环中第三位上的氮原子(用 N_3 表示)相结合。

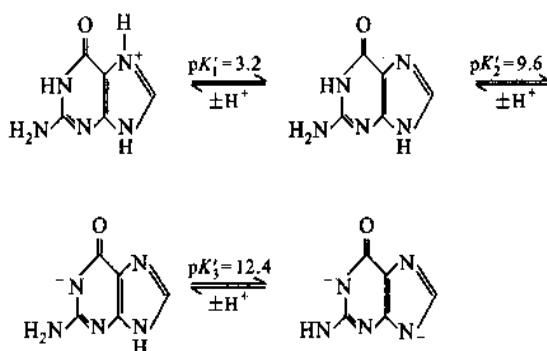
尿嘧啶及胸腺嘧啶环上无氨基, N_3 酸性解离的 pK'_1 值分别为 9.5 与 9.9。



腺嘌呤中,质子结合于 N_1 上,其 $pK'_1 = 4.15$ 。pH 9.8 的解离在咪唑环的 $-NH-$ 基上发生,在它的核苷及核苷酸中,由于 N_9 上形成了糖苷键,所以没有 pH=9.8 的解离。



鸟嘌呤和次黄嘌呤中,质子则结合于 N_7 上。以鸟嘌呤为例, N_7 上的解离 $pK'_1 = 3.2$ 。 N_1 上的解离, $pK'_2 = 9.6$ 。咪唑环 N_9 上的解离 $pK'_3 = 12.4$ 。鸟嘌呤咪唑环上的 pK' 值如此之大,可能是受到环上烯醇式羟基的影响所致。

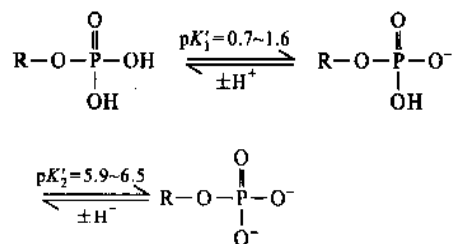


2. 核苷的解离

由于戊糖的存在,核苷中碱基的解离受到一定的影响,例如,腺嘌呤环的 pK'_1 值原为 4.15,在核苷中则降至 3.63。胞嘧啶 pK'_1 为 4.6,胞嘧啶核苷中则降至 4.15。 pK' 值的下降说明糖的存在增强了碱基酸性解离。核糖中的羟基也可以发生解离,其 pK'_1 值通常在 12 以上,所以一般不去考虑它。

3. 核苷酸的解离

由于磷酸基的存在,使核苷酸具有较强的酸性。在核苷酸中,碱基部分的 pK' 值与核苷的相似,额外两个解离常数是由磷酸基引起的。这两个解离常数分别为 $pK'_1 = 0.7 \sim 1.6$, $pK'_2 = 5.9 \sim 6.5$ (表 14-1)。



但是在多核苷酸中,除了末端磷酸基外,磷酸二酯键中的磷酸基只有一个解离常数, $pK'_1 = 1.5$ 。

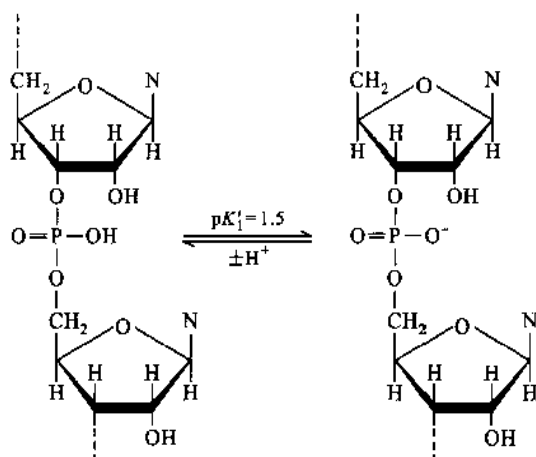


表 14-1 某些碱基、核苷和核苷酸的解离常数

碱基种类	碱基的 pK' 值	核苷的 pK' 值	核苷酸的 pK' 值
腺嘌呤	4.15, 9.8	3.5, 12.5 *	0.9, 3.8, 6.2
鸟嘌呤	3.2, 9.6, 12.4	1.6, 9.2, 12.4 *	0.7, 2.4, 6.1, 9.4
胞嘧啶	4.6, 12.2	4.15, 12.3 *, 12.5	0.8, 4.5, 6.3
尿嘧啶	9.5	9.2, 12.5 *	1.0, 6.4, 9.5
胸腺嘧啶 * *	9.9	9.8, >13 *	~1.6, 6.5, 10.0

* 戊糖羟基的 pK' 值

* * 其核苷和核苷酸中的戊糖为脱氧核糖

综上所述,由于核苷酸含有磷酸与碱基,为两性电介质,它们在不同 pH 的溶液中解离程度不同,在一定条件下可形成兼性离子。图 14-1 为 4 种核苷酸的解离曲线。在腺苷酸、鸟苷酸、胞苷酸中, pK'_1 值是由于第一磷酸基—— PO_3H_2 的解离, pK'_2 是由于含氮环—— N^+H 的解离,而 pK'_3 则是由于第二磷酸基—— PO_3H^- 的解离。从核苷酸的解离曲线可以看出,在第一磷酸基和含氮环解离曲线的交叉处,带负电荷的磷酸基正好与带正电荷的含氮环数目相等,这时的 pH 即为此核苷酸的等电点。核苷酸的等电点 (pI) 可以按下式计算:

$$pI = \frac{pK'_1 + pK'_2}{2}$$

处在等电点时,上述核苷酸主要呈兼性离子存在。当溶液 pH 小于 pI 值时,核苷酸的 $-PO_3H^-$ 基即开始与 H^+ 结合成 $-PO_3H_2$, 因此 $=N^+H$ 数量比 $-PO_3H^-$ 数量为多,核苷酸带正电荷。反之,当溶液的 pH 大于 pI 值时, $=N^+H$ 上的 H^+ 解离下来,核苷酸即带负电荷。尿苷酸的碱基碱性极弱,实际上测不出其含氮环的解离曲线,故不能形成兼性离子。

核苷酸中磷酸基在糖环上的位置对其 pK' 值略有影响,一般说来,磷酸基与碱基之间的距离越小,由于静电场的作用,其 pK' 值应越大。例如 2'-胞苷酸的 pK'_1 值为 4.4 比 3'-胞苷酸的 pK'_1 值(4.3)为大。

研究核苷酸的解离不仅对了解核酸的物化性质极其重要,而且在核苷酸的制备及分析中有很大的实用价值。应用离子交换柱层析和电泳等方法分级分离核苷酸及其衍生物,主要是利用它们在一定 pH 条件下具有不同的解离特性这一特性。

4. 核酸的滴定曲线

电位滴定可用于确定参与酸碱反应的基团性质。将小牛胸腺 DNA 钠盐溶液由 pH 6~7 滴定到 pH 2.5 或滴定到 pH 12,此滴定过程是不可逆的;用碱和酸进行反向滴定所得到的曲线显著不同于正向滴定

曲线(图 14-2)。开始滴定时,没有酸碱基团解离,非缓冲区较宽,在 pH 4.5~11.0 之间;而在反向滴定中非缓冲区只存在于 pH 6~9 之间。这就是说,当最初的 DNA 溶液超过 pH 4.5 和 pH 11.0 时即迅速释放出酸-碱基团参与 pH 2.0~6.0 和 pH 9.0~12.0 范围的滴定。由此可见天然 DNA 与变性 DNA 的滴定曲线是不同的,双链解开后碱基即参与酸碱滴定。

DNA 的酸碱滴定曲线对了解 DNA 的酸碱变性很有帮助。

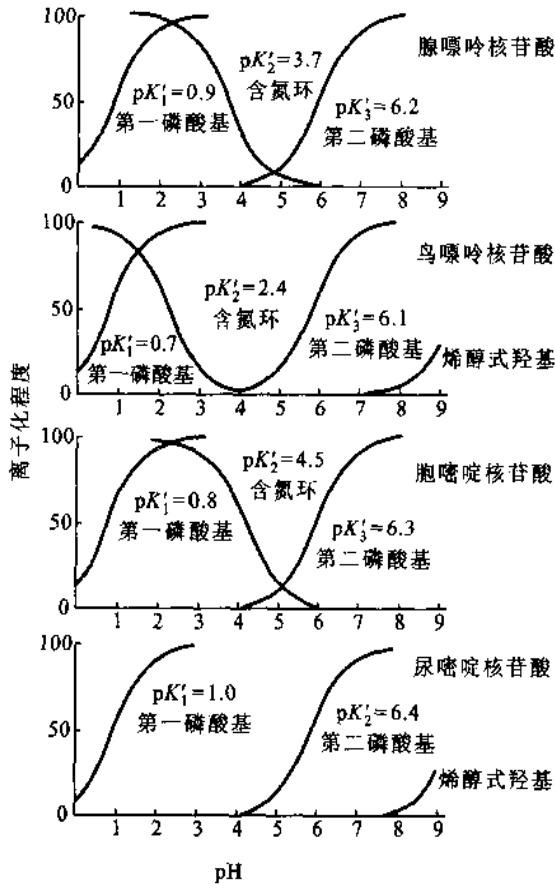


图 14-1 核苷酸的解离曲线

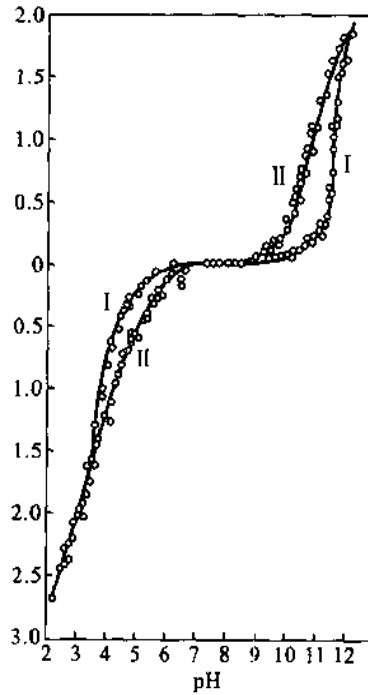


图 14-2 小牛胸腺 DNA 的滴定曲线

I. 从 pH 6.9 用酸或碱正向滴定; II. 从 pH 12 或 pH 2.5 分别用酸和碱反向滴定

三、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。

紫外吸收是实验室中最常用的定量测定 DNA 或 RNA 的方法。对待测核酸样品的纯度也可用紫外分光光度法进行鉴定。读出 260 nm 与 280 nm 的吸光度(A)即光密度(D)值,从 A_{260}/A_{280} 的比值即可判断样品的纯度。纯 DNA 的 A_{260}/A_{280} 应大于 1.8,纯 RNA 应达到 2.0。样品中如含有杂蛋白及苯酚, A_{260}/A_{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 A 值即可算出含量。通常以 A 值为 1 相当于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双螺旋 DNA,或 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单链 DNA(或 RNA),或 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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,经溴化乙锭染色在紫外灯下粗略地估计其含量。

有时核酸溶液的紫外吸收以摩尔磷的吸光度来表示,摩尔磷即相当于摩尔核苷酸。据此先测定核酸

溶液中的磷含量及紫外吸收值,然后求出摩尔磷吸光系数 $\epsilon(P)$ 。

$$\epsilon(P) = \frac{A}{cL}$$

A 为吸收值, 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:

$$\epsilon(P) = \frac{30.98A}{WL}$$

一般天然 DNA 的 $\epsilon(P)$ 为 $\sim 6\,600$, RNA 为 $7\,700 \sim 7\,800$ 。核酸的 $\epsilon(P)$ 值较所含核苷酸单体的 $\epsilon(P)$ 要低 $40\% \sim 45\%$ 。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 14-3)。复性后 $\epsilon(P)$ 值又降低,这现象称减色效应(hypochromic effect)。这是因为双螺旋结构使碱基对的 π 电子云发生重叠,因而减少了对紫外光的吸收。测定核酸的 $\epsilon(P)$ 可判断 DNA 制剂是否发生变性或降解。

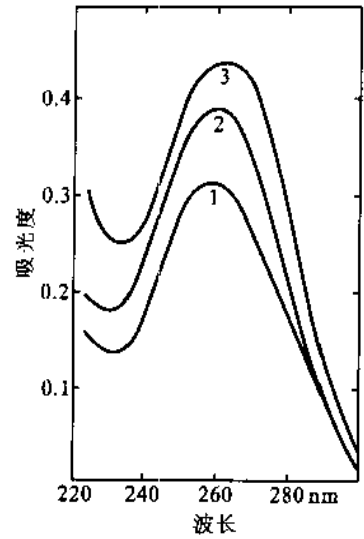


图 14-3 DNA 的紫外吸收光谱
1. 天然 DNA; 2. 变性 DNA;
3. 核苷酸总吸光度值

四、核酸的变性、复性及杂交

(一) 变性

变性(denaturation)作用是核酸的重要性质。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。降解引起核酸相对分子质量降低。

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,以测定 RNA 的分子大小。

当将 DNA 的稀盐溶液加热到 $80 \sim 100^\circ\text{C}$ 时,双螺旋结构即发生解体,两条链分开,形成无规线团(图 14-4)。一系列物化性质也随之发生改变: 260 nm 区紫外吸光度值升高,粘度降低,浮力密度升高,双折射现象消失,比旋下降,酸碱滴定曲线改变等。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,有一个相变的过程。通常把加热变性使 DNA 的双螺旋结构失去一半时的温度称为该 DNA

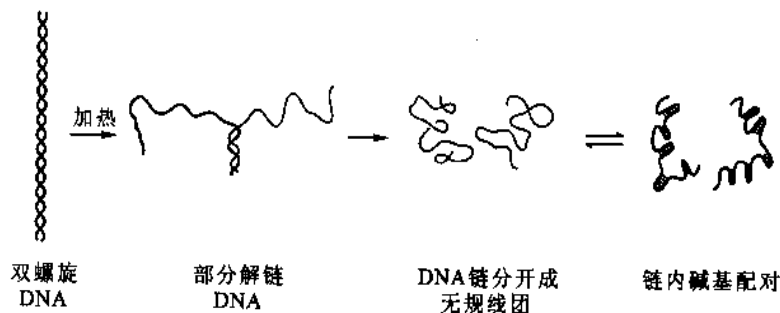


图 14-4 DNA 的变性过程

的熔点或溶解温度(melting temperature),用 T_m 表示。DNA 的 T_m 值一般在 $82 \sim 95^\circ\text{C}$ 之间。

DNA 的 T_m 值大小与下列因素有关:

(1) DNA 的均一性。均质 DNA(homogeneous DNA)如一些病毒的 DNA,人工合成的多聚腺嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷酸,简称 poly d(A-T),多聚鸟嘌呤-胞嘧啶脱氧核苷酸,简称 polyd(G-C),熔解过程发生在一个较小的温度范围之内。异质 DNA(heterogeneous DNA)熔解的过程发生在一个较宽的温度范围之内。所以 T_m 值可作为衡量 DNA 样品均一性(homogeneity)的标准。

(2) G-C 之含量。在 pH 7.0, 0.165 mol/L NaCl 中 DNA 的 T_m 值与 G-C 的含量之间有正比关系(图 14-5),G-C 对含量越多, T_m 值越高,这是因为 G-C 对之间有 3 个氢键,所以含 G-C 对多的 DNA 分子更为稳定。因此,测定 T_m 值,可以推算出 DNA 的碱基的百分组成。其经验公式为: $x_{G+C} = (T_m - 69.3) \times 2.44$ 。也可以利用此公式从 DNA 的 G+C 含量来计算出 T_m 值。

(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,而且熔解温度的范

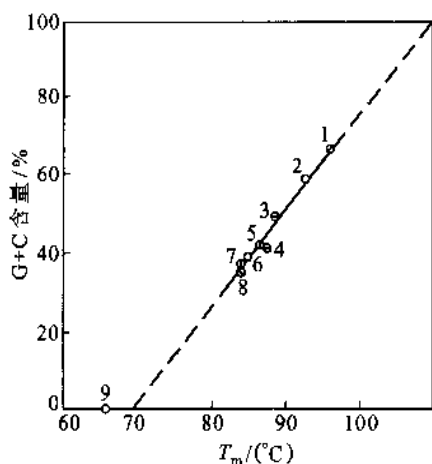


图 14-5 DNA 的 T_m 值与 G-C 含量之关系
DNA 来源如下: 1. 草分支杆菌; 2. 沙门氏菌属; 3. 大肠杆菌; 4. 鲑鱼精子; 5. 小牛胸腺; 6. 肺炎球菌;
7. 酵母; 8. 噬菌体 T4; 9. 多聚 d(A-T)

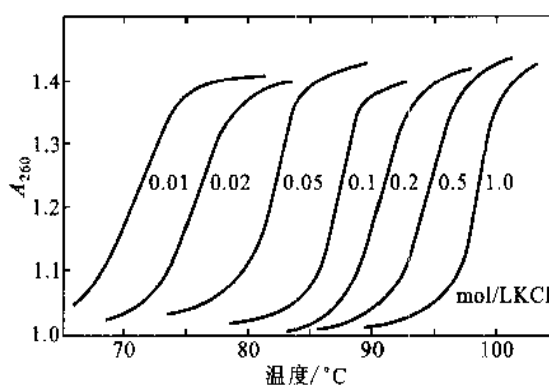


图 14-6 大肠杆菌 DNA 在不同 KCl 浓度下的熔解温度曲线

围较宽。而在较高的离子强度时, DNA 的 T_m 值较高,而且熔解过程发生在一个较小的温度范围之内(图 14-6)。所以 DNA 制品不应保存在极稀的电解质溶液之中,一般,在含盐缓冲溶液中保存较为稳定。

RNA 的变性: RNA 也具有螺旋 \rightarrow 线团之间的转变。但是由于 RNA 只有局部的双螺旋区,所以这种转变不如 DNA 那样明显。变性曲线不那么陡, T_m 值较低。tRNA 具有较多的双螺旋区,所以具有较高的 T_m 值,变性曲线也较陡。双链 RNA 的变性几乎与 DNA 的相同(图 14-7)。

(二) 复性

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(renaturation)。DNA 复性后,许多物化性质又得到恢复。复性过程基本上符

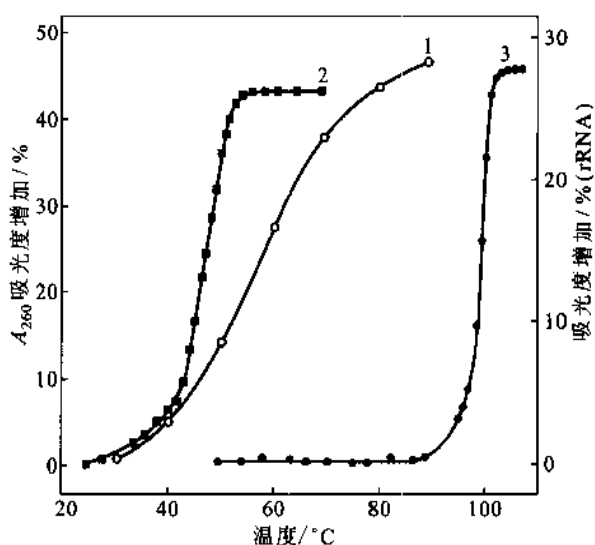


图 14-7 rRNA 和双链 RNA 的热变性曲线
1. 一种浮萍的 18 S rRNA; 2. 酵母的杀伤 RNA(Killer RNA)在 0.017 mol/L Na^+ 和 67% 甲酰胺中变性; 3. 同 2, 但无甲酰胺

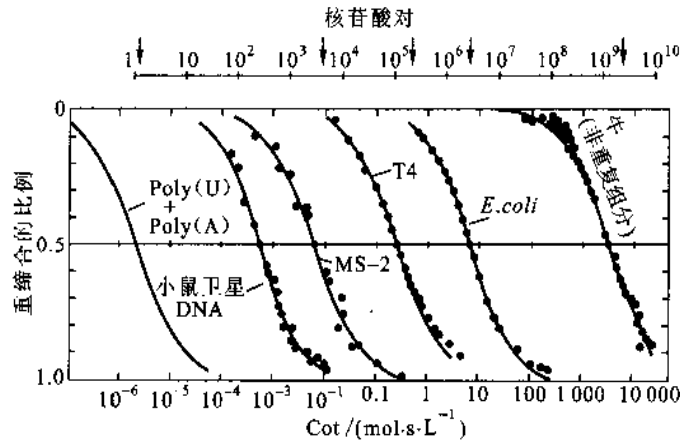


图 14-8 不同 DNA 的复性时间

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, 在沸水浴中加热数分钟后, 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, 此过程称为退火 (annealing)。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 $Cot_{1/2}$ 来衡量。Co 为变性 DNA 复性时的初始浓度, 以核苷酸的摩尔浓度表示, t 为时间, 以秒表示, $Cot_{1/2}$ 表示复性一半的 Cot 值。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 14-8)。具有很多重复序列的 DNA, 复性也快。因此, 可以用复性动力学的方法来测定基因组大小和重复序列的拷贝数。

复性过程可以在溶液中进行, 也可以在固相支持物表面进行。将单链和双链 DNA 分开, 可以测定复性的部分。

(三) 核酸的杂交

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 (hybridization)。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和尼龙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) 溶液中使 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 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤 $4\sim 6\text{ h}$, 使 DNA 牢固地吸附在硝酸纤维素膜上。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 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$) 下进行数小时或

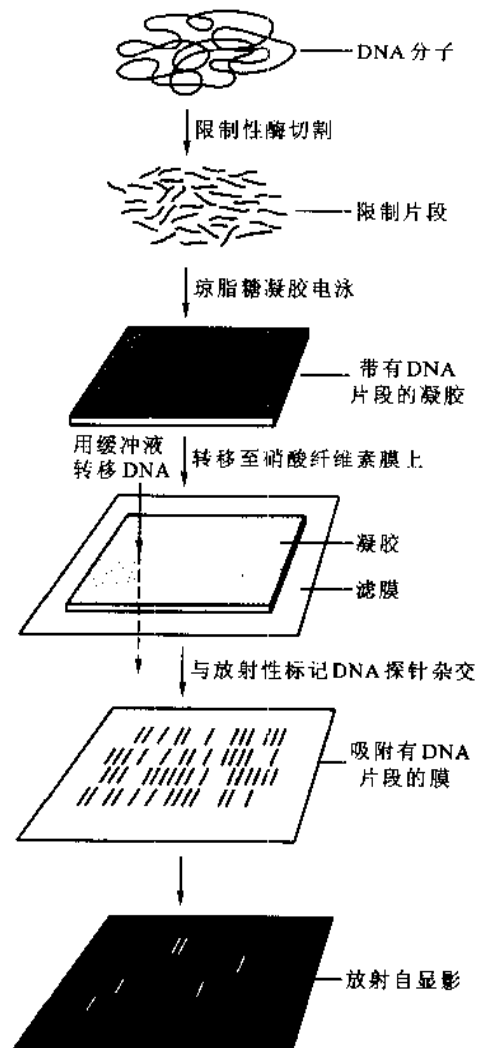


图 14-9 Southern 印迹法图解

十余小时,然后通过洗涤,除去未杂交上的标记物。将硝酸纤维素膜烘干后进行放射自显影。全部过程在图 14-9 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用于分析 RNA。即将 RNA 变性后转移到硝酸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。

提 要

核酸的糖苷键和磷酸二酯键可被酸、碱和酶水解,产生碱基、核苷、核苷酸和寡核苷酸。酸水解时,糖苷键比磷酸酯键易于水解;嘌呤碱的糖苷键比嘧啶碱的糖苷键易于水解;嘌呤碱与脱氧核糖的糖苷键最不稳定。RNA 易被稀碱水解,产生 2'-和 3'-核苷酸, DNA 对碱比较稳定。细胞内有各种核酸酶可以分解核酸。限制性内切酶是基因工程的重要工具酶。

核酸的碱基和磷酸基均能解离,因此核酸具有酸碱性质。碱基杂环中的氮具有结合和释放质子的能力。核苷和核苷酸的碱基与游离碱基的解离性质相近,它们是兼性离子。核酸中的磷酸基只有一级解离。DNA 的酸碱变性使酸碱滴定曲线不可逆。

核酸的碱基具有共轭双键,因而有紫外吸收的性质。各种碱基、核苷和核苷酸的吸收光谱略有区别。核酸的紫外吸收峰在 260 nm 附近,可用于测定核酸。根据 260 nm 与 280 nm 的吸光度(A)可判断核酸纯度。天然 DNA 的 $\epsilon(\text{P})$ 为 $\sim 6\,600$, RNA 为 $7\,700\sim 7\,800$, 发生变性和降解时 $\epsilon(\text{P})$ 值会升高,以此可鉴别核酸制剂的质量。

变性作用是指核酸双螺旋结构被破坏,双链解开,但共价键并未断裂。引起变性的因素很多,升高温度、过酸、过碱、纯水以及加入变性剂等都能造成核酸变性。核酸变性时物理化学性质将发生改变。热变性一半时的温度称为熔点或变性温度,以 T_m 来表示。DNA 的 G+C 含量影响 T_m 值。根据经验公式 $\%G+C = (T_m - 69.3) \times 2.44$ 可以由 DNA 的 T_m 值计算 G+C 含量,或由 G+C 含量计算 T_m 值。

变性 DNA 在适当条件下可以复性,物化性质得到恢复。复性快慢以 $\text{Cot}_{1/2}$ 值来表示。用不同来源 DNA 进行退火,得到杂交分子。也可以由 DNA 链与互补 RNA 链得到杂交分子。分子杂交是进行分子生物学研究的重要方法。

习 题

1. 比较核酸不同糖苷键和磷酸酯键对酸的稳定性。
2. 为什么 DNA 比 RNA 不易被碱水解?
3. 试述核酸酶的种类和分类依据。
4. 为什么说碱基、核苷和核苷酸是兼性离子? 是否它们都是兼性离子?
5. 计算腺苷酸、鸟苷酸和胞苷酸的等电点。
6. 为什么 DNA 酸碱滴定的正向曲线和反向曲线有显著的不同?
7. 核酸的紫外吸收有何特点? 在实验室中如何利用这一特点研究核酸?
8. 肺炎球菌 DNA 的 G+C 含量为 40%, 计算其 T_m 值。[85.7 °C]
9. 何谓 $\text{Cot}_{1/2}$? 它表示什么?
10. 核酸杂交的分子基础是什么? 有哪些应用价值?
11. 什么是 Southern 印迹法? 基本步骤是什么?

主要参考书

1. Nelson D L, Cox M M, Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000

2. Weaver R F. Molecular Biology. New York: Mc Graw-Hill Companies Inc. 2000
3. Stryer L. Biochemistry. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999

(朱圣庚)

第 15 章 核酸的研究方法

理论研究的重大发展往往是从方法技术上的突破开始的。20 世纪中叶以来核酸研究获得迅猛发展得益于核酸研究方法的不断更新和改进。这里仅对核酸研究最基本的一些方法作一简要介绍。

一、核酸的分离、提纯和定量测定

核酸研究的首要方法是分离和测定。核酸制备中共同需要注意的问题是防止核酸的降解和变性,要尽量保持其在生物体内的天然状态。早期的研究工作,由于方法上的限制,得到的样品往往是一些降解产物。要制备天然状态的核酸,必须采用温和的条件,防止过酸、过碱、避免剧烈搅拌,尤其重要的是防止核酸酶的作用。天然核酸都具有生物活性,这是检验其质量的重要指标。物理化学指标也常用来评定核酸的品质,这些指标包括:相对分子质量、紫外吸收、沉降系数、电泳迁移率、粘度等。制备的方法因所用生物材料不同而有很大差异。这里仅就一般性问题予以叙述。

(一) DNA 的分离

真核生物中的染色体 DNA 与碱性蛋白(组蛋白)结合成核蛋白(DNP)形式存在于核内。DNP 溶于水 and 浓盐溶液(如 1 mol/L 氯化钠),但不溶于生理盐溶液(0.14 mol/L 氯化钠)。利用这一性质,可将细胞破碎后用浓盐溶液提取,然后用水稀释至 0.14 mol/L 盐溶液,使 DNP 纤维沉淀出来。使其缠绕在玻璃棒上,再溶解和沉淀多次以纯化。用苯酚抽提,除去蛋白质。苯酚是很强的蛋白质变性剂,用水饱和的苯酚与 DNP 一起振荡,冷冻离心,DNA 溶于上层水相,不溶性变性蛋白质残留物位于中间界面,一部分变性蛋白质停留在酚相。如此操作反复多次以除净蛋白质。将含 DNA 的水相合并,在有盐存在的条件下加 2 倍体积冷的乙醇,可将 DNA 沉淀出来。用乙醚和乙醇洗沉淀。用此方法可以得到纯的 DNA。

用氯仿-辛醇(或异戊醇)与 DNP 溶液振荡,借助表面变性除去蛋白质,反复多次直至得到不含蛋白质的 DNA。此操作过程与苯酚法相似。

为了得到大分子 DNA,避免核酸酶和机械振荡对 DNA 的降解,在细胞悬液中直接加入 2 倍体积含 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)的缓冲溶液,并加入广谱蛋白酶(如蛋白酶 K)最后浓度达 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 4 h,使细胞蛋白质全部降解,然后用苯酚抽提,除净蛋白酶和蛋白质的部分降解产物。DNA 制品中的少量 RNA 可用纯的 RNase 分解除去。此方法现在比较常用。

氯化铯密度梯度离心(cesium chloride density gradient centrifugation)也是实验室制备高质量 DNA 常用的方法。

(二) RNA 的分离

RNA 比 DNA 更不稳定,而且 RNase 又无处不在,因此 RNA 的分离更为困难。制备 RNA 通常需要注意 3 点:① 所有用于制备 RNA 的玻璃器皿都要经过高温烘烤,塑料用具经过高压灭菌,不能高压灭菌的用具要用 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理,再煮沸以除净 DEPC。DEPC 能使蛋白质乙基化而破坏 RNase 活性。② 在破碎细胞的同时加入强变性剂(如胍盐)使 RNase 失活。③ 在 RNA 的反应体系内加入 RNase 的抑制剂(如 RNasin)。

目前最常用的制备 RNA 方法有两个:其一,用酸性胍盐/苯酚/氯仿(acid guanidinium/phenol/chloroform)抽提。异硫氰酸胍(guanidinium isothiocyanate)是极强烈的蛋白质变性剂,它几乎使所有遇到的蛋白质都被变性。然后用苯酚和氯仿多次除净蛋白质。此法用于小量制备 RNA。

其二,用钨盐/氯化铯将细胞抽提物进行密度梯度离心。蛋白质密度 $<1.33\text{ g/cm}^3$,在最上层。DNA 密度在 1.71 g/cm^3 左右,位于中间。RNA 密度 $>1.89\text{ g/cm}^3$,沉在底部。用此方法可制备较大量高纯度的天然 RNA。

分离 poly(A)⁺ mRNA 通常采用寡聚胸腺嘧啶核苷酸(oligo(dT)_n)亲和层析法。用寡聚(dT)纤维素柱或寡聚(dT)琼脂糖凝胶柱吸附 mRNA,洗涤后用低离子强度缓冲液回收 mRNA,得到较高质量的制品。

不同功能 RNA 常分布于细胞的不同部位,分离这些 RNA 常需先用差速离心法,将细胞核、线粒体、叶绿体、胞质体等各部分分开,再从这些部分中分离出 RNA。

(三) 核酸含量的测定法

核酸含量常用紫外分光光度法、定磷法、定糖法等进行测定。紫外分光光度法如上所述。磷的测定最常用的是钼蓝比色法。此法需先用浓硫酸或过氯酸将有机磷水解成无机磷。在酸性条件下正磷酸与钼酸作用生成磷钼酸,在还原剂存在下被还原成钼蓝,其最大吸收峰在 660 nm 处,在一定范围内溶液光密度与磷含量成正比,据此可以计算出核酸含量。

定糖法常用的也是比色法。当 RNA 与盐酸共热时核糖转变为糠醛,它与甲基苯二酚(地衣酚)反应呈鲜绿色,最大吸收峰在 670 nm 处,反应需要三氯化铁作催化剂。DNA 在酸性溶液中与二苯胺共热,其脱氧核糖可参与反应生成蓝色化合物,最大吸收峰在 595 nm 处。此外,还有一些比色反应也可给出灵敏的结果。

细胞或组织中核酸含量的测定需要先对生物材料作一定的处理,以便定量提取出核酸的成分。组织预先处理的目的是除去酸溶性含磷化合物及脂溶性含磷化合物。常用冷的 5%~10% 过氯酸(PCA)或三氯乙酸(TCA)处理粉碎的生物材料,抽提液为酸溶性部分,包括核苷酸,及相对分子质量小的寡核苷酸等。再将残留物用有机溶剂(如乙醇、乙醚、氯仿等)除去脂溶性含磷物质。抽提液中,主要是磷脂类物质。留下的残渣为不溶于酸的非脂类含磷化合物,包括 DNA、RNA、蛋白质及少量其他含磷化合物。然后可按下列 3 种方法中的一种测定核酸含量(图 15-1):

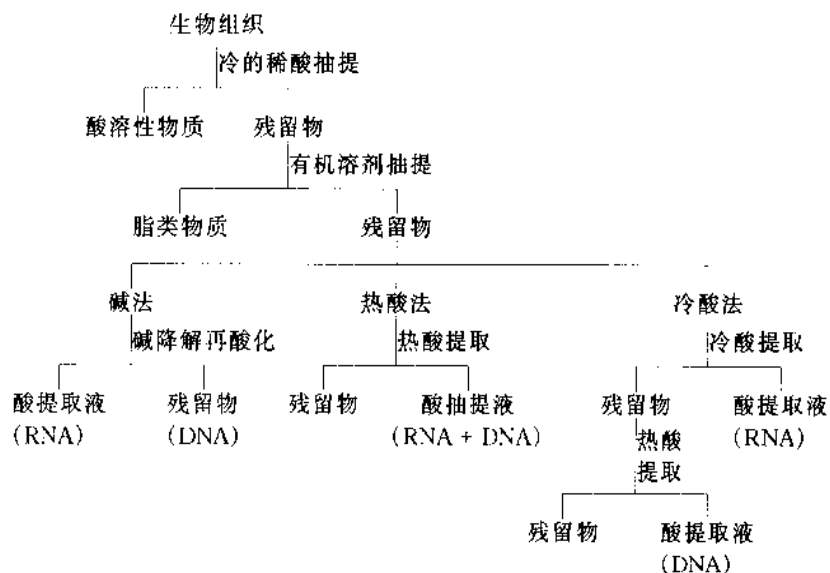


图 15-1 生物组织中核酸组分的分离

(1) 热酸法 把组织预处理后的沉淀部分用稀的 PCA(或 TCA)在 90 ℃处理 15 min,两种核酸皆成为酸溶性物质而抽提出来,并与大部分不溶性的蛋白质分开。因此,将此酸抽提液进行糖的颜色反应时,无蛋白质干扰。该法的另一优点是迅速简单。缺点是没有把 DNA 与 RNA 分开,只能用地衣酚和二苯胺反应来得到 RNA 与 DNA 的含量。所以用这个方法所测得的 DNA 与 RNA 含量的准确度较差。

(2) 冷酸法 最初用于测定植物根尖细胞和花粉细胞内少至 $1 \mu\text{g}$ 的 RNA 和 DNA, 而不受植物组织含有的戊糖胶和多糖醛酸类物质的干扰。将经酸和有机溶剂处理后的组织用 1 mol/L PCA 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 处理 18 h 抽提出 RNA, 再用 0.5 N PCA 在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 处理 20 min (动物材料用 1 mol/L PCA, $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min) 抽提出 DNA。各抽提液可用定磷法, 定糖法或紫外分光光度法来测定。该法的缺点是有些组织材料的 DNA 可被冷的 PCA 提取出一部分而混杂于 RNA 之中。

(3) 碱法 将酸不溶的非脂类含磷化合物与 1 N 氢氧化钠(或氢氧化钾)在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温过夜, RNA 被碱解为酸溶性核苷酸, 而 DNA 不被分解。加入 PCA 或 TCA (达到终浓度为 $5\% \sim 10\%$) 酸化后, DNA 即沉淀下来, 上清液中为 RNA 的酸解产物。本法的优点是将 DNA 和 RNA 分开了。可用定磷法、定糖法, 或紫外分光光度法分别测定上述两部分的核酸含量。缺点是 RNA 部分还有其他含磷化合物, 如磷酸肌醇等。所以用定磷法测得的结果偏高。

现在已经有许多高精密的分析仪器可用于细胞内生物分子, 包括核酸和核苷酸的分析测定。例如高效液相色谱仪、毛细管电泳仪等。新的芯片技术可以将细胞内微量成分直接在芯片上分离和检测。因此传统的测定方法已越来越让位于新的检测仪器。

二、核酸的超速离心

溶液中的核酸在引力场中可以下沉。在超速离心机造成的极大的离心力场中, 核酸分子下沉的速率大大加快。这就有可能通过研究核酸在离心力场中的行为来认识核酸在溶液中的构象。

应用超速离心技术, 可以测定核酸的沉降常数和相对分子质量, 其基本原理与测定蛋白质的相对分子质量相同。常用沉降速度法测定生物大分子的相对分子质量。测定 DNA 的相对分子质量时, 由于它具有极大的粘度, 所以应采用极稀的溶液, 否则不可能得到可靠的结果。

密度梯度沉降平衡超离心法在核酸分子构象的研究中应用颇广。分析 DNA 时, 常用氯化铯密度梯度, 因为它在水介质中具有极高的溶解度, 可以制成浓度很高 (8.0 mol/L) 的溶液。密度梯度沉降平衡法常用于如下几个方面:

1. 核酸密度的测定

以测定 DNA 浮力密度为例。将 8.0 mol/L 的氯化铯溶液装入离心杯中, DNA 样品溶于氯化铯溶液, 装在离心杯顶部。开动离心机, 以每分钟 $45\,000$ 转的速度运转 16 h 以上。此时离心杯中形成线形氯化铯密度梯度, 自杯底的 1.80 g/cm^3 , 到顶部的 1.55 g/cm^3 。当 DNA 样品的沉降速度与扩散速度达到平衡状态时, DNA 形成一稳定的区带, 漂浮于氯化铯密度梯度中的一定位置上。此时 DNA 所处的位置上的氯化铯密度等于 DNA 的浮力密度。可以用公式直接计算出 DNA 的浮力密度。不过更方便的办法是应用 $1 \sim 2$ 个已知其浮力密度的标准 DNA 样品作参考, 与未知样品一起离心。待达到平衡后, 通过离心机上的光学系统测定 DNA 与转头的中心轴之间的距离, 按下式计算出未知 DNA 的浮力密度:

$$\rho = \rho_0 + 4.2\omega^2(r^2 - r_0^2) \times 10^{-10}$$

式中: ρ 为未知 DNA 的密度, ρ_0 为标准 DNA 的密度, ω 为角速度(弧度/秒), r 为未知 DNA 与转轴之间的距离, r_0 为已知 DNA 的距离。

2. 测定 DNA 中 G-C 之含量

G-C 碱基对比 A-T 碱基对之密度大, 因为 G-C 对中有 3 个氢键。所以含 G-C 对多的 DNA, 浮力密度大, 含 G-C 对少的 DNA, 浮力密度小。而且 G-C 的百分含量与 DNA 的浮力密度之间呈正比关系。因此用这个方法能迅速而精确地测定 DNA 的碱基成分。Rolf-Meselson 导出了如下计算公式:

$$\rho = 0.100x_{\text{G-C}} + 1.658$$

例: 狂犬病毒 DNA 的浮力密度是 1.732 g/cm^3 , DNA 的 G-C 含量为: $x_{\text{G-C}} = \frac{1.732 - 1.658}{0.100} = 0.740$ 。

用化学分析法所得的值为 0.733。两者十分接近。但是含 5-甲基胞嘧啶多的 DNA, 其浮力密度降低, 不能按此公式计算。植物 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶可高达 25%, 应用此公式计算 G-C 含量将会产生偏差。

3. 溶液中核酸构象的研究

RNA 只有局部双螺旋结构, 它的浮力密度比双链 DNA 高。双链 DNA 又比蛋白质的密度高。双螺旋 DNA 受热变性后成为单链, 密度增高。核酸的不同构象具有不同的浮力密度, 可利用此技术研究核酸的构象变化及其动力学过程。

4. 用于核酸的制备

应用溴化乙锭-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 h 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 16 h。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 15-2)。蛋白质漂浮在最上面, RNA 沉淀在底部。超螺旋 DNA 沉降较快, 开环及线型 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。

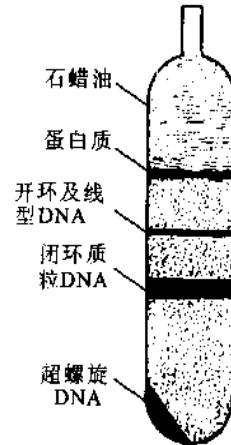


图 15-2 经染料-氯化铯密度梯度超离心后, 质粒 DNA 及各种杂质的分布

三、核酸的凝胶电泳

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 迁移率与相对分子质量对数成反比;
- (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, 线型 DNA 其次, 开环 DNA 最慢。但在胶中加入过多的溴化乙锭时, 上述分布次序会发生改变;
- (4) 电压 一般不大于 5V/cm, 在适当的电压差范围内, 迁移率与电压大小成正比;
- (5) 碱基组成 有一定影响, 但影响不大;
- (6) 温度 4~30 °C 都可以, 常在室温进行, 电流过大时凝胶温度升高, 溶液蒸发, 会造成电泳异常。

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, 将胶在荧光染料溴化乙锭的水溶液中染色 (0.5 μg/mL)。溴化乙锭为一扁平分子, 很易插入 DNA 中的碱基对之间。DNA 与溴化乙锭结合后, 经紫外光照射, 可发射出红-橙色可见荧光。1 ng DNA 即可用此法检出, 所以此方法十分灵敏。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负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 15-3 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相对分子质量的样品(如图 15-3 中的 λ DNA/*Hind* III 的片段)。电泳完毕后,经溴化乙锭染色,照相,从照片上比较待测样品中的 DNA 片段与标准样品中的哪一条带最接近,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相对分子质量的标准样品。

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 h 后,将电极倒转,再通电 30~60 s,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

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胶要小,所以可用于分析相对分子质量小于 1 000 bp 的 DNA 片段和 RNA 的电泳。聚丙烯酰胺中一般不含有 RNase,用于 RNA 的分析不会分解样品。但仍要留心缓冲液及其他器皿中所带的 RNase。聚丙烯酰胺凝胶强度较好,常用垂直板电泳。

聚丙烯酰胺凝胶上的 RNA 样品,经溴化乙锭染色,在紫外光照射下,也能发出荧光,但较暗。这是因为 RNA 的双螺旋区较少,其荧光远比 DNA 为弱,浓度很低的样品不能用此法检测出来,需要用亚甲蓝或银染来显示。

四、核酸的核苷酸序列测定

20 世纪 60 年代 R. W. Holley 首先测定了酵母丙氨酸 tRNA 的序列,该测序法的基本策略与蛋白质的测序相同,都是利用小片段的重叠。这种策略工作量非常大,而且只能对付几十个核苷酸的较小分子,要用来测定 DNA 的序列就非常困难了。1975 年 Sanger 突破了这个框框,提出了一种新的策略。他并不逐个去测定 DNA 的核苷酸序列,而是设法获得一系列多核苷酸片段,使其末端固定为一种核苷酸,然后通过测定片段的长度来推测核苷酸的序列。其后发展起来的各种 DNA 和 RNA 序列测定方法,也都是以这一原理为基础的。

(一) DNA 的酶法测序

Sanger 于 1975 年设计的 DNA 快速测序法称为“加减法”。该方法以单链 DNA 为模板,加入适当的引物,四种脱氧核苷三磷酸(dNTP)和 DNA 聚合酶,使合成反应尽可能是随机的,合成产物中各种长度的片段都存在。然后从反应体系中除去 4 种 dNTP,并将反应物分成 8 组,4 组用于加法系统,4 组用于减法系统。加法系统每组分别只加 A、G、C、T 一种 dNTP;减法系统每组加三种 dNTP(分别减去 A、G、C、T 一种 dNTP)。在加法系统中,每组只有一种 dNTP(例如 dATP),DNA 聚合酶的 3'→5' 外切酶将除该核苷酸外所有 3' 末端核苷酸都水解掉,于 3' 末端核苷酸都变成了该核苷酸。在减法系统中, DNA 聚合酶能够把

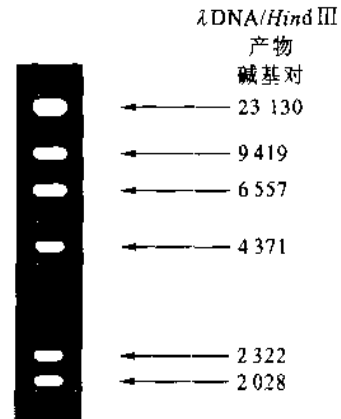


图 15-3 DNA 相对分子质量标准物 (λ DNA/*Hind* III 片段)琼脂糖凝胶电泳图

片段继续合成下去,直到遇上所缺的核苷酸才停止。这就得到了都在所缺核苷酸前一个核苷酸结尾的片段。将各组样品都进行含变性剂(8 mol 尿素)的聚丙烯酰胺凝胶电泳,从放射自显影的图谱上可以推测出 DNA 的核苷酸序列(图 15-4)。

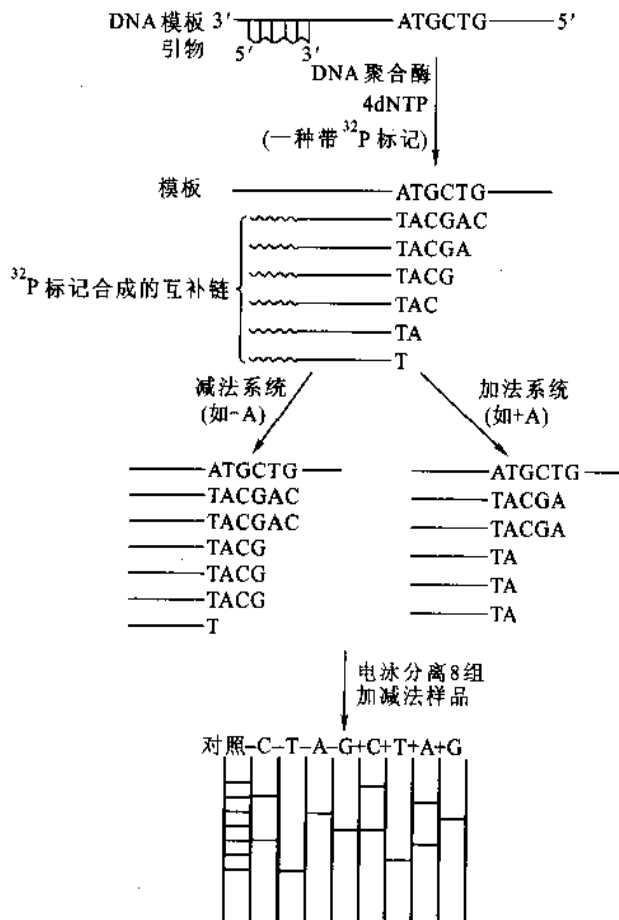


图 15-4 加减法测定 DNA 序列的原理

1977 年 Sanger 对 DNA 的酶法测序技术又作了重要改进,提出了“终止法”。其反应体系也包含单链模板、引物、4 种 dNTP 和 DNA 聚合酶。共分 4 组,每组按一定比例加入一种 2',3' 双脱氧核苷三磷酸,它能随机掺入合成的 DNA 链,一旦掺入 DNA 合成即终止,于是各种不同大小片段的末端核苷酸必定为该种核苷酸。经变性胶电泳,可从自显影图谱上直接读出 DNA 序列(图 15-5)。

终止法测序极为方便。现已有各种自动化的测序仪,基本上也是按此原理设计的。

(二) DNA 的化学法测序

化学法测序由 Maxam 和 Gilbert 于 1977 年所发明。其基本原理是用特异的化学试剂作用于 DNA 分子中不同碱基,然后用哌啶切断反应碱基的多核苷酸链。用 4 组不同的特异反应,就可以使末端标记的 DNA 分子切成不同长度的片段,其末端都是该特异的碱基。经变性胶电泳和放射自显影得到测序图谱。

4 组特异的反应如下:

(1) G 反应 用硫酸二甲酯(dimethyl sulfate, DMS)使鸟嘌呤上的 N_7 原子甲基化,加热引起甲基化鸟嘌呤脱落,多核苷酸链可在该处断裂。

(2) G+A 反应 用甲酸使 A 和 G 嘌呤环上的 N 原子质子化,从而使其糖苷键变得不稳定,再用哌啶使键断裂。

(3) T+C 反应 用胍使 T 和 C 的嘧啶环断裂,再用哌啶除去碱基。

(4) C 反应 当有盐存在时,只有 C 与胍反应,并被哌啶除去。

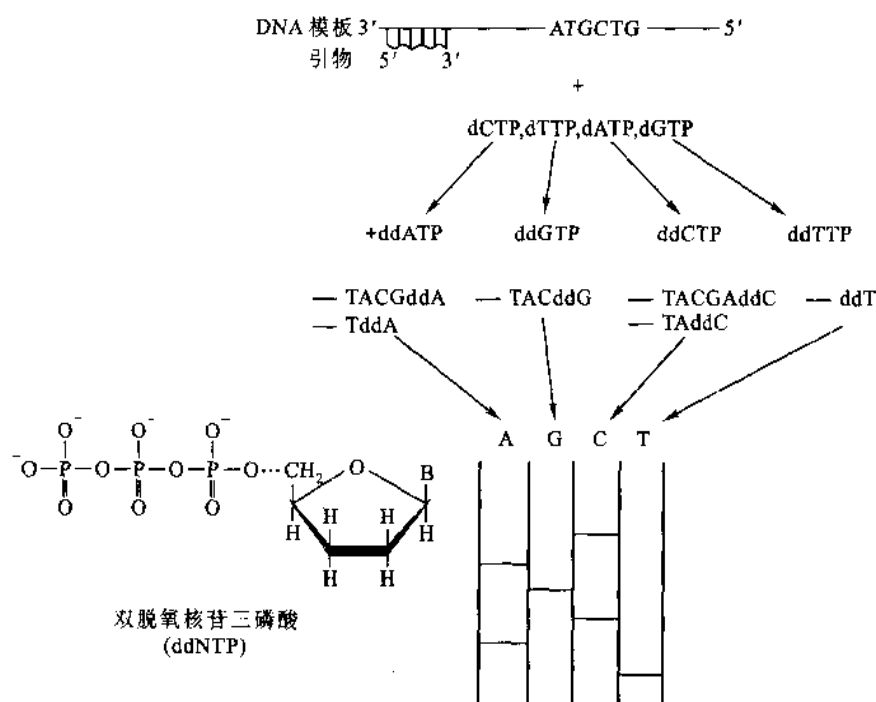


图 15-5 终止法测定 DNA 序列的原理

嘧啶促使修饰碱基脱落,并使去掉碱基的磷酸二酯键断裂。

上述样品分别进行聚丙烯酰胺变性胶电泳,放射自显影,此过程与酶法测序相同。

(三) RNA 的测序

DNA 的快速测序获得成功,同样原理也应用于 RNA 的测序。RNA 的测序方法很多,主要有 3 个。

(1) 用酶特异切断 RNA 链 从胰脏提取的 RNase A 水解嘧啶核苷酸的键,所产生寡核苷酸的 3'端均为嘧啶核苷酸。米曲霉中提取的 RNase T₁ 特异水解鸟苷酸与相邻核苷酸的键。黑粉菌(*Ustilago sphaerogena*)中提取的 RNase U₂ 在一定条件下特异水解腺苷酸的键。从多头粘菌(*Physarum polycephalum*)中提取的 RNase Phy I 水解 A、G、U 3 种核苷酸,但不水解胞苷酸(-C)。利用上述 4 种酶可测定 RNA 的序列。

(2) 用化学试剂裂解 RNA 基本原理与 DNA 化学法测序法相似。

(3) 逆转录成 cDNA 即可用 DNA 测序法来测定序列。

五、DNA 聚合酶链反应(PCR)

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)体外扩增 DNA 已成为应用最广泛的一种生物技术。1985 年 K. Mullis 在研究 DNA 聚合酶反应时发明了这项技术。最初采用 Klenow 酶来扩增 DNA,但每次加热变性 DNA 时都会使酶失活,需要重新添加 DNA 聚合酶,因此使用不方便。1988 年 Saiki 等人用耐热的 Taq DNA 聚合酶取代 Klenow 酶之后,才使这项技术成熟,从而得到各方面的应用。

这项技术的基本步骤是:

(1) 设计一对引物以便有效扩增所需要的 DNA 序列,并尽量减少可能产生的非特异产物。

(2) 优化反应体系,以便获得最好的扩增效果。该反应体系应包括适量模板(1 ng~0.001 ng),引物(~100 pmol/100 μl),4 种 dNTP(200 μmol/L),Taq DNA 聚合酶(2 U/100 μl),和适量 Mg⁺(0.05~5 mmol/L)。

(3) 选择 3 个温度进行热循环。这 3 个温度为:变性,94 ℃,45~60 s;退火(根据引物与模板的 T_m 值

来定,一般为两引物中较低的 T_m 值减 2), 1 min; 延伸, 72 °C, 1 min。开始时热变性 5~10 min, 热循环 25~30 个周期, 最后延伸 10 min。

(4) 扩增完成后取出一定量反应产物, 检测扩增结果。最普通的检测方法是进行凝胶电泳, 用溴化乙锭染色, 在紫外光下检查结果。

PCR 技术十分灵敏, 少数几个模板分子即可检查出来。它的扩增效率非常高, 通常可扩增 10^6 倍。其扩增产量可按下列公式计算:

$$y = (1 + x)^n$$

y = 产量

x = 扩增效率

n = 循环次数

PCR 技术应用很广, 主要可用在以下几方面:

(1) 遗传病和某些疑难病的诊断以及孕妇的产前检查。

(2) 病原体的检测。某些恶性疾病用一般微生物学、生化和免疫学技术无法查出病原体时, 可用 PCR 来检查。

(3) 法医和刑侦鉴定。PCR 可灵敏检测出亲属间的亲缘关系, 并对生物残留的痕量样品进行鉴定, 因此, 对刑侦极为有用。

(4) 癌基因的检查。

(5) 基因探针的制备。

(6) 基因组测序、染色体巡视。

(7) cDNA 库的构建。

(8) 基因突变的分析和定位诱变。

(9) DNA 重组。

(10) 基因的分离和克隆。

PCR 技术发展很快, 许多新的技术不断涌现, 新的应用不断在开拓。详细内容可参看“基因工程和蛋白质工程”一章。

六、DNA 的化学合成

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一百多个核苷酸的 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 则用氨基亚磷酸化合物(phosphoramidite)进行活化。从图 15-6 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, 收集相对分子质量最大的部分。图 15-6 为 DNA 固相合成过程的图解。

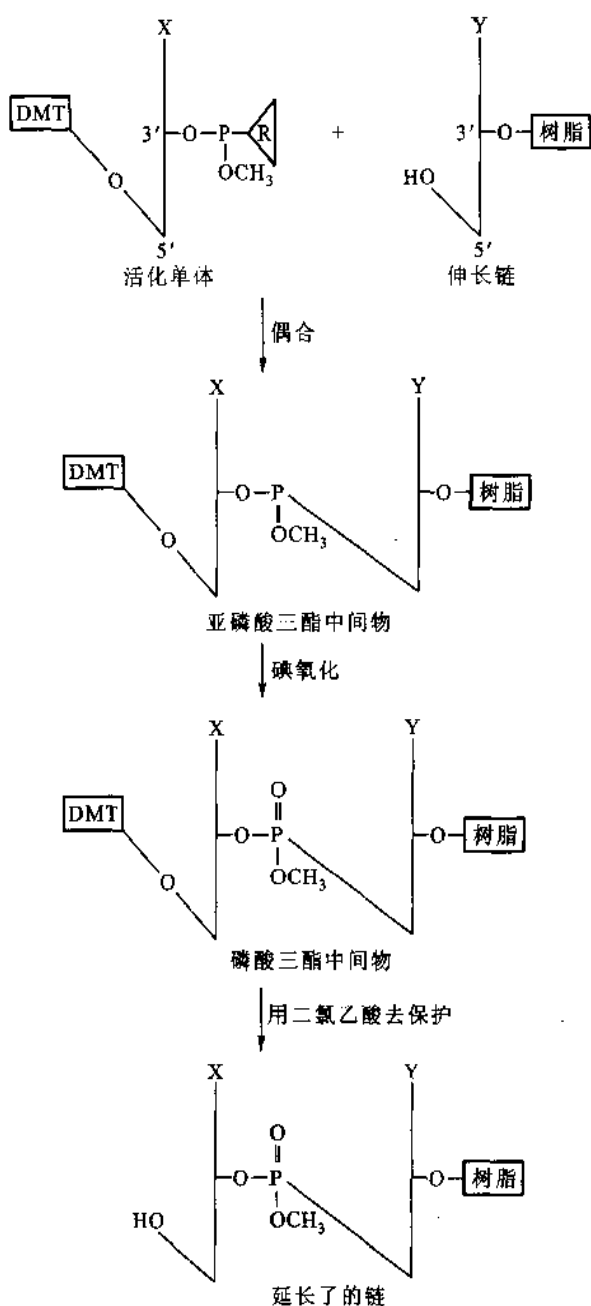


图 15-6 DNA 固相合成(亚磷酸三酯法)

提 要

核酸研究的迅猛发展得益于核酸研究方法的不断更新和改进。核酸研究的首要方法是核酸的分离和测定。目前分离 DNA 最重要的方法有 3 个：一是用盐抽提，用苯酚和氯仿除去蛋白质。二是用广谱蛋白酶在 SDS 存在下保温消化细胞悬液，再用苯酚和氯仿去蛋白，用 RNase 除去少量的 RNA。三是用氯化铯密度梯度离心法分离纯化 DNA。

制备 RNA 要防止 RNase 的降解。① 器皿要高温处理或用 DEPC 除去 RNase。② 破碎细胞的同时使蛋白质变性。③ RNA 反应体系中加入 RNase 抑制剂(RNasin)。目前常用的 RNA 分离方法有两个：其一，用酸性胍盐/苯酚/氯仿抽提。其二，用胍盐/氯化铯密度梯度离心。分离 poly(A)⁺mRNA 可用寡聚(dT)_n亲和层析法。

核酸的测定常用紫外分光光度法、定磷法和定糖法。测定生物样品中的核酸需要预先处理，定量提取

出核酸或其成分再作测定。

核酸的超速离心是研究核酸的重要方法。常用的是密度梯度离心法。可用来测定核酸密度、测定 G + C 含量和研究核酸的构象。

核酸的凝胶电泳是最常用的核酸研究方法。通常用的是琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳。

快速测定核酸序列有许多方法。Sanger 最初提出加减法测定 DNA 序列,后又改进为终止法。Maxam 和 Gilbert 提出化学法测定 DNA 序列。RNA 序列测定方法与 DNA 测序法的原理是一样的。

DNA 的聚合酶链反应(PCR)是应用最广泛的生物技术。它的基本步骤为:(1)设计一对引物。(2)优化反应体系。(3)选择热循环温度。(4)鉴定扩增产物。PCR 技术在生物学、医学、法医等方面都有广泛的应用。

DNA 的化学合成已有自动化仪器来完成。目前采用的是亚磷酸三酯法。DNA 的化学合成为基因工程提供了重要手段。

习 题

1. 分离 DNA 和 RNA 主要有哪些方法? 其原理是什么?
2. 比较紫外吸收、定磷、定糖这些核酸测定方法的特点和适用的范围。
3. 何谓密度梯度离心? 主要有哪几种? 对核酸研究有何用途?
4. 核酸的凝胶电泳有何用途?
5. 试述核酸序列测定的酶法和化学法的基本原理。
6. 何谓 PCR? 它有何用途?
7. 讨论影响 PCR 可靠性的因素。
8. 何谓 DNA 合成的亚磷酸三酯法? 它有何优点?

主要参考书

1. Nelson D. L., Cox, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed., New York: Worth Publishers, 2000
2. Sambrook J., Russell D. W.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
3. 吴乃虎, 基因工程原理, 第二版, 北京: 科学出版社, 2001

(朱圣庚)

第 16 章 抗 生 素

一、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,甚至杀死他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下万种,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、灰质霉素等。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 2 500 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。

20 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),它能抑制葡萄球菌的生长;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 20 世纪 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(*Streptomyces*),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、红霉素和博来霉素等。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了飞速的发展,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。

(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:

1. 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。

2. 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。

3. 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,培养两天后,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16-1)。

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 $0.6 \mu\text{g}$

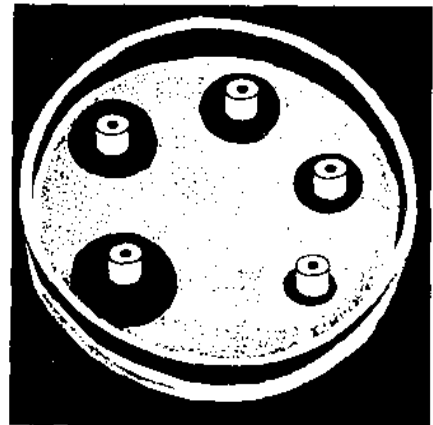


图16-1 不同浓度青霉素所致的抑菌圈

青霉素 G 钠盐结晶为一个国际单位,即 1 mg 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 mg 为 1 000 单位,则 1 mg 链霉素硫酸盐的理论效价应为 798 单位。

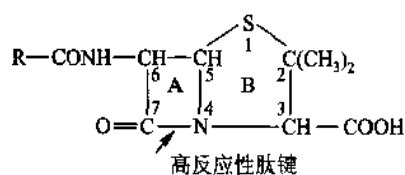
二、一些重要抗生素的化学和医疗特性

(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。

1. 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下:



青霉素通式

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 16-1。

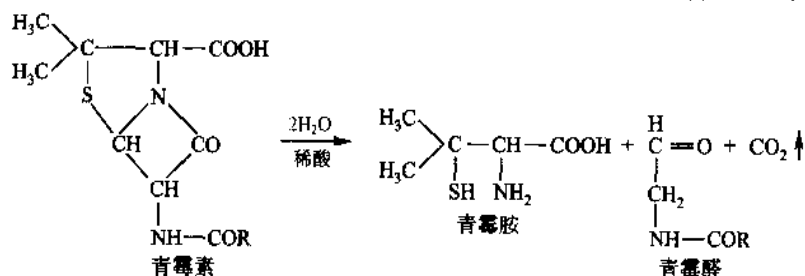
表 16-1 几种青霉素的侧链及物理常数

名称	审定名	侧链 R	相对分子质量(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℃
青霉素 G(或 II)	苯青霉素	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-$	356.4	215℃
青霉素 X(或 III)	对羟苯青霉素	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	372.4	228~235℃
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	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-$	336.3	
青霉素 V	苯氧甲基青霉素	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-\text{CH}_2-$	372.4	120~128℃

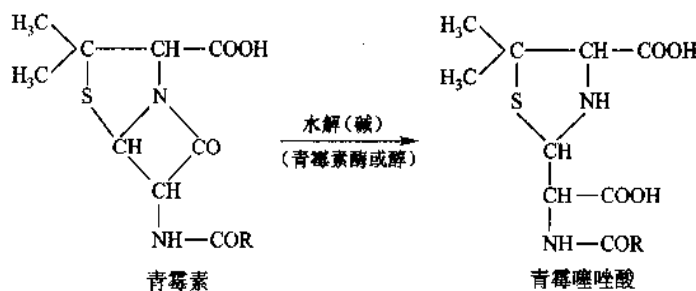
2. 青霉素的理化性质

青霉素本身为一元酸,可与钾、钠、钙、镁、铝和铵等化合成盐类。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断裂,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:

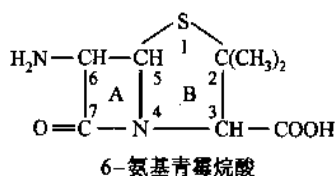


3. 青霉素分子结构的改造

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 的侧链结构见表 16-1。

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”,具结构式如下:



6-APA 可从不加侧链前体的发酵液或氨苄青霉素的酶解液中获得。

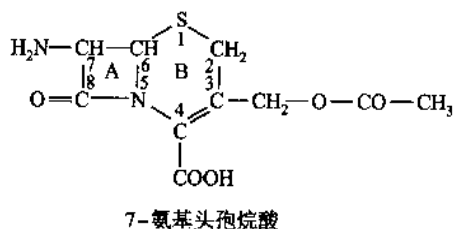
自 1959 年以来各国报道的各种新型半合成青霉素已达千种。其中有的抗菌谱较广,有的对酸和青霉素酶较稳定,如半合成的 α -氨苄青霉素(ampicillin):



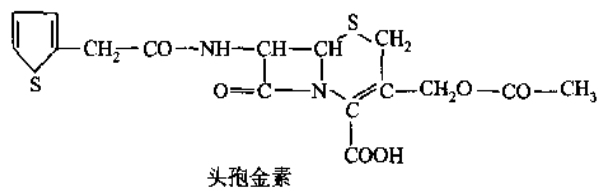
有广抗菌谱的特性,且对酸稳定,可口服,并对革兰氏阴性细菌也有较强的抗菌效力。

青霉素分子在羧基方面的改造,主要是与钾、钠、铁等结合成盐类,或与某些有机碱结合成复盐。钾盐和钠盐易溶于水,适于肌肉、静脉注射,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“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- aminocephalosporanic 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-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(cephloridin)。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:



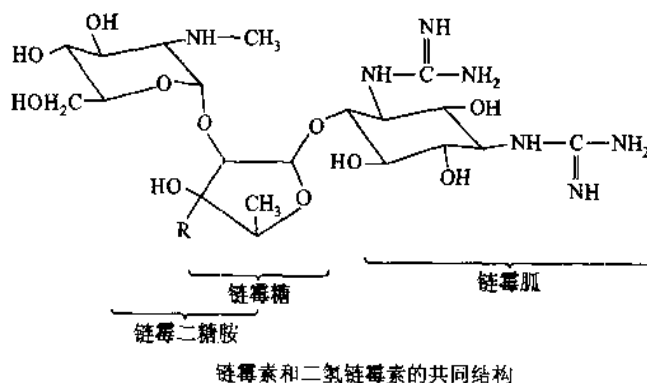
4. 青霉素的抗菌作用和临床应用

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,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、梅毒和炭疽等。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:



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-甲氨基葡萄糖所构成。

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。

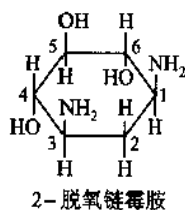
链霉素为氨基环醇化合物,碱性强,且不稳定,因此一般制成盐类(盐酸盐、硫酸盐等)。链霉素碱及其盐

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

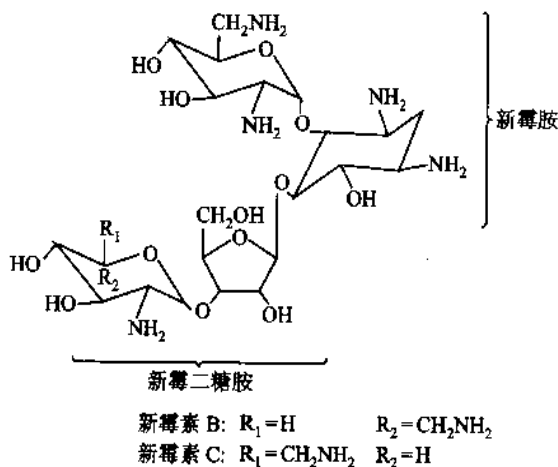
氨基环醇类抗生素是一类在分子中含有一个环己醇型配基,以糖苷键与氨基糖(或中性糖)相结合的化合物,曾称氨基糖苷类抗生素。前面叙述的链霉素和将谈到的春雷霉素和有效霉素都属于这一类。这类抗生素首先根据环己醇衍生物的结构进行分类,如链霉素归属于链霉胍衍生物类;春雷霉素和有效霉素属于肌醇-肌醇胺衍生物类;新霉素(neomycin)、巴龙霉素(paromomycin)、卡那霉素(kanamycin)和庆大霉素(qing-dameisu)等属于2-脱氧链霉胺(2-deoxystreptamine)衍生物类:



1. 新霉素

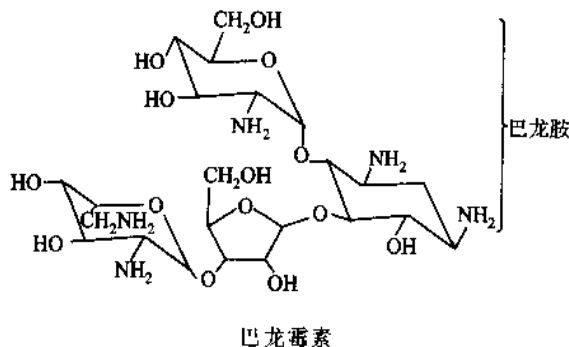
新霉素是一种链霉菌(*Streptomyces fradiae*)产生的广谱抗生素。发现于1949年。能抑制大多数革兰氏阴性细菌及阳性细菌、结核杆菌。由于新霉素口服后很少被吸收,所以临床上常用它治疗肠道疾病。

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 3个成分组成。新霉素A即新霉胺(neamine),抗菌作用弱,新霉素B和C是异构体,具结构式如下:



2. 巴龙霉素

巴龙霉素是一种龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus flosma paromomycinus*)分泌的广谱抗生素。它的化学

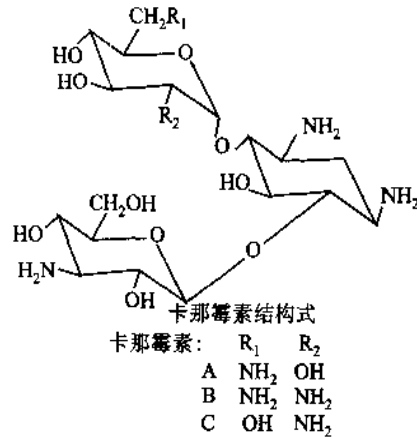


结构和性质与新霉素 B(或 C)极相似,抗菌谱也差不多,临床上巴龙霉素用于治疗肠阿米巴,痢菌痢及其他肠道细菌感染。该抗生素的特点是毒性低,副作用小,以口服为佳。

3. 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。

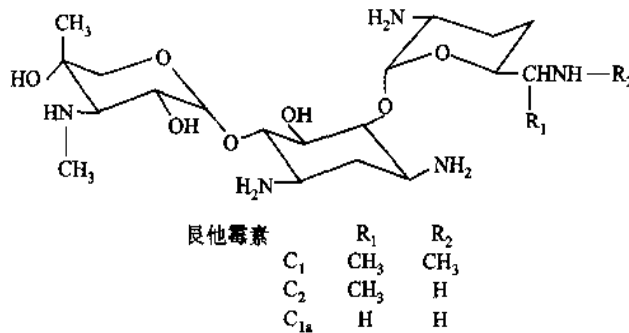
卡那霉素制品含有 A、B、C 3 种成分,国产的主要成分为 A,卡那霉素的结构式如下:



4. 庆大霉素

庆大霉素是从小单孢菌属(*Micromonospora purpurea*) F 19-77 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:



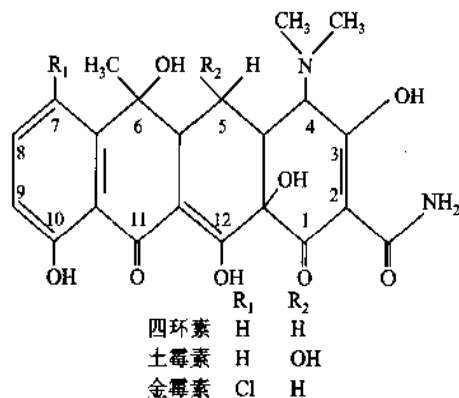
氯霉素分子中存在着两个不对称碳原子,所以有4个光学异构体,其中只有左旋异构体具有抗菌能力。临床上常用人工合成的外消旋氯霉素,称为合霉素(sytmocin)。

氯霉素为白色或无色的针状或片状结晶,熔点 149.7~150.7℃,易溶于甲醇、乙醇、丙醇及乙酸乙酯,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5h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,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(terracycline)和四环素(tetracycline)。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 fimosus*)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。四环素族的化学结构具有共同的骨架,其关系如下:



四环素族的化学结构

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(chlortetracycline),土霉素即氧四环素(oxytetracycline)。

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,略溶于水和低级醇。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16-2。

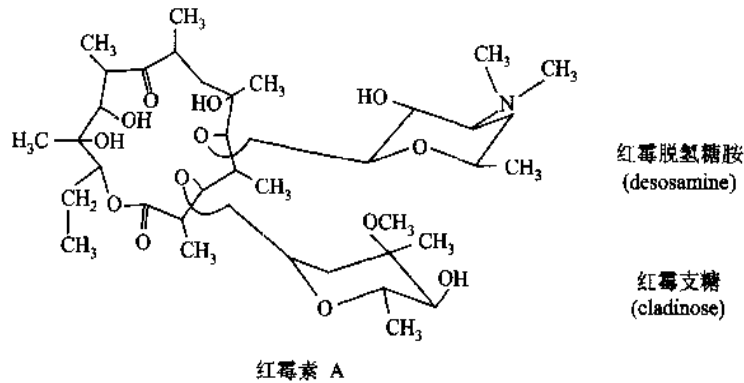
表16-2 几种四环素族抗菌素的物理常数

名称	熔点	比旋度	紫外吸收峰/nm
金霉素	168~169℃	$[\alpha]_D^{25} - 274.9^\circ$ (甲醇)	230, 262.5, 367.5 (0.1 mol/L HCl)
土霉素 (含 2H ₂ O)	181~182℃	$[\alpha]_D^{25} - 196.6^\circ$ (0.1 mol/L HCl)	268, 353 (pH 1.7 磷酸)
四环素 (含 3H ₂ O)	170~173℃	$[\alpha]_D^{25} - 239^\circ$ (甲醇)	268, 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 3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 游离碳水化合物的熔点为 133~138 ℃,在 280 nm 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

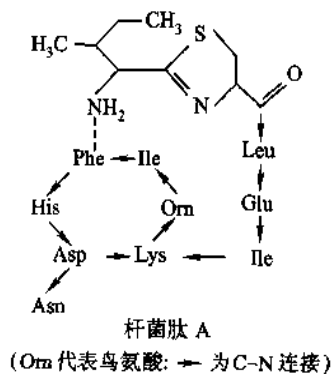
多肽类抗生素很多都是细菌产生的,在它们的结构中,含有环状多肽链,临床上应用的有杆菌肽、短杆菌肽和多粘菌素等。

1. 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 ℃ 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。

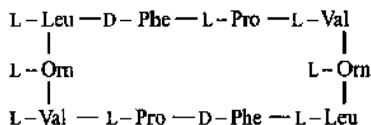
杆菌肽为多成分抗生素,其中杆菌肽 A 由 9 种氨基酸组成,结构式如下:



2. 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。

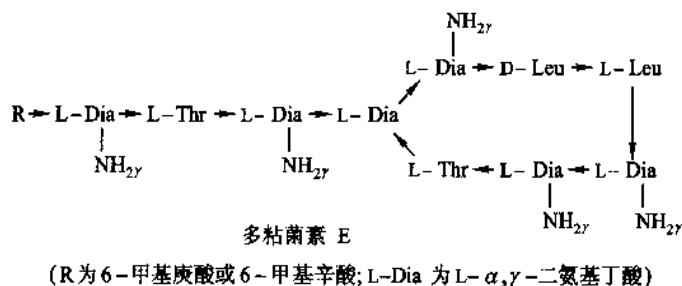
短杆菌肽 S (环状结构) 的结构式如下:



3. 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。

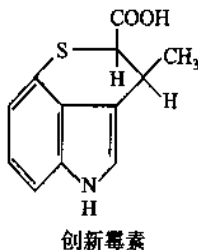
临床应用的多粘菌素 E 是它的硫酸盐, 白色结晶状粉末, 易溶于水, 有吸湿性, 微溶于甲醇、丙酮、乙醚及酯类。在酸性环境中较稳定, 但在碱性溶液中易失效。经化学分析证明, 多粘菌素 E 含有 3 种氨基酸、两种脂肪酸, 其结构式如下:



(八) 创新霉素

创新霉素 (creatmycin) 是我国首创的抗生素。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 pH 2.6~9.2 条件下煮沸 3 h, 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。新霉素游离酸为白色或浅黄色针状结晶, 相对分子质量为 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:



创新霉素体抗菌试验表明, 它主要对大肠杆菌和痢疾杆菌等有较强的抑制作用, 临床上用于大肠杆菌引起的败血症、阴囊炎、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

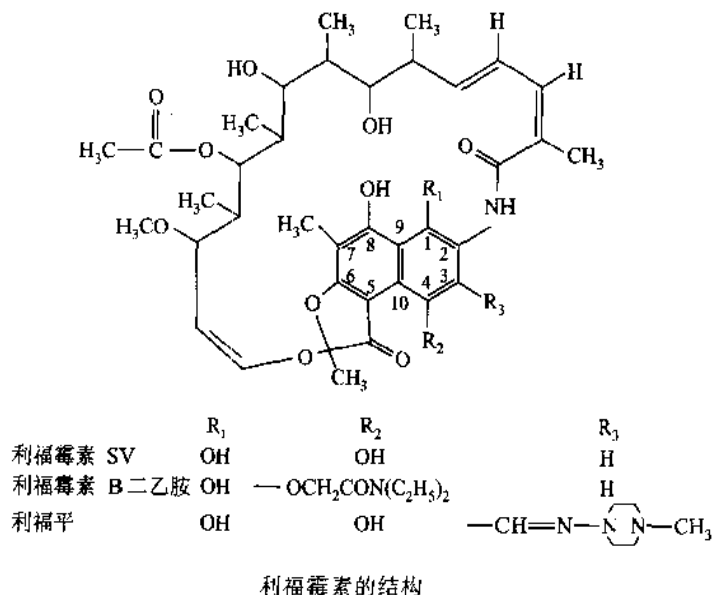
利福霉素 (rifamycin) 于 1957 年发现, 最早从地中海链霉菌 (*Streptomyces mediterranei*) 的发酵液中获得。它是一种多组分的抗生素。目前的临床使用的有利福霉素 SV、利福霉素 B 二乙胺和利福平 3 种。

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 3 年。

利福霉素 B 二乙胺(rifamide)能溶于甲醇、乙醇、苯、丙酮和乙酸乙酯,难溶于水及石油醚。250 ℃ 以上分解。其钠盐为橙黄色结晶,易溶于水。

利福平(rifampicin)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'双取代的脒化合物。利福平是一种砖红色结晶性粉末,熔点 183~185 ℃。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 ℃ 能保持其活性。

利福霉素的化学结构式如下所示。



利福霉素族抗生素为广谱抗生素,对革兰氏阳性和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 脒衍生物,例如利福平的哌嗪环上 2,6 位被甲基化,4 位甲苯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,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制是抑制细菌 RNA 聚合酶的活性,妨碍转录的起始。

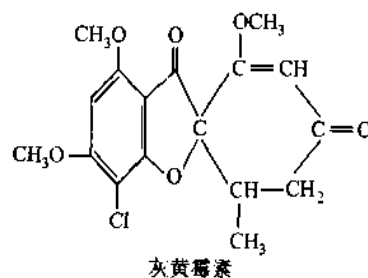
(十) 灰黄霉素

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 ℃,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 min,仍不失活性,其结构式如右:

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。

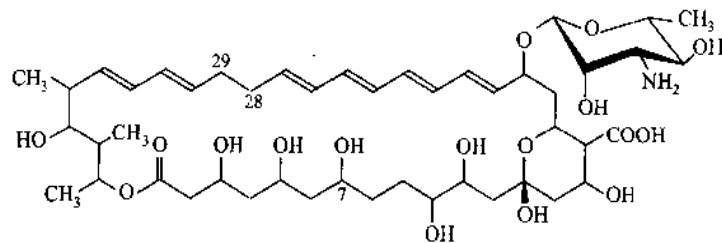
(十一) 制霉菌素

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(polyene)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相比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℃ 左右加热 10 min,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 $C_{47}H_{75}NO_{17}$,相对分子质量为 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、乙酸及 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 A_1 ,泛称制霉菌素。次要成分为制霉菌素 A_2 、 A_3 等。制霉菌素(即 A_1)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 元的多烯大环内酯环,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。

三、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新的重要的新方向。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。

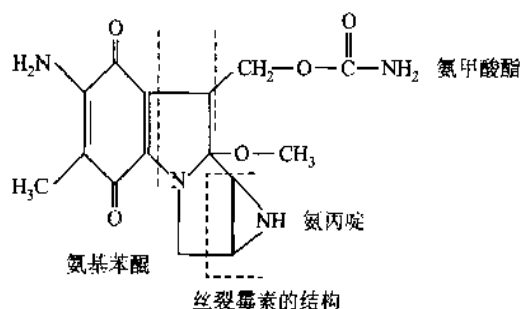
抗肿瘤抗生素均具有相当毒性,对骨髓的毒性尤强,治疗效果远非理想,目前只作为综合措施中的一种治疗手段。

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*)H 2760 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)是同一物质。

丝裂霉素是一种吡啶酮的衍生物。分子中含有氮丙啶(aziridine)、氮甲酸酯和氨基苯醌等具有抗肿瘤活性的基团。丝裂霉素的结构如下:



自力霉素制品为深蓝紫色针状结晶或柱状结晶。在 300 ℃ 以上无明显熔点或分解点,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 ℃ 经 4 h 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 nm 及 218 nm 波长处有两个紫外吸收峰,在 292 nm 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 247—248 ℃ (分解)。易溶于丙酮、氯仿和苯,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 的分子结构包括两部分,即发色团(2-氨基-4,6-二甲基-3-氧-吩恶嗪-1,9-二羧酸)和 2 个相同的环肽,其结构式如下:(见下页)。

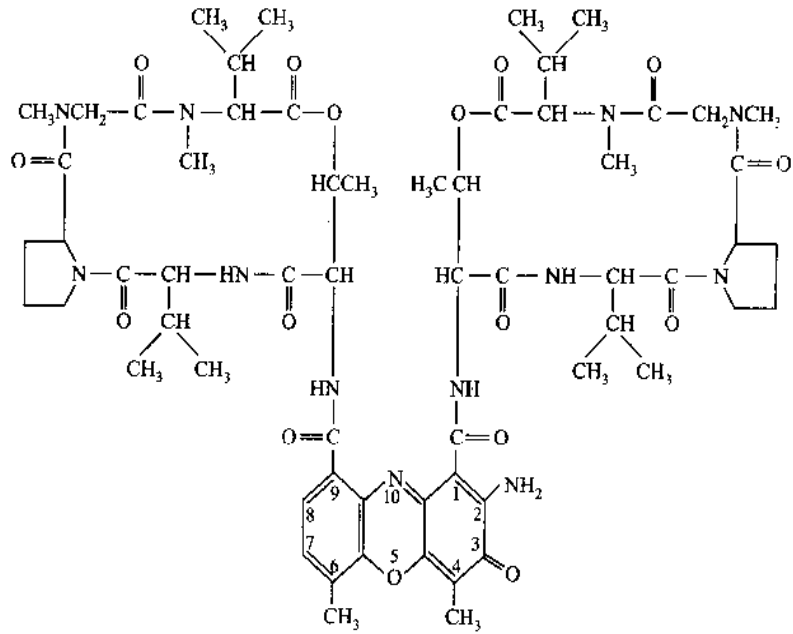
环肽由 L-甲基缬氨酸、肌氨酸(甲基甘氨酸)、L-脯氨酸、D-缬氨酸和 L-苏氨酸组成。苏氨酸的羟基和甲基缬氨酸的羧基之间形成一个酯键,因而成环肽。

放线菌素 D 通过与模板 DNA 相结合的方式妨碍转录反应而抑制细菌生长。在低浓度时,放线菌素 D 抑制转录但不影响 DNA 复制,并且也不直接影响蛋白质的生物合成。因此,它已被广泛地用作原核细胞和真核细胞中新 RNA 形成的高专一性抑制剂。

临床试验表明,放线菌素 D 对恶性葡萄胎、绒毛膜上皮癌、何杰金氏病等都有一定疗效。但因毒性太大,很少作为药物使用。

(三) 争光霉素

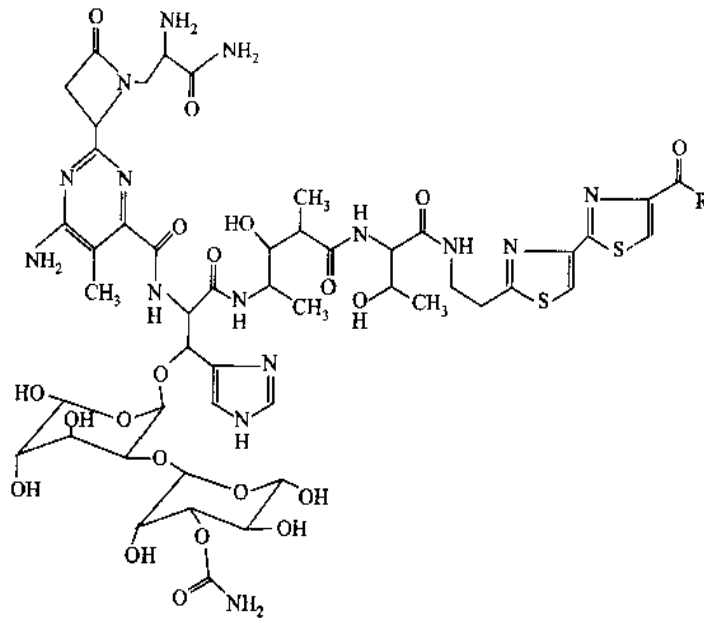
争光霉素也是放线菌产生的抗癌抗生素。产生菌是 1969 年从浙江平阳山区土壤中分离出来的放线菌 72 号菌株。它与 1965 年从轮支链霉菌(*Streptomyces verticillus*)B-80-Z2 菌株中获得的博莱霉素



放线菌素 D 的结构

(bleomycin)系属同一抗生素。

争光霉素是一族与铜离子螯合的含硫配糖多肽抗生素,具弱碱性。含铜制品为绿色粉末,除铜后为白色粉末,易溶于水和甲醇,微溶于乙醇,难溶于丁醇、乙酸乙酯、乙醚及苯。争光霉素的水溶液比较稳定,临床使用的为其去铜盐酸盐。用层析法可以分为 A₁、A₂……B₄ 和 B₆ 等共 13 种成分,但主要成分为 A₂。博莱霉素的结构式如下。

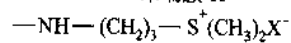


博莱霉素的结构式

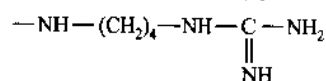
博莱霉素

末端胺 R

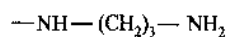
A₂



B₂



A_{2b}



博莱霉素的作用方式是引起 DNA 在 GpT 和 GpC 处的单链断裂。

争光霉素对革兰氏阳性和阴性细菌以及分枝杆菌均有抑制作用。争光霉素进入体内后,集中在皮肤、食道、肺和阴茎等组织,这是其他抗癌抗生素所没有的特性。它能抑制迅速增殖细胞的 DNA 的合成。

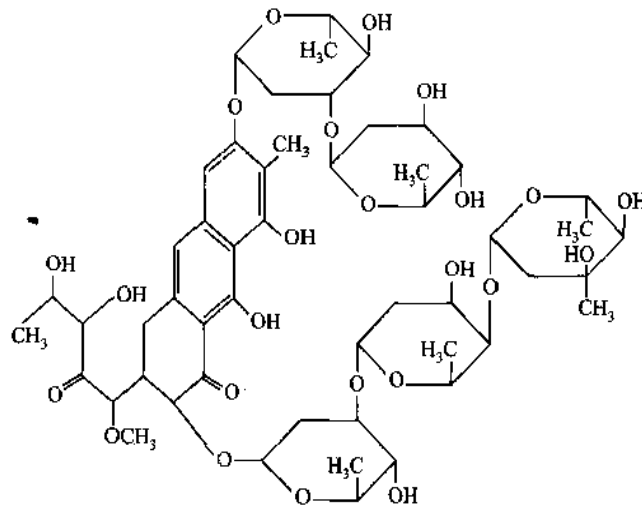
临床上用争光霉素治疗皮肤和头颈部的鳞状上皮细胞癌有显著效果。适应症包括上颌窦癌、唇癌、舌癌、鼻咽癌、喉癌、跟癌及阴茎癌等。它对脑瘤也有治疗作用。

(四) 光辉霉素

光辉霉素是从我国土壤中分离的放线菌(*Strep. 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℃(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。pH 2.5~9,50℃,1 h 稳定,80℃ 1 h 则几乎全部破坏,其钠盐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,从而停止 RNA 的合成。

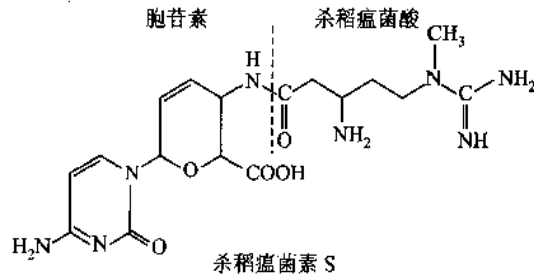
四、抗生素在农业中的应用

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、柑橘、烟草、蔬菜和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,防治稻瘟疹病的效果比杀稻瘟菌素高数倍,对植物、动物和人体的毒害较低。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生素、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 nm 波长处有一个吸收峰。

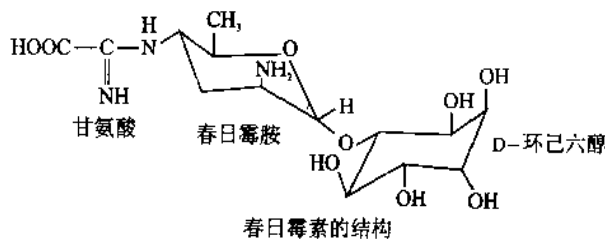
灭瘟素能抑制革兰阳性及阴性细菌生长。灭瘟素对真菌的作用差别很大, 稻瘟病梨形孢 (*Piricularia oryzae*) 对它特别敏感, 最小抑制浓度为每毫升 5~10 μg, 稻恶苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) 则需每毫升 400 μg。灭瘟素只要每毫升 0.05 μg 即能抑制烟草花叶病毒 (TMV) 的繁殖。

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。

灭瘟素对植株有毒害。使用浓度必须控制在每毫升 40 μg 以下, 对动物和人体也有毒性, 特别是对皮肤、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, 现已将它制成苯胺基磺酸盐使用。

(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:

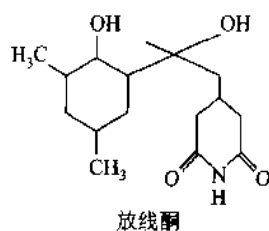


春雷霉素呈弱碱性, 其盐酸盐为白色针状或片状结晶, 熔点 210 °C, 有甜味, 易溶于水, 不溶于甲醇、乙醇、丙酮、苯等有机溶剂, 在酸性溶液中稳定, 在碱性条件下 (pH > 7.5) 药效极易破坏。

春雷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, 一般使用质量浓度为 20~40 μg/mL。

(三) 放线酮

放线酮 (actidione) 首先于 1946 年从灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 中获得。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:



放线酮为无色片状或针状结晶,熔点 116~117 °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。

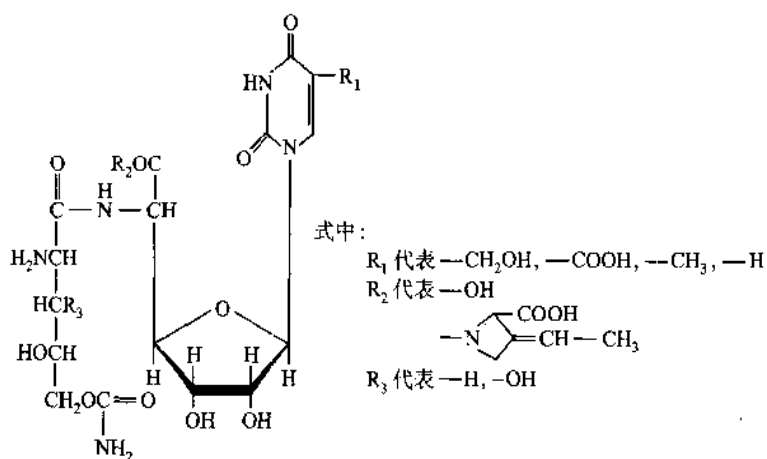
放线酮在农业上用于防治茶云纹叶枯病、白松疱锈病、水稻枯纹病和棉花角斑病等真菌引起的作物病害。临床上可用来治疗隐球菌病——一种霉菌所致的脑膜炎。

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上壤的刺孢吸水链霉菌(*Strep. hygrospinosus* n. sp.)。内疗素对光、热、酸较稳定。质量分数 1×10^{-6} ~ 10×10^{-6} 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、橡胶白粉病和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. ahyscopicus gongzhulingensis* n. var.)。公主岭霉素的主要组分为:脱水放线酮、异放线酮、奈良霉素 B、制霉菌素和苯甲酸等。其中以放线酮类活性较高,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)是一族新的酰胺-嘧啶核苷抗生素,它首先由日本人从可可链霉菌(*Streptomyces cacaoi* var. *asoensis*)中提取出来。目前已知它有 A-M 13 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: $R_1 = \text{COOH}$, $R_2, R_3 = \text{OH}$

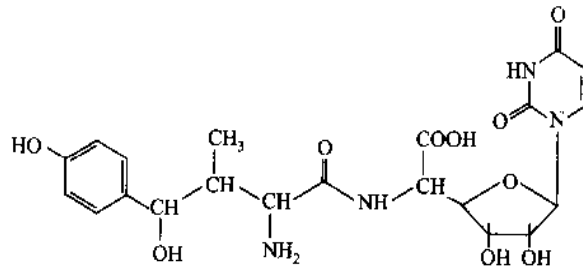
多氧菌素 D 是防治植物病虫害最好的农用抗生素之一。多氧菌素为结晶形粉末,熔点 >190 °C,在 0.05 mol/L HCl 中最大吸收峰在 276 nm。在 0.05 mol/L NaOH 中最大吸收峰在 271 nm,溶于水,不溶于大部分有机溶剂。

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

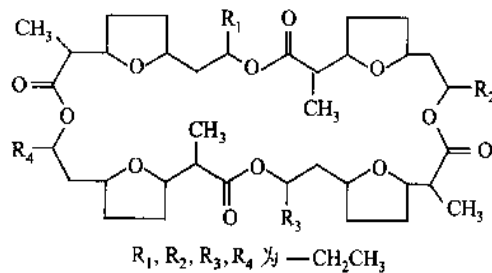
日光霉素(nikkomycin)为两性水溶性核苷类抗生素,其产生菌为 *Strep. tendac* T₁901,来自日本日光土壤。该菌产生多组分杀虫杀菌抗生素,其中组分C和CX只对昆虫有杀灭效力。日光霉素的化学结构如下所示:



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)也称杀螨毒素,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3个活性组分,其中组分C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:

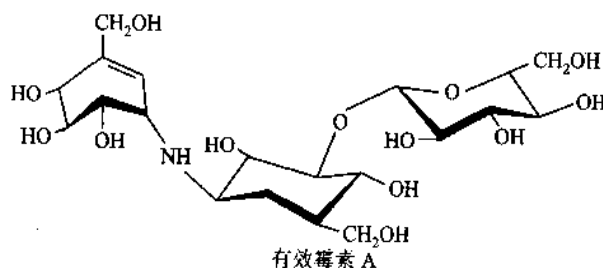


四抗生素为无色或微黄色的梭形结晶,对光、热、酸、碱都很稳定,易溶于醇类、丙酮、苯、氯仿和乙酸乙酯等有机溶剂,但几乎不溶于水。

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 d),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(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. hygroscopicus* var *limoncus*)。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:

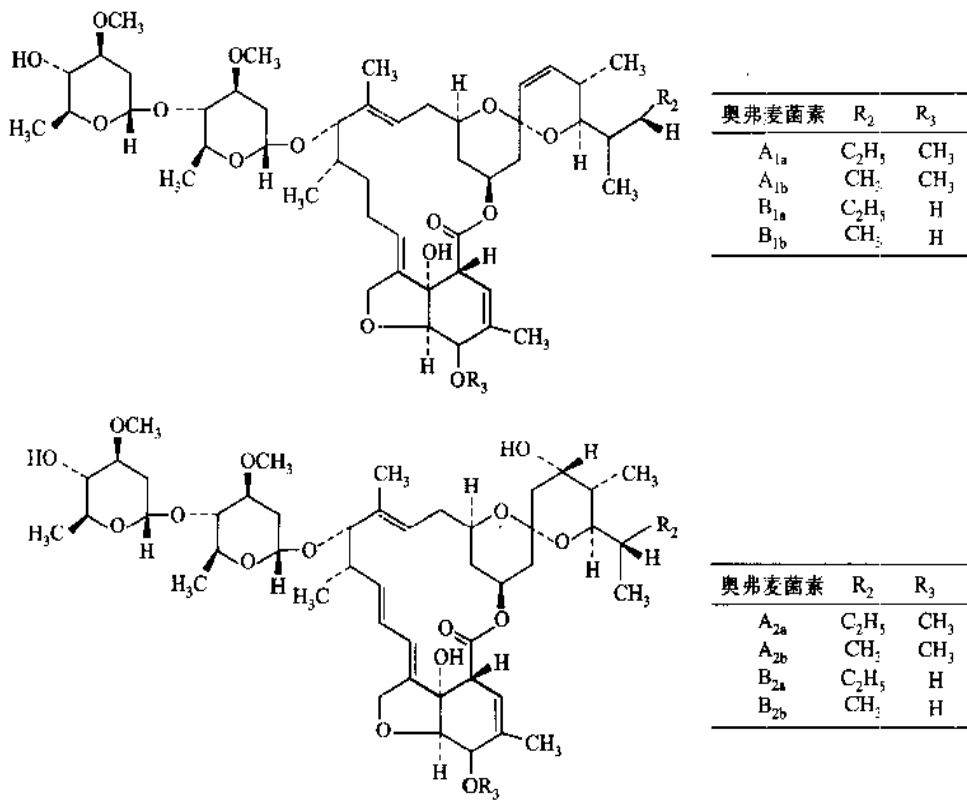


有效霉素属于氨基环醇类抗生素。用Dowex树脂分离可得A-F有效氧胺A,B共8个组分。有效霉素A喷施于接种病菌的病株30 min后,降雨也不影响其防治效果。有效霉素的作用机理可能与阻碍丝核菌产生肌醇有关。

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. hygroscopicus* var. *Jinggangensis* 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。一些长期以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(thioistreptone)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。

五、抗生素的抗菌作用机制

研究抗生素的作用机制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。

抗生素作用机制的研究对分子生物学的发展也起着很大的推动作用。例如,对青霉素作用机制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制。

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制即属于这一类。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制,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A₃(chromomycin A₃)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,像利福霉素、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:

1. 放线菌素 D

与我国生产的放线菌素K₂(亦称更生霉素)相同,分子含有一个发色团——吩恶嗪酮(phenoxazone)和两个环肽。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物质的分子比)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,它的吩恶嗪(phenoxazine)环平面嵌入两个相邻的G-C碱基对平面之间,吩恶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,一个环肽在吩恶嗪环上方,另一个在环的下方。两个环肽的Thr羰基分别与两个鸟嘌呤的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。如果忽略吩恶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恶嗪环中央的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,妨碍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。

2. 丝裂霉素 C

同于我国生产的自力霉素。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。

3. 利福霉素和利福平

这是一类含萘氧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。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(pppG或pppA)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)。

利福霉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两个亚基组成。真核细胞的核糖体为80S,它由40S和60S两个亚基组成。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和60S,其亚基也相应不同。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4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。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、活化酶和蛋白因子等,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制。

1. 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(或称色氨酸-tRNA合成酶)结合,因此抑制了氨酰-tRNA的形成。

2. 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_f的结合)。春日霉素的作用位点在30S亚基的16S RNA部分。

3. 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)。

四环素族抗生素由于它们封闭30S亚基上的A部位(氨基酸部位)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

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 50 S 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 60 S 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 50 S 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酯抗生素(macrolide antibiotics)如麦迪霉素(midecamycin)和螺旋霉素(spiramycin)等以及梭链孢酸(fusidic acid)等。

4. 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。像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(purromycin)对蛋白质生物合成具有独特的作用。它与 50 S 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(图 16-2)。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。

(三) 改变细胞膜的通透性

细胞质膜(plasma membrane)是由双层脂组成的。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、核苷酸和无机盐离子等外漏,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,很像膜系统上的离子载体(ionophore),因此称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(见下图)。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。

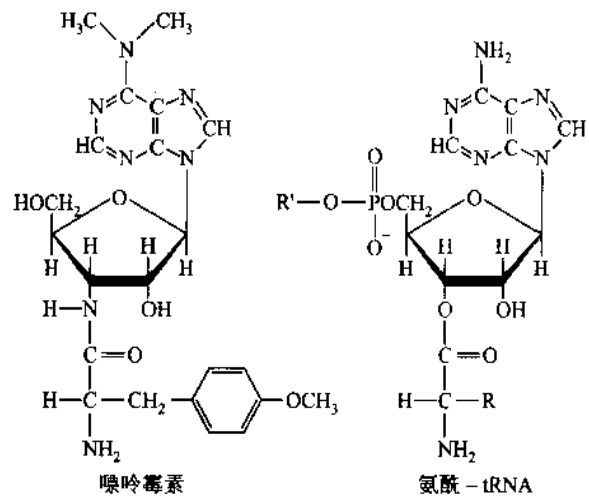
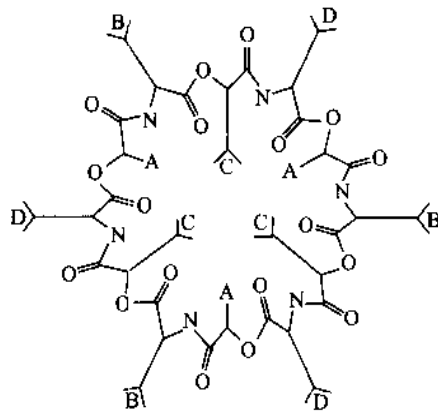


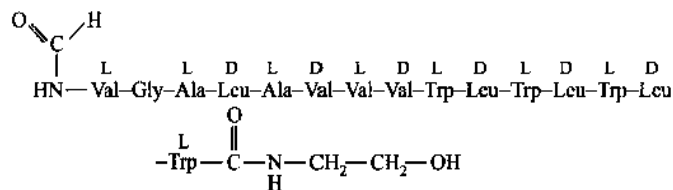
图 16-2 嘌呤霉素与氨酰-tRNA 3'-末端结构的相似性

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

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。短杆菌肽 A 能形成通道(channel)横贯双层脂膜。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。



短杆菌肽 A

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。

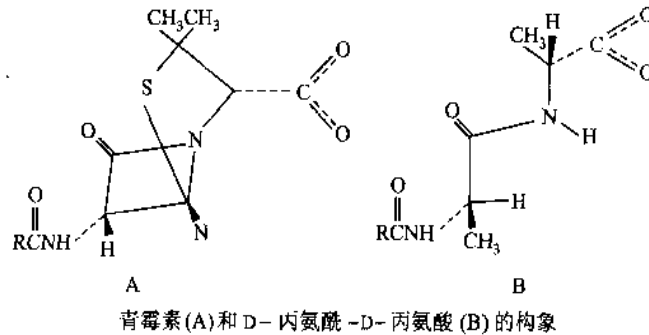
(四) 干扰细胞壁的形成

青霉素、头孢菌素、杆菌肽、D-环丝氨酸(D-cycloserine)、磷霉素(phosphonomycin)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。

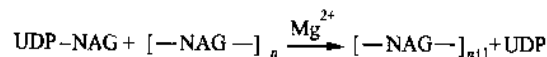
很早已有人观察到,在青霉素的影响下,大肠杆菌发生变形。细菌的外形决定于细胞壁的完整性,细菌的变形是细胞壁受损的结果。由于青霉素专门作用生长时期的细菌,可见青霉素的作用是抑制新的胞壁形成,而不是破坏已经形成的细胞壁。细胞壁的合成受到抑制后,细菌的抗渗透压能力降低;引起菌体变形,破裂而死亡。

20 世纪 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。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)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。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。



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

抗生素的作用机制除上述的 4 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。

六、细菌对抗生素耐药性的生物化学机制

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 1982 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,虽然也有少数例外,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。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制主要有 3 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。

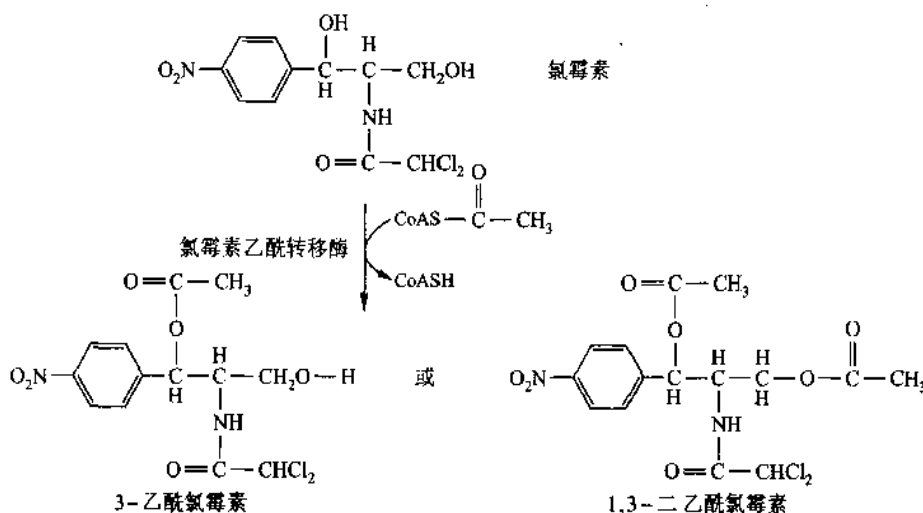
(一) 耐药菌产生导致抗生素失效的酶

1. 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 -内酰胺酶的 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。

2. 乙酰化导致氯霉素失效

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。

3. 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 3 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,由腺苷酰转移酶(adenyl 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)30 S 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 30 S 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(氨基环醇类抗生素)的抑菌机制也是作用于 70 S 核糖体的 30 S 亚基,但不是作用于 30 S 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 16 S RNA 3'-端附近 AACUUG 顺序中的二个腺苷酸残基使成二甲基腺苷酸。由于 16 S 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($1\sim 10\ \mu\text{g}/\text{mL}$)时是敏感性 R^- 大肠杆菌(不含R因子)的 $1/50\sim 1/100$ 。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。

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它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。

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杯碟法。

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,青霉素分子中有一个由 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,它的抗菌机制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、巴龙霉素、卡那霉素和庆大霉素等。这是一类广谱抗生素,能抑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,如杆菌肽、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3个抗肿瘤基团,即氨基苯醌、氨基甲酸酯和氮丙啶;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极强的抑制作用。

抗生素也用于治疗畜禽的感染症,同时也用于饲养畜禽,抗生素具有促进家禽生长的作用。

抗生素的作用机制可以归纳为4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。

细菌耐抗生素的生化机制主要有3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。

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. 试述青霉素的抗菌作用机制。
3. 离子载体抗生素的结构特点是什么?
4. 按化学结构和性质可将抗生素分成哪几类?
5. 抗生素今后发展方向是什么?
6. 抗生素的抗菌作用机制有哪些方式?
7. 细菌耐药性的生物化学机制有哪些类型?

主要参考书

1. 马誉澈主编. 抗菌素. 第二版. 北京: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:上海人民出版社,1977
3. 王嶽,方金瑞主编. 抗菌素. 北京: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. 北京:科学出版社,1977
5. Garrod L P, et al. Antibiotic and Chemotherapy. 4th ed. Churchill Livingstone, 1973
6. Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M. Principles of Biochemistry. 2nd ed. Worth Publishers, 1993
7. Zubay G. Biochemistry. 3rd ed. Wm. C. Brown Publishers, 1993
8. Stryer L. Biochemistry. 3rd ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1988

(徐长法 唐建国)

第 17 章 激 素

一、概 述

激素(hormones)一词于 1904 年首先由 Bayliss W 及 Starling E 提出,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结构与功能进行了较广泛的研究(内分泌学),对激素的作用机制也有了一定的了解。20 世纪 60 年代以来,大批激素的分子结构开始有了陆续报导,近年来,更深入地发现了激素与细胞膜或细胞核中受体的结合,对于激素对机体的调节作用也有了较多的研究,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 技术的产生极大地促进了研究工作,使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,都会破坏这种平衡,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。

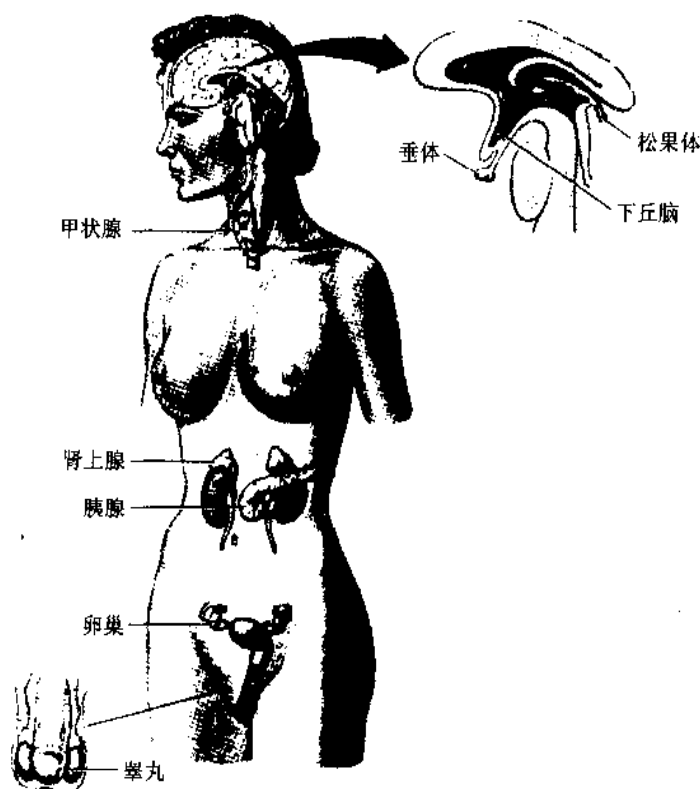


图 17 1 人体部分特殊内分泌腺示意图

产生激素的内分泌腺很多,以哺乳动物为例,一些特殊的内分泌腺见图 17-1,分泌的激素参见表 17-1 及表 17-2。

表 17-1 含氮激素

内分泌腺	激素	简称	英文名称	化学本质	相对分子质量 (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个氨基酸	4 700	促进肾上腺皮质分泌激素	
	催乳激素	LTH	lutotropic 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 LH	lutcinizing hormone (in terstitial cell stimulating hormone)	蛋白质(含糖)	27 400 (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 bormone	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 :93个氨基酸) (γ :60个氨基酸)		水解酯类	
	后叶	催产素	—	oxytocin	9个氨基酸	1 070	促使妊娠子宫收缩
	后叶	加压素(抗利尿)	—	vasopressin	9个氨基酸	1 070	升高血压并抗利尿
	中叶	促黑素细胞激素	MSH	malanophore - stimulating hormone	α -MSH 13个氨基酸 β -MSH 18个氨基酸		刺激黑色素的扩散 和生物合成
下 丘 脑	促肾上腺皮质激素释放因子	CRF	corticotropin releasing factor	41个氨基酸		促进或抑制激素的 分泌	
	促黄体生成激素释放因子	LRF	lutcinizing hormone releasing factor	10个氨基酸			
	促卵泡激素释放因子	FRF	follicle stimulating hormone releasing factor	40-44个氨基酸			
	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个氨基酸			
	催乳激素释放因子	PRF	prolactin releasing factor	多肽			
	促黑色细胞激素释放因子	MRF	melanophore - stimulating hormone releasing factor	多肽			
	促黑色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个氨基酸			

续表

内分泌腺	激素	简称	英文名称	化学本质	相对分子质量 (近似值)	生理效应
胸腺	胸腺素 ^I 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	32个氨基酸	3 800	调节钙磷的正常代谢,降低血钙
	降钙素基因相关肽	CGRP	calcitonin gene related peptide	37个氨基酸	4 000	血管舒张剂
甲状旁腺	甲状旁腺激素	PTH	parathormone	84个氨基酸	9 500	调节钙磷的正常代谢,升高血钙
肾上腺	髓质					促进糖原分解,使血糖升高。 也还可以促使脂肪、氨基酸分解
	肾上腺素	—	adrenaline (epinephrine)	酪氨酸的衍生物		
	去甲肾上腺素 (正肾上腺素)	—	noradrenaline			
皮质	(见表8-2)					
肾	肾素			蛋白质		
胰岛	α -细胞					促使血糖增高;促使脂肪、蛋白质分解
	胰高血糖素	—	glucagon	29个氨基酸	3 485	
	β -细胞					促使血糖降低;促进脂肪、蛋白质合成及糖的氧化和贮存
胰岛素	—	insulin	51个氨基酸	5 734		
十二指肠粘膜	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	CCKPZ	cholecystokinin pancreozymin	33个氨基酸		促使胆囊收缩并促使胰液中酶含量增高
	肠促胰液素	—	secretin	27个氨基酸		促使胰液分泌增多
	肠抑胃素		enterogastrone	43个氨基酸		抑制胃的收缩及分泌
胃粘膜* (幽门部)	促胃酸激素		gastrin	17个氨基酸		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。排于尿中可用来检查是否妊娠
卵巢黄体	耻骨松弛激素		relaxin	53个氨基酸		促使耻骨松弛
脂肪细胞	瘦素		leptin	146个氨基酸		抑制饮食,增加代谢,减肥

* 十二指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 17-2 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,氧化可的松)	—	17-hydroxy-corticosterone (corticosterone)	甾 醇	2. 盐皮质激素: 促使体内保持钠,排出钾
		3) 皮质酮	—	corticosterone		
		2. 盐皮质激素	—	aldosterone		
		1) 醛甾酮	—	aldosterone		
		2) 11-脱氧皮质酮	DOC	11-deoxy-corticosterone	甾 醇	
		3) 17-羟,11-脱氧皮质酮(脱氧皮质醇)	—	deoxycortisol		
		4) 皮质酮	—	corticosterone	甾 醇	促进雄性动物发育、生长及维持雄性特征
	二、性激素:					
	肾上腺雄酮	—	androstenedione			
	孕酮等	—	progesterone 等			
	髓质	(见表 8-1)				
辜 丸	间质细胞	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	
		辜 酮	—			testosterone
		雄 酮	—			androsterone
卵 巢	卵 泡	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	—			
胎 盘		雌激素:				
		孕 酮	—	见 上		
		促性腺激素	—	见表 17-1		
		耻骨松弛素	—	见表 17-1		
		绒毛膜促性腺激素	—	见表 17-1		

(二) 激素的化学本质

激素按其化学本质可分 3 类:① 含氮激素(包括蛋白质、多肽类激素,氨基酸衍生物激素);② 固醇类激素;③ 脂肪酸衍生物激素(二十碳四烯酸)。前两类分别列于表 17-1,17-2 中。

由表 17-1 可见,垂体前叶、中叶及后叶、甲状旁腺、胰岛等分泌的激素为多肽或蛋白质,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。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,也分泌一些肽类激素,如促肾上腺皮质激素释放因子、促性腺激素释放因子等。

性腺和肾上腺皮质分泌的绝大多数都是固醇类激素(表 17-2)。而耻骨松弛素及绒毛膜促性腺激素则也是含氮激素。

二、激素的合成与分泌

虽然所有激素在体内的生物合成应该说都是在基因的调控之下,但就合成途径来看,大体上可以划分为两个类型:① 由激素的结构基因通过转录与翻译形成,② 通过胞内存在的酶系催化合成。

(一) 多肽激素合成后储存于分泌囊中

蛋白质和多肽激素的生物合成属于第一种类型。因而它们的合成途径与一般蛋白质生物合成是一样的,这里不再赘述。但有一点应该指出,就是许多多肽激素的前体都是较大的蛋白质,这种前体多肽激素分子称为“原激素”(prohormone)。原激素的生物活性非常低,原激素经酶解,才加工成相对分子质量较小的具生物活性的激素。到目前为止,已发现许多原激素,如胰岛素原、胰高血糖素原、甲状旁腺素原、降钙素原、大胃泌素以及促黑激素前体(图 17-2)。从原激素转化为激素,掉下的无生物活性的肽段是否有其

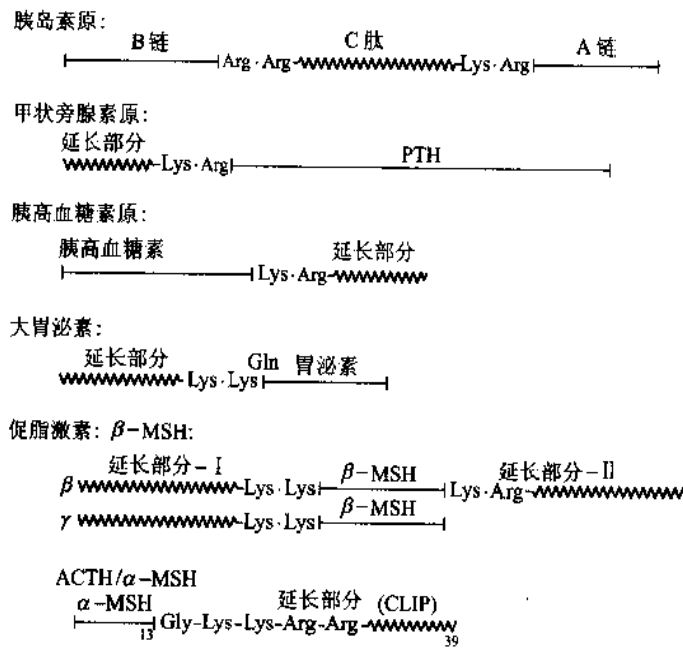


图 17-2 几种多肽激素前体的一级结构示意图

直线部分代表具生物活性的完整肽段;锯齿部分和标出的碱性氨基酸残基是前体无活性肽段;整个长链就是原激素的结构示意

他的生物功能,目前还不清楚。看来生物体对它所合成的物质是不会白白浪费掉的。近年有报导胰岛素原中的 C 肽对糖尿病动物具有阻止其微血管病变及神经紊乱的作用。促黑激素的合成途径也可以给我们一些启示, β -促脂素分子中间含有一段 β -MSH 的分子,可以认为 β -MSH 的前体就是 β -促脂素;同样,ACTH 分子 N 端 13 肽就是 α -MSH,因此 ACTH 可以认为是 α -MSH 的前体。从图 17-2 中我们看到,前体多肽链的位置并无规律可循,具激素活性的肽段可能出现在前体的 N 端(如 ACTH 原,胰高血糖素原),也可能出现在 C 端(如甲状旁腺素原)或在两端(如胰岛素原),也有出现在中间的(如 β -促脂素)。但是仔细分析一下原激素分子断裂成激素的位置,不难发现都是在两个连续的碱性氨基酸处,因此

可以推断所有的原激素的裂解机制都是相似的,即由一类类似胰蛋白酶的酶所组成,它们只水解成对的碱性氨基酸残基。

激素为什么要以前体的形式进行合成至今仍不清楚。可能原激素对激素分子在形成时进行正确的折叠、分泌是必要的;还有一个可能就是原激素具有保护和贮存的作用,因大分子在细胞内不易被降解,只有在需要时才被加工成活性形式,以减少激素被破坏。

对于某些小肽,像促甲状腺素释放激素(TRH)三肽,则可能是由存在于丘脑下部的 TRH 合成酶合成的。还有一类蛋白质与多肽激素是通过存在于血浆中的 α_2 -球蛋白裂解而成,例如血管紧张素和激肽。

(二) 甲状腺激素和肾上腺激素是氨基酸衍生物

1. 甲状腺激素

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,活性碘与甲状腺球蛋白中的酪氨酸残基作用产生一碘酪氨酸残基,进而产生 3,5-二碘酪氨酸残基。碘化酪氨酸残基之间进一步反应,并通过甲状腺球蛋白的水解进而形成三碘甲状腺原氨酸(T_3)及甲状腺素(T_4),见图 17-3。

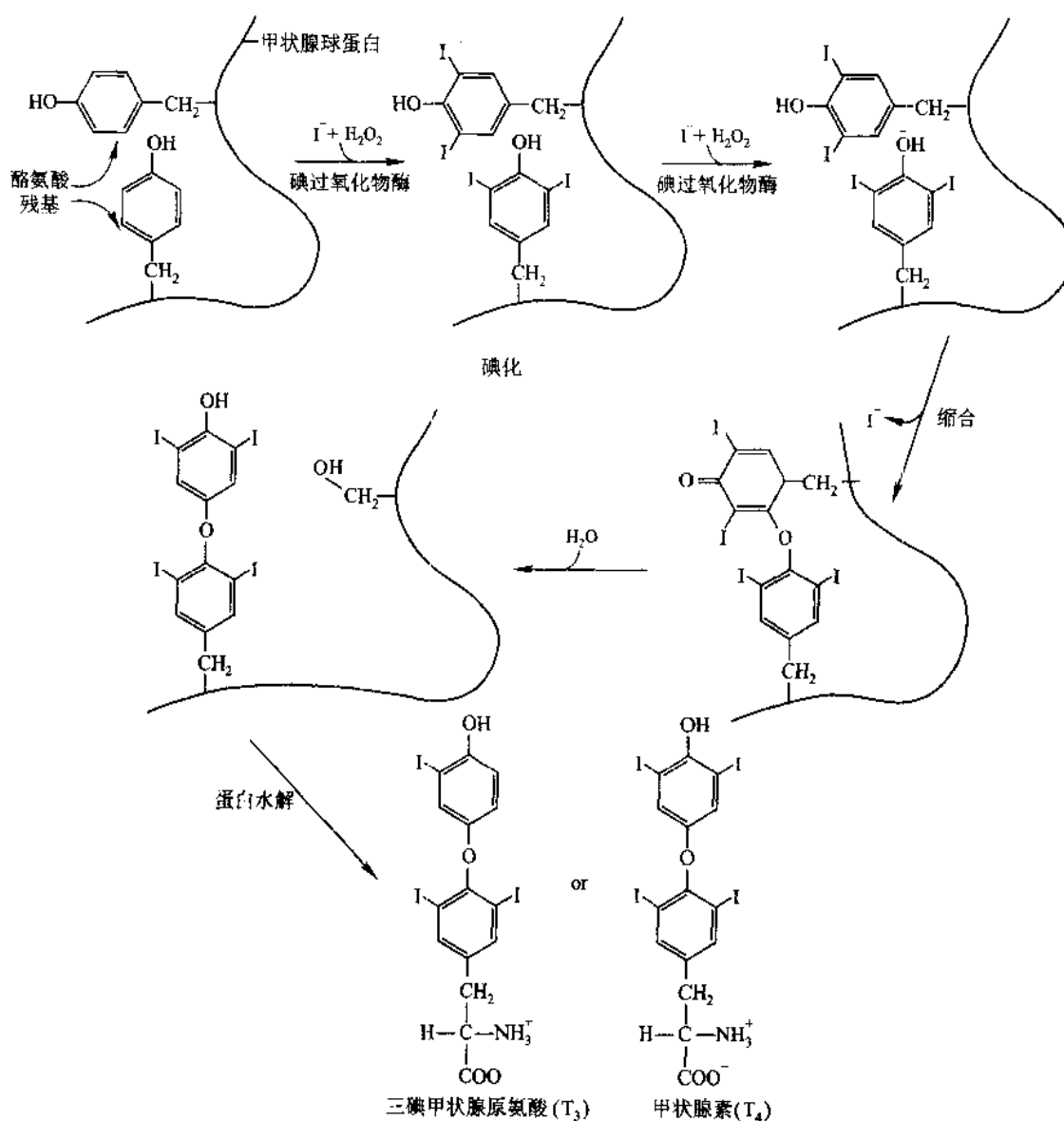


图 17-3 甲状腺素(T_4)及三碘甲状腺原氨酸(T_3)的生物合成途径

甲状腺球蛋白是相对分子质量约为 660 000 的含碘糖蛋白,其中含有约 120 个酪氨酸残基。

甲状腺激素的生物合成受硫脲(thiourea)及硫脲嘧啶(thiouracil)的抑制。其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。

2. 肾上腺激素

肾上腺素及正肾上腺素均由酪氨酸转变而来,其过程见图 17-4。

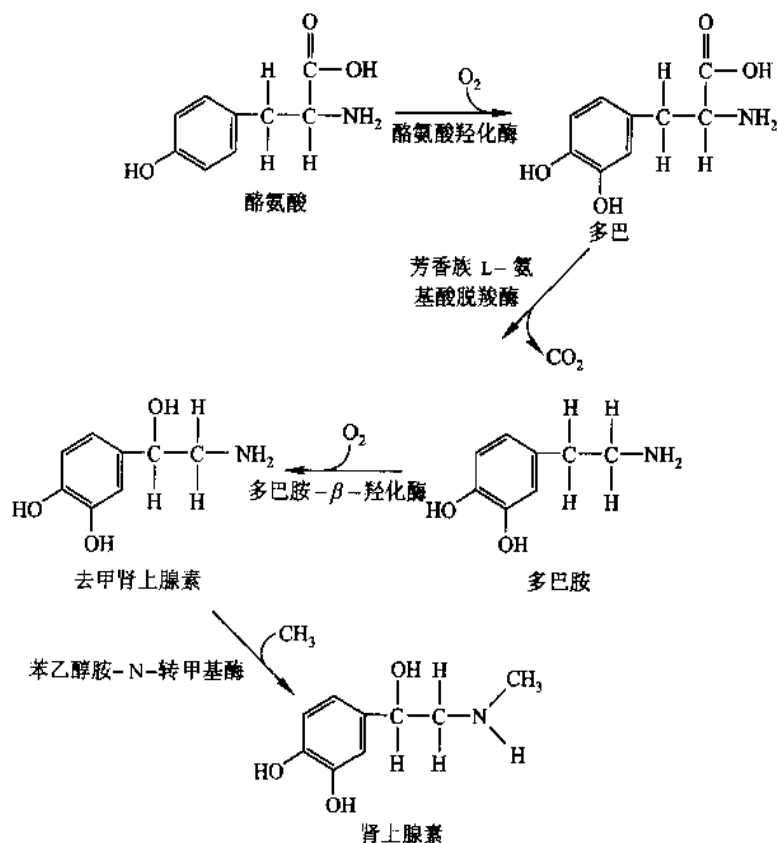


图 17-4 肾上腺素的生物合成途径

(三) 固醇类激素源自胆固醇

各种固醇类激素的生成过程,开始时都相同,由胆固醇(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 17-5。

(四) 脂肪族激素——前列腺素

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)。

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 4 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, PGF₁ α , PGF₂ α 及 PGF₃ α 。前列腺烷酸及前列腺素的结构见图 17-6。

E₁ 及 F₁ α 两种前列腺素是从 $\Delta^8,11,14$ -二十碳三烯酸衍生出来的,见图 17-7;然而 E₂ 及 F₂ α 则是从 $\Delta^5,8,11,14$ -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(羊贮精囊中含有此酶)作用,形成花生烷酸(图 17-7),然后再衍生而成的。

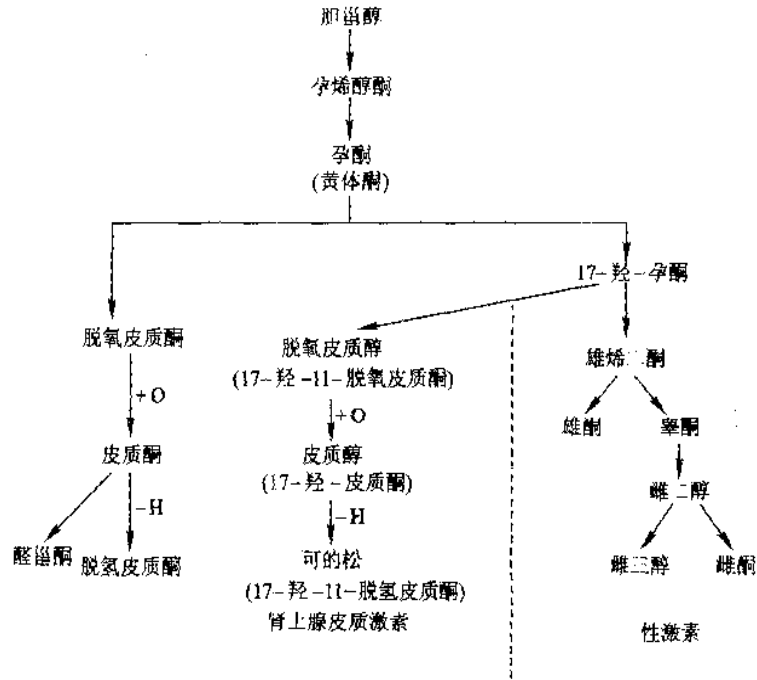


图 17-5 肾上腺皮质激素及性激素的生物合成途径

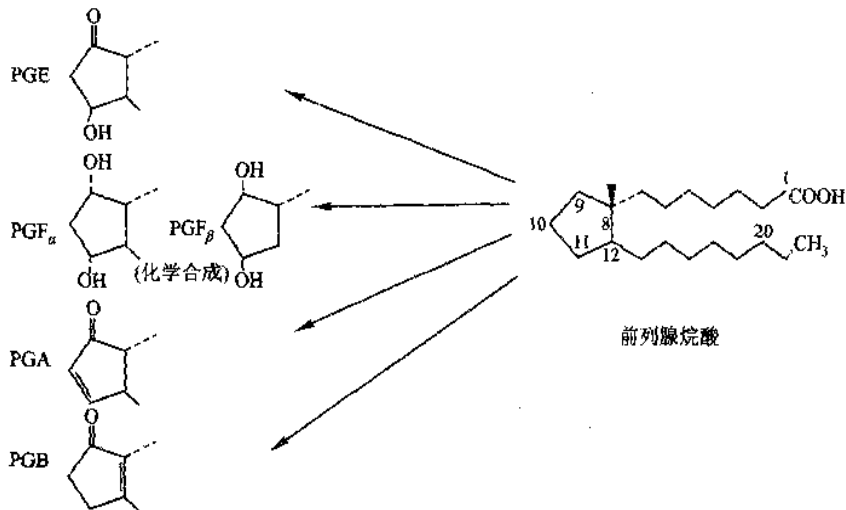


图 17-6 前列腺烷酸及各类前列腺素的结构

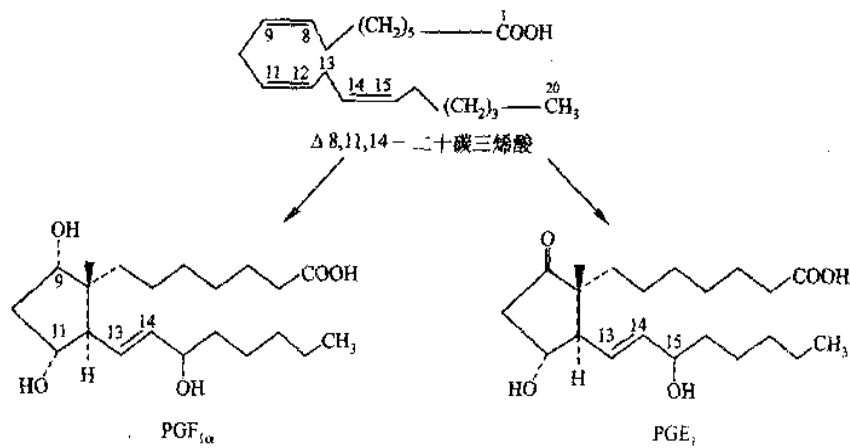


图 17-7 PGF_{1α}及 PGE₁ 的生成

三、重要激素举例

(一) 氨基酸衍生物激素

1. 肾上腺激素

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。结构见图 17-4。

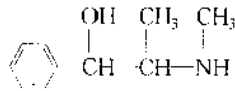
肾上腺素在生理上的作用与交感神经兴奋的效果很相似,都对心脏、血管起作用,可使血管收缩,心脏活动加强,血压急剧上升,但它对血管的作用是不持续的。另一方面,肾上腺素是促进分解代谢的重要激素,它对糖代谢影响最大,可以加强肝糖原分解,迅速升高血糖。这种作用是机体应付意外情况的一种能力。此外,它还具有促进蛋白质、氨基酸及脂肪分解,增强气体代谢,升高体温等作用。

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 17-3。

表 17-3 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

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:



2. 甲状腺素(T₄)及三碘甲腺原氨酸(T₃)

甲状腺分泌的激素有甲状腺素及三碘甲腺原氨酸,其结构见图 17-3。甲状腺激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、造血过程以及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,引起耗氧量及产热量的增加,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;切除甲状腺的动物逐渐衰弱,最后死去。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。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用。

(二) 重要多肽类激素

下丘脑、垂体、胰脏中胰岛的 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、肾脏和胸腺等器官也分泌一些多肽、蛋白质类的激素。

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 3 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 17-8。

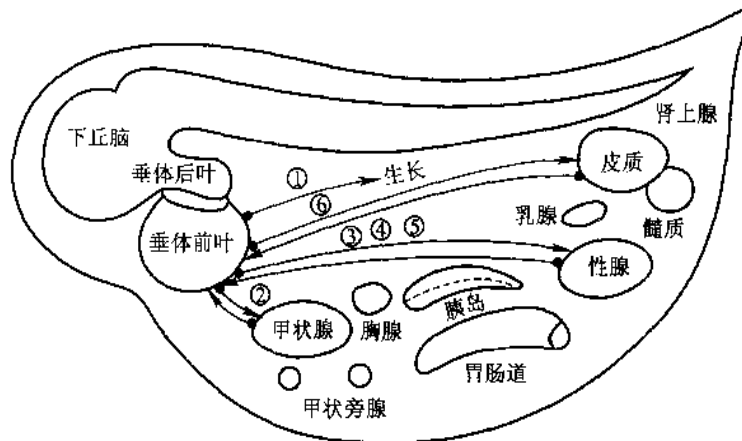


图 17-8 脊椎动物内分泌器官和下丘脑、垂体相互关系示意图

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 促甲状腺激素 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。

1. 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,并受神经控制,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,引起体内各种反常的生理现象。

① 生长激素 生长激素(growth hormone,即 somatotropin)为蛋白质,并已提纯结晶。不同动物的生长激素相对分子质量可以从 20 000 至 50 000 不等,等电点 pH 也各异,人的生长激素相对分子质量为 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、脂质的代谢,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、骨骺缝合之后),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,其相对分子质量为 28 300,有两个亚基:相对分子质量为 13 600 的 TSH α 及相对分子质量为 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。

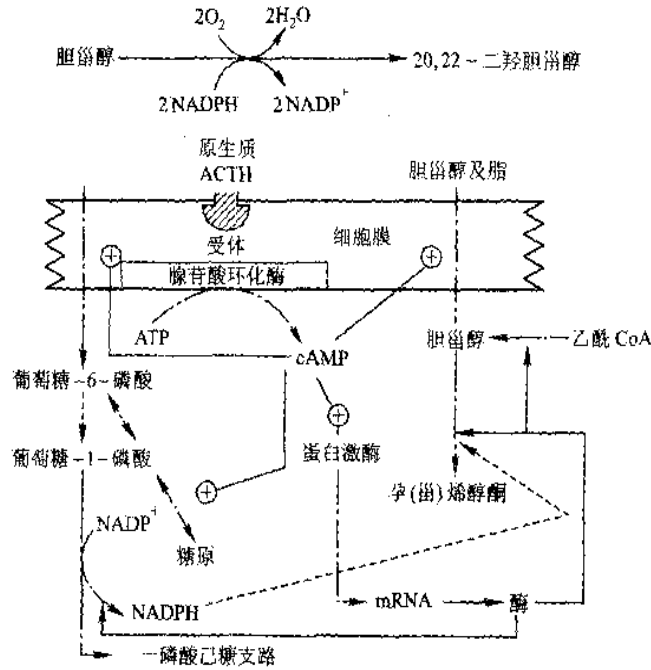


图 17-9 促肾上腺皮质激素作用的中间过程

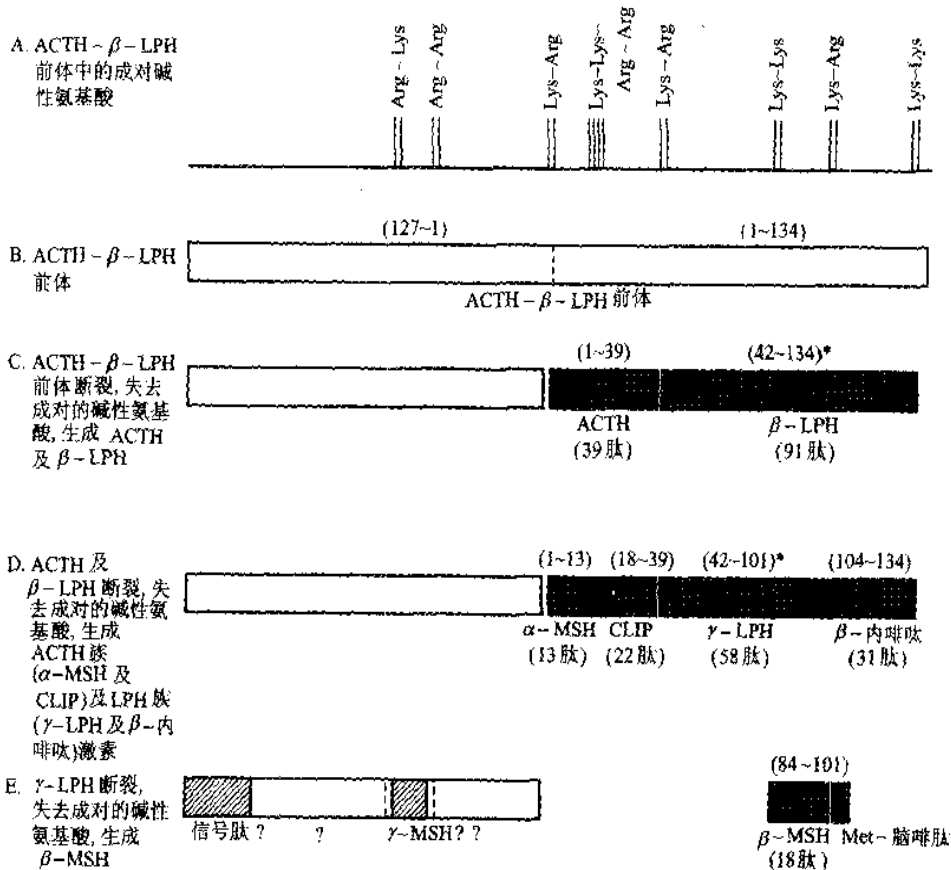
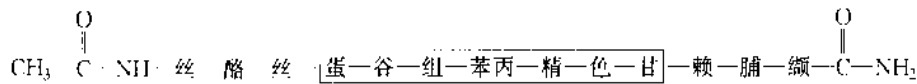
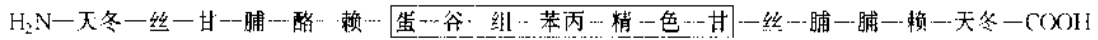


图 17-10 牛 ACTH-β-LPH 前体及其断裂产物的结构示意图

*图中 C(42-134) 及 D(42-101) 肽段与 B(1-134) 肽段比较, 少去第 73, 74 两个氨基酸的原因现不明



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:



与 γ -LPH 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。

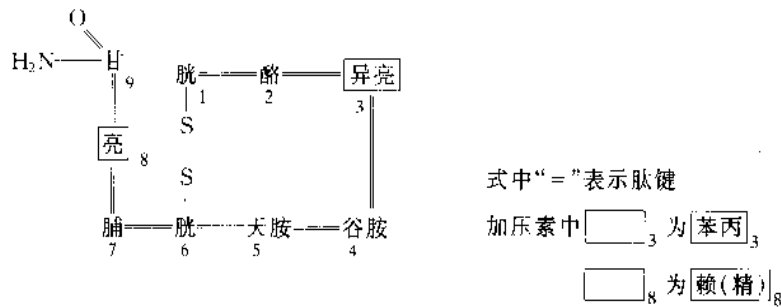
人患阿狄森氏病(Addison's disease,一种慢性肾上腺皮质机能减退症)时,MSH 及 ACTH 的分泌都过多,结果使皮肤中色素沉着,MSH 调节鱼类、两栖类及爬虫类动物表皮细胞色素的增加及减少。

3. 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)的等电点为 pH 7.7,结构相同,见如下所示:



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。加压素的结构见上面与催产素的比较。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)。

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。

4. 下丘脑激素

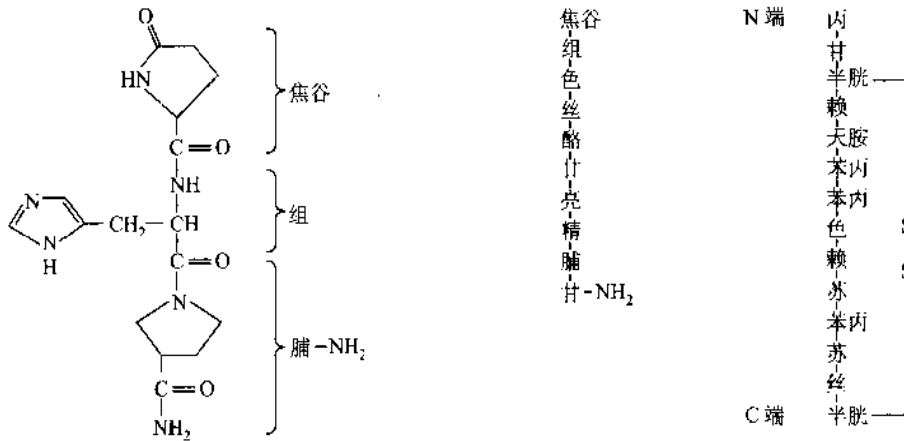
下丘脑分泌几种激素释放因子及释放抑制因子以调节垂体前叶的功能,控制促甲状腺激素、促性腺激素、促肾上腺皮质激素及生长激素的分泌,举例如下:

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(图 17-11),它促进促甲状腺激素(TSH)的分泌。

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氨酸和第十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(图 17-11),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



促甲状腺激素释放因子 促黄体生成激素释放因子 生长激素释放抑制因子

图 17-11 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

酮及雌二醇)对 LRF 等的分泌有负反馈抑制作用(图 17-12)。

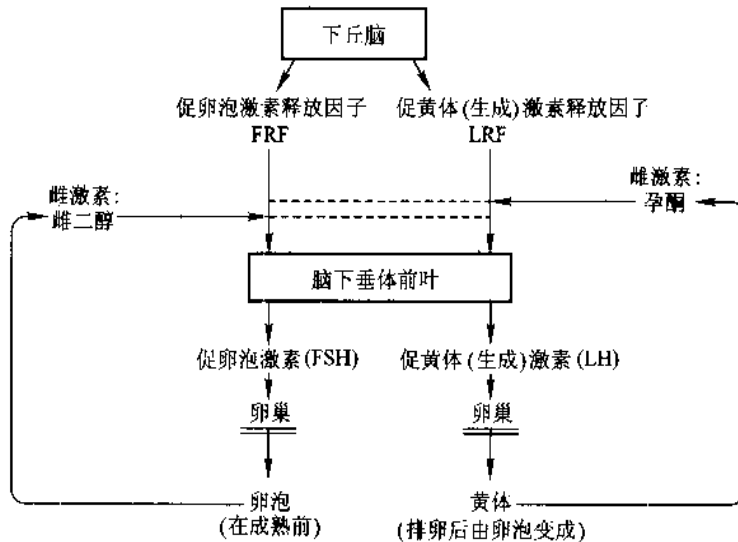


图 17-12 雌激素(孕酮及雌二醇)对某些下丘脑释放因子的反馈抑制作用

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肠胃道激素,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,我国现已成功地将其基因克隆到猪、牛和鱼中。

GRIF 是由 14 个氨基酸残基组成的短肽,带一个二硫键,其氨基酸序列见图 17-11。可用于治疗肢端肥大症及高血糖症。

5. 脑肽

α 、 β 、 γ -内啡肽(endorphin)的一级结构分别相当于 β -LPH 的 61~67,61~91,61~77 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-脑啡肽的氨基酸序列为: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。

Met-脑啡肽与 β 内啡肽(31 肽)的前 5 个氨基酸的序列相同,不过, β 内啡肽的这 5 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:

H₂N-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,将我们带入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:引起全身在几小时内深度地失去痛觉,在这段间隔中体温降低,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。

6. 胰岛及甲状旁腺等的激素

① 胰岛素(insulin) 胰岛 β 细胞基因表达出来的产物,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3条途径对胰岛素A、B链的基因(或胰岛素原的基因)进行DNA重组克隆取得成功,获得活性胰岛素。目前,世界上基因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: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,(图17-13)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,甚至影响大脑机能。

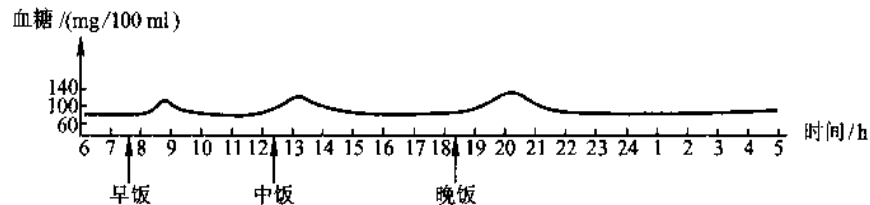


图 17-13 正常人一天内典型的血糖变化

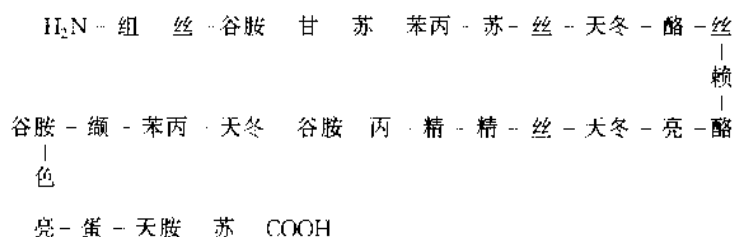
胰岛素促进组织摄取葡萄糖的能力,很可能是由于它具有影响细胞通透性的效应。而降低血糖的作用,则由于胰岛素具有抑制细胞内腺苷酸环化酶的效应。肾上腺素与胰高血糖素引起cAMP的增加,而胰岛素却相反,引起细胞内cAMP的减少,同时还引起cGMP的增加。

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。

② 胰高血糖素 胰高血糖素(glucagon)是胰岛 α 细胞分泌的多肽激素,由29个氨基酸组成,相对分子质量为3485,等电点为pH7.5~8.5,氨基酸排列顺序已清楚。

胰岛中首先合成的是无活性的、相对分子质量较高的前体——胰高血糖素原,它比胰高血糖素在C端多8个氨基酸残基。

胰高血糖素:



胰高血糖素具有增高血糖含量的效应,和肾上腺素的效应相同,两者都是通过 cAMP 提高肝糖原磷酸化酶活性,从而促进糖原分解。但是胰高血糖素和肾上腺素不同,主要作用于肝脏,并不促进肌糖原分解。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。

③ 甲状旁腺激素、降钙素 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(降钙素被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。

牛甲状旁腺激素的相对分子质量为 9 500,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。

降钙素相对分子质量为 3 800,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激素分泌过多而引起的成人高血糖症。

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。

④ 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 两种形式。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。

⑤ 胎盘中的含氮激素

a. 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。

b. 耻骨松弛素(relaxin)主要作用是促使耻骨的联合松动,便于分娩时胎儿通过。耻骨松弛素及胰岛素两者生理功能很不相同,但是它们的空间结构却十分相似,由两条肽链组成,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,所以可能起源于同一个祖先的基因。

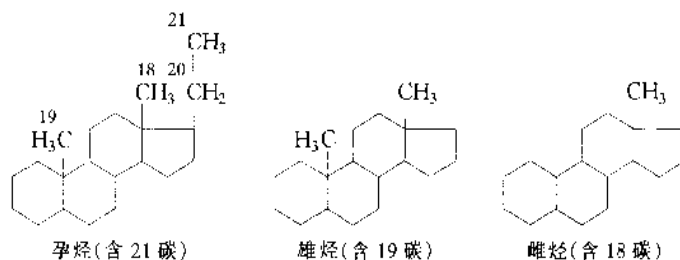
⑥ 胃肠道激素

胃肠道激素中的肠促胰液素为 27 肽,其他还有缩胆囊肽-肠促胰酶素为 33 肽,肠抑胃素为 43 肽,促胃酸激素为 17 肽及促肠液激素等。

(三) 重要固醇类激素

肾上腺皮质、性腺及胎盘分泌的激素都属于固醇类激素,其合成过程见图 17-5。

各种固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 3 种炔核的结构为带有不同侧链的环戊烷多氢菲的衍生物:



下面分别介绍几种激素。

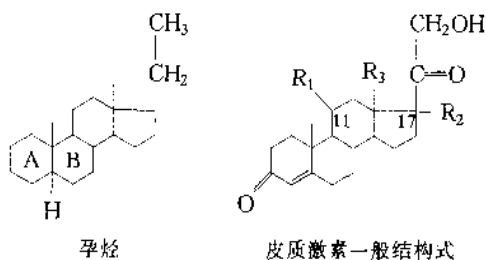
1. 肾上腺皮质激素

肾上腺皮质激素占肾上腺全重的三分之二左右,从中可提取出数 10 种固醇类结晶。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)。

表 17-4 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. 脱氧皮质酮(DOC)	11-脱氧皮质酮	deoxycorticosterone	-H	-H
2. 皮质酮	同左	corticosterone	-OH	-H
3. 脱氢皮质酮	11-脱氢皮质酮	11-dehydrocorticosterone	=O	-H
4. 醛固酮	同左	aldosterone	-OH	-H
5. 脱氧皮质醇	17 羟-11 脱氧皮质酮	deoxycortisol	H	-OH
6. 皮质醇(氢化可的松)	17 羟-皮质酮	cortisol	-OH	-OH
7. 可的松(皮质素)	17 羟-11 脱氢皮质酮	cortisone	=O	-OH

皮质激素是妊娠炔的衍生物(妊娠炔即孕炔,母核中 A、B 环为反型),见表 17-4。7 种皮质激素都含有 21 个碳原子,孕炔的结构及皮质激素的一般结构式如下:



式中:R₁, R₂:见表 8-6, R₃:醛固酮为-CHO,其他均为-CH₃

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(表 17-5)。

表 17-5 几种皮质激素生理效价的比较

激 素	糖皮质激素活性	盐皮质激素活性	抗炎作用
可的松(皮质素)	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
醛固酮	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。

(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。

(2) 盐皮质激素 主要生理功能是促进体内保留钠及排出钾,调节水、盐代谢。其中以醛固酮的生理效应最强,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。

醛固酮对钠的再吸收作用可以从图 17-14 中看出,当醛固酮进入肾细胞后,与细胞质中的醛固酮受体蛋白结合,这个复合物再移动到染色质上,形成特异的 mRNA,这个 mRNA 又合成特异的蛋白质:醛固酮诱导蛋白(称为 AIP)。这个蛋白质对钠泵起作用,Na⁺由胃细胞向血液中移动,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。

2. 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。卵泡雌激素是雌烃的直接衍生物。

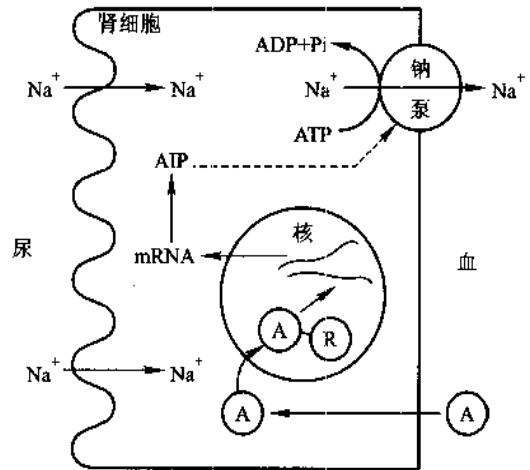
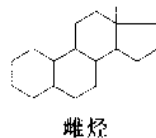
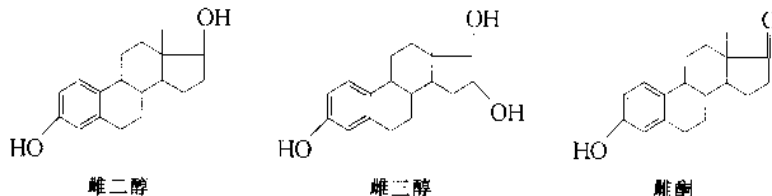


图 17-14 醛固酮对储钠作用的示意图
图中:①为醛固酮,②为醛固酮-受体蛋白复合物, AIP 为醛固酮诱导蛋白



卵泡雌激素的结构如下:



雌二醇是卵泡激素最重要的一个,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,3 种激素在体内可相互转变。

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。

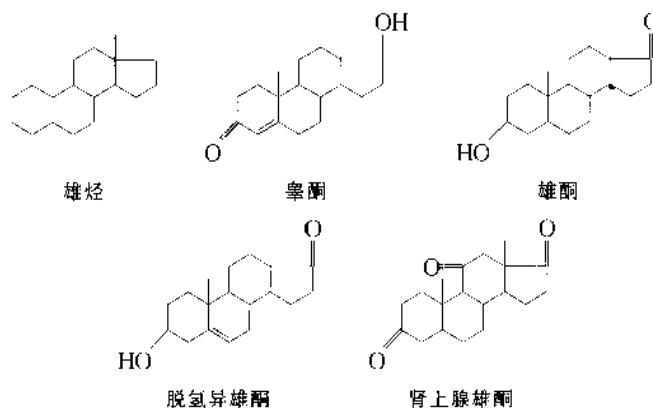
雌二醇对子宫生长的促进作用的第一步是:雌二醇穿过子宫细胞的细胞膜,与细胞质中的专一性受体

3. 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)。

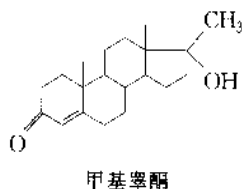
雄激素都是雄烯的直接衍生物,它们含 19 个碳原子(甲基睾酮除外),雄烯和这些激素的结构如下:



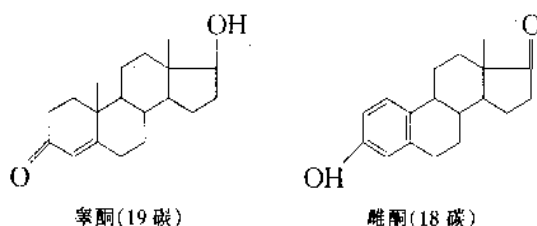
睾酮是活性最大的雄激素,它的激素活性约为雄酮的 6 倍,而脱氢异雄酮活性小,只有雄酮的 1/3。

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。



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。

(四) 脂肪族激素

我们在这节里介绍脂肪族激素

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、甘蔗及椰子等)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 $\mu\text{g}/\text{ml}$),在其他组织中含量均很低(约 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。其结构及合成见图 17-6 及图 17-7。

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。

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:PEGI 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、胰高血糖素和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——阿司匹林却可减少发炎,后来发现阿司匹林可干扰前列腺素的酶促合成,见图 17-17。

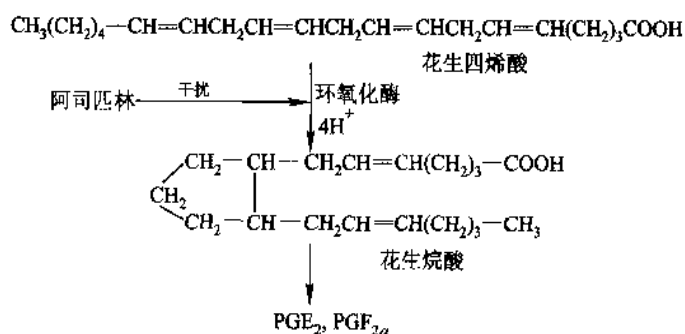


图 17-17 花生烷酸等的形成及阿司匹林的干扰

至于前列腺素许多重要功能的分子生物学机制则有待于进一步研究。

四、激素的作用机制研究

激素作为一种化学物质是怎样引起效应细胞的一系列生物化学和生理反应的呢?对于这个问题很早以前就有人提出,激素可能与细胞中的某种化学成分相互作用。较早的一些观点认为,激素如同维生素一样,以辅酶的形式和酶蛋白质分子相互作用,从而改变了化学反应的速度。尽管有许多人试图证明激素与酶的相互作用,而且发现了雌激素具有刺激 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 和 NAD^+/NADH 之间的转氢作用,但激素作为“辅酶”的概念,无法解释激素作用的专一性和功能的多样性。因此,这种概念逐渐被人们所放弃。后来,又有人提出了激素影响基因表达的概念。这概念最早是来自昆虫蜕皮激素的观察。蜕皮激素引起摇蚊幼虫唾液腺巨型染色体出现两条特殊的膨胀带,膨胀带是一种松散的 DNA 结构,也是合成 RNA 最活跃的部位。因此,激素影响染色体基因表达的这一新概念,对于激素作用原理的研究给予了新的启示和推动,并为人们所重视。

就目前所知,蛋白质、多肽、类固醇和前列腺素几种激素分子似乎是通过不同的作用方式来实现其生理功能的。蛋白质、多肽类激素以及前列腺素首先与靶细胞膜上的特异受体结合,从而改变质膜内侧的

腺苷酸环化酶的活性。腺苷酸环化酶催化 ATP 转变为 cAMP, cAMP 携带着激素的信息完成激素所产生的各种生理效应。如果把激素看作是第一信息, 那么, cAMP 则可以被看作是第二信息或信使。这种二级信息的学说不仅为激素作用原理提供了新的概念, 而且通过对 cAMP 的广泛和深入的研究, 进一步丰富了有关细胞分化和组织生长调节控制的知识。近些年来, 第二信使成员逐渐增多, 如: cGMP, 肌醇三磷酸, 二酰甘油, 钙离子。类固醇激素是一类多环有机化合物, 这类分子能够通过细胞膜屏障而进入细胞内, 所以这类激素的特异受体不在细胞质膜上, 而是在靶细胞内。类固醇激素与靶细胞质的受体蛋白形成激素受体复合物, 并向细胞核转移。这种激素和受体的复合物直接作用在染色质上, 影响染色质特定部位的基因表达, 从而控制蛋白质的合成和决定细胞的生长和分化。由此可见, 激素作用原理的研究已经成为分子生物学和分子内分泌学研究的重要领域之一。此外, 它还极大地丰富了临床内分泌学的理论。如果我们能够更深入、更精确地了解激素的作用机制, 那就可能通过改变激素反应的途径, 控制某些疾病的发生和为临床内分泌治疗提供更可靠的依据。

(一) 膜受体通过腺苷酸环化酶作用途径

这种作用反应快(几分钟), 通过生成 cAMP 而立刻作用于机体组织, 见图 17-18。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。

1. 受体结构

各种含氮激素作为第一信使首先与受它作用的细胞(靶细胞)膜上的特异受体结合。肾上腺素(epinephrine 或 adrenaline)可结合到专一性的 β -肾上腺素特异受体(β -adrenergic receptor)上触发后续的环化酶活化作用(注意, α -adrenergic receptor 则与下面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, $M_r 64 \times 10^3$, 横跨在靶细胞的细胞膜上, 像其他一些与 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 7 个螺旋区的受体, 见图 17-19。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, 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, 又能激活 G 蛋白。这种调节设计与视觉激动过程的分子机制是相近的。

2. G 蛋白(guanyl-nucleotide-binding protein 结合鸟苷酸的蛋白)

激素-受体复合物并不直接地活化环化酶, 而是首先活化 G 蛋白, 通过 G 蛋白与激素受体的偶联, 将信息传递给腺苷酸环化酶(adenylate cyclase), 然后, 活化了的环化酶再触发一系列由 cAMP 介导的级联反应。实际上, G 蛋白参与许多种信号传导过程, 信号传导过程在细胞膜上发生。

G 蛋白是一个界面蛋白, 处于细胞膜内侧, 由 α ($M_r 45 \times 10^3$)、 β ($M_r 35 \times 10^3$)、 γ ($M_r 7 \times 10^3$) 3 个亚基组成。它变动于它的 GDP 形式(对环化酶无活性)及它的 GTP 形式(有活性)之间。无激素时, 几乎所有的 G 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-受体复合物结合到 G 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 蛋白上释放, GTP 进入 G 蛋白。接着, 负载着 GTP 的 α 亚基($G\alpha$ -GTP)从 β 、 γ 亚基上解离下来, 然后 $G\alpha$ -GTP 活化环化酶(图 17-18)。每一个被激素结合的受体又促使形成许多个分子 $G\alpha$ -GTP, 由此给出“放大”的效应。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

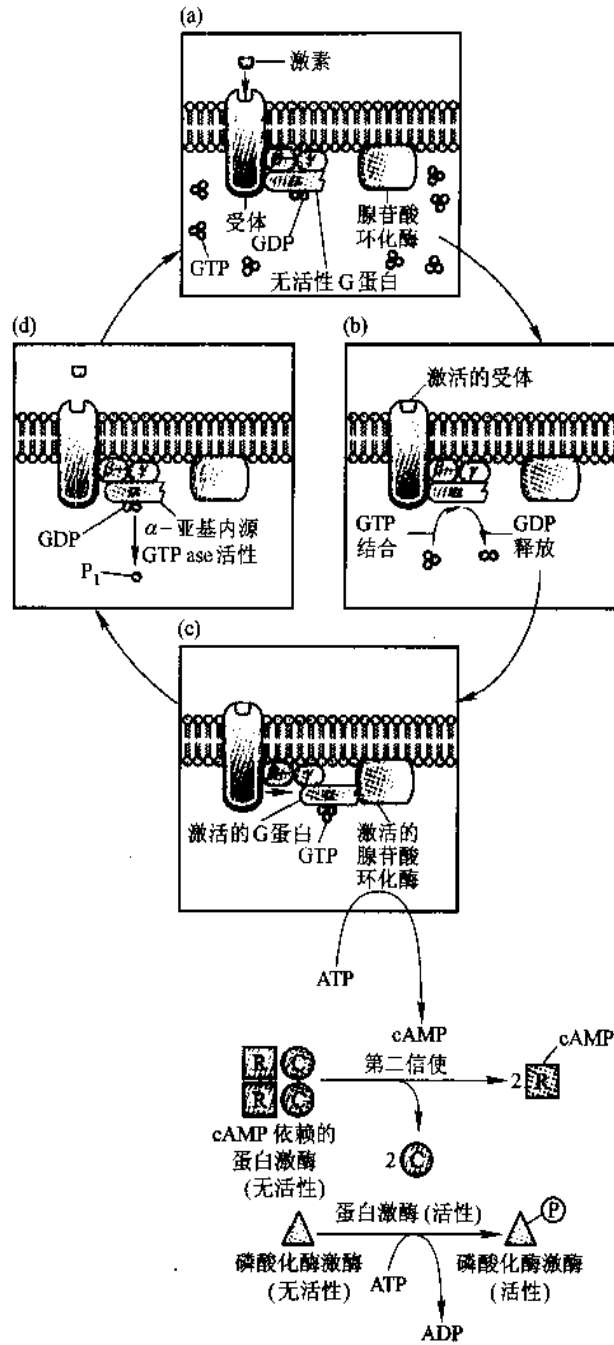


图 17-18 激素通过形成 cAMP 的作用途径

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。最后,几乎所有的 G 蛋白均以结合着 GDP 的无活性形式存在,接着,几乎所有的环化酶都转变成为无活性状态。

3. 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。

现已知道,上面的结果,实际上是激素与受体结合,使 G 蛋白活化,进而再使腺苷酸环化酶活化,催化

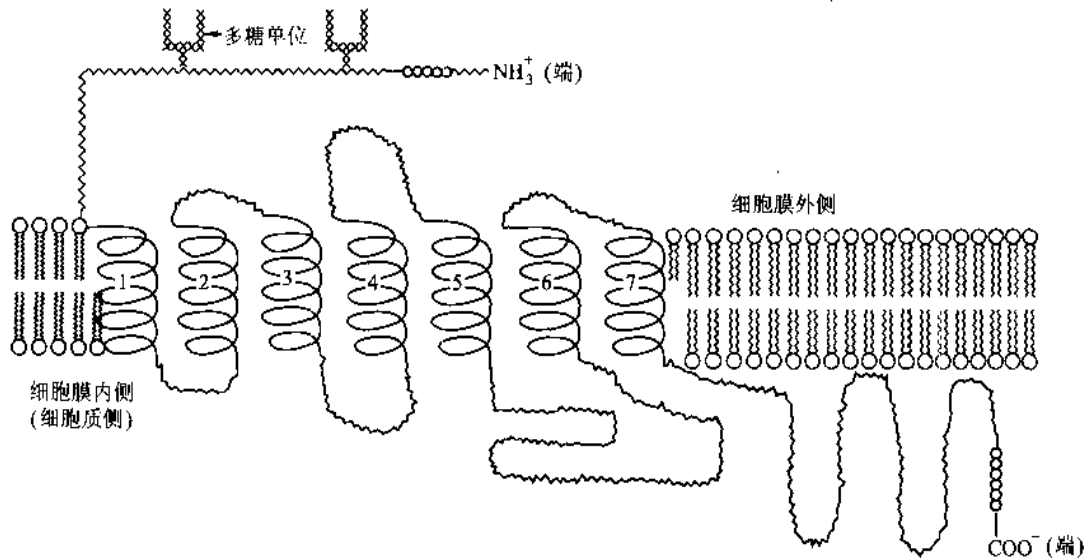


图 17-19 β 肾上腺素受体的结构图像——七螺旋区等

受体中部为七个镶嵌在脂双层细胞膜中的螺旋区。N-带有两个多糖单位,处于细胞膜的外侧;C-端有多个羧基,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

ATP 形成 cAMP。作为第二信使的 cAMP 再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,再进一步诱发各种功能单位产生相应的反应(图 17-18)。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)。

4. 蛋白激酶

肾上腺素等激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。

依赖于 cAMP 的蛋白激酶的无活性形式含有两种类型的亚基(图 17-18),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。

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。

5. 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 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ mol/L 的浓度到达肝细胞表面时,迅速地与肝细胞表面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(图 17-18)。

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,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团共价结合的、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($10^{-8} \sim 10^{-10}$ 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。

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。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) 钙及肌醇三磷酸作用途径

磷酸肌醇级联放大与腺苷酸环化酶级联放大一样,都可以将许多细胞外的信号转化为细胞内的信号,在许多种细胞内引起广泛的不同反应。激素通过结合到细胞表面的受体上,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,见图 17-20。这个级联放大的细胞内信使是磷酸酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP_2 , phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)的两个酶解产物:肌醇 1,4,5-三磷酸(IP_3 , inositol 1,4,5-trisphosphate)和二酰基甘油(DAG, diacylglycerol)见图 17-21。

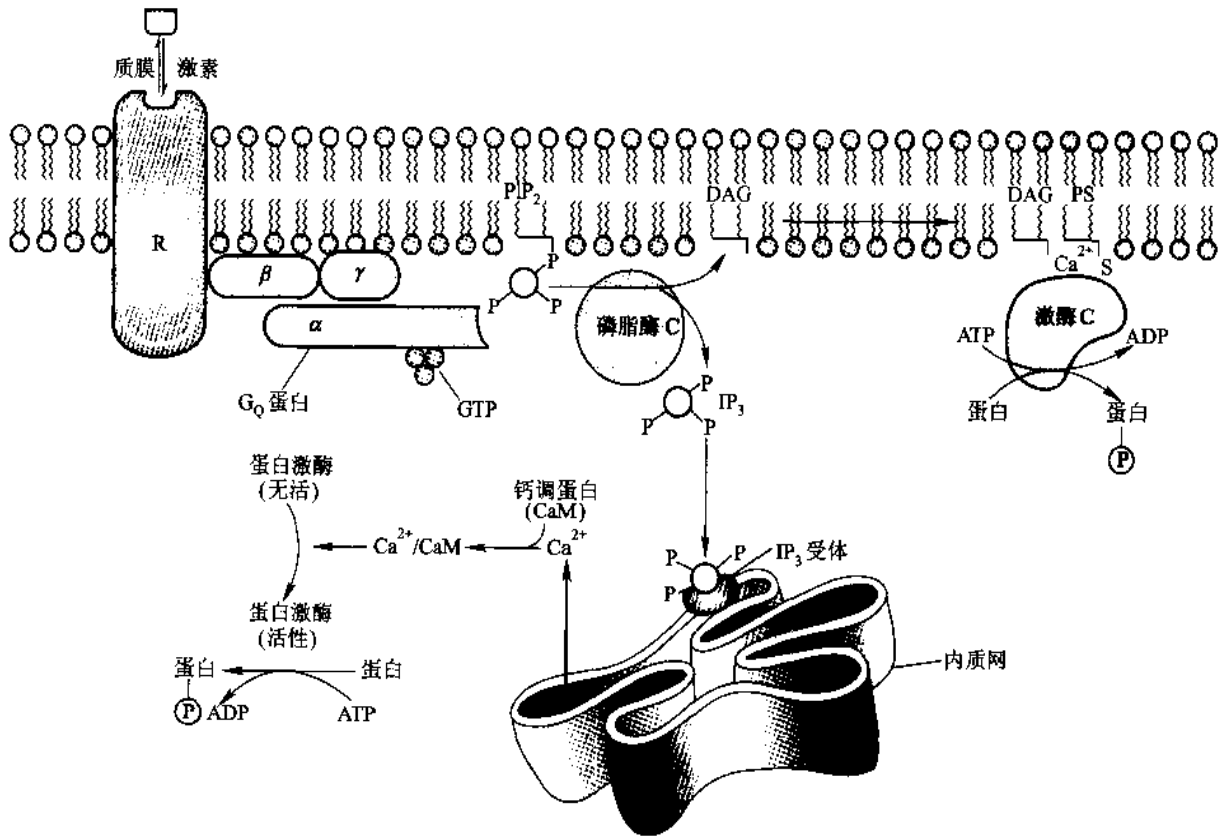
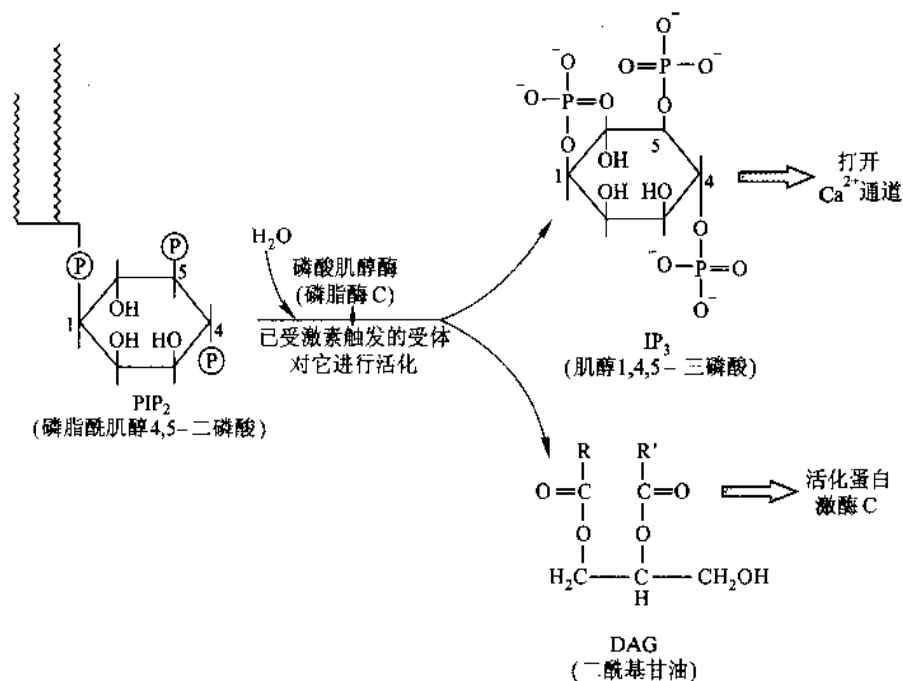


图 17-20 激素通过形成肌醇三磷酸的作用途径

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;肌醇三磷酸则作用于内质网膜受体,打开 Ca^{2+} 通道,升高细胞质内 Ca^{2+} 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,从而完成激素的磷酸肌醇级联放大作用(phosphoinositide amplification cascade),在多种细胞内引起广泛的生理效应。

图 17-21 IP₃ 及 DAG 的形成

1. PIP₂, IP₃, DAG 的形成及转变

CDP-二酰基甘油与肌醇(inositol)相互作用,形成磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI),并释放出CMP。PI是细胞膜的一种组成成分,磷脂酰肌醇又进一步受两分子ATP的磷酸化,形成磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP₂)。IP₃是一个短寿命的信使,只维持几秒钟,它可以在3个磷酸酶的顺次作用下形成肌醇。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,PIP₂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。

2. 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。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。

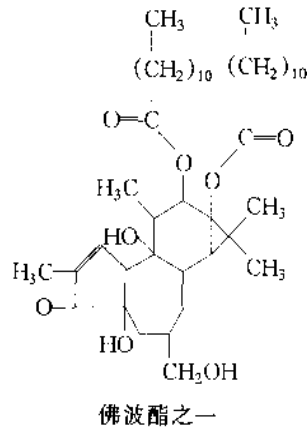
DAG活化蛋白激酶C。活性蛋白激酶C将存在于许多种靶蛋白质中的丝氨酸残基和苏氨酸残基磷酸化,从而改变这些靶蛋白质的生物活性,失活或活化。例如糖原合成酶被蛋白激酶C磷酸化后,停止合成糖原。

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. Yasutonin发现,蛋白激酶C只有在有Ca²⁺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的实际机制是: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M_r77×10³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。

佛波酯类(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,佛波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,而又不像二酰基甘油那样容易被降解,所以这种激活作用是持久的。



3. 具有螺旋区-泡区-螺旋区结构(EF 手图像)的钙传感器家族的成员之一——钙调蛋白(Calmodulin, CaM)

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+} 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 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空隙中;并能在比 Mg^{2+} 浓度低 1 000 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小清蛋白(parvalbumin)的蛋白质,这个 $M_r 12 \times 10^3$ 的蛋白质有 8 个氧原子,分别地来自于 3 个天冬氨酸(提供 4 个羧基氧)、1 个谷氨酸(提供 2 个羧基氧)、1 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,它们的相对位置就像右手的大拇指与食指夹着一个吸 Ca^{2+} 区那样。Robert Krettwo 称这种螺旋区-泡区-螺旋区的结构为 EF 手图像(图 17-22),并主张小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)与小清蛋白的氨基酸序列相似,并预言肌钙蛋白中也有 EF 手图像。后来,X 射线晶体衍射指出在

肌钙蛋白和其他结合钙的蛋白质中,确实都有 EF 手图像。所以,EF 手图像与这类蛋白质的结合钙的功能相关。

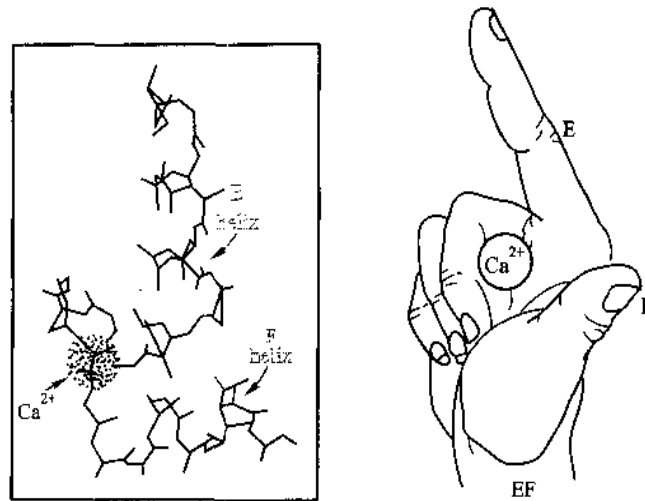


图 17-22 EF 手图像

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

钙调蛋白(CaM),是钙传感器家族——结合钙的蛋白质中的一种,约 $M_r 17 \times 10^3$ 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, $M_r 16\ 700$ 。它的氨基酸序列已得到阐明(图 17-23)。CaM 分子内有 4 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。它是酸性蛋白质,等电点为 4.0,近 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,即使原生动物的梨形四叶虫的 CaM 与脊椎动物的 CaM 相比,也只有 11 个氨基酸残基被取代,1 个缺口。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。

如上所述,钙调蛋白只有在结合 Ca^{2+} ,形成 $Ca^{2+} - CaM$ 复合物后,才有生物活性。 $Ca^{2+} - CaM$ 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 $Ca^{2+} - CaM$ 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,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。

(三) 受体的酪氨酸激酶途径

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。

胰岛素就是这样起作用的。表皮生长因子(epidermal growth factor 即 EGF)也类似地起作用。现在还发现许多癌基因(oncogenes)也如此,几种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。

胰岛素的生理效应早为人知,对胰岛素的作用机制则还未完全为人们所认识。以前,人们曾经常观察

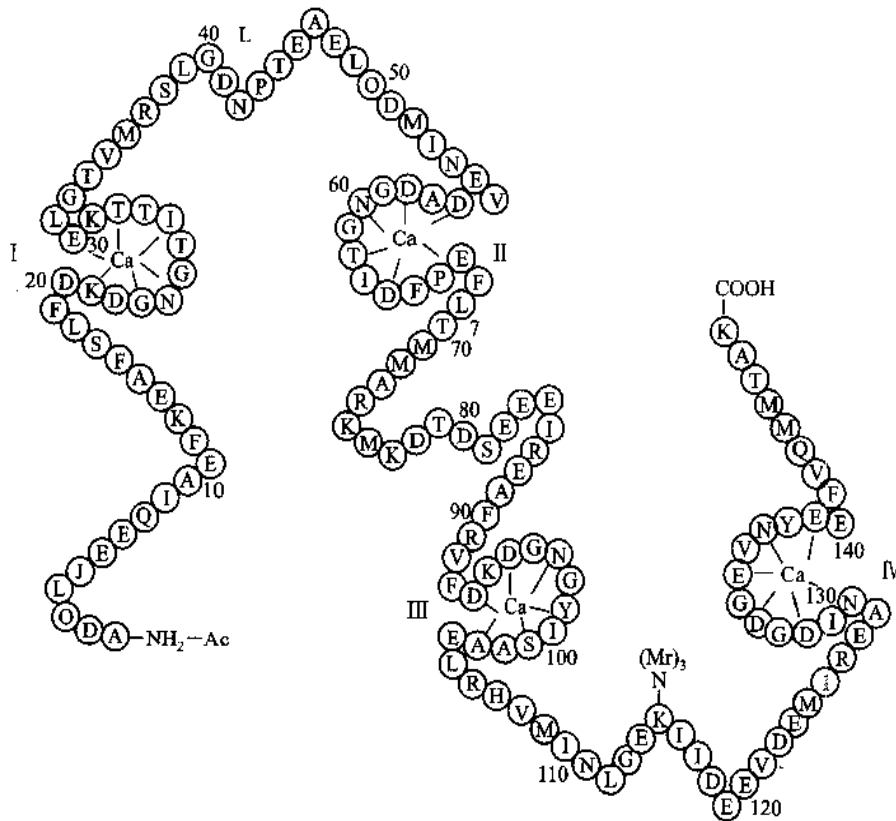
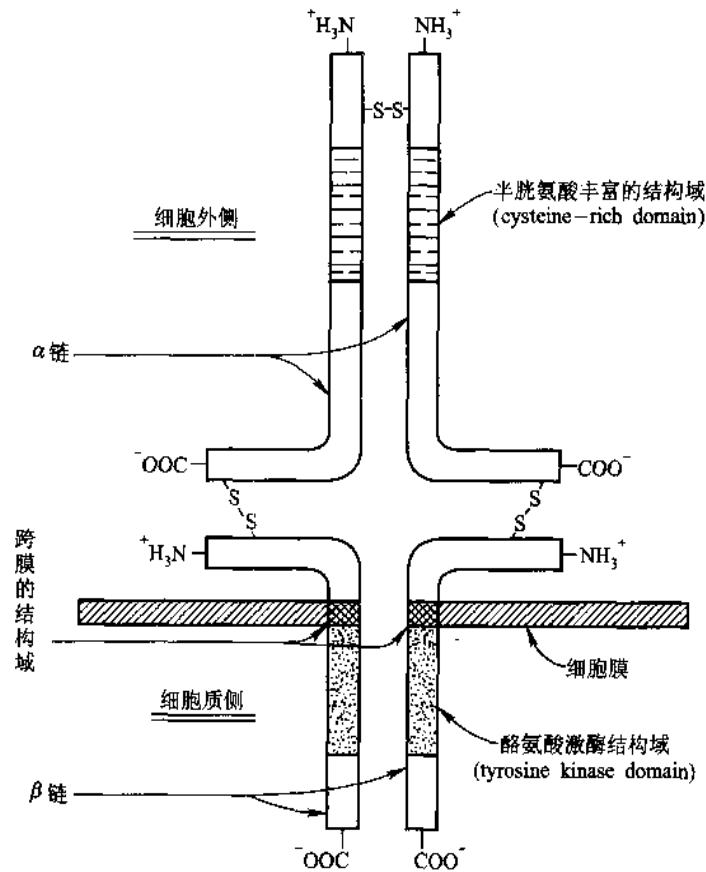


图 17-23 牛脑 CaM 的一级结构(氨基酸残基用单字母码表示)
含有 I、II、III、IV 四个 Ca^{2+} 结合域

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:1 g 肝的膜蛋白只有 30 μg 胰岛素受体;1 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 X-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,测知相对分子质量为 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)半寿期约 16 min。胰岛素受体是整合在细胞膜上的一种糖蛋白,由两个 α 链(M_r 135 $\times 10^3$)和两个 β 链(M_r 95 $\times 10^3$)通过 3 个二硫键联结而组成,见图 17-24。 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 1 个 $\alpha\beta$ 单位组成,每一个 $\alpha\beta$ 单位都从一个具有 1 382 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,激酶活性仍不下降。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,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

图 17-24 胰岛素的受体($\alpha\beta-\alpha\beta$)

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。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具有多重的促生长效应和多重的代谢效应的?等等。

Stanley Cohen 在对神经生长因子(nerve growth factor, NGF)进行研究时,偶然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。Cohen 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 $M_r 6 \times 10^3$ 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,经成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 17-25。

表皮生长因子像胰岛素一样,紧密地结合到细胞表面的受体上。EGF 的受体是 $M_r 175 \times 10^3$ 的单链多肽,跨在细胞膜上(图 17-26),也像胰岛素受体一样,它的细胞质侧部分中含有酪氨酸激酶结构域,其中酪氨酸残基被自动磷酸化,它的细胞膜外侧的部分氨基末端具有 EGF 的结合位点,其中有两个相似的富含半胱氨酸的结构域,许多半胱氨酸以二硫键形式结合着;这个部分还具有大量潜在的糖基化位点,同样地,生长因子也像胰岛素那样,一旦结合到受体的细胞膜外侧部分上就激活了 EGF 受体的酪氨酸激酶的活性,同样,受体本身的自动磷酸化作用又进一步刺激酪氨酸激酶的活性。在此基础上, Axel Ullrich 为了解这些激素信号穿透细胞膜的机制,人工合成了一个重组基因:由胰岛素受体的细胞膜外侧部分提供前一部分编码序列,由 EGF 受体的跨膜部分和细胞质侧部分提供后一部分序列。这个重组基因的表达产物是一个嵌合受体,此受体具有惊人的生物学功能:胰岛素能结合于其上诱导出酪氨酸激酶活性,其证据是此表达产物也有迅速的自动磷酸化能力。因此,这两种受体有共同的传递信号透过细胞膜的机制。关于

白质合成则作用极慢,经过 24 小时才表现出刺激作用。

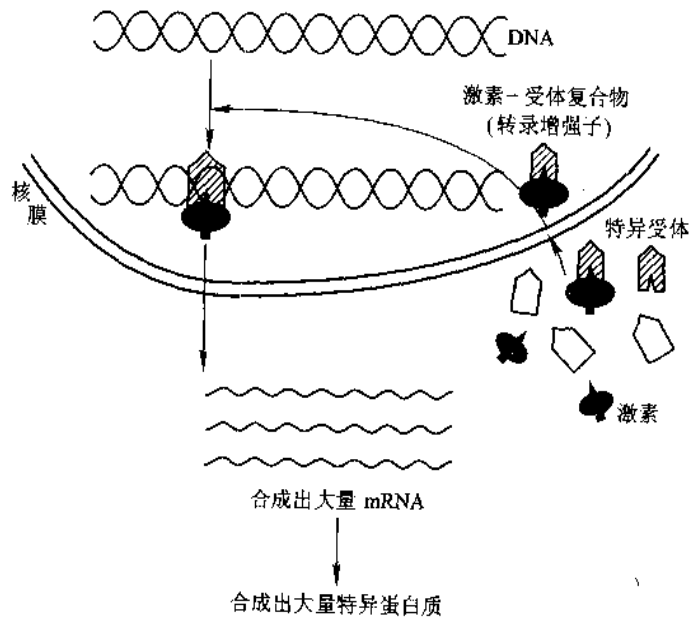


图 17-27 激素通过基因形成特异的蛋白质示意图

现将作用方式较为清楚的一些激素列于表 17-6 中。

表 17-6 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: 醛固酮	表皮生长因子	
促黄体生成激素 (LH)	促性腺激素 雌激素: 雌二醇、孕酮		
促卵泡激素 (FSH)			
催乳激素 (LTH)		雄激素: 睾酮	
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			

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制。

五、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 4 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 17-28。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。

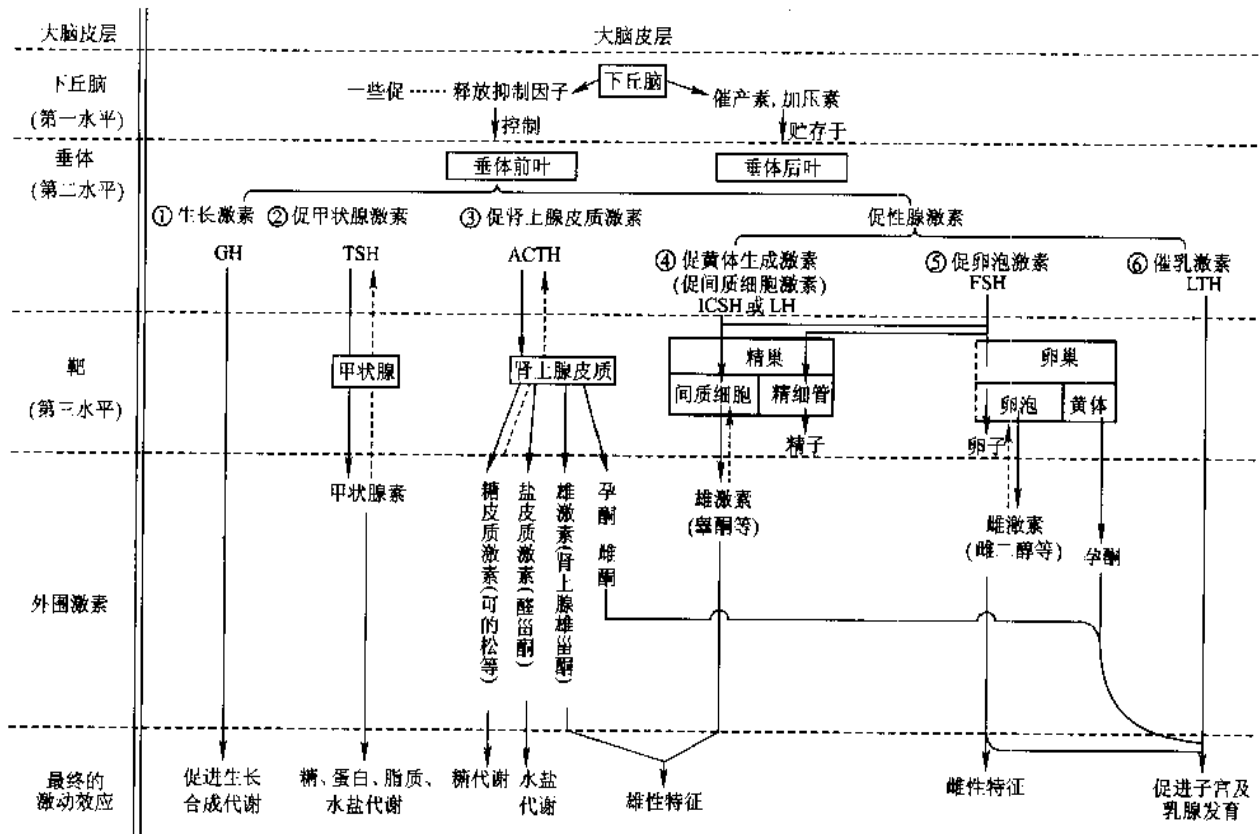


图 17-28 下丘脑-脑下垂体系统激素分泌的调节及最终效应

(↑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)

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 CRF(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。

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功能。

(二) 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。

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,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(以降低糖的利用);又如甲状旁腺激素引起血钙升高,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 17-29。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。

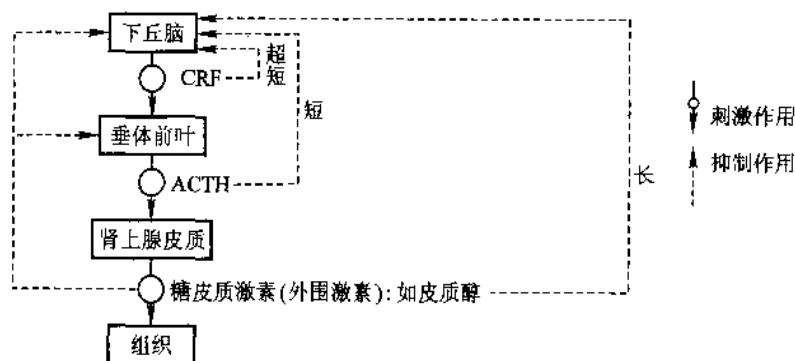


图 17-29 皮质醇对垂体前叶及下丘脑激素分泌的负反馈作用

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。

(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)。后者对合成醛固酮有较专一的作用,与水盐代谢有关。

(四) 多元调控

除以上 3 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。

六、植物激素

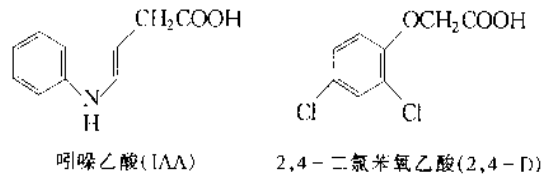
植物激素是指一些对植物生长发育(发芽、开花、结实和落叶等)及代谢有控制作用的有机化合物。自 1934 年首次由植物中分离出化学纯的植物激素以来,现在不仅已从植物中提取出许多植物激素,而且还

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。

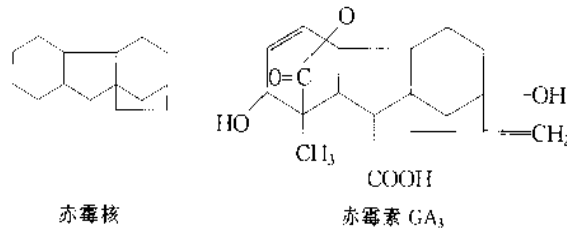
(一) 植物生长素

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)过早落花落铃;2,4-二氯苯氧乙酸(简称 2,4-D),低浓度处理番茄等花可提早结实,增高产量;吲哚丙酸(IPA);吲哚丁酸(IBA); β -萘氧乙酸(β -NOAA)及 2,4,5-三氯苯氧乙酸(简称 2,4,5-T)等。两种生长素的结构如下:



(二) 赤霉素

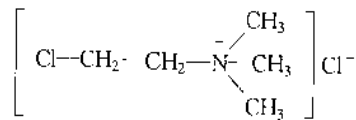
目前已发现有 40 多种赤霉素(gibberellin),它们的化学结构都有一个赤霉核。赤霉核及赤霉素 GA_3 的化学结构式为:



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。

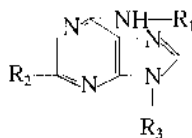
矮壮素(简称 CCC)是“抗赤霉素物质”,其结构式为:

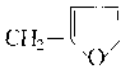
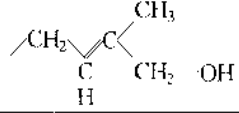
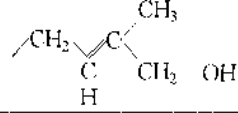


(三) 细胞分裂素

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:

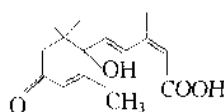


激动素	玉米素	ms-核糖基-玉米素
R ₁ 		
R ₂ H	H	-SCH ₃
R ₃ H	H	核糖基

(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, 而在衰老和休眠的器官中, 只有脱落酸单独存在。脱落酸就是植物生长抑制剂, 可促使植物离层细胞成熟, 从而引起器官脱落, 其结构为:

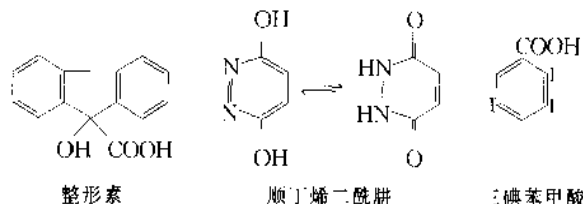


它也与赤霉素有拮抗作用。

(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(ethephal)、整形素(morphactin)、石油助长剂、顺丁烯二酸肼(简称 MH, 又名青鲜素)及三碘苯甲酸(TIBA)等。



七、昆虫激素

昆虫激素发现得较晚(1937年), 但近年来这方面的研究工作发展十分迅速。

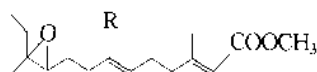
(一) 昆虫的内激素

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“保幼激素”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固醇类物质, 它们又都受“脑激素”的控制。

1. 保幼激素

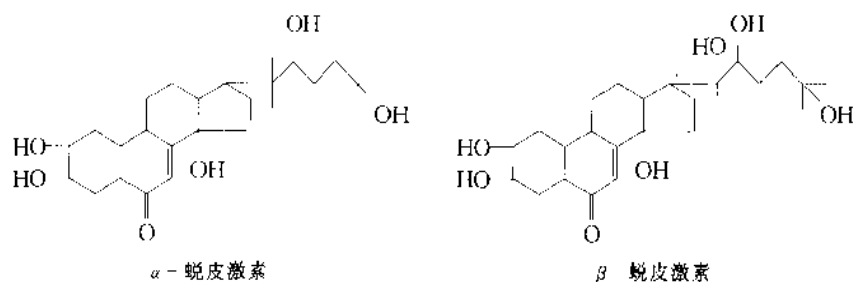
保幼激素(juvenile hormone)由昆虫的咽侧体分泌, 主要作用为保持昆虫幼年时期的特性, 防止昆虫内部器官分化与变态, 即防止出现成虫的性状。一般快到化蛹时期, 昆虫就停止分泌保幼激素。若用保幼激素处理成虫, 常产生不孕现象。保幼激素及其类似物很可能成为防治害虫的比较理想的不孕剂。其化学结构为:



R: 在保幼激素 I 中是 C₂H₅, 在保幼激素 II 中是 CH₃

2. 蜕皮激素

蜕皮激素(molting hormone 或 ecdysone), 又称变态蜕皮激素。当保幼激素消失时, 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:



3. 脑激素

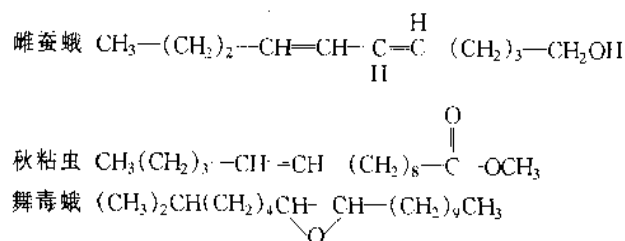
由前脑神经细胞分泌, 促进蜕皮激素分泌, 调节保幼激素及蜕皮激素作用, 其化学本质尚未确定。

(二) 昆虫的外激素

1. 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:



2. 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, 而沾染到幼蜂身上, 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的生理功能, 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。

激素按其化学成分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. 固醇类激素: 肾上腺皮质激素、雌性性激素及雄性性激素。

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制的激素, 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。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。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。

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。

从激素的作用机制来看,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信息,这种信息促进或抑制某些特定的代谢过程。

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 等一系列生物物质,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制中起着重要作用,又称为第二信使,除肾上腺素、胰高血糖素外,ACTH、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,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醇级联,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制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制已比较了解,并诱发出许多更令人感兴趣的问题。某些癌基因的作用机制也与此有类似之处。

固醇类激素(如雌二醇、孕酮及皮质醇等)则是通过第四种机制而起作用的,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。

从激素的调节控制来看,大部分含氮激素及全部固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信息后,首先,大脑底部的下丘脑分泌促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 及生长激素 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. 酶的逐步剪裁调节;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、行经及泌乳等,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、代谢等而失活,周转十分迅速。

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、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。

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. 列表指出固醇类激素分哪几类?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. 《基础医学》编辑委员会. 中国医学百科全书——基础医学. 上海:上海科学技术出版社,1995
2. 盛树力主编. 多肽激素的当代理论和应用. 北京:科学技术文献出版社,1998
3. Nelson, D. L., and Cox, M. M. . Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd Edition. Worth Publishers, 2000
4. Zubay, G. . Biochemistry. 3rd Edition. Wm. C. Brown Publishers, 1993

(俞梅敏 唐建国)

第 18 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 6~10 nm)将其内含物与环境分开,这层膜称细胞膜或外周膜。此外,真核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、高尔基体和过氧化物酶体,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,如某些细菌的间体(mesosome),蓝绿藻中进行光合作用的类囊体膜等。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,生物体内许多重要过程(如物质运送、能量转换、细胞识别、细胞免疫、神经传导和代谢调控)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、耐盐和抗病等的机制正在进行,这方面的研究成果将为农业增产带来显著成效。在医药方面,几乎所有疾病都与膜的变异有密切关系。很多细胞质膜上的受体可能是药物的靶体。人工膜(脂质体)作为药物载体已经进行了大量研究,有的已经进入临床试验。

总之,20 世纪 70 年代以来,生物膜的研究已深入到生物学的很多领域,当前仍然是分子生物学、细胞生物学中最活跃的研究领域之一。

一、生物膜的组成和性质

生物膜主要由蛋白质(包括酶)、脂质(主要是磷脂)和糖类组成,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 18-1)。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有关组分,共约 60 种蛋白质。

表 18-1 生物膜的化学组成(%)

类 别	蛋 白 质	脂 质	糖 类
神经髓鞘质膜	18	79	3
人红细胞	49	43	8
小鼠肝细胞	44	52	4
嗜盐菌紫膜	75	25	0
线粒体内膜	76	24	0

(一) 膜脂

1. 脂质的种类

生物膜内的脂质有磷脂、胆固醇、糖脂等,其中以磷脂为主要组分,分布很广泛。

(1) 磷脂 构成生物膜主要成分的磷脂中主要是甘油磷酸二酯,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,最简单的是磷脂酸。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、磷脂酰肌醇和二磷脂酰甘油(心磷脂)等(图 18-1)。

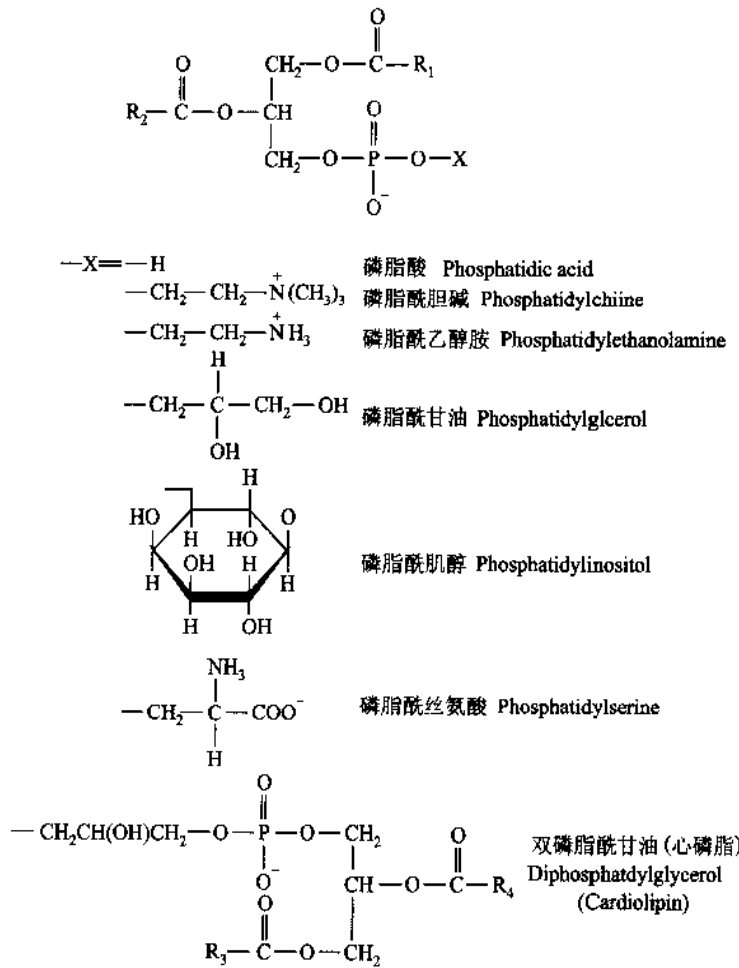


图 18-1 甘油磷脂结构

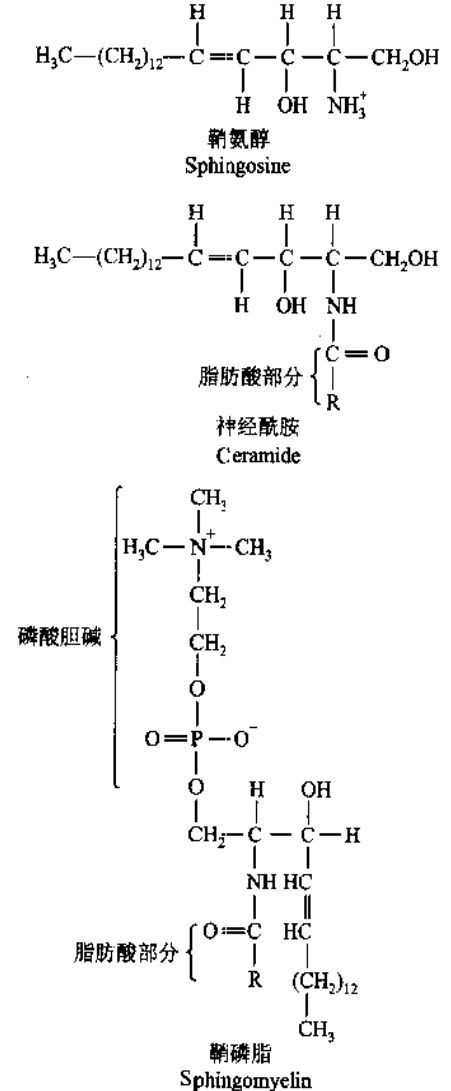


图 18-2 鞘氨醇、神经酰胺和鞘磷脂结构

除了甘油磷脂外,生物膜中还含有另外一类磷脂,称为鞘磷脂(sphingomyelins, sphingophospholipids)。这种磷脂分子以鞘氨醇代替甘油作为骨架,它的氨基以氨酰键与一个长链脂肪酸相连(形成神经酰胺 ceramide),而一个羟基则与磷酸胆碱(或磷酸乙醇胺)相连(图 18-2)。鞘磷脂的构象与甘油磷脂相似。

无论甘油磷脂还是鞘磷脂都系两性分子(amphipathic molecules),每一分子既有亲水部分(有时称为“头部”)又有疏水部分(有时称“尾部”)。这一特征决定了它们在生物膜中的双分子排列(或称脂双层)。

(2) 糖脂 动物细胞的质膜几乎都含有糖脂,其含量约占外层膜脂的 5%,这些糖脂大多都是鞘氨醇的衍生物,例如,半乳糖脑苷脂(galactocerebroside),它的极性头部含一个半乳糖残基(图 18-3)。这种糖脂是髓鞘膜的主要糖脂,约占外层膜脂的 40%。糖脂在质膜中大多含有 1~15 个糖残基。

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。

糖脂中还有一种神经节苷脂,迄今已知其有 60 余种。它们是带有数目不等糖残基(至少有一个唾液

酸)的神经酰胺。图 18-4 列出的是其中 G_{M1} 、 G_{M2} 、 G_{M3} 的结构。神经节苷脂具有受体的功能,如霍乱毒素、干扰素、促甲状腺素和破伤风素等的受体都是神经节苷脂类化合物。它们可能还有调节膜蛋白功能的作用。

(3) 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多于细胞内膜系。胆固醇的两亲性特点(图 18-5)对生物膜中脂质的物理状态有一定调节作用。在相变温度以上时,胆固醇阻碍脂分子脂酰链的旋转异构化运动,从而降低膜的流动性。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,从而降低其相变温度,从而防止向凝胶态的转化,保持了膜的流动性。

上述磷脂、糖脂又有许多类。每一类磷脂由于脂酰链长短和不饱和程度分为许多种,糖脂也因所含糖残基的不同可有很多种。在不同类型细胞的质膜和细胞内膜体系中,各种膜脂的组成和含量的比例是不同的。表 18-2 显示几种生物膜的脂质组成。

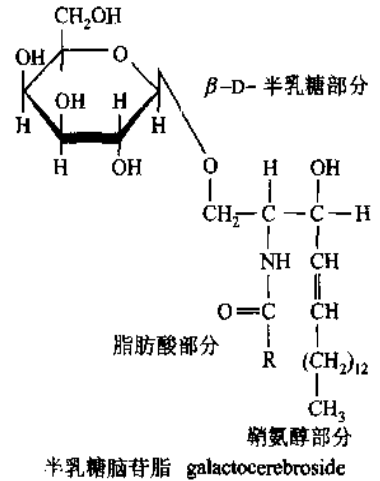


图 18-3 半乳糖脑苷脂结构

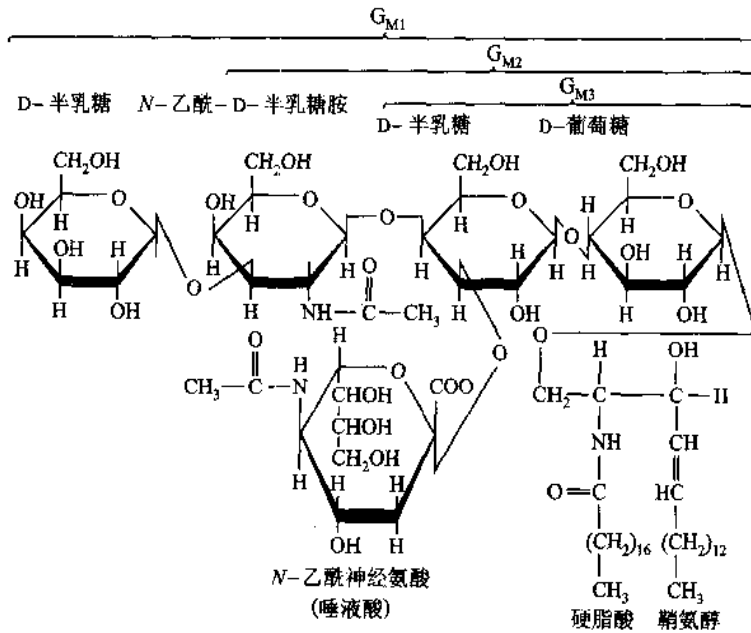


图 18-4 神经节苷脂(G_{M1} 、 G_{M2} 、 G_{M3})结构图

表 18-2 一些生物膜的脂质组成(%)

脂 质	人红细胞	人 髓 鞘	牛心线粒体	大肠杆菌
磷脂酸	1.5	0.5	0	0
磷脂酰胆碱	19	10	39	0
磷脂酰乙醇胺	18	20	27	65
磷脂酰甘油	0	0	0	18
磷脂酰肌醇	1	1	7	0
磷脂酰丝氨酸	8.5	8.5	0.5	0
心磷脂	0	0	22.5	12
鞘磷脂	17.5	8.5	0	0
糖脂	10	26	0	0
胆固醇	25	26	3	0

2. 膜脂的多态性 (polymorphism)

膜脂是两亲性分子,因此,膜脂(包括磷脂)在水溶液中的溶解度是很有限的。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 18-6)。在水-空气界面这些磷脂分子倾向于形成单分子层。极性部分与水接触,烃“尾部”伸向空气一侧(图 18-6)。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)或双层(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,并通过疏水键之间和范德华(Van der Waal)引力的作用使脂酰键尽可能靠近,将水从其邻近部位排除。同时极性头部相互间也有吸引作用。但实际上对于大多数磷脂或糖脂来说都不是以微团而是以脂双层形式存在。因为它们的两条脂酰侧链难以容纳在微团(直径仅为 20 nm)的内腔中。磷脂分子在水溶液中形成脂双层结构是一个自发的自组装过程,并进一步自我封合为双层微囊(脂质体, liposome)。它比平面脂双层形式的优越性在于使疏水的烃链部分完全不与水相接触。这样的结构形式是最为稳定的(图 18-6)。但是对于只含一条脂酰链的溶血磷脂(lysophospholipids)、游离脂肪酸和去垢剂(detergents)来说则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。

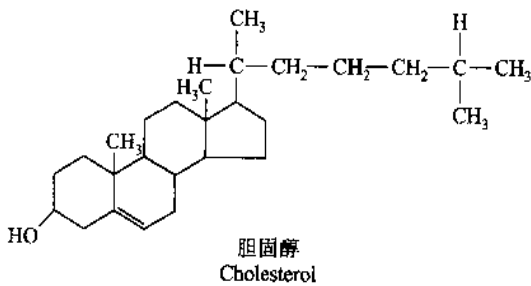


图 18-5 胆固醇结构

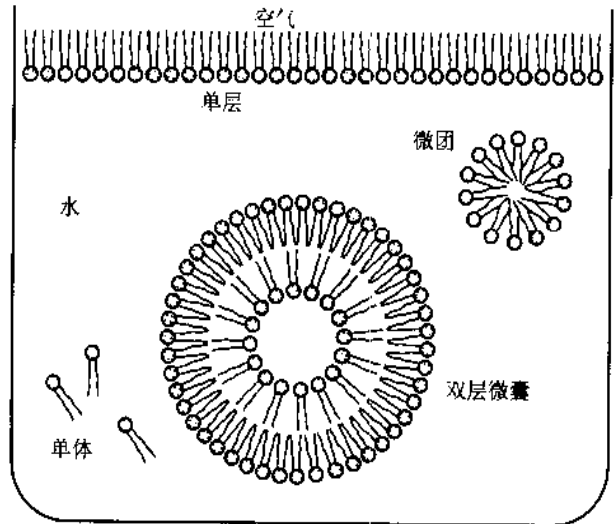


图 18-6 磷脂分子在水溶液中存在的几种结构形式

1962 年 Luzzati 等用 X 射线衍射技术发现脂质分子在脂质体中除脂双层排列外,还具有形成多种相的能力,如六角形相 I (H_I),六角形相 II (H_{II}) 结构等(图 18-7),在 H_I 结构中,膜脂的极性头部朝外,而在 H_{II} 结构中则刚好相反,膜脂的极性头部向内。从二维来观察,每一微团组成柱形,它们并以六角形形式堆积(图 18-8)。 H_I , H_{II} 都称为非双层脂结构(non-bilayer lipid structure)。如前所述的原因,两者相比较,一般都倾向形成 H_{II} 结构。后来由于核磁共振(NMR),电镜冷冻断裂技术的应用,非双层脂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 18-8),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 II (H_{II}) 结构。

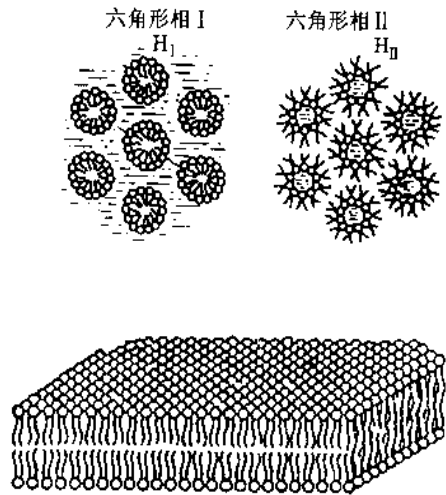


图 18-7 磷脂类的双层结构和六角形相 H_I 、 H_{II}

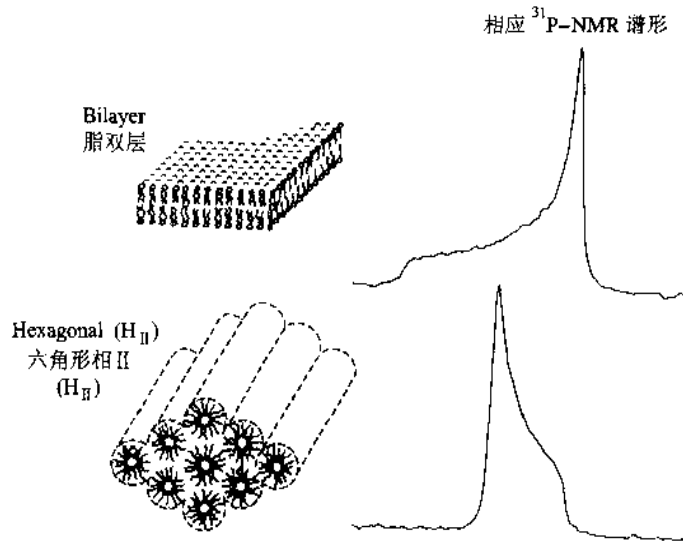


图 18-8 脂双层和六角形相 II (H_{II}) 结构的 ^{31}P -NMR 波谱

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,而不饱和脂酰链的磷脂酰乙醇胺(PE),单葡萄糖甘油二酯(monoglucosyldiglyceride, MGDG)及单半乳糖甘油二酯(MGalDG)则容易形成六角形相 II (H_{II}) 结构,心磷脂(diphosphatidylglycerol, cardiolipin)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双层脂(non-bilayer lipid)。磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、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,这些磷脂可称为双层脂。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)均可能出现非双层脂结构。但迄今为止,非双层脂结构的存在是在人工膜体系中发现并得到证明的,要验证生物膜中是否存在这类结构还需要在检测的技术方法方面有所创新。

(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联系的,膜蛋白根据它们在膜上的定位可分为膜周边蛋白质和膜内在蛋白质(图 18-9)。

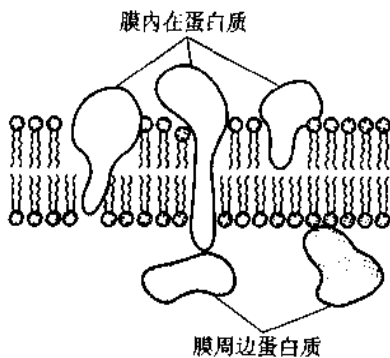


图 18-9 生物膜膜周边蛋白、膜内在蛋白示意图

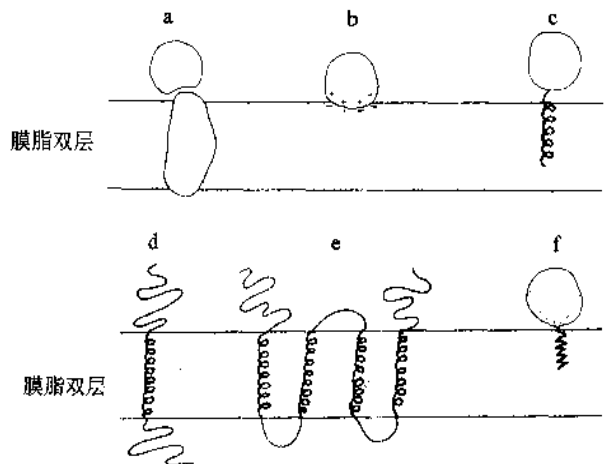


图 18-10 膜蛋白与膜脂双层结合的主要形式

1. 外周蛋白质

外周蛋白质分布于膜的脂双层(外层或内层)的表面,它们通过静电力(图 18-10b)或非共价键与其

他膜蛋白相互作用连接在膜上(18-10a)。前者如线粒体内膜外侧的细胞色素 c,后者如支撑红细胞外形的膜骨架(membrane skeleton)的主要组分—血影蛋白(spectrin),它们并不直接与膜结合,而是通过其他蛋白与膜连接(图 18-11)。膜周边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。这类蛋白质都溶于水。膜周边蛋白质一般约占膜蛋白的 20%~30%。

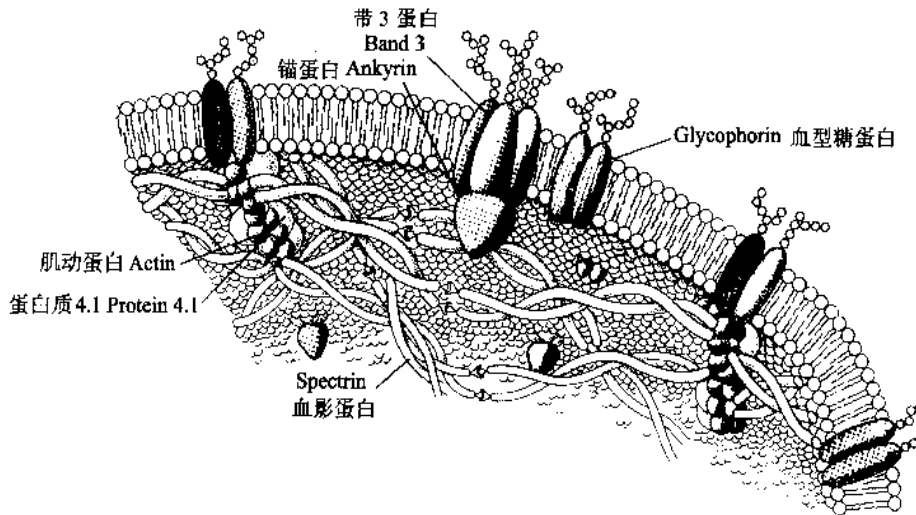


图 18-11 红细胞膜骨架各组分与质膜连接的示意图

2. 膜内在蛋白质

膜内在蛋白质一般占膜蛋白的 70%~80%左右,主要靠疏水力与膜脂相结合,蛋白质分子上非极性基团的氨基酸侧链与膜脂的疏水部分都与水疏远,它们之间存在一种相互趋近的作用,称为疏水相互作用。膜内在蛋白质有的部分嵌在脂双层中,有的横跨全膜(图 18-9)。这类蛋白质不易分离,只有用较剧烈的条件(如去垢剂、有机溶剂和超声波等)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,构象与活性都发生很大的变化。膜内在蛋白质与膜结合的主要形式如图 18-10 所示:

(1) 以单- α 螺旋跨膜 膜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,其中尤以前者更为普遍(图 18-10d)。例如,人红细胞的血型糖蛋白(glycophorin),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 70 个糖残基,跨脂双层的疏水片段约含 20 个氨基酸残基呈 α 螺旋结构。

(2) 以多段 α 螺旋跨膜 有的膜内在蛋白质含有不止一段跨膜的 α 螺旋结构(图 18-10e)。例如,嗜盐菌紫膜的细菌视紫红质(又称紫膜质 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。紫膜质由 235 个氨基酸组成。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(图 18-24,18-25)。很多膜内在蛋白质也具有 7 段呈 α 螺旋结构的跨膜分布形式。例如,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,前者由 348 个氨基酸残基组成,整个分子也由 7 段呈 α 螺旋结构的跨膜多肽组成。此外,有的膜内在蛋白质还含有更多的跨膜 α 螺旋结构,如人红细胞膜的带 3 蛋白(Band 3)含 14 段 α 螺旋跨膜多肽, Na^+ 、 K^+ -ATP 酶含 8 段 α 螺旋跨膜多肽等等。

(3) 以蛋白质分子末端片段插膜 有的膜内在蛋白质仅以其短的末端片段插进脂双层(图 18-10c),如细胞色素 b_5 。

(4) 通过共价键结合的脂插膜 有的膜内在蛋白质本身并没有进入膜内,它们以共价键与脂质、脂酰链或异戊烯基团相结合并通过它们的疏水部分插入到膜内。这种方式也可以称之为锚定在膜上(图 18-10f)。蛋白质既可以在胞质一侧锚定,也可以在非胞质一侧锚定。下面举例说明:

① 通过糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定的蛋白质。通过糖基磷脂酰肌醇分子的脂肪酸的烃链插入膜内的蛋白质有乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase), 碱性磷酸酯酶(alkaline phosphatase)等。

② 通过豆蔻酸(myristic acid)锚定的蛋白质。通过豆蔻酸的脂酰链($-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_3$)插入脂双层的蛋白质如 $\text{p60}^{\text{v-Src}}$ (或称 v-Src), 它是正常细胞内 c-Src 蛋白质的突变体, 具有酪氨酸激酶活性。当 v-Src 插入膜内可使正常细胞转化为癌细胞, 而 c-Src 则不能与豆蔻酸结合, 因而不能插入膜内并使细胞癌变。

③ 通过法尼基(Farnesyl)锚定蛋白质。这类膜蛋白的 C 端半胱氨酸残基通过硫醚键与法尼基(含 15 个碳的不饱和烃基, 由 3 个异戊烯基组成)结合, 后者插入膜内。例如: p21ras (或 Ras) 是由 ras 基因表达的蛋白质, 它与细胞质膜结合后才具有调节细胞生长与分裂的功能。某些 Ras 蛋白质的突变体能使正常细胞转化为癌细胞。如果 Ras 蛋白质不加上法尼基就丧失诱导正常细胞癌变的作用。

(三) 糖类

生物膜中含有一定量的糖类, 在真核细胞中, 无论质膜还是细胞内膜系都有糖类分布, 前者约占质膜重量的 2%~10%。它们大多与膜蛋白结合, 少量与膜脂结合(估计细胞质膜约有 1/10 的膜脂与糖类结合)。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 18-12)。在生物膜中组成寡糖的单糖主要有: 半乳糖、甘露糖、岩露糖、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。

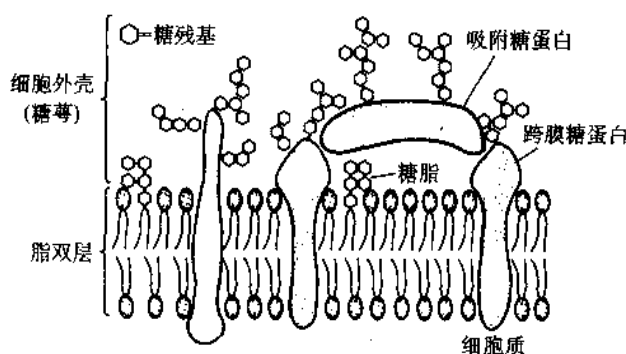


图 18-12 细胞外壳(糖萼)示意图

二、生物膜的分子结构

生物膜是由蛋白质、脂质和糖类组成的超分子体系。因此, 探讨生物膜的分子结构除了对它的组分各自进行研究外, 还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, 生物膜结构的几个主要特征, 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

一般认为, 生物膜中分子之间主要有 3 种力起作用: 静电力、疏水力和范德华(van der Waal)引力。

1. 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。在膜两侧的脂质与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。

2. 疏水作用

疏水作用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酰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。

3. 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,它和疏水作用有相互补充的作用。

(二) 生物膜结构的几个主要特征

1. 膜组分的不对称分布

构成膜组分的脂质、蛋白质和糖类在膜两侧的分布都是不对称的。以膜脂来说,例如,人红细胞的外层含磷脂酰胆碱(PC)和鞘磷脂较多,内层含磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺较多(图 18-13)这种不对称分布会导致膜两侧电荷数量、流动性等的差异。膜脂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。我们下面将要谈到,生物膜脂质在两层之间的翻转运动是很缓慢的,这对于维持膜脂的不对称性看来是很重要的。

膜蛋白无论是膜周边蛋白,还是膜内在蛋白,它们在膜两侧的分布也是不对称的(图 18-9)。前者有的分布在内侧,有的则专一分布在外侧。就膜内在蛋白来说,有的部分嵌入或插入外侧,有的则从内侧嵌入或插入。即使是跨膜分布的膜蛋白,由于膜蛋白定向分布,无论它们在膜两层的疏水区,还是暴露在两侧亲水部分的组分都是不同的。与膜脂不同,膜蛋白不能从脂双层的一层翻转到另一层,这有利于膜蛋白的不对称分布的维持。

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的分布都是不对称的。

2. 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)、胞吐(exocytosis)以及激素作用等都与膜的流动性有密切关系。

(1) 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“熔解”为液晶态(图 18-14)。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。

① 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:

a. 磷脂分子在膜内作侧向扩散或侧向移动。磷脂分子在膜内的侧向扩散或侧向移动是指磷脂分子在脂双层的同一层中与临近分子进行交换,这样的扩散无论在生物膜还是人工膜中都能进行,而且速度很

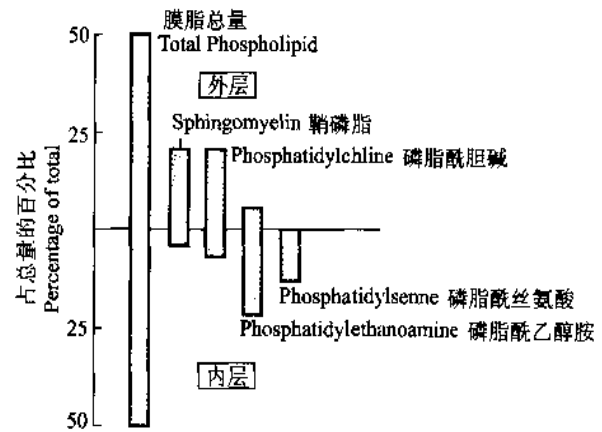


图 18-13 人红细胞膜主要磷脂在膜内、外两层的分布

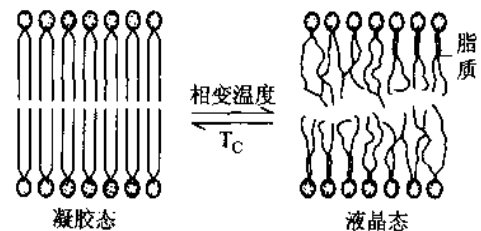


图 18-14 膜脂的相变

快。以大肠杆菌为例,在 30℃ 左右膜脂侧向扩散的系数 $D = 10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ 。换言之,一个膜脂分子 1 s 侧向移动的距离约为 2 μm 。在人工膜中,脂质分子的侧向扩散系数比生物膜平均还要高 10 倍左右。

b. 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,与侧向扩散相比较,这种运动速度要慢得多。以大鼠红细胞为例,在 37℃ 磷脂酰胆碱的半寿期为 45 h,而在人工膜中,磷脂这样的翻转运动基本上不发生。

c. 磷脂烃链围绕 C—C 键旋转而导致异构化运动。磷脂分子脂酰链的 C—C 键具有全反式(all trans)和偏转(gauche)两种构型(图 18-15)。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。

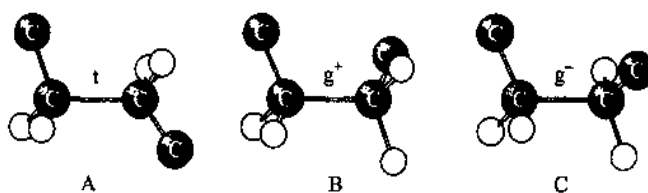


图 18-15 全反式(all trans)、偏转(gauche)构型示意图

d. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴左右摆动,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,脂酰链的烃部分的运动又较快,尤以“尾部”运动得最快。

e. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴作旋转运动。

上述磷脂的几种运动形式总结于图 18-16。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:磷脂脂酰链的不饱和的程度和链长,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。

② 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不同,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。

(2) 膜蛋白的运动性

① 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,在此过程中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扩散(图 18-17)。具体的做法是两种细胞表面抗原的抗体接上两种不同的荧光染料作为标记:发绿光的荧光素(fluorescein)和发红光的碱性苾香红(rhodamine)。当小鼠和人细胞融合后形成一个新的杂合细胞时,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,开始时一半呈绿色,另一半呈红色。但经 37℃ 保温 40 min 后,2 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。

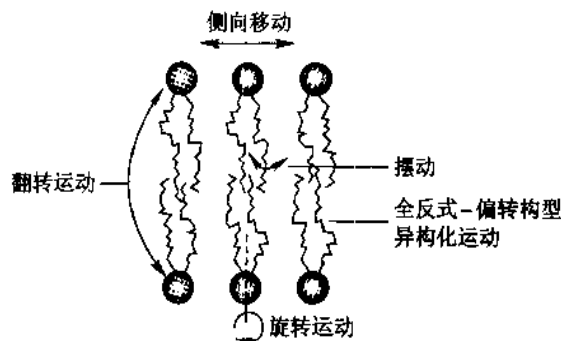


图 18-16 磷脂分子运动的几种方式

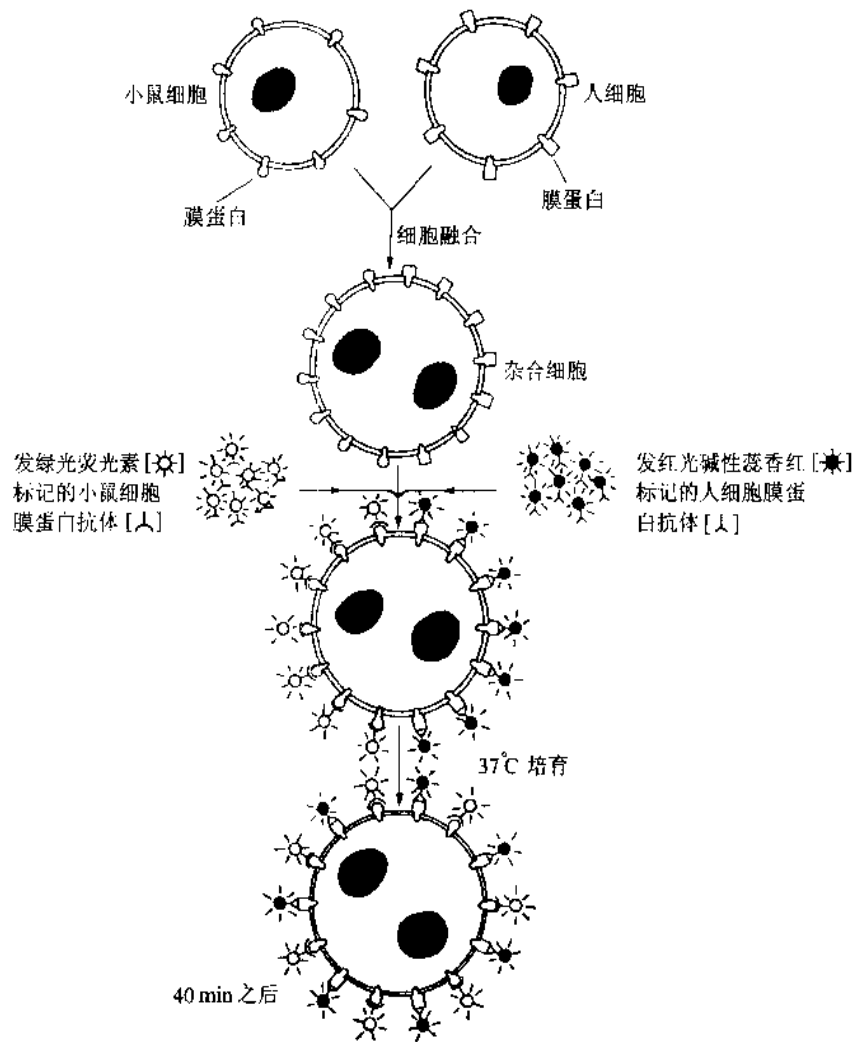


图 18-17 通过细胞膜融合证明膜蛋白运动的示意图

此外,膜蛋白的侧向扩散也受到细胞骨架的很大制约,红细胞的膜骨架由血影蛋白(spectrin)、肌动蛋白(actin)等组成(图 18-11),如果发生缺陷(如球形红细胞),则膜内在蛋白的侧向扩散速率可能增加 50 倍左右。

② 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,不同的膜内在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。

膜内在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,膜内在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。

脂质的流动性对生物膜的膜内在蛋白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。膜脂的合适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)诸因素影响膜的流动性来调节其功能。如果超出正常范围,生物膜就会产生异常的变化。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异于正常。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、骨骼肌细胞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低于正常。

此外,植物的抗冷性与生物膜的流动性也存在着一定的相关性,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。

(三) 生物膜分子结构的模型

1. 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槽测定了其表面积,同时也估算了红细胞膜的表面积。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3个条件:①红细胞的全部脂质分子都分布在膜上,②丙酮将所有的脂质分子都从膜中抽出,③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。由于这两方面的误差恰好相互抵消,因而Gorter与Grendel的假设仍然是正确的。所以迄今为止,脂双层是生物膜结构主体的论点仍然被广泛接受(图18-18)。

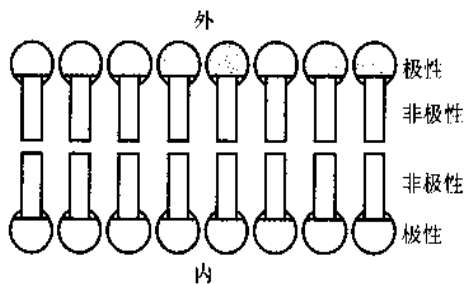


图 18-18 脂双层模型

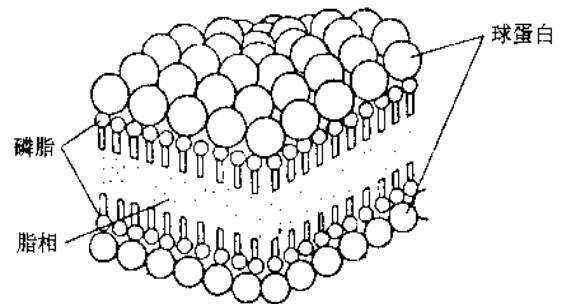


图 18-19 Danielli-Davson 模型

2. 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,其极性一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18-19)。这个模型曾得到电镜观察和X射线衍射分析等方面实验结果的支持。

3. Robertson 单位膜模型

20世纪50年代末期Robertson应用电子显微镜观察到生物膜具有三层结构,即在膜两侧呈现电子密度高,中间电子密度低的现象,经过大量试验数据的积累,Robertson进一步发现除细胞质膜外,其他如内质网、线粒体、叶绿体和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模型不同之处在于脂双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18-20)。

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。

4. “流体镶嵌”模型

在生物膜的流动性和膜组分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；二是显示了膜蛋白分布的不对称性。有的蛋白质镶在脂双层表面，有的则部分或全部嵌入其内部，有的则横跨整个膜(图 18-21)。

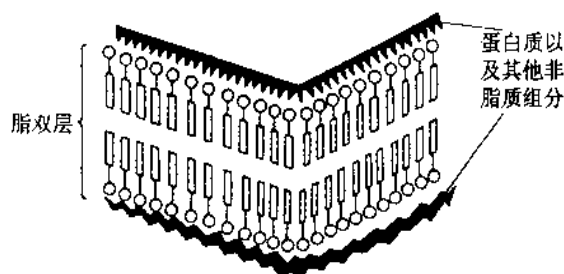


图 18-20 Robertson 单位膜模型

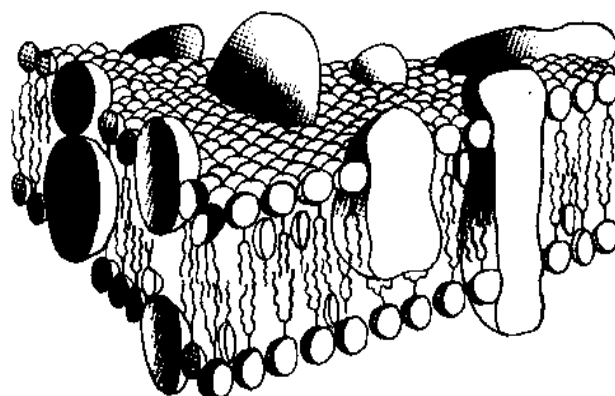


图 18-21 Singer & Nicolson 流体镶嵌模型

迄今为止，有关生物膜的膜型先后提出已不下数十种，其中“流体镶嵌”模型虽然得到比较广泛的支持，但仍然存在着很多的局限性，例如，近年来很多实验结果表明，膜的各部分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)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，也有人将非双层脂结构引入到膜的模型中去。但是，迄今为止，这些模型还没有像“流体镶嵌”模型那样受到广泛的应用。

(四) 膜蛋白的三维结构

细胞内膜蛋白约占全部蛋白质的 1/4。迄今所知，各种生物的基因组(包括人类基因组)编码的蛋白质中，膜蛋白也差不多占 25%。膜蛋白可分为膜周边蛋白和膜内在蛋白，后者约占整个膜蛋白的 70%~80%。像水溶性蛋白质一样，要深入了解膜蛋白的功能必须解析其具有原子分辨率的三维结构。但是膜蛋白(主要是膜内在蛋白，如受体、离子通道、离子泵、运载体和膜酶等等)在这方面的研究遇到了很大的困难。当前由于技术上的很大进展，水溶性蛋白质三维结构的解析正以每年近 2 000 个的速度递增。根据 1999 年年初统计，解出具有原子分辨率三维结构的蛋白质总数已超出 8 000，然而其中膜内在蛋白只有 20 个左右，换言之，仅占千分之二。解析膜内在蛋白三维结构的主要困难在于：① 膜内在蛋白的分离、纯化难度很大，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。分离后一旦将去垢剂或有机溶剂全部除去，疏水性的膜内在蛋白质又聚为不溶性的物质；② 大多数膜蛋白的含量都非常低，应用基因工程方法对大量表达膜内在蛋白来说也存在着很大的困难；③ 当前测定蛋白质三维结构的主要手段为：X 射线晶体衍射分析、电子晶体衍射分析和核磁共振波谱分析(NMR)。其中 NMR 方法目前只适用相对分子质量小于 35×10^3 的蛋白质，对于非水溶性的膜内在蛋白来说更有其局限性。迄今，X 射线晶体衍射分析仍然是膜蛋白获得高分辨率三维结构的主要方法。但其前提条件必须获得高质量的单晶，而膜内在蛋白的特性使生长三维晶体非常困难。另外一条途径是电子晶体衍射方法，该方法只需要膜内在蛋白的二维晶体即可进行分析。与三维晶体相比，由于膜内在蛋白的疏水特性，它们的二维晶体较易形成。应用电子显微镜将膜内在蛋白的二维晶体经低剂量的电子束辐射后，收录电子衍射强度和相位信息，然后经过图像处理进行三维重建，从而解出其立体结构。一般讲，用电子晶体衍射方法来分析膜内在蛋白的三维结构，只能得到较低分辨率(1.5~2 nm)的结果。但从 20 世纪 90 年代以来由于技术方面的改进，也有些膜内在蛋白(如嗜盐菌菌紫质，植物捕光色素复合体 light harvesting complex 等)应用电子晶体

衍射方法也能解出具有高分辨率(0.34~0.35 nm)的三维结构。下面举 3 个例子说明膜内在蛋白原子分辨率三维结构的解析对深入了解它们功能的重要作用。

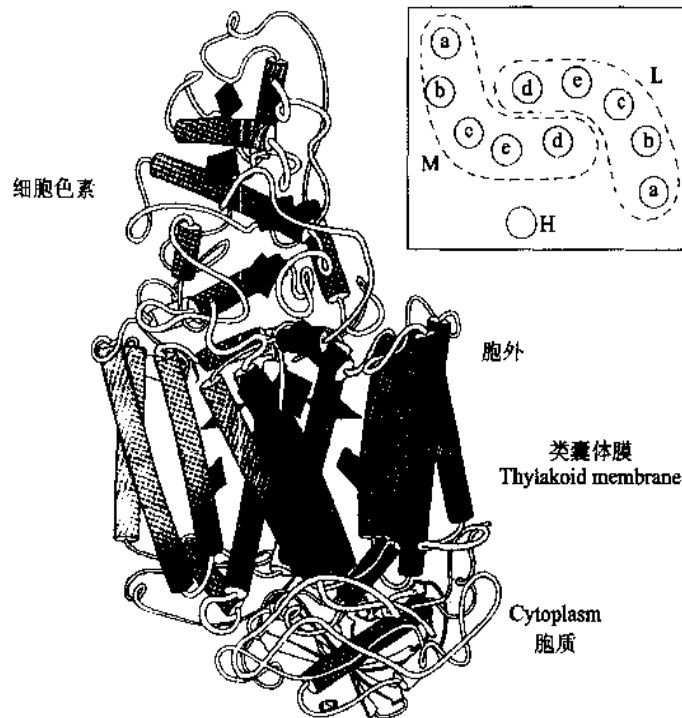


图 18-22 紫色细菌(*Rhodospseudomonas viridis*)光合反应中心的三维结构

1. 紫色细菌光合反应中心的三维结构

这是由德国 3 位科学家, Michel, Deisenhofer 和 Huber 共同协作所获得的杰出成果。经过多年的摸索以后他们首先成功获得第一个膜内在蛋白的三维晶体, 之后用 X 射线衍射解出它的原子分辨率(0.32 nm)的三维结构, 从而使他们荣获 1988 年诺贝尔化学奖。细菌光合反应中心结构与植物光系统 II (PS II) 很类似, 它由 4 个亚单位组成: L ($M_r 31 \times 10^3$), M ($M_r 36 \times 10^3$), H ($M_r 28 \times 10^3$) 以及细胞色素。前两者组成光合反应中心结构与功能的核心, H 亚单位主要位于胞质一侧, 细胞色素则位于膜的另一侧。光合反应中心长 13 nm, 它的核心的横切面为 7 nm × 3 nm, 从它的原子分辨率的三维结构清晰可见整个组成电子传递链的各组分: 4 个细菌叶绿素 (bacteriochlorophyll, BC), 其中两个成对分布 (最大吸收波长在 960 nm, 故又称 P960) 具有捕捉光子的功能, 在整个光合作用起很重要的作用。此外, 还有两个细菌去镁叶绿素 (bacteriopheophytin, BP), 两个醌 (Q_A 和 Q_B), 一个非血红素 Fe (以非共价键与 L 和 M 亚单位相连), 以及细胞色素亚单位内含的 4 个血红素 (图 18-23)。当两个成对分布的 BC 被光子激发后即释放一个电子, 随后即被分布于 L 亚单位的 BC 和 BP 相继接受, 发生电荷分离形成 $P960^+$ 和 BP。之后这一活泼电子继续从 BP 传递至 Q_A 与 Q_B 。当电子从 Q_B 传至细胞色素 bc_1 复合体会产生质子跨膜梯差从而合成 ATP。电子再从细胞色素 bc_1 复合体传至细胞色素 c_2 (鉴于细胞色素 bc_1 复合体和细胞色素 c_2 不分布于光合反应中心故未在图 18-23 中列出)。之后电子又从细胞色素 c_2 传回至位于光合反应中心的细胞色素亚单位, 通过 4 个血红素配基最后将电子传给 $P960'$, 使这一对 BC 恢复到基态 (有关细节可参阅“光合作用”章节)。值得注意的是通过紫色细菌光合反应中心的原子分辨率三维结构的解出, 发现了两个 BC 的成对分布, 其他两个 BC 以及 BP 分子也都是对称分布。因此, 按理两个 BC 接受光子被激发后, 其产生的电子可以有两条途径进行传递, 但实际上只利用一条, 其原因迄今还没有得到满意而合理的解释。总之, 对紫色细菌光

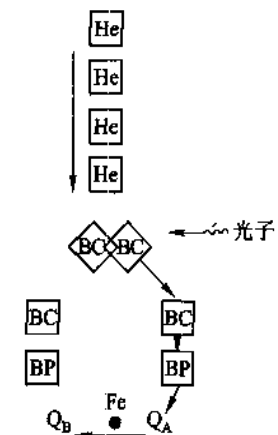


图 18-23 紫色细菌光合反应中心内配基组成的电子传递链各组分分布的示意图

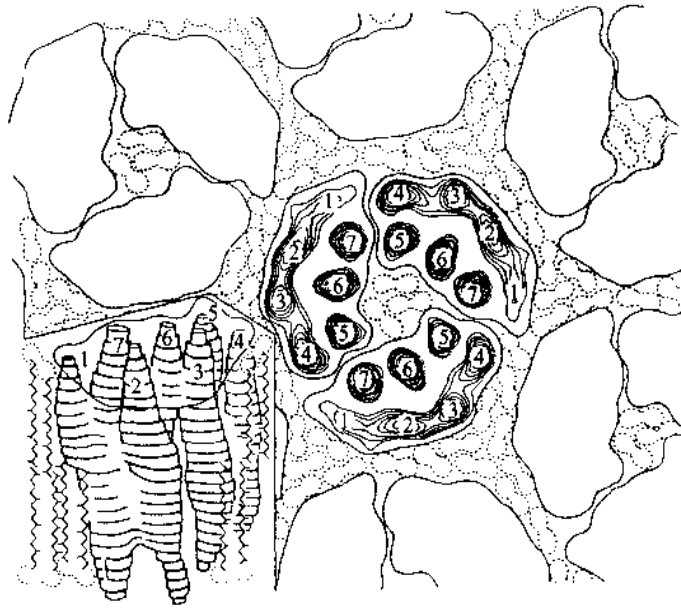


图 18-25 菌紫质在嗜盐菌膜上以三聚体形式有序分布

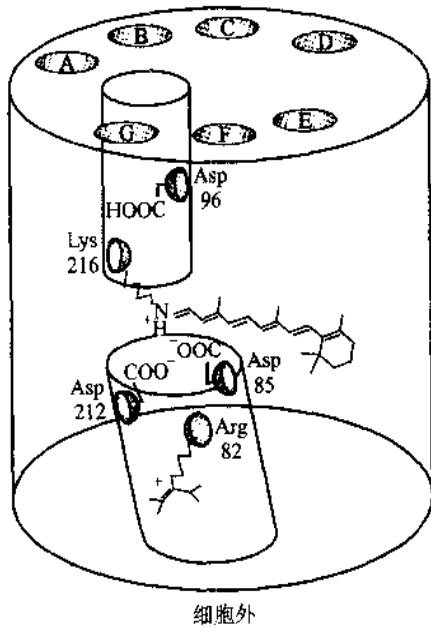


图 18-26 嗜盐菌菌紫质参与组成 H⁺ 通道的有关基团的三维分布的示意图



图 18-27 链霉菌(*S. lividans*) 钾通道的三维结构

获得了链霉菌(*Streptomyces lividans*)钾通道的晶体,并用 X 射线衍射得到高分辨率(0.32 nm)的三维结构。图 18-27 是钾通道 KcsA 的三维结构。图 18-28 是简化的模式图每一个钾通道 KcsA 由 4 个亚单位组成,每个亚单位含两段跨膜 α 螺旋柱形多肽,其中一段与膜的疏水相相接触(即图中的周边螺旋),另一段的亲水一侧朝向膜的中心(即图中的内侧螺旋)。这样,4 个亚单位就组成一个倒锥形的跨膜孔道。此外,靠近膜外侧一端还有 4 个环圈结构(P)分布于亲水通道的内壁,具有选择性过滤器的作用。每一个 P 的上端为螺旋结构,下端为伸展多肽,它们的羰基(C=O)指向孔的中央,当水化的 K⁺ 通过通道时先脱水,之后与羰基相结合,才得以通过(图 18-29)。Na⁺ 的半径(0.093 nm)虽较 K⁺(0.133 nm)要小 0.04 nm,但水化的 Na⁺ 脱水后与孔四周的 C=O 不能像 K⁺ 那样相匹配,因此就不能通过钾通道。这样长期困惑人们的有关钾通道只能通过 K⁺ 而不能通过 Na⁺,即其选择性通透的机制已从结构上得到了合理的解释。鉴于细菌钾通道的孔结构的主要部分与真核细胞相应结构有很大的相似性,因此,前者的研究

成果对了解后者作用的分子机制也有很大的帮助。

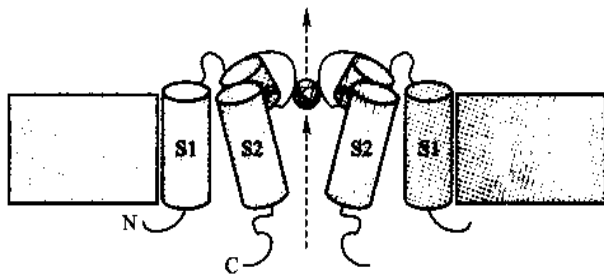


图 18-28 链霉菌(*S. lividans*)
钾通道(KcsA)孔结构的同化模式图

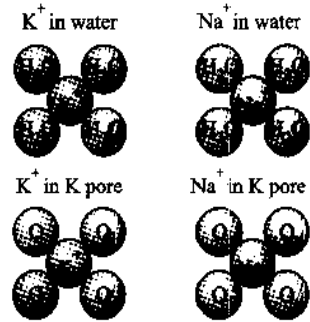


图 18-29 K^+ 、 Na^+ 在进入钾
通道过滤器前后的比较

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,生命活动中许多重要过程(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。

生物膜的主要组分(蛋白质、脂质、糖类)在膜两侧的分布都是不对称的,这对于膜功能的表现是很重要的。

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(如细胞的胞吞与胞吐、细胞融合、蛋白质跨膜运送等)有可能出现非双层脂结构(如六角形 Π , H_{II} 等结构)。这称为膜脂的多态性(polymorphism)。

根据在膜上的定位,膜蛋白可分为膜周边蛋白质和膜内在蛋白质,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)在膜内作侧向扩散或侧向移动,(2)在脂双层中作翻转运动,(3)烃链围绕C—C键旋转而导致异构化运动,(4)围绕与膜平面相垂直的轴左右摆动,(5)围绕与膜平面相垂直的轴作旋转运动。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3种类型:(1)静电力,(2)疏水作用和(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。

膜蛋白约占整个细胞内含蛋白质的1/4。其中70%~80%为膜内在蛋白(如受体、离子通道、离子泵、运载体以及膜酶等等)。要深入了解膜内在蛋白的功能必须解析它们的三维结构。由于这些蛋白分离纯化难度较大,含量又很低,尤其是难以得到三维晶体,因此迄今为止,已经获得原子分辨率的三维结构的膜内在蛋白为数十分有限。这是一个十分困难,但又必须加以攻克的研究课题。

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. 试述膜脂的多态性,非双层脂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?
7. 试述生物膜膜内在蛋白三维结构的解析的重要性与困难。

主要参考书

1. 杨福愉,黄芬,王金凤. 膜脂-蛋白的相互作用(上). 生物化学与生物物理进展,1985,5:2~7
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,1985,6:7~13
3. 杨福愉,黄芬. 膜脂-膜蛋白相互作用及其在医学和农业上的应用. 济南:山东科技出版社,1996
4. Stryer, L. Biochemistry 4 th Ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
5. Lodish H, Baltimore D, *et al.* . Molecular Cell Biology. 3rd Ed. Scientific American Books, 1995
6. Doyle D A, *et al.* . The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K^+ Conduction and Selectivity. Science, 1998, 280: 69~76

(杨福愉)

索 引

A		半乳糖胺	30
阿比可糖	30	半乳糖醇	26,27
阿拉伯胶	51	半乳糖二酸	17
D-阿拉伯糖	23	α -半乳糖苷酶 A	345
L-阿拉伯糖	23	半乳糖结合位点	61
阿拉伯木聚糖	48	D-半乳糖醛酸	29
阿卓庚酮糖	24	半寿期	63
γ -氨基丁酸	129	半缩醛碳原子	9
α -氨基己二酸	129	半透膜	292
氨基酸	123	半脱氢-L-抗坏血酸	461
α -氨基酸	123	半位反应性	418
氨基酸臂	496	半纤维素	48
氨基酸残基	163	伴刀豆凝集素	65
氨基酸分析仪	153	伴肌动蛋白	283
氨基糖	30	包含体	61
δ -氨基 γ -酮戊酸	439	胞壁酸	30
氨甲蝶呤	458	胞壁肽	51
氨甲酸血红蛋白	264	胞壁质	51
氨肽酶	170	胞吞	61
氨肽酶法	170	胞外基质	62
螯环结构	18	胞质动力蛋白	280
β 凸起	211	胞质小 RNA	474
ABO 血型系统	63	饱和比值	419
ATP 合酶	319	饱和度	306
A 肽	187	饱和脂肪酸	82
A 型 DNA	487	倍半萜	112
B		被衣霉素	60
巴西棕榈蜡	96	苯丙氨酸	126
白喉毒素	158	D-苯丙氨酸	129
白蜡	95	苯基琼脂糖	313
白三烯	91	苯脲	18
白细胞介素	274	苯异硫氰酸酯	137
半胱氨酸	125	苯异硫氰酸酯(PITC)法	170
半抗原	272,343	比活力	336
半乳葡甘露聚糖	48	比连环差	491
D-半乳糖	23	比旋	3
L-半乳糖	23	吡喃	10
		吡喃[型]葡糖	10
		吡喃糖的构象	11

成脞反应	18	单电子氧化还原	97
成线机制	26	单结构域	222
成酯	19	单克隆抗体	278
D-赤藓糖	22	单绕平行 β 桶	224
D-赤藓酮糖	22	单糖	2
重叠肽	179	单体蛋白质	159
重复二糖单位	66	单体酶	325
重复序列	483	单萜	111
重建完整多肽链的一级结构	169	单酰甘油	93
重链	218	单线态氧	99
重酶解肌球蛋白	219	胆钙化(甾)醇	437
初级胆汁酸	115	胆固醇	114
初级酶工程	345	胆碱	105
穿孔素	274	胆碱鞘磷脂	108
船式构象	12	胆酸	115
串珠蛋白聚糖	70	胆甾烷醇	114
次级胆汁酸	115	胆汁酸	115
刺突蛋白	230	弹性蛋白	158, 218
粗分级分离	301	弹性蛋白酶	185
粗丝	281	蛋氨酸	125
醋酸纤维素	45	蛋白激酶	426
催产素	167	蛋白激酶 C	426
催化常数	361	蛋白聚糖聚集体	70
催化二联体	412	蛋白酪氨酸激酶	427
催化三联体	406	蛋白水解酶原的激活	185
淬灭	103	蛋白质	157, 159
翠雀苷	33	蛋白质氨基酸	124
翠雀素	33	蛋白质变性	233
C-苷	19	蛋白质的氨基酸组成	172
Chargaff 规则	486	蛋白质的等电点	291
Chou - Fasman 算法	240	蛋白质的化学修饰	140
$Co_{1/2}$	510	蛋白质的四级结构	242
C型 DNA	487	蛋白质分子的摩擦比	299
		蛋白质工程	270, 347
		蛋白质数据库	181
		蛋白质序列仪	177
		蛋白质折叠	237
		蛋白质折叠经过熔球态	238
		蛋白质组学	473
		导向蛋白	162
		等电点	133
		等电点沉淀	305
		等电聚焦	310
		等离子点	291
D			
带负电荷的 R 基氨基酸	127		
带正电荷的 R 基氨基酸	127		
丹磺酰氯	136, 169		
丹磺酰氯(DNS)法	169		
单-置换反应	364		
单半乳糖基二酰基甘油	110		
单不饱和脂肪酸	82		
单纯蛋白质	157, 324		
单纯脂质	79		

低密度脂蛋白	116	多能蛋白聚糖	69
低密度脂蛋白受体	61	多配体蛋白聚糖	70
低自旋态	260	多氢菲	112
底物	322	多顺反子 mRNA	474
地衣酚	20	多肽	163
地中海贫血	266	多肽激素	554
α -地中海贫血	270	多糖	2
β -地中海贫血	270	多萜	112
缔合常数	243	多维 NMR 谱	200
点群对称	246, 246	多亚基蛋白质	242
碘值	95	DNA 浮力密度	515
α -淀粉酶	43, 345	DNA 重组技术	472
电荷中继网	387	DNFB	137
电化学方法	337	DNS-Edman 测序法	177
电聚焦	310	D 系醛糖	6
电喷射电离串联质谱法	177	D 型 DNA	488
电渗作用	309		
电泳	307	E	
电泳迁移率	307	α -鹅膏蕈碱	167
淀粉	41	鹅[脱氧]胆酸	115
β -淀粉酶	43	鹅肌肽	168
调节部位	248	额外环	497
调节蛋白	160	萘酮反应	20
调节轻链	219	二半乳糖基二酰基甘油	110
叠氮(azide)法	191	O, O'-二环己基碳二亚胺	192
丁达尔效应	299	二级(2°)结构	160
定点诱变	387	二级结构	207
定向效应	202, 388	二级结构预测	240
动力蛋白	158, 162	二级结构元件	207
动相	148	二硫赤藓糖醇	142
豆固醇	114	二硫键	163
豆蔻酰锚钩	232	二硫键的改组	239
断开多肽链内的二硫桥	169	二硫桥	235
对称元素	3	二硫苏糖醇	142, 338
对甲苯磺酰氯	136	二面角	204
对角线电泳	179	二面体	246
多巴胺- β -羟化酶	463	二羟丙酮	22
多不饱和脂肪酸	82	二氢尿嘧啶环	496
多结构域	222	二氢鞘氨醇	107
多聚蛋白质	159, 242	二酮吡嗪	139
多聚核苷酸	478	二维核奥氏增强波谱法	200
多聚唾液酸	55	二酰甘油	93
多克隆抗体	278	2,4-二硝基氟苯	136
多酶复合体	326	二硝基氟苯(DNFB 或 FDNB)法	169

(需)钙蛋白酶	427	功能域	222
钙调蛋白	576	共轭系统	85
钙连蛋白	60	共价闭环 DNA	490
钙粘着蛋白	62	共价调节酶	424
N-苄	19	共价主链	164
O-苄	19	共聚合	189
甘氨酸	116	共同凝血途径	187
甘氨酸结合物	116	共振相互作用	164
甘氨酸	125	构象	3,160
D-甘露醇	26,27	ϵ 构象	211
D-甘露庚酮糖	24	β 构象	210
甘露聚糖	48	构象分析	11
D-甘露糖	23	构象及其描绘方法	11
甘露糖二酸	17	构象体	11
甘露糖醛酸	29	构象异构体	11
甘油单酯	93	构型	3,160
L-甘油-D-甘露庚糖	24	构造	3
D-甘油-D-甘露辛酮糖	24	古洛糖	17
D-甘油醛	22	谷氨酸	125
甘油二酯	93	D-谷氨酸	129
甘油磷脂	79,103,103	谷氨酸脱氢酶	360
甘油醚	93	谷氨酰胺	125
甘油三酯	79	谷氨酰羧化酶	440
甘油糖脂	110	谷醇溶蛋白	158
肝素	345	谷蛋白	158
肝乙醇脱氢酶	242	β -谷固醇	114
苄	19	谷胱甘肽	167
高半胱氨酸	129	谷胱甘肽过氧化物酶	103
高碘酸氧化	72	谷胱甘肽还原酶	103
高级酶工程	346	固醇	114
高密度脂蛋白	116	固醇类	79
高内皮微静脉	62	固醇类激素	556
高丝氨酸	129	固定化伴刀豆凝集素 A	71
高铁肌红蛋白	254	固定化酶	345
高铁血红素	253	固定相	148
高效液相层析	154,314	固相合成 DNA	520
γ -高亚麻酸	89	固相肽合成	192
高自旋态	260	瓜氨酸	129
革兰氏染色	51	瓜尔豆胶	51
革兰氏阳性细菌	51	寡聚蛋白质	159,242
革兰氏阴性细菌	51	寡聚酶	325
根皮苄	33	寡肽	163
庚糖	24	寡糖	2
功能基因组学	473	寡糖顺序降解	73

黄素单核苷酸	445	肌连蛋白	283
黄素蛋白	158	肌球蛋白	218
黄素腺嘌呤二核苷酸	445	肌球蛋白相关蛋白质	282
黄原胶	51	肌肉收缩的分子机制	284
磺基丙氨酸	142	肌丝滑动模型	283
回文结构	483	肌酸激酶	283,365
蛔糖	30	肌肽	168
混合三酰甘油	92	肌中蛋白	283
混合酸酐(mixed anhydride)法	191	基态氧	97
混合抑制	372	基因工程	472
活动羧基载体	454	激活剂	248,380
活化分子	320	激素	550
活化能	320	级联放大作用	573
活化酯(activated ester)法	191	极低密度脂蛋白	116
活力单位	336	α -极限糊精	43
活性部位	248,384	β -极限糊精	43
活性氧	97	极性	79
活性脂质	82	极性头	81
活性中心	384	几何异构	3
H-DNA	490	己醛糖	2
Handerson - Hasselbalch 公式	131	己糖激酶	336
Haworth 式	10	己酮糖	2
Haworth 投影式	10	记忆细胞	271
Hb 氧合的 S 形曲线	262	加压素	167
HDL	119	荚豆二糖	38
Hoogsteen 配对	490	荚膜多糖	55
		甲基钴胺素	451
I		甲基化	19
IDL	118	甲基化分析	73
		ϵ -N-甲基赖氨酸	128
J		4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖	48
肌氨酸	129	N-甲基精氨酸	129
肌醇	27	ϵ -N-甲基赖氨酸	128
肌醇三磷酸	574	甲基组氨酸	128
肌动蛋白	162,281,282	3-甲基组氨酸	128
F-肌动蛋白	282	甲硫氨酸	125
G-肌动蛋白	282	α -甲胎蛋白	429
肌动球蛋白	283	甲状旁腺激素	565
肌钙蛋白复合体	282	甲状腺激素	555
肌苷	266	甲状腺素	129
肌红蛋白	184,252	假底物序列	427
[亚铁]肌红蛋白	253	假尿嘧啶核苷	480
肌红蛋白的三级结构	253	假球蛋白	158
肌红蛋白的氧分数饱和度	256	间苯二酚	20

间苯三酚试验	20	结构蛋白质	56
间隔臂	314	结构多糖	41
兼性离子	124,130	结构花式	58
减色效应	508	结构基因组学	473
简单三酰甘油	92	α, β -结构(平行或混合型 β 折叠片)蛋白质	224
碱基堆积力	487	结构异构	3
碱性氨基酸	125	结构域	222
α 键	12	结构脂质	81
鉴定多肽链的 N-末端和 C-末端残基	169	介电常数	306
键级	97	金属·激活酶	393
浆细胞	271	金属蛋白	158
降钙素	438	金属激活酶类	465
交联凝胶网	49	金属酶	393
交联葡聚糖	44,303	金属酶类	465
交联琼脂糖凝胶	50	筋骨草糖	39
胶束	45	紧张	260
胶体溶液	299	紧张型构象	420
胶原	158,215	进化树	182
胶原蛋白	162,215	进化祖先	184
胶原酶	218	近侧(proximal)氨基酸	254
胶原纤维	215	精氨酸	126
胶原原纤维	215	精氨酸酶	467
胶质蛋白	162	鲸蜡	96
焦谷氨酸	128	鲸蜡醇	96
焦谷氨酸氨肽酶	170	胍解	170
焦糖	36	胍解法	170
鲛肝醇	93	D-景天庚酮糖	24
角叉聚糖	50	竞争性抑制	368
角蛋白	212	静相	148
α -角蛋白	212	镜像重复	490
β -角蛋白	214	局部激素	89
角张力	11	菊粉	44
绞链 DNA	490	橘皮苷	33
酵母固醇	115	橘皮素	33
酵母交配因子	232	巨红细胞性贫血	459
接触距离	202	巨噬细胞	270
接肽缩合剂	192	锯架式	11
接头蛋白	162	聚半乳糖醛酸	47
节肢弹性蛋白	162	聚半乳糖醛酸酶	47
拮抗物	264	聚丙烯酰胺凝胶	303
结蛋白	283	聚丙烯酰胺凝胶电泳	309
β 结构	209	聚合	189
结构成分	162	聚合酶链反应	519
结构蛋白	162	聚焦层析	310

磷酸化酶	43	3.6 ₁₃ - 螺旋	207
磷酸化酶激酶	427	4,4 ₁₆ - 螺旋	209
磷酸精氨酸	129	α 螺旋的手性	207
磷酸酪氨酸	128	螺旋(screw)对称	246
磷酸丝氨酸	128	α 螺旋卷曲螺旋	218
磷酸苏氨酸	128	螺旋帽化	207
磷酸酮酶	442	螺旋圈	495
6 磷酸葡萄糖酸	28	α 螺旋束	220
磷酸组氨酸	128	LamB 蛋白	231
磷脂	79,103	lambda 受体	231
磷脂酰胆碱	105	LDL	118
磷脂酰甘油	106	L 系醛糖	6
磷脂酰肌醇	106		
磷脂酰丝氨酸	106		
磷脂酰乙醇胺	106		
领先底物	364		
流动相	148		
硫酸素	441		
硫酸素焦磷酸	441		
硫苷脂	109		
硫醚 - 连接异戊二烯基锚钩	231		
硫氰酸酶	223		
硫酸角质素	67		
硫酸类肝素	67		
硫酸皮肤素	67		
硫酸鞘糖脂	109		
硫酸软骨素	67		
硫酸乙酰肝素	67		
“流体镶嵌”模型	599		
硫辛酸	459		
硫酯 - 连接脂肪酰锚钩,	231		
龙胆二糖	38		
龙胆三糖	39		
龙胆糖	39		
笼形结构	203		
芦丁糖	33		
卤化	95		
滤纸电泳	308		
卵磷脂	105		
卵清蛋白	162		
螺线管	495		
α 螺旋	207		
π 螺旋	209		
3 ₁₀ - 螺旋	209		
		马鞍形	223
		马鞍形扭曲片	224
		麦醇溶蛋白	158
		麦谷蛋白	158
		麦角钙化(甾)醇	437
		麦角固醇	115
		麦芽三糖	43
		麦芽糖	37
		麦芽糖膜孔蛋白	231
		麦芽酮糖	38
		D(+)-毛地黄毒素糖	30
		毛(洋)地黄毒苷	32
		毛地黄毒苷配基	32
		毛花洋地黄苷	32
		毛蕊花糖	39
		毛细管电泳	309
		5'帽子	485
		锚定蛋白	162
		玫瑰花结	495
		酶	160
		酶促反应动力学	351
		酶促激活的级联放大	185
		酶工程	344
		酶联免疫吸附测定	278
		酶命名法	160
		酶原	185,421
		糜蛋白酶	173
		米谷蛋白	158
		密度和溶解度	93
		密度梯度	302

缬氨酸	125	血小板活化因子	107
D-缬氨酸	129	血型抗原	56
心磷脂	106	血型糖蛋白	56,230
辛基琼脂糖	313	X射线衍射法	197
辛糖	24		
信封式构象	13		
信号识别颗粒	496	压缩比	492
信使 RNA	474	亚单位	159
信使依赖性蛋白激酶	425	亚基	159
信息体	496	亚磷酸三酯法	520
胸苷酸合成酶	458	烟草花叶病毒	159
溴化氰断裂	174	烟酸	443
序变模型	420	烟酰胺	444
序列反应	364	盐溶	305
序列同源〔性〕	181	盐酸胍	233
旋光度	3	颜色和气味	93
旋光率	3	D-岩藻糖	30
旋光性	3,13	L-岩藻糖	29
旋光异构	3	衍生脂质	79
旋转发动机	280	羊毛蜡	96
旋转轴	246	羊毛硫氨酸	129
选择蛋白	62	羊毛脂	96
L-选择蛋白	62	氧合肌红蛋白	254
选择蛋白家族	65	氧化成醛糖二酸	16
血管地址素	62	氧化成醛糖酸	16
血红蛋白	184,242,257	氧化成糖醛酸	17
血红蛋白病	266	叶酸	456
血红蛋白的三维结构	258	一级(1°)结构	160
血红蛋白的氧结合曲线	265	一氧化碳肌红蛋白	254
血红蛋白构象的转换	259	胰蛋白酶	173,185,405
血红蛋白遗传变体	266	胰蛋白酶原	422
血红素(heme)	253	胰岛素	564
[亚铁]血红素	253	胰高血糖素	564
血红素蛋白	158	胰凝乳蛋白酶	185,405
血浆蛋白质	56	α -胰凝乳蛋白酶	345
血浆铜蓝蛋白	56	胰凝乳蛋白酶原	421
血浆脂蛋白	116	移动界面电泳	308
血清类粘蛋白	56	移植抗原	56
血栓	188	遗传病	266
血糖	23	遗传工程	472
血纤蛋白	187	乙醇胺	106
血纤蛋白单体	187	乙酰〔化〕值(价)	95
血纤蛋白原	187	乙酰丙酸	20
血纤肽	187	乙酰化	95

N-乙酰赖氨酸	129	右旋糖酐蔗糖酶	44
N-乙酰半乳糖胺	30	诱导契合	384
N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与丝氨酸(Ser)或 苏氨酸(Thr)缩合形成的O-糖肽键	57	诱导效应	202
N-乙酰胞壁酸	30	鱼精蛋白	158
N-乙酰葡糖胺	30	玉米醇溶蛋白	158
椅式构象	11	玉米黄质	112
异促效应	248,413	预防型抗氧化剂	102
异淀粉酶	43	域	222
异构	3	愈创葡聚糖	48
异亮氨酸	125	原卟啉IX	253
异裂	95	原弹性蛋白	218
异麦芽酮糖	38	原果胶	47
异鼠李糖	30	原肌球蛋白	219,282
异锁链素	218	原胶原	215
异头定向	35	原聚体	242
异头碳原子	9	原始型同工酶	429
异头物	9	圆二色性	199
α 异头物	9	圆偏振	199
β 异头物	9	远侧(distal)氨基酸	254
α 和 β 异头物	9	芸香苷	33
异头效应	13	运铁蛋白	56
异戊二烯单位	110	运铁蛋白受体	60
异戊二烯基锚钩	232		
异种缔合	243	Z	
抑制剂	248,368	杂多聚(heteromultimeric)蛋白质	242
抑制作用	368	杂多聚蛋白质	169
茛三酮	138	杂多糖	2,41
应答	63	甾醇	114
樱草糖	38	甾核	112
荧光	199	甾类	79,112
荧光偏振	199	载脂蛋白	116
荧光探针技术	199	藻酸	50
硬蛋白	158	藻酸或褐藻酸	50
泳动度	307	皂苷	34
用羟胺断裂	175	皂化值(价)	94
优球蛋白	158	皂化作用	94
油	91	增色效应	508
游动系统	279	粘蛋白	56
有效分配系数	148	粘多糖	66
有序反应	364	粘胶丝	46
“诱导契合”假说	334	粘蛋白聚糖	70
右旋糖	23	粘酸	17
右旋糖酐	43	粘着蛋白	62
		粘着分子	62

展层	151	植物固醇	114
张力	11	植物糖鞘磷脂	108
蔗糖	36	纸层析	151
β 折叠	221	指纹图谱	267
β 折叠片	209	质谱法	74
真脂	91	中间密度脂蛋白	116
整联蛋白	62	中心法则	471
正碳离子	95	中性氨基酸	125
正效应物	248,413	中性脂	91
正协同性	248,419	终止法测序	518
正协同性同促效应	261	珠蛋白	185,224,252
支持剂	151	珠蛋白型 α -螺旋蛋白	224
支架蛋白	162	主要组织相容性复合体	271
支架作用	162	贮存或贮能多糖	41
支链淀粉	41	贮存脂质	80
脂	91	柱床体积	303
脂蛋白	116	专一性	322
脂蛋白脂酶	118	转化	36
脂多糖	54	转化酶	36
脂肪酶	345	转化糖	36
脂肪酸	82	转甲酰酶	458
脂肪酸合成酶	326	β 转角	211
脂肪酰锚钩	232	转羧化酶	456
脂肪族激素	556	转酮酶	442
脂褐素	102	转移 RNA	474
脂加氧酶	89	转移酶类	330
脂锚定蛋白质	229	转运蛋白	162
脂锚定结构	231	转酯[基]作用	119
脂锚定膜蛋白	231	装配接触	259
脂锚钩	231	缀合蛋白质	157,324
脂双层	81	紫菌素	112
脂双层模型	599	紫外差光谱	198
脂质	79	自动氧化	95
脂质 A	54	自杀性底物	376
脂质的定义	79	自身抗体	63
脂质的分类	79	自身抗原	63
I 类极性脂质	80	自身耐受性	63,273
II 类极性脂质	80	自我剪接	339
III 类极性脂质	80	自我装配	235
脂质过氧化	96	自旋-自旋分裂	147
脂质转移蛋白	119	自旋-自旋偶合	147
直立键	12	自由基	85,96
直链淀粉	41	自由基的产生	96
植物毒蛋白	162	自由基清除剂	102

自由能	320	$\beta\alpha\beta$ 组合	221
自由能最低的构象	237	组织相容性抗原	56
总酸碱催化	390	组织型纤溶酶原激活剂	189
阻断型抗氧化剂	102	最低相对分子质量	291
组氨酸	127	最适温度	378
组成	3	左旋糖	23
组蛋白	158	Z 型 DNA	488