

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

生物化学

第三版 下册

王镜岩 朱圣庚 徐长法 主编



A0967647



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。每章都附有提要和习题,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.下册/王镜岩等主编. —3版. —北京:高等教育出版社,2002.8

ISBN 7-04-011089-X

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 046096 号

生物化学(第三版)(下册)

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 43.75

字 数 1 350 000

版 次 1980 年 4 月第 1 版

2002 年 8 月第 3 版

印 次 2002 年 8 月第 1 次印刷

定 价 59.40 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

深切怀念我们的导师

——敬爱的沈同教授

《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 王兰仙

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

目 录

第 19 章 代谢总论	(1)	(六) 能量学用于生物化学反应中的一些规定	(32)
一、分解代谢与合成代谢	(1)	(七) ΔG^0 、 ΔG 以及平衡常数计算的举例	(32)
二、能量代谢在新陈代谢中的重要地位	(2)	三、高能磷酸化合物	(34)
三、辅酶 I 和辅酶 II 的递能作用	(3)	(一) 高能磷酸化合物的概念	(34)
四、FMN 和 FAD 的递能作用	(3)	(二) 高能磷酸化合物及其他高能化合物的类型	(34)
五、辅酶 A 在能量代谢中的作用	(4)	(三) ATP 的结构特性	(36)
六、新陈代谢的调节	(5)	(四) 细胞内影响 ATP 自由能释放的因素	(38)
七、代谢中常见的有机反应机制	(5)	(五) ATP 在能量转运中的地位和作用	(39)
(一) 基团转移反应		(六) 磷酸肌酸和磷酸精氨酸及其他贮能物质	(40)
(group-transfer reaction)	(7)	(七) ATP 断裂形成 AMP 和焦磷酸的作用	(41)
(二) 氧化反应和还原反应		(八) ATP 以外的其他核苷三磷酸的递能作用	(41)
(oxidation and reduction)	(9)	(九) ATP 系统的动态平衡	(42)
(三) 消除、异构化及重排反应	(10)	提要	(43)
(四) 碳-碳键的形成与断裂反应	(12)	习题	(44)
八、新陈代谢的研究方法	(15)	主要参考书目	(45)
(一) 使用酶的抑制剂	(16)	第 21 章 生物膜与物质运输	(46)
(二) 利用遗传缺乏症研究代谢途径	(17)	一、被动运输与主动运输	(46)
(三) 气体测量法(manometric method)	(18)	(一) 被动运输(passive transport)	(46)
(四) 同位素示踪法	(18)	(二) 主动运送(active transport)	(46)
(五) 核磁共振波谱法	(20)	二、小分子物质的运输	(47)
提要	(21)	(一) Na^+ 和 K^+ 的运输	(49)
习题	(22)	(二) Ca^{2+} 的运输	(51)
主要参考书目	(22)	(三) 三类驱动离子的 ATP 酶	(52)
第 20 章 生物能学	(23)	(四) 阴离子运输(anion transport)	(53)
一、有关热力学的一些基本概念	(23)	(五) 糖和氨基酸的运送	(53)
(一) 体系的概念、性质和状态	(23)	(六) ATP/ADP 交换体	
(二) 能的两种形式——热与功	(23)	(ATP/ADP exchanger)	(54)
(三) 内能和焓的概念	(23)	三、生物大分子的跨膜运输	(55)
(四) 热力学第一定律		(一) 胞吐作用	(55)
(first law of thermodynamics)	(24)	(二) 胞吞作用	(56)
(五) 化学能的转化	(25)	四、离子载体(ionophores)	(58)
(六) 热力学第二定律和熵的概念	(25)	(一) 缬氨霉素	(58)
(七) 自由能的概念	(26)	(二) “A23187”载体	(59)
二、化学反应中自由能的变化和意义	(28)	(三) 尼日利亚菌素	(59)
(一) 化学反应的自由能变化公式	(28)	(四) 短杆菌肽 A	(59)
(二) 标准自由能变化和化学平衡的关系	(28)		
(三) 标准生成自由能及其应用	(30)		
(四) 偶联化学反应标准自由能变化的可加性及其意义	(31)		
(五) 化学反应和自由能关系的进一步说明	(32)		

五、生物膜运输的分子机制	(60)	提要	(89)
(一) 移动性载体模型	(60)	习题	(90)
(二) 孔道或通道模型	(60)	主要参考书目	(90)
(三) 构象变化假设	(60)	第 23 章 柠檬酸循环	(92)
提要	(62)	一、丙酮酸进入柠檬酸循环的准备阶段	
习题	(62)	—形成乙酰 - CoA	(92)
主要参考书目	(62)	(一) 催化丙酮酸转变为乙酰 - CoA	
第 22 章 糖酵解作用	(63)	的反应步骤	(93)
一、糖酵解作用的研究历史	(63)	(二) 对丙酮酸脱氢酶复合体结构	
二、糖酵解过程概述	(65)	和装配的深入探讨	(95)
三、糖酵解和酒精发酵的全过程图解	(66)	(三) 丙酮酸脱氢酶复合体催化反应	
四、糖酵解第一阶段的反应机制	(66)	的简单图解	(96)
(一) 葡萄糖的磷酸化	(66)	(四) 砷化物对硫辛酰胺的毒害作用	(96)
(二) 葡萄糖 - 6 - 磷酸异构化形成		(五) 丙酮酸脱氢酶复合体的调控	(96)
果糖 - 6 - 磷酸	(69)	二、柠檬酸循环概貌	(97)
(三) 果糖 - 6 - 磷酸形成果糖 - 1,6 -		三、柠檬酸循环的反应机制	(98)
二磷酸	(71)	(一) 草酰乙酸(oxaloacetate)与乙酰 - CoA	
(四) 果糖 - 1,6 - 二磷酸转变为甘油		缩合(condense)形成柠檬酸	(98)
醛 - 3 - 磷酸和二羟丙酮磷酸	(72)	(二) 柠檬酸异构化形成异柠檬酸	(100)
(五) 二羟丙酮磷酸转变为		(三) 异柠檬酸氧化形成 α - 酮戊二酸	(101)
甘油醛 - 3 - 磷酸	(72)	(四) α - 酮戊二酸氧化脱羧形成	
五、酵解第二阶段——放能阶段		琥珀酰 - CoA	(103)
的反应机制	(74)	(五) 琥珀酰 - CoA 转化成琥珀酸	
(一) 甘油醛 - 3 - 磷酸氧化成		并产生一个高能磷酸键	(103)
1,3 - 二磷酸甘油酸	(74)	(六) 琥珀酸脱氢形成延胡索酸	(104)
(二) 1,3 - 二磷酸甘油酸转移高能磷酸		(七) 延胡索酸水合形成 L - 苹果酸	(105)
基团形成 ATP	(76)	(八) L - 苹果酸脱氢形成草酰乙酸	(106)
(三) 3 - 磷酸甘油酸转变为		四、柠檬酸循环的化学总结算	(107)
2 - 磷酸甘油酸	(77)	五、柠檬酸循环的调控	(108)
(四) 2 - 磷酸甘油酸脱水生成		(一) 柠檬酸循环本身制约系统的调节	(108)
磷酸烯醇式丙酮酸	(78)	(二) ATP、ADP 和 Ca^{2+} 对柠檬酸循环	
(五) 磷酸烯醇式丙酮酸转变为		的调节	(109)
丙酮酸并产生一个 ATP 分子	(79)	六、柠檬酸循环的双重作用	(110)
六、由葡萄糖转变为两分子丙酮酸能量转变		七、柠檬酸循环的发现历史	(111)
的估算	(80)	提要	(111)
七、丙酮酸的去路	(81)	习题	(112)
(一) 生成乳酸	(81)	主要参考书目	(112)
(二) 生成乙醇	(82)	第 24 章 生物氧化——电子传递	
八、糖酵解作用的调节	(83)	和氧化磷酸化作用	(114)
(一) 磷酸果糖激酶是关键酶	(83)	一、氧化 - 还原电势	(114)
(二) 果糖 - 2,6 - 二磷酸对酵解		(一) 氧化 - 还原电势	(114)
的调节作用	(84)	(二) 生物体中某些重要	
(三) 己糖激酶和丙酮酸激酶对糖酵解		的氧化 - 还原电势	(116)
的调节作用	(85)	(三) 电势和自由能的关系	(117)
九、其他六碳糖进入糖酵解途径	(85)	(四) 标准电动势和平衡常数的关系	(118)
(一) 果糖	(85)	二、电子传递和氧化呼吸链	(118)
(二) 半乳糖	(87)	(一) 电子传递过程	(118)
(三) 甘露糖	(89)	(二) 呼吸链概念的建立	(119)

(三) 电子传递链	(119)	四、糖原代谢的调控	(187)
(四) 电子传递链各个成员	(121)	(一) 糖原磷酸化酶的调控机制	(187)
(五) 电子传递的抑制剂	(128)	(二) 对糖原合酶的调控	(189)
三、氧化磷酸化作用	(129)	(三) 肝脏中糖原代谢调控的特殊性	(189)
(一) 线粒体的结构	(129)	(四) 激素对糖原代谢的调节和激素效应	
(二) 氧化磷酸化作用机制	(130)	的级联放大系统	(190)
(三) 质子梯度的形式	(132)	(五) G 蛋白及其对激素信号的	
(四) ATP 合成机制	(134)	传递作用	(193)
(五) 氧化磷酸化的解偶联和抑制	(137)	(六) 糖原累积症	(194)
(六) 细胞溶胶内 NADH 的再氧化	(139)	提要	(194)
(七) 氧化磷酸化的调控	(140)	习题	(195)
(八) 葡萄糖彻底氧化的总结算	(141)	主要参考书目	(195)
(九) 氧的不完全还原	(142)	第 27 章 光合作用	(197)
提要	(144)	一、光合作用的概况	(197)
习题	(145)	(一) 光合作用的发现	(197)
主要参考书目	(146)	(二) 光合作用的场所——叶绿体	(198)
第 25 章 戊糖磷酸途径和糖的		(三) 光合作用的总过程	(198)
其他代谢途径	(147)	(四) 光的本性	(200)
一、戊糖磷酸途径	(147)	二、叶绿素的光反应性:光吸收	(201)
(一) 戊糖磷酸途径的发现	(147)	(一) 叶绿素吸收光能	(201)
(二) 戊糖磷酸途径的主要反应	(147)	(二) 辅助色素扩展光吸收的范围	(202)
(三) 戊糖磷酸途径反应速度的调控	(151)	(三) 叶绿素在膜上被组织成光合单位	(204)
(四) 戊糖磷酸途径的生物学意义	(153)	(四) 叶绿素通过激子传递把吸收	
二、糖的其他代谢途径	(154)	的能量汇集到作用中心	(204)
(一) 葡萄糖异生作用	(154)	三、光驱动电子流:中心光化学事件	(205)
三、葡萄糖出入动物细胞的特殊运载机构	(158)	(一) 光合细菌只有一个光化学	
四、乙醛酸途径	(159)	作用中心	(205)
五、寡糖类的生物合成和分解	(161)	(二) 高等植物和藻类具有两个光系统	(208)
(一) 概论	(161)	(三) 放氧光合生物中光作用中心	
(二) 乳糖的生物合成和分解	(162)	的结构	(210)
(三) 糖蛋白的生物合成	(164)	(四) 真核光合电子传递的 Z 图式	(211)
(四) 糖蛋白糖链的分解代谢	(173)	(五) 水的光解与放氧	(213)
提要	(173)	(六) PS I 和 PS II 在类囊体膜上的定位	(214)
习题	(174)	四、光驱动的 ATP 合成:光合磷酸化	(215)
主要参考书目	(175)	(一) 电子传递与光合磷酸化相偶联	(215)
第 26 章 糖原的分解和生物合成	(176)	(二) 光合磷酸化的机制——化学渗透	(216)
一、糖原的生物学意义	(176)	(三) 循环和非循环光合磷酸化	(217)
二、糖原的降解(glycogen breakdown)	(176)	(四) 盐细菌的光合磷酸化	(217)
(一) 糖原磷酸化酶	(177)	(五) 光合作用中能量的利用效率	(218)
(二) 糖原脱支酶(glycogen debranching enzyme)		五、暗反应:CO ₂ 固定	(218)
(包括糖基转移酶)	(180)	(一) CO ₂ 固定与核酮糖-1,5-二	
(三) 磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)		磷酸羧化酶/加氧酶	(218)
的作用	(181)	(二) Calvin 循环	(220)
(四) 葡萄糖-6-磷酸酶	(182)	(三) CO ₂ 固定的调节	(222)
三、糖原的生物合成	(183)	六、光呼吸和 C ₄ 途径	(224)
(一) 糖原生物合成的研究经历了缓慢		(一) 核酮糖二磷酸加氧酶反应:	
的历程	(183)	光呼吸	(224)
(二) 催化糖原合成的三种酶	(183)	(二) CO ₂ 固定的 C ₄ 途径	(225)

(三) 景天酸代谢	(227)	二、脂类的合成	(258)
提要	(227)	(一) 脂肪酸的生物合成	(258)
习题	(228)	(二) 其他脂类的生物合成	(267)
主要参考书目	(229)	提要	(297)
第 28 章 脂肪酸的分解代谢	(230)	习题	(298)
一、脂质的消化、吸收和传送	(230)	主要参考书目	(298)
(一) 脂肪的消化发生在脂质 - 水		第 30 章 蛋白质降解和氨基酸	
的界面处	(231)	的分解代谢	(299)
(二) 胆汁盐促进脂类在小肠中被吸收 ..	(231)	一、蛋白质的降解	(299)
(三) 吸收	(232)	(一) 蛋白质降解的特性	(299)
二、脂肪酸的氧化	(232)	(二) 蛋白质降解的反应机制	(300)
(一) 脂肪酸的活化	(232)	(三) 机体对外源蛋白质的需要	
(二) 脂肪酸转入线粒体	(233)	及其消化作用	(302)
(三) β -氧化	(234)	二、氨基酸分解代谢	(303)
(四) 脂肪酸氧化是高度的放能过程	(238)	(一) 氨基酸的脱氨基作用	(303)
三、不饱和脂肪酸的氧化	(240)	(二) 氧化脱氨基作用: 谷氨酸脱氢酶	(306)
(一) 不饱和脂肪酸的氧化	(240)	(三) 其他的脱氨基作用	(306)
(二) 奇数碳原子脂肪酸		(四) 联合脱氨基作用(transdeamination) ..	(307)
的氧化生成丙酰 - CoA	(240)	(五) 氨基酸的脱羧基作用	(308)
(三) 脂肪酸还可发生 α - 或 ω -氧化 ..	(243)	(六) 氨的命运	(308)
四、酮体	(243)	三、尿素的形成	(310)
(一) 乙酰 - CoA 的代谢结局	(243)	(一) 尿素循环的发现	(310)
(二) 肝脏中酮体的形成	(244)	(二) 尿素循环	(311)
(三) 肝外组织使用酮体作为燃料	(245)	(三) 尿素循环的调节	(313)
五、磷脂的代谢	(245)	四、氨基酸碳骨架的氧化途径	(314)
(一) 膜结构脂类——磷脂和糖脂	(245)	(一) 形成乙酰 - CoA 的途径	(315)
(二) 磷酸甘油酯是磷脂酸的衍生物	(245)	(二) α - 酮戊二酸途径	(320)
(三) 磷脂的代谢	(247)	(三) 形成琥珀酰 - CoA 的途径	(325)
六、鞘脂类的代谢	(248)	(四) 形成延胡索酸途径	(326)
(一) 鞘磷脂	(248)	(五) 形成草酰乙酸途径	(326)
(二) 鞘糖脂	(249)	五、生糖氨基酸和生酮氨基酸	(329)
七、甾醇的代谢	(251)	六、由氨基酸衍生的其他重要物质	(329)
(一) 概论	(251)	(一) 氨基酸与一碳单位	(329)
(二) 胆固醇的代谢	(251)	(二) 氨基酸与生物活性物质	(332)
八、脂肪酸代谢的调节	(253)	七、氨基酸代谢缺陷症	(336)
(一) 脂肪酸进入线粒体的调控	(254)	提要	(338)
(二) 心脏中脂肪酸氧化的调节	(254)	习题	(338)
(三) 激素对脂肪酸代谢的调节	(254)	主要参考书目	(339)
(四) 根据机体代谢需要的调控	(255)	第 31 章 氨基酸及其重要衍生物	
(五) 长时间膳食的改变导致相关酶水平		的生物合成	(340)
的调整	(255)	一、概论	(340)
提要	(255)	二、脂肪族氨基酸的生物合成	(343)
习题	(256)	(一) 谷氨酸族氨基酸的生物合成: L- 谷	
主要参考书目	(256)	氨酸, L- 谷氨酰胺, L- 脯氨酸	(343)
第 29 章 脂类的生物合成	(257)	(二) 天冬氨酸族的生物合成: L- 天	
一、贮存脂肪	(257)	冬氨酸, L- 天冬酰胺, L- 甲硫氨酸,	
(一) 贮存脂肪	(257)	L- 苏氨酸	(347)
(二) 脂肪肝	(257)	(三) 丙酮酸族的生物合成: L- 丙氨酸、	

L-缬氨酸、L-亮氨酸	(353)	(三) 脱氧核糖核苷酸的合成	(398)
(四) 丝氨酸族的生物合成: L-丝氨酸、 L-甘氨酸、L-半胱氨酸的生物合 成及固硫作用	(353)	三、辅酶核苷酸的生物合成	(401)
三、芳香族氨基酸及组氨酸的生物合成	(356)	(一) 烟酰胺核苷酸的合成	(401)
(一) 苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸 的生物合成	(356)	(二) 黄素核苷酸的合成	(402)
(二) 组氨酸的生物合成	(359)	(三) 辅酶 A 的合成	(402)
四、氨基酸生物合成的调节	(361)	提要	(404)
(一) 通过终端产物对氨基酸生物合成 的抑制	(361)	习题	(404)
(二) 通过酶生成量的改变调节氨基酸 的生物合成	(362)	主要参考书目	(405)
五、氨基酸转化为其他氨基酸 及其他代谢物	(363)	第 34 章 DNA 的复制和修复	(406)
(一) 氧化氮的形成	(363)	一、DNA 的复制	(406)
(二) 谷胱甘肽 (glutathion)	(363)	(一) DNA 的半保留复制	(406)
(三) 肌酸 (creatine) 的生物合成	(365)	(二) DNA 复制的起点和方式	(408)
(四) 卟啉 (porphyrin)、血红素 (Heme) 的生物合成	(366)	(三) DNA 聚合反应有关的酶	(410)
(五) 短杆菌肽 S (gramicidin S)	(372)	(四) DNA 的半不连续复制	(418)
(六) D-氨基酸的形成	(375)	(五) DNA 复制的拓扑性质	(419)
提要	(375)	(六) DNA 复制的过程	(421)
习题	(375)	(七) 真核生物 DNA 的复制	(424)
主要参考书目	(376)	二、DNA 的损伤修复	(427)
第 32 章 生物固氮	(377)	(一) 错配修复	(428)
一、生物固氮作用及固氮生物类型	(377)	(二) 直接修复	(428)
(一) 根瘤菌与豆科植物根的共生	(378)	(三) 切除修复	(429)
(二) 自生固氮微生物	(379)	(四) 重组修复	(430)
二、固氮酶的结构与功能研究	(379)	(五) 应急反应 (SOS) 和易错修复	(431)
三、固氮的基因表达调控	(382)	三、DNA 的突变	(432)
(一) 自身固氮	(382)	(一) 突变的类型	(432)
(二) 共生固氮	(383)	(二) 诱变剂的作用	(432)
四、生物固氮的基因工程	(384)	(三) 诱变剂和致癌剂的检测	(435)
(一) 使非豆科植物转变为固氮作物	(384)	提要	(435)
(二) 提高现有固氮作物的固氮能力	(385)	习题	(436)
提要	(386)	主要参考书目	(437)
习题	(386)	第 35 章 DNA 的重组	(438)
主要参考书目	(386)	一、同源重组	(438)
第 33 章 核酸的降解和核苷酸代谢	(387)	(一) Holliday 模型	(438)
一、核酸和核苷酸的分解代谢	(387)	(二) 细菌的基因转移与重组	(440)
(一) 核酸的解聚作用	(387)	(三) 重组有关的酶	(441)
(二) 核苷酸的降解	(388)	二、特异位点重组	(443)
(三) 嘌呤碱的分解	(388)	三、转座重组	(447)
(四) 嘧啶碱的分解	(389)	(一) 细菌的转座因子	(448)
二、核苷酸的生物合成	(391)	(二) 真核生物的转座因子	(451)
(一) 嘌呤核糖核苷酸的合成	(391)	提要	(452)
(二) 嘧啶核糖核苷酸的合成	(396)	习题	(453)
		主要参考书目	(454)
		第 36 章 RNA 的生物合成和加工	(455)
		一、DNA 指导下 RNA 的合成	(455)
		(一) DNA 指导的 RNA 聚合酶	(455)
		(二) 启动子和转录因子	(459)
		(三) 终止子和终止因子	(564)
		(四) 转录的调节控制	(466)

(五) RNA 生物合成的抑制剂	(469)	的合成	(527)
二、RNA 的转录后加工	(472)	(五) 翻译开始于 mRNA 与核糖体	
(一) 原核生物中 RNA 的加工	(472)	的结合	(527)
(二) 真核生物中 RNA 的一般加工	(475)	(六) 蛋白质因子帮助的蛋白质	
(三) RNA 的拼接、编辑和再编码	(478)	合成起始	(528)
(四) RNA 生物功能的多样性	(488)	(七) 在氨基酸的掺入过程中有 3 个重复	
(五) RNA 的降解	(491)	的延伸反应	(528)
三、在 RNA 指导下 RNA 和 DNA 的合成	(491)	(八) 核糖体反应中 GTP 的作用	(530)
(一) RNA 的复制	(491)	(九) 翻译的终止需要释放因子	
(二) RNA 的逆转录	(493)	和终止密码子的参加	(531)
(三) 逆转座子的种类和作用机制	(498)	(十) 核糖体在翻译中能跳跃式读码	(531)
提要	(501)	(十一) 蛋白质合成的抑制剂	(531)
习题	(503)	三、蛋白质的运输及翻译后修饰	(533)
主要参考书目	(503)	(一) 蛋白质通过其信号肽	
第 37 章 遗传密码	(504)	引导到目的地	(533)
一、DNA 是遗传信息的携带分子	(504)	(二) 一些线粒体叶绿体蛋白质	
(一) 细胞含有恒定量的 DNA	(504)	是翻译完成后被运输的	(534)
(二) DNA 是细菌的转化因子	(505)	(三) 分泌型的真核蛋白在内质网	
(三) 病毒是游离的遗传因子	(506)	(endoplasmic reticulum, ER) 内合成	(535)
二、RNA 传递和加工遗传信息	(506)	(四) 高尔基体中多肽的糖基化修饰	
(一) RNA 的拼接	(507)	及多肽的分类	(536)
(二) RNA 的编辑	(507)	(五) 大肠杆菌蛋白质在翻译	
(三) RNA 的译码和再编码	(507)	的同时也在被运输	(536)
三、遗传密码的破译	(508)	提要	(536)
四、遗传密码的基本特性	(511)	习题	(537)
(一) 密码的基本单位	(511)	主要参考书目	(537)
(二) 密码的简并性	(512)	第 39 章 细胞代谢与基因表达调控	(538)
(三) 密码的变偶性	(512)	一、细胞代谢的调节网络	(538)
(四) 密码的通用性和变异性	(513)	(一) 代谢途径交叉形成网络	(538)
(五) 密码的防错系统	(515)	(二) 分解代谢和合成代谢的单向性	(540)
提要	(515)	(三) ATP 是通用的的能量载体	(541)
习题	(516)	(四) NADPH 以还原力形式携带能量	(541)
主要参考书目	(516)	(五) 代谢的基本要略在于形成 ATP、还原力	
第 38 章 蛋白质合成及转运	(517)	和构造单元以用于生物合成	(542)
一、蛋白质合成的分子基础	(518)	二、酶活性的调节	(543)
(一) mRNA 是蛋白质合成的模板	(519)	(一) 酶促反应的前馈和反馈	(544)
(二) tRNA 转运活化的氨基酸		(二) 产能反应与需能反应的调节	(545)
至 mRNA 模板上	(520)	(三) 酶活性的特异激活剂和抑制剂	(547)
(三) 核糖体是蛋白质合成的工厂	(522)	(四) 蛋白酶解对酶活性的影响	(548)
二、翻译的步骤	(524)	(五) 酶的共价修饰与连续激活	(548)
(一) 氨酰-tRNA 合成酶帮助使氨基酸结合		三、细胞结构对代谢途径的分隔控制	(550)
到特定的 tRNA 上	(525)	(一) 细胞结构和酶的空间分布	(550)
(二) 每一个氨酰-tRNA 合成酶可识别一个		(二) 细胞膜结构对代谢的调节	
特定的氨基酸和与此氨基酸对应的		和控制作用	(552)
tRNA 的特定部位	(525)	(三) 蛋白质的定位控制	(554)
(三) 氨酰-tRNA 合成酶能够纠正酰化		四、细胞信号传递系统	(554)
的错误	(526)	(一) 门控离子通道和神经信号的传导	(554)
(四) 一个特殊的 tRNA 启动了蛋白质		(二) 激素和递质受体的信号转导系统	(556)

(三) 细胞增殖的调节	(559)	三、克隆基因的表达	(602)
五、基因表达的调节	(561)	(一) 基因表达的控制元件	(602)
(一) 原核生物基因表达的调节	(561)	(二) 非融合蛋白和融合蛋白的表达	(602)
(二) 真核生物基因表达的调节	(570)	(三) 外源基因在真核细胞中的表达	(603)
提要	(577)	四、蛋白质工程	(607)
习题	(579)	(一) 蛋白质的分子设计和改造	(607)
主要参考书目	(579)	(二) 蛋白质的实验进化	(608)
第 40 章 基因工程及蛋白质工程	(580)	(三) 蛋白质工程的进展	(608)
一、DNA 克隆的基本原理	(580)	五、基因工程的应用与展望	(611)
(一) DNA 限制酶与连接酶	(580)	(一) 基因工程开辟了生物学研究	
(二) 分子克隆的载体与宿主系统	(582)	的新纪元	(611)
(三) 外源基因导入宿主细胞	(587)	(二) 基因工程促进了生物技术产业	
二、基因的分、合成和测序	(588)	的兴起	(612)
(一) 基因文库的构建	(589)	(三) 基因工程研究的展望	(613)
(二) cDNA 文库的构建	(590)	提要	(614)
(三) 克隆基因的分离与鉴定	(592)	习题	(615)
(四) 聚合酶链式反应扩增基因	(595)	主要参考书目	(616)
(五) DNA 的化学合成	(598)	生化名词英汉对照	(617)
(六) 基因定位诱变	(598)	常用生化名词缩写	(657)
(七) DNA 序列的测定	(600)	名词索引	(667)

第19章 代谢总论

在本书上册的各章中,讨论了构成生物体的主要分子:糖类、脂类、蛋白质、酶、核酸、维生素和激素等,以及生物膜的结构。这些物质在生物体内都不是孤立存在的,彼此之间有着错综复杂的关系。而且这些物质都不是静止不变的,它们都在不停地发生着化学变化。生物体自外界摄取物质,即营养物质,以维护其生命活动。这些物质进入体内,转变为生物体自身的分子以及生命活动所需的物质和能量等等。营养物质在生物体内所经历的一切化学变化总称为新陈代谢(metabolism)。

新陈代谢简称代谢,是生物体表现其生命活动的重要特征之一。生物体内的新陈代谢并不是完全自发进行的,而是靠生物催化剂——酶来催化的。酶是推动生物体内全部代谢活动的工具。由于酶作用的专一性,每一种化学反应都有特殊的酶参与作用。每种特殊的酶都有其调节机制。它们使错综复杂的新陈代谢过程成为高度协调的、高度整合在一起的化学反应网络。

生物体内酶催化的化学反应是连续的,前一种酶的作用产物往往成为后一种酶的作用底物。这种在代谢过程中连续转变的酶促产物统称为代谢中间产物(metabolic intermediates),或简称代谢物(metabolites)。

代谢通过一系列连续的反应,无论是外界引入的或是体内形成的有机分子,最后都转变成代谢的最终产物。新陈代谢途径中的个别环节,个别步骤称为中间代谢(intermediary metabolism)。

人们往往将新陈代谢的功能概括为五个方面:① 从周围环境中获得营养物质。② 将外界引入的营养物质转变为自身需要的结构元件(building blocks),即大分子的组成前体。③ 将结构元件装配成自身的大分子,例如蛋白质、核酸、脂类以及其他组分。④ 形成或分解生物体特殊功能所需的生物分子。⑤ 提供生命活动所需的一切能量。

虽然新陈代谢包括数以千计的不同酶的催化反应,但通过仔细地分析研究,仍然可以从错综复杂的代谢网络中总结归纳成一些具有共同规律的途径,并将这些途径称之为主要代谢途径(central metabolic pathways)。人们还发现,这些主要代谢途径,在千差万别的生物界都具有相当的普遍性。

下面我们对新陈代谢再作一些进一步的阐述。

一、分解代谢与合成代谢

从上面的叙述中不难看出,新陈代谢包含的是物质合成和分解两个方面。有机营养物,不管是从外界环境获得的,还是自身贮存的,通过一系列反应步骤转变为较小的、较简单的物质的过程称为分解代谢(catabolism)。与分解代谢相伴随的,是将蕴藏在有机大分子中的能量逐步释放出来。分解代谢所经过的反应途径称之为分解代谢途径(catabolic pathways)。合成代谢(catabolism)又称生物合成(biosynthesis),是生物体利用小分子或大分子的结构元件建造成自身大分子的过程。由小分子建造成大分子是使分子结构变得更为复杂。这种过程都是需要提供能量的。有关能量代谢还将另作讨论。

应当注意的是,同一种物质,其分解代谢和合成代谢途径一般是不相同的。他们并不是简单的可逆反应,而往往是通过不同的中间反应或不同的酶来实现。可以把分解代谢形象地比作高山上的巨石往山下滚动。巨石在不断滚动中,逐步释出本身所具有的潜能。山坡越陡峭,巨石滚动得越快,能量消失得也越快。若是沿着相同的途径,将巨石上推到原来的位置,几乎是不可能的。但是如果沿着盘山路逐步上推,就可以比较容易地达到山顶。合成代谢正是通过比较容易达到的途径,合成机体所需要的大分子。分解和合成代谢选择不同的途径,使生物机体增加了体内化学反应的数量,并使其对代谢活动的调控具有更大的灵活性和应变能力。

生物机体的分解代谢和合成代谢不只是采取不同的途径,甚至同一种物质的两种过程是在细胞的不同部位进行。这种现象特别在真核细胞生物是比较常见的。

例如,ATP的合成反应是在线粒体内进行的,而ATP的供能(分解)反应大多是在细胞溶胶中进行的。又如脂肪酸分解成乙酰辅酶A,是在线粒体内进行的,而乙酰辅酶A合成脂肪酸是在细胞溶胶中进行的。

虽然分解代谢和合成代谢基本上采取不同的途径,但有许多代谢环节还是双方都可共同利用的。这种可以公用的代谢环节称为两用代谢途径(amphibolic pathway)。柠檬酸循环(citric acid cycle)(参看第23章)可看作是两用代谢途径的典型例证。例如,不同氨基酸分解代谢的结果(参看第30章)可形成柠檬酸循环中的中间产物。柠檬酸循环中的 α -酮戊二酸是谷氨酸脱去氨基的产物。柠檬酸循环中的草酰乙酸是天冬氨酸脱去氨基的产物等等。因此, α -酮戊二酸、草酰乙酸既是氨基酸以及蛋白质分解代谢的产物,又可以作为合成氨基酸以及蛋白质的前体物质。 α -酮戊二酸、草酰乙酸作为柠檬酸循环中的成员,又可以进一步被氧化分解最后形成 CO_2 和水。两用代谢途径的存在,使机体细胞的代谢更增加了灵活性。

二、能量代谢在新陈代谢中的重要地位

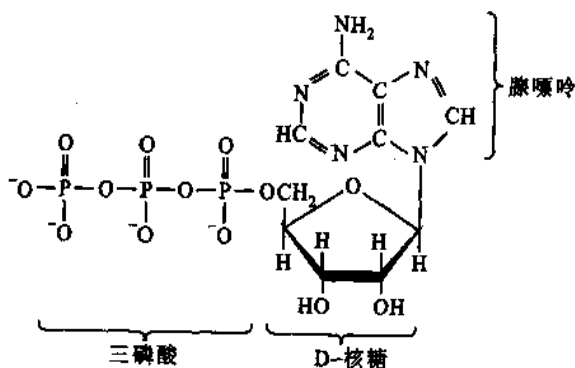
前面讨论了生物机体通过分解代谢将营养物质分解为小分子物质,通过合成代谢将小分子物质合成自身的大分子以及自身所需的其他生物分子。这两种代谢途径所包括的物质转化,都属于物质代谢。以物质代谢为基础,与物质代谢过程相伴随发生的,是蕴藏在化学物质中的能量转化,统称为能量代谢(energetic metabolism)。

生物体的一切生命活动都需要提供能量。生物体的生长、发育,包括核酸、蛋白质的生物合成,机体运动,包括肌肉的收缩以及生物膜的传递、运输功能等等,都需要消耗能量。如果没有能量来源,生命活动也就无法进行,生命也就停止。

太阳能是所有生物最根本的能量来源。太阳能在具有叶绿素的生物进行光合作用的过程中,将光能转化为化学能(参看第27章)。如由 CO_2 合成葡萄糖,通过化学过程,将太阳能贮存在葡萄糖分子中;而依靠外界营养物质为生的生物(称为异养生物 heterotrophs)将复杂的营养物,如葡萄糖,进行分解代谢,在分解代谢过程中,葡萄糖分子蕴藏的能量逐步释放出来。葡萄糖依靠机体内进行的氧化作用,最后生成 CO_2 和水。在生物氧化的过程中,有许多环节可将葡萄糖释放出的能量捕获贮存起来,以便用于机体做功。肌肉收缩、合成代谢、跨膜运输以及所有的需能反应都属于机体做功,这种能用于做功的能量称为自由能(free energy)。机体利用自由能所做的功是在常温和常压下进行的。在分解代谢中,起捕获和贮存能量作用的分子是腺嘌呤核苷三磷酸,简称腺苷三磷酸(即ATP)。ATP是由ADP(腺苷二磷酸)和无机磷酸合成的。ATP、ADP和无机磷酸广泛存在于生物体的各个细胞内,起着传递能量的作用,因此又称为能量传递系统(energy-transmitting system)。

异养生物将外界有机营养物质通过分解代谢产生ATP的过程可大致划分为三个阶段。第一个阶段由营养物的大分子分解为较小的分子。例如,蛋白质被降解为氨基酸,多糖被降解为单糖,脂肪被降解为甘油和脂肪酸等等。这个阶段并没有ATP的产生。第二阶段是由各种小分子进一步转变为少数几种共同物质。例如,转变为乙酰基(形成乙酰辅酶A)。第二个阶段基本上也是不释放能量的过程,虽然也只有很少量ATP形成。第三个阶段由柠檬酸循环和氧化磷酸化两个共同代谢途径组成。这个阶段是形成ATP的主要阶段。

以ATP形式贮存的自由能,概括起来可归纳为用于提供以下四方面对能量的需要:①提供生物合成做化学功时所需的能量。在生物合成过程中,ATP将其所携带的能量提供给大分子的结构元件,例如氨基酸,使这些元件活化,处于较高的能态,这就为进一步装配成生物大分子蛋白质等作好了准备。②是生物机体活动以及肌肉收缩的能量来源。③供给营养物逆浓度梯度跨膜运输到机体细胞内所需的自由能。④在DNA、RNA和蛋白质等生物合成中,保证基因信息的正确传



递,ATP 也以特殊方式起着递能作用。

当 ATP 提供能量时,在 ATP 远端的那个 γ -磷酸基团水解成为无机磷酸分子,ATP 分子失掉一个磷酸基而变为腺苷二磷酸。腺苷二磷酸又可在捕获能量的前提下,再与无机磷酸结合形成 ATP。ATP 和 ADP 的往复循环是生物机体利用能量的基本方式。

ATP 作为自由能的贮存分子,并不是以长时期不动的形式存在,而是不断地处于动态平衡的周转之中。一般情况下,ATP 分子一旦形成,一分钟之内就被利用,所以严格地说,ATP 并不是能量的贮存形式,而是一种传递能量的分子。关于这个问题,在第 20 章中还将讨论。

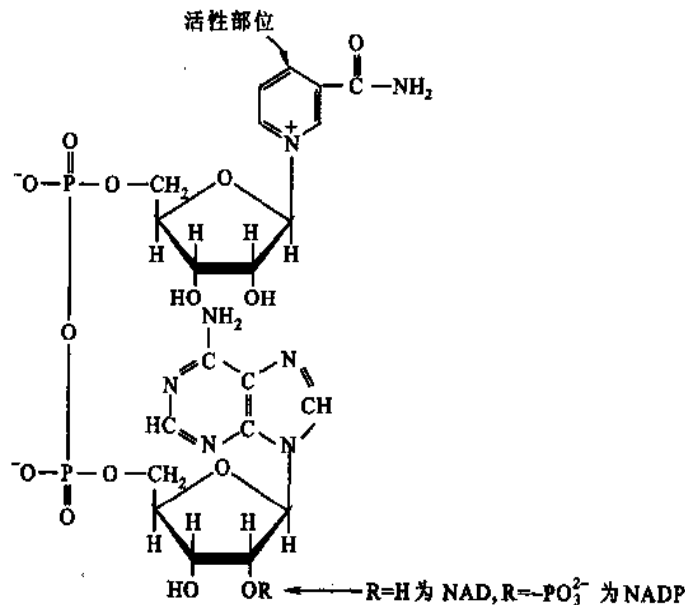
生物机体对能量的消耗是惊人的,一个处于安静状态的成人,据计算,一日内需消耗 40 kg 的 ATP。在激烈运动时,ATP 的利用率每分钟可达到 0.5 kg。

能够直接提供自由能推动生物体多种化学反应的核苷酸类分子除 ATP 外,还有 GTP(鸟苷三磷酸)、UTP(尿苷三磷酸)以及 CTP(胞苷三磷酸)等。

例如,GTP 对 G 蛋白的活化、蛋白质的生物合成、蛋白质的寻靶(targeting)作用、蛋白质的移位等等都作为推动力提供自由能。又例如 UTP 在糖原合成中所起的活化葡萄糖分子的作用;CTP 在合成磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺以及合成纤维素中所起的推动作用等等,都将在以后有关的章节中阐述。

三、辅酶 I 和辅酶 II 的递能作用

由营养物质的分解代谢释放出的化学能,除了合成 ATP 的途径捕获外,还有另外一种途径,就是以氢原子和电子的形式将自由能转移给生物合成的需能反应。这种具有高能的氢原子是由脱氢反应形成的。脱氢酶催化物质的脱氢反应,将脱下的氢原子和电子传递给一类特殊能接受这种氢原子和电子的辅酶,称为辅酶 I 和辅酶 II(参看第 11 章)。

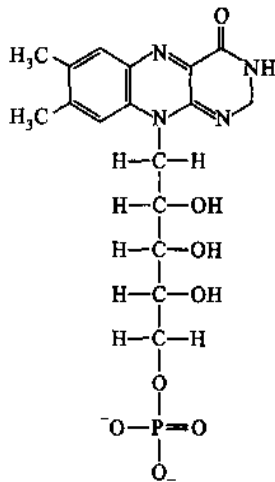


物质氧化产生的高能位电子和脱下的氢原子通过辅酶 I 或辅酶 II 传递给生物合成中需要还原力的反应;例如,在脂肪酸和胆固醇的合成中,电子和氢原子用于将双键还原为饱和的单键。

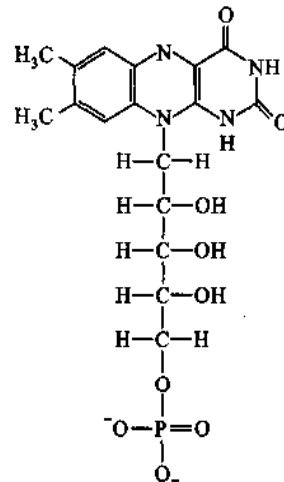
四、FMN 和 FAD 的递能作用

FMN(flavin mononucleotide),译名为黄素腺嘌呤单核苷酸,FAD(flavin adenine dinucleotide),译名为黄素腺嘌呤二核苷酸,它们是另一类在传递电子和氢原子中起作用的载体。FMN 和 FAD 都能接受两个电子和两个氢原子,它们在氧化还原反应中,特别是在氧化呼吸链中起着传递电子和氢原子的作用。它们的结构

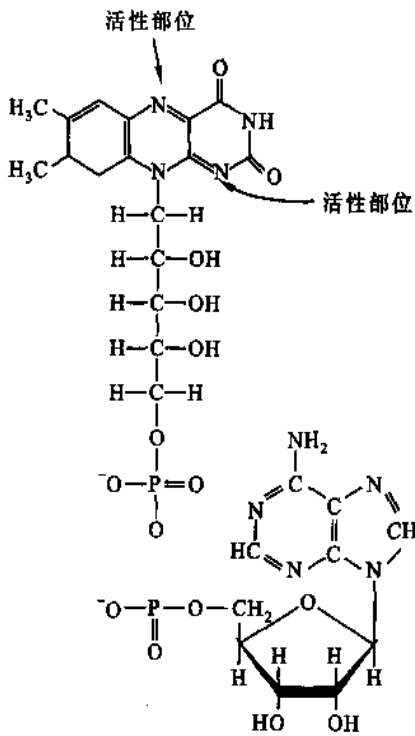
式如下：



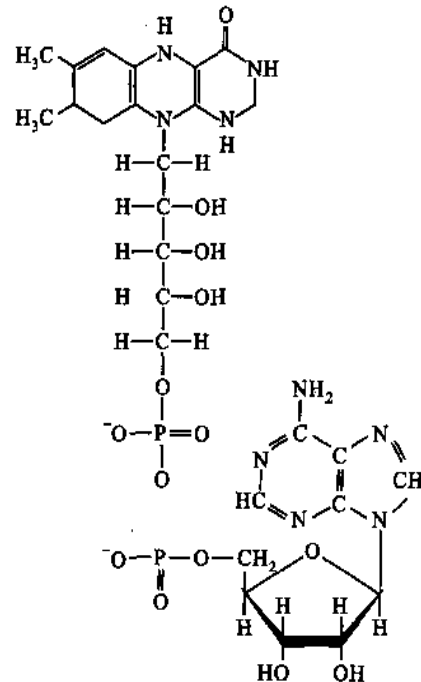
黄素单核苷酸 (FMN)
(氧化型)



黄素单核苷酸 (FMNH₂)
(还原型)



黄素腺嘌呤二核苷酸 (氧化型)
(FAD)



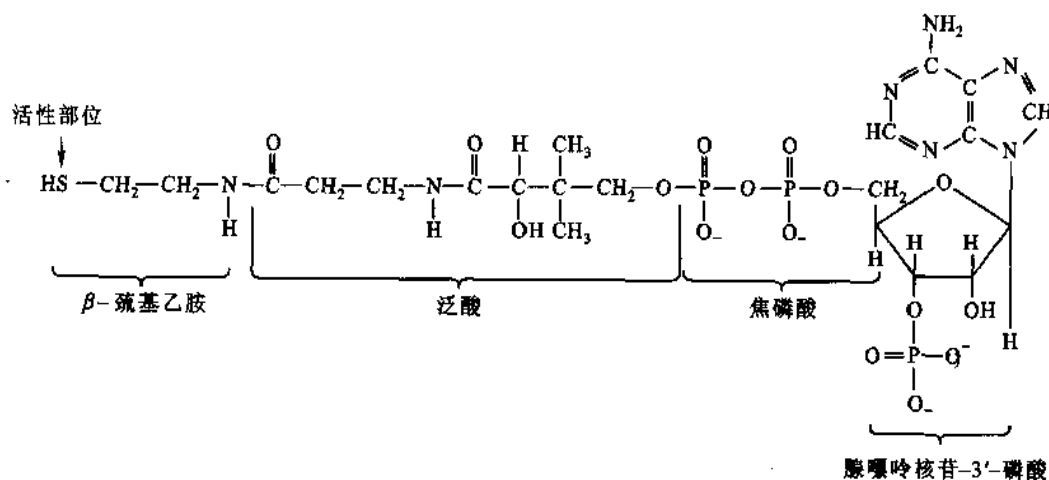
黄素腺嘌呤二核苷酸 (还原型)
(FADH₂)

五、辅酶 A 在能量代谢中的作用

辅酶 A (coenzyme A) 简称为 (CoA), 分子中含有腺嘌呤、D-核糖、磷酸、焦磷酸、泛酸和巯基乙胺。腺嘌呤以 β -糖苷键与核糖的第一个碳原子相连。D-核糖的第 5' 位与焦磷酸基团相连。焦磷酸基团的第二个磷酸基团以酯键形式与泛酸相连。泛酸又以酰胺键的形式与巯基乙胺相连。巯基乙胺的游离端是一个巯基 (-SH)。

巯基是 CoA 的活泼基团。为了显示 -SH 基的重要作用, CoA 又常以辅酶 A-SH 或 CoA-SH 表示。它在酶促转乙酰基的反应中, 起着接受或提供乙酰基的作用。CoA 的“A”字就是取自英语中乙酰化作用 acetylation 的字头。乙酰-CoA (acetyl CoA) 常用 $\text{CH}_3\text{-CO-S CoA}$ 表示, 或写作乙酰-S-CoA (acetyl-S-CoA)。乙酰基与 CoA 的结合是通过一个硫酯键。乙酰-CoA 形成的硫酯键和 ATP 的高能磷酸键相似, 都

在水解时释放出大量的自由能。因此可以说,乙酰 - CoA 具有高的乙酰基转移势能。ATP 的酸酐键水解断裂时释放出 30.54 kJ/mol 相当于 7.3 kcal/mol 的自由能,而乙酰 - CoA 的硫酯键水解断裂时释放出的自由能为 31.38 kJ/mol(有关自由能计算问题请参看第 20 章)。乙酰 - CoA 所携带的乙酰基已不是一般的乙酰基,而是活泼的乙酰基团,正像 ATP 所携带的活泼磷酸基团一样。



许多物质代谢,最终都可形成乙酰 - CoA。例如,葡萄糖、丙酮酸(pyruvate)、乙酸、乙醛及脂肪酸等。这些物质的转变都将在有关章节讨论。

六、新陈代谢的调节

前面已经提到,生物机体的新陈代谢是一个完整统一的体系。机体代谢的协调配合,关键在于它存在有精密的调节机制。代谢的调节使生物机体能够适应其内、外复杂的变化环境,从而得以生存。这种精密的调节机制是生物在长期演化中获得的。

可将代谢的调节概括地划分为三个不同水平:分子水平、细胞水平和整体水平。

分子水平的调节包括反应物和产物的调节(主要是浓度的调节和酶的调节)。酶的调节是最基本的代谢调节,包括酶的数量调节以及酶活性的调节等。酶的数量不只受到合成速率的调节,也受到降解速率的调节。合成速率和降解速率都各有一系列的调节机制。在酶的活性调节机制中,比较普遍的调节机制是可逆的变构调节和共价修饰两种形式。

细胞的特殊结构与酶结合在一起,使酶的作用具有严格的定位条理性,从而使代谢途径得到分隔控制。

多细胞生物还受到在整体水平上的调节。这主要包括激素的调节和神经的调节。高等真核生物由于分化出执行不同功能的各种器官,而使新陈代谢受到合理的分工安排。人类还受到高级神经活动的调节。

除上述各方面的调节作用外,还有来自基因表达的调控作用。

有关代谢调节的详细内容将在本书第 39 章讨论。

七、代谢中常见的有机反应机制

学习代谢途径中的一系列变化,有必要牢固地掌握反应物的结构,并理解发生反应的机制,只有这样,才能使自己对新陈代谢中的各种变化有一个比较深刻地了解。

前面已经提到代谢过程几乎都是酶促有机反应。酶催化的有机反应机制可归纳为以下几种:酸 - 碱催化、共价催化、金属离子催化和静电催化(electro static catalysis)。酶催化反应的实现,多是经过反应部位的接近和取向的效应,形成过渡态而发生的。

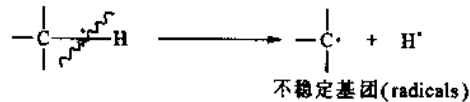
生物化学中的反应大体可归纳为四类,即①基团转移反应,②氧化 - 还原反应,③消除、异构化和重排反应,④碳 - 碳键的形成或断裂反应。这些反应的酶促作用机制不少已经得到阐明。以下将按不同类型

的代谢反应原理进行介绍。

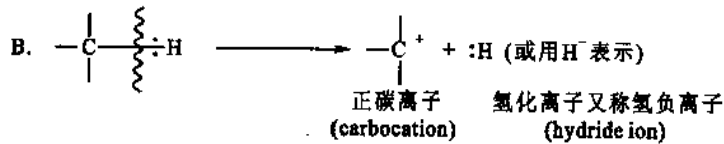
在介绍上述四大类反应之前,先对有机化学中与代谢反应关系密切的一些基本知识作如下简介:

共价键是两个原子间共享的一对电子。这样形成的键断裂时它们的电子对或是留在一个原子的一侧,称为异裂断键(heterolytic bond cleavage);或是电子对分开,每一个电子留在不同原子的一侧,称为均裂断键(homolytic bond cleavage),如图:

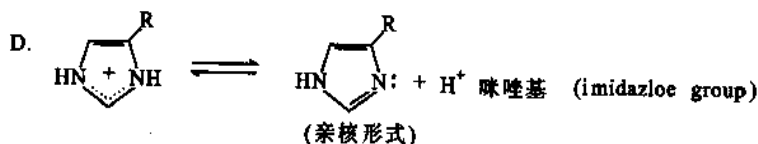
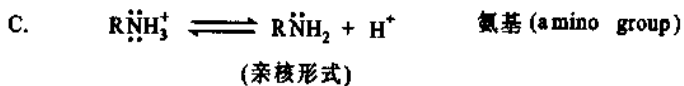
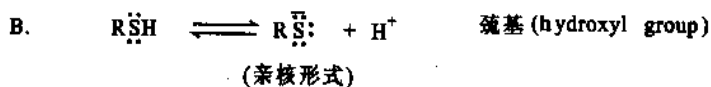
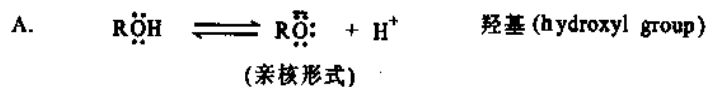
(1) 均裂断键



(2) 异裂断键

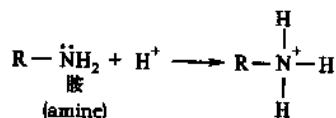


均裂断键常产生不稳定基(团),最常见于氧化-还原反应。C-H键的异裂断键,常伴随负碳离子及质子(H⁺)的形成,或正碳离子及氢化离子(H⁻)的形成。碳原子较氢原子的电负性稍高(原子成键时,该原子对于成键电子对的吸引能力称为电负性。C的电负性为2.5,H的电负性为2.1)。因此在生物化学体系中,C-H键的断裂以电子对留在碳原子一侧,形成负碳离子的方式居多。另一方面,氢化离子(H⁻)具有高度的反应性,所以只有当氢化离子的受体,例如NAD⁺(或NADP⁺)同时存在时,氢化离子一旦形成,就立即转移到受体上。只有在此种情况下,才可以发生形成正碳离子及氢化离子的断裂。参与反应的化合物,包括异裂的断键或成键,可分为两大类:即富电子者和缺电子者。富电子的化合物称为亲核体(nucleophiles),它持负电荷,即未共用的电子对,与缺电子中心很易形成共价键。在生物化学中这种亲核基团有:氨基、羟基、咪唑基以及巯基(-SH)等。如图:

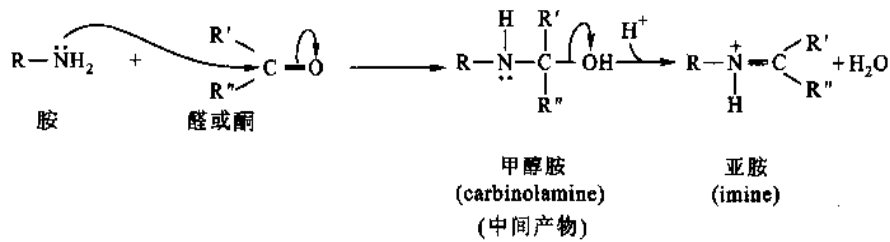


这些亲核型的基团都表现为碱性基团,或者说亲核性与碱性是极其相近的。这样的化合物发生作用时,若它是与H⁺形成共价键,一般称为碱性反应;若是与缺电子中心形成共价键,一般称为亲核性反应。缺电子中心一般常为缺电子的碳原子。请见下例:

a. 胺的碱性反应:

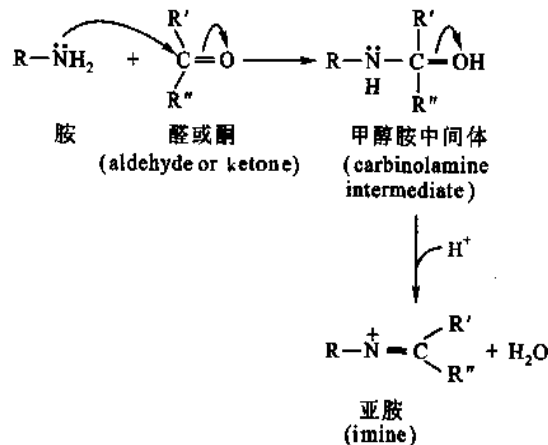


b. 胺的亲核性反应:



缺电子的化合物称为亲电体(electrophiles),它有一个未饱和的电子壳,即含有一个电负性的原子而呈正电性。在生物化学体系中最常见的亲电体是 H^+ 、金属离子、羰基的碳原子(它有一个电负性的氧原子)和阳离子亚胺。

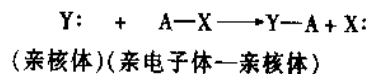
生物化学的一个重要反应是胺与醛或酮的反应,如下所示:



这个反应的第一步是胺的未共用电子对向缺电子的羰基进攻,使 $\text{C}=\text{O}$ 双键的电子对更向氧原子靠近,并使氮原子上一个氢原子转移到氧原子上。第二步是甲醇胺中间体的氮原子上的未共用电子对向缺电子的碳原子进攻,在质子(H^+)的参与下,释出一分子水。任何时候,任何体系都遵循化学法则(Lewis law),例如,碳原子绝对不可能有 5 个键,氢原子不可能有 2 个键。下面我们讨论生物化学中的四大类反应。

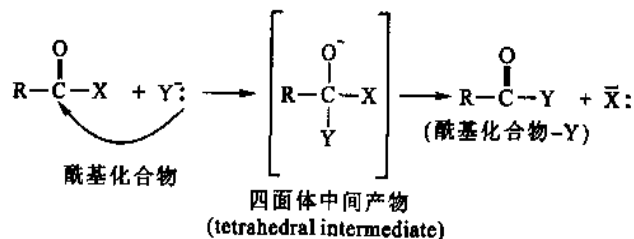
(一) 基团转移反应(group-transfer reaction)

在生物化学体系中,基团转移常表现为亲电子基团(如 A)从一个亲核体(如 X:)转移到另一亲核体(如 Y:)



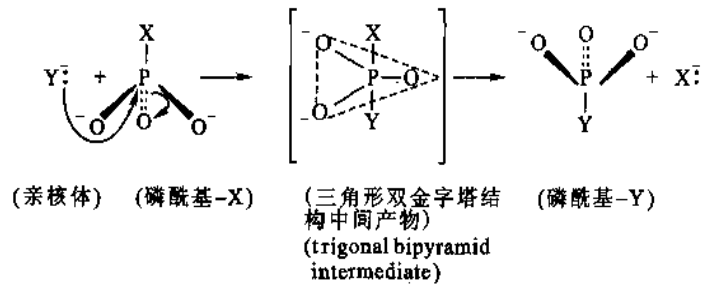
这类反应也可称为亲核体的取代反应。在代谢反应中,最常见的转移基团是酰基(acyl)、磷酸基(phosphoryl)及葡糖基(glycosyl)等。

1. 酰基转移(acyl group transference)



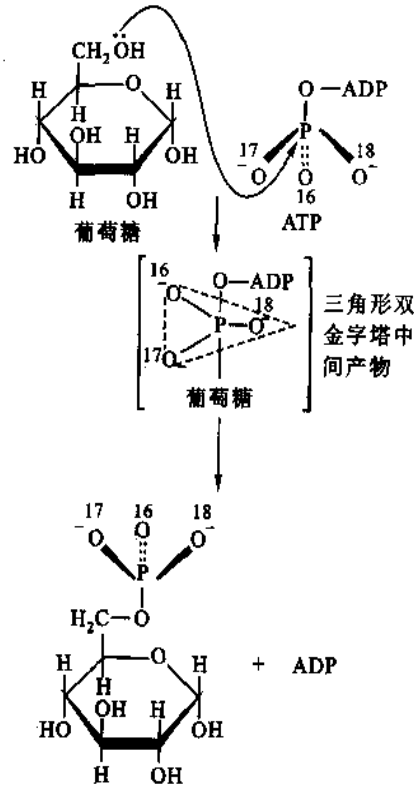
酰基转移是酰基从一个亲核体转移到另一亲核体,它常是亲核体向酰基的羰基碳原子进攻,先形成四面体结构的中间体。例如,在胰蛋白酶的催化下肽键的水解就是这类反应的典型例子。

2. 磷酸基转移 (phosphoryl group transfer)

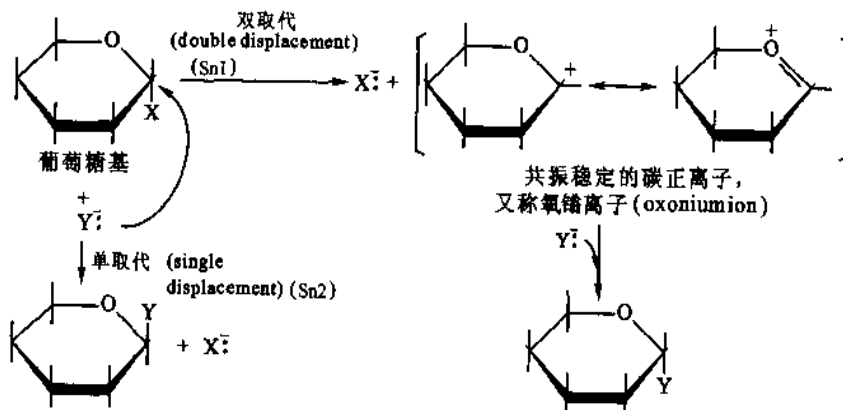


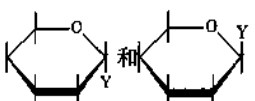
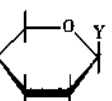
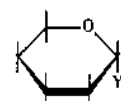
磷酸基的转移起始于一个亲核体(Y)向磷酸基的磷原子进攻,形成一个三角形,双金字塔结构(三角形为金字塔的底座,X,Y分别为两个金字塔的顶端)的中间体。三角形的顶端位置原来由一个被攻击的离子基团(X)所占据。(Y)的进攻,(X)的脱去,导致四面体磷酸基构象反转,产生最后的产物。实验证明具有“手性”的磷酸基化合物确实是在发生反转。

例如,在形成 ATP 的 γ -磷酸基中,引进同位素证实了:当它在己糖激酶(hexokinase)作用下向葡萄糖转移时,即发生构型的反转。



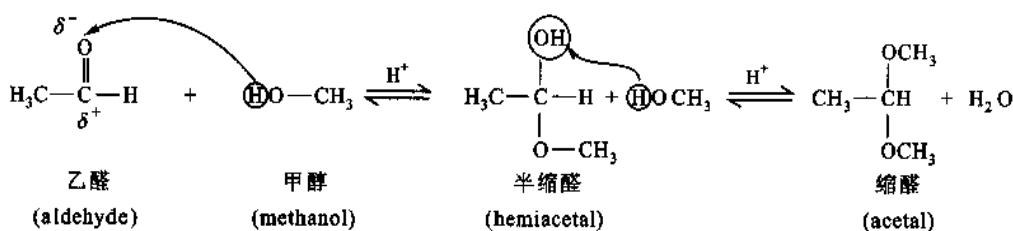
3. 葡糖基转移 (glycosyl group transfer)



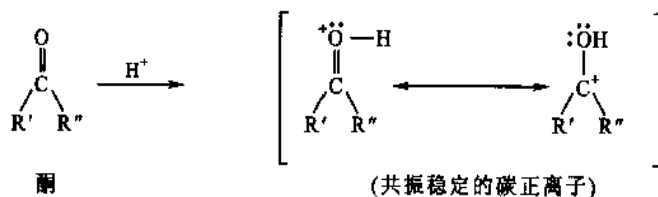
注:此处若从化学角度看有两种产物  和 , 但生物体内只有一种 

葡萄糖基转移过程是一个亲核体(图中的 Y^-)取代葡萄糖环上(C1)处的另一亲核体(图中的 X)的过程。这个反应一般发生的是双取代(用符号 S_N2 表示),其机制是葡萄糖基上的 X 脱下,形成共振稳定的碳正离子,随后是亲核体 Y^- 的进攻。这个反应也可以单取代机制进行,即 Y 直接地取代 X,与此同时“构型”发生逆转。

进一步说,这里存在着一个缩醛的中心碳原子。所谓缩醛中心碳原子是指当一分子的醇与一分子的醛或酮,在酸性条件下,发生如下的反应:

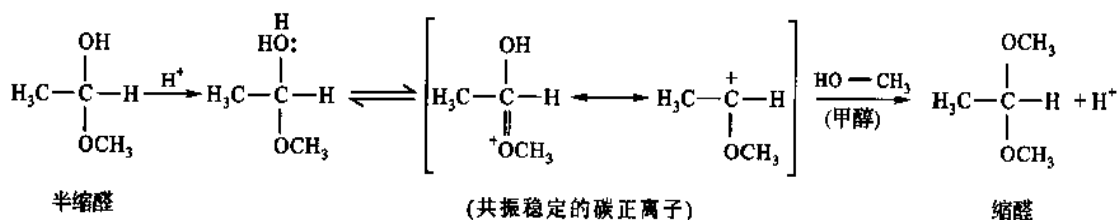


上述的平衡受醛(或酮)所左右,即这个取代步骤的产生取决于醛(或酮)分子。以酮为例,它在酸性条件下形成“碳正离子”,如下所示:



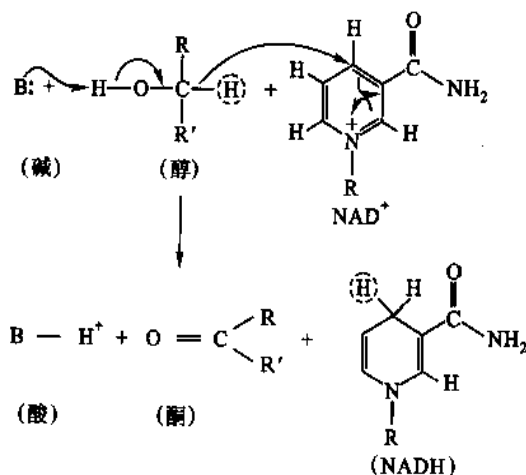
它与半缩醛分子在酸性条件下形成碳正离子(即上述缩醛的中心碳原子)是相当的。

葡萄糖基转移中形成的“共振稳定的碳正离子”(如下示)与“缩醛的中心碳原子”也是同样意义的。

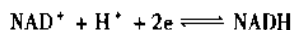


(二) 氧化反应和还原反应(oxidation and reduction)

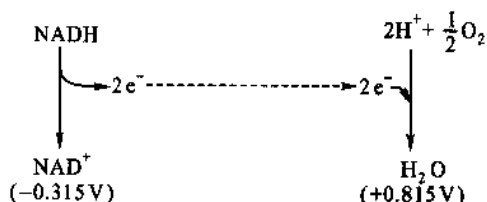
氧化-还原反应(redox reaction)实质是电子的得失反应。在代谢过程中,此类反应十分重要。如下的反应所示:



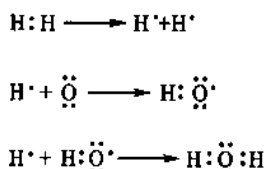
NAD^+ 及碱从醇分子上移去两个氢,形成 NADH ,也可看作是 NAD^+ 自 H :接受了一对电子形成 NADH 。或反过来, NADH 提供了一对电子,形成 NAD^+ 。即 NADH 为电子供体(donor), NAD^+ 为电子受体(acceptor)。可以概括为:



在生物体的能量代谢中, NADH 提供出两个电子,进入电子传递链,即:



进一步说,当代谢物被氧化,转移出一对电子时,这对电子的最终受体常是分子氧(O_2)。而且这对电子对氧的攻击是一个一个分别地进行的,如下式:



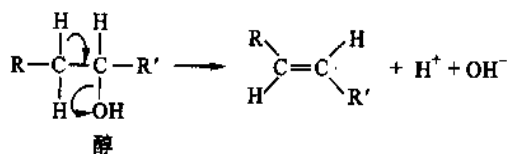
(三) 消除、异构化及重排反应

1. 消除反应(elimination reaction)

(1) 碳-碳双键的形式——消除反应

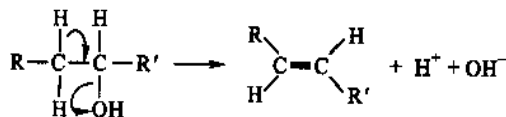
碳-碳双键的形成是单键饱和中心发生消除反应后形成的。消除掉的分子一般是 H_2O 、 NH_3 、 R-OH 、或 R-NH_2 。

醇的脱水就是消除反应的一例:

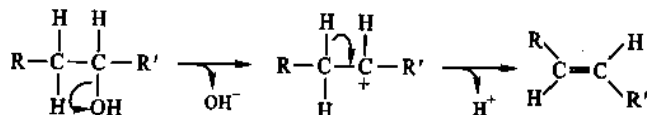


(2) 消除反应有以下三种可能的机制

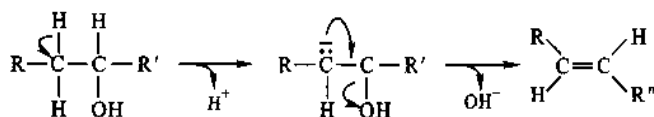
① 协同机制(concerted mechanism)



② 经过碳正离子的机制(via carbocation mechanism)



③ 经过碳负离子的机制(via carbanion mechanism)



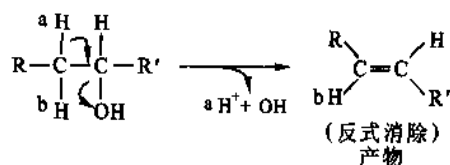
(3) 酶催化的消除反应或是以②的形式或是以③的形式进行

当酸性催化时,由于酸性基团的作用, OH^- 被除掉,即是机制②的形式。当碱性催化时,一个质子被夺取,即是机制③的形式。

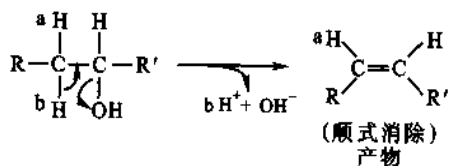
另外,酶的活性基团的电荷,可使带不同电荷的中间体趋于稳定。这是一种分阶段(stepwise)进行的反应方式。糖酵解过程中的烯醇化酶(enolase),柠檬酸循环中的延胡索酸酶(fumarase)所催化的消除反应都属于这种类型。

(4) 从立体化学来看,有反式消除和顺式消除两类,如下所示:

① 反式消除(trans elimination)



② 顺式消除(cis elimination)



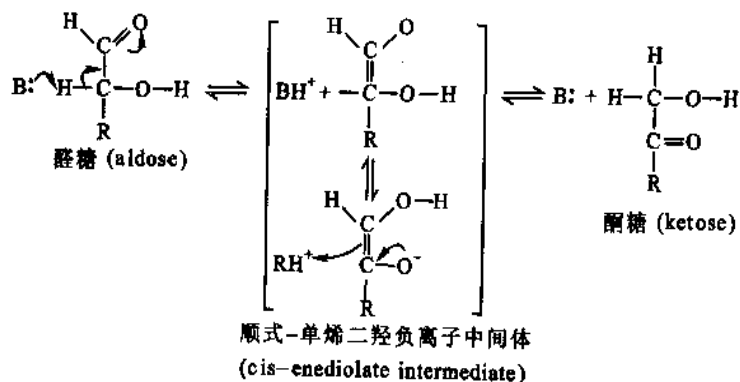
注:为表明反应式中原子的位置,在原子旁边加小写 a, b, c...表示,以下皆同。

其中反式消除是生物化学发生最多的机制。顺式消除在生物体中很少发生。

2. 分子内氢原子的迁移——异构化反应(isomerization)

生物化学中的异构化反应是指一个氢原子在分子内迁移,即质子从一个碳原子脱离,转移到另一个碳原子上,由此发生了双键位置的改变。

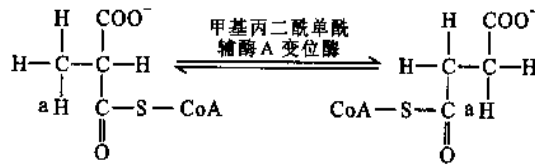
在代谢中,存在最多的异构化反应是醛糖-酮糖互变反应(aldehyde-ketose interconversion)。它是在碱性催化下,经过形成单烯二羟负离子(enediolate anion)中间体,而发生的。糖酵解酶系中的磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase)所催化的反应就属此类反应。醛糖-酮糖互变反应机制如下:



3. 分子重排反应(rearrangement)

重排是C-C键断裂,又重新形成的反应。其结果碳骨架发生了变化。例如,在甲基丙二酰单酰-CoA变位酶(methylmalonyl-CoA mutase)的作用下,L-甲基丙二酰单酰辅酶A转化为琥珀酰-CoA

(succinyl - CoA)是最常见的一种转化(参看第28章脂类的分解代谢)。这个变位酶的辅基(prosthetic group)是维生素 B₁₂的衍生物。



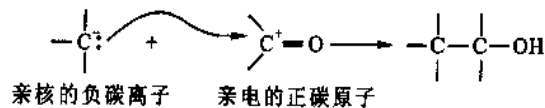
从上式可看到,实际上发生了碳骨架的重排: $\text{C}-\text{C}-\text{C} \rightarrow \text{C}-\text{C}-\text{C}$

具有奇数碳原子脂肪酸的氧化。某些氨基酸的降解属于这一类反应。

(四) 碳-碳键的形成与断裂反应

分解代谢与合成代谢实质就是以碳-碳键的形成与断裂为基础的反应过程。葡萄糖经过5次断裂反应成为 CO₂, 葡萄糖的生物合成则是碳-碳键形成的反应过程。

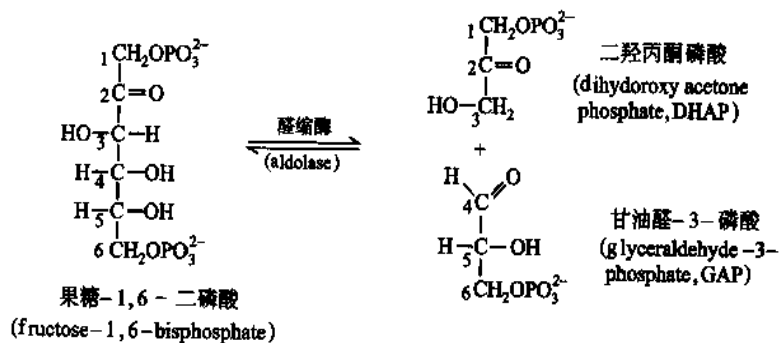
从合成的走向来看,这类碳-碳键形成的生物合成过程包括着亲核的负碳离子向亲电子的正碳原子进攻。最常见的亲电子的碳原子是醛、酮、酯、CO₂ 等的 sp² 杂化轨道的羰基碳原子。如:



在这反应中,必须有一个稳定态的负碳离子生成,才能向亲电子的中心进攻。有关此类反应可以举出3种类型。

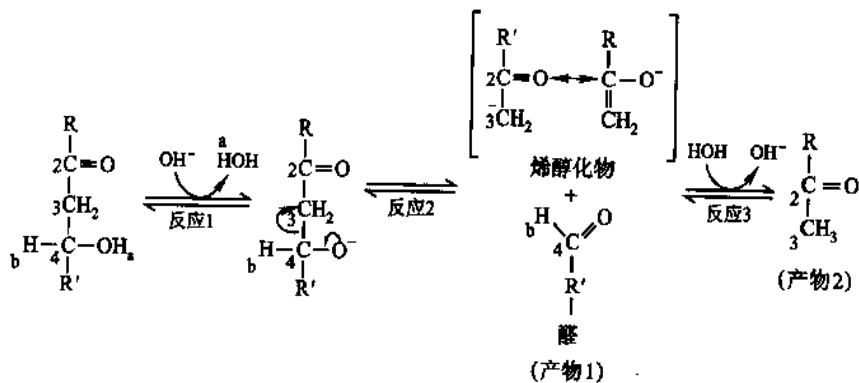
1. 羟醛缩合反应(aldol condensation)

例如醛缩酶(aldolase)所催化的反应:



注: aldolase(中译名常用醛缩酶),实际上它催化的是羟醛缩合的逆反应,即碳-碳键的断裂反应。

这个反应是羟醛裂解(羟醛缩合的逆反应)。它的反应机制是在有机碱的催化下进行的。其一般式如下图:

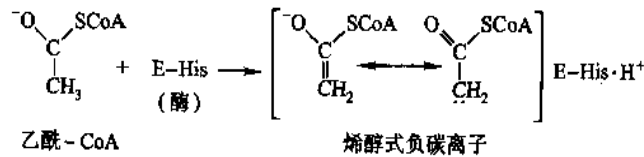


羟醛裂解发生于果糖-1,6-二磷酸的 C₃ 及 C₄ 处,这个裂解发生的条件是由于 C₂ 为羰基碳, C₄ 处有一羟基。上示的一般式中,反应的第 1 步为有机碱的 OH⁻ 夺去底物上的羟基氢,使与羟基氢相连的碳原子成为 C-O⁻。第 2 步反应发生羟醛断裂,是由于 C₂ 处羰基碳吸引电子的倾向使 C-O⁻ 的电子转移成为 C=O, C-C 间的电子转移,发生 C-C 断键。反应 2 之所以发生,乃是由于烯醇化物共振中间体的稳定性。

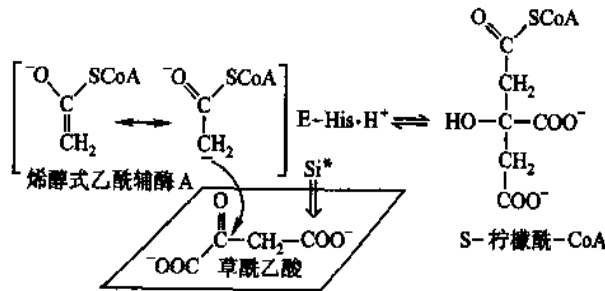
2. 克莱森酯缩合反应 (Claisen ester condensation)

这个反应是在柠檬酸合酶 (citrate synthase) 的作用下发生的。可以说,这是一个羟醛-克莱森酯缩合的反应,它包括以下 3 个步骤:

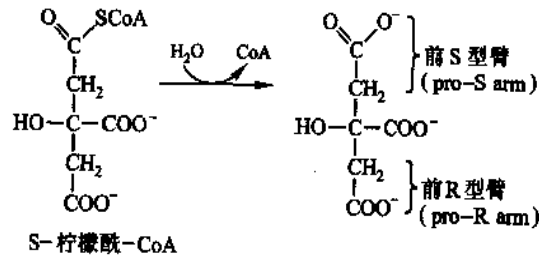
(1) 乙酰-CoA 负碳离子的形成是由于特定酶的组氨酸残基 (E-His) 以碱性催化夺去乙酰基的一个质子。酶-组氨酸成为 E-His·H⁺。CoA 的硫酯键使烯醇式负碳离子通过共振而稳定。即:



(2) 乙酰-CoA 负碳离子对草酰乙酸的羰基碳进行亲核进攻,反应所得柠檬酰-CoA (citryl-CoA) 仍然保持与酶成键。



(3) 柠檬酰-CoA 的水解,形成柠檬酸及 CoA

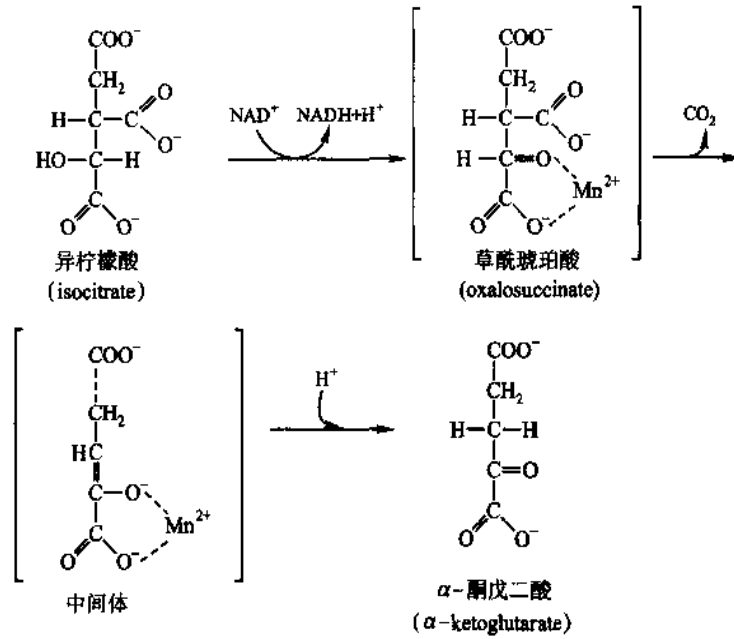


另外,在这反应中,该提及的是,酶促反应常是立体专一的。在烯醇-克莱森缩合的反应中,可以看到乙酰-CoA 负碳离子对草酰乙酸羰基碳的进攻是专一地进攻于 Si 面。因此所产生的全部是 S-柠檬酰-CoA。即乙酰-CoA 的乙酰基只专一地形成柠檬酸的前-S 羧甲基基团(即前 S 型臂)。

注:对 S、R、前-S (pro-S)、前-R (pro-R) 和 Si、Re 的解释见本节最后附录。

3. β-酮酸的氧化脱羧反应

这类反应是在异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase) 或脂肪酸合酶 (fatty acid synthase) 的催化下发生的。例如,在柠檬酸循环中由异柠檬酸脱氢酶催化的脱羧过程中,由 NAD⁺ 还原形成 NADH, 异柠檬酸氧化后形成 β-酮酸的中间体——草酰琥珀酸,此 β-酮酸发生脱羧反应,形成 α-酮戊二酸。反应式如下:



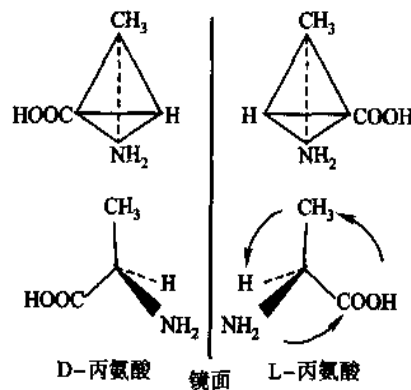
在哺乳动物组织中,有两种不同形式的酶,一种是参与柠檬酸循环的,从线粒体中分离获得的,在发生作用时 NAD^+ 是它的辅助因子。另一种在线粒体及细胞溶胶中都存在。以 NADP^+ 作为辅助因子。前者,即需要 NAD^+ 为辅助因子的异柠檬酸脱氢酶在发生作用的过程中还需 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 作为辅助因子参与反应。它先氧化二级醇的醇基(即异柠檬酸的一OH),使醇基转化为酮基即转化为草酰琥珀酸(oxalosuccinate),同时与 Mn^{2+} 离子发生静电结合并紧接着进行脱羧形成 α -酮戊二酸。

附录:1. RS-构型; 2. Pro-R 和 Pro-S; 3. re-面和 si-面的立体化学意义

在第一章糖类中已介绍过“手性”和“RS”构型问题。因为这些概念是立体化学中的一些基本问题,也是立体化学中的常用词。当前在生物代谢机制的探讨中已不罕见,因此有必要再从不同角度进一步明确这些概念。“手性”的英文为“chiral”,来源于希腊字母。碳原子有4个等同的价键,它们所取位置为:碳原子居金字塔中心,4个价键分别指向金字塔的4个顶端。如若碳原子与4个不同的原子(或基团)结合,其一般式为 C_{abcd} ,以实物为例,丙氨酸分子($\text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH}$)



的 α -碳即属这一类型。此时丙氨酸可有两个立体异构体:

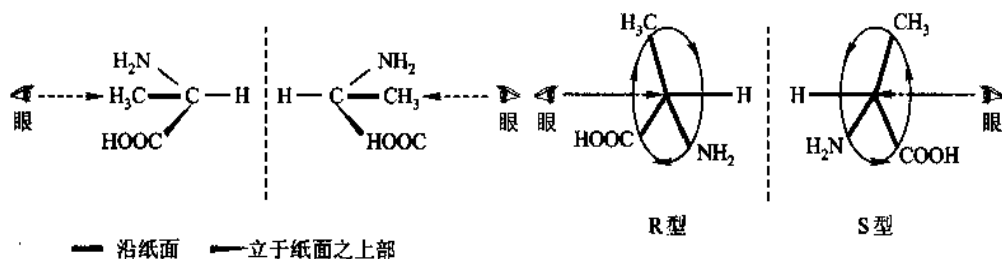


从它的主体结构式可以看出,这两个异构体是互为实物-镜像的关系,是不对称的。犹如左手和右手,因此称为“手性”。

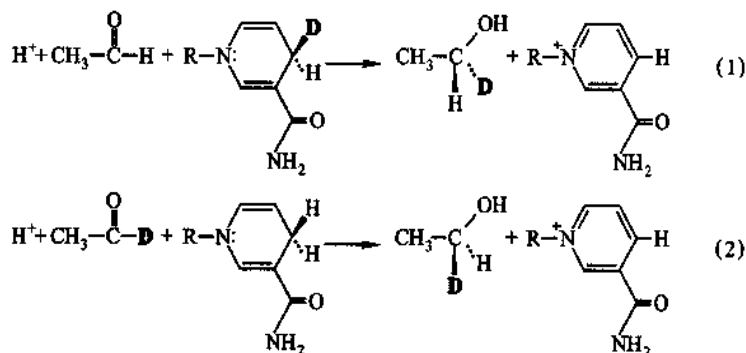
RS-构型可以无误地规定任何一个含有不对称碳原子的化合物的构型——即其空间的绝对构型。应用RS表示法的第一步是指定4个取代基(或原子)的位置顺序。其原则是①原子序数高的优先,非共价键的居末位;②若直接与碳原子连接的原子相同,考察这些原子被取代的其他原子,仍以原子序数高的优先;③取代基为不饱和基团者,不饱和基团优先;④取代基互为异构体的基团时,例如,一个为顺式,一个为反式,顺式者居先。以丙氨酸为例,4个取代基的顺序应定为 $\text{NH}_2 >$

COOH > CH₃ > H。下一步是旋转这个分子,使优先级最差的(此例为 H)距观察者最远。最后一步是考察其余 3 个取代基(或原子)的顺序。从最优先者(本例为 NH₂)到次优先者(COOH),再到更其次者(CH₃)的次序,(NH₂ > COOH > CH₃),自观察者看,是顺时针方向(R)? 还是反时针方向(S)? 顺序为顺时针方向的为 R-型(rectus,拉丁文),反时针方向的为 S-型(sinister)。由此决定其构型是 R-型或是 S-型。自然界大量存在的丙氨酸是 S-型。

以上 3 个集团的旋转观察情况可用下图表示:

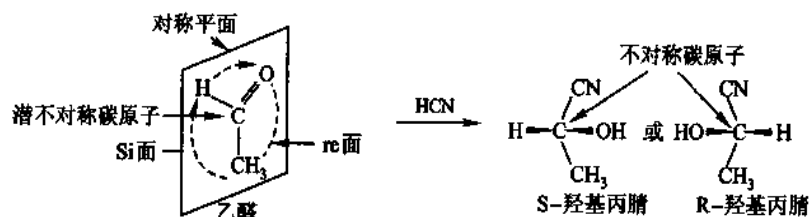


碳原子的 4 个取代基(原子)中若有 2 个相同,这个分子是对称的,称为前手性(prochiral),它意味着如果这相同的 2 个原子(基团)其中之一被置换,这个分子的对称的碳原子可能变成不对称的碳原子。例如,辅酶 NADH 对乙醛分子(不具有不对称碳原子)转移一个氢原子,若使用同位素氘 D 标记,可清楚说明问题。(1)式 D 标记在 NADH 上,(2)式标记在 CH₃CHO 上:



按上述 RS-构型的规则,D 优先于 H(D > H),这时 D 标记的产物乙醇就有了两种不同构型。上图的(1)式为 R,(2)式为 S。这样,(1)式的乙醛称为前 R 型(pro-R),(2)式的乙醛称为前 S 型(pro-S)。

以乙醇受到 HCN 的加成进攻为例,反应产物为 2 个不对称的羟基丙腈:



即乙醛分子是对称的,它具有一个对称平面,如图示,乙醛分子在对称平面(设为纸面)上的排布,按 RS-构型规则应为 O > CH₃ > H,是顺时针方向,为 R,因此纸面上部称为 re 面。向它进攻,称为 re-面的进攻。本例产物为 R-羟基丙腈。同样,纸面的背面称为 si 面。向它进攻称为 si-面的进攻,本例得到的产物为 S-羟基丙腈。

八、新陈代谢的研究方法

新陈代谢研究的生物机体,往往用“活细胞”来概括。活细胞(living cell)包括的范围很广。它包括单细胞生物、多细胞生物的细胞;也包括病毒(virus)、噬菌体(phage),它们介于生物和非生物之间,只有当寄生于其他生物的细胞中时,才表现代谢等生命现象。

代谢研究使用的研究材料是多种多样的。材料的选择主要根据研究目的和是否便于阐明问题。下面举出一些常用的研究材料,以及他们的拉丁学名供参考:

大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	大肠杆菌噬菌体 λ (<i>Bacteriophage - Lambda, \lambda</i>)
大肠杆菌噬菌 T4 (<i>Bacteriophage T4</i>)	枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
四膜虫 (<i>Tetrahymena thermophila</i>)	酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
红色面包霉 (<i>Neurospora crassa</i>)	小球藻 (<i>Chlorella vulgaris</i>)
玉米 (<i>Zea mays</i>)	果蝇 (<i>Drosophila melanogaster</i>)
海胆 (<i>Arbacia punctulata</i>)	爪蟾 (<i>Xenopus laevis</i>)
鸽 (<i>Columba livia</i>)	小鼠 (<i>Mus musculus</i>)
大鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)	兔 (<i>Lepus californicus</i>)
黑猩猩 (<i>Pan troglodytes</i>)	

当前已经阐明的新陈代谢途径是前人经过多年辛勤研究的总结。每一代谢途径的确立,都凝集着许许多多前人的智慧与实验成果。以柠檬酸循环(citric acid cycle)途径的研究为例,可以清楚地看到新陈代谢研究和其他科学研究一样,都有其规律性的发展。

柠檬酸循环作为一个完整的代谢途径是由 Krebs H A 于 1937 年提出的。柠檬酸循环的确立是近代生物学经典研究的一项推理和实验相结合的光辉成果。这项研究对以后的新陈代谢研究都具有重要的指导意义和推动作用。事实上这项研究绝非 Krebs 一人的创举,而是在前人许多研究成果的基础上逐步发展起来的。可举出前人研究的一些重要成果。

早在 1919—1920 年, Thunberg T, Battli F 和 Stern L S 等人的研究就发现动物肌肉组织的捣碎悬浮液能将琥珀酸、苹果酸以及柠檬酸等有机酸脱氢,使氧化型的甲烯蓝(methylene blue)(蓝色)转变为还原型的无色甲烯蓝分子。

20 世纪 30 年代初期,科学家利用气体测量法,测定动物组织利用氧的速率。最著名的气体测量仪是由 Warburg - Barcorft 发明的,称为瓦氏呼吸计(Warburg - Barcorft manometer)。它的结构参看图 19-1。用这种方法发现琥珀酸、延胡索酸(fumarate)、苹果酸、柠檬酸能迅速地被氧化为 CO_2 。

1935 年,匈牙利科学家 A. Szent - Gyorgyi 总结了前人的研究成果,并通过他的实验证实,提出一个琥珀酸由琥珀酸酶促氧化步骤的设想。他认为琥珀酸在酶的作用下,经过延胡索酸、苹果酸而后转变为草酰乙酸。他的重要发现是,往肌肉组织悬浮液中加入少量的草酰乙酸或苹果酸,使氧的利用量远远超过了这两种酸本身氧化为 CO_2 和水所需要的氧分子。在此发现的基础上,并参考其他人的研究成果,他提出草酰乙酸和苹果酸可促进肌肉组织内某些其他物质的氧化。

随后,德国的 Martius C 和 Knoop F 发现,柠檬酸通过顺 - 乌头酸异构化为异柠檬酸,后者可被酶氧化为琥珀酸。氧化过程的中间物为 α - 酮戊二酸。

在以上这些研究和发现的基础上 Krebs H A 于 1936 年开始研究各种二羧酸和三羧酸在组织氧化中的相互关系。他使用的是鸽子飞翔肌的匀浆悬浮液(homogenate suspension)。他的研究和推理最终使他能够提出柠檬酸循环途径(参看第 23 章,柠檬酸循环途径)。

这条途径又经过后人的不断验证和补充。特别是同位素标记化合物的使用,使柠檬酸循环途径的研究不断向深化发展。这条途径已证明成为一条确定无疑的、普遍存在于生物界的共同代谢途径。

下面再概括地列举一些新陈代谢研究中最常用的手段。也可以说是一些基本原则和途径。

新陈代谢的研究可以说,主要是对中间代谢进行研究。可从不同水平开展工作。用生物整体进行研究,称为体内研究。用拉丁语“*in vivo*”表示,是“在体内”的意思。用整体器官,或微生物细胞群进行研究也称为“*in vivo*”。

用器官组织制成切片、匀浆、或提取液作为材料进行研究,称为“*in vitro*”研究,是“在体外”或“在试管内”的意思,都属于体外研究。

近代科学技术的发展,为代谢研究的深化提供了有利条件。分离、纯化技术的发展,使代谢研究的取材可精细到分离、纯化个别的细胞以及细胞器,例如线粒体等。还可分离、纯化催化个别反应的酶以及分离中间代谢物等。测定中间代谢物曾经使用过如下的方法:

(一) 使用酶的抑制剂

酶的抑制剂(enzyme inhibitor)可使代谢途径受到阻断,结果造成某一种代谢中间物的积累,从而为测

定该中间代谢物提供可能。

用这种方法最早探明的代谢过程,是酵母的酒精发酵,即由葡萄糖(或淀粉)经过酵解途径形成酒精的过程(参看第22章)。在这项研究中,发现了一些代谢的抑制剂。这些抑制剂可在代谢过程的某些特定环节阻滞有关酶的作用,结果造成受该酶作用的中间代谢物的积累。例如,碘乙酸(iodoacetate)造成酵母发酵液中积累果糖-1,6-二磷酸(由于抑制了醛缩酶的作用)。氟化物造成甘油酸-3-磷酸和甘油酸-2-磷酸的积累(由于抑制了烯醇化酶的作用)。对这些代谢中间物的分离、纯化和鉴定,为阐明糖酵解途径提供了直接的证据。对酶的分离、纯化和对代谢中间物的分离、纯化,使得在试管内对某一特定的反应进行验证实验成为可能。

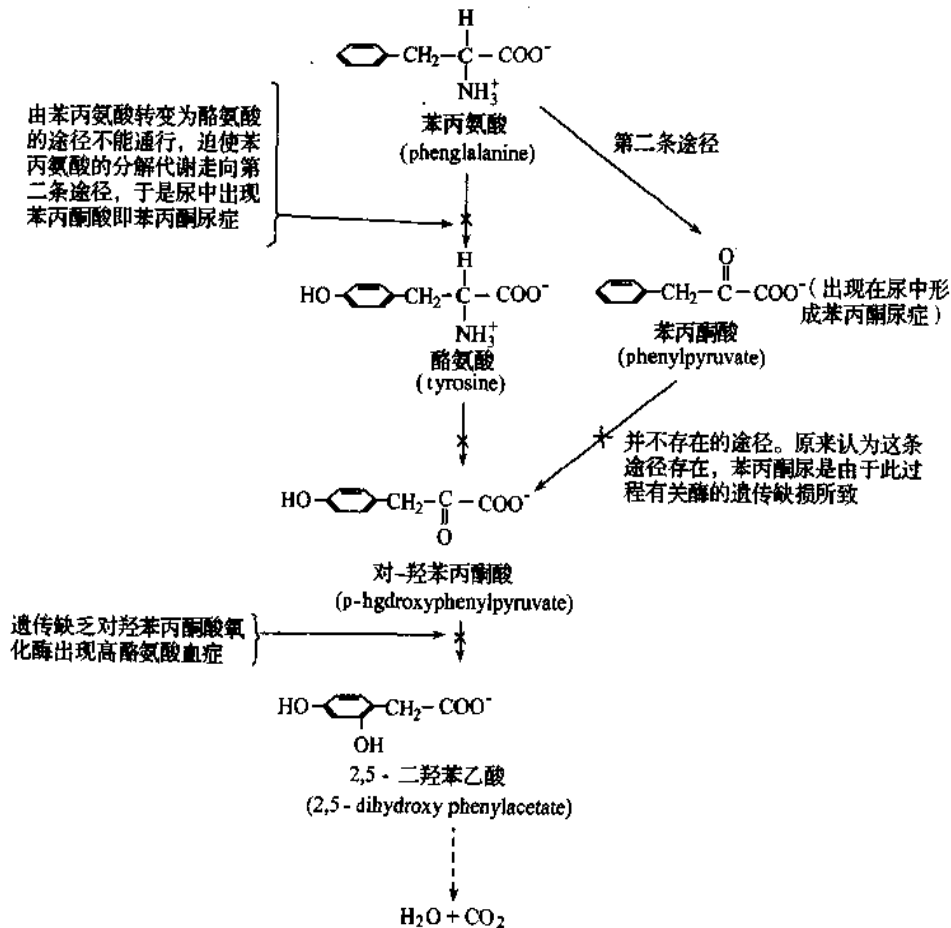
又例如,在研究氧化呼吸链过程中(参看第24章),用电子传递的抑制剂选择性地阻断呼吸链中某个特定的电子传递步骤,再测定呼吸链中各个组分的氧化-还原情况,成为研究电子传递顺序的一种重要手段。

(二) 利用遗传缺欠症研究代谢途径

患有遗传缺欠症的病人,由于先天性基因的突变,在体内往往表现为缺乏某一种酶,致使为该酶作用的前体不能进一步参加代谢过程,从而造成这种前体物的积累。这些代谢中间物因不能进一步利用而出现在血液或随尿排出体外。测定这些代谢中间物有助于阐明有关的代谢途径。

例如,先天缺乏尿黑酸氧化酶的病人酪氨酸的代谢中间物尿黑酸(homogentisate)不能氧化而随尿排出体外,在空气中使尿变为黑色。从尿中检测出尿黑酸,由此而推测出尿黑酸是酪氨酸正常分解代谢的中间物。

又例如,由遗传缺欠产生的苯丙酮酸尿症(phenylketonuria),若婴儿患此疾病不加治疗,就会发生剧烈的精神障碍。这种遗传疾病也是苯丙氨酸发生异常代谢的结果,这时尿中出现苯丙酮酸(phenylpyruvate)。但酪氨酸的代谢仍然正常。通过以上两种不正常的代谢现象,使苯丙氨酸的代谢途径得到了阐明,如下图:



由人类先天性代谢缺欠症研究的启发,人们进一步使用微生物的基因突变型研究代谢途径。利用各种诱变法,例如,X射线照射法,引起微生物的基因发生突变。这种突变型微生物可能造成酶或代谢途径的缺乏。这种方式已成为研究代谢机制的重要工具,也成为研究分子生物学的重要方法。

例如,将正常生长的红色面包霉(*Neurospora crassa*)(称为野生型, wild type)用X射线照射后,由于基因发生了突变而造成在原有简单培养基中不能正常生存的营养缺陷型突变体(autotrophic mutants)。突变体失去了自身制造精氨酸的能力。必需在培养基中补加精氨酸才能正常生存。经深入探索,发现X射线引起基因的突变,不是只在特定的部位发生。在精氨酸合成过程中,各种酶的基因都有可能发生突变而导致在合成不同阶段上酶的缺失。对这类突变型,只有在培养基中添加有关酶作用后的产物,正常生长才能维持。这类不同的缺陷型使得能够一步步阐明精氨酸的生物合成。

又例如,对能够生长在乳糖培养基的大肠杆菌(*E. coli*)进行突变诱导后,形成一种不能在乳糖培养基上生长的突变型。这种突变型经研究发现,缺失了能够将乳糖分解为半乳糖和葡萄糖的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)。从而进一步阐明了乳糖的代谢机制。

利用微生物的遗传突变型研究新陈代谢机制,比利用其他生物有很多优越性。它不只容易引起突变,而且经济、简便。许多代谢途径的中间步骤都是利用这种方法得以阐明的。

(三) 气体测量法(manometric method)

气体测量法是用以研究包含有气体变化的生物化学反应,从20世纪40年代到50年代相当流行。这种方法主要是利用代谢过程中气体(例如氧气)的消耗或产生二氧化碳的变化量来探知新陈代谢情况。测定气体变化需要有特别精密的、能测出微量气体变化的仪器。早在19世纪20年代瓦勃氏(Warburg O)就开始利用这种方法研究代谢变化。他创造了瓦氏呼吸器(英文为 Warburg - Barcroft apparatus)(图 19-1)。

这个仪器由两个主要部分构成。一部分是供给代谢物进行反应的装置。它是一个反应瓶,里面可放进行代谢反应的组织切片,组织匀浆或组织提取液以及供给组织利用的反应物等。在反应瓶中央往往还设有一个小池,可放入 CO_2 的吸收剂,如KOH等。组织代谢产生的 CO_2 立即可由小池内的碱将其吸收。另一部分装置是量气装置,是一个U形管,内装有水银或其他用于气体测量的专用液体。两部分联通起来。反应瓶内消耗的空气或氧气使U形管内的平衡液体产生压差,利用压差即可计算出组织呼吸的情况。根据实验设计,可测定酶系统以及代谢作用的程度等。

目前我国的味精发酵工业大多仍使用气体测量法测定发酵液内谷氨酸的含量。将含有谷氨酸的发酵液加入谷氨酸脱羧酶。该酶将谷氨酸脱羧而产生 CO_2 。测出 CO_2 的排出量即可计算出谷氨酸的含量。这种方法比其他方法简便,有利于及时掌握发酵罐内的发酵情况。

(四) 同位素示踪法

早在同位素示踪法应用之前,1904年德国科学家 Franz Knoop 就开始应用标记化合物示踪法研究脂肪酸的代谢(参看第28章)这就是著名的脂肪酸 β -氧化学说。

在随后的研究中,科学家改用同位素示踪法。用同位素来标记化合物具有无比优越性。因它不改变

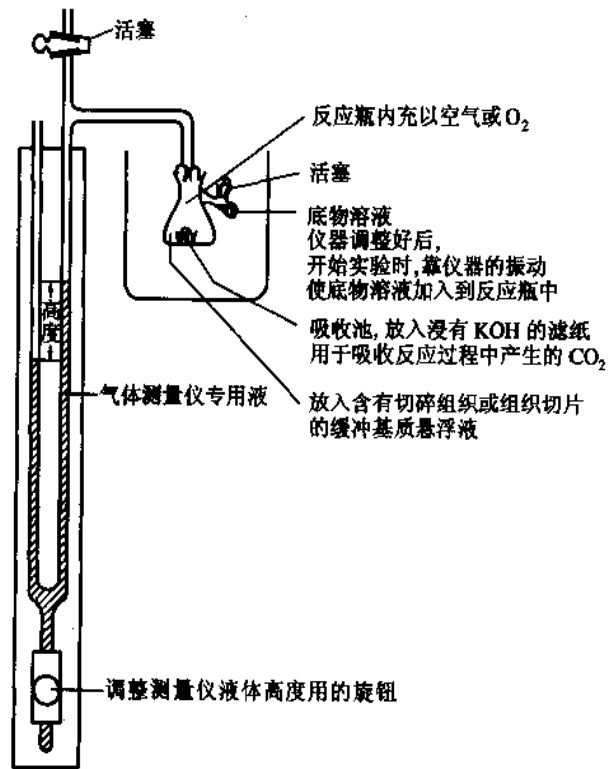


图 19-1 瓦氏呼吸器的结构示意图

被标记化合物的化学性质。化合物的标记,可根据需要来选定不同的同位素和不同标记部位。例如,标记 α -氨基酸的 α -氨基,用同位素 ^{15}N 标记后成为 α - $^{15}\text{NH}_2$ 。测定含有 ^{15}N 的化合物,须用质谱测定仪(mass spectrometer)。氮转化为气体后,产生不同的质量。普通氮气的质量为28(^{14}N , ^{14}N),带有同位素氮的氮气质量为29(^{15}N , ^{14}N)。用重氢标记的化合物经过燃烧形成重水 D_2O ,与普通水的质量也可加以鉴别。

当代最常使用的方法是放射性同位素示踪法。放射性同位素可用人工方法制得。他们有一定的半寿期或称半衰期(half-life),是不稳定的同位素。常用的放射性同位素有氚(tritium, T 或 ^3H)、碳14(^{14}C)、磷32(^{32}P)、硫34(^{34}S)、碘131(^{131}I)等。

以下一些放射性同位素半寿期(半衰期)和放射线类型可供参考。

常用放射性同位素表

同位素名称	符号	放射线类型	半寿期
氢3(氚)	^3H , T	β -	12.26年
碳14	^{14}C	β -	5730天
磷32	^{32}P	β -	14.3天
碘131	^{131}I	β -	8.070 ± 0.009 天
硫34	^{34}S	β -	87.1天

放射性同位素的放射性可用不同的技术加以测定。在生物化学研究中,最常用的是正比计数法(proportional counting)。最简单的计数器是盖格计数器(Geiger counting)。此外还常使用液体闪烁测定法(liquid scintillation counting)和放射自显影法(autoradiography)。正比计数法是测定由放射线通过对闪烁器内某种物质的冲击,使之产生离子化,并能放出闪光。经光电倍增管把光转变为电子脉冲的振幅。经倍增管放大后,即可加以检测。这种测定法对于穿透力较强的 γ 射线比较适合。而对于穿透力较小的 β 射线(^3H 和 ^{14}C)则不易穿透到闪烁器内。而液体闪烁仪正是为改进这种不足而设计的。液体闪烁仪是使用一种芳香族的溶剂和同位素化合物或是溶解,或是悬浮。这种芳香族溶剂受到射线激发时,即产生荧光,即是发射光。这种发射光可用电子仪器进行测定。

放射自显影法是将带有放射性标记的化合物与照相的感光片放在一起,利用放射性能使感光片感光的性质测定感光片变黑的部分。

最早使用天然同位素的研究成果是Rudolf Schoenheimer的工作,他在1941年发表的“机体组成分的动态”(The Dynamic State of Body Constituents)一书中叙述了用天然同位素标记的营养素喂饲小鼠的许多实验研究。他发现天然同位素掺入了肝脏、肠壁、肌肉、皮肤等组织。还发现标记的氨基酸进入了血清中的球蛋白、抗体、清蛋白等。应用重氢标记的软脂酸喂饲小鼠,发现重氢掺入到小鼠体内的许多其他脂肪酸。Schoenheimer R的一系列实验证明了生物机体虽然从表面上看,保持着恒定状态,但实际上并不是恒定不变的。生物有机体在不断地进行新陈代谢,体内各种物质在不断地更新。1952年英国剑桥大学生物化学系的教授Ernest Baldwin发表了“动态生物化学”(Dynamic Aspects of Biochemistry 2nd ed, 1952)一书,对于用动态观点进行生物化学教学起到重要作用。这本书已成为一本经典著作。

1945年David Shemin和David Rittenberg首先成功地用 ^{14}C 和 ^{15}N 标记的乙酸和甘氨酸证明了血红素(heme)分子中的全部碳原子和氮原子都来源于乙酸和甘氨酸(参看第31章血红素的生物合成)。

胆固醇分子中碳原子的来源也是用同样的同位素示踪法得到阐明的。胆固醇的碳原子来源于乙酰辅酶A(参看第29章胆固醇的生物合成)。

当前在生物化学以及分子生物学的研究中,同位素示踪法已成为一种重要的必不可少的常规先进技术。仅就新陈代谢而言,无论在代谢反应的顺序方面,代谢的机制方面,代谢的调控方面等等都可举出许许多多的例证。

(五) 核磁共振波谱法

核磁共振波谱法的英文是 nuclear magnetic resonance spectroscopy, 简称 NMR。核磁共振波谱法的设计所根据的一些基本原理, 可作如下定性的理解: 首先根据的是原子核的自旋运动。原子核始终处于自旋运动状态, 它的自旋方向在一定条件下总是取一定的角度。原子核是带有正电荷的粒子(也称质子), 由于它的旋转便产生一定方向的磁场, 称为磁矩。磁矩与核的角运动量成正比关系。

如果将带有磁性的自旋核放在外加磁场中, 磁矩与外加磁场就相互作用。不同状态的核, 在外加磁场中的旋转取不同的方向。每种取向各有与之相应的能量。能量低的低能态核的磁矩与相应的外加磁场的方向相反。

如果以适当频率的电磁波照射于外加磁场中的自旋核, 这时处于低能态的自旋核, 就会吸收电磁波的能量, 从低能态跃迁到高能态。这种现象称为核磁共振现象。这时的核产生一种核磁共振信号, 从而给出核磁共振谱(即 NMR 谱)。据此核磁共振谱可反映分子中各个原子所处的状态。这是其他分析手段(红外、紫外、圆二色性及质谱)所不能的。这个方法最早由物理学家布洛赫(Bloch)及巴赛尔(Purcell)建立(1948年)的。由此, 他们获得了 1952 年诺贝尔奖。

发生共振时, 照射频率的大小取决于外加磁场的强度, 如果固定照射频率, 对不同的核来说, 磁矩大的核若发生共振, 它所需外加磁场的强度将小于磁矩小的核。即原子核发生共振所需的照射频率, 也就是共振频率, 是由外加磁场强度和核的磁矩所决定。

另一方面, 原子核的外部是被电子所包围的。这些核外电子由于不停地转动而产生一种环电流, 并产生一个与外磁场方向相反的次级磁场。这种对外加磁场的作用称为电子屏蔽效应。由于电子屏蔽效应, 原子核受到的磁场强度不完全与外加磁场强度相同。实际上, 原子核受到的磁场强度等于外加磁场强度减去其次级磁场强度。在分子中处于不同化学环境中的原子核, 其核外电子云的分布也各不相同。因此, 不同化学环境中的原子核受到不同程度的屏蔽作用。核外电子云的密度越大, 屏蔽作用也越大。若固定照射频率, 受到屏蔽作用大的原子核, 其共振信号出现在外加磁场较高的部位, 小的, 则出现在外加磁场强度低的部位。换言之, 受到不同程度屏蔽作用的原子核, 也就是不同分子中的各个原子核, 在受到一定频率照射时, 他们吸收电磁波的能量必然有所差异。这种现象称为化学位移。可以说, 化学位移反映原子核所处的特定化学环境。

但是, 化学环境不同的氢核, 化学位移的变化, 只有百万分之十左右。因此, 一般乃是测定位移的相对值。方法是以适当的化合物, 如四甲基硅烷(TMS)为标准试样, 测定相对的共振频率变化来表示化学位移。据此, 就可以获得分子结构的信息。

近代高分辨的核磁共振谱的技术及应用, 是由李查德·恩斯特(Richard Ernst)所开发的。因此, 他获得了 1991 年诺贝尔化学奖。

自然界中具有磁矩的同位素有 100 多种, 但至今为止, 研究最多的则只有几种核的共振行为。除(^1H)谱外, 研究最多、应用最广的是碳(^{13}C)谱, 其次是氟(^{19}F)、(^{31}P)谱和氮(^{15}N)谱。

^1H 谱可以提供分子“外围”结构信息, ^{13}C 谱可以获得有机化合物分子“骨架”的结构信息。例如 ^{13}C 谱可直接得到羰基($\text{C}=\text{O}$)、腈基($\text{C}\equiv\text{N}$)和季碳原子等信息。

核磁共振的分析对于样品不加任何破坏, 因此, 在生物体的研究得到广泛的应用。样品不仅不受损害, 可以完美地实现“*in vivo*”的实验, 而且最能反映机体内化学反应的真实情况。这是生物化学研究中至关重要的。

在生物化学、生理学以及医学等方面都广泛使用 NMR 技术对生活状态的人体进行研究, 在对骨骼肌、心肌和脑等方面都取得了重要的研究成果。最为人知的实验是 1986 年用 NMR 对人体前臂肌肉在运动前和运动后的比较。这项研究是以测定磷谱为基础。

有趣的是, 由人体前臂肌肉测得的磷谱只表现为 5 个明显的峰谱。这 5 个峰谱中的 3 个来自于 ATP 的 α 、 β 、 γ 3 个磷原子; 另外两个来自于磷酸肌酸和无机磷酸的磷原子。ADP 和其他磷酸化合物, 因为浓度或因其磷原子不能自由旋转或转动过于缓慢, 而不表现明显的光谱峰。

实验表明,人的前臂在运动前和经过 19 分钟的运动后所显示的磷谱有明显的变化,磷酸肌酸显示出的峰明显降低,而由无机磷酸显示出的峰则明显升高;但 ATP 的 3 个磷原子所显示出的峰谱却几乎没有变化。实验结果如图 19-2 所示:

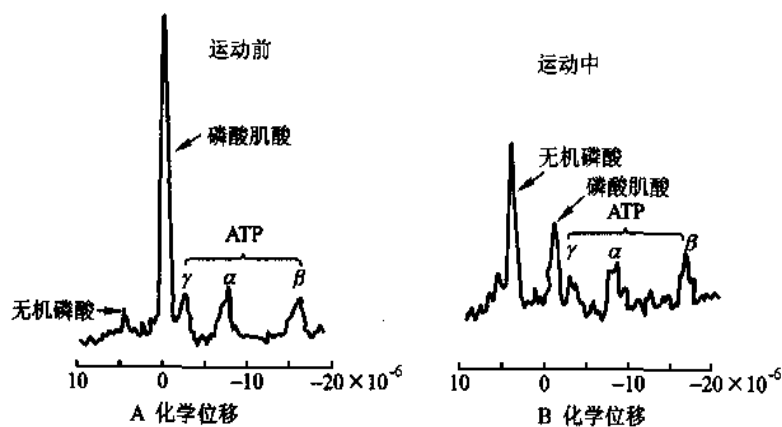


图 19-2 人体前臂肌肉在运动前后磷酸肌酸、无机磷酸和 ATP 三个磷酸基团的³¹P NMR 波谱
A. 运动前, B. 运动 19 分钟后; A 为 256s 内的波谱, B 为 645s 内的波谱

这个实验生动地表明了人体代谢随机体的活动所发生的动态变化,也表明了肌肉运动时 ATP 的恒定水平是由磷酸肌酸提供的磷酰基维持的。

提 要

新陈代谢是生物体内一切化学变化的总称,是生物体表现其生命活动的重要特征之一。它是由多酶体系协同作用的化学反应网络。

代谢过程中连续转变着的酶促产物称为代谢中间物。代谢过程中的个别步骤、个别环节称为中间代谢。各种物质在体内经过代谢,最终都转变为代谢的最终产物。

新陈代谢的功能可概括为五个方面:①从周围环境中获得营养物质。②将外界引入的营养物质转变为自身需要的结构元件。③将结构元件装配成自身的大分子。④形成或分解生物体特殊功能所需的生物分子。⑤提供机体生命活动所需的一切能量。

新陈代谢途径包括生物界具有普遍性的共同规律,这些共同规律称为主要代谢途径。

新陈代谢包括分解代谢和合成代谢两个方面。机体将营养物质转变为较小、较简单的物质称为分解代谢。合成代谢是机体利用小分子或大分子的结构元件建造成大分子。这种过程是需能过程。同一种物质的分解代谢和合成代谢途径往往是不同的。这使生物体对代谢的调控具有更大的灵活性和应变能力。分解代谢和合成代谢存在一些双方都可利用的两用代谢途径,这也使机体细胞的代谢具有更多的灵活性。

生物体的一切生命活动都需要能量。如果没有能量来源,生命也就停止。太阳能是所有生物最根本的能量来源。具有叶绿体的生物,通过光合作用,将太阳能转变为化学能。例如,利用 CO₂ 合成葡萄糖。靠外界营养物质为生的生物(异养生物)利用分解代谢将营养分子,例如,葡萄糖中蕴藏的能量释放出来,用以做功,维持生命活动。这种能够用以做功的能量称为自由能。机体利用自由能所做的功,是在常温、常压下进行的。机体内捕获和贮存自由能的分子是 ATP。机体在分解代谢中产生自由能的过程可大致分为三个阶段:第一阶段由营养物的大分子分解为较小的分子。第二阶段小分子进一步转变为少数几种共同物质,例如乙酰-CoA 等。第三阶段由柠檬酸循环和氧化磷酸化两个共同代谢途径组成。是形成 ATP 的主要阶段。

以 ATP 形式贮存的自由能,提供以下四方面对能量的需要:①生物合成;②肌肉收缩;③营养物逆浓度梯度跨膜运送;④在 DNA、RNA、蛋白质等生物合成中,以特殊方式起递能作用。

ATP 不断地处于动态平衡的周转之中。严格地说,它是一种传递能量的分子(很多书将他称为生物体内的流通“货币”。这种提法虽已流行,但不甚确切)。

能够提供能量的核苷酸类分子除 ATP 外,还有 GTP、UTP、CTP 等。

营养物质在分解代谢中释放出的化学能,除用于合成 ATP 外,还可以氢原子和电子的形式将自由能转移给生物合成的需能反应。具有高能的氢原子是由脱氢酶催化的脱氢反应产生的。脱氢酶将脱下的氢原子和电子传递给辅酶 I 和辅酶 II,通过辅酶 I 和辅酶 II,将氢原子和电子传递给生物合成中需要还原力的反应。此外还有 FMN 和 FAD 都能接受两个电子和两个氢原子,特别在氧化呼吸链中起着重要的传递电子和氢原子的作用。

乙酰-CoA 具有高的乙酰基转移势能,在需乙酰基的反应中起着重要的提供乙酰基的作用。

生物机体的代谢有着完整精密的调节机制,使它能够适应内外复杂的环境变化,从而得以生存。代谢的调节有多种方式。酶的数量受到合成与降解速率的控制,酶的活性受到变构效应、共价修饰以及环境中底物和产物浓度等条件的调节,区域化作用以及生物合成与降解选择的不同途径等都对代谢的调节起到一定作用。高等真核生物由于分化出执行不同功能的各种器官而使代谢受到合理的分工安排。多细胞生物还受到整体水平上的神经和激素调节。对于高等动物,还有高级神经活动的调节。此外,对各种生物都有基因表达的调控作用。

新陈代谢的研究方法是多种多样的,在测定中最为常用的手段是同位素示踪法。近年来兴起的核磁共振波谱法对于生物化学、生理学以及临床医学的发展都将起无比优越的作用。

习 题

1. 怎样理解新陈代谢?
2. 能量代谢在新陈代谢中占何等地位?
3. 在能量贮存和传递中,哪些物质起着重要作用?
4. 新陈代谢有哪些调节机制? 代谢调节有何生物学意义?
5. 从“新陈代谢总论”中建立了哪些基本概念?
6. 概述代谢中的有机反应机制。
7. 举例说明同位素示踪法和 NMR 波谱法在生物化学研究中的重要作用。

主要参考书目

1. 沈同,王镜岩主编. 生物化学. 第二版下册. 北京:高等教育出版社,1991
2. 沈仁权,顾其敏主编. 生物化学教程. 北京:高等教育出版社,1993:292 ~ 297
3. 赵藻潘等. 仪器分析. 北京:高等教育出版社,1991:109 ~ 129
4. 陈守良编著. 动物生理学. 第二版. 北京:北京大学出版社,1996
5. 陈守良,贺嘉严,吴鹤龄,葛明德,汪劲武编著. 人类生物学. 北京:北京大学出版社,2001
6. Lehninger A L. Biochemistry, The Molecular Basis of Cell Structure and Function. 2nd ed. Worth Publishers, 1990:363 ~ 386
7. Lehninger A L. Principles of Biochemistry, Worth Publishers, 1982:333 ~ 357
8. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. Worth Publishers, 2000: 485 ~ 869
9. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. Freeman W. H. and Company, 1995:443 ~ 459
10. Voet D, Voet J G. Biochemistry. 2nd ed, John Wiley & Sons Inc., 1995:412 ~ 795

(王镜岩、文重)

第 20 章 生物能学

生物能学(Bioenergetics)是深入理解生物化学特别是理解生物机体新陈代谢规律不可缺少的基本知识。它是生物化学中涉及生活细胞转移和能量利用的基本问题。生物能学完全建立在热力学的基础上,因此,为了理解生物能学,有必要重温一些关于热力学的基本概念。

一、有关热力学的一些基本概念

(一) 体系的概念、性质和状态

热力学经常使用的两个名词,一个是体系(system),一个是环境(surroundings),体系又称为系统或称物系。热力学中所说的体系指的是在研究中所涉及的全部物质的总称,换言之,体系是在一个限定范围内的物质。也有人称之为:人们进行研究的宇宙的一部分。环境又称为外界;指的是,除规定体系以外的物质总称,也就是与体系直接相互作用的外界。可用图 20-1 简单地表示它们之间的关系。

在恒温恒压下的反应,体系和环境之间可以交换能量。但能量的交换必须遵循热力学定律。即:“宇宙”的总能量是恒定的。(体系 + 环境) = 恒定值。当系统进行物理的或化学的变化时,宇宙的熵值增加,同时体系的自由能下降。伴随着这些变化有热量的变化。或是由体系流向环境,或是由环境流向体系都遵守以下的关系: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ 。

根据体系与环境之间的不同关系,可将体系分为三种类型:凡与环境之间有物质交换和能量传递的体系称为开放体系(open system);凡与环境之间只有能量传递而不能发生物质交换的体系称为封闭体系(closed system);凡与环境不能以任何形式发生作用的,即无能量传递也无物质交换的体系,称为隔离体系(isolated system)。生物体都属于开放体系。

一个体系的性质包括压力、体积、温度、组成、比热及表面张力等等。热力学正是用体系的这些性质来描述一个体系所处的状态。当体系的各种性质确定之后,这个体系也就有了确定的状态。反之,当一个体系的状态确定之后,这个体系的各种性质也就有了确定的数值。热力学把这种性质与状态之间的单值对应关系称为状态函数。一个体系所处状态的微小变化,都必然引起状态函数的微小变化。应注意的是,状态函数的变化只与体系状态变化的始态和终态有关,而与状态变化的过程无关。

(二) 能的两种形式——热与功

能的表现形式可有多种多样。其中热与功是能的两种主要形式。热与功是一个体系的状态在发生变化时与环境交换能量的两种形式。热是由于温差而产生的能量传递方式。热的传递总是伴随着质点的无序运动。功是体系与环境间另外一种能量交换方式。例如,体积变化以对抗外界压力、表面积变化以对抗表面张力、对抗外电场的电功、机械功等等都是做功。任何一种功都伴随着体系质点的定向移动。这是一种有序的运动。

(三) 内能和焓的概念

内能(internal energy)是体系内部质点能量的总和,通常用符号 U (或 E)表示。体系内部每个质点的能量都与体系的性质、结构、运动状态及其相互作用等情况有关。因此,内能 U (或 E)是体系状态函数的函数。内能本质是由于分子的平动能、转动能、振动能、电子能、电子与核的相对静止质量能及分子间相互作用的势能等等所形成。由此可见,内能的绝对值是无法测量的。但是,当一个体系的状态发生变化时,其内能的改变量却是可以测定的。也就是说,如果体系的状态确定了,内能也就成为某一固定值。实验证明,内能只与确定了的状态有关,而与如何达到这个状态无关。也就是说与达到某个状态的途径无关。

焓又称为热焓(enthalpy),用符号 H 表示。焓也是体系的一个状态函数。它是一个体系的内能与其全部分子的压力和体积总变化之和。由于体系内各种质点之间有碰撞,而使质点之间具有相互作用。焓所涉及的是体系内质点之间的相互作用和质点自身的能量。焓的变化称为焓变,用符号 ΔH 表示。焓变和内能变化之间的关系可用下式表示:

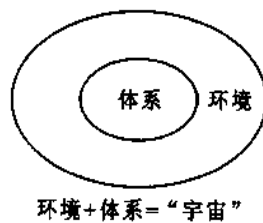


图 20-1 反应体系和
周围环境图解

$$\Delta H = \Delta U + \Delta PV \quad (1)$$

式中: ΔH —焓变;

ΔU —内能的变化,也可用 ΔE 表示;

ΔPV —压力(P)和体积 $\Delta(V)$ 的变化。

有了以上的一些基本概念,就不难理解有关热力学的两个基本定律。

(四) 热力学第一定律(first law of thermodynamics)

热力学第一定律称为能量守恒定律。这一定律指出,一个体系及其周围环境的总能量是一个常数。虽然能的形式可以转变,但不会消灭。

体系与环境是宇宙总内能的两个功能部分。无论能量从体系流向环境或从环境流向体系,宇宙的总内能不发生变化。任何一个特定体系有两种方法可以从环境得到能量或给予环境能量。一种是从环境得到热量或给予环境热量;另一种是对环境做功或环境对体系做功。如果一个体系的状态发生了变化,这个体系的内能也必然发生变化。体系内能的变化等于该体系所吸收的热量减去它所做的功。

热力学第一定律的数学表达式如下:

$$\Delta U = Q - W \quad (2)$$

上式中: ΔU —一个体系的内能变化(在有些书中用 ΔE 表示);

Q —体系变化时吸收的热量;

W —代表体系所做的功。

如果体系的内能发生了微小变化,这个微小变化用下式表达:

$$dU = dQ - dW \quad (3)$$

式中: dU —体系内能的微小变化;

dQ —体系吸收的微小热量;

dW —体系所做的微小功。对以上的公式可以进行如下的推导:

对于一个等压过程,体系只做体积功,不对环境做功,于是 $dW = PdV$,则(3)式可改写为:

$$dU = dQ - PdV \quad (4)$$

式中: dU —内能的微小变化;

dQ —热量的微小变化;

P —压力;

dV —体积的微小变化;

PdV —体系所做的微小体积功。

同理,体系焓的微小变化可用下式表示:

$$dH = d(U + PV) = dU + PdV + VdP \quad (5)$$

式中: dH —焓的微小变化;

dU —内能的微小变化;

P —压力;

dP —压力的微小变化;

dV —体积的微小变化。

将(4)式代入(5)式则:

$$dH = (dQ - PdV) + PdV + VdP \quad (6)$$

式中: dH —焓的微小变化;

dQ —热量的微小变化;

P —压力;

dP —压力的微小变代;

V —体积;

dV —体积的微小变化。

因 $(dQ - PdV)$ 为(4)式的 dU 值,对于只作体积功的体系,其焓可用下式表示:

$$dH = dQ + VdP \quad (7)$$

(4)式和(7)式中的 dQ 、 P 、 V 、 dP 、 dV 都是可测得的数值。由此即可求得 dU 和 dH 之值。

对于体积不改变的过程, $dV = 0$, 所以:

$$dU = dQ \text{ 或写成 } \Delta U = Q_V \quad (8)$$

对于压力不变的过程, $dP = 0$, 所以:

$$dH = dQ \text{ 或写成 } \Delta H = Q_P \quad (9)$$

从上面的推导可以看出, 在恒容(体积不变)条件下, 体系吸收的热量, 在数值上等于体系内能的改变量; 在恒压(压力不变)条件下, 体系吸收的热量, 在数值上等于体系焓的改变量。

生物体系是一个开放体系。这种体系的特点是体系和周围环境既有物质交换又有能量传递。在生物体内, 绝大多数生物化学过程都是在压力近似不变的条件下发生的, 所以在这些过程中, 体系所吸收或放出的热量就是该体系的焓变。而且绝大多数生物化学过程都是在液体或固体中进行的, 所以体积变化很小。因此, 可以把生物化学过程近似地看成恒压、恒容过程, 即 $dP = 0, dV = 0$, 因而 ΔH 近似地等于 ΔU ($\Delta H \approx \Delta U$)。在生物化学中往往忽略 ΔH 和 ΔU 的差别, 而简称与某一反应伴随的“能量变化”。

(五) 化学能的转化

不同的化学物质含有不同的化学能。化学物质所含的能量可以在其发生反应时转换为其他形式。例如, 光合作用, 将光能转换为化学能。这些化学能便蕴藏在所形成的化学物质中。异养生物又通过代谢将化学物质中所含的能量释放出来加以利用, 将其转换成机械功或提供给生物合成等的需能反应。在代谢过程中, 生物体将引入机体的化学物质一步步转换为含较低能量的新化学物质同时释放出自由能和热。

当化学物质完全氧化(燃烧)时, 化学能大量转变为热能, 称为燃烧热。燃烧热的定义是: 将一摩尔的有机化合物完全氧化所释放出的最大能量。燃烧是一种激烈的氧化形式。在缓慢的氧化作用中, 化学物质所释放的能量等于这一物质所具有的化学键能与其氧化产物所含化学键能之差。氧化作用所放出的总能量的多少, 与该物质氧化的途径无关, 只要在氧化后所生成的产物相同, 释放出的总能量必然相等。

生物氧化是化学物质在机体内进行的氧化作用。生物氧化的最终产物和燃烧一样, 也是二氧化碳和水。但生物体内的氧化过程是缓慢地, 逐步地将能量释放出来, 其中大部分能量转移到一些特殊的化合物中。

例如, 葡萄糖在体外燃烧所释放的能量为 2868.852 kJ/mol (相当于 686 kcal/mol)。在生物体温的条件下, 逐步氧化为二氧化碳和水, 仍释放同样的能量, 但葡萄糖在体内的氧化不是一次完成的, 而是分成许多阶段进行; 其所蕴藏的能量也是逐步地释放出来。其中大部分能量都转移到特殊的贮能化合物 ATP 中。

(六) 热力学第二定律和熵的概念

热力学第二定律指出: 热的传导只能由高温物体传至低温物体。热的自发地逆向传导是不可能的。第二定律说明, 热力学体系的运动有一定的方向性, 即自高温流向低温。

生活经验告诉我们, 有许多过程在一定条件下可以自发地进行。例如热从高温物体自动传给低温环境; 金刚石与氧气有可能自发地反应, 生成二氧化碳。以上的相反过程不能自发地进行。这些能够自发进行的过程称为自发过程。

当热自高温物体传给低温环境时, 即把原来集中于高温物体的能量分散到与它相联系的环境的质点中。这表明能量分散的程度增大。相反的过程是不可能自发进行的。金刚石生成二氧化碳也是一个能量由比较集中成为更分散的过程。自发过程的共同特征就是所有这些过程都向能量分散程度增大的方向进行。一个体系中能量分散的程度是该体系中大量微观质点进行各种运动的综合表现从而汇集成一种宏观性质。这种性质随体系的状态而变化, 也就是该体系的状态函数。这个代表体系能量分散程度的状态函数, 笼统地称为熵(entropy), 用符号 S 表示。熵值也可以说是代表一个体系质点散乱无序的程度。一个体系的质点当变为更混乱时, 它的熵值增加。熵的变化用 ΔS 表示, 是正值。

热力学第二定律还可作如下的叙述: 在隔离体系中, 一个过程只有当其体系和周围环境的熵值总和增加时才能自发进行。隔离体系的熵变可用下式表示:

$$\Delta S = \frac{Q_{\text{可逆}}}{T} \text{ 或 } dS = \frac{dQ_{\text{可逆}}}{T} \quad (10)$$

式中: Q —隔离体系的热量;

T —体系的热力学温度(绝对温度);

ΔS —体系的熵变。

隔离体系的熵变(ΔS)又等于体系的熵变与环境熵变的总和,可用下式表示:

$$\Delta S = \Delta S_{\text{体系}} + \Delta S_{\text{环境}} \geq 0 \quad (11)$$

式中: ΔS —总熵变;

$\Delta S_{\text{体系}}$ —体系的熵变;

$\Delta S_{\text{环境}}$ —环境的熵变。

式中的等号表示可逆过程。可逆过程的熵变等于零。此时体系处于平衡状态。不等号大于零表示不可逆过程,体系的熵增加。事实上,所有实际发生的自发过程,都是不可逆的。其熵总是增加的,直至增加到最大可能值时,过程才停止进行。

值得注意的是,一个体系的过程在自发进行时,其熵是可能降低的,但其周围环境的熵必然增加。它们的总和必然是正值。此外,一个热力学上预示可以自发进行的过程,并不意味着这个过程已经在进行。一个过程是否真正进行,还要看是否存在适当的条件。对非生物体,可用改变压力、温度、提高反应物浓度等条件来促使反应进行。生物体所处的是自然条件,机体内的一切反应都严格限制在一定的温度和压力下进行。反应物的浓度在体内也有一定的局限性。生物体如何遵循热力学规律驱动体内化学反应进行,并依靠化学反应所释放的能量维持生命活动?这正是生物化学所要揭示的问题。

根据热力学第二定律,可以了解在机体内哪些过程可能发生,推测哪些因素是某一过程的条件。例如,形成一个高度有序的生物结构之所以可能,是因为形成有序结构本身的熵降完全由周围环境中熵的增加所抵消并有余。又例如,生物体内所有的不可逆过程,都在不断地产生正熵,这可能给机体带来接近极大熵的危险性。极大熵值意味着生命过程停止,机体死亡。但机体能够巧妙地不断地从周围环境吸取负熵维持生存。新陈代谢过程使机体成功地向周围环境释放出其生命活动不得不产生的全部正熵。

用熵作为衡量一个生物化学过程是否能够自发进行是困难的,从公式(11)可看出,它需要由环境熵变和体系熵变两个值求得,也就是说要环境与体系熵变都为已知数据。化学反应的熵是不易测量的。用自由能作为衡量标准,可以排除这个困难。自由能也是一个状态函数,它是由热力学第二定律提出的另一个自然过程自发运动方向的判据。

(七) 自由能的概念

自由能(free energy)的概念对研究生物化学过程的力学具有特别重要的意义。生物体用以做功的能量正是体内化学反应释放出的自由能。生物氧化释放出的能量也正是可为有机体利用的自由能。它不仅可用来判断机体内某一过程能否自发进行。而且还可利用自由能这个函数来计算反应的其他有用参数。

自由能的概念是1878年由热力学的奠基人 Josiah Willard Gibbs 提出的。为了弄清自由能的概念,举一个简单的例子:如果将含有热量 Q 的热气体放到一个假设无摩擦的热机内,该气体的温度为 T_1 ,气体在热机内做功后的温度假设降至绝对零度。因假设热机活动没有摩擦,则所有的热能 Q 全部转变为功。凡是能够用于做功的能量 Gibbs 即之称为自由能。因此能量 Q 的全部都是自由能。但实际上做功后的气体温度往往远远高于绝对零度,假设降为 T_2 ,因此总能量中只有一部分能够用于做功,也就是表现为自由能。这个具有能量 Q 无摩擦的热机,在温度 T_1 和 T_2 之间做功时,所做的功可用以下方程式表示:

$$W = Q(T_1 - T_2)/T_1 \quad (12)$$

式中: W —最大功;

Q —总热能;

T_1 —热气体做功前的温度;

T_2 —热气体做功后的温度。

(12)式经过整理,可改写为下式:

$$W = Q - (Q/T_1)T_2 \quad (13)$$

上式表明如果 T_2 为绝对温度零度,即 $T_2 = 0$,则全部能量 Q 都表现为功,即 $W = Q$ 。在所有其他 T_2 不等于零的情况下,总有一部分能量是不能用来做功的。上式不能做功的这部分能量就是 T_2 与 Q/T_1 的乘积。 Q/T_1 就是这一体系的熵,一般用 S 表示。能够用以做功的自由能,用符号“ G ”表示。较早的文献也用 F 表示。

通常人们把可用的能量分为两种。一种是热能,热能做功只能引起温度或压力的变化;另一种是自由能,这种能可在恒温恒压下做功。

Gibbs 提出的自由能公式表示如下:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

式中： ΔG —在恒温、恒压下，体系发生变化时的自由能变化；

ΔH —体系焓的变化；

T —体系的绝对温度；

ΔS —体系的熵变。

从 Gibbs 的自由能公式，不难看出，自由能是焓和熵二者相结合的函数。这个公式体现出了热力学第一定律和第二定律之间的结合关系。

Gibbs 发现处于恒温和可逆的过程，存在如下的关系：

$$dH = TdS$$

也就是： $\Delta H = T\Delta S$ (15)

将(15)代入(14)则得：

$\Delta G = 0$ ，即对于一个可逆的过程其自由能的变化为零。

下面的讨论有助于更好地理解自由能的意义。

一个体系如果做功，可将功区分为两种。一种是体系本身体积变化时所做的功，称为体积功，另一种是体系对外做功，称为有用功。一个无限小过程里的功(总功)，也包括体积功(用 PdV 表示)和有用功(用 dW' 表示)两部分，它们之间的关系可用下式表示：

$$\begin{matrix} dW \\ \text{(总功)} \end{matrix} = \begin{matrix} PdV \\ \text{(体积功)} \end{matrix} + \begin{matrix} dW' \\ \text{(有用功)} \end{matrix} \quad (16)$$

根据热力学第一定律：

$$dU = dQ - dW$$

参看公式(3)代入(16)式，得到以下公式：

$$dU = dQ - PdV - dW' \quad (17)$$

如果一个体系的过程是可逆的，则 $dQ = TdS$ [参看公式(10)]，这时 dW 即为最大功，也是可逆过程所做的总功。 dW 代表的不是总功而是有用功。 dQ 代表体系在无限小的可逆过程里所吸收的热量。

将 $dQ = TdS$ 代入(17)式：

$$\text{则 } dU = TdS - PdV - dW' \quad (18)$$

又根据自由能的定义：

$$G = H - TS$$

将上式微分得到 dG 表达式如下：

$$dG = dH - TdS - SdT \quad (19)$$

又因 $dH = dU + PdV + VdP$ ，

将 dH 代入(19)式得到下式：

$$dG = dU + PdV + VdP - SdT - TdS \quad (20)$$

式中： dG —自由能的微小变化；

dU —内能的微小变化；

P —体系的压力；

dP —压力的微小变化；

V —体积；

dV —体积的微小变化。

将(18)式的 dU 代入(20)式则得到：

$$dG = VdP - SdT - dW' \quad (21)$$

如果温度不变 $SdT = 0$ 则：(21)式变为：

$$dG = VdP - dW' \quad (22)$$

将(22)式积分，得下式：

$$-dG = - \int_{P_1}^{P_2} VdP + W' \quad (23)$$

如果温度不变体系又不对外做功即 $W' = 0$ 则得下式：

$$-\Delta G = \int_{P_1}^{P_2} VdP \quad (24)$$

如果温度和压力都不变,则得到如下公式:

$$-\Delta G = W' \quad (25)$$

这就是说,自由能的降低(ΔG 为负值),就是在可逆的恒温、恒压过程中,所做的最大有用功。

如果体系在过程中只做体积功,不做有用功,即 $W' = 0$,于是(23)式可简化为下式:

$$-\Delta G = 0 \quad \text{或写为} \quad \Delta G = 0 \quad (26)$$

这意味着此过程可逆。

$$\text{如果: } -\Delta G > 0 \text{ 即 } \Delta G < 0 \quad (27)$$

则此过程不可能进行。这种过程必需提供能量才能进行。

因为自由能是生物化学中最有用的热力学函数,下面还将着重讨论生物化学中反应和自由能的关系。

二、化学反应中自由能的变化和意义

为了阐明自由能在化学反应特别是生物化学反应中的作用和意义,有必要进一步分析在化学反应中自由能的变化。

第一节中已经阐述了自由能的基本概念,如果对一个化学反应考查它的自由能变化,也必然得到同样的自由能公式。

(一) 化学反应的自由能变化公式

设有一化学反应:



式中 $A + B$ 含有的总能量大于 $C + D$ 含有的总能量,所超过的能量就是反应中释放出的能量(ΔH)。如果把 $A + B$ 和 $C + D$ 看作一个体系,可以看出,体系由 $A + B$ 状态进入 $C + D$ 状态是一个放能过程。式中 $A + B$ 所含的总能量和熵显然不同于 $C + D$ 所含的总能量和熵。 $A + B$ 和 $C + D$ 的能值本身对生物体的意义并不是直接的。对生物体最有意义的是由 $A + B$ 变为 $C + D$ 的能量变化,特别是自由能的变化。将反应前 $A + B$ 的能态用下式表示:

$$G_1 = H_1 - TS_1 \quad (29)$$

反应后形成 $C + D$ 的能态用下式表示:

$$G_2 = H_2 - TS_2 \quad (30)$$

在恒温条件下,该反应自由能的变化即为(30)式减(29)式:

$$G_2 - G_1 = (H_2 - H_1) - T(S_2 - S_1) \quad (31)$$

式中 $G_2 - G_1$, $H_2 - H_1$, $S_2 - S_1$, 依次分别代表体系自由能焓的熵的变化,所以分别用 ΔG 、 ΔH 、 ΔS 代表这些数值,于是(31)式可改写为:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (32)$$

(32)式就是(14)式,即自由能公式。

因为自由能变化容易通过计算求得,所以它在判断生物化学过程的进行方向和可逆反应处于平衡的位置都是比较方便的。

可以把自由能看成是促使化学反应达到平衡的一种驱动力。当一化学反应达到平衡时,焓和熵的变化在数值上是相等的[参看公式(15)]。这时自由能的变化是“0”。

(二) 标准自由能变化和化学平衡的关系

在化学反应中,反应物和产物各自都有特定的自由能。反应物自由能的总和与产物自由能总和之差,就是该反应的自由能变化。为了计算的方便,人们总是规定一些条件作为标准条件,并将在此条件下,所发生的化学反应的自由能变化称为标准自由能变化。标准条件指的是,反应的温度为 25°C , 即 298 K , 大气压为 $101\,325\text{ Pa}$ (1 atm), 参加反应的物质和生成物质[如(28)式中的 A 、 B 、 C 、 D] 的浓度都是 1 mol/L 。

标准自由能变化的符号用 ΔG^0 表示。对于生物化学反应,标准状况还规定反应进行的环境为 $\text{pH} = 7$ 。这时的标准自由能变化用 ΔG^0 表示。

应该提起注意的是,必须弄清 ΔG^0 和 ΔG 之间的区别。 ΔG^0 是在特定条件下,一个化学反应的常数,因为是在标准状态下,这个值决定于参加反应的物质本身,所以每一个化学反应都有其特定的标准自由能变化。而 ΔG 是某一化学反应随参加反应物质的浓度,发生反应的 pH 和温度而改变的自由能变化。根据反应物和产物浓度计算出的 ΔG 值,可判断一个化学反应是否能按预想的方向进行。只有当 ΔG 是负值时,反应才能进行。因为这负值意味着反应发生时,将释放出能量。而 ΔG^0 若为正值,只要计算所得的 ΔG 为负值,反应仍会按预想的方向进行。 ΔG 对于所有趋向化学平衡的反应都是负值。而且此绝对值逐渐缩小,直至达到零为止。这就是反应的平衡点。

下面我们讨论化学反应的自由能变化和平衡常数之间的关系。

假设有如下的一个化学反应式:



这一反应式中的小写字母 a, b, c, d 是参与反应的 A, B, C, D 四种物质的分子数。在恒温 and 恒压下,这一反应的自由能变化公式是:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (34)$$

上式 ΔG^0 是当反应物和产物都处于标准状态时的自由能变化,即标准自由能的变化, R 是气体常数, T 是绝对温度, $[A], [B], [C], [D]$ 代表反应物 (A, B) 和生成物 (C, D) 的摩尔浓度 (molar concentration), 严格地应为活度。

从以上的公式可以看出,一个化学反应自由能的变化 ΔG , 由两部分所决定,一部分是不变因素,即由反应物本身的性质所决定,另一部分是可变因素,即反应物和产物的浓度,反应的化学当量以及反应的温度。根据以上条件,对于任何一个化学反应,如果知道反应的温度,反应物和产物的标准自由能变化以及它们的浓度,就可以计算该反应的自由能变化。

如果反应式 (33) 进行到平衡点时,再没有进一步的反应发生。这时的自由能变化即成为零, $\Delta G = 0$ 。这时的反应系统不再能做任何功。当一个反应达到平衡点时,上面的 (34) 式即成为如下的形式:

$$0 = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (35)$$

(35) 式移项得下式:

$$\Delta G^0 = - RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (36)$$

生物化学中的平衡常数表示法如下:

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (37)$$

注: K'_{eq} 代表在一定条件下,所测得的平衡常数,和热力学的真正的平衡常数之间往往有一点差异,所以用 K'_{eq} 表示以区别于 K_{eq} 。

将 (37) 式代入公式 (36) 得到下式,此时 ΔG^0 即为 ΔG^0

$$\Delta G^0 = - RT \ln K'_{\text{eq}} \quad (38)$$

将 (38) 式改写为 \log_{10} 对数式:

$$\Delta G^0 = - 2.303 RT \log K'_{\text{eq}} \quad (39)$$

$$(39) \text{ 式还可改写为: } K'_{\text{eq}} = 10^{-\Delta G^0 / 2.303 RT} \quad (40)$$

式中 R 为气体常数,如果气体常数的能量单位以“卡”表示,这时 $R = 1.98 \times 10^{-3} \text{ kcal/mol} \cdot \text{K}$ (此处的“K”为绝对温度,等于 298K,相当于 25°C), 则测得的 ΔG^0 用 kcal/mol 表示。如果气体常数作为能量单位以 kJ/mol 表示,这时 $R = 8.31 \times 10^{-3} \text{ kJ/mol} \cdot \text{K}$, 则测得的 ΔG^0 用 kJ/mol 表示。如果一个反应的平衡常数 K'_{eq} 为已知,就可利用 K'_{eq} 由 (39) 式求得 ΔG^0 值。

表 20-1 列举出平衡常数与自由能变化的关系值。

表 20-1 平衡常数 K'_{eq} 与标准自由能变化 ΔG°
在 25°C 条件下的数值关系

K'_{eq}	ΔG°	
	kcal/mol	kJ/mol
10^{-5}	6.80	28.55
10^{-4}	5.46	22.85
10^{-3}	4.05	16.95
10^{-2}	2.73	11.42
10^{-1}	1.36	5.69
1	0	0
10	-1.36	-5.69
10^2	-2.73	-11.42
10^3	-4.09	-17.11
10^4	-5.46	-22.85
10^5	-6.82	-28.54

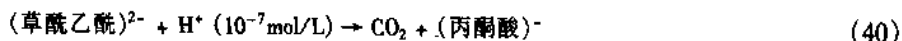
(三) 标准生成自由能及其应用

每一种有机化合物都有特定的标准生成自由能,用符号 ΔG_f° 表示。“f”这个右下角的角注是英文“formation”的字头,是形成的意思。标准生成自由能的定义是,由处于标准状态的最稳定单质合成标准状态当量化合物时,其标准自由能的变化值(ΔG_f°)。因事实上标准生成自由能的绝对值是无法由实验测出的。但利用自由能是状态函数的性质,规定在一大气压下,一定温度时,最稳定单质的标准自由能为零。这样,在标准状态下,由稳定单质生成 1 mol 纯化合物的 ΔG° 就等于该化合物的标准生成自由能。

许多生物化学化合物中常见的标准生成自由能已经列成表载于化学手册。在 SI(system international)制中,标准生成自由能的单位是 J/mol,或 kJ/mol。有时也用 cal/mol 或 kcal/mol。

利用标准生成自由能可以测知一个反应的标准自由能变化。因为化学反应的标准自由能变化等于反应产物的标准生成自由能的总和减去反应物标准生成自由能的总和,所以如果已知反应物和产物的标准生成自由能,就很容易求得该反应的标准自由能变化。

例如,计算由草酰乙酸脱羧形成丙酮酸反应的标准自由能变化。这一反应式可表示如下:



反应式中括号右上角的角注代表化合物的离子价数。查上述化合物的标准生成自由能表得到:草酰乙酸的标准生成自由能为 -190.53 kcal/mol (-797.18 kJ/mol),氢离子 (10^{-7} mol/L) 的标准生成自由能为 -9.55 kcal/mol (-39.96 kJ/mol),二氧化碳气体的标准生成自由能为 -94.45 kcal/mol (-395.18 kJ/mol),丙酮酸的标准生成自由能为 -113.44 kcal/mol (-474.63 kJ/mol)。于是该反应的标准自由能变化可根据下式求得:

$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ} &= \sum \Delta G_{f\text{产物}}^{\circ} - \sum \Delta G_{f\text{反应物}}^{\circ} \quad (41) \\ \Delta G^{\circ} &= -113.44 + (-94.45) - [(-190.53) + (-9.55)] \\ &= -113.44 - 94.45 + 190.53 + 9.55 \\ &= -7.81 \text{ kcal/mol} = -32.68 \text{ kJ/mol} \end{aligned}$$

上面的计算表明,当草酰乙酸的离子浓度为 1 mol/L ,氢离子为 10^{-7} mol/L ,生成的 CO_2 为 101325 Pa ,丙酮酸的离子浓度为 1 mol/L 时,反应的标准自由能变化为 -7.81 kcal/mol (32.68 kJ/mol)。这一结果显示在上述条件下反应可以进行。但在实际反应中,在草酰乙酸解离的 pH 条件下生成的 CO_2 并不是气体,而是碳酸氢根(HCO_3^-)。因此由前面所求得的 ΔG° 值,还须予以校正。其校正值可由下式的标准自由能求出:



式中 CO_2 的标准生成自由能为 -94.45 kcal/mol , H_2O 的标准生成自由能为 -56.69 kcal/mol , HCO_3^- 的标准生成自由能为 -140.33 kcal/mol , H^+ 的标准生成自由能为 -9.55 kcal/mol 。将有关数值代入下式:

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= \Delta G_{\text{HCO}_3^-}^0 + \Delta G_{\text{H}^+}^0 - (\Delta G_{\text{CO}_2}^0 + \Delta G_{\text{H}_2\text{O}}^0) \\ &= -140.33 - 9.55 + 94.45 + 56.69 \\ &= 1.26 \text{ kcal/mol} = 5.27 \text{ kJ/mol}\end{aligned}$$

因此由草酰乙酸脱羧生成丙酮酸的反应,其标准自由能变化为: $-7.81 \text{ kcal/mol} + 1.26 \text{ kcal/mol} = -6.55 \text{ kcal/mol} = -27.41 \text{ kJ/mol}$ 。

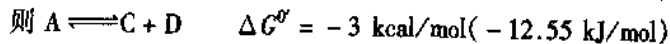
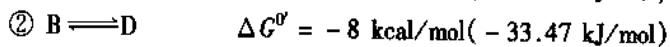
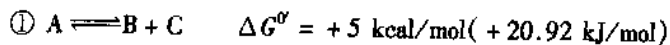
利用标准生成自由能既可求出一个反应的标准自由能变化 ΔG^0 ,还可进一步利用 $\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{eq}}$ 的公式,计算求得反应的平衡常数。

表 20-2 一些化合物的标准生成自由能

化合物名称 (化合物都为解离式)	标准生成自由能 ΔG_f^0	
	反应条件: 1 mol/L, pH = 7, 25°C	
	kcal/mol	kJ/mol
乙酸 (acetate)	-88.99	-372.30
顺-乌头酸 (cis-aconitate) ³⁻	-220.51	-922.61
L-丙氨酸 (L-alanine)	-88.75	-371.3
铵离子 (ammonium ion)	-19.00	-79.50
L-天冬氨酸 (L-aspartate)	-116.99	-698.69
碳酸氢离子 (bicarbonate ion)	-140.33	-587.14
二氧化碳气 (carbon dioxide)	-94.45	-395.18
乙醇 (ethanol)	-43.39	-181.60
延胡索酸 (fumarate) ²⁻	-144.41	-604.21
α -D-葡萄糖 (α -D-glucose)	-219.22	-917.22
甘油 (glycerol)	-116.76	-488.64
氢离子 (hydrogen ion)	-9.55	-39.96
羟离子 (hydroxide ion)	-37.60	-157.32
α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate) ²⁻	-190.62	-797.56
乳酸 (lactate)	-123.76	-517.81
L-苹果酸 (L-malate) ²⁻	-201.98	-845.08
草酰乙酸 (oxaloacetate) ²⁻	-190.53	-797.18
丙酮酸 (pyruvate)	-113.44	-474.63
琥珀酸 (succinate) ²⁻	-164.97	-690.23
水溶液 (water) (liquid)	-56.69	-237.19

(四) 偶联化学反应标准自由能变化的可加性及其意义

在互相联系或称为偶联的化学反应中,这些相互联系的化学反应的总的标准自由能变化等于各步反应自由能变化的总和。换句话说即,偶联化学反应各反应的标准自由能变化是可以相加的。例如,下面有两个相偶联的反应:



因反应式①的标准自由能变化为正值 ($+5 \text{ kcal/mol}$),所以该反应不能进行。但是②的标准自由能变化为负值 (-8 kcal/mol),即由 B 形成 D 的反应是容易自发进行的。由于偶联反应的自由能变化是可以加和的。加和的结果由 A 形成 C 和 D 的标准自由变化 $\Delta G^0 = -3 \text{ kcal/mol} (-12.55 \text{ kJ/mol})$,即成为负值。因此由 A 形成 C 和 D 的反应就成为可以自发进行的。这就是说②式,即由 B 形成 D 的反应驱动了①式的反

应,使原来不能自发进行的①式反应能够进行。这一事实表明:一个在热力学上不利的反应,可以由热力学上有利的反应所驱动。这种情况在生物化学反应中是很多的。

(五) 化学反应和自由能关系的进一步说明

在化学反应中,只有自由能降低,即 $\Delta G < 0$ 的反应才能自发地进行。反应进行的推动力与自由能降低的多少成正比。当 ΔG 为正值时,即 $\Delta G > 0$,也就是反应产物的标准生成自由能大于反应物的标准生成自由能,这种反应不能自发地进行。需要由环境提供能量反应才能进行。这种反应称为需能反应。最简单的例子是:欲从无机磷酸形成焦磷酸。这个反应,因其 $\Delta G > 0$, ($\Delta G = 37.7 \text{ kJ/mol}$)。自由能变化的计算预示该反应不能自发进行。即使向此反应中加入纯酸等催化剂,仍不能使无机磷酸自发地形成焦磷酸。而反方向的反应却可顺利地进行。因为由焦磷酸水解为无机磷酸的自由能变化为 -37.7 kJ/mol 。应提醒注意的是:反应能否进行的自发性是以 ΔG 值为判据,而不是 ΔG^\ominus 。

当一个反应处于平衡时,没有自由能的变化, $\Delta G = 0$ 。所以不可能从处于平衡的任何化学反应中获得能够做功的能。

热力学第二定律只指示一个化学反应的方向和限度,不预示反应过程的速率。因此对于 $\Delta G \leq 0$ 的化学反应,也不等于这个反应实际上已经自发进行。对许多反应还必须给参加反应分子提供活化能,或用催化剂,例如酶,来降低活化能,反应才能进行。

有机物所含的自由能,主要决定于化合物中所含基团的能量。一般情况下,不稳定的活泼的化学基团常具有高的自由能。这种基团在化学反应中也具有大的化学势能或者说推动力。

(六) 能量学用于生物化学反应中的一些规定

为了便于用能量学探讨在生命过程中的化学反应原理,根据生物化学的反应特点,作出一些规定概括如下:

(1) 在任何情况下,一个稀的水溶液系统,如果有水作为反应物或产物时,水的浓度(近似的即活度)规定为 1.0。因为水在反应中被视为纯的不含溶质的液体。虽然水的体积摩尔浓度实际上为 55.5 mol/L 。

(2) 在生物化学能量学(biochemical energetics)中,通常把标准状况的 pH 规定为 7.0。因为生物化学反应大多是在 $\text{pH} = 7.0$ 的环境下进行的,而且往往有 H^+ 的参与或释放,因此,在 pH 为 7.0 的环境下所测得的标准自由能变化用 ΔG^\ominus 表示。这不同于物理化学以 $\text{pH} = 0.0$ (即氢离子浓度为 1.0 mol/L)作为标准自由能变化的条件。 $\text{pH} = 0.0$ 时的标准自由能变化用 ΔG^\ominus 表示。

(3) ΔG^\ominus 值用于生物化学能量学是假设每个反应物和产物都能解离。它们解离的标准状态是未解离形式和解离形式的混和状态。两种状态的存在正是 $\text{pH} = 7.0$ 的环境。因此 ΔG^\ominus 是以 $\text{pH} = 7.0$ 为基础。如果 pH 不等于 7.0 就不能用 ΔG^\ominus 值。因为一种组分或一种以上的组分其解离程度都可能改变 pH 。 pH 的变化可导致反应中对 H^+ 和 OH^- 结合或释放的差异。

(4) 标准自由能单位,过去和习惯上都以 cal/mol 或 kcal/mol 表示。1 kcal 是 1 g 无空气之水的温度在恒定压力下从 14.5°C 升到 15.5°C 所需的热量。我国根据国际单位制(Le Systeme International Unit,简称 SI 单位)名称导出的对热和能量的单位建议今后用焦耳/摩尔,简称焦/摩尔, (Joules/mol 或 J/mol) 或千焦耳/摩尔,简称千焦/摩尔(kiloJoules/mol)(或 kJ/mol)表示。1 J 是施加 1 N 的力于 1 m 距离所需的能量。1 cal 相当于 4.184 J, 1 kcal 相当于 4.184 kJ。

(七) ΔG^\ominus 、 ΔG 以及平衡常数计算的举例

例 1 葡萄糖-1-磷酸的浓度为 0.020 mol/L ,在磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)催化下,向葡萄糖-6-磷酸转变,或由葡萄糖-6-磷酸(起始浓度也是 0.020 mol/L),向葡萄糖-1-磷酸转变,最后得到混合物。无论以哪个为起始物都含有 0.001 mol/L 的葡萄糖-1-磷酸和 0.019 mol/L 的葡萄糖-6-磷酸。此反应温度为 25°C , $\text{pH} = 7$ 。求出该反应的 K'_{eq} 和 ΔG^\ominus 值。

解

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[\text{葡萄糖} - 6 - \text{磷酸}]}{[\text{葡萄糖} - 1 - \text{磷酸}]} = \frac{0.0190}{0.0010} = 19.0$$

$$\Delta G^{\theta} = -2.303 RT \lg K'_{\text{eq}}$$

$$= -2.303 \times 1.987 \times 10^{-3} \times 298 \times \lg 19.0$$

$$= -1.36 \times 1.28 = -1.74 \text{ kcal/mol}$$

$$= -1.74 \times 4.184 = -7.280 \text{ kJ/mol}$$

例 2 当二羟丙酮磷酸与甘油醛-3-磷酸互变达到平衡时,甘油醛-3-磷酸与二羟丙酮磷酸浓度的比值是 0.0475,其反应条件是,25℃和 pH=7。当达到平衡时甘油醛-3-磷酸的浓度为 3×10^{-6} mol/L,二羟丙酮磷酸的浓度为 2×10^{-4} mol/L,求出该反应的 ΔG^{θ} 及 ΔG 值。

解

$$\Delta G^{\theta} = RT \ln K'_{\text{eq}}$$

$$= -2.303 \times 1.987 \times 10^{-3} \times 298 \times \log(0.0475)$$

$$= -1.364 \times \lg(0.0475)$$

$$= 1.81 \text{ kcal/mol} = 7.57 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta G = \Delta G^{\theta} + RT \ln \frac{[\text{甘油醛} - 3 - \text{磷酸}]}{[\text{磷酸二羟丙酮}]}$$

$$= 1.81 + 2.303 \times 1.987 \times 10^{-3} \times 298 \times \lg(3 \times 10^{-6} / 2 \times 10^{-4})$$

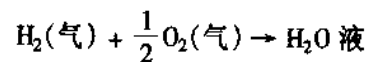
$$= 1.81 - 2.487 = -0.677 \text{ kcal/mol}$$

$$= -1.01 \text{ kJ/mol}$$

由上面求出的 ΔG^{θ} 值为正值(+1.81),而 ΔG 值为负值(-0.677)。因自发反应的判断依据是 ΔG 值,而不是 ΔG^{θ} 值。 ΔG 值主要依赖于反应物的性质和它们的浓度(对数)。 ΔG 值为负值表明该反应能够自发进行。因此,由磷酸二羟丙酮转变为甘油醛-3-磷酸的反应在上述浓度的条件下可以自发进行。

例 3 在标准状态下(101 325 Pa,25℃),由 H_2 和 O_2 形成 H_2O 的过程,如果反应物 H_2 和 O_2 以及产物 H_2O 的浓度(活度)都是 1.0,求其自由能变化。

解 上述反应可用下列反应式表示:



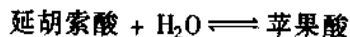
$$\Delta G^{\theta} = G_{f\text{H}_2\text{O}}^{\theta} - \left(\frac{1}{2} \Delta G_{f\text{O}_2}^{\theta} + G_{\text{H}_2}^{\theta} \right)$$

$$\Delta G^{\theta} = G_{f\text{H}_2\text{O}}^{\theta} - \left(\frac{1}{2} 0 + 0 \right)$$

$$= G_{f\text{H}_2\text{O}}^{\theta} = -237.17 \text{ kJ}$$

例 4 在延胡索酸酶的催化下,计算延胡索酸形成苹果的标准自由能变化。

解 上述反应的反应式如下:



$$\Delta G^{\theta} = G_{f\text{苹果酸}}^{\theta} - (\Delta G_{f\text{延胡索酸}}^{\theta} + \Delta G_{f\text{水}}^{\theta})$$

查表 20-2 得到: $G_{f\text{苹果酸}}^{\theta} = -201.98 \text{ kcal/mol}$

$$\Delta G_{f\text{延胡索酸}}^{\theta} = -144.41 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta G_{f\text{水}}^{\theta} = -56.69 \text{ kcal/mol}$$

则:

$$\Delta G^{\theta} = -201.98 - (-144.41 - 56.69)$$

$$= -0.88 \text{ kcal/mol}$$

$$= -0.88 \times 4.184$$

$$= -3.682 \text{ kJ/mol}$$

三、高能磷酸化合物

(一) 高能磷酸化合物的概念

磷酸化合物在生物体的换能过程中占有重要地位。机体内有许多磷酸化合物,当其磷酰基水解时,释放出大量的自由能。这类化合物为高能磷酸化合物。这些分子中的酸酐键,能释放出大量自由能。Fritz Lipman 称之为“高能键”(high-energy bond)。并用符号“~”表示。一般将水解时能释放出 5 000 cal(20.92 kJ)以上自由能的键视为“高能键”。生物化学中所用的“高能键”的含义和化学中使用的“键能”(energy bond)含义是完全不同的。化学中“键能”的含义是指断裂一个化学键所需要提供的能量;而生物化学中所说的“高能键”是指该键水解时所释放出的大量自由能。

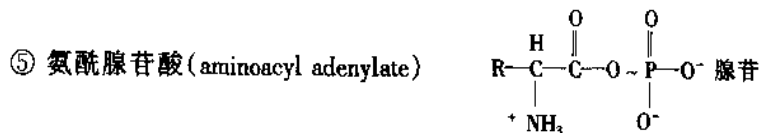
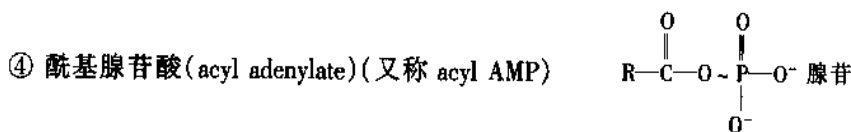
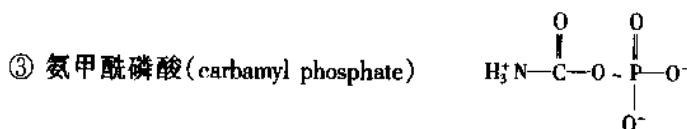
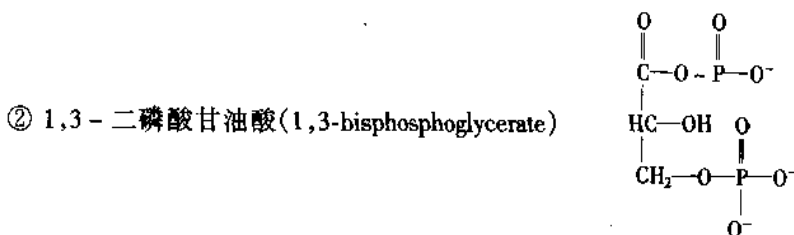
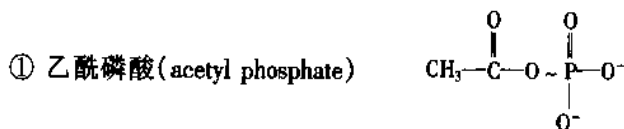
(二) 高能磷酸化合物及其他高能化合物的类型

生物体高能化合物的种类是很多的,不只是高能磷酸化合物。根据它们键型的特点,可归纳为以下几种类型:

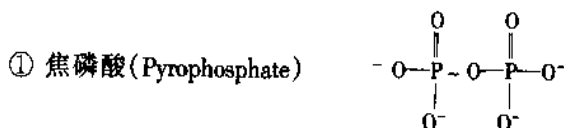
1. 磷氧键型(-O-P-)

属于这种键型的化合物很多,又可分成几类。

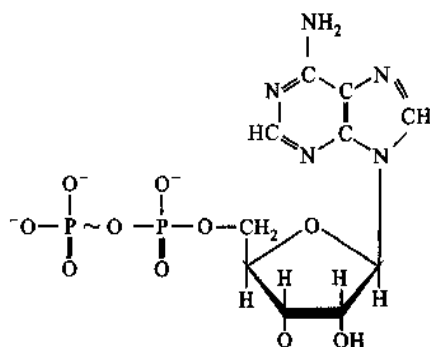
(1) 酰基磷酸化合物(acyl phosphate) 例如:



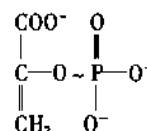
(2) 焦磷酸化合物



② 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate)

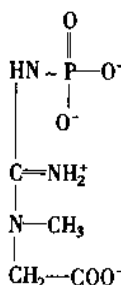


(3) 烯醇式磷酸化合物 磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate)

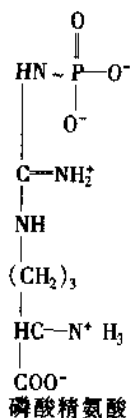


2. 氮磷键型——如胍基磷酸化合物

(1) 磷酸肌酸(phosphocreatine 或 creatine phosphate)

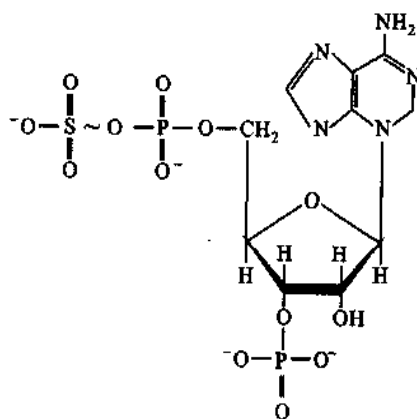


(2) 磷酸精氨酸(arginine phosphate)



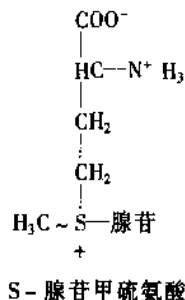
3. 硫酯键型——活性硫酸基

(1) 3'-腺苷磷酸 5'-磷酸硫酸(adenosine - 3' - phosphate - 5' - phosphosulfate)



(2) 酰基辅酶 A(acyl coenzyme A) $\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{SCoA}$

4. 甲硫键型——活性甲硫氨酸(S-adenosylmethionine)



上述高能化合物中含磷酸基团的占绝大多数。但并不是所有含磷酸基团的化合物都是高能磷酸化合物。例如,葡萄糖-6-磷酸、甘油磷脂等化合物,水解时每摩尔只能释出 4.184 ~ 12.55 kJ(即 1 000 ~ 3 000 cal)能量。

上面所举的高能化合物都含有特定的容易被水解的键型(式中都以“~”表示)。这些化合物水解后所形成的产物都含有很少的自由能。所以说上述的高能化合物都有很高的基团转移势能。其中如磷酸肌酸、磷酸烯醇式丙酮酸、乙酰磷等具有比 ATP 更高的基团转移势能。表 20-3 列出了一些磷酸化合物水解时的标准自由能变化。

表 20-3 清晰地表明了不同磷酸化合物其磷酸基团转移的热力学趋势或转移势能的大小(一般用无方向的正值表示)。表 20-3 还显示出 ATP 的磷酸基团转移势能处于所列磷酸化合物的中间部位。这一点具有重要的生物学意义。下面将详细讨论。

表 20-3 一些磷酸化合物水解的标准自由能变化

化 合 物	ΔG°		磷酸基团转移势能	
	kcal/mol	kJ/mol	ΔG° kcal/mol	ΔG° kJ/mol
磷酸烯醇式丙酮酸 phosphoenolpyruvate	-14.8	-61.9	14.8	61.9
氨甲酰磷酸 carbamoyl phosphate	-12.3	-51.46	12.3	51.46
3-磷酸甘油酸磷酸 (3-phosphoglyceroyl phosphate)	-11.8	-49.3	11.8	49.3
磷酸肌酸 phosphocreatine	10.3	-43.1	10.3	43.1
乙酰磷酸 acetyl phosphate	-10.1	-42.3	10.1	42.3
* 焦磷酸 pyrophosphate	-8.0	-33.5	8.0	33.5
	-4.6	-19.2	4.6	19.2
磷酸精氨酸 phosphoarginine	-7.7	-32.2	7.7	32.2
腺苷三磷酸 ATP→ADP + Pi	-7.3	-30.5	7.3	30.5
* ATP→AMP + Pi	-7.7	-32.2	7.7	32.2
	-10.9	-45.6	10.9	45.6
腺苷二磷酸 ADP→AMP + Pi	-7.3	-30.5	7.3	30.5
腺苷一磷酸 AMP→腺苷 + Pi	-3.4	-14.2	3.4	14.2
葡萄糖-1-磷酸 glucose 1-phosphate	-5.0	-20.9	5.0	20.9
* 果糖-6-磷酸 fructose 6-phosphate	-3.8	-15.9	3.8	15.9
	-3.3	-13.8		
葡萄糖-6-磷酸 glucose 6-phosphate	-3.3	-13.8	3.3	13.8
甘油-3-磷酸 glycerol 1-Phosphate	-2.2	-9.2	2.2	9.2

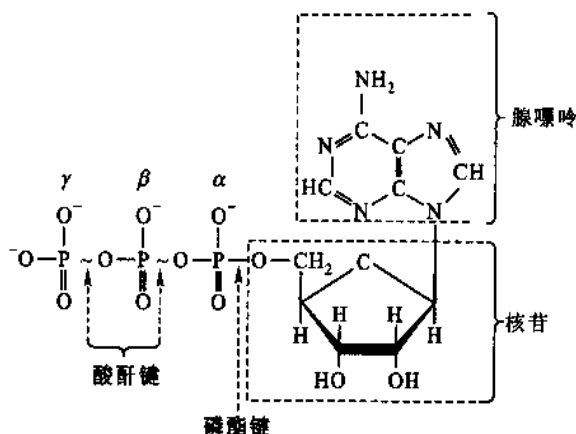
注:表中带*号的化合物在表内列出的两个不同数据是来自不同的报道资料。

(三) ATP 的结构特性

ATP(三磷酸腺苷又称腺苷三磷酸, adenosine triphosphate)是高能磷酸化合物的典型代表。以下将对它

进行较详细的讨论。

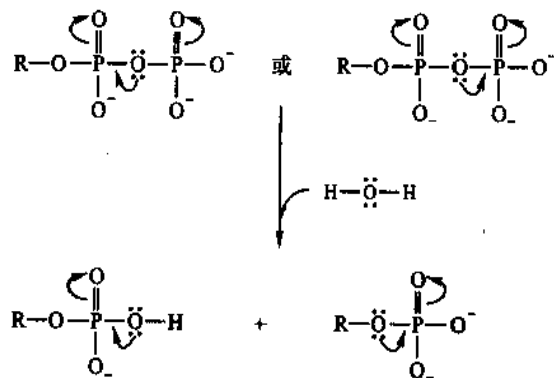
腺苷三磷酸是一分子腺嘌呤、一分子核糖和三个相连的磷酸基团构成的核苷酸。如下图所示：



腺苷三磷酸(ATP)的结构式

腺苷三磷酸分子中的三个磷酸基团从与分子中的腺苷基团相连的磷酸基团算起,依次分别称为 α 、 β 、 γ 磷酸基团。即远离腺苷基团的那个磷酸基团称为 γ 磷酸基团。

腺苷三磷酸的酸酐键水解时的 $\Delta G^0' = -30.54 \text{ kJ/mol}$ 。经考察证明, α 磷酸基团与腺苷直接相连的磷酸酯键(phosphoester bond)和 β 、 γ 磷酸基团的所谓“高能键”之间,从电子特性上看,并没有任何特殊之处。但为何 β 、 γ 磷酸基团的酸酐键却如此容易水解并释放大量的自由能呢?其原因可作如下的分析:腺苷三磷酸中酸酐键(phosphoanhydride bond)的共振稳定性小于磷酸酯键型。这是因为磷酸基团酸酐键缺失的两个电子和它相邻的氧桥争夺 π 电子而引起电子的转移。磷酸酯键不存在争夺电子的现象。可用下式表示酸酐键和氧桥的氧原子之间电子转移的情况:

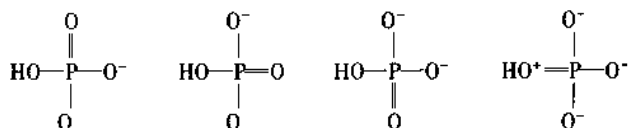


从上式的弯箭头看出,由于共振的原因,磷原子会缺失两个电子。这时在两个磷原子之间的氧原子上的价电子就受到磷原子的争夺而使氧桥的稳定性降低,甚至断裂。

造成酸酐键不稳定的重要因素是磷酸基团之间相邻的负电荷之间相互排斥。在生物机体的pH条件下,ATP分子内约有4个负电荷。可用 ATP^{4-} 表示。这4个负电荷在空间上相距很近。它们之间的相互排斥促使ATP的磷酸基团易于水解。当ATP的末端磷酸基团脱下后,分子内相同电荷的斥力由于形成 ADP^{3-} 和 HPO_4^{2-} 而缓和。同时 ADP^{3-} 和 HPO_4^{2-} 再结合成ATP的可能性极小。因此促使ATP向水解的方向进行,而葡萄糖6-磷酸水解后形成的葡萄糖分子不带电荷,葡萄糖和 HPO_4^{2-} 互不排斥,所以比较易于再结合成葡萄糖6-磷酸。

另一方面,从ATP水解形成的产物着眼,也可看到ATP易于走向水解的必然趋势。ATP水解所形成的产物 ADP^{3-} 和 HPO_4^{2-} 都是共振杂化物(resonance hybrids)。其中某些电子所处的位置和在与ATP中相比,都是具有最低能量的构象形式。这意味着 ADP^{3-} 和 HPO_4^{2-} 比ATP具有更大的共振稳定性。而且当ATP水解时能够释放出大量的自由能。

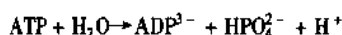
以正磷酸(orthophosphate,即无机磷酸)为例,可以举出如下几种能量近似的共振形式:



而 ATP 的末端磷酸基团就不可能有这样多的形式。

此外,使 ATP 容易水解的因素还有酸酐键溶剂化所需能量小于磷酸键,这就是酸酐键的水解从热力学上获得了较大的驱动力。

当 ATP 水解时形成三种产物,即 ADP^{3-} 、 HPO_4^{2-} 和 H^+ 。在 pH7.0 的条件下, H^+ 浓度为 10^{-7} mol/L 。根据质量作用定律, H^+ 的低浓度易导致 ATP^{4-} 向分解的方向进行。 ATP^{4-} 向水解方向进行的反应式可表示如下:



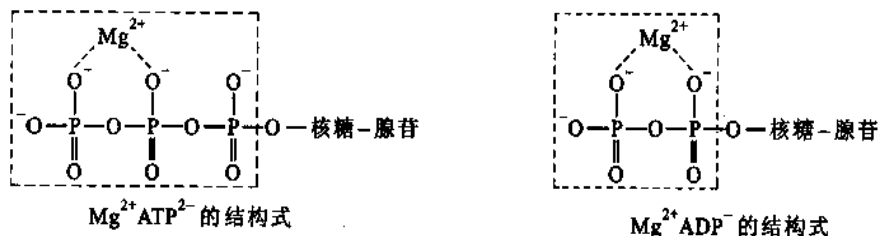
其他磷酸化合物如葡萄糖 6-磷酸在 pH7 水解时,不产生额外的氢离子,因此也没有像 ATP 水解时产生的这种推动力。

虽然使 ATP 容易水解并释放大量自由能的因素很多,但可以归纳为两种因素:一种是导致反应物不稳定的因素,另一种是导致产物稳定的因素。具体地说,主要决定于分子内的静电斥力和形成产物的共振稳定化作用。

(四) 细胞内影响 ATP 自由能释放的因素

前面已经提到,ATP 是细胞内特殊的自由能载体。它在细胞内广泛地存在,无论是细胞核、细胞溶胶以及线粒体等。

细胞的内环境往往为 pH=7。在 pH=7 时,ATP 以及 ADP 的全部磷酸基团都处于解离状态,而成为多电荷负离子形式,即 ATP^{4-} 和 ADP^{3-} 。细胞内存在有大量的 Mg^{2+} 。 Mg^{2+} 与解离状态的 ATP^{4-} 和 ADP^{3-} 形成 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}^{2-}$ 和 $\text{Mg}^{2+} - \text{ADP}^-$ 复合物的形式。它们的结构式表示如下:



ATP 水解释放的自由能受到许多因素的影响。当 pH 升高时 ATP 释放的自由能(ΔG_{ATP})明显升高。细胞内 Mg^{2+} 与 ATP^{4-} 、 ADP^{2-} 以及 HPO_4^{2-} 形成复合物也必然会影响到 ATP 的 ΔG_{ATP} 。又因 Mg^{2+} 与这些磷酸化合物结合所形成的复合物不同,而且 Mg^{2+} 与 HATP^{3-} 、 HADP^{2-} 以及 H_2PO_4^- 也都可以形成复合物。而且 Mg^{2+} 与这些离子化磷酸化合物的亲和力随 pH 的升高而增加。因此可以设想 pH 和 Mg^{2+} 以及其他一些 2 价阳离子(如 Mn^{2+})对 ATP 水解的标准自由能变化(ΔG_{ATP}^0)的影响一定也是比较复杂的。

在活细胞中,ATP、ADP 和无机磷酸的浓度完全不同于标准状况下 1 mol/L 浓度,甚至比标准的 1 mol/L 浓度低许多,而且细胞的 pH 比标准状态的 7 也有某些差异。在标准情况下,ATP 水解为 ADP 和 Pi 的标准自由能变化 $\Delta G^0 = -30.54 \text{ kJ/mol}$ (-7.3 kcal/mol),在各种因素影响下 ATP 水解的自由能变化值可达到 -52.3 kJ/mol (-12.5 kcal/mol)。

表 20-4 列出了 ATP 的不同浓度和它所处的 pH 环境对其水解时自由能释放的影响。

表 20-4 ATP 的浓度和 pH 环境对其水解时自由能释放的影响

pH	ATP 浓度			
	1 mol/L(kcal)	0.1 mol/L(kcal)	0.01 mol/L(kcal)	0.001 mol/L(kcal)
6.0	-7.89			
6.2	-7.94			
6.4	-8.01			
6.6	-8.12			
6.8	-8.26	-9.78	-11.75	-12.52
7.0	-8.40			
7.2	-8.59			
7.4	-8.81			
7.6	-9.06			
7.8	-9.32			
8.0	-9.56			

实验表明,多数细胞 ATP、ADP 和无机磷酸的浓度大约都在 2~10 mmol/L 之间。

(五) ATP 在能量转运中的地位和作用

从表 20-2 中已经清楚地表明,ATP 的 ΔG^0 在所有含磷酸基团的化合物中处于中间位置。这使 ATP 有可能在磷酸基团转移中作为中间传递体而起作用。在物质的分解代谢中形成的具有更高磷酸基团转移势能的化合物,例如,磷酸烯醇式丙酮酸、3-磷酸甘油酸磷酸(又称 1,3-二磷酸甘油酸)都是葡萄糖分解的中间产物。葡萄糖分解为乳酸时释放出的大部分自由能,几乎都保留在这两个化合物中。在细胞中,这两个化合物并不直接水解,而是通过特殊激酶的作用,以转移磷酸基团的形式,将捕获的自由能传递给 ADP 从而形成 ATP。这就是葡萄糖在分解过程中产生 ATP 的一种方式。而 ATP 分子又倾向于将它的磷酸基团转移给具有较低磷酸基团转移势能的化合物。例如,D-葡萄糖和甘油分子,从而依次生成 D-葡萄糖-6-磷酸和甘油-3-磷酸。这就是 ATP 在磷酸基团转移中所起到的中间传递体的作用。可以说它是一个转移磷酸基团的“共同中间传递体”。它的作用如图 20-2 所示。

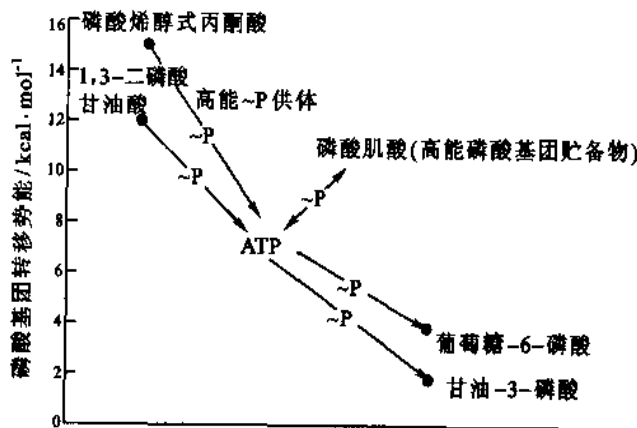
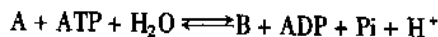


图 20-2 ATP 作为磷酸基团共同中间传递体示意图

ATP 作为磷酸基团的共同传递体的实质是传递能量。它水解释放出的能量,可推动一个在热力学上不利的反应,使之能够顺利地进行。如果有一个在热力学上不能进行的反应 $A \rightarrow B$,但与 ATP 的水解相偶联,这个反应就能够进行。其总的反应式如下:



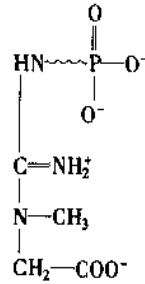
上述的 A 转变为 B 的反应具有非常普遍的意义。例如,一种蛋白质由一种构象转变为另一种构象,

一种低能态的物质转变为高能态的物质,离子逆浓度梯度的跨膜转运等等。

(六) 磷酸肌酸和磷酸精氨酸及其他贮能物质

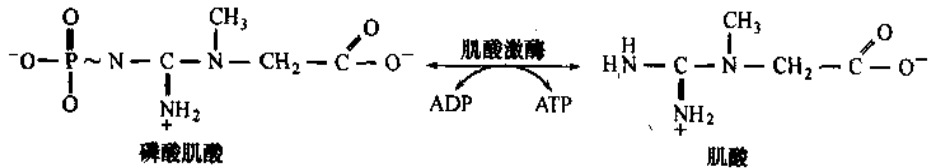
神经和肌肉等细胞活动的直接供能物质是 ATP。但 ATP 在细胞中的含量很低。在哺乳动物的脑和肌肉中约 3~8 mmol/kg。这么微的含量只能提供肌肉剧烈活动 1 s 左右的消耗。而肌肉和脑中的磷酸肌酸 (phosphocreatine) 含量都远远超过 ATP。在脑中大约相当 ATP 的 1.5 倍。在肌肉中则相当于 ATP 的 4 倍。受过良好训练的运动员其肌肉中磷酸肌酸的含量可高达 30 mmol。磷酸肌酸是细胞内首先供应 ADP 使之再合成 ATP 的能量物质。

磷酸肌酸又称肌酸磷酸 (creatine phosphate)。其结构式如下:



磷酸肌酸

磷酸肌酸在肌酸激酶 (creatine kinase) 的催化下,很容易将其磷酸基团传递给 ADP,从而使 ATP 再生。反应式如下:

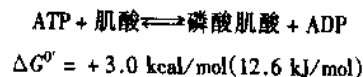


在 pH7 的条件下,磷酸肌酸水解的标准自由能是 -41.1 kJ/mol (-10.3 kcal/mol)。而由磷酸肌酸形成的 ATP 其标准自由能变化为 $-10.3 - (-7.3) = -3 \text{ kcal/mol}$ (12.6 kJ/mol)。在标准状况下上述反应的平衡常数为 160。

以大鼠为例,大鼠的肌细胞处于静息状态时,ATP 的浓度为 8.05 mmol,ADP 的浓度为 0.93 mmol,AMP 的浓度为 0.04 mmol,无机磷酸的浓度为 8.05 mmol。磷酸肌酸的浓度为 28 mmol,肌酸的浓度为 13 mmol。

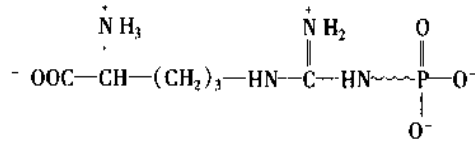
从磷酸肌酸的高含量和它高于 ATP 的磷酸基团转移势能可以看出,肌肉活动急需能量的情况下,磷酸肌酸可使 ATP 含量维持其高的稳定水平。它可提供给肌肉强烈活动 4~6 s 的能量需要。一般认为,人体肌肉中磷酸肌酸的含量及其再合成速度是运动员速度素质的物质基础。

在运动后的恢复期,细胞内积累的肌酸又可由其他途径来源的 ATP 提供高能磷酸基团,重新合成磷酸肌酸。磷酸激酶催化的反应是可逆的。ATP 和肌酸形成磷酸肌酸的反应是细胞代谢反应中接近平衡的一个典型例子(细胞内的代谢从整体看,是远离平衡的过程)。此反应的生物学意义在于,它能够随时有效地调整反应物和产物的浓度变化。由肌酸形成磷酸肌酸是一个需能反应。



该反应能够进行的原因正是因为其反应物和产物的浓度接近反应的平衡点 ($\Delta G \approx 0$)。当细胞处于静息状态时,ATP 的浓度较高,反应向合成磷酸肌酸的方向进行。当细胞处于活动状态时,ATP 的浓度下降,反应即转向合成 ATP 的方向进行。因此磷酸肌酸有“ATP 缓冲剂 (buffer)”之称。

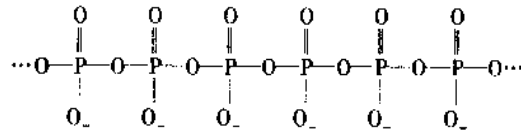
磷酸精氨酸 (phosphoarginine) 又称精氨酸磷酸 (arginine phosphate)。其结构式如下:



磷酸精氨酸

磷酸精氨酸是某些无脊椎动物例如蟹和龙虾等肌肉中的贮能物质。磷酸精氨酸的作用和磷酸肌酸相似。

磷酸精氨酸和磷酸肌酸以高能磷酸基团作为贮能物质又统称磷酸原(phosphagens)。有些微生物以聚偏磷酸(polymetaphosphate)作为贮能物质。聚偏磷酸本身是线形的、没有固定长度。其结构如下图所示:

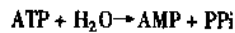


聚偏磷酸

聚偏磷酸受特殊的酶催化其磷酸基团水解。

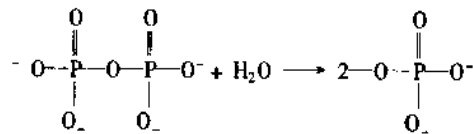
(七) ATP 断裂形成 AMP 和焦磷酸的作用

在有些情况下,ATP 的 α 和 β 磷酸基团之间的高能键被水解,形成 AMP 和焦磷酸(用 PPi 表示):

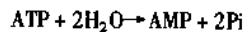


这一反应的标准自由能变化 $\Delta G^{\circ} = -7.7 \text{ kcal/mol} = -32.19 \text{ kJ/mol}$ 。比 ATP 的 β 和 γ 磷酸基团之间的高能磷酸键水解释放出的自由能略高($\Delta G^{\circ} = -7.3 \text{ kcal/mol}, = -30.514 \text{ kJ/mol}$)。

无机焦磷酸水解生成两分子正磷酸:



上式反应的 $\Delta G^{\circ} = -6.9 \text{ kcal/mol} = -28.84 \text{ kJ/mol}$ 。综合以上反应,ATP 降解为 AMP 和 2 分子正磷酸(用 Pi 表示)的反应表示如下:

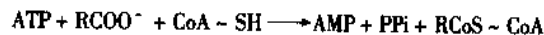


$$\Delta G^{\circ} = -14.6 \text{ kcal/mol} = -61.03 \text{ kJ/mol}$$

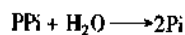
由上可见,ATP 降解为 AMP 和 2 分子正磷酸的 ΔG° 值恰好等于 ATP 降解为 ADP 和 ADP 降解为 AMP 两个 ΔG° 值之和。

虽然表面看来由 ATP 降解为 AMP 和 PPi 似乎对细胞利用能不是经济途径。但生物体以这种方式利用能具有特殊的生物学意义。例如,萤火虫的发光物质“虫萤光酰腺苷酸”(luciferyl adenylate)的形成就是由 ATP 降解为 AMP 和 PPi 而提供腺苷酸的。

脂肪酸的酶促活化形成脂酰辅酶 A 的反应需由 ATP 水解为 AMP 和 PPi 来提供能量。因该反应的 ΔG° 趋近于“0”,即几乎接近平衡,故反应进行的推动力还需靠焦磷酸的进一步水解:

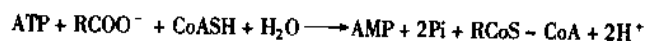


$$\Delta G^{\circ} = \pm 0.2 \text{ kcal/mol} = 0.84 \text{ kJ/mol}$$



$$\Delta G^{\circ} = -4.6 \text{ kcal/mol} = -19.3 \text{ kJ/mol}$$

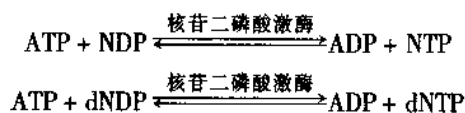
总反应:



(八) ATP 以外的其他核苷三磷酸的递能作用

细胞在能量传递中,除 ATP 作为主要的能量载体外,还有其他一些 5'-三磷酸核苷和 2-脱氧核苷也

参与细胞的能量传递作用。带有 5' - 二或三磷酸的各种核苷在 RNA 合成中作为活化的前体 (precursors), 在其他许多生物合成反应中也起传递高能磷酸基团的作用。所有的核苷 5' - 三磷酸的高能磷酸基团都由 ATP 转移而来。催化转移反应的酶称为核苷二磷酸激酶 (nucleoside diphosphate kinase), 这种酶在细胞溶胶和线粒体中都存在。它的专一性不强, 对除 ATP 以外的其他核苷三磷酸 (NTP) 和核苷二磷酸 (NDP) 之间的高能磷酸基团转移都有可逆的催化作用。



不同的核苷三磷酸在生物合成中的作用往往不同。图 20-3 列出每种核苷三磷酸参与不同生物合成的关系。

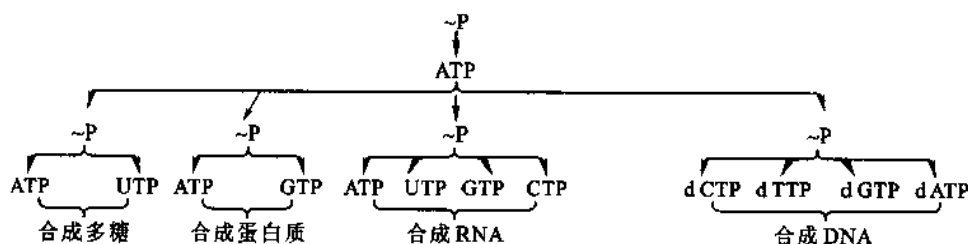
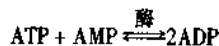


图 20-3 各种核苷三磷酸参与不同生物合成的关系示意图

ATP—腺嘌呤核苷三磷酸, CTP—胞嘧啶核苷三磷酸, GTP—鸟嘌呤核苷三磷酸,
TTP—胸腺嘧啶核苷三磷酸, UTP—尿嘧啶核苷三磷酸

细胞内形成的 AMP 可在腺苷酸激酶 (adenylate kinase) 的催化下, 接受 ATP 的一个高能磷酸基团而形成两分子 ADP。反应式如下:



其他的核苷一磷酸 (NMP) 可在核苷单磷酸激酶的催化下, 使 NMP 接受 ATP 的一个高能磷酸基团而形成 NDP, 反应式如下:



单核苷酸 (NMP) 包括 AMP 的再磷酸化, 只能接受由 ATP 提供的高能磷酸基团。

(九) ATP 系统的动态平衡

如果 ATP 的末端酸酐键水解形成 ADP 和 P_i , 它就会以热的形式释放出自由能。由于酶的作用, 使 ATP 的水解和其他反应相偶联而使它释放的自由能转变为更有用的形式; 在代谢总论中已经讨论过。生活细胞的生命活动无时无刻不需要能量供应。因此 ATP 必需不断地产生。ATP 的周转 (turnover) 是非常迅速的, 前面已经提到。一个处于静息状态的人, 需消耗 40 kg/d 的 ATP。在紧张活动的情况下, ATP 的消耗可达 0.5 kg/min。虽然机体需要如此多的 ATP, 细胞内的 ATP 和 ADP 的转换速度能够适应细胞对能量的需求。即它们在机体总是保持相应的平衡状态。

细胞所处的能量状态用 ATP、ADP 和 AMP 之间的关系式来表示, 称为能荷 (energy charge)。能荷的公式如下:

$$\text{能荷} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

从上式可看出, 能荷是细胞所处能量状态的一个指标。当细胞内的 ATP 全部转变为 AMP 时, 能荷值为“0”。当 AMP 全部转变为 ATP 时, 能荷值成为“1”。可见能荷值是在 0 和 1 之间变动。高能荷值对 ATP 的生成途径有抑制作用, 但是高能荷可以促进 ATP 的应用, 即促进机体内的合成代谢。已知大多数细胞的能荷处于 0.80 到 0.95 之间。细胞内的能荷进一步表明了细胞内 ATP 的产生和利用都处在一个相对稳定

的平衡状态。细胞所处能量状态还可以从 ATP、ADP、和 Pi 的浓度关系着眼,这种关系用下式表示,称为磷酸化势能(phosphorylation potential)。

$$\text{磷酸化势能} = \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]}$$

这种表示方法着重强调 Pi 浓度的作用,而 Pi 的浓度依赖于 ATP 末端磷酸基团的水解,也可以说与 ATP 提供的自由能多少成正比关系。细胞内有一系列的调节机制,一方面调节 ATP 的生成以供给细胞的能量需要,另一方面又调节 ATP 的利用,使它维持在相对稳定的平衡状态,这就构成 ATP 的动态平衡。

细胞内 ATP 维持动态平衡的事实,可用放射性 ^{32}P 作为探针予以证明:曾经用标记的磷酸测定了细胞内 ATP 末端磷酸基团的周转率。将标记的磷酸(^{32}P)注入到活细胞内,随后迅速分离细胞内的 ATP,测定其放射性。实验表明,虽然 ATP 的含量并没有发生变化,但它的末端磷酸基团已经被放射性 ^{32}P 所标记。而且可以看到 ATP 的放射性和无机磷酸的放射性强度完全达到一致。 ^{32}P 取代 ATP 末端磷酸基团的速度以肝细胞为例只需 1~2 min。细菌只需几秒钟。但是在 ATP 分子中与核糖直接相连的 α -磷酸基团的周转率却是很慢的。

提 要

代谢作用中所包括的化学反应是生物体从周围环境获取能量的重要手段。机体内化学反应的能量变化,也遵循热力学的第一和第二定律。那就是,化学反应总是朝着达到其平衡点的方向进行。因为在达到化学平衡点时,该反应系统的熵值与其周围环境熵值的总和处于最高值。而反应的自由能变化为零。形成一个高度有序的生物结构之所以可能,是因为形成有序结构本身的熵降,完全由周围环境中的熵的增加所抵销而且有余。生物体能够巧妙地与环境吸取负熵以维持生存。自由能的概念对研究生物化学过程的力能学具有特别重要的意义。对于生物化学反应,自由能是在恒温、恒压条件下,一个体系作有用功的能力的度量。只有当自由能的变化为负值时,反应才能自发进行。反应的自由能变化与反应的途径无关。反应的自由能变化主要由反应物的性质及其活度(近似于浓度)所决定。当反应物和产物的浓度(近似活度)都是 1 mol/L,反应的温度为 25℃,压力为 101 325 Pa,反应的 pH 为 7 时,所测得的自由能变化值称为标准自由能变化值,标准自由能变化用 ΔG° 表示。每一种有机化合物有其标准生成自由能。利用标准生成自由能可以测得一个反应的标准自由能的变化。一个反应的标准自由能变化还可由公式:

$$\Delta G^{\circ} = -2.303 RT \log K'_{\text{eq}}$$

求得。只要测出反应的平衡常数 K'_{eq} ,就可计算出 ΔG° 值。反之,只要已知 ΔG° 值也可容易地计算出平衡常数。

食物在机体内分解所释放出的自由能,由 ATP 捕获并提供给机体生命活动的需要。ATP 分子所释放的自由能主要蕴藏在 ATP 的两个磷酸酐键内。ATP 水解为 ADP 无机磷酸的 $\Delta G^{\circ} = -7.3 \text{ kcal/mol}$ 。有机化合物如 3-磷酸甘油酸磷酸、磷酸烯醇式丙酮酸水解时可释放出比 ATP 更高的自由能。这些物质可称为超高能化合物(superhigh-energy compound)。有些含磷酸化合物如葡萄糖-6-磷酸的 ΔG° 比 ATP 低,称为低能磷酸化合物。高能磷酸化合物的共同特点是具有容易水解的活泼键。它的水解伴有大量自由能的释放。超高能磷酸化合物可借助其相应激酶的作用将其磷酸基团转移到 ADP 上,使 ADP 变为 ATP。ATP 又将其磷酸基团转移给其他需能的化合物,使其从中获得能量而形成具有较高反应势能的磷酸化合物。因此 ATP 又可在机体内起着中间传递能量的作用,称为能量的共同中间体,或称磷酸基团传递者。机体内有一系列的化学反应可将 ATP 与 ADP 和 Pi 之比 $[\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{P}_i]$ 维持在高的水平,例如,可达到 500 左右。因此,机体内一些在热力学上不可能发生的反应,只需与 ATP 分子的水解反应相偶联,就可使之顺利地顺利进行。除 ATP 作为能量的传递者外,机体内还有一些贮能物质。磷酸精氨酸是昆虫细胞的贮能物质。这类化合物的磷酸基团只能转移到 ADP 分子上,使之形成 ATP。

ATP 分子既可水解下一个磷酸基团(γ -磷酸基团),又可同时水解下两个磷酸基团(β 和 γ -磷酸基团)而形成 AMP 和焦磷酸。这种水解方式可在某些生物合成中具有特殊意义。所形成的 AMP 可在腺苷

酸激酶的作用下,由 ATP 提供一个磷酸基团而形成 ADP。ADP 又可迅速地接受另外的磷酸基团而形成 ATP。在生活细胞内 ATP 末端磷酸基团的周转是极其迅速的,而 ATP 的含量却维持在一个相对稳定的水平。这是一种动态稳定。这种动态稳定表明 ATP 末端磷酸基团的消耗和再生的速度是相对平衡的。

生物机体是一个开放体系,与外界不断地进行着物质的交换与能量的交换。这种不断进行的物质与能量的交换,驱使着这个体系远离其平衡态。在机体所处的条件下,这一开放体系处于稳定态。稳定态和平衡态的概念完全不同。平衡态时的能量交换等于零,而稳定态的维持需要有能量和物质的不断供应,也就是说消耗着能量与物质。

机体内的任何活动规律都不违背热力学定律。因此掌握机体内的热力学规律可帮助我们更深入地理解生命现象。

习 题

1. 就某些方面而论,热力学对于生物化学工作者更为重要,为什么?

2. 考虑下列提法是否正确?

- (1) 在生物圈内,能量只能从光养生物到异养生物,而物质却能在这两类生物之间循环。
- (2) 生物机体可利用体内较热部位的热能传递到较冷的部位而做功。
- (3) 当一个系统的熵值降低到最低时,该系统即处于热力学平衡状态。
- (4) 当 ΔG° 值为 0.0 时,说明反应处于平衡状态。
- (5) ATP 水解成 ADP 的反应, ΔG° 约等于 ΔG° 。

[(1) - 是, (2) - 非, (3) - 非, (4) - 非, (5) - 非]

3. 怎样可以判断一个化学反应是否能够自发进行?

4. 怎样判断一个化学反应进行的方向? 当反应物和产物的起始浓度都为 1 mol 时,请判断下列反应的进行方向。(参看表 20-3 中的数据)。

- (1) 磷酸肌酸 + ADP \rightleftharpoons ATP + 肌酸
- (2) 磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP \rightleftharpoons 丙酮酸 + ATP
- (3) 葡萄糖 6-磷酸 + ADP \rightleftharpoons ATP + 葡萄糖

[(1) - 向右, (2) - 向右, (3) - 向左]

5. 解释 ATP 的 γ -磷酸基团转移到葡萄糖 6-磷酸的磷酸酯键 ($\Delta G^{\circ} = 13.8 \text{ kJ/mol}$) 上,一般情况下,为什么在热力学上可行? 逆反应是否可行?

6. 从 ATP 的结构特点说明 ATP 在能量传递中的作用。

7. ATP 水解成 ADP + Pi 的 ΔG° 是 -30.5 kJ/mol ,

(1) 试计算此反应的平衡常数。

(2) 此反应在细胞内是否处于平衡状态?

[(1) $K'_{\text{eq}} = 2.2 \times 10^5$, (2) 否]

8. 在细胞内是否 ATP 水解的 ΔG° 通常比 $\Delta G'$ 更负? 为什么?

[是, $\Delta G' = \Delta G^{\circ} + RT \ln K$, $\Delta G' \approx -41.84 \text{ kJ/mol}$]

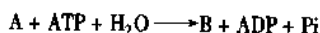
9. 利用表 20-3 的数据试计算:

ATP + 丙酮酸 \rightleftharpoons 磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP 的反应在 25°C 下,其 ΔG° 和 K'_{eq} 值。若 ATP 与 ADP 之比为 10 时,求丙酮酸与磷酸烯醇式丙酮酸的平衡比。($\Delta G^{\circ} = +31.38 \text{ kJ/mol}$, $K'_{\text{eq}} = 3.06 \times 10^6$, 平衡比是 8.28×10^4)

10. 假设有一个由 A 向 B 的转化反应 ($A \rightarrow B$), 它的 $\Delta G^{\circ} = 20 \text{ kJ/mol}$ 请计算:

a. 在达到平衡时 $[B]/[A]$ 的比值。

b. 假设 A 和 B 参加的反应正与 ATP 水解为 ADP 和 Pi 同时进行,总反应是:



请计算此反应达平衡时 $[B]/[A]$ 的比值,假设 ATP、ADP 和 Pi 都是 1 mol 浓度,请问在什么时候该反应才达到平衡?

c. 已知 $[\text{ATP}]$ 、 $[\text{ADP}]$ 和 $[\text{P}_i]$ 在生理条件下都远非 1 mol 浓度。当 $[\text{ATP}]$ 、 $[\text{ADP}]$ 和 $[\text{P}_i]$ 依次为 8.05 mmol, 0.93 mmol 和 8.05 mmol 时,求出一个与 ATP 偶联反应的 $[B]/[A]$ 比值。

[a. 比值 $= 3.1 \times 10^{-4}$; b. $[B]/[A] = 69.4$; c. $[B]/[A] = 7.5 \times 10^4$]

主要参考书目

1. 黄子卿. 物理化学. 北京: 高等教育出版社, 1957
2. 吉林大学等. 物理化学. 北京: 人民教育出版社, 1979
3. 李庆国, 汪和睦, 李安之. 分子生物物理学. 北京: 高等教育出版社, 1992
4. 沈同, 王镜岩主编. 生物化学(下册). 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1991
5. Edsall J T, Gutfreund H. *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*. Wiley, 1983
6. Atkins P W. *The Second Law*. New York: Scientific American Books Inc, 1984
7. Lehninger A L. *Bioenergetics, The Molecular Basis of Biological Energy Transformations*. 2nd ed. Benjamin, 1971
8. Price N N, Dwek R A. *Principles and Problems in Physical chemistry for biochemists*. Oxford: Clarendon Press, 1979
9. Lehninger A L. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers Inc, 1982
10. Zubay G. *Biochemistry*. Addison-Wesley Pub Comp, 1984
11. Hanson R W. The role of ATP in metabolism. *Biochem Educ*. 1989;17:86 ~ 92
12. Alberty R. A. Levels of thermodynamic treatment of biochemical reaction system. *Biophys J*. 1993;65:1 243 ~ 1 254
13. Stryer L. *Biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and comp, 1995
14. Tinoco I, Jr, Saenger K, Wang J C. *Physical chemistry: Principles and Applications in Biological sciences* 3rd ed. New York: Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, 1996
15. Van Holde E K, Johnson W C, Ho P S. *Principles of Physical Biochemistry*. New York: Prentice-Hall Inc Upper Saddle River, 1998. 243
16. Bergelson P R. *The Physical Basis of Biochemistry*. New York: Springer-Verlag, 1998

(王镜岩)

第 21 章 生物膜与物质运输

生物膜的主要功能可归纳为:① 能量转换,② 物质运输,③ 信息识别与传递。能量转换在线粒体氧化磷酸化和叶绿体光合磷酸化有关章节中叙述。信息识别与传递不拟在本章中叙述。本章将着重介绍生物膜与物质运输。

生物膜的通透性具有高度选择性,细胞能主动地从环境中摄取所需要的营养物质,同时排除代谢产物和废物,使细胞保持动态的恒定,这对维持细胞的生命活动是极为重要的。大量证据表明,生物界中的许多生命过程都直接或间接与物质的跨膜运输密切相关。例如,神经冲动传播,细胞行为和细胞分化,以及感觉的接受及传导等重要生命过程。因此,了解物质跨膜运输的规律和机制具有重要意义。

下面将主要介绍一些重要的小分子、生物大分子的跨膜运输及其相关分子机制的主要观点。

一、被动运输与主动运输

根据物质运输自由能变化的情况,基本上可分为被动运输和主动运输两大类(图 21-1)。

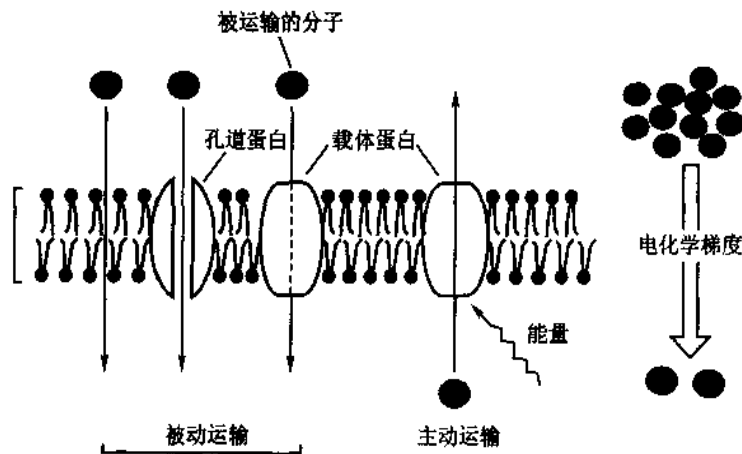


图 21-1 顺电化学梯度的被动运输和逆化学梯度的主动运输
被动运输可自发进行,而主动运输需供给能量

(一) 被动运输 (passive transport)

物质从高浓度的一侧,通过膜运输到低浓度的一侧,即顺浓度梯度的方向跨膜运输的过程称被动运输。如一些离子或分子通过简单的扩散作用进入或出膜。被动运输的主要特点是:物质的运输速率既依赖于膜两侧运输物质的浓度差,又与被运输物质的分子大小,电荷和在脂双层中的溶解性有关。根据热力学第二定律,被动运输过程的自由能减少,熵增加,因此,它是一个不需要供给能量的自发过程。人红细胞膜葡萄糖的运送,红细胞膜带 3(band 3)蛋白运送阴离子(Cl^- , SO_4^{2-} 等)的过程就属于这一运输类型。

(二) 主动运送 (active transport)

如表 21-1 所示,一些离子在细胞内外的含量存在显著差别。在细胞内、外形成的这种离子梯度差显然不能用简单的被动运输来解释。细胞之所以能维持恒定的离子梯度差,是由于细胞膜具有逆浓度梯度主动运输的功能。因此,凡物质逆浓度梯度的运输过程称为主动运输。这一过程的进行需要供给能量。运输过程中自由能增加,其自由能(ΔG)的变化可以下式表示:

$$\Delta G = 2.3 RT \lg(C_2/C_1)$$

C_1 和 C_2 表示运输物质从浓度为 C_1 的一侧运输到 C_2 的一侧, R 为气体常数, T 为绝对温度, 根据热力学第二定律, 如果 $C_2 > C_1$, 则 ΔG 为正值, 这说明运输过程不能自发进行, 因而必须由外界提供能量, 这一过程才能发生。

表 21-1 一个典型的哺乳动物细胞内、外的离子浓度的比较

组 分	细胞内的离子浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞外的离子浓度/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
阳离子		
Na^+	5 ~ 15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}	30	1 ~ 2
Ca^{2+}	1 ~ 2	2.5 ~ 5
(游离浓度: $\leq 10^{-7} \text{ mol/L}$)		
H^+	4×10^{-5}	4×10^{-5}
阴离子		
Cl^-	4	110

如果运输物质带有电荷, 则物质跨膜运输时需要逆两个梯度, 一是浓度梯度, 二是电荷梯度。这二者的总和又称为电化学梯度。我们将物质逆浓度梯度或电化学梯度的运输过程称为主动运输。在后者情况下, 运输过程的自由能(ΔG)变化为:

$$\Delta G = 2.3 RT \lg(C_2/C_1) + ZF\Delta V$$

式中, Z 为运送物质所带的静电荷, F 是法拉第(Faraday)常数, ΔV 是膜电位差。显然, 带电荷物质的逆电化学梯度的运输比不带电荷者要消耗更多的能量。

主动运输的主要特点是: ① 专一性。有的细胞膜能主动运输某些氨基酸, 但不能运输葡萄糖, 有的则相反。哺乳动物的红细胞能迅速摄取 D-葡萄糖, 但运输 D-果糖的速度则很慢。② 运输速度可以达到“饱和”状态。例如, 葡萄糖进入细胞的速度可随外界浓度的增加而加快, 但这种增加有一定的限度, 增加到一定浓度对运输体系即处于“饱和”状态, 即使再增加葡萄糖浓度, 其速度不再增加, 犹如酶分子可被底物分子饱和一样。③ 方向性。例如, 细胞为了保持其内、外的 K^+ 、 Na^+ 的浓度梯度差以维持其正常的生理活动, 细胞主动地向外运输 Na^+ , 而向内运输 K^+ 。④ 选择性抑制。各种物质的运输有其专一的抑制剂阻遏这种运送。例如, 乌本苷(ouabain)专一地抑制 Na^+ 向细胞外的运输, 而肾细胞的葡萄糖运输却被根皮苷(phlorizin)抑制。红细胞阴离子运输被 DIDS(4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonate)抑制, 每一个红细胞膜带 3 蛋白分子大约可以结合 1 分子的 DIDS。⑤ 需要提供能量。如红细胞的 Na^+ 、 K^+ 主动运输的能量主要来自糖酵解产生的 ATP, 如果加入糖酵解过程的抑制剂, 如氟化物, 则运输不能进行。肝或肾细胞中的 Na^+ 、 K^+ 主动运输的能量来自线粒体的氧化磷酸化, 如果加入电子传递体的抑制剂氰化钾或解偶联剂 2,4-二硝基苯酚, 则主动运输过程也被抑制。因此, 主动运输过程的进行, 需要有两个体系存在。一是参与运输的传递体(多肽或蛋白质构成的载体或通道), 二是由酶或酶系组成的能量传递系统。这二者的偶联才能推动主动运送。生物膜中主动运输的实例, 将在下面介绍。

如果根据运输物质的分子大小, 物质运输亦可分为小分子的运输和生物大分子的运输两大类。它们或是通过被动运输或是主动运输进行的。

二、小分子物质的运输

由于生物膜的脂双层结构含有疏水区, 它对被运输物质具有高度的选择通透性。一般来说分子越小

且疏水性或非极性较强,通过膜较易。不带电荷的极性小分子也能迅速地经扩散通过膜。图 21-2 表示脂双层对不同类型分子的透性。小分子的跨膜运输大都是通过专一性运输蛋白(transport proteins)的作用实现。如果只是运输一种分子由膜的一侧到另一侧,称为单向运输(uniport transport);如果一种物质的运输与另一种物质的运输相关而且方向相同,称为同向(symport)运输,方向相反则称为反向(antiport)运输,这二者又统称为协同(cotransport)运输(图 21-3)。下面介绍几种主要的小分子运输体系。

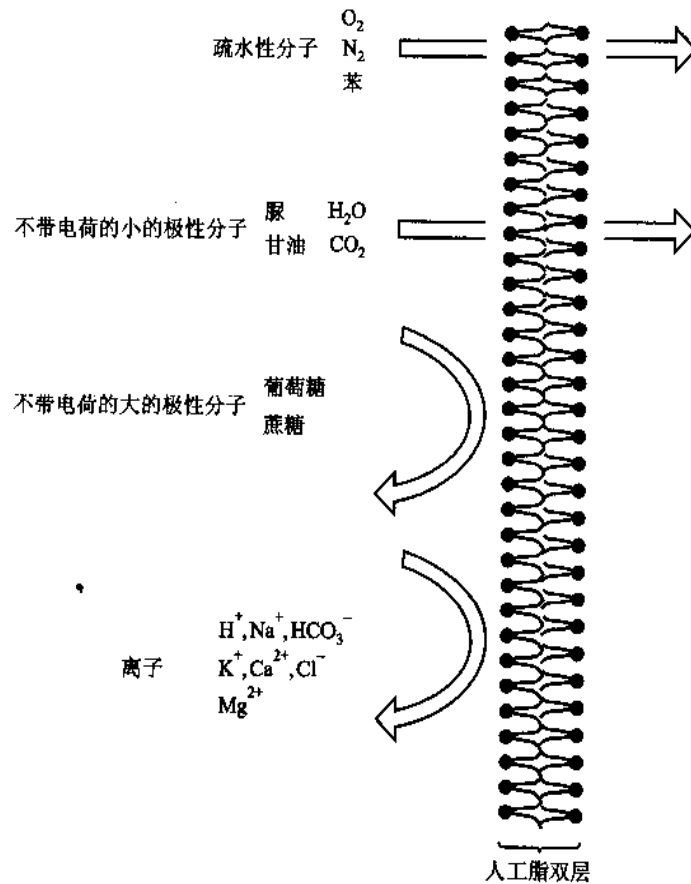


图 21-2 人工脂双层膜对不同类型分子的相对透性

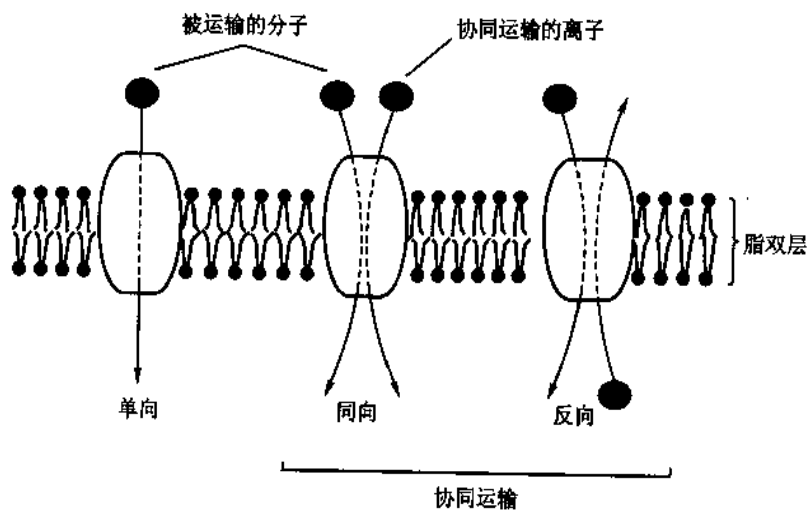


图 21-3 执行单向、同向和反向运输功能的运输蛋白

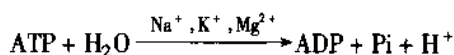
(一) Na⁺和K⁺的运输

无论动物、植物细胞或细菌,细胞内、外都存在着离子梯度差。细胞内是高K⁺低Na⁺,而外环境中则是高Na⁺低K⁺。如红细胞内K⁺的含量比Na⁺高20倍左右,轮藻细胞中的K⁺含量比其生存的水环境中高63倍左右,而叉轴藻细胞中甚至高出1000倍以上。这种明显的离子梯度显然是由于Na⁺或K⁺逆浓度梯度主动运输的结果,执行这种运输功能的体系称为Na⁺,K⁺-泵。

很多研究工作的结果表明,Na⁺,K⁺-泵就是分布于膜上的Na⁺,K⁺-ATP酶:

1. Na⁺,K⁺-泵与Na⁺,K⁺-ATP酶

丹麦科学家Jens C. Skou于1957年首次发现有一种酶,除了有Mg²⁺外,只有在Na⁺和K⁺同时存在时才可以水解ATP,因此命名为Na⁺,K⁺-ATP酶。



Skou提出Na⁺,K⁺-ATP酶是一个跨脂膜的Na⁺,K⁺-泵,即通过水解ATP提供的能量主动向外运输Na⁺,而向内运输K⁺。他的假设主要有以下证据:①Na⁺,K⁺-ATP酶水解ATP的最适活力需要Na⁺和K⁺的存在,Na⁺和K⁺的变化对Na⁺,K⁺-ATP酶的水解活力和运输具有平行性的影响。②Na⁺,K⁺-ATP酶的水解活力与其泵运输活力是定量相关的。③乌本苷是Na⁺,K⁺-泵的专一性抑制剂,它也抑制Na⁺,K⁺-ATP酶的活力。④用重新封闭的红细胞血影(ghost)进行实验的结果更进一步提供了ATP酶如何水解ATP以推动Na⁺,K⁺-泵的证据:a. Na⁺和K⁺的运输与ATP的水解紧密偶联;b. 离子的运输与ATP的水解只有在Na⁺和ATP存在于血影膜内侧,而K⁺存在于膜外侧时才能发生(图21-4);c. 乌本苷只有在血影膜外侧时因竞争K⁺结合位置才能起到抑制作用;d. 每水解1个ATP分子向膜外泵出3个Na⁺,向膜内泵入2个K⁺(图21-4);e. 将提纯的Na⁺,K⁺-ATP酶重建在人工膜脂质体上,当有ATP和Mg²⁺存在时,重建ATP酶具有向膜外运输Na⁺向膜内运输K⁺的功能(图21-5)。用其他不同来源的Na⁺,K⁺-ATP酶的研究也得到了相似的结果。

正是由于Jens C. Skou对Na⁺,K⁺-ATP酶研究的杰出贡献,他与另外两名从事F型ATP酶研究的科学家分享1997年诺贝尔化学奖。

不同来源的Na⁺,K⁺-ATP酶都可提纯。

它是由一个跨膜的催化亚单位α亚基(相对分

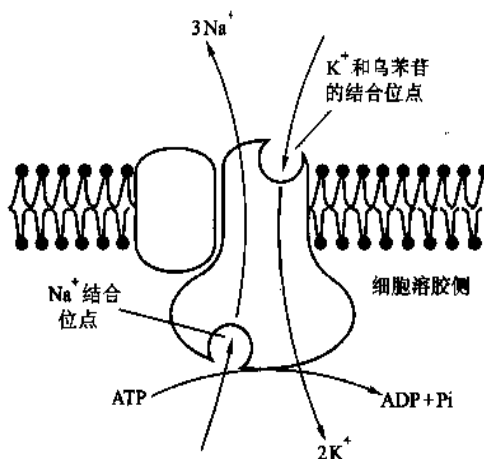


图21-4 Na⁺,K⁺-ATP酶逆浓度梯度主动向细胞外泵出Na⁺和向细胞内泵入K⁺的功能图示
每分解一个ATP分子,泵出3个Na⁺和泵入2个K⁺

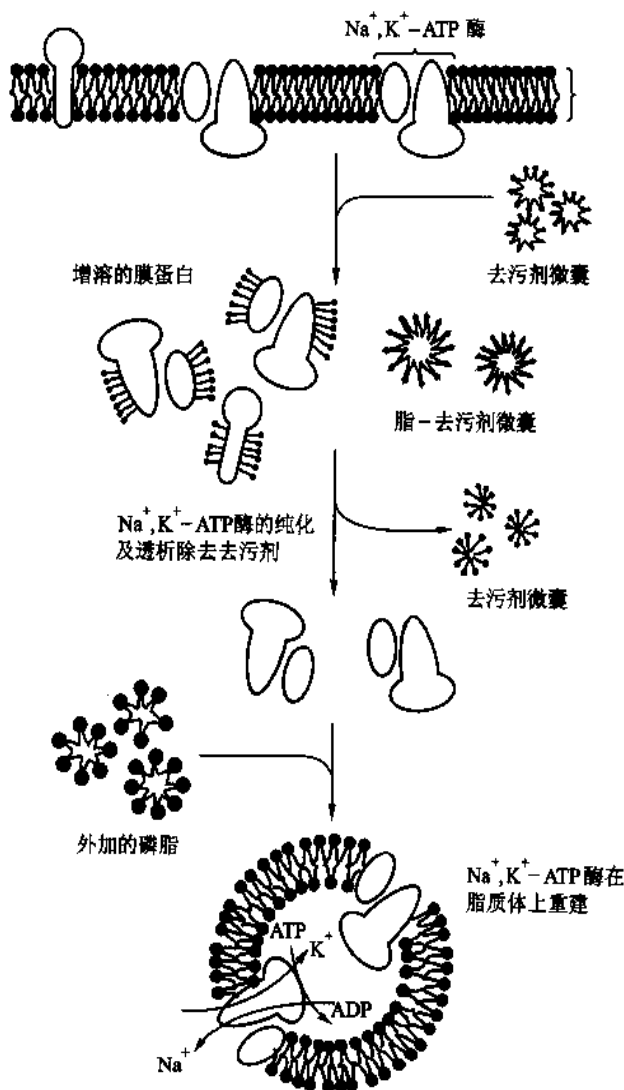


图21-5 Na⁺,K⁺-ATP酶的增溶、提纯及其在人工磷脂膜上的重建

子质量大约 120 000)和与其结合的一个糖蛋白 β 亚基(相对分子质量约 35 000)所组成。它们在膜上相互结合成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体。从 α 亚基一级序列,预测其含有 8 个 α 跨膜螺旋,有位于质膜内侧表面的 Na^+ 和 ATP 的结合位点,在它的外侧表面有 K^+ 和乌本苷的结合位点。至于 β 亚基,只有一个跨膜螺旋,糖蛋白的功能还不清楚。

2. Na^+, K^+ - ATP 酶的作用机制——构象变化假说

令人信服的证据表明,ATP 为 Na^+, K^+ - 泵提供了能量来源。但是,ATP 的水解究竟怎样与 Na^+, K^+ 的运输相偶联呢? Na^+, K^+ - ATP 酶的作用机制如何? 虽然目前还没有高分辨率的 Na^+, K^+ - ATP 酶的三维结构,但是根据实验结果,人们普遍接受构象变化假说。

一些研究表明,正常状态下 Na^+, K^+ - ATP 酶(E_1 构象)在 Na^+ 和 Mg^{2+} 存在下(不需要 K^+)可将 ATP 的末端磷酸基团,转移到 ATP 酶的天氨酸残基上,即 ATP 酶磷酸化,形成 $E_1 - P$ 中间体,与 Na^+ 有关的蛋白磷酸化导致酶的构象发生变化,使 Na^+ 运输至细胞外,酶的构象也随之变成 $E_2 - P$ 构象。其后该 $E_2 - P$ 中间体在 K^+ 存在下(不需要 Na^+ 和 Mg^{2+}),ATP 酶进行去磷酸化导致酶的构象发生变化(E_2),使 K^+ 运输入细胞内,此步反应可被乌本苷抑制。ATP 酶经去磷酸化作用等步骤后构象又回复到原来的状态(E_1), Na^+, K^+ - ATP 酶完整的催化过程见图 21-6 所示。因此,在 Na^+, K^+ 分别向膜外和膜内运输过程中,运输蛋白 ATP 酶经历了磷酸化和去磷酸化过程,而酶本身的构象变化($E_1 \rightarrow E_1 - P \rightarrow E_2 - P \rightarrow E_2 \rightarrow E_1$)调节着 Na^+ 和 K^+ 的运输。每一循环过程需要近 10 ms,每水解 1 个 ATP 分子,定量向膜外主动运输 3Na^+ ,而同时向膜内转运 2K^+ 。这是一种主动向膜外泵出 Na^+ ,向膜内泵入 K^+ 的运输过程,从而维持膜内外的离子梯度差。

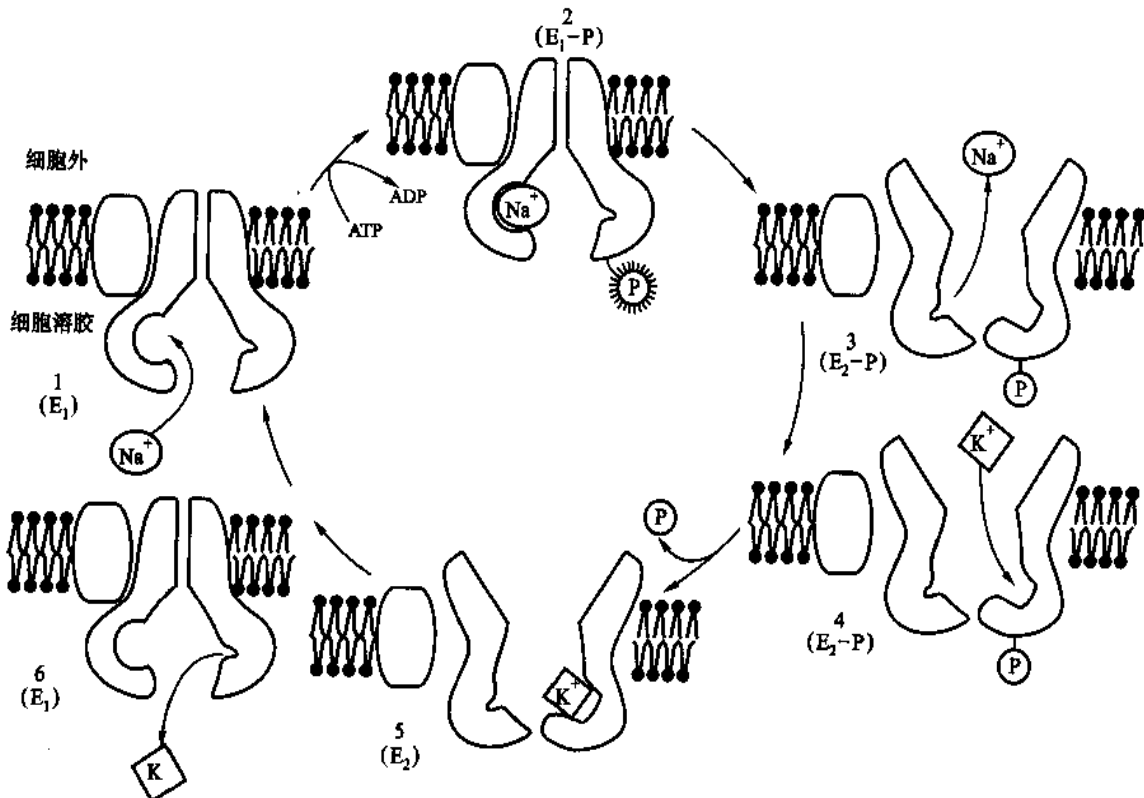


图 21-6 Na^+, K^+ - ATP 酶的作用模型

① Na^+ 的结合;② 和其后的在细胞质侧 ATP 酶的磷酸化;③ 其诱导的构象变化运输 Na^+ 通过膜并在外侧释放;④ K^+ 结合到细胞外表面;⑤ 其后发生磷去磷酸化;⑥ 使蛋白回到原来的构象,并运输 K^+ 通过膜和释放 K^+ 到细胞质侧

由 Na^+, K^+ - ATP 酶维持的离子梯度差具有重要的生理意义。它不仅维持细胞的膜电位,成为可兴奋细胞,如神经、肌细胞等的活动基础,也调节细胞的体积和驱动某些细胞中的糖和氨基酸的运送。

(二) Ca^{2+} 的运输

细胞内、外也存在着明显的 Ca^{2+} 梯度差。如细胞质的 Ca^{2+} 浓度很低, 约在 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ mol/L, 而细胞外的浓度却高达 10^{-3} mol/L。细胞怎样来保持这样大的离子梯度差呢? 研究表明, 主要是通过存在于细胞质膜和细胞内膜系统中的 Ca^{2+} 运输体系的作用实现的。下面主要介绍肌肉细胞中肌质网膜的 Ca^{2+} 运输。

1. Ca^{2+} 泵和 Ca^{2+} - ATP 酶

肌质网(sarcoplasmic reticulum)是肌细胞含有的一种特化的内质网膜系统。在肌细胞中, 它形成一种由许多精细的通道构成的网状结构, 是细胞内重要的 Ca^{2+} 库之一。当肌细胞受到外界刺激(如电刺激产生神经冲动使膜去极化)时, Ca^{2+} 由肌质网释放进入细胞质中, 引起肌肉收缩。当肌肉松弛时, Ca^{2+} 重新摄入肌质网。可见肌肉的收缩和松弛过程, 是 Ca^{2+} 从肌质网释放和再摄入的主动运输过程。这一过程又受到分布于膜上的 Ca^{2+} 泵即 Ca^{2+} - ATP 酶的调节。 Ca^{2+} - ATP 酶催化以下反应:



这里, “外”指肌质网膜外侧, “内”指肌质网膜内侧。

提纯的 Ca^{2+} - ATP 酶重组在人工膜脂质体上, 当加入 ATP 时, 具有将 Ca^{2+} 主动运输入膜内的功能。目前研究较清楚的 Ca^{2+} 泵的主要性质有: Ca^{2+} 泵具有 Ca^{2+} 激活的 Ca^{2+} - ATP 酶活性, 心肌和骨骼肌中 Ca^{2+} 主动运输是通过 Ca^{2+} - ATP 酶的作用实现的; Ca^{2+} 泵主动运输 Ca^{2+} 是通过水解 ATP 提供的能量驱动的。每一分子的 ATP 酶每秒钟大约可水解达 10 个 ATP 分子, 每水解一分子 ATP 运输 2 分子 Ca^{2+} ; Ca^{2+} - ATP 酶是肌质网的主要成分, 占膜总蛋白的 90%, 因而较其他来源的 Ca^{2+} - ATP 酶易于提纯; Ca^{2+} - ATP 酶对 Ca^{2+} 有很高的亲和力, K_m 约为 10^{-7} mol/L。 Ca^{2+} 泵还具有效率高, 容量大的运送功能。

除了上述的 Ca^{2+} 运输体系外, 在真核细胞质膜, 线粒体膜, 内质网膜中都含有 Ca^{2+} 运输体系。比如兴奋性细胞质膜受电压控制的 Ca^{2+} 通道(voltage-dependent Ca^{2+} channel), 质膜的 Ca^{2+} - Na^+ 交换体(Ca^{2+} - Na^+ exchange carrier)和 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} pump), 线粒体内膜的 Ca^{2+} - Na^+ 交换体和质子电化学梯度驱动的电泳单向运输体(electrophoretic uniporter)等。

2. 钙调蛋白(calmodulin, CAM)

钙调蛋白是由 Cheung 和 Kakiuchi 等在 1970 年同时发现的。它在调节神经突触膜、脂肪细胞膜、小肠基底膜以及红细胞膜等的 Ca^{2+} 运输中起重要作用。钙调蛋白可刺激细胞对 Ca^{2+} 的摄取。这种刺激与 Ca^{2+} - ATP 酶活力的增加以及与依赖钙调蛋白的磷酸化的增加有平行关系。这说明 CAM 在 Ca^{2+} 运输中起着重要作用。心肌肌质网膜对 Ca^{2+} 的摄取达到它的最大激活一半所需的 CAM 的浓度约 $10 \sim 20$ nmol/L, 表明 CAM 的调节作用是很强的。每个 CAM 可结合 4 个 Ca^{2+} 。CAM 的作用与细胞内 Ca^{2+} 浓度有关。在 Ca^{2+} 浓度极低时, CAM 主要以不与 Ca^{2+} 结合的非活性状态存在, 也不能激活 Ca^{2+} - ATP 酶, 酶对 Ca^{2+} 的亲和力也很低, 如细胞内的 Ca^{2+} 浓度达 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ mol/L 时, CAM 与 Ca^{2+} 形成复合物, 可与 Ca^{2+} - ATP 酶结合, 并提高酶对 Ca^{2+} 的亲和力, 酶活性增加 6~7 倍, 使 Ca^{2+} 主动运输大大增强, 从而使细胞内 Ca^{2+} 浓度又达到原有稳态水平。

CAM 存在于所有脊椎动物组织中, 而在脑、睾丸和一种电鱼的电板(electroplax)中分布相对丰富。CAM 对热处理和三氯醋酸的沉淀作用有高度的抗性。在 Ca^{2+} 存在下, 它可以和一些药物(如吩噻嗪)相结合, 因而利于大量制备。CAM 是一个小的酸性蛋白, 由 149 个氨基酸组成, 相对分子质量为 16 700。各种肌肉的 CAM 与脑的相似。氨基酸组成中缺乏色氨酸和半胱氨酸, 而天冬氨酸和谷酰胺基残基含量很高, 这可解释其酸性特征, 还有高比例的苯基丙氨酸/酪氨酸(8/2)。

3. Ca^{2+} - ATP 酶的作用机制

Ca^{2+} - ATP 酶在运输 Ca^{2+} 的过程中, 与 Na^+ , K^+ - ATP 酶类似, 也经历了磷酸化和去磷酸化循环过程, 有 E_1 和 E_2 两种构象, E_1 构象对 Ca^{2+} 具有高的亲和力。通过 E_1 和 E_2 两种构象的相互转变, 将 Ca^{2+} 由膜的一侧向另一侧运输(图 21-7)。

Ca^{2+} - ATP 酶是一个跨膜的, 不对称分布的膜结合酶, 在膜上可能以四聚体形式存在。从肌质网膜分

离提纯的 Ca^{2+} -ATP 酶, 相对分子质量约为 110 000, 有 1 015 个氨基酸残基。用电子晶体学方法已确定了 0.8 nm 分辨率肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 (SRCa^{2+} -ATP 酶) 的三维结构(图 21-8)。可以看到, 它由三部分组成: 较大的亲水结构域包含有 ATP 结合位点和磷酸化位点; 跨膜结构域由 10 个 α 跨膜螺旋组成, Ca^{2+} 结合位点在该结构域; 而亲水结构域与跨膜部分由颈部(stalk)相连。用胰蛋白酶处理 Ca^{2+} -ATP 酶, 可分解成两个大小基本相同的肽段, 相对分子质量分别为 57 000 和 55 000, 而大的肽段可继续分解成相对分子质量为 24 000 和 33 000 的两个小肽段, 前者具有运输 Ca^{2+} 的功能, 后者具有水解 ATP 的活性。

(三) 三类驱动离子的 ATP 酶

迄今已知自然界中存在三种类型驱动离子的 ATP 酶, 即 P 型、F 型和 V 型。它们的基本功能是通过水解 ATP 提供的能量转运离子, 或者是通过离子梯度合成 ATP。

P 型 ATP 酶来源于英文磷酸化(phosphorylation)的字头。这类 ATP 酶一般由单肽链组成, 相对分子质量为 100 000 左右, 如 Ca^{2+} -ATP 酶, Na^+ , K^+ -ATP 酶的 α 亚基等, 通过水解 ATP, 转运 Ca^{2+} 或 Na^+ , K^+ 。这类酶的作用机制符合 E_1 - E_2 构象变化假说。

F 型 ATP 酶大量存在于真核细胞中的线粒体内膜上, 通过呼吸链复合体 I~IV 建立的质子梯度, 产生质子推动力(proton-motive force)用于合成 ATP, 因此称其为 F 型 ATP 酶, 或质子 ATP 酶。F 型 ATP 酶一般由 9~12 个亚基组成, 它由镶嵌于膜脂双层部分的 F_0 和朝向基质侧的膜外部分 F_1 构成, 一般还认为含有连接 F_1 和 F_0 的柄部如 OSCP(致寡酶素敏感蛋白)。 F_0 的功能是转运质子, 主要由 12 个 c 亚基、a 亚基和 2b 亚基组成; F_1 由 3 α 亚基、3 β 亚基、 γ 亚基、 δ 亚基和 ϵ 亚基组成。 F_1 的功能是合成 ATP。F 型 ATP 酶的催化机制是由 Paul D. Boyer 提出的结合变构(binding-change)假说: α 亚基和 β 亚基交替排列成橘子瓣状 $\alpha_3\beta_3$ 六聚体, 而 γ 亚基、 δ 亚基和 ϵ 亚基呈不对称分布。跨膜质子梯度使 γ 亚基转动, 从而带动 β 亚基结构变化, 使 β 亚基结合 ATP 能力变化。John E. Walker 成功地解析了 F_1 三维精细结构, 证明了 Boyer“结合变构”假说。为此, Boyer 和 Walker 并与前述研究 Na^+ , K^+ -ATP 酶的丹麦科学家 Jens C. Skou 共享 1997 年诺贝尔化学奖。

V 型 ATP 酶由于主要分布于真菌(fungi)和酵母的微囊上(vacuoles), 因而叫做 V 型 ATP 酶。它的功能与 F 型 ATP 酶刚好相反, 是通过水解 ATP 释放的能量转运质子, 是致电质子泵(electrogenic pump)。V 型 ATP 酶还没有三维结构的报道, 但从其亚基的分离、分析以及氨基酸一级序列上看, V 型 ATP 酶与 F 型属同源体, 与 F-型 ATP 酶一样, V-型 ATP 酶也有膜外部分 V_1 (相当于 F_1)和跨膜部分 V_0 (相当于 F_0)两部

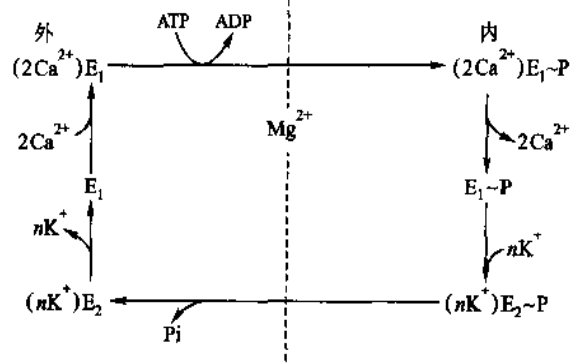


图 21-7 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶作用机制假设 Ca^{2+} 的结合与释放, 和蛋白的磷酸化与去磷酸化及其伴随的蛋白构象由 E_1 到 E_2 的变化及其相互转变所产生的 Ca^{2+} 释放和重新结合的循环过程与 Na^+ , K^+ -ATP 酶的作用模型相似



图 21-8 肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 0.8 nm 分辨率结构

分组成。按亚基相对分子质量从大到小顺序, V_1 由 3A 亚基(相当于 F 型 β 亚基)、3B 亚基(相当于 F 型 α 亚基)、D 亚基、E 亚基和 F 亚基等组成,其功能是水解 ATP; V_0 由 9~12 个 c 亚基等组成,其功能是转运质子。

P 型、F 型和 V 型三类 ATP 酶的基本性质见表 21-2。

表 21-2 P 型、F 型和 V 型三类 ATP 酶的基本性质

ATP 酶	肽链	功能	催化机制	抑制剂	例子
P 型	单肽链	水解 ATP	$E_1 - E_2$ 构象变化	VO_3^- Ouabain	$Ca^{2+} - ATPase$ $Na^+, K^+ - ATPase$
F 型	多亚基	合成 ATP	结合变构	Oligomycin, DCCD	$F_1F_0 - ATPase$
V 型	多亚基	水解 ATP	结合变构	NEM, NO_3^-	V - ATPase

(四) 阴离子运输(anion transport)

阴离子跨膜运输也是通过存在于膜上的运输体系进行的。目前研究较多的是红细胞膜上的带 3 蛋白(band3)的阴离子运输功能。带 3 蛋白其名系源于它在 SDS 凝胶电泳上相对于其他蛋白的位置而来。

带 3 蛋白是一个跨膜分布的内在性糖蛋白。在膜上以二聚体形式存在。每个红细胞有大约 5×10^5 二聚体。二聚体也可发生交联形成多聚体。带 3 蛋白是以扩展的多肽链多次跨脂双层膜分布的,具有多折叠的或球状构象(a more folded or globular conformation)(图 21-9)。带 3 蛋白的氨基末端位于细胞内侧。目前对带 3 蛋白跨膜螺旋区的氨基酸组成、结构的序列及其阴离子运输的关系等都在进行深入研究。

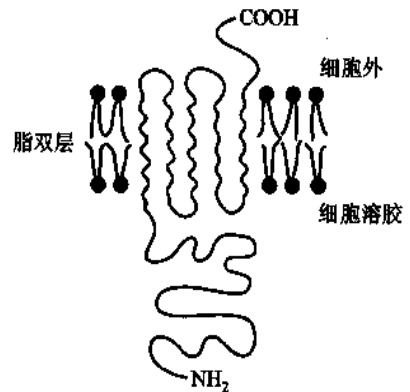


图 21-9 带 3 蛋白(band 3)在人工红细胞中的可能分布图示
带 3 蛋白是多次跨脂双层膜分布的。它的氨基末端是在细胞内侧

带 3 蛋白在红细胞执行 $O_2 - CO_2$ 交换功能中起着重要作用。红细胞膜上存在有专一性的负责 $HCO_3^- - Cl^-$ 交换的阴离子通道。当用放射性标记的专一性抑制剂 $^3H_2 - DIDS$ 标记红细胞膜蛋白时,发现 DIDS 专一性地与膜上带 3 蛋白相结合,同时带 3 蛋白的阴离子(如 Cl^-)交换功能即被抑制。这证明膜上的阴离子通道蛋白就是带 3 蛋白。并且实验证明,DIDS 的结合位点是在位于带 3 蛋白 C 端的第 558 或 561 位的赖氨酸残基上。用重新封闭的红细胞血影膜的实验,也证明 Cl^- 的运输是通过带 3 蛋白进行的。

带 3 蛋白执行阴离子交换功能的分子机制,目前实验证据较多的是“乒-乓”(ping-pang)机制假设。认为一个阴离子在细胞外表面进入运输位点之后,发生转运,并在细胞质一侧释放,然后细胞质侧的一个阴离子又结合到空出的运输位点上,并被运输到细胞外去,当它释放时,细胞外面的一个运输位点又可用于开始新的循环运输。这好似一对一的交换运输。

带 3 蛋白占红细胞膜蛋白的 25% 左右,如果抽提掉外周蛋白—血影收缩蛋白(spectrin)后计算,则可达膜蛋白的 70%。每个红细胞含 1.2×10^6 个分子的带 3 蛋白。它的相对分子质量约为 100 000,含大约 800 个氨基酸残基,37.5% 是疏水性氨基酸。它的 N-端是乙酰甲硫氨酸,C-端是赖氨酸。糖通过天冬酰胺与蛋白质相连接,共含 29 个糖残基,主要是半乳糖,N-乙酰葡萄糖胺,以及少量的甘露糖,岩藻糖与唾液酸等。

(五) 糖和氨基酸的运送

1. 协同运输(co-transport)

一些糖或氨基酸的主动运输并不是直接通过水解 ATP 提供的能量推动,而是依赖于以离子梯度形式贮存的能量。在动物细胞中形成这种离子梯度的通常是 Na^+ 。在小肠或肾细胞中葡萄糖的运输是伴随 Na^+ 一起输入细胞的,所以这种运输称为协同运输(co-transport)。协同运输假设认为,由于膜外 Na^+ 浓

度高, Na^+ 电化学梯度流向膜内, 葡萄糖利用 Na^+ 梯度提供能量, 通过专一性的运输载体, 伴随 Na^+ 一起运输入细胞。 Na^+ 梯度越大, 葡萄糖进入的速度越快。如果细胞外的 Na^+ 浓度明显减少, 葡萄糖的运输也就减慢或停止, 但是, 进入膜内的 Na^+ 通过质膜上的 Na^+, K^+ - 泵又运输到膜外以维持 Na^+ 浓度梯度, 从而使葡萄糖不断利用离子梯度形式的能量进入细胞(图 21-10)。所以, 葡萄糖的运输虽不直接利用 ATP, 但间接利用 Na^+, K^+ - 泵产生的离子梯度所提供的能量进行协同运输。动物细胞质膜中氨基酸的运输, 也是通过运输蛋白伴随 Na^+ 进行协调运输的。应提及的是, 在细菌中, 很多糖与氨基酸的运输是由质子梯度推动的。换言之, 在协同运输中, 伴随的不是 Na^+ , 而是 H^+ 。在大肠杆菌中, 每运输一个乳糖分子进入细胞, 伴随着一个 H^+ 的协同运输。在线粒体和较低等的真核细胞膜中也存在这种协同运输。

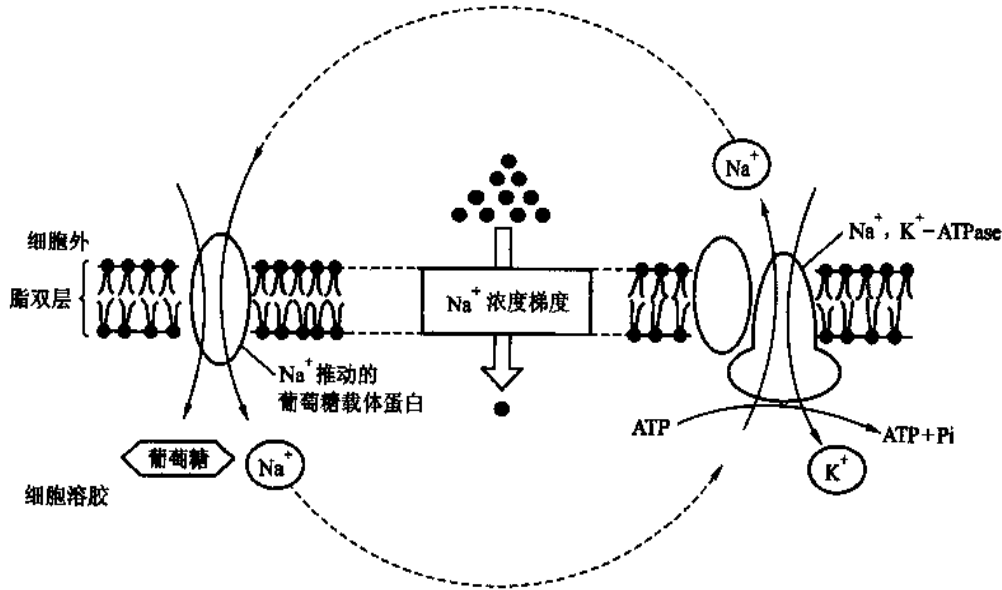
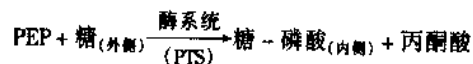


图 21-10 葡萄糖的同向运输图示

表明葡萄糖的主动运输是由 Na^+, K^+ - ATP 酶维持的, Na^+ 梯度推动的

2. 基团运输 (group transport)

一般来说, 物质通过膜运输时不需进行化学修饰, 但有些糖在通过细菌膜时需要进行磷酸化反应加入一个磷酸基团, 以糖-磷酸的形式才能通过膜, 称为基团运输。一个最明显的例子是 1964 年由 Rosman S 等在大肠杆菌中发现的磷酸烯醇式丙酮酸转磷酸化酶系统即 PTS (phosphoenolpyruvate (PEP) - linked phosphotransferase system) 系统。在这里不是利用 ATP 而是利用磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 作为磷酸基团的供体, PEP 经 PTS 催化转移磷酸基团使糖磷酸化并运送通过细胞膜。这个系统催化的总反应是:



在这个反应中, 糖磷酸化的能源是由 PEP 提供的, 因此它也是一种主动运输(图 21-11)。细菌中的脂肪酸, 嘌呤和嘧啶等的运输也可能是通过基团运输机制进行的。

(六) ATP/ADP 交换体 (ATP/ADP exchanger)

真核细胞的线粒体是合成 ATP 的主要场所, 而细胞很多利用 ATP 的代谢过程主要是在细胞质中。因此, 通过什么机制将合成的 ATP 进行跨线粒体内膜运输的呢? 这种运输功能是通过分布于线粒体膜上的 ATP/ADP 交换体进行的, 通过呼吸作用形成的跨线粒体膜的膜电位(内负、外正), 使 ATP/ADP 交换体易于向外运输 ATP, 向内运输 ADP, 这一交换过程如图 21-12 所示。

分离提纯的 ATP/ADP 交换体是一个相对分子质量为 30 000 的多肽, 在膜上是以二聚体形式存在的。如果解离成单体, 则失去其对运输物质的亲和力, 起作用的是二聚体形式。生物化学与动力学研究, 都支持 ATP/ADP 交换体作用机制的两态闸门-孔道机制 (two-state gated-pore mechanism) (图 21-13) 假说。认为每一个二聚体交换蛋白只含有一个核苷酸结合位点。当它面向膜外表面时, 对 ADP 具有高的亲和

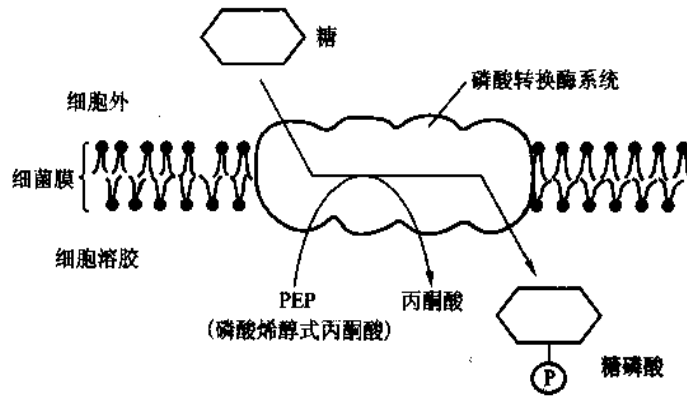


图 21-11 细菌中糖通过基团运送的主动运送
细菌膜中蛋白质的“磷酸转移酶体系”使糖在通过膜的运送中磷酸化。磷酸基团的供体不是 ATP 而是磷酸烯醇式丙酮酸

力,而面向膜内侧时,对 ATP 具有高的亲和力。核苷酸的结合位点的这两种状态可以通过蛋白的构象变化而相互转变,从而实现核苷酸的交换。

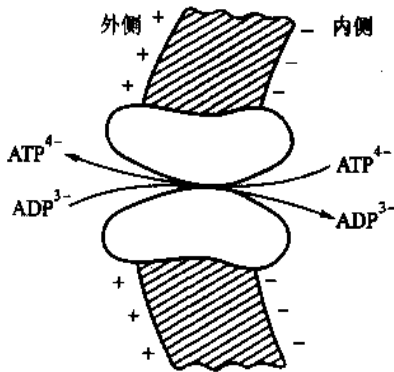


图 21-12 线粒体内膜的 ATP/ADP 交换体二聚体蛋白执行线粒体内的 ATP 对在细胞质中由代谢反应所形成的 ADP 的交换。膜电位(内为负)有利于这一交换反应的进行

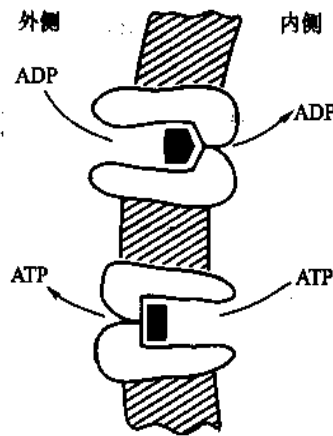


图 21-13 线粒体内膜 ATP/ADP 交换体作用的分子机制模型
二聚体蛋白可能仅有一个腺核苷酸的结合位点。当它面对膜的外表面时,结合位点对 ADP 有高的亲和力(如图中五边形),而对 ATP 有低的亲和性(如图中的直角形)。当它面对膜内表面时,则相反。结合位点的这两种状态可相互转变,这表明交换体蛋白具有不同的构象

三、生物大分子的跨膜运输

如前所述,小分子的跨膜运输主要是通过运输蛋白体系来实现的。但是,像多核苷酸,或多糖等生物大分子甚至颗粒物的运输,则主要是通过胞吐作用(exocytosis),胞吞作用(endocytosis),包括受体介导的内吞作用(receptor-mediated endocytosis)等运输的。蛋白质跨膜运输除胞吞、胞吐,还有跨内质网膜和跨线粒体膜、叶绿体膜等运输类型。

(一) 胞吐作用

细胞内物质先被囊泡裹入形成分泌泡,然后与细胞质膜接触、融合并向外释放被裹入的物质,这个过程,称为胞吐作用(图 21-14)。真核细胞中的分泌作用通常是通过胞吐作用发生的。如胰岛素的分泌,产胰岛素的细胞将胰岛素分子堆积在细胞内的囊泡里,然后这种分泌囊泡与质膜融合并打开,从而向细胞外释放胰岛素。有些囊泡携带来自高尔基体新合成的质膜组分送到质膜上去,也是通过相似的过程进行

的。许多可以影响细胞分泌的因素也影响细胞的胞吐作用,当细胞质中的 Ca^{2+} 浓度增加,导致分泌泡与质膜融合而启动胞吐作用,从而释放分泌泡中的内含物到细胞外去。神经因素引起腮腺(parotid gland)和肾上腺髓质细胞分泌,血浆中的葡萄糖促进胰岛细胞的分泌都是通过细胞膜的去极化,使 Ca^{2+} 进入细胞而引起的。当神经冲动传至突触前膜时,由于膜的去极化,让 Ca^{2+} 进入,从而使突触细胞质内大量的贮存泡与突触前膜相融合,而将所含的乙酰胆碱释放至突触隙内,然后乙酰胆碱与突触后膜上的受体相结合,使神经兴奋继续传递下去。又如海胆卵受精时,皮质颗粒(cortical granules)通过与细胞质膜的融合而将其内含物排至细胞外的过程也需 Ca^{2+} 参与等。除 Ca^{2+} 外,也需要 ATP 提供能量,胞吐作用才能发生。

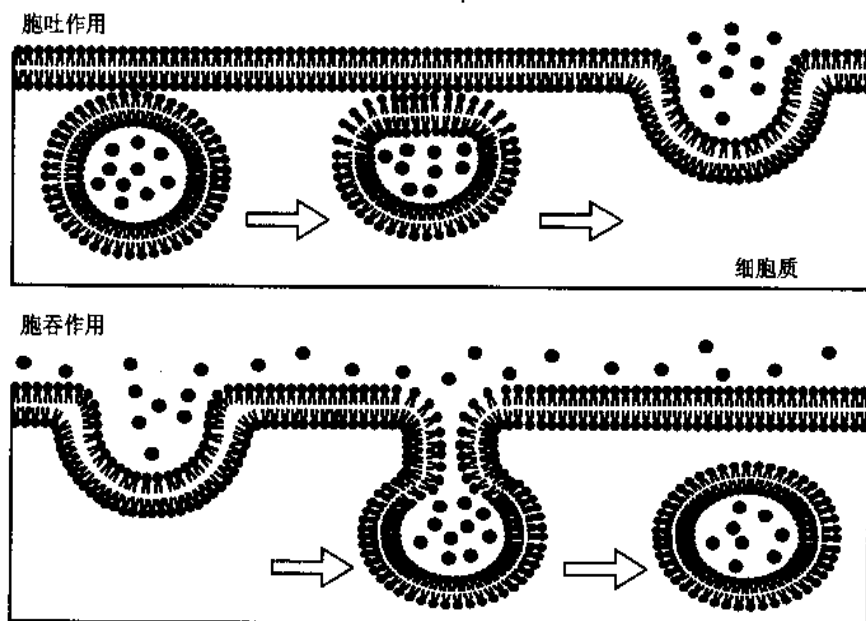


图 21-14 两种膜融合过程——胞吐作用和胞吞作用中的脂双层的粘附和联合图示在胞吐作用的脂双层的粘附过程中,是质膜的两细胞质侧的单层产生粘附,而在胞吞作用中,则是质膜的两层非细胞质侧的单层粘附。这种差别,可能提示胞吐作用和胞吞作用是分别被调控的

胞吐过程中,在分泌囊泡与细胞质膜相互融合并将其内含物排出后,分泌囊泡膜也就参入到质膜中去成为细胞膜的一部分,其后,也可能降解或“回流”(recycling)而被重新利用参加到新的分泌囊泡中去。

(二) 胞吞作用

细胞从外界摄入的大分子或颗粒,逐渐被质膜的一小部分包围,内陷,其后从质膜上脱落下来而形成含有摄入物质的细胞内囊泡的过程,称为胞吞作用(图 21-14)。可见,它的形成过程恰与胞吐作用相反,胞吞作用又可分为吞噬作用(phagocytosis)、胞饮作用(pinocytosis)以及受体介导的胞吞作用。

1. 吞噬作用

凡以大的囊泡形式(常称为液泡 vacuoles)内吞较大的固体颗粒、直径达几微米的复合物、微生物以及细胞碎片等的过程,称为吞噬作用。例如,原生动物摄取细菌和食物颗粒;高等动物的免疫系统的巨噬细胞内吞内侵的细菌等。吞噬又可分为吸附和吞进两个相对独立的过程。总的来说,吞噬作用是一个需能的主动运输过程,但吸附并不需要能量。一般认为,被吞噬的颗粒在细胞表面的吸附并不具有明显的专一性。

2. 胞饮作用

它是指以小的囊泡形式将细胞周围的微滴状液体(微滴直径一般小于 $1\ \mu\text{m}$)吞入细胞内的过程。被吞进的微滴常含有离子或小分子,胞饮作用也不具有明显的专一性。绝大多数细胞都具有胞饮作用,即使哺乳动物的红细胞在适合条件下也能进行胞饮作用。

3. 受体介导的胞吞作用

它是指被内吞物(称为配体 ligand,它们或是蛋白质或是小分子)与细胞表面的专一性受体相结合,并

随即引发细胞膜的内陷,形成的囊泡将配体裹入并输入到细胞内的过程。因此,它是一种专一性很强的胞吞作用。能使细胞选择性地摄入大量的专一性配体,无需像胞饮作用那样摄入体积相当大的细胞外液。

例如,动物细胞摄取胆固醇的过程就是通过受体介导的内吞作用实现的。细胞摄取胆固醇是进行膜的生物合成所必需的。胆固醇是作为一种低密度脂蛋白(low-density lipoprotein- LDL)复合物形式被运输的。LDL是一种大的球形颗粒,直径约22 nm,每一个LDL有一个由大约1500个胆固醇脂分子组成的核心,其周围被含有单一蛋白质的脂双层包围。LDL的运输过程如图21-15A所示。当动物细胞需要胆固醇进行生物膜合成时,产生的LDL受体蛋白插入质膜中,并迁移至被膜区与被膜区相结合。随后,被膜区脱落而形成被膜囊泡。因此,结合于LDL受体的LDL颗粒迅速实现内部化而完成胞吞作用。其后,被膜囊泡迅速失去其被膜并与其他囊泡形成较大的称为胞吞小体(endosome)的囊泡,并依次与初级溶酶体融合形成次级溶酶体。以LDL形式存在的胆固醇脂在溶酶体中水解成游离的胆固醇,而用于新的生物膜合成。也像其他一些内吞囊泡膜的组分一样,大多数进入细胞的LDL受体蛋白在溶酶体中并不被破坏,它们可迅速地返回到质膜中去,与被膜区重新结合,又回流入细胞中去。

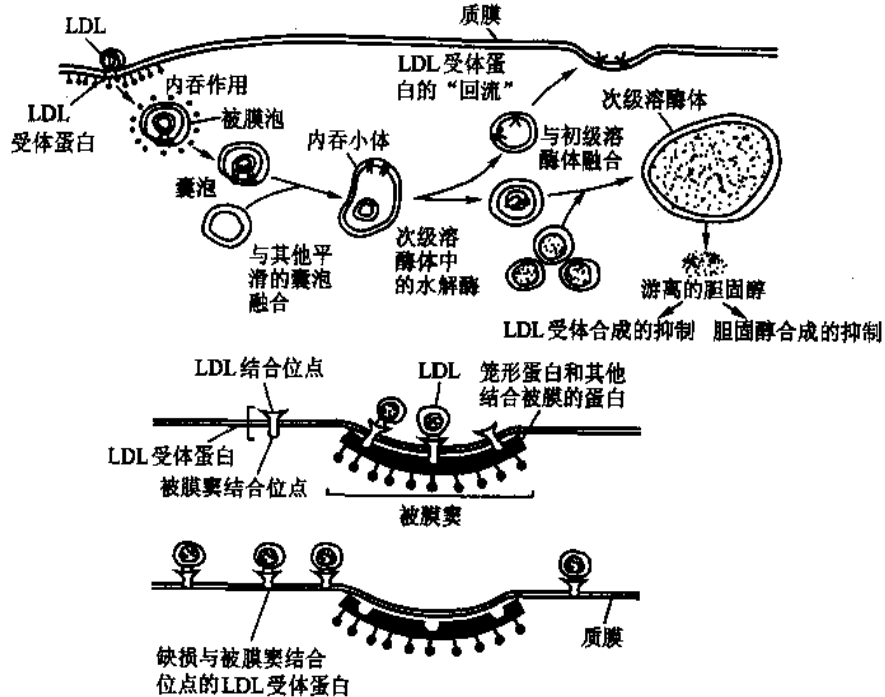


图 21-15 受体介导的胞吞作用图示

通过被膜区和囊泡受体介导的 LDL 内吞作用调节着细胞的胆固醇水平。当 LDL 在次级溶酶体中分解时, LDL 受体蛋白由内吞小体放回并流至质膜。正常细胞质膜的 LDL 受体蛋白具有被膜区结合位点因而能结合于被膜区。有些 LDL 受体即使未结合 LDL, 仍定位于被膜区中。对于一个突变细胞来说, 由于 LDL 受体蛋白不正常, 缺失能使其结合到被膜区上的位点, 这些细胞虽结合 LDL, 但并不能摄入它

一个正常细胞的 LDL 受体, 可以结合 LDL 并且与被膜区结合完成胞吞作用(图 21-15B)。但是, 有些个体因遗传性缺损产生 LDL 受体的基因, 因而细胞不能从血液中摄取 LDL, 使血液中胆固醇水平升高, 导致患动脉粥样硬化的冠状动脉疾病, 其原因之一乃是 LDL 受体缺失结合被膜区的位点。虽然结合 LDL 的受体的数量可能并无差异, 但是它们并不能定位于质膜的被膜区中(图 21-15C), 因而也就不能实现内部化而完成胞吞作用, 继而不可能完成如图 21-15A 示的过程。这清楚表明, 被膜区在受体介导的胞吞作用中起着重要作用。

在大多数真核细胞中含有一类称为被膜泡(coated vesicles)的特殊囊泡, 它是通过质膜的被膜区(coated region)的内陷、脱落而形成的。这种被膜区称为被膜(coated pits)。在电镜下可以看见在囊泡的细胞质一侧表面覆盖有类似短刚毛(bristlelike)的结构。在成纤维细胞(fibroblast)中, 被膜区占细胞表面的 2%。内

吞的被膜泡,在形成后很快(数秒内)失去其被膜(coats),然后与细胞内其他囊泡融合,并将其内含物传至溶酶体。分离的被膜泡含有几种主要蛋白质,其中研究较多的是笼形蛋白(clathrin),它是一种纤维蛋白,相对分子质量为 180 000,与一个相对分子质量约 35 000 的小肽一起,在被膜泡的表面形成一具有特征性的多面体被膜(polyhedral coat)。已有的研究表明,笼形蛋白在质子跨膜转位中起着重要作用。

胞吞囊泡具有多种形状和不同大小,直径一般在 50~400 nm。由于相互融合或与细胞其他囊泡融合,因而常呈膨大状。胞吞的速度也因细胞类型不同而异,但一般来说,速度相当惊人。例如,巨噬细胞每小时饮入的液体可达细胞体积的 25% 左右,而阿米巴的饮入速度比巨噬细胞的更高。它们大多数最终要与溶酶体融合。但有些也可穿过细胞质,通过外排作用在细胞的另一表面释放其内含物。

四、离子载体(ionophores)

离子载体是一类可溶于脂双层的疏水性的小分子,它增加脂双层对离子的透性。因此,在天然膜和人工膜的研究中,广泛用于增加膜对一些特殊离子的透性,是研究离子运输的一个有用的工具。大多数离子载体是由微生物合成的,有些离子载体就是抗生素。

离子载体大体上可分为两类:移动性离子载体(mobile ion carrier)和通道形成体(channel former)(图 21-16)。属于前者的有缬氨霉素(valinomycin), A23187 和尼日利亚菌素(nigericin)等。属于后者的如短杆菌肽 A(gramicidin A)。

(一) 缬氨霉素

它是由链霉菌(*Bacterium streptomyces*)分离的一种抗生素,其结构如图 21-17A 所示。它对结合 K^+ 具有高度的选择性。实验证明,不能用 Na^+ 取代 K^+ 。它与 K^+ 形成缬氨霉素- K^+ 复合物,有效地屏蔽了分子内部的亲水基团,而使分子的四周呈疏水性(图 21-17B)。因

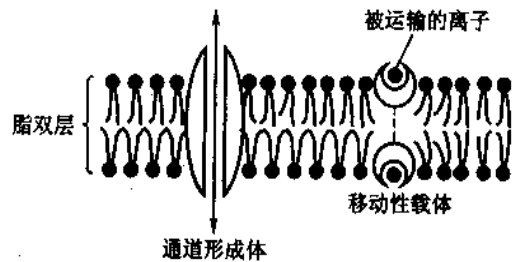


图 21-16 移动性离子载体和形成通道的泳电离子的图示

二者仅在顺电化学梯度条件下发生净的离子流

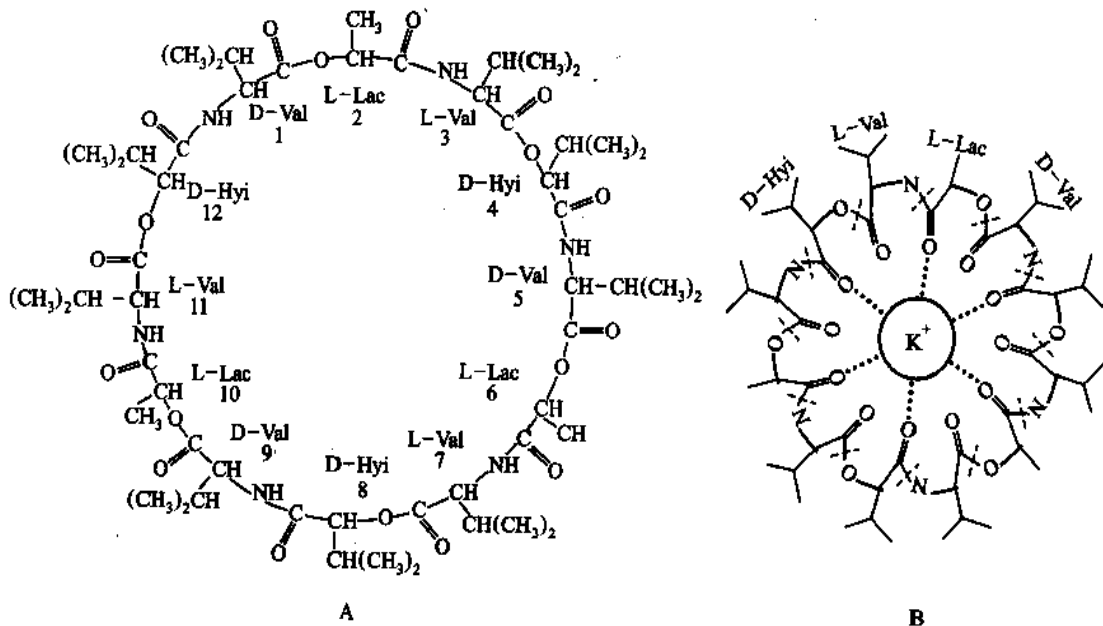


图 21-17 对 K^+ 专一的缬氨霉素泳电离子载体

A. 它的化学结构是含有重复三次的由 D-缬氨酸(D-Val), L-乳酸(L-Lac), L-缬氨酸(L-Val)和 D-羟基异戊酸盐(D-Hyi)序列的环肽; B. 与 K^+ 形成的缬氨霉素- K^+ 复合物。结合离子的亲水基团埋于“果实型”分子的内部,而疏水侧链暴露于分子的周围,使 K^+ -缬氨霉素复合物在脂双层中具有高度可溶性

五、生物膜运输的分子机制

物质跨膜运输的分子机制,大致可概括为三种主要假设模型:移动性载体模型(mobile carrier model)、孔道或通道模型(pore or channel model)和构象变化模型(conformational change model)。

(一) 移动性载体模型

这个模型假设主要认为:运输体(transporter)或其结合被运输物质的部位在运输过程中,或由于通过膜的来回穿梭运动,或由于通过膜平面的旋转运动改变它在膜内的定向,可以使物质从膜的一侧运至另一侧(图 21-20)。比如大肠杆菌的乳糖运输就是通过移动载体进行的。缬氨霉素等运送 K^+ 也是以这种方式运输的。

(二) 孔道或通道模型

这一模型假设认为:运输蛋白在膜内有较确定的方向,并且形成一个对被运输物具有立体构型的亲水性孔道。孔道在识别被运输物作出反应时才瞬时打开,让被运输物质通过膜。从孔道的开、关来说,又具闸门(gated)作用(图 21-21)。如果当配基结合到一个专一性的细胞表面受体时,引起通道打开,称为“配体-闸门通道”(ligand-gated channels)(图 21-22A)。如果通道因膜电位变化而打开,称为“电压-闸门通道”(voltage-gated channels)(图 21-22B)。在电镜下可以见到由内在膜蛋白形成的跨膜孔道(transmembrane pores)。在大肠杆菌外膜上有由孔道蛋白质(porins)构成的直径 1 nm 的孔道。它对相对分子质量为 600 以下的亲水性分子是通透的。如将孔道蛋白掺入人工磷脂膜,可观察到亲水性小分子迅速扩散通过脂双层。与这种孔道相似的通道也存在于叶绿体和线粒体的外膜中。

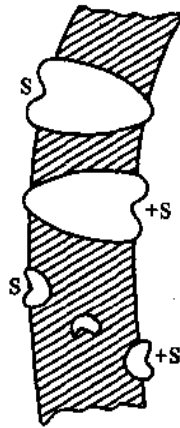


图 21-20 从理论上讲,物质能够由一个移动性载体的通过膜平面的旋转运动或是跨膜的平面移动而被运送过膜

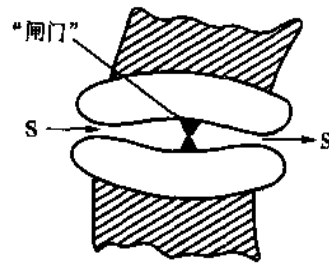


图 21-21 物质可能通过一个由闸门控制的较为固定的通道或孔道而被运送过膜

(三) 构象变化假设

除了上述的载体和孔道或通道假设外,运输蛋白的构象变化也是阐明物质运输的分子机制的重要假设。物质的跨膜运输具有高度的选择性和方向性,运输的这种专一性与运输过程中运输蛋白的构象变化相关。对一个多聚体蛋白来说,由于亚单位之间相互位置的变化所导致的亚单位重排,运输物质与运输蛋白的结合以及代谢、能量状态等都可导致蛋白质的构象变化(图 21-23)。例如,关于 Na^+, K^+ -泵 的分子机制,有一种假设认为 Na^+, K^+ -ATP 酶的构象变化可能会导致 Na^+ , 或 K^+ 由膜的一侧运输到另一侧(图

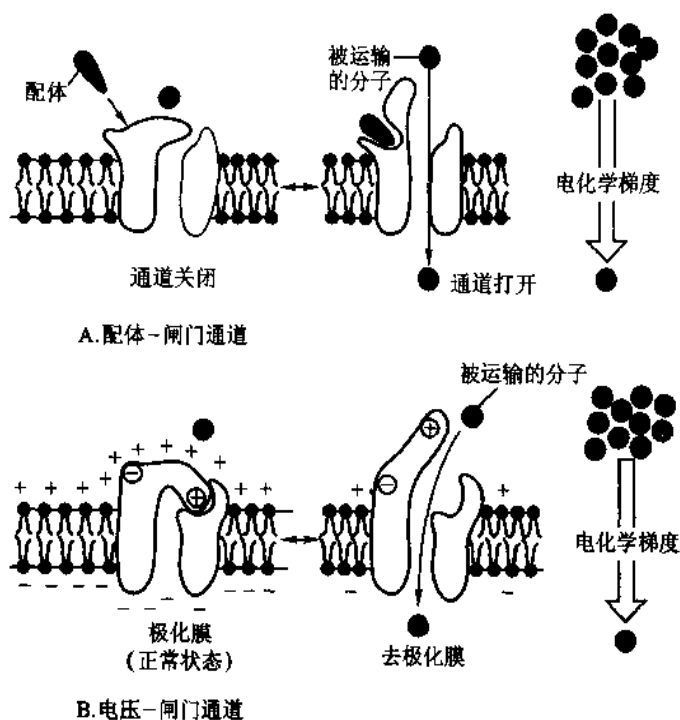


图 21-22 两种类型的闸门离子通道

只有当运输蛋白处于“开”的构型时,让离子顺电化学梯度通过。A. 中的通道“配体-闸门”通道。只有当细胞外的配体结合到运送蛋白(或膜结合蛋白)时,通道打开。B. 中的通道是“电压-闸门”通道,当膜去极化时则打开

21-24)。根据这种假说,在磷酸化和去磷酸化时, Na^+ , K^+ -ATP 酶处于两种不同的构象,因而专一性地单方向的向细胞外运输 Na^+ , 而向细胞内运输 K^+ , 这正是 ATP 酶构象变化的结果。根据构象变化假说, Ca^{2+} -泵运输 Ca^{2+} , 也是受 Ca^{2+} -ATP 酶在磷酸化和去磷酸化时构象变化所调节的。

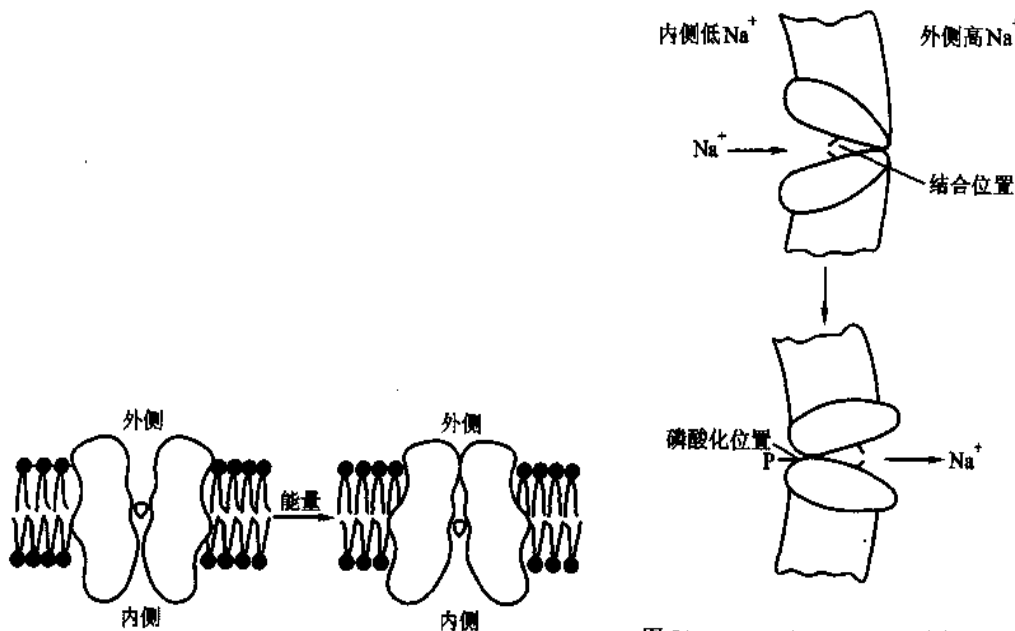


图 21-23 对含有多聚体载体蛋白的亚单位的构象重排推动物质运送的一般分子模型
在主动运输中能量(如来自 ATP 的水解)可用于影响这种构象变化。另外运送物质的结合能足以启动运送体系中的这种重排

图 21-24 Na^+ , K^+ -ATP 酶作用的构象变化假设模型
 Na^+ 结合到膜内侧的高亲和力位置因而启动由 ATP 的磷酸化并依次引起阳离子的结合位置暴露到外侧的构象变化。后者的构象变化对 Na^+ 具有低的亲和力, 但对 K^+ 有高的亲和力。 K^+ 的结合使构象变化逆转并伴随酶的去磷酸化并把 K^+ 泵入细胞溶胶侧

应该提到的是,对同一种离子的跨膜运输,在不同的细胞中,也可能由不同的运输机制或者是以某种机制为主来完成的。在载体,孔道或通道和构象变化假设之间也可能没有非常严格的界限,或许运输蛋白的构象变化利于孔道或通道的形成、打开或关闭。例如运输蛋白的亚单位相对位置的变化,就可能对孔道的开、闭产生影响,当然,也不可能用一种运输模型来概括迄今已知的众多运输体系的功能。

提 要

生物膜的物质运输是生物膜的主要功能之一。许多重要的生命过程都直接或间接地与物质的跨膜运输功能密切相关。

根据物质运输过程中自由能的变化情况,物质运输可分为被动运输和主动运输两大类。被动运输是物质从高浓度一侧,顺浓度梯度的方向,通过膜运输到低浓度一侧的过程,这是一个不需要外界供给能量的自发过程。主动运输是物质逆电化学梯度的运输过程,它需要外界供给能量方能进行。能源除主要来自 ATP 的形式提供外,也可以从其他形式获取能量。

如果根据被运输物质分子的大小,物质运输又可分为小分子的运输与生物大分子的运输两类。按其运输形式而言,或是通过被动运输或是主动运输。诸如 Na^+ 和 K^+ 的运输, Ca^{2+} 的运输,阴离子(如 Cl^- , SO_4^{2-} 等)的运输,糖和氨基酸的运输以及 ATP/ADP 交换等均可归于小分子的运输体系。大量的研究表明,小分子的运输是通过相应的专一性的位于膜上的运输蛋白的作用实现的。运输蛋白调控小分子的运输,使膜内、外维持恒定的离子梯度差,这对于细胞执行正常的生理功能是非常重要的。像多核苷酸、多糖等生物大分子以及颗粒物的运输,则主要是通过胞吐作用和胞吞作用包括受体介导的胞吞作用实现的。有关生物膜运输的分子机制已提出了不少假设模型。这里主要介绍了移动性载体模型、孔道或通道模型以及构象变化假设等模型。生物膜运输是生物膜研究中一个重要的而内容又非常广泛的领域。显然,不可能用一种模型去概括迄今已知的多种运输体系的功能。但是,注意它们之间的共同性和相关性,对于我们了解和掌握生物膜运输中的一些基本问题是必要的。

习 题

1. 试述物质的被动运输和主动运输的基本特点。研究物质运输的意义是什么?
2. 什么是 Na^+ 泵和 Ca^{2+} 泵,其生理作用是什么?
3. 试述 Na^+ 泵的作用机制。
4. 什么是胞吐作用和胞吞作用? 它们有何共同点?
5. 试举例说明受体介导的胞吞作用的重要性。
6. 生物膜运输的分子机制有几种主要假设? 它们的相互关系如何?

主要参考书目

1. Zubay Geoffrey L *et al.* Biochemistry Addison - Wesley Publishing Company, Inc. 1984:621 ~ 657
2. Bruce Alberts *et al.* Molecular Biology of the Cell, New York and London: Garland Publishing Inc. 1985:256 ~ 283
3. Oxender D, Fox C F (Eds). Progress in clinical and biological research Vol.22: Molecular aspects of membrane transport. Assemblage of papers on many transport system that are being studied. New York: Alan Liss, 1977
4. Hobbs A S, Albers R W. The structure of proteins involved in active membrane transport. Annu. Rev. Biophys. Bioenerg. 1980, (9): 259 ~ 291
5. Pressman B C. Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biochem. 1976, (45): 501 ~ 530
6. Wilson D B. Cellular transport mechanism. Annu. Rev. Biochem. 1976, (49): 933 ~ 965
7. Lubert Stryer. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995

(黄有国, 张旭家)

第 22 章 糖酵解作用

机体的生存需要能量,机体内主要提供能量的物质是 ATP。ATP 的形成主要通过两条途径,一条是由葡萄糖彻底氧化为 CO_2 和水,从中释放出大量自由能形成大量的 ATP,另一条是在没有氧分子参加的条件下,即无氧条件下,由葡萄糖降解为丙酮酸,并在此过程中产生 2 分子 ATP。本章要讨论的是,葡萄糖作为能量来源,在动物体以及一些不靠光合作用获取能量的生物体内,是怎样在没有氧分子参加的条件下形成 ATP 的。

在无氧条件下,葡萄糖进行分解,形成 2 分子丙酮酸并提供能量。这一过程称为糖酵解作用 (glycolysis)。糖酵解过程可以说,是真核细胞以及细菌摄入体内的葡萄糖最初经历的酶促分解过程。也是葡萄糖分解代谢所经历的共同途径。

葡萄糖是很多生物的主要能源。它富含能量,还可在机体内以多糖形式进行贮存,需要时,可由糖原迅速动员出来。

glycolysis(糖酵解)这一名词来源于希腊语 glykos 的词根,是“甜”的意思。lysis 是“分解”或“解开”的意思。糖酵解过程被认为是生物最古老、最原始获取能量的一种方式。在自然发展过程中出现的大多数较高等生物,虽然进化为利用有氧条件进行生物氧化获取大量的自由能,但仍保留了这种原始的方式。这一系列过程,不但成为生物体共同经历的葡萄糖的分解代谢前期途径,而且有些生物体还利用这一途径在供氧不足的条件下,给机体提供能量,或供应急需。这一途径也是人们最早阐明的酶促反应系统,也是研究得非常透彻的一个过程。因为这一过程的反应原则以及调节机制,在所有细胞代谢途径中具有普遍意义,所以有必要对此过程作较详细的介绍。此外,其他糖类是怎样进入酵解途径的,也将进行适当的讨论。

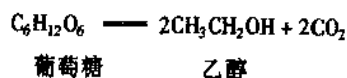
糖酵解过程作用机制研究的发展最富于启发性。因此本章将较详细介绍糖酵解作用机制研究的发展史。

一、糖酵解作用的研究历史

从历史的纪元开始,人们就已经会用酵母菌将葡萄糖发酵成乙醇和 CO_2 。在生活实践中,人们发展了酿酒、制作工业酒精以及面包制造业等等。这些都是利用酵母菌的发酵过程。虽然人们很早就开始利用“发酵”,但是对发酵的研究却只是在 19 世纪后半叶才开始的。

对发酵现象的解释,1854—1864 的 10 年间,Louis Paster 的观点占有统治地位。他认为发酵现象是由微生物引起的,发酵过程以及各种生物过程都离不开一种生命物质所固有的“活力”(vital force)的作用。他称发酵为“不要空气的生命”。

1897 年,Hans Buchner 和 Edward Buchner 兄弟,开始制作不含有细胞的酵母浸出液拟供药用。他们用细沙和酵母一起研磨,加上矽藻土(Kieselguhr),用水力压榨机榨出汁液来。取得了汁液后,考虑到如何防腐的问题。因为他们打算将榨液用于动物实验,选择了不妨碍动物实验的防腐剂,日常惯用的蔗糖。这就是重大发现的开端。酵母菌的榨液居然引起了蔗糖发酵。这是第一次发现没有活酵母存在的发酵现象。从此开始了研究没有活细胞参加的酒精发酵的新纪元。在研究中发现,葡萄糖几乎是全量地按照下面方程式分解为乙醇和 CO_2 :



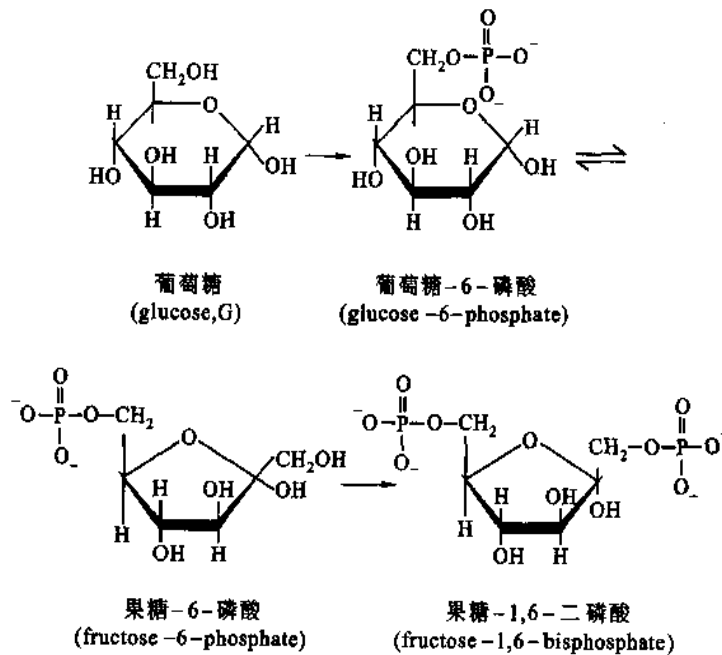
此外,在发酵液中还发现有微量的甘油。

上述实验中还发现,新鲜酵母的发酵液远不如活酵母菌的发酵能力。用气体测量法测定生成 CO_2 的量来测定发酵的速度。实验表明,活酵母的发酵能力比等当量的榨液约大 10 至 20 倍。如果将酵母榨液搁置起来放一些时候,其发酵能力随时间的延长很快地下降。如果将榨液在 30°C 条件下干燥,仍能保持发酵能

力。氯仿对发酵没有影响。但是若将发酵液加热至 50℃ 以上,便会失效。这些都表明发酵力与酶有关。

对于酵母榨液的作用原理,最早做出贡献的是 Arthur Harden 和 William Young 在 1905 年的工作。他们将新鲜的酵母榨液加到 pH 为 5~6 的葡萄糖溶液中。如果再加入一些磷酸,发酵就又恢复起来。但这种恢复也只是暂时的。加进去的无机磷酸消失了。游离磷酸的存在量越低,其发酵速度减退得也越快。每次再加入一些磷酸就可以再看到有一阵新的发酵现象出现。

无机磷酸加入到发酵混合液中就很快消失的现象使人们想到可能形成了有机磷酸酯。1905 年, Harden A 和 Young W J 两人果然分离得到了果糖-1,6-二磷酸。如果将人工合成的果糖-1,6-二磷酸加入到发酵液中,它和葡萄糖一样被酵解。这一现象表明了果糖-1,6-二磷酸很可能是发酵过程中的一种过渡产物。随后,Robison 又分析得到另外一种糖的磷酸酯。经分析证明,它是葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸的平衡混合物。这两种己糖-1-磷酸加入到酵母液中,都可以被酵解。以上的事实表明,这些磷酸酯是葡萄糖与无机磷酸作用的结果,当时已经测出由葡萄糖磷酸化形成磷酸糖酯的次序可能如下:



这些磷酸糖酯是怎样形成的? 又是怎样转变成乙醇和 CO₂ 的? 阐明这些问题又经历了几十年的光景,通过不同国别科学家的共同努力才得以解决。在阐明发酵机制的过程中,越来越多的证据表明,酵母菌的榨液使葡萄糖发酵的过程和肌肉浸出液利用葡萄糖发生的酵解作用,是几乎完全相似的过程。除去产物有些差异外,其余过程都是一致的。这就更有利于互相参照阐明其全过程的机制。

Harden 和 Young 还发现,酵母榨液经透析后就失去了发酵能力。向透析剩下的液体中加入少量透析液或煮沸过的使酶失活的榨液,发酵能力就得到恢复。这表明,酵母菌榨液包括两类重要物质,一类是不耐热的、不能透析的酶,命名为发酵酶(zymase),另一类是耐热的、可以透析的物质,命名为发酵辅酶(cozymase)。发酵作用依靠这两种物质组合而成。发酵酶是催化葡萄糖发酵的。发酵辅酶是酶发挥作用所必需的,后来又进一步证明了发酵辅酶实际是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD,或称辅酶)和腺嘌呤核苷酸的混合物,此外还有 ADP、ATP 以及金属离子。

当认清以上这些物质的存在后,将它们分别加入到透析残余物中,对深入探讨发酵机制起到重要的作用。此外,在实验过程中还发现了许多化学物质具有阻滞发酵进行的作用。这些物质可以导致某些发酵中间产物的积累。这对阐明发酵机制也起到重要的作用。例如,实验证明氟化物(fluoride)抑制发酵液的发酵过程,造成 3-磷酸甘油酸和 2-磷酸甘油酸的积累。碘乙酸(iodoacetate)造成果糖-1,6-二磷酸的积累。这些物质得到明确以后,大大促进了对这些物质产生机制的研究。

以上这些基本的研究,以及随后发现的,肌肉提取液能使葡萄糖发生酵解作用而产生乳酸的研究,都促使 19 世纪 30 年代德国生物化学家对酵解的更加深入地研究。贡献最显著的是 Gustav Embden。他提出

果糖-1,6-二磷酸裂解的形式以及随后的步骤。还有 Otto Meyerhof, 他对 Embden 提出的假设作了合理修改, 而且研究了酵解作用的能力学。由于他们的重要贡献, 从葡萄糖开始至产生丙酮酸的过程常常被称为 Embden - Meyerhof 途径。他们将肌肉中由葡萄糖形成乳酸的过程称之为酵解过程。

此外, 在酵解的研究中做出重要贡献的科学家还应举出德国的 Otto Warburg, Carl Neuberg, 美国的 Carl Cori 和 Gerty Cori 以及波兰的 Parnas J 等人。

可以说, 糖酵解的各个步骤在 19 世纪 40 年代就已经很清楚了。但对糖酵解的深入研究, 例如对有关酶的结构与功能的研究, 还在不断深入地进行着。

从以上的研究中可以看出, 发酵(fermentation)是最早研究的, 由酵母菌将葡萄糖转化为酒精的过程。而酵解这一名词最初是来自动物肌肉利用葡萄糖最后转化为乳酸的过程。

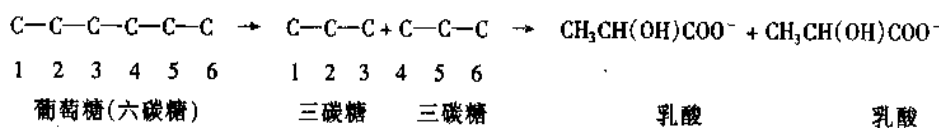
但是, 经过广泛的研究表明: 它们的基本途径都是一致的, 只存在极小的差异。除在产物上可能有所差别(例如乙醇和乳酸)外, 在不同种属和不同类型细胞之间还可能存在着同工酶以及不同的调节方式。当前人们将葡萄糖酵解产生丙酮酸这一段过程称为糖酵解过程或酵解过程。

二、糖酵解过程概述

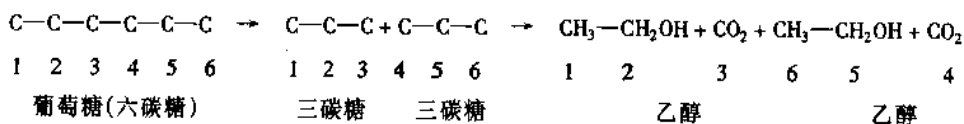
从历史的叙述中, 已经可以明了, 糖酵解是葡萄糖转变为丙酮酸的一系列反应。酵解过程的生物学意义在于, 它是在不需要氧供应的条件下, 产生 ATP 的一种供能方式。

在详细探讨酵解的全过程之前, 不妨先从葡萄糖骨架的变化得到一些粗略的概念。

对于酵解过程, 由葡萄糖经历丙酮酸最后生成乳酸, 其碳原子的变化可作如下的概括:

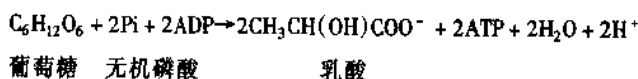


对于发酵作用产生的酒精(又简称酒精发酵), 其碳原子的变化情况如下:

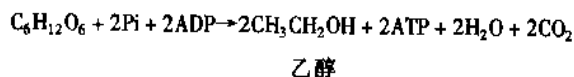


有了碳骨架变化的概念之后, 再来看看酵解和酒精发酵作用, 包括其形成 ATP 的反应式。

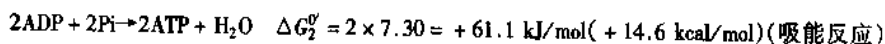
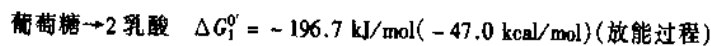
酵解作用的反应式:



酒精发酵作用的反应式:



从能量观点出发, 可以把酵解过程划分为两个方面。一方面从葡萄糖转变为乳酸是物质的分解过程, 其中伴随有自由能的释放。即放能过程。另一方面 ADP 和无机磷酸形成 ATP, 则是吸收能量的过程:



总括上述能量反应。由葡萄糖形成乳酸过程的总能量变化为:

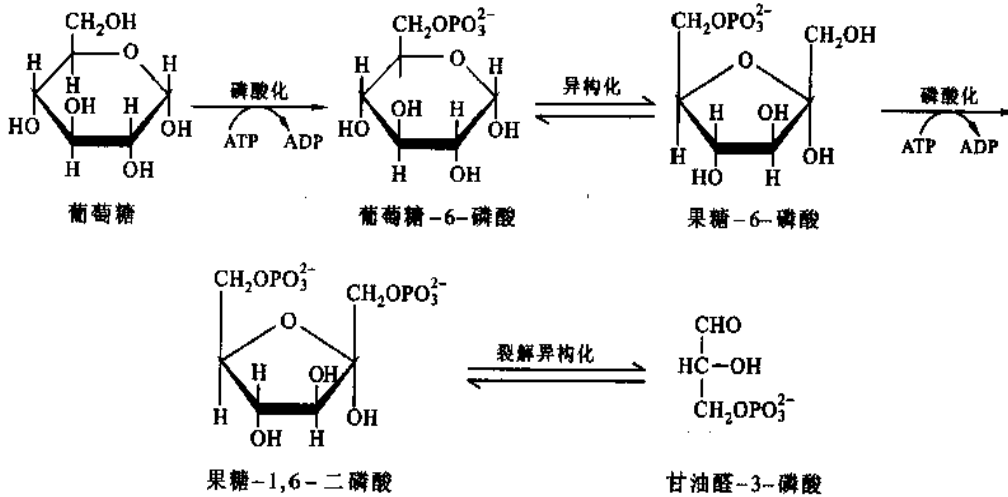
$$\Delta G_{\text{总}}^{\circ} = \Delta G_1^{\circ} + \Delta G_2^{\circ} = -47.0 + 14.6 = -135.56 \text{ kJ/mol} (-32.4 \text{ kcal/mol})$$

因此, 从酵解的总能量变化来考虑, 可知这是一个放能过程。其中由形成 ATP 捕获的能量所占释放全部能量的百分比为 $14.6/47.4 \times 100\% = 31\%$ 。但在细胞内, 真正的反应物和产物浓度并不是标准状况下的 1.0 mol/L, 而是低许多倍。这样计算起来, 酵解的实际效益远不只 31%。由于酵解所释放的净能量为 -135.56 kJ/mol (-32.4 kcal/mol), 因此酵解过程实际是一个不可逆的(irreversible)反应过程。但在全部过程中, 大多数反应步骤的标准自由能变化差异并不大。因此, 这类反应的逆反应也可用于葡萄糖在细胞

内的再合成。

应该引起注意的是:糖酵解过程由葡萄糖到所有的中间产物都是以磷酸化合物的形式来实现的。中间产物磷酸化至少有三种意义:①带有负电荷的磷酸基团使中间产物具有极性,从而使这些产物不易透过脂膜而失散;②磷酸基团在各反应步骤中,对酶来说,起到信号基团的作用,有利于与酶结合而被催化;③磷酸基团经酵解作用后,最终形成 ATP 的末端磷酸基团,因此具有保存能量的作用。

糖酵解过程从葡萄糖到形成丙酮酸共包括 10 步反应,可划分为两个主要阶段。前 5 步为准备阶段,葡萄糖通过磷酸化、异构化裂解为三碳糖。每裂解一个己糖分子,共消耗 2 分子 ATP。使己糖分子的 1,6 位磷酸化。磷酸化的己糖裂解和异构化,最后形成一个共同中间物即甘油醛-3-磷酸。



后 5 步为产生 ATP 的贮能阶段。磷酸三碳糖转变成丙酮酸。每分子三碳糖产生 2 分子 ATP。整个过程需要 10 种酶。这些酶都存在于胞质溶胶中,大部分过程都有 Mg^{2+} 离子作为辅助因子。

三、糖酵解和酒精发酵的全过程图解

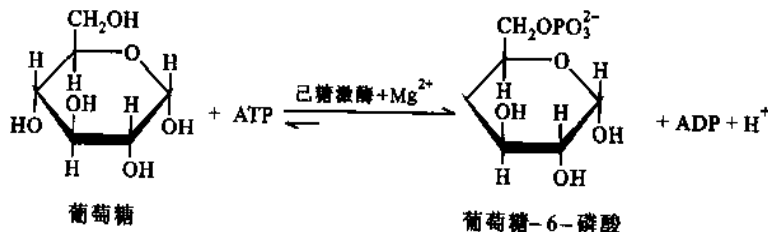
前面已经提到,酵解和酒精发酵基本路线完全相同,只是在形成丙酮酸以后才有差异。丙酮酸转化为乳酸时称为酵解;丙酮酸转化为乙醛、乙酸时,称为发酵。图 22-1 列出酵解和发酵化学过程的总貌。关于每步化学反应的机制,将在下一节中详细讨论。

四、糖酵解第一阶段的反应机制

前面已经提到糖酵解的第一阶段是酵解的准备阶段,包括 5 步反应,以下逐步进行讨论。

(一) 葡萄糖的磷酸化

葡萄糖发生酵解作用的第一步是 D-葡萄糖分子在第 6 位的磷酸化,形成葡萄糖-6-磷酸 (glucose-6-phosphate),可简称为 G6P。这是一个磷酸基团转移的反应,即 ATP 的 γ -磷酸基团在己糖激酶 (hexokinase) 的催化下,转移到葡萄糖分子上。这个反应必需有 Mg^{2+} 的存在。反应式如下:



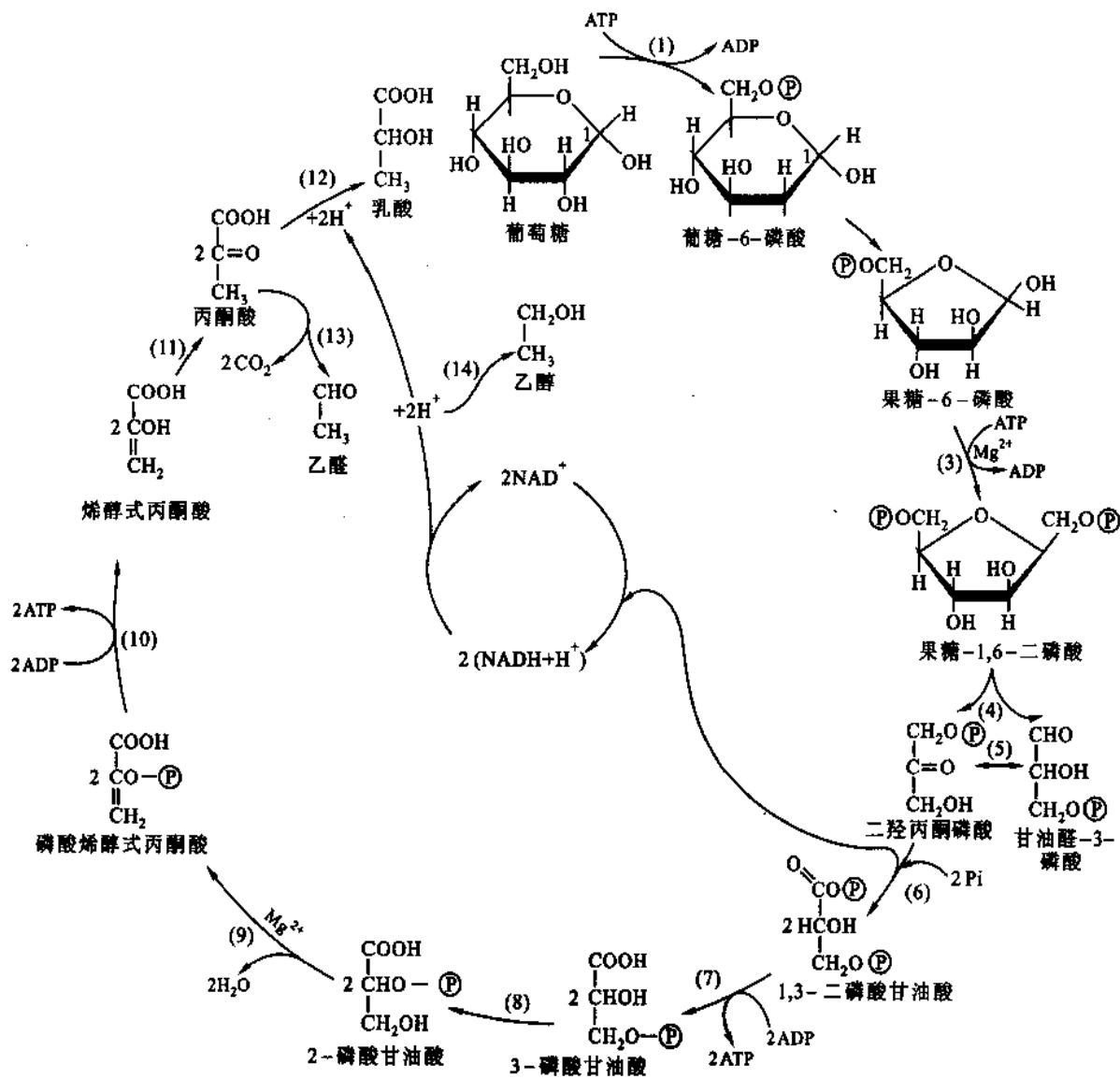
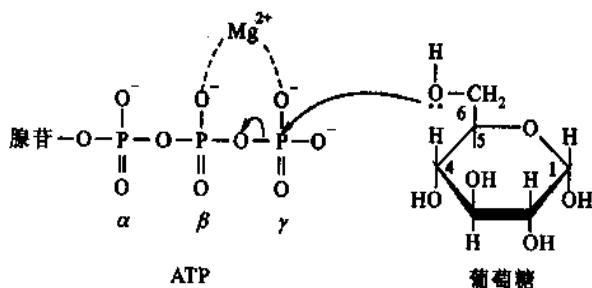


图 22-1 糖酵解和发酵的全过程

注:图中 P 代表磷酸基(磷酸基团),Pi 代表无机磷酸,括号内数字代表催化相应反应的酶如下:

- (1) 己糖激酶(hexokinase)或葡萄糖激酶(glucokinase)
- (2) 磷酸葡萄糖异构酶(glucosephosphate isomerase)
- (3) 磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)
- (4) 醛缩酶(aldolase)
- (5) 磷酸丙糖异构酶(triose phosphofructokinase)
- (6) 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase)
- (7) 磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)
- (8) 磷酸甘油酸变位酶(phosphoglyceromutase)
- (9) 烯醇化酶(enolase)
- (10) 丙酮酸激酶(pyruvate kinase)
- (11) 非酶促反应
- (12) 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)
- (13) 丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)
- (14) 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)

葡萄糖与 ATP 的反应机制如下:



上图表明,葡萄糖第 6 位碳原子上的羟基[可用 C(6) - OH 或 C6 - OH 表示]氧原子上有一孤电子对,它向 Mg^{2+} - ATP 的 γ - 磷原子进攻, γ - 磷原子所以具有亲电子性质,主要是由于 2 价 Mg^{2+} 的作用。 Mg^{2+} 如图所示,吸引了 ATP 磷酸基团上 2 个 O(氧)的负电荷,使 γ - 磷原子更易接受孤电子对的亲核进攻,其结果促使 γ - 磷原子与 β - 磷原子之间氧桥所共有的电子对向氧原子一方转移,于是 ATP 的 γ - 磷酸基团与氧桥断键并与葡萄糖分子结合成葡萄糖 - 6 - 磷酸。

磷酸基团从 ATP 分子转移到葡萄糖分子上的反应其标准自由能变化是 ΔG^0 (ATP 酸酐键的水解) = -7.3 kcal/mol (-30.54 kJ/mol)。葡萄糖 - 6 - 磷酸的磷酸酯水解时标准自由能变化是 $\Delta G^0 = -13.81 \text{ kJ/mol}$ (-3.3 kcal/mol)。由于能量的损失,使葡萄糖形成葡萄糖 - 6 - 磷酸的反应基本上是不可逆的。这一反应保证了进入细胞的葡萄糖可立即被转化为磷酸化形式。不但为葡萄糖随后的裂解活化了葡萄糖分子,还保证了葡萄糖分子一旦进入细胞就有效地被捕获,不会再透出胞外。

催化葡萄糖形成葡萄糖 - 6 - 磷酸反应的酶称为己糖激酶,因为它所催化的底物不只限于 D - 葡萄糖,对其他六碳糖如 D - 甘露糖(D - mannose)、D - 果糖(D - fructose)、氨基葡萄糖(aminoglucose)都有催化作用,字头“hexo”即表示不专一的“六碳糖”。激酶是能够在 ATP 和任何一种底物之间起催化作用,转移磷酸基团的一类酶。六碳糖激酶存在于所有细胞内。在肝脏中还存在着一种专一性强的葡萄糖激酶又称葡糖激酶。这种酶在维持血糖的恒定中起作用。

参与上述反应的 ATP,必须与 Mg^{2+} 形成 Mg^{2+} - ATP 复合物(Mg^{2+} - ATP complex)。未形成复合物的 ATP 分子,对己糖激酶反而有强的竞争性抑制作用。虽然 Mg^{2+} 对己糖激酶起活化作用,其他 2 价金属离子如 Mn^{2+} 也可具类似的作用,但正常生理情况下起作用的多是 Mg^{2+} 。

酵母己糖激酶的相对分子质量为 108 000。X 射线晶体研究证明,己糖激酶在起催化作用时,其酶分子先结合上葡萄糖分子和 Mg^{2+} - ATP 分子,形成一个三元复合物(ternary complex)。随后,己糖激酶由葡萄糖分子的诱发,而显现出明显的构象变化如图 22 - 2 所示。



图 22 - 2 己糖激酶与葡萄糖结合时的构象变化

由图 22 - 2 可看出,在未与葡萄糖结合之前,球形的己糖激酶分子分成大小不等的两叶(两个亚基)构成中间明显的裂缝。当与葡萄糖结合后,两叶像钳子一样便合拢起来,将葡萄糖夹在酶分子中间。酶分子

的这种变构动作恰好使 ATP 分子和葡萄糖的第 6 位碳原子的羟基靠拢。这大大有利于 ATP 的 γ -磷酸基团向葡萄糖第 6 碳原子羟基的转移。由己糖激酶催化的 ATP γ -磷酸基团向葡萄糖分子的转移速度,比向水分子的转移速度快 40 000 倍。

己糖激酶是一种调节酶。它催化的反应产物葡萄糖-6-磷酸和 ADP 能使该酶受到变构抑制。但葡萄糖磷酸激酶却不受葡萄糖-6-磷酸的抑制。它对葡萄糖的米氏常数 K_m (5~10 mmol/L)比己糖激酶的 K_m 值(0.1 mmol/L)大得多。因此当葡萄糖浓度相当高时,葡萄糖激酶才起作用。当血液中和肝细胞内游离葡萄糖的浓度增高时,它催化葡萄糖形成葡萄糖-6-磷酸,该物质是葡萄糖合成糖原的中间物,由肝脏合成糖原。

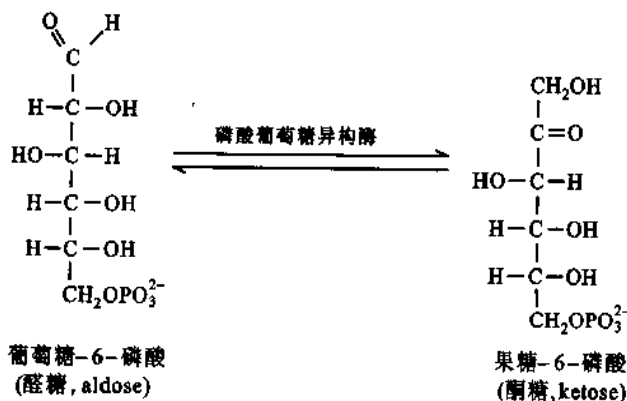
随着电泳技术的发展,从动物组织中分离得到 4 种电泳行为不同的己糖激酶,分别称为 I、II、III、IV 型。它们在机体的分布情况不同,催化的性质也不完全相同。I 型主要存在于脑和肾中,II 型存在于骨骼和心肌中,III 型存在于肝脏和肺脏中,IV 型只存在于肝脏中。I、II、III 型酶大都存在于基本不能合成糖原的组织中。无机磷酸有解除葡萄糖-6-磷酸和 ADP 对 I、II、III 型酶抑制的作用。I 型酶对无机磷酸最为敏感。这和脑细胞需要保持一定的酵解速度以维持能量的需要有关,只要有少量的无机磷酸存在,就能解除葡萄糖-6-磷酸的抑制作用,使酵解中间物维持在一定水平。II 型酶由于对无机磷酸远不及 I 型敏感,当肌肉处于静息状态时,并不要求高的酵解速度,而是受葡萄糖-6-磷酸的抑制,使酵解速度保持低的水平。此外, I 型酶还可由柠檬酸激活。IV 型酶(葡萄糖激酶)的合成受胰岛素(insulin)的诱导,使肝脏中的酶 IV 维持在较高的水平。当肝细胞损伤或患糖尿病时,此酶的合成速度降低,不仅糖的合成受阻,糖的降解也受影响。肝细胞内也有专一性不强的己糖激酶,存在于肝细胞线粒体和细胞溶胶两部分。结合于线粒体上的酶,活性较高。肝细胞内己糖激酶的分布受到某些条件的调节,例如葡萄糖-6-磷酸和无机磷酸等。酶的区域性分布,是机体对酶活性调控的一种方式。

(二) 葡萄糖-6-磷酸异构化形成果糖-6-磷酸

由葡萄糖-6-磷酸异构化形成果糖-6-磷酸的反应式如下:



这一反应的标准自由能变化是极其微小的, $\Delta G^0 = 1.67 \text{ kJ/mol}$ (0.4 kcal/mol)。因此,这一反应是可逆的。在正常情况下,葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸保持或接近平衡状态。在这一反应中葡萄糖第一碳原子位上的羰基(成环后的半缩醛基),不像碳 6 位上的羟基那样容易磷酸化,所以下一步反应是使葡萄糖分子发生异构化。这就是葡萄糖的羰基从碳 1 位转移到碳 2 位,使葡萄糖分子由醛式转变成酮式的果糖,其碳 1 位上即形成了自由羟基。葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸的存在形式都是以环式为主,而异构化反应需以开链形式进行。



异构化形成的果糖-6-磷酸随后又形成环状结构。

催化这一反应的酶称为磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase),又称磷酸葡糖异构酶。当前对该酶的催化机制已作出如下的解释:

从实验获得的信息表明,该酶活性部位的催化残基可能为赖氨酸(Lys)和组氨酸(His)。催化反应的实质包括一般的酶促酸-碱催化机制。如图 22-3 所示。

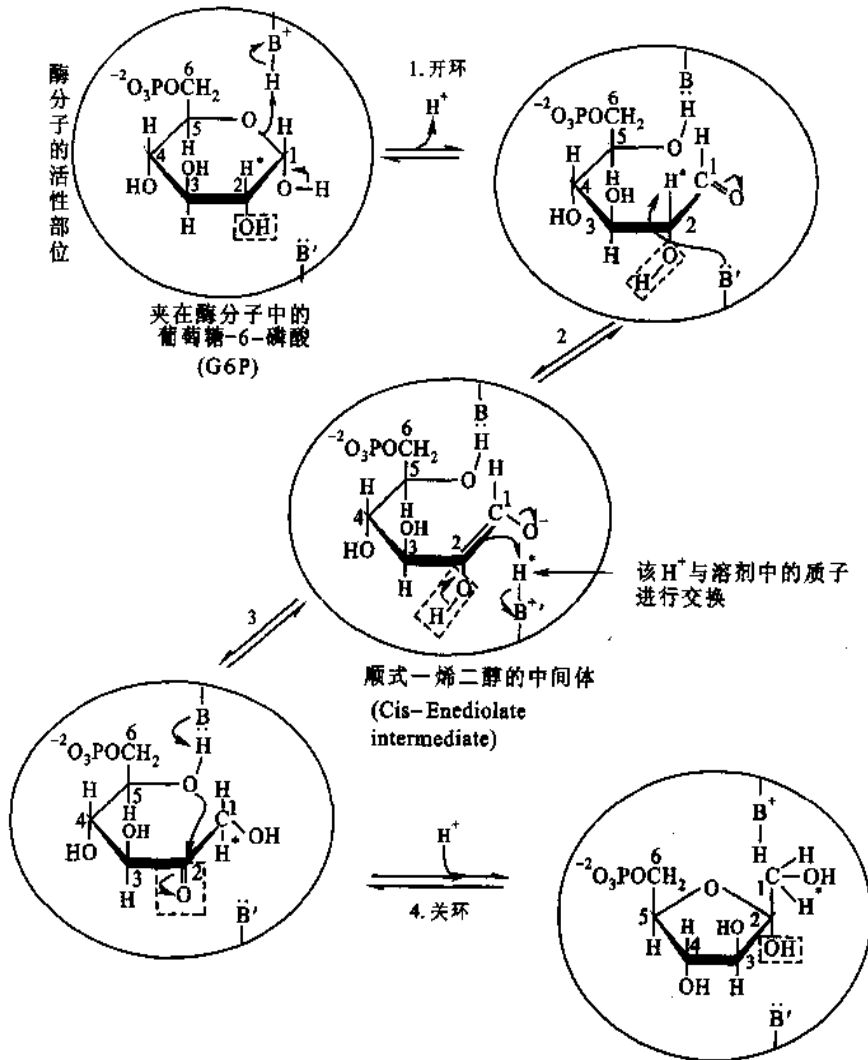


图 22-3 磷酸葡萄糖异构酶催化的反应机制

外环表示酶分子的活性部位,其中有两个起催化作用的氨基酸残基:B⁺H代表Lys,B'代表His

图 22-3 的第 1 步反应为:酸性催化开环。图中的 $B^+ - H$ 是一例,可代表酶分子上的 Lys 残基即 ϵ -氨基($\epsilon - NH_3^+$)吸引 $O - C_1$ 中间的对电子,于是引起断键,开环。

第 2 步反应为:酶分子上的碱,例如 His 的咪唑环,取掉(C_2)上的质子(这个质子由于它处在羰基的 α 位,所以具有酸性)形成了 cis-烯二醇, ($HO - C = C - OH$) 的中间体。

第 3 步反应为:(C_1)上质子的取代,是一个全盘的质子转移。被碱性基所吸引的质子是很不稳定的。它迅速地与溶剂的质子进行交换。其结果可以看成:(C_2)上的质子进行了分子内的质子转移,移到了(C_1)位。这个机制曾使用³H进行实验得到证明。

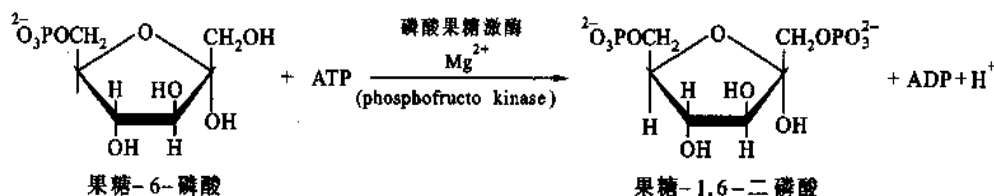
第 4 步反应为:关环,形成最终产物。

磷酸葡萄糖异构酶有绝对的底物专一性和立体专一性(stereospecificity)。6-磷酸葡糖酸(6-phosphogluconate, 6PG)、赤藓糖-4-磷酸(erythrose 4-phosphate, E4P)、景天庚酮糖-7-磷酸(sedoheptulose 7-phosphate, S7P)等对磷酸葡萄糖异构酶都是竞争性抑制剂。上述的三种糖类磷酸化合物都是五碳糖磷

酸途径(pentosephosphate pathway)的代谢中间物。

(三) 果糖-6-磷酸形成果糖-1,6-二磷酸

这一步是糖降解或酒精发酵过程中的第二个磷酸化反应。也是糖酵解过程使用第二个 ATP 分子的反应。果糖-6-磷酸被 ATP 进一步磷酸化形成果糖-1,6-二磷酸。该化合物的英文名称为 fructose-1,6-bisphosphate, 它的旧名称为 fructose-1,6-diphosphate。把“diphosphate”, 变为“bisphosphate”的原因: “bisphosphate”表示两个磷酸基团是互相分离的, 而“diphosphate”表示两个磷酸基团是相连的。例如腺苷二磷酸的英文名称为“adenosin diphosphate”。腺苷二磷酸中的两个磷酸基团是以酸酐键(anhydride bond)相连的。由果糖-6-磷酸形成果糖-1,6-二磷酸的反应式如下:



在这一反应中, ATP 酸酐键的水解和果糖-1,6-二磷酸在其碳 1 位上形成磷脂键的两个反应 $\Delta G^{0'} = -14.23 \text{ kJ/mol} (-3.4 \text{ kcal/mol})$, 因此该反应是不可逆反应。

催化此反应的酶称为磷酸果糖激酶(phosphofructokinase, PFK)。该酶需要 Mg^{2+} 参加反应, 其他 2 价金属离子虽然也有一定作用, 以 Mg^{2+} 的作用最为显著。

该酶的催化机制和己糖激酶催化的反应机制基本一致。可用图 22-4 表示:

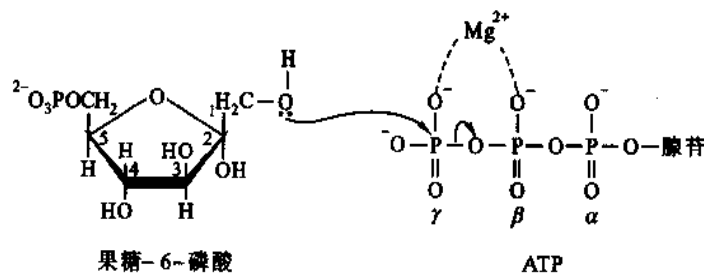


图 22-4 果糖-6-磷酸与 ATP 的结合机制

上图表明, 果糖-6-磷酸第 1 个碳原子上的羟基 $[\text{C}(1)-\text{OH}]$ 氧原子的孤电子对向 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 的 γ -磷原子进行亲核进攻, 导致 γ -磷原子与 β -磷原子之间氧桥的共用电子对向氧原子转移, 从而断键, 于是果糖-6-磷酸与 γ -磷酸基团结合而形成果糖-1,6-二磷酸。

磷酸果糖激酶是一种变构酶(allosteric enzyme)。它的催化效率很低, 糖酵解的速率严格地依赖该酶的活力水平。它是哺乳动物糖酵解途径最重要的调控关键酶, 该酶由 4 个亚基组成, 是一个四聚体(tetramer)。由肝脏提取的酶相对分子质量为 340 000。该酶的活性受到许多因素的控制。例如, 肝中的磷酸果糖激酶受高浓度 ATP 的抑制。ATP 可降低该酶对果糖-6-磷酸的亲合力。ATP 对该酶的变构效应是由于 ATP 结合到酶的一个特殊的调控部位上, 调节部位不同于催化部位。但是 ATP 对该酶的这种变构抑制效应可被 AMP 解除。因此 ATP/AMP 的比例关系对此酶也有明显的调节作用。特别是 H^+ 浓度对该酶活性的影响。当 pH 下降时, H^+ 对该酶有抑制作用。在生物体内这种抑制作用具有重要的生物学意义。因为通过它可以阻止整个酵解途径的继续进行, 从而防止乳酸的继续形成; 这又可防止血液 pH 的下降, 有利于避免酸中毒(acidosis)。

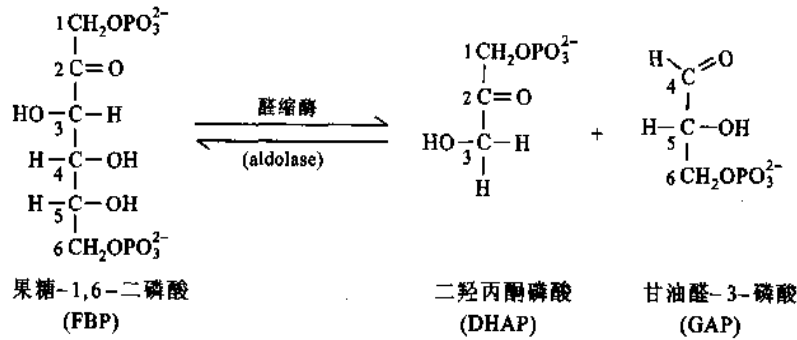
从兔分离得到的磷酸果糖激酶, 发现有三种同工酶, 分别称为磷酸果糖激酶 A、B、C。同工酶 A 存在于心肌和骨骼中, 同工酶 B 存在于肝和红细胞中, 同工酶 C 存在于脑中。这三种同工酶对影响酶活力的不同因素反应各异。例如, A 型对磷酸肌酸(phosphocreatine)、柠檬酸和无机磷酸的抑制作用最敏感, B 型对

2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphoglycerate, BPG)的抑制作用最敏感, C 型对腺嘌呤核苷酸的作用最敏感。

通过上述的三个步骤,从葡萄糖磷酸化开始到形成果糖-1,6-二磷酸,可以说为下一步的分子裂解完成了条件准备。

(四) 果糖-1,6-二磷酸转变为甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸

这是一个由六碳糖——果糖-1,6-二磷酸裂解为两个三碳糖的反应过程。果糖-1,6-二磷酸在醛缩酶(aldolase)的作用下发生裂解反应生成一分子二羟丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate)和一分子甘油醛-3-磷酸(glyceraldehyde-3-phosphate):



上述反应的机制请参看第 19 章。前面已经提到,醛缩酶的名称来自于该酶所催化的逆反应。由果糖-1,6-二磷酸裂解为二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸的 $\Delta G^0 = 23.97 \text{ kJ/mol} (+5.73 \text{ kcal/mol})$ 。可以理解,在标准状况下,这一反应是向缩合的方向,即自右向左进行。但在细胞内的条件下,该反应却是很容易地自左向右进行,即向裂解的方向进行。如果细胞内产生的果糖-1,6-二磷酸的浓度为 0.1 mmol/L , 根据计算有 53.9% 即被醛缩酶所裂解。

醛缩酶有两种不同的类型。高等动、植物中的醛缩酶称为 I 型,从肌肉中分离出来的醛缩酶相对分子质量为 160 000,含有 4 个亚基。分子内有数个游离的-SH 基。游离的-SH 基是酶催化活性所必需的。醛缩酶 I 型又有三种同工酶。分别称为醛缩酶 A、B、C。醛缩酶 A 主要存在于肌肉中,醛缩酶 B 主要存在于肝脏,醛缩酶 C 主要存在于脑组织。这三种醛缩酶都由氨基酸组分不同的四个多肽链构成。

第 II 种类型的醛缩酶主要存在于细菌、酵母、真菌以及藻类中。它和第 I 种类型的区别在于,含有 2 价金属离子。通常是 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 或 Fe^{2+} ,也需要 K^+ 。它的相对分子质量约为 65 000,只相当于动、植物中醛缩酶的一半左右。它的催化机制也和 I 型不同。下面重点讨论醛缩酶 I 型的催化步骤。

该酶的催化步骤可分为 5 步,如图 22-5 所示:

图 22-5 表明,醛缩酶类型 I (class I) 的第 1 步反应是酶和底物的结合。第 2 步反应是果糖-1,6-二磷酸的羰基与酶活性部位赖氨酸的 ϵ -氨基发生反应,形成一个亚胺阳离子,即质子化的西佛碱。第 3 步反应 C3 和 C4 发生醇醛断裂形成酶的烯胺(enamine)中间体并释放出甘油醛-3-磷酸(GAP)。亚胺离子比前体羰基的氧原子更容易拉电子,因此 C3 和 C4 间的共价键电子对也被吸引,促使醇醛断裂的催化反应发生。第 4 步是西佛氏碱的烯胺发生互变异构,形成了亚胺阳离子。第 5 步是亚胺水解放出二羟丙酮磷酸后,又形成了游离的酶。

酶分子活性部位的半胱氨酸和组氨酸残基在酶的催化反应中,相当酸和碱的作用。它们有增强质子转移的作用。

(五) 二羟丙酮磷酸转变为甘油醛-3-磷酸

果糖-1,6-二磷酸裂解后形成的两分子三碳糖磷酸中,只有甘油醛-3-磷酸能继续进入糖酵解途径,二羟丙酮磷酸必须转变为甘油醛-3-磷酸才能进入糖酵解途径。丙糖磷酸异构酶(triose phosphate

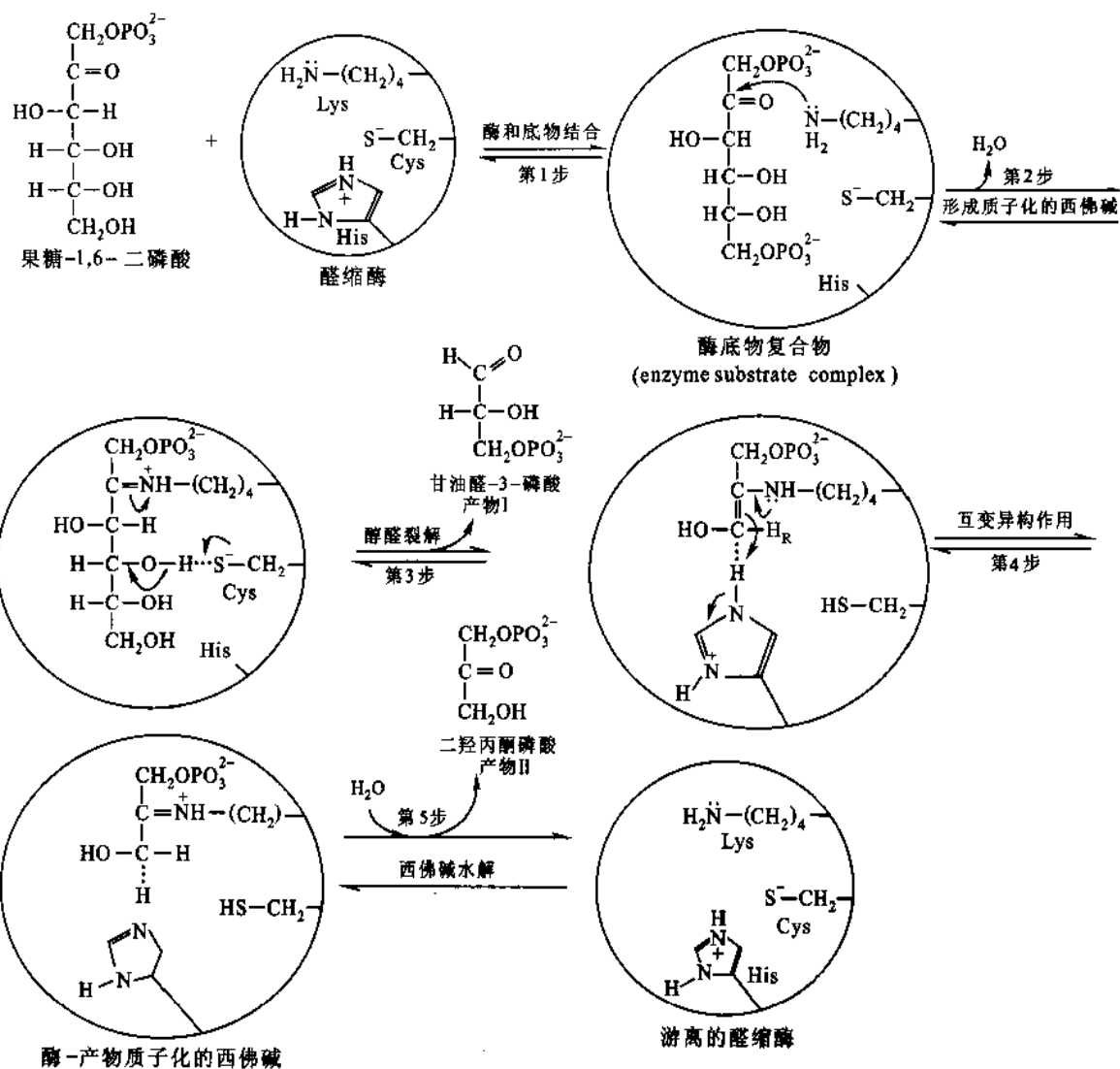


图 22-5 醛缩酶类的反应机制

图中圆圈代表酶的活性部位,圈内赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)和半胱氨酸(Cys)三个残基直接参与酶的催化反应

isomerase)正是担负这一转变的酶。在该酶催化下,二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸可以互变,它们之间正是醛酮化合物的互变异构关系,正像葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸的互变所以可能实现,是因为它们通过一个共同中间体即顺式-单烯二羟负离子中间体(cis-enediolate intermediate)(参看第19章代谢中的有机反应机制)

在探讨葡萄糖分子的碳原子和2分子甘油醛-3-磷酸碳原子之间的关系中发现,葡萄糖分子的第3、4位碳原子形成了2分子甘油醛-3-磷酸的醛基碳原子,葡萄糖分子的第1、6位碳原子形成了甘油醛-3-磷酸分子上的第3位碳原子。

二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸的互变异构关系如图22-6所示。

实验证明,丙糖磷酸异构酶的活性部位是以谷氨酸(Glu)残基的游离羧基与底物相结合。

丙糖磷酸异构酶的催化反应是极其迅速的,只要酶与底物分子一旦相互碰撞,反应就即刻完成。因此,任何加速丙糖磷酸异构酶催化效率的措施都不能再提高它的反应速度。又由于二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸互变异构极其迅速,因此这两种物质总是维持在反应的平衡状态。二羟丙酮磷酸甘油醛-3-磷酸的 $\Delta G^{\circ} = 7.7 \text{ kJ/mol} (+1.83 \text{ kcal/mol})$;在平衡点时, $K = [\text{甘油醛-3-磷酸}]/[\text{二羟丙酮磷酸}] = 4.73 \times 10^{-2}$ 。由此可见,二羟丙酮磷酸的浓度在平衡点远远超过甘油醛-3-磷酸的浓度。但甘油醛-3-磷酸不断在糖酵解途径中被消耗,所以二羟丙酮磷酸也就不断地转变为甘油醛-3-磷酸。

丙糖磷酸异构酶的相对分子质量为 56 000, 它是由 8 股平行的 β 折叠链环抱构成一个中心核。在 β 折叠链周围环绕着与每条折叠相对应的 α 螺旋链, 折叠链与 α 螺旋链之间以无规则的卷曲肽链相连接。如图 22-7 所示:

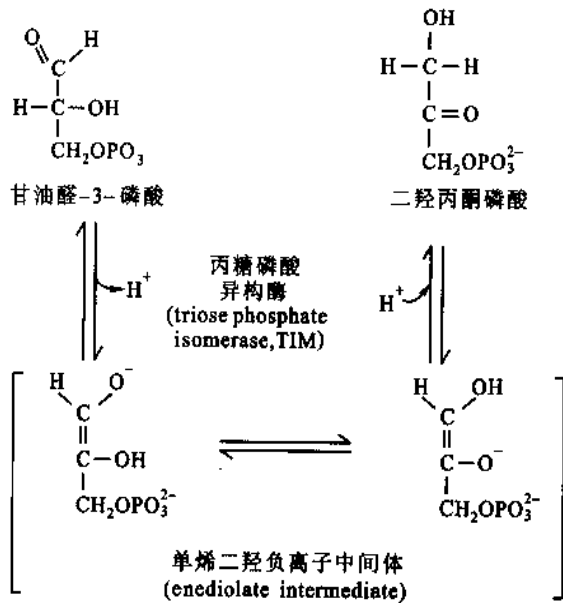


图 22-6 二羟丙酮磷酸和甘油醛 3-磷酸的互变异构关系

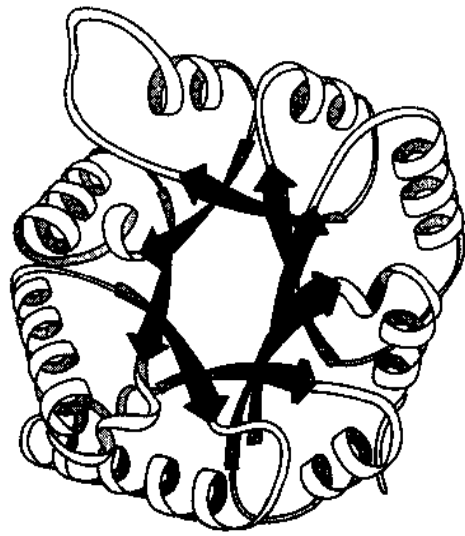


图 22-7 丙糖磷酸异构酶的结构图

8 股 β 折叠链构成中间的中心核, 8 股 α 螺旋链与 β 折叠链相对应环绕在外 β 折叠链周围, 两种不同型式的链条以无规肽链相连

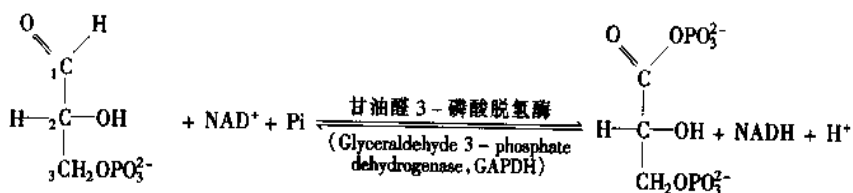
五、酵解第二阶段——放能阶段的反应机制

从前述的 5 步反应完成了糖酵解的准备阶段。酵解的准备阶段包括两个磷酸化步骤由六碳糖裂解为两分子三碳糖, 最后都转变为甘油醛-3-磷酸。在准备阶段中, 并没有从中获得任何能量, 与此相反, 却消耗了两个 ATP 分子。以下的 5 步反应包括氧化-还原反应、磷酸化反应。这些反应正是从甘油醛-3-磷酸提取能量形成 ATP 分子的过程。

(一) 甘油醛-3-磷酸氧化成 1,3-二磷酸甘油酸

这是糖酵解过程中的第 6 步反应, 也是一步重要的反应。因为在甘油醛-3-磷酸的醛基氧化为羧基时, 将氧化过程产生的能量贮存到 ATP 的分子中。

甘油醛-3-磷酸的氧化和磷酸化是在甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的催化下, 由 NAD^+ 和无机磷酸 (Pi) 参加实现的。在此反应中, 醛基氧化释放的能量推动了 1,3-二磷酸甘油酸 (1,3-bisphosphoglycerate, 1,3-BPG, 旧名为 1,3-diphosphoglycerate) 的形成, 这是一个酰基磷酸。酰基磷酸是具有高能磷酸基团转移势能的化合物。上述反应可表示如下:



甘油醛-3-磷酸的氧化是放能反应, $\Delta G^{\circ} = -43.09 \text{ kJ/mol}$ (-10.3 kcal/mol), 磷酸酐键的形成是非常吸能的反应, $\Delta G^{\circ} = 49.37 \text{ kJ/mol}$ ($+11.8 \text{ kcal/mol}$), 两反应相偶联后的 $\Delta G^{\circ} = +6.276 \text{ kJ/mol}$ ($+1.5 \text{ kcal/mol}$)。这表明, 在标准状况下, 整个反应是稍吸能的。但是下一步反应又是一个放能反应, 这就使该

反应可以顺利地进行。

1. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的催化机制

甘油醛-3-磷酸脱氢酶的反应机制可用图 22-8 表示。该酶的活性部位含有一个带游离巯基(-SH)的半胱氨酸。巯基是亲核体,它以解离形式向作为底物的醛分子中带正性的羰基碳原子进攻,从而形成一个与酶分子结合着的半缩硫醛(hemithioacetal),这时醛分子上与原来羰基相连的氢原子就以氢负离子(H^-)的形式离开羰基碳原子,也就是离开半缩硫醛,于是形成了还原的 NADH 和硫酯。同时释放出一个 H^+ 。NADH 一旦形成就立即从酶分子上解离下来,而氧化型的 NAD^+ 又立即结合到酶分子上。随后磷酸分子又向硫酯进行亲核攻击,形成 1,3-二磷酸甘油酸和游离的酶。和酶结合的硫酯是一种高能中间产物;1,3-二磷酸甘油酸也是一种高能磷酸酯。以上的反应机制可用图 22-8 所示:

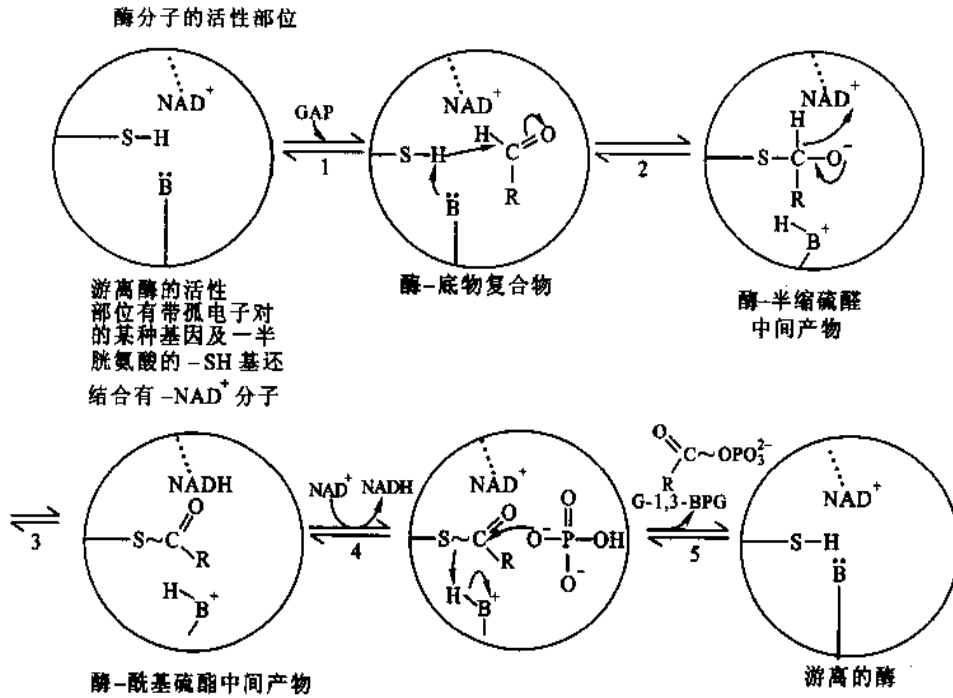


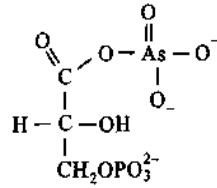
图 22-8 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的反应机制

- (1) S-H 的 H 为酸性(即带正电),酶分子上的 B 的孤电子对向 H 进攻。
- (2) S-H 形成 S^- 向醛分子的羰基 C 进攻形成半缩硫醛中间产物。
- (3) 醛分子与原羰基相连的 H 原子以 H^- 形式脱离,而与氧化型的 NAD^+ 结合形成 NADH 及硫酯。
- (4) 被还原的 NADH 立即脱离酶分子,同时又结合上另一氧化型 NAD^+ 。
- (5) 磷酸分子向硫酯进攻进行亲核攻击,使硫酯键断裂形成游离的 1,3-二磷酸甘油酸,同时酶又恢复原状。

从兔肌肉分离出的结晶酶其相对分子质量为 14 000,含有 4 个相同的亚基。每个亚基由 330 个氨基酸残基组成。重金属离子和烷化剂如碘乙酸能抑制酶的活性。这成为推测酶的活性部位是否有巯基的有力证据。

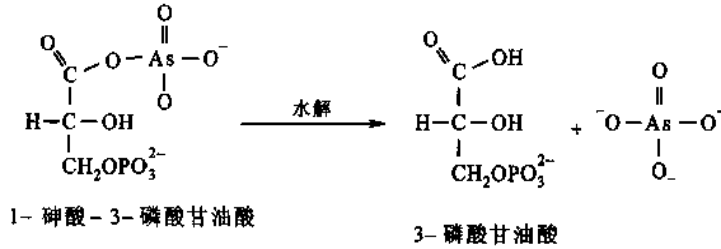
2. 砷酸盐(arsenate)破坏 1,3-二磷酸甘油酸的生成

砷酸盐(AsO_4^{3-})在结构和反应方面都和无机磷酸极为相似,因此,能代替磷酸进攻硫酯中间产物的高能键,产生 1-砷酸-3-磷酸甘油酸(1-arseno-3-phosphoglycerate)。其结构式如下:



1-砷酸-3-磷酸甘油酸
(1-arseno-3-phosphoglycerate)

砷酸化合物是很不稳定的化合物。它迅速地进行水解。其结果是：砷酸盐代替磷酸与甘油醛-3-磷酸结合并氧化，生成不是 1,3-二磷酸甘油酸，而是 3-磷酸甘油酸反应式如下：



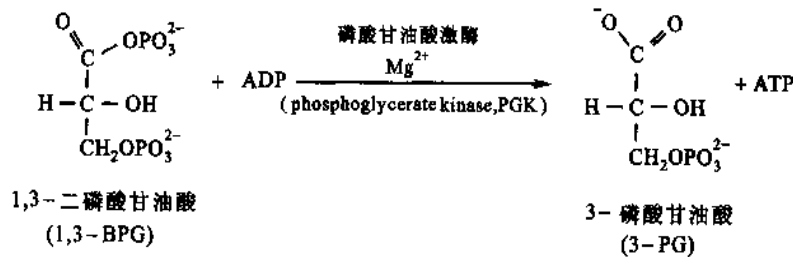
在砷酸盐存在下，虽然酵解过程照样进行，但是却并没有形成高能磷酸键。由甘油醛-3-磷酸氧化释放的能量，未能与磷酸化作用相偶联而被贮存。因此砷酸盐起着解偶联的作用，即解除了氧化和磷酸化的偶联作用。

从以上事实得到的启发是，在生物分子的进化中，为什么选择了具有较大动力学稳定性的磷酸基团作为递能基团，而不是砷酸。

(二) 1,3-二磷酸甘油酸转移高能磷酸基团形成 ATP

这一步反应是糖酵解过程的第 7 步反应，也是糖酵解过程开始收获的阶段。在此过程中产生了第一个 ATP。

Warburg 等人证明，1,3-二磷酸甘油酸(1,3-bisphosphoglycerate, 1,3-BPG)在磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase, PGK)的催化下，将其以高能酸酐键连接在碳 1 位[C(1)]上的高能磷酸基团转移到 ADP 分子上形成 ATP 分子。1,3-二磷酸甘油酸则转变为 3-磷酸甘油酸(3-phosphoglycerate, 3-PG)



该反应的 $\Delta G^0 = -18.83 \text{ kJ/mol} (-4.50 \text{ kcal/mol})$ ，是一个高效的放能反应，因此起到推动前一步反应顺利进行的作用。

磷酸甘油酸激酶分子的外观和己糖激酶极其相似。都由两叶构成，很像钳子，中间有很深的裂缝。活性部位在裂缝的底部。 $\text{Mg}^{2+} - \text{ADP}$ 结合位点在酶的一个结构域中。1,3-二磷酸甘油酸的结合部位在另一个结构域中，二者相距大约 1 nm。当酶与底物结合后，酶的两个结构域合拢，使底物得以在无水的环境中发生反应。这种情况和己糖激酶的作用机制也非常相似。但它们的蛋白质组成却是完全不同的。磷酸甘油酸激酶(PGK)的催化机制可用图 22-9 表示。

由图 22-6 可见，ADP β 磷酸基团的氧原子向 1,3-二磷酸甘油酸 C(1) 位的磷(P)原子进行亲核攻击，从而生成 ATP 和 3-磷酸甘油酸。

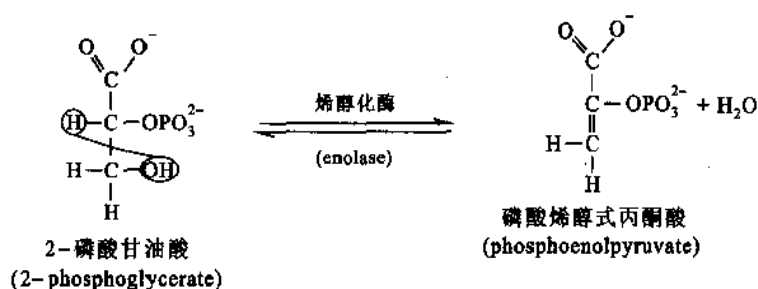
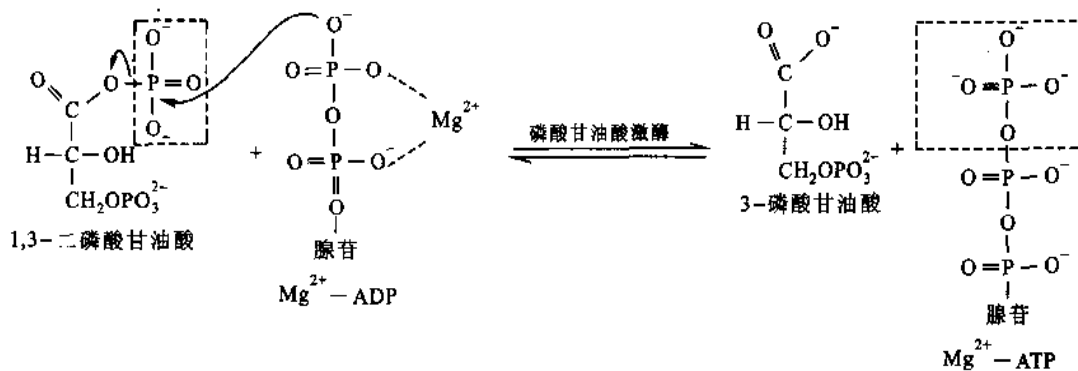


图 22-9 磷酸甘油酸激酶(PGK)的催化机制

注:在 ADP 和 ATP 分子中的 Mg^{2+} 的位置是假设的,实际上的 Mg^{2+} 位置仍是未知的

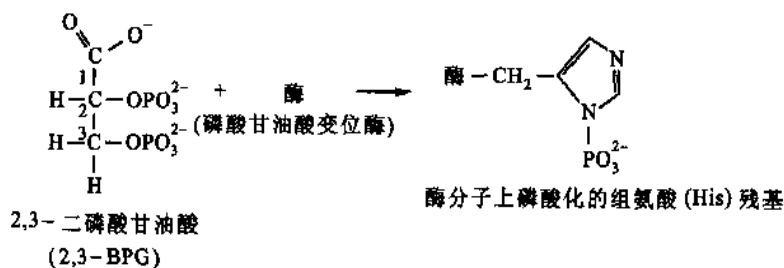
(三) 3-磷酸甘油酸转变为 2-磷酸甘油酸

这一反应是糖酵解过程的第 8 步反应,该反应是由磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase)催化的。通常将催化分子内化学基团移位的酶称为变位酶(mutase)。由 3-磷酸甘油酸转变为 2-磷酸甘油酸是为酵解过程的下一步骤准备条件。

磷酸甘油酸变位酶的活性部位结合有一个磷酸基团。当 3-磷酸甘油酸作为酶的底物结合到酶的活性部位后,原来结合在酶活性部位的那个磷酸基团便立即转移到底物分子上,形成一个与酶结合的二磷酸的中间产物,2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphoglycerate, 2,3-BPG),这个中间产物又立即使酶分子的活性部位再磷酸化,同时产生游离的 2-磷酸甘油酸。

对上述反应机制的解释曾有以下的实验根据。

- ① 磷酸甘油酸变位酶的催化机制需有 2,3-二磷酸甘油酸作为引物,或者说是必需因素。
- ② 将极少量用 ^{32}P 标记的 2,3-二磷酸甘油酸与酶一起保温发现,具有放射性的磷酸基团标记到酶的组氨酸残基上。

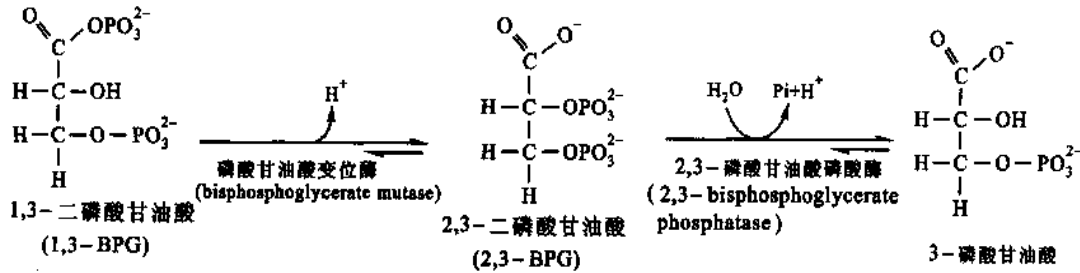


- ③ 用 X 射线观察酶的结构发现,在酶的活性部位 His8(第 8 位的组氨酸残基)上有放射性磷标记的磷酸基团。

上面的实验还有力地证明了与磷酸基结合的残基是酶活性部位中第 8 位的组氨酸。

这里应该提及的是,上述的 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-BPG)不只在磷酸甘油酸变位酶的催化过程中起着重要的作用,在红细胞对氧的转运中还起着调节剂的作用。它使脱氧血红蛋白稳定化,从而降低血红蛋白对氧的亲合力。没有它,血红蛋白在通过组织的毛细血管时就很难脱下氧。2,3-二磷酸甘油酸在红细胞中的浓度极高,大约与血红蛋白具有相同的浓度,在其他的细胞中则只存在微量。

2,3-二磷酸甘油酸的合成和降解是糖酵解途径中的一个短支路(short detour)。全部反应可用下式表示:



上述的两步反应几乎都是不可逆的。此外,2,3-二磷酸甘油酸是二磷酸甘油酸变位酶(bisphosphoglycerate mutase)强有力的竞争性抑制剂。2,3-二磷酸甘油酸的浓度不只决定于二磷酸甘油酸变位酶的活力,还决定于 2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶(2,3-bisphosphoglycerate phosphatase)的活力。一般将催化磷酸酯水解的酶总称为磷酸酶(phosphatase)。

催化 1,3-二磷酸甘油酸转变为 2,3-二磷酸甘油酸的二磷酸甘油酸变位酶的作用机制已了解得很清楚。该变位酶先同时结合 1,3-二磷酸甘油酸和 3-磷酸甘油酸,然后磷酸基团从 1,3-二磷酸甘油酸的 C(1)上移到 3-磷酸甘油酸的 C(2)上。从化学计算上看不到 3-磷酸甘油酸的出现,但它却是磷酸基团转移的重要参加者,磷酸基团的转移情况可用图 22-10 表示。

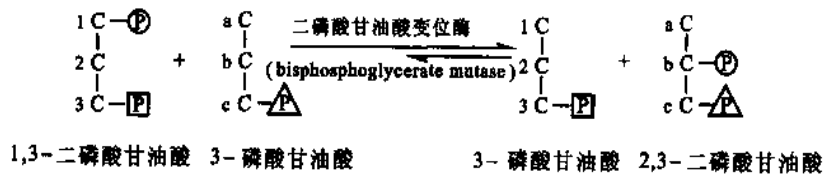
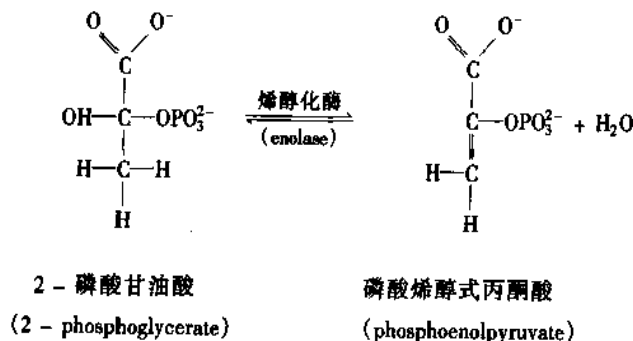


图 22-10 二磷酸甘油酸变位酶催化的磷酸基团转移反应

注: P 、 A 、 B 代表不同碳原子上的磷酸基团,从不同的图形可看到磷酸基团转移的来龙去脉

(四) 2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸

这是酵解过程的第 9 步反应。这一反应是烯醇化酶(enolase)催化的。



烯醇化酶在与底物结合前先与 2 价阳离子如 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 结合形成一个复合物,才有活性。烯醇化酶的催化作用可用图 22-11 表示。

烯醇化酶分子活性部位碱性残基上的孤电子对吸引 2-磷酸甘油酸第 2 碳原子上的氢原子。形成负

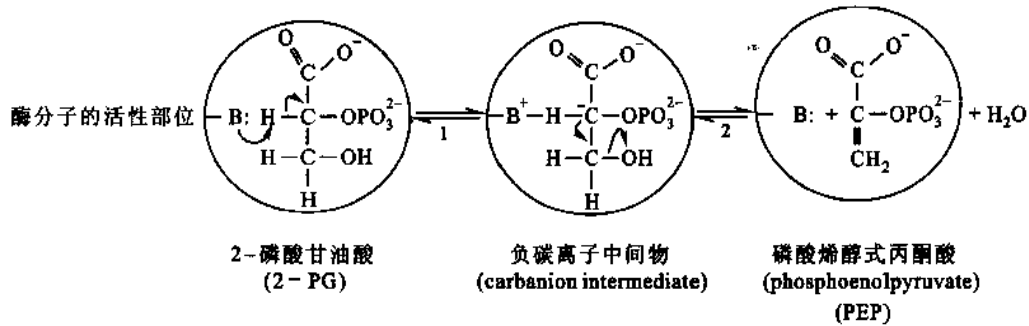


图 22-11 烯醇化酶可能的反应机制

反应 1: 酶分子碱性残基用 B: 表示它的孤对电子吸引 2-磷酸甘油酸 C(2) 上的 H 原子, 使 C(2) 成为负碳离子, 从而形成负碳离子中间物。

反应 2: 2-磷酸甘油酸 C(3) 上的 -OH 基团离开负碳离子中间物, 从而形成磷酸烯醇式丙酮酸和一分子水

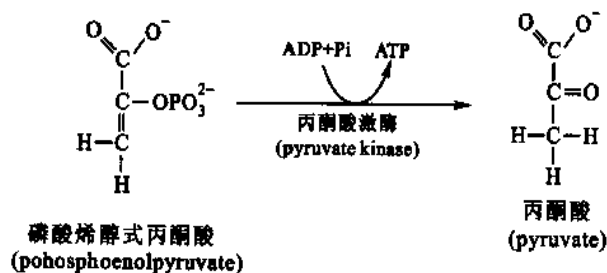
碳离子中间产物, 于是 2-磷酸甘油酸第 3 碳原子上的 -OH 基团即离开负碳离子中间产物, 形成磷酸烯醇式丙酮酸。在上述的两步反应中, 2-磷酸甘油酸第 2 位碳原子被孤电子对吸引的质子能极迅速地与溶剂中的质子相互交换。而且 2-磷酸甘油酸负碳离子中间产物第 3 碳原子上 -OH 基团的消除是比较缓慢的。因此 -OH 的消除速度是由 2-磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸的限速步骤。用 ^{18}O 标记 -OH 基团曾证明, 放射性氧(O)从中间产物消除的速度和放射性 O 与溶剂互相交换的速度是相同的。

应着重指出的是, 烯醇磷酸酯具有高基团转移势能。普通磷酸酯水解的标准自由能 ΔG° 为 -12.55 kJ/mol (-3 kcal/mol)。而磷酸烯醇式丙酮酸水解的标准自由能 $\Delta G^{\circ} = -61.92$ kJ/mol (-14.8 kcal/mol)。如此高的磷酸基团转移势能是由于磷酸基团移后形成的烯醇紧接着又形成丙酮酸, 由烯醇向酮转变, 其 $\Delta G^{\circ} = -41.84$ kJ/mol (-10 kcal/mol), 如此大的标准自由能变化便成了磷酸烯醇式丙酮酸上磷酸基团高的转移势能的巨大推动力。

烯醇化酶的相对分子质量为 85 000。氟化物是该酶强烈的抑制剂。其原因是, 氟与镁和无机磷酸形成一个复合物, 取代天然情况下酶分子上镁离子的位置, 从而使酶失活。

(五) 磷酸烯醇式丙酮酸转变为丙酮酸并产生一个 ATP 分子

这是糖酵解过程的第 10 步反应。是由葡萄糖形成丙酮酸的最后一步反应。催化此反应的酶称为丙酮酸激酶(pyruvate kinase)。反应式如下:

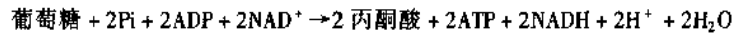


磷酸基团由磷酸烯醇式丙酮酸转移到 ADP 上同时形成丙酮酸是一个不可逆反应。这是因为磷酸烯醇式丙酮酸水解的 $\Delta G^{\circ} = -61.92$ kJ/mol (-14.8 kcal/mol), 而 ATP 生成的 $\Delta G^{\circ} = +30.54$ kJ/mol ($+7.3$ kcal/mol)。二者能量的差别表明该反应是一个高度放能反应, $\Delta G^{\circ} = -31.38$ kJ/mol (-7.5 kcal/mol)。

丙酮酸激酶的催化活性需要 2 价阳离子参与, 如 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 。它是糖酵解途径中的一个重要变构调节酶(regulatory enzyme)、ATP、长链脂肪酸、乙酰 - CoA、丙氨酸都对该酶有抑制作用; 而果糖 - 1,6 - 二磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸对该酶都有激活作用。丙酮酸激酶的相对分子质量为 250 000, 由四个相对分子质量为 55 000 的亚基构成四聚体。该酶至少有三种不同类型的同工酶。在肝脏中占优势的称为 L 型。肌肉和脑中占优势的称为 M 型, 其他组织中的称为 A 型。这些同工酶结构相似, 但调控机制不同。

六、由葡萄糖转变为两分子丙酮酸能量转变的估算

由葡萄糖分解为两分子丙酮酸包括能量的产生可用下面的总反应式表示：



从反应式中可一目了然，从一分子葡萄糖的降解到形成 2 分子丙酮酸的过程，净产生 2 分子 ATP。在酵解过程中，ATP 的消耗和产生可用表 22-1 作一概括；其每步反应的标准自由能和自由能的变化如表 22-2 所示：

表 22-1 酵解过程中 ATP 的消耗和产生

消耗或产生 ATP 的反应	每分子 ATP 葡萄糖 ATP 变化的分子数
葡萄糖 → 葡萄糖 6-磷酸	-1
果糖-6-磷酸 → 果糖-1,6-二磷酸	-1
2 × 1,3-二磷酸甘油酸 → 2 × 3-磷酸甘油酸	+2
2 × 磷酸烯醇式丙酮酸 → 2 × 丙酮酸	+2
总 计	+2

注：负号(-)代表消耗，正号代表产生。

表 22-2 糖酵解过程中各步反应的能量变化

反应内容	酶	ΔG°	ΔG
		kcal(kJ)/mol	kcal(kJ)/mol
1. 葡萄糖 + ATP → 葡萄糖-6-磷酸 + ADP + H ⁺	己糖激酶	-0.4 (-16.74)	-8.0 (-33.47)
2. 葡萄糖-6-磷酸 → 果糖-6-磷酸	磷酸葡萄糖变位酶	+0.4 (+1.67)	-0.6 (-2.51)
3. 果糖-6-磷酸 + ATP → 果糖 1,6-二磷酸 + ADP + H ⁺	磷酸果糖激酶	-3.4 (-14.23)	-5.3 (-22.18)
4. 果糖-1,6-二磷酸 → 二羟丙酮磷酸 + 甘油醛-3-磷酸	烯醇化酶	+5.7 (+23.85)	-0.3 (-1.25)
5. 二羟丙酮-磷酸 → 甘油醛-3-磷酸	己糖磷酸变位酶	+1.8 (+7.53)	+0.6 (+2.51)
6. 甘油醛-3-磷酸 + Pi + NAD ⁺ → 1,3-二磷酸甘油酸 + NADH + H ⁺	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	+1.5 (+6.28)	-0.4 (-1.67)
7. 1,3-二磷酸甘油酸 + ADP → 甘油酸-3-磷酸 + ATP	磷酸甘油酸激酶	-4.5 (-18.83)	+0.3 (+1.26)
8. 甘油酸-3-磷酸 → 甘油酸-2-磷酸	磷酸甘油酸变位酶	+1.1 (+4.60)	+0.2 (+0.84)
9. 甘油酸-2-磷酸 → 磷酸烯醇式丙酮酸 + H ₂ O	烯醇化酶	+0.4 (+1.67)	-0.8 (-3.35)
10. 磷酸烯醇式丙酮酸 + ADP + H ⁺ → 丙酮酸 + ATP	丙酮酸激酶	-7.5 (-31.38)	-4.0 (-16.74)

注：上表中 ΔG° 和 ΔG 用 kcal/mol 和 kJ/mol 单位表示。实际的自由能变化 ΔG 是在正常生理条件下测得反应物浓度和标准自由能 ΔG° 的数据计算所得

上表所示糖酵解各步反应的实际自由能变化，有三项其 ΔG 为正值。其中包括：丙糖磷酸变位酶催化的二羟丙酮磷酸转变为甘油醛-3-磷酸，磷酸甘油酸激酶催化的由甘油酸-1,3-二磷酸和 ADP 形成

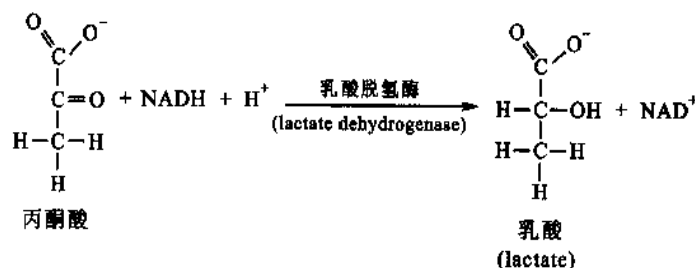
3-磷酸甘油酸转变为2-磷酸甘油酸的反应。根据热力学原理,糖酵解过程只有在全部反应的值都为负值时才能进行。这些小的正值表明,细胞内进行着的酵解中间产物的浓度难于准确测得。

七、丙酮酸的去路

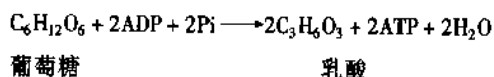
从葡萄糖到形成丙酮酸的酵解过程,在生物界都是及其相似的。丙酮酸以后的途径却随着机体所处的条件和发生在什么样的生物体中各不相同。在有氧条件下丙酮酸的转变这里不作讨论,请参看下面的章节,本章只讨论在无氧条件下丙酮酸的去路。

(一) 生成乳酸

动物包括人,在激烈运动时,或由于呼吸、循环系统障碍而发生供氧不足时,缺氧的细胞必须用糖酵解产生的ATP分子暂时满足对能量的需要。为了使甘油醛-3-磷酸继续氧化,必须提供氧化型的 NAD^+ 。丙酮酸作为 NADH 的受氢体,使细胞在无氧条件下重新生成 NAD^+ ,于是丙酮酸的羰基被还原,生成乳酸(lactic acid 或 lactate)。反应式如下所示:



在无氧条件下,每分子葡萄糖代谢形成乳酸的总方程式如下:



由于糖酵解产生等摩尔的 NADH 和丙酮酸,每分子葡萄糖所产生的2个 NADH 分子,都可通过利用2个丙酮酸分子而重新被氧化。

催化上述反应的酶称为乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)。

哺乳动物有两种不同的乳酸脱氢酶亚基。一种是M型(或称为A型),一种是H型(或称为B型)。这2种亚基类型构成5种同工酶: M_4 、 M_3H 、 M_2H_2 、 MH_3 、 H_4 。所有这5种同工酶催化相同的反应。但每种同工酶都有对底物(丙酮酸和 NADH 或乳酸和 NAD^+)特有的 K_m 值。 M_4 和 M_3H 型对丙酮酸有较小的 K_m 值,也就是较高的亲和力。它们在骨骼肌和其他一些依赖糖酵解获得能量的组织中占优势。相反, MH_3 和 H_4 型对丙酮酸有较大的 K_m 值,即较低的亲和力,它们在需氧的组织中占优势。例如,心肌中是 H_4 型, H_4 型对丙酮酸的亲和力最小。这确保了在心肌中丙酮酸不能转变为乳酸,而有利于丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)的催化,使其朝有氧代谢方向进行(参看以后章节)。

乳酸脱氢酶催化 NADH 被丙酮酸氧化为 NAD^+ 的过程,与其他由酶催化的 NADH 的氧化或 NAD^+ 的还原反应都具有绝对的立体专一性(stereospecificity)。在 $\text{NADHC}(4)$ 上的 $\text{Pro}-\text{R}$ (A-面)的氢,立体特异地转移到丙酮酸 $\text{C}(2)$ 位的 re 面,使丙酮酸形成L-乳酸(也称为S-乳酸)。这是带一对电子的质子(氢阴离子)的转移。这一氢阴离子是从烟酰胺环的背面(opposite face),直接转移到丙酮酸上的。这种情况和甘油醛磷酸脱氢酶在甘油醛-3-磷酸(GAP)转变为1,3-二磷酸甘油酸的反应中,由 NAD^+ 还原 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 的反应方式是一致的,丙酮酸还原的机制,可用图22-12表示。

机体血液内乳酸脱氢酶同工酶的比例是比较恒定的。临床上利用测定血液中乳酸脱氢酶同工酶的比例关系作为诊断心肌、肝脏等疾患的重要指标之一。

生长在厌氧或相对厌氧条件下的许多细菌以乳酸为最终产物。这种以乳酸为终产物的厌氧发酵称为乳酸发酵。乳酸发酵在经济上是非常重要的。人们利用细菌对牛乳中乳糖的发酵生产奶酪、酸奶和其他食品。

(二) 生成乙醇

酵母在无氧条件下,将丙酮酸转变为乙醇和 CO₂。这一过程实际包括两个反应步骤。第一步是丙酮酸脱羧形成乙醛和 CO₂,第二步乙醛由 NADH+H 还原生成乙醇同时产生氧化型 NAD⁺。

1. 丙酮酸脱羧形成乙醛

催化这一步反应的酶是丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase)。该酶在动物细胞中不存在。它以硫胺素焦磷酸(TPP)为辅酶。TPP 以非共价键和酶紧密结合。

丙酮酸脱羧酶的催化机制可用图 22-13 表示。

丙酮酸脱羧酶需要 TPP 是因为丙酮酸为 α-酮酸。它直接脱羧必然在羰基碳原子上产生电负性,羰基碳就

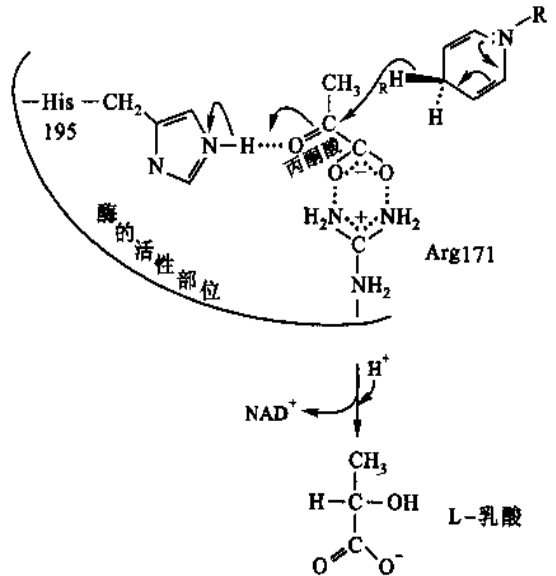


图 22-12 乳酸脱氢酶的催化反应机制 图中表明负氢离子从 NADH 直接向丙酮酸羰基转移的情况

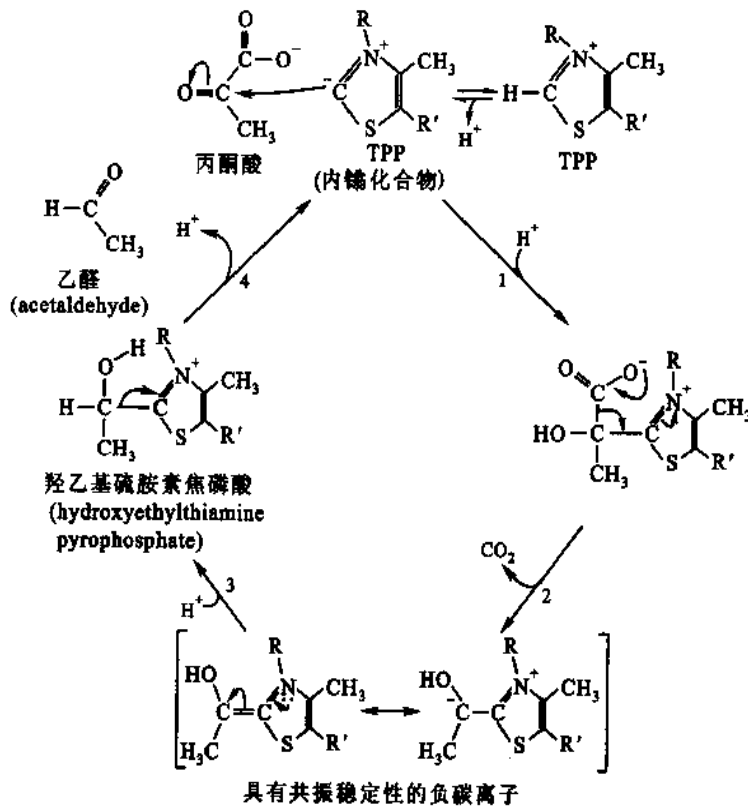


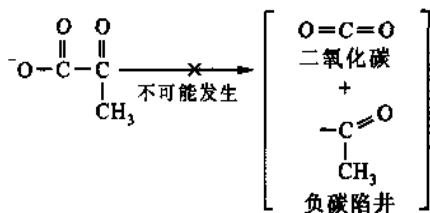
图 22-13 丙酮酸脱羧酶的催化机制

图中表明 1. TPP 以内轭化合物形式对丙酮酸的羰基进行亲核攻击;2. 羰基以 CO₂ 形式脱去形成共振稳定性的负碳离子;3. 负碳离子质子化;4. 脱去 TPP 的内轭化合物(ylid)和乙醛

注:内轭化合物是碳和其他元素间既有共价键又有离子键性质的化合物

形成一个负碳“陷阱”。这是极不稳定的状态,因此是根本不可能的。只有丙酮酸和 TPP 结合,经过图 22-13 所示的 1、2、3、4 比较稳定的中间过程才可以实现。经过这些过程乃避开了羰基碳形成带负电荷的

“陷井”。



TPP 的活性末端是一个噻唑环(thiazolium ring)。它第 2 碳原子上的氢,由于相邻的 4 价氮原子上正电荷的影响而具有相对酸性。氮原子上的正电荷使质子解离后形成的碳负离子得以稳定。这一两性负碳离子(是一个内络离子,见图 22-13 之注)是 TPP 的活性形式。

丙酮酸脱羧酶催化的脱羧过程可归纳为 4 个反应步骤: 第一步, TPP 的内络离子对丙酮酸的羰基碳进行亲核攻击; 第二步, 释放出 CO_2 并生成一个共振稳定的负碳离子加化物, 在这个加化物上 TPP 的噻唑环起着电子陷井的作用; 第三步, 负碳离子质子化; 第四步, 乙醛被释放出又形成游离的活性酶(图 22-13)。

2. 乙醛还原成乙醇同时产生氧化型 NAD^+

催化这一反应的酶是乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)。酵母乙醇脱氢酶(YADH)是含有 4 个亚基的四聚体。每个亚基结合一个 NADH 和一个 Zn^{2+} 。 Zn^{2+} 的作用是使乙醛的羰基极化, 这可使处于反应中的中间态产生的负碳电荷比较稳定, 从而对 NADH Pro-R 的氢原子的转移有促进作用。这一氢原子转移到乙醛的 re-面上, 从而产生一个氢原子在 Pro-R 位的乙醇分子。如图 22-14 所示:

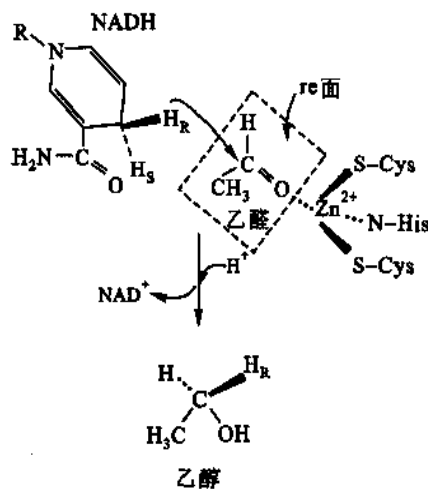


图 22-14 乙醇脱氢酶催化反应机制表明 NADH Pro-R 的负氢离子定向地转移到乙醛的 re 面

乙醇发酵有很大的经济意义, 在发面、制作面包和馒头, 以及酿酒工业中起着关键性的作用。在酿醋工业上, 微生物也是先在不需氧条件下形成乙醛而后在有氧条件下氧化为醋。

八、糖酵解作用的调节

(一) 磷酸果糖激酶是关键酶

在代谢途径中, 催化基本上不可逆反应的酶所处的部位是控制代谢反应的有力部位。在糖酵解途径中由己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶催化的反应实际都是不可逆反应, 因此, 这三种酶都具有调节糖酵解途径的作用。它们的活性受到变构效应物(allosteric effectors)可逆地结合以及酶共价修饰的调节。当然这些酶的量还根据代谢情况的需要受到转录的控制。酶的可逆的变构调控, 磷酸化作用的调节以及转录的控制根据不同情况可在百万分之一秒、几秒或几小时内发生变化。

磷酸果糖激酶是哺乳动物酵解途径的重要调节酶已如前述。该酶受到高浓度 ATP 的抑制(图 22-15)。

从图 22-15 可看出, 高的 ATP 浓度使酶与底物果糖-6-磷酸的结合曲线从双曲线形变为 S 形。

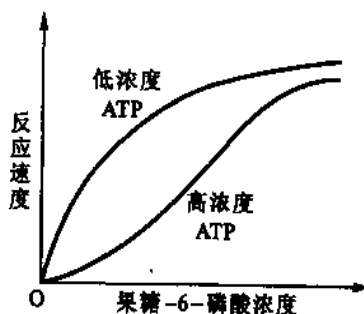


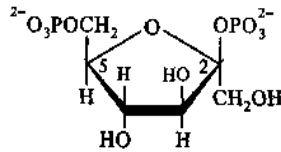
图 22-15 ATP 对磷酸果糖激酶的变构调节作用表明高浓度 ATP 降低酶和底物的亲和力, 从而降低反应速度

因糖酵解作用不只是在缺氧条件下提供能量,也为生物合成提供碳骨架,因此,碳骨架需要的情况也必然影响酵解作用的速度。柠檬酸对磷酸果糖激酶的抑制作用正具有这种意义。细胞内的柠檬酸含量高,意味着有丰富的生物合成前体存在,葡萄糖无需为提供合成前体而降解,柠檬酸是通过加强 ATP 的抑制效应来抑制磷酸果糖激酶的活性,从而使糖酵解过程减慢。

因磷酸果糖激酶是糖酵解作用的限速酶,因此,对此酶的调节是调节酵解作用的关键步骤。

(二) 果糖 - 2,6 - 二磷酸对酵解的调节作用

果糖 - 2,6 - 二磷酸(fructose 2,6 - bisphosphate, F - 2,6 - BP)是 1980 年由 Henri - Gery Hers 和 Emile Van Schaftingen 新发现的酵解过程的调节物。它的结构如下:



果糖 - 2,6 - 二磷酸
(fructose - 2,6 - bisphosphate F - 2,6 - BP)

它是磷酸果糖激酶强有力的激动剂。在肝脏中,果糖 - 2,6 - 二磷酸提高果糖激酶与果糖 - 6 - 磷酸的亲和力并降低 ATP 的抑制效应。果糖 - 2,6 - 二磷酸对磷酸果糖激酶的激活作用可用图 22 - 16 表示。

实质上果糖 - 2,6 - 二磷酸是一个变构激活剂(allosteric activator)。它控制磷酸果糖激酶的构象转换,维持构象之间的平衡关系。

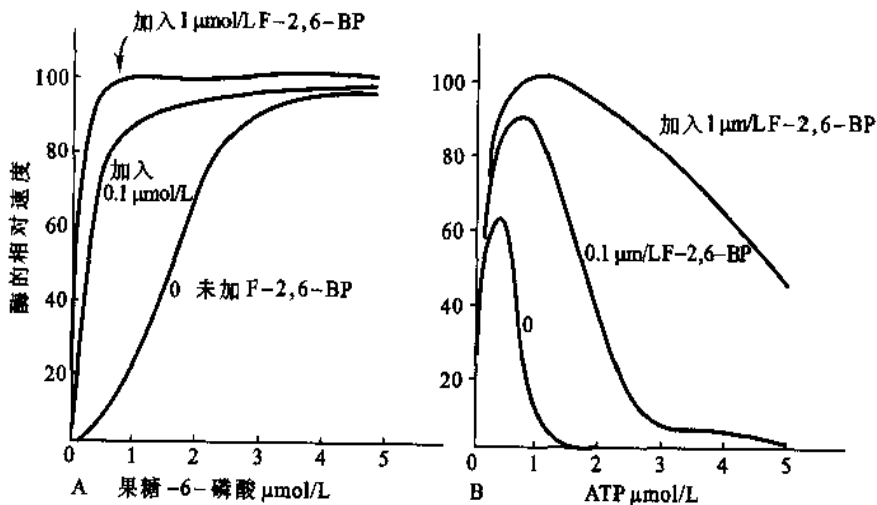


图 22 - 16 果糖 - 2,6 - 二磷酸对磷酸果糖激酶的激活作用

A. 加入果糖 2,6 - 二磷酸 1 μmol/L 后,底物浓度对酶的活性影响由图中的 S 形变为双曲线形

B. ATP 浓度对酶的抑制效应当加入不同浓度的果糖 2,6 - 二磷酸后受到不同的解除

果糖 - 2,6 - 二磷酸的形成是由磷酸果糖激酶 2(phosphofructokinase 2, PFK2)催化果糖 - 6 - 磷酸,使其在 C(2)位磷酸化而形成的。磷酸果糖激酶 2 和磷酸果糖激酶(PFK)是两种不同的酶。它们的催化机制不同。果糖 - 2,6 - 二磷酸的水解也是由一种特殊的磷酸酶,称为果糖二磷酸酶 2(fructose bisphosphatase 2, FBPase 2)催化的。水解的产物是果糖 - 6 - 磷酸。有趣的是,这两种酶,即磷酸果糖激酶 2 和果糖二磷酸酶 2,处于一条单一的多肽链上,这条多肽链的相对分子质量为 55 000,也可以说这是一个具有双重功能的酶。

果糖 - 6 - 磷酸有加速果糖 - 2,6 - 二磷酸合成的作用,还有抑制该化合物被水解的作用。因此,高的果糖 6 - 磷酸浓度可导致高浓度果糖 - 2,6 - 二磷酸的形成。果糖 - 2,6 - 二磷酸又进一步激活果糖磷酸

激酶。这种过程称为前馈刺激作用(feedforward stimulation)。

磷酸果糖激酶 2 和果糖二磷酸酶 2 的活性由酶分子上一个丝氨酸残基往复地磷酸化所控制。当葡萄糖缺乏时,血液中的胰高血糖素(glucagon)启动环 AMP(cyclic AMP)的级联效应,从而引起该双重功能酶的磷酸化。酶的共价修饰使果糖二磷酸酶 2 激活,同时使磷酸果糖激酶 2 受到抑制。结果使果糖-2,6-二磷酸减少。当葡萄糖过剩时,磷酸基团从酶分子上脱落,果糖-2,6-二磷酸的含量于是上升,结果使糖酵解过程加速。称为协同控制作用(coordinated control)。因激酶和磷酸酶的结构域同处在一条肽链上,形成一个调节结构域而使上述的协同控制作用得到加强。

(三) 己糖激酶和丙酮酸激酶对糖酵解的调节作用

前面已经提到,己糖激酶的催化作用受到它催化生成的产物葡萄糖-6-磷酸的抑制。如果磷酸果糖激酶不活跃,果糖-6-磷酸的浓度就增加,也必然使得葡萄糖-6-磷酸的浓度增加,因为葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸是维持一种相对平衡的浓度。这也就使得己糖激酶受到抑制。为什么磷酸果糖激酶是限速酶而不是己糖激酶?因为葡萄糖-6-磷酸并不是唯一的糖酵解的中间物,葡萄糖-6-磷酸还可以转变为糖原,还可以经五碳糖磷酸途径(pentose phosphate pathway)进行氧化。对酵解途径单独具有的不可逆反应,即关键步骤,就是磷酸果糖激酶催化的由果糖-6-磷酸形成果糖-1,6-二磷酸的反应。一般认为,在新陈代谢过程中,催化关键步骤的酶是这一途径中的重要控制因素。

丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸生成 ATP 和丙酮酸。后者是一个共同的代谢中间物,它可进一步被氧化,或用作结构元件。丙酮酸激酶控制着丙酮酸的外流量,不同的丙酮酸激酶同工酶由不同的基因编码。果糖-1,6-二磷酸对丙酮酸激酶的激活作用,使糖酵解过程的反应中间物能够顺利地往下一步进行。当能量贮存足够时,ATP 对丙酮酸激酶的变构抑制效应使酵解过程减慢。如果血液中的葡萄糖水平下降,激起肝脏中丙酮酸激酶的磷酸化,使该酶变为不活跃的形式,从而降低了酵解作用的进行,使血糖浓度得以维持正常水平。

丙氨酸对丙酮酸激酶的变构抑制效应,也使酵解过程减慢。丙氨酸是由丙酮酸接受一个氨基形成的,丙氨酸浓度增加意味着丙酮酸作为丙氨酸的前体过量,因此丙氨酸对丙酮酸减慢的抑制效应也是维持代谢动态平衡的一种有效措施。丙酮酸激酶也是通过磷酸化和去磷酸化转变其活性。其活跃形式是去磷酸化形式,而磷酸化形式是不活跃形式。如图 22-17 所示。

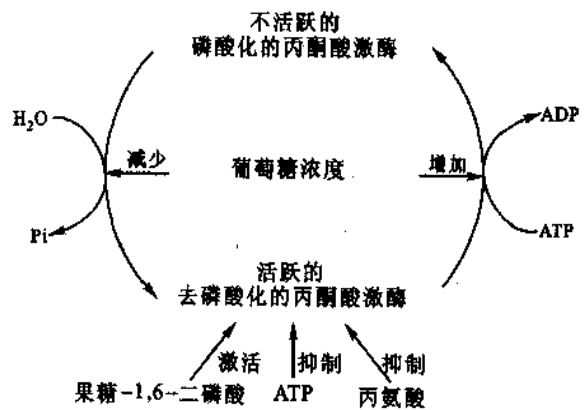


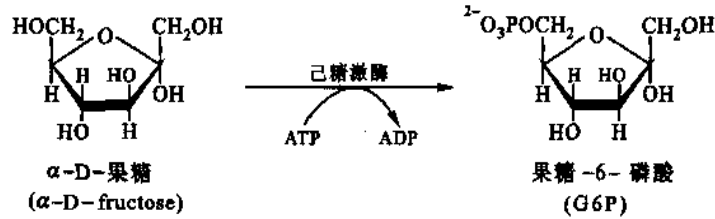
图 22-17 丙酮酸激酶催化活性控制关系图

九、其他六碳糖进入糖酵解途径

淀粉和糖原经消化后都转变为葡萄糖进入糖酵解途径。水果和由蔗糖水解产生的果糖,由乳酸水解产生的半乳糖,由糖蛋白等多糖经消化产生的甘露糖都是通过转变成糖酵解途径的中间产物而进入酵解途径。

(一) 果糖

在肌肉中,果糖由己糖激酶催化磷酸化形成果糖-6-磷酸。

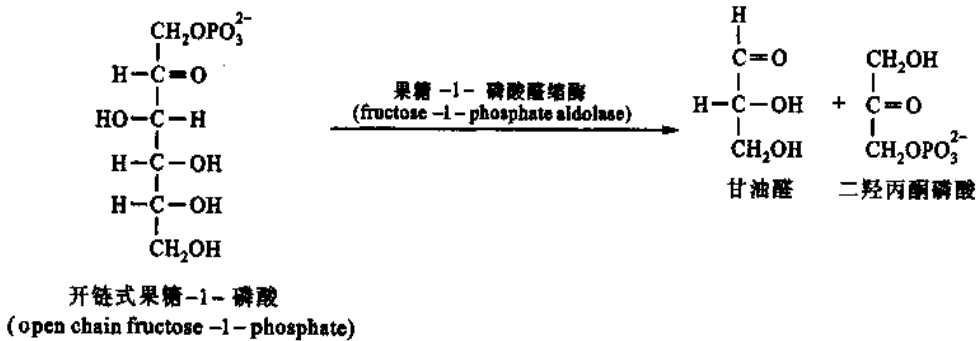


在肝脏中,因只含有葡萄糖激酶,此酶只催化葡萄糖的磷酸化,所以果糖在肝脏中进入糖酵解途径不能像在肌肉中那么简单,需经过 6 种酶的催化转变过,其过程如下:

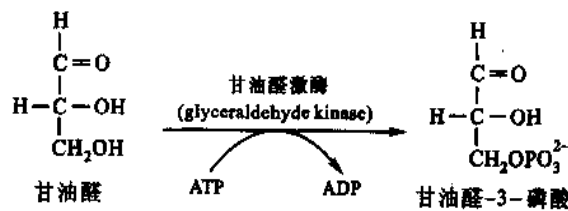
(1) 果糖由果糖激酶(fructokinase)催化,在 C(1)位磷酸化,消耗 1 个 ATP 分子,形成果糖-1-磷酸(fructose-1-phosphate)。

(2) 果糖-1-磷酸进行醇、醛裂解形成二羟丙酮磷酸和甘油醛

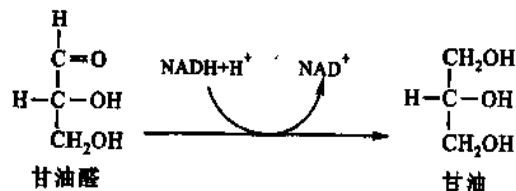
前面已经提到,醛缩酶有不同类型。肌肉中为 A 型,只对果糖-1,6-二磷酸起作用;肝脏中为 B 型,也可利用果糖-1-磷酸作为底物。因此 B 型醛缩酶有时也称为果糖-1-磷酸醛缩酶。它催化如下的反应:



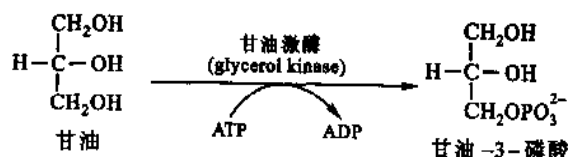
(3) 甘油醛在甘油醛激酶(glyceraldehyde kinase)催化下,消耗 1 分子 ATP,形成甘油醛-3-磷酸。反应如下:



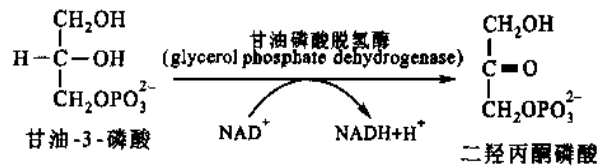
(4) 甘油醛还可在醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)催化下,由 NADH 还原形成甘油,反应如下:



(5) 甘油在甘油激酶(glycerol kinase)的催化下,消耗 1 分子 ATP,转变为甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate):



(6) 甘油-3-磷酸在甘油磷酸脱氢酶(glycerol phosphate dehydrogenase)催化下,由 NAD^+ 氧化,形成二羟丙酮磷酸,反应如下:



二羟丙酮磷酸经酵解途径中的丙糖磷酸异构酶(triosephosphate isomerase)转变为甘油醛-3-磷酸,从而进入糖酵解途径。

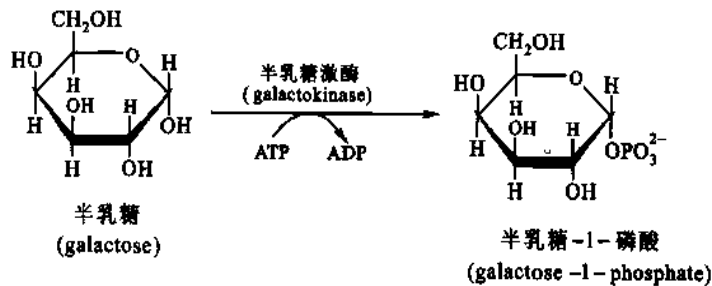
临床上,过去认为给病人输入果糖优于葡萄糖。但血中果糖浓度过高超出肝脏中醛缩酶 B 的正常功能范围,引起果糖-1-磷酸积累,造成肝脏中无机磷酸的大量消耗以致耗竭,进而使 ATP 浓度下降,于是糖酵解过程加速产生大量乳酸。血中乳酸浓度过高,甚至达到危及生命的地步。

有一种遗传病,称为果糖不耐症(fructose intolerance),是由于肝中缺乏 B 型醛缩酶。食入的果糖不能被正常代谢,也造成果糖-1-磷酸积累引起一系列和临床输入果糖同样的症状。这种病人对任何甜味都失去感觉。

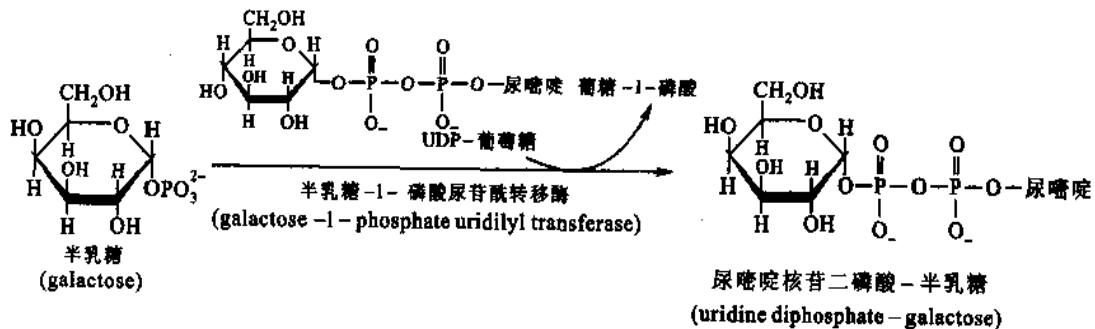
(二) 半乳糖

1. 半乳糖(galactose)转变为能进入糖酵解途径的中间产物,包括 5 个步骤

(1) 半乳糖由半乳糖激酶(galactokinase)催化其第一个碳原子 C(1)磷酸化,形成半乳糖-1-磷酸(galactose-1-phosphate),也需要消耗 1 分子 ATP。



(2) 半乳糖-1-磷酸形成 UDP-半乳糖(尿嘧啶核苷二磷酸-半乳糖,uridine diphosphate-galactose)。催化此反应的酶称为尿苷酰转移酶(uridyl transferase)。它催化尿苷酰基团从 UDP-葡萄糖分子在焦磷酸键处断裂转移到半乳糖-1-磷酸的磷酸基团上。反应如下:



(3) UDP-半乳糖转化为 UDP-葡萄糖。催化此反应的酶称为 UDP-半乳糖 4-差向异构酶(UDP-galactose 4-epimerase)。此酶以 NAD^+ 为辅酶。在转变中需经过氧化-还原过程。反应如图 22-18 所示。

(4) UDP-葡萄糖转变为葡萄糖-1-磷酸。催化此反应的酶为 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)。反应式如下:

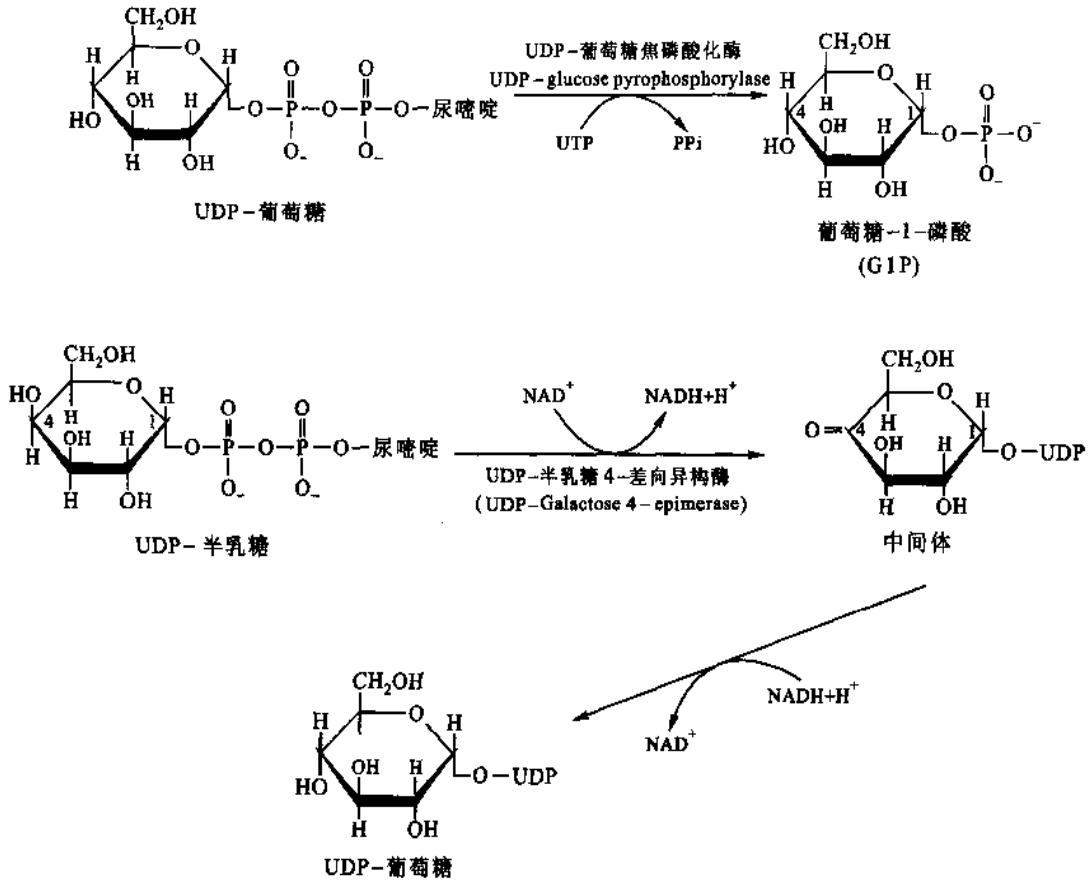
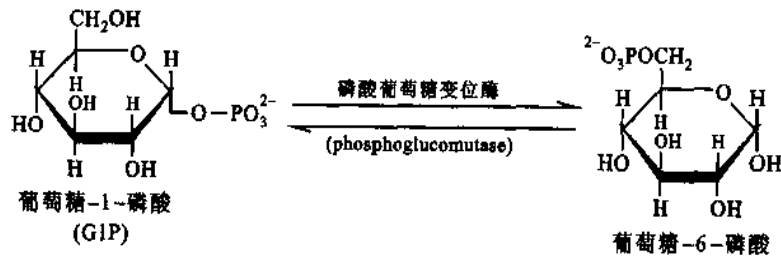


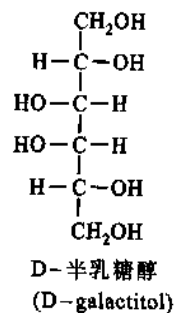
图 22-18 UDP-半乳糖 4-差相异构酶催化的反应

(5) 葡萄糖-1-磷酸由磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)转变为糖酵解过程的中间产物葡萄糖-6-磷酸。反应式如下:



2. 半乳糖血症

半乳糖血症(galactosemia)是一种遗传病。这种患者体内不能将半乳糖转化为葡萄糖。原因是缺乏半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶,不能使半乳糖-1-磷酸转变为UDP-半乳糖。结果使血中半乳糖积累,进一步造成眼睛晶状体半乳糖含量升高。并还原为半乳糖醇(galactitol),它的结构如下:



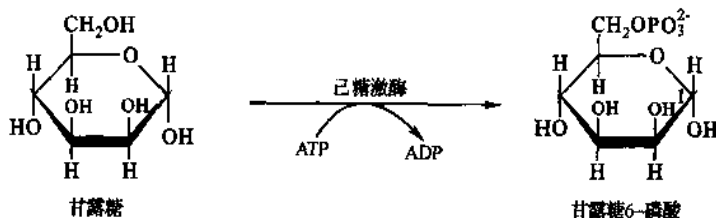
晶状体内的半乳糖醇最后造成晶状体混浊引起白内障。

半乳糖血症严重的引起生长停滞,智力迟钝,还往往引起肝脏损伤而致死亡。

治疗措施主要是食用不含半乳糖的饮食。体内合成糖蛋白和糖脂所需的半乳糖,可能在体内由葡萄糖经差向异构酶催化转变成成为半乳糖供给合成的需要。因此机体可不摄入半乳糖。

(三) 甘露糖

甘露糖进入糖酵解途径是经过两步反应转变为果糖-6-磷酸。反应如下:



(1) 甘露糖由己糖激酶催化转变为甘露糖-6-磷酸。

(2) 甘露糖-6-磷酸由磷酸甘露糖异构酶(phosphomannose isomerase)催化转变为果糖-6-磷酸(F6P),其催化机制和磷酸葡萄糖异构酶相似。

提 要

糖酵解过程是生物最古老、最原始获得能量的一种方式。大多数较高等生物虽然进化为利用有氧条件进行生物氧化获取大量的自由能,但仍保留了这种原始的方式。这一过程是生物体共同经历的途径,而且有些生物还利用这一途径在供氧不足时给机体提供能量。

糖酵解作用的定义是:葡萄糖在无氧条件下转变为丙酮酸所经历的一系列反应,在此过程中净生成两个ATP分子。

这一过程是最早阐明的酶促反应过程,也是研究得非常透彻的过程。糖酵解作用机制的研究是最富于启发性的科学工作。

酵解过程产生的丙酮酸在无氧条件下由NADH还原为乳酸。在高等动物肌肉中糖酵解的最终产物为乳酸,这一过程又称为单纯乳酸发酵(homolactic fermentation)。人们将微生物经过无氧条件产生乳酸的过程称为乳酸发酵,将丙酮酸脱羧形成乙醇的过程称为乙醇发酵。单纯乳酸发酵和乙醇发酵除了在最后步骤不同外,所经历的步骤完全相同。

糖酵解过程共有10步反应,可划分为两个阶段,全部在细胞溶胶(胞液)中进行。第一阶段是支付能量的准备阶段,即预先支出阶段,包括5步反应。葡萄糖与2分子ATP反应,通过磷酸化、异构化、第二次磷酸化,形成果糖-1,6-二磷酸。每次磷酸化都需要由ATP提供能量。第二阶段是收入阶段,也包括5步反应。果糖-1,6-二磷酸由醛缩酶裂解为二羟丙酮磷酸和甘油醛-3-磷酸。这两种化合物在丙糖异构酶作用下,很容易互变。在甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用下,甘油醛-3-磷酸被氧化和磷酸化即与 NAD^+ 和 P_i 形成甘油酸-1,3-二磷酸,形成的高能酰基磷酸,具有高的转移势能,在磷酸甘油酸激酶的作用下,生成一分子ATP同时产生一分子3-磷酸甘油酸。随后又在磷酸甘油酸变位酶的催化下,异构化为2-磷酸甘油酸。后者由烯醇化酶脱氢发生磷酸基团变位和脱水,形成磷酸烯醇式丙酮酸。它是第2个高能磷酸基团转移势能的酵解中间物。磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶的作用下,将高能磷酸基团转移给ADP形成另外1分子ATP和丙酮酸。

催化酵解10步反应的酶作用机制都已通过化学、动力学测定并结合X射线结构分析基本得到阐明。酵解酶的催化过程表现出严格的立体专一性,其中两种激酶由底物引起酶分子的构象变化,防止了底物上高能磷酸基团向水分子的转移而且直接转移到ADP分子上。

糖酵解作用能在无氧条件下继续进行,必须有使 NADH 再被氧化为 NAD^+ 的途径。乳酸或乙醇(先脱羧形成乙醛,再由 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 还原成乙醇)的形成解决了 NAD 再生的问题。丙酮酸脱羧形成乙醛由丙酮酸脱羧酶催化。此酶需焦磷酸硫胺素作为辅助因素。催化乙醛还原为乙醇的酶是乙醇脱氢酶。催化丙酮酸形成乳酸的酶是乳酸脱氢酶。

糖酵解过程有三个反应步骤是基本上不可逆的。催化这三步反应的酶是己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶。其中磷酸果糖激酶催化的反应是糖酵解的限速反应。该酶受高浓度 ATP 和柠檬酸的抑制,被 AMP 和果糖-2,6-二磷酸激活。己糖激酶受葡萄糖-6-磷酸抑制,如果磷酸果糖激酶受到抑制,则葡萄糖-6-磷酸积累。丙酮酸激酶受 ATP 和丙氨酸引起的变构抑制,受果糖-1,6-二磷酸激活。当机体能荷或糖酵解的中间物积累时,丙酮酸激酶达到活跃顶峰。丙酮酸激酶的活性受磷酸化的调节。血液中葡萄糖水平降低时,激起肝脏中丙酮酸激酶的磷酸化从而使其活性降低,于是肝脏中葡萄糖的利用下降,因此,丙酮酸激酶对维持血糖浓度的相对稳定起着调节作用。

己糖激酶和丙糖磷酸异构酶对底物引起的诱导式的配合,使催化反应避开了不需要的副反应,这大大提高了酶的催化效率。

丙糖磷酸异构酶的催化效率是最完善的典型,一旦酶分子与底物接触,在碰撞的瞬间反应已经完成,因此,这种酶促反应是由底物分子的扩散速度调节的。

甘油醛-3-磷酸脱氢酶在催化甘油醛-3-磷酸氧化和磷酸化为 1,3-二磷酸甘油酸的过程中,形成一个半缩硫醛中间物,这一硫酯中保存了甘油醛-3-磷酸氧化释放出的部分能量,是一个高能中间物,它接受无机磷酸的攻击而形成具有高能磷酸基团的 1,3-二磷酸甘油酸。砷酸是磷酸的类似物(analog),它使氧化和磷酸化解偶联。

双糖及多糖经消化后形成的单糖主要是葡萄糖,其他的单糖产物还有果糖、半乳糖、甘露糖等。这些单糖都转变为糖酵解的中间物之一而进入糖酵解的共同途径。

习 题

1. 为什么应用蔗糖保存食品而不用葡萄糖?
2. 用 ^{14}C 标记葡萄糖的第一个碳原子,用作糖酵解底物,写出标记碳原子在酵解各个步骤中的位置。
3. 写出从葡萄糖转变为丙酮酸的化学平衡式。
4. 已知 ATP 和葡萄糖-6-磷酸在 pH7 和 25°C 时水解的标准自由能变化 ΔG° 分别为 -7.3 和 -3.183 kcal/mol (1 kcal = 4.184 kJ), 计算己糖激酶催化的葡萄糖和 ATP 反应的 ΔG° 和 K_{eq} 。 ($\Delta G^\circ = -17.44$ kJ/mol = -4.162 kcal/mol, $K_{\text{eq}} = 1.125 \times 10^3$)
5. 由丙酮酸转变为乳酸的标准自由能变化 $\Delta G^\circ = -25.10$ kJ/mol, 计算出由葡萄糖转变为乳酸的标准自由能变化。 ($\Delta G^\circ = -56.48$ kJ/mol)
6. 当葡萄糖的浓度为 5 mmol/L, 乳酸的浓度为 0.05 mmol/L, ATP 和 ADP 的浓度都为 2 mmol/L, 无机磷酸(Pi)的浓度为 1 mmol/L 时, 计算该由葡萄糖转变为乳酸的自由能(ΔG°)变化。 ($\Delta G^\circ = -113.80$ kJ/mol)
7. 参考表 22-2, 计算在标准状况下当 $[\text{ATP}]/[\text{ADP}] = 10$ 时, 磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸的平衡比。 (3.06×10^{-5})
8. 若以 ^{14}C 标记葡萄糖的 C3 作为酵母的底物, 经发酵产生 CO_2 和乙醇, 试问 ^{14}C 将在何处发现?
9. 总结一下在糖酵解过程中磷酸基团参与了哪些反应, 它所参与的反应有何意义?
10. 为什么砷酸是糖酵解作用的毒物? 氟化物和碘乙酸对糖酵解过程有什么作用?
11. 总结一下参与糖酵解作用的酶有些什么特点?
12. 糖酵解过程有哪些金属离子参加反应, 它们起什么作用?
13. 概括除葡萄糖以外的其他单糖如何进入分解代谢的?

主要参考书目

1. 石声汉译. 动态生物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1957
2. 沈同, 王镜岩主编. 生物化学(下册). 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1991

3. 李建武. 生物化学. 北京: 北京大学出版社, 1990
4. Stryer L. Biochemistry 4th ed. W. H. Freeman and Company, 1995
5. Voet D, Voet J G. Biochemistry 2nd ed. John Wiley & Sons, 1995
6. Lehninger A R. Principles of Biochemistry 3rd ed. Worth Publishers, Inc., 1982
7. Lehninger A R. Biochemistry 2nd ed. Worth Publishers, Inc., 1975
8. Nelson, D L, Cox M M. Lehninger principles of Biochemistry, Worth Publishers, 2000
9. Lebioda L, Stec B. Crystal structure of enolase indicates that enolase and pyruvate kinase from a common ancestor. *Nature*, 1988, (333): 683 ~ 686
10. Rose Z B. The enzymology of 2,3 bisphosphoglycerate *Adv. Enzymol*, 1980, (51): 211 ~ 253
11. Bennett W S Jr, Steitz T A. Glucose induced conformational change in yeast hexokinase, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1978, (75): 4848 ~ 4852
12. Fersht J S. *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of chemistry and Biology*. Wiley - Interscience, 1974

(王镜岩)

第 23 章 柠檬酸循环

上一章重点讨论的是在无氧条件下葡萄糖经过分解代谢形成的丙酮酸,或无氧发酵形成乳酸或乙醇。在有氧条件下葡萄糖的分解代谢并不停止在丙酮酸,而是继续进行有氧分解,最后形成 CO_2 和水。它所经历的途径分为两个阶段,分别为柠檬酸循环和氧化磷酸化。氧化磷酸化途径将在下一章讨论。本章着重讨论柠檬酸循环。这一途径之所以称为柠檬酸循环是因为在循环的一系列反应中,关键的化合物是柠檬酸,又因为它有三个羧基,所以又称为三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle),简称 TCA 循环。为了纪念德国科学家 Hans Krebs 在阐明柠檬酸循环所做出的突出贡献,这一循环又称为 Krebs 循环。柠檬酸循环途径的发现是生物化学领域的一项重大成就。1953 年该项成就获得了诺贝尔奖。这项成就是生物化学宝库的一项经典。它所以如此可贵,还因为这一重大发现是在当时完全没有现代化的实验方法,例如,同位素示踪法等条件下所取得的成果。

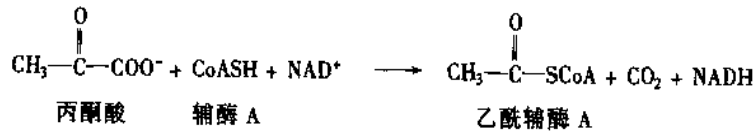
柠檬酸循环是在细胞的线粒体中进行的。丙酮酸通过柠檬酸循环进行脱羧和脱氢反应;羧基形成 CO_2 ,氢原子则随着载体(NAD^+ 、 FAD)进入电子传递链经过氧化磷酸化作用,形成水分子并将释放出的能量合成 ATP。

柠檬酸循环不只是丙酮酸氧化所经历的途径,也是脂肪酸、氨基酸等各种燃料分子氧化分解所经历的共同途径。此外柠檬酸循环的中间体还可作为许多生物合成的前体。也可以说柠檬酸循环是两用代谢途径(amphibolic pathway)。

丙酮酸进入柠檬酸循环之前需先转变为乙酰辅酶 A(acetyl-coenzymeA),或简称为乙酰-CoA(acetyl-CoA)。乙酰-CoA 也是许多物质例如脂肪酸降解的中间产物。下面先讨论丙酮酸进入柠檬酸循环的准备阶段,即由丙酮酸先转变为乙酰-CoA 的过程。

一、丙酮酸进入柠檬酸循环的准备阶段——形成乙酰-CoA

从丙酮酸转变为乙酰-CoA 可概括为 4 步反应。催化这些反应的酶是包括丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase)在内的多酶复合体(multienzyme complex),由 3 种酶高度组合在一起形成的,统称为丙酮酸脱氢酶复合体或丙酮酸脱氢酶系(pyruvate dehydrogenase complex),有时也笼统地称为丙酮酸脱氢酶,这一名称不够确切。丙酮酸转变为乙酰 CoA 的总反应式可表示如下:



实际上这一反应过程是非常复杂的。从上面的总反应式只能看到辅酶 A(CoA-SH)和 NAD^+ 两种辅助因子,在反应过程中参加反应的还有其他的辅助因子,即硫胺素焦磷酸(thiamine pyrophosphate, TPP)、硫辛酰胺(lipoamide)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)等。

参与反应的 3 种酶也就是上述的丙酮酸脱氢酶复合体中的三种酶,分别称为:丙酮酸脱氢酶组分(pyruvate dehydrogenase component)、二氢硫辛酰转乙酰基酶(dihydrolipoyl transacetylase)、二氢硫辛酸脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase),这三种酶在结构上形成一个有秩序的整体。这种有秩序的相互结合,使丙酮酸脱氢酶催化形成乙酰-CoA 的复杂反应得以相互协调依次有序地进行。而且可以避免产生不必要的副反应。从大肠杆菌分离出来的丙酮酸脱氢酶复合体所包括的内容总结如表 23-1 所示:

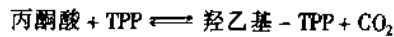
表 23-1 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合体的内容

	缩写	肽链数	辅基	催化反应
1. 丙酮酸脱氢酶组分	E ₁	24	TPP	丙酮酸氧化脱羧
2. 二氢硫辛酰转乙酰基酶	E ₂	24	硫辛酰胺	将乙酰基转移到 CoA
3. 二氢硫辛酸脱氢酶	E ₃	12	FAD	将还原型硫辛酰胺转变为氧化型

(一) 催化丙酮酸转变为乙酰 - CoA 的反应步骤

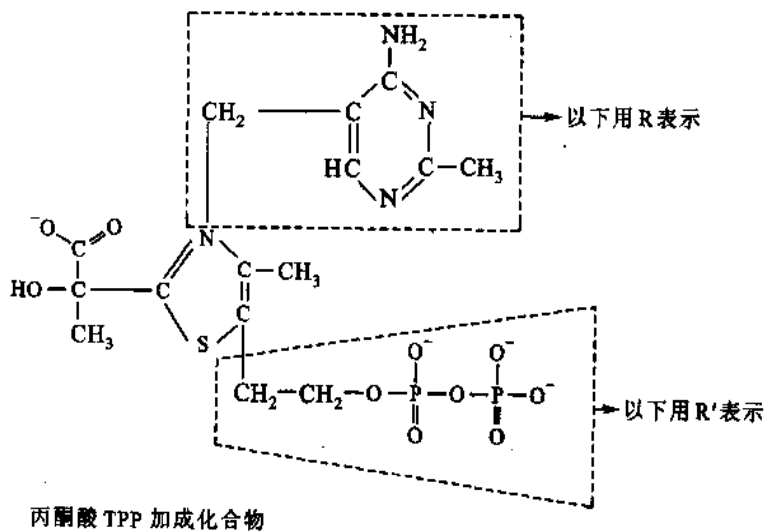
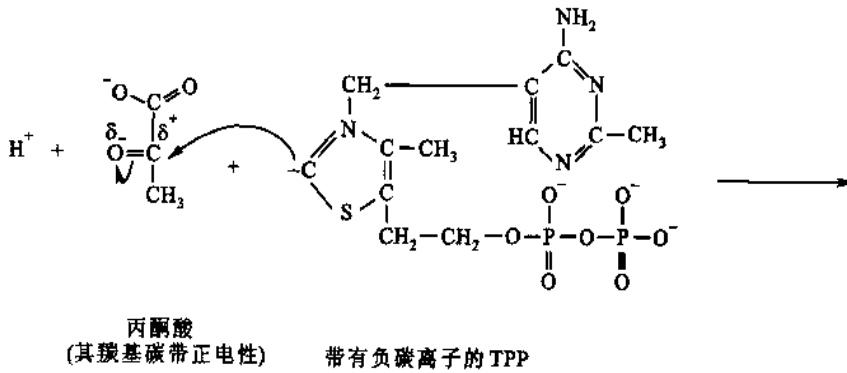
1. 丙酮酸脱羧反应

这是第 1 步反应,由丙酮酸脱氢酶复合体中的丙酮酸脱氢酶组分(E₁)催化。该酶以 TPP 为辅基。它催化的反应可用下式表示:



丙酮酸脱氢酶组分的催化反应又可划分为两个步骤:

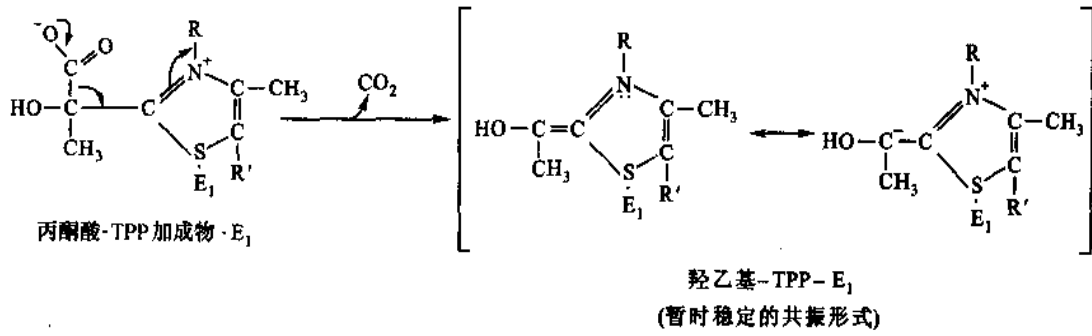
(1) 发生在 TPP 辅基的催化反应



上式反应起源于丙酮酸脱氢酶组分的辅基 TPP 分子的噻唑环。该环中夹在氮原子和硫原子之间的碳原子有很强的酸性,极易解离而形成负碳离子。负碳离子向丙酮酸的羰基进攻,结果形成丙酮酸与 TPP 的加成化合物。

紧接着丙酮酸 - TPP 加成物脱羧,形成羟乙基硫胺素焦磷酸(hydroxyethyl - TPP),这一反应所以能进行,是 TPP 环上带正电荷的氮原子起到电子“陷阱”的作用,使脱羧后形成的羟乙基上产生较稳定的负碳离

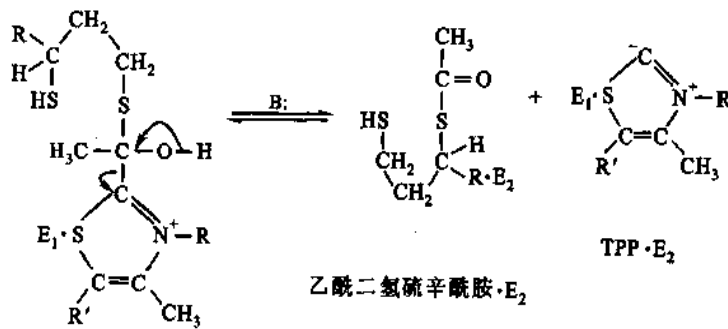
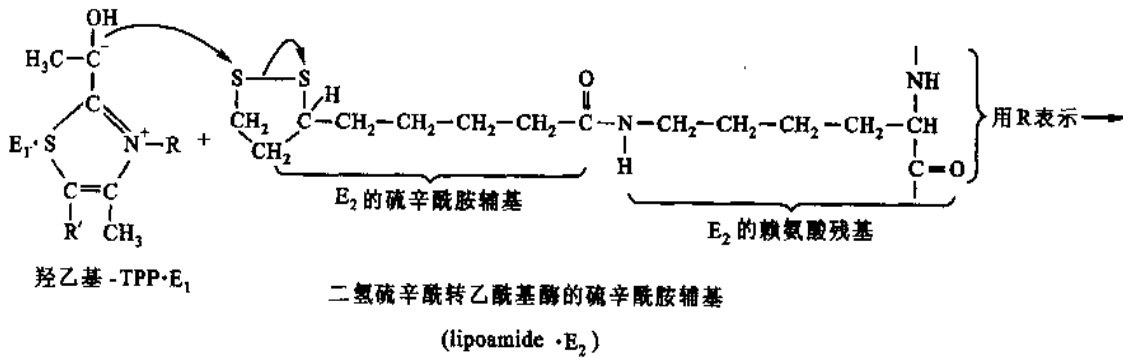
子。反应如下：



由丙酮酸脱氢酶组分催化的脱羧反应和酵母菌丙酮酸脱氢酶催化的脱羧机制是一样的。与酵母不同之处是，它催化形成的羟乙基-TPP中间物不转变为乙醛和TPP，而是将它转给下一个酶，即二氢硫辛酰转乙酰基酶(E₂)。

(2) 羟乙基氧化形成乙酰基

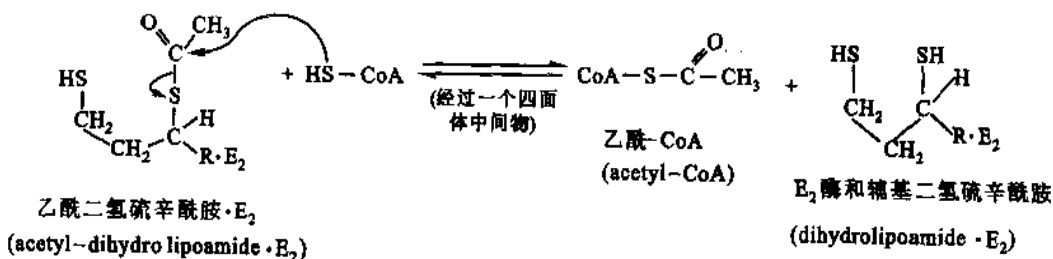
如上所述，丙酮酸-TPP加成物脱羧后形成羟乙基-TPP，羟乙基氧化转变为乙酰基同时转移到E₂的辅基硫辛酰胺(lipoamide)上。这是为下一步的反应作好准备。E₂催化羟乙基氧化和转移的反应如下：



丙酮酸脱氢酶组分(TPP · E₁)完成了乙酰基的转移后即恢复原状，又可接受另一丙酮酸分子。

2. 乙酰基转移到 CoA 分子上形成乙酰-CoA

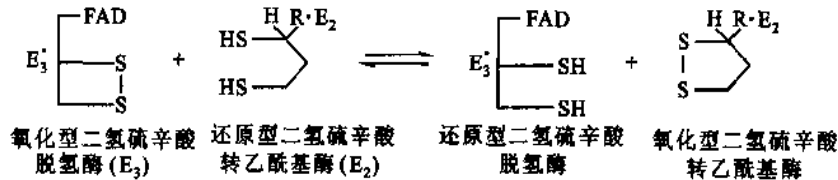
在二氢硫辛酰转乙酰基酶分子上结合着的乙酰基，由该酶催化，将乙酰基转移到 CoA-SH 分子上，形成游离的乙酰-CoA 分子，从而使二氢硫辛酰转乙酰基酶成为还原型的二氢硫辛酰转乙酰基酶。



上述反应是一个酯基转移反应 (transterification)。在此反应中,辅酶 A 的硫氢基进攻 E_2 - 乙酰二氢硫辛酰胺上的乙酰基,先形成一个四面体的中间物,接着迅速分解为乙酰 - CoA 和 E_2 - 二氢硫辛酰胺,经上述反应形成的游离状态的乙酰 - CoA 分子保留了高能的硫酯键,换言之,即形成了一个高能硫酯键。

3. 还原型二氢硫辛酰胺转乙酰基酶氧化,形成氧化型的(二氢)硫辛酰胺转乙酰基酶

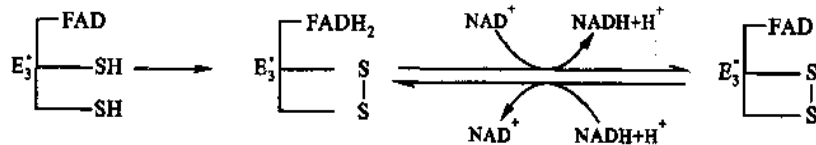
这一步反应是使氧化型硫辛酰胺再生的反应。在此反应中,氧化型的 NAD^+ 起着氧化剂的作用,催化此反应的酶称为二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoyl dehydrogenase),简称 E_3 ,又称为二氢硫辛酰胺脱氢酶 (dihydrolipoamide dehydrogenase),该酶的辅基是 FAD。二氢硫辛酰胺脱氢酶使二氢硫辛酰胺再氧化,从而使其完成了它的全部反应过程。这一催化过程可用下列反应图解表示。



氧化型的 E_3 有一个活泼的 -S-S- (disulfide group, 二硫键) 和一个与酶分子本体紧密结合的 FAD。二氢硫辛酰胺的氧化实际是在 E_2 和 E_3 二硫键之间形成的互换反应。二氢硫辛酰胺 (E_2) 之二硫键形成的同时, E_3 的二硫键还原为两个 -SH 基团。

4. 还原型的 E_3 再氧化

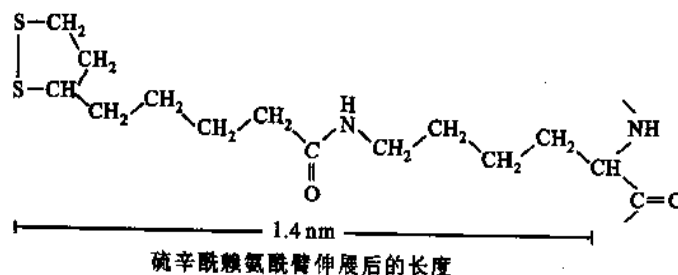
还原型 E_3 二硫键的再氧化先由该酶结合着的辅基 FAD 接受 -SH 基的氢原子,形成 $FADH_2$,接着又将氢原子转移给 NAD^+ ,于是恢复其氧化型,反应如下所示:



(二) 对丙酮酸脱氢酶复合体结构和装配的深入探讨

对丙酮酸脱氢酶复合体的结构和装配情况进行深入研究并提供数据的科学家,应特别提到 Lester Reed。他详细地研究了大肠杆菌中的丙酮酸脱氢酶复合体,证明其相对分子量为 50 000 000,由 60 条球形多肽链组成。在电子显微镜下可观察到,它是多面体结构,直径约 30 nm。这种复合体甚至比核糖体还大。 E_2 由 24 条多肽链构成,它是多面体的核心。 E_1 也是由 24 条多肽链构成,它和由 12 条多肽链构成的 E_3 结合在二氢硫辛酰胺转乙酰基酶的外面。

1992 年在《科学》杂志上报道了用 X 射线研究 E_2 的立体结构,表明该酶由 8 个三聚体 (trimer) 结合在一起构成一个中空的立方体。这个立方体内部的空穴以深沟与外界相通。这些深沟跨过立方体的表面。 E_1 、 E_2 、 E_3 三种酶的活性部位在这个酶复合体上相互距离甚远,大约有 4 nm (= 40Å)。 E_2 有一个由赖氨酸残基与硫辛酰胺二硫键相连的长臂,即所谓硫辛酰胺赖氨酰臂 (lipoyl lysyl arm)。这个长臂伸长后可达 1.4 nm,它具有极大的转动灵活性,可将丙酮酸脱氢酶复合体所催化的底物在转变过程中,从一个酶转送到另一个酶,在转动时,呈现三种状态:其静电荷依次为“0”、“-1”、“-2”。这三种静电荷的变化可为此长臂在酶体系中的转动提供推动力,使硫辛酰胺基能够定向地运转。



(三) 丙酮酸脱氢酶复合体催化反应的简单图解

上述丙酮酸脱羧形成乙酰 - CoA 的复杂过程可用简单的图解表示(图 23 - 1)。

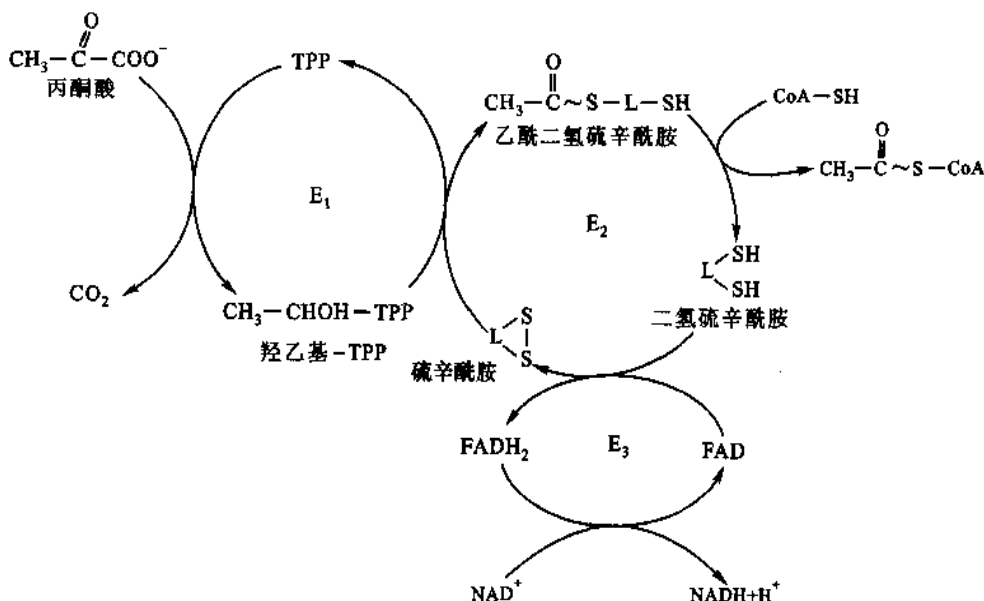
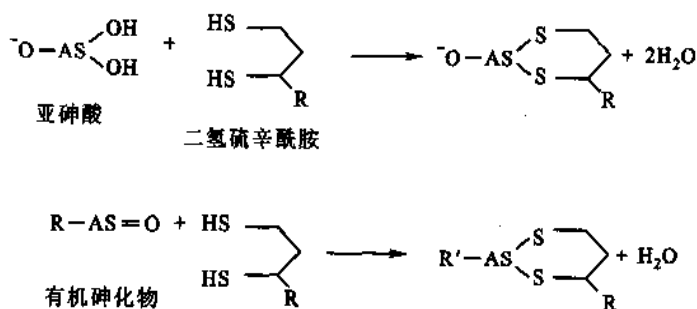


图 23 - 1 丙酮酸脱氢酶复合体催化反应图解

(四) 砷化物对硫辛酰胺的毒害作用

在糖酵解作用一章中,我们探讨了砷酸盐在甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶所催化的反应中代替磷酸盐攻击硫酯中间产物的高能键形成迅速自发水解的酰基磷酸酯(1 - 砷酸 - 3 - 磷酸甘油酸),而使氧化作用解偶联的机制。砷化物对机体的毒害不仅限于对糖酵解的抑制作用,亚砷酸盐(arsenite)及有机砷化物(organic arsenicals)是自古即为人知的剧毒物。它们的代表作用机制之一是与丙酮酸脱氢酶复合体中的 E_2 辅基硫辛酰胺的巯基发生共价结合,使还原型硫辛酰胺形成失去催化能力的砷化物。其反应机制可用下式表示:



这类砷化物抑制丙酮酸脱氢酶复合体的机制同样表现在对 α - 酮戊二酸脱氢酶 (α - ketoglutarate dehydrogenase complex) 的抑制作用。因构成 α - 酮戊二酸脱氢酶复合体的三种酶也含有二氢硫辛酰胺辅基。该复合体的组成在下面还将讨论。

微生物中许多酶对有机砷化物的毒害比人类更敏感,20 世纪初曾将砷化物作为抗生药物用于治疗锥虫病。这是一种原生动植物寄生于人体的疾患。临床症状是贫血、发烧并出现红斑。砷化物还用于治疗梅毒等症。含砷药物对病人有严重的副作用,如引发湿疹、头晕、头痛、关节炎、痛风、心悸及恶心等症状。

(五) 丙酮酸脱氢酶复合体的调控

丙酮酸脱氢酶复合体在丙酮酸转变为乙酰 - CoA 过程中起着重要催化作用。这一途径也是哺乳动物

使丙酮酸转变为乙酰 - CoA 的唯一途径。乙酰 - CoA 既是柠檬酸循环的入口物质,又是合成脂类例如胆固醇的起始物质(参看第 29 章中胆固醇的生物合成)。这就意味着丙酮酸既可走向继续分解提供能量的途径,又可走向生物合成途径。关键在于对丙酮酸脱氢酶复合体的活性的调控。事实上它正是接受着严格的调控,可概括为两个主要方面,分述如下:

1. 产物控制

即由 NADH 和乙酰 - CoA 控制。这两种产物表现的抑制作用是和酶的作用底物即 NAD^+ 和 CoA 竞争酶的活性部位,是竞争性抑制。乙酰 - CoA 抑制 E_2 , NADH 抑制 E_3 。如果 $[\text{NADH}]/[\text{NAD}^+]$ 和 $[\text{乙酰 - CoA}]/[\text{CoA}]$ 的比值高, E_2 则处于与乙酰基结合的形式,这时不可能接受在 E_1 酶上与 TPP 结合着的羟乙基基团,使 E_1 酶上的 TPP 停留在与羟乙基结合的状态,从而抑制了丙酮酸脱羧作用的进行。

2. 磷酸化和去磷酸化的调控

E_1 的磷酸化和去磷酸化是使丙酮酸脱氢酶复合体失活和激活的重要方式。在处于丙酮酸脱氢酶复合体核心位置的 E_2 分子上结合着两种特殊的酶,一种称为激酶,另一种称为磷酸酶。激酶使丙酮酸脱氢酶组分磷酸化,磷酸酶则是脱去丙酮酸脱氢酶的磷酸基团从而使丙酮酸脱氢酶复合体活化。 Ca^{2+} 通过激活磷酸酶的作用,也使丙酮酸脱氢酶活化。总之,丙酮酸脱氢酶的活化或抑制根据细胞能荷的高低和生物合成对相应中间物的需要,受到多种因素灵活地调控。

二、柠檬酸循环概貌

在深入探讨柠檬酸循环的各个反应步骤及其有关的酶之前,先记住循环的概貌对下一步的学习是非常有帮助的。通过图 23-2 可以从含碳化合物碳原子的数目着眼,极概括地了解柠檬酸循环中碳原子的数目变化过程。

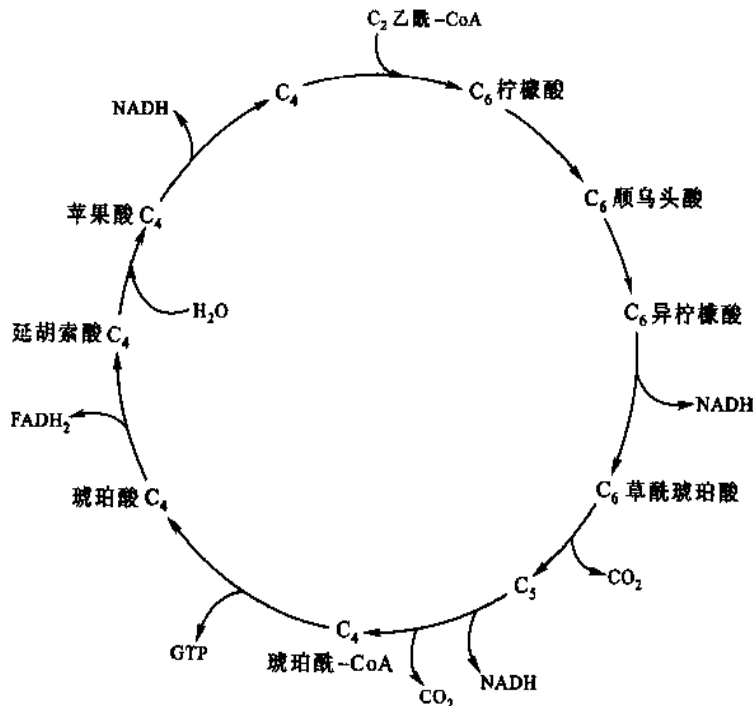
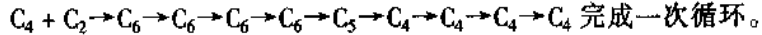


图 23-2 柠檬酸循环碳原子数目的变化概貌

柠檬酸循环的起始步骤可看作是由 4 个碳原子的化合物(草酰乙酸)与循环外的两个碳原子的化合物(乙酰 - CoA)形成 6 个碳原子的柠檬酸。柠檬酸经过三步异构化成为异柠檬酸,然后进行氧化(形成 6 个碳原子的草酰琥珀酸),再脱羧失去一个碳原子形成 5 个碳原子的二羧酸化合物(α - 酮戊二酸)。5 碳化合物又氧化脱羧形成 4 碳二羧酸化合物(琥珀酸)。4 碳化合物经过三次转化,其间形成一个高能磷酸键

(GTP)、使 FAD^+ 、 NAD^+ 分别还原为 FADH_2 和 NADH ，最后又形成 4 个碳原子的草酰乙酸。

总括起来即：



下面用柠檬酸循环中的化合物结构式表明柠檬酸循环的全过程，如图 23-3 所示：

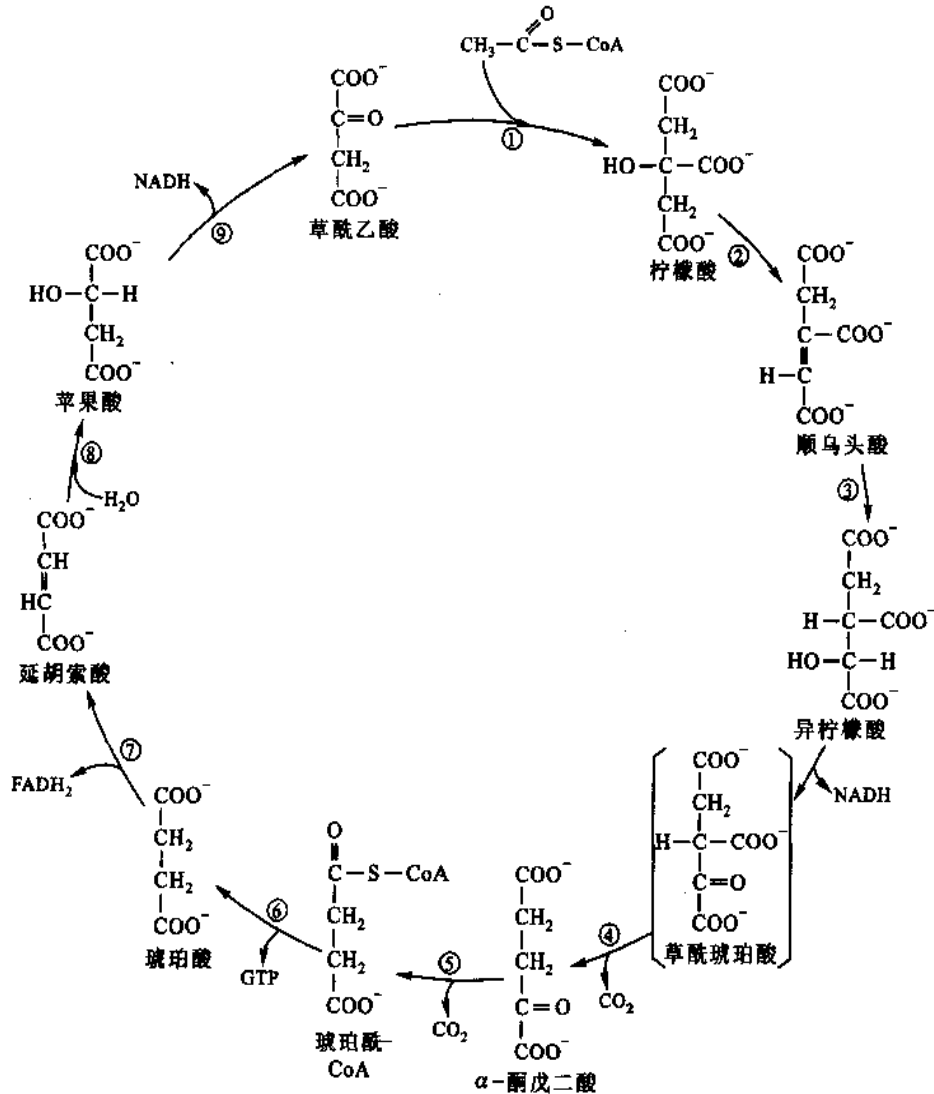


图 23-3 柠檬酸循环

柠檬酸循环中的每一步反应都是由酶催化的。按图中所示的顺序数由下列的酶进行催化：①柠檬酸合酶(citrate synthase)、②乌头酸酶(aconitase)、③乌头酸酶、④异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase)、⑤α-酮戊二酸脱氢酶复合体(α-ketoglutarate dehydrogenase complex)、⑥琥珀酰-CoA合成酶(succinyl-CoA Synthetase)、⑦琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase)、⑧延胡索酸酶(fumarase)、⑨苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)。

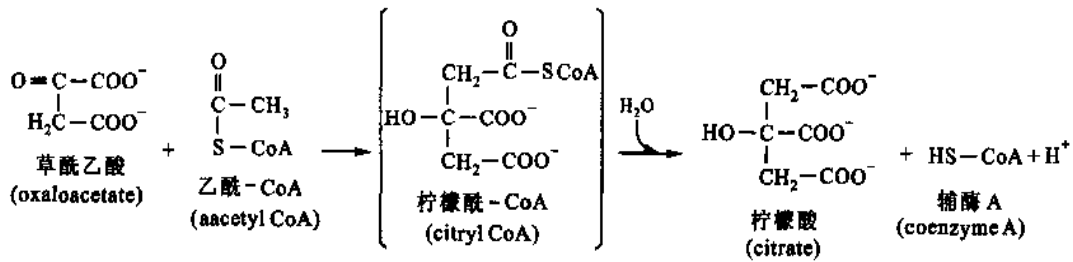
三、柠檬酸循环的反应机制

柠檬酸循环的反应共包括 8 个步骤：

(一) 草酰乙酸(oxaloacetate)与乙酰-CoA 缩合(condense)形成柠檬酸

可以把这一步反应看作是柠檬酸循环的起始步骤。通过这一反应，含有两个碳原子的化合物以

乙酰 - CoA形式进入柠檬酸循环。以硫酯形式进入的 2 碳化合物——乙酸,含有足够的能量,使它能顺利地加合到草酰乙酸的羰基上。反应式如下所示:



催化上面反应的酶称为柠檬酸合酶(citrate synthase)。起初称为柠檬酸缩合酶(citrate condensing enzyme)。在催化过程中,草酰乙酸先于乙酰 - CoA 与酶结合。此酶是由两个亚基构成的二聚体。由每个亚基的两个结构域构成一个深的裂缝。其中含有一个草酰乙酸结合位点。当酶与草酰乙酸结合后,其较小的那个结构域随即发生 18°的转向(相对于较大的结构域),造成酶分子的裂缝合拢,同时又暴露出与乙酰 - CoA 的结合部位。乙酰 - CoA 结合部位在酶分子裂缝合拢后才暴露出来的事实,说明乙酰 - CoA 的催化反应是有序地动态催化反应。由草酰乙酸与酶结合后而诱导出的构象变化,产生了乙酰 - CoA 的结合部位并且杜绝了溶剂对草酰乙酸的干扰。这是一个典型的由于底物与酶结合而诱导产生的“诱导契合”(induced-fit)模型。己糖激酶和底物结合后的诱导效应也是诱导契合机制。

柠檬酸合酶催化的反应属于醛醇 - 克莱森酯(aldol-claisen ester)缩合反应(请参看第 19 章有关克莱森酯缩合反应),它的反应可划分为 3 步,请参照图 23 - 4。

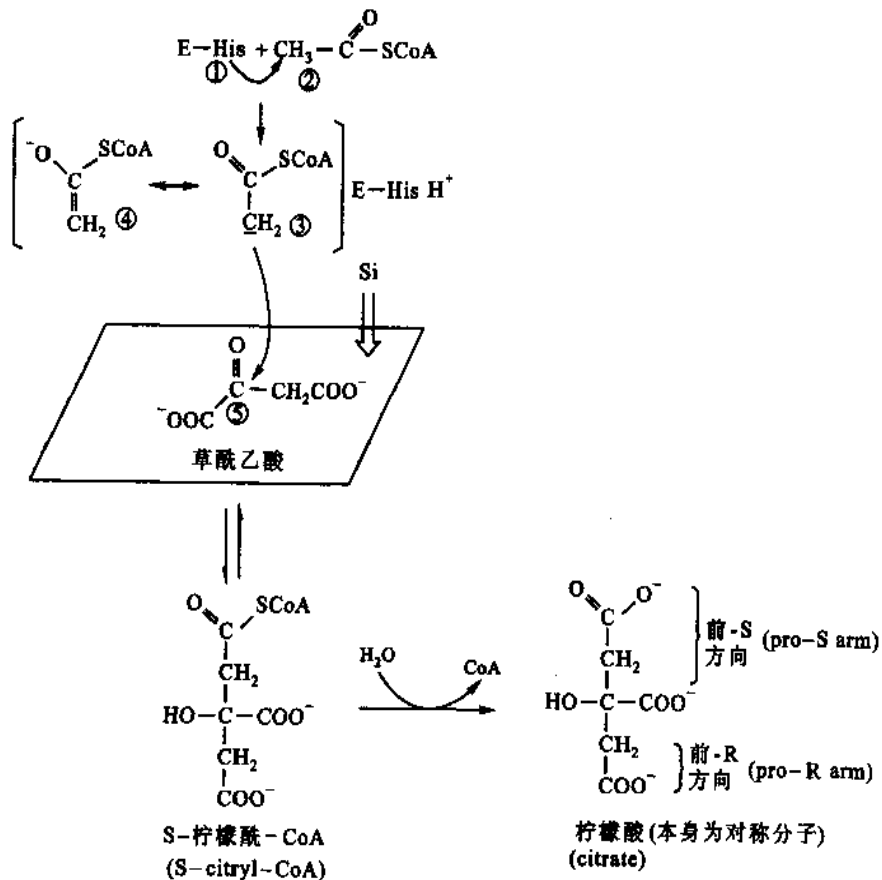


图 23 - 4 柠檬酸合酶催化的缩合反应

第一步:柠檬酸合酶的组氨酸(His)残基①作为碱基与乙酰 - CoA 的甲基②作用,使它的甲基失去一个氢离子而形成负碳离子。此负碳离子由于与 CoA 相接的硫酯的存在,可发生烯醇化作用[③→④],③

和④之间的共振使负碳离子中间体得以稳定。

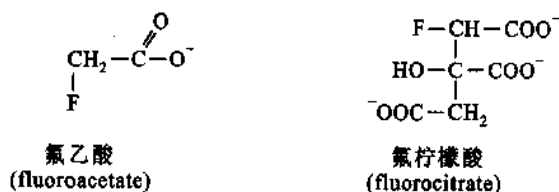
第二步:乙酰 - CoA 负碳离子向草酰乙酸的羰基进行亲核攻击,形成柠檬酰 - CoA (citryl - CoA) 该化合物仍连接在酶分子上。

第三步:柠檬酰 - CoA 水解为柠檬酸和 CoA。柠檬酰 - CoA 水解的标准自由能变化 ΔG° 为 -31.5 kJ/mol 。它保证了反应向水解的方向进行。

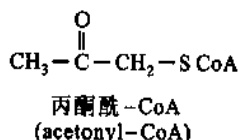
在第 19 章已经讨论过酶催化的醇醛克莱森缩合反应的特点(例如柠檬酸合酶),反应具有严格的立体专一性。与柠檬酸合酶结合着的乙酰 - CoA 上的负碳离子向草酰乙酸羰基的进攻,严格地限制在 Si 面进行。这样进攻产生的必然是 S - 柠檬酰 - CoA。S 和 R 是有关“手性”的命名。

前面已经提到,形成的柠檬酰 - CoA 仍结合在酶分子上。柠檬酰 - CoA 的形成使酶分子进一步发生构象变化,在酶的活性部位暴露出天冬氨酸残基,这个残基与水分子结合,有利于硫酯键的水解。柠檬酰 - CoA 水解释放出的自由能($\Delta G^{\circ} = -30 \text{ kJ/mol}$)是促使柠檬酰 - CoA 水解的推动力,其结果产生游离的 CoA 和柠檬酸,酶分子又恢复其开放型的构象。

柠檬酸合酶属于调控酶。它的活性受 ATP、NADH、琥珀酰 - CoA、酯酰 - CoA 等的抑制。它是柠檬酸循环中的限速酶。由氟乙酸形成的氟乙酰 - CoA 可被柠檬酸合酶催化与草酰乙酸缩合生成氟柠檬酸。它取代柠檬酸结合到顺 - 乌头酸酶 (cis-aconitase) 的活性部位上,从而抑制柠檬酸循环的下一步反应。因此由氟乙酰 - CoA 形成氟柠檬酸的反应称为致死性合成反应。这一特性可用于制造杀虫剂或灭鼠药。各种有毒植物的叶子大都含有氟乙酸,可作为天然杀虫剂使用。氟乙酸和氟柠檬酸的结构式如下:



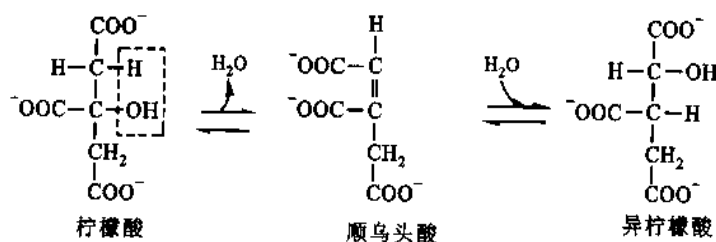
另一种柠檬酸合酶的抑制剂是丙酮酰 - CoA (acetyl - CoA), 它的结构式如下:



它是乙酰 - CoA 的类似物,可对乙酰 - CoA 的反应产生抑制效应,因可代替乙酰 - CoA 与柠檬酸合酶结合。用这种方法测出了乙酰 - CoA 在柠檬酸合酶上的结合部位。

(二) 柠檬酸异构化形成异柠檬酸

柠檬酸异构化形成异柠檬酸是适应柠檬酸进一步氧化的需要。因为柠檬酸是一个叔醇化合物,它的羟基所处的位置妨碍着柠檬酸进一步氧化。异柠檬酸是可以氧化的仲醇。柠檬酸通过失水形成顺 - 乌头酸,然后再加水到顺 - 乌头酸这一不饱和的中间物上,把羟基从原来的位置转移到相邻的碳原子上从而形成异柠檬酸。反应式如下:



上述反应在 pH7.0 和 25℃ 的平衡状态时,柠檬酸、顺 - 乌头酸、异柠檬酸浓度的比例依次为 90:4:6。

由于异柠檬酸在下一步反应中极迅速地被氧化,从而推动此反应向异柠檬酸的方向进行。

催化柠檬酸转变为异柠檬酸的酶,称为乌头酸酶(aconitase)。因该酶在催化过程中形成顺-乌头酸中间产物而得名。乌头酸酶催化柠檬酸和异柠檬酸互变的双向反应。柠檬酸有一个对称平面因此没有旋光性,但它具有前手性。乌头酸酶能识别柠檬酸的前-R(Pro-R)和前-S(Pro-S)两种取向不同的羧甲基,即顺时针和逆时针取向不同的两个基团。乌头酸酶含有由共价键结合的4个铁原子(Fe^{2+})。这4个铁原子和4个无机硫化物、4个半胱氨酸(Cys)的硫原子一起结合成团,称为Fe-S聚簇。如图23-5所示。

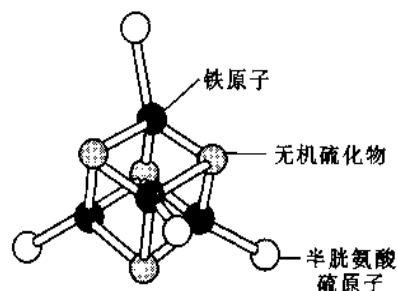


图23-5 乌头酸酶分子内的铁-硫团与4Fe-4S形成方形的4个铁原子每个都(深黑色)结合着3个无机硫化物(浅灰色)和一个半胱氨酸硫原子(白色)

乌头酸酶的这个Fe-S聚簇与柠檬酸结合,并参与底物的脱水和再水合作用。与Fe-S聚簇结合着的蛋白质称为铁-硫蛋白(iron-sulfur proteins),或称为非血红素铁蛋白(nonheme iron proteins)。

乌头酸酶催化的顺-乌头酸双键加水的反应可在两个方向进行。一个方向导致形成柠檬酸,另一个方向导致形成异柠檬酸。顺-乌头酸在一般情况下是与酶结合的中间物,它极缓慢地与酶脱离。用氚(3H)标记底物的实验证明,H-和-OH总是加在顺-乌头酸双键的正、反两个方向,如图23-6所示:

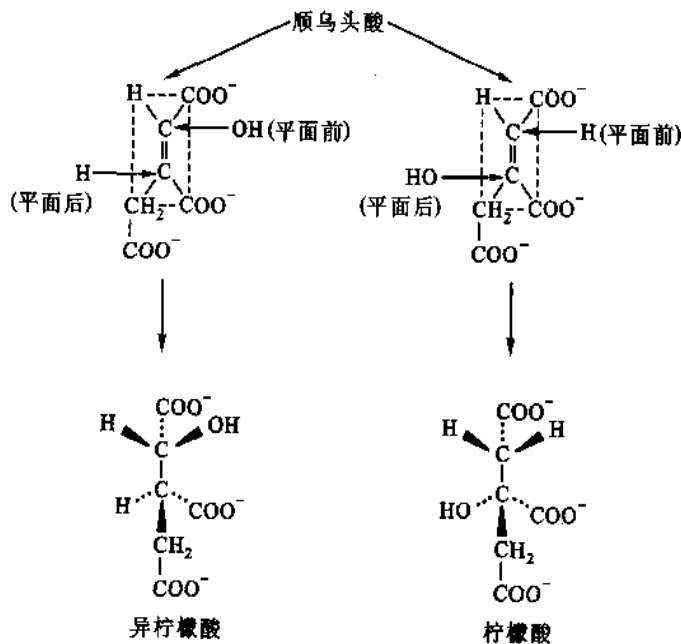
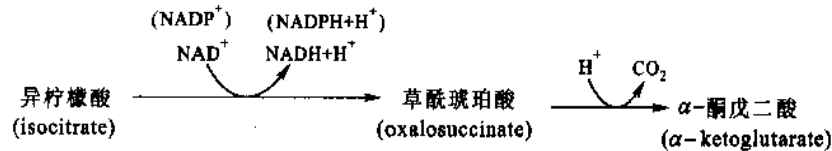


图23-6 水分子加入到顺-乌头酸分子上的方式

水分子加入到顺乌头酸分子的双键上具有严格的立体专一性,顺乌头酸分子的6个中心原子构成一个平面,水分子的-H和-OH以两种不同的方式加到所形成平面的前面和后面

(三) 异柠檬酸氧化形成 α -酮戊二酸

在柠檬酸循环中包括4个氧化-还原步骤。异柠檬酸氧化脱羧是一个氧化-还原步骤,也是柠檬酸循环中两次氧化脱羧反应中的第一个反应。氧化的中间产物是一个不稳定的酮酸,即草酰琥珀酸(oxalosuccinate)。催化这一氧化脱羧的酶称为异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase)。异柠檬酸的氧化脱羧反应可用下式表示:



上述反应的标准自由能变化 $\Delta G^0 = -20.92 \text{ kJ/mol} (-5.0 \text{ kcal/mol})$, 表明该反应有利于向氧化的方向进行。

异柠檬酸脱氢酶在高等动植物以及大多数微生物中实际发现有两种, 一种以 NAD^+ 为辅酶, 另一种以 NADP^+ 为辅酶。前者只存在于线粒体中, 后者在细胞溶胶中也发现。以 NAD^+ 为辅酶的异柠檬酸脱氢酶需要有 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 激活。这种酶只存在于线粒体中, 另一种类型的酶既存在于线粒体中也存在于细胞溶胶中。异柠檬酸脱氢酶催化的氧化脱羧可能的机制如图 23-7 所示。

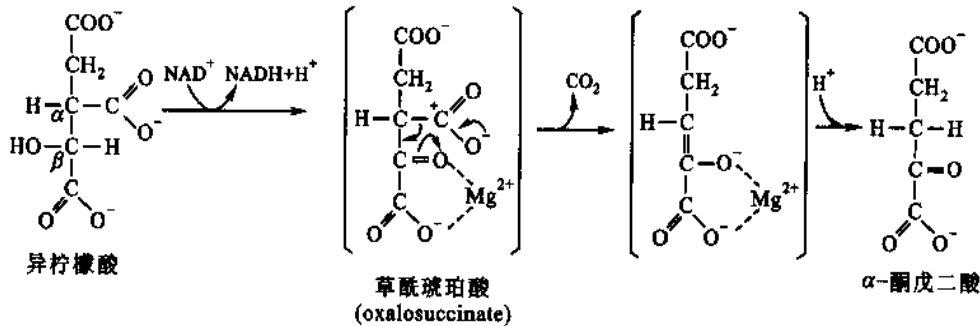


图 23-7 异柠檬酸脱氢酶催化的氧化脱羧过程

异柠檬酸为 β -羟酸, 辅助因子 NAD^+ 作为受氢体使 β -羟酸氧化为 β -酮酸即草酰琥珀酸。位于异柠檬酸 β -碳原子上的羟基转变为酮基。酮基的形成促使了邻近 $\text{C}-\text{C}$ 键的断裂, 即有利于脱羧作用的进行。在括弧内的化合物表示未与酶脱离的反应中间物。

异柠檬酸脱氢酶催化的反应, 在生物化学酶促反应中具有代表性。由 β -羟酸氧化为 β -酮酸, 从而引起脱羧反应, 也就是促进了相邻 $\text{C}-\text{C}$ 键的断裂, 称为 β -裂解。这种 β -裂解是生物化学中最常见的一种 $\text{C}-\text{C}$ 键的断裂方式。

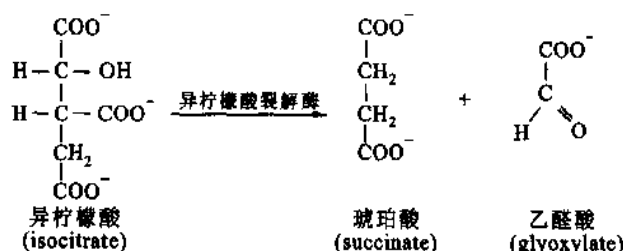
异柠檬酸脱氢酶催化的氧化脱羧反应还具有重要的生物学意义。可以说通过这一步反应, 使生物体解决了具有两个碳原子的乙酰基氧化和降解的问题。在该酶所催化的氧化脱羧反应中, 其所催化断裂的 $\text{C}-\text{C}$ 键, 正是柠檬酸循环第一步反应中, 进入循环的乙酰基中, 连接乙酰基的两个碳原子之间的键。在乙

酰基的两个碳原子之间是共价键 ($\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$)。这个共价键不可能通过一般任何一种断裂方式打开。在二碳分子中间也不可能发生上述的 β -裂解。但是乙酰基一旦与草酰乙酸缩合, 就形成对 β -裂解敏感的产物。因此这种缩合就成为乙酰基 $\text{C}-\text{C}$ 键 β -裂解的必要条件。

异柠檬酸脱氢酶是一个变构调节酶。它的活性受 ADP 变构激活。 ADP 可增强酶与底物的亲和力。该酶与异柠檬酸、 Mg^{2+} 、 NAD^+ 、 ADP 的结合有相互协同作用。与 NAD^+ 、 ADP 的作用相反, NADH 、 ATP 对该酶起变构抑制作用。在能荷低的情况下 (能荷 = $[\text{ATP} + 1/2[\text{ADP}]/[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]]$), NAD^+ 的含量升高, 不仅有利于柠檬酸脱氢酶, 对其他需要以 NAD^+ 为辅助因子的酶促反应也有推动作用。异柠檬酸脱氢酶所具有的这些性质, 使它在柠檬酸循环中起到调节酶的作用。

细菌中的异柠檬酸脱氢酶受磷酸化的抑制。在酶活性部位的丝氨酸 (Ser113, 即处于多肽链的第 113 位) 若被磷酸化, 就直接抑制了酶与异柠檬酸底物的结合。使异柠檬酸脱氢酶磷酸化的酶, 称为异柠檬酸脱氢酶激酶 (isocitrate dehydrogenase kinase), 使磷酸化了的异柠檬酸脱氢酶脱去磷酸的酶, 称为异柠檬酸脱氢酶磷酸酶 (isocitrate dehydrogenase phosphatase)。这两种不同作用的酶处于同一条肽链上。

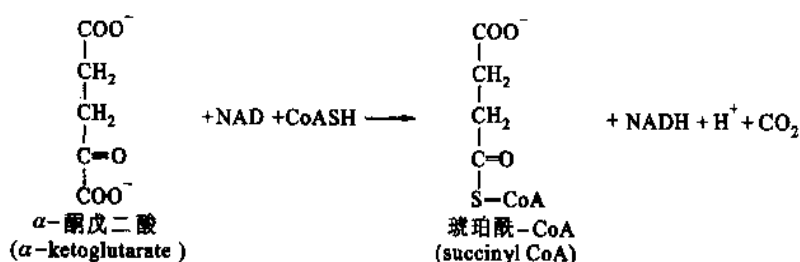
实际上在许多植物和有些细菌体内, 异柠檬酸的转变有两条途径。当需要能量时, 即进行氧化脱羧形成 α -酮戊二酸。当能量贮备充裕时, 异柠檬酸裂解为琥珀酸和乙醛酸 (glyoxylate), 催化此反应的酶, 称为异柠檬酸裂解酶 (isocitrate lyase), 催化机制如下:



关于乙醛酸的代谢下面还将进一步讨论。

(四) α -酮戊二酸氧化脱羧形成琥珀酰 - CoA

这是柠檬酸循环两次氧化脱羧作用中的第二次脱羧。该反应需要 NAD^+ 和 CoA 作为辅助因子。反应式如下：



上述反应是不可逆的。其标准自由能变化 $\Delta G^{\circ} = -33.47 \text{ kJ/mol} (-8.0 \text{ kcal/mol})$ 。

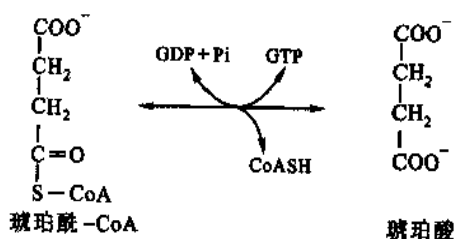
α -酮戊二酸氧化释放出的能量有三方面的作用：①驱使 NAD^+ 还原，②促使反应向氧化方向进行并大量放能，③相当的能量以琥珀酰 CoA 的高能硫酯键形式保存起来。

催化上述反应的酶称为 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -ketoglutarate dehydrogenase)。该酶和丙酮酸脱氢酶复合体极其相似，也是一个多酶复合体，由 α -酮戊二酸脱氢酶 (E_1)、二氢硫辛酰转琥珀酰酶 [dihydrolipoyl transsuccinylase (E_2)]、二氢硫辛酰脱氢酶 (E_3) 组成。这里的二氢硫辛酰脱氢酶实际上和丙酮酸脱氢酶复合体中的二氢硫辛酰脱氢酶是相同的。由于 α -酮戊二酸脱氢酶是一复合体，又称为 α -酮戊二酸脱氢酶系，也简称 α -酮戊二酸脱氢酶。

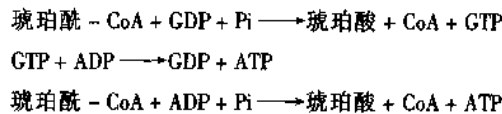
α -酮戊二酸脱氢酶系催化的每步反应机制也和丙酮酸脱氢酶复合体相一致，也需要 TPP、硫辛酸、CoA、FAD、 NAD^+ 、 Mg^{2+} 6 种辅助因子。这里不再赘述。酶催化的产物琥珀酰 - CoA 也是高能硫酯化物。该酶是一个变构调节酶。它受调控的很多方面也和丙酮酸脱氢酶复合体非常相似。 α -酮戊二酸脱氢酶受其产物琥珀酰 - CoA 和 NADH 的抑制，也同样受高能荷的抑制，因此当细胞的 ATP 充裕时，柠檬酸循环进行的速度就减慢。和丙酮酸脱氢酶复合体中不同之处是：丙酮酸脱氢酶复合体中的 E_1 受磷酸化和去磷酸化共价修饰的调节。磷酸化使丙酮酸脱氢酶 (E_1) 失去活性，而 α -酮戊二酸脱氢酶不受磷酸化、去磷酸化共价修饰的调节作用。

(五) 琥珀酰 - CoA 转化成琥珀酸并产生一个高能磷酸键

由琥珀酰 - CoA 转化成琥珀酸的反应式如下：



琥珀酰 - CoA 水解的 $\Delta G^{\circ} = -33.6 \text{ kJ/mol} (-8.0 \text{ kcal/mol})$, 而 ATP 的水解其 ΔG° 为 $-29.3 \text{ kJ/mol} (-7 \text{ kcal/mol})$ 。琥珀酰 - CoA 硫酯键是一个高能键, 它的断裂与鸟苷二磷酸(GDP)的磷酸化相偶联。催化这一反应的酶称为琥珀酰 - CoA 合成酶(succinyl - CoA synthetase), 也称为琥珀酰硫激酶(succinyl thiokinase), 这一命名指的是催化相反方向的反应。上述反应极易向正反两个方向进行, 虽然习惯上称为琥珀酰 - CoA 合成酶, 在柠檬酸循环中都是向形成琥珀酸的方向进行。这个反应的要点是产生一个高能磷酸键; 在哺乳动物形成一分子 GTP, 在植物和微生物直接形成 ATP。这是柠檬酸循环中唯一直接产生一个高能磷酸键的步骤。GTP 在生物合成中有其特殊的作用, 它在蛋白质的生物合成中是磷酸基的提供者即磷酸基供体(phosphoryl donor), 在与视觉兴奋有关的信号结合蛋白的活化与钝化中起控制作用。当信号结合蛋白与 GTP 结合时即被活化。因此 GTP 参与信号的传递过程。此外, GTP 还在核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphokinase)的催化下将磷酸基转给 ADP 生成 ATP。也就是, 通过琥珀酰 - CoA 合成酶和核苷二磷酸激酶的偶联作用, 琥珀酰 - CoA 的水解产生一个 ATP 分子。



与糖酵解过程 ATP 的生成步骤相比较, 这又是通过分解途径在底物水平上直接产生 ATP, 即底物水平的磷酸化作用, 而不是通过还原型辅酶的重新氧化(参见第 24 章氧化磷酸化)产生 ATP。

从柠檬酸循环以上的 5 步反应可看到一分子乙酰基被完全氧化为 CO_2 , 并使两分子 NAD^+ 还原为 NADH, 还产生了一个高能磷酸基团(GTP 或 ATP)。如何使机体产生的乙酰基在细胞内不断地进行氧化分解? 生物体选择了形成循环的方式, 即使琥珀酸经过 3 步反应再转变为能够接受乙酰基的草酰乙酸, 下面即是柠檬酸构成循环的 3 步反应, 从全部柠檬酸循环着眼即反应(六)、(七)、(八)。

(六) 琥珀酸脱氢形成延胡索酸

琥珀酸脱氢形成延胡索酸(fumarate)的反应可简单表示如下:



从上式可看到琥珀酸的两个中间碳原子各脱掉一个氢原子形成反式的丁烯二酸又称为延胡索酸。催化这一反应的酶称为琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase)。这个酶是以 FAD 作为其脱下电子的受体, 而不是 NAD^+ 。因琥珀酸脱氢酶催化的是两个碳原子之间($-\text{C}-\text{C}-$)即碳 - 碳键的氧化。碳 - 碳键氧化所释放的自由能不足以使脱下的电子转移到 NAD^+ 上。使 NADH 再氧化的 ΔG° 值为 $-220.1 \text{ kJ/mol} (-52.6 \text{ kcal/mol})$, 而 FADH_2 再氧化的 ΔG° 为 $-181.6 \text{ kJ/mol} (-43.4 \text{ kcal/mol})$ 。在下一章中可以看到 NADH 氧化产生 3 个 ATP 分子, 而 FADH_2 氧化只能产生两个 ATP 分子这正是 FAD 在氧化 - 还原反应中作为辅酶或辅基所起的特殊作用。

琥珀酸脱氢酶与 FAD 的关系是以共价键互相连接, 因此它是酶和辅基的关系。而且这个辅基是一种修饰形式, 其第 8a 位碳原子与酶的组氨酸残基相连, 如图 23-8 所示。这种 FAD 与酶蛋白之间以共价键结合的形式一般是不常见的。通常 FAD 即便与酶结合得相当紧密, 也是以非共价键形式结合。

尽管琥珀酸脱氢酶的作用是专一的, 与它的底物在结构上相类似的化合物例如丙二酸(malonnate)还是可以与酶结合, 但是酶却不能催化其脱氢, 因此丙二酸是琥珀酸的强抑制剂。

琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸的脱氢具有严格的立体专一性(图 23-9)。

柠檬酸循环的发现者 Krebs 首先观察到丙二酸抑制细胞呼吸的现象, 这一现象是启发他提出柠檬酸

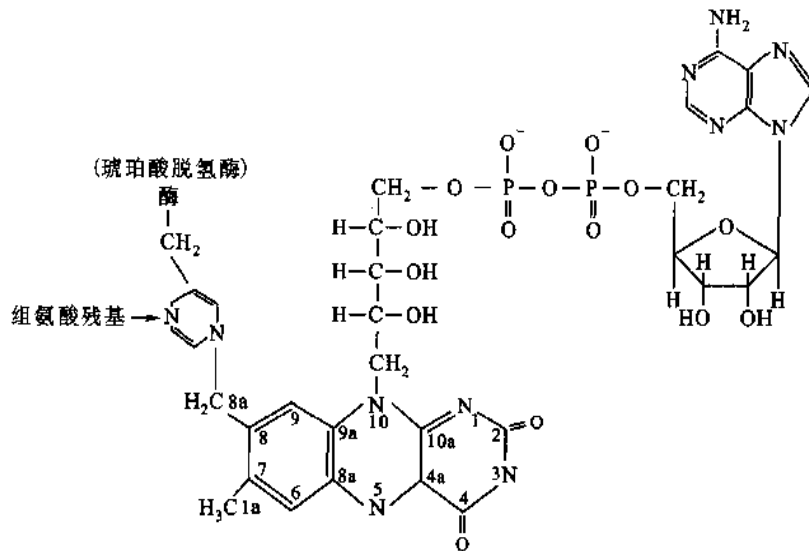


图 23-8 FAD(黄素腺嘌呤的核苷酸在 C8 位以共价键与酶组氨酸相连)

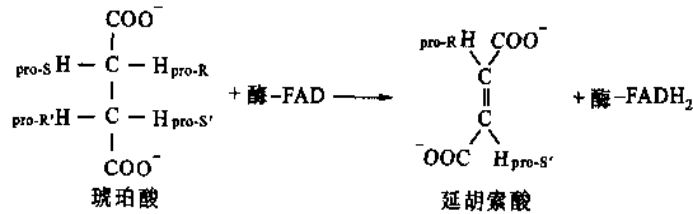


图 23-9 琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸脱氢的主体专一性

循环假说的重要实验之一。

琥珀酸脱氢酶与柠檬酸循环中的其他酶不同,是唯一嵌入到线粒体内膜的酶,是线粒体内膜的一个重要组成部分,而其他的酶大多存在于线粒体的基质(matrix)(图 23-10)。

从心肌线粒体内膜提纯的琥珀酸脱氢酶相对分子质量是 100 000, 包含有相对分子质量为 70 000 和 27 000 的两个亚基。该酶的组分中除黄素(flavin)外还含有三种不同的铁硫聚簇(iron-sulfur cluster), 一种是两个铁原子结合到两个无机硫化物(inorganic sulfide)上, 用 2Fe-2S 表示, 另外两种是 3 个铁原子和 4 个铁原子结合到 4 个无机硫化物上, 用 3Fe-4S 和 4Fe-4S 表示。这些铁硫聚簇在氧化磷酸化(参看第 24 章)的电子传递反应中以及在光合作用(参看第 27 章)中都起着重要的作用。事实上琥珀酸脱氢酶是直接连在电子传递链上的。由琥珀酸分子上脱下的氢即形成 FADH₂, 后者直接将电子传递给酶分子的 Fe-S, 氢的最终受体是氧分子。

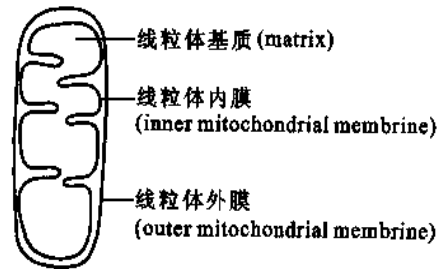
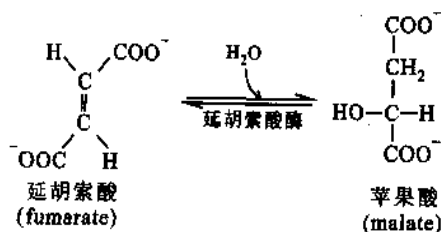


图 23-10 线粒体结构示意图

(七) 延胡索酸水合形成 L-苹果酸



催化延胡索酸水合形成苹果酸的酶,称为延胡索酸酶(fumarase)。该酶的催化反应具有严格的立体专一性。用重氢标记的水 D_2O 观察该酶的催化情况表明,—OD(—OH)严格地加到延胡索酸双键的一侧,而另一个 D 原子则加到相反的另一侧。因此形成的苹果酸只有 L-苹果酸(S-苹果酸)。上面的反应可用重氢表示出它的方向性(图 23-11)。

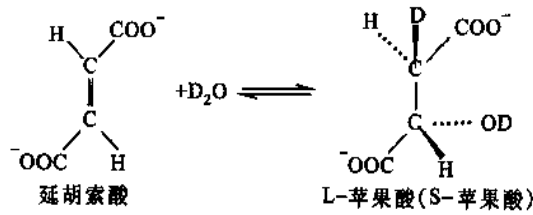
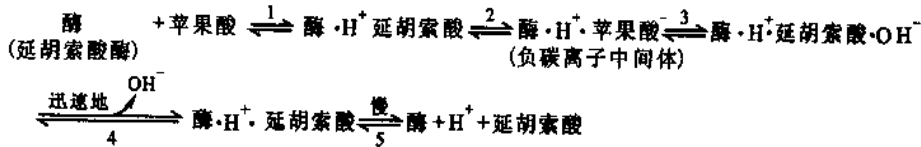


图 23-11 用重氢显示延胡索酸酶催化反应的立体专一性

此外用氧 $^{18}(^{18}O)$ 交换实验还证明了水合作用发生时,究竟是一OH基团先加到延胡索酸的双键上还是一H原子在先的问题。这个实验是用上面的逆反应,即S-苹果酸形成延胡索酸的反应进行的。当酶与苹果酸结合后形成一个负碳离子的中间体,造成OH $^-$ 基团脱离中间体,形成与酶结合着的延胡索酸,脱离中间体但仍与酶表面结合着的OH $^-$ 很快地与酶脱离,这时用 ^{18}O 标记着的 $^{18}O^-$ 得以与未标记的OH $^-$ 进行交换,于是产生了用 ^{18}O 标记的OH的S-苹果酸。这个实验还显示出除OH $^-$ 以外的其他产物的释放都比OH $^-$ 的速度慢,包括H $^+$ 在内。

关于延胡索酸在形成苹果酸OH $^-$ 和H $^+$ 究竟以何种机制加到双键上的问题,曾进行过多种实验,最后才得到确证。在科学实验中绝不能只凭一个证据就作出结论,必须从不同的方面入手反复证明才能得出可靠的结论。

上述由苹果酸形成延胡索酸的实验其反应顺序可简单表示如下:



从猪心获得的延胡索酸酶结晶,相对分子质量为200 000,由4个相同的亚基组成,每个亚基含有3个酶活性所必需的巯基。

(八) L-苹果酸脱氢形成草酰乙酸

这一步是再生成草酰乙酸完成柠檬酸循环的最后一个步骤。L-苹果酸的羟基氧化形成羰基。催化这个反应的酶称为苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)。它的辅酶是NAD $^+$ 。苹果酸氧化的 $\Delta G^{\circ} = +29.7 \text{ kJ/mol} (+7.1 \text{ kcal/mol})$,在热力学上尽管是不利的反应,但由于草酰乙酸与乙酰-CoA的缩合反应是高度的放能反应($\Delta G^{\circ} = -31.5 \text{ kJ/mol} = -7.5 \text{ kcal/mol}$),通过草酰乙酸不断地消耗,使苹果酸氧化成为草酰乙酸的方向得以进行,这正是我们在代谢总论及生物能学中强调过的,在热力学上一个不利的反应可由一个有利的反应所推动。而且由于柠檬酰-CoA的硫酯键水解时的高度放能,使得草酰乙酸在低的生理浓度下(约少于 10^{-6} mol/L)也可向生成柠檬酸的方向进行。

苹果酸脱氢酶催化的由-OH脱下的氢负离子定向地转移到NAD $^+$ 的re面。乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶以及苹果酸脱氢酶所有已知的脱氢酶都具有立体结构的专一性。它们都以NAD $^+$ 作为电子受体。NAD $^+$ 与它们的结合方式都是极相似的,NAD $^+$ 的腺嘌呤核苷部分都是结合在酶的疏水裂缝中。烟酰胺与酶结合是使其发挥活性作用的部分暴露在极性环境中,不发挥活性的其他部分还是与酶的疏水基团相接。与酶结合的NAD $^+$ 分子呈现伸展的构象形式。与NAD $^+$ 结合的各种脱氢酶,尽管它们的结构各异,但它们与NAD $^+$ 相结合的结构域的结构都是极其相似的。不但如此,在结构域中

NAD^+ 的腺嘌呤核苷与酶结合的部分和烟酰胺与酶结合的部分其构象也是极为相似的。如图 23-12 所示。

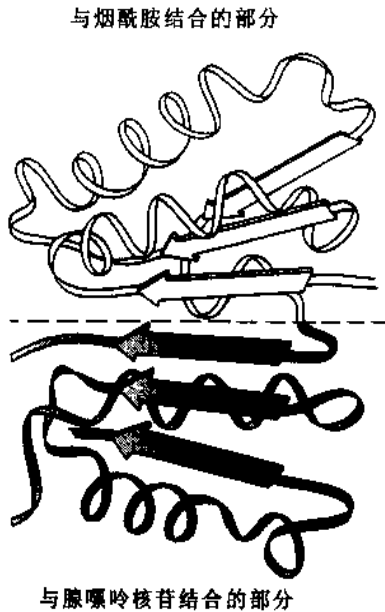
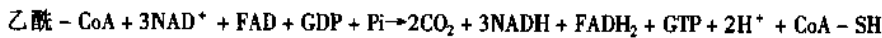


图 23-12 NAD 与脱氢酶结合区域的结构示意图

上半部分表示酶与烟酰胺结合的部分。下半部分表示酶与腺嘌呤核苷结合的部分,这两部分在结构上极其相似

四、柠檬酸循环的化学总结算

柠檬酸循环的总化学反应式如下:



从上式可以看出,柠檬酸循环的每一次循环都纳入一个乙酰 CoA 分子,即两个碳原子进入循环。又有两个碳原子以 CO_2 的形式离开循环。但是离开循环的两个碳原子并不是刚刚进入循环的那两个碳原子。

每一次循环共有 4 次氧化反应。参加这 4 次氧化反应的有 3 个 NAD^+ 分子和一个 FAD 分子;同时有 4 对氢原子离开循环,形成 3 个 NADH 和一个 FADH_2 分子。

每一次循环以 GTP 的形式产生一个高能键,并消耗两个水分子。

在柠檬酸循环中虽然没有氧分子直接参加反应。但是柠檬酸循环只能在有氧条件下进行。因为柠檬酸循环所产生的 3 个 NADH 和一个 FADH_2 分子只能通过电子传递链和氧分子才能够再被氧化(参看第 24 章)。

柠檬酸循环的总结算,见表 23-2。

柠檬酸循环共有 4 个脱氢步骤,其中有 3 对电子经 NADH 转递给最后与氧结合生成水。每对电子通过化学计算产生 2.5 个 ATP 分子,3 对电子共产生 7.5 个 ATP 分子,一对电子经 FADH_2 转移给电子传递链,化学计算产生 1.5 个 ATP 分子,通过柠檬酸循环本身,只产生一个 $\text{ATP}(\text{GTP})$ 分子。因此,根据化学计算每循环一次最终可以形成 $7.5 + 2.5 + 1 = 10$ 个 ATP 分子。这个数值比以往的计算少了两个 ATP 分子。(以往是 $9 + 2 + 1 = 12$ 个 ATP 分子)。若从丙酮酸脱氢酶开始计算每分子丙酮酸氧化脱羧产生一个 NADH ,经电子传递链最后产生 2.5 个 ATP 分子。因此,从丙酮酸开始经过一次循环共产生 $2.5 + 10 = 12.5$ 个 ATP 分子。若从葡萄糖开始计算,若不考虑糖酵解产生的两个 ATP 分子和两个 NADH ,每分子葡萄糖可形成 2 分子丙酮酸,因此,从葡萄糖形成 2 分子丙酮酸开始经柠檬酸循环共产生 2 倍的 12.5 个 ATP 分子 (12.5×2),即 25 个 ATP 和两个 NADH ,则一分子葡萄糖共产生 $\frac{25}{\text{柠檬酸循环}} + \frac{2+2+2.5}{\text{糖酵解}} = 32$ 个 ATP 分子。

表 23-2 柠檬酸循环的总结算

反应步骤	化学方程式	参加催化的酶	辅助因子	ΔG° kJ/mol	ΔG kJ/mol	反应类型
1	乙酰 - CoA + 草酰乙酸 + H ₂ O → 柠檬酸 + CoASH + H ⁺	柠檬酸合酶 (citrate synthase)	-	-31.38 或 -31.5 或 38.8	负值 (不可逆)	缩合反应 (condensation)
2	柠檬酸 ⇌ 顺 - 乌头酸	乌头酸酶 (aconitase)	Fe - S	+8.37 或	~0	脱水反应 (dehydration)
3	顺 - 乌头酸 + H ₂ O ⇌ 异柠檬酸	乌头酸酶	Fe - S	-2.09		水合反应 (hydration)
4	异柠檬酸 + NAD ⇌ α - 酮戊二酸 + CO ₂ + NADH	异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase)	-	-8.37 或 -7.11 或 -21	负值	氧化脱羧反应 (oxidative decarboxylation)
5	α - 酮戊二酸 + NAD + CoASH → 琥珀酰 - CoA + CO ₂ + NADH	α - 酮戊二酸脱氢酶系 (α - Ketoglutarate dehydrogenase complex)	硫辛酸 (lipoic acid) FAD, TPP	-30.12 或 -33.0 或 -24.0	负值 (不可逆)	氧化脱羧反应 (oxidative decarboxylation)
6	琥珀酰 - CoA + Pi + GDP ⇌ 琥珀酸 + GTP + CoA	琥珀酰 - CoA 合成酶 (succinyl - CoA synthetase) 或称琥珀酰 - CoA 硫激酶 (succinyl - CoA thiokinase)	-	-3.35 或 -2.1 或 -8.96	~0	底物水平氧化磷酸化 (substrate level phosphorylation)
7	琥珀酸 + FAD (结合在酶上) ⇌ 延胡索酸 + FADH ₂ (结合在酶上)	琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase)	FAD, Fe - S	+6 或 0.00	~0	氧化反应 (oxidation)
8	延胡索酸 + H ₂ O ⇌ L - 苹果酸	延胡索酸酶 (fumarase)	-	-3.68 或 -3.77 或 -3.40	~0	水合反应 (hydration)
9	L - 苹果酸 + NAD ⁺ ⇌ 草酰乙酸 + NADH + H ⁺	苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase)	-	+29.71 或 +28	~0	氧化反应 (oxidation)

* ΔG° 在不同的测定中所得数值往往有很大差异。上述数值主要从心肌和肝组织测得

五、柠檬酸循环的调控

柠檬酸循环的速度和其他代谢途径一样,受到精确地调控以适应细胞对能量的需要,以及满足某些生物合成对底物的需要。

实验表明,在心肌中,随着心肌收缩对 ATP 的需要,柠檬酸循环中的酶活性几乎作为一个功能整体和肌细胞对氧的利用速度成正比关系。因此氧的利用、NADH 的再氧化和 ATP 的生成都是相密切相关的(参看第 24 章)。柠檬酸循环可概括地看作来自两个方面的调控:①柠檬酸循环本身所具有的内部相互制约系统的调节,②ADP、ATP 和 Ca²⁺ 对柠檬酸循环的调节。下面从这两个方面分别作一些简要讨论。

(一) 柠檬酸循环本身制约系统的调节

在柠檬酸循环中,虽有 9 种酶参加反应,但在调节循环速度中起关键作用的可视为三种酶:柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α - 酮戊二酸脱氢酶。从表 23-2 中可看到此三种酶在生理条件下都远离平衡,其 ΔG 都是负值。柠檬酸循环中酶的活性主要靠底物提供的情况推动,并受其生成产物浓度的抑制。循环中最关键的底物应推乙酰 - CoA、草酰乙酸和产物 NADH。

乙酰 - CoA 和草酰乙酸在细胞线粒体中的浓度并不能使柠檬酸合酶达到饱和的程度。因此该酶对底

物催化的速度随底物浓度而变化,也就是酶的活性受底物供给情况所控制。乙酰 - CoA 来源于丙酮酸,所以它还受到丙酮酸脱氢酶活性的调节。草酰乙酸来源于苹果酸。它与苹果酸的浓度保持一定的平衡关系。而且 $[NADH]/[NAD^+]$ 的比例也保持一定的平衡关系。当呼吸速度加强时,线粒体中的 NADH 浓度下降。结果使草酰乙酸的浓度上升,又促使柠檬酸合酶的活性增强。柠檬酸合酶活性的强弱直接关系到柠檬酸的合成。一般情况下细胞对柠檬酸的利用速度总是高于柠檬酸的合成速度。而柠檬酸的利用速度又被以 NAD^+ 为辅助因子的异柠檬酸脱氢酶所控制,异柠檬酸脱氢酶和乌头酸酶的活性是保持平衡的。异柠檬酸脱氢酶又受到它的产物之一 NADH 的强烈抑制。柠檬酸合酶也受 NADH 的抑制,但异柠檬酸脱氢酶对浓度变化的敏感程度高于柠檬酸合酶。

柠檬酸是柠檬酸合酶底物之一的草酰乙酸的竞争性抑制剂(competitive inhibitor)。柠檬酸浓度的下降又促使柠檬酸的合成。 α -酮戊二酸脱氢酶也受产物 NADH 和琥珀酰 - CoA 的抑制。如果 NADH 的浓度下降, α -酮戊二酸脱氢酶的活性也必然升高。琥珀酰 - CoA 和乙酰 - CoA 结构相似,对柠檬酸合酶有竞争性反馈抑制作用。

上述柠檬酸循环中相互制约的关系构成循环中自身协调的调控体系。

(二) ATP、ADP 和 Ca^{2+} 对柠檬酸循环的调节

机体活动增加总要消耗更多的 ATP。与 ATP 水解速度相伴随的是 ADP 浓度的增加。ADP 是异柠檬酸脱氢酶的变构促进剂(allosteric activator),从而增加了该酶对底物的亲和力(降低异柠檬酸脱氢酶的表现 K_m 值)。机体活动处于静息状态时,ATP 的消耗下降、浓度上升,对该酶产生抑制效应。

Ca^{2+} 在机体内的生物功能是多方面的,它对柠檬酸循环也间接地起着重要作用。它刺激糖原的降解、启动肌肉收缩,还对许多激素的信号起中介作用,在柠檬酸循环中它对丙酮酸脱氢酶的磷酸酶即丙酮酸脱氢酶磷酸酶(pyruvate dehydrogenase phosphatase)起激活作用,对异柠檬酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶都有激活作用。

肝脏中柠檬酸循环不仅在提供能量中起重要作用,由于肝脏功能的多样性(它能合成机体所需要的多种物质包括葡萄糖、脂肪酸、胆固醇、氨基酸及叶啉类等),柠檬酸循环还有对其他代谢提供中间产物的作用。因此,在肝脏中的柠檬酸循环受到的调控关系就显得更为错综复杂虽然它在各种组织中受到的调控机制都是相同的。

柠檬酸循环的调控关系可用图 23-13 表示:

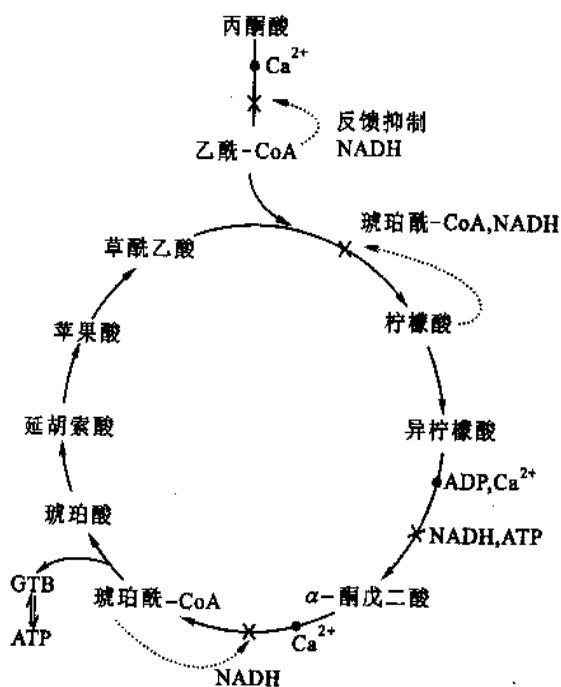


图 23-13 乙酰 - CoA 形成和柠檬酸循环中的激活和抑制部位示意图

·代表激活部位 ×代表抑制部位

···代表反馈抑制

图中表示出 ADP 和 Ca^{2+} 为激动剂,

NADH、ATP 为抑制剂

六、柠檬酸循环的双重作用

柠檬酸循环是绝大多数生物体主要的分解代谢途径,也是准备提供大量自由能的重要代谢系统,在许多合成代谢中都利用柠檬酸循环的中间产物作为生物合成的前体来源,从这个意义上看,柠檬酸循环具有分解代谢和合成代谢双重性或称两用性(ammphiblic),如图 23-14 所示:

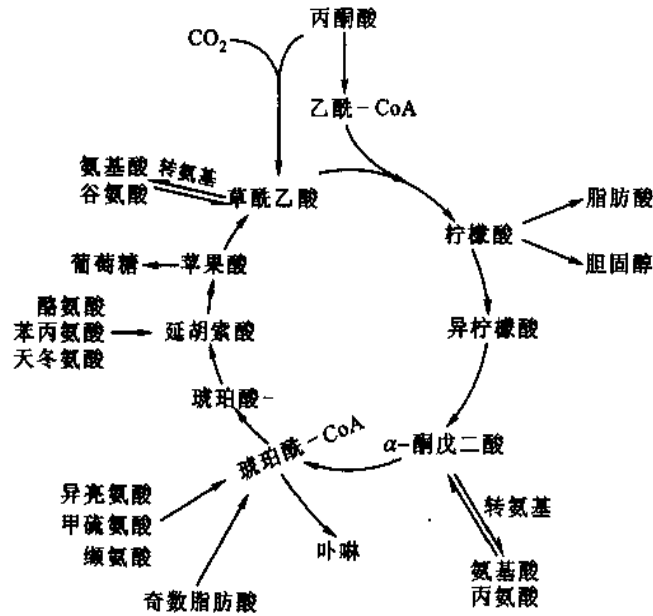
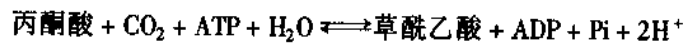


图 23-14 柠檬酸循环双重用途示意图

柠檬酸循环中由于参与其他代谢途径而失去的中间产物,必须予以及时补充,才能保持柠檬酸循环顺利地、不间断地运转。

直接利用柠檬酸循环中间产物的生物合成途径有:葡萄糖生物合成(称为葡萄糖异生作用),脂类的生物合成,包括脂肪酸的胆固醇和生物合成、氨基酸的生物合成、卟啉类的生物合成等,都将在以后的有关章节中详细讨论。

对柠檬酸循环中间产物有补充作用的反应称为填补反应(anaplerotic reaction,该英文名词来自希腊语 ana = up, pleritikos = to fill, 二词结合为 to fill up 即填补或补充的意思)。属于这种类型的反应有丙酮酸羧化反应,化学反应式如下:



催化这一反应的酶称为丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)。由于草酰乙酸或循环中任何一种中间产物的不足而引起柠檬酸循环速度有任何的降低都会使乙酰-CoA 浓度增加,而乙酰-CoA 是丙酮酸羧化酶的激动剂,结果会产生更多的草酰乙酸,从而提高柠檬酸循环的速度。过量的草酰乙酸被转运到线粒体外用于合成葡萄糖。

有些降解途径可产生柠檬酸循环的中间产物。例如,奇数脂肪酸(odd-chain fatty acids)的氧化,异亮氨酸、甲硫氨酸、缬氨酸的分解都可产生琥珀酰-CoA。脱氨基和转氨基作用都可产生柠檬酸循环的中间产物,例如产生 α-酮戊二酸和草酰乙酸。这些反应都是可逆反应,它们的方向决定于代谢的需要。因此,这些反应在调节柠檬酸循环中都发挥着应有的作用。

综上所述可以看出,柠檬酸循环确实是新陈代谢的中心环节。它们在循环过程中产生的还原型 NADH 和 FADH₂,进一步通过电子传递链和氧化磷酸化被再氧化,所释放出的自由能形成 ATP 分子。柠檬酸循环的中间产物在许多生物合成中充当前体原料。在以后的章节还将详细讨论。

七、柠檬酸循环的发现历史

在第 19 章新陈代谢总论中,讨论新陈代谢的研究方法时,以柠檬酸循环发现的过程强调了任何一项重大科学发现都绝非是一个人的成果。它凝集着许许多多科学家的艰辛劳动和成果积累。柠檬酸循环的建立经过了许多年的逐渐演化而成(参看第 19 章代谢总论)。据 Krebs H A 的看法,认为这一发现集中的发展是从 1932 到 1936 年,大约经历了 5 年的时间。这一段时间 Krebs H A 参与了这项工作。他们在前人工作的基础上,用那些预期可能是食物氧化的中间产物如柠檬酸、琥珀酸、延胡索酸及乙酸等在各种不同的动物组织中,例如,肌肉、肾脏、肝脏等组织的匀浆悬浮液或切片的材料,研究它们的氧化情况,发现上述几种化合物在各种不同组织中的氧化速率都是最快。他还发现,若向肌肉悬浮液中加入草酰乙酸,就会迅速生成柠檬酸。又发现柠檬酸是草酰乙酸和一种来自丙酮酸或乙酸的化合物合成的。他的研究成果和重要发现,再加上 Albert Szent-Gyorgyi 的关键性的发现,即往肌肉组织悬浮液中加入少量草酰乙酸或苹果酸等 4C 二羧酸,则氧的利用量远远超过加入的二羧酸本身氧化为 CO_2 和水所需要的氧分子。它们对耗氧量产生一种催化作用。还有 Carl Martius 和 Franz Knoop 两人证明柠檬酸通过顺-乌头酸而被异化为异柠檬酸。后者再氧化脱羧形成 α -酮戊二酸。他们还证明 α -酮戊二酸被氧化为琥珀酸。这表明他们揭示了从柠檬酸到琥珀酸的途径。

上述几位科学家的重要贡献和 Krebs 自己的重要视察和发现,使得 Krebs 提出完整的循环途径。他的推理和假设能够完满地解释许多已揭示的代谢现象,例如,为什么琥珀酸及其他许多 4C 二羧酸能够加速呼吸作用的进行等等。环式代谢途径的概念是 Krebs H A 对代谢的重大贡献。他不仅确立了柠檬酸循环式代谢途径的概念,6 年前他就已经提出了尿素生成的鸟氨酸环式循环概念(参看第 30 章蛋白质及氨基酸的分解代谢)。

提 要

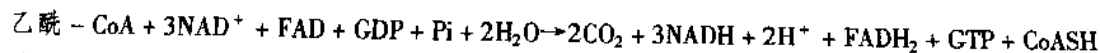
柠檬酸循环是糖、脂类和氨基酸代谢的最后共同途径。葡萄糖在无氧条件下转变为丙酮酸后,在进入柠檬酸循环之前,先进行氧化脱羧转变为乙酰-CoA。

脱羧反应有两种形式,一种是简单脱羧,另一种是氧化脱羧。区别在于是否伴有氧化-还原反应。简单脱羧不需要 NAD^+ 辅助因子。草酰乙酸转变为 CO_2 和丙酮酸属于简单脱羧。脱羧反应是放能反应,极有利于朝形成产物的方向进行。氧化脱羧包括氧化-还原反应和脱羧反应。脱羧过程需要 NAD^+ 以及其他一些辅助因子。丙酮酸脱氢酶系参加反应的辅助因子有 CoA、 NAD^+ 、硫胺素焦磷酸(TPP)、硫辛酰胺、FAD 等 5 种辅助因子。

丙酮酸脱氢酶系是包括三种不同酶的多酶复合体。多酶复合体的优越性是所有的中间产物都不需要离开酶的复合体,所有的反应都在组织严密的体系中有秩序地进行。除丙酮酸脱氢酶系外,还有 α -酮丁酸脱氢酶系、分支链酮酸脱氢酶系、 α -酮丁酸脱氢酶系等都是包括三种酶的复合体,而且都包括 5 种辅助因子。

乙酰-CoA 是柠檬酸循环氧化二碳片段的碳源。乙酰-CoA 和草酰乙酸反应生成 6 碳三羧酸—柠檬酸。由此开始柠檬酸循环。随后是异构化为异柠檬酸,然后氧化脱羧形成 5 碳二羧酸即 α -酮戊二酸。后者又进行氧化脱羧,形成 4 碳的琥珀酰-CoA。琥珀酰-CoA 的高能硫酯键和 GDP 及 P_i 发生底物水平磷酸化作用产生一个高能 GTP。琥珀酸通过三步反应又形成草酰乙酸,完成了柠檬酸的一次循环。在柠檬酸循环中草酰乙酸是再生的底物,而乙酰-CoA 是按化学反应的比例关系被消耗的底物。

柠檬酸循环的化学方程式应作如下的表示:



从乙酰-CoA 进入柠檬酸循环开始,每一次循环最终可产生 10 个 ATP 分子,然而该循环本身只产生一个 ATP(GTP)分子;其他 9 个 ATP 分子是由 3 个 NADH 和 1 个 FADH_2 通过电子传递链和氧化磷酸化生成

的。

参加柠檬酸循环的酶共有 9 种。柠檬酸合酶催化乙酰 - CoA 和草酰乙酸(和水)形成柠檬酸和 CoA (或 CoASH)。在催化过程中,酶与草酰乙酸结合后发生明显的构象变化。该酶催化的反应在生理条件下是不可逆的。乌头酸酶催化柠檬酸脱水产生顺乌头酸,再加水形成异柠檬酸。异柠檬酸脱氢酶催化脱羧反应形成第一个 CO_2 和 α -酮戊二酸及 NADH。 α -酮戊二酸脱氢酶系催化 α -酮戊二酸脱羧产生第二个 CO_2 、NADH 和琥珀酰 - CoA。琥珀酰 - CoA 合成酶或称琥珀酰硫激酶催化形成琥珀酸和形成高能分子 GTP。这种由不包括电子传递链和氧而形成的高能核苷三磷酸,称为底物水平的磷酸化作用。琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸氧化为延胡索酸。琥珀酸脱氢酶是柠檬酸循环中唯一嵌入线粒体内膜中的酶,其他的酶都处于线粒体的基质中。琥珀酸氧化形成的还原型 FADH_2 不脱氢酶,直接将电子传递给电子传递链的辅酶 Q。通过这种传递最终可产生 1.5 个 ATP,从 NADH 分子上每传递一对电子给电子传递链最终可产生 2.5 个 ATP 分子。琥珀酸脱氢酶催化的是简单的氧化 - 还原反应,是可逆反应。丙二酸是琥珀酸脱氢酶强抑制剂。延胡索酸酶催化延胡索酸水化形成苹果酸,苹果酸脱氢酶催化苹果酸和 NAD^+ 作用产生草酰乙酸和第三个 NADH 分子。

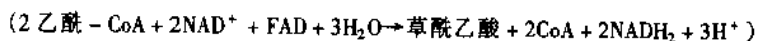
在柠檬酸循环中还有两点值得注意,一点是乙酰 - CoA 的二碳片段结合到草酰乙酸上再脱羧时并不是立刻形成 CO_2 而脱去。放射性同位素证明脱下的羧基是原来在草酰乙酸分子上的羧基。另一点是,柠檬酸虽然本身没有旋光性不存在具有手性的碳原子,但是柠檬酸具有前手性,它的羧基能够被酶所辨识。乌头酸酶能够辨识在柠檬酸分子中的两个 $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ 基团,经过一步反应,柠檬酸分子就变成成为具有手性的分子。

习 题

1. 从柠檬酸循环的发现历史中受到什么启发?
2. 画出柠檬酸循环概貌图,包括起催化作用的酶和辅助因子。
3. 总结柠檬酸循环在机体代谢中的作用和地位。
4. 用 ^{14}C 标记丙酮酸的甲基碳原子 ($*\text{CH}_3-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{COO}^-$) 当其进入柠檬酸循环运转一周后,标记碳原子的命运如何?

(标记碳原子出现在草酰乙酸的 C2 和 C3 部位)。

5. 写出由乙酰 - CoA 形成草酰乙酸的反应平衡式。



6. 在标准状况下苹果酸由 NAD^+ 氧化形成草酰乙酸的 $\Delta G^\circ = +29.29 \text{ kJ/mol}$ 。在生理条件下这一反应却极易由苹果酸向草酰乙酸的方向进行。假定 $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 8$, $\text{pH} = 7$, 计算由苹果酸形成草酰乙酸两种化合物最低的浓度比值应是多少? ($[\text{苹果酸}]/[\text{草酰乙酸}] > 1.75 \times 10^4$)

7. 乙酰 - CoA 的乙酰基在柠檬酸循环中氧化推动力是什么? 计算其数值(推动力是释放出的标准自由能变化 ΔG° , 其数值是 -41 kJ/mol)。

8. 如果将柠檬酸和琥珀酸加入到柠檬酸循环中,当完全氧化为 CO_2 、形成还原型 NADH 和 FADH_2 , 并最后形成 H_2O 时需经过多少次循环?(柠檬酸 3 次,琥珀酸 2 次)。

9. 丙二酸对柠檬酸循环有什么作用? 为什么?

主要参考书目

1. Robert Roskoski Jr. Biochemistry. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996
2. Lubert Stryer. Biochemistry 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
3. Donald Voet, Judith G Voet. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, 1990
4. Voet D, Voet G J. Biochemistry 2nd ed. John Wiley & Sons Inc., 1995
5. Nelson L D, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed Worth Publishers, 2000
6. Baldwin J E, Krebs H. The evolution of metabolic cycles. Nature, 1981, (291): 381 ~ 382

7. Krebs H A, Johnson W A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia*, 1937, (4): 148 ~ 156
8. Krebs H A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspectives in Biology and Medicine*, 1970, (144): 154 ~ 170
9. Popjak, G. Stereospecificity of enzymic reactions. *The Enzymes*, 3rd ed. Academic Press, 1970, (2): 115 ~ 215
10. Angelides J K, Hammes G G. Mechanism of action of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *E. coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978, (75): 4 877 ~ 4 880
11. Weiland O H. The mammalian pyruvate dehydrogenase complex: structure and regulation, *Rev. physiol. Biochem. pharmacol*, 1983, (96): 123 ~ 170
12. Weiland G, Remington S J. Citrate synthase: structure, control and mechanism, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem*, 1986, (15): 97 ~ 117
13. Kent T A *et al.* Studies of aconitase: substrate and inhibitor binding reaction intermediates and hyperfine interactions of reduced 3Fe and 4Fe clusters, *J. Biol. Chem*, 1985, (260): 6 871 ~ 6 881

(王镜岩)

第 24 章 生物氧化—电子传递 和氧化磷酸化作用

生物体所需的能量大都来自糖、脂肪、蛋白质等有机物的氧化。生物体内的氧化和外界的燃烧在化学本质上虽然最终产物都是水和二氧化碳,所释放的能量也完全相等,但二者所进行的方式却大不相同。糖、脂肪、蛋白质在细胞内彻底氧化之前,都先经过分解代谢,在不同的分解代谢过程中,都伴有代谢物的脱氢和辅酶 NAD^+ 或 FAD 的还原。这些携带着氢离子和电子的还原型辅酶 NADH 、 FADH_2 ,最终将氢离子和电子传递给氧时,都经历相同的一系列电子载体传递过程。有机分子在细胞内氧化分解成二氧化碳和水并释放出能量形成 ATP 的过程,笼统地称为生物氧化(biological oxidation)。生物氧化实际上是需氧细胞呼吸作用中的一系列氧化-还原反应,所以又称为细胞氧化或细胞呼吸,有时也称组织呼吸。生物氧化的特点是在体温条件下进行,通过酶的催化作用,有机分子发生一系列的化学变化,在此过程中逐步氧化并释放能量。这种逐步分次的放能方式,不会引起体温的突然升高,而且可使放出的能量得到最有效的利用。与此相反,有机分子在体外燃烧需要高温,而且一次性地产生大量的光和热。生物氧化的第二个特点是在氧化过程中产生的能量一般都贮存在一些特殊的化合物中,主要是 ATP 。电子由还原型辅酶传递到氧的过程中,形成大量的 ATP 占全部生物氧化产生能量的绝大部分。例如,一个葡萄糖分子氧化时生成 30 个 ATP 分子,其中 26 个是还原型辅酶氧化时得到的。

一、氧化-还原电势

生物氧化实质上就是指氧化磷酸化(oxidative phosphorylation),是 NADH 和 FADH_2 上的电子通过一系列电子传递载体传递给 O_2 ,伴随 NADH 和 FADH_2 的再氧化,将释放的能量使 ADP 磷酸化形成 ATP 的过程。有机分子中的氢和电子是如何转移和传递的?又是如何与分子氧结合形成水并释放能量的?都是生物氧化作用的关键问题。为了比较深刻地了解生物氧化作用,有必要先复习一下氧化-还原电势的概念。

凡是反应中有电子从一种物质转移到另一种物质的化学反应称为氧化-还原反应(oxidation-reduction reactions,又可称为 oxidoreductions 或 redox reactions)换言之,电子转移反应就是氧化-还原反应。提供电子的分子称为还原剂(reducing agent 或 reductant),接受电子的分子称为氧化剂(oxidizing agent 或称为 oxidant)。还原剂和氧化剂相偶联构成氧化-还原电子对(reduction-oxidation pairs),简称氧-还电对(redox pairs)。

氧化-还原反应往往是可逆的,物质失去电子后,称为氧化型,氧化型再得到电子又成为还原型。习惯上将反应按以下方式书写:



其中 A^{n+} 为氧化型,即电子受体; A 为还原型,为电子供体; n 为电子数目, e 为电子。

(一) 氧化-还原电势

在容器 A 和 B 中分别放入硫酸锌和硫酸铜溶液,如图 24-1 所示。

在盛有硫酸锌的容器中放入锌片,在盛有硫酸铜的容器中放入铜片,两个容器用盐桥连接起来,盐桥内装有饱和氯化钾溶液与琼脂做成的凝胶。如果用导线将两片金属连接起,中间串联一检流计(voltmeter),则检流计的指针会立即向一方偏转,表明有电流通过导线。与此同时,锌片开始溶解,而铜片上则有铜沉积上去。这是因为锌失去了两个电子形成锌离子。反应如下:



Zn^{2+} 进入溶液中,电子则留在锌片上,锌片上的电子经导线向铜片流动,使硫酸铜溶液中的铜离子在金属铜上与电子结合还原为铜原子而沉积在铜片上。反应如下:



通过盐桥消除由于电解质离子迁移(扩散)而引起的扩散电势。以上这种将化学能转变为电能的装置称为化学电池,又称原电池。通常我们把发生氧化反应的电极定义为阳极,把发生还原反应的电极定义为阴极。

从图 24-1 可见,电子流动的方向是从锌电极(阳极)流向铜电极(阴极),电极的方向则相反。从电学观点看,既然电流是从阴极经导线流向阳极,阴极的电势必然高于阳极的电势。因此,从电位高低看,又可把原电池的阴极称为正极,阳极为负极。此外,根据电学惯例,把电池的电动势(ϵ)规定为正极电势减去负极的电极电势。

在氧化-还原反应中,如果反应物的组成原子或离子能提供电子,则该物质称为还原剂;如果反应物的组成原子或离子能夺得电子,则该反应物称为氧化剂。

以上事例还可作如下的概括和分析:当把一金属电极(electrode)M放入它的盐溶液即构成一个半电池(half cell)时,一方面金属M表面的一些原子有一种留在金属电极上,而自身以离子 M^{n+} 的形式进入溶液的倾向(金属越活泼,溶液越稀,这种倾向越大);另一方面,盐溶液中的 M^{n+} 又有一种从金属电极M表面获得电子而沉淀在金属电极上的倾向(金属越不活泼,浓度越浓,这种倾向越大)。这两种倾向达到平衡时的反应式如下:



若失去电子的倾向大于获得电子的倾向,结果是金属进入溶液,使金属电极带负电,而靠近金属电极附近的溶液带正电。在金属电极和盐溶液之间即产生电势(electric potential)或称电位,这就是电极电势(electric potential)或称电极势或电极电位。若金属失电子的倾向小于它的离子获得电子的倾向,在金属和盐溶液之间也产生电极电势,只是金属电极带正电,靠近金属电极附近的溶液带负电。金属电极势除同本金属的性质和金属离子在溶液中的活度(浓度)有关外,还与温度有关。单个电极即半电池的电极电势的绝对值无法直接测量。人们能测量的是由两个电极即两个半电池组成的电动势(简称 ϵ 或 E)。实际上能够比较和衡量的只能是电极的相对电势。根据国际纯粹和应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry 简称 IUPAC)的建议,通常用一种标准氢电极作为标准,将所测得的电势称为氢标电势。标准氢电极是一个镀有铂黑的铂电极,在 25°C 一大气压的氢压力下,浸于氢离子活度为1质量摩尔浓度的溶液中,其 $\text{pH}=0$ (标准状态)而组成的。发生氧化作用的电极为阴极,又称为负极,用“-”表示。发生还原作用的电极即阳极,称为正极,用“+”号表示。如果将锌电极与氢电极构成原电池,则氢电极为正极,锌电极为负极。如果将铜电极与氢电极构成原电池,则氢电极为负极,铜电极为正极。按氢标电势的规定,标准氢电极的电极势为零($E_{\text{H}^+/\text{H}_2}^0 = 0$)。原电池的电动势与电极势的关系可用下式表示:

$$\epsilon = E_{\text{正极}} - E_{\text{负极}} \quad (5)$$

式中 ϵ 代表电动势, $E_{\text{正极}}$ 和 $E_{\text{负极}}$ 分别代表电池正极和负极的电极。

根据以上公式即可计算出氢锌原电池的电极势。

标准电动势在反应中各种物质的活度均为1质量摩尔浓度时的电动势。用 ϵ_0 表示。

当电解质溶液活度为1(质量摩尔浓度)时的电极势称为标准电极势,用 E_0 表示。则标准电动势和标准电极的关系是:

$$\epsilon_0 = E_{0\text{正极}} - E_{0\text{负极}} \quad (6)$$

经测量,氢锌电池的标准电动势 $\epsilon_0 = 0.763 \text{ V}$,则

$$0.763 = E_{\text{OH}^+/\text{H}_2} - E_{\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}}$$

因 $E_{\text{OH}^+/\text{H}_2} = 0$,所以,

$$\Delta E_{\text{Zn}^{2+}/\text{Zn}} = -0.763 \text{ 伏(V)}$$

同法测得铜氢电池的电动势为 0.34 V ,铜是正极,氢为负极。则

$$0.34 = E_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}} - E_{\text{OH}^+/\text{H}_2}$$

$$\Delta E_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}} = +0.34 \text{ V}$$

从上面测定的数据可看出,锌的标准电极势带有负号,铜的标准电极势带有正号。因此锌的还原能力强,而铜离子的氧化能力强,还原剂失掉电子的倾向(氧化剂得到电子的倾向)称为氧化-还原电势(oxidation-reduction potential)。

任何氧化-还原物质与标准氢电极组成原电池,都可测定其标准氧化-还原电势,并可依上法求出其标准电极电势。在实际工作中,由于氢电极使用不便,往往采用一些比较简便稳定的参比电极来代替氢电极,例如甘汞电极。

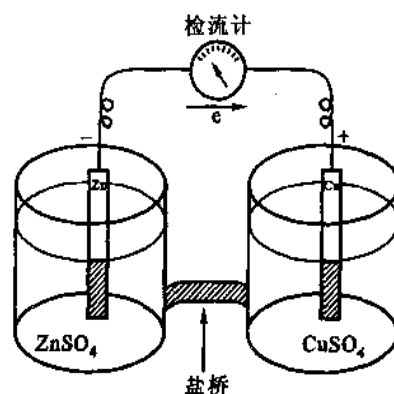


图 24-1 化学电池示意图

因铂和金放入溶液中几乎不发生反应,常用于作为指示电极(工作电极)来测定溶液中氧化-还原电对的电势,亦即氧化-还原电势。如将两个铂电极分别插入铁离子(Fe^{3+})和氢醌(H_2Q)两种溶液中并组成原电池, Fe^{3+} 从铂电极上获得电子还原为 Fe^{2+} ;氢醌(H_2Q)将电子释放到另一电极上本身氧化形成醌 Q。其反应式为:



如果上述反应中 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的浓度为已知,根据电极势的能斯特方程(Nernst equation)即可算出电极在溶液中的电极势。能斯特方程如下:

$$E_n = E_0 + RT/nF \cdot \ln[\text{电子受体}]^a/[\text{电子供体}]^b \quad (8)$$

式中 E_n 为待测溶液中氧化电对的电极势, E_0 为标准电极势。 R 为气体常数(8.314 焦耳/升·摩尔), T 为 25℃ 或 298K 的绝对温度, n 为电极上的价数变化(即体系中每摩尔物质给予或接受的电子摩尔数), F 为法拉第常数等于 23 062 Cal/V(卡/伏)又等于 96 494 C/mole⁻(库仑/摩尔电子), \ln 为自然对数。

对于 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 其电极势的计算公式为:

$$E_n = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}^{2+}]}$$

式中 E_n 为 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 的电极势,其他符号含意同上。

在很多情况下,氢离子也参与电极上的氧化-还原反应。这时溶液的 pH 会直接影响这个体系的氧化-还原电势。前述标准氧化-还原电势的 pH=0,当 pH 不等于 0(生物化学反应),一般是 pH=7 测得的标准氧化-还原电势用 ϵ'_0 表示。

电子从分子上转移往往通过下列 4 种方式:

① 以电子形式直接转移。例如 $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{3+}$ 电对可将电子转移到 $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^{2+}$ 电对:



② 电子以氢原子的形式转移。因为氢原子由一个质子(H^+)和一电子(e^-)组成。可写成:



AH_2 是氢或电子的供体,A 是氢和电子的受体, AH_2 和 A 组成一氧化还原电对,它可使电子受体 B 以转移氢原子的形式还原。



③ 电子以氢负离子($:\text{H}^-$)的形式,它带有 2 个电子从电子供体转移到电子受体上。例如,与 NAD 有关的脱氢酶类的作用。

④ 当一个有机氧化剂直接与氧结合时,也发生电子转移,生成的产物是与氧以共价形式相结合的。例如,碳氢化合物氧化形成醇的反应:



此反应式中,碳氢化合物是电子供体,氧原子是电子受体。

以上 4 种电子传递形式在细胞中都存在。生物化学中常用“还原当量”(reducing equivalent)这一名词,指的是参加到氧化-还原反应中的是一个当量的电子,不管电子本身(electron per se)以什么形式转移。例如,在线粒体的电子传递中可见到电子传递的不同形式:氢负离子、氢原子以及电子形式等。

生物燃料分子的酶促脱氢反应一般是同时失去两个还原当量电子,每个氧原子能够接受两个还原当量。因此,习惯上将生物氧化单位视作一对还原当量从底物传递到氧。

(二) 生物体中某些重要的氧化-还原电势

生物体内的氧化-还原物质进行氧化-还原反应时,基本原理和化学电池一样,也可以把生物体内的氧化剂和还原剂做成化学电池,无论是有机物,无机物或混合的有机、无机氧化-还原体系,任何的氧化-还原物质连在一起,都可以有氧化-还原电势产生。任何的氧化还原电对都有其特定的标准电势(standard potential),用 ϵ_0 或 E_0 表示,称标准还原势(standard reduction potential),或标准氧化还原电势(standard oxidation-reduction potential)。生物体内一些重要物质的标准氧化-还原电势已经测出,如表 24-1 所示。

从表 24-1 中可见,标准电势具有较大负值的氧化还原电对比具有较小负值的氧化还原电对更倾向于失去电子;换言之,标准电势的正值越大的,越倾向于获得电子。例如,异柠檬酸/(α -酮戊二酸 + CO_2)电对当它们的浓度都是 1.0 mol/L 时,其标准电势 E'_0 为 -0.38 V。这个氧化还原电对倾向于将电子传递给氧化还原电对

NADH/NAD⁺, 它的 $E'_0 = -0.32$ V。如果有柠檬酸脱氢酶存在, 这个电对具有相对的正电势。而水/氧电对的标准电势为 +0.82 V。这表明水分子失去电子形成分子氧的倾向性极小。相反, 分子氧对电子或氢原子具有极高的亲和力。虽然标准电势的单位是 V(伏, volts), 但为了便利, 常用 mV(毫伏, millivolts) 表示。

表 24-1 生物体中某些氧化 - 还原体系的标准氧化还原电势

氧化 - 还原反应式	标准电势
乙酸 + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 丙酮酸 + H ₂ O	-0.70
琥珀酸 + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 酮戊二酸 + H ₂ O	-0.67
乙酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 乙醛 + H ₂ O	-0.58
3-磷酸-甘油酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 甘油醛-3-磷酸 + H ₂ O	-0.55
α-酮戊二酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 异柠檬酸	-0.38
乙酰-CoA + CO ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 丙酮酸 + CoA	-0.48
1,3-二磷酸甘油酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 甘油醛-3-磷酸 + Pi	-0.29
硫辛酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 二氢硫辛酸	-0.29
S + 2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂ S	-0.23
乙醛 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 乙醇	-0.197
丙酮酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 乳酸	-0.185
FAD + 2H ⁺ + 2e ⁻ → FADH ₂	-0.18*
草酰乙酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 苹果酸	-0.166
延胡索酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 琥珀酸	-0.031
2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂	-0.421
乙酰乙酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → β-羟丁酸	-0.346
胱氨酸 + 2H ⁺ + 2e ⁻ → 2 半胱氨酸	-0.340
NAD ⁺ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → NADH	-0.32
NADP ⁺ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → NADPH	-0.32
NADH 脱氢酶(FMN 型) + 2H ⁺ + 2e ⁻ → NADH 脱氢酶(FMNH ₂ 型)	-0.30
标准氢电极 $E^0 = 0.00$	
CoQ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → CoQH ₂	+0.045
细胞色素 b(ox) + e ⁻ → 细胞色素 b(red)	+0.07
细胞色素 c ₁ (ox) + e ⁻ → 细胞色素 c ₁ (red)	+0.215
细胞色素 c(ox) + e ⁻ → 细胞色素 c(red)	+0.235
细胞色素 a(ox) + e ⁻ → 细胞色素 a(red)	+0.210
细胞色素 a ₃ (ox) + e ⁻ → 细胞色素 a ₃ (red)	+0.385
1/2O ₂ + 2H ⁺ + 2e ⁻ → H ₂ O	+0.815
Fe ³⁺ + e ⁻ → Fe ²⁺	+0.77

注 E_0 值的测定条件为 pH7.0, 25℃, 和标准氢电极构成的化学电池的测定值。电子供体和受体的浓度都是 1 mol/L

* FAD/FADH₂ 的测定值仅为辅酶的单独测定值, 当辅酶与酶蛋白结合后 E_0 值在 0.0 到 +0.3 V 之间, 随特异蛋白而异

氧化 - 还原体系对生物体之所以重要, 不只是因为生物体内的许多重要反应属于氧化 - 还原反应, 更重要的是因为生物体所需的能量来源于体内所进行的氧化 - 还原反应。要了解氧化 - 还原体系和能量之间的关系, 还必须弄清楚氧化 - 还原和自由能的关系。

(三) 电势和自由能的关系

前面已经阐明, 体系自由能的改变等于体系所做最大功的能量, 可用下式表示:

$$-\Delta G = W_{\max}$$

式中 ΔG 为自由能的变化, 此处应为负值, 表示体系自由能减少之量, W_{\max} 为最大功。

可以把一个氧化-还原反应看成是能做最大功的电池。当通过这个电池的电流为无限小时, 它所做的功就是最大。其电动势 $\epsilon = (\Delta E)$ 可以测出。因电池所做的功在数值上等于两个电极之间的电动势和电量的乘积。当电池传递的电子为 1 摩尔 (即 6.02×10^{23} 个电子 = 1 法拉第 = 96485 C/mol 库仑/摩尔)。则该电池在标准状态下所做的功可用下式表示:

$$W = n\Delta E_0 F \text{ (焦耳)} \quad (13)$$

ΔE_0 为相应反应的标准电极势差, n 为氧化-还原反应中传递的电子数目, F 为法拉第常数。

因以上所做的功为最大功, 所以也可以把它看成是自由能的变化, 即

$$W_{\max} = -\Delta G^0 = -n\Delta E_0' F \quad (14)$$

式中各符号含义同上, $-\Delta G$ 表示体系自由能降低的变化。利用以上公式即可由氧化-还原电势差计算出化学反应的自由能变化。

在生物化学反应中, 这种自由能变化意味着一个体系能够转移电子的能力。

(四) 标准电动势和平衡常数的关系

标准电动势和平衡常数的关系可根据平衡常数和标准自由能的关系以及标准电动势和标准自由能的关系导出。可表示如下:

$$\epsilon_0 = \Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \ln K_{\text{eq}} = 2.3 \frac{RT}{nF} \lg K_{\text{eq}} \quad (15)$$

式中的对数关系表明电势的微小变化都将引起平衡常数的很大变化。在 25°C 下若 $n = 2$ 时, 一个能够进行到 99% 的反应 ($K_{\text{eq}} = 100$) 只需 118 mV 的电势

在实际反应条件下, 如果反应物和产物都不是 1 摩尔, 则需根据能斯特方程即(8)式求出反应的电动势。

机体中的许多反应都是靠电动势推动的, 例如, 在细胞表面发生的许多反应就往往是靠电势差推动的。细胞或细胞器表面的脂质膜不能使游离电子自由通过, 这就形成了一种膜内的离子梯度, 从而产生了电势。跨膜电势即可提供一种能量, 使膜上的反应得以进行。这方面的问题不在此作详细讨论。

二、电子传递和氧化呼吸链

(一) 电子传递过程

需氧细胞内糖、脂肪、氨基酸等通过各自的分解途径, 所形成的还原型辅酶, 包括 NADH 和 FADH_2 通过电子传递途径被重新氧化。还原型辅酶上的氢原子以质子形式脱下, 其电子沿着一系列的电子载体转移, 最后转移到分子氧。质子和离子型氧结合而成水。在电子传递过程中释放出的大量自由能则使 ADP 磷酸化生成 ATP。

还原型的辅酶通过电子传递再氧化。它脱下的电子经过一整套电子传递途径。电子传递过程包括电子从还原型辅酶通过一系列按照电子亲和力递增顺序排列的电子载体所构成的电子传递链传递到氧的过程。这些电子载体都具有氧化-还原作用。电子传递和形成 ATP 的偶联机制称为氧化磷酸化作用。氧化磷酸化作用是电子在沿着电子传递链传递过程中所伴随的, 将 ADP 磷酸化而形成 ATP 的全过程。这个过程又称为氧化呼吸或呼吸代谢。

在电子传递过程中, 还原型辅酶借助氧分子得以氧化的过程可用下式表示:



上述反应式既表明氧化型辅酶的氧化, 氧的消耗, 又表明在此反应中有水的生成。细胞对其燃料物质的彻底氧化是形成 CO_2 和 H_2O 。 CO_2 是通过柠檬酸循环形成的; 水则是在电子传递过程的最后阶段生成。

上式所标明的标准自由能 ΔG^0 显示, 无论是 NADH 或 FADH_2 的氧化, 都有大量自由能的释放。表明它们所带的电子对, 都具有高的转移势能。它推动电子从还原型辅酶顺坡而下, 直到转移至分子氧上。同时在电子传递过程中由自由能降而释放出的自由能即用于合成 ATP。在葡萄糖的分解代谢中, 一分子葡

葡萄糖共生成 10 个 NADH 和 2 个 FADH_2 。它们的标准自由能为 $10(52.6) + 2(43.4) = 2564.8 \text{ kJ/mol}$ (613 kcal/mol) 在燃烧时,一个葡萄糖分子可释放出 2870.23 kcal/mol (686 kcal/mol) 的热,因此可推算葡萄糖分子所释放自由能的 90% 都贮存在还原型辅酶中。随后细胞再进一步利用。据计算,还原型辅酶所释放的自由能超过 3 个 ATP 的自由能含量,这有利于推动电子的传递。在此过程中,能量的逐步释放,有利于 ADP 形成 ATP; 特别是有利于形成并维持跨膜电势。

电子传递链在原核细胞存在于质膜上,在真核细胞存在于线粒体的内膜上。

在电子传递过程中,电子的传递仅发生在相邻的传递体之间,它的传递方向取决于每个电子所具有的电化学势能的大小。电子传递还伴有 H^+ 的结合和释放,通过这种步骤,使 H^+ 能定向转移,通过 H^+ 的定向转移维持质子的跨膜电势,从而推动 ATP 的合成。

前面已经提到根据各种氧化-还原电对的 E'_0 值,可以判断电子流动的方向,但是必须有催化剂或酶来催化反应才能发生。催化剂或酶的作用并不能改变电子流动的方向。电子的流动方向总是由电负性较强的氧还电对流向具有更强电正性的氧还电对。例如, NADH/NAD^+ 的 $E'_0 = -0.32 \text{ V}$, 还原型细胞色素 c/氧化型细胞色素 c 的 $E'_0 = +0.235 \text{ V}$ 。电子将从 NADH/NAD^+ 流向氧化型细胞色素 c。结果使 NADH 氧化为 NAD^+ , 而氧化型细胞色素 c 还原为还原型细胞色素 c; 又因 $\text{H}_2\text{O}/1/2\text{O}_2$ 电对的 $E'_0 = +0.815 \text{ V}$, 所以电子的流向一定是从还原型细胞色素 c 到氧。电子从电负性流向电正性系统是伴随着自由能降低的方向流动。在两个氧还电对之间,当电子从电负性电对流向电正性电对时,标准电势之差越大自由能的丢失也越大。如果一对电子从 NADH 转移到氧。它的标准自由能变化可根据公式(8)求出即:

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E'_0$$

NADH/NAD^+ 电对的标准电势 $E'_0 = -0.32 \text{ V}$, $\text{H}_2\text{O}/1/2\text{O}_2$ 电对的 $E'_0 = +0.815 \text{ V}$ 。 n 为转移电子数, F 为法拉第常数 $= 23062 \text{ cal/Vmol}$ 。 E'_0 是电子供体和电子受体两个系统的标准电势差。

假设所有参加反应物质的浓度都是 1.0 mol/L 、反应条件是 25°C , $\text{pH} = 7$ 。则:

$$\Delta G^{\circ} = -2 \times 23062 \times [0.815 - (-0.32)] = -219.13 \text{ kJ} (-52.35 \text{ kcal})$$

公式 $\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E'_0$ 对计算电子传递链中的每一步电子传递的自由能变化是非常有用的。

(二) 呼吸链概念的建立

呼吸链概念的建立是由两个不同的研究途径经过几十年的研究,最后结合起来才构成了近代的呼吸链概念。

随着研究的不断开展。对呼吸链的理解也越来越深入,1900 年至 1920 年间,曾发现了催化脱氢作用的脱氢酶可以在完全没有氧的条件下,将底物的氢原子脱下,于是产生了氢激活作用的学说。Wieland 提出,氢的激活是生物氧化的主要过程,而氧分子不需要激活,即可与被激活的氢分子结合。1913 年 Warburg 发现,极少量的氰化物即能全部抑制组织和细胞对分子氧的利用,而氰化物对于脱氢酶并没有抑制作用。氰化物与铁原子可以形成非常稳定的化合物(如铁氰化物),于是提出生物氧化作用需要一种含铁的“呼吸酶”,这种呼吸酶起着激活分子氧的作用,氧的激活是生物氧化的主要步骤。后来匈牙利的科学工作者 A. Szent-Gyorgyi 将两种学说合并在一起,提出在生物氧化过程中氢的激活和氧的激活都是需要的。还提出在“呼吸酶”和脱氢酶之间起电子传递作用的是黄素蛋白类物质。1925 年 David Keilin 提出,细胞色素起着连续传递电子的作用。这时,对生物氧化的研究,越来越多地改用分离提纯的电子传递链碎片或组分在试管中进行重组研究的方法,为进一步阐明生物氧化问题开辟了广阔的前景。应该指出,直到现在有关呼吸链电子传递及 ATP 的生成机制还未全部阐明还有待进一步深入研究。

(三) 电子传递链

电子从 NADH 到 O_2 的传递所经过的途径形象地称为电子传递链,或称呼吸链(respiratory chain)。这条链主要由蛋白质复合体组成,大致分为 4 个部分,分别称为 NADH-Q 还原酶(NADH-Q reductase)、琥珀酸-Q 还原酶(succinate-Q reductase)、细胞色素还原酶(cytochrome reductase)和细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase)。它们的排列顺序和主要特点如图 24-2 和表 24-2 所示。

从表 24-2 中可看出,电子传递酶复合体的辅基有:黄素类(flavins)、铁硫集团(iron-sulfur clusters)、血红素(hemes)和铜离子(copper ions)、这些辅基都是电子载体。电子传递都通过与酶分子结合的辅基来完成。

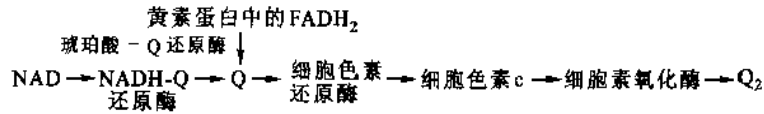
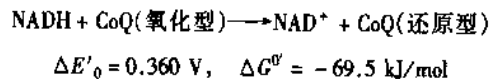


图 24-2 电子传递链中的电子载体及其顺序

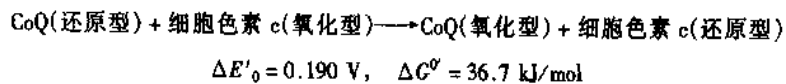
表 24-2 电子传递链的组分

酶复合体	相对分子质量	亚单位	辅基	氧化剂或还原剂			
				线粒体基质侧	碳氢核心	细胞溶胶侧	
复合体 I	NADH-Q 还原酶	880	≥ 34	FMN Fe-S	NADH	Q	
复合体 II	琥珀酸-Q 还原酶	140	4	FAD Fe-S	琥珀酸	Q	
复合体 III	细胞色素还原酶			血红素 b-562 血红素 b-566 血红素 c ₁		Q	细胞色素 c
复合体 IV	细胞色素氧化酶	160	10	Fe-S 血红素 a 血红素 a ₃ Cu _A 和 Cu _B			细胞色素 c

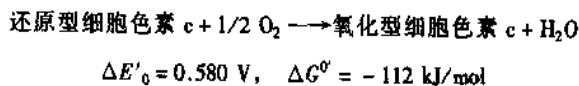
辅酶 Q (coenzyme-Q), 又称泛醌(ubiquinone), 简称为 Q. ubiquinone 的命名是因为它广泛存在于具有呼吸作用的生物体内, 采用了英文“ubiquity”(是普遍存在的意思)的字头。它是疏水的醌(quinone)化物, 在线粒体内膜内部扩散迅速。辅酶 Q 在电子传递中的作用是将电子从 NADH-Q 还原酶(复合体 I, complex I)和琥珀酸-Q 还原酶(复合体 II, complex II)转移到细胞色素还原酶(复合体 III, complex III)上, 反应式如下:



细胞色素还原酶(复合体 III)借助于细胞色素 c(cytochrome c), 使还原型 CoQ 再氧化, 反应式如下:

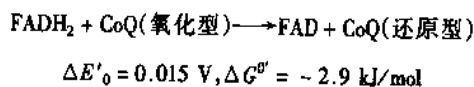


细胞色素氧化酶(复合体 IV)催化由氧使还原型细胞色素 c 氧化的反应式如下:



当电子对连续地通过复合酶 I、III 和 IV 时, 其标准还原势的变化在这三个阶段都释放出足够的自由能提供给 ATP 的形成。

复合酶 II 的作用是借助 CoQ 催化 FADH₂ 的氧化。反应式如下:



这一步氧化-还原反应所释放的自由能不足以形成 ATP, 它的作用只是将 FADH₂ 的电子脱下并注入到电子传递链中。

合成 ATP 所需要的自由能就是靠上述电子传递链的 4 种酶复合体将 NADH 和 FADH_2 所携带的电子从标准还原势较低的成员传递到较高的成员所释放的自由能得来的。这个过程的全貌还可用详图 24-3 表示。

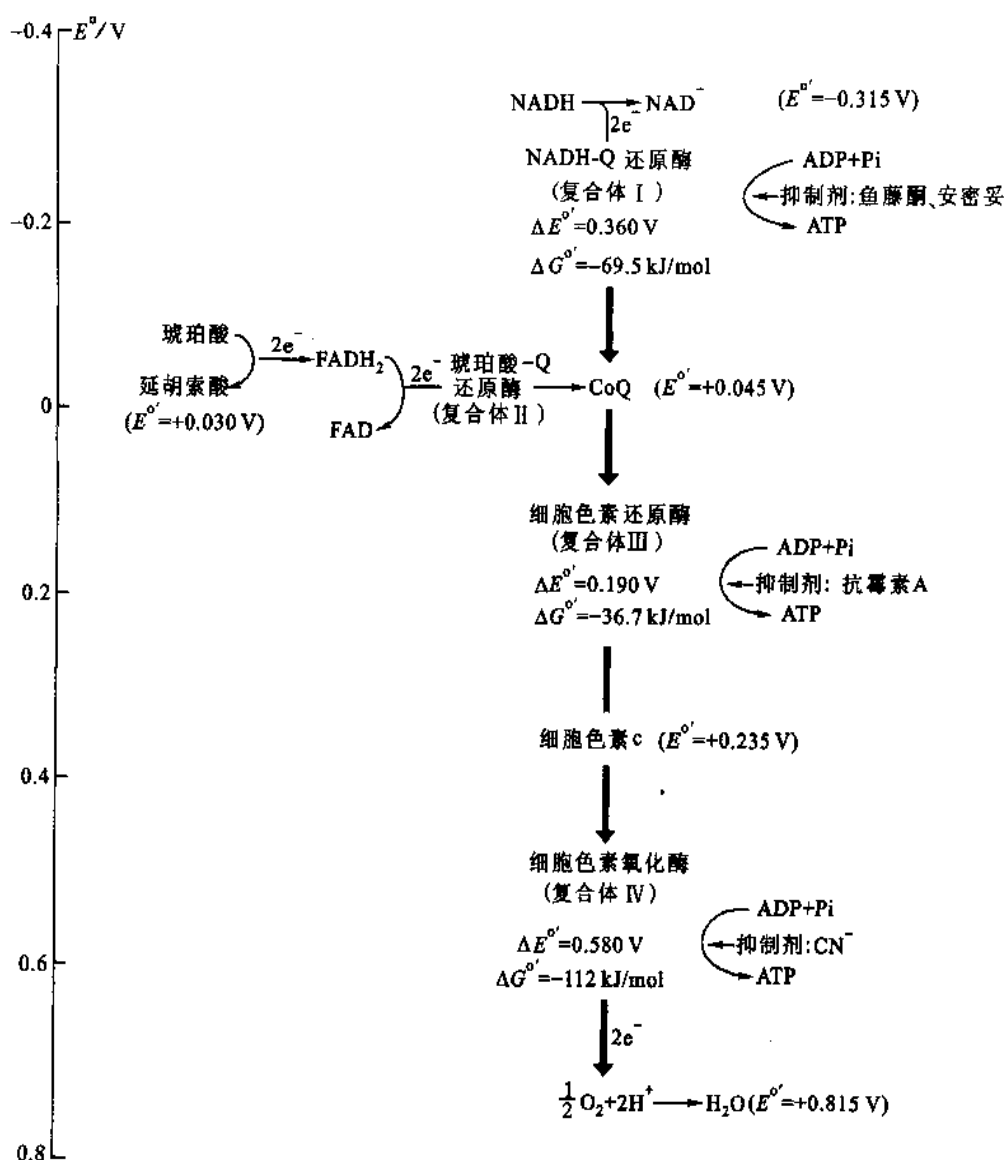


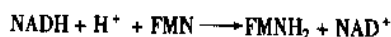
图 24-3 电子传递链标准氧化还原势自由能变化和 ATP 合成部位示意图

(四) 电子传递链各个成员

1. NADH-Q 还原酶

NADH-Q 还原酶又称为 NADH 脱氢酶 (NADH dehydrogenase), 简称为复合体 I (complex I), 是一个具有相对分子质量 88 000 的大蛋白质分子, 至少包含有 34 条多肽链。分别由核和线粒体两个不同的基因组编码构成。在电子传递链中共有 3 个质子泵 (proton pump), 该酶是第一个质子泵。

该酶的作用是先与 NADH 结合并将 NADH 上的两个高能电子转移到 FMN 辅基上, 使 NADH 氧化, 并使 FMN 还原, 反应如下:



FMN 既可接受两个电子形成 FMNH_2 , 又可接受一个电子, 或由 FMNH_2 给出一个电子形成一个稳定的半醌中间产物, 反应如图 24-4 所示。

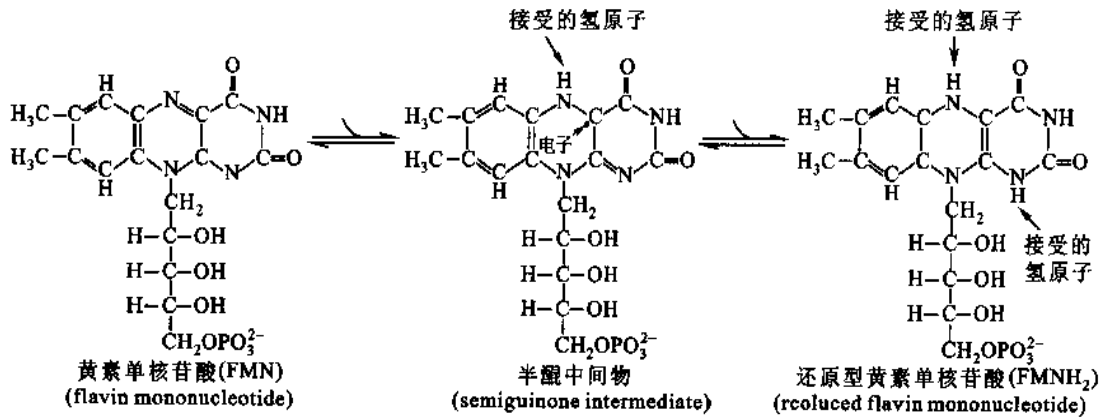


图 24-4 黄素单核苷酸形成还原型黄素单核苷酸中间形成半醌中间物

NADH-Q 还原酶辅基 FMNH₂ 上的电子又转移到铁硫聚簇(iron-sulfur clusters)上,铁-硫聚簇的符号是 Fe-S。它是 NADH-Q 还原酶的第二种辅基。Fe-S 聚簇与蛋白质相结合称为铁-硫蛋白,又称非血红素铁蛋白(nonheme iron proteins)。这种铁-硫蛋白在生物系统的许多氧化-还原反应中起着关键性的电子传递作用。铁-硫聚簇有几种不同的类型,有的只含有一个铁原子[FeS],有的含有两个铁原子(2Fe-2S),有的含有 4 个铁原子(4Fe-4S)。只有一个铁原子的铁-硫聚簇其铁原子以四面体形式与蛋白质的 4 个半胱氨酸残基上的(-SH)配位相连。含有两个铁原子的[2Fe-2S],每个铁原子分别与两个半胱氨酸残基的-SH 相连。此外两个铁原子又同时与两个无机硫原子相连。含有 4 个铁原子的铁-硫聚簇[4Fe-4S],其 4 个铁原子除每个铁原子各与一个半胱氨酸残基的-SH 相连外,每个铁原子还与聚簇中的 4 个无机硫原子的 3 个相连。三种类型的铁-硫聚簇可用图 24-5 表示铁-硫关系。

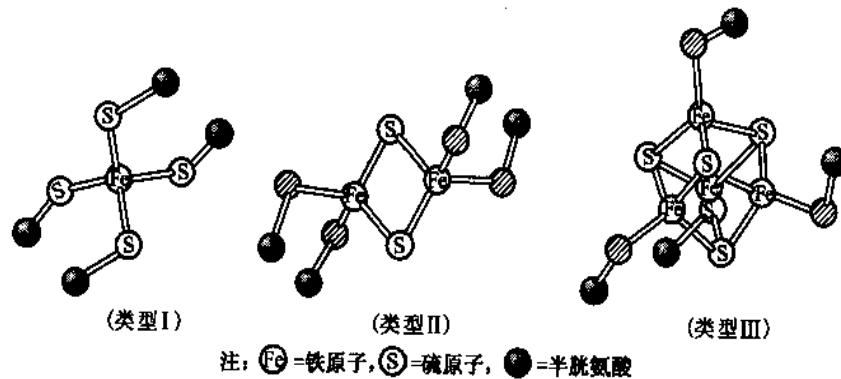


图 24-5 三种类型铁-硫聚簇的铁原子与硫原子关系示意图

2. 辅酶 Q

辅酶 Q(CoQ)又称泛醌,有时简称为 Q。是脂溶性辅酶。在线粒体内膜中是一种均一的流动库,可以结合到膜上,也可以游离状态存在。它以不同的形式在电子传递链中起传递电子的作用。它不只接受 NADH-Q 还原酶脱下的电子和氢原子,还接受线粒体其他黄素酶类脱下的电子和氢原子。如琥珀酸-Q 还原酶、脂酰-CoA 脱氢酶(acyCoA dehydrogenase)以及其他黄素酶类脱下的电子和氢原子。可以说 CoQ 在电子传递链中处于中心地位。它在呼吸链中是一种和蛋白质结合不紧密的辅酶。这使它在黄素蛋白类和细胞色素类之间能够作为一种特殊灵活电子载体起作用。电子传递复合体和 CoQ 等在可流动的线粒体脂双层中的局部扩散和碰撞是呼吸链电子传递的前提和条件。

辅酶 Q 有以异戊二烯(isoprene)为单位构成的长碳氢链,在不同生物中长度不同。哺乳动物中最常见的是具有 10 个异戊二烯单位的长链,简称为 Q₁₀,为了简便也往往省略“10”这个脚注。在非哺乳类动物中可能只有 6-8 个异戊二烯单位。Q 的异戊二烯碳氢长链称为类异戊二烯(isoprenoid)链。它的作用是使 Q 成为非极性化物,使其在线粒体内膜的脂双层中可以迅速扩散。

CoQ 和 FMN 都是 NADH - CoQ 还原酶的辅酶。CoQ 和 FMN 一样,都能够接受或给出一个或者两个电子,因为它们都有稳定的半醌形式如图 24 - 6 所示。

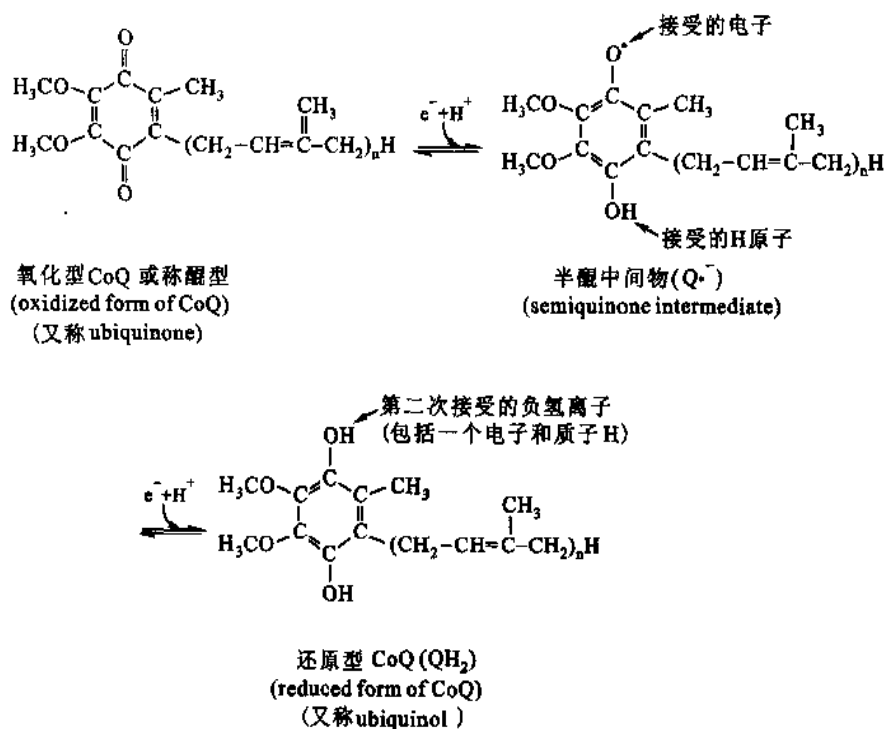


图 24 - 6 辅酶 Q 形成还原型辅酶 Q 中间经过半醌中间物

3. 琥珀酸 - Q 还原酶

琥珀酸 - Q 还原酶又称为复合体 II,它是嵌在线粒体内膜的酶蛋白。完整的酶还包括柠檬酸循环中使琥珀酸氧化为延胡索酸的琥珀酸脱氢酶。FADH₂ 作为该酶的辅基在传递电子时并不与酶分离,只是将电子传递给琥珀酸脱氢酶分子的铁 - 硫聚簇。这个铁 - 硫聚簇含有 2Fe - 2S, 3Fe - 3S 和 4Fe - 4S。电子经过铁 - 硫聚簇又传递给 CoQ,从而进入了电子传递链。琥珀酸 - Q 还原酶的 CoQ 辅基和 NADH 还原酶中的辅基已证明具有完全相同的结构和性质。

琥珀酸 - Q 还原酶以及其他的酶,将电子从 FADH₂ 转移到 CoQ 上的标准氧还电势变化不能产生足够的自由能以合成 ATP。因此,这一步反应没有 ATP 的形成。但是,这一步反应的重要意义在于,它保证 FADH₂ 上的具有相对高转移势能的电子进入电子传递链。

4. 细胞色素还原酶

细胞色素还原酶的名称多种多样,又称复合体 III,辅酶 Q - 细胞色素 c 还原酶 (coenzyme Q - cytochrome c reductase)、细胞色素 bc₁ 复合体 (cytochrome bc₁ complex) 或简称 bc₁ 等。

细胞色素是一类含有血红素 (heme) 辅基的电子传递蛋白质的总称。因含有血红素所以显红色或褐色。细胞色素这一名称也是因为它们有颜色而得名。还原型细胞色素具有明显的可见光谱吸收现象。可看到 α 、 β 和 γ 三条光谱吸收带或称 α 、 β 、 γ 吸收峰。 γ 光谱带又称为索瑞氏 (soret) 光谱带。 α 峰的吸收波长随细胞色素种类的不同各有特异的变化。这是区别细胞色素种类的重要指标。氧化型的细胞色素看不到有吸收峰的存在。

细胞色素在细胞呼吸中的重要作用前面已经提到是 1925 年 David Keilin 最先发现的。他还根据吸收光谱的不同将细胞色素分为 a、b、c 三类。细胞色素几乎存在于所有的生物体内。只有极少数的专性厌氧微生物 (obligate anaerobes) 没有这类蛋白质。

不同的细胞色素又因为其血红素所处的环境不同,其 α 吸收峰的波长位置也有一些差异。例如,细胞色素还原酶 (复合体 III) 有两种细胞色素 b 类型的血红素:一种其最大吸收光谱在 562 nm,写作 b₅₆₂ 或

b_{560} , 或 b_H 或 b_K ; 另一种其最大吸收光谱在 566 nm, 写作 b_{566} 或 b_L 或 b_T 。这两种细胞色素 b 对电子的亲合力不同, 主要是因为环绕它们的多肽链环境不同。琥珀酸 - Q 还原酶(复合体 II) 已知含有细胞色素 b_{562} 。细胞色素的可见吸收光谱如图 24-7 所示。

不同细胞色素最大吸收峰的位置差异如表 24-3 所示。

表 24-3 不同细胞色素的最大吸收峰位置举例

细胞色素	波长/nm		
	α	β	γ
a	600		439
b	566		
b	562	532	429
c	550	521	415
c_1	554	524	418

不同组的细胞色素其分子内卟啉环上的取代基团各不相同。这与铁原子的氧化-还原活性是相关的。b 类型细胞色素的血红素是铁-原卟啉 IX (protoporphyrin IX)。铁-原卟啉 IX 也存在于血红蛋白和肌红蛋白分子中, 这种血红素又称为 b 型血红素。c 类型细胞色素的血红素和铁-原卟啉 IX 的区别是血红素上的乙烯基(vinyl groups)通过其双键与蛋白质的半胱氨酸(Cys)的巯基作用, 形成硫醚键与蛋白质相连。铁-原卟啉 IX 的结构(b 型血红素)和细胞色素 c 类型(c 型血红素)的结构如图 24-8 所示。

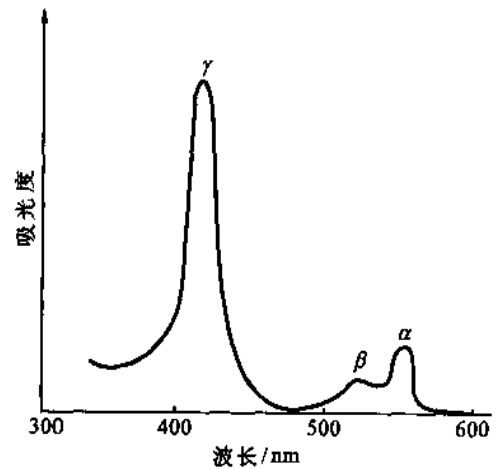
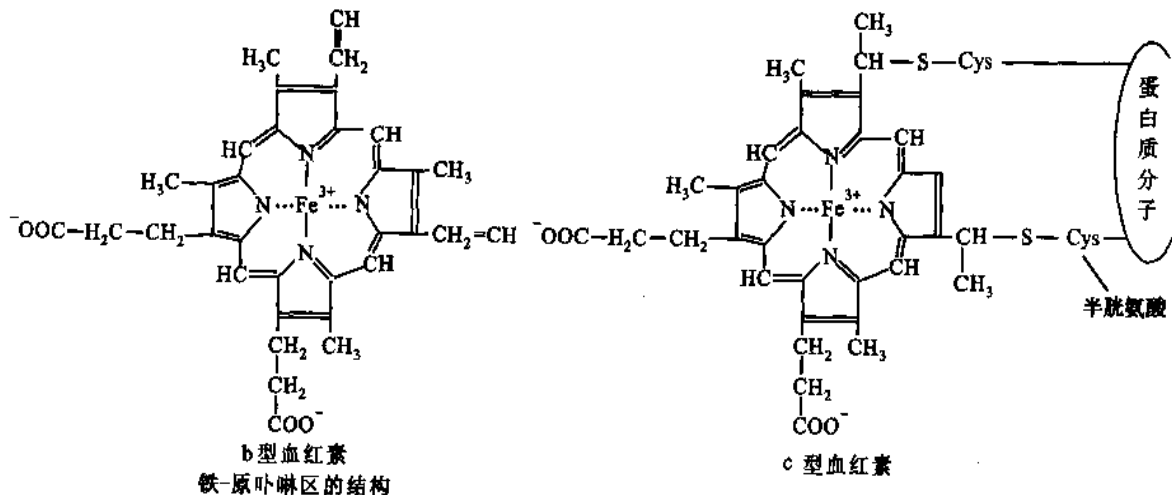


图 24-7 还原型细胞色素 c 的光吸收峰

细胞色素还原酶除含有细胞色素 b 外, 还含有 2Fe-2S, 构成铁-硫蛋白的铁-硫中心, 此外还含有细胞色素 c_1 。细胞色素 b 在细胞色素还原酶中以游离形式存在, 而细胞色素 c_1 则是以共价键与蛋白质相连。细胞色素还原酶的一部分模



在铁-原卟啉区结构基础上血红素的一 $\text{CH}=\text{CH}_2$ 与蛋白质分子半胱氨酸的 $-\text{SH}$ 基作用形成硫醚键与蛋白质相连

图 24-8 b 类型细胞色素和 c 类型细胞色素血红素的基本结构及差异

式可用图 24-9 表示。

细胞色素还原酶在线粒体内膜的排列是不对称的。细胞色素 c_1 和铁-硫蛋白(又名 Rieske 铁-硫蛋

白)都位于线粒体内膜的外表面。而两种细胞色素 b(b_{562} 、 b_{566})都只与一条肽链相关联(associated)。根据编码细胞色素 b 的线粒体 DNA 序列推测,不同种来源细胞色素 b 的多肽链,其氨基酸数目都在 380 到 385 之间,并表现出氨基酸序列上的高度一致。估计细胞色素 b 的多肽链有 9 次跨线粒体膜的弯曲,每两个弯曲之间是大于 20 个氨基酸的以疏水残基占优势的伸展多肽链。它们可能以稳定的 α 螺旋形式跨越脂双层膜。细胞色素还原酶的两个血红素可能是以配位的形式与 4 个组氨酸(His)残基相连。4 个组氨酸残基在肽链中的位置也已经被推测出来。

细胞色素还原酶血红素辅基的铁原子,在电子传递中发生可逆的 2 价 Fe^{2+} 和 3 价 Fe^{3+} 的价态变化。在电子传递链中细胞色素还原酶的作用是催化电子从 QH_2 转移到细胞色素 c。

5. 细胞色素 c

细胞色素 c 是一个相对分子质量为 13 000 的较小球形蛋白质,直径为 3.4 nm,由 104 个氨基酸构成一条单一的多肽链。它是唯一能溶于水的细胞色素。它的分子结构包括氨基酸序列及三维空间结构都已经得到阐明。是了解最透彻的细胞色素蛋白质。

细胞色素 c 的铁原子与甲硫氨酸残基的硫原子和组氨酸残基的氮原子相连接。它的血红素基团由数个赖氨酸残基形成环状所包围。这些赖氨酸残基受到细胞色素还原酶和细胞色素氧化酶的保护。这两种酶蛋白中的带负电荷部位与细胞色素 c 多个赖氨酸的 ϵ -氨基的正电荷相互吸引,从而使细胞色素 c 的赖氨酸残基形成的环状位置具有极大的稳定性。这部分结构被认为是细胞色素 c 的结合部位。

在细胞溶胶中的细胞色素 c 称为无血红素细胞色素 c(apocytochrome c)和成熟的细胞色素 c 的氨基酸序列完全相同,只是没有血红素基团。这种无血红素细胞色素 c 可以通过线粒体外膜蛋白通道自由地扩散穿过线粒体外膜。当无血红素细胞色素 c 跨过线粒体外膜进入线粒体内膜的间隙后,细胞色素 c 合成酶(cytochrome c synthetase)又称细胞色素 c 血红素裂合酶(cytochrome c hemelyase)。将血红素与蛋白分子结合,血红素引起细胞色素 c 蛋白分子发生构象变化,使细胞色素 c 不再能穿过线粒体外膜,被“锁”在线粒体内外膜的间隙。

细胞色素 c 交互地与细胞色素还原酶(复合体 III)的细胞色素 c_1 和细胞色素氧化酶(复合体 IV)接触,起到在复合体 III 和 IV 之间传递电子的作用。

细胞色素 c 接受由复合体 III 传递来的电子不是简单地一次完成的,而是分为两个阶段。在第一阶段,还原型辅酶 Q 所具有的两个高势能电子中的一个电子转移到细胞色素还原酶的铁-硫聚簇,再经过细胞色素 c_1 传递到细胞色素 c。换句话说, QH_2 失去了一个电子转变为半醌阴离子,即 $Q^{\cdot-}$ 。半醌中间体上的电子迅速地通过细胞色素还原酶中的血红素 b_L (b_{566}),它位于膜的靠近细胞溶胶的部位,然后又转移到对电子具有较高亲和力的血红素 b_H (b_{562}),它位于膜的靠近线粒体基质的部位。半醌阴离子 $Q^{\cdot-}$ 失去电子后形成 Q。Q 在线粒体膜内处于自由流动状态。血红素 b_H 上的电子又转移到流动在接近细胞溶胶一边的 Q 分子上,于是又形成了一个半醌阴离子 $Q^{\cdot-}$ 。

在第一阶段参与电子转移的 QH_2 通过上述过程只将一个电子传递给细胞色素 c。另外一个电子使 QH_2 变成了半醌阴离子 $Q^{\cdot-}$ 。 $Q^{\cdot-}$ 并不是继续转移其所荷电子,而是由另一分子 QH_2 作为第二个阶段通过上述相同的途径,将一个电子转移到细胞色素还原酶的铁-S 聚簇,再经过细胞色素 c_1 传递到细胞色素 c。而这个 QH_2 分子上剩余的一个电子又使它形成了一个新的半醌阴离子 $Q^{\cdot-}$,这个半醌阴离子上的电子又传递给 b_L 和 b_H 。但这次 b_H 上的电子并没有传递给 Q 分子,而是传递给相应位置的半醌阴离子,这就使半醌阴离子又形成了 QH_2 。

总结起来,两个 QH_2 参与电子传递,使两个细胞色素 c 还原,经过全过程又产生了一个 QH_2 分子。因

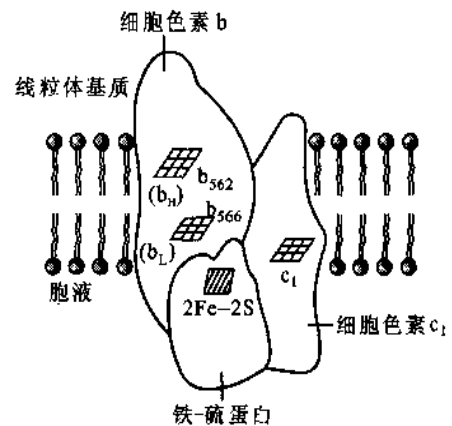


图 24-9 细胞色素还原酶的部分结构模式

此从化学反应计算是一个 QH_2 分子的两个电子分别传递给 2 分子细胞色素 c。这种通过辅酶 Q 的电子传递方式称为 Q 循环。通过上述的方式使电子由携带两个电子的载体—— QH_2 转移给携带一个电子的载体——细胞色素 c。这有利于电子的有效利用。上述的电子传递过程可用图 24-10 表示。

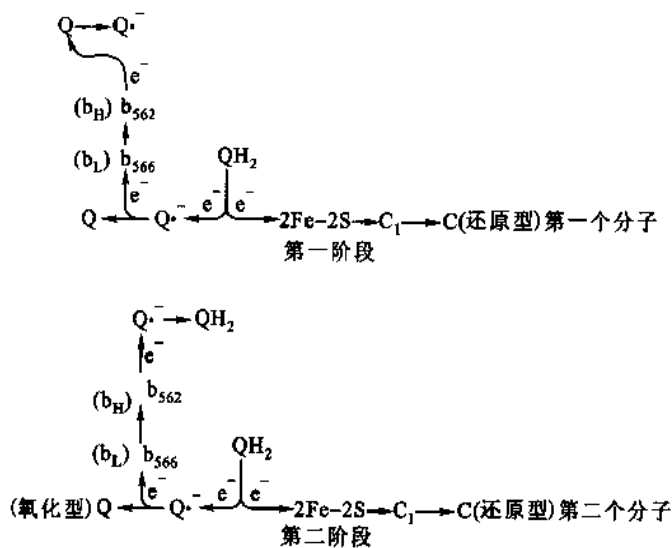


图 24-10 从细胞色素还原酶到细胞色素 c 的电子传递途径

图中表明细胞色素还原酶接受了两个 QH_2 分子上的电子, 分别将每个 QH_2 上的一个电子传递给两个细胞色素 c 分子; 每个 QH_2 上带有另一个电子, 分别形成两个半醌中间体 ($\text{Q}^{\cdot-}$) 分子。随后, 两个半醌中间体上的电子, 分别走了两条传递途径: 一条是电子经细胞色素 b ($\text{b}_{566} \rightarrow \text{b}_{562}$) 传递给一个氧化型 Q 分子, 结果形成一个半醌中间体分子; 另一条是电子经细胞色素 b ($\text{b}_{566} \rightarrow \text{b}_{562}$) 传递给另一个半醌中间体分子, 结果又形成一个 QH 分子

6. 细胞色素氧化酶

细胞色素氧化酶又称为细胞色素 c 氧化酶 (cytochrome c oxidase)、复合体 IV (complex IV)。

哺乳动物细胞色素氧化酶的相对分子质量大约为 20 万, 是嵌在线粒体内膜的跨膜蛋白, 其结构如图 24-11 所示。

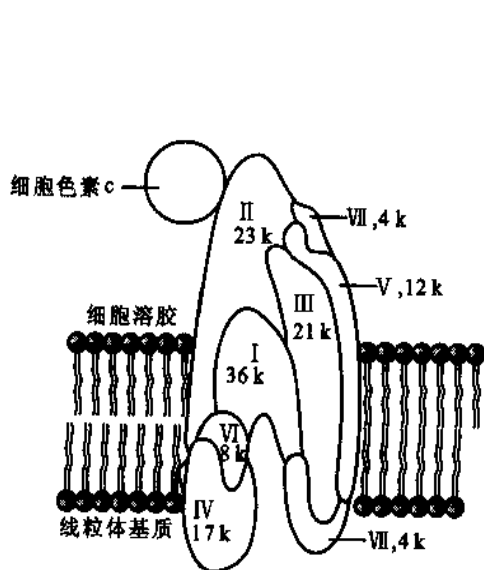


图 24-11 细胞色素氧化酶结构示意图

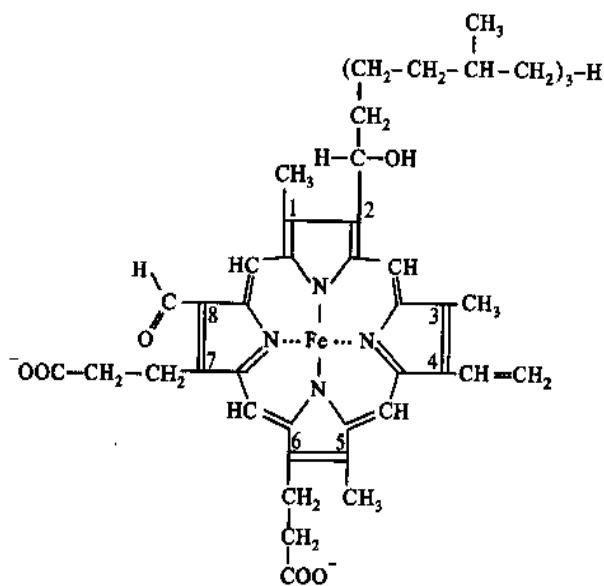


图 24-12 血红素 a 的结构图

血红素 a (或血红素 A) 是细胞色素氧化酶的铁卟啉结构。它与其他血红素的区别是有一个甲酰基取代了一个甲基而且有一个长达 17 个碳的碳氢链

细胞色素氧化酶由 10 个亚基构成,分别称为 I、II、III…。其中最大的和疏水性最强的三个亚基都是编码在线粒体 DNA 上。这些亚基总共有 18 个疏水段,形成类似于细胞色素 b 的跨膜螺旋(membrane-spanning helices)。该酶共有 4 个氧化-还原活性中心,都集中在亚基 I 和亚基 II 上。这 4 个氧化-还原活性中心是两个 a 型血红素和两个铜离子。两个血红素中一个是血红素 a,另一个称为血红素 a₃。血红素 a 类和其他血红素的不同点是①由一个甲酰基(formyl group)取代一个甲基,②由一个 15 碳原子长的碳氢链取代乙烯基(vinyl group),③血红素和蛋白质不是以共价键相连。两个血红素 a 分子虽然在化学结构上完全相同,但因处于细胞色素氧化酶的不同部位,它们具有不同的性质。因此一种命名为血红素 a,另一种命名为血红素 a₃。两个 Cu 离子分别称为 Cu_A(或 Cu_a)和 Cu_B(或 Cu_b),也是由于它们所结合的蛋白质不同,其性质也有差异。Cu_A 的势能较低(~0.24 V),Cu_B 的势能较高(~0.34 V)。血红素 a 位于亚基 II 与 Cu_A 接近,血红素 a₃ 位于亚基 I 与 Cu_B 接近。它们依次为:血红素 a-Cu_A 聚簇(heme a-Cu_A cluster)和血红素 a₃-Cu_B 聚簇(heme a₃-Cu_B cluster)或称血红素 a-Cu_A 中心,血红素 a₃-Cu_B 中心。细胞色素氧化酶的氧化-还原单位即认为是细胞色素 a 和 a₃。它们依次位于第 II 亚基和第 I 亚基。Cu_A 是通过两个半胱氨酸(Cys)和一个组氨酸(His)残基还有另外一个氮原子相连,此外还与细胞色素 c 的结合部位相连。血色素 a₃ 和 Cu_B 之间可能通过一个硫(S)原子相连;铁原子和 Cu_B 原子可能就是 O₂ 的结合部位。如图 24-13 所示。

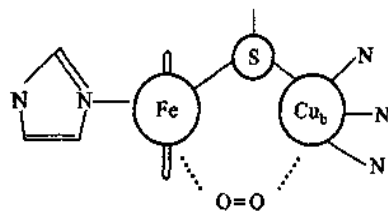


图 24-13 氧(O₂)在细胞色素氧化酶与细胞色素 a₃ 的铁原子和与其相邻的铜原子(Cu_B)的结合关系示意图

细胞色素氧化酶和细胞色素 c 的相互作用部位可能是数个天冬氨酸(Asp)或谷氨酸(Glu)残基,这些残基与前面提到的环绕细胞色素 c 血红素赖氨酸(Lys)残基构成的环相互作用。

细胞色素氧化酶接受和传递电子的顺序如下:先由还原型细胞色素 c 将所携带的电子传递给血红素 a-Cu_A 聚簇,然后再传递给血红素 a₃-Cu_B 聚簇。在这里 O₂ 经过一系列步骤最后生成 2 分子 H₂O。

分子氧是一个理想的最终电子受体。它对电子的强的亲和力保证了氧化磷酸化所需的热力学驱动力。还原型细胞色素 c 的第 1 个电子先传递给铜离子,使 Cu²⁺ 还原为 Cu⁺;第 2 个电子传递给铁离子,使 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺。这就使细胞色素氧化酶血红素的铁离子完全成为还原型,使它容易地与氧结合。被铁离子吸引的氧分别从 Fe²⁺ 和 Cu⁺ 上各吸引一个电子形成一种过氧中间体(peroxy intermediate)(图 24-14)。这个中间体又吸引一个电子和两个 H⁺ 形成另一个中间体,称为高铁中间体(ferryl intermediate)。(图 24-14)。在这一中间产物中,一个氧原子以 -2 价形式结合到 +4 价 Fe 原子上。另外一个氧原子则以 HOH 形式结合到 2 价 Cu 原子上。这个高价中间产物又接受一个电子和 2 个 H⁺,最后释放出 2 分子 H₂O。这种结合方式保证了 O₂ 和电子结合的过程中能够避免产生对细胞有害的化合物——O₂⁻,称为超氧化负离子(superoxide anion)。这种超氧化负离子 O₂⁻ 是 O₂ 接受一个电子形成的。细胞色素氧化酶催化的将 4 个电子与氧结合的过程可用图 24-14 表示。

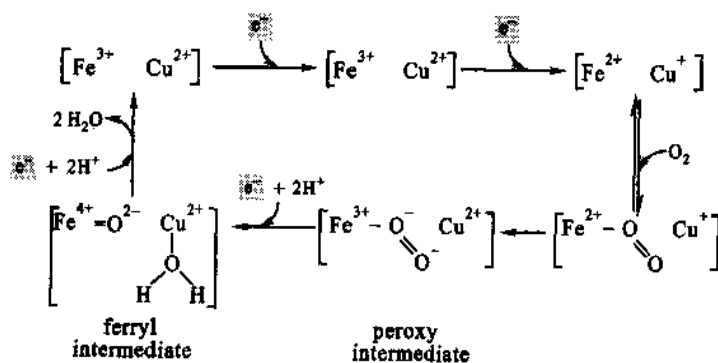


图 24-14 细胞色素氧化酶催化氧接受 4 个电子的过程

通过上述电子传递的全过程在最终产生 2 分子 H_2O 的同时,细胞色素氧化酶的铁原子和铜原子完成了一次循环,又回到原来的氧化态。

在上述电子传递过程中,电子在从过氧化物中间体到形成水的两步反应中是产生质子泵的部位,在此间当一对电子流经细胞色素氧化酶的同时,有 4 个质子跨越线粒体膜进入到细胞溶胶中。

(五) 电子传递的抑制剂

能够阻断呼吸链中某部位电子传递的物质称为电子传递抑制剂。利用专一性电子传递抑制剂选择性地阻断呼吸链中某个传递步骤,再测定链中各组分的氧化-还原态情况,是研究电子传递链顺序的一种重要方法。这种方法的原理正像连通管中的水位,越靠近出水管口越低,从入水到出水形成均匀的梯度;若连通水管中某一环节受阻,则在受阻部位以前的水管即充满水,而在受阻部位以后的水管,因无水继续补充而即将流空。

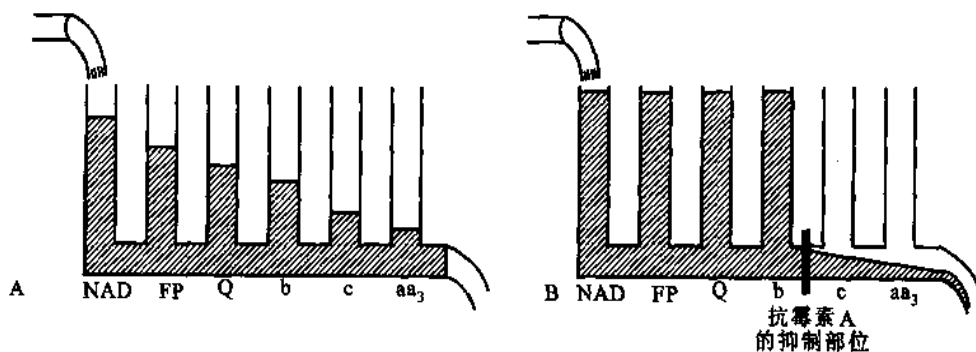
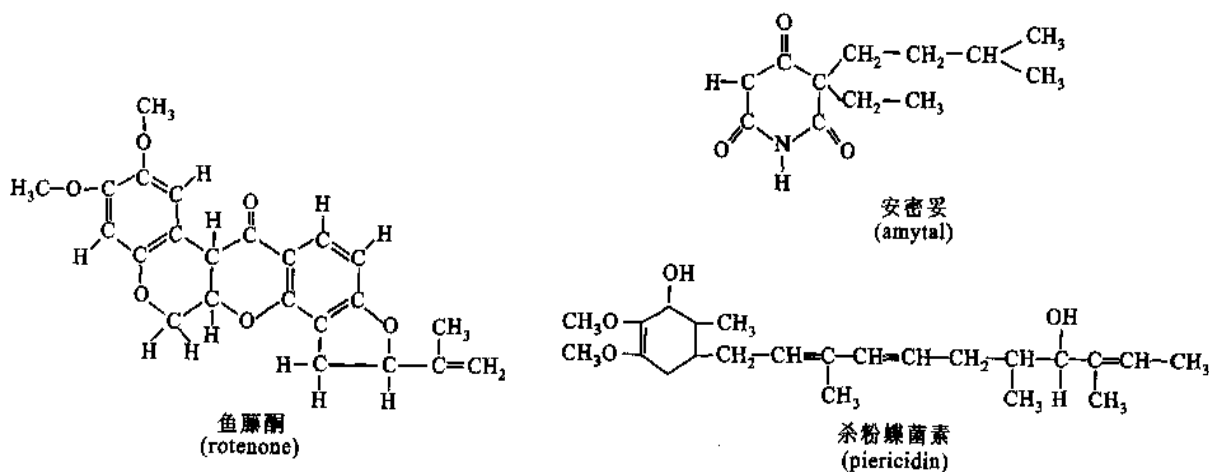


图 24-15 呼吸链的比拟图解

- A. 正常呼吸链正像流水在水管中畅流无阻,水面沿流向逐步降低
B. 被阻断后,在阻断部位前面的水管被水充满,后面则即将流尽

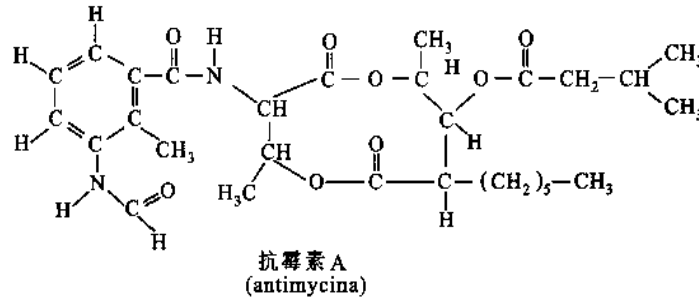
常见的抑制剂可列举以下几种:

① 鱼藤酮 (rotenone)、安密妥 (amytal)、杀粉蝶菌素 (piericidine)。它们的作用是阻断在 $NADH - Q$ 还原酶内的传递,因此阻断了电子由 $NADH$ 向 CoQ 的传递。鱼藤酮是一种极毒的植物物质,常用作重要的杀虫剂。几种抑制剂的结构如下:



② 抗酶素 A (antimycin A)。它是由链霉菌 (*streptomyces griseus*) 分离出的抗生素,有干扰细胞色素还原酶中电子从细胞色素 b_H 的传递作用,从而抑制电子从还原型 $CoQ(QH_2)$ 到细胞色素 c_1 的传递作用。抗酶素 A 的结构:

③ 氰化物 (cyanide, CN^-), 叠氮化物 (azide, N_3^-), 一氧化碳 (carbon monoxide, CO)。它们都有阻断电子



在细胞色素氧化酶中传递作用。氰化物和叠氮化物与血红蛋白 a₃ 的高铁形式 (ferric form) 作用,而一氧化碳则是抑制 a₃ 的亚铁形式 (ferrous form)。

上述的各种抑制剂对电子传递的抑制部位可用图 24-16 表示。

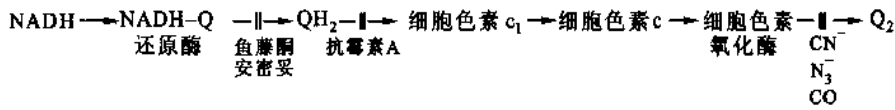


图 24-16 几种电子传递抑制剂的作用部位

三、氧化磷酸化作用

氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 是需氧细胞生命活动的主要能量来源,是生物产生 ATP 的主要途径。氧化磷酸化作用指的是与生物氧化作用相伴而生的磷酸化作用;是将生物氧化过程中释放的自由能,用以使 ATP 和无机磷酸生成高能 ATP 的作用。

真核生物的电子传递和氧化磷酸化都是在细胞的线粒体内膜发生的作用。原核生物则是在浆膜发生的。为了阐明真核细胞内氧化磷酸化进行的机制,有必要在讨论氧化磷酸化的机制之前对线粒体的结构作一些较深入的了解。

(一) 线粒体的结构

线粒体普遍存在于动、植物细胞内。是需氧细胞产生 ATP 的主要部位。各种类型的细胞有其特有的线粒体数目和特性,其数目可达到数百到数千。例如,鼠肝细胞大约有 800 个线粒体。细胞内线粒体的位置常处于需要 ATP 的结构附近,或处于细胞进行氧化作用所需燃料例如脂肪滴附近。昆虫飞翔肌细胞的线粒体规则地排列在肌原纤维周围,这有利于细胞对 ATP 的利用。在细胞溶胶中线粒体所占的比例相当可观,在肝细胞中占 20%,在心肌细胞中超过 50%。

线粒体的形状随不同种细胞而异。例如,褐色脂肪细胞的线粒体呈球状或近似球状,肝细胞的线粒体呈足球状,肾细胞的线粒体呈圆筒状。成纤维细胞的线粒体为线状。酵母细胞线粒体的形状极不规则,且带有长的突起。它的平均长度约为 1~2 μm,宽约为 0.1~0.5 μm。例如,鼠肝线粒体的长度为 2 μm,宽小于 1 μm。

线粒体的结构可由图 24-17 表示。

线粒体含有两层膜,中间有膜间隙。外膜平滑稍有弹性,大约由一半脂类和一半蛋白质构成,外膜的蛋白质含有线粒体孔道蛋白,构成外膜孔道,能通过相对分子质量小于 4 000~5 000 的物质,包括质子。内膜含有大约 20% 的脂和 80% (76%) 的蛋白质。它的蛋白质比例比细胞的其他任何膜含量都高。内膜是细胞溶胶和线粒体基质之间的主要屏障。内膜有许多向内的折叠称为嵴 (cristae)。嵴的数目和结构随细胞的类型不同而各不相同。嵴的存在大大增加了内膜的面积。这扩大了它产生 ATP 的能力。肝脏细胞线粒体内膜相当于外膜的 5 倍,线粒体内膜的总面积相当于细胞膜的 17 倍。心脏和骨骼肌线粒体的嵴

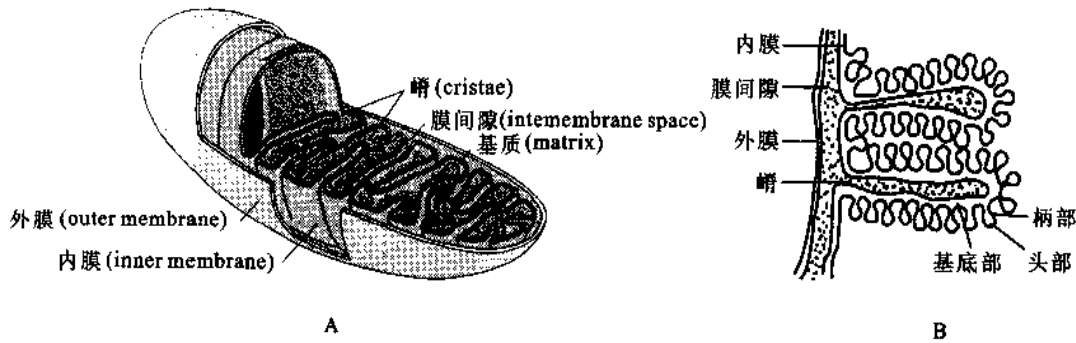


图 24-17 线粒体的结构

A. 线粒体的模式结构 B. 线粒体嵴上的球体示意图

相当于肝脏细胞嵴的 3 倍。这可能反映了肌肉细胞对 ATP 的大量需求。

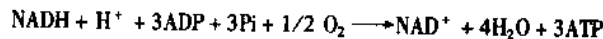
内膜嵴和嵴之间构成分隔的区室 (compartment)。区室中有胶状的基质 (matrix)。有的基质构成网状, 明显地附着在内膜的内表面。线粒体基质的体积和结构随着呼吸作用的进行不断地发生变化。用负染法和电子显微镜可观察到线粒体内膜的内表面是一层排列规则的球形颗粒 (图 24-17B)。球的直径为 8~9 nm, 并带有一细柄, 长约 5 nm, 宽约 3 nm, 与嵴相连。这种颗粒称为内膜球体 (inner membrane sphere), 只存在于线粒体内膜的内表面。内膜还含有许多富含蛋白质的跨膜颗粒。这些颗粒既包括有电子从 NADH 和 FADH_2 到 O_2 的电子传递链又在 ATP 的合成中起重要作用。有些颗粒是物质的跨膜运送者 (transporters)。因为有些分子例如 ADP、 P_i 以及 ATP 等都不能透过线粒体内膜, 这些颗粒能够使 ADP 和 P_i 从细胞溶胶通过它进入线粒体基质, 又能使 ATP 等分子从线粒体基质进入到细胞溶胶。含有约 20% 脂的内膜主要构成其磷脂双层。这大大降低了内膜对质子的通透性, 从而使形成一种跨线粒体内膜的质子动力 (proton-motive force) (质子泵, proton pump) 成为可能。

膜间隙与细胞溶液相接触, 也含有酶类, 如腺苷酸激酶 (adenylate kinase) 以及其他酶类。

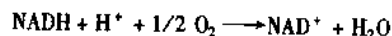
可以把线粒体内膜的功能概括为 3 个方面, 每种反应都限制在线粒体内膜的一定部位。第一方面是丙酮酸以及脂肪酸氧化为 CO_2 , 同时使 NAD^+ 和 FAD 还原为 NADH 和 FADH_2 。这是发生在线粒体基质或面向基质的内膜蛋白质上。第二方面是电子从 NADH 和 FADH_2 传至线粒体内膜上, 并同时形成跨膜质子泵。第三方面是将贮存于电化学质子梯度的能量由内膜上的 F_0F_1 ATP 酶 (F_0F_1 ATPase) 复合体合成 ATP。

(二) 氧化磷酸化作用机制

伴随电子从底物到氧的传递, ADP 被磷酸化形成 ATP 的酶促过程即是氧化磷酸化作用 (oxidative phosphorylation)。氧化磷酸化的全过程可用方程式表示如下:

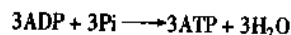


前面着重讨论了电子传递过程及在此过程中自由能的释放, 电子从 NADH 到 O_2 传递过程的化学反应式为:



这一反应所释放的自由能 $\Delta G^{\circ} = -220.5 \text{ kJ/mol}$ (-52.7 kcal/mol)

下面要讨论的是吸能反应, 也就是将电子传递过程中释放的自由能贮存于 ATP 的过程, 全过程的总反应式为:



这一吸能反应的标准自由能 $\Delta G^{\circ} = 3 \times 7.3 = +91.6 \text{ kJ/mol}$ ($+21.9 \text{ kcal/mol}$)

从上面的反应和计算表明, 3 个 ATP 分子的形成共劫获了电子由 NADH 传递到氧所释放出全部自由能的 42% ($21.9/52.7 \times 100\%$)。

前面已经提到, 氧化磷酸化作用和底物水平磷酸化作用有原则的区别。氧化磷酸化作用是指直接与

电子传递链相偶联的由 ADP 形成 ATP 的磷酸化作用,底物水平的磷酸化是指 ATP 的形成,直接由一个代谢中间产物(例如磷酸烯醇式丙酮酸)上的磷酸基团转移到 ADP 分子上的作用。

早在 1940 年 Ochoa S 等人最先测定了呼吸过程中 O_2 的消耗和 ATP 生成的关系。用组织匀浆(tissue homogenates)以及组织切片(tissue slices)表明,组织利用 O_2 的同时,ATP 含量随之增加,测定用放射性同位素标记的无机磷酸利用量即可得出 ATP 的合成量。实验证明,每消耗 1 个 O_2 分子约合成 3 个 ATP 分子。这个比例关系称为磷-氧比即 P/O 比。P/O 比又可以看作是当一对电子通过呼吸链传至 O_2 所产生的 ATP 分子数。从最早测出的 P/O 比值为 3 得到的启示认为电子由 NADH 到 O_2 的传递过程中,ATP 是在 3 个不连续的部位生成的。实验也证明,沿电子传递链确实有 3 个部位可以释放能量形成 ATP。当然,P/O 比值也有可能小于 3。比值的大小(不可能超过 3)根据电子进入电子传递链的位置。例如, $FADH_2$ (琥珀酸脱氢酶)的电子通过辅酶 Q 进入电子传递链,这时的 P/O 比值就是 2,而不是 3。

1. ATP 的合成部位

前面已经讨论过 ATP 的合成是在线粒体内膜由电子传递链将 NADH 和 $FADH_2$ 上的电子传递给氧的过程中释放出自由能供给 ATP 合成。其释放自由能的部位有三处:第 1 个部位是由复合体 I 将 NADH 上的电子传递给 CoQ 的过程,第 2 个部位是由复合体 III 执行的,将分子由 CoQ 传递给细胞色素 c 的过程,第 3 个部位是复合体 IV 执行的,将电子从细胞色素 c 传递给氧的过程。这三个部位也正是 ATP 合成的部位。但是,ATP 合成是一个复杂的过程。ATP 的合成是线粒体内膜上和电子传递完全不同的,另外的具有特殊装备的分子集群(molecular assembly)执行的。它是多种酶的复合体最初被称为线粒体 ATP 酶(mitochondrial ATPase)或称为 H-ATP 酶(H^+ -ATPase)。因为该酶最先发现的是它的水解反应而得名。但是它在线粒体内的真正作用是合成 ATP。为强调该酶的实际合成作用,现在普遍称为 ATP 合酶(ATP synthase),又称为复合体 V (complex V)。ATP 合酶和电子传递酶类(复合体 I - IV)完全不同。电子传递所释放出的自由能必须通过一种保留形式使 ATP 合酶能够利用。这种能量的保存和 ATP 合酶对它的利用称为能量偶联(energy coupling)或能量转换(energy transduction)。

2. 能量偶联假说

氧化磷酸化作用与电子传递相偶联已经不存在任何疑问。但是电子在传递链中究竟怎样从一个中间载体到另一个中间载体的过程中促使 ADP 磷酸化,还有许多未完全阐明的问题。共存在三种假说:化学偶联假说(chemical coupling hypothesis)、结构偶联假说(conformational coupling hypothesis)和化学渗透假说(chemiosmotic hypothesis)。现在已有越来越多的证据支持化学渗透假说。这三种假说的要点如下:

(1) 化学偶联假说 化学偶联假说是 1953 年 Edward Slater 最先提出的。他认为电子传递过程产生一种活泼的高能共价中间物。它随后的裂解驱动氧化磷酸化作用。这种例证可见于糖酵解作用中 ATP 的合成。甘油醛-3-磷酸被 NAD^+ 氧化释放的能量供给形成甘油酸-1,3-二磷酸的需要。甘油酸-1,3-二磷酸是一个活泼的具有高能磷酸基团的酰基磷酸化物。它的高能磷酸基团随后在磷酸甘油酸激酶的作用下转移给 ADP 而生成 ATP。虽然在糖酵解作用中可看到这种情况,但是在氧化磷酸化作用中一直未能找到任何一种活泼的高能中间产物。

(2) 构象偶联假说 这一假说是 1964 年 Paul Boyer 最先提出的。他认为电子沿电子传递链传递使线粒体内膜蛋白质组分发生了构象变化,形成一种高能形式。这种高能形式通过 ATP 的合成而恢复其原来的构象。这一假说和化学偶联假说一样,至今未能找到有力的实验证据。但是在 ATP 的合成过程中仍可能包含有不同形式的构象偶联现象。

(3) 化学渗透假说 这一假说是 1961 年由英国生物化学家 Peter Mitchell 最先提出的。他认为电子传递释放出的自由能和 ATP 合成是与一种跨线粒体内膜的质子梯度(proton gradient)相偶联的。也就是,电子传递的自由能驱动 H^+ 从线粒体基质跨过内膜进入到膜间隙,从而形成跨线粒体内膜的 H^+ 电化学梯度(electrochemical H^+ gradient)。这个梯度的电化学电势(electrochemical potential,用 $\Delta\mu_{H^+}$ 来表示)驱动 ATP 的合成。图 24-18 可作为化学渗透假说的示意图。

化学渗透假说可以解释许多关键的现象,得到许多实验证据。例如:

① 氧化磷酸化作用的进行需要封闭的线粒体内膜存在。

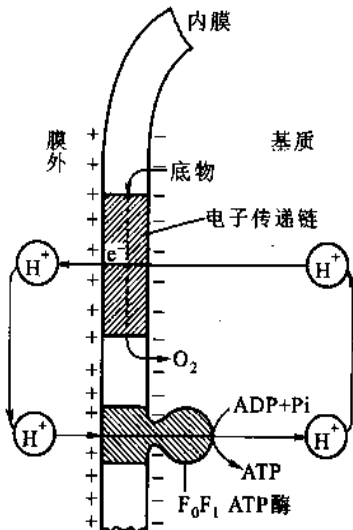


图 24-18 化学渗透假说示意图

图中表明电子传递链是一个 H^+ 离子泵(质子泵)使 H^+ 从线粒体基质排到内膜外,在内膜外面的 H^+ 浓度比膜内高,即形成一种 H^+ 浓度梯度,所产生的电势驱动 H^+ 通过 ATP 合成酶系统的 F_0F_1 ATP 酶分子上的特殊通道回流到线粒体基质,同时释放出自由能与 ATP 的合成相偶联

- ② 线粒体内膜对 H^+ 、 OH^- 、 K^+ 和 Cl^- 等离子都是不通透的。
- ③ 破坏 H^+ 浓度梯度的形成(用解偶联剂或离子载体抑制剂等)都必然破坏氧化磷酸化作用的进行。
- ④ 线粒体电子传递所形成的电子流能够将 H^+ 从线粒体内膜逐出到线粒体膜间隙。
- ⑤ 大量直接或间接实验证据表明,膜表面不仅能滞留大量质子,而且在一定条件下,质子沿膜表面迅速的转移,其速度超过在大量水相中的速度。

Michell 的化学渗透假说曾获得 1978 年的诺贝尔化学奖。迄今虽然能量偶联的具体分子机制尚未能完全阐明,但是跨膜质子电化学梯度产生的质子化学电势即 $\Delta\mu_{H^+}$ 和质子跨膜循环在能量偶联中起关键作用已经成为共识。

化学渗透假说需要线粒体内膜或亚线粒体囊泡(submitochondrial vesicles)(见后面叙述)的完整性。膜不完整则不能形成跨膜 H^+ 离子梯度。如果用解偶联(uncoupler)使线粒体膜对 H^+ 的通透性改变,增加它对 H^+ 的通透性, H^+ 离子梯度即不复存在,也就不存在能量偶联问题。已经证明, H^+ 从线粒体内膜基质逐出和由 ATP 合酶将膜外 H^+ 又吸收到膜内的速度是相当的。

虽然化学渗透假说能够解释氧化磷酸化过程的大部分问题,但仍有一些问题尚未得到完满地解决。例如 H^+ 究竟是怎样通过电子传递链而被逐出的,当前虽然已经有些设想,还有许多问题有待解决。

(三) 质子梯度的形式

电子传递使复合体 I、III 和 IV 推动 H^+ 跨过线粒体内膜到线粒体的间隙(图 24-19),线粒体间隙与细胞溶胶相接触。 H^+ 跨膜流动的结果造成线粒体内膜内部基质的 H^+ 浓度低于间隙。线粒体基质形成负电势,而间隙形成正电势,这样产生的电势梯度即电动势(electromotive force, emf)称为质子动势或质子动力(protonmotive force, pmf)。其中蕴藏着自由能即是 ATP 合成的动力。

1. 质子泵出是需能过程

一个质子逆电化学梯度跨过线粒体膜的自由能变化公式可以用 pH 表示如下式:

$$\Delta G = 2.3 RT[\text{pH}(\text{膜内}) - \text{pH}(\text{膜外})] + ZF \Delta \Psi$$

式中 Z 为质子的电荷(包括符号), F 为法拉第(faraday)常数, Ψ 为膜电势。 $\Delta \Psi$ 的符号习惯上是当一个电子从负转移到正时, $\Delta \Psi$ 为正值。线粒体内膜外的 pH 低于膜内的 pH, 因此质子从线粒体基质逆质子梯度转移到膜外是一个吸能过程。而且质子从基质出去后使内膜的内表面比外表面电负性更强。一个正离子(阳离子)向外转移必然使 $\Delta \Psi$ 为正值, 而且使自由能增加, 这就是需能过程。但是如果一个负离子被转移出去, 就会得到完全相反的结果。

2. 质子转移的机制有两种假设

电子传递链的 4 种电子传递复合体中的 3 种复合体即复合体 I、III 和 IV 都和质子转移有密切关系。

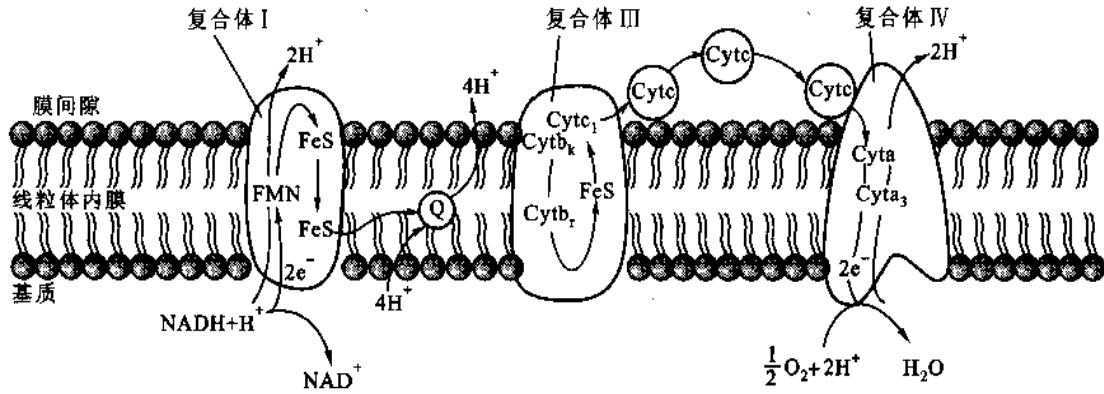


图 24-19 线粒体电子传递链图解表明电子传递和 H⁺ 排出的途径

质子主动转移和电子传递产生的自由能相偶联的机制当前存在两种假设：一种是氧化-还原回路机制 (redox loop mechanism), 另一种是质子泵机制 (proton pump mechanism)。

(1) 氧化-还原回路机制 该机制由 Mitchell 提出。可简称为氧-还回路。他认为线粒体内膜呼吸链的各个氧化-还原中心即 FMN、CoQ、细胞色素以及铁-硫聚簇的排列可能既能执行电子的转移, 又能转移基质的质子。前一个被还原的氧-还中心被后一个氧-还中心再氧化, 同时相伴而生是质子的转移, 包括质子由基质泵出和在线粒体内膜外的质子回流到基质一边。氧-还回路机制可用图 24-20 表示。

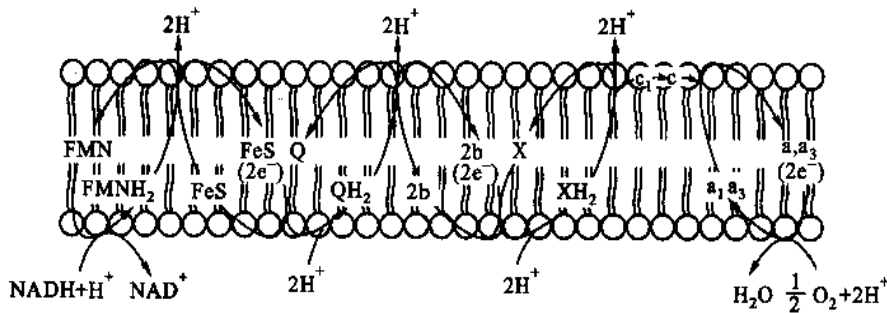


图 24-20 氧还-环机制示意图

线粒体内电子传递与质子转移相结合的设想 FMN 和 CoQ 起着 (H⁺ + e⁻) 载体的作用。铁-硫聚簇和细胞色素是单纯的 e⁻ 载体, 这些组分的排列既能满足电子传递又能伴有 H⁺ 的转移。在传递过程中应有一种 (H⁺ + e⁻) 的载体存在。图中的 X 应该是第 3 个 H⁺ 的转移部位

氧化-还原回路机制需要第 1 个氧化-还原载体处在还原态时比其氧化态含有更多的氢原子, 其第 2 个氧化-还原载体在氧化态和还原态时所含的氢原子没有差异。事实上 FMN 和 CoQ 在还原态时确实含有较多的氢原子, 因此可以起质子载体和电子载体的双重作用。如果这些中心专一地与细胞色素和铁-硫聚簇纯电子载体进行交换, 这种机制设想是可以成立的。图 24-20 即表示这种交换机制。

这种氧化-还原回路机制的主要问题是, 并没有发现一种 (H⁺ + e⁻) 的电子载体存在。15 个纯电子载体 (最多有 8 个铁-硫蛋白、5 个细胞色素和两个 Cu 原子) 中只有两个 (H⁺ + e⁻) 载体。而已知的是有 3 个部位能合成 ATP, 这表明, 至少应有 3 个质子转运部位。因此, 按此种机制设想必须有另外一个 (H⁺ + e⁻) X 载体存在 (图 24-20)。

为了解决上述的问题, Mitchell 曾提出一种设想, 即 CoQ 可能在复合体的质子转移中发挥两次作用, 即所谓 Q 循环。在 Q 循环中, CoQ 被认为是通过两个步骤还原。其中一个步骤就是半醌作为一个稳定的中间产物。如上所述, 通过复合体 III 中作用步骤, 就使得当每个电子从复合体 I 转移到细胞色素 c₁ 时转运两个质子成为可能。但是 Q 循环不能在复合体 IV 起作用, 因为复合体 IV 没有 (H⁺ + e⁻) 载体。虽然如此

它还是在电子传递过程中将质子从基质“泵”出到内膜外的细胞溶胶中。

(2) 质子泵机制 这个机制的内容是,电子传递导致复合体的构象变化。质子的转移是氨基酸侧链 pK 值变化产生影响的结果。构象变化造成氨基酸侧链 pK 值的改变,结果发挥质子泵作用的侧链暴露在外并交替地暴露在线粒体膜的内侧或外侧,从而使质子发生移位。这种系统即认为是质子泵的机制。

当前,以上两种机制虽然各自都有一些旁证,但尚未能在电子传递链本身得到完整的证据。

质子的跨膜转运和 ATP 形成机制是复杂的,也可能在一条电子传递链的不同部位的质子转运通过不同的机制。这正是当前引人注目的课题。

(3) 合成一个 ATP 需要 2~3 个跨膜质子 在生理条件下合成一个 ATP 分子所需自由能大约为 +40 ~ 50 kJ/mol。这个值不可能只需要由一个质子流回到线粒体基质的跨膜驱动力,至少需要两个质子。此值很难精确测得,因为被转移的质子还有一部分又漏回基质。测定的结果表明,每合成一分子 ATP 大约有 2~3 个质子跨膜。

(四) ATP 合成机制

ATP 的合成是由一个酶的复合体系完成的。这个复合体系称为 ATP 合酶(ATP synthase)由两个主要的单元(unit)构成,如图 24-21 所示。起质子通道作用(protonconducting)的单元称为 F_0 单元(F_0 右下角的注脚为英文的“o”字母而不是“零”)和催化 ATP 合成的单元称为 F_1 单元。因此,ATP 合酶又称为 F_0F_1 -ATP 酶(F_0F_1 -ATPase)。

研究质子动力如何用于合成 ATP 的模型是使用超声波制备的亚线粒体结构。

1. 亚线粒体结构

1960 年 Efraim Racker 发现用超声波处理线粒体,将其嵴打成碎片,这些碎片又自动重新封闭起来形成泡状体。这些泡状体称为亚线粒体泡(submitochondrial vesicles)。这种囊泡的特点是使原有朝向嵴内侧的线粒体内膜转变为翻转朝外的内膜如图 24-22 所示。

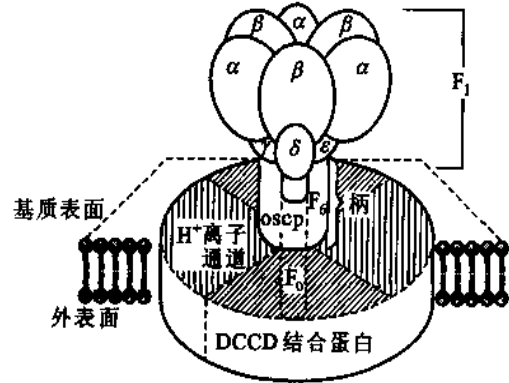


图 24-21 ATP 合酶结构示意图
该酶象一个花朵, F_0 单元是质子通道 F_1 单元是 ATP 的合成部位

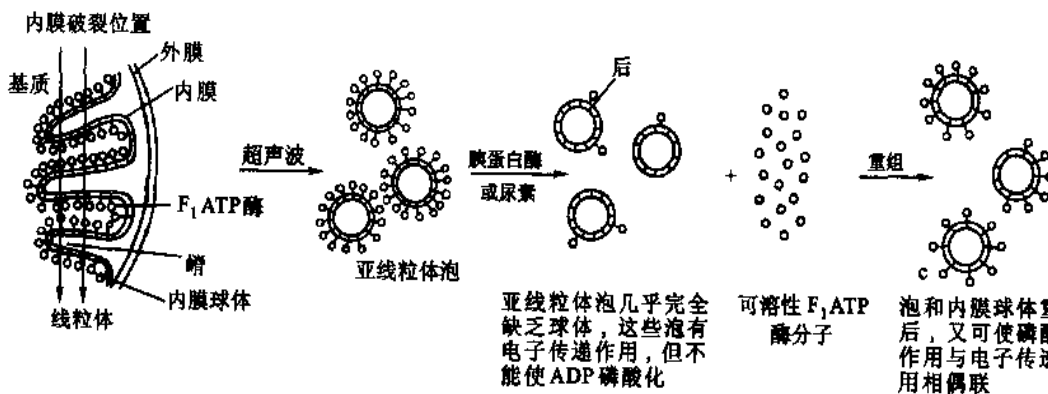


图 24-22 亚线粒体泡的制备示意图

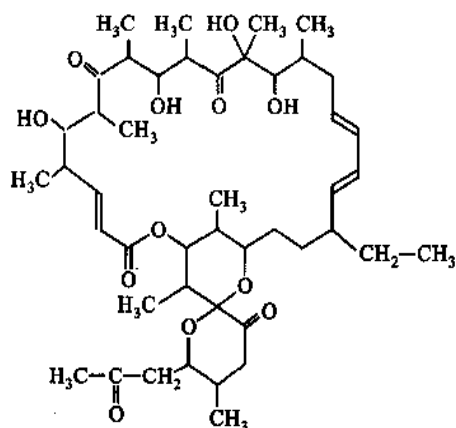
将亚线粒体泡分解成失去磷酸化作用的无球体的部分和可溶性 F_1 ATP 酶球体部分,然后又重组为具有氧化磷酸化作用的泡,多数亚线粒体泡的膜是内表面翻转向外的线粒体内膜

由内膜重新封闭形成的亚线粒体泡仍保有氧化磷酸化作用的功能。在亚线粒体泡的外围可看到内膜球体,即 F_1 单元的球状体。如果用尿素(urea)或胰蛋白酶(trypsin)处理这些内膜球体翻转向外的囊泡,则内膜上的 F_1 球状体即从囊泡上脱落。这时只有 F_0 单元留在上面。这种处理过的囊泡还保有电子传递的

功能,但却失去了合成 ATP 的功能。而脱落下来的球体却有催化 ATP 水解的功能。当将 F_1 球体再加回到只有 F_0 的囊泡时,则氧化磷酸化作用又恢复,即恢复了 ATP 的合成功能。这时又可看到在囊泡周围有 F_1 球体聚集。因此,可以认为 F_1 单元的正常功能是催化 ATP 合成,其水解 ATP 的功能是在缺乏质子梯度的情况下表现出的非正常生理功能。

2. F_1 单元和 F_0 单元的结构

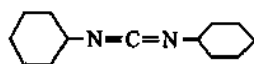
F_1 单元是球状结构,其直径为 8.5 ~ 9.0 nm,已知由 5 种不同的多肽链组成。化学计算表明其组分为 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$,它的相对分子质量为 378 000。用电子显微镜观察重组后的 F_0F_1 颗粒可清楚地看到这个颗粒呈哑铃状。 F_0 和 F_1 之间由一个大约 5 nm (50Å) 的柄相连。柄包含有两种蛋白质。一种称为寡霉素敏感性付与蛋白(oligomycin-sensitivity-conferring protein, OSCP)。因这种蛋白质使酶复合体对寡霉素产生敏感性而得名。寡霉素(oligomycin)是一种抗生素,它的结构如下:



寡霉素 B 的结构式

它干扰对质子梯度的利用从而抑制 ATP 的合成。柄的另一种蛋白质称为偶合因子 6 (coupling factor 6, F_6)。 F_1 催化 ATP 合成的部位在 β 亚基上, δ 亚基是 F_1 和 F_0 相连接所必需的。 F_0 是跨线粒体内膜的疏水蛋白质。它是质子通道,它由 4 种多肽链组成。这 4 种多肽链的相对分子质量分别为 25 000、21 000、12 000、8 000。每个 F_1 单元含有 6 条相对分子质量为 8 000 的肽链,很可能这六条肽链构成 H^+ 的跨膜孔道。寡霉素抑制剂对 ATP 合酶的抑制作用是由于它结合到 ATP 合酶的 F_0 亚基上,从而抑制 H^+ 通过 F_0 。有趣的是寡霉素抑制剂并不是结合到寡霉素敏感性付与蛋白上。

有一种脂溶性的羧基试剂(carboxyl reagent)称为二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide)简称 DCCD,也称 DCC 或 DCCI,它的结构如下:



二环己基碳二亚胺, DCCD

DCCD 也有抑制质子通过 F_0 的作用,对哺乳动物,它只要与 F_0 蛋白中的一个亚基的一个谷氨酸(Glu)残基结合,就可起到抑制作用。对大肠杆菌(*E. coli*)是与天冬氨酸(Asp)结合。

因 DCCD 是一个脂溶性的羧基试剂,与 DCCD 发生反应表明有一个羧基位于脂质环境,也即是埋藏在膜内。

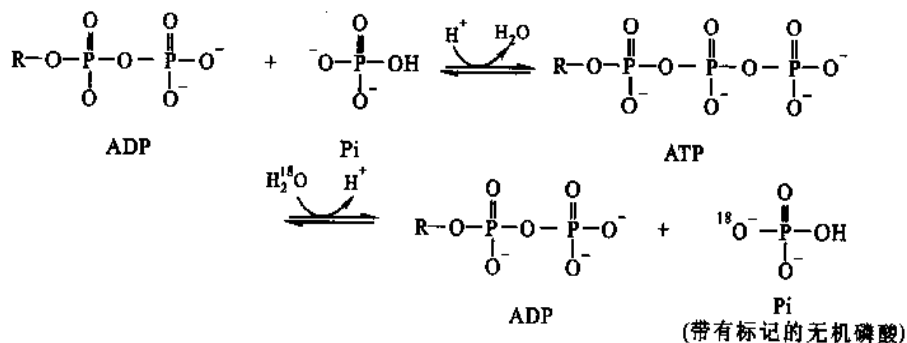
哺乳动物的 F_0 共有 6 个这种能与 DCCD 结合的蛋白质,称为 DCCD-结合蛋白(DCCD-binding protein),也称 DCCD-结合蛋白脂(DCCD-binding proteolipid)。这些蛋白质联合起来好像木桶的桶板构成具有极性的 H^+ 通道。这个通道中埋藏着谷氨酸残基。

表 24-4 线粒体 ATP 合酶复合体组分

亚基	相对分子质量	作用	定位
F ₁	378 000	含有合成 ATP 的催化部位	线粒体内膜向基质侧的球状体
α	56 000		
β	52 000		
γ	34 000		
δ	14 000		
ε	6 000		
F ₀	25 000	含有质子通道	跨膜部位
	21 000		
	12 000		
	8 000		
F ₁ 抑制剂 (IF ₁)	10 000	调节质子流及 ATP 的合成	F ₀ F ₁ 之间的柄
寡霉素敏感性付与蛋白 (OSCP)	23 000		
F ₆	8 000		

3. 质子流通过 ATP 合酶同时释出与酶牢固结合的 ATP 分子

质子流是如何驱动 ATP 合成的？这个问题一直是科学家感兴趣的课题。一种假设认为最初是能化的质子(energized protons)通过 F₀ 质子通道集中到 F₁ 的催化部位,在此处质子脱去无机磷酸上的一个氧原子,结果使平衡驱向 ATP 合成。但是用同位素交换实验却证明了与酶结合着的 ATP 在没有质子动力的情况下合成很容易。将 ADP 和无机磷酸加入到含有 H₂¹⁸O 的 ATP 合酶中,标记¹⁸O 通过 ATP 的合成和随后的水解被参入到无机磷酸分子中。如下式:



¹⁸O 参入到无机磷酸的速度表明,在没有质子梯度存在的情况下,与 F₁ 催化部位结合着的 ATP 和游离的 ADP 处于平衡状态。但是如果质子流不通过 F₀,合成的 ATP 就不离开催化部位。因此 Paul Boyer 认为质子梯度的作用并不是形成 ATP,而是使 ATP 从酶分子上解脱下来。Paul Boyer 还发现,ATP 合酶分子 ADP 和 Pi 的结合,有促使 ATP 分子从酶上解脱下来的作用。这表明 ATP 合酶分子上的核苷酸(ATP、ADP)结合部位在催化过程中有相互协调的作用。Paul Boyer 对于质子驱动 ATP 合成的机制问题提出“结合变化机制”(binding-change mechanism)。这个机制可用图 24-23 表示。



图 24-23 ATP 合酶的结构变化机制示意图

Paul Boyer 提出在 ATP 合酶上的 3 个 β 亚基本质上是相同的。但它们的作用在任何情况下都是不相同的。其中之一处于“O”状态,即是开放形式,对底物的亲和力极低。第 2 种状态是“L”形式。这种状态与底物的结合较松弛,对底物没有催化能力。第 3 种是“T”形式,与底物结合紧密,并有催化活性。如果在酶分子的“T”部位结合着一个 ATP 分子,又有 ADP 和 P_i 结合到它的“L”部位,这时质子流的能量使“T”部位转变为“O”部位,“L”部位转变为“T”部位,“O”部位转变为“L”部位。当 ATP 所处的部位转变为“O”部位时,就使 ATP 容易地从这个新形成的“O”部位解脱下来,同时又使 ADP 和 P_i 由原来“L”部位转变成“T”部位并合成新的 ATP 分子。只有当质子流从 F_0 流至膜的 F_1 时才发生 O、L 和 T 的相互转化。这种构象转化是连续发生的,很可能是亚基相互作用发生的变化。

ATP 合酶的作用是由质子动力所驱动的。这种动力实质上是由 pH 梯度和膜电势产生的。某些氨基酸残基在 pH 梯度的条件下可以发生质子化(protonation)或去质子化(deprotonation)。例如,某些氨基酸的羧基即以质子化状态—COOH 存在。这种在一边的质子化和另一边的去质子化能够驱动一个单方向反应循环即构成促使 ATP 合成的驱动力。

对于膜电势的作用可作如下的设想:假如在细胞溶胶一侧的膜电势为 +0.18 V,而膜两侧的 pH 都是 7.5。在 F_0 通道的 H^+ 浓度不可能是均一的。因为 H^+ 必然被膜的基质侧相对于另一侧的电负性所吸引,可用图 24-24 表示。如果电势差为 0.18 V,即可导致 H^+ 浓度在 F_0-F_1 接头处比在 F_0 通道入口处高出 1 000 倍。这就是说,膜的正电势由于在 F_0 和接头处形成局部的高 H^+ 浓度而导致 ATP 的合成。特别是,0.18 V 电势产生的浓度梯度和膜两边 3 个 pH 单位差所产生的浓度梯度是相同的。如果有 3 个 H^+ 通过 ATP 合酶的 F_0-F_1 接头处,即导致合成一个 ATP 分子。

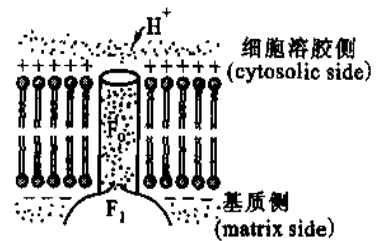


图24-24 膜的正电势导致 H^+ 浓度在 F_0 和 F_1 接头处远远高于 F_0 入口处

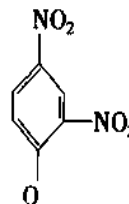
(五) 氧化磷酸化的解偶联和抑制

一般正常情况下,电子传递和磷酸化是紧密结合的。在静止状态(resting state),氧化磷酸化处于最低水平,这时通过线粒体内膜的电化学梯度的大小,正好能够阻止质子泵的活动,于是电子传递也就受到抑制。在有些情况下,电子传递和磷酸化作用可被解偶联,可举出以下情况:

1. 特殊试剂的解偶联作用

用特殊的试剂可将氧化磷酸过程分解成单个的反应,这是研究氧化磷酸化中间步骤的有效方法。氧化磷酸化和电子传递过程相似,都能受到许多化学因素的作用。不同的化学因素对氧化磷酸化作用的影响方式不同。根据它们的不同影响方式可划分为三大类,一类称为解偶联剂,另一类称为氧化磷酸化抑制剂,第三类称为离子载体抑制剂。

(1) 解偶联剂(uncouplers) 这类试剂的作用是使电子传递和 ATP 形成两个过程分离,失掉它们的紧密联系。它只抑制 ATP 的形成过程,不抑制电子传递过程,使电子传递产生的自由能都变为热能。因为这种试剂使电子传递失去正常的控制,亦即不能形成离子梯度。造成过分地利用氧和燃料底物而能量得不到贮存。典型的解偶联剂是弱酸性亲脂试剂 2,4-二硝基苯酚(2,4-dinitrophenol, DNP),它的作用机制可用图 24-25 表示。解偶联剂的作用指抑制氧化磷酸化的 ATP 形成,对底物水平的磷酸化没有影响。

在 pH7 的环境下,2,4-二硝基苯酚以离解的形式存在() 这种形式不能透过膜,因它是脂

不溶性的。在酸性的环境中 2,4-二硝基苯酚接受质子后成为不解离的形式而变为脂溶性的,从而容易地透过膜,同时将一个质子带入膜内。解偶联剂使内膜对 H^+ 的通透性增加。亲脂的膜能结合 H^+ ,将其

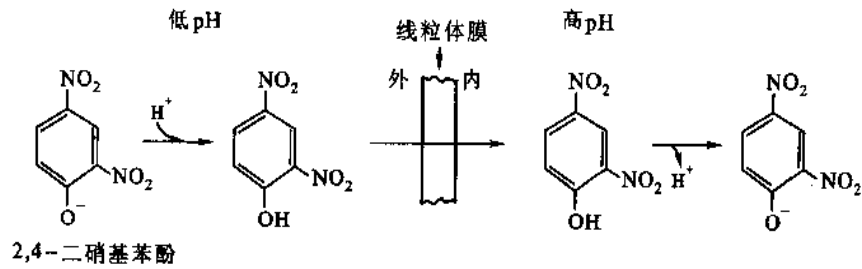


图 24-25 2,4-二硝基苯酚的作用机制

带到 H^+ 浓度低的一方。这样就破坏了跨膜梯度的形成(参看化学渗透偶联学说),这种破坏 H^+ 梯度而引起解偶联现象的试剂又称质子载体。

其他一些酸性芳香族化合物如 FCCP (为三氟甲氧基苯胺羰基氰化物, carbonylcyanide - *p* - trifluoromethoxyphenylhydrazoned 的简称)也有同样作用。FCCP 的结构式如图 24-26 所示。

(2) 氧化磷酸化抑制剂(inhibitors) 这类试剂的作用特点是抑制氧的利用又抑制 ATP 的形成,但不直接抑制电子传递链上载体的作用。这一点和电子传递抑制剂不同。氧化磷酸化抑制剂的作用是直接干扰 ATP 的生成过程。由于它干扰了由电子传递的高能状态形成 ATP 的过程,结果也使电子传递不能进行。寡霉素(oligomycin)就属于这类抑制剂。寡霉素作用和 2,4-二硝基苯酚(解偶联试剂)作用之不同,可用实验清楚地表明(图 24-27):当在线粒体悬浮液中,加入寡霉素后,再加入 ADP,不见有刺激活性的作用发生,这时若加入 DNP 解偶联试剂,则可看到呼吸作用立即加快,表明寡霉素对利用氧的抑制作用可被解偶联试剂解除。

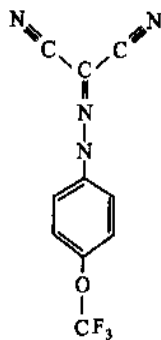


图 24-26 FCCP(三氟甲氧基苯胺羰基氰化物)的结构式

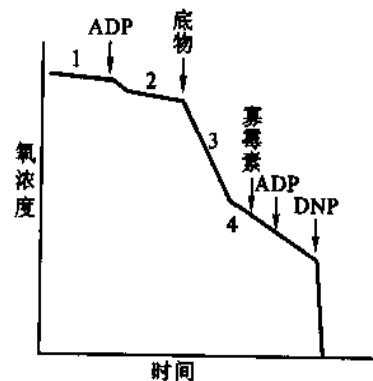


图 24-27 线粒体呼吸的 4 种状态,及寡霉素对氧消耗的抑制作用,以及 DNP 解除寡霉素的抑制作用

(3) 离子载体抑制剂(ionophores) 这是一类脂溶性物质。这种物质能与某些离子结合并作为它们的载体使这些离子能够穿过膜。它和解偶联试剂的区别在于它是除 H^+ 以外其他 1 价阳离子的载体,例如缬氨霉素(Valinomycin)能够结合 K^+ 离子,与 K^+ 形成脂溶性的复合物,于是 K^+ 容易地透过膜。如果 K^+ 离子不与缬氨霉素结合,它透过膜的速度就很低。又如短杆菌肽(gramicidin)可使 K^+ 、 Na^+ 以及其他一些 1 价阳离子穿过膜。因此,这类抑制剂是通过增加线粒体内膜对一价阳离子的通透性而破坏氧化磷酸化过程(参看生物膜与物质运送)。

2. 激素控制褐色脂肪线粒体氧化磷酸化解偶联机制使产生热量

电子传递产生的电化学 H^+ 离子梯度受到破坏而与 ATP 形成解偶联结果产生热已如前述。有一种褐色脂肪组织(brown adipose tissue)又称褐色脂肪,由大量甘油三脂和大量线粒体的细胞构成。线粒体内的细胞色素使褐色脂肪呈褐色。人类、新生无毛的哺乳动物以及冬眠哺乳动物在颈部和背部都含有褐色脂肪。它的作用是非战栗性产热(nonshivering thermogenesis)。这和由战栗肌肉收缩或其他活动引起 ATP 水

解产热机制不同,褐色脂肪的产热机制是线粒体氧化磷酸化解偶联的结果。褐色脂肪线粒体内含有一种激素称为产热素(thermogenin),是一种含有两个亚基形成二聚体的蛋白质,其相对分子质量为 64 000。这种激素只存在于褐色脂肪线粒体中,它控制着线粒体内膜对质子的通透性。适应于寒冷生活的动物在褐色脂肪线粒体内膜蛋白质中含有高达 15% 的产热素。该激素可被游离脂肪酸激活,又可被嘌呤核苷酸(ATP、ADP、GTP、CTP)抑制。核苷酸类对它的抑制又可被游离脂肪酸解除。它刺激质子流使其通过该激素蛋白并使氧化磷酸化解偶联从而产生热量。该褐色脂肪中的游离脂肪酸又受到正肾上腺素(norepinephrine)与 cAMP 的调节。在正肾上腺素的作用下,正肾上腺素受体系统合成 cAMP,于是变构激活 cAMP—依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase),随后激酶又通过磷酸化作用激活激素—敏感的甘油三酯酶(hormone-sensitive triacylglycerol lipase),最后被激活的脂酶催化甘油三酯水解产生游离脂肪酸。

(六) 细胞溶胶内 NADH 的再氧化

细胞溶胶内的 NADH 不能透过线粒体内膜进入线粒体氧化。因此通过两种“穿梭”途径解决 NADH 再氧化问题。一种称为甘油 3-磷酸穿梭途径(glycerol 3-phosphate shuttle),另一种称为苹果酸—天冬氨酸穿梭途径(malate-aspartate shuttle)。

1. 甘油-3-磷酸穿梭途径在传递 NADH 电子中的特殊作用

由糖酵解过程产生的 NADH 虽不能穿过线粒体内膜,但是 NADH 上的电子却可以进入到线粒体内膜。在这里起电子载体(carrier)作用的即是甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate)。后者可以容易地穿梭于线粒体的内膜,起到穿梭(shuttle)搬运作用,其机制如图 24-28 所示。

图 24-28 中所示的穿梭作用的第一步是电子从 NADH 转移到二羟丙酮磷酸形成甘油-3-磷酸。催化这一反应的酶称为甘油-3-磷酸脱氢酶(glycerol 3-phosphate dehydrogenase),该反应是在细胞溶胶中进行的。甘油-3-磷酸脱氢酶上的电子对转移到跨线粒体膜的线粒体甘油-3-磷酸脱氢酶(mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase)的辅基 FAD 分子上。甘油-3-磷酸转变为二羟丙酮磷酸,FAD 还原为 FADH₂(酶-FADH₂)。二羟丙酮磷酸能够通过线粒体内膜扩散到细胞溶胶中,这就使甘油-3-磷酸完成了携带 NADH 电子透入线粒体内膜的使命,并完成了一次穿梭历程。

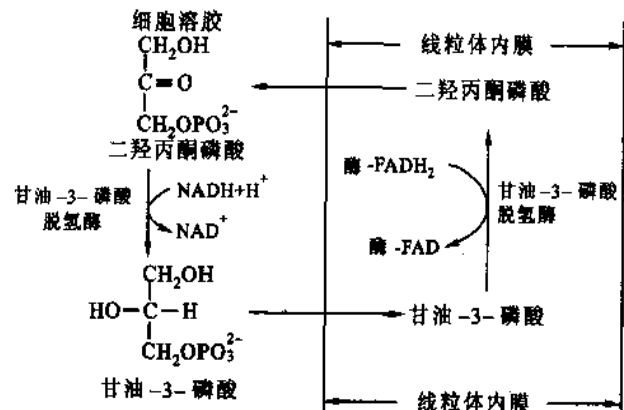


图 24-28 甘油-3-磷酸穿梭途径

在线粒体内部被还原的 FADH₂ 将电子传递给辅酶 Q 使 Q 还原为 QH₂,于是进入了电子传递链,已如前述。

甘油磷酸穿梭途径将 NADH 电子转移进入电子传递链进行氧化磷酸化所利用的电子传递中介体是 FAD 而不是 NAD⁺,这就使从 NADH 脱下的电子通过氧化磷酸化最后生成的 ATP 分子数比以 NAD⁺ 作为传递体时少 1 个 ATP 分子。也就是说细胞溶胶中的 NADH 上的电子通过甘油磷酸穿梭途径转运后形成的 ATP 分子不是 2.5 个,而是 1.5 个。甘油磷酸穿梭作用的生物学意义就在于它使细胞溶胶中的 NADH 逆浓度梯度转运到线粒体内膜进入电子传递链进行氧化。昆虫飞行肌中这种穿梭途径最为突出,它的穿梭作用保证了氧化磷酸化作用以极高速度进行。

2. 苹果酸—天冬氨酸穿梭途径

在心脏和肝脏细胞溶胶内 NADH 的电子进入线粒体是通过苹果酸—天冬氨酸穿梭途径(malate-aspartate shuttle)。这条途径是在细胞溶胶中 NADH 的电子由细胞溶胶的苹果酸脱氢酶(cytoplasmic malate dehydrogenase)传递给草酰乙酸使后者转变为苹果酸,同时 NADH 即氧化为 NAD⁺。苹果酸通过苹果酸-α

- 酮戊二酸载体 (malate - α - ketoglutarate carrier) 穿过线粒体膜进入线粒体内膜的苹果酸在线粒体内膜基质内被 NAD^+ 氧化失去电子又转变为草酰乙酸, NAD^+ 又形成 NADH (在基质内)。基质内的草酰乙酸并不易透过线粒体内膜, 但是由草酰乙酸经过转氨基作用 (参看第 30 章) 形成的天冬氨酸, 通过谷氨酸 - 天冬氨酸载体即透过线粒体膜转移到细胞溶胶侧, 随后再通过转氨基作用又转变为草酰乙酸。这种穿梭途径和甘油磷酸穿梭途径的差异是它可容易地逆转。由于该反应的可逆性, 因此只有当细胞溶胶中的 NADH 和 NAD^+ 之比值比线粒体基质内的比值高时, NADH 才通过这条途径进入线粒体。这条途径的最终结果是将细胞溶胶中 NADH 所荷电子转移到线粒体基质内, 为进入电子传递链创造条件。苹果酸 - 天冬氨酸穿梭途径可用图 24 - 29 表示。

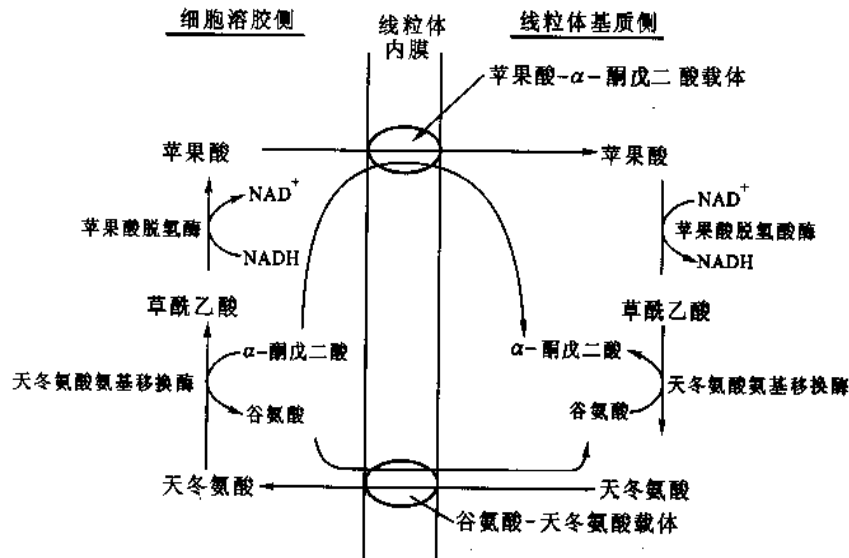


图 24 - 29 苹果酸 - 天冬氨酸穿梭示意图

(七) 氧化磷酸化的调控

电子传递和 ATP 形成的偶联关系是相辅相成的, ATP 的生成必须以电子传递为前提, 而呼吸链只有生成 ATP 才能推动电子的传递。完整的线粒体只有当无机磷酸和 ADP 都充分时电子传递速度才能达到最高水平。当缺少 ADP 时, 因为缺乏磷酸的受体则不能进行磷酸化作用。[ATP]/[ADP] 之比在细胞内对电子传递速度起着重要的调节作用, 同时对还原型辅酶的积累和氧化也起调节作用。ADP 作为关键物质对氧化磷酸化作用的调节称为呼吸控制 (respiratory control)。当细胞利用 ATP 做功时, 细胞内 ATP 水平迅速下降, 同时 ADP 的浓度迅速升高。这正意味着无论从热力学或动力学方面都有利于氧化磷酸化的进行。于是 ATP 的合成加速, 电子传递也加速各种辅酶往复的氧化 - 还原反应又活跃起来, 底物又不断地被氧化, 氧的利用也增加。反之, 若 ATP 在细胞内积累时, ADP 的浓度必然很低。这时电子传递变缓或停止, 还原型辅酶浓度增加以致不能再接受电子, 于是整个呼吸链也受到抑制或停止。因此, 氧化磷酸化作用的进行和细胞对 ATP 的需要是相适应的。这种精确的适应正是靠以 ADP 作为关键物质的“呼吸控制”来实现的。

Chance B 和 Williams G R 曾根据线粒体利用氧的情况将呼吸功能分为 5 种状态, 如图 24 - 30 所示。

悬浮的线粒体在既无可氧化的底物又无 ADP 情况下的呼吸状态称为状态 I (state I), 这时的氧利用率极低。加入 ADP 后的呼吸状态称为状态 II, ADP 刚加入时有一个短暂刺激呼吸的作用。如果既加入 ADP 又加入底物, 这时的氧化状态称为状态 III。这时氧的利用速度很快。这种状态一直继续到 ADP 被用尽, 再加入 ADP, 于是氧的利用又迅速下降, 这时的状态称为状态 IV。当氧被耗尽时, 线粒体呼吸停止, 这时称为状态 V。在这些状态中, 只有状态 IV 和 III 经常发生。状态 III 和 ADP 的加入直接相关。这也说明 ADP 对呼吸链的重要调节作用。

呼吸控制 (respiratory control) 的定量表示法是测定有 ADP 存在时氧的利用速度 (状态 III) 和没有 ADP 时氧的利用速度 (状态 IV) 的比值。

完整的线粒体其呼吸控制值可高达 10 以上, 而受损伤或衰老的线粒体此值可低至 1, 这表明电子传递速度和 ATP 的形成已经失去偶联, 或只有很少偶联, 虽然电子传递仍保持最大速度, 但失去了磷酸化作用。

受体控制比值是鉴定分离的线粒体完整状况的指标, 比值越高表明线粒体越接近完整。如图 24-31 所示, 由 ADP 的浓度所导出的氧的消耗可测得 $\Delta\text{ADP}/\Delta\text{O}$ 的比值, 这个比值和 P/O 比正相吻合。

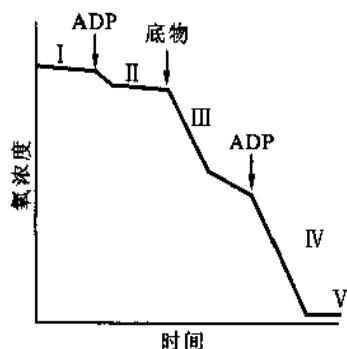


图 24-30 线粒体呼吸的 5 种状态

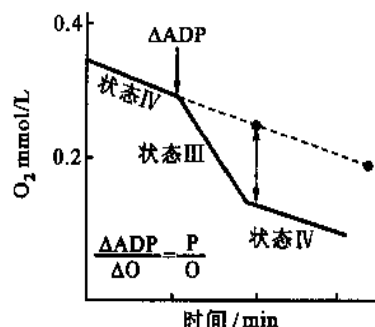


图 24-31 呼吸的受体控制

随着呼吸第 IV 状态 (没有 ADP) 和第 III 状态 (过量的 ADP) 的互相转变, 线粒体的超微结构也相应发生着明显的变化。这些变化是线粒体内膜基质变化所造成的。当缺乏 ADP 时, 线粒体的内部分隔完全充满整个线粒体空间, 内膜与外膜相接。这种状态称为常态 (orthodox state) (图 24-32)。当加入 ADP 后, 线粒体处于呼吸活动状态 (即第 III 状态)。基质的体积压缩成只有常态体积的 50%。内膜和嵴的折叠变得更密更曲折。这种状态称为紧缩态 (condensed state) (图 24-32)。常态和紧缩态的结构相应地反映着线粒体的 ATP 生成系统处于“静止”或“活动”状态。完整的肝细胞内, 线粒体处于第 III 种状态和第 IV 状态之间。ADP 的浓度比较低, 不足以引起呼吸的最大速度。当细胞受刺激而活动时, 呼吸速度增加, 线粒体处于紧缩态, 即第 III 种呼吸状态。

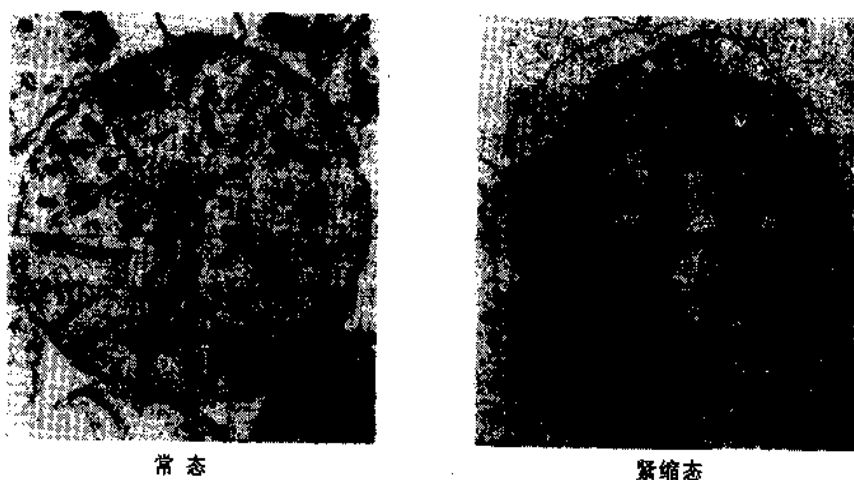


图 24-32 线粒体常态和紧缩态的电子显微图

图中表明鼠肝线粒体在静止态 (状态 IV) 和活动态 (状态 III) 的超微结构变化, 内膜-基质的结构和体积的显著变化可能和内膜 ADP-ATP 移位酶与 ADP 分子的结合有关

(八) 葡萄糖彻底氧化的总结算

关于葡萄糖彻底氧化为水和 CO_2 究竟产生多少 ATP 分子的问题一直受到人们的关注。葡萄糖分解

通过糖酵解和柠檬酸循环形成的 ATP 或 GTP 的分子数,根据化学计算可以得到明确的答复。但是氧化磷酸化产生的 ATP 分子数并不十分准确。因为质子泵、ATP 合成以及代谢物的转运过程并不需要是完整的数值甚至不需要是固定值。根据当前最新测定, H^+ 经 NADH-Q 还原酶、细胞色素还原酶和细胞色素氧化酶从线粒体内膜基质泵出到膜外的细胞溶胶侧时,一对电子泵出的质子数依次为 4、2 和 4。合成一个 ATP 分子是由 3 个 H^+ 通过 ATP 合酶所驱动。多余的一个 H^+ 可能用于将 ATP 从基质运往膜外细胞溶胶。因此一对电子从 NADH 传至 O_2 , 所产生的 ATP 分子数是 2.5 个。在细胞色素还原酶的水平进入电子传递链的电子,例如琥珀酸,或细胞溶胶中的 NADH, 它们的电子对只产生 1.5 个 ATP 分子。这样,当一分子葡萄糖彻底氧化为 CO_2 和水所得到的 ATP 分子数和过去传统的统计数(36 个 ATP)少了 6 个 ATP 分子,成为 30 个。全部的统计列于表 24-5。在 30 个 ATP 分子中,26 个是由氧化磷酸化作用生成的。

表 24-5 葡萄糖彻底氧化生成 ATP 分子的统计

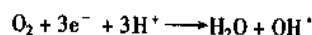
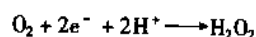
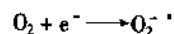
反应名称	生成 ATP 分子数
糖酵解作用(在细胞溶胶中进行)	
1. 葡萄糖磷酸化	-1
2. 果糖-6-磷酸磷酸化	-1
3. 2 分子 1,3-二磷酸甘油(1,3-BPG)去磷酸化	+2
4. 2 分子磷酸烯醇式丙酮酸去磷酸化	+2
5. 2 分子甘油醛-3-磷酸氧化产生 2 分子 NADH	
丙酮酸转变为乙酰-CoA 产生 2 分子 NADH(在线粒体中进行)	
柠檬酸循环(在线粒体内进行)	
1. 2 分子琥珀酸 CoA 产生 2 分子 GTP(相当 ATP)	+2
2. 2 分子异柠檬酸氧化产生 2 分子 NADH	
3. 2 分子 α -酮戊二酸氧化产生 2 分子 NADH	
4. 2 分子苹果酸氧化产生 2 分子 NADH	
5. 2 分子琥珀酸氧化产生 2 分子 $FADH_2$	
氧化磷酸化作用(在线粒体内膜进行)	
1. 糖酵解作用中产生的 2 个 NADH 每分子形成 1.5 个 ATP (NADH 假定通过甘油磷酸穿梭途径转运)	+3
2. 丙酮酸氧化脱羧反应产生 2 分子 NADH 每分子生成 2.5 个 ATP 分子	+5
3. 柠檬酸循环形成两分子 $FADH_2$, 每分子产生 1.5 个 ATP	+3
4. 异柠檬酸、 α -酮戊二酸、苹果酸氧化共产生 6 分子 NADH, 每分子生成 2.5 个 ATP 分子	+15
总计	+30

注:30 个 ATP 分子数是根据 Hinkle P C, Kumar M A, Resetar A, 和 Harris G H 的测定得到的结论。

此项研究发表在《Biochemistry》30(1991):3 576 页。如果在葡萄糖氧化过程中是通过苹果酸-天冬氨酸穿梭途径运转 NADH, 在总结算中还多形成 2 分子 ATP, 于是总计即为形成 32 个 ATP

(九) 氧的不完全还原

前面已经阐明,氧由细胞色素氧化酶彻底还原需要 4 个电子。但在其他的一些氧化反应中会产生一些部分还原的氧的形式。任何来源的电子,例如,半胱氨酸的巯基(thiol group)或还原型的维生素 C, 都很容易使氧发生不完全还原,形成氧的自由基(Oxygen radicals)。一个电子使氧还原形成超氧化物负离子(superoxide anion, $O_2^{\cdot -}$), 两个电子使氧还原形成过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2), 3 个电子使氧还原形成羟自由基(hydroxyl radical, OH^{\cdot})。反应式如下:



不完全还原形式的氧反应性极强,对机体非常有害。羟自由基是其中最强的氧化剂也是最活跃的诱变剂(mutagen)。这种自由基当机体受到电离辐射时就会产生。生物要存活必须将这些毒性极强的高活性氧转变为活性较小的形式。需氧细胞有几种主要的自我保护机制使机体免受不完全还原氧的侵害。其中最主要的一种方式是通过酶的作用,包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)、过氧化氢酶(catalase)和过氧化物酶(oxidase)。

使超氧化物阴离子解毒的主要方式是由超氧化物歧化酶将其转变为过氧化氢(H₂O₂)。该酶催化的是一种歧化反应(dismutation reaction),即两个相同的底物形成两种不同的产物,一个超氧化物负离子被氧化另一个则被还原。反应如下式:



超氧化物歧化酶清除 O₂^{·-} 的机制可作如下解释:

红细胞的细胞溶胶中的超氧化物歧化酶的活性部位含有一个铜离子和一个锌离子,因此又称为铜-锌超氧化物歧化酶。这两个离子在催化反应中与酶蛋白侧链的组氨酸(His)残基协同作用。带有负电荷的超氧化物,由于静电作用,被吸引到超氧化物歧化酶的带正电荷的活性部位。这个活性部位正处于球形酶的凹陷底部。在凹陷处的外围由带有负电荷的残基所环绕。超氧化物负离子 O₂^{·-} 与 Cu²⁺ 和精氨酸的胍基(guanido group)相结合,使超氧化物上的一个电子被转移到 2 价铜离子(cupricion)上形成 1 价的 Cu⁺ 和 O₂,后者被释出。第 2 个超氧化物负离子进入酶的活性部位与 1 价的 Cu⁺、精氨酸和 H₃O⁺ 结合,被结合的 O₂^{·-} 从 Cu⁺ 上得到一个电子,从被结合的 H₃O⁺ 得到两个质子形成 H₂O₂。于是酶活性部位的 1 价铜离子又恢复到 2 价 Cu²⁺。反应机制如图 24-33 所示。

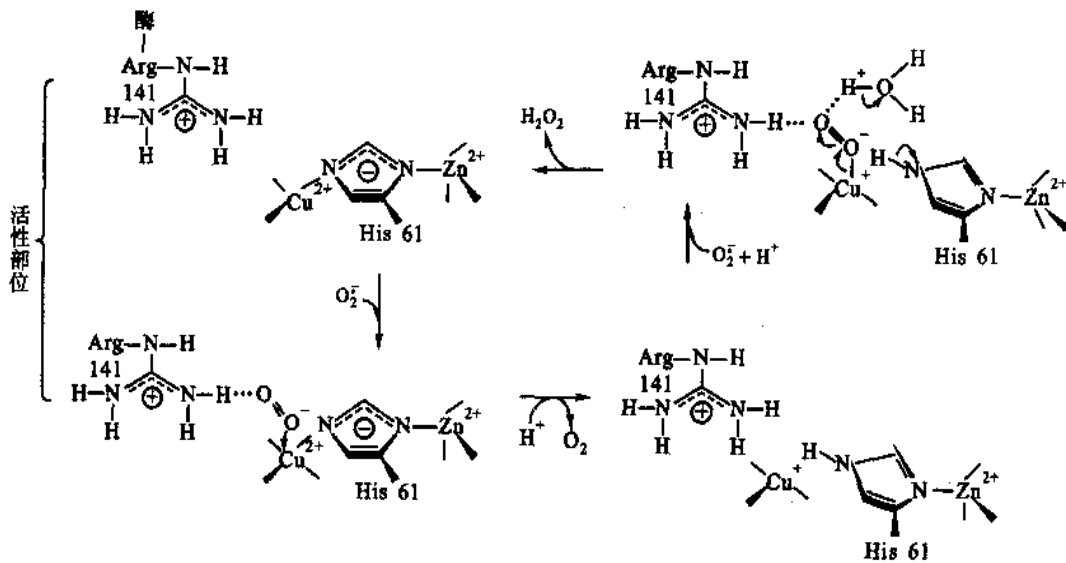
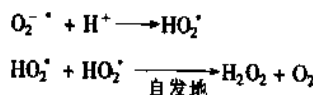
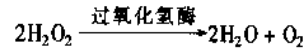


图 24-33 超氧化物歧化酶可能的催化机制,在反应过程中铜离子在 1 价和 2 价之间发生价态变化
组氨酸残基在酶与 O₂^{·-} 开始作用时与铜离子(Cu²⁺)相结合同时也与 Zn²⁺ 相结合,精氨酸的胍基以正电荷吸引 O₂^{·-},经电子转移后释出 O₂,铜离子还原为 Cu⁺,与组氨酸暂时分离,当再与另一分子 O₂^{·-} 结合后释出 H₂O₂ 酶复原, Cu⁺ → Cu²⁺ 并与组氨酸结合

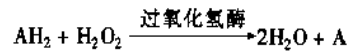
超氧化物负离子还可通过第二条途径形成过氧化氢。首先是 O₂^{·-} 的质子化,生成过氧羟自由基(hydroperoxyl radical, HO₂[·])。它是超氧化物负离子的共轭酸(conjugate acid)。2 分子过氧羟自由基自发地结合形成过氧化氢。反应如下式:



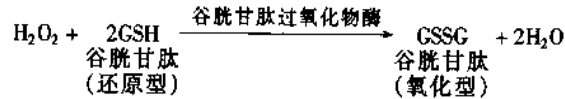
无论是由超氧化物负离子或由其他代谢反应生成的过氧化氢都是对机体有害的。机体内由过氧化氢酶将其分解为水和 O₂。反应如下式:



过氧化物酶也可以破坏过氧化氢,但需有一个可提供电子的化合物作为电子供体(electron donor)存在,此电子供体用 AH_2 表示。反应如下式:

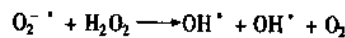


谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase)是一种含硒(selenium)的酶,存在于红细胞内。它与谷胱甘肽的氧化相偶联,催化红细胞内过氧化氢的分解。反应如下式:



谷胱甘肽过氧化物酶对保护红细胞不受 H_2O_2 的伤害是必需的。氧化型的谷胱甘肽在谷胱甘肽还原酶的作用下还原,又生成 GSH。

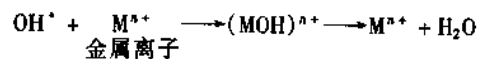
羟自由基的形成主要由过氧化物负离子和过氧化氢反应生成:



因此清除过氧化物负离子和过氧化氢不只除去了这两种有害的自由基,还防止了更有害的羟自由基的生成。

虽然机体存在有效的消除自由基的途径,但不可避免地在机体内还会存在一些羟自由基。它们可能参与 3 种主要反应:

① 使金属离子氧化形成高氧化态:



② 从 C—H 键中吸收一个氢原子,使形成水和有机化合物基团(organic radical)。

③ 加到双键上形成二级基团。

由于不完全还原氧造成对人类的危害极大,甚至和癌症、衰老以及其他许多疾病有关。因此有人主张每天服用一些有抗氧化作用的维生素例如维生素 A、C 和 E 对于抗病以及抗衰老都是有益的。

提 要

电子传递和氧化磷酸化使 NADH 和 FADH_2 再氧化,并将释放出的能量以 ATP 的形式进行贮存。真核细胞电子传递和氧化磷酸化都在细胞的线粒体内膜进行,而原核细胞则利用浆膜进行。

物质氧化-还原电势 E 的大小代表它对电子的亲合力。标准氧-还势(E'_0)是在 pH7 及标准状态下测得的数值,用伏特(V)表示。反应的标准自由能变化在 pH7 时用 $\Delta G'^0$ 表示,可从底物和产物的氧-还电势的变化 $\Delta E'_0$ 计算求得。 $\Delta E'_0$ 为正值的反应,它的 $\Delta G'^0$ 为负值,这种反应为放能反应。

电子从 NADH 传递到氧是沿着一条电子传递链,也叫呼吸链。这条电子传递链主要包括 4 种蛋白复合体: NADH-Q 还原酶(复合体 I)、琥珀酸-Q 还原酶(复合体 II)、细胞色素还原酶(复合体 III)和细胞色素氧化酶(复合体 IV)。它们的电子载体有黄素蛋白类、铁-硫复合体、醌类、细胞色素的血红素基团以及铜离子等。电子从 NADH 转移到含有铁-硫中心(Fe-S)的 NADH-Q 还原酶(NADH 脱氢酶)时,先转移到 FMN 辅基,形成 FMNH_2 ,再转移到 Fe-S 中心,使其中的铁原子发生 3 价(Fe^{3+})和 2 价(Fe^{2+})的价态变化。电子从 NADH-Q 还原酶又转移到辅酶 Q,使其从氧化型 CoQ 转变为还原型的 CoQH_2 。辅酶 Q 是易流动的、非极性的疏水载体,能够自由地在膜内扩散; CoQH_2 上的电子随后传递给细胞色素还原酶。后者是由细胞色素 b 和 c_1 以及铁-硫蛋白构成的复合体。含有血红素的细胞色素,其中的铁原子在传递电子中,从 Fe^{3+} 到 Fe^{2+} ,当电子再转移到其他组分后铁原子又恢复其 Fe^{3+} 状态。细胞色素还原酶(复合体 III)上的电子又转移到细胞色素 c 上。细胞色素 c 是一个水溶性的周边膜蛋白(peripheral membrane protein),它和辅酶 Q 一样都是传递电子的流动载体。细胞色素 c 接受电子后立即将其传递给细胞色素氧化酶。该酶含有两种细胞色素(细胞色素 a 和 a_3)以及两个铜离子(Cu_A 和 Cu_B)。在电子传递时,铜原子往复地发生

Cu^{2+} 和 Cu^+ 的价态变化。最后细胞色素氧化酶传递 4 个电子到氧分子, 形成 2 分子 H_2O 。

沿电子传递链发生的氧-还电势的变化是每一步自由能变化的依据。在 NADH-Q 还原酶、细胞色素还原酶(又称细胞色素 bc_1 复合体)和细胞色素氧化酶催化的三步反应中, 自由能的变化足以将 H^+ 离子(质子)从线粒体内膜基质“泵”(“pump”)出线粒体内膜进入到线粒体的内外膜间隙, 于是产生了一种 H^+ 离子梯度。因此, 上述三种酶(即三种复合体)的每一种都是一个质子泵。质子泵都是由电子传递的驱动力形成的。

FADH_2 再氧化为 FAD, 是将其所带的电子对传递给琥珀酸-Q 还原酶。后者将电子传递给辅酶 Q, 电子通过 Q 进入电子传递链的主链, 经进一步传递才能形成质子梯度以及合成 ATP 分子。琥珀酸-Q 还原酶本身并没有质子泵的作用。

鱼藤酮、安密妥通过抑制 NADH-Q 还原酶抑制电子传递, 抗霉素 A 抑制细胞色素还原酶, 氰化物 (CN^-)、叠氮化物 (N_3^-) 以及一氧化碳 (CO) 抑制细胞色素氧化酶。

电子流通过酶复合体 I、III、IV 都将质子从线粒体内膜基质侧泵出到细胞溶胶侧。由 pH 梯度和膜电势构成质子动力。这时细胞溶胶侧为酸性, 其电性为电正性。当质子从细胞溶胶侧经 ATP 合酶流回到线粒体基质时, 通过 ATP 合酶的质子流产生驱动力使 ADP 和 P_i 合成 ATP。ATP 合酶含有 F_0 和 F_1 单位。质子流回基质通过 F_0 通道, ATP 的合成部位则是在 F_1 单位。与 ATP 合酶紧密结合着的 ATP 分子, 当质子流经该酶时被释放出来。

一对电子流经 NADH-Q 还原酶所产生的质子动力足够形成 1 个 ATP 分子, 流经细胞色素还原酶形成 0.5 个 ATP 分子, 流经细胞色素氧化酶形成 1 个 ATP。因此每个 NADH 分子通过氧化磷酸化所产生的 ATP 分子是 2.5 个。而一个 FADH_2 的氧化只形成 1.5 个 ATP 分子。因为它通过辅酶 Q 进入电子传递链, 细胞溶胶中的 NADH 通过呼吸链也只形成 1.5 个 ATP 分子。因为它的电子是通过甘油磷酸穿梭途径进入电子传递链。一个葡萄糖分子完全氧化为 CO_2 和 H_2O 可产生大约 30 个 ATP 分子。

电子传递在正常情况下是与 ATP 的合成紧密联系着的。只有当 ADP 被合成 ATP 时, 电子才流经电子传递链传递到氧。这二者是同时发生的。也只有当 ADP 的供应充分时电子的传递才继续进行, ATP 也才合成; 如果 ADP 的浓度降低, 电子传递也随之下降。这种关系称为呼吸控制。它保证只有当需要 ATP 分子时, 电子传递过程才进行。

有一些化合物例如 2,4-二硝基苯 (DNP) 属于解偶联试剂。这类试剂使电子传递照常进行, 但不能合成 ATP。因为它们使 H^+ 离子通过线粒体内膜失去了控制, 从而破坏了质子梯度。电子传递与 ATP 形成解除了偶联, 致使产生的能量只能以热的形式释放。机体的某些组织例如褐色脂肪组织的线粒体, 也被一种产热蛋白 (thermogenin) 解偶联。由脂肪组织形成的热称为非战栗产热, 对新生儿有保护敏感机体组织的作用, 对冬眠动物有维持体温的作用。

细胞溶胶的 NADH 不能跨过线粒体内膜进入线粒体进行再氧化。它通过甘油-3-磷酸穿梭途径再氧化。细胞溶胶的甘油-3-磷酸脱氢酶催化 NADH 氧化, 并使二羟丙酮磷酸还原为甘油-3-磷酸。后者可自由通过线粒体膜, 而后又由线粒体甘油-3-磷酸脱氢酶将其转变为二羟丙酮磷酸。该酶以 FAD 为辅助因子。二羟丙酮磷酸可通过扩散回到细胞溶胶内。在心脏和肝脏细胞溶胶内 NADH 的再氧化通过苹果酸-天冬氨酸穿梭途径使其电子进入氧化呼吸链。在细胞溶胶中的草酰乙酸由 NADH 还原为苹果酸, 通过苹果酸- α -酮戊二酸载体进入线粒体。在基质内苹果酸由 NAD^+ 氧化又形成草酰乙酸, 而 NAD^+ 则还原为 NADH, 结果是从细胞溶胶中的 NADH 变为基质内的 NADH 只通过电子传递作用。草酰乙酸通过转氨酶的作用形成天冬氨酸离开线粒体, 在细胞溶胶内又通过转氨酶的作用形成草酰乙酸。

习 题

1. 什么是氧化-还原电势? 怎样计算氧化-还原电势?
2. 将下列物质按照容易接受电子的顺序加以排列:

a: α -酮戊二酸 + CO_2

c: O_2

b: 草酰乙酸

d: NADP⁺

3. 在电子传递链中各成员的排列顺序根据什么原则?

4. 在一个具有全部细胞功能的哺乳动物细胞匀浆中加入下列不同的底物,当每种底物完全被氧化为 CO₂ 和 H₂O 时,能产生多少 ATP 分子?

- | | |
|----------------|--------------|
| (1) 葡萄糖 | (5) 磷酸烯醇式丙酮酸 |
| (2) 丙酮酸 | (6) 柠檬酸 |
| (3) 乳酸 | (7) 二羟丙酮磷酸 |
| (4) 果糖-1,6-二磷酸 | (8) NADH |

5. 在生物化学中 O₂ 形成 H₂O 所测得的标准氧化-还原电势为 0.82 V,而在化学测定中测得的数值为 1.23 V,这种差异是怎样产生的?

6. 电子传递链和氧化磷酸化之间有何关系?

7. 解释下列的化合物对电子传递和氧化呼吸链有何作用?当供给充分的底物包括异柠檬酸、Pi、ADP、O₂,并分别加入下列化合物时,估计线粒体中的氧化呼吸链各个成员所处的氧化还原状态。

- | | |
|---------------------|--------------------|
| (1) DNP | (5) N ₂ |
| (2) 鱼藤酮 | (6) CO |
| (3) 抗霉素 A | (7) 寡霉素 |
| (4) CN ⁻ | |

8. 什么是磷/氧比(P/O比),测定磷/氧比有何意义?

9. P/O比、每对电子转运质子数之比(H⁺/2e⁻)、形成一分子 ATP 所需质子数的比例、将 ATP 转运到细胞溶胶所需质子数之比(~P/H⁺),它们之间是否有相关性?10. 计算琥珀酸由 FAD 氧化和由 NAD⁺ 氧化的 ΔG° 值(利用表 24-1 的数据)。设 FAD//FADH₂ 氧-还对的 ΔE° 接近于 0V。解释为什么在琥珀酸脱氢酶催化的反应中只有 FAD 能作为电子受体而不是 NAD⁺?

11. 电子传递链产生的质子电动势为 0.2 V,转运 2、3、4 个质子,温度为 25℃,所得到的有效自由能为多少?用这些能可合成多少 ATP 分子?

主要参考书目

1. 吉林大学等. 物理化学. 北京:人民教育出版社,1979
2. 沈同,王镜岩主编. 生物化学(下册). 第二版. 北京:高等教育出版社,1990
3. 郑集,陈钧辉. 普通生物化学. 第三版. 北京:高等教育出版社,1998
4. Stryer L. Biochemistry 4th ed., New York: W. H. Freeman and Company, 1995
5. Voet D, Voet J G. Biochemistry. New York: John Wiley and Sons, 1990, 1995
6. Stenesh J. Biochemistry. Plenum Press, 1998
7. Roskoski R. Biochemistry. W. B. Saunders Company, 1996
8. Hames B D, Hooper N M, Houghton J D. Instant Notes in Biochemistry. Springer, 1998
9. Pedersen P L, L Amzel M. ATP synthases. Journal of Biological Chemistry, 1993, (268): 9937 ~ 9940
10. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. Worth Publishers, 2000
11. Fetter J R *et al.*, Possible proton relay pathways in cytochrome c oxidase. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, (92): 1 604 ~ 1 608
12. Gray H B, Winkler J R. Electron transfer in proteins. Annu Rev Biochem, 1996, (65): 537 ~ 561
13. Boyer P D. The ATP synthase—a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 1998, (66): 717 ~ 749
14. Kinoshita K J, Yasuda R *et al.* F₁ATPase: a rotary motor made of a single molecule. Cell 1998, (93): 21 ~ 24
15. Stock D, Losile A G W walker J E. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science. 1999, (286): 1 700 ~ 1 705
16. Klingenberg M, Huang S G. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. Biochim. Biophys. Acta, 1999, (1415): 271 ~ 296

(王镜岩)

第 25 章 戊糖磷酸途径和糖的其他代谢途径

一、戊糖磷酸途径

(一) 戊糖磷酸途径的发现

戊糖磷酸途径 (pentose phosphate pathway) 又称戊糖支路 (pentose shunt)、己糖单磷酸途径 (hexose monophosphate pathway)、磷酸葡糖酸氧化途径 (phosphogluconate oxidative pathway) 及戊糖磷酸循环 (pentose phosphate cycle) 等。这些名称强调的是从磷酸化的六碳糖形成磷酸化的五碳糖。

这条途径的发现是从研究糖酵解过程的观察中开始的。向供研究糖酵解使用的组织匀浆中添加碘乙酸、氟化物等抑制剂,葡萄糖的利用仍在继续。许多现象表明在已发现的糖酵解途径之外,还存在有另外未知的糖的代谢途径。特别是 1931 年, Otto Warburg 及同事,还有 Fritz Lipman 发现了葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose phosphate dehydrogenase) 和 6-磷酸葡糖酸脱氢酶 (6-phosphogluconate dehydrogenase), 这两种酶都促使葡萄糖分子的代谢走向糖酵解以外的未知途径。他们还发现了 NADP^+ (当时称为 TPN, 是 triphosphopyridinenucleotide 的缩写, 中文名称为三磷酸吡啶核苷酸) 是上述两种酶的辅酶。这些发现不只引起人们对这条未知途径的进一步探索, 还在酶学、中间代谢以及维生素和辅酶研究的发展中具有重要的历史意义。他们还提出 6-磷酸葡糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡糖酸氧化脱羧形成的直接产物可能是戊糖磷酸。Frank Dickens 继续 Warburg, O. 等人的研究, 分离得到许多戊糖磷酸途径的混合中间产物, 包括磷酸戊糖酸 (phosphopentonic acid) 和磷酸己糖酸 (phosphohexonic acid) 以及其他一些五碳和四碳化合物的磷酸酯等, 其中五碳化合物经鉴定已知是戊糖。Frank Dickens 还提出了一条葡萄糖-6-磷酸降解新途径的设想。此外, 在各种生物体内所发现的五碳糖、六碳糖、七碳糖以及它们的衍生物景天庚酮糖 (sedoheptulose)、核糖 (ribose)、脱氧核糖 (deoxyribose) 等等, 它们的来源不可能从糖酵解途径中得到解释, 这些事实也支持有未知的新途径存在, 但当时的酶制剂还不可能达到只催化某单一反应的纯度, 也缺乏分离和鉴定少量反应产物的方法, 因此通过实验和推理所得到的研究结果还有待进一步地验证。

20 世纪 30 年代虽然已发现了戊糖磷酸途径的存在, 也认识到这条途径的某些重要性, 但由于战争和研究的极大困难, 这一课题竟停顿了约 10 年之久。1953 年 Dickens, F. 总结了前人的研究成果, 发表在英国的医学杂志上 (British Medical Bulletin, 英国医学公报), 这项研究又得到了进一步发展。50 年代开始, 随着酶分离方法的进展, 获得了较纯的酶制剂, 大大促进了对一步步反应产物的认识。最早分离得到戊糖的是在 1951 年, Scott, D. B. 和 Cohen, S. S.。他们用 Dickens, F. 的酶制剂得到少量的核糖-5-磷酸。当时的鉴定手段是用纸层析法和酶促分析法。

同位素标记研究的应用使这条途径得到了进一步地确证, 还显示了这条途径存在的普遍性。

在探索戊糖磷酸途径中做出重要贡献的人除了前述的 Otto Warburg、Fritz Lipman、Frank Dickens 等人外, 还应提出 Bernard Horecker、Efraim Racker 等人。有人也将戊糖磷酸途径称为 Warburg - Dickens 戊糖磷酸途径。

(二) 戊糖磷酸途径的主要反应

戊糖磷酸途径是糖代谢的第二条重要途径, 它是葡萄糖分解的另外一种机制。这条途径在细胞溶胶内进行, 广泛存在于动植物细胞内。

它由一个循环式的反应体系构成。该反应体系的起始物为葡萄糖-6-磷酸, 经过氧化分解后产生五

碳糖, CO_2 、无机磷酸和 NADPH 即还原型烟酰胺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 又称还原型辅酶 II)。NADPH 的结构式如图 25-1 所示。

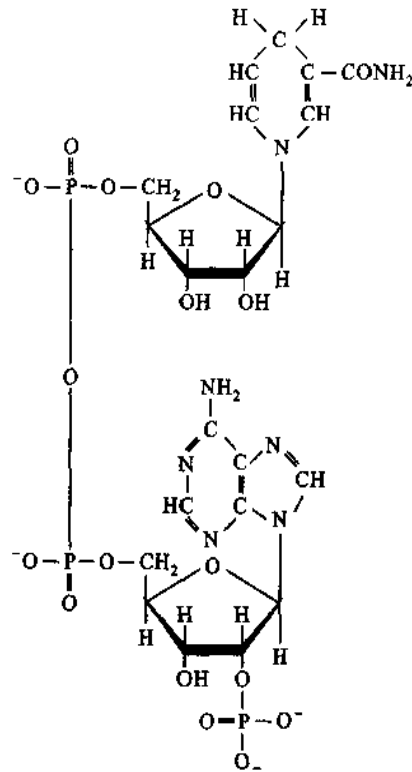
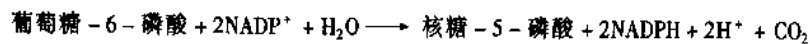


图 25-1 还原型 NADPH 的结构式

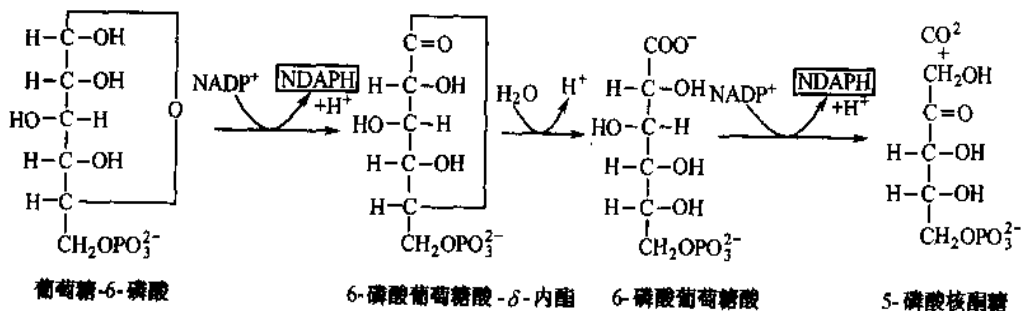
戊糖磷酸途径的核心反应可作如下的概括:



一般可将其全部反应划分为两个阶段:氧化阶段(oxidative phase)和非氧化阶段(nonoxidative phase)。

1. 氧化阶段

这个阶段包括六碳糖脱羧形成五碳糖(核酮糖, ribulose)并使 NADP^+ 还原形成还原型 NADPH。氧化阶段共包括三步反应:



(1) 葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的作用下形成 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内酯(6-phosphoglucono δ -lactone) 该反应是分子内第 1 碳 C(1) 的羧基和第 5 碳 C(5) 的羟基之间发生的酯化反应。酶的催化过程需要 NADP^+ 作为辅酶。

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶高度严格地以 NADP^+ 为电子受体。以 NAD^+ 为辅酶测得的 K_m 值相当于以 NADP^+ 为辅酶的千倍。

(2) 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内酯在一个专一内酯酶(lactonase)作用下水解,形成 6-磷酸葡萄糖酸(6-

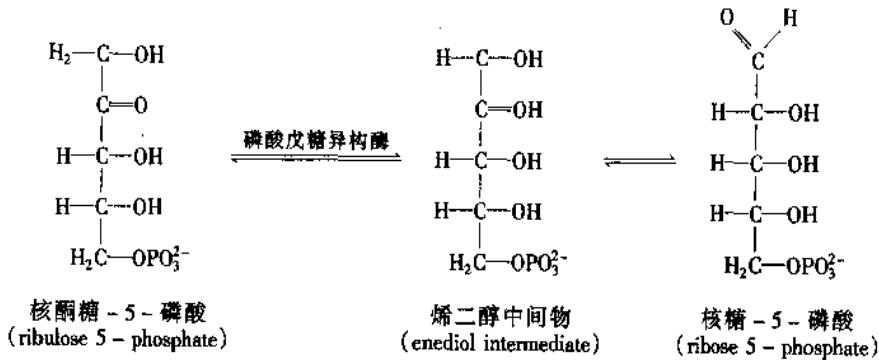
phosphogluconate)。

(3) 6-磷酸葡萄糖酸在6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6-phosphogluconate dehydrogenase)作用下,形成核酮糖-5-磷酸(ribulose 5-phosphate) 该酶也是以 NADP⁺ 为电子受体,催化的反应包括脱氢和脱羧步骤。

2. 非氧化反应阶段

全部戊糖磷酸途径除上述的三步反应外,都是非氧化反应阶段。包括核酮糖-5-磷酸通过形成烯二醇中间步骤,异构化为核糖-5-磷酸。核酮糖-5-磷酸还通过差向异构形成木酮糖-5-磷酸,再通过转酮基反应和转醛基反应,将戊糖磷酸途径与糖酵解途径联系起来,并使葡萄糖-6-磷酸再生。

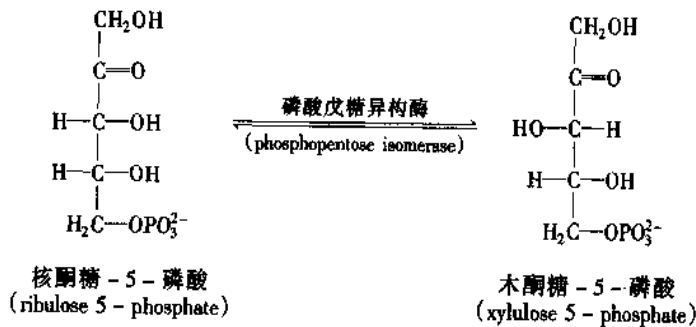
(1) 核酮糖-5-磷酸异构化为核糖-5-磷酸 核酮糖-5-磷酸在磷酸戊糖异构酶(phosphopentose isomerase)作用下,通过形成烯二醇中间产物,异构化为核糖-5-磷酸(ribose 5-phosphate):



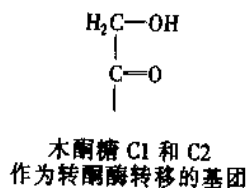
上述反应和糖酵解过程中葡萄糖-6-磷酸转变为果糖-6-磷酸的反应以及二羟丙酮磷酸异构化为甘油醛-3-磷酸都属于酮-醛异构化反应。它们都通过烯二醇中间产物步骤。

葡萄糖-6-磷酸通过三步氧化反应和一步异构化反应形成两分子 NADPH 和一分子核糖-5-磷酸。

(2) 核酮糖-5-磷酸转变为木酮糖-5-磷酸 核酮糖-5-磷酸在磷酸戊糖异构酶(phosphopentose isomerase)作用下转变成核酮糖-5-磷酸的差向异构体(epimer)木酮糖-5-磷酸(xylulose 5-phosphate):

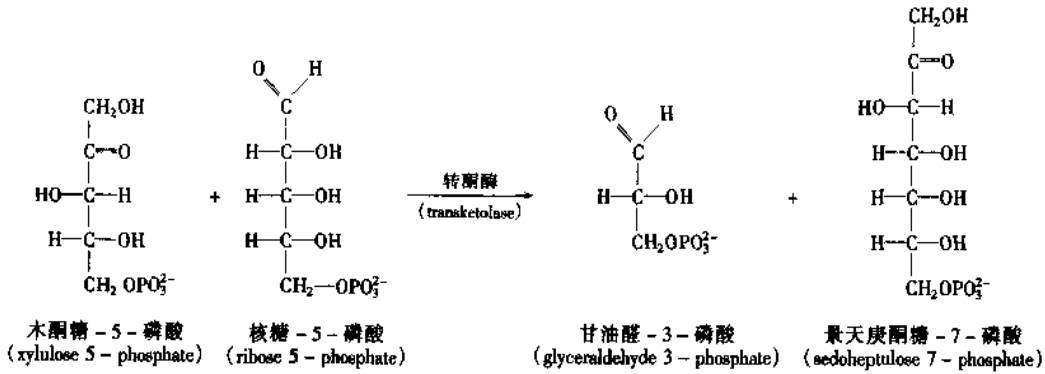


核酮糖-5-磷酸转变为差向异构体木酮糖-5-磷酸具有特别的生物学意义。因为酮糖(ketose)作为转酮酶(transketolase)的底物只有当其 C3 位的羟基相当于木酮糖的位置时才起作用。核酮糖 C3 位的羟基不能满足转酮酶的要求。木酮糖的 C1 和 C2 构成转酮酶转移的基团:

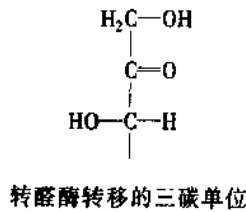


(3) 木酮糖-5-磷酸与核糖-5-磷酸作用,形成景天庚酮糖-7-磷酸和甘油醛-3-磷酸 木酮糖不仅具有转酮酶所要求的结构,还将戊糖磷酸途径与糖酵解途径联成一体。木酮糖经转酮酶的作用,将两碳单位(two-carbon unit)转移到核糖-5-磷酸上,结果自身转变为甘油醛-3-磷酸,同时形成另外一

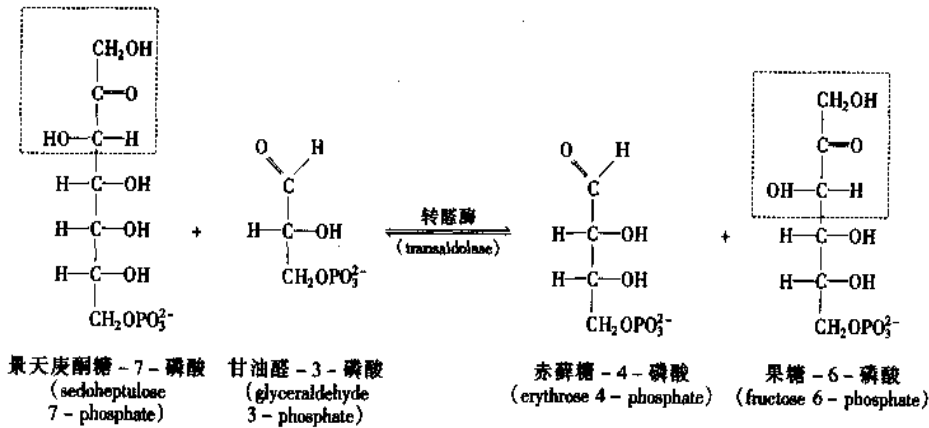
个七碳产物,即景天庚酮糖-7-磷酸(sedoheptulose 7-phosphate):



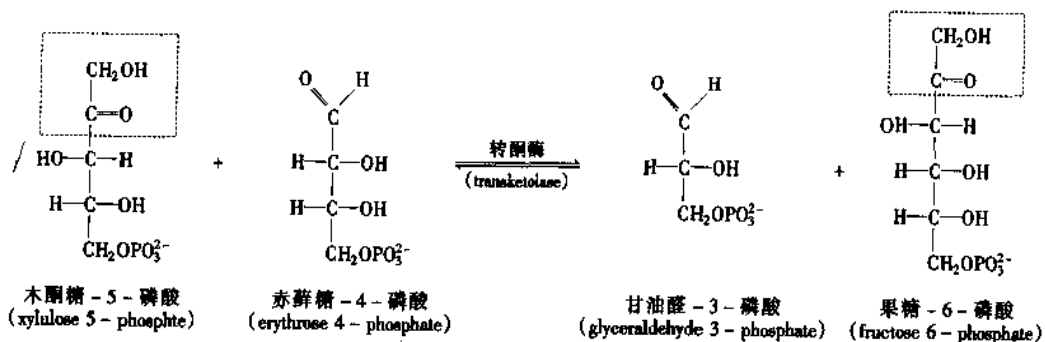
(4)景天庚酮糖-7-磷酸与甘油醛-3-磷酸之间发生转醛基反应,形成果糖-6-磷酸和赤藓糖-4-磷酸(erythrose 4-phosphate) 在转醛酶(transaldolase)的催化下,景天庚酮糖-7-磷酸转变为果糖-6-磷酸,而甘油醛-3-磷酸则转变为赤藓糖-4-磷酸。转醛酶催化转移的是三碳单位(three-carbon unit),如下所示:



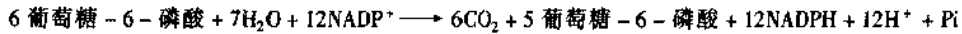
转醛酶催化的全部反应如下:



(5)木酮糖-5-磷酸和赤藓糖-4-磷酸作用形成甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸 木酮糖-5-磷酸和赤藓糖-4-磷酸之间发生转酮基作用,生成糖酵解途径的两个中间产物:甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸。反应如下:



果糖-6-磷酸也可在磷酸葡萄糖异构酶(phosphoglucose isomerase)催化下转变为葡萄糖-6-磷酸。如果6个葡萄糖-6-磷酸分子通过戊糖磷酸途径后,每个葡萄糖-6-磷酸分子氧化脱羧失掉一个CO₂,最后又生成5个葡萄糖-6-磷酸分子。全部反应可用下式表示:



由上式可看出通过戊糖磷酸途径使一个葡萄糖-6-磷酸分子全部氧化为6分子CO₂,并产生12个具有强还原力的分子即12个NADPH。

戊糖代谢的非氧化阶段中,全部反应都是可逆反应,这保证了细胞能以极大的灵活性满足自己对糖代谢中间产物以及大量还原力的需求。戊糖磷酸途径的总览如图25-2所示。

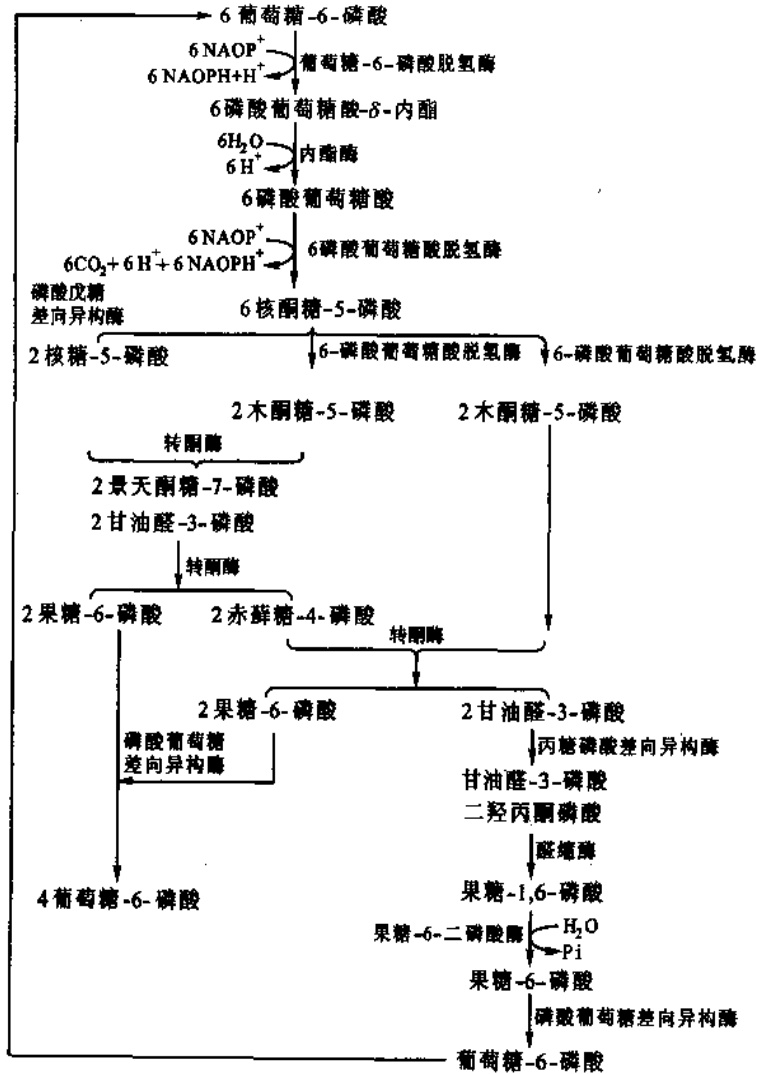


图 25-2 戊糖磷酸途径总览

6个葡萄糖-6-磷酸分子进入戊糖磷酸途径,再生5个葡萄糖-6-磷酸分子,产生6分子CO₂和P_i,并产生12个NADPH+12个H⁺

(三) 戊糖磷酸途径反应速度的调控

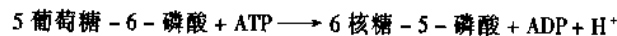
戊糖磷酸途径氧化阶段的第一步反应,即葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化的葡萄糖-6-磷酸的脱氢反应,实质上是不可逆的。在生理条件下属于限速反应(rate-limiting reaction),是一个重要的调控点。最重要的调控因子是NADP⁺的水平。因为NADP⁺在葡萄糖-6-磷酸氧化形成-6-磷酸葡萄糖酸δ-内酯的反应中起电子受体的作用。形成的还原型NADPH与NADP⁺争相与酶的活性部位结合而引起酶活性

的降低,即竞争性地抑制葡萄糖-6-磷酸脱氢酶及-6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的活性。所以 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 的比值直接影响葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性。从营养充足的大白鼠肝脏细胞溶胶测得的 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 比值大约为 0.014,这个比值比 NAD^+ 和 NADH 的比值低若干个数量级, NAD 和 NADH 的比值在完全相同的条件下为 700。0.014 表明 NADP^+ 的水平只略高于 NADPH 水平。这个比值还表明, NADP^+ 的水平对戊糖磷酸途径的氧化阶段具有极明显的效果。只要 NADP^+ 的浓度稍高于 NADPH ,即能够使酶激活从而保证所产生的 NADPH 能够及时满足还原性生物合成以及其他方面的需要。所以说 NADP^+ 的水平对戊糖磷酸途径在氧化阶段产生 NADPH 的速度和机体在生物合成时对 NADPH 的利用形成偶联关系。

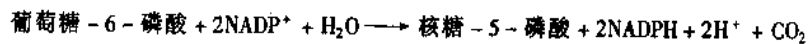
如前述,转酮酶和转醛酶反应都是可逆反应。因此根据细胞代谢的需要,戊糖磷酸途径和糖酵解途径可灵活地相互连系。

戊糖磷酸途径中葡萄糖-6-磷酸的去路,可受到机体对 NADPH 、核糖-5-磷酸和 ATP 不同需要的调节。可能有 3 种情况:

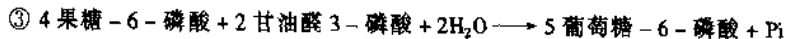
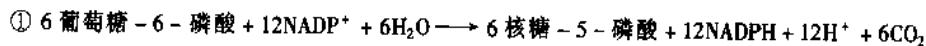
第 1 种情况是机体对核糖-5-磷酸的需要远远超过对 NADPH 的需要。这种情况可见于细胞分裂期,这时需要核糖-5-磷酸合成 DNA 的前体核苷酸。为了满足这种需要,大量的葡萄糖-6-磷酸通过糖酵解途径转变为果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸。这是由转酮酶和转醛酶将 2 分子果糖-6-磷酸和 1 分子甘油醛-3-磷酸通过反方向戊糖磷酸途径反应转变为 3 分子核糖-5-磷酸。全部反应的化学计算关系可表示如下:



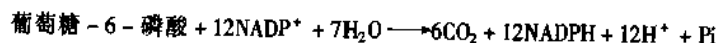
第 2 种情况是机体对 NADPH 的需要和对核糖-5-磷酸的需要处于平衡状态。这时戊糖磷酸途径的氧化阶段处于优势。通过这一阶段形成 2 分子 NADPH 和 1 分子核糖-5-磷酸。这一系列反应的化学计算关系可表示为:



第 3 种情况是机体需要的 NADPH 远远超过核糖-5-磷酸,于是葡萄糖-6-磷酸彻底氧化为 CO_2 。例如,脂肪组织*需要大量的 NADPH 作为还原力来合成脂肪酸(参看第 29 章脂类的生物合成)。组织对 NADPH 的需要促使以下 3 组反应活跃起来:首先,是由戊糖磷酸途径在氧化阶段形成 2 分子 NADPH 和 1 分子核糖-5-磷酸;第 2 组反应是核糖-5-磷酸由转酮酶和转醛酶转变为果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸;第 3 组反应是果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸,通过葡糖异生途径(见本章后面糖的其他代谢途径)形成葡萄糖-6-磷酸。三组反应全过程的化学计算式可表示如下:



以上 3 种反应的总反应式即是:

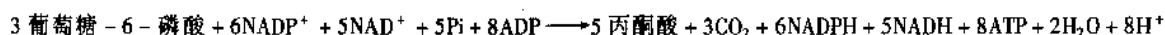


从物质的量关系上看一分子葡萄糖-6-磷酸可以完全被氧化为 6 分子 CO_2 ,同时产生 12 个 NADPH 。实际上形成的核糖-5-磷酸又通转酮基、转醛基和葡糖异生途径中的一些酶的作用又转变为葡糖-6-磷酸。

此外,由戊糖磷酸途径形成的核糖-5-磷酸还可转变为丙酮酸。由核糖-5-磷酸形成的果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸即可进入糖酵解途径。所以即可产生 ATP 又可产生 NADPH ,同时由葡萄糖-6-

* 脂肪组织的戊糖磷酸途径比肌肉的该途径活跃得多。这是用放射性同位素(^{14}C)分别标记葡萄糖分子的第 1 个碳原子(C_1)和第 6 个碳原子(C_6)并比较它们在两种组织中的代谢情况(观察 CO_2 的形成)所得到的结果

磷酸中的 5 个碳原子形成丙酮酸。总反应如下：



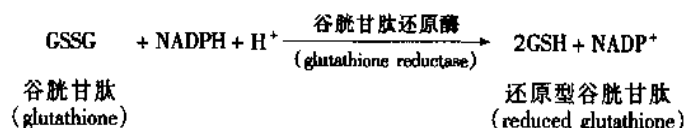
(四) 戊糖磷酸途径的生物学意义

可将戊糖磷酸途径的主要功能概括为以下两个方面：

1. 戊糖磷酸途径是细胞产生还原力(NADPH)的主要途径

生活细胞将获得的燃料分子经分解代谢将一部分高潜能的电子通过电子传递链传至 O_2 , 产生 ATP 提供能量消耗的需要, 另一部分高潜能的电子并不产生 ATP, 而是以还原力的形式保存下来, 供还原性生物合成的需要。NADPH 分子不只是因为它的核糖单位的第 2 个碳原子上有一个磷酸基团而在结构上区别于 NADH, 它的功能在大多数生物化学反应中也和 NADH 根本不同。NADH 的作用主要是通过呼吸链提供 ATP 分子, 而 NADPH 在还原性生物合成中起负氢离子供体的作用。例如, 在脂肪酸和固醇类的生物合成中, 在光合作用中戊糖磷酸途径的部分途径参加由 CO_2 合成葡萄糖的途径, 由核糖核苷酸转变为脱氧核糖核苷酸等都需要 NADPH。

戊糖磷酸途径的酶类在骨骼肌肉中活性很低, 而在脂肪组织以及其他合成脂肪酸和固醇类活跃的组织如乳腺、肾上腺皮质、肝脏等组织, 它们的活性是很高的。主要是因为脂肪酸固醇类的合成需要还原力。在脊椎动物的红细胞(red blood cells)中戊糖磷酸途径酶类的活性也很高。因为在红细胞中戊糖磷酸途径提供的还原力可保证红细胞中的谷胱甘肽(glutathion, GssG)处于还原状态：



红细胞需要大量的还原型谷胱甘肽, 一方面红细胞与还原型谷胱甘肽共用 -SH 基团来维持其蛋白质结构的完整性; 另一方面用于保护脂膜防止被过氧化物、过氧化氢等氧化; 再一方面是维持红细胞内血红素的铁原子处于 2 价 (Fe^{2+}) 状态; 因含有 Fe^{3+} 的高铁血红蛋白(methemoglobin)没有运输氧的功能。NADPH 水平的降低可使蛋白质发生变化, 使脂类发生过氧化作用, 使红细胞产生高血红素(Fe^{3+})。所有的变化都使红细胞膜变弱, 导致红细胞对损伤敏感, 往往引起溶血(hemolysis)。

关于戊糖磷酸途径在各种组织中的活力情况是用放射性同位素标记实验证明的。用这种方法阐明了有多少葡萄糖-6-磷酸是通过戊糖磷酸途径代谢的, 多少是通过糖酵解和柠檬酸循环途径代谢的。例如, 将一份组织匀浆与在 C1 位用 ^{14}C 标记的葡萄糖共同保温, 将另一份组织匀浆与在 C6 位用 ^{14}C 标记的葡萄糖共同保温, 然后比较两个样品产生的放射性 CO_2 的量。该实验的基本原理是只有 C1 位是通过戊糖磷酸途径脱羧, 而当葡萄糖通过酵解途径、丙酮酸脱氢酶辅合体和柠檬酸循环时, 则在 C1 位和 C6 位均等地脱羧, C1 和 C6 相当的原因是由于在酵解过程中, 甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸在丙糖磷酸异构酶作用下互变非常迅速。

有些人, 在我国多发生在南方, 在国外多发生在黑人, 因遗传缺陷葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。他们的红细胞中 NADPH 浓度达不到需要水平, 很容易患贫血症(anemia)。这种病人对具有氧化性的药物例如原奎宁又称伯氨喹(pamaquine, 一种抗疟疾药物)、磺胺类药物(sulfa drugs)以及阿司匹林(aspirin)等药物过敏。这些药物对大多数患疟疾的病人都能接受, 看不出有任何毒害, 但对少数遗传缺陷葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的患者却会产生严重后果, 他们的氧化红细胞内的 NADPH, 使细胞因缺乏 NADPH 而容易破裂。结果造成严重的溶血性贫血症(hemolytic anemia), 表现为黄疸、尿呈黑色、血色素下降等症状, 严重者甚至因大量红细胞破裂而导致死亡。

2. 戊糖磷酸途径是细胞内不同结构糖分子的重要来源, 并为各种单糖的相互转变提供条件

三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖以及七碳糖的碳骨架都是细胞内糖类不同的结构分子, 其中核糖及其衍生物 ATP、CoA、NAD⁺、FAD、RNA 及 DNA 等都是重要生物分子的组成部分, 它们都来源于戊糖磷酸途径。

二、糖的其他代谢途径

(一) 葡糖异生作用

葡糖异生即是葡萄糖的异生作用,英文名称为 gluconeogenesis,来源于希腊文:“glykys”是“甜”的意思,“neo”是“新”的意思,“genesis”是“来源”或“产生”的意思。英语中的前缀“gluco”或“glyco”来源于同一个希腊文“glykys”。这两个前缀实质上是相同的,区别只是拼写的差异。

英语的旧名称为“glyconeogenesis”根据原来的词意比较合理的应为“gluconeogenesis”。现在新的教科书已普遍改用“gluconeogenesis”。

葡糖异生作用指的是以非糖物质作为前体合成葡萄糖的作用。非糖物质包括乳酸、丙酮酸、丙酸、甘油以及氨基酸等。葡糖异生对于人类以及其他动物是绝对需要的途径。例如,人脑以葡萄糖作为主要燃料,对葡萄糖有高度的依赖性。红细胞也需要提供葡萄糖。成人脑每日大约需要 120 g 葡萄糖,占人体对葡萄糖的每日总需要量——约为 160 g 的绝大部分。已知体液中的葡萄糖含量大约为 20 g,从糖原(glycogen)可随时提供的葡萄糖大约为 190 g。因此机体在一般情况下,体内的葡萄糖量足够维持一天的需要,但是如果机体处于饥饿状态,则必须由非糖物质转化成葡萄糖提供急需。当机体处于剧烈运动时,也需要由非糖物质及时提供葡萄糖。机体除中枢神经系统(central nervous system)和红细胞需直接提供葡萄糖外,肾髓质(kidney medulla)、睾丸(testes)、眼晶状体等组织也主要利用葡萄糖提供能量。机体必须将血糖维持在一定水平,才能使这些器官及时得到葡萄糖的供应。因此即使每日从摄食得到葡萄糖而且体内有储存的糖原,机体仍需要不断从非糖物质合成葡萄糖以保证不间断地将葡萄糖提供给那些主要依赖葡萄糖为能源的组织。

1. 葡糖异生作用的途径

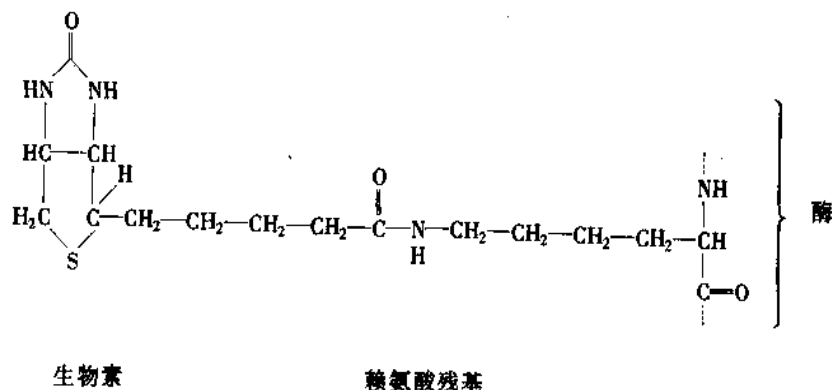
(1) 葡糖异生作用和糖酵解作用的关系

葡糖异生作用并不是糖酵解作用的直接逆反应。虽然葡萄糖可由丙酮酸合成,其所经历的途径绝大部分是糖酵解过程的逆反应,但并不完全是糖酵解过程的逆反应。糖酵解过程是放能过程。一般在典型的细胞内环境下,由葡萄糖形式丙酮酸的 ΔG 为 -83.68 kJ/mol (-20 kcal/mol)。其中有三步反应是不可逆的。即:①由己糖激酶催化的葡萄糖和 ATP 形成葡萄糖-6-磷酸和 ADP,②由磷酸果糖激酶催化的果糖-6-磷酸和 ATP 形成果糖-1,6-二磷酸和 ADP,③由丙酮酸激酶催化的磷酸烯醇式丙酮酸和 ADP 形成丙酮酸和 ATP 的反应。葡糖异生作用要利用糖酵解过程中的可逆反应步骤必须对上述 3 个不可逆过程采取迂迴措施绕道而行。

(2) 葡糖异生对糖酵解的不可逆过程采取的迂迴措施如下

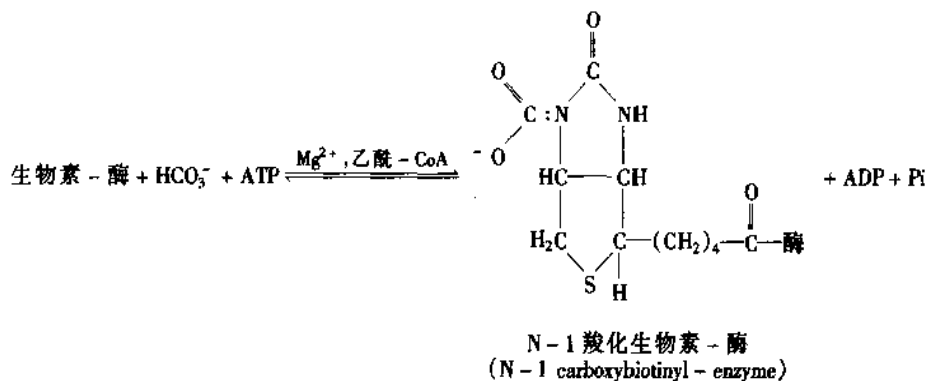
① 迂迴措施之一:丙酮酸通过草酰乙酸形成磷酸烯醇式丙酮酸。该措施分两步进行:

a. 丙酮酸在丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)催化下,消耗一个 ATP 分子的高能磷酸键形成草酰乙酸。丙酮酸羧化酶含有一个从共价键结合的生物素(biotin)作为辅基。生物素起 CO_2 载体的作用。生物素的末端羧基与酶分子的一个赖氨酸残基的 ϵ -氨基以酰胺键相连。使生物素和赖氨酸形成丙酮酸羧化酶的一个长摆臂:



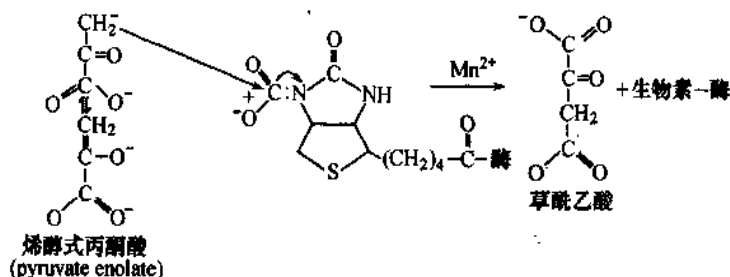
丙酮酸的羧化分两步进行:

①丙酮酸羧化酶在 ATP 参与下与 CO_2 结合使其成为活化的形式。ATP 的水解推动此反应的进行:



上式表明: CO_2 以羧基形式结合到酶辅基生物素环的 N1 原子上, 形成活化羧基。此活化羧基水解的 $\Delta G^0 = -19.7 \text{ kJ/mol} (-4.7 \text{ kcal/mol})$ 。因此, 它的转移不需提供能量。

②活化的羧基从羧化生物素转移到烯醇式丙酮酸上形成草酰乙酸:

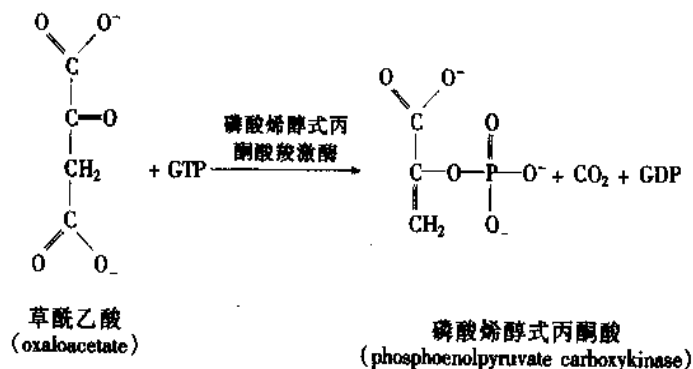


丙酮酸羧化酶是存在于线粒体基质的酶, 由 4 个亚基组成四聚体。每个亚基都与 Mg^{2+} 相结合。每个亚基的相对分子质量为 120 000。乙酰-CoA 是该酶强有力的别构激活剂(allosteric activator)。如果该酶不与乙酰-CoA 结合, 则生物素不能羧化。

上述的总反应可用下式表示:



b. 草酰乙酸在磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)催化下, 形成磷酸烯醇式丙酮酸。该反应需消耗一个 GTP 分子, 反应如下:

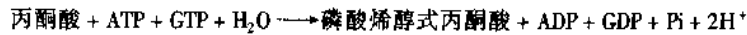


磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶由一条单一肽链构成, 其相对分子质量为 740 000。不同生物该酶在亚细胞内的位置不同。例如, 在大白鼠和小白鼠的肝细胞, 全部存在于细胞溶胶中; 在鸟和兔的肝细胞, 全部存在于线粒体中; 在豚鼠和人类, 则比较均匀地分布在线粒体和细胞溶胶中。

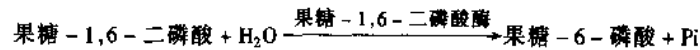
应提醒注意的是, 在前述反应中的丙酮酸羧化酶是一种线粒体酶, 而葡萄糖异生作用中导致形成葡萄糖-6-磷酸的其他酶都是细胞溶胶酶。由丙酮酸羧化形成的草酰乙酸, 必须穿过线粒体膜才能作为磷酸

烯醇式丙酮酸羧激酶的底物被催化形成磷酸烯醇式丙酮酸。因为细胞不存在直接使草酰乙酸跨膜的运送蛋白,一般情况下,草酰乙酸通过形成苹果酸的途径跨过线粒体膜。草酰乙酸在线粒体内由与 NADH 相联的苹果酸脱氢酶催化,还原为苹果酸,跨过线粒体膜后,又由细胞溶胶中的与 NAD^+ 相联的苹果酸脱氢酶使其再氧化形成草酰乙酸。

总结上述由丙酮酸转变为磷酸烯醇式丙酮酸的反应可表示如下:

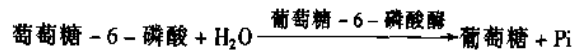


② 迂迴措施之二: 果糖 - 1,6 - 二磷酸在果糖 - 1,6 - 二磷酸酶(fructose 1,6 - bisphosphatase)催化下,其 C1 位的磷酸酯键水解形成果糖 - 6 - 磷酸。这一反应是放能反应,容易进行。



上述反应的特殊意义在于,它避开了糖酵解过程不可能进行的直接逆反应,即形成一个 ATP 分子和果糖 - 6 - 磷酸的吸能反应,将其改变为释放无机磷酸的放能反应。

③ 迂迴措施之三: 葡萄糖 - 6 - 磷酸在葡萄糖 - 6 - 磷酸酶(glucose 6 - phosphatase)催化下水解为葡萄糖。



葡萄糖 - 6 - 磷酸酶是结合在光面内质网膜的一种酶。它的活性需有一种与 Ca^{2+} 结合的稳定蛋白(Ca^{2+} - binding stabilizing protein)协同作用。葡萄糖 - 6 - 磷酸在转变为葡萄糖之前必须先转移到内质网内才能接受葡萄糖 - 6 - 磷酸酶的水解作用;形成的葡萄糖和无机磷酸,通过不同的转运途径又回到细胞溶胶中。

肝、肠和肾细胞内由葡萄糖 - 6 - 磷酸形成的葡萄糖进入血液,对维持血液中葡萄糖(血糖)浓度的平衡起着重要作用。脑和肌肉中不存在葡萄糖 - 6 - 磷酸酶,因此脑和肌肉细胞不能利用葡萄糖 - 6 - 磷酸形成葡萄糖。在肝脏中,葡糖异生作用的主要物质是骨骼肌活动的产物乳酸和丙氨酸。当肌肉紧张活动时形成的乳酸随血流进入肝脏加工。这有利于减轻肌肉的繁重负担。

上述三步迂迴措施实际上是由不同的酶绕过了糖酵解中不可逆的三步反应。葡糖异生作用和糖酵解作用中酶的差异可用表 25 - 1 表明。

表 25 - 1 糖酵解和葡糖异生反应中的酶的差异

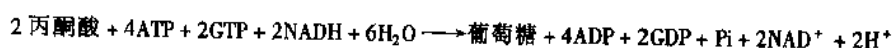
	糖酵解作用	葡糖异生作用
1.	己糖激酶(hexokinase)	葡萄糖 - 6 - 磷酸酶(glucose 6 - phosphatase)
2.	磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)	果糖 - 1,6 - 二磷酸酶(fructose 1,6 - bisphosphatase)
3.	丙酮酸激酶(pyruvate kinase)	丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase) 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase)

2. 葡糖异生途径总览

图 25 - 3 表明葡糖异生途径的全过程。为便于理解葡糖异生途径和糖酵解途径的关系,用糖酵解途径的次序和相反的箭头方向相对比。

3. 由丙酮酸形成葡萄糖的能量消耗及意义

由两分子丙酮酸形成一分子葡萄糖的总反应可用下式表示:



上述反应的 $\Delta G^0 = -37.66 \text{ kJ/mol} (-9 \text{ kcal/mol})$ 。

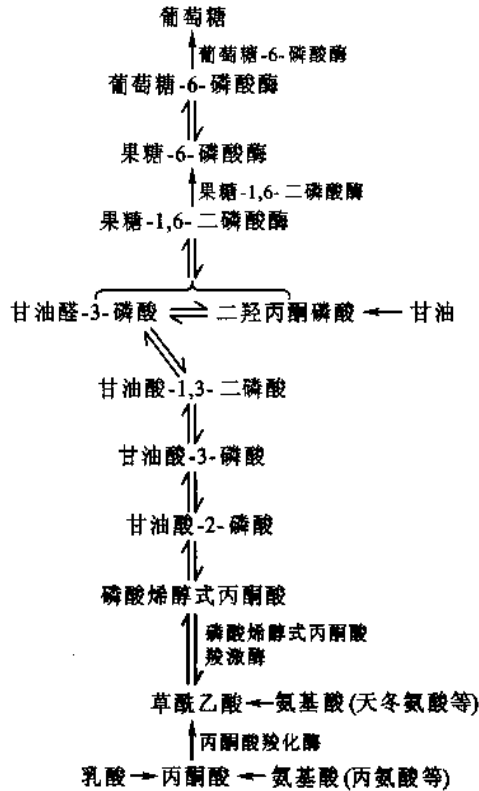
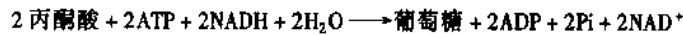


图 25-3 葡糖异生途径总览图

图中粗箭头表示与糖酵解不同的反应途径,其他反应都属糖酵解过程的逆反应

若完全走糖酵解的逆反应过程,可推算出如下的反应和能量消耗:



$\Delta G^0' = +20 \text{ kcal/mol}$ (反应不可能进行)。

从上述两种不同途径的比较可看到,由葡萄糖经酵解途径形成丙酮酸可产生两个 ATP 分子。由丙酮酸合成葡萄糖需消耗 4 个 ATP 分子和两个 GTP 分子即 6 个高能磷酸键。总算起来,葡糖异生需消耗 4 个额外的高能键。这 4 个额外的高能磷酸键的能量即用于将不可能逆行的过程转变为可以通行的反应。此外,ATP 分子参加反应可改变反应的平衡常数。已知一个 ATP 分子参加到反应中或与某一反应相偶联可改变其平衡常数的系数为 10^8 。如果有 n 个 ATP 分子参与反应,可使反应平衡比改变的系数为 10^{8n} 。因此葡糖异生作用中参与的 4 个额外的 ATP 分子,可使反应的平衡常数的系数变为 10^{32} 。这又从另一个角度表明葡糖异生作用在热力学上是有利的。

4. 葡糖异生作用的调节

葡糖异生作用和糖酵解作用有密切的相互协调关系。如果糖酵解作用活跃,则葡糖异生作用必受一定限制。如果糖酵解的主要酶受到抑制,则葡糖异生作用酶的活性就受到促进。这种相互制约又相互协调的关系主要由两种途径不同的酶活性和浓度起作用;因每条途径的酶浓度和活性都是受到调控的。此外底物浓度也起调节作用。葡萄糖的浓度对糖酵解起调节作用。乳酸浓度以及其他葡萄糖前体的浓度对葡糖异生都起调节作用。无论是糖酵解作用还是葡糖异生作用都是高度的放能过程,除上述相互协调的关系外,不存在热力学上的调控抑制关系。两种过程都可同时进行,即一方面葡萄糖转变成丙酮酸,另一方面丙酮酸又重新合成葡萄糖。在这种往复转变的过程中,对机体来说,只是净消耗了两个 ATP 分子和两个 GTP 分子。因此,这种循环又有“无用循环”(“futile cycle”)之称。但是,人们不难想像,“无用循环”不可能对机体是毫无意义的。

(1) 磷酸果糖激酶(PFK)和果糖-1,6-二磷酸酶的调节 AMP对磷酸果糖激酶有激活作用。当AMP浓度高时,表明机体需要合成更多的ATP。AMP刺激磷酸果糖激酶使糖酵解过程加速,同时果糖-1,6-二磷酸酶不再催化葡糖异生作用。ATP以及柠檬酸对磷酸果糖激酶起抑制作用,当二者的浓度升高时,磷酸果糖激酶受到抑制从而降低糖酵解作用,同时柠檬酸又刺激果糖-1,6-二磷酸酶,通过它使葡糖异生作用加速进行。

当饥饿时,机体血糖含量下降,刺激血液中的胰高血糖素水平升高。胰高血糖素有启动cAMP级联反应的作用(关于级联反应请参看第26章糖原代谢的调节),使果糖二磷酸酶2和磷酸果糖激酶2都发生磷酸化,结果导致果糖二磷酸酶2受到激活,同时磷酸果糖激酶2受到抑制。磷酸果糖激酶2使果糖-6-磷酸转变为果糖-2,6-二磷酸(F-2,6-BP)。果糖-2,6-二磷酸是一个信号分子(signal molecule),它对磷酸果糖激酶和果糖-1,6-二磷酸酶具有协同调控作用。果糖-2,6-二磷酸对磷酸果糖激酶具有强烈的激活作用,而对果糖-1,6-二磷酸酶有抑制作用;而果糖-2,6-二磷酸酶使果糖-2,6-二磷酸水解形成果糖-6-磷酸。因此可以理解,果糖-2,6-二磷酸的水平在饥饿情况下对调节糖酵解和葡糖异生作用有特殊的重要意义。在饱食的条件下,血糖浓度升高,血中胰岛素的水平也升高,这时果糖-2,6-二磷酸的水平也随之升高。由于果糖-2,6-二磷酸对磷酸果糖激酶的激活,和对果糖-1,6-二磷酸酶的抑制,从而糖酵解过程加速,葡糖异生作用受到抑制。在饥饿时,低水平的果糖-2,6-二磷酸使葡糖异生作用处于优势。

(2) 丙酮酸激酶、丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶之间的调节 在肝脏中丙酮酸激酶受高浓度ATP和丙氨酸的抑制。高浓度的ATP和丙氨酸是能荷高和细胞结构元件丰富的信号,因此当ATP和丙酮酸等供生物合成所需的中间物充足时,糖酵解作用就受到抑制。催化由丙酮酸作为起始物合成葡萄糖的第一个酶,丙酮酸羧化酶受乙酰-CoA的激活和ADP的抑制,当乙酰-CoA的含量充分时,丙酮酸羧化酶受到激活从而促进葡糖异生作用。但如果细胞的供能情况不够充分,ADP的浓度升高,丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶都受到抑制,而使葡糖异生作用停止进行。因这时的ATP水平很低,丙酮酸激酶解除了抑制,于是糖酵解作用又发挥其有效作用。

丙酮酸激酶还受到果糖-1,6-二磷酸的正反馈激活作用,也加速糖酵解作用的进行。

当机体处于饥饿状态时,为首先保证供应脑和肌肉足够的血糖,肝脏中的丙酮酸激酶受到抑制从而限制了糖酵解作用的进行。因胰高血糖素的分泌加强,进入血液后激活cAMP的级联效应使丙酮酸激酶由于磷酸化也失去活性。

5. 乳酸的再利用和可立氏循环(图 25-4)

前面已经提到,在激烈运动时,糖酵解作用产生的NADH的速度超出通过氧化呼吸链再形成NAD⁺的能力。这时肌肉中酵解过程形成的丙酮酸由乳酸脱氢酶转变为乳酸以使NAD⁺再生,这样糖酵解作用才能继续提供ATP。乳酸属于代谢的一种最终产物,除了再转变为丙酮酸外,别无其他去路。肌肉细胞内的乳酸扩散到血液并随着血流进入肝脏细胞,在肝细胞内通过葡糖异生途径转变为葡萄糖,又回到血液随血流供应肌肉和脑对葡萄糖的需要。这个循环过程称为可立氏循环(Cori cycle)。

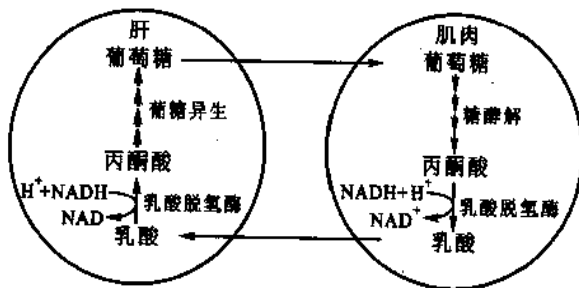


图 25-4 可立氏循环(Cori cycle)示意图

三、葡萄糖出入动物细胞的特殊运载机构

应提起注意的是葡萄糖出入细胞质膜(plasma membrane)并不是简单的扩散作用,而是靠葡萄糖的特殊运送机构,称为葡萄糖运载蛋白(glucose transporter)。运载蛋白对葡萄糖的转运速度是简单扩散的50 000倍。用红细胞进行的研究对了解细胞的运输机制起到了关键性的作用。红细胞的跨膜运载蛋白往

复进行着两种形式的构象变化。在一种构象状态下,这种运载蛋白与葡萄糖的结合部位(glucose-binding site)面向细胞质膜的外面,在另一种构象状态下,其结合部位则面向质膜内面。当面向外面的结合部位与葡萄糖结合后即引起运载蛋白发生构象变化,使结合着的葡萄糖分子从原来面向外的结合部位转移到新形成的面向内的结合部位。这种转换并不是整个蛋白质分子的翻转而只是由于构象变化发生的。葡萄糖分子由于两种不同构象的转换,完成了它的跨膜转移。与向内的结合部位结合着的葡萄糖随即从结合部位解脱下来,游离到红细胞内部。运载蛋白失去葡萄糖分子后,又变回到原来的构象形式。面向细胞内面的结合部位失去活性,又重新形成面向外部的结合部位,完成了运输蛋白转运葡萄糖的一次循环过程,这一运载蛋白又可再接受第2个葡萄糖分子进行第2次的转运。在一般情况下,葡萄糖的转运是一种顺浓度梯度下降形式的运载方式。如果细胞内的葡萄糖浓度高于胞外,例如,小肠的上皮细胞(intestinal epithelial cells),则葡萄糖通过相反方向的运载蛋白催化相反方向的运载;即从上皮细胞运载到血液。葡萄糖由质膜外向内的运载和由质膜内向外的运载是由同一运载蛋白往复地进行,还是由不同的运载蛋白执行,目前似乎认识尚未取得完全一致。

葡萄糖运载蛋白有许多种,在结构和功能上属于一个家族。已发现的葡萄糖运载蛋白命名为 GLUT 1, GLUT 2, GLUT 3, GLUT 4, GLUT 5 及 GLUT 7 等(GLUT 为 glucose transporter 的缩写)。这类蛋白质由一条约为 500 个氨基酸残基的多肽链构成。它们的共同结构要点是有 12 个跨膜片段。如图 25-5 所示。

不同的运载成员所起的作用不同。例如:

① GLUT 1 和 GLUT 3 几乎存在于所有哺乳类细胞,负责基本的葡萄糖摄取;两种运载蛋白对葡萄糖的 K_m 值约为 1 mmol/L。一般血清的葡萄糖浓度为 4~8 mmol/L,因此这两种运载蛋白不断地以稳定的速度转运葡萄糖到细胞内。

② GLUT 2 存在于肝和胰腺的 β 细胞:它的特点是对葡萄糖的 K_m 值特别高,可达 15~20 mmol/L;葡萄糖进入该组织的速度和血糖的水平成正比。胰腺依据葡萄糖浓度的高低调整胰岛素的分泌。GLUT 2 的高 K_m 值还保证,只有当葡萄糖非常充足时,才迅速进入肝细胞。当血糖浓度低时,葡萄糖优先进入脑、肌肉以及其他 K_m 值低于肝细胞的组织。

③ GLUT 4 主要存在于肌肉和脂肪细胞:它的 K_m 值为 5 mmol/L。在摄食充足的情况下,胰岛素作为一种信号使质膜上的 GLUT 4 运载蛋白的数量增加。

④ GLUT 5 存在于小肠细胞:它是 Na^+ 和葡萄糖的共同运载蛋白(Na^+ -glucose symporter),负责从肠腔吸收葡萄糖。这种共同运载蛋白将葡萄糖从肠腔吸收到小肠的上皮细胞。在细胞质膜内侧的 GLUT 5 又将葡萄糖释放到血液中。

⑤ GLUT 7 位于内质网膜,运载葡萄糖-6-磷酸进入内质网内。

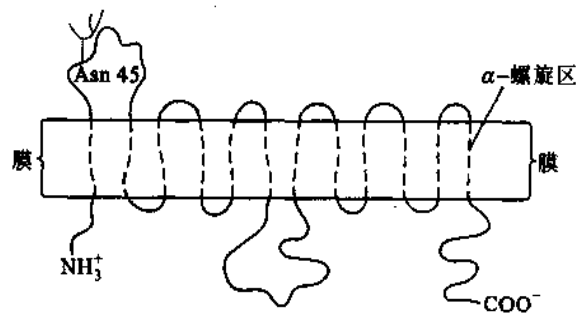


图 25-5 葡萄糖运载蛋白的结构示意图

注:虚线表示 α 螺旋区,都是跨膜螺旋

四、乙醛酸途径

乙醛酸途径(glyoxylate pathway)又称乙醛酸循环(glyoxylate cycle),名称的来源是因为在这个途径中经过一系列反应最终产生乙醛酸。这一途径在动物体内并不存在,只存在于植物和微生物中。它的主要内容实际是通过乙醛酸途径使乙酰-CoA 转变为草酰乙酸从而进入柠檬酸循环。

催化乙醛酸途径的酶既存在于线粒体,也存在于一种为植物膜所特有的亚细胞结构称为乙醛酸循环体(glyoxysome)或写作 glyoxisome)。特别包括两种酶只存在于乙醛酸循环体中,即异柠檬酸裂合酶(isocitrate lyase)和苹果酸合酶(malate synthase)。

乙醛酸途径的全过程如图 25-6 所示。从图中可看到通过乙醛酸途径,乙酰-CoA 转变为草酰乙酸。

乙醛酸途径开始于草酰乙酸与乙酰 - CoA 的缩合。但线粒体中的草酰乙酸不能透过线粒体膜, 必须在天冬氨酸氨基移换酶(aspartate aminotransferase)作用下接受谷氨酸分子的 α - 氨基形成天冬氨酸(aspartate), 才能跨越线粒体膜并进入乙醛酸循环体。在乙醛酸循环体内, 天冬氨酸再经天冬氨酸氨基移换酶的作用将氨基转移到 α - 酮戊二酸分子上, 本身又形成草酰乙酸后, 才能与乙酰 - CoA 缩合形成柠檬酸。柠檬酸

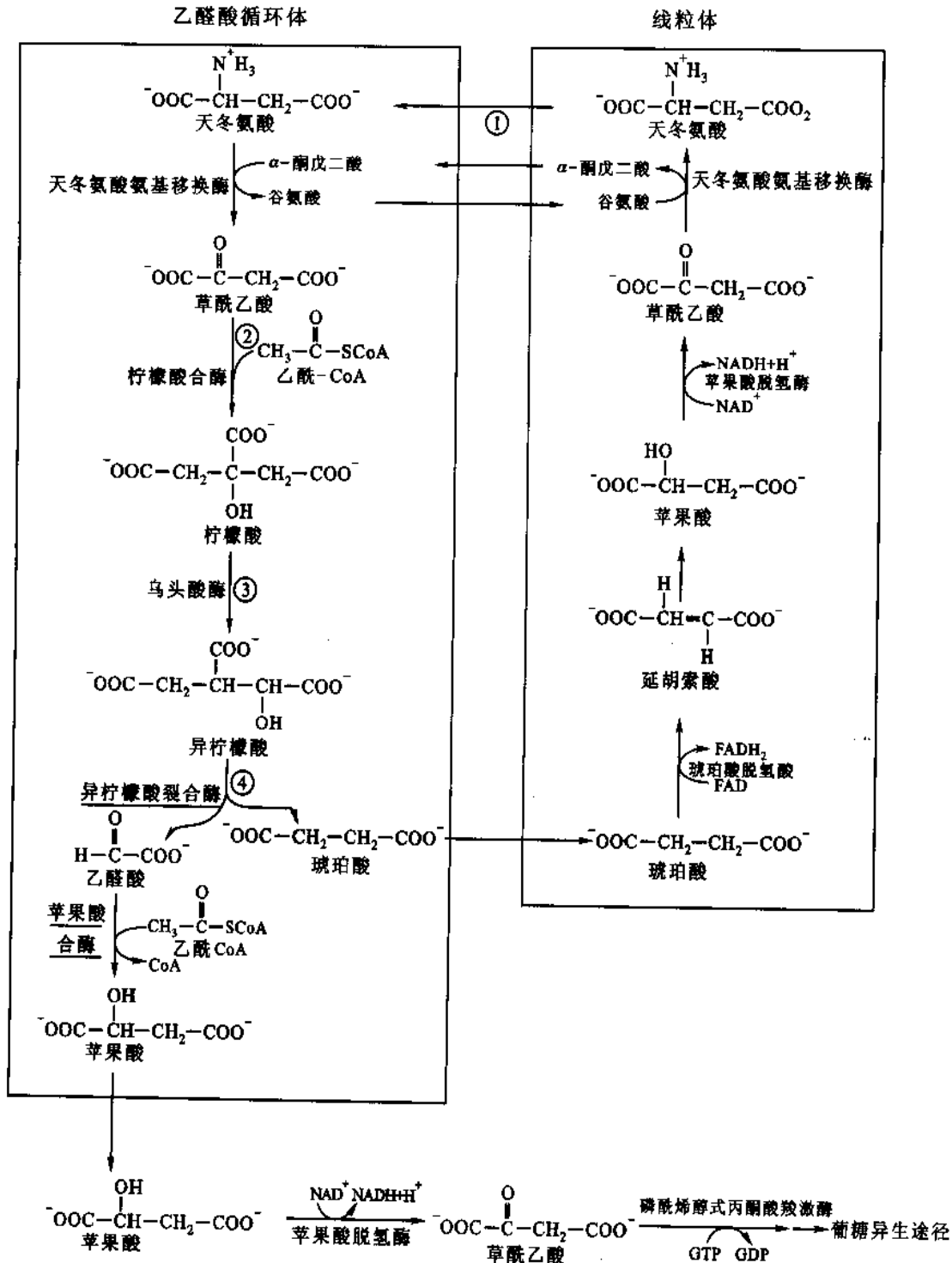
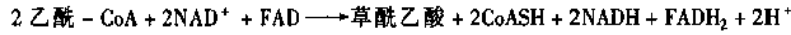


图 25-6 乙醛酸途径示意图

①线粒体内的草酰乙酸转变为天冬氨酸, 跨过线粒体膜进入乙醛酸循环体再转变为草酰乙酸。②草酰乙酸与乙酰 - CoA 缩合形成柠檬酸。③乌头酸酶将柠檬酸转变为异柠檬酸。④异柠檬酸裂合酶催化异柠檬酸裂解为琥珀酸和乙醛酸。⑤苹果酸合酶催化乙醛酸和乙酰 - CoA 缩合形成苹果酸。⑥苹果酸进入细胞溶胶后, 苹果酸脱氢酶将其氧化为草酰乙酸。从而可进入葡萄糖异生途径。⑦琥珀酸进入线粒体, 又通过柠檬酸循环转变为草酰乙酸。(图中表明参与乙醛酸途径的酶既有在线粒体的酶, 也有在乙醛酸循环体中的酶。划横线的异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶表示只存在于植物体内)

异构化形成异柠檬酸,与柠檬酸循环不同的是异柠檬酸不进行脱羧,而是经异柠檬酸裂合酶裂解为琥珀酸和乙醛酸。乙醛酸与另一分子乙酰 - CoA 在苹果酸合酶的催化下缩合形成苹果酸,苹果酸穿过乙醛酸循环体膜进入细胞溶胶,由苹果酸脱氢将其氧化为草酰乙酸。细胞溶胶中的草酰乙酸可经葡糖异生途径转变为葡萄糖。异柠檬酸裂解产生的琥珀酸又可跨膜进入线粒体,通过与柠檬酸循环相同的途径形成草酰乙酸,从而构成乙醛酸途径的一次循环。因此,乙醛酸循环的全部反应可看作是将两个乙酰 - CoA 分子转变为一分子草酰乙酸,同时将 2 分子 NAD^+ 和 1 分子 FAD 还原,反应式如下:



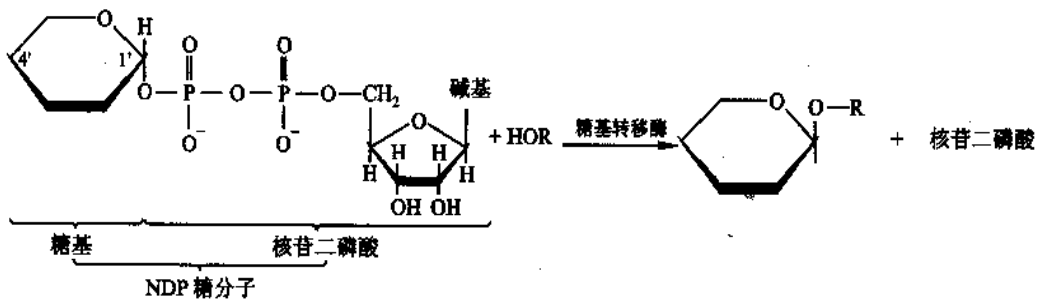
乙醛酸循环在植物种子中有特别重要的意义。它使萌发的种子将贮存的三酰甘油(又称甘油三脂, triacyl glycerol)通过乙酰 - CoA 转变为葡萄糖。

五、寡糖类的生物合成和分解

(一) 概论

在上册第 1 章糖类中对寡糖(oligosaccharides)已有详细的介绍。它是一类由含有以糖苷键形式相连接的糖分子的复杂化合物。已知天然存在的以糖苷键相连接的复杂的寡糖类化合物不下 80 余种。其中构成多种形式寡糖的最常见的成分有甘露糖(mannose)、N - 乙酰葡萄糖胺(N - acetyl glucosamine)、N - 乙酰胞壁酸(N - acetyl muramic acid)、葡萄糖、岩藻糖(fucose)、半乳糖(galactose)、N - 乙酰神经氨酸(N - acetyl neuraminic acid)又名唾液酸(sialic acid)及 N - 乙酰半乳糖胺(N - acetyl galactosamine)等。

糖苷键的形成在生理条件下需要提供能量。能量的需要主要是供单糖形成活化形式的 NDP - 糖分子(核苷酸糖分子, nucleotide sugars)。该反应的标准自由能变化 $\Delta G^0 = 16 \text{ kJ/mol}$ (3.82 kcal/mol)。糖分子异头碳原子上的核苷酸基团很容易离开糖分子,这就促进了与第二个糖分子形成糖苷键。催化形成糖苷键的酶称为糖基转移酶(glycosyl transferases)。反应式可表示如下:



参与转移单糖的核苷酸有 UDP(尿苷二磷酸)、GDP(鸟苷二磷酸)、CMP(胞苷酸)等,每一种糖分子只与核苷酸中的一种相结合,如表 25 - 2 所示。

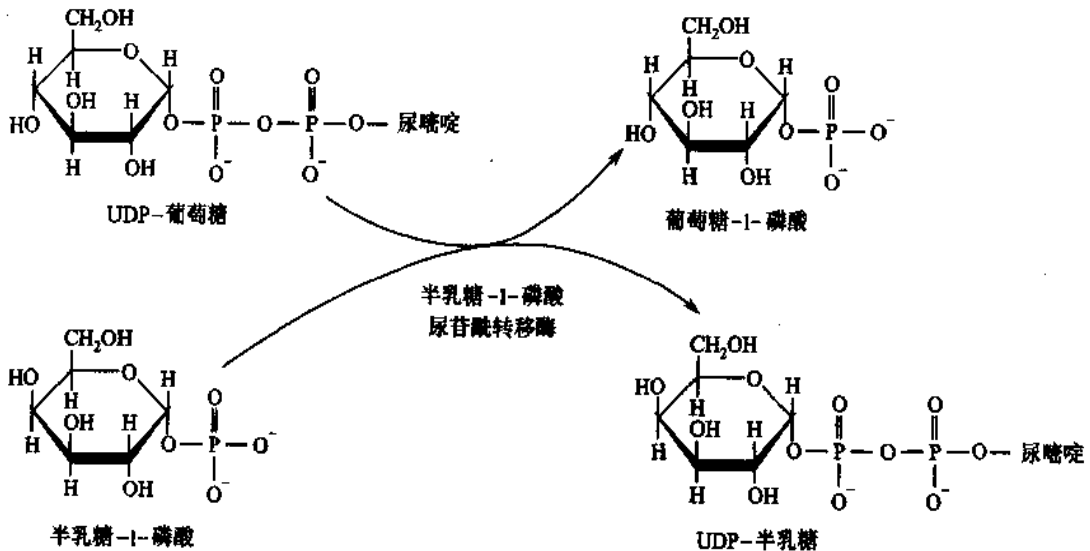
表 25 - 2 糖基转移反应中与单糖相应的核苷酸

UDP	GDP	CMP
N - 乙酰半乳糖胺(N - acetyl galactosamine)	岩藻糖(fucose)	唾液酸(sialic acid)
(N - 乙酰葡萄糖胺)(N - acetyl glucosamine)	甘露糖(mannose)	
N - 乙酰胞壁酸(N - acetyl muramic acid)		
半乳糖(galactose)		
葡萄糖醛酸(glucuronic acid)		
木糖(xylose)		

(二) 乳糖的生物合成和分解

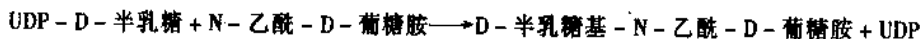
1. 乳糖的生物合成

乳糖是寡糖中简单寡糖的代表。因寡糖类的简单寡糖种类繁多(参看第 1 章第六节),只能举出一例进行讨论。乳糖由半乳糖和葡萄糖以 β -糖苷键相连 [β -galactosyl-(1 \rightarrow 4)-glucose]。乳糖的生物合成需要活化的半乳糖作为前体,UDP-半乳糖(UDP-galactose)就是其活化形式,用作合成乳糖的前体。UDP-半乳糖来源于 UDP-葡萄糖,是由 UDP-葡萄糖在半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶(galactose 1-phosphate uridylyl transferase)催化下,将尿苷酰基转移给半乳糖-1-磷酸形成的。



UDP-葡萄糖转变为 UDP-半乳糖对机体的某些生物合成,例如,复杂多糖和糖蛋白的合成起着重要作用。

在授乳期的乳腺中乳糖合成特别旺盛,其所进行的乳糖合成机制和糖原的合成机制相似。但调节机制却有其特殊性。有一种酶专一地对某种不同底物起不同的催化作用,在某种情况下,可以转变为催化合成乳糖的形式。绝大多数的脊椎动物组织含有一种半乳糖基转移酶(galactosyltransferase),这种酶在糖蛋白的合成中起催化 UDP-半乳糖的半乳糖基向 N-乙酰葡萄糖胺分子上转移的作用。反应式如下:



上述反应在乳糖合成中不起作用。起催化作用的半乳糖基转移酶对于以葡萄糖作为半乳糖基受体的催化活性极小。但当雌性哺乳动物一旦生产后,这时乳腺中产生一种 α -乳清蛋白(α -lactalbumin),乳腺中的半乳糖基转移酶随即迅速地与乳清蛋白结合,从而使其专一性立刻发生变化,并以极高的速度将半乳糖基转移到葡萄糖分子上形成乳糖:



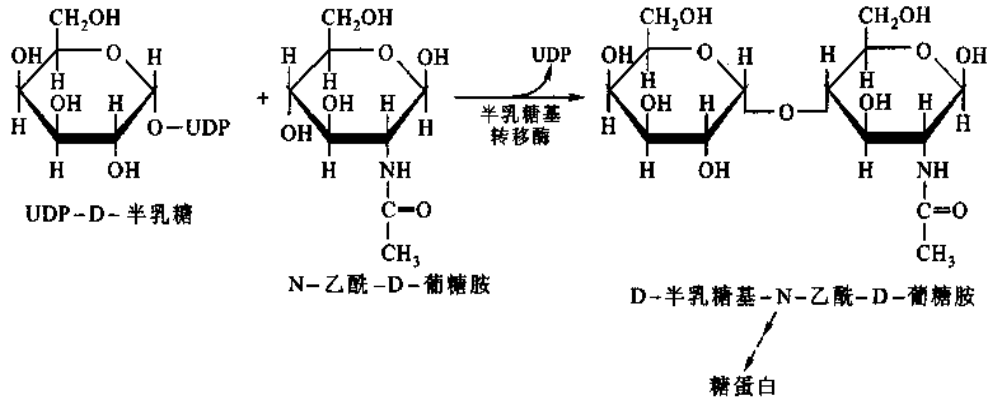
与乳清蛋白结合的半乳糖基转移酶可以说变成了一种新酶,命名为乳糖合酶(lactose synthase)。

以上两种情况下的反应式可用图 25-7 表示。

也可以认为乳糖合酶由两个亚基组成,即半乳糖基转移酶(或称转半乳糖基酶)和 α -乳清蛋白。后者是乳腺中特有的无催化作用的蛋白质,它的作用就是改变半乳糖基转移酶的催化功能,使之以葡萄糖作为半乳糖基的受体。

乳糖是乳汁中主要的糖。人乳汁含乳糖 5%~7%。牛乳汁含乳糖 4%。乳汁中除含有乳糖外,还含有一种含乳糖的寡糖称为乳糖-N-新四糖,有抑制肺炎双球菌型多糖抗原的作用,从而得以保护婴儿机体的健康。

1. 非乳腺组织



2. 授乳期乳腺内

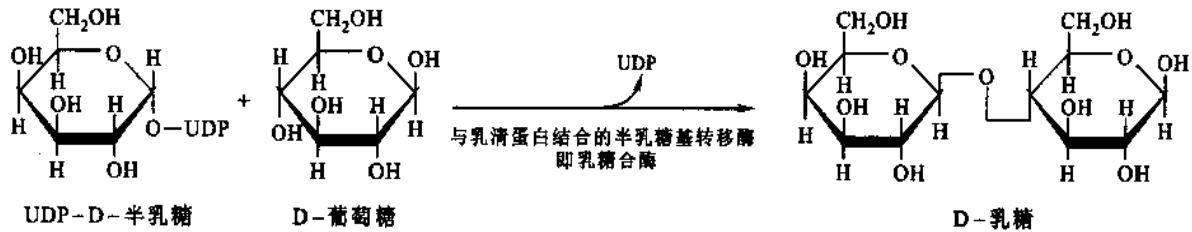
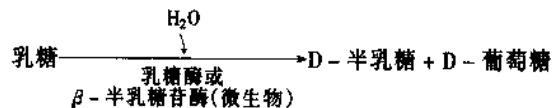


图 25-7 乳糖的生物合成

起催化作用的半乳糖基转移酶随着是否有 α -乳清蛋白存在而表现两种不同的催化作用,其一是在非乳腺组织中,其二是在乳腺中,只有在乳腺中才出现乳糖合酶

2. 乳糖的分解代谢

乳糖在消化管内的分解是由乳糖酶(lactase)催化的。此酶和其他的一些双糖水解酶,如麦芽糖酶(maltase)、蔗糖酶(sucrase)一样都附着在小肠上皮细胞的外表面上。乳糖被细胞摄取以前必须被水解为单糖。微生物水解乳糖不是由乳糖酶催化,而是靠一种 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的作用。乳糖被水解后形成半乳糖和葡萄糖:



形成的单糖进入小肠上皮细胞再进入血液,由血液送到各种组织,在组织细胞中进行磷酸化并纳入糖酵解途径。

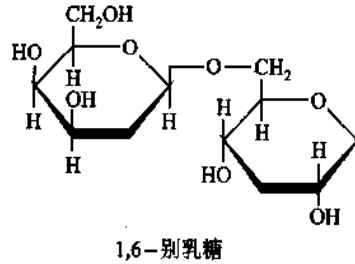
3. 乳糖不耐症

几乎所有的婴儿和幼儿都能消化乳糖,但到青年或成年之后,有许多人小肠细胞的乳糖酶活性或是大部分或是全部消失,致使乳糖不能被完全消化或完全不能消化,也不能被小肠吸收。乳糖在小肠腔内会产生很强的渗透效应(osmotic effect)导致流体向小肠内流(influx);在大肠内,乳糖被细菌转变为有毒物质。因此出现腹胀(abdominal distention)、恶心(nausea)、绞痛(cramping pain)以及腹泻(Watergdiarria)等症状,临床上称为乳糖不耐症(galactose intolerance)。乳糖酶的消失和遗传有关,可能是常染色体的隐性症状(autosomal recessyve trait)。据统计各国患乳糖酶消失症的人数有很大差异,亚洲人患乳糖不耐症的人数多于欧美人。例如,泰国人大约有97%不能耐受乳糖,而丹麦人则只有3%。除北欧外,非洲某些地区的人也很少发生乳糖不耐症。当前有些国家已经出售用乳糖酶处理过的牛乳,也有乳糖酶制剂出售。

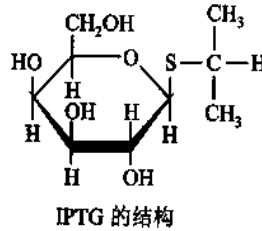
还应提出的是细菌中的 β -半乳糖苷酶是可诱导的酶。大肠杆菌(*E. coli*)能利用乳糖作为唯一的碳源。在乳糖代谢中所必需的酶就是 β -半乳糖苷酶,由它将乳糖水解为半乳糖和葡萄糖。一个*E. coli*细胞在乳糖上生长,含有数千个 β -半乳糖苷酶分子。但是如果它生长在其他碳源上,例如,葡萄糖或是甘油上,每个*E. coli*细胞只含有不到10个 β -半乳糖苷酶。实验证明,在培养基中的乳糖促进新酶分子的合成从而诱导出大量的 β -半乳糖苷酶,而不是使酶原活化(图25-8)。

由图 25-8 可看出 β -半乳糖苷酶是一种可诱导酶(inducible enzyme)。和 β -半乳糖苷酶相伴合成的还有两种酶,一种是半乳糖苷通透酶(galactoside permease),另一种是硫代半乳糖苷转乙酰基酶(thiogalactoside transacetylase)。通透酶对于乳糖跨越细菌的细胞膜是必需的。转乙酰基酶的作用目前尚不清楚。体外实验发现它催化将乙酰基从乙酰-CoA 转移到硫代半乳糖苷的 C6 羟基上。

在 *E. coli* 细胞内,天然的诱导物是别乳糖(allolactose)。它是由乳糖经转糖基作用形成。它的结构如下:



别乳糖的合成是由少数已存在的 β -半乳糖苷酶分子催化的。有些 β -半乳糖苷并不是作为 β -半乳糖苷酶的底物而是诱导物,而有些化合物是 β -半乳糖苷酶的底物而不是诱导物例如乳糖;又例如一种称为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropylthiogalactoside, IPTG)的化合物,它是一种不参与代谢的诱导物。IPTG 的结构如下:



(三) 糖蛋白的生物合成

人体内的蛋白质有三分之一以上属于糖蛋白。后者广泛存在于机体的各种组织和细胞中。它的广泛分布请参看第 1 章第九节内容。由于糖蛋白结构上的多样性和复杂性,赋予了这类物质极其广泛的生物功能,也增添了其生物合成的复杂性。关于糖蛋白中肽键部分是在核糖体合成的,将在第 38 章蛋白质的生物合成中作详细介绍。本章只侧重介绍寡糖对多肽链进行的加工过程。关于糖蛋白的某些重要的生物功能请参看第 1 章糖类六的有关部分。

1. 糖蛋白糖链生物合成的特点

糖蛋白中 N-糖链的合成是和肽链的生物合成同时进行的, O-糖链的合成是在肽链合成后,对肽链进行修饰加工时将糖基逐个连接上去的。糖链的合成是由糖基作为供体和受体,在糖基转移酶(glycosyltransferase)催化下完成的。糖基供体、受体和糖基转移酶之间有相互协调的作用。糖基转移酶将活化的糖基转移到糖基受体上。糖基转移酶对作为供体的糖基和受体都有严格的专一性。因此,糖链中的每个糖苷链都是由专一的糖基转移酶催化形成的。前一个糖基转移酶的产物是后一个糖基转移酶的底物。作为糖基供体的活化单糖最常见的活化形式有核苷二磷酸形式如 UDP-Glc(尿苷二磷酸-葡萄糖), GDP-Man(鸟苷二磷酸-甘露糖)等,以及长醇焦磷酸(dolichol pyrophosphate, DPP)形式,如 DPP-Man、DPP-GlcNAc(长醇焦磷酸-N-乙酰-D-葡萄糖)等。糖蛋白的肽链在糖基化过程中,作为第一个糖基受体的氨基酸残基一般是肽链中特定位点的氨基酸残基。肽链中有许多特定氨基酸残基可作为糖基的接受位点,如天冬酰胺、丝氨酸、苏氨酸、羟赖氨酸、羟脯氨酸和酪氨酸等。糖链延伸时,糖基的受体则是新接上去

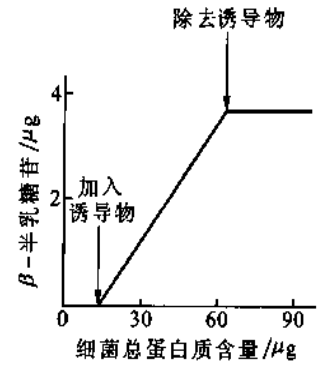


图 25-8 β -半乳糖苷酶量的增加和生长在培养基上 *E. coli* 细胞的增加成平行关系
图中的斜率表明,6.6%的蛋白质是合成的 β -半乳糖苷酶

的糖基。

2. 糖蛋白寡糖部分与多肽链相连接的类型

根据寡糖部分与肽链相接的方式不同可将其概括为三大类：N-连接型、O-连接型和酰胺键型，分述如下：

(1) N-连接型寡糖的要点 N-连接型寡糖(简称N-连寡糖)，是寡糖分子以 β -N-糖苷键的形式与多肽键相连。相连的部分是多肽链的天冬酰胺(Asn)残基。对这一残基的要求是，与该残基相隔的氨基酸必须是丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)，与该残基相连的氨基酸是除脯氨酸和天冬氨酸以外的任何氨基酸。这段序列的表示应为Asn-X-Ser或Asn-X-Thr。

多肽链的天冬酰胺残基与寡糖的连接形式可表示如图25-9。

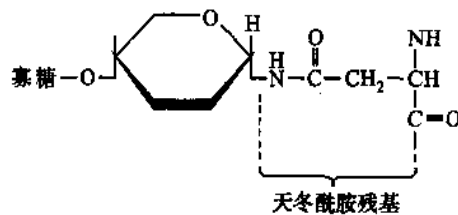


图25-9 天冬酰胺残基与寡糖的连接形式

N-连接类型的糖链一般由6至数10个糖基连接而成且都形成分支称为“天线”。寡糖的糖基组分主要是N-乙酰氨基葡萄糖，此外还有半乳糖和甘露糖等。在酸性N-糖链的末端往往是唾液酸(sialic acid, Sia)，又称N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid)。例如，免疫球蛋白(immunoglobulin)和肽类激素等都含有唾液酸。

以N-连接的寡糖中都有一个共同的五糖核心。它由3个甘露糖残基和两个N-乙酰葡萄糖胺残基构成。其他附加的糖以不同的形式加在这个核心上，形成各式各样的寡糖，可大致分为高甘露糖型、复杂型和杂合型(详见第1章)。图25-10举出两例表明它们的结构。

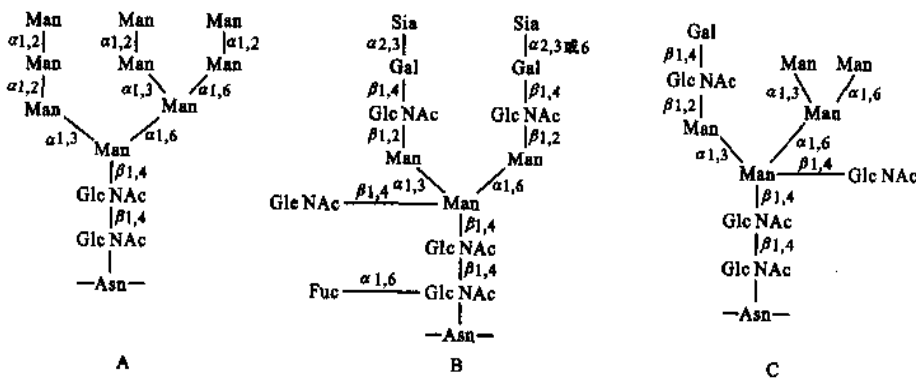


图25-10 N-连接寡糖含有的共同五糖核心

包括3个甘露糖和两个N-乙酰葡萄糖胺残基。图中还表明其他的糖分子加在核心上形成各种不同形式的寡糖，其中A代表高甘露糖型，B代表复杂型，C代表杂合型

图中Asn:天冬酰胺，Fuc:岩藻糖，Gal:半乳糖，GlcNAc:N-乙酰葡萄糖胺，Sia:唾液酸，Man:甘露糖

岩藻糖(6-脱氧-L-半乳糖)是由甘露糖衍生而来的。

(2) O-连接型寡糖的要点 O-连接的寡糖(简称O-连寡糖)，是通过 α -O-糖苷键与肽链上的丝氨酸或苏氨酸相连如图25-11。

只有在胶原蛋白(collagens)中，O-糖苷键是与5-羟赖氨酸(5-hydroxylysine)残基相连如图25-12。

O-糖链的结构虽然比N-糖链的简单，但参与连接的糖残基却是多种多样的。(参看第1章九)。糖蛋白中已发现的由两个糖基组成的O-糖链就有4种：唾液酸 α 2,6-N-乙酰-D-半乳糖胺 α 1-丝氨酸

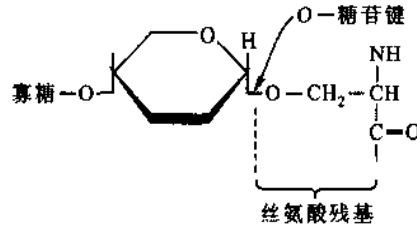


图 25-11 寡糖与肽链 Ser 形成的 α -O-糖苷键

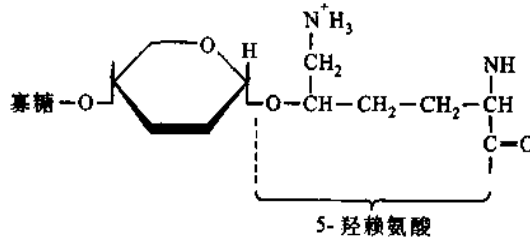


图 25-12 胶原蛋白中寡糖与 5-羟赖氨酸形成的 O 糖苷键

酸/苏氨酸(SA $\alpha 2,6$ -GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr)、半乳糖 $\beta 1,3$ -N-乙酰-D-半乳糖胺 $\alpha 1$ -丝氨酸/苏氨酸 (Gal $\beta 1,3$ -GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr)、N-乙酰-D-葡萄糖胺 $\beta 1,3$ -N-乙酰-D-半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸 (GlcNAc $\beta 1,3$ -GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr)及 N-乙酰-D-半乳糖胺 $\alpha 1,3$ -N-乙酰-D-半乳糖胺-丝氨酸/苏氨酸(GalNAc $\alpha 1,3$ GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr)。含有两个以上糖基的多糖链,主要是由 O-乙酰-D-半乳糖胺构成,可将其结构大致划分为 3 个部分:核心、骨架和非还原性末端。O-连糖链和 N-连糖链的核心不同,N-连糖链只有一个共同的五糖核心,而 O-连糖链多由于 N-乙酰-D-半乳糖胺和半乳糖以及 N-乙酰-D-葡萄糖胺的连接方式不同,而形成多种形式的糖链核心。最多见的可举出 4 种形式如图 25-13 所示。

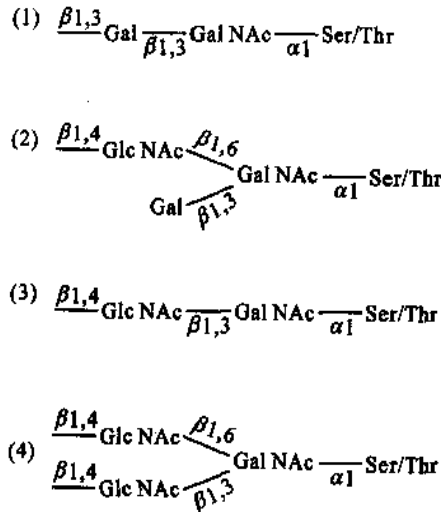


图 25-13 最常见的 O-连糖链

骨架部分即核心外的延伸部分。O-糖链和 N-糖链的外链基本相似,大多由 Gal-GlcNAc(半乳糖-N-乙酰葡萄糖胺)二糖单位组成。但 O-糖链骨架的多样性仍是它的一个特点。在有的 O-糖链的骨架上还有分支存在。O-糖链的非还原末端主要是唾液酸(SA),可以 $\alpha 2,6$ 或 $\alpha 2,3$ 的连接形式分别与半乳糖或 N-乙酰-D-半乳糖胺相连。此外还有的非还原末端是 HSO_3^- 。O-糖链上的分支结构和糖链非还原末端部分的糖基往往在构成复杂的血型抗原中起重要作用。

(3) 酰胺键型连接的要点 这一类型的寡糖链的非还原端大多是通过甘露糖磷酸乙醇胺间接地和多肽链的末端羧基形成酰胺键而结合(图 25-14);同时寡糖链的还原端又和磷脂酰肌醇中的肌醇分子的 C6 位相连。磷脂酰肌醇有两条脂肪酸链嵌在细胞膜中,因此糖基化的磷脂酰肌醇起着锚(着点)的作用。糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphoinositol, GPI)被称为糖基磷酸酯酰肌醇-锚(着点)。

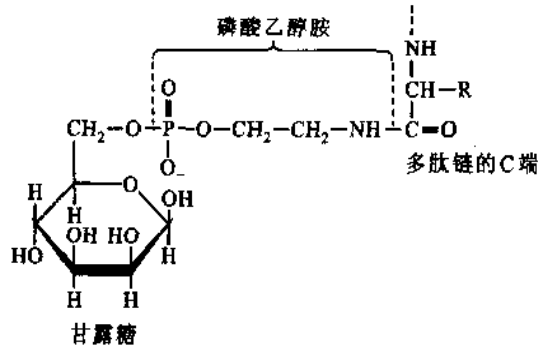


图 25-14 多肽链 C 末端与磷酸乙醇胺之间形成酰胺键;多肽链通过磷酸乙醇胺的磷酸基团与甘露糖(寡糖成分)相连

3. 糖蛋白中寡糖链的生物合成

前面已经提到糖蛋白的寡糖部分根据其于多肽链连接的形式大致分为三种类型,分别称为 N-连寡糖, O-连寡糖和糖基化磷酸肌醇-膜锚钩,本章重点讨论 N-连寡糖和 O-连寡糖的生物合成。糖基磷脂酰肌醇只讨论其四糖核心的合成。

(1) N-连寡糖的生物合成 N-连寡糖开始合成是在内质网进行,随后又在高尔基体内加工,全部合成可大致分为 4 步进行。

- ① 合成以酯键相连的寡糖前体。
- ② 将前体转移到正在增长着的肽链上。
- ③ 除去前体的某些糖单位。
- ④ 在剩余的寡糖核心上再加入另外的糖分子。

第 1 步: N-连寡糖最初形成时是以一种长链多萜醇作为载体,称为长醇(dolichol)或多萜醇。长醇含有 14~24 个异戊二烯单元。动物的长醇含有 17~21 个异戊二烯单元,真菌类和植物含有 14~24 个。异戊二烯通过焦磷酸连接到寡糖前体上(图 25-15),因此可以说 N-连寡糖最初是以酯键形式合成前体,脂质组分即是长醇。长醇的 α -异戊二烯单元实际上是饱和形式的醇。长醇显然是起着锚定作用,将正在增长着的寡糖锚定在内质网膜上。在 N-连糖蛋白的生物合成中有酯连寡糖存在,最早是 1972 年由 Armando Parodi 和 Luis Leloir 发现的。他们用大鼠肝的微粒体(microsomes)分离出内质网的囊泡片段,将这种囊泡片段与连接在脂质上的带有 C_{14} 标记葡萄糖的寡糖共同保温,可在蛋白质中发现放射性。

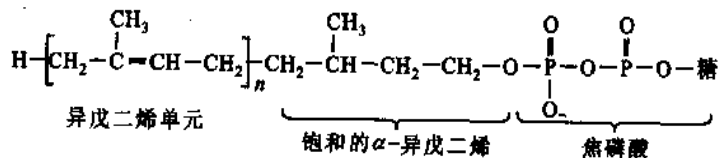


图 25-15 异戊二烯通过焦磷酸连接到寡糖前体上

a. N-连寡糖的共同寡糖前体——长醇-焦磷酸-寡糖的合成。长醇-焦磷酸-寡糖(长醇-PP-寡糖)的合成是一步步地将单糖单位加到不断增长的糖酯上,形成一个共同的前体形式(有的作者也称之为核心)。起催化作用的酶是具有高度专一性的糖基转移酶(glycosyl transferases)。每个单糖单位的转移都由专一的糖基转移酶催化。合成共同寡糖前体的全过程如图 25-16 所示。

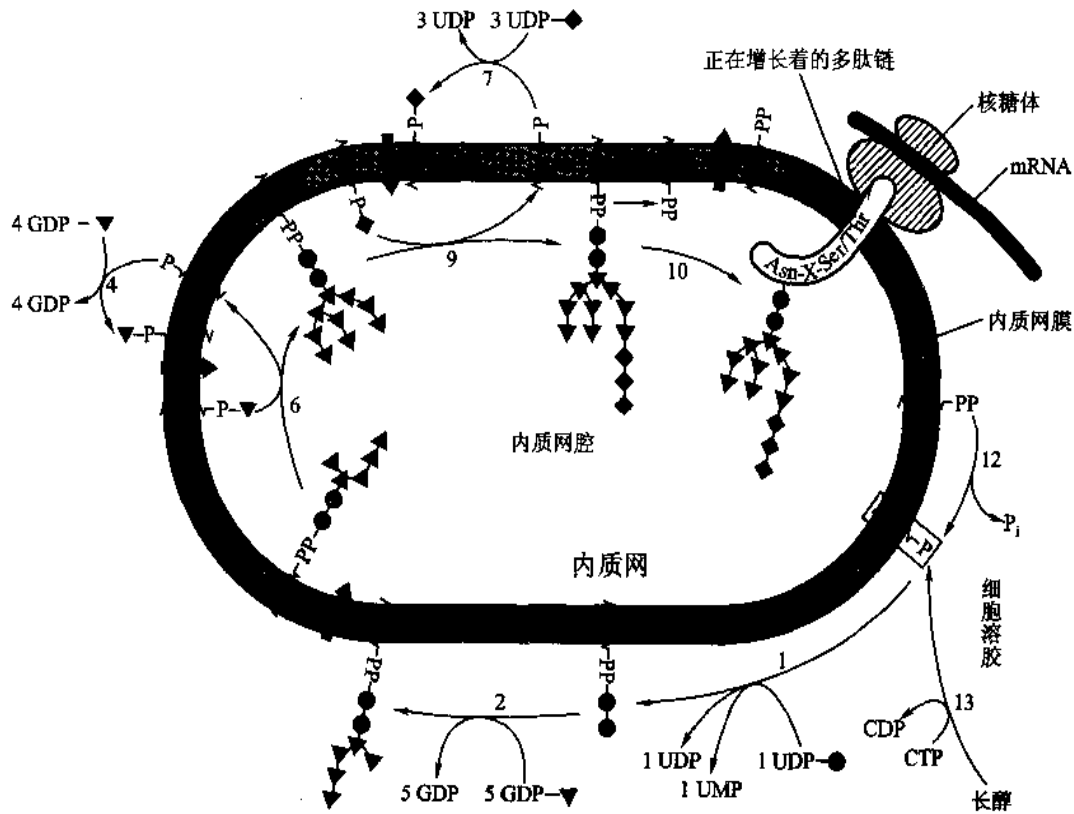


图 25-16 长醇焦磷酸寡糖的合成途径

构成寡糖前体的组分包括 2 分子 N-乙酰-D-葡萄糖胺, 9 分子甘露糖和 3 分子葡萄糖 ($\text{NAcGlc}_2 \cdot (\text{Man})_9 \cdot (\text{Glc})_3$)。虽然在糖基转移反应中, 与核苷酸相连的糖基是最普遍的单糖供体, 但仍有一些甘露糖基和葡萄糖基是由长醇-磷酸衍生物提供的。这种对长醇-磷酸-甘露糖的需要是由 Stuart Kornfeld 发现的。他发现, 小鼠的一种淋巴瘤 (lymphoma) 细胞的突变型, 不能合成正常的酯连寡糖, 结果导致形成小于正常的糖酯。这种细胞含所有需要的糖基转移酶, 但不能合成长醇-磷酸-甘露糖。这是由于在细胞溶胶中由 GDP-甘露糖和长醇-磷酸合成长醇-磷酸-甘露糖的反应被阻断。若将长醇-磷酸-甘露糖提供给细胞, 甘露糖分子就能加到不正常的长醇-焦磷酸-寡糖分子上。

如图 25-16 所示, 在长醇-PP-寡糖合成中的第 1 步反应是 2 分子活化的 N-乙酰葡萄糖胺 (UDP-GlcNAc_2), 连续加到长醇磷酸上, 1 个 N-乙酰葡萄糖胺以 N-乙酰葡萄糖胺 1-磷酸形式, 第 2 个以 N-乙酰葡萄糖胺形式, 结果形成长醇-PP-(N-乙酰葡萄糖胺)₂。第 2 步反应是 5 个 GDP-甘露糖分子以甘露糖形式加到长醇-PP-N-(乙酰葡萄糖胺)₂ 分子上形成长醇-PP-N-(乙酰葡萄糖胺)₂-(甘露糖)₅。5 个甘露糖残基是由 5 种不同的甘露糖转移酶催化的。这 5 个甘露糖残基形成分支 (图 25-16)。因前两步反应都是在内质网膜的细胞溶胶侧进行的, 两步反应完成后的第 3 步反应是形成的上述分子进行移位。“翻转”到内质网腔内, 但它是如何进行的翻转? 尚未阐明。有趣的是长醇-PP-N-(乙酰葡萄糖胺)₂-(甘露糖)₅ 分子的再增长还需从细胞溶胶侧引进下一步反应所需的甘露糖分子。引进甘露糖分子的反应包括全部反应过程中的第 4 步和第 5 步两步反应。4 个活化的甘露糖分子 (GDP-甘露糖) 先与长醇磷酸反应形成长醇-磷酸-甘露糖分子, 然后进行移位, 锚定在长醇磷酸上的甘露糖转移到了内质网腔。第 6 步反应是转入的与长醇-磷酸结合着的甘露糖又转移到需再增长的寡糖核心分子上, 使之又增加了 4 个甘露糖残基。催化 4 个甘露糖分子转移的是 4 种不同的甘露糖转移酶。寡糖核心进一步的生长需要 3 个葡萄糖分子。活化的葡萄糖分子 (UDP-葡萄糖) 与长醇-磷酸反应形成长醇-磷酸-葡萄糖分子成为第 7 步反应。随后又是移位反应, 即第 8 步反应, 磷酸-葡萄糖部分翻转到内质网腔内。第 9 步反应是 3 分子分别锚定在长醇-磷酸上的葡萄糖残基转移到含有 9 个甘露糖分子的长醇-焦磷酸-N-(乙酰-葡萄糖胺)₂-(甘露

糖)上,使之又多了3个葡萄糖残基,于是完成了长醇-焦磷酸-寡糖核心的合成。这时寡糖部分已具备转移到多肽链天冬酰胺残基上的条件。当肽链中出现合乎要求的天冬酰胺分子时(Asn-X-Ser/Thr),就可进行寡糖部分的转移,同时释出的长醇-焦磷酸分子又进行移位将焦磷酸转换到内质网膜的细胞溶胶侧。其后长醇-焦磷酸又失去一个磷酸基团形成长醇-磷酸。从全部反应中可看到长醇-磷酸完成了一次变化多端的长途旅行,最后又回到了原位。

b. 长醇-焦磷酸-寡糖的合成过程包含有拓扑变化。从图25-16可看出,在长醇-焦磷酸-寡糖的合成过程中包含有中间产物的拓扑变化。图中反应1,2,4和7都发生在内质网膜的细胞溶胶侧。这些事实是用内部翻转到外面的粗面内质网囊泡测定的。实验表明各种干扰内质网膜通透性的试剂都能够干扰上述某种反应的进行。图中反应6,9和10,都发生在内质网腔内。这是利用伴刀豆球蛋白A(concanavalin A),一种糖结合蛋白质作膜通透实验判断出的。伴刀豆球蛋白A若不透入到内质网腔内就不能与反应6,9和10的产物结合。因此,反应2的产物,长醇-PP-N(乙酰葡萄糖胺)₂-(甘露糖)₅,反应4的产物,长醇-P-甘露糖和反应7的产物长醇-P-葡萄糖都必需穿过内质网膜,改换位置,这就是通过相应的反应3,5和8使这些产物伸出到内质网腔内,只有这样才能使N-连寡糖的合成继续下去。目前尚不知这些移位过程的机制。

c. N-连寡糖与蛋白质的结合是在蛋白质合成过程中开始的 这项研究是利用一种能使牛感染产生类似流感症状的病毒称为疱疹性口腔炎病毒(vesicular-stomatitis virus, VSV)进行的。VSV的外壳是由宿主细胞膜构成的。宿主细胞被病毒感染后,在宿主细胞膜中嵌入了一个单一的病毒糖蛋白称为VSVG蛋白(VSVG protein)。因病毒感染几乎是全部侵占了被感染细胞的蛋白质合成机器,正常细胞的高尔基体可合成自身的数百种糖蛋白,一旦细胞被感染后,除合成病毒G蛋白外已不再合成自身的蛋白质。因此病毒G蛋白的合成就能顺利地进行。

对VSV感染细胞的研究表明了,寡糖分子从长醇链上的转移在多肽链合成的进程中就开始了。病毒G蛋白的N-糖基化是由结合在膜上的寡糖转移酶催化的,它能识别肽链上的Asn-X-Ser/Thr序列位点。但实际测定表明,在真核细胞糖蛋白中的Asn-X-Ser/Thr位点(又称三联序列子)只有三分之一是被N-糖基化的。根据大量糖蛋白二级结构的预测和对多肽模型糖基化的研究表明,蛋白质中有70%的Asn-X-Ser/Thr序列处于 β -转角部位,20%处于 β 折叠片中,10%处于 α -螺旋部位;糖化率高的部位是 β -转角或成环部位。在这些部位的Asn的N-H基团和Ser/Thr的羟基O原子容易形成氢键。关于脯氨酸不能占据-X-位,可能是因为它会妨碍Asn-X-Ser/Thr所需要的某种源于氢键的构象。 α -螺旋结构致密,不易容纳长达3~4 nm的含有14个单糖分子的寡糖前体,故糖化概率很小。如果X为半胱氨酸,则容易形成二硫键,而影响糖基化。在十四糖寡糖前体中的3个葡萄糖分子是有效转移所必需的。

d. 糖蛋白的加工开始于内质网完成于高尔基体。糖蛋白最初的加工开始于内质网,由酶促除去3个葡萄糖残基(图25-17,反应2,3)和一个甘露糖残基(图25-17,反应4)。随后糖蛋白被裹在由膜形成的囊泡中转移到高尔基体进一步加工。高尔基体由一叠4~6或更多个扁平的膜状囊袋(sacs)构成。囊袋的数目随种属而不同。高尔基体的叠层有内面(cis face)和外面(trans face)的不同,每面都由彼此相连的管道网构成:内在高尔基体网络(cis Golgi network)在内质网对面,是蛋白质的入口,通过它蛋白质进入高尔基体。高尔基体外侧网络(trans Golgi network),是加工过的蛋白质的出口。介于二者之间的高尔基叠层至少含有3种不同的囊袋,分别称为内侧的、中间的和外侧的嵴(cis, medial and trans cisternae),每一种都含有不同组合的糖蛋白加工酶。在糖蛋白通过内在嵴、中间嵴和外侧嵴的旅途中,甘露糖残基已经过修剪,N-乙酰葡萄糖胺、半乳糖、岩藻糖以及唾液酸残基都根据需要加到糖蛋白分子上,从而完成它的加工(图25-17反应5~11)。最后,糖蛋白在高尔基体外侧网络分类准备转移到细胞的相关部位。糖蛋白在这些不同部位之间的转移是在膜泡(membranous vesicles)中进行的。

前面已经提到,N-连糖蛋白的寡糖之间表现出极大的多样性,甚至具有相同多肽链的糖蛋白也能表现出相当明显的微小差异。这种差异可能是由于糖基化不完全或是由于糖基转移酶或糖化酶的专一性差异造成的。最后形成的寡糖部分可大致归纳为3类即高甘露糖寡糖、复杂寡糖和杂合寡糖(参看第1章第九节糖链的分类)此处不作详细解释。不同类型的寡糖与它的功能以及与它们的糖蛋白在细胞内的最后

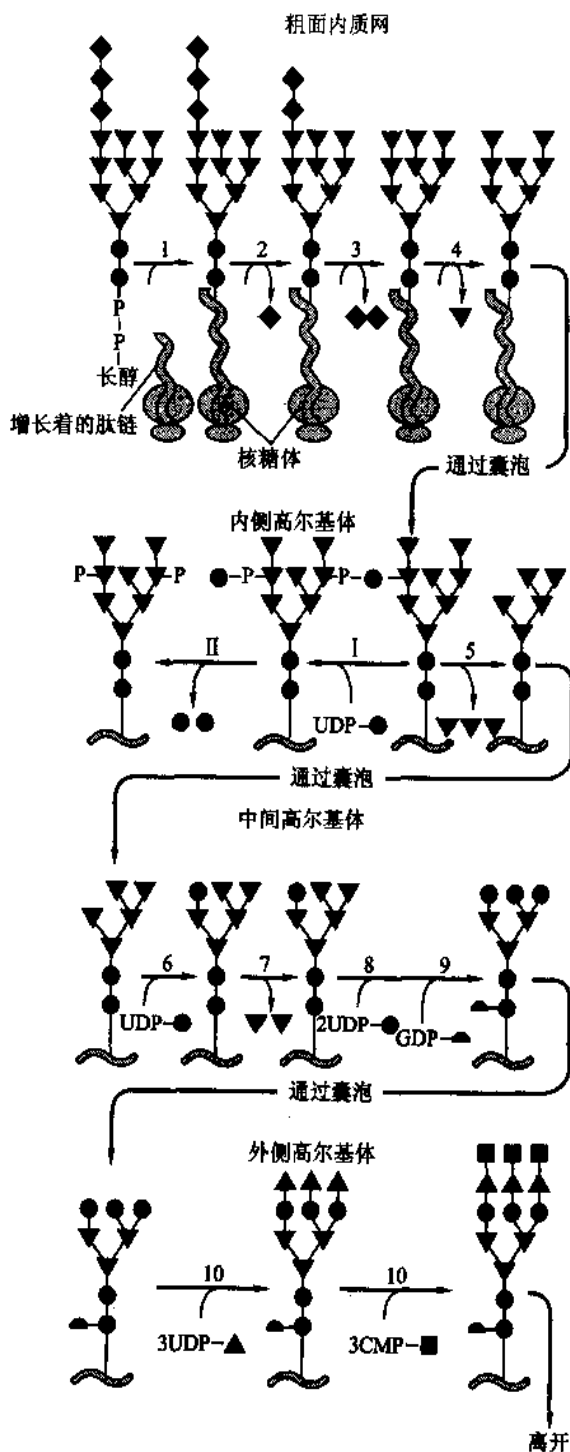


图 25-17 糖蛋白在高尔基体的加工过程

定位之间是怎样的关系？还需进行深入研究。现已知溶酶体糖蛋白似乎是高甘露糖型的变种。

e. 抑制剂在研究 N-连糖蛋白中起到重要作用。应用能阻断某种专一性糖基化酶的抑制剂研究糖蛋白糖基化的加工过程曾起到重要的推动作用。值得提出的是两种有效的抑制剂。一种是称为衣霉素 (gunicamycin) 的抗生素 (参看第 16 章抗生素)。它是一种具有疏水性的 UDP-N-乙酰葡萄糖胺的类似物。另一种是杆菌肽 (bacitracin) 它是一种环状多肽, 也是一种抗生素 (参看第 16 章抗生素)。

这两种抗生素都能抑制细菌细胞壁的生物合成。细胞壁的合成过程有脂连寡糖参与作用。衣霉素阻断由磷酸长醇和 UDP-N-乙酰葡萄糖胺形成长醇-焦磷酸-寡糖的过程 (图 25-16 反应 1)。衣霉素类似于这些反应物中的某一种, 成为结合到酶分子上的加合物, 结合后的解离常数为 $7 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。杆菌肽和

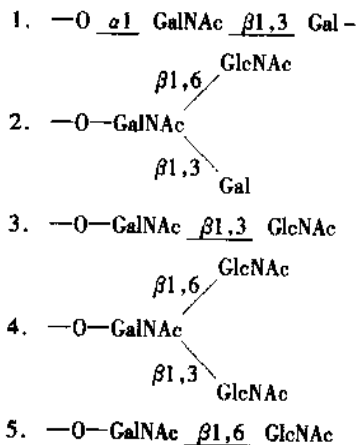
长醇-焦磷酸形成一种复合物,从而抑制长醇焦磷酸的去磷酸化作用(图 25-16 反应 12),因此在脂连寡糖前体的形成中起抑制作用。杆菌肽用于临床只抑制细菌细胞壁的合成,不伤害动物细胞,因杆菌肽不能通过细胞膜,而细菌细胞壁的合成是在细胞膜外进行的。

(2) O-连寡糖的生物合成 O-连寡糖是先合成蛋白质的多肽链,然后合成寡糖链;所以是翻译后加工形成。

黏蛋白生物合成的深入研究,为 O-连寡糖的生物合成程序提供了有力的证据。黏蛋白是由颌下唾液腺分泌的一种 O-连糖蛋白。它的糖链的合成是在高尔基体中进行的。这时 O-寡糖的多肽链已经全部合成。O-寡糖链是由酶促连续地向已完成的多肽链上加入单糖单位构成的(图 25-18)。

O-连寡糖合成的开始是在 N-乙酰半乳糖胺转移酶的催化下,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)从 UDP-GalNAc 上转移到多肽链的丝氨酸或苏氨酸的残基上。和 N-连寡糖不同的是:N-连寡糖的糖链是转移到多肽链的一定氨基酸序列上的天冬酰胺残基上;O-连寡糖糖基化的丝氨酸、苏氨酸位点不属于任何一段特定的氨基酸序列,而是和多肽链的二级和三级结构有关。当丝氨酸或苏氨酸的附近含有脯氨酸时,则 α -螺旋结构被 β -折叠片或 β -转角取代从而容易发生 O-连糖基化。O-连糖基化是由相关的糖基转移酶将半乳糖、唾液酸、N-乙酰葡萄糖胺和岩藻糖,根据需要逐步地加上去。一般认为 O-糖基化(实际是 O-N-乙酰半乳糖基化)发生于 N-糖基化之后,而且不同糖蛋白 O-糖基化的起始地点并不一致,有的在网内质网,有的在网内质网-高尔基体中间结构,也有的在网内高尔基体。但外侧糖基的添加都是在高尔基体完成的。将 UDP-N-乙酰半乳糖胺(UDP-GalNAc)的 GalNAc 首先转移到多肽链上的酶称为多肽-O-GalNAc 转移酶。该酶能识别肽链上 Ser 或 Thr 所处的空间构象。

目前已知 O-连寡糖链在合成时也有核心形成。但是它的核心类型较多。至少可举出以下几种类型如下所示:



因此 O-糖链的延伸也和 N-糖链相似在核心的基础上逐个添加糖基。催化核心形成的有关的酶有的已鉴定清楚,有的尚未鉴定清楚,此处不作详细介绍。

O-连寡糖链的非还原端的基团大致包括 3 种,唾液酸、硫酸和岩藻糖。唾液酸化所需的酶也具有专一性。硫酸化时, HSO_3^- 基团一般和半乳糖的 4 位相接。催化此反应的酶是高尔基体中的磺基转移酶。临床上发现肿瘤、炎症等病灶中的黏蛋白硫酸化程度可发生明显的改变。非还原端的 L-岩藻糖基化是血型抗原合成的必需步骤。

(3) 糖基磷脂酰肌醇四糖核心的合成 前面已经提到糖基磷脂酰肌醇(GPI)可将各种蛋白质锚定到真核细胞浆膜的外表面。GPI 连接到蛋白质的羧基端使蛋白质得到依附,得以自由地在细胞膜的外面活动。全部蛋白质除糖脂锚(两条脂肪酸链)外都在细胞的外部空间。许多细胞表面的水解酶类以及黏附素

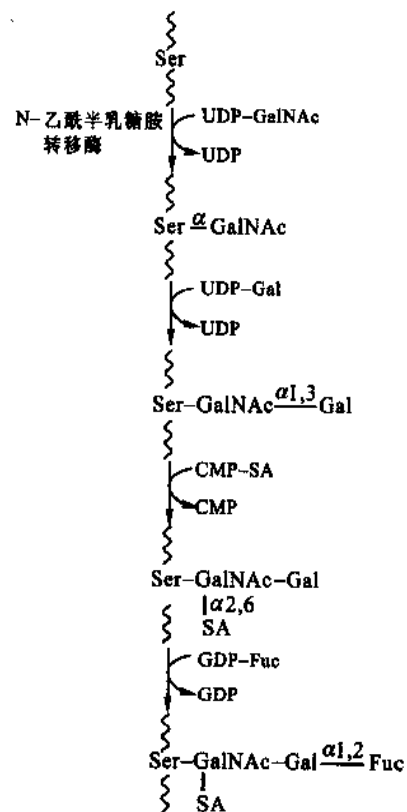


图 25-18 狗颌下唾液腺 O-连寡糖链糖单位的合成途径示意

GalNAc: N-乙酰-D-半乳糖胺, Gal: 半乳糖, SA: 唾液酸, Fuc: 岩藻糖

(adhesins), 都借助 GPI 锚定在细胞上。

GPI 的核心结构是在内质网膜腔侧由磷脂酰肌醇、UDP - N - 乙酰葡萄糖胺(UDP-GlcNAc)、长醇 - 磷酸 - 甘露糖(dol - P - man)和磷脂酰乙醇胺合成的。如图 25 - 19A 所示。

形成的核心随后被修饰加工。根据动物不同的种属以及其附着的蛋白质的不同,加入的糖基也随之变化。GPI - 锚的脂肪酸残基的变化也是很大的。这是由于在锚的合成过程中脂质会发生改变。靶蛋白锚定到膜表面是当 GPI 上磷酸乙醇胺的氨基对蛋白质靠近 C - 端的专一酰胺基进行亲核攻击时,结果引起转酰胺基作用,在 C - 端释放出 20 ~ 30 个疏水肽链(图 25 - 19B)。因 GPI 基团是附着在粗面内质网的腔面蛋白质上,由 GPI 锚定的蛋白质得以存在于细胞浆膜的外表面。

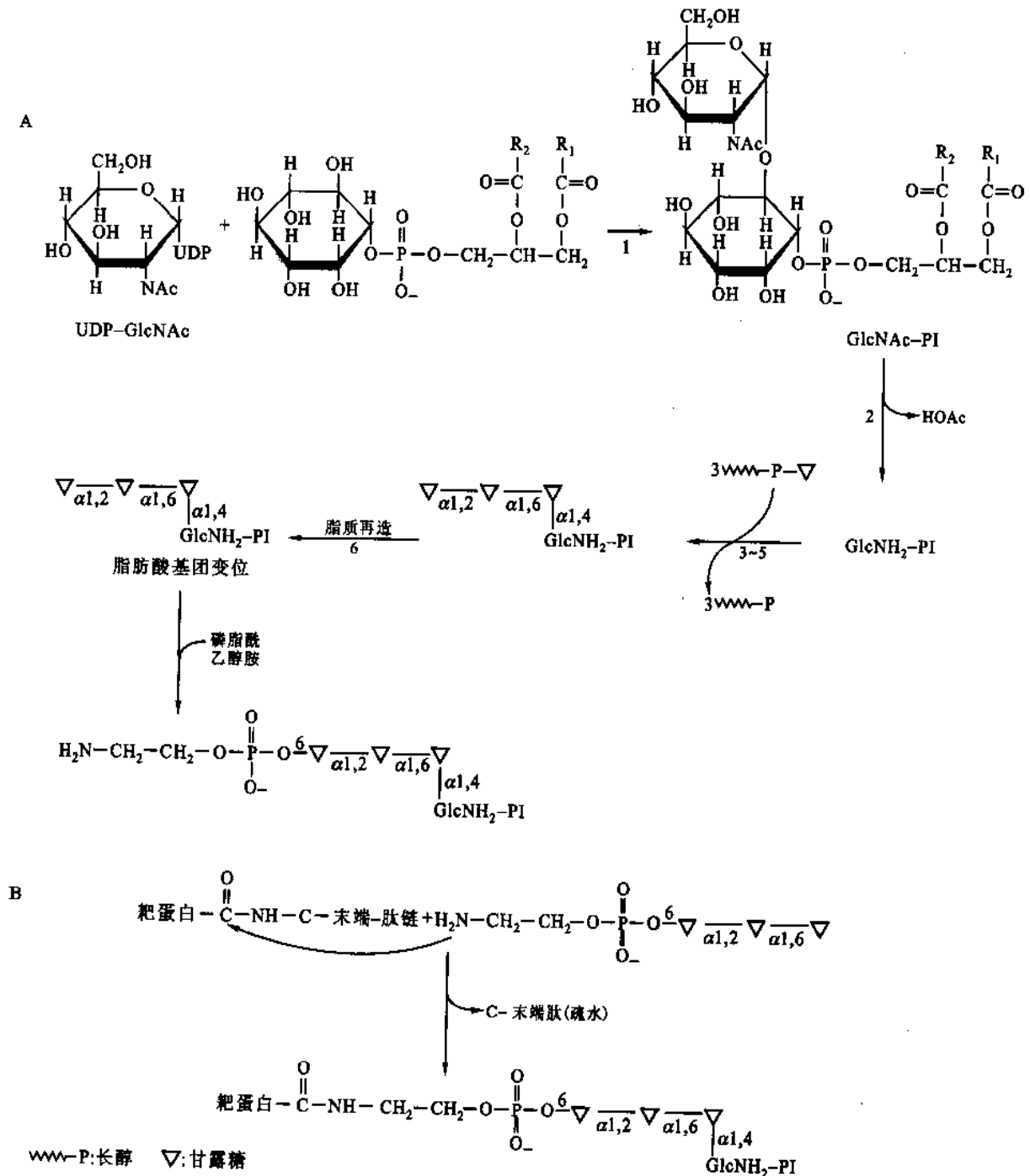


图 25 - 19 A. 糖基磷脂酰肌醇(GPI)四糖核心的合成途径 B. 靶蛋白的转酰胺基作用导致其 C - 末端连接到 GPI 锚上
 (1) N - 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)加到磷脂酰肌醇(PI)上;(2) GlcNAc 脱乙酰化;(3 - 5)由长醇 - P - 甘露糖在 3 种不同酶的催化下加入 3 个甘露糖基;(6) 在 PI 上的脂质中的脂肪酸变位;(7) 磷酸乙醇胺从磷脂酰乙醇胺转移到四糖核心末端甘露糖残基的变位羟基上

(四) 糖蛋白糖链的分解代谢

糖蛋白的分解代谢是在溶酶体中进行的。糖蛋白的彻底降解需要蛋白水解酶和糖苷酶的联合作用。N-连糖蛋白的水解先从裸露在糖链外的肽链开始,肽链的降解为N-糖链的水解提供空间。糖链核心的降解,先被水解的基团往往是岩藻糖,其次水解以 β 1,4-糖苷键连接的N-乙酰-葡糖胺。当肽链和糖链分开后,两部分则分别进行水解。糖链上的糖基由不同的外切糖苷酶从非还原端逐个将糖链上的糖基水解脱下,而肽链上剩余的个别N-乙酰葡糖胺残基则被专一的糖肽水解酶降解。剩下的肽链最后被蛋白水解酶降解。

O-糖蛋白的水解根据糖链的密集程度不同,其多肽链和寡糖链水解的先后也有不同,但也可同时进行。以黏蛋白为例,因含寡糖链较多,一般是先从糖链末端的唾液酸开始水解,随后再从非还原端逐个切除糖单元。多肽链的水解和肽链的暴露情况直接有关。

提 要

戊糖磷酸途径主要作用是形成NADPH和核糖-5-磷酸。有关作用的酶都存在于细胞溶胶中。NADPH在还原性生物合成中,例如,脂肪酸和固醇类的合成用于提供还原力。而核糖-5-磷酸及其衍生物则用于合成RNA、DNA、NAD⁺、FAD、ATP和辅酶A等重要生物分子。戊糖磷酸途径由葡萄糖-6-磷酸脱氢开始形成一个内酯(lacton),内酯水解形成6-磷酸葡糖酸,紧接着进行氧化脱羧基作用产生核酮糖-5-磷酸。NADP⁺在上述的氧化过程中都是电子受体。最后的步骤是核酮糖-5-磷酸发生差向异构由酮糖形式转变为醛糖形式即核糖-5-磷酸。因机体对核糖-5-磷酸的需要量远不及对NADPH的需要量,于是借助转酮基和转醛基作用将核糖-5-磷酸转变为果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸。这就使戊糖磷酸途径和糖酵解途径连接起来。木酮糖-5-磷酸,景天庚酮糖-7-磷酸和赤藓糖-4-磷酸,都在相互转变过程中作为中间产物。通过这条途径每分子葡萄糖-6-磷酸,如果完全氧化为CO₂可形成12分子NADPH。如果核糖-5-磷酸的需要量超过对NADPH的需要,这时非氧化反应步骤就会相对地更活跃。在这种情况下,果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸就转变为核糖-5-磷酸而不产生NADPH。如果相反,由氧化步骤形成的核糖-5-磷酸还可以通过果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸转变为丙酮酸。以这种方式,葡萄糖-6-磷酸的6个碳原子中的5个碳原子参与形成丙酮酸分子,并且产生出ATP和NADPH。戊糖磷酸途径和糖酵解途径之间的穿插作用,使得机体内的NADPH、ATP、核糖-5-磷酸以及丙酮酸等物质可以根据需要保持合理的水平。

葡糖异生作用指的是由非糖物质例如乳酸、氨基酸、甘油等作为原料合成葡萄糖的作用。葡糖异生作用对于机体饥饿时和激烈运动时不断提供葡萄糖维持血糖水平是非常重要的。脑和红细胞几乎全部依赖血糖提供能源。葡糖异生作用的绝大多数酶是细胞溶胶酶,只有丙酮酸羧化酶和葡萄糖-6-磷酸酶除外,前者位于线粒体基质,后者结合在光面内质网上。

葡糖异生作用的主要起点可认为是丙酮酸。由丙酮酸转变为葡萄糖,凡在糖酵解过程中的可逆反应都被葡糖异生作用利用。但遇到糖酵解途径中的不可逆反应则必须绕道而行。以生物素为辅酶的丙酮酸羧化酶和由GTP供能的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化的反应绕过了丙酮酸激酶催化的不可逆反应。果糖-1,6-二磷酸酶绕过了磷酸果糖激酶催化的不可逆反应。葡萄糖-6-磷酸酶绕过了己糖激酶催化的反应。糖酵解过程发生于机体的所有细胞,而葡糖异生作用则主要发生在肝脏,其次是肾脏。在线粒体中丙酮酸羧化为草酰乙酸,在细胞溶胶中草酰乙酸又脱羧并磷酸化为磷酸烯醇式丙酮酸。在这些反应中共用去两个高能磷酸键。

葡糖异生作用和糖酵解作用是互相协调的。当一条途径活跃时,另一条途径的活性就相应降低,磷酸果糖激酶和果糖-1,6-二磷酸酶是起调控作用的关键酶。当葡萄糖供应丰富时,果糖-2,6-二磷酸作为细胞内的分子信号也处于高水平。它活化糖酵解作用并抑制葡糖异生途径。果糖-2,6-二磷酸受到破坏则引起果糖-1,6-二磷酸酶活性加强,从而加速葡糖异生作用。胰高血糖素/胰岛素比值升高,也促

进葡萄糖异生作用加快。丙酮酸激酶和丙酮酸羧化酶所受到的调节使它们同时都不是处于最活跃的状态。别构调节和可逆磷酸化作用都是迅速的。这类调节为转录调节(参看第 39 章)。

乙醛酸循环是植物和微生物特有的反应途径。这个循环除两步由柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶催化的反应外,其他的反应都和“柠檬酸循环”相同。乙醛酸循环使两个乙酰 - CoA 分子转变为一分子草酰乙酸,同时使 2 分子 NAD^+ 和一分子 FAD 还原。乙醛酸循环在植物种子中有特殊重要意义。它使萌发的种子将贮存的三酰甘油通过乙酰 - CoA 转变为葡萄糖。它使植物和微生物能够靠乙酸生活。

寡糖由单糖以糖苷键连接而成,种类极多,其组成成分包括有甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸、葡萄糖、果糖、半乳糖、N-乙酰神经氨酸、N-乙酰半乳糖胺等。

以糖苷键相连的最简单的典型寡糖是乳糖。糖蛋白是多肽链与寡糖分子相结合的重要物质。糖蛋白上的寡糖分子是起识别标记作用的重要分子。以“N”糖苷键相连接的糖蛋白其寡糖组分通过 N-糖苷键与蛋白质中具有 $\text{Asn}-\text{X}-\text{Ser}/\text{Thr}$ 序列片段的 Asn 相连。以“O”糖苷键连接的糖蛋白,其寡糖部分以 O-糖苷键连接到多肽链的 Ser 或 Thr 残基上。或者在胶原中连接到 5-羟赖氨酸上,糖基化的磷脂酰肌醇-锚蛋白的糖组分通过一个中间的磷酸乙醇胺作为桥连接到蛋白质上。它和多肽链的 C-端氨基酸残基形成一个酰胺键相连。N-连寡糖的合成,开始于内质网。先是经过多步反应形成一个以酯键连接的前体,它是以长醇焦磷酸连接着一个共有的由十四个糖残基构成的寡糖核心,即长醇·焦磷酸·寡糖,这一寡糖前体再转移到正在增长着的多肽链上。N-连寡糖的形成和多肽链的延长是同时逐步进行的。未完成的糖蛋白分子随后通过膜泡,被转移到高尔基体的内侧,中间以及外侧嵴,使糖蛋白中的寡糖部分继续加工修饰。这些加工包括加减甘露糖残基以及其他一些单糖分子。加工完了的 N-连糖蛋白,在高尔基体外侧嵴根据它们所具有的寡糖特性进行分类并准备通过膜泡迁往其目的部位。N-糖链可分为 3 种主要类型,高甘露糖型、复杂型和杂合型,这 3 种类型都含有一个共同的五糖核心。O-连糖蛋白是在肽链合成的基础上逐步加上糖基的。抗生素的使用有力地推动了对糖蛋白生物合成的研究,使用过的最重要的抗生素有衣霉素和杆菌肽。O-连寡糖部分在高尔基体合成,在相应肽链的 Ser 或 Thr 残基上依次加入所需的单糖单位;Ser/Thr 在肽链中的位置与肽链的二、三级结构有关。糖蛋白的寡糖是一种识别标记,它对糖蛋白的定向投送,细胞-细胞和抗体识别都具有重要作用。糖基磷脂酰肌醇可将各种不同的蛋白质锚定到真核细胞质膜的外表面,使它们可以在细胞外部空间自由地发挥作用。

习 题

1. 向含有戊糖磷酸途径全部有关酶和辅助因子的溶液中,加入在 C6 上具有放射性标记的葡萄糖,请问哪些物质上会带有放射标记?

(核糖 - 5 - 磷酸 C5 出现放射性标记)

2. 写出由葡萄糖 - 6 - 磷酸转变为核糖 - 5 - 磷酸不必同时计算 NADPH 的化学方程式。

(葡萄糖 - 6 - 磷酸 + ATP \longrightarrow 6 核糖 - 5 - 磷酸 + ADP + H^+)

3. 写出葡萄糖 - 6 - 磷酸合成 NADPH 而不涉及戊糖的化学方程式。

(葡萄糖 - 6 - 磷酸 + $12\text{NADPH} + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + \text{Pi}$)

4. 鸡蛋清中有一种对生物素亲和力极高的抗生物素蛋白。它是含生物素酶的高度专一的抑制剂,请考虑它对下列反应有无影响:

(1) 葡萄糖 \longrightarrow 丙酮酸

(2) 丙酮酸 \longrightarrow 葡萄糖

(3) 核糖 - 5 - 磷酸 \longrightarrow 葡萄糖

(4) 丙酮酸 \longrightarrow 草酰乙酸

5. 计算从丙酮酸合成葡萄糖需提供多少高能磷酸键? (6 个)

6. 维持还原型谷胱甘肽[GSH]的浓度为 10 mmol/L ,氧化型[GSSG]的浓度为 1 mmol/L ,所需的 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 的比例应是多少?(参看第 24 章氧化电势表)(谷胱甘肽由 NADPH 还原的 $\Delta E_0' = +0.09 \text{ V}$,因此 $\Delta G^{\circ'} = -4.15 \text{ kcal/mol}$ 。相应的平衡常数为 1126 所需的 $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$ 比值等于 8.9×10^{-2})

7. 比较柠檬酸循环途径和戊糖磷酸途径的脱羧反应机制。

8. 糖酵解、戊糖磷酸途径和葡萄糖异生途径之间如何联系?

9. 比较糖醛酸循环和柠檬酸循环。糖醛酸的存在有何特殊意义?
10. 为什么有人不能耐受乳糖? 而乳婴却靠乳汁维持生命?
11. 糖蛋白中寡糖与多肽链的连接形式有几种类型?
12. N-连寡糖和 O-连寡糖的生物合成各有何特点?

主要参考书目

1. 沈同,王镜岩主编.生物化学(下册).第二版.北京:高等教育出版社,1991:102~130
2. 王琳芳,杨克恭主编.医学分子生物学原理.北京:高等教育出版社,2001
3. 陈惠黎.糖蛋白寡糖链的生物学功能.上海:上海医科大学出版社,1997
4. Greenberg, David M., *Metabolic Pathways vol. I*, New York and London: Press, 1998
5. Voet D, Voet J G. *Biochemistry*. John Wiley and Sons, 1995: 561 ~ 584
6. Stryer, Lubert. *Biochemistry*. 4th ed. W. H. Freeman and Company, 1995: 559 ~ 580
7. Robert Roskoski, JR. *Biochemistry*. W. B. Saunders Company, 1997: 135 ~ 138
8. Hames B D, Hooper N M, Houghton J D. *Instant Notes in Biochemistry*. Bios Scientific Publishers, Springer, 1997
9. Zubay, Geoffrey. *Biochemistry*. 3rd ed. Wm. c. Brown Publishers, 1993: 347 ~ 376, 585 ~ 609
10. Nelson D L, Michael M. Cox *Lehringer Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, 2000
11. Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 2000, (271): 1 519 ~ 1 525
12. Berthon H A, Kuchel P W, Nixon P E. High control coefficient of transketolase in the nonoxidative pentose phosphate pathway of human erythrocytes: NMR, antibody, and computer simulation studies. *Biochemistry*, 1992, (31): 12 792 ~ 12 798
13. Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J. *Essential Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999

(王镜岩)

第 26 章 糖原的分解和生物合成

在第 1 章中已讨论过糖原(glycogen)和淀粉(starch)都是由葡萄糖分子聚合而成的高聚物,统称为葡聚糖(glucan)。糖原是动物细胞中葡萄糖的贮存形式。淀粉是植物体内贮存的多聚葡萄糖。用电子显微镜观察二者都呈聚集的颗粒状。糖原是动物细胞最容易动员的贮存葡萄糖。

葡聚糖中葡萄糖的连接形式有两种:一种是以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键相连接(也可用 $\alpha-1,4-$ 表示);另一种是在多糖分子的分支处,以 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键的形式相连(也可用 $\alpha-1,6-$ 表示)。植物淀粉中的支链淀粉(amylopectin)大约每 24~30 个糖残基有一个分支。糖原比淀粉具有更多的分支,大约每 8~12 个葡萄糖残基就有一个分支。糖原的连接和分支情况可由图 26-1 表示。

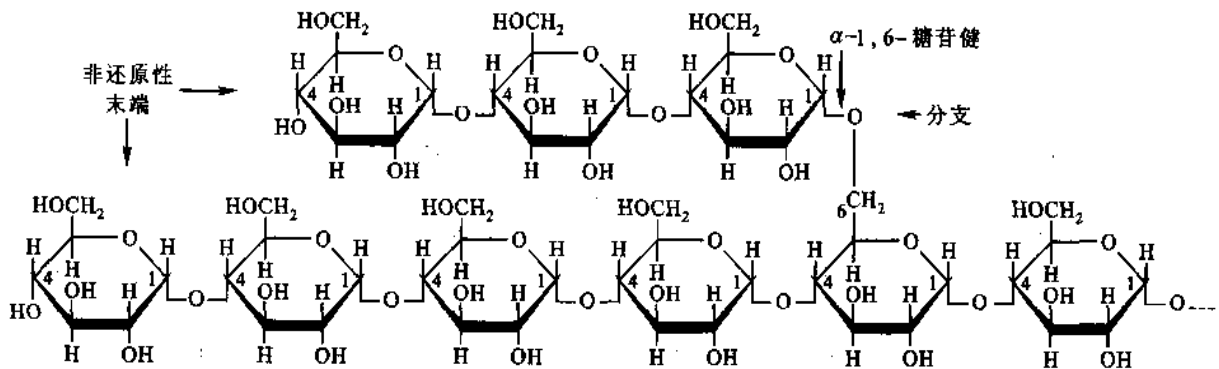


图 26-1 糖原的连接方式和分支方式

一、糖原的生物学意义

糖原的生物学意义就在于它是贮存能量的、容易动员的多糖。当机体细胞中能量充足时,细胞即合成糖原将能量进行贮存;当能量供应不足时,贮存的糖原即降解为葡萄糖从而提供 ATP。因此糖原是生物体所需能量的贮存库。糖原的存在保证了机体最需能量供应的脑和肌肉紧张活动时对能量的需要;同时也保证不间断地供给维持恒定水平的血糖。因为组织所利用的葡萄糖直接来源于血糖,如果血糖水平低于正常水平,会严重影响中枢神经系统的正常功能,以致产生休克和死亡。

糖原是葡萄糖的一种高效能的贮存形式。糖原降解的产物是葡萄糖-1-磷酸(glucose 1-phosphate)。糖原的葡萄糖残基磷酸解形成葡萄糖-1-磷酸所消耗的底物除糖原分子的残基外,就是无机磷酸,没有消耗任何 ATP 分子。而葡萄糖-1-磷酸在进一步分解前转变为葡萄糖-6-磷酸也不消耗 ATP 分子。糖原分子 90% 降解为葡萄糖-1-磷酸,其余 10% 被水解成为葡萄糖分子。葡萄糖-6-磷酸彻底氧化为 CO_2 和 H_2O 可产生约 31 个 ATP 分子。糖原分子与被水解下的葡萄糖分子转变为葡萄糖-6-磷酸需消耗 1 个 ATP 分子。若贮存一个葡萄糖-6-磷酸分子也只消耗约 1 个 ATP 稍多的能量。因此,将葡萄糖转变为贮存形式的糖原其效益是很高的,大约可收到 97% 的效益。

二、糖原的降解(glycogen breakdown)

糖原以颗粒状存在于细胞溶胶中,其颗粒直径大、小不等,约 10~40 nm。每个颗粒含有的葡萄糖分子可高达 12 万,这些颗粒中不只含有糖原,还含有催化糖原合成和降解的酶以及调节蛋白(regulatory

proteins),使糖原颗粒可随时被动员并可随时形成贮存的糖原颗粒,从两方面确保生命活动所需的能量。一个体重为 70 kg 的人,他体液中的葡萄糖只含有约 160 kJ(约 40 kcal)的能量,而体内的糖原甚至经过一夜饥饿之后所提供的能量还相当体液所含能量的 15 倍(约 2 510 kJ 或 600 kcal)。机体贮存的糖原作为能源大约可供机体 12 小时的需要。

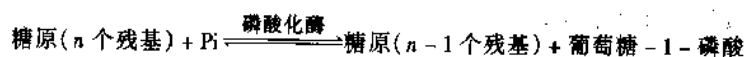
机体贮存糖原的器官主要是肝脏和肌肉。肝组织内的糖原约占肝脏湿重的 7% ~ 10%;肌肉中的含量约占其重量的 1% ~ 2%。因肌肉的总体重量比肝脏重得多,总算起来肌肉中糖原的贮存量反而超过肝脏。

机体的贮脂比糖原丰富得多,为什么还要选择糖原作为不可缺少的贮能物质?可能有三重意义。首先肌肉不可能像动员糖原那样迅速地动员贮脂;其次,脂肪的脂肪酸残基不可能在无氧条件下进行分解代谢,再者,动物不能将脂肪酸转变为葡萄糖的前体,因此单纯的脂肪酸代谢不可能维持血糖的正常水平。

血糖(血液中的葡萄糖)水平的稳定对确保细胞执行其正常功能具有重要意义。正常人血糖的水平为每 100 ml 血液含有约 80 mg 葡萄糖(80 mg%),相当 4.5 mmol%(医院检测的正常指标为 4 ~ 6 mmol%)。饥饿时机体首先动用的是肝糖原,肝糖原可在 1 ~ 2 天之内下降至正常含量的 10%。肌肉内糖原的动员不如肝脏迅速,肌肉的糖原主要提供肌肉运动时的需要;而肝脏中的糖原在维持血糖水平的稳定中起着重要作用,人(70 kg 体重为例)在晚餐后直至第二天清晨肝脏能够提供大约 100 g 葡萄糖。

人脑的代谢速度很快,在安静状态它消耗的能量也占全身总能量消耗的 20% 以上。而且脑在正常情况下只利用葡萄糖作为能源,每天的需要量大约为 140 g。脑细胞内也含有少量糖原以及水解、合成和调节糖原代谢的各种酶。

对糖原分解途径的阐明做出卓越贡献的人是 Carl Cori 和 Gerty Cori 两人。他们首先发现正磷酸能使糖原裂解产生葡萄糖 - 1 - 磷酸,还对催化糖原磷酸解(phosphorolysis)的酶——糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase),进行了分离、纯化,获得了结晶,并对其结构进行了分析,糖原磷酸化酶简称磷酸化酶(phosphorylase)催化糖原的降解,反应可表示如下:



糖原作为贮存能源在供能前必须先降解为葡萄糖分子。这和植物细胞内的淀粉一样。糖原和淀粉的降解都是从它们的大分子上按照顺序一个个地移去葡萄糖残基。只是催化糖原降解的是糖原磷酸化酶,催化淀粉降解的是淀粉磷酸化酶(starch phosphorylase)。虽然它们在某些方面有所差异,但它们催化的都是磷酸解作用。磷酸解作用和水解作用的根本区别在于前者是由正磷酸引起断键反应,而不是由水引起断键反应,正磷酸作为一个基团加到断键的一端。

糖原的降解需要 3 种酶的作用:糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase)、糖原脱支酶(glycogen debranching enzyme)和磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)

(一) 糖原磷酸化酶

1. 磷酸化酶催化糖原非还原性末端磷酸解

磷酸化酶催化的特点是,从糖原分子的非还原性末端(nonreducing end)断下一个葡萄糖分子。同时又出现一个新的非还原性末端葡萄糖分子。这样可以连续地将处于末端位置的葡萄糖残基(glucosyl residue)一个个地移去。该酶催化断裂的键是末端葡萄糖残基的第 1 个碳原子(C1)与相邻的那个葡萄糖残基的第 4 个碳原子(C4)之间相连的键,也就是末端葡萄糖基 C1 碳原子和相邻葡萄糖 C4 形成的糖苷氧原子之间的键,断键后氧原子仍留在相邻葡萄糖残基的第 4 个碳原子上。如图 26-2 所示。

2. 磷酸化酶催化糖原 1→4 糖苷键磷酸解

糖原磷酸化酶只催化 1→4 糖苷键的磷酸解,因此它只能脱下糖原分子直链部分的葡萄糖残基。实际上磷酸化酶的作用只到糖原的分支点前 4 个葡萄糖残基处即不能再继续进行催化。糖原的继续分解还需其他酶(脱支酶)参与作用。磷酸化酶催化的反应在机体外的实验条件下是可逆的,从两个方向都可以迅速地达到平衡。用蔗糖磷酸化酶,肌肉磷酸化酶等多种磷酸化酶都证实磷酸化酶的作用发生在葡萄糖 -

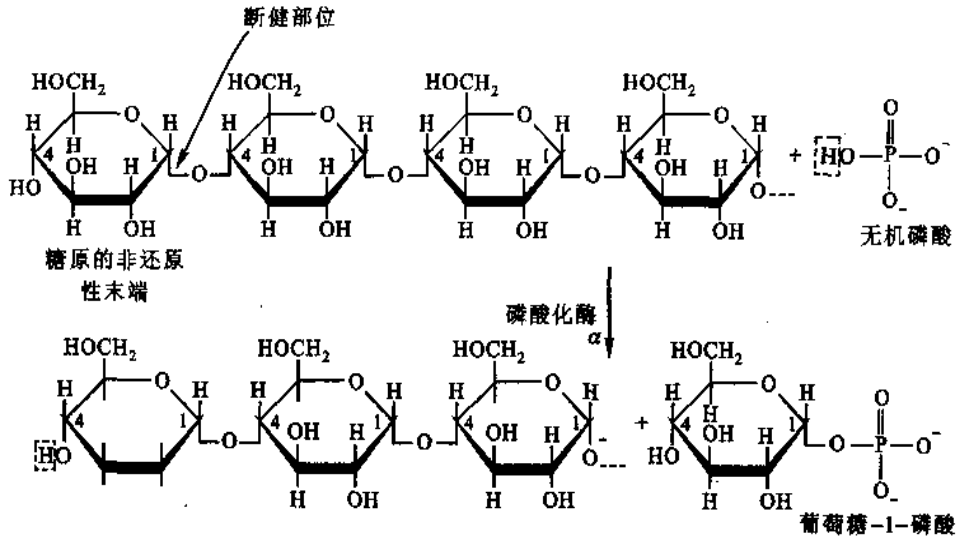
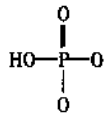


图 26-2 磷酸化酶的作用位点及产物

磷酸化酶催化糖原分子非还原性末端葡萄糖残基上 C1 和相邻葡萄糖残基的 C4 之间的键断裂, 正磷酸以



保留 α 构型

1-磷酸的碳和氧之间而不是氧和磷之间。当 pH 为 6.8 时测得的正磷酸和葡萄糖-1-磷酸的平衡比值 (equilibrium ratio) 等于 3.6。糖原磷酸解产生葡萄糖-1-磷酸反应的标准自由能变化 (ΔG°) 很小。因磷酸解的反应是由磷酸酯键取代糖苷键。这两种键型的转移势能大体相当。但在体内的条件下, 无机磷酸与葡萄糖-1-磷酸浓度之比 ($\frac{[\text{Pi}]}{[\text{葡萄糖-1-磷酸}]}$) 往往大于 100, 所以磷酸解作用可顺利地沿着糖原分解的方向进行。

糖原的降解采用磷酸解而不是水解, 具有重要的生物学意义。磷酸解使降解下的葡萄糖分子带上磷酸基团。葡萄糖-1-磷酸不需要能量提供可容易地转变为葡萄糖-6-磷酸, 从而进入糖酵解等葡萄糖的降解途径; 如果不是磷酸解而是水解, 则所得的水解产物为葡萄糖。后者需要消耗 1 个 ATP 分子才能转变为葡萄糖-6-磷酸进入糖酵解途径。磷酸解作用对肌肉细胞还有另外的优越性: 在生理条件下, 磷酸解生成的葡萄糖-1-磷酸以解离形式存在, 而不致扩散到细胞外, 而非磷酸化的葡萄糖则可以扩散到胞外。

3. 磷酸化酶的分子结构

早在 1938 年 Carl Cori 和 Gerty Cori 二人就发现有两种磷酸化酶, 分别称为磷酸化酶 a (phosphorylase a) 和磷酸化酶 b (phosphorylase b)。对磷酸化酶的结构和功能进行系统研究并做出重要贡献的还应提出 Robert Fletcher 和 Louise Johnson 等人。他们曾用高分辨率 X 射线深入探讨并阐明了磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b 的三维结构和作用。

磷酸化酶 a 和 b 都是由两个相同亚基构成的二聚体, 每个亚基由 842 个氨基酸构成 (有的资料报道由 841 个氨基酸构成)。亚基的相对分子质量为 97 000 (也有文献报道为 92 000)。磷酸化酶 a 分子每个亚基肽链中的第 14 位丝氨酸 (Ser14) 残基上的羟基各被一个磷酸基团酯化。而磷酸化酶 b 则缺少这两个磷酸基团。但是两种磷酸化酶的结构是非常相似的。实际上磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b 是一种酶的不同存在形式。磷酸化酶 a 有催化活性, 而磷酸化酶 b 是几乎无活性的形式。若磷酸化酶 b 两个亚基中的 Ser14 被磷酸化就转变为磷酸化酶 a。所以磷酸化酶是以两种可以互相转变的形式存在。而 Ser14 是磷酸化酶 b 转变为磷酸化酶 a 的关键部位。这种对磷酸化酶的共价修饰作用 (covalent modification) 是由专一的酶即磷

酸化酶激酶(phosphorylase kinase)实现的,而去修饰作用(demodification)又是由另一种专一的酶即磷酸酶(phosphatase)实现的。磷酸化酶是一个重要的调节酶在糖原分解和合成代谢的调节中还将进一步讨论它的作用。

磷酸化酶的三维结构经 X 射线结晶法研究表明,每个亚基都紧密折叠形成两个结构域:氨基末端结构域(amino-terminal domain,可简称为 N-末端结构域)和羧基末端结构域(carboxyl-terminal domain,可简称为 C-末端结构域)。氨基末端结构域由 1~484 位的氨基酸残基构成已知最大的结构域。C-末端结构域由第 485~842 位氨基酸构成。N-末端结构域又分为两个亚结构域(subdomain)。一个是介面亚结构域(interface subdomain),由 1~315 位氨基酸残基构成,含有共价修饰部位(covalent modification site),即 Ser 14,别构效应部位(allosteric effector site)以及二聚体内全部亚单位间的接触部位;另一个是糖原结合亚结构域(glycogen binding subdomain)由 316~484 位的氨基酸残基构成。它包含有一个糖原停靠部位(glycogen docking site)。N-末端结构域和 C-末端结构域合在一起,中间形成一个深的裂缝(deep crevice)。催化部位(catalytic site)即位于这个裂缝中。裂缝的长度大约为 3 nm,它的曲率半径(radius curvature)和糖原相同,此裂缝有保护与隔离催化部位的作用,使催化部位与水的环境隔开,造成有利于磷酸解的环境。裂缝和糖原停靠部位相连。由停靠部位将结合的糖原送到起催化作用的活性部位。磷酸化酶的催化活性需要吡哆醛磷酸(pyridoxal phosphate)作为辅酶。该辅酶结合在磷酸化酶的活性部位上,并将其磷酸基团紧挨着与酶连接着的正磷酸。停靠部位和催化部位之间的距离,适合于磷酸化酶同时接受糖原同一分子的 4~5 个末端葡萄糖残基。实际上该裂缝比较狭窄不但只适合糖原分子。即使是紧靠近分支点的 4 个葡萄糖残基也不能进入。此外,在靠近磷酸化酶两个亚基界面处有一个 AMP 的结合位点。AMP 是磷酸化酶的一个别构活化剂(allosteric activator)。这个结合位点距催化部位和糖原结合部位都较远,如图 26-3 所示。AMP 对磷酸化酶的调节作用将在后面讨论。

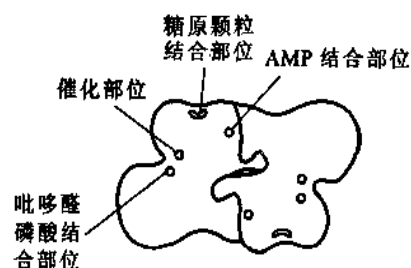


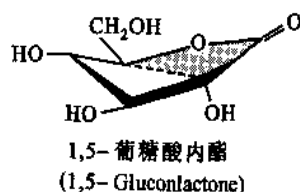
图 26-3 磷酸化酶 b 二聚体示意图
表明各结合部位的相对位置,该图
为沿分子二重轴向下观察的情况

4. 磷酸化酶催化的反应机制

前面已经提到磷酸化酶使糖原非还原性末端葡萄糖残基的 C1 与 O 原子(-C-O-)之间的键断裂产生葡萄糖-1-磷酸并且保留了原来的构象不变。有一种假设认为,磷酸解作用可能是通过双取代机制(double displacement mechanism)进行的。它包括两步连续的亲核取代。每次都发生构象的翻转(inversion),中间形成一个共价葡萄糖基-酶中间体(covalent glucosyl-enzyme intermediate)。但至今尚未能成功地得到这个假设的“共价中间体”。因此,还不能确切地证明这一假想反应机制的正确性。

第二种磷酸化酶催化机制的设想如图 26-4 所示,是先形成一个由正磷酸、酶和糖原构成的三元(Pi·E·糖原)复合体,随后生成一个被遮掩的氧鎓离子(shielded oxonium ion)中间体。断键和随后形成氧鎓离子(oxonium ion)是由无机磷酸引起的糖苷氧的质子化(protonation)协助产生的。

这种氧鎓离子机制得到的支持是,1,5-葡糖酸内酯(1,5-gluconoactone)是磷酸化酶的强力抑制剂。1,5-葡糖酸内酯的结构如下:



1,5-葡糖酸内酯和推测产生的葡萄糖氧鎓离子具有相同的半椅形构型。很可能这是磷酸化酶活性部位产生的过渡态氧鎓离子的类似物。此外,该机制的设想也与提供的动力学数据以及化学和结构数据都比较吻合。

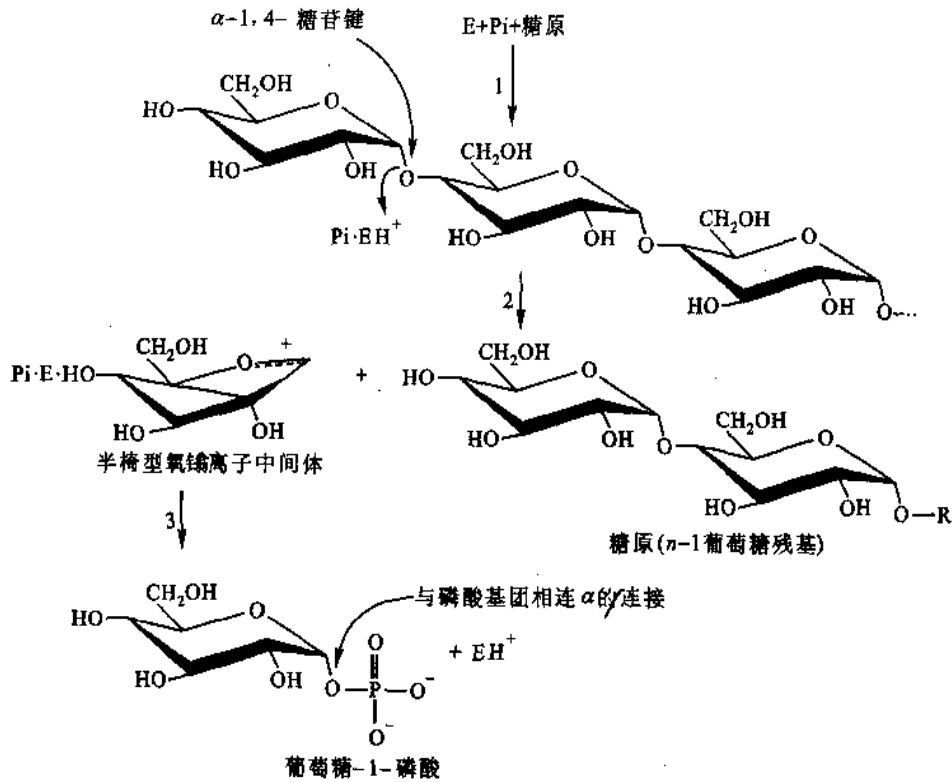


图 26-4 糖原磷酸化酶催化的可能机制

1. 形成正磷酸·酶(E)·糖原的三元复合物。2. 糖原末端葡萄糖基形成被遮掩的氧鎓离子中间体。此反应包括有酶参与进行的酸化反应。氧鎓离子(Oxonium ion)具有半椅状构型。3. 正磷酸与氧鎓离子发生反应并全面保留葡萄糖 C-1 的构象形成 α -D-葡萄糖-1-磷酸

5. 磷酸吡哆醛是磷酸化酶的必需辅助因子

磷酸化酶的催化作用需要磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)作为辅助因子。X 射线结构分析表明,磷酸吡哆醛的磷酸基团紧挨着磷酸化酶的活性部位。它以共价键通过希夫碱(Schiff base)的形式与酶的第 680 位赖氨酸(Lys 680)相连(图 26-5)。磷酸吡哆醛不只是磷酸化酶的辅助因子,它在氨基转移作用(transamination)中也是一个必需的辅助因子。然而它在不同酶中所起的作用不同,即发挥作用的部位不同。如果用四硼酸钠($NaBH_4$)将希夫碱的 $-CH=N-$ 还原为 $-CH_2-NH-$,对磷酸化酶的活性并没有影响;但却使氨基酸代谢中的氨基转移酶失去活性。实验证明,磷酸吡哆醛与磷酸化酶活性相关的基团是其磷酸基团;很可能是在酶催化反应中作为酸-碱催化剂(acid-base catalyst)起作用。

(二) 糖原脱支酶(glycogen debranching enzyme)(包括糖基转移酶)

磷酸化酶催化磷酸解作用,使糖原分子从非还原性末端逐个移去葡萄糖残基直至邻近糖原分子 $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -糖苷分支点前 4 个葡萄糖残基处。如此作用,最后形成一个具有许多短分支链的多糖分子称为极限糊精(limit dextrin)。极限糊精的短的分支称为“极限分支”(limit branch),它的进一步分解需要糖原脱支酶(包括糖基转移酶)和磷酸化酶的协同作用,如图 26-6 所示。

一般称为糖原脱支酶的肽链上,实际具有两个起不同催化作用的活性部位;也可以说,同一个肽链上

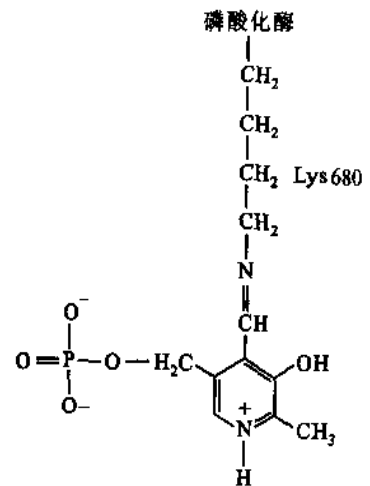


图 26-5 磷酸吡哆醛(DLP)与磷酸化酶以希夫碱形式与酶的 Lys 680 共价相连

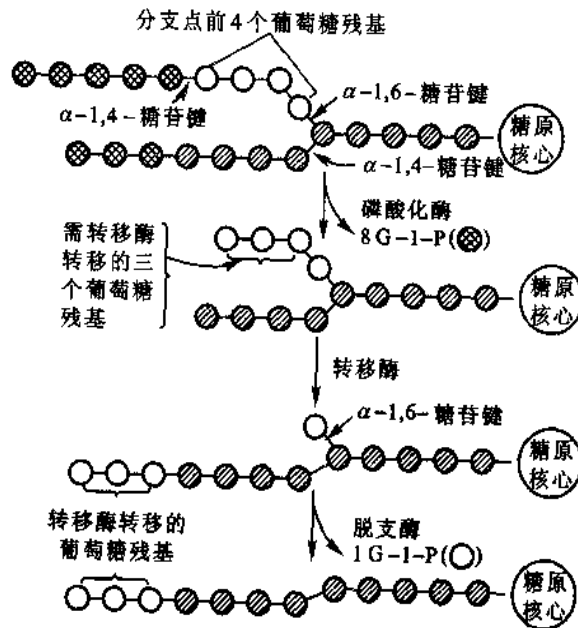


图 26-6 磷酸化酶和糖原脱支酶、糖基转移酶的协同作用示意图
代表糖原分子中处于不同位置的葡萄糖分子

有两种酶存在：一种是起转移葡萄糖残基作用的酶，称为糖基转移酶 (glycosyl transferase)；另一种是起分解葡萄糖 $\alpha(1\rightarrow6)$ -糖苷键作用的酶，称为糖原脱支酶，脱支酶又称 $\alpha(1,6)$ -糖苷酶 ($\alpha(1,6)$ -glucosidase)。人们往往将糖原脱支酶笼统地看作是一种双重功能酶 (bifunctional enzyme)。

当磷酸化酶的作用停止后，糖原脱支酶肽链上的转移葡萄糖残基的活性部位先起催化作用将原来极限分支前面以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 连接的三个葡萄糖残基转移到另一个分支的非还原性末端的葡萄糖残基上，或者转移到糖原的核心链 (core chain) 上。通过转移酶的转移作用，一方面形成一个带有 3 个葡萄糖残基的新的 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键，另一方面又同时暴露出以 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键相连的葡萄糖残基。这个分支点即由脱支酶的另一催化作用，即分解 $1\rightarrow6$ -糖苷键的作用将最后的分支点消除。脱支酶脱下 $\alpha(1\rightarrow6)$ 连接的葡萄糖残基不是磷酸解作用，是水解作用，其结果是产生一个葡萄糖和以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键相连的葡萄糖残基，于是磷酸化酶又可继续发挥作用。

(三) 磷酸葡萄糖变位酶 (phosphoglucomutase) 的作用

由磷酸化酶催化糖原磷酸解的结果，使糖原分子的葡萄糖残基形成葡萄糖-1-磷酸。后者必须转变成葡萄糖-6-磷酸才有可能进入代谢主流，参加糖酵解或转变成游离的葡萄糖。担负磷酸基团转移的酶就是磷酸葡萄糖变位酶。该酶为由 561 个氨基酸残基构成的单体酶 (monomeric enzyme)。

用 X 射线结构测定，以兔肌肉为材料所得结果表明，具有活性的磷酸葡萄糖变位酶的活性部位深深地埋藏在酶的裂缝的底部。在它的一个丝氨酸残基上带有一个磷酸基团，如图 26-7 所示。

活化的磷酸葡萄糖变位酶分子，其丝氨酸残基上带有一个磷酸基团。在起催化作用时，酶分子上的磷酸基团转移到葡萄糖-1-磷酸的第 6 位碳原子的羟基上，形成葡萄糖-1,6-二磷酸中间体。这时葡萄糖-1,6-二磷酸 C1 位的磷酸基团又转回到磷酸葡萄糖变位酶丝氨酸残基原来磷酸基团所处的位置上，于是葡萄糖-1,6-二磷酸转变成葡萄糖-6-磷酸，而磷酸葡萄糖变位酶又恢复其原来带有磷酸基团的活化形式。

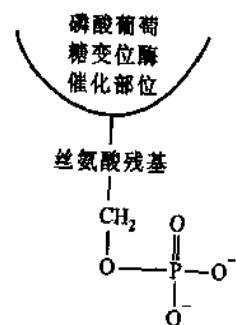
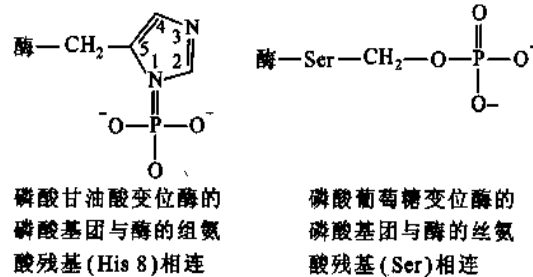


图 26-7 磷酸葡萄糖变位酶催化部位表示酶的催化部位丝氨酸残基上带有一个磷酸基团

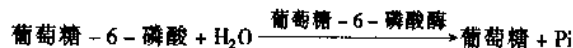
磷酸葡萄糖变位酶的反应和磷酸甘油酸变位酶(phosphoglyceromutase)的反应机制很相似。后者在糖酵解过程中将甘油酸-3-磷酸转变为甘油酸-2-磷酸时,中间经过形成2,3-二磷酸甘油酸(2,3-bisphosphoglycerate)中间体。磷酸葡萄糖变位酶的磷酸基团与酶的丝氨酸残基相连,而磷酸甘油酸变位酶的磷酸基团与酶的组氨酸残基相连。



磷酸葡萄糖变位酶发挥其充分活性(fully active),需有少量的葡萄糖-1,6-二磷酸存在。后者是由磷酸葡萄糖激酶(phosphoglucokinase)提供的,它利用ATP催化葡萄糖-1-磷酸的第6位羟基磷酸化形成的。如果葡萄糖1,6-二磷酸从磷酸葡萄糖变位酶分子上脱落,就会发生酶活性的钝化。

(四) 葡萄糖-6-磷酸酶

葡萄糖-6-磷酸酶(Glucose 6-phosphatase)是专门水解葡萄糖-6-磷酸的酶。它催化的反应如下:



该酶存在于肝细胞,肾细胞及肠细胞光滑内质网膜的内腔面。脑细胞和肌肉细胞都无此酶。肝脏的主要功能之一是维持血糖浓度的稳定。肝细胞必需依靠此酶才能维持血糖的相对稳定水平。当机体未进食,例如,处于两餐之间,或肌肉运动时以及脑的活动等都使葡萄糖在血液中的浓度降低,于是肝脏中的葡萄糖-6-磷酸酶立即将进入内质网腔的葡萄糖-6-磷酸水解为游离葡萄糖。游离的葡萄糖能够迅速地扩散出肝细胞进入血流。

葡萄糖-6-磷酸通过转运蛋白(T_1)进入内质网腔,由结合在膜上的葡萄糖-6-磷酸酶将其水解,形成的无机磷酸和游离葡萄糖分别通过相关的转运蛋白 T_2 (无机磷酸)、 T_3 (游离葡萄糖)运送到细胞溶胶中。葡萄糖-6-磷酸酶的活性需要一种钙-结合稳定蛋白(Ca-binding stabilizing Protein)协同作用。图26-8表明葡萄糖-6-磷酸酶的存在情况及其作用。

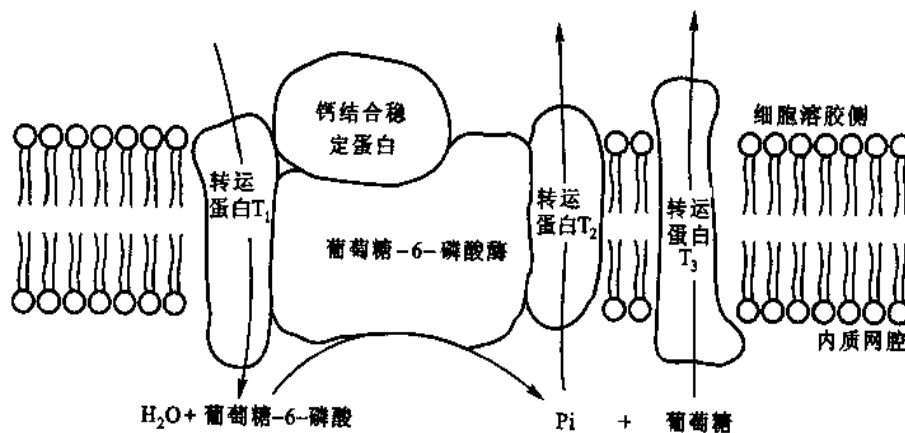


图 26-8 葡萄糖-6-磷酸酶的存在及作用

葡萄糖-6-磷酸酶存在于细胞光面质网膜的内腔面,它的作用共需5种蛋白质合作,转运蛋白 T_1 使葡萄糖-6-磷酸进入内质网腔,转运蛋白 T_2 将 P_i 运至细胞溶胶,转运蛋白 T_3 将葡萄糖运至细胞溶胶。葡萄糖-6-磷酸酶的活性需有 Ca^{2+} -结合稳定蛋白协同作用

三、糖原的生物合成

(一) 糖原生物合成的研究经历了缓慢的历程

在糖酵解过程中我们看到葡萄糖如何转变为丙酮酸。在葡萄糖异生过程中又看到丙酮酸如何转变为葡萄糖。虽说葡萄糖的分解与合成途径并不完全相同。但由丙酮酸合成葡萄糖除了丙酮酸激酶、磷酸果糖激酶和己糖激酶催化的三个步骤是通过绕道而行外,其他途径也都是糖酵解的逆反应。而糖原的生物合成和分解却走的是完全不同的途径。

最早研究糖原或淀粉的合成曾用葡萄糖-6-磷酸作为起始物,先用磷酸葡萄糖变位酶,使其转变为葡萄糖-1-磷酸。因为葡萄糖-1-磷酸是糖原降解时由磷酸化酶降解的第一步产物。Cori C 和 Cori G 二人曾用磷酸化酶和分支酶从葡萄糖-1-磷酸成功地合成过糖原,因此开始阶段曾设想糖原磷酸化酶的催化反应是可逆的。虽然在试管内(*in vitro*)该酶的确可催化双向反应。但在细胞内的条件下,糖原磷酸化酶却只能催化糖原降解的方向。研究糖原合成的许多实验都证明,催化分解糖原的酶不可能进行糖原的合成。例如实验证明,一般在接近中性的 pH 环境下,[无机磷酸]和[葡萄糖-1-磷酸]的比约为 3.5~3.6,在这种条件下,磷酸化酶所催化的反应处于平衡状态,但在细胞中,上述的浓度比值变动在 30~100 以上。因此在体内,无机磷酸的浓度远远高于葡萄糖-1-磷酸的情况下,磷酸化酶的反应必然朝向糖原降解的方向进行。实验还观察到,刺激磷酸化酶活性增高的激素,总是使磷酸化酶增强催化磷酸解的活性而促使糖原降解。此外,临床上观察到,麦卡德尔氏病(McArdle's disease)的患者虽然肌肉中缺乏磷酸化酶活性,病人的紧张运动能力有限,但这种病人仍有合成肌肉糖原的能力。上述事实都促使人们考虑糖原的生物合成可能通过与分解完全不同的途径。

直至 1957 年,Luis Leloir 等人终于发现了糖原生物合成的不同途径。他们发现,在糖原生物合成中,糖基的供体并不是葡萄糖-1-磷酸而是另一种核苷酸的化合物即尿苷二磷酸葡萄糖(uridine diphosphate glucose),简称 UDP-葡萄糖(UDP-glucose)或 UDPG。它的结构式如右图。UDP-葡萄糖作为糖原合成糖基供体的发现打开了糖原合成研究迅速进展的大门。

Luis Leloir 用葡萄糖-1-磷酸与尿苷三磷酸(uridine triphosphate, UTP)作用,生成尿苷二磷酸葡萄糖:



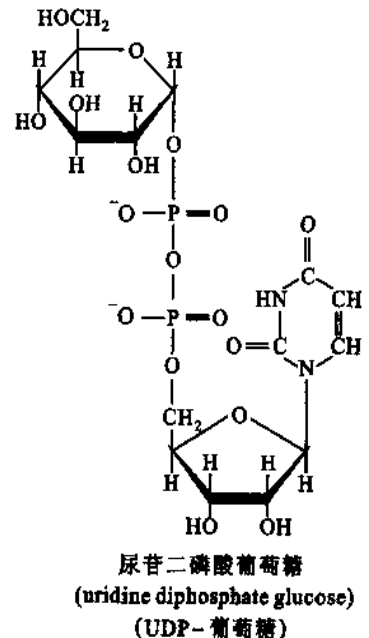
(二) 催化糖原合成的三种酶

糖原的生物合成通过 3 个步骤,包括 3 种酶的催化作用:UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)、糖原合酶(glycogen synthase)和糖原分支酶(glycogen branching enzyme)。

1. UDP-葡萄糖焦磷酸化酶

UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化葡萄糖-1-磷酸与 UTP 的反应。在此反应中葡萄糖-1-磷酸分子中磷酸基团带负电荷的氧原子向 UTP 的 α -磷原子进攻,形成 UDPG,如图 26-9 所示。

图 26-9 表明,UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化的是葡萄糖-1-磷酸和 UTP 之间的磷酸酐交换反应(phosphoanhydride exchange reaction)。在此反应中,葡萄糖-1-磷酸分子中的磷酸基团因带有负电荷,向 UTP 分子的 α -磷原子进攻,结果葡萄糖-1-磷酸的磷酸基团取代了 UTP 的 β 和 γ 磷酸基团与 UTP 的 α -磷酸基团相连,形成 UDP-葡萄糖,而被取代的 β 和 γ 磷酸基团形成焦磷酸(PPi),后者迅速被无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase)水解为无机磷酸分子。葡萄糖-1-磷酸与 UTP 形成 UTPG 的反应标准自



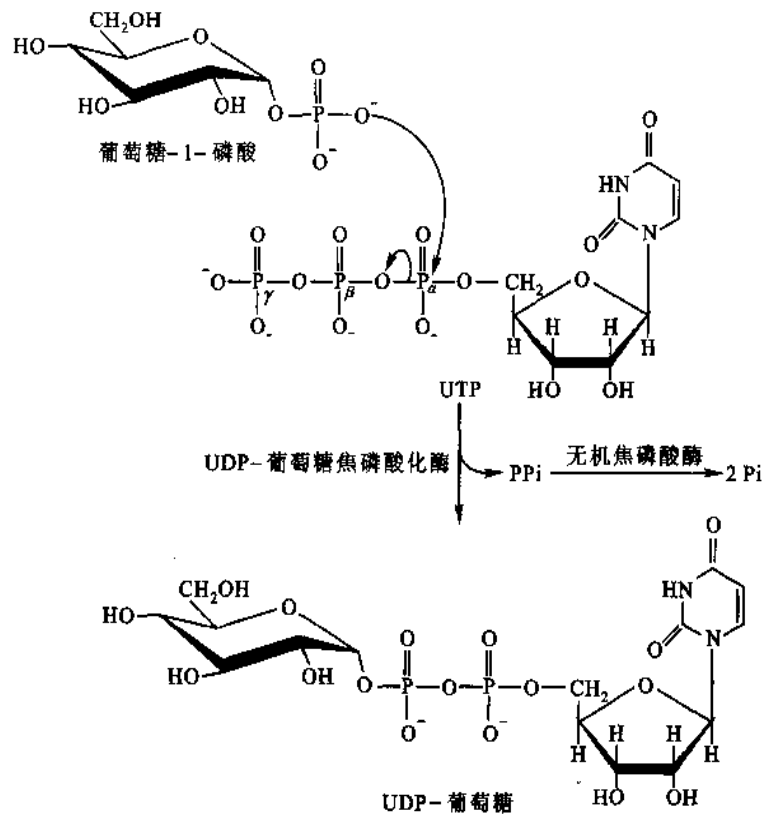


图 26-9 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化的反应。葡萄糖-1-磷酸分子中磷酸基团的氧原子向 UTP 分子的 α 磷原子进攻形成 UDP-葡萄糖 (UDPG) 和焦磷酸 (PPi) (即 UTP 的 β 和 γ 磷酸基团), PPi 迅速被无机焦磷酸酶水解

由能变化 (ΔG°) 接近于零。这一反应本属可逆反应, 但因焦磷酸随即被水解, 其 ΔG° 为 $-25 \sim -31 \text{ kJ/mol}$, 致使该反应成为不可逆的单向反应。

核苷三磷酸在反应中裂解产生焦磷酸, 这种现象在生物合成中广泛存在。焦磷酸的水解和核苷三磷酸的水解反应相偶联, 有力地推动那些在热力学上原来可逆的甚至是吸能的反应向一个方向进行。由葡萄糖-1-磷酸和 UTP 形成 UDPG 的反应就是很好的例子。不可逆的焦磷酸的水解推动 UDPG 的合成。许多生物合成反应就是由焦磷酸的水解推动的。高能态的 UDPG 可容易地将其糖基供给糖原的合成。在许多双糖和多糖的生物合成中 UDPG 都起着糖基供体的作用。葡萄糖形成 UDPG 的重要生物学意义就在于它使葡萄糖变为更活泼的活化形式。UDPG 分子中葡萄糖基上的 C1 原子因其羟基被 UDP 二磷酸酯化而活化。

2. 糖原合酶 (glycogen synthase)

糖原合酶催化的反应是将 UDPG 上的葡萄糖分子转移到已存在的、糖原分子的某个分支的非还原性末端上。该酶的催化反应如图 26-10 所示。

从图 26-10 可看到, 糖原合酶催化的结果是 UDPG 分子上的葡萄糖分子的 1 位碳原子与糖原某个分支的非还原末端葡萄糖残基第 4 位碳原子上的羟基形成 $\alpha(1 \rightarrow 4)$ 糖苷键, 使糖原延长了 1 个葡萄糖残基。糖原合酶催化的反应和糖原磷酸化酶以及溶菌酶的催化机制都比较类似, 在催化过程中都包含有一个糖基氧鎓离子过渡态, 因为该反应也被 1,5-葡糖酸内酯所抑制, 它在几何学上与半椅状的氧鎓离子相似。糖原合酶只能催化 $1 \rightarrow 4$ 糖苷键的形成, 形成的产物只能以直链形式存在, 而且它只能催化将葡萄糖残基加到已经具有 4 个以上葡萄糖残基的葡聚糖分子上。糖原合酶不可能从零开始将两个葡萄糖分子互相连起。该酶的催化作用至少需要有“引物” (primer) 存在。起引物作用的是一种相对分子质量为 37 000 的特殊蛋白质称为 glycogenin, 译为生糖原蛋白, 或糖原引物蛋白也有译为糖原素的。这种蛋白质分子上带着

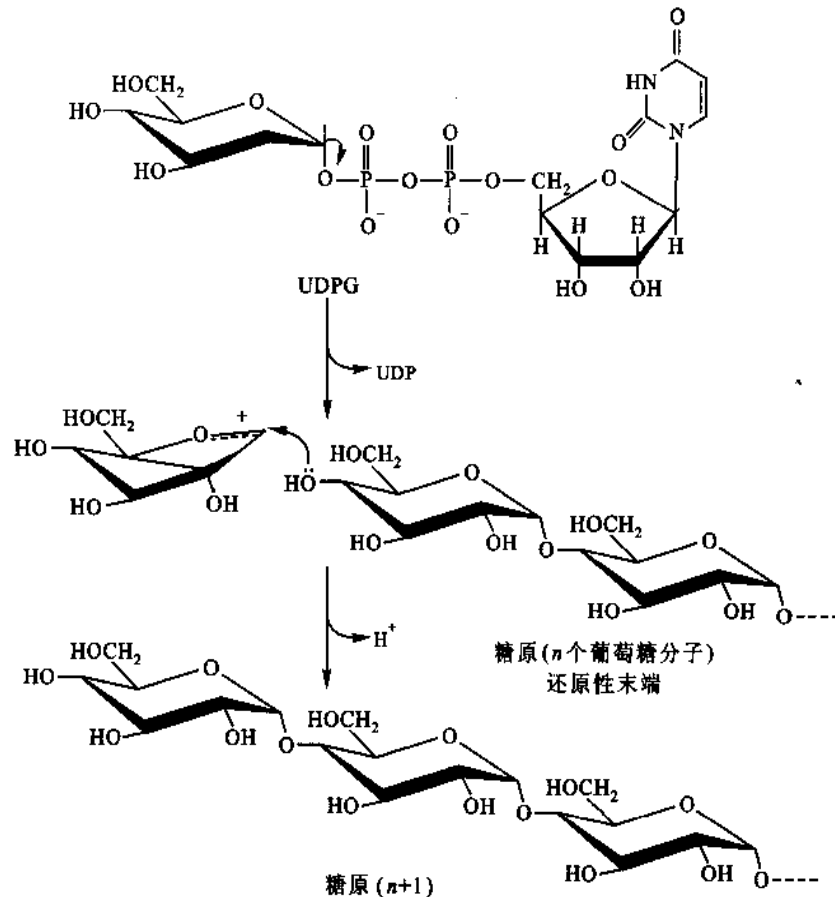


图 26-10 糖原合酶催化的反应——由 UDPG 提供葡萄糖基加到原有糖原某分支非还原性末端,糖基转移中形成一个葡萄糖氧鎓离子中间体

一个有 α -1,4 葡萄糖单位的寡糖分子。糖原的第 1 个葡萄糖单位以共价键连接到生糖原蛋白的专一酪氨酸残基的酚羟基上。生糖原蛋白具有自动催化作用 (autocatalysis), 可催化大约 8 个葡萄糖单位连续以 1 \rightarrow 4 糖苷键相连成链。自动糖基化 (autoglycosylation) 的糖基供体也是 UDP-葡萄糖。在已经合成的 8 个葡萄糖残基的基础上, 糖原合酶再继续延长糖基链。糖原合酶只有当它与生糖原蛋白紧紧结合在一起时才能有效地发挥其催化作用。生糖原蛋白实际上形成了糖原分子的核心 (core)。糖原颗粒的数目即取决于生糖原蛋白的分子数目。糖原分子的延长与否, 亦即分子的大小, 取决于糖原合酶与生糖原蛋白相互之间的作用。糖原合酶一旦与生糖原蛋白脱离, 即不再行使其合成作用。

应提起注意的是, 糖原合酶这一名称之所以称为“合酶” (synthase) 而不是“合成酶” (synthetase), 是因为合酶在催化反应中没有 ATP 直接参加反应。如若需要 ATP 直接参加反应, 就称为某某合成酶。

糖原合酶是由两个相同亚基构成的二聚体, 称为同型二聚体 (homodimer)。每个亚基由 737 个氨基酸残基构成, 其中含有 9 个丝氨酸残基。这 9 个残基可被蛋白激酶 a 以及其他蛋白激酶催化其磷酸化而使糖原合酶受到不同的抑制。未磷酸化的糖原合酶 (即糖原合酶 a) 的电荷测定值为 -13, 而全部磷酸化的糖原合酶 (即糖原合酶 b) 其电荷值为 -31。9 个发生磷酸化的部位比较集中在靠近肽链 N 端和 C 端的两个聚簇 (cluster) 中。它的电荷情况可由图 26-11 表示。

3. 糖原分支酶 (glycogen branching enzyme)

糖原合酶只能催化合成 α -1,4 葡萄糖苷键结果形成直链淀粉。使直链淀粉形成多分支的多聚糖必须有糖原分支酶的协同作用。

糖原分支酶又称淀粉 1,4 \rightarrow 1,6-转葡萄糖基酶 (amylol-1,4 \rightarrow 1,6-transglycosylase), 或称糖基 4 \rightarrow 6-转移酶 (glycosyl-4 \rightarrow 6-transferase)。糖原分支酶的作用包括断开 α (1 \rightarrow 4) 糖苷键并形成 α (1 \rightarrow 6) 糖苷键。糖原分支酶将糖原分子中处于直链状态的葡萄糖残基, 从非还原性末端约 7 个葡萄糖残基的片段在 1 \rightarrow 4 连



26-11 糖原合酶的电荷分布示意图

磷酸化明显地改变酶氨基端和羧基端的电荷值。图中表示酶分子内部的电荷不受磷酸化与否的影响,肽链的-N端未磷酸化的电荷为-8,充分磷酸化后则变为-12,肽链的-C端未磷酸化的电荷为-8,充分磷酸化后则变为-22。图中还表明糖原合酶磷酸化的部位集中在肽链的-N末端区域和-C末端区域。

接处切断,然后转移到同一个或其他的糖原分子比较靠内部的某个葡萄糖残基的第6个碳原子的羟基上(C6—OH)进行1→6连接。该酶所转移的6~7个葡萄糖片段是从至少已经有11个葡萄糖残基的直链上断下;而此片段被转移的位置即形成新的分支点。此分支点必须与其他分支点至少有4个葡萄糖残基的距离(图26-12)。

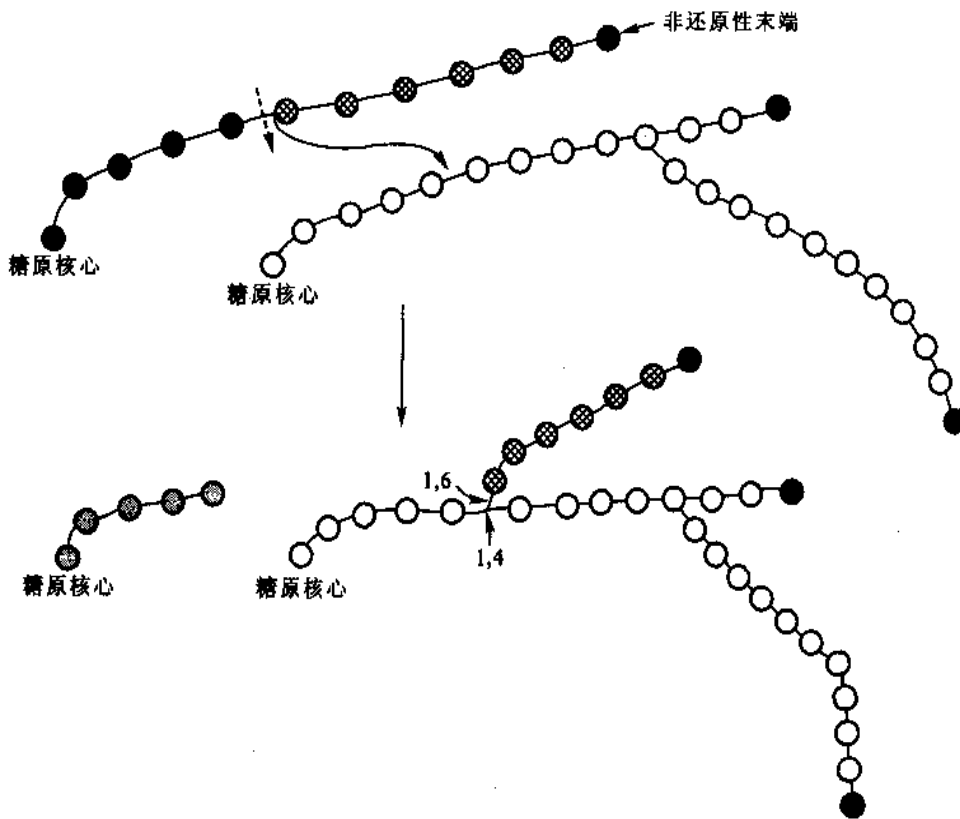


图 26-12 糖原新分支的形成

深黑色代表非还原性末端,浅灰色代表糖基片段转移后留下的葡萄糖基

⊙代表被转移的葡萄糖基 ○代表葡萄糖残基。

图中表示在两个糖原分子间糖基片段的转移分支情况

糖原的多分支对机体是非常有利的,它增加了糖原的可溶性,而且增加了非还原性末端的数目,从而大大提高了糖原的分解和合成效率。无论是糖原磷酸化酶或糖原合酶都以非还原性末端基团为作用位点。

对糖原脱支和分支进行比较,可看到它们的明显区别。脱支包括 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键的断裂和形成,可以认为只有 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键的水解。分支则是 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键的断裂和 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键的形成。糖原脱支需要两步反应。糖原分支则只需要1步反应。这主要决定于系统的热力学效应。 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键水解的自

由能为 -15.5 kJ/mol , 而 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键仅为 -7.1 kJ/mol 。因此 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键的水解可以驱动一个 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键的合成, 若相反的过程则是需能反应。

四、糖原代谢的调控

糖原的合成和分解都是根据机体的需要由一系列的调节机制进行调控。磷酸化酶和糖原合酶的的作用都受到严格的调控。当磷酸化酶充分活动时, 糖原合酶几乎不起作用; 而当糖原合酶活跃时, 磷酸化酶又受到抑制。这两种酶受到效应物 (effectors) 的别构调控。这些别构效应物有 ATP、葡萄糖-6-磷酸 (G6P)、AMP 等。在肌肉中, 糖原磷酸化酶受 AMP 的活化, 受 ATP 和 G6P 和葡萄糖的抑制; 而糖原合酶却受 G6P 和葡萄糖的活化。当肌肉需要 ATP 时, ATP 的浓度和 G6P 的浓度都处于低水平状态, 不能满足肌肉活动的需要, 这时的 AMP 浓度必然处于高水平, 这时 AMP 刺激糖原磷酸化酶使它活力提高。同时糖原合酶处于抑制状态。反之, 当肌肉中的 ATP 浓度和 G6P 浓度处于高水平时, 糖原合酶受到激活而磷酸化酶则受到抑制。ATP 对磷酸化酶的抑制作用是由于它与 AMP 竞争性地争夺酶分子上 AMP 的结合部位, 阻止磷酸化酶活化所需的多肽片段的的活动。下面进一步讨论各种酶受到的相互制约关系。

(一) 糖原磷酸化酶的调控机制

1. AMP 对骨骼肌磷酸化酶的别构调节机制。

前面已经讨论过, 有活性的磷酸化酶 a 是酶分子丝氨酸 14 上的羟基被磷酸化后形成的。无活性的磷酸化酶 b 是丝氨酸 14 上的羟基未磷酸化的形式。骨骼肌中的磷酸化酶 b 和磷酸化酶 a 实际上各自都有两种别构状态。各自都具有活化状态和钝化状态两种形式。钝化状态又称为“T 状态”取自英文“tense”的词头, 直译为“紧张”状态。活化状态又称为“R 状态”取自英文“relaxed”的词头, 直译为“松弛的”状态。磷酸化酶 b 和磷酸化酶 a 各自的 R 和 T 的不同状态都来源于它们的构象变化。R 和 T 的不同构象之间也有一定的平衡关系。对于磷酸化酶 a, 这种平衡远远偏向于活化的 R 构象; 对于磷酸化酶 b, 这种平衡则几乎完全偏向于钝化的构象。当 ATP 和葡萄糖-6-磷酸的浓度很低, 而 AMP 的浓度很高时, 磷酸化酶 b 由于与 AMP 结合, 其构象由 T 形式转变为 R 形式, 即使磷酸化酶 b 处于活化状态。磷酸化酶 b 进一步磷酸化转变为磷酸化酶 a, 则使酶几乎完全处于活化的 R 状态。磷酸化酶 a 和 b 所处的 T 和 R 的构象关系, 可用图 26-13 表示。在一般生理条件下, 酶的活性主要决定于磷酸化和去磷酸化的速度。

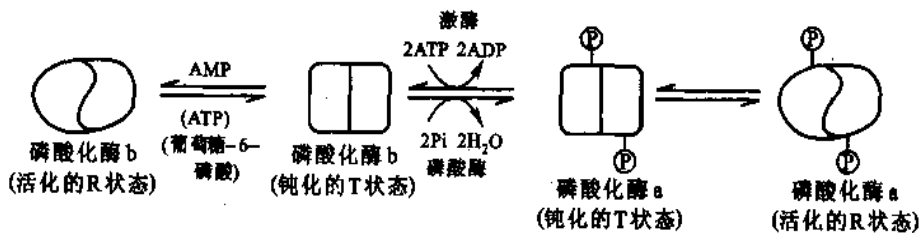


图 26-13 骨骼肌磷酸化酶 a, b 及其活化、钝化形式的相互关系示意图

磷酸化酶 a 和 b 都有活化的 R 和钝化的 T 两种构型, 磷酸化了的磷酸化酶 a 的 T、R 平衡关系远远趋向于 R 一方, 即主要以活化形式存在; 而磷酸化酶 b 主要以钝化的 T 状态存在, 只有当高浓度 AMP 存在而 ATP 与葡萄糖-6-磷酸的浓度极低时磷酸化酶 b 与 AMP 的结合可使 b 具有活化的 R 状态。ATP 和葡萄糖-6-磷酸都抑制磷酸化酶 b 的活性

AMP 作为磷酸化酶 b 的别构活化剂的机制可作如下解释: AMP 的腺苷、核糖、磷酸作为三个部分各与磷酸化酶 b 多肽链的三个不同部位相连。AMP 与磷酸化酶 b 的结合是在它的变构效应部位 (allosteric effectorsite)。AMP 的结合使该酶的两个亚基之间界面和 N-末端区域得以相连, 而导致 N-末端区域从处于 T 状态时的位置发生一个大的构象转换将 Ser 14 转移 3.6 nm 。AMP 的结合还导致磷酸化酶在结构上高耸的螺旋发生倾斜而使酶分子张开成为更有利于结合的形式。所有的变化都涉及到三维构象的变动。又

启动一种协调的由 T 向 R 的转变。它包括两个亚基发生大约 10° 的旋转。这一旋转所取的轴与二聚体的对称双重轴相垂直。高耸螺旋的运动使第 282 ~ 286 的氨基酸残基形成的环(称为 $280 \leq 100p$)发生转移并成为无规状态,此环原来遮掩着 T 状态的活性部位。它还造成第 569 位精氨酸残基的旋转,以利于增强酶对无机磷酸负离子的亲和力。这一精氨酸残基正处于与 PLP 磷酸基团和无机磷酸结合部位相近的活性部位。AMP 对酶引起的构效应在血红蛋白以及天冬氨酸转氨甲酰酶(aspartate transcarbamoylase)中也存在。ATP 为什么不能促使磷酸化酶 b 转变,反而起抑制作用? ATP 与 AMP 虽然都结合在同一个活性部位上,它比 AMP 多两个磷酸基团,这两个磷酸基团此时成为 ATP 的障碍。这两个磷酸基团结构到酶上使与 AMP 相当的核糖和 α -磷酸基团发生了转移造成 R 状态的不稳定性 ATP 对磷酸化酶的抑制作用,概括地理解就是它与 AMP 竞争酶的结合位点,它与酶的结合阻止了磷酸化酶活性状态所需要的三个肽段的相应运动。葡萄糖-6-磷酸对磷酸化酶也有抑制效应,而使它处于无活性的磷酸化酶 b 的状态。

2. 骨骼肌磷酸化酶激酶的控制作用

使磷酸化酶 b 磷酸化转变为磷酸化酶 a 的酶是磷酸化酶激酶(phosphorylase kinase)。该酶是一个很大的蛋白质。骨骼肌中的磷酸化酶激酶由 4 种不同亚基构成的寡聚体(gligomer),用 $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ 表示或用 $(\alpha_4\beta_4\gamma_4\delta_4)$ 表示。它的相对分子质量为 1 200 000。该酶本身受到双重调控。磷酸化作用使它从低活性形式转变为高活性形式。催化磷酸化酶激酶磷酸化的酶称为蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)。蛋白激酶 A 受环 AMP (cyclic AMP, cAMP) 的活化。磷酸化酶激酶还受到浓度约为 $1 \mu\text{mol}$ 的 Ca^{2+} 调控。它实际上是一种依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶。磷酸化酶激酶在蛋白激酶 A 的催化下,由 ATP 磷酸化才能转变为高活性的形式。 Ca^{2+} 起激活剂的作用。磷酸化酶激酶的 δ 亚基实际上是钙调蛋白(calmodulin, CaM),它有 4 个 Ca^{2+} 结合部位,当 Ca^{2+} 结合到这些部位时,酶的构象即发生广泛的构象变化从而使磷酸化酶激酶活化,该酶的 α 和 β 亚基是调节亚基, γ 亚基是催化亚基。 α 和 β 亚基上都有磷酸结合部位,只有当它们充分磷酸化才能使酶的催化活性达到高峰,并提高酶对底物的亲和能力。 Ca^{2+} 对磷酸化酶激酶的活化作用具有一种特殊的生理意义。因为肌肉的收缩正是由神经冲动引起细胞溶胶内 Ca^{2+} 的浓度的短暂升高而启动的。因此,糖原降解的速度和肌肉收缩之间由 Ca^{2+} 而发生了关联。糖原降解为肌肉收缩提供了能源保证。

3. 蛋白磷酸酶-1 的控制

蛋白磷酸酶-1 (protein phosphatase-1) 又称磷蛋白磷酸酶 1 (phosphoprotein phosphatase 1, PP1)。它的作用是从带有磷酸基团的酶分子上水解下磷酸基团。它和由“激酶”催化的磷酸化作用正好相反。磷酸化作用的动态平衡正是由激酶和 PP1 两种酶的相互作用来维持。PP1 作用的对象有肌肉中糖原磷酸化酶 a, 磷酸化酶激酶 α 、 β 亚基上的磷酸基团,此外还有糖原代谢中至少两种其他蛋白质。事实上所有酶蛋白分子上被磷酸化了的丝氨酸和苏氨酸残基其磷酸基团的水解都是由蛋白磷酸酶催化的。已知的磷酸酶有 4 种,PP1、蛋白磷酸酶-2A (PP2A)、蛋白磷酸酶-2B (PP2B) 及蛋白磷酸酶 2C (PP2C) 等。Philip Cohen 发现 PP1 在调节糖原代谢中起主要作用。

PP1 如果和蛋白磷酸酶抑制剂 (protein phosphatase inhibitor, 又称抑制剂 1) 结合,其活性就受到抑制。蛋白磷酸酶抑制剂又称磷蛋白磷酸酶抑制剂是一种小的蛋白质,它也受到其他酶相互作用的控制。它受一种 cAMP-依赖性蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinase) 催化的磷酸化作用而激活,并由 PP1 去磷酸化而失活。PP1 抑制剂被磷酸基团修饰的部位是其肽链上的苏氨酸 (Thr) 残基。当苏氨酸残基被磷酸化后,PP1 抑制剂才能起抑制作用。不同浓度的 cAMP,不仅通过控制磷酸化的方式提高酶的催化活性,也通过控制去磷酸化的方式钝化酶的催化活性。当 cAMP 浓度增加时,糖原磷酸化酶不只提高其催化反应的速度,同时也降低该酶的失活速度。

PP1 的活性既受磷酸化与否的控制(见后面)也受到与它结合着的磷酸化酶 a 的控制。磷酸化酶 a 不论处于活动状态(R 状态)或是处于不活动状态(T 状态)都和 PP1 牢固地结合着。但是只有当磷酸化酶 a 处于 T 状态,这时它的 Ser 14 上的磷酸基团才能被水解脱落。磷酸化酶 a 的磷酸基团被水解下以后,就由 a 转变为 b。反之,只有当磷酸化酶 a 处于活动的 R 状态时,它才能有效地解除 PP1 的作用。因为磷酸化酶 a 转变为 T 状态时,其分子中的 Ser 14 磷酸基团被暴露了出来,PP1 才能对磷酸化酶 a 暴露出的 Ser 14 上的磷酸基团进行水解使磷酸化酶 a 转变为原始态的磷酸化酶 b。PP1 有两个亚基,一个是催化亚基,相

对分子质量为 37 000,另一个是糖原结合亚基,相对分子质量为 160 000。又称糖原结合 G 亚基。也简称 G 亚基,单独的催化亚基与糖原颗粒的亲合力很低。必需与糖原结合亚基结合才能表现出高的亲合力。糖原结合亚基将 PP1,与糖原颗粒拉近。使它能有有效地发挥作用。然而糖原结合亚基又受蛋白激酶 A 的磷酸化而抑制它与催化亚基的结构。一旦有一个磷酸化酶 a 失去磷酸基团,就解除了对 PP1 的抑制,PP1 即被释放出来。于是 PP1 就可连续地解除其他蛋白磷酸酶的抑制而活化。糖原磷酸化酶的浓度比 PP1 的浓度约大 10 倍。因此只有当 90% 的糖原磷酸化酶都处于原始的 b 状态时,PP1 才能得到释放。

4. 蛋白激酶 A (protein kinase A) (cAMP - 依赖性蛋白激酶) 的调控作用

蛋白激酶 A 亦称 cAMP - 依赖性蛋白激酶 (cAMP - dependent protein kinase, cAPKs), 是依赖 cAMP 活化的蛋白激酶, 或称依赖 cAMP 的蛋白激酶。该酶由 4 个亚基构成 ($2\alpha, 2\beta$ 或用 R_2C_2 表示)。有两个亚基属于调节亚基, 两个亚基属于催化亚基。它是一个关键性的调节酶。它催化许多酶蛋白的 Ser 或 Thr 残基的磷酸化, 其中也包括磷酸化酶激酶和糖原合酶等的磷酸化, 而它 (蛋白激酶 A) 的激活则绝对需要 cAMP。如果没有 cAMP, 则 cAMP - 依赖性蛋白激酶 (蛋白激酶 A) 即处于无活性的四聚体状态。cAMP 与激酶的调节亚基结合后才使四聚体解聚而形成具有催化活性的单体。由此可见, 细胞内 cAMP 的浓度决定着蛋白激酶的活性状态, 也决定着它对其底物磷酸化的速度。cAMP 和蛋白激酶 A 之间的关系可用图 26 - 14 表示。

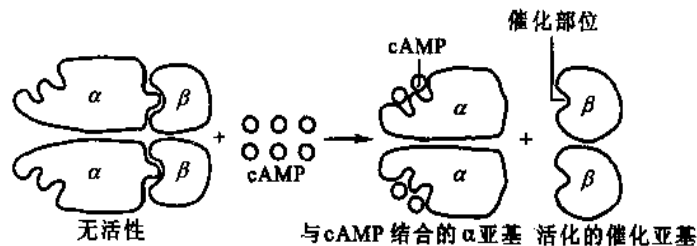


图 26 - 14 cAMP 和 cAMP - 依赖性蛋白激酶的关系

图中两个 α 亚基为调节亚基, 两个 β 亚基为催化亚基

(二) 对糖原合酶的调控

糖原合酶和磷酸化酶相似, 在生理条件下也以两种可互相转化的形式存在。一种是磷酸化的形式 (又称修饰型简称为“m”即 modified 之词头), 正好与磷酸化酶 a 的活性相反, 是无活性的形式。这种形式称为 b 型。另一种形式是非磷酸化的形式 (又称原始型, 简称为“o”即 original 之词头), 为活化的形式, 称为 a 型。

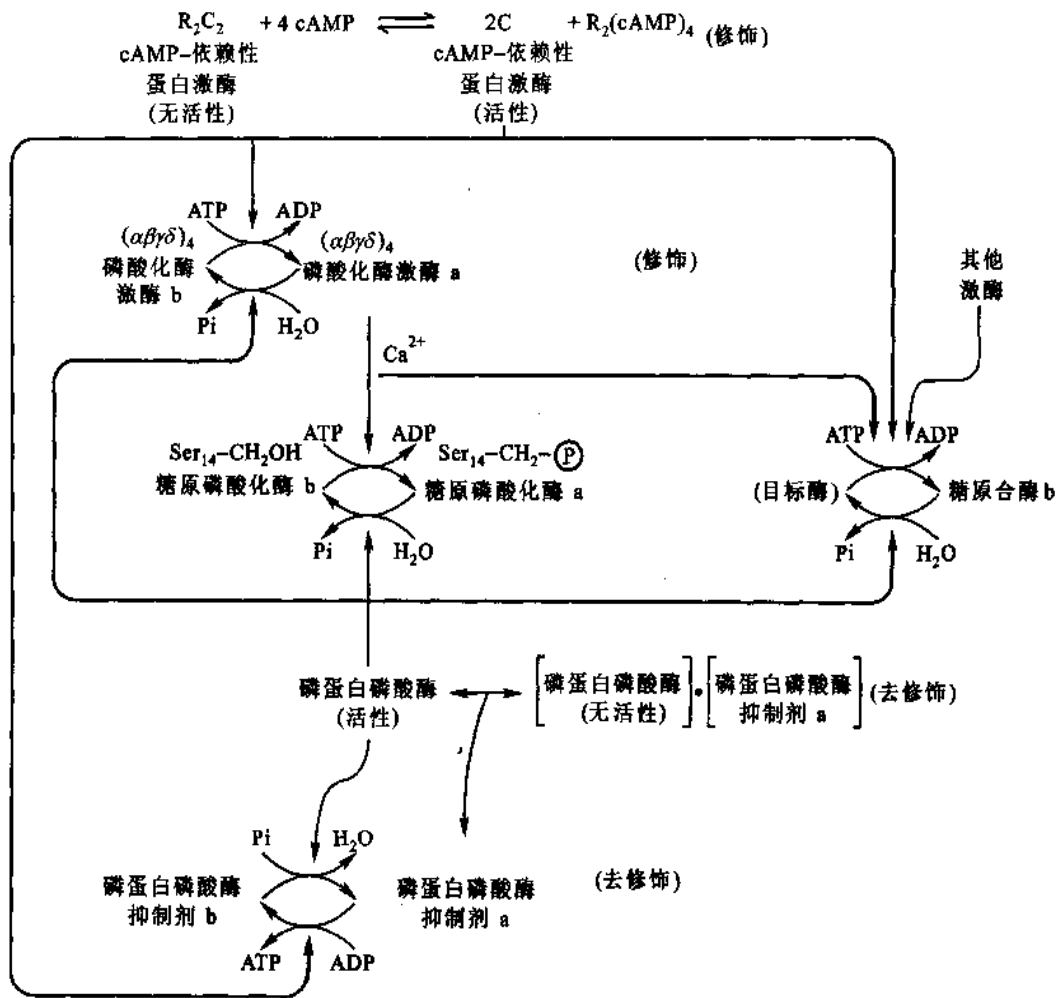
糖原合酶 b 在生理条件下几乎是完全没有活性的。可以认为糖原合酶的活性情况主要随未磷酸化的糖原合酶 a 所处的状态而改变。细胞内的糖原合酶活性受到磷酸化与否的调控关系是非常复杂的, 尚未完全阐明。比较清楚的是未磷酸化的糖原合酶受到包括磷酸化酶激酶和 PP1 在内的双重环的级联调控 (bicyclic cascade control)。但已知至少有 6 种其他的蛋白激酶参与或部分参与人肌肉糖原合酶的调控。这些激酶的作用方式是使同型四聚体糖原合酶含有 737 个氨基酸亚基中 9 个酪氨酸残基的 1 个或多个磷酸化而使酶发生不同程度的失活。这些激酶中包括 cAMP - 依赖性蛋白激酶。因此, 糖原合酶的失活可能通过一种单环级联 (monocyclic cascade) 的调控; 此外蛋白激酶 A、钙调蛋白 - 依赖性蛋白激酶 (该酶需 Ca^{2+} 激活)、蛋白激酶 C (该蛋白激酶与细胞外某些激素的存在有关), 它们之间的作用机制将在第 39 章中讨论。除上述的激酶外, 还有糖原合酶激酶 - 3 等。其作用还未确认。

糖原合酶受到如此复杂的抑制调控, 它和适应机体代谢状况复杂性之间的关系尚待进一步阐明。

糖原代谢调控过程有关酶的磷酸化和去磷酸化之间的关系可用图 26 - 15 表示。

(三) 肝脏中糖原代谢调控的特殊性

葡萄糖对肝脏中糖原代谢起着特殊的调控作用。血糖浓度直接控制肝脏中相关酶的活性。肝脏中的



26-15 糖原合成和分解有关酶的修饰的去修饰情况图示

图中表明糖原磷酸化酶受到(除 AMP、ATP、G6P 和葡萄糖别构调控效应以外的)酶相互转度的调节控制情况

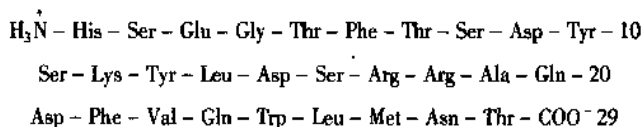
磷酸化酶 a 是葡萄糖浓度的感受器。葡萄糖与磷酸化酶 a 结合后,使磷酸化酶 a 从活化状态(R 状态)转变为钝化状态(T 状态)。磷酸化酶 a 状态的改变使酶分子第 14 位丝氨酸(Ser 14)上的磷酸基团暴露给 PP1,使其能够被水解。PP1 与磷酸化酶 a 实际上是紧密结合在一起的。但是 PP1 行使水解作用只在一种条件下才有可能,即是葡萄糖与磷酸化酶 a 结合而将该酶诱导为 T 状态。磷酸化酶 a 的 Ser 14 磷酸基团被水解后,由于失去磷酸基团而转变为磷酸化酶 b。后者不与蛋白磷酸酶 1 结合。因此当磷酸化酶 a 转变为磷酸化酶 b 的同时,即伴随着 PP1 的释放。于是 PP1 即成为游离状态。处于游离状态的 PP1 又成为活化糖原合酶的工具。它将糖原合酶 b(无活性)上的磷酸基团水解下,而使糖原合酶 b 转变为 a 的活化形式。由上述的磷酸化酶和糖原合酶活力表现的相互关系以及葡萄糖对两种酶活化与钝化的调节作用,可看到血液中葡萄糖的浓度是如何直接调节着肝脏中两种酶的活性的。在正常情况下,血糖的浓度如果超过前述的阈值(80~120 mg/100 ml, 4.4~6.7 mmol/L),肝脏就利用葡萄糖合成糖原;如果低于阈值,肝脏就释放葡萄糖。肝脏在需要供给葡萄糖的情况下磷酸化酶 a 的浓度比磷酸酶的浓度约高 10 倍。因此只有当绝大多数的磷酸化酶 a 都转变为 b 时,糖原合酶的活性才开始升高。概括起来肝脏对葡萄糖的灵敏感受系统主要依靠的是 3 个关键:①丝氨酸磷酸和葡萄糖相关的酶变构部位之间的联系。② PP1 对磷酸化酶的钝化和激活糖原合酶。③ PP1 与磷酸化酶 a 的结合阻止糖原合酶的活性。

(四) 激素对糖原代谢的调节和激素效应的级联放大系统

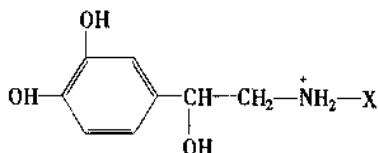
1. 肾上腺素和胰高血糖素对糖原代谢的调控

肝脏中的糖原代谢主要受到胰高血糖素(glucagon)的调控。胰高血糖素是胰岛的 α 细胞分泌的,由 29

个氨基酸残基构成的多肽。它的结构如下：



在肌肉及其他各种组织中，糖原代谢受肾上腺素 (epinephrine, 又称 adrenalin) 和正肾上腺素 (norepinephrine, 又称 noradrenalin) 的调控。



若 X = CH₃, 则称为肾上腺素, 若 X = H, 则称为正肾上腺素。或去甲肾上腺素。

上述的激素作用于细胞表面, 刺激腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase) 活化。该酶使 ATP 的 α 磷酸基团环化形成环 - AMP, 同时产生一个焦磷酸分子。腺苷酸环化酶催化的反应可用图 26-16 表示。

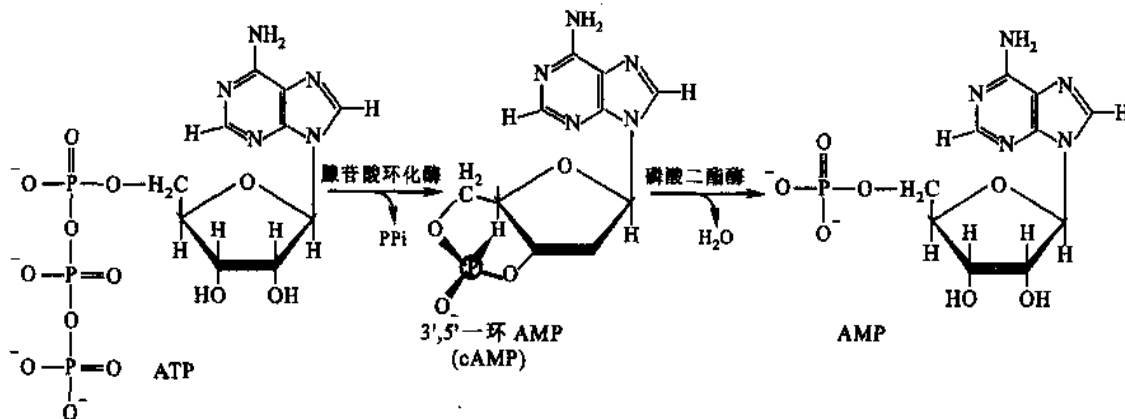


图 26-16 腺苷酸环化酶催化由 ATP 形成 cAMP
cAMP 经磷酸二酯酶 (phosphodiesterase) 水解开环形成 AMP

腺苷酸环化酶称为细胞的第二信使 (second messenger), 它的作用是作为激素和细胞内的中介物质。激素作为一种信息物质与靶细胞上的受体结合后又通过激活一种 G 蛋白 (见下节叙述) 而激活腺苷酸环化酶, 使产生 cAMP。cAMP 又激活 cAMP 依赖性蛋白激酶。

当胰高血糖素或肾上腺素使细胞内的 cAMP 浓度升高时, cAMP-依赖性蛋白激酶的活性增加, 于是许多酶的磷酸化速度增高而去磷酸化的速度下降。去磷酸化速度的下降使蛋白磷酸酶抑制剂的磷酸化程度增加, 于是使 PP1 的活性受到抑制。磷酸化酶 a 浓度的增加, 也使磷 PP1 受到抑制。肾上腺素对 PP1 的抑制效应可用图 26-17 表示。

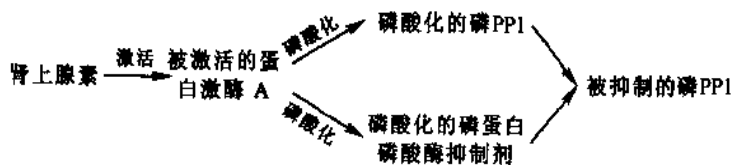


图 26-17 肾上腺素对 PP1 的抑制效应

依赖 cAMP 的蛋白激酶即将磷酸化酶激酶磷酸化, 也将糖原合酶磷酸化。这两种酶的磷酸化构成糖原合成和分解相互调节的基础。cAMP-依赖性蛋白激酶通过磷酸化酶激酶使磷酸化酶磷酸化而被激活; 同时又使糖原合酶磷酸化而失去活性。

cAMP 可被磷酸二酯酶(phosphodiesterase)水解形成 AMP 而失去激素信号的作用。

激素的信号可通过一系列连续反应使其作用不断加以放大。这种连锁放大的反应系统即称为级联系统(cascade system)。激素经受体作用可导致数以百计的 G 蛋白分子活化。每分子活化的 G 蛋白又激活大量的腺苷酸环化酶,从而可诱发合成大量的 cAMP。例如,可使细胞内 cAMP 的浓度由 10^{-10} mol/L 提高到 10^{-6} mol/L。cAMP 浓度的大量增加又大量激活 cAMP-依赖性蛋白激酶,结果引起大量糖原的分解。另一方面,大量 cAMP 激活的 cAMP-依赖性蛋白激酶,又可使大量的糖原合酶磷酸化而失去合成糖原的活性,于是可释放出大量的葡萄糖。

由激素作为信号引起的糖原降解过程可归纳为图 26-18。

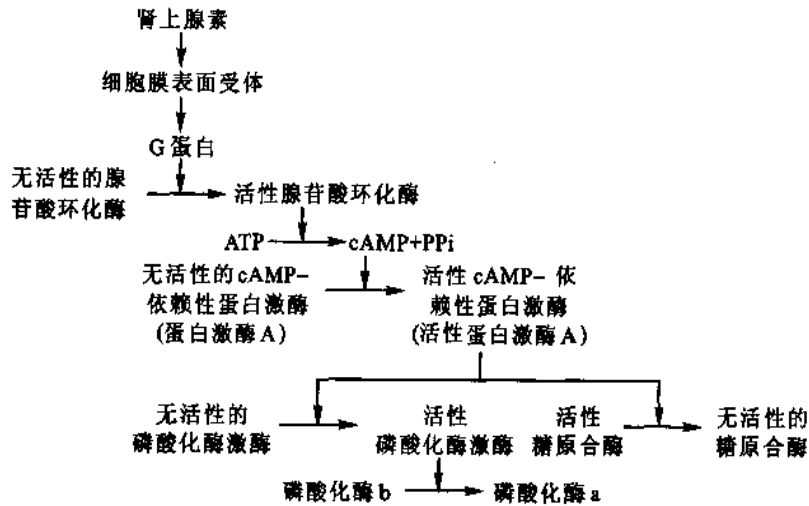


图 26-18 由激素信号引起的糖原降解途径

2. 胰岛素对糖原代谢的调节作用

(1) 胰岛素的作用 胰岛素对糖代谢的作用主要是刺激糖原的合成。它的作用途径主要是通过去磷酸化作用使糖原合酶解除抑制,同时使磷酸化酶激酶和磷酸化酶 a 由于去磷酸化而受到抑制。胰岛素的作用机制是相当复杂的,对它的深入了解也只是近期的事,它的作用也是通过级联放大系统。前面(第 17 章)已经讨论过,胰岛素发挥作用首先是与质膜上的专一受体结合。胰岛素受体由两两相同的 4 个亚基($\alpha_2\beta_2$)构成。胰岛素和受体的 α 亚基结合。受体的 β 亚基实际上是一种酪氨酸激酶。胰岛素和受体结合后即使 β 亚基上的酪氨酸激酶能利用 ATP 的 γ 磷酸基团将自身一关键性的酪氨酸残基磷酸化。自身磷酸化的结果进一步使该酪氨酸激酶活化。它随后又激活一种激酶,此激酶又激活胰岛素敏感蛋白激酶(insulin-sensitive protein kinase, 又称为胰岛素刺激的蛋白激酶, insulin-stimulated protein kinase)。胰岛素敏感蛋白激酶活化后,又使 PP1 活化。前述的蛋白激酶 A 也使 PP1 磷酸化。但两种蛋白激酶对 PP1 的磷酸化部位不同,胰岛素敏感蛋白激酶使与糖原结合的 G 亚基上的部位 1 磷酸化。胰岛素诱发出的 PP1 的活性比肾上腺素诱发的活性更强。最后引起的糖原合酶、磷酸化酶激酶和磷酸化酶 a 的去磷酸化,都促进糖原的合成并抑制它的降解。胰岛素的产生是血液中出现血糖升高信号时,由胰岛的 β 细胞分泌的。因此,上述的胰岛素对糖原合成的促进作用是在机体摄取的食物被消化后发生的。胰岛素对糖原合成的促进途径可用图 26-19 表示。

(2) 胰岛素缺乏和糖尿病

糖尿病(diabetes mellitus, 也简称 diabetes)实际上是一种常见的、复杂的疾病。糖尿病的主要临床症状是血和尿中的葡萄糖含量超出正常范围。糖尿病的发生,直接原因是由于血中胰岛素含量不足。在正常情况下,摄入含糖食物后,血中的葡萄糖含量明显升高,导致肝脏中葡萄糖-6-磷酸的浓度升高。葡萄糖-6-磷酸的命运受到胰高血糖素和胰岛素颌颞作用的控制。胰高血糖素启动 cAMP 级联系统,使糖原降解,胰岛素正好相反,拮抗胰高血糖素的作用。如果血糖浓度高则胰高血糖素的分泌减少,而胰岛素的分

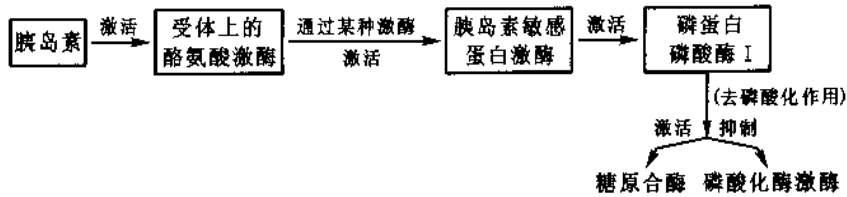


图 26-19 胰岛素对糖原合成的促进途径

胰岛素和受体结合后激活受体上的酪氨酸激酶,又通过某种激酶激活胰岛素敏感蛋白激酶,后者又使 PP1 活化,PP1 催化的去磷酸化作用一方面激活了糖原合酶,另一方面又抑制了磷酸化酶激酶的作用。

泌增加。因此当血糖升高时,糖原的合成速度加快。高浓度的胰岛素可以促进葡萄糖进入肌肉和脂肪组织。胰岛素有刺激肝脏和肌肉合成糖原的作用。一般在进食数小时后血糖浓度即开始下降,血糖下降导致胰岛素的分泌减少,而胰高血糖素的分泌加速。糖尿病患者则不能正常地利用燃料。患者的肝脏往往产生过量的葡萄糖。由于缺少胰岛素,葡萄糖不能正常地进入细胞。又因胰高血糖素的浓度超过胰岛素的浓度,一方面导致肝脏中果糖-2,6-二磷酸的浓度下降,使糖酵解受到抑制,又刺激了葡糖异生作用,另一方面又加速了糖原的降解。这些过程都促使肝脏产生过量的葡萄糖并进入血液。当血糖在血液中的浓度超过肾小管(renal tubules)能够再吸收的极限时,葡萄糖即随尿排出;葡萄糖排出还需大量水分共同排出,这使得病人感到口渴。糖尿病患者由于糖代谢的紊乱进而使脂类代谢及蛋白质代谢都受到损害。

糖尿病的病因至今并未完全阐明。临床上将此病分为两种类型。I型又称为胰岛素依赖型(insulin dependent)糖尿病。因此种类型往往在儿童时代就突然发作,又有幼年发作糖尿病(juvenile-onset diabetes)。被认为是由于自身免疫破坏了胰岛中的胰岛素分泌细胞—— β 细胞 I型糖尿病和遗传有关;II型又称为非胰岛素依赖(noninsulin-dependent)糖尿病。这种类型的发病往往在40岁以后因此又称为成年发作糖尿病(maturity-onset diabetes)也和遗传基础有关。这些患者主要是缺乏胰岛素受体。他们的胰岛素水平并不低,甚至高于一般正常水平;如果控制饮食就可控制病情。

(五) G 蛋白及其对激素信号的传递作用

G 蛋白(G protein)全名是 GTP-结合蛋白(GTP-binding protein),它既与 GTP 结合也与 GDP 结合是一类信号传递蛋白(signal-transducing protein),一般由三个不同亚基(α 、 β 、 γ)构成异(源)三聚体(heterotrimer)。G 蛋白有许多种,它们的作用各不相同,即有不同的专一性。例如,具有激活作用的 G 蛋白用 G_s 表示(stimulatory G protein),具有抑制作用的 G 蛋白用 G_i 表示(inhibitory G protein)等等。

G 蛋白可广泛地传递由不同激素-受体复合物传来的信号,作用于同样的效应器(effector),调节其活性。不同类型的细胞以不同的受体结合不同的激素,却诱导激活同样的腺苷酸环化酶。例如,胰高血糖素和肾上腺素结合到不同的受体上,都通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶而产生 cAMP,并由此引发出同样的代谢反应。

胰高血糖素和肾上腺素以及一些其他激素,都以其各自的受体与 G 蛋白中的 G_s 类型结合,并激活 G_s 。

G_s 当处于无活性状态时(未与激素受体结合),其 α 亚基与 GDP 结合($G_{s\alpha}\cdot GDP\cdot G_{\beta\gamma}$),当激素结合到其受体上使受体激活后, G_s 蛋白的 α 亚基发生构象变化,GDP 从 α 亚基上脱下,GTP 取代了 GDP 的位置与 α 亚基结合,同时 β 、 γ 亚基和 α 亚基分离。与 GTP 结合的 α 亚基即处于激活状态($G_{s\alpha}\cdot ATP$),随之又去激活其效应器分子—腺苷酸环化酶,即合成 cAMP。G 蛋白的催化作用是短暂的。因为其 α 亚基上还带有一个能水解 GTP 的 GTP 酶(GTPase)。该酶迅速从 GTP 分子上水解下 α -磷酸基团,使 α 亚基又恢复到 $G_{s\alpha}\cdot GDP\cdot \beta\gamma$ 原状而失去活性。

腺苷酸环化酶被 $G_{s\alpha}\cdot ATP$ 激活后,因合成 cAMP 而使其浓度升高,cAMP 的浓度和 $G_{s\alpha}\cdot ATP$ 的浓度成正比关系。 $G_{s\alpha}\cdot GTP$ 的浓度又与激素浓度及其与受体的结合密切相关。有关 G 蛋白的作用还将在其

他有关章节中讨论。

(六) 糖原累积症

糖原累积症(glycogen storage disease)种类很多,主要是由于缺失糖原代谢过程中的某种酶。这种病是由先天性遗传缺欠引起。现将已发现的几种主要糖原累积症,其缺欠的酶种类、其受影响的器官及其中糖原含量的情况,糖原结构的情况以及临床症状等列表(表 26-1)如下。

表 26-1 几种遗传性糖原累积症

类型	疾病名称	缺欠酶	受损器官	受损器官糖原含量	糖原结构	临床症状
I 型	von Gierk's 病	葡萄糖-6-磷酸酶或运载系统的酶	肝、肾	增加	正常	肝及肾曲管细胞糖原大量沉积,严重低糖,酮血,高尿酸血,生长发育受影响
II 型	Pompe's 病	溶酶体内缺乏 α -1,4-葡糖苷酶	全部器官(全部溶酶体)	大量增加	正常	细胞溶酶体堆积糖原,心脏、呼吸衰竭,通常 2 周岁前致死,血糖正常
III 型	Cori's 病(又称 Forbes)	脱支酶	全部器官特别是肌肉和肝脏	增加	外部链缺失或极短	和 I 型情况类似,病情较轻
IV 型	Andersen's 病	分支酶(α -1,4 \rightarrow α -1,6)	肝脏及全部器官	无影响	长支多,分支少	肝脏进行性硬化,通常 2 周岁前死于肝功能衰竭
V 型	McArdle's 病	肌糖原磷酸化酶	肌肉	稍有增加	正常	肌肉痛性痉挛,无法从事剧烈运动,但病人生长发育正常
VI 型	Hers' 病	肝糖原磷酸化酶	肝脏	增加	正常	低血糖,类似 I 型情况,但较轻
VII 型	—	磷酸果糖激酶	肌肉	增加	正常	并 V 型相似
VIII 型	Tarui's 病	磷酸化酶激酶	肝脏	增加	正常	肝略增大,轻度低血糖
IX 型	—	糖原合酶	肝脏	下降	正常	糖原含量不足

提 要

糖原主要是肝脏和骨骼肌作为容易动员的能量贮存物质,肌肉中糖原的作用主要是供给其连续收缩时能量的不断需要,而肝脏中的糖原主要用于维持血液中葡萄糖的稳定水平。

糖原的降解主要由糖原磷酸化酶和糖原脱支酶联合作用。磷酸化酶从糖原分子的非还原末端依次移去葡萄糖单位。磷酸化(磷酸解)作用脱下的产物为葡萄糖-1-磷酸。磷酸化酶只能断开糖原分子的 α (1 \rightarrow 4)糖苷键,不能断开 α (1 \rightarrow 6)糖苷键。实际上在距分支点前 4 个葡萄糖残基处作用已经停止。脱支酶先转移分支点前 3 个葡萄糖残基,暴露出以 1 \rightarrow 6 糖苷键与糖原分子相连的葡萄糖残基。葡萄糖-1-磷酸由磷酸葡萄糖变位酶将其转变为葡萄糖-6-磷酸。吡哆醛磷酸参与糖原的磷酸解作用。在肝脏中葡萄糖-6-磷酸由葡萄糖-6-磷酸酶又转变为葡萄糖而进入血液。骨骼肌缺乏葡萄糖-6-磷酸酶,而将葡萄糖-6-磷酸纳入糖酵解及进一步氧化途径产生供肌肉收缩的能量。

UDP-葡萄糖由 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化利用 UTP 和葡萄糖 1-磷酸合成。糖原合酶利用 UDP-葡萄糖作为底物合成糖原。糖原合酶每次催化一个葡萄糖残基以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键的形式加到糖原分子的非还原末端。糖原合酶只能起延长糖原链的作用。糖原起始合成需要一种引物。这种引物称为 glycogenin(生糖原蛋白或称糖原引物蛋白)。生糖原蛋白是一种具有 8 个以 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键相连的葡萄糖单元的特殊蛋白质。由它形成糖原的核心,不断由糖原合酶往上延长糖基分子。糖原分子的分支是由分支酶实现的。分支酶将糖原链上的 $\alpha(1\rightarrow4)$ 糖苷键断裂并将断下的约 7 个葡萄糖残基的一段转移到同一个或其他的糖原分子比较靠内部的位置以 $\alpha(1\rightarrow6)$ 糖苷键予以连接。

糖原的降解和合成是完全不相同的两条途径。它们都受到严格而复杂的别构调节和激素调节。

磷酸化酶以活化的磷酸化酶 a 和无活性的磷酸化酶 b 两种形式存在。这两种形式在磷酸化酶激酶(磷)PPI 的作用下互相转变。在骨骼肌中,磷酸化酶 b 由于肌肉的紧张活动产生大量的 AMP 而被激活,活化后形成的磷酸化酶 a 使糖原降解。AMP 的作用又被高浓度的 ATP 和葡萄糖-6-磷酸取代而使酶在静息的肌肉中失去活性。在肝脏中,磷酸化酶 b 不受 AMP 浓度的影响。磷酸化酶 a 的活性受葡萄糖浓度的抑制。因此只有当葡萄糖浓度低时方由糖原降解产生葡萄糖。糖原合酶以磷酸化形式,即无活性的 b 形式和去磷酸化的活性形式(a 形式)存在。高浓度的葡萄糖-6-磷酸可激活静息肌肉中的糖原合酶 b 从而刺激糖原的合成。但当肌肉处于收缩状态时,糖原合酶因葡萄糖-6-磷酸的浓度降低即失去活性。

肾上腺素在骨骼肌中刺激糖原降解。在肝脏,肾上腺素和胰高血糖素都刺激糖原的降解。激素与细胞质膜受体结合并通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶催化由 ATP 合成 cAMP。cAMP 随即激活蛋白激酶 A、cAMP-依赖性蛋白激酶。蛋白激酶 A 又催化激活磷酸化酶激酶,后者又使磷酸化酶 b 磷酸化转变为磷酸化酶 a。蛋白激酶 A 同时使糖原合酶磷酸化而失去活性,并即由糖原合酶 a 转变为糖原合酶 b。

当激素水平降低时,一方面由于已生成的 cAMP 被磷酸二酯酶分解为 5'AMP,从而停止对糖原降解的刺激作用;另一方面又由于磷酸化酶 a 去磷酸化转变为磷酸化酶 b,而使糖原降解停止。又由于 PPI 使糖原合酶去磷酸化而激活。

细胞溶胶中的 Ca^{2+} 水平可直接激活磷酸化酶激酶。磷酸化酶激酶的一个亚基实际上就是钙调蛋白。

胰岛素是胰岛 β 细胞的分泌激素,当血液中葡萄糖浓度升高时,胰岛素在血液中的浓度随之增高从而刺激糖原的合成。胰岛素首先和细胞质膜上的受体结合,受体的自身磷酸化作用使其酪氨酸激酶作用进一步激活,又通过胰岛素敏感蛋白激酶使 PPI 活化;一系列的级联系统使糖原合酶脱去磷酸基团而得到活化。

糖原累积症属遗传缺欠症,种类很多。患者遗传缺失糖原代谢中某种酶的后果造成组织中沉积大量的或结构不正常的糖原。

习 题

1. 写出糖原分子中葡萄糖残基的连接方式。
2. 糖原降解为游离的葡萄糖需要什么酶?
3. 糖原合成需要哪些酶?
4. 从“0”开始合成糖原需要什么条件?
5. 肾上腺素、胰高血糖素对糖原代谢怎样起调节作用?
6. 血糖浓度如何维持相对稳定?
7. 将一肝病患者的糖原样品与正磷酸、磷酸化酶、脱支酶(包括转移酶)共同保温,结果得到葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖的混合物,二者的比值: $\frac{\text{葡萄糖-1-磷酸}}{\text{葡萄糖}} = 100$, 试推测该患者可能缺乏哪种酶?(患者缺乏脱支酶)

主要参考书目

1. 沈同,王镜岩主编.生物化学(下册).第二版.北京:高等教育出版社,1991
2. 张蘅主编.生物化学第二版.北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1999:177~183
3. 王琳芳,杨克恭主编.医学分子生物学原理.北京:高等教育出版社,2001:834~883
4. Hames B D, Hooper N M, and Houghton J D. Instant Notes in Biochemistry. Bios Scientific Publishers, 1998:250~257
5. Smythe C, Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. Eur. J. Biochem. 1991,

(200):625 ~ 631

6. Stryer, Lubert. *Biochemistry*, 4th, 1995:581 ~ 602
7. Voet D, Voet J G. *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., 1995:484 ~ 512
8. Nelson D L, Cox M M. *Lehninger principles of Biochemistry*. Worth Publishers, 2000
9. Fischer E H. Protein phosphorylation and cellular regulation II. *Angew. chem. Int. Ed.* 1993, (32):1130 ~ 1137 [Nobel Lecture]
10. Krebs E G. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.* 1993, (13):127 ~ 142 [Nobel Lecture]
11. Madsen N R. Structural basis for activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science*, 1991, (254):1 367 ~ 1 371
12. Sprang S R *et al.* Structural change in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature*, 1988, (336):215 ~ 221

(王镜岩)

第 27 章 光合作用

光合作用(photosynthesis)可简单地概括为含光合色素主要是叶绿素的植物细胞和细菌,在日光下利用无机物质(CO_2 、 H_2O 、 H_2S)合成有机化合物($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$),并释放氧气(O_2)或其他物质(如 S 等)的过程。在第 24 章我们曾看到葡萄糖氧化成 CO_2 和 H_2O 期间,细胞是如何形成 ATP 磷酸酐键的。本章将讨论光合作用中的多个步骤,包括光吸收机制、电子传递途径、光合磷酸化过程和 CO_2 固定等。虽然讨论的重点放在植物叶绿体中的光合作用,但也将涉及某些细菌中的光合过程。对较简单的细菌光合系统的结构与功能的了解有助于在分子细节上追踪光能是如何转化为化学能的。此外还要讨论一下光呼吸以及 CO_2 固定的 C_4 途径。

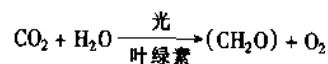
一、光合作用的概况

光合作用是地球上进行的最大的有机合成反应。每天从太阳到达地球的能量约为 1.5×10^{22} kJ,其中约 1% 被光合生物吸收,通过光合作用转化为分子形式的化学能*,并通过食物链为生物圈的其他成员所利用。因此,太阳光是地球上几乎所有生物所需能量的最终来源。太阳能(光能)转化为化学能经常用 CO_2 固定这一术语来表示。据估计,每年地球上约有 10^{11} t CO_2 的碳被固定,其中三分之一主要是由海洋中的光合微生物固定的。

(一) 光合作用的发现

在实践中人们很早就认识到植物需要光、水和空气。例如,在 6 世纪贾思勰的《齐民要术》中就有“槐,性扇地,其阴下,五谷不植”的说法,显然当时人们已懂得光对植物生长的意义。一般的教科书中把 18 世纪的英国化学家 Priestley J 推为最先发现光合作用的人。1771 年他发现在密闭容器中蜡烛燃烧会“伤害”空气,致使空气不再能助燃,并使放在其中的小鼠窒息。如若在密闭容器中放入一枝薄荷,则“伤害的”空气又能助燃,并能维持小鼠生活。它的结论是植物能净化空气。然而他未注意到植物净化空气必须照光,因此,他的实验有时成功(照光),有时失败(不照光)。这一矛盾直至 1779 年荷兰医师 Ingenhousz J 才确定植物净化空气是依赖于光的,在暗处植物和动物一样会把好的空气变坏。

此后不久,空气的组成弄清楚了, O_2 代替了“净化的”空气, CO_2 代替了“伤害的”空气。1782 年瑞士牧师 Senebier J 证明,植物在照光时吸收 CO_2 ,释放 O_2 。随着植物学、化学和物理学的发展,实验技术由定性分析到定量测定,因此对光合作用的认识更加深化。在 18 世纪末到 19 世纪中这一阶段知道 H_2O 参与光合作用,被吸收的 CO_2 中的碳参与产物的组成,光合作用的产物是糖,色素特别是叶绿素在这个过程中起着重要的作用,光是推动这个过程的能量来源,这个过程是一个贮能过程等。到了 1860 年左右,对植物光合作用的认识可以用下面的方程式表示[式中 (CH_2O) 代表一个糖单位]:



但是“光合作用”一词是 1897 年才首次在教科书中出现。

上述方程代表了半个多世纪的研究结果。虽然此后光合作用的研究有了很大的发展,取得许多新成果,但是此公式至今还在沿用,只是我们对它的认识和它的含义已与百年前很不相同了。

* 剩余的 99% 中约三分之二被陆地和海洋吸收,用于加热这个星球;其余的三分之一随光反射回空间而丧失。

** 例如,深海生物热泉口的一些细菌,在完全缺乏光的情况下,可利用 H_2S 、 H_2 等物质氧化所产生的能量作为另一种能源。但它仅占生物圈能源的很小部分。

(二) 光合作用的场所——叶绿体

虽然能进行光合作用的生物是各种各样的,但从简单的细菌到高大的乔木,它们的光合作用有不少共同点,其中最主要的一点是光合作用都在膜上发生。在光合原核细胞中光合膜充满细胞内部,在光合真核细胞中光合膜位于称为叶绿体(chloroplast)(图 27-1)的细胞器中。叶绿体是植物特有的、是称为质体(plastid)的细胞器家族中的一个成员。叶绿体的形状因植物种类不同而有很大的差别。特别是藻类差别更大,它们可以是板状、杯状或星状,例如,水棉(*Spirogyra*)的叶绿体是螺旋带状的。在高等植物中叶绿体一般为扁平的椭圆形或双凸透镜形,直径约为 $4 \sim 6 \mu\text{m}$,厚约为 $2 \sim 3 \mu\text{m}$ 。细胞中的叶绿体数目因物种、细胞种类和生理状况不同而异。在高等植物的叶肉细胞中一般含有 $50 \sim 200$ 个叶绿体,藻类细胞通常只有一个大的叶绿体。

叶绿体的共同特点是一种内膜系统的组织形式,即所谓类囊体膜(thylakoid membrane)。类囊体膜被组织成许多片层(lamella),伸展在整个细胞器(图 27-1)中。

这些片层形成称为类囊体小泡(thylakoid vesicle,来自希腊文 thylakos,意为囊袋)的扁平小囊或圆盘。类囊体小泡的直径约为 $250 \sim 800 \text{ nm}$,厚约为 10 nm ,它们以垛叠(stack)的形式存在,称为基粒(granum)。一个叶绿体含有 $40 \sim 60$ 个基粒,一个基粒约由 $5 \sim 30$ 个类囊体小泡组成,这些小泡也称基粒片层(granal lamella)。基粒之间由基质片层(stroma lamella)连接,此片层通过称为基质(stroma)的细胞器的可溶性部分。从图 27-1 可以看到叶绿体含有 3 种膜,外膜、内膜和类囊体膜,以及由它们界定的 3 种彼此分隔的含水区室,膜间隙、基质和类囊体小泡内部孔隙,即所谓类囊体腔(thylakoid lumen)。

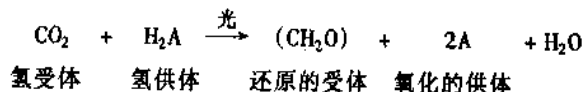
叶绿体的外膜和内膜都不含叶绿素,不直接参与光合作用。叶绿体外膜与线粒体外膜(第 24 章)相似,能透过小分子代谢物($M_r < 10\,000$),因为它们含有水性通道的膜孔蛋白。内膜是叶绿体的通透性屏障,含通透酶(permease),能调节代谢物进、出细胞器的运动。光合作用是在类囊体膜上发生的,此膜含有许多内在膜蛋白,捕获光能的叶绿素和其他辅助色素都结合在这些膜蛋白上,形成镶嵌在膜中的叶绿素-蛋白复合体。在下面我们将看到彼此相通、自成一体的类囊体腔在光能转换为 ATP 形成的过程中起着重要作用。内膜和类囊体之间的基质含有大量的核酮糖二磷酸羧化酶以及其他酶类, CO_2 固定反应就在这里发生。

叶绿体也像线粒体,有自己的 DNA、RNA 和核糖体(在基质中),表现出相当程度的自主性(autonomy)。但是许多关键的叶绿体组分仍是由核基因编码,所以也称叶绿体为半自主细胞器。

(三) 光合作用的总过程

1. 光合作用的一般化方程

20 世纪 30 年代, van Niel 对细菌光合作用进行比较研究后,提出光合作用总过程的更一般化的表示形式:



在光合细菌中氢供体是多种多样的,例如,绿色和紫色硫细菌利用 H_2S 、 S 或 SO_3^{2-} 作为氢供体(或电子供体),非硫细菌利用 H_2 或其他(如异丙醇、乳酸等)作为氢供体:

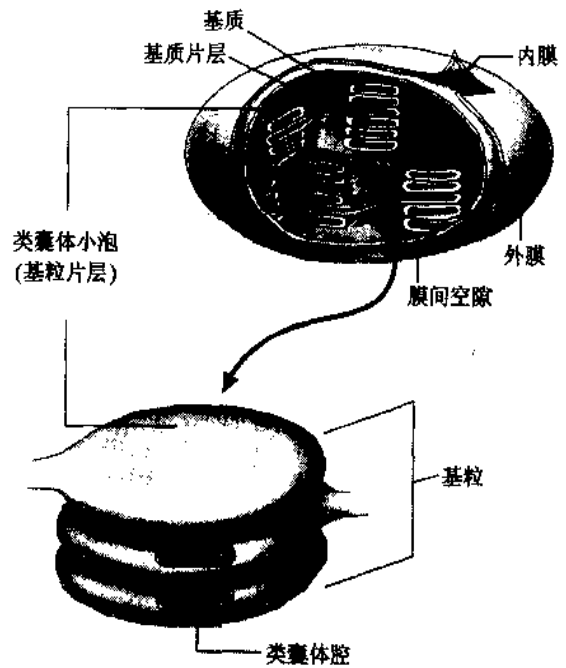
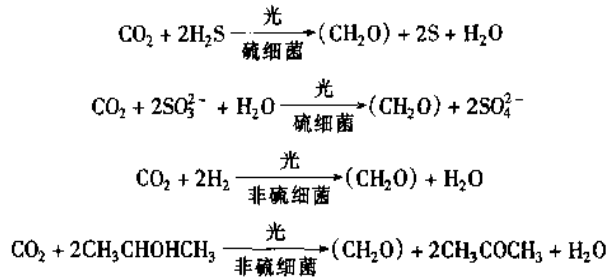
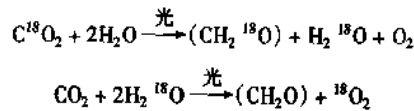


图 27-1 叶绿体解剖图



van Niel 发现当 1 分子 CO_2 被同化时,有 2 分子 H_2S 变成了硫;其他光合细菌进行的光合作用也有类似的化学计量关系。可见,光合细菌也是利用光能裂解氢供体,把 CO_2 还原为有机物;与绿色植物不同之点,只是氢供体不是 H_2O ,释放的不是 O_2 罢了。事实上,细菌型的光合作用与绿色植物的光合作用在进化上是有联系的。属于原核生物的蓝细菌(cyanobacteria),它的光合类型与高等植物的相同,也以 H_2O 作为氢供体,释放 O_2 。某些绿藻(真核生物)本来的光合作用与高等植物一样,光解 H_2O ,释放 O_2 ,但在无氧条件下培养数小时后,它们也能变成细菌型的光合作用,利用 H_2 还原 CO_2 ,而不放 O_2 ,但一旦遇上 O_2 又立即恢复原来的类型。

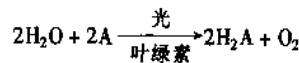
绿色植物光合作用中释放的 O_2 究竟来自 CO_2 还是 H_2O 的问题,细菌光合作用的研究提供了间接证据证明, O_2 来自氢供体 H_2O ,正如 S 来自 H_2S 。不久(1941 年) Ruben S 和 Kamen N O 用 ^{18}O 标记的 H_2O 和 CO_2 的同位素标记实验给出了直接证据。发现释放的 O_2 中没有一个氧原子是来自 CO_2 的,它们全由氢供体提供:



约占地球大气 20% 的 O_2 就是全球的藻类、高等植物以及蓝细菌在漫长的岁月中生氧光合作用的直接结果。

2. 光反应和暗反应

1937—1939 年英国学者 Hill R 发现含叶绿体的叶片提取液在人工电子受体(氢受体)存在下照光,将发生如下反应:



式中 A 代表非生物电子受体如 Fe^{3+} 、醌类、醛类和多种有机染料,它们也常称为 Hill 试剂或 Hill 氧化剂。一种 Hill 试剂,染料 2,6-二氯酚靛酚,处于氧化态(A)时为蓝色,还原态(H_2A)时为无色。当叶片提取液加上这种染料在无 CO_2 存在下照光时,则可观察到提取液由蓝色变为无色,并释放出 O_2 ;但放在暗处,则既无 O_2 释放也无染料被还原(仍为蓝色),这类反应通称为 Hill 反应,它们在正常情况下是热力学上很不利的,例如 2,6-二氯酚靛酚(标准还原电势 E^0 为 + 0.22 V)作为氧化剂比 O_2 (E^0 为 + 0.82 V)要弱得多,因此平衡远向左边偏移。但 Hill 的发现证明,照光下的叶绿体能驱动热力学上不利的反应。Hill 反应导致数年后 Ochoa S 发现生物体内这一电子受体是 NADP^+ (E^0 为 - 0.32 V)。更有意义的是 Hill 的发现第一次明确地把光合作用总

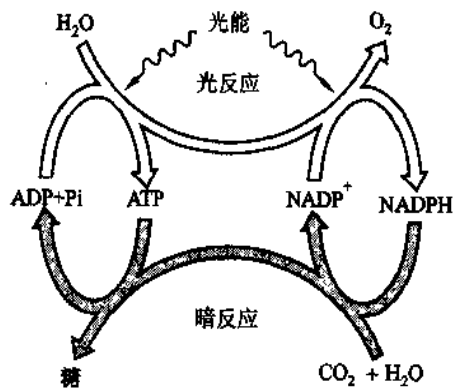


图 27-2 光合作用总过程

过程区分为两个阶段:第一个阶段是光反应,第二个阶段是暗反应(图 27-2)。因为如果把叶绿体悬浮液在无 CO_2 条件下照光,能释放 O_2 ,如果把照了光的叶绿体移到暗处并供给 CO_2 ,则可观测到有净的己糖合成。由此可见 O_2 释放和 CO_2 固定是可以暂时分离的, CO_2 固定并不直接依赖于光。光反应(light reaction)

在类囊体膜上进行,利用日光使 H_2O 裂解,释放出 O_2 ,并生成高能磷酸化合物(ATP)和还原力(NADPH)。暗反应(dark reaction)在基质中进行,利用光反应形成的ATP将 CO_2 还原为糖。必须指出,“暗反应”一词并不是指这些反应只在暗处才能发生,其意思只是强调这些反应不要求光的直接参与。其实,从总过程来看,只有持续的照光,暗反应才能不断地进行。

(四) 光的本性

1. 光具有波-粒二重性

人们获得关于光的本性的现代认识,从17世纪牛顿(Newton I)提出微粒说算起至少也有300多年历史了。目前公认,光具有两重性:波动性和粒子性,即波-粒二重性(wave-particle duality)。在一些情况下,光是在空间和时间上以正弦方式振动的一种电磁场(上册图5-4),在另一些情况下光又是一粒一粒地以光速运动的粒子流。这些光的粒子称为光量子(light quantum)或称光子(phyton),它是一种特殊形式的物质。

1900年普朗克(Planck M)在解释黑体热辐射实验现象时,提出了量子假说。假说的中心思想是辐射能不是连续的,而是以独立的小包(pocket)形式出现。“量子(quantum)”一词就是指这些能量小包。这种小包是能量的最小单元,也称为能量子(energy quantum), ϵ ;其大小与辐射频率成正比,即:

$$\epsilon = h\nu$$

式中 h 为普朗克常数, $6.626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$ 或 $4.135 \text{ eV}\cdot\text{s}$; ν 为频率,单位 s^{-1} 。认为辐射物质中能量变化是量子化的,也即发射或吸收辐射能必须是 $h\nu$ 的整数倍($\epsilon, 2\epsilon, 3\epsilon \dots n\epsilon$),并且是一份一份地按不连续方式进行的。

1905年爱因斯坦(Einstein A)在解释光电效应实验现象时,以普朗克量子假说为基础,提出了光子说。认为光是由系列称为光子的能量小包组成,每一光子的能量也是 $\epsilon = h\nu$,不同频率的光子具有不同的能量。因为频率与波长成反比,所以短波长的光具有更高的能量。一个具有足够能量的光子($h\nu$)被物质中的一个电子吸收时,一部分能量消耗于从物质的束缚中逸出电子所作的外逸功(A),剩余部分的能量转换为外逸电子(称为光电子)的动能($\frac{1}{2}mv^2$) v 因此:

$$h\nu = \frac{1}{2}mv^2 + A$$

此式称为爱因斯坦光电效应方程。

植物光合色素吸收一个适当能量的光子也将从色素分子中逸出一个光电子。必须强调,一个光子不能把它的能量(ϵ)传递给两个或更多个电子,两个或更多个光子的能量也不能结合起来发射一个电子。因此必须具有超过一个临界值的能量的光子才能使色素分子中的一个电子受激发,从而启动光合作用。

2. 光合作用所需的光处在可见光光谱范围

顾名思义光合作用是在太阳能推动下进行的。太阳是一个热核装置,它的内层温度高达数百万度,在这里发生巨大的热核聚变。核裂变释放的巨大能量使太阳表面温度维持在 6000 K 左右。太阳辐射出电磁光谱的所有成分,但能穿过地球大气层的只有部分红外线、部分紫外线和全部可见光(图27-3)。大部分紫外线被大气层上部的臭氧所吸收,使得地球上的生物免受紫外辐射的伤害。

电磁辐射的速度都是 $2.998 \times 10^8 \text{ m/s}$,即光速 c 。但每种辐射的波长是不同的,例如,X射线小于 10^{-8} m ,而无线电波则在 10 m 以上,可见光的范围为 $380 \sim 750 \text{ nm}$ 。光合作用所需的光谱正在可见光范围。

3. 可见光光谱的能级

光合作用也和一般的光化学反应一样,遵循爱因斯坦的光化学当量定律。如果一个分子只有吸收一个光子的能量($h\nu$)之后才能发生反应,那么 1 mol 化合物必须吸收 N (阿佛加德罗数, 6.22×10^{23})个光子的能量($Nh\nu$)以启动反应。 N 个光子,即 1 mol 光子,称为 1 einstein (爱因斯坦);一个 einstein 的能量 $E = Nh\nu$ 。光子和 einstein 都是光化学中使用的光能单位。

根据频率 = 光速/波长,即 $\nu = c/\lambda$ 。则可算出各种波长光的能量。例如,可见光红端 $\lambda = 700 \text{ nm}$ 的

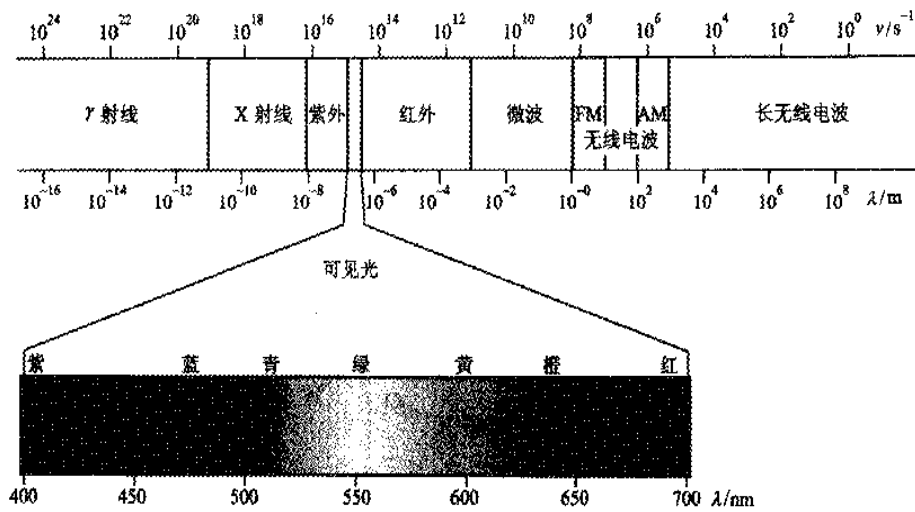


图 27-3 电磁辐射的光谱

光, 能量为 $17.10 \times 10^4 \text{ J/einstein}$ 或 1.77 eV/光子 ($1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ J}$); 紫端 $\lambda = 400 \text{ nm}$ 的光, 能量为 $29.93 \times 10^4 \text{ J/einstein}$ 或 3.10 eV/光子 。由此可知, 1 mol 可见光的能量约为 $170 \sim 300 \text{ kJ}$, 这几乎比从 ADP 和 P_i 合成 1 mol ATP 所需的能量 30 kJ 大一个数量级。

二、叶绿素的光反应性:光吸收

(一) 叶绿素吸收光能

叶绿素(chlorophyll, Chl)是深绿色光合色素的总称。高等植物和藻类中存在 5 种结构上很相似的叶绿素, 称叶绿素 a、b、c、d 和 e。其中最主要的是叶绿素 a, 存在于所有的放氧生物(包括蓝细菌)中。不放氧的光合细菌则含有另一类叶绿素, 称为细菌叶绿素(bacteriochlorophyll, Bchl)。叶绿素 b 存在于高等植物和绿藻(包括眼虫藻)中。在这些生物中叶绿素 a 和 b 的含量约为 2:1。硅藻和褐藻中不存在叶绿素 b, 代之以叶绿素 c。红藻中含叶绿素 d。从另两种藻中分离到叶绿素 e。在所有的光合细菌中都含有细菌叶绿素 a, 紫色光合细菌如红假单胞菌(*Rhodospseudomonas viridis*)中尚含细菌叶绿素 b。此外还有其他类型的细菌叶绿素存在。

图 27-4 示出几种主要类型的叶绿素结构。叶绿素是含镁的四吡咯衍生物, 其基本结构与含铁的卟啉化合物血红素相似(上册第 5 章), 它们都是由原卟啉 IX 通过生物合成形成的(第 31 章)。叶绿素在结构上有 4 点与血红素不同。在叶绿素分子的共轭环中心被配位的是镁而不是铁; 连接吡咯环 III 和环 IV 的亚甲基桥被取代并与环 III 交联, 导致环 V(附加环, 为叶绿素所特有)的形成, 环 V 上有一个羰基和一个甲氧甲酰基(carbomethoxy); 在叶绿素 a 和 b 中, 其中的一个吡咯环(环 IV)由于加入两个氢而被还原, 而在细菌叶绿素 a 中, 有两个环(环 II 和环 IV)被还原; 环 IV 的丙酰基侧链被多萜醇(上册第 2 章)酯化; 在叶绿素 a、b、c、d 中多萜醇是叶绿醇, 细菌叶绿素 a 中或是叶绿醇或是牻牛儿牻牛儿醇(geranylgeraniol), 这取决于细菌的种类。叶绿素由于带有长长的多萜醇基, 使之不溶于水, 只溶于乙醇、丙酮、乙醚等有机溶剂。

叶绿素分子中围绕 Mg^{2+} 的是 4 个吡咯环构成的一个单、双键交替(共轭系统)的环状多烯结构, 在此多烯环面的上下具有离域的 π 电子。 π 轨道中电子状态间的能量差相当于可见光光子的能量, 也即两个分子轨道之间的能量差与可见光的能量 $h\nu$ 相当。被吸收的光能用于激发一个电子从一个 π 轨道跃迁到另一个能量较高的 π^* 轨道, 因而提高该电子(π^* 电子)向一个适当受体传递的转移势。这种光激发的高压电子传递给受体的过程是一个氧化还原反应。净结果是光能转换为氧化还原反应的化学能。因此, 叶绿素在可见光区具有强烈的光吸收, 有非常高的摩尔吸光系数(ϵ , 依次为 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 例如, 菠菜叶绿

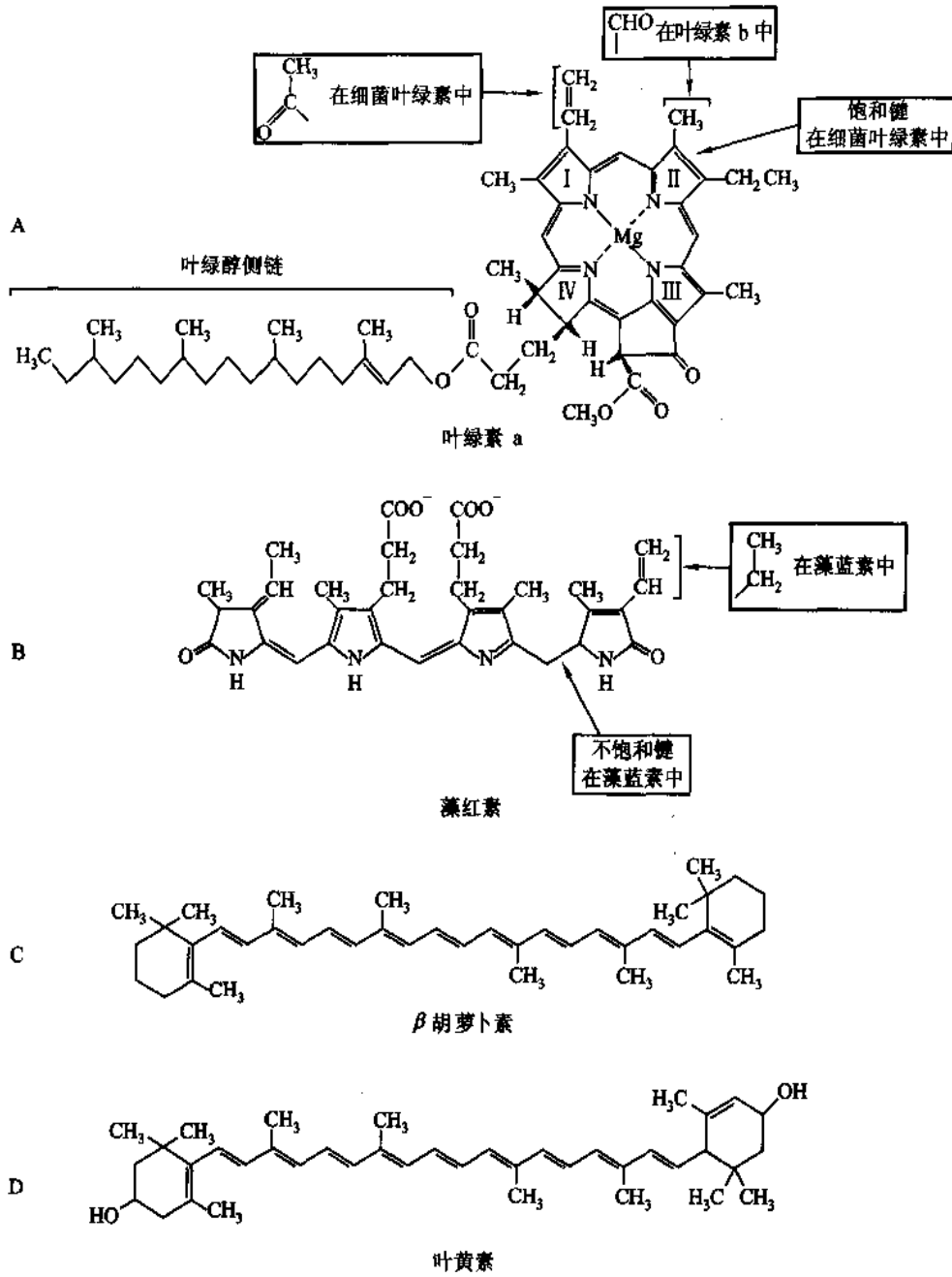


图 27-4 光合色素的结构

素a在乙醚中 $\epsilon = 8.63 \times 10^4$ ($\lambda = 662 \text{ nm}$), $\epsilon = 11.2 \times 10^4$ ($\lambda = 428 \text{ nm}$), 菠菜叶绿素 b 在乙醚中 $\epsilon = 5.61 \times 10^4$ ($\lambda = 644 \text{ nm}$), $\epsilon = 15.9 \times 10^4$ ($\lambda = 452 \text{ nm}$)。

高等植物的叶绿体总是同时含有叶绿素 a 和 b。虽然二者均呈绿色,但它们的吸收光谱还是有差别的(图 27-5)。这种差别使它们在可见光范围彼此互补,因而拓宽了被吸收的人射能谱。

(二) 辅助色素扩展光吸收的范围

除叶绿素外光合色素还有藻胆素和类胡萝卜素两类。藻胆素、类胡萝卜素和除叶绿素 a (和细菌叶绿素) 以外的其他叶绿素 (b、c、d 等) 总称为辅助色素 (accessory pigment)。而把叶绿素 a (和细菌叶绿

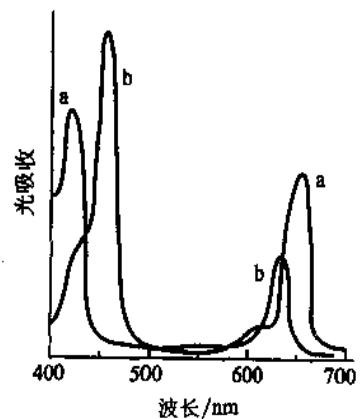


图 27-5 叶绿素a叶绿素b的吸收曲线

素)列为主要色素(primary pigment)。分成主要色素和辅助色素的根据是,叶绿素 a(或细菌叶绿素)吸收红光端的光,也即主要色素具有最小的激发能。因此从能量角度看,辅助色素收集的光能可以传给主要色素,换言之叶绿素 a(或细菌叶绿素)分子可作为“尾间”或“陷阱”(trap),接受从吸收光子的地方(辅助色素分子)迁移过来的某种形式的激子(exciton,激发能的量子)或电子,直至参与光化学事件。可见辅助色素的功能是收集光能,但不直接参加光化学反应。

藻胆素类(phycobilins)是一类存在于某些藻类中与蛋白质结合的色素,它们在光合作用中起叶绿素 a 的辅助色素的作用,所吸收的光能几乎以 100% 的效率传递给叶绿素 a,并优先用于光系统 II(见后面)。藻胆素是开链的四吡咯衍生物,具有叶绿素中的共轭多烯系统,但已不是大环结构,也不含中心 Mg^{2+} 。已知的藻胆素主要有藻蓝素(phycoerythrin)和藻红素(phycoerythrin)(图 27-4)它们存在于蓝细菌(旧称蓝绿藻)和红藻中。藻蓝素在红藻中占优势。

藻蓝素与特异蛋白质共价结合而成的缀合蛋白质称为藻胆蛋白(phycobiliprotein)。藻蓝素和藻红素的相应藻胆蛋白分别称为藻蓝蛋白(phycoerythrin)和藻红蛋白(phycoerythrin),此外还有一种别藻蓝蛋白(allophycoerythrin)。这些藻胆蛋白缔合成高度有序的集装体,称为藻胆体(phycobilisome)(图 27-6)。藻胆体是很大的集装体,含有数百个亚基(藻胆蛋白)相对分子质量可达数百万。藻胆体结合在类囊体膜的外侧,它是这些藻类中的主要集光结构。藻胆体中的色素,吸收 520~630 nm 范围的光(图 27-7),这样使这些藻类能够生活在高于或低于此范围波长的光,即已被生长在它们上方海水中的其他生物的叶绿素或海水本身滤去的环境中。

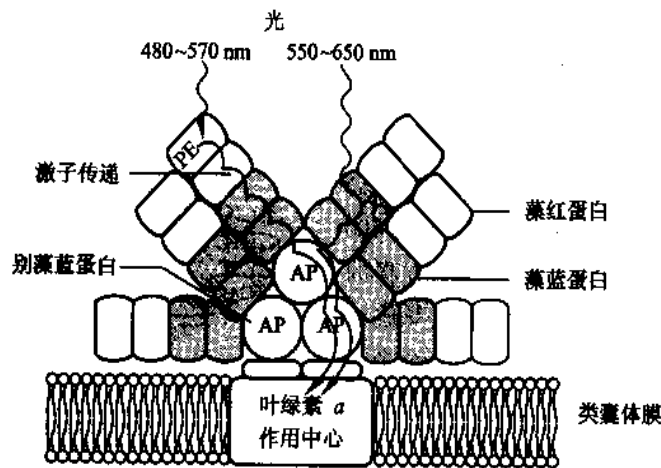


图 27-6 被 PE(藻红蛋白)或 PC(藻蓝蛋白)吸收的光子能量通过 AP 传递到作用中心的叶绿素 a

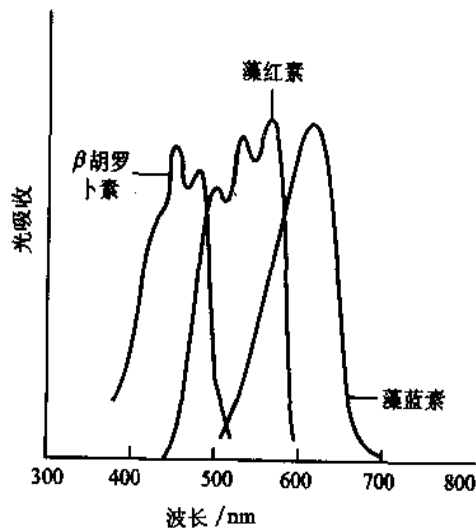


图 27-7 β 胡萝卜素、藻红素和藻蓝素的光吸收曲线

类胡萝卜素类(carotenoids)存在于所有的光合细胞中。作为辅助色素的类胡萝卜素类约有 70 多种,它们以不同的组合存在于各种光合生物中。类胡萝卜素类是具有共轭双键系统的四萜化合物(上册第 2 章),其中最重要的有橙红色的 β 胡萝卜素、黄色的叶黄素(lutein, xanthophyll, 图 27-4)等。这类色素在叶子中的颜色往往被叶绿素所掩盖,但在深秋季节,叶绿素被破坏后,叶子就显露出它们特有的红、橙、黄的壮丽色彩。类胡萝卜素的吸收光谱在 400 ~ 500 nm 范围(图 27-7),吸收的光能可传递给叶绿素 a,用于启动光化学反应。此外,这类色素在强光下保护细胞免遭 O_2 损伤中起重要作用。在光下形成的激发三线态叶绿素分子,相对寿命较长,不易回复到基态,但当与三线态分子氧(基态)相遇,则很容易使三线态叶绿素分子回到基态,而 O_2 被激发成单线态,它是一种自由基,对生物体毒性很大(上册第 2 章)。类胡萝卜素能够在三线态叶绿素与 O_2 反应之前就使三线态叶绿素淬灭,同时还能淬灭单线态 O_2 本身。这些淬灭都涉及将类胡萝卜素提高到它的激发三线态,其能级低于单线态 O_2 ,并能无伤害地衰变回基态。

(三) 叶绿素在膜上被组织成光合单位

20 世纪 30 年代初 Emerson R 和 Arnold W 研究了入射光的量子(光强度)、存在的叶绿素量和被照光小球藻(*Chlorella*)释放的氧量之间的关系。这种关系也即每吸收一个量子后释放的 O_2 分子数,称为光合作用的量子产额(quantum yield)或量子效率(quantum efficiency)。它们用重复的短暂闪光激发小球藻悬浮液,并测量其放氧量时,发现在 25℃ 时,为了使每次闪光的产氧量达到最高值,在二次闪光之间需要有 20 ms 的黑暗时间。当闪光之间的暗周期小于 20 ms 时,每次闪光的产氧量会降低。这意味着每次闪光生成一个产物,而这个产物必须在第二次闪光到来之前被利用掉。如果第二次闪光到达太早,则吸收的能量主要以热和荧光的形式被浪费了。

Emerson 和 Arnold 测定了当闪光暗周期为最佳时的每次闪光的产氧量。但它们意外地发现,即使用了饱和强度的闪光,产氧量对叶绿素量的比值仍是很小的。细胞每释放一个 O_2 分子,约需要 2 500 个叶绿素分子存在。根据前面的光合作用总方程的化学计量关系算得:每还原一个 CO_2 分子和释放一个 O_2 分子,2 500 个叶绿素分子群需要吸收 8 个光量子,进行 8 次光化学反应。平均约每 300 个叶绿素分子吸收一个光量子,发生一次光化学反应。Emerson

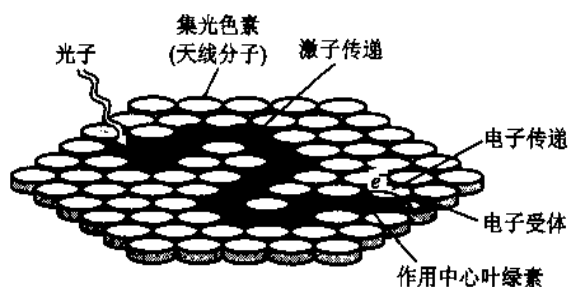


图 27-8 光合单位的结构

和 Arnold 的实验结果表明,叶绿体中不是所有的叶绿素分子都具有光化学反应性的,并因此发展出光合作用是发生在功能上独立的单位中的概念。叶绿体在光合作用中担当两种角色:一是参与光的收集,并通过激子转移(见下面)将光能传递到光反应性部位;二是光反应性部位的叶绿素分子直接参与光化学事件,借此光能转变为化学能。一个光合单位(photosynthetic unit)可简单地看成是由几百个集光的叶绿素分子和其他色素分子组成的一个天线系统加一个具有光化学反应性的叶绿素 a“特殊对”(二聚体)。这个叶绿素 a 二聚体被称为光合作用的作用中心色素(reaction center pigment)或能量陷阱。一个光合单位中大多数叶绿素分子的目的是收集入射的光,并经共振能传递把它汇集到作用中心(图 27-8)。因此大多数叶绿素和辅助色素只起一个大集光天线的作用。这些天线分子也称集光色素。在起天线作用的意义上说,多数叶绿素 a 分子也是一种“辅助色素”。在光化学事件中,作用中心的叶绿素 a 分子被氧化,变成一个阳离子自由基 $Chla^+$,它的性质是作为电子受体,具有重要的光合作用后果。注意,在这些氧化还原反应中 Mg^{2+} 的价数没有变化。

(四) 叶绿素通过激子传递把吸收的能量汇集到作用中心

被光合色素吸收的光量子有 4 种可能的命运:

1. 以热形式损失

激发能量通过重新分配到色素分子内的原子振动逐步衰减以热散失,这也称内转换(internal

conversion)。

2. 光损失

激发能量以荧光再现(光发射):当 e^- (电子)返回到一个低能轨道时,发射出一个荧光光子。但这种情况只见于饱和光强度时,由于热力学的原因,荧光光子的波长比激发光光子的波长长,因此具有的能量也比激发的量子低。

3. 共振能传递(激子传递)

激发能量可以通过共振能传递(非辐射过程)被转移到邻近的分子,条件是它们的能量水平差值与激发能的量子相当。在此过程中,随着在原来的吸光分子中一个光激发的 e^- 返回到基态,发生量子或所谓激子的传递,将受体分子中的一个电子提升到高能态。共振能传递(resonance energy transfer)也称激子传递(exciton transfer),它是使那些落在天线色素分子上的光子最终传递到光化学作用中心的机制(图 27-9A)。

4. 电子传递(能量转换)

当激发能量把分子中的一个电子提升到高能轨道时,将显著改变这个色素分子的标准还原势 E^0 ,使之成为一个十分有效的电子供体(图 27-9B)。也即,由于光吸收而具有高能电子的激发态分子是一个很强的电子供体。这个激发态电子供体将高能电子传递给附近的电子受体,并导致光能转换为化学能(还原力、电子传递的电势)。光能转换为化学能是光合作用的实质。

在集光复合体中叶绿素分子具有的光吸收性质与游离的叶绿素分子有所不同。在体外被提取的叶绿素受光激发后,吸收的能量很快地就以荧光和热被释放。但在完整叶片中叶绿素被照光后,几乎观察不到荧光现象。受激发的天线色素借助上述的激子传递机制,把能量最后传递给作用中心的叶绿素分子。后者通过电子传递把一个高能电子转移给附近的一个电子受体,它是电子传递链的一个成员。作用中心叶绿素分子(电子供体)变成阳离子自由基 $\text{Chla}^{\cdot+}$,也即具有一个空轨道(“电子空穴”),而电子受体获得一个负电荷。反应中心叶绿素失去的电子将由来自一个邻近的电子供体的电子所置换,此供体变成带正电。这样,光激发引起电荷分离,启动氧化还原链的电子流。

三、光驱动电子流:中心光化学事件

(一) 光合细菌只有一个光化学作用中心

在发现真核光合细胞的作用中心色素 P700 和 P680 之前,1952 年 Duysens L 借差光谱法(上册第 5 章)发现用 870 nm 波长光照射一种称为深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)的紫色[非硫]细菌时,引起该波长的光吸收暂时性降低,也即一种色素被 870 nm 光所漂白(退色)。这种色素被命名为 P870。

光合细菌具有比较简单的光[能]转换机构,只含两种类型作用中心中的一种。一种类型(存在于紫色细菌中)是把激发电子通过细菌脱镁叶绿素或细菌叶褐素(bacteriopheophytin,它是中心 Mg^{2+} 被两个 H 原子取代的细菌叶绿素)传递给醌。另一种类型(存在于绿色硫细菌中)是把电子通过醌传递给铁-硫中心。细菌光转换机构的生化与生物物理的研究已揭示出有关作用中心的许多分子细节。因此,这些细菌系统可作为更复杂的高等植物光转换的原型。

1. 脱镁叶绿素-醌型作用中心(II型作用中心)

紫色细菌的光合机构由 3 个基本组件构成(图 27-10):① 单作用中心(P 870),包括围绕它的天线色素系统;② 细胞色素 bc_1 复合体,它与线粒体电子传递链复合体 III 相似;③ ATP 合酶(ATP synthase),也与

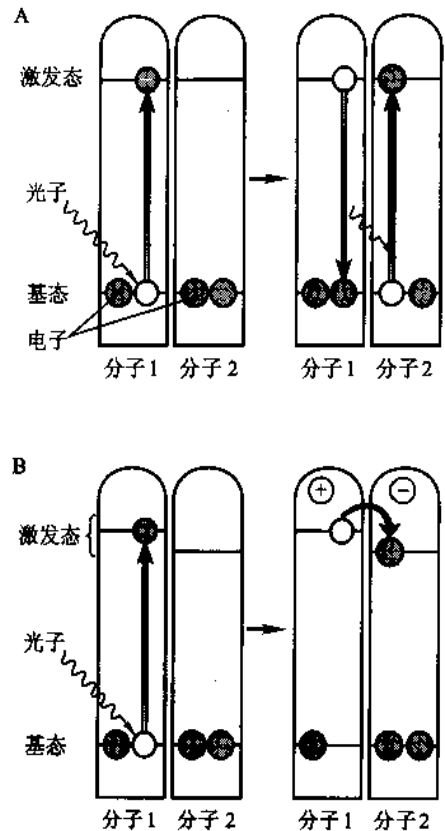


图 27-9 激子传递(A)和电子传递(B)

线粒体的 ATP 合酶很相似。光照射驱动电子经细菌脱镁叶绿素和醌到达细胞色素 bc_1 复合体,通过此复合体后,电子经细胞色素 c_2 返回作用中心,恢复到照光前状态。这种光驱动的循环式电子流为细胞色素 bc_1 复合体泵送质子提供能量。在生成的质子梯度推动下,组件 ATP 合酶合成 ATP,这与线粒体中的情况完全一样(第 24 章)。

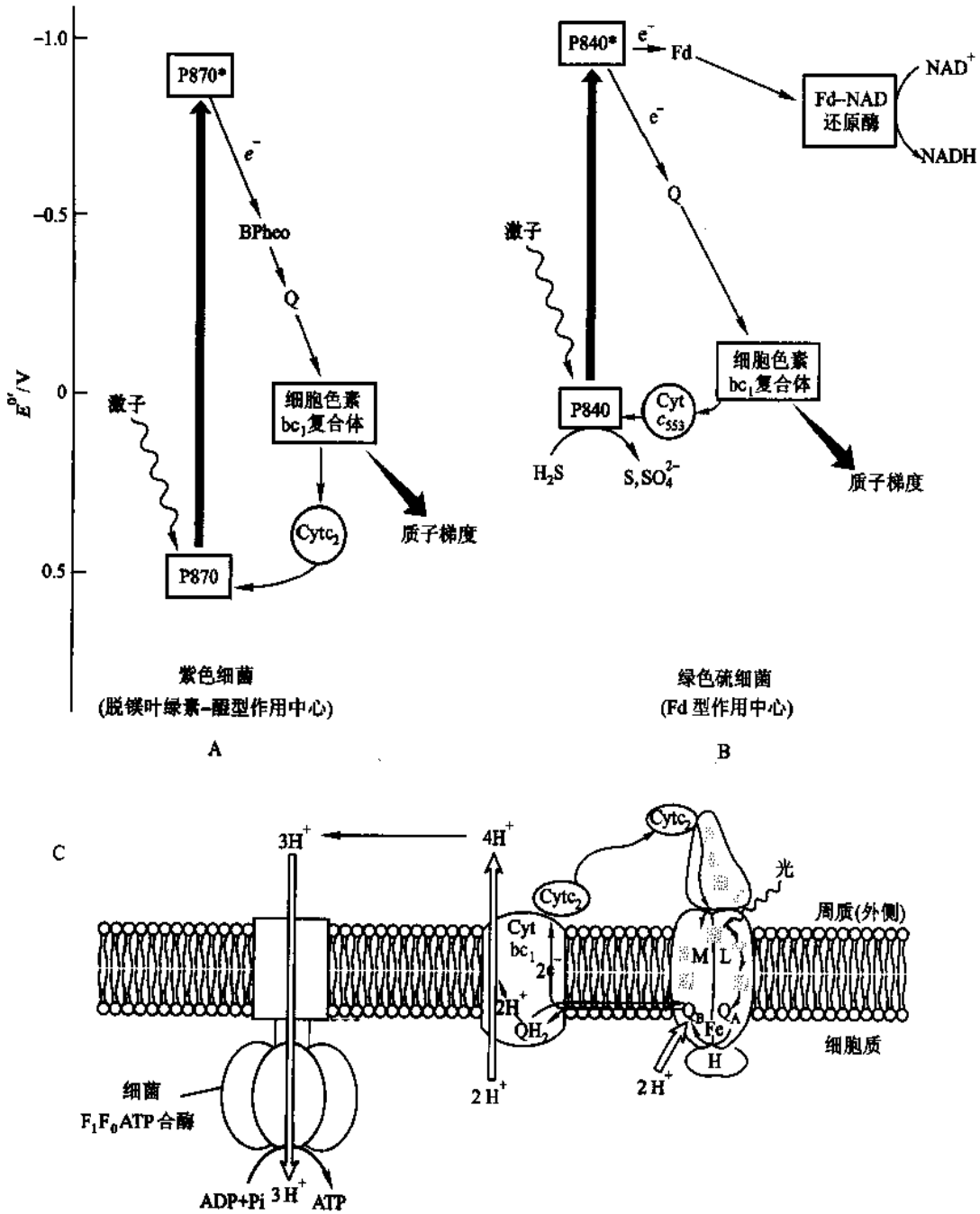


图 27-10 紫色细菌和绿色硫细菌中光合机构的 3 个基本组件
(作用中心, 细胞色素 bc_1 复合体和 ATP 合酶)

A. 紫色细菌作用中心及其电子传递; B. 绿色硫细菌作用中心及其电子传递; C. 紫色细菌光合电子传递(循环式), 质子梯度建立和 ATP 合成

2. 紫色细菌作用中心的三维结构

紫色细菌如绿色红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas viridis*) 的作用中心三维结构已根据其 X 射线晶体学资料解出, 它阐明了光转换在脱镁叶绿素 - 醌型 (II 型) 作用中心是如何发生的。 *R. viridis* 的作用中心是一个大的蛋白复合体 ($M_r 145 \times 10^3$), 含 4 个多肽亚基, 13 个辅基(图 27-11)。这 4 个不同的亚基分别标为 L

(273个氨基酸残基)、M(323个残基)、H(258个残基)和c-型细胞色素(333个残基)。L和M亚基每个都由5个跨膜 α 螺旋段组成。H亚基只含一个跨膜 α 螺旋段,此蛋白的大部分形成一个球状结构域,处于胞质中。c-型细胞色素亚基的N末端氨基酸是Cys,此亚基是通过该Cys残基上的二脂酰甘油的脂肪酸链被锚定在膜的周质面。13个辅基是:L和M每个含2个细菌叶绿素分子(BChl)和1个细菌脱镁叶绿素分子(BPheo);L还有1个紧密结合的醌分子 Q_A ;M含1个疏松结合的醌分子 Q_B ;L和M一起与一个非血红素Fe原子配位;c-型细胞色素亚基含4个血红素基。作用中心的光化学活性分子是P870,由2个细菌叶绿素组成,它们各由M和L贡献(图27-11)。

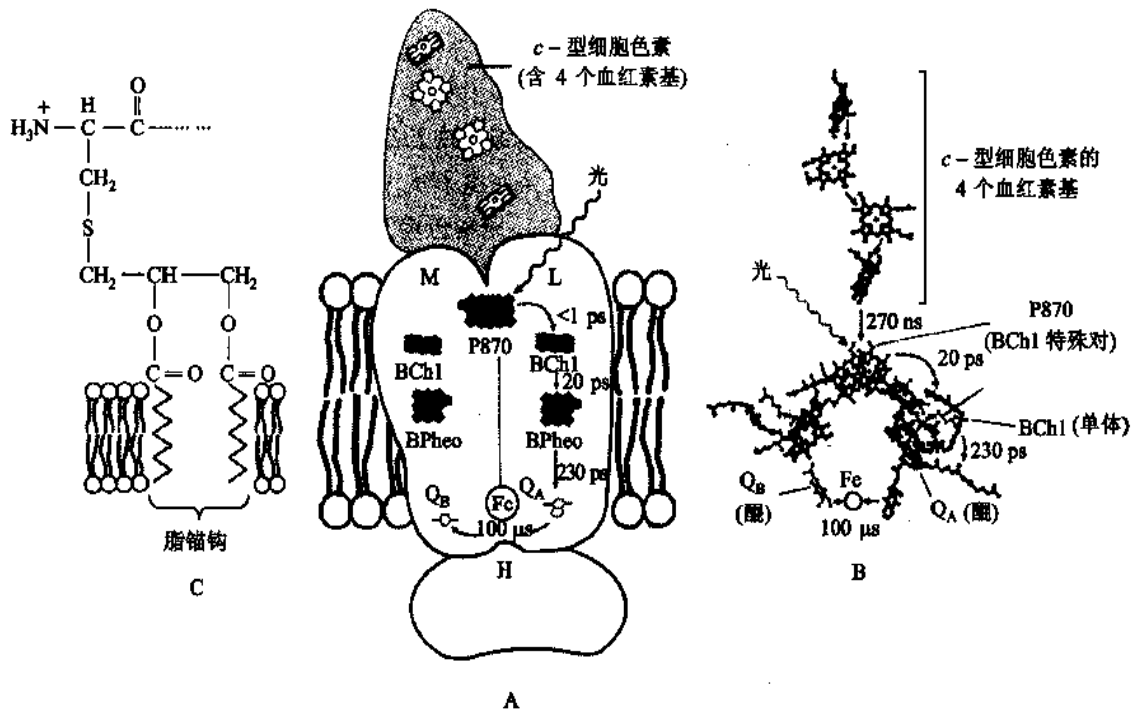
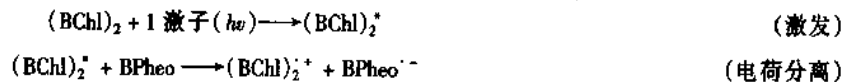


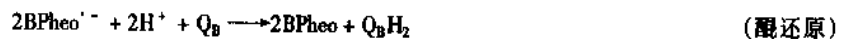
图27-11 紫色细菌(*R. viridis*)作用中心的结构(A)和各辅基间的关系(B)
c-型细胞色素是通过其N末端Cys残基上的二脂酰甘油的脂肪酸链被锚定在膜的周质面(C)

3. 紫色细菌光化学作用中心的电子传递

R. viridis 作用中心的辅基在空间上彼此关系是固定的,这有利于光合电子传递。细菌脱镁叶绿素-醌作用中心的物理学方面的研究,包括利用短闪光引发光转换以及各种分光光度技术追踪沿载体链的电子流。如图27-11所示,作用中心的电子传递速度是极快的,在皮秒(ps)到微秒(μs)的数量级。照光时,光子被作用中心周围的天线分子所吸收,能量通过激子传递到达作用中心,并激发 $(\text{BChl})_2$ (即P870)成为 $(\text{BChl})_2^*$,其中一个BChl分子释放出一个电子变成 $(\text{BChl})_2^+$ 。释放出的电子经附近的L细菌叶绿素单体(BChl)到达L细菌脱镁叶绿素分子(BPheo)。结果产生了两个自由基, $(\text{BChl})_2^+$ 和 $\text{BPheo}^{\cdot-}$;



细菌脱镁叶绿素将它的电子传递给紧密结合的醌(Q_A), Q_A 转变为半醌自由基,后者立即将额外的电子提供给疏松结合的醌(Q_B)。两次这样的电子传递使 Q_B 转变为全还原型醌($Q_B\text{H}_2$),它能在膜双层中自由扩散,并离开作用中心:



这里有趣的是,虽然M和L两个亚基所含的辅基在几何上是对称的,电子传递途径也是相同的,但没有发生通过M的电子传递。

还原醌($Q_B\text{H}_2$)进入溶于膜的还原醌库($Q_B\text{H}_2$ pool),并通过膜双层的脂相移动到邻近的细胞色素 bc_1 复

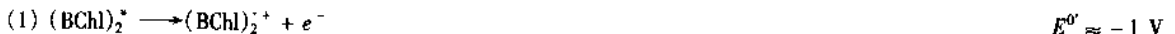
合体。此复合体把来自一个醌醇(QH_2)的电子转运给一个电子受体,利用电子传递的能量跨膜泵送质子,产生质子动势(proton-motive force)。通过细胞色素 bc_1 复合体的电子流很像通过线粒体复合体 III 的情况,涉及一个 Q 循环,循环中质子在膜的一侧被吸收,在另一侧被释放。紫色细菌中最终的电子受体是空缺电子的 P870 ,即 $(\text{BChl})_2^+$ (见图 27-10A, C)。电子从细胞色素 bc_1 复合体流到 P870 是经过一个可溶性细胞色素 c_2 (在周质中)和作用中心 c -型细胞色素亚基的 4 个血红素。位于 P870 和最近一个血红素之间的是 L 的一个特异酪氨酸残基(Tyr162),它是 P870^+ 的直接电子供体。至此电子传递完成了一个循环,作用中心的 P870 处于基态,准备从天线分子吸收另一激子,启动下一次循环。

4. 铁氧还蛋白型作用中心(I型作用中心)

绿色硫细菌中的光合作用与紫色细菌一样也涉及 3 个组件,但光合过程在某些方面有区别,包括涉及一些额外的酶促合成(见图 27-10B)。激发引起一个电子从作用中心(P840)经过一个醌载体流到细胞色素 bc_1 复合体,并产生质子动势,用于 ATP 合成,这与紫色细菌中和线粒体中的情况是一样的。但还有一条与紫色细菌中的循环式电子流不同的电子传递线路,某些电子从作用中心流向一个铁硫蛋白,称铁氧还蛋白(ferredoxin, Fd),后者再把电子经铁氧还蛋白: NAD^+ 还原酶传递给 NAD^+ ,形成 NADH 。从作用中心取用以还原 NAD^+ 的电子是由 H_2S 氧化成 S 或/和 SO_4^{2-} (图 27-10B)所产生的电子来填补的。

5. 热力学和动力学因素防止内转换引起的能量散失

作用中心的复杂结构是进化选择的产物,它有利于提高光合作用的效率。激发态(P870^*)原则上能够通过内转换衰减回到基态。这是一个非常迅速的过程,约 10 ps,被吸收的光子能量转变为热而散失。作用中心的构建正能防止这种内转换引起的低效率。作用中心的蛋白质将细菌叶绿素、细菌脱镁叶绿素和醌以彼此确定的方向固定在它上面(图 27-11),因此在这些组分之间的光化学反应实际上是在固态中进行的。这就是光反应高效、快速的原因,这里不存在概率碰撞或随机扩散的问题。从天线分子到作用中心的叶绿素“特殊对”的激子传递,不到 100 ps 时间便完成,效率达 90% 以上。 P870 被激发的 20 ps 内, BPheo 即获得电子而变成阴离子自由基;200 ps 左右电子到达醌 Q_A (图 27-11)。电子传递反应不仅快而且在热力学上是“下坡”的;被激发的叶绿素“特殊对”(BChl_2^*) 是一个很好的电子供体(E^0 约为 -1 V),相继的电子传递每次都是传给 E^0 负值小得相当多的受体。因此,过程的标准自由能变化是大的负值。 $\Delta G^0 = -nF\Delta E^0$ (第 20 章),这里 ΔE^0 是下面两个半-反应:



的标准还原电势之差,因此,

$$\Delta E^0 = -0.045 \text{ V} - (-1 \text{ V}) \approx 0.95 \text{ V}$$

$$\Delta G^0 = -2(96.5 \text{ kJ/V}\cdot\text{mol})(0.95 \text{ V}) \approx 183 \text{ kJ/mol}$$

快速的动力学和有利的热力学二者的结合使过程成为实际上不可逆和高效率。过程的总能量产率(贮存于 QH_2 中的光子能量百分数)大于 30%,其余能量以热散失。

(二) 高等植物和藻类具有两个光系统

1. Emerson 增益效应表明叶绿体存在不同的两个光系统

1943 年 Emerson R 等人在分析小球藻光合作用的光化学作用光谱时发现“红降”现象(图 27-12)。反映光合作用效率的作用光谱(action spectrum)是以放氧量作为入射光波长的函数绘制的曲线图。“红降”(red

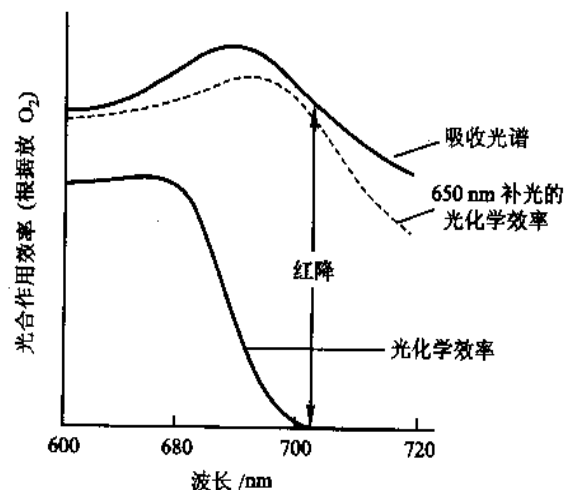


图 27-12 光合作用的光化学作用光谱

drop)是指在较短波长($< 680\text{ nm}$)光下,光合的量子效率(释放的 O_2 分子数/光子)是恒定的,但在 $> 680\text{ nm}$ 波长的远红光区光合效率则剧烈下降。13年后(1956年)他们又发现了所谓“Emerson 增益效应”(enhancement effect),或称双光效应。他们指出当小球藻(或其他绿色植物细胞)的光合作用在 $> 700\text{ nm}$ 光下量子效率下降,如果在 700 nm 光的背景下补加短波长光($< 680\text{ nm}$),则光合量子效率可增强(图27-12)。换言之,这两种波长的光是协作的;当两种波长光同时给予时引起的放氧量,比分别给予时引起的放氧量总和还要大。一个解释是放氧的光合细胞有两个光反应的参与:一个光反应利用 700 nm 波长的光,另一个利用 680 nm 或短于 680 nm 的光。两个光反应的发现确立了两个相互合作的色素系统存在。这些色素系统也称光化学反应系统,简称光系统(photosystem, PS)。光系统可看成是前面谈到过的“光合单位”的更具体形式。

2. P700 和 P680 分别是光系统 I 和光系统 II 的作用中心色素

1955年 Duysens L 发现,当用 700 nm 光照射真核光合细胞时,吸收此波长光的色素(P700)被漂白。因为 700 nm 光吸收的漂白可用加入人工电子受体,如高铁氰化物来模仿,所以漂白与从P700取走电子有关。P700浓度很小,仅为植物中叶绿素总量的 0.25% 。但是这个低浓度与“作用中心”(特异的光反应性部位)的概念是一致的。P700是光系统 I (PS I)的作用中心色素,其红光端的最大吸收在 700 nm 波长。1956年 Kok B 利用较短波长光进行同样的研究,发现了另一个类似的色素,P680,它构成光系统 II (PS II)的作用中心,在 680 nm 波长呈现最大红光吸收。P700和P680都是处于特化蛋白质复合体中的叶绿素a分子二聚体或“特殊对”。

3. 叶绿素是以整合蛋白质形式存在于光合膜中

用去污剂处理类囊体悬浮液时,膜被溶解,并释放出含有叶绿素和蛋白质的复合体。这些复合体是类囊体膜的整合组分。它们的组织结构反映出它们是起集光复合体(light-harvesting complex, LHC)、PS I 复合体或 PS II 复合体的作用。所有叶绿素都位于这3种大分子聚集体中。集光复合体是光系统的天线。在LHC中叶绿素分子彼此的关系与其他蛋白质复合体的关系以及与膜的关系都是固定的,例如,集光复合体 II (LHC II)。LHC II 是光系统 II 的主要天线,它的详细结构已用 X 射线晶体学方法阐明,LHC II 单体结构中含有3个跨膜 α 螺旋段和12个色素分子包括7个叶绿素a分子,5个叶绿素b分子和2个叶黄素分子(图27-13)。

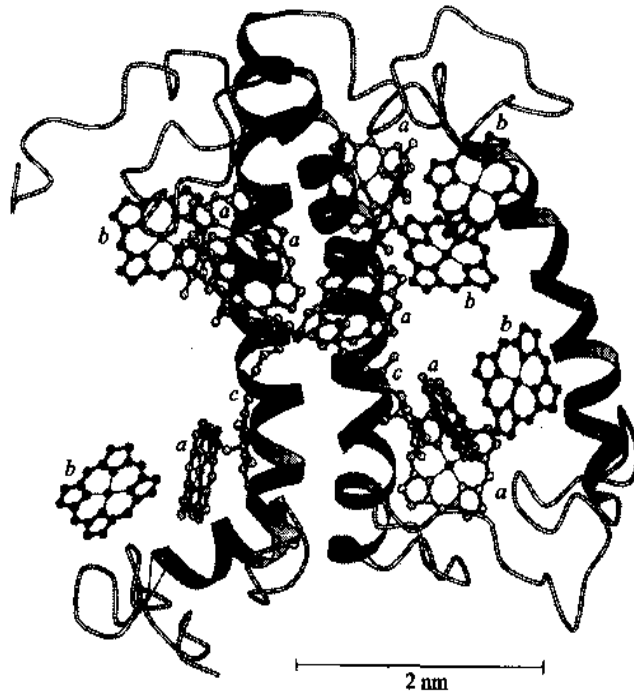


图 27-13 集光复合体 II (LHC-II) 单体的图解

功能单位是 LHC-II 三聚体;每个单体含 7 个叶绿素 a 分子(a), 5 个叶绿素 b 分子(b)和 2 个叶黄素分子(c)

(三) 放氧光合生物中光作用中心的结构

放氧光合生物包括蓝细菌、藻类和高等植物,它们的光合机构比单作用中心的细菌系统复杂很多,同时含有两个作用中心或两个光系统(PS I 和 PS II)。PS I 和 PS II 很可能是通过两个较简单的细菌光合作用中心的组合进化而来的。这两个系统各有自己的光化学作用中心和一套天线色素,它们有着不同而又互补的功能。PS II 含脱镁叶绿素-醌型(II型)作用中心(类似紫色细菌的光系统),此系统含大体等量的叶绿素 a 和叶绿素 b 以及其他辅助色素。PS I 含铁氧还蛋白型(I型)作用中心(类似绿色硫细菌的光系统),此系统中叶绿素 a 的含量比叶绿素 b 高。一个菠菜叶绿体的类囊体膜所含有的光系统每种都有数百个。

1. 光系统 II 的结构

高等植物和藻类的 PS II 含有 20 多个蛋白亚基,比紫色细菌 *R. viridis* 的作用中心复杂很多。但 *R. viridis* 的作用中心仍是 PS II 核心结构的一个好模型。两个脱镁叶绿素(Pheo)位于一对内在膜蛋白:D1 (M_r 38 000)和 D2(M_r 39 400)(图 27-14)。酪氨酸残基(Z 或 Tyr_Z)是 D1 氨基酸序列中的 Tyr161。与 D2 紧密结合的是质体醌(plastoquinone)分子,PQ_A。电子从 P680⁺ 流向 D1 上的 Pheo,再流向 D2 上的 PQ_A,然后流到位于 D1 上的质体醌,PQ_B。PQ_A 和 PQ_B 的电子传递得到位于二者之间的铁原子的协助。每个进入 PQ_B 部位的质体醌(PQ_B),在以醌醇形式释放到膜脂相中之前,接纳两个从水衍生来的电子和两个来自基质的 H⁺。细胞色素 b₅₅₉是一个与 PS II 结合的细胞色素分子,由两个多肽(M_r 4 400 和 9 300)组成,但它的功能尚不清楚。两个叶绿素结合蛋白(M_r 4 700 和 4 300)行使集光功能,把吸收的激子能传递给 P680。还有一个含锰的外在膜蛋白,称为放氧复合体(oxygen-evolving complex, OEC)位于类囊体膜的腔侧。OEC 的主要亚基是 M_r 为 33 000,23 000 和 16 000 的多肽。

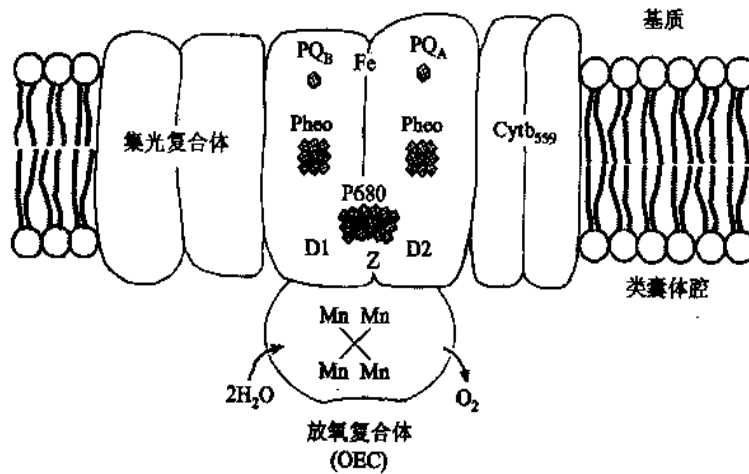


图 27-14 光系统 II 的结构

PS II 的核心由两个肽链组成(D1 和 D2),结合有 P680、Pheo、质体醌(Q_A 和 Q_B)以及附加组分细胞色素 b₅₅₉、集光复合体(含天线分子)和放氧复合体(含锰离子串)

2. 光系统 I 的结构

一种蓝细菌细长聚球藻(*Synechococcus elongates*)的 PS I 结构已用 X 射线晶体学方法解得。此结构与前面讨论过的 *R. viridis* 的作用中心和真核 PS II 都很相似,但它与真核 PS I 的资料直接相关。蓝细菌的 PS I 结构是所有含 P700 的光系统的一个通用模型(图 27-15)。虽然 PS I 由 11 个不同的蛋白亚基组成,但所有对 PS I 功能必需的电子传递辅基都定位在 3 个多肽上,其中两个, PsaA 和 PsaB(M_r 均为 83 000),组成作用中心的异二聚体,这种结构模式现在看来是光合作用中心的普遍形式。PsaA 和 PsaB 各有 11 个跨膜 α 螺旋段。PS I 约含 100 个叶绿素分子,包括两个组成 P700 的叶绿素 a 分子和两个位于离 P700 约 1.6 nm 的叶绿素 a 分子,其中一个标为 A₀(功能上类似 PS II 中的脱镁叶绿素),A₀ 是 P700 的直接电子受体

(图 27-16)。醌以与 PS I 结合的形式存在,包括一个标为 A_1 的叶绿醌(phyloquinone),也称维生素 K_1 (上册第 11 章),它是中间电子载体。 $Fe-S$ 中心($Fe-S_X$)桥连 PsaA 和 PsaB。第三个蛋白是 PsaC(M_r 9 000),它含有两个额外的 $Fe-S$ 中心或称 $Fe-S$ 串($Fe-S_A$ 和 $Fe-S_B$);PsaC 和另外两个蛋白(PsaD 和 PsaE)一起位于作用中心复合体的基质侧。PsaD 是真核 PS I 中铁氧还蛋白的结合部位。PsaF(含 3 个跨膜 α 螺旋段)为质体蓝素(plastocyanin)提供作用部位(在类囊体膜的腔侧)。

蓝细菌(*S. elongatus*)PS I 的整个结构是由一个作用中心和一个围绕它并与它连接的大天线系统(以叶绿素为主体)所组成。3 个这样的 PS I 复合体聚集一起形成一个三聚体结构。光化学过程从 P700 吸收激子开始,并立即发生电子传递和电荷分离($P700^+ : A_0^-$);接着电子从 A_0 经 A_1 到 $Fe-S_X$, 然后到 $Fe-S_A/Fe-S_B$, 在这里用于还原位于膜的基质侧的铁氧还蛋白分子。 $P700^+$ 的正电荷与 $Fe-S_A/Fe-S_B$ 的 e^- 代表跨膜的电荷分离,这是光所创造的高能状态(energized condition)。

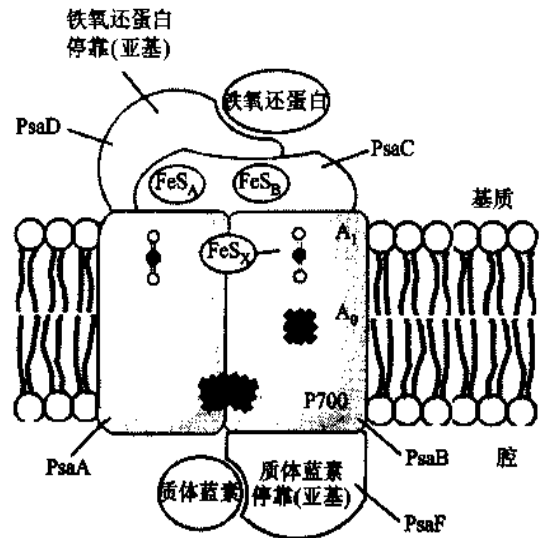


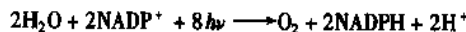
图 27-15 光系统 I 的结构

作用中心由 PsaA 和 PsaB 两个亚基组成,含 P700、 A_0 (Chl a 单体)、叶绿醌(A_1);附加组分:PsaC($Fe-S_A$ 和 $Fe-S_B$)、PsaD 和 PsaE(基质侧)和 PsaF(腔侧)

(四) 真核光合电子传递的 Z 图式

1. 光系统 II 和光系统 I 是以串联方式作用的

真核光合细胞中由 P680 和 P700 吸收的光能驱动电子从 H_2O 流向 $NADP^+$ 。PS I 以 NADPH 的形式提供还原力(reducing power)。PS II 光解水和放氧,并把释放的电子送入连接 PS II 和 PS I 的电子传递链。在电子传递过程中引起质子跨膜泵送和 ATP 合成(图 27-16)。 H_2O 的氧化和 $NADP^+$ 的还原在类囊体膜上是分开的;氧化在 PS II 这边进行,还原在 PS I 那边进行。 $NADP^+/NADPH$ 电对的标准还原电势 E^0 为 -0.32 V,因此在标准条件下还原 $NADP^+$,需要一个 E^0 值 < -0.32 V 的强还原剂。同样,为把 H_2O 氧化成 O_2 需要一个 $E^0 > +0.82$ V 的强氧化剂。从图 27-16 可以看到,含两个光系统(PS I 和 PS II)的生物,还原 $NADP^+$ 所需的电子最终来自 H_2O 的氧化,释放的 O_2 是水光解(photolysis)的副产物(图 27-16 左下方)。这一过程称为生氧(oxygenic)光合作用,以区别于紫色细菌和绿色硫细菌所进行的不生氧(anooxygenic)光合作用。所有放氧光合细胞都含有 PS I 和 PS II;只含一个光系统的生物不放氧。图 27-16 常称为 Z 图式(Z scheme),因为此图的总形式很像是侧着排的 Z 字母。Z 图式概括出两个光系统之间的电子流途径和光反应的能量关系。因此,Z 图式依据下面方程:



描绘出从 H_2O 到 $NADP^+$ 的电子流完整路线。每吸收两个光子(每个光系统一个),一个电子从 H_2O 流到 $NADP^+$ 。为形成一个分子 O_2 ,要求 4 个电子从两个 H_2O 传递给两个 $NADP^+$;总共需要吸收 8 个光子,每个光系统吸收 4 个光子。

整个光合电子传递是由 3 个跨膜超分子复合体(membrane-spanning supramolecular complex)完成的。这 3 个复合体是 PS II 复合体、细胞色素 b_6f 复合体和 PS I 复合体。

2. 通过 PS I 的光驱动电子流

在 PS II 和 PS I 中的光化学反应机制的细节与两个细菌光系统基本相同。光合电子流从 P680(PS II 中)受光激发形成 $P680^*$ 开始。 $P680^*$ 是一个很好的电子供体(E^0 约为 -1 V),在 20 ps 内即把一个电子传递到脱镁叶绿素(Pheo)而成阴离子 $Pheo^-$ (图 27-16 左上方)。 $P680^*$ 因丢失电子转变为阳离子自由基($P680^+$)。 $Pheo^-$ 很快将额外电子传递给质体醌, PQ_A ; PQ_A 又将电子传递给另一个质体醌 PQ_B (相当于线粒

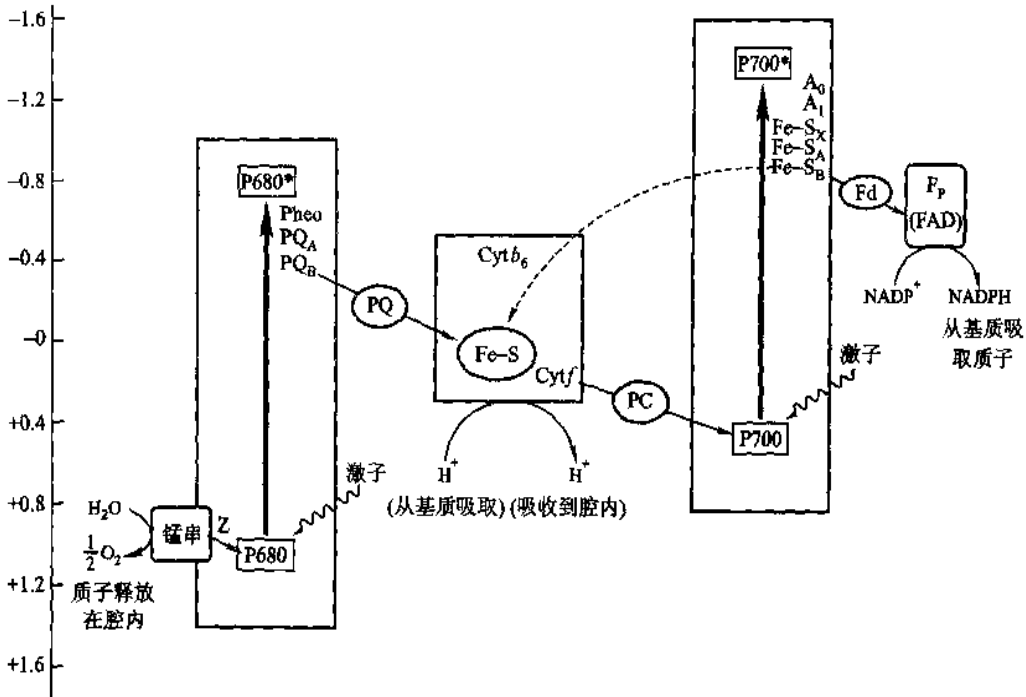


图 27-16 真核光合电子传递的 Z 图式

体中的 Q)。经两次这样的传递, PQ_B 从 PQ_A 获得两个电子并从基质水相中获得两个质子, 变成完全还原的醌醇(氢醌)形式, PQ_BH₂。在 PS II 中光引发的总反应是:



PQ_BH₂ 离开 PS II, 进入膜中的质体醌库。由于质体醌的脂质本质, 它能在膜内游动, 并因此能把来自 PS II 的电子不断地运送到细胞色素 b₆f 复合体。质体醌不仅起脂溶性的两电子载体的作用, 而且它和它的还原型(质体醌醇)交替氧化还原涉及质子的吸收(图 27-17)。

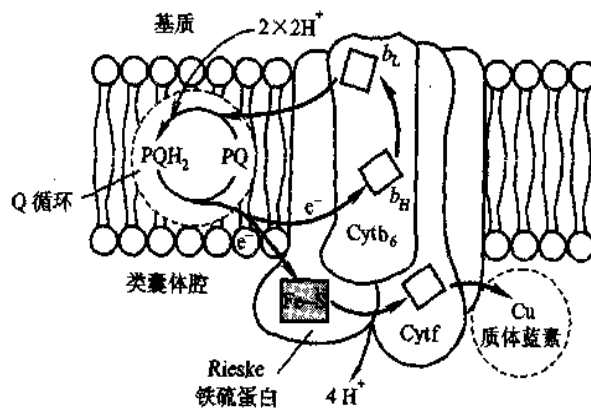


图 27-17 通过细胞色素 b₆f 复合体的电子流与质子流

3. 通过 PS I 的光驱动电子流

PSI 复合体可看成是光驱动的质体蓝素: 铁氧还蛋白氧化还原酶 (plastocyanin; ferredoxin oxidoreductase)。P700(PS I 中)吸收一个激子转变为激发态 P700*, 它立即释放出一个电子给 A₀(一个特化的叶绿素 a 分子), 生成 A₀⁻。激发的结果是造成光化学作用中心的电荷分离, P700⁺: A₀⁻(图 27-16 右上方)。P700⁺是一个强氧化剂(P700⁺/P700 电对的 E^{0'} 约为 +0.45 V), 很容易从质体蓝素(PC)获得一个电

子。质体蓝素(相当于线粒体中的细胞色素 *c*)是一个水溶性的一电子载体蛋白(M_r 10 400),能在类囊体腔内扩散,适于穿梭在细胞色素 b_6f 复合体与 PS I 之间转运电子。PC 分子含一个铜原子,当铜原子在 Cu^+ 和 Cu^{2+} 状态之间交替氧化还原时起电子载体($E^0 = +0.32$ V)作用。 A_0^- 是一个很强的还原剂,它很快地将电子传递给一个特化的醌,即叶绿醌(A_1),后者又将电子传递给膜结合的铁硫蛋白(在 PS I 中电子通过 3 个 Fe-S 中心)。从这里电子转移到铁氧还蛋白(Fd),这是一个与膜疏松结合的可溶性铁硫蛋白。菠菜的铁氧还蛋白(M_r 10 700)含有一个 2Fe-2S 中心(第 24 章),能进行一电子氧化还原反应。Fd 是黄素蛋白(Fp)的直接电子供体。此黄素蛋白称为铁氧还蛋白:NADP⁺ 氧化还原酶,催化将电子从还原的铁氧还蛋白(Fd_{red})转移到 NADP⁺:



此酶与绿色硫细菌的铁氧还蛋白:NAD⁺ 还原酶(图 27-10B)是同源的。

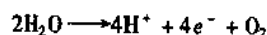
4. 细胞色素 b_6f 复合体连接 PS II 和 PS I 的电子流

细胞色素 b_6f 复合体(图 27-17)或称质体醌醇:质体蓝素氧化还原酶,是一个大的多聚蛋白质(M_r 210×10^3),具有 22 到 24 个跨膜 α 螺旋段。它很像线粒体的复合体 III,含有一个带两个血红素基(b_H 和 b_L)的 *b*-型细胞色素 b_6 ,它在 559 nm 波长处有一个吸收带, E^0 为 -0.06 V,一个 Rieske 铁硫蛋白(M_r 20 000);和一个 *c*-型细胞色素 c_{552} ,常称为细胞色素 *f*(*f* 来自拉丁文 *frons* 或 *folium*,意思是叶子),它在 552 nm 处有一个吸收带, E^0 为 $+0.37$ V。PS II 的 P680 受激发时贮存在质体醌(PQ_BH_2)中的电子是经细胞色素 b_6f 复合体和质体蓝素传递给 PS I 的 $P700^+$ 的。细胞色素 b_6f 复合体的功能涉及质体醌介导的 Q 循环(参看第 24 章)。循环中从 PQ_BH_2 到细胞色素 b_6 ,一次传递一个电子。Q 循环的结果是质子的跨膜泵送;在叶绿体中质子移动的方向是从基质区室到类囊体腔,每传递一对电子转移高达 4 个质子。因此,随电子流经细胞色素 b_6f 复合体,将产生一个跨类囊体膜的质子梯度。因为扁平的类囊体腔体积很小,所以少量质子流入则对腔内 pH 产生相当大的影响。基质(pH 8)和类囊体腔(pH5)之间测得的 pH 差相当于膜两侧 1 000 倍的质子浓度差,这是合成 ATP 的强大驱动力。

在某些条件下来自 $P700^+$ 的电子不传递到 NADP⁺,而沿另一途径经 PS I 中的铁硫蛋白(Fe-S_A/Fe-S_B),细胞色素 b_6f 复合体和质体蓝素,最后回到 $P700^+$ (图 27-16 中虚线箭头所示)。这一循环式电子流不涉及放 O₂ 和 NADP⁺ 还原,但能导致所谓循环式光合磷酸化的 ATP 合成。

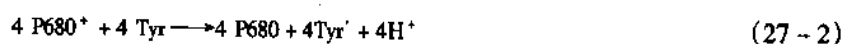
(五) 水的光解与放氧

生氧光合作用中传递给 NADP⁺ 的电子的最终来源是水。PS II 中 P680 被激发时给出一个电子转变成成为 $P680^+$,而它必需获得一个电子以返回基态,准备捕获下一个光子。原则上 $P680^+$ 所要的电子可以来自任一有机或无机的化合物。为此光合细菌可利用各种电子供体,如乙酸盐、琥珀酸盐和硫化物;这取决于特定生态环境中可利用的是什么。大约 30 亿年前原始光合细菌(现代蓝细菌的祖先)的进化产生了一个光系统,能够从一个总是能得到的供体——水中获得电子。在此过程中 2 分子水被裂解,产生 4 个电子,4 个质子和 1 个氧分子:



一个可见光光子的能量($h\nu$)不足以破裂 H₂O 分子中的键。水的光解反应需要 4 个光子。

从水中抽取的 4 个电子不是直接传递给 $P680^+$, $P680^+$ 一次只能接纳一个电子。但在生物进化中有一个巧妙的分子设计,即放氧复合体(OEC),也称水裂解复合体(water-splitting complex),它能一次一个地将 4 个电子传递给 $P680^+$ (图 27-18)。 $P680^+$ 的直接电子供体是 PS II 作用中心的 D1 的 Tyr 残基(Z),它失去一个质子和一个电子,转变为电中性的 Tyr 自由基,Tyr[•]:



Tyr 自由基通过氧化水裂解复合体中的锰离子串(四锰中心)重新获得缺失的电子和质子。每传出一个电

子, Mn 串的氧化状态增高, 4 次一电子传递(每次相当于吸收一个光子)在锰络合物(Mn complex)上产生 4 个正电荷(图 27-18):

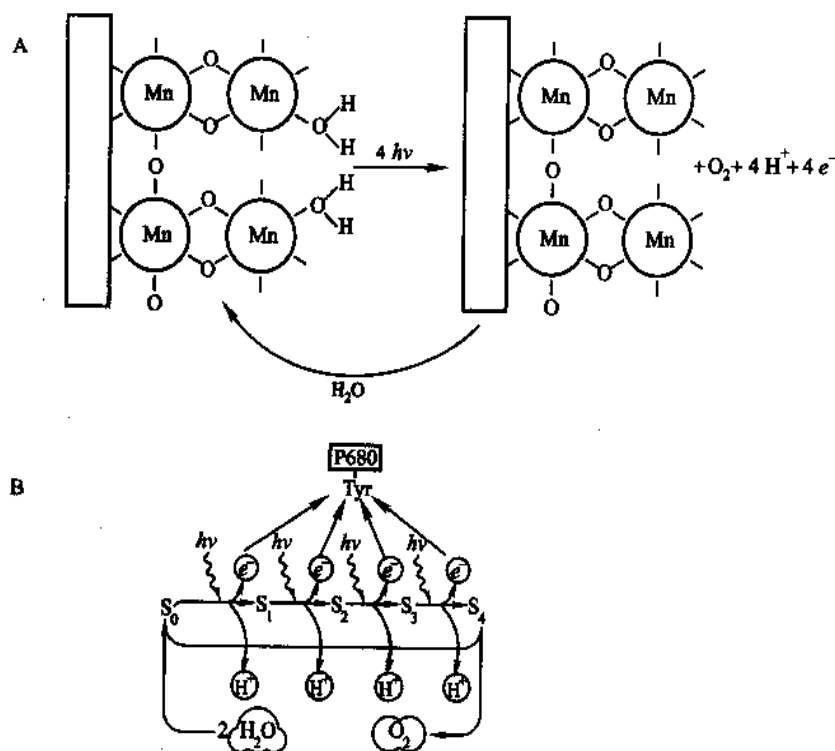
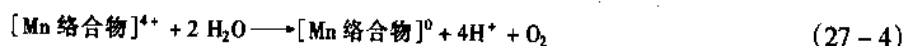


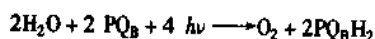
图 27-18 放氧复合体的水光解活性

A. 与 H₂O 分子配位的锰离子串中 4 个 Mn 原子可能的结合方式; B. 示出形成 4-电子氧化剂(锰络合物, 图中用 S 表示)的过程。P680 吸收 1 个 hν 引起锰串失去 1 个 e⁻; 连续吸收 4 个 hν, 锰串的氧化状态相继提高, 由 S₀→S₄。通过 2 分子 H₂O 氧化成 O₂, S₄ 自发地衰减为 S₀

[Mn 络合物]⁴⁺ 可以从两个 H₂O 分子中取得 4 个电子, 并释放 4 个 H⁺ 和 1 个 O₂:



因为反应中产生的 4 个质子被释放入类囊体腔中, 所以放氧复合体起着电子传递驱动的质子泵作用。方程(27-1)至方程(27-4)4 个式子的总和是:



与 PS II 作用中心关联的水裂解活性组分很难纯化。在腔侧类囊体膜上的一个外周膜蛋白(M_r 33 000)可能是稳定 Mn 络合物的。Mn 串的详细结构尚不清楚。锰能够以几种稳定的氧化状态存在, 从 +2 到 +7 价, 因此四锰离子串一定能供给或接纳 4 个电子。图 27-18 所示的机制是与实验事实相符的。但在所有 Mn 串中间物的化学结构被弄清楚之前, 真实的机制仍难确定。

(六) PS I 和 PS II 在类囊体膜上的定位

激发 P700(PS I 中)所需的能量比激发 P680(PS II 中)所需的能量低。如果 PS I 和 PS II 在空间上是接近的, 那么来自 PS II 的天线系统的激子常会绕过 PS II 的作用中心直接传递给 PS I 的作用中心, 使 PS II 长期激发不足, 因而干扰双中心系统的正常运作。这种激子失窃(exciton larceny)可以通过类囊体膜上 PS I 和 PS II 的空间分离加以防止(图 27-19)。PS II 几乎无例外地位于基粒内部紧密垛叠的膜层(基粒片层)。与 PS II 缔合的集光复合体(LHC II)介导基粒中相邻膜的缔合。PS I 和 ATP 合酶复合体几乎都位于面向

基质的基质片层和基粒顶部和底部的表面,在这里可以与基质的内容物包括 ADP 和 NADP^+ 接近,有利于 NADP^+ 还原和 ATP 合成。细胞色素 b_6f 复合体存在于整个类囊体膜。

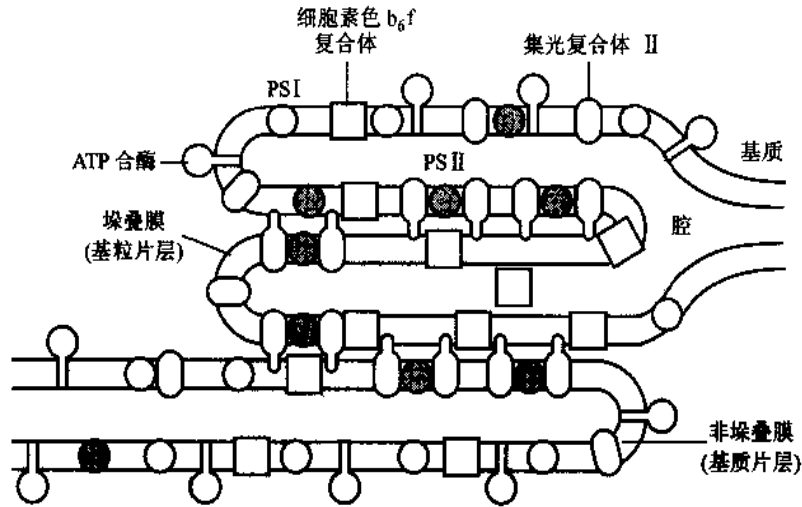


图 27-19 PSI 和 PS II 在类囊体膜上的定位

LHC II 与 PS II 的缔合由光强度和波长调节。在强日光(蓝光成分多)下,PS II 吸收的光比 PS I 吸收的多,产生还原型质体醌(PQ_BH_2)的速度比 PS I 氧化它的速度快。结果, PQ_BH_2 的积累激活了蛋白激酶,它是磷酸化 LHC II 上 Thr 残基的一个蛋白激酶(图 27-20)。磷酸化使 LHC II 与 PS II 的相互作用减弱,某些 LHC II 发生解离并移动到基质片层;在这里为 PS I 捕获光子,加速 PQ_BH_2 的氧化,因而扭转了 PS I 和 PS II 之间的不平衡。在低强度的光(红光成分多)如阴影下,PS I 氧化 PQ_BH_2 速度比 PS II 产生它的速度快,结果 PQ_B 的浓度增加,并因此引发 LHC II 的去磷酸化而逆转了磷酸化的效应。

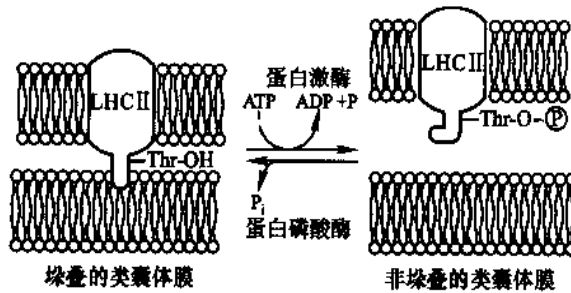


图 27-20 调整基粒的堆叠状态以平衡 PS I 和 PS II 中的电子流

四、光驱动的 ATP 合成:光合磷酸化

1954 年 Arnon D 等人发现照光的菠菜叶绿体在光合电子传递过程中由 ADP 和 P_i 形成 ATP。此后又有在称为载色体(chromatophore)的光合细菌的含色素膜结构中观察到光诱导的 ATP 合成。因此得出结论:被这些生物的光系统捕获的光能一部分能量转化为 ATP 的磷酸键能。这一过程称为光合磷酸化,以区别于线粒体中的氧化磷酸化。光合磷酸化是光合作用过程的一个基本部分。

(一) 电子传递与光合磷酸化相偶联

前面我们讨论了光合电子传递导致 NADPH (还原力)的产生, NADPH 也是富能的化合物,光合系统捕获的能量一部分就贮存在这里。电子传递的另一结果是质子从基质跨膜泵送到类囊体腔,形成跨膜质子梯度。叶绿体光合电子传递和光合磷酸化的若干性质表明质子梯度所起的作用是与线粒体氧化磷酸化中

的相同。①作用中心、电子载体和 ATP 合酶复合体都位于质子不透膜——类囊体膜中,膜必需完整才能支持光合磷酸化;②光合磷酸化可加入能促进质子通过类囊体膜的试剂而解偶联;③光合磷酸化可被杀黑星霉素(venturicidin)和类似的试剂所阻断,这些试剂是抑制线粒体 ATP 合酶从 ADP 和 P_i 合成 ATP 的(第 24 章);④ ATP 合成受 CF_1CF_0 复合体催化(C 表示叶绿体的),此复合体位于类囊体膜的外表面,结构和功能上都类似线粒体的 F_1F_0 复合体。

连接 PS II 和 PS I 的载体链中载体分子在类囊体膜上是不对称的,所以光驱动的电子流能够造成质子从基质到类囊体腔的跨膜净转移(图 27-21)。

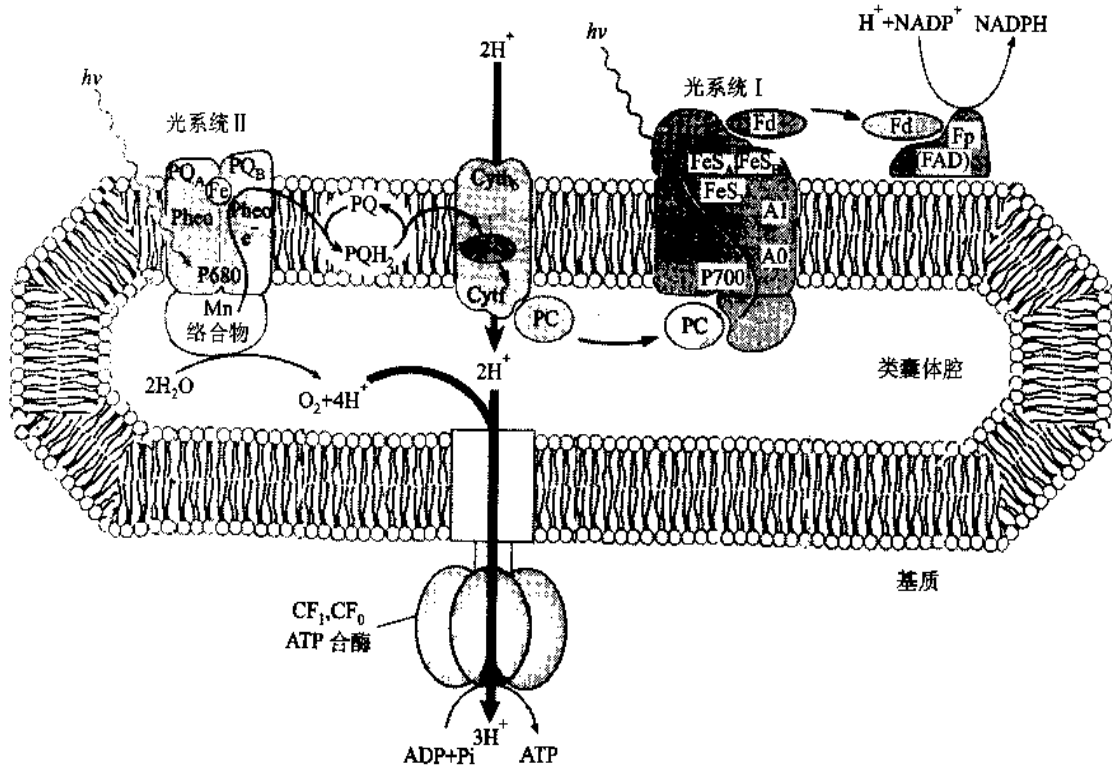


图 27-21 在类囊体中质子和电子流的线路(光合磷酸化的机制)

1966 年 Jagendorf A 证明了跨类囊体膜的 pH 梯度是 ATP 合成的驱动力。他在暗处的 pH 4 缓冲液中温育叶绿体,温育期间缓冲液慢慢渗入类囊体腔内,使腔内 pH 降低;再向暗中此叶绿体悬浮液加入 ADP 和 P_i ,并立即将外介质的 pH 升高到 8。这样瞬间创造了一个很大的跨膜 pH 梯度。当质子从类囊体腔向外移到介质时,发生从 ADP 和 P_i 合成 ATP。因为实验是在暗处进行的,并无光能输入,所以说明跨膜质子梯度是一种高能态。

图 27-21 表明,质子跨膜移位(translocation)可以在几个部位发生:一在放氧复合体,这是由于水光解的结果;二是在细胞色素 b_6f 复合体,当电子通过 Q 循环时由氧化还原反应引起;NADP⁺ 还原用去的质子也是从类囊体膜的基质侧取走的。目前的看法是每当 4 个电子从 H_2O 流到 NADP⁺ (也即每形成一分子 O_2),约 12 个 H^+ 从基质被转移到类囊体腔内。其中 4 个质子由放氧复合体“转运”(在腔内产生);8 个 H^+ 由细胞色素 b_6f 复合体转运(每传递 1 个电子跨膜转运两个质子)。

(二) 光合磷酸化的机制——化学渗透

光合磷酸化与氧化磷酸化一样也是通过化学渗透机制进行的。贮存在质子梯度中的能量(ΔG)称为电势(electrochemical potential)。它由两项组成:一项是膜电势($\Delta\psi$),由于电荷分离造成(当质子跨膜转移时无相应的反离子同时转移);一项是化学势,由膜间隔的两个区域内质子浓度差(ΔpH)引起:

$$\Delta G = \mathcal{F}\Delta\psi - 2.303 RT\Delta pH$$

质子梯度的电势也可用质子动势(Δp)表示。质子动势定义为自由能变化 ΔG 除以 Farady 常数(96485 J/V·mol):

$$\Delta p = \Delta G/\mathcal{F} = \Delta\psi - (2.303 RT/\mathcal{F})\Delta\text{pH}$$

在叶绿体中 ΔpH 是主要项;因为类囊体膜对阴离子是可以通透的,也即反离子移动损失了大部分电势能, $\Delta\psi$ 只有 -50 mV 左右;而 $\Delta\text{pH} = 3$ 。在 25°C 叶绿体中每 mol 质子贮存在质子梯度中的能量:

$$\Delta G = -22 \text{ kJ/mol 或 } \Delta p = -0.23 \text{ V}$$

因此 12 mol 质子通过类囊体膜相当于贮存约 260 kJ 的能量,此能量足以驱动几个摩尔 ATP($\Delta G^0 = 30.5 \text{ kJ/mol}$)的合成。实验测得,每放出 1 个 O_2 合成约 3 个 ATP。

(三) 循环和非循环光合磷酸化

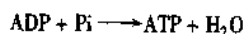
光合电子传递能以两种方式进行,但它们都导致跨膜质子动势的形成。因此这两种方式都与 ATP 合成相偶联,并且它们的光合磷酸化的机制也是相同的。这两种方式,一种称为循环光合磷酸化,另一种称为非循环光合磷酸化。

非循环光合磷酸化(noncyclic photophosphorylation)实际上在前面已经着重讨论了。光合磷酸化的机制图解于图 27-21,这里,在 PS II 和 PS I 中被光子活化的电子从 H_2O 流到 NADP^+ ,同时建立了质子动势($3\text{H}^+/\text{e}^-$),驱动 ATP 合成。注意,在非循环光合磷酸化中有 O_2 释放和 NADP^+ 还原。非循环光合磷酸化的总方程是:



循环光合磷酸化(cyclic photophosphorylation)是循环光合电子流引起的。在循环电子流中 P700 丢失电子形成的 P700^+ “电子空穴”不是由衍生自 H_2O 经 PS II 传递过来的电子填补,而是由 P700 的光激发电子沿循环途径最终返回到 P700^+ 。此循环途径在图 27-16 中用连接 PS I 中 Fe-S_b 和细胞色素 b_6f 复合体的虚线示出。细胞色素 b_6 (Cytb_6)的功能是经质体醌库连接细胞色素 b_6f 复合体和 PS I 的结合型铁氧还蛋白($\text{Fe-S}_b/\text{Fe-S}_A$)。此途径使活化的电子不流向 NADP^+ 而经质体蓝素返回 P700^+ 。

循环电子流中无 NADPH 产生,也无 O_2 释放,因为它不涉及 PS II。但循环途径中也有质子被细胞色素 b_6f 复合体(经 Q 循环)泵送到类囊体腔中($2\text{H}^+/\text{e}^-$),因此伴有 ADP 的磷酸化。循环电子流和光合磷酸化的总方程可简单地写为:



循环光合磷酸化的最大速率不到非循环光合磷酸化的 5%。植物可以通过调节参与 NADP^+ 还原和循环磷酸化的电子数目调节光反应中产生的 ATP 和 NADPH 的比例以适应暗反应中对这些化合物的需要。在下面“光合作用的暗反应”一节中将看到 CO_2 固定所需的 ATP 和 NADPH 的摩尔比为 3:2。

(四) 盐细菌的光合磷酸化

盐细菌或称嗜盐菌(*Halobacterium salinarum*)是一种从远古的进化祖先衍生来的古细菌,它捕获太阳能的方式与前面讨论过的光合机制很不相同。这种细菌生活在盐湖水(例如死海、美国的大盐湖)。这里盐的浓度超过 4 mol/L,高盐浓度是长期蒸发失水的结果。事实上嗜盐菌不能生活在低于 3 mol/L 的 NaCl 溶液中。这些细菌是需氧的,正常情况下利用 O_2 氧化有机燃料分子。然而在盐水中 O_2 的溶解度很低,有时氧化性代谢需要以日光作为另一能源加以补充。

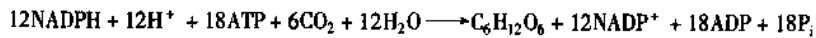
盐细菌的质膜含有吸光色素称紫膜质(上册第 5 章)。此色素以视黄醛(维生素 A 的一种形式)作为辅基。当细胞被照光时,结合在紫膜质上的全反式视黄醛吸收一个光子,并发生光异构化(photoisomerization),变成 13-顺式视黄醛。全反式视黄醛复原时伴随质子跨膜泵送到外介质。紫膜质是已知最简单的光驱动质子泵,它的三维结构在暗处和照光后不同。这表明当构象发生变化时,一个协同的

连续质子“跳跃”(hop)能够有效地使一个质子跨膜转移。辅基视黄醛是通过一个西佛碱与紫膜质的一个 Lys 残基的 ϵ -氨基相连。在暗处希夫碱的 N 原子被质子化,但视黄醛的光异构化降低此基团的 pK_a ,当它把质子释放给邻近的 Asp 残基的 β -COO⁻时,则引发一个连续的质子跳跃,最后质子在膜外表面被释放。

形成的电化学势驱动质子通过膜的 ATP 合酶复合体(与线粒体和叶绿体的相似)返回胞内。因此,当 O₂ 受限制时嗜盐菌可利用光来补充氧化磷酸化合成 ATP 之不足。但盐细菌不放 O₂,也不进行 NADP⁺ 的还原;因此,它的光能转换机构比蓝细菌或高等植物简单得多。被这种简单蛋白质利用的质子泵机制是许多其他更复杂的离子泵的原型。

(五) 光合作用中能量的利用效率

从前面非循环光合磷酸化的总方程可以看到光合量子产额(每 mol 光子输入形成的产物量)相当于每吸收 8 mol 光量子产生 1 mol O₂, 2 mol NADPH 和 ~ 3 (或 $2\frac{2}{3}$) mol ATP。CO₂ 固定成己糖的总化学计量方程是:



也即合成 1 mol 己糖需要 12 mol NADPH 和 18 mol ATP。为产生这些 NADPH 和 ATP 需要 48 mol 光子,如果按每 8 mol 光子产生 $2\frac{2}{3}$ mol ATP 的比率计算,尚需产生额外 2 mol ATP,即再消耗 6 mol 光子。这样合成 $2\frac{2}{3}$ mol 己糖需要 54 einstein 光能。按真核光系统所吸收的最低能量光(700 nm 波长)计算,1 einstein 约为 170 kJ, 54 einstein = 9 180 kJ。根据细胞呼吸逆转,从 CO₂ 和 H₂O 合成己糖的标准自由能变化 ΔG^0 为 +2 870 kJ。因此可算得光合电子传递过程中能量利用效率为 $(2\ 870/9\ 180) \approx 31\%$,即光系统吸收的能量 31% 转化为贮存的化学能。

五、暗反应:CO₂ 固定

(一) CO₂ 固定与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶

本章一开始,就把光合作用几乎等同于 CO₂ 固定过程。这是因为绿色植物在光合作用中发生从 CO₂ 和 H₂O 到糖的净合成。事实上能否从 CO₂ 到糖的净积累是区分自养生物和异氧生物的根本标志。虽然动物体内也能通过催化反应把 CO₂ 连接到有机化合物受体上,但这些反应不能达到有机碳的净积累。例如,脂肪酸生物合成中 CO₂ 被共价连接到乙酰-CoA 而形成丙二酸单酰-CoA,但是这样“固定的 CO₂”,在下一步的反应中则被释放(第 29 章)。

1. CO₂ 固定是通过循环途径进行的

绿色植物在它的叶绿体中含有一个特有的酶促机构,催化 CO₂ 转变为还原性的有机化合物。这一过程被称为 CO₂ 固定(CO₂ fixation)或碳固定,也称为 CO₂ 同化(CO₂ assimilation)。CO₂ 固定是通过循环途径进行的,途径中关键中间物不断地被再生。此途径最先在 20 世纪 50 年代初被美国的 Calvin M 及其同事们所阐明;并因此称为 Calvin-Bensen 循环,常简称为 Calvin 循环(Calvin cycle)。

1945 年 Calvin 等人利用单细胞的小球藻作实验材料,探索了 CO₂ 固定为糖的途径。实验策略是用放射性 ¹⁴C 作为追踪 CO₂ 的示踪物,将 ¹⁴C 注入照光的藻悬浮液,此时藻已与正常的 CO₂ 进行光合作用。经过预先选定的时间之后,将悬浮液滴入乙醇中,把藻杀死以停止酶促反应。藻中的放射性化合物用双向纸层析(见上册第 3 章)进行分离,并用放射自显影显示后进行鉴定。照光 60 s 后的放射层析谱非常复杂,无法检出 CO₂ 固定的最早中间产物。然而只照光 5 s 的,层析谱则简单得多,发现只有一个显著的斑点,已证明它是 3-磷酸甘油酸。

2. 核酮糖-1,5-二磷酸是 CO₂ 固定中的 CO₂ 受体

业已证明,CO₂ 固定反应中 CO₂ 的受体是核酮糖-1,5-二磷酸(ribulose-1,5-biphosphate),简称 RuBP。

此五碳糖与 CO₂ 结合,经不稳定的 6C 中间物,被裂解成 2 分子 3-磷酸甘油酸(图 27-22)。催化此关键反应的酶是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(rubulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase),简称为 rubisco。此酶的名称反映它既能催化 CO₂ 与 RuBP 加成,也能催化 O₂ 与 RuBP 反应(见后面光呼吸)。rubisco 存在于叶绿体的基质中。它是一个很丰富的酶,约占总叶绿蛋白的 50%。已知生物圈里植物物质占优势,因此 rubisco 可能是世界上最丰富的蛋白质,据估计世界上 rubisco 约有 4 × 10⁷ t。rubisco 分子很大,高等植物中它是一个杂多聚体(α₈β₈),Mr 540 × 10³,由 8 个相同的大亚基(Mr 53 × 10³)和 8 个小亚基(Mr 14 × 10³)组成(图 27-23)。大亚基是酶的催化单位,它能结合底物(CO₂ 和 RuBP)以及 Mg²⁺ (2 价阳离子,对酶活性是必需的)。小亚基是调节酶活性的单位,它能使催化速度常数 k_{cat} 增加 100 倍以上。rubisco 的大亚基是由叶绿体 DNA 的一个基因编码的,而小亚基是由核 DNA 的一个多基因家族编码的。有活性的 rubisco 杂多聚体的装配是在叶绿体内当小亚基跨过叶绿体膜进入基质时发生的。

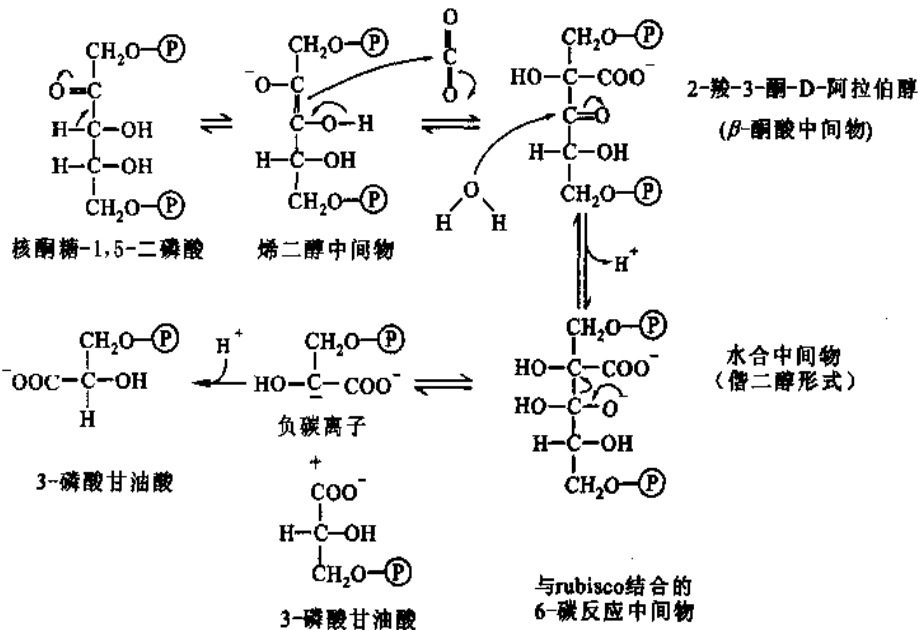


图 27-22 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(rubisco)催化的 CO₂ 固定反应

光合细菌的 rubisco 结构上与植物的很不相同,只含两个亚基,这些亚基在很多方面与植物的大亚基相似。

3. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶催化的反应

rubisco 的羧化酶活性催化 CO₂ 和 RuBP 的加成,导致与酶结合的 β-酮酸中间物即 2-羧-3-酮-D-阿拉伯醇(2-carboxy-3-keto-D-arabinitol)的形成(图 27-22)。此是在 CO₂ (不是它的水合形式 HCO₃⁻) 加到烯二醇形式的 RuBP 时产生的。中间物的 C₂-C₃ 键的水解产生 2 分子 3-磷酸甘油酸。此反应基本上是不可逆的,ΔG⁰ = -51.9 kJ/mol。加入的 CO₂ 在其中 3-磷酸甘油酸中以羧基形式出现。

4. 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶活性的调节

Calvin 循环中的限速步骤是核酮糖-1,5-二磷酸被羧化形成 2 分子 3-磷酸甘油酸。照光时 rubisco 的活性显著增加。在基质中 pH 由 7 增至 8~9 以及 Mg²⁺ 的水平增高是由于质子泵入类囊体腔的结果。在这些条件下 rubisco 羧化酶活化,正是因为碱性 pH 有利于氨甲酸的形成。CO₂ 加到去质子化的调节性 Lys 残基的 ε-氨基以及 Mg²⁺ 与氨甲酸的结合形成催化所必需的加合物。

rubisco 以 3 种形式存在:①无活性形式,称 E 型;②氨甲酰化的无活性形式,EC 型;③活性形式,ECM 型;氨甲酰化并在活性部位有 Mg²⁺。rubisco 氨甲酰化(carbamylation)是 CO₂ 和它的 Lys201 ε-NH₂ 发生加

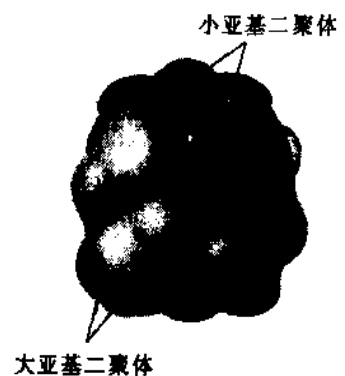


图 27-23 根据 X 射线晶体学揭示的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶亚基组织的图解

成的结果(生成 $\epsilon\text{-NH-COO}^-$ 衍生物)。用于 $\epsilon\text{-NH}_2$ 氨甲酰化的 CO_2 不能作为酶的底物。氨甲酰化反应受微碱性 pH (~8) 促进。rubisco 氨甲酰化使 Mg^{2+} 的结合部位得以形成, Mg^{2+} 是参与催化反应的。一旦 Mg^{2+} 与 EC 型 rubisco 结合, 则变成活性形式(ECM 型)。被激活的 rubisco 对 CO_2 的 K_m 约为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。

底物 RuBP 与 rubisco 的无活性型 E 的结合 ($K_d = 20\ \text{nmol/L}$) 比与活性型 ECM 的结合 ($K_m = 20\ \mu\text{mol/L}$) 更牢。因此 RuBP 也是 rubisco 活性的强抑制剂。从 rubisco 的活性部位除去 RuBP 是由 rubisco 激活酶(activase)介导的。rubisco 激活酶是一个调节蛋白, 它能与 E 型 rubisco 结合, 并在消耗 ATP 的反应中促进 RuBP 的释放。然后游离的 rubisco 经氨甲酰化和 Mg^{2+} 的结合变成活性形式(图 27-24)。rubisco 激活酶本身以间接方式受光激活。因此光是 rubisco 的最终激活剂。

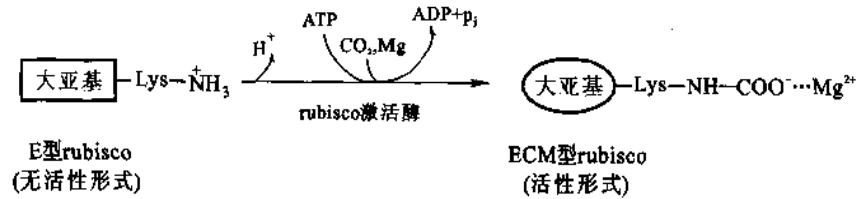


图 27-24 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的活化

rubisco 的氨甲酰化形式不受 RuBP 抑制, 但 2-羧-阿拉伯醇-1-磷酸是一个强抑制剂。它是天然存在的过渡态类似物, 结构类似 rubisco 反应中的 β -酮酸中间物。此化合物在某些植物中暗时能被合成, 因而有时称它为“夜间抑制剂”(nocturnal inhibitor); 当回到光下则被破坏, 使 rubisco 重新激活。

(二) Calvin 循环

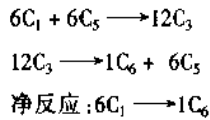
在实现糖的净合成之前, CO_2 固定的直接产物, 3-磷酸甘油酸, 必需进行一系列的转化。糖化合物中己糖特别是葡萄糖占据中心位置。葡萄糖是合成纤维素和淀粉的构件分子。因此, 把葡萄糖看成是 CO_2 固定的主要终产物。在下面的反应方程中以形成 1 分子葡萄糖作为化学计量的基准。

表 27-1 Calvin 循环中的反应系列*

1. 核酮糖二磷酸羧化酶: $6\ \text{CO}_2 + 6\ \text{H}_2\text{O} + 6\ \text{RuBP} \longrightarrow 12\ 3\text{-PG}$	$6(1) + 6(5) \longrightarrow 12(3)$
2. 3-磷酸甘油酸激酶: $12\ 3\text{-PG} + 12\ \text{ATP} \longrightarrow 12\ 1,3\text{-BPG} + 12\ \text{ADP}$	$12(3) \longrightarrow 12(3)$
3. NADP^+ -甘油醛-3-磷酸脱氢酶: $12\ 1,3\text{-BPG} + 12\ \text{NADPH} \longrightarrow$ $12\ \text{NADP}^+ + 12\ \text{G3P} + 12\ \text{P}_i$	$12(3) \longrightarrow 12(3)$
4. 丙糖磷酸异构酶: $5\ \text{G3P} \longrightarrow 5\ \text{DHAP}$	$5(3) \longrightarrow 5(3)$
5. 转二羟丙酮酶: $3\ \text{G3P} + 3\ \text{DHAP} \longrightarrow 3\ \text{FBP}$	$3(3) + 3(3) \longrightarrow 3(6)$
6. 果糖二磷酸酶: $3\ \text{FBP} + 3\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3\ \text{F6P} + 3\ \text{P}_i$	$3(6) \longrightarrow 3(6)$
7. 磷酸葡萄糖异构酶: $1\ \text{F6P} \longrightarrow 1\ \text{G6P}$	$1(6) \longrightarrow 1(6)$
8. 葡萄糖磷酸酶: $1\ \text{G6P} + 1\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 1\ \text{Glc} + 1\ \text{P}_i$ 此途径剩下的反应步骤涉及从剩余的 两个 F6P(12C), 4 个 G3P(12C) 和 2 个 DHAP(6C) 再生 6 个 RuBP 受体 (=30C)	$1(6) \longrightarrow 1(6)$
9. 转羟乙醛酶: $2\ \text{F6P} + 2\ \text{G3P} \longrightarrow 2\ \text{Xu5P} + 2\ \text{E4P}$	$2(6) + 2(3) \longrightarrow 2(5) + 2(4)$
10. 转二羟丙酮酶: $2\ \text{E4P} + 2\ \text{DHAP} \longrightarrow 2\ \text{景天庚酮糖-1,7-二磷酸(SBP)}$	$2(4) + 2(3) \longrightarrow 2(7)$
11. 景天庚酮糖二磷酸酶: $2\ \text{SBP} + 2\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\ \text{S7P} + 2\ \text{P}_i$	$2(7) \longrightarrow 2(7)$
12. 转羟乙醛酶: $2\ \text{S7P} + 2\ \text{G3P} \longrightarrow 2\ \text{Xu5P} + 2\ \text{R5P}$	$2(7) + 2(3) \longrightarrow 4(5)$
13. 磷酸戊糖差向异构酶: $4\ \text{Xu5P} \longrightarrow 4\ \text{Ru5P}$	$4(5) \longrightarrow 4(5)$
14. 磷酸戊糖异构酶: $2\ \text{R5P} \longrightarrow 2\ \text{Ru5P}$	$2(5) \longrightarrow 2(5)$
15. 磷酸核酮糖激酶: $6\ \text{Ru5P} + 6\ \text{ATP} \longrightarrow 6\ \text{RuBP} + 6\ \text{ADP}$	$6(5) \longrightarrow 6(5)$
净反应: $6\ \text{CO}_2 + 18\ \text{ATP} + 12\ \text{NADPH} + 12\ \text{H}^+ + 12\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow$ $\text{Glc} + 18\ \text{ADP} + 18\ \text{P}_i + 12\ \text{NADP}^+$	$6(1) \longrightarrow 1(6)$

* 反应 1 到反应 15 构成导致形成一分子葡萄糖的 Calvin 循环。表中列出催化每步反应的酶以及平衡方程。括号中的数字示出底物或产物分子中的碳原子数目。括号前的数字是为给出平衡的净反应以化学计量形式指出每一步需进行的次数

3-磷酸甘油酸转化为己糖这一系列反应组成 Calvin 循环(表 27-1)。这一系反应实际上是循环的,因为不仅需要作为终产物的糖出现,而且 5C 受体,RuBP,必需再生,以继续 CO₂ 固定。循环中平衡方程可简单地描述为:



式中 C₁ 到 C₆ 表示 1C 到 6C 化合物。6C₁(6CO₂)与 5C₅(RuBP)缩合生成 12 C₃(3-磷酸甘油酸);12C₃ 在 Calvin 循环中经重排形成 1 C₆(己糖),并重新生成 6 C₅(RuBP)受体(图 27-25)。

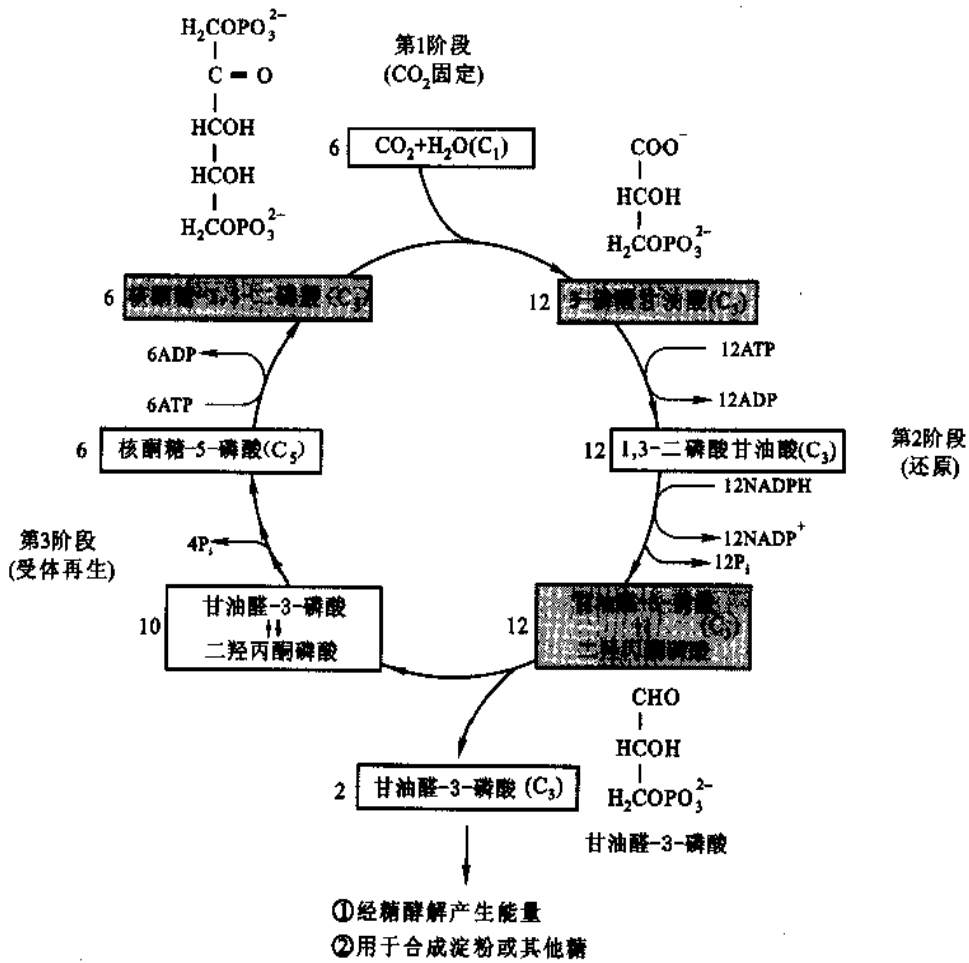


图 27-25 光合生物中 Calvin 循环的 3 个阶段

1. Calvin 循环反应可以分为 3 个阶段(图 27-25)

第 1 阶段是 CO₂ 固定。在 rubisco 羧化酶活性作用下 CO₂ 和它的受体缩合生成不稳定的中间物,然后裂解成 2 分子 3-磷酸甘油酸(见图 27-22)。第 2 阶段是 3-磷酸甘油酸还原。第 1 阶段中的产物 3-磷酸甘油酸被还原成丙糖磷酸,甘油醛-3-磷酸,后者与另一丙糖磷酸,二羟丙酮磷酸,处于平衡之中。第 3 阶段是 RuBP 再生(regeneration)。RuBP 是循环的起始物,CO₂ 的受体,它必需不断地再生才能维持循环的继续。在这阶段,果糖-6-磷酸是一个关键的中间物,它处在导致 RuBP 再生或淀粉合成的分支点上。从果糖-6-磷酸(己糖磷酸)到 RuBP(戊糖二磷酸)的途径中,许多反应与动物细胞的戊糖磷酸途径中从戊糖磷酸转化为己糖磷酸的反应,包括所用的酶都是相同的;但是还原性循环中的戊糖磷酸途径的运行方向与动物细胞中氧化性反应的戊糖磷酸途径相反(第 25 章)。

(1) 第 1 阶段 CO₂ 固定成 3-磷酸甘油酸 这部分内容已在前面“CO₂ 固定与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶”中详细介绍。

(2) 第2阶段3-磷酸甘油酸转变为甘油醛-3-磷酸 第1阶段形成的3-磷酸甘油酸转化为甘油醛-3-磷酸分二步进行,基本上是糖酵解中相应步骤的逆转,只有一点不同,即用于1,3-二磷酸甘油酸还原的核苷酸因子是NADPH,而不是糖酵解中的NADH(图27-25)。叶绿体的基质中含有除磷酸甘油酸变位酶外的所有糖酵解酶,这些基质酶是胞质中存在的相应酶的同工酶;这两套酶催化相同的反应,但它们是不同基因的产物。

第一步,基质的磷酸甘油酸激酶催化磷酸基从ATP转移到3-磷酸甘油酸,生成1,3-二磷酸甘油酸(图27-26,反应②)。第二步在甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化的反应中NADPH提供电子,生成甘油醛-3-磷酸(图27-26,反应③),丙糖磷酸异构酶催化甘油醛-3-磷酸与二羟丙酮磷酸互变(图27-26,反应④)。丙糖磷酸在叶绿体中可以转化为淀粉,贮存后用,或立即外运到细胞质转变为蔗糖以便转运到植物的生长区域。在发育的叶片中相当一部分丙糖磷酸经糖酵解途径被降解,为生长提供额外的能量(见图27-25)。

(3) 第3阶段从丙糖磷酸再生核酮糖-1,5-二磷酸 RuBP的再生从丙糖磷酸开始,涉及甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸的碳架重排。过程中的中间物包括三碳糖、四碳糖、五碳糖、六碳糖和七碳糖。下面讨论中所涉及的反应步骤的编号与图27-26和表27-1中的相同。

反应⑤和⑩由转二羟丙酮酶(transaldolase)或醛缩酶(aldolase)促进;此酶催化甘油醛-3-磷酸与二羟丙酮磷酸可逆缩合(反应⑤),这与糖酵解中的相同(第22章);它也催化赤藓糖-4-磷酸和二羟丙酮磷酸缩合,产生七碳糖,景天庚酮糖-1,7-二磷酸(反应⑩);反应⑨和⑫由转羟乙醛酶(transketolase)催化,它含有硫胺素焦磷酸(TPP,见上册第11章)作为辅基,并需要 Mg^{2+} (第25章)。反应⑨中转羟乙醛酶催化从酮糖磷酸供体(果糖-1,6-二磷酸)将一个羟乙醛基($-CO-CH_2OH$)转给醛糖磷酸受体(甘油醛-3-磷酸),生成赤藓糖-4-磷酸和木酮糖-5-磷酸。在反应⑫中此酶催化景天庚酮糖-1,7-二磷酸和甘油醛-3-磷酸转变为两个戊糖磷酸(木酮糖-5-磷酸和核糖-5-磷酸)。在转羟乙醛酶催化的反应中形成的戊糖磷酸转变为核酮糖-5-磷酸(反应⑬和⑭)。核酮糖-5-磷酸处在循环的最后一步(反应⑮),在磷酸核酮糖激酶的催化下被磷酸化为RuBP。这是途径中第三次耗能的反应,另两次耗能反应在反应②和③(图27-25和27-26)。

2. 为说明己糖净合成对 Calvin 循环反应进行平衡

图27-26为说明己糖(葡萄糖)净合成,进行碳架重排平衡。5个甘油醛-3-磷酸分子转变为二羟丙酮磷酸。其中3个二羟丙酮磷酸与3个甘油醛-3-磷酸经转二羟丙酮酶反应缩合成3个己糖,果糖-1,6-二磷酸形式(图27-26反应④)。(回忆一下,在糖酵解中转二羟丙酮酶反应的 ΔG° 是23.9 kJ/mol。因此在Calvin循环中以“逆向”进行的转二羟丙酮酶反应在标准条件下热力学上应是有利的。)1个果糖-1,6-二磷酸经图27-26中反应⑦和⑧转变为葡萄糖,这是Calvin循环图解所设想的产物。剩下的30个碳通过图27-26反应⑨到⑮重新组织成6个RuBP。这就是前面介绍的第3阶段的反应系列。图27-26中反应⑩是景天庚酮糖-1,7-二磷酸酶参与的。此磷酸酶为植物所特有,它产生景天庚酮糖-7-磷酸,是转羟乙醛酶的底物。催化最后一步反应的磷酸核酮糖激酶也是植物所特有的。6个 CO_2 固定成一个己糖的净转化消耗18个ATP和12个NADPH(见表27-1)。

(三) CO_2 固定的调节

植物细胞含有线粒体,能进行细胞呼吸(糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化),为在暗时提供能量。糖酵解和三羧酸循环进行的反应是糖的分解,从糖到 CO_2 ,而 CO_2 固定途径进行的是糖的合成,从 CO_2 到糖;前者主要是夜间发生的,后者是在白天进行的。植物体内糖的合成和分解是如何协调控制的?各种调节机制都是保证只有当光合作用的光反应产生ATP和NADPH时Calvin循环才运转。否则只能靠消耗分解代谢产生的能量,将在 CO_2 到糖和糖到 CO_2 之间进行无为的循环。协调控制主要是通过调节Calvin循环解决的。在这种调节中Calvin循环的关键酶的活性与光合产率是一致的。实际上这些酶都间接地对光激活作出反应。当有可利用的光能以产生 CO_2 固定所需的ATP和NADPH时,Calvin循环就运行,暗中不能产生ATP和NADPH时, CO_2 固定则停止。叶绿体中调节Calvin循环关键酶的光诱导变化包括①基质的

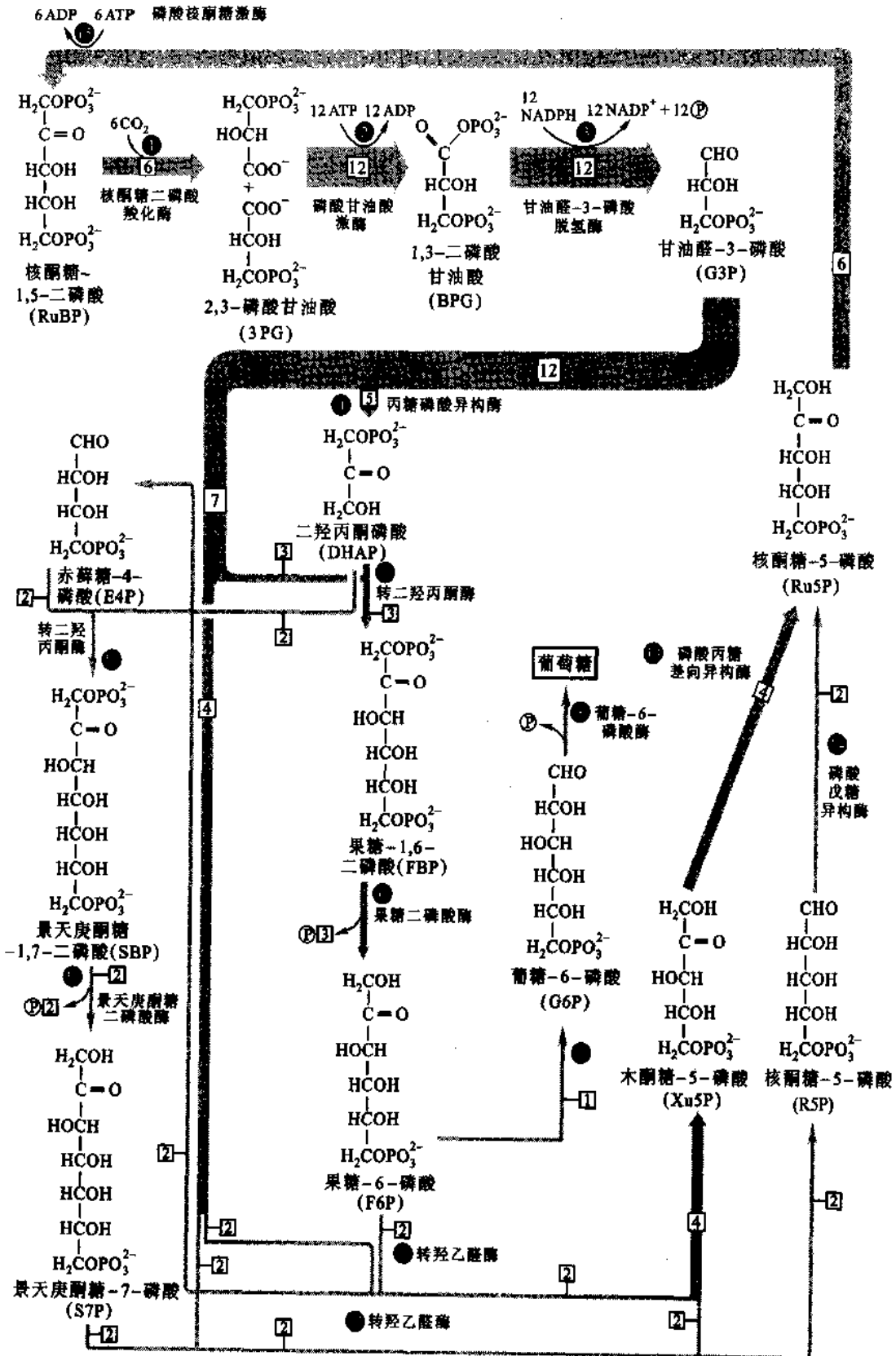


图 27-26 Calvin 循环中的详细反应步骤

每步中与箭头相连的方框内数字是参与产生一分子葡萄糖的一轮循环反应的分子数目

pH 改变, ②还原力的产生, ③ Mg²⁺ 从类囊体腔外流。

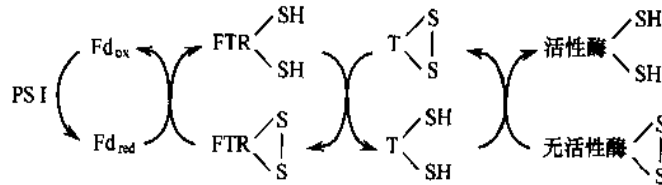
1. 叶绿体区室内光诱导的 pH 改变

在前面光反应部分曾讲到, 叶绿体的照光导致光驱动的质子跨膜泵入类囊体腔, 它引起基质和类囊体腔中 pH 的改变。基质的 pH 升高, 一般可达到 pH 8。因为 rubisco 和 rubisco 激活酶在 pH 8~9 时活性强,

所以当基质 pH 升高时 CO₂ 固定反应被激活。果糖 - 1,6 - 二磷酸酶(表 27 - 1, 反应 6), 核酮糖 - 5 - 磷酸激酶(反应 15) 和甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(反应 3), 它们的最适 pH 都在碱性范围。因此, 光诱导的基质 pH 升高引起这些酶的活性增加。

2. 还原力的光诱导产生

叶绿体照光引发光合电子传递, 并偶联还原力的产生, 包括还原型铁氧还蛋白和 NADPH。介入 CO₂ 固定的几种酶, 特别是果糖 - 1,6 - 二磷酸酶、景天庚酮糖 - 1,7 - 二磷酸酶和核酮糖 - 5 - 磷酸激酶。当它们的 Cys - Cys 二硫键被还原成半胱氨酸的巯基时, 这些酶则被激活。还原型硫氧还蛋白(thioredoxin)介导此反应。此酶是一个小蛋白(M_r 12 × 10³), 还原态时具有一对巯基(-SH HS-), 当氧化时形成一个二硫桥(-S-S-)。硫氧还蛋白在 NADPH 或还原型铁氧还蛋白(Fd_{red}) 和光调节的酶之间起着氢载体的作用, 它们之间的关系(Calvin 循环酶的光诱导途径)如下图所示:



图中 Fd_{red} 提供 e⁻, 在 FTR(铁氧还蛋白 - 硫氧还蛋白还原酶)催化的反应中用于还原硫氧还蛋白(T), 因此在光下还原型 T 丰富。它用于激活 Calvin 循环的酶。例如照光时, 磷酸核酮糖激酶的活性增加 100 倍。相反, 几种降解酶当被硫氧还蛋白还原时它们的活性受到抑制。

3. 光诱导的 Mg²⁺ 从类囊体腔外流

发生光驱动的质子跨膜泵入类囊体腔时, 同时伴有 Mg²⁺ 从腔中外流到基质。Mg²⁺ 的这种外流对由于 H⁺ 流入引起的电荷积累略有平衡作用, 它是叶绿体膜电势变化比线粒体小的一个原因。核酮糖 - 1,5 - 二磷酸羧化酶和果糖 - 1,6 - 二磷酸酶都是 Mg²⁺ 激活的酶。Mg²⁺ 流入基质是由于光驱动的质子泵送的结果, 它在这些关键步骤中促进 CO₂ 固定的途径。活性测定已证明, 果糖 - 1,6 - 二磷酸酶可以是 Calvin 循环中的限速步骤。果糖 - 1,6 - 二磷酸酶作为叶绿体中光诱导变化对象的重复主题一事表明此酶是 Calvin 循环中控制的关键点。

六、光呼吸和 C₄ 途径

(一) 核酮糖二磷酸加氧酶反应: 光呼吸

正如核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶(rubisco)名称所指的, 它还能催化另一反应, 即 O₂ 代替 CO₂ 作为底物与 RuBP 发生加成(图 27 - 27)。加氧酶活性的产物是 3 - 磷酸甘油酸和磷酸乙醇酸(phosphoglycolate)。磷酸乙醇酸去磷酸化转变为乙醇酸, 并转移到另一细胞器过氧化物酶体(Peroxisome), 在这里被氧化成乙醛酸(glyoxylate)和过氧化氢。乙醛酸经转氨作用生成甘氨酸(图 27 - 28B)。甘氨酸被转移到线粒体中, 由两个甘氨酸缩合成一个丝氨酸, 同时释放出一个 CO₂ 和一个 NH₃; 此步骤是光呼吸中 CO₂ 的来源(图 27 - 28C)。可

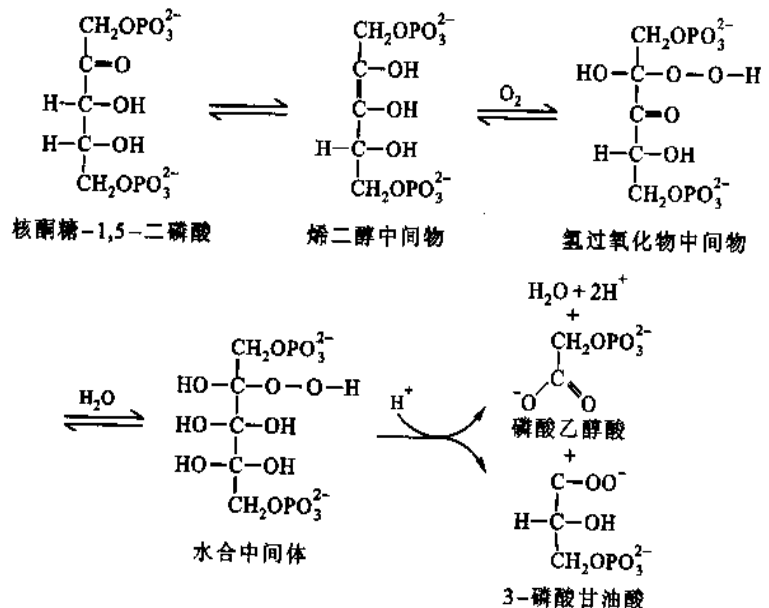


图 27 - 27 RuBP 与 O₂ 的加成

见加氧酶催化的反应没有碳的净积累。相反,还要消耗被羧化酶活性固定的有机碳,以热的形式散失掉。

看来 rubisco 在同一个活性部位可以结合 CO₂ 或 O₂ 的特性在进化的早期就出现了,那时地球的大气层中或许还没有或很少有氧,所以 rubisco 反应不会产生磷酸乙醇酸。随着光合作用产生的氧在大气中积累,代谢上浪费的磷酸乙醇酸也随之积累。rubisco 对 CO₂ 的 K_m 约为 10 μmol/L,对 O₂ 的 K_m 约 350 μmol/L。现代大气层含 O₂ 约 20%,但 CO₂ 只有 0.003% 左右(在室温下与大气平衡的基质含 CO₂ 约 10 μmol/L, O₂ 约 250 μmol/L)。在这种给定的条件下, rubisco 的羧化酶活性对加氧酶活性的比率约为 3:1。光合作用过程中随着 CO₂ 的消耗,叶片气隙中的 O₂ 比例增加。此外,由于温度升高 rubisco 对 CO₂ 的亲合力下降,加重该酶倾向催化浪费的加氧酶反应。在进化中产生一条从磷酸乙醇酸中抢救碳的途径称乙醇酸途径(图 27-28)。与光有关的 rubisco 加氧酶活性加上此补救途径形成消耗 O₂, 产生 CO₂ 的过程。因此,称它为光呼吸(photorespiration)。此过程与一般的呼吸不同,不能贮存能量。光呼吸可以使生物量的形成减少 50% 以上。C₃ 植物中光合作用固定的碳相当一部分被光呼吸消耗掉。所谓 C₃ 植物是指只具有 Calvin 循环(也称 C₃ 循环)的植物。光呼吸也导致某些植物特别是热带和亚热带的禾本科植物如玉米、甘蔗和高粱等对它产生适应性;这些植物(称 C₄ 植物,见下面)的光合效率比 C₃ 植物(如菠菜、小麦和水稻等)高出二倍。

(二) CO₂ 固定的 C₄ 途径

如前所述热带禾本科植物有对付光呼吸的手段(适应性)。应用¹⁴CO₂ 作为示踪物的研究指出,在这些植物中被标记的第一个有机中间物不是 3C 化合物,而是 4C 化合物。20 世纪 60 年代澳大利亚学者 Hatch M D 和 Slack C R 首先发现了这一 4C 产物,因此 CO₂ 固定的 C₄ 途径也被称为 Hatch - Slack 途径。C₄ 途径并不是代替 Calvin 循环的反应系列,也不是一种净 CO₂ 固定的路线图。C₄ 途径是作为 CO₂ 的收集、浓缩和转运的系统。将 CO₂ 从氧含量较丰富的叶片表面转运到内部的细胞,这里 O₂ 浓度较低,与 CO₂ 竞争 rubisco 反应的能力较弱。因此 C₄ 途径是保证 rubisco 反应离开高氧浓度的细胞区室以避免或减小光呼吸发生的一种方式。C₄ 途径涉及两种类型的细胞:叶肉细胞(mesophyll cell)和维管束鞘细胞(bundle sheath cell),前者是邻接叶片气隙的细胞,后者是环绕维管束组织的细胞(图 27-29)。叶肉细胞在富含 O₂ 的叶片表面(气隙)吸收 CO₂,并用它羧化磷酸烯醇丙酮酸(PEP)生成草酰乙酸(OAA),这一步是在 PEP 羧化酶催化下进行的(图 27-30)。然后被 NADPH 特异的苹果酸脱氢酶还原为苹果酸或通过转氨作用转变为天冬氨酸。4C 的 CO₂ 载体(苹果酸或天冬氨酸)通过胞间连丝被转运到邻近的维管束鞘细胞,在这里脱羧生成 3C 产物丙酮酸,并释放出

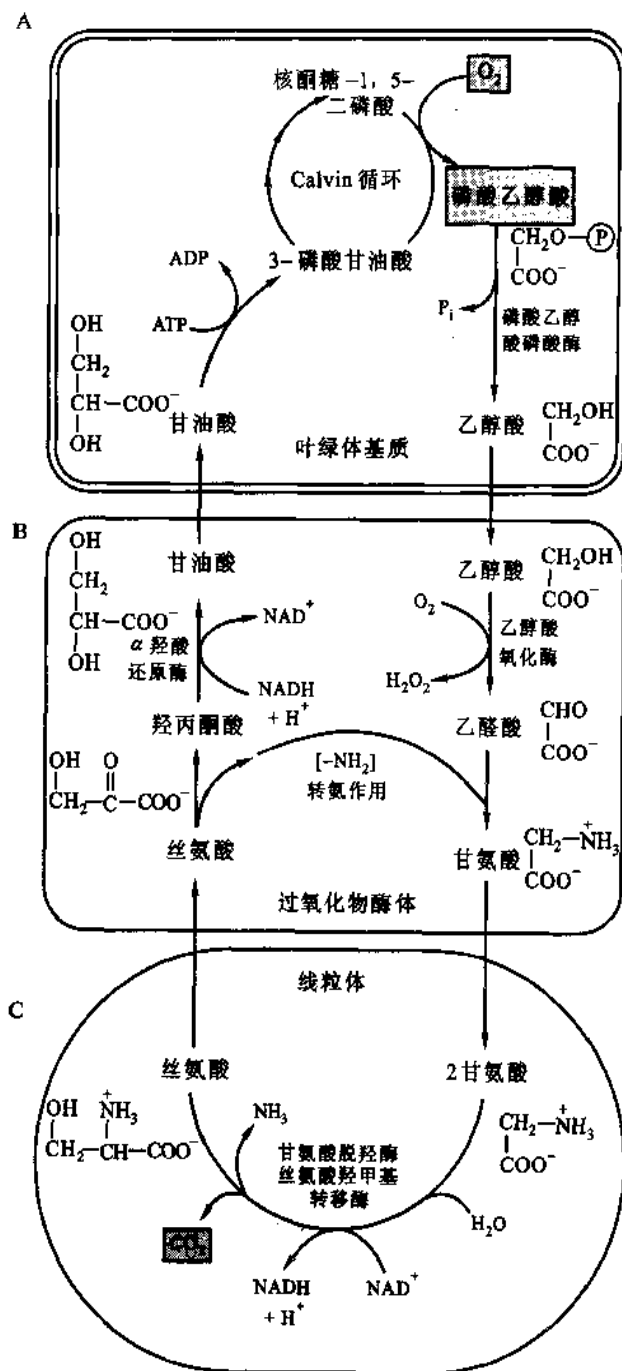


图 27-28 光呼吸中的乙醇酸途径

CO₂。CO₂ 进入与 C₃ 植物中完全相同的 Calvin 循环被固定为有机碳,而丙酮酸返回叶肉细胞,并重新转变为 PEP,准备接受另一个 CO₂(图 27-30)。利用 C₄ 途径的植物称为 C₄ 植物,它与 C₃ 植物的不同主要是吸收 CO₂ 的方式不一样。

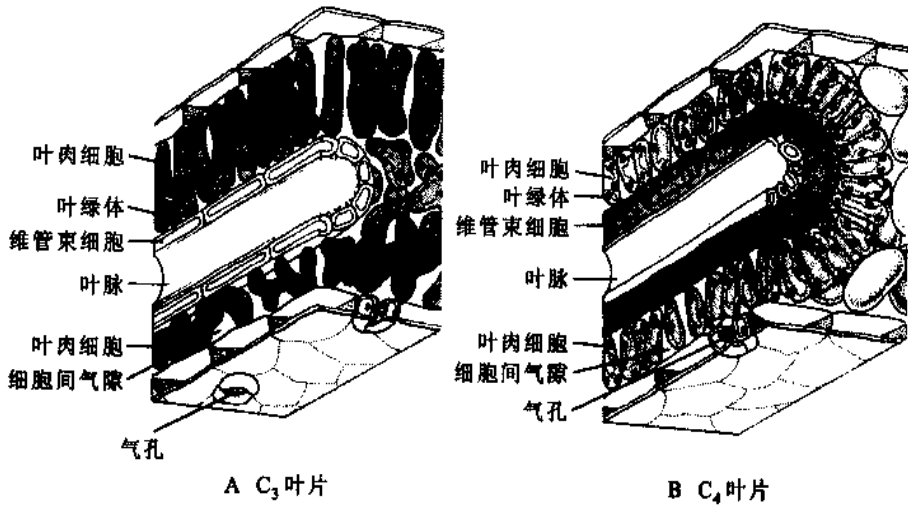


图 27-29 C₃ 和 C₄ 植物叶片的结构差别

A. C₃ 植物的叶肉细胞是 Calvin 循环的光合作用部位; B. C₄ 植物先在叶肉细胞中利用 C₄ 途径将 CO₂ 固定成 4C 化合物,然后这些化合物被运送到维管束鞘细胞,在这里进行 Calvin 循环

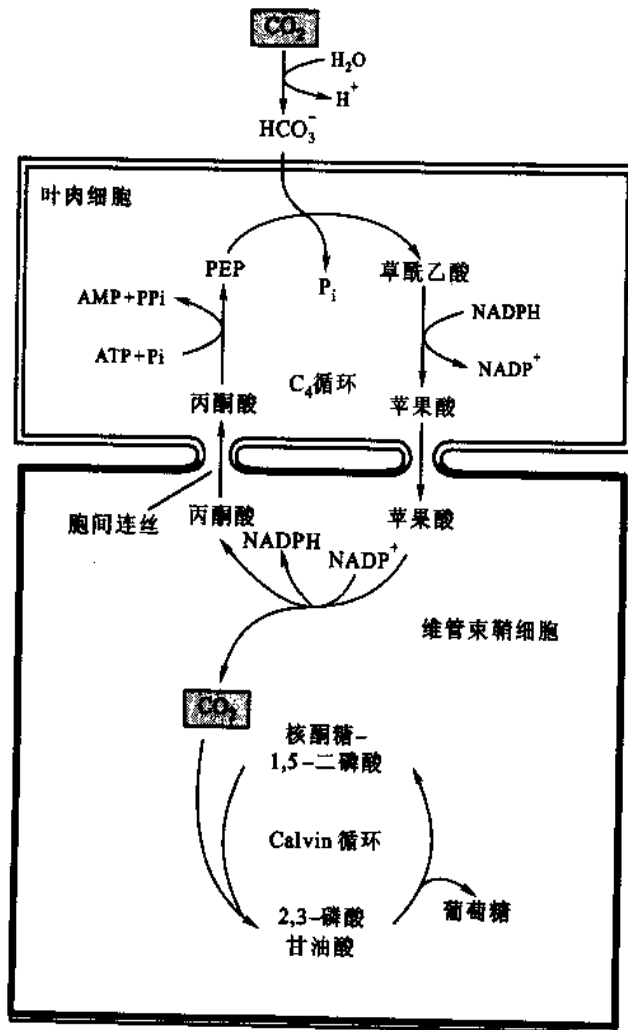
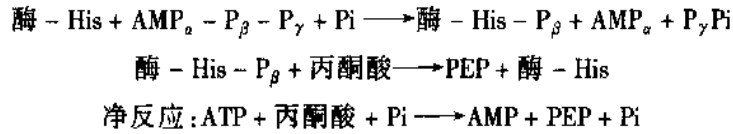


图 27-30 CO₂ 固定的 C₄ 途径

借苹果酸或天冬氨酸在细胞间转运 1 个 CO_2 需要消耗两个高能磷酸键。这些键能用于丙酮酸的磷酸化,此反应是由丙酮酸磷酸二激酶(pyruvate phosphate dikinase)催化的,其产物是 PEP、AMP 和 PPi (焦磷酸)。这是一个唯一的催化一个 ATP 分子的 β - 和 γ - 磷酸基同时磷酸化两个不同的底物,使丙酮酸转变为 PEP, Pi 转变为 PPi 的磷酸转移酶(phosphotransferase)。反应机制涉及一个酶磷酸组氨酸中间物。ATP 的 γ - 磷酸基被转移给 Pi , 而 ATP 的 γ - 磷酸基与酶 - His 发生加成,形成酶 - His - P 复合体:



丙酮酸磷酸二激酶受一个苏氨酸残基的可逆磷酸化调节,非磷酸化形式是活性酶。有趣的是在此可互变的调节中 ADP 是磷酸基的供体。尽管 C_4 植物每固定一个 CO_2 要比 C_3 植物(每合成一个丙糖磷酸消耗 9 个 ATP)多消耗两个 ATP(两个高能磷酸键),但是在高光强度,高温度的热带条件下, C_4 植物的光合效率比 C_3 植物高(C_3 植物随温度升高其光呼吸增强, CO_2 固定效率下降)。热带甘蔗种植园代表集光效率的至高点。落在甘蔗园的人射光约 8% 的能量以固定 CO_2 成糖的形式被转变为化学能。对于非栽培植物面积光合效率只有 0.2%。开展光呼吸研究的目的是想通过控制这个浪费的过程以达到提高农业生产效率。已知的 230 000 种植物中只有 1% 是 C_4 植物,而且大多数是生长在炎热地带。

(三) 景天酸代谢

肉质植物如仙人掌科(Cactaceae)和景天科(Crassulaceae)原本生长在半干旱的热带沙漠环境,它们把 CO_2 吸收和 CO_2 固定在时间上是分开进行的。 CO_2 (以及 O_2)通过气孔(stomata)进入叶片,水蒸气也是通过开放的气孔逃逸。在非肉质植物中气孔是白天开放,此时光驱动光合细胞固定 CO_2 , 而夜间关闭。肉质植物在白天炎热时气孔不开放,因为干旱地区珍贵水分的任何丢失,都将是对它们的一种致命打击。因此,这些植物只有在夜间开放气孔,吸收 CO_2 ; 这时温度较低,水分丢失较少。吸入的 CO_2 在 PEP 羧化酶催化下直接与 PEP 结合生成草酰乙酸(OAA)。OAA 在苹果酸脱氢酶存在下还原为苹果酸,并在液泡中贮存至天明。在白天苹果酸从液泡中释放出来,经脱羧产生 CO_2 和一个 3C 产物丙酮酸。产生的 CO_2 参与 Calvin 循环并固定成有机碳。因为此过程涉及有机酸(OAA、苹果酸),并且是景天科肉质植物所共有的特点,因此被称为景天酸代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)。能进行景天酸代谢的植物称为 CAM 植物。在 CAM 植物与 C_4 植物中 CO_2 都是通过 C_4 途径进入 Calvin 循环被固定成糖的。它们之间的主要区别是: CAM 植物中 CO_2 最初的羧化(CO_2 的浓缩或积累)和糖的合成(Calvin 循环)发生在同一细胞内,但时间不同;而 C_4 植物中这些过程发生在同一时间,但空间不同也即发生在两种不同的细胞中。

提 要

光合作用是含光合色素的植物细胞叶绿体和细菌载色体,在日光下利用无机物(CO_2 、 H_2O 和 H_2S 等)合成有机物($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$),并释放出 O_2 或其他物质(如 S 等)的过程。

光合作用所需的光能处在可见光谱范围,可见光光子的能量为 170 ~ 300 kJ/mol。吸收光能的色素可分为两类:主要色素(叶绿素 a 和细菌叶绿素)和辅助色素(藻胆素、胡萝卜素和叶黄素等)。光合色素在光合膜上被组织成集光复合体(LHC)和光化学作用中心复合体(光系统)。

光合细菌只有一个作用中心。它们的光合系统结构和功能相对地比较简单。光合能量转换的机制在紫色细菌中了解得最清楚。紫色细菌作用中心的三维结构和电子传递过程都已在分子细节上得到了阐明。

高等植物和藻类含有两个不同的作用中心或光系统:PS I 和 PS II。在 PS II 中的作用中心色素叶绿素 a“特殊对”是 P680,在 PS I 中是 P700。集光复合体天线分子吸收的光能通过激子传递机制被汇集到作用中心叶绿素 a 特殊对。受激发的叶绿素 a 分子(特殊对中的一个)把高能电子传递给相邻的电子受体,自

身变成正离子($P680^+$ 和 $P700^+$)。这样光激发引起电荷分离,光能转换为化学能,包括氧化还原链的电子传递,NADPH和ATP的形成。光能转换为化学能是光合作用的实质。

PS II和PS I是以串联方式起作用的。由P680和P700吸收的光能驱动电子从 H_2O 流到 $NADP^+$ 。P680激发的结果是位于类囊体腔侧表面上的放氧复合体(锰离子串)从 H_2O 中吸取电子,并形成 O_2 和质子。质子留在腔内,产生一部分质子动势。电子通过PS II后经细胞色素 b_6f 复合体从膜内基质侧被转运到类囊体腔的质体蓝素(可溶性电子载体)。同时另一些质子借助Q循环跨膜从基质泵送到腔内。

电子被质体蓝素体传递到PS I。光系统I中激发的电子可以有两种去向:一是按非循环电子流途径经一系列载体,最后到达Fd:NADP⁺氧化还原酶,催化 $NADP^+$ 还原为NADPH。二是按循环电子流途径返回PS I中的 $P700^+$,并伴随一些质子从基质跨膜泵送到腔内。循环电子流过程不涉及PS II也无NADPH和 O_2 的形成。

类囊体膜对阴离子是可通透的,因此膜电势很小,质子动势主要决定于质子梯度(腔内pH 5.0,基质pH~8.0, ΔpH 3.0),跨类囊体膜的pH梯度主要用于ATP合成。光反应阶段产生的ATP和NADPH用于一系列酶促反应(Calvin循环)使 CO_2 转化为糖。

在 C_3 植物中 CO_2 固定(暗反应)是由核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(rubisco)催化的,反应在叶绿体的基质中进行。 CO_2 和核酮糖-1,5-二磷酸缩合并形成2分子3-磷酸甘油酸,后者是 CO_2 固定的最初产物。因为它含有3个碳原子,故称 C_3 途径。生成的3-磷酸甘油酸去向复杂,一部分被转变为蔗糖或淀粉;一部分用于重新生成核酮糖-1,5-二磷酸,参与Calvin循环。

在 C_4 植物中 CO_2 最初在外部的叶肉细胞中通过与磷酸烯醇丙酮酸反应被固定,这样产生的4碳分子被转运到内部的微管束鞘细胞,在这里释放 CO_2 ,并用于Calvin循环。这些反应组成 C_4 途径。因此 C_4 植物,即使在大气 CO_2 浓度很低时,其光合效率仍然很高。

光合作用总是伴随着光呼吸,光呼吸在光下发生,消耗 O_2 并把一部分核酮糖-1,5-二磷酸转变为 CO_2 。

习 题

1. 根据放氧测定绿色植物的光合作用速率当用680 nm波长的光照射时比用700 nm光时高,但用这两种光一起照射时给出的光合作用速率比单独使用这两种波长光中的任一种光时高。请解释。

2. 光系统I中处于基态的 $P700$, E^0 为+0.4 V,当受700 nm光激发时转变为 $P700^+$, E^0 为-1.0 V。在此光反应中 $P700$ 捕获光能的效率是多少? [79%]

3. 当光系统I在标准条件下吸收700 nm红光时 $P700$ 的标准还原电势 E^0 由+0.4 V变为-1.2 V。被吸收的光能有百分之多少以NADPH($E^0 = -0.32$ V)形式被贮存? [45%]

4. 在无ADP和 P_i 存在下用光照射菠菜叶绿体,然后停止照光(在暗处),加入ADP和 P_i 。发现在短时间内有ATP合成。请解释原因。

5. 如果水的光诱导氧化反应(引起放氧)的 ΔG^0 为-25 kJ/mol。光系统II中光产生的原初氧化剂的 E^0 值是多少? [+0.88 V]

6. 在充分照光下,25°C, pH7的离体叶绿体中ATP、ADP和 P_i 的稳态浓度分别为3 mmol/L、0.1 mmol/L和10 mmol/L。
(a) 在这些条件下,合成ATP反应的 ΔG 是多少? (b) 在此叶绿体中光诱导的电子传递提供ATP合成所需的能量(通过质子动势),在这些条件下合成ATP所需的最小电势差(ΔE^0)是多少? 假设每产生1分子ATP要求 $2e^-$ 通过电子传递链。
[(a) $\Delta G = 50.3$ kJ/mol; (b) $\Delta E^0 = 0.26$ V]

7. 如果非循环光合电子传递导致 $3H^+/e^-$ 的跨膜转移,循环光合电子传递导致 $2H^+/e^-$ 的跨膜转移。问(a)非循环光合磷酸化的和(b)循环光合磷酸化的ATP合成效率(以每合成一个ATP所需吸收的光子数表示)是多少?(假设 CF_1CF_0 ATP合酶产生1ATP/ $3H^+$)。[(a) 2 $h\nu$ /ATP; (b) 1.5 $h\nu$ /ATP]

8. 真核光养生物非循环光合电子传递中ATP/ $2e^-$ 的实际比值并不确定。试计算从光系统II到光系统I的光合电子传递中ATP/ $2e^-$ 的最大理论比值。假设在细胞条件下,生成ATP的 ΔG 为+50 kJ/mol,并假设 $\Delta E \approx \Delta E^0$ 。(提示: $P680^+/P680$ 电对和 $P700^+/P700$ 电对的 E^0 分别为-0.6 V和+0.4 V)[3.9]

9. 如果使用碳1位上标记 ^{14}C 的核酮糖-5-磷酸作为暗反应的底物。3-磷酸甘油酸的哪位碳将被标记? [碳3]

10. 在 1 轮 Calvin 循环中将有 $6 \mu\text{mol } ^{14}\text{CO}_2$ 和 $6 \mu\text{mol}$ 未标记的核酮糖 - 1,5 - 二磷酸 (RuBP) 发生反应, 产生 $1 \mu\text{mol}$ 葡萄糖 - 6 - 磷酸, 并重新生成 $6 \mu\text{mol}$ RuBP。问: (a) 在重新生成的 RuBP 中哪两个碳原子将不被标记; (b) 在重新生成的 RuBP 中其他 3 个碳原子各自被标记的百分数是多少? [(a) C3 和 C4 不被标记; (b) $1/6$ 在 C1, $1/6$ 在 C2, $3/6$ 在 C3。其余 $1/6$ 被等分地标记在葡萄糖 - 6 - 磷酸的 C3 和 C4 上]

主要参考书目

1. 沈允钢. 地球上最重要的化学反应——光合作用. 北京: 清华大学出版社, 2000
2. Hall D O, Rao K K 著. 光合作用. 第 3 版. 张永平译. 北京: 科学出版社, 1984
3. Garrett R H, Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed. Saunders College Publishing, 1999
4. Stryer L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1995
5. Nelson D L, Cox M L. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
6. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. 2nd ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1990

(徐长法、王兰仙)

第 28 章 脂肪酸的分解代谢

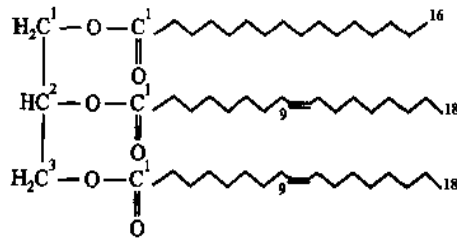
脂肪酸对生物体有四种重要功能,其一,脂肪酸是磷脂和糖脂的组成单元,这些分子又是生物膜的组成成分;其二,脂肪酸以共价键与糖蛋白的蛋白质部分相接,经过修饰的这个糖蛋白在脂肪酸残基的引导下指向膜的靶标位置;其三,脂肪酸是燃料分子,它们以三脂酰甘油形式贮存起来;其四,脂肪酸的某些衍生物担当着激素及胞内信使的职能。本章将着重讲述脂肪酸的氧化分解及其相关的化合物酮体。

长链脂肪酸的氧化是动物、许多原生生物和一些细菌获取能量的主要途径。在脂肪酸氧化过程中,电子的转移通过线粒体呼吸链,推动 ATP 合成,并产生乙酰 - CoA(乙酰辅酶 A)。乙酰 - CoA 经过柠檬酸循环产生二氧化碳,并进一步实现能量贮存。脊椎动物中,乙酰 - CoA 在肝脏会转化为酮体,这是一种可溶于水的燃料,当葡萄糖不能供应时,它可向脑和其他组织提供能量。在高等植物中,脂肪酸氧化产物乙酰 - CoA 首先用作生物合成的前体,其次才用为燃料。脂肪酸氧化的生物功能尽管因不同生物体有所差异,但它的基本反应机制都是相同的。

讲述将从概述脂肪酸的来源和它们是经过怎样的途径实现它的氧化开始,重点是脊椎动物。脂肪酸氧化的化学步骤可分为三步:一是长链脂肪酸降解为两个碳原子单元,即乙酰 - CoA。二是乙酰 - CoA 经过柠檬酸循环氧化成 CO_2 。三是从还原的电子载体(electron carrier)到线粒体呼吸链的电子传递。

一、脂质的消化、吸收和传送

三脂酰甘油(triacylglycerol)又称为三酰甘油,或脂肪(中性脂肪)是脂肪酸的甘油三脂,例如,由一个软脂酸(棕榈酸, palmitic acid)和两个油酸(oleic acid)形成的三脂酰甘油结构式如下:



化学命名为 1 - 软脂酰 - 2,3 - 二油酸 - 甘油

三脂酰甘油在人类的饮食脂肪中,以及作为代谢能量的主要贮存形式中约占 90%。成人每天平均摄入的脂肪大约为 60 ~ 150 g。脂肪可完全氧化成为 CO_2 和 H_2O ,由于脂肪分子中绝大部分碳原子和葡萄糖相比,都处于较低的氧化状态,因此脂肪氧化代谢产生的能量按同等重量计算比糖类或蛋白质要高出 2 倍以上(表 28 - 1)。

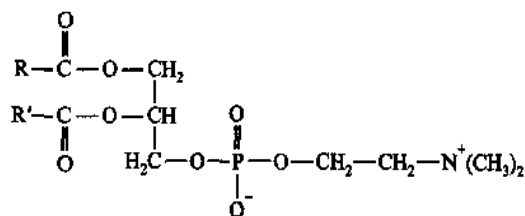
表 28 - 1 食物成分含有的能量

成分	$\Delta H(\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}\text{干重})$
糖类	16
脂肪	37
蛋白质	17

脂肪是非极性化合物,它以无水状态(anhydrous state)贮存,而贮能的糖原(glycogen)是极性化合物,它以水合形式(hydrated form)贮存。因此按同等重量计算,脂肪的代谢能量实际高达糖原的 6 倍。

(一) 脂肪的消化发生在脂质 - 水的界面处

由于三脂酰甘油是水不溶性的,而消化作用的酶却是水溶性的,因此三脂酰甘油的消化是在脂质 - 水的界面处发生的。三脂酰甘油的消化速度取决于界面的表面积,在小肠蠕动的“剧烈搅拌”下,特别是在胆汁盐的乳化作用下,消化量大幅提高。胆汁盐是强有力的,用于消化的“去污剂”,它是在肝脏中合成的,经过胆囊分泌进入小肠。脂肪的消化和吸收主要在小肠中进行。另外,肝脏还产生磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline)它的亲水和疏水基分居分子的两端,也有助于脂肪的乳化。



磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline)

R, R': 脂肪酸单元

胃产生胃脂肪酶(gastric lipase),它在胃的低 pH 环境中是稳定、有活性的。脂肪的消化实际开始于胃中的胃脂肪酶,彻底的消化是在小肠内由胰脏分泌的胰脂肪酶(pancreatic lipase)完成。胰脂肪酶消化三脂酰甘油,使它转化为 2-单酰甘油(2-acyl glycerol)和脂肪酸。辅脂肪酶(colipase)是一个小的蛋白质,相对分子质量为 12 000,它产生于胰脏,是胰脂肪酶活性所必需的。(pancreatic juice)还含有酯酶(esterase),它作用于单酰甘油、胆固醇酯和维生素 A 的酯。另外,胰脏还分泌磷脂酶(phospholipase),它催化磷脂的 2-酰基的水解。

胰脂肪酶对三酰甘油催化的作用点在 1-和 3-位,随之形成 1,2-二酰甘油(1,2-diacylglycerols)和 2-单酰甘油(2-acylglycerols)与此同时得到脂肪酸的 Na^+ 和 K^+ 盐(肥皂)。肥皂是两亲性的(amphipathic),它既亲水又亲脂,所以可使脂肪乳化。脂肪酶(lipase)也简称脂酶,与很多蛋白质一样,在一些界面,例如,脂质 - 水界面中会很快地变性。辅脂肪酶与脂酶形成 1:1 的复合物,可以抑制脂酶在界面的变性,并把它固定到脂质 - 水界面上。

脂质中的磷脂(phospholipide)可被磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2)催化降解,水解发生于 C(2)处,产生脂肪酸及相应的溶血磷脂(lysophospholipid)(图 28-1),例如,上述的磷脂酰胆碱,它也是一个强力的“去污剂”。

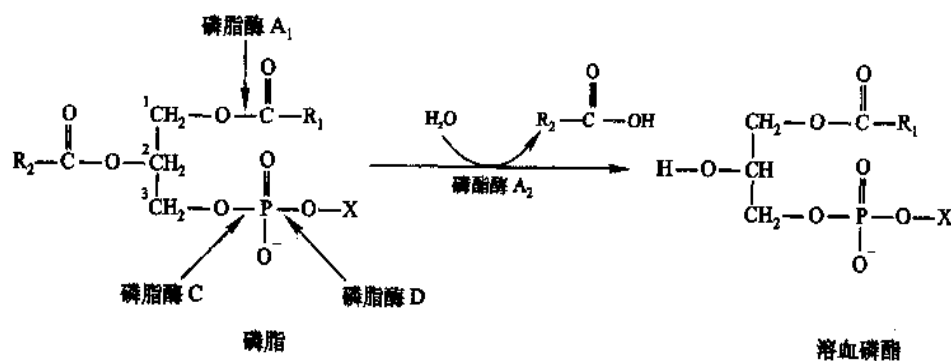


图 28-1 磷脂酶 A_2 水解磷脂于 C(2)位,生成溶血磷脂

胰磷脂酶 A_2 (pancreatic phospholipase A_2)与胰脂肪酶一样,在界面上优先地进行催化反应。牛的这个酶的 X 射线结构分析表明,该酶的活性部位与胰凝乳蛋白酶(chymotrypsin)相像,有一个“凹陷”,由一个环和两侧的鳞状片围绕。鳞状片由 21 个表面残基构成。据推断,其侧链伸向磷脂聚合物微团并与之结合。NMR 测定指出,在这个微团内可能有一构象恰与活性部位互补。

(二) 胆汁盐促进脂类在小肠中被吸收

胆汁盐包括胆酸、甘氨酸胆酸和牛磺胆酸是胆固醇的氧化产物(图 28-2),它的极性端暴露于水构成外侧,而内侧一端是非极性的。这样就形成一个胶质颗粒,即微团。具体讲,它的疏水部分指向内侧,羧基和羟基部分指向外侧。它不仅在这

样的特性,而且还作为载体把脂肪从小肠腔移送到上皮细胞。小肠对脂肪的吸收即在这里发生。对于游离脂肪酸、单酰甘油和脂溶性维生素,微团也参与它们的吸收。

对胆管堵塞的患者进行检查证实:小肠只吸收了少量的脂肪,在粪便中可看到有较多的脂肪水解产物(脂肪痢)。可以说,胆汁盐不仅有助于脂肪的吸收,而且有助于脂肪消化产物的吸收。

(三) 吸收

脂肪经消化后的产物脂肪酸和 2-单酰甘油由小肠上皮黏膜细胞吸收随后又经黏膜细胞转化为三脂酰甘油,后者和蛋白质一起包装成乳糜微粒(血尘)(chylomicron),释放到血液,又通过淋巴系统运送到各种组织。短的和中等长度链的脂肪酸在膳食中含量不多,它们被吸收进入门静脉血液,并以游离酸形式被送入肝脏。即短链和中长链的脂肪酸绕过了形成脂蛋白的途径。它们的这种特性可用于药物治疗学的开发。

在脂肪组织和骨骼肌毛细血管中在脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)的作用下,乳糜微粒的组分三脂酰甘油被水解为游离脂肪酸和甘油。产生的游离脂肪酸被这些组织吸收,同时甘油被运送到肝和肾脏,在这里经甘油激酶(glycerol kinase)和甘油-3-磷酸脱氢酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)作用,转化为糖酵解的中间产物二羟丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate)。

贮存在脂肪组织内的三脂酰甘油的转移包含有以下内容,即:在激素敏感的三脂酰甘油脂肪酶(hormone-sensitive triacylglycerol lipase)的作用下,被水解为甘油和游离脂肪酸。被释出的游离脂肪酸进入血流,并与清蛋白(albumin)结合。后者是一个可溶性的相对分子质量为 66 500 的单体蛋白质(monomeric protein),它构成血清蛋白的接近一半。在清蛋白不存在下,游离脂肪酸的最大溶解度为 10^{-6} mol/L。在此浓度以上,游离脂肪酸分子即形成微团,起着像“去污剂”的作用,破坏蛋白质及膜的结构,因此必呈毒性。但脂肪酸对脂肪酸-清蛋白复合物的有效溶解度最高不超过 2 mmol/L。尽管如此仍有罕见患者得无清蛋白血症(analbuminemia),清蛋白水平严重下降。但此症患者并无明显副作用的症状。很明显,患者的脂肪酸与某些其他的血清蛋白结合而被运送。

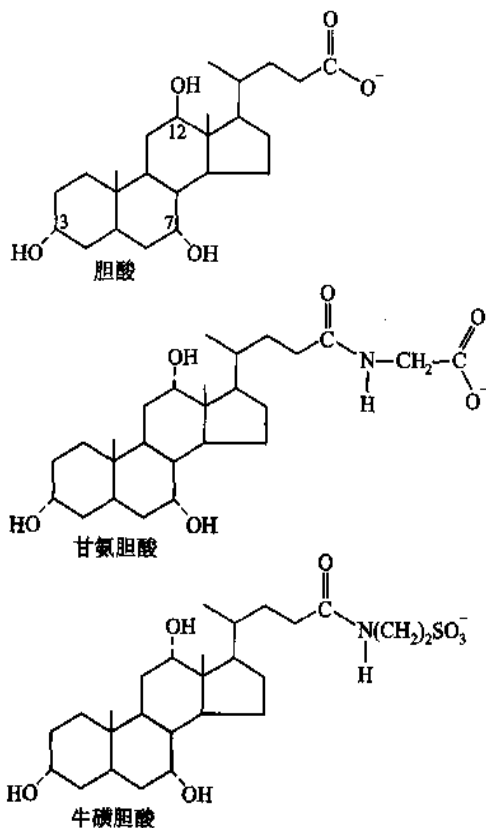
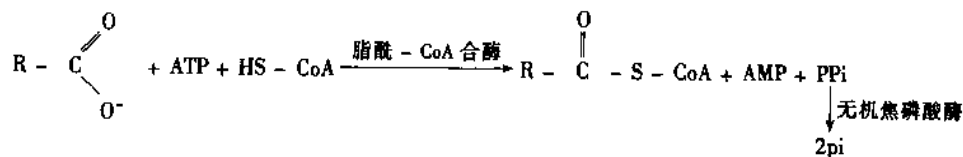


图 28-2 几种胆汁盐

二、脂肪酸的氧化

(一) 脂肪酸的活化

脂肪酸分解(代谢)发生于原核生物的细胞溶胶及真核生物的线粒体基质中。它在进入线粒体基质前,脂肪酸先与辅酶 A(CoA)形成硫酯键(thioester link)。这个反应是由脂酰辅酶 A 合酶(acyl CoA synthase)(又称脂肪酸硫激酶 1, fatty acid thiokinase 1)催化发生的,此酶存在于线粒体外膜。它起作用时需要消耗一个 ATP。反应的总体是不可逆的。因为生成的 PPi 立即被水解为两分子的 Pi。



上述的脂酰-CoA 合酶实际是一个“家族”,至少有三种,依其底物脂肪酸的链长不同而异。这些酶或与内质网(endoplasmic reticulum, SER),或与线粒体膜外膜相连。

用长链脂酰-CoA 合成酶(long-chain acyl-CoA synthetase)对 ^{18}O 标记的软脂酸进行活化发现 AMP 和脂酰-CoA 都为 ^{18}O 所标记。它表明此反应经过一个脂酰腺苷酸混合酸酐(acyladenylate mixed anhydride)中间体,它被 CoA 的巯基(sulfhydryl group)进攻,形成了硫酯(thioester)的产物。正是由于 ^{18}O 标记了两个产物

脂酰 CoA 和 AMP,才作出这个中间体存在的证明(图 28-3)。这个反应包含着化学键的断裂与合成两个方面。当水解时有较大的负的自由能伴随,所以与反应总体相关的自由能变化接近于零。在细胞内全部反应完成的驱动力是产物焦磷酸(PPi)发生的高度放能的水解(exergonic hydrolysis),这是由广泛存在的无机焦磷酸酶(inorganic pyrophosphatase)的催化实现的。

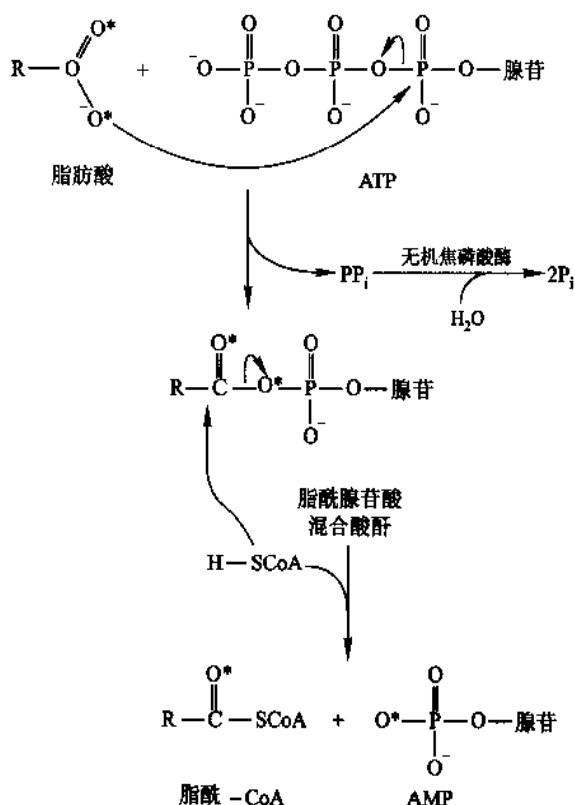


图 28-3 在脂酰-CoA 合酶催化下脂肪酸活化的反应机制

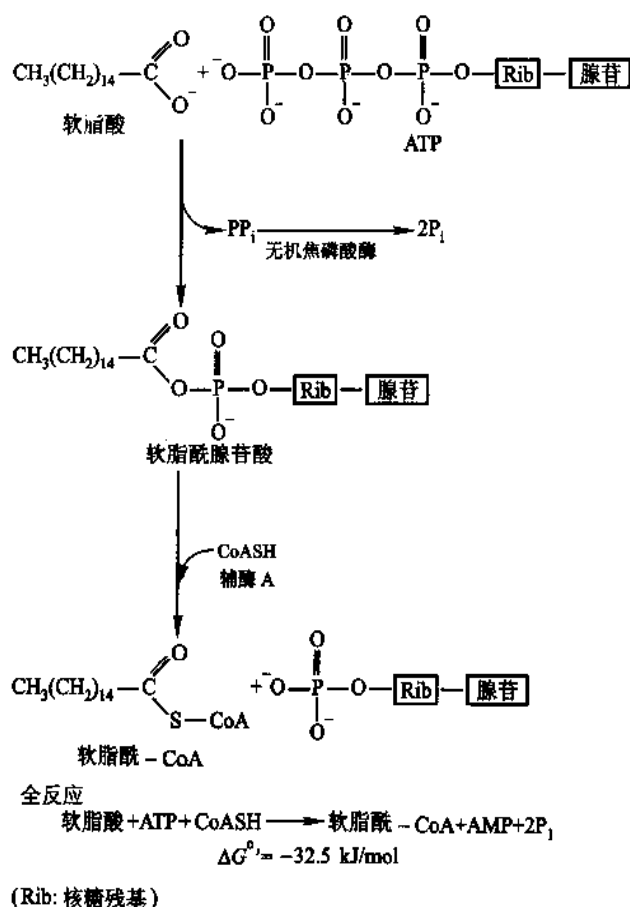


图 28-4 软脂酸活化的反应机制

在一般代谢途径中常发生的是：一个形成高能键的反应是通过 ATP 的一个磷酸酐键的水解产生的，这个反应由 ATP 的第二个酸酐键的水解来驱动完成。

脂肪酸的活化是形成脂酰-CoA，它与乙酰辅酶 A 同样是高能化合物。当它被水解成为脂肪酸和 CoA 时，产生很大的负的标准自由能变化($\Delta G^{\circ\prime} \approx -13 \text{ kJ/mol}$)；而脂酰-CoA 的形成，是靠 ATP 的两个高能键的水解。因为若把脂肪酸直接与辅酶 A (CoA) 相连，需吸收能量；但当把脂酰-CoA 的形成与 ATP 的水解相偶联，则脂酰-CoA 的形成便成为释放能量的过程。ATP 的分解分 2 步进行。以软脂酸 (palmitic acid) 为例(图 28-4)，ATP 的两个磷酸酐键的断裂用以形成软脂酰-CoA。反应的第一步是 ATP 提供腺苷-磷酸(adenylate)从而形成软脂酰腺苷酸，并释出 PPi。这个 PPi (焦磷酸) 立即被无机焦磷酸酶水解，活化了的脂酰基即转移到辅酶 A 上，形成脂酰-CoA。

以上全部反应，其一是 ATP 的“放能”，释出 AMP 和 PPi ($\Delta G^{\circ\prime} = -32.5 \text{ kJ/mol}$)，其二是形成脂酰-CoA 的“吸能”反应 ($\Delta G^{\circ\prime} = 31.4 \text{ kJ/mol}$)。

(二) 脂肪酸转入线粒体

短或中长链的脂酰-CoA 分子(10 个碳原子以下)可容易地渗透通过线粒体内膜(inner mitochondrial membrane)，但是更长链的脂酰-CoA 就不能轻易透过其内膜，需要一个特殊的运送机制。这个机制就是长链脂酰-CoA 要与极性的肉碱(carnitine)分子结合。肉碱在植物和动物体中均存在。结合反应是由线

粒体内膜表层上存在的肉碱-脂酰转移酶 I (carnitine acyltransferase I) 进行催化发生的。反应使 CoA 基团脱下, 肉碱分子进行取代, 得到的脂酰肉碱在肉碱/脂酰肉碱移位酶 (carnitine/acylcarnitine translocase) 的催化下, 被运送透过线粒体内膜 (图 28-5)。这个“膜运输蛋白”通过此种方式即将脂酰肉碱分子送进线粒体基质, 然后又把游离肉碱运出。脂酰肉碱一旦进入线粒体基质后, 又在肉碱/脂酰肉碱移位酶 II 作用下, 释出游离肉碱, 肉碱如上述被运出, 同时脂酰基又回到 CoA 上, 如此完成了脂酰-CoA 穿过线粒体内膜的“使命”。上述的酶存在于线粒体基质侧 (图 28-5)。

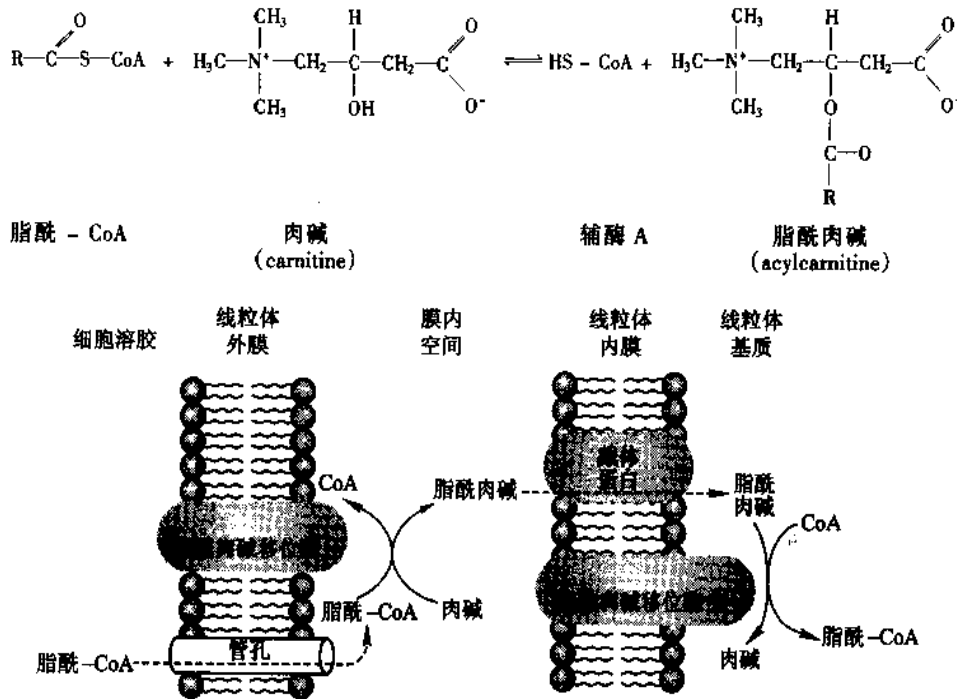


图 28-5 脂酰-CoA 跨线粒体内膜机制

概括起来, 脂肪酸在细胞溶胶中被活化, 成为脂酰-CoA, 它按以下 4 个步骤穿越线粒体内膜进入线粒体基质:

- ① 细胞溶胶中的脂酰-CoA 转移到肉碱上, 释出 CoA 到细胞溶胶。
- ② 经传送系统, 上述产物脂酰-肉碱被送进线粒体基质。
- ③ 在这里, 脂酰基转移到来自线粒体的 CoA 分子上。
- ④ 同时释出的肉碱又回到细胞溶胶中。

这使细胞得以维持分别在细胞溶胶和线粒体基质内的 CoA 库 (pool)。线粒体的 CoA 库除对脂肪酸外, 还在丙酮酸和某些氨基酸的氧化降解中起作用, 而细胞溶胶中的 CoA 库则满足脂肪酸生物合成的需要。细胞同样地维持着分别在细胞溶胶和线粒体基质中的 ATP 和 NAD^+ 库。

(三) β -氧化

1. Knoop 的重要发现

对于脂肪酸分解代谢反应机制的探索, 自 20 世纪初即已开始, Knoop F 极为出色的实验 (1904) 做出了重要贡献。当时研究反应机制的重要手段的放射性同位素尚未出现, Knoop 巧妙地设计出第一个用于生物化学实验的“示踪物” (tracer), 他把偶数或奇数碳的脂肪酸分子的末端甲基接上苯基, 用这带“示踪物”的脂肪酸喂狗, 然后分析排出的尿液, 示踪物苯基在体内不被代谢, 而以某一特定的有机化合物被排出。

Knoop 发现, 把偶数碳原子的脂肪酸己酸 (C 6) 带上苯基示踪物后喂狗, 分析尿液的结果是苯基以苯乙酰-N-甘氨酸 (phenylacetic acid) (苯乙尿酸) 的形式出现。同样, 对奇数碳原子的戊酸 (C 5) 进行实验, 结果得到苯甲酰-N-甘氨酸 (hippuric acid) (马尿酸)。他由此推论: 脂肪酸氧化每次降解下一个 2 碳单元的片断, 氧化是从羧基端的 β -位碳原子开始的, 释下一个乙酸单元。图 28-6 表示 Knoop 对苯基标记的

脂肪酸氧化实验。箭头表示设想的断裂点。

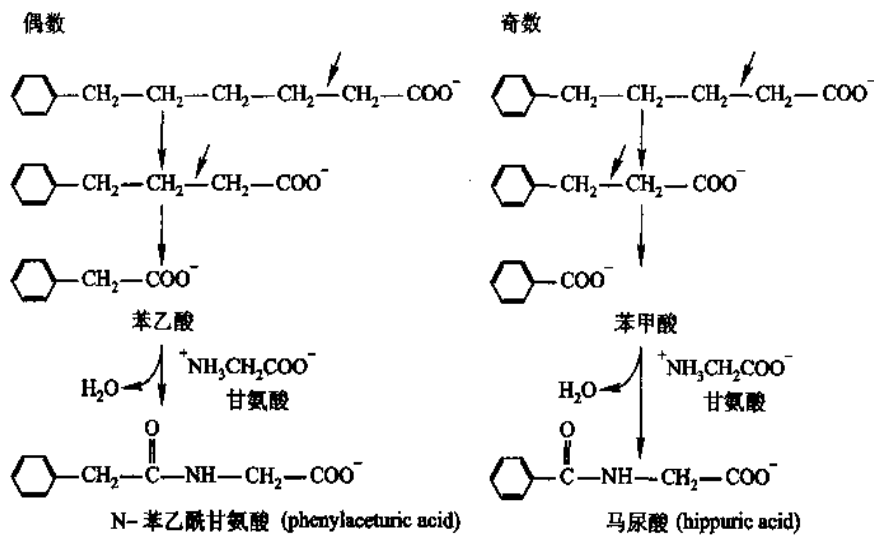


图 28-6 Knoop 的苯基标记的脂肪酸氧化实验。
(箭头指向是假想的断键处)

继 Knoop 精彩的发现之后,近百年的研究工作结果都在支持他的基本论点。即降解始发于羧基端的第二位(β -位)的碳原子,在这一处断裂切掉两个碳原子单元,脂肪酸的降解被命名为 β -氧化(β -oxidation)。这正是 Knoop 的发现。用现时的观点比较 Knoop 的假说,有以下三点差异,即:

- ①切掉的两个碳原子单元是乙酰 - CoA,而不是醋酸分子。
- ②在反应系列中的中间产物全部都是结合在辅酶 A 上。
- ③降解的起始需要 ATP 的水解。

2. 脂肪酸的 β -氧化作用

脂肪酸 β -氧化发生于线粒体中,将各步骤一并计算在内,共有五个步骤,即:①活化(activation),②氧化(oxidation),③水合(hydration),④氧化(oxidation),⑤断裂(cleavage)。

一般常说 β -氧化是四个步骤,即不计脂肪酸的活化步骤。在进入这 4 步反应的细节前,应把眼光放大一些,以了解 β -氧化在生物体中的地位和作用。

线粒体中的脂肪酸氧化可看作三个大步骤(图 28-7),第一步是 β -氧化。以 16 碳的软脂酸为例,经过一系列氧化,每一轮切下两个碳原子单元即乙酰 - CoA。经过 7 轮之后,软脂酸只残留两个碳原子,即乙酰 - CoA。每一个乙酰 - CoA 的形成需要失去 4 个氢原子(4 个 H^+),和两对电子,每步都是在酯酰 - CoA 脱氢酶的作用下发生的。

第二个大步骤是 β -氧化形成的乙酰 - CoA(若是软脂酸,共形成 8 个),进入柠檬酸循环,继续被氧化最后脱出 CO_2 。柠檬酸循环也是在线粒体中发生的。换言之,脂肪酸氧化先是经过它们的独特途径—— β -氧化,最后进入生物分子(包括糖,氨基酸等)的一般氧化途径——柠檬酸循环。

第三个大步骤指的是:前二大步骤中脂肪酸氧化过程产生出还原型的电子传递分子——NADH 和 $FADH_2$,它们在

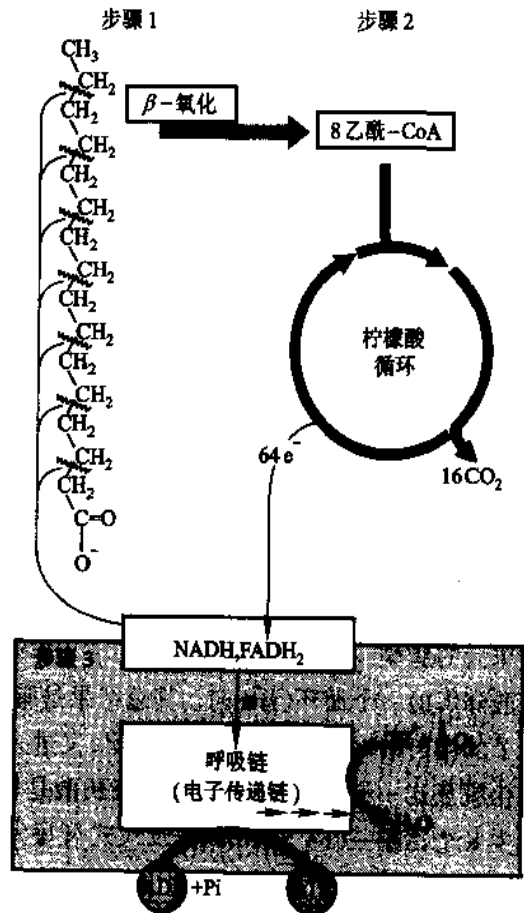


图 28-7 线粒体中脂肪酸彻底氧化的三大步骤

第三步骤中把电子送到线粒体呼吸链,经过呼吸链,电子被运送给氧原子,伴随这个电子的流动,ADP 经磷酸化作用转化为 ATP。脂肪酸氧化中释出的能量就这样转化给了 ATP 分子(参阅第 24 章生物氧化——电子传递和氧化磷酸化作用)。

下面将着重详述脂肪酸氧化的第一步骤,β-氧化过程,还将讲述偶数和奇数碳原子的氧化。

(1) β-氧化过程

如前述,脂肪酸氧化若从活化进入线粒体计算共为 5 步,概括其全部过程如图 28-8 所示。

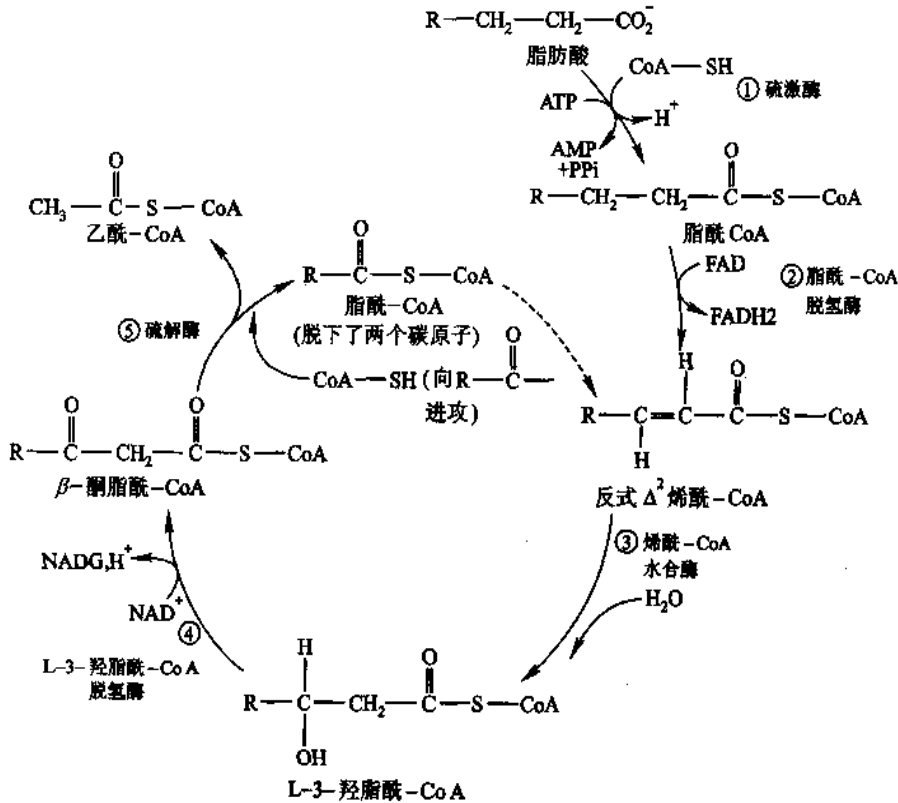
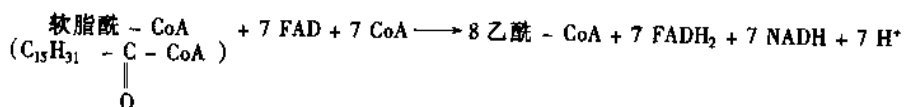


图 28-8 脂肪酸 β-氧化途径

一个轮回产生一个脂酰 - CoA,它与最初进入循环的起始物,脂酰 - CoA 相较,缩短了两个碳原子。这两个碳以乙酰 - CoA 的形式释出

反应第 1 步活化,已作过详述。脂肪酸在硫激酶(thiokinase)(又称脂酰 - CoA 合酶,acyl CoA synthase)作用下形成脂酰 - CoA,此处即从略。第 2 步是脂酰 - CoA 的氧化,即脂酰 - CoA 的羧基邻位(β-位)被脂酰 - CoA 脱氢酶作用,脱下两个氢原子转化为反式 - Δ^2 - 烯酰 - CoA(trans - Δ^2 - enoyl CoA),同时产生 $FADH_2$ 。第 3 步是反式 - Δ^2 - 烯酰 - CoA 水合形成 3 - 羟脂酰 - CoA,这步反应是在烯酰 - CoA 水合酶(enoyl CoA hydratase)的作用下发生的。第 4 步是 L - 3 - 羟脂酰 - CoA 在 L - 3 - 羟脂酰 - CoA 脱氢酶(L - 3 - hydroxyacyl CoA dehydrogenase)的作用下转化为 3 - 酮脂酰 - CoA(3 - ketoacyl CoA),并产生 $NADH$ 。第 5 步是 3 - 酮脂酰 - CoA 受第二个 CoA 的作用发生硫解(thiolysis),断裂为乙酰 - CoA 和一个缩短了两个碳原子单元的脂酰 - CoA。这步反应是在 β - 酮硫解酶(β - keto - thiolase)的催化下进行的。以上反应形成脂肪酸降解的一个循环(round)。其总结果是脂肪酸链以乙酰 - CoA 形式自羧基端脱下两个碳原子单元。缩短了的脂肪酸以脂酰 - CoA 形式残留,又进入下一轮的 β - 氧化,如图所示,它进入脂酰 - CoA 脱氢酶的催化脱氢这一步(图 28 - 8)。如果脂肪酸是软脂酸(C 16),就得转化为软脂酰 - CoA 后,经过 7 轮的降解产生 8 个乙酰 - CoA 分子,其总反应式可写为:



(2) 脂酰 - CoA 脱氢酶

上述 5 步反应中的第 2 步氧化,是脂酰 - CoA 脱氢酶催化的反应。它使被活化(第 1 步)的脂肪酸,脂酰 - CoA 在羧基邻位(β -位)上脱下两个氢原子,转化为反式 - Δ^2 - 烯酰 - CoA。脂酰 - CoA 脱氢酶存在于线粒体。根据线粒体基质中脂酰 - CoA 碳氢链的不同长度,短、中等和长链,而有各自的特异酶,即此类脱氢酶共有 3 种。它们催化反应的作用点是 C_α 和 C_β ,即在 C_α 处脱下一个质子,又自 C_β 处脱下一个带有一对电子的质子,两个质子都被 FAD 得到。产物 $FADH_2$ 被线粒体电子传递链再氧化,这个氧化过程是通过一系列的电子传递中间体完成的。电子传递黄素蛋白(electron-transfer flavoprotein,ETF)自 $FADH_2$ 转移一对电子给黄素 - 硫蛋白(flavo-sulfur protein)。ETF 又名辅酶 Q 氧化还原酶,辅酶 Q 即泛醌,所以 ETF 又名泛醌氧化还原酶(ubiquinone oxidoreductase)。它在脂酰 - CoA 的 β -氧化过程中,把辅酶 Q 还原为 QH_2 ,从而一个接一个地把电子对转移给线粒体电子传递链(图 28-9)。

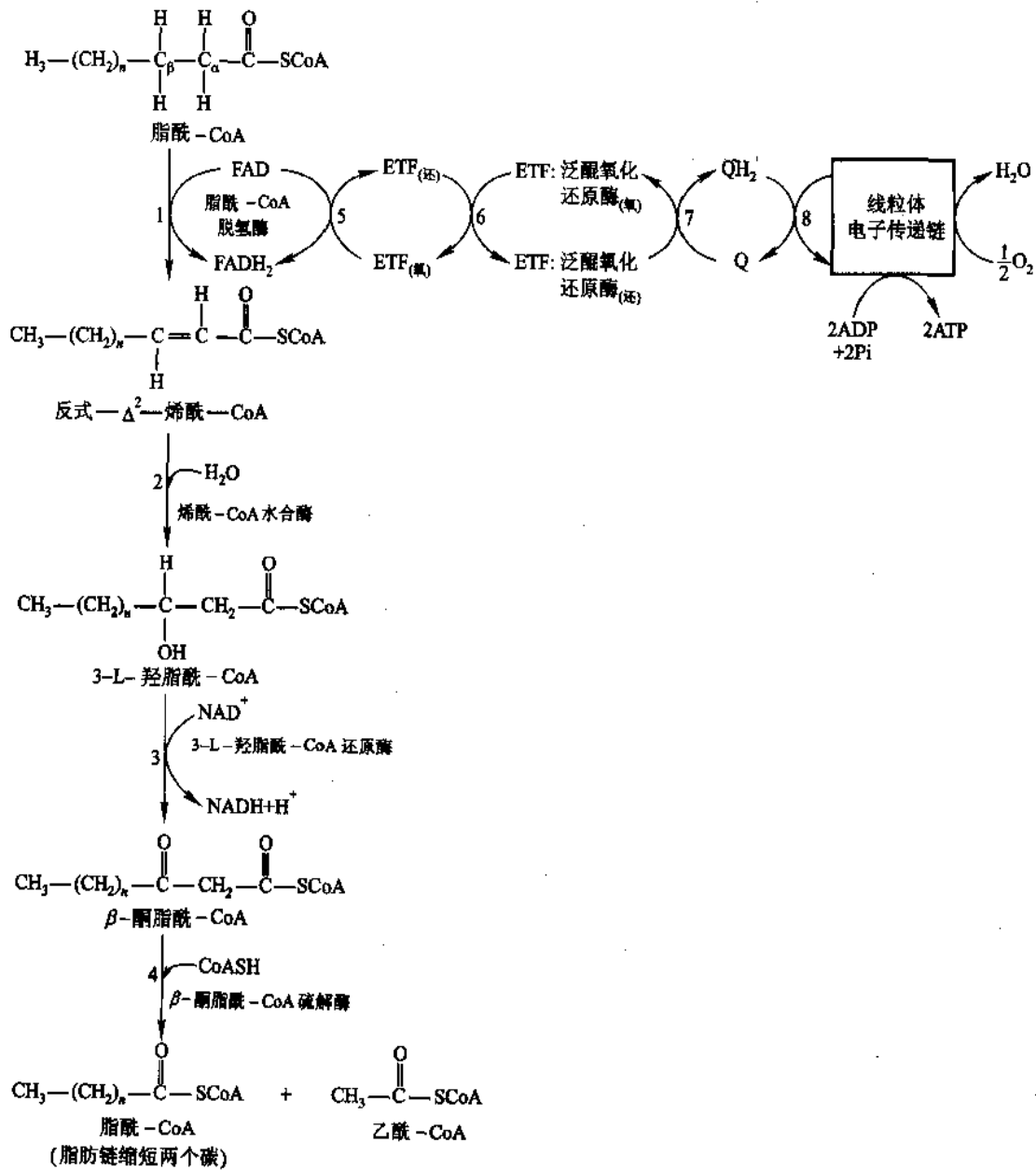


图 28-9 脂肪酸 β -氧化通过脂酰 - CoA 脱氢酶与电子传递链相连
(图例(还):还原型;(氧):氧化型)

电子传递链把 O_2 还原成 H_2O ,若起始于辅酶 Q 的阶段,结果是每转移一对电子产生 1.5 个 ATP 分子。

(3) 脂酰 - CoA 脱氢酶缺乏症

新生儿一夜之间突然死亡,称为婴儿突然死亡症候群(sudden infant death syndrome, SIDS)。此类婴儿至少 10% 表现为中长链脂酰脱氢酶的缺乏。这种遗传病较苯酮尿症(phenyl ketonuria, PKU)更为普遍。在食物摄取即后,葡萄糖是主要的能量代谢的底物,过后,当葡萄糖浓度水平降低,脂肪酸氧化的速度随即增高。新生儿的突然死亡可能因中长链脂酰脱氢酶的缺乏,导致葡萄糖和脂肪酸氧化发生不平衡而产生的后果。

脂酰 - CoA 脱氢酶还与牙买加呕吐病(Jamaican vomiting sickness)有关。这是一种惊厥后剧烈呕吐,随后昏迷、死亡的症状。在多数情况下观察到出现低血糖。其病因是由于吃了未熟的“ackee 浆果”所致,这种未熟的浆果含有一种很少见的氨基酸——降糖氨酸 A(hypoglycin A),经代谢可形成甲叉环丙基乙酰 - CoA(methylene cyclopropylacetyl - CoA, MCPA - CoA)。它是乙酰 - CoA 脱氢酶的一个底物,乙酰 - CoA 脱氢酶把它的 C_α 位的质子移去,形成一个中间体,即酶的 FAD 辅基被修饰,这个产物可钝化乙酰 - CoA 脱氢酶(图 28 - 10)。

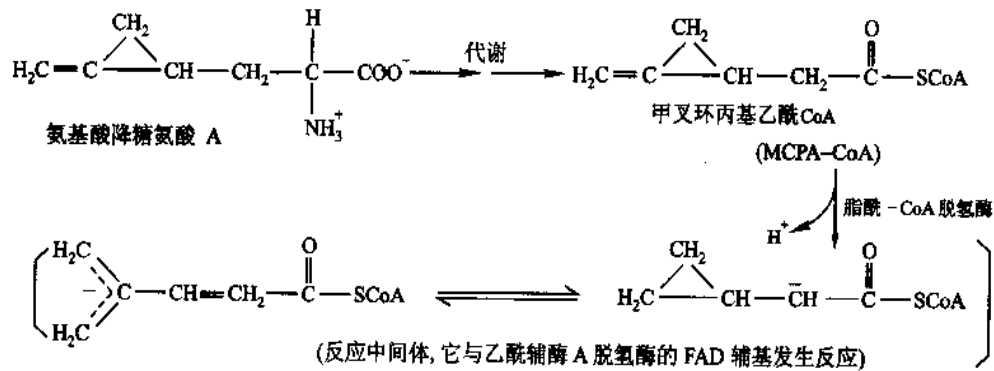


图 28 - 10 降糖氨酸 A 经代谢反应转化的产物可以钝化脂酰 - CoA 脱氢酶

(4) 烯酰 - CoA 水合酶和 3 - L - 羟酰 - CoA 脱氢酶的催化特点

在 β - 氧化的第 3 步反应中烯酰 - CoA 水合酶(enoyl - CoA hydratase)对底物的作用是对反式 α, β 双键进行立体特异的加水,形成 3 - L - (S) - 羟酰 - CoA(hydroxyacyl - CoA)。随后,3 - L - 羟酰 - CoA 脱氢酶对二级醇进行氧化得到酮,即形成 β - 酮脂酰 - CoA,此时使用的氧化剂是 NAD^+ 。

(5) 硫解酶的反应

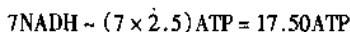
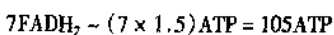
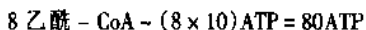
脂肪酸氧化最后一步是硫解,形成的产物是乙酰 - CoA 和一个新的脂酰 - CoA,它一次使起始物缩短两个碳原子,参看图 28 - 11 中的起始物及最终产物脂酰 - CoA。

硫解酶反应的第一步是使底物 β - 酮脂酰 - CoA 形成硫酯键。第二步是碳 - 碳键断裂,形成乙酰 - CoA 的负碳离子中间体。这步反应类型为克莱森酯解(Claisen ester cleavage),即克莱森缩合的逆反应。反应的第三步是在酶的作用下,酶持有的羧基对上述中间体提供质子,形成了乙酰 - CoA 及酶 - 硫酯中间体。最后一步是在 CoAS - H 的作用下形成脂酰 - CoA。

(四) 脂肪酸氧化是高度的放能过程

脂肪酸氧化的功能无疑是产生代谢能。 β - 氧化每一轮回产生 1 个 NADH , 1 个 FADH_2 和 1 个乙酰 - CoA。乙酰 - CoA 进入柠檬酸循环又生成 FADH_2 及 NADH , 每 1 分子乙酰 - CoA 可产生 10 个 ATP(过去的理论值为 12 个 ATP); 每 1 分子 NADH 被氧化呼吸链氧化产生 2.5 个 ATP(过去的理论值为 3 个 ATP); 每 1 分子 FADH_2 氧化产生 1.5 个 ATP(过去的理论值为两个 ATP)。

以软脂酸彻底氧化为例,1 分子软脂酰 - CoA(C_{16} - 酰基 - CoA)需经 β - 氧化的 7 个轮回,到最后轮回时 C_4 - 酮酰基 - CoA 被硫解为两个分子的乙酰 - CoA,因此软脂酰 - CoA 彻底氧化的化学计算为:



以上总计为 108 个 ATP(软脂酰-CoA 彻底氧化根据过去的理论值计算共产生 131 个 ATP),但软脂酸活化为软脂酰-CoA 时消耗了两个高能磷酸键,净算下来:1 分子软脂酸可生成 106 个 ATP(按过去的理论计算净生成 129 个 ATP)。106 个 ATP 水解的标准自由能为:106 × -30.54 kJ = -3 237 kJ(-773.8 kcal),软脂酸的标准自由能为 -9 790 kJ(-2 340 kcal)。所以在标准状态下软脂酸氧化的能量转化率约为 33%(按过去的理论值计算为 40%)。

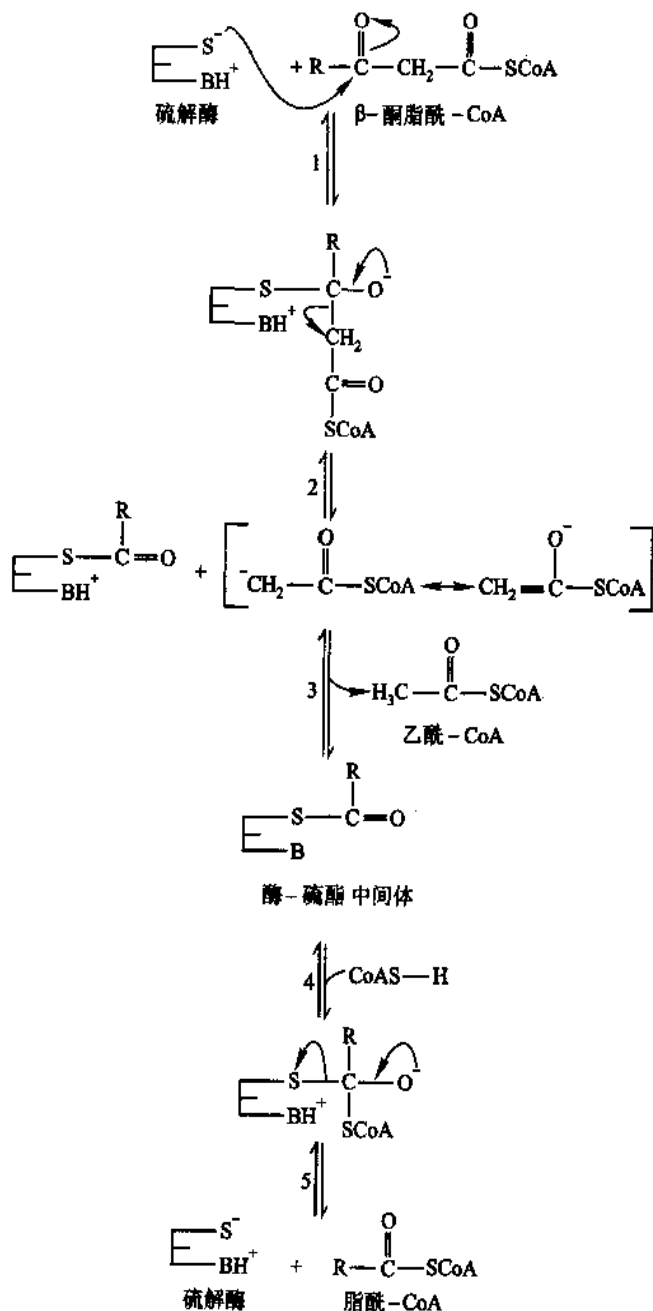


图 28-11 β -氧化最后一步, β -酮脂酰-CoA 硫解酶的催化反应机制
酶的活性中心半胱氨酸残基形成酶-硫酯中间体是关键步骤

三、不饱和脂肪酸的氧化

(一) 不饱和脂肪酸的氧化

不饱和脂肪酸的氧化也是发生在线粒体中,它的活化和跨越线粒体内膜都与饱和脂肪酸相同,也是经 β -氧化而降解,但它需要另外两个酶:一个是异构酶,一个是还原酶。如图 28-12 所示,油酰 - CoA (oleoyl - CoA) 的降解与硬脂酰 - CoA 的降解在 β -氧化的最初 3 步轮回中是完全相同的。其后油酰 - CoA 生成 Δ^3 -顺式 - 十二烯酰 - CoA。但它对脂酰 - CoA 脱氢酶,不是合格的底物。下面一步是对 Δ^3 -顺式 - 十二烯酰 - CoA 进行改造,即经烯酰 - CoA 异构酶(isomerase)催化把它转化为 Δ^2 -反式 - 十二烯酰 - CoA ($12:\Delta^2$),成为烯酰 - CoA 水合酶的正常底物后,即可继续步上 β -氧化的正路。这样,在油酰 - CoA 的 β -氧化中没有使用脱氢酶;与硬脂酰 - CoA (18:0) 的 β -氧化相比较,它少产出 1 个 FADH_2 和 1.5 个 ATP。烯酰 - CoA 异构酶从肝的线粒体 ($M_r = 90\ 000$) 中曾纯化获得,它对 Δ^3 -顺式或 Δ^3 -反式的脂酰 - CoA 都显示活性,脂酰指的是 6 到 16 个碳的脂肪酸链。

多不饱和脂肪酸也可经 β -氧化而被降解,但它的过程除需要油酰异构酶外,还要有 2,4-二烯酰 - CoA 还原酶 (2,4-dienoyl - CoA reductase) 参与。现以亚油酰 - CoA (linoleoyl - CoA) (顺式 - 9,12 十八(碳)二烯酰 - CoA) 为例,它的 β -氧化最初的 3 步轮回与油酰 - CoA 相同,形成一个 Δ^3 -顺式不饱和脂肪酸。它同样不属脂酰 - CoA 脱氢酶的底物,经烯酰 - CoA 异构酶的作用,将 Δ^2 -反式位的双键异构化,就可继续进行 β -氧化,生成 Δ^4 -顺式 - 烯酰 - CoA。随后,在脂酰 - CoA 脱氢酶的催化下生成 Δ^2 -反式, Δ^4 -顺式 - 二烯酰 - CoA。这个产物在 NADPH 及 2,4-二烯酰 - CoA 还原酶的作用下生成 Δ^3 -反式烯酰 - CoA, 又再转化为 Δ^2 -反式异构体,此时,按 Δ^2 -反式异构体的结构, β -氧化即可继续步上第 4 个轮回(图 28-13)。2,4-二烯酰 - CoA 还原酶也已自肝脏中纯化获得,它专一地需要 NADPH; NADH 对它既不是抑制剂,也不是还原剂。

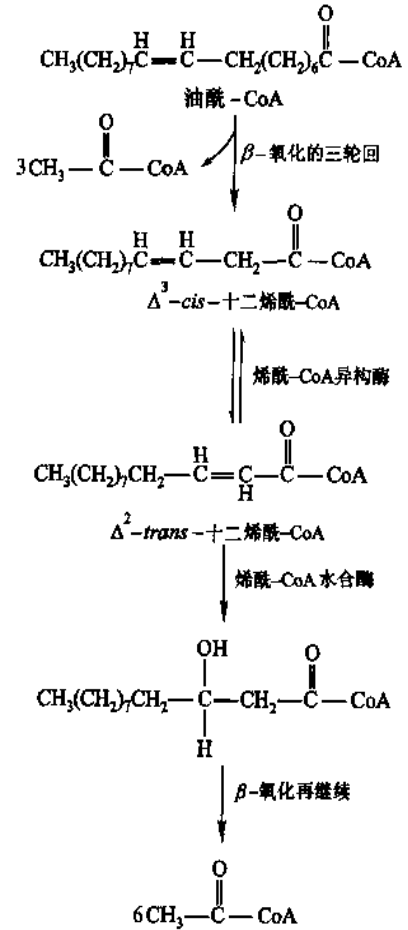
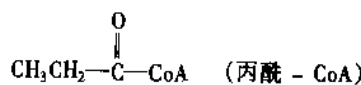


图 28-12 不饱和脂肪酸在线粒体中的降解

(二) 奇数碳原子脂肪酸的氧化生成丙酰 - CoA

1. 奇数碳原子脂肪酸的氧化途径

大多数哺乳动物组织中奇数碳原子的脂肪酸是罕见的,但在反刍动物,如牛、羊中,奇数碳链脂肪酸氧化提供的能量相当于它们所需能量的 25%。具有 17 个碳的直链脂肪酸可经正常的 β -氧化途径,产生 7 个乙酰 - CoA 和 1 个丙酰 - CoA。



这种三个碳的酰基 - CoA 也是氨基酸缬氨酸及异亮氨酸的降解产物(阅第 30 章)。丙酰 - CoA 经 3 步酶反应转化为琥珀酰 - CoA(图 28-14)。起始一步的丙酰 - CoA 羧化酶催化的反应,需用生物素作为辅助因子。反应第 2 步是在甲基丙二酰 - CoA 消旋酶(methylmalonyl - CoA racemase)催化下, D-甲基丙二酰 - CoA 转化为 L-甲基丙二酰 - CoA。最后一步的反应是在需钴胺素(维生素 B_{12}) 的酶——甲基丙二酰 -

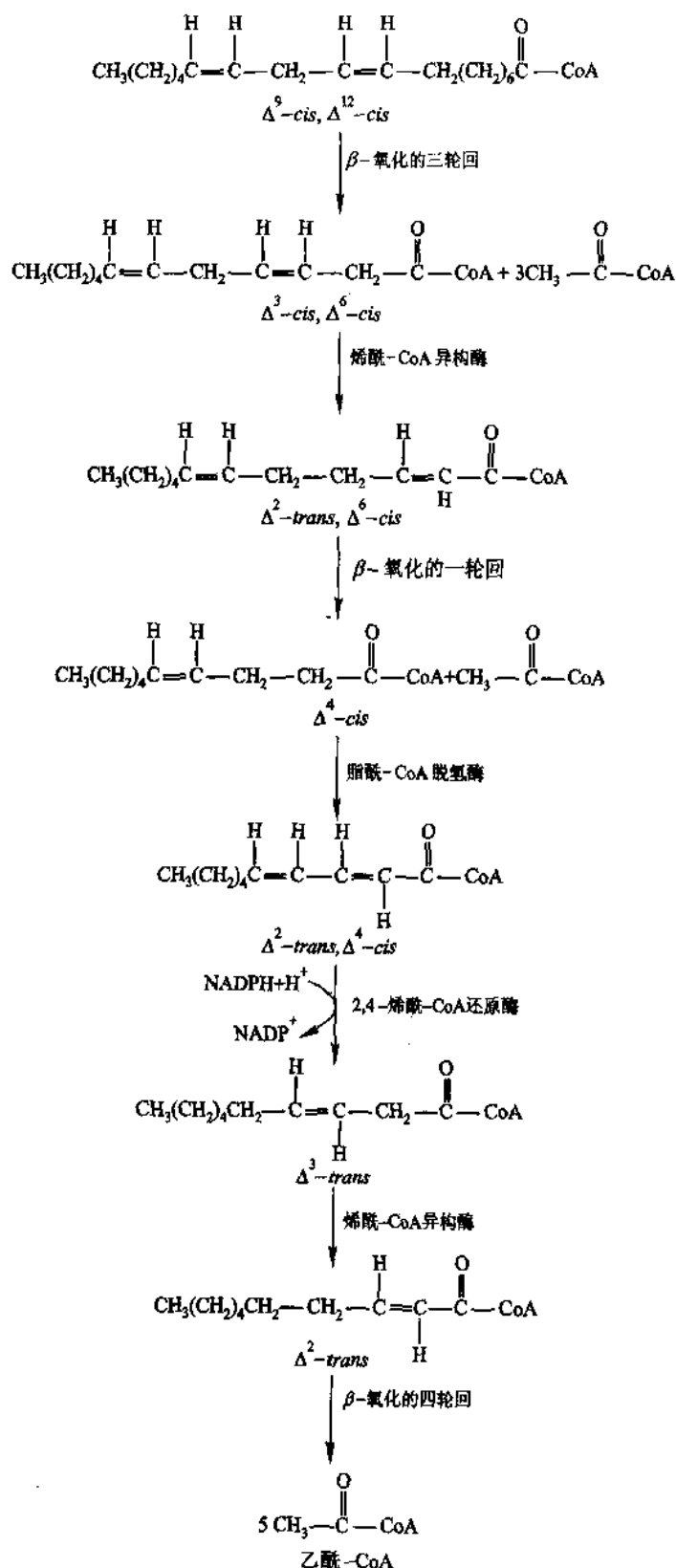


图 28-13 多不饱和脂肪酸的降解(在线粒体内)

CoA 变位酶(methylmalonyl-CoA mutase)的作用下,发生一个少见的羰基-CoA 基团转移到甲基并置换一个氢的反应。产物琥珀酰-CoA 可以进入柠檬酸循环进一步进行代谢(参看第 23 章)。

2. 维生素 B₁₂ 作为甲基丙二酰-CoA 变位酶辅酶的作用机制

在上述奇数碳原子脂肪酸的氧化中,最后一步反应 L-甲基丙二酰-CoA 在甲基丙二酰变位酶作用下转化为琥珀酰-CoA,这一酶促反应必需同时有维生素 B₁₂ 作为辅酶存在(下式, a)。维生素 B₁₂ 也作为其

他酶的辅酶催化以下类型的反应：与相邻的两个碳原子连接的基团，若一个是烷基或取代烷基(X)，另一个是 H，它们之间的互换(下式，b)需通过辅酶 B₁₂ 的参与。在自然界中此类反应较为稀少。此外参与互换的氢原子并未经与溶剂水混合后移位，也就是说，氢原子并未在有更多氢的环境中在两个碳原子间移位，其原因如下：

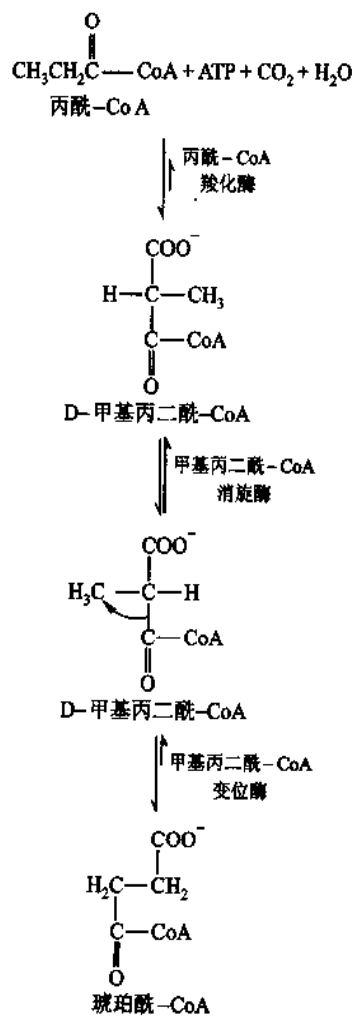
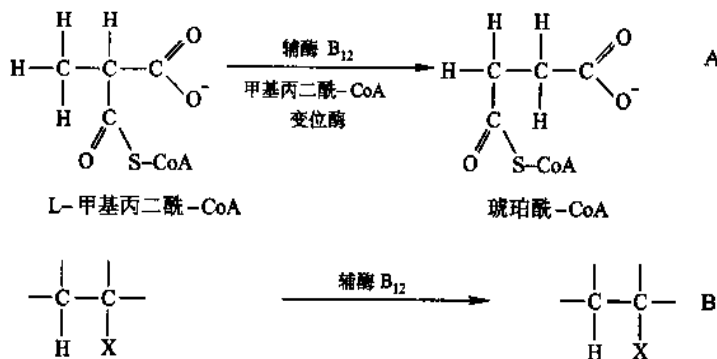


图 28-14 由丙酰-CoA 生成琥珀酰-CoA

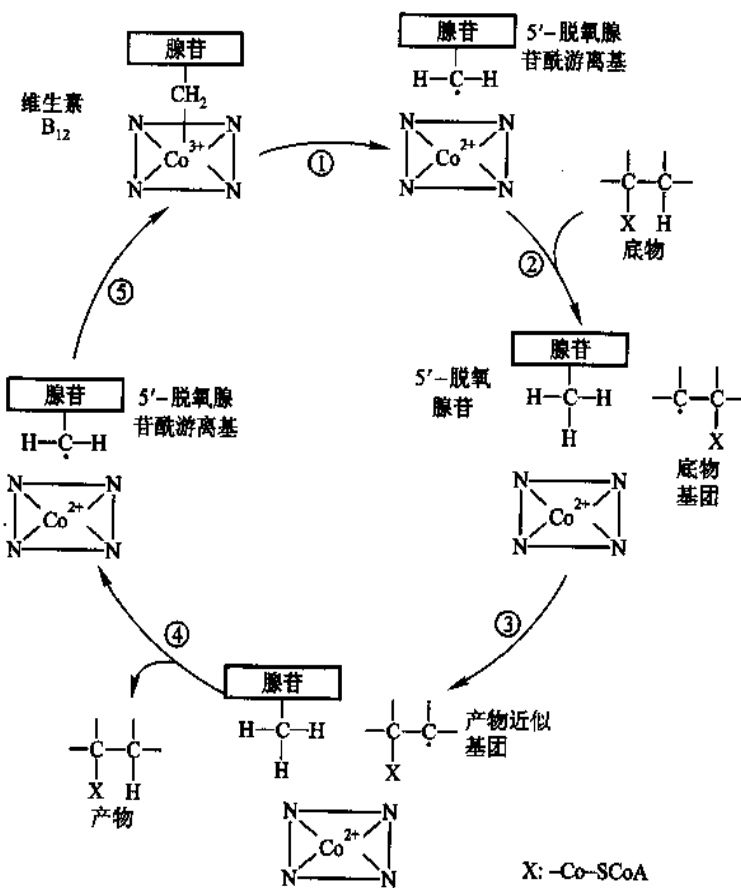
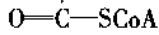


图 28-15 辅酶 B₁₂ 的催化反应

辅酶 B₁₂ 是维生素 B₁₂ 作为辅助因子(cofactor)的形式，它在众多的维生素中是唯一的不仅有一个复杂的含有脱氧腺苷的有机分子，而且与一钴(Co³⁺)原子相络合，因此又名脱氧腺苷钴胺素(deoxyadenosyl cobalamin)，有关它的结构详见本书第 11 章。它参与催化甲基丙二酰变位酶的反应，开始是 5'-脱氧腺苷钴胺素的 Co-C 键的断裂，生成 5'-脱氧腺苷酰游离基，及 Co²⁺ 型(图 28-15 的①步)。这个脱氧腺苷酰

游离基从底物 L- 甲基丙二酰 - CoA 分子中取下一个氢原子, 形成 5' - 脱氧腺苷 (②步)。第③步反应是底物游离基, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$, 发生重排, 得到一个新的游离基。此时, $(-\text{CO}-\text{S}-\text{CoA})$ 基转移到最后



产物的位置上。在反应第②步中, 原底物的氢原子转移给 5' - 脱氧腺苷游离基形成 5' - 脱氧腺苷。在第④步中, 5' - 脱氧腺苷又把那个底物的氢原子转给产物游离基, 自己成为 5' - 脱氧腺苷游离基, 并完成了产物琥珀酰 - CoA 的转化。反应第⑤步是 5' - 脱氧腺苷游离基与 Co^{2+} 相接, 恢复了辅酶 B_{12} 的结构 (图 28 - 15)。

(三) 脂肪酸还可发生 α - 或 ω - 氧化

尽管 β - 氧化是脂肪酸分解代谢的最重要而且占比例最大的途径, 某些脂肪酸的 α - 氧化对于人类健康还是必不可少的。植烷酸 (phytanic acid) 是膳食中的一个重要的组成成分, 它存在于反刍动物的脂肪以及某些食品中。经检测, 在某些地方一日摄入的植烷酸约为 50 ~ 100 mg。由于在 C - 3 位上有一个甲基取代基, 因此植烷酸不属于 β - 氧化的第一步反应的脂酰 - CoA 脱氢酶的底物。它降解的第一步是由另一个线粒体酶来实现的, 即脂肪酸 α - 羟化酶 (fatty acid α - hydroxylase)。反应是在植烷酸的 α - 位发生羟基化。羟基化的中间体进一步脱羧, 形成降植烷酸 (pristanic acid) 和 CO_2 (图 28 - 16)。降植烷酸经硫激酶 (thiokinase) 活化形成降植烷酰 - CoA。因 C - 3 位已不存在甲基, 即可进行正常的 β - 氧化。对于人类, 如若缺欠 α - 氧化作用系统, 即造成体内植烷酸的积聚, 会导致外周神经炎类型的运动失调及视网膜炎等症状。

在鼠肝微粒体中观察到一种较少见的脂肪酸氧化途径。这个途径使中长链和长链脂肪酸通过末端甲基, 即 ω - C 位的氧化, 转变为二羧基酸。催化此反应的酶存在于内质网的微粒体中。

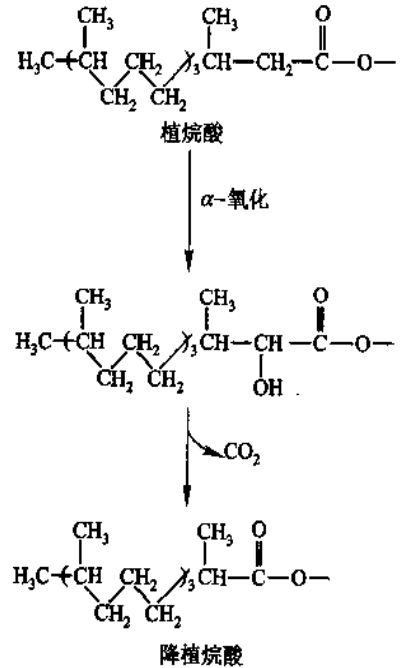
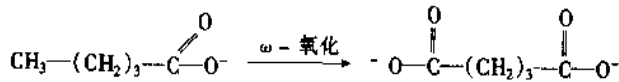


图 28 - 16 植烷酸的 α - 氧化



ω 碳原子的氧化包括羟基化, 有细胞色素 P_{450} 参与反应, 催化此反应的酶为单加氧酶 (monooxygenase), 它需要 NADPH 和 O_2 参与反应。羟基即氧化为羧基, 两端羧基都可与 CoA 结合, 并进行 β - 氧化。 ω - 氧化的底物为长链和中长链脂肪酸。 ω - 氧化加速了脂肪酸降解的速度。

四、酮 体

(一) 乙酰 - CoA 的代谢结局

在肝脏线粒体中脂肪酸一旦降解, 生成的乙酰 - CoA 可以有几种代谢结局。最主要的当然是进入柠檬酸循环及进一步的电子传递系统, 最终完全氧化为 CO_2 及 H_2O (阅第 23 章); 其二是作为类固醇的前体, 生成胆固醇。它在胆固醇生物合成中是起始化合物。每 3 分子乙酰 - CoA 合成一分子甲羟戊酰 - CoA (β - hydroxy - β - methylglutaryl - CoA 或称 mevalonyl - CoA), 它是胆固醇生物合成前两步反应产物。其三是步上脂肪酸代谢的逆方向, 即扮演脂肪酸合成前体的角色; 其四是转化为乙酰乙酸, D - β - 羟丁酸和丙酮, 这三个化合物统称为酮体 (ketone body) (图 28 - 17)。对这三个化合物冠以“酮体”名称似易引起误导, 因为这三者都是有机化合物, 并不是什么“体”, 而且在其中只有两个化合物是酮, 第三个 β - 羟丁酸也不是什么“酮”。

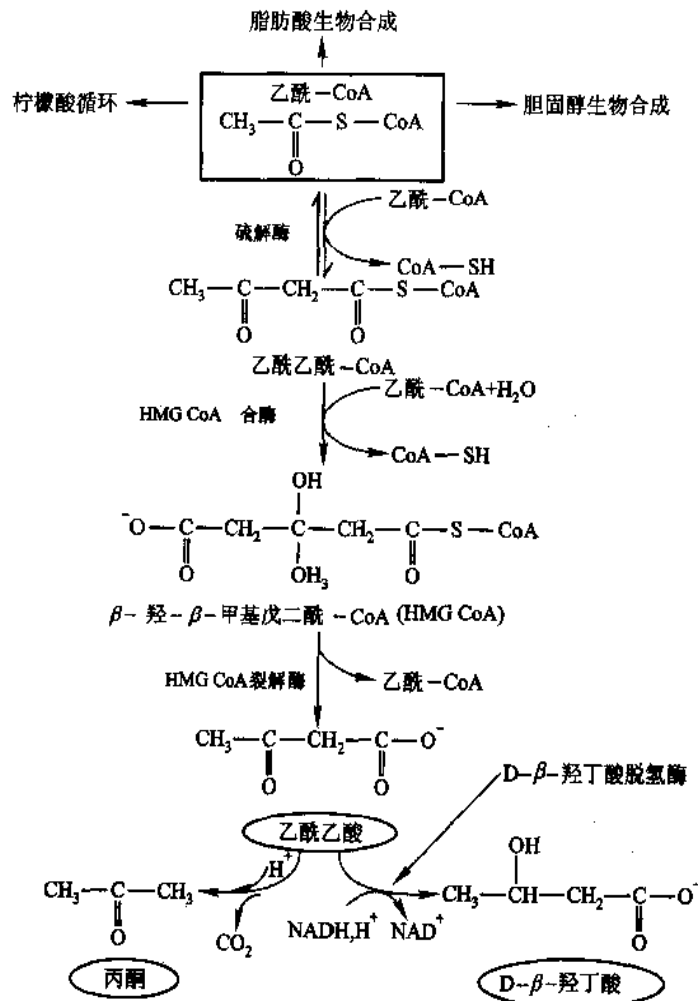


图 28-17 乙酰-CoA 的代谢结局,酮体的生成及其他三种走向

(二) 肝脏中酮体的形成

酮体的合成主要是肝脏的功能。酮体中丙酮的生成量相当小,生成后即被吸收。乙酰乙酸和 D-β-羟丁酸则经血流进入肝外组织,在那里被氧化,经柠檬酸循环提供更多能量给那些组织使用,例如骨,心肌和肾皮质。脑组织一般只用葡萄糖作为燃料,但当饥饿时,葡萄糖供给不足,它可以接受使用乙酰乙酸或 D-β-羟丁酸。

在肝脏线粒体中,决定乙酰-CoA 去向的是草酰乙酸,它带动乙酰-CoA 进入柠檬酸循环,但在某种情况(如饥饿,糖尿病)下,草酰乙酸离开柠檬酸循环,去参与葡萄糖合成。这时草酰乙酸浓度十分低下,乙酰-CoA 进入柠檬酸循环的量也随之变得很少,这有利于进入酮体合成途径。当乙酰-CoA 不经柠檬酸循环被氧化时,由于酮体自肝脏输出到肝外组织,在肝外组织转变为乙酰-CoA,因此脂肪酸在肝中的氧化仍保持继续进行。

如图 28-17 所示,在肝脏基质中乙酰乙酸(acetoacetate)形成的第 1 步是 2 个分子乙酰-CoA 在硫解酶作用下缩合成为乙酰乙酰-CoA。这是 β-氧化最后一步的逆向反应,只有当乙酰-CoA 水平升高时才发生。第 2 步是乙酰乙酰-CoA 与乙酰-CoA 在 HMG-CoA 合酶催化下,再缩合形成 β-羟-β-甲基戊二酰-CoA(β-hydroxy-β-methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)。反应的第 3 步就是 HMG-CoA,在 HMG-CoA 裂解酶(HMG-CoA lyase)催化下的裂解,形成乙酰-CoA 和乙酰乙酸。

这样形成的游离乙酰乙酸经线粒体基质酶 D-β-羟丁酸脱氢酶(D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase)作用,(需 NADH)被还原为 D-β-羟丁酸。这步反应的酶是立体专一的,它只对 D-异构体有效,与可以

催化 L-3-羟脂酰-CoA 的 L-3-羟脂酰-CoA 脱氢酶完全不同,后者是 β -氧化途径中所必需的。乙酰乙酸还可自动脱羧形成丙酮。对于健康人,由乙酰乙酸脱羧形成丙酮的量是极微少的。

严重饥饿或未经治疗的糖尿病人体内可产生大量的乙酰乙酸,其原因是饥饿状态和胰岛素水平过低都会耗尽体内糖的贮存。肝外组织不能自血液中获取充分的葡萄糖,为了取得能量,肝中的葡糖异生作用就会加速,肝和肌肉中的脂肪酸氧化也同样加速,同时并动员蛋白质的分解。脂肪酸氧化加速产生出大量的乙酰-CoA,葡糖异生作用使草酰乙酸供应耗尽,而后者又是乙酰辅酶进入柠檬酸循环所必需的,在此种情况下乙酰-CoA 不能正常地进入柠檬酸循环,而转向生成酮体的方向。这时,①血液中出现大量丙酮,它是有毒的。丙酮有挥发性和特殊气味,常可从患者的气息嗅到,可借此对疾患作出诊断。②血液中出现乙酰乙酸和 D- β -羟丁酸,使血液 pH 降低,以至发生“酸中毒”(acidosis),另外尿中酮体显著增高,这种情况称为“酮病”(ketosis)如表 28-2 所示。上述的血液或尿中的酮体过高都可导致昏迷,有时甚至死亡。

表 28-2 糖尿的酮病中酮体的累集

	尿排泄量 mg/24 h	血中浓度 mg/100 ml
正常	≤ 125	< 3
严重酮病(未治疗糖尿病)	5 000	90

(三) 肝外组织使用酮体作为燃料

在肝外组织中,D- β -羟丁酸被 D- β -羟丁酸脱氢酶催化,氧化成为乙酰乙酸。乙酰乙酸与 CoA 相接而被活化,这步反应是由柠檬酸循环中间产物琥珀酰-CoA 供给 CoA。乙酰乙酰-CoA 被硫解酶裂解,生成两个分子的乙酰-CoA,进入柠檬酸循环。如前述,1 分子的乙酰-CoA 可产生 10 个 ATP(理论值为 12 个 ATP),由此提供能量给肝外组织(图 28-18)。

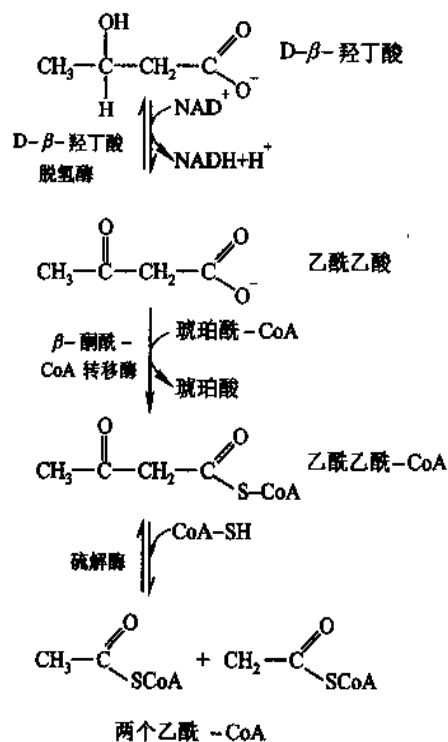


图 28-18 肝外组织使用酮体为燃料

五、磷脂的代谢

(一) 膜结构脂类——磷脂和糖脂

生物膜的重要特征是其脂双层。磷脂是构成脂双层的主要成分。它们具有两亲(amphipathic)性质,它们的亲水性区和疏水性区使它们固定成为膜的双分子层排列。构成膜脂的磷脂或糖脂中,磷酸甘油酯的疏水区由两个与甘油相接的脂肪酸构成;鞘脂(sphingolipid)的疏水区由一个与羟基化的二级胺相连接的脂肪酸构成。这些两性分子中的亲水区大多是一个简单的一OH基,例如,甾醇环的一端,磷酸甘油酯及鞘脂中的醇基,或末端的磷酸。这些膜脂中的脂肪酸的尾部或极性的头部还常附有种种结合基团。

各种膜脂类(membrane lipids)和贮存脂类(storage lipids)关系图如下页上图。

(二) 磷酸甘油酯是磷脂酸的衍生物

膜含有几种脂类,在它们分子中有两个脂肪酸以酯键与甘油的 C1 和 C2 相接,还有一个高极性或具电荷的“头”,接在 C-3 上,后者是亲水性的。在绝大多数膜中存在的这些极性脂肪大多是甘油磷(酸)脂(glycerophospholipids),又称磷酸甘油酯(phosphoglyceride),它们的结构如图 28-19 所示。

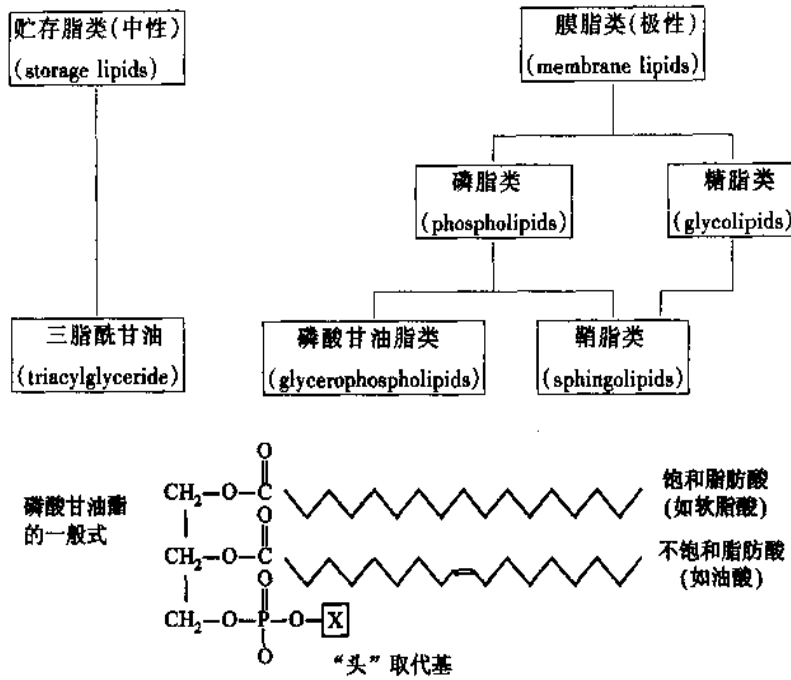


图 28-19 磷酸甘油酯的一般结构式

各类磷酸甘油酯的头的取代基,见表 28-3。

表 28-3 各类磷酸甘油酯的“X”即“头”的取代基

X 名	X 的分子式	磷酸甘油酯名
—	—H	磷脂酸 (phosphatidic acid)
乙胺	—CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine)
胆碱	—CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₂	磷脂酰胆碱 (卵磷脂) (phosphatidylcholine)
丝氨酸	—CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine)
甘油	—CH ₂ —CH—CH ₂ OH OH	磷脂酰甘油 (phosphatidylglycerol)
肌醇		磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol)
磷脂酰甘油	—CH ₂ — CHOH CH ₂ —O—P(=O)(O ⁻)—O—CH ₂ — CH—O—C(=O)—R ¹ CH ₂ —O—C(=O)—R ²	心磷脂 (cardiolipin)

(三) 磷脂的代谢

降解磷脂的酶称为磷脂酶(phospholipase)。这些磷脂酶根据裂解酯键的位置不同名称各异。磷脂酶 A_1 和 A_2 可切下磷脂的脂肪酸部分,磷脂酶 C 及 D 的攻击部位见图 28-20。磷脂酶 B 被认为是磷脂酶 A_1 及 A_2 的混合物。

磷脂水解后,最后的产物脂肪酸进入 β -氧化途径,甘油和磷酸则进入糖代谢。

磷脂即甘油磷酸脂,它的母体是甘油-3-磷酸,常称为 sn-甘油-3-磷酸(sn-glycerol-3-phosphate),如下式 A。

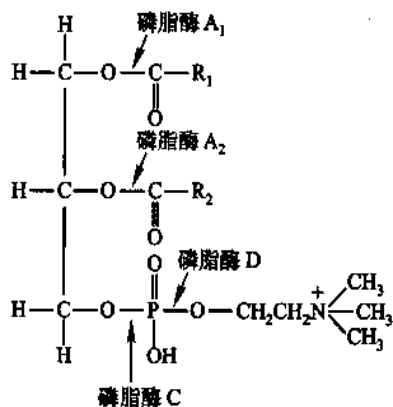
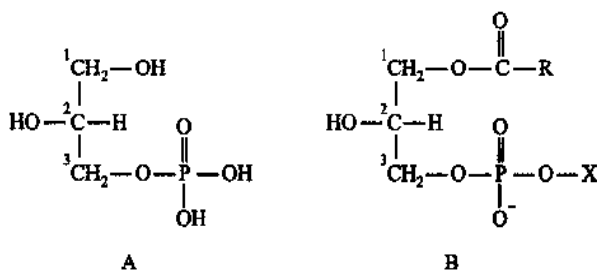


图 28-20 磷脂酶对磷脂酰胆碱(卵磷脂)的作用点
 R_1, R_2 : 长链脂酰基

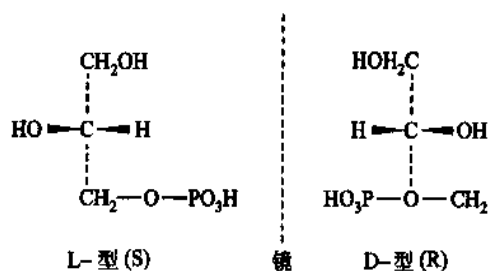
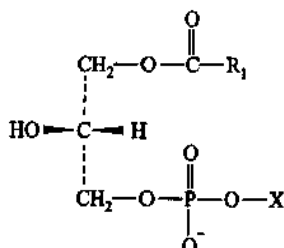


图 28-21 Sn-甘油-3-磷酸的两个光学异构体

若有两个脂肪酸在这母体化合物的 C_1, C_2 位酯化,取代基 X 取代了磷酸基的 H,即形成磷酸甘油酯的一般式(图 28-19)。化合物 A 按本文图示,应是 L 型(为 S 型),它还有一个光学异构体,即 D-甘油-3-磷酸脂。按 Fischer 投影式如图 28-21 所示[即 A 式的两个光学异构体]。A 式的 L-型为 S-型, D-型为 R-型(见第 19 章)。

母体(a)又称为 sn-甘油-3-磷酸,sn 是“stereospecific numbering”(立体特异编号)的缩写,“sn-1”是指

某一基团,例如 $R-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$,取代 1 位(成为 B 式)。此化合物若以 Fischer 投影式表示,应该是 S-型的:



因此,磷脂酶对磷脂(甘油磷酸酯)的进攻,常说成:“磷脂酶 A_1 选择性地把 sn-1 位的脂酰基水解掉”。同样,磷脂酶 A_2 的作用称为对 sn-2 位进攻。

六、鞘脂类的代谢

鞘脂类典型的结构特征是具有一长链和羟基化的二级胺。它们主要是三种长链的碱,如表 28-4 所示。

表 28-4 鞘脂的三种重要的碱

结 构	系统命名	普通名
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}=\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{N H}_3 \\ \downarrow \end{array}$	4-鞘氨醇 (4-sphinganine)	鞘氨醇 (sphingosine)
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{N H}_3 \\ \downarrow \end{array}$	二氢鞘氨醇 (sphinganine)	二氢鞘氨醇 (dihydrosphingosine)
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{N H}_3 \\ \downarrow \end{array}$	4-羟鞘氨醇 (4-hydroxysphinganine)	植物鞘氨醇 (phytosphingosine)

鞘脂类中一个脂肪酸分子与上述的碱(胺)形成酰胺,称为 N-脂酰鞘氨醇,或称神经酰胺(ceramide),图 28-22 为神经酰胺代表性的结构式,这里的图式是 4-鞘氨醇。一般鞘脂中所含的脂肪酸分子大多为饱和或不饱和的 C_{16} 、 C_{18} 、 C_{20} 或 C_{24} 。N-脂酰的 α -位大多有一羟基。N-脂酰鞘氨醇可进一步修饰成为最终的鞘脂结构,修饰的部位是它的一级羟基。

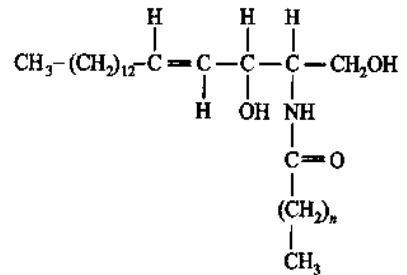


图 28-22 神经酰胺的结构式

(一) 鞘磷脂

磷酸胆碱以磷酰基与 N-脂酰鞘氨醇的一级羟基相接形成鞘磷脂(sphingomyelin)。其结构见图 28-23。

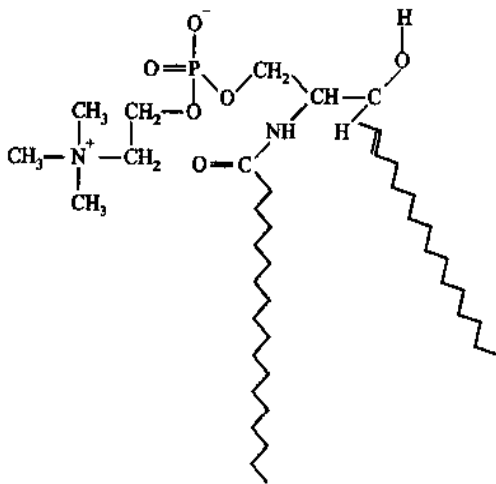


图 28-23 鞘磷脂的结构

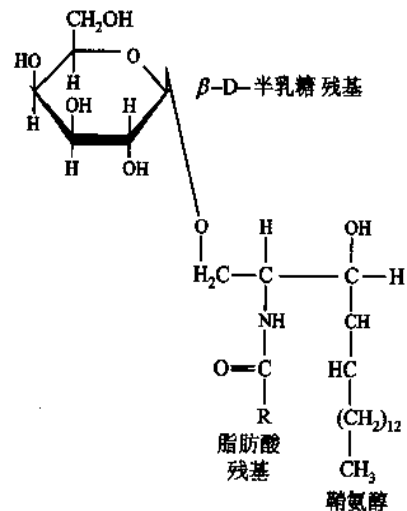


图 28-24 半乳糖脑苷脂的结构式

鞘磷脂是所有动物细胞的组成成分。它在包裹着神经细胞轴突的髓鞘中含量特别丰富,并由此而得名,它构成的多层膜的结构对神经纤维起保护和绝缘作用。在红细胞中鞘磷脂主要存在于脂双层的外表层。鞘磷脂在血浆脂蛋白中也有发现,因此,又是血浆脂蛋白的组成成分。

(二) 鞘糖脂

1. 脑苷脂

脑苷脂(cerebroside)是最简单的鞘糖脂(sphingoglycolipids),它由神经酰胺(ceramide)与一个单一的糖残基结合而成。其中一例是半乳糖脑苷脂(galactocerebroside)。它是脑的神经细胞膜中含量最多的组成成分,具有一个D-β-半乳糖残基(图 28-24)。葡萄糖脑苷脂(glucocerebroside)是葡萄糖残基代替了半乳糖残基的脑苷脂,它存在于其他组织的膜中。

脑苷脂与鞘磷脂不同,没有磷酸基团,因此,它的绝大多数是非离子性化合物。

2. 脑硫脂

脑硫脂(sulfatides)是某些脑苷脂中的半乳糖残基在它们的 C3 位上与一硫酸分子连接。有些更复杂的鞘糖脂持有无侧链的寡糖基,但最多不超过 4 个。

3. 神经节苷脂

神经节苷脂(ganglioside)是持有最复杂基团的鞘糖脂。它们以 N-脂酰鞘氨醇(ceramide)与寡糖分子连接,再有一个唾液酸(sialic acid),即 N-乙酰神经氨酸(N-acetylneuraminic acid)又与寡糖中的一个单糖分子结合而成的化合物。图 28-25 是其一例,它是神经节苷脂 GM₁ 的结构式。GM₂ 与 GM₃ 不同于 GM₁ 仅在于寡糖部分,GM₂ 在末端少一个半乳糖分子,GM₃ 则少一个半乳糖及一个 N-乙酰-半乳糖胺。

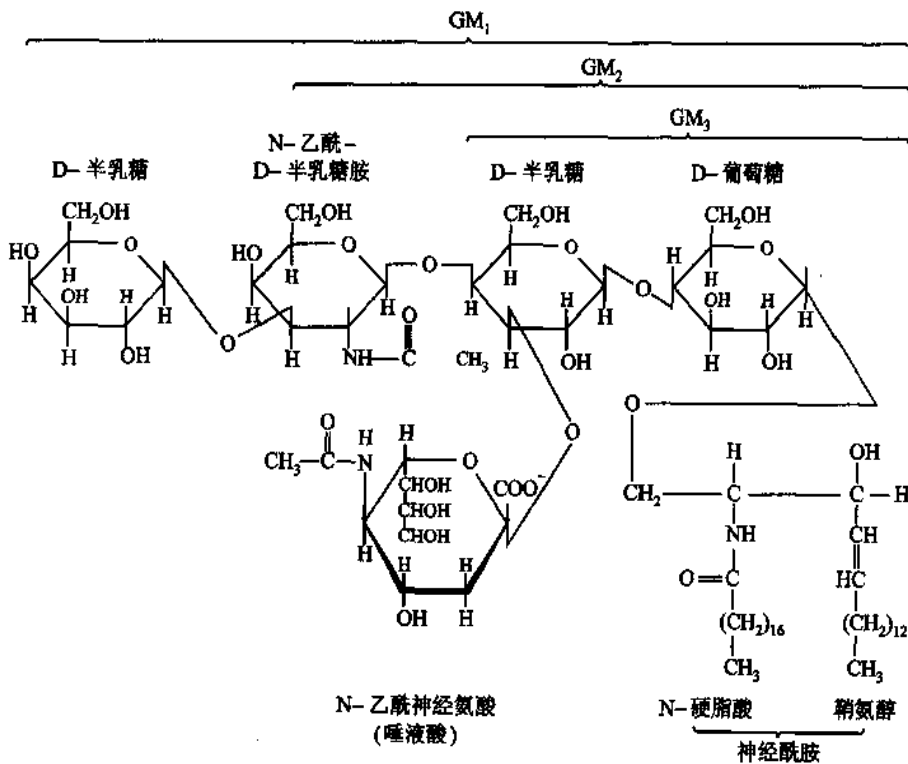


图 28-25 神经节苷脂的一例,神经节苷脂 GM₁

神经节苷脂具有相当重要的生理和医学意义。在它们分子中,居于头部的复杂的糖基延伸到细胞膜的表面,是某些脑下垂体(pituitary)糖蛋白激素的特异受体。这些激素的许多重要生理功能是具有调节作用。神经节苷脂还是细菌蛋白毒素的受体,例如霍乱毒素(cholera toxin)。有大量证据证明神经节苷脂是细胞-细胞间多糖识别的特殊的决定单元,因此它们可能在细胞的生长和分化,以及在心脏的发生(cardiogenesis)中有重要的功能。

神经节苷脂分解代谢的紊乱和某些遗传性神经鞘脂(sphingolipids)的积聚疾患有关。

4. 鞘糖脂的分解代谢

鞘糖脂的降解一步步地发生在溶酶体中(图 28-26)。鞘糖脂降解过程的研究由于在降解过程中存

在着一些人类的遗传性疾患而受到重视。各种疾患都是由鞘糖脂代谢中间体的积聚而引起,多数情况是分解代谢所需的某种酶的缺欠。现已阐明的不下 10 种。举二例说明:其一是“Fabry 病”,它是 Fabry J 和 Anderson W 在 1898 年分别同时发现的,其症状是皮疹(skin rash),骨端疼痛(pain in the extremities),肾损坏(renal impairment),同时伴有血压增高。患者还可正常生活,一般存活到 40 岁左右,这时肾发生衰竭。

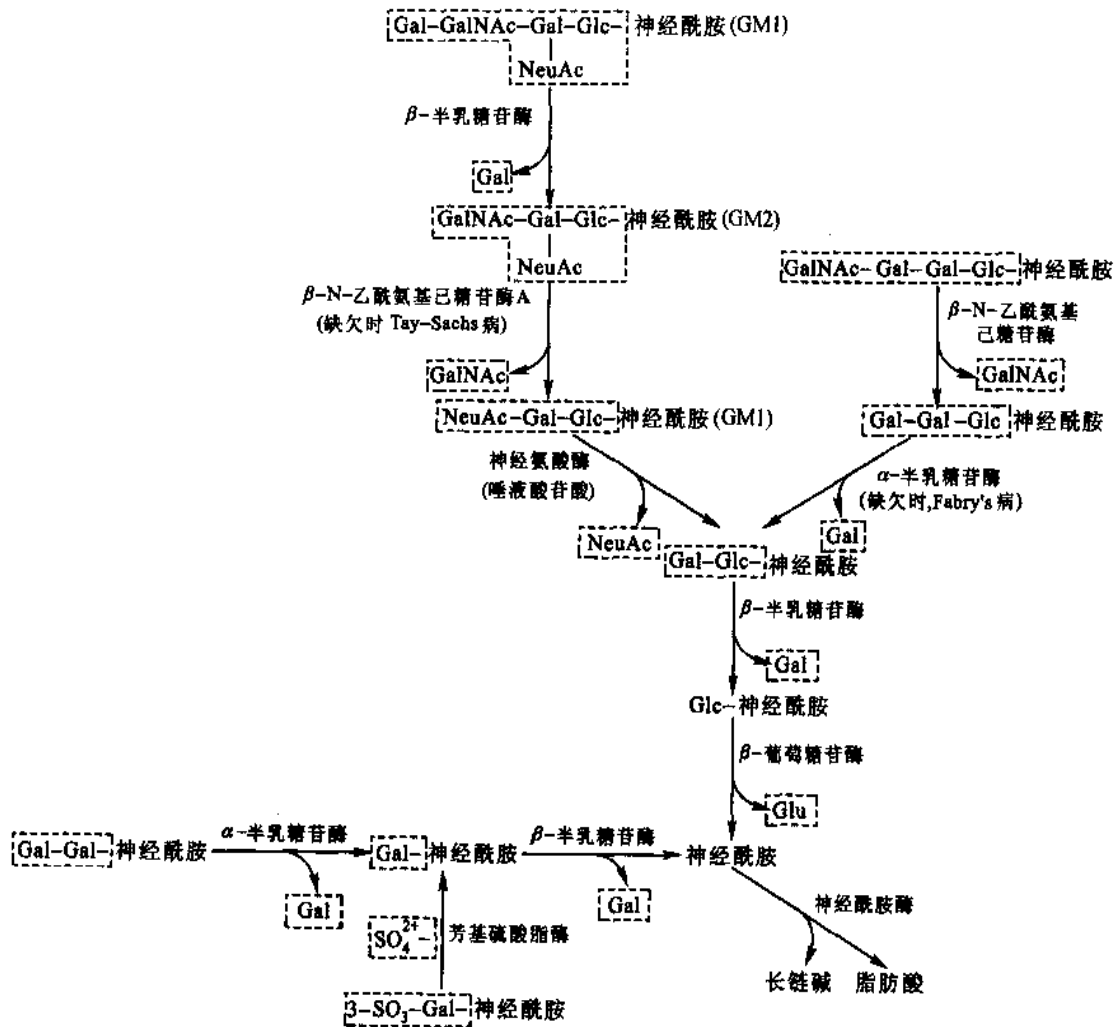


图 28-26 鞘糖脂的分解代谢

图例:Gal(半乳糖);Glc(葡萄糖);Neu,神经氨(糖)酸(neuraminic acid),又名甘露糖酸丙酮酸;NAc,N-乙酰-;神经酰胺(ceramide);半乳糖苷酶(Galactosidase);氨基己糖苷酶(hexosaminidase);葡萄糖苷酶(Glucosidase)

1963 年,发现了“Fabry 病”患者的肾中积聚有“半乳糖-半乳糖-葡萄糖-神经酰胺”(Gal-Gal-Glc-ceramide)。1967 年证明了这是由于缺欠降解三己糖神经酰胺(trihexosylceramide)的酶所引起,再稍后,证明这个酶是“ α -半乳糖苷酶 A”(α -galactosidase A)(图 28-26)。现时, α -半乳糖苷酶 A 的检测是判定此疾患的诊断方法。可以想到对患者的治疗似可使用这个酶,例如注射。但是成功例极少,因为酶注射进入血液后,存活期极短。好在 Fabry 病是极其罕见的。有过明确诊断报告的在全球不过几百例。

另一例是 Tay-Sachs 病,这是在 1881 年由 Tay W 发现的。现在美国,每年有 30~50 名儿童的病历,其中多是犹太民族。Tay-Sachs 病只能活到 3~5 岁,它是由于神经糖苷脂 GM₂ 的积聚所致,特别是在脑中,原因是氨基己糖苷酶(hexosaminidase)的缺欠。对于 Tay-Sachs 病现时是无法治疗的,因为用酶来注射,也无法穿透血-脑屏障。但是对这种疾患可进行控制。因为这种疾患是常染色体隐性疾病。若父母每一方都带有一单一的氨基己糖苷酶缺欠基因时,下一代患这种疾患的可能约为 25%。

七、甾醇的代谢

(一) 概论

甾醇存在于绝大多数真核细胞膜的结构脂中,它们结构的特点是含有4个烃环合为一体的甾核。这4个烃环中有3个是六碳环,一个是五碳环。甾核几乎处于一个平面上,它是相当僵硬的,C-C键不能自由旋转。动物组织中的主要的胆固醇是两亲性的,它有一个极性头的基团(在C-3位上的羟基)和一个非极性的烃结构(甾核和在C-17位上的烃侧链)。

胆固醇是自然界存在最丰富的甾醇化合物,是人的重要脂类物质之一,其结构式如图28-27所示。它来源于简单的五碳化合物异戊二烯,有关合成请见第29章。它是膜,血浆脂蛋白的重要组成成分,又是许多具有特殊生物活性物质的前体,例如,胆汁酸,类固醇激素,维生素D₃等。它们的结构式如图28-28。

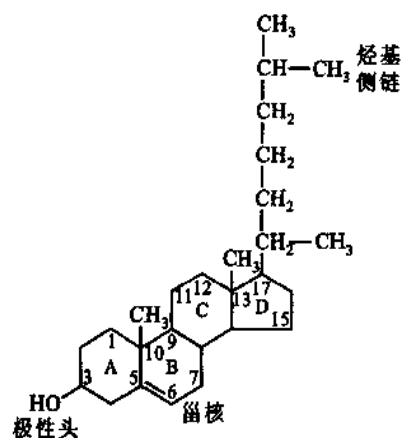


图28-27 胆固醇的结构

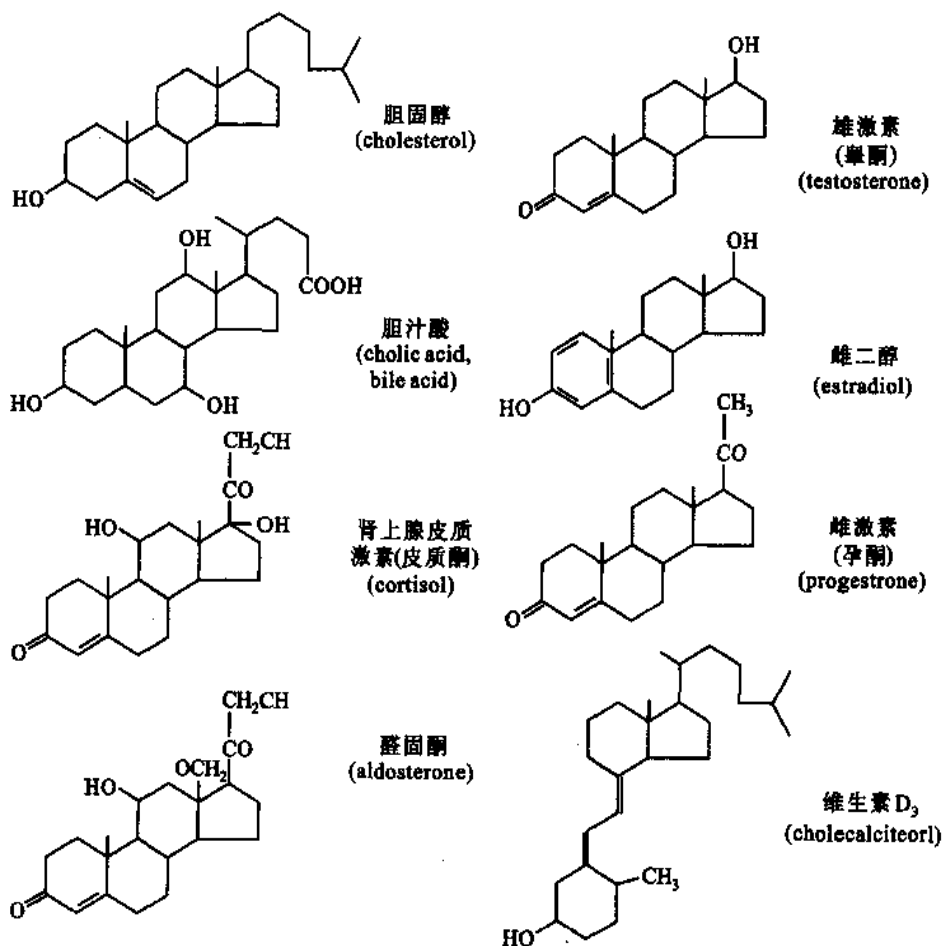


图28-28 胆固醇及其重要衍生物

(二) 胆固醇的代谢

胆固醇与一般脂肪不同,它不被降解并氧化为二氧化碳和水,而仅经过氧化,成为上述生物活性物质(图28-28)。

胆固醇在肝中的代谢主要途径是转化为胆汁酸。它在 $7-\alpha$ -羟化酶作用下转变为 $7-\alpha$ -羟胆固醇，其代谢过程如图 28-29。胆汁酸形成后，绝大部分都转变为胆汁酸盐(胆盐)进入肠道，它是来自膳食的脂质消化和吸收所不可少的，它乳化这些肠内的脂质，帮助消化脂质的酶对脂质进行分解。进入肠道的胆汁酸(胆固醇)剩余部分，在细菌作用下，其 C-5, C-6 间的双键被还原，成为饱和单键，这个化合物称为粪固醇(coprosterol)，被直接排出体外。机体每日随粪便排泄的胆固醇大约 0.4 g。

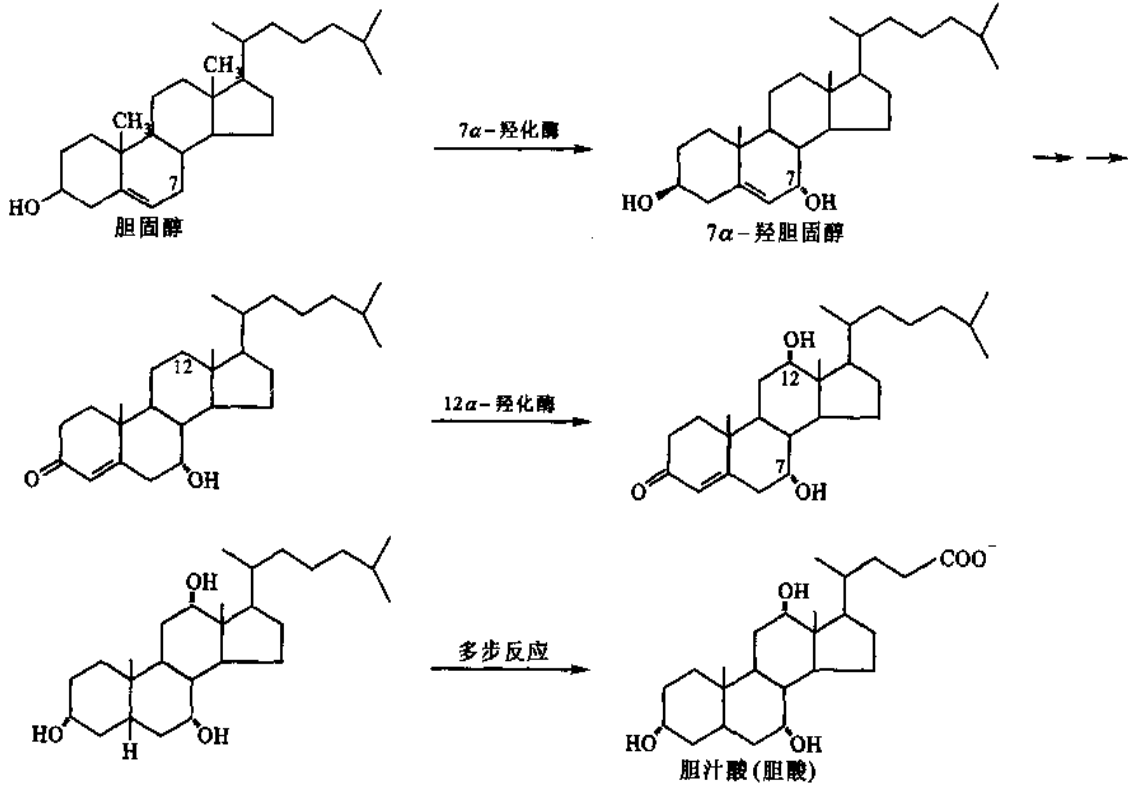
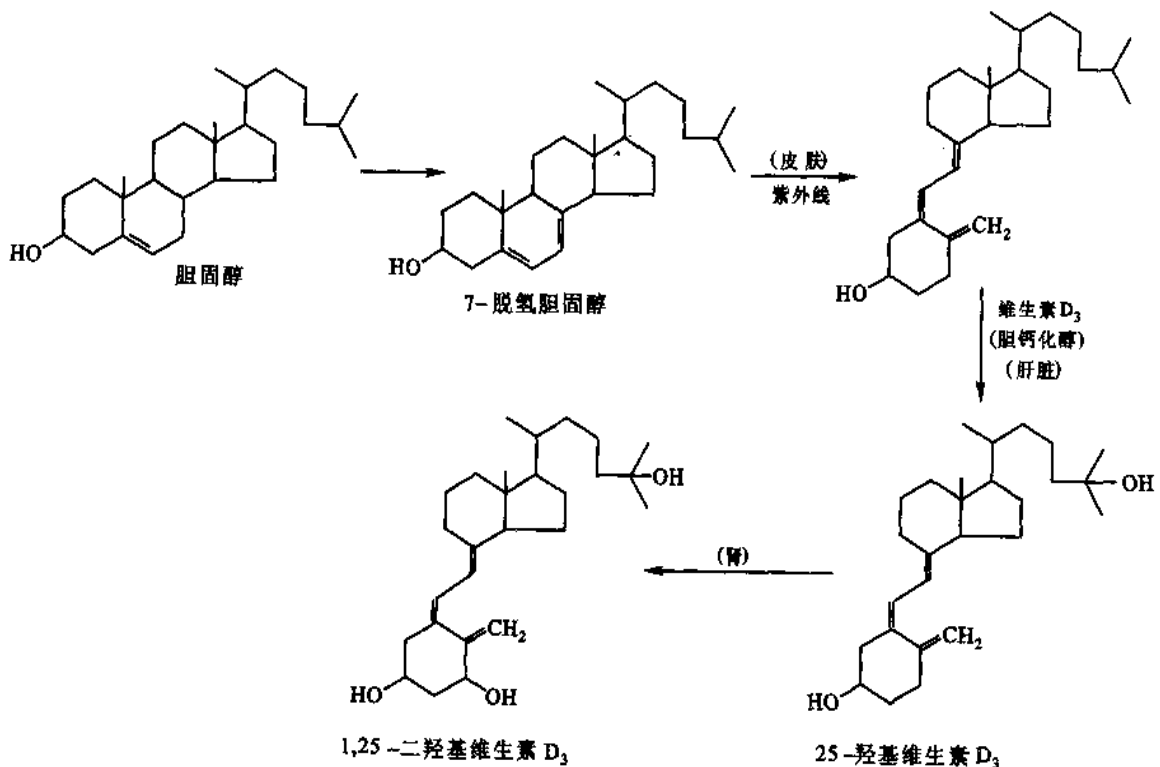


图 28-29 胆固醇的代谢

图 28-30 胆固醇到维生素 D_3 (无活性) 及活性维生素 D_3 的转变

如上述,胆固醇又是各种类固醇激素,如肾上腺皮质激素(皮质醇,醛固酮等)、雄性和雌性激素(睾酮,孕酮,雌二醇等)的前体化合物,它在肾上腺、性腺等组织的线粒体中,只经二步代谢反应即可转化为孕酮就是一例。这些激素又参与机体的代谢调节。

胆固醇在7-脱氢酶作用下,先形成7-脱氢胆固醇,在紫外线照射皮肤后,一步转化成维生素D₃。后者是无活性的,但在肝中可发生羟基化成为25-羟基维生素D₃。这个活性维生素D₃若进入肾,可以再转化为1,24-二羟基维生素D₃(图28-30)。

胆固醇的3-位羟基还可与脂肪酸结合成为胆固醇酯。在许多组织中脂肪酸经活化成为脂酰-CoA,在脂酰-CoA胆固醇脂酰转移酶(acyl-CoA:cholesterol acyl transferase, ACAT)作用下将脂酰基转移到游离胆固醇而形成胆固醇酯(图28-31)。

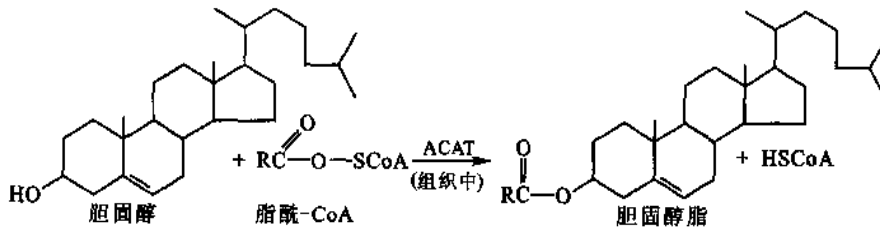


图28-31 胆固醇酯的形成

在血浆中,脂酰-CoA是由卵磷脂提供的。形成的胆固醇酯是血浆脂蛋白中,LDL(低密度脂蛋白)及HDL(高密度脂蛋白)内核的主要成分。HDL可从肝外组织将胆固醇运送到肝内进行代谢,这种运送方式称为胆固醇的逆向转运。机体可通过这样的转运把衰老细胞膜中的胆固醇送到肝脏,再排到体外(图28-32)。

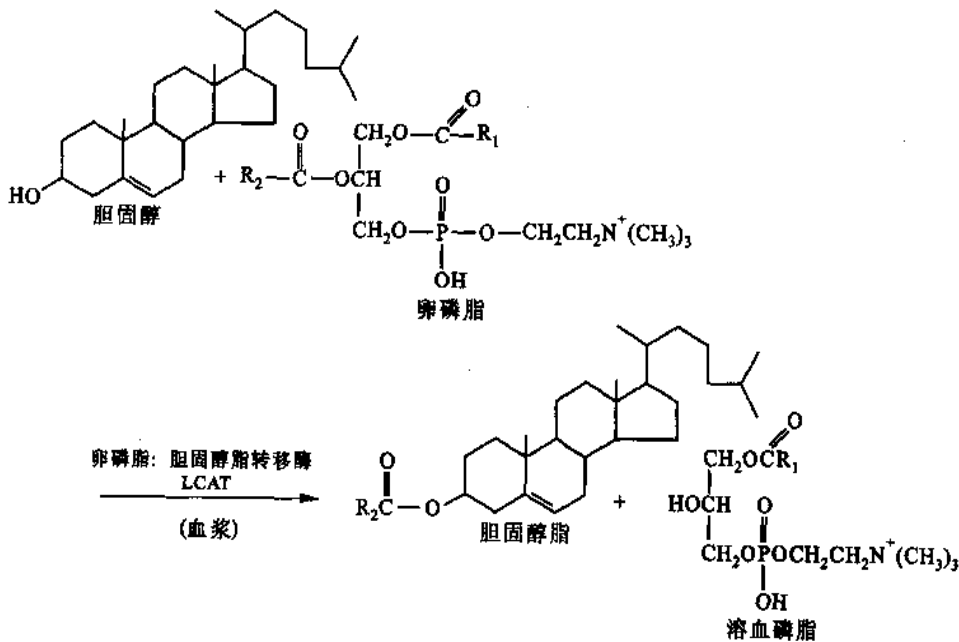


图28-32 血浆胆固醇酯的形成

八、脂肪酸代谢的调节

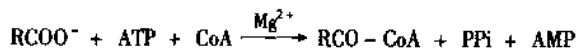
脂肪酸 β -氧化的主要调控关键是血液中脂肪酸的供给情况。血液中游离脂肪酸主要来源于三脂酰甘油的分解,它原是贮存在脂肪组织中,并受激素敏感的三脂酰甘油脂肪酶的调节。脂肪酸分解代谢与脂

肪酸合成是协同地受调控的,如此,它们可防止耗能性的无效循环(futile cycle)。

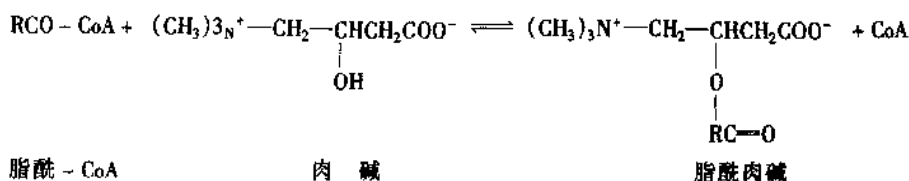
(一) 脂肪酸进入线粒体的调控

虽然血流中的脂肪酸水平适合于脂肪酸的利用,但由于不同类型的细胞对脂肪酸的需要量有很大差别,在细胞内仍需对脂肪酸的代谢进行调控。在细胞内,脂肪酸分解代谢的调控主要是由线粒体控制脂肪酸进入线粒体内。

脂肪酸进入细胞后,在细胞溶胶中,在硫激酶催化下先被 - CoA 和 ATP 活化,形成脂酰 - CoA:



脂酰 - CoA 进入线粒体的调节是以脂酰 - CoA 不能直接进入线粒体为依据。即它必须先转化为脂酰肉碱(acyl carnitine),才可穿越线粒体的内膜。



这个反应是在肉碱酰基转移酶的催化下发生的。至少有三种这样的酶与线粒体联系在一起,其中一个是对短链脂肪酸的,另两个(转移酶 I 及 II)是针对长链脂肪酸的。另外,在线粒体内膜有一蛋白质载体,负责运送肉碱,乙酰肉碱及短和长链脂酰肉碱衍生物通过此载体穿越线粒体内膜。脂酰肉碱运进线粒体后就立即受肉碱酰基转移酶 II 的作用,发生上面反应式的逆反应,肉碱得以游离,并产生脂酰 - CoA。也就是说,在细胞中至少有两个显然不同的脂酰 - CoA“库”,其一是在细胞溶胶中,另一是在线粒体中。转移酶 I 及 II 分别占据各自的部位, I 在线粒体外膜, II 在线粒体内膜,后者面向线粒体基质(参阅本章二、脂肪酸的氧化,图 28-5)。

这样安排精致的反应链提供了几种调控脂酰 - CoA 氧化降解的可能性。其中主要的调控点是肉碱酰基转移酶 I,它强烈地受丙二酰 - CoA 的抑制。如前所述,丙二酰 - CoA 在脂肪酸合成中担负着重要角色。因此,当丙二酰 - CoA 处于高水平时,它指向脂肪酸合成,也就妨碍脂肪酸的分解代谢。

(二) 心脏中脂肪酸氧化的调节

在绝大多数组织中, β -氧化的调节是个复杂问题,因为它与脂质生物合成与糖代谢都牵连在一起。在心脏中,脂质合成很少存在,因此脂肪酸氧化的“图形”更为简单。脂肪酸氧化是心脏的主要能源,如若心脏用能减少,柠檬酸循环和氧化磷酸化的活动也随之减弱,导致乙酰 - CoA 和 NADH 的积聚。乙酰 - CoA 在线粒体中水平增高会抑制硫解酶的活性,也就抑制 β -氧化。NADH 的增高,NAD⁺的缺少,影响了 3-羟脂酰 - CoA 脱氢酶也就妨碍了氧化反应。在心脏中 β -氧化的调节似发生于氧化循环后程的酶,与一般代谢途径的调节发生于起始行程有所不同。

(三) 激素对脂肪酸代谢的调节

在脂肪酸分解代谢的调节中,有两个重要的激素,即胰高血糖素(glucagon)和肾上腺素(epinephrin 或 adrenaline)参与作用。

它们在脂肪酸的存贮部位促进它的分解代谢。如前所述,脂肪组织中三脂酰甘油的水解速度受激素敏感的三脂酰甘油脂肪酶活性的调节,此酶敏感地受到磷酸化和去磷酸化的调节,而磷酸化和去磷酸化又受到由激素控制的 cAMP 水平的调节。肾上腺素,胰高血糖素都使脂肪组织的 cAMP 含量升高。cAMP 变构激活 cAMP-依赖性蛋白激酶,后者增加三脂酰甘油脂肪酶磷酸化的水平,从而加速了脂肪组织中的脂解(lipolysis)作用,又进一步提高了血液中脂肪酸的水平。最终活化了其他组织例如肝脏和肌肉中的 β -氧化途径。在肝脏,则生成酮体进入血流可代替葡萄糖作为燃料提供给其他组织。cAMP 依赖性蛋白激酶也抑制乙酰 - CoA 羧化酶(acetyl CoA carboxylase),它是脂肪酸合成中的一个限速酶,因此 cAMP 依赖性磷

酸化作用既刺激脂肪酸的氧化又抑制脂肪酸的合成。

胰岛素和肾上腺素、胰高血糖素的作用相反,胰岛素刺激三脂酰甘油以及糖原的形成。它还有降低 cAMP 水平的作用。导致去磷酸化从而抑制激素敏感的脂肪酸的活性,于是使供给 β -氧化所需的脂肪酸量减少。胰岛素也激活一些不依赖 cAMP 的蛋白激酶,这些酶使另外一些酶磷酸化,例如乙酰 - CoA 羧化酶即由此磷酸化。因此,胰高血糖素和胰岛素的比例在决定脂肪酸代谢的速度和方向中是至关重要的。

脂肪酸氧化另外的控制点是当脂肪酸的合成被激活后,丙二酰 - CoA 是肉碱脂酰转移酶 I 强劲的抑制剂。这一抑制将新合成的脂肪酸保留在线粒体外而远离 β -氧化途径。

(四) 根据机体代谢需要的调控

前面已经提到,脂肪酸代谢的调控是根据机体代谢的需要进行的。细胞溶胶中若软脂酰 - CoA 过量,则表明机体不再需要更多的软脂酰 - CoA,在此情况下,通过抑制脂肪酸合成的酶关闭脂肪酸合成途径,并抑制产生 NADH 的反应。同样,柠檬酸的充足,表明机体对能量的需要能够满足,这正是合成脂肪酸以存贮能量的好时机。从这景象中可以看到:脂肪酸, NADPH 和乙酰 - CoA 是合成底物的关键化合物,进一步说,柠檬酸是在脂肪酸生物合成中执行第一步反应的乙酰 - CoA 羧化酶(催化形成丙二酰 - CoA)的专一性的活化剂。

(五) 长时间膳食的改变导致相关酶水平的调整

须脂出,膳食条件长时期改变,对与脂肪酸代谢相关的酶会发生水平的变化。例如,禁食后大鼠肝中脂肪酸合酶及乙酰 - CoA 羧化酶的浓度都降低了 4 到 5 倍。当给大鼠以无脂肪饲料,脂肪酸合酶较用正常饲料喂饲的大鼠增高 14 倍。当今所得证据指出,这些酶的水平是由控制酶的合成速度形成的,而不是控制其降解。mRNA 的合成主要由 DNA 转录的速度进行调控。当前感兴趣的问题是 DNA 转录的调节。

提 要

脂肪酸分解代谢又称脂肪酸 β -氧化,是指脂肪酸的长链被氧化最终产生 ATP 形式的能量。其过程,简言之是脂肪酸先以它的酰基与 - CoA 相连,形成脂酰 - CoA 衍生物。随后经过 4 步代谢反应,自脂肪酸的羧基端脱掉两个碳原子单元即乙酰辅酶 - A 单元。脂肪酸的彻底氧化是上述步骤的多次反复,以软脂酸为例,最终产生 8 个乙酰 - CoA, 7FADH₂, 7NADH 和 7H⁺。一分子软脂酸可生成 106 个 ATP(过去的理论值为 129 个 ATP), 相当于 $106 \times -30.54 \text{ kcal}$, 或 $129 \times -30.54 \text{ kcal} = 3\,237.6 \text{ kJ}$ 或 $3\,940.1 \text{ kJ}$ 。

脂肪酸分解代谢发生于原核生物的细胞溶胶及真核生物的线粒体基质中。它在进入线粒体前,先与 - CoA 以硫酯键连接形成脂酰 - CoA 而被活化。

线粒体内膜不允许长链脂酰 - CoA 穿透,为此它要先经肉碱/脂酰肉碱转移酶催化,形成肉碱衍生物,才可进入线粒体。一旦进入线粒体后又在酶的特异催化下,释出游离肉碱,回归为脂酰 - CoA。

此后,脂酰 - CoA 发生 β -氧化经历 4 步反应。它们是①脂酰 - CoA 被 FAD 氧化形成反式 - Δ^2 -烯酰 - CoA。②上述烯酰 - CoA 经过水合,生成 3-羟脂酰 - CoA。③3-羟脂酰 - CoA 被 NAD⁺ 氧化,形成酮脂酰 - CoA。④最后一步是被第二个 - CoA 分子硫解,生成乙酰 - CoA 及一个减少了两个碳原子的脂酰 - CoA。以上反应都需相应酶的催化。

脂肪酸的 β -氧化产生的 FADH₂ 及 NADH 直接进入氧化磷酸化,乙酰 - CoA 则进入柠檬酸循环,并进一步产生 FADH₂ 及 NADH。动物体内 β -氧化产生的乙酰 - CoA 不能转化为丙酮酸或草酰乙酸,因此也就不能产生葡萄糖。在植物中有另外两种酶可使乙酰 - CoA 通过乙醛酸途径(glyoxylate pathway)转化为草酰乙酸。

不饱和脂肪酸在它的 β -氧化途径中,需有更多的酶参加反应。例如,棕榈油酸(cis - Δ^9 C16:7)当它按正常 β -氧化进行了三个轮回之后,形成顺式 - Δ^3 -烯酰 - CoA,这时必得有异构酶参加反应将顺式 - Δ^3 构型转化为反式 - Δ^2 构型,才可继续沿 β -氧化途径进行。对于偶数碳原子的多不饱和脂肪酸,除异构酶外,还需另外的酶参与。

奇数碳原子的脂肪酸在最后的一步轮回后,生成乙酰-CoA(两个 C)及丙酰-CoA(三个 C)。

脂肪酸的 β -氧化产生的乙酰-CoA,若过量就会转化为乙酰乙酸及D-3-羟丁酸。后二者与甚少量的转化物,丙酮合在一起称为酮体。乙酰乙酸及D-3-羟丁酸产生于肝脏,在饥饿或患糖尿病时,它们可以提供选择性燃料给脑组织。

脂肪酸分解代谢与生物合成的调控,如若二者不同时发生,将会是“浪费”的。调控的因子是当生物体的能量贮存过量时,令合成进行,分解代谢只要在需能时才发生。激素肾上腺素和胰高血糖素、胰岛素都参与脂肪酸代谢的调控。

生物膜的重要特征是其脂质的双层膜(脂双层)。这些脂质是两亲性的。一般膜脂类是由磷脂类(phospholipids)和糖脂类(glycolipids)构成。磷酸甘油脂类(glycerophospholipids)是磷脂类中的代表,鞘脂类(sphingolipids)则是磷脂类和糖脂类二者兼而有之的代表。磷脂类的分解由4种以上的磷脂酶执行。不同酶有不同的攻击点。鞘脂类中又有鞘磷脂(sphingomyelin)与鞘糖脂(sphingoglycolipids)之分,其中鞘糖脂中的脑苷脂(cerebrosid),神经节苷酯(gangliosid)有着重要的生理学和医学意义。如鞘糖脂的分解代谢,最终可生成脂肪酸和长链碱。在代谢途径中,某种重要酶的缺欠都可导致严重的遗传疾患。

胆固醇代谢不同于绝大多数生物活性物质,不降解为二氧化碳和水。它仅经过氧化转化为胆汁酸、类固醇激素、维生素D₃等。以胆汁酸盐形式进入肠道的胆固醇,一般是在细菌作用下转化为粪固醇或以残量胆固醇排出体外。

习 题

1. 说明经典的 Knoop 对脂肪酸氧化的实验和结论。比较他的假说与现代 β -氧化学说的异同。
2. 计算一分子硬脂酸彻底氧化成CO₂及H₂O,产生的ATP分子数,并计算每克硬脂酸彻底氧化产生的自由能。
3. 说明肉碱-酰基转移酶在脂肪酸氧化过程中的作用。
4. 说明辅酶维生素B₁₂在奇数碳原子氧化途径中的功能。
5. 说明在植烷酸的氧化中, α -氧化是必然的。
6. 如若膳食中只有肉,蛋和蔬菜,完全排除脂质,会不会发生脂肪酸缺欠症?
7. 患者体内发生脂质异常积聚,经检测,脂质中具有半乳糖-葡萄糖神经酰胺的结构。试问是哪一步酶反应不能正常运行?
8. 试说明“酮尿症”的生化机制。
9. 说明无活性维生素D₃和活性维生素D₃的结构关系。

主要参考书目

1. Zubay G. Biochemistry, 3rd ed. Illinois: Wm. C. Brown Publishers, 1993
2. Lehninger A L *et al.* Principles of Biochemistry, 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1993
3. Voet D, Voet J G. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1990, 1995
4. Roskoski R. Biochemistry. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1996
5. Hames B D *et al.* Instand Notes for Biochemistry. Stoodleich: Bios Scientific Publisher, Ltd., 1997
6. Vance D E, Vance J E. Biochemistry of lipids, Lipoproteins, and Membranes. Elsevier Science Publishers, 1991
7. Numa S. Fatty Acid Metabolism and Its Regulation. Elsevier Science Publishers, 1984
8. Stenesh J. Biochemistry. Plenum Press, 1998
9. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. Work Publishers, 2000
10. Eston S, Bartlett K., Pourfarzam M. Mammalian mitochondrial β -oxidation. Biochem. J. 1996, (320): 345 ~ 257
11. Rinaldo P, Raymond K *et al.* clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. Curr. Opin. Pediatr. 1998, (10): 615 ~ 621
12. Thorpe C, Kim J J. Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. FASEB J. 1995, (9): 718 ~ 725
13. Hashimoto T. Peroxisomal β -oxidation: enzymology and molecular Biology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1996, (804): 86 ~ 98

第 29 章 脂类的生物合成

脂类的功能是多种多样的。在大多数生物中脂肪是能量贮存的主要形式,类脂,特别是磷脂和胆固醇是细胞膜的主要组成成分,起着维持细胞的完整、区隔细胞内部的不同结构的作用。有些特殊的脂质还起着某些特殊作用,例如,激素(维生素 D 的衍生物性激素)、辅助因子(维生素 K)、乳化剂(胆汁盐)、转运者(多萜醇 dolichol)、颜料(视黄醛 retinal)及细胞外和细胞内的信使(白细胞三烯 leukotrienes, 前列腺素 eicosanoids、血栓烷 thromboxane, 即类花生酸以及磷脂酰肌醇 phosphatidylinositol 等),它们多在发生作用的部位或邻近部位产生,属于局部激素。还有膜蛋白的锚钩(anchors)(以共价相连的异戊二烯基及磷脂酰肌醇)等。因此,所有的有机体合成种种不同脂类的能力是十分重要的。在本章中将着重讨论脂肪在体内的贮存动员和脂类的生物合成。

一、贮存脂肪

(一) 贮存脂肪

前面已经提到脂类,特别是脂肪是动物的主要能量贮存形式,脂类是所有营养物质中单位质量具有最多能量的化合物(38 kJ/g 或 9.0 kcal/g),用它们来贮存能量是最有利的。

我们把贮存的脂肪称之为贮存脂肪(depot fat)或脂肪组织(adipose tissue)。来自膳食的脂肪必得先转化为贮存脂肪。脂肪的贮存和运送是相互联系的过程。当需要脂肪分解代谢提供 ATP 形式的能量时,脂肪酸自脂肪组织转移到肝脏以便分解。我们把脂肪仓库中贮存的脂肪释出游离脂肪酸,并转移到肝脏的过程称为动员(mobilization)。这个过程需要酶的作用。脂酶(lipases)和磷脂酶(phospholipases)担负着水解脂肪的作用(图 29-1)。释出的游离脂肪酸在线粒体中进行分解代谢,甘油则在细胞溶胶中降解。脂肪酸动员是由一系列酶的作用所调控,与糖类动员的情况颇相像。脂肪酸一旦从脂肪细胞(adipocytes, 脂肪组织的细胞)中游离释出,它们就渗透穿过膜,与血清清蛋白结合,运送到各种组织。

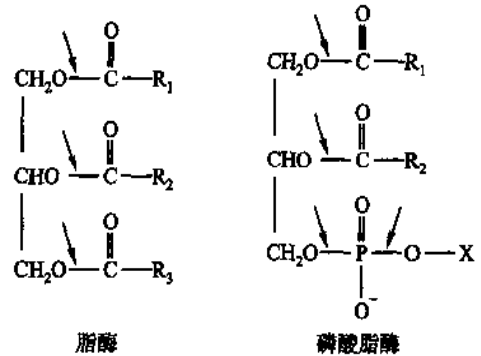


图 29-1 脂酶和磷酸脂酶的作用

(二) 脂肪肝

过度的脂肪动员可导致发展成脂肪肝(fatty liver),这时肝脏被脂肪细胞所浸渗,变成了非功能的脂肪组织。脂肪肝可能因糖尿而产生,由于胰岛素缺乏不能正常动员葡萄糖,此时就必须使用其他营养物质供给能量。典型的情况是脂类的分解代谢加剧,包括过度的脂肪酸动员和肝脏中过度的脂肪酸降解,其结果引起了脂肪肝的发生。

脂肪肝的发生还有可能是受化学药品的影响,例如,四氯化碳或吡啶。这些化合物破坏了肝细胞,导致脂肪组织去取代它们,肝的功能就逐步丧失。膳食中缺乏抗脂肪肝剂(lipotropic agents),即胆碱和甲硫氨酸(蛋氨酸)时,因为它们对脂类运送有

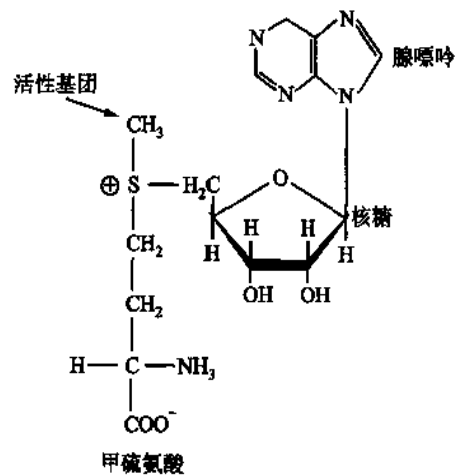


图 29-2 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)

作用,缺乏也可导致脂肪肝的出现。

已知,胆碱是磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline)的组成成分,它的合成需要有丝氨酸提供碳骨架,S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)(图 29-2)提供三个甲基。后者是由甲硫氨酸和 ATP 反应形成,它在许多生物化学的甲基化反应中扮演甲基供体的角色。可以说,磷脂酰胆碱的合成是一个步步叠加的系列:



在膳食中甲硫氨酸和胆碱的不足,导致磷脂酰胆碱合成的缺乏,又导致脂蛋白的缺少。前面已提到,脂蛋白是磷脂和蛋白质环绕着胆固醇和三脂酰甘油的核构成。脂蛋白的脂类来自肝脏。脂蛋白合成的减弱导致肝脏中脂类的积聚,结果产生脂肪肝。

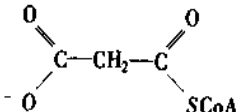
二、脂类的合成

(一) 脂肪酸的生物合成

1. 乙酰 - CoA 的作用

当有机体需要自膳食获取能量以贮存时,脂肪酸合成就会发生。合成在细胞溶胶中进行,包括脂肪酸链自乙酰 - CoA 获得两个碳原子单元,从而增长链长的步骤。随后在需要时,脂肪酸与甘油分子结合形成贮存形式的脂肪。

在上章已述,脂肪酸降解的步骤是氧化移去两个碳原子单位(乙酰 - CoA)的过程,不难设想脂肪酸合成或许是降解酶反应步骤简单的逆反应而已。但是实际却不是这样。脂肪酸氧化和降解通过不同的途径,使用不同的酶,发生场所也是在细胞的不同部位,而且有一个重要的三碳单元中间体即丙二酸单酰辅

酶 A(malonyl - CoA)(又简称丙二酰 - CoA)  ,参与脂肪酸合成,它与脂肪酸降解完全无关。

在叙述这个三碳单元的中间体前,先讨论与降解、合成都相关的乙酰 - CoA。已知,乙酰 - CoA 产生在线粒体中,在丙酮酸脱氢酶复合体的催化下,丙酮酸被转化为乙酰 - CoA,另外,在 β -氧化中硫解酶的反应也产生乙酰 - CoA。但是在线粒体产生的乙酰 - CoA 必须先从线粒体转移到细胞溶胶中,才能参与脂肪酸合成。然而,线粒体内膜对乙酰 - CoA 是不容许穿透的。在这里,有一穿梭机制取代直接的运送,这个机制称为三羧酸转运体系(tricarboxylate transport system)(图 29-3),它使用柠檬酸作为乙酰基的载体。在线粒体中,柠檬酸循环的第一步反应是柠檬酸的形成,来自乙酰 - CoA 和草酰乙酸。柠檬酸跨过线粒体内膜,在细胞溶胶中,受柠檬酸裂解酶作用而断裂,生成乙酰 - CoA 和草酰乙酸:



草酰乙酸可转向苹果酸或丙酮酸,二者都可以再被运送进入线粒体。在有些条件下,穿梭机制产生出的 NADPH 可用于脂肪酸合成中的还原反应。如果苹果酸回到线粒体,就没有 NADPH 形成。如果苹果酸在苹果酸酶作用下转化为丙酮酸,在细胞溶胶中就有 NADPH 的形式。在后述的步骤中,每产生一分子 NADPH,就有一分子乙酰 - CoA 被运送到细胞溶胶中。在脂肪酸合成的总体中,这是重要的一步。举例来说,合成 1 分子软脂酸需要 8 分子乙酰 - CoA 和 14 分子 NADPH。将 8 分子乙酰 - CoA 自线粒体运送到细胞溶胶,就同时产生 8 分子 NADPH,余下不足的 6 分子 NADPH 可从肝脏中的戊糖磷酸途径(pentose phosphate pathway)或从脂肪组织中苹果酸酶反应中获得(图 29-3)。

2. 丙二酸单酰 - CoA 的形成来自乙酰 - CoA 和碳酸氢盐

脂肪酸合成起始于乙酰 - CoA 转化成丙二酸单酰 - CoA。这步反应是在乙酰 - CoA 羧化酶作用下实现的,羧化酶反应构成脂肪酸合成的重要步骤。

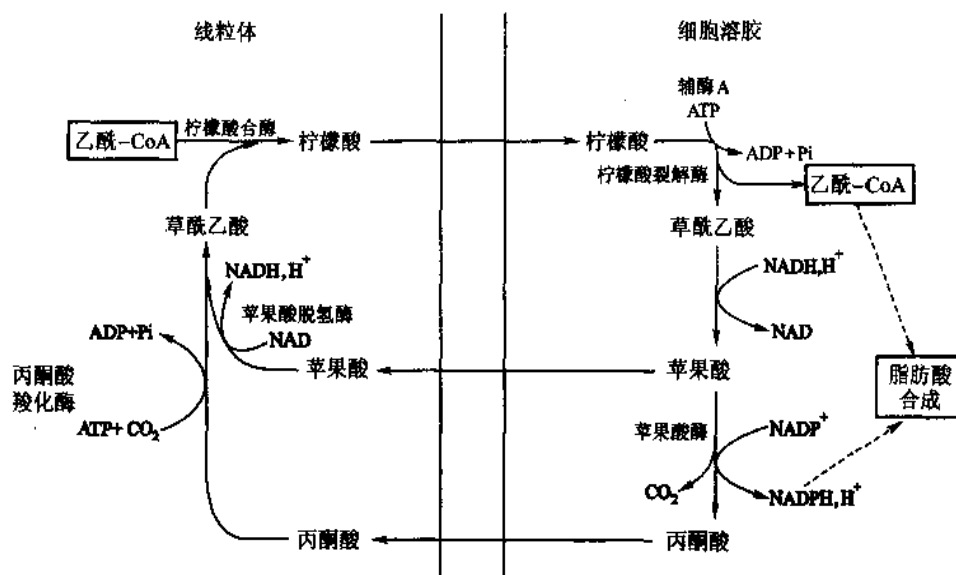


图 29-3 三羧酸转运体系

原核生物,例如,大肠杆菌(*E. coli*)的乙酰 - CoA 羧化酶,人们已将其催化不同反应的亚基都分离得到。它是 3 种蛋白质的复合体,其一是生物素羧基载体蛋白(biotin carboxyl carrier protein, BCCP),它的作用是生物素的载体。

生物素的羧基与这个蛋白质的赖氨酸残基的 ϵ - 氨基以共价连接,形成生物胞素(biocytin, 图 29-4)。另外的两种蛋白质是生物素羧化酶(biotin carboxylase)和转羧酶(trans carboxylase)。在 *E. coli* 中,这个载体蛋白和两个酶的相对分子质量依次为 23 000,98 000(两个亚单位各为 49 000)及 130 000。转羧酶催化由乙酰 - CoA 形成丙二酸单酰 - CoA 的反应如图 29-5 所示。

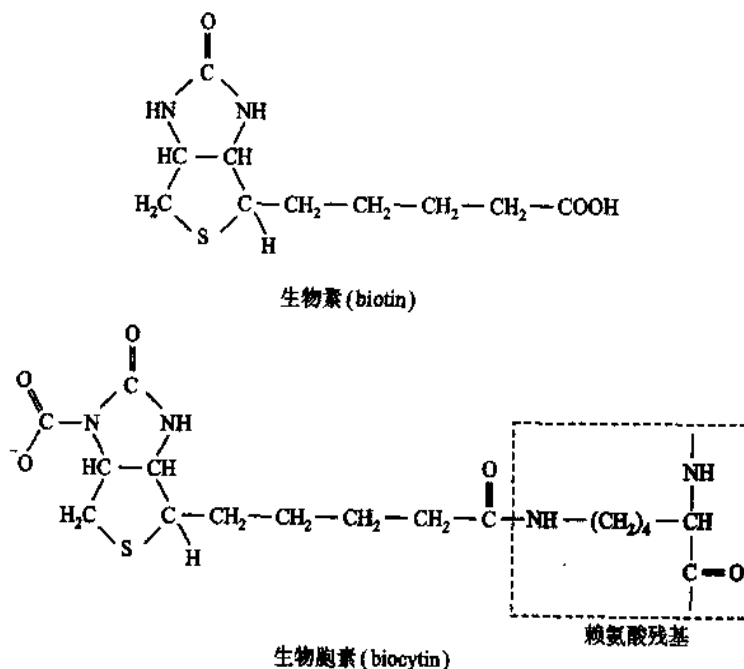
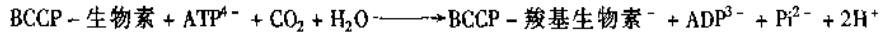


图 29-4 生物素和生物胞素(又名羧基生物素酰赖氨酸, carboxy biotinyl lysine)

真核生物哺乳类和鱼类的乙酰 - CoA 羧化酶是两个相同亚单位(相对分子质量各为 260 000)的二聚体,其生物素羧化酶和转羧酶以及生物素羧基载体都在单一的,相对分子质量为 230 000 的肽链上。生物素羧化酶催化的反应如下:



转羧酶催化的反应是将 BCCP-羧基生物素的活性羧基转移给乙酰-CoA(图 29-5), 结果生成丙二酸单酰-CoA。

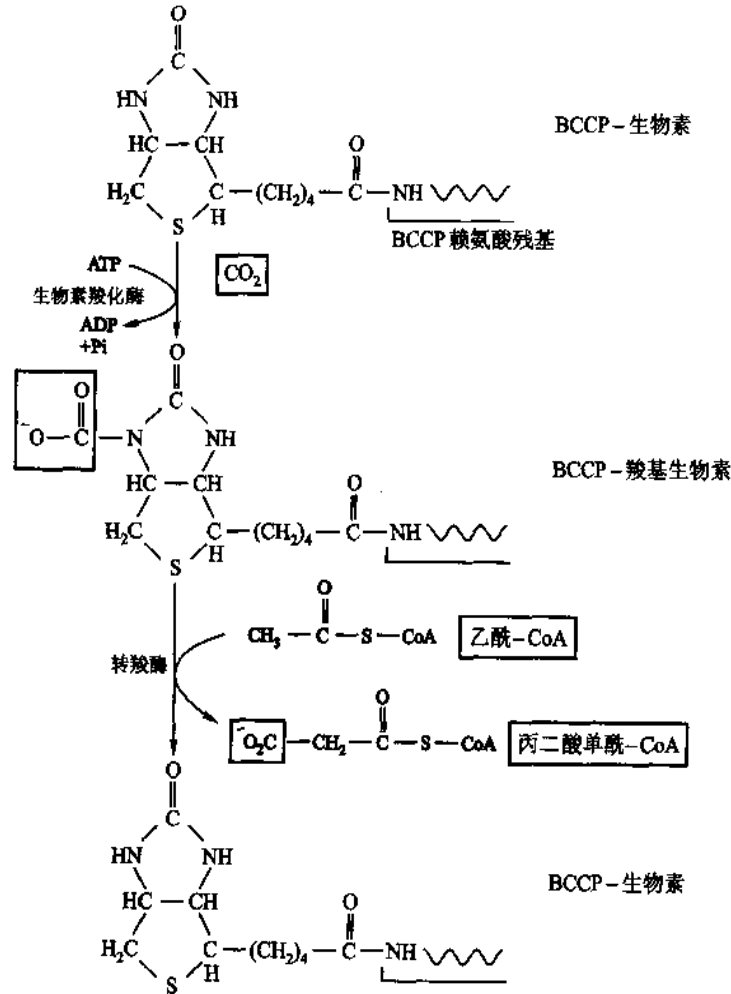
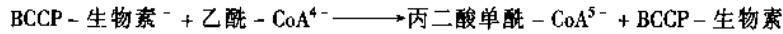


图 29-5 在乙酰-CoA 转羧酶作用下丙二酸单酰-CoA 的形成

3. 脂肪酸合酶

乙酰-CoA 和丙二酸单酰-CoA 准备好之后, 脂肪酸合成的下一步反应是脂肪酸合酶复合体的酶促反应。在动物细胞中, 脂肪酸合酶复合体包含有 7 种酶活性和一个酰基载体蛋白质。

酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)是一个相对分子质量低的蛋白质, 它在脂肪酸合成中的作用犹如辅酶 A 在脂肪酸降解中的作用。它的辅基是磷酸泛酰巯基乙胺(phosphopantetheine), 这个辅基的磷酸基团与 ACP 的丝氨酸残基以磷酸酯键相接, 另一端的-SH 基与脂酰基形成硫酯键, 这样形成的分子可把脂酰基从一个酶反应转移到另一酶反应, 由此即得到“脂基载体蛋白”的名称。在脂肪酸的降解中, 同样的磷酸泛酰巯基乙胺又是辅酶 A 的一部分(图 29-6)。这个长链的磷酸泛酰巯基乙胺分子犹如“摆臂”, 和丙酮酸脱氢酶复合体的硫辛酰赖氨酸臂(lipoyl lysine arm)相像, 它可以把底物在酶复合体上从一处的催化中心转移到另一处。

脂基载体蛋白最初自 *E. coli* 分离得到。磷酸泛酰巯基乙胺(也可视为 4'-磷酸泛酰氨基乙硫醇)的磷酸基团与蛋白质的第 36 位丝氨酸的羟基酯化相接(图 29-6, A)。蛋白质本身含有 77 个氨基酸残基($M_r = 10\ 000$)。ACP 的装配和脂肪酸合成的酶系因有机体类型而异。在 *E. coli* 和植物中, 脂肪酸合酶由

多酶体系构成,它是由不同的7种多肽链的聚合体。其中一链是 ACP,其余六链是酶。

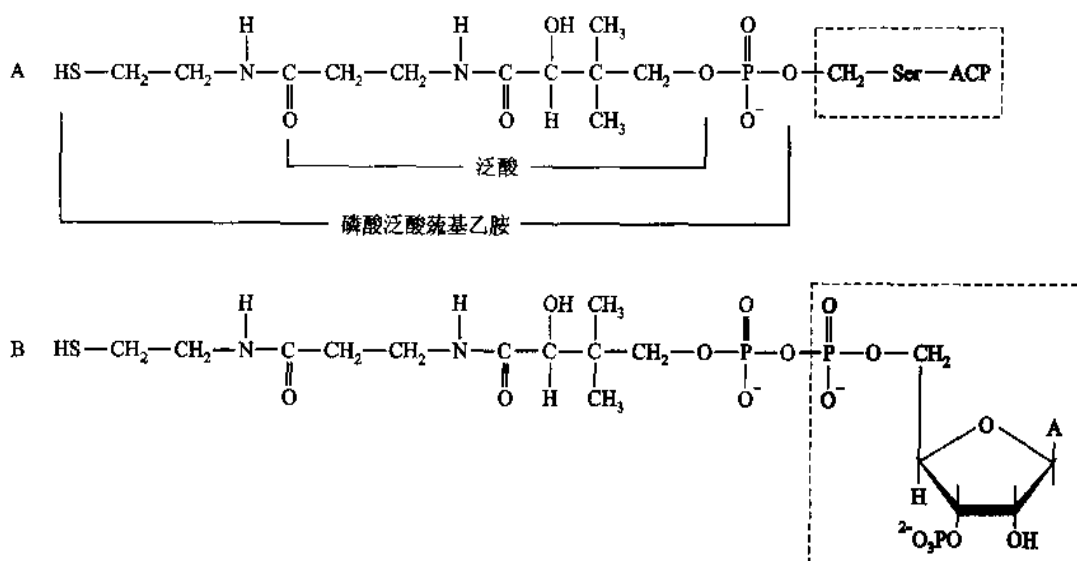


图 29-6 磷酸泛酰硫基乙胺(phosphopantetheine)是 ACP 和辅酶的活性单位

- A. ACP 与辅基磷酸泛酰硫基乙胺连接的复合体
- B. 辅酶 A 中的磷酸泛酰硫基乙胺单元

在酵母中,脂肪酸合酶也由 ACP 及 6 个酶构成,所不同的是它们定位为两个多功能的多肽链。其中之一($M_r = 185\ 000$),具有 ACP 功能和两种酶的活性。另外一链($M_r = 175\ 000$)含有余下的 4 种酶的活性。6 个二聚体组合成为一个大复合体($M_r \approx 2.4 \times 10^6$)。

在动物中,脂肪酸合酶含有 1 个 ACP 和 7 个酶,所有这些酶全都定位于单一的多功能多肽链,如图 29-7。多肽链的邻近区折叠成独特形式,形成不同的酶活性和 ACP 功能区。酶是二聚体,含有两个相同的亚单位(每一单位的 $M_r \approx 260\ 000$),有着一个反平行由头到尾的配置。

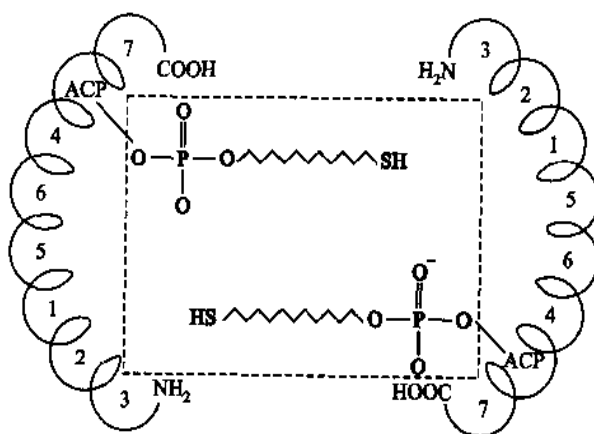


图 29-7 真核生物脂肪酸合酶的二聚体结构

每一亚单位含有一个脂基载体蛋白(ACP)和 7 个活性酶的催化部位:

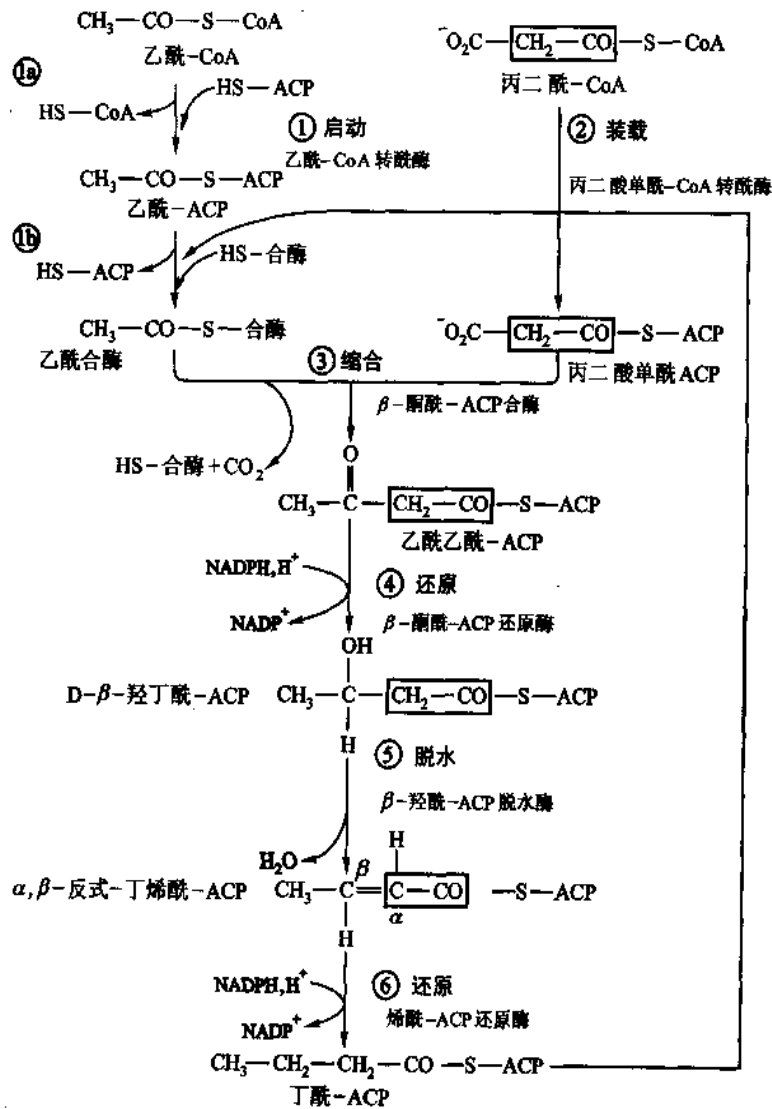
1. 乙酰 - CoA:ACP 转酰酶
2. 丙二酰 - CoA:ACP 转酰酶
3. β -酮酰 - ACP 合酶
4. β -酮酰 - ACP 还原酶
5. β -羟酰 - ACP 脱水酶
6. 烯酰 - ACP 还原酶
7. 软脂酰 - ACP 硫酯酶

动物体脂肪酸合酶独自多出的酶活性称为软脂酰 - ACP 硫酯酶(palmitoyl - ACP thioesterase),它催化最后生成的软脂酰 - CoA 的水解,转化为软脂酸和 ACP,它是在 16 个碳的脂肪酸链合成以后方显示功能。其他的有机体没有软脂酰 - ACP 硫酯酶,而是直接利用软脂酰 - ACP。

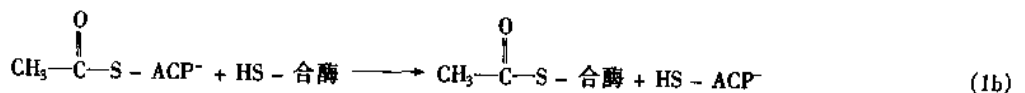
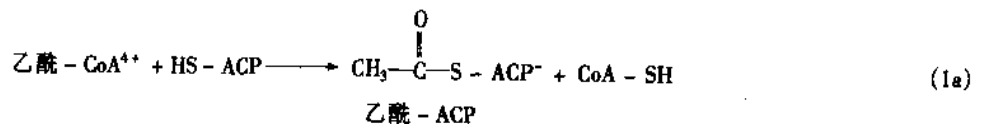
4. 由脂肪酸合酶催化的各步反应

在动物体中脂肪酸合成包含有以下 7 步反应,最初的 6 步见图 29-8。

- ① 启动:乙酰 - CoA:ACP 转酰酶
- ② 装载:丙二酸单酰 - CoA:ACP 转酰酶
- ③ 缩合: β - 酮酰 - ACP 合酶
- ④ 还原: β - 酮酰 - ACP 还原酶
- ⑤ 脱水: β - 羟酰 - ACP 脱水酶
- ⑥ 还原:烯酰 - ACP 还原酶
- ⑦ 释放:软脂酰 - ACP 硫酯酶

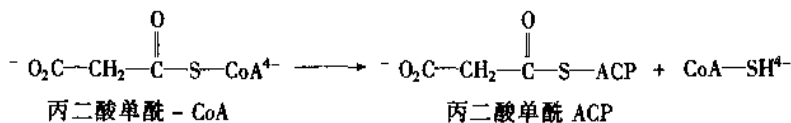
图 29-8 *E. coli* 中的脂肪酸合成

(1) 启动(priming) “启动”反应是在乙酰 - CoA:ACP 转移酶催化下实现的。反应分两步进行,第 1 步,乙酰 - CoA 的乙酰基转移到 ACP(1a)上,随后第 2 步转移到脂肪酸合酶(HS - 合酶)上,形成乙酰合酶(1b)。但在哺乳动物体内不经过乙酰 - ACP 中间体。

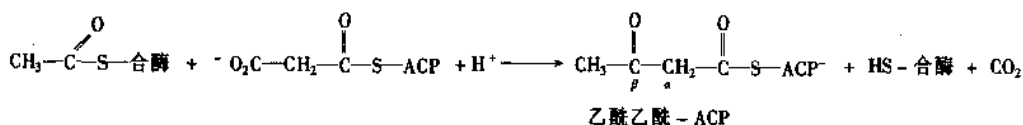


(2) 装载(loading) 丙二酸单酰 - CoA - ACP 转酰酶(malonyl - CoA - ACP transacylase)催化此反应。

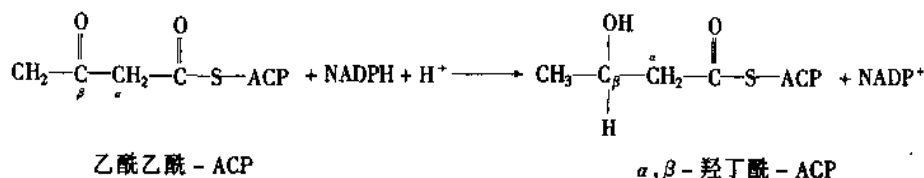
催化下一步反应的 β -酮酰-ACP合酶(β -ketoacyl-ACP synthase)已在等待丙二酸接到ACP上,以便“接运”。此反应中ACP的游离-SH基团向丙二酸单酰-CoA的羰基进攻,形成丙二酸单酰-ACP。“启动”和“装载”这两步反应为下一步缩合准备了两个底物。



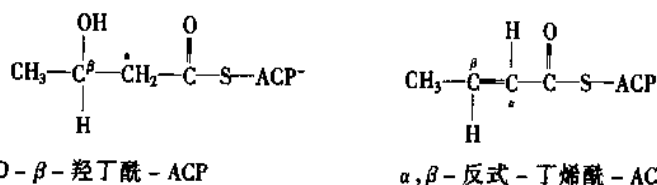
(3) 缩合(condensation) 上步反应(1)的乙酰基(与酶的-SH相接)与(2)的丙二酸单酰基(与ACP相接)在 β -酮酰-ACP合酶(β -ketoacyl-ACP synthase)的催化下进行缩合。丙二酸单酰-ACP的脱羧激活了它的次甲基,CO₂的丢失也有助于使反应在热力学上有利,而且不可逆行。反应产物是乙酰乙酰基连接到ACP上,即乙酰乙酰-ACP。



(4) 还原(reduction) β -酮酰-ACP还原酶(β -ketoacyl-ACP reductase)的催化反应是脂肪酸合成途径的第一道还原反应,NADPH作为还原剂参与此反应,产物为D-构型(β -碳原子成为不对称碳原子),即D- α, β -羟丁酰-ACP。

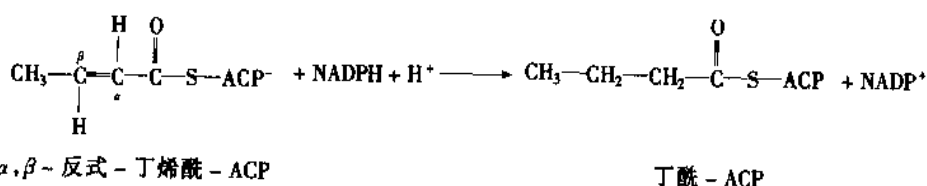


(5) 脱水(dehydration) 脱水反应是在 β -羟酰-ACP脱水酶(β -hydroxyacyl-ACP dehydrase)的催化下实现的,产物是反式的 α, β -不饱和化合物,即 α, β -反式-丁烯酰-ACP。



(6) 还原(reduction) 这步反应是脂肪酸合成第一个循环的最后一步,在这步中形成了4个碳的脂肪酸,这4个碳是由最初2分子的两个碳的化合物,乙酰-CoA提供的。这里所说2分子的乙酰-CoA是指在反应第一步(启动)中,一分子乙酰-CoA转化为乙酰合酶,另一分子是乙酰-CoA在羧化酶作用下生成丙二酸单酰-CoA,它是反应第二步(装载)的起始物。

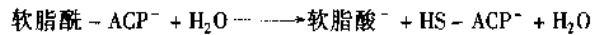
此反应为总反应中的第二次还原,同样发生在 β -位上,还原剂也同样是NADPH。参与反应的酶为烯酰-ACP还原酶(enoyl-ACP reductase),产物是一个连接在ACP上的四碳脂肪酸(丁酰-ACP)。可以说,乙酰基是接受了丙二酸衍生物的二碳原子的片段而增长了碳链的。丁酰-ACP现在可以进入第二轮的碳链延伸。第一轮回的乙酰-ACP由丁酰-ACP代替,经过(1a)反应与丙二酸单酰-ACP缩合(反应3),经过4,5,6的反应得到6个碳的脂肪酸与ACP相接。如此下去,每一循环碳链即延伸两个碳原子单元。



(7) 释放(release)

在脂肪酸合成的每一循环中(图29-8),脂肪酸链延伸了两个碳原子。动物细胞中延伸的程序在到达16个碳原子时即行停止,即最终产物形成软脂酰-ACP时,软脂酰-ACP硫酯酶(palmitoyl thioesterase)

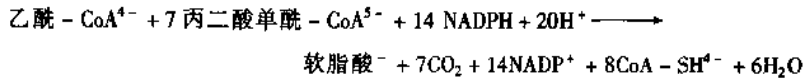
开始作用,软脂酸从脂肪酸合酶复合体中被释放,游离出来。这步酶反应实际是水解反应:



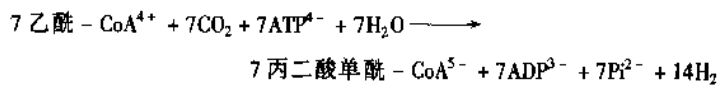
软脂酸若形成更长链的脂肪酸,或引进双键必须接受其他酶系的作用,将在后述。

由于合成的第一轮生成的是 4 碳原子单位而不是 2 碳原子单位,达到软脂酰(16 碳)进行“释放”反应前,要求进行 7 个轮回的反应,即使用 7 个丙二酸单酰 - CoA 分子。软脂酰合成共产生 7 分子水,但在最后一步(释放)反应中要消耗一分子水,即净产生 6 分子水。

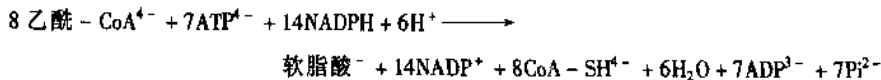
合成一分子软脂酸消耗的乙酰 - CoA 和丙二酸单乙酰 - CoA 的总结果如下式:



7 分子丙二酸单酰 - CoA 的形成要求按照下式,即需要 7 分子乙酰 - CoA:



综合以上反应式,从起始物乙酰 - CoA 到产物软脂酸的化学计量的总反应式为:

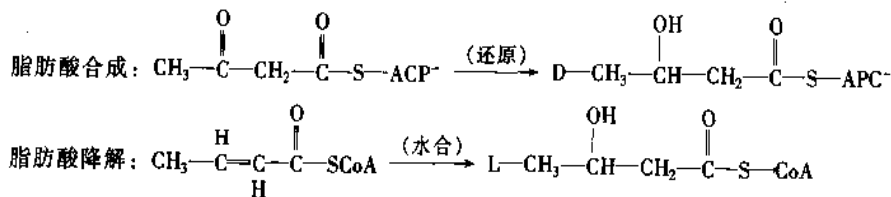


其中用于还原的 NADPH 和 H^+ 来自苹果酸酶反应(图 29-3)及戊糖磷酸途径。

5. 脂肪酸合成途径与 β -氧化的比较

脂肪酸合成途径与脂肪酸降解即 β -氧化的异同可归纳如下:

- (1) 两条途径的发生场所不同,脂肪酸合成发生于细胞溶胶,降解发生于线粒体。
- (2) 两条途径中都有一中间体与载体连接,脂肪酸合成中载体为 ACP,降解中的载体则为辅酶 A。
- (3) 在两个途径中有 4 步反应,从化学上看一条途径的 4 步反应是另一途径的 4 步反应的逆方向,它们所用的酶和辅助因子也不相同。脂肪酸合成中的 4 步反应是:缩合,还原,脱水和还原;在脂肪酸降解中的这 4 步反应是:氧化,水合,氧化和裂解。
- (4) 两条途径都具有转运机制将线粒体和细胞溶胶沟通起来。在脂肪酸合成中,有三羧酸转运机制,它的功能是运送乙酰 - CoA;在脂肪酸降解中,有肉碱载体系统,它的功能是运送脂酰 - CoA。
- (5) 两条途径都以脂肪酸链的逐次、轮番的变化为特色,在脂肪酸合成中,脂肪链获取 2 碳单元而成功地得到延伸,即得自于乙酰 - CoA,它必须与丙二酸单酰 - CoA 缩合,后者又是乙酰 - CoA 衍生而来;在脂肪酸降解中则是使乙酰 - CoA 形式的 2 碳单元离去,以实现脂肪链的缩短。
- (6) 脂肪酸合成时,是从分子的甲基一端开始到羧基为止,即羧基是最后形成的;脂肪酸降解则持相反的方向,羧基的离去开始于第一步。
- (7) 羟酯基中间体在脂肪酸合成中有着 D-构型,但在脂肪酸降解中则为 L-构型。



(8) 脂肪酸合成由还原途径构成,需要有 NADPH 参与,脂肪酸降解则由氧化途径构成,需要有 FAD 和 NAD^+ 参与。

(9) 这两个途径的循环,每一轮回可延伸或除去两个碳原子单元。以 16 碳脂肪酸为例,不论合成或降解都是进行 7 个轮回为止。

(10) 在动物体中,脂肪酸合成用的酶全都设置在单一多肽链上,此多肽链是脂肪酸合酶的一部分。

脂肪酸降解的酶以何种程度聚合在一起,这一问题尚未弄清。

6. 脂肪酸碳链的加长和去饱和

已知,在动物体中脂肪酸合成停止在 16 碳脂肪酸即软脂酸而终止,这是正常的脂肪酸合酶作用的终点。更长链的脂肪酸,或不饱和脂肪酸等都是把软脂酸作为前体,需要另外的酶反应形成(图 29-9)。

(1) 碳链的延长 碳链的延长发生在线粒体(mitochondria)和内质网(endoplasmic reticulum)中,细胞不同部位碳链的延长机制有所差异。

线粒体中的延长是独立于脂肪酸合成之外的过程,它是乙酰单元的加成和还原,恰恰是脂肪酸降解过程的逆反应。仅仅是脂肪酸延长最后一步使用了还原剂 NADPH,而脂肪酸降解的最前一步使用了 FAD 为氧化剂(图 29-10)。

光面内质网中的延长是更活跃的,16 碳的软脂酸可延长两个碳原子形成硬脂酸,只是参与的酶有改变,辅酶 A 代替了脂肪酸合成中所用的 ACP。它与软脂酸合成的最后一轮相同,即由已合成的软脂酰 - CoA 以丙二酸单酰 - CoA 为二碳单元的供体,由 NADPH + H⁺ 供氢,经过还原,脱水,再还原的步骤,形成十八碳产物,硬脂酰 - CoA。

(2) 碳链的去饱和 动物体内最常见的两个饱和脂肪酸,软脂酸和硬脂酸是棕榈酸(16, Δ⁹)和油酸(18, Δ⁹)的前体(图 29-9)。这两个不饱和脂肪酸都在 Δ⁹ 位(C-9 和 C-10 间)有一双键,这个不饱和双键是在脂酰 - CoA 去饱和酶(fatty acyl - CoA desaturase)催化下,经氧化反应引入的。在哺乳动物体内,引入双键的氧化反应需要一个由两种酶和一个细胞色素组成的电子传递体系参与(图 29-11)。但是哺乳动物缺少能够在 C-9 位以外引进双键的酶,因此,亚油酸(linoleic acid, 18, Δ^{9,12})和亚麻酸(linolenic acid, 18, Δ^{3,12,15})不能经生物合成得到,只能通过膳食获取,因此称为必需脂肪酸(essential fatty acid)。

上述的去饱和反应所使用的脂酰 - CoA 去饱和酶是混合功能氧化酶(mixed-function oxidase)的一例。在此反应中,去饱和酶的两个底物,脂肪酸和 NAD⁺,相继经历两个电子的氧化作用,电子传递包括黄素蛋白(细胞色素 b₅ 还原酶)和细胞色素(细胞包素 b₅),二者与脂酰 - CoA 去饱和酶全都存在于光面内质网中。分子氧作为电子受体参与反应,但不反映在被氧化的产物中。

哺乳动物肝细胞能够容易地在脂肪酸 Δ⁹ 位引入双键,但不能在 C-10 至甲基末端间再引入第 2 个双键。已于上述,哺乳动物不能合成亚油酸(linoleic acid),亚麻酸(linolenic acid)。但存在于植物中的去饱和酶却可以实现。植物中的这些酶不能直接作用于游离脂肪酸,但可对磷脂类,例如,磷脂酰胆碱含有一个油酸的磷脂,使其油酸链去饱和,成为亚油酸链,以至亚麻酸链。

7. 脂肪酸的调节

当细胞或有机体的代谢燃料超过了需要量时,一般会把脂肪酸转化为脂肪,即三脂酰甘油用以贮存。这个反应是由乙酰 - CoA 羧化酶的催化实现的。乙酰 - CoA 羧化酶在脂肪酸合成中将乙酰 - CoA 转化为丙二酸单酰 - CoA,后者是脂肪酸合成的重要起始物之一。乙酰 - CoA 羧化酶催化的反应是脂肪酸合成过程中的限速步骤,它是脂肪酸合成调控的关键所在。在脊椎动物中,脂肪酸合成的主要产物,软脂酰 - CoA 扮演着此羧化酶反馈抑制物的角色。当线粒体乙酰 - CoA 的浓度增高,ATP 也增高时,柠檬酸自线粒体释出,转化为细胞溶胶乙酰 - CoA,同时成为乙酰 - CoA 羧化酶活化的别构信号。

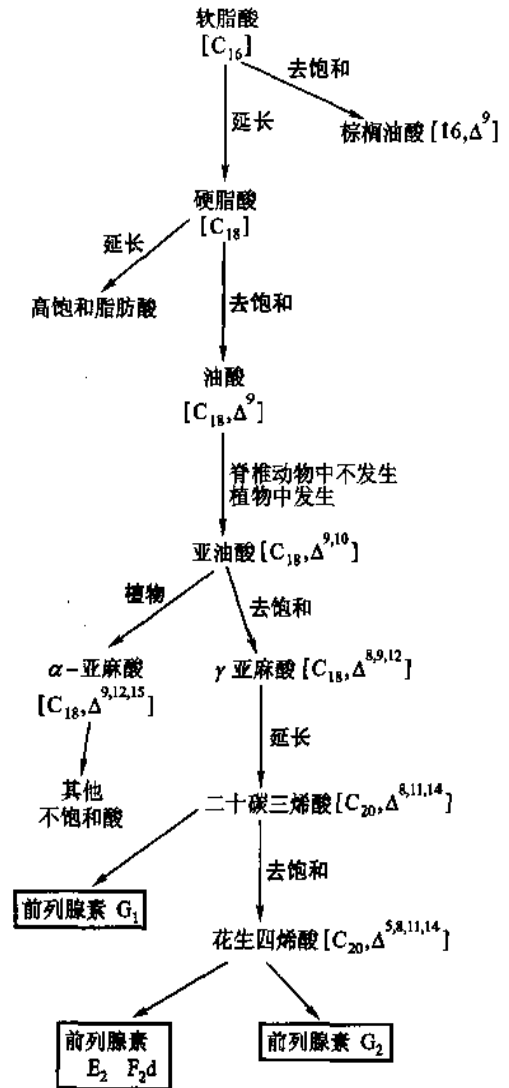


图 29-9 脂肪酸碳链的延长

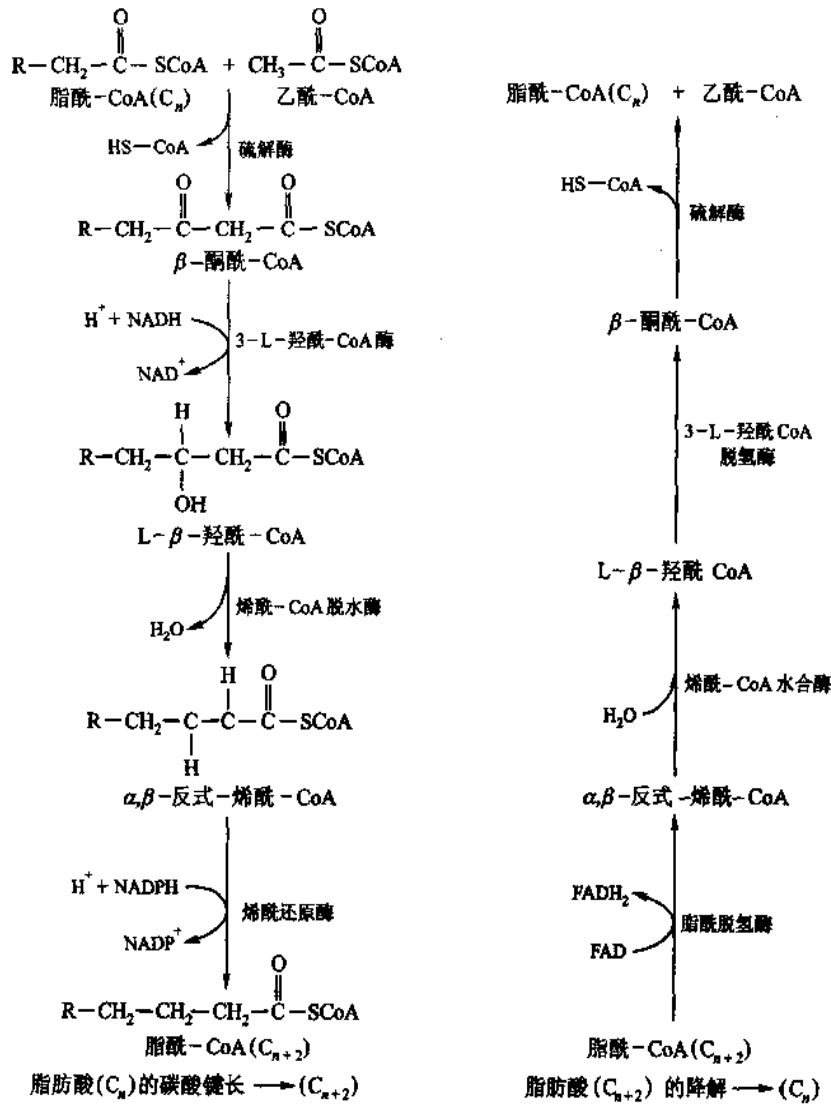


图 29 - 10 脂肪酸加长和脂肪酸降解的比较

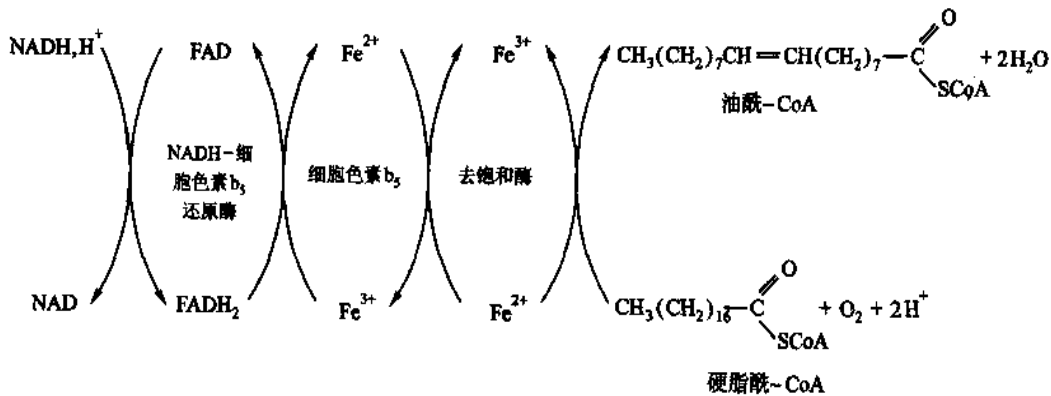


图 29 - 11 哺乳动物体内脂肪酸去饱和酶(desaturase)的电子传递系统
该系统处于内质网的细胞溶胶侧,2个水分子的形成通过了4个电子反应,其中2个电子来自NADH,2个电子来自脂肪酸被还原的键

乙酰 - CoA 羧化酶还受共价交替(covalent alternation)所调节。受胰高血糖素和肾上腺素激素引发的磷酸化抑制,也就是减缓脂肪酸合成(图 29 - 12)。它的活化(去磷酸化)型即乙酰 - CoA 羧化酶的聚合物

型,当磷酸化时这个聚合物解离成为单体,遂失去活性。可以说,乙酰 - CoA 羧化酶的活性取决于二者平衡的调控(图 29 - 13),柠檬酸把平衡引向聚合一侧,即促进脂肪酸合成,软脂酰 - CoA 则把平衡引向单体一侧,即抑制脂肪酸合成。软脂酰 - CoA 是脂肪酸合成的产物,它的作用可称为反馈抑制。

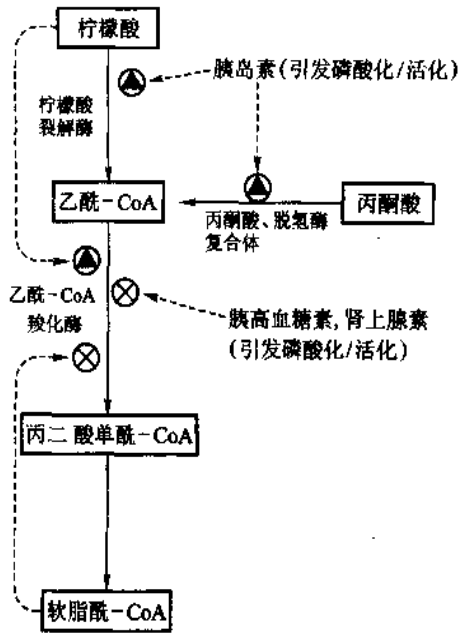


图 29 - 12 脂肪酸合成的调节

在脊椎动物细胞中别构调控和激素依赖的共价修饰对前体流向丙二酸单酰 - CoA 给以活化⊕,或抑制⊗

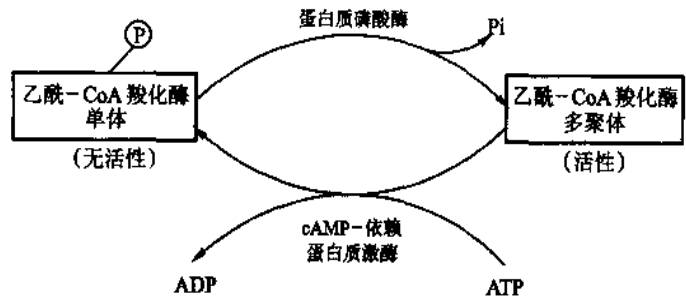


图 29 - 13 无活性的(单体)和活性的(多聚体)之间乙酰 - CoA 羧化酶的平衡

激素调控的磷酸化和去磷酸化改变着平衡

植物和细菌中的乙酰 - CoA 羧化酶不受柠檬酸或磷酸化/去磷酸化循环的调节,但当基质(stroma)的 pH 和 Mg^{2+} 的浓度增高时,酶活性也升高。二者皆发生于植物被照射时。细菌不用三脂酰甘油作为能量贮存。在大肠杆菌中,脂肪酸的合成是为膜脂质提供前体,它的调节机制比较复杂,包括某种鸟嘌呤核苷的参与。后者在膜形成中与细胞成长有关。

脂肪酸合成途径中的其他酶也受调节,丙酮酸脱氢酶复合体,柠檬酸裂解酶都受胰岛素作用而被激活,它是通过蛋白质磷酸化的级联作用来实现的。胰岛素和胰高血糖素的释放都受血糖浓度过高或过低的影响。

如果脂肪酸合成及 β - 氧化同时发生,这两个过程必呈耗能性无效循环,从而浪费能量。也如前述, β - 氧化可受丙二酸单酰 - CoA 作用而阻断,后者可抑制肉碱脂酰转移酶 I。这样,当脂肪酸合成产生出第一个中间体丙二酸单酰 - CoA,它就从线粒体内膜的运送系统上关闭了 β - 氧化。

(二) 其他脂类的生物合成

在细胞中游离脂肪酸的含量并不多,绝大多数的脂肪酸是以酯化成三脂酰甘油或磷酸甘油酯的形式存在着。这两种类型复合脂质的生物合成主要是发生在肝细胞的内质网(SER)或脂肪细胞中。

1. 脂酰甘油

脂酰甘油(acyl glycerols)是由两个前体合成的,它们是脂酰 - CoA(fatty acyl - CoA)和甘油 - 3 - 磷酸(glycerol 3 - phosphate)。脂酰 - CoA 来自脂肪酸的活化,甘油 - 3 - 磷酸由两条途径形成,其一是糖酵解的中间体二羟丙酮磷酸形成,其二是甘油降解中的一步,即甘油的磷酸化(图 29 - 14)。

单酰 - 和二脂酰 - 甘油是由甘油 - 3 - 磷酸与脂酰 - CoA 经相继酯化形成的。三脂酰甘油来自于 1,2 - 二脂酰甘油 3 - 磷酸(磷脂酸,phosphatidic acid,PA),经 2 步反应生成。第 1 步水解,把磷酸基除去,第 2 步二脂酰甘油再与另一分子脂酰 - CoA 反应,即得到产物三脂酰甘油(图 29 - 15)。

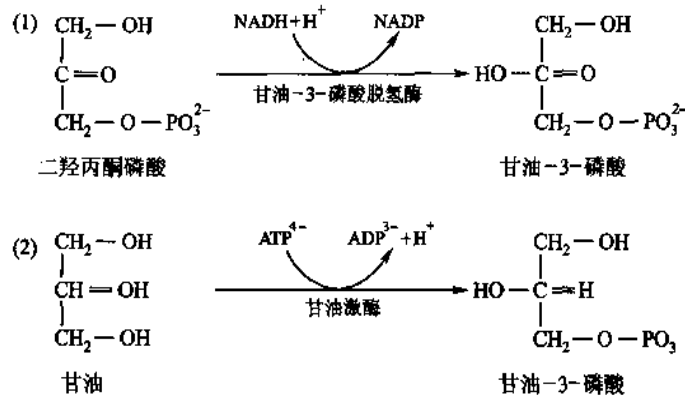


图 29-14 甘油-3-磷酸生物合成的两途径

2. 磷脂类

(1) 甘油磷脂(glycerophospholipids)的合成 甘油磷脂是生物膜的重要组成成分,因为它有着两亲性的结构,极性头的一端喜欢水性环境,而非极性的脂酰取代基则是亲脂性的。其结果,甘油磷脂分子自动地形成双层结构,这种双层结构是绝大多数膜优势选择的结构特征。甘油磷酸脂的这种两亲性质对它的合成方式有很大影响。脂质合成所包括的绝大多数反应发生在膜结构的表面,与之相关的各种酶本身就具有着两亲性。

①甘油磷脂在大肠杆菌中的合成:大肠杆菌有三类重要的甘油磷脂:磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)(75%~85%),磷脂酰甘油(phosphatidyl glycerol, PG)(10%~20%)和二磷脂酰甘油(diphosphatidyl glycerol)。 (图 29-16)这三种甘油磷脂的生物合成途径从开始到 CDP-二脂酰甘油(CDP-diacylglycerol)(图 29-17)是共通的,自 CDP-二脂酰甘油以下就分别有各自的途径(图 29-18)。这里说的 CDP 是 5'-胞苷二磷酸(cytidine diphosphate),它经常用作脂质成分的载体,比糖类的载体 UDP 更为普遍,UDP 是尿苷二磷酸(uridine diphosphate)的缩写(图 29-19)。

大肠杆菌中绝大多数与甘油磷脂合成有关的酶都在内质网膜上,第 1 步反应,脂酰-CoA 对甘油-3-磷酸进行酰基化(图 29-17),是在酰基转移酶的催化下实现的。酰基转移酶的催化机制如图 29-20 所示。将甘油-3-磷酸转化为 CDP-二脂酰甘油是在特定的胞苷转移酶的催化下进行的。这步反应使用了 CTP(cytidine 5'-triphosphate,胞苷三磷酸)作为共底物(cosubstrate)。

②甘油磷脂在真核生物中的合成:甘油磷脂在真核生物体中的合成较在大肠杆菌中更为复杂。因为真核生物有更多的膜结构,每一结构有着自己的独特功能。而且与大肠杆菌不同,真核生物以三酰甘油形式贮存脂肪酸。

甘油磷脂合成的第一阶段由甘油-3-磷酸形成磷脂酸的反应途径,真核生物与大肠杆菌十分相像(图 29-17)。主要的差异是有两条附加的途径,即:磷脂酸不是来自甘油-3-磷酸而是来自二羟丙酮磷酸(dihydroxyacetone phosphate, DHAP),另外,磷脂酸的下一步是分解代谢,形成二脂酰甘油(图 29-18 及 29

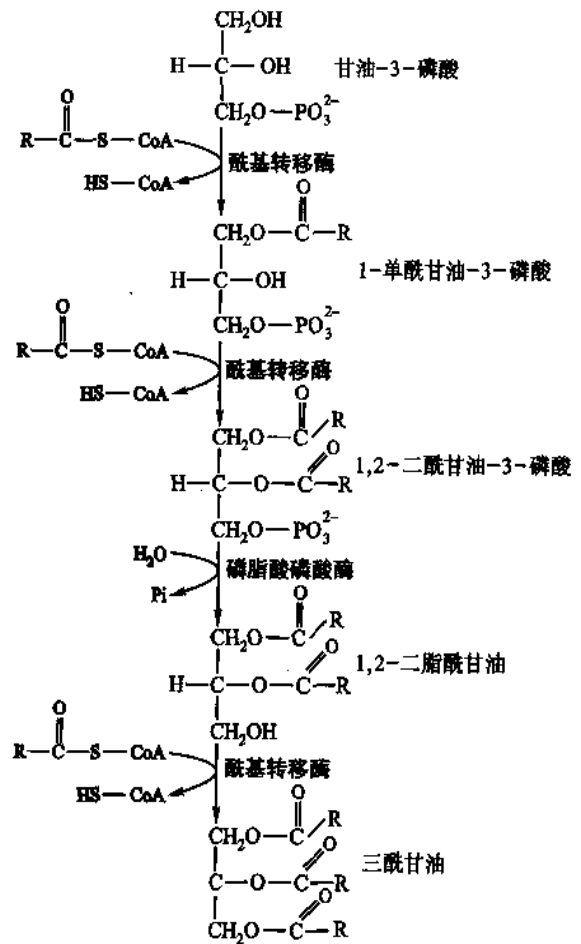


图 29-15 三脂酰甘油的生物合成

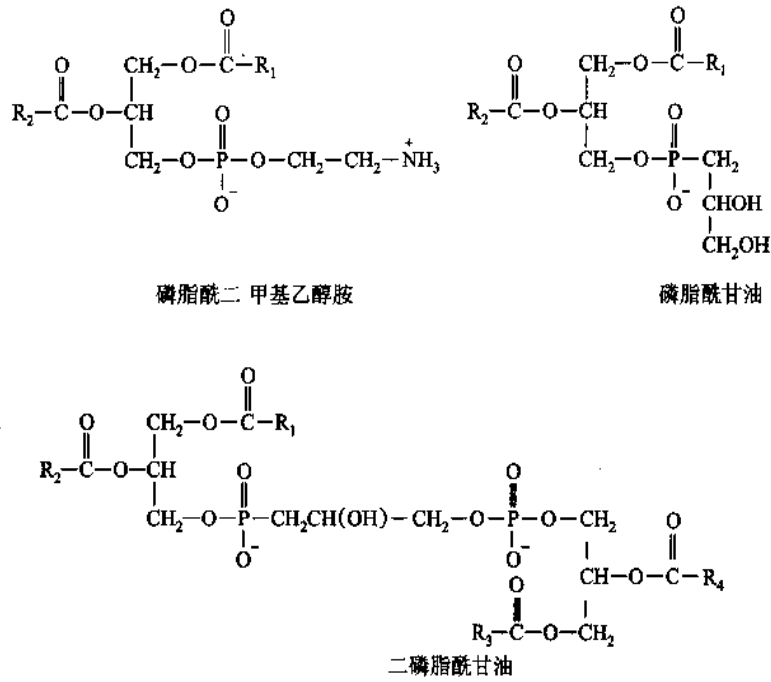


图 29-16 大肠杆菌 *E. coli* 中的三种甘油磷脂

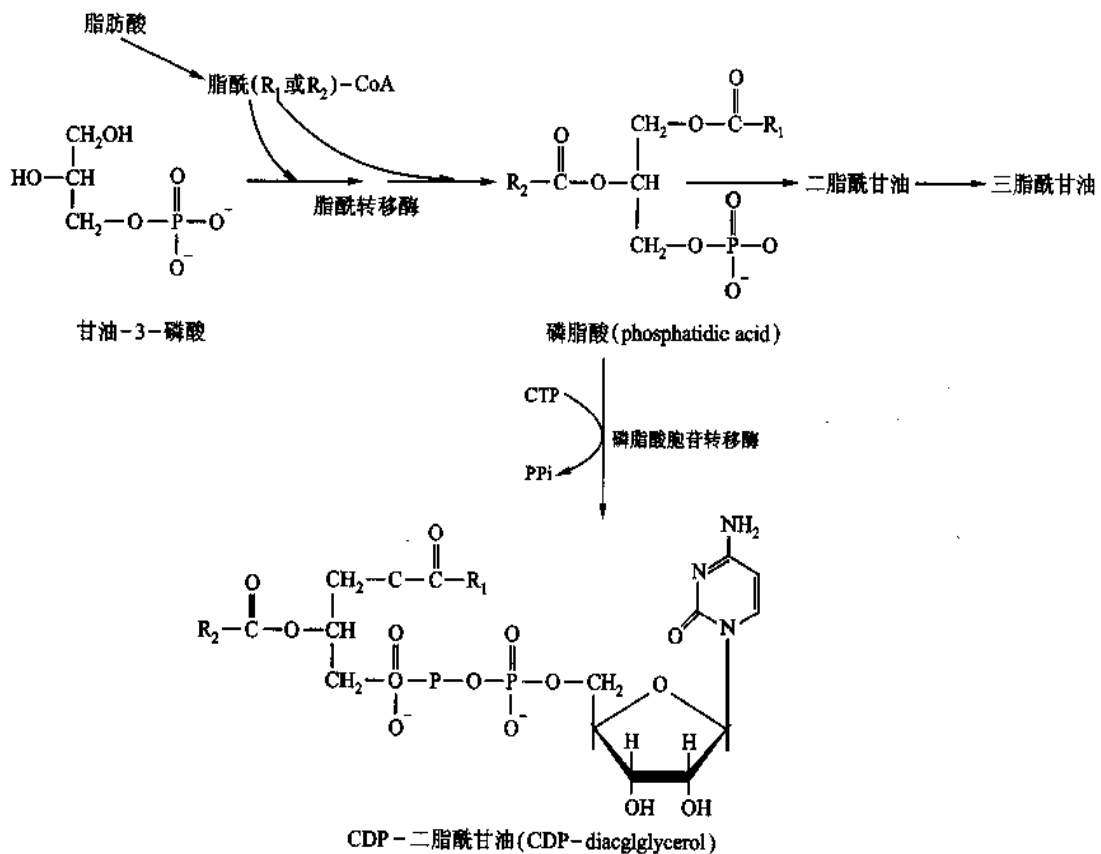


图 29-17 自甘油-3-磷酸和脂肪酸合成 CDP-二脂酰甘油

-21)。一旦,磷脂酸形成,很快转化为二脂酰甘油或 CDP-二脂酰甘油,后者将分头进行代谢(图 29-21)。

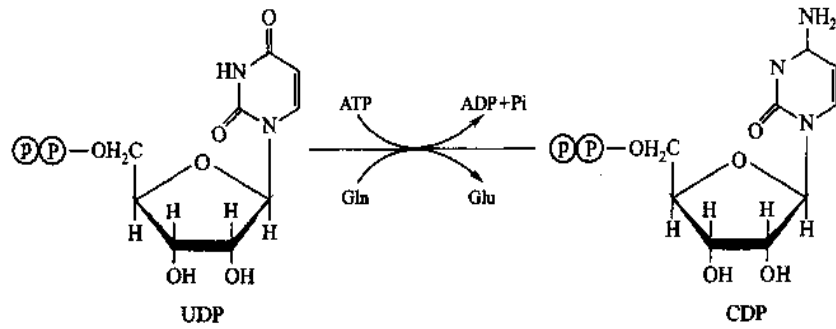
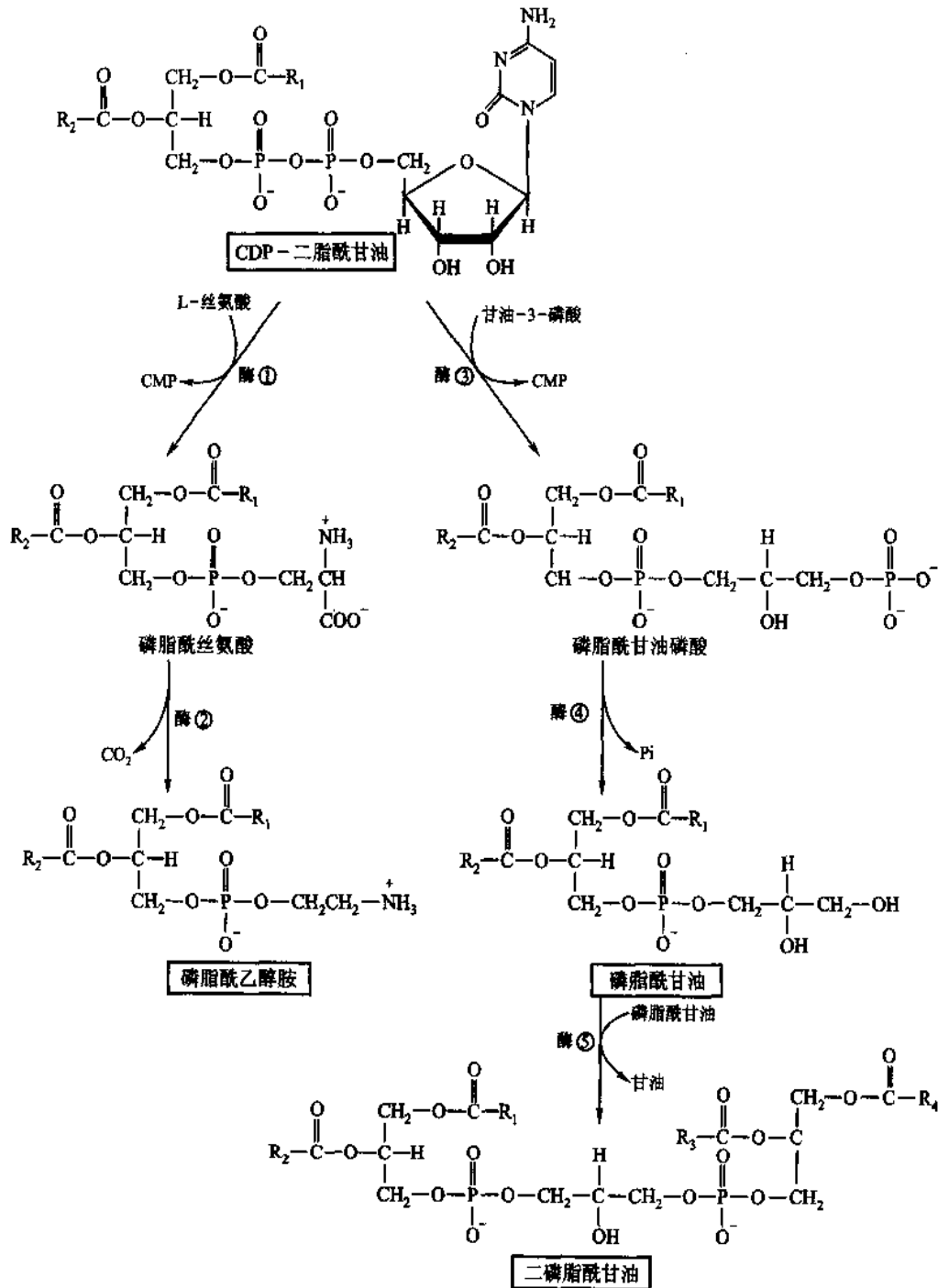


图 29-18 大肠杆菌 (*E. coli*) 中以 CDP-二脂酰甘油为起点, 三种甘油磷脂的生物合成



酶①: 磷脂酰丝氨酸合酶 酶②: 磷脂酰丝氨酸脱羧酶 酶③: 磷脂酰甘油磷酸合酶
 酶④: 磷脂酰甘油磷酸磷酸酶 酶⑤: 二磷脂酰甘油合酶

图 29-19 CDP 和 UDP

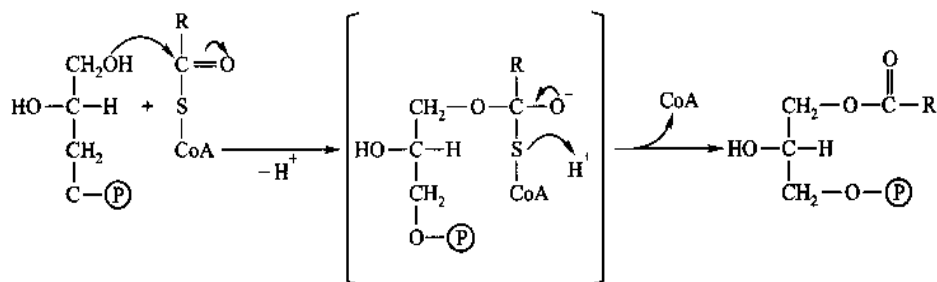


图 29-20 酰基转移酶的作用机制

中性的激活了的(脂)酰基是很易发生作用的,在正四面体中间体中的辅酶 A 是个很好的离去基团,这样的机制在乙酰乙酰 - CoA 的形成中也可看到。本反应起始于羟基向酰基 - CoA 的亲核进攻,形成正四面体中间体,随后 CoA 即被除去

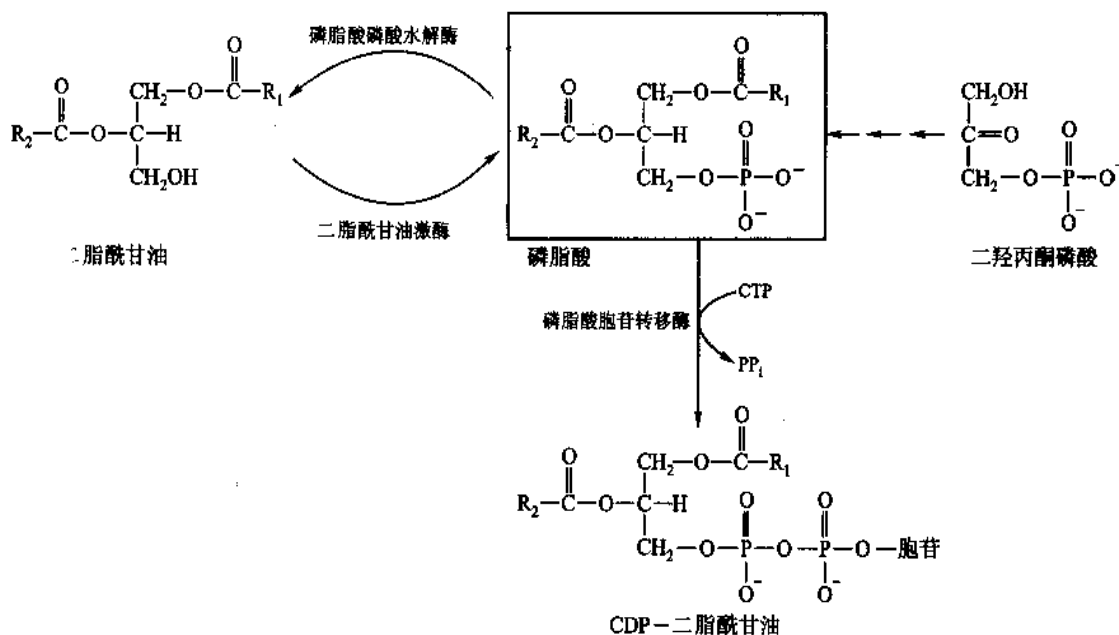


图 29-21 在真核生物中,磷脂酸来自二羟丙酮磷酸,并降解为二脂酰甘油

(3) 二脂酰甘油是磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺合成的关键化合物 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺在数量上是真核生物细胞中最重要的磷脂,它们自二脂酰甘油衍生而来(图 29-18)。磷脂酰胆碱的生物合成起始于胆碱(choline)被运送进入细胞。胆碱是人类膳食中不可缺少的组成成分,不能在动物体内生成。胆碱一旦进入细胞,就在胆碱(或乙醇胺)激酶作用下迅速地磷酸化成为磷酸胆碱。这个激酶是细胞溶胶中的一种酶。磷酸胆碱与胞苷三磷酸(CTP)在 CDP:磷酸胆碱胞苷转移酶(CTP:phosphocholine cytidyltransferase)作用下转化为 CDP-胆碱。此酶是一“限速”酶。它在细胞溶胶中无活性,进入内质网后,与膜的磷脂(phospholipids)作用后而活化。CDP-胆碱立即与二脂酰甘油反应,它是受内质网中存在的酶催化发生的。磷脂酰乙醇胺的生物合成是以乙醇胺为起始物,它进行的途径与磷脂酰胆碱相似。

在肝脏,酵母和细菌,假单胞菌(*Pseudomonas*)中,有一条途径可自磷脂酰乙醇胺转化为磷脂酰胆碱,在此途径中磷脂酰乙醇胺接受来自 S-腺苷甲硫氨酸的甲基化,经过三次同样的反应,乙醇胺的 -O-CH₂CH₂NH₃⁺ 转化为胆碱的末端 -OCH₂CH₂N⁺(CH₃)₃ (图 29-22)。与这三步反应的同时发生的,还有磷脂酰胆碱的降解,可产生胆碱,这是肝脏中唯一产生胆碱的机制。

(4) 脂肪酸取代可能都在 sn1 和 sn2 位上 肺组织可产生特定的磷脂酰胆碱,即二软脂酰磷脂酰胆碱。软脂酸在此化合物中以软脂酰形式连接在甘油骨架的 sn1 和 sn2 位上(sn 指立体特异编号,

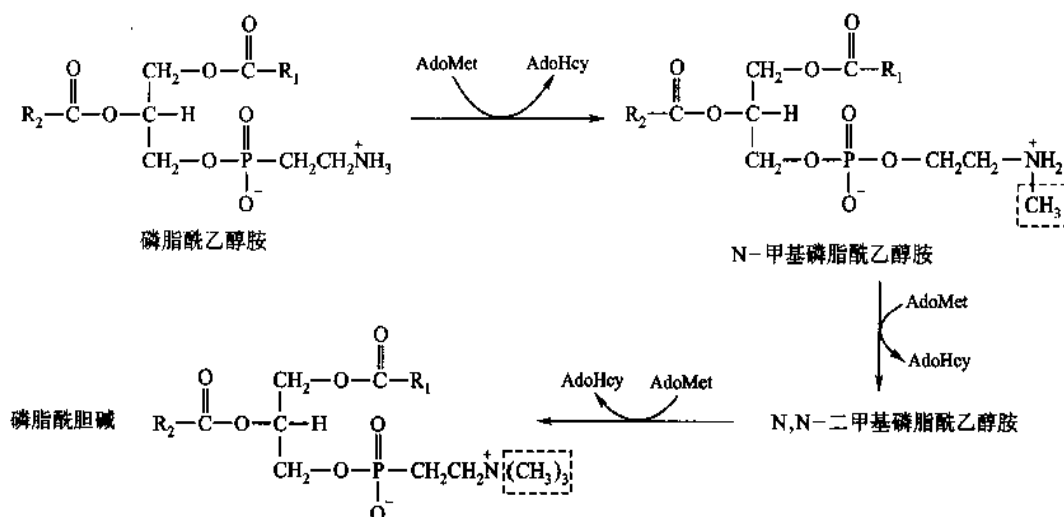


图 29-22 磷脂酰乙醇胺到磷脂酰胆碱的转换

AdoMet: S-腺苷甲硫氨酸, S-adenosyl-L-methionine

AdoHcy: S-腺苷高兰胱氨酸, S-adenosyl-L-homocysteine

stereospecific numbering, 它的意义请参阅第 28 章五、磷脂的代谢)。这种磷脂酰胆碱是肺脏表面活性剂的主要成分。它可保持肺泡的表面张力, 因此当肺泡中的空气被排除时, 肺泡不会折叠塌陷。

二软脂酰磷脂酰胆碱的合成途径可能如图 29-23 所示。起始物磷脂酰胆碱是由 CDP-胆碱途径生成的, 即: ①胆碱在 ATP 作用下转化为磷酸胆碱; ②磷酸胆碱受胞苷三磷酸(CTP)作用形成 CDP-胆碱; ③ CDP-胆碱与二脂酰甘油反应得到磷脂酰胆碱。这时形成的磷脂酰胆碱(图 29-22)其 sn2 位的脂肪酸常常是不饱和脂肪酸, 反应第 1 步是软脂酰-CoA 在磷脂酶 A2 催化下把原 sn2 位上的不饱和脂肪酸水解脱下, 软脂酰胆碱转变为溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine)。第 2 步是在 1-脂酰甘油磷酸胆碱酰基转移酶(1-acylglycerol phosphocholine acyltransferase)催化下与软脂酰-CoA 反应、生成二软脂酰磷脂酰胆碱。这里, 再脂酰基化发生的位置, 即脂肪酸残基在甘油骨架上的位置, 规律性地都是在 sn1 和 sn2 位上。

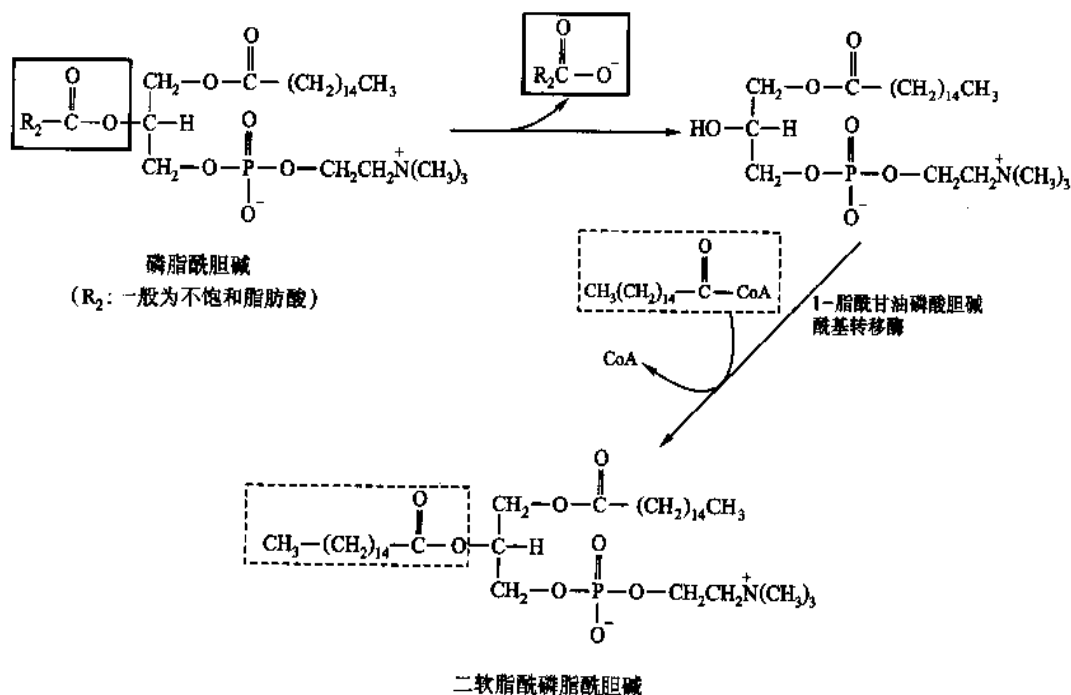
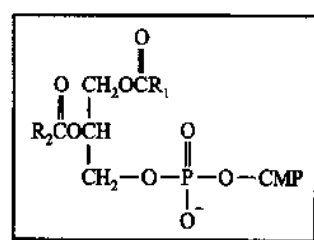


图 29-23 自磷脂酰胆碱转化为二软脂酰磷脂酰胆碱的二步反应

由磷脂酰胆碱到二软脂酰磷脂酰胆碱的转变,实际只是发生了脂肪酸残基的转换。通过这种途径改变了原来分子的特性,对机体无疑是一种经济的形成新分子的措施。磷酸胆碱的去脂酰化作用(deacylation)和再脂酰化作用(reacylation)在其他组织中也存在。它提供了一条在 sn1 和 sn2 改换脂肪酸残基以确保生物对特殊分子需要的重要途径。

(5) 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 已述,CDP-二脂酰甘油在原核生物体内的磷脂合成中是一关键的中间体,它在真核生物的线粒体中也可合成磷脂酰甘油和二磷脂酰甘油(图 29-18)。另外 CDP-二脂酰甘油可导致形成磷脂酰肌醇(图 29-24),磷脂酰肌醇约占膜中脂质的 5%,它还以磷脂酰肌醇-4-磷酸及磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸的形式存在,但浓度较小。这二磷酸衍生物可以在磷脂酶 C 的作用下降解成为肌醇-1,4,5-三磷酸和二脂酰甘油。这两种降解产物都有着重要的调节功能。肌醇-1,4,5-三磷酸参与钙在细胞内贮存(内质网)的移位,并可引起细胞溶胶钙对各种酶的激活。磷脂酶 C 反应的其他产物,二脂酰甘油是蛋白激酶 C 的激活剂。蛋白激酶 C 需低浓度的钙和磷脂酰丝氨酸以获得活性。C 是英文 calcium 的字头,它催化许多蛋白质的磷酸化从而改变它们的活性以及它们所介导的生理应答。



CDP-二脂酰甘油

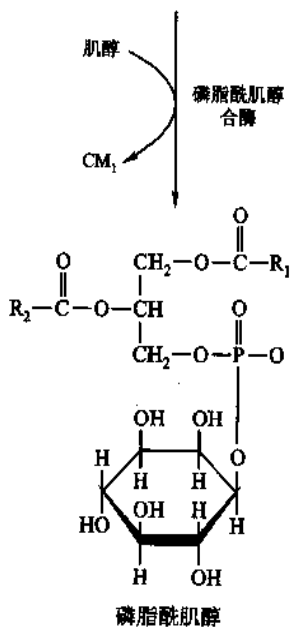
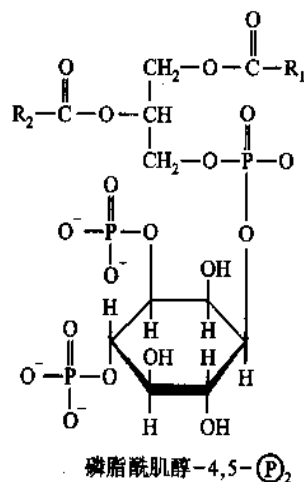


图 29-24 在真核生物体内 CDP-二脂酰甘油到磷脂酰肌醇的转化



磷脂酰肌醇-4,5-(P)₂

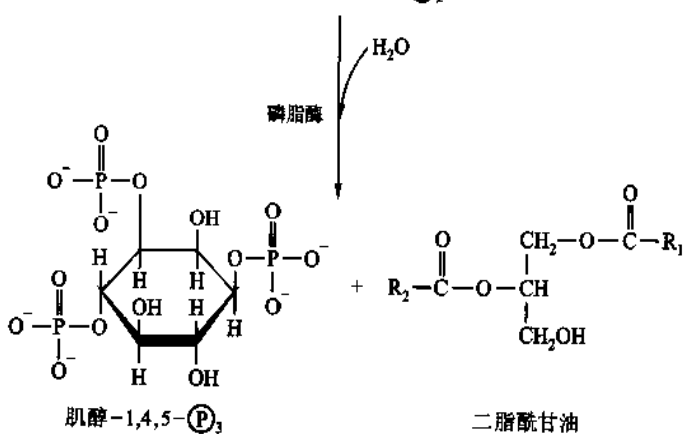


图 29-25 磷脂酶对磷脂酰肌醇-4,5-(P)₂ 的降解

注:Ⓟ = 磷酸基团

(6) 烷基(alkyl)和(链)烯基(alkenyl)醚(ethers)的生物合成 有些磷脂在它的 sn1 位含有 O-烷基或 O-(链)烯基而不是以常见的酯形式结合。在真核生物体内的这种磷脂酸的烷基脂的合成如图 29-26 所示。合成的最初一步是二羟丙酮磷酸(DHAP)的酰基化,它与磷脂酸合成(图 29-18)相像。紧接的是以由醇衍生的烷基取代 1-酰基。这里进行反应的醇是由脂酰-CoA 被 NADPH 或 NADH 还原生成的。第三步反应是酮的还原,最后一步是 2-羟基脂酰基化。这种磷脂酸的 1-烷基醚衍生物一旦形成,即用来合成其他的磷脂。

某些磷脂酰胆碱的烷基醚有强有力的生物活性,例如,1-烷基-2-乙酰甘油磷酸胆碱(1-alkyl-2-

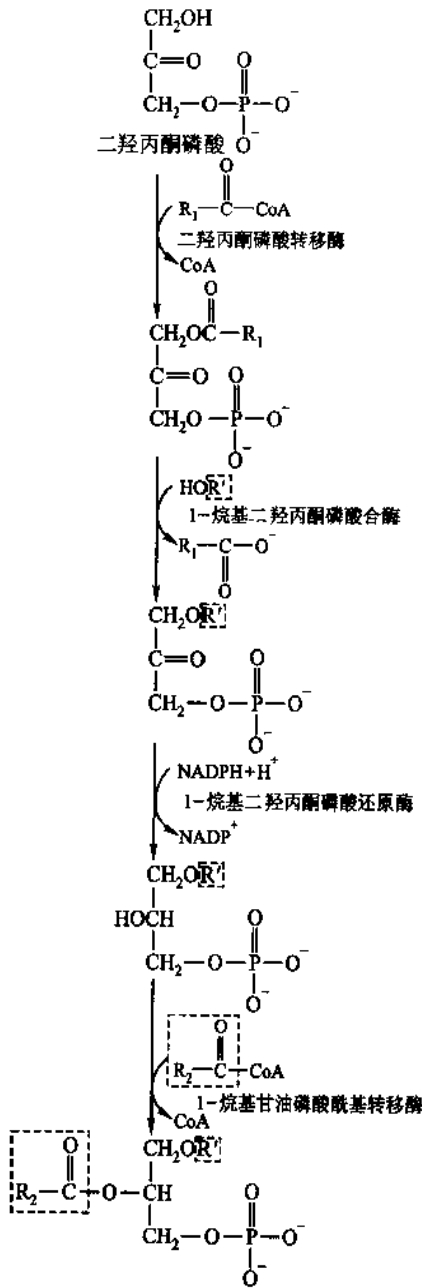


图 29-26 磷脂酰烷基酯的生物合成

- acetylglycero phosphocholine)(图 29-27)是有名的小血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF),它对高血压的小鼠显示有降压功能,其原因是血小板在极低的激素水平(10^{-10} mol/L)下发生集结。

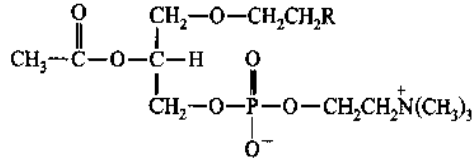


图 29-27 1-烷基-2-乙酰甘油磷酸胆碱

在许多组织中,1-烷基-2-脂酰磷脂酰乙醇胺可被一种内质网膜酶作用而去饱和,这个酶名为 1-烷基-2-脂酰乙醇胺去饱和酶,产物为 1-(链)烯基-2-脂酰磷脂酰乙醇胺,又名缩醛磷脂(plasmalogen)(图 29-28)。上述的酶进行反应时需要 O_2 , NADH 和细胞色素 b_5 。这些辅助因子与脂肪酰-CoA 去饱和转化为软脂酰-CoA 时的辅助因子完全相同。在很多组织中“缩醛磷脂”是少有的组成成分,但在心脏组织中,约有 50% 的磷脂酰乙醇胺在 sn1 位含有(链)烯基醚的结构。含(链)烯基醚键的磷脂可以保护细胞免受单态氧(singlet oxygen)的毒害,这种单态氧当浓度高时可致细胞死亡。

醚脂质(ether lipids)在微生物中也有发现,特别是原生动物和古细菌(archaeobacteria)。对水解来说,烷基醚键较烷基酯键更为牢固。这种稳定性可能是古细菌的膜中醚脂质无所不在的原因,古细菌时常经受极度的 pH,盐和温度的影响。

(7) 肝脏中对结构脂质的调控优先于对贮能脂质的调控 虽然目前还不清楚从二脂酰甘油到磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺或三脂酰甘油的转化(图 29-18)是怎样受调控的,但至少现已了解,在肝脏中对于组成膜所必需的,磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺的合成,在适量的三脂酰甘油合成之前,已经先行得到满足。这三种脂质合成的调控,以及磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油以及肌醇磷脂合成的调控,都密切地与细胞内的膜,包括质膜、内质网膜、高尔基体等的维持、形成和功能有密切关系。

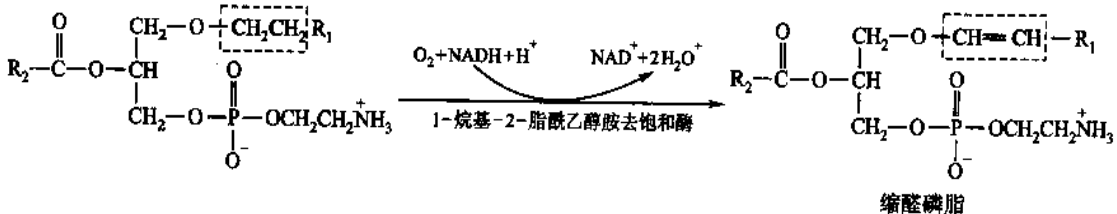


图 29-28 缩醛磷脂(plasmalogen)的生成

磷脂酰胆碱生物合成的速度主要由 CTP:磷酸胆碱磷脂酰转移酶的活力进行调节。后者是两个相同的亚单位组成的二聚体,相对分子质量为 41920。这个酶存在于细胞溶胶和内质网中,但只有与膜结合的那一部分才具有活性。调节 CT(CTP):磷酸胆碱磷脂酰转移酶在细胞溶胶和内质网间的分配有以下几种机制:①很可能是主要的,是一种反馈调节,它基于磷脂酰胆碱在内质网中的浓度。当磷脂酰胆碱在膜内

的浓度降低,酶与内质网的结合即增高,随即被激活,并推动磷脂酰胆碱的合成。当磷脂酰胆碱的浓度回到正常水平,磷脂酰转移酶就从内质网释出进入细胞溶胶,变为无活性。②蛋白激酶使“CT”磷酸化,结果酶自膜脱离(变为无活性);磷酸酶可发生相反效应。有关这个蛋白激酶的本面目现在还不清楚,但它与 cAMP-依赖性蛋白激酶或蛋白激酶 C 并不相像。③脂肪酸推动磷脂酰转移酶与内质网结合,当脂肪酸移去,酶即从内质网释出进入细胞溶胶。④最后,磷脂酰胆碱合成的底物之一,二脂酰甘油也可使磷脂酰转移酶与内质网结合。当脂肪酸量充裕,二脂酰水平也较高,这时不仅对磷脂酰胆碱生物合成提供了底物,而且也会激活磷脂酰转移酶。(图 29-29)这些新颖的调控酶活性的机制使得肝脏得以调节磷脂酰胆碱的生物合成,既迅速,又是正反两个方向都可行。

腺苷酸环化酶(环化 AMP) - 介导的反应抑制脂肪酸合成,此种反应也使二脂酰甘油生物合成下降。二脂酰甘油的供应可对磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺及三脂酰甘油的生物合成给以限制。当二脂酰甘油充裕时,膜成分所必需的磷脂酰胆碱及磷脂酰乙醇胺在贮存能量的三脂酰甘油获得适当量前,就已先行得到二脂酰甘油的满足。磷脂酰胆碱合成可因 CDP-胆碱的供给,通过磷脂酰转移酶反应而受到调控。同样 CDP-乙醇胺的供给可调节磷脂酰乙醇胺的合成。当细胞需要的这些磷脂质已得到满足时,过量的二脂酰甘油及脂酰-CoA 就进入转化为三脂酰甘油的途径。

(8) 磷脂类生物合成的最后一步反应发生于内质网的细胞溶胶面 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇的合成,全都发生在内质网的细胞溶胶面和高尔基体膜上(小鼠肝脏)。与之不同,磷脂酰甘油和二脂酰甘油的合成则大部发生在线粒体中。有关这些脂质分布,在膜中有两个问题还留待回答:①因为磷脂质的合成发生在内质网的细胞溶胶侧;这些磷脂还发现居于双层膜内部的外小叶(outer leaflet)和内小叶(inner leaflet)上,这些磷脂是怎样到达双层膜的小叶的? ②细胞对这些磷脂是怎样

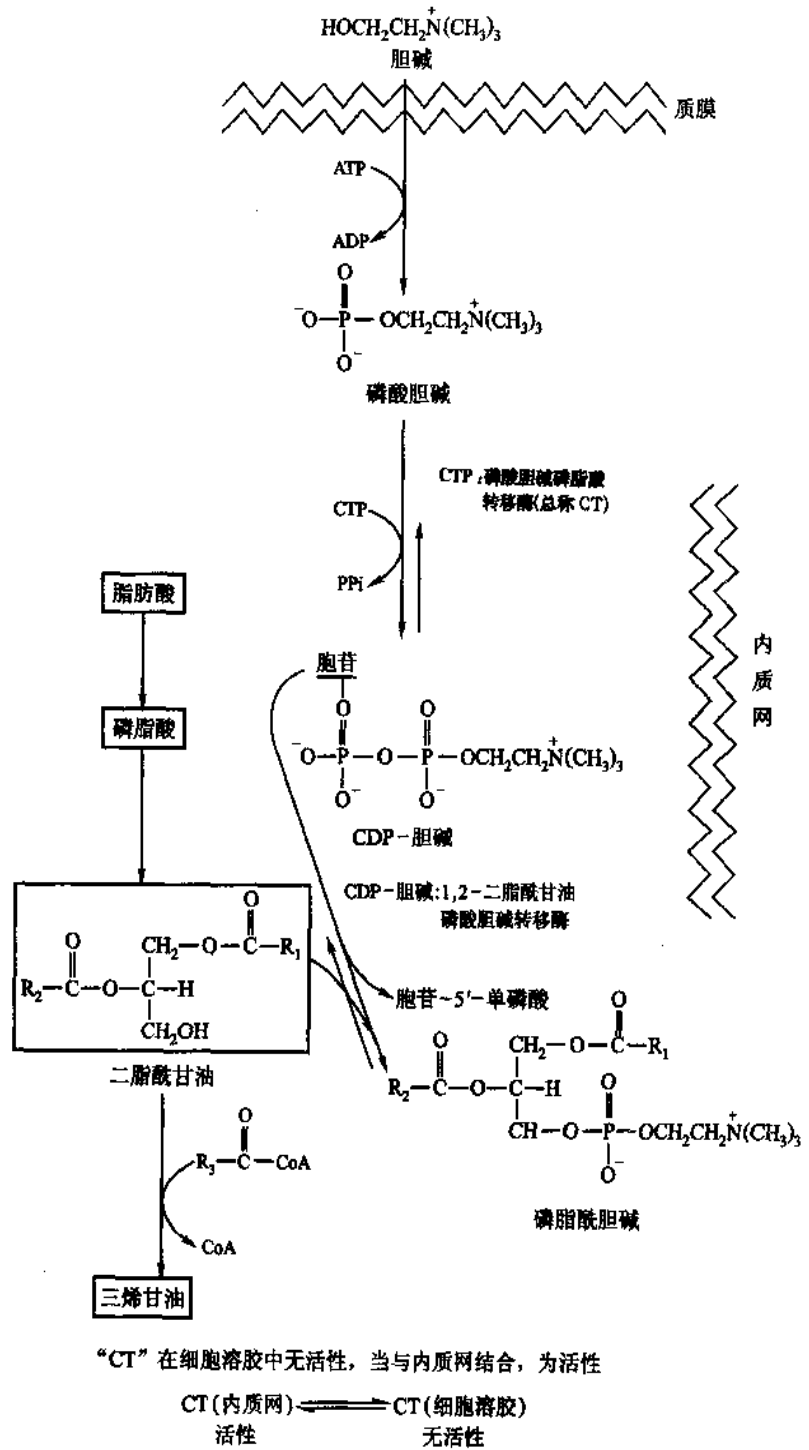


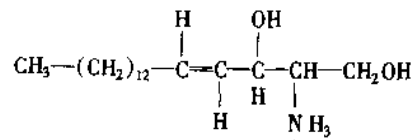
图 29-29 小鼠肝脏中 CTP:磷酸胆碱磷脂酸转移酶(CT)的调节

分配和就位的?是怎样运送磷脂从合成地点到其他膜的?有关第 1 问,得从膜蛋白的不对称排列说起,一些完整的膜蛋白可优先地与某些脂质联合。蛋白质的取向影响着脂质的取向。这种不对称分隔的磷脂质能进入外、内小叶是依赖于运送它们的膜内在蛋白质。例如,在不同来源的红细胞发现了一种蛋白质,其相对分子质量为 31 000。它需要 ATP 提供能量,可将不同地点的磷脂酰丝氨酸经过运送中的突然转向的方式,从外小叶转入内小叶。当然这里还有很多问题留待阐明。关于第 2 问,很可能磷脂质在细胞内是作为膜的一部分被转移的。由于带有特定膜蛋白的膜小泡(membrane vesicles)从内质网出芽并移动穿过细胞溶胶,最后与特定细胞器的膜融合在一起。在小泡表面的特定膜蛋白可能将小泡导向特定的细胞器,或通过相互碰撞(collision)达到相互融合(fusing)。

细胞内脂质运送的另一可能机制是磷脂与真核细胞中细胞溶胶的蛋白质交换。这些蛋白质可以催化磷脂分子在双层膜之间交换。例如,在内质网上的磷脂酰胆碱分子与交换蛋白(exchange protein)相连接的磷脂酰胆碱进行交换。交换蛋白又转移到线粒体,在这里可发生另一种交换。按此机制,磷脂酰胆碱分子即从内质网转移到线粒体。从已经被分离出的交换蛋白表明,有一些对磷脂的极性头部不表现专一性,但其他的却是高度专一的。虽然膜的成长需要脂质转入,但脂质通过这些蛋白质进入膜的效应却很难模拟。但是最低限度可以说,这种蛋白质以交换方式,可以在不同膜上交换脂质使它新生,因为在真核细胞中磷脂质确是在周转着的。

3. 鞘磷脂和鞘糖脂

所有鞘磷脂(sphingolipids)的一般结构都有一个长的脂肪链。一个二级胺和一个醇羟基部分,它的代表即鞘氨醇(4-sphinganine):

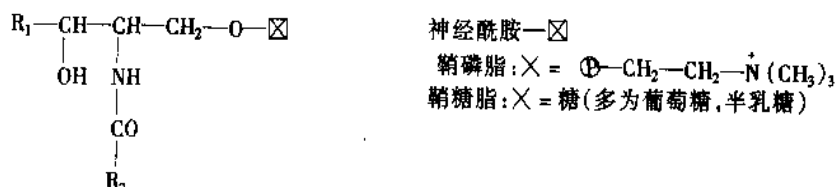


与前述的磷脂质相比较,它代替了甘油分子与不同组分结合,形成鞘磷脂的一般式。这些鞘磷脂的作用如前所述,是所有脊椎动物细胞的组成成分,在髓鞘(myelin sheath)中含量丰富,具有保护和使神经纤维绝缘的作用。它们在红细胞以及血浆脂蛋白中都有存在。

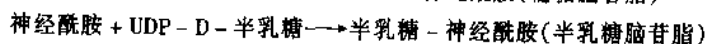
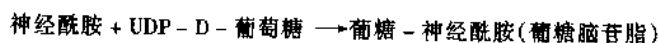
(1) 鞘磷脂直接由神经酰胺(ceramide)生成 在鞘磷脂中的主要结构是(神经)鞘氨醇,它的生物合成发生在内质网上。最初的起始物软脂酰-CoA 与丝氨酸缩合形成 3-酮鞘氨醇(3-ketosphinganine)。催化此反应的酶称为 3-酮鞘氨醇合酶。随后 3-酮衍生物被还原,形成二氢鞘氨醇(sphinganine)。催化此反应的酶称为 3-酮鞘氨醇还原酶,它以 NADPH + H⁺ 为辅助因子。它的氨基部分与一分子脂酰-CoA 反应,形成 N-脂酰-二氢鞘氨醇(N-acyl-sphinganine),再经 FAD 脱氢,形成神经酰胺(图 29-30)。

鞘磷脂(sphingomyelin)是磷脂酰胆碱转移磷酸胆碱给神经酰胺形成的。磷酸胆碱转移酶位于高尔基体膜的腔侧。

(2) 鞘糖脂的生物合成也始于神经酰胺 鞘糖脂(glycosphingolipid)与鞘磷脂都含有鞘氨醇。它们的不同处是鞘磷脂还含有磷酸胆碱,鞘糖脂则含有糖(单糖、低聚糖或其衍生物):



鞘糖脂的生物合成在许多地方与 O-连接的糖蛋白的合成相像,糖基二磷酸尿苷,例如,葡萄糖二磷酸尿苷(uridine-diphosphate - D-glucose, UDP-D-葡萄糖)为起始物,与神经酰胺反应即形成葡萄糖-神经酰胺(葡萄糖脑苷脂)。同样,半乳糖-神经酰胺(半乳糖脑苷脂)也是这样合成的。



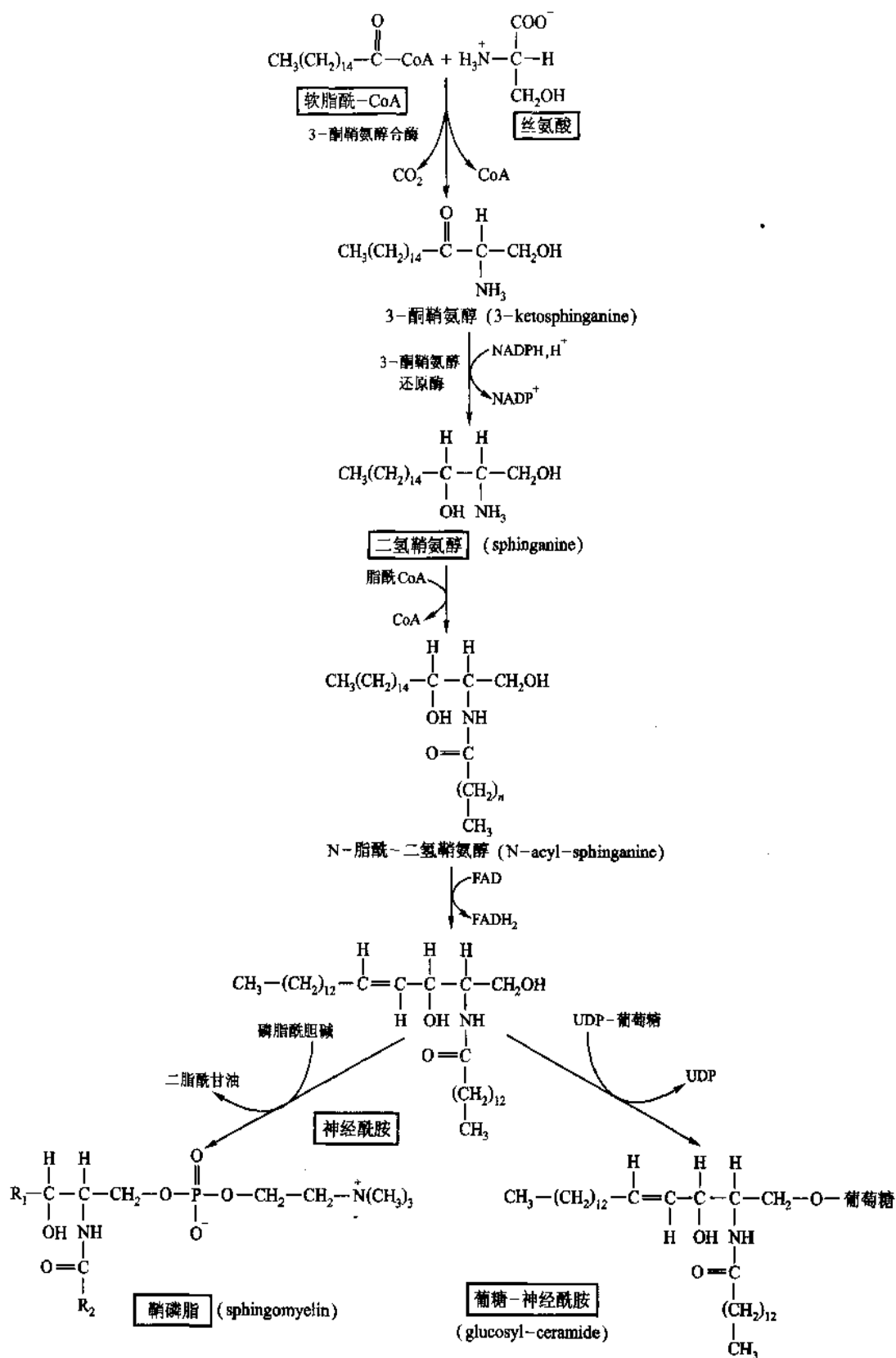


图 29-30 以软脂酰 CoA 和丝氨酸为起始物到鞘磷脂和葡糖-神经酰胺的生物合成路线

即糖分子以糖核苷酸的形式转移到受体的脂质分子(神经酰胺)上,参与此反应的酶是糖基转移酶,它们对各个反应是特异的。参与鞘糖脂合成的糖基转移酶的绝大多数存在于高尔基体的空腔一侧。最后,用于鞘糖脂合成的糖核苷酸(如 UDP-葡萄糖),是由位于高尔基体膜上的运送分子使它能够通过膜进入高尔基体空腔的。有关鞘糖脂合成的路线见图 29-31。

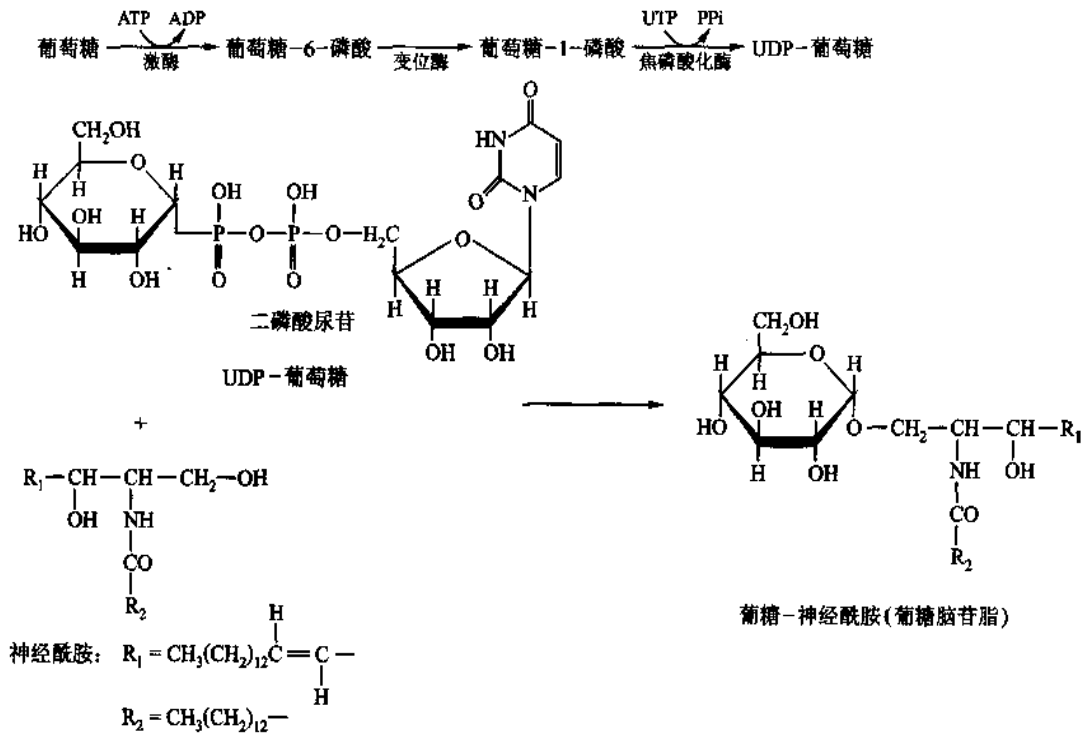


图 29-31 葡萄糖-神经酰胺的生物合成

各种鞘糖脂的生物合成可概括如图 29-32。

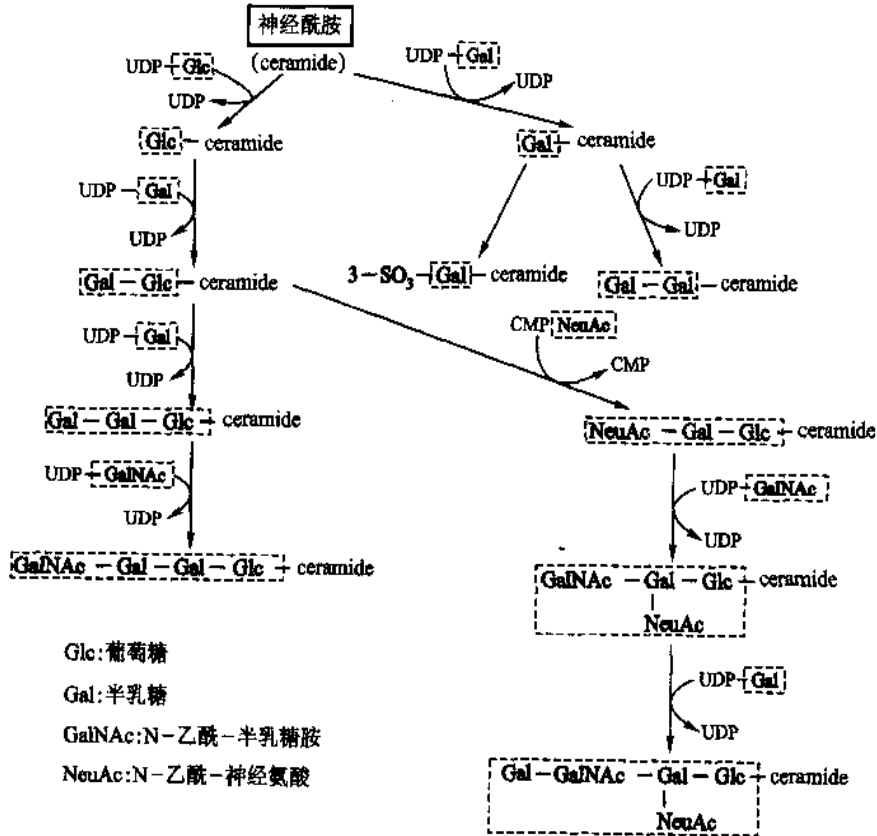


图 29-32 各种鞘糖脂的生物合成概貌

4. 类二十烷酸:与膜结合的花生四烯酸衍生出的激素

类二十烷酸(类花生酸, eicosanoids)是一族多样化的激素,它们的绝大多数是由 C_{20} 多不饱和脂肪酸,花生四烯酸(arachidonic acid)衍生而来。在一系列的环戊烷酸(cyclopentanoic acid)中最突出的是前列腺素(prostaglandin, PG),它以前列腺烷酸(prostanoic acid)为基本骨架。这个酸有一个五元环和两条侧链,无不饱和双键。根据前列腺烷酸的五元环取代基团以及环上无双键、双键位置等,可将前列腺素(PG)分为九类,即PGA, B, C, D, E, F, G, H及I。体内较多存在的是PGA, PGE及PGF。PGG, PGH及PGI在五元环外还有一含氧的五元并环,因此又称前列环素(prostacyclin)。又根据 R_1 和 R_2 两条侧链中双键的数目和位置又分为1,2,3类。另外,如第9位碳原子上有羟基,根据羟基位于五元环平面的上方或下方,分为 β 及 α 型,天然的前列腺素均为 α -型(图29-33)。

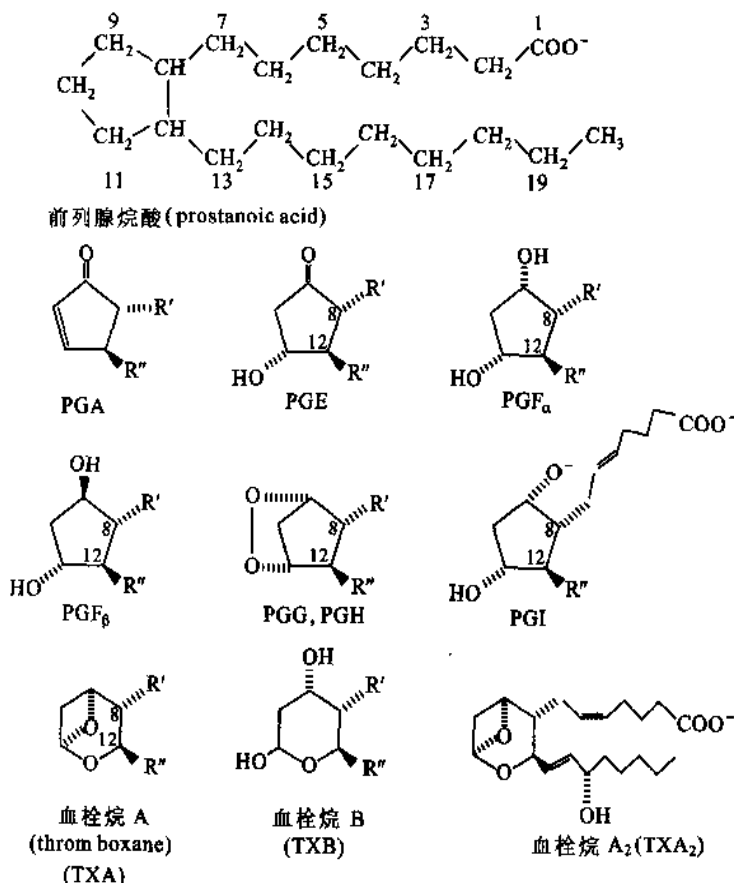


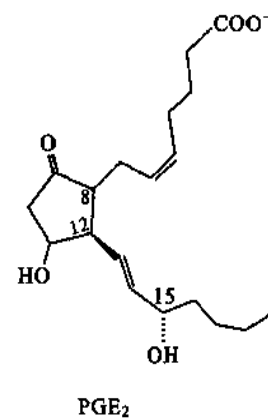
图29-33 前列腺烷酸,前列腺素及血栓烷的诸结构

从以上一般式可以设想,侧链(R_1 或 R_2)上如有双键,就有一个顺式或反式问题。以PGE $_2$ 为例,结构测定结果表明5和6位间的双键为顺式(*cis* Δ^5); 13和14位间为反式(*trans* Δ^{13}),如右图所示:

与前列腺素很相近的是含氧的类二十烷酸,血栓烷(thromboxan)。它在环状结构上与前列腺素不同,血栓烷以恶烷环(oxane ring)代替前列腺素的五元环。以血栓烷A $_2$ 为例,它的结构如图29-33所示。

类二十烷酸类化合物的前体花生四烯酸作为磷脂复合物的一部分贮存于膜中。根据需要,经专一的磷脂酶A $_2$ 的催化,自磷脂复合物释出。除此之外还有,在磷脂酰肌醇专一的磷脂酶C(phosphatidylinositol-specific phospholipase C)的作用下,磷脂酰肌醇可降解产生二脂酰甘油及磷酸肌醇(phosphoinositol)。

二脂酰甘油随即在二脂酰甘油酯酶(diacylglycerol lipase)的催化下被裂解,产生花生四烯酸(arachidonic acid)和单酰甘油(monacyl glycerol)。二脂酰甘油还可经另外途径产生花生四烯酸,即经二脂酰甘油激酶



(diacylglycerol kinase) 催化形成磷脂酸 (phosphatidic acid, PA), 再经磷脂酶 A_2 催化形成溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid) 和花生四烯酸。磷脂酶 A_2 催化的花生四烯酸的释出是类二十烷酸化合物生物合成途径的限速步骤。

自花生四烯酸以下的类二十烷酸化合物的合成路线根据产物的结构可分为两路, 其一是环加氧酶途径 (cyclooxygenase pathway), 另一是线性脂加氧酶途径 (linear lipoxygenase pathway) (图 29-34)。前者的产物为前列腺素 (prostaglandins) 及其衍生物, 如前列环素 (prostacyclin, PGI_2)、血栓烷 (thromboxan) 等, 它们都含有五元环。后者的产物是线形白三烯类 (leucotrienes), 它的英文名用“leuco”作字头是指这类化合物都是从白细胞 (leucocyte) 游离得到的, 有三个双键的三烯及四个双键的四烯。

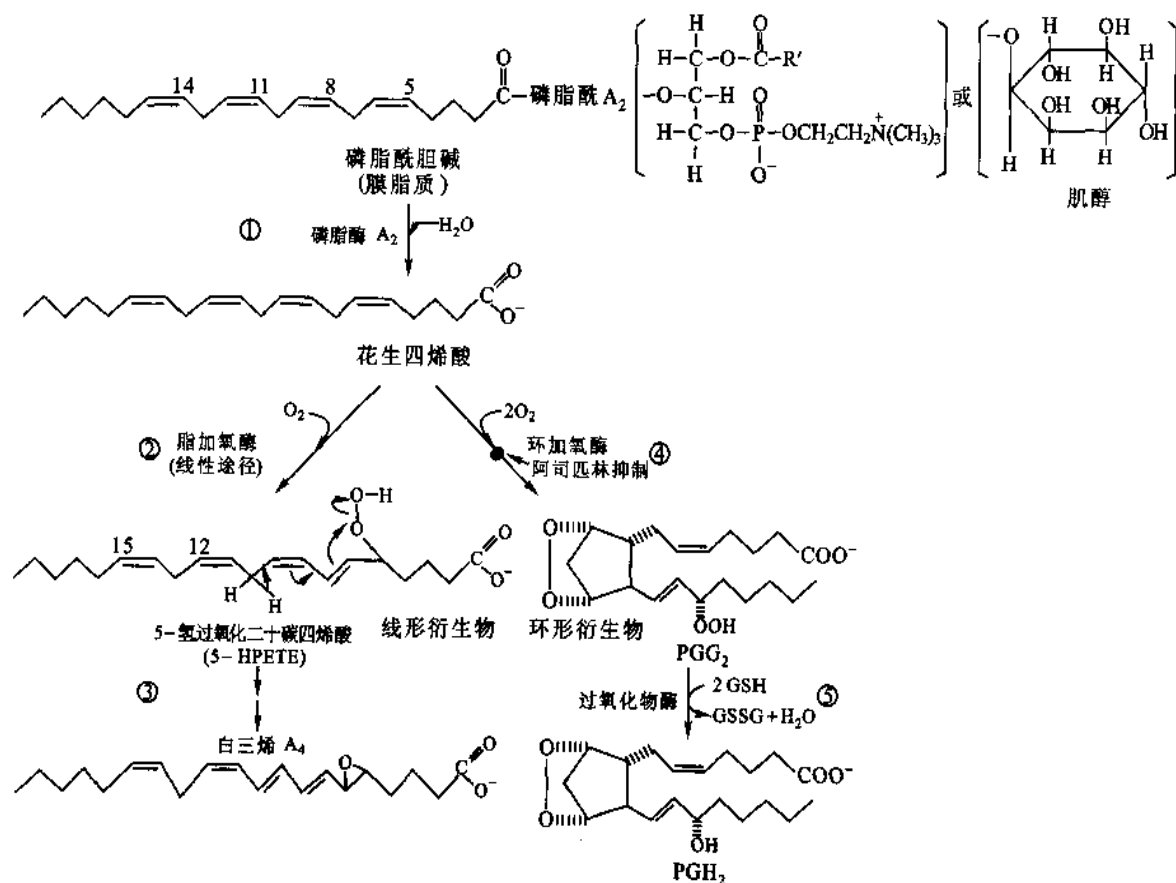


图 29-34 类二十烷酸生物合成的环形和线形途径

(1) 环加氧酶途径 (the cyclooxygenase pathway) 前列腺素和血栓烷生物合成的最初一步是花生四烯酸的氧化和环化, 产物依次为 PGG_2 和 PGH_2 , 这步反应是在与内质网膜结合的双功能酶——环加氧酶也称为前列腺素内过氧化物合酶 (prostaglandin endoperoxide synthase) 的催化下实现的。这个酶所以称为“双功能酶”是由于它具有环加氧酶 (cyclooxygenase) 和过氧化物酶 (peroxidase) 的活性。花生四烯酸依次转变化 PGG_2 及 PGH_2 (前列腺素 G_2 及前列腺素 H_2)。后者又是其他前列腺素及血栓烷的前体。环加氧酶具有很不寻常的性质, 它可以催化自我毁灭。差不多每对 400 个底物催化后, 环加氧酶就不可逆转地失活。不论“体内” *in vivo* 和“体外” *in vitro* 的实验都表现出这样的“自杀性的反应”, 它的化学反应机制现尚不明。

花生四烯酸的氧化是两个分子氧在环加氧酶催化下转化为环状衍生物 PGG_2 。这步酶反应受阿司匹林 (aspirin) 不可逆转的抑制是值得注意的。阿司匹林对酶活性部位的丝氨酸残基乙酰化, 导致酶失活, 而且不可逆转 (图 29-35)。

环加氧酶的失活会导致自 PGH_2 衍生出的三类化合物的形成受抑制, 这三类化合物是其他一些前列腺素 (如 PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$)、前列环素 (如 PGI_2) 和血栓烷 (如 TXA_2 , TXB_2)。阿司匹林对过氧化物酶的活性无作用。众所周知, 阿司匹林是著名的具有抗炎作用 (anti-inflammatory) 药物, 其他非类固醇抗炎药物也可抑制

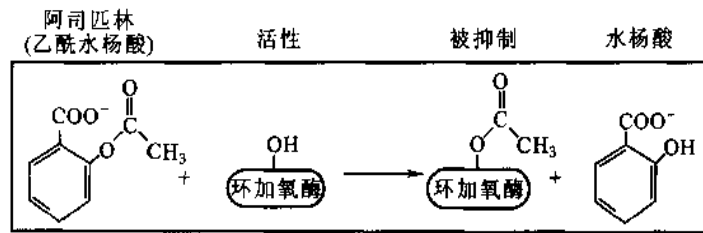
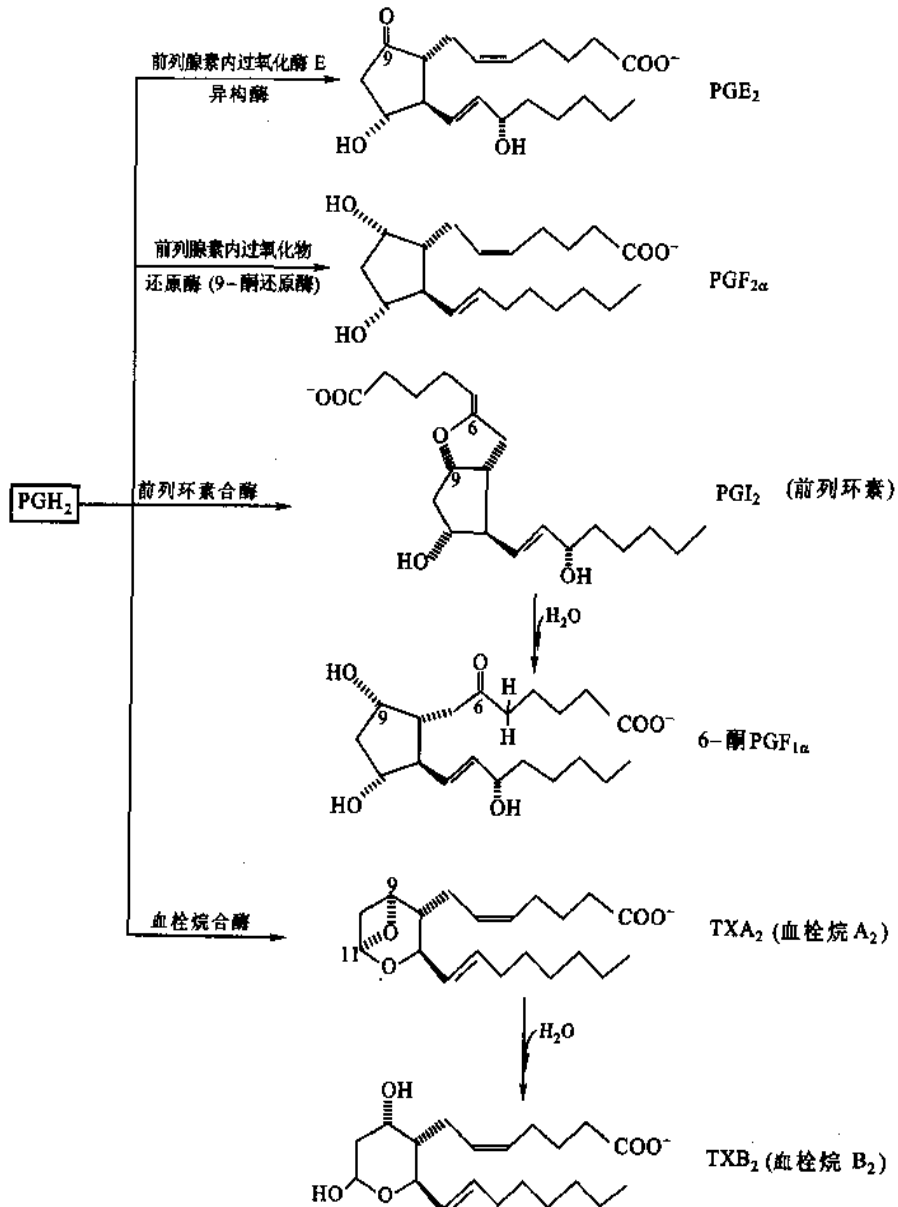


图 29-35 阿司匹林使环加氧酶失活,而且不可逆转

环加氧酶,但与阿司匹林不同,它们是非共价性的结合,也不是不可逆转的抑制。

每隔一天服用低剂量的阿司匹林,有报告称,可以降低心肌梗塞,中风猝发的发病率,这种效应估计是由于对环加氧酶抑制所致。但是阿司匹林能够预防、保护心血管疾患,对此还没有完全的定论,解决这个问题还需要进一步的研究。

(2) 自 PGH_2 转化为其他前列腺素及血栓烷 自 PGH_2 转化为 PGE_2 经过一个异构化反应,9 位上的氢与 11 位的氧连接成醇,9 位氧与 9 位碳形成酮(图 29-36)。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的形成则包括着过氧化结构的两个氧全

图 29-36 以 PGH_2 为起始物,前列腺素、前列环素及血栓烷的生物合成

被还原成两个羟基。动脉壁中含有前列环素合酶 (prostaglandin synthase), 它催化 PGI_2 转化为前列环素, 它含有一个新的含氧五元环, 这个反应是在 C9 位和 C6 位间形成醚键, 产物 PGI_2 可以水解形成 6-酮 $\text{PGF}_{1\alpha}$ 。在血小板 (thrombocytes) 中含有血栓烷合酶 (thromboxane synthase)。它催化 PGH_2 形成血栓烷的六元恶烷环从而形成血栓烷 A_2 。这个血栓烷 A_2 水解, 9, 11 位的环氧结构转化为两个羟基, 即为血栓烷 B_2 (图 29-36)。

(3) 线性脂加氧酶途径 (the linear lipoxygenase pathway) 脂加氧酶 (Lipoxygenase) 对各种类二十烷酸进行催化可在它的 5, 12 或 15 位上插入过氧基, 产物为 5-氧过氧化二十碳四烯酸 (hydroperoxy eicosatetraenoates, HPETEs) (见图 29-35)。其中只有过氧基插在 5 位的 5-HPETE 引人注目。它进行脱水反应可形成一个环氧化物名为白三烯 A_4 (leukotriene A_4)。下一步是谷胱甘肽 (三肽化合物) 的巯基与白三烯 A_4 的 C6 反应, 生成硫醚 (C-S-C), 反应还将环氧基转变为羟基形成白三烯 C_4 。白三烯 C_4 经水解, 将原来是三肽 (谷胱甘肽) 的衍生物转化为二肽衍生物白三烯 D_4 。白三烯 D_4 再水解得到白三烯 E_4 , 它只有一个甘氨酸侧链。上述的水解反应是放能的, 而且是单向的。上述的这些白三烯可以转化为十多种代谢物 (图 29-37)。

脂加氧酶存在于白细胞、心、肺、脾、脑等组织, 属于混合功能加氧酶。

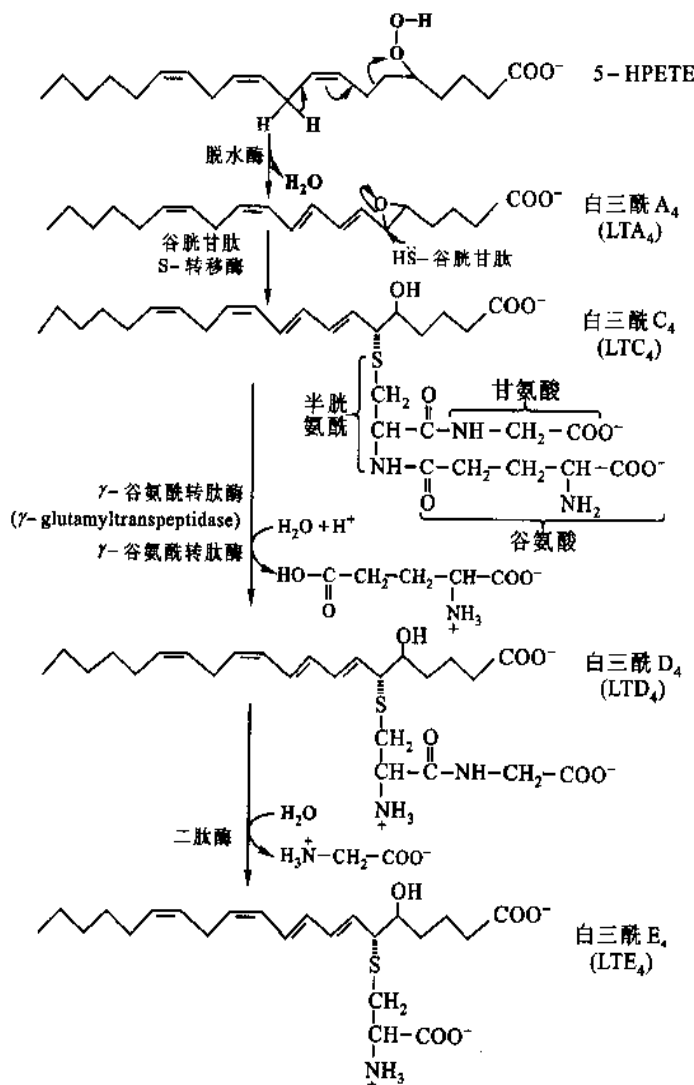


图 29-37 白三烯类化合物自 5-HPETE 的生物合成

(4) 缩醛磷脂 (plasmalogen) 和血小板活化因子 缩醛磷脂的骨架是磷酸甘油酯 (phosphoglycerolipid)。在 sn1 位上有一醚键, 与 sn3 位相接的是磷酸乙醇胺或磷酸胆碱 (见图 29-28 及图 29-38)。缩醛磷脂存在于脑中的生物膜、心脏、红细胞及其他组织中, 含量各异。在人的神经组织中, 磷脂的 20% 左右是缩醛磷脂构成, 但在肝脏中其百分比却少于 1%。缩醛磷脂的生物合成起始于二羟丙酮磷酸的放能酰基化反

应(以下,图 29-38)。众所周知,二羟丙酮磷酸是糖酵解、脂肪代谢的重要中间体。长链的脂肪酸链以醇的形式取代其 1 位上的酰基进入二羟丙酮磷酸,形成醚键,再经过 4 步反应,脂肪烷基的侧链,与氧邻近的乙基被氧化成双键,最后形成缩醛磷脂。最后一步的氧化是在 O₂ 的参与下,经细胞色素 b₅ 的催化进行的。这是一步放能,单向性的反应,两个氢被氧化成水脱下。

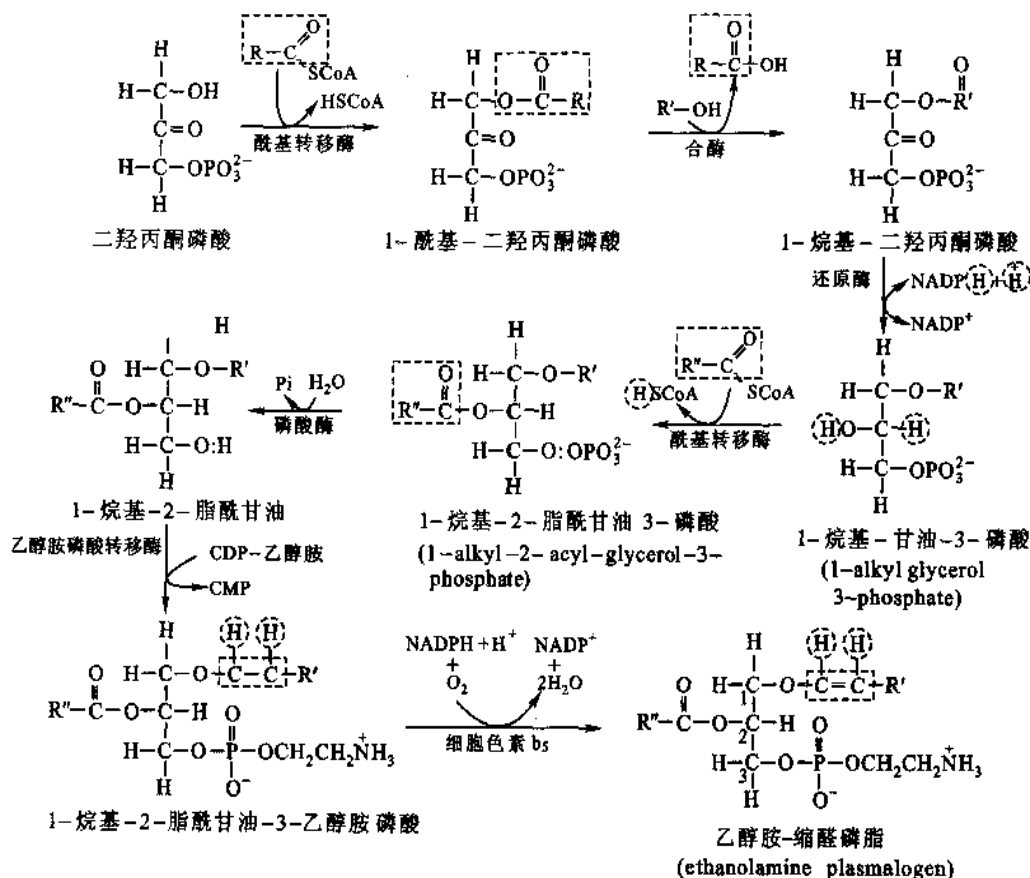
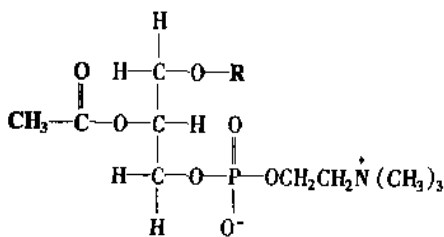


图 29-38 缩醛磷脂的生物合成

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)也是一个含醚结构的磷脂,其结构如下式:



血小板活化因子(PAF)

1-烷基-2-乙酰基-甘油磷酸胆碱

对照缩醛磷脂的结构,仅仅是 1 位的烷基与烯基和 2 位的乙酰基与脂酰基之别(与磷酸基相接的可以是乙醇胺,也可以是胆碱)。这个磷脂名为血小板活化因子是因为它可以制止血小板结粒(granulation)。PAF 还可对不同的细胞,包括肌肉、肝脏、肾和脑发生作用,它还可缓解炎症、过敏(allergic reponses)等。这个脂质药物在不同的细胞中都可合成,包括白细胞(leukocytes)、血小板(platelets)、肾细胞(kidney)及血管内皮(vascular endothelium)。PAS 在 sn2 位上被乙酰基,而不是长链的脂酰基酯化是很不平常的。

PAF 是自 1-烷基-2-乙酰基甘油-3-磷酸胆碱衍生而来。它的合成途径与本节中前述的磷酸乙醇胺衍生物的合成途径相同。它的合成是根据需要而进行,不是贮存在细胞中。PAF-循环如图 29-39, 磷脂酶 A₂ 催化 1-烷基-2-脂酰甘油-3-磷酸的水解生成“溶-血小板活化因子”(lyso-PAF), 溶-

PAF 发生乙酰化生成 lyso-PAF。lyso-PAF 是个活性物质,它可引发一些生理反应。它被水解转化为溶-PAF(lyso-PAF),并失活。在溶-PAF 乙酰基转移酶作用下,溶-PAF(lyso-PAF)又回到 1-烷基-2-脂酰甘油-3-磷酸(1-alkyl-2-acylglycerol-3-phosphocholine)。这一循环之后,经适当的刺激又可进行下一循环。PAF 循环的每一步都是放能反应。

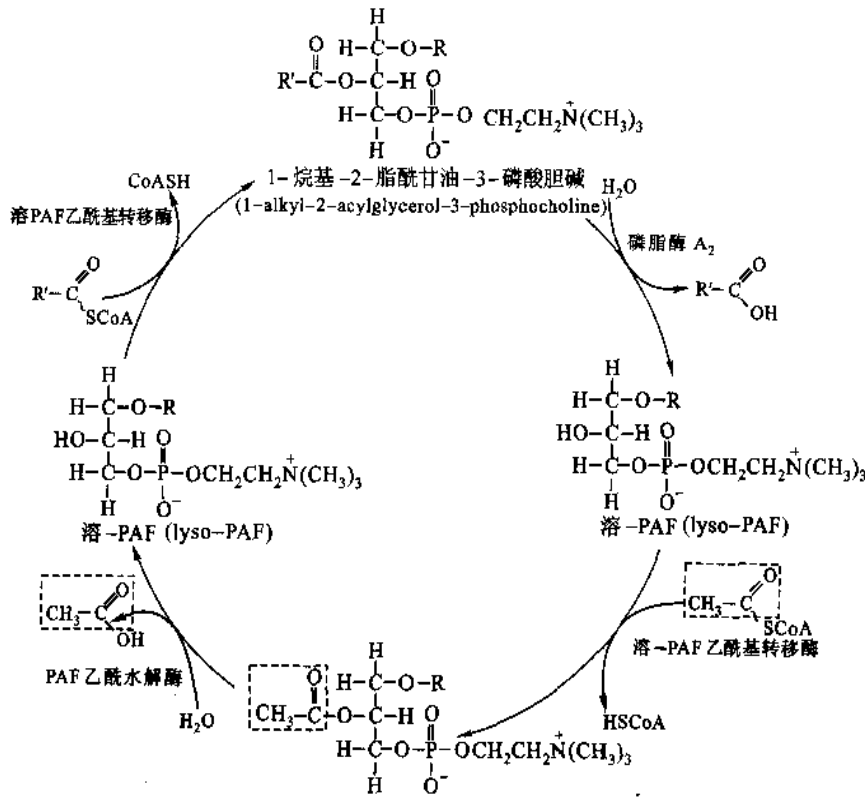


图 29-39 血小板活化因子(PAF)循环

5. 胆固醇(cholesterol)

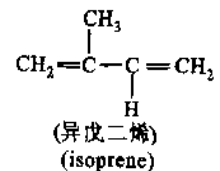
类固醇(steroids)在真核生物中较之原核生物更为普遍,胆固醇(cholesterol)是类固醇家族中最突出的成员,它是真核生物膜的一个重要组成成分,此外,它又是类固醇的重要的另外两类:类固醇激素(steroid hormones)和胆汁酸(bile acids)的前体(图 29-40)。

图 29-40 中胆固醇和它衍生出的各化合物,其碳原子都是来自细胞溶胶的乙酰-CoA。后者经 3 步反应转化为甲羟戊酸(mevalonate),再经 30 步反应生成胆固醇,其反应步数在图 29-40 中作了标记。以胆固醇为起点,各种不同的类固醇、胆汁酸和胆(汁盐)在各个特定的器官中形成,它们的生物合成大多是在特定器官细胞内的内质网中进行的,极少部分发生在线粒体中。绝大多数反应是单向性的。

类固醇激素在代谢调控中扮演着关键作用的角色。这些激素有着丰富的种类,每种激素都与受体蛋白高度专一地相互作用,在适当的靶组织中影响基因表达。胆汁酸是胆固醇降解的最初产物,它在肝脏中生成,贮存在胆囊中,并分泌进入小肠。在小肠中它的功能是使脂质得以溶解使其在小肠脂酶催化下消化。

类固醇在人体中的生物作用十分显著,胆固醇代谢的缺欠主要地会导致心血管疾患,在药物生物化学中类固醇担当了主要的角色。

(1) 胆固醇的生物合成 胆固醇的结构早在 1930 已经测定,1941 年 RiHenberg 和 Konrad Bloch 使用重氢标记的醋酸($\text{C}^2\text{H}_5-\text{COO}^-$)发现在大鼠和小鼠中,它是胆固醇的前体,其后发现粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*, 又称红色面包霉)中的甾醇,麦角固醇(ergosterol)的碳骨架全部是自醋酸衍生得来的。到了 1949 年, Bonner J 和 Arreguin B 证实 3 个醋酸分子可以结合成为一简单的五碳单位,即为异戊二烯(isoprene)。



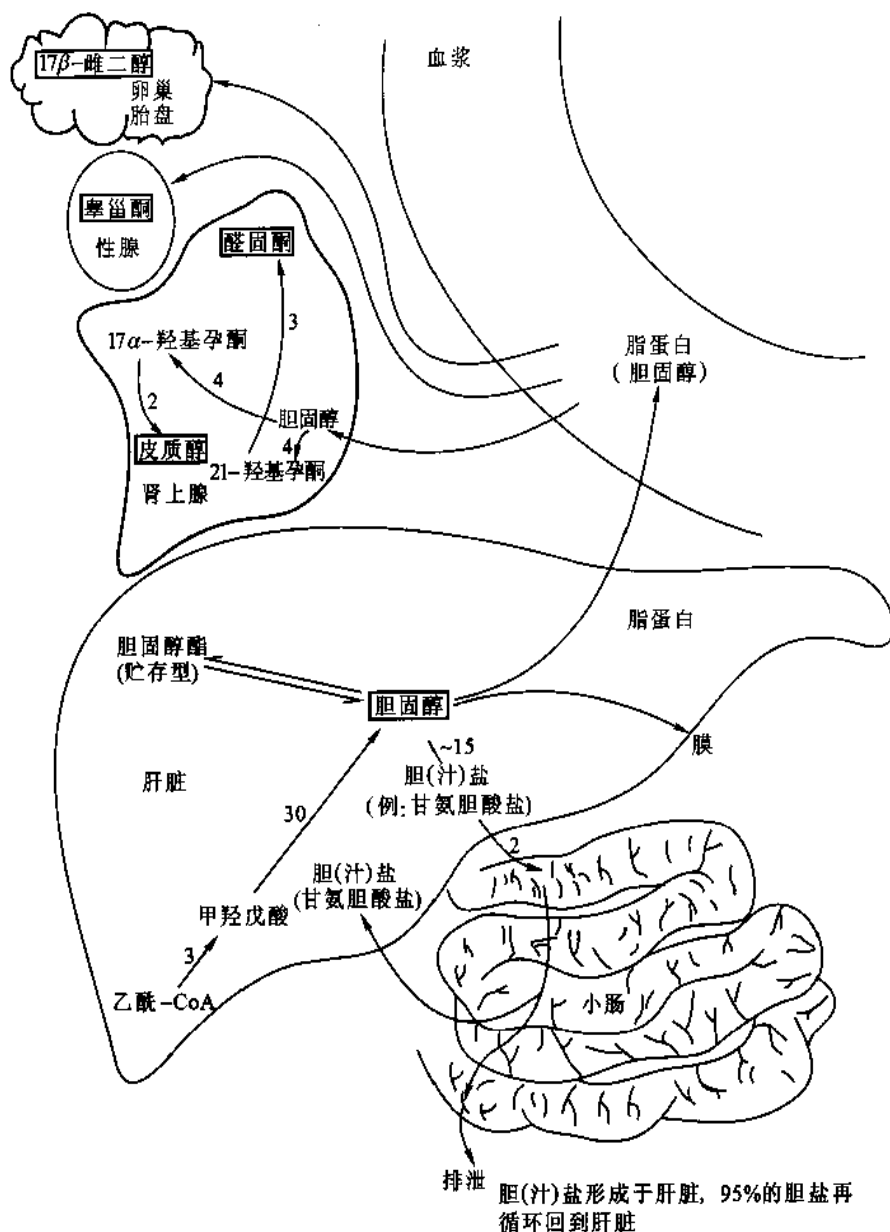
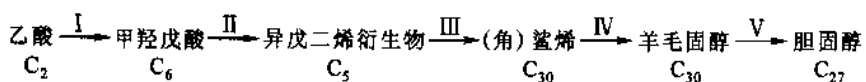


图 29-40 胆固醇和它的一些衍生物的形成

他们的这一发现与更早些的 Robert Robinson 的预见合拍, Robinson 认为胆固醇是(角)鲨烯(squalene, 三十碳六烯)的环合产物,而这个三十碳六烯可由异戊二烯聚合形成。1952年 Bloch 和 Langdon R 证实了这个(角)鲨烯确实可以转化为胆固醇,他们提出并证实了胆固醇生物合成的途径如图 29-41。

至此,还有两个问题需待解决。即这个类异戊二烯(isoprenoid)的中间产物是什么? 还有,(角)鲨烯是怎样环合成为胆固醇的? 1953年 Bloch 和 Woodward R B 提出了这个环合的设想(见图 29-40),后来对此有了修正。直到 1956年,这个未知的类异戊二烯中间产物才经确认,原来是甲羟戊酸(mevalonic acid)。甲羟戊酸的发现找到了探寻胆固醇生物合成中未解的中间环节。自此以后,胆固醇生物合成的线路和立体化学问题得到了详细的阐明。

胆固醇的所有碳原子都是来自乙酰-CoA,它的甲基和羧基碳全部进入类固醇的核中。胆固醇的全生物合成可分为 5 个阶段:



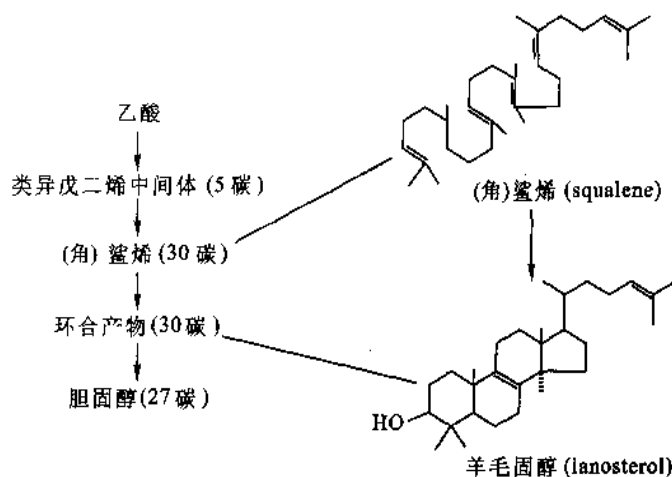


图 29-41 Bloch(1952)设想的(左)及 Woodward 和 Bloch 提出的鲨烯关环的(右)胆固醇合成路线

(2) 步骤 I: 甲羟戊酸的合成 甲羟戊酸是胆固醇生物合成的关键中间体,它是由 3 分子乙酰 - CoA 合成的(图 29-42)。反应的起始一步是乙酰 - CoA 在硫解酶(thiolase)的反向催化下形成乙酰乙酰 - CoA。步骤 I 的最后一步是 3 - 羟 - 3 - 甲基戊二酰 - CoA (3 - hydroxy - 3 - methylglutaryl CoA, HMG - CoA) 转化为甲羟戊酸,这步反应需要 2 分子的 $\text{NADPH} + 2\text{H}^+$ 及 HMG - CoA 还原酶的催化作用。这步酶促反应时胆固醇生物合成既承担任务又起决定反应速度的作用,也是对胆固醇生物合成调控起作用的第一步。此还原酶有着共价修饰和别构调节两方面的功能。

酶活性受着 3 方面机制的调节。其一属于基因表达的范畴。mRNA 的生成量受胆固醇供给情况所调节,当胆固醇过量时,HMG - CoA 还原酶的 mRNA 量乃减低,因此产生的酶也减少。胆固醇的缺乏将增强还原酶的 mRNA 的合成。

第 2 个调节机制是 HMG - CoA 还原酶的降解速度。已知,酶在细胞中的含量决定着酶的合成和降解两方面的速度。HMG - CoA 还原酶的半寿期为 2 ~ 4 h,约为内质网中的其他蛋白半寿期的十分之一。换句话说

说,HMG - CoA 还原酶在细胞内降解得很快。这个还原酶的降解速度又是由胆固醇的供给情况所决定。当胆固醇含量丰富时,酶降解的速度与胆固醇在限量供给时相比,要增快约 2 倍。胆固醇对酶降解的效应由酶的膜结构域(membrane domain)介导。为证明这样的观点,选定了缺欠膜结构域的突变酶,它显现了对甲羟戊酸合成的活力,尽管它在细胞溶胶中不存在,这个突变酶的半寿期为正常酶的 5 倍。而且胆固醇的供给并不影响此酶的半寿期。

第 3 个调节机制是还原酶的磷酸化/去磷酸化,它导致酶的失活和激活。HMG - CoA 还原酶激酶的激酶(HMG - CoA reductase kinase kinase)可以使 HMG - CoA 还原酶激酶磷酸化,并使其激活。HMG - CoA 还原酶激酶被激活后又使 HMG - CoA 还原酶磷酸化从而导致还原酶的失活。所有的激酶都是 cAMP - 不依赖的。它们的效应可由蛋白磷酸酶(protein phosphatases)所逆转。这些激酶和磷酸酶介导着 HMG - CoA 还原酶活性的短时变化。

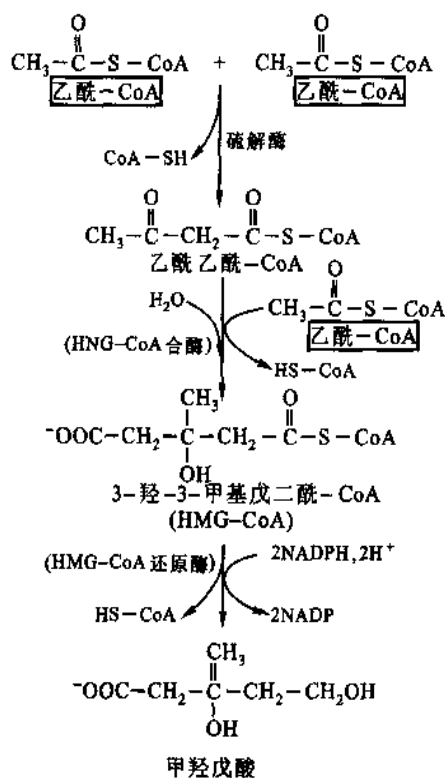


图 29-42 步骤 I: 3 分子乙酰 - CoA 转化为甲羟戊酸

很长时期,人们认识到血浆中的高胆固醇与心血管疾病(如绝大多数的心脏病,脑溢血等)有着相互关联。绝大多数的血浆胆固醇发生在肝脏中,因此设想可有药物特异地对胆固醇生物合成给予作用。也就合乎逻辑地设想使 HMG - CoA 还原酶失活或钝化的药物出现,因为这个酶是调节合成途径的关键物。人们从真菌中分离出一些代谢物,它们对 HMG - CoA 还原酶有竞争性抑制作用。其中最有效的一个是 lovastatin,如图 29 - 43。对狗作的实验表明,服用小剂量的这种药物(8 mg/1 kg 体重)可以降低胆固醇在血浆中浓度的 30%。这个药物已被批准用于高胆固醇血症(hypercholesterolemia)患者。

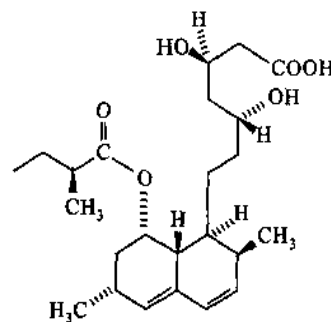


图 29 - 43 lovastatin 酸的结构
它是一个有效的 HMG - CoA 还原酶的竞争性抑制剂

图 29 - 44 是 3 - 羟基 - 3 - 甲基戊二酰 - CoA(HMG - CoA)和甲羟戊酸的立体构型。

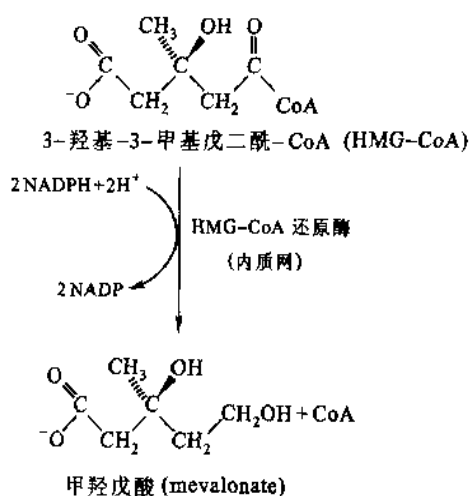


图 29 - 44 HMG - CoA 和甲羟戊酸的结构

(3) 步骤 II: 自甲羟戊酸到异戊酰焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸的生成 步骤 II 包括有甲羟戊酸的磷酸化和脱羧基三步反应(图 29 - 45),生成异戊酰焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate),再一步异构化形成二甲基烯丙基焦磷酸(dimethylallyl pyrophosphate)。第 II 步的合成有 4 种酶参与,甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase)使底物磷酸化,磷酸甲羟戊酸激酶(phosphomevalonate kinase)催化第二个磷酸化。二步反应形成产物 5 - 焦磷酸甲羟戊酸(5 - pyrophosphomevalonate)。第 3 个酶是 5 - 焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶(5 - pyrophosphomevalonate decarboxylase),它催化脱羧基反应,并把 3 - 位的羟基消除。此脱羧酶可能是在最初由 ATP 对 3 - 位羟基磷酸化之后,进行羧基和 3 - 位磷酸基的反式消除的,所以形成了异戊酰焦磷酸。此产物可在异戊酰焦磷酸异构酶(isopentenyl pyrophosphate isomerase)的催化下转化为 3,3 - 二甲基烯丙基焦磷酸(3,3 - dimethylallyl pyrophosphate)。这里形成的两种类型异戊二烯焦磷酸将共同作为第 III 步的起始物继续进行胆固醇的合成。

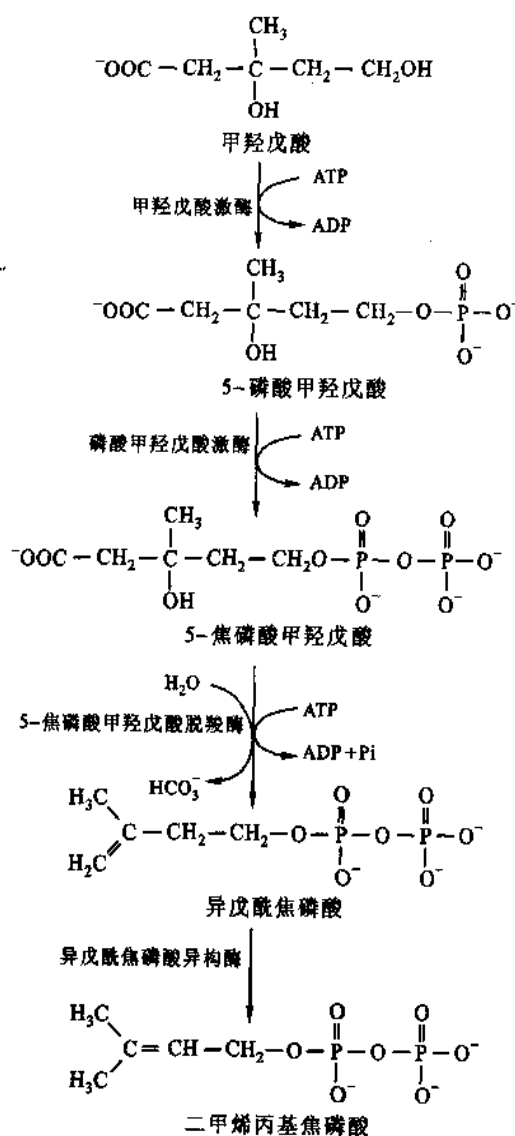


图 29 - 45 步骤 II,甲羟戊酸转化为两种类型异戊二烯焦磷酸

(4) 步骤 III: 三十碳(角)鲨烯(squalene) 步骤 III 包含有 6 个异戊二烯焦磷酸衍生物参与的一系列缩

合反应(图 29-46)。最初是步骤 II 的产物 3,3-二甲烯丙基焦磷酸与异戊酰焦磷酸进行首尾(1'-4)相接的缩合,生成牻牛儿焦磷酸(geranyl pyrophosphate, C₁₀),紧接着牻牛儿焦磷酸又与异戊酰焦磷酸再首尾缩合产生法尼焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, C₁₅)。最后 2 分子法尼焦磷酸头与头(1'-1)缩合,形成了 30-碳的开链不饱和烃,(角)鲨烯(图 29-46)。步骤 III 需用一分子 NADPH + H⁺,并释放出 4 个焦磷酸基团(4PPi)。焦磷酸的放能水解是在焦磷酸酶催化下实现的,它对胆固醇合成提供了驱动力。

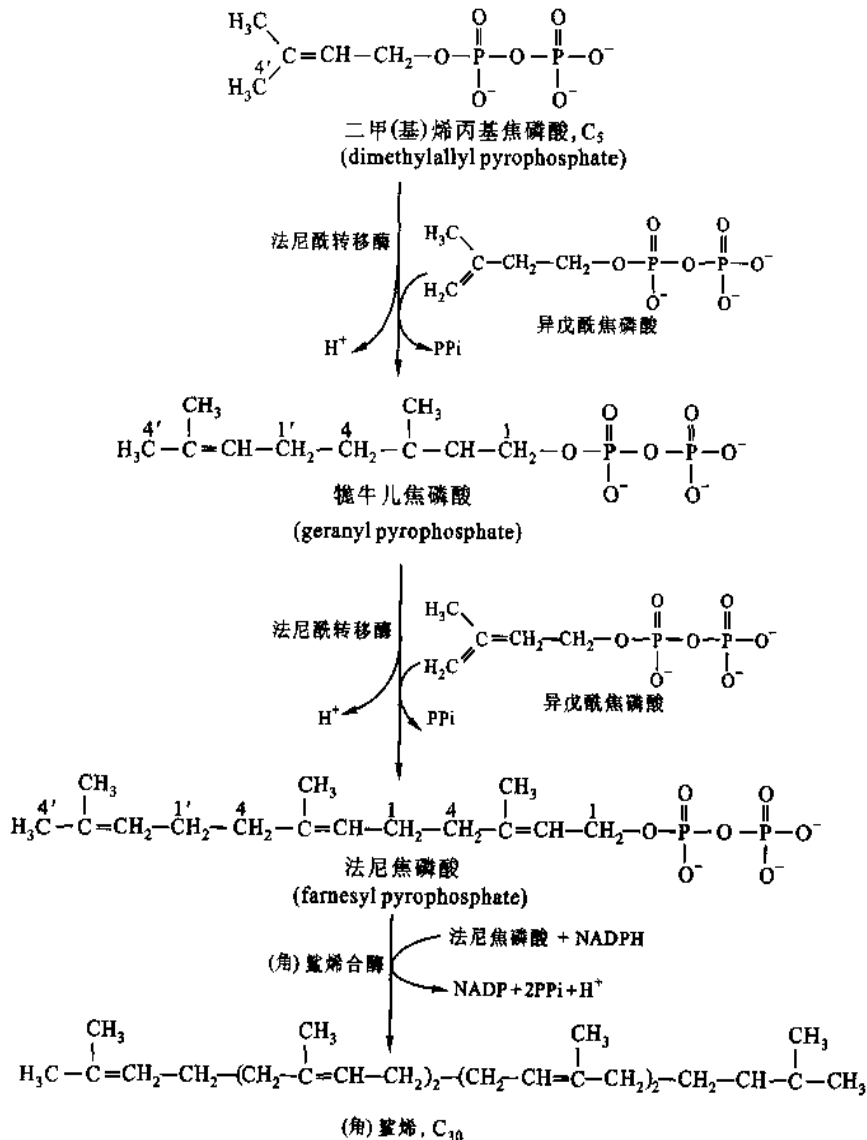


图 29-46 · 步骤 III, 自二甲烯丙基焦磷酸合成(角)鲨烯

第 1 步: 二甲烯丙基焦磷酸失去 PPi, 成为正碳离子[(CH₃)₂C=CH-CH₂], 它受到异戊酰焦磷酸双键电子的进攻, 发生(1'-4)首尾相接的缩合

第 2 步: 第 2 步的缩合与第 1 步相像得到(1'-4)缩合的法尼焦磷酸

第 3 步(详见图 29-47): 2 分子的法尼焦磷酸缩合得到了(角)鲨烯

自步骤 II 至步骤 III, 即自甲羟戊酸到(角)鲨烯的生物合成途径中参与各个酶可能都存在于细胞溶胶内, 最后一步的法尼酰转移酶(farnesyl transferase)紧紧地结合在内质网上, 而且这种膜结合的酶很难溶解。此酶曾从酵母得到。法尼酰转移酶以聚合的形式在 NADPH 的存在下, 可把 2 分子的法尼焦磷酸首-首(1'-1)缩合, 生成 30-碳的烯烃, (角)鲨烯(squalene)。这一步的反应机制见图 29-47。如果此酶以解聚形式存在, 它只催化形成前(角)鲨烯焦磷酸(presqualene pyrophosphate)。

甲基戊酸转化为(角)鲨烯途径中的立体化学问题

在步骤 I, II 和 III 中,自甲基戊酸(C_6)到(角)鲨烯(C_{30})的途径中有 14 步立体化学问题需待解决。换句话说,从理论上,自甲基戊酸到(角)鲨烯的途径中,在立体化学上应有 2^{14} (16 384) 个异构体出现的可能性。

1960 年,Popjak G 和 Cornforth J 明确指出,这可能产生 16 384 个异构体的途径,在生物体内实际上只有一条途径在发生。对于这个在立体化学上为什么只有一条可能性是现实的? 这里不能一一详述,现只举出两例来说明。其一,是焦磷酸甲基戊酸的脱羧反应,它是步骤 II 中第 3 步反应(图 29-45)。为便于阅读,现按利于理解的需要重新作图如下:

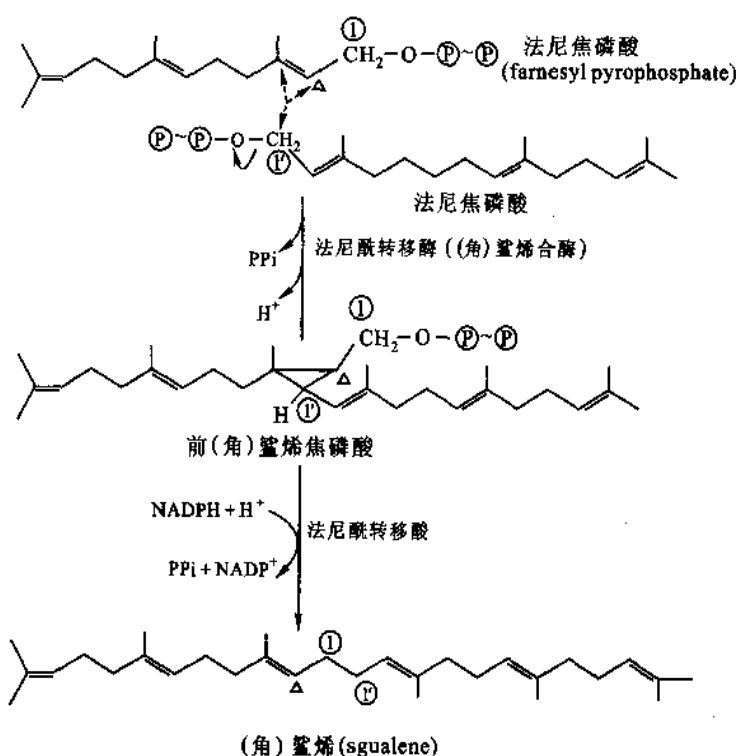
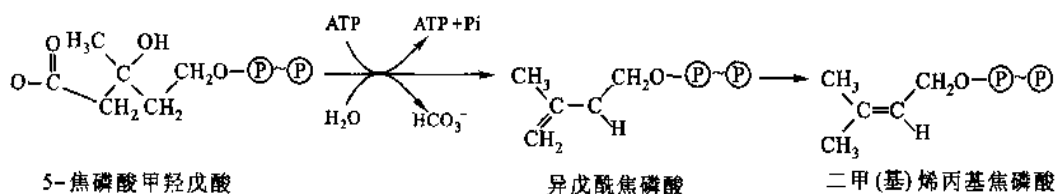


图 29-47 2 分子的法尼焦磷酸经 2 步缩合形成(角)鲨烯

这个焦磷酸甲基戊酸酶的催化反应,消除羧基和羟基在立体化学上有两种可能,即顺式消除和反式消除。为解决这个问题, Cornforth 等人合成了重氢标记的焦磷酸甲基戊酸(图 29-48, 1), 把它们与脱羧酶共同保温, 然后游离出反应产物, 经几步化学转化, 对产物异戊酰-焦磷酸进行鉴别。结果明确无误地得到的是唯一的反式消除产物。

另外一例是异戊酰焦磷酸 C2 位上的两个氢原子, 是哪一个在异构化反应中除去, 形成二甲烯丙基焦磷酸? (步骤 II, 第 4 步反应, 图 29-45)。将重氢标记在 2R 或 2S 位, 将底物与异构酶共同保温, 结果表明“前 R”的 H 专一地被除去, 留下的是 HS(图 29-48, 2)。

有关这 14 步的立体化学问题的详细内容请阅 Rentley R. *Molecular Asymmetry in Biology*, Vol. 2. New York: Academic Press, 1970。

(5) 步骤 IV: (角)鲨烯二步环合形成羊毛固醇(lanosterol) 30-碳的(角)鲨烯形成后, 经过二步反应环合形成羊毛固醇(C_{27}), 类固醇的 4 个环的骨架在此搭成(图 29-49)。反应的第 1 步是在(角)鲨烯单加氧酶(squalene monooxygenase)的催化下, 接受分子氧和 NADPH 形成一个活性的中间体, (角)鲨烯环氧化物(squalene-2, 3-oxide)。反应的第 2 步是在 2, 3-氧化(角)鲨烯羊毛固醇环化酶(2, 3-oxidosqualene:

lanosterol cyclase) 的作用下, 进行一个非凡的闭环, 得到羊毛固醇。这步闭环需要电子的协同位移 (concerted movement), 即来自 4 个双键的电子和两个甲基的位移是协同进行的。“协同”这个名称是指参与反应的任何一方对另一方发生反应是必要而不可缺的, 所有各方是自发协同的。从甲羟戊酸到羊毛固醇反应的全部历程约需 10 种酶的参与。

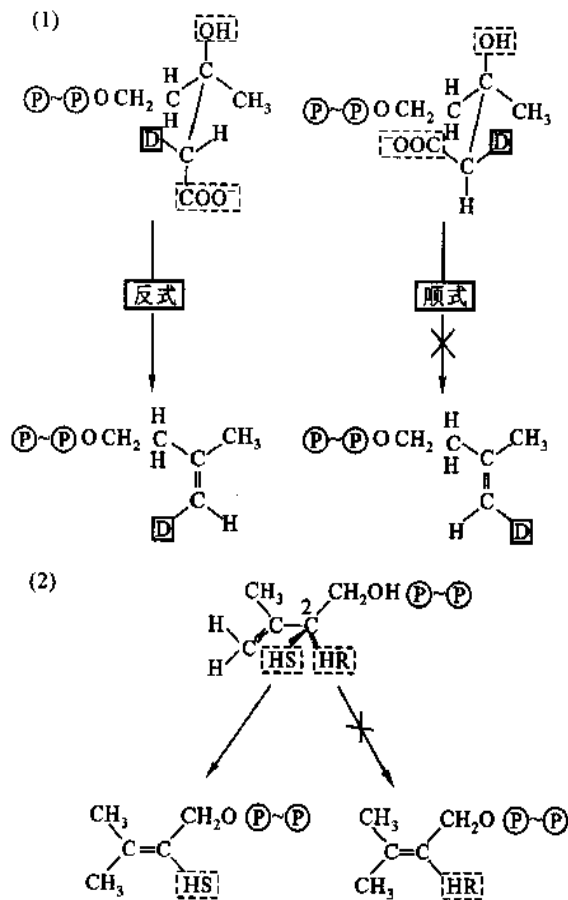


图 29-48 两个例证的立体化学问题
图中 1, 焦磷酸甲羟戊酸转变为异戊烯焦磷酸;
图中 2, 异戊烯焦磷酸形成二烯丙基焦磷酸

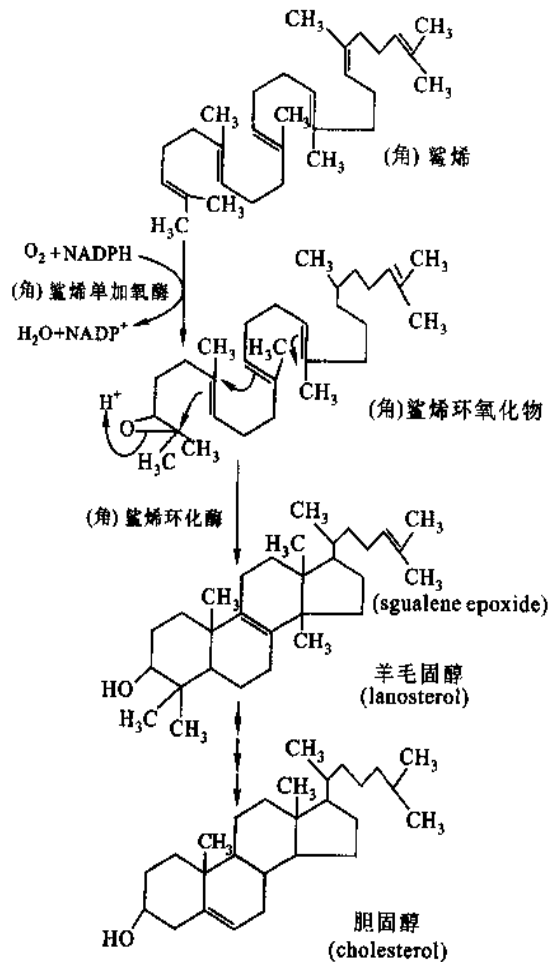


图 29-49 步骤 IV 和 V: (角) 鲨烯转化为羊毛固醇是 2 步反应; 羊毛固醇转化为胆固醇是 20 步反应

(6) 步骤 V: 自羊毛固醇至胆固醇 在胆固醇生物合成的最后步骤中, 羊毛固醇经过约 20 步反应转化为胆固醇, 这些反应大多需要 NADH (或 NADPH) 及分子氧。可以看到在胆固醇的生物合成过程中要消耗 ATP 供能, 部分由焦磷酸水解提供, 还需要大量的具有还原力的 NADH 和 NADPH。NADPH 来自苹果酸酶 (malic enzyme) 的反应和戊糖磷酸途径。苹果酸酶以 NADP⁺ 为辅酶催化苹果酸脱氢产生丙酮酸和 NADPH。

自羊毛固醇至胆固醇有两条可能的途径 (图 29-50), 在哺乳动物中的主要途径由一系列的双键还原反应和去甲基反应构成。24-位 (Δ^{24}) 的双键是怎样被还原的? 现在还没有明确定论。另外, 在这系列反应中包括有氧化反应, 14 α -甲基的消除, 紧接着是 6 位的氧化和消除两个甲基。最后一步反应是在 7 位脱氢成为 Δ^7 双键。

另外, 还有一条变更途径, 起始于去甲基转化为酵母甾醇 (zymosterol), 然后 Δ^8 双键发生异构化转变成 Δ^5 双键, 生成链甾醇 (dosmosterol)。最后一步是 Δ^{24} 双键的还原。

自羊毛固醇至胆固醇所用的酶全都嵌于内质网膜上。除这些酶外, 还发现有两种细胞溶胶蛋白质, 它们对膜-联合的反应起催化作用, 这个膜-联合反应在把 (角) 鲨烯转化为胆固醇中起作用。这两个可溶性的蛋白质在胆固醇生物合成中是怎样作用的? 现在还是有待研究的问题。

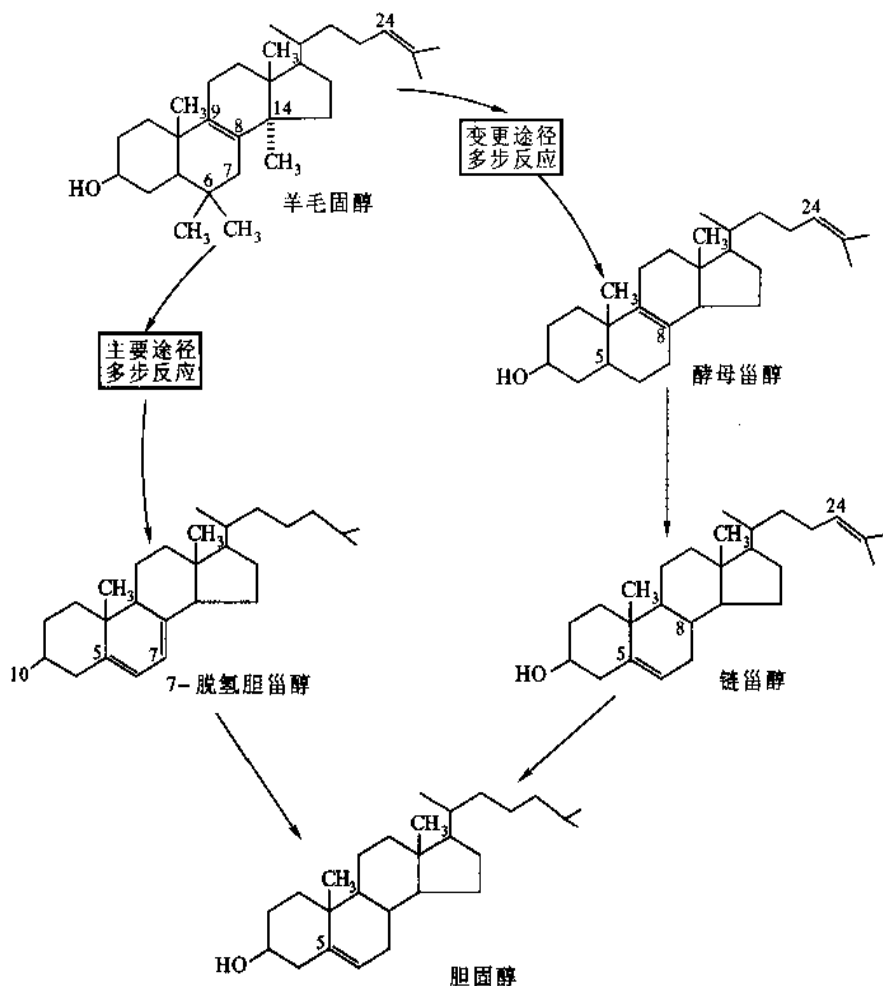


图 29-50 自羊毛固醇到胆固醇的两条途径

6. 胆固醇及其转化产物

本节内容在第 28 章中已有述及,本节只作一些补充。

(1) 哺乳动物的胆固醇代谢一般概貌 哺乳动物中胆固醇的代谢十分复杂,图 29-51 是一概括的图解有助于了解它的主要代谢物和内在关系。

虽然机体各组织都能合成胆固醇但绝大部分是在肝脏中合成,或自膳食摄取。由小肠黏膜细胞吸收的胆固醇会同三脂酰甘油、磷脂及在细胞内新合成的某些载脂蛋白 (apoprotein, apo) 共同形成乳糜微粒 (chylomicron, CM), CM 经淋巴进入血浆。这个颗粒迅速地受脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase) 作用而降解,未被降解的残迹又回到肝脏。载脂蛋白,乳糜微粒中的脂质成分和残迹,实行了与高密度脂蛋白 (HDL) 的交换。胆固醇在细胞内合成的部位是细胞溶胶和光面内质网。合成胆固醇的酶系主要存在于细胞溶胶和光面内质网部位。在肝脏中生成的胆固醇还有一些其他的前途:

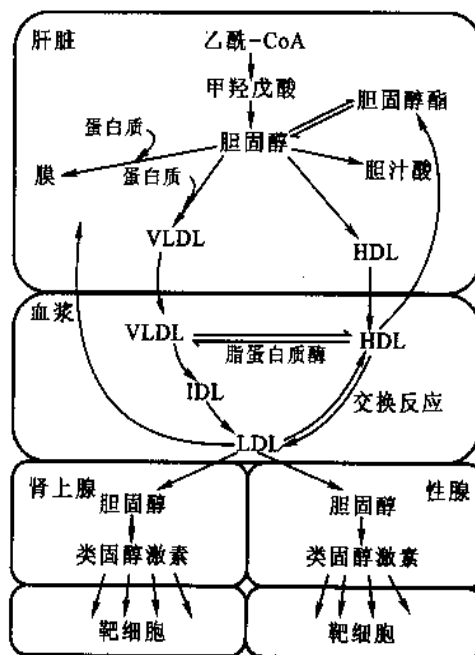


图 29-51 胆固醇的“走向”

a. 作为血浆脂蛋白,乳糜微粒,高密度脂蛋白 (HDL) 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 的组成分泌进入血浆;

- b. 以胆固醇酯的形式贮存在小滴(droplets)中。
 - c. 用于细胞膜的结构组成。
 - d. 转化为胆(汁)酸或胆汁盐。
 - e. 在肾上腺或性腺中转化为多种类固醇激素。
- 现分别介绍如下。

(2) 血浆脂蛋白 在人类血浆中脂类的含量和类型主要依据膳食习惯和个体的代谢状况而定。血浆脂蛋白共有五类,它们的组成和密度如表 29-1 所示:

脂蛋白是球状的,直径小到 5~12 nm 大到 1 200 nm,其大小是依特定的蛋白质和脂类决定的。不论何种类型,脂蛋白的结构都有一球心,它是由三脂酰甘油或胆固醇酯等中性脂类构成的。球心的外层是由蛋白质、磷脂类和胆固醇构成的“层”包裹着,它们定向地排列着,磷脂类的极性头部朝向脂蛋白的表面,如图 29-52 所示。

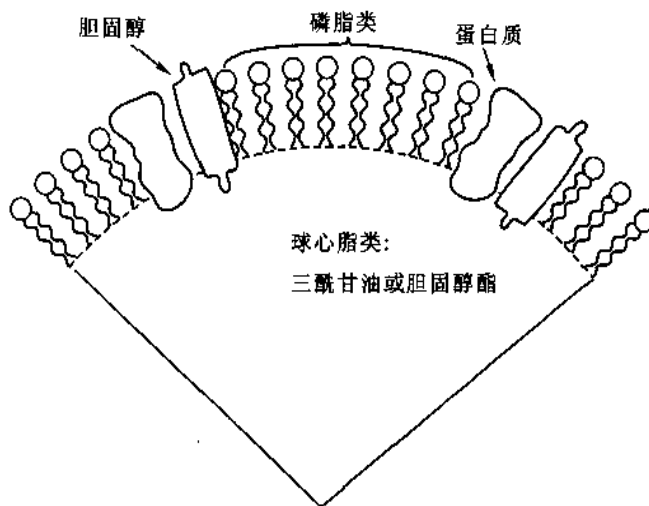


图 29-52 人类血浆脂蛋白的一般结构

脂蛋白颗粒中的蛋白质部分称为载脂蛋白 (apolipoprotein, apoprotein, apo), 现已知的有十余种。颗粒中的蛋白质多以某一种为主。对这些蛋白质曾作了大量研究,包括了解其序列,已知它们有富含疏水的氨基酸区,与磷脂结合十分有利。

表 29-1 血浆脂蛋白的分类及组成

	乳糜微粒	VLDL	IDL	LDL	HDL
密度/ $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	< 0.95	0.95 ~ 1.006	1.006 ~ 1.019	1.019 ~ 1.063	1.063 ~ 1.210
直径/nm	75 ~ 1 200	30 ~ 80	25 ~ 35	18 ~ 25	5 ~ 12
组成成分/(干重)					
蛋白质	1 ~ 2	10	18	25	33
三脂酰甘油	83	50	31	10	8
胆固醇和胆固醇酯	8	22	29	46	30
磷脂类	7	18	22	22	29
载脂蛋白成分					
	A I, A II	B100	B100	B100	A I, A II
	B-48	C I, C II, C III	C I, C II, C III		C I, C II, C III
	C I, C II, C III	E	E		D
					E
电泳分类	Ω	前- β	β 和前- β 间	β	α

VLDL: 极低密度脂蛋白 IDL: 中密度脂蛋白 LDL: 低密度脂蛋白 HDL: 高密度脂蛋白

脂蛋白的多种组成成分是怎样组在一起的? 现在还没有完全阐明。目前的看法认为这些组分是从内质网运送到高尔基体,在这里形成分泌小泡,这些小泡随即与质膜融合,并把这些脂蛋白的组成成分分泌进入血浆。

血浆脂蛋白主要在肝脏和小肠中生成,小鼠 80% 左右的血浆载脂蛋白是在小肠发生的。乳糜微粒的绝大多数组成成分,包括载脂蛋白 A, B-48, 磷脂类,胆固醇,胆固醇酯及三脂酰甘油都是在小肠细胞中制出的。乳糜微粒分泌进入毛细淋巴管,它实际是经大的锁骨下静脉进入血流的,因此绕过了肝脏。肝脏是 VLDL 和 HDL 的主要源头,包括载脂蛋白, apo A - I、apo A - II、apo B - 100、apo C - I、apo C - II、apo C -

III 和 apo E 及脂蛋白的脂质组分。低密度脂蛋白是由 VLDL 制出的,下面将进行讨论。

① 乳糜微粒(CM)和极低密度脂蛋白(VLDL)运送胆固醇和三脂酰甘油到其他组织:乳糜微粒(chylomicrons)作为三脂酰甘油及胆固醇酯的运输方式将它们从小肠送到其他组织。VLDL(极低密度脂蛋白)以相似的功能将脂类自肝脏运到其他组织。这两种富含三脂酰甘油的颗粒首先受脂蛋白脂肪酶的催化而降解,这是一种细胞外酶,它绝大多数是在脂肪组织的毛细管、心肌和骨骼肌以及乳腺中发生作用。脂蛋白脂肪酶使三脂酰甘油水解,它受到与乳糜微粒和 VLDL 缔合的载脂蛋白 C- II 的特异作用而被激活。其结果是这个脂肪酶从血浆中的这些乳糜微粒等脂蛋白给心脏和脂肪组织提供脂肪酸。在心脏和脂肪组织中这些脂肪酸又为脂肪酶所用,生成三脂酰甘油形式的贮能物质。此外,这些脂肪酸还会与清蛋白结合,运送到其他组织。

当这些脂蛋白耗尽了它的三脂酰甘油,颗粒就会缩小。某些表面分子(载脂蛋白,磷脂类)就被输送到 HDL。在小白鼠中,来自乳糜微粒和 VLDL 的“残迹”受肝脏作用发生分解代谢。在人类也发生这种 VLDL 残迹的分解作用,但是三脂酰甘油更多是被脂蛋白脂肪酶作用而降解,转向成为中(间)密度脂蛋白(IDL)。这个颗粒又在脂蛋白脂肪酶作用下转化为 LDL,并经胆固醇酯转移蛋白自 HDL 获得胆固醇酯。在人类血浆中,乳糜微粒及其“残迹”清除的半寿期为 4~5 min。VLDL 的清除值则为 1~3 h。

② 低密度脂蛋白(LDL)自血浆转移到肝脏,肾上腺和脂肪组织:每日血浆“池”中的低密度脂蛋白(LDL)约有 45% 被转移到肝脏和肝外组织(特别是肾上腺和脂肪组织)。有关肝外组织吸收 LDL 的机制曾有过大量研究。例如,为研究 LDL

的吸收,使用人类皮肤的成纤维细胞(fibroblast),令其在培养皿中生长,发现 LDL 颗粒与细胞表面的特异受体相结合,这些受体是集聚在质膜的称为包被区(coated region)的部位。质膜的这个区域吞食了 LDL 颗粒,这个过程称为胞吞作用。经胞吞形成了“包被小泡”(coated vesicles)它导向这些 LDL 与溶酶体融合,LDL 颗粒就在溶酶体脂肪酶和蛋白酶的催化下发生降解。胆固醇或胆固醇衍生物自溶酶体弥散出来,它抑制 HMG-CoA 还原酶的活性,激活脂酰-CoA:胆固醇酰基转移酶(ACAT)。ACAT 催化胆固醇酯的合成,产物随即贮存在细胞中。胆固醇(或其衍生物)还抑制 LDL 受体的合成,因此限制了 LDL 的吸收(图 29-53)。

LDL 受体是一糖蛋白,含有 839 个氨基酸残基,由 5 个结构域组成(图 29-54)。结构域 1 是与脂蛋白的结合部位,含有载脂蛋白 apo B-100 和 apo E。结构域 2 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的前体细胞外结构域的一部分有 35%

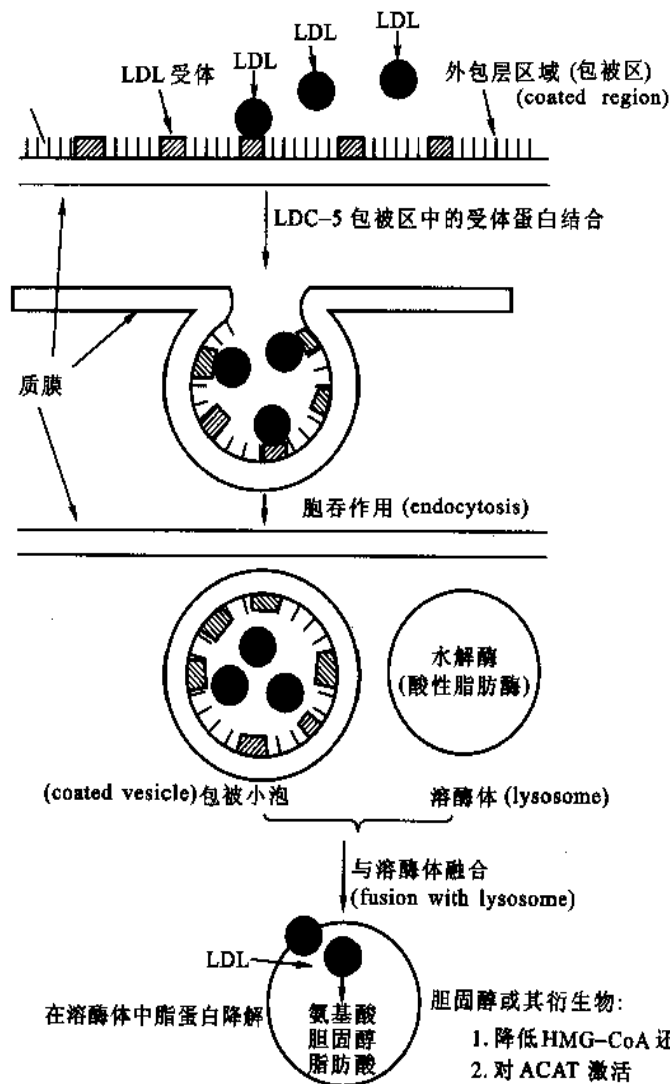


图 29-53 人类皮肤的成纤维细胞中 LDL 的受体介导的吸收

的同源(homologous)。它的功能现尚不明。结构域 5 即细胞溶胶蛋白,对在质膜包被区 LDL 受体的聚集是必需的。一个细胞中的 LDL 受体数目从 15 000 到 70 000。数目的不同基于细胞对胆固醇的要求程度。一旦 LDL 分子结合到受体上后,双方在胞吞作用下迅速内化(internalized)。

(3) 胆固醇沉积引起的一系列疾病 对家族高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia)进行研究,发现患者所患的是纯合型(homozygous)(两个缺欠基因)病症。其血浆胆固醇水平显著升高(650 ~ 1 000 mg/100 ml),它大部分是由浓度升高的 LDL 运载。结果之一是在身体不同部位的皮肤中出现胆固醇沉积(黄瘤, xanthomas)。更严重的后果是胆固醇沉积在动脉中,导致动脉粥样硬化(atherosclerosis),这是很多心血管疾患的预兆。实际上,纯合型家庭高胆固醇血症的患者在十多岁时即表现出心脏病的症状,常常不满 20 岁即因心血管疾患而死亡。另外,杂合型(一正常基因,一缺欠基因)表现有相似的,但较轻的症状。患者的血浆胆固醇在 250 ~ 550 mg/100 ml 的范围内。一般说,患者在 40 岁前不显现心脏病突发(heart attack)。家庭高胆固醇血症的杂合型的概率为 1:500,纯合型为 1:1 000 000。

有 4 种不同的生物化学突变(mutations)导致家族高胆固醇血症。最普通的缺陷(第 1 类)是在内质网中的 LDL 受体合成的突变。第 2 类的突变是把受体传送到高尔基体的缺陷。第 3 类是 LDL 与受体结合的缺陷。第 4 类是在被膜凹陷处胆固醇受体不能聚集。

另一相关的症候是“Wolman's”症,它更明确的是 LDL 吸收所必需的受体介导途径的缺陷。Wolman's 病是极其罕见的先天性代谢差错。它的特征是在不同组织中胆固醇酯和三脂酰甘油的积聚,直接的病因是溶酶体中酸性脂肪酶(acid lipase)的完全缺乏,如图 29-53 所示。在正常情况下,胆固醇酯和三脂酰甘油的分解代谢是由酸性脂肪酶催化实现的。胆固醇酯累积症(cholesterol ester storage disease)是相关病的一种,它的病因是溶酶体中的酸性脂肪酶的活性大大地减低。这种疾病的症状远比 Wolman's 病要轻,一般到四十岁时才变严重。

对于 LDL 受体和高胆固醇血症研究的重要意义到 1985 年已广为人知,那年,Joseph Goldstein 和 Michael Brown 由于他们的卓越贡献获得了诺贝尔生理学 and 医学奖。

(4) 高密度脂蛋白(HDL)可以减少胆固醇沉积 高密度脂蛋白的分解代谢是个复杂过程,是现时的研究课题。在人类血浆中 HDL 的半寿期(5 ~ 6 日)较其他脂蛋白要长。当 HDL 自肝脏分泌进入血浆时,它的外形是圆盘形,几乎不含胆固醇酯。这些新形成的 HDL 颗粒由于胆固醇酯在它上面的积聚形成了球状颗粒。在 HDL 颗粒表面上,由于卵磷脂:胆固醇脂酰转移酶(lecithin:cholesterol acyl transferase,LCAT)的作用,磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine)与胆固醇发生作用生成胆固醇酯。LCAT 是一糖蛋白(糖类含重为 24%),相对分子质量为 59 000。这个酶在血浆中与 HDL 缔合,并被载脂蛋白 AI 活化,后者又是 HDL 的一个组成成分。与 LCAT-HDL 复合物缔合在一起的是胆固醇酯转移蛋白(cholesterol ester transfer protein),后者可以帮助把胆固醇酯自 HDL 转移到 VLDL 或 LDL。在此种稳定状态下,由 LCAT 合成的胆固醇酯必会被运送到其他脂蛋白上,并发生分解代谢。HDL 颗粒本身又周转(turnover)。但它们是怎样降解的现尚无定论。

在人类的血浆中胆固醇和 LDL 水平的升高与心血管疾患的发生密切关连。最近的实验结果表明 HDL 在血浆中的浓度升高与减弱冠状动脉疾病的发生也密切关连。为什么提升 HDL 在血浆中的浓度水平会防止心血管疾患?似乎 LDL 水平的升高是这类疾患的原因?对这些问题目前还没有明白的回答。一种解释认为 HDL 有使胆固醇回到肝脏的作用,在肝脏即可经代谢并排出。从净效应看,提供动脉血管的 HDL,血浆胆固醇量是减少了。

区块:

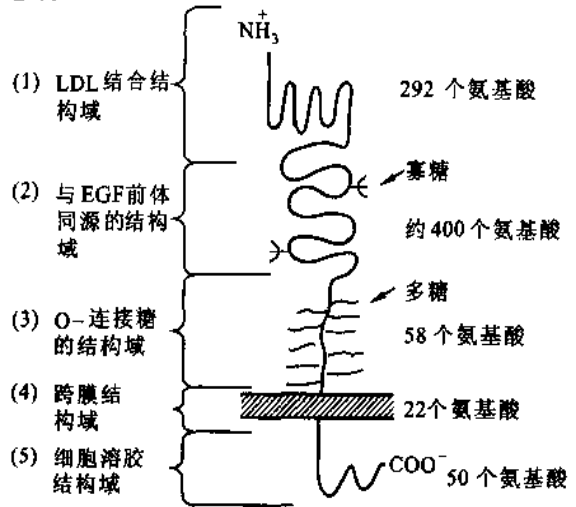


图 29-54 LDL-受体:是一单一蛋白质,具有 5 个结构域区,结构域 5,即质膜结构域用于使质膜包被区 LDL 受体汇集。一旦 LDL 分子与受体结合,LDL 与受体双方在胞吞作用下迅速内化(internalization)

胆固醇代谢和心脏病

前已述及在血浆中胆固醇浓度水平的升高与心脏病发生有着直接的关系。这样的看法已广为人们所知。专家们一般认为：如果血浆中胆固醇浓度常年在 240 mg/100 ml 以上与血浆胆固醇水平在 200 mg/100 ml 者相比，会增加心脏病突发的危险性。所以一般建议成人要竭力保持总胆固醇(包括游离胆固醇和胆固醇酯)在血浆中的浓度应在 200 mg/100 ml 或以下。如本节所述，血浆胆固醇的大部分是以胆固醇酯的形式被 LDL 所携带，这种被 LDL 携带的胆固醇酯有时被称为“不良胆固醇”。

实际上，血浆中的胆固醇水平与心血管疾病之间的关系并不那么简单。因为高水平的 HDL(它含有按重量计为 30% 的胆固醇)表现为可以防止心脏病突发。所以有时被 HDL 携带的胆固醇称为“良性胆固醇”。而且，流行病学研究认为：与心脏病突发的危险性相关联的，还有许多其他因素。例如，吸烟、高血压、基因背景(例如本节述及的家族高胆固醇血症)，糖尿病及肥胖症等。

人们该怎样努力保持总胆固醇水平为 200 mg/100 ml 或更低？如果他们幸运地从父母获得的基因可以使他们得以防止高胆固醇，他们的膳食中即便是高脂肪和高胆固醇，仍可以保持在 200 mg/100 ml 界限以下。绝大多数的成人不是这种类型，所以要从膳食或药剂中去降低他们的胆固醇水平。胆固醇富存于肉类和奶制品中，但蔬菜中不含有。所以很多人食用很少量的肉类和奶制品，得以降低他们的胆固醇水平。另外，膳食中的饱和或多不饱和脂肪酸对血浆胆固醇的影响有很大不同。多不饱和脂肪酸可以防止血浆中胆固醇的水平升高，而饱和脂肪酸则可增高胆固醇水平。肉和乳制品中富含饱和脂肪酸。与之相反，很多鱼类则含有高含量的多不饱和脂肪酸，特别是 C_{22:5} 和 C_{22:6} 多不饱和脂肪酸。有些国家，例如，日本人的膳食中多为鱼类，他们与北美和许多欧洲人相比，血浆中胆固醇的水平较低，心脏病的发作也较少。因此，每日膳食中按卡路里计，减少脂肪从 40% 到 30%，进食更多的糖类、蔬菜和鱼，会减低血浆中胆固醇含量 15% 到 20%。当然，对个体而言，每个人可在膳食中获得的效果还有很大差异，因为基因的因素又在起着作用。

1990 年前后，出现名为“lovastatin”的新药(图 29-43)，治疗高胆固醇血症有显著疗效，这个化合物是 HMG-CoA(图 29-44)的竞争性抑制剂，可明显地降低胆固醇合成速度。同样重要的是：对细胞中胆固醇水平降低的应答，LDL 受体表达得到了增高，依次地使更多 LDL 自血流中清除，特别是被肝脏清除。因此，把用药和控制饮食相结合，可获得明显的血浆胆固醇的下降(例如从 300 mg/100 ml 降到 200 mg/100 ml)。lovastatin 对杂合体(heterozygote)的家族高胆固醇血症也有效果。有趣的是它对纯合体(homozygote)的家庭高胆固醇血症未显示显著疗效，因为患者不持有起作用的 LDL 受体。

高浓度的血浆胆固醇并不直接引起心脏病突发。应该说高水平的血清胆固醇持续过长时间，由于某种原因会使动脉疾患得到发展，这种疾患称之为动脉粥样硬化(atherose lerosis)。动脉粥样硬化的蚀斑(plaque)在动脉壁上的复合的病灶损伤常含有不正常的胆固醇酯的沉积。但是，血浆中的高胆固醇水平与动脉粥样硬化间的关系迄今尚属不明，是当今医学研究中的一个尖端课题。实际上，心脏病发作的突然袭击表现在从血小板粘着于动脉粥样硬化的病灶部位开始，随后形成了凝块，堵塞了心脏冠状动脉中的血流。心脏组织的血液供应被剥夺，此时即导致组织死亡。

7. 胆汁酸代谢

从胆固醇向胆(汁)酸(bile acid)的转化是胆固醇降解最重要的机制。成人每日约有 0.5 g 的胆固醇转化为胆(汁)酸。对这个过程的调控是由在内质网的酶，7 α -羟化酶(7 α -hydroxylase)来执行的，它控制着胆固醇到胆汁酸的第一步反应。7 α -羟化酶是一族称为“混合功能氧化酶”(mixed function oxidase)的总称。它与分子氧催化底物，产生 H₂O。7 α -羟化酶是涉及细胞色素 P₄₅₀ 的一些酶中的一种。胆固醇的羟基化也需要 NADPH:细胞色素 P₄₅₀ 还原酶(图 29-55)。随着 7-羟基胆固醇转化为胆酸(cholic acid)，其概貌如图 29-56。这个反应过程包括有 3 β -羟基的氧化，双键的异构化，12 α -羟基化，双键的还原和 3-酮基还原为 3 α -羟基。另外加上侧链的羟基化和氧化反应，遂形成胆酸(cholic acid)。它与鹅脱氧胆酸(chenodeoxycholic acid)一起是人体中两个重要的胆汁酸(bile acids)。

胆酸的绝大部分都转化为相应的胆盐(bile salt)，例如，图 29-57 所示的甘氨酸胆酸(glyco cholate)。从结构上说，胆汁酸(bile acid)可分为两大类，即胆酸(cholic acid)包括脱氧胆酸等，称为游离胆酸。另一类是游离胆酸与甘氨酸或牛磺酸的结合产物，又泛称为胆盐。胆盐对于脂类在小肠中的溶解是关键性的重要物质。

8. 类固醇激素

胆固醇在肾上腺或性腺中转化为诸种类固醇激素是胆固醇转化产物中最为重要的一大类。请阅第 17 章激素。

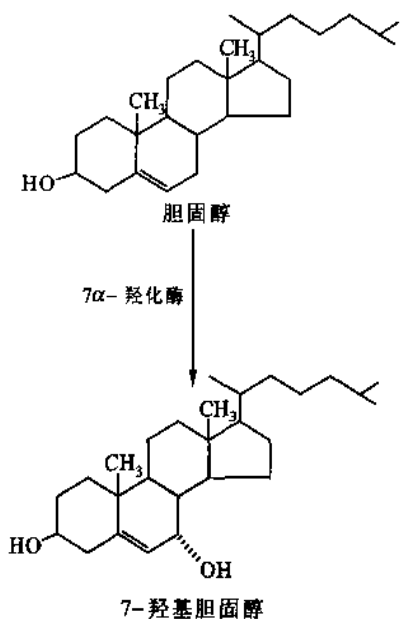


图 29-55 羟基胆固醇生成胆酸合成的调控是由 7α-羟化酶去实现的

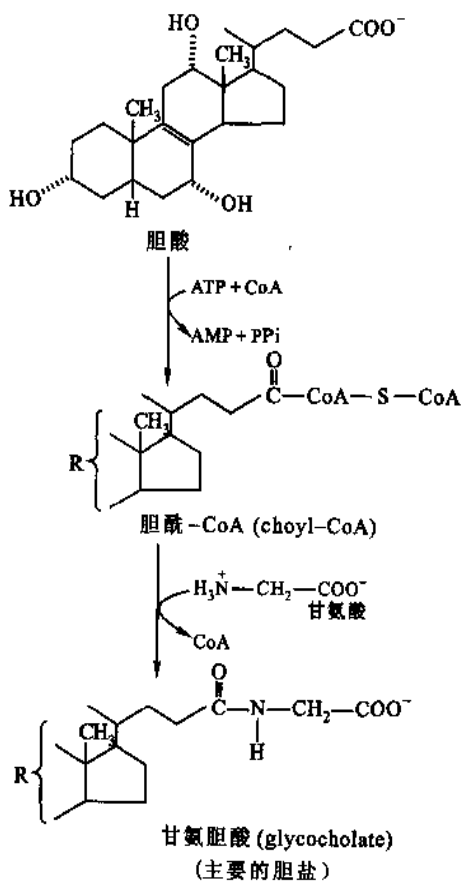


图 29-57 自胆酸到胆盐的转化
甘氨酸胆酸是胆盐的一例, 它在小肠中溶解脂质, 它又可被脂(肪)酶降解

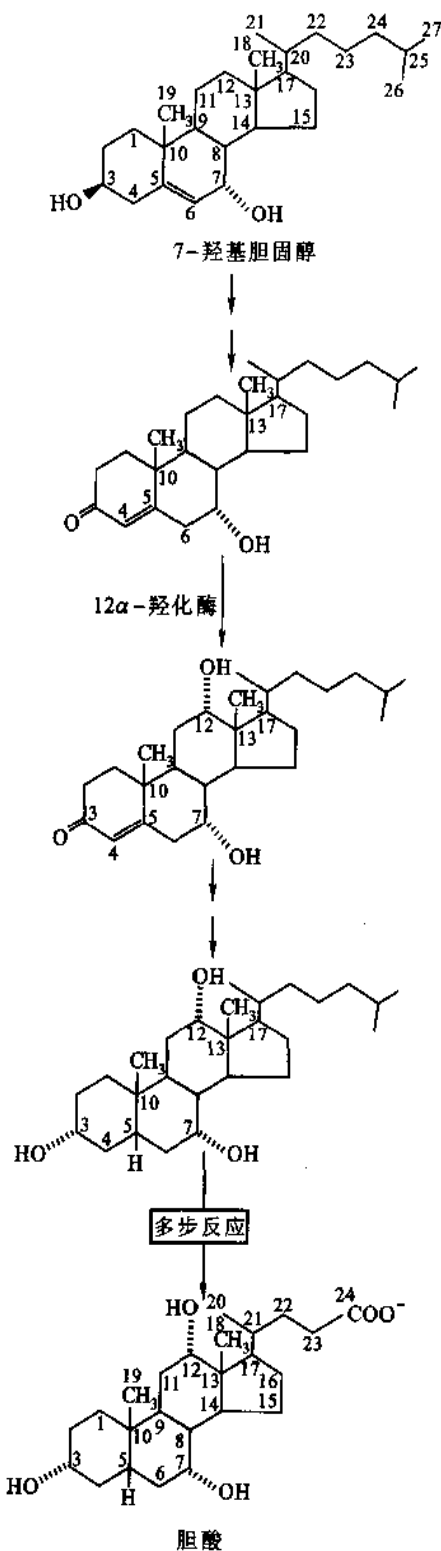


图 29-56 自 7-羟基胆固醇转化为胆酸

随着反应进程极性基团的增加, 水可溶性也增高。胆酸的 A, B 二环不复在一平面上, 而是 A/B 顺式构型。构型的转变改进了胆酸的乳化功能, 从而有助于溶解脂质, 帮助对它的消化

提 要

乙酰-CoA 是脂肪酸分子所有碳原子的唯一来源,它来自糖的氧化分解或氨基酸的分解。这些过程是在线粒体内进行的,但脂肪酸合成的酶却存在于细胞溶胶中。乙酰-CoA 借助柠檬酸-丙酮酸循环自线粒体进入细胞溶胶,即乙酰-CoA 先与草酰乙酸缩合形成柠檬酸,进入细胞溶胶后又裂解形成乙酰-CoA 和草酰乙酸。

脂肪酸生物合成的酶在哺乳动物几乎都在一个大酶复合体内,合成步骤如下:①启动:乙酰-CoA 经乙酰-ACP 转化为乙酰-合酶。②装载:丙二酰-CoA 转化为丙二酸单酰 ACP。③缩合:乙酰合酶与丙二酸单酰 ACP 缩合形成乙酰乙酰-ACP。④还原:将③的产物还原为 β -羟丁酰-ACP。⑤脱水:将④的产物脱水为 α,β -反式-丁烯酰-ACP。⑥还原:将⑤的产物还原生成丁酰-ACP。至此,每一循环脂肪链延长了两个碳原子。如此循环反复进行,例如生成了 16 个碳的软脂酰-ACP。实行最终一步⑦释放,软脂酰-ACP 水解,生成了软脂酸。

脂肪酸碳链的加长和去饱和是指生物合成最终产物为软脂酸。再长链的脂肪酸或不饱和脂肪酸,需要在形成软脂酸后,另加多步酶反应去完成。

磷脂类合成反应几乎是在膜结构表面进行,这是很独特的。其原因是磷脂分子的两亲性。在真核生物中有各样的细胞器与脂类合成相关,最重要的是内质网膜、线粒体和高尔基体。细菌中没有这样的细胞器,脂类合成是在内原生质膜。

磷脂质的生物合成是甘油-3-磷酸或磷酸二羟丙酮经酰基化转化为磷脂酸,这是一个“中转作用”的中间体,可进一步经两种途径转化为磷脂,其一是磷脂酸与 CTP 作用,生成 CDP-二酰甘油,它在细菌中可转化为磷脂酰丝氨酸,或磷脂酰甘油,或二磷脂酰甘油。大肠杆菌(*E. coli*)中的磷脂主要是磷脂酰乙醇胺。它是磷脂酰丝氨酸经脱羧反应生成的。第二条途径发现于真核生物体中,磷脂酸水解为二脂酰甘油,后者与 CDP-乙醇胺或 CDP-胆碱反应,生成磷脂酰乙醇胺或磷脂酰胆碱。二脂酰甘油还有另外别的途径,即与脂酰-CoA 反应生成三脂酰甘油。

磷脂类的脂酰基团或极性头部可以发生各样反应,或修饰,或交换。它还可被磷脂酶降解。磷脂在膜间的运送是由磷脂交换蛋白推动的。出芽和融合也对脂类在不同膜之间的分配起作用。

在大肠杆菌中,脂肪几乎全被用于磷脂合成,脂肪酸合成的调节发生在合成的起始步。在哺乳动物的肝脏中,脂肪酸是结构磷脂和能量贮存脂肪三脂酰甘油的重要前体。结构磷脂对脂肪酸的需要总是比用作能量贮存的脂肪即三脂酰甘油对脂肪酸的需要先得到满足。

三脂酰甘油合成速度的调控来自于膳食及生物合成对脂肪的供应情况。磷脂酰胆碱生物合成的调节首先实现于 CTP:磷酸胆碱磷脂酰转移酶催化的反应。该酶在细胞溶胶中无活性,当位移到内质网即被激活。在正常细胞中,其他磷脂酸生物合成的调节现尚不明。

鞘磷脂是真核细胞膜中重要的结构脂类。鞘氨醇经酰基化生成神经酰胺。它与磷脂酰胆碱反应即形成鞘磷脂。神经酰胺还可与活化了了的糖类(如 UDP-葡萄糖)作用,转化生成鞘糖脂。对鞘糖脂分解代谢的研究引起对一些遗传性疾病的思考,这些疾患是因一种鞘脂类降解所需酶的缺欠所引起的。

前列腺素和血栓烷统称为类二十烷酸,它们都是以 C_{20} 多不饱和脂肪酸,花生四烯酸,为起始物合成的。这两类型化合物的生物活性很不相同。花生四烯酸在前列腺素内在过氧化物合酶催化下转化为 PGH_2 ,随后, PGH_2 又可转化为 PGE_2 , PGF_2 , TXA_2 或 PGL_2 。另外,花生四烯酸还可转化为羟基花生四烯酸。类二十烷酸是一种局部激素(就地分泌,就地起作用),它与细胞表面的受体结合,而影响细胞的功能。这类受体总是与 GTP 结合蛋白反应,后者可改变第二信使如 cAMP 的合成。

类固醇是四环烷烃,环戊烷多氢菲(perhydrocyclopentano-phenanthrene)的衍生物。它的生物合成开始于 3 分子乙酰-CoA 转化为甲羟戊酸。甲羟戊酸脱羧转化为异戊烯焦磷酸。随后,6 分子异戊烯焦磷酸聚合生成(角)鲨烯,经环化生成羊毛固醇。至此四环烷烃的结构已形成。羊毛固醇再转化即得胆固醇,后者是胆酸,类固醇激素类的前体。

胆固醇生物合成速度的调节首先由 HMG-CoA 还原酶的活性所决定。这个关键酶又由酶的合成和

磷酸化/去磷酸化反应所控制。酶的合成受胆固醇调控,这里讲的胆固醇指的是低密度脂蛋白(LDL)提供给细胞的胆固醇。胆固醇和磷脂类靠脂蛋白运送到血浆取得。脂蛋白是由小肠和肝脏合成并分泌的。胆固醇合成的部位主要在细胞溶胶和内质网。

脂蛋白有 5 种,即:乳糜微粒、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)和中密度脂蛋白(IDL)。在乳糜微粒和 VLDL 中的三脂酰甘油在血浆脂蛋白脂肪酶的催化下降解,降解产物脂肪酸和单酰甘油主要被心脏、骨骼及脂肪组织吸收。LDL 与质膜上专一的 LDL 受体结合后经胞吞作用从血浆进入溶酶体。在溶酶体中 LDL 被酶解。

在家族高胆固醇血症患者体内,专一的 LDL 受体是无活性的。这样,高水平的 LDL 有增加心血管疾病发病率的危险。而高水平的 HDL 却似可防止心血管疾病发生。

胆汁酸是 C_{24} 的羧酸,它是胆固醇在体内的代谢产物。胆固醇的 7α -羟基化是胆汁酸生物合成的第一步,这步反应既是必需的,又是承担限速的。胆汁酸形成后经分泌进入小肠,帮助脂类的溶解和消化。

习 题

1. 试解释“三羧酸运送系统(tricarboxylate transport system)的作用机制和功能。
2. 说明真核生物体内脂肪酸合酶的结构与功能。
3. 试比较脂肪酸合成与脂肪酸 β -氧化的异同。
4. 脂肪酸合成中的碳链延长在线粒体中和在内质网中的机制有何不同?
5. 乙酰-CoA 羧化酶在脂肪酸合成中起着调控作用,试述这个调控的机制。
6. 磷脂的特征是在 C2 位上有一不饱和脂肪酸。举一磷脂的实例。它在 C2 位上是饱和脂肪酸,这样的结构是怎样合成的?
7. 试述以 CDP-二脂酰甘油为起始物,3 种甘油磷脂(磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、二磷脂酰甘油)的生物合成路线。
8. “血小板活化因子”(platelet activating factor, PAF)为何物?用二羟丙酮磷酸为原料如何实现它的合成?
9. 试述以软脂酰-CoA 和丝氨酸为起始物,鞘磷脂和葡萄糖-神经酰胺的生物合成路线。
10. 低剂量的阿司匹林(如隔日一粒)有防止心脏病突发的功能。如每日服用 3~4 粒,为什么反而事得其反?(揭示: TXA_2 生成于血小板中, PGI_2 生成于动脉壁上)
11. 培养肝细胞时加入 2-[^{14}C]-醋酸。 ^{14}C 标记在 HMG-CoA 的什么位置上?
12. 试述 Wolman's 病的症候和病因。将患者的皮肤的成纤维细胞进行培养, HMG-CoA 的活性是变高,还是变低?在培养基中 LDL-受体的数量是增,还是减?
13. 乙酰-CoA 如何转化为甲羟戊酸?试述甲羟戊酸转化为(角)鲨烯的立体化学问题。
14. 试综述低密度脂蛋白(LDL)的大体组成,体内的运送和生物功能。

主要参考书目

1. Hanes B D *et al.* Instant Notes for Biochemistry. Stoodleich: Bios Scientific Publisher, Ltd, 1997
2. Roskoski R. Biochemistry. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1996
3. Lehninger A L *et al.* Principles of Biochemistry, 2nd ed. New York: Worth Publishers Inc, 1998
4. Stryer L. Biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman & Company, 1995
5. Zuby G L *et al.* Biochemistry, 3rd ed. Oxford: Wm C. Brown Publishers, 1993
6. Voet And D, Voet. J. G. Biochemistry, 2nd ed. New York: John Wiley & Son, 1995
7. 张迺衡等. 生物化学. 第 2 版. 北京: 北京医科大学, 中国医科大学联合出版社, 1999
8. Kim K H, Kioez C F, Bai D H, Luo X, Pape M E. Role of reversible phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in long-chain fatty acid synthesis. FASEB J, 1989, (3): 225~2256
9. Iritani N. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic-enzyme gene expression in rat liver. Eur. J. Biochem, 1992(205): 433~442
10. Lands W E. Biosynthesis of Prostaglandins. Ann. Rev. Nutrit, 1991, (11): 41~60
11. Rently R. Molecular Asymmetry in Biology, Vol. 2, New York: Academic Press, 1970

(文重, 王镜岩)

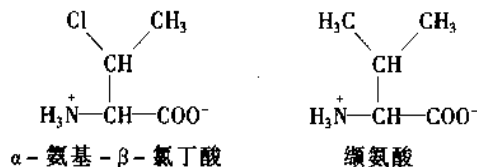
第 30 章 蛋白质降解和氨基酸的分解代谢

一、蛋白质的降解

Henry Borsook 和 Rudolf Schoenheimer 1940 年证明了活细胞的组成成分在不断地转换更新。蛋白质有自己的存活时间,短到几分钟,长到几周。不论何种情况,细胞总是不断地从氨基酸合成蛋白质,又把蛋白质降解为氨基酸。表面看来,这样的变化过程似是一种浪费,实际上它有二重功能,其一是排除那些不正常的蛋白质,它们若一旦积聚,将对细胞有害;其二是通过排除累积过多的酶和调节蛋白(regulatory proteins)使细胞代谢的井然有序得以维持。酶的活动能力实际是根据它的合成速度和降解速度决定的。在细胞“经济学”中,控制蛋白质的降解与控制其合成速度是同样重要的。在本章中将讨论细胞内蛋白质降解及其影响的有关问题。

(一) 蛋白质降解的特性

细胞有选择地降解非正常蛋白质,例如,血红蛋白与缬氨酸类似物 α -氨基- β -氯代丁酸(α -amino β -chlorobutyric acid)结合,得到的产物在网织红细胞(reticulocyte)中的半存活期约为 10 min,而正常血红蛋白可延续红细胞的存活期最终可达 120 天。同样,不稳定的突变株血红蛋白在与此种丁酸衍生物结合之后,即迅速降解。因此,它成了溶血性贫血这种分子疾患的治疗药物。



细菌也表现有选择性降解。例如,在大肠杆菌(*E. coli*)中 β -半乳糖苷酶的 *amber* 与 *ochre* 突变株,其半存活期仅为几分钟,而广域的这种酶却是绝对稳定的。绝大多数的非正常蛋白质很可能基于此种化学修饰或由于这些脆弱分子的不断变性而容易发生降解。它们更多缘起于细胞的活泼环境,而不一定是基于突变,或在转录或翻译时出现的误差,受损蛋白质的降解能力是具选择性的,它是一种自发的再循环机制。它可防止某种物质的形成,否则一旦形成即将妨碍细胞的系列活动。

正常的胞内蛋白质被排除的速度是由它们的个性所决定的。某一蛋白质被排除的速度若为一级反应,表示这个分子之被降解是偶然选择的,与其存活寿命无关。在组织中,不同酶的半存活期有着很大差异。以大鼠肝脏中的酶为例,如表 30-1 所示。

很显然,绝大多数快速降解的酶都居于重要的“代谢控制”位置,而较为稳定的酶在所有生理条件下有着较稳定的催化活性。酶对降解的敏感性很明显的与它们的催化活性以及变构性质密切相关。因此,细胞能有效地对它的环境及代谢需求作出应答。

细胞中蛋白质降解的速度还因它的营养及激素状态而有所不同。在营养被剥夺的条件下,细胞提高它的蛋白质降解速度,以维持它的必需营养源使不可缺的代谢过程得以进行。在大肠杆菌中增高降解速度的机制是一种应激反应。在真核生物中也与大肠杆菌相似,因为正像在大肠杆菌中的那样,提高了的降解速度可被能够阻断蛋白质合成的抗生素所抑制。

蛋白质的周转代谢使种种代谢途径之调节得以容易地实现。

表 30-1 大鼠肝脏中某些酶的半存活期

酶	半存活时间/h
短寿命的酶	
鸟氨酸脱羧酶	0.2
RNA 聚合酶 I	1.3
酪氨酸转氨酶	2.0
酪氨酸水合酶	4.0
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶	5.0
长寿命的酶	
醛缩酶	118
甘油醛磷酸脱氢酶	130
细胞色素 b	130
乳酸脱氢酶	130
细胞色素 c	150

(引自 Dice J F, Doldberg A I, Arch. Biochem. Biophys. 1975. 170 ~ 214)

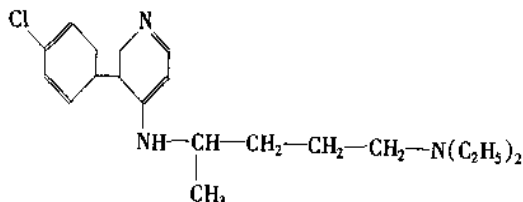
(二) 蛋白质降解的反应机制

真核细胞对于蛋白质降解持有两种体系,一种溶酶体的降解机制(lysosomal mechanism)和一种 ATP-依赖性的以细胞溶胶(cytosolically)为基础的机制,现分别阐述如下:

1. 溶酶体无选择的降解蛋白质

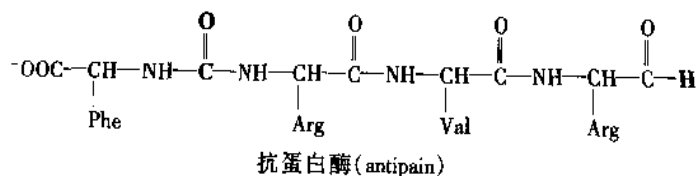
溶酶体是具有单层膜被的细胞器,它含有约 50 种水解酶,包括不同种的蛋白酶,称之为组织蛋白酶(cathepsins)。溶酶体保持其内部 pH 在 5 左右,而它含有的酶之最适 pH 即是酸性。可以设想这种境况可抵制偶然的溶酶体渗漏从而保护了细胞,因为在细胞溶胶的 pH 下,溶酶体的各种酶大部分都是无活性的。

溶酶体对细胞内各组分的再利用是通过它融合细胞质的膜被点块(bits)即自(体吞)噬泡(autophagic vacuole),并随即分解其内容物来实现的。溶酶体还降解一些物质,这些物质是细胞通过胞吞作用(endocytosis)来利用的。这就是溶酶体如何处理细胞内组成分的过程,它近似于降解作用。使用溶酶体的阻断剂曾模拟证明上述过程之存在,例如抗疟药物,氯代奎宁(chloroquine)。



氯代奎宁(chloroquine)

这是一种弱碱,它以不带电荷形式随意穿透溶酶体,在溶酶体内累积形成持电荷型,因此增高了溶酶体内部的 pH,并阻碍了溶酶体的功能。用氯代奎宁处置细胞可减低它们的蛋白质降解速度。同样地,以组织蛋白酶(cathepsin)阻断剂,例如,用一种多肽抗生素、抗蛋白酶(antipain)处置细胞也可降低蛋白质的降解速度。



溶酶体降解蛋白质是无选择性的。溶酶体抑制剂对于非正常蛋白质或短寿命酶无快速降解的效应。但是,它们可以防止饥饿状态下蛋白质的加速度崩溃。

许多正常的和病理的活动经常随伴溶酶体活性的升高。糖尿病会刺激溶酶体的蛋白质分解。同样由于废弃使用神经切除或创伤导致肌肉损毁可引起溶酶体活性增高。如产后子宫的萎缩,此时这个肌肉器官的重量在9天内从2 kg降到50 g,是此类过程的突出例证。很多慢性炎症,例如,类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)等,引起溶酶体酶的细胞外释放,这些释出的酶会损坏周围的组织。

2. 泛肽(ubiquitin)给选择降解的蛋白质加以标记

最初设想真核细胞中的蛋白质降解,主要是溶酶体的活动过程。但是,缺少溶酶体的网织红细胞却可选择性地降解非正常蛋白质。

从实验观察得到:在无氧条件下蛋白质的分解受到阻断,从而发现了这里有ATP-依赖的蛋白质水解体系存在。这种现象是热力学上未曾料到的,因为多肽水解是一个放能过程。

对无细胞的兔网织红细胞体系进行分析,发现了ATP-依赖的蛋白质的分解需要有泛肽相伴,泛肽最初是一个对其功能不了解的蛋白质。它是一个有76个氨基酸残基的蛋白质单体,由于它无所不在(ubiquitous),而且在真核细胞中含量丰富。因而得名“ubiquitin”,它以高度保守、氨基酸序列极少变化闻名,在不同种属生物中是同一的,例如,人、蟾蜍、鲑鱼及果蝇属(*Drosophila*)等,又如人与酵母,只有3个氨基酸残基不同。因此,泛肽几乎是唯一的,适合于某些必需的细胞过程。

被选定降解的蛋白质先加以标记。即以共价键与泛肽连接。这个程序的目的是标记氨基酸的激活,它分三步进行(图30-1)。

(1) 在一个“需-ATP”的反应中,泛肽的羧基末端通过硫酯键与泛肽-活化酶(ubiquitin-activating enzyme, E_1)偶联。泛肽-活化酶的相对分子质量为105 000,它是两个全同的亚单位形成的二聚体。

(2) 泛肽随即转接到几种小蛋白质(相对分子质量为25 000~70 000)中的某一小蛋白质的巯基(sulfhydryl group)上。这个结合物称为“泛肽-携带蛋白”(ubiquitin-carrier protein, E_2)。

(3) 第三步,泛肽-蛋白连接酶(ubiquitin-protein ligase)(E_3 ,相对分子质量约180 000),将活化了的泛肽从 E_2 转移到赖氨酸的 ϵ -氨基上。这个 NH_2 -Lys是 E_3 事先已与之结合了的蛋白质的一个残基。这样,形成了一个异肽键(isopeptide bond)。在选择蛋白质发生降解的过程中, E_3 似呼起着关键的作用。在一般情况下是若干个泛肽分子与那些宣布无用的蛋白质相连接。而且可能有20个泛肽分子依次一前一后地与目的蛋白质分子相连接,形成多泛肽链,在这里,每一泛肽的Lys 48都与下一个泛肽的C末端羧基相连,形成一个异肽键。

这样,泛肽连接的蛋白质,即在ATP-依赖的反应过程中被降解。这个反应过程是由较大的(相对分子质量为100 000),了解较少的多蛋白质复合体参与实现。这个复合体名为“泛肽-连接的降解酶”(ubiquitin-conjugating enzyme, UC DEN)。该酶只对待降解的泛肽-连接蛋白质有效。

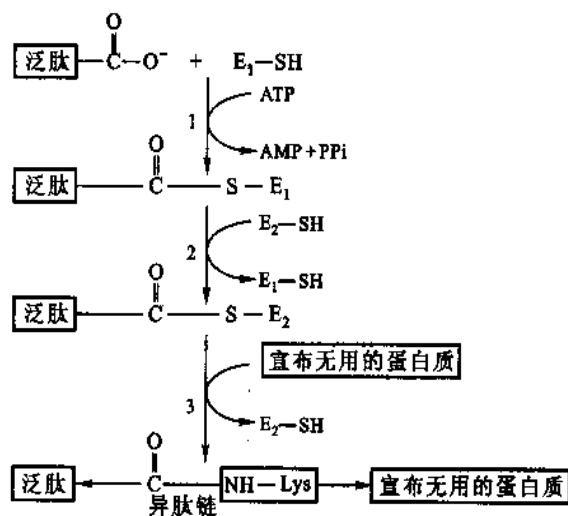


图30-1 泛肽与选择性降解蛋白质的相接

第1步:泛肽的羧基在ATP水解的推动下,以巯基与 E_1 相接。

第2步:活化了的泛肽立即与 E_2 的巯基相连接

第3步:在 E_3 的催化下,泛肽与宣布无用的蛋白质之一Lys的 ϵ -氨基相接。

这就形成了“标记”的蛋白质它乃在UCDEN催化下,发生降解

E_1 :泛肽活化酶, E_2 :泛肽携带蛋白, E_3 :泛肽蛋白连接酶

(三) 机体对外源蛋白质的需要及其消化作用

外源蛋白质进入体内,总是先经过水解作用变为小分子的氨基酸,然后才被吸收。高等动物摄入的蛋白质在消化管内消化后形成游离氨基酸。吸收入血液,供给细胞合成自身蛋白质的需要。氨基酸的分解代谢主要在肝脏进行。同位素示踪法表明,一个体重 70 kg 的人,吃一般膳食,每天可有 400 g 蛋白质发生变化。其中约有四分之一进行氧化降解或转变为葡萄糖,并由外源蛋白质加以补充;其余四分之三在体内进行再循环。机体每天由尿中以含氮化合物排出的氨基氮约为 6~20 g,甚至在未进食蛋白质时也是如此。每天排泄 5 克氮相当于丢失 30 g 内源蛋白质。

蛋白质在哺乳动物消化管中降解为氨基酸经过一系列的消化过程。食物进入胃后,使胃分泌胃泌素(gastrin),后者刺激胃中壁细胞(parietal cells)分泌盐酸,主细胞(chief cells)分泌胃蛋白酶原(pepsinogen)。胃液的酸性(pH1.5~2.5)可促使球状蛋白质变性和松散。胃蛋白酶原经自身催化(autocatalysis)作用,脱下自 N 端的 42 个氨基酸肽段转变为活性胃蛋白酶(pepsin),它催化具有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸以及亮氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺等肽键的断裂,使大分子的蛋白质变为较小分子的多肽。

蛋白质在胃中消化后,连同胃液进入小肠。在胃液的酸性刺激下,小肠分泌肠促胰液肽(secretin)进入血液,刺激胰腺分泌碳酸进入小肠中和胃酸。食物中的氨基酸刺激十二指肠分泌胰蛋白酶、糜蛋白酶、羧肽酶、氨肽酶等。这些酶也以酶原形式分泌,随后被激活而发挥作用。胰蛋白酶被肠激酶(enterokinase)激活,胰蛋白酶也有自身催化作用。其酶原从分子的 N 端脱掉一段 6 肽肽段,转变为有活性的酶。胰蛋白酶可水解由赖氨酸、精氨酸的羧基形成的肽键。糜蛋白酶原分子中含有 4 个二硫键,由胰蛋白酶水解断开其酶原中的两个二硫键,并脱掉分子中的两个肽而被激活,形成的活性糜蛋白酶分子,是由二硫键连接着的三段肽链构成的。该酶的作用是水解含有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等残基羧基形成的肽键。

肠中还有一种弹性蛋白酶(elastase),其特异性最低,能水解缬氨酸、亮氨酸、丝氨酸及丙氨酸等各种脂肪族氨基酸羧基形成的肽键。

经胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶及弹性蛋白酶作用后的蛋白质,已变成短链的肽和部分游离氨基酸。短肽又经羧肽酶和氨肽酶的作用,分别从肽段的 C 端和 N 端水解下氨基酸残基。羧肽酶有 A、B 两种,分别称为羧肽酶 A 和羧肽酶 B。羧肽酶 A(相对分子质量为 34 000)主要水解由各种中性氨基酸为羧基末端构成的肽键。羧肽酶 B 主要水解由赖氨酸、精氨酸等碱性氨基酸为羧基末端构成的肽键。氨肽酶则水解氨基末端的肽键。

蛋白质经过上述消化管内各种酶的协同作用,最后全部转变为游离氨基酸。

细胞内蛋白质周转是非常迅速的,蛋白质的半寿期(half-life)可从几分钟到几个星期不等。这许多半寿期极短的蛋白质能使细胞迅速地改变代谢条件。许多代谢的关键酶和受严格调节的酶都能够迅速地进行周转。例如,在多胺(polyamine)生物合成中起限速作用的鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase);多胺的浓度影响 DNA 的复制、蛋白质的合成和细胞分裂,从而影响细胞的生长速度。RNA 聚合酶 I 决定核糖体 RNA 的合成速度,受激素和营养条件控制的丝氨酸脱氢酶(serine dehydrogenase)、色氨酸氧化酶(tryptophan oxygenase)、酪氨酸氨基转移酶(tryrosin aminotransferase)以及在糖异生作用中催化关键反应的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase)等,所有这些酶都属于周转迅速的蛋白质。

前已述及细胞内催化蛋白质降解的是溶酶体中的各种蛋白质水解酶。细胞内蛋白质的分解机制,还有待深入研究。

氨基酸在细胞内的代谢有多种途径。一种是经生物合成形成蛋白质,一种是进行分解代谢。氨基酸的分解一般总是先脱去氨基,形成的碳骨架, α -酮酸,可进行氧化,形成二氧化碳和水,产生 ATP,也可以转化为糖和脂肪。

多数细菌,体内氨基酸的分解不占主要位置,而以氨基酸的合成为主。有些细菌又以氨基酸作为唯一碳源,这类细菌则以氨基酸的分解为主。高等植物随着机体的不断增长需要氨基酸,因此合成过程胜于分解过程。下面主要讨论动物体内氨基酸的分解代谢。

二、氨基酸分解代谢

α -氨基酸的功能除去它是蛋白质的组成单位外,还是能量代谢的物质,又是许多生物体内重要含氮化合物的前体。这些含氮化合物突出的有血红蛋白,生物活性的胺,谷胱甘肽,核苷酸及核苷酸的辅酶等。已于前述,哺乳动物可自代谢物前体合成非必需氨基酸,而非必需氨基酸则自膳食中获取。膳食中获取的多余氨基酸既不为后来使用而被贮存,也不被排泄。多余的氨基酸则转化为常见的代谢中间体,例如,丙酮酸、草酰乙酸、 α -酮戊二酸等。由此,氨基酸又是葡萄糖、脂肪酸及酮体的前体物,也就是说,它又是代谢过程的“燃料”。

氨基酸的分解一般有三步:

第一步脱氨(脱氨基),这里脱下的氨基或转化为氨,或转化为天冬氨酸或谷氨酸的氨基。

第二步氨与天冬氨酸的氮原子相结合,成为尿素并被排放。

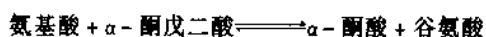
第三步氨基酸的碳骨架(由于脱氨基产生的 α -酮酸)转化为一般的代谢中间体。现分别详述如下。

(一) 氨基酸的脱氨基作用

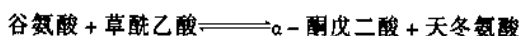
氨基酸分解代谢的第一步常是 α -氨基的脱离。分离出多余的氮,并留下碳骨架进一步降解。

在陆栖哺乳动物中主要排泄出的氮化合物是尿素,它合成的起始步骤是由氨与天冬氨酸作用。后者主要来自谷氨酸,它又是绝大多数脱氨基反应的产物。下面将讨论 α -氨基怎样结合到 α -酮戊二酸分子上形成谷氨酸的,以及如何转化为天冬氨酸和氨的。

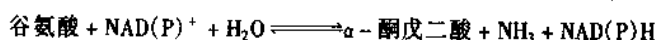
绝大多数氨基酸之脱氨基是出自转氨基作用。氨基酸脱下的氨基转移到一个 α -酮酸上,产生与原氨基酸相应的酮酸和一个新氨基酸,这个反应是在氨基转移酶(aminotransferase)的催化下发生的。在此反应中具有优势接受脱下的氨基的是 α -酮戊二酸,新生成的氨基酸为谷氨酸:



接着,谷氨酸的氨基在第二步的转氨基中转移到草酰乙酸上,形成天冬氨酸。



当然,并非所有的纯脱氨基作用皆起因于转氨基作用。大部分的脱氨基作用发生于谷氨酸的“氧化脱氨基作用”(oxidative deamination),它是在谷氨酸脱氢酶的催化下发生的,产物为氨。此反应需要有 NAD^+ 或 NADP^+ 作为氧化剂参与,并使 α -酮戊二酸得到再生,后者可用于进一步的氨基转移反应。

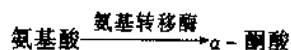


本节中将讨论氨基转移及氧化脱氨基作用的反应机制。还将讨论某些氨基酸的其他脱氨基反应。

1. 氨基转移反应

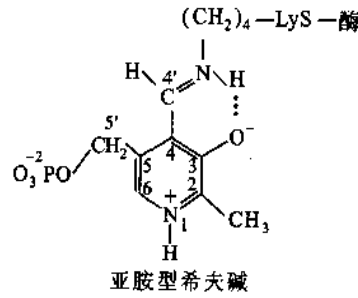
氨基转移酶促反应分两步进行:

(1) 任意的氨基酸在氨基转移酶的作用下,把氨基转移到酶分子上,自身形成 α -酮酸。



(2) 酶分子上的氨基转移到酮酸受体上(例如 α -酮戊二酸),形成产物氨基酸(例如谷氨酸),同时,酶又再生。

氨基转移酶为了携带氨基,需要有吡哆醛-5'-磷酸(pyridoxal-5'-phosphate, PLP)参与反应,后者是吡哆醇(维生素 B_6)的衍生物。PLP转化为吡哆胺-5'-磷酸(pyridoxamine-5'-phosphate, PMP)时,即接受了一个氨基。实际上,PLP是以共价键与酶相接,即它以醛基与酶分子Lys残基的 ϵ -氨基结合成为希夫碱(亚胺型)如下图:



这个与辅酶的吡啶鎓环(puridinium ring)共轭的希夫碱左右着辅酶的活性程度。

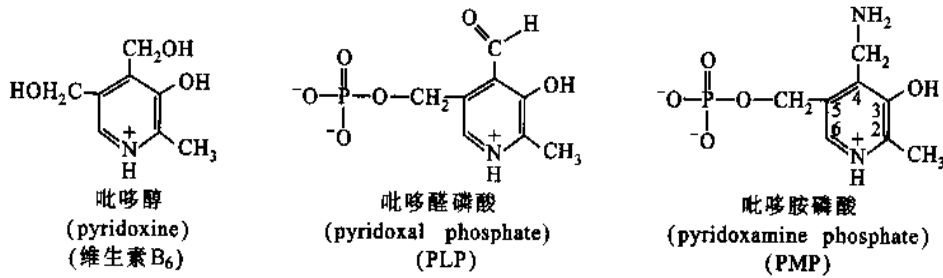


图 30-2 辅酶吡哆醛 5'-磷酸(PLP)和吡哆胺磷酸(PMP)是自吡哆醇(维生素 B₆)衍生形成的

氨基转移酶的反应属于“乒乓 BiBi 机制(Ping Pong BiBi mechanism)”(双底物的酶反应机制),它的两个步骤各由三步反应组成,即:

(1) 步骤 I 氨基酸转化为酮酸

① 在氨基转移反应中,氨基酸的亲核氨基向酶-希夫碱的碳原子进攻,形成氨基酸-PLP 希夫碱(醛亚胺 aldimine),与此同时,酶-Lys 残基被释出。

② 由于氨基酸的 α -氢的消除及 PLP 的 C(4')原子的质子化,形成共振稳定的负碳离子中间体,氨基酸-PLP 希夫碱的 α -酮酸-PMP 希夫碱。

③ α -酮酸-PMP 希夫碱水解,形成 PMQ 及 α -酮酸。

(2) 步骤 II α -酮酸转化为氨基酸

为了完成氨基转移酶的催化循环(catalytic cycle),这里的辅酶必须把 PMP 转化回归为酶-PLP 希夫碱。它包括着与上述 3 步反应相同,但方向相反的反应。即:

③ PMP 与 α -酮酸反应形成希夫碱。

② α -酮酸-PMP 希夫碱互变异构为氨基酸-PLP 希夫碱。

① Lys 残基的 ϵ -氨基在氨基转移反应中向氨基酸-PLP 希夫碱进攻,再生成活泼的酶-PLP 希夫碱,与此同时释出新形成的氨基酸。

本反应的化学计量学可总结为:



以上的两个步骤各包括 3 步反应如图 30-3 所示。

仔细究明氨基酸-PLP 希夫碱的结构,可以了解:为什么这个体系被称为“乐于推出电子的体系”(electron pusher's delight)。“氨基酸 C _{α} 原子的三个键(图中的 a、b 和 c)中任何一个的断裂皆可产生一个共振稳定的 C _{α} 碳负离子,这个碳负离子的电子都远离 C _{α} 原子而靠近辅酶的吡啶中质子化的正氮原子。因此可将 PLP 视为起着“电子槽”(electric sink)的作用”。在氨基转移反应中,这种拉电子的能力可容易地在希夫碱的互变异构中移走 α 质子(得自图 30-3 中 a 键的断裂)。PLP 引起的反应还包括 b 键的断裂(氨基酸的脱羧)和 c 键的活化。

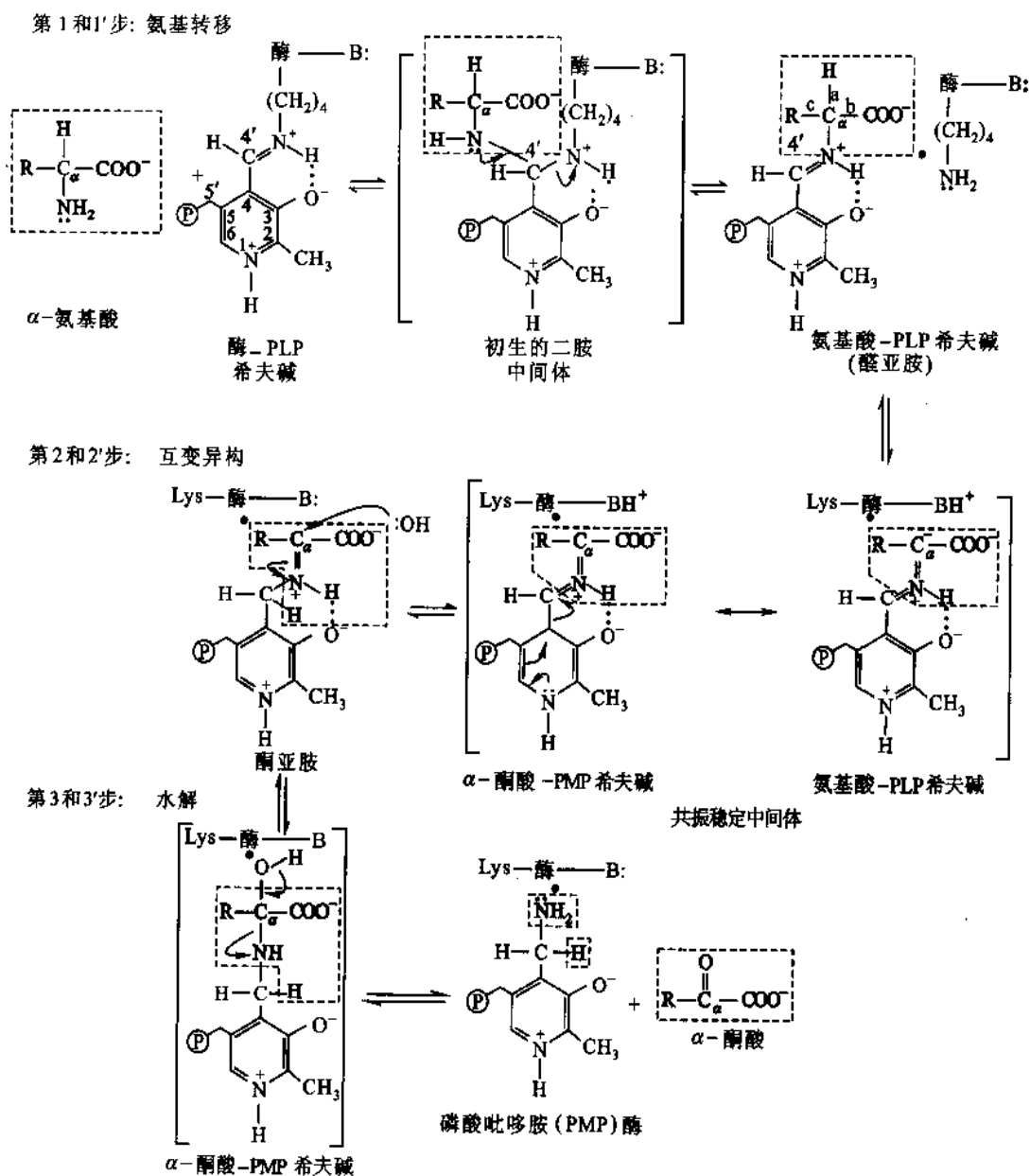


图 30-3 以吡哆醛 5'-磷酸为辅酶的酶催化氨基转移反应的机制

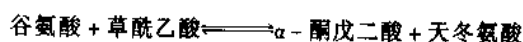
反应步骤 I: 氨基酸的 α -氨基转移给 PLP 形成 PMP (吡哆胺-5'-磷酸) 及 α -酮酸。

它包括三步反应, 即图中的①氨基转移, ②互变异构, ③水解。

反应步骤 II: PMP 的氨基转移给另一 α -酮酸, 形成 PLP 及一新的氨基酸,

它也包括三步反应实际是步骤 I 的三步反应的逆反应

氨基转移酶因氨基转移反应第一步的底物氨基酸特性不同而异, 从而使酶促催化产生了不同的 α -酮酸产物。但氨基转移酶的绝大多数在反应第二步中作为 α -酮酸底物的, 仅能是 α -酮戊二酸, 或者(少部分的)草酰乙酸, 因此只可能产生谷氨酸或天冬氨酸。绝大多数氨基就这样流进而形成谷氨酸或天冬氨酸, 它们乃自行受谷氨酸-天冬氨酸氨基转移酶的作用进行如下转化:



谷氨酸氧化脱氨基产生氨, 并再生 α -酮戊二酸。 α -酮戊二酸又进入另一种氨基反应的途径。在尿素合成中, 氨和天冬氨酸扮演着两个氨基受体的角色。

2. 葡萄糖-丙氨酸循环, 氨运入肝脏

与前述转氨基作用规律相反的一个重要例外, 是有一组肌肉氨基转移酶, 可把丙酮酸当作它们的 α -酮酸底物。即在它们的催化下得到的产物为丙氨酸。这个丙氨酸被释放进入血流, 并被传送到肝脏, 在肝

脏中经过转氨基作用产生丙酮酸,又可用于葡糖异生作用(gluconeogenesis),(见第 25 章)。这样形成的葡萄糖又回到肌肉中,在这里又以糖酵解方式降解为丙酮酸。以上称之为葡萄糖-丙氨酸循环(glucose-alanine cycle)。氨基酸最后以氨或天冬氨酸告终,产物即用于尿素的形成。它证明葡萄糖-丙氨酸循环起着将氨运入肝脏的作用。

3. 转氨酶

催化转氨基反应的酶称为转氨酶(transaminase),或称氨基转移酶(aminotransferase)。催化氨基酸转氨基的酶种类很多,在动、植物、微生物中分布很广,在动物的心、脑、肾、睾丸以及肝细胞中含量都很高。大多数转氨酶需要 α -酮戊二酸作为氨基的受体,因此它们对两个底物中的一个底物,即 α -酮戊二酸(或谷氨酸)是专一的,而对另外一个底物则无严格的专一性,虽然某种酶对某种氨基酸有较高的活力,但对其他氨基酸也有一定作用。酶的命名是根据其催化活力最大的氨基酸命名,当今已发现至少有 50 种以上的转氨酶。

动物和高等植物的转氨酶一般只催化 L-氨基酸和 α -酮酸的转氨作用。某些细菌,例如,枯草杆菌(*B. Subtilis*)的转氨酶能催化 D-和 L-两种氨基酸的转氨作用。

转氨酶催化的反应都是可逆的,它们的平衡常数为 1.0 左右,也表明催化的反应可向左、右两个方向进行。但是在生物体内,与转氨作用相偶联的反应是氨基酸的氧化分解作用,例如,谷氨酸的氧化脱氨基作用,这种偶联反应可以促使氨基酸的转氨作用向一个方向进行。

真核细胞的线粒体和细胞溶液中都可进行转氨作用。在细胞不同部位的转氨酶,虽然功能相同,但结构和性质并不相同,在猪心细胞线粒体内和线粒体外的天冬氨酸转氨酶,其氨基酸组成和等电点都不相同,但两种转氨酶的相对分子质量都是 90 000,都含有两个大小相同的亚基。

哺乳动物细胞中氨基酸氨基的集合作用是在细胞溶胶中进行的。起催化作用的酶是细胞溶胶中的天冬氨酸转氨酶,该酶催化的转氨产物是谷氨酸。谷氨酸通过膜的特殊转运系统进入线粒体基质(matrix),在线粒体基质中,谷氨酸或直接脱氨基,或作为 α -氨基的供体,借助理体天冬氨酸转氨酶,将氨基转移给草酰乙酸又形成天冬氨酸。在线粒体内,天冬氨酸是尿素形成时氨基的直接供给者,又是形成腺苷酸代琥珀酸(adenylosuccinate)的重要物质(参看联合脱氨基作用)。

(二) 氧化脱氨基作用:谷氨酸脱氢酶

谷氨酸在线粒体中受谷氨酸脱氢酶作用发生氧化脱氨基反应。这是唯一为人所知的酶,至少在一些组织中,既可使 NAD^+ 又可把 NADP^+ 作为它的氧化还原辅酶。氧化之发生被认为是由于谷氨酸的 C_α 的带一对电子的质子转移到 NAD(P)^+ 所致。这时,形成 α -亚氨基戊二酸。这个具有亚氨基的中间产物经水解即形成 α -酮戊二酸及氨,见图 30-4。

谷氨酸脱氢酶的相对分子质量为 330 000,在脊椎动物中,此酶由 6 个相同的亚基构成。此酶只存在于细胞溶胶中。它是一变构调节酶。在体外的实验中可以见到谷氨酸脱氢酶被 GTP 和 ATP 抑制,被 ADP 激活。因此,认为此类核苷酸在体内起着调节此酶的作用。然而,对于细胞底物及产物浓度的研究却表明在体内此脱氢酶的作用非常接近平衡状态($\Delta G \approx 0$)。因此,最大的可能是受底物及产物浓度所左右。反应的平衡点表明在动态反应中谷氨酸的形成超过氨的形成(即在上图的反应式中 $\Delta G^0' \approx 30 \text{ kJ/mol}$ 时)。氨的浓度越高,越显示毒性,因此这个平衡点在生理学上至关重要,它维护了氨的低浓度。这里产生的氨又转化为尿素(见后节)。

(三) 其他的脱氨基作用

L-氨基酸氧化酶及 D-氨基酸氧化酶是两个非专一性的氨基酸氧化酶,它们把 FAD [而不是 NAD

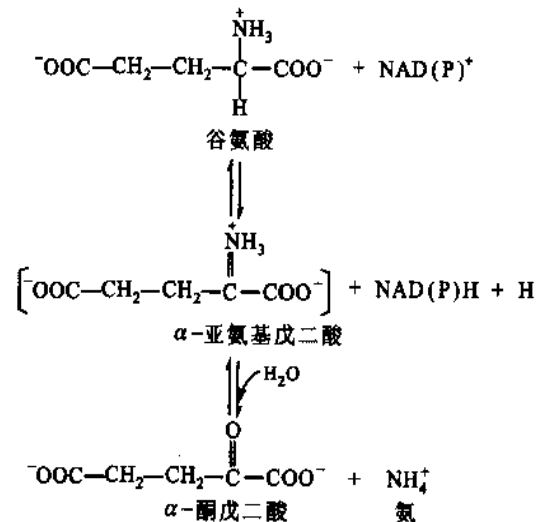
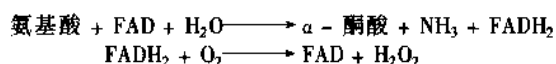


图 30-4 谷氨酸的氧化脱氨基作用

(P)⁺]作为辅酶,催化 L- 及 D- 氨基酸的氧化反应。产出的 FADH 又被 O₂ 再氧化:



D-氨基酸氧化酶主要存在于肾脏中。它的功能是颇为神秘的,因为 D-氨基酸绝大多数是结合在细菌的细胞壁上。

极少数的氨基酸,如丝氨酸及组氨酸之脱氨基是非氧化型的脱氨基作用。

(四) 联合脱氨基作用(transdeamination)

氨基酸的转氨作用虽然在生物体内普遍存在,但是单靠转氨作用并不能最终脱掉氨基。当前联合脱氨基作用有两个内容:其一是指氨基酸的 α -氨基借助转氨作用,转移到 α -酮戊二酸的分子上,生成相应的 α -酮酸和谷氨酸,然后谷氨酸在谷氨酸脱氢酶的催化下,脱氨基生成 α -酮戊二酸,同时释放出氨(图 30-5)。

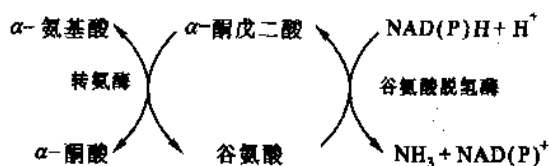


图 30-5 以谷氨酸脱氢酶为主的联合脱氨基作用

其二是嘌呤核苷酸的联合脱氨基作用,这一过程的内容是:次黄嘌呤核苷酸与天冬氨酸作用形成中间产物腺苷酸代琥珀酸(adenylsuccinate),后者在裂合酶的作用下,分裂成腺嘌呤核苷酸和延胡索酸,腺嘌呤核苷酸(腺苷酸)水解后即产生游离氨基酸和次黄嘌呤核苷酸(图 30-6)。

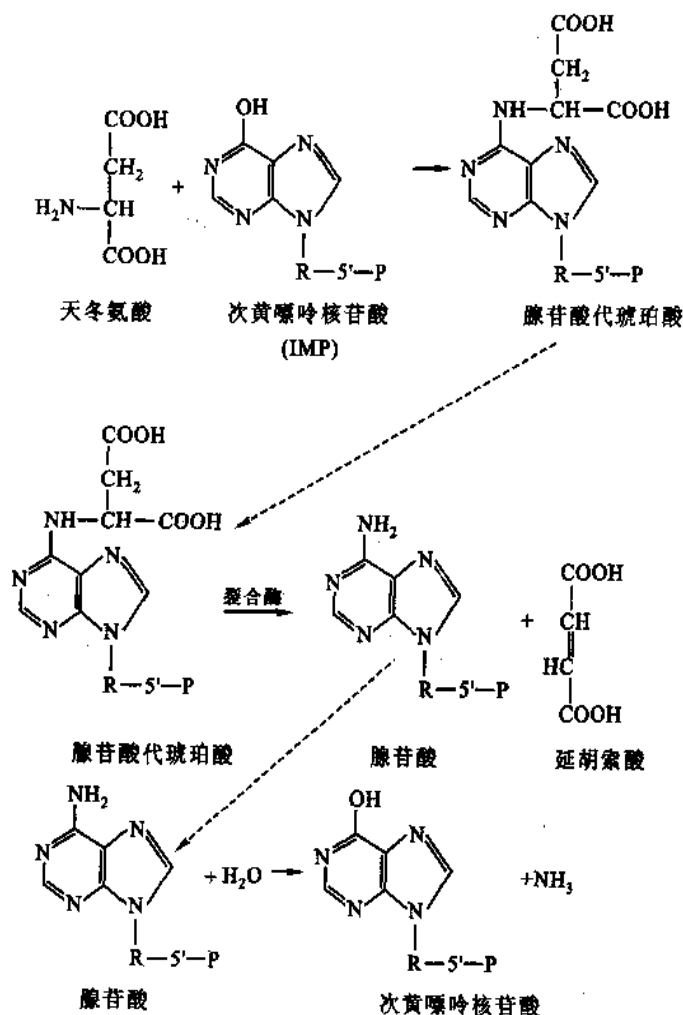


图 30-6 嘌呤核苷酸的联合脱氨基作用

天冬氨酸:主要来源于谷氨酸,由草酰乙酸与谷氨酸转氨而来,催化此反应的酶称为谷氨酸-草酰乙酸转氨酶,简称谷草转氨酶,又称为谷氨酸:天冬氨酸转氨酶。从 α -氨基酸开始的联合脱氨基反应可概括如图 30-7。

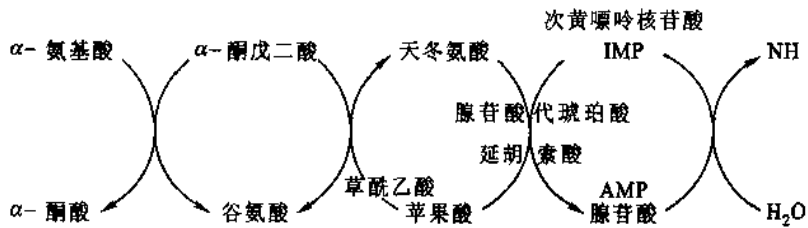
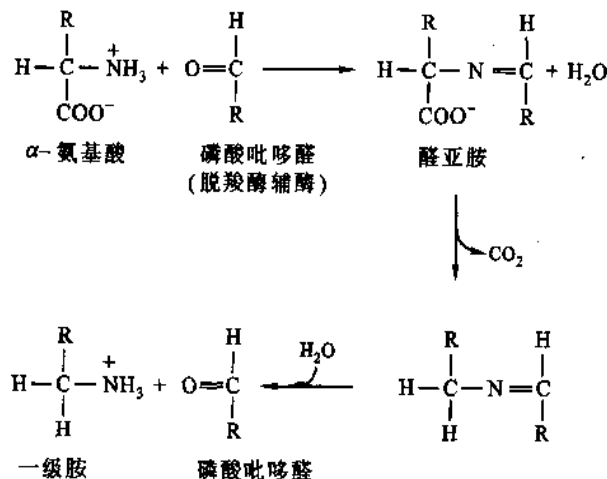


图 30-7 从 α -氨基酸开始通过嘌呤核苷酸循环的联合脱氨基过程

以谷氨酸脱氢酶为中心的联合脱氨基作用,虽然在机体内广泛存在,但不是所有组织细胞的主要脱氨方式。骨骼肌、心肌、肝脏以及脑的脱氨方式可能都是以嘌呤核苷酸循环为主,实验证明脑组织中的氨有 50% 是经嘌呤核苷酸循环产生的。

(五) 氨基酸的脱羧基作用

机体内部分氨基酸可进行脱羧而生成相应的一级胺。催化脱羧反应的酶称为脱羧酶(decarboxylase),这类酶的辅酶为磷酸吡哆醛,其所催化的反应如下:



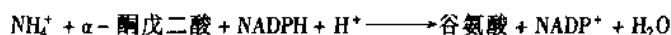
氨基酸脱羧酶的专一性很高,一般是一种氨基酸一种脱羧酶,而且只对 L-氨基酸起作用。在脱羧酶中只有组氨酸脱羧酶不需要辅酶。

氨基酸的脱羧反应普遍存在于微生物、高等动、植物组织中。动物的肝、肾、脑中都发现有氨基酸脱羧酶,脑组织中富有 L-谷氨酸脱羧酶,能使 L-谷氨酸脱羧形成 γ -氨基丁酸。氨基酸脱羧后形成的胺,有许多具有重要的生理作用。如上述的 γ -氨基丁酸是重要的神经递质(neurotransmitter)。组氨酸脱羧形成的组胺(histamine)又称组织胺,有降低血压的作用,又是胃液分泌的刺激剂。酪氨酸脱羧形成的酪胺(tyramine)有升高血压的作用,还将在氨基酸与生物活性物质一节中详细讨论。绝大多数胺类是对动物有毒的。但体内有胺氧化酶,能将胺氧化为醛和氨。醛可进一步氧化成脂肪酸,氨可合成尿素,又可形成新的氨基酸。

(六) 氨的命运

氨基酸经过前述的氧化脱氨基作用、脱酰氨基作用,或经嘌呤核苷酸循环等途径将氨基氮转变为氨。氨对生物机体是有毒物质,特别是高等动物的脑对氨极为敏感,血液中 1% 的氨就可引起中枢神经系统中毒,因此氨的排泄是生物体维持正常生命活动所必需的。

人类氨中毒的症状表现为语言紊乱、视力模糊,机体发生一种特有的震颤,甚至昏迷或死亡。氨对中枢神经系统危害的机制目前尚未完全阐明。已知脑细胞线粒体可将氨与 α -酮戊二酸作用形成谷氨酸:



此反应一方面大量消耗了 α -酮戊二酸,从而破坏了柠檬酸循环的正常进行,另一方面,对 NADPH 的大量消耗,严重地影响需要还原力(NADPH + H⁺)反应的正常进行。

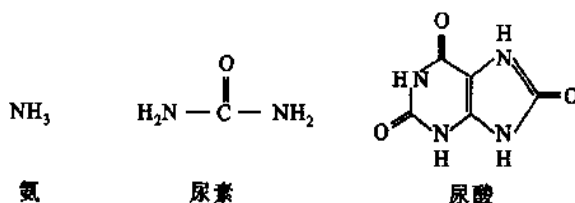
有些微生物可将游离氨用于形成细胞的其他含氮物质。当以某种氨基酸作为氮源时,从氨基酸上脱下的氨,除一部分用于进行生物合成外,多余的氨即排到周围环境中。

某些水生的或海洋动物,如原生动物和线虫以及鱼类、水生两栖类等,都以氨的形式将氨基氮排出体外。这些动物称为排氨动物(ammonotelic animals)。

绝大多数陆生动物将脱下的氨转变为尿素。鸟类和陆生的爬虫类,因体内水分有限,它们的排氨方式是形成固体尿酸的悬浮液排出体外。因此鸟类和爬虫类又称为排尿酸动物(uricotelic animals)。

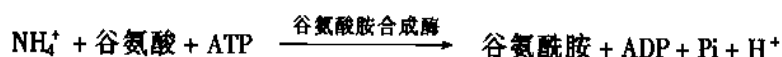
有些两栖类处于中间位置,幼虫为排氨动物如蝌蚪,变态时肝脏产生出必要的酶,成蛙后,即排泄尿素。

概括地说,生活着的有机体把氨基酸分解代谢产生的氮的多余部分排出体外,取 3 种形式。排氨:包括许多水生动物,排泄时需要少量的水。另一种形式排尿素:包括绝大多数陆生脊椎动物。第三种是排尿酸,包括鸟类和陆生爬行动物。有些生物在水供应受到限制时,可以从排氨类转变为排尿素类或排尿酸类。

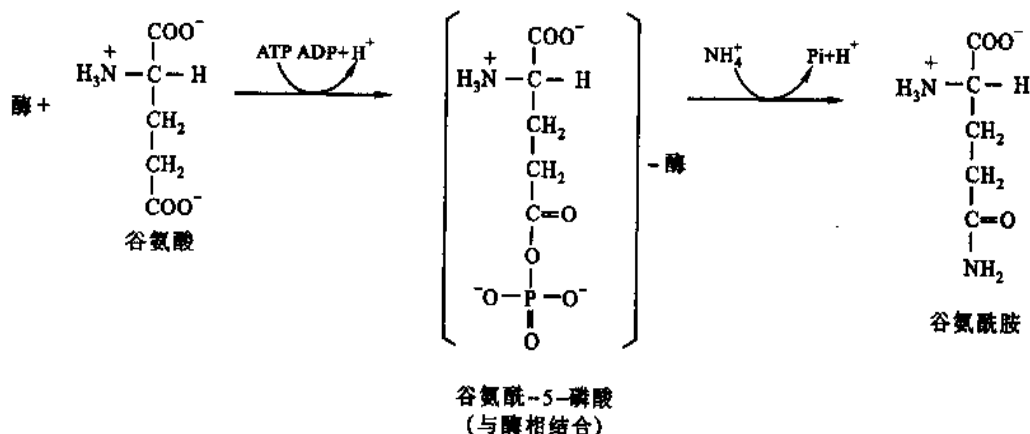


1. 氮的转运

氮的转运主要是通过谷氨酰胺,多数动物细胞内有谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase),催化谷氨酸与氨结合而形成谷氨酰胺。

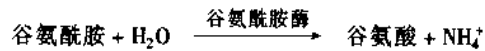


在该反应中形成中间产物谷氨酰-5-磷酸,是一种与酶结合的高能中间产物,是谷氨酸第 5 位的羧基磷酸化的结果,提供磷酸基团的是 ATP。谷氨酰-5-磷酸的磷酸键是活泼键,很容易脱下磷酸基团而与氨结合形成谷氨酰胺。

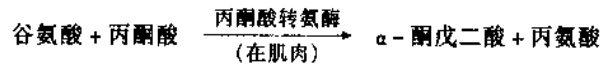


谷氨酰胺是中性无毒物质,容易透过细胞膜,是氨的主要运输形式;而谷氨酸带有负电荷,则不能透过细胞膜。

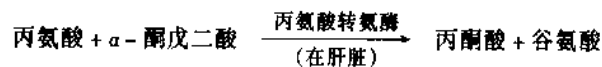
谷氨酰胺由血液运送到肝脏,肝细胞的谷氨酰胺酶(glutaminase)又将其分解为谷氨酸和氨。



前已述及,肌肉可利用葡萄糖-丙氨酸循环转运氨,将氨送到肝脏。在肌肉中谷氨酸与丙酮酸进行转氨形成丙氨酸:



丙氨酸在 pH 近于 7 的条件下是中性不带电荷的化合物,通过血液运送到肝脏,再与 α -酮戊二酸转氨又变为丙酮酸和谷氨酸。



肌肉中所需的丙酮酸由糖酵解提供,在肝脏中多余的丙酮酸又可通过葡糖异生作用转化为葡萄糖。

生物体利用丙氨酸作为从肌肉到肝脏运送氨的载体,是机体在维持生命活动中遵循经济原则的一种表现。肌肉在紧张活动中既产生大量的氨,又产生大量的丙酮酸,二者都需要运送到肝脏进一步转化。将丙酮酸与氨转化为丙氨酸,收到一举两得的功效。

2. 氨的排泄

(1) 排氨动物由氨基酸的 α -氨基形成的氨,经谷氨酰胺形式运送到排泄部位 例如,鱼类的鳃,经鳃内谷氨酰胺酶分解,游离的氨即借助扩散作用排出体外。

(2) 尿素的形成——尿素循环(urea cycle) 排尿素动物合成尿素是在肝脏中进行,由一个循环机制完成的,这一循环称为尿素循环(the urea cycle),如图 30-8 所示。

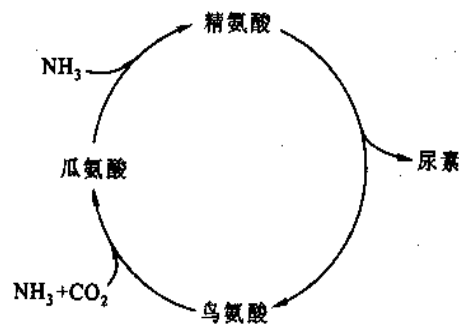
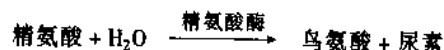


图 30-8 Krebs 和 Henseleit 最早提出的尿素循环

三、尿素的形成

(一) 尿素循环的发现

尿素循环是最早发现的代谢循环,比发现柠檬酸循环还早 5 年。1932 年发现柠檬酸循环的同一人, Hans Krebs A 和他的学生 Kurt Henseleit 观察到,当往悬浮有肝脏切片的缓冲液中加入任何一种鸟氨酸(ornithine)、瓜氨酸(citrulline)或精氨酸时,都可促使肝脏切片显著加快尿素的合成,而其他任何氨基酸或含氮化合物都不能起到上述 3 种氨基酸的促进作用。较早人们就已经知道精氨酸可以由精氨酸酶(arginase)水解为鸟氨酸和尿素。



Krebs 和 Henseleit 研究了前述 3 种氨基酸的结构关系,发现它们彼此的相关结构,提出鸟氨酸是瓜氨酸的前体,瓜氨酸是精氨酸的前体,它们的相互关系如图 30-8 所示。

在以上实验和分析的基础上,Krebs 提出了尿素循环的设想。在此循环中,鸟氨酸所起的作用类似草酰乙酸在柠檬酸循环中的作用,一分子鸟氨酸和一分子氨及二氧化碳结合形成瓜氨酸。瓜氨酸与另一分子氨结合形成精氨酸。精氨酸水解形成尿素和鸟氨酸完成一次循环。当今公认的尿素循环表示如图 30-9。

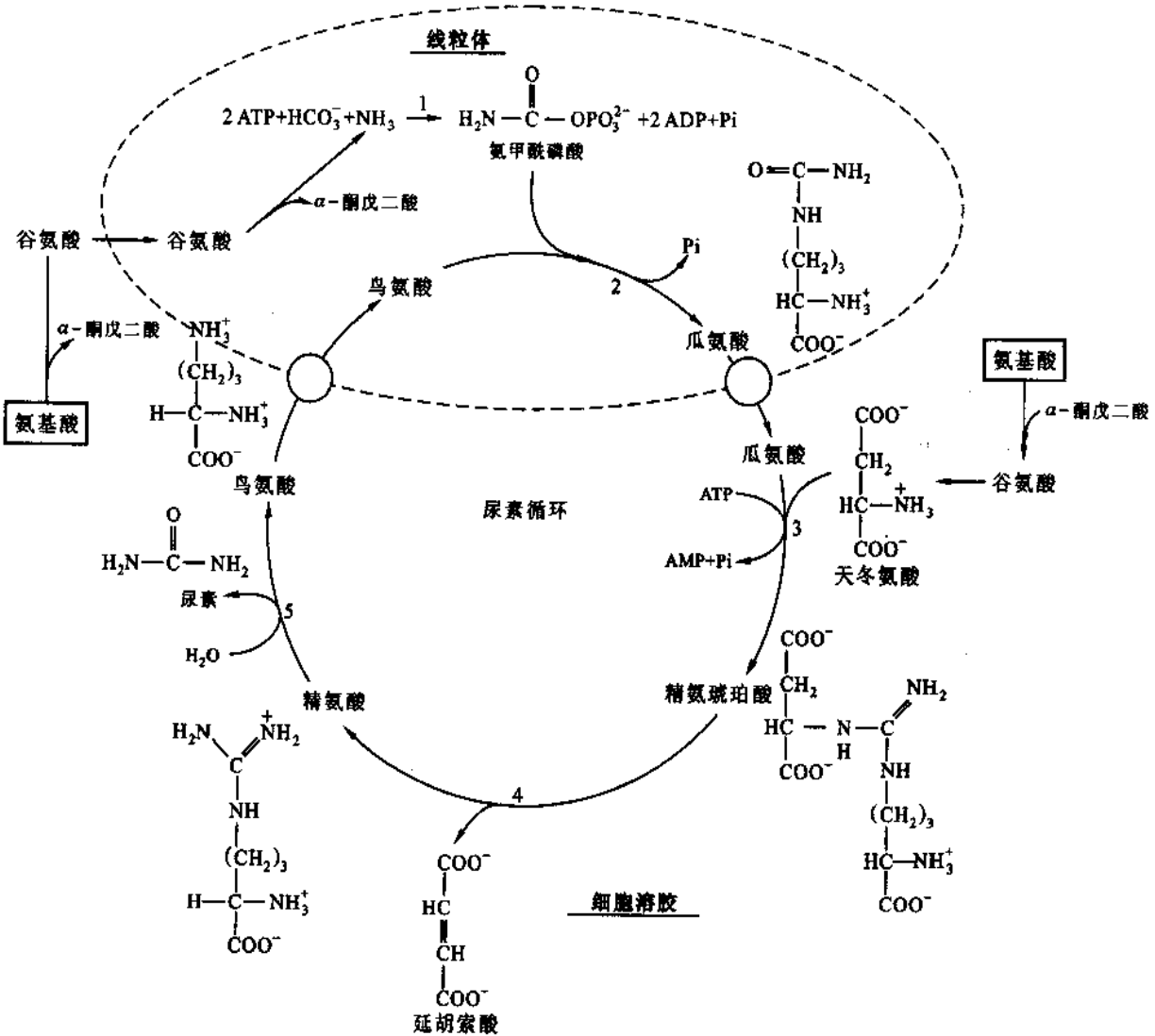


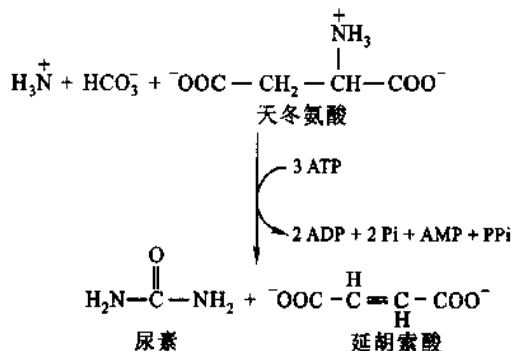
图 30-9 尿素循环部分发生在线粒体,部分发生在细胞溶胶。

其通路是分别经鸟氨酸及瓜氨酸在特异的运输体系下穿过线粒体膜实现的。在尿素循环中分布有 5 种酶:

- ① 氨甲酰磷酸合成酶; ② 鸟氨酸转氨琥珀基酶; ③ 精氨酸琥珀酸合酶; ④ 精氨酸琥珀酸裂解酶; ⑤ 精氨酸酶

(二) 尿素循环

尿素是肝脏中由尿素循环的一系列酶催化形成的。合成的尿素被排泄进入血流,再被肾脏分离,从尿中排出。尿素循环的过程可概括为:



尿素的两个 N 原子来自一个氨分子和一个天冬氨酸分子,其 C 原子则来自 HCO_3^- 。在尿素循环中包括有 5 步酶反应,其中 2 步发生在线粒体内,3 步发生在细胞溶胶中(图 30-9)。下面着重讨论鸟氨酸循环的反应机制:

1. 氨甲酰磷酸合成酶:尿素的第一个氮原子的获取

氨甲酰磷酸合成酶(carbamoyl phosphate synthetase, CPS)严格地说,其实不属于尿素循环的一员。它催化 NH_4^+ 及 HCO_3^- 使之活化并缩合形成氨甲酰磷酸。它是尿素循环的两个含氮底物中的一个。这个反应随伴有两个 ATP 的水解。真核生物中的 CPS 有两类,即:

(1) 线粒体的氨甲酰磷酸合成酶 I (CPS I) 用氨作为它的氮给体,参与尿素的生物合成。

(2) 细胞溶胶的氨甲酰磷酸合成酶 II (CPS II) 用谷氨酸作为它的氮给体,分担着嘧啶生物合成的任务。

CPS 所催化的反应包含有 3 个步骤(图 30-10):

① HCO_3^- 受 ATP 作用而活化,形成羧基磷酸。

② 氨对羧基磷酸进攻,取代磷酸基团形成氨基甲酸酯。

③ 受第 2 个 ATP 作用,发生氨基甲酸的磷酸化,形成氨甲酰磷酸及 ADP。

本反应基本上是不可逆的,它在尿素循环中是限速的一步。

2. 鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transcarbamoylase)

鸟氨酸转氨甲酰酶的作用是将氨甲酰磷酸的氨甲酰基转移到鸟氨酸(ornithine)上,形成瓜氨酸(citrulline),这是尿素循环的第 2 步。此反应发生在线粒体中,而鸟氨酸则产生于细胞溶胶,所以它必须通过一个特异的运送体系进入线粒体。同样地,尿素循环的以后几步皆在细胞溶胶中进行,瓜氨酸就必须从线粒体中脱出(见图 31-9)。

3. 精氨琥珀酸合成酶(argininosuccinate Synthetase),尿素第二个氮原子的获取

尿素第 2 个氮原子的获取是在尿素循环的第 3 步反应中实现的,即:在精氨琥珀酸合成酶作用下,瓜氨酸的脲基(ureido group)与天冬氨酸的氨基进行缩合。反应的机制是瓜氨酸经 ATP 作用,形成瓜氨酸-AMP(citrullyl-AMP)中间体,此时瓜氨酸的脲基氧乃活化成为脱氨基

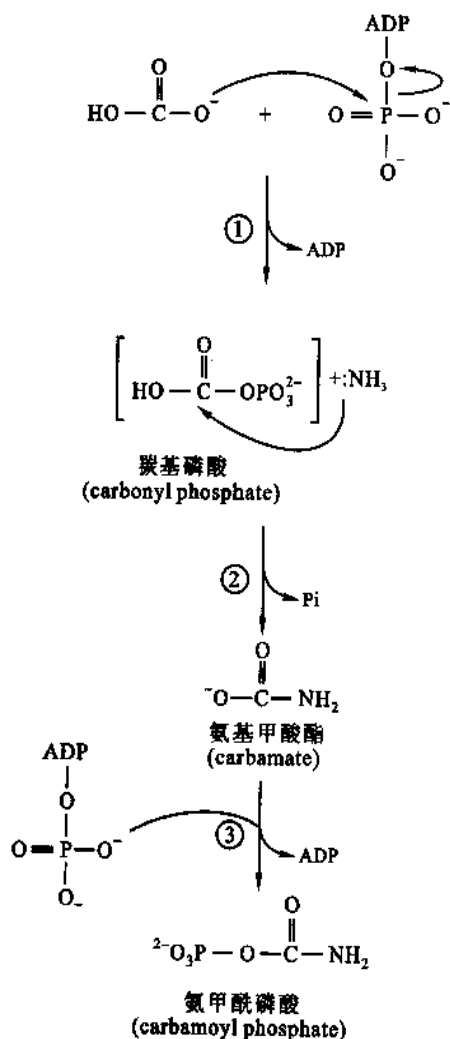


图 30-10 CPS I 酶促反应的机制

① HCO_3^- 被磷酸化而活化,形成一个假设的中间体,羧基磷酸;

② NH_3 向羧基磷酸进攻,形成氨基甲酸酯;

③ 氨基甲酸酯受 ATP 作用发生磷酸化反应,产生氨甲酰磷酸

团。这个中间体立即与天冬氨酸的氨基发生置换反应,形成精氨酸琥珀酸(argininosuccinate)。使用 ^{18}O 标记的瓜氨酸,最后在释出的 AMP 中分离得到了带标记的 AMP。这个实验证明 AMP 与瓜氨酸确实是通过氨基氧以共价联合在一起。

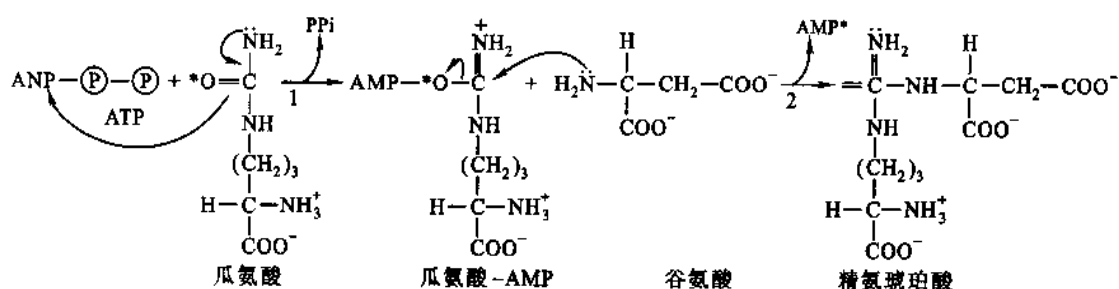


图 30-11 精氨酸琥珀酸合成酶的催化反应机制

- (1) 瓜氨酸的氨基氧由于形成瓜氨酸-AMP 而被活化;
 (2) 天冬氨酸以其氨基与 AMP 置换,星号(*)表示用 ^{18}O 标记的氧及相应化合物

4. 精氨酸琥珀酸酶(argininosuccinase)

精氨酸琥珀酸形成之后,尿素分子的全部组成成分都已齐备。但是天冬氨酸所提供的氨基仍然连接在天冬氨酸的碳骨架上。这时需要精氨酸琥珀酸酶的作用,精氨酸琥珀酸酶又称精氨酸琥珀酸裂解酶,在它的催化下,精氨酸与天冬氨酸的碳骨架脱离,脱下的是延胡索酸(见图 30-9 反应 4)。精氨酸最终成为尿素的直接前体。请注意尿素循环与柠檬酸循环之间的沟通正是通过尿素循环中精氨酸琥珀酸酶催化形成的延胡索酸和柠檬酸循环中形成的草酰乙酸经转氨基反应形成天冬氨酸而连接在一起的。

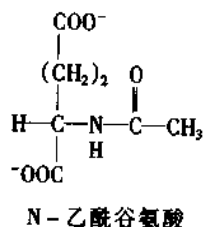
5. 精氨酸酶(arginase)

尿素循环的第 5 步,也是最后一步,是精氨酸酶催化水解精氨酸产生尿素及再生成鸟氨酸(见图 30-9)。再生成的鸟氨酸又回到线粒体中进入另一轮尿素循环。就这样,尿素循环把两个氨基和一个碳原子转化为非毒性的排泄物尿素。在这个循环中使用了 4 个“高能”磷酸键(3 个 ATP 水解为两个 ADP 及 P_i , 一个 AMP 和 PP_i , 后者并随之迅速水解为 P_i)。上述的两个氨基,其中一个来自氨,另一个来自天冬氨酸;一个碳原子来自 HCO_3^- 。在这过程中,能量的消耗大于能量的获取,因为在形成尿素底物时,是需要能量的。但是在谷氨酸脱氢酶催化下,由谷氨酸释出氨的反应中,伴随着 NADH 的形成;在延胡索酸经草酰乙酸转化为天冬氨酸(图 30-12)的过程中,同样也伴有 NADH 生成。在线粒体中对 NADH 再氧化,能产生 $2.5 \times 2 = 5$ 个 ATP。

(三) 尿素循环的调节

线粒体酶之一的氨甲酰磷酸合成酶 I 承担着尿素循环关键的第一步反应,它被 N-乙酰-谷氨酸变构激活。这个代谢物是谷氨酸在 N-乙酰谷氨酸合酶(N-acetylglutamate synthase)的催化下与乙酰-CoA 合成的。

肝脏中尿素生成的速度实际上与这个 N-乙酰谷氨酸合酶的浓度直接相关。尿素合成的增加是当氨基酸降解速度提高,产生出过量的,必须排出的氮时。氨基酸降解速度增高的“信号”使转氨反应加速从而引起谷氨酸浓度增高。随之又引起 N-乙酰谷氨酸合成的增加,又激活了氨甲酰磷酸合成酶,乃至整个尿素循环。



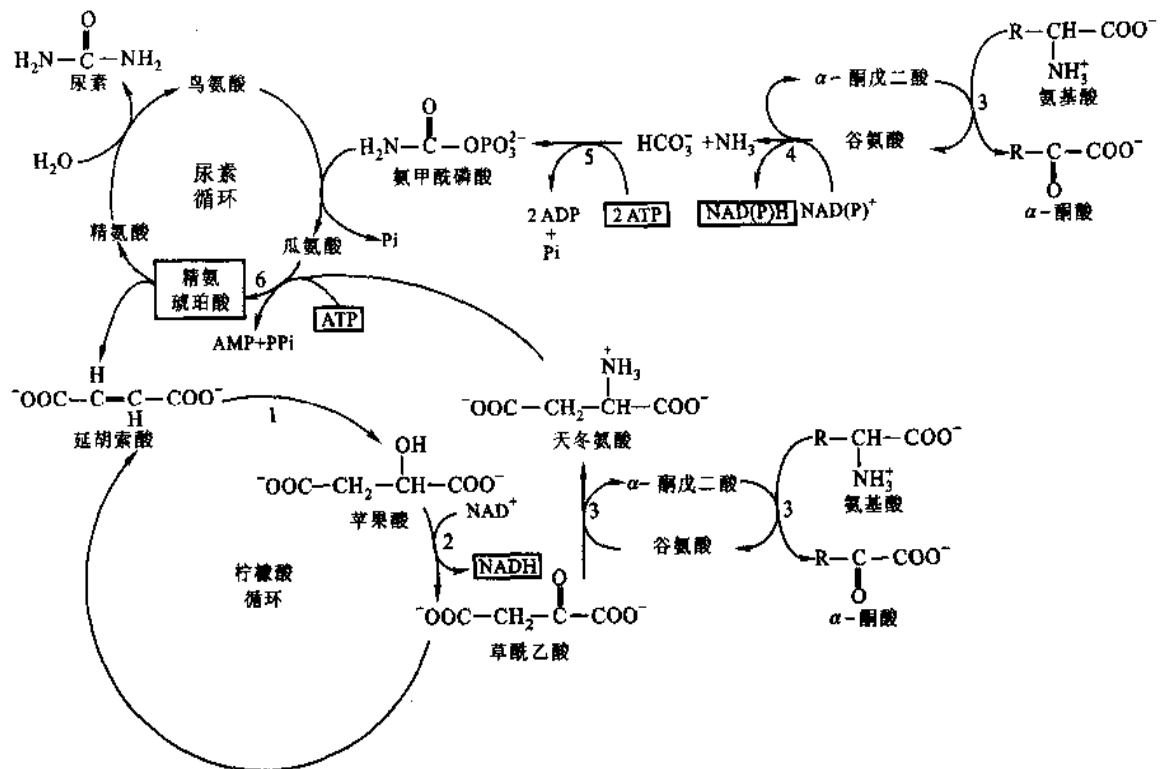


图 30-12 尿素循环与柠檬酸循环的联系是基于精氨酸琥珀酸的断裂与形成实现的

酶(1)延胡索酸酶及(2)顺丁烯二酸脱氢酶是属于柠檬酸循环的成员。草酰乙酸自柠檬酸循环改道形成天冬氨酸是受酶(3)氨基转移酶的作用所致。ATP的水解发生于酶(5),氨基酰磷酸合成酶I及(6)精氨酸琥珀酸合成酶所催化的二反应中。在酶(4)谷氨酸脱氢酶的作用下,由于产生出的NAD(P)H及酶(2)反丁烯二酸脱氢酶的反应中产生出NADH,经氧化磷酸化作用后又形成5个ATP

尿素循环中的其他酶则是由它们的底物所控制。正因为这样,遗传性尿素循环中某些酶的不足,除精氨酸酶以外,都不会因此发生尿素的重大减量(但是任何一种尿素循环酶的完全丧失,都会导致初生儿死亡)。当这些缺欠酶的底物增加时,它会由于缺欠某种酶引起的某一速度之不足恢复正常。当然,这种欠量底物之增加,不是不需付出的。底物浓度的提升会使尿素循环逆行直至产生氨的各个途径,结果会发生“高血氨症(hyperammonemia)”。迄今,氨毒性的根源尚未彻底弄清,氨的高浓度会使“氨清除体系(ammonia-clearing system)”过分耗力,特别是在脑中(尿素循环酶缺欠症状包括有智力迟钝,嗜眠症等)。上述的“氨清除体系”中包含有谷氨酸脱氢酶(反方向工作)及谷氨酰胺合成酶。这个体系可使 α -酮戊二酸及谷氨酸的“蓄池水位”下降,这些蓄池如若耗竭,脑将发生极其敏感的反应。 α -酮戊二酸的耗尽,会引发生能量的柠檬酸循环失速,而谷氨酸既是神经递质,又是“ γ -氨基丁酸(GABA)”的前体,后者是另一种神经递质。

四、氨基酸碳骨架的氧化途径

脊椎动物体内的20种氨基酸的碳骨架,由20种不同的多酶体系进行氧化分解。虽然氨基酸的氧化分解途径各异,但它们都集中形成5种产物而进入柠檬酸循环,最后氧化为 CO_2 和水,图30-13表明20种氨基酸进入柠檬酸循环的途径。

图30-13表明,丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸及色氨酸共10种氨基酸的碳骨架分解后形成乙酰-CoA;精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸及谷氨酸共5种氨基酸形成 α -酮戊二酸;异亮氨酸、甲硫氨酸及缬氨酸共3种氨基酸变为琥珀酰-CoA;苯丙氨酸、酪氨酸形成延胡索酸;天冬氨酸、天冬酰胺转变为草酰乙酸。因此构成蛋白质的20种氨基酸通过转变为乙酰-

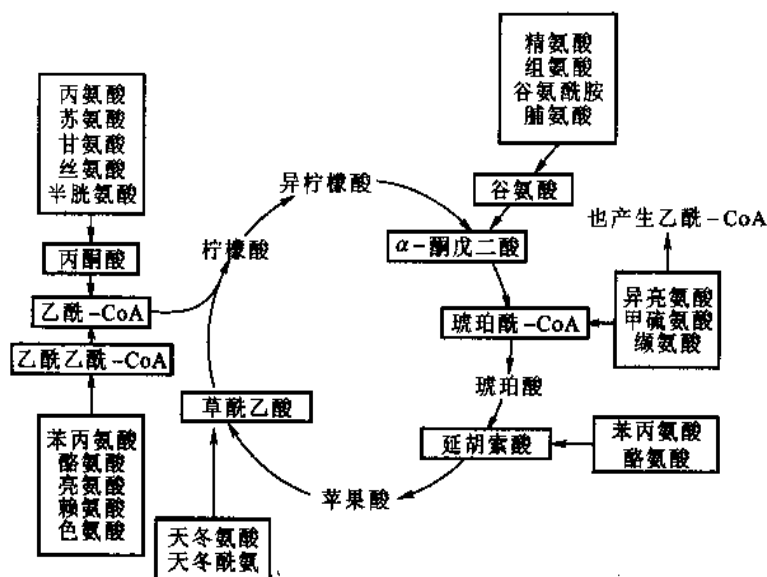


图 30-13 氨基酸碳骨架进入三羧酸循环的途径

CoA、 α -酮戊二酸、琥珀酰-CoA、延胡索酸以及草酰乙酸 5 种物质都能进入柠檬酸循环。此外，苯丙氨酸和酪氨酸碳骨架的一部分也以乙酰-CoA 的形式进入柠檬酸循环。当氨基酸脱羧形成胺类后，即失去了进入柠檬酸循环的可能性。

氨基酸的分解途径并不是其合成途径的逆转，虽然在分解和合成途径之间也有共同的步骤。氨基酸分解代谢过程中有许多中间产物具有其他生物功能，特别是用作组成细胞其他成分的前体。脊椎动物分解代谢主要是在肝脏中进行，肾中也比较活跃。肌肉中氨基酸的分解是很少的。

下面将按照氨基酸碳骨架进入柠檬酸循环的入口方式分述其代谢途径。

(一) 形成乙酰-CoA 的途径

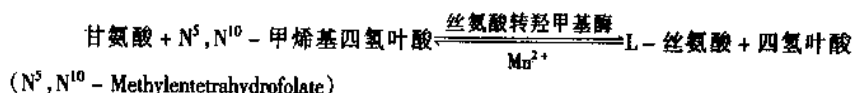
乙酰-CoA 是进入柠檬酸循环的主要入口物质，通过形成乙酰-CoA 进入柠檬酸循环的氨基酸又有三条途径，一条是由氨基酸先转变为丙酮酸再形成乙酰-CoA。第二条是经过乙酰乙酰-CoA 再形成乙酰-CoA，第三条是氨基酸直接形成乙酰-CoA(参看图 30-13)。现分述如下：

1. 经丙酮酸到乙酰-CoA 的途径——氨基酸转变为丙酮酸的途径

(1) 丙氨酸 经与 α -酮戊二酸转氨。催化此反应的酶为谷-丙转氨酶，反应如下：

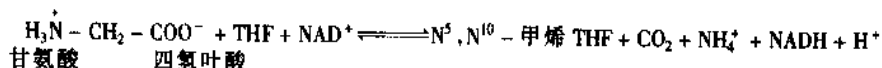


(2) 甘氨酸 先转变为丝氨酸，再由丝氨酸转变为丙酮酸。催化甘氨酸转变为丝氨酸的酶称为丝氨酸转羟甲基酶 (serine transhydroxymethylase)，该酶以磷酸吡哆醛为辅基，但其转移的羟甲基以四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF) 为载体，反应如下：



丝氨酸和甘氨酸的互变是极为灵活的，因此该反应也是丝氨酸生物合成的重要途径，关于四氢叶酸将在氨基酸与一碳单位一节中详述。

甘氨酸的分解代谢不是以形成乙酰-CoA 为主要途径。甘氨酸的重要作用是一碳单位的提供者，在此反应中，同时产生 CO_2 和 NH_4^+ 。该反应需 NAD^+ 作为氢的传递体，反应如下式：



(3) 丝氨酸 本身脱水、脱氨转变成丙酮酸,催化该反应的酶称为丝氨酸脱水酶。该酶也是磷酸吡哆醛酶类,又称为丝氨酸-苏氨酸脱水酶(serine-threonine dehydratase),反应如图30-14所示。

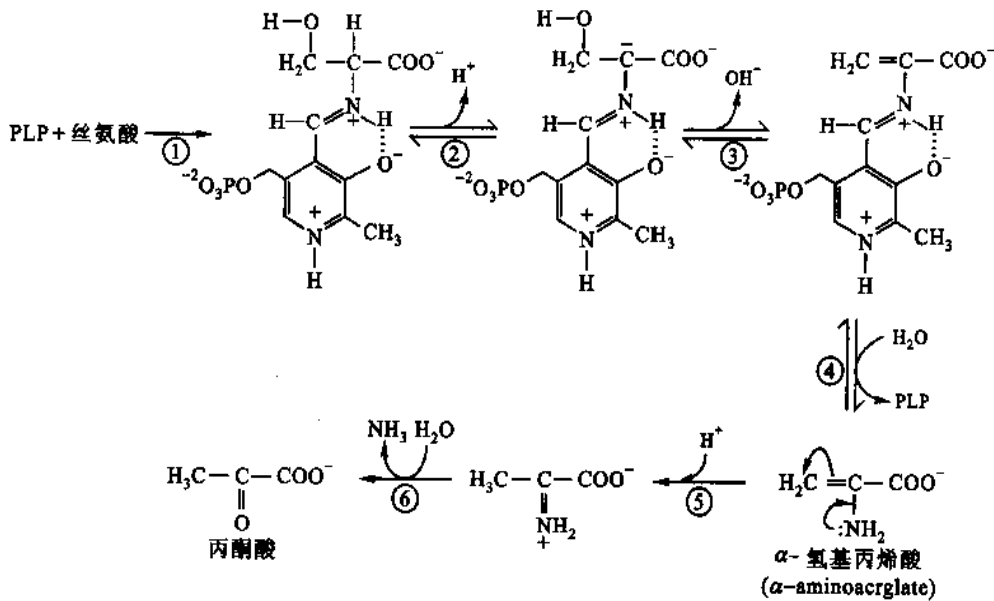
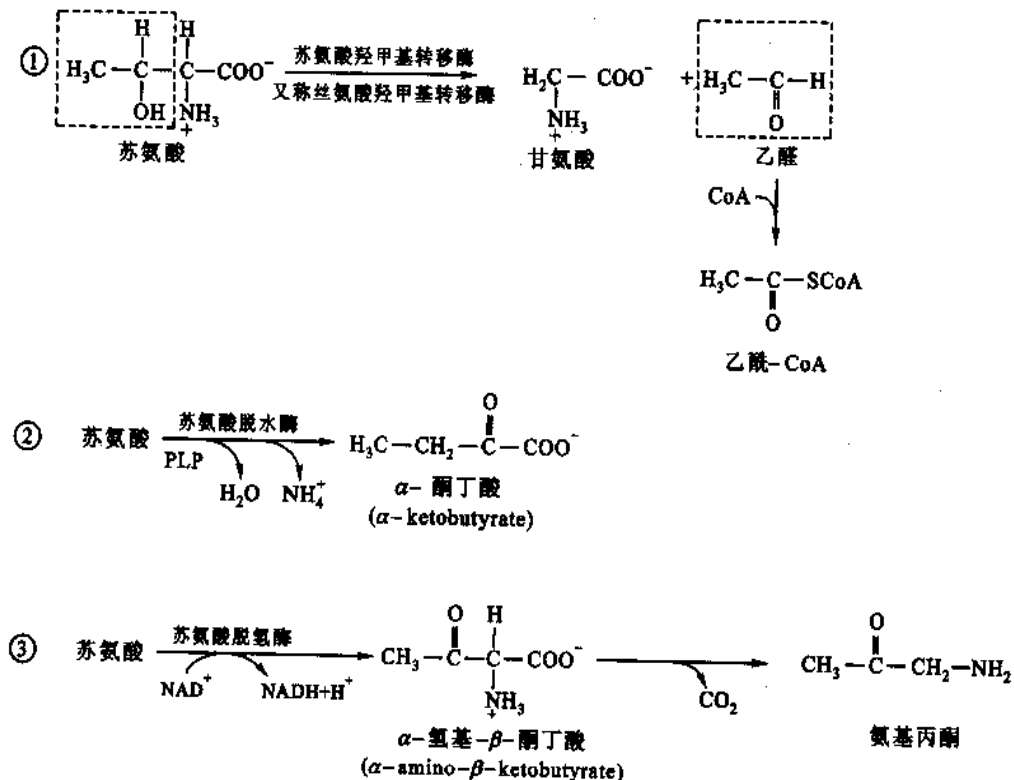


图30-14 丝氨酸脱水转变为丙酮酸的机制

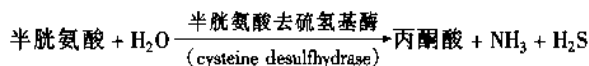
①丝氨酸与磷酸吡哆醛(PLP)形成希夫碱;②丝氨酸脱下一个 α -H原子形成共振稳定的负碳离子;③ OH^- 基的 β -消除;④希夫碱水解,游离出PLP-酶并产生氨基丙烯酸(aminoacrylate);⑤非酶促互变异构形成亚胺;⑥非酶促水解形成丙酮酸和氨

(4) 苏氨酸 由苏氨酸醛缩酶(threonine aldolase)催化裂解生成甘氨酸和乙醛(acetaldehyde),后者氧化形成乙酸。乙酸氧化形成乙酰-CoA。甘氨酸形成丙酮酸的途径已如前述,苏氨酸的分解代谢还有两条其他途径,一条是由丝氨酸-苏氨酸脱水酶(serine-threonine dehydratase)转变为 α -酮丁酸,另一条是脱氢、脱羧形成氨基丙酮(aminoacetone)。



(5) 半胱氨酸 形成丙酮酸的途径如图 30-15 所示。

在某些细菌可发生半胱氨酸的加水分解反应。



上述 5 种氨基酸经丙酮酸转变为乙酰 - CoA 的关系概括如图 30-16。

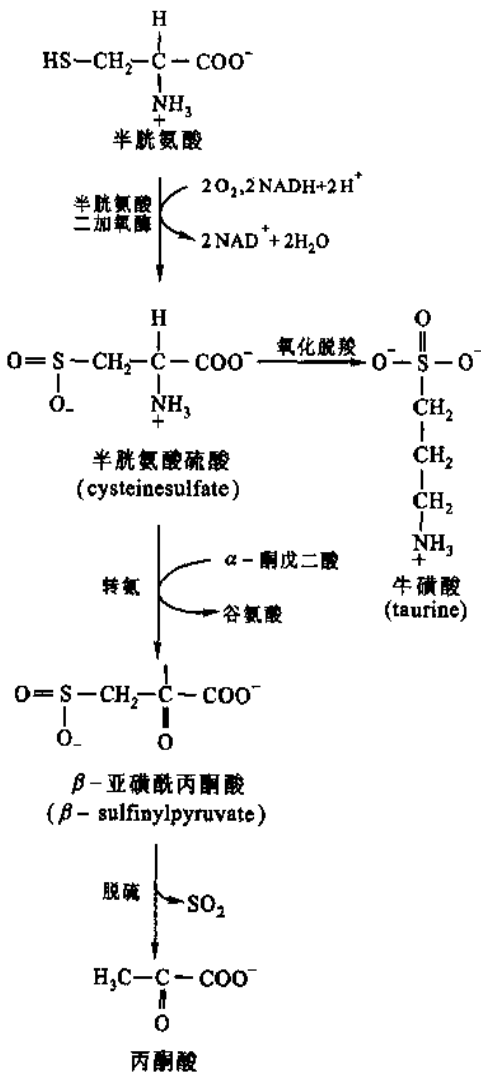


图 30-15 半胱氨酸转为丙酮酸的途径
在动物体内主要分 3 步进行。第 1 个中间产物半胱氨酸硫酸是一个分叉点。一方面可以形成丙酮酸，另一方面也可形成牛磺酸

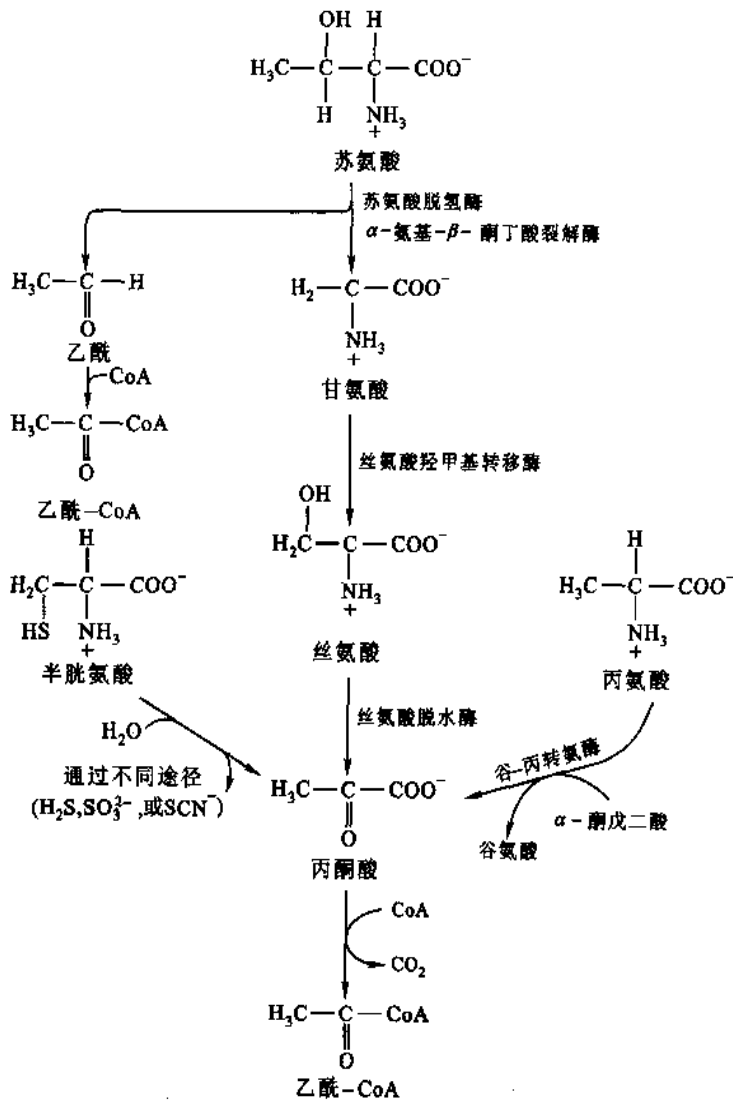


图 30-16 苏氨酸、甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸及半胱氨酸
5 种氨基酸通过丙酮酸形成乙酰 - CoA 的关系图

2. 经乙酰乙酰 - CoA 到乙酰 - CoA 的途径

通过形成乙酰乙酰 - CoA 再形成乙酰 - CoA 的氨基酸有苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸及色氨酸 5 种氨基酸。它们的转变可概括如图 30-17。

下面分述以上 5 种氨基酸的分解途径：

(1) 苯丙氨酸 在分解代谢中先转变为酪氨酸，因此它的分解途径和酪氨酸相同(参看酪氨酸的分解)，苯丙氨酸转变为酪氨酸的反应如下：

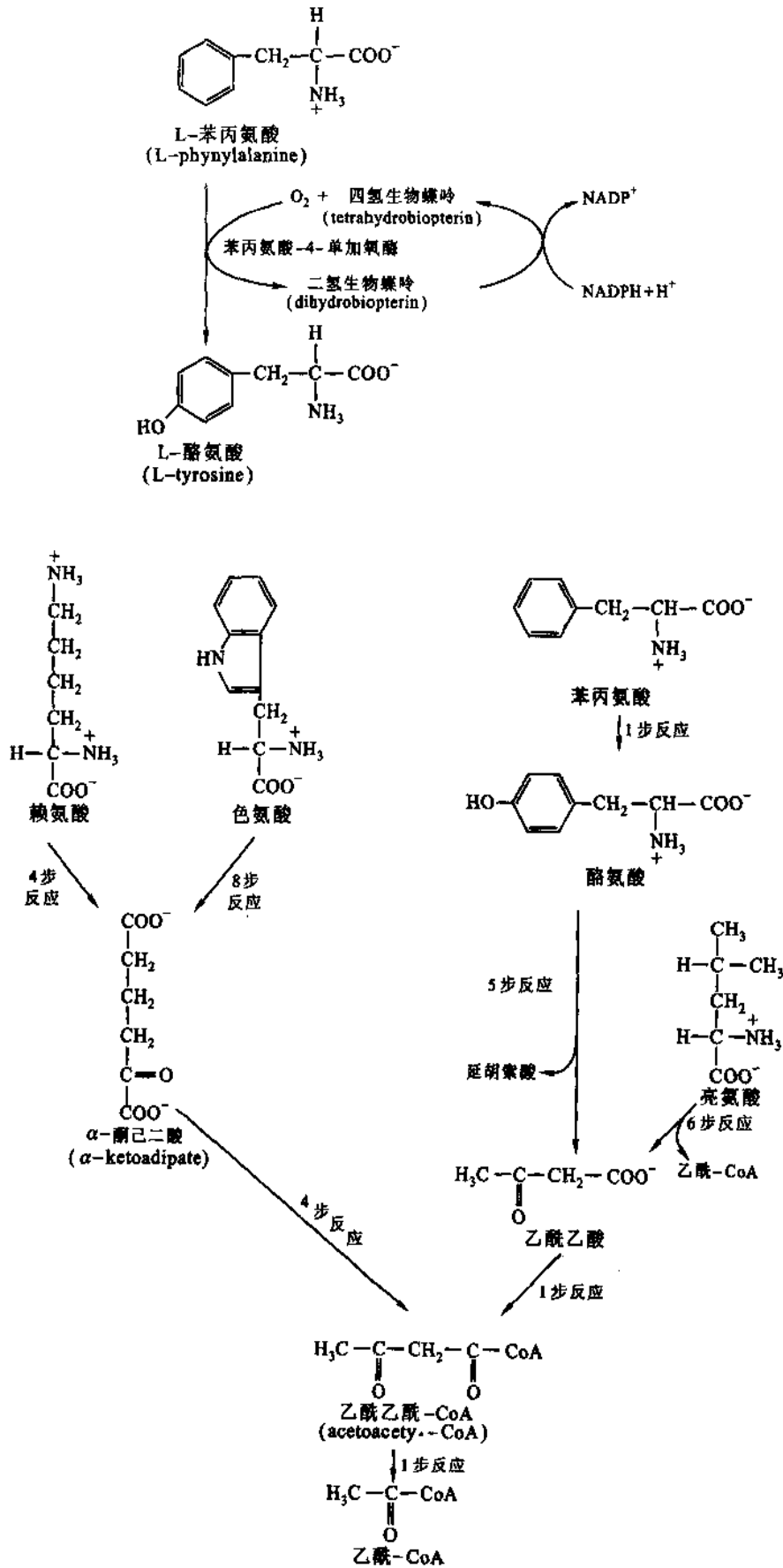


图 30-17 通过乙酰乙酰-CoA 途径形成乙酰-CoA 的氨基酸共 5 种：
 赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和亮氨酸

(2) 酪氨酸 酪氨酸既可转变为延胡索酸,又可转变为乙酰-CoA。苯丙氨酸和酪氨酸转变为延胡索酸和乙酰乙酰-CoA的途径如图30-18所示。

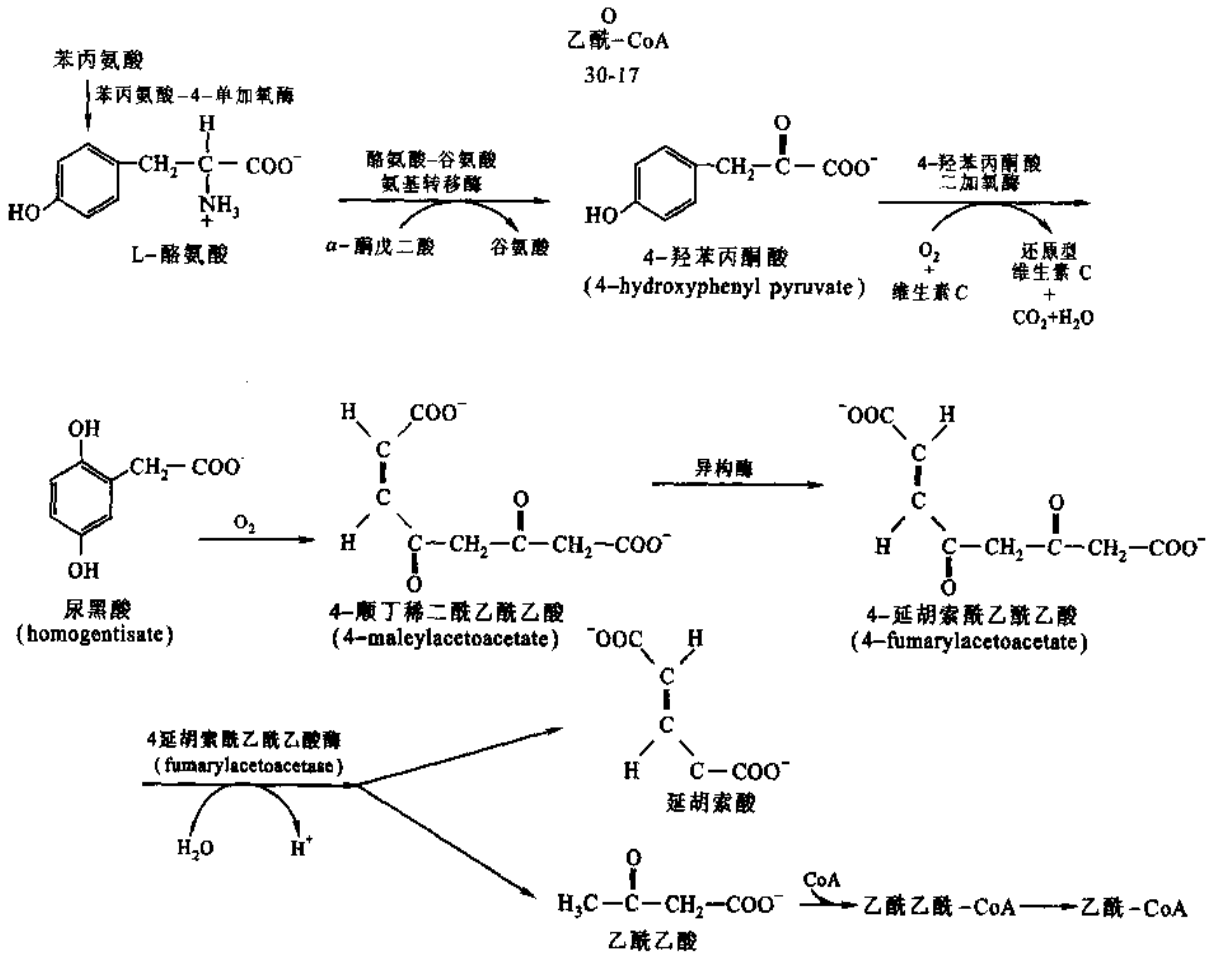


图 30-18 酪氨酸转变为延胡索酸和乙酰乙酰-CoA的途径

酪氨酸在酪氨酸转氨酶催化下将氨基转移到α-酮戊二酸上,本身转变为4-羟苯丙酮酸,后者脱羧形成尿黑酸,并产生一个CO₂。酪氨酸和苯丙氨酸有4个碳原子转变为延胡索酸,因此该两种氨基酸可通过形成延胡索酸进入三羧酸循环,除形成一个CO₂和4个碳的延胡索酸外,其余的4个碳原子即形成乙酰乙酸,后者经琥珀酰-CoA的活化形成乙酰乙酰-CoA。

在苯丙氨酸、酪氨酸代谢途径中,有两个酶和分子遗传缺陷症有关,将在本章第十节中讨论。

(3) 亮氨酸 先经转氨形成α-酮酸,再氧化脱羧形成异戊酰-CoA(isovaleryl CoA),后者再经脱氢、羧化、加水,形成六碳β-羟-β-甲基戊二酰-CoA(β-hydroxy-β-methyl glutaryl CoA),随后分裂为乙酰-CoA和乙酰乙酸,后者转变为乙酰乙酰-CoA已如前述。β-羟-β-甲基戊二酰-CoA是胆固醇生物合成的前体之一。现将亮氨酸的分解途径概括如图30-19。

(4) 赖氨酸 其转变过程如图30-20所示。在复杂的转变过程中,4个碳原子转变为乙酰乙酰-CoA,其他两个碳原子经脱羧失去。赖氨酸不进行转氨作用。在一条途径中,赖氨酸先与α-酮戊二酸缩合,形成酵母氨酸(sacharopine)[ε-N(L-戊二酰基-2-)-L-赖氨酸],最后形成乙酰乙酰-CoA。在第二条途径中,赖氨酸的α-氨基可能被L-氨基酸氧化酶氧化。两条途径都形成L-α-氨基己二酸半醛(L-α-aminoadipic semialdehyde)。

(5) 色氨酸 其分解路线也颇复杂如图30-21所示。色氨酸的11个碳原子中的4个转变为乙酰乙酰-CoA,另外两个转变为乙酰-CoA,其余的5个形成4分子CO₂和一分子甲酸。色氨酸分解的第一步是氧化,形成N-醛基犬尿氨酸。催化此反应的酶称为色氨酸2,3-二加氧酶,又名色氨酸吡咯酶

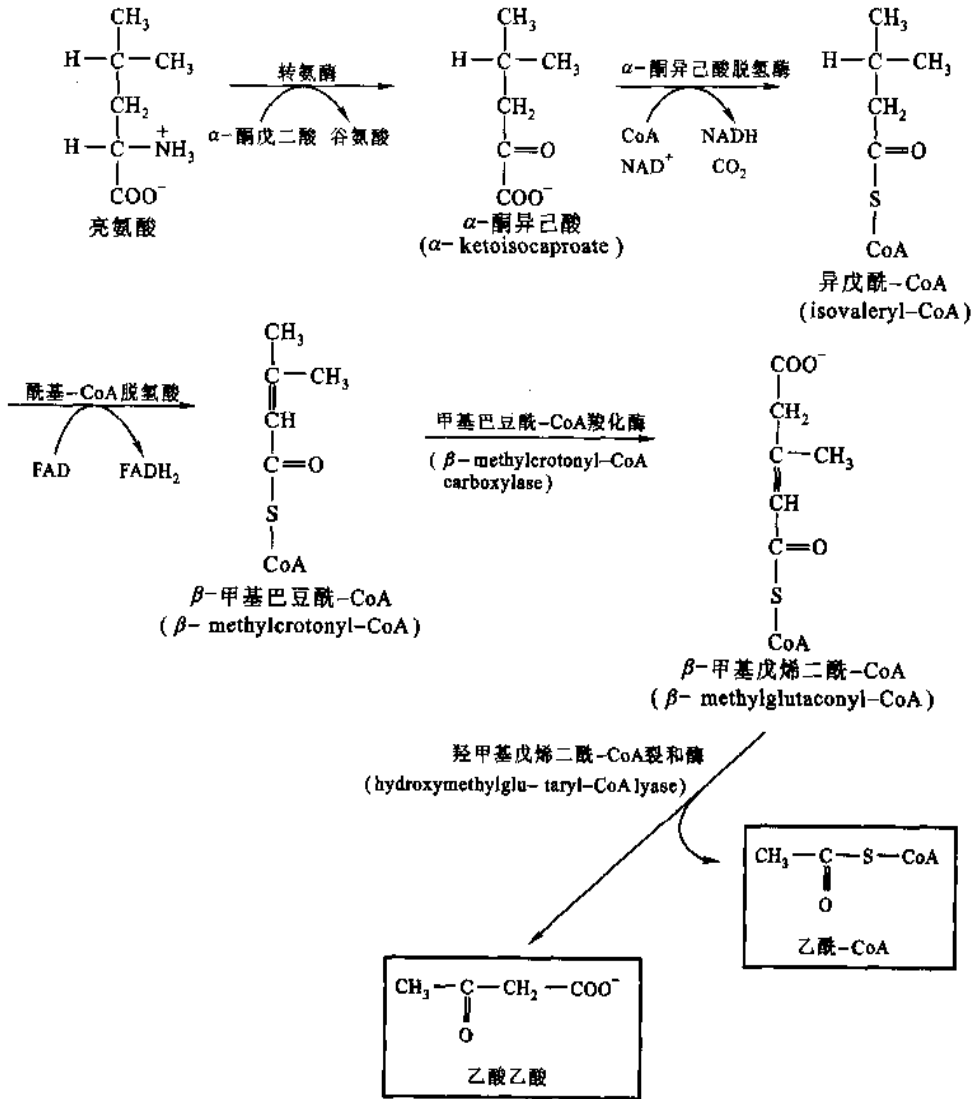


图 30-19 亮氨酸转变为乙酰-CoA 和乙酰乙酸途径

(pyrrolase), 该酶含有铜和血红素。人类患色氨酸 2,3-二加氧酶遗传缺陷症, 导致智力迟钝。中间产物 3-羟犬尿氨酸在某些昆虫类用作色素的前体称为眼色素(ommochrome)。犬尿氨酸酶催化 3-羟犬尿氨酸的分解, 生成丙氨酸和 3-羟邻氨基苯甲酸, 该酶含有磷酸吡哆醛。哺乳动物缺乏维生素 B₆ 时, 在尿中排出大量的犬尿氨酸, 中间产物 3-羟邻氨基苯甲酸是尼克酸生物合成的前体。

色氨酸分解代谢的中间产物是许多其他重要物质生物合成的前体, 如 5-羟色胺 (serotonin) 是一种神经递质和血管收缩物质, 吲哚乙酸 (indoleacetic acid) 是一种植物激素, 烟酸又称尼克酸是 NAD 和 NADP 的前体(图 30-22)。

(二) α -酮戊二酸途径

如图 30-13 所示, 经 α -酮戊二酸进入柠檬酸循环的氨基酸有精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸以及谷氨酸 5 种氨基酸。它们的转变关系可概括如图 30-23 其中每个氨基酸的转变扼要分述如下:

1. 精氨酸

在精氨酸酶的作用下, 水解形成尿素和鸟氨酸, 经鸟氨酸转氨酶的作用, 将 δ -氨基转给 α -酮戊二酸, 本身转变为谷氨酸 γ -半醛; 再经脱氢酶的作用形成谷氨酸, 反应步骤参看图 30-24。谷氨酸转氨或氧化脱氨又形成 α -酮戊二酸。

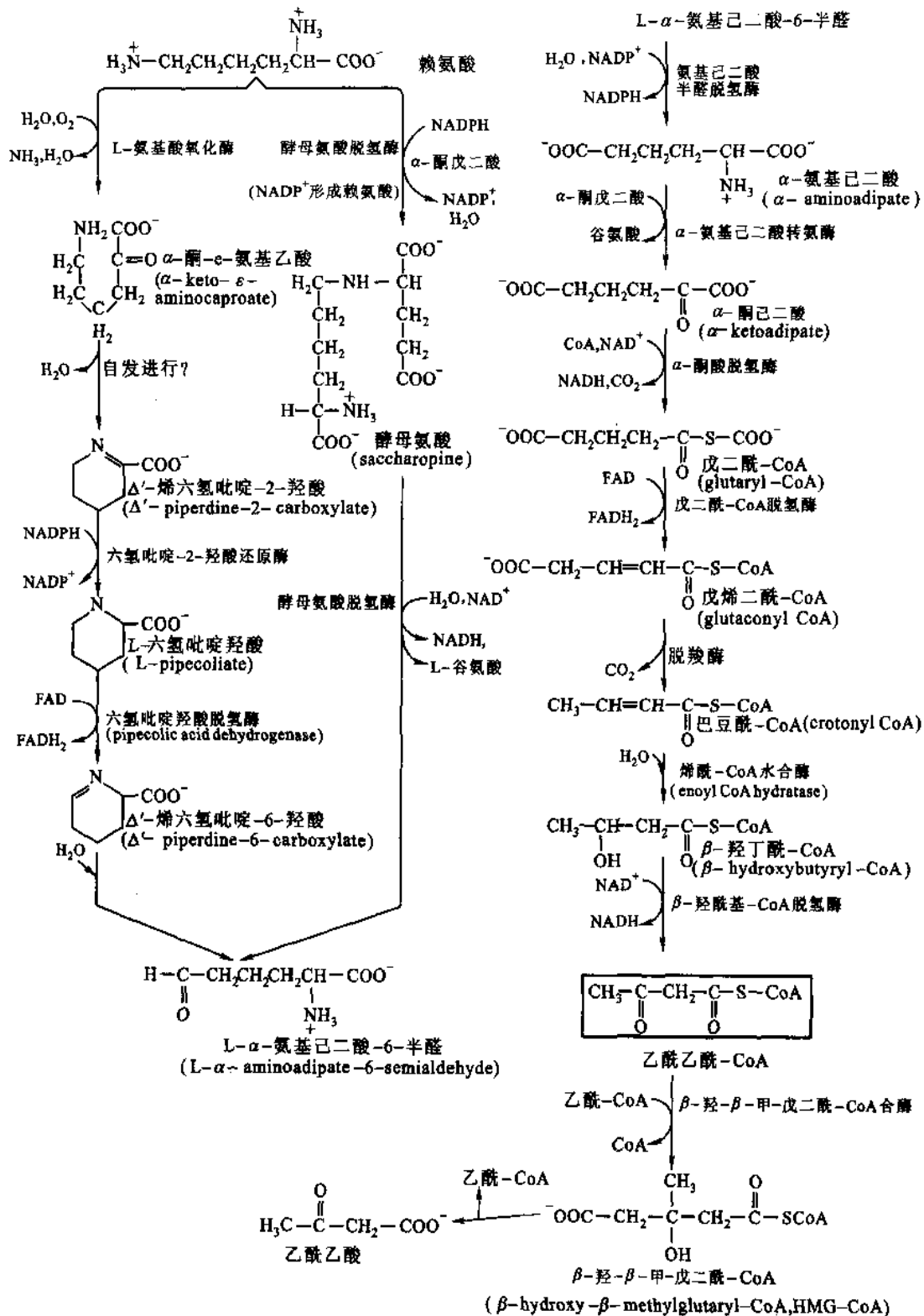


图 30-20 赖氨酸转变为乙酰乙酰-CoA

由赖氨酸变为 α -氨基己二酸半醛有两条不同路线,在肝脏占优势的是形成中间产物酵母氨酸途径

2. 组氨酸

经组氨酸氨裂合酶(histidine ammonia lyase)的作用,移去(α, β)一分子 NH_3 ,转变为尿刊酸(urocanic acid),再经尿刊酸水合酶(urocanate hydratase)作用,形成(4-咪唑酮-5-丙酸(4-imidazolone 5-propionate),这步转变包括加入水分子和分子内部的氧化还原反应。咪唑酮丙酸酶催化水解使咪唑酮丙酸转变为N-甲亚氨基谷氨酸(N-formimino glutamic acid),后者在谷氨酸转甲亚氨酶(glutamate transformiminase)作用下,将甲

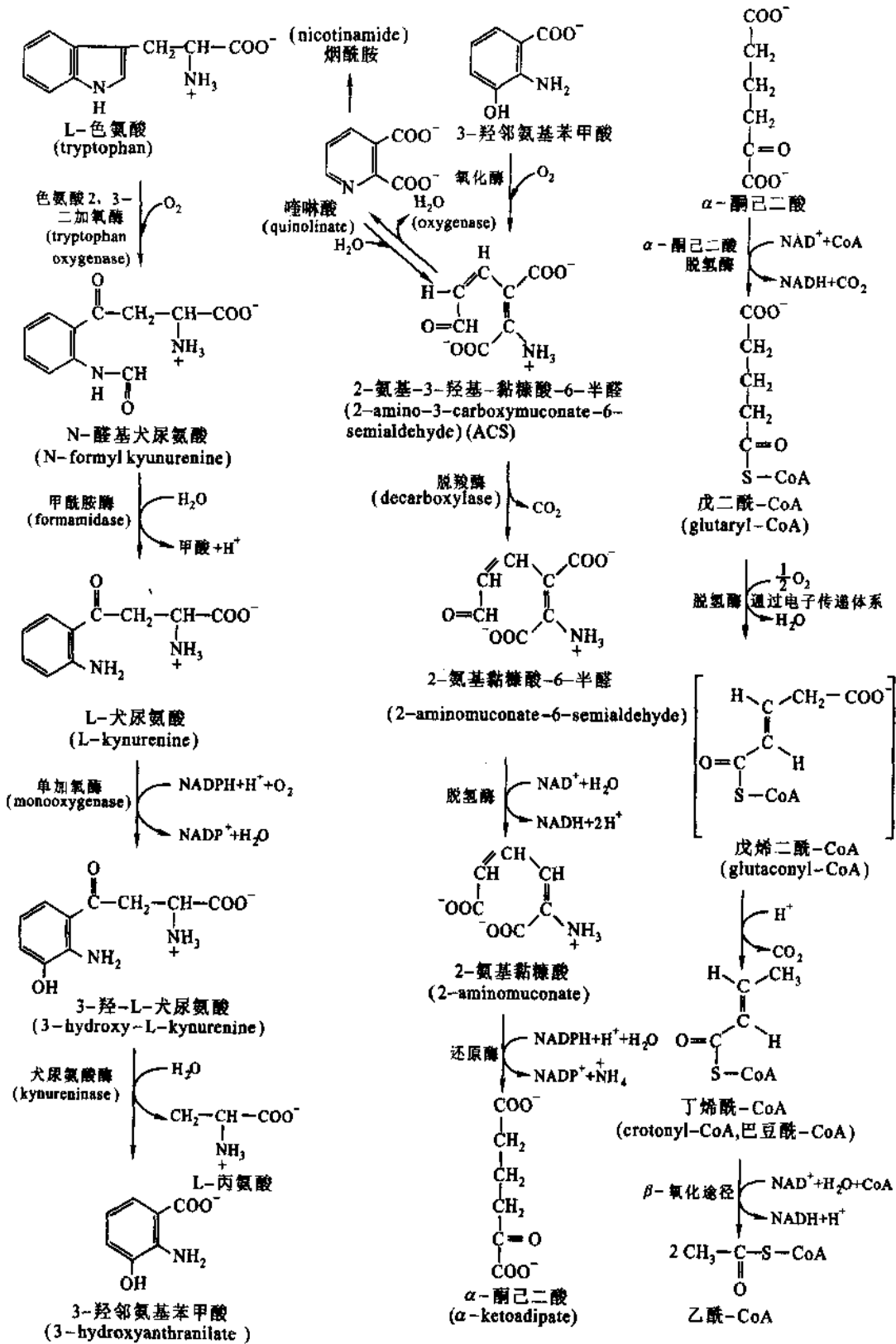


图 30-21 色氨酸的分解代谢形成 2 分子酰 - CoA 的途径

亚氨基转移到四氢叶酸的第 5 位 N 原子上, 本身转变为谷氨酸、组氨酸转变为谷氨酸的全过程如图 30-25 所示。

3. 谷氨酰胺

可有三条途径形成谷氨酸, 再形成 α-酮戊二酸。

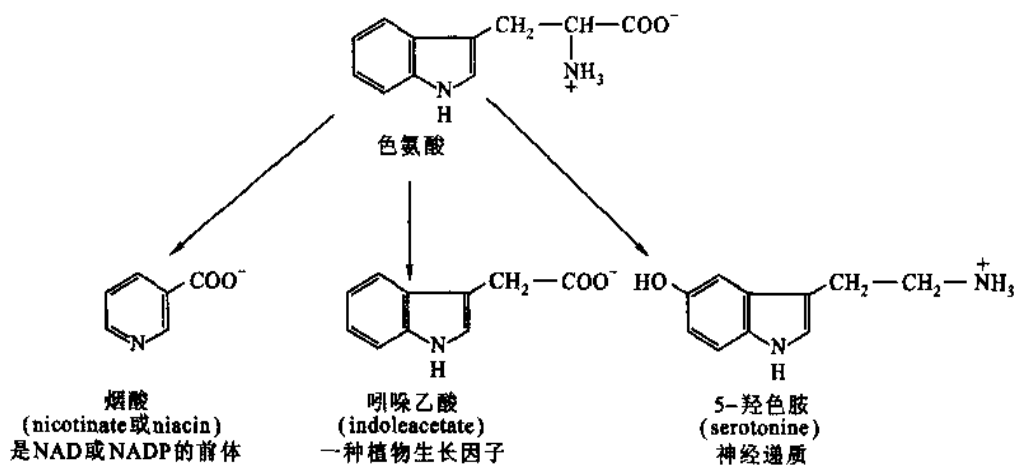


图 30-22 色氨酸的重要衍生物

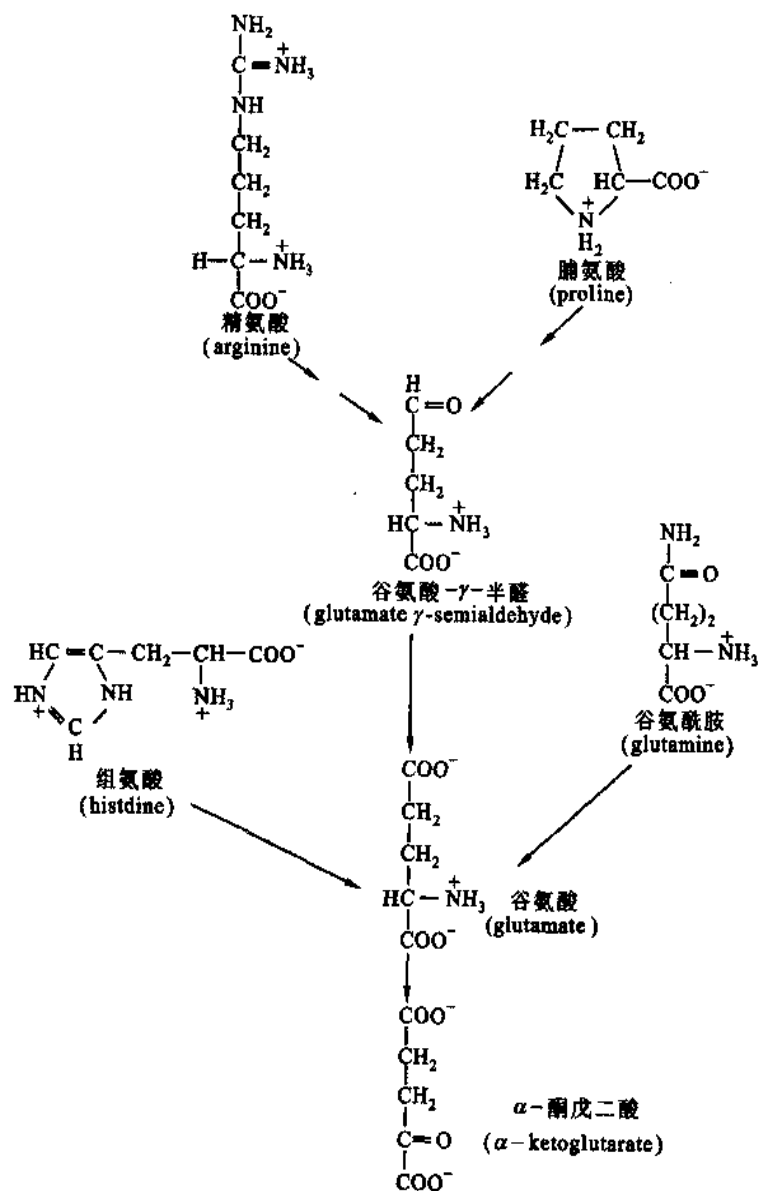


图 30-23 精氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸和谷氨酸形成 α -酮戊二酸的途径

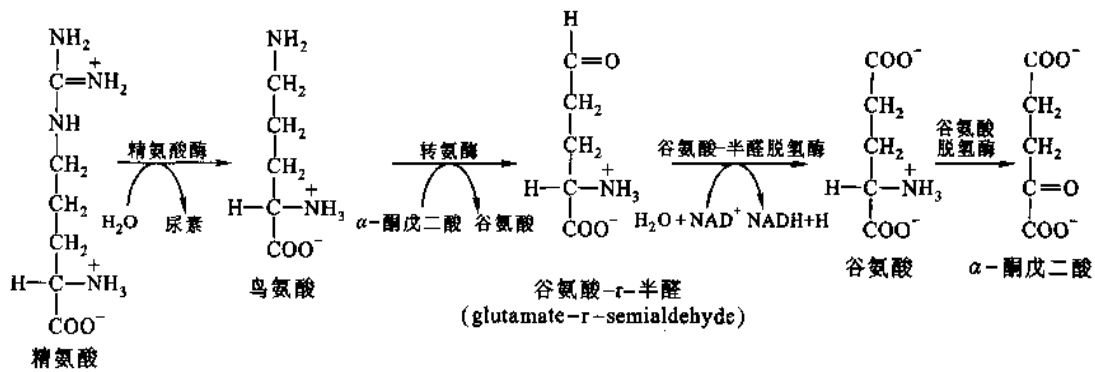


图 30-24 精氨酸形成 α-酮戊二酸的途径

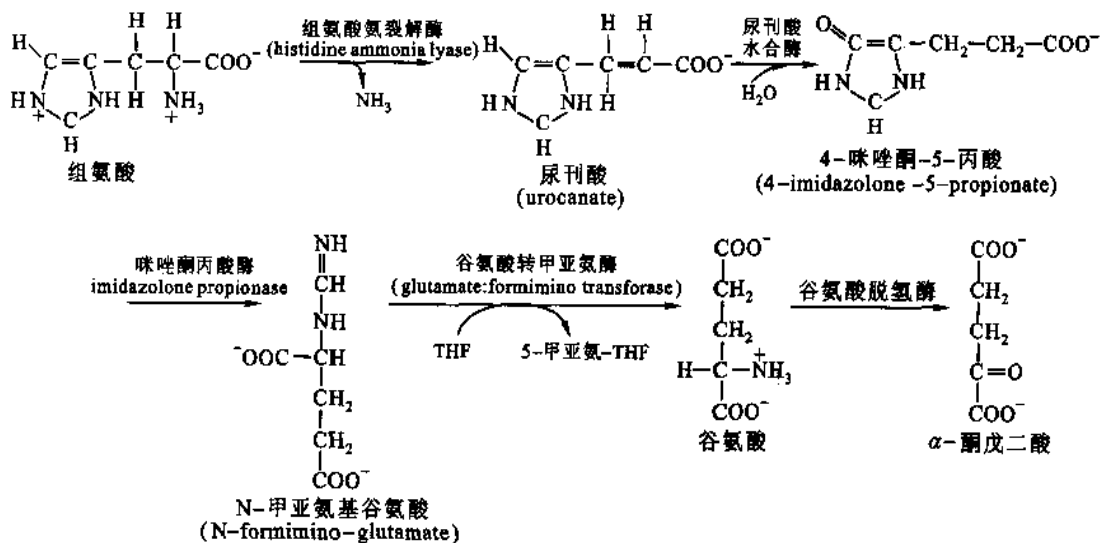
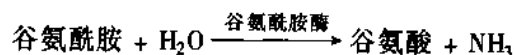
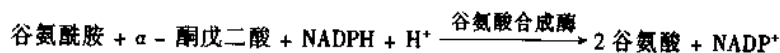


图 30-25 组氨酸形成 α-酮戊二酸的途径

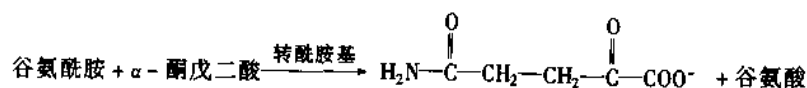
(1) 经谷氨酰胺酶水解



(2) 由谷氨酸合成酶催化,借助 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 的还原作用,使 α-酮戊二酸与谷氨酰胺转变为 2 分子谷氨酸



(3) 与 α-酮戊二酸的 γ-位羧基转氨形成 γ-酮谷酰胺酸(α-ketoglutaric acid),又进而水解形成 α-酮戊二酸和氨



4. 脯氨酸和羟脯氨酸

如图 30-26 所示,经氧化、加水等步骤形成谷氨酸 γ-半醛,再脱氢形成谷氨酸。

值得提出的是羟脯氨酸的转变与脯氨酸有所不同,它的分解产物是丙酮酸和乙醛酸,参看图 30-26。但在脯氨酸和羟脯氨酸开始分解到形成 γ-羟谷氨酸的过程,二者的分解方式是类似的,脯氨酸则形成谷氨酸。

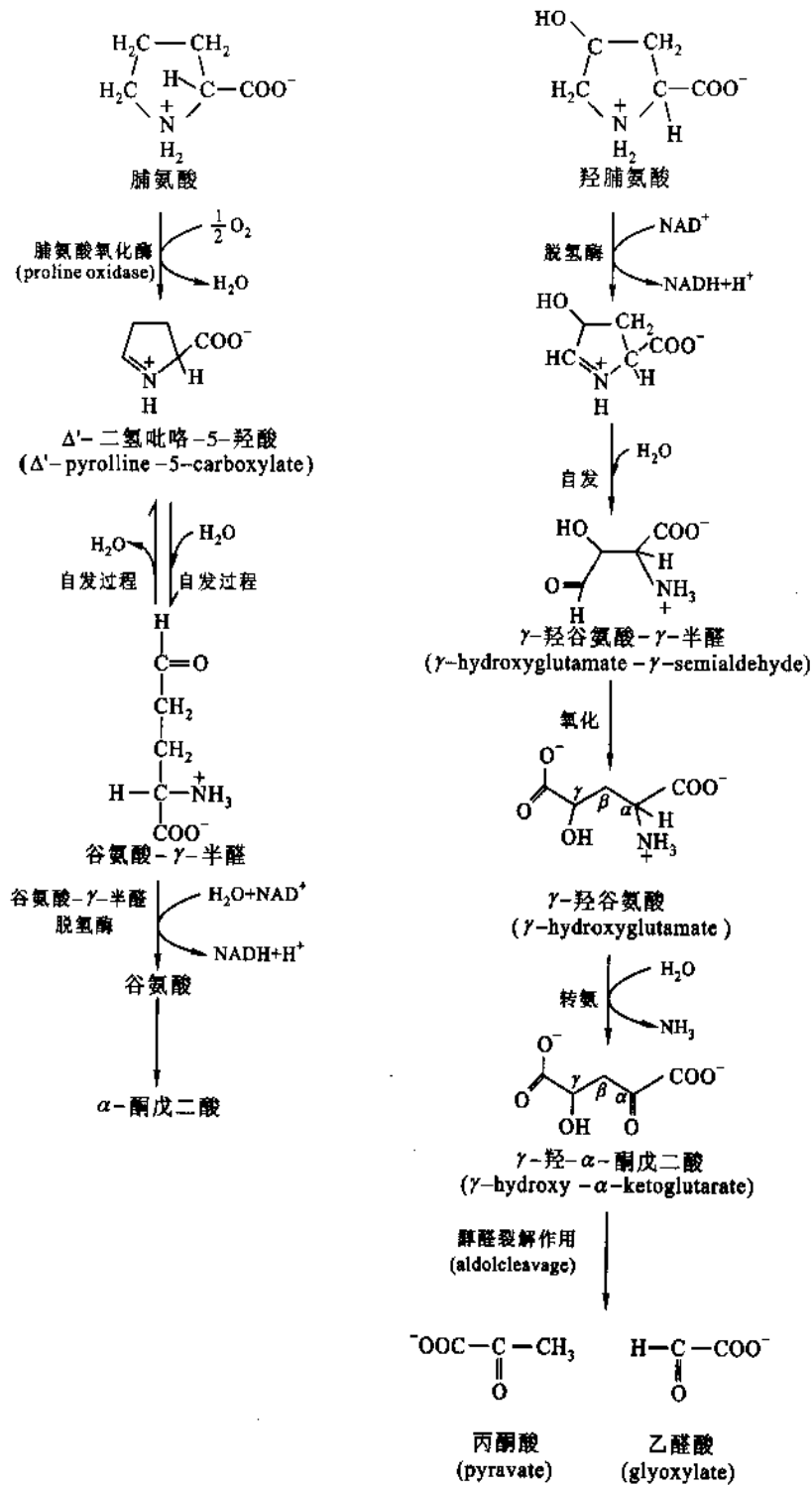


图 30-26 脯氨酸和羟脯氨酸的分解途径

5. 谷氨酸

经谷氨酸脱氢酶或经转氨都可形成 α-酮戊二酸。

(三) 形成琥珀酰-CoA 的途径

甲硫氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的碳骨架最后形成丙酰辅酶 A 和甲基-丙二酰辅酶 A, 进而转变为琥珀酰辅酶 A, 概括如图 30-27。

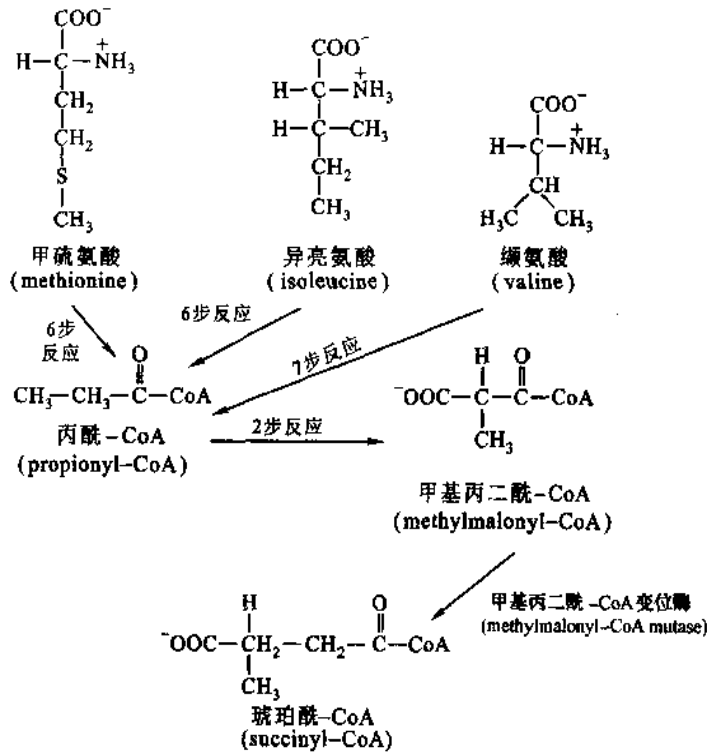


图 30-27 甲硫氨酸、异亮氨酸、缬氨酸转变为琥珀酰-CoA 的途径

1. 甲硫氨酸

甲硫氨酸转变为琥珀酰-CoA 如图 30-28 所示。

2. 异亮氨酸

其转变为琥珀酰-CoA 以及乙酰-CoA 的步骤如图 30-29 所示。

3. 缬氨酸

转变为琥珀酰-CoA 的途径如图 30-30 所示。

(四) 形成延胡索酸途径

经延胡索酸进入柠檬循环的氨基酸有苯丙氨酸和酪氨酸。这两种氨基酸的分解已在图 30-17 和图 30-18 中表明,在分解过程中,其芳香环的降解通过氧化酶的作用,苯丙氨酸羟化酶为单加氧酶,以四氢蝶呤为还原剂,中间产物 4-延胡索酰乙酰乙酸由延胡索酰乙酰乙酸酶催化,形成两个产物,一个是乙酰乙酸,另一个是延胡索酸。因此,苯丙氨酸和酪氨酸分子都是通过两条途径进入柠檬酸循环的,一条是通过乙酰乙酰-CoA 再形成乙酰-CoA 的途径,另一条则是延胡索酸途径。

(五) 形成草酰乙酸途径

天冬酰胺和天冬氨酸可转变为草酰乙酸而进入柠檬循环。天冬酰胺先转变为天冬氨酸,然后再经转氨作用而形成草酰乙酸。催化天冬酰胺转变为天冬氨酸和氨的酶称为天冬酰胺酶(asparaginase)(图 30-31)。天冬酰胺酶在动、植物组织中分布很广。静脉注射天冬酰胺酶对控制某些白血病人的症状有一定效果,可能是由于该酶限制恶性白细胞利用天冬酰胺。

植物和某些微生物的天冬氨酸还可直接脱氨形成延胡索酸。催化此反应的酶为天冬氨酸氨裂解酶(aspartate ammonia lyase),该酶在动物组织中不存在。

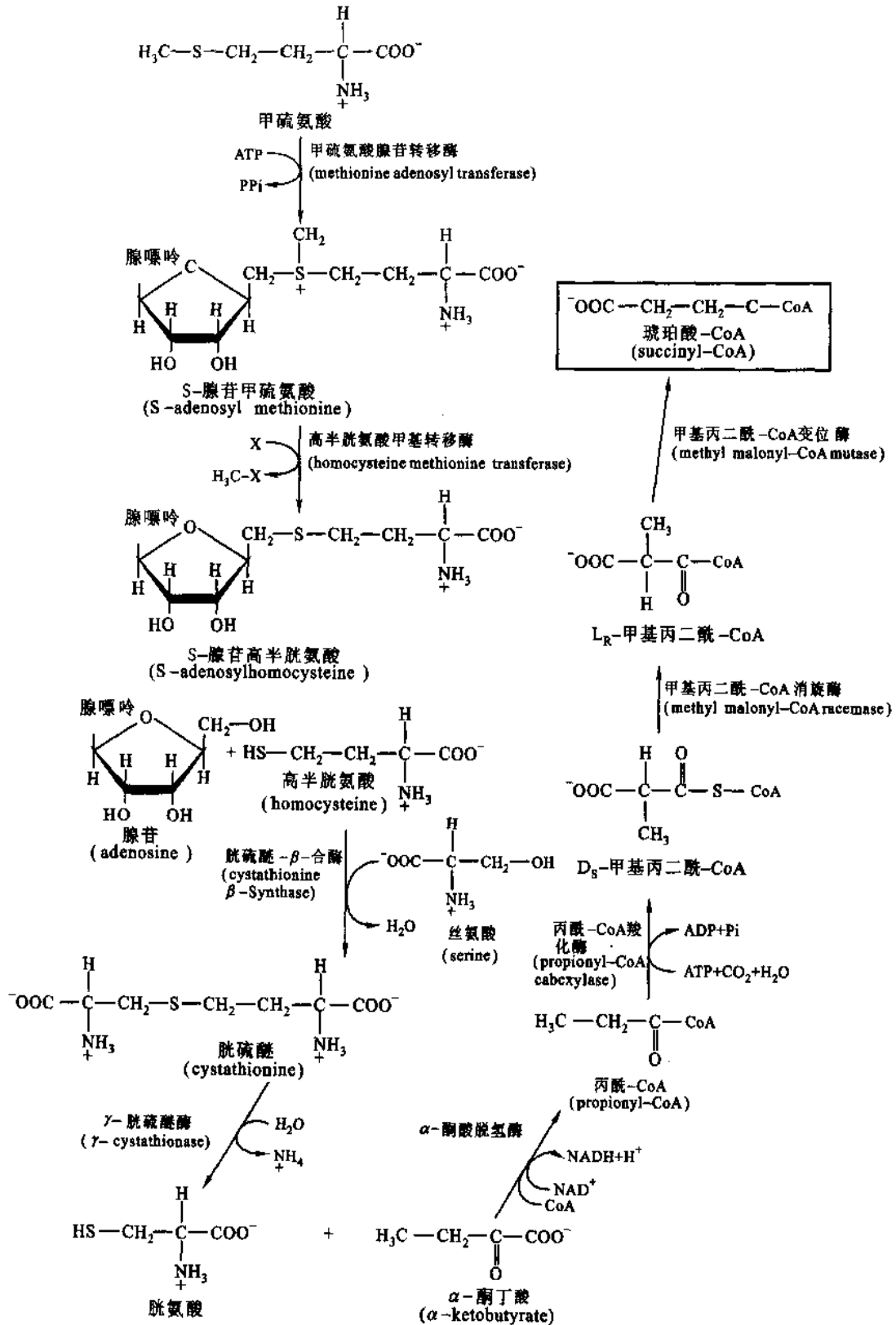


图 30-28 甲硫氨酸转变为琥珀酰-CoA 的途径

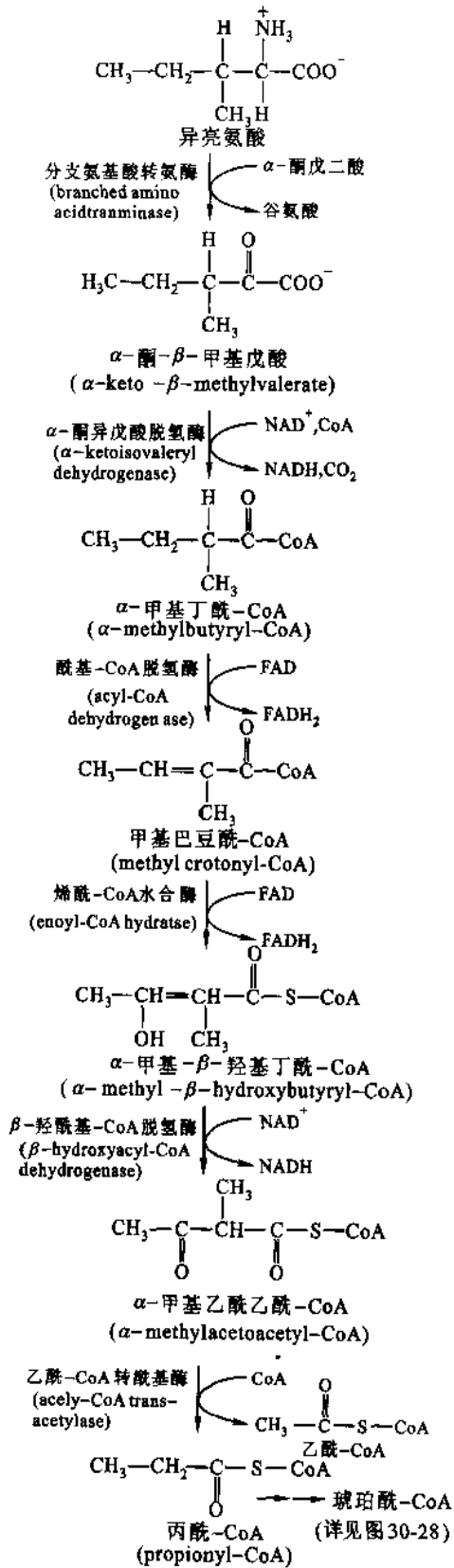


图 30-29 异亮氨酸转变为琥珀酰-CoA 以及乙酰-CoA 的途径

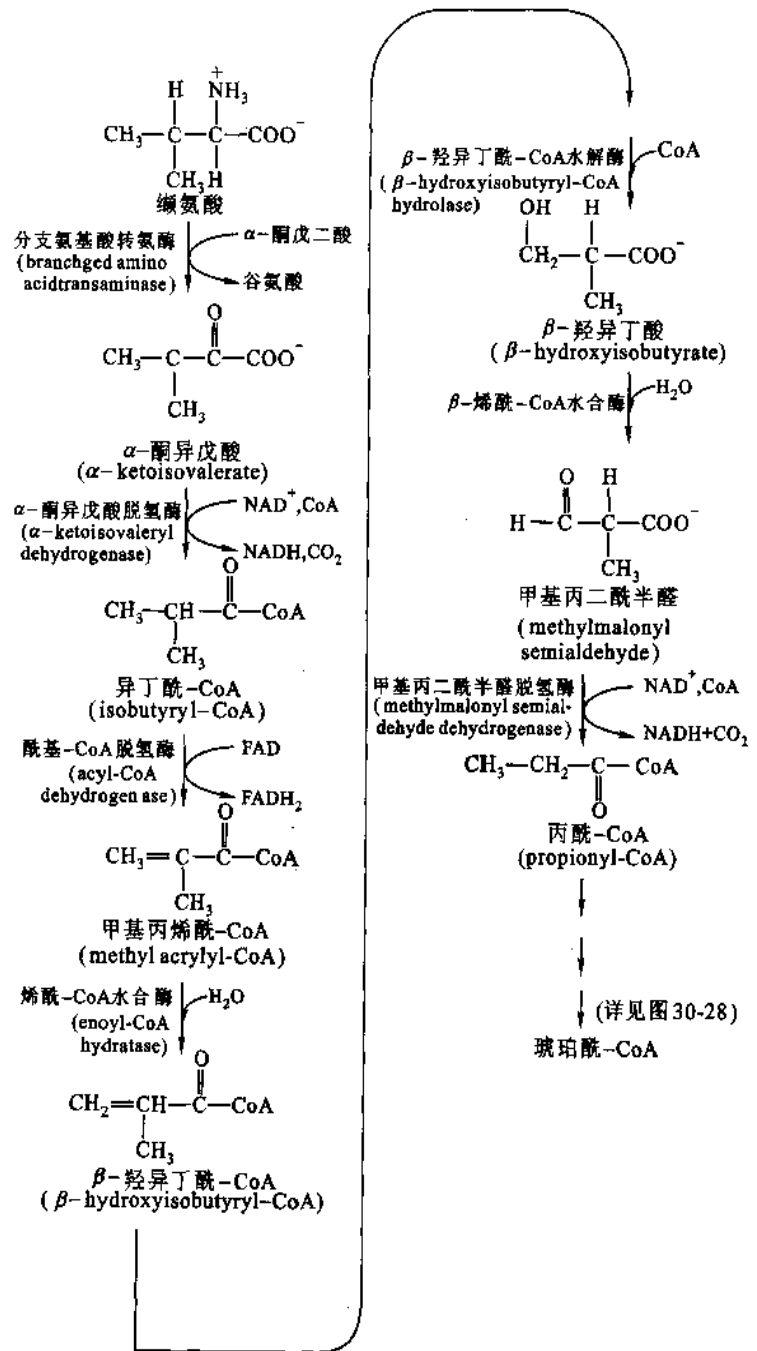


图 30-30 缬氨酸转变为琥珀酰-CoA 的途径

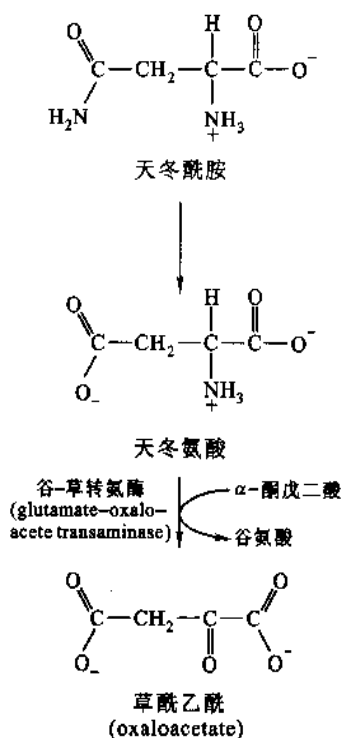


图 30-31 天冬酰胺和天冬氨酸转变为草酰乙酸的途径

五、生糖氨基酸和生酮氨基酸

有些氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、色氨酸，在分解过程中转变为乙酰乙酰 - CoA，而乙酰乙酰 - CoA 在动物的肝脏中可变为乙酰乙酸和 β -羟丁酸，因此这 5 种氨基酸称为生酮氨基酸 (ketogenic amino acids)。糖尿病人的肝脏所形成的大量酮体，除来源于脂肪酸外，还来源于生酮氨基酸。

凡能形成丙酮酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸和草酰乙酸的氨基酸都称为生糖氨基酸 (glucogenic amino acids)。因为这些物质都能导致生成葡萄糖和糖原 (参看第 26 章)。

有的氨基酸如苯丙氨酸和酪氨酸，既可生成酮体又可生成糖，因此，称为生酮和生糖氨基酸。

还有些氨基酸如丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸，也可通过形成乙酰 - CoA 后进而形成乙酰乙酸，因此，生酮氨基酸和生糖氨基酸的界限并不是非常严格的。

六、由氨基酸衍生的其他重要物质

(一) 氨基酸与一碳单位

生物化学中将具有一个碳原子的基团称为“一碳单位”(one carbon unit)或“一碳基团”(one carbon group)。

生物体内的一碳单位有许多形式，例如：

① 亚氨基 - COHNH (formimino-)

② 甲酰基 - $\text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ (formyl-)

③ 羟甲基 - CH_2OH (hydroxymethyl-)

④ 亚甲基又称(甲叉基) - CH_2- (methylene-)

⑤ 次甲基(又称为甲川基) - CH = (methenyl)

⑥ 甲基 - CH₃(methyl -)

许多氨基酸都可作为一碳单位来源,如甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸和组氨酸等。

一碳单位不只与氨基酸代谢密切相关,还参与嘌呤和嘧啶的生物合成以及 S-腺苷甲硫氨酸的生物合成。它是生物体各种化合物甲基化的甲基来源。

许多带有甲基的化合物在生物学上都有重要功能。如肾上腺素、肌酸、卵磷脂等。嘌呤和嘧啶又是合成核酸的重要成分。

一碳单位的转移靠四氢叶酸(5,6,7,8-tetrahydrofolate),用符号 THF 表示,曾用 HF₄ 表示,携带甲基的部位是在 N⁵,N¹⁰位(参看维生素章叶酸部分)。

一碳单位的转移靠四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF) THF 是一个 6-甲基蝶呤(6-methylpterin)的衍生物,依次与对-氨基苯甲酸(p-aminobenzoic acid)和谷氨酸残基相连(图 30-32)。四氢叶酸有附加的 5 个谷氨酸残基与第 1 个谷氨酸残基通过异肽键(isopeptide bonds)相连,形成多谷氨酸尾部。

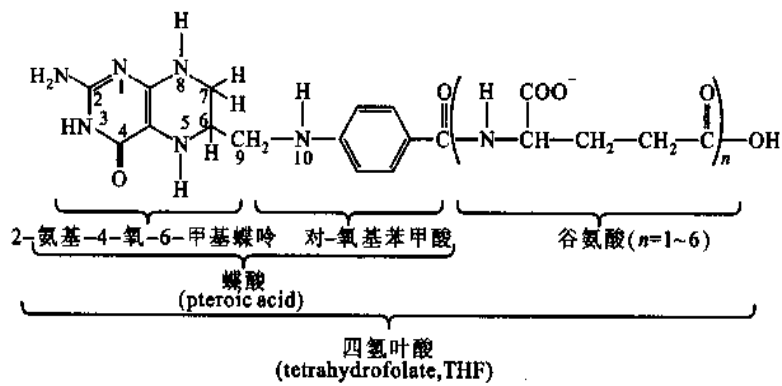


图 30-32 四氢叶酸结构图

一碳单位与 THF 在 N-5, N-10, 或 N-5 和 N-10 位以共价相连。与 THF 相连的一碳单位可处于不同的氧化水平,如甲酸(formate)、甲醛(formaldehyde)或甲醇(methanol)等,在氧化还原酶的催化下,可以互相转化(图 30-33)。

氨基酸和一碳单位的关系可列举如下:

- ① 甘氨酸脱氨基生成乙醛酸后,与 THF 反应生成 N⁵,N¹⁰-次甲基 THF。
- ② 苏氨酸可分解为甘氨酸和乙醛,所以苏氨酸是通过甘氨酸形成一碳单位。
- ③ 丝氨酸分子上的 β-碳原子可转移到 THF 上,同时脱去一分子水,生成 N⁵,N¹⁰-亚甲基 THF (N⁵,N¹⁰-CH₂-THF)。丝氨酸的 β-碳原子转移后变为甘氨酸。所以丝氨酸既可直接与 THF 作用形成一碳衍生物,又可通过甘氨酸途径形成 N⁵,N¹⁰-次甲基 THF(N⁵,N¹⁰)。

④ 组氨酸在分解过程中形成亚氨甲酰谷氨酸(N-formimino glutamate)后与 THF 作用,将亚氨甲酰基转移到 THF 上,形成亚氨甲酰 THF,再脱去氨后即形成 N⁵,N¹⁰-次甲基四氢叶酸

⑤ 甲硫氨酸活化为 S-腺苷甲硫氨酸即可提供甲基。高半胱氨酸又可自四氢叶酸接受甲基而形成甲硫氨酸。

生物体内合成胆碱、肌酸、肾上腺素等所需的甲基都是由 S-腺苷甲硫氨酸提供。S-腺苷甲硫氨酸是大约 50 种不同甲基受体的供给者。催化甲基转移的酶称为甲基转移酶,脱甲基后的产物是 S-腺苷高半胱氨酸。虽然甲硫氨酸是甲基的供给者(donor),但是,甲硫氨酸的甲基却只能由极少数反应提供,主要途径是从 N⁵-甲基四氢叶酸的甲基转移到高半胱氨酸上。

一碳单位还可参与嘌呤和胸腺嘧啶合成。

如上所述,甲基的转移靠四氢叶酸。叶酸是四氢叶酸的前身。人体所需叶酸来源于食物,因体内没有合成叶酸的酶,而细菌所需叶酸靠自身合成。叶酸分子的组成成分之一是对-氨基苯甲酸。常用的磺胺类

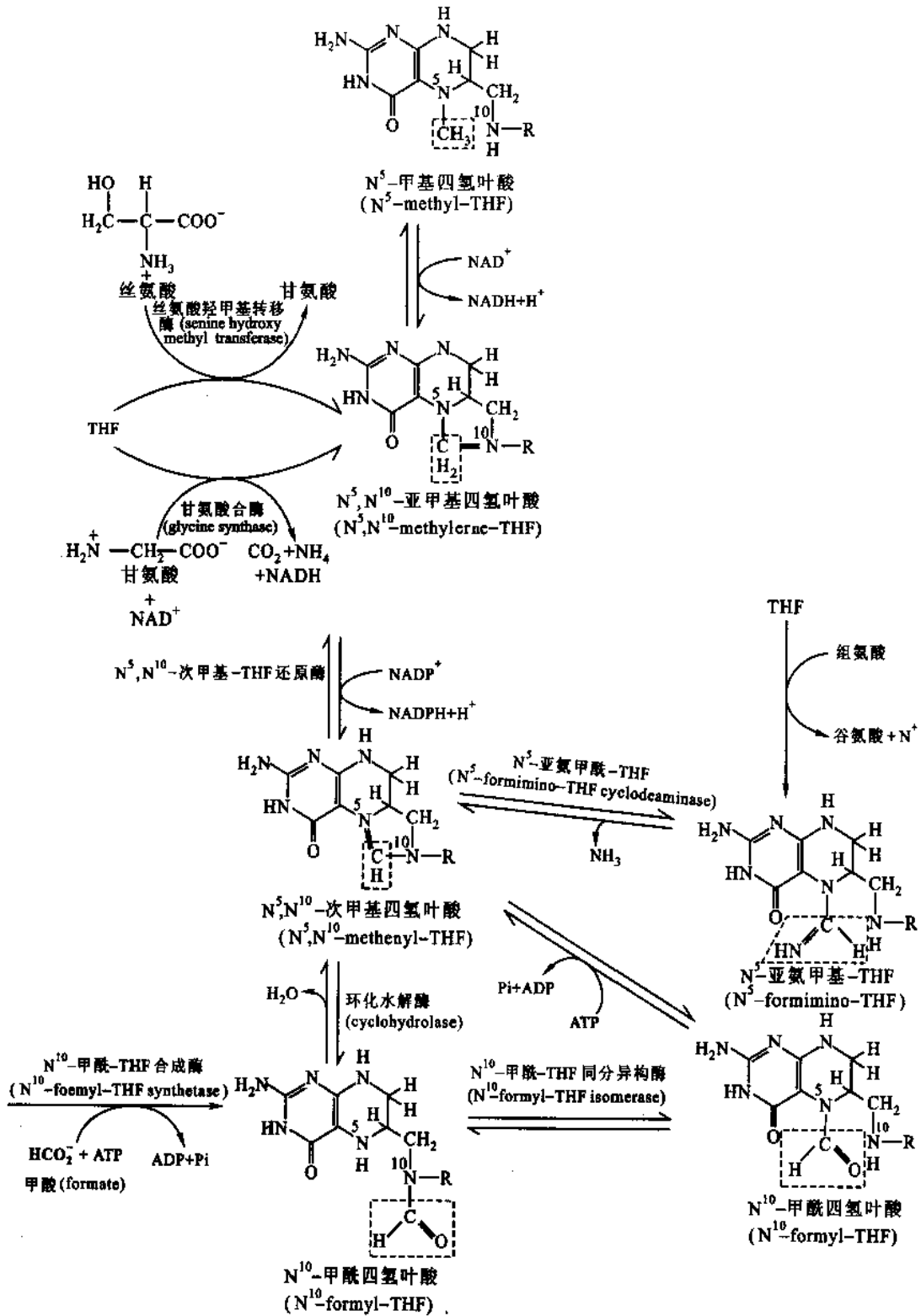


图 30-33 与四氢叶酸结合的 1 碳单位的转变形式

药物是对 - 氨基苯甲酸的颞颥剂, 因此能抑制细菌的生长, 而对人体影响不大。抗叶酸药物如三甲氧苄二氮嘧啶 (trimethoprim, TMP) 等二氢叶酸类似物, 能抑制二氢叶酸还原酶的活性从而影响叶酸还原为四氢叶酸。若将甲氧苄氮嘧啶与磺胺药共同使用, 可明显增强药力并减少两种药物的用量。这类药物称为“增效剂”。

(二) 氨基酸与生物活性物质

有些氨基酸在神经系统活动中起着重要作用,它们本身都属于生物活性物质,此外,生物体在生命活动中还需要由氨基酸合成许多其他生物分子来调节代谢及生命活动。这类生物分子,少量就能发挥明显的生物功能,因此称为生物活性物质。表 16-2 列举了一部分由氨基酸来源的生物分子。

表 30-2 氨基酸来源的生物活性物质

氨基酸	转变产物	生物学作用	备注
甘氨酸	嘌呤碱	核酸及核苷酸成分	与 Gln、Asp、一碳单位 CO ₂ 共同合成
	肌酸	组织中储能物质	与 Arg、Met 共同合成
	卟啉	血红蛋白及细胞色素等辅基	与琥珀酰-CoA 共同合成
丝氨酸	乙醇胺及胆碱	磷脂成分	胆碱由 Met 提供甲基
	乙酰胆碱	神经递质	
半胱氨酸	牛磺酸	结合胆汁酸成分	
天冬氨酸	嘧啶碱	核酸及核苷酸成分	与 CO ₂ 、Gln 共同合成
谷氨酸	γ-氨基丁酸	抑制性神经递质	
组氨酸	组胺	神经递质	
酪氨酸	儿茶酚胺类	神经递质	肾上腺素由 Met 提供甲基
	甲状腺激素	激素	
	黑色素	皮、发形成黑色	
色氨酸	5-羟色胺	神经递质促进平滑肌收缩	(即 N-乙酰-5-甲氧色胺)
	黑素紧张素	松果体激素	
	烟酸	维生素 PP	
鸟氨酸	腐胺亚精胺	促进细胞增殖	
天冬氨酸	—	兴奋性神经递质	
谷氨酸	—	兴奋性神经递质	

下面列举几种生物分子的形成机制:

1. 酪氨酸代谢与黑色素(melanin)的形成

酪氨酸在酪氨酸酶(tyrosinase)作用下形成二羟苯丙氨酸(dihydroxyphenylalanine - dopa),后者是一辅助底物(cosubstrate),再被同一酶作用形成多巴醌(dopaquinone)又称苯丙氨酸-3,4-醌(phenylalanine-3,4-quinone)。极少量的多巴醌能起到催化作用,酮式的苯丙氨酸-3,4-醌是不稳定物质,自发进行一系列反应形成吲哚-5,6-醌(indole-5,6-quinone),后者聚合形成黑色素(melanin pigment)(图 30-34)。

2. 酪氨酸代谢和肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴及多巴胺的形成

肾上腺素和去甲肾上腺素最早发现于肾上腺髓质,其生理功能除对心脏、血管有作用(参看第 8 章激素)外,还发现它们与多巴(dopa)、多巴胺(dopamine)这些由酪氨酸衍生来的系列物,都在神经系统中起重要作用。它们和神经活动、行为以及大脑皮层的醒觉和睡眠节律等都有关系。

肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴及多巴胺由酪氨酸的衍生途径如图 30-35。

肾上腺素(Ad)、去甲肾上腺素(NA)、多巴和多巴胺(DA)等统称为儿茶酚胺(Catecholamine)类物质。

3. 色氨酸代谢与 5-羟色胺及吲哚乙酸

如前所述,5-羟色胺是脊椎动物的一种神经递质,在神经系统中的含量与神经的兴奋和抑制状态有密切关系,也是一种血管收缩素。吲哚乙酸是一种植物生长激素。二者都是由色氨酸形成的,其形成途径如图 30-36 所示。

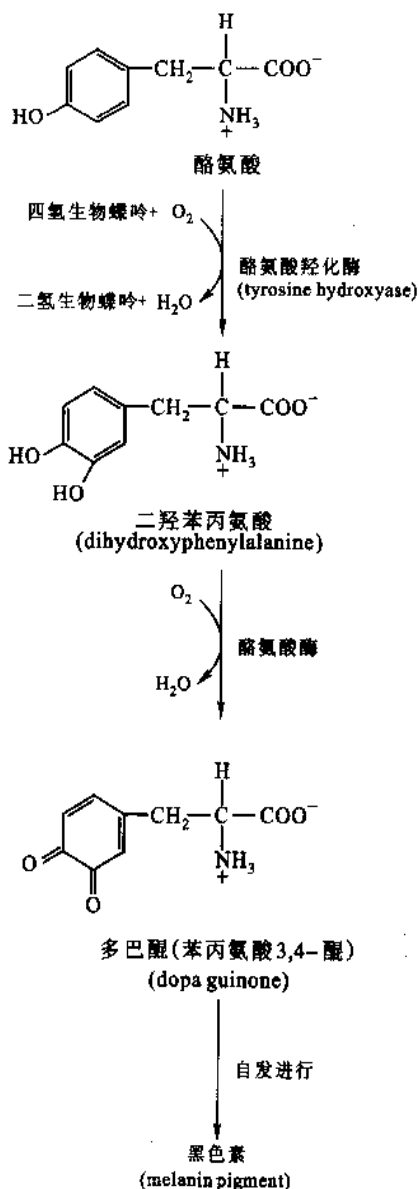


图 30-34 酪氨酸代谢与黑色素的形成

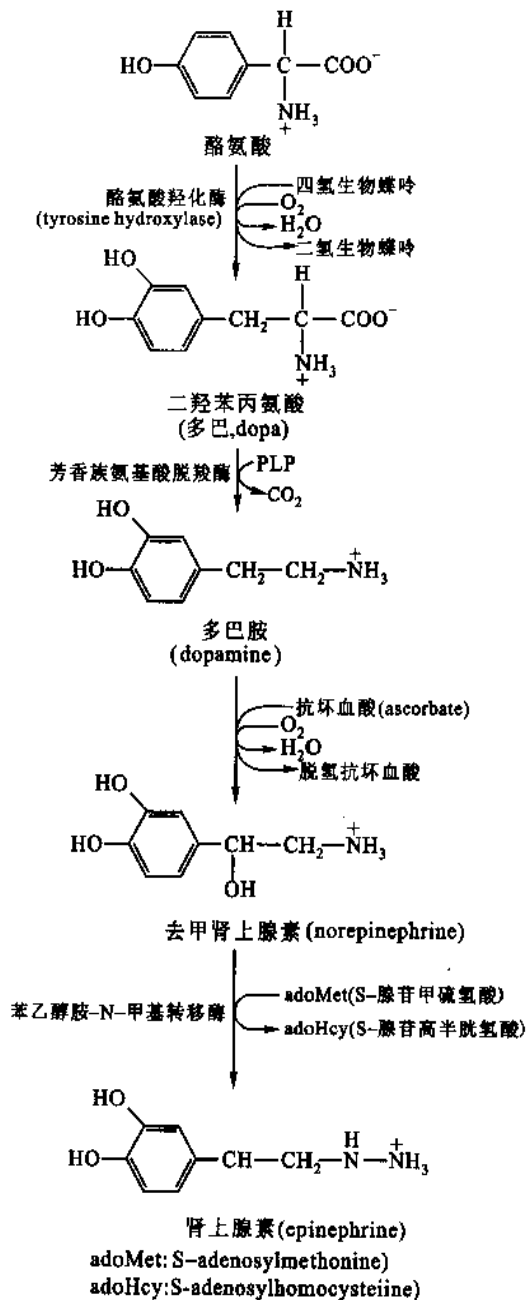


图 30-35 酪氨酸形成多巴、多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素的途径

4. 肌酸和磷酸肌酸的形成

肌酸存在于动物的肌肉、脑和血液。既可以游离形式存在,也可以磷酸化形式存在。后者称为磷酸肌酸。肌酸和磷酸肌酸在贮存和转移磷酸键能中起重要作用(参看第 20 章生物能学)。参与肌酸合成的有 3 种氨基酸:精氨酸、甘氨酸和甲硫氨酸。合成反应如图 30-37 所示。

5. 组胺的形成

肺、肝、胃黏膜的壁细胞、肌肉、乳腺及神经组织都有组胺存在。它是一种强烈的血管舒张物质,浓度过高可引起虚脱。创伤性休克或炎症病变部位都有组胺释放。它还有刺激胃黏膜分泌胃蛋白酶和胃酸的作用。在神经组织中它是感觉神经的一种递质,和周围神经的感觉与传递有密切关系。

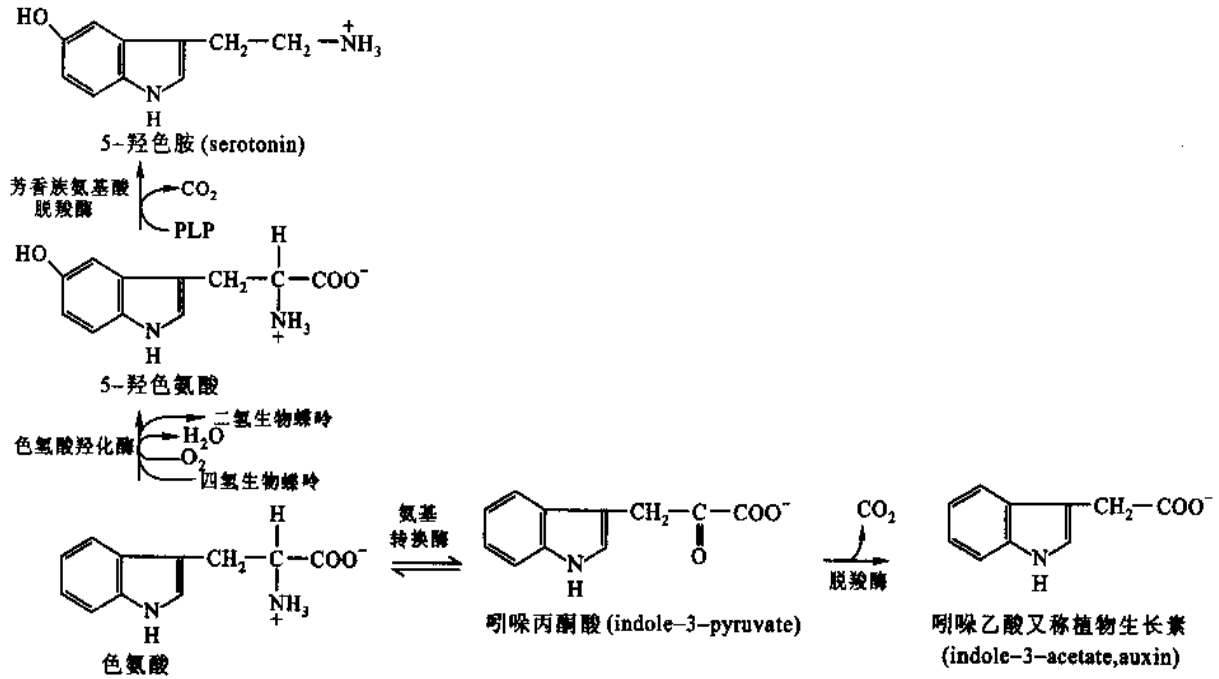


图 30-36 由色氨酸形成 5-羟色胺及吲哚乙酸的途径

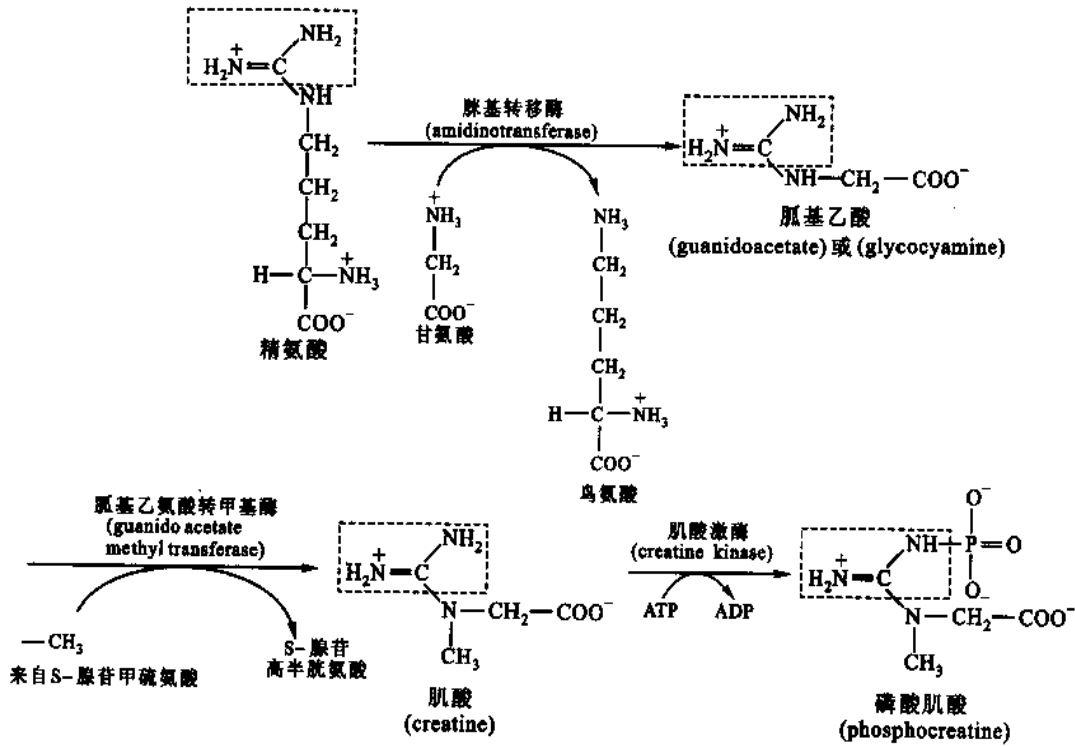
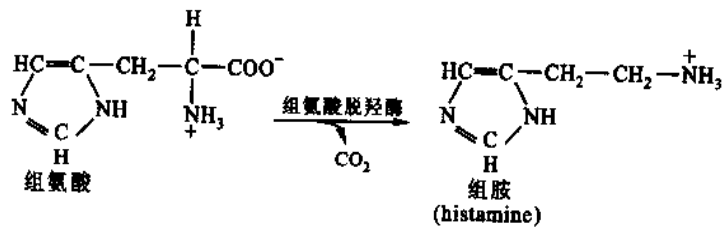


图 30-37 精氨酸、甘氨酸、甲硫氨酸形成磷酸肌酸的途径

组胺是组氨酸脱羧基的产物,它的形成如下式:



6. 腐胺、精胺、亚精胺(精脒)的形成

腐胺(putrescine)名称的起源是因为它发现于腐败的肉中。它是鸟氨酸脱羧的产物,鸟氨酸来源于精氨酸的水解。

亚精胺(spermidine)和精胺(spermine)名称的来源是因为它们发现于人的精液。这两种物质在法律上一直用于鉴定犯罪事实。但它们的结构直至1926年才弄清。近20年来才了解到亚精胺、精胺和腐胺广泛存在于各种组织,而且可能具有重要的功能。它们总是与核酸并存,可能在转录和细胞分裂的调节中起作用。

亚精胺来源于腐胺。三者的形成途径如图30-38所示。

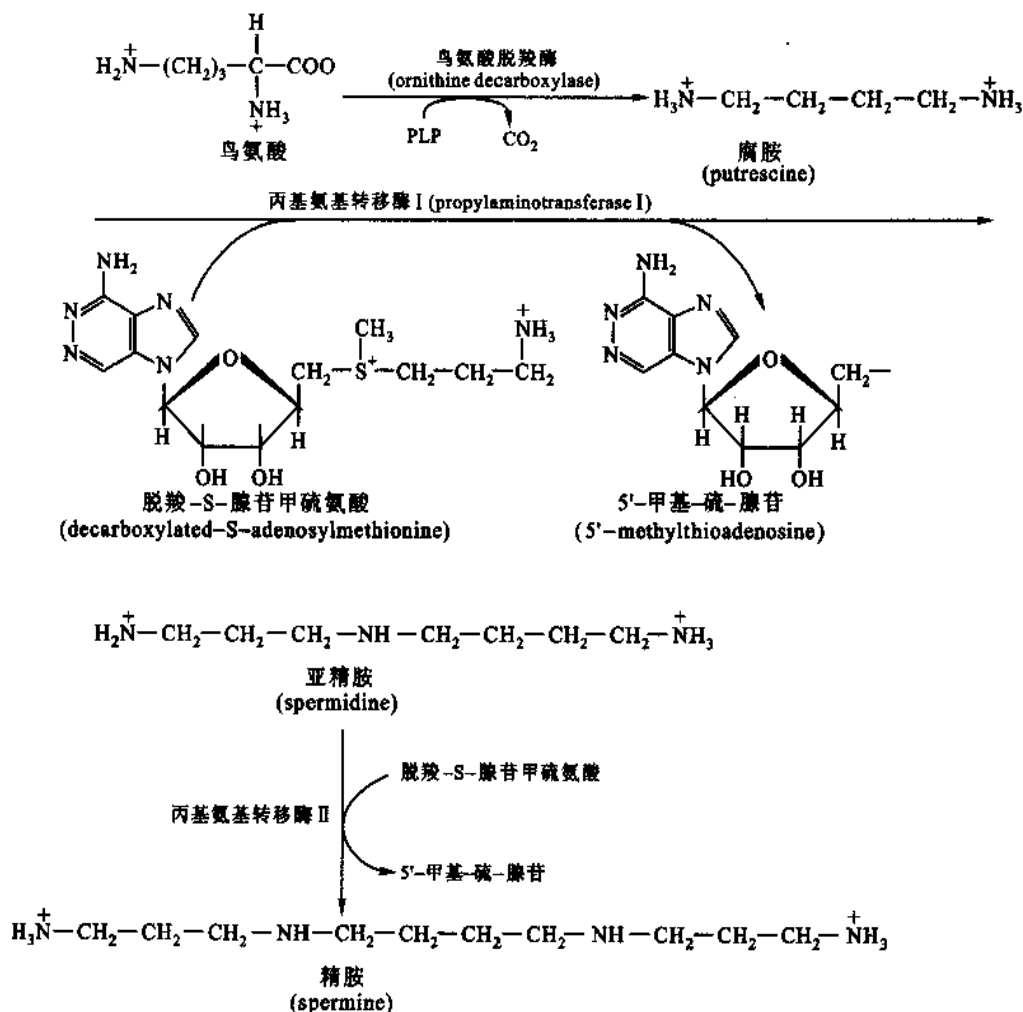


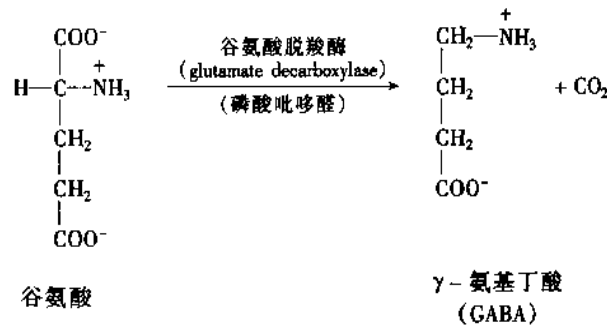
图30-38 腐胺、亚精胺和精胺的形成途径

亚精胺和精胺的分子中,含有许多氨基,因此又统称多胺(polyamine)。

7. 谷氨酸和 γ -氨基丁酸

谷氨酸在动物脑中含量占全身各组织的首位。在脑和脊髓中是一种广泛存在的具有兴奋作用的神经递质。谷氨酸脱羧形成 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid),简称GABA,可增加突触后神经细胞膜对 Na^+ 的通透性,使神经膜超极化,从而提高动作电位的启动阈值,因此,是脑组织中具有抑制作用的神经递质。

γ -氨基丁酸的形成途径如下:



γ -氨基丁酸并非氨基酸中唯一的抑制性神经递质,甘氨酸、牛磺酸等也都是不同程度的抑制性神经递质。谷氨酸也并非唯一的兴奋性神经递质,天冬氨酸也有类似的作用。

8. 牛磺酸和半胱氨酸

牛磺酸来源于半胱氨酸氧化脱羧,反应参看图 30-15:

牛磺酸是某些胆酸的组分,也被认为是一种抑制性神经递质。

七、氨基酸代谢缺陷症

氨基酸代谢中缺乏某一种酶,都可能引起疾患,这种疾病称为代谢缺陷症。由于某种酶的缺乏,致使该酶的作用物在血中或尿中大量出现。这种代谢缺陷属于分子疾病。其病因和 DNA 分子突变有关,往往是先天性的,又称为先天性遗传代谢病。这类先天性代谢缺陷症,大部分发生在婴儿时期,常在幼年导致死亡,发病的症状表现有智力迟钝、发育不良、周期性呕吐、沉睡、搐溺、共济失调及昏迷等。目前已发现的氨基酸代谢病已达 30 多种。表 30-3 列举一些先天性氨基酸代谢病有关的酶,以及血或尿中出现的异常代谢产物。

表 30-3 先天性氨基酸代谢缺陷症

病名	涉及的氨基酸代谢途径	临床症状	代谢缺陷
精氨酸血和高血氨症 (argininemia and hyperammonemia)	精氨酸和尿素循环	智力迟钝,血中出现精氨酸及氨	缺乏精氨酸酶
鸟氨酸血和高血氨症 (ornithinemia and hyperammonemia)	尿素循环	新生儿死亡、昏睡、惊厥智力迟钝	缺乏氨甲酰磷酸合成酶,鸟氨酸脱羧酶
高甘氨酸血症 (hyperglycinemia)	甘氨酸	严重的智力迟钝	甘氨酸代谢系统疾患
高组氨酸血症 (hyperhistidinemia)	组氨酸	语言缺陷,某些情况有智力迟钝	组氨酸酶缺乏
枫糖尿素 (MSUD) (maple syrup urine disease) (又称分支链酮尿素)	异亮氨酸,亮氨酸,缬氨酸	新生儿呕吐、惊厥、死亡,严重的智力迟钝	分支链酮酸脱氢酶复合体缺乏
甲基丙二酸血症 (methylmalonic acidemia)	异亮氨酸,甲硫氨酸,苏氨酸及缬氨酸	除血中积累甲基丙二酸外,其他症状同上	缺乏甲基丙二酰-CoA、变位酶(有些病人对维生素 B ₁₂ 治疗有反应)
异戊酸血症 (isovaleric acidemia)	亮氨酸	新生儿呕吐、酸中毒、昏睡及昏迷,生存者智力迟钝	缺乏异戊酰-CoA 脱氢酶
高赖氨酸血症 (hyperlysinemia)	赖氨酸	智力迟钝,同时某些非中枢神经系统不正常	缺乏赖氨酸-酮戊二酸还原酶
高胱氨酸尿症 (homocystinuria)	甲硫氨酸	智力迟钝,眼疾患,血栓栓塞,骨质疏松、骨结构不正常	胱硫醚- β -合酶缺乏

续表

病名	涉及的氨基酸代谢途径	临床症状	代谢缺陷
苯丙酮尿症和高苯丙氨酸尿症 (phenylketonuria and hyperphenylalaninemia)	苯丙氨酸	新生儿呕吐,智力迟钝以及其他神经疾患	缺乏苯丙氨酸 L-单加氧酶
高脯氨酸血症 I 型 (hyperprolinemia type I)	脯氨酸	临床检验除血中含有过量脯氨酸外,未发现其他症状	缺乏脯氨酸氧化酶,脯氨酸脱氢酶
尿黑酸症 (alkaptonuria)	酪氨酸	尿中含有尿黑酸,在碱性条件下,在空气中变黑。成人皮肤和软骨变黑,发展成关节炎。	缺乏尿黑酸氧化酶
白化病 (albinism)		最普通的类型是眼皮肤白化。使头发变为白色,皮肤呈粉色。非惧光,眼睛缺少色素	缺失黑色素细胞的酪氨酸酶

上表中值得特别提出的是在苯丙氨酸代谢中由于缺乏苯丙氨酸 4-单加氧酶 (phenylalanine-4-monoxygenase) 而引起的苯丙酮尿症 (phenylketonuria, PKU 症)。这种病,在 10 000 人中即可发现一人。当机体缺乏这种酶时,苯丙氨酸的正常代谢途径 (参看图 30-17, 30-18) 即改变为在正常情况下很少起作用的第二条途径,即苯丙氨酸与 α -酮戊二酸转氨形成苯丙酮酸,聚集在血液中,最后由尿中排出体外。这是人们最早认识的一种代谢遗传缺陷症。患者若在儿童时期限制吃含有苯丙氨酸的饮食,可以防止发生智力迟钝。

尿黑酸症,是酪氨酸代谢中缺乏尿黑酸氧化酶引起 (图 30-39)。这种病人尿中含有尿黑酸,在碱性条件下暴露于氧气中即氧化并聚合成为类似黑色素的物质而使尿显黑色。因此称为尿黑酸症 (alkaptonuria),这种病人的结缔组织有不正常的色素沉着。

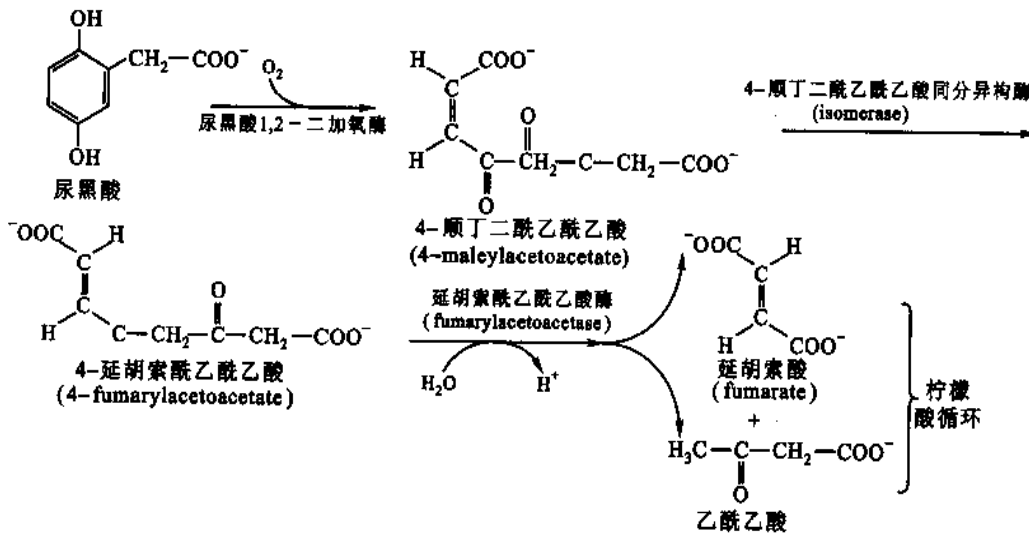


图 30-39 酪氨酸代谢中间产物尿黑酸的氧化分解途径
缺乏尿黑酸 1,2-二加氧酶导致尿黑酸症

槭糖尿症 (maple syrup urine) 名称的来源并不是由于尿中有槭糖排出,而是患者的尿有类似槭糖的气味。患者血浆及尿中出现大量支链氨基酸 (缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸) 及其相应酮酸,因此,又称为支链酮尿症。

患者出生后约一周未出现症状,喂食困难、呕吐、昏睡等,出现广泛的大脑损伤,一般在周岁死亡。

提 要

细胞不断地把氨基酸合成为蛋白质,又不断把蛋白质降解为其组成成分——氨基酸。这个过程有二重功能,其一是排除不正常的蛋白质,它们若一旦聚集,将对细胞有害;其二是通过排除积累过多的酶和“调节蛋白”,使细胞代谢得以秩序井然地进行。对正常蛋白质的降解,细胞是有选择性的。绝大多数的非正常蛋白质很可能基于它们的化学修饰及/或“这些分子不变性”而降解。细胞中蛋白质的降解速度还因它的营养及激素状态而有所差异。

真核细胞对蛋白质的降解有二体系,一是溶酶体系,另一是以细胞溶胶为基础,依赖 ATP 的机制。溶酶体系含有约 50 种水解酶,其中不少是不同种的蛋白酶。溶酶体融合细胞中的自噬泡,随即分解其内容物;溶酶体还能降解一些物质,这些物质是细胞的胞吞作用的目的物。溶酶体降解蛋白质是非选择性的,这个机制有着多样的生理功能。依赖 ATP,以细胞溶胶为基础的机制,又称泛肽标记选择性蛋白质降解。有选择性的蛋白质先以共价键与泛肽连接,这个程序的目的是“标记”氨基酸的激活,它经过 3 步反应,泛肽连接的蛋白质乃在 ATP-依赖的反应中由泛肽结合降解酶——专一降解与泛肽相接的蛋白质的水解酶催化而被降解。

氨基酸的分解代谢总是先脱去氨基。脱氨基的方式,不同生物不完全相同,氧化脱氨基作用普遍存在于动植物中,非氧化脱氨基作用主要见于微生物。转氨基作用是氨基酸脱去氨基的一种重要方式。不同氨基酸和 α -酮戊二酸的转氨形成谷氨酸在氨基酸的分解代谢中占有重要地位。催化转氨基作用的酶称为转氨酶,以磷酸吡哆醛作为辅基。与转氨作用相偶联的反应有氨基酸的氧化脱氨基作用和嘌呤核苷酸循环。谷氨酸脱氢酶将谷氨酸脱去氨基形成 NH_4^+ 和 α -酮戊二酸。 NAD^+ 或 NADP^+ 是该反应的电子受体。陆生脊椎动物将脱下的氨合成尿素。嘌呤核苷酸循环将氨基酸的 α -氨基与次黄嘌呤核苷酸结合形成腺嘌呤核苷酸,再经水解脱下氨基形成 NH_4^+ 。氨的运输形式是形成谷氨酰胺。

尿素的形成通过尿素循环,尿素的直接前体是精氨酸。精氨酸水解形成尿素和鸟氨酸,后者又与由氨、二氧化碳和 ATP 合成的氨甲酰磷酸作用,形成瓜氨酸。瓜氨酸又在天冬氨酸参与下,加入亚氨基形成精氨酸。

氨基酸的碳骨架进行氧化分解时,先形成能够进入柠檬酸循环的化合物。氨基酸可通过 5 条途径进入柠檬酸循环:通过形成乙酰-CoA。 α -酮戊二酸、琥珀酸-CoA、延胡索酸和草酰乙酸。大多数氨基酸是生糖氨基酸。两种氨基酸是生酮氨基酸。少数氨基酸既能生糖也能生酮。丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、苏氨酸都能转变为丙酮酸。天冬酰胺和天冬氨酸都能转变为草酰乙酸。 α -酮戊二酸是各氨基酸以及谷氨酰胺、组氨酸、脯氨酸和精氨酸 5 种氨基酸碳骨架的入口处,后 4 种氨基酸都可转变为谷氨酸。琥珀酰-CoA 是甲硫氨酸、异亮氨酸、缬氨酸部分碳原子的入口,这 3 种氨基酸都通过形成甲基丙二酰-CoA 转变为琥珀酰-CoA。亮氨酸可转变为乙酰乙酰-CoA 和乙酰-CoA。酪氨酸和苯丙氨酸通过两条途径进入柠檬酸循环。一条是通过乙酰乙酰-CoA 再形成乙酰-CoA,另一条是延胡索酸途径。

生物体许多重要生物分子都是由氨基酸衍生而来。氨基酸是“一碳单位”的直接提供者,此外氨基酸还是多种生物活性物质的前体,如黑色素,儿茶酚胺,5-羟色胺, γ -氨基丁酸以及肌酸等。

习 题

1. 动物体内有哪些主要的酶参加蛋白质水解反应? 总结这些酶的作用特点。
2. 氨基酸脱氨基后的碳链如何进入柠檬酸循环?
3. 有一种遗传病人,在血浆中异戊酸的含量增高,可能影响了哪种氨基酸的代谢? 如果这种氨基酸及其 α -酮酸在血液中的含量是正常的,可能缺乏哪一种酶? (a. 亮氨酸, b. 异亮氨酸-CoA 脱氢酶)
4. 写出苯丙氨酸在排氮动物和排尿素动物体内完全氧化时的平衡式,包括全部活化和能量贮存步骤。
(苯丙氨酸 + 10O_2 + 46ADP + 46P_i \longrightarrow 9CO_2 + NH_3 + 45ATP + AMP + PP_i + $45\text{H}_2\text{O}$)

第 31 章 氨基酸及其重要衍生物 的生物合成

一、概 论

不同生物合成氨基酸的能力不同,以合成原料为例,有的能利用二氧化碳,有的能利用有机酸,有的能利用单糖。不同生物能够合成氨基酸的种类也不完全相同,有的可以合成构成蛋白质的全部氨基酸,有的则不能全部合成,这些生物所需的氨基酸必需从其他生物获得。

凡是机体不能自己合成,必需自外界获取的氨基酸,称为必需氨基酸(essential amino acids)。这一名称来源于用大白鼠所作的实验。若在喂饲大白鼠的膳食中缺乏苯丙氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、色氨酸、缬氨酸、组氨酸或精氨酸(对幼小动物需要)等 10 种氨基酸的任何一种,动物都不能正常生长,由此得名。凡机体能自己合成的氨基酸称为非必需氨基酸(nonessential amino acids)。人类和大白鼠的必需氨基酸是相同的。高等植物有能力合成自己所需的全部氨基酸,而且既可利用氮又可利用硝酸根作为合成氨基酸的氮源。微生物合成氨基酸的能力有很大差异,例如,大肠杆菌可合成全部所需氨基酸,而乳酸菌却需从外界获取某些氨基酸。

虽然生物合成氨基酸的能力有种种差异,但仍可总结出氨基酸生物合成的某些共性。本章将讨论它们的共性,以及论构成蛋白质 20 种氨基酸的各种合成途径。

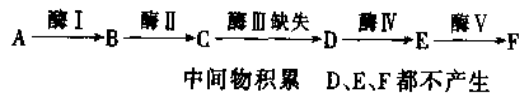
氨基酸生物合成的研究,大多数以微生物作为材料。这不仅因为取材方便,最大的优越性是比较容易地将遗传和生物化学技术结合起来。应用遗传突变技术可获得在合成氨基酸方面具有各种特点的遗传突变株。例如,某个突变株在某种氨基酸合成过程中缺乏某一种酶,则该氨基酸合成过程就在这缺乏酶的一步受阻,这时全部合成反应就停留在这缺失酶的步骤上,而使前一步反应的产物大量积累。在突变株微生物的培养基中就可测出此积累产物的浓度大大提高。又例如,某种突变株有合成某一种氨基酸的特殊能力,则该突变株即可为研究这种氨基酸的合成途径提供便利条件。

将氨基酸的生物合成反应步骤用下列反应式表示:



式中 A 代表某种氨基酸生物合成前体物质, B、C、D、E、F 代表不同的中间产物,酶(I、II、III、IV、V)代表不同的酶, F 代表最终产物,即某种氨基酸。

突变株微生物的同一种氨基酸的正常合成路线在发生变异的步骤受阻可用下式表示:



上式表明当酶 III 缺失时,此突变株培养基中即大量积累中间产物 C。通过对中间产物 C 的测定,即可判断氨基酸(F)的一个中间代谢环节。

用上述材料和方法阐明的氨基酸合成途径,还需用其他生物材料弄清不同生物合成氨基酸的特殊性。

讨论氨基酸的生物合成,首先要说明的是:它的碳骨架是怎样形成的?氮是经怎样的途径进入的?

概括地说,在生物合成中,各种氨基酸碳骨架的形成,源起于代谢的几条“主要干线”(柠檬酸循环、糖酵解以及戊糖磷酸途径等)中的关键中间体。根据生物合成起始物——代谢中间体的不同,可将氨基酸的生物合成途径归纳为六族,将在下面分族讨论。它们的氨基基团多来自谷氨酸的转氨基反应。

氨基酸生物合成分族情况如图 31-1 所示。氨基酸生物合成的概貌如图 31-2 所示。

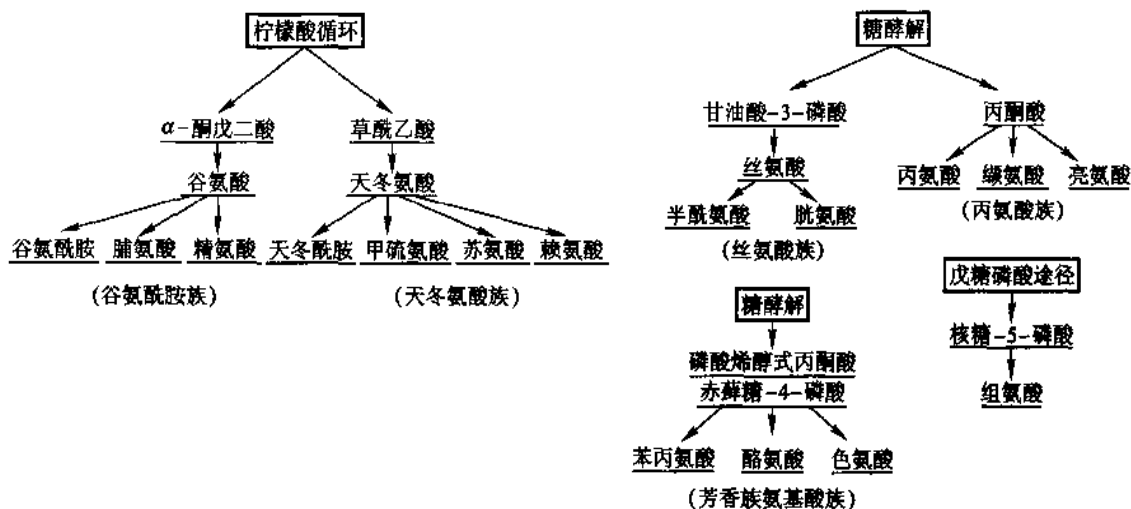


图 31-1 氨基酸生物合成的分族情况

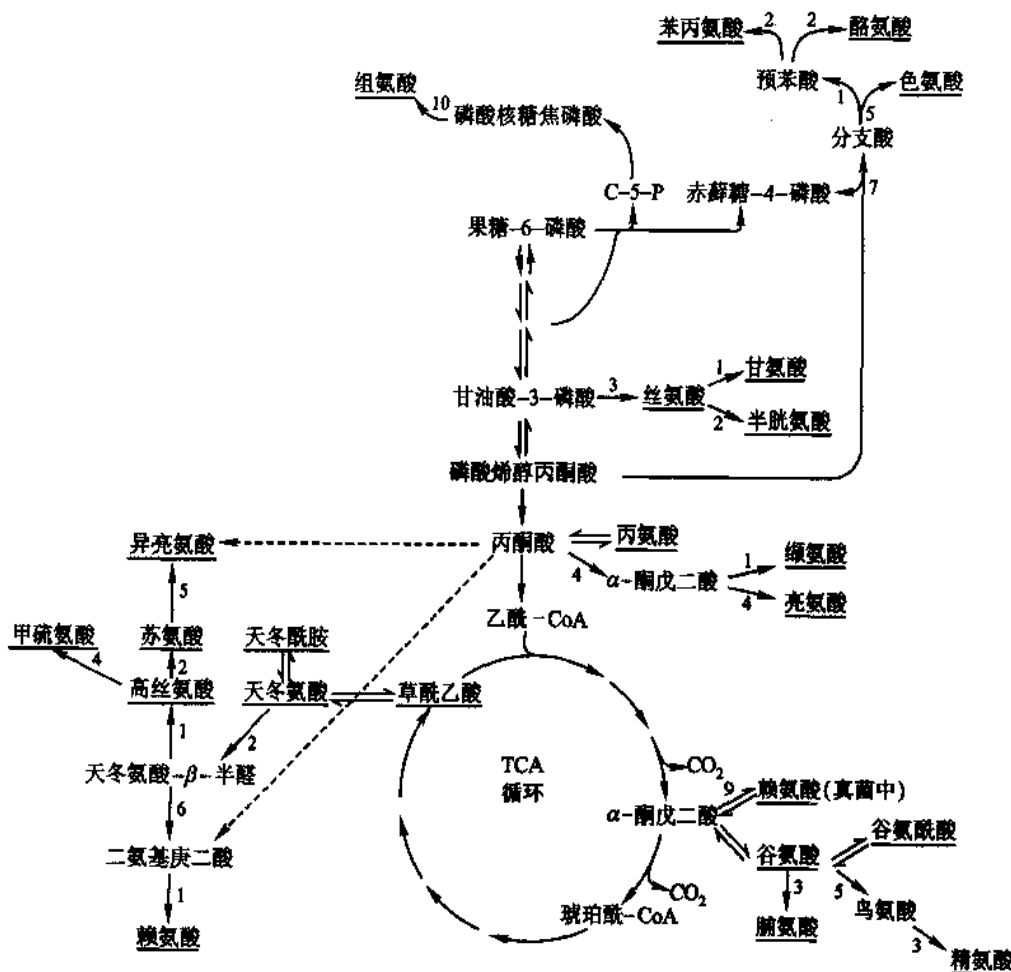


图 31-2 20 种氨基酸的生物合成概貌(各氨基酸全为 L-型)

图为蛋白质中的是 20 种氨基酸生物合成的概貌。氨基酸生物合成与相关的柠檬酸循环,糖酵解及戊糖磷酸途径。图中画出了一些重要的中间物,丙酮酸起始的两条虚线指向二氨基庚二酸(diaminopimelate, DAP),及异亮氨酸,表示丙酮酸为这两个化合物的某侧链之碳源做出贡献。请注意,赖氨酸的生物合成是独特的,它有着两条完全不同的途径。图中数字表明通过的反应步骤数

氮流入氨基酸分子,起始,于无机氮,例如 N_2, NH_3 转化为复杂的有机含氮化合物。 N_2 之转化,请参阅“生物固氮”一章。概括无机氮和有机氮的互相关系,可见图 31-3。

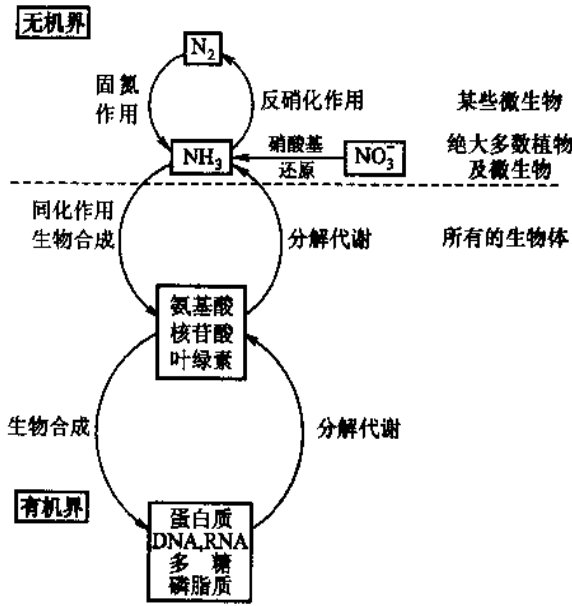


图 31-3 无机氮和有机氮的相互代谢转化

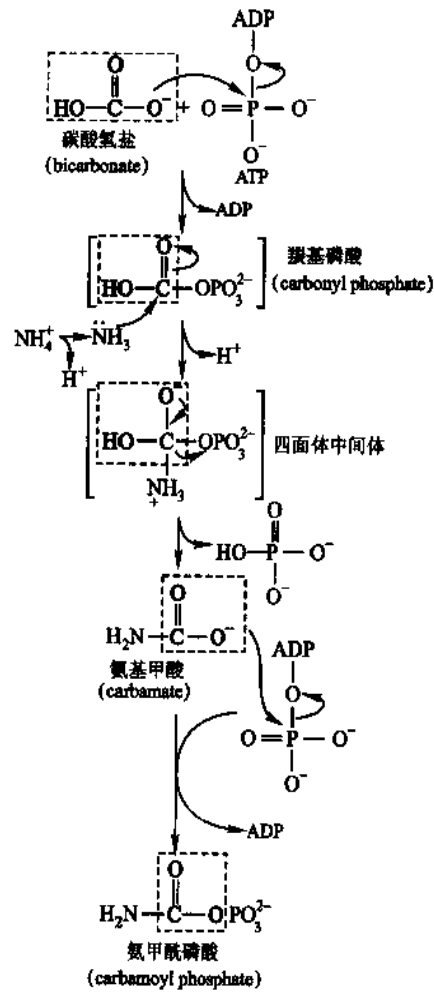
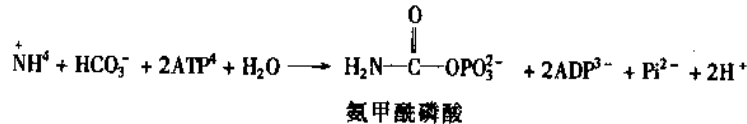


图 31-4 氨基酰磷酸的合成机制

在氨基酰磷酸合成酶 I 的作用下,碳酸氢盐形成活化形式的羧基磷酸,与此同时,准备了碳原子,以接受氨的亲核进攻

生物体利用 3 种反应途径把氮转化为有机化合物,这些有机物即用于氨基酸的生物合成。第 1 种反应途径是在氨基酰磷酸合成酶(carbamoyl phosphate synthetase)的催化下,氨,CO₂(以 HCO₃⁻ 的形式)及 ATP 合成氨基酰磷酸(carbamoyl phosphate),反应式如下:

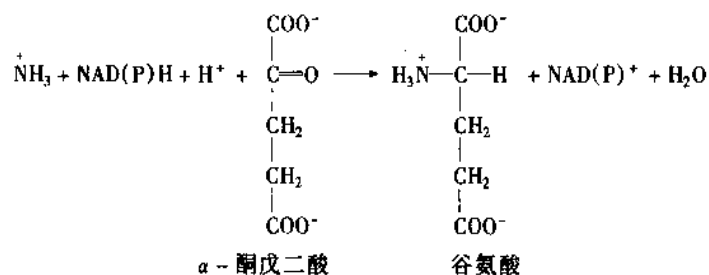


氨基酰磷酸的合成机制如图 31-4。氨基酰磷酸是一重要的代谢物,它不仅扮演着一种氮“固定”的角色,而且它与其酸酐(anhydride)的混合物还担负着富能化合物的作用。氨基酰磷酸的生物合成需要消耗两个 ATP 分子。

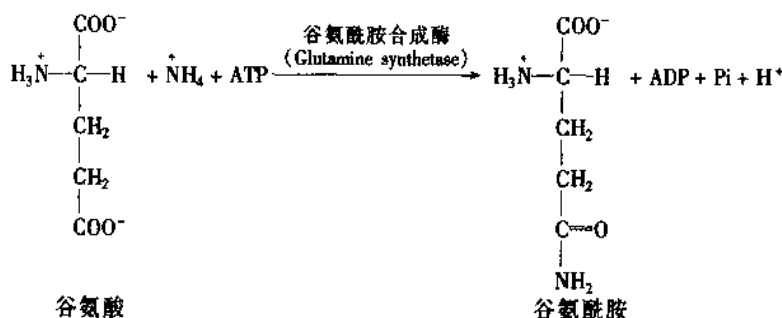
氨基酰磷酸参与尿素循环中的精氨酸合成及嘧啶生物合成(见有关章节)。在真核细胞中,用于尿素循环的氨基酰磷酸的合成是在线粒体酶(氨基酰磷酸合成酶 I)的催化下实现的。它的氮源来自于氨。氨基酰磷酸参与嘧啶生物合成则是在另外的细胞溶胶内的氨基酰磷酸合成酶 II 的催化下发生反应的。该酶使用谷氨酰胺作为氮源。原核细胞仅持有一种氨基酰磷酸合成酶,它对精氨酸及嘧啶合成都有催化作用,而且对这两种生物合成全都是利用谷氨酸作为氮源。

第 2 种把氮转化为有机化合物的途径是在谷氨酸脱氢酶的催化下将 α-酮戊二酸还原,氨化为谷氨酸。谷氨酸脱氢酶广泛地存在于动物、植物及微生物的细胞中。在植物,动物中这个酶居于线粒体内。有些种属的谷氨酸脱氢酶用 NADH 为其辅酶,另一些种属则以 NADPH 为其辅酶。有一些生物的谷氨酸脱氢

酶可以利用 NADH 或 NADPH 作为辅酶。



第 3 种氨的“固定”途径是在谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)的作用下,谷氨酸转化为谷氨酰胺。这一酰胺化(amidation)需要 ATP 水解驱动。反应式如下:



在氮代谢中谷氨酸占据着轴心的位置,因为它扮演着很多代谢物前体的角色。因此,对至关重要的大肠杆菌(*E. coli*)谷氨酸合酶(glutamate synthase)的研究开展得十分深入和广泛。它是一个具有变构性质的酶。大肠杆菌还接受变构因子所引起的多重调控,如激活抑制以及共价修饰等。共价修饰中包括有一个腺苷酰化反应(adenylation)。由此,ATP(分裂出 P_i)转化出的 AMP 基与酶分子的酪氨酸进行特异结合。结合键是由 AMP 的磷酸基与酪氨酸的酚羟基进行酯化而形成。此种腺苷酰化反应将降低谷氨酸合成酶的活性。

哺乳动物的谷氨酸合酶与细菌的酶在其结构与性质上都有不同。哺乳动物的酶含有 8 个等同的亚基,形成四聚体。对脑和肝脏的谷氨酸合酶已有较透彻的了解。肝脏的酶不经历共价修饰。甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸及氨甲酰磷酸对肝中的这个酶及 α -酮戊二酸酶的活性有抑制作用。在哺乳动物中,谷氨酸最初是在肌肉组织中合成的,随后经过血流转入其他组织。在血液中谷氨酸的浓度约为 0.6 mol/L,较所有其他氨基酸都高。

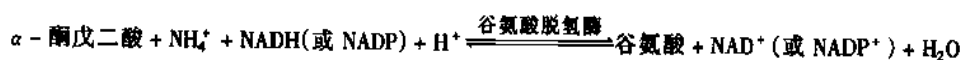
二、脂肪族氨基酸的生物合成

(一) 谷氨酸族氨基酸的生物合成:L-谷氨酸,L-谷氨酰胺,L-脯氨酸

这些氨基酸的生物合成都以 α -酮戊二酸为前体,即它们都是由 α -酮戊二酸衍生而来,下面分述它们的生物合成。

1. 由 α -酮戊二酸形成谷氨酸

α -酮戊二酸和氨基酸经转氨酶的作用即形成谷氨酸。 α -酮戊二酸与游离氨可在谷氨酸脱氢酶的催化下发生还原氨基化而形成谷氨酸。反应式如下:



这种反应在自然界并不普遍,植物、藻类以及细菌只有当环境中的 NH_4^+ 浓度很高时才由此途径形成谷氨酸。在动物的细胞中,过多的 NH_4^+ 也可通过这一途径形成谷氨酸,再由谷氨酰胺合成酶催化转变为谷氨酰胺。谷氨酸脱氢酶和谷氨酰胺合成酶在脑中的含量都相当高。当然由形成谷氨酰胺而消除 NH_4^+ 的作

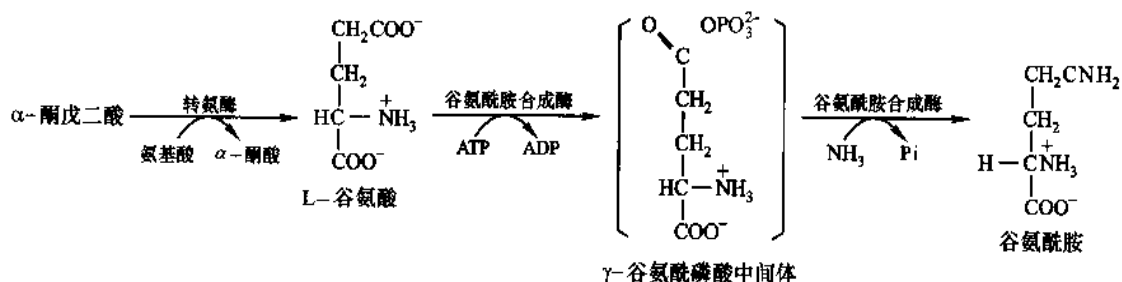
用可能比由 α -酮戊二酸形成谷氨酸更为重要。

L-谷氨酸脱氢酶在动物体内可利用 NAD^+/NADH 和 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 两类辅酶,利用 NAD^+ 作辅酶的酶一般是催化谷氨酸脱氨基转变为 α -酮戊二酸,无论利用哪种辅酶的 L-谷氨酸脱氢酶,都能催化可逆反应。

实验表明:植物、微生物、草类的谷氨酸氨基一般并非来源于游离氨,而是来源于谷氨酰胺的酰胺基。后面还将进一步讨论。

2. 由 α -酮戊二酸形成谷氨酰胺

由 α -酮戊二酸先经转氨基作用形成 L-谷氨酸已如上述,再经谷氨酰胺合成酶(*glutamate synthetase*)催化由 L-谷氨酸形成 L-谷氨酰胺。这一过程需 ATP 提供能量。

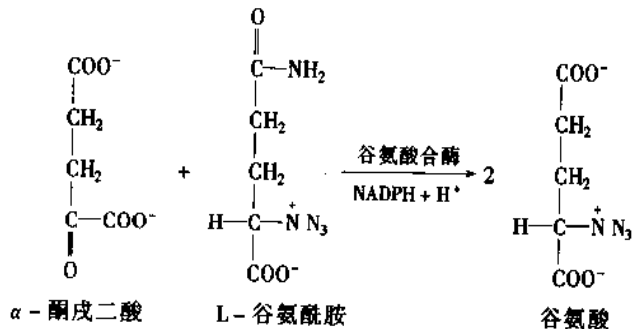


谷氨酰胺合成酶是催化氨转变为有机含氮物的主要酶。该酶活性受到机体对含氮物需要情况的灵活控制。

从大肠杆菌中获得的谷氨酰胺合成酶的结构以及其调控机制都已经得到阐明。该酶由 12 个相同的亚基对称排列成两个六面体环棱柱状结构。每个亚基的相对分子质量为 51 600。它的活性受到复杂的反馈控制系统以及共价修饰调控。有 9 种含氮物以不同程度对该酶发生反馈变构抑制效应。每一种都是自己与酶的结合部位。这 9 种含氮物是:氨基葡萄糖-6-磷酸、色氨酸、丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸、组氨酸、胞苷三磷酸、AMP 及氨甲酰磷酸。除甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸外,所有上述其他含氮物的氮都直接来源于谷氨酰胺,而且都是由谷氨酰胺导出的反应最终产物。虽然丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸的氨基也来源于谷氨酰胺,但都不是反应系列的最终产物。在培养细胞时检测培养液中丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸含量的高低,却可作为了解氮源供给情况的鉴定指标。

谷氨酰胺合成酶的调节机制,可作为氨基酸生物合成调控机制复杂性的典型,将在氨基酸生物合成的调控中讨论。

前已述及, α -酮戊二酸直接与氨由谷氨酸脱氢酶催化还原反应,合成谷氨酸的途径,在自然界并不普遍。在一般情况下最普遍的合成谷氨酸的途径是在谷氨酰胺合成酶(*glutamate synthetase*)催化下, α -酮戊二酸接受 L-谷氨酰胺的酰胺基形成谷氨酸的反应。在这个反应中实际上形成了两个谷氨酸分子。



虽然经这种形式合成谷氨酸从能量观点看并不经济。因为由谷氨酸形成谷氨酰胺需要消耗 ATP 如前所示。但这种方式有很多优越性。由谷氨酰胺合成酶催化的酰胺基的形成可在 NH_4^+ 浓度极低的条件下进行,而由谷氨酸脱氢酶催化的反应却需要很高的 NH_4^+ 浓度。以大肠杆菌(*E. coli*)为例,其谷氨酸脱氢酶所催化的反应,以 NH_4^+ 计算, K_m 值为 1.1 mmol,而谷氨酰胺合成酶的 K_m 值仅为 0.2 mmol。因此谷

氨酰胺合成酶所催化的反应方向更倾向于脱去酰胺基。一般在自然条件下 NH_4^+ 的浓度不会很高。所以由谷氨酰胺提供酰胺基使 α -酮戊二酸形成谷氨酸的可能性是最大的。 α -酮戊二酸、谷氨酸和谷氨酰胺的合成关系如图 31-5 所示。

谷氨酸合酶的氢供给者(hydrogen donor)随不同来源的酶而异。细菌以 NADPH 为供氢体,有些蕈类以 NADH 为供氢体。植物则有两种类型。有一种对还原型“铁氧还蛋白”(reduced ferredoxin)是特异的,另一种,体外试验表明需要 NADPH 或 NADH。因为在土壤中, NH_4^+ 的浓度常是不高的,因此在植物中氨基的形成是在低浓度下进行的,而 α -酮戊二酸的氨基化则需由谷氨酰胺的酰胺基提供。

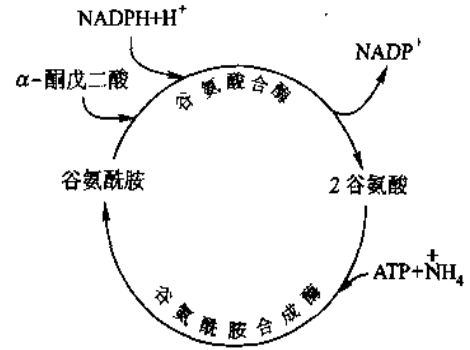


图 31-5 由 α -酮戊二酸、谷氨酰胺和谷氨酸形成关系图

3. 由 α -酮戊二酸形成脯氨酸

L-脯氨酸的合成步骤如图 31-6 所示。由 α -酮戊二酸先形成谷氨酸。后者在谷氨酸激酶催化下由 ATP 提供磷酸基团形成谷氨酰磷酸,又在谷氨酸脱氢酶作用下将谷氨酸的 γ -羧基还原形成谷氨酸- γ -半醛 (glutamic- γ -semialdehyde),然后自发环化形成五元环化合物 Δ' -二氢吡咯-5-羧酸 (Δ' -pyrroline-5-carboxylate),再由二氢吡咯还原酶催化还原形成脯氨酸。

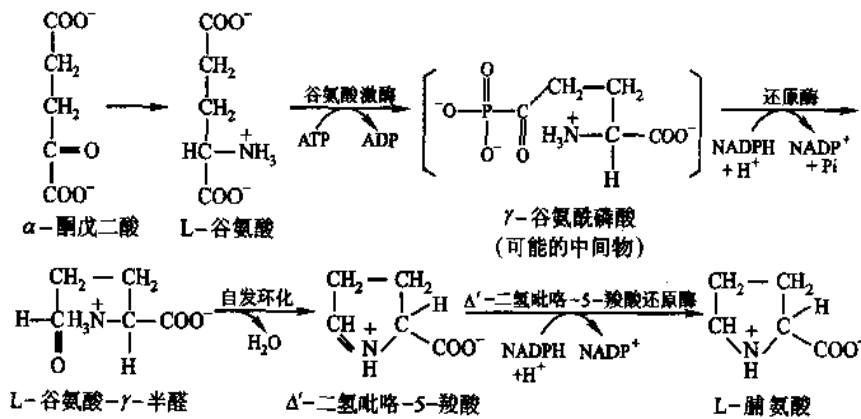


图 31-6 L-脯氨酸的合成途径

4. L-精氨酸的生物合成

精氨酸的生物合成如图 31-7 所示,它是由谷氨酸经过许多步骤形成。谷氨酸先在转乙酰基酶催化下,转化为 N-乙酰谷氨酸(N-acetylglutamate),再经激酶作用由 ATP 上转移一个高能磷酸基团,形成 N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸(N-acetyl- γ -glutamyl phosphate),再经以 NADPH 为辅酶的还原酶作用,形成 N-乙酰谷氨酸- γ -半醛(N-acetylglutamic- γ -semialdehyde),又经转氨酶作用,自谷氨酸分子转移一个 α -氨基,形成 α -N-乙酰鸟氨酸(α -N-acetyl ornithine),经酶促脱去乙酰基(脱乙酰基作用或转乙酰基作用),形成 L-鸟氨酸,接受由转氨甲酰酶催化,自氨甲酰磷酸转移的氨甲酰基先形成 L-瓜氨酸,L-瓜氨酸在合成酶的催化下,与 L-天冬氨酸结合(需 Mg^{2+} 离子,同时 $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PPi}$),形成精氨琥珀酸,精氨琥珀酸在裂解酶的作用下,形成精氨酸,同时产生延胡索酸。

谷氨酸 α -氨基的乙酰化,可使氨基受到保护,以利于羧基的活化和还原,并防止发生环化作用,使反应向形成精氨酸的方向进行。乙酰基可通过谷氨酸转乙酰基酶的作用,在全部合成反应中得到保证。

精氨酸不只是构成蛋白质的组分,也是尿素形成的前体物质(请参看尿素的形成)。

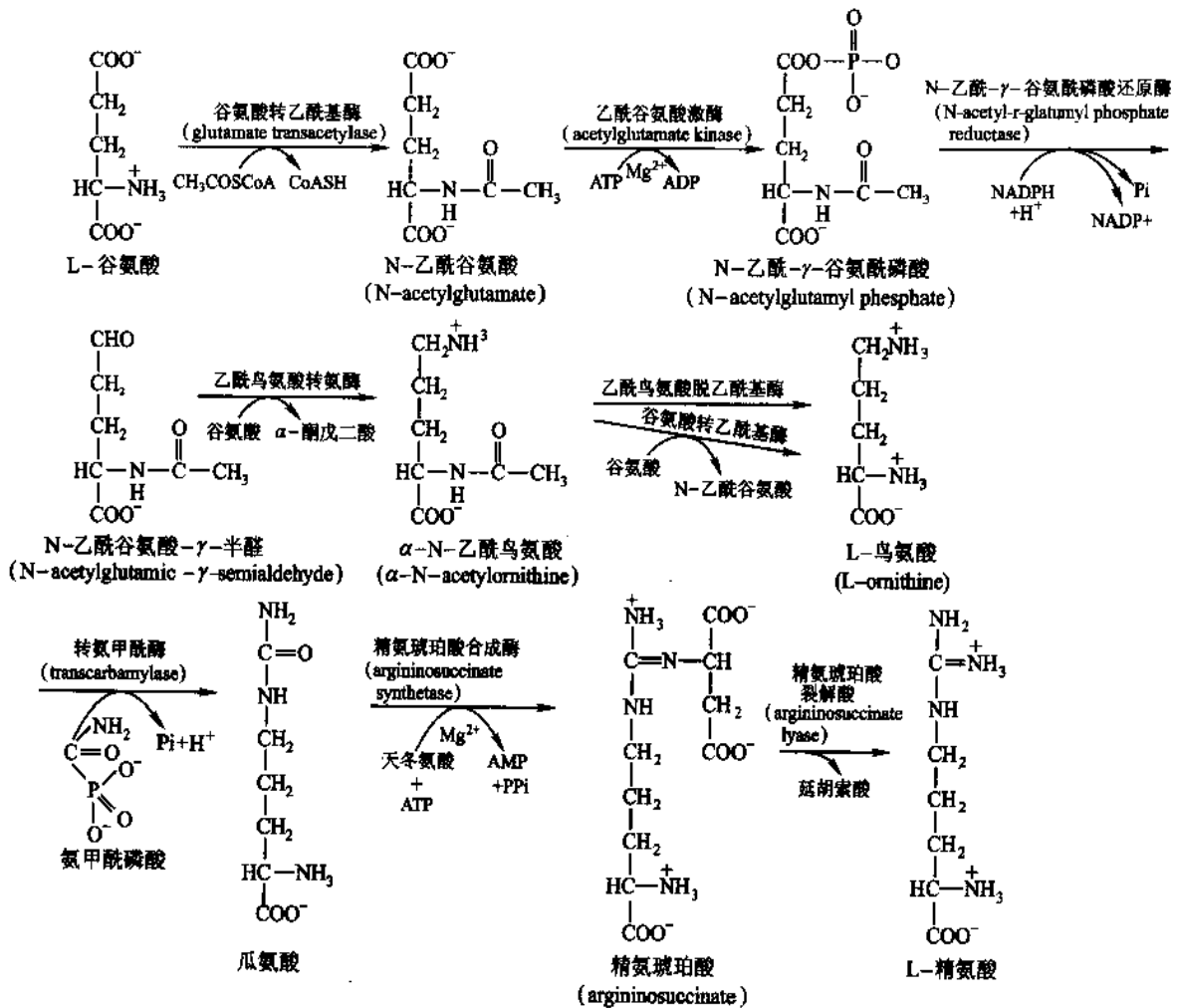


图 31-7 精氨酸的生物合成途径

5. 由 α -酮戊二酸形成 L-赖氨酸

L-赖氨酸的生物合成在不同生物体内有完全不同的两条途径。蕈类(和眼虫)L-赖氨酸的合成以 α -酮戊二酸为起始物。图 31-8 表明蕈类(和眼虫)由 α -酮戊二酸合成 L-赖氨酸的途径。细菌和绿色植物则是通过丙酮酸和天冬氨酸途径(参看天冬氨酸族的生物合成,图 31-9)。

α -酮戊二酸有 5 个碳原子。而赖氨酸有 6 个碳原子。因此, α -酮戊二酸形成赖氨酸需延长碳链。第一步是 α -酮戊二酸在高柠檬酸合酶(homocitrate synthase)的催化下,与乙酰辅酶 A 作用,形成高柠檬酸,高柠檬酸在脱水酶催化下脱水形成顺-高乌头酸(cishomoaconitate),再由水化酶催化形成高异柠檬酸(homoisocitrate),然后在脱氢酶催化下脱氢,形成 α -酮己二酸(α -keto adipate)。该反应所需辅酶为 NAD^+ ,反应过程中还脱去羧基。

由 α -酮戊二酸形成 α -酮己二酸所经过的碳链延长过程和柠檬酸循环中草酰乙酸转变为 α -酮戊二酸以及在亮氨酸生物合成中碳链延长过程都基本相同。不同处是 α -酮戊二酸的 α -羧基是由草酰乙酸的 β -羧基形成,不是转来的乙酰基。以上表明这些 α -酮酸碳链的延长都遵循一般 α -酮酸碳链延长的规律。

α -酮戊二酸的形成提供了赖氨酸的碳骨架结构,下一步的变化是 δ -羧基的还原。羧基的活化需 ATP 参与反应,可能形成酸酐和 AMP 的复合物,即 δ -腺苷- α -氨基己二酸,这和脯氨酸以及鸟氨酸生物合成中的羧基活化机制不同。 δ -腺苷- α -氨基己二酸在其还原酶的催化下,以 NADPH 为辅酶还原,同时释放出腺苷基团形成 α -氨基己二酸- δ -半醛(α -amino adipic- δ -semialdehyde)。己醛基团一旦形成,在 α -氨基己二酸- δ -半醛-谷氨酸还原酶作用下,即与谷氨酸在氨基部位缩合。这是一个需 NADPH 的还原缩合反应。缩合后形成 ϵ -N(2-戊二酸)-赖氨酸(saccharopine)。后者在 ϵ' -N(2-戊二

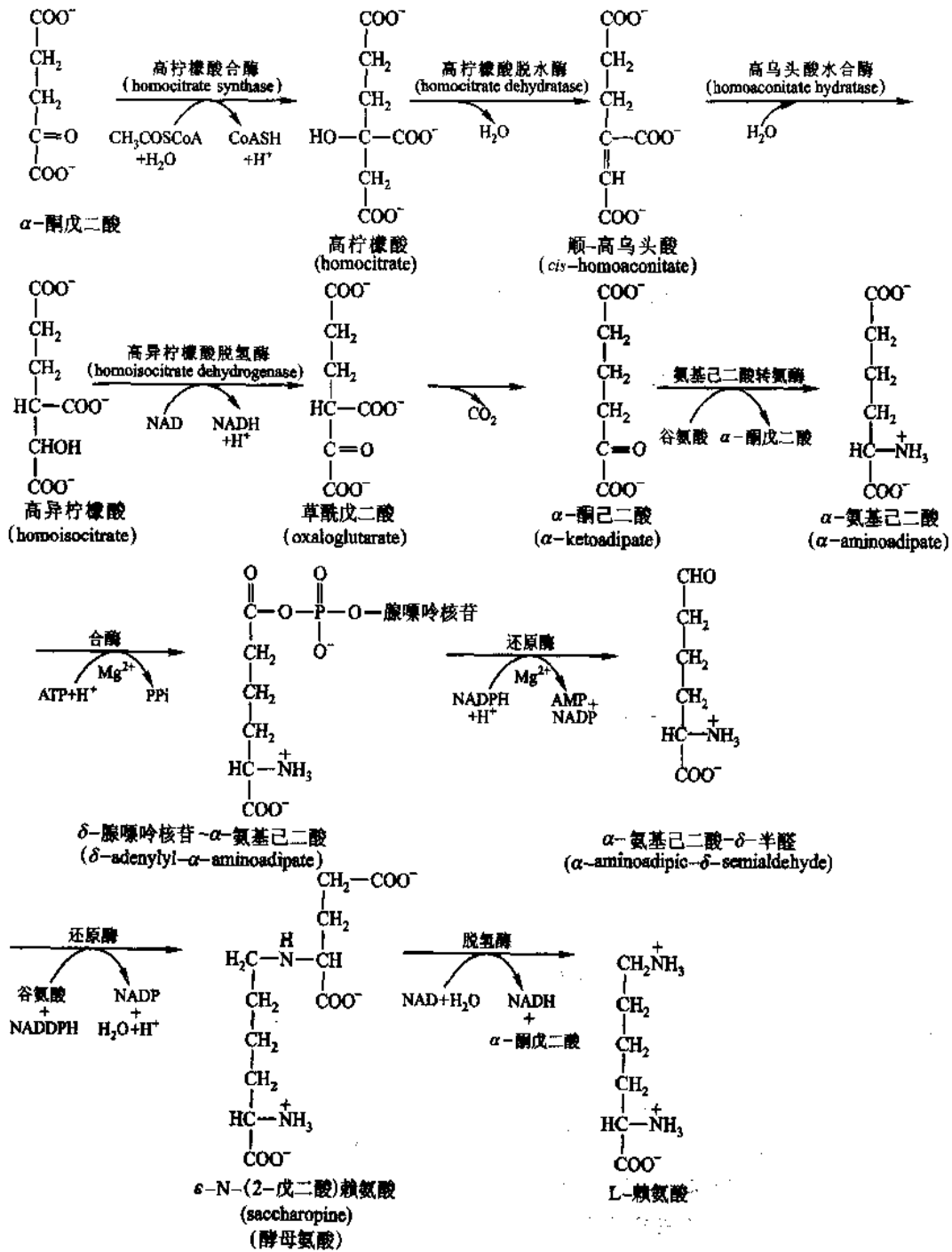


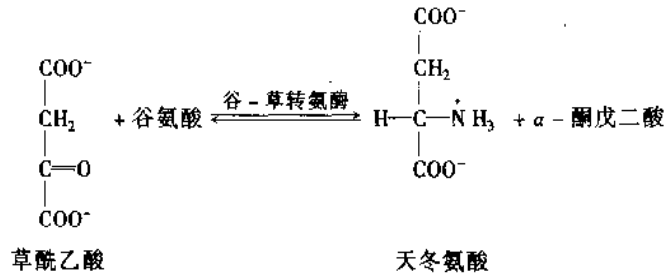
图 31-8 蕈类和眼虫 L-赖氨酸的生物合成途径

酸)-赖氨酸脱氢酶作用下,再氧化裂解形成 L-赖氨酸和 α -酮戊二酸。此反应专一地以 NAD^+ 为辅酶。上述的两步反应,实际是一种氨基转移反应。它和以磷酸吡哆醛为辅酶的氨基转移反应方式完全不同。

(二) 天冬氨酸族的生物合成:L-天冬氨酸,L-天冬酰胺,L-甲硫氨酸,L-苏氨酸

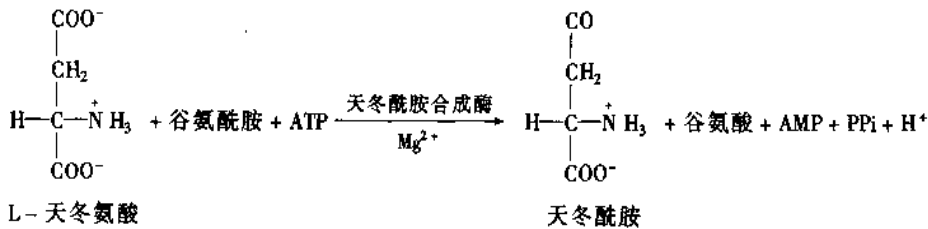
1. 天冬氨酸的生物合成

L-天冬氨酸是由草酰乙酸接受由谷氨酸转来的氨基形式。催化这一反应的酶称为谷-草转氨酶或称天冬氨酸-谷氨酸转氨酶。天冬氨酸的合成途径如下所示:



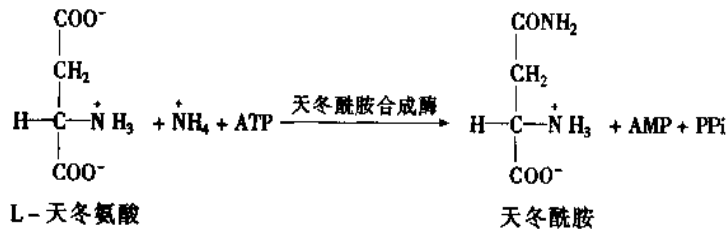
2. 天冬酰胺的生物合成

哺乳动物天冬酰胺的合成可能都是在天冬氨酸的 β -羧基上转移一个谷氨酰胺的酰胺基而成。催化该反应的酶称为天冬酰胺合成酶 (asparagine synthetase), 需 ATP 参与作用。ATP 在反应中降解为 AMP 和 P_i 。天冬酰胺的合成反应可用下式表示:



该反应可能在酰胺基断裂时形成一个酶和氨基结合的中间产物。

除上述的天冬酰胺合成途径外,在细菌则有另外一种由 NH_4^+ 提供酰胺基氮源的合成途径。这一途径也伴有 ATP 降解为 AMP 和 P_i 的反应。



在这个反应中,也可能包括一个形成与酶结合的 β -天冬酰胺腺苷酸 (β -aspartyladenylate) 中间物的步骤。

催化上述两种形成天冬酰胺的酶都称为天冬酰胺合成酶 (asparagen synthetase), 它们区别在于一种催化酰胺基的断裂,另一种则对游离氨有高的亲和力。

天冬酰胺和谷氨酰胺合成的机制有许多类似之处,主要的不同是在谷氨酰胺合成反应中 ATP 转变成 ADP 和 P_i ,天冬酰胺合成反应中 ATP 则形成 AMP 和 P_i 。在机体内催化 P_i 水解为 2P_i 的酶是焦磷酸酶。这一水解反应可释放约 34 kJ 能,因此,天冬酰胺的合成反应比谷氨酰胺的合成反应更易于进行。

3. 细菌和植物 L-赖氨酸的生物合成

由 L-天冬氨酸作为起始物的 L-赖氨酸合成途径如图 31-9 所示。首先要使 L-天冬氨酸的 β -羧基还原。该反应需 ATP 活化羧基。催化此反应的酶称为天冬氨酸激酶 (aspartokinase)。羧基活化后,形成天冬氨酰- β -磷酸 (aspartyl- β -phosphate)。这一还原反应和谷氨酸羧基的还原以及 3-磷酸甘油酸还原为 3-磷酸甘油醛的情况都很相似。再由天冬氨酰- β -半醛脱氢酶催化逆反应,使天冬氨酰- β -磷酸还原。参与天冬氨酸还原反应的辅酶是 NADPH。还原的产物是天冬氨酸- γ -半醛。天冬氨酸- γ -半醛与丙酮酸缩合形成一环状化合物称为 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸 (2,3-dihydropyridine 2,6-dicarboxylate)。因此,也可将植物 L-赖氨酸的合成看作是起始于丙酮酸和天冬氨酸。催化天冬氨酸- γ -半醛和丙酮酸缩合的酶称为 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸合酶。该酶受赖氨酸抑制。2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸由以 NADPH 为辅酶的脱氢酶还原为 Δ' -吡啶-2,6-二羧酸 (又称 2,3,4,5-四氢吡啶-2,6-二羧酸)。该二羧酸与琥珀酰-CoA 作用形成 N-琥珀酰-2-氨基-6-酮庚二酸 (N-Succinyl-2-amino-6-keto-L-pimelate)。在有些生物由乙酰基代替琥珀酰基。6-酮基通过与谷氨酸的转氨基作用而形成氨基,使 N-琥珀酰-2-氨基-6-酮庚二酸转变为 N-琥珀酰-L,L-2,6-二氨基庚二酸。

在琥珀酰-二氨基庚二酸脱琥珀酸酶的作用下,脱去琥珀酸形成 L,L-2,6-二氨基庚二酸或称 L- α,ϵ -二氨基庚二酸。在二氨基庚二酸差向异构酶的作用下,形成消旋- α,ϵ -二氨基庚二酸(meso- α,ϵ -diamino pimelate)。再经二氨基庚二酸脱羧酶的作用。脱去羧基形成 L-赖氨酸。

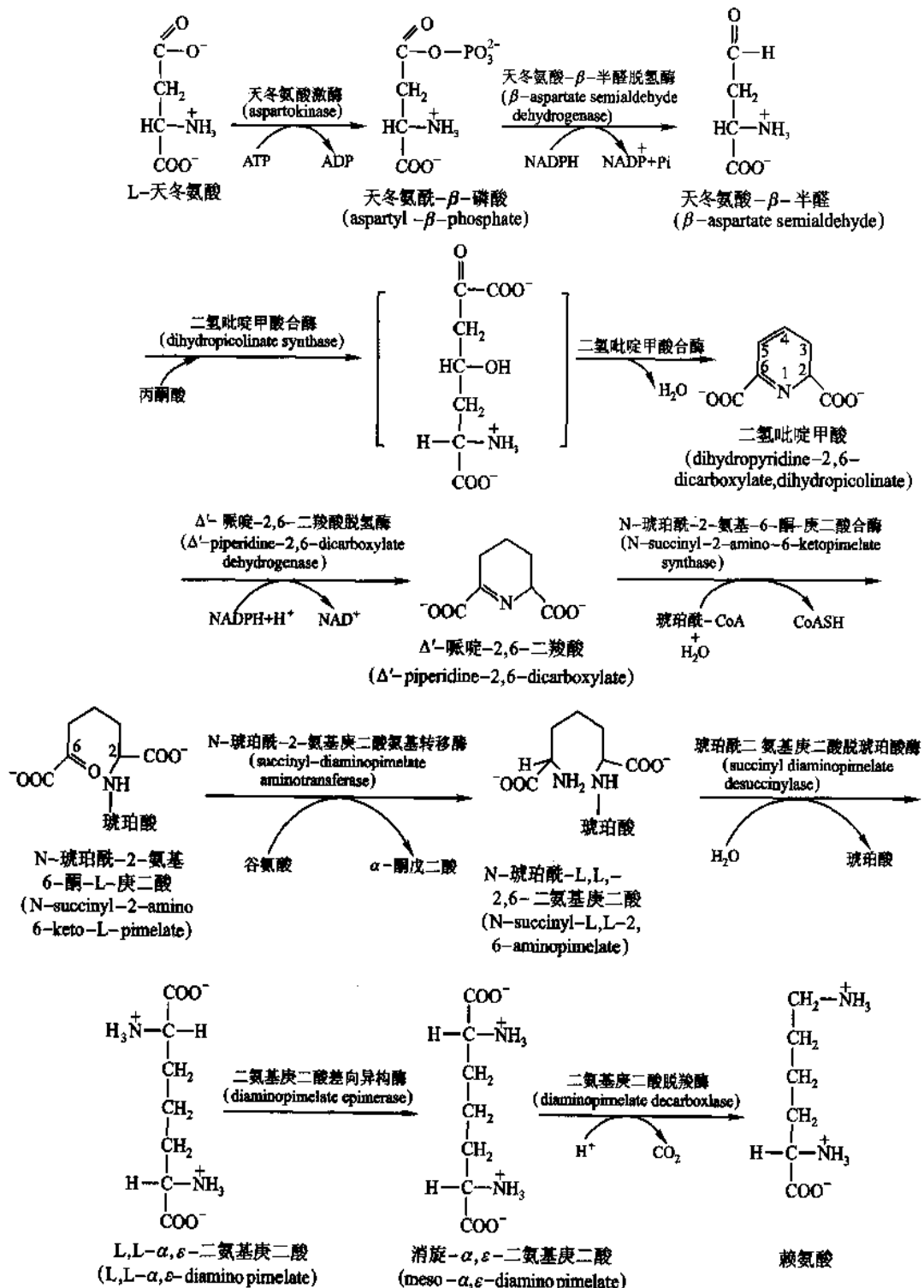


图 31-9 细菌和绿色植物赖氨酸的合成途径

4. 甲硫氨酸的生物合成

甲硫氨酸的生物合成如图 31-10 及 31-11 所示,由天冬氨酸的羧基还原,此反应由 ATP 参与。它活化了羧基并提供一个磷酸基,形成天冬氨酰磷酸。反应进一步形成天冬氨酸- β -半醛。以上反应过程与细菌及植物合成 L-赖氨酸的一段过程完全相同。天冬氨酸- β -半醛以 NADPH 为辅酶,在脱氢酶作

用下还原形成 L-高丝氨酸(L-homoserine)。由 L-高丝氨酸转化为甲硫氨酸的途径不只一种。它的酰基化也有不同方式。在绿色植物形成的 O-磷酸高丝氨酸。一般从高丝氨酸转变为酰基高丝氨酸,进而转变为 L-高半胱氨酸。转变为 L-高半胱氨酸也有不同路线。在细菌中,是在胱硫醚-γ-合酶

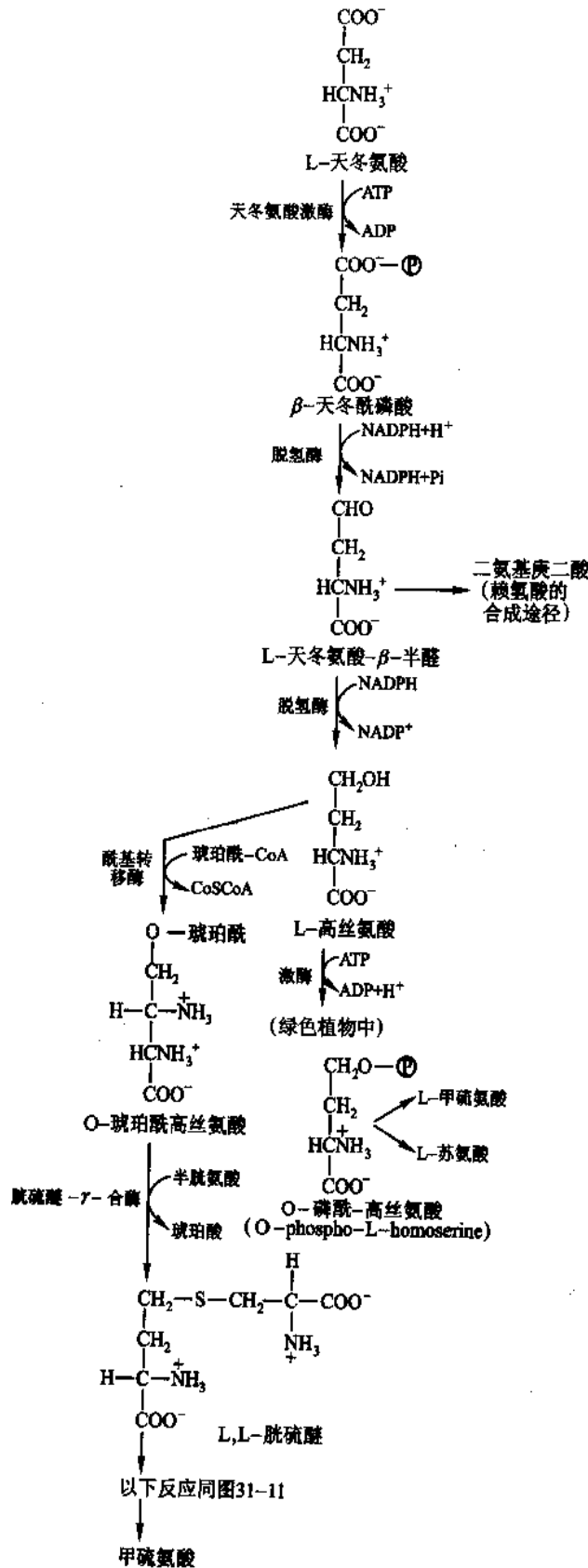


图 31-10 天冬氨酸族的氨基酸(赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸)共同经历的合成途径

(cystathionine- γ -synthase)催化下,与半胱氨酸作用形成 L,L-胱硫醚(L,L cystathionine)。后者又在 β -胱硫醚酶(β -cystathionase)作用下,形成 L-高半胱氨酸。另外的途径是 O-琥珀酰基高丝氨酸在硫水解酶(sulphydolase)作用下与 H₂S 作用直接生成 L-高半胱氨酸(图中虚线标示),接着 L-高半胱氨酸在转移酶(transferase)催化下,接受 N-甲基四氢叶酸的甲基,生成 L-甲硫氨酸。高丝氨酸还可在酰基转移酶作用下与琥珀酰基结合形成 O-琥珀酰基高丝氨酸,又在胱硫醚- γ -合酶催化下由半胱氨酸替下琥珀酰基形成胱硫醚,又在胱硫醚- β -裂解酶作用下,脱出丙酮酸和氨形成高半胱氨酸再由 N⁵-甲基四氢叶酸提供甲基,由转移酶催化形成甲硫氨酸。

5. 苏氨酸的生物合成

苏氨酸的合成,从 L-天冬氨酸开始,直到形成 L-高丝氨酸,与甲硫氨酸的合成步骤是完全相同的(图 31-10)。L-高丝氨酸在其激酶作用下在羟基位置转移 ATP 上的一个磷酸基团形成 O-磷酸-L-高丝氨酸(O-phospho-L-homoserine),再经苏氨酸合酶作用,水解下磷酸基团形成苏氨酸(图 31-12)。

纵观上述 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸的合成,可看出这三种氨基酸有一段共同的合成途径,由 L-天冬氨酸为共同起点都需经过 β -羧基的还原,形成的天冬氨酸- β -半醛是一个分支点化合物,L-赖氨酸的合成即由此物质分道,甲硫氨酸和苏氨酸的合成还共同经过 L-高丝氨酸再分道,L-高丝氨酸也是分支点化合物(见图 31-10)。

6. 异亮氨酸的生物合成

异亮氨酸的 6 个碳原子有 4 个来自天冬氨酸,只有 2 个来自丙酮酸,所以一般将异亮氨酸的合成列入天冬氨酸类型。在异亮氨酸合成过程中有 4 种酶和缬氨酸合成中的酶是相同的,而缬氨酸的合成属于丙酮酸衍生类型,因此异亮氨酸的生物合成也可视为丙酮酸衍生类型。鉴于异亮氨酸和缬氨酸生物合成中 4 种酶的共同,异亮氨酸的合成途径和缬氨酸共同讨论(图 31-13)异亮氨酸和缬氨酸的合成途径。

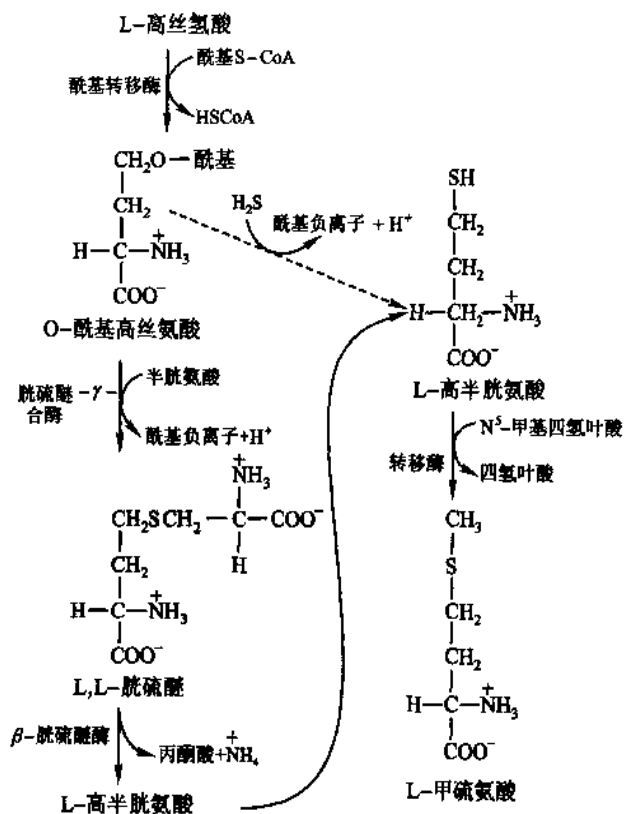


图 31-11 甲硫氨酸的合成,最后一步的 L-高半胱氨酸转变为甲硫氨酸还有依赖维生素 B₁₂ 的另一途径

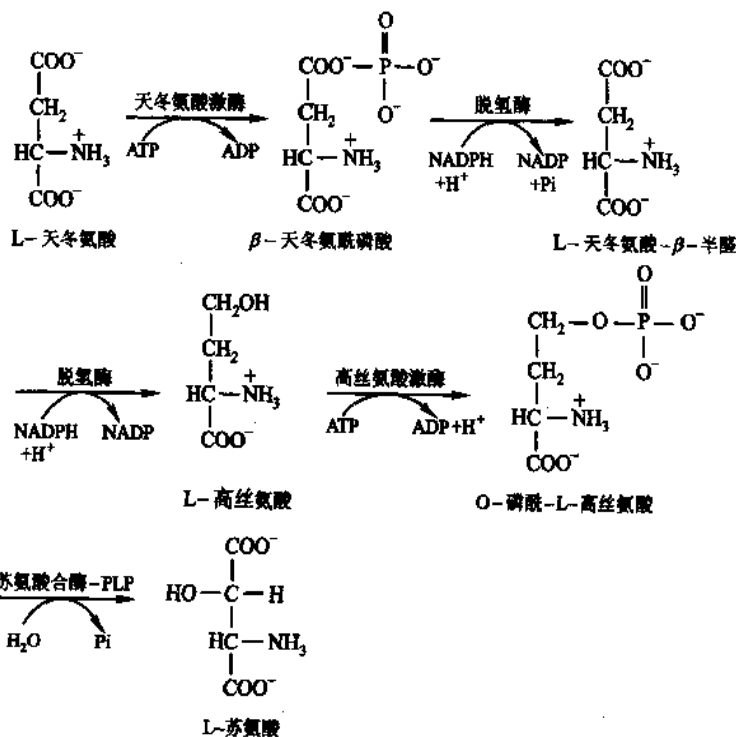


图 31-12 L-苏氨酸的生物合成

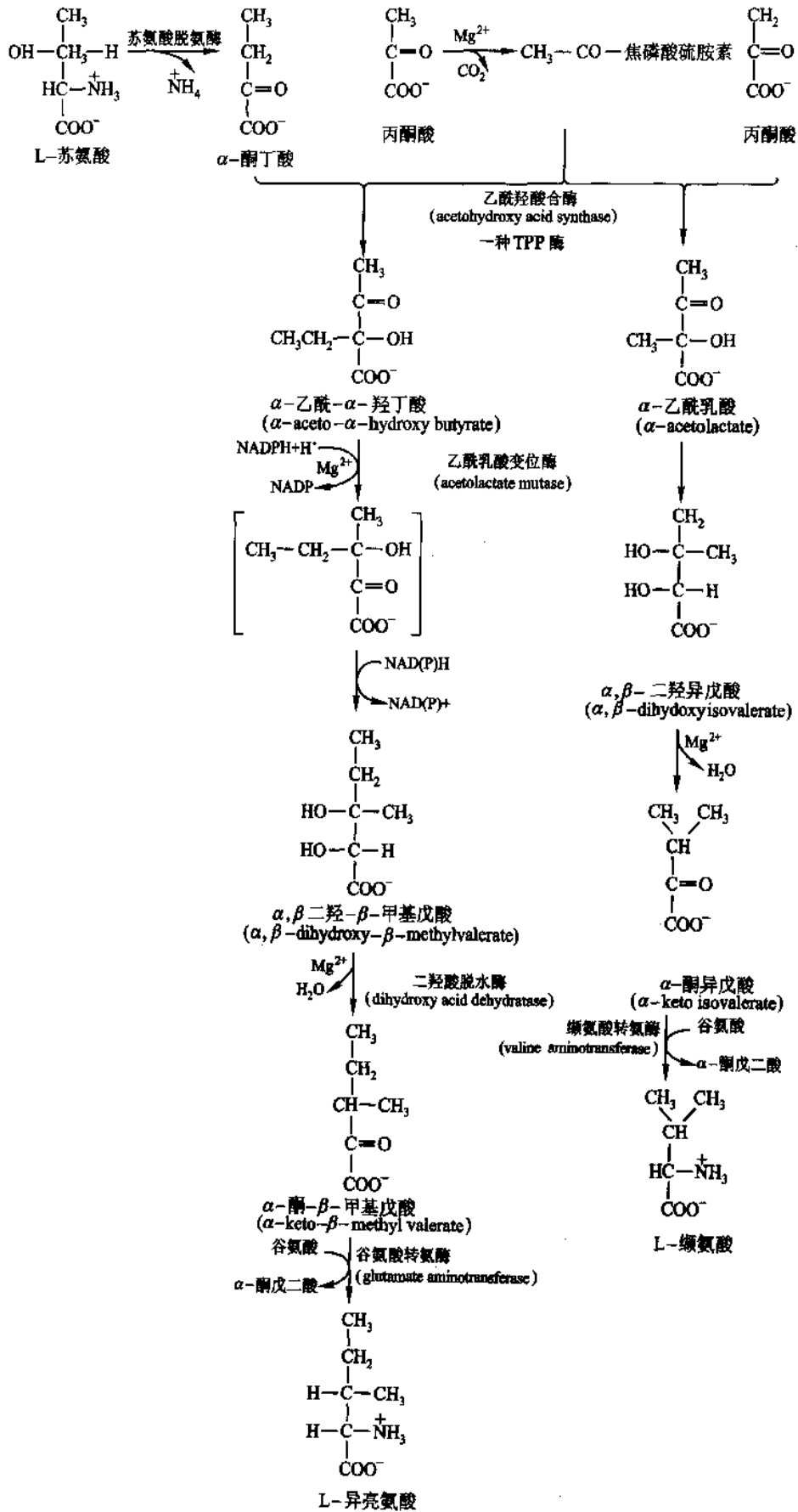


图 31-13 异亮氨酸和缬氨酸的合成途径

(三) 丙酮酸族的生物合成:L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸

由丙酮酸形成的氨基酸有L-丙氨酸、L-缬氨酸、L-亮氨酸,还为异亮氨酸的合成提供两个碳原子,为赖氨酸的合成提供两个或3个碳原子(图31-8及图31-9赖氨酸的生物合成)。因异亮氨酸和缬氨酸生物合成途径的平等关系,本节将一并讨论其合成途径。

1. 丙氨酸的生物合成

丙氨酸是丙酮酸与谷氨酸在谷-丙转氨酶的作用下形成的,如图31-14所示。

丙氨酸的合成没有反馈抑制效应。机体细胞内可找到许多丙氨酸库。又因转氨酶的作用是可逆的,丙酮酸和丙氨酸可根据需要而互相转换。

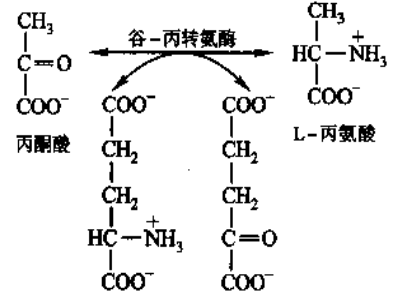


图31-14 丙氨酸的生物合成

2. 缬氨酸和异亮氨酸的生物合成

缬氨酸和异亮氨酸的生物合成如图31-13所示。这两种氨基酸的第一步是相应地由丙酮酸和丁酮酸与活性乙醛基缩合。活性乙醛基可能是乙醛基与α-羟乙基硫胺素焦磷酸结合的产物。醛基是由丙酮酸脱羧而成。缩合后所形成的产物是相应的α-乙酰-α-羟酸。形成的两种化合物进行甲基、乙基的自动位移,产物经脱水后形成缬氨酸和异亮氨酸和相应酮酸,再经转氨作用形成缬氨酸和异亮氨酸。

3. 亮氨酸的生物合成

亮氨酸的合成途径从丙酮酸开始直至形成α-酮异戊酸和L-缬氨酸以及异亮氨酸的合成途径完全相同(参看图31-13,L-缬氨酸的生物合成)。α-酮异戊酸(α-ketoisovalerate)在α-异丙基苹果酸合酶(α-isopropyl malate synthase)作用下,由乙酰-CoA 转来酰基形成α-异丙基苹果酸,后者在(同分)异构酶作用下形成β-异丙基苹果酸。再经以NAD⁺为辅助因子的脱氢酶作用形成α-酮异己酸。后者再由亮氨酸转氨酶催化与谷氨酸转氨形成L-亮氨酸(图31-15)。

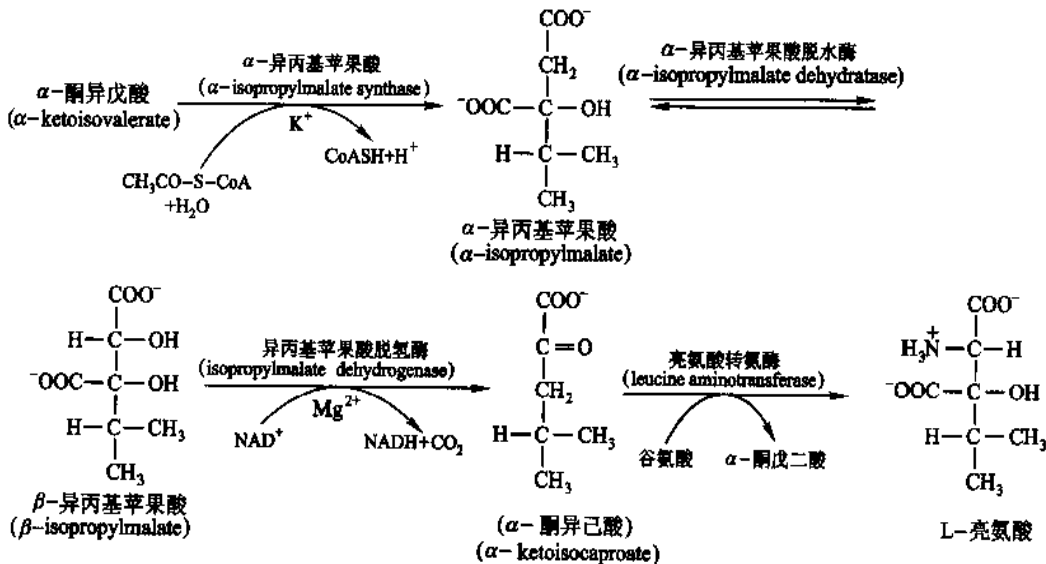


图31-15 L-亮氨酸的生物合成途径

(四) 丝氨酸族的生物合成:L-丝氨酸、L-甘氨酸、L-半胱氨酸的生物合成及固硫作用

1. 丝氨酸和甘氨酸的生物合成

如图31-16所示,这两种氨基酸合成的第一步,是由糖酵解过程的中间产物甘油酸3-磷酸作为起始物质,它的α-羟基在磷酸甘油酸脱氢酶催化下,由NAD⁺脱氢形成3-磷酸羟基丙酮酸,后者再经磷酸丝

氨酸转氨酶催化由谷氨酸转来氨基形成 3-磷酸丝氨酸。在磷酸丝氨酸磷酸酶(phosphoserine phosphatase)的作用下脱去磷酸,即形成 L-丝氨酸。L-丝氨酸在丝氨酸转羟甲基酶(serine hydroxymethyltransferase)的作用下,脱去羟甲基,即形成甘氨酸,丝氨酸转羟甲基酶的辅酶是四氢叶酸。

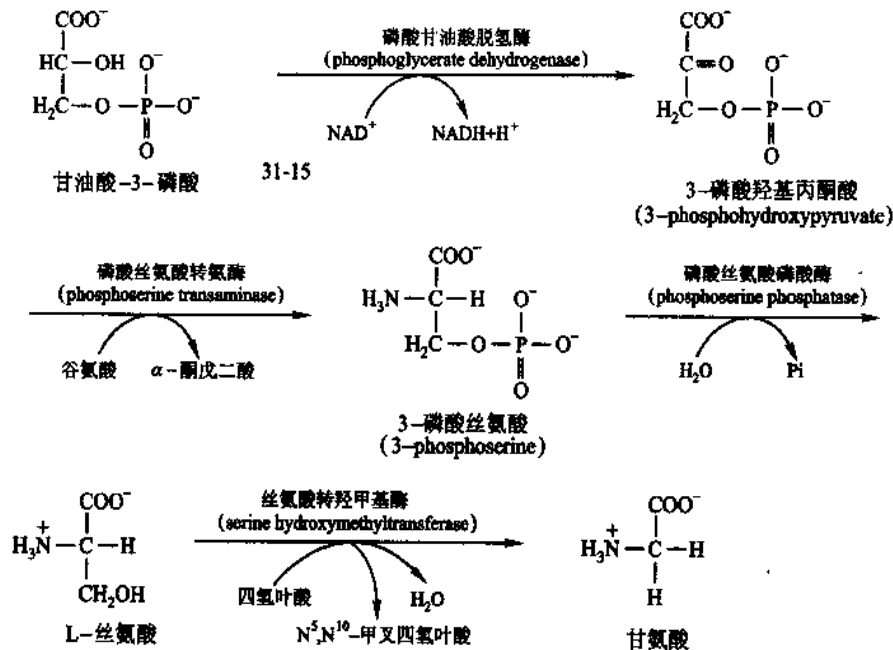


图 31-16 丝氨酸和甘氨酸的生物合成途径

2. 半胱氨酸的生物合成

半胱氨酸生物合成中的关键是硫氢基的来源,在大多数植物和微生物,其硫氢基主要来源于硫酸,可能还原为某种硫化物,这一过程相当复杂,迄今了解很少。在动物体内,硫氢基团主要来源于高半胱氨酸。

大多数植物和微生物的半胱氨酸合成途径如图 31-17 所示。起始步骤是乙酰-CoA 的乙酰基转移到丝氨酸上,形成 O-乙酰丝氨酸。催化这一反应的酶为丝氨酸转乙酰基酶。O-乙酰丝氨酸将 β-丙氨酸基团部分(-CH₂-CHNH₃⁺-COO⁻)提供给与酶结合的硫氢基团而形成 L-半胱氨酸。

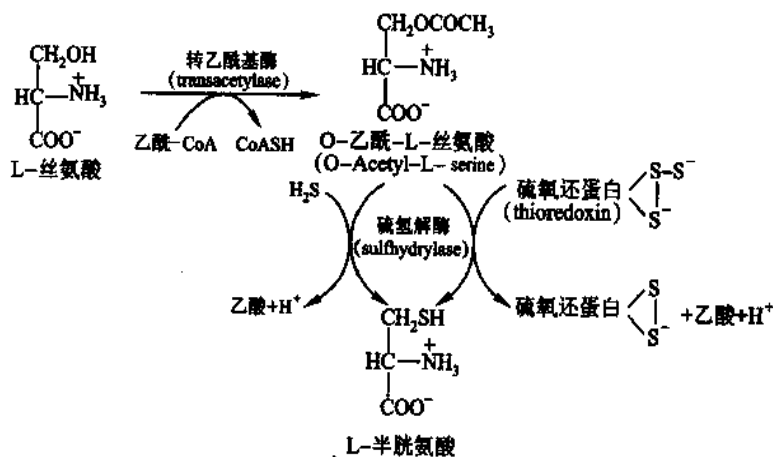


图 31-17 某些植物和微生物体内半胱氨酸的合成途径

关于硫酸的还原问题即由 SO₄²⁻ 还原为 H₂S 的过程,目前所了解的首先是通过硫酸与 ATP 作用形成活化形式,即腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(adenosine-5'-phosphosulfate, APS),催化这一反应的酶称为腺苷硫酸焦磷酸化酶(adenylylsulfate pyrophosphorylase),该化合物又在腺嘌呤-5'-磷酸硫酸激酶(APS-激酶)的作用下,再从另一分子 ATP 上接受一磷酸基团形成 3-磷酸腺嘌呤-5'-磷酸硫酸(3-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS)(图 31-18)。

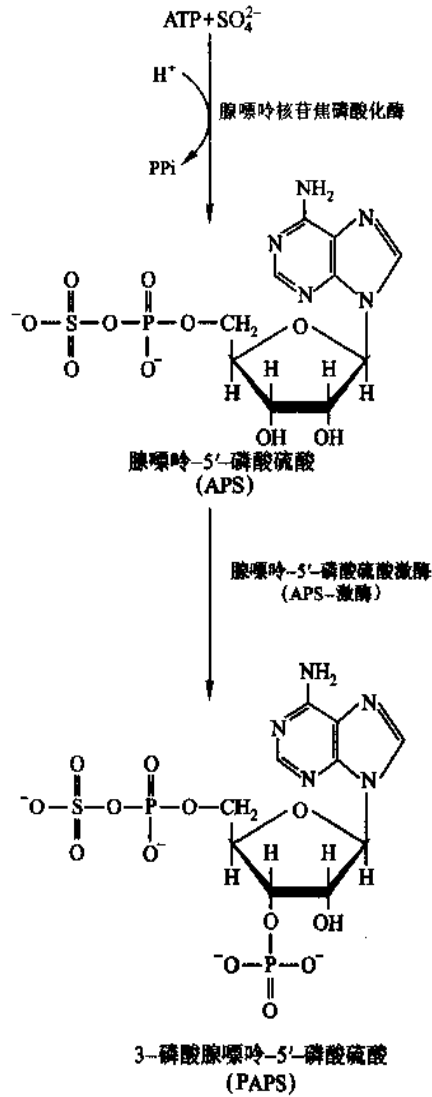


图 31-18 硫酸还原过程中所形成的活性中间产物 3-磷酸腺嘌呤-5'-磷酸硫酸 (3-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)

在动物体内半胱氨酸的直接前体为丝氨酸和高半胱氨酸。后者也是甲硫氨酸生物合成的一个中间产物,也可称为前体(见图 31-10 及 31-11 甲硫氨酸的生物合成途径)

丝氨酸和高半胱氨酸在胱硫醚 β-合酶作用下,形成 L-胱硫醚,后者在胱硫醚-γ-水解酶(胱硫醚-γ-裂合酶)作用下,分解为 α-酮丁酸、NH₄⁺ 和 L-半胱氨酸(图 31-19)。

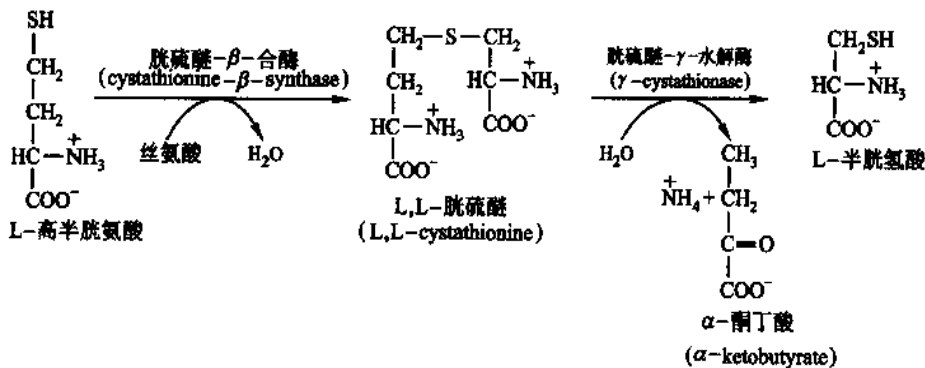


图 31-19 运动体内半胱氨酸的合成途径

三、芳香族氨基酸及组氨酸的生物合成

(一) 苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸的生物合成

芳香族氨基酸包括苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸,只能由植物和微生物合成。这 3 种氨基酸的合成途径有 7 步是共同的。合成的起始物是赤藓糖 4-磷酸(erythrose 4-phosphate)(戊糖磷酸途径的中间产物)和糖酵解过程的一个中间产物——磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate)。二者缩合形成一个七碳酮糖开链磷酸化合物,称为 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸(3 deoxy- α -arabinoheptulosonate-7-phosphate, DAHP)(图 31-20),再经脱磷酸环化,形成苯环后又脱水、加氢形成莽草酸(shikimate)。可以把莽草酸看作合成此 3 种芳香族氨基酸的共同前体,因此可将芳香族氨基酸合成相同的一段过程称为莽草酸途径。这一途径指的是以莽草酸为起始物直至形成分支酸的一段过程。具体步骤如图 31-20 所示。

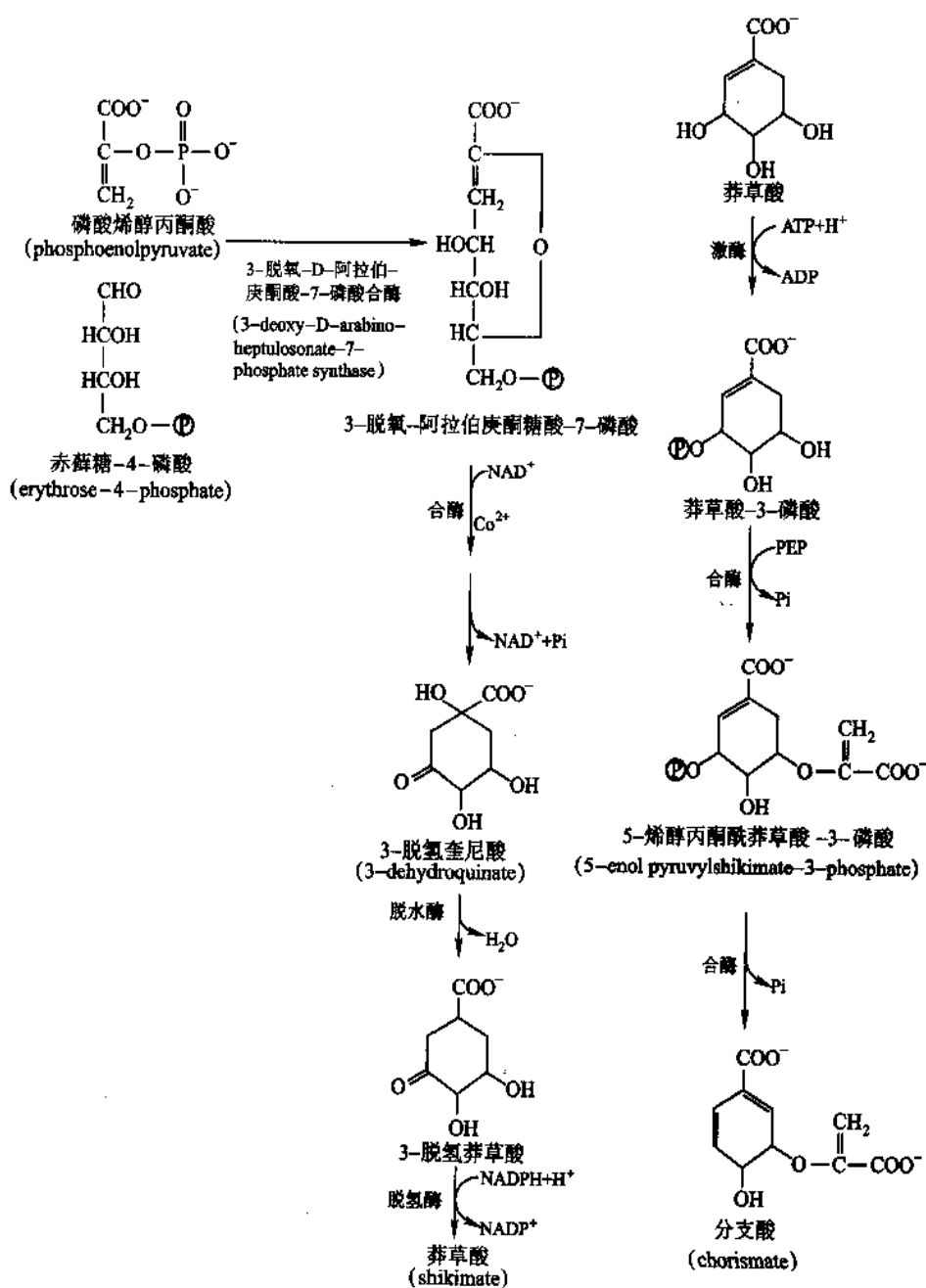


图 31-20 分支酸的生物合成,它的成环导致芳香族氨基酸的形成,例如,苯丙氨酸、色氨酸

注:Ⓧ代表磷酸基团,PEP代表烯醇式丙酮酸磷酸

分支酸(chorismate)是芳香族氨基酸合成途径的分支点。在分支酸以后即分为两条途径。其中一条是形成苯丙氨酸和酪氨酸,另一条是形成色氨酸。

1. 由分支酸形成苯丙氨酸和酪氨酸

如图 31-21 所示,分支酸(chorismate)在分支酸变位酶(chorismate mutase)作用下,转变为预苯酸(prephenate),经脱水、脱羧后形成苯丙酮酸(phenylpyruvate),后者在转氨酶作用下,与谷氨酸进行转氨形成苯丙氨酸。

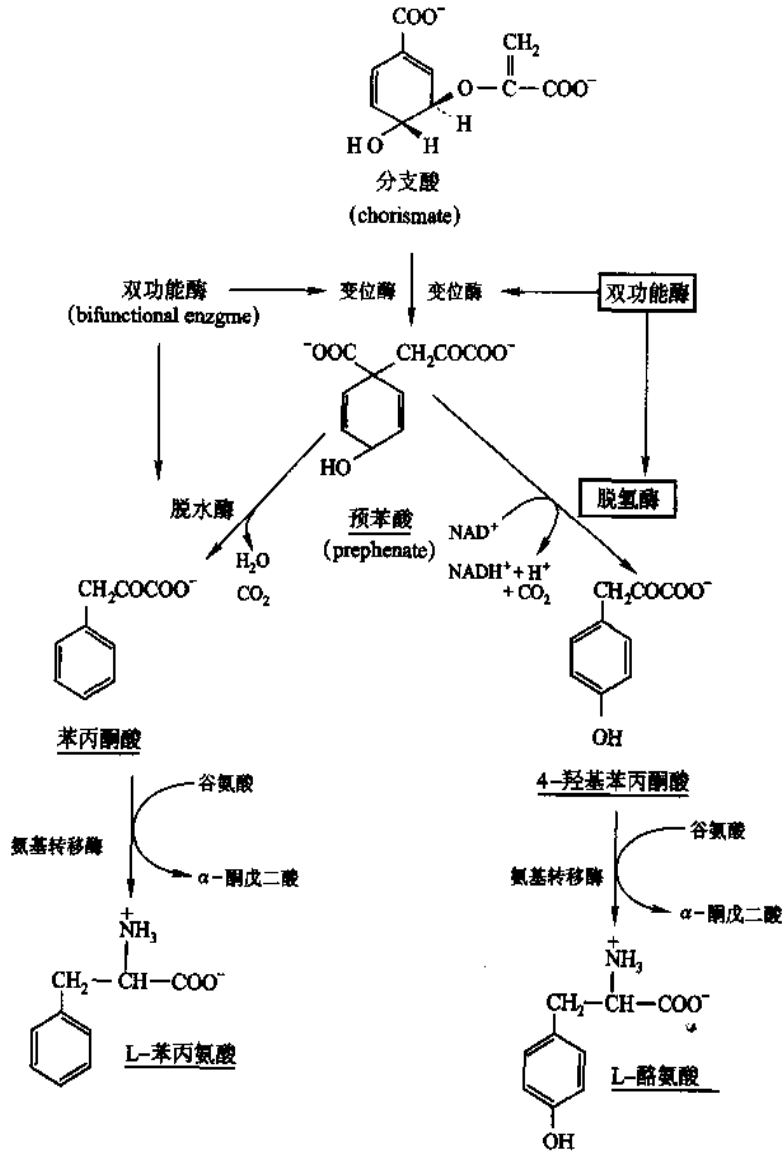


图 31-21 L-苯丙氨酸和 L-酪氨酸的生物合成,它们都来自分支酸,经过预苯酸后,步向两条不同途径

预苯酸经氧化脱羧作用形成对-羟苯丙酮酸,再由谷氨酸进行转氨即形成酪氨酸。

虽然苯丙氨酸和酪氨酸都以预苯酸作为由分支酸转变的第一步反应,但它们的合成确实是通过两条不同的途径。分支酸形成苯丙酮酸经过两个步骤,都是由一个酶催化的,称为分支酸变位酶 P-预苯酸脱水酶(chorismate mutase P - prephenate dehydratase)。该酶先将分支酸转变为预苯酸。酶蛋白和预苯酸结合在一起,由同一酶脱水、脱羧,将预苯酸转化为苯丙酮酸。催化形成对-羟苯丙酮酸是另外一个酶,称为 NAD^+ 依赖性分支酸变位酶 T-预苯酸脱氢酶 (NAD dependent chorismate mutase P - prephenate dehydrogenase)。它催化分支酸形成对-羟苯丙酮酸也是先形成与它结合在一起的预苯酸中间产物再脱

氢,脱羧(图 31-21),形成对-羟苯丙酮酸。

预苯酸无论转变为苯丙酮酸或对-羟苯丙酮酸都需脱去羧基同时脱水或脱氢。这一步骤也可视为“成环”即形成芳香环的最后步骤。

酪氨酸的生物合成除上述途径外,还可由苯丙氨酸羟化而形成。催化此反应的酶称为苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase)又称苯丙氨酸-4-单加氧酶。

有些人遗传缺乏苯丙氨酸羟化酶而产生苯丙酮酸尿症。

2. 由分支酸形成色氨酸

如图 31-22 所示,由分支酸形成色氨酸的第 1 步是形成邻-氨基苯甲酸(anthranilate)。这一步是在氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase)作用下,需谷氨酰胺的酰胺基团提供氨基,同时以丙酮酸形式脱去分

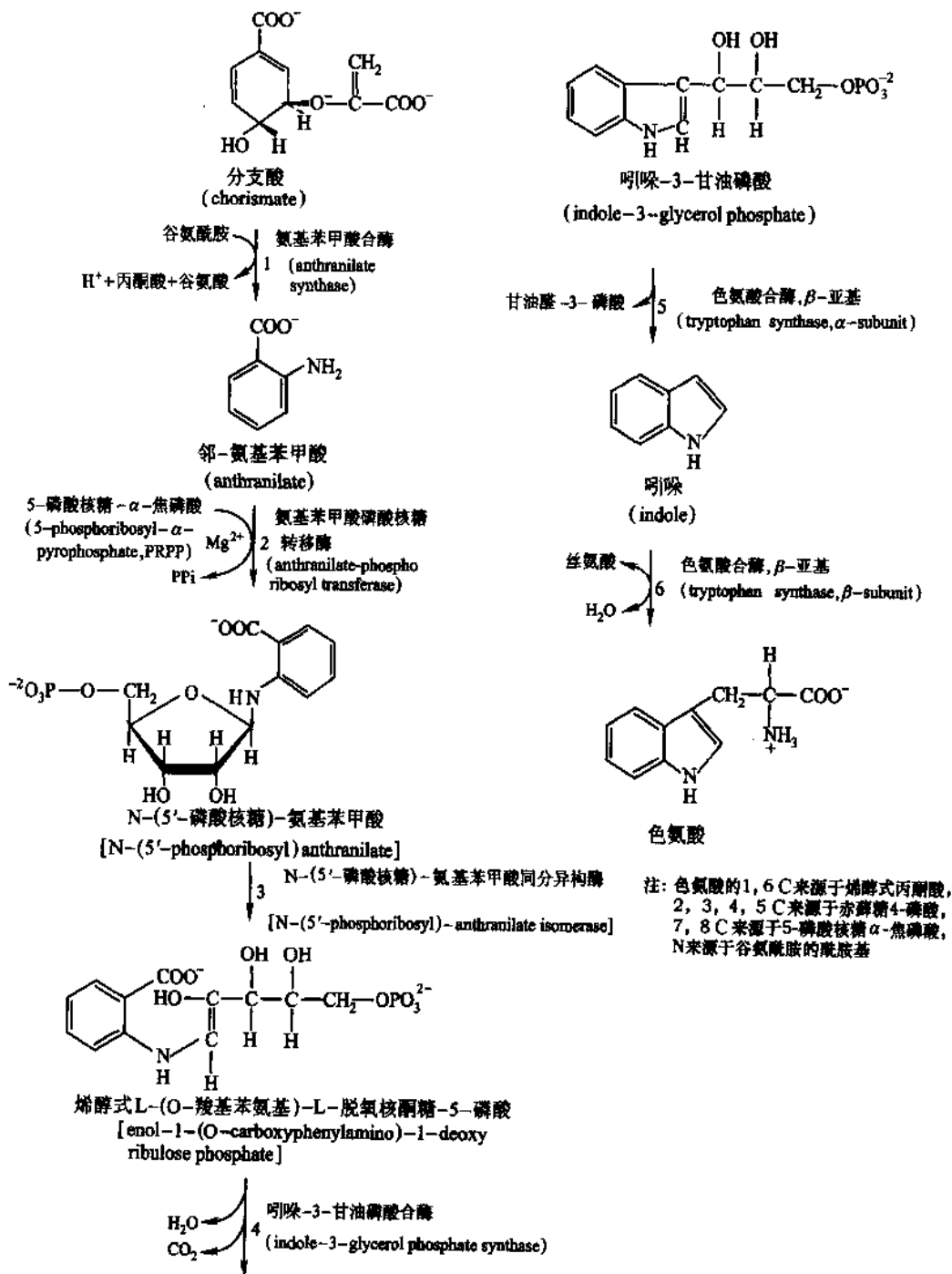


图 31-22 由分支酸形成色氨酸的途径

支酸的烯醇式丙酮酸侧链。第2步是邻-氨基苯甲酸在氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶(anthranilate-phosphoribosyl transferase)作用下,将5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸(PRPP)的5'-磷酸核糖部分转移到邻-氨基苯甲酸的氨基上,同时脱掉一个焦磷酸分子,形成N-5'-磷酸核糖-氨基苯甲酸[N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate]。核糖的C₁和C₂为吲哚环的形成提供两个碳原子。第3步的转变是在同分异构酶作用下,核糖的呋喃环被打开进行互变异构,转变为烯醇式1-(0-羧基苯氨基)-1-脱氧核酮糖-5'-磷酸[enol-1-(0-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5'-phosphate]。又在吲哚-3-甘油磷酸合酶(Indole-3-glycerol phosphate synthase)作用下环化,形成吲哚-3-甘油磷酸。吲哚-3-甘油磷酸在色氨酸合酶催化下脱掉甘油醛-3-磷酸形成吲哚(indole),在同-酶作用下与丝氨酸结合,脱去水,形成色氨酸。

通过上述的合成反应,总览一下色氨酸碳原子和氮原子的来源可以看到,吲哚环上苯环的C₁和C₆来源于磷酸烯醇式丙酮酸;C₂、C₃、C₄、C₅来源于赤藓糖-4-磷酸。色氨酸吲哚环的氮原子来源于谷氨酰胺的酰胺氮,吲哚环的C₁和C₄来源于PRPP,色氨酸的侧链部分来源于丝氨酸(图31-22)。

(二) 组氨酸的生物合成

组氨酸的酶促合成有9种酶参与催化,并经过10步特殊反应,如图31-23。

组氨酸合成的第1步是5'-磷酸核糖-1'-焦磷酸(PRPP)的5'-磷酸核糖部分转移到ATP分子上,与ATP嘌呤环的第一个氮原子形成以N-糖苷键(N-glycosyl linkage)相连的化合物N-1-(5'-磷酸核糖)-ATP。第2步,上述化合物ATP部分水解除掉一个焦磷酸分子形成N-1-(5'-磷酸核糖)-AMP。该化合物的C₆与一亚氮离子(iminium ion)相连,亚氮离子有强烈吸收电子的作用,因此容易受水的亲核攻击。第3步,在磷酸核糖-AMP解环酶(cyclohydrolase)作用下,上述N-1-(5'-磷酸核糖)-AMP的嘌呤环在C₆和N₁之间被打开,形成N-1-(5'-磷酸核糖亚氨基)-5-氨基咪唑-4-羧酰胺核苷酸(N¹-5'-phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)。第4步,由同分异构酶打开核糖的呋喃环,将其转变为酮糖,形成N-1-(5'-磷酸核酮糖亚氨基)-5-氨基咪唑-4-羧酰胺核苷酸。即分子内的核糖转变为核酮糖(ribulose)。第5步,由谷氨酰胺酰氨基转移酶催化形成咪唑甘油磷酸和5'-磷酸核糖-4-羧酰胺-5-氨基咪唑核苷酸,后者是嘌呤核苷酸生物合成的中间产物。参加组氨酸合成的是咪唑甘油磷酸,在第5步中,谷氨酰胺的酰胺基可能在酶的活性部位短暂地以NH₃的形式攻击亚氨基的碳原子,使亚氨基键断裂,并紧接着环化形成咪唑环。谷氨酰胺的酰胺氮即进入了组氨酸咪唑环N₁的位置。咪唑环的N₂、C₅来源于起始步骤中ATP的嘌呤环,咪唑甘油磷酸其余的5个碳原子都来源于PRPP。第6步,咪唑甘油磷酸脱水酶催化脱水,生成的烯醇式产物互变异构形成咪唑丙酮醇磷酸(imidazole acetol phosphate)。第7步,需谷氨酸的组氨酸醇磷酸氨基转移酶将谷氨酸的氨基转移到咪唑丙酮醇磷酸上,形成L-组氨酸醇磷酸。第8步,组氨酸醇磷酸酶将上述磷酸酯水解生成L-组氨酸醇。第9步和第10步都是由需NAD⁺的组氨酸醇脱氢酶将L-组氨酸醇连续脱氢,第一次脱氢形成L-组氨酸醛,第二次则生成L-组氨酸。

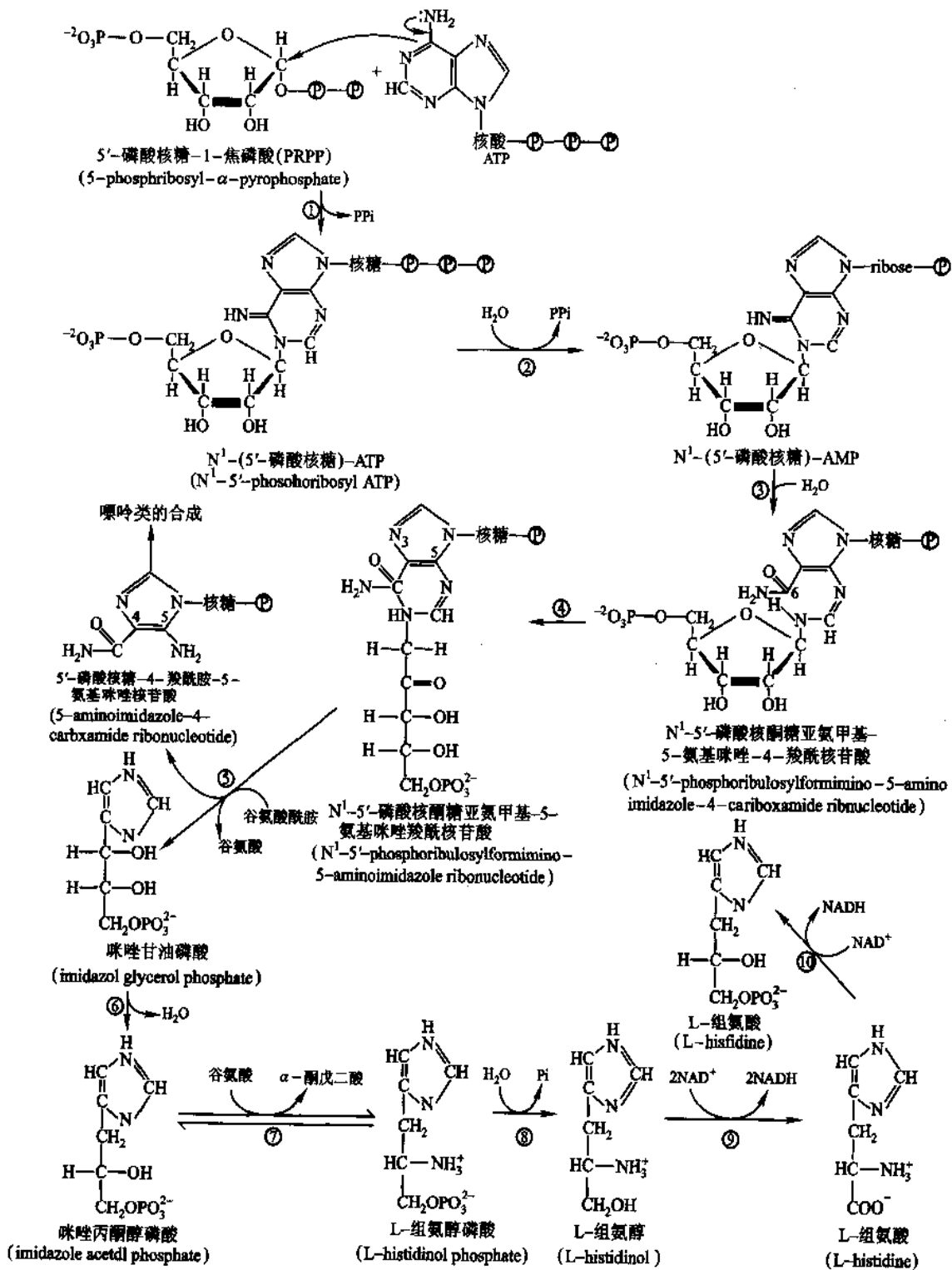


图 31-23 组氨酸的生物合成

图中①ATP 磷酸核糖转移酶(ATP phosphoribosyl transferase), ②焦磷酸水解酶(pyrophosphohydrolase), ③磷酸核糖-AMP 环化水解酶(phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase), ④磷酸核糖亚氨基-5-氨基咪唑-4-羧酰胺核苷酸同分异构酶(phosphoribuloylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide isomerase), ⑤谷氨酸酰胺转氨酶(glutamine amidotransferase), ⑥咪唑甘油磷酸脱水酶(imidazole glycerol phosphate dehydrogenase), ⑦L-组氨酸醇磷酸转氨酶(L-histidinol phosphate aminotransferase), ⑧L-组氨酸醇磷酸酶(L-histidinol phosphate phosphatase), ⑨组氨酸醇脱氢酶(histidinol dehydrogenase), ⑩组氨酸脱氢酶(histidinal dehydrogenase)

四、氨基酸生物合成的调节

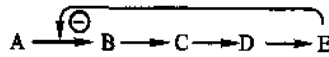
氨基酸的生物合成,根据机体的需要情况有严格的调节机制。不同氨基酸的调节机制不同,甚至不同机体同一种氨基酸的调节机制也不同。当前研究得透彻的是大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏杆菌(*Salmonella typhimurium*),对其 20 种氨基酸合成的调节机制都作过比较深入的研究。但从其他细菌、真菌以及植物中得到的结果,与上述两种机体的调节机制往往有很大差异,本节着重讨论以大肠杆菌作为主要材料所得到的一些一般调节规律。

氨基酸合成既可通过调节酶活性或代谢过程中的代谢物,又可通过调节酶的生成量实现调节。最有效的调节是通过合成过程的终端产物抑制其反应系列中第一个酶的活性,亦即通过变构效应(allosteric effect)调节第一个酶的生成物。

(一) 通过终端产物对氨基酸生物合成的抑制

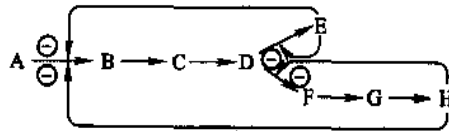
可概括为以下几种形式:

1. 简单的终端产物抑制可用下式表示:



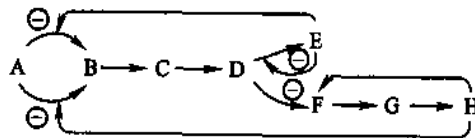
终端产物 E 抑制合成途径中第一个酶的活性,例如,由苏氨酸合成异亮氨酸,后者即是苏氨酸脱氨酶(threonine deaminase)的反馈抑制物(图 31-13)。

2. 不同终端产物对共经合成途径的协同抑制(concerted end product inhibition)



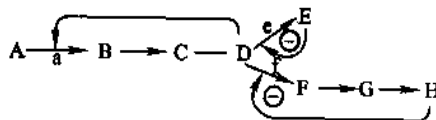
终端产物 E 和 H 既抑制在合成过程中共经途径的第一个酶,也抑制在分道后第一个产物的合成酶。例如,谷氨酸形成谷氨酰胺第 1 步反应中起催化作用的酶,即谷氨酰胺合酶(参看本章第一节,α-酮戊二酸形成谷氨酰胺)受到 8 种产物的反馈抑制。

3. 不同分支产物对多个同工酶的特殊抑制——酶的多重性抑制(enzyme multiplicity)



A 形成 B 由两个酶分别合成,两个酶分别受不同分支产物的特殊控制。两个分支产物又分别抑制其分道后第一个产物 E 和 F 的形成。例如,由赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸形成 3 种芳香族氨基酸的途径(图 31-24)。

4. 连续产物抑制(sequential end product inhibition),又称连续反馈控制(sequential feedback control)或逐步反馈抑制(step feedback inhibition)



终端产物 E 和 H 只分别抑制分道后自己途径中第一个酶的作用。共经途径的终端产物 D 抑制全合成过程第一个酶的作用。这种抑制的特点是由于 E 对 e 酶的抑制致使 D 产物增加, D 的增加促使反应向 D→F→G→H 方向进行, 而使产物 H 增加, 又对 f 酶产生抑制, 结果也造成 D 物质的积累, D 物质反馈抑制 a 酶的作用, 而使 A→B 的速度减慢。枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 中芳香族氨基酸生物合成的反馈抑制即属这种类型。苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸分支途径的第一步都分别受各自终产物的抑制。如果 3 种终端产物都过量, 则分支酸即行积累。分支点中间产物积累的结果, 使共经途径催化第一步反应的酶受到反馈抑制, 从而抑制赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸的缩合反应 (见图 31-24)。

由天冬氨酸生成赖氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸的过程也出现有各种类型的抑制现象 (图 31-25)。

催化谷氨酸与氨结合形成谷氨酰胺的谷氨酰胺合成酶受到 8 种产物的反馈抑制作用。该酶的调节属于已知酶中最复杂的调节机制之一 (图 31-26)。

并不是所有氨基酸的生物合成都受最终产物的反馈抑制, 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸就是例外。这 3 种氨基酸靠与其相对应的酮酸的可逆反应维持平衡。这 3 种氨基酸是中心代谢环节的关键中间产物。

甘氨酸的合成酶也不受最终产物抑制, 此酶可能受到一碳单位和四氢叶酸的调节。

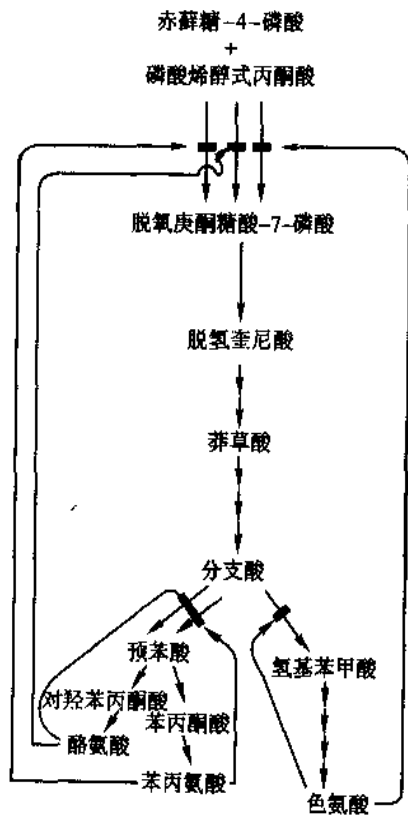


图 31-24 苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸合成的连续产物抑制

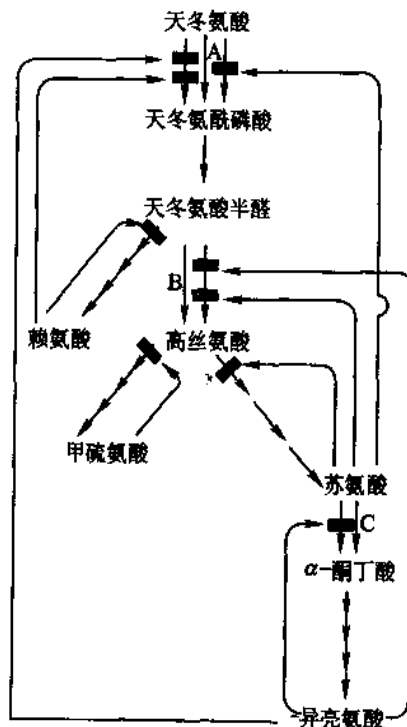


图 31-25 赖氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸合成的连续产物抑制

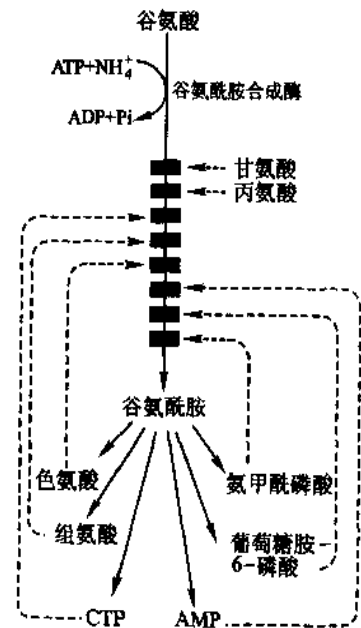


图 31-26 谷氨酰胺合成的连续产物抑制

(二) 通过酶生成量的改变调节氨基酸的生物合成

酶生成量的控制主要是通过有关酶编码基因活性的改变。当某种氨基酸的合成能够提供超过需要量的产物时, 则该合成途径酶的编码基因即受到抑制; 而当合成产物浓度下降时, 有关编码基因则解除抑制, 从而合成增加产物浓度所需要的酶。有关酶基因的调控问题请参考第 39 章。

在氨基酸的合成途径中,有些酶能够受到细胞合成量的控制,这种酶称为阻遏酶(repressible enzyme)。例如,在大肠杆菌由天冬氨酸衍生的几种氨基酸的合成过程中(图 31-25),标有 A、B、C 的 3 种酶都不属于变构酶,这些酶属于阻遏酶,它们的调控靠细胞对其合成速度的改变。当甲硫氨酸的量足够时,同工酶 A 和 B 都受到阻遏。同样当异亮氨酸的合成足够时同工酶 C 的合成速度就受到阻遏。靠阻遏与去阻遏(derepression)调控氨基酸的生物合成一般比变构调控缓慢。

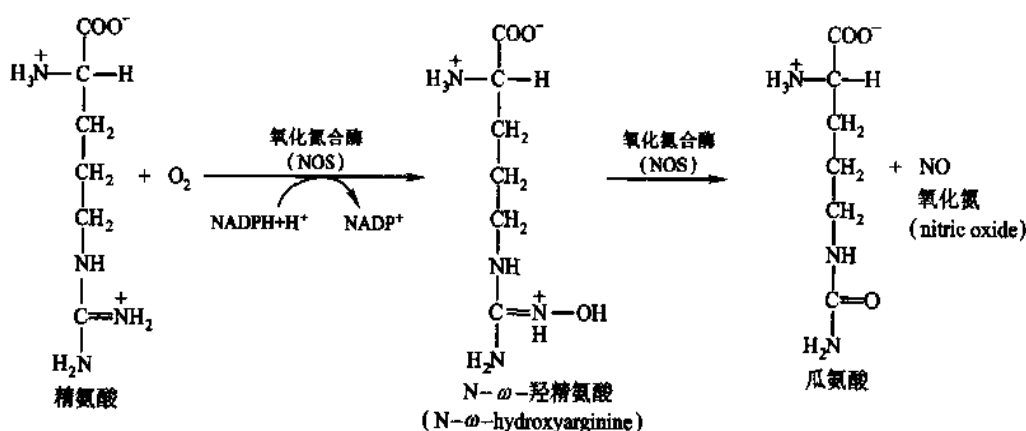
因 20 种氨基酸在蛋白质生物合成中都需以准确的比例提供需要,因此生物机体不仅有个别氨基酸合成的调控机制,而且有使各种氨基酸在合成中相互协调(coordination)的调控机制。在生长迅速的细菌中,这种机制比电子计算机还要完善。

五、氨基酸转化为其他氨基酸及其他代谢物

某些氨基酸,除了它是蛋白质的组成单元外,还可成为一些重要生物分子的前体。这些分子包括一些核苷酸、核苷酸辅酶、血红素、各种激素、神经介质、氧化氮及谷胱甘肽等。本节将介绍氧化氮、谷胱甘肽、肌酸、卟啉及血红素、短杆菌肽等是如何从氨基酸转化形成的。有关核苷酸、核苷酸辅酶将在有关章节介绍。

(一) 氧化氮的形成

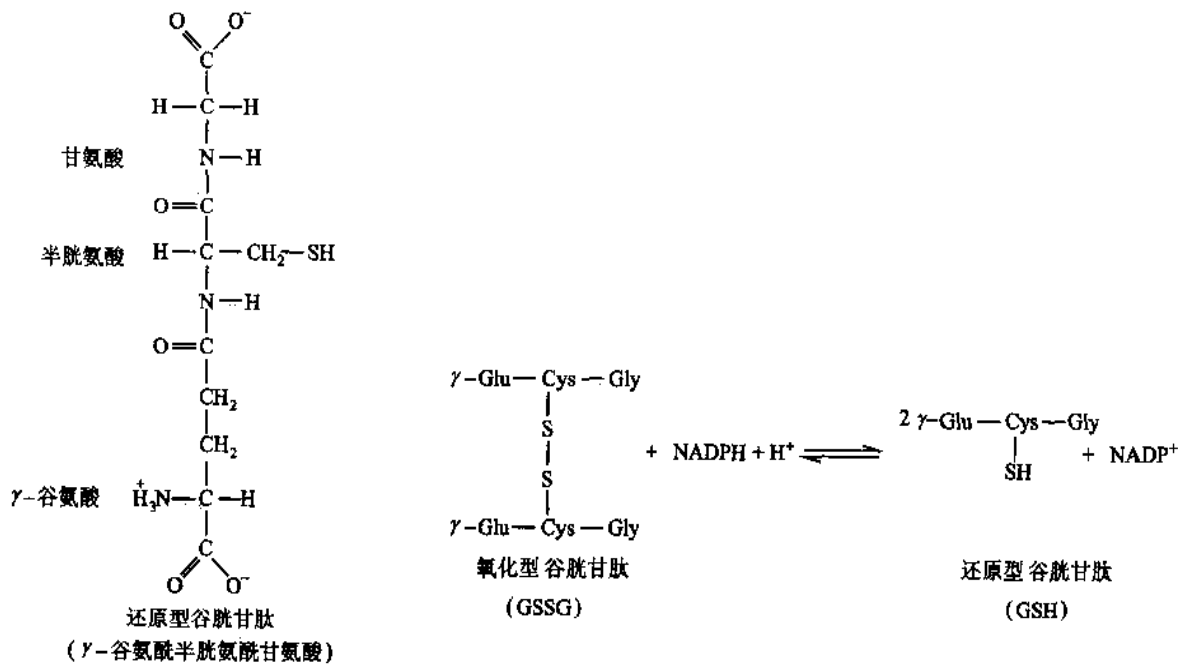
氧化氮(nitric oxide, NO)最近被发现在脊椎动物体内是一种重要的信息分子。它在信号传导过程中起重要作用。它是由精氨酸在氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下形成的,产物是氧化氮和瓜氨酸,反应如下式:



以上的反应,实际上是一复杂反应。反应中还原型的 NADPH 和 O_2 都需要。对这两种物质的需要表明氧化氮合酶(NOS)可能类似于细胞色素 P450。后者在催化羟基化反应中有活化分子氧的作用。实验证明,氧化氮合酶的 cDNA 序列自羧基端有一半与 P450 加氧酶(oxygenases)的序列相似。特别是在结合部位,二者都有黄素(flavins)和 NADPH 的结合部位。氧化氮可自由地跨膜扩散。因它非常活跃,其存在时间极短,甚至少于几秒钟。一氧化氮非常适合于在细胞内部以及在细胞之间作为瞬间的信号分子。

(二) 谷胱甘肽(glutathion)

谷胱甘肽含有巯基(-SH),能保护血液中的红细胞不受氧化损伤、维持血红素中半胱氨酸处于还原态。正常情况下,还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)之比为 500:1 以上。在运动细胞中谷胱甘肽的含量很高(约 5 mol/L),因此谷胱甘肽可起到 -SH“缓冲剂”(sulfhydryl buffer)的作用。



还原型谷胱甘肽与过氧化氢或其他有机氧化物反应还可起到解毒作用。

谷胱甘肽还参与氨基酸的转运, Meister A 首先提出 γ-谷氨酰循环, 解释了谷胱甘肽在氨基酸跨膜转运中的机制(图 31-27)。

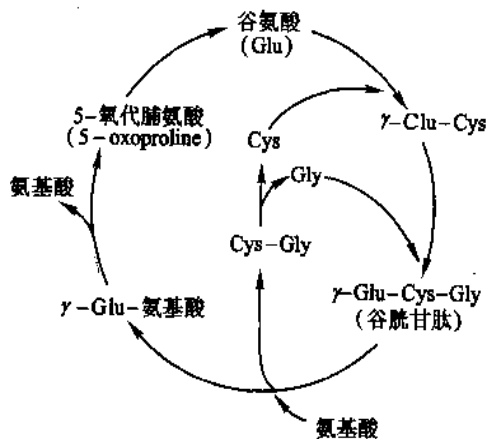


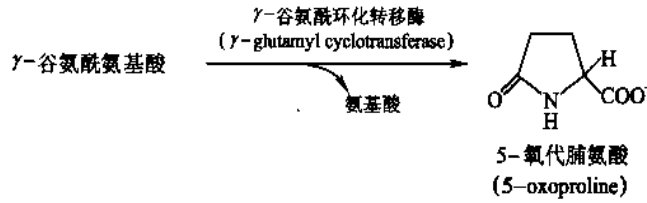
图 31-27 谷胱甘肽在氨基酸跨膜转运的作用机制

谷胱甘肽通过 γ-谷氨酰循环完成氨基酸的跨膜转运, 氨基酸以 γ-谷氨酰衍生物(γ-glutamyl derivative)的形式, 从一个细胞转移到另一个细胞, 谷胱甘肽与氨基酸形成 γ-谷氨酰氨基酸的反应发生于细胞质膜的外表面。循环中所有其他反应都在细胞溶胶内进行

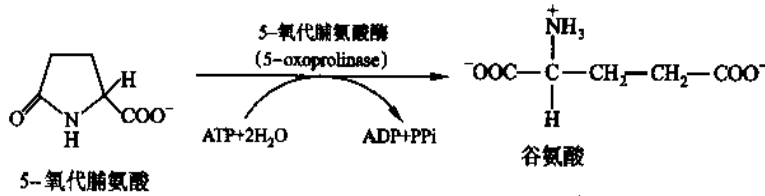
在此循环中存在一个与膜结合的酶, 称为 γ-谷氨酰转肽酶(γ-glutamyl transpeptidase)。该酶的催化作用是使谷胱甘肽分子上的 γ-谷氨酰基转移到任何一个氨基酸上, 形成 γ-谷氨酰氨基酸:



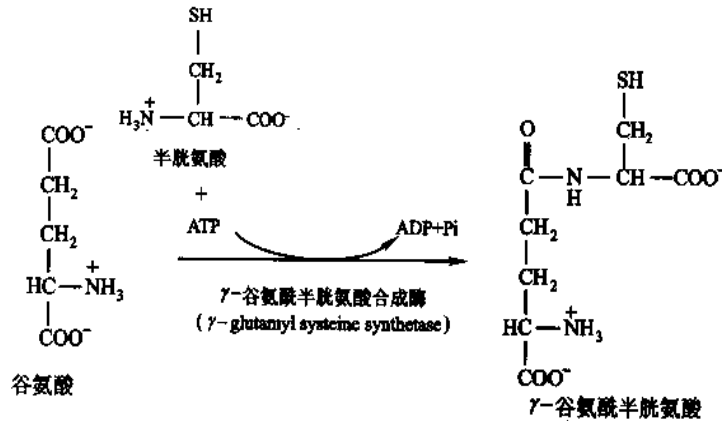
该酶的催化部位在细胞膜外侧(肾细胞)。谷胱甘肽能跨过质膜进行上述反应, 形成的 γ-谷氨酰氨基酸被其他器官的细胞吸收并环化形成 5-氧代脯氨酸(5-oxoproline)。同时将被转运的氨基酸释出:



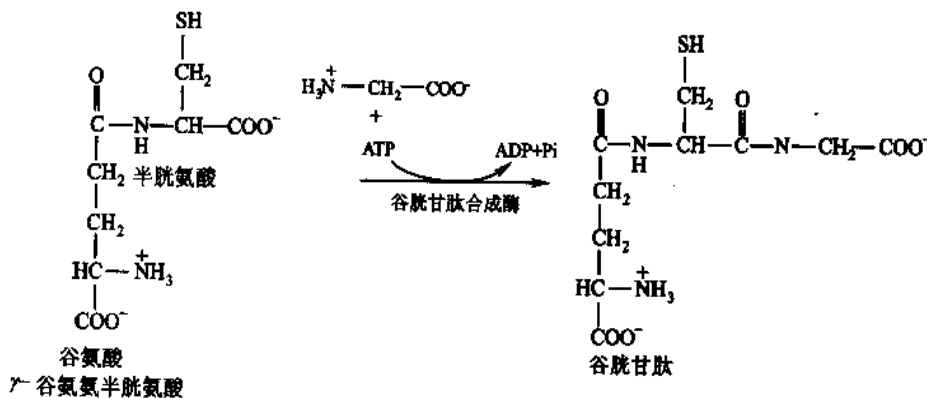
5-氧代脯氨酸在5-氧代脯氨酸酶作用下水解开环又形成谷氨酸。该反应为需能反应。



谷胱甘肽生物合成的第1步是谷氨酸的γ-羧基和半胱氨酸的氨基之间形成肽键。催化此反应的酶称为γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶。该肽键的形成需要由ATP先将γ-羧基活化,形成γ-谷氨酰磷酸,活化了了的γ-羧基易于接受半胱氨酸氨基的进攻,形成肽键,同时脱去磷酸,该反应受谷胱甘肽的反馈抑制。



谷胱甘肽合成的第二步是γ-谷氨酰半胱氨酸分子中半胱氨酸部分的羧基与甘氨酸的氨基之间形成肽键。催化此反应的酶称为谷胱甘肽合成酶,反应的机制和上述肽键的形成基本上相同,在ATP参与下使半胱氨酸的羧基活化,而易于接受甘氨酸氨基的进攻。



(三) 肌酸(creatine)的生物合成

肌酸可形成磷酸肌酸在肌肉和神经的贮能中占有重要地位(参看第20章生物能学)。

肌酸的生物合成是由甘氨酸、精氨酸、甲硫氨酸形成。精氨酸提供胍基(guanidino group)甲硫氨酸提供甲基,其合成步骤可表示如图31-28。

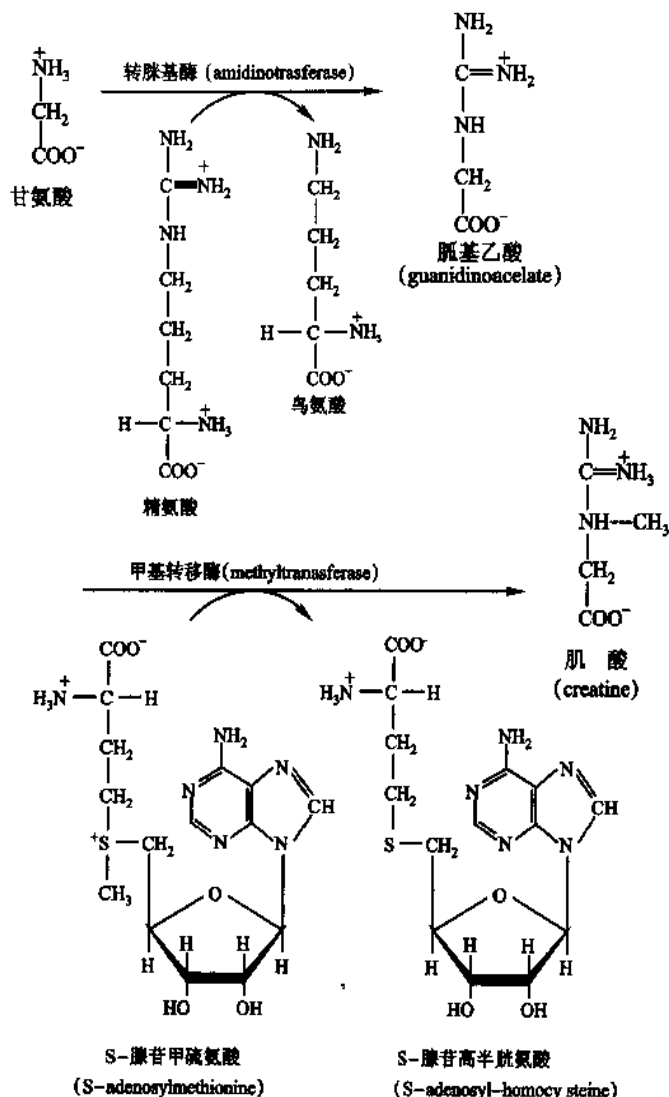
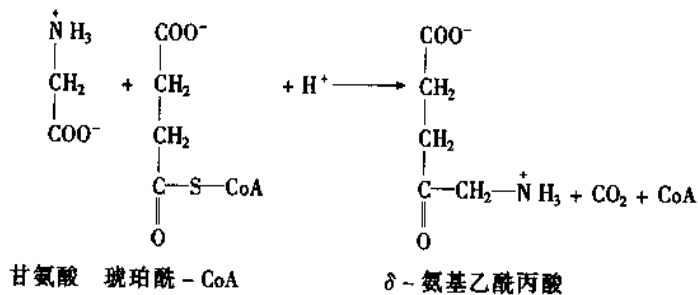


图 31-28 肌酸的生物合成

(四) 卟啉 (porphyrin), 血红素 (heme) 的生物合成

1. 卟啉是从琥珀酰 - CoA 及甘氨酸衍生而来

(1) 自甘氨酸形成 δ -氨基乙酰丙酸 (δ -aminolevulinate, ALA) 甘氨酸在与琥珀酰辅酶 A 缩合前先与 δ -氨基乙酰丙酸合成酶的辅酶磷酸吡哆醛结合, 形成一个中间产物 α -氨基- β -酮己二酸, 然后脱羧而成 δ -氨基乙酰丙酸。



其反应机制如图 31-29 所示。

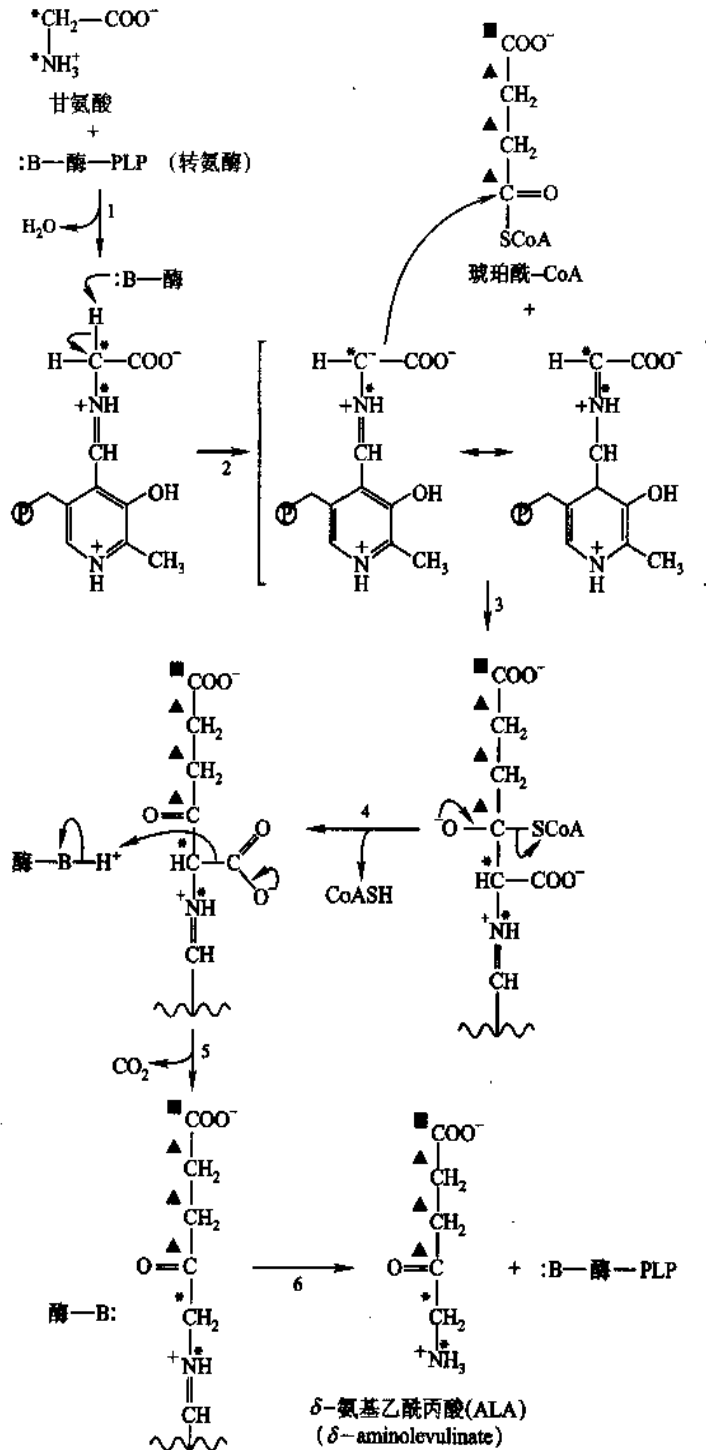
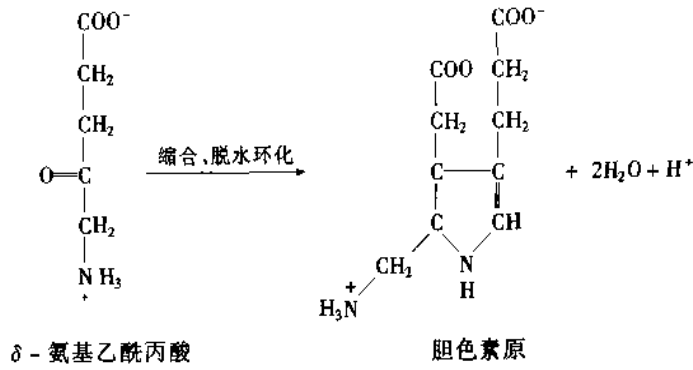


图 31-29 卟啉合成过程中甘氨酸与琥珀酰-CoA 形成中间产物 δ -氨基乙酰丙酸的反应机制
 1. 甘氨酸在酶催化下发生转氨基反应, 辅因子为吡哆醛磷酸 (PLP); 2. PLP 使磷负离子的形成得到稳定; 3. C-C 键的形成; 4. CoA 的释出; 5. 由于 PLP 希夫碱发生脱羧反应; 6. 发生转氨基作用, 产生 δ -氨基乙酰丙酸 (ALA) 同时 PLP 酶又得到再生。■、▲、* 为 C 和 N 原子来源的标记

(2) 自 δ -氨基乙酰丙酸生成胆色素原 (porphobilinogen, PBC) 在细胞溶胶中, 两分子 δ -氨基乙酰丙酸缩合形成一分子胆色素原, 这是第二个中间产物。催化此反应的酶 δ -氨基乙酰丙酸脱水酶 (δ -aminolevulinic acid dehydratase)。催化过程经过两分子 δ -氨基乙酰丙酸间的醇醛缩合反应, 加合物的脱水以及环化等反应最后形成胆色素原。以上反应都是在与酶结合的状态下进行。



全部过程可表示如图 31-30。

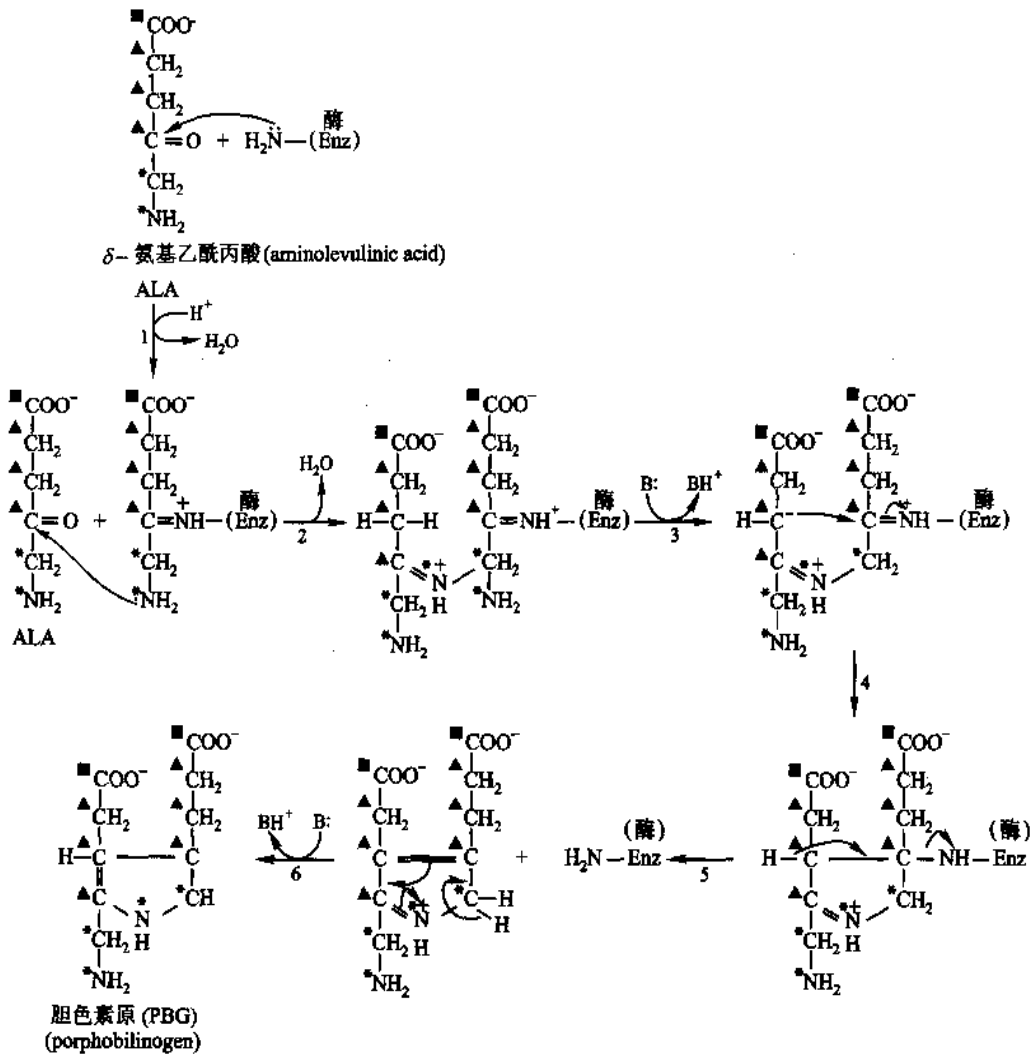


图 31-30 由 δ -氨基乙酰丙酸(ALA)合成胆色素原

图中所示反应包括①形成希夫碱;②形成第二个希夫碱;③形成 α -负碳离子(carbanion)与希夫碱反应;④以羟醛(alldol)形式缩合而环化;⑤消除酶的 NH_2 基团;⑥互变异构化,形成胆色素原

(3) 胆色素原是吡咯化合物的母体 4 分子胆色素原在胆色素原脱氨酶(porphobilinogendeaminase)催化下,缩合形成一线型四吡咯(tetrapyrrole),即聚吡咯基甲烷(polypyrryl methane)。每一缩合即形成一个乙烯桥,同时失去一铵离子。仔细考察可以看到这个四吡咯中的氮和碳原子来源于丙氨酸,其他则来自琥珀酰-CoA,其反应机制见图 31-31。

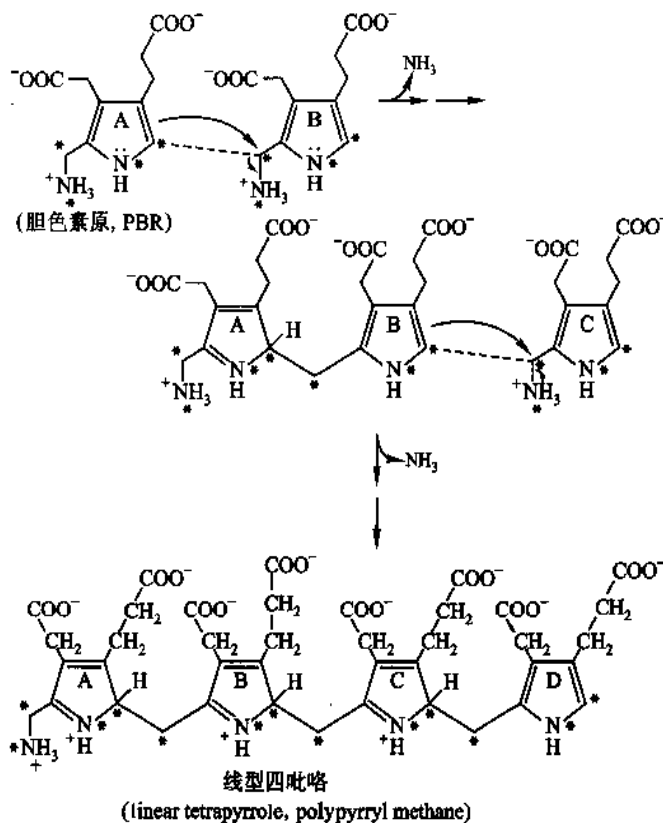


图 31-31 胆色素原缩合形成线型四吡咯反应机制

(4) 线型四吡咯的环化 如果没有其他酶存在, 线型四吡咯可自行环化, 形成尿卟啉原 I (uroporphyrinogen I)。该化合物的结构特点如图 31-32 所示。它的四个吡咯环内的双键以两个对称平面彼此对称; 侧链的乙酸和丙酸基都以该分子的中心互相对称, 尿卟啉原 I 并不是血红素的前体, 它的前体是尿卟啉原 III, 后者是由胆色素原脱氢酶和尿卟啉原 III 同合酶 (uroporphyrinogen III cosynthase) 共同作用形成的, 它的结构如图 31-33 所示。尿卟啉原 III 和尿卟啉原 I 的区别在于第 4 个吡咯环 (B 环) 上的乙酸基和

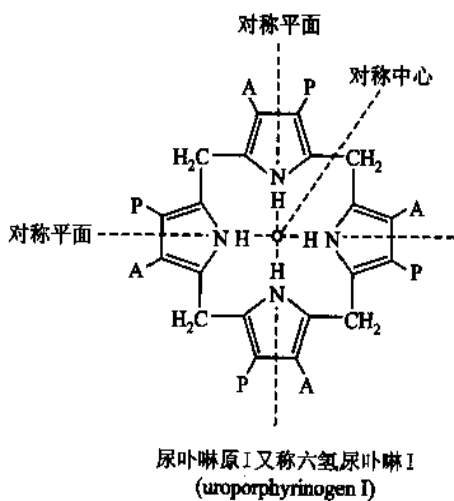


图 31-32 尿卟啉原I (uroporphyrinogen I) 的结构
图中 A 代表乙酰基; P 代表丙酰基。吡咯核双键以两个对称平面对称, 乙酰基和丙酰基侧链以对称中心对称

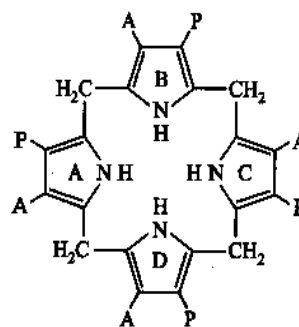


图 31-33 尿卟啉原III (uroporphyrinogen III)
与尿卟啉原 I 的结构 (图 31-32) 的区别仅在于一个吡咯环上的侧链, 乙酰基和丙酰基的位置不同, 图中 A 代表乙酰基; P 代表丙酰基

丙酸基侧链位置相反,因此失去以分子对称中心的对称关系。此侧链异位是由于辅合成酶催化四吡咯 D 环双键的互变异构后环化产生的。胆色素原(PBG)合成尿卟啉原Ⅲ的过程如图 31-34 所示,图中参与反应的与胆色素原脱氨酶(porphobilinogen deaminase)结合的辅助因子——联吡咯甲烷是由胆色素原脱氨酶自己用两个胆色素原预先合成的。

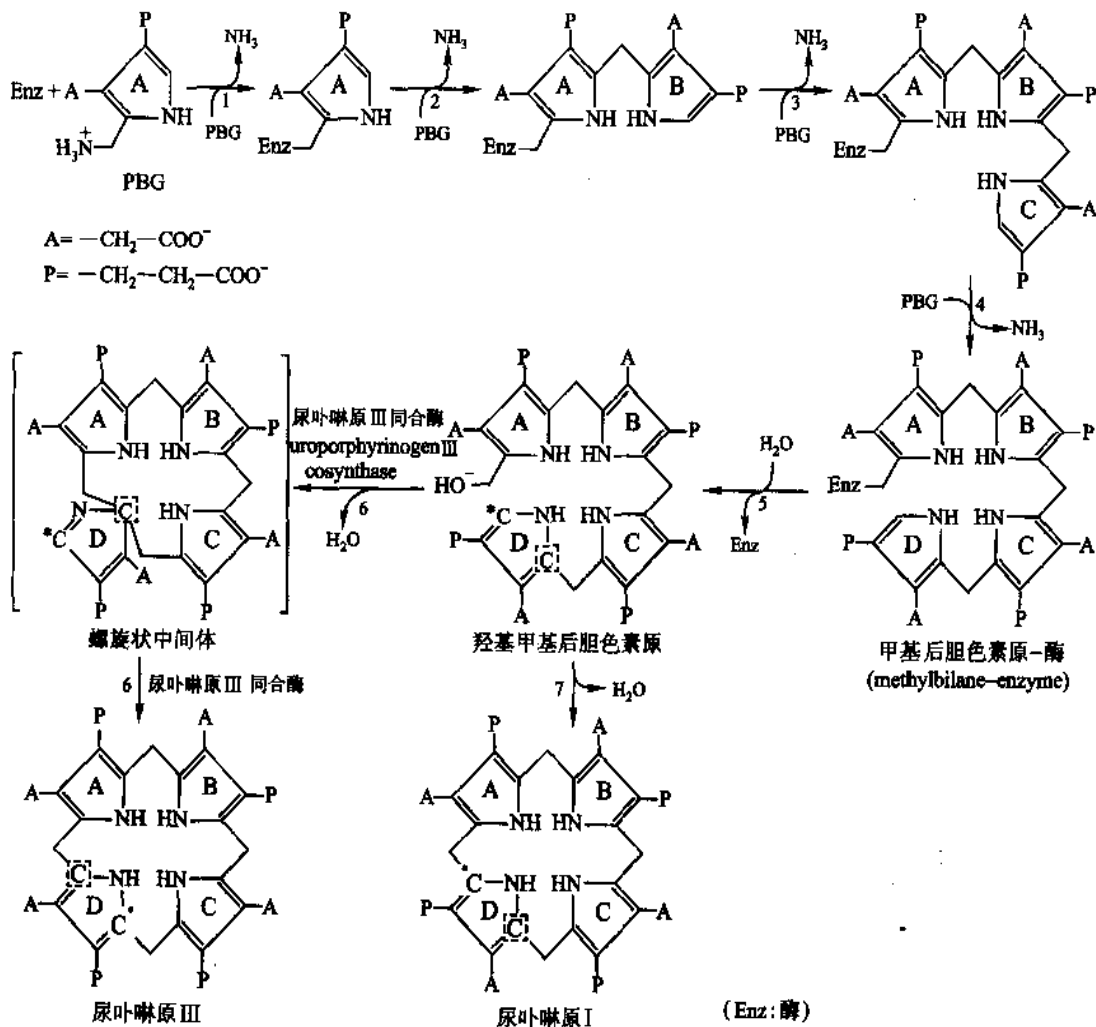


图 31-34 自胆色素原(PBG)合成尿卟啉原Ⅲ的过程

(1a)由一般碱催化脱氨形成亚吡咯啉(methylene pyrrolinene)中间体,(1b)与胆色素原脱氨酶-联吡咯甲烷(E-C₁-C₂)相结合。(2-4)第二,三,四 PBG 连续加成并脱氨形成甲基-后胆色素原-酶-C₁-C₂,每次的反应过程重复 1a 和 1b。(5)甲基后胆色素原-酶-C₁-C₂水解形成羟基甲基后胆色素原,并脱下酶-C₁-C₂。(6)由胆色素原脱氨酶和尿卟啉原Ⅲ同合酶催化经螺旋状中间体,转化为尿卟啉原Ⅲ(7)羟基甲基后胆色素原还可自动环合,形成尿卟啉原Ⅰ

尿卟啉原Ⅲ在一系列酶的催化下,经类卟啉原Ⅲ(coproporphyrinogen)(图 31-35),在原卟啉Ⅸ氧化酶作用下转变为原卟啉Ⅸ(protoporphyrin Ⅸ)(图 31-36),在亚铁螯合酶(ferrochelatase)催化下,亚铁原子掺入原卟啉Ⅸ形成血红素,它的结构如图 31-37 所示。

2. 血红素(heme)生物合成的历程

① δ -氨基乙酰丙酸(ALA)的合成完成于线粒体中。②它从线粒体脱出转化为胆色素原(PBG)。③由胆色素原脱氨酶催化,4个分子的 PBG 缩合脱氨又羧基化形成线型羟基甲基后胆色素原,然后在尿卟啉原Ⅲ同合酶(uroporphyrinogen Ⅲ cosynthase)的作用下形成尿卟啉原Ⅲ(uroporphyrinogen Ⅲ),它在尿卟啉原Ⅲ脱羧酶的作用下形成血红素的前体类卟啉原Ⅲ(coproporphyrinogen Ⅲ)(图 31-35)。④接着对吡咯环取代基的氧化作用产生原卟啉Ⅸ(protoporphyrin Ⅸ)。这三步反应是伴随反应物又返回线粒体发生的。⑤与吡咯环相接的亚甲基(methylene)被氧化后,产生原卟啉Ⅸ(protoporphyrinogen Ⅸ)。⑥亚铁螯合酶催化下,对

原卟啉Ⅸ螯合 Fe^{2+} 离子,得到血红素(heme)。血红素合成的全过程如图 31-39 所示。图中 A 为乙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$),D 为丙酰基($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$),M 为甲基($-\text{CH}_3$)V 为乙烯基($-\text{CH}_2=\text{CH}_2$)。

类卟啉原Ⅲ在生物合成的地位十分重要,除血红素外,它还是生成叶绿素,维生素 B_{12} 及 siro- 血红素的中间体,从它出发,经原卟啉Ⅸ,若螯合 Fe^{2+} 得(正铁)血红素(protoheme),它是血红素的前体。若螯合 Mg^{2+} ,则得到 Mg^{2+} 原卟啉Ⅸ(Mg protoporphyrin IX),它是叶绿素的前体。从尿卟啉原走向另一途径,可生成维生素 B_{12} 等。

临床上由于血红素合成的某种酶缺失,而引起卟啉化合物或前体物堆积,称为卟啉症(porphyrin),这种病属于遗传病。如缺乏尿卟啉原Ⅲ同合酶,则尿卟啉原Ⅰ在红细胞中积累,尿中含有大量尿卟啉原Ⅰ和类卟啉原Ⅰ并呈红色,牙齿在紫外光下有强的荧光,皮肤对阳光过敏。另一种类型卟啉症是肝细胞中积累胆色素原而且出现周期性的精神和行为失常。

应附带提及的是,铁卟啉或血红蛋白血红素降解后的产物为 Fe^{2+} 和胆红素(bilirubin)。后者是一线型开链四吡咯衍生物,结构如图 31-38 所示。

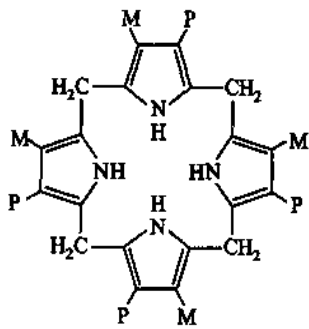


图 31-35 类卟啉原Ⅲ(coproporphyrinogen III)的结构
图中 M 代表甲基;P 代表丙酰基

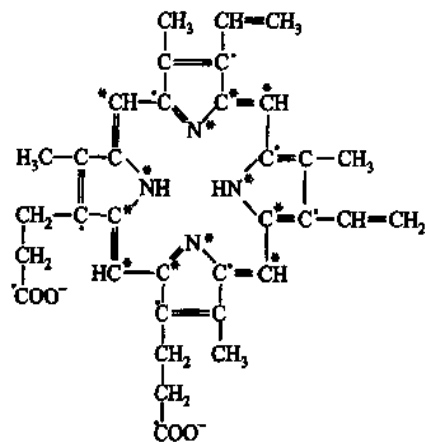


图 31-36 原卟啉Ⅸ(protoporphyrin IX)的结构
C' 代表来源于琥珀酰辅酶 A 的碳原子
C*, N* 代表来源于甘氨酸的碳原子和氮原子

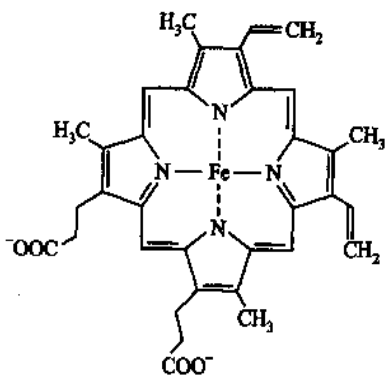


图 31-37 血红素(heme)的结构

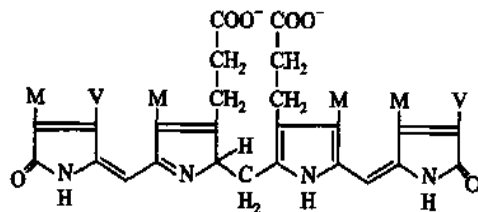


图 31-38 胆红素的结构(bilirubin)
图中 M 代表甲基($-\text{OH}_3$);V 代表乙烯基($-\text{OH}=\text{OH}_2$)

正常人的红细胞寿命大约为 120 天,衰老的红细胞随血流进入脾脏降解,血红蛋白脱辅基蛋白质(apoprotein)被水解为氨基酸,血红素则转变为胆红素。后者与血清清蛋白结合形成复合体被转移到肝脏,形成胆红素二葡萄糖苷酸(bilirubin diglucuronide)被分泌到胆汁中,而铁原子则可被再利用。

黄疸(Jaundice)表现为血液中胆红素浓度升高,并且皮肤和眼球变黄。黄疸的产生有几种可能,红细胞的过分破裂,肝功能的损坏或机械性胆道梗阻都可导致黄疸。测定血液中的结合胆红素和非结合胆红

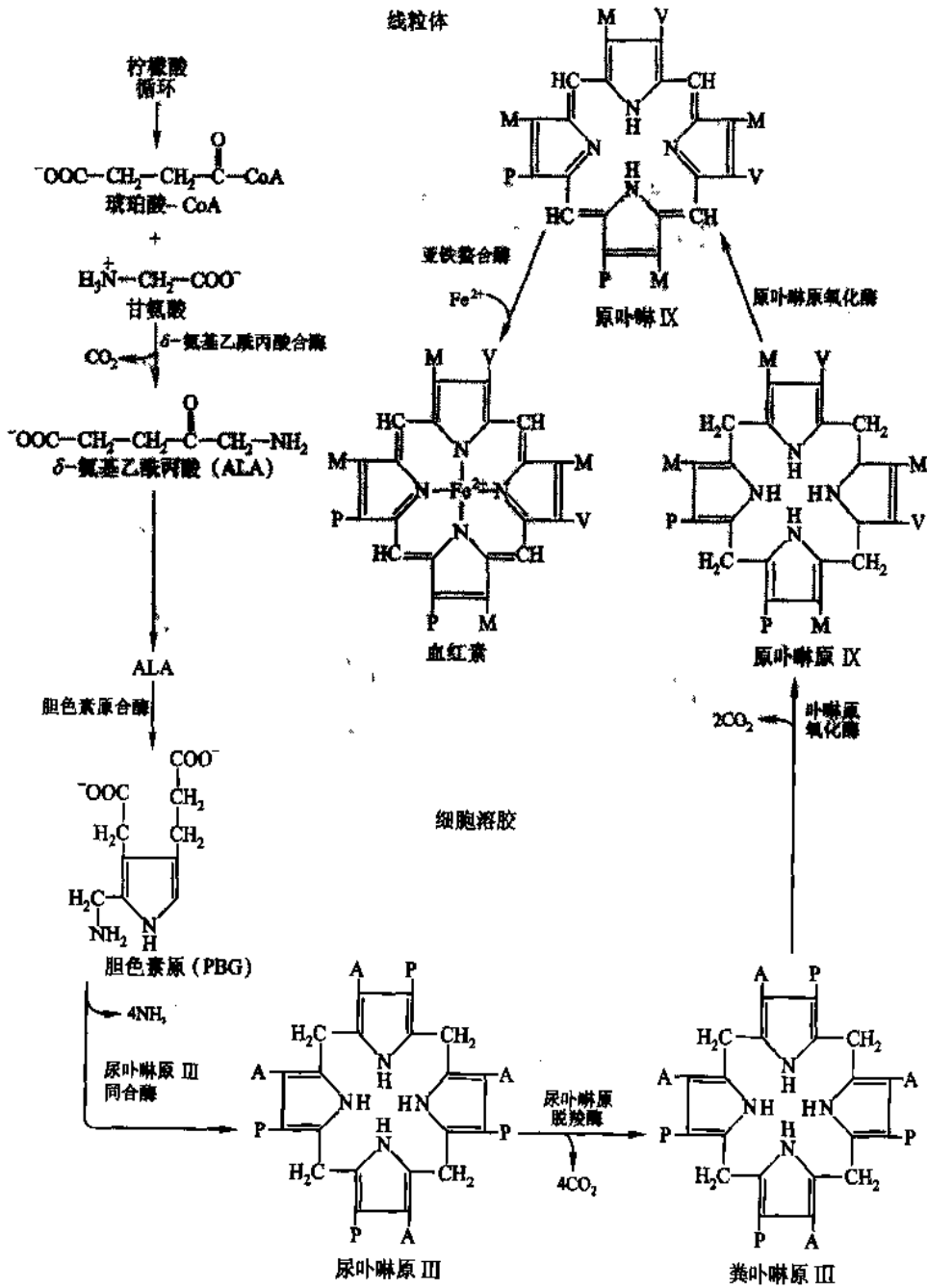


图 31-39 血红素生物合成的全路线 (图中说明阅上述本文)

素的浓度比例有助于疾病的诊断。

血红素降解的第 1 步是形成胆绿素,它比胆红素有更好的溶解度,而哺乳动物却选择了胆红素,其重要原因是胆红素对机体是非常有效的抗氧化剂(antioxidant)。它可消除过氧羟自由基(hydroperoxy radical, HO_2)。每分子可结合 2 分子 HO_2 而转变为胆绿素(图 31-40),它又可还原为胆红素。按浓度计算,胆红素与清蛋白结合后对过氧化物的消除率是抗坏血酸(维生素 C)的 10 倍。由此可以看到在自然选择中,代谢途径的分解产物也使其能够对机体发挥效用。

(五) 短杆菌肽 S (gramicidin S)

短杆菌肽 S 是一种离子载体性抗生素,是氧化磷酸化的一种偶联剂,它的结构如图 31-41 所示。

短杆菌肽 S 是一个环状 10 肽,是由两条五肽链头尾相接构成。它以酶为模板逐步合成,不需要 mRNA 和核糖体参加(参看第 38 章蛋白质的生物合成)。它的合成是由两个酶体系完成的,其中两个酶中的一个酶具有催化合成和作为模板的双重功能。

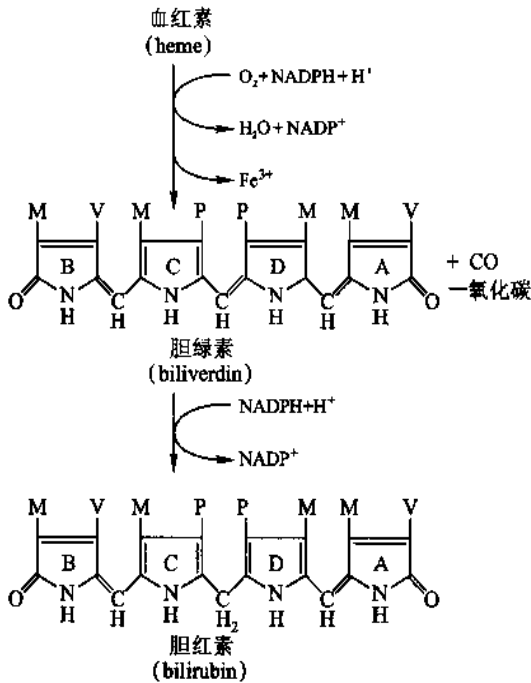


图 31-40 血红素的降解

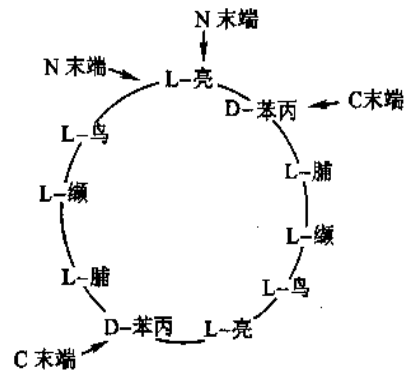
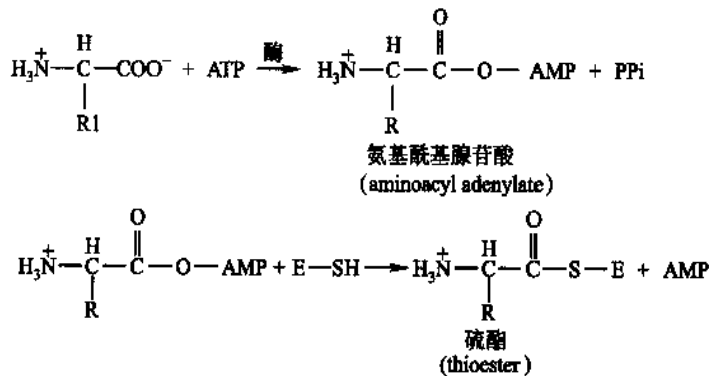


图 31-41 短杆菌肽 S 的结构

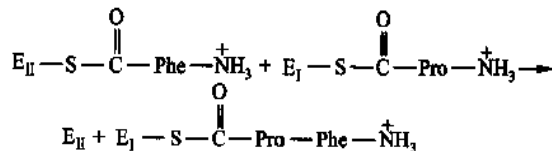
在合成过程中氨基酸的活化不需要氨基乙酰 tRNA 参加反应。

催化短杆菌肽的多酶体系中的两个酶,用 E_I 和 E_{II} 表示。E_I 的相对分子质量为 280 000,称为重链。E_{II} 相对分子质量为 100 000,称为轻链。短杆菌肽 S 的合成可划分为 5 个步骤。详见图 31-42。

反应包括氨基酸在相应酶作用下的活化、硫酸化和消旋。E_{II} 能使苯丙氨酸消旋并与之结合形成硫酸键, E_{II} 只与 D-Phe 结合。E_I 则可同时与短杆菌肽所需的其他 4 个氨基酸结合,无论与 E_I 或 E_{II} 形成硫酸键都是由氨基酰基腺苷酸(aminoacyl adenylates)与之作用。短杆菌肽 S 合成时氨基酸的活化包括两步如下:



合成的下一步是活化的氨基酸结合到酶的轻链 E_I (D-Phe)和重链 E_{II} (Pro₂、Val、Orn、Leu)上。



苯丙氨酸残基被消旋,并转移到重链的泛酰巯基乙胺长臂上。其余的所有步骤都在 E_I 上进行。

在 E_I 分子上以共价相连的长臂 4'-磷酸泛酰巯基乙胺(4'-phosphopantetheine)。可视为该酶的辅基。与脂肪酸生物合成中酰基载体蛋白的作用相似, E_I 能以准确的顺序活化合成长杆菌肽 S 所需的 4 个氨基酸,并按一定顺序同时结合到 E_I 上。由 E_{II} 将 Phe 转移到 E_I 结合着的 Pro 上形成一个二肽 Pro-Phe,然后由 4'-磷酸泛酰巯基乙胺臂将其转送到下一个与 E_I 以硫酯键相连的 Val 的游离氨基上形成三肽链(-Val-Pro-Phe-NH₂),同时在第一位上的-SH 基被空出来。

如上依次转移连接下一个氨基酸直至形成五肽,两个五肽头尾相接形成环状十肽。相接反应也是在酶分子 E_I 上进行的。其全部合成方式见图 31-42。

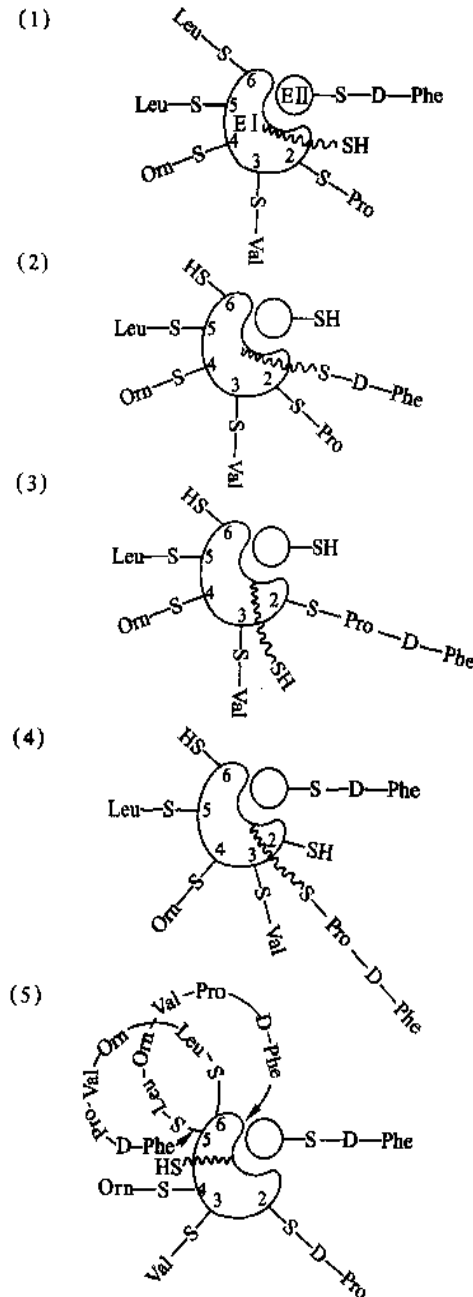


图 31-42 在蛋白质模板上形成短杆菌肽 S 的可能机制

- (1) 活化的氨基酸以硫酯键分别结合到酶体系的轻链和重链上,苯丙氨酸残基与轻链结合被消旋并转移到重链的泛酰巯基乙胺臂上。
- (2) 苯丙氨酸残基从泛酰巯基乙胺臂上转移到脯氨酸残基上形成第一个肽键。
- (3) 苯丙氨酸-脯氨酸残基转移到泛酰巯基乙胺的游离巯基上,同时轻链接受另外一个已被消旋的苯丙氨酸残基。
- (4) 苯丙氨酸-脯氨酸残基转移到缬氨酸残基上。
- (5) 形成的五肽被转移到“等候”部位 6 上,第二个五肽也同时合成并与第一个五肽缩合形成短杆菌肽 S,游离的泛酰巯基乙胺臂又为下一个肽的合成作好准备。

许多寡肽其链长在有 15 个氨基酸残基以下的,几乎都是通过上述类似的方式合成。

(六) D-氨基酸的形成

许多生物体内既含有 L-氨基酸,也含有 D-氨基酸。例如,微生物的细胞壁以及许多肽类的抗生素都含有 D-氨基酸。

D-氨基酸的来源大多是由 L-氨基酸通过消旋酶(racemase)的作用形成。D-氨基酸一旦形成就立即掺入到肽链中。细菌细胞壁的 D-丙氨酸就是由 L-丙氨酸经消旋酶作用形成的。丙氨酸消旋酶以磷酸吡哆醛为辅助因子。L-丙氨酸转变为 D-丙氨酸后,立即形成 D-丙氨酰-D-丙氨酸二肽,消旋酶催化的反应是需能反应。形成的二肽随后即将其 D-氨基酸掺入到细菌细胞壁的肽聚糖(peptidoglycan)分子中。到现在为止,还没有发现一种含 D-氨基酸的肽在其形成时直接以游离的 D-氨基酸作为合成肽的底物。

提 要

不同生物合成氨基酸的能力不同,合成氨基酸的种类也有很大差异。机体维持正常生长所必需,而又不能自己合成,需从外界摄取的氨基酸称为必需氨基酸。凡能自己合成的为非必需氨基酸。人和大白鼠需 10 种必需氨基酸。研究氨基酸生物合成大多用微生物的遗传突变株,使突变株在氨基酸的某个合成环节上产生缺失,造成某种中间物的积累,从而判明各个中间代谢环节。当前 20 种氨基酸的生物合成途径已得到基本阐明。

在生物合成中,氨基酸的各种碳骨架起源于代谢的几条主要途径,即柠檬酸循环,糖酵解及戊糖磷酸途径。因此,可将这几条途径中与氨基酸合成密切相关的几种化合物看作氨基酸生物合成的起始物。氮的来源起始于无机氮,如 N_2 , NH_3 。 N_2 的转化是经生物固氮, NH_3 的转化是经同化作用。氨基酸生物合成可按碳来源于柠檬酸循环、糖酵解、戊糖磷酸途径划分为若干类型。

α -酮戊二酸衍生类型包括谷氨酸、谷氨酰胺、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸及赖氨酸(以草酰乙酸为底物)提供碳原子。

甘油酸 3-磷酸衍生类型包括丝氨酸、半胱氨酸、甘氨酸。

芳香族氨基酸——苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸生物合成的起始物为赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸。色氨酸还需要磷酸核糖焦磷酸(PRPP)以及丝氨酸参与合成反应。

组氨酸的生物合成需要 PRPP 以及 ATP 的 N-C 基团。因此,组氨酸的合成也可认为是嘌呤核苷酸代谢的一个分支。

氨基酸的生物合成根据需要有严格的调控机制,调控机制中最有效的是通过合成过程的终产物抑制反应系列中第一个酶的活性。

有许多重要的生物活性物质来源于氨基酸,如氧化氮、谷胱甘肽、肌酸、叶啉及短杆菌肽 S 等。D-氨基酸大多是由 L-氨基酸经过消旋酶作用形成的。

习 题

1. 哪些氨基酸对人体是必需氨基酸?为什么有些氨基酸称为非必需氨基酸?
2. 写出由葡萄糖合成丙氨酸的总平衡式
(葡萄糖 + 2ADP + 2P_i + 2NAD⁺ + 2 谷氨酸 → 2 丙氨酸 + 2 α -酮戊二酸 + 2ATP + 2NADH + H⁺)
3. 在氨基酸生物合成中哪些氨基酸和柠檬酸循环有联系?哪些氨基酸和糖酵解过程以及五碳糖磷酸途径有直接联系?
4. 在下列的每个转变中是哪种叶酸的中间产物参与反应?
(1) 甘氨酸 → 丝氨酸(四氢叶酸)
(2) 组氨酸 → 谷氨酰胺(四氢叶酸)

(3) 高半胱氨酸 → 甲硫氨酸 (N⁵-甲基四氢叶酸)

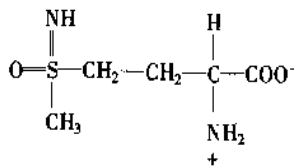
5. 芳香族氨基酸生物合成的共同前体是什么? 它们以哪种中间产物作为合成路线的分支点:

(莽草酸, 分支酸)

6. 缺乏苯丙氨酸羟化酶(苯丙氨酸单加氧酶)的病人为什么出现苯丙酮酸尿症?

(苯丙氨酸不能形成酪氨酸则积累, 经转氨形成苯丙酮酸, 随尿排出)

7. 从漂白过面粉中有时可分离到一种甲硫氨酸衍生物——甲硫氨酸亚砷亚胺(methionine sulfoximine), 它的结构如下:



甲硫氨酸亚砷亚胺

它可引起机体抽搐, 是谷氨酰胺合成酶的强烈抑制剂。请提出这一抑制剂可能的作用机制?

(甲硫氨酸亚砷亚胺与谷氨酸的差异仅在 γ 位, 一个是在亚砷亚胺 $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{S}=\text{NH} \end{array} \right)$, 一个是羧基 $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array} \right)$, 甲硫氨酸亚砷亚胺经酶催化转变为甲硫氨酸亚砷亚胺磷酸, 后者与谷氨酰胺合成酶结合牢固)

8. 由 N₂ 到血红素(heme)在氮的流程中有哪些中间产物?

(N₂ → NH₄⁺ → 谷氨酸 → 丝氨酸 → 甘氨酸 → α -氨基- β -酮己二酸(或称 δ -氨基- γ -酮戊酸) → 5-氨基乙酰丙酸 → 血红素)

主要参考书目

1. Stryer L. Biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman, 1995
2. Voet D, Voet J C. Biochemistry, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995
3. Zubay J D. Biochemistry, 3rd ed. Oxford: Wm. C. Brown Publishers, 1993
4. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers, 2000
5. Umbarger H E. Amino Acid Biosynthesis and its Regulation Ann, Rev, Bioshem, 1978, (47): 533 ~ 606
6. Jordan P M. Biosynthesis of Tetrapyrroles, Elsevier, 1991
7. Cooper A J L. Biochemistry of sulfur-containing amino acids. Ann. Rev. Biochem, 1983, (52): 187 ~ 222
8. Umbarger H E. Amino acid biosynthesis and its regulation. Ann. Rev. Biochem, 1978, (47): 533 ~ 606
9. Liaw S H, Eisenberg D. Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. Biochemistry, 1994, (33): 675 ~ 681
10. Herrmann K M, Somerville R L (Eds.). Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison - Wesley, 1983

(文重, 王镜岩)

第 32 章 生物固氮

氮是构成生命物质的基本元素,也是农业生产的基本肥料。尽管分子氮(N_2)占空气的 79%,但因 $N \equiv N$ 键非常牢固,高等植物无法直接利用它。只有通过某些微生物把空气中游离的氮固定,转化为含氮化合物后植物方可利用。这种通过微生物将分子氮转化为含氮化合物的过程即称为生物固氮。

生物固氮的研究领域,包括生物固氮机制、共生固氮机制、固氮分子遗传及固氮微生物等等。从 1862 年发现生物固氮现象到目前为止,生物固氮的研究已有一百多年的历史。以生物固氮机制为主线,可以把这一百年的研究史大致分为三个时期。

第一个时期,从 1862 年到 1960 年,大约一百年,是细胞水平时期。在这漫长的历史时期内,生物固氮的研究,是用完整的细胞作为实验材料的。1888 年,贝杰林克(Beijerinck)第一个从豆科植物中分离到根瘤菌。从此以后,各种各样的固氮微生物相继被分离鉴定出来。20 世纪初期,将圆褐固氮菌、根瘤菌等应用于农业,使一些农作物获得了明显的增产。由于当时实验材料摆脱不了完整的细胞,使生物固氮机制的研究受到了很大的限制,生物固氮机制的研究进展十分缓慢。虽然早在 1893 年维诺格拉得斯基(Winogradsky)就推测过, NH_3 可能是生物固氮的产物,但是关于生物固氮的产物是不是 NH_3 的问题,一直争论不休。1942 年,鲍利斯应用 ^{15}N 实验示踪确定了 NH_3 是生物固氮的产物。

第二个时期,从 1960 年到 1966 年,是无细胞水平时期。在这一时期,生物固氮机制的研究,主要是用无细胞抽提液作为实验材料的。首先把固氮菌细胞粉碎,用超速离心分离,除去细胞的残渣碎片,得到无细胞的抽提液。然后,以此抽提液为实验材料,来研究生物固氮机制。

1960 年,美国卡纳汉(Carnahan)等人,通过将丙酮酸加到巴氏梭菌的无细胞抽提液中,成功地实现了 N_2 还原成 NH_3 的试验,这一试验的成功,打破了长期以来生物固氮机制的研究摆脱不了完整细胞的困难局面,开辟了用无细胞抽提液研究生物固氮机制的新途径。1962 年,莫顿森(Mortenson)等人发现,生物固氮必须有铁氧还蛋白作电子传递体,并从巴氏梭菌中得到了这种蛋白。1964 年,哈迪等人直接明确地证明了生物固氮必须有 ATP 的参与。1965 年,布伦(Bulen)等人发现, $Na_2S_2O_4$ 可以代替由铁氧还蛋白、氢化酶和 H_2 所组成的电子供体系统。1966 年,迪尔沃思(Dilworth)和肖勒霍恩(Schollhorn)同时发现了 C_2H_2 可作为固氮酶的底物,并且创建了一个测定固氮酶活性的新方法——乙炔还原法。

第三个时期,从 1966 年到目前,是分子水平时期。1966 年,布伦等和莫顿森等分别从棕色固氮菌和巴氏梭菌的抽提液中,得到了部分纯化的钼铁蛋白和铁蛋白制剂。1972 年,伊迪(Eady)等人从肺炎克氏杆菌中分离到了纯的钼铁蛋白和铁蛋白制剂。固氮酶提纯的成功,得以使固氮酶结构与功能为中心的生物固氮机制的研究进入更本质的阶段。1992 年,固氮酶的空间结构得到测定。

一、生物固氮作用及固氮生物类型

蛋白质和核酸是构成生物体的主要成分,没有蛋白质和核酸,就没有一切生命。氮是构成蛋白质和核酸的重要元素,是农作物生长发育不可缺少的三个要素之一。人不吃饭不行,庄稼不施氮肥也不行。但是,大豆、花生、绿豆、赤豆、蚕豆和豌豆等绝大多数豆科植物,不施氮肥,照样长得很好,而且,还能提高肥力,为下一季农作物创造良好的氮肥营养条件。难道豆科植物不需要氮吗?结论是否定的。只不过,它们的氮从空气中来。但氮气不能被高等植物直接利用,只有某些原核生物才有将大气中的氮固定成氨的特殊本领。它们广泛分布于土壤和水域中,有的与豆科植物和某些非豆科树木共生形成根瘤固氮;有的则能自生固氮。全球每年生物固定的氮量约 2×10^8 t(折合尿素约 4×10^8 t 多),其中由植物根瘤菌所固定的氮约占 1.5×10^8 t,为宿主植物提供了大量氮源。但是对那些不能与固氮微生物共生的植物,特别是非豆科的粮食作物、果树和蔬菜等,由自生固氮菌所提供的氮肥则有限。据计算每收获 1 t 小麦将自土壤中吸收

20 kg 氮。由于氮肥在土壤中大量流失(反硝化、挥发以及水冲洗等),为植物所吸收的氮还不到 40%。随着全球人口不断增长和对粮食需要的增加,农业生产不得不依赖大量化肥。据不完全统计,1990 年全球化学氮肥的用量(折合成氮)已由 1950 年的 3×10^6 t 直线上升到 8×10^7 t, 预计 2020 年将达到 1.6×10^8 t。生产和施用化学氮肥不但消耗不可再生能源,增加农业生产成本,也会造成对大气和水域的污染,破坏生态平衡,不利于农业的可持续发展,在农业生产中如何发挥生物固氮的效能以降低化肥用量,是大自然向人类提出的严峻挑战。

固氮作用过程是地球上氮循环的一个重要部分。就农作物而言,豆科作物的根通常具有由不同根瘤菌诱导的能够固氮的根瘤,只要它们被合适菌株浸染,豆科植物就能够在不需要额外提供氮肥的条件下生长。禾谷类作物是人类赖以生存的粮食作物,维持其正常生长需氮肥 200 kg/hm^2 以上。试想,如果能够通过基因操作手段使其也具备从大气中固氮的功能,其意义丝毫不亚于光合效率上的突破。因为多数农作物(如玉米、水稻、大麦及小麦等)都无固氮能力,其所需的氮不外乎来自土壤本身的肥力及人工追施的肥料(主要以化肥为主)。长期的栽培,一方面迅速造成地力衰竭,另一方面,购买化肥不仅是一个极大的经济负担,而且还会造成严重的生态破坏。长期以来,人们始终乐此不疲地探究着生物固氮的途径和机制,其最终目的是:① 提高现有固氮生物的固氮能力;② 提供优质高效的微生物肥料,为农业开发肥源;③ 用分子生物学等方法促使不固氮作物固氮;④ 人工模拟固氮酶在常温常压下还原分子氮,使氮肥的工业生产有一个历史性突破。

迄今已知的能固氮的生物属于原核生物,从其固氮类型来说,可分为两大类(图 32-1):其一为能独立生存的自生型固氮微生物,种类较多,包括细菌、放线菌类微生物和蓝藻等;其二为与其他植物共生的共生型固氮微生物。所有这些固氮微生物中最重要的是豆科植物的根瘤菌。据统计,由自生型固氮微生物所固定的氮,每年 $5 \sim 20 \text{ kg/hm}^2$, 而共生型固氮微生物(主要是豆科植物的根瘤菌)所固定的氮每年能增加 $100 \sim 600 \text{ kg/hm}^2$ 。

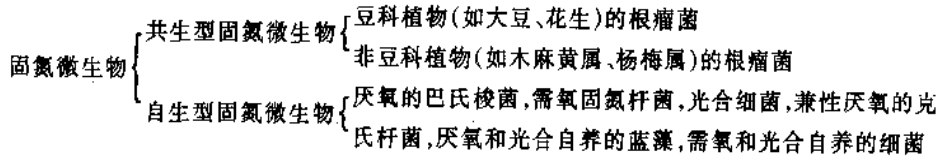


图 32-1 固氮生物的类型

(一) 根瘤菌与豆科植物根的共生

在过去的 20 年间,关于固氮根瘤菌同豆科植物之间的遗传共生问题的研究,已经取得了很大进展。已知根瘤菌属的细菌只有与豆科植物建立了共生关系时才能进行正常的固氮作用。根据根瘤菌的寄主专一性,可将根瘤菌分为 6 个种群:苜蓿群、车轴草群、豌豆群、菜豆群、羽扇豆群及大豆群。不同的寄主需要不同的根瘤菌,如大豆需要大豆根瘤菌,花生需要花生根瘤菌,但这种专一性并非绝对。即使是同一种根瘤菌,其固氮能力的大小也因菌株不同而异。扩大根瘤菌的宿主范围,让根瘤菌能在小麦、玉米、高粱及棉花等非豆科农作物的根系上结瘤,是农业生物技术的一个重要研究方向。

根瘤菌侵染豆科植物的根部,形成一种具有复杂结构和高度分化的特殊的植物器官——根瘤。如果你从田野里拔出一棵大豆植株,你就能看到大豆根系长着许多小球型的根瘤(图 32-2)。固氮作用就是在根瘤所提供的厌氧环境中进行的。植物与根瘤菌相互识别涉及根瘤菌表面黏多糖和植物凝集素的相互作用,把根瘤的形成过程大致可概括为:土壤中根瘤菌吸收豆科植物的根的分泌物后产生鞭毛,运动至根毛,根瘤菌分泌生长素使根毛卷曲,根瘤菌大量繁殖,形成感染丝状体(侵染线),刺激寄主根细胞分裂,根瘤逐渐形成,根瘤菌发育成能固氮的“类菌体”,在固氮酶、植物豆血红蛋白等共同作用下开始固氮过程(图 32-3)。

豆血红蛋白是由血红素和珠蛋白组成,其功能和血红蛋白、肌红蛋白一样,起运输氧的作用,以保证固氮类菌体呼吸作用所需的氧气,同时又降低其周围的氧分压,造成厌氧的固氮环境。豆血红蛋白中的珠蛋白由豆科植物产生,是在细菌侵入之后诱导产生的。血红素则是由根瘤菌自身合成提供的。由此也可看

出它们在分子水平上的共生关系。根瘤菌的运动、繁殖乃至固氮功能的实现,都需寄主供给糖类,但它同时将其所固定的氮供应给寄主,每一步都受植物及微生物双方的基因调控。

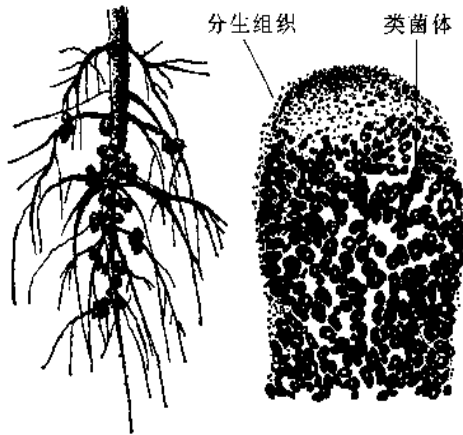


图 32-2 大豆根系及根瘤结构示意图

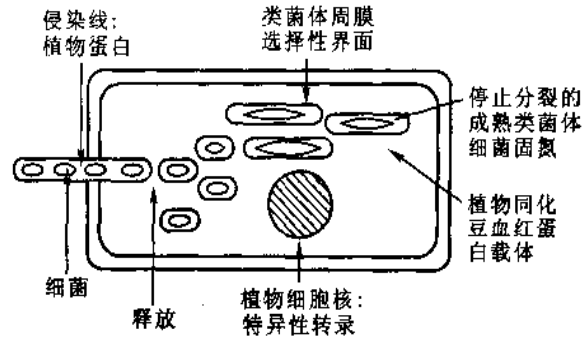


图 32-3 类菌体的形成过程

此外,在非豆科植物中也存在共生固氮。20世纪70年代中期,巴西学者发现在禾本科作物根际有与之联合生长的固氮微生物。它们主要生活于根表,但不形成根瘤,以根分泌物或植物残体的半纤维素为碳源和能源进行固氮生长,并可产生一些植物生长激素。但是这类固氮微生物所固定的氮量远不能满足高产作物的需要,如要获得高产仍需投入化学氮肥。在有化合态氮的情况下,它们却不固氮。因此,从分子遗传学上弄清铵对固氮作用调控的分子机制,进而打破铵对固氮的抑制作用,已成为近20年来联合共生固氮的研究热点。近年来巴西科学家又在甘蔗中发现了共生固氮菌,以甘蔗中的蔗糖为碳源和能源在植物体内生长和固氮,可为甘蔗提供60%的氮源。继而,德国科学家在卡拉草中也发现了共生固氮菌,更引发了在其他禾本科作物中寻找共生固氮菌的研究。

(二) 自生固氮微生物

在自然界中,除了共生固氮外,还有自生固氮。所谓自生固氮,就是指微生物自由生活进行固氮。自生固氮微生物可分为细菌和蓝藻两类(见图32-1)。

就细菌而言,常见的有好氧的固氮菌属(如巴氏梭菌),有兼性厌氧的克氏杆菌属和芽孢杆菌属,有能进行光合作用的红螺菌属和红硫细菌属。这些自生固氮细菌也在为农业生产做出自己的贡献,但是,与根瘤菌的贡献相比,显得小了许多。然而,由于根瘤菌一般只能与相应的豆科植物共生固氮,局限性很大,对于大多数非豆科植物,特别是禾本科农作物,自生固氮细菌则有它特殊的作用。因此,人们早就利用固氮能力较强的圆褐固氮菌等作为细菌肥料,以满足非豆科农作物对氮的需要。

蓝藻的种类有一千余种,其中有固氮能力的不过20余种。它们都含有叶绿素,能进行光合作用。由于它们含有固氮酶,所以能够固氮。大多数固氮蓝藻是水生植物,每年能固氮25~100 kg/hm²,虽然也不及根瘤菌,但是,它们对水稻等水生农作物有重大贡献。

二、固氮酶的结构与功能研究

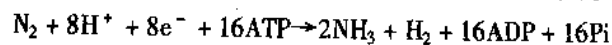
自20世纪60年代初实现了无细胞制剂固氮后,固氮酶结构和功能的研究得以顺利进行。1972年,奥姆-约翰逊(Orme-Johnson)等人用顺磁共振法发现,铁蛋白在Na₂S₂O₄到钼铁蛋白之间起传递电子的作用;Mg²⁺-ATP推动电子从铁蛋白向钼铁蛋白转移。1973年,伯杰森(Bergersen)等人用动力学法证明,催化N₂和C₂H₂还原反应的是钼铁蛋白,而不是铁蛋白。1973年,莫顿森等人用顺磁共振法发现,Mg²⁺-ATP对铁蛋白起变构作用。1977年,坦纳卡(Tanaka)等人用氨基酸测序仪完成了巴氏梭菌铁蛋白一级结

构的测定。80年代以后,由于分子生物学的发展,涉及固氮基因的表达调控和共生固氮体系中植物与根瘤菌之间分子相互作用的研究突飞猛进。1992年,固氮酶三维结构终于被美国加州理工大学的化学家 Rees 等用晶体的 X 射线衍射技术阐明(图 32-4)。图中给出的模型是根据分别得到的铁蛋白、钼铁蛋白的晶体结构,以及突变体研究得到的两个蛋白的接触面,用计算机模拟而得。从此,生物固氮的神秘面纱已逐渐被人们揭开。



图 32-4 固氮酶的结构模型

固氮酶是由两个蛋白组分组成的一个有活性的功能单位,单独一个组分不起作用,而且它们都是厌氧的,遇氧很快失活。组分 1 相对分子质量约为 240 000,由两对不同的 4 个亚单位($\alpha_2\beta_2$)组成,因其分子中含有 Mo 和 Fe,而被称为钼铁蛋白,其活性中心位于 α 亚单位内,由 MoFe_7S_9 原子簇和 1 分子异柠檬酸组成,被称为铁钼辅因子(FeMoco),是络合和还原 N_2 生成 NH_3 的部位。另一临近的 Fe_8S_7 原子簇位于 α 和 β 亚单位之间,负责将电子传递给 FeMoco ,用于将 N_2 还原成 NH_3 并放 H_2 。组分 2 的相对分子质量约 60 000,由两个相同的亚单位(γ_2)组成,因分子中含有 Fe,不含 Mo,被称为铁蛋白。组分 2 中含有一个 Fe_4S_4 原子簇,位于两个亚单位之间,其功能是将由代谢过程所产生的电子传递给钼铁蛋白的 Fe_8S_7 原子簇,再转移给 FeMoco 。组分 2 向组分 1 每转移一个电子要消耗两个 ATP。生物固氮中化学反应计量式一般认为是:



但 N_2 究竟络合在 FeMoco 的 Mo 上还是 Fe 上,这个涉及固氮酶催化的本质问题,长期以来众说纷纭,即使在已有的结构模型上,对于 N_2 是如何被电子还原的机制仍不十分清楚,还需大量的实验证据。但值得指出的是,固氮酶是一种氧化还原蛋白,在 pH7.5 时,其氧化还原电位为 $-0.25 \sim -0.29 \text{ V}$,位于生理还原剂——铁氧还蛋白(Fd , $0.3 \sim 0.49 \text{ V}$)和氢(-0.277 V)之间。这说明固氮酶确实能够从还原剂接受电子,而又能送出电子给分子氮使之还原。

生物固氮过程是一个相当复杂的过程,目前的了解还有限,但固氮作用必须在固氮酶的催化下才能发生已是毋庸置疑的事实。而且一些重要的进展也是来自固氮酶的分离。该酶即使在 0℃ 以下保存也很不稳定,在有氧气存在时也同样,所以直至 1965 年才得到其粗制品。目前,已从许多种固氮生物中分离出这种酶,这些生物包括自生固氮细菌(需氧的和厌氧的)、假菌体、蓝藻、光合细菌及根瘤菌等。这些固氮酶皆由钼铁蛋白和铁蛋白组成,这两种蛋白单独存在时都不能表现固氮酶活性,只有两种组合构成复合体时才具备催化氮还原的功能。不同来源固氮酶的铁蛋白和钼铁蛋白可以交叉组合,但有明显的物种特异性。尽管不同来源的两种蛋白互补活性不如同一起来源的高,但在固氮酶的反应上表现颇为一致,说明彼此有共同的活性中心和机制。

根瘤菌的固氮过程如图 32-5 所示。根瘤菌的固氮酶与常规的固氮酶一样,都由钼铁蛋白和铁蛋白组成,由 *nif* HDK 基因编码。其中 *nifK* 和 *nifD* 是钼铁蛋白 α 和 β 亚基的结构基因,*nifH* 是铁蛋白的结构基因。钼铁蛋白相对分子质量分别为 51 000 和 80 000 的 2 个 α 亚基和 β 亚基组成的四聚体($\alpha_2\beta_2$),相对分子质量约 220 000 ~ 245 000。柱孢鱼腥藻的 α 、 β 亚基及巴氏梭菌的 α 亚基的全部氨基酸顺序已经分别由 *nifD* 和 *nifK* 基因的序列推断出来。不同固氮生物的钼铁蛋白的氨基酸顺序有 47% ~ 66% 同源。铁蛋白相对分子质量在 59 000 ~ 73 000 之间,由两个相对分子质量同为 30 000 的亚基(γ_2)组成。大豆根瘤菌、三叶草根瘤菌以及 *Paraasponia* 根瘤菌铁蛋白的氨基酸顺序也经 *nifH* 基因推算出来。所有这些菌的铁蛋白都不含色氨酸,一级结构也非常相似。

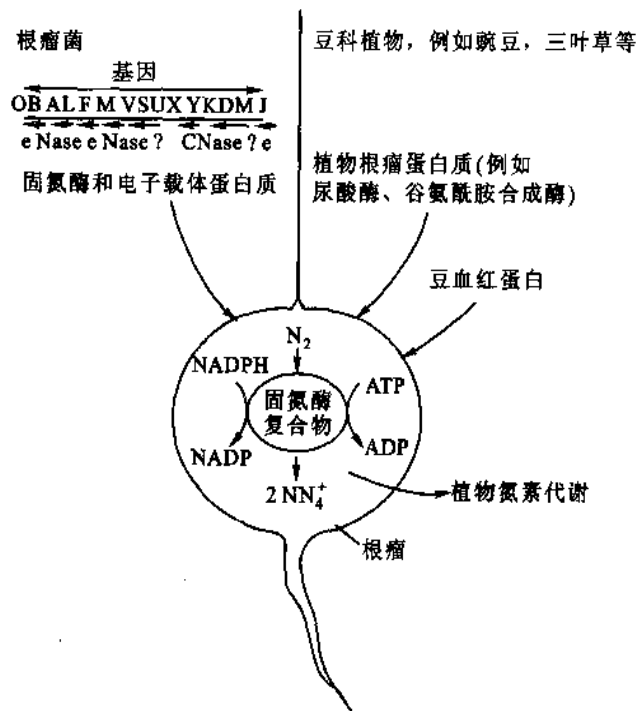


图 32-5 根瘤菌固氮过程示意图

上述由钼铁蛋白和铁蛋白组成的固氮酶系统曾一度被认为是固氮微生物中起固氮作用的唯一系统,但最近十几年的发现动摇了这一观念。1980 年,有人从棕色固氮菌中发现了由钒铁蛋白和铁蛋白组成的固氮系统,称之为第二套固氮系统。近年,在棕色固氮菌中发现了不含钼和钒的第三套系统,它也是一种双蛋白系统。

对于根瘤菌中的固氮酶,目前只有部分的了解,其组成、结构及固氮机制是否与上述完全一致,还缺乏全面透彻的认识。不过,已知豆科植物与根瘤菌共生时,除了几乎像其他所有固氮生物一样需要钼外,还另外需要钴(不与根瘤菌共生时不需要)。有实验表明,钴的存在大大提高了根瘤菌固氮能力。据推测,钴的作用大概是形成维生素 B_{12} ,而 B_{12} 的作用可能与豆血红蛋白的合成有关,豆血红蛋白仅存在于根瘤中。

固氮酶的活性还受两个重要调节系统的调节。其一是氧防护系统。由于氧会不可逆地破坏固氮酶组

分的结构,因此固氮酶的催化反应需在厌氧环境下进行。除了专性厌氧的生物外,氧对其他固氮生物的固氮酶皆有损伤作用,但这些生物通过呼吸作用生成固氮所需的 ATP 又需要氧,所以高效率的固氮作用一般是在微氧条件下进行的。这些固氮生物在进行需氧呼吸的同时,还要防止氧对固氮酶的抑制或损伤,这些是由细胞内精细的区域化来保证的,即发生固氮作用的部位周围,有一种结构保证这个部位不与氧接触。具体来说,不同固氮生物的固氮酶护氧机制各异。例如,异形细胞的蓝藻的固氮功能主要在异形细胞中进行,这种细胞外有一层防氧进入的糖脂组成的外膜,胞内缺少光解放氧的 PS II,从而使异形细胞保持一个微氧环境,避免了氧对固氮酶的伤害。而在根瘤菌与豆科植物共生形成的根瘤中,由根瘤菌演变来的类菌体外有一层类菌体周膜,瘤的内皮层内侧细胞排列紧密并形成间隙,二者都参与氧进入根瘤的调节。并且,根瘤内还含有作为氧载体的豆血红蛋白,在氧分压高时吸氧,以降低根瘤中的氧浓度,保护固氮酶免受氧的伤害。而在氧分压低时则放氧,保证氧化磷酸化(形成 ATP)的进行,以满足固氮过程对能量的需求。可见,要实现豆科农作物自我固氮的目标,克服固氮酶对氧的敏感仍是个最基本的课题。

除氧防护系统外,氨同化系统也是影响固氮酶固氮活性的主要因素之一。利用同位素¹⁵N 示踪的方法,确定了氨是生物固氮的最初产物。氨对固氮生物无细胞制剂(包括纯化的固氮酶)固氮活性的抑制不明显,但对活体固氮生物的固氮酶来说氨则有抑制作用,即所谓的铵抑制效应。不过,这种抑制是可逆的,抑制程度因微生物种类、碳源供应和膜势能受干扰程度不同而异。氨对固氮酶活性的抑制与环境条件有关。如在合适的氧分压下,培养的棕色固氮菌的固氮活性对 NH_4^+ 敏感度高,而在高氧或低氧下则相反;低 pH 下培养的棕色固氮菌和柱孢鱼腥藻的固氮酶活性对 NH_4^+ 敏感度比高 pH 的大;在蓝藻和光合细菌中, NH_4^+ 对固氮酶活性的抑制还牵涉到光,弱光下固氮酶活性受 NH_4^+ 抑制显著;其他氮化物如 NO_3^- 、尿素也会抑制棕色固氮菌、蓝藻的固氮酶活性;在大豆根瘤的类菌体中, NO_3^- 还原的中间产物 NO_2^- 对其固氮活性呈现不可逆的抑制。

自 1965 年固氮酶两个独立但又能重组活性的蛋白组分分离成功以来,固氮酶学及其固氮生化、固氮遗传的研究日趋深入,包括固氮酶的分离、纯化、结晶、结构组成、生理生化特性、能源、电子链及质子传递直至固氮酶的功能及其调节和作用机制等,但需要探讨的问题仍然很多。

N_2 是惰性气体,两个 N 原子间的键能甚高,无论化学合成氨或生物固氮都要消耗大量的能量。化学合成氨是以不可再生的化石燃料为能源,在高温(300 ~ 400℃)和高压(50 MPa)下,以 Fe 作催化剂将 N_2 还原成 NH_3 。而生物固氮则是以可再生的植物光合产物为能源,在常温和常压下,由固氮酶将 N_2 催化成 NH_3 。二者相比,生物固氮的优越性显而易见。因此,化学模拟生物固氮长期以来就是科学家们所关注的重要课题。而早日弄清固氮酶的结构及其催化 N_2 还原成氨的分子机制,必将为实现化学模拟生物固氮打开大门。

三、固氮的基因表达调控

(一) 自身固氮

肺炎克氏杆菌是自身固氮菌,广泛分布于自然界中,包括土壤、水域乃至人的肠道内。它的固氮能力只有在以分子氮为唯一氮源和厌氧的条件下才得以表达。在固氮生物中,克氏杆菌是被研究得最深入的。它的完整的固氮基因群(*nif*)的 DNA 序列早已被测定。除固氮酶的结构基因 *nifHDK* 外,*nifE*、*nifN*、*nifB* 和 *nifQ* 都与 FeMoco 的加工或装配有关,*nifS* 及 *nifU* 的产物参与钼铁蛋白的加工装配。*nifM* 产物为铁蛋白加工成熟所必需。*nifF* 及 *nifJ* 的产物都与固氮酶系的电子传递有关。*nifLA* 则是调控基因。*nif* 系统基因完整表达的最终表现是固氮为氨,这种表达受其最终产物 NH_4^+ 及 O_2 的抑制。

nif 系统活性的表达调控有多个环节,有两个调节系统。一个是 *nifLA* 操纵子系统,一个是氨调节系统(*ntr*)。*nif* 系统本身有两个调控基因 *nifL* 及 *nifA*,它们处于同一操纵子内。其中,*nifA* 是主要的正调控基因,其表达产物(*nifA*)相对分子质量 57 000,作用于 *nif* 系统内各操纵子的启动子,使它们协调地转录表

达为固氮酶系。NifA 对温度非常敏感,大于 35℃ 便会失活。NifA 在激活各 *nif* 启动子时需要 *ntrA* 协同作用。*nifL* 的表达产物相对分子质量 50 000,也是温敏分子,当细胞在有氨和氧时,NifL 即修饰 NifA,从而阻遏固氮酶系合成。一般认为,生物体中氨的同化是通过谷氨酰胺合成酶(GS)进行的。*ntr* 调控系统涉及三个基因 *ntrA*、*ntrB* 和 *ntrC*。*nifA* 为一操纵子,其表达产物是相对分子质量为 84 000 的调节蛋白。另一操纵子包括 GS 合成基因、*ntrB*、*ntrC* 基因,其中 *ntrB*、*ntrC* 两个基因分别编码相对分子质量为 36 000、56 000 的调节蛋白。*ntr* 系统的调控者是 *ntrA* 和 *ntrC*,其主要作用点在于激活 *nifLA* 启动子,而 *ntrB* 则对 *ntrC* 的表达加以限制或修饰。

(二) 共生固氮

共生固氮的基因表达调控较为复杂,与根瘤菌及植物本身的参与有关(图 32-6)。

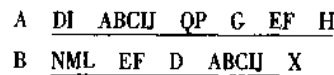


图 32-6 苜蓿根瘤菌 A 和豌豆根瘤菌 B 结瘤基因图谱

1. 根瘤菌基因

(1) 结瘤基因 根瘤菌-豆科植物共生固氮的建立,需要许多根瘤菌基因的参与。一批与结瘤有关的细菌基因已被证实存在于苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌、三叶草根瘤菌等多种根瘤菌中,它们可分为共同结瘤基因(*nodABC*, *nodD*)和宿主专一结瘤基因(*nodEF*, *nodH* 和 *nodLMN*)两群(图 32-6)。*nodA*、*B*、*C* 三个基因是细胞分裂及宿主根毛弯曲变形所必需的,若突变发生于这三者之一,则不能结瘤。就核苷酸序列和功能来说,这三者似乎是保守的,在不同种根瘤菌之间可以互换。*nodEF*、*nodG*、*nodH* 或 *nodLMN* 参与宿主选择,并与根毛卷曲的位置、细胞分裂的效率及持久性有关。这些基因是不保守的,具根瘤特异性,在不同根瘤菌之间不能替换。

(2) 结瘤基因的调节基因 在各种根瘤菌的自生培养细胞中,上述种种 *nod* 基因是诱导型表达。*nodD* 是一个调节基因,与 *nodABC* 操纵子相连,但转录方向相反,其表达产物起着诱导其余 *nod* 基因表达的作用。在某些条件下,豌豆根瘤菌中的 *nodD* 还可调节其自身的表达。不同根瘤菌之间的 *nod* 基因有一定的同源性。苜蓿根瘤菌有多拷贝的 *nod* 基因,通常认为这是该根瘤菌能与多种宿主结瘤的基础。*NodD* 蛋白相对分子质量为 33 000,存在于细胞质中,属于新发现的转录激活蛋白族中的一员。能与诱导型 *nod* 基因启动区结合,从而激活 *nod* 基因的转录。在诱导型 *nod* 基因上游有一个高度保守的序列,它普遍存在于各种根瘤菌中,称为 *nod* 盒(*nod box*),它正是 *NodD* 蛋白的结合部位。*nod* 盒距 *nodABC*、*nodEF* 和 *nodH* 转录起始位点只有 24~28 bp,并且也非常靠近 *nodD* 自身的转录起始点。*Nod* 蛋白通常在细胞质中不具活性,只有被豆科植物分泌的诱导物激活后才变为活性态。已经从许多植物-根瘤菌共生系统中分离出植物所分泌的诱导物质,经鉴定都是类黄酮化合物。

(3) 固氮基因 根瘤菌的固氮基因一般分成两群,即 *nif* 基因和 *fix* 基因。前者与克氏肺炎杆菌同源,为共生固氮所必需,后者与克氏肺炎杆菌不同源,功能尚不甚清楚,从序列分析的结果推断,大豆根瘤菌的 *fixA* 和 *fixX*、三叶草根瘤菌及苜蓿根瘤菌的 *fixX* 都与细菌铁氧还原蛋白相似,或许这些基因参与共生系统的电子传递,或许与别的 *fix* 基因产物装配。目前研究较为深入的固氮基因当属苜蓿根瘤菌、豌豆根瘤菌以及大豆根瘤菌(图 32-7)。苜蓿根瘤菌的固氮基因分布于 200 kb 的大质粒 pSym 上,豌豆及快生型大豆根瘤菌的固氮基因也在大质粒上,而慢生型大豆根瘤菌的所有固氮基因均位于染色体上。另外,编码固氮酶的 *nifHDK* 在所有根瘤菌中都存在,但它们的组织机构上有所不同:苜蓿根瘤菌及豌豆根瘤菌的 *nifHDK* 自成一个操纵子,但在大豆根瘤菌中则分为两个不连锁的操纵子——*nifH* 和 *nifDK*。

与克氏杆菌基因类似,根瘤菌的 *nifB* 与固氮酶活性中心 FeMoco 的合成有关,*fixABCX* 可能与电子传递有关,而 *nifA*、*fixLJ* 和 *fixK* 则都是调控基因。根瘤菌基因的表达调控,与肺炎克氏杆菌 *nif* 基因表达调控类似。根瘤菌 *nifA* 也是 *nif* 基因操纵子的转录调控者,这种激活作用也同样需要根瘤菌的 *ntrA* 基因产

物的参与,但 *ntrA* 不由 *ntrC* 激活。*ntrA* 基因还可能与根瘤的形成、维持有关。另外,在根瘤菌中 *nifL* 基因可能不存在。*nifA* 的表达依赖于低浓度 O_2 。研究表明, O_2 的这种低浓度诱导作用由 *fixLJ* 介导,固氮基因的调控模式也已提出。*fixL* 基因产物对大气中的氧十分敏感,它在根瘤菌的细胞膜上“巧妙”地占据着一个特定的位置,当根瘤菌处在较高氧分压环境时,*fixL* 基因产物就使 *fixJ* 基因产物处于失活状态,使固氮基因群关闭;当根瘤菌处在较低氧分压环境时,*fixL* 基因产物就使 *fixJ* 基因产物处于活化状态,*fixJ* 基因产物分别激活 *nifA* 基因及 *fixK* 基因的转录。*nifA* 基因产物再激活 *nifHDKE*、*fixABCX* 和 *fixN* 等操纵子转录。*fixK* 基因产物则激活 *fixN* 基因簇的转录;同时,*fixK* 基因产物可抑制 *nifA* 基因转录;且又自身负反馈,这样,通过 *nifA/fixK* 基因产物相对含量实施对固氮基因表达的调控,而这种复杂的调控作用的源头还是 *fixLJ* 基因。

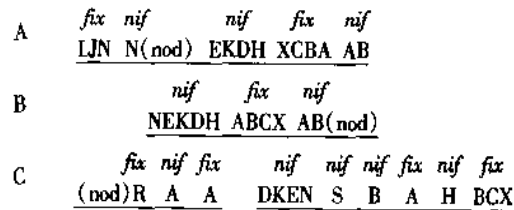


图 32-7 苜蓿根瘤菌 A、豌豆根瘤菌 B 和慢生型根瘤菌 C 的 *nif* 和 *fix* 基因图谱

2. 豆科植物基因

(1) 早期结瘤素基因 根瘤内存在高水平表达的植物结瘤素基因,根据其表达先后及功能差异分为早期结瘤素基因和晚期结瘤素基因,它们都与根瘤的分化和功能密切相关。在根瘤形成阶段,早期结瘤素基因的表达与感染过程有关。有实验表明,早期结瘤素在细菌与宿主根系接触后一周内即出现在无菌感染的“空瘤”内,说明宿主和细菌之间相互作用以及 *nod* 基因的激活对早期结瘤素基因的表达是必需的。目前,在这方面研究得最为详尽的是大豆早期结瘤素 N-75。这个蛋白在慢生型大豆根瘤菌感染 7 天后就出现。现已从大豆 cDNA 文库中克隆出该基因,印迹法试验表明,它与豌豆、野豌豆、苜蓿的早期结瘤素 mRNA 有强烈的交叉反应,说明不同豆科植物中普遍存在结构及功能上都与之类似的基因。对 N-75 的进一步分析揭示,N-75 有可能作为一个细胞壁蛋白,在早期成瘤过程中起作用。

(2) 晚期结瘤素基因 晚期结瘤素在根瘤发育的后期表达,参与根瘤中的固氮和氮同化。豆血红蛋白(Lb)是晚期结瘤素中最具有代表性的一个,其中以大豆的 Lb 研究得最详尽。豆血红蛋白基因及别的晚期结瘤素基因,都只特异地在根瘤中转录,并且多数晚期结瘤素似乎 Lb 是协同表达的。除豆血红蛋白外,根瘤中还有许多特有的植物基因产物得以表达,如脲酸酶、谷氨酰胺合成酶、胆碱激酶及蔗糖合成酶等(图 32-5)。此外,还有许多位于类菌体周膜中而功能尚未知晓的结瘤素。早期和晚期结瘤素基因的表达及功能行使与特定的共生阶段相吻合。因此,研究结瘤素基因表达系统的分子基础显然是富有吸引力的。近年来,结瘤素的鉴定、结瘤素基因的克隆及表达的分析都颇有进展。

四、生物固氮的基因工程

随着人口的急剧增长,生活水平的不断提高,人类对农业生产提出了更高的要求。增加氮肥的工业生产及更好地利用和提高生物固氮能力,是为农业提供更多氮肥的两条重要途径。特别是生物固氮无污染,且经济。随着当前分子遗传学、基因工程等技术的建立和发展,生物固氮的基因工程早已是科学家们非常关注的研究课题。把生物固氮的基因工程运用于农业生产,目标主要有两个:一是把非豆科作物,尤其是禾谷类作物转变成固氮作物;二是提高现存固氮作物的固氮能力。

(一) 使非豆科植物转变为固氮作物

应用基因工程技术,可从三方面入手:一种途径是把豆科植物的结瘤基因导入其他作物细胞,使之能

够对固氮菌的感染作出恰当的反应;另一种途径是改变根瘤菌的遗传结构,使它能够与非豆科作物的根结合形成根瘤,从而使非固氮作物获得固氮能力,简单地说,就是扩大根瘤菌的寄主范围;第三种途径则是直接把固氮基因导入非豆科植物。

就前两种途径而言,首先必须对影响固氮菌与植物根部相互作用的因素乃至固氮菌体的遗传结构和生理生化特征有深刻的了解。如前所述,我们对根瘤菌在豆科植物根的侵染直至根瘤形成的过程、固氮酶的组成、功能及活性影响因素,以及共生固氮的众多相关基因的功能和定位都有了一定的了解。而且,到目前为止,许多植物的结瘤基因已被克隆,以豆科植物三叶草边材料的一种研究根瘤形成的模型也已经建立。基于这些,实现上述目标并非没有可能。

第三条途径看来比较困难,原因有二:其一,固氮酶复合体对于氧的抑制作用十分敏感。豆科植物根瘤组织中,由类菌体的周膜、根瘤内皮层内侧独特的组织结构以及根瘤中豆血红蛋白三者共同形成的氧调节结构,为固氮酶创造了良好的厌氧环境。若直接将固氮基因导入非豆科作物,该受体作物很难为固氮酶提供这样一个厌氧环境。其二,由于豆科植物根瘤菌固氮所需的 ATP 几乎占植物总量的五分之一,因此也要求新形成的固氮植物必需具有极高的 ATP 形成速率,方可使能量供求平衡,进而达到固氮的目的,而这也并非易事。不过,作为一种尝试,20 世纪 70 年代末科学家们已把克氏肺炎杆菌的固氮基因转入大肠杆菌,使大肠杆菌也能直接利用空气中的氮。而日本科学家将方法稍作变通,把固氮基因转移到水稻根际微生物中,结果可使这种微生物给水稻提供五分之一的需氮量。

值得一提的是,现在已发现了能与禾谷类作物根际联合共生固氮的固氮螺菌,并对其分子生物学特性进行了较细致的研究。1979 年巴西科学家杜伯林纳(Doberiner)等首次证实了这是一类可与禾本科作物根际联合共生固氮的微生物。该菌的固氮效率虽不及豆科植物根瘤菌,但它能与玉米、水稻和小麦等禾本科作物共生固氮,而且分布范围广,又能产生植物生长素,因而日益受到人们的重视。目前已发现固氮螺菌属有 5 个种,其中以巴西固氮螺菌及产脂固氮螺菌研究最多。固氮螺菌只有在铵浓度及氧分压都低时才固氮,且对其固氮系统的调控是通过固氮酶活性及其他众多相关基因的表达协同完成的。随着对固氮螺菌研究的日渐深入,或许有可能为禾谷类作物固氮开辟一条希望之路。

(二) 提高现有固氮作物的固氮能力

要提高现有固氮作物的固氮能力,就必须提高根瘤菌的结瘤能力或固氮基因的固氮能力,或者二者兼顾。通常采用的方法是接种高效固氮的根瘤菌剂,即将筛选出来的具高效固氮能力的根瘤菌人工培养,使之大量繁殖,而后制成根瘤菌剂,作为一种细菌肥料与大豆、花生等拌种,可显著提高作物产量。不过,在长期种植豆科作物的田中,由于土壤中已有固氮效率差别甚远的根瘤菌群体(称之为土著根瘤菌),且其中大部分是无效菌株(即固氮效率一般很低),但由于它群体大、分布广、竞争能力强,因此接种的高效固氮根瘤菌在竞争结瘤时往往敌不过土著根瘤菌,从而使形成的根瘤实际上多为无效根瘤,严重影响了固氮效率。为了克服这一点,人们尝试的方法主要有两种。一种是结合施用抗生素来抑制土著根瘤菌,使有抗性的高效固氮根瘤菌的结瘤率提高。另一种方法是接种拮抗菌。土壤中存在许多根际微生物,它们之间相互作用非常复杂,有很多可相互产生拮抗作用或者说抑制作用。利用这一点,筛选对土著根瘤菌具有抑制作用的拮抗菌,再将其与不受拮抗菌影响的高效固氮根瘤菌同时接种,以此提高后者的结瘤率。

目前,用基因工程技术正在进行的有关提高现有固氮作物的固氮能力的研究主要有如下几个方面:

1. 将固氮效率高的大豆根瘤菌的固氮基因簇导入高结瘤能力的大豆根瘤菌中

土壤中根瘤菌的特点是:具有较强的竞争结瘤优势,但固氮效率一般较低。因此,通过筛选优势的土著根瘤菌,而后利用基因工程手段将一些具有高固氮效率的固氮基因(簇)导入其中,就有可能获得结瘤能力及固氮效率双高的基因工程菌株。

2. 将外源共生基因导入豆科作物根瘤菌,提高其结瘤或固氮能力

自 20 世纪 70 年代以来,国内外学者对根瘤菌共生固氮基因的定位、表达及其调控的研究较多,而对不同来源的根瘤菌共生基因或共生质粒之间的相互作用研究很少。目前发现,接受了外源共生基因根瘤菌的竞争结瘤能力及固氮酶活性确有明显变化,有的提高,有的降低,因此,阐明外源共生基因的作用机

制以及寻找合适的外源共生基因供体和受体是很有必要的。

3. 培育具抗药基因的根瘤菌

福美双是农业生产上常用的杀菌剂,多用于种子和土壤处理,但它往往对土壤中一些有益微生物如根瘤菌等也具有明显的杀伤或抑制作用。已有报道,用福美双处理苜蓿种子并接种抗福美双的苜蓿根瘤菌可显著提高苜蓿产量,接种福美双的大豆根瘤菌也可大幅度提高结瘤率。因此,克隆抗福美双的基因并将其导入根瘤菌,使根瘤菌获得对福美双的抗性将对固氮效应的发挥大有裨益。

另外,培育抗农药根瘤菌的工作也正在进行之中。已从枯草杆菌中克隆了一种抗药基因 *xyIE*,它可以分解具苯环和杂环的农药。若将此基因导入高效固氮根瘤菌,使该工程菌具有抗药性,无疑会对豆科作物的生产带来极大好处。目前正在寻找一种既可被 *xyIE* 基因产物分解,又可抑制固氮效率低的土著根瘤菌生长的农药。

总的说来,生物固氮的基因工程研究尚处于积累资料的沉寂阶段,但毫无疑问,新的突破正在孕育之中。

提 要

高等植物无法直接利用空气中的 N_2 ,只有通过某些微生物把空气中游离的氮固定,转化为含氮化合物后植物方可利用。这些原核生物广泛分布于土壤和水域中,有的与豆科植物和某些非豆科植物共生形成根瘤固氮,有的则能自生固氮。植物根瘤菌所固定的氮约占生物固氮的三分之二。生物固氮过程是一个相当复杂的过程,必须在固氮酶的催化下才能进行。固氮酶是由两个蛋白组分组成的一个有活性的功能单位,单独一个组分不起作用,而且它们都是厌氧的,遇氧很快失活。组分1相对分子质量约为240 000,由两对不同的4个亚单位($\alpha_2\beta_2$)组成,称为钼铁蛋白,是络合和还原 N_2 生成 NH_3 的部位。组分2的相对分子质量约60 000,由两个相同的亚单位(γ_2)组成,称为铁蛋白,其功能是将由代谢过程所产生的电子传递给钼铁蛋白。氨对固氮酶活性有抑制作用。固氮酶基因表达的调控、氧敏感机制及其保护、固氮酶和氢酶的关系等等尚待进一步研究。化学模拟生物固氮依赖于固氮酶的结构及其催化 N_2 还原成氨的分子机制的阐明。共生结瘤固氮的分子调控机制极为复杂。从根瘤菌来说涉及到结瘤基因(*nod*)、结瘤基因的调节基因、固氮基因(*nif* 基因和 *fix* 基因)。从豆科植物本身来说涉及到早期结瘤素基因及晚期结瘤素基因。生物固氮研究的意义是重大的,其最终目的是:①提高现有固氮生物的固氮能力;②提供优质高效的微生物肥料,为农业开发肥源;③用分子生物学等方法促使不固氮作物固氮;④人工模拟固氮酶在常温常压下还原分子氮,使氨的工业合成有一个历史性突破。

习 题

1. 什么叫生物固氮?有何重要意义?
2. 固氮生物的种类及其特点。
3. 固氮酶的结构组成、催化的反应及可能过程。
4. 共生固氮过程中的基因表达调控过程。
5. 生物固氮的基因工程有哪些工作可做?

主要参考书目

1. 丁勇,吴乃虎,陈春霞,钟珍萍. 基因工程与农业. 北京:科学技术文献出版社,1994
2. 姜涌明. 生物固氮的秘密. 北京:科学出版社,1981

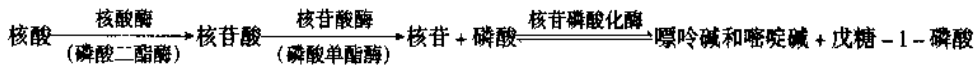
第 33 章 核酸的降解 和核苷酸代谢

核酸的基本结构单位是核苷酸。核酸代谢与核苷酸代谢密切相关。细胞内存在多种游离的核苷酸，这是一类在代谢上极为重要的物质，它们几乎参与细胞的所有生化过程，总结起来有以下几个方面的作用：①核苷酸是核酸生物合成的前体。②核苷酸衍行物是许多生物合成的活性中间物。例如，UDP-葡萄糖和 CDP-二脂酰甘油分别是糖原和磷酸甘油酯合成的中间物。③ATP 是生物能量代谢中通用的高能化合物。④腺苷酸是三种重要辅酶(烟酰胺核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸和辅酶 A)的组分。⑤某些核苷酸是代谢的调节物质。如 cAMP 和 cGMP 是许多种激素引起的胞内信使；(P)ppGpp 是氨基酸饥饿引起效应的中间介质；腺苷酰基、尿苷酰基是酶活性共价修饰基团。

核酸降解生产核苷酸，核苷酸还能进一步分解。在生物体内，核苷酸可由其他化合物合成。某些辅酶的合成与核苷酸代谢亦有关。

一、核酸和核苷酸的分解代谢

动物和异养型微生物可以分泌消化酶类来分解食物或体外的核蛋白和核酸类物质，以获得各种核苷酸。核苷酸水解脱去磷酸而生成核苷，核苷再分解生成嘌呤碱或嘧啶碱和戊糖。核苷酸及其水解产物均可被细胞吸收和利用。植物一般不能消化体外的有机物质。但所有生物的细胞都含有与核酸代谢有关的酶类，能够分解细胞内各种核酸，促使核酸的分解更新。在体内，核酸的水解产物戊糖可参加戊糖代谢，嘌呤碱和嘧啶碱还可以进一步分解。核酸的分解过程如下：



(一) 核酸的解聚作用

核酸是由许多核苷酸以 3',5'-磷酸二酯键连接而成的大分子化合物。核酸分解代谢的第一步是水解连接核苷酸之间的磷酸二酯键，生成低级多核苷酸或单核苷酸。在生物体内有许多磷酸二酯酶可以催化这一解聚作用。作用于核酸的磷酸二酯酶称为核酸酶。水解核糖核酸的称核糖核酸酶，水解脱氧核糖核酸的称脱氧核糖核酸酶。核糖核酸酶和脱氧核糖核酸酶中能够水解核酸分子内磷酸二酯键的酶又称为核酸内切酶(endonuclease)，从核酸链的一端逐个水解下核苷酸的酶称为核酸外切酶(exonuclease)。

有些非特异的磷酸二酯酶，例如，蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶，对核糖核酸和脱氧核糖核酸(或其低级多核苷酸)都能分解。它们能从多聚核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸链的一端逐个水解下核苷酸，因此属于核酸外切酶。蛇毒磷酸二酯酶是从多核苷酸链的 3'端开始，逐个水解下 5'-核苷酸。牛脾磷酸二酯酶则相反，从 5'基端开始，逐个水解下 3'-核苷酸。由于水解的位置不同，因而所得到的核苷酸可以是 3'-核苷酸，或是 5'-核苷酸(图 33-1)。

细胞中 DNA 的含量是相当恒定的，而 RNA 的

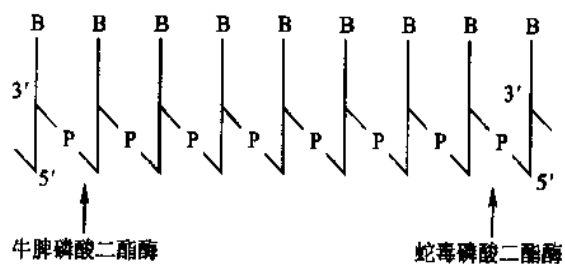


图 33-1 磷酸二酯酶对核酸的水解位置
B 代表嘌呤或嘧啶碱基 P 代表核糖或脱氧核糖

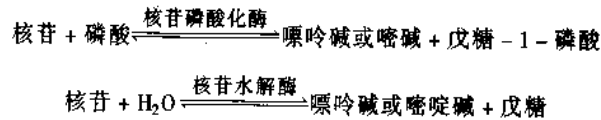
含量却有显著变化。许多证据表明, DNA 在细胞中是一种较为稳定的成分, 其分解速度很慢, 不像 RNA 那样代谢活跃。但是, 令人惊异的是脱氧核糖核酸酶含量在相当众多的细胞中却是很高的。推测这种脱氧核糖核酸酶的可能生理功能在于消除异常的或外源的 DNA, 以维持细胞遗传性的稳定; 或是用于细胞自溶。

在细菌细胞内存在一类能识别并水解外源双链 DNA 的核酸内切酶, 称为限制性内切酶, 可用于特异切割 DNA, 是很有用的工具酶。

(二) 核苷酸的降解

核苷酸水解下磷酸即成为核苷。生物体内广泛存在的磷酸单酯酶或核苷酸酶可以催化这个反应。非特异性的磷酸单酯酶对一切核苷酸都能作用, 无论磷酸基在核苷的 2'、3' 或 5' 位置上都可被水解下来。某些特异性强的磷酸单酯酶只能水解 3' - 核苷酸或 5' - 核苷酸, 则分别称为 3' - 核苷酸酶或 5' - 核苷酸酶。

核苷经核苷酶(nucleosidase)作用分解为嘌呤碱或嘧啶碱和戊糖。分解核苷的酶有两类。一类是核苷磷酸化酶(nucleoside phosphorylase), 另一类是核苷水解酶(nucleoside hydrolase)。前者分解核苷生成含氮碱和戊糖的磷酸酯, 后者生成含氮碱和戊糖:



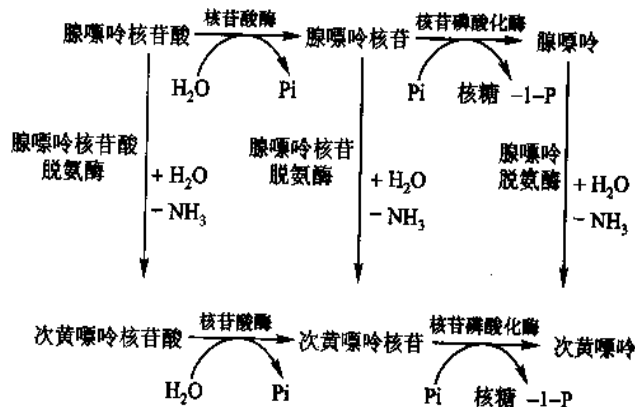
核苷磷酸化酶存在比较广泛, 其所催化的反应是可逆的。核苷水解酶主要是存在于植物和微生物体内, 并且只能对核糖核苷作用, 对脱氧核糖核苷没有作用, 反应是不可逆的。它们对作用底物常具有一定的特异性。

核苷酸的降解产物嘌呤碱和嘧啶碱还可以继续分解。

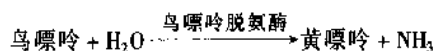
(三) 嘌呤碱的分解

不同种类的生物分解嘌呤碱的能力不一样, 因而代谢产物亦各不相同。人和猿类及一些排尿酸的动物(如鸟类, 某些爬虫类和昆虫等)以尿酸作为嘌呤碱代谢的最终产物。其他多种生物则还能进一步分解尿酸, 形成不同的代谢产物, 直至最后分解成二氧化碳和氨。

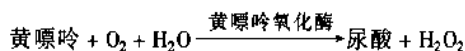
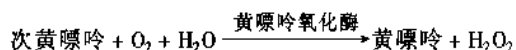
嘌呤碱的分解首先是在各种脱氨酶的作用下水解脱去氨基。腺嘌呤和鸟嘌呤水解脱氨分别生成次黄嘌呤和黄嘌呤。脱氨反应也可以在核苷或核苷酸的水平上进行。在动物组织中腺嘌呤脱氨酶(adenine deaminase)的含量极少, 而腺嘌呤核苷脱氨酶(adenosine deaminase)和腺嘌呤核苷酸脱氨酶(adenylate deaminase)的活性较高, 因此, 腺嘌呤的脱氨分解可在其核苷和核苷酸的水平上发生, 然后再水解生成次黄嘌呤。它们的关系如下:



鸟嘌呤脱氨酶(guanine deaminase)的分布较广。鸟嘌呤的脱氨分解主要是在该酶的作用下进行的:

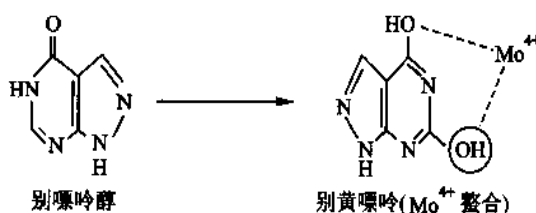


次黄嘌呤和黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)的作用下氧化生成尿酸:



黄嘌呤氧化酶是一种复合黄素酶,它由2个相同的亚基所组成,相对分子质量为260 000。每一个亚基含有一个FAD,一个钼原子和一个 Fe_4S_4 中心。黄嘌呤(或次黄嘌呤)的氧化是一极其复杂的过程,它要求分子氧作为电子受体,还原产物是过氧化氢,进入尿酸的氧来自水。当底物与酶结合后, Mo(VI) 被还原成 Mo(IV) ,电子经过黄素、铁硫中心等一系列转移步骤而传递给分子氧,并与氢离子形成过氧化氢, Mo(IV) 则再氧化成 Mo(VI) 。产物过氧化氢随即被过氧化氢酶所分解。

结构与次黄嘌呤很相似的别嘌呤醇(allopurinol)对黄嘌呤氧化酶有很强的抑制作用。所以有时用它治疗痛风。该病是由于尿酸在体内过量积累而引起的。经别嘌呤醇治疗的患者排泄黄嘌呤和次黄嘌呤以代替尿酸。别嘌呤醇可被黄嘌呤氧化酶氧化成别黄嘌呤(alloxanthine),它与酶活性中心的 Mo(IV) 牢固结合,从而使 Mo(IV) 不易转变成 Mo(VI) 。这种底物类似物经酶作用后成为酶的灭活物,称为自杀作用物(suicide substrate)。别嘌呤醇转变成别黄嘌呤的反应如下:

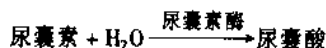


如前所述,尿酸的进一步分解代谢随不同种类生物而异。人和猿类缺乏分解尿酸的能力。鸟类等排尿酸动物不仅可将嘌呤碱分解成尿酸,还可以把大量其他含氮代谢物转变成尿酸,再排出体外。然而大多数种类的生物能够继续分解尿酸。尿酸在尿酸氧化酶(urate oxidase)的作用下被氧化,同时脱掉二氧化碳,而生成尿囊素(allantoin):



尿酸氧化酶是一种铜酶,它以氧作为直接电子受体,但产生过氧化氢而不产生水。

尿囊素是除人及猿类以外其他哺乳类嘌呤代谢的排泄物。也就是说,它们分解尿酸到尿囊素为止。其他多数种类生物则含存尿囊素酶(allantoinase),能水解尿囊素生成尿囊酸(allantoic acid):



尿囊酸是某些硬骨鱼的嘌呤碱代谢排泄物。尿囊酸在尿囊酸酶(allantoicase)作用下水解生成尿素和乙醛酸:



尿素是多数鱼类及两栖类的嘌呤碱代谢排泄物。然而,某些低等动物还能将尿素分解成氨和二氧化碳再排出体外。

植物和微生物体内嘌呤碱代谢的途径大致与动物相似。植物体内广泛存在着尿囊素酶、尿囊酸酶和脲酶等;嘌呤碱代谢的中间产物,如尿囊素和尿囊酸等也在多种植物中大量存在。微生物一般能分解嘌呤碱类物质,生成氨、二氧化碳以及一些有机酸,如甲酸、乙酸、乳酸等。现将嘌呤碱的分解过程总结如图 33-2。

(四) 嘧啶碱的分解

核苷酸的分解产物嘧啶碱可以在生物体内进一步被分解。不同种类生物对嘧啶碱的分解过程也不完

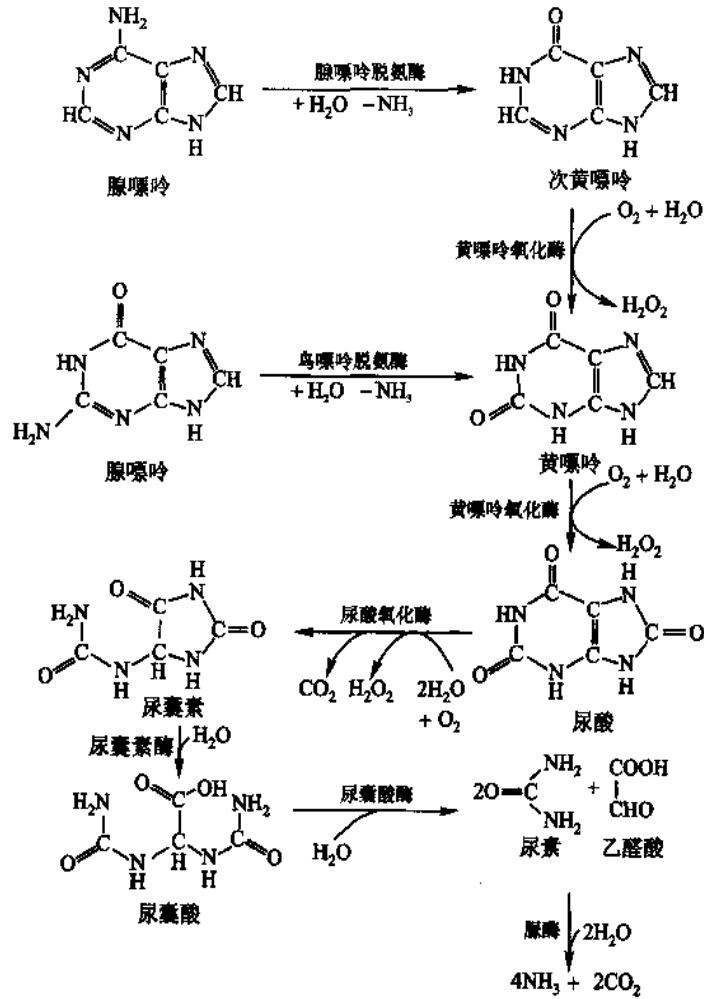


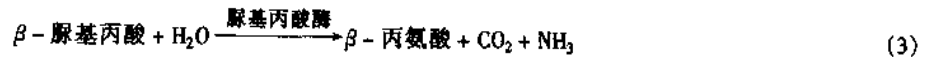
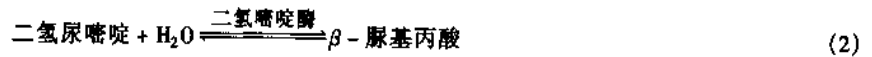
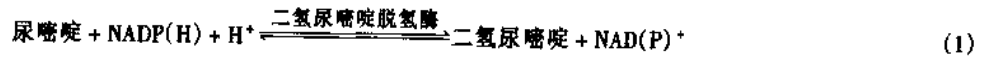
图 33-2 嘌呤碱的分解代谢

全一样。一般具有氨基的嘧啶需要先水解去氨基,如胞嘧啶脱氨生成尿嘧啶:

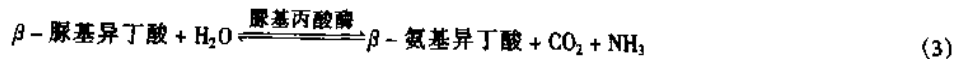
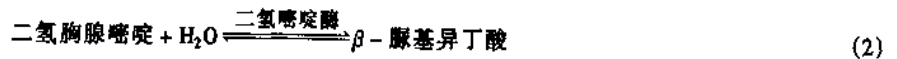
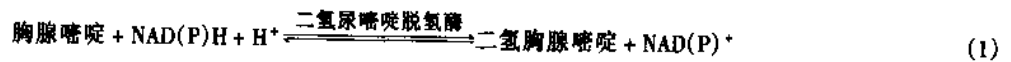


在人和某些动物体内其脱氨过程也可能是在核苷或核苷酸的水平上进行的。

尿嘧啶经还原生成二氢尿嘧啶,并水解使环开裂,然后水解生成二氧化碳、氨和 β -丙氨酸; β -丙氨酸经转氨作用脱去氨基后还可参加有机酸代谢:



胸腺嘧啶的分解与尿嘧啶相似,其分解过程如下:



现将嘧啶碱的分解途径总结如图 33-3。

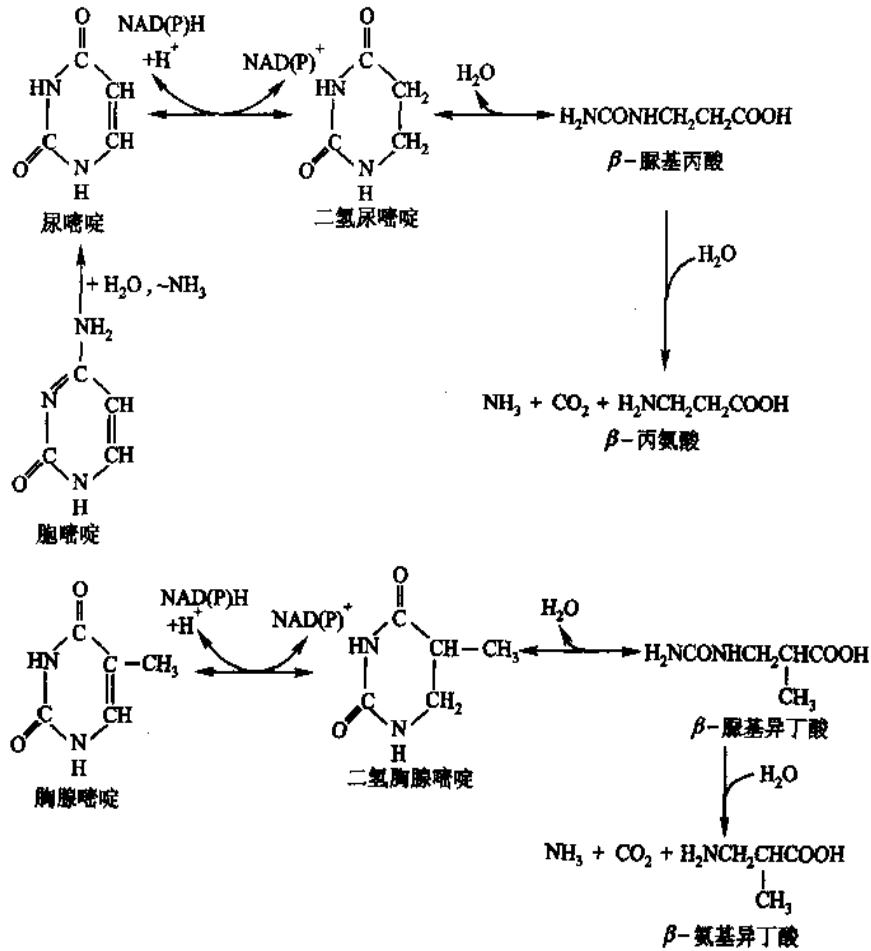


图 33-3 嘧啶碱的分解代谢

二、核苷酸的生物合成

无论动物、植物或微生物,通常都能合成各种嘌呤和嘧啶核苷酸:

(一) 嘌呤核糖核苷酸的合成

用同位素标记的化合物做实验,证明生物体内能利用二氧化碳、甲酸盐、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸作为合成嘌呤环的前体。嘌呤环中的第 1 位氮来自天冬氨酸的氨基,第 3 位及第 9 位氮来自谷氨酰胺的酰胺基。第 2 及第 8 位碳来自甲酸盐;第 6 位碳来自二氧化碳;而第 4 位碳,第 5 位碳及第 7 位氮则来自甘氨酸。这些关系如下图所示:

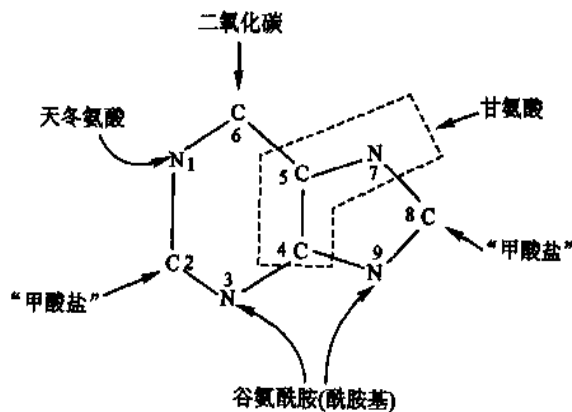


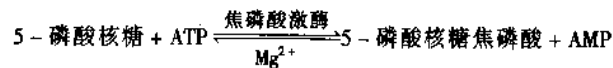
图 33-4 嘌呤环的元素来源

目前关于嘌呤碱的合成途径已经了解得比较清楚。生物体内不是先合成嘌呤碱,再与核糖和磷酸结合成核苷酸,而是从 5-磷酸核糖焦磷酸开始,经过一系列酶促反应,生成次黄嘌呤核苷酸,然后再转变为其他嘌呤核苷酸。

1. 次黄嘌呤核苷酸的合成

次黄嘌呤核苷酸的酶促合成过程,主要是以鸽肝的酶系统为材料研究清楚的。以后在其他动物、植物和微生物中也找到有类似的酶和中间产物,由此推测它们的合成过程也大致相同。

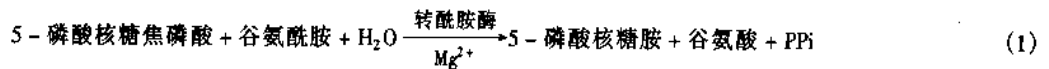
次黄嘌呤核苷酸的合成是一系列连续的酶促反应过程,首先需要由 5-磷酸核糖焦磷酸(5-phosphoribosyl pyrophosphate)供给核苷酸的磷酸核糖部分,在其上再完成嘌呤环的装配。在体内,5-磷酸核糖焦磷酸可由 5-磷酸与 ATP 作用产生。催化这一反应的酶称为磷酸核糖焦磷酸激酶(phosphoribosyl pyrophosphokinase)。在此反应中 ATP 的焦磷酸基是作为一个单位直接转移到 5-磷酸核糖分子的第一位碳的羟基上。



次黄嘌呤核苷酸的合成过程共有十步反应,可分成两个阶段。在第一阶段的反应中,由 5-磷酸核糖焦磷酸与谷氨酰胺反应生成 5-磷酸核糖胺(5-phosphoribosylamine),再与甘氨酸结合,经甲酰化和转移谷氨酰胺的氮原子,然后闭环生成 5-氨基咪唑核苷酸(5-aminoimidazole ribotide),至此形成了嘌呤的咪唑环。第二阶段的反应则由 5-氨基咪唑核苷酸羧化,进一步获得天冬氨酸的氨基,再甲酰化,最后脱水闭环生成次黄嘌呤核苷酸。现依次叙述如下。

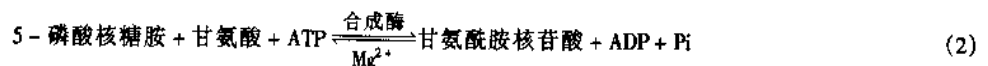
第一阶段的反应:

5-磷酸核糖焦磷酸可与谷氨酰胺反应生成 5-磷酸核糖胺、谷氨酸和无机焦磷酸盐(反应 1)。催化这一步骤的酶为磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶(phosphoribosyl pyrophosphate transamidase)。

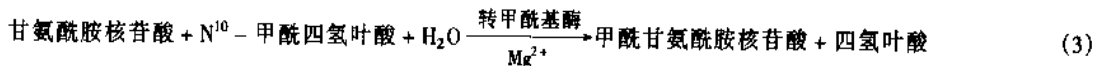


也就在这一步,使原来的 α -构型核糖化合物变为 β -构型。因为 5-磷酸核糖焦磷酸具有 α -构型,而 5-磷酸核糖胺则具有 β -构型。

5-磷酸核糖胺和甘氨酸在有 ATP 供给能量的情况下,合成为甘氨酰胺核苷酸(glycinamide ribotide),同时 ATP 分解成 ADP 和正磷酸盐(反应 2)。这一步骤是由甘氨酰胺核苷酸合成酶(glycinamide ribotide synthetase)所催化,反应是可逆的。

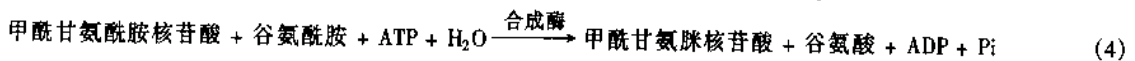


甘氨酰胺核苷酸经甲酰化生成甲酰甘氨酰胺核苷酸(formylglycinamide ribotide)。在此处甲酰基的供体为 N^{10} -甲酰四氢叶酸(N^{10} -formyltetrahydrofolate)(反应 3)。催化这个甲酰化反应的酶为甘氨酰胺核苷酸转甲酰基酶(glycinamide ribotide transformylase)。

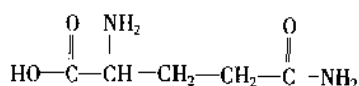


在体内, N^{10} -甲酰四氢叶酸的甲酰基可由甲酸供给。在酶的催化下,甲酸经 ATP 活化并以甲酰基形式转移给四氢叶酸生成 N^{10} -甲酰四氢叶酸(N^{10} -formyltetrahydrofolate)。

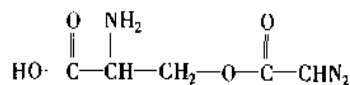
甲酰甘氨酰胺核苷酸在有谷氨酰胺供给酰胺基并有 ATP 存在时,转变成甲酰甘氨脒核苷酸(formylglycinamidine ribotide)。谷氨酰胺脱去酰胺基后生成谷氨酸,ATP 则分解成 ADP 和正磷酸盐(反应 4)。促进这个反应的酶为甲酰甘氨脒核苷酸合成酶(formylglycinamidine ribotide synthetase)。



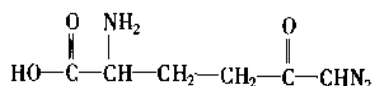
这一步反应可被抗生素重氮丝氨酸(azaserine)和 6-重氮-5-氧-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)不可逆地抑制。这两种抗生素与谷氨酰胺有类似的结构:



谷氨酰胺



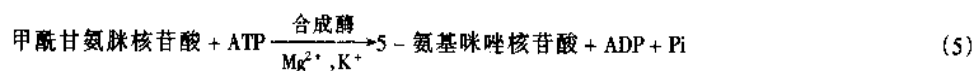
重氮丝氨酸



6-重氮-5-氧-正亮氨酸

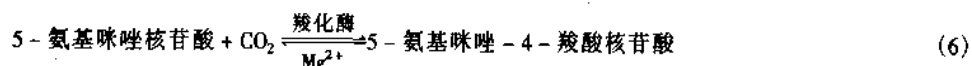
其他有谷氨酰胺参与的反应,如5-磷酸核糖胺的合成等,也受重氮丝氨酸和6-重氮-5-氧-正亮氨酸的抑制。这些抗生素虽有抗癌作用,但副作用大,临床上不大使用。

在有ATP存在时,甲酰甘氨酸核苷酸经氨基咪唑核苷酸合成酶(aminoimidazole ribotide synthetase)的作用转变成5-氨基咪唑核苷酸。这个作用可被镁离子和钾离子激活。反应式如下:

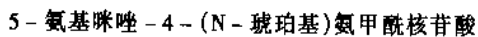
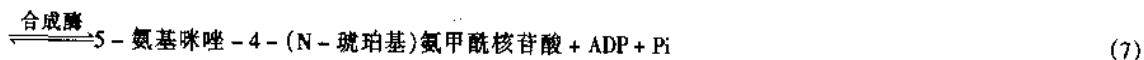


第二阶段的反应:

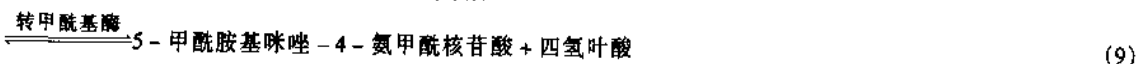
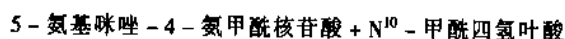
在氨基咪唑核苷酸羧化酶(aminoimidazole ribotide carboxylase)的催化下,5-氨基咪唑核苷酸可与二氧化碳反应,生成5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxylate ribotide),反应是可逆的。反应式如下:



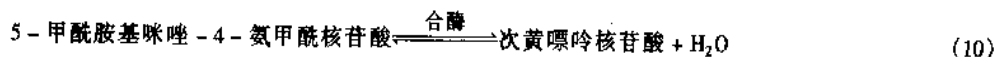
在有ATP存在时,5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸与天冬氨酸缩合生成5-氨基咪唑-4-(N-琥珀基)氨甲酰核苷酸(5-aminoimidazole-4-(N-succino)-carboxamide ribotide)(反应7)。反应是由氨基咪唑琥珀基氨甲酰核苷酸合成酶(5-aminoimidazole-4-(N-succino)-carboxamide ribotide synthetase)所催化的。而在另一酶的催化下,5-氨基咪唑-4-(N-琥珀基)氨甲酰核苷酸可被分解,脱去一分子延胡索酸,而转变成5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide)(反应8)。现已了解,这个酶同时具有分解腺苷酸琥珀酸(adenylosuccinate)的活力,因此,称为腺苷酸琥珀酸裂解酶(adenylosuccinate lyase)。反应7和反应8都是可逆的。



在以N¹⁰-甲酰四氢叶酸供给甲酰基的情况下,5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸经甲酰化生成5-甲酰胺基咪唑-4-氨甲酰核苷酸(5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribotide)(反应9)。催化这个反应的酶为氨基咪唑氨甲酰核苷酸转甲酰基酶(aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase)。反应是可逆的。



5-甲酰胺基咪唑-4-氨甲酰核苷酸在次黄嘌呤核苷酸合酶(IMP synthase)作用下脱水环化,形成次黄嘌呤核苷酸。反应是可逆的。



现将次黄嘌呤核苷酸的酶促合成过程总结如图33-5所示。

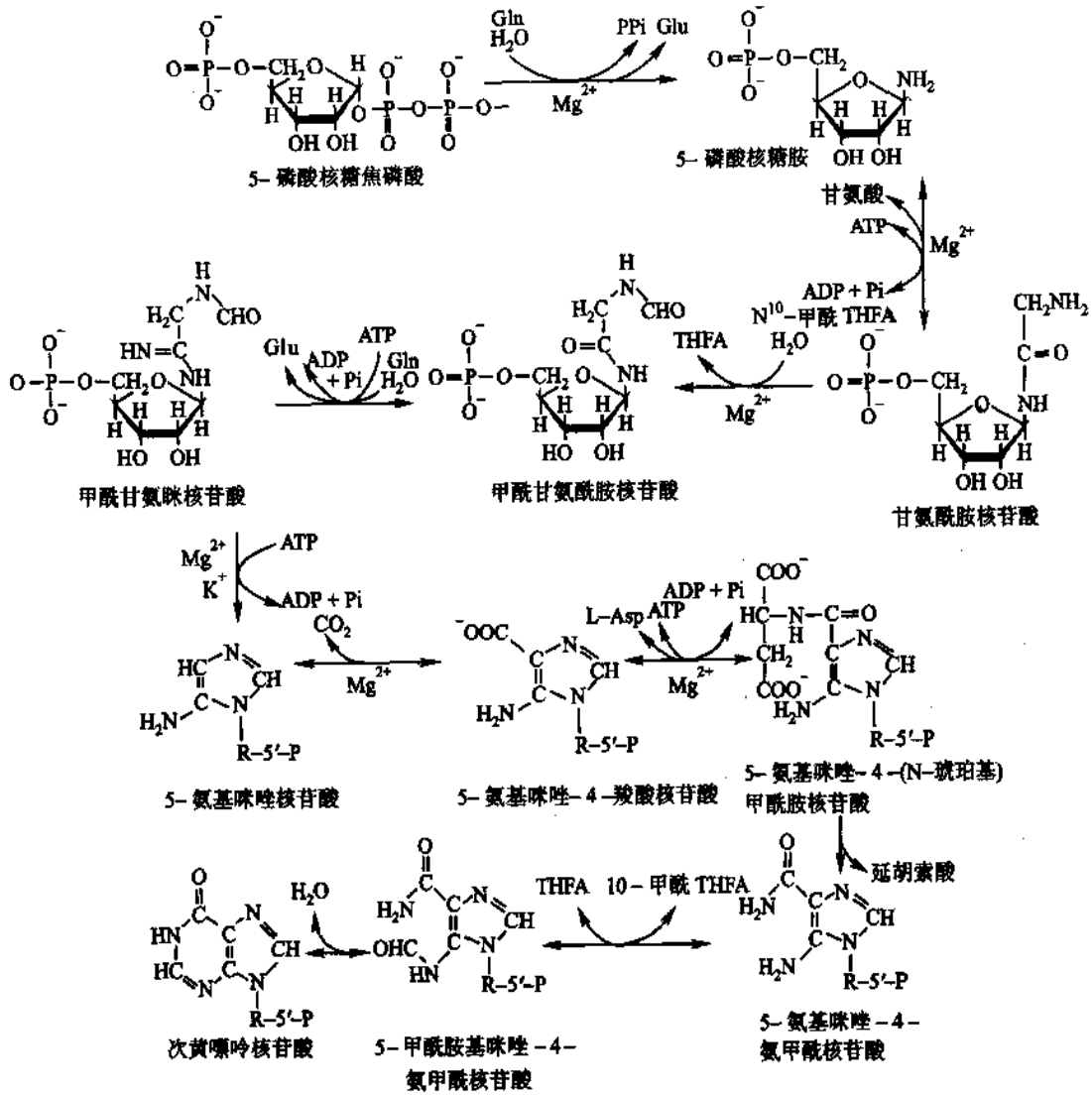
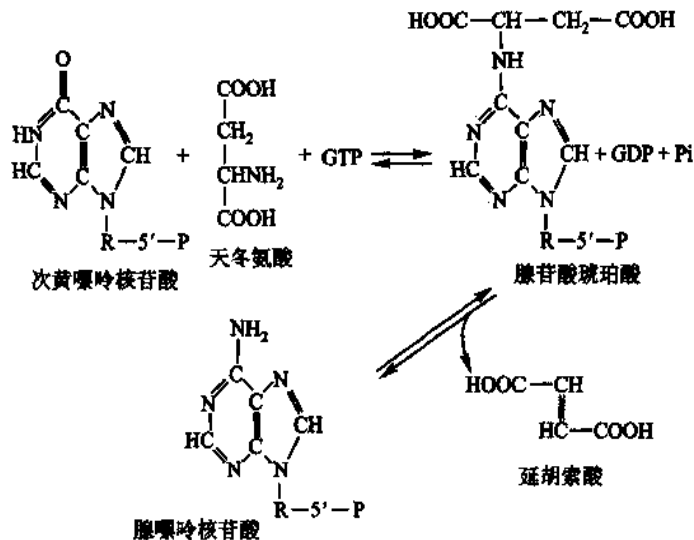


图 33-5 次黄嘌呤核苷酸的合成途径

2. 腺嘌呤核苷酸的合成

生物体内由次黄嘌呤核苷酸氨基化生成腺嘌呤核苷酸,共分两步进行:次黄嘌呤核苷酸在 GTP 供给能量的条件下与天冬氨酸合成腺苷酸琥珀酸(adenylosuccinic acid),GTP 则分解成 GDP 和正磷酸盐。这个反应是由腺苷酸琥珀酸合成酶(adenylosuccinate synthetase)所催化的。中间产物腺苷酸琥珀酸随即在腺苷酸琥珀酸裂解酶的催化下分解成腺嘌呤核苷酸和延胡索酸。反应过程如下:



Lesch - Nyhan 综合征是一种与 X 染色体连锁的遗传代谢病,患者先天性缺乏次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶。这种缺陷是伴性的隐性遗传性状,主要见之于男性。由于鸟嘌呤和次黄嘌呤补救途径的障碍,导致过量产生尿酸。嘌呤核苷酸的从头合成和补救途径之间通常存在平衡。5 - 磷酸核糖胺的合成受到嘌呤核苷酸的抑制;缺少补救途径会引起嘌呤核苷酸合成速度的增加。结果大量积累尿酸,并导致肾结石和痛风。这些症状可通过别嘌呤醇对黄嘌呤氧化酶的抑制而得到缓解。Lesch - Nyhan 综合征更严重的后果是招致自残肢体,别嘌呤醇对此症状无效。现在还不知道,缺少补救途径为什么会造成如此的神经疾病症状。

5. 嘌呤核苷酸生物合成的调节

嘌呤核苷酸的从头合成受其两个终产物腺苷酸和鸟苷酸的反馈控制。主要控制点有三个。第一个控制点在合成途径的第一步反应,即氨基被转移到 5 - 磷酸核糖焦磷酸上以形成 5 - 磷酸核糖胺。催化该反应的酶是一种变构酶,它可被终产物 IMP、AMP 和 GMP 所抑制。因此,无论是 IMP、AMP 或是 GMP 的过量积累均会导致由 PRPP 开始的合成途径第一步反应的抑制。另两个控制点分别位于次黄苷酸后分支途径的第一步反应,这就使得 GMP 过量的变构效应仅抑制其自身的形成,而不影响 AMP 的形成。反之,AMP 的积累抑制其自身的形成,而不影响 GMP 的生物合成。大肠杆菌中嘌呤核苷酸生物合成的反馈控制机制如图 33 - 6 所示。不同生物的调节方式略有不同。

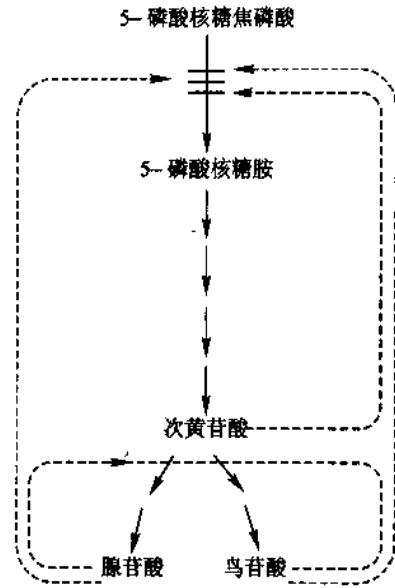


图 33 - 6 嘌呤核苷酸生物合成的反馈控制机制

(二) 嘧啶核糖核苷酸的合成

嘧啶核苷酸的嘧啶环是由氨甲酰磷酸和天冬氨酸合成的(图 33 - 7)。

与嘌呤核苷酸不同,在合成嘧啶核苷酸时首先形成嘧啶环,再与磷酸核糖结合成为乳清苷酸(orotidine - 5 - phosphate),然后生成尿嘧啶核苷酸。其他嘧啶核苷酸则由尿嘧啶核苷酸转变而成。

1. 尿嘧啶核苷酸的合成

由氨甲酰磷酸(carbamyl phosphate)与天冬氨酸合成氨甲酰天冬氨酸(carbamyl aspartate),闭环并被氧化生成乳清酸(orotic acid)。乳清酸与 5 - 磷酸核糖焦磷酸作用生成乳清苷酸,脱羧后就成为尿嘧啶核苷酸。

生物体内的氨甲酰磷酸可由氨、二氧化碳和 ATP 合成。用于形成嘧啶的氨甲酰磷酸需由谷氨酰胺作为氨的供体。每合成一分子氨甲酰磷酸消耗 2 分子 ATP。催化此合成反应的酶为氨甲酰磷酸合成酶(carbamyl phosphate synthetase)。

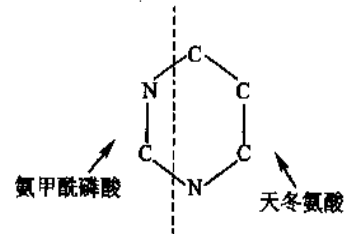
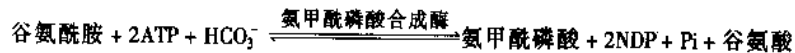
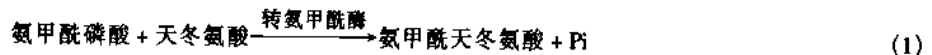


图 33 - 7 嘧啶环的来源

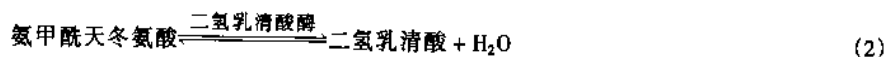


尿嘧啶核苷酸的酶促合成共有五步反应:

氨甲酰磷酸在天冬氨酸转氨甲酰酶(aspartate carbamyl transferase)的作用下,将氨甲酰部分转移至天冬氨酸的 α - 氨基上,形成氨甲酰天冬氨酸。

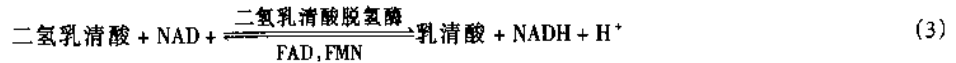


氨甲酰天冬氨酸通过可逆的环化脱水作用转变成二氢乳清酸(dihydroorotic acid)。催化这一步骤的酶为二氢乳清酸酶(dihydroorotase)。

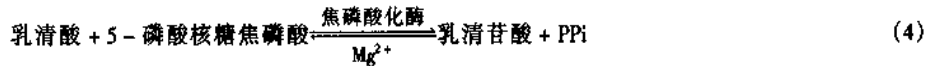


二氢乳清酸随后在二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase)催化下被氧化成乳清酸。该酶是一

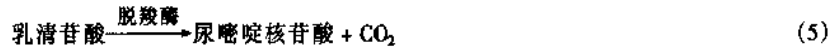
含铁的黄素酶。在以氧作为电子受体时生成过氧化氢;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸可代替氧被还原。



乳清酸是合成尿嘧啶核苷酸的重要中间产物,至此已形成嘧啶环,而后再和 5-磷酸核糖相连接。催化乳清酸与 5-磷酸核糖焦磷酸作用生成乳清苷酸的酶,称为乳清苷酸焦磷酸化酶(oroxydic acid pyrophosphorylase)。反应是可逆的。镁离子可活化此反应。



乳清苷酸在乳清苷酸脱羧酶(oroxydic acid decarboxylase)作用下脱去羧基,即生成尿嘧啶核苷酸。



尿嘧啶核苷酸的酶促合成过程总结如图 33-8。

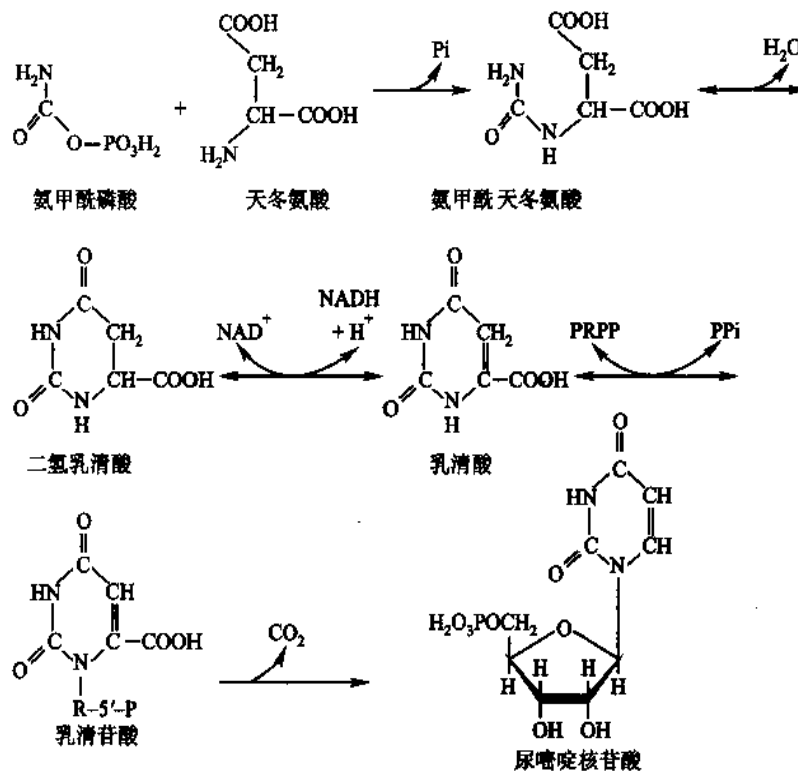
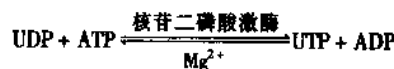


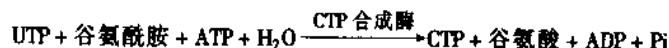
图 33-8 尿嘧啶核苷酸的合成途径

2. 胞嘧啶核苷酸的合成

由尿嘧啶核苷酸转变为胞嘧啶核苷酸是在尿嘧啶核苷三磷酸的水平上进行的。尿嘧啶核苷三磷酸可以由尿嘧啶核苷酸在相应的激酶作用下经 ATP 转移磷酸基而生成。催化尿嘧啶核苷酸转变为尿嘧啶核苷二磷酸的酶为特异的尿嘧啶核苷酸激酶(uridine-5-phosphate kinase)。催化尿嘧啶核苷二磷酸转变为尿嘧啶核苷三磷酸的酶为特异性较广的核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphokinase)。

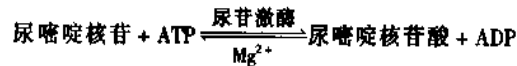
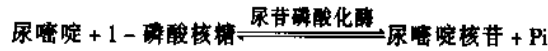


尿嘧啶、尿嘧啶核苷和尿嘧啶核苷酸都不能氨基化变成相应的胞嘧啶化合物,只有尿嘧啶核苷三磷酸才能氨基化生成胞嘧啶核苷三磷酸。在细菌中尿嘧啶核苷三磷酸可以直接与氨作用;动物组织则需要由谷氨酰胺供给氨基。反应要由 ATP 供给能量。催化此反应的酶为 CTP 合成酶(CTP synthetase)。反应式如下:

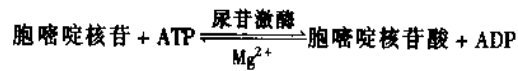


3. 由嘧啶碱和核苷合成核苷酸

生物体对外源的或核苷酸代谢产生的嘧啶碱和核苷可以重新利用。在嘌呤核苷酸的补救途径中,主要是通过磷酸核糖转移酶反应,直接由碱基形成核苷酸;然而嘧啶核苷激酶(pyrimidine nucleoside kinase)在嘧啶的补救途径中却起着重要作用。例如,尿嘧啶转变为尿嘧啶核苷酸可以通过两种方式进行:①与 5-磷酸核糖焦磷酸反应;②尿嘧啶与 1-磷酸核糖反应产生尿嘧啶核苷,后者在尿苷激酶作用下被磷酸化而形成尿嘧啶核苷酸。反应式如下:



胞嘧啶不能直接与 5-磷酸核糖焦磷酸反应生成胞嘧啶核苷酸。但是尿苷激酶也能催化胞苷被 ATP 磷酸化而形成胞嘧啶核苷酸。



4. 嘧啶核苷酸生物合成的调节

大肠杆菌中嘧啶核苷酸的生物合成可在三个控制点上受到终产物的反馈控制。合成途径的第一个调节酶是氨甲酰磷酸合成酶,它受 UMP 的反馈抑制。另两个调节酶是天冬氨酸转氨甲酰酶和 CTP 合成酶,它们受 CTP 的反馈抑制。前者被抑制将影响尿苷酸和胞苷酸的合成,后者只与胞苷酸的合成有关。嘧啶核苷酸生物合成的调节机制如图 33-9 所示

(三) 脱氧核糖核苷酸的合成

脱氧核糖核苷酸是脱氧核酸核糖合成的前体。此外,某些脱氧核糖核苷酸衍生物在代谢中还起着重要作用。如 dTDP-鼠李糖可由 dTDP-葡萄糖还原而成;dTDP-葡萄糖还可转化成 dTDP-半乳糖。

生物体内脱氧核糖核苷酸可以由核糖核苷酸还原形成。腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶核糖核苷酸经还原,将其中核糖第二位碳原子上的氧脱去,即成为相应的脱氧核糖核苷酸。胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的形成则需要经过两个步骤,首先由尿嘧啶核糖核苷酸还原形成尿嘧啶脱氧核糖核苷酸,然后尿嘧啶再经甲基化转变成胸腺嘧啶。

1. 核糖核苷酸的还原

在生物体内,腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶四种核糖核苷酸均可被还原成相应的脱氧核糖核苷酸。由细菌和动物组织中已分别提取出催化此还原反应的酶体系。核糖核苷酸还原酶由 R1 和 R2 亚基所组成,它们分开时没有酶的活性,只有合在一起并有镁离子存在时才形成有催化活性的酶。R1 亚基含有两条相同的多肽链,每条多肽链上有两个变构调节位点和一对参与还原反应的巯基。酶活性调节位点影响整个酶的活性,ATP 结合其上使酶活化;dATP 结合其上使酶抑制。第二个调节位点是底物特异性位点,当 ATP 或 dATP 与之结合使酶有利于 UDP 和 CDP 的还原;当 dTTP 或 dGTP 结合时分别促进 GDP 或 ADP 的还原;在这里,酶活性的调节不仅有底物的前馈激活和产物的反馈抑制,而且不同核苷酸之间还存在特异性的调节,使 DNA 四种前体的合成达到平衡。R2 亚基也含有两条多肽链,各有一个酪氨酸基和一个双核铁(Fe^{3+})辅因子(binuclear iron cofactor)。酶的两个活性部位在 R1 亚基和 R2 亚基的界面处。双核铁中心的功能是产生和稳定酪氨酸自由基。但酪氨酸自由基距离活性部位太远,不能直接参与作用,而需要产生另一自由基($-\text{X}^*$),可能是位于活性部位 R2 亚基上的半胱氨酸转变成一个硫的自由基,以起催化作用。核糖核苷二磷酸(NDP)进入酶

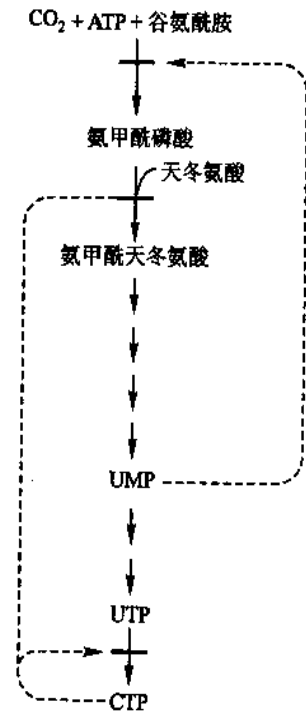


图 33-9 大肠杆菌嘧啶核苷酸生物合成的调节

的活性部位,由 R2 亚基上的自由基(-X^{*})发动单电子转移反应,导致 R1 亚基上一对硫氢基(-SH)被氧化,同时核糖核苷酸上 2'-羟基被还原,由氢取代羟基生成脱氧核糖核苷二磷酸(dNDP)和水。核糖核苷酸还原酶结构示意图见图 33-10。通常核糖核苷酸是在核苷二磷酸水平上被还原的。ATP、dATP、dTTP 和 dGTP 是还原酶的变构效应物。

目前已发现的核糖核苷酸还原酶可分为四种类型,它们的区别是在于产生自由基的基团不同。上述酶属于类型 I,其代表为大肠杆菌的酶,在酪氨酸自由基被淬灭后要求氧进行再生,因此必须在有氧环境下才具有功能。类型 II 的酶发现于其他微生物,它含有 5'-脱氧腺苷钴胺素,而不是双核铁中心。类型 III 核糖核苷酸还原酶适应于厌氧环境下反应,大肠杆菌除类型 I 的酶外,还含有类型 III 的酶。该酶含铁硫簇,其结构有别于类型 I 的双核铁中心,并且活化要求 NADPH 和 S-腺苷甲硫氨酸。它以核苷三磷酸作为底物,而不是通常的核苷二磷酸。类型 IV 核糖核苷酸还原酶含有双核锰中心(binuclear manganese center),它存在于某些微生物中。生物在进化过程中产生不同种类核糖核苷酸还原酶,使得不同环境下均能合成 DNA 的前体,反映了该反应在核苷酸代谢中的重要性。

核糖核苷酸还原成脱氧核糖核苷酸需要提供两个氢原子,氢的最终给体是 NADPH,其间由氢携带蛋白(hydrogen carrying protein)转移给还原酶,再传递到四种底物核苷酸上。硫氧还蛋白(thioredoxin)是一种广泛参与氧化还原反应的小分子蛋白质,它含有一对硫氢基,给出两个氢后即成为氧化型,或二硫化物型,在硫氧还蛋白还原酶催化下被 NADPH 所还原。硫氧还蛋白还原酶是一种含 FAD 的黄素酶。另一种氢携带蛋白谷氧还蛋白(glutaredoxin),也能起同样传递氢的作用。谷氧还蛋白还原酶结合两分子的谷胱甘肽(GSH,氧化型为 GSSG),可从 NADPH 获得氢。它们传递的关系如图 33-11 所示。

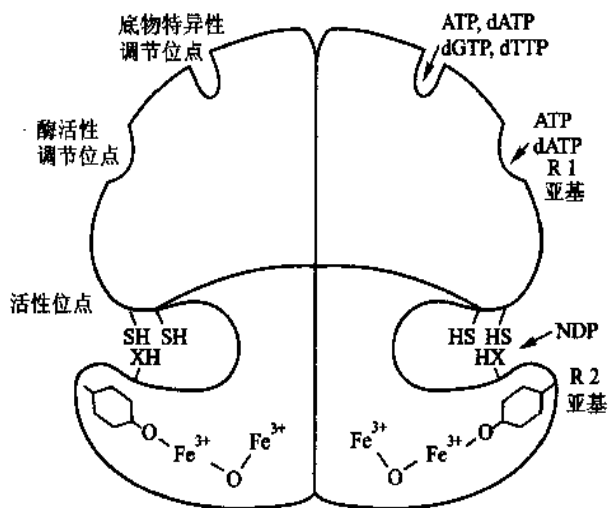


图 33-10 核糖核苷酸还原酶

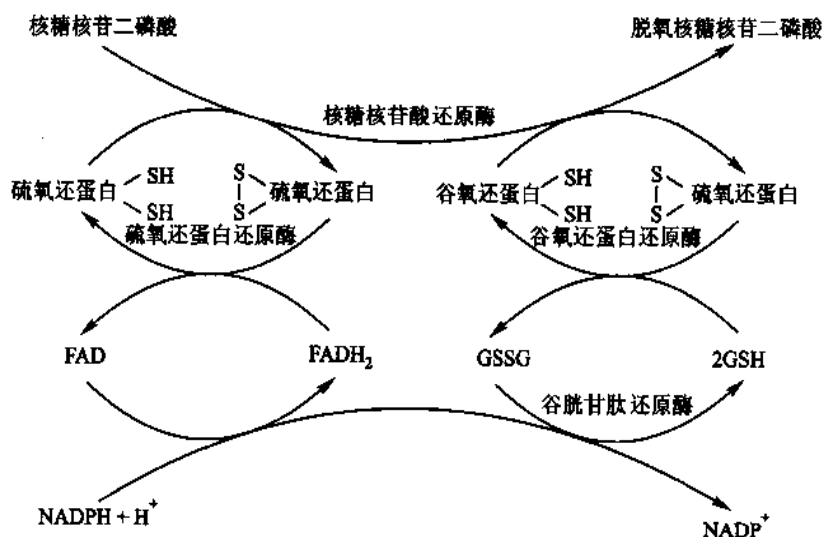
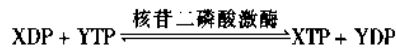


图 33-11 核糖核苷酸还原为脱氧核糖核苷酸的氢传递过程

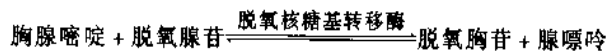
四种核苷(或脱氧核苷)一磷酸可以分别在特异的核苷一磷酸激酶(nucleoside monophosphate kinase)作用下,由 ATP 供给磷酸基,而转变成核苷(或脱氧核苷)二磷酸。从动物和细菌中已分别提取出 AMP 激酶、GMP 激酶、UMP 激酶、CMP 激酶和 dTMP 激酶可以催化这类反应。例如,AMP 激酶(肌激酶)可以使 AMP 转变成 ADP 反应如下:



核苷二磷酸与核苷三磷酸可在核苷二磷酸激酶(nucleoside diphosphokinase)作用下相互转变。核苷二磷酸激酶的特异性很低,如以 X 和 Y 代表几种核糖核苷和脱氧核糖核苷,它可催化下列反应:

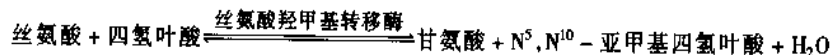
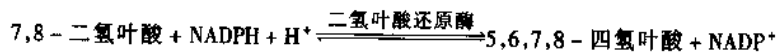
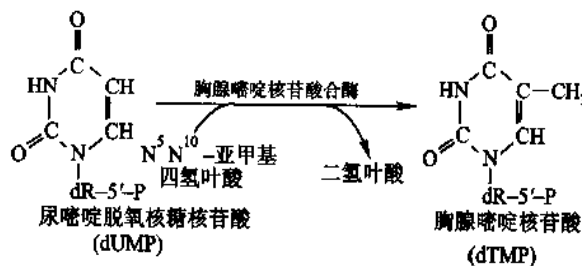


脱氧核糖核苷酸也能利用已有的碱基和核苷进行合成。但体内不存在相应于磷酸核糖转移酶的脱氧核糖化合物;四种脱氧核糖核苷可以分别在特异的脱氧核糖核苷激酶和 ATD 作用下,被磷酸化而形成相应的脱氧核糖核苷酸。脱氧核糖核苷则由碱基和脱氧核糖-1-磷酸,在嘌呤或嘧啶核苷磷酸化酶的催化下形成。微生物体内存在的核苷脱氧核糖基转移酶(nucleosides deoxyribosyl transferase),还可以使碱基与脱氧核糖核苷之间互相转变。例如,胸腺嘧啶与脱氧腺苷可转变成脱氧胸苷与腺嘌呤,反应式如下:



2. 胸腺嘧啶核苷酸的合成

胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)是脱氧核糖核酸的组成部分,它是由尿嘧啶脱氧核糖核苷酸(dUMP)经甲基化而生成。催化尿嘧啶脱氧核糖核苷酸甲基化的酶称为胸腺嘧啶核苷酸合酶(thymidylate synthase)。甲基的供体是 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲基四氢叶酸($\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -methylene tetrahydrofolate)。 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲基四氢叶酸给出甲基后即变成二氢叶酸。二氢叶酸再经二氢叶酸还原酶催化,由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸供给氢,而被还原成四氢叶酸。如果有亚甲基的供体,例如丝氨酸存在时,四氢叶酸可获得亚甲基而转变成 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲基四氢叶酸。其反应过程如下:

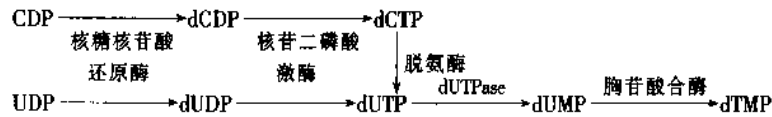


叶酸的衍生物四氢叶酸是一碳单位的载体,它在嘌呤和嘧啶核苷酸的生物合成中起着重要的作用。某些叶酸的结构类似物,如氨基蝶呤(aminopterin)、氮甲蝶呤(methotrexate)等,能与二氢叶酸还原酶发生不可逆结合,结果阻止了四氢叶酸的生成,从而抑制了它参与的各种一碳单位转移反应。氮甲蝶呤等的主要作用点是胸腺嘧啶核苷酸合成中的一碳单位转移反应。它们的结构式如下:



氨甲蝶呤是一类重要的抗肿瘤药物,它对急性白血病、绒毛膜上皮癌等有一定疗效。这类药物能够抑制肿瘤细胞核酸的合成,但对正常细胞亦有影响,故毒性较大,限制了在临床上的运用。但作为二氢叶酸还原酶特异抑制剂,在实验室可用于配制选择培养基,筛选抗性基因或鉴定胸腺嘧啶核苷激酶基因,十分有用。

至于合成胸腺嘧啶核苷酸时所需要的底物尿嘧啶脱氧核苷酸,可以由尿嘧啶核苷二磷酸还原成尿嘧啶脱氧核苷二磷酸,经磷酸化成为尿嘧啶脱氧核苷三磷酸,再经尿嘧啶脱氧核苷三磷酸酶转变成尿嘧啶脱氧核苷一磷酸。另一条途径是由胞嘧啶脱氧核苷三磷酸脱氨,经尿嘧啶脱氧核苷三磷酸再转变成尿嘧啶脱氧核苷酸。这在不同生物体内可能不一样。胸苷酸(thymidylate)的合成途径如下:



为防止尿苷酸掺入 DNA,细胞内尿嘧啶脱氧核苷三磷酸一生成即被酶转变成尿嘧啶脱氧核苷一磷酸,保持尿嘧啶脱氧核苷三磷酸在一个很低的水平。

根据以上所述,可将核苷酸的合成总结如图 33-12 所示。

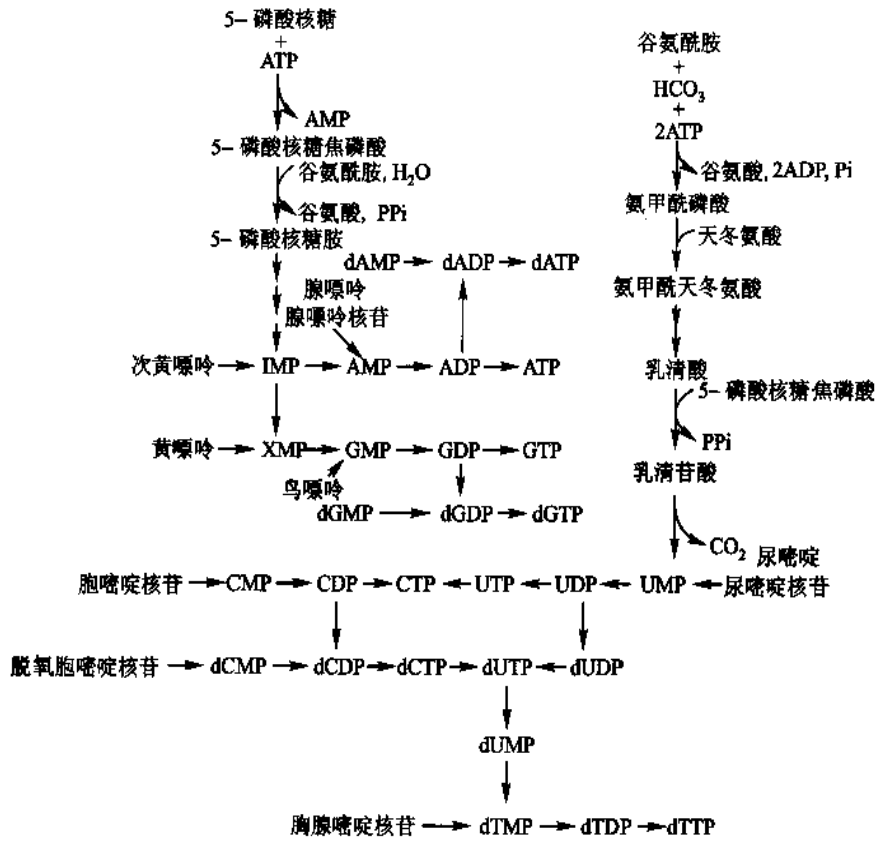


图 33-12 核苷酸的生物合成

三、辅酶核苷酸的生物合成

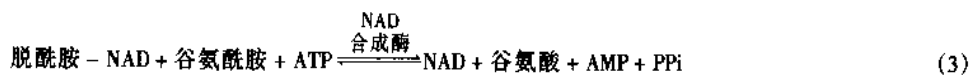
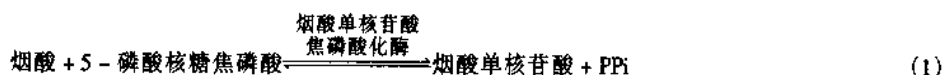
生物体内尚有多种核苷酸衍生物作为辅酶而起作用。其中重要的有:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸、黄素单核苷酸、黄素腺嘌呤二核苷酸及辅酶 A。这几种辅酶核苷酸可在体内自由存在。现将其生物合成途径分别叙述如下:

(一) 烟酰胺核苷酸的合成

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(即辅酶 I、NAD 或 DPN)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II, NADP 或

TPN)是含有烟酰胺的两种腺嘌呤核苷酸的衍生物。它们为脱氢酶的辅酶,在生物氧化还原系统中起着氢传递体的作用。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸由一分子烟酰胺核苷酸(NMN)和一分子腺嘌呤核苷酸连接而成。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸则在腺苷酸核糖的 2' - 羟基上多一个磷酸基。烟酰胺核苷酸的结构和作用见维生素和辅酶一章。

由烟酸合成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸需要经过三步反应。烟酸先与 5 - 磷酸核糖焦磷酸反应产生烟酸单核苷酸;催化该反应的酶称为烟酸单核苷酸焦磷酸化酶(nicotinate mononucleotide pyrophosphorylase)。在 5 - 磷酸核糖焦磷酸中,焦磷酸部分为 α - 构型,而在 NAD 中,核糖与烟酰胺之间的连接为 β - 构型,因此认为可能在这一步发生构型的变化。第二步为烟酸单核苷酸与三磷酸腺苷在脱酰胺 - NAD 焦磷酸化酶(deamido - NAD pyrophosphorylase)催化下进行缩合。最后,烟酸腺嘌呤二核苷酸(脱酰胺 - NAD)酰胺化形成烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。催化该反应的酶称为 NAD 合成酶(NAD synthetase),并且需要谷氨酰胺作为酰胺氮的供体。



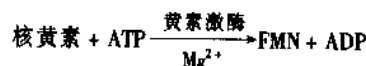
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸是由 NAD 经磷酸化转变而成。NAD 激酶(NAD - kinase)催化 NAD 与 ATP 反应生成 NADP。



(二) 黄素核苷酸的合成

黄素核苷酸是核黄素的衍生物,通常又称为异咯嗪核苷酸,共有两种:黄素单核苷酸(异咯嗪单核苷酸,FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(异咯嗪腺嘌呤二核苷酸,FAD)。它们在许多氧化还原酶的辅基;以其异咯嗪部分的氧化还原而参与传递氢和电子的作用。FMN 由 6,7 - 二甲基异咯嗪核醇和磷酸所组成。FAD 由一分子 FMN 和一分子腺苷酸联结而成。其结构式和作用参看维生素和辅酶一章。

动物、植物和微生物均能利用核黄素以合成黄素核苷酸。核黄素的来源见维生素和辅酶一章。核黄素在黄素激酶(flavokinase)的催化下成 ATP 反应生成 5'磷酸核黄素,即异咯嗪单核苷酸。



FMN 又在 FAD 焦磷酸化酶(FAD pyrophosphorylase)的作用下与 ATP 反应而生成 FAD。反应是可逆的。在此反应中所释放的焦磷酸完全来自 ARP。

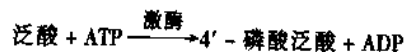


(三) 辅酶 A 的合成

辅酶 A 分子中含有腺苷酸、泛酸、巯基乙胺和磷酸,它们连接的方式是 3 - 磷酸 - ADP - 泛酰 - 巯基乙胺。辅酶 A 是酰基转移酶的辅酶。关于辅酶 A 的结构和作用以及泛酸的来源等见维生素和辅酶一章。

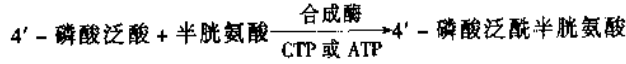
从泛酸开始合成辅酶 A,其主要合成途径如下:

第一步,在泛酸激酶(pantothenate kinase)催化下泛酸与 ATP 反应形成 4' - 磷酸泛酸(4' - phosphopantothenate)。该激酶已从动物、细菌和酵母中分别提取得到。

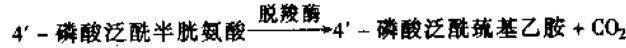


下一步反应为:4' - 磷酸泛酸与半胱氨酸缩合产生 4' - 磷酸泛酰半胱氨酸(4' - phosphopan - tothenylcysteine)。催化此反应的酶称为磷酸泛酰半胱氨酸合成酶(phosphopantothenylcysteine synthetase)。从细菌中提取得到的合成酶必需以 CTP 供给能量,但从动物系统中提得的合成酶可用其他三磷酸核苷来代

替 CTP。



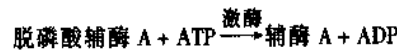
所生成的 4'-磷酸泛酰半胱氨酸在磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶 (phosphopantothencysteine decarboxylase) 的催化下脱去羧基, 转变成 4'-磷酸泛酰巯基乙胺 (phosphopantetheine)。



4'-磷酸泛酰巯基乙胺可与 ATP 缩合形成脱磷酸辅酶 A (dephospho-CoA), 并释放出无机焦磷酸。这是辅酶 A 生物合成过程中唯一的可逆反应; 催化该反应的酶为脱磷酸辅酶 A 焦磷酸化酶 (dephospho-CoA pyrophosphorylase)。



最后, 脱磷酸辅酶 A 在脱磷酸辅酶 A 激酶 (dephospho-CoA kinase) 催化下, 被磷酸化而形成辅酶 A, 磷酸基的供体必须是 ATP, 并且在有半胱氨酸时酶活性最大。



辅酶 A 的生物合成过程总结为图 33-13。

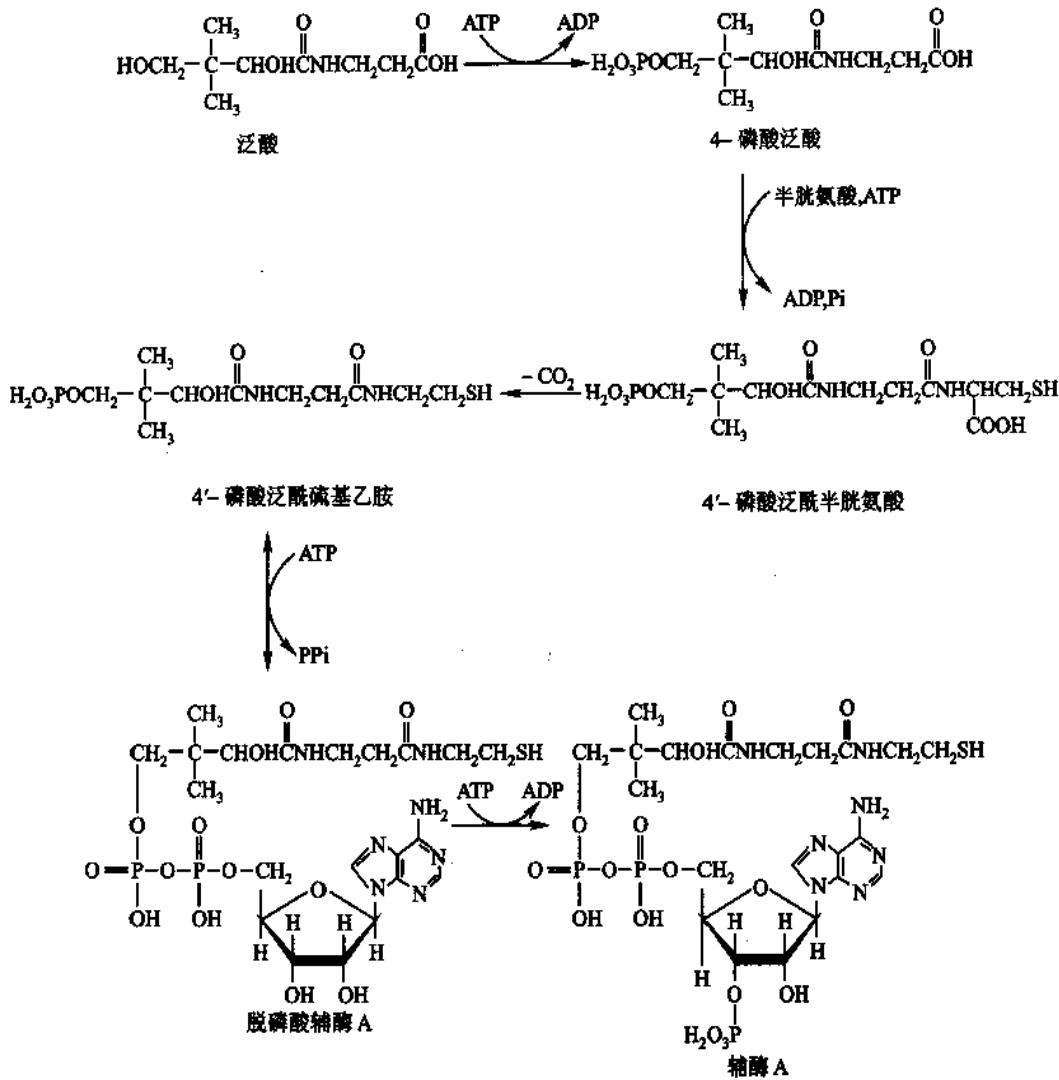


图 33-13 辅酶 A 的生物合成

提 要

核酸在核酸酶的作用下水解产生寡聚核苷酸和单核苷酸。水解核酸链内磷酸二酯键的酶称为核酸内切酶,包括作用于 RNA 的核糖核酸酶和作用于 DNA 的脱氧核糖核酸酶。某些核酸内切酶具有较高的特异性。在细菌中存在一类能识别和水解外源 DNA 的核酸内切酶,称为限制性内切酶。从多核苷酸链的 5' 端或 3' 端逐个水解下单核苷酸的酶称为核酸外切酶。有的磷酸二酯酶特异性较低,既能作用于核糖核酸链,又能作用于脱氧核糖核酸链。

核苷酸在核苷酸酶作用下水解成核苷和磷酸。核苷又可被核苷酶分解成嘌呤碱和嘧啶碱以及糖。嘌呤碱和嘧啶碱还可进一步分解。腺嘌呤和鸟嘌呤经脱氨和氧化后生成尿酸。尿酸再分解成一系列产物(尿囊素、尿囊酸、尿素和乙醛酸等)。各类生物对尿酸的代谢能力不同。胞嘧啶脱氨后生成尿嘧啶。胸腺嘧啶和尿嘧啶可被还原后再分解。

核苷酸是一类在代谢上极为重要的物质。无论动物、植物或微生物,通常都能由一些简单的前体物质合成嘌呤和嘧啶核苷酸。嘌呤核苷酸的合成不是先形成嘌呤环,再与核糖和磷酸结合成核苷酸,而是从 5-磷酸核糖焦磷酸开始,经过一系列酶促反应,生成次黄嘌呤核苷酸,然后再转变成腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸。嘧啶核苷酸则相反,须先形成嘧啶环,再与磷酸核糖结合成为乳清苷酸,然后生成尿嘧啶核苷酸。其他嘧啶核苷酸是由尿嘧啶核苷酸转变而来的。尿嘧啶核苷三磷酸经氨基化后即成为胞嘧啶核苷三磷酸。

四种核苷(或脱氧核苷)一磷酸可以分别在特异的核苷一磷酸激酶作用下,由 ATP 供给磷酸基,而转变成相应的核苷(或脱氧核苷)二磷酸。核苷二磷酸和核苷三磷酸可在核苷二磷酸激酶的作用下互相转变。核苷二磷酸激酶的特异性很低,与核酸有关的所有核苷(包括脱氧核苷)二磷酸和三磷酸均可在该酶作用下作为磷酸基的受体和供体。

腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶核苷二磷酸在核糖核苷酸还原酶系的作用下,可被还原成相应的脱氧核糖核苷二磷酸。该酶系包括硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶以及核糖核苷酸还原酶。谷氧还蛋白、谷氧还蛋白还原酶、谷胱甘肽还原酶可取代硫氧还蛋白和硫氧还蛋白还原酶。胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的生成需经过两个步骤,首先由尿嘧啶核糖核苷酸还原形成尿嘧啶脱氧核糖核苷酸,然后尿嘧啶再经甲基化转变成胸腺嘧啶。

外源的或降解产生的碱基和核苷,可被生物体重新利用。嘌呤碱的再利用主要是通过磷酸核糖转移酶的反应,直接由碱基和 5-磷酸核糖焦磷酸生成核苷酸。嘧啶碱除上述与 5-磷酸核糖焦磷酸反应外,尚能与 1-磷酸核糖反应生成核苷,然后在核苷激酶作用下被磷酸化而生成核苷酸。胸腺嘧啶核苷和脱氧胞嘧啶核苷亦可在相应核苷激酶作用下生成脱氧核糖核苷酸。

某些重要的辅酶,如烟酰胺核苷酸、黄素核苷酸和辅酶 A 等,它们的分子结构中包含有腺苷酸部分。这几种辅酶的合成亦与核苷酸代谢有关。

习 题

1. 解聚核酸的酶有几类? 举例说明它们的作用方式和特异性。
2. 比较不同生物对嘌呤分解代谢产物的差别。
3. 生物体内嘌呤环和嘧啶环是如何合成的? 有哪些氨基酸直接参与核苷酸的合成?
4. 简要说明嘌呤和嘧啶核苷酸生物合成的反馈控制机制。
5. 说明下列抗代谢物抑制核苷酸生物合成的原理和主要作用点。

重氮丝氨酸 6-重氮-5-氧-正亮氨酸 羽田杀菌素 氨基蝶呤 氨基嘌呤

6. 分析 6-巯基嘌呤(次黄嘌呤的类似物)和 5-溴尿嘧啶(胸腺嘧啶的类似物)进入体内后可能的转变途径和作用机制。
7. 简要说明糖、脂肪、氨基酸和核苷酸代谢之间的相互联系。

主要参考书目

1. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Stryer L. Biochemistry. 5th ed. New York: W H Freeman and Company, Inc, 1999
3. Michal G. Biochemical Pathways. Boehringer Mannheim GmbH - W - Germany, 1982

(朱圣庚)

第 34 章 DNA 的复制和修复

现代生物学已充分证明, DNA 是生物遗传的主要物质基础。生物机体的遗传信息以密码的形式编码在 DNA 分子上, 表现为特定的核苷酸排列顺序, 并通过 DNA 的复制(replication)由亲代传递给子代。在后代的生长发育过程中, 遗传信息自 DNA 转录(transcription)给 RNA, 然后翻译(translation)成特异的蛋白质, 以执行各种生命功能, 使后代表现出与亲代相似的遗传性状。所谓“复制”, 就是指以原来 DNA 分子为模板合成出相同分子的过程。所谓“转录”就是在 DNA 分子上合成出与其核苷酸顺序相对应的 RNA 的过程。“翻译”则是在 RNA 的控制下, 根据核酸链上每三个核苷酸决定一个氨基酸的三联体密码(triplet code)规则, 合成出具有特定氨基酸顺序的蛋白质肽链过程。在某些情况下 RNA 也可以是遗传信息的基本携带者, 例如, RNA 病毒能以自身核酸分子为模板(template)进行复制, 致癌 RNA 病毒还能通过逆转录(reverse transcription)的方式将遗传信息传递给 DNA。

一、DNA 的复制

原核生物每个细胞只含有一个染色体, 真核生物每个细胞常含有多个染色体。在细胞增殖周期的一定阶段整个染色体组都将发生精确的复制, 随后以染色体为单位把复制的基因组分配到两个子代细胞中去。染色体 DNA 的复制与细胞分裂之间存在密切的相互联系。一旦复制完成, 就可发动细胞分裂; 细胞分裂结束后, 又可开始新一轮 DNA 复制。

染色体外的遗传因子, 包括细菌的质粒、真核生物的细胞器以及细胞内共生或寄生生物的 DNA, 它们的复制或是受染色体复制的控制, 而与染色体复制同步; 或是不受染色体复制的控制, 在细胞增殖周期后随时都可进行。属于严紧控制(stringent control)的质粒, 每个细胞只有一个或少数几个拷贝, 因此称为单拷贝质粒; 属于松弛控制(relaxed control)的质粒, 每个细胞含有许多拷贝(通常在 20 个以上), 又称为多拷贝质粒。

线粒体和叶绿体的 DNA 可用以编码自身的 rRNA、tRNA 以及一小部分蛋白质, 另外的蛋白质则由核基因编码, 并在胞液中合成后再运进细胞器中。随着这些细胞器组成成分的倍增, 它们可发生分裂。根据电镜观察推测, 线粒体和叶绿体是通过内膜凹陷进行分裂的, 其过程与细菌的分裂类似。细胞器 DNA 的复制并不限于核 DNA 的合成期(S 期), 而可在整个细胞周期中进行。对于某个 DNA 分子来说, 进入或不进入复制是随机的, 因而有些 DNA 分子在细胞周期中复制不止一次, 有些则不发生复制, 然而就整体来说, 每一细胞周期中细胞器 DNA 的总量将增加一倍, 从而保持了每个细胞的细胞器 DNA 数量恒定。

病毒是具有感染能力的基因, 它们在侵入细胞后即能进行复制。如果病毒的 DNA 整合进入宿主的染色体中, 这部分 DNA 就作为宿主染色体的一部分而被复制。

由于 DNA 是遗传信息的载体, 在合成 DNA 时, 决定其结构特异性的遗传信息只能来自其本身, 因此必须由原来存在的分子为模板来合成新的分子, 即进行自我复制(self-replication)。DNA 的双链结构对于维持这类遗传物质的稳定性和复制的准确性都是极为重要的。细胞内存在极为复杂的系统, 以确保 DNA 复制的正确进行, 并纠正可能出现的误差。本节将着重介绍 DNA 的半保留复制(semiconservative replication)、复制的单位、复制的酶系、复制的半不连续性(semidiscontinuity)、复制的拓扑学(topology)、复制过程和调控机理等。

(一) DNA 的半保留复制

DNA 由两条螺旋的多核苷酸链组成, 两条链的碱基通过腺嘌呤(A) - 胸腺嘧啶(T), 以及鸟嘌呤(G) - 胞嘧啶(C)之间的氢键连接在一起, 所以这两条链是互补的。一条链上的核苷酸排列顺序决定了另一条

链上的核苷酸排列顺序。由此可见, DNA 分子的每一条链都含有合成它的互补链所必需的全部遗传信息。Watson 和 Crick 在提出 DNA 双螺旋结构模型时即推测, 在复制过程中首先碱基间氢键需断裂并使双链解旋和分开, 然后每条链可作为模板在其上合成新的互补链, 结果由一条链可以形成互补的两条链(图 34-1)。这样新形成的两个 DNA 分子与原来 DNA 分子的碱基顺序完全一样。在此过程中, 每个子代分子的一条链来自亲代 DNA, 另一条链则是新合成的, 这种方式称为半保留复制。

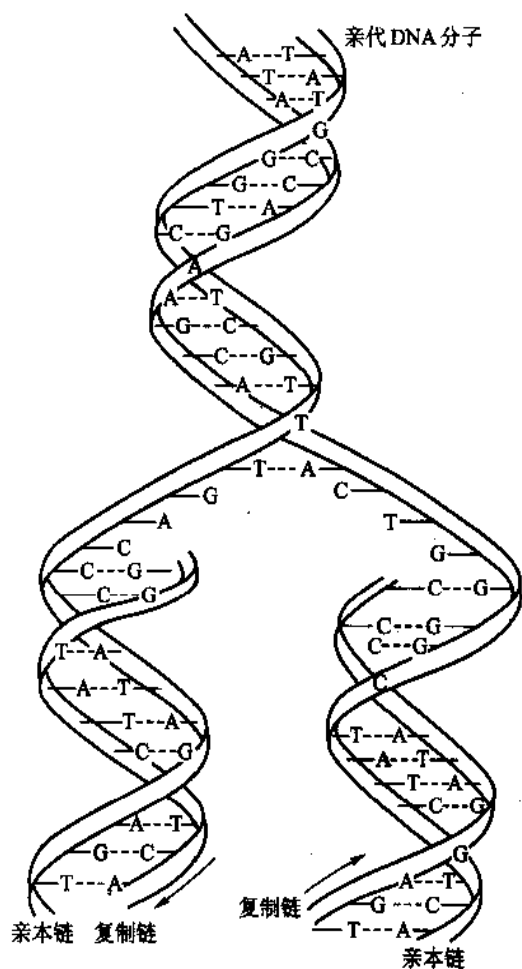


图 34-1 Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋复制模型

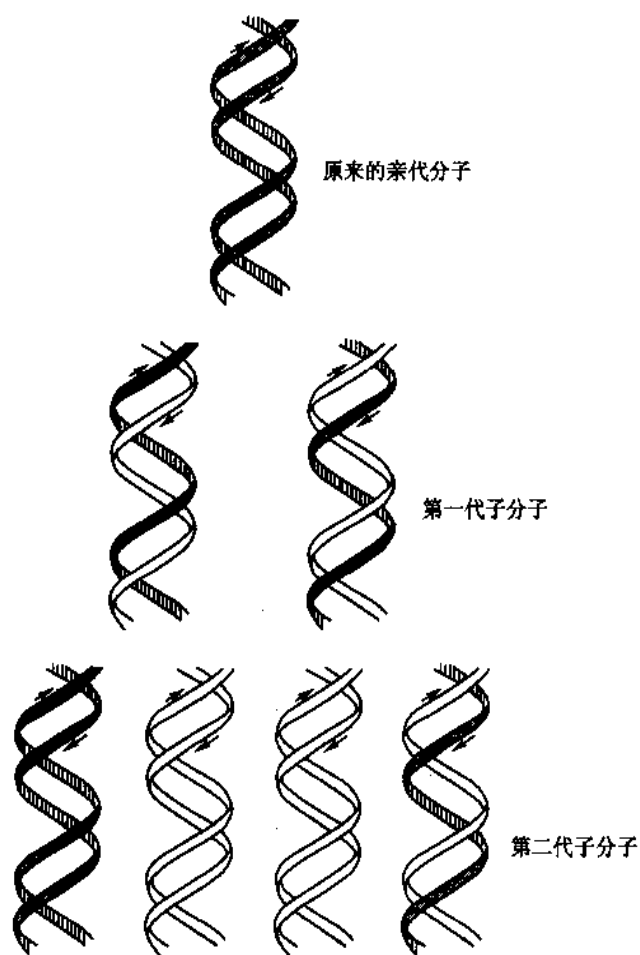


图 34-2 DNA 的半保留复制

第一代子分子含有一条亲代的链(用黑色表示), 与另一条新合成的链(用白色表示)配对。在以后的连续复制过程中, 原来亲代的两条链仍然保持完整, 因此总有两个分子各具有一条原来亲代的链

1958 年 Meselson 和 Stahl 利用氮的同位素¹⁵N 标记大肠杆菌 DNA, 首先证明了 DNA 的半保留复制。他们让大肠杆菌在以¹⁵NH₄Cl 为唯一氮源的培养基中生长, 经过连续培养 12 代, 从而使所有 DNA 分子标记上¹⁵N。¹⁵N - DNA 的密度比普通¹⁴N - DNA 的密度大, 在氯化铯密度梯度离心 (CsCl density gradient centrifugation) 时, 这两种 DNA 形成位置不同的区带 (zone)。如果将¹⁵N 标记的大肠杆菌转移到普通培养基 (含¹⁴N 的氮源) 中培养, 经过一代之后, 所有 DNA 的密度都介于¹⁵N - DNA 和¹⁴N - DNA 之间, 即形成了 DNA 分子的一半含¹⁵N, 另一半含¹⁴N 的杂合分子。两代后, ¹⁴N 分子和¹⁴N - ¹⁵N 杂合分子等量出现。若再继续培养, 可以看到¹⁴N - DNA 分子增多。当把¹⁴N - ¹⁵N 杂合分子加热时, 它们分开成¹⁴N 链和¹⁵N 链。这就充分证明了, 在 DNA 复制时原来的 DNA 分子可被分成两个亚单位, 分别构成子代分子的一半, 这些亚单位经过许多代复制仍然保持着完整性(图 34-2)。

在这以后, 用许多种原核生物和真核生物复制中的 DNA 做了类似的实验, 都证实了 DNA 复制的半保留方式。然而, 这类实验所研究的复制中的 DNA 在提取过程中已被断裂成许多片段, 得到的信息只涉及 DNA 复制前和复制后的状态。1963 年 Cairns 用放射自显影 (autoradiograph) 的方法第一次观察到完整的正

在复制的大肠杆菌染色体 DNA。他将³H 脱氧胸苷标记大肠杆菌 DNA,然后用溶菌酶把细胞壁消化掉,使完整的染色体 DNA 释放出来,铺在一张透析膜上,在暗处用感光乳胶覆盖于干燥了的表面上,放置若干星期。在这期间³H 由于放射性衰变而放出 β 粒子,使乳胶曝光生成银粒。显影以后银粒黑点轨迹勾画出 DNA 分子的形状,黑点数目代表了³H 在 DAN 分子中的密度。把显影后的片子放在光学显影镜下就可以观察到大肠杆菌染色体的全貌。有这种方法,Cairns 阐明了大肠杆菌染色体 DNA 是一个环状分子,并以半保留的方式进行复制(图 34-3)。

半保留的复制,即子代 DNA 分子中仅保留一条亲代链,另一条链则是新合成的,这是双链 DNA 普遍的复制机制。即使是单链 DNA 分子,在其复制过程中通常也总是要先形成双链的复制型式(RF)。半保留复制要求亲代 DNA 的两条链解开,各自作为模板,通过碱基配对的法则,合成出另一条互补链。所谓模板即是能提供合成一条互补链所需精确信息的核酸链。在这里,碱基配对是核酸分子间传递信息的结构基础。无论是复制、转录或逆转录,在形成双链螺旋分子时都是通过碱基配对来完成的。需要指出的是,碱基、核苷或核苷酸单体之间并不形成碱基对,但是在形成双链螺旋时由于空间结构的关系而构成特殊的碱基对。

DNA 的半保留复制机制可以说明 DNA 在代谢上的稳定性。经过许多代的复制,DNA 的多核苷酸链仍可保持完整,并存在于后代而不被分解掉。DNA 与细胞其他成分相比要稳定得多,这和它的遗传功能是相符合的。但是这种稳定性是相对的,DNA 在代谢上并不是完全惰性的物质。在细胞内外各种物理、化学和生物因子的作用下,DNA 会发生损伤,需要修复;在复制和转录过程中 DNA 也会有损耗,而必须进行更新。在发育和分化过程中,DNA 的特定序列还可能进行修饰、删除、扩增和重排。已有实验表明,老年动物 DNA 双链的不配对碱基数远较幼年和胚胎期多。从进化的角度上看,DNA 更是处在不断的变异和发展之中。

(二) DNA 复制的起点和方式

基因组能独立进行复制的单位称为复制子(replicon)。每个复制子都含有控制复制起始的起点(origin),可能还有终止复制的终点(terminus)。复制是在起始阶段进行控制的,一旦复制开始,它即继续下去,直到整个复制子完成复制。

原核生物的染色体和质粒,真核生物的细胞器 DNA 都是环状双链分子。实验表明,它们都在一个固定的起点开始复制,复制方向大多是双向的(bidirectional),即形成两个复制叉(replication fork)或生长点(growing point),分别向两侧进行复制;也有一些是单向的(unidirectional),只形成一个复制叉或生长点(图 34-4)。通常复制是对称的,两条链同时进行复制;有些则是不对称的,一条链复制后再进行另一条链的复制。DNA 在复制叉处两条链解开,各自合成其互补链,在电子显微镜下可以看到形如眼的结构,环状 DNA 的复制眼形成希腊字母 θ 形结构(图 34-5)。真核生物染色体 DNA 是线性双链分子,含有许多复制起点,因此是多复制子(multireplicon)。

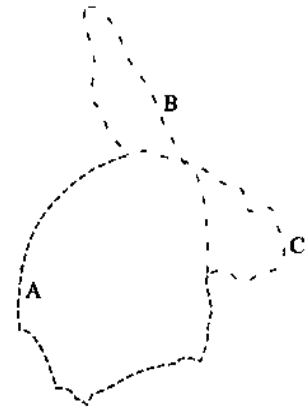


图 34-3 复制中的大肠杆菌染色体放射自显影图

³H-胸苷掺入大肠杆菌 DNA,经过将近两代时间。非复制部分(C)银粒子密度较低,由一股放射性链和一股非放射性链构成。已复制的部分约占整个染色体的三分之二,其中一条双链(B)仅一股链是标记的;另一条双链(A)的两股链都是标记的,银粒子密度为二者的两倍。染色体全长约为 1100 μm

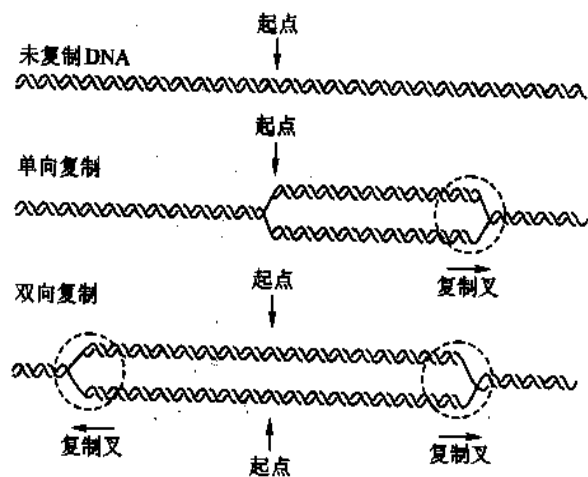


图 34-4 DNA 的双向或单向复制

病毒 DNA 有多种多样,或是环状分子,或是线性分子,或是双链,或是单链。每一个病毒基因组 DNA 分子是一个复制子,它们的复制方式也是多种多样的:双向的,或是单向的;对称的,或是不对称的。有些病毒线性 DNA 分子在侵入细胞后可转变成环状分子,而另一些线性 DNA 分子的复制起点在末端。

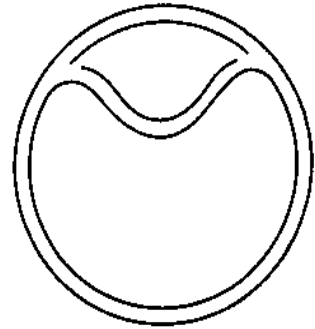


图 34-5 环状 DNA 的复制眼形成 θ 结构

用遗传学和生物化学的方法可以确定大肠杆菌染色体 DNA 的复制起点 *ori C* 在基因图谱上的位置。在一个生长的群体中几乎所有的染色体都在复制过程中,因此离复制起点越近的基因出现频率越高,越远的基因出现频率越低。将大肠杆菌提取出来的 DNA 切成大约 1% 染色体长度的片段,通过分子杂交的方法测定各基因片段的频率,结果表明 *ori C* 位于基因图谱的 *ilv* 位点处(83 分附近)。一旦复制开始以后,复制叉向两侧以相等速度向前移动,两个复制叉在起点 180° 的 *trp* 位点处(33 分附近)相会合(图 34-6)。

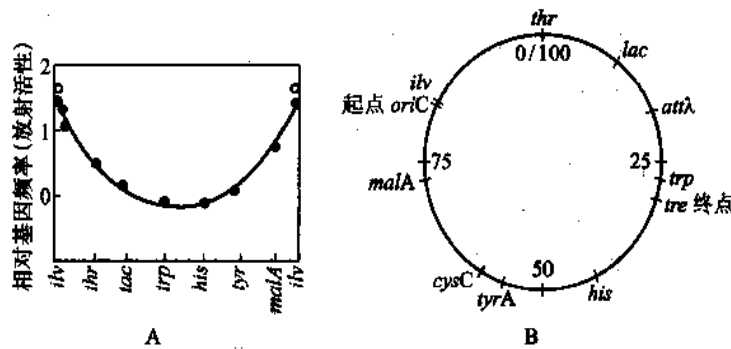


图 34-6 大肠杆菌复制起点和终点在基因图谱上的位置

A. DNA 复制起点的测定; B. 复制起点和终止的位置

通过放射自显影的实验可以判断 DNA 的复制是双向进行的,还是单向进行的。在复制开始时,先用低放射性的 ^3H -脱氧胸苷标记大肠杆菌。经数分钟后,再转移到含有高放射性的 ^3H -脱氧胸苷培养基中继续进行标记。这样,在放射自显影图像上,复制起始区的放射性标记密度比较低,感光还原的银颗粒密度就较低;继续合成区标记密度较高,银颗粒密度也就较高。若是单向复制,银颗粒的密度分布应是一端低,一端高。若是双向复制,则应是中间密度低,两端密度高。由大肠杆菌所获得的放射自显影图像都是两端密,中间稀,这就清楚证明了大肠杆菌染色体 DNA 是双向复制的(图 34-7)。

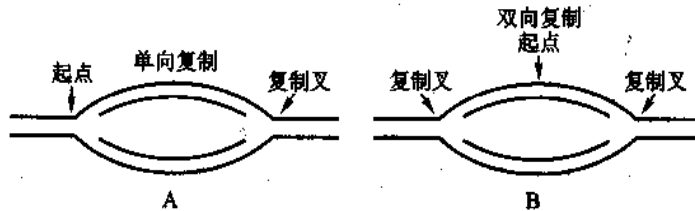


图 34-7 单向和双向复制的放射自显影示意图

A. 单向复制; B. 双向复制

大肠杆菌和其他几种革兰氏阴性细菌以及酵母的 DNA 复制起始区已被克隆并测定了它们的核苷酸顺序。从质粒中分出带有抗药性基因(例如氨苄青霉素的抗性基因 *amp^r*)是不能自主复制的限制性酶切片段,用同一种限制性酶处理大肠杆菌的染色体 DNA 和质粒载体 DNA,经 DNA 连接酶加以连接后转化大肠杆菌,筛选抗氨苄青霉素的转化子(transformant)。这些细胞中含有由复制起点片段以及 *amp^r* 片段构成的重组质粒,它的复制起点便是大肠杆菌的复制起点(*ori C*)。克隆的复制起始区可用于研究复制的控制

及复制染色体在细胞分裂时的分离机制。实验表明,起点自身并不携带使复制染色体在细胞分裂时进行分配所必需的信息,这部分功能涉及另外的序列。

含有 *ori C* 区 1 000 kb 的重组质粒在大肠杆菌中的复制行为与细菌染色体一样,受到严紧控制,每个细胞只有 1~2 个拷贝。用核酸外切酶缩短 *ori C* 克隆片段的大小,最后得 245 bp 的基本功能区,携带它的质粒依然能自主复制,但拷贝数可增加到 20 以上,这说明决定拷贝数和发动复制的作用是由不同序列控制的。

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的起点位于一段 296 bp 的 DNA 片段上,与大肠杆菌的起点相比,它们之间的相似程度达 86%。其他的细菌,即使亲缘较远的细菌,其起点在大肠杆菌中亦能进行复制。看来起始区的结构是很保守的。比较已知序列的起始区,发现它们都含有一系列对称排列的反向重复(inverted repeats)和某些短的成簇的保守序列,这些序列的意义还不清楚。

大多数生物染色体 DNA 的复制是双向的,并且是对称的,然而也有例外。枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)染色体 DNA 的复制虽是双向的,但是两个复制叉移动的距离不同。一个复制叉仅在染色体上移动五分之一距离,然后停下来等待另一复制叉完成五分之四距离。质粒 R6K 两个复制叉的移动也是不对称的,第一个复制叉到达五分之一距离即停下来,从反方向开始形成第二个复制叉并完成其余部分的复制。质粒 Col EI 的复制完全是单向的,复制叉只向一个方向移动。

有一种单向复制的特殊方式,称为滚动环(rolling circle)式。噬菌体 ϕ X 174 DNA 是环状单链分子。它在复制过程中首先形成共价闭环的双链分子(复制型),然后其正链由 A 蛋白在特定位置切开,游离出一个 3'-OH 末端,A 蛋白连在 5'-磷酸基末端。随后,在 DNA 聚合酶(DNA polymerase)催化下,以环状负链为模板,从正链的 3'-OH 末端加入脱氧核苷酸,使链不断延长,通过滚动而合成出新的正链。合成一圈后,露出切口序列,A 蛋白再次将其切开,并连在切出的 5'-磷酸基末端,游离出单位长度噬菌体环状单链 DNA 分子。实验证明,某些双链 DNA 的合成也可以通过滚动环的方式进行。例如,噬菌体 λ 复制的后期以及非洲爪蟾(*Xenopus*)卵母细胞中 rRNA 基因的扩增都是以这种方式进行的。

另一种单向复制的特殊方式称为取代环(displacement loop)或 D-环(D-loop)式。线粒体 DNA 的复制采取这种方式(纤毛虫的线粒体 DNA 为线性分子,其复制方式与此不同)。双链环在固定点解开进行复制,但两条链的合成是高度不对称的,一条链先复制,另一条链保持单链而被取代,在电镜下可以看到呈 D-环形状。待一条链复制到一定程度,露出另一链的复制起点,另一条链才开始复制。这表明复制起点是以一条链为模板起始合成 DNA 的一段序列;两条链的起点并不总在同一点上,当两条链的起点分开一定距离时就产生 D-环复制。叶绿体 DNA 的复制也采取 D-环的方式,双链环两条链的起点不在同一位置,但同时在起点处解开双链,进行 D-环复制,故称为 2D-环复制。DNA 的不同复制方式见图 34-8。

利用放射自显影的方法测定,细菌 DNA 的复制叉移动速度大约每分钟 50 000 bp。大肠杆菌染色体完成复制需要 40 min。但是在丰富培养基中,大肠杆菌每 20 min 即可分裂一次。实验分析结果表明,复制叉前进的速度是比较恒定的,复制速度实际取决于起始频率。在丰富培养基中,大肠杆菌染色体一轮复制尚未完成,起点已开始第二轮的复制,因此一个染色体可以不只 2 个生长点(图 34-9)。真核生物染色体 DNA 的复制叉移动速度比原核生物慢得多,这是由于真核生物的染色体具有复杂的高级结构,复制时需要解开核小体(nucleosome),复制后又需重新形成核小体。它们的复制叉移动速度大约为 1 000~3 000 bp/min。高等真核生物一般复制单位长度是 100~200 kb,低等真核生物要小一些,每一复制单位在 30~60 min 内复制完毕。由于各复制子发动复制的时间有先后,就整个细胞而言,通常完成染色体复制的时间要用 6~8 h。

(三) DNA 聚合反应有关的酶

DNA 由脱氧核糖核苷酸聚合而成。与 DNA 聚合反应有关的酶包括多种 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶。

1. DNA 的聚合反应和聚合酶

1956 年 Kornberg 等首先从大肠杆菌提取液中发现 DNA 聚合酶。其后从广泛不同的生物中都找到有这种酶。用提纯的酶制剂作实验,结果表明,在有适量 DNA 和镁离子存在时,该酶能催化四种脱氧核糖核

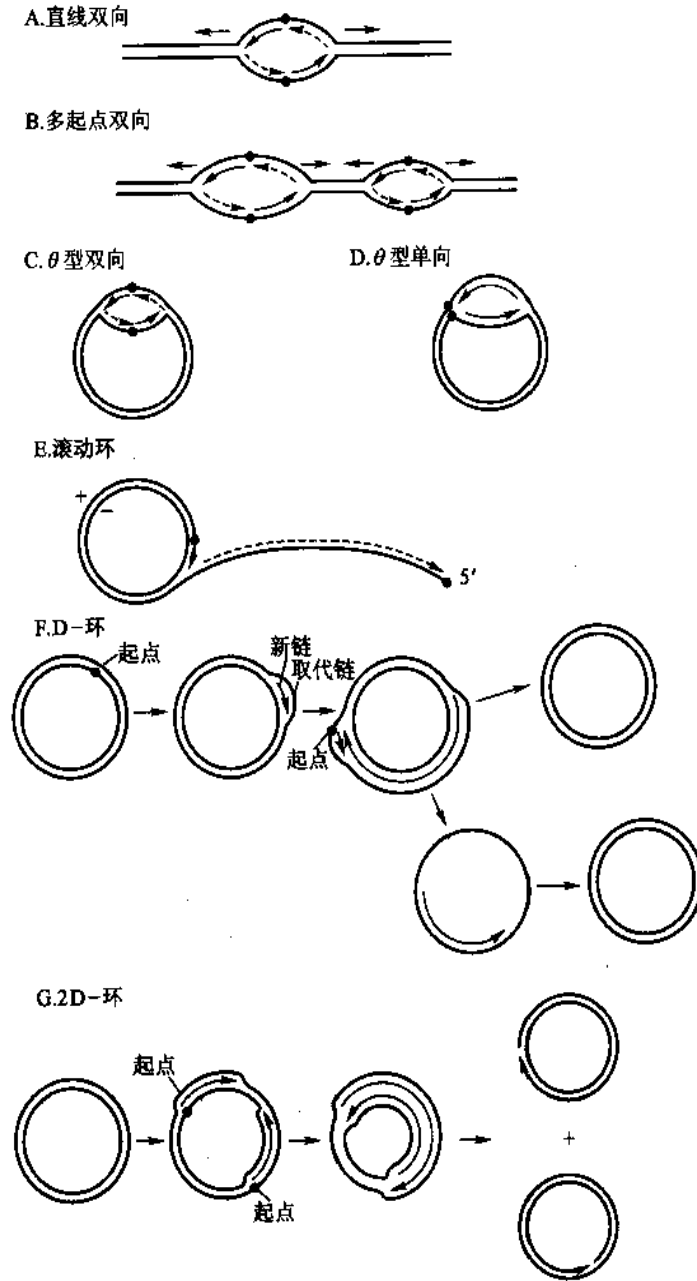
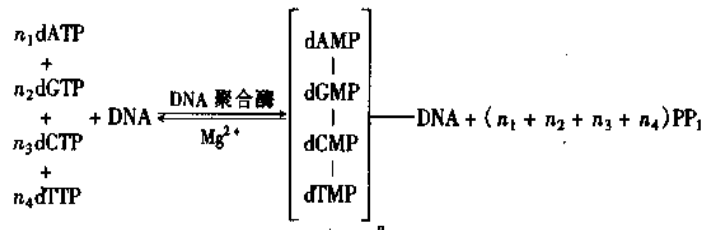


图 34-8 DNA 的不同复制方式

核苷三磷酸合成 DNA, 所合成的 DNA 具有与天然 DNA 同样的化学结构和物理化学性质。dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 四种脱氧核糖核苷三磷酸缺一不可; 它们不能被相应的二磷酸或一磷酸化合物所取代, 也不能被核糖核苷酸所取代。在 DNA 聚合酶催化下, 脱氧核糖核苷酸被加到 DNA 链的末端, 同时释放出无机焦磷酸。DNA 的聚合反应可表示如下:



图 34-9 大肠杆菌的多复制叉染色体



在 DNA 聚合酶催化的链延长反应中,链的游离 3'-羟基对进入的脱氧核糖核苷三磷酸 α 磷原子发生亲核攻击,从而形成 3',5'-磷酸二酯键并脱下焦磷酸(图 34-10)。形成磷酸二酯键所需要的能量来自 α -与 β -磷酸基之间高能键的裂解。聚合反应是可逆的;但随后焦磷酸的水解可推动反应的完成。DNA 链由 5'向 3'方向延长。DNA 聚合酶只能催化脱氧核糖核苷酸加到已有核酸链的游离 3'-羟基上,而不能使脱氧核糖核苷酸自身发生聚合,也就是说,它需要引物链(primer strand)的存在。加入的核苷酸则由模板链所决定。

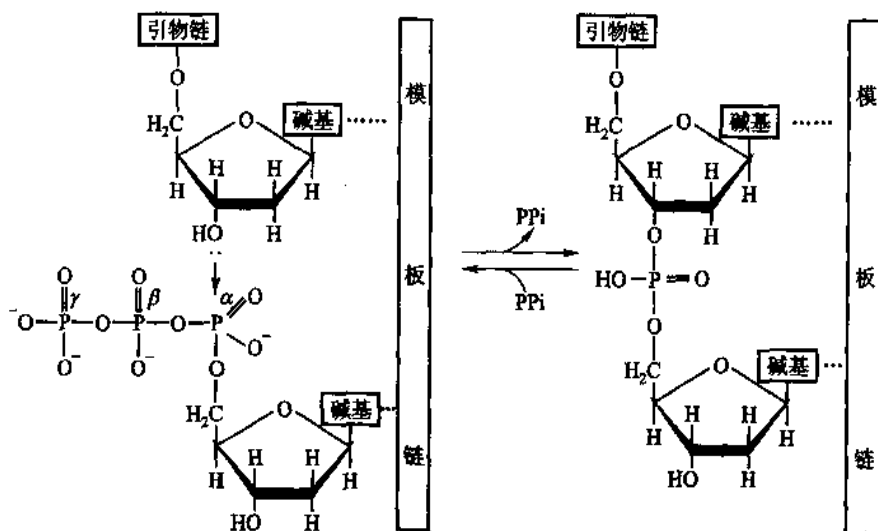


图 34-10 DNA 聚合酶催化的链延长反应

与生物小分子的合成不同,信息大分子(informational macromolecule)的合成除需要底物、能量和酶外,还需要模板(template)。DNA 聚合酶催化的反应是按模板的指令(instruction)进行的。只有当进入的碱基能与模板链的碱基形成 Watson-Crick 类型的碱基对时,才能在该酶催化下形成磷酸二酯键。因此,DNA 聚合酶是一种模板指导的酶。加入各种不同生物来源的 DNA 作模板,可以同样引起和促进新的 DNA 的酶促合成,而且产物 DNA 的性质完全不取决于聚合酶的来源,也与四种核苷酸前体的相对比例无关,而仅仅取决于所加进去的模板 DNA。产物 DNA 与作为模板的双螺旋 DNA 具有相同的碱基组成,这说明在 DNA 聚合酶作用下,模板 DNA 的两条链都能进行复制。由不同模板 DNA 和大肠杆菌 DNA 聚合酶合成的 DNA,其碱基组成比较如表 34-1。

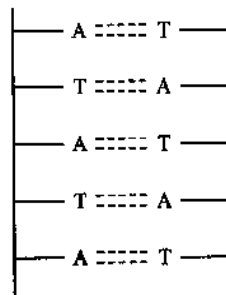
表 34-1 不同模板作用下酶促合成 DNA 的碱基组成

DNA		A	T	G	C	$\frac{A+G}{T+C}$	$\frac{A+T}{G+C}$
草分枝杆菌	模板	0.65	0.66	1.35	1.34	1.01	0.49
	产物	0.66	0.65	1.34	1.37	0.99	0.48
大肠杆菌	模板	1.00	0.97	0.98	1.05	0.98	0.97
	产物	1.04	1.00	0.97	0.98	1.01	1.02
小牛胸腺	模板	1.14	1.05	0.90	0.85	1.05	1.25
	产物	1.12	1.08	0.85	0.85	1.02	1.29
噬菌体 T ₂	模板	1.31	1.32	0.67	0.70	0.98	1.92
	产物	1.33	1.29	0.69	0.70	1.02	1.90
AT 共聚体	产物	1.99	1.93	<0.05	<0.05	1.03	40

A. 腺嘌呤; T. 胸腺嘧啶; G. 鸟嘌呤; C. 胞嘧啶。数字为摩尔比例

上表中最后一行提到的 AT 共聚物是一种人工合成的产物。如果不外加 DNA 而仅有 dATP 和 dTTP,

在经过一个长的潜伏期后,这个系统也能自发地合成新的分子,但仅含有腺嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸,其分子结构和物理化学性质类似于天然的双链 DNA,在其多核苷酸链中腺嘌呤和胸腺嘧啶以交替方式排列。该产物结构可简单表示如下:



当用这种特殊的类似 DNA 的共聚物作模板时,新的 AT 共聚物立即就开始合成,即使有四种脱氧核糖核苷三磷酸存在,鸟嘌呤和胞嘧啶脱氧核糖核苷酸也几乎毫不掺入到共聚物中去。

DNA 的体外酶促合成必须加入少量的 DNA 才能进行。由于 DNA 在提取过程中常受到机械切力或酶的作用,从而引起磷酸二酯键的断裂。在一条链上失去一个磷酸二酯键称为切口(nick),失去一段单链称为缺口(gap)。显露出 3'-羟基的核酸链可作为引物,链延长的信息来自对应的互补链。由此可见,在 DNA 聚合酶反应中,加入的 DNA 同时起两者作用:一条链作为引物,另一条作为模板(图 34-11)。

DNA 聚合酶的反应可以利用双链 DNA 作为模板和引物,也可以利用单链 DNA 作为模板和引物。在单链 DNA 的复制中,3'-羟基末端通过链的自身回折成为引物链,其余未配对的链则为模板链,由此形成发夹环结构。双链 DNA 的复制发生在切口、缺口或末端单链区。当新合成的链填满空隙遇上另一条与模板互补的链的 5'-端时,它可以取代互补链而继续向前延长。如果在某些点上,酶离开原先的模板,开始复制互补链,结果形成分支结构(图 34-12)。发夹环和分支结构只存在于体外酶促合成的 DNA 分子中,它使 DNA 的变性行为异常,并且失去遗传活性。

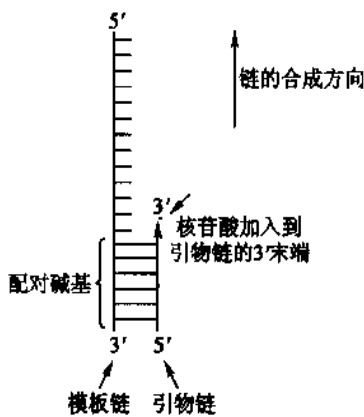


图 34-11 DNA 酶促合成的引物链和模板链

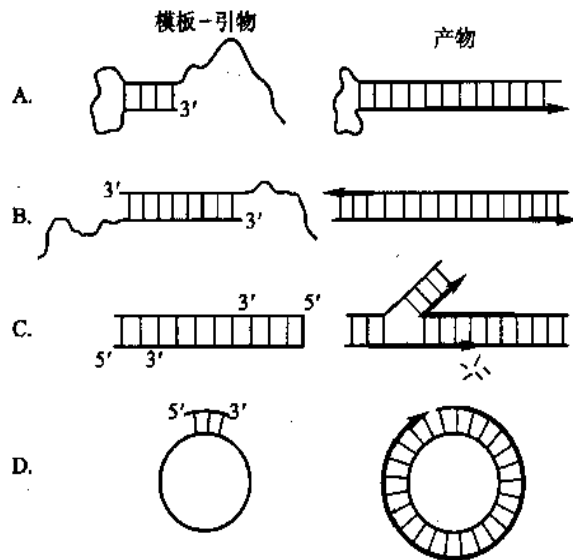


图 34-12 由 DNA 聚合酶催化的 DNA 合成反应

A. 由线性单链 DNA 进行的反应; B. 由局部变成了单链的双链 DNA 进行的反应; C. 在具有切口的双链 DNA 的反应中,通过 5'→3'外切酶水解 5'端核苷酸或形成分支的 DNA; D. 环状 DNA 进行的反应。模板-引物用细线表示;新合成的 DNA 用粗线表示

综上所述,DNA 聚合酶的反应特点为:① 以四种脱氧核糖核苷三磷酸作底物,② 反应需要接受模板

的指导,③ 反应需要有引物 3'-羟基存在,④ DNA 链的生长方向为 5'→3',⑤ 产物 DNA 的性质与模板相同。这就表明了 DNA 聚合酶合成的产物是模板的复制物。

2. 大肠杆菌 DNA 聚合酶

大肠杆菌中共含有五种不同的 DNA 聚合酶,它们分别称为 DNA 聚合酶 I、II、III、IV 和 V。

(1) DNA 聚合酶 I Kornberg 等最初从大肠杆菌中分离出来的酶称为 DNA 聚合酶 I 或 Kornberg 酶。DNA 聚合酶 I 已得到高度纯化,从 100 kg 大肠杆菌中可以分离得到约 500 mg 纯化的酶。

DNA 聚合酶 I 的相对分子质量为 103 000,由一条单一多肽链组成,多肽链中含有一个锌原子。酶分子形状像球体,直径约 6.5 nm,为 DNA 直径的三倍左右。每个大肠杆菌细胞约有 400 个分子的 DNA 聚合酶 I。

当有底物和模板存在时,DNA 聚合酶 I 可使脱氧核糖核苷酸逐个地加到具有 3'-OH 末端的多核苷酸链上。与其他种类的 DNA 聚合酶一样,DNA 聚合酶 I 只能在已有核酸链上延伸 DNA 链,而不能从无到有开始 DNA 链的合成,也就是说,它催化的反应需要有引物链(DNA 链或 RNA 链)的存在。在 37℃ 条件下,每分子 DNA 聚合酶 I 每分钟可以催化约 1 000 个核苷酸的聚合。

DNA 聚合酶 I 是一个多功能酶。它可以催化以下的反应:①通过核苷酸聚合反应,使 DNA 链沿 5'→3'方向延长(DNA 聚合酶活性);②由 3'端水解 DNA 链(3'→5'核酸外切酶活性);③由 5'端水解 DNA 链(5'→3'核酸外切酶活性);④由 3'端使 DNA 链发生焦磷酸解;⑤无机焦磷酸盐与脱氧核糖核苷三磷酸之间的焦磷酸基交换。焦磷酸解是聚合反应的逆反应,焦磷酸交换反应则是由前两个反应连续重复多次引起的。因此,实际上 DNA 聚合酶 I 兼有聚合酶、3'→5'核酸外切酶和 5'→3'核酸外切酶的活性。在酶的活性中心,与这些功能有关的结合位置分布得十分精巧。

若用蛋白水解酶将 DNA 聚合酶 I 作有限水解,可以得到相对分子质量为 68 000 和 35 000 的两个片段。大的片段具有聚合酶和 3'→5'核酸外切酶活性,小的片段具有 5'→3'核酸外切酶活性。聚合酶和 3'→5'外切酶活性紧密结合在一起,表明两者间有着重要的内在联系(图 34-13)。

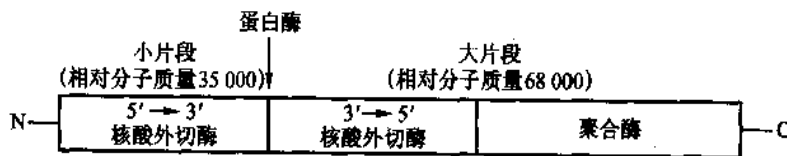


图 34-13 DNA 聚合酶 I 的酶切片段

DNA 聚合酶 I 被蛋白酶切开得到的大片段称为 Klenow 片段,X 射线晶体学研究揭示它有两个明显的裂隙,彼此接近垂直。其中一个裂隙为双链 DNA 的结合位点;另一裂隙为聚合反应的催化位点以及单链模板的结构位点。3'→5'核酸外切酶位点十分靠近聚合酶位点,合成链的 3'端可在其间摆动(图 34-14)。其他种类的 DNA 聚合酶往往无 5'→3'核酸外切酶活性,但有 3'→5'核酸外切酶活性,其空间结构与 Klenow 片段类似,相当于右手形状。实际上不仅是 DNA 聚合酶 I,右手结构是所有核酸聚合酶的共同特征。

当模板核酸落入核酸聚合酶拇指结构和食指结构间的凹槽时,引起构象改变,从而使聚合酶能够握住核酸分子。聚合酶所以能够辨别进入的底物核苷酸,因为凹槽空间只允许底物与模板之间形成 Watson-Crick 类型的碱基配对。非配对碱基因空间位置不适合而不能进行聚合反应,这就保证了新合成的链严格按模板链的互补碱基顺序进行聚合。在这里,酶对底物进行了专一性的核对。然而错配的碱基仍然不可避免地会出现。DNA 聚合酶的 3'→5'核酸外切酶活性能切除单链 DNA 的 3'末端核苷酸,而对双链 DNA 不起作用,故不能形成碱基对的错配核苷酸可被该酶水解下

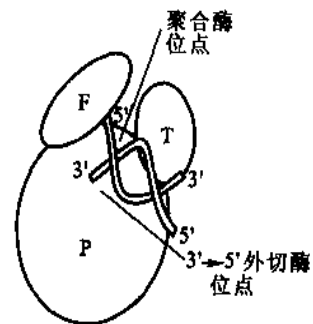


图 34-14 DNA 聚合酶 I 大片段(Klenow 片段)的结构

P. 掌形结构区 F. 指形结构区 T. 拇指结构区

来。在正常聚合条件下,3'→5'外切酶活性不能作用于生长链;若一旦出现错配碱基时,聚合反应立即停止,生长链的3'末端核苷酸落入3'→5'外切酶位点,错配核苷酸迅速被除去,然后聚合反应才得以继续进行下去。3'→5'核酸外切酶活性被认为起着校对的功能(proofreading function),它能纠正聚合过程中的碱基错配。由此可见,DNA复制过程中碱基配对要受到双重校对;聚合酶的选择作用和3'→5'外切酶的校对作用,在无3'→5'外切酶的校对功能时,DNA聚合酶I掺入核苷酸的错误率为 10^{-5} ,具有校对功能后,错误率降低至 5×10^{-7} 。

DNA聚合酶的3'→5'核酸外切酶活力对DNA复制的忠实性(fidelity)极为重要。如果没有这种活性,DNA复制的错误将会大大增加。例如,某些变异的 T_4 噬菌体突变率很高,从这种变异株得到的 T_4 DNA聚合酶中3'→5'外切酶活性很弱,在DNA复制时非常容易出错误,起着促突变因子(mutator)的作用;另一些 T_4 噬菌体变异株具有很高的抗突变能力,它的DNA聚合酶中3'→5'外切酶活性很强,复制时很少出差错,起着抗突变因子(antimutator)的作用。显然,3'→5'外切酶活性对聚合酶活性的比值与DNA复制的准确性有关,因而影响到自然突变率。抗突变株的DNA聚合酶虽然对复制是高度保真的,但在进化中却未必优越。因为一定的自然突变率对于生物的进化是必要的;而3'→5'外切酶活性过强,甚至在聚合条件下失去对外切酶的抑制作用,造成正常聚合的核苷酸不断被切除,这肯定是个耗能大,效率低的系统。

DNA聚合酶I尚具有5'→3'核酸外切酶活性,它只作用于双链DNA的碱基配对部分,从5'末端水解下核苷酸或寡核苷酸。因而该酶被认为在切除由紫外线照射而形成的嘧啶二聚体(pyrimidine dimer)中起着重要作用。DNA半不连续合成中冈崎片段5'端RNA引物的切除也有赖于这个外切酶。

DNA聚合酶I在DNA复制和损伤修复中的作用,将在后面再作介绍。

(2) DNA聚合酶II和III DNA聚合酶I发现后,随着对其性质的逐步了解,增加了对该酶是否真是细胞DNA复制酶的怀疑。首先,该酶合成DNA的速度太慢,只及细胞内DNA复制速度的百分之一。其次,它的持续合成能力(processivity)较低,细胞内DNA的复制不会频繁中断。第三,遗传学分析表明,许多基因突变都会影响DNA的复制,但都与DNA聚合酶I无关。1969年DeLucia P和Cairns J分离到一株大肠杆菌变异株,它的DNA聚合酶I活性极低,只为野生型的0.5%~1%,这一变异株称为 $pol A1$ 或 $pol A^-$ 。该变异株可以像它的亲代株一样以正常速度繁殖,但是对紫外线、X射线和化学诱变剂甲基磺酸甲酯等敏感性高,容易引起变异和死亡。这表明 $pol A1$ 变异株的DNA复制是正常的,但DNA损伤的修复机制(repair mechanism)有明显的缺陷。由此直接表明,DNA聚合酶I不是复制酶,而是修复酶。后来证明,它在DNA复制过程中起着取代RNA引物的作用,只是参与局部修复。

由于 $pol A1$ 变异株中DNA聚合酶I的聚合反应活力很低,因此是寻找其他聚合酶的适宜材料。Kornberg T和Gefter M在1970年和1971年先后分离出了另外两种聚合酶,称为DNA聚合酶II和III。

DNA聚合酶II为多亚基酶,其聚合酶亚基由一条相对分子质量为88000的多肽链组成。这个酶的活力比DNA聚合酶I高,若以每分子酶每分钟促进核苷酸掺入DNA的转化率计算,约为2400个核苷酸。每个大肠杆菌细胞约含有100个分子的DNA聚合酶II。它也是以四种脱氧核糖核苷三磷酸为底物,从5'→3'方向合成DNA,并需要带有缺口的双链DNA作为模板—引物,缺口不能过大,否则活性将会降低。反应需 Mg^{2+} 和 NH_4^+ 激活。DNA聚合酶II具有3'→5'核酸外切酶活力,但无5'→3'外切酶活力。已分离到一株大肠杆菌变异株($pol B1$),它的DNA聚合酶II活力只有正常的0.1%,但仍然以正常速度生长,表明DNA聚合酶II也不是复制酶,而是一种修复酶。

DNA聚合酶III是由多个亚基组成的蛋白质,现在认为它是大肠杆菌细胞内真正负责从新合成DNA的复制酶(replicase)。经诱变处理,分离到一些大肠杆菌温度敏感条件致死变异株。 $dna E$ ($pol C$)基因的温度敏感变异株在允许温度(30℃)下,DNA能正常复制;当培养温度上升到限制温度(45℃)时,DNA的合成立即停止。亦已鉴定该位点编码DNA聚合酶III的 α 亚基。从这种变异株中分离出来的DNA聚合酶III是对温度敏感的,而聚合酶I和II则不敏感。前面已经提到过,诱变消除DNA聚合酶I和II的聚合反应活力后,大肠杆菌仍然能进行DNA复制和正常生长。虽然每个大肠杆菌细胞只有10~20个DNA聚合酶III分子,然而它催化的合成速度达到了体内DNA合成的速度。DNA聚合酶III的许多性质都表明,它就是DNA的复制酶。

DNA 聚合酶 II 和 III 在促进 DNA 合成的基本性能上和 DNA 聚合酶 I 是相同的:①它们都需要模板指导,以四种脱氧核糖核苷三磷酸作为底物,并且需要有 3'-OH 的引物链存在,聚合反应按 5'→3' 方向进行。②它们都没有 5'→3' 核酸外切酶活性,但具有 3'→5' 核酸外切酶活性,在聚合过程中起校对作用。③它们都是多亚基酶,DNA 聚合酶 II 和 III 共用了许多辅助亚基。然而它们又有明显区别:①DNA 聚合酶 II 和纯化的 DNA 聚合酶 III 最宜作用于带有小段缺口(小于 100 个核苷酸)的双链 DNA;而 DNA 聚合酶 I 最宜作用于具有大段单链区的双链 DNA,甚至是带有很短引物的单链 DNA。②二者的聚合速度、持续合成能力均有很大不同,反映了它们功能的不同,DNA 聚合酶 II 是修复酶,DNA 聚合酶 III 是复制酶。DNA 聚合酶 I、II 和 III 的基本性质总结于表 34-2。

表 34-2 大肠杆菌三种 DNA 聚合酶的性质比较

	DNA 聚合酶 I	DNA 聚合酶 II	DNA 聚合酶 III
结构基因*	<i>pol A</i>	<i>pol B</i>	<i>pol C (dna E)</i>
不同种类亚基数目	1	≥7	≥10
相对分子质量	103 000	88 000 [†]	830 000
3'→5'核酸外切酶	+	+	+
5'→3'核酸外切酶	+	-	-
聚合速度(核苷酸/分)	1 000~1 200	2 400	15 000~60 000
持续合成能力	3~200	1 500	≥500 000
功能	切除引物,修复	修复	复制

* 对于多亚基酶,这里仅列出聚合活性亚基的结构基因

[†] 仅聚合活性亚基。DNA 聚合酶 II 与 III 共有许多辅助亚基,其中包括 β 、 γ 、 δ 、 δ' 、 χ 和 ψ

DNA 聚合酶 III 的亚基很容易解离,在分离酶的过程中常得到不同的组分,对每一组分的作用也还不十分清楚,因此要区分酶的组成成分和辅助因子是比较困难的。现认为 DNA 聚合酶 III 的全酶(holoenzyme)由 α 、 β 、 γ 、 δ 、 δ' 、 ϵ 、 θ 、 τ 、 χ 和 ψ 10 种亚基所组成,含有锌原子。其中 α 亚基的相对分子质量为 132 000,具有 5'→3' 方向合成 DNA 的催化活性。 ϵ 亚基具有 3'→5' 核酸外切酶活性,起校对作用,可提高聚合酶 III 复制 DNA 的保真性。由 α 、 ϵ 和 θ 三种亚基组成全酶的核心酶(core enzyme)。 θ 亚基可能起组建的作用。DNA 聚合酶 III 为异二聚体(heterologous dimer),它使 DNA 解开的双链可以同时进行复制,但二聚化的两个聚合酶亚基种类并不完全相同,在这里 τ 亚基起着促使核心酶二聚化的作用。 β 亚基的功能犹如夹子,两个 β 亚基夹住 DNA 分子并可向前滑动,使聚合酶在完成复制前不再脱离 DNA,从而提高了酶的持续合成能力(图 34-15)。 γ 亚基是一种依赖 DNA 的 ATP 酶,两个 γ 亚基与另 4 个亚基($\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$)构成 γ 复合物,其主要功能是帮助 β 亚基夹住 DNA,故称为夹子装置器(clamp-loader)。DNA 聚合酶 III 的亚基组成列于表 34-3,其全酶的结构如图 34-16 所示。DNA 聚合酶 III 的复杂亚基结构使其具有更高的忠实性(fidelity)、协同性(cooperativity)和持续性(processivity)。如无校对功能,DNA 聚合酶 III 的核苷酸掺入错误率为 7×10^{-6} ,具有校对功能后降低至 5×10^{-9} 。各亚基的功能相互协调。全酶可以持续完成整个染色体 DNA 的合成。

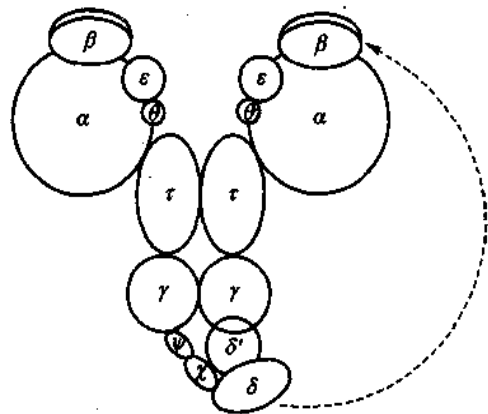
图 34-15 DNA 聚合酶 III 两个 β 亚基夹住 DNA

图 34-16 DNA 聚合酶 III 异二聚体的亚基结构示意图
在 γ 复合物帮助下, β 夹子夹住模板与引物双链并转移到核心酶上,开始 DNA 复制

表 34-3 DNA 聚合酶 III 全酶的亚基组成

亚基	相对分子质量	亚基数目	基因	亚基功能
α	132 000	2	<i>pol C</i> (<i>dna E</i>)	聚合活性
ϵ	27 000	2	<i>dna Q</i> (<i>muu D</i>)	3'→5'外切酶校对功能
θ	10 000	2	<i>hol E</i>	组建核心酶
τ	71 000	2	<i>dna X</i>	核心酶二聚化
γ	52 000	2	<i>dna X</i> *	依赖 DNA 的 ATP 酶,形成 γ 复合物
δ	35 000	1	<i>hol A</i>	可与 β 亚基结合,形成 γ 复合物
δ'	33 000	1	<i>hol B</i>	形成 γ 复合物
χ	15 000	1	<i>hol C</i>	形成 γ 复合物
ψ	12 000	1	<i>hol D</i>	形成 γ 复合物
β	37 000	4	<i>dna N</i>	两个 β 亚基形成滑动夹子,以提高酶的持续合成能力

* γ 亚基由 τ 亚基的基因一部分所编码, τ 亚基氨基末端 80% 与 γ 亚基具有相同的氨基酸序列

(3) DNA 聚合酶 IV 和 V DNA 聚合酶 IV 和 V 是在 1999 年才被发现的,它们涉及 DNA 的错误倾向修复 (errorprone repair)。当 DNA 受到较严重损伤时,即可诱导产生这两个酶,使修复缺乏准确性 (accuracy),因而出现高突变率。编码 DNA 聚合酶 IV 的是 *din B*。编码 DNA 聚合酶 V 的基因是 *umu C* 和 *umu D*。基因 *umu D* 产物 Umu D 被裂解产生较短的 Umu D',并与 Umu C 形成复合物,成为一种特殊的 DNA 聚合酶 (聚合酶 V)。它能在 DNA 许多损伤部位继续复制,而正常 DNA 聚合酶在此部位因不能形成正确碱基配对而停止复制,在跨越损伤部位时就造成了错误倾向的复制。高突变率虽会杀死许多细胞,但至少可以克服复制障碍,使少数突变的细胞得以存活。

3. DNA 连接酶

DNA 聚合酶只能催化多核苷酸链的延长反应,不能使链之间连接。环状 DNA 的复制表明,必定存在一种酶,能催化链的两个末端之间形成共价连接。1967 年不同实验室同时发现了 DNA 连接酶 (DNA ligase)。这个酶催化双链 DNA 切口处的 5'-磷酸基和 3'-羟基生成磷酸二酯键。

连接反应需要供给能量。大肠杆菌和其他细菌的 DNA 连接酶以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 作为能量来源,动物细胞和噬菌体的连接酶则以腺苷三磷酸 (ATP) 作为能量来源。反应分三步进行。首先由 NAD 或 ATP 与酶反应,形成腺苷酰化的酶 (酶~AMP 复合物),其中 AMP 的磷酸基与酶的赖氨酸之 ϵ -氨基以磷酸胺键相结合,然后酶将 AMP 转移给 DNA 切口处的 5'-磷酸,以焦磷酸键的形式活化,形成 AMP~DNA。然后通过相邻链的 3'-OH 对活化的磷原子发生亲核攻击,生成 3',5'-磷酸二酯键,同时释放出 AMP (图 34-17)。

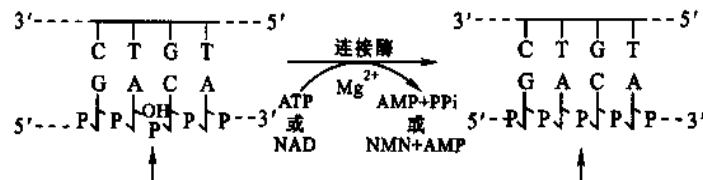


图 34-17 DNA 连接酶催化的反应

大肠杆菌 DNA 连接酶要求断开的两条链由互补链将它们聚在一起,形成双螺旋结构。它不能将两条游离的 DNA 分子连接起来。*T₄* DNA 连接酶不仅能在模板链上连接 DNA 和 DNA 链之间的切口,而且能连接无单链黏性末端 (sticky end) 的平头 (blunt) 双链 DNA。

大肠杆菌 DNA 连接酶是一条相对分子质量为 74 000 的多肽。每个细胞含有约 300 个连接酶分子。连接酶缺陷的大肠杆菌变异株中 DNA 片段积累,对紫外线敏感性增加。DNA 连接酶在 DNA 的复制、修复和重组等过程中均起重要的作用。

(四) DNA 的半不连续复制

在体内, DNA 的两条链都能作为模板, 同时合成出两条新的互补链。由于 DNA 分子的两条链是反向平行的, 一条链的走向为 $5' \rightarrow 3'$, 另一条链为 $3' \rightarrow 5'$ 。但是, 所有已知 DNA 聚合酶的合成方向都是 $5' \rightarrow 3'$, 而不是 $3' \rightarrow 5'$ 。这就很难说明, DNA 在复制时两条链如何能够同时作为模板合成其互补链。为了解决这个矛盾, 日本学者冈崎等提出了 DNA 的不连续复制模型, 认为 $3' \rightarrow 5'$ 走向的 DNA 实际上是由许多 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成的 DNA 片段连接起来的(图 34-18)。

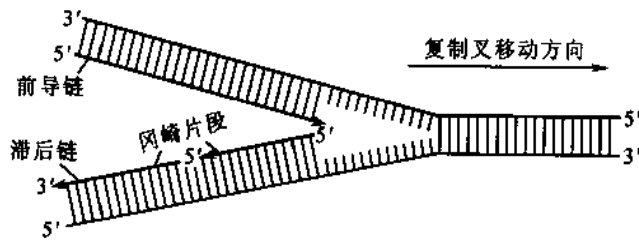


图 34-18 DNA 的一条链以不连续方式合成

1968 年, 冈崎等用 ^3H -脱氧胸苷标记噬菌体 T_4 感染的大肠杆菌, 然后通过碱性密度梯度离心法分离标记的 DNA 产物, 发现短时间内首先合成的是较短的 DNA 片段, 接着出现较大的分子, 最初出现的 DNA 片段长度约为 1 000 个核苷酸左右, 一般称为冈崎片段(Okazaki fragment)。用 DNA 连接酶变异的温度敏感株进行实验, 在连接酶不起作用的温度下, 便有大量 DNA 片段积累。这些实验都说明在 DNA 复制过程中首先合成较短的片段, 然后再由连接酶连成大分子 DNA。

从大肠杆菌中分离出冈崎片段之后, 许多实验室的研究进一步证明, DNA 的不连续合成不只限于细菌, 真核生物染色体 DNA 的复制也是如此。细菌的冈崎片段长度为 1 000 ~ 2 000 个核苷酸, 相当于一个顺反子(cistron), 即基因的大小; 真核生物的冈崎片段长度为 100 ~ 200 个核苷酸, 相当于一个核小体 DNA 的大小。

冈崎等最初的实验不能判断 DNA 链的不连续合成只发生在一条链上, 还是两条链都如此, 对冈崎片段进行测定, 结果测得的数量远超过新合成 DNA 的一半, 似乎两条链都是不连续的。后来发现这是由于尿嘧啶代替胸腺嘧啶掺入 DNA 所造成的。DNA 中的尿嘧啶可被尿嘧啶-DNA-糖苷酶(uracil-DNA-glycosidase)切除, 随后该处的磷酸二酯键断裂, 一些核苷酸被水解, 造成一个缺口, 最后缺口空隙被填补和修复, 在此过程中也会产生一些类似冈崎片段的 DNA 片段。

当用缺乏糖苷酶的大肠杆菌变异株(ung^-)进行实验时, DNA 的尿嘧啶将不再被切除。此时, 新合成 DNA 大约有一半放射性标记出现于冈崎片段中, 另一半直接进入大的片段。由此可见, 当 DNA 复制时, 一条链是连续的, 另一条链是不连续的, 因此称为半不连续复制(semidiscontinuous replication)。

以复制叉向前移动的方向为标准, 一条模板链是 $3' \rightarrow 5'$ 走向, 在其上 DNA 能以 $5' \rightarrow 3'$ 方向连续合成, 称为前导链(leading strand); 另一条模板链是 $5' \rightarrow 3'$ 走向, 在其上 DNA 也是从 $5' \rightarrow 3'$ 方向合成, 但是与复制叉移动的方向正好相反, 所以随着复制叉的移动, 形成许多不连续的片段, 最后连成一条完整的 DNA 链, 该链称为滞后链(lagging strand)。由于 DNA 复制酶系不易从 DNA 模板上解离下来, 因此前导链的合成通常总是连续的。但是有很多因素会影响到前导链的连续性, 例如, 模板链的损伤、复制因子和底物的供应不足等, 都会引起前导链复制中断并从另一新点起始。

如前所述, 所有已知的 DNA 聚合酶都不能发动新链的合成, 而只能催化已有链的延长反应。然而 RNA 聚合酶则不同, 它只需要 DNA 模板存在, 就可以在其上合成出新的 RNA 链。这就是说, DNA 合成需要引物, RNA 合成不需要引物。那么, 每一个冈崎片段是怎样开始合成的? 它的引物是什么? 现在知道, 在 DNA 模板上需先合成一段 RNA 引物, DNA 聚合酶从 RNA 引物的 $3' - \text{OH}$ 端开始合成新的 DNA 链。

在用大肠杆菌提取液进行 DNA 合成的实验表明, 冈崎片段的合成除需要四种脱氧核糖核苷酸外, 还

需要四种核糖核苷酸(ATP、GTP、CTP 和 UTP)。通过对新合成的 DNA 片段进行分析,发现它们以共价键连着一小段 RNA 链。用专一的核酸酶水解证明, RNA 链位于 DNA 片段的 5'末端。这些实验有力地说明了,冈崎片段的合成需要 RNA 引物。

RNA 引物是在 DNA 模板链的一定部位合成并互补于 DNA 链,合成方向也是 5'→3',催化该反应的酶称为引物合成酶(primase)。引物的长度通常为几个核苷酸至 10 多个核苷酸, DNA 聚合酶 III 可在其上聚合脱氧核糖核苷酸,直至完成冈崎片段的合成。RNA 引物的消除和缺口的填补是由 DNA 聚合酶 I 来完成的。最后由 DNA 连接酶将冈崎片段连成长链。

随着研究的深入,人们对 DNA 复制机制的复杂性也有了进一步的认识。生物体为什么要用如此复杂的机制来复制 DNA 呢?主要是为了保持 DNA 复制的高度忠实性。假定观察到的生物自发突变都是由 DNA 复制时碱基对的错配引起的,则可估计出大肠杆菌复制时每个碱基对错配的频率为 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ 。实际上还存在其他来源的变异和修复机制,生物的突变频率往往比这个数值还低。这是令人惊异的高保真系统。从热力学的角度考虑,碱基对的错配使双螺旋结构不稳定,因而给出正的自由能值,但由此计算的碱基错配频率大约在 10^{-2} 。DNA 聚合酶对底物的选择作用和 3'→5'核酸外切酶的校对作用分别使错配频率下降 10^{-2} ,因而达 10^{-6} 。这是一般 DNA 聚合酶在体外合成 DNA 时所能达到的水平。在体内,复制叉的复杂结构进一步提高了复制的准确性;修复系统可以检查出错配碱基和 DNA 的各种损伤并加以修正,从而使变异率下降到更低的水平(对生物进化合宜的水平)。

由此可以理解,为什么 DNA 聚合酶需要引物,而 RNA 聚合酶则不需要;为什么冈崎片段要以 RNA 为引物,而最后又要切除 RNA,并以 DNA 链来取代 RNA 链。DNA 聚合酶具有校对功能,它在每引入一个核苷酸后都要复查一次,碱基配对无误才继续往下聚合。它不能从无到有合成新的链,这是因为在未核实前一个核苷酸处于正确配对状态,是不会进行聚合反应的。RNA 聚合酶没有校对功能,因此不需要引物。RNA 引物都是从新开始合成的,它的错配可能性大,在完成引物功能后即将它删除,而代之以高保真的 DNA 链。

(五) DNA 复制的拓扑性质

核酸的拓扑结构(topology 拓扑学或拓扑结构)是指核酸分子结构的空问关系。拓扑学是近代数学的一个分支,它研究曲线或曲面的空问关系和内在数学性质,而不考虑它们的度量(大小、形状等)。两条互相缠绕的双螺旋核酸分子表现出许多拓扑学的关系。在 DNA 的复制、重组、转录和装配等过程中无不牵涉到其拓扑结构的转变。DNA 在复制时,首先需要将两条链解开,因而会产生扭曲张力。早期曾认为 DNA 分子可通过旋转而消除这种张力。然而一条很长的 DNA 双螺旋分子进行高速的旋转,这是不可思议的。通过对 DNA 的拓扑结构和拓扑异构酶的研究,现在已能较好了解 DNA 在复制时双链是如何解开的。

1966 年 Vinograd 和 Lebowitz 在研究闭环 DNA 的空问关系时提出了以下公式:

$$\alpha = \beta + \tau$$

其中 α 为双链闭环中两条链的互绕数(intertwining number),或称为拓扑连环数(topological linking number); β 为 DNA 构象所应有的螺旋数(helical turns)或扭转数(twisting number); τ 为超螺旋数(superhelical turns),亦即缠绕数(writhing number)。当双链闭环的两条链保持连续时, α 值不变。 β 值只与 DNA 分子的碱基对数目和构象有关,B 型 DNA 的 β 值为碱基对数目除以 10.4。 α 值减 β 值之差即为超螺旋数 τ 。 α 值必定是整数, β 值与 τ 值不一定是整数。 α 与 β 的正负表示螺旋方向,右手螺旋为正,左手螺旋为负; τ 的正负则表示 α 大于还是小于 β ,即双链闭环的螺旋圈数增加还是减少。

超螺旋数目是整个环状 DNA 分子为单位的,为便于比较,需引入另一个概念,比超螺旋(specific superhelix),或称为超螺旋密度(superhelical density),以符号 σ 来表示:

$$\sigma = \frac{\alpha - \beta}{\beta}$$

生物体内的 DNA 分子通常处于负超螺旋状态。从热力学上考虑,超螺旋 DNA 处于较高自由能状态,因此,如果 DNA 的一条链有一个切口它即自发转变成松弛状态。负超螺旋状态有利于 DNA 两条链的解

开,而 DNA 的许多生物功能都需要解开双链才能进行,生物体内可通过 DNA 不同的负超螺旋结构来控制其功能状态。

除连环数不同外其他性质均相同的 DNA 分子称为拓扑异构体(topological isomers),引起拓扑异构反应的酶称为拓扑异构酶(topoisomerase)。DNA 拓扑异构酶通过改变 DNA 的 α 值而影响其拓扑结构。拓扑异构酶可分为两类:类型 I 的酶能使 DNA 的一条链发生断裂和再连接,反应无需供给能量;类型 II 的酶能使 DNA 的两条链同时发生断裂和再连接,当它引入超螺旋时需要由 ATP 供给能量。

类型 I 拓扑异构酶首先在大肠杆菌中发现。过去称为 ω 蛋白,或切口封闭酶(nick-closing enzyme),现在统一称为拓扑异构酶 I,为相对分子质量 97 000 的一条多肽链,由基因 *top A* 所编码。该基因突变将导致 DNA 负超螺旋水平的增加,并影响到转录活性。拓扑异构酶 I 只能消除负超螺旋,对正超螺旋无作用,每次作用改变的 α 值为 +1。除消除负超螺旋外,拓扑异构酶 I 还能引起 DNA 其他的拓扑转变,例如,单链环形成拓扑结和互补单链环形成环状双链。

当大肠杆菌的拓扑异构酶 I 与 DNA 结合时,可形成稳定的复合物。分析此复合物的结构发现, DNA 的一条链断裂,并且其 5'-磷酸基与酶的酪氨酸羟基形成酯键。在此发生的是磷酸二酯键的转移反应,由 DNA 转移到蛋白质。随后使原来断裂的 DNA 链重新连接,即磷酸二酯键又由蛋白质转到 DNA。整个过程并不发生键的不可逆水解,没有能量的丢失。因此 DNA 链的断裂和再连接并不需要外界供给能量。拓扑异构酶 I 在使 DNA 的一条链断裂时,由于酶与 DNA 相结合, DNA 链并不能自由转动,超螺旋 DNA 的扭曲张力不会自动消失。但是酶分子可牵引另一条链通过切口,然后使断链重新连接,从而改变 DNA 的连环数和超螺旋数。拓扑异构酶 I 只能消除负超螺旋,说明该酶只能按一方向牵引 DNA 链。大肠杆菌细胞内还有另一种类型 I 拓扑异构酶,称为拓扑异构酶 III,其性质与拓扑异构酶 I 相似,功能也可能相同。

细菌的 DNA 旋转酶(*gyrase*)是一种类型 II 的拓扑异构酶,称为拓扑异构酶 II,它可连续引入负超螺旋到同一个双链闭环 DNA 分子中去,每分钟引入大约 100 个负超螺旋。反应需要由 ATP 供给能量。在无 ATP 存在时,旋转酶可松弛负超螺旋,但不作用于正超螺旋,而且松弛负超螺旋的速度比引入负超螺旋的速度慢 10 倍。

大肠杆菌旋转酶由两条相对分子质量为 105 000 的 A 亚基和两条相对分子质量为 95 000 的 B 亚基所组成,即 A_2B_2 ,整个酶的相对分子质量为 400 000。这两个亚基分别由基因 *gyr A* 和 *gyr B* 所编码。对抗生素抗性突变的分析表明,*gyr A* 是抗萘啶酮酸(nalidixic acid)和奥喹酸(oxilinic acid)作用的位点;*gyr B* 是抗香豆霉素 A_1 (coumestrolin A_1)和新生霉素(novobiocin)作用的位点。这些抗生素均能抑制复制,因而推测 DNA 旋转酶对 DNA 的合成是必需的。

图 34-19 说明了旋转酶的作用机制。当酶结合到 DNA 分子上时,可同时使两条链交错断裂,交错 4 个碱基对。2 个 A 亚基通过酪氨酸分别与断链 5'-磷酸基结合,在酶构象改变的牵引下, DNA 双链穿过切口,然后断裂的 2 条链又重新连接。每次反应改变的连环数为 -2。ATP 水解产生的能量用来恢复酶的构象,从而可进行下一次循环。新生霉素通过抑制 ATP 与 B 亚基的结合而干扰依赖 ATP 的反应。萘啶酮酸则抑制 A 亚基的功能。大肠杆菌有两种类型 II 的拓扑异构酶,除拓扑异构酶 II 外,还有拓扑异构酶 IV,该酶的功能可能为分离环状 DNA 复制后形成的连锁体(catenane)。

真核生物的细胞也有类型 I 和类型 II 拓扑异构酶。拓扑异构酶 I 和 III 均属于类型 I。与原核生物的拓扑异构酶 I 不同,真核生物的拓扑

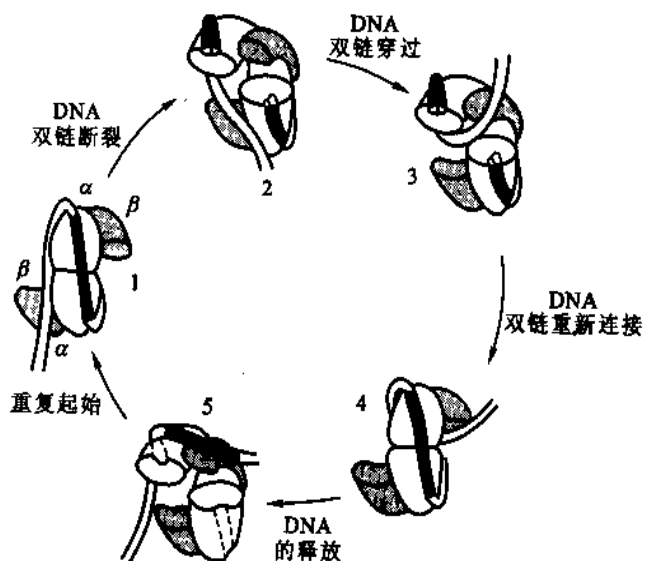


图 34-19 拓扑异构酶 II 的作用机制

异构酶 I 既能消除负超螺旋,又能消除正超螺旋。真核生物拓扑异构酶 III 只消除负超螺旋,而且活性较弱。真核生物两种类型 II 拓扑异构酶分别称为拓扑异构酶 II α 和 II β ,它们能够消除正超螺旋和负超螺旋,但不能导入负超螺旋。真核生物染色体 DNA 的负超螺旋可能是在 DNA 盘绕组蛋白核心时产生的,同时未与组蛋白结合的 DNA 部分则形成正超螺旋,随后正超螺旋即被拓扑异构酶消除。

拓扑异构酶 I 和 II 广泛存在于原核生物和真核生物。细胞内的定位分析表明,拓扑异构酶 I 主要集中在活性转录区,同转录有关。拓扑异构酶 II 分布在染色质骨架蛋白和核基质部位,同复制有关。原核生物拓扑异构酶 II 可引入负超螺旋,拓扑异构酶 I 可减少负超螺旋。真核生物略有不同,但均在它们协同作用下控制着 DNA 的拓扑结构。复制时需要较高水平的负超螺旋,复制结束后需要降低负超螺旋水平,以便在活性染色质部位进行转录。拓扑异构酶在重组、修复和其他 DNA 的转变方面也起着重要的作用。

DNA 拓扑异构酶 II 引入负超螺旋,可以消除复制叉前进时带来的扭曲张力,从而促进双链的解开。而将 DNA 两条链解开,则有赖于 DNA 解螺旋酶(helicase)。这类酶能通过水解 ATP 获得能量来解开双链,每解开一对碱基,需要水解 2 分子 ATP 成 ADP 和磷酸盐。分解 ATP 的活力要有单链 DNA 的存在。如双链 DNA 中有单链末端或缺口,解螺旋酶即可结合于单链部分,然后向双链方向移动。大肠杆菌有许多种解螺旋酶,其中解螺旋酶 I、II 和 III 可以沿着模板链的 5'→3'方向移动,而 rep 蛋白则沿 3'→5'方向移动。过去以为在 DNA 复制中,这两种解螺旋酶的配合作用推动着 DNA 双链的解开。但是上述酶经诱变并不影响细胞复制。曾经分离出一些大肠杆菌 DNA 复制温度敏感突变株。其中一株当培养温度由 30℃ 上升到 40℃,DNA 复制立即停止,分析表明 *dna B* 基因发生温度敏感突变。该基因产物 Dna B 是一种解螺旋酶,可沿 DNA 链 5'→3'方向移动,由 ATP 供给能量。这就证明,该解螺旋酶参与 DNA 的复制,其余的可能参与修复过程。

解开的两条单链随即被单链结合蛋白(single-strand binding protein,SSB)所覆盖。大肠杆菌的 SSB 蛋白相对分子质量为 75 600,由 4 个相同亚基所组成。过去这类蛋白曾被称为解链蛋白(unwinding protein)、熔解蛋白(melting protein)、螺旋去稳定蛋白(helix destabilizing protein)等。值得指出的是,这一蛋白实际并非 DNA 解链蛋白,它的功能在于稳定 DNA 解开的单链,阻止复性和保护单链部分不被核酸酶降解。

原核生物的 SSB 蛋白与 DNA 的结合表现出明显的协同效应,当第一个蛋白结合后,其后蛋白的结合能力可提高 10^3 倍。因此一旦结合反应开始后,它即迅速扩展,直至全部单链 DNA 都被 SSB 蛋白覆盖。从真核生物中分离到的 SSB 蛋白没有表现出这种协同效应,可能它们的作用方式有所不同。

(六) DNA 复制的过程

大肠杆菌染色体 DNA 的复制过程可分为三个阶段:起始、延伸和终止。其间的反应和参与作用的酶与辅助因子各有不同。在 DNA 合成的生长点(growth point),即复制叉上,分布着各种各样与复制有关的酶和蛋白质因子,它们构成的复合物称为复制体(replisome)。DNA 复制的阶段表现在其复制体结构的变化。

1. 复制的起始

大肠杆菌的复制起点称为 *ori C*,由 245 个 bp 构成,其序列和控制元件在细菌复制起点中十分保守。关键序列在于两组短的重复:三个 13 bp 的序列和四个 9 bp 序列(图 34-20)。

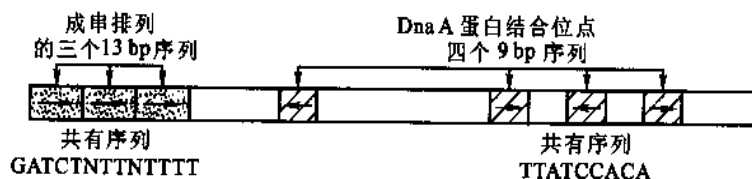


图 34-20 大肠杆菌复制起点成串排列的重复序列

复制起点上四个 9 bp 重复序列为 Dna A 蛋白的结合位点,大约 20~40 个 Dna A 蛋白各带一个 ATP 结合在此位点上,并聚集在一起,DNA 缠绕其上,形成起始复合物(initial complex)。HU 蛋白是细胞的类组蛋

白,可与 DNA 结合,促使双链 DNA 弯曲。受其影响,邻近三个成串富含 AT 的 13 bp 序列被变性,成为开链复合物(open complex),所需能量由 ATP 供给。Dna B(解螺旋酶)六聚体随即在 Dna C 帮助下结合于解链区(unwound region)。Dna B 借助水解 ATP 产生的能量,沿 DNA 链 5'→3' 方向移动,解开 DNA 的双链,此时称为前引发复合物(prepriming complex)。DNA 双链的解开还需要 DNA 旋转酶(拓扑异构酶 II)和单链结合蛋白(SSB),前者可消除解螺旋酶产生的拓扑张力,后者保护单链并防止恢复双链。至此即可由引物合成酶合成 RNA 引物,并开始 DNA 的复制。复制的起始,要求 DNA 呈负超螺旋,并且起点附近的基因处于转录状态。这是因为 Dna A 只能与负超螺旋的 DNA 相结合。RNA 聚合酶对复制起始的作用,可能是因其在起点邻近处合成一段 RNA,形成 RNA 突环(R-loop),影响起点的结构,因而有利于 Dna A 的作用。与复制起始有关的酶和蛋白质辅助因子列于表 34-4。

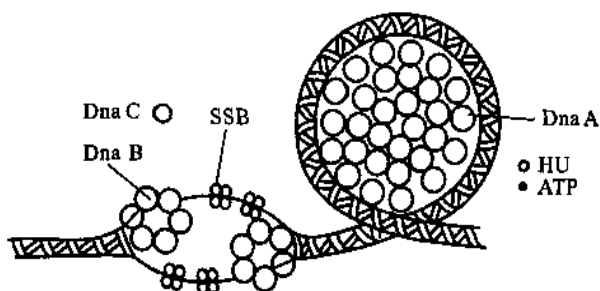


图 34-21 大肠杆菌复制起点在起始阶段的结构模型

至此即可由引物合成酶合成 RNA 引物,并开始 DNA 的复制。复制的起始,要求 DNA 呈负超螺旋,并且起点附近的基因处于转录状态。这是因为 Dna A 只能与负超螺旋的 DNA 相结合。RNA 聚合酶对复制起始的作用,可能是因其在起点邻近处合成一段 RNA,形成 RNA 突环(R-loop),影响起点的结构,因而有利于 Dna A 的作用。与复制起始有关的酶和蛋白质辅助因子列于表 34-4。

表 34-4 大肠杆菌起点与复制起始有关的酶与辅助因子

蛋白质	相对分子质量	亚基数目	功能
Dna A	52 000	1	识别起点序列,在起点特异位置解开双链
Dna B	300 000	6	解开 DNA 双链
Dna C	29 000	1	帮助 Dna B 结合于起点
HU	19 000	2	类组蛋白, DNA 结合蛋白,促进起始
引物合成酶(Dna G)	60 000	1	合成 RNA 引物
单链 DNA 结合蛋白(SSB)	75 600	4	结合单链 DNA
RNA 聚合酶	454 000	5	促进 Dna A 活性
DNA 旋转酶(拓扑异构酶 II)	400 000	4	释放 DNA 解链过程产生的扭曲张力
Dam 甲基化酶	32 000	1	使起点 GATC 序列的腺嘌呤甲基化

DNA 复制的调节发生在起始阶段,一旦开始复制,如无意外受阻,就能一直进行到完成。现在知道, DNA 复制的发动与 DNA 甲基化以及与细菌质膜的相互作用有关。在 245 bp 的 *ori C* 位点中总共有 11 个 4 bp 回文序列 GATC, Dam 甲基化酶可使该序列中腺嘌呤第 6 位 N 上甲基化。当 DNA 完成复制后, *ori C* 的亲代链保持甲基化,新合成的链则未甲基化,因此是半甲基化的 DNA(hemimethylated DNA)。半甲基化的起点不能发生复制的起始,直到 Dam 甲基化酶使起点全甲基化。然而,起点处 GATC 位点在复制后一直保持半甲基化状态,约经过 13 min 才再甲基化。这点很特殊,基因组其余部位的 GATC 在复制后通常很快(< 1.5 min)就能再甲基化。只有与 *ori C* 靠近的 *dna A* 基因启动子的再甲基化需要同样的延迟期。当 *dna A* 启动子处于半甲基化时,转录被阻遏,从而降低了 Dna A 蛋白的水平。此时起点本身是无活性的,并且关键性起始蛋白 Dna A 的产生也受到阻遏。

什么原因造成 *ori C* 和 *dna A* 位点再甲基化的延迟? 实验表明,半甲基化的 *ori C* DNA(*dna A* 基因位于起点附近)可与细胞膜结合,但全甲基化就不能结合。推测有可能因 *ori C* 与膜结合而阻碍了 Dam 甲基化酶对其 GATC 位点的甲基化,也抑制了 Dna A 蛋白与起点的结合。这种结合使得正在复制中的 DNA 可随着细胞膜的生长而被移向细胞的两半部分。只在此过程完成后, DNA 的起点才从膜上脱落下来,并被甲基化,于是又开始新一轮的复制起始。在延迟期内细胞得以完成有关的功能。复制起始的调节还涉及 Dna A 蛋白活性的循环变化;它与 ATP 结合为活性形式,随之结合到起点上,ATP 被缓慢水解;它与 ADP 结合为无活性形式。膜磷脂可以促进 Dna A 的 ADP 被 ATP 置换。调节的许多细节还不清楚,但上述实验结果为解决调节机制提供了线索。

2. 复制的延伸

复制的延伸阶段同时进行前导链和滞后链的合成。这两条链合成的基本反应相同,并且都由 DNA 聚

合酶Ⅲ所催化;但两条链的合成也有显著差别,前者持续合成,后者分段合成,因此参与的蛋白质因子也有不同。亲代 DNA 首先必须由 DNA 解螺旋酶将双链解开,其产生的拓扑张力由拓扑异构酶释放。分开的链被单链结合蛋白所稳定。自此之后,前导链与滞后链的合成便有所不同。

复制起点解开后形成两个复制叉,即可进行双向复制。前导链开始合成后通常都一直继续下去。先由引物合成酶(Dna G 蛋白)在起点处合成一段 RNA 引物,前导链的引物一般比冈崎片段的引物略长一些,大约为 10~60 个核苷酸。某些质粒和线粒体 DNA 由 RNA 聚合酶合成引物,其长度可以更长。随后 DNA 聚合酶Ⅲ即在引物上加入脱氧核糖核苷酸。前导链的合成与复制叉的移动保持同步。

滞后链的合成是分段进行的,需要不断合成冈崎片段的 RNA 引物,然后由 DNA 聚合酶Ⅲ加入脱氧核糖核苷酸。滞后链合成的复杂性在于如何保持它与前导链合成的协调一致。由于 DNA 的两条互补链方向相反,为使滞后链能与前导链被同一个 DNA 聚合酶Ⅲ不对称二聚体所合成,滞后链必须绕成一个突环(loop),如图 34-22 所示。合成冈崎片段需要 DNA 聚合酶Ⅲ不断与模板脱开,然后在新的位置又与模板结合。这一作用是由 β 夹子和 γ 复合物(β 夹子装置器)来完成的。

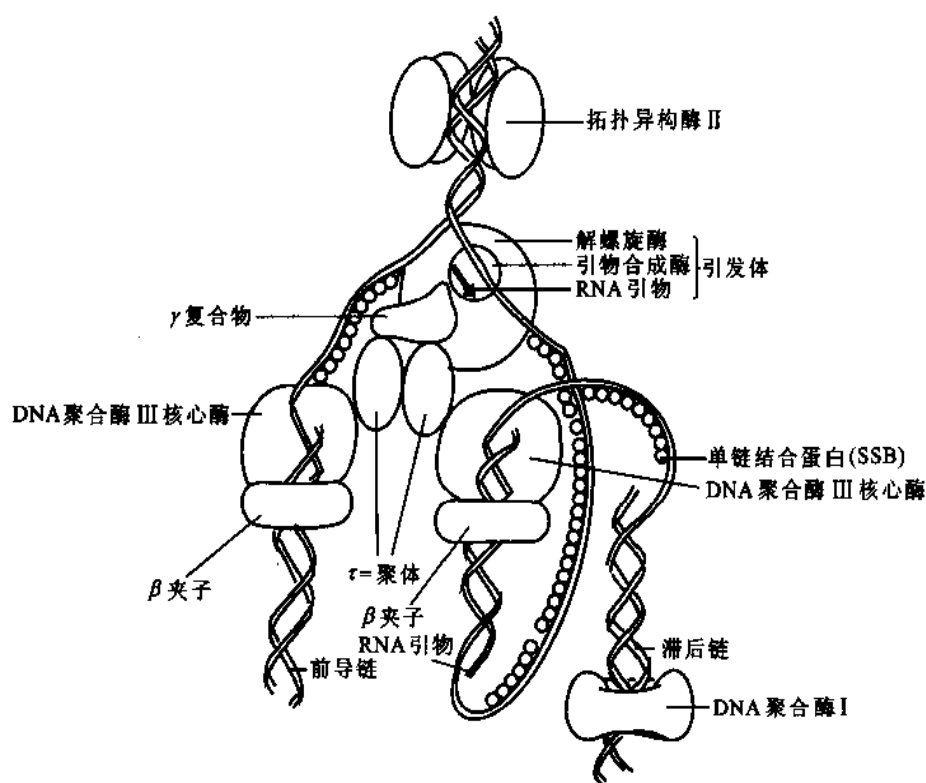


图 34-22 大肠杆菌复制体结构示意图

当引物合成酶在适当位置合成出 RNA 引物后,两个 β 亚基(β 夹子)即在 γ 复合物($\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$)帮助下将引物与模板的双链夹住。 β 亚基的二聚体形成一个环,套在双链分子上,并可在其上滑动。将 β 夹子安装在引物与模板双链上需要能量, γ 亚基具有 ATP 酶活性,可分解 ATP 以提供能量。完成冈崎片段合成后,将 β 夹子从 DNA 双链分子上拆卸下来仍然依赖于 γ 复合物的帮助,并由 ATP 提供能量。 β 夹子的功能在于将 DNA 聚合酶Ⅲ的核心酶束缚在 DNA 模板上,使其持续合成 DNA。它与 γ 复合物的 δ 亚基以及核心酶的 α 亚基都有高的亲和力,二者的结合位点也相同,但随着 β 夹子状态的改变,亲和力大小也发生改变。当 β 夹子在溶液中时,它趋向于和 γ 复合物结合;及至在 γ 复合物帮助下夹住引物与模板双链,它发生构象变化从而使其转移到核心酶上;一旦冈崎片段合成结束,它又转移回 γ 复合物,并在其帮助下脱落。如此使 β 夹子得以反复循环使用。

Dna B 有两个功能,其一是解螺旋酶,以解开 DNA 的双螺旋;另一是活化引物合成酶,促使其合成 RNA 引物。由 Dna B 解螺旋酶和 Dna G 引物合成酶构成了复制体的一个基本功能单位,称为引发体

(primosome)。在某些噬菌体 DNA 的复制过程中,引发体还包括一些辅助蛋白质,例如 ϕ X 174,它含有 6 个前引发蛋白(prepriming protein):Dna B、Dna C、Dna T、Pri A、Pri B 和 Pri C。Pri A 可识别引发体装配位点,与 Pri B 和 Pri C 一起结合其上,然后由 Dna T 引入 Dna B 和 Dna C,称为前引发体(preprimosome),加入 Dna G 后组成引发体。Dna T、Pri A、Pri B 和 Pri C 过去也曾称作 i 、 n 、 n' 和 n'' 蛋白。无论是哪一种引发体,都能依赖 ATP 沿复制叉运动方向在 DNA 链上移动,并合成冈崎片段的 RNA 引物。引物的合成方向与复制叉前进的方向正好相反。DNA 聚合酶 III 在模板链上合成冈崎片段,遇到上一个冈崎片时即停止合成, β 亚基随即脱离 DNA 链。可能正是此停顿成为合成 RNA 引物的信号,由引物合成酶沿反方向合成引物,并被 β 夹子带到核心酶上,开始又一个冈崎片段的合成。

3. 复制的终止

细菌环状染色体的两个复制叉向前推移,最后在终止区(terminus region)相遇并停止复制,该区含有多个约 22 bp 的终止子(terminator)位点。大肠杆菌有 6 个终止子位点,分别称为 *ter* A - *ter* F。与 Ter 位点结合的蛋白质称为 Tus(terminus utilization substance)。Tus - ter 复合物只能阻止一个方向的复制叉前移,即不让对侧复制叉超过中点后过量复制。在正常情况下,两个复制叉前移的速度是相等的,到达终止区后就都停止复制;然而如果其中一个复制叉前移受阻,另一个复制叉复制过半后,就受到对侧 Tus - ter 复合物的阻挡,以便等待前一复制叉的汇合。这就是说,终止子的功能对于复制来说并不是必需的,它只是使环状染色体的两半边各自复制。因为两半边的基因方向也正好是相反的,如果让复制叉超过中点后继续复制就可能与转录方向对撞。

两个复制叉在终止区相遇而停止复制,复制体解体,其间大约仍有 50 ~ 100 bp 未被复制。其后两条亲代链解开,通过修复方式填补空缺。此时两环状染色体互相缠绕,成为连锁体(catenane)。此连锁体在细胞分裂前必须解开,否则将导致细胞分裂失败,细胞可能因此死亡。大肠杆菌分开连锁环需要拓扑异构酶 IV(属于类型 II 拓扑异构酶)参与作用。该酶两个亚基分别由基因 *par* C 和 *par* E 编码。每次作用可以使 DNA 两链断开和再连接,因而使两个连锁的闭环双链 DNA 彼此解开(图 34-23)。其他环状染色体,包括某些真核生物病毒,其复制的终止相可能以类似的方式进行。

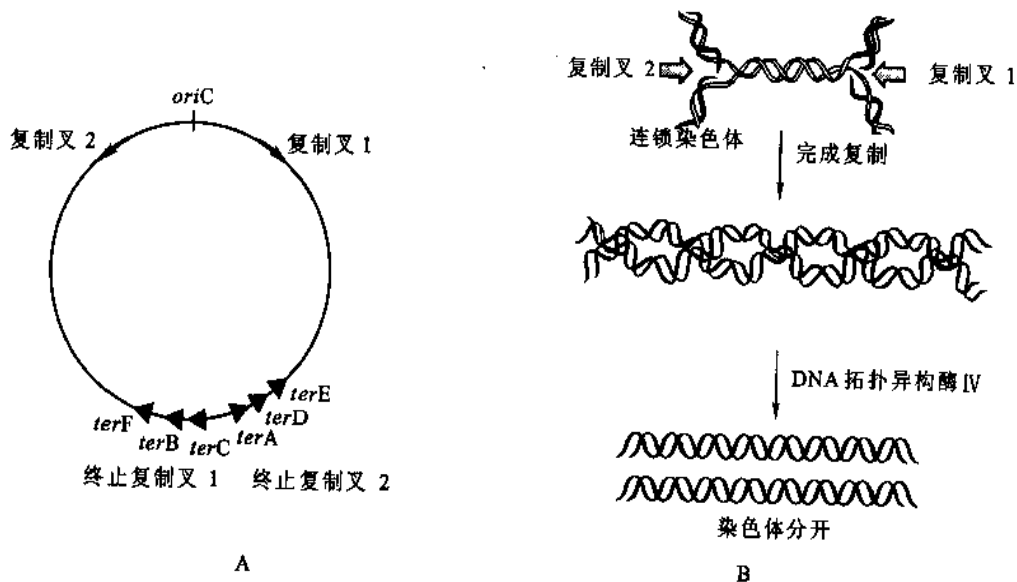


图 34-23 大肠杆菌染色体复制的终止

A. *ter* 位点在染色体上的位置 B. DNA 拓扑异构酶 IV 使连锁环状染色体解开

(七) 真核生物 DNA 的复制

真核生物的 DNA 通常都与组蛋白构成核小体,以染色质的形式存在于细胞核中, DNA 与组蛋白的重量比例约为 1:1。组蛋白主要有 5 种:即 H1、H2A、H2B、H3 和 H4。核小体的核心为 H2A、H2B、H3 和 H4 各

两分子组成的八聚体, DNA 在其上绕 1 又 4/5 圈, 约 146 bp。组蛋白 H1 结合在连接核小体之间的 DNA 间隔区上, 其长度随不同生物或不同基因区而变化。通常核小体 DNA 的长度变动在 156 ~ 260 bp 之间, 平均为 200 bp。由于 DNA 以左手螺旋方向绕在组蛋白核心上, 每形成一个核小体大致相当于引入 1.2 个负超螺旋。真核生物 DNA 复制的冈崎片段长约 200 bp 左右, 相当于一个核小体 DNA 的长度。

真核生物染色体有多个复制起点。酵母的复制起点已被克隆。它们称为自主复制序列 (autonomously replicating sequence, ARS), 或复制基因 (replicator)。酵母的 ARS 元件大约为 150 bp, 含有几个基本的保守序列。单倍体酵母有 17 个染色体其基因组约有 400 个复制基因。有一由 6 个蛋白质组成的复合物, 相对分子质量约为 400 000, 可结合其上, 称为起点识别复合物 (origin recognition complex, ORC)。它的结合要求 ATP。一些蛋白质与 ORC 作用, 并调节其功能, 从而影响着细胞周期。

5-氟脱氧尿苷 (floxuridine) 能够抑制胸腺嘧啶核苷酸的合成, 因而是 DNA 合成的强烈抑制剂。用 5-氟脱氧尿苷处理真核生物的培养细胞以抑制 DNA 的合成, 随后加入 ^3H -脱氧胸苷就可以使 DNA 复制同步化。复制进行大约 30 min, 然后制成 DNA 的放射自显影图像, 放在电子显微镜下观察, 可以看到很多复制眼, 每个复制眼都有独立的起点, 并呈双向延长 (图 34-8B)。通过测量和换算, 可以估计出复制子的大小。哺乳动物的复制子大多在 100 ~ 200 kb 之间。人的细胞有 23 对染色体, 单倍体基因组大约有 3×10^9 bp, 平均每个染色体有 1 000 个复制子。果蝇或酵母的复制子比较小, 平均为 40 kb。

真核生物 DNA 的复制速度比原核生物慢, 基因组比原核生物大, 然而真核生物染色体 DNA 上有许多复制起点, 它们可以分段进行复制。例如, 细菌 DNA 复制叉的移动速度为 50 000 bp/min, 哺乳类动物复制叉移动速度实际仅 1 000 ~ 3 000 bp/min, 相差约 20 ~ 50 倍, 然而哺乳类动物的复制子只有细菌的几十分之一, 所以从每个复制单位而言, 复制所需时间在同一数量级。真核生物与原核生物染色体 DNA 的复制还有一个明显的区别是: 真核生物染色体在全部复制完成之前起点不再从新开始复制; 而在快速生长的原核生物中, 起点可以连续发动复制。真核生物在快速生长时, 往往采用更多的复制起点。例如, 黑腹果蝇的早期胚胎细胞中相邻两复制起点的平均距离为 7.9 kb, 培养的成体细胞中复制起点的平均距离为 40 kb, 说明成体细胞只利用一部分复制起点。幼年细胞生长较快, DNA 复制也必须较快, 在复制速度不变的情况下利用更多复制起点便可以加速复制的进行。

真核生物有多种 DNA 聚合酶。从哺乳动物细胞中分出 5 种 DNA 聚合酶, 分别以 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 来命名。它们的性质列于表 34-5。真核生物 DNA 聚合酶和细菌 DNA 聚合酶的基本性质相同, 均以 4 种脱氧核糖核苷三磷酸为底物, 需 Mg^{2+} 激活, 聚合时必须要有模板和引物 $3' - \text{OH}$ 存在, 链的延伸方向为 $5' \rightarrow 3'$ 。

表 34-5 哺乳动物的 DNA 聚合酶*

	DNA 聚合酶 α (I)	DNA 聚合酶 β (IV)	DNA 聚合酶 γ (M)	DNA 聚合酶 δ (III)	DNA 聚合酶 ϵ (II)
定位	细胞核	细胞核	线粒体	细胞核	细胞核
亚基数目	4	1	2	2	>1
外切酶活性	无	无	$3' \rightarrow 5'$ 外切酶	$3' \rightarrow 5'$ 外切酶	$3' \rightarrow 5'$ 外切酶
引物合成酶活性	有	无	无	无	无
持续合成能力	中等	低	高	有 PCNA 时高	高
抑制剂	羟脲霉素	双脱氧 TTP	双脱氧 TTP	羟脲霉素	羟脲霉素
功能	引物合成	修复	线粒体 DNA 合成	核 DNA 合成	修复

* 酵母相应 DNA 聚合酶以括弧内罗马数字和 M 表示

细胞核染色体的复制由 DNA 聚合酶 α 和 DNA 聚合酶 δ 共同完成。DNA 聚合酶 α 为多亚基酶, 其中一个亚基具有引物合成酶活性, 最大的亚基具有聚合酶活性, 无外切酶活性的亚基。因该酶具有合成引物的能力, 过去以为它的功能是合成滞后链, 但是它无校正功能, 很难解释真核生物 DNA 复制何以具有高度忠实性。现在认为它的功能只是合成引物, 但在合成一小段 RNA 链后还可聚合 4 ~ 5 个寡聚脱氧核糖核苷酸。DNA 聚合酶 δ 既有持续合成 DNA 链的能力, 又有校正功能, 由它完成 DNA 复制。推测在复制叉

上有一个 DNA 聚合酶 α , 以合成引物; 两个 DNA 聚合酶 δ , 分别合成前导链和滞后链。DNA 聚合酶 δ 与一种称为增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的复制因子相结合, 该因子相对分子质量为 29 000。PCNA 相当于大肠杆菌 DNA 聚合酶 III 的 β 亚基, 它能形成环状夹子, 极大增加聚合酶的持续合成能力。

DNA 聚合酶 ϵ 可能相当于细菌的 DNA 聚合酶 I, 它是一种修复酶, 参与 DNA 的修补合成, 并存在于复制叉用以取代滞后链冈崎片段的引物。RNA 引物被 RNase H1 和 MF-1 核酸酶水解, 然后由 DNA 聚合酶 ϵ 填补缺口, DNA 连接酶 I 将冈崎片段相连接。DNA 聚合酶 β 是修复酶。DNA 聚合酶 γ 是线粒体的 DNA 合成酶。

在真核生物的 DNA 复制中, 另有两个蛋白质复合物参与作用。RP-A 是真核生物的单链 DNA 结合蛋白, 相当于大肠杆菌的 SSB 蛋白。RF-C 是夹子装置器 (clamp loader), 相当于大肠杆菌的 γ 复合物, 帮助 PCNA 因子安装到双链上以及拆下来, 它还促进复制体的装配。现将细菌和真核生物复制体的组成总结于表 34-6。

表 34-6 细菌和真核生物复制体的组成

组 成	细 菌	真 核 生 物
复制酶	DNA 聚合酶 III 全酶	DNA 聚合酶 α /DNA 聚合酶 δ
进行性因子	β 夹子	PCNA
定位因子	γ 复合物	RF-C
引物合成酶	Dna G	DNA 聚合酶 α (引物合成酶)
去除引物	RNase H 和 DNA 聚合酶 I	RNase H1 和 MF-1 (5'→3' 核酸外切酶)
滞后链修复	DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶	DNA 聚合酶 ϵ 和 DNA 连接酶 I
解螺旋酶	Dna B (定位需要 Dna C)	T 抗原
消除拓扑张力	旋转酶	拓扑异构酶 II
单链结合	SSB	RP-A

真核生物线性染色体的两个末端具有特殊的结构, 称为端粒 (telomere), 它是由许多成串短的重复序列所组成。该重复序列通常一条链上富含 G (G-rich), 而其互补链上富含 C (C-rich)。例如, 原生动物的四膜虫端粒的重复单位为 TTGGGG (仅列一条链的序列); 人的端粒为 TTAGGG。TG 链常比 AC 链更长些, 形成 3' 单链末端。端粒的功能为稳定染色体末端结构, 防止染色体间末端连接, 并可补偿滞后链 5' 末端在消除 RNA 引物后造成的空缺。原核生物的染色体是环状的, 其 5' 最末端冈崎片段的 RNA 引物被除去后可借助另半圈 DNA 链向前延伸来填补。但是真核生物线性染色体在复制后, 不能像原核生物那样填补 5' 末端的空缺, 从而会使 5' 末端序列因此而缩短。真核生物通过形成端粒结构来解决这个问题。复制使端粒 5' 末端缩短, 而端粒酶 (telomerase) 可外加重复单位到 5' 末端上, 结果维持端粒一定长度。

端粒酶是一种含有 RNA 链的逆转录酶, 它以所含 RNA 为模板来合成 DNA 端粒结构。通常端粒酶含有约 150 个碱基的 RNA 链, 其中含 1 个半拷贝的端粒重复单位的模板。如四膜虫端粒酶的 RNA 为 159 个碱基的分子, 含有 CAACCCCAA 序列。端粒酶可结合到端粒的 3' 末端上, RNA 模板的 5' 末端识别 DNA 的 3' 末端碱基并相互配对, 以 RNA 链为模板使 DNA 链延伸, 合成一个重复单位后酶再向前移动一个单位 (图 34-24)。端粒的 3' 单链末端又可回折作为引物, 合成其互补链。

在动物的生殖细胞中, 由于端粒酶的存在, 端粒一直保持着一定的长度。体细胞随着分化而失去端粒酶活性, 主要是因为编码该催化亚基的基因表达受到了阻遏。在缺乏端粒酶活性时, 细胞连续分裂将使端粒不断缩短, 短到一定程度即引起细胞生长停止或凋亡。组织培养的细胞证明, 端粒在决定细胞的寿命中起重要作用, 经过多代培养老化的细胞端粒变短, 染色体也变得不稳定。然而, 主要的肿瘤细胞中均发现存在端粒酶活性, 因此设想端粒酶可作为抗癌治疗的靶位点。

真核生物 DNA 复制的调节远比原核生物更为复杂。真核生物的细胞有多条染色体, 每一染色体上有多个复制起点, 所以是多复制子。它们的复制是时间控制的, 并不是所有起点都在同一时间被激活, 而是

有先有后。复制时间与染色质结构、DNA 甲基化以及转录活性有关。通常活性区先复制,异染色质区晚复制。复制是双向的,相邻两复制起点形成的复制叉相遇后借助拓扑异构酶而使子代分子分开。真核生物似乎没有复制终止子。

染色体复制在一个细胞周期中只发生一次,所有基因既无丢失,也不会过剩。这一机制被认为是复制许可因子(replication licensing factor)所控制。该因子为复制起始所必需,但一旦复制起始后它即被灭活或降解。由于该因子不能通过核膜,只能经有丝分裂在重建核结构时才能进入核内并作用于染色体的复制起点。这使其仅在在有丝分裂后期才能与复制起点相互作用。

真核生物的细胞周期可分为 DNA 合成前期(G_1 期)、DNA 合成期(S期)、DNA 合成后期(G_2 期)和有丝分裂期(M期)等四个时相(图 34-25)。间期的细胞(包括 G_1 、S 和 G_2 期)进行着复杂的生物化学变化,为 M 期进行准备,生物大分子和细胞器都在此时先后进行倍增。 G_1 期合成 DNA 复制所要求的蛋白质和 RNA,其中包括合成底物和 DNA 复制的酶系、辅助因子和起始因子等。在具备了 DNA 合成的必要条件后,细胞 DNA 才开始复制。首先复制的是常染色质 DNA,然后才发动异染色质 DNA 的复制。DNA 复制完成后即进入有丝分裂的准备期(G_2 期)。 S 、 G_2 和 M 期长短相对比较恒定, G_1 期变动较大。

在细胞分裂后,一部分细胞可再进入 G_1 期,开始第二个周期;另一些细胞失去了分裂的能力,或者进行分化,或者进入静止状态即 G_0 期。成年动物组织大部分细胞处于 G_0 期。 G_0 期细胞一旦解除对增殖的抑制,即又进入细胞周期的 G_1 期。细胞周期受 cdk-周期素复合物的控制,cdk(cyclin-dependent kinase)为依赖于周期素的激酶。在这里有关蛋白质的磷酸化和去磷酸化起着重要的调节作用。详细内容参看细胞周期调节部分。

二、DNA 的损伤修复

DNA 在复制过程中可能产生错配。DNA 重组,病毒基因的整合,更常常会局部破坏 DNA 的双螺旋结构。某些物理化学因子,如紫外线、电离辐射和化学诱变剂等,都能作用于 DNA,造成其结构与功能的破坏,从而引起生物突变,甚而导致死亡。然而在一定条件下,生物机体能使其 DNA 的损伤得到修复。这种修复是生物在长期进化过程中获得的一种保护功能。

造成 DNA 损伤的原因可能是生物因素、物理因素或是化学因素;可能来自细胞内部,也可能来自细胞外部;受到破坏的可能是 DNA 的碱基、糖或是磷酸二酯键。总之,DNA 的正常双螺旋结构遭到破坏,就可能影响其功能。目前已经知道,细胞对 DNA 损伤的修复系统有五种:错配修复(mismatch repair)、直接修复(direct repair)、切除修复(excision repair)、重组修复(recombination repair)和易错修复(error-prone repair)。

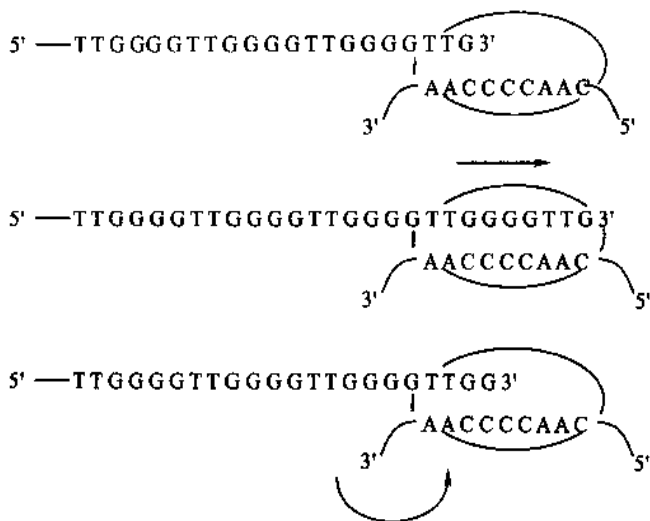


图 34-24 端粒酶以自身携带的 RNA 为模板合成 DNA 的 3' 末端

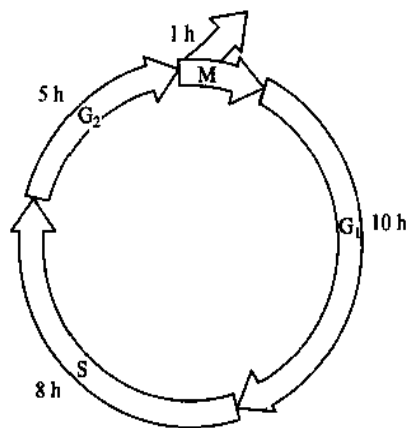


图 34-25 哺乳动物培养细胞各周期阶段的持续时间

(一) 错配修复

早在 1895 年, Alfred Warthin 的女佣告诉他, 她将得癌症而早死, 因为她家庭中许多人都死于癌症。不久她的预感得到应验, 她死于子宫癌。Warthin 对她的家族进行了研究, 发现确实存在高发癌症的倾向; 许多成员患结肠癌、胃癌或子宫癌。其后的研究表明, 这是一种遗传性疾病, 称为遗传性非息肉结肠直肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 或 Lynch 综合征 (syndrome)。其实, 它并不罕见, 200 人中可有 1 人受其影响。现在了解到 HNPCC 是由于 DNA 错配修复有缺陷而造成的。人类的两个基因, 即 *hMSH2* 和 *hMLH1*, 发生突变被认为是导致癌症的主要遗传诱因。

DNA 的错配修复机制是在对大肠杆菌的研究中被阐明的。DNA 在复制过程中发生错配, 如果新合成链被校正, 基因编码信息可得到恢复; 但是如果模板链被校正, 突变就被固定。细胞错配修复系统能够区分“旧”链和“新”链。Dam 甲基化酶可使 DNA 的 GATC 序列中腺嘌呤 N⁶ 位甲基化。复制后 DNA 在短期内 (数分钟) 为半甲基化的 GATC 序列, 一旦发现错配碱基, 即将未甲基化的链切除, 并以甲基化的链为模板进行修复合成。

大肠杆菌参与错配修复的蛋白质至少有 12 种, 其功能或者是区分两条链, 或者是进行修复过程。其中几个特有的蛋白由 *mut* 基因编码。Mut S 二聚体识别并结合到 DNA 的错配碱基部位, Mut L 二聚体与 Mut S 结合。二者组成的复合物可沿 DNA 双链向两方向移动, DNA 由此形成突环。水解 ATP 提供的能量驱使复合物移动, 直至遇到 GATC 序列为止。随后 Mut H 核酸内切酶结合到 Mut SL 上, 并在未甲基化链 GATC 位点的 5' 端切开。如果切开处位于错配碱基的 3' 侧, 由核酸外切酶 I 或核酸外切酶 χ 沿 3'→5' 方向切除核酸链; 如果切开处位于 5' 侧, 由核酸外切酶 ν 或 Rec J 沿 5'→3' 方向切除核酸链。在此切除链的过程中, 解螺旋酶 II 和 SSB 帮助链的解开。切除的链可长达 1 000 个核苷酸以上, 直到将错配碱基切除 (图 34-26)。新的 DNA 链由 DNA 聚合酶 III 和 DNA 连接酶合成并连接。为了校正一个错配碱基, 不仅需要找出错配碱基本身, 还要从远在 1 kb 以外找出 GATC 序列, 找出未甲基化的“新链”, 加以切除可能长达 1 000 个核苷酸以上的核酸链, 然后再合成新链, 这是一个十分耗能的过程, 由此可以看出维持基因信息的完整性对于生物是何等重要。

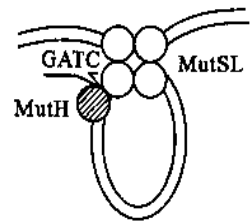


图 34-26 DNA 的错配修复

真核生物的 DNA 错配修复机制与原核生物大致相同。人类的 *hMSH2* (human Muts homolog2) 和 *hMLH1* (human MutL homolog1) 基因编码的蛋白质能够识别错配碱基和 GATC 序列, 与大肠杆菌对应的 Mut S 和 Mut L 一样, 其余过程也都有对应的成分来完成。

(二) 直接修复

紫外线照射可以使 DNA 分子中同一条链两相邻胸腺嘧啶碱基之间形成二聚体 (\widehat{TT})。这种二聚体是由两个胸腺嘧啶碱基以共价键联结成环丁烷的结构而形成的 (图 34-27)。其他嘧啶碱基之间也能形成类似的二聚体 (\widehat{CT} 、 \widehat{CC}), 但数量较少。嘧啶二聚体的形成, 影响了 DNA 的双螺旋结构, 使其复制和转录功能均受到阻碍。

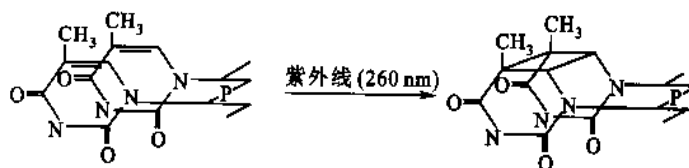


图 34-27 胸腺嘧啶二聚体的形成

胸腺嘧啶二聚体的形成和修复机制研究得最多, 也最清楚。其修复有多种类型, 常见的有光复活修复 (photoreactivation repair) 和暗修复 (dark repair)。最早发现细菌在紫外线照射后立即用可见光照射, 可以显

著提高细菌存活率。稍后一些时间了解到光复活的机制是可见光(最有效波长为 400 nm 左右)激活了光复活酶(photoreactivating enzyme),它能分解由于紫外线照射而形成的嘧啶二聚体(图 34-28)。

光复活作用是一种高度专一的直接修复方式。它只作用于紫外线引起的 DNA 嘧啶二聚体。光复活酶在生物界分布很广,从低等单细胞生物一直到鸟类都有,而高等的哺乳类却没有。这种修复方式在植物中特别重要。高等动物更重要的是暗修复,即切除含嘧啶二聚体的核酸链,然后再修复合成。

另一种直接修复的例子是 O^6 -甲基鸟嘌呤的修复。在烷化剂作用下碱基可被烷基化,并改变了碱基配对的性质。甲基化的鸟嘌呤在 O^6 -甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase)作用下,可将甲基转移到酶自身的半胱氨酸残基上。甲基转移酶因此而失活,但却成为其自身基因和另一些修复酶基因转录的活化物,促进它们的表达。

(三) 切除修复

所谓切除修复,即是在一系列酶的作用下,将 DNA 分子中受损伤部分切除掉,并以完整的那一条链为模板,合成出切去的部分,然后使 DNA 恢复正常结构的过程。这是比较普遍的一种修复机制,它对多种损伤均能起修复作用。切除修复包括两个过程:一是由细胞内特异的酶找到 DNA 的损伤部位,切除含有损伤结构的核酸链;二是修复合成并连接。

细胞内有许多种特异的 DNA 糖苷酶(glycosylase),它们能识别 DNA 中不正常的碱基,而将其水解下来。例如,在 DNA 复制过程中聚合酶对 dTTP 和 dUTP 的分辨能力是不高的,因此常有少量脱氧尿苷酸掺入到 DNA 链中去。大肠杆菌的 dUTP 酶可以分解 dUTP 成 dUMP,但是它的作用有限,仍然不能完全避免 dUTP 的混入。而且,胞嘧啶脱氨基后也会转变成尿嘧啶。对于 DNA 链上出现的这些尿嘧啶,细胞中的尿嘧啶-N-糖苷酶可以把它除去。腺嘌呤脱氨基后形成次黄嘌呤,这一不正常的碱基可被次黄嘌呤-N-糖苷酶切掉。无嘌呤(apurinic)或无嘧啶位点(aprimidinic site)常称为 AP 位点。烷化剂可使碱基被修饰,如甲基磺酸甲酯作用于 DNA 可引起鸟嘌呤第 7 位氮原子,或腺嘌呤第 3 位氮原子甲基化。糖苷酶可识别并除去烷基化碱基。另一些糖苷酶可识别其他的碱基缺陷。AP 位点也可由 DNA 的碱基被修饰后造成 N-糖苷键不稳定而自发水解产生;酸也能使 DNA 脱嘌呤。

一旦 AP 位点形成后,即有 AP 核酸内切酶在 AP 位点附近将 DNA 链切开。不同 AP 核酸内切酶的作用方式不同,或在 5'侧切开,或在 3'侧切开。然后核酸外切酶将包括 AP 位点在内的 DNA 链切除。DNA 聚合酶 I 兼有外切酶活性,并使 DNA 链 3'端延伸以填补空缺,DNA 连接酶将链连上。在 AP 位点必须切除若干核苷酸后才能进行修复合成,细胞内没有酶能在 AP 位置直接将碱基插入,因为 DNA 合成的前体物质是核苷酸而不是碱基。

通常只有单个碱基缺陷才以碱基切除修复(base-excision repair)方式进行修复。如果 DNA 损伤造成 DNA 螺旋结构较大变形,则需要以核苷酸切除修复(nucleotide-excision repair)方式进行修复。最常见的是短片段的修复(short-patch repair);只有多处发生严重的损伤才会诱导长片段修复(long-patch repair)。损伤链由切除酶(excinuclease)切除。该酶也是一种核酸内切酶,但在链的损伤部位两侧同时切开,与一般的核酸内切酶不同。编码此酶的基因是 *uvr* 基因,由多个亚基组成。大肠杆菌 ABC 切除酶包括三种亚基:Uvr A(相对分子质量 104 000)、Uvr B(相对分子质量 78 000)和 Uvr C(相对分子质量 68 000)。由 Uvr A 和 Uvr B 蛋白组成复合物(A_2B),它寻找并结合在损伤部位。Uvr A 二聚体随即离解,留下 Uvr B 与 DNA 牢固结合。然后 Uvr C 蛋白结合到 Uvr B 上,Uvr B 切开损伤部位 3'侧第 5 个磷酸二酯键,Uvr C 切开 5'侧第 8 个磷酸二酯键。结果 12~13 个核苷酸片段(决定于损伤碱基是 1 个还是 2 个)在 Uvr D 解螺旋酶帮助下被除去,

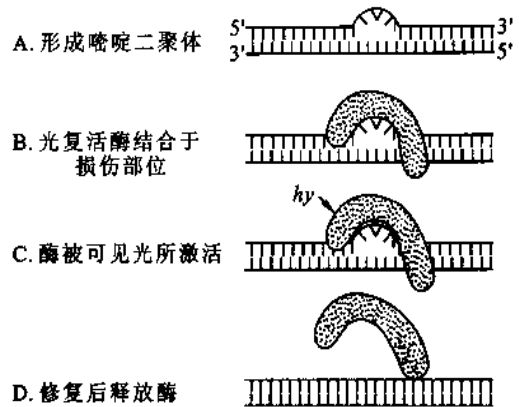


图 34-28 紫外线损伤的光复活过程

空缺由 DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶填补。人类和其他真核生物的酶水解损伤部位 3' 侧第 6 个磷酸二酯键以及 5' 侧第 22 个磷酸二酯键, 切除 27 至 29 个核苷酸片段, 然后用 DNA 聚合酶 E 和 DNA 连接酶填补空缺。

切除酶可以识别许多种 DNA 损伤, 包括紫外线引起的嘧啶二聚体和其他光反应产物, 碱基的加合物, 如 DNA 暴露于烟雾中形成的苯并芘鸟嘌呤等。真核生物具有功能上类似的切除酶, 但在亚基结构上相差较远。切除修复过程可总结如图 34-29 所示。

由此可见, 切除修复作用是一种普遍的功能, 它并不局限于某种特殊原因造成的损伤, 而能一般地识别 DNA 双螺旋结构的改变, 对遭到破坏而呈现不正常结构的部分加以去除。细胞的这种功能, 对于保护遗传物质 DNA, 使它不轻易被破坏, 是有很大的意义的。失去这种修复功能的细菌突变株, 即表现出容易被电离辐射和紫外线所杀死, 同样, 也提高了化学诱变剂的致死效应。

细胞切除修复系统和癌症的发生也有一定的关系。有一种称为着色性干皮病 (xeroderma pigmentosa) 的遗传病, 这种病患者对日光或紫外线特别敏感, 往往容易出现皮肤癌。经分析表明, 患者皮肤细胞中缺乏核苷酸切除修复有关的酶, 因此对紫外线引起的 DNA 损伤不能修复。这说明切除修复系统的障碍可能是癌症发生的一个原因。

DNA 的两条链序列互补, 这就是说两条链编码的信息相同, 当一条链受到损伤时可以用另一条链为模板进行修复。但在有些情况下无法为修复提供正确的模板, 例如, 双链断裂, 双链交联, 模板链遭损伤, 单链损伤而无正常互补链等。当复制叉遇到未修复的 DNA 损伤时, 正常复制过程受阻。这种情况将导致重组修复或易错修复。

(四) 重组修复

上述切除修复过程发生在 DNA 复制之前, 因此又称为复制前修复。然而, 当 DNA 发动复制时尚未修复的损伤部位也可以先复制再修复。例如, 含有嘧啶二聚体, 烷基化引起的交联和其他结构损伤的 DNA 仍然可以进行复制, 但是复制酶系在损伤部位无法通过碱基配对合成子代 DNA 链, 它就跳过损伤部位, 在下一个冈崎片段的起始位置或前导链的相应位置上重新合成引物和 DNA 链, 结果子代链在损伤相对处留下缺口。这种遗传信息有缺损的子代 DNA 分子可通过遗传重组而加以弥补, 即从同源 DNA 的母链上将相应核苷酸序列片段移至子链缺口处, 然后用再合成的序列来补上母链的空缺 (图 34-30)。此过程称为重组修复, 因为发生在复制之后, 又称为复制后修复 (postreplication repair)。

在重组修复过程中, DNA 链的损伤并未除去。当进行第二轮复制时, 留在母链上的损伤仍会给复制带来困难, 复制经过损伤部位时所产生的缺口还需通过同样的重组过程来弥补, 直至损伤被切除修复所消除。但是, 随着复制的不断进行, 若干代后, 即使损伤始终未从亲代链中除去, 而在后代细胞群中也被稀释, 实际上消除了损伤的影响。

参与重组修复的酶系统包括与重组有关的主要酶类以及修复合成的酶类。重组基因 *rec A* 编码一种相对分子质量为 38 000 的蛋白质, 它具有交换 DNA 链的活力。Rec A 蛋白被认为在 DNA 重组和重组修复中均起着关键的作用。基因 *rec BCD* 编码多功能酶 Rec BCD, 具有解螺旋酶、核酸酶和 ATP 酶活性, 使 DNA 在重组位点产生 3' 单链, 该酶亦为重组和重组修复所必需。修复合成需要 DNA 聚合酶和连接酶, 其作用如前所述。

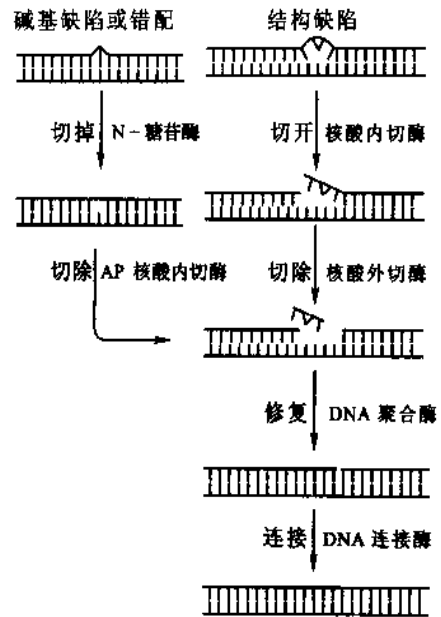


图 34-29 DNA 损伤的切除修复过程

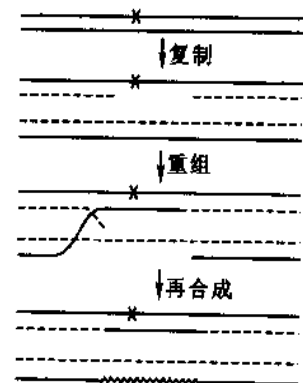


图 34-30 重组修复的过程
× 表示 DNA 链受损伤的部位 虚线表示通过复制新合成的 DNA 链 锯齿线表示重组后缺口处再合成的 DNA 链

重组修复机制缺陷,有可能导致癌症。业已发现,妇女的 *Brca 1* 和 *Brca 2* 两个基因如果有缺陷,80% 的概率可能会发生乳腺癌。实验表明,这两个基因编码的蛋白质 BRCA1 和 BRCA2 可以与重组蛋白 Rad 51 相作用,很可能是参与重组修复过程。

(五) 应急反应(SOS)和易错修复

前面介绍的 DNA 损伤修复功能可以不经诱导而发生。然而许多能造成 DNA 损伤或抑制复制的处理均能引起一系列复杂的诱导效应,称为应急反应(SOS response)。SOS 反应包括诱导 DNA 损伤修复、诱变效应、细胞分裂的抑制以及溶原性细菌释放噬菌体等等。细胞的癌变也可能与 SOS 反应有关。

早在 20 世纪 50 年代中,Weigle 就发现,用紫外线照射过的 λ 噬菌体感染事先经低剂量紫外线照射的大肠杆菌,存活的噬菌体数便大为增加,而且存活的噬菌体中出现较多的突变型(Weigle 效应)。如果感染的是未经照射的细菌,那么存活率和变异率都较低,可见这些效应是经紫外线照射后诱导产生的。

SOS 反应是细胞 DNA 受到损伤或复制系统受到抑制的紧急情况下,为求得生存而出现的应急效应。SOS 反应诱导的修复系统包括避免差错的修复(error free repair)和易产生差错的修复(error prone repair)两类。错配修复、直接修复、切除修复和重组修复能够识别 DNA 的损伤或错配碱基而加以消除,在它们的修复过程中并不引入错配碱基,因此属于避免差错的修复。SOS 反应能诱导切除修复和重组修复中某些关键酶和蛋白质的产生,使这些酶和蛋白质在细胞内的含量升高,从而加强切除修复和重组修复的能力。此外,SOS 反应还能诱导产生缺乏校对功能的 DNA 聚合酶,它能在 DNA 损伤部位进行复制而避免了死亡,可是却带来了高的变异率。SOS 的诱变效应与此有关。

DNA 聚合酶 I 具有 3'核酸外切酶活性而表现出校对功能,它在 DNA 损伤部位进行复制时,由于新合成链的核苷酸不能和模板链的碱基配对而被切除,再次引入的核苷酸如还不能配对仍将被切除,这样 DNA 聚合酶就会在原地打转而不前进,或是脱落下来使 DNA 链的合成中止。SOS 诱导产生 DNA 聚合酶 IV 和 V,它们不具有 3'核酸外切酶校正功能,于是在 DNA 链的损伤部位即使出现不配对碱基,复制仍能继续前进。在此情况下允许错配可增加存活的机会。

SOS 反应使细菌的细胞分裂受到抑制,结果长成丝状体。其生理意义可能是在 DNA 复制受到阻碍的情况下避免因细胞分裂而产生不含 DNA 的细胞,或者使细胞有更多进行重组修复的机会。

现在知道,SOS 反应是由 Rec A 蛋白和 Lex A 阻遏物相互作用引起的。Rec A 蛋白不仅在同源重组中起重要作用,而且它也是 SOS 反应最初发动的因子。在有单链 DNA 和 ATP 存在时,Rec A 蛋白被激活而促进 Lex A 自身的蛋白水解酶活性,Rec A 被称为辅蛋白酶(coprotease)。Lex A 蛋白(相对分子质量为 22 700)是许多基因的阻遏物。当它被 Rec A 激活自身的蛋白水解酶活性后自我分解,使一系列基因得以表达,其中包括紫外线损伤的修复基因 *uvr A*, *uvr B*, *uvr O*(分别编码切除酶的亚基),以及 *rec A* 和 *lex A* 基因本身,此外还有编码单链结合蛋白的基因 *ssb*,与 λ 噬菌体 DNA 整合有关的基因 *him A*,与诱变作用有关的基因 *umu DC*(编码 DNA 聚合酶 V)和 *din B*(编码 DNA 聚合酶 IV),与细胞分裂有关的基因 *sul A*, *ruv* 和 *lon* 以及一些功能还不清楚的基因 *din D*, *F* 等。SOS 反应的机制见图 34-31。

SOS 反应广泛存在于原核生物和真核生物,它是生物在不利环境中求得生存的一种基本功能。SOS 反应主要包括两个方面:DNA 修复和导致变异。在一般环境中突变常是不利的,可是在 DNA 受到损伤和复制被抑制的特殊条件下生物发生突变将有利于它的生存。因此 SOS 反应可能在生物进化中起着重要作用。然而,另一方面,大多数能在细菌中诱导产生 SOS 反应的作用剂,对高等动物都是致癌的:如 X 射线、紫外线、烷化剂及黄曲毒素等。而某些不能致癌的诱变剂却并不引起 SOS 反应,如 5-溴尿嘧啶。因此猜测,癌变可能是通过 SOS 反应诱变造成的。目前有关致癌物的一些简便检测方法即是根据 SOS 反应原理而设计的,因为在动物身上诱发肿瘤的试验需要花费较多人力、物力和较长的时间,而细菌的 SOS 反应则很易测定。

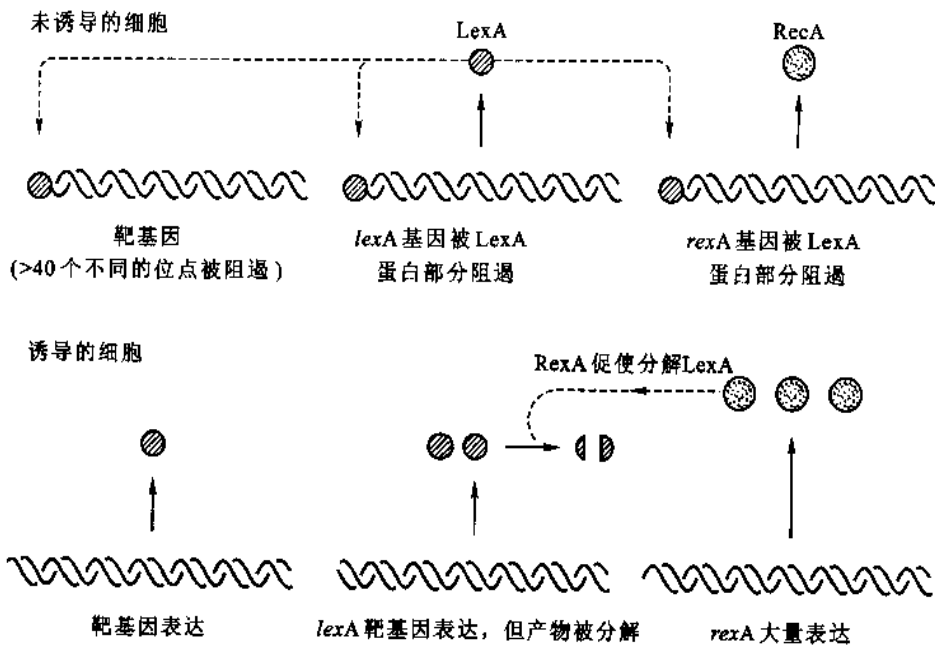


图 34-31 SOS 反应的机制

三、DNA 的突变

DNA 作为遗传物质有三个功能:一是通过复制将遗传信息由亲代传递给子代;二是通过转录使遗传信息在子代得以表达;三是通过变异在自然选择过程中获得新的遗传信息。变异是 DNA 的核苷酸序列改变的结果,它包括由于 DNA 损伤和错配得不到修复而引起的突变,以及由于不同 DNA 分子之间的交换而引起的遗传重组。

(一) 突变的类型

DNA 的编码序列发生改变就会引起突变或死亡,死亡是致死突变的结果。已知突变有以下几种类型:

1. 碱基对的置换(substitution)

DNA 错配碱基在复制后被固定下来,由原来的一个碱基对被另一碱基对所取代,又称为点突变。碱基对置换包括两种类型:一种称为转换(transition),即两种嘧啶之间互换,或两种嘌呤之间互换,这种置换方式最为常见。另一种称为颠换(transversion),在嘌呤与嘧啶之间,或嘧啶与嘌呤之间的互换。易错修复可以发生颠换。三联体密码子发生突变导致蛋白质中原来的氨基酸被另一种氨基酸取代,称为错义突变(missense mutation)。当氨基酸密码子变为终止密码子时,称为无义突变(nonsense mutation),它导致翻译提前结束而常使产物失活。

2. 移码突变(frameshift mutation)

由于一个或多个非三整倍数的核苷酸对插入(insertion)或缺失(deletion),而使编码区该位点后的三联体密码子阅读框架改变,导致后向氨基酸都发生错误,通常该基因产物会完全失活;如出现终止密码子则使翻译提前结束。

(二) 诱变剂的作用

在自然条件下发生的突变称为自发突变(spontaneous mutation)。自发的突变率是非常低的,大肠杆菌和果蝇的基因突变率都在 10^{-10} 左右。能够提高突变率的物理或化学因子称为诱变剂(mutagen)。许多诱变剂的作用机制已经清楚。最常见的诱变剂有以下几类:

1. 碱基类似物 (base analog)

与 DNA 正常碱基结构类似的化合物,也能在 DNA 复制时取代正常碱基掺入并与互补链上碱基配对。但是这些类似物易发生互变异构 (tautomerization),在复制时改变配对的碱基,于是引起碱基对的置换。所有碱基类似物引起的置换都是转换,而不是颠换。

5-溴尿嘧啶 (BU) 是胸腺嘧啶的类似物,在通常情况下它以酮式 (keto) 结构存在,能与腺嘌呤配对;但它有时以烯醇式 (enol) 结构存在,与鸟嘌呤配对 (图 34-32)。胸腺嘧啶也有酮式和烯醇式互变异构现象,但其烯醇式发生率极低。而 5-溴尿嘧啶中由于溴原子负电性很强,其烯醇式发生率要高得多,因此显著提高了诱变的能力。结果使 AT 对转变为 GC 对;而在相反的情况下使 GC 对转变成 AT 对。

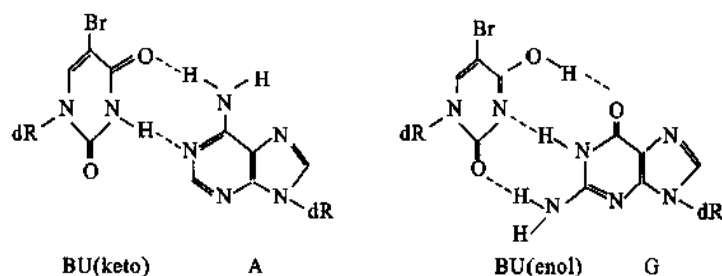


图 34-32 5-溴尿嘧啶的酮式和烯醇式具有不同配对性质

2-氨基嘌呤 (AP) 是腺嘌呤的类似物,正常状态下与腺嘌呤配对,但以罕见的亚氨基状态存在时却与胞嘧啶配对 (图 34-33)。因此,它能引起 AT 对转换为 GC 对,以及 GC 对转换为 AT 对。

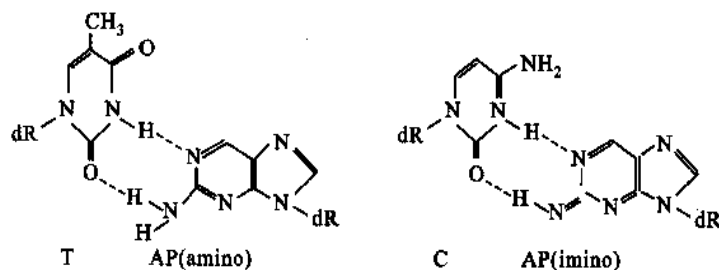


图 34-33 2-氨基嘌呤的不同配对性质

2. 碱基的修饰剂 (base modifier)

某些化学诱变剂通过对 DNA 碱基的修饰作用,而改变其配对性质。例如,亚硝酸能脱去碱基上的氨基。腺嘌呤脱氨后成为次黄嘌呤 (I),它与胞嘧啶配对,而不是与原来的胸腺嘧啶配对。胞嘧啶脱氨后成为尿嘧啶,它成为与腺嘌呤配对。DNA 经过两次复制后,分别由于腺嘌呤和胞嘧啶脱氨,而使 AT 对转换为 GC 对,或 GC 对转换为 AT 对。鸟嘌呤脱氨后成为黄嘌呤 (X),它仍与胞嘧啶配对,因此经过 DNA 复制后即恢复正常,并不引起碱基对置换。

羟胺 (NH_2OH) 与碱基作用十分特异,它只与胞嘧啶作用,生成 4-羟胺胞嘧啶 (HC),而与腺嘌呤配对,结果 GC 对变为 AT 对 (图 34-34)。

烷化剂 (alkylating agent) 是极强的化学诱变剂,其中较常见的包括氮芥 (nitrogen mustard)、硫芥 (sulfur mustard)、乙基甲烷磺酸 (ethyl methane sulfonate, EMS)、乙基乙烷磺酸 (ethylethane sulfonate, EES) 和亚硝基胍 (nitrosoguanidin, NTG) 等。烷化剂使 DNA 碱基上的氮原子烷基化,最常见的是鸟嘌呤上第 7 位氮原子的烷基化,引起分子电荷分布的变化而改变碱基配对性质,如 7-甲基鸟嘌呤 (MG) 与胸腺嘧啶配对 (图 34-34)。而直接与配对有关位置的烷基化可以完全阻断碱基配对。氮芥是二(氯乙基)胺的衍生物,硫芥是二(氯乙基)的硫醚,它们能使 DNA 同一条链或两条不同链上鸟嘌呤连接成二聚体。DNA 两条链的交联阻止了正常的修复,因此交联剂往往是强致癌剂。亚硝基胍在适宜条件下可使大肠杆菌每一个细胞都发生一个以上的突变,典型的变化是在 DNA 复制叉部位出现多个紧相靠近的一簇突变。因此精确控制培养条件

和加入亚硝基胍的时间与剂量可选择性地使细胞 DNA 特殊片段发生突变。此外,烷化后的嘌呤和脱氧核糖结合的糖苷键变得不稳定,容易使嘌呤脱落。N-糖苷酶也能将其水解除掉。

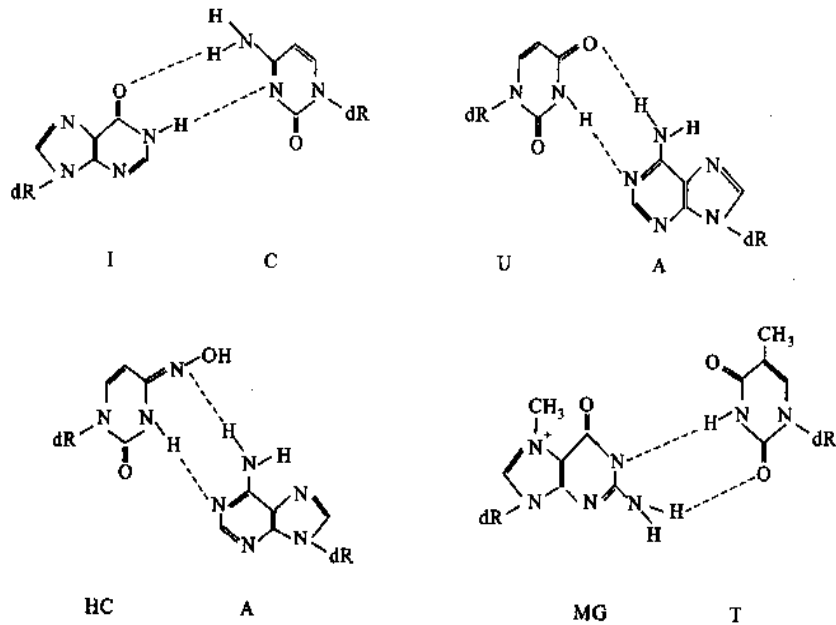


图 34-34 化学修饰剂改变碱基的配对性质

3. 嵌入染料 (intercalating dye)

一些扁平的稠环分子,例如吖啶橙 (acridine)、原黄素 (proflavine)、溴化乙锭 (ethidium bromide) 等染料,可以插入到 DNA 的碱基对之间,故称为嵌入染料。这些扁平分子插入 DNA 后将碱基对间的距离撑大约一倍,正好占据了一个碱基对的位置。嵌入染料插入碱基重复位点处可造成两条链错位。在 DNA 复制时,新合成的链或者增加核苷酸插入,或者使核苷酸缺失,结果造成移码突变。其可能的机制如图 34-35 所示。

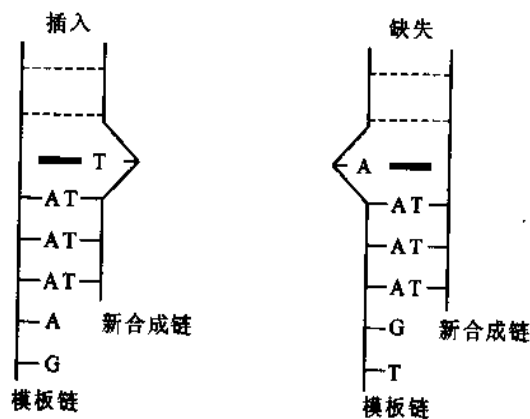


图 34-35 嵌入染料插入 DNA 引起移码突变的可能机制
嵌入染料以粗短线表示

4. 紫外线 (ultraviolet) 和电离辐射 (ionizing radiation)

紫外线的高能量可以使相邻嘧啶之间双键打开形成二聚体,包括产生环丁烷结构和 6-4 光产物 (6-4 photoproduct), 即一个嘧啶的第 6 位碳原子与相邻嘧啶第 4 位碳原子间的连接,并使 DNA 产生弯曲 (bend) 和纽结 (kink)。电离辐射 (如 X 射线、 γ 射线等) 的作用比较复杂,除射线直接效应外还可以通过水在电离

时所形成的自由基起作用(间接效应)。DNA链可以出现双链断裂或单链断裂的情况。大剂量照射时,还有碱基的破坏。紫外线和电离辐射都是强的诱变剂。

(三) 诱变剂和致癌剂的检测

医学和生物学的研究表明,人类癌症的发生是由于某些调节正常细胞分裂的基因缺陷或变异所致,这些基因包括原癌基因和抑癌基因。细胞生长失控就形成肿瘤,能转移的恶性肿瘤称为癌。控制细胞分裂的基因由于突变或肿瘤病毒的入侵而失去其调节功能,原癌基因成为癌基因,抑癌基因失去抑制细胞恶性生长的能力。因此,细胞癌变与修复机制的受损坏以及突变率的提高有关。

由于食品、日用品和环境中的诱变剂和致癌剂对人类健康十分有害,需要有效的方法将它们检测出来。Bruce Ames发明了一种简易的检测方法,称为Ames试验(Ames test)。该方法采用鼠伤寒沙门氏杆菌(*Salmonella typhimurium*)的营养缺陷型菌株,其组氨酸生物合成途径一个酶的基因发生突变而使酶失活,将该菌与待测物置于无组氨酸的平皿培养基中培养,如果待测物具有诱变作用,就可使营养缺陷型细菌因恢复突变而产生菌落,根据菌落的多少可判断诱变力的强弱。由Ames试剂和动物试验的结果发现,致癌物质中90%都有诱变作用,而诱变剂中90%有致癌作用。不少化合物需在体内经过代谢活化才有诱变作用,在测试时可将待测物与肝提取物一起保温,使其转化,这样可使潜在的诱变剂也能被检测出来。

大肠杆菌的SOS反应可以使处于溶原状态的 λ 噬菌体被激活,从而裂解宿主细胞产生噬菌斑。通常引起细菌SOS反应的化合物对高等动物都是致癌的。Devoret R根据此原理,利用溶原菌被诱导产生噬菌斑的方法来检测致癌剂,大大简化了检测方法。

提 要

生物系统的遗传信息主要贮存在DNA分子中,表现为特异的核苷酸排列顺序。DNA分子的两条链都含有合成它的互补链的全部信息,因此DNA能指导它自身的合成(即复制)。DNA的互补合成有两种:一是整个DNA分子的复制,通过复制得以将遗传信息由亲代传递给子代;二是DNA的局部修复,这对消除偶然引起的碱基改变,维持DNA的正常结构具有重要意义。碱基配对原理是遗传信息传递的基本机制。

DNA的复制是一个半保留的过程,即子代分子的一条链来自亲代,另一条链是新合成的。半保留复制保证了遗传信息的稳定性,这种稳定性是通过DNA的新陈代谢来维持的。

DNA的复制始于特殊的起点,双向或单向进行。原核生物的DNA和真核生物细胞器的DNA是单个复制子;真核生物染色体DNA是多复制子。原核生物和真核生物DNA的复制速度不同。DNA或是线性,或是环状;复制或是对称,或是不对称,这些状况的不同构成了DNA的不同复制方式。有些相对分子质量较小的环状DNA可以按滚动环或D环的方式复制。

最初由Kornberg从大肠杆菌中分离到的DNA聚合酶称为DNA聚合酶I,其后又发现DNA聚合酶II和III。它们的底物均为四种脱氧核苷三磷酸,反应并要求模板和引物。DNA链的合成方向为5'→3'。DNA聚合酶I除聚合酶活力外还有3'→5'核酸外切酶和5'→3'核酸外切酶活性。3'→5'核酸外切酶起着校对改错的功能。DNA聚合酶II和III也有3'→5'核酸外切酶活性,但聚合酶II和III无5'→3'外切酶活力。聚合酶I负责切除引物和修复,各结构域有其特殊功能;聚合酶II可能仅与修复有关;聚合酶III是真正的复制酶。聚合酶III有10种亚基,以不对称二聚体形式存在,共同作用使全酶功能具有忠实性,持续性和协调性。新近发现DNA聚合酶IV和V,这两个酶参与易错修复。

DNA复制时,一条链的合成方向与复制叉移动方向一致,称为前导链,其合成是连续的,另一条链的合成方向与复制叉移动方向相反,称为滞后链,其合成是不连续的,这种复制方式称为半不连续复制。不连续片段称为冈崎片段。冈崎片段的合成需要RNA引物。原核生物的冈崎片段约长1000~2000个核苷酸,真核生物的冈崎片段约长100~200个核苷酸。

DNA在复制过程中双链需解开。能引起DNA拓扑异构反应的酶为拓扑异构酶。原核生物拓扑异构酶II(旋转酶)可使DNA连续引入负超螺旋,每次反应改变DNA的连环数为 $\Delta L = -2$,反应需要由ATP供

给能量。负超螺旋有利于DNA双链的解开。拓扑异构酶I可消除负超螺旋,每次反应改变 $\Delta L = +1$,反应不需要供给能量。拓扑异构酶I和II共同控制着DNA的负超螺旋水平,从而影响其功能。拓扑异构酶III的作用与I类似,拓扑异构酶IV主要作用为分离DNA复制后形成的连锁体。真核生物的拓扑异构酶与原核生物有些不同。DNA解螺旋酶能通过水解ATP获得能量来解开DNA的双链。单链结合蛋白(SSB)可保护解开的单链。

DNA复制的生长点形状如同分叉故称为复制叉。为数众多的酶和蛋白质(至少50种以上)参与作用,所形成的复合物称为复制体。复制体的基本活动包括:①双链的解开;②RNA引物的合成;③DNA链的延长;④切除RNA引物,填补缺口,连接DNA片段;⑤切除和修复错配碱基。

DNA复制过程包括起始、延伸和终止三个阶段。复制起始Dna A蛋白在HU和RNA聚合酶帮助下识别并结合到起点上,解开富含AT区。Dna B、Dna C、旋转酶和SSB配合作用使双链解开。然后引物合成酶合成RNA引物,DNA聚合酶III合成DNA链。Dam甲基化酶在起始的调节控制中起关键性作用。在延伸阶段,前导链连续合成,滞后链分段合成,由 γ 复合物帮助 β 夹子将引物与模板带至生长点。在终止阶段,两复制叉又在终止区相遇,形成的连锁体由拓扑异构酶IV分开。终止子 ter 和终止蛋白Tus防止复制叉超过终止区过界复制。

真核生物的DNA通常都与组蛋白结合,构成核小体,以染色质的形式存在于细胞核中。复制过程需疏松染色质和解开核小体,复制后又需装配并凝缩成染色体,再分配到两个子细胞中去。核小体解开时,组蛋白八聚体并不散开,它们能以完整的八聚体形式与子代DNA链结合。真核生物有五种DNA聚合酶,DNA聚合酶 α 合成引物, δ 是复制酶, γ 是线粒体的合成酶, β 和 ϵ 是修复酶。真核生物染色体DNA的末端有端粒结构,端粒是由端粒酶合成的。真核生物DNA的复制受复制许可因子的控制。cdk-周期素对细胞周期起调控作用。

生物体内DNA的损伤在一定条件下可以修复。错配修复系统能够识别错配位点以及“新”“旧”链,将错配新链切除并加以修复。光复活是直接修复的一种方式,它分解紫外线引起的嘧啶二聚体,但是高等哺乳类没有。切除修复和重组修复是比较普遍的修复机制,它们对多种结构损伤和错配碱基起修复作用。这两种过程都有多种与DNA复制或重组有关的酶参与作用。

DNA损伤或抑制复制均能引起一系列复杂的诱导效应,称为应急反应(SOS)。SOS反应包括诱导修复、诱变效应、细胞分裂的抑制以及溶原细菌释放噬菌体等。SOS反应是由Rec A蛋白和Lex A蛋白相互作用引起的,并导致易错修复。引起SOS的作用剂通常具有致癌作用。

变异是DNA序列改变的结果。突变包括碱基对的置换和移码突变。某些物理化学因子能提高突变率,称为诱变剂。常见的诱变剂有碱基类似物、化学修饰剂、嵌入染料、紫外线和电离辐射等,它们的作用机制基本已经清楚。

突变会导致细胞癌变。修复机制缺陷或由SOS反应引起易错修复均会提高癌症的发病率。Ames试验通过沙门氏杆菌营养缺陷型的恢复突变来检测诱变剂。Devoret试验根据SOS反应可引起溶原细菌释放噬菌体的原理来检测致癌剂。

习 题

1. 生物的遗传信息如何由亲代传递给子代?
2. 何谓DNA的半保留复制?是否所有DNA的复制都以半保留的方式进行?(双链DNA通常都以半保留方式复制。)
3. 若使 ^{15}N 标记的大肠杆菌在 ^{14}N 培养基中生长三代,提取DNA,并用平衡沉降法测定DNA密度,其 ^{14}N -DNA分子与 ^{14}N - ^{15}N 杂合DNA分子之比应为多少?(1:3)
4. 比较DNA聚合酶I、II和III性质的异同。DNA聚合酶IV和V的功能是什么?有何生物学意义?
5. DNA复制的精确性、持续性和协同性是通过怎样的机制实现的?
6. 何谓DNA的半不连续复制?何谓冈崎片段?试述冈崎片段合成的过程。
7. DNA复制时双链是如何解开的?比较类型I和类型II拓扑异构酶的作用特点和生理功能。
8. 天然双链闭环DNA(cccDNA)的比超螺旋(σ)为 -0.05 ,复制时解螺旋酶将双链撑开,如果反应系统中无旋转酶,当比

超螺旋达到 +0.05 时, DNA 的扭曲张力将阻止双链解开, 此时已解开的双链占 DNA 分子的百分数是多少? (9.52%)

9. 何谓复制体? 试述其主要成分的功能。
10. DNA 的复制过程可分为哪几个阶段? 其主要特点是什么? 复制的起始是怎样控制的?
11. 真核生物 DNA 聚合酶有几种? 它们主要功能是什么?
12. 真核生物染色体 DNA 的端粒有何功能? 它们是如何合成的?
13. 哪些因素能引起 DNA 损伤? 生物机体是如何修复的? 这些机制对生物机体有何意义?
14. 何谓应急反应(SOS)和易错修复? 它们之间是什么关系? SOS 反应对生物机体有何意义?
15. 何谓突变? 突变与细胞癌变有何关系?
16. DNA 复制时两条链发生错配的概率是否相等? 两条链错配修复的概率是否相等?
17. 为什么引起 SOS 反应的化合物通常都是致癌剂?
18. 试述 Ames 试验的原理。

主要参考书目

1. Nelson D L, Cox M M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Lewin B. *Genes VI*. Oxford: Oxford University Press, 2000
3. Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, Inc. 1999
4. Weaver R F. *Molecular Biology*. McGraw-Hill Companies, 1999
5. 特怀曼 R M 著. 高级分子生物学要义. 陈淳, 徐沁等译. 北京: 科学出版社, 2000

(朱圣庚)

第 35 章 DNA 的重组

DNA 分子内或分子间发生遗传信息的重新组合,称为遗传重组(genetic recombination),或者基因重排(gene rearrangement)。重组产物称为重组体 DNA(recombinant DNA)。DNA 的重组广泛存在于各类生物。真核生物基因组间重组多发生在减数分裂(meiosis)时同源染色体之间的交换(crossover)。细菌及噬菌体的基因组为单倍体,来自不同亲代两组 DNA 之间可通过多种形式进行遗传重组。

DNA 重组对生物进化起着关键的作用。生物进化是生物随时间发生变化和多样化的过程。生物进化以不断产生可遗传的变异为基础。首先有突变和重组,由此产生遗传的变异,然后才有遗传漂变(genetic drift)和自然选择(natural selection),才有进化。可遗传变异的根本原因是突变。然而,突变的机率很低,而且多数突变是有害的。如果生物只有突变没有重组,在积累具有选择优势的突变同时不可避免积累许多难以摆脱的不利突变,有利突变将随不利突变一起被淘汰,新的优良基因就不可能出现。重组的意义在于,它能迅速增加群体的遗传多样性(diversity);使有利突变与不利突变分开(separation);通过优化组合(optimization)积累有意义的遗传信息。此外,DNA 重组还参与许多重要的生物学过程。它为 DNA 损伤或复制障碍提供修复机制。某些生物的基因表达受 DNA 重组的调节。生物发育过程也受到基因加工的控制。

DNA 重组包括同源重组(homologous recombination)、特异位点重组(site-specific recombination)和转座重组(transpositional recombination)等类型,以下分别介绍。

一、同源重组

同源重组又称为一般性重组(general recombination),它是由两条同源区的 DNA 分子,通过配对、链的断裂和再连接,而产生片段交换(crossing over)的过程。同源重组的最初证据来自细胞遗传学对减数分裂时染色体行为的研究。真核生物在形成配子时,细胞染色体进行一次复制,细胞核进行两次分裂,由此从双倍体细胞产生单倍体细胞,故称为减数分裂。在减数分裂前期,参与联会(synapsis)的同源染色体实际上已复制形成两条姊妹染色单体,从而出现由四条染色单体构成的四联体(tetrad)。在四联体的某些位置,非姊妹染色单体之间可以发生交换。光学显微镜可看到联会复合体中存在染色体交叉(chiasma)现象。Holliday 对遗传重组的可能机制成功提出了一个模型予以说明。在分子水平上了解重组过程是在细菌的研究中加以解决的。

(一) Holliday 模型

Robin Holliday 于 1964 年提出一个模型,对于认识同源重组起了十分重要作用(图 35-1)。在这一模型中,关键步骤有四个:①两个同源染色体 DNA 排列整齐;②一个 DNA 的一条链断裂并与另一个 DNA 对应的链连接,形成的连接分子(joint molecule),称为 Holliday 中间体(intermediate);③通过分支移动(branch migration)产生异源双链(heteroduplex)DNA;④ Holliday 中间体切开并修复,形成两个双链重组体 DNA。切开的方式不同,所得到的重组产物也不同。如果切开的链与原来断裂的是同一条链(见 Holliday 模型左边的产物),重组体含有一段异源双链区,其两侧来自同一亲本 DNA,称为片段重组体(patch recombinant)。但如切开的链并非原来断裂的链(模型右边产物),重组体异源双链区的两侧来自不同亲本 DNA,称为拼接重组体(splice recombinant)。

Holliday 模型能够较好解释同源重组现象,但也存在问题。该模型认为进行重组的两个 DNA 分子在开始时需要在对应链相同位置上发生断裂。DNA 分子单链断裂是经常发生的事,但很难设想两个分子何以能在同一位置发生断裂。Meselson M 和 Radding C 对此提出了修正意见,他们认为同源 DNA 分子中只有

一个分子发生单链断裂,随后单链入侵另一 DNA 分子的同源区,造成链的置换,被置换的链再切断并与最初断链连接,即形成 Holliday 中间体。但是更多的事实表明,重组是由双链断裂所启动。现在认为,同源重组是减数分裂的原因,而不是减数分裂的结果。DNA 分子双链断裂才能与同源分子发生链的交换,藉以将同源染色体分配到子代细胞中去。因此,双链断裂启动重组,也启动了减数分裂。

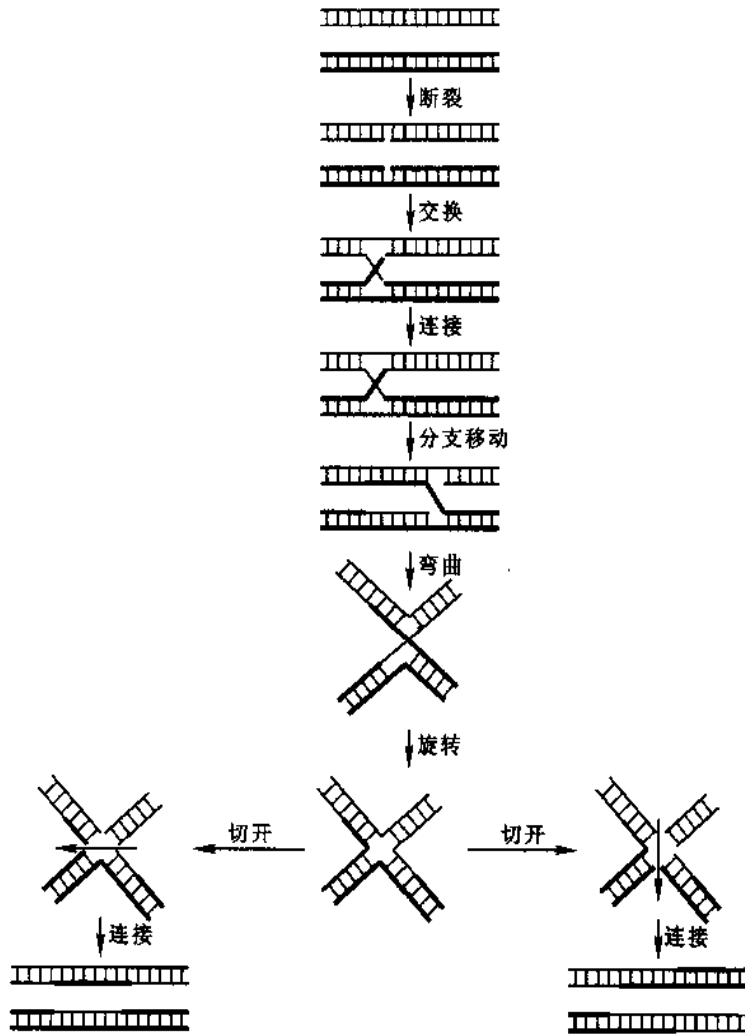


图 35-1 同源重组的 Holliday 模型两同源 DNA 分别以粗线和细线表示

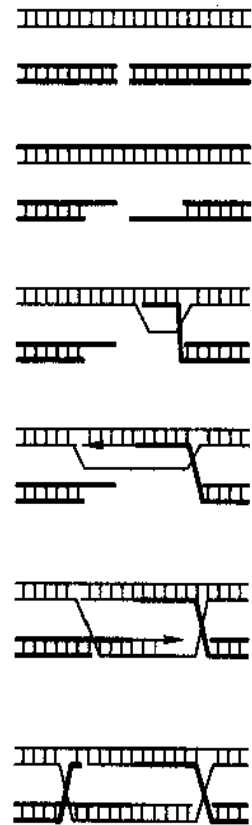


图 35-2 双链断裂启动重组

DNA 同源重组是一个十分精确的过程,哪怕只有一个核苷酸的差错都会造成基因失活。同源重组的分子基础是链间的配对,通过碱基配对才能找到正确位置,进行链的交换。当两同源 DNA 分子之一发生双链断裂,经核酸酶和解螺旋酶作用,产生具有 3'末端的单链,它在另一 DNA 分子的同源区寻找互补链并与之配对。相对应的链则被置换出来,与原来断裂的链配对。经修复合成和链的再连接,形成两个交叉,而不是单链交换时形成的一个交叉。值得注意的是,在两交叉之间,由交换和分支移动产生的是异源双链,而由修复合成产生的是同源双链(图 35-2)。实验表明,两 DNA 分子必需具有 75 bp 以上的同源区才能发生同源重组,同源区小于此数值将显著降低重组率。

在不同生物体内同源重组的具体过程可以有许多变化,但基本步骤大致相同。同源性并不意味着序列完全相同。两 DNA 分子只要含有一段碱基序列大体类似的同源区,即使相互间略有差异,仍然可以发生重组。同源重组是最基本的重组方式,它参与各种重要的生物学过程。复制、重组和重组修复三个过程是密切相关的,许多有关的酶和辅助因子也都是共用的。同源重组也在基因的加工、整合和转化中起着重要的作用。

(二) 细菌的基因转移与重组

细菌可以通过多种途径进行细胞间基因转移,并通过基因重组以适应随时改变的环境。这种遗传信息的流动不仅发生在种内,也发生在种间,甚至与高等动植物细胞之间也存在横向遗传传递(horizontal genetic transmission)。例如,从人体内寄生的细菌基因组中可以找到确定属于人类的基因。被转移的基因称为外基因子(exogenote),如果与内源基因组或称内基因子(endogenote)的一部分同源,就成为部分二倍体(partial diploid),这种情况下可以发生同源重组。细菌的基因转移主要有四种机制:接合(conjugation)、转化(transformation)、转导(transduction)和细胞融合(cell fusion)。进入受体细胞(recipient cell)的外源基因通常有四种结果:降解、暂时保留、与内源基因置换和发生整合。

1. 细菌的接合作用

细菌的细胞相互接触时遗传信息可以由一个细胞转移到另一个细胞,称为接合作用。供体细胞被定义为雄性,受体细胞为雌性。通过接合而转移 DNA 的能力是由接合质粒(conjugative plasmid)提供的,与接合功能有关的蛋白质均由接合质粒所编码。能够促使染色体基因转移的接合质粒称为致育因子(fertility factor),简称为性因子或 F 因子。大肠杆菌 F 质粒(F 因子)是研究得最多,也是研究得最清楚的一种接合质粒。

F 质粒是双链闭环的大质粒,总长约 100 kb,复制起点为 *ori V*。F 质粒可以在细胞内游离存在,也可以整合到宿主染色体内,因此属于附加体(episome)。其与转移有关的基因(*tra*)占据质粒的三分之一(~33 kb),称为转移区,包括编码 F 性菌毛(F pilus)、稳定接合配对、转移的起始和调节等,总共约 40 个基因。*tra A* 编码性菌毛单个亚基蛋白(pilin),由菌毛蛋白聚合形成中空管状的性菌毛,它的修饰和装配至少还要 12 个另外的 *tra* 基因参与作用。每一 F 阳性细胞大约有 2-3 条性菌毛。

接合过程由给体细胞 F 性菌毛接触受体细胞表面所启动。给体细胞不会与其他含 F 因子的细胞相接触,因为 *tra S* 和 *tra T* 基因编码表面排斥蛋白(surface exclusion protein),阻止同为 F 阳性细胞之间的相互作用。F 阳性细胞的性菌毛固着阴性细胞后,即通过回缩与拆装(disassemble)使两细胞彼此靠近。F 阳性细菌性菌毛的功能是识别和联结阴性细菌,它不是 DNA 转移的通道。DNA 转移需要 F⁺ 细胞的 Tra D 蛋白,它是一种内膜蛋白,可提供或成为转移的通道。Tra I 在 Tra Y 的帮助下结合到转移起点 *ori T* 上,切开一条链,并与 5' 末端形成共价连接。Tra I 兼有切口酶(nickase)和解螺旋酶的活性。游离的 5' 末端由此导入受体细胞。单链进入受体细胞后即合成出其互补链,结果 F⁻ 细胞转变为 F⁺ 细胞。给体细胞留下的 F 质粒单链也合成出互补链。

当整合在染色体 DNA 中的 F 质粒启动接合过程时,质粒转移起点被切开,其前导链引导染色体 DNA 单链转移。大肠杆菌全部染色体完成转移的时间约 100 min,其间配对的细胞如受外力作用而分开,转移的 DNA 即被打断,根据转移基因所需时间可以确定该基因在环状染色体上的位置,绘制出染色体的基因图。

给体单链 DNA 进入受体细菌后转变为双链形式,并可与受体染色体发生重组。外源基因的插入需要在两端分别形成交叉连接,即发生两个位点的重组。因此接合可以在细菌之间交换遗传物质。整合 F 因子的大肠杆菌菌株具有较高频率的重组(high-frequency recombination),称为 Hfr 菌株。F 因子可以整合在染色体不同位置,由此而得到不同的 Hfr 菌株,它们从不同位点开始转移基因。

整合的 F 因子引导染色体转移往往不能使受体细胞转变为 F⁺ 细胞。因为发生转移时,F 因子在转移起点(*ori T*)处切开单链,其 5' 端前导链引导染色体转移,F 因子的转移区(*tra* 基因)直至最后才转移,然而染色体很长,随时都会断裂而中止转移。整合的 F 因子可被切割出来,有时不精确切割使 F 因子带有若干宿主染色体基因,此时称为 F' 因子。使 F' 细胞与 F⁻ 细胞杂交,给体部分染色体基因随 F' 一起进入受体细胞,无需整合就可以表达,实际上形成部分二倍体,此时受体细胞也变成 F'。细胞基因的这种转移过程称为性导(sexduction)。

2. 细菌的遗传转化

遗传转化(genetic transformation)是指细菌品系由于吸收了外源 DNA(转化因子)而发生遗传性状的改

变现象。具有摄取周围环境中游离 DNA 分子能力的细菌细胞称为感受态细胞(competent cell)。很多细菌在自然条件下就有吸收外源 DNA 的能力(如固氮菌、链球菌、芽孢杆菌、奈氏球菌及嗜血杆菌等),虽然感受态经常是瞬时的,与特定的生理状态有关。

转化过程涉及细菌染色体上 10 多个基因编码的功能。例如,感受态因子(competence factor)、与膜联结的 DNA 结合蛋白(membrane-associated DNA binding protein)、自溶素(autolysin)以及多种核酸酶(nuclease)均参与感受态的形成。感受态因子可诱导与感受态有关蛋白的表达,其中包括自溶素,它使细胞表面的 DNA 结合蛋白和核酸酶裸露出来。当游离 DNA 与细胞表面 DNA 结合蛋白相结合后,核酸酶使其中一条链降解,另一条链则被吸收,并与感受态特异蛋白相结合,然后转移到染色体,与染色体 DNA 重组。不同细菌的转化途径不完全相同,也有细菌能吸收双链 DNA。细菌广泛存在自然转化现象,表明这是细菌遗传信息转移和重组的一种重要方式。

有些细菌在自然条件下不发生转化或转化效率很低,但在实验室中可以人工促使转化。例如大肠杆菌,用高浓度 Ca^{2+} 处理,可诱导细胞成为感受态,重组质粒得以高效转化。人工转化的机制目前还不十分清楚,可能与增加细胞通透性有关。实际上在自然条件下,除接合质粒外,一些小质粒也能在大肠杆菌细胞间转移,表明存在质粒穿过细胞被膜的途径。

3. 细菌的转导

转导(transduction)是通过噬菌体将细菌基因从供体转移到受体细胞的过程。转导有两种类型:普遍性转导(generalized transduction),是指宿主基因组任意位置的 DNA 成为成熟噬菌体颗粒 DNA 的一部分而被带入受体菌;局限性转导(specialized transduction),某些温和噬菌体在装配病毒颗粒时将宿主染色体整合部位的 DNA 切割下来取代病毒 DNA。在上述两种类型中,转导噬菌体均为缺陷型,因为都有噬菌体基因被宿主基因所取代。缺陷型噬菌体仍然将颗粒内 DNA 导入受体菌,前宿主的基因进入受体菌后即可与染色体 DNA 发生重组。

4. 细菌的细胞融合

在有些细菌的种属中可发生由细胞质膜融合导致的基因转移和重组。在实验室中,用溶菌酶除去细菌细胞壁的肽聚糖,使之成为原生质体,可人工促进原生质体的融合,由此使两菌株的 DNA 发生广泛的重组。

(三) 重组有关的酶

已经分离并鉴定了原核生物和真核生物促进同源重组各步骤有关的酶,研究最多的还是大肠杆菌的酶。在大肠杆菌中,Rec A 蛋白参与重组是最关键的步骤。Rec A 有两个主要的功能:诱发 SOS 反应和促进 DNA 单链的同化(assimilation)。所谓单链同化即是指单链与同源双链分子发生链的交换,从而使重组过程中 DNA 配对、Holliday 中间体的形成,分支移动等步骤得以产生。当 Rec A 与 DNA 单链结合时,数千 Rec A 单体协同聚集在单链上,形成螺旋状纤丝(helical filament)。Rec F、Rec O 和 Rec R 蛋白调节 Rec A 纤丝的装配和拆卸。

Rec A 蛋白相对分子质量为 38 000,它与单链 DNA 结合形成的螺旋纤丝每圈含六个单体,螺旋直径 10 nm,碱基间距 0.5 nm。此复合物可以与双链 DNA 作用,部分解旋以便阅读碱基序列,迅速扫描寻找与单链互补的序列。互补序列一旦被找到,双链进一步被解旋以允许转换碱基配对,使单链与双链中的互补链配对,同源链被置换出来(图 35-3)。链的交换速度大约为 6 bp/s,交换沿单链 5'→3'方向进行,直至交换终止,在此过程中由 Rec A 水解 ATP 提供反应所需能量。

任何部位的单链 DNA 都能借助 Rec A 蛋白与同源双链 DNA 进行链的交换。单链 DNA 可以由许多途径产生,Rec BCD 酶是产生参与重组的 DNA 单链主要途径。该酶的亚基分别由基因 *rec B*、*rec C* 和 *rec D* 编码。Rec BCD 酶具有三种酶活性:① 依赖于 ATP 的核酸外切酶活性,② 可被 ATP 增强的核酸内切酶活性,③ ATP 依赖的解螺旋酶活性。当 DNA 分子断裂时,它即结合在其游离端,使 DNA 双链解旋并降解,解旋所需能量由 ATP 水解供给。及至酶移动到 *chi* 位点(5'GCTGGTGG3'),在其 3'侧 4~6 个核苷酸处将链切开,产生具有 3'末端的游离单链。随后单链可参与重组各步骤。大肠杆菌基因组共有 1 009 个 *chi* 位点,

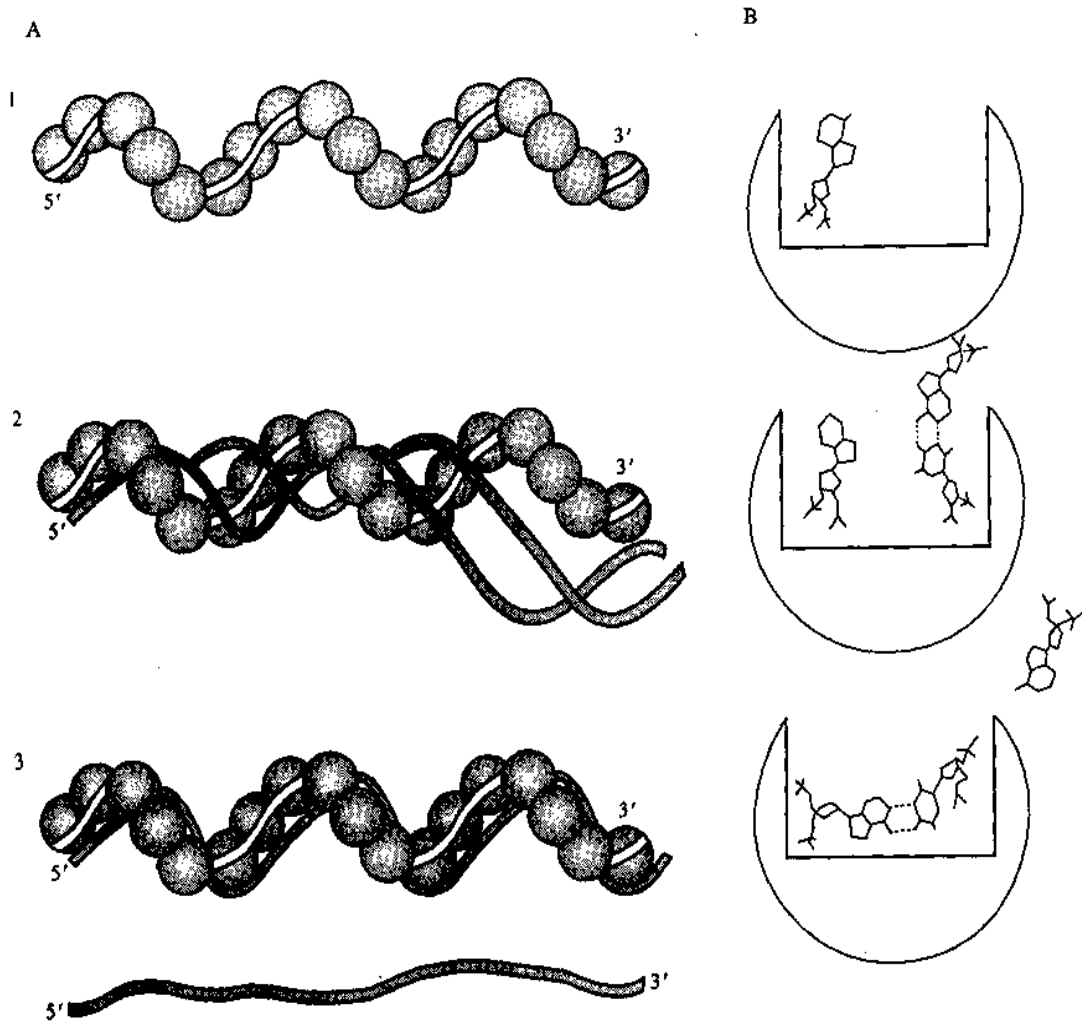


图 35-3 Rec A 蛋白介导的 DNA 链交换模型

- A. DNA 链交换的侧面观: 1. Rec A 蛋白与单链 DNA 结合; 2. 复合物与同源双链 DNA 结合; 3. 入侵单链与双链中的互补链配对, 同源链被置换出来
- B. DNA 链交换过程 Rec A 蛋白的横切面

分布在 DNA 各部位, 平均 5 kb 有一个, 成为重组热点。

由于 DNA 分子具有螺旋结构, 在持续进行链的交换时需要两 DNA 分子发生旋转。Rec A 能够介导单链绕入另一 DNA 分子, 并水解 ATP。一旦 Holliday 中间体形成, 即由 Ruv A 和 Ruv B 蛋白促进异源双链的形成。Ruv A 蛋白能够识别 Holliday 联结体(junction)的交叉点, Ruv A 四聚体结合其上形成四方平面的构象, 使得分支点易于移动, Ruv A 还帮助 Ruv B 六聚体环结合在双链 DNA 上, 位于交叉点上游。Ruv B 是一种解螺旋酶, 通过水解 ATP 而推动分支移动(图 35-4)。Ruv AB 复合物的移动速度约为 10~20 bp/s。

同源重组最后由 Ruv C 将 Holliday 联结体切开, 并由 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶进行修复合成。Ruv C 是一种核酸内切酶, 特异识别 Holliday 联结体并将其切开。它识别不对称的四核苷酸 ATTG, 此序列因而成为切开 Holliday 联结体的热点, 并决定结果是片段重组还是拼接重组, 即异源双链区两侧来自同一分子还是不同分子。

相当于原核生物中与重组有关酶的对物也已在真核生物中发现。在酿酒酵母中的 *rad 51* 基因与大肠杆菌 *rec A* 基因同源, 二者的功能有关。该基因突变造成双链断裂积累, 并且无法形成正常的联会复合物, 但此蛋白质不能在体外与单链 DNA 形成纤丝, 表明原核生物与真核生物的同源重组机制可能有所不同。

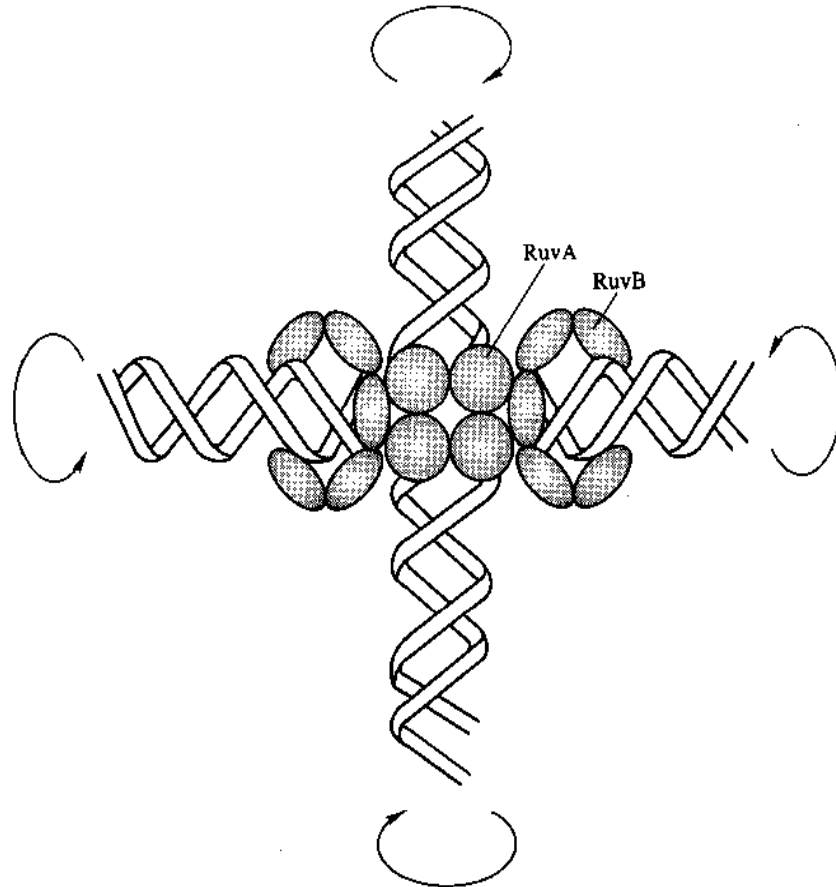


图 35-4 Ruv AB 复合物结合于 Holliday 联结体的模型

二、特异位点重组

特异位点重组广泛存在于各类细胞中,起着十分特殊的作用,彼此有很大的不同。它们的作用包括某些基因表达的调节,发育过程中程序性 DNA 重排,以及有些病毒和质粒 DNA 复制循环过程中发生的整合与切除等。此过程往往发生在一个特定的短的(20~200 bp)DNA 序列内(重组位点),并且有特异的酶(重组酶)和辅助因子对其识别和作用。特异位点重组的结果决定于重组位点的位置和方向。如果重组位点以相反方向存在于同一 DNA 分子上,重组结果发生倒位。重组位点以相同方向存在于同一 DNA 分子上,重组发生切除;在不同分子上,重组发生整合(图 35-5)。重组酶通常由 4 个相同的亚基组成,它作用于两个重组位点的 4 条链上,使 DNA 链断开产生 3'-磷酸基与 5'-羟基,3'-磷酸基与酶形成磷酸酪氨酸(phosphotyrosine)或磷酸丝氨酸(phosphoserine)键。这种暂时的蛋白质-DNA 连接可以在 DNA 链再连接时无需靠水解高能化合物(如 ATP)来提供能量。重组的两个 DNA 分子,如果先断裂两条链,交错连接,此时形成中间联结体;然后另两条链断裂并交错连接,使联结体分开。有些重组酶使 4 条链同时断裂并再连接,而不产生中间物。本节简要介绍噬菌体 DNA 的整合与切除,细菌的特异重组和免疫球蛋白基因重排。

1. λ 噬菌体 DNA 的整合与切除

最早研究清楚的特异位点重组系统是 λ 噬菌体 DNA 在宿主染色体上的整合与切除。 λ 噬菌体 DNA 进入宿主大肠杆菌细胞后存在溶原和裂解两条途径,二者的最初过程是相同的,都要求早期基因的表达,为溶原和裂解途径的歧化作好准备。两种生活周期的选择取决于 CI 和 Cro 蛋白相互拮抗的结果。CI 蛋白抑制除自身外所有噬菌体基因的转录,如果 CI 蛋白占优势,溶原状态就得到建立和维持。Cro 蛋白抑制 cI 基因的转录,它占优势噬菌体即进入繁殖周期,并导致宿主细胞裂解。 λ 噬菌体的整合发生在噬菌体和宿主染色体的特定位点,因此是一种特异位点重组。整合的原噬菌体随宿主染色体一起复制并传递给后

代。但在紫外线照射或升温等因素诱导下,原噬菌体可被切除下来,进入裂解途径,释放出噬菌体颗粒。

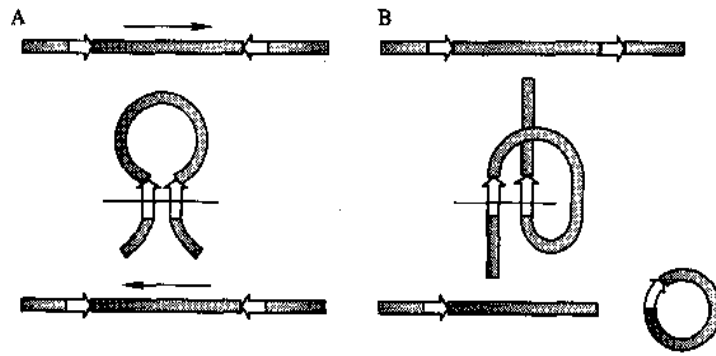


图 35-5 特异位点重组的结果依赖于重组位点的位置和方向
重组位点以白箭头表示。A. 重组位点反方向位于同一 DNA 分子,重组结果发生倒位。B. 重组位点同方向位于同一 DNA 分子,重组发生切除;位于不同分子,重组发生整合

λ 噬菌体与宿主的特异重组位点 (recombination site) 称为附着位点 (attachment site)。删除实验确定噬菌体的附着位点 (*att P*) 长度为 240 bp, 细菌相应的附着位点 (*att B*) 只有 23 bp, 二者含有共同的核心序列 15 bp (O 区)。噬菌体 *att P* 位点的序列以 POP' 表示, 细菌 *att B* 位点以 BOB' 表示。整合需要的重组酶 (recombinase) 由 λ 噬菌体编码, 称为 λ 整合酶 (λ integrase, Int), 此外还需要由宿主编码的整合宿主因子 (integration host factor, IHF) 协助作用。整合酶作用于 POP' 和 BOB' 序列, 分别交错 7 bp 将两 DNA 分子切开, 然后交互再连接, 噬菌体 DNA 被整合, 其两侧形成新的重组附着位点 BOP' 和 POB' (图 35-6)。在此过程中不需要水解 ATP 提供能量。因为整合酶的作用机制类似于拓扑异构酶 I, 它催化磷酸基转移反应, 而不是水解反应, 故无能量丢失。在切除反应中, 需要将原噬菌体两侧附着位点联结到一起, 因此除 Int 和 IHF 外, 还需要噬菌体编码的 Xis 蛋白参与作用。

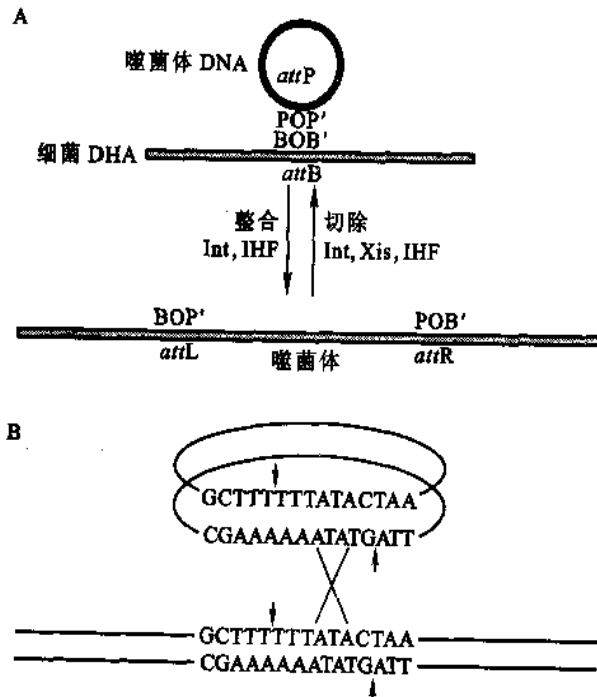


图 35-6 λ 噬菌体 DNA 在宿主染色体靶位点的整合与切除
噬菌体的附着位点 (*att P*) 与细菌附着位点 (*att B*) 之间有 15 bp 共同的序列 (O), 整合后在被整合噬菌体 DNA 两侧产生两个新的附着位点 (*att R* 和 *att L*)。(A) 为整合和切除过程;(B) 为共同的核心序列

2. 细菌的特异位点重组

鼠伤寒沙门氏杆菌 (*Salmonella typhimurium*) 由鞭毛蛋白决定的 H 抗原有两种, 分别为 H1 鞭毛蛋白和 H2 鞭毛蛋白。从单菌落的沙门氏菌中经常能出现少数呈另一 H 抗原的细菌细胞, 这种现象称为鞭毛相转变 (phase variation)。遗传分析表明, 这种抗原相位的改变是由一段 995 bp 的 DNA, 称为 H 片段 (H segment), 发生倒位所决定。

H 片段的两端为 14 bp 特异重组位点 (*hix*), 其方向相反, 发生重组后可使 H 片段倒位。H 片段上有两个启动子 (P), 其一驱动 *hin* 基因表达; 另一取向与 *H2* 和 *rH1* 基因一致时驱动这两基因表达, 倒位后 *H2* 和 *rH1* 基因不表达。*hin* 基因编码特异的重组酶, 即倒位酶 (invertase) Hin。该酶为 22 000 亚基的二聚体, 分别结合在两个 *hix* 位点上, 并由辅助因子 Fis (factor for inversion stimulation) 促使 DNA 弯曲而将两 *hix* 位点联结在一起, DNA 片段经断裂和再连接而发生倒位。*rH1* 表达产物为 H1 阻遏蛋白, 当 *H2* 基因表达时, *H1* 基因被阻遏; 反之, *H2* 基因不表达时, *H1* 基因才得以表达 (图 35-7)。

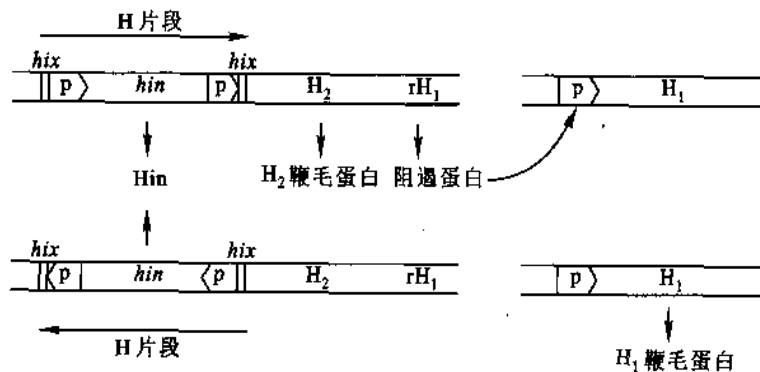


图 35-7 沙门氏菌 H 片段倒位决定鞭毛相转变

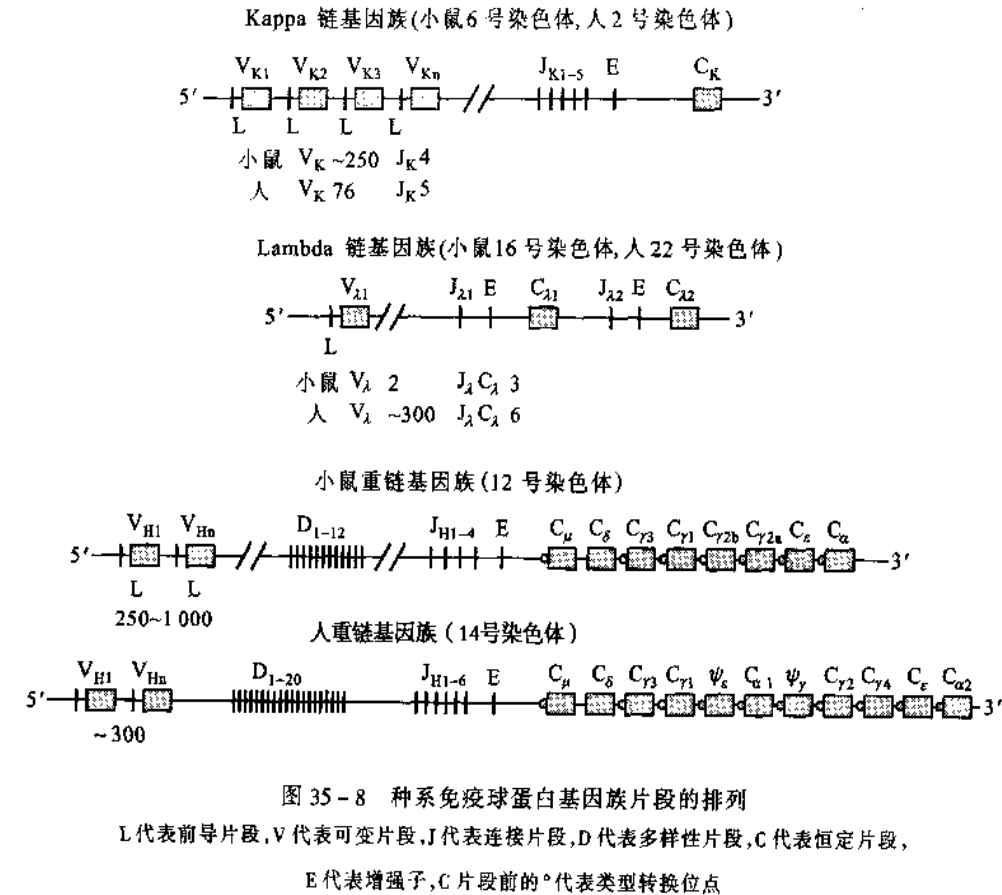
hix 为 14 bp 的反向重复序列, 它们之间的 H 片段可在 Hin 控制下进行特异位点重组 (倒位)。H 片段上有两个启动子, 其一驱动 *hin* 基因表达, 另一正向时驱动 *H2* 和 *rH1* 基因表达, 反向 (倒位) 时 *H2* 和 *rH1* 不表达。*rH1* 为 III 阻遏蛋白基因, P 代表启动子

噬菌体 Mu 的 G 片段, 噬菌体 P1 的 C 片段, 分别由倒位酶 Gin 和 Cin 控制发生倒位, 并决定噬菌体的宿主范围, 其作用机制与沙门氏菌鞭毛相转变类似。Hin、Gin 和 Cin 与转座子 Tn3 解离酶结构同源, 属于同一家族。

3. 免疫球蛋白基因的重排

脊椎动物和人的淋巴细胞在其成熟过程中抗体基因的重排, 是有关基因重排研究中一个最重要的实例。按照 Burnet F M 的克隆选择学说, 每一个浆细胞只能产生一种或几种抗体, 无数由淋巴细胞分化而来的浆细胞就能产生无数种类的抗体分子。抗体分子也即免疫球蛋白 (Ig), 由两条轻链 (L 链) 和两条重链 (H 链) 组成, 它们分别由三个独立的基因族 (gene family) 所编码, 其中两个编码轻链 (κ 和 λ), 一个编码重链。小鼠的 κ 、 λ 和重链分别位于第 6、16 和 12 号染色体上。决定轻链的基因族上分别有 L、V、J、C 四类基因片段。L 代表前导片段 (leader segment), V 代表可变片段 (variable segment), J 代表连接片段 (joining segment), C 代表恒定片段 (constant segment)。决定重链的基因族上共有 L、V、D、J、C 五类基因片段, 其中 D 代表多样性片段 (diversity segment)。在 J 和 C 片段之间存在增强子 (enhancer)。

抗体基因可通过倍增和歧化来增加其数量, 在种系 (germ line) 中基因数目有较大变动, 因此难于确定。抗体各链基因的 V 片段约有数百个, J 片段 4~6 个。小鼠 λ 链基因 V 片段数异常少, 可能是其在过去曾遭剧变而丢失大部分的 V 片段。轻链的恒定区只 1 个, 但 λ 链每个 J 片段都与其本身 C 片段相连。重链基因除 V 片段、J 片段外, 还有 10~30 个 D 片段, 并有多个恒定区 (C 片段) 以决定抗体的效应功能, 即抗体的类型和亚类型。小鼠 IgH 的基因恒定区存在 8 个 C 片段。人的 IgH 的基因恒定区 C 片段依次为: C_{μ} 、 C_{δ} 、 $C_{\gamma 3}$ 、 $C_{\gamma 1}$ 、 ψC 、 $C_{\alpha 1}$ 、 $\psi \gamma$ 、 $C_{\gamma 2}$ 、 $C_{\gamma 4}$ 、 C_{ϵ} 、 $C_{\alpha 2}$ (其中 ψC 和 $\psi \gamma$ 是两个无活性的假基因), 它们分别相当于免疫球蛋白 IgM、IgD、IgG3、IgG1、IgA1、IgG2、IgG4、IgE 和 IgA2。小鼠和人种系抗体基因片段的排列如图 35-8 所示。



除淋巴细胞外,所有细胞免疫球蛋白基因族的结构都是相同的,称为种系结构,只有骨髓干细胞在分化为成熟 B 淋巴细胞的过程中才出现免疫球蛋白基因的体细胞重排(somatic rearrangement)。利根川进(Tonegawa S)揭示了抗体基因重排机制,因而获得 1987 年诺贝尔生理学 and 医学奖。在 B 细胞分化过程中,首先出现免疫球蛋白基因位移,然后才进行重排。重排具有严格的顺序,第一次重排发生在前 B 细胞中,最先由编码免疫球蛋白重链的基因族片段参与重排,使在种系中相互分离的片段经重排后连接在一起,称为 V-D-J 连接。其间, D 片段与 J 片段先连接,接着 V 片段加到 D-J 上,形成 V-D-J 复合体。重排中选择的片段是随机的,片段之间序列在重排中被删除。重链重排后接着是轻链 κ 链基因重排,形成 V-J 复合体。只有 κ 链基因重排失败,才发动 λ 链基因重排,故抗体中大部分轻链是 κ 链, λ 链只占少部分。淋巴细胞在繁殖过程中还发生体细胞突变,以增加抗体的多样性。

单个 B 淋巴细胞只产生一种抗体基因,因此是单特异性的(mono specific)。由于淋巴细胞是二倍体,因而 H 链、 κ 链和 λ 链都有两个等位基因族,然而重排表现出等位基因排斥(allelic exclusion),即两个等位基因中只发生一个等位基因重排。二者之中何者重排是随机的,但只要一个等位基因发生重排,另一等位基因即受到抑制,不再发生重排。轻链基因重排还表现出同型性排斥(isotypic exclusion),即 κ 链和 λ 链基因只有一种轻链基因发生重排。

重链(IgH)基因的 V-D-J 重排和轻链(IgL)基因的 V-J 重排均发生在特异位点上。在 V 片段的下游, J 片段的上游以及 D 片段的两侧均存在保守的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)。该信号序列都由一个共同的回文七核苷酸(CACAGTG)和一个共同的富含 A 九核苷酸(ACA AAA ACC),中间为固定长度的间隔序列,或为 12 bp,或为 23 bp。间隔长度也是一种识别信号,重组只发生在间隔为 12 bp 与间隔为 23 bp 的不同信号序列之间,称为 12-23 规则。重链基因 V 片段的信号序列间隔为 23 bp, D 片段两侧信号序列间隔为 12 bp, J 片段信号序列的间隔为 23 bp,而且信号序列总是以七核苷酸一端与基因片段相连,12 与 23 两信号序列的方向相反。因此,在 V-D-J 连接中不会发生连接错误。同样,在轻链基因中, V 片段和 J 片段与不同信号序列相连,只能在它们之间发生连接。

此重排的重组酶基因 *rag* (recombination activating gene) 共有两个,分别产生蛋白质 RAG1 和 RAG2。RAG1 识别信号序列,包括 12/23 间隔以及七核苷酸和九核苷酸信号,然后 RAG2 加入复合物,九核苷酸提供最初的识别位点,七核苷酸为切割位点。RAG1/RAG2 复合物在接头的一条链上切开一个缺刻,形成 3'-OH 和 5'-P 末端。游离的 3'-OH 基对双链的另一条链磷酸酯键发生攻击,在基因片段末端形成发夹结构。然后复合物进一步将发夹结构切开。单链切开的位置往往不是原来通过转酯反应连接的位置,多出的核苷酸与末端序列相同,但方向相反,称为 P 核苷酸。末端可以被外切酶删除一些核苷酸;也可以由脱氧核苷酸转移酶外加一些核苷酸,称为 N 核苷酸。最后两基因片段填平补齐并连接。在接头处随机插入和删除若干核苷酸可以增加抗体基因的多样性,然而插入或删除核苷酸的总数如不是 3 的倍数,就将改变阅读框架而使抗体基因失活,或许这是为增加抗体多样性所付出的代价。抗体基因片段的连接过程如图 35-9 所示。

抗体重链和轻链基因重排后转录成初级 mRNA 前体,经加工修饰产生成熟的 mRNA 并翻译成免疫球蛋白。第二次重排发生在成熟 B 细胞经抗原刺激后,这次重排出现重链基因改变恒定区,即类型转换,其抗原特异性不变。B 细胞分化至此称为浆细胞,它的特点是可以大量分泌抗体,并且是单特异性的抗体。重链基因 C 片段的转换发生在转换区 (switch region, S 区),该区位于 C 片段的 5' 端, S 区内存在成串的重序列,转换即 S_{μ} 与各 S 位点间的重组。C_δ 片段前无 S 区,故 IgM 与 IgD 通常都共表达。

T 淋巴细胞的受体有两类,一类是 $\alpha\beta$ 受体,一类是 $\gamma\delta$ 受体。 $\gamma\delta$ 受体只存在于缺失 α 、 β 链的 T 细胞和发育早期的 T 细胞; $\alpha\beta$ 受体出现于成熟的 T 细胞,是主要的 T 细胞受体。它们的基因重排与抗体基因重排十分类似,也存在 β 链与 γ 链的 V-D-J 连接和 α 链与 δ 链的 V-J 连接。

三、转座重组

转座因子 (transposable element) 是一种可以由染色体的一个位置转移到另外位置的遗传因子,也就是一段可以发生转座 (transposition) 的 DNA,又称为转座子 (transposon)。转座的位置通常或多或少是随机的。当转座子插入一个基因内时,该基因即失活,如果是重要的基因就可能细胞死亡。因此转座必须受到控制,并且频率都很低。转座子对基因组而言是一个不稳定因素,它可导致宿主序列删除、倒位或易位,并且其在基因组中成为“可移动的同源区”。位于不同位点的两个拷贝转座子之间可以发生交互重组,从而造成基因组不同形式的重排。有些转座子与基因组的关系犹如寄生,它们的功能只是为了自身的扩增与繁衍,因此被称为是自私的 DNA (selfish DNA)。

早在 20 世纪 40 年代,美国遗传学家 McClintock B 在研究玉米的遗传因子时发现,某些基因活性受到一些能在不同染色体间转移的控制因子 (controlling element) 所决定。这一发现与当时传统的遗传学观点相抵触,因而不被学术界所普遍接受。直到 60 年代后期,美国青年细菌学家 Shapiro J 在大肠杆菌中发现一种由插入序列 (insertion sequence, IS) 所引起的多效突变,之后又在不同实验室发现一系列可转移的抗药性转座子,才重新引起人们重视。1983 年 McClintock 被授予诺贝尔生理学与医学奖,距离她公布玉米控制因子的时间已有 32 年之久。

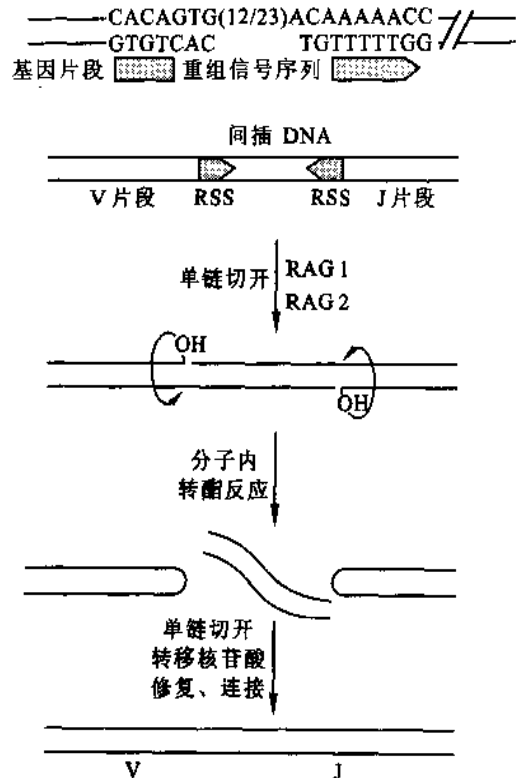


图 35-9 免疫球蛋白基因重排过程

(一) 细菌的转座因子

细菌的转座因子有两类：一类为插入序列 (IS)，是简单的转座子，除转座所需基因外不携带任何标记基因，它的存在只能借助插入位点有关基因的失活来判断，或者通过分子杂交和测序来检测。另一类是复杂转座子 (Tn)，除转座酶 (transposase) 基因外还携带各种标记基因，因而易于检测其存在。

1. 插入序列

插入序列是最小的转座因子。所有插入序列的两端都有反向重复 (inverted repeats)，反向重复为转座酶识别所需，通常重复序列长度为 15~25 bp。重复序列有时只是类似，并非完全相同。当插入序列转座时，宿主靶部位双链被交错切开，经修复后插入序列两侧形成短的正向重复 (direct repeats)。靶序列通常是任意的，但交错切开的长度，也就是正向重复的长度是固定的，一般常见到的正向重复为 5 bp 和 9 bp。在 DNA 序列分析时，常可根据末端重复来确定插入序列的位置。表 35-1 列出几种较常见的插入序列结构和性质。例如，某标准大肠杆菌菌株中含有 8 个拷贝 IS1，5 个拷贝 IS2。只存在于转座子中的插入序列称为类 IS 因子。

表 35-1 一些插入序列的结构和性质

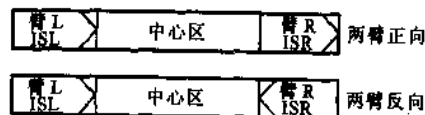
插入序列	长度/bp	两侧正向重复/bp	末端反向重复/bp	靶部位的选择
IS 因子				
IS1	768	9	23	随机
IS2	1 327	5	41	热点
IS4	1 428	11~13	18	AAAN ₂₀ TTT
IS5	1 195	4	16	热点
类 IS 因子				
IS10R	1 329	9	22	NGCTNAGCN
IS50R	1 531	9	9	热点
IS90R	1 057	9	18	随机

转座频率随不同转座因子而异，通常每一世代的转座频率为 10^{-3} 至 10^{-4} 而自发突变的频率为 10^{-5} 至 10^{-7} ，因此二者可以相区分。IS 被精确切除而使基因恢复活性的频率更低，约为 10^{-6} 至 10^{-10} 。

2. 转座子

转座子除编码转座功能有关的基因外还携带抗性或其他标记基因。转座子按其结构又分为两类：一类为组合因子 (composite element)，由个别模块组合而成，通常包括两个插入序列作为两臂，中间为标记基因。另一类为复合因子 (complex element)，含有转座酶基因、解离酶 (resolvase) 基因以及标记基因，两端为反向重复，无插入序列。

组合型的转座子很可能是通过一个插入序列的拷贝插在附近区域而形成的。两个插入序列中间夹着一段序列即可构成一个转座单位。每个插入序列两端为反向重复，因此，无论两插入序列处于正向还是反向位置，作为转座单位其两端均有可被转座酶识别的反向重复序列。如果两个插入序列正好位于抗性基因两侧，该转座单位携带的性状对宿主细胞是有利的，因而具有选择优势。组合转座子的两个插入序列以正向或反向 (更常见) 位于两端，它们的序列可以不完全相同，有时只有一个插入序列具有转座活性，另一个已在多次传代中失去活性。组合转座子的结构如下：



复合型的转座子以转座酶基因取代插入序列。TnA 家族即属于这一类型的转座子，其中包括 Tn3、Tn1、Tn1000 (过去称为 $\gamma\delta$) 和 Tn501 等。它们的两端通常有 38 bp 的反向重复，两侧为 5 bp 的正向靶序列。

Tn3 转座子中 *tnp A* 基因编码产物为 1 021 个氨基酸的转座酶, 相对分子质量为 120 000。*tnp R* 基因编码一个 185 个氨基酸的蛋白质, 相对分子质量为 23 000。它有两个功能: 一是其作为解离酶, 促使转座中间产物拆开; 另一是作为阻遏蛋白, 调节 *tnp A* 和 *tnp R* 两个基因的表达。解离的控制位点称为 *res*, 它位于左右转录单位间的 163 bp 富含 A-T 区。该区共有三个长 30~40 bp 的同源序列, Tnp R 蛋白即可结合其上。Tn3 的结构如下:



现将几种主要的转座子列于表 35-2。

表 35-2 一些转座子的结构和性质

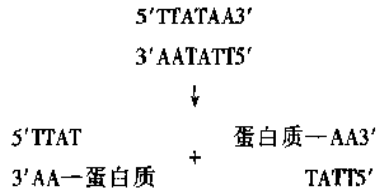
转座子	长度/bp	遗传标记	末端结构	两侧正向重复/bp	靶部位的选择
组合转座子(I类)					
Tn10	9 300	tet ^R	IS10R IS10L(低活性)	反向, 2.5% 差异	9 NGCTNAGCN
Tn5	5 700	kan ^R	IS50R IS50L(无活性)	反向, 差 1 bp	9 热点
Tn903	3 100	kan ^R	IS903	反向, 相同	9 随机
Tn9	2 500	cam ^R	IS1	正向, 相同	9 随机
复合转座子(II类)					
Tn3	4 957	amp ^R	38	5	区域优先
Tn1	5 000	amp ^R	38	5	区域优先
Tn1000(γδ)	5 800	amp ^R	37	5	区域优先
Tn501	8 200	Hg ^R	38	5	—

3. 转座过程与效应

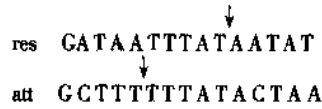
转座酶能够识别转座子的末端反向重复序列并且在其 3' 端切开, 同时在靶部位交错切开单链, 它的 5' 突出末端与转座子的 3' 末端连接, 形成 Shapiro 中间体。不同种类转座子形成与靶序列连接中间体的过程大致相同; 随后步骤各不一样。按其转座过程是否发生复制, 可分为非复制转座 (nonreplicative transposition) 和复制转座 (replicative transposition) 两类。非复制转座又称为保留性转座 (conservative transposition), 转座子从原来位置上切除下来转入新的位置, 其两条链均被保留。复制转座则在形成靶部位与转座子连接中间体后即进行复制。通过复制使原来位置与新的靶部位各有一个转座子, 其一条链是原有的, 另一条链是新合成的。复制转座使给体与受体分子连在一起, 成为共整合体 (cointegrate), 因此下一步必须通过重组将二者拆开。非复制转座与复制转座过程见图 35-10。

所有转座因子都有在基因组中增加其拷贝数的能力。此过程可以借助两种方式来完成: 一是通过转座过程的复制 (复制转座); 另一是从染色体已完成复制的部位转到尚未复制的部位, 然后随着染色体而复制。非复制转座的转座因子只能借后一种方式来扩增。

共整合体含有两个拷贝的转座子, 故可通过同源重组将连接的两部分分开。但是借助 Rec A 蛋白拆分效率较低。转座子编码的解离酶可在解离区 (*res*) 进行重组, 可极大提高解离效率。解离酶是一种重组酶, 它所催化 DNA 链的断开和再连接并不需要供给能量。当它在 *res* 位点断开两条链时, 解离酶以共价键连在链的 5' 末端。链的断裂发生在一个短的回文对称区:



这种情况与 λ 噬菌体 DNA 特异位点重组十分相似。λ 噬菌体整合位点 att 的核心序列与 res 位点有 15 bp 序列类似,其中 10 bp 相同。该序列为:



不同种类的转座子可能以不同的方式进行转座。IS1、IS903 通常以非复制的方式进行转座, TnA 家族总是以复制的方式进行转座,另一些转座子可以视不同情况而用两种方式之一进行转座。转座子有各种类型和亚类型,转座作用也是多种多样。

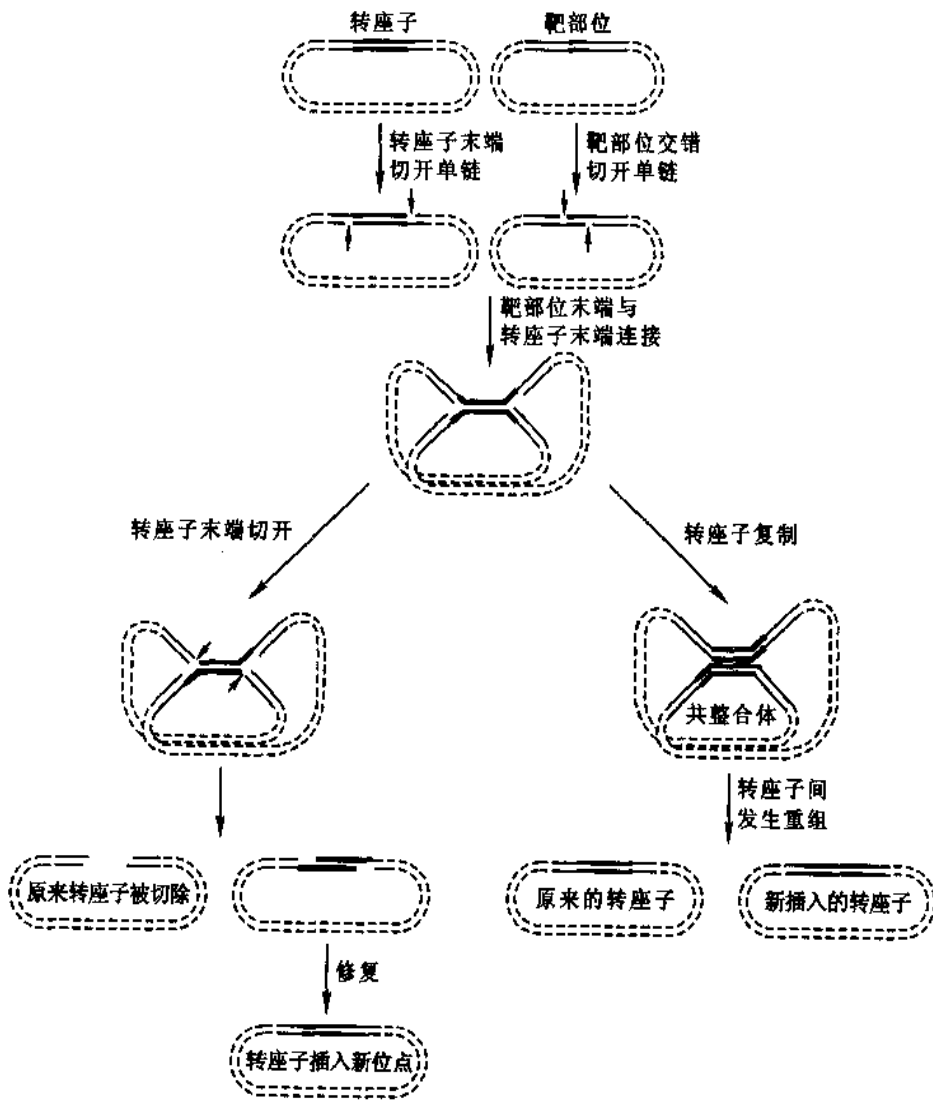


图 35-10 非复制转座与复制转座的基本过程

转座因子首先因其可导致突变而被认识。它插入基因后,使基因突变失活,这是转座作用最直接的效应。当转座因子自发插入细菌的操纵子时,即可阻止它所在基因的转录和翻译;并且由于转座因子带有

终止子,它的插入将影响到操纵子中其后基因的表达,因而表现出极性(polarity),也即方向性。由此构成的负突变只有在插入因子被切除后才能恢复。转座因子的存在,往往会引起宿主染色体 DNA 重组,造成染色体断裂、重复、缺失、倒位及易位等,是基因突变和重排的重要原因。转座因子也可通过干扰宿主基因与其调控元件之间的关系或转座因子本身的作用而影响邻近基因的表达,从而改变宿主的表型。

(二) 真核生物的转座因子

最早发现能转移的遗传因子是玉米转座子,它对染色体基因有不稳定的诱变效应,因而影响某些遗传性状,故称为控制因子。其后发现真核生物广泛存在各种转座因子。真核生物的转座因子与原核生物转座因子十分相似;转座依赖于转座酶,转座因子的两端有被转座酶识别的反向重复序列,转座的靶位点是随机的,靶位点交错切开,插入转座因子后经修复形成两侧正向重复序列。但是二者在结构和性质上也有一些差别。原核生物的转录和翻译几乎是同时进行的,真核生物由于核结构的存在而使此两过程在空间上和时间都被分隔开了。因此,真核生物细胞内只要存在转座酶,任何序列片段具有该酶识别的反向重复末端均可发生转移,而无需由被转移序列自身编码这些酶。这就可以说明,为什么真核生物的转座因子家族中只保留少数拷贝具有编码转座酶基因的活性,而多数拷贝中发生程度不同的删除,失去转座酶基因活性,但保留了两端的反向重复序列。原核生物的转座酶主要作用于产生它的转座因子,表现出顺式显性(cis dominance),真核生物则无此特性,这也是二者最明显的差别。

玉米中研究得比较清楚的控制因子有三个系统,激活-解离系统(activator-dissociation system, Ac-Ds),抑制-促进-增变系统(suppressor-promoter-mutator, Spm)和斑点系统(dotted, Dt)。激活因子 Ac 和解离因子 Ds 是属于同一家族的控制因子。Ac 是自主因子(autonomous element),它编码有活性的转座酶,能自主发生转座。Ds 是非自主因子(nonautonomous element),它与 Ac 同源,只是不同程度缺失了中间序列,从而丢失转座酶的功能。Ds 的存在能抑制邻近基因的表达。它本身不能转座,但有 Ac 存在时通过反式转座酶激活而转移到新的位置。真核生物转座因子通常以非复制方式转座,而且总是只转移到邻近的位置。玉米的 Ds 因子插入新靶位点后,原来位置上即失去 Ds 因子,结果可造成染色体断裂或重排,由此引起显性基因丢失,隐性基因得以表达。

Spm 和 En 因子除个别碱基不同外,二者基本一样,均为自主因子;其对应的非自主因子为 dSpm (defective Spm),即有缺陷的 Spm 因子。该家族的因子发生转座时可使靶位点的基因或被抑制,或被促进,这决定于插入的位置。插入的位置如果在一个基因的外显子中,可以在转录后通过拼接(splicing)除去,然而拼接过程留下的变化将会影响产物的性质。此外,Spm 产生的 TnpA 蛋白可以起抑制因子(suppressor)的作用,因其能结合在靶部位,阻止转录的进行。插入的位置如在一个基因附近,由于转座因子所携带增强子(enhancer)的影响,促进了靶位点基因的表达,Spm 缩写的含意也源于此。现将玉米几种主要转座因子的性质列于表 35-3。

表 35-3 玉米转座因子的性质

自主因子	非自主因子	反向末端重复	靶位点正向重复
Ac(activator)4.5 kb	Ds(dissociation)	11 bp	8 bp
Mp(modulator)			
Spm(suppressor-promoter-mutator)8.3 kb	dSpm	13 bp	3 bp
En(enhancer)			
斑点(dotted)	未取名	—	—

果蝇中也存在几个转座因子家族。P 因子是在对果蝇杂种不育(hybrid dysgenesis)现象的研究中发现的。黑腹果蝇的某些品系中含有 40~50 个 P 因子,而其他品系缺少 P 因子。自主的 P 因子为 2.9 kb,两端为 31 bp 的反向重复,优先的靶位点是 GGCCAGAC,两侧产生 8 bp 的正向重复。大约三分之二的 P 因子是缺陷的,中间序列有不同程度的删除,成为非自主因子。

杂种不育只发生在 P 品系雄性与 M 品系雌性果蝇之间。P 品系果蝇染色体携带 P 因子, M 品系不含 P 因子。当 P 雄性与 M 雌性果蝇杂交时, 子一代体细胞是正常的, 生殖细胞则发育不全, 因而无后代。研究表明, P 因子在体细胞和生殖细胞中 mRNA 前体的拼接方式不同。在其前体中共有 3 个内含子, 体细胞的拼接保留了第 3 个内含子, 因为有一蛋白质结合其上, 阻止该内含子的拼接。由此翻译的产物是一个相对分子质量为 66 000 的蛋白质, 它是转座反应的阻遏蛋白。而在生殖细胞中可以拼接除去全部内含子, 包括内含子 3, 翻译产物相对分子质量为 87 000 的转座酶。二者的这一差别, 使得 P 因子在体细胞中不能发生转座, 而在生殖细胞中转座十分活跃。转座因子插入新的位点可引起突变, 原来位置失去转座因子造成染色体断裂, 都会带来有害的效果。

如果改变交配亲本品系就不会造成后代不育。M 雄性与 M 雌性果蝇交配, 二者均不携带 P 因子, 当然不会有 P 因子转座。P 雄性或 M 雄性与 P 雌性果蝇交配, 因 P 雌性果蝇卵中存在抑制 P 因子转座酶成活性的蛋白质, 从而阻遏 P 因子的转座。这是一种细胞质效应, 由细胞质中存在的相对分子质量 66 000 蛋白质所致。

杂种不育在物种形成中可能是一个重要环节。如果某个地区的种群由转座因子造成杂种不育系统, 另一些因子在别的地区造成不同的系统。它们之间在遗传上将被隔开, 并且进一步分离。多个杂种不育系统就可能造成相互不配对, 并导致物种形成。

提 要

DNA 作为遗传物质, 具有保守性、变异性和流动性。DNA 重组增加了基因和基因组的多样性, 使有利突变和有害突变分离, 通过优化组合积累有意义的遗传信息。DNA 重组还参与许多重要的生物学过程: DNA 的复制与修复, 基因表达与细胞功能的调节, 生物发育与进化等。DNA 重组主要有同源重组、特异位点重组和转座重组三种方式。

同源重组是最基本的重组方式, 它通过链的断裂和再连接, 在两 DNA 分子同源序列间进行单链或双链片段的交换。Holliday 模型可以较好说明同源重组过程。其基本过程是在两同源 DNA 分子间对应部位单链断裂、交换连接、分支移动及切开修复。实际上同源重组是由一个 DNA 两条链断裂启动的, 它们分别与另一 DNA 同源区配对再发生链的交换连接。

细菌可以通过接合、转化、转导和细胞融合四种方式发生基因转移。接合作用有关蛋白质由接合质粒上各转移基因(*tra*)编码。DNA 的一条链发生转移, 随后再合成互补链。DNA 的转化由多个基因编码的蛋白质参与作用, 通常也是仅吸收一条链, 但有时双链 DNA 片段也能穿越细胞膜。噬菌体转导分普遍性转导和局限性转导两种类型。在某些因素的作用下细菌细胞可以发生融合。外源基因经上述过程进入宿主细胞后, 即可与宿主基因发生同源重组。

细菌参与 DNA 同源重组的酶至少有数十种, 许多酶和辅助因子与 DNA 复制和修复是共用的。最关键的是 Rec A 蛋白, 它能诱发 SOS 反应和促进 DNA 单链同化。许多 Rec A 与单链 DNA 结合形成螺旋纤维, 每圈含 6 个单体。此复合物可与双链 DNA 作用, 在找到同源区后即使单链与互补链配对, 而将同源链置换出来。Rec BCD 具有三种酶活性: 依赖于 ATP 的核酸外切酶, 可被 ATP 增强的核酸内切酶以及需要 ATP 的解螺旋酶。它遇到 *chi* 位点可在其下游切出 3' 末端的游离单链。Ruv B 是一种解螺旋酶, 在 Ruv A 的帮助下推动分支移动。Ruv C 可切开同源重组的中间体。已发现真核生物有相应的酶。

特异位点重组发生在特定位点内, 并有特异的酶(重组酶)参与作用。如果重组位点反向存在于同一 DNA 分子, 重组产生倒位; 重组位点正向存在于同一 DNA 分子, 重组发生切除, 存在于不同分子, 重组发生整合。重组酶通常由 4 个亚基组成, 可以与 DNA 磷酸基形成酪氨酸或丝氨酸键。

λ 噬菌体 DNA 的整合和切除是一种特异位点重组。噬菌体的重组位点 *att P* 与大肠杆菌的重组位点 *att B* 之间有 15 bp 核心序列相同。在整合酶(Int)、整合宿主因子(IHF)作用下发生整合; 切除还需 Xis 蛋白参与作用。

沙门氏杆菌鞭毛相转变由基因组 H 片段倒位所决定。H 片段的重组位点 *hix* 为 14 bp 的反向重复序

列,倒位酶 Hin 在辅助因子 Fis 帮助下使 H 片段发生倒位。

免疫球蛋白基因在淋巴细胞发育过程发生两次特异位点重组。首先是重链基因发生 V-D-J 重排,然后轻链(κ 或 λ)基因发生 V-J 重排。RAG1/RAG2 复合物识别信号序列,包括 12/23 间隔以及七核苷酸和九核苷酸,并在七核苷酸末端切开单链,形成发夹结构,然后连接基因片段,并填平补齐缺口。在此过程可随机插入和删除若干核苷酸以增加抗体基因多样性。第二次重排发生在成熟 B 细胞经抗原刺激后,由重链基因改变恒定片段,使抗体类型转换,但特异性不变。T 淋巴细胞受体基因也有类似的重组过程。

转座因子可以从染色体的一个位点转移到另一个位点。细菌的转座因子包括插入序列、组合型和复合型转座子。转座因子含有编码转座酶的基因,两端为反向重复,两侧为正向重复。插入序列不含标记基因,只能根据其靶位点基因插入失活或检测序列来判断它的存在。组合型转座子由两个插入序列中间夹一个标记基因所组成。复合型转座子不含插入序列但有转座酶基因、解离酶基因和标记基因。

转座过程可分为非复制转座和复制转座两种类型。借助转座酶将转座子两末端切开单链,并将靶位点交错切开单链,使二者连接。非复制转座将转座子两末端另一条单链也切开,转座子连到新的靶位点。复制转座经复制形成共整合体,然后由解离酶通过重组使两部分解开。解离酶既起重组酶的作用,也是一种阻遏蛋白。

转座因子具有不稳定诱变效应。转座可引起靶位点基因失活,并有极性即方向性。转座因子插入靶位点还可影响邻近基因的表达。转座因子作为可移动的同源区,通过重组造成基因组断裂、重复、删除、倒位及易位等一系列重排。

真核生物转座因子与原核生物类似。由于核结构的存在,转录和翻译被分隔开,顺式显性作用不复存在。真核生物转座因子家族通常只保少部分成员具有转座酶基因活性,多数有不同程度删除,因此同一家族可分为自主因子和非自主因子两类。

玉米的转座因子主要有三个系统:激活-解离系统(As-Ds),抑制-促进-增变系统(Spm-dSpm)和斑点系统(dotted)。Ac 是自主因子,能自主转座。Ds 是非自主因子,其转座依赖于 Ac 的存在。Ds 能抑制邻近基因的表达,其转座往往会引起染色体断裂和重排,并由于显性基因的丢失而使隐性基因得以表达。Spm/dSpm 因子插入新的位点可使靶位点基因或受抑制,或被促进,决定于插入在靶基因外显子中还是在基因附近位置。

果蝇的 P 因子能引起杂种不育。当 P 品系雄性和 M 品系雌性果蝇交配时,子一代(F_1)体细胞正常,生殖细胞发育不全,因而无后代。P 品系含有 P 因子,M 品系不含 P 因子。P 因子转录产物在体细胞中拼接留下内含子 3,翻译产物是转座的阻遏蛋白;生殖细胞中拼接正常,翻译产物是转座酶,结果使得 P 因子在生殖细胞中活跃转座,造成有害后果。P 品系的细胞质含有 P 因子转座的阻遏蛋白,因此 P 品系的雌性果蝇与 P 品系或 M 品系的雄性果蝇交配均不会产生不育后代。杂种不育在物种形成中可能起重要作用。

习 题

1. DNA 重组有何生物学意义? 是否可以说没有 DNA 重组就没有生物进化?
2. 试分析 DNA 复制、修复和重组三者之间关系。
3. DNA 重组可分为哪几种类型? 它们的主要特点是什么?
4. 什么是同源重组? 它有何功能?
5. 简要说明 Holliday 模型。
6. 细菌基因转移有哪几种方式? 它们有何生物学意义?
7. 参与同源重组主要的酶和辅助因子有哪些? 简要说明其作用机制。
8. 何谓特异位点重组? 其作用特点是什么?
9. 说明 λ 噬菌体 DNA 的整合和切除过程。
10. 何谓鞭毛相转变? 它如何控制鞭毛基因的表达?
11. 试总结免疫球蛋白基因重组的规则。
12. 免疫球蛋白基因重组过程中产生的 P 核苷酸和 N 核苷酸是如何来的? 它们产生的意义和需要付出的代价是什么?

13. 何谓转座重组? 它有何生物学意义?
14. 细菌的转座因子有几种? 它们的结构有何特点?
15. 何谓 Shapiro 中间体? 何谓共整合体? 它们之间有何关系?
16. 为什么真核生物转座因子可分为自主因子和非自主因子? 它们转座的生物效应是否相同?
17. 比较玉米的 Ac - Ds 系统和 Spm - dSpm 系统的特点。
18. 果蝇 P 因子在杂种不育中起何作用? 杂种不育与物种形成有何关系?

主要参考书目

1. 特怀曼 R M 著, 高级分子生物学要义, 陈淳, 徐沁等译, 北京: 科学出版社, 2000
2. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
3. Stryer L. Biochemistry, 5th ed. New York: W. H. Freeman, 1999
4. Lewin B. Genes VII. Oxford: Oxford University Press, 2000
5. Weaver R F. Molecular Biology. McGraw - Hill Companies, Inc, 1999

(朱圣庚)

第 36 章 RNA 的生物合成和加工

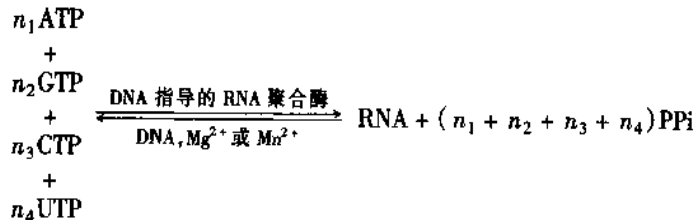
贮存于 DNA 中的遗传信息需通过转录和翻译而得到表达。在转录过程中, DNA 的一条链作为模板, 在其上合成出 RNA 分子, 合成以碱基配对的方式进行, 所产生的 RNA 链与 DNA 模板链互补。细胞的各种 RNA, 包括合成蛋白质的 mRNA、rRNA 和 tRNA, 以及具有各种特殊功能的小 RNA, 都以 DNA 为模板, 在 RNA 聚合酶催化下合成的。最初转录的 RNA 产物通常都需要经过一系列加工和修饰才能成为成熟的 RNA 分子。RNA 所携带的遗传信息也可以用于指导 RNA 或 DNA 的合成, 前一过程即 RNA 复制, 后一过程为逆转录。由于 RNA 既能携带遗传信息, 又具有催化功能, 故推测生命起源早期存在 RNA 世界。RNA 的信息加工和各种细胞功能的发现, 已使 RNA 研究成为最活跃的研究领域之一。

一、DNA 指导下 RNA 的合成

在 DNA 指导下 RNA 的合成称为转录, RNA 链的转录起始于 DNA 模板的一个特定起点, 并在另一终点处终止。此转录区域称为转录单位。一个转录单位可以是一个基因, 也可以是多个基因。基因是遗传物质的最小功能单位, 相当于 DNA 的一个片段。它通过转录对表型有专一性的效应, 并可突变成各种等位形式。基因的转录是一种有选择性的过程, 随着细胞的不同生长发育阶段和细胞内外条件的改变将转录不同的基因。转录的起始是由 DNA 的启动子 (promoter) 控制的, 而控制终止的部位则称为终止子 (terminator)。转录是通过 DNA 指导的 RNA 聚合酶来实现的, 现在已从各种原核生物和真核生物中分离到了这种聚合酶。通过提纯的酶在体外对某些 DNA 进行选择性的转录, 基本上搞清楚了转录的机制。

(一) DNA 指导的 RNA 聚合酶

1960 年至 1961 年, 由微生物和动物细胞中分别分离得到 DNA 指导的 RNA 聚合酶 (DNA-directed RNA polymerase), 这就为了解 RNA 的转录过程提供了基础。该酶需要以 4 种核糖核苷三磷酸作为底物, 并需要适当的 DNA 作为模板, Mg^{2+} 能促进聚合反应。RNA 链的合成方向也是 $5' \rightarrow 3'$, 第一个核苷酸带有 3 个磷酸基, 其后每加入一个核苷酸脱去一个焦磷酸, 形成磷酸二酯键, 反应是可逆的, 但焦磷酸的分解可推动反应趋向聚合。与 DNA 聚合酶不同, RNA 聚合酶无需引物, 它能直接在模板上合成 RNA 链。RNA 聚合酶无校对功能。



分子杂交实验表明, 合成的 RNA 只与模板 DNA 形成杂交体, 而与其他 DNA 不能形成杂交体。这就说明了反应产物 RNA 是在作为模板的 DNA 上, 通过碱基配对机制合成的。

在体外, RNA 聚合酶能使 DNA 的两条链同时进行转录; 但在体内的情况不同。许多实验证明, 在体内 DNA 两条链中仅有一条链可用于转录; 或者某些区域以这条链转录, 另一些区域以另一条链转录。用于转录的链称为模板链, 或负链 (-链); 对应的链为编码链, 即正链 (+链)。编码链与转录出来的 RNA 链碱基序列一样, 只是以尿嘧啶取代胸腺嘧啶, 它无转录功能, 只能进行复制。DNA 在体外转录时失去控制机制, 而使两条链同样进行转录, 这种不正常情况被认为可能是由于 DNA 在制备过程因断裂而失去控制序列, 或 RNA 聚合酶在分离时丢失起始亚基 σ 引起的。如果小心制备大肠杆菌噬菌体 ϕ X174 DNA 的双链

环状复制形式,以其为模板并加入完全的 RNA 聚合酶,则双链中只有一条链能作为转录的模板链,所合成的 RNA 仅与负链(模板链)互补。

在 RNA 聚合酶催化的反应中,天然(双链)DNA 作为模板比变性(单链)DNA 更为有效。这表明 RNA 聚合酶对模板的利用与 DNA 聚合酶有所不同。DNA 在复制时,首先需要将两条链解开,DNA 聚合酶才能将它们作为模板,合成出各自的互补链,从而以半保留的方式形成两个子代分子。RNA 转录时无需将 DNA 双链完全解开,RNA 聚合酶能够局部解开 DNA 的两条链,并以其中一条链为有效的模板,在其上合成出互补的 RNA 链。DNA 经转录后仍以全保留的方式(*conservative mode*)保持双螺旋结构,已合成的 RNA 链则离开 DNA 链(图 36-1)。

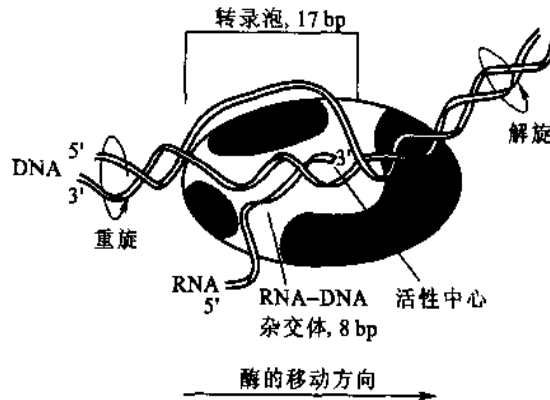


图 36-1 大肠杆菌 RNA 聚合酶进行转录

已从大肠杆菌和其他细菌中高度提纯了 DNA 指导的 RNA 聚合酶。大肠杆菌的 RNA 聚合酶全酶(holoenzyme)相对分子质量 465 000,由五个亚基($\alpha_2\beta\beta'\sigma$)组成,还含有两个 Zn 原子,它们与 β' 亚基相联结。没有 σ 亚基的酶($\alpha_2\beta\beta'$)叫核心酶(core enzyme)。核心酶只能使已开始合成的 RNA 链延长,但不具有起始合成 RNA 的能力,必需加入 σ 亚基才表现出全部聚合酶的活性。这就是说,在开始合成 RNA 链时必需有 σ 亚基参与作用,因此称 σ 亚基为起始亚基。此外,在全酶制剂中还存在一种相对分子质量较小的成分,称为 ω 亚基,核心酶则没有。各亚基的大小和功能列于表 36-1。

表 36-1 大肠杆菌 RNA 聚合酶各亚基的性质和功能

亚基	基因	相对分子质量	亚基数目	功能
α	<i>rpoA</i>	40 000	2	酶的装配 与启动子上游元件和活化因子结合
β	<i>rpoB</i>	155 000	1	结合核苷酸底物 催化磷酸二酯键形成 与模板 DNA 结合 } 催化中心
β'	<i>rpoC</i>	160 000	1	
σ	<i>rpoD</i>	32 000 ~ 92 000	1	识别启动子 促进转录的起始
ω		9 000	1	未知

在不同种的细菌中, α 、 β 和 β' 亚基的大小比较恒定; σ 亚基有较大变动,其相对分子质量由 32 000 ~ 92 000。酶的形状有如一个多突起椭球体,长达 16 nm。大肠杆菌和 T₇ 噬菌体的 RNA 聚合酶已用 X 射线测定晶体结构。细菌的 mRNA、rRNA 和 tRNA 由同一种 RNA 聚合酶所转录。每一个大肠杆菌细胞约含有 7 000 个酶分子。RNA 聚合酶的转录速度在 37℃ 约为 50 个核苷酸/s,与多肽链的合成速度(15 个氨基酸/s)大致相当,但远比 DNA 的复制速度(800 bp/s)为慢。

转录反应可以分为 4 个阶段:模板的识别、转录的起始、转录的延伸和转录的终止。RNA 聚合酶在 σ 亚基引导下识别并结合到启动子上,然后 DNA 双链被局部解开,形成的解链区称为转录泡(transcription

bubble)。解链仅发生在与 RNA 聚合酶结合的部位。在转录的起始阶段酶继续结合在启动子上,酶的催化中心按照模板链的碱基选择与之结合的底物核苷酸,形成磷酸二酯键并脱下焦磷酸,合成 RNA 链最初 2~9 个核苷酸。第一个核苷酸通常为带有 3 个磷酸基的鸟苷或腺苷(pppG 或 pppA)。随后 σ 亚基即脱离核心酶,后者也就离开启动子,起始阶段至此结束。在延伸阶段,随着酶沿 DNA 分子向前移动,解链区也跟着移动,新生 RNA 链得以不断生长,并与 DNA 模板链在解链区形成 RNA-DNA 杂交体,其后 DNA 恢复双螺旋结构, RNA 链被置换出来。最后, RNA 聚合酶在 Nus A 因子(亚基)帮助下识别转录终止信号,停止 RNA 链的生长,酶与 RNA 链离开模板, DNA 恢复双螺旋结构。核心酶具有基本的转录功能,对于转录的全过程都是需要的。而识别启动子和起始转录还需要起始亚基 σ , 识别转录的终止信号和终止转录还需要终止因子 Nus A 参与作用(图 36-2)。

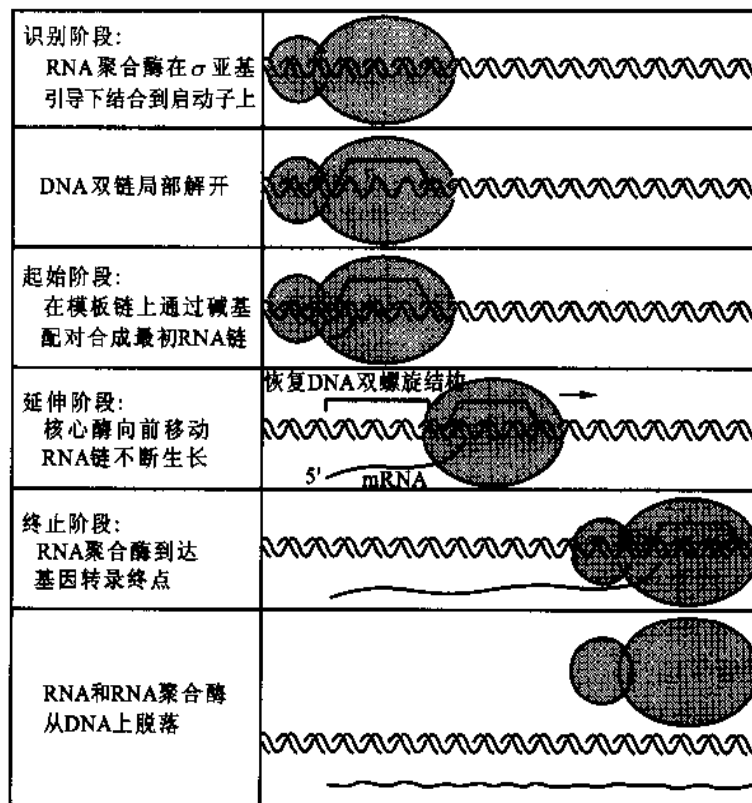


图 36-2 RNA 聚合酶催化的转录过程

σ 因子(σ 亚基)的功能在于引导 RNA 聚合酶稳定地结合到 DNA 启动子上。单独核心酶也能与 DNA 结合。 β' 亚基是一碱性蛋白,与酸性 DNA 之间可借静电引力相结合; β 亚基也可借疏水相互作用与 DNA 结合,但是此种结合与 DNA 的特殊序列无关, DNA 仍保持其双螺旋形式。 σ 因子的存在对核心酶的构象有较大影响,它导致 RNA 聚合酶与 DNA 一般序列和启动子序列的亲合力有很大不同,极大降低了酶与 DNA 一般序列的结合常数和停留时间,同时又大大增加了酶与启动子的结合常数和停留时间。大肠杆菌 RNA 聚合酶的核心酶不能区分 DNA 的启动子和一般序列,它与 DNA 的结合常数约为 $10^9 (\text{mol/L})^{-1}$,停留的半寿期约 60 min。当 σ 因子与核心酶结合后,与 DNA 一般序列的结合常数下降为 10^5 ,半寿期小于 1 s;而与 DNA 启动子的结合常数达到 10^{12} ,半寿期为数小时,二者结合常数相差约 10^7 。这只是一个平均数,因为酶与不同基因启动子的亲合力并不一样。它们的结合常数变动范围在 $10^{12} \sim 10^6$ 。受亲和力的影响,起始频率也各不相同, rRNA 基因启动子为每秒一次, lac I 启动子为每 30 min 一次。

目前对酶与 DNA 启动子识别与结合的动力学过程已比较清楚。全酶可通过扩散与 DNA 任意部位结合,这种结合是疏松的,并且是可逆的。随后酶结合的 DNA 迅速被置换。DNA 置换显然比酶从 DNA 上脱落下来再经扩散结合到另外部位要快得多。这个过程一直继续下去,全酶不断改变与 DNA 的结合部位,

直到遇上启动子序列,随即由疏松结合转变为牢固结合,并且 DNA 双链被局部解开。

在电子显微镜下观察 RNA 聚合酶,其外形犹如右手,拇指与食指间的凹槽正好可结合 DNA。单独核心酶存在时拇指与食指呈闭合状态,与 σ 因子结合后即张开,DNA 可落入凹槽内。当酶遇到启动子时拇指与食指闭合,同时 DNA 双链被局部解开,然后模板链上开始合成 RNA 链。完成最初几个核苷酸的连接后, σ 因子脱落,核心酶才能离开启动子向前移动。由于核心酶牢固籍住 DNA,保证了转录过程的持续进行,直至转录终点。RNA 聚合酶结合 DNA 的过程如图 36-3 所示。

不同的 σ 因子识别不同类型的启动子,可借以调节基因的转录。大肠杆菌一般基因由 σ^{70} 因子所识别(σ 右上角 70 表示该因子相对分子质量为 70 000)。其他 σ 因子可以介导特殊基因的协同表达,如识别热休克(heat shock)应激蛋白基因的因子为 σ^{32} ,识别固氮酶和有关基因的因子为 σ^{54} 。一些噬菌体编码自身的 σ 因子(如 T_4 噬菌体),这些 σ 因子使宿主细胞的核心酶被用于转录噬菌体的基因。另一些噬菌体(如 T_3 、 T_7)合成自己的 RNA 聚合酶,它们仅为一条相对分子质量小于 100 000 的单链多肽,但对自身 DNA 的启动子

具有高度专一性和高的转录效率,在 37℃ 转录速度可达 200 个核苷酸/s,相当于细菌转录速度的 3~4 倍。这说明细菌的 RNA 聚合酶之所以巨大并具有复杂的多亚基结构,是由于它需要识别并转录数量极大的转录单位(超过 1 000 个)。有些转录单位可由聚合酶直接转录;另一些还需要有辅助的蛋白质因子协助作用。细菌 RNA 聚合酶具有复杂结构还由于它需要和多种多样辅助因子相互作用。

真核生物的基因组远比原核生物更大,它们的 RNA 聚合酶也更为复杂。真核生物 RNA 聚合酶主要有三类,相对分子质量大致都在 500 000 左右,通常有 8~14 个亚基,并含有 Zn^{2+} 。利用 α -鹅膏蕈碱(α -amanitine)的抑制作用可将真核生物三类 RNA 聚合酶区分开:RNA 聚合酶 I 对鹅膏蕈碱不敏感,RNA 聚合酶 II 可被低浓度 α -鹅膏蕈碱(10^{-9} ~ 10^{-8} mol/L)所抑制,RNA 聚合酶 III 只被高浓度 α -鹅膏蕈碱(10^{-5} ~ 10^{-4} mol/L)所抑制。 α -鹅膏蕈碱是一种毒蕈(鬼笔鹅膏 *Amanita phalloides*)产生的八肽化合物,对真核生物有较大毒性,但对细菌的 RNA 聚合酶只有微弱的抑制作用。

真核生物 RNA 聚合酶 I 转录 45S rRNA 前体,经转录后加工产生 5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA。RNA 聚合酶 II 转录所有 mRNA 前体和大多数核内小 RNA(snRNA)。RNA 聚合酶 III 转录 tRNA、5S rRNA、U6 snRNA 和不同的胞质小 RNA(sc RNA)等小分子转录物。将提纯的酵母 RNA 聚合酶 II 进行凝胶电泳可分出 10 条明显的条带。最大的 3 个亚基分别相当于细菌 RNA 聚合酶 β' 、 β 和 α 亚基的同源物,化学计量测定它们之间的比例为 1:1:2,它们担负着 RNA 聚合酶的基本功能。个别条带可能含有不只一种成分。真核生物 RNA 聚合酶中没有细菌 σ 因子的对应物,因此必须借助各种转录因子才能选择和结合到启动子上。真核生物 RNA 聚合酶的种类和性质列于表 36-2。

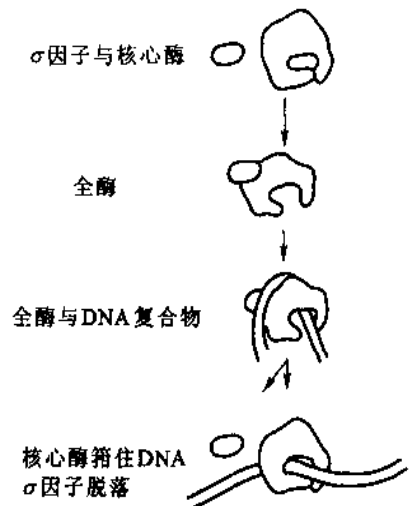


图 36-3 大肠杆菌 RNA 聚合酶与 DNA 的相互作用

表 36-2 真核生物 RNA 聚合酶的种类和性质

酶的种类	功能	对抑制物的敏感性
RNA 聚合酶 I	转录 45S rRNA 前体,经加工产生 5.8S rRNA、18S rRNA 和 28S rRNA	对 α -鹅膏蕈碱不敏感
RNA 聚合酶 II	转录所有编码蛋白质的基因和大多数核内小 RNA	对 α -鹅膏蕈碱敏感
RNA 聚合酶 III	转录小 RNA 的基因,包括 tRNA、5S rRNA、U6 snRNA 和 scRNA	对 α -鹅膏蕈碱中等敏感

真核生物 RNA 聚合酶的转录过程大体与细菌相似,所不同的是真核生物 RNA 聚合酶自身不能识别和结合到启动子上,而需要在启动子上由转录因子和 RNA 聚合酶装配成活性转录复合物才能起始转录。真核生物的转录过程分为装配、起始、延长和终止 4 个阶段,其间各种因子的作用比细菌复杂得多。

除了上述细胞核 RNA 聚合酶外,还分离到线粒体和叶绿体 RNA 聚合酶,它们分别转录线粒体和叶绿体的基因组 DNA。线粒体和叶绿体的 RNA 聚合酶不同于细胞核的 RNA 聚合酶,它们的结构比较简单,类似于细菌的 RNA 聚合酶,能催化所有种类 RNA 的生物合成,并被原核生物 RNA 聚合酶的抑制物利福平等抑制。

(二) 启动子和转录因子

启动子是指 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列。RNA 聚合酶起始转录需要的辅助因子(蛋白质)称为转录因子,它的作用或是识别 DNA 的顺式作用位点,或是识别其他因子,或是识别 RNA 聚合酶。

利用足迹法(footprint)和 DNA 测序法可以确定启动子的序列结构。所谓足迹法即是将 DNA 起始转录的限制片段分离出来。加 RNA 聚合酶使之结合。再用 DNA 酶部分水解。与酶结合的部位被保护而不水解,其余部位水解成长短不同的片段,经凝胶电泳即可测出酶所结合的部位(图 36-4)。

习惯上 DNA 的序列按其转录的 RNA 同样序列的一条链来书写,由左到右相当于 5'向 3'方向。转录单位的起点(startpoint)核苷酸为 +1,从转录的近端(proximal)向远端(distal)计数。转录起点的左侧为上游(upstream),用负的数码来表示,起点前一个核苷酸为 -1。起点后为下游(downstream),即转录区。

当 RNA 聚合酶全酶最初与 DNA 相结合时,它占据的长度约 75 ~ 80 bp,从启动子的 -55 至 +20。RNA 聚合酶全酶的长径为 16 nm(160Å),只能盖 ~ 50 bp 的 DNA,这表明全酶结合的 DNA 必有某种程度的弯曲。在转录起始阶段结束时, σ 因子被释放, RNA 聚合酶形状发生改变,失去与 DNA -55 至 -35 区域间的接触,此时核心酶覆盖的长度约为 60 bp。及至核心酶向前移动若干核苷酸对,核心酶进入延伸阶段,它进一步收缩,只覆盖 30 ~ 40 bp(图 36-5)。

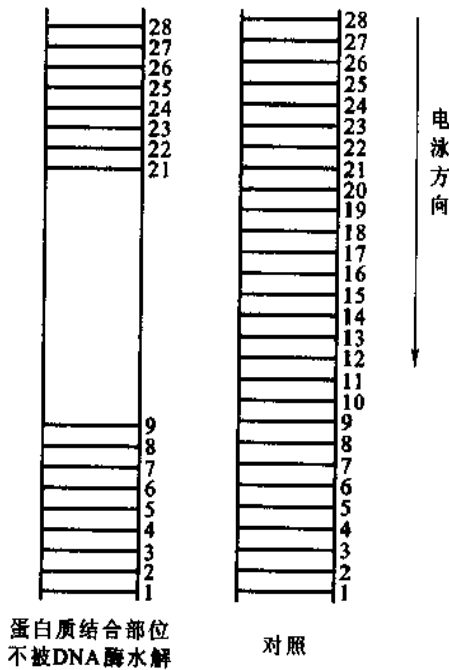


图 36-4 足迹法测定 DNA 上蛋白质的结合部位

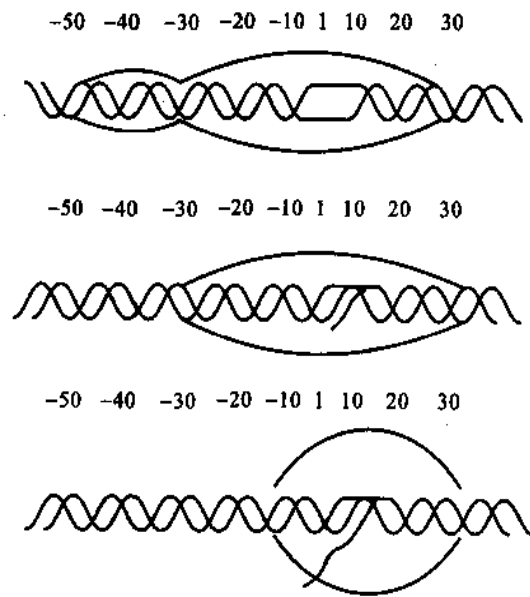
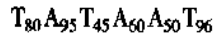


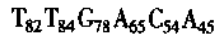
图 36-5 大肠杆菌 RNA 聚合酶在转录起始阶段缩短覆盖 DNA 的长度

通过比较已知启动子的结构,可寻找出它们的共有序列(consensus sequence)大肠杆菌基因组为 $4.7 \times$

10^6 bp, 为避免假信号的出现, 估计信号序列最短必需有 12 bp ($4^{12} = 1.68 \times 10^7$, 略大于基因组)。信号序列并不一定要连续, 因为分开距离的本身也是一种信号。从起点上游约 -10 处找到 6 bp 的保守序列 TATAAT, 称为 Pribnow 框(box), 或称为 -10 序列。实际位置在不同启动子中略有变动。起点上游序列中出现频率较高的碱基为:



若将上述片段提纯, RNA 聚合酶不能与之再结合, 因此必定存在另外的序列为 RNA 聚合酶识别和结合所必需。在 -10 序列的上游又找到一个保守序列 TTGACA, 其中心约在 -35 位置, 称为识别区或 -35 序列。各碱基出现的频率如下:



利用定位诱变技术使启动子发生突变可获得有关共有序列功能的信息。-35 序列的突变将降低 RNA 聚合酶与启动子结合的速度, 但不影响转录起点附近 DNA 双链的解开; 而 -10 序列的突变不影响 RNA 聚合酶与启动子结合的速度, 可是会降低双链解开速度。由此可见, -35 序列提供了 RNA 聚合酶识别的信号, -10 序列则有助于 DNA 局部双链解开。-10 序列含有较多的 A-T 碱基对, 因而双链分开所需的能量也较低。启动子共有序列的功能见图 36-6。启动子的结构是不对称的, 它决定了转录的方向。

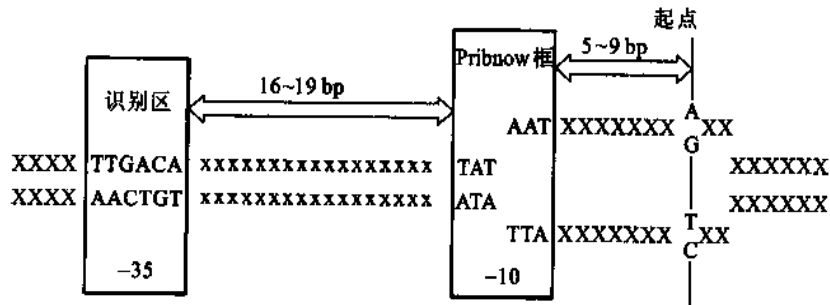


图 36-6 启动子共有序列的功能

σ 因子能直接和启动子的 -35 序列以及 -10 序列相互作用。两个位点正好位于双螺旋 DNA 的同一侧, 它们之间距离的改变将影响 σ 因子的作用力而改变起始效率。启动子的序列是多种多样的, 尽管分成两个保守位点是最为常见的结构, 最弱的启动子完全没有 -35 序列, 转录速度儿近乎零, 必须在另外的激活蛋白帮助下 RNA 聚合酶才能结合。不同的 σ 因子可以识别不同的启动子序列。表 36-3 总结了大肠杆菌不同 σ 因子识别不同类型启动子的共有序列。

表 36-3 大肠杆菌不同 σ 因子识别具有不同共有序列的启动子

基因	因子	用途	-35 序列	间隔	-10 序列
<i>rpo D</i>	σ^{70}	通用	TTGACA	16 ~ 18 bp	TATAAT
<i>rpo H</i>	σ^{32}	热休克	CCCTTGAA	13 ~ 15 bp	GCCGATNT
<i>rpo E</i>	σ^E	热休克	未知	未知	未知
<i>rpo N</i>	σ^{54}	氮源*	CTGGNA	6 bp	TTGCA
<i>fli A</i>	σ^F	鞭毛	CTAAA	15 bp	GCCGATAA

* *gln A* P2 强启动子的转录

真核生物的启动子有三类, 分别由 RNA 聚合酶 I、II 和 III 进行转录。真核生物的启动子由转录因子而不是 RNA 聚合酶所识别, 多种转录因子和 RNA 聚合酶在起点上形成前起始复合物(preinitiation complex)而促进转录。启动子通常由一些短的保守的序列所组成, 它们被适当种类的辅助因子(auxiliary factor)识别。RNA 聚合酶 I 和 III 的启动子种类有限, 对其识别所需辅助因子的数量也较少。RNA 聚合酶 II 的启动子序列多种多样, 基本上由各种顺式作用元件(cis-acting element)组合而成, 它们分散在转录起点上游大约

200 bp 的范围内。某些元件和其识别因子是共同的,存在于各种启动子中;有些元件和因子是特异的,只存在于某些种类的基因,见于发育转变和组织分化的控制基因。参与 RNA 聚合酶 II 转录起始的各类因子数目很大,可分为三类:通用因子(*general factor*)、上游因子(*upstream factor*)和可诱导因子(*inducible factor*)。

类别 I (*class I*) 启动子只控制 rRNA 前体基因的转录,转录产物经切割和加工后生成各种成熟 rRNA。该基因有许多拷贝,往往成簇存在。类别 I 启动子由两部分(*bipartite*)保守序列所组成。核心启动子(*core promoter*)位于转录起点附近,从 -45 至 +20;上游控制元件(*upstream control element, UCE*)位于 -180 至 -107。两部分都有富含 GC 的区域。RNA 聚合酶 I 对其转录需要两种因子参与作用。UBF1 是一条相对分子质量为 97 000 的多肽链,可结合在两部分富含 GC 区。随后 SL1 因子结合其上。SL1 因子是一个四聚体蛋白,它含有一个另两类 RNA 聚合酶起始转录也需要的蛋白和 3 个不同的转录辅助因子 TAF I。在 SL1 因子介导下 RNA 聚合酶 I 结合在转录起点上并开始转录。SL1 因子的作用类似于细菌的 σ 因子。类别 I 启动子的结构与转录因子的结合位置见图 36-7。

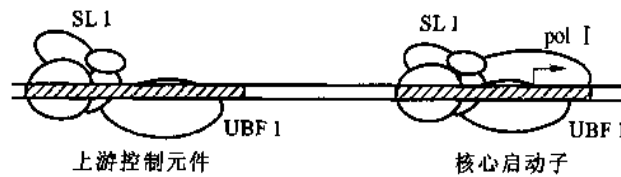
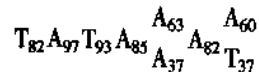


图 36-7 类别 I 启动子的结构与相应转录因子的结合位置

类别 II (*class II*) 启动子涉及众多编码蛋白质的基因表达的控制。该类型启动子包含四类控制元件:基本启动子(*basal promoter*)、起始子(*initiator*)、上游元件(*upstream element*)和应答元件(*response element*)。这些元件的不同组合,再加上其他序列的变化,构成了数量十分庞大的各种启动子。它们受相应转录因子的识别和作用。其中有些是组成型的,可在各类细胞中表达;有些是诱导型的,受时序、空间和各种内外条件的调节。

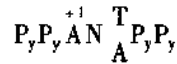
基本启动子序列为中心在 -25 至 -30 左右的 7 bp 保守区,其碱基频率为:



这一序列称为 TATA 框(TATA box)或 Goldberg-Hogness 框。此共有序列中全为 A-T 碱基对,仅少数启动子中含有一个 G-C 对,其功能与 RNA 聚合酶的定位有关,DNA 双链在此解开并决定转录的起点位置。失去 TATA 框,转录将在许多位点上开始。

作用于基本启动子上的辅助因子称为通用(转录)因子(GTF),或基本转录因子(*basal transcription*),它们为任何细胞类别 II 启动子起始转录所必需,以 TF II X 来表示,其中 X 按发现先后次序用英文字母定名。目前已知至少有 6 种以上通用因子参与作用。最先结合到 TATA 框上的因子是 TF II D,它是一种寡聚蛋白,包含 TATA 结合蛋白(TATA-binding protein, TBP)和多种 TBP 联结因子(TBP-associated factor, TAF)。TBP 结合于 DNA 的小沟,使 DNA 弯曲成约 80°,有助于双链解开。TAF 具有特异性,作用类别 II 启动子的因子为 TAF II,含有不同 TAF II 的 TF II D 可以识别不同的启动子。其后 TF II A 结合其上,以稳定 TF II D 与启动子的结合。TF II F 可与 RNA 聚合酶 II (pol II) 形成复合物。TF II F 由两个亚基所组成。较大的亚基 RAP74 具有依赖 ATP 的 DNA 解螺旋酶活性,可能参与起点的解链;较小的亚基 RAP38 能与 RNA 聚合酶 II 牢固结合。TF II B 有两结构域,其一结合 TBP,另一功能为引进 TF II F/pol II 复合物;TF II D 也可和 RNA 聚合酶 II C 端结构域(CTD)直接相互作用,从而使 RNA 聚合酶 II 定位于转录起点,并促进其间作用。在聚合酶帮助下 TF II E 进入结合位点,后者又引入 TF II H 并提高其活性。TF II H 具有多种酶活性,包括 ATP 酶、解螺旋酶和激酶。它的激酶活性催化 RNA 聚合酶 II 最大亚基羧基端结构域多个位点磷酸化,促使复合物构象改变而促进转录。TF II F 除参与转录外,还参与 DNA 损伤的切除修复。TF II E 和 TF II H 均为多亚基因子,它们与转录的起始反应无关,但为启动子的清除,即由起始转入延伸阶段所必需。在延伸阶段,大部分转录起始因子均离去,只保留 TF II F 并有一些延伸因子参与作用。

TATA 框是 RNA 聚合酶 II 和通用因子形成前起始复合物的主要装配点。转录的起点位置处有一保守序列称起始子 (initiator, Inr), 其共有序列如下:



其中 P_y 为嘧啶碱 (C 或 T), N 为任意碱基, A 为转录的起点。DNA 在此解开并起始转录。此外还有许多附加序列作为影响 RNA 聚合酶 II 活性的转录因子结合位点, 这些附加序列或围绕 TATA 框, 或位于起始子下游, 可被一种或多种转录因子所识别。有些启动子无 TATA 框, 有些无起始子共有序列, 或二者均无。无 TATA 框的启动子可通过某些识别起始子的 TAF II 介导 TBP 结合其上, 并装配起始复合物。TATA 框和起始子均无的启动子则通过结合于上游元件上的因子介导并装配起始复合物。RNA 聚合酶 II 与通用转录因子在启动子上的装配过程如图 36-8 所示。

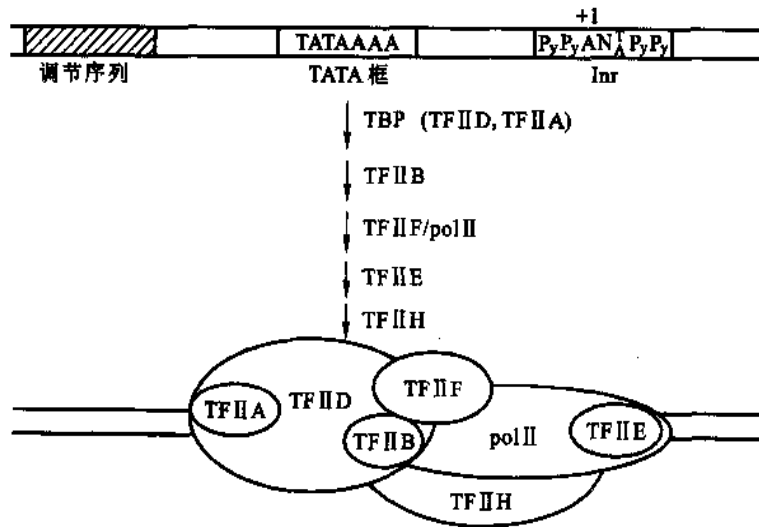


图 36-8 RNA 聚合酶 II 和转录因子在启动子上的装配

上述基本启动子和转录因子对于 RNA 聚合酶 II 的转录是必要的, 但不是足够的, 它们单独只能给出微弱的效率, 而要达到适宜水平的转录还需要位于上游的一些调节控制元件及其识别因子参与作用。识别上游元件的转录因子称为上游因子或转录辅助因子 (transcription ancillary factor)。通常一个元件可以被不止一个因子所识别, 有些因子存在于所有细胞, 有些因子只存在一定种类的细胞和发育时期。普遍存在的上游元件有 CAAT 框、GC 框和八聚体 (octamer) 框等。CAAT 框的共有序列是 GCCAATCT, 与其相互作用的因子有 CTF 家族的成员 CP1、CP2 和核因子 NF-1。然而因子 C/EBP 可以与两个特定的位点结合, 一是 CAAT 框, 另一是增强子核心序列 TGTGGWWG。GC 框的共有序列为 GGGCGG 和 CCGCCC, 后者是前者的反向序列, 识别该序列的因子为 Sp1。八聚体框含有 8 bp, 其共有序列为 ATGCAAAT, 它的识别因子为 Oct-1 和 Oct-2, 前者普遍存在, 后者只存在 B 淋巴细胞中。

在真核生物中, 与细胞类型和发育阶段相关的基因表达, 主要通过转录因子的重新合成来进行调节的, 因此是长期的过程。对外界刺激的快速反应则主要通过转录激活物 (transcription activator) 的可诱导调节。细菌细胞调节蛋白的活性以变构调节为主; 真核生物经信号转导途径对转录因子或与之作用的蛋白进行诱导调节则以共价修饰为基本机制。由此产生的转录激活因子与靶基因上所谓应答元件相结合。例如, 热休克效应元件 HSE 的共有序列是 CNNGAANNTCNNG, 可被热休克因子 HSF 识别和作用; 血清效应元件 SRE 的共有序列 CCATATTAGG, 可被血清效应因子 SRF 识别和作用; 干扰素- γ 的效应元件 IGRE 的共有序列 TTNCNNAA 可被信号转导及转录活化蛋白 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 识别和作用。它们的活性受因子磷酸化和脱磷酸化的调节。表 36-4 所列为一些重要的上游元件和其作用因子。

表 36-4 真核生物基因的一些上游元件、应答元件以及相应的转录因子

共有序列	元件名称	转录因子	存在位置
上游元件			
GCCAATCT	CAAT 框	CTF/NF-1 GPI、GP2 C/EBP(bZIP)	普遍存在 普遍存在 普遍存在,肝中水平较高
GGGGCG	GC 框	Sp1(zf)	普遍存在
ATGCAAAT	八聚体(octamer)	Oet 1(h) Oct 2(h)	普遍存在 B 淋巴细胞
细胞类型专一性元件			
GATA		GATA-1(zf)	红细胞
ATATTCAT	POU	Pit-1	垂体
CANNG	E 框	MyoD1(bHLH)	成肌细胞
GGGACTTCC	κ B 位点	NF- κ B	淋巴细胞
TTYAGNACCRGGAS AGNRCC	NRSE	NRSF/NEST(zf)	非神经细胞
发育调节元件			
TCCTAATCCC		Bicoid(h)	果蝇 Ap 轴特异
CGGGGGGCC		Krox-20(zf)	脊椎动物后脑发育
TAATAATAATAATA		Antennapedia(h)	果蝇同源异型基因
TCAATTAATGA		Fushi tarazu(h)	果蝇配对基因
应答元件			
CNNGAANNTCNNG	HSE	HSF(bZIP)	普遍存在
CCATATTAGG	SRE	SRF	普遍存在
TTNCNNAA	IGRE	STAT1	普遍存在

注: bZIP, 碱性亮氨酸拉链; zf, 锌指结构; h, 同源异型结构; bHLH, 碱性螺旋-突环-螺旋

类别 III (class III) 启动子为 RNA 聚合酶 III 所识别, 它涉及一些小分子 RNA 的转录。5S 和 tRNA 以及胞质小 RNA (cytoplasmic RNA, scRNA) 基因的启动子位于转录起点下游, 也即在基因内部。核内小 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 基因的启动子在转录起点的上游, 与通常的启动子类似。无论是上游启动子, 还是下游启动子, 都由一些为转录因子所识别的元件所组成, 在转录因子的指引下 RNA 聚合酶 III 方始结合其上。

基因内启动子最初是在鉴定爪蟾 5S rRNA 基因的启动子序列时发现的, 在此之前总以为启动子都是在转录起点的上游, 然而删除实验却证明 5S rRNA 基因上游序列完全去除仍然能合成 5S rRNA 产物。用核酸外切酶将爪蟾 5S rRNA 基因 5' 端上游序列不同程度切除, 然后克隆到质粒内, 转录始终能正常进行。当删除进入基因内部时, 转录从质粒部分开始, 以补足被删除的基因序列, 直至 +55 位置。从 3' 端开始删除基因序列, 一直删除到 +80 位置并不影响转录, 但是一旦进入 +55 至 +80 位置, 转录即停止。这就表明, 启动子位置于该区域内。其后用系统碱基诱变的方法, 在该区内找到 3 个敏感区, 其碱基改变会显著降低启动子的功能。它们分别称为框架 A (box A)、中间元件 (intermediate element) 和框架 C (box C)。用类似的方法从腺病毒 VA RNA 和 tRNA 基因中找到两个控制元件, 分别为框架 A 和框架 B (图 36-9)。

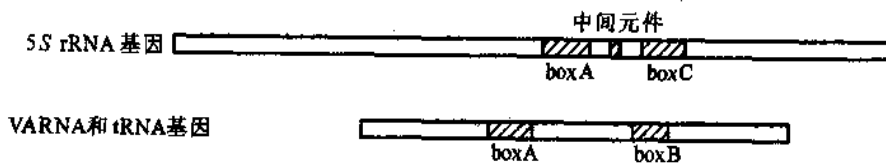


图 36-9 由 RNA 聚合酶 III 转录的基因内启动子

RNA 聚合酶 III 的启动子有 3 种类型结构。基因内启动子可分为两种类型, 各自含有两个框架序

列,分别被 3 种辅助因子所识别。TFⅢA 是一种锌指蛋白。TFⅢB 含有 TBP 和另两种蛋白质。TFⅢC 是一个大的蛋白质复合物 ($M_r > 500\ 000$),由至少 5 个亚基组成,其大小与 RNA 聚合酶相当。

在类别Ⅲ启动子,如 5S rRNA 基因的启动子,先由 TFⅢA 结合在框架 A 上,然后促使 TFⅢC 结合,后者结合导致 TFⅢB 结合到转录起点附近,并引导 RNA 聚合酶Ⅲ结合在起点上。TFⅢA 和 TFⅢB 是装配因子(assembly factor);TFⅢC 才是真正的起始因子(initiation factor)。TFⅢB 的功能是使 RNA 聚合酶Ⅲ正确定位,起“定位因子”(positioning factor)的作用。在类别Ⅲ的类型 2 启动子,如 tRNA 基因的启动子,由 TFⅢC 识别框架 B,其结合区域包括框架 A 和框架 B,然后与类型 1 启动子相同,依次引导 TFⅢB 和 RNA 聚合酶结合。如前所述,TBP 也存在于其他类别启动子的转录因子中,它能直接与 RNA 聚合酶Ⅲ相互作用。

有些类型启动子,如 snRNA 基因的启动子,位于转录起点上游。这类启动子含有 3 个上游元件(图 36-10)。在 RNA 聚合酶Ⅲ的上游启动子中,只要靠近起点存在 TATA 元件,就能起始转录。然而 PSE 和 OCT 元件的存在将会增加转录效率。PSE 表示邻近序列元件(proximal sequence element),OCT 表示八聚体基序(octamer motif),它们各自被有关因子识别和结合。有些 snRNA 的基因由 RNA 聚合酶Ⅱ转录;其余 snRNA 的基因由 RNA 聚合酶Ⅲ转录。然而这二者的启动子都存在上述 3 个上游元件(TATA、PSE、OCT)。究竟是由聚合酶Ⅱ还是聚合酶Ⅲ转录,似乎是由 TATA 框的序列所决定。关键的 TATA 元件由包含 TBP 的转录因子所识别,TBP 又与其他蛋白质结合,其中有些是对聚合酶Ⅲ启动子特异的蛋白质。由 TBP 和 TAF 的功能使 RNA 聚合酶Ⅲ正确定位于起点。

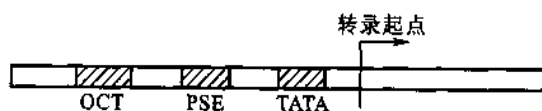


图 36-10 RNA 聚合酶Ⅲ的上游启动子

(三) 终止子和终止因子

细菌和真核生物转录一旦起始,通常都能继续下去,直至转录完成而终止。但在转录的延伸阶段 RNA 聚合酶遇到障碍会停顿和受阻,酶脱离模板即终止。真核生物中有一些能与酶结合的延伸因子(elongation factor),可抑制停顿(如延伸蛋白 elongin)和防止受阻(如 TEFb、TFⅡS)。转录结束, RNA 聚合酶和 RNA 转录产物即被释放。真核生物 RNA 聚合酶Ⅱ去磷酸化后可再循环利用。

提供转录停止信号的 DNA 序列称为终止子,协助 RNA 聚合酶识别终止信号的辅助因子(蛋白质)则称为终止因子(termination factor)。有些终止子的作用可被特异的因子所阻止,使酶得以越过终止子继续转录,这称为通读(readthrough)。这类引起抗终止作用的蛋白质称为抗终止因子(antitermination factor)。

DNA 的转录终止信号可被 RNA 聚合酶本身或其辅助因子所识别。在转录过程中, RNA 聚合酶沿着模板链向前移动,它所感受的信号来自正在转录的序列,而不能感受尚未转录的信号,即终止信号应位于亦已转录的序列中。所有原核生物的终止子在终止点之前均有一个回文结构,其产生的 RNA 可形成由茎环构成的发夹结构。该结构可使聚合酶减慢移动或暂停 RNA 的合成。然而, RNA 产生具有发夹型的二级结构远比终止信号为多,如果酶所遇到的不是终止序列,它将继续移动并进行转录。

大肠杆菌 *E. coli* 存在两类终止子:一类称为不依赖于 ρ (ρ) 的终止子,或简单的终止子;另一类称为依赖于 ρ (ρ) 的终止子。简单终止子除能形成发夹结构外,在终点前还有一系列 U 核苷酸(约有 6 个);回文对称区通常有一段富含 G-C 的序列。寡聚 U 序列可能提供信号使 RNA 聚合酶脱离模板。由 rU-dA 组成的 RNA-DNA 杂交分子具有特别弱的碱基配对结构。当聚合酶暂停时, RNA-DNA 杂交分子即在 rU-dA 弱键结合的末端区解开。

依赖于 ρ (ρ) 的终止子必需在 ρ (ρ) 因子存在时才发生终止作用。依赖于 ρ 的终止子其回文结构不含富含 G-C 区,回文结构之后也无寡聚 U。依赖于 ρ 的终止子在细菌染色体中少见,而在噬菌体中广泛存在。二者结构见图 36-11。

Rho 因子是一种相对分子质量约为 46 000 的蛋白质,通常以六聚体形式存在,在有 RNA 存在时它能水解核苷三磷酸,即具有依赖于 RNA 的 NTPase 活力。由此推测,Rho 结合在新产生的 RNA 链上,借助水解 NTP 获得的能量推动其沿着 RNA 链移动。RNA 聚合酶遇到终止子时发生暂停,使 Rho 得以追上酶。Rho 与酶相互作用,造成释放 RNA,并使 RNA 聚合酶与该因子一起从 DNA 上脱落下来。最近发现 Rho 具有 RNA-DNA 解螺旋酶(helicase)活力,进一步说明了该因子的作用机制。

抗终止作用主要见于某些噬菌体的时序控制。早期基因与其后基因之间以终止子相隔开,通过抗终止可以打开其后基因的表达。因此,新的基因表达是由于 RNA 链的延长所致。 λ 噬菌体前早期(immediate early)基因的产物 N 蛋白即是一种抗终止因子。它与 RNA 聚合酶作用使其在左右两个终止子处发生通读,从而表达晚早期(delayed early)基因。晚早期基因的产物 Q 蛋白也是一种抗终止因子,它能使晚期基因得以表达。

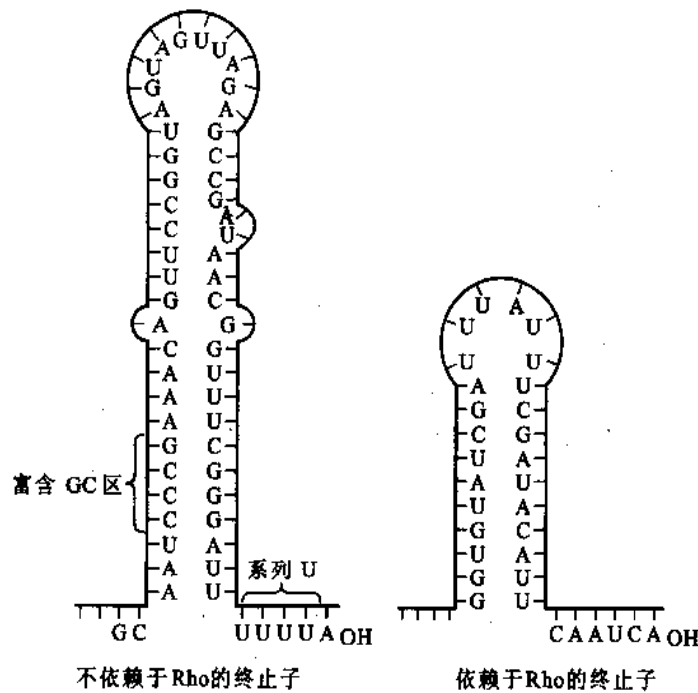


图 36-11 两类终止子的回文结构

正如 RNA 聚合酶识别启动子需要有 σ 因子一样,识别终止子也需要一些特殊的辅助因子。已知 *nus* 位点与终止功能有关,其中包括:*nus A*、*nus B*、*nus E* 和 *nus G* (*nus* 是 N utilization substance 的缩写),其中仅 *nus A* 基因产物的性质研究得比较清楚。*Nus A* 因子可提高终止效率,可能是由于它能促进 RNA 聚合酶在终止子位置上的停顿。*nus E* 基因编码核糖体蛋白 S10,作为核糖体蛋白和终止功能间有何关系尚不清楚。*Nus B* 和 S10 形成二聚体,作用于 RNA 聚合酶。*nus G* 与诸 *nus* 因子和 RNA 聚合酶形成复合物的装配有关。业已发现,在大肠杆菌的 *rnm* (rRNA) 操纵子中,抗终止作用涉及上述 *Nus* 因子。*Nus B*-S10 二聚体与 RNA 聚合酶结合,改变其性质,从而对转录单位中依赖于 Rho 的终止子发生通读。

Nus 因子是在研究 N 蛋白抗终止作用时发现的,名称也由此而来。当 N 发生突变时可克服由于 *Nus A* 突变造成的抗终止障碍;*Nus A* 蛋白与 N 蛋白在体外能相结合,进而说明 N 蛋白的作用需由 *Nus A* 蛋白中介,N 蛋白是一条相对分子质量为 13 000 的碱性多肽链。*Nus A* 则是相对分子质量为 69 000 的酸性多肽。对于 N 蛋白阻止不依赖于 Rho 的终止子作用,仅有 *Nus A* 因子就已足够,然而 N 蛋白阻止依赖于 Rho 的终止子作用,要求有 4 种 *Nus* 因子的参与。*Nus* 因子和 N 蛋白是在 RNA 聚合酶经过特定的位点时依次结合其上,该位点称为 *nus* (N utilization)。*Q* 蛋白的作用与 N 蛋白类似,通过 *qut* 位点结合到 RNA 聚合酶上,阻止它的停顿,使酶得以越过终止子。

Nus A 可与 RNA 聚合酶的核心酶结合,形成 α_2 、 β ' *Nus A* 复合物。当 σ 因子存在时,它可取代 *Nus A*,

形成 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 。全酶 ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) 可识别并结合到启动子上。 σ 因子完成起始功能后即脱落下来,由核心酶 ($\alpha_2\beta\beta'$) 合成 RNA。然后 Nus A 结合到核心酶上,由 Nus A 识别终止子序列。转录终止后, RNA 聚合酶脱离模板, Nus A 又被 σ 所取代,由此形成 RNA 聚合酶起始复合物和终止复合物两种形式的循环。因此 Nus 因子也可以看作是 RNA 聚合酶的亚基。

有关真核生物转录的终止信号和终止过程了解甚少。实验表明, RNA 聚合酶 II 的转录产物是在 3' 末端切断,然后腺苷酸化,而并无终止作用。但在病毒 SV40 的 DNA 中仍可检测到类似细菌不依赖于 rho 的位点,在发夹结构后有一段 U 序列。

RNA 聚合酶 I 转录出一个大的前体分子,它包括主要的 rRNA 序列,其末端有一段连续的 U。RNA 聚合酶 III 转录产物末端常有连续的 U,但是很不均一,有的为 2 个 U,有的 3 个甚至 4 个 U。显然,仅仅连续 U 的本身不足以成为终止信号。在终止子中为 U_5 而不是 U_4 ,而真核生物通常仅转录 2 个 U。很可能 U 序列附近的发夹结构和富含 G-C 对的区域在终止反应中起重要作用。

(四) 转录的调节控制

细胞基因的表达,即由 DNA 转录成 RNA 再翻译成蛋白质的过程,是受到严格的调节控制的。在细胞的生长、发育和分化过程中,遗传信息的表达可按一定时间程序发生变化,而且随着细胞内外环境条件的改变而加以调整,这就是时序调控(temporal regulation)和适应调控(adaptive regulation)。在这里,转录水平的调控是关键的一环,因为遗传信息的表达首先涉及到的是转录过程。尤其是原核生物,转录和翻译几乎同时进行,转录水平的调控就显得更为重要。转录调控主要发生在起始和终止阶段。

启动子是转录起始的控制部位。通常,转录调节因子的结合位点存在于启动子内部或启动子附近。当调节因子与 DNA 结合后对转录或是起促进作用(正调控),或是起抑制作用(负调控)。

法国分子生物学家 Monod 和 Jacob 对大肠杆菌酶产生的诱导和阻遏现象进行深入研究后,提出了操纵子结构模型(operon structural model)。所谓操纵子即是指细菌基因表达和调控的单位,它包括结构基因、调节基因(regulatory gene)和由调节基因产物所识别的控制序列。通常在功能上彼此有关的编码基因串联在一起,有共同的启动子并受操纵基因(operator)的控制。当调节基因的产物阻遏蛋白(repressor protein)与操纵基因结合后,即可阻止其邻近启动子起始转录。阻遏蛋白的作用属于负调控。但调节基因的产物可以是负调节因子(例如阻遏蛋白),也可以是正调节因子。有关操纵子的调控机制详见细胞代谢和基因表达调控一章。

环腺苷酸(cAMP)对原核生物许多可诱导酶的合成,具有普遍的促进作用。体外实验表明,这类以 cAMP 为信号分子的调节系统是通过一种正调节蛋白作用于某些操纵子的启动子。该正调节蛋白称为环腺苷酸受体蛋白(cyclic AMP receptor protein, CRP)。经 cAMP 活化,它可结合于受其调节的启动子附近。CRP 由两个相同亚基所组成,相对分子质量为 45 000,每一亚基含有一个 DNA 结合区和一个转录活化区。cAMP 能改变它的构象,提高它对 DNA 启动子的亲和力,促进转录的进行。所谓葡萄糖效应,即培养基中葡萄糖含量较高时,细菌首先利用葡萄糖,而阻遏利用其他底物酶类的合成。其原因这是由于葡萄糖代谢降解物(catabolite)可以抑制细胞内腺苷酸环化酶(adenylate cyclase)的活力,并且激活磷酸二酯酶,因而降低 cAMP 水平,造成 cAMP - CRP 浓度不够,使许多酶的基因不能进行转录。CRP 又称为降解代谢基因激活蛋白(catabolite gene activator protein, CAP)。受 cAMP - CRP 系统调节的操纵子,即代谢降解物敏感的(catabolitesensitive)操纵子,包括许多负责糖分解代谢的可诱导操纵子,如乳糖(*lac*)、半乳糖(*gal*)和阿拉伯糖(*ara*)操纵子等;以及负责氨基酸分解代谢的操纵子,如利用组氨酸(*hut*)的操纵子。

受一种调节蛋白所控制的几个操纵子系统称为调节子(regulon)。一个调节子中的不同操纵子通常都属于同一代谢途径或与同一种功能有关。例如,阿拉伯糖操纵子和阿拉伯糖运输系统操纵子都受调节基因 C 的产物所调节。如果一种调节蛋白控制几个不同代谢途径的操纵子,构成一个复杂的调节网络,这样的调控系统称为综合性调控(global regulation)。上述 cAMP - CRP 对各种分解代谢的调控系统即属于一个综合性调节子。又如,细菌在氨基酸饥饿时,通过严紧控制因子(stringent factor, SF)产生 (p)ppG pp,不但关闭 rRNA 的合成,同时延缓 RNA 聚合酶的转录过程,将代谢活性降至最低,对多种操纵子产生影响,藉以

渡过艰难时期。SOS 反应也属于综合性的调控,对此上一章已有介绍,这里不再讨论。

除对启动子的调控外,原核生物对终止子也存在调控作用。此外,在某些负责氨基酸合成的操纵子中还存在一类称作衰减子(attenuator)的特殊序列,它既是一个终止信号,又是一个调节信号。合成色氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、苏氨酸、亮氨酸和异亮氨酸-缬氨酸的操纵子,其衰减子位于前导序列上。无论在氨基酸丰富或贫乏的条件下,转录在衰减子处终止,也就是说结构基因均不表达。但是如果有其余种类的氨基酸而仅缺乏上述一种氨基酸时,负责合成该氨基酸的操纵子即可通过衰减子而转录出全部有关的结构基因。因为此时合成该种氨基酸才有意义。

真核生物的转录调节与原核生物相比,有相似之处,也有显著的不同。其间主要差别为:① 原核生物功能相关的基因常组织在一起构成操纵子,作为基因表达和调节的单位。真核生物不组成操纵子,每个基因都有自己的基本启动子和调节元件,单独进行转录;但相关基因间也存在协同调节(cooperative regulation),拥有共同顺式元件和反式因子的基因组成基因群(gene battery)。② 原核生物只有少数种类的调节元件,包括激活蛋白(activator)和阻遏蛋白(repressor)的结合位点,它们常与启动子重叠或在其附近。真核生物为数众多的上游调节元件包括组成型元件、可诱导元件和增强子(沉默子),它们由许多短的共有序列所组成,并能独自活化基因,基因组的许多中等重复序列也就是一些调节元件。③ 无论是原核生物或是真核生物,其转录受反式调节因子(转录激活因子或抑制因子)所调节,这种调节可在两个水平上进行,一是通过调节因子的生物合成(种类和数量的调节),另一是通过它们变构或共价修饰(活性的调节)。缓慢并持续的反应包括细胞分化,经常涉及转录因子的重新合成。对细胞内外环境条件改变作出迅速的反应主要涉及活性调节。原核生物常以负调节为主,调节因子活性常受变构效应调节;真核生物以正调节为主,调节因子常受共价修饰,主要是磷酸化的调节。④ 真核生物具有染色质结构,基因活化首先需要改变染色质的状态,使转录因子能够接触启动子 DNA,此过程称为染色质改型(chromatin remodeling)。这一过程只是使基因转录成为可能;转录的实现还有赖于顺式作用元件、反式作用因子与 RNA 聚合酶的相互作用。染色质水平的调节在原核生物中不存在,它涉及真核生物发育与细胞分化等长期(long term)的调节;DNA 水平的调节属于短期(short term)的调节,基本与原核生物相似。

上游调节因子,包括激活因子和阻遏因子,均属于反式作用因子,它们与顺式元件中的上游激活序列(元件)、应答元件、增强子(enhancer)和沉默子(silencer)等特异地结合,对真核生物的转录分别起促进和阻遏作用。上游调节因子通常都有三个结构域,即 DNA 结合结构域(DNA-binding domain)、转录激活结构域(transcription activation domain)和二聚化结构域(dimerization domain)。蛋白质与 DNA 结合区域存在一些特殊的基序结构,常见的有以下几种:

1. 螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)

螺旋-转角-螺旋常见于真核生物含有同源(异型)域(homeodomain)的蛋白质中。它最初在果蝇与发育有关的编码基因中发现,与原核生物的阻遏蛋白有同源性。同源域的保守序列位于 3 个螺旋区,螺旋 3 为识别螺旋,结合于 DNA 的大沟,螺旋 1、2 位于 DNA 上,螺旋 1 的 N 端肽段结合于小沟,全长约 60 个氨基酸残基。

2. 锌指(zinc finger)

锌指结构主要见于真核生物的调节因子,可分为两类:一类为 Cys₂/His₂ 锌指, Zn²⁺ 结合的共有序列为 Cys-X₂₋₄-Cys-X₃-Phe-X₃-Leu-X₂-His-X₃-His, 如 TFⅢA 和 SP1。前者有 9 个锌指单位,后者有 3 个锌指单位,每一锌指单位约 30 个氨基酸残基,由一个反平行 β 发夹和一个 α 螺旋所组成。β 发夹含有两个半胱氨酸,α 螺旋含有两个组氨酸,以配位键与锌离子结合。锌指的 α 螺旋结合于 DNA 大沟的靶部位。一般而言, DNA 结合蛋白以 α 螺旋与 DNA 的大沟结合,通常都需形成同源或异源二聚体,而此类锌指蛋白本身有多个结合结构域,故不再形成二聚体。

另一类为 Cys₂/Cys₂ 锌指, Zn²⁺ 结合的共有序列 Cys-X₂-Cys-X₁₃-Cys-X₂-Cys, 这类锌指很少重复。如甾醇激素受体中有两个锌指单位,第一个锌指含有识别螺旋,其右边旁侧序列决定 DNA 结合的特异性,第二个锌指提供二聚化表面,其左边旁侧序列决定二聚化的特异性。甾醇激素受体,如糖皮质激素受体、盐皮质激素受体、雄性激素受体和孕酮受体,都形成同源二聚体,它们识别半位点(half site)共有序列

TGTTCT,以回文结构(反向重复)排列。甲状腺激素(T3R)、维生素 D(VDR)、视黄酸(RAR)和 9-顺视黄酸(RXR)有多重受体,它们形成异源二聚体,识别半位点共有序列 TGACCT,以正向重复排列。两个半位点间相隔一定数目的核苷酸对,其间隔距离决定结合受体的种类(表 36-5)。激素受体的 C 端为激素结合区, N 端为转录激活区,中间为 DNA 结合和二聚化区。

表 36-5 激素受体结合的增强子应答元件

受体	结合的共有序列
雄激素	GG ^A ACAN ₂ TGTTCT
糖皮质激素	GGTACAN ₃ TGTTCT
维生素 D	AGGTCAN ₃ AGGTCA
甲状腺激素	AGGTCAN ₃ AGGTCA
视黄酸(有些)	AGGTCAN ₃ AGGTCA
9-顺视黄酸*	AGGTCANAGGTCANAGGTCANAGGTCANAGGTCAN

*与视黄酸和维生素 D 受体形成异源二聚体

3. 螺旋-突环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)

螺旋-突环-螺旋由 40~50 个氨基酸残基形成两个两性 α 螺旋,中间隔着一个长度可变的连接区(即突环),如结合于 CAAT 框的因子 CTF1、2 和 3 以及某些增强子的结合因子。含有 HLH 结构域的蛋白质,以其两性螺旋表面疏水氨基酸残基之间的相互作用,形成同源二聚体或异源二聚体。多数 HLH 蛋白可借助其 HLH 基序 N 端的碱性 α 螺旋与 DNA 结合,具此碱性区的 HLH 蛋白称为 bHLH 蛋白。缺少碱性区的 HLH 蛋白可以与 bHLH 蛋白形成二聚体,但无结合 DNA 的能力。通过二聚化可以使有限的亚基形成众多的转录因子。

4. 亮氨酸拉链(leucine zipper, ZIP)

亮氨酸拉链因其在 α 螺旋中每两圈 7 个氨基酸残基有一个亮氨酸,正好亮氨酸位于同一侧,借助亮氨酸侧链的疏水相互作用而形成二聚体。此结构形似拉链故而得名。在亮氨酸所在螺旋的 N 端连以约 30 个氨基酸构成的碱性 α 螺旋,与 DNA 结合有关,称为 bZIP。如 C/EBP 蛋白(可结合于 CAAT 框和 SV40 的增强子)为含有 4 个重复亮氨酸结构单位的同源二聚体。Jun 和 Fos 家族成员均含有 5 个亮氨酸结构单位,Jun 可形成同源或异源二聚体,Fos 只能与 Jun 形成异源二聚体,AP1 因子即是一种 Jun-Fos 异二聚体。

转录激活结构域常见的有 3 种:① 酸性 α 螺旋(acidic α -helix)。该结构域含有酸性氨基酸的保守序列,形成带负电荷的螺旋区,如酵母活化因子 GAL4、糖皮质激素受体和 AP1 等。② 富含谷氨酰胺结构域(glutamine-rich domain)。首先在 SP1 中发现,其 N 端有两个转录激活区,其中谷氨酰胺(gln)残基含量可达 25%。③ 富含脯氨酸结构域(proline-rich domain)。CTF 家族的 C 端区与转录激活有关,其脯氨酸残基可达 20%~30%。

上游因子的转录激活作用,或是直接作用于转录起始复合物(包括 RNA 聚合酶和通用转录因子),刺激转录活性;或是通过蛋白质-蛋白质的介导,间接作用于转录复合物。大多数上游因子需经过中间蛋白质因子将信息传递给转录复合物。这类中间因子称为辅转录因子(cofactor),它们不能直接与 DNA 调节元件结合,只是在上游因子和转录复合物间起桥梁作用。转录抑制因子的作用通常是阻断激活因子对转录的促进作用。它们或是结合于 DNA 的调节元件,或是结合于激活因子,或是结合于转录复合物,使转录激活因子无法发挥作用。

增强子(enhancer)主要存在于真核生物的基因组中。最早发现的 SV40 增强子位于转录起点上游大约 200 bp 处的超敏感位点,由两个相同的 72 bp 序列前后排列而组成。增强子是一类顺式作用元件,它能极大促进启动子的转录活性,其作用有几个明显特点:① 能在很远距离(大于几 kb)对启动子产生影响;②

无论位于启动子上游或是下游都能发挥作用;③ 其功能与序列取向无关;④ 无生物种属特异性;⑤ 受发育和分化的影响。增强子与启动子相似,是一类具有模块组织的顺式元件,它们都由许多模块元件所组成,二者成分中有的相同,有的相似,但在增强子中这类模块元件更加集中和紧密。从某种意义上来说,增强子也可以看作是启动子远离起点的上游元件。事实上作用其上的反式因子也相同或相似。同样,沉默子(silencer)和启动子负调节元件之间也无本质的差别,它们都能对某些激活因子起阻碍作用。

就目前所知,染色质的结构域(或许即相当于染色体上的染色带)可能具有 3 种类型的控制位点和多个转录单位。基因座控制区(locus control region, LCR)是一类真核生物的顺式作用元件,它包括 DNase I 高度敏感区和许多转录因子的结合位点,常位于所控制基因相当远的距离,为基因转录活性所必需。LCR 被认为是通过改变染色质结构,以“打开”整个结构域,使其可进行转录。然而各个基因还有其自身特异的控制,可进一步调节。绝缘子(insulator)是近年发现一类很特殊的顺式作用元件,它与增强子和沉默子都不同,其功能只是阻止激活或阻遏作用在染色质上的传递,因而使染色质活性限定于结构域之内。如果将一个绝缘子置于增强子和启动子之间,它能阻止增强子对启动子的激活。另一方面,如果一个绝缘子在活性基因和异染色质之间,它可以保护基因免受异染色质化扩展招致的失活。这些性质表明,绝缘子可能影响染色质的组织结构。基质附着位点(matrix attachment region, MAR)帮助染色质附着在核周质一定部位。这三类元件或存在于结构域的一端,或存在于两端,如图 36-12 所示。

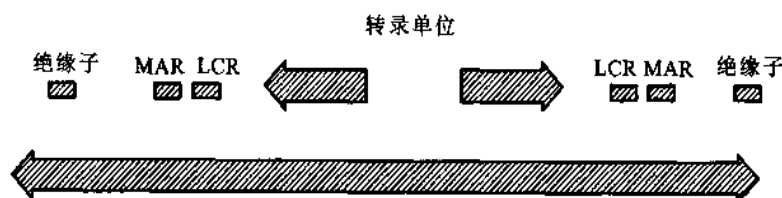


图 36-12 染色质结构域具有 3 种类型的位点

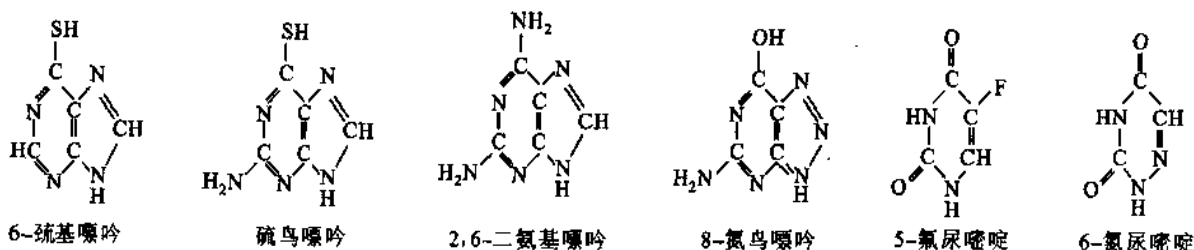
LCR, 基因座控制区 MAR, 基质附着位点

(五) RNA 生物合成的抑制剂

某些核酸代谢的产物和抗生素能抑制核苷酸或核酸的生物合成,因而被用作治疗疾病,特别是抗病毒和抗肿瘤药物,而在临床上得到广泛应用。在实验室中研究核酸的代谢也常要用到这些抑制剂。按照作用性质的不同, RNA 生物合成的抑制剂可分为三类:一类是嘌呤和嘧啶类似物,它们可作为核苷酸代谢产物而抑制核酸前体的合成;第二类是通过与 DNA 结合而改变模板的功能;第三类则是与 RNA 聚合酶结合而影响其活力。现分别举例说明如下:

1. 嘌呤和嘧啶类似物

有些人工合成的碱基类似物(analogue)能够抑制和干扰核酸的合成。其中重要的如:6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、2,6-二氨基嘌呤(2,6-diaminopurine)、8-氮鸟嘌呤(8-azaguanine)、5-氟尿嘧啶(5-flourouracil)以及氮尿嘧啶(azauracil)等。



这些碱基类似物在体内至少有两方面的作用:它们或者作为代谢产物(antimetabolite),直接抑制核苷酸生物合成有关的酶类;或者通过掺入到核酸分子中去,形成异常的 DNA 或 RNA,从而影响核酸的功能

并导致突变。

例如,6-巯基嘌呤进入体内后,在酶催化下与5-磷酸核糖焦磷酸反应,或经其他途径,转变成巯基嘌呤核苷酸,然后在核苷酸的水平上阻断体内嘌呤核苷酸的生物合成。具体的作用部位可能有两个:一是抑制次黄嘌呤核苷酸转变为腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸;另一是通过反馈抑制阻止5-磷酸核糖焦磷酸与谷氨酰胺反应生成5-磷酸核糖胺。6-巯基嘌呤是重要的抗癌药物,临床上用于治疗急性白血病和绒毛膜上皮癌等。

一般认为,碱基类似物进入体内后需要转变成相应的核苷酸,才表现出抑制作用。8-氮鸟嘌呤在形成核苷酸后,除能抑制嘌呤核苷酸的生物合成外,尚能显著地掺入到RNA中去,有时也有少量掺入DNA。8-氮鸟嘌呤对蛋白质合成的抑制作用,可能与它构成不正常的RNA有关。

6-氮尿嘧啶在体内可以先转变成核苷,然后再转变成核苷酸;后者对乳清苷酸脱羧酶有明显的抑制作用。氮尿嘧啶核苷二磷酸能够抑制多核苷酸磷酸化酶;而其核苷三磷酸则能抑制DNA指导的RNA聚合酶。通常氮尿嘧啶并不掺入RNA中去。

嘧啶的卤素化合物常能掺入到核酸中,造成不正常的核酸分子。5-氟尿嘧啶能掺入RNA,但不能掺入DNA。5-氯、5-溴、5-碘尿嘧啶均能取代胸腺嘧啶掺入到DNA中去。这是因为氟的范德华半径为0.135 nm,与氢的范德华半径0.12 nm相近似,故氟尿嘧啶类似于尿嘧啶;另一方面,胸腺嘧啶中甲基的范德华半径为0.202 nm,而氯为0.180 nm,溴为0.195 nm,碘为0.215 nm,尿嘧啶的氯、溴、碘取代物均类似于胸腺嘧啶。但三者间也有差别,以溴的范德华半径与甲基最为相近,因而溴尿嘧啶最易掺入DNA。溴尿嘧啶掺入DNA中能与腺嘌呤配对,但它通过互变异构而形成较罕见的烯醇式时,却能和鸟嘌呤配对,因此在掺入或复制时造成碱基配对的错误,结果使A-T碱基对转变成G-C对,或反之。

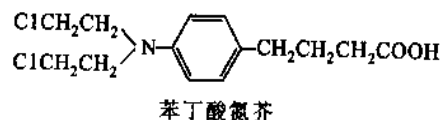
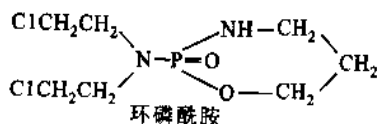
某些卤素取代的嘧啶类似物也是常见的抗癌药物,其中以5-氟尿嘧啶较为重要,它可用于治疗直肠癌及结肠癌、胃癌等等。5-氟尿嘧啶进入体内后能先转变成它的核糖核苷酸(F-Ump),再转变成脱氧核糖核苷酸(F-dUMP),后者能抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,使细胞缺乏DNA合成必需的胸腺嘧啶核苷酸而显示出抗癌效力。在正常细胞内,5-氟尿嘧啶能被分解为 α -氟- β -氨基丙酸,但在癌细胞内则否。这可能是5-氟尿嘧啶具有选择性抑制癌细胞生长的原因之一。

2. DNA 模板功能的抑制物

有一些化合物由于能够与DNA结合,使DNA失去模板功能,从而抑制其复制和转录。某些重要的抗癌药和抗病毒药即属于这一类抑制物。现举一些例子说明其作用原理。

(1) 烷化剂(alkylating agent) 如氮芥[nitrogen mustard,为二(氯乙基)胺的衍生物]、磺酸酯(sulfonate)以及氮丙啶(aziridine)或乙撑亚胺(ethylenimine)类的衍生物等。它们带有一个或多个活性烷基,能使DNA烷基化。烷基化位置主要发生在鸟嘌呤碱基的N₇上,腺嘌呤的N₁、N₃和N₇以及胞嘧啶的N₁也有少量被烷基化。鸟嘌呤烷基化后不稳定,易被水解脱落下来,留下的空隙可能干扰DNA复制或引起错误碱基的掺入。带有双功能基团的烷化剂(即有两个活性基团的烷化剂)能同时与DNA的两条链作用,使双链间发生交联(cross-link),从而抑制其模板功能。磷酸基也可以被烷基化,这样形成的磷酸三酯是不稳定的,可以导致DNA链断裂。

通常烷化剂都具有较大毒性,并能引起细胞突变和致癌作用。有些烷化剂因能比较选择性地杀死肿瘤细胞而在临床上用于治疗恶性肿瘤。例如,环磷酰胺(cyclophosphamide)在体外几乎无毒性,但进入肿瘤细胞后受磷酸酯酶作用水解成活性氮芥,因而可用于治疗多种癌症。再如,苯丁酸氮芥(chlorambucil)因含有酸性基团,不易进入正常细胞;而癌细胞酵解作用旺盛,大量积累乳酸,pH较低,故容易进入癌细胞。环磷酰胺与苯丁酸氮芥的结构式如下:



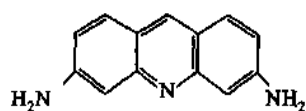
(2) 放线菌素 放线菌素有抗菌和抗癌作用,临床上应用很广泛。放线菌素 D(Actinomycin D)的结构式见“抗生素”一章。

放线菌素 D 含有一个吩恶嗪酮稠环(phenoxazone)和两个五肽环[L-N-甲基缬氨酸、肌氨酸(sarcosine)、L-脯氨酸、D-缬氨酸-L-苏氨酸]。它可与 DNA 形成非共价的复合物,因而抑制 DNA 的模板功能。低浓度(1 mmol/L)的放线菌素 D 即可有效地抑制 DNA 指导的 RNA 的合成,也就是说阻止 DNA 分子上遗传信息的转录;但对 DNA 的复制,则必须在较高浓度(10 mmol/L)下才有抑制作用。在实验室中,常用它来研究核酸的生物合成。

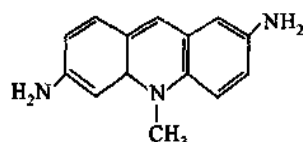
研究表明,放线菌素的这种抑制作用和它与 DNA 的鸟嘌呤之间形成特殊的氢键结合有关。根据放线菌素与脱氧鸟嘌呤核苷复合物的结晶所作的 X 射线分析以及其他资料,推测放线菌素-DNA 复合物的可能结构为:放线菌素的吩恶嗪酮稠环部分插入 DNA 的邻近两 G-C 碱基对之间,鸟嘌呤恰位于 DNA 相反的两条链上,两个鸟嘌呤的 2-氨基分别与环肽的 L-苏氨酸残基的羰基氧形成氢键,两个环肽则位于 DNA 双螺旋的“浅沟”(minor groove)上。放线菌素与 DNA 的特异结合,使其多肽部分在 DNA 的“浅沟”上如同阻遏蛋白一样,抑制 DNA 的转录功能。

与此相类似的,色霉素 A₃(chromomycin A₃)、橄榄霉素(olivomycin)和光神霉素(mithramycin)等抗癌抗生素亦能和 DNA 形成非共价的复合物,从而抑制 DNA 的模板功能。

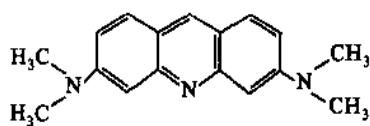
(3) 嵌入染料 某些具有扁平芳香族发色团的染料,可插入双链 DNA 相邻碱基对之间,因而称为嵌入染料(intercalative dye)。嵌入剂通常含有吡啶(acridine)或菲啶(phenanthridine)环,它们与碱基对差不多大小,插入后使 DNA 在复制中缺失或增添一个核苷酸,从而导致移码突变。吡啶类染料有原黄素(proflavine)、吡啶黄(acridine yellow)、吡啶橙(acridine orange)等,它们也能抑制 RNA 链的起始以及质粒复制。溴乙锭(ethidium bromide)常用于检测 DNA 和 RNA,是一种高灵敏的荧光试剂,与 DNA 结合后抑制 DNA 的复制和转录。这类化合物的结构式如下:



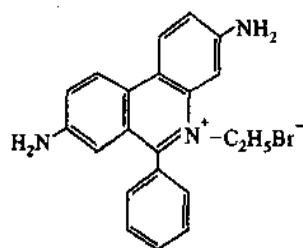
原黄素



吡啶黄



吡啶橙



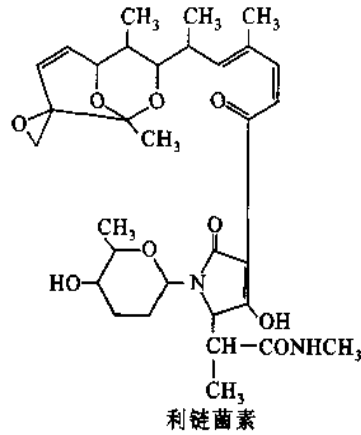
溴乙锭

3. RNA 聚合酶的抑制物

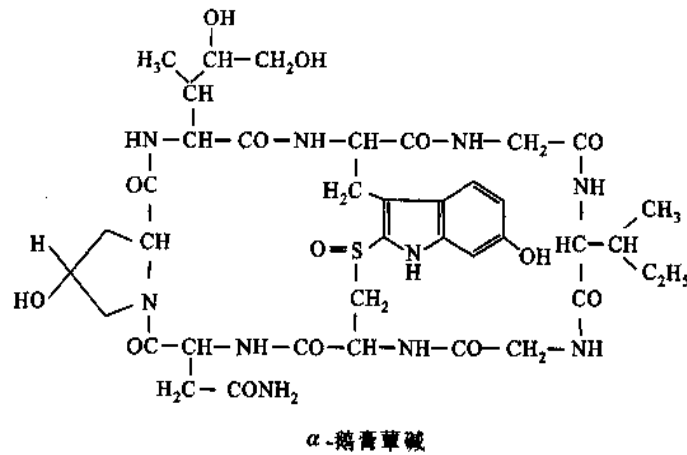
有些抗生素或化学药物,由于能够抑制 RNA 聚合酶,因而抑制 RNA 的合成。

(1) 利福霉素 利福霉素(rifamycin)是 1957 年分离得到的一族抗生素,它能强烈抑制革兰氏阳性菌和结核杆菌,对革兰氏阴性菌的抑制作用较弱。随后进行了对利福霉素结构改造工作。1962 年获得半合成的利福霉素 B 衍生物利福平(rifampicin),它可供口服,且具有广谱的抗菌作用,对结核杆菌有高效,并能杀死麻疯杆菌,在体外有抗病毒作用。许多实验说明,利福霉素及其同类化合物的作用机制与前类抗生素不同,它们不作用于 DNA,而主要是特异地抑制细菌 RNA 聚合酶的活性,因而抑制细菌 RNA 的合成。它们的结构式见本书“抗生素”一章。

(2) 利链菌素 利链菌素(streptolydigin)与细菌的 RNA 聚合酶 β 亚基结合,抑制转录过程中链的延长反应。利链菌素的结构式如下:



(3) α -鹅膏蕈碱 α -鹅膏蕈碱是从毒蕈(鬼笔鹅膏 *Amanita phalloides*)中分离出来的一种八肽化合物。它抑制真核生物 RNA 聚合酶,但对细菌 RNA 聚合酶的抑制作用极为微弱。 α -鹅膏蕈碱的结构式如下:



二、RNA 的转录后加工

在细胞内,由 RNA 聚合酶合成的原初转录物(primary transcript)往往需要经过一系列的变化,包括链的裂解、5'端与 3'端的切除和特殊结构的形成、核苷的修饰和糖苷键的改变、以及拼接和编辑等过程,始能转变为成熟的 RNA 分子。此过程总称之为 RNA 的成熟,或称为转录后加工(post-transcriptional processing)。

原核生物的 mRNA 一经转录通常立即进行翻译,除少数例外,一般不进行转录后加工。但稳定的 RNA(tRNA 和 rRNA)都要经过一系列加工才能成为有活性的分子。真核生物由于存在细胞核结构,转录与翻译在时间和空间上都被分隔开来,其 mRNA 前体的加工极为复杂。而且真核生物的大多数基因都被居间序列(intervening sequence),即内含子(intron)所分隔而成为断裂基因(interrupted gene),在转录后需通过拼接使编码区成为连续序列。在真核生物中还能通过不同的加工方式,表达出不同的信息(alternative gene)。因此,对于真核生物来讲,RNA 的加工尤为重要。

(一) 原核生物中 RNA 的加工

在原核生物中,rRNA 的基因与某些 tRNA 的基因组成混合操纵子。其余 tRNA 基因也成簇存在,并与编码蛋白质的基因组成操纵子。它们在形成多顺反子转录物后,经断链成为 rRNA 和 tRNA 的前体,然后进一步加工成熟。

1. 原核生物 rRNA 前体的加工

大肠杆菌共有 7 个 rRNA 的转录单位,它们分散在基因组的各处。每个转录单位由 16S rRNA、23S

rRNA、5S rRNA 以及一个或几个 tRNA 的基因所组成。16S rRNA 与 23S rRNA 的基因之间常插入 1 个或 2 个 tRNA 的基因,有时在 3'端 5S rRNA 的基因之后还有 1 个或 2 个 tRNA 的基因。rRNA 的基因原初转录物的沉降常数为 30S,相对分子质量为 2.1×10^6 ,约含 6 500 个核苷酸,5'末端为 pppA。由于在原核生物中 rRNA 的加工往往与转录同时进行,因此不易得到完整的前体。从 RNase III 缺陷型大肠杆菌中分离到 30S rRNA 前体(P30)。RNase III 是一种负责 RNA 加工的核酸内切酶,它的识别部位为特定的 RNA 双螺旋区。16S rRNA 和 23S rRNA 的两侧序列互补,形成茎环结构,RNase III 在茎部有两切割位点相差 2 bp。切割产生 16S 和 23S rRNA 前体 P16 和 P23。5S rRNA 前体 P5 在 RNase E 作用下产生的,它可识别 P5 两端形成的茎环结构。P5、P16 和 P23 两端的多余附加序列需进一步由核酸酶切除。可能 rRNA 前体需先经甲基化修饰,再被核酸内切酶和核酸外切酶切割(图 36-13)。不同细菌 rRNA 前体的加工过程并不完全相同,但基本过程类似。

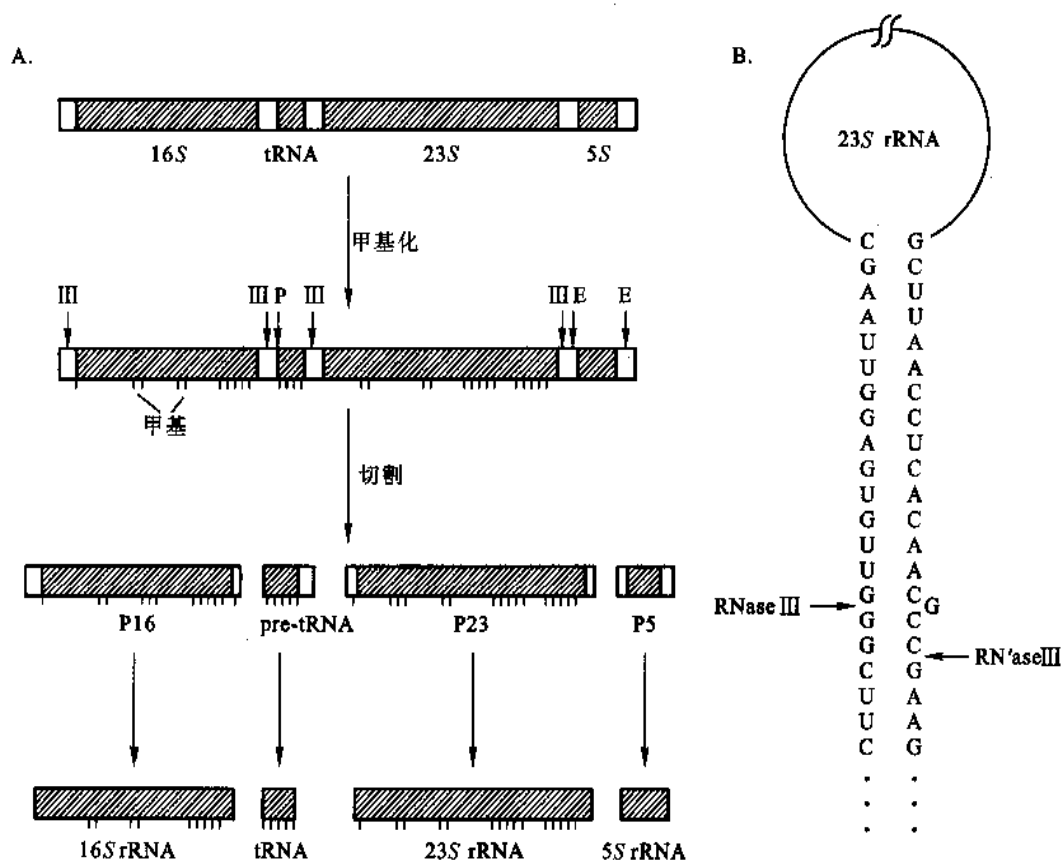


图 36-13 大肠杆菌 rRNA 前体的加工

A. rRNA 前体的加工过程; B. RNase III 的切割位点

原核生物 rRNA 含有多个甲基化修饰成分,包括甲基化碱基和甲基化核糖,尤其常见的是 2'-甲基核糖。16S rRNA 含有约 10 个甲基,23S rRNA 约 20 个甲基,其中 $N^4,2'$ -O-二甲基胞苷(m^4Cm)是 16S rRNA 特有的成分。一般 5S rRNA 中无修饰成分,不进行甲基化反应。

2. 原核生物 tRNA 前体的加工

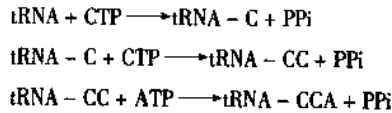
大肠杆菌染色体基因组共有 tRNA 的基因约 60 个。这个数字远大于按变偶假说所要求的反密码子数,也就是说,某些反密码子可以不只一个 tRNA 分子,或某些 tRNA 基因不只一个拷贝。tRNA 的基因大多成簇存在,或与 rRNA 的基因,或与编码蛋白质的基因组成混合转录单位。tRNA 前体的加工包括:① 由核酸内切酶在 tRNA 两端切断(cutting);② 由核酸外切酶从 3'端逐个切去附加的顺序,进行修剪(trimming);③ 在 tRNA 3'端加上胞苷酸-胞苷酸-腺苷酸(-CCA_{OH});④ 核苷酸的修饰和异构化。

与 DNA 限制性内切酶不同,RNA 核酸内切酶不能识别特异的序列,它所识别的是加工部位的空间结构。大肠杆菌 RNase P 是一类切断 tRNA 5'端的加工酶,属于核酸内切酶性质。差不多所有大肠杆菌及其

噬菌体 tRNA 前体都是在该酶作用下切出成熟的 tRNA 5' 端。因此,这个 5' - 核酸内切酶是 tRNA 的 5' 成熟酶。RNase P 是一个很特殊的酶,它含有蛋白质和 RNA 两部分。RNA 链由 375 个核苷酸组成(相对分子质量约 130 000),蛋白质多肽链的相对分子质量仅 20 000。在某些条件下(提高 Mg^{2+} 浓度或加入多胺类物质),RNase P 中的 RNA 单独也能切断 tRNA 前体的 5' 端序列。RNase P 中的 RNA 称为 M1 RNA。有关 RNA 的催化功能,后面还将进一步讨论。

加工 tRNA 前体 3' 端的序列还需要另外的核酸内切酶,例如 RNase F,它从靠近 3' 端处切断前体分子。为了得到成熟的 3' 端,需要有核酸外切酶进一步进行修剪,从前体 3' 端逐个切去附加的序列,直至 tRNA 的 3' 端。负责修剪的核酸外切酶可能主要为 RNase D。这个酶由相对分子质量为 38 000 的单一多肽链所组成,具有严格的选择活性。实验表明它识别的是整个 tRNA 结构,而不是 3' 末端的特异序列。由此可见,RNase D 是 tRNA 的 3' 端成熟酶。

所有成熟 tRNA 分子的 3' 端都有 CCA_{OH} 结构,它对于接受氨酰基的活性是必要的。细菌的 tRNA 前体存在两类不同的 3' 端序列。一类其自身具有 CCA 三核苷酸,位于成熟 tRNA 序列与 3' 端附加序列之间,当附加序列被切除后即显露出该末端结构。另一类其自身并无 CCA 序列。当前体切除 3' 端附加序列后,必须外加 CCA。添加 CCA 是在 tRNA 核苷酰转移酶(nucleotidyl transferase)催化下进行的,由 CTP 和 ATP 供给胞苷酸和腺苷酸,反应式如下:



成熟的 tRNA 分子中存在众多的修饰成分,其中包括各种甲基化碱基和假尿嘧啶核苷。tRNA 修饰酶具有高度特异性;每一种修饰核苷都有催化其生成的修饰酶。tRNA 甲基化酶对碱基及 tRNA 序列均有严格要求,甲基供体一般为 S-腺苷蛋氨酸(SAM),反应如下:



tRNA 假尿嘧啶核苷合酶催化尿苷的糖苷键发生移位反应,由尿嘧啶的 N_1 变为 C_5 。

细菌 tRNA 前体的加工如图 36-14 所示。

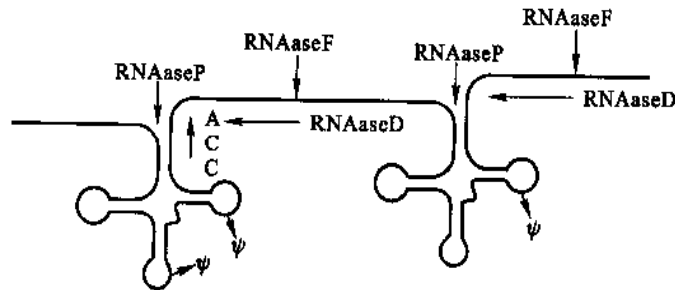


图 36-14 tRNA 前体分子的加工

↓ 表示核酸内切酶的作用; ← 核酸外切酶的作用
↑ 核苷酰转移酶的作用; ↓ 异构化酶的作用

3. 原核生物 mRNA 前体的加工

细菌中用于指导蛋白质合成的 mRNA 大多不需要加工,一经转录即可直接进行翻译。但也有少数多顺反子 mRNA 需通过核酸内切酶切成较小的单位,然后再进行翻译。例如,核糖体大亚基蛋白 L10 和 L7/L12 与 RNA 聚合酶 β 和 β' 亚基的基因组成混合操纵子,它在转录出多顺反子 mRNA 后需通过 RNase III 将核糖体蛋白质与聚合酶亚基的 mRNA 切开,然后再各自进行翻译。该加工过程的意义在于可对 mRNA 的翻译进行调控。核糖体蛋白质的合成必须对应于 rRNA 的合成水平,并且与细胞的生长速度相适应。细胞内 RNA 聚合酶的合成水平则要低得多。将二者 mRNA 切开,有利于各自的翻译调控。

类似的加工过程也可以在某些噬菌体的多顺反子 mRNA 中见到。例如,大肠杆菌噬菌体 T7 的早期基

因转录出一条长的多顺反子 mRNA, 经 RNase III 切割成 5 个单独的 mRNA 和一段 5' 端前导序列。mRNA 的切割对其中某些早期蛋白质的合成是必要的。推测可能是由于较长的 mRNA 产生二级结构, 会阻止有关编码序列的翻译。这种 RNA 二级结构(可能还有三级结构)与其功能的调控关系在多种情况下均可看到, 并不仅限于翻译起始的调控。通过 RNA 链的裂解, 改变了 RNA 的二级结构, 从而影响它的功能。

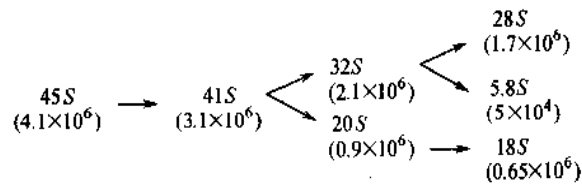
(二) 真核生物中 RNA 的一般加工

真核生物 rRNA 和 tRNA 前体的加工过程与原核生物有些相似; 然而其 mRNA 前体必须经复杂的加工过程, 这与原核生物大不相同。真核生物大多数基因含有居间序列, 需在转录后的加工过程中予以切除。由于这方面研究的进展极为迅速, 故留在后面单独进行讨论。

1. 真核生物 rRNA 前体的加工

真核生物的核糖体比原核生物的核糖体更大, 结构也更复杂。真核生物核糖体的小亚基含有一条 16~18S rRNA; 大亚基除 26~28S rRNA 和 5S rRNA 外还含有一条 5.8S rRNA, 该 5.8S rRNA 在原核生物中是没有的。真核生物 rRNA 基因拷贝数较多, 通常在几十至几千之间。rRNA 基因成簇排列在一起, 由 16~18S、5.8S 和 26~28S rRNA 基因组成一个转录单位, 彼此被间隔区分开, 由 RNA 聚合酶 I 转录产生一个长的 rRNA 前体。不同生物的 rRNA 前体大小不同。哺乳类动物的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因构成一个转录单位, 转录产生 45S rRNA 前体。果蝇的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因的转录产物为 38S rRNA 前体。酵母的 17S、5.8S 和 26S rRNA 基因的转录产物为 37S 的 rRNA 前体。

真核生物细胞的核仁是 rRNA 合成、加工和装配成核糖体的场所。rRNA 的成熟需经过多步骤的加工过程。用同位素³H-或¹⁴C-尿苷标记 HeLa 细胞的 RNA, 则可分离到 45S rRNA 前体(相对分子质量为 4×10^6)以及 41S、32S、20S 等加工产物。通过标记动力学实验证明它们是 rRNA 生成过程的前体和中间物。它们的加工过程如下:



不同真核生物 rRNA 前体的加工过程可略有不同。RNase III 以及其他核酸内切酶在 rRNA 前体的加工中起重要作用。

在真核生物中 5S rRNA 基因也是成簇排列的, 中间隔以不被转录的区域。它由 RNA 聚合酶 III 转录, 经过适当加工即与 28S rRNA 和 5.8S rRNA 以及有关蛋白质一起组成核糖体的大亚基。18S rRNA 与有关蛋白质则组成小亚基。然后它们通过核孔再转移到细胞质中参与核糖体循环。

rRNA 在成熟过程中可被甲基化, 主要的甲基化位置也在核糖 2'-羟基上。真核生物 rRNA 的甲基化程度比原核生物 rRNA 的甲基化程度高。例如, 哺乳类细胞的 18S 和 28S rRNA 分别含甲基约 43 和 74 个, 大约 2% 的核苷酸被甲基化, 相当于细菌 rRNA 甲基化程度的 3 倍。与原核生物类似, 真核生物 rRNA 前体也是先甲基化, 然后再被切割。现在知道, 真核生物 rRNA 前体的甲基化、假尿苷酸化(pseudouridylation)和切割是由核仁小 RNA(small nucleolar RNA, snoRNA) 指导的。真核细胞的核仁中存在种类甚多的 snoRNA, 从酵母和人类细胞中已发现有上百种。含有 C 框(AUGAUGA)和 D 框(CUGA)的 snoRNA 可借助互补序列识别 rRNA 前体中进行甲基化(2'OMe)和切割的位点; 含 H 框(ANANNA)和 ACA 框的 snoRNA 可识别假尿苷酸化的位点。酵母 rRNA 中假尿苷酸残基有 43 个, 以及众多的甲基化位点, 依靠 snoRNA 才能精确加工(图 36-15)。

多数真核生物的 rRNA 基因不存在内含子。有些 rRNA 基因含有内含子但并不转录。例如, 果蝇的 28S 个 rRNA 基因中有约三分之一含有内含子, 它们均不转录。四膜虫(Tetrahymena)的核 rRNA 基因和酵母线粒体 rRNA 基因含有内含子, 它们的转录产物可自动切去内含子序列。

线粒体和叶绿体 rRNA 基因的排列方式和转录后加工过程一般都与原核生物的 rRNA 基因类似。

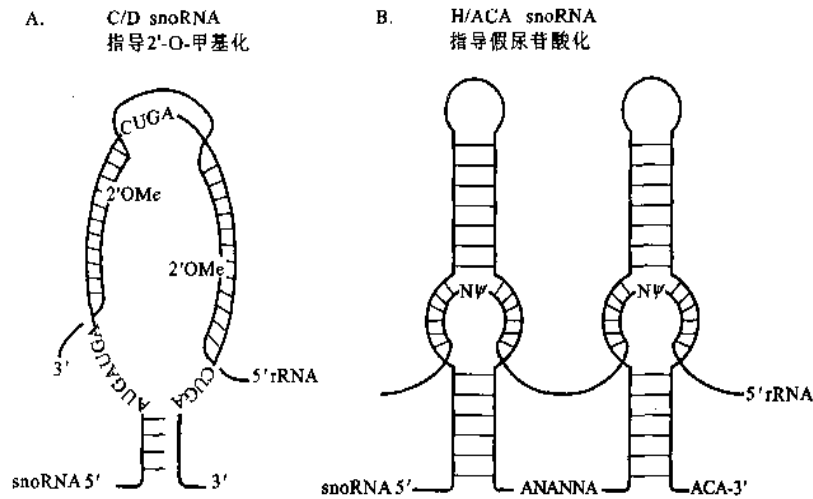


图 36-15 反义 snoRNA 指导 rRNA 位点特异的修饰

2. 真核生物 tRNA 前体的加工

真核生物 tRNA 基因的数目比原核生物 tRNA 基因的数目要大得多。例如,大肠杆菌基因组约有 60 个 tRNA 基因,啤酒酵母有 320~400 个,果蝇 850 个,爪蟾 1 150 个,而人体细胞则有 1 300 个。真核生物的 tRNA 基因也成簇排列,并且被间隔区所分开。tRNA 基因由 RNA 聚合酶 III 转录,转录产物为 4.5S 或稍大的 tRNA 前体,相当于 100 个左右的核苷酸。成熟的 tRNA 分子为 4S,约 70~80 个核苷酸。前体分子在 tRNA 的 5'端和 3'端都有附加的序列,需由核酸内切酶和外切酶加以切除。与原核生物类似的 RNase P 可切除 5'端的附加序列,但是真核生物 RNaseP 中的 RNA 单独并无切割活性。3'端附加序列的切除需要多种核酸内切酶和核酸外切酶的作用。

真核生物 tRNA 前体的 3'端不含 CCA 序列,成熟 tRNA 3'端的 CCA 是后加上去的,催化该反应的酶是核苷酰转移酶,胞苷酰和腺苷酰基分别由 CTP 和 ATP 供给。tRNA 的修饰成分由特异的修饰酶所催化。真核生物的 tRNA 除含有修饰碱基外,还有 2'-O-甲基核糖,其含量约为核苷酸的百分之一。具有居间序列的 tRNA 前体还须将这部分序列切掉。

3. 真核生物 mRNA 前体的一般加工

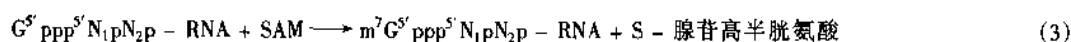
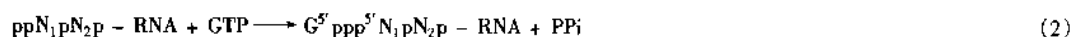
真核生物编码蛋白质的基因以单个基因作为转录单位,不像原核生物那样组成操纵子,其转录产物为单顺反子 mRNA,而不是多顺反子 mRNA。大多数蛋白质基因存在居间序列,它与编码序列一起被转录,需要在转录后加工过程中切除掉。由于细胞核结构将转录和翻译过程分隔开,合成蛋白质的模板(mRNA)在核中产生后须经过一系列复杂的加工过程并转移到细胞质中才能表现出翻译功能,因此它的调控序列变得更为复杂,半寿期也 longer。mRNA 的原初转录物是相对分子质量极大的前体,在核内加工过程中形成分子大小不等的中间物,它们被称为核内不均一 RNA(heterogeneous nuclear RNA,缩写为 hnRNA),其中至少有一部分可转变成细胞质的成熟 mRNA。

hnRNA 的碱基组成与总的 DNA 组成类似,因此又称为类似 DNA 的 RNA(D-RNA)。它们在核内迅速合成和降解,其半寿期很短,比细胞质 mRNA 更不稳定。不同细胞类型的 hnRNA 半寿期不同,几分钟至 1 h 左右;而细胞质 mRNA 的半寿期一般在 1~10 h,神经细胞 mRNA 最长半寿期可达数年。

hnRNA 的相对分子质量分布极不均一,其沉降系数在 10S 以上,主要在 30S~40S 区域,少部分可高达 70~100S。哺乳类动物 hnRNA 平均链长在 8 000~10 000 个核苷酸之间,而细胞质 mRNA 平均链长为 1 800~2 000 核苷酸,hnRNA 链长约是 mRNA 的 4~5 倍。由于 hnRNA 代谢转换率极高,而稳定性 RNA 则较低,用同位素脉冲标记技术,即短期加入同位素标记前体核苷酸随即除去并用非标记前体取代,可追踪 hnRNA 的去向。用这样的方法测定 hnRNA 转变成 mRNA 所占的物质比例,对哺乳类细胞来说大约为 5%。考虑到 hnRNA 分子大小为 mRNA 的 5 倍,粗略计算有 25%的 hnRNA 经加工转变成 mRNA。

由 hnRNA 转变成 mRNA 的加工过程包括:① 5'端形成特殊的帽子结构($m^7G^5'ppp^5'NmpNp-$),② 在链的 3'端切断并加上多聚腺苷酸(poly A)尾巴,③ 通过拼接除去由内含子转录来的序列,④ 链内部核苷被甲基化。

(1) 5'端加帽 真核生物的 mRNA 都有 5'端帽子结构。该特殊结构亦存在于 hnRNA 中,它可能在转录的早期阶段或转录终止前就已形成。从某些病毒和动物组织 mRNA 前体加帽过程的研究表明,原初转录的巨大 hnRNA 分子 5'端为三磷酸嘌呤核苷($pppPu$),转录起始后不久从 5'端三磷酸脱去一个磷酸,然后与 GTP 反应生成 5',5'-三磷酸相连的键,并释放出焦磷酸,最后以 S-腺苷蛋氨酸(SAM)进行甲基化产生所谓的帽子结构,反应如下:



催化反应(1)的酶为 RNA 三磷酸酶,催化反应(2)的酶为 mRNA 鸟苷酰转移酶,催化反应(3)的酶为 mRNA (鸟嘌呤-7)甲基转移酶,催化反应(4)的酶为 mRNA(核苷-2')甲基转移酶。不同生物体内,由于甲基化程度的不同,可以形成几种不同形式的帽子。有些帽子结构仅形成 7-甲基鸟苷三磷酸 m^7Gppp ,被称为 Cap 0 型;有些在 m^7Gppp 之后的 N_1 核苷甚至 N_2 核苷的核糖 2'-OH 基上也被甲基化,分别称为 Cap I 型和 Cap II 型。

5'端帽子的确切功能还不十分清楚,推测它能在翻译过程中起识别作用以及对 mRNA 起稳定作用。用化学方法除去 m^7G 的珠蛋白 mRNA 在麦胚无细胞系统中不能有效地翻译,表明帽子结构对翻译功能是很重要的。帽子结构还可以保护 mRNA,避免 5'端受核酸外切酶的降解。帽子结构上的鸟嘌呤如果不带甲基时($G, pppNpNp-$),翻译效果也较差,但稳定性不变。5'-脱氧-5'-异丁酰基腺苷是腺苷高半胱氨酸的类似物,它能强烈抑制劳氏肉瘤的生长。实验分析表明,这是因为该抑制剂可抑制 mRNA(鸟嘌呤-7)甲基转移酶活力,从而阻止了帽子结构上鸟嘌呤的甲基化。

(2) 3'末端的产生和多聚腺苷酸化 真核生物 mRNA 的 3'端通常都有 20~200 个腺苷酸残基,构成多聚腺苷酸的尾部结构。但也有例外,如组蛋白、呼肠孤病毒和不少植物病毒的 mRNA 并没有多聚腺苷酸。核内 hnRNA 的 3'端也有多聚腺苷酸,表明加尾过程早在核内已完成。hnRNA 中的多聚腺苷酸比 mRNA 的略长,平均长度为 150~200 个核苷酸。

实验表明, RNA 聚合酶 II 的转录产物是在 3'端切断,然后多聚腺苷酸化(polyadenylation)。高等真核生物(酵母除外)的细胞和病毒 mRNA 在靠近 3'端区都有一段非常保守的序列 AAUAAA,这一序列离多聚腺苷酸加入位点的距离不一,大致在 11~30 个核苷酸范围内。将病毒转录单位的该段序列删除后,原来位置上就不再发生切断和多聚腺苷酸化。一般认为,这一序列为链的切断和多聚腺苷酸化提供了某种信号。

hnRNA 链的切断可能是由 RNase III 完成的。多聚腺苷酸化则由多聚腺苷酸聚合酶(poly(A) polymerase)所催化,该酶以带 3'-OH 基的 RNA 为受体,ATP 作供体,需 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 。此外,还需十多个蛋白质参与作用,协助切割和多聚腺苷酸化。

多聚腺苷酸化可被类似物 3'-脱氧腺苷,即冬虫夏草素(cordycepin)所阻止。这是一种多聚腺苷酸化的特异抑制剂;它并不影响 hnRNA 的转录,但在加入该抑制剂时,即可阻止细胞质中出现新的 mRNA。这表明多聚腺苷酸化对 mRNA 的成熟是必要的。另一方面,珠蛋白 mRNA 上的多聚腺苷酸尾巴被除去后,仍然能在麦胚无细胞系统中翻译,显示该尾部结构并非翻译所必需。然而除去多聚腺苷酸尾巴的 mRNA 稳定性较差,可被体内有关酶所降解,翻译效率下降。当 mRNA 由细胞核转移到细胞质中时,其多聚腺苷酸尾部常有不同程度的缩短。由此可见,多聚腺苷酸尾巴至少可以起某种缓冲作用,防止核酸外切酶对 mRNA 信息序列的降解作用。

(3) mRNA 的内部甲基化 真核生物 mRNA 分子内部往往有甲基化的碱基,主要是 N^6 -甲基腺嘌呤(m^6A)。这类修饰成分在 hnRNA 中已经存在。不过也有一些真核生物细胞和病毒 mRNA 中并不存在 N^6 -甲

基腺嘌呤,似乎这个修饰成分对翻译功能不是必要的。据推测,它可能对 mRNA 前体的加工起识别作用。

(三) RNA 的拼接、编辑和再编码

大多数真核基因都是断裂基因,但也有少数编码蛋白质的基因以及一些 tRNA 和 rRNA 基因是连续的。断裂基因的转录产物需通过拼接,去除插入部分(即内含子, intron),使编码区(外显子, exon)成为连续序列。这是基因表达调控的一个重要环节。内含子具有多种多样的结构,拼接机制也是多种多样的。有些内含子可以催化自身拼接(self-splicing),有些内含子需在拼接体(spliceosome)作用下才能拼接。RNA 编码序列的改变称为编辑(editing)。RNA 编码和读码方式的改变称为再编码(recoding)。由于存在选择性拼接(alternative splicing)、编辑和再编码,一个基因可以产生多种蛋白质。

1. RNA 的拼接

1977 年 Roberts R J 和 Sharp P A 分别发现断裂基因(interrupted gene)。当用 RNA 与其转录的模板 DNA 分子杂交时, RNA 链取代 DNA 双链中对应的链,形成 R-突环(R-loop)。Roberts 等用腺病毒(Ad2)纤维(fiber)mRNA 与病毒 DNA 限制片段杂交,然后用电子显微镜观察 R-突环的结构,结果令人惊异的发现 mRNA 的 5'端与其余部分分别与不同 DNA 限制片段形成杂交。Sharp P A 等用腺病毒六邻体(hexon)mRNA 与 DNA 杂交,在电子显微镜下也看到 mRNA 5'端不与同一 DNA 片段杂交(图 36-16)。这说明腺病毒 mRNA 5'前导序列与其余序列由基因组不同部位转录而来。其后研究进一步了解到真核生物基因大部分都是断裂的,即不连续的,插进去的序列称为居间序列(intervening sequence),需在转录后通过 RNA 拼接加以切除。1978 年 Gilbert W 将断裂基因中经转录被拼接除去的序列称为内含子(intron);而在成熟 RNA 产物中出现的序列称为外显子(exon)。Roberts 和 Sharp 由于发现断裂基因以及其后有关 RNA 拼接研究中的贡献而获 1993 年诺贝尔生理学 and 医学奖。

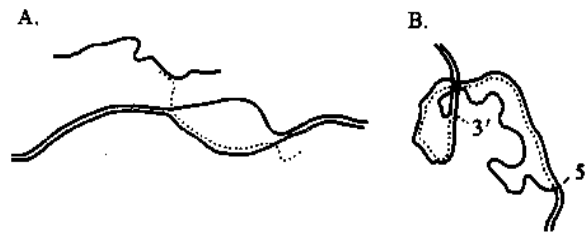


图 36-16 腺病毒-2 晚期 mRNA 与互补 DNA 片段形成 R-突环示意图

A. 腺病毒-2 纤维 mRNA 与两 DNA 片段形成 R-突环

B. 腺病毒-2 六邻体 mRNA 与互补 DNA 片段形成 R-突环, 5'和 3'末端游离在外

— DNA 链 ····· RNA 链

迄今所知, RNA 的拼接共有 4 种方式: 类型 I 自我拼接(group I self-splicing), 类型 II 自我拼接(group II self-splicing), 核 mRNA 的拼接体的拼接(nuclear mRNA spliceosomal), 核 tRNA 的酶促拼接(nuclear tRNA enzymatic)。它们的拼接过程如图 36-17 所示。

(1) 类型 I 自我拼接 1981 年 Cech T 在研究四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) rRNA 前体拼接过程中发现, 此类拼接无需蛋白质的酶参与作用, 它可自我催化完成。Cech 称具有催化功能的 RNA 为核酶(ribozyme)。由于发现核酶, 1989 年 Cech T 和 Altman S 共同获诺贝尔化学奖。Altman 的贡献是发现 RNase P 中的 M1 RNA 单独也有催化功能。

四膜虫的大核含有大量经扩增的 rRNA 的基因(rDNA), 这些 rDNA 以回文二聚体的形式构成微染色体。每一个回文二聚体由两个同样的转录单位所组成, 其转录产物为 rRNA 前体 35S rRNA。35S rRNA 含 6 400 个核苷酸, 经加工生成 17S、5.8S 和 26S rRNA。某些品系的四膜虫在其 26S rRNA 的基因中有一个内含子, 长 413 bp。35S rRNA 前体需经过拼接以切除内含子序列。此拼接过程只需要 1 价和 2 价阳离子以及鸟苷酸(或鸟苷)存在即能自发进行, 无需供给能量和酶催化。拼接实际上是磷酸酯的转移反应, 如图 36-18 所示。

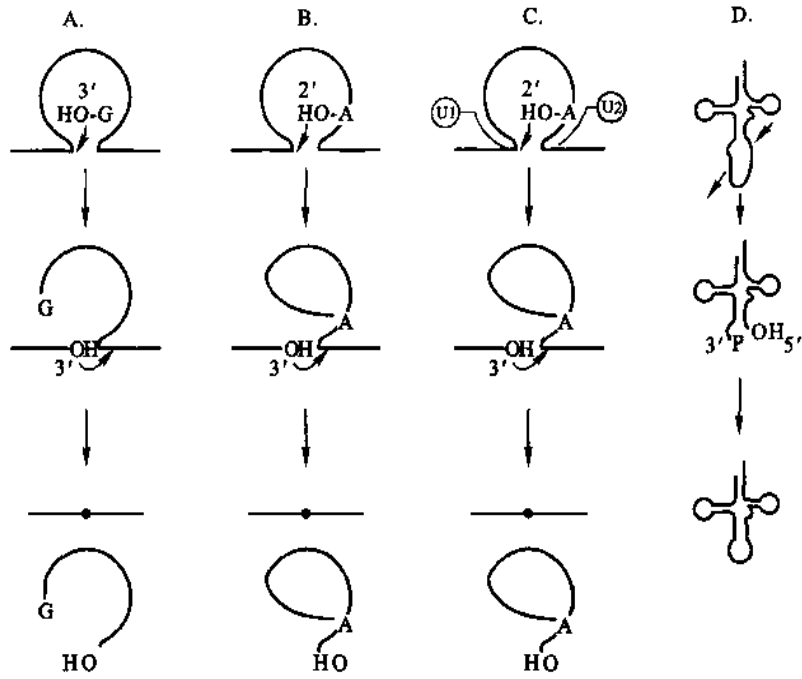
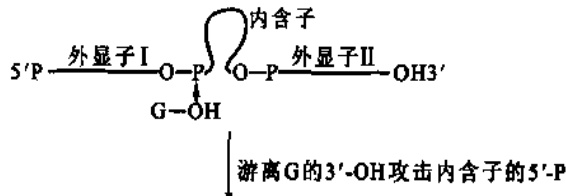


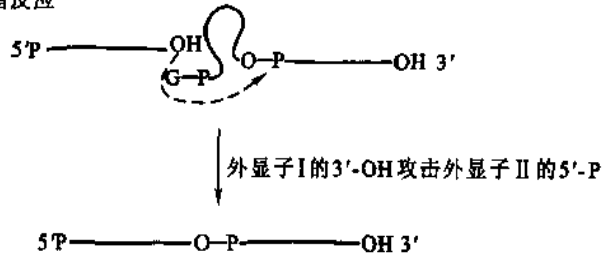
图 36-17 RNA 的拼接方式

A. 类型 I 自我拼接； B. 类型 II 自我拼接； C. 核 mRNA 的拼接体的拼接；
D. 核 tRNA 的酶促拼接

A. 第一次转酯反应



B. 第二次转酯反应



C. 第三次转酯反应

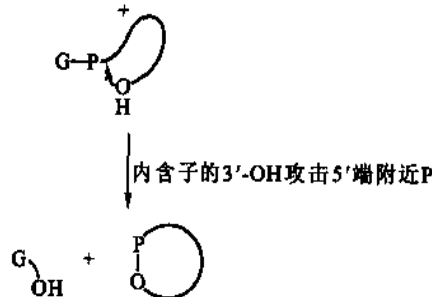


图 36-18 四膜虫 rRNA 前体的拼接过程

鸟苷酸(或鸟苷)在此起着辅助因子的作用,它提供了游离的 3'-羟基,从而使内含子的 5'-磷酸基转移其上。紧接着发生第二次类似的转酯反应,由第一个外显子产生的 3'羟基攻击第二个外显子的 5'磷酸

基。因为在磷酸酯的转移过程中并不发生水解作用,磷酸酯键的能量被贮存起来,由此可以解释为什么反应不需要供给能量。在两次转酯反应中产生的线状内含子片段可以发生环化。这是由于内含子分子的 3'-羟基攻击 5'-末端第 15 个核苷酸处的磷酸基,引起第三次磷酸基转移反应所致,结果形成一个环状分子和一小段 15 聚核苷酸。环状内含子还具有自我切割和转酯反应,最后产生 395 个核苷酸的线型分子,称为 L-19。它不再自我切割,但可以催化适当 RNA 底物的水解和转酯反应。

类型 I 自我拼接的内含子分布很广,存在于真核生物的细胞器(线粒体和叶绿体)基因,低等真核生物核的 rRNA 的基因,细菌和噬菌体的个别基因中。这类内含子含有某些特殊序列,它的内含子指导序列(intron guide sequence, IGS)GGAGGG 可与左侧外显子末端的 CUCUCU 序列配对,包括 IGS 在内共有 9 个碱基配对区,其中 P、Q、R、S 4 个序列十分保守,其核酶活性与所形成特定的折叠有关(图 36-19)。

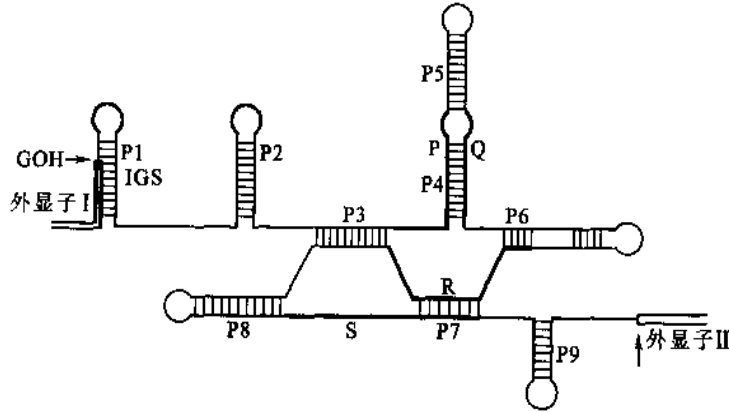
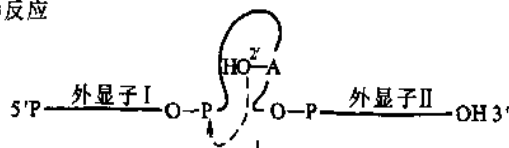


图 36-19 类型 I 内含子的二级结构

粗黑线为保守序列;双线为外显子

(2) 类型 II 自我拼接 类型 II 内含子本身也具有催化功能,能够自我完成拼接。它与类型 I 内含子自我拼接的差别在于转酯反应无需游离鸟苷酸(或鸟苷)发动,而是由内含子靠近 3'端的腺苷酸 2'-羟基攻击 5'-磷酸基引起的。经过两次转酯反应,内含子成为套索(lariat)结构被切除,两个外显子得以连接在一起(图 36-20)。类型 II 内含子只见于某些真菌线粒体和植物叶绿体基因。

A. 第一次转酯反应



B. 第二次转酯反应

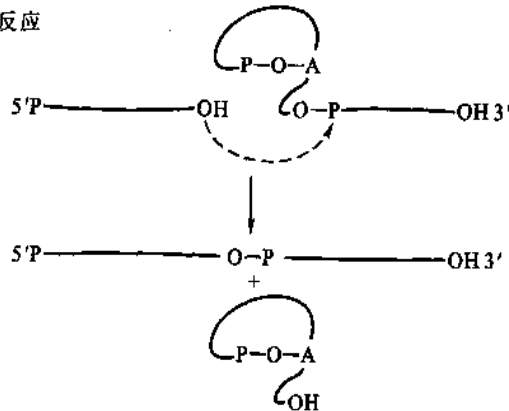


图 36-20 类型 II 内含子的自我拼接

类型 II 内含子的结构更复杂,也更保守,这也是这类内含子存在受局限的重要原因之一。该内含子有 6 个螺旋区,其中螺旋区 I 有两个外显子结合位点(exon binding site, EBS),可以与左侧外显子的内含子结合位点(intron binding site, IBS)配对。内含子靠近 3' 端有一保守序列 CUGAC,其上 A 的 2'-OH 可与末端 5'-P 形成磷酸酯键。由于已有两个磷酸酯键,此反应较弱,对核酶的要求也就比较高。类型 II 内含子的自我拼接活性有赖于其二级结构和进一步折叠,如图 36-21 所示。

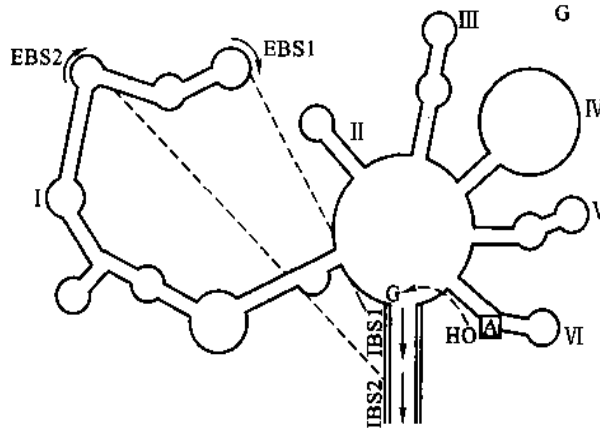
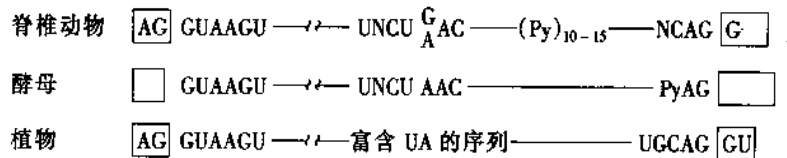


图 36-21 类型 II 内含子的二级结构

(3) hnRNA 的拼接 真核生物编码蛋白质的核基因含有数目巨大的内含子,它们占据了所有内含子的绝大部分。这些内含子的左端(5'端)均为 GT,右端(3'端)均为 AG,此称为 GT-AG 规则(对应于 RNA 为 GU-AG)。此规则不适合于线粒体和叶绿体基因的内含子,也不适合于 tRNA 和 rRNA 核基因的内含子。根据大量资料分析的结果,脊椎动物、酵母和植物 mRNA 前体(hnRNA)的内含子具有以下保守方式:



细胞核内存在许多种类的小分子 RNA,其大小在 100~300 个核苷核,称为核内小 RNA(small nuclear RNA, snRNA)。U 系列的 snRNA 中尿嘧啶含量较高,因而得名。这些小 RNA 通常都与多肽或蛋白质相结合,形成核糖核蛋白(RNP)。每一 snRNA 与数个或十多个蛋白质结合,称为 snRNP。U1、U2、U4、U5、U6 snRNP 参与 hnRNA 的拼接;U3 snRNP 与 rRNA 前体的加工有关。拼接体(spliceosome)为在被拼接 RNA 上由上述 5 种 U 系列 snRNA 和约 50 种蛋白质所组成的复合物,沉降常数为 50S~60S,呈有突起的椭球体。拼接体是由 U1、U2、U4-6 snRNP 以及一些拼接因子(splicing factor, SF),在 RNA 拼接位点逐步装配而成。hnRNA 的拼接过程与类型 II 内含子 RNA 的拼接十分相似,其差别在于前者由拼接体完成,后者由内含子自我催化完成。

U1 snRNA 的 5' 端序列与 hnRNA 内含子 5' 拼接点处的序列互补,因而可以结合其上。U2 snRNA 含有与分支点互补的序列,但 U2 snRNA 与分支点的结合还需要 U1 snRNP 和 U2 辅助因子(U2 auxiliary factor, U2AF)的帮助。U4 与 U6 有很长片段互补,它们往往结合在同一核糖核蛋白颗粒中。U4/U6 和 U5 snRNP 三聚体进入拼接体后,U1 snRNP 被释放,从而腾出空间,使 U5 snRNP 先结合在外显子上,然后转移到内含子上。关键步骤是释放 U4 snRNA, U4 与 U6 的解离需要由 ATP 供给能量。U6 活性受 U4 封闭,因此 U4 脱离后 U6 即可和 U2 碱基配对,并自身回折形成发夹结构,构成类似于 II 型内含子的催化中心。U5 snRNP 可以识别两外显子的拼接点并与之结合。在 U6/U2 催化下完成两次转酯反应,使两个外显子连接在一起,拼接过程如图 36-22 所示。

如上所述,核 mRNA 前体的拼接与类型 II 内含子的拼接基本相同。但是核 mRNA 前体的含内含子数目如此庞大,在进化过程中不可能都保持其 II 型内含子核酶结构,唯一可行的途径是将 II 型内含子的催化功

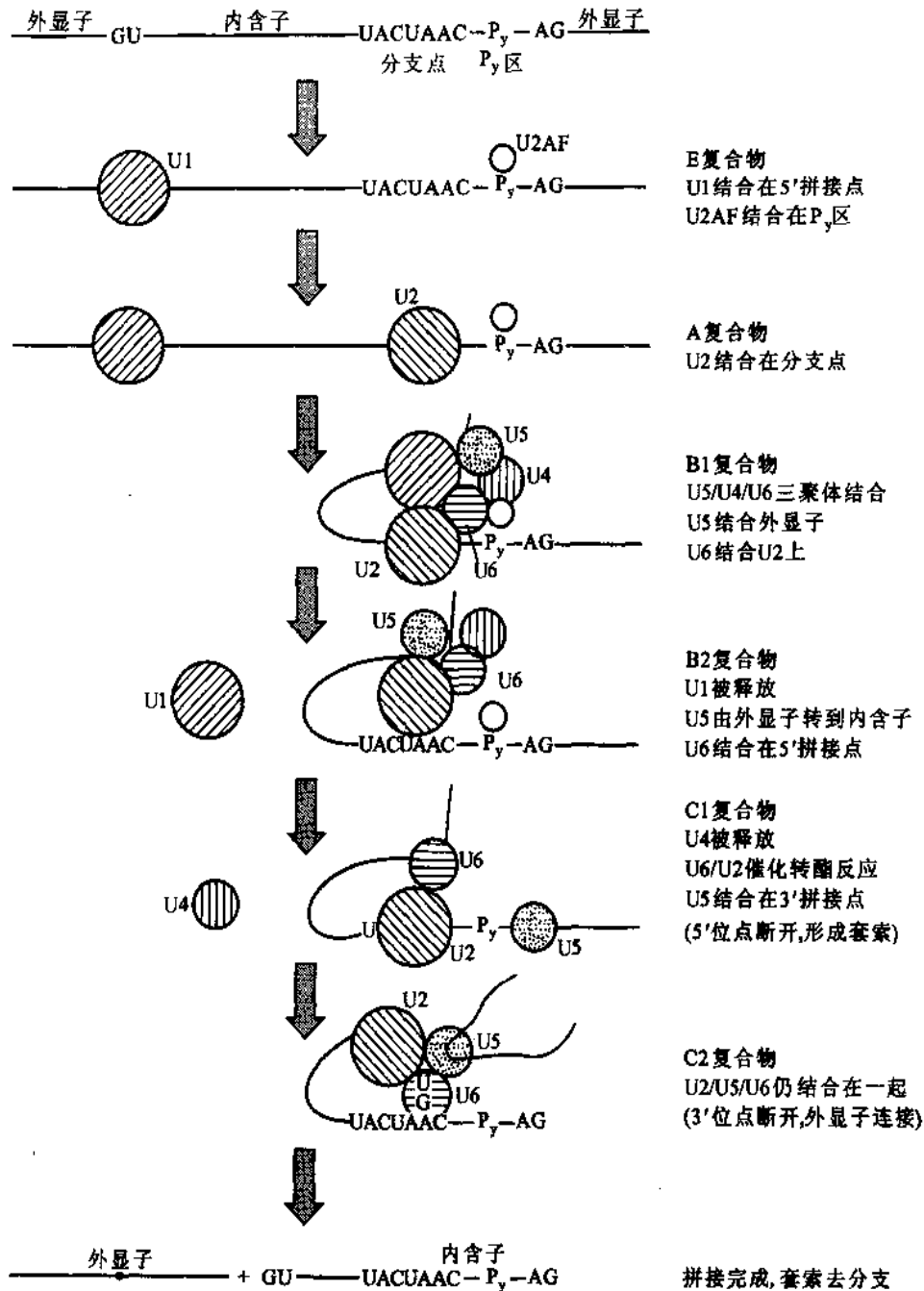


图 36-22 hnRNA 的拼接过程

能转交某些小 RNA 和辅助蛋白,以专司其职。迄今仍可从 snRNA 中看到与 II 型内含子结构域的一些类似之处。

(4) 核内 tRNA 前体的酶促拼接 酵母 tRNA 前体的拼接机制研究得比较清楚。酵母基因组共有约 400 个 tRNA 的基因,含有内含子的基因仅占十分之一。内含子的长度从 14 ~ 46 bp 不等,它们之间并无保守序列。推测切除内含子的酶识别的仅是共同的二级结构,而不是共同的序列。通常内含子插入到靠近反密码子处,与反密码子碱基配对,反密码子环不再存在,代之以插入的内含子构成的环(图 36-23)。

研究 tRNA 前体在无细胞提取液中的拼接过程表明,反应分两步进行,分别由不同的酶所催化。第一步是由一个特殊核酸内切酶断裂磷酸二酯键,切去插入序列,反应不需要 ATP。第二步需要 ATP,由 RNA 连接酶催化使切开的 tRNA 两部分共价连接。

核酸内切酶断裂 tRNA 前体,产生 tRNA 的两个半分子和一个线状内含子分子。它们的 5'端均为羟

基;3'端为 2',3'-环状磷酸基。两个半分子 tRNA 通过碱基对仍然维系在一起。在有激酶和 ATP 存在时,5'-羟基可转变成 5'-磷酸基。2',3'-环状磷酸基在环磷酸二酯酶催化下被打开,形成 2'-磷酸基和 3'-羟基。

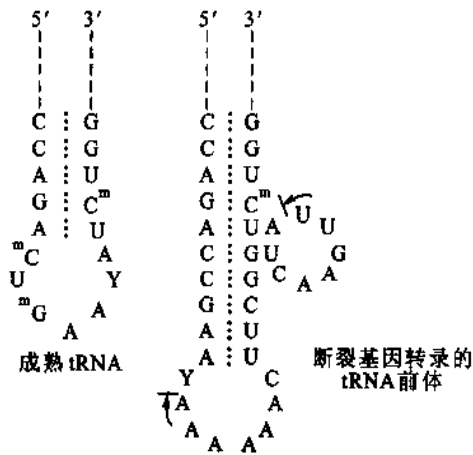


图 36-23 酵母 tRNA^{Phe}前体拼接前后的结构
GAA 为反密码子;┆→含子

连接反应(ligation reaction)首先需由 ATP 活化连接酶,形成腺苷酸化蛋白质。AMP 的磷酸基以共价键连接在酶蛋白质的氨基上。然后 AMP 被转移到 tRNA 半分子的 5'-磷酸基上,形成 5'-5'磷酸-磷酸连接。在 tRNA 另一半分子 3'-羟基攻击下 AMP 被取代,产生 5',3'-磷酸二酯键。此时多余的 2'-磷酸基被磷酸酯酶所除去。整个拼接过程如图 36-24 所示。

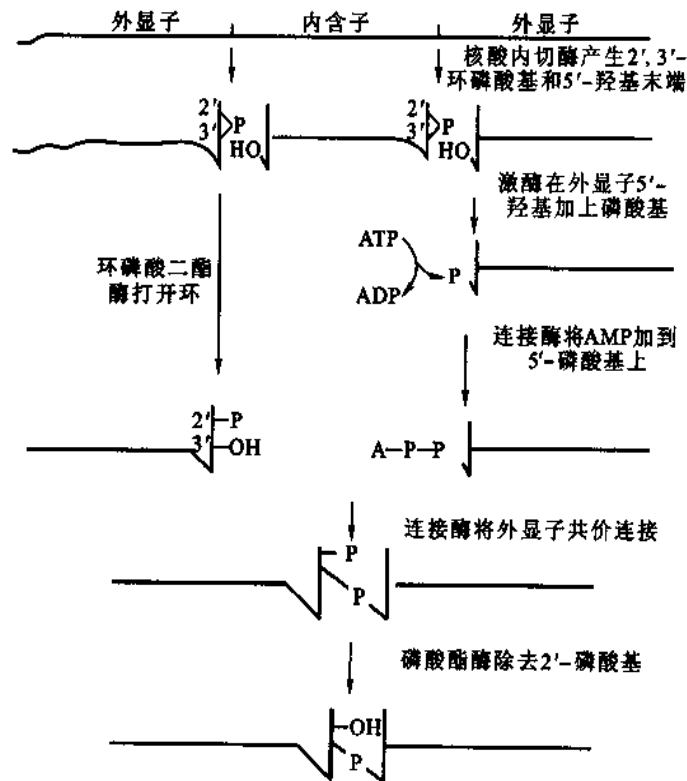


图 36-24 酵母和植物 tRNA 前体的拼接过程

植物和哺乳动物 tRNA 前体被核酸内切酶断裂时也产生 2',3'-环磷酸。植物的拼接过程与酵母类似。哺乳动物的反应则有些差别。HeLa(人)细胞的连接酶可将 RNA 的 2',3'-环磷酸基直接与 5'-羟基

末端连接。因此,当 tRNA 前体被核酸内切酶除去内含子后,两个 tRNA 半分子可直接由 RNA 连接酶催化连接,无需末端基的转变。

(5) 反式拼接与选择性拼接 上述四类拼接均为分子内拼接,即顺式拼接。但有事实表明,生物体内存在分子间的拼接,即反式拼接。如果一个 RNA 分子具有 5' 拼接点,另一分子具有 3' 拼接点,它们又靠得很近,就可以发生反式拼接。经过类似于顺式拼接过程,可使一分子 5' 拼接点上游序列与另一分子 3' 拼接点下游序列连在一起,被切除的序列(相当于内含子)形成类似套索的 Y 形结构。分支点形成不稳定的磷酸三酯,随即水解脱去分支。反式拼接比较少见。一个研究较多的反式拼接例子是存在于锥虫的众多 mRNA,其 5' 端有一共同的 35 个碱基长的前导序列。该前导序列并非由各个转录单位的上游所编码,而是来自一些重复单位的转录产物(图 36-25)。给出 35 碱基前导序列的 RNA 称为 SL RNA (spliced leader RNA)。在其他生物中也发现有个别反式拼接现象。

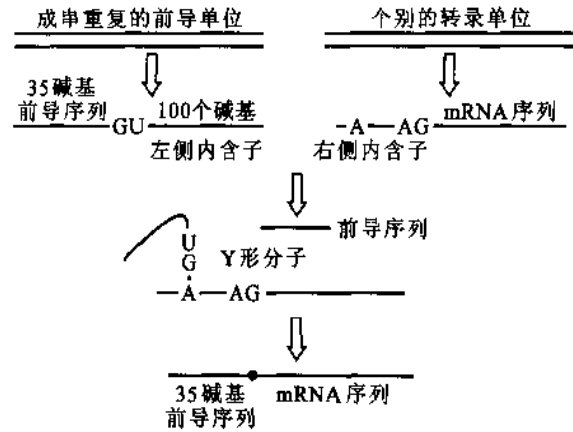


图 36-25 锥虫 mRNA 前导序列的反式拼接

一个基因的转录产物在不同的发育阶段、分化细胞和生理状态下,通过不同的拼接方式,可以得到不同的 mRNA 和翻译产物,称为选择性拼接(alternative splicing)。

所产生的多个蛋白质即为同源体(isoform)。例如, α 原肌球蛋白基因可得到 10 个不同蛋白质产物。肌钙蛋白可产生 64 个蛋白质同源体。果蝇的性分化是由一系列基因产物相互作用的结果,通过关键基因转录物的选择性拼接决定了雄性和雌性的差别。选择性拼接广泛存在,在基因表达的调节控制中起了十分重要的作用。

选择性拼接可以有多种方式,归纳起来有以下 4 种。①拼接产物缺失一个或几个外显子;②拼接产物保留一个或几个内含子作为外显子的编码序列;③外显子中存在 5' 拼接点或 3' 拼接点,从而部分缺失该外显子;④内含子中存在 5' 拼接点或 3' 拼接点,从而使部分内含子变为编码序列。由于转录的起点不同以及 mRNA 前体 3' 端聚腺苷酸位点不同,增加了最后成熟 mRNA 的种类。图 36-26 列出各种选择性拼接的方式。

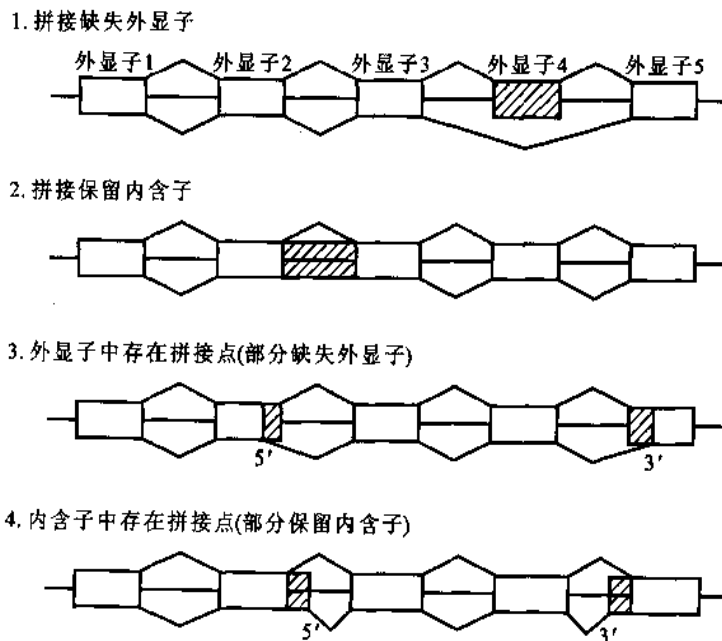


图 36-26 选择性拼接示意图

现以降钙素 (calcitonin) 的 mRNA 前体为例,说明具选择性拼接的机制。降钙素基因有 6 个外显子。它的原初转录物 3' 端有两个 poly(A) 位点,其一显现于甲状腺中,另一显现于脑中。在甲状腺中,通过拼接产生降钙素 mRNA,它包括外显子 1~4。在脑中拼接去除降钙素外显子(外显子 4),产生降钙素基因相关肽 (calcitonin-gene-related peptide, CGRP) mRNA。同一基因在不同组织中由于加工的不同而得到两种不同的激素(图 36-27)。

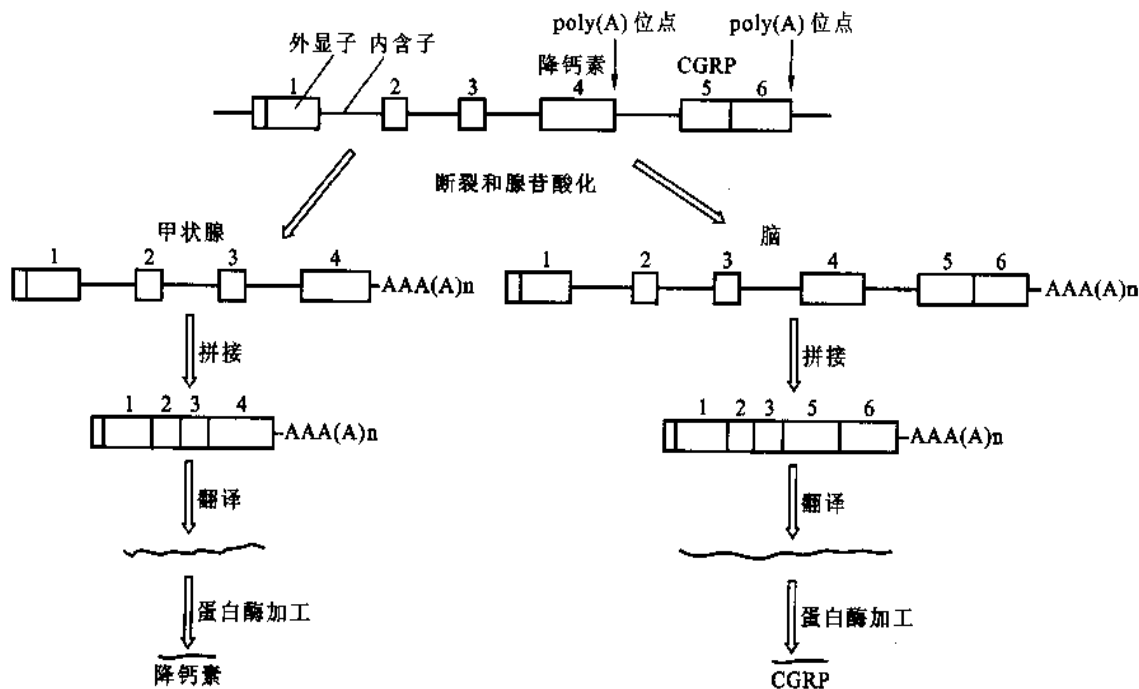


图 36-27 降钙素基因转录物的选择性加工

(6) RNA 拼接的生物学意义 RNA 拼接现象的发现,给生物学家带来了一系列令人困惑的疑问。为什么生物机体要先转录内含子,然后将其切除? RNA 拼接的耗费是巨大的,其收益是什么? 内含子由何而来? 为什么内含子主要见于真核生物? 内含子序列有无生物功能? 围绕这些问题曾提出不少设想,争论很大,迄今尚无定论。这里仅提出一些看法,以供思考。

首先需要指出的是, RNA 拼接是生物机体在进化历史中形成的,是进化的结果。基因与基因产物蛋白质都是由一些构造元件即模块 (module) 装配而成。从已有资料的分析中发现,约半数的基因其外显子与蛋白质结构域、亚结构域或基序有很好的对应关系。例如,免疫球蛋白基因的外显子十分精确的相当于蛋白质折叠的结构域。再有血红蛋白基因有 3 个外显子,而其蛋白质分子的三维结构显示有 4 个亚结构域,第一个外显子对应于蛋白质第一个亚结构域,第二个外显子对应于中间 2、3 两亚结构域,第三个外显子对应于第 4 个亚结构域。而且还发现豆科植物的豆血红蛋白 (leghemoglobin) 基因有 4 个外显子,正好对应于蛋白质的 4 个亚结构域;这就是说,为结合血红素的两亚结构域编码的外显子在豆血红蛋白基因中是精确分开的,而在动物相应的基因中合并为一个外显子。类似的例子还很多。但是另有约半数的基因不能找出外显子与蛋白质结构域的对应关系;这毫不奇怪,因为在漫长的进化历程中由于变异而使模块的边界逐渐模糊以至完全消失。

其次, RNA 拼接是基因表达调节的重要环节。RNA 转录后通过拼接而抽提有用信息,形成连续的编码序列,并可通过选择性拼接而控制生物机体生长发育。因此,这是真核生物遗传信息精确调节和控制的方式之一。

第三,如上所述,基因由模块装配而成,模块间的间隔序列也就演变成为内含子,因此外显子和内含子有着同样古老的历史。而现今存在的几类内含子也各有其起源和进化历史,从它们的拼接方式和分布(表 36-6)可以大致推测其起源时间。I 型内含子能够自我拼接,并且分布极广,从蓝细菌、噬菌体到低等真

核生物 rRNA 基因和高等真核生物的细胞器基因都有,估计它出现于 35 亿年前。II 型自我拼接的内含子也许与 I 型内含子同时或稍后出现。核 tRNA 前体的内含子应在真细菌和真核生物分化之前出现,也就是说 17 亿年前。而核 mRNA 前体的内含子应在真核生物出现之后,大约 7 亿 - 10 亿年前出现。另一方面,某些 I 型内含子含有编码核酸内切酶的序列,它们可以如同转座子一般在基因组内由一位点转移到另一位点;II 型内含子含有核酸内切酶或逆转录酶的编码序列,可以如同转座子和逆转座子一般扩散。这是内含子横向转移的过程。

表 36-6 内含子的拼接方式与分布

拼接方式	真细菌	古细菌	真核生物		
			细胞核	线粒体	叶绿体
I 型自我拼接	蓝细菌 <i>Leu-tRNA</i>		原动物、 真菌、藻类 rRNA 的基因	mRNA、rRNA	mRNA、rRNA <i>Leu-tRNA</i>
	大肠杆菌 T 偶数噬菌体 (<i>td</i> 、 <i>nrd</i> 、 <i>sunY</i> 基因)				
	枯草芽孢杆菌 SPO1				
	噬菌体				
II 型自我拼接				mRNA	mRNA、tRNA
核 mRNA 前体依赖拼接体的拼接			mRNA		
核 tRNA 的酶促拼接		tRNA、rRNA	tRNA		

第四, RNA 拼接主要存在于真核生物,原核生物极为少见,但并非完全没有。一种合理的解释是原核生物为适应快速生长的需要,在进化过程中已将内含子丢掉。事实上,快速生长的单细胞真核生物,如酵母,其编码基因也几乎没有内含子。然而内含子的存在和拼接作用对生物机体的进化十分重要。内含子的存在使同源重组两 DNA 分子间链的断裂和再连接可以发生在内含子处,因而促进了重组,并且避免了在重组过程中由于错位而造成基因失活。内含子增加了基因组的复杂性,可成为新的编码序列。尤其重要的是,当基因内由突变产生新的 5' 或 3' 拼接点时,旧的拼接依然存在,使生物机体不因突变而失去的蛋白质。突变多数是有害的,有益突变只是少数,新旧蛋白质并存使机体能在长时间内对它们进行选择,只有对生物机体有益的突变才被固定下来。

第五,外显子和内含子是相对的,有些内含子具有编码序列,能够产生蛋白质或功能 RNA。前面提到 I 型内含子能产生核酸内切酶,II 型内含子能产生核酸内切酶或逆转录酶,以帮助内含子转移。也有些 I 型和 II 型内含子能产生成熟酶 (*maturase*),帮助内含子自身折叠,促进自我拼接。许多核仁小 RNA 是由内含子产生的。上述内含子在表达时就成为外显子。再者,许多内含子对基因表达有一定影响,也就是说它们编码了某些基因表达的调控信息。因此,不能将内含子看成是无用的序列。

2. RNA 的编辑

1986 年 Benne R 等在研究锥虫线粒体 DNA 时发现,其细胞色素氧化酶亚基 II (*co II*) 基因与酵母或人的相应基因对比存在一个 -1 的移码突变,然而酶的功能又是正常的。进一步比较 *co II* 基因与其转录物的序列,发现转录物在移码突变位点附近有 4 个不被基因 DNA 编码的额外尿苷酸,正好纠正了基因的移码突变(图 36-28)。由于用分子杂交技术在线粒体内找不到第二个 *co II* 基因,所以认为这些尿苷酸是在转录中或转录后插进去的。他们将这种改变 RNA 编码序列的方式称为 RNA 编辑。

DNA 正链序列	GA	G	A A
mRNA 序列	GAU	UGU	AUA
	*	* *	*
蛋白质序列	Asp	Cys	Ile

图 36-28 锥虫 *co II* 基因与其表达产物的序列比较

* 标出插入核苷酸的位置

继 Benne 等人的工作之后,又有一些实验室陆续在多种生物中发现 RNA 的编辑,其中包括 U 的插入和删除,C、A 和 G 的插入,C 被 U 取代或 U 被 C 取代,A 转变为 I 等方式(表 36-7)。在锥虫线粒体细胞色素氧化酶亚基 III (co III) 中,来自原始基因的遗传信息只占成熟 mRNA 的 45%,而 55% 的遗传信息需要通过 RNA 编辑。在插入 G 的编辑中,由于插入数量的不同引起阅读框架改变,一个 mRNA 前体的编辑产物可以产生多种蛋白质。

表 36-7 RNA 编辑的不同类型和分布

编辑类型	机制	存在
U 的插入与删除	gRNA 的转酯反应	锥虫线粒体 mRNA
C, A 或 U 的插入		多头绒孢菌线粒体 mRNA 和 rRNA
G 的插入	RNA 聚合酶重复转录	副黏病毒的 P 基因
C 转变为 U	酶促脱氨	哺乳类肠的 apoB mRNA
C 转变为 U 或 U 转变为 C	脱氨或氨基化	植物线粒体 mRNA 和 rRNA 牛心线粒体 tRNA ^{met}
A 转变为 I	脱氨	脑谷氨酸受体亚基 mRNA

Blum B 等揭示了 RNA 编辑中插入尿苷酸的机制。他们从线粒体中分离出一些长约 60 个核苷酸的 RNA,与被编辑 mRNA 序列互补,可作为编辑的模板,称为指导 RNA (guide RNA, gRNA)。编辑通常沿 mRNA 由 3' 端向 5' 端方向进行,当 gRNA 与 mRNA 配对而遇到第一个不能配对的核苷酸时,gRNA 末端的 3'-OH 攻击该核苷酸 5'-P 并发生转酯反应,mRNA 游离出来的 3'-OH 攻击 gRNA 寡聚 U 第一个不配核苷酸的 5'-P,发生第二次转酯反应。这个过程可以重复进行,直到全部编辑完成。gRNA 3' 端的寡聚 U 由线粒体内的末端尿苷酸转移酶(TUTase)以 UTP 为底物而合成。Blum 等认为,RNA 编辑与拼接过程十分类似,可能也需在被编辑的 mRNA 分子上由 gRNA 和蛋白质装配成编辑体(editosome)来完成编辑过程。至于多头绒孢菌 (*Physarum polycephalum*) 线粒体 mRNA 和 rRNA 的编辑插入 C、A 和 U,是否也由 gRNA 所导致,目前还不清楚。

哺乳类动物的载脂蛋白 B (Apolipoprotein B, Apo B) 按大小可分为 Apo B100 和 Apo B48 两种,二者是同一基因产物。人的 Apo B100 (Mr 512 000) 在肝中合成; Apo B48 (Mr 241 000) 在小肠中合成。Apo B mRNA 前体在小肠细胞中在特定的位置上一个 C 脱氨变成 U,原来编码谷氨酸的密码子 CAA 变成终止密码子 UAA,从而引起翻译提前结束。研究表明,编辑位点附近一段序列(约 26 个碱基)很重要,推测编辑酶(editing enzyme)识别并结合其上,然后脱去一定位置上 C 的氨基。

尤为引人瞩目的是脑受体离子通道亚基 mRNA 的编辑。脑的快速兴奋突触反应和参与建立并维持突触可塑性通路以进行学习及记忆均与受体离子通道有关。大鼠脑谷氨酸受体通道蛋白有 6 个亚基,其中三个亚基的 mRNA 能发生编辑,使一个谷氨酰胺的密码子变成精氨酸的密码子,以此控制神经递质引起的离子流。在受体的另一位置上,还发生一个精氨酸密码子转变成甘氨酸密码子。这些变化都涉及腺嘌呤的脱氨反应。腺苷脱氨酶作用于双链 RNA 区上的 A 使其变为 I (次黄嘌呤)。I 的碱基配对行为与 G 相当,因此曾以为上述 RNA 编辑使 A 变为 G。编辑酶能够特异识别编辑位点的茎环结构,因此作用位点十分精确。同样的事件也发生在 5-羟色胺受体的 mRNA。

RNA 的编辑有何生物学意义? 首先,从锥虫线粒体 mRNA 编辑和其他的例子中可以看到, RNA 编辑可以消除移码突变等基因突变的为害。甚至某些基因在突变过程中丢失达一半以上的遗传信息都可藉 gRNA 一一加以补足。令人费解的是何以 RNA 编辑恰好可以纠正基因突变带来的损害? 合乎逻辑的推理是 RNA 原来就是多变的,它能够通过分子内和分子间转酯反应产生种种 RNA 重排或由酶进行修饰,如果有 RNA 或酶引起 mRNA 众多变异中的一种恰好补救了基因突变引起的灾难,自然选择就将这种变异固定下来,成为 RNA 编辑。其次, RNA 编辑增加了基因产物的多样性,由同一基因转录物经编辑可以表达出多种同源体蛋白质。第三, RNA 编辑还和生物发育与分化有关,是基因调控的一种重要方式。第四, RNA 编辑

还可能使基因产物获得新的结构和功能,有利于生物进化。第五, RNA 编辑还可能与学习和记忆有关。

3. RNA 的再编码

过去一直以为编码在 mRNA 上的遗传信息是以固定的方式进行译码的,然而并不尽然。日益积累的事实表明,在某些情况下可以用不同的方式译码,也就是说改变了原来编码的含义,称为再编码(recoding)。

在正常情况下, mRNA 的三联体密码子可以被 tRNA 的反密码子所识别, mRNA 携带的遗传信息得以正确翻译。但是基因的错义、无义和移码突变,改变了编码信息,使基因活性降低或失活。校正 tRNA 通常是一些变异的 tRNA,它们或是反密码子环碱基发生改变,或是决定 tRNA 特异性即个性的碱基发生改变,从而改变了译码规则,故而使错误的编码信息受到校正。这是 RNA 再编码的一种重要方式。校正 tRNA 在错义或无义突变的位置上引入一个与原来氨基酸相同或性质相近的氨基酸,因而恢复或部分恢复基因编码蛋白质的活性,并通过阅读一个二联体(doublet)密码子或四联体(quadruplet)密码子而消除 -1 移码或 +1 移码的效应。有时 rRNA 的突变也有助于消除移码突变的影响。

在蛋白质合成过程中核糖体按照 mRNA 上一个阅读框架移动,另两个可能的阅读框架是不含有用遗传信息的。然而,核糖体遇到某些 mRNA 可能在翻译的一定位点上发生“打嗝”,由此改变阅读框架。此过程称为核糖体移码(ribosomal frame shifting),或程序性阅读框架移位(programmed reading frame shift),简单称为翻译移码(translational frameshifting)。这一机制可以从一个 mRNA 产生两个或更多相互有关但是不同的蛋白质,也可以借以调节蛋白质的合成。

劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)是一种逆转录病毒,其 RNA 的基因组上 *gag* 和 *pol* 基因有 1 bp 重叠,因此 *pol* 阅读框架对于 *gag* 阅读框架有 -1 移位。在合成病毒蛋白质时有两种情况,一是合成完 *gag* 蛋白后在终止密码子处终止并解离;另一是完成 *gag* 蛋白合成后发生 -1 移位,紧接着 *pol* 蛋白的合成,形成两个蛋白连在一起的多蛋白(polyprotein),然后再由蛋白酶将两蛋白切开。*gag* 是病毒的结构蛋白,要求量大,*pol*(逆转录酶)要求量小,串联的多蛋白合成只占 5%,因此逆转录酶的合成只有 *gag* 蛋白的 1/20。图 36-30 表示劳氏肉瘤病毒中 *gag* 和 *pol* 的阅读框架。

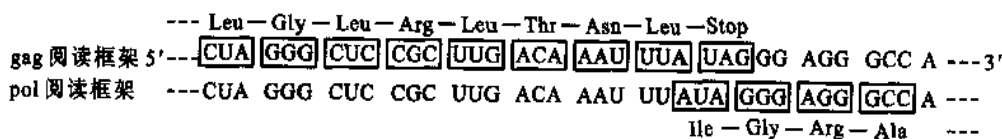


图 36-30 劳氏肉瘤病毒中 *gag* - *pol* 重叠区

有时核糖体在 mRNA 上可以发生跳跃。例如, T_4 噬菌体基因 60 的 mRNA,核糖体在其上移动时跃过长达 50 个核苷酸片段不进行翻译。可能 mRNA 的高级结构对此有一定的作用。

(四) RNA 生物功能的多样性

按照传统的观点, RNA 只是基因表达的中间物, RNA 的主要功能是控制蛋白质的生物合成。1981 年 Cech T 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,称之为核酶。随后 Altman S 证明, RNase P 中的 RNA(M1 RNA)在适当条件下(高浓度 Mg^{2+} 或存在多胺化合物)单独也具有加工 tRNA 5' 端的催化活性。他们的研究结果不仅破除了“酶一定是蛋白质”的传统观点,而且也破除了“RNA 的功能只是控制蛋白质的合成”这一传统观点。因此他们于 1989 年共同获诺贝尔化学奖。此后 RNA 的

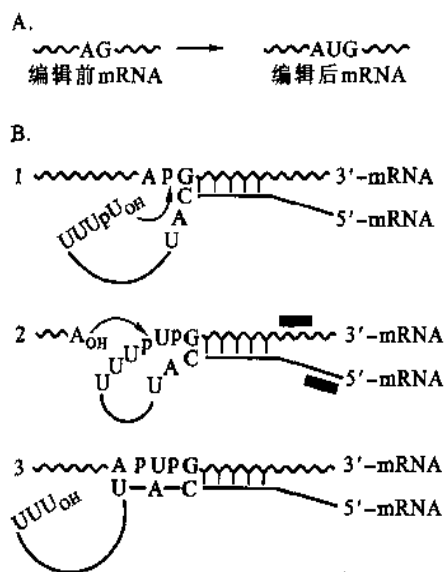


图 36-29 RNA 编辑的转酯反应

A. mRNA 编辑前后的变化

B. 由 gRNA 导致的转酯反应

——用 PCR 检测编辑中间物时所用引物

重要功能不断有新的发现。从而认识到,DNA 是携带遗传信息分子,蛋白质是执行生命功能的分子,RNA 则既是信息分子,又是功能分子。归纳起来,RNA 的主要功能有以下几个方面:

第一, RNA 在遗传信息的翻译中起着决定的作用。蛋白质生物合成是生物机体最复杂也是最重要的代谢过程,三类 RNA 共同承担并完成这一过程。rRNA 起着装配(assembler)和催化(catalyst)作用, tRNA 起着转运(transfer)和信息转换(adaptor)的作用, mRNA 起信使(messenger)和模板(template)的作用。蛋白质是在核糖体上合成的。按照传统的观点,催化肽键形成的肽基转移酶活性应归之于核糖体上一个或几个蛋白质。1992 年, Holler H F 等证明,该活性是由大亚基 rRNA 所催化,而核糖体蛋白质被认为只起辅助作用。2000 年在多个实验室共同努力下,核糖体小亚基和大亚基高分辨率的结构已被揭示,这代表迄今在生物大分子复合物研究中取得的最高水平成就,在此基础上必将详细揭开蛋白质生物合成的各个细节。

第二, RNA 具有重要的催化功能和其他持家功能(house - keeping function)。20 世纪 80 年代初由 Cech 和 Altman 首先发现 RNA 有催化功能。紧接着 Apirion D 发现 T₄RNA 也能够自我切割,随后陆续发现一些植物类病毒(viroid)、拟病毒(virusoid)和卫星 RNA 在复制过程中能够自我切割和环化。Symons R 比较了几种自我切割 RNA 的结构后提出了锤头核酶(hammerhead ribozyme)的结构模型,它由 13 个保守的核苷酸和 3 个螺旋区所组成。Hampel A 又发现发夹结构(hairpin)核酶。丁型肝炎病毒(HDV)和链孢霉线粒体 VS 质粒 RNA 正链与负链的自我切割完全不同于锤头和发夹结构,表明自然界存在多种核酸催化方式(图 36 - 31)。

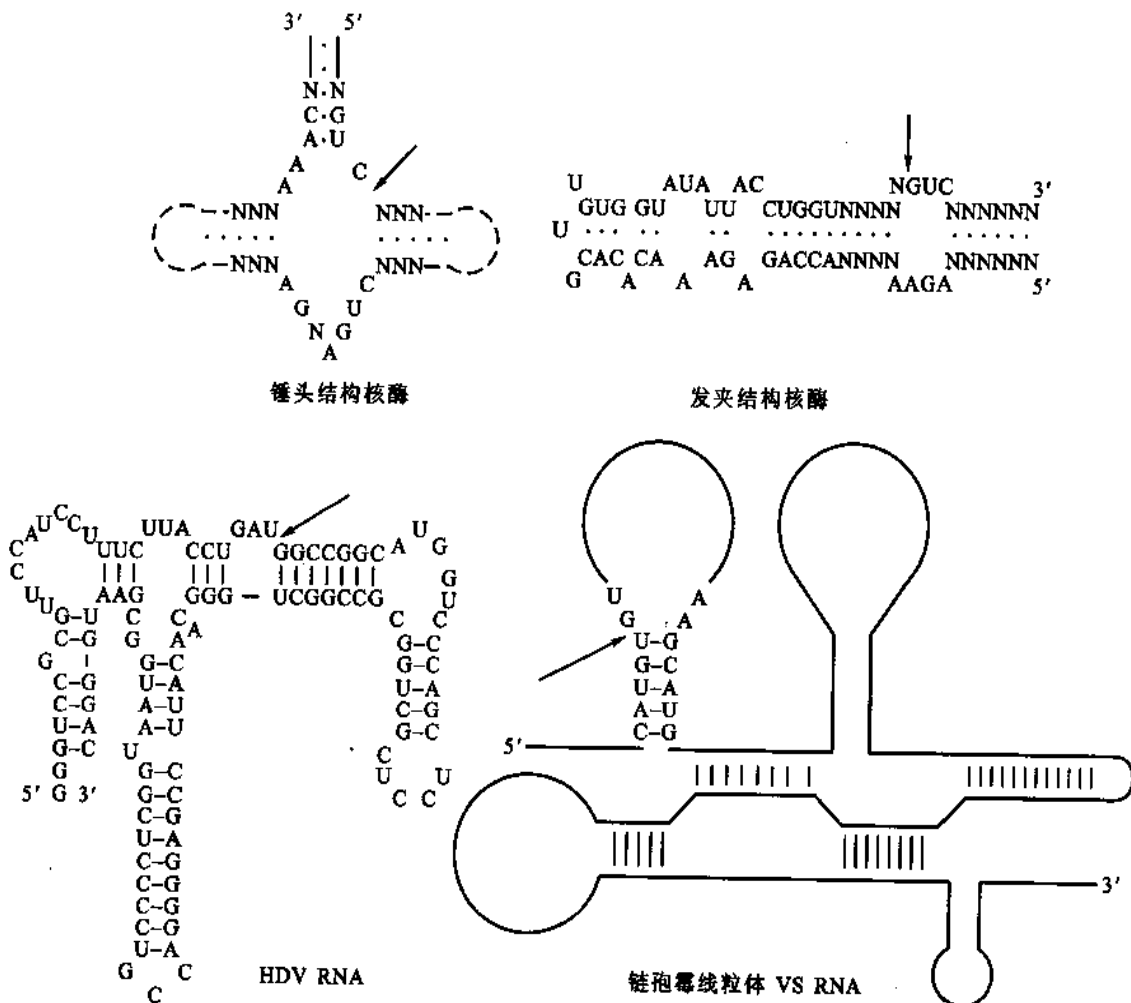


图 36 - 31 几种自我切割的核酶结构

自然界存在的核酶多数催化分子内反应,它们是 RNA 合成后加工的一种方式,包括自我切割、自我拼接、自我环化等。催化分子间反应的核酶通常都与蛋白质结合,形成核糖核蛋白复合物,如 RNase P、1,4 -

α -葡聚糖分支酶(branching enzyme)、端粒酶(telomerase)、马铃薯邻苯二酚氧化酶等。从这些复合物中分离出的 RNA,有些单独即具催化活性,如 RNase P 中的 M1 RNA。生物体内一些非常重要的 RNA-蛋白质颗粒体,如核糖体、拼接体、编辑体及信号识别颗粒等也可以看成是核酶的复合物。

持家功能是指细胞(包括病毒)的基本功能,如原核和真生物染色体的结构 RNA,噬菌体的装配 RNA(packaging RNA, pRNA)等。

第三, RNA 转录后加工和修饰依赖于各类小 RNA 和其蛋白质复合物。RNA 转录后的信息加工十分复杂,其中包括切割、修剪、修饰、异构、附加、拼接、编辑和再编码等,除少数比较简单的过程可以直接由酶完成外,通常都要由一些特殊的 RNA 参与作用。它们或选择加工部位,或完成加工反应,并且这些 RNA 常与蛋白质形成复合物,如 UsnRNP。近年来发现核仁中存在大量小 RNA(snoRNA),它们与 rRNA 前体的加工有关,包括断裂、甲基化、假尿嘧啶核苷的形成。另一特点是, snoRNA 不是由其单独的基因所编码,而是由切除的内含子片段加工而成。有关 RNA 的信息加工,前面已有介绍,这里不再重复。

第四, RNA 对基因表达和细胞功能具有重要调节作用。反义 RNA(antisense RNA)可通过与靶部位序列互补而与之结合,或直接阻止其功能,或改变靶部位构象而影响其功能。早期发现的 micRNA 可调节 mRNA 的翻译。一般 micRNA 结合于 mRNA 的 5'末端,但线虫 *C. elegans* 的 *lin4* RNA 对 *lin 14* 和 *lin 28* 表达的调节却结合在 mRNA 的 3'非翻译区, *lin 14* 和 *lin 28* 是控制幼虫发育的基因。

细胞应激反应涉及一系列细胞功能和基因表达的调节。大肠杆菌在氧应力诱导下产生一种稳定的小 RNA,称为 oxyS RNA,它可激活或阻遏 40 多种基因的表达,其中包括转录调节因子 Fh1A 和 σ^s 的基因,并且具有抗诱变作用。

较早就发现 RNA 在个体发育和组织分化中起重要调节作用。例如,异配动物的性决定和剂量补偿可由 RNA 进行调节。果蝇和哺乳动物雌性细胞带有两条 X 染色体,雄性细胞带有一条 X 染色体和一条 Y 染色体。果蝇通过活化雄性细胞的 X 染色体,使其转录水平达到雌性细胞两条 X 染色体的转录水平,这种活化作用是由 X 染色体编码的 roX1 RNA 所调节。哺乳动物采取另一种剂量补偿机制,在发育早期雌性细胞两条 X 染色体中的一条随机失活,以浓缩的异染色质小体形式存在,由此使雌性细胞 X 连锁基因表达水平与雄性细胞相当。X 染色体失活的起始和维持均由 Xist RNA 介导,该 RNA 是从失活 X 染色体上所产生的。

RNA 能够形成十分复杂的空间结构,这种结构还能随环境状态的变动而改变,因而赋予 RNA 特殊的识别和分辨能力。前不久 Tu G F 等发现大肠杆菌 10Sa RNA 能使截短的外源蛋白羧基端连上一个十一肽。其后知道这种 RNA 的结构一半类似 tRNA,并携带一个丙氨酸;另一半可作为 mRNA 翻译出一个十肽。因其兼有 tRNA 和 mRNA 的功能,故被称为 tmRNA。它的生物学作用在于识别 3'端残缺的 mRNA,使其翻译产物带上标志。因转录不完全或转录后被降解,使 mRNA 失去终止密码子,在核糖体上翻译至断裂处而受阻,此时 tmRNA 即进入核糖体,将丙氨酸转给新生肽,并编码后面十肽。具有这种异常十一肽尾部的蛋白质最后被细菌中一些专一性蛋白酶所降解。

1995 年发现线虫中一些小 RNA 能够关闭有关基因的表达,与植物中已知的“基因沉默”(gene silence)相似,由此认识到基因功能可因 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)而受调节。基因沉默是由双链 RNA 介导的,它在两个水平上发挥作用,一是发生在转录水平上,抑制相应基因的转录,称为转录基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS);另一是发生在转录后,结合并引起特异 mRNA 的降解,称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。2001 年在人和鼠细胞中也发现 RNAi 作用,将它看成是生物界广泛存在的基因调节方式。

第五, RNA 在生物的进化中起重要作用。RNA 进化的研究一直是一个十分活跃的领域。核酶的发现表明 RNA 既是信息分子,又是功能分子,生命起源早期可能首先出现的是 RNA。1986 年 Gilbert W 提出“RNA 世界”的假说,这对“DNA 中心”的观点是一次有力的冲击。如果说生物大分子的合成在一定程度上反映了它们的演化历史,那么 RNA 就是具有最复杂演化历史的生物大分子,因它的转录后加工远比任何一类大分子合成后的加工都复杂。从 RNA 的拼接过程中可以推测蛋白质及基因由模块构筑的演化历程。拼接和编辑可以消除基因突变的危害,增加遗传信息的多样性,促进生物进化。RNA 也可能是某些获得

性遗传的分子基础。

逆转座子是基因组的不稳定因素,它们能够促进基因组的流动性,并在进化中成为形成新的基因和调控元件的种子。上述许多问题目前还知道不多,有待更深入研究。

(五) RNA 的降解

基因表达可在不同水平上进行调节。RNA 降解是涉及基因表达的一个重要环节。rRNA 和 tRNA 是稳定的 RNA,其更新率较低;mRNA 是不稳定 RNA,其更新率非常高。因为 mRNA 与其编码基因的表达活性直接有关,不同的 mRNA 需要以不同速度进行降解。对于一个基因产物仅短暂需要的 mRNA,其半寿期只有几分钟,甚至几秒钟。然而,细胞对基因产物如果恒定需要,其 mRNA 将在细胞的许多世代中都是稳定的。脊椎动物细胞 mRNA 的平均半寿期约为 3 h,细胞每一世代中各类 mRNA 约周转 10 次。细菌 mRNA 的半寿期大约只有 1.5 min,以适应快速生长和对环境作出快速反应的要求。

在所有细胞中都存在各种核糖核酸酶,可以降解 RNA。但由核糖核酸外切酶按 5'→3'方向降解 RNA 较为常见,虽然 3'→5'核糖核酸外切酶也存在。在细菌中,通常 mRNA 还未转录完,已有核糖体跟着结合上去进行翻译,经过几轮翻译,mRNA 即被降解。具有不依赖于 rho 因子终止子的 mRNA 其末端可形成发夹结构,因而具有对降解的稳定性。类似的发夹结构可以使多顺反子 mRNA 的某些部分变得更加稳定。在真核细胞中,3'多聚腺苷酸尾巴对许多的 mRNA 的稳定性十分重要。真核生物 mRNA 降解的主要途径首先是 poly(A)尾巴的缩短。去腺苷酸化既能诱发 5'端脱掉帽子结构,然后由 5'→3'方向降解 RNA;也能直接由 3'→5'方向降解 mRNA。

三、在 RNA 指导下 RNA 和 DNA 的合成

核糖核酸(RNA)在遗传信息表达和调节中的重要作用已如上述。在有些生物中,核糖核酸也可以是遗传信息的基本携带者,并能通过复制而合成出与其自身相同的分子。例如,某些 RNA 病毒,当它侵入寄主细胞后可借助于复制酶(replicase)(RNA 指导的 RNA 聚合酶)而进行病毒 RNA 的复制。遗传信息还可以从 RNA 传递给 DNA,即以 RNA 为模板借助逆转录酶(RNA 指导的 DNA 聚合酶)合成 DNA。

(一) RNA 的复制

从感染 RNA 病毒的细胞中可以分离出 RNA 复制酶,这种酶以病毒 RNA 作模板,在有 4 种核苷三磷酸和镁离子存在时合成出与模板性质相同的 RNA。用复制产物去感染细胞,能产生正常的 RNA 病毒。可见,病毒的全部遗传信息,包括合成病毒外壳蛋白质(coat protein)和各种有关酶的信息均贮存在被复制的 RNA 之中。

1. 噬菌体 Q β RNA 的复制

复制酶的模板特异性很高,它只识别病毒自身的 RNA,而对宿主细胞和其他与病毒无关的 RNA 均无反应。例如,噬菌体 Q β 的复制酶只能以噬菌体 Q β RNA 作模板,而代用与其类似的噬菌体 MS₂、R₁₇和 ϕ_2 RNA 或其他 RNA 都不行。

大量关于 RNA 复制机制的研究工作是以感染各种 RNA 噬菌体(例如噬菌体 Q β)的大肠杆菌为材料进行的。噬菌体 Q β 是一种直径为 20nm 的正二十面体小噬菌体,含 30%的 RNA,其余为蛋白质。RNA 为相对分子质量 1.5×10^6 左右的单链分子,由 4 500 个核苷酸组成,含有编码 3~4 个蛋白质分子的基因。其有关蛋白质为:成熟蛋白(A 或 A₂ 蛋白)、外壳蛋白和复制酶 β 亚基。Q β 还含有另一个特异的蛋白质称之为 A₁,它是完整病毒的次要组分。氨基酸顺序分析表明,A₁ 蛋白 N 端氨基酸顺序与外壳蛋白一致。推测编码 A₁ 蛋白的 RNA 顺序具有两个终止位点,在第一个位点终止时仅产生外壳蛋白,但如通读过去直到第二个终止位点,这样就产生 A₁ 蛋白。Q β 的基因次序是:

5'末端 - 成熟蛋白 - 外壳蛋白(或 A₁ 蛋白) - 复制酶 β 亚基 - 3'末端

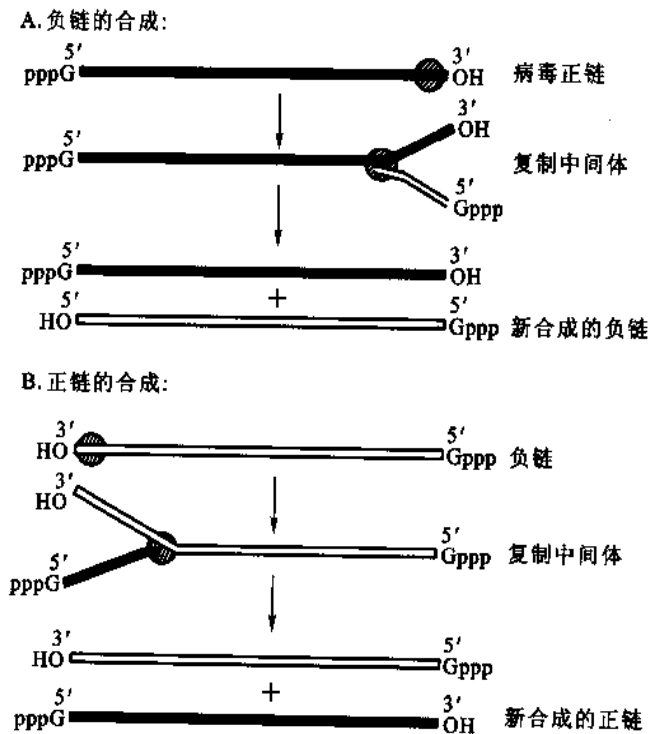
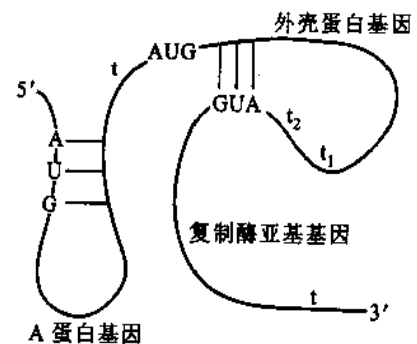
$Q\beta$ 复制酶有 4 个亚基,噬菌体 RNA 只编码其中的 β 亚基,另外 3 个亚基(α 、 γ 和 δ)则来自宿主细胞。现已证明, α 是核糖体的蛋白质 S_1 。 γ 和 δ 是宿主细胞蛋白质合成系统中的肽链延长因子 EF-Tu 和 EF-Ts。它们的性质功能总结于表 36-8。

表 36-8 $Q\beta$ 复制酶亚基的性质和功能

亚基名称	相对分子质量	来源	功能
I (α)	65 000	宿主细胞核糖体的蛋白质 S_1	与噬菌体 $Q\beta$ RNA 结合
II (β)	65 000	噬菌体感染后合成	聚合反应中磷酸二酯键形成的活性中心
III (γ)	45 000	宿主细胞的 EF-Tu 因子	与底物结合,识别模板并选择底物
IV (δ)	35 000	宿主细胞的 EF-Ts 因子	稳定 α 、 γ 亚基结构

当噬菌体 $Q\beta$ 的 RNA 侵入大肠杆菌细胞后,其 RNA 本身即为 mRNA,可以直接进行与病毒繁殖有关的蛋白质的合成。通常将具有 mRNA 功能的链称为正链,而它的互补链为负链;故噬菌体 $Q\beta$ RNA 为正链。在噬菌体特异的复制酶装配好后不久,酶就吸附到正链 RNA 的 3' 末端,以正链为模板合成出负链 RNA,直至合成进程结束,负链从模板上释放。同样的酶又吸附到负链 RNA 的 3' 末端,并以负链为模板合成正链(图 36-32)。所以两条链都是由 5'→3' 方向延长。在最适宜条件下,无论正链或负链的合成速度均为每秒 35 个核苷酸。

噬菌体 RNA 通过回折形成大量短的双螺旋区,在此二级结构基础上还可形成紧密的三级结构。噬菌体 RNA 的高级结构参与了翻译的调节控制。当噬菌体 RNA 处于天然高级结构状态时,成熟蛋白基因的起始区处于折叠结构之中,无法与核糖体结合,成熟蛋白基因因而被关闭。只有刚复制噬菌体 RNA,成熟蛋白基因的起始区才能接受核糖体,进行成熟蛋白的翻译。同样,RNA 复制酶亚基的合成起始区与外壳蛋白基因部分序列碱基配对,核糖体能直接起动外壳蛋白合成,但不能直接起动 RNA 复制酶亚基的合成。只有当外壳蛋白合成过程中核糖体使双链结构打开,RNA 复制酶亚基的起始区才能接受核糖体,并开始复制酶亚基的合成(图 36-33)。通过这种方式可以控制各种蛋白质合成的时间和合成的量。

图 36-32 噬菌体 $Q\beta$ RNA 的合成图 36-33 $Q\beta$ RNA 翻译和复制的自我调节

A 蛋白基因和复制酶亚基基因的起始区可通过碱基配对形成双螺旋,AUG 是起始密码子;t 是终止位点。外壳蛋白基因有两个终止位点, t_1 和 t_2 。刚复制的 $Q\beta$ RNA 可起动 A 蛋白的合成,复制酶亚基的合成有赖于外壳蛋白的合成

当以正链为模板合成负链时,除需要复制酶外,还需要两个来自宿主细胞的蛋白质因子,称为 HFI 和 HFII。但是,由负链为模板合成正链时并不需要这两个因子。在感染后期,噬菌体 RNA 大量合成,这时正链 RNA 的合成远超过负链 RNA 的合成,原因就是宿主的蛋白质因子起了调节作用。

进化的压力使病毒具有极高的复制效率,精确的识别和控制机制,并且尽量依赖宿主的条件。病毒的一个显著特点是,它的各组成成分常具有多种复杂的功能。例如, Q β 复制酶不仅能将噬菌体正链和负链 RNA 与大量存在于宿主细胞的所有 RNA 区别开来,特异地催化噬菌体 RNA 的复制;而且还能强力地抑制核糖体结合到 Q β 的 RNA 上,起蛋白质合成阻遏物的作用,这在病毒复制的早期起重要作用。再如,作为病毒颗粒结构组分的外壳蛋白,同时又是复制酶合成的调节蛋白,因此感染后期当外壳蛋白的需要达到高潮时,复制酶的合成即大大降低。

2. 病毒 RNA 复制的主要方式

RNA 病毒的种类很多,其复制方式也是多种多样的,归纳起来可以分成以下几类:

(1) 病毒含有正链 RNA 进入宿主细胞后首先合成复制酶(以及有关蛋白质),然后在复制酶作用下进行病毒 RNA 的复制,最后由病毒 RNA 和蛋白质装配成病毒颗粒。噬菌体 Q β 和灰质炎病毒(poliovirus)即是这种类型的代表。灰质炎病毒是一种小 RNA 病毒(picornavirus)。它感染细胞后,病毒 RNA 即与宿主核糖体结合,产生一条长的多肽链,在宿主蛋白酶的作用下水解成 6 个蛋白质,其中包括 1 个复制酶,4 个外壳蛋白和 1 个功能还不清楚的蛋白质。在形成复制酶后病毒 RNA 才开始复制。

(2) 病毒含有负链 RNA 和复制酶 例如,狂犬病病毒(rabies virus)和马水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus)。这类病毒侵入细胞后,借助于病毒带进去的复制酶合成出正链 RNA,再以正链 RNA 为模板,合成病毒蛋白质和复制病毒 RNA。

(3) 病毒含有双链 RNA 和复制酶 例如,呼肠孤病毒(reovirus)。这类病毒以双链 RNA 为模板,在病毒复制酶的作用下通过不对称的转录,合成出正链 RNA,并以正链 RNA 为模板翻译成病毒蛋白质。然后再合成病毒负链 RNA,形成双链 RNA 分子。

(4) 致癌 RNA 病毒 主要包括白血病病毒(leukemia virus)和肉瘤病毒(sarcoma virus),它们的复制需经过 DNA 前病毒阶段,由逆转录酶所催化。这类病毒的复制过程,后面再予详细介绍。

不同类型的 RNA 病毒产生 mRNA 的机制大致可分为 4 类(图 36-34)。由病毒 mRNA 合成各种病毒蛋白质,再进行病毒基因组的复制和病毒装配。因此病毒 mRNA 的合成在病毒复制过程中处于核心地位。

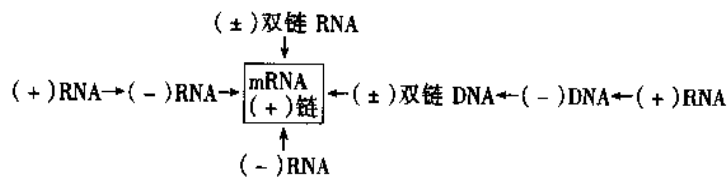


图 36-34 RNA 病毒合成 mRNA 的不同途径

(二) RNA 的逆转录

以 RNA 为模板、即按照 RNA 中的核苷酸顺序合成 DNA,这与通常转录过程中遗传信息流从 DNA 到 RNA 的方向相反,故称为逆转录(reverse transcription)。催化逆转录反应的酶最初是在致癌 RNA 病毒中发现的。

1. 逆转录酶的发现

1970 年, Temin 和 Mizufani 以及 Baltimore 分别从致癌 RNA 病毒中发现逆转录酶(reverse transcriptase),这就有力证明了 Temin 的前病毒学说(provirus theory)。

致癌 RNA 病毒是一大群能引起鸟类、哺乳类等动物白血病和肉瘤以及其他肿瘤的病毒。这类病毒感染细胞后并不引起细胞死亡,却可以使细胞发生恶性转化。Temin 等注意到致癌 RNA 病毒的复制行为与一般 RNA 病毒不同,用特异的抑制物(放线菌素 D)能抑制致癌 RNA 病毒的复制,但不能抑制一般 RNA 病

毒的复制。已经知道放线菌素 D 专门抑制以 DNA 为模板的反应,可见致癌 RNA 病毒的复制过程必然涉及到 DNA。Temin 于 1964 年提出了前病毒的假设,认为致癌 RNA 病毒的复制需经过一个 DNA 中间体(即前病毒),此 DNA 中间体可部分或全部整合(integration)到细胞 DNA 中,并随细胞增殖而传递至子代细胞。细胞的恶性转化就是由前病毒引起的。

前病毒学说的一个关键,即是认为遗传信息可以由 RNA 传递给 DNA。这种逆转录的传递方式,虽然能解释一些现象,但却不能被当时生物学界所接受;因为按照传统的“中心法则”,遗传信息的传递只能由 DNA 到 RNA 然后再到蛋白质,是一种单向进行的过程。为了证明前病毒学说,促使 Temin 等人努力去寻找逆转录酶。

Bader 用嘌呤霉素(puromycin)来抑制静止细胞的蛋白质合成,发现这种细胞仍然能感染劳氏肉瘤病毒(RSV,一种致癌 RNA 病毒),说明有关的酶不是感染后在细胞中合成的,而是在病毒中早已存在并由病毒带进细胞的。在这之后陆续报道在病毒粒子中发现有 DNA 聚合酶或 RNA 聚合酶存在。

以上结果推动了 Temin 等以及 Baltimore 从致癌 RNA 病毒中寻找合成前病毒的酶,终于在 1970 年分别在劳氏肉瘤病毒和鼠白血病病毒(MLV)中找到了逆转录酶。这一发现具有重要的理论意义和实践意义。它表明不能把“中心法则”绝对化,遗传信息也可以从 RNA 传递到 DNA,从而冲破了传统观念的束缚。它还促进了分子生物学、生物化学和病毒学的研究,为肿瘤的防治提供了新的线索。逆转录酶现已成为研究这些学科的有力工具。Temin 和 Baltimore 于 1975 年因发现逆转录酶而获诺贝尔生理学及医学奖。

2. 逆转录酶的性质

禽类成髓细胞瘤病毒的逆转录酶由一个 α 亚基和一个 β 亚基所组成。 α 亚基的相对分子质量为 65 000,它是由相对分子质量为 90 000 的 β 亚基经蛋白酶水解产生的片段。鼠类白血病病毒的逆转录酶由一条多肽链组成,相对分子质量为 84 000。该酶由 *pol* 基因(RNA 基因)所编码。正如所有 DNA 和 RNA 聚合酶一样,逆转录酶亦含有 Zn^{2+} 。

逆转录酶催化的 DNA 合成反应要求有模板和引物,以 4 种脱氧核苷三磷酸作为底物,此外还需要适当浓度的 2 价阳离子(Mg^{2+} 和 Mn^{2+})和还原剂(以保护酶蛋白中的巯基),DNA 链的延长方向为 $5' \rightarrow 3'$ 。这些性质都与 DNA 聚合酶相类似。当以其自身病毒类型的 RNA 作为模板时,该酶表现出最大的逆转录活力,但是带有适当引物的任何种类 RNA 都能作为合成 DNA 的模板。许多人工合成的多聚核苷酸表现出很高的模板活力,例如 poly A·dT₁₂₋₁₈, poly C·dG, poly dA·dT 等。因此,这些多聚物就被利用为提纯逆转录酶时测定活力的模板。poly dA·dT₁₂₋₁₈ 虽也能促进 DNA 的合成,但其模板活力比 poly A·dT₁₂₋₁₈ 为低。引物可以是寡聚脱氧核糖核苷酸,也可以是寡聚核糖核苷酸,但必须与模板互补,并且具有游离 $3' - OH$ 末端,其长度至少要有 4 个核苷酸。

几乎所有真核生物的 mRNA(组蛋白 mRNA 除外)分子 $3'$ 末端都有一段多聚腺苷酸(poly A),因此加入寡聚 dT 后, mRNA 就可以成为逆转录酶很好的模板。利用这一方法能够合成出相应于一定 mRNA 的互补 DNA(cDNA)。

现在知道,逆转录酶是一种多功能酶,它兼有 3 种酶的活力。①它可以利用 RNA 作模板,在其上合成出一条互补的 DNA 链,形成 RNA-DNA 杂合分子(RNA 指导的 DNA 聚合酶活力);②它还可以在新合成的 DNA 链上合成另一条互补 DNA 链,形成双链 DNA 分子(DNA 指导的 DNA 聚合酶活力);③除了聚合酶活力外,它尚有核糖核酸酶 H 的活力,专门水解 RNA-DNA 杂合分子中的 RNA。

3. 逆转录病毒的基因组

所有已知的致癌 RNA 病毒都含有逆转录酶,因此被称为逆转录病毒(retrovirus)。这类病毒的基因组通常是由两条相同的(+)RNA 链所组成,在 RNA 分子靠近 $5'$ 端附近区域以氢键结合在一起,因此是二倍体,在各类病毒中是独特的。基因组 RNA 的两端具有同样的序列,成为正向重复。 $5'$ 端有帽子结构(m^7G^5' ppp $^5'N-$), $3'$ 端有多聚腺苷酸,与一般真核生物 mRNA 相似。(+)RNA 靠近 $5'$ 端处还带有 1 分子的宿主 tRNA,以作为逆转录的引物。某些鸟类逆转录病毒携带的是 tRNA^{Pro};鼠类是 tRNA^{Pro};人嗜 T 淋巴细胞病毒(HTLV)也是 tRNA^{Pro},而获得性免疫缺损综合征(AIDS)病毒是 tRNA^{Lys}。

典型的逆转录病毒 RNA 的基因组长约 7000 ~ 10 000 个核苷酸,携带 3 个基因: *gag* (group associated

antigen)、*pol* 和 *env*。*gag* 和 *pol* 通常翻译成一条长的多肽链,由病毒的蛋白酶切成 6 个蛋白。*gag* 基因编码病毒颗粒内的核心蛋白,包括基质(matrix, MA)、衣壳(capsid, CA)和核衣壳(nucleocapsid, NC)3 个蛋白。*pol* 基因编码蛋白酶、整合酶(integrase)和逆转录酶。许多逆转录酶含有 α 和 β 两个亚基, α 亚基是由 β 亚基被蛋白酶切去 C 端后形成的;也有只含一条多肽链。*env* 基因编码被膜(envelope)蛋白,病毒 RNA 经拼接后翻译成一条多肽链,经蛋白酶切成两个蛋白,即表面蛋白(surface protein, SU)和跨膜蛋白(transmembrane, TM)。劳氏肉瘤病毒的 RNA 基因组还有第 4 个基因,这是病毒携带的癌基因(*v-onc*),仅与转化宿主细胞有关,对病毒自身繁殖并非必需。目前已知肉瘤病毒带有的癌基因(*src*)编码一种酪氨酸蛋白激酶,它的高表达造成细胞分裂失控。

人嗜 T 淋巴细胞病毒(human T lymphotropic virus, HTLV)和获得性免疫缺损综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)病毒的基因组更为复杂,除 *gag*、*pol* 和 *env* 基因外,还有多个开放阅读框架,编码不同功能的蛋白质。其中有些框架序列被内含子分开,需要经过拼接才能翻译。图 36-35 显示某些逆转病毒的基因组。

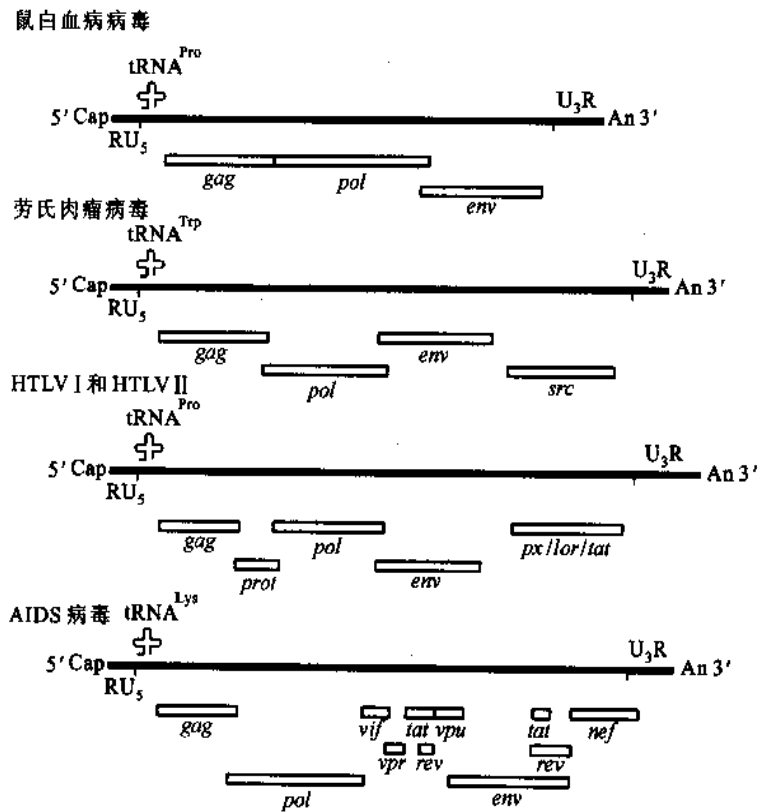


图 36-35 某些逆转录病毒的基因组

□ 开放阅读框架,其中有些阅读框架被内含子分开

4. 逆转录的过程

逆转录病毒的生活周期十分复杂。借助于病毒颗粒的表面蛋白和跨膜蛋白,使病毒与宿主细胞相融合,病毒颗粒所携带的基因组 RNA 以及逆转录和整合所需要的引物(tRNA)和酶(逆转录酶、整合酶)得以进入宿主细胞内。在细胞质内发生病毒 RNA 的逆转录,由 cDNA 进入细胞核,在整合酶帮助下病毒 cDNA 整合到宿主染色体 DNA 内,成为前病毒(provirus)。前病毒可随宿主染色体 DNA 一起复制和转录。只有整合的前病毒 DNA 转录的 mRNA 才能翻译产生病毒蛋白质,刚进入细胞的病毒 RNA 是无翻译活性的。因此,逆转录和整合所需的酶必须由病毒颗粒所携带。由此可见,在逆转录病毒生活周期中最关键的是逆转录过程。

逆转录过程可分为十步反应,其中需要经过逆转录酶两次转换模板(或称为两次跳跃)。首先,由结合在靠近 5' 端 PB(paired bases)位点的 tRNA 作为引物,在逆转录酶作用下合成 U5(unique to the 5' end)和 R

(direct repeat)区的互补 DNA U'5 和 R'。第二步,由逆转录酶的 RNase H 将模板 RNA 的 U5 和 R 区水解掉。第三步,新合成的 DNA 链之 R'与 RNA3'端的 R 配对,逆转录酶随之转换为以此 RNA3'端作为模板,这是第一次跳跃。第四步,(-)链 DNA 继续延长。第五步,模板 RNA 的 U3(unique to the 3' end)R 和 poly (A)_n 被

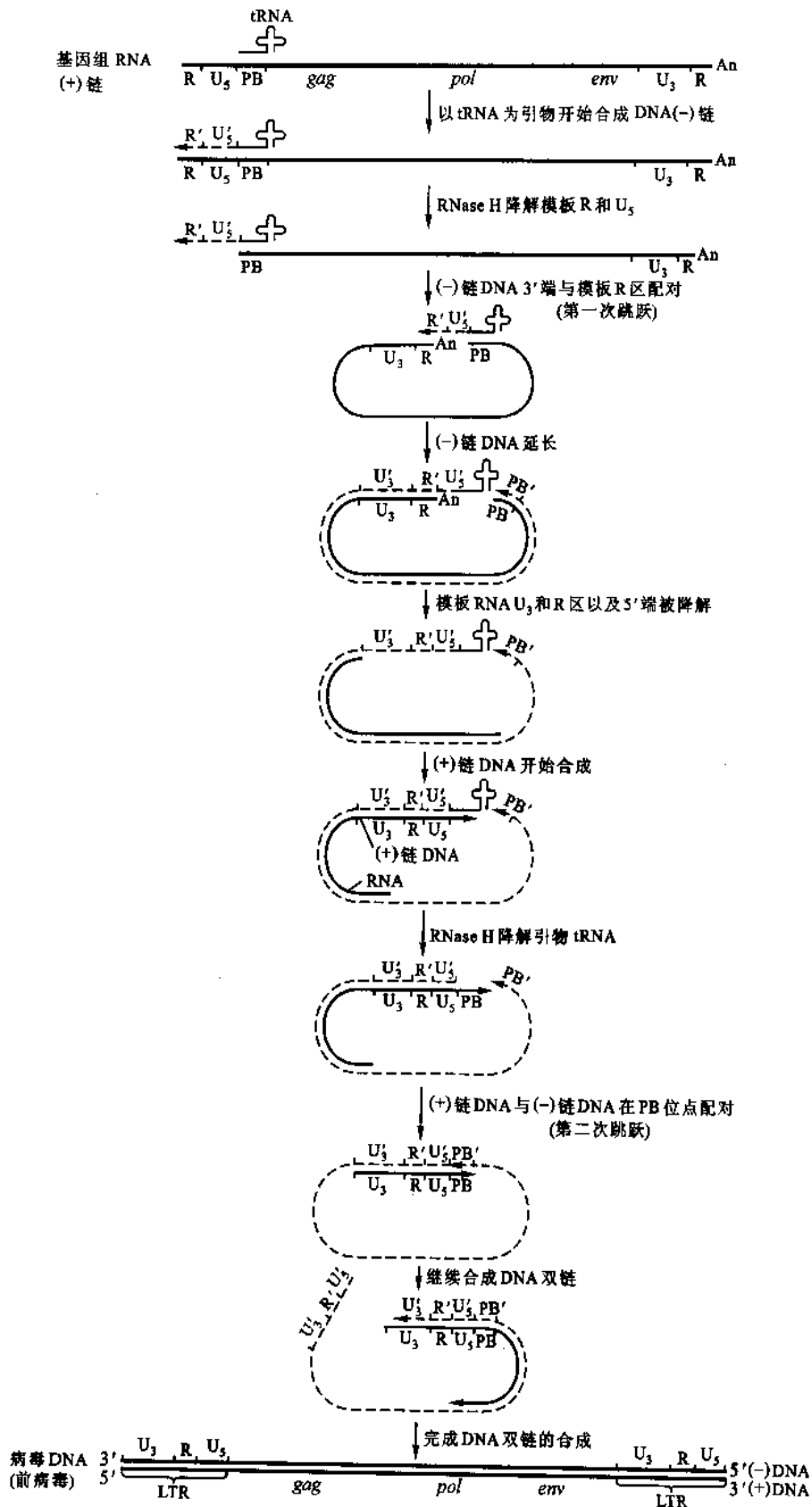


图 36-36 逆转录病毒 DNA 的合成

水解掉,5'端也开始被水解。第六步,以 RNA 的 3'端为引物合成 (+)链 DNA 的 U3 - R - U5。第七步,引物 tRNA 被降解掉。第八步,(+)链 DNA 与 (-)链 DNA 在 PB 位点处配对,即第二次跳跃,逆转录酶开始以新合成的 (-)链 DNA 为模板,合成 (+)链 DNA。第九步,继续合成 (+)链 DNA。第十步,(-)链 DNA U'3 - R' - U'5 与 (+)链 DNA U3 - R - U5 解开,(-)链 DNA 重复合成 U'3 - R' - U5,形成两端长重复序列 (long terminal repeat, LTR)。整个逆转录过程如图 36 - 36 所示。

逆转录产生的线型双链 cDNA 进入核内即可发生整合。逆转录病毒 DNA 的整合机制与转座子的转座过程类似。前病毒的两端 LTR 各失去 2 bp,两侧形成 4 ~ 6 bp 的正向重复。

逆转录病毒 RNA 是从整合的前病毒 DNA 上经转录而来。它们转运到胞质,在那里进行翻译。基因组 RNA 和病毒蛋白质转移到质膜,经装配通过出芽的方式形成新的病毒颗粒(图 36 - 37)。

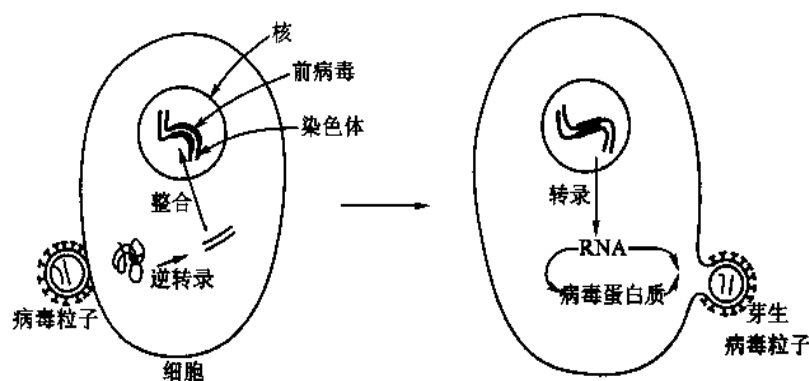


图 36 - 37 逆转录病毒的生活周期

5. 逆转录的生物学意义

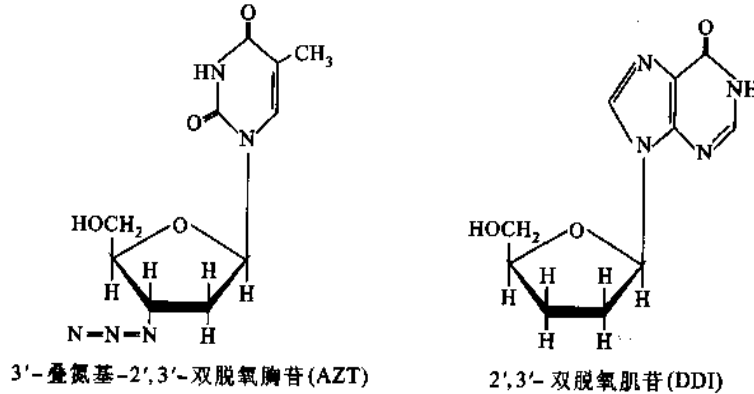
逆转录病毒能够使遗传信息从 RNA 传递给 DNA。病毒的基因来自细胞,病毒只是游离的基因或基因组。这就是说逆转录过程是细胞所具有的,而并不仅限于病毒,虽然最初逆转录过程是从病毒中发现的。其后发现众多的逆转座子,表明逆转录过程在细胞中频繁发生。但是在一般的细胞中并无可觉察的逆转录酶活性。其实端粒酶就是一种逆转录酶,其活性只存在于胚胎和肿瘤细胞中。可能细胞的逆转录酶只在一定条件下才能表达,这也是细胞染色体遗传信息得以保持相对稳定的一个原因。

逆转录过程的发现,对中心法则是一次冲击,并且还修改了其内容。DNA 和 RNA 之间遗传信息流虽以双向箭头来表示,但并不是所有 DNA 的遗传信息都能传递给 RNA,而且传递受到严格的调节控制;而遗传信息从 RNA 传递给 DNA 更受限制。它们之间的相互关系正是遗传、发育和进化的核心问题之一。

逆转录病毒能够转导宿主的染色体 DNA 序列。通过重组,前病毒 DNA 可以与宿主染色体 DNA 组合在一起,由此产生的病毒以宿主的一段 DNA 序列取代了自身的基因片段,故而是复制有缺陷的,不能依靠自身完成感染周期。逆转录病毒的二倍体基因组对于细胞 DNA 序列的转导十分重要。由于二倍体的存在,一个基因组发生重组,另一仍是正常的,后者可成为辅助病毒,提供所失去的病毒功能。如果重组病毒携带了控制细胞生长分裂的原癌基因,使其以异常高的水平表达,或经突变失去了调节机制,就成为癌基因。逆转录过程的发现,有助于人们对 RNA 病毒致癌机制的了解,并对防治肿瘤提供了重要线索和途径。

1983 年发现人类免疫缺损病毒 (human immune deficiency virus, HIV), 它是一类逆转录病毒,其 RNA 基因组中除一般常见基因外,还有一些特殊的基因,使其表现出不同寻常的行为。通常逆转录病毒侵入细胞后并不杀死宿主细胞,而是发生病毒基因组的整合,带有癌基因的病毒可引起宿主细胞转化。但是 HIV 却不同,它感染(主要是 T 淋巴细胞)后即杀死细胞,造成宿主机体免疫系统损伤,引起艾滋病 (AIDS)。根据艾滋病的起因和逆转录过程已设计和研制了一批治疗药物。药物作用的靶部位主要选择对逆转录病毒特异的逆转录酶和蛋白酶,其中治疗效果较好的有叠氮胸苷 (3' - azido - 2', 3' - dideoxythymidine, AZT) 和双脱氧肌苷 (2', 3' - dideoxyinosine, DDI)。AZT 原设计作为抗肿瘤药物,临床试验发现它抗肿瘤的效果不理想,但是意外发现它对 AIDS 有很好疗效。当 AZT 被 T 淋巴细胞吸收后,即转变为 AZT 三磷酸,而 HIV

的逆转录酶对 AZT 三磷酸有很高亲和力,从而竞争性抑制了酶对 dTTP 的结合。当 AZT 加入到 DNA 链生长的 3'端时,病毒 DNA 链的合成迅即终止。AZT 对 T 淋巴细胞的毒性不大,因为细胞 DNA 聚合酶对其亲和力较低。然而对骨髓细胞却有较大毒性,尤其是红细胞的祖细胞,因此采用 AZT 治疗常会引起贫血,这是该类药物的缺点。DDI 具有类似的作用机制。AZT 和 DDI 的结构式如下:



嗜肝 DNA 病毒(Hepadnavirus),如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus),在复制周期中也需经过逆转录的步骤。乙型肝炎病毒的基因组是一个带缺口的环状 DNA 分子,其大小为 3 200 bp。病毒粒子中携带有 DNA 聚合酶(即逆转录酶)和蛋白质引物。当细胞感染乙型肝炎病毒后,基因组 DNA 的缺口即由 DNA 聚合酶所填补,从而形成闭环分子,并转录产生(+)链 RNA。RNA 被装配到核壳内,在那里进行逆转录,最后加上外壳成为成熟的病毒粒子。由此可见,嗜肝 DNA 病毒的复制过程与逆转录病毒很相像,二者均有逆转录的阶段。但它们之间也有明显的差别:①嗜肝 DNA 病毒含 DNA,其复制过程为 DNA→RNA→DNA;逆转录病毒含 RNA,其复制过程为 RNA→DNA→RNA。②嗜肝 DNA 病毒以蛋白质作为合成(-)链 DNA 的引物;逆转录病毒则以 tRNA 作为合成(-)链 DNA 的引物。③在复制过程中,逆转录病毒的前病毒 DNA 形成长末端重复序列;嗜肝 DNA 病毒则否。④逆转录病毒能有效地将其前病毒 DNA 整合到细胞 DNA 中去,嗜肝 DNA 病毒只能低频随机整合。这可能与嗜肝 DNA 病毒缺乏长末端重复序列和整合酶有关。嗜肝 DNA 病毒的例子,也表明了研究逆转录过程的重要意义。

逆转录病毒和嗜肝 DNA 病毒严重危害人类健康并给畜牧业造成损失,然而将它们进行改造,也可以成为向细胞内引入外源遗传信息的有效工具。尤其是逆转录病毒,经过改建,它能成为理想的信息载体,用于肿瘤和遗传病等的基因治疗。在这方面,已取得了令人鼓舞的初步成功。

(三) 逆转座子的种类和作用机制

真核生物的基因通常被居间序列所分隔,其基因组内存在大量分散的重复序列,基因内和基因间大量非编码序列的存在使基因组变得极为庞大。现在知道,基因组的分散重复序列主要是由一些移动因子(mobile element)所组成。DNA 重组一章已对转座子作了介绍。另一类移动因子由于它们在转座过程中需要以 RNA 为中间体,经逆转录再分散到基因组中,故称之为逆转座子(retroposon)。过去曾将逆转座子看成是一些无用的、“自私的”、进入进化死端的 DNA,认为它们只不过被杂乱堆放在基因组内。最近有关逆转座子活动和作用的一些发现表明,这一观点并不正确;逆转座子可能在基因组结构动态变化中起着关键的作用,故有深入研究的必要。

1. 逆转座子的结构特点

逆转座作用的关键酶为逆转录酶(reverse transcriptase, RT)和整合酶(integrase, IN)。自身编码逆转录酶和/或整合酶的非传染性转座因子称为逆转录转座子(retrotransposon)。按其结构特征可分为两类:一类具有与逆转录病毒类似的长末端重复结构(long terminal repeat, LTR),并含 gag 和 pol 基因,但无被膜蛋白基因 env,不形成细胞外相。这类中包括酵母的 Ty 因子,果蝇的 copia 和 gypsy,玉米的 Bsl,啮齿类的 LAP,人类的 THE1。另一类不具有 LTR,但有 3' poly(A),其中心编码区含有与 gag 和 pol 类似的序列,5'端常被截

短,其中包括果蝇的 I 因子,哺乳类的长分散因子(long interspersed element, LINE) L1 和线粒体质粒。它们的结构如图 36-38 所示。

另一方面,真核生物由于细胞存在核结构,其转录和翻译过程在空间上和时间上均被分隔开,因此逆转座有关的酶并不一定需要由移动因子自身编码,可以由其他基因通过反式作用供给。基于同样原理,几乎所有种类的细胞 RNA 都能产生其逆转座序列。自身不编码逆转录酶的逆转座子(retroposon)包括由

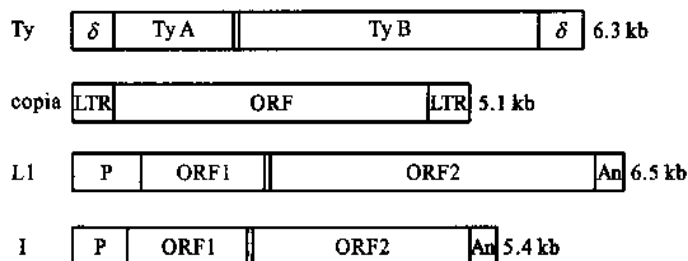


图 36-38 几种逆转录转座子的结构

RNA 聚合酶 II 转录物(各种 mRNA 和 snRNA)形成的逆基因和逆假基因;由 RNA 聚合酶 III 转录物(tRNA、4.5S RNA、7SK RNA、7SL RNA、Alu 序列等)形成的短分散因子(short interspersed element, SINE)。它们的共同结构特点是无内含子,无重复末端,通常有 3' poly(A),5'端或 3'端可能被截短。

2. 逆转座子的转座作用

一般认为逆转座子插入基因组的位点是随机的,但实际上它仍有一定程度的选择,并非完全任意。例如,测定果蝇 gypsy 插入的位点表明,它的靶序列是 5'TAYATA3',其中 Y 代表嘧啶,整合造成的 4 个 bp 正向重复为 TAYA。这很可能与其整合酶的特异性有关。分析酵母 Ty 因子的插入位点可得出下列结论:第一,它们倾向于整合在富含 AT 区;第二,一些例子表明有成串 Ty 因子存在,这可能是由于 Ty 因子易于插入另一个 Ty 因子内,或是由于存在共同的靶序列;第三,Ty 因子常位于 tRNA 基因、5S rRNA 基因以及 U6 的基因邻近或上游,显示这些转座子的整合位点与 RNA 聚合酶 III 转录的基因启动子或有关序列相关联,具体机制目前还不清楚。

逆转录转座子自身能编码整合酶,它们整合部位的两侧有固定长度的正向重复,表明整合酶能交错切开靶序列,整合后通过复制而使靶序列倍增。通常整合酶对靶序列并无严格选择,但交错切开的长度是固定的。然而,逆基因和逆假基因两侧的正向重复长度却不固定,最短为零,最长可达 41 bp,不像是由整合酶交错切开而成,很可能是随机插入染色体 DNA 的断裂部位,再由连接酶接上。DNA 富含 AT 区最易断裂,由此可以理解为什么该区是插入热点。许多逆转座子具有 3' poly(A)结构,它在整合中可能起一定作用。另外,活性基因 5'端上游的 DNase I 超敏感区是染色体 DNA 暴露的部位,易于和各种因子接触,也是较易整合的部位。

人类的 Alu 家族与 7SL RNA(信号识别颗粒的 RNA)的两端序列高度同源,其中间和 3'端为 A_n。当 7SL RNA 发夹结构的中间部分被切除后再连接,即构成 Alu 序列。人类 Alu 序列常以二聚体(或四聚体)形式存在;灵长类和啮齿类常为单体。它们内部都有 RNA 聚合酶 III 启动子。RNA 聚合酶 III 转录终止于 oligo(U),U_n 回折与 A_n 配对可引发 cDNA 的合成(图 36-39)。Alu 序列可能以这种方式得以大量扩增。在人类单倍体基因组中它的拷贝数可达 50 万以上,是拷贝数最多的一种逆转座子。实验表明,Alu RNA 的二级结构为其逆转座所必需。

3. 逆转座子的生物学意义

逆转座子广泛分布于真核生物的基因组中,必将对真核生物基因组的功能带来影响。归纳起来可能有以下几方面的作用:

(1) 逆转座子对基因表达的影响

逆转录转座子的两个 LTR 是由逆转录酶重复逆转录 RNA 的基因组两端序列而构成,包括 U3、R 和 U5。U3 区含有正向重复序列构成的增强子以及转录起始信号 CCAAT 和 TAATA,U5 区含有 poly(A)加工

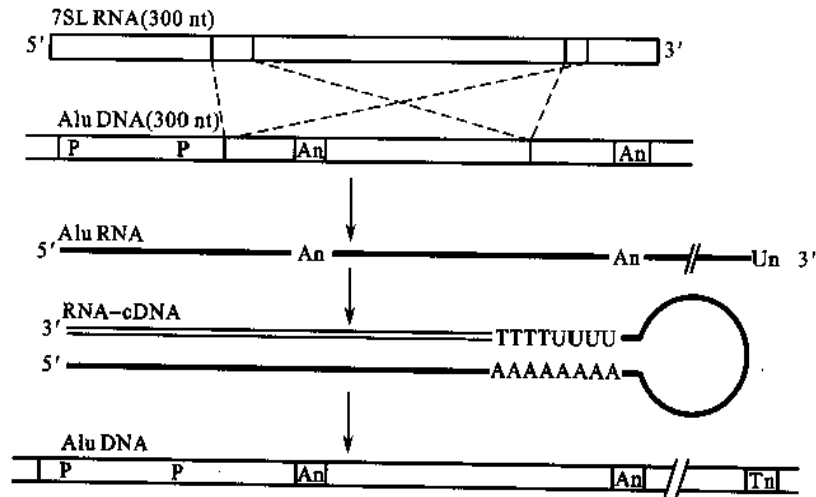


图 36-39 Alu 序列逆转座作用的一种可能方式

信号 AATAA。左 LTR 可启动自身基因的表达,右 LTR 可启动邻近宿主基因的表达。

逆转录转座子编码有关逆转座作用的酶,它们的作用包括反式因子和顺式序列两个方面。一般的逆转录序列不编码逆转座有关的酶,它们只有顺式序列的作用。逆转座子对宿主基因表达的影响与其整合的部位有关。当它们插入基因的编码序列和启动子序列时即造成基因失活;插入基因 3' 和 5' 非翻译区或内含子时可能会影响到基因的转录、转录后加工或翻译过程,有时还会影响表达的组织特异性和发育阶段性。逆转座子如插入在基因上游的调控区,其启动子和增强子可使邻近沉默的基因得以表达。

果蝇的 I 因子是造成 I-R 杂交不育的起因。存在两种类型的果蝇:I 品系(inducer)含有活性 I 因子;R 品系(reactive)不含活性 I 因子,它们的细胞型(cytype)不同。当 I 雄性与 R 雌性杂交时,产生不育的 F1 雌性果蝇。I-R 不育的机制很复杂,它是一种综合征候群,主要涉及雌性不育、增加突变频率和 I 因子的高频转座。在此,I 因子的活化是组织特异的,仅限于雌性的生殖细胞,体细胞发育则是正常的。与此相类似的系统还有 P(paternal contributing)和 M(maternal contributing)构成的 P-M 杂交不育;但是 P 因子的转座作用仅限于 DNA 水平,不经过 RNA 中间体。

(2) 逆转座子介导基因的重排

逆转座子自身在复制时易发生重排,已如上所述。分散在真核生物基因组中的大量逆转座子是基因组的不稳定因素,它们可引起基因组序列的删除、扩增、倒位、移位及断裂等重排。由逆转座子引起基因重排主要有以下几种方式:① 由逆转座子提供同源序列促进同源重组,② 逆转座子经逆转座作用插入新的位点,③ 逆转座子编码的反式作用因子或顺式作用序列引起基因重排。

由逆转座子介导的基因重排是人类某些遗传疾病的形成原因。血友病 A 是由于缺乏凝血因子Ⅷ所致,经分析知道这是因为 L1 因子插入该凝血因子基因造成的。已知癌基因的形成和活化与基因重排有关。据文献报道,发现一些肿瘤组织的特定基因位点内存在 L1,但其周围正常细胞的该位点则不存在 L1 因子。人类基因组中 L1 因子的拷贝数大于 10 000,该因子造成了人类的许多遗传突变。

脉络膜和视网膜的回状萎缩(GA),一种常染色体隐性的脉络膜视网膜变性(chorioretinal degeneration),已知是由于鸟氨酸 δ-转氨酶(OAT;EC2.6.1.13)缺陷所致。经研究发现这一突变是由于以反方向插在基因内含子 3 内的 Alu 序列发生了一个 G 变为 C 的颠换,从而使 Alu 的反义链上产生新的拼接给体位点,并活化其 5' 端的隐蔽受体位点,结果使得拼接后的 mRNA 在外显子 3 和 4 之间留下了一段 Alu 反义序列,该序列长 142 个核苷酸,使鸟氨酸 δ-转氨酶因之失活。突变机制如图 36-40 所示。

逆转座子介导的基因重排在生物进化中无疑具有重要的意义。

(3) 逆转座子在生物进化中的作用

逆转座子除了能够促进基因组的流动性,从而有利于遗传的多样性外;它们散布在基因组中,还可成为进化的种子。它们一旦遇到合适的基因组环境,即可通过突变而形成新的基因或基因的结构域,或是与

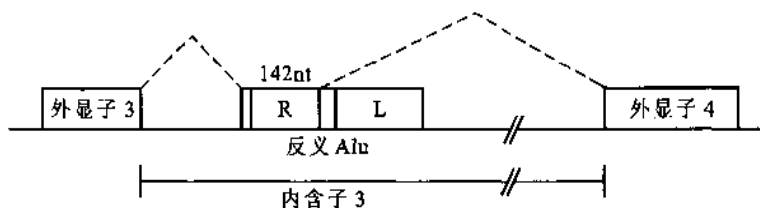


图 36-40 Alu 反义序列的插入导致鸟氨酸 δ -转氨酶的失活

先存的基因匹配成为新的调节因子。

在众多逆转座子中,也有一些具有表达功能,称为半加工的逆基因。例如,大鼠和小鼠(还有少数鱼类)有两个非等位的前胰岛素原基因,基因 I 在 5'非翻译区含有单个小的内含子,而基因 II 除此小内含子外,在 C 肽编码区还有一个大的内含子。比较这两个基因的结构可以看到,基因 I 的两侧有 41 bp 的正向重复,5'端有与基因 II 类似的启动子和调控序列,但少一个内含子,3'端有 Oligo(A)。显然基因 I 是由基因 II 的不正常转录产物,即从基因 II 上游至少 0.5 kb 处由另一启动子(或类似序列)转录出来,经部分加工然后逆转座而成。

由逆转座子衍生的基因还包括人类和小鼠的磷酸甘油酸激酶的基因 2(*pgk-2*)。基因 1(*pgk-1*)与 X 染色体的连锁,在体细胞中组成型表达,它含有 10 个内含子;而常染色体的 *pgk-2* 为逆基因,它的表达则是组织特异的,仅在产生精子的细胞进行减数分裂时表达。在选择压力下,通常一个有功能的基因很难转变成另一个新的基因,只有经过基因倍增后才能逐渐歧化。基因倍增有两种途径:一是染色体间不等量重组,二是基因的转座或逆转座。在这里 *pgk-2* 是通过逆转座并获得新性状(组织特异表达)的一个成功进化的例子。人类唾液腺淀粉酶启动子区(AMY1A, AMY1B, AMY1C)是由 γ -肌动蛋白假基因的 3'非翻译区衍变而来。这表明逆转座子还可以作为新的调节元件的来源。

RNA 较易变异,而且与环境有着更直接的联系,因此它所包含的遗传信息比 DNA 丰富得多。它通过逆转座作用能将所获得的遗传信息逆向转移给 DNA,并促进基因结构域或基因的最优组合。昆虫和哺乳类动物在进化上的优势很可能与它们含有大量活跃的逆转座子有关。

逆转座子的功能和活动规律虽还不很清楚,但它们在真核生物进化中无疑起着重要作用。对于逆转座子的深入研究,将有助于对基因组动态结构的了解,并且还能能为基因工程的实践提供新的途径和手段。

提 要

在 DNA 指导下 RNA 的合成称为转录。DNA 指导的 RNA 聚合酶要求以 4 种核苷三磷酸作为底物,并需要 DNA 作为模板, Mg^{2+} 能促进反应, RNA 链的合成方向也是 5'→3'。反应是可逆的,焦磷酸的分解可推动反应趋向聚合。RNA 聚合酶催化的反应无需引物,也无校对功能。

大肠杆菌 RNA 聚合酶全酶有 5 个亚基($\alpha_2\beta\beta'\sigma$)组成,没有 σ 亚基的酶为核心酶。RNA 的合成可分为 4 个阶段:识别、起始、延伸和终止。 σ 亚基的作用在于引导 RNA 聚合酶稳定结合在 DNA 启动子上,它增加了 RNA 聚合酶对启动子的亲和力和停留时间;降低了酶与一般序列的亲和力和停留时间。 σ 亚基还可帮助 RNA 聚合酶选择不同的转录基因。

真核生物的 RNA 聚合酶分为 I、II 和 III 三种,它们分别转录 rRNA、mRNA 和小 RNA。利用 α -鹅膏蕈碱的抑制作用可以区分这三类 RNA 聚合酶。

启动子是 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列。原核生物的启动子有两个保守序列,位于 -10 的 Pribnow 框,和位于 -35 的识别区。

真核生物的启动子有三类,分别由 RNA 聚合酶 I、II 和 III 所进行转录。RNA 聚合酶不能直接识别和结合到启动子上,而需借助于转录因子和辅助转录因子才能形成前起始复合物进行转录。类别 I 启动子包括核心启动子和上游控制元件两部分,需要 UBF1 和 SL1 因子参与作用。类别 II 启动子包括四类控制

元件:基本启动子、起始子、上游元件和应答元件。识别这些元件的反式因子有通用转录因子、上游转录因子和可诱导的因子。类别Ⅲ启动子有两类:上游启动子和基因内启动子,分别由装配因子和起始因子促进转录起始复合物的形成和转录。

转录的终止控制元件为终止子,其辅助因子为终止因子。大肠杆菌有两类终止子:依赖于 *rho* 因子的终止子和不依赖于 *rho* 的终止子。终止子还可用于控制下游基因的表达。

转录的调节是基因表达调节的重要环节,包括时序调节和适应调节。原核生物的操纵子既是表达单位,也是协同调节的单位。调节有正调节和负调节,原核生物以负调节为主。受一种调节蛋白所控制的调节系统称为调节子。不同调节系统间形成调节网络。

真核生物的转录调节与原核生物有相同之处,也有显著的不同。①真核生物基因不组成操纵子;②真核生物存在大量顺式元件和反式因子,调节更复杂;③真核生物的调节以正调节为主,可诱导因子以共价修饰为主;④真核生物具有染色质结构水平上的调节。

上游调节因子通常有3个结构域:DNA结合结构域、转录激活结构域和二聚化结构域。最常见的DNA结合结构域有:螺旋-转角-螺旋、锌指、碱性螺旋-突环-螺旋以及碱性亮氨酸拉链。

增强子能在很远距离对启动子产生影响,不论在启动子上游或下游都有作用,作用无方向性,无生物种族特异性,但受发育影响。从本质上讲,增强子与上游元件起同样作用。

RNA生物合成的抑制剂包括嘌呤和嘧啶类似物、DNA模板抑制物和RNA聚合酶抑制物。它们有些可在临床上作为抗生素和抗肿瘤药物,有些只能在实验室供试验用。

RNA在转录后需要经过一系列复杂的加工过程才能成为成熟的RNA分子。原核生物的稳定RNA(rRNA和tRNA)存在切割、修剪、附加、修饰和异构化等加工过程,mRNA一般在转录的同时即能进行翻译,不存在加工作用。真核生物RNA加工过程更为复杂,mRNA存在特殊结构,其加工包括5'端加帽和3'端聚腺苷酸化。真核生物RNA还存在拼接、编辑和再编码等信息加工过程。信息加工可以抽提有用信息,消除错误,适应调节和选择性的表达。这类加工还有利于生物进化。

RNA也可以成为遗传信息的基本携带分子,例如,有些病毒的基因组为RNA分子。RNA可借复制将遗传信息由亲代分子传递给子代分子。RNA的复制由RNA指导的RNA聚合酶所催化。通常RNA复制酶对模板有很高的特异性,并且对RNA的复制和翻译,正链和负链的数量等存在调节控制作用。

逆转录酶最初发现于致癌RNA病毒。该酶为多功能酶,能以RNA为模板合成第一条cDNA链(逆转录酶活性),水解除去RNA-DNA杂合分子中的RNA(RNase H活性),再以DNA链为模板合成双链DNA(DNA聚合酶活性)。病毒RNA的逆转录要求特定tRNA为引物。逆转录酶无校正功能,因此错误率较高。逆转录过程共有十步反应,其中有两次逆转录酶在模板上的转移或称为跳跃。逆转录的结果在前病毒的两端出现两个长末端重复(即U3-R-U5),这是末端重复逆转录和复制所致。长末端重复序列中含有整合位点、加工位点以及启动子和增强子序列,对于前病毒的整合和表达十分重要。

逆转录病毒能够转导宿主DNA序列。如果病毒携带了细胞的原癌基因,使其高水平表达或失去调控即成为癌基因。人免疫缺损病毒主要感染T淋巴细胞,它在感染后即杀死宿主细胞,造成获得性免疫缺损综合征(AIDS)。逆转录过程的研究不仅揭示了DNA和RNA之间的关系,而且也为RNA病毒致癌和艾滋病等的治疗提供新的途径。

由RNA逆转录和整合而形成的遗传因子即为逆转座子。逆转座子有两类,一类自身编码逆转录酶/整合酶;另一类自身不能编码有关的酶,而依赖于其他来源。事实上任何RNA都能经逆转录和整合而成为逆转座子。具有整合酶和整合位点的逆转座子以较高的效率发生整合。具有poly(A)_n结构的逆转座子易于结合在染色体富含A-T的断裂处。有些逆转座子利用染色体DNA随机断裂而发生整合,这种整合方式将缺乏转座子整合位点的结构。

逆转座子广泛分布在真核生物基因组内。它们的生物学作用主要为:①影响所在位点或邻近基因的活性;②成为基因组的不稳定因素,促进基因组重组;③促进生物进化。

习 题

1. 比较四类聚合酶性质和作用的异同(四类聚合酶是:DNA 指导的 DNA 聚合酶,DNA 指导的 RNA 聚合酶,RNA 指导的 RNA 聚合酶,RNA 指导的 DNA 聚合酶)。
2. 原核生物 RNA 聚合酶是如何找到启动子的?真核生物 RNA 聚合酶与之相比有何异同?
3. 何谓启动子?保守序列与共有序列的概念是否一样? Pribnow 框与启动子之间是何关系?
4. 真核生物三类启动子各有何结构特点?
5. 何谓终止子和终止因子?依赖于 *rho* 的转录终止信号是如何传递给 RNA 聚合酶的?
6. 何谓时序调控?何谓适应调控?分别对原核生物和真核生物的转录调控举例加以说明。
7. 简要说明原核生物和真核生物转录调控的主要特点。
8. 转录调节因子的结构有何特点?
9. 比较启动子上游元件、增强子和绝缘子的作用特点。
10. 什么是染色质的结构域?它有哪些控制位点?
11. 目前有哪些重要的 RNA 合成抑制剂已在临床上用作抗癌药物、抗病毒药物和治疗艾滋病的药物?其作用机制是什么?
12. 为什么 RNA 转录后加工比任何生物大分子合成后的加工过程都更复杂?
13. 试述 snoRNA 的结构和作用?
14. 为什么真核生物要先转录内含子然后再将其切除?
15. RNA 拼接可分为几种类型?其作用特点是什么?
16. RNA 拼接和编辑对真核生物的进化有何作用?
17. 校正 tRNA 可以消除错义、无义和移码突变带来的危害,但它是否会将正确的密码子翻译错误?
18. 简要说明 RNA 功能多样性。
19. RNA 复制酶如何调节病毒 RNA 复制与翻译、正链与负链合成的关系?
20. 逆转录病毒前病毒的长末端重复是如何形成的?它有何意义?
21. 为什么逆转座子只存在于真核生物?它有何生物学意义?

主要参考书目

1. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Stryer L. Biochemistry, 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999
3. Lewin B. Gene VII. Oxford: Oxford University Press, 2000
4. Weaver R F. Molecular Biology. McGraw - Hill Companies, Inc, 2000
5. Watson J D, Hopkins N H, Roberts J W *et al.* Molecular Biology of the Gene, 4th ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1987

(朱圣庚)

第 37 章 遗传密码

生物功能由生物不同层次的结构所决定。生物不同层次的结构则是由生物大分子装配而成。生物大分子有四类:蛋白质、核酸、多糖和脂类化合物。蛋白质是生物主要的功能分子,它参与所有的生命活动过程,并起着主导作用。核酸包括 DNA 和 RNA,是主要的遗传信息携带分子,RNA 还是重要的功能分子,在遗传信息的传递、加工和调节中起关键的作用。多糖和脂类化合物协助蛋白质完成其功能。脂类化合物本身虽然仍属于生物小分子,但能聚集成复合物而具大分子的性质,它与蛋白质构成生物膜,形成细胞基本的结构。核酸能够复制,蛋白质的合成由核酸所控制,多糖和脂类化合物由蛋白质作为酶催化合成。因此,生物的形态结构可通过生物大分子的自复制和自装配而完成。生物亲代传递给子代的遗传信息主要编码在核酸分子上,表现为特定的核苷酸序列。半个多世纪以来,生物化学与分子生物学揭示了基因的许多重要编码规律,破译了氨基酸密码表。所谓遗传密码(genetic code)通常就是指核苷酸三联体(triplet)决定氨基酸的对应关系。实际上,在高等动物和植物基因组中只有 1%左右用于编码蛋白质氨基酸序列,更大部分是用于编码基因表达的调控信息。相信随着研究的深入,会有第二套、第三套遗传密码表被破译。

一、DNA 是遗传信息的携带分子

虽然早在 1869 年 Miescher F 就发现了细胞核中存在 DNA,但直到 20 世纪中叶才了解这类物质是遗传信息的携带分子。其后半个世纪的研究,揭示了遗传信息的编码、传递和表达机制。

(一) 细胞含有恒定量的 DNA

细胞中 DNA 含量分析结果表明,任何一种生物的细胞,其 DNA 含量都是恒定的,不受外界环境、营养条件和细胞本身代谢状态的影响。单倍体生殖细胞的 DNA 含量正好是双倍体体细胞的一半。这些都符合遗传物质的特性。表 37-1 列出几种动物细胞中 DNA 的平均含量。

表 37-1 细胞的 DNA 含量(pg/细胞)

生物种类	体细胞(二倍体)	精细胞(单倍体)
牛	6.5	3.4
小鼠	5.3	2.7
鸡	2.4	1.3
蟾蜍	7.3	3.7
鲤鱼	3.4	1.6

此外,每个细胞中 DNA 含量与生物机体的复杂性有关。可以想象生物机体越复杂,遗传信息量越大,就需要越多遗传物质携带遗传信息。从表 37-2 可见,生物进化程度越高,每个细胞中 DNA 含量(C 值)也越高。例如,细菌每个细胞约含 DNA 0.01 pg(1×10^{-12} g),而高等动物每个细胞约含 6 pg,比细菌多近千倍。但是,细胞 DNA 含量与进化程度并不是简单的平行关系,相等进化程度的生物在不同物种间细胞 DNA 含量可以差别很大。例如,昆虫、两栖类之间细胞 DNA 含量可以相差数十倍,开花植物甚至可以相差数百倍。不少动植物物种的细胞 DNA 含量远大于人类细胞平均 DNA 含量 5.06 pg。这种现象称为 C 值悖论(C value paradox)。造成比现象的原因是基因组 DNA 存在重复序列;基因组除染色体基因外还有染色体外基因(extrachromosomal gene)和细胞器基因。多倍体现象使得物种间细胞 DNA 含量有很大差别,开花植

物就是如此。表 37-2 列出一些细胞和病毒的大致 DNA 含量。

表 37-2 一些细胞和病毒的 DNA 含量

生物种类	DNA 量 (pg/细胞或病毒)	碱基对数目/bp
开花植物	0.3 ~ 200	$5.6 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{11}$
哺乳类	6	5.5×10^9
鸟类	2	2×10^9
爬虫类	5	4.5×10^9
两栖类	1.6 ~ 160	$1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{11}$
鱼类	0.6 ~ 21	$6 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{10}$
昆虫类	0.2 ~ 10	$2 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$
甲壳类	3	2.8×10^9
软体动物	1.2	1.1×10^9
线虫	0.08	8×10^7
海绵	0.1	1×10^8
霉菌	0.02 ~ 0.17	$2 \times 10^7 \sim 1.6 \times 10^8$
细菌	0.002 ~ 0.06	$2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^7$
噬菌体 T ₄	0.000 24	1.7×10^5
噬菌体 λ	0.000 08	4.8×10^4

* 真核细胞是体细胞的数值

由此可知, DNA 的信息量只与 DNA 的复杂度 (complexity) 有关, 而 DNA 的复杂度是指单倍体细胞基因组 DNA 非重复序列的碱基对数, 并不相等于细胞 DNA 含量。信息量 (I) 与概率 (P) 有关, 可按以下公式计算:

$$I = -k \ln p$$

k 是常数, P 由 DNA 的碱基对数 (n) 决定:

$$P = \frac{1}{4^n}$$

生物分子的进化表现出在动力学控制下开放系统热力学过程的特征。生物在进化过程中, 借助基因扩增和重组, 基因组 DNA 变大, 信息量增加。随机突变经中性漂移而固定, 增加了生物的多样性。然而, 只有经过自然选择, 才使生物的多样性具有适应性。DNA 的大小只表明它可能编码信息的量, 它实际具有的编码信息, 是在进化过程中通过自然选择而获得的。换句话说, 自然选择赋予 DNA 有义信息。现有生物分子的结构都是进化的结果。

(二) DNA 是细菌的转化因子

细菌的转化现象, 最初是在 1928 年由 Griffith F 所发现。肺炎球菌通常包有一层黏稠的多糖荚膜, 形成光滑的菌落, 称为 S 型。这个多糖荚膜是细菌致病所必需。失去荚膜的突变株就没有致病能力, 成为粗糙不光滑的菌落, 称为 R 型。Griffith 发现, 单独给小鼠注射活的 R 型肺炎球菌, 或单独注射加热杀死的 S 型肺炎球菌都不能致病。但是若将两者混合后一起注射, 则可使小鼠得肺炎致死, 并且从小鼠体内分离出 S 型肺炎球菌。这一事实说明, 非致病的 R 型肺炎球菌可被存在于 S 型菌中一种耐热成分转化为 S 型。在这之后他又发现, S 型菌加热杀死后的无细菌提取液, 也能在体外经试管培养, 使 R 型菌转化为 S 型菌。转化产生的 S 型后代, 还能继续繁殖, 并遗传此性状。

1944年, Avery O T通过实验证明,使无荚膜的肺炎球菌产生荚膜的转化因子是DNA。他从加热杀死的S型菌中提取出DNA,经过反复纯化,仍然保持转化活力。用蛋白酶和核糖核酶处理都不会使其失活,但若用脱氧核糖核酸酶分解DNA,则转化活力随即消失。虽然Avery的实验能够充分证明细菌的转化因子是DNA,但在当时比较普遍的看法仍然认为遗传物质是蛋白质。对Avery的实验,或是抱怀疑态度,认为也许是DNA制剂中混杂了少量不被检测出来的蛋白质所致;或是认为DNA只不过是一种特异诱变剂,改变了菌体特性,而不是基因本身。DNA是遗传物质最令人信服的证据来自信息学派对噬菌体感染大肠杆菌的研究。

其实,细菌的转化现象十分普遍。在自然界,细菌借此而获得新的有用基因。由于滥用抗生素而使不少致病菌提高了对药物的抗性,R质粒的横向扩散也是其中原因之一。在实验室,借助转化而得以构建各种基因工程菌。

(三) 病毒是游离的遗传因子

信息学渗入生命科学是在量子理论奠基者倡导下开始的。1932年量子论的先驱N.Bohr在题为“生命和光”(“Life and Light”)的演讲中指出,量子物理学以统计概率取代了一对一的因果关系,生物学也是如此。Bohr的学生量子物理学家Delbrück M与微生物学家Luria S和Hershey A D一起,组成了著名的“噬菌体小组”。他们认为,揭示生命本质的关键问题是了解染色体如何编码遗传信息,而噬菌体就是“裸露的”染色体,因而是研究生物学最理想的对象。

1952年Hershey A D和Chase M用 ^{32}P 标记 T_2 噬菌体的DNA,用 ^{35}S 标记噬菌体蛋白质,然后用此标记的噬菌体去感染大肠杆菌。经短暂培养后,将培养物置于匀浆器中搅拌数分钟,使吸附在大肠杆菌表面的噬菌体脱落。通过离心,菌体沉淀在管底,而 T_2 噬菌体颗粒则留在上清液中。结果发现,上清液中可检测到 ^{35}S 标记物, ^{32}P 却在管底菌体内。这个实验说明,噬菌体感染大肠杆菌的过程是将它的DNA注入菌体内,而蛋白质空壳仍留在外面。这就有力证明,噬菌体DNA携带了噬菌体的全部遗传信息,也即噬菌体的遗传物质是DNA,而不是蛋白质。在Hershey和Chase实验的启发下,Watson和Crick才于1953年提出DNA双螺旋结构模型。1969年Delbrück、Hershey和Luria共获诺贝尔生理学 and 医学奖,以表彰他们在噬菌体遗传学研究中的功绩。

核酸是遗传信息运载物质的另一个证据,来自烟草花叶病毒(TMV)重组实验。TMV是一种RNA病毒,它的粒子相对分子质量为 4×10^7 ,其中94.5%为蛋白质,5.5%为RNA。TMV由2100个相对分子质量为17400的蛋白质亚基包围一条相对分子质量为 2×10^6 的单链RNA,以螺旋状排列构成棒状粒子。从TMV中分离出来的RNA具有感染性,但比天然完整病毒的感染力要低得多。1955年Fraenkel-Conrat H和Singer B报道,将提纯的TMV外壳蛋白和RNA在体外混合,它们可以自装配成棒状病毒。如果将甲株的RNA与乙株的外壳蛋白混合,所得重组TMV其感染力和产生的子代病毒都与甲株完全相同,而与乙株相异;反之亦然。这个实验说明,在某些情况下(如RNA病毒),基因组是RNA,遗传信息可以编码在RNA分子上。

有些病毒感染宿主细胞后,并不形成新的病毒粒子,也不杀死细胞,而是以病毒DNA,或是病毒RNA的cDNA,整合到宿主细胞染色体DNA中去。整合的病毒DNA可随宿主细胞染色体DNA一起复制,并经细胞分裂而传给子代;在适当条件下又可装配成病毒粒子,而离开宿主细胞。总之,遗传单位基因,只是一段核酸分子,它可以存在染色体内,也可以存在染色体外;可以是细胞内相,也可以是细胞外相。

二、RNA传递和加工遗传信息

RNA是单链分子,并可自身回折形成局部双螺旋,再折叠成特殊的空间结构,这就使RNA既能像DNA那样贮存和传递遗传信息,又能像蛋白质那样具有催化和调节功能。所谓RNA的信息加工是指RNA在传递遗传信息过程中进行抽提信息、转换信号、消除差错、调节信息流等作用。

转录水平的调节使得细胞在不同环境和时空条件下,表达不同基因编码的信息。但转录是一个传真

的过程,转录初产物(primary transcript)RNA 与被转录 DNA 的序列基本一致。RNA 在转录后常常要经过一系列的加工才成为成熟的、有功能的 RNA。一般性加工,包括切割(cutting)、修剪(trimming)、添加(append)、修饰(modification)和异构化(isomerization),不改变 RNA 的编码序列。编码序列加工,包括拼接(splicing)、编辑(editing)和再编码(recoding)则改变了 RNA 的序列,也改变了携带的遗传信息。

(一) RNA 的拼接

真核生物的基因通常都是断裂基因(interrupted gene),保留在成熟 RNA 中的序列称为外显子(exon),插入的非编码序列称为内含子(intron)。内含子在转录后加工过程中被删除。拼接是一个抽提信息的过程,从转录初产物中将编码序列拼接出来,形成完整有意义的表达信息。通过选择性拼接(alternative splicing),一个基因可以编码多条多肽链,这些多肽链称为同源体(isoform),它们是一些有意义结构的不同组合。在这里已不再是“一个基因一条多肽链”的对应关系,而是“一个基因多条多肽链”,或者反过来说,“一条多肽链一个基因”。基因和其产物蛋白质是在长期进化过程中形成的,生物合成在一定程度上重复了这一过程。基因和蛋白质在进化过程中由一些模块(module)经过随机组合和自然选择而产生,拼接反映了这一历程,并因有生物学意义而被保留。拼接的生物学意义就在于:它是基因表达调节的一个重要环节,并还能成为产生新的基因和新的蛋白质的基础。基因突变多数是有害的,或者是中性的,有益突变的概率极低。拼接的突变则与此不同。当基因点突变产生一个新的拼接点时,在产生新的拼接产物同时还保留着旧的拼接产物。如果新的拼接产物无用,该拼接点逐渐被淘汰;而新的拼接产物有用,就可通过选择保留该突变,这是十分有效的进化方式。

(二) RNA 的编辑

RNA 的序列可通过转酯反应插入或删除若干核苷酸,或通过酶促脱氨和氨基化反应改变碱基,因而改变编码信息。这就破坏了基因与蛋白质的共线性关系。RNA 的编辑需要提供信息,或者来自指导 RNA(gRNA),或者来自被编辑 RNA 自身(帮助酶识别编辑位点)。RNA 编辑可消除基因移码突变或无义突变带来的危害,通过编辑恢复正确的阅读框架。选择性编辑(alternative editing),为生物发育的基因调节提供了一种途径,甚至为大脑的学习记忆提供了可能的机制。RNA 编辑作为一种信息加工过程,在基因的进化中也可能起一定的作用。

(三) RNA 的译码和再编码

译码是 RNA 信息加工最重要最核心的作用。蛋白质的编码信息以三联体密码形式编码在核酸分子中,表达时由 RNA 翻译(translation)成蛋白质,所以称为翻译。因为在核酸分子中使用的是核苷酸语言,在蛋白质分子中使用的是氨基酸语言,在这里由一种语言转变为另一种语言。参与翻译过程的 RNA 有三类:mRNA 传递基因的遗传信息,起模板(template)作用;tRNA 转移氨基酸,起信号转换器(adaptor)的作用;rRNA 组织蛋白质合成的装配线,催化肽键形成,起装配者(assembler)的作用。蛋白质翻译或许是体内最复杂的代谢过程,为保证高效率和准确性,除上述三类 RNA 外,至少有近百种蛋白质参与作用,仅核糖体蛋白就有几十种。

基因在复制或表达过程中发生的差错,可通过解码(decoding)即译码环节来纠正。某些 tRNA 能校正基因的有害突变,称为校正 tRNA(suppressor tRNA)。校正 tRNA 通常是由于反密码子发生改变,不按常规引入氨基酸,却起了校正功能。基因突变造成密码子的改变,称为错义突变(missense mutation)。基因突变使有义密码子变成终止密码子,称为无义突变(nonsense mutation)。对应于三种终止密码子,无义突变有琥珀型(UAG),赭石型(UAA)和乳白型(UGA)三种。校正 tRNA 或是在错义密码子处引入正确氨基酸(这种情况较为少见);或是在无义突变造成的终止密码子处引入一个氨基酸,使多肽链得以继续合成,引入的氨基酸决定于校正 tRNA 的种类,往往并非原来的氨基酸,因此只是部分恢复蛋白质活力。值得注意的是,无义突变的校正 tRNA 并不在正常终止密码子处引入氨基酸,说明正常翻译终止还有其他信号存在。还有一类校正 tRNA,在反密码子或附近核苷酸的改变导致识别的密码子为两个核苷酸或四个核苷酸,因而

可校正 -1 或 +1 移码突变。

近年来还发现,在核糖体上进行翻译时,mRNA 的解读框架可以发生程序性移位,由某些信号决定在特定位点上作 -1 或 +1 移动,甚至跳过 50 个核苷酸。这一过程称为程序性解读框架移位和跳跃(programmed reading frame shifts and hops),或者称为核糖体移码(ribosomal frame shifting)。这种现象广泛存在于细菌、酵母、植物和哺乳动物中。移位信号来自 mRNA,由 mRNA 的假结、颈环结构以及 mRNA 与 rRNA 的相互作用,促使在一定位点发生滑动和移位。

蛋白质的结构信息编码在核酸分子中,通过 mRNA、tRNA 和 rRNA 之间的相互作用将核酸编码信息翻译出来,用以指导蛋白质的合成。通常 mRNA 上的遗传信息按不重叠、无标点三联体密码子的规则进行翻译。但在上述三种情况下,通过校正 tRNA,mRNA 的翻译内含子(形成假结或颈环结构)和核糖体移码,改变了常规读码方式,称为 RNA 的再编码(recoding)。RNA 再编码可以校正有害的基因突变。然而令人费解的是,当基因失活之后何以会产生 RNA 再编码加以校正?合乎逻辑的推理是 RNA 原来就是多变的,正常的基因可因 RNA 的变异而产生错误的蛋白质,在众多拷贝的 RNA 和蛋白质中有少数拷贝的错误分子并不影响细胞功能。但是,一些重要的基因发生突变则是致死的,如果正好遇到细胞中存在某种变异的 RNA 能够纠正有害的突变,经过自然选择就能固定下来。

信息有三个层次的意义:语言信息、语义信息和语用信息。各种密码和信号构成了语言信息,它们的生物学意义则是语义信息,而在生物体内的表达和作用则是语用信息。在信息加工过程中通常会删除一些核苷酸,减少信息量,丢掉无用信息,增加有用信息。

三、遗传密码的破译

20 世纪中叶已经知道 DNA 是遗传信息的携带分子,并通过 RNA 控制蛋白质的合成,于是科学家们的注意力被吸引到核酸分子如何指导蛋白质中氨基酸排列顺序的问题。一些科学家从不同角度去破译遗传密码。

1954 年物理学家 Gamov G 首先对遗传密码进行探讨。核酸分子中只有 4 种碱基,要为蛋白质分子的 20 种氨基酸编码,不可能是一一对一的关系,两个碱基决定一个氨基酸也只能编码 16 种氨基酸,如果用三个碱基决定一个氨基酸, $4^3 = 64$,就足以编码 20 种氨基酸。这是编码氨基酸所需碱基的最低数目,故密码子(codon)应是三联体(triplet)。那么密码子是重叠的还是不重叠的? Gamov 指出,重叠的密码子更为经济。但是,重叠密码子使氨基酸序列中每一个氨基酸都受上下氨基酸的约束。这种现象在已知的蛋白质序列中却并未见到。

1961 年 Crick F H C 及其同事提供了确切的证据,说明三联体密码子学说是正确的。他们研究 T₄ 噬菌体 γ II 位点 A 和 B 两个顺反子变异的影响,这两个基因与噬菌体能否感染大肠杆菌 κ 株有关。吡啶类染料是扁平的杂环分子,可插入 DNA 两碱基对之间,而引起 DNA 插入或丢失核苷酸。他们的研究发现,在上述位点缺失一个核苷酸或插入一个核苷酸产生的突变体,以及两个缺失型突变体或两个插入型突变体重组得到的重组体,都是严重缺陷性的,不能感染大肠杆菌 κ 株。然而从一个缺失突变体和一个插入突变体得到的重组体却能恢复感染活性。他们还观察到,如果缺失三个核苷酸,或插入三个核苷酸,这些核苷酸彼此非常靠近,这样的突变体也表现正常的功能。但缺失或插入四个核苷酸,虽然彼此非常靠近,其突变体却是严重缺陷性的。

Crick 等的实验结果表明三联体密码是非重叠的,而且连续编码并无标点符号隔开,因为在序列的任一位置上插入或删除一个核苷酸都会改变三联体密码的阅读框架,发生移码突变使基因失活。但是如果插入或删除三个核苷酸,或者插入一个核苷酸后又删除一个核苷酸,阅读框架仍可维持不变,原来编码的信息便能够在变异位点之后照旧表现出来(图 37-1)。这是基因与蛋白质共线性(colinearity)的最早证据。

在 Crick 等提出遗传信息是在核酸分子上以非重叠、无标点、三联体的方式编码的同时,Spiegelman S 以及 Jacob F 和 Monod J 证明了 mRNA 的存在,而 Nirenberg M W 和 Matthaei J H 开始了用人工合成的 mRNA 在无细胞蛋白质合成系统中寻找氨基酸与三联体密码子的对应关系。Nirenberg 等将大肠杆菌破碎,离心

除去细胞碎片,上清液含有蛋白质合成所需各种成分,其中包括 DNA、mRNA、tRNA、核糖体、氨酰 tRNA 合成酶以及蛋白质合成必需的各种因子。将上清液保温一段时间,内源 mRNA 被降解,该系统自身蛋白质的合成即停止。当补充外源 mRNA 以及 ATP、GTP 和氨基酸等成分,再在 37℃ 保温就能合成新的蛋白质。为检测某种氨基酸是否掺入新合成的蛋白质,需将氨基酸用放射性标记。

```

      CAT  CAT  CAT  CAT  CAT  CAT
-1   CAT  CAVC  ATC  ATC  ATC  ATC
-1+1 CAT  CAVC  AXT  CAT  CAT  CAT
+3   CAX  TXC  ATX  CAT  CAT  CAT

```

图 37-1 缺失或插入核苷酸引起三联体密码的改变

-1, 删除一个核苷酸,在删除位置以符号 V 表示

-1+1, 在相近位置分别删除和插入一个核苷酸,插入核苷酸以 X 表示

+3, 在相近位置分别插入三个核苷酸

Nirenberg 等早期实验使用的多聚核糖核苷酸为均聚尿嘧啶核苷酸(poly U)。原以为 poly U 大概不能替代 mRNA,或活性很低。出乎意料的是,在无细胞蛋白质合成系统中,它能指导多聚苯丙氨酸的合成,而且只合成多聚苯丙氨酸。由此推断密码子 UUU 代表 Phe。用同样的方法证明 poly C 指导 Pro 掺入蛋白质, poly A 指导 Lys 掺入蛋白质。poly G 因易于形成多股螺旋,不宜作 mRNA。这三个密码子最早得到破译。当时对起始密码子和终止密码子还一无所知,虽然从 Crick 等的实验结果已预示遗传密码的阅读有起始和终止信号。十分幸运的是,Nirenberg 等的实验采用的 Mg^{2+} 浓度较高,以致合成的均聚核苷酸不需要起始密码子便可指导肽链的合成,此时密码子阅读的起点是任意的。

均聚核苷酸的实验获得成功之后,Nirenberg 和 Ochoa 等又进一步用两种核苷酸或三种核苷酸的共聚物作模板,重复上述实验。例如,U 和 G 的共聚物 poly UG 可以出现 8 种不同的三联体,即 UUU、UUG、UGU、GUU、GUG、GGU、UGG 和 GGG。酶促合成共聚核苷酸时,根据加入核苷酸底物的比例可以计算出各种三联体出现的相对频率,而标记氨基酸掺入的相对量应与其密码子的出现频率相一致(表 37-3)。需要指出的是,用此方法可以确定 20 种氨基酸密码子的碱基组成,但不知道它们的排列顺序。

表 37-3 无序 poly UG 对氨基酸的密码(U:C=5:1)

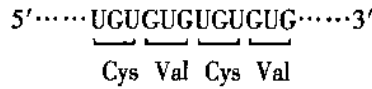
可能的密码子	按计算可能出现的相对频率*	氨基酸掺入的相对分子质量
UUU	100	Phe(100)
UUG } UGU } GUU }	20	Cys(20) Val(20)
UGG } GUG } GGU }	4	Gly(4) Trp(5)
GGG	0.8	-

* 以 UUU 出现的频率为 100

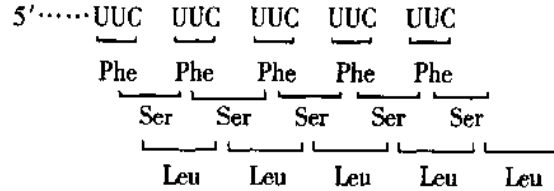
1964 年 Nirenberg 发现,用人工合成的三核苷酸取代 mRNA,在没有 GTP 时,不能合成蛋白质,但是核苷酸三联体却能与对应的氨酰 tRNA 一起结合在核糖体上。将此反应混合物通过硝酸纤维素滤膜时,核糖体便和核苷酸三联体以及特异结合的氨酰 tRNA 形成复合物而留在膜上。用这种核糖体结合技术可以直接测出三联体对应的氨基酸。所有 64 种可能的三联体都已合成,经试验其中 50 种以上都得到确切的结果。但是在此系统中仍有一些三联体编码的氨基酸不能肯定,需要用其他方法来破译。

与此差不多同一时间,Khorana H G 和他的同事将化学合成和酶促合成巧妙地结合起来,合成含有重

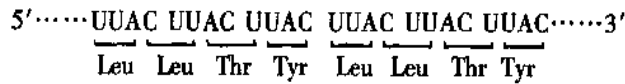
复序列的多聚核苷酸。例如 poly(UG), 它含有两种三联体密码子, UGU 和 GUG, 在无细胞蛋白质合成系统中指导合成 poly(Cys·Val)。经与核糖体结合技术所得结果相比较, 可以确定 UGU 是 Cys 的密码子, GUG 是 Val 的密码子。其间关系如下:



如果用聚三核苷酸作模板, 由于阅读框架不同, 可以指导产生三种不同的均聚多肽。例如, poly(UUC) 指导 poly Phe、poly Ser 和 poly Leu 的合成, 其间关系为:



用四核苷酸多聚物作模板, 可合成共聚四肽, 或因出现终止密码子而只合成小肽, 如 poly(UUAC) 可合成 (Leu·Leu·Thr·Tyr)_n:



由其他二核苷酸、三核苷酸和四核苷酸共聚物作模板时, 所合成的多聚氨基酸见表 37-4。

表 37-4 重复序列共聚核苷酸指导下多聚氨基酸的合成

多聚核苷酸	含有的密码子	合成多肽
(AG) _n	AGA, GAG	(Arg·Glu) _n
(AC) _n	ACA, CAC	(Thr·His) _n
(UC) _n	UCU, CUC	(Ser·Leu) _n
(UG) _n	UGU, GUG	(Cys·Val) _n
(AAG) _n	AAG, AGA, GAA	(Lys) _n , (Arg) _n , (Glu) _n
(UUC) _n	UUC, UCU, CUU	(Phe) _n , (Ser) _n , (Leu) _n
(UUG) _n	UUG, UGU, GUU	(Leu) _n , (Cys) _n , (Val) _n
(AAC) _n	AAC, ACA, CAA	(Asn) _n , (Thr) _n , (Gln) _n
(UAC) _n	UAC, ACU, CUA	(Tyr) _n , (Thr) _n , (Leu) _n
(AUC) _n	AUC, UCA, CAU	(Ile) _n , (Ser) _n , (His) _n
(GAU) _n	GAU, AUG, UGA	(Asp) _n , (Met) _n
(GUA) _n	GUA, UAG, AGU	(Val) _n , (Ser) _n
(UAUC) _n	UAU, CUA, UCU, AUC	(Tyr·Leu·Ser·Ile) _n
(UUAC) _n	UUA, CUU, ACU, UAC,	(Leu·Leu·Thr·Tyr) _n
(GAUA) _n	GAU, AGA, UAG, AUA	
(GUAA) _n	GUA, AGU, AAG, UAA	二三肽

用以上所述方法, 经过5年的努力, 终于在1966年完全确定了编码20种氨基酸的密码子, 另有3个密码子用作翻译的终止信号。表37-5为全部64个遗传密码子的字典。除甲硫氨酸和色氨酸只有一个密码子外, 其余氨基酸均有不只一个密码子。已知多肽合成的第一个氨基酸为甲酰甲硫氨酸(原核生物)或

甲硫氨酸(真核生物),但甲硫氨酸的密码子只有一个,这就是说编码多肽链内部甲硫氨酸和起始氨基酸的是同一个密码子。

表 37-5 遗传密码字典

第一位碱基 (5'端)	第二位碱基(中间)				第三位碱基 (3'端)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	终止	终止	A
	Leu	Ser	终止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

破译遗传密码是用无细胞系统进行实验得出的。那么生物体内的情况是否也是如此呢?不少实验室对此作了许多研究,都得到肯定的结论。例如,Sanger等测定噬菌体 R17 RNA 一些区段的序列并与其编码蛋白质的氨基酸序列相比较,完全符合遗传密码表。还有一些实验室利用突变,得出三联体密码子的可靠资料。20世纪70年代兴起的基因克隆和快速测序技术,充分证明了遗传密码表的正确。

四、遗传密码的基本特性

经过许多科学家的共同努力,于20世纪60年代中期才完全破译了编码蛋白质中氨基酸的遗传密码,并发现有以下特点:

(一) 密码的基本单位

如上所述,Crick等最早推测蛋白质中氨基酸序列的遗传密码编码在核酸分子上,其基本单位是按5'→3'方向编码、不重叠、无标点的三联体密码子。其后一系列实验证明这个推测是正确的,并找出了各种氨基酸对应的密码子。AUG为甲硫氨酸兼起始密码子。UAA、UAG和UGA为终止密码子。其余61个密码子对应于20种氨基酸。因此要正确阅读密码,必须从起始密码子开始,按一定的读码框架(reading frame)连续读下去,直至遇到终止密码子为止。若插入或删除一个核苷酸,就会使这以后的读码发生错位,称为移码突变(frame-shift mutation)。

目前已经证明,在绝大多数生物中基因是不重叠的;但在少数病毒中,部分基因的遗传密码却是重叠的。即使在重叠基因(overlapping genes)中,各自的开放读码框架仍按三联体方式连续读码。

(二) 密码的简并性

一共有 64 个三联体密码子,除了三个终止密码子外,余下 61 个密码子编码 20 种氨基酸,所以许多氨基酸的密码子不只一个。同一种氨基酸有两个或更多密码子的现象称为密码子的简并性(degeneracy)。对应于同一种氨基酸的不同密码子称为同义密码子(synonymous codon),只有色氨酸与甲硫氨酸仅有一个密码子(表 37-6)。

表 37-6 氨基酸密码子的简并

氨基酸	密码子数目	氨基酸	密码子数目
Ala	4	Leu	6
Arg	6	Lys	2
Asn	2	Met	1
Asp	2	Phe	2
Cys	2	Pro	4
Gln	2	Ser	6
Glu	2	Thr	4
Gly	4	Trp	1
His	2	Tyr	2
Ile	3	Val	4

密码的简并性具有重要的生物学意义,它可以减少有害突变。设若每种氨基酸只有一个密码子,64 个密码子中只有 20 个是有意义的,对应于一种氨基酸,那么剩下 44 个密码子都将是无意义的,将使肽链合成导致终止。因而由基因突变而引起肽链合成终止的概率也会大大提高,这将极不利于生物生存。简并增加了密码子中碱基改变仍然编码原来氨基酸的可能性。密码简并也可使 DNA 上碱基组成有较大变动余地,细菌 DNA 中 G+C 含量变动很大,但不同 G+C 含量的细菌却可以编码出相同的多肽链。所以密码简并性在物种的稳定上起一定作用。

曾有科学家提出,氨基酸的密码子数目与该氨基酸残基在蛋白质中的使用频率有关,频率越大,密码子数目也越多。图 37-2 所示为大肠杆菌蛋白质中氨基酸的使用频率与各种氨基酸密码子数目之间的关系。其间可以看出有一定的倾向表明,越是常见的氨基酸其密码子数目越多,但它们之间并无严格的对应关系。需要指出的是,遗传密码是在生命起源的早期形成的,如果氨基酸的密码子数目与其在蛋白质中的使用频率有关,应该对应于原始蛋白质中氨基酸的出现频率,而不是现今某种生物蛋白质的氨基酸频率。

(三) 密码的变偶性

密码的简并性往往表现在密码子的第三位碱基上,如甘氨酸的密码子是 GGU、GCC、GGA 和 GGC,丙氨酸的密码子是 GCU、GCC、GCA 和 GCG。它们的前两位碱基都相同,只是第三位碱基不同。有些氨基酸只有两个密码子,通常第三位碱基或者都是嘧啶,或者都是嘌呤。例如,天冬氨酸的密码子 GAU、GAC,第三位皆为嘧啶;谷氨酸的密码子 GAA、GAG,第三位皆为嘌呤。所以几乎所有氨基酸的密码子都可以用 XY_C^U 和 XY_C^A 来表示。显然,密码子的专一性基本上取决于前两位碱基,第三位碱基起的作用有限。有些科学家注意到了这一点,并进而发现 tRNA 上的反密码子(anticodon)与 mRNA 密码子配对时,密码子第一位、第二位碱基配对是严格的,第三位碱基可以有一定的变动。Crick 称这一现象为变偶性(wobble)。特别应该指出的是,在 tRNA 反密码子中除 A、U、G、C 四种碱基外,还经常在第一位出现次黄嘌呤(I)。次黄嘌呤的特点是可以与 U、A、C 三者之间形成碱基配对,这就使带有次黄嘌呤的反密码子可以识别更多的简并密码子。这一点已有实验证明。酵母丙氨酸 tRNA 的反密码子 IGC 可阅读 GCU、GCC、GCA 三个密码子:

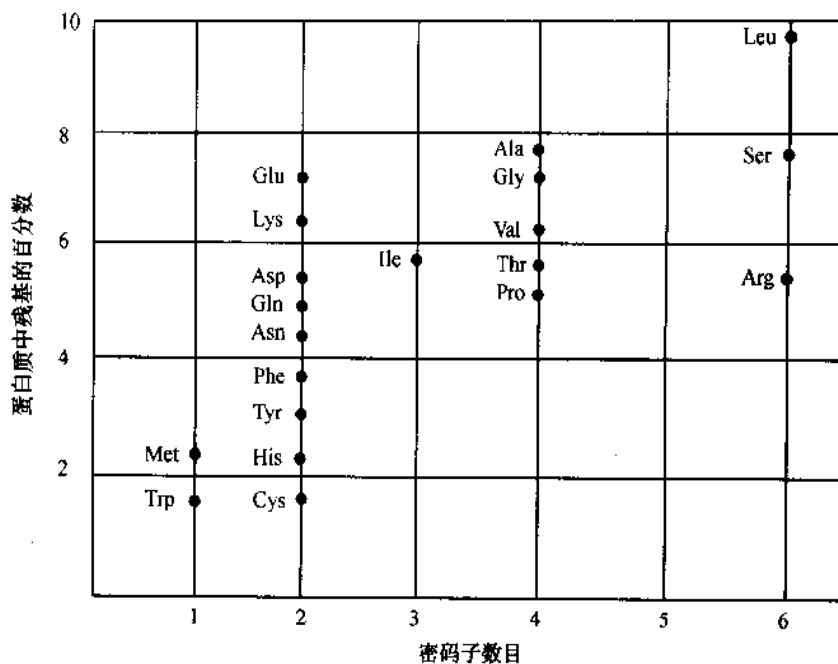
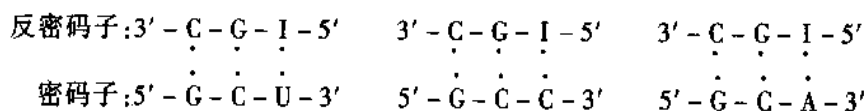


图 37-2 氨基酸的密码子数目与在蛋白质中的使用频率



tRNA 上的反密码子与 mRNA 的密码子呈反向配对关系。按照 Crick 于 1966 年提出的变偶假说,反密码子的第一位碱基与密码子第三位碱基的配对可以在一定范围内变动(变偶)。如 U 可以和 A 或 G 配对,G 可以和 U 或 C 配对,I 可以和 U、A、C 配对,但 A 和 C 只能与 U 和 G 配对(表 37-7)。由于变偶性的存在,细胞内只需要 32 种 tRNA,就能识别 61 个编码氨基酸的密码子。

从已知一级结构的 tRNA 中,其反密码第一位碱基为 C、G、U、I,没有 A,显然 I 是由 A 转变而来的。体外实验表明,在有的情况下,反密码子第一位碱基可以与密码子第三位上任意四种碱基(A、G、C、U)配对。例如,家蚕 tRNA_{1^{Gly}} 反密码子为 GCC,可识别 GCN(N 为 A、G、C 或 U)四种密码子。兔肝 tRNA_{1^{Val}} 反密码子为 IAC,可识别 GUN。哺乳动物线粒体 tRNA 第一位为 U 的反密码子也可识别四种密码子。这类配对关系被称为是“三配二”(two-out-of-three base pairing)。

表 37-7 反密码子与密码子之间的碱基配对

反密码子第一位碱基	密码子第三位碱基
A	U
C	G
G	{ U C
U	{ A G
I	{ U C A

(四) 密码的通用性和变异性

所谓密码的通用性是指各种低等和高等生物,包括病毒、细菌及真核生物,基本上共用同一套遗传密码。较早时曾进行实验,将兔网织红细胞的核糖体(结合有 mRNA)与大肠杆菌的氨酰-tRNA 及其他蛋白质合成因子一起进行反应,合成的是血红蛋白,说明大肠杆菌 tRNA 上的反密码子可以正确阅读兔血红蛋白 mRNA 的编码序列。这样的交叉试验也在其他生物中进行过。还发现烟草花叶病毒 RNA 可以在大肠杆菌无细胞体系中指导病毒外壳蛋白的合成。更引人注目的实验是,携带大肠杆菌基因的噬菌体可在人

的细胞中指导 mRNA 和蛋白质的合成。1971 年 Merrill 等将带有人肠杆菌半乳糖操纵子的 λ 噬菌体感染离体培养的病人成纤维细胞。该病人患有半乳糖血症,是一种常染色体上隐性遗传代谢病,缺乏一种 1-磷酸半乳糖尿苷酰转移酶(galactose 1-phosphate uridylyl transferase),因而不能利用 1-磷酸半乳糖,使半乳糖积累而引起相应症状。病人的成纤维细胞被 λ 噬菌体感染后,在噬菌体导入的大肠杆菌半乳糖操纵子基因指导下合成了转移酶,使培养细胞能正常代谢半乳糖。这一实验表明,细菌基因能在人的细胞中正确表达,从而也表明了原核细胞与真核细胞的遗传密码是通用的。20 世纪 70 年代后,各种生物大量基因被测序,同时蛋白质序列的资料也迅速积累,结果充分证明生物界有一套共同的遗传密码。这说明生物有共同的起源。

在地球上,生命起源距今已有近 40 亿年,现今不同生物仍共用一套遗传密码,说明其十分保守。这不难理解,因为即使只有一个氨基酸发生置换,都有可能对蛋白质结构带来巨大有害的影响。遗传密码的改变涉及基因组全部编码信息,可以设想只编码少数几种蛋白质的小基因组较有可能发生。其次,三个终止密码子,因其只存在于基因编码序列的末尾,也较有可能改变。

目前已知线粒体 DNA(mt DNA)的编码方式与通常遗传密码有所不同(表 37-8)。脊椎动物 mt DNA 含有编码 13 种蛋白质、2 种 rRNA 和 22 种 tRNA 的基因。其特殊的变偶规则使得 22 种 tRNA 就能识别全部氨基酸密码子,而正常情况下至少要有 32 种 tRNA。在线粒体的遗传密码中,有四组密码子其氨基酸特异性只决定于三联体的前两位碱基,它们由一种 tRNA 即可识别,该 tRNA 的反密码子第一位为 U。其余的 tRNA 或者识别第三位为 A、G 的密码子,或者识别第三位为 U、C 的密码子。这就是说,所有 tRNA 或者识别两个密码子,或者识别四个密码子。

在正常密码中,有两种氨基酸只有一个密码子,这两种氨基酸为甲硫氨酸和色氨酸。按照线粒体的编码规则,它们各有两个密码子,即各增加一个密码子。正常的甲硫氨酸密码子为 AUG,在线粒体中 AUA 由异亮氨酸密码子转变为甲硫氨酸密码子。正常的色氨酸密码子为 UGG,在线粒体中终止密码子 UGA 转变为色氨酸密码子。甲硫氨酸的两个密码子和色氨酸的两个密码子各由单个 tRNA 识别。

表 37-8 线粒体中变异的密码子

	密码子*				
	UGA	AUA	AGA AGG	CUN	CGG
通用密码	终止	Ile	Arg	Leu	Arg
动物					
脊椎动物	Trp	Met	终止	+	+
果蝇	Trp	Met	Ser	+	+
酵母					
酿酒酵母(<i>S. cerevisiae</i>)	Trp	Met	+	Thr	+
光滑球拟酵母(<i>T. galabrata</i>)	Trp	Met	+	Thr	?
彭贝裂殖酵母(<i>S. pombe</i>)	Trp	+	+	+	+
丝状真菌	Trp	+	+	+	+
锥虫	Trp	+	+	+	+
高等植物	+	+	+	+	Trp

* N 为任意碱基; + 表示与正常密码子相同

除了线粒体外,某些生物的细胞基因组密码也出现一定的变异。在原核生物的支原体中,UGA 也被用于编码色氨酸。十分特殊的是,在真核生物中少数纤毛类原生动物以终止密码子 UAA 和 UAG 编码谷氨酰胺。

在有些情况下密码子的含义可随上下文不同而改变。在大肠杆菌中,有时缬氨酸密码子 GUG 和亮氨酸密码子 UUG 也可被用作起始密码子,当其位于特殊 mRNA 翻译的起始位置时,可被起始 tRNA (tRNA^{f-met}) 所识别。

蛋白质中的修饰氨基酸一般都是在翻译后进行修饰的;但有例外,含硒代半胱氨酸(selenocysteine)的

蛋白质其硒代半胱氨酸是在翻译过程中掺入的。硒代半胱氨酸与半胱氨酸类似,但以硒代替硫,为硒蛋白(selenoprotein)或硒酶(selenoenzyme)功能所必需。如细菌中的甲酸脱氢酶,哺乳动物的谷胱甘肽过氧化物酶都是含硒的酶。其中了解最清楚的是大肠杆菌中的有关合成过程。在大肠杆菌中有一类丝氨酸 tRNA,其存在水平比其他丝氨酸 tRNA 更低,它识别阅读框架内的 UGA 密码子。该 tRNA 携带丝氨酸后在酶的催化下转变为硒代半胱氨酸,然后根据 mRNA 的上下文识别编码硒代半胱氨酸的密码子 UGA,而对任何作为终止密码子的 UGA 并无反应。在编码硒蛋白的 mRNA 中有一段称为硒代半胱氨酸插入序列(selenocysteine insertion sequence, SECIS)所构成的二级结构,帮助硒代半胱氨酸 tRNA 识别这种密码子。在细菌中,SECIS 位于 mRNA 编码区,而在真核生物中,SECIS 位于 3'非编码区。在大肠杆菌中一种帮助硒代半胱氨酸-tRNA 进入核糖体 A 位点的鸟苷酸结合蛋白(Sel B)已被发现。从诸多迹象来看,硒代半胱氨酸可被认为是蛋白质的第 21 个氨基酸,UGA 正在演变成编码该氨基酸的密码子,但还未进化完善。

(五) 密码的防错系统

虽然密码子的简并程度各不相同,但同义密码子在密码表中的分布十分有规则,而且密码子中碱基顺序与其相应氨基酸物理化学性质之间存在巧妙的关系。在密码表中,氨基酸的极性通常由密码子的第二位(中间)碱基决定,简并性由第三位碱基决定。例如,①中间碱基是 U,它编码的氨基酸是非极性、疏水的和支链的,常在球蛋白的内部。②中间碱基是 C,相应的氨基酸是非极性的或具有不带电荷的极性侧链。③中间碱基是 A 或 G,其相应氨基酸常在球蛋白外周,具有亲水性。④第一位碱基是 A 或 C,第二位碱基是 A 或 G,第三位可以是任意碱基,其相应氨基酸具有可解离的亲水性侧链并具有碱性。⑤带有酸性亲水侧链的氨基酸其密码子前两位为 AG,第三位为任意碱基。

这种分布使得密码子中一个碱基被置换,其结果或是仍然编码相同的氨基酸;或是以物理化学性质最接近的氨基酸相取代。从而使基因突变可能造成的危害降至最低程度。这就是说,密码的编排具有防错功能,密码表是一个故障-安全系统(fail-safe system),是在进化过程中获得的最佳选择。

提 要

生物功能由生物不同层次的结构所决定,不同层次的结构由蛋白质与其他生物分子自装配形成,决定蛋白质结构的遗传信息编码在核酸分子中。所谓遗传密码,即是指编码氨基酸的核苷酸序列。

细胞含有恒定量的 DNA。细胞的 DNA 含量有时与进化程度并不呈平行关系,此现象称为 C 值悖论。DNA 的信息量只与 DNA 的复杂度有关,复杂度为基因组 DNA 非重复序列的碱基对数。信息量(I)与概率(P)有关: $I = -k \ln P$ 。DNA 分子的大小反映它能编码信息的量,它所具有的编码信息是在进化过程中通过自然选择获得的。1944 年 Avery 最早证明细菌的转化因子是 DNA。1952 年 Hershey 和 Chase 证明噬菌体的全部遗传信息由 DNA 所携带,从而证明了 DNA 是遗传物质。

在某些情况下,如对于 RNA 病毒,RNA 可以是遗传的基本物质。RNA 的主要功能是传递和加工遗传信息。RNA 在转录后的信息加工是一个抽取信息,转换信号,消除错误,调节表达的过程。信息有三个层次的意义;语言信息、语义信息和语用信息。各种密码和信号构成了语言信息,它们的生物学意义是语义信息,而在生物体内的表达和作用则是语用信息。

Crick 及其同事通过研究噬菌体基因的移码突变而推测,核酸分子以非重叠、无标点、核苷酸三联体的方式来编码蛋白质中氨基酸的序列。他们还证明了基因与蛋白质的共线性关系。在这之后,许多科学家从事破译遗传密码的研究。

Nirenberg 等早期用均聚核糖核苷酸作模板,指导多聚氨基酸的合成,揭示了个别氨基酸的密码子。后用共聚核苷酸作模板,由模板中各种密码子可能出现的频率和氨基酸掺入多聚物的相对量,可推算出 20 种氨基酸各密码子的碱基组成,但不能知道它们的排列顺序。技术上的重大突破来自于发现核苷酸三联体能与对应的氨酰-tRNA 一起结合在核糖体上,由此可以直接用三核苷酸来确定其编码的氨基酸。另一方面,Khorana 和他的同事用化学合成结合酶促反应,合成了含有各种二、三、四核苷酸重复序列的多聚核

苷酸,以此作模板来找出各氨基酸的密码子。1966年全部64个密码子得到破译。

遗传密码的主要特性为:①密码的基本单位是三联体密码子,以5'→3'方向、非重叠、无标点的方式编码在核酸分子上。②密码的简并性,即一个氨基酸可以具有多个密码子。③密码的变偶性,一个tRNA的反密码子可以识别多个简并密码子。变偶关系表现为反密码子的第一位如果是U,可以和密码子第三位A和G配对;反密码子第一位如果是G,可以和密码子第三位U和C配对;反密码子第一位如果是I,可以和U、C、A配对。④密码的通用性和变异性。生物界从低等到高等基本上共有一套遗传密码。线粒体以及少数生物基因组的密码子有变异,其中线粒体密码子的第三碱基或是不起作用,或是只区分嘌呤和嘧啶。⑤密码的防错系统。密码的编排方式使得密码子中一个碱基被置换,其结果常常或是编码相同氨基酸,或是以物理化学性质最接近的氨基酸相取代。遗传密码的上述特性是在进化过程中形成的。

习 题

1. DNA分子的哪些性质使其适宜作为遗传信息的携带物质?
2. RNA的主要功能是什么? RNA转录后的一系列加工有何生物意义?
3. Crick等如何证明遗传密码的基本单位是核苷酸三联体?
4. 如何理解基因与蛋白质的共线性? RNA的拼接、编辑与再编码对共线性概念有何影响?
5. 遗传密码是如何破译的?
6. 何谓密码的简并性和变偶性?二者有何关系?
7. 为什么只要32种tRNA就能识别通用遗传密码中61个编码氨基酸的密码子?而在线粒体中只要22种tRNA就能识别全部氨基酸的密码子?
8. 何谓密码的通用性和变异性?试分析线粒体遗传密码的特点。
9. 为什么遗传密码的编排具有防错的效果?
10. 举例说明遗传密码的翻译受上下文的影响。

主要参考书目

1. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Stryer L. Biochemistry, 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999
3. Lewin B. Genes, 7th ed. Oxford: Oxford University Press, 2000
4. 特怀曼 R M 著. 高级分子生物学要义. 陈淳, 徐沁等译. 北京: 科学出版社, 2000

(朱圣庚)

第 38 章 蛋白质合成及转运

蛋白质是包含有内在结构信息的生物大分子,其结构信息贮存在一级结构中,而一级结构的信息最终是由存在于染色体上的核苷酸序列来决定的。每一个蛋白质都是由一个或一个以上的多肽链组成,每一条多肽链又是由许多氨基酸以酰胺键聚合起来的线性分子。多肽链中的氨基酸残基序列是由这一多肽链对应的信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 分子中的核苷酸序列决定的。本章将讨论蛋白质代谢的三方面的问题(图 38-1):①氨基酸是怎样被选择及掺入到多肽链当中去的;②当多肽链在核糖体上合成完了之后,其翻译后化学修饰是怎样进行的;③合成加工好的蛋白质是怎样被运送到其发挥功能的地方。

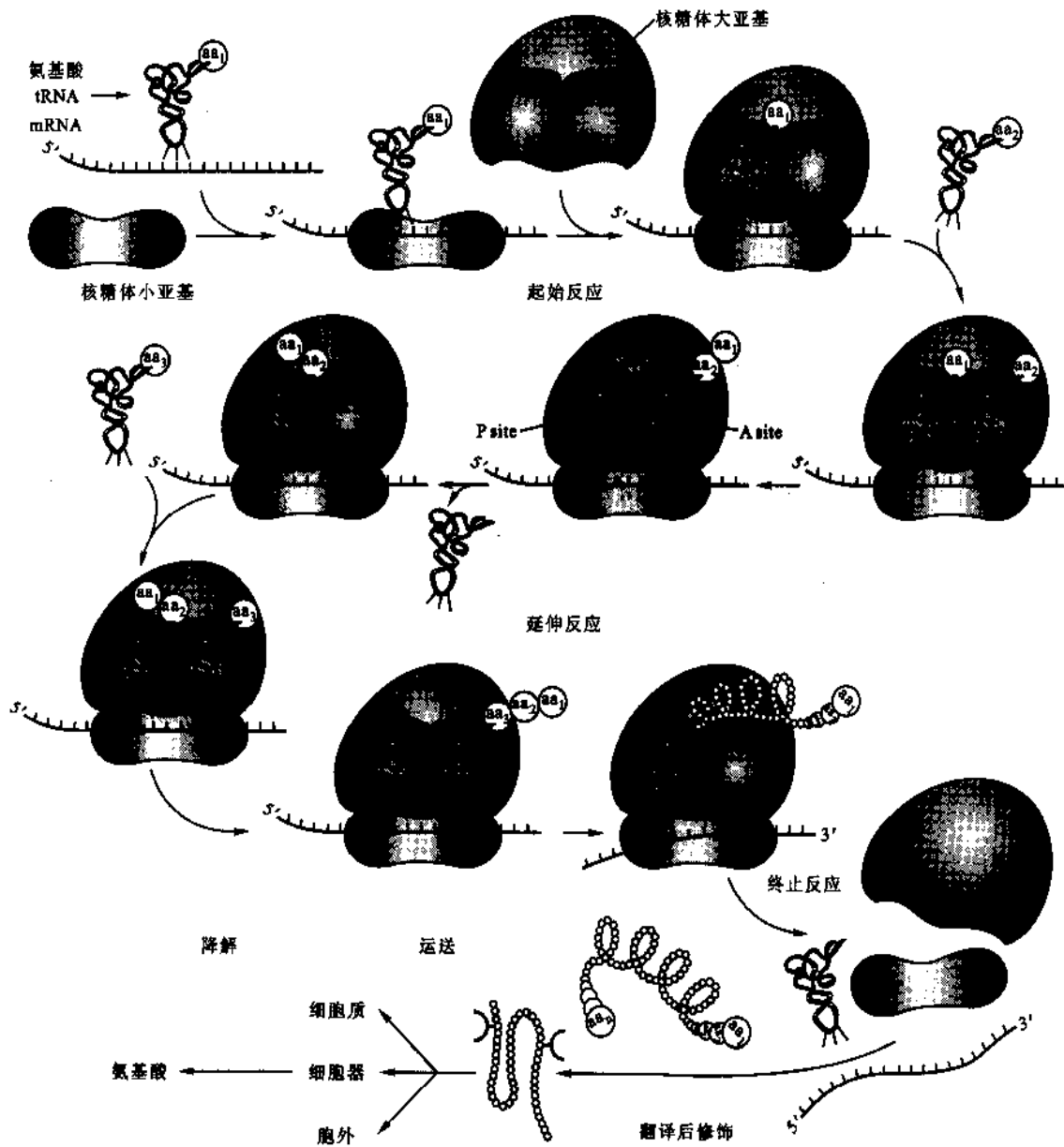


图 38-1 蛋白质生物合成过程总览

蛋白质生物合成(protein biosynthesis)在细胞代谢中占有十分重要的地位。蛋白质生物合成的早期研究工作都是用大肠杆菌的无细胞体系(cell-free system)进行的。以大肠杆菌为例,蛋白质占细胞干重 50%

左右。每个细胞中约有 3 000 种不同的蛋白质分子,每种蛋白质又有无数分子。而大肠杆菌细胞的分裂周期不过 20 min,可见蛋白质生物合成的速度之快。同时蛋白质生物合成过程又是十分复杂的,几乎涉及到细胞内所有种类的 RNA 和几十种蛋白质因子。蛋白质生物合成的场所是在核糖体内,所以把核糖体称作蛋白质合成的工厂。蛋白质合成的原料是氨基酸,反应所需能量由 ATP 和 GTP 提供。真核细胞蛋白质合成的机制与大肠杆菌的有许多相似之处。

一、蛋白质合成的分子基础

氨基酸是在核糖体上加入到多肽链中的。在与 mRNA 作用之前,氨基酸先共价地与转运 RNA (transfer RNA, tRNA) 形成氨酰-tRNA。氨酰-tRNA 结合到 mRNA 的特殊位点上。mRNA 含有遗传密码的信息,用于指导特定氨基酸序列多肽链的合成。一个核糖体结合到一个 mRNA 分子合成起始序列上,并由此开始读码,沿着密码序列合成一条多肽链。读码的方向是从 mRNA 的 5' 到 3', 而合成出来的多肽则是从氨基端到羧基端。通常,一个 mRNA 分子上,可结合有多个不同时间开始翻译的核糖体,这样的结构称为多聚核糖体 (polysome)。在原核细胞中,mRNA 的转录与多肽的翻译是同时进行的,如图 38-2 所示,可见在染色体 DNA 分子上,有多条正在转录的 mRNA 分子,每个分子上都结合有多个正在进行翻译的核糖体。真核生物的转录与翻译是在不同的地方进行的,核糖体可以自由地存在于细胞质中,或者与内质网膜结合。RNA 分子在蛋白质的合成中起着举足轻重的作用,除了 mRNA 和 tRNA,核糖体还含有核糖体 RNA (ribosome RNA, rRNA)。

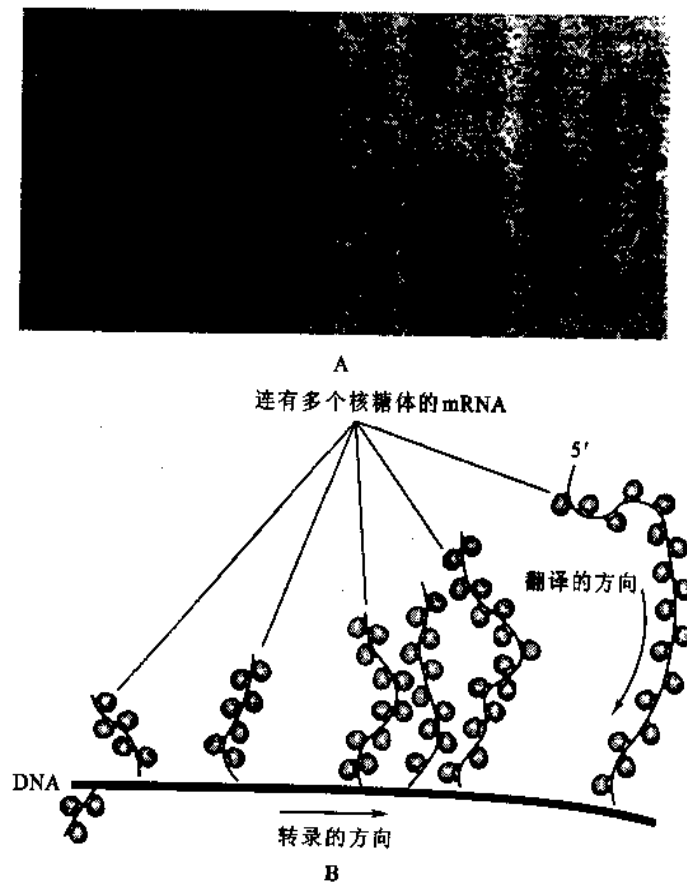


图 38-2 大肠杆菌中 mRNA 的转录与多肽的翻译是同时进行的
A. 为多聚核糖体的电镜照片

(一) mRNA 是蛋白质合成的模板

Jacob F 和 Monod J 早在 1961 年就已提出 mRNA 的概念。他们认为,既然蛋白质是在细胞质中合成的,而编码蛋白质的信息载体 DNA 却在细胞核内,所以必定有一种中间物质用来传递 DNA 上的信息。他们在研究大肠杆菌中与乳糖代谢有关酶类的生物合成时发现诱导物,如异丙基硫代半乳糖苷(β -isopropylthiogalactoside)的加入,可以立刻使酶蛋白的合成速度增加上千倍。而诱导物一旦消失,又可使酶蛋白的合成立刻停止。这个实验结果给人的启示是:蛋白质合成的模板是一种不稳定的物质,其半寿期很短。他们对这种信使物质的性质作了如下的预言:

- ① 信使是一种多核苷酸。
- ② 信使的碱基组成应与相应的 DNA 的碱基组成相一致。
- ③ 信使的长度应是不同的,因为由它们所编码的多肽链的长度是不同的。
- ④ 在多肽合成时信使应与核糖体作短暂的结合。
- ⑤ 信使的半寿期很短,所以信使的合成速度应该是很快的。

所以,这样的信使可能是一种 RNA。但是当时已发现的两种 RNA 都不具备这些特性。各种生物的 rRNA 的大小差异不大,碱基组成的变化也不大。tRNA 除了有与 rRNA 相同的问题以外,它们的分子也太小,所以这两种 RNA 都不能胜任信使的功能。可喜的是当时已有人提出过,认为细胞中有可能存在第三种 RNA。被噬菌体 T_2 感染后的大肠杆菌中,有人发现有一种新的 RNA,它的代谢速度极快,分子的大小也参差不齐,碱基组成又与 T_2 DNA 相一致。这些特性都符合信使分子的要求。

mRNA 的概念提出后,还必须要用实验来证明这种概念是否正确。Brenner S, Jacob F 和 Monod M 等人设计了一组实验:用噬菌体 T_2 感染大肠杆菌后,发现几乎所有在细胞内合成的蛋白质都不再是细胞本身的蛋白质,而是噬菌体所编码的蛋白质,这些蛋白质的合成速度与细胞总 RNA 的合成速度无关; T_2 感染后不久,细胞中出现了少量半寿期很短的 RNA,它们的碱基组成与 T_2 DNA 是一致的。上述这些特性都与他们预言的信使分子特性十分符合。他们将大肠杆菌接种在含有重标记(^{15}N 和 ^{13}C)的培养基上,再用 T_2 感染。感染后立刻将细菌转移到含有轻同位素(^{14}N 和 ^{12}C)的培养基上。再将 T_2 感染前与感染后的细菌破碎,分离出核糖体,用密度梯度超离心技术将带有重同位素的核糖体与带有轻同位素的核糖体分开。他们还用 ^{32}P 或用 ^{14}C 尿苷去标记 RNA,并用 ^{35}S -甲硫氨酸去标记新合成的蛋白质。这些实验结果(图 38-3)表明:

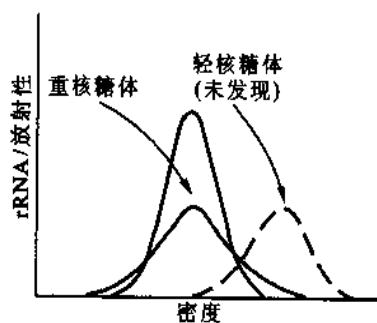


图 38-3 正常的与噬菌体 T_2 感染前后大肠杆菌核糖体的密度梯度超离心分析

- ① T_2 感染后并无轻标记核糖体出现,说明在 T_2 感染后并未引起新核糖体的合成。
- ② T_2 感染后,诱发了新的 RNA 的合成。大多数放射性标记的 RNA 出现在重标记核糖体中。这种新合成的 RNA 代谢速度极快。
- ③ ^{35}S 标记的蛋白质只暂时出现在重标记核糖体中,说明新合成的蛋白质是在早就存在的核糖体中合成的。

以后,Spiegelman S 又用分子杂交技术证明了经 T_2 感染后的新合成的 RNA 可以与 T_2 DNA 杂交,但细胞内的其他 RNA 则不能与 T_2 DNA 杂交。从而证明新合成的 RNA 是由 T_2 噬菌体 DNA 编码的。

对于 mRNA 的结构特征,我们已经有了较详尽的了解。mRNA 以核苷酸序列的方式携带遗传信息,通过这些信息来指导合成多肽链中的氨基酸的序列。每一个氨基酸可通过 mRNA 上 3 个核苷酸序列组成的遗传密码来决定,这些密码以连续的方式连接,组成读码框架(reading frame)。读码框架之外的序列称作非编码区,这些区域通常与遗传信息的表达调控有关。在读码框架的 5' 端,是由起始密码(start codon) AUG 开始的,它编码一个蛋氨酸。在读码框架的 3' 端,含有一个或一个以上的终止密码(stop codon): UAA、UAG 和 UGA,其功能是终止这一多肽链的合成。在真核生物 mRNA 的 3' 端,通常还含有转录后加上去的多聚腺嘌呤核苷酸(polyA)序列作尾巴,其功能可能与增加 mRNA 分子的稳定性有关。

mRNA 分子的 5' 端序列对于起始密码的选择有重要作用,这种作用对于原核生物和真核生物还有所差别。原核生物中(图 38-4),在 mRNA 分子起始密码子的上游含有一段特殊的核糖体结合位点(ribosome-binding site)序列,这一结合位点使得核糖体能够识别正确的起始密码 AUG。原核生物的 mRNA 通常是多基因的,分子内的核糖体结合位点使得多个基因可独立地进行读码框架的翻译,得到不同的蛋白质。而对于真核生物而言,其 mRNA 通常只为一条多肽链编码,核糖体与 mRNA 5' 端的核糖体进入部位(ribosome entry site)结合之后,通过一种扫描机制向 3' 移动来寻找起始密码,mRNA 5' 末端的帽子结构可能对于核糖体进入部位的识别起到一定作用。翻译的起始通常开始于从核糖体进入部位向下游扫描到的第一个 AUG 序列。

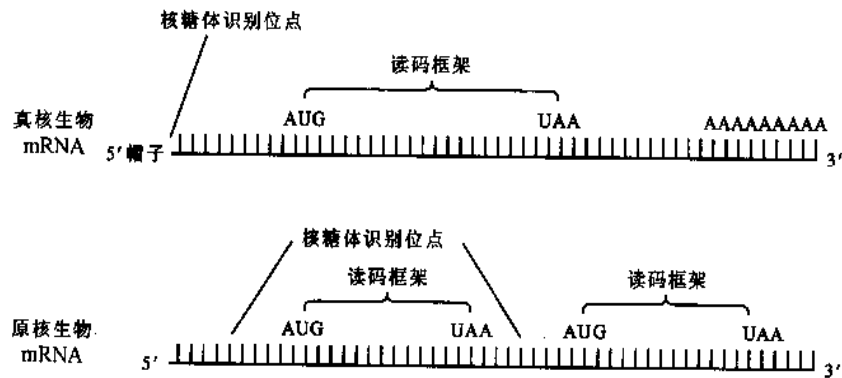


图 38-4 真核生物及原核生物 mRNA 结构简图

(二) tRNA 转运活化的氨基酸至 mRNA 模板上

tRNA 含有两个关键部位:一个是氨基酸结合部位,另一个是与 mRNA 的结合部位。对于组成蛋白质的 20 种氨基酸来说,每一种至少有一种 tRNA 来负责转运。为了准确地翻译,每一种 tRNA 必需能被很好地识别。在书写时,将所运氨基酸写在 tRNA 的右上角,如 $tRNA^{Phe}$ 及 $tRNA^{Ser}$ 分别表示为苯丙氨酸和丝氨酸转运的 tRNA。大多数氨基酸具有几种用来转运的 tRNA,一个细胞中,通常含有 50 或更多的不同的 tRNA 分子。

$tRNA^{Phe}$ 是第一个通过 X 射线晶体衍射技术测定了空间结构的 tRNA 分子,其他 tRNA 都与它类似,可用一个如图 38-5 的结构来表征其一级、二级、三级结构。所有的 tRNA 都是有由 50~95 个核苷酸组成的一条多聚核苷酸链,这条链经过折叠,呈现三叶草型结构,含有 4 个双链的茎和 4 个单链的环。5' 端和 3' 端的碱基通过形成 7 个 Watson-Crick 碱基配对将两端拉到一起,形成受体端,氨基酸通过与 3' 端的核糖连接而形成氨酰-tRNA 分子。tRNA 的 3' 端通常是 CCA 的序列。

未配对的环的命名由其特定的结构来定。环 I 的大小在 7~11 个核苷酸之间,常含有稀有碱基 dihydrouracil,故命名为 D 环;环 II 含有被称作反密码子(anticodon)的 3 个碱基序列,被命名为反密码子环。tRNA 的这一部分在蛋白质的合成中非常重要,它可与 mRNA 模板上的密码子进行碱基配对的专一性的识别,并将所携带的氨基酸送入到合成的多肽链的指定位置上;环 III 是可变环,其组成可在 3~21 个碱基之间,是 tRNA 大小变化最大的区域;环 IV 含有稀有的胸腺嘧啶核糖核苷(ribothymidine)和假尿嘧啶核苷

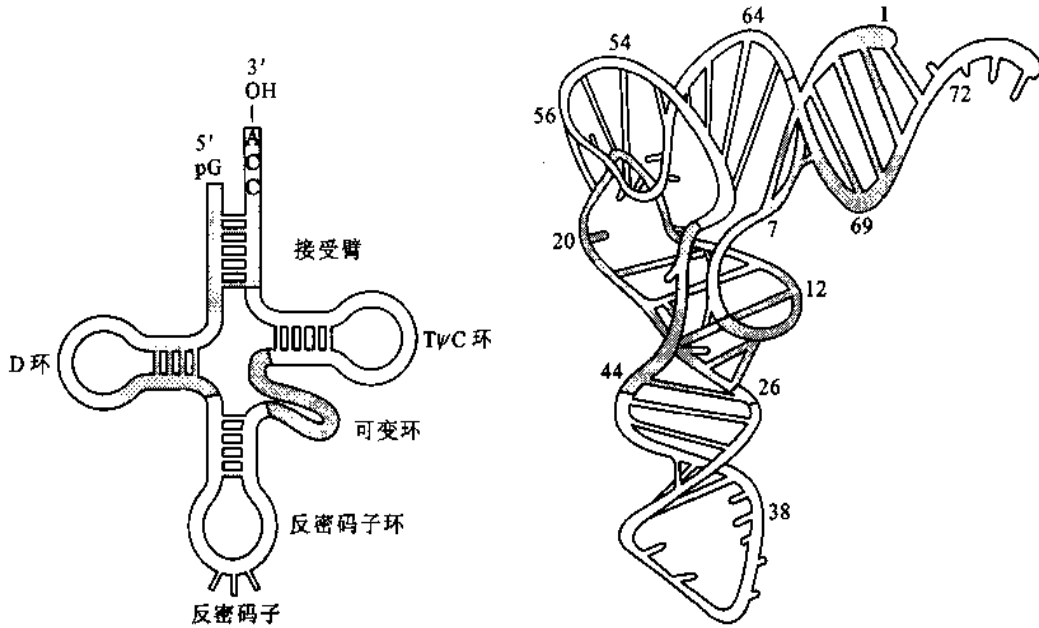


图 38-5 tRNA 的结构简图

(pseudouridine)(符号 ψ 表示)碱基作为不变序列,故把它叫做 T ψ C 环。

tRNA 三叶草型的二级结构可折叠成 L-型的三维结构,如图 38-5 所示,这一结构由两个螺旋以直角的方位构成,结合氨基酸的一端称接受臂(acceptor arm),另一端则含有反密码子,被称作反密码子臂(anticodon arm)。tRNA 分子上与多肽合成有关的位点至少有 4 个,分别为 3'端 CCA 上的氨基酸接受位点、识别氨酰-tRNA 合成酶的位点、核糖体识别位点及反密码子位点。

tRNA 在识别 mRNA 分子上的密码子时,具有接头(adaptor)的作用。氨基酸一旦与 tRNA 形成氨酰-tRNA 后,进一步的去向就由 tRNA 来决定了。tRNA 凭借自身的反密码子与 mRNA 分子上的密码子相识别(图 38-6),而把所带的氨基酸送到肽链的一定位置上。Chapeville 及 Lipmann (1962)做了一个巧妙的实验来证明这一点。将放射性同位素标记的半胱氨酸在半胱氨酰-tRNA 合成酶催化下与 tRNA^{Cys}形成半胱氨酰-tRNA^{Cys}。然后,用活性镍作催化剂,使半胱氨酸转变成丙氨酸,形成丙氨酰-tRNA^{Cys}。然后将它放到网织红细胞无细胞体系中进行蛋白质合成。分析后,发现丙氨酸插入了本应由半胱氨酸所占的位置。

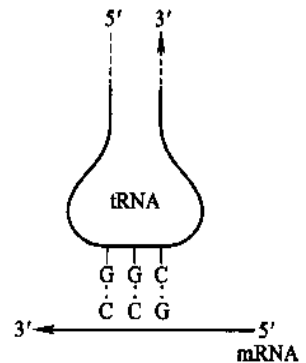


图 38-6 密码子与反密码子的识别

前面在讨论遗传密码的性质时曾提到过密码的简并性问题。这里将进一步讨论与此有关的 tRNA 分子突变与校正基因(suppressor gene)的问题。遗传学家早就发现了回复突变(reverse mutation)现象。回复突变的原因很多,其中有一种回复突变是由于其在基因上发生的一个突变引起的,这称为基因间校正突变。长期以来人们很难解释基因间校正突变。但是现在由于对 tRNA 的结构功能有了较深入的了解,基因间校正突变的本质已经被揭露了。大多数校正突变是发生在 tRNA 基因的突变上,从而使 tRNA 的反密码子在阅读 mRNA 的信息时发生了变化。下面举一个例子加以说明(图 38-7)。

从上图可以看出,某基因中部发生点突变而出现了额外的终止密码子 UAG,于是多肽的合成在中途终止,产物失去生物活性,所以这种突变称无义突变(nonsense mutation),因为基因产物变得没有什么生物学意义了。对酪氨酸专一的 tRNA 上的反密码子应为 3'-AUG-5',但如果此 tRNA 的基因发生突变,使反密码子变成 3'-AUC-5',它就可以将 mRNA 上的终止信号 UAG 读成酪氨酸了,从而使多肽的合成得以继续。所合成的多肽中只有在酪氨酸处发生突变,这样的多肽突变体常具有部分或全部活力。通常,当有某种 tRNA 突变分子出现时,也必定有可以识别正常氨基酸的 tRNA 存在。例如, tRNA^{Tyr}的突变分子可

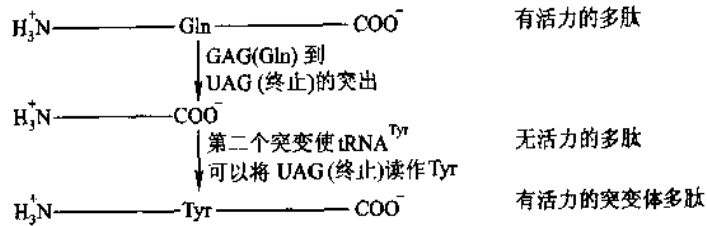


图 38-7 基因间校正突变图解

识别终止信号,但同时也必定有可以正常识别 UAC,UAU 酪氨酸密码子的 tRNA^{Tyr} 分子存在。这样,就可使翻译维持正常。

(三) 核糖体是蛋白质合成的工厂

早在 1950 年就有人将放射性同位素标记的氨基酸注射到小鼠体内,经短时间后,取出肝脏,制成匀浆,离心,分成核、线粒体、微粒体及上清等组分。发现微粒体中的放射性强度最高。再用去污剂,如脱氧胆酸,处理微粒体,将核糖体从内质网中分离出来,发现核糖体的放射强度比微粒体的要高 7 倍。这就说明核糖体是合成蛋白质的部位。

核糖体是一个巨大的核糖核蛋白体。在原核细胞中,它可以游离形式存在,也可以与 mRNA 结合形成串状的多核糖体。平均每个细胞约有 2 000 个核糖体。真核细胞中的核糖体既可游离存在,也可以与细胞内质网相结合,形成粗面内质网。每个真核细胞所含核糖体的数目要多得多,为 $10^6 \sim 10^7$ 个。线粒体、叶绿体及细胞核内也有自己的核糖体。表 38-1 中总结了不同生物核糖体的一些组成特性。

表 38-1 核糖体的结构组成

核糖体种类	亚基	rRNA(相对分子质量)	蛋白质分子数目
原核细胞核糖体 (以大肠杆菌为例)	$\begin{matrix} & 30\text{S} & \\ & \swarrow & \searrow \\ 70\text{S} & & \\ & \swarrow & \searrow \\ & 50\text{S} & \end{matrix}$	16S(5.5×10^5)	21
		$\begin{cases} 5\text{S}(0.4 \times 10^5) \\ 23\text{S}(110 \times 10^5) \end{cases}$	34
真核细胞核糖体	$\begin{matrix} & 40\text{S} & \\ & \swarrow & \searrow \\ 80\text{S} & & \\ & \swarrow & \searrow \\ & 60\text{S} & \end{matrix}$	18S($\sim 70 \times 10^5$)	~ 30
		$\begin{cases} 5\text{S}(0.4 \times 10^5) \\ 28 \sim 29\text{S}(140 \sim 180 \times 10^5) \end{cases}$	~ 50

核糖体由两个亚基构成,一个较大,一个较小。当镁离子浓度为 10 mmol/L 时,大、小亚基聚合,镁离子浓度下降至 0.1 mmol/L 时,又解聚。原核细胞核糖体的 30S 亚基含有 21 种蛋白质,还含有一分子 16S rRNA。50S 亚基中含 34 种蛋白及 5S,23S rRNA 各一分子。真核细胞核糖体的 40S 亚基中有 30 多种蛋白质及一分子 18S rRNA。60S 亚基中有 50 多种蛋白质及 5S,28S rRNA 各一分子。哺乳类核糖体的 60S 大亚基中还有一分子 5.8S rRNA。

1. 核糖体 RNA(rRNA)

核糖体内的所有 rRNA 在形成核糖体的结构和功能上都起重要作用。rRNA 中有很多双螺旋区。图 38-8 为 16S rRNA 的二级结构。

16S rRNA 在识别 mRNA 上的多肽合成起始位点中起重要作用。但对 rRNA 的其他生物学功能还缺少了解。

5S、16S、23S 三种 rRNA 的基因是相连在一起的。所以,最初的 30S 转录产物即 rRNA 的前体中含有这三种 rRNA。30S rRNA 前体经过 RNase III 的切割形成 16S 前体 rRNA 及 23S 前体 rRNA。这些 rRNA 前体的进一步加工是在与核糖体蛋白相结合后进行的。

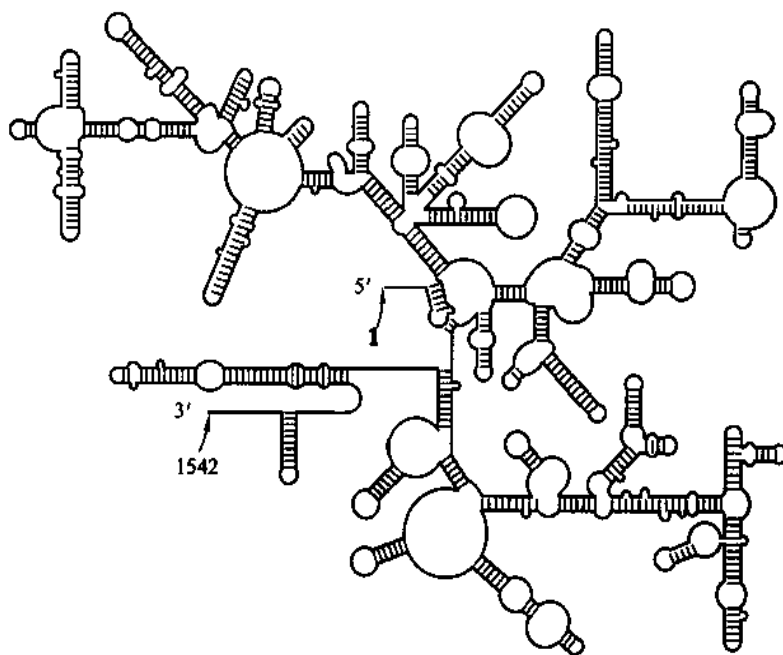


图 38-8 16S rRNA 的二级结构

2. 核糖体蛋白

应用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳等技术,已成功地将大肠杆菌的核糖体蛋白质进行了分离。大多数蛋白呈纤维状,只有极少数是呈球形的。

3. 核糖体的结构模型

应用电镜及其他物理学方法,已经提出了大肠杆菌 30S, 50S 及 70S 核糖体的结构模型(图 38-9)。70S 核糖体为一椭圆球体(13.5×20.0×40.0 nm), 30S 亚基之外形好像一个动物的胚胎样子,长轴上有一凹下去的颈部,将 30S 亚基分成头部与躯干两部分。50S 亚基之外形很特别,好像一把特殊的椅子,三边带有突起,中间凹下去的部位有一个很大的空穴。当 30S 与 50S 亚基互相结合成 70S 核糖体时,30S 亚基水平地与 50S 亚基相结合,腹面与 50S 亚基之空穴相抱,它的头部与 50S 亚基中含蛋白质较多的一侧相结合。两亚基接合面上留有相当大的空隙。蛋白质生物合成可能就在这空隙中进行。

核糖体的大小亚基与 mRNA 有不同的结合特性。大肠杆菌的 30S 亚基能单独与 mRNA 结合形成 30S 核糖体-mRNA 复合物,后者又可与 tRNA 专一地结合,50S 亚基不能单独地与 mRNA 结合,但可非专一地与 tRNA 相结合,50S 亚基上有两个 tRNA 位点:氨酰基位点(A 位点)与肽酰基位点(P 位点)。这两个位点的位置可能是在 50S 亚基与 30S 亚基相结合的表面上。50S 亚基上还有一个在肽酰-tRNA 移位过程中使 GTP 水解的位点。在 50S 与 30S 亚基的接触面上有一个结合 mRNA 的位点。此外,核糖体上还有许多与起始因子、延伸因子、释放因子及与各种酶相结合的位点。至此,不难看出核糖体是一个多么复杂的结构,它真配得上称为蛋白质合成的工厂。

采用温和的条件小心地从细胞中分离核糖体时可以得到 3~4 个成串的甚至上百个成串的核糖体,称为多核糖体(polyribosome)。多核糖体是由一个 mRNA 分子与一定数目的单个核糖体结合而成的,形成念珠状。两个核糖体之间,有一段裸露的 mRNA。每个核糖体可以独立完成一条肽链的合成(见图 38-2)。所以在多核糖体上可以同时进行好多条多肽链的合成。这样就提高了翻译的效率。

血红蛋白的多肽链由 150 个氨基酸组成,相应的它的 mRNA 的编码区应有 450 个碱基组成的多核苷酸,长约 150 nm。网织红细胞核糖体的直径为 22 nm,所以每条 mRNA 链足以容纳好几个核糖体。现已证明,网织红细胞多核糖体由 5~6 个核糖体组成,两个核糖体之间的间隔应为 3 nm。

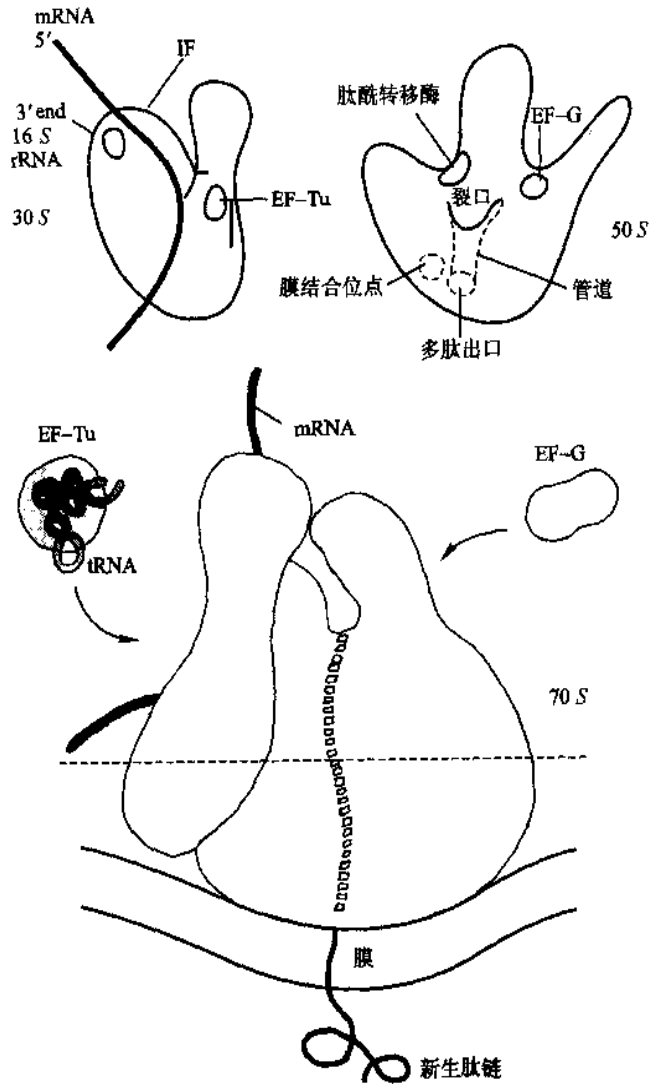


图 38-9 原核生物核糖体的功能位点

二、翻译的步骤

肽链合成是向氨基端(N端)还是向羧基端(C端)延伸的呢? Dintzis 等人用 ^3H -亮氨酸作标记分析了兔网织红细胞无细胞体系中血红蛋白生物合成的过程。血红蛋白中含有较多亮氨酸。其氨基酸序列为已知。合成反应在较低温度(15°C)中进行,以降低合成速度。在反应开始后的 4~60 min 内,每隔一定时间取样分析。将带有标记的蛋白质分离出来,用胰蛋白酶水解肽链,用纸层析分离水解碎片并测定所含的放射性强度。实验结果如图 38-10 所示。从图中可以看出,反应 4 min 后,只有羧基端含有 ^3H -亮氨酸。随着反应时间的延长,带有标记的肽段自羧基端向 N 端延伸,到 60 min 时,几乎整个肽段都布满了标记物。这个实验说明多肽链的合成是从 N 端向 C 端进行的。肽链延长的速度极快。兔网织红细胞的一个核糖体合成一条完整的血红蛋白 α 链(146 个氨基酸残基),在 37°C 时约需 3 min。大肠杆菌具有更高的速度,一个核糖体每秒钟可延伸 20 个氨基酸。

现在已经证明,mRNA 上信息的阅读(翻译)是从 mRNA 的 5'端向 3'端进行的。这方面的实验很多,只举一例。当用下列人工合成的多核苷酸作模板:



在无细胞体系中进行翻译时,其多肽产物为:



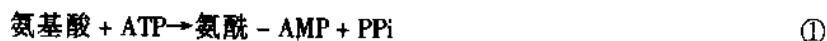
而且,天冬酰胺是以羧基为末端,所以它的密码子 AAC 是最后才被翻译的。这就证明了翻译的方向为 5'→3'。由于 mRNA 从 DNA 模板的转录作用也是由 5'→3' 进行的,所以在细胞内,当 mRNA 的转录还没有完成时,翻译工作就可以开始了。

蛋白质合成是最复杂的生物化学过程之一,它包括了上百种不同的蛋白质,以及 30 多种 RNA 分子的参与。这一过程开始于氨基酸接在特异的 tRNA 上,随后的步骤则在核糖体上进行。氨基酸通过 tRNA 转运到核糖体上,直到氨基酸掺入到多肽链中后 tRNA 才离开核糖体。

(一) 氨酰-tRNA 合成酶帮助使氨基酸结合到特定的 tRNA 上

一种称为氨酰-tRNA 合成酶的酶类参与了将氨基酸结合到其对应的 tRNA 上的过程。这种结合有两方面的意义:①氨基酸与 tRNA 分子的结合使得氨基酸本身被活化,利于下一步进行的肽键形成的反应;②tRNA 可以携带氨基酸到 mRNA 的指定部位,使得氨基酸能够被掺入到多肽链合适的位置。这样,氨酰-tRNA 合成酶不仅为蛋白质的合成解决了能量问题,而且还解决了专一性问题。

氨酰-tRNA 合成酶参与的合成分两步进行。第一步是氨酰-tRNA 合成酶识别它所催化的氨基酸以及另一底物 ATP,在氨酰-tRNA 合成酶的催化下,氨基酸的羧基与 AMP 上的磷酸之间形成一个酯键,同时释放出一分子 PPi :



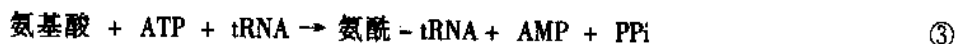
这个反应的平衡常数大约为 1,以至于 ATP 分子中磷酸酐键断裂所具备的能量继续保存到了氨酰-AMP 分子中。这时,氨酰-AMP 仍然紧密地与酶分子结合。

第二个氨酰-tRNA 合成酶催化的反应是通过形成酯键,将氨基酸连接到 tRNA 3'端的核糖上:



氨酰-tRNA 合成酶之间在识别 tRNA 的部位上有所不同。一些氨酰-tRNA 合成酶能特异形成 2' 形式的酯,有的形成 3' 形式的酯,有的还可能形成混合物。一旦结合到最末端的核糖上后,氨酰基团还能在 2' 或 3' 的羟基之间进行交换,但只有 3' 形式的酯,才参与在核糖体催化下的下面的转肽反应。

上面两个由氨酰-tRNA 合成酶催化的反应可总结如下式:



总反应③的平衡常数近于 1,自由能降低极少,反应是可逆的。但随着 PPi 被焦磷酸酶水解成两个自由磷酸分子,上述反应就趋向于完全。氨基酸与核糖之间形成的高能酯键对于蛋白质合成中肽键的形成十分重要。

(二) 每一个氨酰-tRNA 合成酶可识别一个特定的氨基酸和与此氨基酸对应的 tRNA 的特定部位

虽然氨酰-tRNA 合成酶之间在分子大小、亚基组成上有所差异,但它们都有一些共同的结构特征。通过酪氨酰-tRNA 合成酶与反应中间物酪氨酰-腺苷酸复合物晶体结构的解析,对于氨酰-tRNA 合成酶的活性部位有了较深入的认识(图 38-11)。反应中间物结合在酶分子的一个深沟里,二者之间形成 11 个氢键。6 个氢键涉及 AMP 部分,5 个涉及酪氨酰部分。由此可见,酪氨酰-tRNA 合成酶对底物的选择性主要由这些氢键来决定的。

对应于 20 种氨基酸的每一种氨基酸,大多数细胞都只含有一种与之对应的氨酰-tRNA 合成酶,每一种氨酰-tRNA 合成酶即能够识别相应的氨基酸,又能识别与此氨基酸相对应的一个或多个 tRNA 分子。有时,还把氨酰-tRNA 合成酶和与之对应的 tRNA 分子叫做“遗传密码第二”。

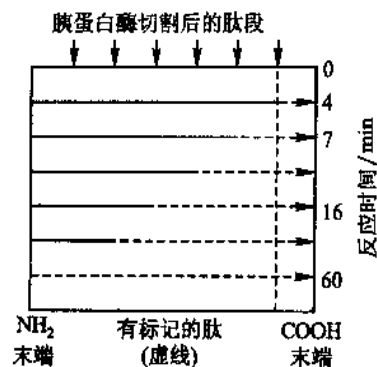


图 38-10 标记亮氨酸掺入血红蛋白 α -链羧基末端图解
虚线为带有标记肽段

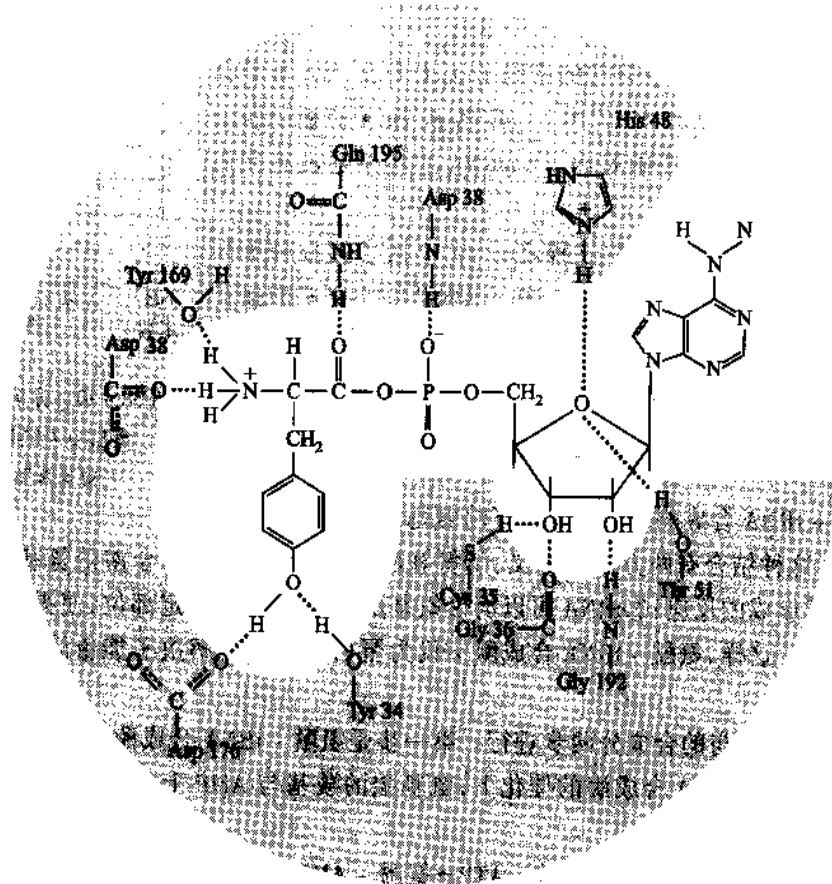


图 38-11 酪氨酰 - tRNA 合成酶与反应中间物酪氨酰 - 腺苷酸复合物的氢键相互作用

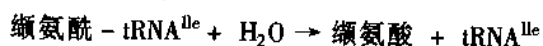
通过对氨酰 - tRNA 合成酶识别 tRNA 反密码子的专一性的分析,可将它们分成两类。一类可识别反密码子,一类则不能。这一差别可由如下理由来理解。有的 tRNA 在遗传上其反密码子发生了改变,但其氨酰 - tRNA 合成酶对它的识别却没有发生改变。与此类似,一些 tRNA 的反密码子即使被化学方法改变,它们仍能被其相应的氨酰 - tRNA 合成酶所识别。然而,另一些氨酰 - tRNA 合成酶则不能识别反密码子发生了变化的 tRNA。

谷氨酰胺酰 - tRNA 合成酶与 tRNA、ATP 复合物的晶体结构已经得到解析。谷氨酰胺酰 - tRNA 合成酶要求 tRNA 的反密码子环要保持不变,结构解析表明,酶蛋白与反密码子环上的碱基有大面积的接触,这种接触主要来自于形成的氢键。

tRNA 的氨基酸接受臂处于酶活性部位,与 ATP 结合部位邻近。通过与酶分子的结合,tRNA 3' 端的氨基酸接受臂的 CCA 有较大的构象变化,这种构象变化似乎可使得在末端的 AU 配对解链,以利于末端碱基与酶分子发生作用。在这一点上看,酶分子对 tRNA 的识别是特异和复杂的。

(三) 氨酰 - tRNA 合成酶能够纠正酰化的错误

许多氨酰 - tRNA 合成酶似乎含有第二个活性部位,叫做校正部位,用于水解非正确组合的氨基酸和 tRNA 之间形成的共价联系,这一纠错过程可用异亮氨酰 - tRNA 合成酶来加以说明。异亮氨酸与缬氨酸只有一个甲基的差异,较难区别。异亮氨酰 - tRNA 合成酶能够在酰化部位区分这两种氨基酸,然而也会偶尔生成缬氨酰 - tRNA^{lle}。当异亮氨酰 - tRNA 合成酶遇到缬氨酰 - tRNA^{lle}时,它的水解活性部位会将其水解掉:



这样,缬氨酸取代异亮氨酸的错误掺入就可以通过异亮氨酰 - tRNA 合成酶的水解活性得到避免。经过氨

基酰化部位以及校正部位的共同作用,可使翻译过程的错误频率小于万分之一。

(四) 一个特殊的 tRNA 启动了蛋白质的合成

所有蛋白质的翻译开始于甲硫氨酸的参与,一个特殊的起始 tRNA 对所有蛋白质合成中起始氨基酸——甲硫氨酸的掺入负责,这个 tRNA 可简称为 $tRNA^{Met}$,它也对选择在 mRNA 上在什么位置开始翻译起重要作用。通常,细胞中只有两种 tRNA 可携带甲硫氨酸,我们把另一种携带甲硫氨酸掺入到蛋白质内部的 tRNA 写作 $tRNA^{Met}$ 。只有一种甲硫氨酰-tRNA 合成酶参与了这两种甲硫氨酰-tRNA 的合成。对这两种甲硫氨酰-tRNA 的识别是由参与蛋白质合成的起始和延伸因子决定的,起始因子识别 $tRNA^{Met}$,而延伸因子识别 $tRNA^{Met}$ 。可以想到,这两种甲硫氨酰-tRNA 既能够被它们唯一的甲硫氨酰-tRNA 合成酶所识别,以区别开其他 tRNA;同时,这两种甲硫氨酰-tRNA 又能被蛋白质合成因子所区分。

在原核细胞中,有一种特异的甲酰化酶,能够使得 $tRNA^{Met}$ 中的氨基发生甲酰化,这样可使得参与起始的 $tRNA^{Met}$ 不参与肽链的延伸过程。这种识别过程在进化过程中逐渐消失,在真核细胞中是不存在的。

(五) 翻译开始于 mRNA 与核糖体的结合

蛋白质合成中翻译的开始需要在 mRNA 分子上选择合适位置的起始密码 AUG,这一过程可通过核糖体小亚基与 mRNA 的结合来完成。原核与真核生物在识别合适的起始密码上有所差别,这种差别源于原核与真核生物 mRNA 的差异。对于真核生物 mRNA 而言,它通常只编码一个蛋白质,而原核生物 mRNA 通常可为多个蛋白质编码(见图 38-4)。

在真核生物的 mRNA 中,最靠近 5' 端的 AUG 序列通常是起始密码。核糖体小亚基首先结合在 mRNA 的 5' 端,然后向 3' 端移动,直到 AUG 序列被 $tRNA^{Met}$ 上的反密码子识别。在除酵母以外的高等真核生物中,这种识别为类似 GCCGCCpurCCAUGG 这样序列所加强,核糖体与它怎样进行的识别过程目前尚不清楚,但可以肯定的是,如没有这样类似的序列,40S 小亚基将不能识别 AUG,而是继续向 3' 移动,识别到含有类似序列的 AUG 时才开始翻译的起始。

在原核细胞中,起始 AUG 可以在 mRNA 上的任何位置,并且一个 mRNA 上可以有多个起始位点,为多个蛋白质编码。原核细胞中的核糖体是如何对 mRNA 分子内如此众多的 AUG 起始位点进行识别? Shine 和 Dalgarno 在 20 世纪 70 年代初期解答了这个问题。他们发现,细菌的 mRNA 通常含有一段富含嘌呤碱基的序列,现被称作 SD 序列,它们通常在起始 AUG 序列上游 10 个碱基左右的位置,能与细菌 16S 核糖体 RNA 3' 端的 7 个嘧啶碱基进行碱基互补性的识别,以帮助从起始 AUG 处开始翻译,如表 38-2 所示。这种识别已被证实是细菌中识别起始密码的主要机制,在 SD 序列上发生增强碱基配对的突变能够加强翻译,反之,发生减弱碱基配对的突变则会减弱翻译的效率。

表 38-2 大肠杆菌 16S rRNA 与 SD 序列的识别

	与 SD 序列互补的嘧啶碱基富含区
16S rRNA	3'...HO AUUCCUCCACUA...5'
<i>lacZ</i> mRNA	5'...ACACAGGAAACAGCUAUG...3'
<i>trpA</i> mRNA	5'...ACGAGGGGAAAUCUGAUG...3'
RNA polymerase β mRNA	5'...GAGCUGAGGAACCCUAUG...3'
r-Protein L10 mRNA	5'...C CAGGAGCAA AGCUAAUG...3' 富含嘌呤碱基的SD序列 起始密码子

SD 序列的重要性还可以通过细菌毒素 colecicn E3 的作用机制来说明。这个毒素可通过核酸酶的活性特异地在 16S rRNA 3' 端切下 50 个碱基左右的片段,使得核糖体小亚基中的 16S rRNA 失去了与 mRNA 上 SD 序列互补的序列,由此抑制了细菌蛋白质的合成。由于原核生物与真核生物在蛋白质合成起始机制上

的差异,colecic E3 并不影响真核生物核糖体的功能。

(六) 蛋白质因子帮助的蛋白质合成起始

在核糖体上的蛋白质合成可分成起始、延长及终止 3 个不同阶段,每一阶段都涉及到一组不同的蛋白质因子。虽然原核生物与真核生物在蛋白质合成的起始上有差异,但是有三点是大家都要进行的:①核糖体小亚基结合起始 tRNA;②在 mRNA 上必需要找到合适的起始密码子;③大亚基必须与已经形成复合物的小亚基、起始 tRNA、mRNA 结合。一些被称作起始因子(initiation factor, IF)的非核糖体蛋白质,参与了上述 3 个过程。这些起始因子不同于核糖体蛋白质,它们仅是临时性地与核糖体发生作用参与蛋白质的起始,之后会从核糖体复合物上解离下来,而核糖体蛋白质则是一直结合在同一核糖体上。

大肠杆菌有 3 个起始因子(图 38-12)与 30S 小亚基结合。其中 IF-3 的功能是使前面已结束蛋白质合成的核糖体的 30S 和 50S 亚基分开,其他两个起始因子 IF-1 及 IF-2 的功能则是促进 fMet-tRNA^{fMet} 及 mRNA 与 30S 小亚基的结合。正如前面已谈到,mRNA 上的 SD 序列可与小亚基上 16S rRNA 的 3' 进行碱基配对,起始密码子 AUG 可与起始 tRNA 上的反密码子进行配对。当 30S 小亚基结合上 fMet-tRNA^{fMet} 及 mRNA 形成复合物后,IF-3 就解离开来,以便 50S 大亚基与复合物结合。这一结合使得 IF-1 及 IF-2 离开核糖体,同时使结合在 IF-2 上的 GTP 发生水解。原核生物的起始过程需要一分子的 GTP 水解成 GDP 及磷酸以提供能量。

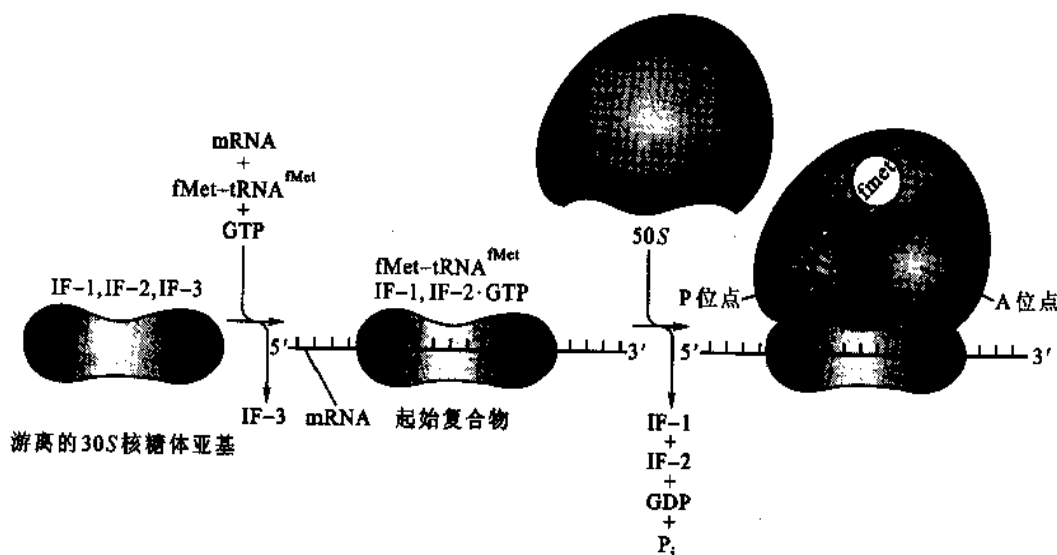


图 38-12 原核生物蛋白质合成起始复合物的形成

真核生物蛋白质合成的起始需要更多的蛋白质因子(eIF)参与,目前,至少已发现 9 种,其中有一些因子含有多达 11 种不同的亚基,我们迄今只知道部分因子的功能。主要的过程如图 38-13 所示。与原核系统类似,eIF-3 使得 40S 小亚基与大亚基分开,而且也是通过 GTP 的水解使大小亚基结合,然而,其间的反应则有所不同。Met-tRNA^{Met} 首先与小亚基结合,同时与 eIF-2 及 GTP 形成四元复合物,形成的复合物在多个因子的帮助下开始与 mRNA 的 5' 端结合。其中一个因子 eIF-4 含有一个亚基,能够特异性地结合在 mRNA 的帽子结构上。结合上 mRNA 后,核糖体小亚基就开始向 3' 端移动至第一个 AUG,这种移动由 ATP 水解为 ADP 及磷酸来提供能量。

(七) 在氨基酸的掺入过程中有 3 个重复的延伸反应

当起始过程结束后,mRNA 上接下来的密码子的翻译则由 3 个重复的反应来完成一个氨基酸的掺入。这 3 个延长反应在原核和真核生物中是相似的,其中两个需要非核糖体蛋白的延长因子(elongation factor, EF)的参与。值得指出的是,肽键的形成并不需要任何蛋白质因子的参与,而是靠核糖体自身催化完成

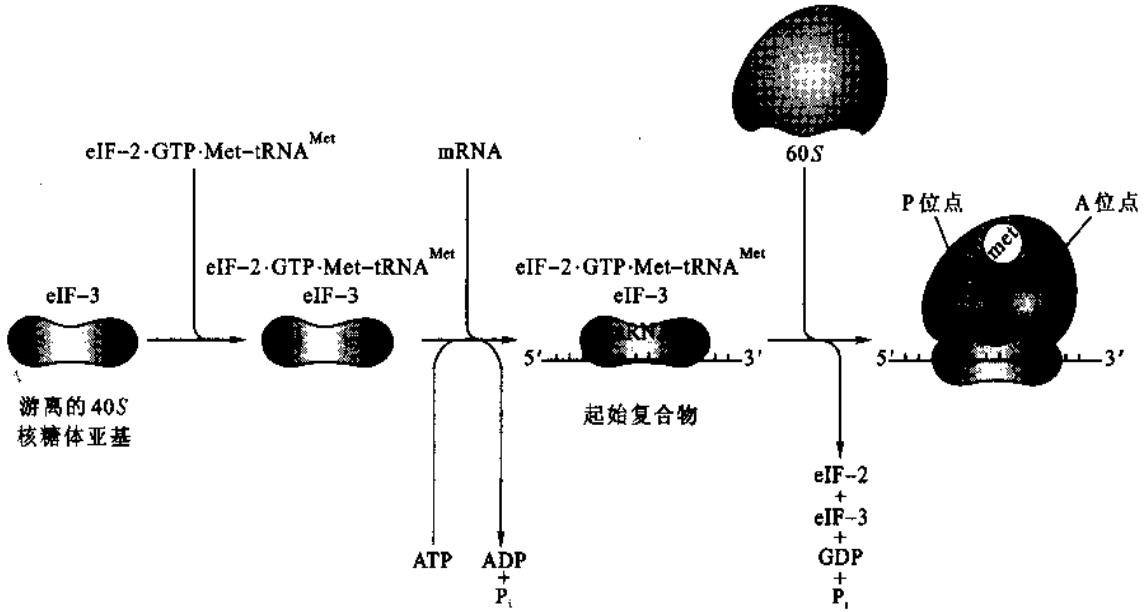


图 38-13 真核生物蛋白质合成起始复合物的形成

的,这也是蛋白质合成过程中,核糖体参与催化的唯一反应。

当与起始密码子紧邻的密码子被其氨酰-tRNA 上的反密码子识别并结合后,延长反应也就开始了。氨酰-tRNA 的结合由氨酰-tRNA 结合因子催化,在细菌中简称为 EF-Tu,在真核系统中为 EF-1。这个因子可与结合有氨酰-tRNA 和 GTP 的核糖体形成四元复合物,同时偶联上 GTP 的水解。随着氨酰-tRNA 与核糖体的结合,EF-Tu 则与 GDP 形成复合物离开核糖体。第二个延长因子 EF-Ts 则负责催化 EF-Tu-GTP 复合物的再形成,为结合下一个氨酰-tRNA 作准备,以上过程如图 38-14 所示。EF-1 是一个多亚基的蛋白,同时具备了 EF-Tu 及 EF-Ts 的性质。

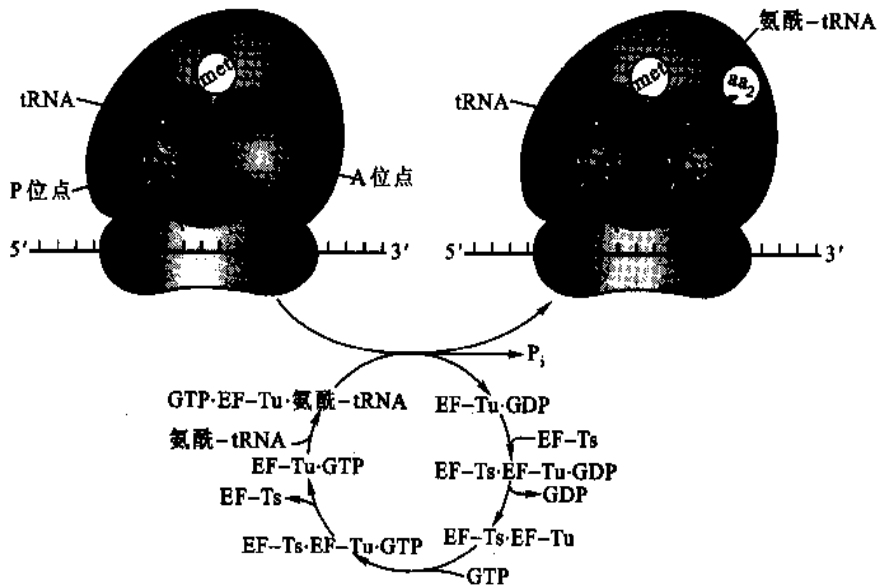


图 38-14 原核生物蛋白质合成中第二个氨酰-tRNA 的加入

肽键在延长因子从核糖体上解离下来之后就形成了,这一过程叫做转肽(transpeptidation),催化这一过程的酶叫肽酰转移酶(peptidyl transferase),它催化的实质是使一个酯键转变成了一个肽键。转肽过程可看作是新加入的氨酰-tRNA 上氨基酸的氨基对肽酰-tRNA 上酯键的羰基作亲核进攻,如图 38-15 所示。

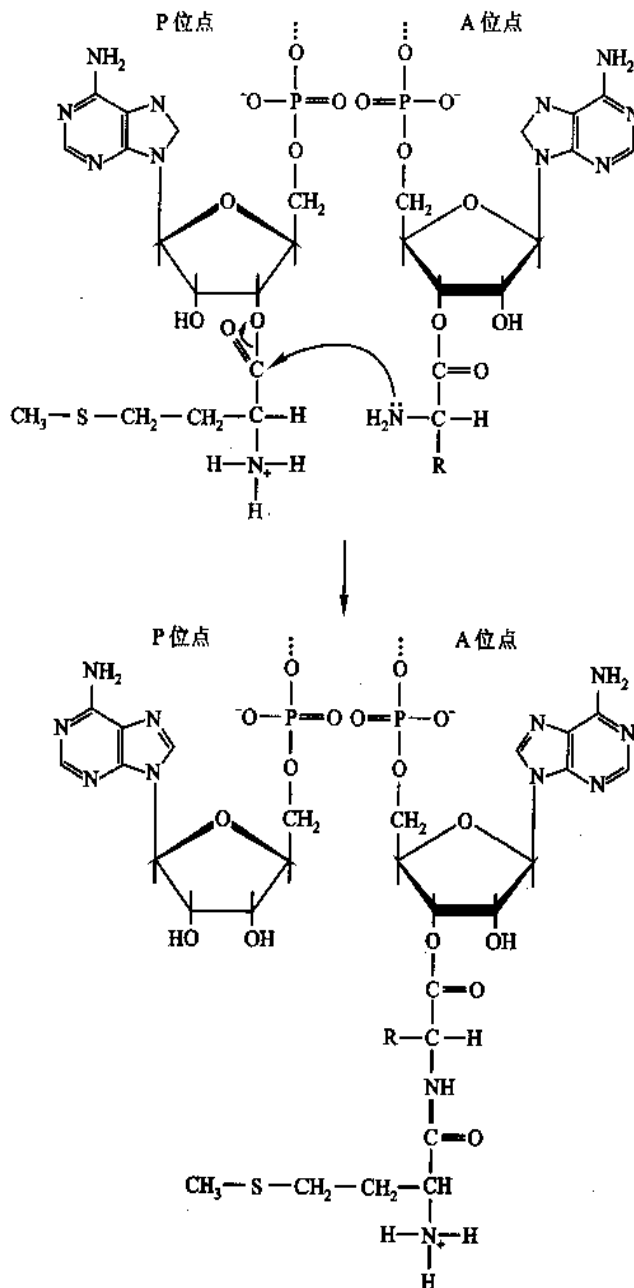


图 38-15 蛋白质合成中第一个肽键的形成

嘌呤霉素对蛋白质合成的抑制作用就发生在这一步上。嘌呤霉素的结构与氨酰-tRNA 3'端上的AMP残基的结构十分相似。肽酰转移酶也能促使氨基酸与嘌呤霉素结合,形成肽酰嘌呤霉素,但其连键不是酯键,而是酰胺键。肽酰-嘌呤霉素复合物很易从核糖体上脱落,从而使蛋白质合成过程中断。这一点不仅证明了嘌呤霉素的作用机制,也说明了活化氨基酸是添加在延伸肽链的羧基上的。

延长过程中的最后一步叫做移位(translocation)(图 38-16),如同氨酰-tRNA的结合,这一过程由移位因子催化(原核中为EF-G,真核中为EF-2),此过程有GTP的水解。移位的目的是使核糖体沿mRNA移动,使下一个密码子暴露出来以供继续翻译。

(八) 核糖体反应中GTP的作用

GTP的水解在翻译过程中具有重要的作用,在每掺入一个氨基酸的延长过程中,都有两个GTP分子发生了水解,这相当于整个这一过程消耗的能量的一半。GTP水解过程可通过EF-Tu和EF-G的作用

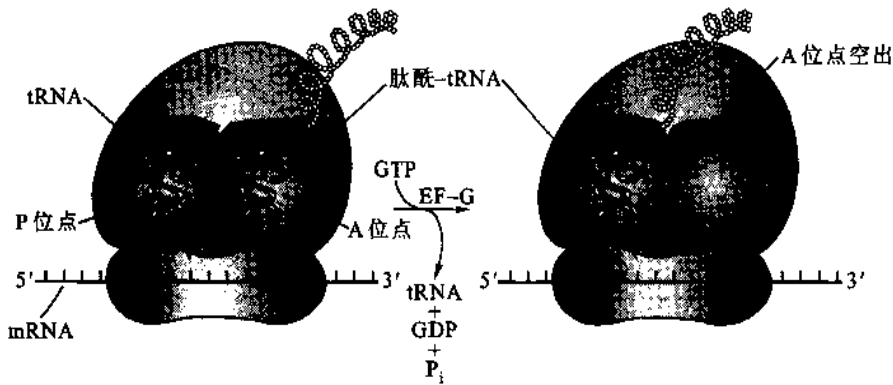


图 38-16 原核生物蛋白质合成中的移位

来理解, GTP 的结合与水解都在这些因子上进行, 这些因子和 GTP 的复合物与核糖体的作用, 才激活了水解部位的活性。随着 GTP 水解成 GDP, 这些因子的构象将发生变化, 与核糖体分离。GTP 及 GDP 与这些因子的结合与否, 成了调节这些因子与核糖体结合的开关。这一过程可通过 GTP 的类似物 GMPPCP 来说明。这个类似物在 β 和 γ 磷酸基团之间不含氧, 而是一个亚甲基, 因此难以发生类似 GTP 生成 GDP 的过程。在延长反应中, 当用 GMPPCP 取代 GTP 后, 延长反应变慢, 这是因为由于没有 GDP 的生成, 延长因子很难与核糖体发生解离。

与 GTP 发生作用的翻译因子属于 G 蛋白家族, 所有的 G 蛋白都能结合并水解 GTP, 并且遵从类似的机制, 当与 GTP 结合后, 这些蛋白被激活, 当结合上水解来的 GDP 后, 就变成无活性的构象。

(九) 翻译的终止需要释放因子和终止密码子的参加

翻译的最后一步涉及到合成好的肽酰-tRNA 中连接 tRNA 和 C 端氨基酸的酯键的切开(图 38-17), 这一过程除了需要终止密码子外, 还需要释放因子(release factors, RFs)的参加。在这一过程中, 核糖体与 mRNA 的解离还需要核糖体释放因子(ribosome releasing factor, RRF)的参与。

细胞通常不含能够识别 3 个终止密码子的 tRNA。在大肠杆菌中, 当终止密码子进入核糖体上的 A 位点后, 它们就被释放因子识别。RF-1 识别 UAA 和 UAG, RF-2 识别 UAA 和 UGA, RF-3 不识别终止密码子, 但能刺激另外两个因子的活性。当释放因子识别在 A 位点上的终止密码子后, 将改变在大亚基上的肽酰转移酶的专一性, 使其能结合水用于亲核进攻, 而不是识别通常的底物氨酰-tRNA。换言之, 终止反应实际上是将肽酰转移酶活性转变成酯酶活性。图 38-18 显示在体外实验中, 当大肠杆菌的核糖体与 fMet-tRNA^{Met}、RF-1、两个三聚核苷酸 AUG 和 UAA 混合后, 通过水解, 甲酰蛋氨酸得到了生成。

(十) 核糖体在翻译中能跳跃式读码

通常, 核糖体对密码子的识别是从起始 AUG 开始, 一个接一个地按顺序进行识别, 直到终止密码子, 这样, 翻译严格地按一个读码框架进行。然而, 在原核和真核生物中, 也有一些例外的情况, 翻译中读码框发生了位移(translational frameshifting)。这种位移通常表现为一个碱基位移。但也有核糖体跳过一大段 mRNA(如 50 个碱基)后继续翻译, 这一过程常叫做翻译跳跃(translational jumping)。从遗传信息流方面来看, 翻译跳跃类似于 mRNA 的剪接, 只不过遗传信息没有像 mRNA 的剪接那样被切掉, 而是被核糖体忽略掉了。不论是翻译位移还是翻译跳跃, 它们都发生在 mRNA 的特殊位置, 这些位置通常会有特殊的序列和结构。虽然特殊的位置和结构已有所掌握, 但核糖体是怎样进行识别的尚不太清楚。

(十一) 蛋白质合成的抑制剂

除了上面提到的嘌呤霉素外, 还有许多抗生素及毒素可抑制蛋白质合成。氯霉素、四环素、链霉素只抑制原核细胞的翻译, 但不作用于真核细胞。氯霉素只结合 70S 核糖体, 不与 80S 核糖体结合。氯霉素

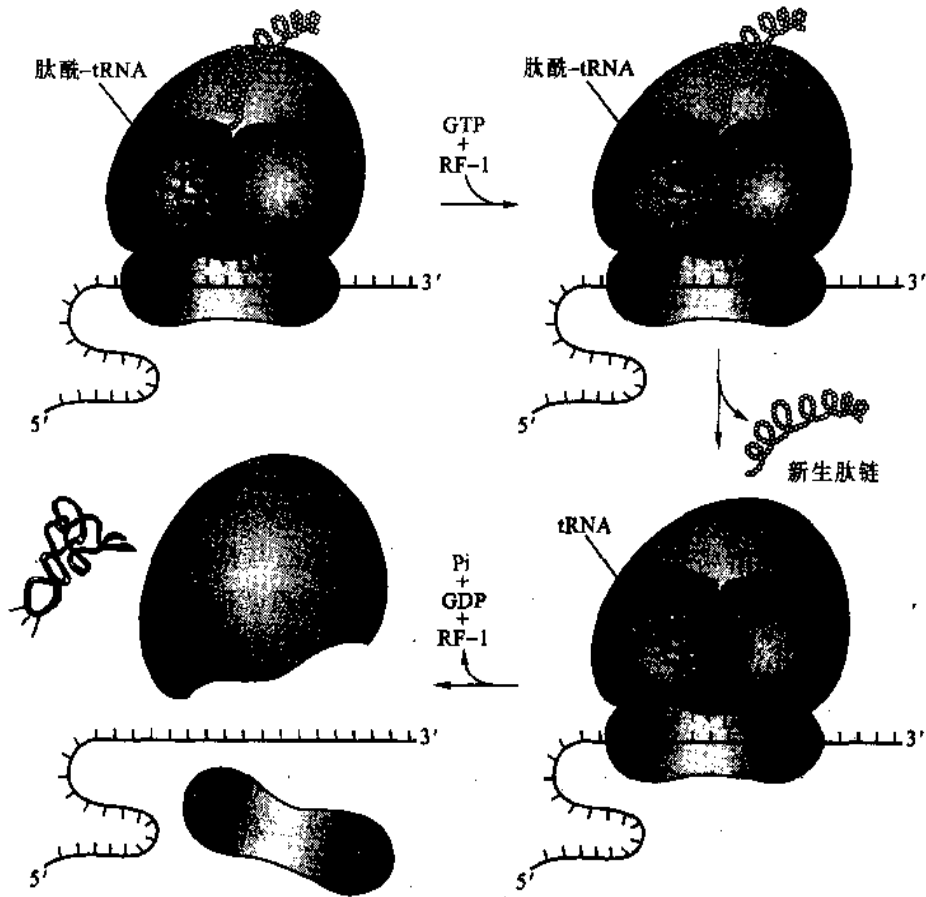


图 38-17 原核生物蛋白质合成中新生肽链的释放

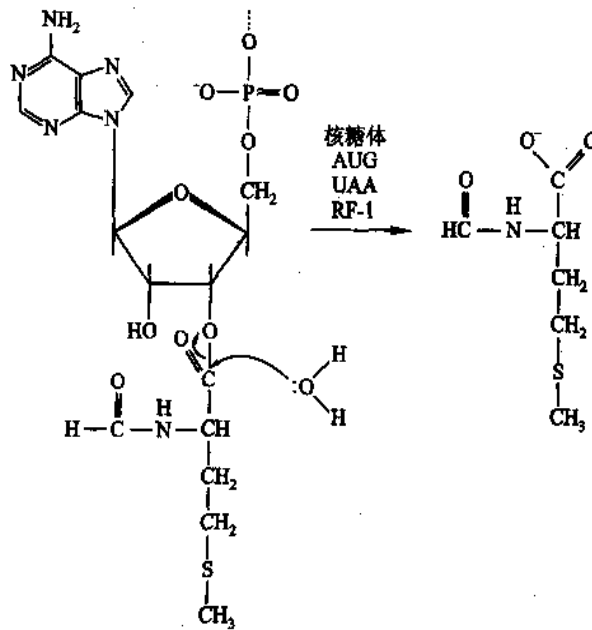


图 38-18 体外释放因子活性实验

对人的毒性可能与线粒体蛋白质合成受到抑制有关；链霉素、新霉素、卡那霉素与原核细胞 30S 核糖体相结合，可引起密码错读。

亚胺环己酮只作用于 80S 核糖体，所以，只抑制真核细胞的翻译。

由白喉棒状杆菌所产生的白喉毒素(diphtheria toxin)是一种蛋白质,这种毒素是由寄生于某些白喉杆菌内的溶源性噬菌体的基因组所编码的。几微克毒素足以致人于死命,因为这种毒素可抑制蛋白质合成。白喉毒素可以与 EF-2 结合,可以抑制肽链的移位作用。

三、蛋白质的运输及翻译后修饰

在核糖体上新合成的多肽被送往细胞的各个部分,以行使各自的生物功能,大肠杆菌新合成的多肽,一部分仍停留在胞浆之中,一部分则被送到质膜、外膜或质膜与外膜之间的空隙,有的也可分泌到胞外。真核细胞中新合成的多肽被送往溶酶体、线粒体、叶绿体胞核等细胞器。所以新合成的多肽的输送是有目的、定向地进行的。尽管蛋白质生物合成中遗传密码只指导 20 种氨基酸的掺入,然而,对于成熟蛋白质的分析表明,可发现上百种氨基酸的存在,但它们也只是在 20 种氨基酸基础上衍生出来的。这种翻译后加工过程使得蛋白质组成更加多样化,从而导致蛋白质结构上呈现更大的复杂化。我们关于后加工过程的知识还十分有限。除了对氨基酸残基的侧链基团进行修饰外,还有合成出的部分肽段在蛋白质成熟过程中被切除。这些修饰和加工过程是与这些蛋白质是在什么部位合成的,要运送到什么部位去有关。其实,加工过程在多肽链合成开始即随之进行。在多核糖体上合成的蛋白质或者留在细胞质中,或者运送到细胞器。留在细胞质中的蛋白质从核糖体上释放后即可行使其功能,而运往别处的蛋白质则往往在运送的过程中发生大量的修饰。许多由结合在膜上的多核糖体合成出来的蛋白质或者停留在 ER 膜上,或者被运往高尔基体、分泌小泡、质膜或溶酶体。

(一) 蛋白质通过其信号肽引导到目的地

蛋白质的运输尽管比较复杂,但生物系统中的蛋白质的运输可用一个比较简单的模式来解释。每一需要运输的多肽都含有一段氨基酸序列,称为信号肽序列(signal or leader sequence),引导多肽至不同的转运系统。在真核细胞中,当某一种多肽的 N 端刚开始合成不久,这种多肽合成后的去向就已被决定。一部分核糖体以游离状态停留在胞浆中,它们只合成供装配线粒体及叶绿体膜的蛋白质。另一部分核糖体,受新合成的多肽的 N 端上的信号肽(signal sequence)所控制而进入内质网,使原来表面平滑的内质网(smooth ER)变成有局部凸起的粗面内质网(rough ER)。与内质网相结合的核糖体可合成三类主要的蛋白质:溶酶体蛋白,分泌到胞外的蛋白和构成质膜骨架的蛋白。信号肽的概念首先是由 Salatini D 和 Blobel G 所提出的。以后, Milstein C 和 Brownlee G 在体外合成的免疫球蛋白肽链的 N 端找到了这种信号肽。当时,只是在体外合成的未经加工的免疫球蛋白上找到了信号肽,但不能在体内合成的经过加工的成熟免疫球蛋白上找到它。因为在体内合成后的加工过程中,信号肽被信号肽酶(signal peptidase)切掉了。许多蛋白质激素就是以前体蛋白形式合成,例如,胰岛素 mRNA 通过翻译,可得到前胰岛素原蛋白,其前面的 23 个氨基酸残基的信号肽在转运至高尔基体的过程中被切除。以后在很多真核细胞的分泌蛋白中都发现有信号肽。

信号肽序列通常在被转运多肽链的 N 端,这些序列在 10~40 个氨基酸残基范围,氨基端至少含有一个带正电荷的氨基酸,在中部有一段长度为 10~15 个氨基酸残基的由高度疏水性的氨基酸组成的肽链,常见的为丙氨酸,亮氨酸、缬氨酸,异亮氨酸和苯丙氨酸。这个疏水区极重要,其中某一个氨基酸被非极性氨基酸置换时,信号肽即失去其功能。疏水序列表明,一般蛋白质是很难通过脂膜的,而信号肽可引导它至特定的细胞器,并通过膜。什么样的序列能指导蛋白质转运至什么细胞器,目前还没有完全阐明。在信号肽的 C 端有一个可被信号肽酶识别的位点,此位点上游常有一段疏水性较强的 5 肽,信号肽酶切点上游的第一个(-1)及第三个(-3)氨基酸常为具有一个小侧链的氨基酸(如丙氨酸)。图 38-19 为一些真核细胞多肽的信号肽结构。

信号肽的位置也不一定在新生肽的 N 端,有些蛋白质(如卵清蛋白)的信号肽位于多肽链的中部,但其功能则相同。

那么,信号肽又是由什么蛋白质加以识别的呢? Blobel 等已证明,识别信号肽的是一种核蛋白体,称

		切点
人生长激素	MATGSR <u>S</u> TSLLLA <u>F</u> GLLCLPWLQEGSA	FPT
人胰岛素原	MALWMS <u>L</u> LLPLLALLALWGPDPAAA	FVN
牛血清蛋白原	M <u>S</u> WVTFISLLLFSSAYS	RGV
小鼠抗体 H 链	M <u>S</u> VLSLLYLLTAIPHIMS	DVQ
鸡溶菌酶	M <u>S</u> LLILVLCFLPKLAALG	KVF
蜂毒蛋白	M <u>S</u> FLVNVALVFMVVYISYIYA	APE
果蝇胶蛋白	M <u>S</u> LLVVAVIACMLIGFADPASG	CKD
玉米蛋白 19	MAA <u>S</u> IFCLIMLLGLSASAATA	SIF
酵母转化酶	MLLOAFLFLLAGFAA <u>S</u> ISA	SMT
人流感病毒 A	M <u>S</u> LLVLLYAFVAG	DQI

图 38-19 一些真核细胞多肽氨基端的信号肽结构
疏水氨基酸残基以加重线字母表示,碱性氨基酸残基用带网纹字母表示

为信号识别体(signal recognition particle, SRP)。SRP 的相对分子质量为 325 000,由一分子 7SL RNA(长 300 核苷酸)和 6 个不同的多肽分子组成。7SL RNA 上有两段核苷酸序列,称为 Alu 序列。Alu 序列在哺乳类 DNA 中颇为常见。SRP 有两个功能域,一个用以识别信号肽,另一个用以干扰进入的氨酰-RNA 和肽酰移位酶的反应,以终止多肽链的延伸作用。信号肽与 SRP 之结合发生在蛋白质合成刚开始时,即 N 端的新生肽链刚一出现时,一旦 SRP 与带有新生肽链的核糖体相结合,肽链的延伸作用暂时终止,或延伸速度大大减低。SRP-核糖体复合体就移动到内质网上并与那里的 SRP 受体停泊蛋白(docking protein)相结合。一旦与此受体相结合后,蛋白质合成的延伸作用又重新开始。SRP 受体是一个二聚体蛋白,由相对分子质量为 69 000 的 α 亚基与相对分子质量为 30 000 的 β 亚基组成。然后,带有新生肽链的核糖体被送入多肽移位装置(translocation machinery),同时,SRP 又被释放到胞浆中,新生肽链又继续延长。移位装置含有两个膜本蛋白(integral membrane protein):ribophorin I 和 II。

上述整个过程总结于图 38-20 中。

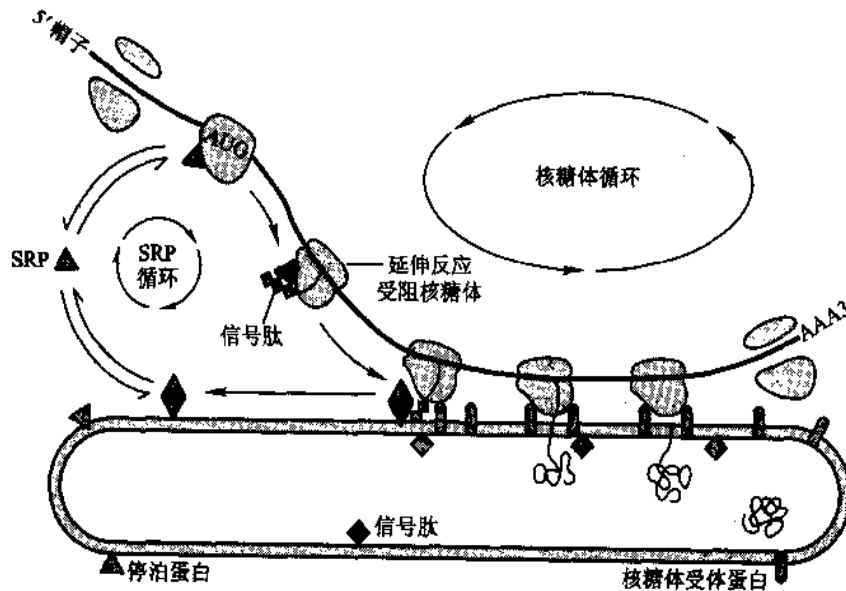


图 38-20 信号肽的识别过程

(二) 一些线粒体叶绿体蛋白质是翻译完成后被运输的

线粒体 DNA 基因组可编码全部线粒体 RNA,但只编码一小部分线粒体蛋白。叶绿体的情形也相似。大部分线粒体和叶绿体的蛋白质是由细胞核基因组 DNA 编码的,并在胞浆内由游离核糖体合成这些蛋白质,再送到这些细胞器中去,这种运输被称作翻译后运输(posttranslational transport)。在这一过程中,为了

过膜,这些蛋白质需要通过多肽链结合蛋白(polypeptide chain binding proteins, PCBs)的帮助进行去折叠。往线粒体进行的翻译后运输需要 ATP 和质子梯度,以帮助蛋白质去折叠和跨膜。

由核基因组编码的线粒体外膜蛋白的 N 端上也有一段肽链,称线粒体定向肽,起信号肽的作用。它可以与外膜上的相应位点相识别,线粒体定向肽富含带正电荷的氨基酸和丝氨酸、苏氨酸。

MLKTSSLFTRRUQPSLFRNILRLQST-

(线粒体定向肽)

从胞质往线粒体内运送蛋白质的过程较为复杂,因为线粒体本身具有多膜的结构。如图 38-21 所示,细胞色素 c_1 前体蛋白的 N 端有两个信号肽序列。第一个序列被线粒体外膜上的受体蛋白识别,引导至膜上的运输通道并得以进入线粒体内的基质中,这时,第一个信号肽被切除。随之,第二个信号肽用与第一个信号肽相似的方式,携带多肽穿过内膜,之后,第二个信号肽被切除,细胞色素 c_1 则折叠成其天然结构,并结合上一个血红素分子。在胞质中合成的叶绿体蛋白质的运输与线粒体蛋白非常类似,叶绿体新生肽的定向输送也是由 N 端上的一段肽链决定的,称叶绿体转移肽。

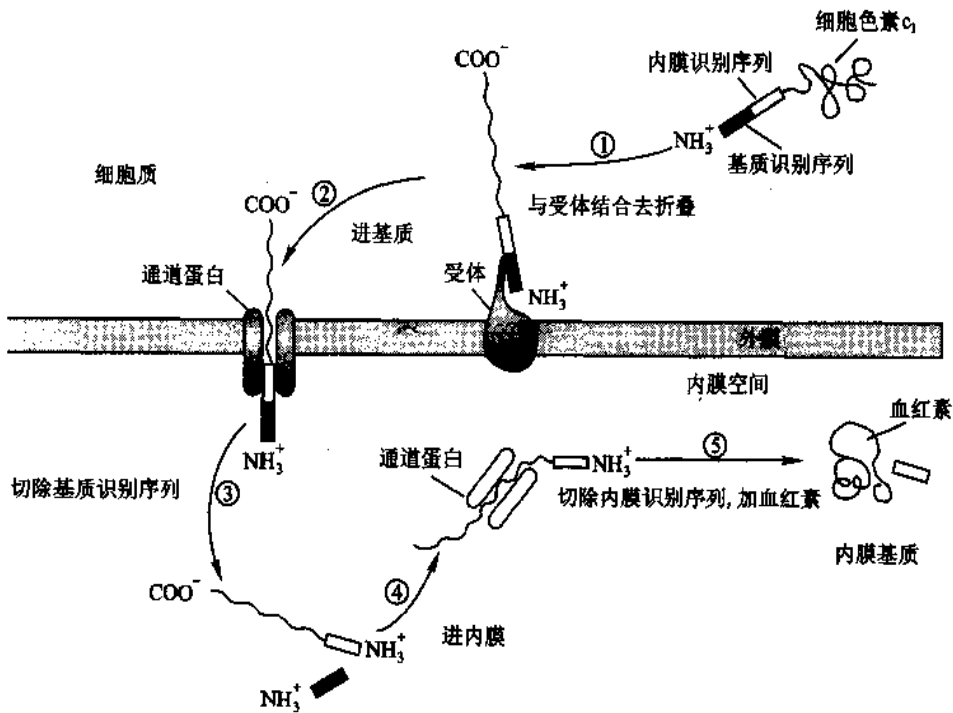


图 38-21 细胞色素 c_1 前体蛋白通过两个信号肽序列的连续跨膜过程

(三) 分泌型的真核蛋白在内质网(endoplasmic reticulum, ER)内合成

在真核细胞中,内质网是最大的模状结构的细胞器,其表面积可以是质膜面积的几倍。大部分的内质网与核糖体相结合形成粗面内质网。在粗面内质网上的核糖体是膜蛋白和分泌性蛋白合成的地方,也是蛋白质分泌途径的起点。多肽经移位后,在内质网的小腔中被修饰。这些修饰作用包括:N 端信号肽的切除,二硫键形成,使线形多肽呈现一定空间结构及糖基化作用。在内质网的膜及内腔有一些特殊的参与加工分泌蛋白和膜蛋白的蛋白质,如蛋白质二硫键异构酶。通过短时间内在粗面内质网内加工后,分泌蛋白形成被膜包裹的小泡,转运至高尔基体,然后再转运至细胞表面或溶酶体中。

糖基化作用使多肽链转变成糖蛋白。许多膜本体蛋白及抗原蛋白都是糖蛋白。糖蛋白中的糖苷键有两类:一类是肽链上天冬酰胺侧链上的 N 原子与寡聚糖核之间构成的 N-糖苷键,另一类是肽链上丝氨酸、苏氨酸侧链上的氧原子与寡聚糖核之间构成的 O-糖苷键。通常在糖蛋白上发现的寡聚糖核(oligosaccharide core)是五聚糖。其成分为 3 分子甘露糖及 2 分子 N-乙酰氨基葡萄糖。寡聚糖核是如何被带到蛋白质上的呢?已证明携带的载体是长萜醇的磷酸酯(dolichol phosphate)。它是一条具有很长的烃

链的磷酸酯,末端的磷酸基可与核糖结合。

(四) 高尔基体中多肽的糖基化修饰及多肽的分类

高尔基体主要有两方面功能:一是对糖蛋白上的寡聚糖核作进一步修饰与调整,二是将各种多肽进行分类并送往溶酶体、分泌粒(*granule*)和质膜等目的地。但是何种蛋白质应送往何处,是由蛋白质本身的空间结构决定的。

高尔基体是由许多层袋状的膜结构组成的。糖蛋白的进一步糖基化修饰就是在这种膜结构中完成的。以溶酶体中的酶类的输送为例,由于这些酶类自身构象的变化可与 6-磷酸甘露糖酯相结合。后者可被高尔基体膜上的受体识别,最终使这些酶—糖蛋白进入溶酶体。所以,6-磷酸甘露糖酯是一种导向标志,指挥糖蛋白的运输方向。但 6-磷酸甘露糖酯对分泌蛋白与质膜蛋白并不起导向标志的作用。

(五) 大肠杆菌蛋白质在翻译的同时也在被运输

细菌中新生肽的定向输送的情形相对于真核细胞来说较为简单,在细胞质中合成出来的多肽可以在合成部位、或被整合到质膜上、或通过质膜分泌出来行使功能。大多数非细胞质细菌蛋白在核糖体上合成的同时也在被运送至质膜或跨过膜,这一过程称为翻译中运输(*cotranslational transport*)。这一过程有一组帮助多肽分泌的蛋白质参与,它们中有些是能识别新生肽链 N 端引导肽序列(*leader sequence*)的膜蛋白,可将正在翻译的核糖体拉至质膜,使合成的多肽得到转运。这段引导肽也可被引导肽酶(*leader peptidase*)切除,使多肽能够分泌出细胞。

提 要

蛋白质生物合成的机制,对于原核生物与真核生物来说,是大同小异的。mRNA 是蛋白质生物合成的模板,mRNA 上的遗传信息来自 DNA。蛋白质合成的遗传信息归根结蒂是由 DNA 提供的。肽链上各个氨基酸的排列顺序是由 mRNA 上的核苷酸排列顺序决定的。每 3 个核苷酸决定一个氨基酸的位置,称为三联体密码或密码子。tRNA 在阅读密码时起重要作用,它们的反密码子用来识别 mRNA 上的密码子。在识别过程中,密码子上头两位碱基较为重要,而第三位则不太重要。这种密码的摆动性或 tRNA 在阅读密码上的灵活性,减低了由遗传密码的突变而引起的基因产物中的错误。

核糖体是蛋白质生物合成的工厂。原核细胞核糖体为 70S,由 50S 与 30S 两个亚基组成,真核细胞核糖体为 80S,由 40S 与 60S 两个亚基组成。若干个核糖体与 mRNA 分子同时结合,形成多核糖体。rRNA 在核糖体中既具有结构上的功能,又参与转译过程的起始等反应。同样,核糖体蛋白也是既具有结构上的功能,许多核糖体蛋白又是转译过程中必不可少的因子。

肽链合成时延伸的方向是从 N 端到 C 端。合成速度极快。mRNA 上信号被转译的方向是从 5' 端向 3' 端。

氨基酸必须经活化才能掺入多肽,这是多肽合成前的准备工作。氨酰-tRNA 合成酶催化这一反应,形成氨酰-tRNA。这类酶具有较高的专一性,既对氨基酸又对 tRNA 具有高度的选择性,以防止错误的氨基酸掺入多肽。一旦形成氨酰-tRNA 后,氨基酸的去向就由 tRNA 来决定,所以,tRNA 具有接头的作用。tRNA 基因的突变可以校正结构基因上的某些突变,使基因产物仍具有功能,这称基因校正突变。

大肠杆菌中多肽合成的第一步是 70S 起始复合物的形成。mRNA 上的起始密码子 AUG,16S rRNA 的 3' 端序列,30S 及 50S 核糖体亚基,起始氨基酸及起始 tRNA 等成分参与这一复杂的过程。

第二步是肽链的延伸,分三步进行,一个新进入的氨酰-tRNA 结合到 70S 核糖体的 A 位点上后,肽酰基从 P 位点转到 A 位点上,并形成肽键,核糖体沿 mRNA 位移动,mRNA 上的下一个密码子又进入 A 位点,氨酰-tRNA 从 A 位点上移位到 P 位点,开始新一轮肽链延伸反应。

第三步为肽酰合成的终止及释放。当碰到 mRNA 的终止信号时,释放因子可完成终止信号的识别并使肽酰释放到介质中。

真核细胞中的情形略有不同。起始复合物的大小为 80S, 起始 tRNA 为甲硫氨酸(而不是原核细胞所用的 N-甲酰甲硫氨酸), 起始 tRNA 也不同, 起始密码子为 AUG。涉及到的蛋白因子也较多。肽链延伸与终止过程中的延伸因子与信号释放因子也不同。

许多抗生素和毒素是多肽合成的抑制剂。

多肽合成后的定向输送的机制较为复杂。定向输送是由 N 端一段肽段, 被称信号肽控制的, 一旦信号肽出现在新生肽链上, 此肽链合成后的去向也就决定了。信号肽结构有一些特征, 它可被信号识别体识别。

在内质网上, 多肽可遭到糖基化修饰, 形成糖蛋白。其他的修饰包括切去信号肽, 形成二硫键等等。多肽的进一步修饰是在高尔基体中实现的。在高尔基体中还将多肽分类并输送到各处去。

习 题

1. mRNA 的概念是如何形成的? 如何证实的?
2. 核糖体的基本结构与功能有哪些?
3. 假定以下列 mRNA 片段为模板, 合成的多肽有何氨基酸序列:

5'GGUUUCAUGGACGAAUACUGAUAAU3'

4. 按下列 DNA 单链

5'TCGTCGACGATGATCATCGGCTACTCG3'

试写出:

- (1) DNA 复制时, 另一单链的序列;
- (2) 转录成的 mRNA 的序列;
- (3) 合成的多肽的序列。
5. 试设想一下, 在转译过程中, 在哪些环节上保证了所合成的多肽的正确无误?
6. 氨酰-tRNA 合成酶有何功能?
7. tRNA 有何功能?
8. 嘌呤霉素如何抑制蛋白质合成?
9. 在蛋白质定向输送时, 多肽本身有何作用?
10. 蛋白质的糖基化如何完成?
11. 高尔基体的功能是什么?

主要参考书目

1. Zubay G. Biochemistry, 3rd ed. Wm. C. Brown Publishers, 1993
2. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. Worth Publishers, 2000
3. Stryer L. Biochemistry, 4th ed. W. H. Freeman and company, 1995: 875 ~ 948
4. Voet D, Voet J G. Biochemistry, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc, 1995
5. 张衡主编. 生物化学. 第 2 版. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999, 416 ~ 435
6. Noller H F. tRNA - rRNA interactions and peptidyl transferase. FASEB J. 1993, (7): 87 ~ 89
7. Brown C M, McCaughan K K, Tate W P. Two regions of the *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are important for decoding stop signals in polypeptide chain termination. Nucl Acids Res. 1993, (21): 2109 ~ 2115
8. Proud C C. Protein phosphorylation in translational control. Curr. Top. Cell Regul, 1992, (32): 243 ~ 369

(唐建国)

第 39 章 细胞代谢与基因表达调控

细胞是生物机体的结构和功能单位。细胞代谢是一切生命活动的基础。细胞代谢包括物质代谢、能量代谢和信息代谢三个方面。任何物质变化总有能量变化,而能量变化又总是伴随着它们组成成分相对无序和有序结构的变更。组织结构的这种变化可以通过称为“熵”的热力学函数进行测量。熵越大,系统越混乱;反之熵越小,系统的有组织程度就越高。信息也可以作为系统组织程度的量度,获得信息意味着混乱程度或者不确定程度的减少,也就是说它的组织程度提高。因此可以说信息就是负熵。活细胞不断与环境交换物质,摄取能量,输入负熵,从而得以构建和维持其复杂的组织结构;一旦这种关系破坏,死亡便到来,细胞就解体了。

前面我们分别叙述了糖、脂类、蛋白质和核酸等物质的代谢过程,以及在这些物质代谢过程中能量和信息的变化。实际上,生物机体的新陈代谢是一个完整统一的过程,并且存在复杂的调节机制。生物体内的代谢调节在三种不同的水平上进行,即①分子水平调节,②细胞水平调节,③多细胞整体水平调节。所有这些调节机制都是在基因产物蛋白质(可能还有 RNA)的作用下进行的,也就是说与基因表达调控有关。

在这一章里,我们将着重介绍生物体内各种代谢途径间的调控网络,酶促反应的前馈和反馈,细胞结构对代谢的控制,神经体液的调节作用,以及原核和真核生物基因表达的调控机制。

一、细胞代谢的调节网络

生物界,包括人类、动物、植物和微生物,其结构特征和生活方式多种多样,千变万化。然而,它们的新陈代谢有着共同的规律。这也表明地球上的生物有统一的起源。

所有细胞都是由四类生物大分子(多糖、脂类复合物、蛋白质和核酸)、为数有限的生物小分子、无机盐和水所组成。生物大分子的相对分子质量在数千以上。多糖、蛋白质和核酸都是高聚物,它们由较小的基本结构单位所组成。多糖是由同一种单糖聚合而成,有些多糖也含有几种单糖或单糖衍生物,聚合链分支或不分支。蛋白质或组成蛋白质亚基的多肽链是由 20 种氨基酸组成的长链聚合物。RNA 由 4 种核糖核苷酸所组成;DNA 由 4 种脱氧核糖核苷酸所组成,它们都是不分支的长链分子。脂类分子仍属于生物小分子,然而它们可以聚集成超分子结构,因此将脂类复合物也归之为生物大分子。生物大分子具有高度特异性;生物之间的差别是由它们的生物大分子所决定。多糖和脂类复合物的结构特异性由合成它们的酶所决定,此外也受到先存结构(preexisting structure)的影响。蛋白质和核酸的合成除需要底物、能量和酶外,还需要模板;他们的结构信息来自 DNA 和 RNA 模板。因此,核酸被称为信息分子。

细胞从环境中取得物质和能量,用以构建自身的组成结构,同时分解已有的成分,加以再利用,并将不被利用的代谢产物排出胞外。细胞是如何经济有效地转化各类物质的?这里就细胞代谢调节总的原则和方略作一概述。

(一) 代谢途径交叉形成网络

细胞内有数百种小分子在代谢中起着关键的作用,由它们构成了成千上万种生物大分子。如果这些分子各自单独进行代谢而互不相关,那么代谢反应将变得无比庞杂,以至细胞无法容纳。细胞代谢的原则和方略是,将各类物质分别纳入各自的共同代谢途径,以少数种类的反应,例如,氧化还原、基团转移、水解合成、基团脱加及异构反应等,转化种类繁多的分子。不同的代谢途径可通过交叉点上关键的中间代谢物而相互作用和相互转化。这些共同的中间代谢物使各代谢途径得以沟通,形成经济有效、运转良好的代谢网络通路。其中三个最关键的中间代谢物是:葡萄糖-6-磷酸、丙酮酸和乙酰辅酶 A。

现将细胞内 4 类主要有机物质：糖、脂类、蛋白质和核酸相互转变关系，分别叙述如下：

1. 糖代谢与蛋白质代谢的相互关系

糖是生物机体重要的碳源和能源，可用于合成各种氨基酸的碳链结构，经氨基化或转氨后，即生成相应的氨基酸。例如，糖在分解代谢过程中可产生丙酮酸，丙酮酸经三羧酸循环，转变成 α -酮戊二酸和草酰乙酸。这三种酮酸均可加氨基或经氨基移换作用，分别形成丙氨酸、谷氨酸和天冬氨酸。此外，在糖分解过程中产生的能量，尚可供氨基酸和蛋白质合成之用。

蛋白质可以分解为氨基酸，在体内转变为糖。许多种氨基酸在脱氨后转变为丙酮酸、 α -酮戊二酸、琥珀酸、草酰乙酸而生成葡萄糖和糖原。这类氨基酸称为生糖氨基酸。例如，甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸、组氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸及脯氨酸等，都是生糖氨基酸。此外，苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸和色氨酸也能产生糖。

2. 脂类代谢与蛋白质代谢的相互联系

细胞膜由类脂和蛋白质组成。脂类在分解过程中能释放出较多的能量，因此可作为体内贮藏能量的物质。脂类与蛋白质之间可以互相转变。

脂类分子中的甘油可先转变为丙酮酸，再转变为草酰乙酸及 α -酮戊二酸，然后接受氨基而转变为丙氨酸、天冬氨酸及谷氨酸。脂肪酸可以通过 β -氧化生成乙酰辅酶 A，乙酰辅酶 A 与草酰乙酸缩合进入三羧酸循环，从而跟天冬氨酸及谷氨酸相联系。

但是这种由脂肪酸合成氨基酸碳链结构的可能性是受限制的。实际上，当由乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环，从而形成氨基酸时，需要消耗三羧酸循环中的有机酸，如无其他来源补充，反应便将不能进行。在植物和微生物中存在乙醛酸(CHOCOO⁻)循环。可以由二分子乙酰辅酶 A 合成一分子琥珀酸，用以增加三羧酸循环中的有机酸，从而促进脂肪酸合成氨基酸。例如，含有大量油脂的植物种子，在萌发时，由脂肪酸和铵盐形成氨基酸的过程，进行得极为强烈。微生物利用醋酸或石油烃类物质发酵生产氨基酸，可能也是通过这条途径。但在动物体内不存在乙醛酸循环。一般来说，动物组织不易利用脂肪酸合成氨基酸。

蛋白质转变成脂肪，则在动物体内也能进行。生酮氨基酸有亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸等，这些生酮氨基酸在代谢过程中能生成乙酰乙酸。由乙酰乙酸再缩合成脂肪酸。至于生糖氨基酸，通过丙酮酸，可以转变为甘油，也可以在氧化脱羧后转变为乙酰辅酶 A，再经丙二酸单酰途径合成脂肪酸。

此外磷脂分子中的胆胺或胆碱，主要是由丝氨酸转变而成。丝氨酸在脱去羧基后形成胆胺。胆胺是脑磷脂的组成成分。胆胺在接受甲硫氨酸(亦称蛋氨酸)给出的甲基后，即形成胆碱。胆碱是卵磷脂的组成成分。

3. 糖代谢与脂类代谢的相互联系

糖与脂类物质也能互相转变。糖转变为脂类的大致步骤为：糖先经酵解过程，生成磷酸二羟丙酮及丙酮酸。磷酸二羟丙酮可还原为甘油。丙酮酸经氧化脱羧后转变为乙酰辅酶 A，然后再缩合生成脂肪酸。脂类分解产生的甘油可以经过磷酸化生成 α -甘油磷酸，再转变为磷酸二羟丙酮。后者沿酵解过程逆行即可生成糖。至于脂肪酸转变为糖的过程，则有一定的限度。脂肪酸通过 β -氧化，生成乙酰辅酶 A。在植物或微生物体内，乙酰辅酶 A 可缩合成三羧酸循环中的有机酸，如经乙醛酸循环生成琥珀酸，琥珀酸再参加三羧酸循环，转变成草酰乙酸，由草酰乙酸脱羧生成丙酮酸，丙酮酸即可转变成糖。但在动物体内，不存在乙醛酸循环，通常情况下，乙酰辅酶 A 都是经三羧酸循环而氧化成二氧化碳和水，生成糖的机会很少。虽然同位素实验表明，脂肪酸在动物体内也可以转变成糖，但在这种情况下，需要有其他来源补充三羧酸循环中的有机酸。

在某些病理状态下，也可以观察到糖代谢与脂类代谢之间的密切关系。例如，糖尿病患者的糖代谢发生了障碍，同时也常伴有不同程度的脂类代谢紊乱。由于糖的利用受阻，体内必须依靠脂类物质的氧化来供给能量，因此，大量动用体内贮存的脂肪，运到肝脏组织内进行氧化，结果产生大量酮体，必须经血液运到其他组织，如肌肉组织，再被氧化。酮体本身多为酸性物质，血液中酮体增高时，常有发生酸中毒的危险。当饥饿时，体内无糖可供利用，也会产生与糖尿病相类似的情况，大量动用脂肪，并造成酮体过多。

4. 核酸代谢与糖、脂肪及蛋白质代谢的相互联系

核酸是细胞中重要的遗传物质,它通过控制蛋白质的合成,影响细胞的组成成分和代谢类型。一般来说,核酸不是重要的碳源、氮源和能源,虽然生物机体也能利用其中的碳、氮和能量。

许多核苷酸在代谢中起着重要的作用。例如,ATP 是能量和磷酸基团转移的重要物质。UTP 参与单糖的转变和多糖的合成。CTP 参与卵磷脂的合成。GTP 供给合成蛋白质肽链时所需要的能量。此外,许多重要的辅酶,例如,辅酶 A、烟酰胺核苷酸和异咯嗪腺嘌呤二核苷酸等,都是腺嘌呤核苷酸的衍生物。腺嘌呤核苷酸还可以转变为组氨酸。

另一方面,核酸本身的合成,又受到其他物质特别是蛋白质的作用和控制。例如,甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺参加嘌呤和嘧啶环的合成。核酸的合成除需要酶催化外,还需要多种蛋白质因子参与作用。

综合以上所述,可以看出,糖、脂类、蛋白质和核酸等物质在代谢过程中都是彼此影响,相互转化和密切相关的。三羧酸循环不仅是各类物质共同的代谢途径,而且也是它们之间相互联系的渠道。现将四类物质的主要代谢关系总结如图 39-1。

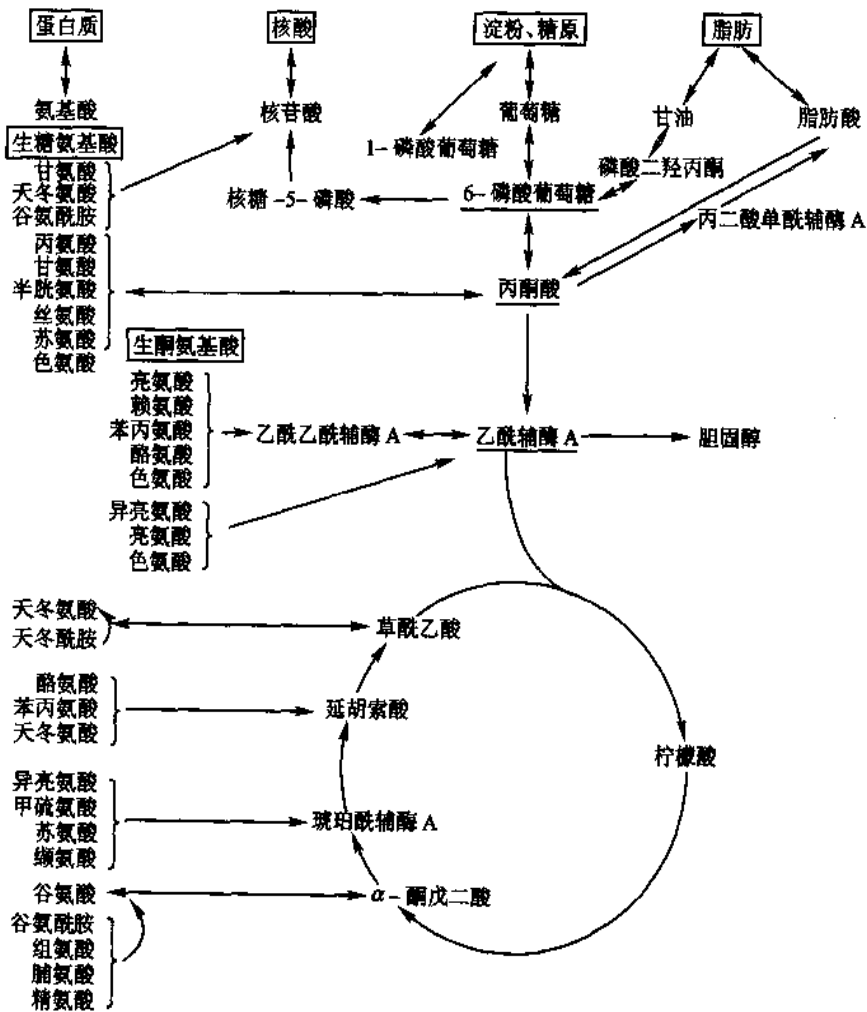


图 39-1 糖、脂类、蛋白质及核酸代谢的相互关系示意图

不同代谢途径之间虽然相互沟通,但它们各自存在控制与调节,互不干扰,转化是有节制的。

(二) 分解代谢和合成代谢的单向性

生物体内的代谢反应都是由酶催化的。任何催化剂,包括酶在内,仅能改变化学反应的速度,并不能改变化学反应的平衡点。因此,它对正反应和逆反应起着同样的促进作用。代谢途径中大量生化反应都能可逆进行。然而,实际上整个代谢过程是单向的,分解代谢和合成代谢各有其自身的途径。在一条代谢

酮基($\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{—}$)还原为亚甲基($\text{—CH}_2\text{—}$)。一般来说,细胞的有机成分比代谢终产物的还原程度高,生物合成是一个还原性的反应过程。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)是还原性生物合成的氢和电子供体。它的氧化型是 NADP^+ 。NADPH与NADH的差别仅在于腺苷部位的2'-羟基与磷酸形成酯,它们携带氢和电子的方式相似。NADH和 FADH_2 是生物氧化过程中氢和电子携带者,其主要功能是通过呼吸链产生ATP。NADPH则专一用于还原性生物合成。NADPH的作用如图39-3所示。

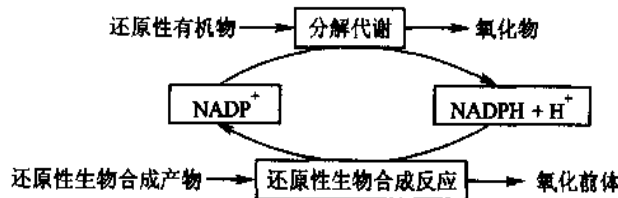


图 39-3 通过 NADPH 循环将还原力由分解代谢转移给生物合成反应

NADH 和 NADPH 的产生途径和生化功能都不相同,在 NADPH 上额外的磷酸基可作为标记,以使有关酶能区别这两类辅酶。这在细胞代谢调节和控制上是有重要意义的。

(五) 代谢的基本要略在于形成 ATP、还原力和构造单元以用于生物合成

细胞代谢包括分解代谢和合成代谢,或者说异化作用和同化作用,其基本要略在于形成 ATP、还原力和构造单元(building block),以用于生物合成。底物水平的磷酸化可以产生有限量的 ATP,绿色植物和光合细菌的光合磷酸化以及呼吸链的氧化磷酸化是 ATP 的主要来源。绿色植物经光照引起的电子传递还可用于还原 NADP^+ ;光合细菌则不能,它的 NADPH 是由外源还原剂产生或是由分解代谢供给。NADPH 主要来自戊糖磷酸途径。此外,当乙酰辅酶 A 由线粒体转移到细胞溶胶伴随有 NADH 的氧化和 NADP^+ 的还原,所产生的 NADPH 可用于脂肪酸合成(图 39-4)。

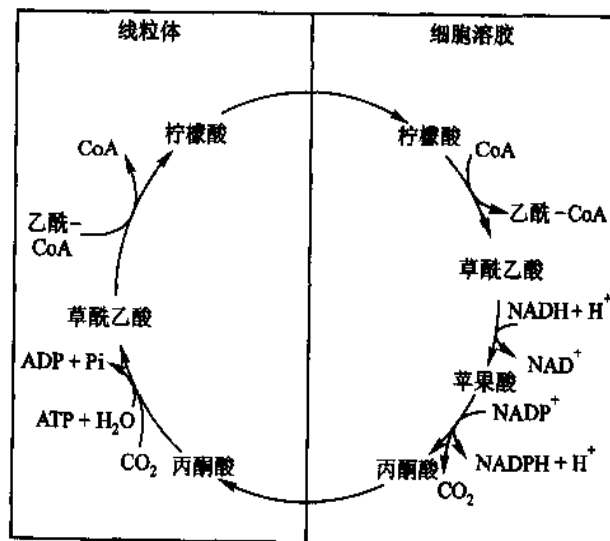


图 39-4 乙酰辅酶 A 由线粒体转移到细胞溶胶伴随有 NADH 的氧化和 NADP^+ 的还原

分解营养成分以产生能量和构造材料,大致可分为三个步骤。第一步,将大分子降解成小分子单位。蛋白质被水解成 20 种氨基酸,多糖水解成葡萄糖和其他简单的糖,脂肪水解成脂肪酸和甘油。这一步释放的能量不能被利用。第二步将各种构造单元分子进一步分解并转变成共同的降解产物乙酰辅酶 A,在

这一阶段可产生还原力 NADPH 和少量 ATP。第三步,乙酰辅酶 A 通过三羧酸循环被完全氧化成 CO_2 , 每个二碳单位给出 4 对电子, 经氧化磷酸化产生大量 ATP(图 39-5)。

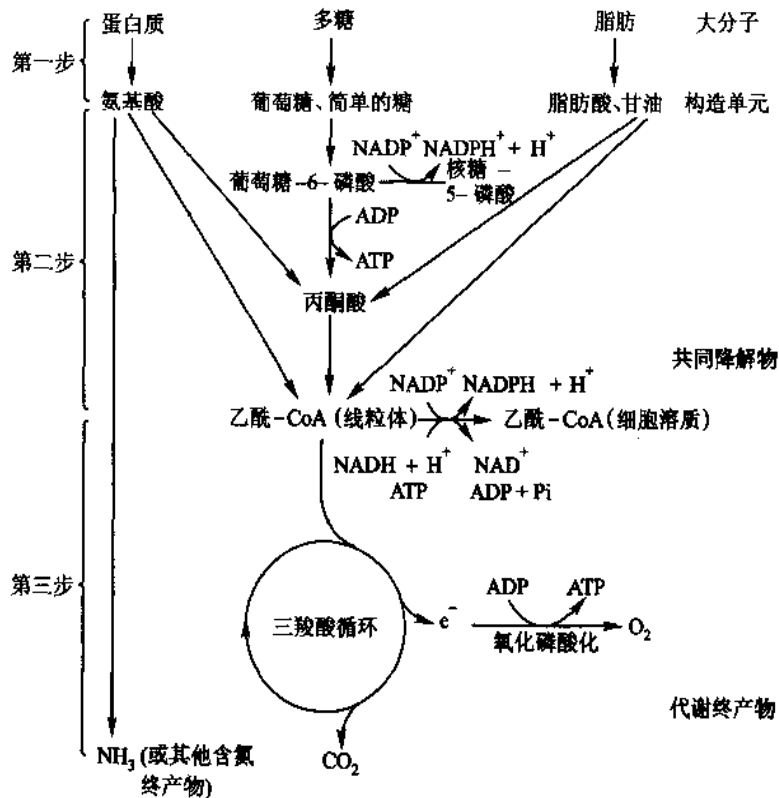


图 39-5 主要产能营养物质分解代谢的三个步骤

由 ATP、NADPH 和构造单元可合成各类生物分子, 并进而装配成生物不同层次的结构。生物合成和生物形态建成是一个耗能和增加有序结构的过程, 需要由物质流、能量流和信息流来支持。

二、酶活性的调节

以上叙述了生物机体内存在着相互联系, 而又错综复杂的代谢过程。不难想象, 如果这些过程是杂乱无章的, 生物也就不能生存; 代谢过程必然存在精确的调节机制。生物机体的代谢是和机体的内外环境分不开的, 生物具有适应环境的能力, 当内外条件改变时, 生物机体能调整和改变其体内的代谢过程, 建立新的代谢平衡, 以适应变化了的环境, 因而能生存和发展。因此代谢平衡是动态的、相对的, 平衡是通过调整和变动达到的, 机体不断地在进行代谢过程的调节和控制, 生物机体也正是在这种不断地运动中才能得到发展, 得到生存。显然, 生物机体对代谢过程的调节控制是生物长期进化过程中, 通过自然选择而逐步建立的。

生物体内的各种代谢变化都是由酶驱动的。酶有两种功能: 其一, 催化各种生化反应, 是生物催化剂; 其二, 调节和控制代谢的速度、方向和途径, 是新陈代谢的调节元件。酶对细胞代谢的调节主要有两种方式: 一种是通过激活或抑制以改变细胞内已有酶分子的催化活性; 另一种是通过影响酶分子的合成或降解, 以改变酶分子的含量。这种“酶水平”的调节机制, 是代谢的最关键的调节。虽然, 代谢底物和代谢产物都对代谢反应有影响。质量作用定律表明, 反应速度与反应物的摩尔浓度乘积成正比。因此, 增加代谢底物的浓度, 将促进正向反应; 反之, 增加代谢产物的浓度, 将促进逆向反应。代谢物的浓度在一定范围内对代谢反应起着调节作用。然而, 代谢物的这种调节作用是有限的, 细胞代谢主要受到酶的调节。不同细胞对代谢物的反应有显著差别, 这是由细胞内不同酶系统所决定的。

生物体内的代谢调节机制随着生物的进化而发展。细胞结构的进一步分化加强了细胞对代谢的调节

和控制。细胞需要接受环境信息,以便作出反应。多细胞生物为协调体内各细胞的代谢活动,发展了细胞之间进行信息传递的机制。在高等动物中,细胞间的信息联系主要由两个系统进行:一个是神经系统,一个是体液(humor)系统。体液系统通过其特定细胞产生活性有机物质——激素,从而对生物机体起调节作用。它们或是改变细胞内酶的活性,或是改变细胞膜的通透性,影响细胞的代谢。比神经调节原始的代谢调节是激素的调节。而最原始也是最基本的代谢调节,则是酶活性和酶含量的调节。

酶活性的调节包括酶的变构效应和共价修饰两种方式。而酶的合成则属于基因表达调控,放在后面再作介绍。本节侧重介绍酶促反应的前馈和反馈,能荷的调节,连锁代谢反应中酶连续激活。

(一) 酶促反应的前馈和反馈

前馈(feedforward)和反馈(feedback)这两个术语来自电子工程学。前者意思是“输入对输出的影响”,后者意思是“输出对输入的影响”。这里分别借用来说明代谢底物和代谢产物对代谢过程的作用。前馈或反馈又可分为正作用和负作用两种。凡反应物能使代谢过程速度加快者,称为正作用;反之,则称为负作用。下面图解表明前馈和反馈,S代表底物,有 $S_0, S_1 \dots S_n$ 等先后出现的各种底物;E代表酶,有 E_0, E_1, E_n 等先后出现的不同的酶;“+”表示正作用,“-”表示负作用。

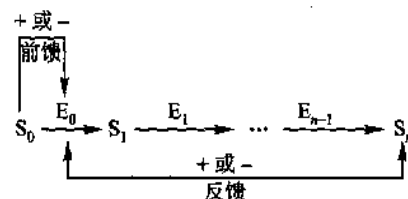


图 39-6 酶促反应的前馈和反馈

通常,代谢物对代谢反应具有促进作用。在代谢途径中前面的底物对其后某一催化反应的调节酶起激活作用,称为正前馈作用。正前馈的例子很多,例如,在糖原合成中,葡萄糖-6-磷酸是糖原合成酶的变构激活剂,因此,可促进糖原的合成(图 39-7)。二磷酸果糖对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的激活作用也是正前馈作用。

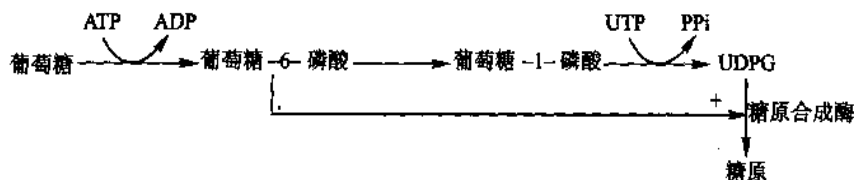
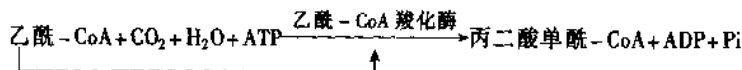


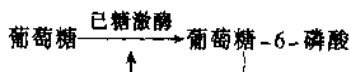
图 39-7 葡萄糖-6-磷酸对糖原合成的正前馈作用

在某些特殊的情况下,为避免代谢途径的过分拥挤,当代谢底物过量存在时,对代谢过程亦可呈负前馈作用。此时过量的代谢底物可以转向另外的途径。例如,高浓度的乙酰辅酶A是乙酰辅酶A羧化酶的变构抑制剂,因而避免丙二酸单酰辅酶A过多合成。反应式如下:



代谢反应产物使代谢过程速度加快者称为正反馈;反之则为负反馈。下面举一些例子来说明代谢过程中的反馈:

例一,葡萄糖的磷酸化:



当葡萄糖-6-磷酸累积太多时,反应就慢下来,这不仅与质量作用效应有关,还存在酶的变构调节作用。

例二,大肠杆菌中胞苷三磷酸(CTP)浓度的反馈作用如图 39-8 所示。

本例图解中,如果胞苷三磷酸的利用率低,而胞苷三磷酸的浓度高时,即出现反馈抑制。如果胞苷三磷酸的利用率高,而胞苷三磷酸的浓度低时,即不出现反馈抑制。

例三,氨基酸生物合成的反馈控制。

一价或单价反馈抑制(monovalent feedback inhibition)是指一个单一代谢途径的末端产物对催化关键步骤的酶活性,通常是第一步反应酶活性的抑制作用。在分支生物合成中,有时催化共同途径第一步反应的酶活性可被两个或两个以上的末端产物所抑制,则称为二价或多价反馈抑制(divalent or multivalent feedback inhibition)。另有一种情况是,关键步骤的反应由两个或两个以上的酶所催化,这些酶称为同工酶,它们可被各自分支途径的产物所抑制。

例四,谷氨酰胺合成酶接受多条代谢途径的末端产物的反馈抑制,这些代谢途径的末端产物有甘氨酸、丙氨酸等(图 39-10)。

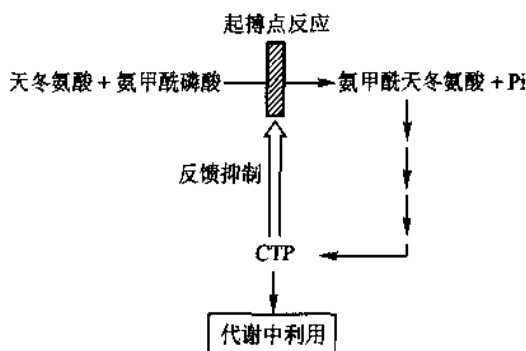


图 39-8 大肠杆菌胞苷三磷酸浓度的反馈抑制

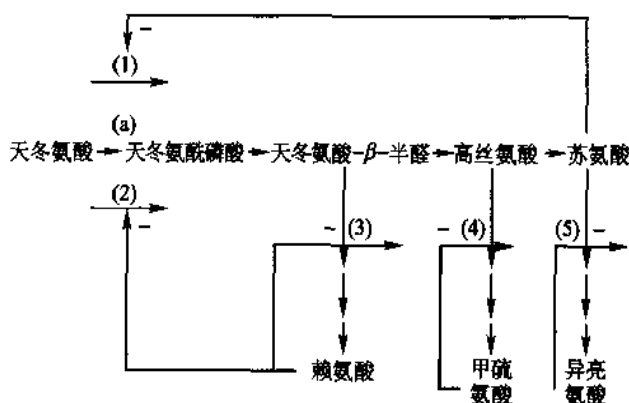


图 39-9 氨基酸合成的反馈抑制

(1)(2)(a)为天冬氨酸同工酶。(1)苏氨酸单价的反馈抑制(2)赖氨酸单价的反馈抑制;(3)(4)(5)赖氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸对相应的酶的反馈抑制

例五,磷酸烯醇式丙酮酸的羧化反应如图所示(39-11)。

代谢物对酶活性的调节,不仅表现为反馈抑制,也可以表现为对酶的激活。在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶活性的调节,就存在这种代谢物的激活作用。磷酸烯醇式丙酮酸通过羧化反应,形成草酰乙酸。这是复杂分支代谢的共同第一步。由草酰乙酸可以转变成各种氨基酸和核苷酸。另一方面,草酰乙酸还可以促使乙酰辅酶 A 通过三羧酸循环而被氧化。

草酰乙酸作为合成氨基酸和核苷酸的前体物质,能被产物连续地进行反馈抑制。即当嘧啶核苷酸积累时,其合成途径第一步反应的酶受到抑制,这就导致天冬氨酸的积累,进而对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性产生反馈抑制。然而,对于三羧酸循环中柠檬酸的合成,又必须有草酰乙酸参加。从而产生了三种正调节,对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶进行激活,即(1)嘧啶核苷酸的反馈激活,(2)乙酰辅酶 A 的反馈激活,(3)前体果糖-二磷酸的前馈激活。

此外,乙酰辅酶 A 还能增加磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶对嘧啶核苷酸的亲和力,从而促进了它们的反馈激活效应。这样,通过错综复杂的调节系统,就能使磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应处于最适当的水平。

(二) 产能反应与需能反应的调节

细胞内许多代谢反应受到能量状态的调节。ATP 是通用的能量载体,ADP 是形成 ATP 的磷酸受体。ATP、ADP 和无机磷酸盐广泛参与细胞的各种能量代谢。通常产能反应与 ADP 的磷酸化相偶联,需能反应则与 ATP 高能磷酸键的水解相偶联。因此 ATP 与 ADP 和 P_i 的浓度比值 $[ATP]/[ADP][P_i]$,成为细胞能量状态的一种指标,被称作 ATP 系统的质量作用比(mass-action ratio)。在正常状态下,该比值是很高的,

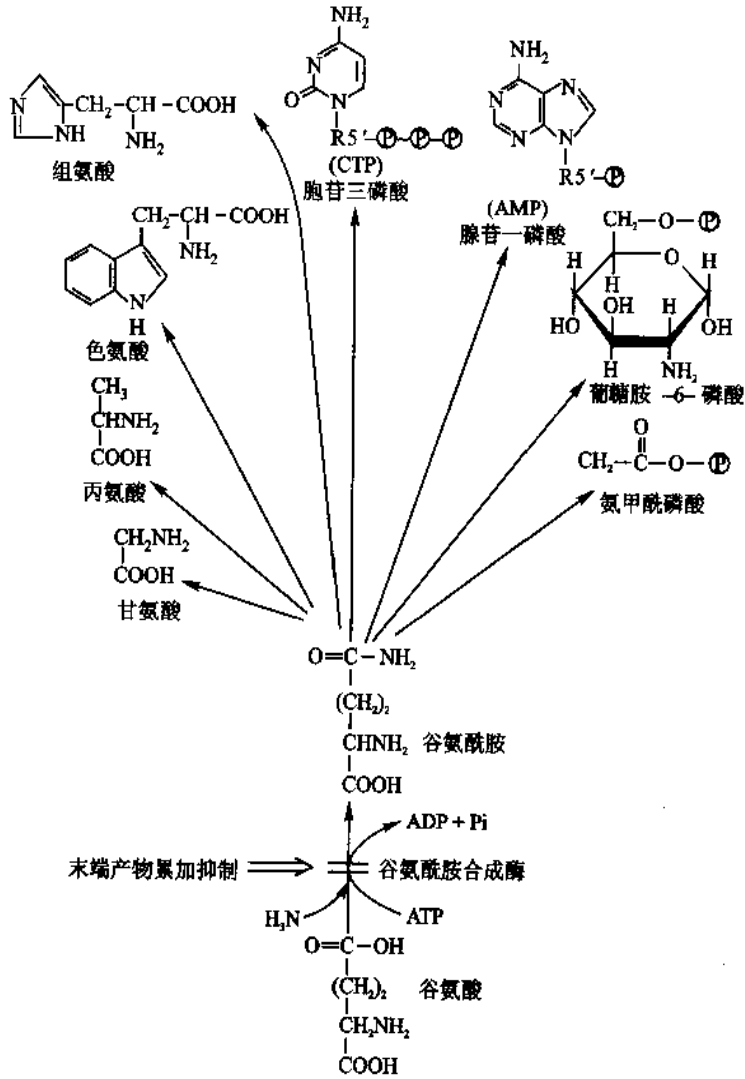


图 39-10 谷氨酰胺的合成受多种代谢产物累加的反馈抑制

ATP-ADP系统总是充分被磷酸化。这使ADP的浓度变得非常低,远不足以使氧化磷酸化达到最大速度。此时ATP的合成速度足够用来维持细胞的一般需要。但当某些需要ATP的细胞活动突然增加时,ATP迅速分解成ADP和磷酸盐,从而降低 $[ATP]/[ADP][P_i]$ 比值。ADP浓度的增加即能自动增加电子传递和氧化磷酸化的速度,从而加速由ADP合成ATP的反应。该过程一直持续到 $[ATP]/[ADP][P_i]$ 比值返回正常的高水平,于是氧化磷酸化的速度再次降低。正常情况时,细胞有机物氧化速度的调节极其灵敏和精确,以至多数组织即使对能量要求有较大变动时 $[ATP]/[ADP][P_i]$ 比值仍然仅有略微波动。ATP通常仅在细胞需能活动时迅速合成。

ATP、ADP和磷酸盐不仅参与产能和需能的反应,通过质量作用效应而调节能量代谢,而且还是许多重要调节酶的结构效应物。例如,在糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化途径中,ATP是抑制效应物,ADP和磷酸盐是激活效应物。因此, $[ATP]/[ADP][P_i]$ 的质量作用比值发生任何变化都将迅速引起相应调节酶活性的

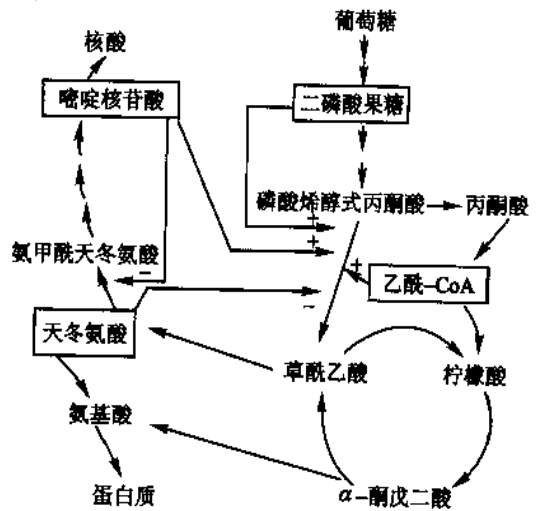


图 39-11 磷酸烯醇式丙酮酸羧化反应的调节控制

改变。而且 AMP 也是上述途径某些调节酶的激活效应物。它们对调节酶的作用见图 39-12。

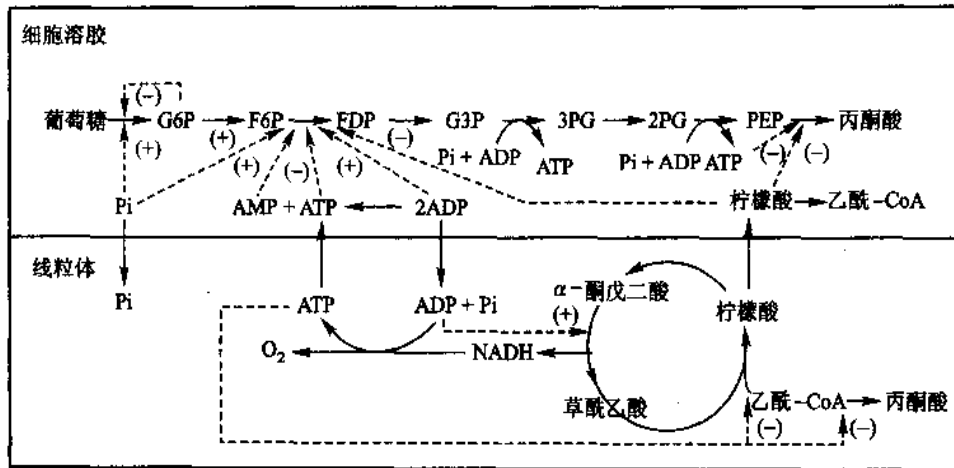


图 39-12 糖酵解与三羧酸循环途径的调节

Atkinson 建议以能荷来表示细胞的能量状态。能荷的定义为在总的腺苷酸系统中(即 ATP、ADP 和 AMP 之和)所负荷的高能磷酸基数量:

$$\text{能荷} = \frac{[\text{ATP}] + 1/2[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

当所有腺苷酸充分磷酸化为 ATP 时,能荷值为 1.0;如所有腺苷酸“卸空”成为 AMP 时,能荷则等于零。正常情况下细胞的能荷大约为 0.9,变动范围从 0.85 ~ 0.95。能荷是腺苷酸总池中 ATP 或其当量的物质的量的分数;由于 AMP 激酶催化二分子 ADP 转化成一分子 ATP 和一分子 AMP,故 ADP 只相当于 1/2ATP。在某些条件下,能荷值可作为细胞产能和需能代谢过程间变构调节的信号。

(三) 酶活性的特异激活剂和抑制剂

酶活性受到多种离子和有机分子的影响,尤其是特异的蛋白质激活剂和抑制剂在酶活性的调节中起重要作用。例如,钙调蛋白,它能感受细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,当钙的水平升高时即激活许多种相关蛋白质。

凝血(clotting)是一个十分复杂的过程,存在精确的调节(图 39-13)。一方面必须在伤口处迅速使血液凝固,防止继续出血(hemorrhage);另一方面又必须使血液凝固局限于损伤部位,防止形成血栓(thrombosis)。一旦出现血液栓塞,溶栓系统即可将其水解,但又要避免伤口处血凝块被水解。凝血和溶栓系统的成分大多为丝氨酸蛋白酶,通过特异肽键的水解而使有关成分依次被激活,形成级联反应(cascade)。其间有诸多蛋白质激活剂和抑制剂进行精确调节。血友病是一种凝血缺陷的遗传病,它以性连锁隐性方式遗传。生化遗传研究表明,该遗传病是由于凝血因子Ⅷ(抗血友病因子)失活或活性显著降低所致。Ⅷ本身并不是蛋白酶,但能促进 IX_a 对 X 的激活,IX_a 与 X_a 均为丝氨酸蛋白酶。X_a 对

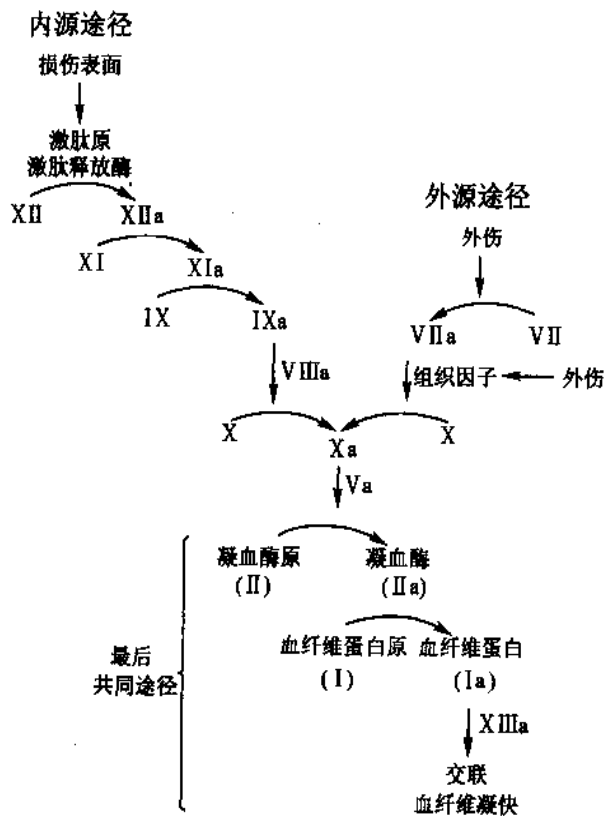


图 39-13 凝血级联系统

VII 的局部水解能激活 VII 的活性,这是对凝血信号的正反馈放大,以加速凝血块的形成。 X_a 与 V_a 形成酶复合物,促使凝血酶原(因子 II)活化为凝血酶(II_a),在这里 V_a 也不是蛋白酶,但为促进 X_a 的活性所必需。凝血酶在凝血过程中起着关键的作用,它裂解血纤维蛋白原(因子 I),生成血纤维蛋白(I_a)和血纤肽 A 与 B。血纤维蛋白单体可通过头尾交错相接自动聚合成血纤维蛋白多聚体。与此同时,因子 VII 也被凝血酶激活,它催化转酰胺基反应,使血纤维蛋白多聚体发生共价交联,血凝块得以稳固。凝血酶还能活化黏附于血管损伤处的血小板,导致血小板聚集形成止血栓。

血浆中存在多种丝氨酸蛋白酶抑制剂,在正常生理状态下它能阻止凝血发生,维持血液流动;当血管受损时又能在凝血过程不同阶段发挥调节作用,阻碍后续的凝血过程,从而限制血凝块扩大,防止血液堵塞。抗凝血酶 III(AT-III)是其中重要的一种,它除主要抑制血酶和因子 X_a 外,也抑制因子 VII_a 、 IX_a 、 XI_a 、 XII_a 等。AT-III 对凝血酶等丝氨酸蛋白酶的抑制作用是通过其活性部位的精氨酸与这些蛋白酶催化部位的丝氨酸以共价键结合来完成的,因此抑制作用是不可逆的。肝素可与 AT-III 结合,使其构象改变,活性部位的精氨酸更加暴露,因而促进 AT-III 的抑制作用。肝素是一种直链型阴离子黏多糖聚合物,临床上用作抗凝药物。血浆中还含有 α_1 -抗胰蛋白酶,它与抗凝血酶 III 均属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)家族,但二者的特异性不同。 α_1 -抗胰蛋白酶这一名称并不恰当,其实它主要抑制弹性蛋白酶。外伤常引起血浆中 α_1 -抗胰蛋白酶活性增加,用以抵消中性白细胞在受刺激后过量产生弹性蛋白酶。

凝血过程的另一重要调节系统是蛋白 C 抗凝系统,包括蛋白 C、蛋白 S 和血栓调节蛋白(TM)。蛋白 C 以无活性的丝氨酸蛋白酶原形式存在,它被凝血酶部分水解而活化,这一过程有赖于 TM 参与作用。活化的蛋白 C 具有很强的抗凝活性,它在膜磷脂、 Ca^{2+} 和辅助因子蛋白 S 的参与下,降解因子 VII_a 和 V_a ,从而使凝血因子在活化后迅即失活,勿使凝血过程持续长时间作用。

类似例子,不胜枚举。总之,细胞内酶活性可以通过特异的激活剂和抑制剂进行精确调节。

(四) 蛋白酶解对酶活性的影响

不少蛋白质在合成之初并无活性,需将一个或少数几个特异肽键切开后才被活化。蛋白酶解是一个不可逆的过程,而且无需供给能量。最为熟知的例子是消化酶的激活,胃和胰腺合成的蛋白酶,如胃蛋白酶、糜蛋白酶、胰蛋白酶、羧肽酶及弹性蛋白酶,都是以酶原的形式存在,分泌到消化管后才被酶切激活。

有些蛋白质激素以无活性前体形式被合成。例如,胰岛素是由胰岛素原经蛋白酶除去一段 C 肽才被激活。一些多肽激素,如垂体激素,其前体经蛋白酶加工,切成许多小肽,才成为有活性激素。

纤维状的胶原蛋白(collagen)是皮肤和骨骼的主要成分,它的前体是可溶性的前胶原蛋白(procollagen)。动物变态涉及胶原蛋白的分解,在此过程中无活性的胶原蛋白酶原定时转变为有活性的胶原蛋白酶。

前面已经提过,凝血过程是由一个系列凝血因子连续激活引起的。凝血因子都是一些丝氨酸蛋白酶或其激活剂,由此构成蛋白酶解激活的级联反应。通过级联反应,一方面能够对外伤作出瞬间放大效应;另一方面也便于调节,能够有效控制凝血的速度和进程。凝血酶(因子 II_a)在启动凝血系统的同时也启动了抗凝(通过蛋白 C)和溶栓(通过纤溶酶原激活剂)系统,以防止血凝块的扩大。纤溶酶原受组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)和尿型纤溶酶原激活剂(u-PA)的酶解激活,它们也都是丝氨酸蛋白酶,并受特异丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)的抑制。

(五) 酶的共价修饰与连续激活

酶的可逆共价修饰是调节酶活性的重要方式。其中最重要、最普遍的调节是对靶蛋白的磷酸化。催化此反应的酶称为蛋白激酶,由 ATP 供给磷酸基和能量,磷酸基转移到靶蛋白特异的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上。蛋白的脱磷酸是由蛋白磷酸酯酶催化水解反应将磷脱下。磷酸化和脱磷酸分别由不同酶促反应来完成,以便于对反应的控制。生物在进化过程中选择磷酸作为调节酶和其他蛋白质活性的共价修饰基团,有结构上的原因,也有热力学和动力学上的原因。首先,磷酸基在细胞内容易得到。再者,在生理条件下磷酸基解离给被修饰的蛋白增加两个负电荷,其影响将显著改变蛋白质与其他分子的相互作用。

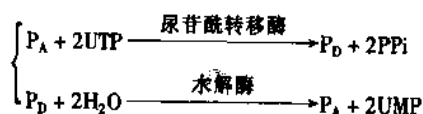
此外磷酸基可以形成三个氢键,使其在反应中能够高度定向。从反应的自由能变化来看,ATP 水解成 ADP 和 P_i 提供 -30.54 kJ/mol (-7.3 kcal/mol),其中的一半消耗于为使磷酸化不可逆,另一半保留于磷酸化的蛋白质中,使得脱磷酸也同样不可逆。最后,磷酸化和脱磷酸反应可发生在不到 1 s 的时间,或超过数小时,从动力学上它们可被调节在生理过程的范围内。

磷酸化反应具有高度放大效应,1 个活化的激酶能够在很短时间内催化数百个靶蛋白的磷酸化,新被激活的激酶又能激活下一个激酶,由此引起级联激活,信号呈指数递增,迅速达到生理效果。共价修饰导致的级联激活与前述蛋白酶解级联激活不同。第一,酶原激活只能发生一次,在传递信号后该酶随即被降解掉,而共价修饰在除去修饰基团后还可反复使用。第二,酶解无需提供能量,共价修饰需要提供能量,从而增加了控制的环节。第三,酶解激活的种类比较有限,共价修饰更加多种多样,尤其是磷酸化,可以引起蛋白质构象的种种变化,这就是为什么蛋白激酶被最广泛用于从原核生物到真核生物细胞信号转导途径的原因。

酶的磷酸化和脱磷酸作用,主要在细胞信号转导途径中进行;而腺苷酰化和脱腺苷酰作用 (adenylation and deadenylation) 则是细菌中共价修饰调节酶活性的另一种重要方式,其中以大肠杆菌谷氨酰胺合成酶(GS)研究得比较清楚。谷氨酰胺合成酶催化谷氨酸、 NH_4^+ 和 ATP 合成谷氨酰胺。它由 12 个完全相同的亚基(亚基相对分子质量为 50 000),有规则地排列成两层六角环的结构,每个亚基含有与底物反应的催化部位和结合效应物的别构部位。此外各个亚基的酪氨酸残基上还能进行可逆的腺苷酰基化,完全腺苷酰化可结合 12 个 AMP,完全和部分腺苷酰化的酶是低活性的,只有全部脱腺苷酰的酶才是高活性的。该酶在中间代谢中起着关键的作用,通过调节氮代谢而影响细胞的许多反应。谷氨酰胺的酰胺基是合成 AMP、CTP、色氨酸、组氨酸、氨甲酰磷酸及葡萄糖胺-6-磷酸等化合物氮的来源,它的氨基可为转氨反应中形成的甘氨酸和丙氨酸提供氮源。谷氨酰胺合成酶活性受到上述 8 种终产物的积累反馈抑制,并且在腺苷酰化后提高了对这些反馈抑制剂的敏感性,致使酶分子具有对多种信号敏感反应的调节特性。

腺苷酰化酶的 AMP 单位来自 ATP;共价结合的 AMP 单位可通过磷酸解而脱去,并产生 ADP。这两个反应都是由腺苷酰转移酶 (adenyltransferase) 催化完成的(图 39-14)。腺苷酰转移酶的特异性是由调节蛋白 P 所控制,该调节蛋白以两种形式存在,分别称为 P_A 和 P_D 。 P_A 与腺苷酰转移酶的复合物催化谷氨酰胺合成酶的腺苷酰化反应; P_D 与腺苷酰转移酶的复合物则催化脱腺苷酰反应。而调节蛋白 P 本身又受到尿苷酰化和脱尿苷酰的可逆共价修饰。 P_A 通过尿苷酰化而转变成 P_D ,催化该反应的酶为尿苷酰转移酶(uridyl transferase),酶活性受 ATP 和 α -酮戊二酸激活,并受谷氨酰胺抑制。 P_D 的尿苷酰基可被酶水解下来。

调节蛋白 P 通过尿苷酰化和脱尿苷酰反应而改变其调节作用的特异性:



在此调节级联反应中,谷氨酰胺合成酶活性不仅受终产物的反馈调节,还要受到体内 α -酮戊二酸、谷氨酰胺、UTP、ATP 和无机磷等代谢物的控制。例如,ATP 和 α -酮戊二酸使尿苷酰转移酶发生正变构,导致脱腺苷酰高活性谷氨酰胺合成酶的增加,当谷氨酰胺浓度上升时,对尿苷酰转移酶起负调控作用,此时谷氨酰胺合成酶处于腺苷酰化低活性状态。所以谷氨酰胺与 α -酮戊二酸的比值 ($\text{Gln}/\alpha\text{-K}_g$) 对谷氨酰

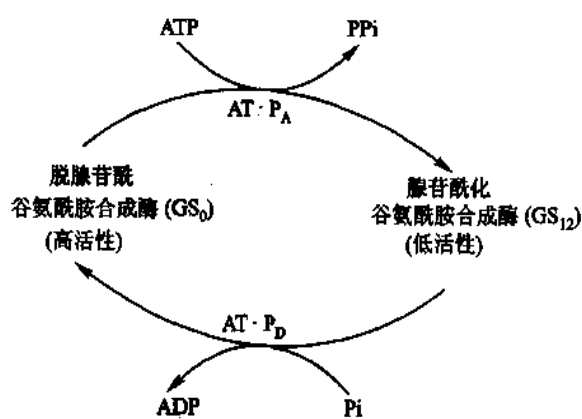


图 39-14 谷氨酰胺合成酶的活性通过可逆共价修饰进行调节
 $\text{AT} \cdot P_A$ 腺苷酰转移酶与调节蛋白 P_A 的复合物; $\text{AT} \cdot P_D$ 腺苷酰转移酶与调节蛋白 P_D 的复合物; GS_0 完全脱腺苷酰的谷氨酰胺合成酶; GS_{12} 12 个亚基全部腺苷酰化的谷氨酰胺合成酶

胺合成酶的活性起调节作用。细胞内代谢反应对氮源十分敏感,而 $\text{Gln}/\alpha\text{-Kg}$ 可看作是 NH_4^+ 浓度的灵敏指标。当 NH_4^+ 过量时, α -酮戊二酸被消耗用于合成谷氨酰胺, $\text{Gln}/\alpha\text{-Kg}$ 比值增大,谷氨酰胺朝向 8 种不同的终产物代谢,在这些终产物达到一定浓度后分别对谷氨酰胺合成酶进行反馈抑制,直至完全的积累抑制,此时谷氨酰胺合成酶完全腺苷酰化并对终产物反馈抑制极度敏感。当 NH_4^+ 浓度不足时,谷氨酰胺合成减少, $\text{Gln}/\alpha\text{-Kg}$ 比值下降,随之 8 种终产物的浓度也下降,终产物的负反馈变构抑制因而被解除,此时在 α -酮戊二酸与 UTP 共同作用下导致谷氨酰胺合成酶脱腺苷酰,使酶活性迅速呈指数地增高,以补充缺乏的谷氨酰胺。

除上述磷酸化、腺苷酰化和尿苷酰化等共价修饰外,还有其他种类的化学改变和级联反应,这里不再一一赘述。

三、细胞结构对代谢途径的分隔控制

细胞具有精细的结构,真核生物的细胞还具有由膜包围的各种细胞器,如核、内质网、线粒体、高尔基体和溶酶体等。组成细胞结构的基本生物大分子是核酸、蛋白质、脂类和多糖。生物大分子彼此特异地结合而成超分子复合物,再由这些复合物装配成细胞本身的结构和细胞器。生物大分子装配所需的信息可能完全包含在大分子内,例如,多聚体酶(multimeric enzyme)、多酶复合物、核糖体、拼接体(spliceosome)和简单的病毒颗粒等,所有这些结构都是由大分子相互作用所能达到的最小自由能状态所决定。但也有一些细胞结构装配所需信息除大分子携带外,还必须由先存结构(preexisting structure)提供,例如染色体、细胞壁和膜等。这种装配是在原有结构的基础上加入新的成分,原有结构对装配起着指导作用。蛋白质在合成后立即定位于细胞的特定部位,各类酶也同样在细胞中有各自的空间分布,或是与细胞的某些结构(膜、颗粒或纤维)相结合,或是存在于胞液内。因此,酶催化的代谢反应得以有条不紊、各不相扰地进行,而且相互协调和制约,受到精确的调节。

(一) 细胞结构和酶的空间分布

细胞有原核细胞和真核细胞之分。支原体、细菌和蓝藻都属于原核细胞,这类细胞的膜结构比较原始。真核细胞是指一般动植物细胞,例如酵母细胞等,具有核结构的细胞。真核细胞的膜结构比较复杂。现在以动物的肝细胞为例,按照肝细胞的电镜切面图,作出肝细胞的简明图解如图 39-15A。

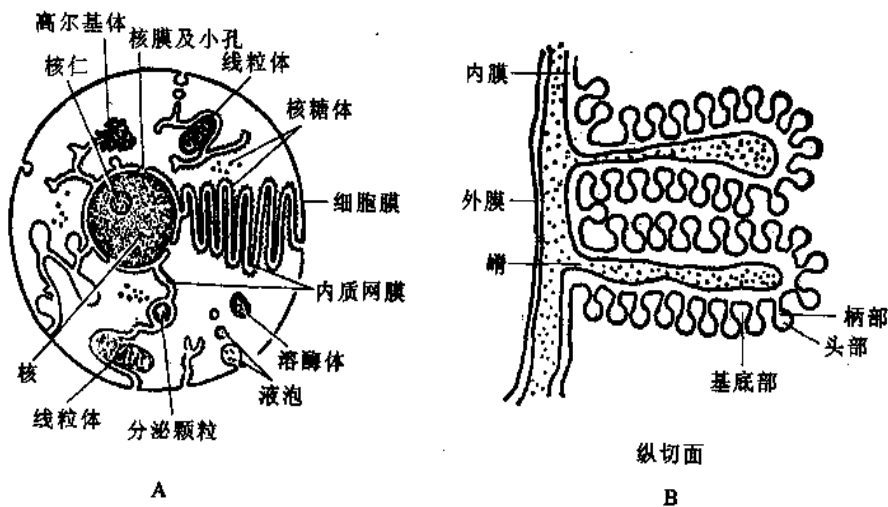


图 39-15 动物细胞图解(A)和线粒体两层膜图解(B)

细胞膜或称质膜(cytolemma),是细胞与外界环境的屏障,它控制着细胞与环境之间的物质、能量和信息交换。细胞膜的主要功能为:①离子和中性化合物的选择性运输。细胞膜还具有胞吞(endocytosis)和胞

吐作用(exocytosis)。②不同形式能量间的转换,例如,光能转化为化学能,化学能转化为电能等。③通过膜受体将信号由胞外转导至胞内。

细胞内部由双层核膜将原生质分成细胞核和细胞质两大结构与功能区域。细胞核是遗传信息的贮存场所,在这里进行基因复制和转录,从而控制着细胞的代谢活动。细胞核的主要结构有核膜、核仁、染色质及核液等。核膜上富有大量酶类,其中除与糖、脂、蛋白质代谢及核膜运输有关的酶外,还存在与DNA复制、RNA合成、加工与修饰等的酶。核膜可能直接参与于各种生化反应的定向进行。染色质是指间期细胞DNA和蛋白质等组成的复杂结构,DNA盘绕组蛋白八聚体形成核小体,念珠状核小体链又进一步盘绕与折叠成螺旋化程度不同的异染色质和常染色质。常染色质折叠疏松,能进行复制与转录;异染色质折叠紧密,不进行转录,复制较晚才发生。核仁是由RNA、DNA和蛋白质组成的丝状和颗粒状结构,在其中合成与加工rRNA,并与蛋白质装配成核糖体亚基。在核内合成的RNA分子经适当加工后通过核膜上的核孔进入细胞质中。

在细胞质内以膜的分化为基础形成很多重要的细胞器。胞液(cytosol)是指细胞质的连续水相部分,约占细胞总体积的55%,细胞器即悬浮其中。大部分中间代谢都在胞液中进行,其中包括糖酵解、糖原异生的许多反应、磷酸葡萄糖酸途径,以及糖、脂肪酸、氨基酸和核苷酸的生物合成。此外,它还含有多种细胞骨架蛋白,以维持细胞外形,造成附着其上的细胞质运动,并且提供了一种框架以便于促使胞液中的许多酶促反应。胞液重量的20%为蛋白质,因此,它更像是一种高度有组织的胶状物质,而不是简单的酶溶液。如糖酵解的酶类被认为附着在质膜内侧的部位。不难设想,脂肪酸生物合成的酶类和酰基载体蛋白(ACP)等,在胞液中也占有一定的位置。在胞液中还分散着许多脂肪小滴(droplet),在脂肪细胞中这种小滴几乎充满了整个胞液。另有许多糖原颗粒存在,与糖原代谢有关的酶类结合在颗粒的表面。脂肪和糖原都是作为供能物质而被贮备的。在胞液中分布的大量核糖体是蛋白质合成的主要场所,它合成的蛋白质除提供胞液需要外,还可转移到其他细胞结构中去。

内质网由膜和膜围成的腔组成,内质网的膜可占细胞总膜的一半以上。内质网是细胞合成蛋白质、糖和脂类的场所。按基本功能和结构,内质网分为两大类型:①粗面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER)或称颗粒内质网(granular endoplasmic reticulum, GER)。其外表面附着大量核糖体,是分泌性蛋白质(如酶原、抗体、激素等)和跨膜蛋白合成的重要场所。通常认为粗面内质网上合成的分泌性蛋白质首先进入内质网的腔内,经管道和小泡输送到高尔基体进行“加工”和浓缩,再分泌到细胞之外。跨膜蛋白则在插入膜后停留在膜上。②光面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER),其上不附着任何核糖体。它与糖类及脂类的合成关系密切。除少数线粒体的磷脂外,细胞的磷脂、糖脂和胆固醇几乎都是由内质网膜上的酶类所催化合成。磷脂转移蛋白可将内质网合成的磷脂携带到线粒体上。蛋白质的糖基化通常发生在内质网膜的腔内面上。研究表明内质网可通过隘裂形成运输泡(transport vesicle),它是由内质网的膜包含腔内可溶性蛋白质所组成。当运输泡与特定靶部位的膜(质膜或细胞器的膜)相融合时,小泡的膜即成为靶部位膜的一部分,而泡内的可溶性蛋白质则释放到靶细胞器的腔内(如果靶部位是质膜,可溶性蛋白质也就分泌到细胞外)。由此可将内质网合成的大分子运输到其他部位,促使细胞各类膜的生长,并保持着膜结构的不对称性。这就可以说明为什么质膜糖蛋白的糖基总是位于细胞的外侧,因为蛋白质的糖基化发生在内质网膜的腔内面,经运输泡与质膜融合后即相当于细胞的外侧。

高尔基体也是真核细胞普遍存在的一种细胞器,它主要由光滑膜形成的一些排列整齐的扁囊(sacculle)和周围膨大的小泡(vesicle)所组成。高尔基体具有对细胞合成物或吸收物加工、浓缩、包装和运输的功能,它参与细胞的分泌和吸收过程。如上所述,内质网产生的运输泡内充满分泌性蛋白质,当小泡运行达到高尔基体生成面时,将泡内物质释放进高尔基体扁囊,小泡本身亦与扁囊融合。在高尔基体膜的腔内面上分布着加工寡聚糖的酶类,由内质网膜合成的糖基化蛋白质在这里进行糖结构的修剪。成熟的糖蛋白被包装到分泌泡中并随后排出细胞外。高尔基体还与细胞的胞饮(pinocytosis)和吞噬作用(phagocytosis)有关。当胞饮泡和吞噬泡进入细胞质后通常移向高尔基体,并和高尔基体形成的初级溶酶体结合。

溶酶体的膜形成囊泡状结构,其内含有水解酶类。不同溶酶体所含水解酶的比例及数量各不相同。

溶酶体的主要功能为消化、吸收、防御以及吞噬作用和细胞自溶作用。

线粒体具有极为复杂的膜结构,有外膜和内膜之分。外膜含有形成大通道的蛋白,因此相对分子质量在 10 000 以下的一般分子均能通过。内膜折皱形成嵴,其上分布大量结构蛋白与酶类,主要为与呼吸链有关的细胞色素和氧化还原酶、ATP 合成酶以及调节代谢物进出的运输蛋白。内膜包围的内腔充满基质,其中含有数百种不同的酶类,包括丙酮酸氧化脱羧、脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环以及氨基酸分解代谢有关的酶类。进行这许多代谢过程的酶体系都有一定的空间分布,它们如何排列,如何形成和代谢,能量如何转化,以及线粒体如何分裂等等,都有待深入研究。

现在把糖、脂类、蛋白质及核酸代谢的相互关系(见图 39-1),以及动物细胞的膜结构(见图 39-15B)结合起来,作成另一个图解,表明动物细胞膜结构和物质代谢的联系(图 39-16)。在这个图解中,表明了细胞质膜内侧和细胞质膜外侧的物质交换,用“来回箭头”表示。细胞质近质膜处进行酵解和脂肪酸的生物合成,在颗粒型内质网膜上进行蛋白质的生物合成。细胞核、核仁和有孔的核膜的附近,表示出 DNA 和各种 RNA。线粒体内进行三羧酸循环,电子传递和氧化磷酸化,以及脂肪酸的 β -氧化。线粒体膜内侧和细胞质之间也有物质交换,也用“来回箭头”表示。

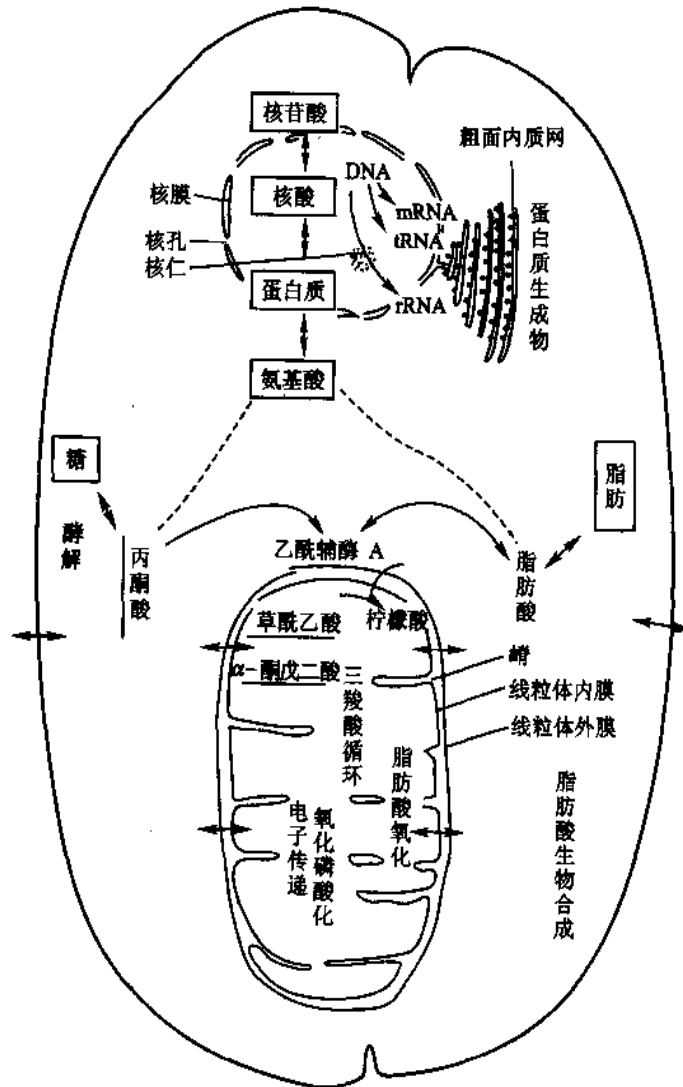


图 39-16 动物细胞膜结构和物质代谢的联系图解(质膜、核及核仁、内质网、线粒体)

(二) 细胞膜结构对代谢的调节和控制作用

膜结构既是细胞结构的基本形式,也是生命活动的主要结构基础。在真核细胞中膜结构占细胞干重

的 70% ~ 80% 左右,除质膜外还有广泛的内膜系统,将细胞分隔成许多特殊区域,形成各种细胞器。原核细胞缺乏内膜系统,但某些细胞的质膜内陷形成中体或质膜体(mesosome)。各种膜结构对代谢的调节和控制作用有以下几种形式:

1. 控制跨膜离子浓度梯度和电位梯度

由于生物膜的选择透性,造成膜两侧的离子浓度梯度和电位梯度,因此当离子逆浓度梯度转移时,需要消耗自由能,而离子沿浓度梯度转移时,则释放自由能。膜的三种最基本功能:物质运输、能量转换和信息传递无不与离子和电位梯度的产生和控制机制有关。细菌质膜和线粒体内膜可利用质子浓度梯度的势能合成 ATP 和吸收磷酸根等物质。在动物细胞以及某些植物、真菌和细菌的细胞中,Na⁺ 离子流可驱动氨基酸和糖的主动运输。神经肌肉的兴奋传导则与跨膜离子流产生膜电位有关。此外,Ca²⁺ 是重要的胞内信使,通过控制质膜、内质网膜和线粒体内膜的 Ca²⁺ 通道蛋白,可以调节细胞不同区域的代谢功能。例如,在静息的骨骼肌中,肌浆 Ca²⁺ 浓度为 10⁻⁷ ~ 10⁻⁸ mol/L,大量的 Ca²⁺ 被贮存在肌浆网中(浓度达 10⁻³ mol/L)。当肌膜兴奋时,它的去极化作用传导到肌浆网,使其中 Ca²⁺ 迅速释放,肌浆 Ca²⁺ 浓度上升到 10⁻⁵ mol/L,从而触发肌肉收缩。收缩过后,肌浆中的 Ca²⁺ 又被肌浆网的钙泵利用水解 ATP 释放的能量主动吸收入肌浆网中,恢复并维持该两区域的 Ca²⁺ 浓度。

2. 控制细胞和细胞器的物质运输

细胞膜由于具有高度的选择透性,使细胞不断从外界环境中吸收有用的营养成分,并排出代谢废物,维持了细胞恒定的内环境,细胞代谢得以顺利进行。细胞器同样需要吸收代谢底物,转移出代谢产物。细胞膜和细胞器膜中的运输系统担负着与周围环境的物质交换。通过运输系统可以控制底物进入细胞或细胞器,从而调节细胞内该物质的代谢。实验证明,葡萄糖进入肌肉和脂肪细胞的运输是它们利用葡萄糖的限速过程。胰岛素可以促进肌肉及脂肪细胞对葡萄糖的主动运输,这也是它能降低血糖,促进肌肉和脂肪细胞中糖的利用、糖原合成和糖转变为脂肪的重要因素。某些载体在代谢底物运入细胞器中起着关键作用。

3. 内膜系统对代谢途径的分隔作用

内膜系统将细胞分成许多功能特异的分隔区,各自以封闭的选择透性膜为界。这些分隔区成为分开的亚细胞反应器,其内包含有一套浓集的酶类和辅助因子,因而有利于酶促反应的进行。而且,细胞内的分隔可防止互不相容或竞争性的酶促反应彼此间的干扰。例如,一般的蛋白质是在胞液和内质网膜表面的核糖体上合成,然而不需要的蛋白质是在溶酶体中水解。脂肪酸代谢中乙酰辅酶 A 的分解代谢和以乙酰辅酶 A 为原来的脂肪酸合成分别在线粒体和胞液内进行。过氧(化)物酶体(peroxisome)是说明分隔意义的极好例子。这是一种由膜包围的胞浆小体,它含有各种氧化酶类和过氧化氢酶,当氧化产生对细胞有毒害的过氧化氢时,即被小泡内的过氧化氢酶所分解,从而避免对细胞的损害。显然,细胞分隔还有利于对不同分隔区代谢途径的调节。

4. 膜与酶的可逆结合

有些酶能可逆地与膜结合,并以其膜结合型和可溶型的互变来影响酶的性质和调节酶活性。这类酶称为双关酶(ambiguous enzyme),以区别于膜上固有的组成酶。双关酶对代谢状态变动的应答迅速,调节灵敏,是细胞代谢调节的一种重要方式。就目前所知这类酶大多是代谢途径中关键的酶或调节酶。例如,糖酵解途径中的己糖激酶、磷酸果糖激酶、醛缩酶及 3-磷酸甘油醛脱氢酶;氨基酸代谢的谷氨酸脱氢酶、酪氨酸氧化酶,以及一些参与共价修饰的蛋白激酶、蛋白磷酸酯酶等。

双关酶与膜结合和溶解状态的构象不同,其理化性质和动力学参数也都有差异。如己糖激酶的两类型对 ATP 的 K_m 值不同,可溶性酶的 K_m 为 0.035 mmol/L,与线粒体外膜结合的酶 K_m 为 0.1 mmol/L,当 ATP 浓度较低时,选择性地显示可溶性酶的活性;当 ATP 浓度较高时,则选择性地显示膜结合酶的活性。细胞内 ATP 浓度的变化还可通过酶的双关性,调节酶与膜的结合。ATP 浓度在 0.1 mmol/L, ~ 0.035 mmol/L,有利于己糖激酶结合于膜上;ATP 浓度大于 0.1 mmol/L,酶便从膜上脱落下来,成为可溶性酶。ATP 经消耗,浓度下降,酶又结合到膜上。膜结合酶是高活性的,使糖的有氧分解得以高效进行,但当 ATP 量积累过多时,酶以低活性的可溶型形式存在,限制了糖的有氧分解代谢的进行,如此周而复始循环

变化。由此可见,细胞内 ATP 浓度的变化,可通过这种双关酶膜结合型/可溶型比值的改变来调节糖代谢流量和去向。此外,己糖激酶的产物葡萄糖-6-磷酸又是酶的反馈抑制物,其两种类型的 K_i 值也不同。结合于线粒体外膜的己糖激酶其对葡萄糖-6-磷酸的 K_i 为 0.035 mmol/L;可溶性酶的 K_i 为 0.007 mmol/L,因此该酶的不同状态受到不同水平的反馈抑制。

双关酶很易受一些因素的影响,离子、代谢物或调节物的存在都会影响酶与膜的结合。激素能够调节这些具双关性的酶的行为,改变两种类型酶的比例。实验表明,己糖激酶与线粒体的结合需要胰岛素;而肾上腺素则有相反效应。

(三) 蛋白质的定位控制

蛋白质是细胞结构的主要组成物质,它参与并控制所有代谢过程。在细胞中蛋白质主要是在细胞质核糖体上合成。数以千计的蛋白质合成以后分送到细胞各部分进行补充和更新。由于细胞各部分结构都有特定的蛋白组分,因此,合成的蛋白质必须定向地并准确无误地进行运送才能保证细胞活动的正常运行。由于细胞或亚细胞结构和细胞器都被膜所包围,分泌蛋白和膜蛋白需经跨膜运送才能到达各自特定部位。分泌蛋白和膜蛋白大都含有一部分甚至很大一部分亲水性氨基酸残基,它们是如何克服能量上的障碍,而穿过疏水的脂双层膜的? 各类蛋白质又是依靠什么信息来进行识别,从而“各就各位”发挥其正常功能的? 这是十分令人关注的问题。在蛋白质定位控制的模型中。Blobel 和 Dobberstein 于 1975 年提出的“信号假说”(signal hypothesis)最有说服力。近年来的研究,包括蛋白质序列分析、信号肽酶的发现、信号识别体与其受体的纯化等,均为这一假说提供了实验证据,并使这一学说趋于完善,Blobel 也因此而获得 1999 年诺贝尔生理学 and 医学奖。分泌蛋白和一些膜蛋白在信号肽的引导下进入内质网,分泌蛋白最终被分泌到胞外。线粒体蛋白和细胞核蛋白也在导肽和核定位序列指导下到达各自部位。有关蛋白质定位控制,见蛋白质生物合成一章。

四、细胞信号传递系统

前面三节分别介绍了底物水平、酶水平和细胞结构水平的代谢调节。随着生物的进化,代谢调节机制也跟着得到发展。多细胞生物增强了细胞间的信息交流,发展了化学信号分子对各类细胞代谢的调节。动物机体的神经系统和神经调节也随着不断发展而完善起来。激素调节是比神经调节较为原始的一种调节方式,但二者都体现了机体水平的代谢调节。无论是激素调节或是神经调节,都作用于细胞并通过信号转导系统而发挥作用。从分子水平来看,激素和神经递质并无本质的区别,调节肽即是神经组织及内分泌组织均可产生和释放并起着同样作用的化学信号分子。实际上单细胞生物就需要对环境信号作出应答,在细胞之间进行通讯,影响彼此的繁殖,或进行有性接合。有关激素的作用已有专门章节作介绍,这里不再重复。本节主要介绍神经兴奋的传导以及化学信号的转导系统。

(一) 门控离子通道和神经信号的传导

神经细胞,或称为神经元(neuron),可以接受、处理和传导信号。有关的信号通过电兴奋传播波作为动作电位(action potential)或神经脉冲(nerve impulse)而沿着神经元的质膜迅速传播。神经元的电信号依赖于离子通过膜通道引起的膜电位变化。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵由分解 ATP 获得的能量不断排出 Na^+ 和吸收 K^+ , 从而使细胞内 Na^+ 浓度远低于细胞外,而 K^+ 浓度则远高于细胞外,从而贮存大量能量以驱使离子运动。在静息神经元中,膜的 K^+ 选择渗漏通道使 K^+ 的透性远大于其他离子,因而静息电位,即静止条件下的膜电位约为 -60 mV 接近于 K^+ 的平衡电位 -75 mV 。动作电位是由电位门控离子通道(voltage-gated ion channel),主要是 Na^+ 通道的暂时打开而产生的。具有许多 Na^+ 通道的膜由于瞬间刺激而局部去极化,某些通道迅即被打开,使 Na^+ 得以进入细胞。带正电荷的离子流进一步使膜去极化,因此打开更多通道,允许更多 Na^+ 流进细胞。该过程以自我扩增的方式继续下去,直到膜电位由静息值达到 $+30 \text{ mV}$ 。此时 Na^+ 流的净电化学驱动力为零,细胞处于一种新的休止状态。随后由于 Na^+ 通道的自动失活而逐渐关闭,直到

膜电位恢复原先的静息值。整个循环过程,从最初刺激到恢复原来的静息状态,发生在几毫秒或更短的时间内。动作电位可沿神经纤维传播。

许多类型的神经元(并非全部,哺乳类有髓鞘的轴突即是例外)由于质膜存在门控 K^+ 通道而加速恢复。与 Na^+ 通道相似, K^+ 通道可因膜的去极化而打开,但其反应相对较慢。当 Na^+ 通道因失活而关闭时,增加膜对 K^+ 的透性,将有助于膜迅速回到 K^+ 平衡电位,因而恢复静息状态。膜的重新极化,使 K^+ 通道再次关闭,并使 Na^+ 通道从失活状态下恢复。这就使细胞膜能在少于 1 ms 时间内准备好对第二次去极化刺激的反应。

门控离子通道有两类:一类是电位门控通道,另一类是配体门控通道(ligand-gated channel)。电位门控通道,如 Na^+ 通道、 K^+ 通道和 Ca^{2+} 通道,它们由一条肽链组成,但分成多个主结构域和亚结构域,跨膜部分形成 α -螺旋,中央部分为离子通道。配体门控通道即由化学信号激活而开放的离子通道,如乙酰胆碱受体通道、氨基酸受体通道、单胺类受体通道和 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道等等,主要是神经递质(neurotransmitter)控制的通道, Ca^{2+} 作为胞内信使亦能激活通道受体。它们通常由多个亚基所组成,除受体亚基外即是通道的本身。两种类型门控通道的作用方式见图 39-17。

神经元之间或神经元与靶细胞(如肌肉细胞)之间的接触部位称为突触(synapse)。现在知道,某些神经元之间的突触可以直接传递电信号,称为电突触;但大多数突触以神经递质来传递信号,称为化学突触。神经递质贮存于轴突末梢的突触泡(synaptic vesicle)内。当神经脉冲到达末梢时,膜电位降低(去极化)造成暂时打开前突触膜(presynaptic membrane)的电位门控 Ca^{2+} 通道。由于细胞外的 Ca^{2+} 浓度远大于细胞内游离的 Ca^{2+} 浓度, Ca^{2+} 大量流入神经末梢(终末),刺激突触泡与前突触膜融合,神经递质被释放到突触裂隙(cleft)内。游离 Ca^{2+} 浓度的升高是短暂的,因为 Ca^{2+} 结合蛋白、隔离 Ca^{2+} 小泡和线粒体能迅速摄取进入轴突末梢的 Ca^{2+} 。神经递质经扩散到达突触后细胞(postsynaptic cell),并与其膜受体相结合。神经递质的受体有两类:一类是配体门控离子通道,它将化学信号又重新转变为电信号;另一类受体通过胞内信使调节细胞代谢,最后引起各种生理效应。存在于突触裂隙的神经递质迅即被酶分解,或被分泌它的前突触膜重吸收。

神经递质的种类很多,除乙酰胆碱外还有各种单胺类和氨基酸和肽类等,其中有些是兴奋性的,有些是抑制性的。例如,骨骼肌细胞膜的乙酰胆碱受体是一种单价阳离子通道,对 Na^+ 和 K^+ 有较小的选择性;当乙酰胆碱与其结合后即被打开,在细胞膜去极化达到阈值时,触发动作电位,因而属于兴奋性作用。而 γ -氨基丁酸(GABA)受体则介导抑制性作用,它打开时允许小的负离子(主要是 Cl^-)通过,而正离子是不可通过的。 Cl^- 的浓度在细胞外大于细胞内,相应于 Cl^- 的平衡电位接近于正常静息电位或更负一些。当 Cl^- 通道打开时,膜电位即保持在非常负的甚至超极化的值上,使膜难于去极化,因此难于使细胞兴奋。

不同神经递质有不同类型的受体,而同一神经递质也可能有不同类型的受体。例如,乙酰胆碱作用于骨骼肌细胞和心肌细胞引起截然相反的效应。前者是兴奋性的,后者是抑制性的,因为二者的受体不同。乙酰胆碱作用于骨骼肌细胞膜受体,打开阳离子(Na^+)通道,从而引起动作电位传播和肌肉细胞收缩,如图 39-18 所示。

中枢神经系统的兴奋和抑制信号可通过不同方式传导给各种靶细胞。在突触部位,神经末梢通过释放神经递质而将信号专一地传给突触后细胞。然而,在某些情况下,神经末梢释放的化学介质可以局部作用于邻近许多细胞膜受体,这种信号介质称为神经调质(neuroregulator),神经肽有调节靶细胞的生理状态和代谢活动的作用。此外,神经末梢释放的活性物质还可以进入血液而作用于其他组织。如促进肾上腺

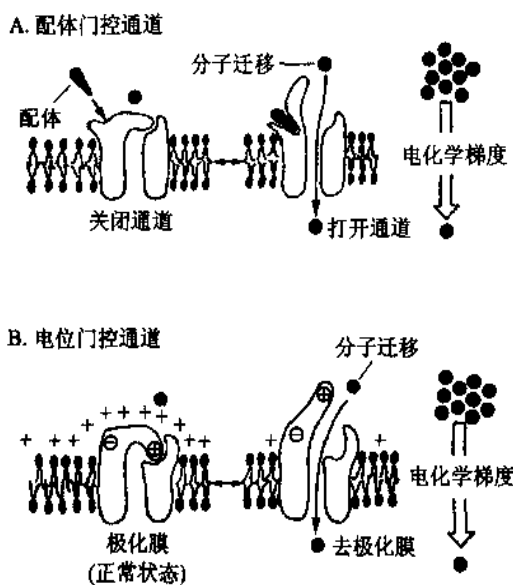


图 39-17 两种类型门控离子通道示意图

- A. 配体门控通道在与胞外配体结合时打开
B. 电位门控通道在膜去极化时打开

髓质和下丘脑肽能神经元的分泌等。这类作用方式称为神经内分泌(neuroendocrine)或神经-体液性(neuro-humoral)分泌。总之,神经组织对靶细胞膜透性和细胞代谢的调节可通过神经递质、局部调质和循环激素三种作用方式进化。

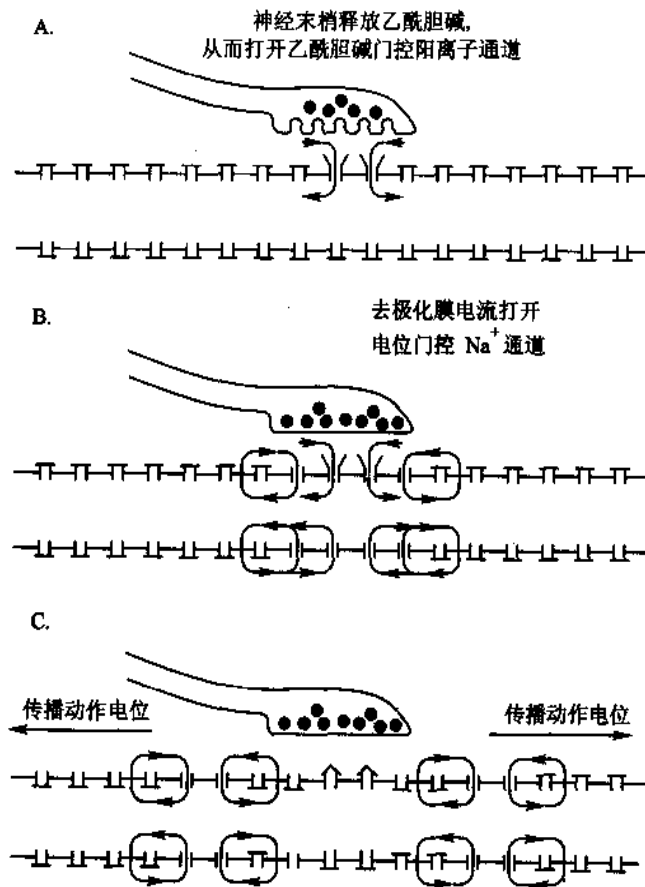


图 39-18 图解表示在神经肌肉接头处由乙酰胆碱打开离子通道,引起动作电位沿肌肉细胞膜传播,并造成肌肉细胞收缩

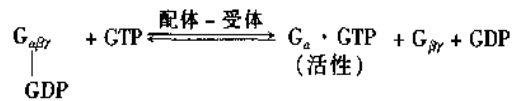
(二) 激素和递质受体的信号转导系统

细胞产生的信号分子(即内源配体),包括激素,神经递质和调节肽等,在释放后可以三种方式作用于膜受体,即自分泌(autoocrine)、旁分泌(paracrine)和内分泌(endocrine)。自分泌的信号分子作用于分泌细胞自身,如神经末梢分泌的递质可作用于前突触膜的递质受体,以进行反馈调节。旁分泌的产物或经细胞外液或经细胞间隙接头(gap junction)局部作用于邻近细胞,如神经组织和内脏器官分泌的调节肽。内分泌的产物则在释放后经血液流到特定器官作用于靶细胞受体。跨膜信号传递(transmembrane signalling)过程中,信号分子仅作用于质膜受体,经受体介导将信号传给胞内,一般信号分子本身并未进入细胞。

细胞质膜上化学信号分子的受体可分为三大类:第一类受体是依赖于神经递质的离子通道(neurotransmitter-dependent channel),或称为配体门控离子通道。它与电位门控通道不同,配体门控离子通道多为数个亚基组成的寡聚体蛋白质,并含有受体亚基;电位门控离子通道仅一条多肽链,可感受电场变化而控制通道的开头。属于这一类的受体有:烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)、 γ -氨基丁酸(GABA)受体、谷氨酸受体(Glu R)和甘氨酸受体(Gly R)等。第二类受体与信号转导蛋白(GTP结合蛋白或G蛋白)相偶联,例如,肾上腺素能 α -受体、肾上腺素能 β -受体和毒蕈碱型乙酰胆碱受体(mAChR)等。它们多为单链多肽,当与激素或神经递质结合后,经G蛋白将信息转给效应器,产生第二信使,才能激活细胞内有关的酶系统。第三类则包括一些生长因子的受体,例如,表皮生长因子(EGF)受体、血小板衍生的生长因子(PDGF)受体、成纤维细胞生长因子(FGF)受体以及胰岛素受体等。它们的主要特点是具有酪氨酸蛋白激

酶(TPK)活性,当它们与各自相应的生长因子结合后,该酶活性即被激活,从而构成信号转导的重要环节。

现在已经分离出多种 G 蛋白,它们分别介导不同的信号转导系统(表 39-1)。对腺苷酸环化酶起调节作用的 G 蛋白有两种: G_s 和 G_i ,分别偶联刺激性(stimulatory)受体(如肾上腺素能 β -受体)和抑制性(inhibitory)受体(如肾上腺素能 α -受体和毒蕈碱型乙酰胆碱受体)与环化酶。前者促进 cAMP 生成;后者抑制 cAMP 生成。作用于磷酸肌醇系统的 G 蛋白称为 G_p 。刺激视网膜 cGMP 磷酸二酯酶的转导蛋白称为 G_t 。还有一些其他的 G 蛋白。所有这些 G 蛋白都是由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成,迄今已知 α 亚基有 21 种, β 亚基 5 种, γ 亚基 11 种,使 G 蛋白富有多样性。不同种类 G 蛋白的 α -亚基都有鸟苷酸结合区,可与 GDP 结合。当受体与其相应配体结合后,诱导 α -亚基构象变化,促进 GDP 与 GTP 变换,此步骤需要 Mg^{2+} 。GTP 的结合导致 α -亚基与 β 、 γ -亚基分开, α -亚基激活并作用于效应器,产生胞内信使,引起各种细胞反应。 α -亚基有 GTP 酶活性,在 Mg^{2+} 存在下水解 GTP,产生的 α -亚基与 GDP 复合物重新与 β 、 γ -亚基结合,使 G 蛋白失活。该过程可简单用反应式表示如下:



G 蛋白的 α -亚基可被共价修饰而改变活性。某些细菌毒素催化其依赖 NAD 的腺二磷核糖基化(ADP-ribosylated),如霍乱毒素(cholera)催化 NAD 的腺二磷核糖基转移到 $G_{s\alpha}$ 的精氨酸残基上,结果抑制 GTP 酶活性,加强 GTP 对 G 蛋白的活化,从而导致腺苷酸环化酶持久活化,肠表皮细胞内 cAMP 水平持续性升高,引起大量 Na^+ 和水外流到肠腔造成严重腹泻。相反,百日咳毒素(pertussis)催化 $G_{i\alpha}$ 的半胱氨酸腺二磷核糖基化,阻断 GTP 和激素对 G_i 的活化,使之丧失抑制功能。

表 39-1 G 蛋白介导的生理效应

信号分子	受体	G 蛋白	效应器	生理效应
肾上腺素	β -肾上腺素能受体	G_s	腺苷酸环化酶	糖原分解
5-羟色胺	5-羟色胺受体	G_s	腺苷酸环化酶	记忆和学习
光	视紫质	G_t (转导素)	cGMP 磷酸二酯酶	视觉兴奋
气味剂	嗅觉受体	G_{ar}	腺苷酸环化酶	嗅觉
lMet 肽	趋化因子受体	G_q	磷脂酶 C	趋化
乙酰胆碱	毒蕈碱受体	G_i	抑制腺苷酸环化酶 活化钾通道	起搏变慢

磷酸肌醇系统是不经过腺苷酸环化酶的另一信使系统。当毒蕈碱型乙酰胆碱受体、肾上腺素能 α -受体、组胺受体、5-羟色胺受体、多肽激素受体以及生长因子受体与其激素或递质结合时,能通过 G 蛋白活化效应器磷脂酶 C,引起特异磷脂酰肌醇二磷酸(PIP_2)的水解,产生三磷酸肌醇(IP_3)和二脂酰甘油(DAG)。由这两种物质作为第二信使,导致胞内游离 Ca^{2+} 浓度瞬间增加,蛋白激酶 C 活化,以及鸟苷酸环化酶活化等一系列级联反应。

Ca^{2+} 是一种广泛存在的胞内信使,对细胞反应起着重要的调节作用。通常动物细胞溶质中游离 Ca^{2+} 的浓度很低($\leq 10^{-7}$ mol/L),与细胞外的浓度($\geq 10^{-3}$ mol/L)相差一千倍以上。这是由于质膜上存在的 Ca^{2+} 泵由 ATP 供给能量将 Ca^{2+} 排出细胞外;内质网膜和线粒体内膜结合的 Ca^{2+} -ATP 酶泵能够摄取大量的 Ca^{2+} 。此外,某些小分子(如磷酸盐)和大分子(如钙调蛋白)亦能结合游离的 Ca^{2+} 。上述受体的活化,都将导致胞内游离 Ca^{2+} 增加,或是从胞外跨膜流入胞内,或是从胞内 Ca^{2+} 储库释放到胞液。对神经细胞,似乎主要是前者;而对肝、胰、血小板、平滑肌及腺细胞等,受体活化首先引起质膜磷脂酰肌醇的水解,生成的三磷酸肌醇扩散到胞质,诱发 Ca^{2+} 从胞内储库(主要是内质网)释放,这过程称为 Ca^{2+} 动员(Ca^{2+} -mobilization),造成 Ca^{2+} 浓度的瞬间增加。

信使 Ca^{2+} 在胞内的调节机制与一系列钙结合蛋白有关。 Ca^{2+} 与钙调蛋白(CaM)结合,使 CaM 转变成

活性构象,大大提高了与靶酶的亲和力。已知许多酶和蛋白质依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$,其中包括几种蛋白激酶、磷酸酯酶、核苷酸环化酶、 Ca^{2+} -ATP 酶泵、离子通道蛋白和肌肉收缩蛋白等,通过影响这些酶的活性,从而控制细胞反应。蛋白激酶 C(PKC)是一种依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶。正常条件下,蛋白激酶 C 以无活性形式存在于胞液中,对 Ca^{2+} 不敏感。当细胞受刺激后,磷脂酰肌醇二磷酸水解,质膜上有瞬时二脂酰甘油积累,同时胞内 Ca^{2+} 浓度增加,促使蛋白激酶 C 由胞质转移到含磷脂的质膜内表面。在二脂酰甘油和磷脂(主要是磷脂酰丝氨酸,PS)的共同作用下,大大提高了酶对 Ca^{2+} 的敏感性,因而使蛋白激酶 C 活化。蛋白激酶 C 由一条多肽链组成。它可以引起许多底物蛋白丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化,其中包括各种受体、膜蛋白、收缩蛋白、细胞骨架蛋白、核蛋白和酶类等,从而影响细胞代谢、生长和分化。

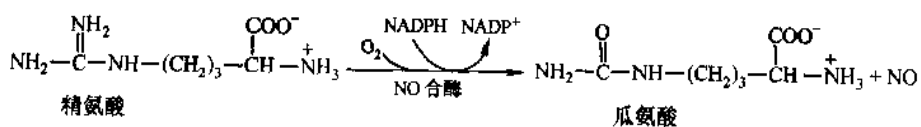
二脂酰甘油在 α -脂肪酸水解酶或磷脂酰肌醇二磷酸在磷脂酶 A_2 作用下产生花生四烯酸,后者经脂加氧酶形成两个重要的前列腺素过氧化物 PGG_2 、 PGH_2 。它们均能激活鸟苷酸环化酶(GC),使 cGMP 浓度升高。cGMP 通过激活多种酶及依赖于 cGMP 的蛋白激酶而发挥生理效应。依赖于 cGMP 的蛋白激酶即蛋白激酶 G(PKG),它由两条相同的肽链组成,与 cGMP 结合后被活化,但二聚体并不解离。蛋白激酶 G 对底物蛋白质的磷酸化方式与蛋白激酶 A 类似,只是对磷酸化丝氨酸或苏氨酸残基周围碱性氨基酸比例要求高些。但二者的激活剂和抑制剂以及活性调节作用不一样,推测它们的天然底物也不会相同。

上述蛋白激酶 A、蛋白激酶 C 和蛋白激酶 G 都属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,酪氨酸蛋白激酶(TPK)则发现较晚。目前已知的酪氨酸蛋白激酶有三类:第一类是生长因子受体,第二类是某些癌基因产物,第三类是正常细胞中非受体的酪氨酸蛋白激酶。在正常细胞中酪氨酸蛋白激酶的活性很低,但在生长旺盛、迅速分裂的细胞和癌细胞中却非常高,许多事实表明,蛋白质酪氨酸的磷酸化是细胞增殖的信号,并与细胞癌变有关。因此,这类酶的研究始终受到人们的极大关注。

表皮生长因子(EGF)受体为单条肽链,可分成三个结构域:质膜外侧 N-端肽段含糖基化部位,组成了与 EGF 的结合区;中间为疏水性的跨膜区;质膜内侧 C-端肽段具有酪氨酸蛋白激酶活性。EGF 与受体结合后使受体二聚体化并激活蛋白激酶活性,受体两条肽链交互磷酸化,成为靶蛋白的结合位点,促使靶蛋白酪氨酸残基磷酸化,从而发挥其促进细胞生长和分化的效应。同时 EGF-受体复合物还通过与 G 蛋白作用,激活蛋白激酶 C 系统,而对细胞代谢施加影响。值得指出的是,鸟类成红细胞增多症病毒(Avian Erythroblastosis Virus, AEV)癌基因编码的蛋白 $\text{P}_{65}^{\text{erb-B}}$ 与 EGF 受体有高度同源性,看起来该病毒的转化蛋白很像是 EGF 受体掐头去尾后截短的蛋白质分子,N-端失去 EGF 结合区,C-端失去自身酪氨酸磷酸化部位。由此推测,EGF 受体基因丢失了受体酪氨酸蛋白激酶的活性调节区,因而转变为一种癌基因。

胰岛素受体是一种跨膜糖蛋白,由 4 条多肽链组成,即 $\alpha_2\beta_2$ 。 α -亚基位于质膜外侧,含有胰岛素结合部位; β -亚基的 N-端肽段在质膜外侧,通过二硫键与 α -亚基结合,经一跨膜区段,其含酪氨酸蛋白激酶的 C-端肽段位于质膜内侧。受体与胰岛素结合后,无需再二聚化,立即激活酪氨酸激酶,导致 β -亚基自身以及底物蛋白酪氨酸的磷酸化,并进一步引起多种丝氨酸-苏氨酸激酶的磷酸化,从而影响代谢和基因表达。胰岛素与受体复合物除促进细胞生长的长期效应外,还能作用于 G 蛋白,导致 G_{12} 的释放并活化磷脂酶 C。胰岛素的调节机制十分复杂,它可促进葡萄糖、其他糖类和氨基酸进入肌肉和脂肪细胞;促进肌肉、肝脏和脂肪组织的合成代谢,抑制分解代谢;特别是增加糖原、脂肪酸和蛋白质的合成速度,增强糖酵解作用,引起多种效应。通过对胰岛素受体介导的信号转导作用的研究,这些复杂的调节机制正在逐步被揭露。

受体酶是多种多样的。一氧化氮(NO)受体是一种鸟苷酸环化酶,存在于细胞质内,含有一个血红素基团。NO 具有不成对的电子,因此是一种自由基气体。研究表明,它在信号转导中起着十分重要的信使作用。在生物体内,NO 由精氨酸经复杂的反应产生,催化此反应的酶是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)。NO 的合成要求 NADPH 和 O_2 ,产物还有瓜氨酸,反应式如下:



NO 是非极性的小分子,容易穿过质膜,从产生的细胞扩散到邻近的细胞中,与鸟苷酸环化酶的血红素结合,并激活酶产生 cGMP。在心脏,cGMP 促使 Ca^{2+} 离子泵将 Ca^{2+} 从胞液中排出,从而使心肌松弛。当冠状动脉梗塞,心脏因缺氧收缩引起疼痛,服用硝酸甘油片剂可缓解心绞痛。NO 十分不稳定,它产生后只在数秒钟内作用,随即被氧化生成亚硝酸或硝酸盐。硝基血管舒张药物能在几小时内不断分解产生 NO,因而能够使心肌持续松弛。

NO 具有十分广泛的生理作用,它对免疫反应、胚胎发育、心血管系统及神经信号传递等过程都起着重要的调节作用。它的大部分作用都是通过依赖于 cGMP 的蛋白激酶(PKG)途径而发生的。Furchgott R F、Ignarro L J 和 Murad F 因发现一氧化氮传递信号的机制而获 1998 年诺贝尔生理学 and 医学奖。

(三) 细胞增殖的调节

真核生物细胞分裂受生长因子、数量众多的细胞因子和各种环境因子的影响和调节。真核细胞分裂周期可分为四个时相;S 期,即合成期,DNA 经复制而使其量倍增;M 期,细胞经有丝分裂生成两个子代细胞。在 S 期和 M 期前各有一个间隙期, G_1 期用于准备 DNA 的合成, G_2 期用于准备细胞有丝分裂(图 39-19)。组织培养的动物细胞完成整个过程大约需要 24 h。

细胞周期的时间控制是由蛋白激酶系统对细胞内外信号作出反应,以改变其活性而实现的。在精确的时间间隔内由蛋白激酶系统使特异的蛋白质磷酸化,从而协调细胞代谢活性和基因表达,以产生有序的细胞分裂周期。在细胞周期控制系统中最关键的是两个蛋白质家族,其一为依赖于周期素的蛋白激酶(cyclin - depending protein kinase, CDK),它促使下游过程特定蛋白质的丝氨酸和苏氨酸发生磷酸化。另一是结合于 CDK 并活化其激酶活性的周期素(cyclin)家族。目前在动物细胞中找到的 CDK 至少有 8 种以上,分别以数字编码;周期素有 10 种以上,用英文字母来表示。例如,周期素 A 和 B 与 CDK2 的复合物对发动细胞有丝分裂是必要的,周期素 D、周期素 E、CDK2 和 CDK4 的合成受转录因子 E2F 的调节,它们共同控制着 G_1 期转向 S 期。

新合成的促细胞分裂周期素(mitotic cyclin)与 CDK 结合,所形成的复合物称为促 M 期因子(M - phase - promoting factor, MPF),其活性受磷酸化的调节。在 CDK2 上有两个磷酸化位点,Y15 为抑制位点,它的磷酸化正好掩盖了 ATP 结合位点;T161 为促进位点,它位于 T 突环肽段,磷酸化使 T 突环移开,导致底物结合位点暴露并提高了激酶活性。在活化 CDK 的激酶催化下 Y15 和 T161 先后被磷酸化,这时复合物并无活性,及至细胞分裂周期基因(cell - division - cycle gene)产物 cdc25,一种特异磷酸酯酶,将 Y15 上的磷酸基水解掉,MPF 才被活化,促使许多靶蛋白被磷酸化,导致有丝分裂的开始(图 39-20)。活化的周期素 - CDK 复合物可以使特异磷酸酯酶磷酸化而激活,通过正反馈加速复合物自身活化。另一方面激活销毁序列识别蛋白(destruction box recognizing protein, DBRP)。周期素上有一段销毁的信号序列 RTALGDIGN,可被经活化的 DBRP 识别,在其指引下由泛素(ubiquitin)连接酶使周期素带有泛素标记,从而可被由蛋白水解酶复合物构成的蛋白酶体(proteasome)所降解。

生长因子受体与配体结合后,其酪氨酸蛋白激酶活性经一系列蛋白质磷酸化级联反应,将信号传递到核内,促使细胞增殖或分化,Ras 蛋白是其中一个重要环节。Ras 是一种分子较小、单体的鸟苷酸结合蛋白,通过共价相连的异戊二烯基锚定在膜上。与前述三聚体 G 蛋白一样,当 GTP 取代 GDP 相结合时,Ras 蛋白即处于活化的构象。Ras 蛋白最终可以激活促分裂原活化的蛋白激酶(mitogen - activated protein kinase, MAPK)。由 MAPK 磷酸化细胞核转录因子,借以调节细胞增殖所需要基因的打开与关闭。受体 - Ras - MAPK 是细胞增殖信号传递的重要途径。许多细胞因子的受体不存在酪氨酸蛋白激酶的结构域,无

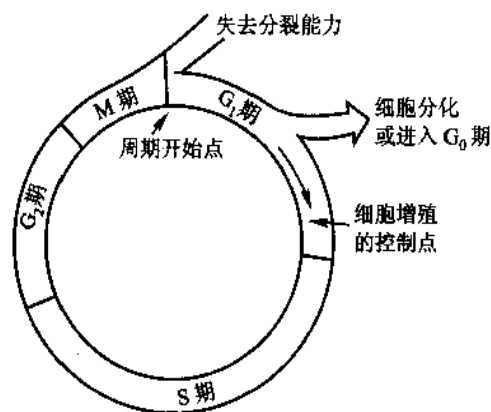


图 39-19 真核生物细胞的增殖周期
S 期:DNA 复制期 M 期:细胞分裂(有丝分裂)期
 G_1 期:DNA 复制准备期 G_2 期:细胞分裂准备期

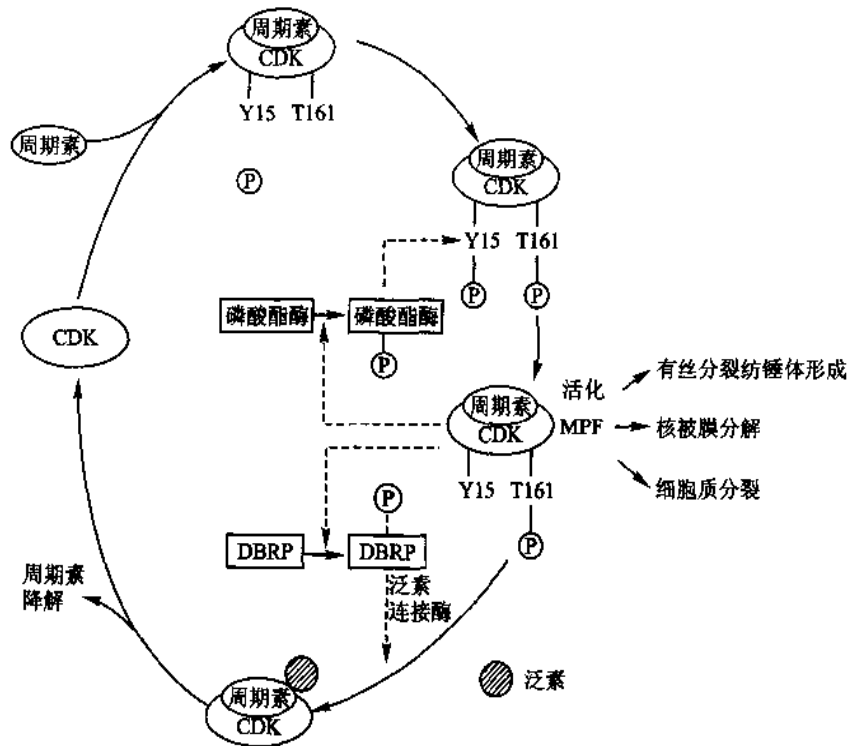


图 39-20 细胞有丝分裂启动的控制

激酶活性,它们需借助另外的激酶 JAK(just another kinase 或 janus kinase)及其底物 STAT(signal transducer and activator of transcription)。二者构成的 JAK-STAT 通路则是细胞因子信号传递最重要的一条途径。JAK 是一类非受体的酪氨酸蛋白激酶家族,能识别细胞因子受体,与之结合后发生激酶的活化。STAT 兼有转导信号和活化转录的功能,它的 SH(src homology)功能区能识别酪氨酸蛋白激酶并与其结合,介导 STAT 形成同源或异源二聚体,通过 DNA 结合区与 DNA 的特定位点结合。在 C 端有一保守的丝氨酸残基,它被 MAPK 磷酸化后能激活转录。在 N 端有一保守区,与蛋白质之间的相互作用有关,可与其他转录因子或蛋白质信号分子结合。受体-Ras-MAPK 途径与 JAK-STAT 途径之间,以及与其他途径之间均存在相互影响和作用,因而表现出对生长因子和各种细胞因子应答的多样性。

肿瘤和癌是细胞分裂失去控制的结果。正常情况下,细胞分裂受到各类生长因子的调节,使休止细胞进入分裂,在某些条件下进行分化。一旦控制细胞增殖的基因发生突变,即成为癌基因(oncogene)。原癌基因(proto-oncogene)是指可经突变转变为癌基因的细胞基因,它们通常都是编码传递信号的蛋白(signal protein),如生长因子、生长因子受体、G 蛋白及 DNA 结合蛋白等。突变可以发生在编码区,表达的癌蛋白失去调节功能,从而促使细胞恶性增殖;突变也可以发生在调控区,结果使信号蛋白异常高水平的表达。

最早发现的癌基因是鸡的肉瘤(sarcoma)基因 *src*。1909 年纽约郊区养禽场爆发一种恶性疾病,病鸡都长了肿瘤。洛克非勒研究所的 Rous P 将鸡肿瘤无细胞滤液注射给正常的小鸡,令人吃惊的是,被注射的小鸡都长出了同样的恶性肿瘤,称为肉瘤。由此 Rous 发现了劳氏肉瘤病毒,或称为禽肉瘤病毒(avian sarcoma virus, ASV)。57 年之后,Rous P 因此而获诺贝尔生理学 and 医学奖。其后的研究表明,ASV 是一种逆转录病毒(retrovirus),致癌只是病毒携带的一个基因——*src* 基因引起的。分子杂交实验说明,正常细胞内含有类似的基因,用 *c-src* 来表示,以区别于病毒的 *v-src*。此基因编码的蛋白质也就是胞质的酪氨酸激酶。正常细胞该蛋白 C 端 19 个残基被病毒蛋白的 12 个残基所取代。这就可以释译,为什么病毒 *src* 的表达产物可以持续活化,因其失去了存在于正常细胞对应 C 端的抑制区,所以它无需受体酪氨酸激酶在接受生长信号后进行磷酸化激活。换句话说,*v-src* 能够使细胞癌变,因此是一个癌基因。

逆转录病毒感染动物细胞后,其 RNA 的基因组在细胞内逆转录成 cDNA,并整合到宿主染色体 DNA 中去。如果整合部位附近存在原癌基因,经重组和转录即成为病毒基因组的一部分,由病毒携带并插入新

的宿主细胞染色体 DNA 中去,在此过程中原癌基因可突变为癌基因。因此,逆转录病毒是一种致癌 RNA 病毒。病毒致癌只是细胞癌变的一个原因。许多物理、化学因素也都能造成基因突变,使原癌基因转变为癌基因。目前已经发现为数众多的癌基因。细胞的生长和分裂存在严格的调节控制机制,并有多种监测系统,阻止细胞的过分增殖或对失控的细胞发动程序性死亡(programmed cell death)或凋亡(apoptosis)。这些防止细胞恶性生长的基因称为抑癌基因(cancer suppressor gene)。肿瘤或癌的形成,除原癌基因突变为癌基因外,还必需抑癌基因发生突变而失活,因此是多个不正常基因作用的结果。表 39-2 列出由逆转录病毒携带的几个主要的癌基因。

表 39-2 逆转录病毒的癌基因

种 类	癌基因	逆转录病毒
酪氨酸激酶	<i>abl</i>	艾贝尔逊鼠白血病病毒
	<i>erbB</i>	鸟类成红细胞增多症病毒
	<i>src</i>	鸟类肉瘤病毒(劳氏肉瘤病毒)
生长因子	<i>sis</i>	猴肉瘤病毒
生长因子受体	<i>erbB</i>	鸟类成红细胞增多症病毒
鸟苷酸结合蛋白	<i>Ha - ras</i>	哈维鼠肉瘤病毒
	<i>Ki - ras</i>	基尔施泰因鼠肉瘤病毒
核蛋白质	<i>fos</i>	FBJ 骨肉瘤病毒
	<i>myb</i>	鸟类成髓细胞性白血病
	<i>myc</i>	鸟类髓细胞血症病毒

五、基因表达的调节

蛋白质参与并控制细胞的一切代谢活动,而决定蛋白质结构和合成时序的信息编码在核酸分子中,表现为特定的核苷酸序列。所谓基因是指一段编码蛋白质多肽链和功能 RNA 的 DNA(某些病毒基因为 RNA),基因表达即是遗传信息的转录和翻译过程。生物在生长发育过程中,遗传信息的展现可按一定时间程序发生改变,而且随着内外环境条件的变化而加以调整,这就是时序调节(temporal regulation)和适应调节(adaptive regulation)。基因由此而分为两类:管家基因(housekeeping genes),其表达产物大致以恒定水平始终存在于细胞内,这类基因的表达为组成型表达(constitutive expression);可调基因(regulated genes),它们的产物只有在细胞需要时才表达,为可调型表达(regulated expression)。

基因表达的调节可以在不同水平上进行,在转录的水平(包括转录前、转录和转录后),或在翻译的水平(包括翻译和翻译后)。原核生物的基因组和染色体结构都比真核生物简单,转录和翻译可在同一时间和位置上发生,基因调节主要是在转录水平上进行的。真核生物由于存在细胞核结构的分化,转录和翻译过程在时间和空间上都被分隔开,且在转录和翻译后都有复杂的信息加工过程,故其基因表达在不同水平上都需要进行调节。

(一) 原核生物基因表达的调节

Jacob 和 Monod 等对大肠杆菌乳糖发酵过程酶的适应合成以及一系列有关突变型进行广泛深入的研究,终于在 1960—1961 年提出了乳糖操纵子模型(lac operon model)开创了基因表达调节机制研究的新领域。操纵子模型可以很好说明原核生物基因表达的调节机制。其后的大量研究工作证明并发展了这一模型,同时也发现了一些其他的调节机制。

1. 操纵子模型

所谓操纵子即基因表达的协调单位(coordination unit),它们有共同的控制区(control region)和调节系统

(regulation system)。操纵子包括在功能上彼此有关的结构基因和控制部位,后者由启动子(promoter, P)和操纵基因(operator, O)所组成。一个操纵子的全部基因都排列在一起,其中虽然包括若干个结构基因,可是通过转录形成的却是一条多顺反子 mRNA(polycistronic mRNA)。操纵子中的控制部位可接受调节基因产物的调节。

Jacob 和 Monod 提出的操纵子模型说明,酶的诱导和阻遏是在调节基因产物阻遏蛋白的作用下,通过操纵基因控制结构基因或基因组的转录而发生的。由于经济的原则,细菌通常并不合成那些在代谢上无用的酶,因此一些分解代谢的酶类只在有关的底物或底物类似物存在时才被诱导合成;而一些合成代谢的酶类在产物或产物类似物足够量存在时,其合成被阻遏(repression)。在酶诱导时,阻遏蛋白与诱导物相结合,因而失去封闭操纵基因的能力。在酶阻遏时,原来无活性的阻遏蛋白与辅阻遏物(corepressor),即各种生物合成途径的终产物(或产物类似物)相结合而被活化,从而封闭了操纵基因。酶生成的诱导和阻遏的操纵子模型可用下列图解来说明(图 39-21)。

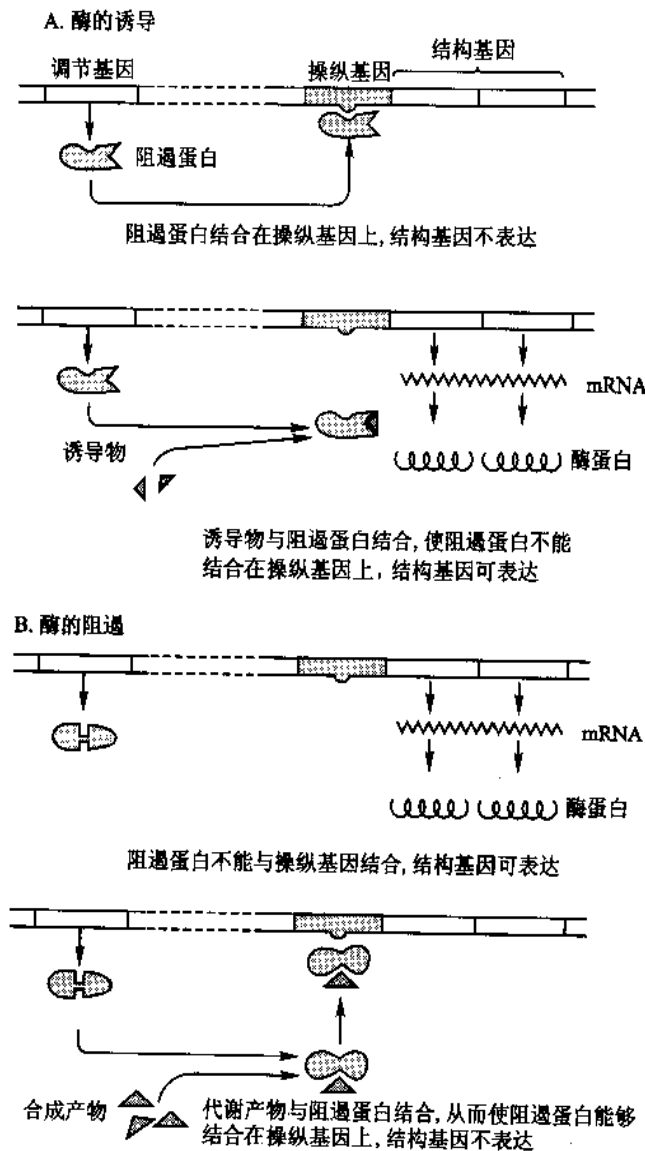
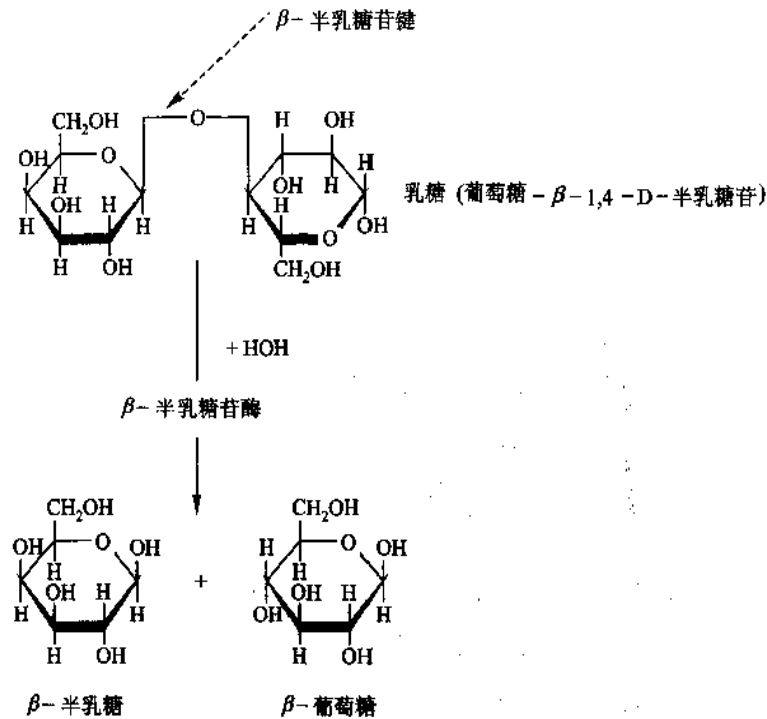


图 39-21 酶诱导和阻遏的操纵子模型

现以大肠杆菌乳糖操纵子来具体说明操纵子的作用机制。大肠杆菌能够利用乳糖作为它唯一的碳源,这就要求合成代谢乳糖的有关酶类,使乳糖能进入大肠杆菌细胞,并将乳糖水解为半乳糖和葡萄糖:

水解乳糖的酶为 β -半乳糖苷酶,催化乳糖透过大肠杆菌质膜的酶为半乳糖苷透性酶。此外,还有一个酶称为 β -半乳糖苷转乙酰酶。这三个酶都是由于乳糖作为大肠杆菌培养基中唯一碳源,而诱导生成



的诱导酶。这三个诱导酶蛋白是大肠杆菌 DNA 上乳糖操纵子的三个结构基因,经过转录和翻译而生成的。

大肠杆菌乳糖操纵子是第一个被发现的操纵子,它包括依次排列着的启动子、操纵基因和三个结构基因。结构基因 *lacZ* 编码分解乳糖的 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase), *lacY* 编码吸收乳糖的 β -半乳糖苷透性酶(β -galactoside permease), *lacA* 编码 β -半乳糖苷乙酰基转移酶(β -galactoside acetylase)。乳糖操纵子的操纵基因 *lacO* 不编码任何蛋白质,它是另一位点上调节基因 *lacI* 所编码的阻遏蛋白的结合部位。阻遏蛋白是一种变构蛋白,当细胞中有乳糖或其他诱导物(inducer)的情况下阻遏蛋白便和它们相结合,结果使阻遏蛋白的构象发生改变而不能结合到 *lacO* 上,于是转录便得以进行,从而使吸收和分解乳糖的酶被诱导产生(图 39-22)。如果细胞中没有乳糖或其他诱导物则阻遏蛋白就结合在 *lacO* 上,阻止了结合在启动子 P 上的 RNA 聚合酶向前移动,使转录不能进行。

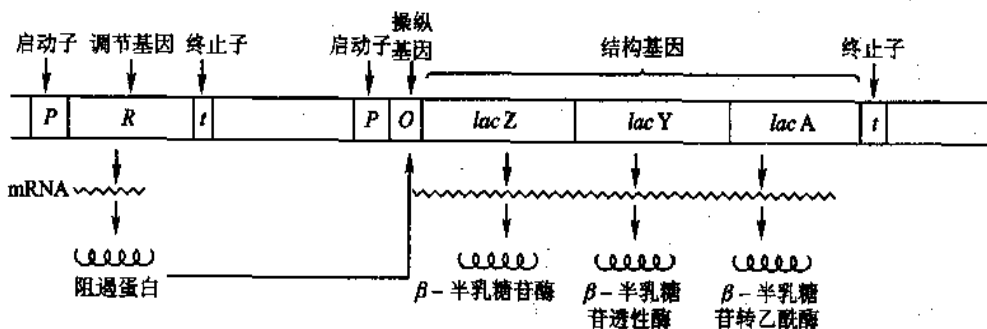


图 39-22 大肠杆菌乳糖操纵子模型

乳糖操纵子的阻遏蛋白是由 4 个相对分子质量为 37 000 的亚基聚合而成。亚基与 DNA 结合的结构域含有螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix)基序(motif),该结构常见于 DNA 结合蛋白。两个短的 α -螺旋,中间夹一个 β -转角,其中一个 α -螺旋能与 DNA 相互作用,识别操纵基因序列并与其结合,称为识别螺旋。核酸酶保护实验表明,操纵基因为一段含有 28 bp 旋转对称的回文结构(palindrome),阻遏蛋白亚基与其结合时正好贴在 DNA 的深沟处,识别螺旋的氨基酸与碱基对之间形成特异的氢键。操纵基因在其上游和下游各有一个相似的回文结构序列,阻遏蛋白 4 个亚基除与操纵基因回文结构结合外,还与上游或下游回文结构结合,中间 DNA 形成突环,由此增加了阻遏蛋白阻止转录的效果(图 39-23)。

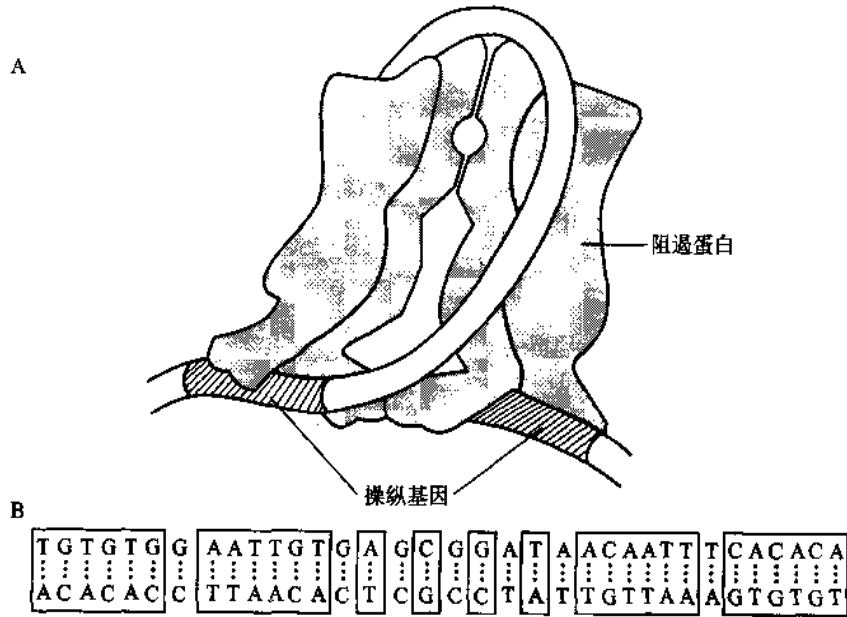


图 39-23 阻遏蛋白与操纵基因结合

- A. 阻遏蛋白亚基与操纵基因及上游或下游相似序列回文结构结合,中间 DNA 形成突环
B. 操纵基因序列,方框内碱基对为回文结构

在上述过程中,无论是代谢途径酶的诱导或合成途径酶的阻遏,阻遏蛋白所起的是负调节作用,当它作用于操纵基因时阻止转录的进行。但是在操纵子模型提出后不久即发现,并非所有调节蛋白都对操纵子起负调节作用,事实上有些调节基因产物对操纵子起着正调节作用。

2. 降解物阻遏

对代谢降解物敏感的操纵子(catabolite-sensitive operon)受到降解物的阻遏。有关的调节蛋白起的是正调节作用。当细菌在含有葡萄糖和乳糖的培养基中生长时,通常优先利用葡萄糖,而不利用乳糖。只有当葡萄糖耗尽后,细菌经过一段停滞期,不久在乳糖诱导下 β -半乳糖苷酶开始合成,细菌才能充分利用乳糖。这种现象过去称为葡萄糖效应。后来了解到这是由于葡萄糖降解物引起的,因此又称为降解物阻遏(catabolite repression)。受到降解物阻遏的酶类包括代谢乳糖、半乳糖、阿拉伯糖及麦芽糖等的操纵子。分解葡萄糖的酶是组成酶(constitutive enzyme),在有葡萄糖时不需分解其他糖的酶类。在这里调节基因的产物为环腺苷酸受体蛋白(cyclic AMP receptor protein, CRP)或降解物基因活化蛋白(catabolite gene activation protein, CAP)。当它与环腺苷酸(cAMP)结合后即被活化,并可作用于分解代谢酶类操纵子的启动子的一定部位,促进转录的进行。葡萄糖分解代谢的降解物能抑制腺苷酸环化酶活性并活化磷酸二酯酶,因而降低 cAMP 浓度,使许多分解代谢酶的基因不能转录。

CRP 为相对分子质量 22 000 亚基的二聚体,其结合 DNA 的结构域也有螺旋-转角-螺旋基序。cAMP-CRP 复合物与可诱导分解代谢操纵子的结合位点均含有 TGTGA 序列。当 cAMP-CRP 结合于 DNA 时,可使 DNA 发生 94 度弯曲,并促进了 RNA 聚合酶与启动子的结合,二者正好位于弯曲 DNA 的同一方向,彼此作用得以加强。由此可以解释,为什么 cAMP-CRP 能够增强转录。

受一种调节蛋白控制的几个操纵子构成的调节系统称为调节子(regulon)。cAMP 与 CRP 复合物对各种不同糖分解代谢的调节即属于一种调节子。

3. 合成途径操纵子的衰减作用

生物合成途径的操纵子通常借助阻遏作用来调节有关酶类的合成。例如,色氨酸操纵子的调节基因(*trpR*)产物阻遏物蛋白(aporepressor),在有过量色氨酸存在时与之结合,成为有活性的阻遏物,它作用于操纵基因可阻止转录的进行。进一步研究发现,除了阻遏物-操纵基因的调节外,还存在另一种在转录水平上调节基因表达的衰减作用(attenuation),用以终止和减弱转录。这种调节的作用部位称为衰减子

(attenuator), 是一种位于结构基因上游前导区的终止子。前导区编码 mRNA 的前导序列 (leader sequence), 该序列可合成一段小肽 (前导肽), 它在翻译水平上控制前导区转录的终止。阻遏和衰减机制虽然都是在转录水平上进行调节, 但是它们的作用机制完全不同, 前者控制转录的起始, 后者控制转录起始后是否继续下去。衰减作用比之遏阻作用是更为精细的调节。衰减机制首先是从色氨酸操纵子的研究中弄清楚。

色氨酸 mRNA 的 5' 端有 162 个核苷酸的前导序列, 当 RNA 的合成启动后除非缺乏色氨酸, 否则大部分 mRNA 仅合成 140 个核苷酸即终止。前导序列能编码一小段 14 肽, 其终止区具有潜在的茎环构象和成串的 U, 表现出一段终止位点的特征。前导 RNA 链有 4 个区域彼此互补, 可形成奇特的二级结构。推测由于 RNA 的特殊空间结构控制着转录的进行。

目前认为, 当氨基酸缺乏时, 前导肽不能形成, 前导 RNA 链以图 39-24A 的结构存在, 转录在终止信号处 (RNA 形成的特殊茎环构象和寡聚 U 处) 停止。如果环境中缺乏色氨酸但还有其他氨基酸存在, 则 $\text{Trp-tRNA}^{\text{Trp}}$ 不能形成, 前导肽翻译至色氨酸密码子 (UGG) 处停止, 核糖体占据区域 1 的位置, 区域 2 与 3 配对, 终止信号不能形成, 转录继续进行, RNA 链以图 39-24B 的结构存在。环境中存在足够量氨基酸存在或生成过量, 前导 14 肽被正常合成, 这时核糖体占据 1 和 2 位置, 终止信号形成, 故转录也终止, 如图 39-24C 所示。衰减子模型能够较好地说明某些氨基酸生物合成的调节机制。

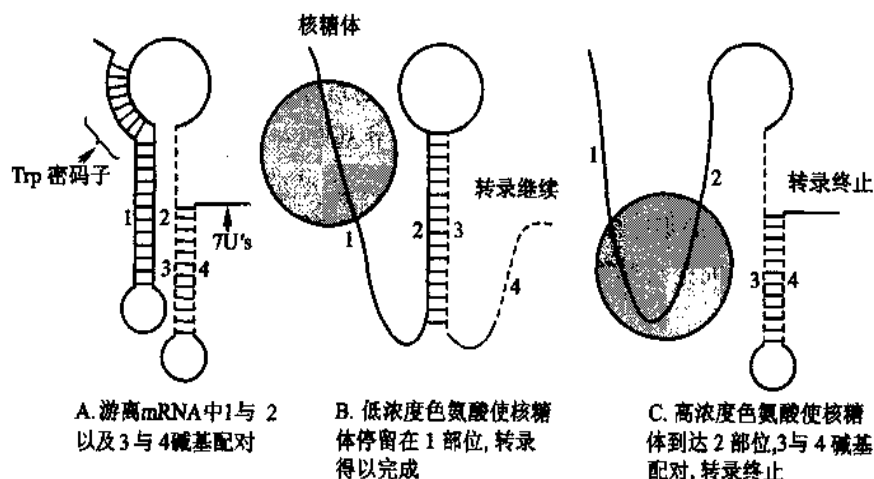


图 39-24 大肠杆菌色氨酸操纵子的衰减机制

除色氨酸外, 苯丙氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸-缬氨酸和组氨酸的有关基因组中都存在衰减子的调节位点, 其 mRNA 前端有一段前导 RNA, 可编码一小肽, 能在翻译水平上抑制相应基因的转录, 对遗传信息的表达起着阻止或衰减的作用。为了提高控制效率, 前导 RNA 链中往往存在重复的调节密码子, 这种现象在苯丙氨酸和组氨酸的前导序列中尤为明显, 前者有 7 个苯丙氨酸密码子, 后者有 7 个组氨酸密码子。有关几种氨基酸合成途径操纵子前导肽的序列和调节的氨基酸列于表 39-3。

嘧啶核苷酸的生物合成由 6 个酶催化完成, 编码这些酶的基因分散在大肠杆菌染色体 DNA 上, 受控于一个调节基因, 因此是一个调节子。最近的研究发现, 嘧啶调节子也有前导区, 它编码的前导 RNA 能形成典型终止信号的茎环结构, 随后紧接一串 U, 并能翻译出前导肽。因此推测嘧啶调节子的转录也受衰减作用的调节。在低浓度 UTP 条件下, RNA 聚合酶转录到一串 U 的部位, 移动受到阻滞, 挡住了正在进行翻译的核糖体, 从而阻止终止信号结构的形成, 由此 RNA 聚合酶继续向前转录, 基因得以表达。在高浓度 UTP 条件下, 核糖体不被 RNA 聚合酶阻挡, 此时 RNA 聚合酶的结合部位形成终止信号茎环结构, 因此转录停止。看来衰减子并非仅限于氨基酸合成操纵子; 其他合成途径酶类的基因表达也受到它的调节。

表 39-3 氨基酸合成操纵子前导肽序列和调节的氨基酸

操纵子	前 导 肽 序 列	调节的氨基酸
<i>trp</i>	Met - Lys - Ala - Ile - Phe - Val - Lev - Lys - Gly - Trp - Trp - Arg - Thr - Ser	Trp
<i>his</i>	Met - Thr - Arg - Val - Gln - Phe - Lys - His - His - His - His - His - His - Pro - Asp	His
<i>phe A</i>	Met - Lys - His - Ile - Pro - Phe - Phe - Phe - Ala - Phe - Phe - Phe - Thr - Phe - Pro	Phe
<i>leu</i>	Met - Ser - His - Ile - Val - Arg - Phe - Thr - Gly - Leu - Leu - Leu - Leu - Asn - Ala - Phe - Ile - Val - Arg - Gly - Arg - Pro - Val - Gly - Gly - Ile - Gln - His	Leu
<i>thr</i>	Met - Lys - Arg - Ile - Ser - Thr - Thr - Ile - Thr - Thr - Thr - Ile - Thr - Ile - Thr - Thr - Gly - Asn - Gly - Ala - Gly	Thr, Ile
<i>ilv</i>	Met - Thr - Ala - Leu - Leu - Arg - Val - Ile - Ser - Leu - Val - Val - Ile - Ser - Val - Val - Val - Ile - Ile - Ile - Ile - Pro - Pro - Cys - Gly - Ala - Ala - Leu - Gly - Arg - Gly - Lys - Ala	Leu, Val, Ile

4. 生长速度的调节

细菌在不同的生长培养基中表现出不同的生长速度。在葡萄糖作为碳源的基本培养基中,大肠杆菌在 37℃ 约每 45 min 分裂一次;然而在以脯氨酸为唯一碳源的培养基中,倍增时间增加至 500 min。在含有葡萄糖、氨基酸、核酸碱基、各种维生素和脂肪酸的丰富培养基中,生长极为迅速,世代时间短达 18 min,不同的生长速度是通过调节蛋白质分子的合成能力而实现的。多肽链的生长速度实际上是由每个细胞的核糖体数目所决定。在迅速生长的细胞中,中隔的形成落后于 DNA 的合成,因此每个细胞可含有不止一个 DNA 分子。表 39-4 列出不同生长速度下大肠杆菌的 DNA 分子数和相对于 DNA 分子的核糖体数。

表 39-4 大肠杆菌在不同生长速度时的某些特征

倍增时间/min	每个细胞的 DNA 分子数	每个 DNA 分子的核糖体数
25	4.5	15 500
50	2.4	6 800
100	1.7	4 200
300	1.4	1 450

细菌的核糖体由 30S 和 50S 两个亚单位所组成。30S 亚单位含有一个 16S RNA 以及大约 21 种蛋白质;50S 亚单位含有 5S 和 23S RNA 以及大约 33 种蛋白质。所有核糖体蛋白质(r-蛋白质)以及与蛋白质合成有关的附属蛋白质,此外还有 DNA 引物合成酶和 RNA 聚合酶亚基及有关因子,它们的基因互相混杂,组成二十几个操纵子。这些基因协同表达,以使复制、转录、翻译过程相互协调,适应于细胞的生长速度需要。通过 r-蛋白质的翻译阻遏,即游离的核糖体蛋白质可抑制其自身 mRNA 的翻译,从而使各种 r-蛋白质水平相应于细胞的生长条件。其他有关蛋白质亦可通过类似的基因自身调节机制维持在适当的水平上。因此,细胞可通过控制 rRNA 和 tRNA 的合成来调整生长速度。

当细菌处于贫瘠的生长环境,缺乏氨基酸供给蛋白质合成,它们即关闭大部分的代谢活性。这种现象称为严紧控制(stringent control),即细菌为节省其贮存物将代谢活性降至最低,借以渡过艰难时期,等待培养条件的改善。

严紧控制造成稳定 RNA(rRNA 和 tRNA)的合成显著下降(10 至 20 倍),这将使 RNA 合成的总量仅为先前水平的 5% ~ 10%。mRNA 合成的降低程度较小(约 3 倍),而且只是某些种类的 mRNA 合成才有降低现象。

任何一种氨基酸的缺乏,或突变导致任何一种氨基酰-tRNA合成酶的失活都将引起严紧控制生长代谢的反应。此时细胞内出现两种不寻常的核苷酸,电泳呈现两个特殊斑点,称之为魔点(magic spots) I 和 II。现已鉴定此两斑点为 ppG_{pp} (鸟苷四磷酸,即5'和3'位置各连两个磷酸), $pppG_{pp}$ (鸟苷五磷酸,5'位置连以三个磷酸基,3'位置连两个磷酸)。大肠杆菌的严紧反应主要积累 ppG_{pp} ,不同细菌的情况不同。

氨基酸饥饿可引起 $(p)ppG_{pp}$ 迅速积累,而rRNA和tRNA以及细菌的生长被强烈抑制。通过消除此种严紧反应的松弛突变(relaxed mutation)表明,编码此严紧控制因子(stringent factor, SF)的基因为*relA*。该基因产生的蛋白质(SF)位于核糖体上,它催化由ATP转移焦磷酸基给GDP或GTP而分别形成 ppG_{pp} 及 $pppG_{pp}$ 。反应式如下:



它们的合成需要有mRNA和相应的未负载tRNA(idling tRNA)的存在。用人工合成的 $T_p\psi C_p$ 可以代替未负载的tRNA,说明tRNA的 $T\psi C$ 环参与此反应。当未负载的tRNA进入核糖体的A位点时,可能触发了核糖体构象的某种改变,引起 $(p)ppG_{pp}$ 的合成。未负载tRNA进入核糖体,反映了氨基酸饥饿的环境条件,它可作为合成该两种核苷酸的信号,通过调节稳定RNA的合成,从而影响蛋白质的合成和细胞的生长。

ppG_{pp} 是控制多种反应的效应分子,最显著的作用是与RNA聚合酶结合,降低rRNA的合成,其结果,一是抑制rRNA操纵子启动子的转录起始作用;另一是增加RNA聚合酶在转录过程中的暂停,因而放慢延长相。但是 ppG_{pp} 对不同操纵子的效应有很大差异。

5. 基因表达的时序控制

生物的生长发育过程中,如细胞分裂、分化、芽孢形成、噬菌体的成熟等,基因表达按一定的时间程序而展现,此即时序控制。时序控制也是一种适应调控,是在历史进化过程中形成的。有关时序控制以 λ 噬菌体的形成过程研究得比较清楚。 λ 噬菌体约含有50个基因,组成4个操纵子,即阻遏蛋白操纵子,左右两个早期操纵子和晚期操纵子,它们分别位于DNA的两条链上。左向转录的链称为L链;右向转录的链称为R链, λ 噬菌体的溶原(lysogenic)和裂解(lytic)两个生活史周期的发育过程是在*cI*、*cro*、*N*、*Q*、*cII*/*cIII*等6个调节基因的控制下进行的,如图39-25所示。

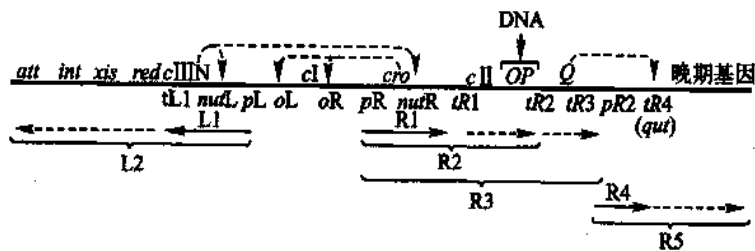


图39-25 λ 噬菌体的调节基因和转录产物

cI、*cro*、*N*、*Q*以及*cII*和*cIII*为调节基因。*pL*和*pR*为左右启动子;*oL*和*oR*为左右操纵基因。*nutL*和*nutR*为N蛋白结合位点;*qut*为Q蛋白结合位点;*tL1*、*tR1*、*tR2*、*tR3*、*tR4*为左右终止子。*L1*、*L2*、*L3*、*R1*、*R2*、*R3*、*R4*和*R5*分别为左右操纵子的转录产物

当 λ 噬菌体DNA侵入宿主细胞后,溶原和裂解途径的最初过程是相同的,二者均要求前早期(immediate early)和后早期(delayed early)基因的表达。然后发生歧化,晚期基因的表达使噬菌体进入裂解循环;而阻遏蛋白合成的建立则进入溶原状态。前早期基因只有两个,即右早期操纵子的调节基因*cro*和左早期操纵子的调节基因*N*。*cro*的功能为抑制溶原性阻遏蛋白*C I*的合成,从而使噬菌体得以进入裂解

循环。*N* 基因的产物为抗终止因子；它可使前早期基因的转录越过终止信号而进入后早期基因，为溶原和裂解途径的歧化作好准备。

后早期基因包括右早期操纵子的两个复制基因（为裂解所需），左早期操纵子的 7 个重组基因（某些与裂解有关，另一些与溶原整合有关）以及分别位于左右早期操纵子的 3 个调节基因（*c* II、*c* III 和 *Q*）。*c* II / *c* III 调节基因与建立溶原性阻遏蛋白的合成有关。*Q* 调节基因的产物亦为抗终止因子，它使晚期操纵子基因得以表达。晚期操纵子占据整个噬菌体基因组的一半，包括裂解基因以及噬菌体头部和尾部蛋白质的基因。

λ 噬菌体对两个生活史周期的选择取决于 C I 蛋白和 Cro 蛋白二者相颌颌的结果。感染早期，寄主的 RNA 聚合酶从 λ 基因组左右启动子 P_L 和 P_R 起始转录。*N* 基因的表达使 *c* II 和 *c* III 基因转录，该两基因的产物相结合形成 C II / C III 调节蛋白复合物，它促使转录并合成 C I 阻遏蛋白。这时 C I 和 Cro 两种起阻遏作用的蛋白质均积累起来。C I 蛋白抑制除自身外所有基因的转录，如果 C I 蛋白占优势，溶原状态就得到建立和维持。Cro 蛋白则抑制 *c* I 基因的转录，因此是一种抗阻遏物（antirepressor），如果 Cro 蛋白占优势，C I 蛋白不能合成，噬菌体即进入营养繁殖周期。另外，在裂解途径的较晚阶段，已不再需要早期基因表达，这时由于 Cro 蛋白的积累而将之关闭。因此，两种途径的选择决定于最初 20 分钟两种阻遏蛋白的合成速度，而它们的合成速度又受到许多因素的影响。

溶原状态一经建立就由 *c* I 基因自身产物维持这一状态，但在紫外线照射或温度升至 42℃ 以及其他因素作用下 C I 蛋白被钝化，原噬菌体又被切割下来，进入裂解循环，称之为诱导。

由此可见，噬菌体的发育阶段是由几个调节蛋白质分别作用于不同启动子和终止子而调节控制的，早期基因的表达可以打开后期基因，在后期又可关闭早期基因，使噬菌体遗传信息按一定时序展现。 λ 噬菌体基因表达的时序控制可作为有关研究的原型，对它的了解必将有助于对更复杂生物发育过程中时序控制的研究。

6. 翻译水平的调节和反义 RNA

原核生物的基因表达除了转录水平上的调节外，还存在翻译水平的调节，已知表现有：①不同 mRNA 翻译能力的差异，②翻译阻遏作用，③反义 RNA 的作用。

mRNA 的翻译能力主要受控于 5' 端的核糖体结合部位（SD 序列），强的控制部位造成翻译起始频率高，反之则翻译频率低。此外，mRNA 采用的密码系统也会影响其翻译速度。大多数氨基酸由于密码子的简并性且具有不只一种密码子，它们对应 tRNA 的丰度可以差别很大，因此采用常用密码子的 mRNA 翻译速度快，而稀有密码子比例高的 mRNA 翻译速度慢。多顺反子 mRNA 在进行翻译时，通常核糖体完成一个编码区的翻译后即脱落和解离，然后在下一个编码区上游重新形成起始复合物。当各个编码区翻译频率和速度不同时，它们合成的蛋白质量也就不同。

前面曾经提到，核糖体蛋白质、RNA 聚合酶亚基、氨酰 tRNA 合成酶及蛋白质合成的各种因子，它们的基因分别组成若干个操纵子，这些操纵子协同表达，因而使有关蛋白质合成的数量与生长速度相适应。绝大部分核糖体蛋白质以等摩尔的数量存在，并且与 rRNA 的分子数量相当。唯一的例外是 L7/L12。二者由同一基因编码，L7 与 L12 的差别仅在于其 N-末端被乙酰基化。每个核糖体含两个拷贝的 L7/L12 二聚体，这就是说，L7/L12 的合成数量比其余核糖体蛋白质大 4 倍。此外，蛋白质合成的延长因子 EF-Tu 与氨酰 tRNA 合成酶则比核糖体数量大 10 倍。由于需要额外合成延长因子，因而存在两个编码该因子的基因 *tufA* 和 *tufB*。另一种特殊情况是，某些蛋白质的数量远比核糖体为少，如 RNA 聚合酶。因此，多顺反子 mRNA 的翻译需要增加 L7/L12、EF-Tu 和氨酰 tRNA 合成酶的合成，并且降低 RNA 聚合酶亚基的合成。显然这种调节是在翻译水平上进行的。

组成核糖体的蛋白质共有 50 多种，它们的合成严格保持与 rRNA 相应的水平。当有过量核糖体游离蛋白质存在时即引起它自身以及有关蛋白质合成的阻遏。这种在翻译水平上的阻遏作用称为翻译阻遏（translational repression）。对核糖体蛋白质起翻译阻遏作用的调节蛋白质均为能直接和 rRNA 相结合的核糖体蛋白质，它们由于能和自身的 mRNA 起始控制部位相结合而影响翻译。例如，在 L11 操纵子中，起调节作用的为第二个蛋白质 L1，它与多顺反子 mRNA 第一个编码区（L11）起始密码子邻近的部位结合，从而

阻止核糖体起始翻译。

利用这种机制可使核糖体蛋白质的合成与 rRNA 的合成直接相关联。我们可以设想,自身调节的核糖体蛋白质与 rRNA 的结合能力大于和 mRNA 的结合能力。因此,凡有核糖体蛋白质合成出来必定首先与 rRNA 结合以装配核糖体。但是,一旦 rRNA 的合成变慢或停止,游离的核糖体蛋白质便会积累。于是它们就与其自身的 mRNA 结合,从而阻遏进一步的翻译。该过程促进核糖体蛋白质维持在与 rRNA 相应的水平上,然而操纵子中的另外的蛋白质则可按其自身需要的速度合成,而不受核糖体蛋白质翻译的束缚。RNA 聚合酶的亚基受到其自身的调节。EF-Tu 和 L7/L12 则具有更强的翻译效率。这就使得同一操纵子中的不同蛋白质以不同的水平相应于细胞的生长速度。

在上述翻译阻遏作用中的调节分子是合成的蛋白质自身。近年来发现反义 RNA (antisense RNA) 亦可调节 mRNA 的翻译功能。所谓反义 RNA 即是指具有互补序列的 RNA。

1983 年 Mizuno 等以及 Simons 和 Kleckner 同时发现反义 RNA 的调节作用,从而揭示了一种新的基因表达调节机制。反义 RNA 可以通过互补序列与特定的 mRNA 相结合,结合位置包括 mRNA 结合核糖体的序列(SD 序列)和起始密码子 AUG,从而抑制 mRNA 的翻译。因此,他们称这类 RNA 为干扰 mRNA 的互补 RNA (mRNA interfering complementary RNA, micRNA)。

Mizuno 等研究了渗透压变化对大肠杆菌外膜蛋白质基因表达的调节,发现有两种外膜蛋白, Omp C 和 Omp F, 它们的合成受渗透压调节。在高渗的条件下, Omp C 的合成增加,而 Omp F 的合成受抑制;反之,低渗使 Omp C 合成抑制,而优先合成 Omp F。两种蛋白质随渗透压的变化而改变,但两种蛋白质的总量保持不变。他们从 *omp C* 基因的启动子前分到一段 DNA 序列,称之为 CX28 区域。当 *omp C* 基因进行转录时,该区域以相反方向转录出一种 6S RNA (174 个核苷酸),称为 mic F。在这个小 RNA 中有很大大一部分序列与 Omp F 的 mRNA 5' - 末端互补,二者可结合而使 mRNA 失去翻译活性。这就解释了为什么高渗时,随着 Omp C 蛋白合成的增加, Omp F 蛋白的合成受到抑制(图 39-26)。

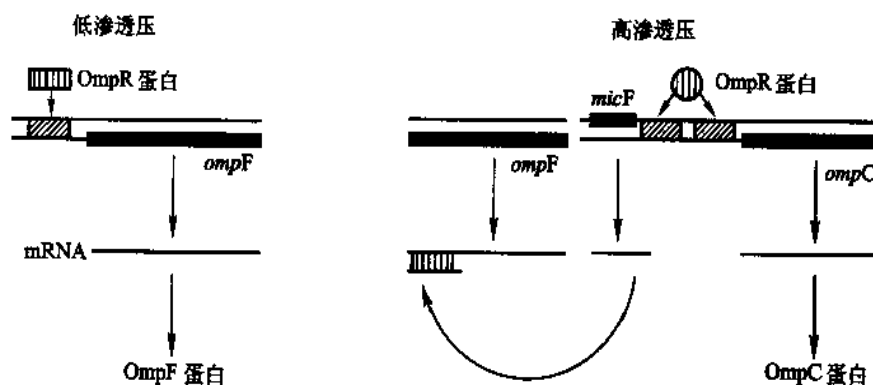


图 39-26 渗透压调节中 micRNA 的调节机制模型

Simons 和 Kleckner 在分析 Tn10 转座子的调节机制时发现一种类似的互补小分子 RNA。该转座子的两端各有一个插入序列 IS10。转位酶是由这一序列编码的。转位活性主要存在于右侧插入序列。转位酶的启动部位有两个启动子,其一转录转位酶 mRNA,另一反方向转录 micRNA,二者 5' - 末端重叠 40 个碱基,因此可以形成碱基配对(图 39-27)。micRNA 与转位酶的 mRNA 结合后,即可抑制转位酶的合成,从而控制转位活性。

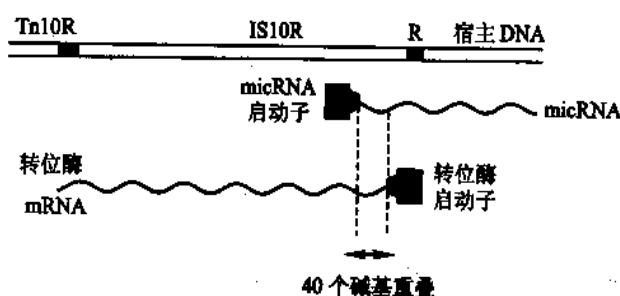


图 39-27 转位酶 mRNA 和 micRNA 转录的模式

反义 RNA 对基因表达调节机制的发现不仅具有重大的理论意义,而且也为人类控制生物的实践提供

了新的途径。不少科学家正在试图将 micRNA 的基因引入家畜和农作物以获得抗病毒的新品种,或是利用反义 RNA 抑制有害基因(如癌基因)的表达。在这方面亦已取得令人鼓舞的成果。

(二) 真核生物基因表达的调节

当前分子生物学的研究重点已从原核生物转向真核生物。真核生物基因表达的调节和控制已成为最引人注目的研究课题之一。通过对真核生物基因表达调节机制的认识将使我们更有效地控制真核生物的生长发育。真核生物的基因工程实际上也有赖于对真核基因调节机制的了解才能得到进一步的发展。

原核生物与真核生物不仅在复杂程度上有很大差别,而且它们沿着两条不同的演化途径发展,前者结构小巧,表达高效;后者结构复杂,功能分化,调节精确,潜力很大。真核生物细胞内 DNA 含量远大于原核生物,其中很大部分是用于贮存调控信息。核内 DNA 和蛋白质以及 RNA 构成以核小体为基本单位的染色质,其中 DNA 以很高的压缩比将十分长的分子装配成较短的染色体。转录和翻译分别发生在细胞核和细胞质中,而且在转录和翻译后均存在复杂的信息加工过程。真核生物基因一般不组成操纵子,即使某些基因连在一起并受共同调节基因产物的调节,但也不形成多顺反子 mRNA,其 mRNA 的半寿期比较长。多细胞真核生物是由不同的组织细胞构成的,从受精卵到完整个体要经过复杂的分化发育过程,除了那些为维持细胞基本生命活动所必需的基因外,其他不同组织细胞中的基因总是在不同的时空关系中受到活化或受到遏阻。

真核细胞基因的表达可随细胞内外环境条件的改变和时间程序而在不同表达水平上加以精确调节。细胞间的信息传递对调节起重要作用。这种在不同水平上进行调节的机制称为多级调节系统(multistage regulation system),如图 39-28 所示。

真核细胞基因表达存在两种类型的调节和控制机制,一种称为短期或可逆的调控;另一种称为长期调控,一般是不可逆的。短期调控主要是细胞对环境变动,特别是对代谢作用物或激素水平升降作出反应,表现出细胞内酶或某些特殊蛋白质合成的变化。长期调控则涉及发育过程中细胞的决定(determination)和分化(differentiation)。细菌基因调控属于短期调控,长期调控仅发生于真核细胞。

1. 转录前水平的调节

从一个受精卵发育成完整的个体要经过许多特定程序的步骤,在此过程中分化的细胞经分裂后仍然维持其分化状态,表现出细胞具有某种“记忆”。在 DNA 和染色质水平上所发生的一些永久性变化,例如,染色体 DNA 的断裂(breakage)、某些序列的删除(elimination)、扩增(amplification)、重排(rearrangement)和修饰(modification)以及异染色质化(heterochromatinization)等。改变基因组和染色质的结构,使胚原型(germline)的基因组转变为分化的,具有表达活性的基因组。所有这些通过改变 DNA 序列和染色质结构从而影响基因表达的过程均属于转录前水平的调节。

然而,现在知道高等生物的细胞具有全能性(totipotency)。植物的体细胞和生长尖细胞可以离体培养成完整植株,花药细胞可以培养成单倍体株。高等动物的体细胞虽然不能离体培养成完整个体,但通过核移植实验也证明了它们细胞核的全能性。例如,从非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)成体的表皮细胞分离出细胞核,然后注射到去核的受精卵中,少数存活的细胞可发育成正常的蝌蚪。由此可见,成体蟾蜍表皮细胞核必定携带了为早期胚胎发育所需的全部 DNA;而细胞质中存在决定分化状态的某些控制因子。克隆羊、克隆牛的成功,更充分证明了细胞的全能性。

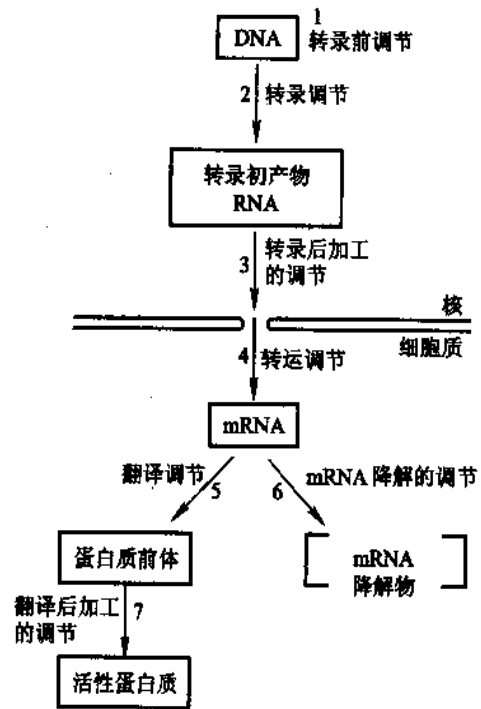


图 39-28 真核生物基因表达在不同水平上进行调节

一般来说,低等动物发育过程中细胞的决定和分化常通过基因组水平的加工改造来实现,高等动物对于分化后不再需要的基因则采取异染色质化的方式来永久性地加以关闭。但在高等生物中依然可以看到基因组序列的某种重排现象,例如,产生抗体的淋巴细胞在发育过程中有明显的基因重排。转位因子能引起基因组序列和表达的改变,而转位频率又受到发育阶段和组织分化的影响,可能转位因子在发育过程中起着某种作用。此外,当基因组发生重排时,可能引起严重的缺陷和失调,例如,细胞癌变与原癌基因(proto-oncogene)的突变和异常表达有关。因此转录前水平的调控,特别是基因重排,引起人们的极大关注。

(1) 染色质丢失 某些低等真核生物,如蛔虫和甲壳类的剑水蚤(*Cyclops*),在其发育早期卵裂阶段,所有分裂细胞除一个之外,均将异染色质部分删除掉,从而使染色质减少约一半。而保持完整基因组的细胞则成为下一代的生殖细胞。推测所删除的 DNA 仅对生殖细胞是必需的。在此加工过程中 DNA 必定发生切除并重新连接。

原生动物的四膜虫(*Tetrahymena*)含有一个大核和一个小核,大核由小核发育而来。大核为营养核,可进行转录;小核为生殖核,无转录活性。在核发育过程中有多处染色质断裂,并删除约 10% 的基因组 DNA,有些部位 DNA 切除后两端又重新连接。在删除这些序列之前基因并不表现转录活性,删除之后即成为表达型的基因,因此推测这些被删除序列的存在可能抑制了基因正常功能的表达。

最突出的例子是哺乳类的红细胞,它在成熟过程中整个核都丢失了。

(2) 基因扩增 另一种基因调控方式为基因扩增,即通过改变基因数量而调节基因表达产物的水平。基因扩增是细胞短期内大量产生出某一基因拷贝从而适应特殊需要的一种手段。某些脊椎动物和昆虫的卵母细胞(oocyte),为贮备大量核糖体以供卵细胞受精后发育的需要,通常都要专一性地增加编码核糖体 RNA 的基因(rDNA)。例如,非洲爪蟾在核仁周围大量积累 rDNA,其后可形成 1 000 个以上的核仁。这些 rDNA 可通过滚环方式进行复制,拷贝数由 1 500 剧增至 2 000 000,其总量可达细胞 DNA 的 75%,当胚胎期开始后,这些 rDNA 失去需要而逐渐消失。原生动物的纤毛虫的大核在发育过程中也要扩增 rDNA,这些 rDNA 以微染色体(minichromosome)的形式大量存在于大核内。昆虫在需要大量合成和分泌卵壳蛋白(chorion)时,其基因也先行专一的扩增。此外,在癌细胞中常可检查出有癌基因的扩增。

(3) 基因重排 基因组序列发生改变,较常见的是失去一段特殊序列,或是一段序列从一个位点转移到另一位点。重排可使表达的基因发生切换,由表达一种基因转为表达另一种基因,例如,单倍体酵母配对型(mating type)的转换,非洲锥虫(African trypanosome)表面抗原的改变等。这是一种调节基因表达的方式。重排的另一意义是产生新的基因,以适合特殊的需要,例如,数量巨大抗体基因借此而产生,并被活化表达。有关基因重排,见 DNA 重组一章。

(4) 染色体 DNA 的修饰和异染色质化 DNA 的碱基可被甲基化,主要形成 5-甲基胞嘧啶(5-mC)和少量 6-甲基腺嘌呤(6-mA)。甲基化的胞苷通常与邻近鸟苷的 5'-磷酸基相连。生物体内有两类甲基化的酶:一类为保持性(maintenance)的甲基转移酶,可在甲基化的母链(模板链)指导下使对应部位发生甲基化;另一类为从头合成(de novo)的甲基转移酶,它不需要母链的指导。

凝缩状态的染色质称为异染色质,为非活性转录区。真核生物可以通过异染色质化而关闭某些基因的表达。例如,雌性哺乳动物细胞有两个 X 染色体,其中一个高度异染色质化而永久性失去活性。通常染色质的活性转录区无或很少甲基化;非活性区则甲基化程度高。而且,生物机体不同发育阶段和不同组织 DNA 甲基化的方式也不同。将克隆的 DNA 微量注射到爪蟾卵母细胞或培养的哺乳动物细胞核内,甲基化的基因不被表达,而未甲基化的基因则可以表达。

近年来,对 DNA 甲基化作为基因表达调节的控制环节这一概念已得到越来越多实验的支持。在生物发育和分化过程中,DNA 甲基化能关闭某些基因的活性,去甲基化能诱导基因的重新活化。研究表明,DNA 甲基化作用能引起染色质结构、DNA 构象、DNA 稳定性以及 DNA 与蛋白质相互作用方式的改变,从而控制着基因的表达。

2. 转录活性的调节

真核生物的基因调节主要表现在对基因转录活性的控制上。基因的转录活性与基因组 DNA 和染色

质的空间结构状态有关。DNA 与染色质蛋白质和少量 RNA 结合,产生超螺旋化和折叠,并被高度凝缩。例如,人细胞含有 6×10^9 bp,总长约 2 m,压缩在 46 个配对的染色体中,总长只有 200 μm ,压缩比达 10^4 。在比较疏松的区域,即所谓常染色质上,能活跃进行转录;而高度凝缩的异染色质上则很少出现 RNA 的合成。因此真核细胞的活化可分为两个步骤:首先由某些调节分子识别基因的特异部位并改变染色质结构,使其疏松化;然后才能由激活蛋白和阻遏蛋白或其他调节物进一步影响基因活性,而第二步调节则类似于原核细胞(图 39-29)。

(1) 染色质的活化 具有转录活性的染色质增加了对核酸酶降解的敏感性。用 DNase I 水解小心制备的染色质 DNA,通常可得到 200 bp 阶梯式的片段,反映了核小体的结构;但转录活性区染色质被核酸酶水解得到的片段较小,大小较不整齐。该区还含有对 DNase I 特别敏感的序列,称为超敏感位点(hypersensitive sites),位于转录基因 5' 末端一侧 1 000 bp 内约长 100~200 bp。有些基因超敏感位点也存在于 3' 末端或基因内。超敏感位点相当于一些已知调节蛋白结合的位点,在其介导下甚至比裸露 DNA 更易被核酸酶水解。在转录非常活跃的区域,缺少或全然没有核小体,如 rRNA 基因就是如此。

真核细胞 DNA 在 C_pG 序列中的胞嘧啶残基通常会被甲基化,但在转录活性区则很少甲基化。管家基因富含 C_pG 岛,它们总是组成型表达,其 C_pG 的胞嘧啶残基均不甲基化。

染色质中与转录相关的结构变化称为染色质改建(chromatin remodeling),其中包括核小体组蛋白核心的酶促乙酰化和脱乙酰化。组蛋白氨基端结构域的多个赖氨酸残基可在组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyltransferase, HAT)催化下发生乙酰化反应。促使组蛋白乙酰化的酶有两种,细胞质的 HAT 为 B 型,它使新合成的组蛋白乙酰化,以便于进入核内。其后,在组蛋白装配成染色质的过程中, H3 和 H4 需要染色质装配因子(chromatin assembly factor, CAF1)的协助, H2A 和 H2B 需要核小体装配蛋白(nucleosome assembly protein, NAP1)的协助。染色质为转录进行活化则需要核内 A 型 HAT。组蛋白 H3 和 H4 氨基末端结构域多个赖氨酸残基被乙酰化,能降低整个核小体对 DNA 的亲合力。乙酰化还可阻止或促进与转录或其调节有关蛋白质的相互作用。当基因不再转录时,核小体的乙酰化被组蛋白脱乙酰化酶所降低,基因趋于沉默,染色质恢复无转录活性的状态。

染色质的改建还要求一些蛋白质复合物,通过水解 ATP 提供的能量来促使核小体移动或取代。该依赖 ATP 的系统对染色质的改建起十分重要的作用。完成改建只是作好转录的准备,转录还有赖于众多顺式作用元件(cis-acting element)和反式作用因子(trans-acting factor)的作用。

真核细胞的转录除需要活化染色质外,还需要活化基因。真核细胞与原核细胞基因转录的调节有几点明显的不同:原核细胞的 RNA 聚合酶能结合于启动子上并进行转录,只有 1~2 种调节蛋白,以负调节(阻遏蛋白)为主。真核细胞 RNA 聚合酶自身对启动子并无特殊亲和力,单独不能进行转录,也就是说基因是无活性的。转录需要众多的转录因子和辅助转录因子,形成复杂的转录装置,转录的调节以正调节为主。通过有限调节蛋白的组合,就可能识别真核细胞数万基因。

(2) 启动子和增强子的顺式作用元件 真核细胞基因的启动子由一些分散的保守序列所组成,其中包括 TATA 框(box)、CAAT 框和多个 GC 框等, CAAT 框、GC 框均属于上游控制元件(upstream control element, UCE)。对于可诱导的基因来说,除基本的控制序列或称为控制元件外,还存在一些信号分子作用的位点,可对细胞内外环境因素变动作出反应的应答元件(response element)。

由增强子(enhancer)、静默子(silencer)及其应答元件进一步调节转录活性。真核细胞基因的增强子能够促进转录,它由比较集中的保守序列组成。除启动子外,能够促进转录的序列即为增强子。增强子最早

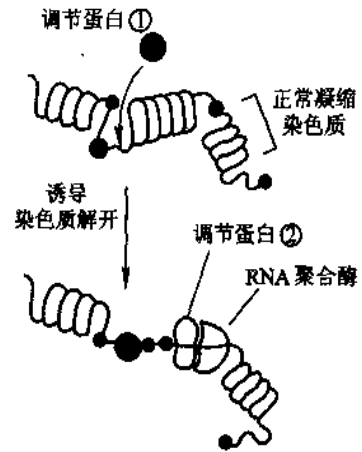


图 39-29 真核生物基因活化机制的图解可能存在两类调节蛋白:调节蛋白①与染色质特异部位结合,改变其结构,使之疏松化;调节蛋白②才得以与基因的控制序列结合,并调节其转录活性

发现于 DNA 病毒 SV40,其转录单位起点上游 200 bp 处存在两个相同成串的 72 bp 序列,删除这两个序列将会显著降低体内的转录活性。其后实验表明,SV40 的增强子不仅促进其自身启动子的转录,而且能促进几乎任何通过重组技术与它相连的其他启动子,包括哺乳类和鸟类的基因以及其他病毒的基因。增强子有两个显著的特点:一是它与启动子的相对位置无关。增强子无论在启动子的上游或是下游,甚至相隔几千个碱基对,只要存在于同一 DNA 分子上都能对其作用。如果邻近有几个启动子,增强子总是优先作用于最近者。二是它无方向性。根据这两个特点可以将增强子与启动子序列相区别。

增强子具有组织特异性,它往往优先或只能在某种类型的细胞中表现功能。这可以部分解释动物病毒要求一定宿主范围的原因。与此类似,组织特异的增强子为发育过程或成熟机体不同组织中基因表达的差别提供了基础。

从上述增强子的性质可以设想,细胞内必定存在一些特异的蛋白质可与其作用,从而影响转录,这种影响可以远距离(达几千碱基对)和无方向性地传递给相对最近的启动子,促使启动子易于结合 RNA 聚合酶或转录因子复合物。增强子常存在于 DNA 酶的超敏感部位。曾提出不少模型试图来说明增强子的作用机制,现在认为增强子与启动子的上游控制元件并无本质区别,实际上有些保守序列在二者中都有,只不过在增强子中更集中而已。增强子与启动子之间距离对活性并无影响,这是因为 DNA 分子具有一定柔性,可以弯曲,结合在增强子上的反式激活因子能够与转录复合物相作用。位于增强子上的应答元件,可调节增强子的活性。沉默了则是负调节蛋白作用的位点。在染色质结构域的边界还存在绝缘子(insulator),可阻止增强子对区域外启动子的影响。

现以金属硫蛋白(metallothionein, MT)基因的调节区为例,说明各顺式作用元件和反式作用因子对基因转录的调节(图 39-30)。金属硫蛋白可与重金属离子结合,将其带出细胞外,从而保护细胞,免除重金属的毒害。通常基因以基础水平表达,但被重金属离子(如镉)或糖皮质激素诱导,能以较高水平表达。在该基因的调节区,TATA 框和 GC 框是两个组成型启动子元件,位于靠近转录起点的上游。两个基础水平元件(basal level element, BLE)属于增强子,为基础水平组成型表达所必需。TRE 是存在于多个增强子中的共有序列,SV40 增强子中也有该序列,其上可结合反式因子 AP1,该因子除作为上游因子促使组成型表达外,还能对佛波酯(phorbol ester)作为促肿瘤剂(promoter tumoragent)产生效应,而这种效应是由 AP1 与 TRE 相互作用介导的。佛波酯通过该途径(但不是唯一的)启动一系列转录的变化。金属应答元件(MRE)序列与金属的反应有关,多个元件可引起 MT 以较高水平表达,该序列可看作启动子的应答元件。糖皮质激素是一种类固醇激素,它的应答元件(glucocorticoid response element, GRE)是增强子的可调节的位点,位于转录起点 250 bp 的位置。类固醇激素与其受体结合于该位点而诱导 MT 高水平表达。

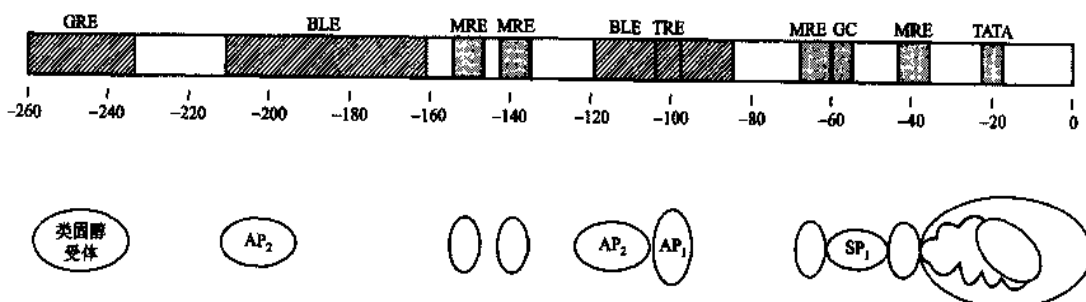


图 39-30 人金属硫蛋白基因的调节区

(3) 调节转录的反式作用因子 调节和控制转录活性的蛋白质有三类:即通用或基本转录因子(basal transcription factor)、上游因子(upstream factor)和可诱导因子(inducible factor)。基本转录因子结合在 TATA 框和转录起点,与 RNA 聚合酶一起形成转录起始复合物。上游因子结合在启动子和增强子的上游控制位点。可诱导因子与应答元件相互作用。有些因子只在特殊类型的细胞中合成,因而有组织特异性,如控制发育的同源域蛋白(homeodomain protein)。有些因子的活性直接受修饰控制,如热激转录因子(heat shock transcription factor, HSTF)经磷酸化而激活。又如,作用于增强子 TRE 序列的 AP1,是由 Jun 和 Fos 两亚基形

成异二聚体,当 Jun 亚基磷酸化即被激活。有些因子的活性受配体调节,如类固醇受体,它与配体结合后即进入核内,与 DNA 结合。二聚体因子还可因改变其搭配物而影响它的活性。

所有结合 DNA 的反式作用因子都有结合 DNA 的结构域,并有一些共同的结构(图 39-31)。结合 DNA 的基序结构主要有以下几种:

①螺旋-转角-螺旋(HTH)是一种常见的结合 DNA 基序。噬菌体阻遏蛋白结合 DNA 的结构域最早被鉴定为该结构。HTH 基序结构存在很广,C I、Cro、乳糖操纵子阻遏蛋白、CRP,酵母的配对因子 MFa1、MFa2,以及从酵母、果蝇到哺乳动物控制发育的同源域蛋白,都含有这种结构。同源域包括一个伸展的氨基末端臂和三个 α -螺旋。螺旋 1 和螺旋 2 彼此反向平行,螺旋 3 与之接近垂直。同源域蛋白可识别并结合到与发育有关的基因同源框(homeobox)上,同源域的氨基末端臂贴在 DNA 浅沟上,螺旋 3 结合在深沟处。螺旋 2 和螺旋 3 呈现为螺旋-转角-螺旋的关系。

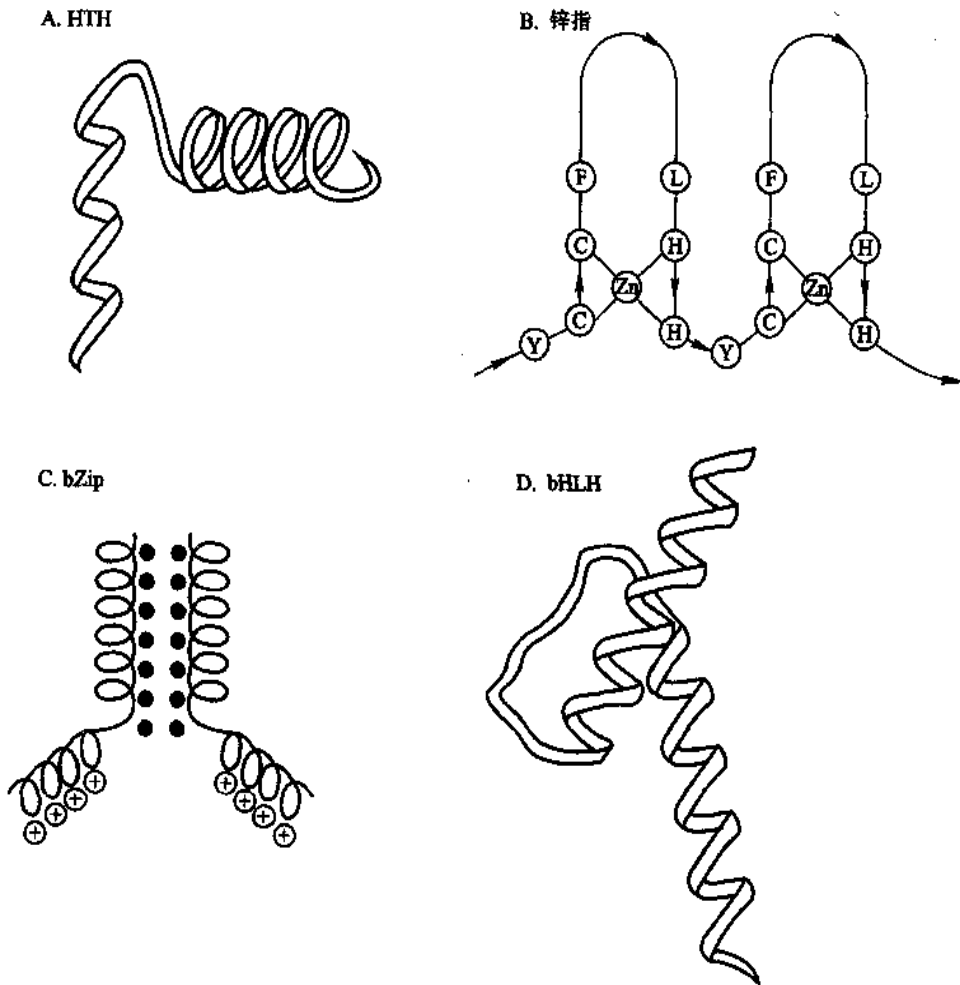


图 39-31 DNA 结合蛋白的几种常见结构

②锌指(zinc finger)基序最早发现于转录因子 TF III A,该因子为 5S rRNA 基因转录所必需。锌指结构广泛存在于各种结合 DNA 的蛋白质,含有一个至多个重复单位,最多可达 37 个。每一锌指单位约有 30 个氨基酸残基,形成一个反平行 β -发夹,随后是一个 α -螺旋,由 β -片层上两个半胱氨酸残基和 α -螺旋上两个组氨酸残基与 Zn 构成四面体配位结构。 α -螺旋是主要的识别单元,它可接触深沟中碱基对,相互间形成氢键。 α -螺旋上不同的氨基酸残基识别不同的碱基对,于是不同排列的锌指就能联合识别 DNA 的序列。另一种锌指结构存在于类固醇激素受体、形态发生素(morphogen)和酵母依赖半乳糖激活蛋白 GAL4。在其结合 DNA 的结构域中,两个锌离子形成两个锌簇(zinc cluster),每个锌离子由 4 个半胱氨酸残基构成四面体配位结构。一个锌指(或称锌簇)与 DNA 结合,另一用于形成二聚体。它们称为 Cys2/Cys2 锌指,以区别于前者 Cys2/His2 锌指。

③亮氨酸拉链(leucine zipper)基序介导结合 DNA 蛋白的二聚化。大多数识别 DNA 序列的调节蛋白都以二聚体形式起作用,这是以少数调节蛋白亚基达到强特异结合的有效途径。亮氨酸拉链基序由约 35 个氨基酸残基形成两性的卷曲螺旋型 α -螺旋(coiled-coil α -helix)。疏水侧链位于一侧,解离基团位于另一侧,使螺旋具有两性性质。每圈螺旋 3.5 个残基,两圈有一个亮氨酸,单体通过疏水侧链(包括亮氨酸)二聚体化,形成拉链。该结构域借助 N 端碱性氨基酸构成 α -螺旋而与 DNA 结合,此种结构称为碱性亮氨酸拉链(bZip)。bZip 广泛存在于同二聚体或异二聚体的反式激活因子(transactivator)中。高等真核生物的 cAMP 应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB),通过亮氨酸拉链而二聚体化,并以碱性氨基酸与 DNA 结合,磷酸化可增强其活性,多种磷酸激酶均能促使它磷酸化,表明它能综合多渠道来源的信号。前述转录因子 AP1 由于 Jun 和 Fos 通过亮氨酸拉链而成为稳定的异二聚体,它们与细胞生长的调节有关。

④螺旋-突环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)基序含有两个两性的 α -螺旋,螺旋之间以一段突环连接,约 40~50 个残基,由于突环的柔性,使两螺旋可回折并叠加在一起。两亚基通过螺旋疏水侧链的相互作用而结合在一起。螺旋的 N 端与一段碱性氨基酸相连,以此与 DNA 结合。bHLH 蛋白以同二聚体或异二聚体作用于基因控制元件,如 E12/E47 结合在免疫球蛋白的增强子上,成肌素(myogenin)Myo D 和转录因子 Myf-5 均与肌细胞生成有关。

结合 DNA 的反式激活因子,除特异结合 DNA 的结构域外,通常都另外还有一个或多个结构域,用于转录的活化或与其他调节蛋白相互作用。常见的转录活化结构域有三类:酸性活化结构域、富含谷氨酰胺结构域和富含脯氨酸结构域。酵母转录因子 GAL4 靠近氨基端有一个类似锌指的结构,借此结合于 DNA 上游控制序列,并通过卷曲螺旋而形成同二聚体,它有一个分开的酸性活化区,含有许多个酸性氨基酸,可作用于转录起始复合物。酵母的 SP1 蛋白靠近羧基端有三个锌指,可结合于 GC 框架,其转录活化区 25% 的氨基酸残基为谷氨酰胺。结合于 CCAAT 的转录因子 1(CTF1)含有一段由碱性氨基酸构成的 α -螺旋,以与 DNA 结合,其结构与上述几种基序都不同。它的活化区 20% 氨基酸残基为脯氨酸。由这三种调节蛋白共同促使酵母与乳糖代谢有关的 GAL 基因的转录。

类固醇激素、甲状腺激素、视黄酸和维生素 D 均结合于细胞内受体,它们有类似的结构,组成细胞内受体超家族。氨基端结构域与转录的活化有关,相互间变化较大,同源性小于 15%;中间结构域为两个锌指(锌簇),同源性达 94%~42%;羧基端为结合激素的结构域,同源性在 57%~15%。它们几个结构域图解表示于图 39-32。

3. 转录后水平的调节

真核生物的 mRNA 前体加工过程主要包括三个步骤:①在新生的 mRNA 前体 5'-端上加一个甲基化

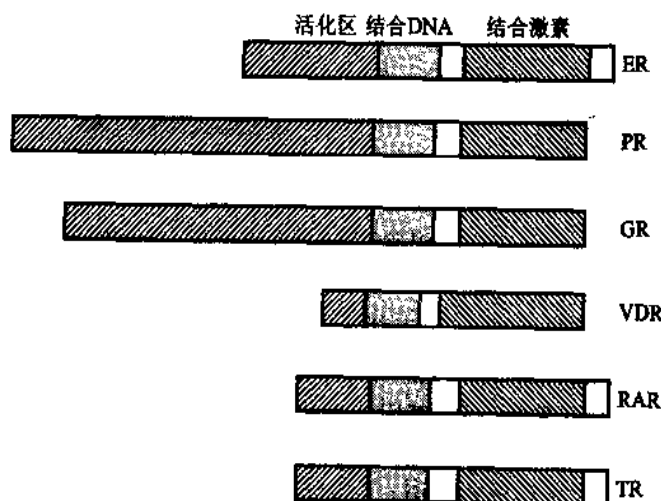


图 39-32 细胞内受体超家族的结构域

ER, 雌激素受体; PR, 孕酮受体; GR, 糖皮质激素受体; VDR, 维生素 D 受体;
RAR, 视黄酸受体; TR, 甲状腺素受体

的鸟嘌呤核苷酸,称之为帽子(cap)即 $m^7G_{ppp}N$,这一过程通常发生在 mRNA 转录完成之前;②当 RNA 聚合酶转录至基因的终止信号处即有特异的核酸内切酶将新合成的 RNA 链切下,然后在 3'-端加上一段多聚腺苷酸(polyA)尾巴;③将 mRNA 前体的内含子(intron)部分切去,并使两个外显子(exon)重新连接,这一过程称之为拼接(splicing)。此外,mRNA 的内部还可发生甲基化,主要生成 6-甲基腺嘌呤(m^6A)。在某些特殊情况下发现 mRNA 能进行重新编辑(editing),例如,插入或删除 U,C 脱氨转变成 U 等。成熟的 mRNA 被转移到细胞质进行翻译,在此过程中存在复杂的调控机制。

mRNA 前体通过不同的拼接途径可以产生不同的 mRNA。例如,抗体基因也是一种断裂基因,其重链转录产物经过不同的拼接方式可以经翻译形成两种抗体分子:一种为分泌型抗体,它的羧基端为亲水肽段;另一种为膜结合的抗体,它的羧基端为疏水肽段。抗体基因有两个转录的终止信号和两个翻译的终止密码子。第一个终止密码子位于一段编码亲水性肽段区的末端,接着是第一个转录终止信号,这段区域含有给体(前一个外显子)和受体(后一个外显子)拼接点,可通过拼接除去。第二个终止密码子在编码疏水肽段区的末端,其后为第二个转录终止信号。当转录产物在第一个终止信号处停止时,由于只含有给体拼接点,而不含受体拼接点,因此不发生拼接,亲水肽段被保留下来形成分泌型免疫球蛋白。而当转录产物在第二个终止信号处停止时,通过拼接除去亲水的肽段,形成疏水末端的膜结合免疫球蛋白(图 39-33)。

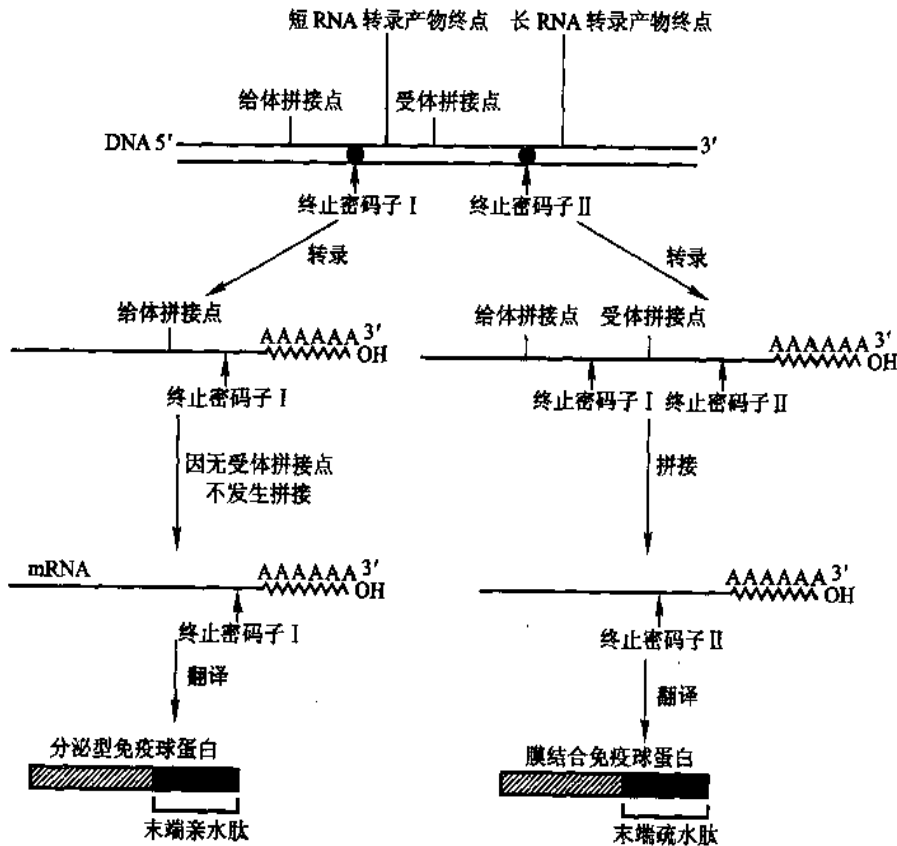


图 39-33 分泌型和膜结合免疫球蛋白的形成

由不同转录起点和终点转录的产物,以及内部不同拼接点进行拼接,再加上不同的编辑,可以得到不同加工的 mRNA(见 RNA 转录后加工一节),它们翻译成不同的蛋白质,称为异形体(isoform)。越是高等的真核生物,其基因表达调控机制越复杂,每个基因能够产生更多的蛋白质。粗略估计,细菌每个基因平均能产生 1.2~1.3 种蛋白质,酵母每个基因产生 3 种蛋白质,人类每个基因产生 10 种蛋白质。由此可见,基因表达在转录后加工的水平上有非常复杂的调节和控制。

4. 翻译水平的调节

真核生物在翻译水平进行基因表达调节,主要是控制 mRNA 的稳定性和有选择的进行翻译。

mRNA 5'-端的加帽作用以及 3'-端的多聚 A 加尾作用都有利于 mRNA 分子的稳定。mRNA 通常总

是与一些蛋白质结合成核蛋白颗粒。所谓信息体(informosome)即是信使 RNA 与蛋白质的复合物,其作用主要是保护 mRNA 免受核酸酶的作用和控制 mRNA 的翻译功能。其中成分复杂,除三种主要的和几种少量的蛋白质外,还有起始因子以及翻译控制 RNA(tsRNA)。翻译控制 RNA 为相对分子质量较小的 RNA,可抑制翻译作用。其中有些具有寡聚尿苷酸,可与 mRNA 的 polyA 结合,形成双链。另有双链 RNA 熔解因子(melting factor)可使之解链。mRNA 的 5' - 端和 3' - 端非编码区的序列对 mRNA 的稳定性和翻译效率起重要调控作用。有些 mRNA 寿命很短,有些很稳定,与其有关。

因为网织红细胞没有细胞核,其蛋白质合成与 RNA 的转录、转录后加工以及向细胞质转移等的调节作用无关,故这是研究翻译过程的理想材料。兔网织红细胞的研究表明,葡萄糖饥饿、缺氧和氧化磷酸化受抑制等所有导致缺乏 ATP 的因素均能诱导细胞产生翻译抑制物;血红素的缺乏亦有类似情况。在细胞中蛋白质的合成与能量代谢有关,而血红素由于在细胞色素和细胞色素氧化酶合成中的作用,可作为能量代谢水平的指标而调节 mRNA 的翻译功能。

血红素对蛋白质合成的控制作用是通过一种称为血红素控制的翻译抑制物(heme - controlled translational inhibitor)来实现的,其本质是 eIF - 2 激酶,它能选择性地将蛋白质合成起始因子 eIF - 2 磷酸化。这种起始因子磷酸化后便失去起始活性。eIF - 2 激酶本身也有磷酸化和脱磷酸两种形式,磷酸化的 eIF - 2 激酶具有活性,脱磷酸后失去活性。eIF - 2 激酶的磷酸化是由依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A 所催化,它的活性受控于血红素。如果有血红素存在时,蛋白激酶 A 不被 cAMP 活化,eIF - 2 激酶以无活性的脱磷酸形式存在,eIF - 2 具有起始活性。当血红素缺乏时,蛋白激酶 A 被 cAMP 活化,eIF - 2 激酶以磷酸化的活化形式存在,使 eIF - 2 被磷酸化而失活。这一级联反应通过控制 eIF - 2 的起始活性而调节蛋白质的合成。

翻译水平存在多种调节机制。有关 mRNA 的翻译能力和翻译阻遏作用等与原核生物相似,这里不再重复。

5. 翻译后水平的调节

多肽链合成后通常需经过加工与折叠才能成为有活性的蛋白质。蛋白质的折叠构象主要决定于它的氨基酸序列,而其最后具有生物活性的构象则是在加工或共价修饰过程中形成的。翻译后的加工过程包括:①除去起始的甲硫氨酸残基或随后几个残基;②切除分泌蛋白或膜蛋白 N - 末端的信号序列;③形成分子内的二硫键,以固定折叠构象;④肽链断裂或切除部分肽段;⑤末端或内部某些氨基酸的修饰,如甲基化、乙酰化、磷酸化等;⑥加上糖基(糖蛋白)、脂类分子(脂蛋白)或配基(复杂蛋白)。此外,蛋白质需在酶和分子伴侣帮助下进行折叠,并正确定位。这种后加工过程在基因表达的调控上起重要作用。细胞内蛋白质转变成易被降解的形式,并被水解成氨基酸,这也是控制蛋白质活性的一种方式。

某些翻译产物经不同加工过程可形成不同活性产物。例如,前阿黑皮素原(POMC)分子至少可加工成 7 个活性肽,每一活性肽的末端各有一对碱性氨基酸残基划分出界线,一般为赖氨酸和精氨酸。界线处的氨基酸对是蛋白质裂解酶(protein - splitting enzymes)识别和切割部位,经酶切割即释放出活性调节肽。

以上扼要介绍了真核生物基因表达的多级调节系统,由此构成的调控网络控制着机体的代谢过程和生理功能。

提 要

细胞代谢包括物质代谢、能量代谢和信息代谢三个方面。活细胞不断与环境交换物质,摄取能量,输入负熵,从而得以构建和维持其复杂的组织结构,进行各种生命活动。生命物质主要有蛋白质、核酸、糖、脂类以及为数有限的有机小分子,在这些物质代谢过程中同时进行着能量和信息代谢。生物机体的新陈代谢是一个完整统一的过程,存在复杂的调节机制。生物体内的代谢调节在三种不同的水平上进行:①分子水平的调节,包括底物的调节和酶的调节;②细胞水平的调节,主要表现在代谢途径的分隔控制、膜的选择透性、膜与酶的结合等方面;③多细胞生物整体水平的调节,如神经调节和激素调节等。细胞间的通讯以及外界的信号都需要通过信号转导系统传递到胞内,并引起细胞的反应。所有这些调节机制都是在基因产物的作用下进行的,也就是说与基因表达调节有关。

多糖、蛋白质和核酸都是高聚物,它们分别由少数种类的单糖、氨基酸和核苷酸所组成。脂类分子也能聚集成超分子结构。这些物质的代谢途径是相互联系的。细胞代谢的原则是将各类物质分别纳入各自的共同代谢途径,不同途径间可通过交叉点上的中间代谢物而相互作用和相互转化。最关键的中间代谢物是:葡萄糖-6-磷酸、丙酮酸和乙酰辅酶 A。代谢途径具有单向性,即分解代谢和合成代谢各有其自身的途径,因而有利于代谢调节控制。在共用的途径中,某些关键部位的正反应和逆反应也是由两种不同的酶所催化,称为相对立的单向反应。这种分开机制可使生物合成和降解反应分别处于热力学的有利状态。ATP 是生物体内通用的能量载体。NADPH 是以还原力形式携带能量。代谢的基本要略在于形成 ATP、还原力和构造单元,用于生物合成。分解代谢大致可分为三步:①将大分子降解成小分子构造单元;②将各种构造单元进一步分解和转变成共同降解产物乙酰辅酶 A,并产生还原力 NADPH 和少量 ATP;③乙酰辅酶 A 通过三羧酸循环被完全氧化,生成大量 ATP。所有生物合成过程都需要有底物、能量和酶;而蛋白质和核酸的合成除需要这三个条件外,还需要模板,用以指导其信息结构。

生物体内的代谢反应都是由酶所催化和调节的。酶的调节包括酶活性的调节和酶含量的调节,前者又分为变构效应,酶的特异激活和抑制以及共价修饰等几种方式;后者则受合成和降解两方面的影响。代谢底物和代谢产物对代谢过程调节酶(变构酶)活性的调节作用分别称为前馈和反馈,这种作用或是激活(正作用),或是抑制(负作用)。ATP、ADP 和磷酸盐广泛参与各种产能和需能反应,它们不仅通过质量作用效应而调节能量代谢,而且还是许多重要调节酶的变构效应物。能荷的定义为在总的腺苷酸系统中(ATP、ADP 和 AMP 之和)所负荷的高能磷酸基数量(ATP 加 $1/2$ ADP)。能荷值可作为细胞产能和需能代谢过程间变构调节的信号。凝血是由一系列凝血因子经级联激活引起的反应,凝血因子大多为丝氨酸蛋白酶。其间受到特异激活剂和抑制剂的精确调节。溶栓过程也是由丝氨酸蛋白酶的酶解级联反应引起的。酶原和激素原由蛋白酶解而激活。级联反应导致原始信号的放大,可于瞬间激活,并易于调节控制。蛋白酶解是不可逆的,共价修饰是可逆的。在连锁的代谢反应中,酶受到连续的共价修饰所激活。其中最重要的是磷酸化和脱磷酸化反应。激素或神经递质作用于膜受体,经信号转导产生第二信使,并连续引起酶的磷酸化,从而调节细胞代谢。腺苷酰化和脱腺苷酰作用是细菌中共价修饰调节酶的一种重要方式。

细胞具有精细的结构。各类酶在细胞中有各自的空间分布,因而使不同代谢途径分别在细胞的不同部位进行。细胞膜结构对代谢的调控作用主要有:①控制跨膜离子浓度梯度和电位梯度,②控制物质运输,③对代谢途径的分隔作用,④与酶的可逆结合影响酶的性质和活性。蛋白质在合成后被分送到细胞的不同部位,以执行各自的功能。在蛋白质的定位机制中信号肽和导肽起着导向的作用。蛋白质的寿命与 N-末端氨基酸有关。泛素与蛋白质结合可作为降解的标记。

在整体水平上的神经调节和激素调节是在进化过程中发展和完善起来的调节机制,它们仍然需通过酶的调节而起作用。神经元传导电信号依赖于离子通过膜通道引起的膜电位变化。有两类门控离子通道:电位门控离子通道和配体门控离子通道。前者在膜去极化时打开,因而产生动作电位;后者由神经递质所打开,使化学信号又转变为电信号。激素、递质和调节肽作用于膜受体,经信号转导蛋白(G 蛋白)而引起效应器的反应,或是改变膜透性,或是产生胞内信使导致酶的连续激活。生长因子的受体自身具有酪氨酸蛋白激酶活性,成为信号转导的重要环节。一氧化氮受体是一种含血红素的鸟苷酸环化酶,它有重要生理功能。细胞增殖存在复杂的调节控制。细胞周期受周期素/依赖周期素的蛋白激酶(CDK)的调节。通过转录因子 E2F 而启动 S 期。周期素/CDK 通过促进 M 期因子(MPF)而控制 M 期的启动。生长因子受体经 Ras 蛋白和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径可调节基因表达。细胞因子自身无酪氨酸激酶活性,需借非受体的酪氨酸蛋白激酶 JAK,并经信号转导活化转录因子 STAT,而调节基因转录。细胞癌变是细胞生长失控的结果。控制细胞增殖的基因发生突变即成为癌基因。

基因表达即是指遗传信息的转录和翻译过程,它受到不同水平的调节。原核生物基因组操纵子作为表达的协同单位,它包括在功能上彼此有关的结构基因和控制部位(启动子和操纵基因),可接受调节基因产物(阻遏蛋白)的作用。对降解物敏感的分解途径操纵子可被 cAMP 与其受体蛋白复合物所活化。某些合成途径操纵子受衰减子的调节。细菌的严紧控制与 $(p)_{pp}G_{pp}$ 的调节功能有关。早期基因的产物可以活化晚期基因,而晚期基因产物又抑制早期基因表达,从而表现出一定的时序控制。翻译水平上的调节主要

有:不同 mRNA 翻译起始频率和速度的差异,翻译阻遏作用,反义 RNA 的作用等。

真核生物基因不组成操纵子,不形成多顺反子 mRNA。真核生物的基因表达受到多级调控系统的调节。转录前水平的调节主要指染色体 DNA 的断裂、删除、扩增、重排、修饰和异染色质化等改变基因结构和活性的过程。转录水平的调节包括染色质的活化和基因的活化。通过染色质改建,组蛋白乙酰化,染色质变得疏松化,可被酶和调节蛋白作用。基因转录受顺式作用元件,包括启动子、增强子及其应答元件的控制;也受反式作用因子,包括基本转录因子、上游转录因子和转录调节因子等的调节。结合 DNA 的基序主要有:螺旋-转角-螺旋、锌指、亮氨酸拉链、螺旋-突环-螺旋等。结合 DNA 的反式激活因子包括活化结构域、结合 DNA 结构域和结合配体结构域。转录后水平的调节包括转录产物的加工和转运的调节;通过不同方式的拼接可产生不同的 mRNA。翻译水平的调节主要是控制 mRNA 的稳定性和有选择的进行翻译。当血红素缺乏时,通过级联反应使 eIF-2 磷酸化,从而抑制翻译的起始。翻译后水平的调节主要控制多肽链的加工和折叠;通过不同方式的加工可产生不同的活性多肽。

习 题

1. 构成生命活动基础的物质代谢、能量代谢和信息代谢三者之间有何关系?
2. 哪些化合物可以认为是联系糖、脂类、蛋白质和核酸代谢的重要环节?为什么?
3. 细胞代谢的基本要略是什么?
4. 什么叫前馈?什么叫反馈?举例说明代谢的前馈调节和反馈调节。
5. 什么是级联的反应?有何意义?以凝血机制为例说明其调节作用。
6. 细胞膜结构在代谢调节中起何作用?
7. 根据所学的知识分析线粒体内代谢途径的调节机制。
8. 门控离子通道有哪几种?它们在神经电兴奋的传导中各起何作用?
9. 何谓信号转导系统?它如何将膜受体接收到的化学信号传递给胞内?
10. 简要说明一氧化氮作为信号分子的调节作用。
11. 细胞增殖信号如何调节细胞分裂和基因表达?与细胞癌变有何关系?
12. 何谓操纵子?根据操纵子模型说明酶的诱导和阻遏。
13. 为什么说在酶诱导中的调节蛋白起负调节作用,而在降解物阻遏中的调节蛋白起正调节作用?
14. 何谓衰减子?说明它的作用机制和生物学意义。
15. 将细菌从贫瘠培养基中转移到丰富培养基中其代谢会发生什么变化?
16. 何谓反义 RNA?它的发现有何理论意义和实践意义?
17. 说明真核生物基因表达调节机制的主要特点。
18. 真核生物转录前水平的基因调节主要有哪些方式?
19. 比较真核生物和原核生物转录水平与翻译水平调节的异同点。
20. 结合 DNA 的反式激活因子结构有何特点?
21. 真核生物转录后和翻译后均存在复杂的信息加工,试分析其生物学意义。

主要参考书目

1. Nelson D L, Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000
2. Stryer L. Biochemistry, 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1999
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J D. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York & London: Garland Publishing, 1994
4. Lewin B. Genes. 7th ed. Oxford: Oxford University Press, 2000

第 40 章 基因工程及蛋白质工程

基因工程(genetic engineering)兴起于 20 世纪 70 年代初。1972 年 Berg P 和他的同事将 λ 噬菌体基因和大肠杆菌乳糖操纵子插入猴病毒 SV40 DNA 中,首次构建出 DNA 的重组体(recombinant)。由于 SV40 能使动物致癌,出于安全的考虑,这项工作没有进行下去。第二年,Cohen S 和 Boyer H 将细菌质粒(所谓质粒即染色体外基因)通过体外重组后导入宿主大肠杆菌细胞内,得到基因的分子克隆(molecular cloning),由此产生了基因工程。基因工程是对携带遗传信息的分子进行设计和施工的分子工程,包括基因重组、克隆和表达。基因工程这个术语既用来表示特定的基因施工项目,也可泛指它所涉及的技术体系,其核心是构建重组体 DNA 的技术,因此基因工程和重组体 DNA 技术有时也就成为同义词。蛋白质工程(protein engineering)是在基因工程基础上发展起来的。1983 年 Ulmer K M 最早提出蛋白质工程这个名词,随即被学术界广泛采用。蛋白质工程是指通过对蛋白质已知结构与功能的认识,借助计算机辅助设计,利用基因定位诱变等技术改造蛋白质,以达到改进其某些性能的目的。基因工程和蛋白质工程既反映了基础学科研究的最新成果,也充分体现了工程科学所开拓出来的新技术和新工艺。它的兴起标志着人类已经进入设计和创建新的基因、新的蛋白质和生物新的性状的时代。

一、DNA 克隆的基本原理

克隆(clone)意为无性繁殖系。DNA 克隆即将 DNA 的限制酶切片段插入克隆载体,导入宿主细胞,经无性繁殖,以获得相同的 DNA 扩增分子。故 DNA 克隆为分子克隆。

(一) DNA 限制酶与连接酶

Arber W 等早在 20 世纪 50 年代就已发现大肠杆菌具有对付噬菌体和外来 DNA 的限制系统,及至 60 年代后期始证明存在修饰酶和限制酶,前者修饰宿主自身的 DNA,使之打上标记;后者用以切割无标记的外来 DNA。1970 年 Smith H O 和 Wilcox K W 从流感嗜血杆菌(*Hemophilus influenzae* Rd)中分离出特异切割 DNA 的限制性核酸内切酶,简称为限制酶。1971 年 Danna K 和 Nathans D 用此限制酶切割 SV40 DNA (5 234 bp),绘制出第一个 DNA 限制酶切图谱。此后数年从不同细菌中分离出许多修饰性甲基化酶(modification methylase)和限制性核酸内切酶(restriction endonuclease)。1973 年 Smith 和 Nathans 提出修饰—限制酶的命名法:取分离菌属名的第一个字母,种名的前两个字母,如有株名也取一个字母,当一个分离菌中不只一种酶时,以罗马数字表示分离出来的先后次序。修饰性甲基化酶标以 M;限制酶标以 R。例如,Smith 等最初分离到的限制酶因是第 2 个分离出来的酶,应称为 R·Hind II,但 R 通常都省略不写;相应的甲基化酶则为 M·Hind II。又如,从大肠杆菌 *Escherichia coli* RY13 中分离到的甲基化酶为 M·EcoR I,限制酶为 EcoR I。限制酶的发现为切割基因提供了方便的工具,DNA 重组才得以成为可能。

修饰—限制酶主要有三类。类型 I 酶为多亚基双功能酶,对 DNA 甲基化和切割由同一酶完成。该酶共有三种亚基,S 亚基为识别亚基,识别位点分为两部分序列,中间隔以一定长度的任意碱基对。例如,Eco B 识别序列为 TGAN₆TGCT,Eco K 识别序列为 AACN₆GTGC。M 亚基具有甲基化酶活性,甲基由 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)供给。R 亚基具有限制酶活性,可在远离识别位点至少 1 kb 以上处随机进行切割。当类型 I 酶特异结合在识别位点上时,由于两条链识别位点特定碱基甲基化的不同而发生不同反应。如果两条链均已甲基化则不发生反应,通过分解 ATP 获得能量而使酶从 DNA 上脱落下来。对半甲基化 DNA,即一条链甲基化,另一条链未甲基化,可使未甲基化的链甲基化。在识别位点上两条链均未甲基化,则 DNA 被酶切割,并需要由 ATP 提供能量,推测能量用来弯折 DNA,并在其上移动,使酶得以在远处作用于 DNA。由于切割是随机的,这类酶在基因操作中并无实际用途。

类型 II 酶的修饰和限制活性由分开的两个酶来完成。通常这类甲基化酶由一条多肽链组成,限制酶由两条相同的多肽链组成。类型 II 酶的识别序列常为 4~6 bp 的回文序列。甲基化产生 5-甲基胞嘧啶、4-甲基胞嘧啶或 6-甲基腺嘌呤。甲基化酶能使半甲基化 DNA 识别位点上特定碱基甲基化,甲基化酶每次作用只引入一个甲基。DNA 两条链都已甲基化时无反应,两条链都未甲基化则被限制酶降解。限制酶的切割位点或在识别位点内,或靠近识别位点。切割 DNA 或是将两条链对应酯键切开,形成平末端,或是将两条链交错切开,形成单链突出的末端。切开的两末端单链彼此互补,可以配对,故称为黏性末端。从已知的上千种限制酶来看,形成 5' 单链突出黏性末端的酶超过一半以上,形成平末端和 3' 单链突出黏性末端的酶均较少。由不同微生物分离得到的限制酶,如果识别位点和切割位点完全一样,称为同裂酶(isoschizomers);如仅仅是黏性末端突出的单链相同,称为同尾酶(isocaudamers)。由同尾酶切割的限制片段彼此相连,不能再被原来的限制酶切割。例如, *Bam* HI $\left(\begin{array}{c} \text{G}^{\downarrow} \text{GATCC} \\ \text{CCTAG}^{\uparrow} \text{G} \end{array} \right)$ 的限制片段与 *Bgl* II $\left(\begin{array}{c} \text{A}^{\downarrow} \text{GATCT} \\ \text{TCTAG}^{\uparrow} \text{A} \end{array} \right)$ 的限制片段相连后,其序列变为 $\begin{array}{c} \text{GGATCT} \\ \text{CCTAGA} \end{array}$,与原来两个限制酶的识别序列均不相同,因此不再为原来的酶所切割。

类型 III 酶为两个亚基双功能酶, M 亚基负责识别与修饰, R 亚基负责切割。其修饰与切割均需 ATP 提供能量,切割位点在识别位点下游 24~26 bp 处。

限制酶的生物学功能在于降解外来的 DNA,自身 DNA 的酶切位点由于修饰酶的甲基化而受到保护。在基因工程操作中限制酶可作为切割 DNA 分子的手术刀,用以制作 DNA 限制酶谱,分离限制片段,进行 DNA 体外重组等,是十分有用的工具酶。

限制片段常用凝胶电泳或高效液相层析(HPLC)法分离。DNA 连接酶(DNA ligase)可将 DNA 相容末端(compatible ends)彼此连接。实验室使用的 DNA 连接酶有两种: T_4 DNA 连接酶和大肠杆菌 DNA 连接酶,前者以 ATP 提供连接所需能量,后者以 NAD^+ 提供能量。 T_4 DNA 连接酶可以连接黏性末端,也可以连接平末端;大肠杆菌 DNA 连接酶只连接黏性末端。因此, DNA 连接反应常用 T_4 DNA 连接酶,大肠杆菌 DNA 连接酶使用较少。

互补黏性末端之间碱基配对促使连接反应容易进行。平末端之间连接反应效率很低,为提高平末端连接效率常采取以下措施:①提高 T_4 DNA 连接酶浓度;②提高 DNA 片段浓度;③降低 ATP 浓度,以增强连接酶与 DNA 的结合;④加入多胺化合物,如亚精胺(spermidine),降低 DNA 的静电排斥力;⑤加浓缩剂,如大分子排阻物乙二醇(PEG)、强水化物三氯化六氨钴等。

DNA 片段两末端若为相容黏性末端或平末端,连接时可以发生分子间串联,或是分子自身环化。此两过程以何者占优势取决于 DNA 片段的链长与浓度, DNA 链较短,浓度较低,有利于自身环化;反之,链较长,浓度较高,有利于分子间串联。DNA 的黏性末端和平末端连接见图 40-1。

在 DNA 的末端加上一段限制性内切酶的识别序列,随后用限制酶切出所需要的黏性末端,使 DNA 的平末端连接得以转变成为较易进行的黏性末端连接。此合成的含限制酶识别序列的 DNA 片段称为接头(linker),通常是一条回文结构(palindrome)的寡核苷酸,在溶液中自身配对成为双链片段。例如, *Eco*R I 的接头为 GGAATTC; *Hind* III 的接头为 CCGAAGCTTGGG。限制酶的切割位点靠近 DNA 片段的末端时其活性将受影响,不同限制酶受影响不同,因此限制酶的接头通常要比识别序列长, *Eco*R I 的接头八核苷酸就足够了, *Hind* III 的接头十二核苷酸仍然酶切不完全。当合成的片段含有不只一种限制酶的识别序列,则称为多接头(polylinker)。如果合成两条互补的寡核苷酸,使其配对后一端为平末端,另一端为黏性末端,或两端为不同的黏性末端,此合成的片段称为衔接物(adaptor)。衔接物可以使 DNA 片段的平末端转变为黏性末端,或由一种黏性末端转变为另一种黏性末端,并且无需用限制酶切,在基因工程中十分有用。现举例说明如下:

*Eco*R I - *Sma* I 平末端衔接物

5'...AATTCCCGG...3'

3'...GGCCCC...5'

EcoR I - *Xmn* I - *Bam*H I 衔接物

EcoR I *Xmn* I *Bam*H I

5'...AATTCCAACCCCTTCG...3'

3'... GCTTGGGGAAGCCTAG...5'

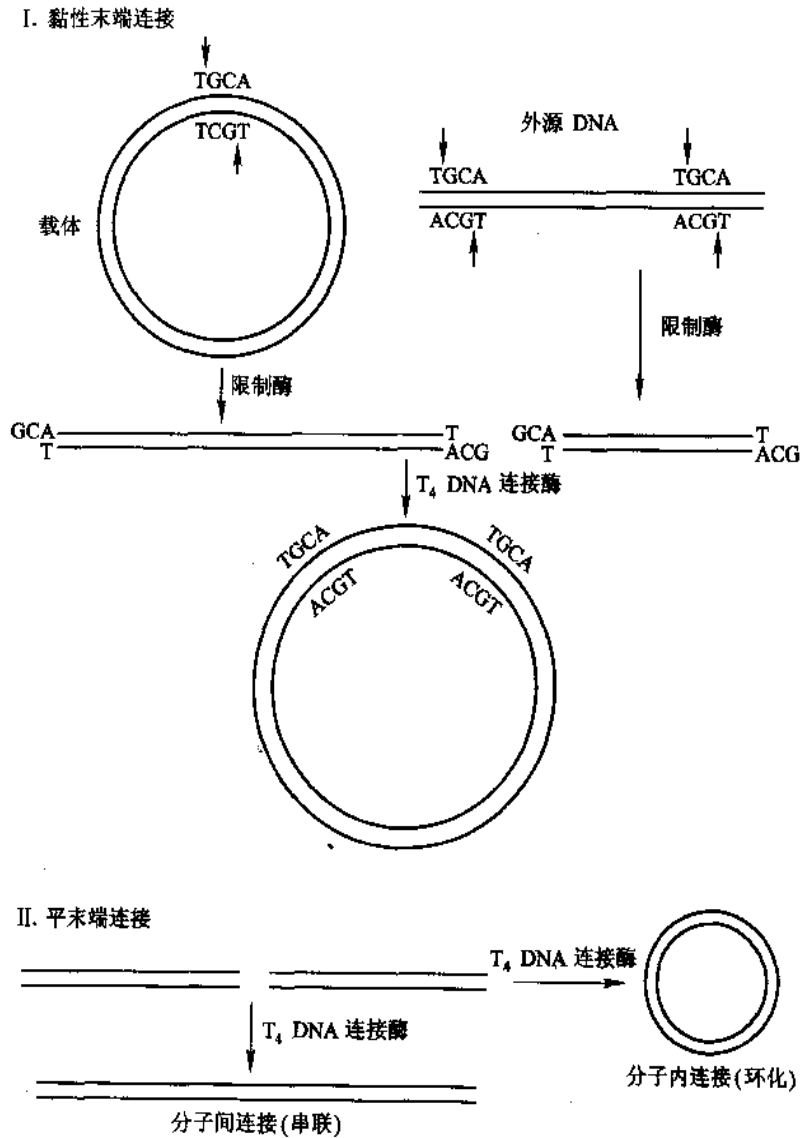


图 40-1 DNA 的连接

在需要连接的两个 DNA 片段末端加上互补的均聚核苷酸后,连接反应比较容易进行。末端核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)能催化 DNA 末端 3'-OH 上添加脱氧核苷酸。如果在一个 DNA 片段的末端添加寡聚 dT,在另一片段末端添加寡聚 dA;或者分别添加寡聚 dC 和寡聚 dG,这样两个片段末端可以“粘合”。然后用 DNA 聚合酶(常用 DNA 聚合酶 I 的大片段 Klenow 酶)填补缺口,最后留下的缺刻被 T_4 DNA 连接酶连上,互补均聚核苷酸末端的连接可见图 40-2。

在基因工程操作中需要用到许多工具酶,除上面提到的限制酶、修饰酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶及末端核苷酸转移酶外,常用的酶还有逆转录酶、RNA 聚合酶、多核苷酸激酶、磷酸酯酶、核酸外切酶及核酸内切酶等。基因工程酶学已成为基因工程技术体系的主要内容之一。

(二) 分子克隆的载体与宿主系统

借助限制酶可切出含有目的基因序列的 DNA 片段。将外源 DNA 带入宿主细胞并进行复制的运载工

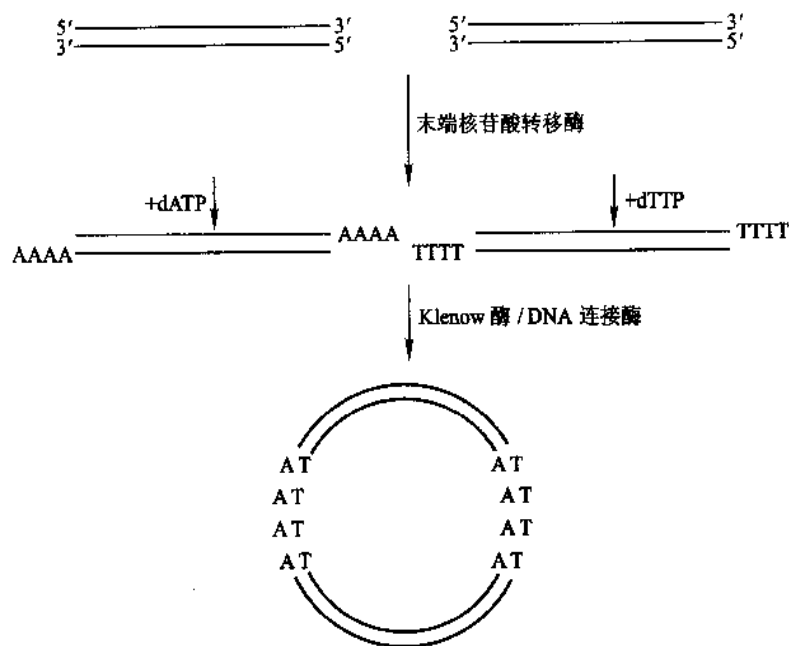


图 40-2 互补均聚核苷酸末端之间的连接

具称为载体(vector)。克隆载体含有在受体细胞内复制的起点,因此可以自主复制,是一个复制子。克隆载体,通常是由质粒、病毒或一段染色体 DNA 改造而成,质粒是染色体外自主复制的遗传因子,多为共价闭环 DNA 分子。细菌与真菌的克隆载体常用质粒来构建,只对特殊的要求才用噬菌体构建。动、植物的基因载体更多是用病毒或染色体 DNA 构建。

作为克隆载体最基本的要求是:①具有自主复制的能力;②携带易于筛选的选择标记;③含有多种限制酶的单一识别序列,以供外源基因插入;④除保留必要序列外,载体应尽可能小,便于导入细胞和进行繁殖;⑤使用安全。从安全性上考虑,克隆载体应只存在于有限范围的宿主,在体内不进行重组,不发生转移,不产生有害性状,并且不能离开工程宿主自由扩散。此外,根据不同目的还有各种特殊的要求。

构建载体时,通常需选择适当质粒、病毒或染色体复制子作为起始物质,删除其中非必需序列,然后插入或融合选择标记序列。最常用的选择标记是对抗生素的抗性基因,如抗氨苄青霉素(*amp^r*)、抗四环素(*tet^r*)、抗氯霉素(*cmi^r*)及抗卡那霉素(*kan^r*)等。利用营养缺陷型宿主可以将相应生物合成基因作为标记,带有合成基因的载体可使宿主细胞在基础培养基中生长,无需补充原来所缺的营养成分。如果抗性基因位于转座子中,可通过转座作用转入载体。当载体过大时,常用限制酶将其切成小碎片,再随机连接,并用选择培养基选出带有抗性、拷贝数多、长度较小的载体,此过程称为分子重排(rearrangement)。在构建载体时保留一些限制酶的切点可作为外源 DNA 插入位点。现常用一段合成的多接头插入载体,其上十分紧凑地排列着多种限制酶的单一识别序列,因此在用限制酶切时不致将载体切成碎片。对于载体上不合适的序列则需要用定位诱变的方法予以改造。

从 20 世纪 70 年代初基因工程诞生至今约 30 年,克隆载体发展大致可分为三个时期:第一个时期,主要依赖天然存在的质粒,如 1973 年 Cohen 等最早使用的载体 pSC101。其后对载体做了许多改造,其中包括删除非必需序列,引入标志基因,减少酶切位点等。1977 年 Bolivar 等从天然存在的质粒出发,经删除、融合、转座及重排等操作,构建成功适合多种用途至今仍在广泛使用的克隆载体 pBR322。它全长 4 361 bp,而非过去以为的 4 363 bp,含两个抗性基因(*tet^r* 和 *amp^r*),具有天然质粒 pMB 的复制起点(*ori*)。pSC101 的复制受严紧型控制(stringent control),每个细胞只有 1~2 个拷贝;而 pBR322 为松弛型控制(relaxed control),每个细胞含 25 个拷贝以上(图 40-3)。由于染色体的复制需要新合成的蛋白质参与作用,质粒的复制通常无需蛋白质合成,因此当培养基中加入蛋白质合成的抑制剂,如氯霉素和链霉素,细胞不再生长,也不复制染色体,全部有关底物和酶都用于合成质粒,质粒载体的数目可达 1 000~3 000 拷贝。

现今许多新构建的载体,往往是由 pBR322 改建而成。

第二个时期大致为 20 世纪 70 年代后期至 80 年代中期,其间构建出了一批相对分子质量小、拷贝数多、具有多种特殊性能的载体。1982 年 Vieira 和 Messing 构建出 pUC 系列的质粒载体,集中了当时载体的诸多优点。它包括 4 个组成部分:①来自 pBR322 的复制起点(ori);②氨苄青霉素抗性基因(*amp^r*),但其序列已经过改造,不再含原来的限制位点;③大肠杆菌乳糖操纵子的调节基因(*lac i*)、启动子(*plac*)和 β -半乳糖苷酶的 α -肽(*lac Z'*);④位于 *lac Z'* 基因中靠近 5'端的一段多接头,或称为多克隆位点(MCS)。

当宿主细胞的 β -半乳糖苷酶基因发生删除突变($\Delta M15$),缺失 N 端的一段氨基酸序列,使酶失活,但在 α -肽存在时可以互补使酶恢复活性。携带 pUC 质粒载体的大肠杆菌细胞在异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)的诱导下发生 α -互补,可使呈色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, X-gal)被分解产生蓝色。多接头上十分紧密地排列着多种限制酶的单一识别序列,外源基因在此插入后使 α -肽失活,因此携带空载体的大肠杆菌呈蓝菌落,携带外源基因的菌落呈白菌落。用此组织化学方法能够十分方便地鉴别重组克隆。pUC 质粒载体相对分子质量较小,如 1985 年构建成的 pUC 18 和 19 全长 2 686 bp, pUC 18 和 19 二者差别只在多接头的方向不同,其余结构完全一样。该载体不仅相对分子质量小,而且还除去了控制质粒拷贝数的基因 *rop*,从而使每个细胞含质粒载体高达 500~700 个拷贝。此外, pUC 系列还除去了质粒转移时被切开及与牵引蛋白(Mob)结合的位点 *nic/bom*,不会发生转移。在此期间,用于酵母、昆虫、高等动、植物基因工程的各种载体也得到了发展。

第三个时期也就是近期,主要借助一些辅助序列引入新的功能,如在 pUC 18/19 质粒载体中插入丝状噬菌体 M13 的基因间隔区(intergenic region, IG region),其中含有单链复制起点,在 M13 辅助噬菌体帮助下可以产生单链 DNA 模板,该载体称为 pUC 118/119(图 40-4)。又如,在多接头的一端插入噬菌体 SP6 的启动子构成 pSP 系列质粒载体。SP6 启动子可被 SP6 RNA 聚合酶特异识别,因而能够在体外进行高效转录。载体 pGEM 系列和 Bluescript M13 十分类似,它们都含有标记基因 *amp^r* 和 *lac Z'*,丝状噬菌体 f1 的 IG 区,并在多接头的两端插入高效转录的启动子, pGEM 系列载体插入 T₇ 和 SP6 启动子, Bluescript M13 插入 T₃ 和 T₇ 启动子,因此用相应特异的 RNA 聚合酶在两个方向都能进行体外高效转录。

质粒载体用途很广,借助插入各种特殊序列而适用于不同目的。当质粒含有噬菌体的复制起点时,称为噬菌质粒(phagemid),在有关噬菌体帮助下可按噬菌体的方式复制和装配。上述 pUC118/119、pGEM 系列以及 Bluescript M13 均为噬菌质粒。若质粒含有两种宿主细胞中复制的起点,可在两种细胞中复制和存在,则称为穿梭质粒(shuttle plasmid)。真核生物的克隆载体,为便于操作,常使其先在大肠杆菌中扩增,将目的基因与之构成合适的重组体后,才转入真核细胞,因此常构成穿梭载体。如插入控制外源基因在宿主细胞内表达的序列,称为表达载体(expression vector)。

一般质粒载体约可携带外源 DNA 数千碱基,但如欲构建基因文库(genomic library),需要载体的容量

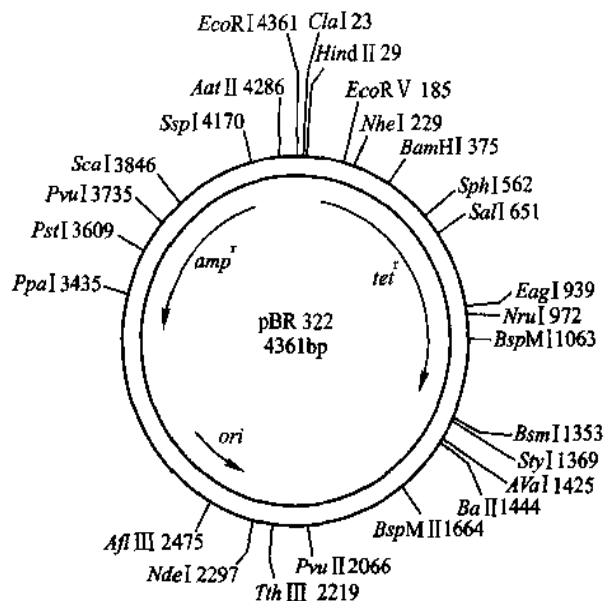


图 40-3 质粒 pBR322

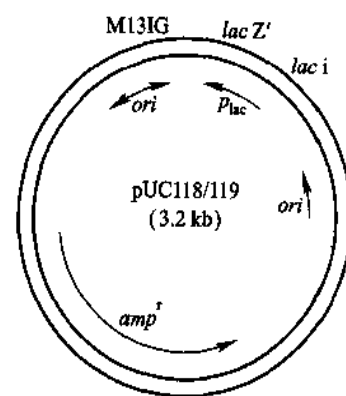


图 40-4 质粒载体 pUC118/119

更大些,常用λ噬菌体改造而成的载体。λ噬菌体是大肠杆菌中的一种温和噬菌体,基因组为双链 DNA,大小在 50 kb 左右。DNA 两端有黏性末端,由 12 个核苷酸组成。一旦进入宿主细胞后,λDNA 两端的黏性末端配对结合,形成环状。λDNA 可以通过两条不同的途径增殖。一条称为裂解途径(lytic pathway)。环状 DNA 经过多次复制后,才合成病毒蛋白,装配出许多子代病毒粒子,最终导致宿主细胞裂解,释放出许多病毒颗粒。另一条途径称为溶原途径(lysogenic pathway)。λ噬菌体 DNA 插入到细菌染色体 DNA 中,随染色体 DNA 的复制而复制。这时细胞内并无噬菌体颗粒。但某些因子可诱导细菌经裂解途径产生噬菌体。

在整个λ噬菌体基因组中,约有三分之一的 DNA 序列对于噬菌体的复制和装配来说并不是必需的,因此可以用外源 DNA 取代这部分 DNA。此时,λ噬菌体携带外源 DNA 一起增殖,起到载体的作用。已经设计出许多可用于 DNA 重组技术的λ噬菌体载体,其中用得较多的是凯伦(Charon)和λgt 系列。

λ噬菌体载体可分为插入型(insertion)和置换型(substitution)两种,前者将线性载体用单个限制酶切开后即可将外源基因相容限制片段与载体两臂连接;后者需切除载体的一个片段,再将外源基因与之替换。无论是前者还是后者,携带外源基因后重组体 DNA 总长度应为λ噬菌体 DNA 的 78%~105%,病毒外壳蛋白才能将其装配成病毒颗粒。用λ噬菌体 DNA 作载体进行 DNA 克隆的另一个优点是易于使细胞感染,提高了使外源 DNA 导入细胞的效率,这对于建库来说十分重要。图 40-5 为以λ噬菌体载体克隆 DNA 的图解。

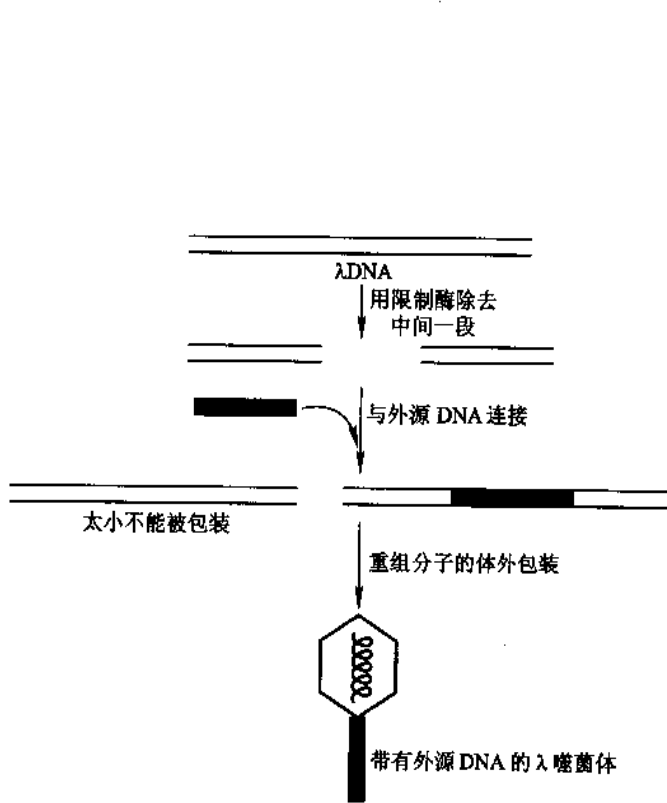


图 40-5 以λ噬菌体为载体进行 DNA 克隆

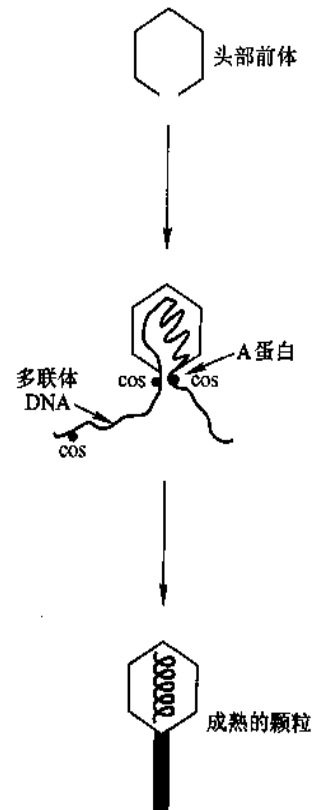


图 40-6 在宿主细胞内进行λDNA 的装配过程

λ噬菌体外壳蛋白在包装噬菌体颗粒时,需先形成囊状头部前体。λDNA 经滚环复制使单位长度基因组(单体)串联成一条长链,称为多联体(concatemer),彼此以 cos 位点相连接。噬菌体编码的 A 蛋白结合在 cos 位点上,并将λDNA 带到头部前体的入口处, DNA 填满头部,A 蛋白在 cos 位点处交错切开λDNA,产生黏性末端(cohesive end)。接着分别装配的针筒状尾部与头部结构连成一体,最终成为成熟的λ噬菌体颗粒(图 40-6)。所以只要 DNA 中有 cos 位点,即可与外壳蛋白进行包装。含有 cos 位点的质粒称为柯斯质粒(cosmid),这种质粒可以携带大至 35~48 kb 的外源 DNA,而λ噬菌体载体最多只能携带 23 kb 的外源 DNA。柯斯质粒主要用于构建基因文库,以获得基因组大片段 DNA 的克隆。柯斯质粒与外源 DNA 的重组

体只要两 *cos* 位点间的长度合适,即可装配成 λ 噬菌体颗粒,但其中的 DNA 却并非 λ DNA。该噬菌体颗粒仍可感染大肠杆菌,进入宿主细胞内的重组柯斯质粒携带了外源 DNA,因不含 λ 噬菌体基因,只以质粒形式存在于细胞内。图 40-7 为柯斯质粒克隆基因组 DNA 的示意图。

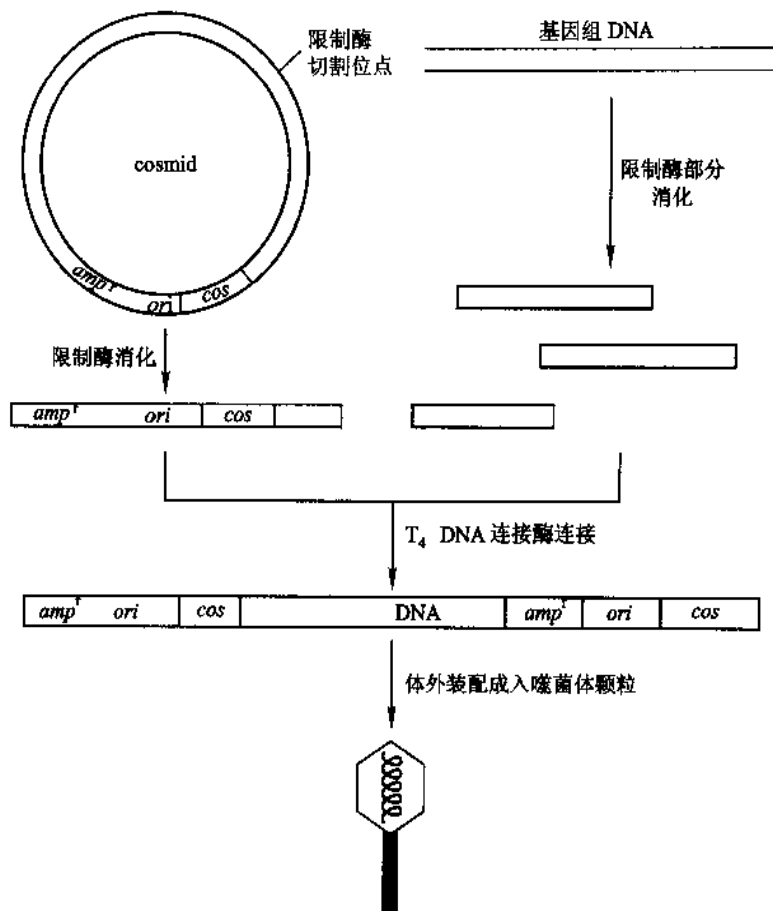


图 40-7 柯斯质粒载体克隆基因组 DNA

大肠杆菌丝状噬菌体包括亲缘关系十分相近的 M13、f1 和 fd,它们都含有长度为 6.4 kb 的单链环状 DNA,基因组共编码 10 种蛋白质(或小肽),复制起点和装配起始信号均位于基因间隔区(intergenic region, IG)。丝状噬菌体经 F 菌毛(pilus)感染大肠杆菌。噬菌体 DNA 的复制需先将单链 DNA(ssDNA)转变成双链复制形式 DNA(replication form DNA, RF DNA)。构建 M13 载体(M13 mp 系列)是在 M13 复制型的 IG 区插入乳糖操纵子(*lac*)的一个片段,其中包含 *lac I^r*(*lac I* 的突变体,可以产生超量阻遏蛋白)、*lac* 启动子(*P*)以及带有多接头的 *lac Z'*(β -半乳糖苷酶的 α -肽),使 M13 载体转染宿主细胞后,在 IPTG 和 X-gal 存在下由于 α -互补作用产生蓝色噬菌斑;但若载体插入外源 DNA,不形成 α -互补,只产生白色噬菌斑。这为重组噬菌体的筛选提供了方便的标志。

丝状噬菌体复制型双链 DNA 先经过几轮 θ 型复制,再通过滚环复制产生单链正链 DNA,正链 DNA 环化后装配成噬菌体颗粒。外壳蛋白在合成后即转移到质膜上,装配发生在噬菌体单链 DNA 复合物穿膜过程中。装配不受基因组 DNA 长度的影响,M13 载体通常携带外源 DNA 300~400 bp,过长易造成基因组不稳定。由于从丝状噬菌体颗粒中可得到单链 DNA 模板,因此这类载体主要用于制备单链探针、单链测序和定位诱变。近年来噬菌体展示技术得到迅速发展,该技术是将外源基因通过接头与噬菌体外壳蛋白基因相融合,从而使外源蛋白能够在噬菌体表面展示,借此可以研究蛋白质分子的相互识别与作用,或从展示库中选择特定功能的蛋白质。噬菌体展示主要用噬菌体 M13 作为载体。

现将大肠杆菌主要的载体系统列于表 40-1。

表 40-1 各类载体的主要功用

	质粒	λ 噬菌体	柯斯质粒	单链噬菌体
实 例	pBR322、pUC 系列 Bluescript M13	凯伦、 λ gt 系列	pJC、pWE 系列	M13 mp 系列
克隆 DNA 片段大小	< 10 kb	< 23 kb	< 49 kb	300 ~ 400 bp
装配成噬菌体颗粒	不能	能	能	能
用 途	外源基因的克隆和 表达, 以及各种基 因操作和分析	建基因文库和 cDNA 文库	建基因文库	制备单链模板和 单链探针、定位诱 变、噬菌体展示

选择克隆载体的宿主细胞通常要满足以下要求: ①易于接受外源 DNA, 为感受态细胞 (competent cells); ②宿主细胞必须无限制酶, 即其防护宿主 DNA 系统 (host safeguarding DNA system, hsd) 应为 S^- 、 R^- 、 M^- ; ③宿主细胞应无重组能力, 即 $rec A^-$; ④宿主细胞应易于生长和筛选, 克隆载体的选择标志必须与之匹配, 例如载体带有 α -肽基因 $lac Z'$, 其宿主细胞的 β -半乳糖苷酶基因必须是突变体 $lac Z \Delta M15$; ⑤符合安全标准, 通常工程菌的生长都必须依赖人工的培养基, 在自然界不能独立生存, 对于有害基因的克隆, 宿主细胞应有更高的安全要求。

(三) 外源基因导入宿主细胞

1. 外源基因导入原核细胞

早在 1944 年, Avery 就已证明 DNA 进入肺炎双球菌细胞能引起遗传性状的转化。1970 年 Mandel 和 Higa 将大肠杆菌细胞置于冰冷的 $CaCl_2$ 溶液中, 然后瞬间加热, λ DNA 随即高效转染大肠杆菌。将外源 DNA 导入宿主细胞, 以改变细胞遗传性状, 称为转化 (transformation); 将病毒 DNA 或病毒重组 DNA 直接导入宿主细胞, 称为转染 (transfection), 以与病毒的感染 (infection) 相区别。用氯化钙法使大肠杆菌细胞处于感受态, 从而将外源 DNA 导入细胞, 至今仍然是应用最广的方法。氯化钙法的作用机制并不完全清楚, 可能是在低温下 Ca^{2+} 使质膜变脆, 经瞬间加热产生裂隙, 外源 DNA 得以进入细胞内。制备感受态细胞的方法有不少改进, 主要是加入各种金属离子或用还原剂和二甲亚砜处理细胞膜。

采用脉冲高压电瞬间击穿双层细胞膜能使外源 DNA 高效导入细胞, 该方法称为电穿孔法 (electroporation)。电击转化的效率与两电极间的电位梯度有关; 在相等电位梯度下, 细胞越大, 细胞两端的电位差也越大, 因此细胞膜易被击穿。用于动、植物细胞的电穿孔仪所需电压远比用于细菌的为低, 前者只需数百伏, 后者需要数千伏。早期电穿孔法主要用于转化动、植物细胞; 现在已有专门用于细菌、真菌、藻类等的电穿孔仪出售, 各类微生物用电穿孔法转化已十分普遍。

2. λ 噬菌体的体外包装

λ 噬菌体颗粒能将其 DNA 分子有效注入大肠杆菌宿主细胞内, 而与颗粒内所含 DNA 的来源无关。前已提到, 重组的 λ 噬菌体载体 DNA 或柯斯载体 DNA, 只要大小合适, 都能和 λ 噬菌体外壳蛋白和协助包装的蛋白一起在体外包装成噬菌体颗粒。将重组体 DNA 包装成噬菌体颗粒可以大大提高导入宿主细胞的效率, 在适宜条件下每微克重组 DNA 可形成 10^9 以上的 pfu (plaque forming unit, 噬菌斑形成单位), 比感受态细胞的转化率提高 $10^2 \sim 10^3$ 倍。

λ 噬菌体的体外包装技术, 最初是由 Becker 和 Gold 于 20 世纪 70 年代中建立的。随后经过不少改进, 现在已能十分简便和有效的进行操作, 各种包装制剂也都有商品出售。

为获得 λ 噬菌体的整套包装蛋白, 以与重组 DNA 在体外进行包装, 必须设法阻止包装蛋白与细胞内 λ DNA 的包装。有两种方法可以实现这一点。其一, 从两株各带有 λ 噬菌体缺陷溶源体的大肠杆菌中制备出一对互补的提取物。这两种提取物分别缺少一种关键的包装蛋白, 它们单独存在时不会与内源 λ DNA 发生包装, 只在有重组 DNA 存在时将二者合并, 包装才得以完成。例如, 溶源性菌株 BHB2690 和 BHB2688, 其 λ 噬菌体头部蛋白 D 和蛋白 E 的基因分别为琥珀突变, 必须互补才能发生包装。其二, 溶原

菌的 λ 溶原体, *cos* 位点被去除, 因此可用单一菌株的包装蛋白提取物, 因其只能和外源重组 DNA 发生包装。

3. 外源基因导入真核细胞

基因工程有时需要将外源基因导入真核细胞, 以进行基因改造和表达。常用的真核工程细胞包括酵母细胞、动物细胞和植物细胞。酵母菌由于生长条件简单, 成为真核生物基因工程优先选择的宿主细胞。酵母细胞进行外源 DNA 的转化, 常需先用酶将细胞壁消化掉, 制成原生质体。蜗牛消化酶含纤维素酶、甘露聚糖酶、葡糖酸酶及几丁质酶等, 它对酵母菌的细胞壁有良好水解作用。原生质体在 CaCl_2 和聚乙二醇存在下, 重组 DNA 便很容易被细胞吸收。再将转化的原生质体悬浮在营养琼脂中, 即再生出新的细胞壁。

外源基因导入动物细胞常用的方法有: ①磷酸钙共沉淀法, 用 Ca^{2+} 沉淀磷酸离子和 DNA, 沉积在细胞质膜上的 DNA 被细胞吸收, 可能是通过吞噬作用; ② DEAE - 葡聚糖 (DEAE - dextran) 或聚阳离子 (polycation), 它能结合 DNA 并促使细胞吸收; ③脂质体 (liposome) 法, 利用类脂经超声波、机械搅拌等处理, 形成双层小囊泡, 将 DNA 溶液包裹在内, 它通过与细胞质膜融合而使 DNA 进入细胞; ④脂质转染法 (lipofectin), 用人工合成的阳离子类脂与 DNA 形成复合性, 借助类脂穿过质膜而将 DNA 导入细胞内; ⑤电穿孔法, 如上所述在脉冲高压电场作用下质膜瞬间被击穿, DNA 得以进入细胞, 细胞膜随即恢复正常。在以上诸方法中, 磷酸钙共沉淀法成本低、操作方便, 但效率低; 脂质转染法和电穿孔法, 前者需要昂贵的试剂, 后者需要特殊的仪器, 但效率高, 现在较常用。对哺乳动物受精卵等较大的细胞, 导入外源 DNA 可以用显微注射法。在显微镜下, 用极细的玻璃注射器针头 ($0.1 \sim 0.5 \mu\text{m}$) 插入细胞内并注入 DNA 溶液。该方法效率极高, 还可直接将 DNA 送入核内, 但需要昂贵仪器, 且技术复杂不易掌握好。

将外源 DNA 导入植物细胞, 通常需要先利用纤维素酶消化细胞壁, 制备原生质体, 植物细胞的原生质体经聚乙二醇 (PEG)、磷酸钙、氯化钙等化学试剂处理后, 即可有效摄取外源 DNA。前述电穿孔法和脂质体法也适用于原生质体的转化。原生质体经细胞培养后可以再生出细胞壁。显微注射法可直接将外源 DNA 注入细胞内, 而无需制备原生质体。根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的 Ti 质粒 (tumor-inducing plasmid) 有一段 T-DNA, 即转移 DNA, 能携带基因转移到植物细胞内并整合到染色体 DNA 中。因此 Ti 质粒是目前植物基因工程最常用的基因载体。将外源基因插入 Ti 质粒载体的 T-DNA 内, 借助土壤杆菌而将外源基因导入植物细胞。土壤杆菌能够从植株伤口处侵入, 吸附在植物细胞壁上, T-DNA 随即进入植物细胞内, 诱发植株形成冠瘿瘤, 土壤杆菌本身并不进入植物细胞。将带有重组 Ti 质粒的土壤杆菌上与刚再生了新细胞壁的原生质体共同培养, 易于促使植物细胞发生转化。目前较常用的是叶盘转化法 (leaf disc transformation), 即用打孔器从叶片上取下盘状圆片, 然后接种上土壤杆菌, 各在培养皿中培养, 再经“长芽培养基”和“生根培养基”诱导叶盘长芽和生根, 最后将转化的植株移栽在土壤中。借助土壤杆菌将外源基因导入植物细胞的方法有一定局限性, 因土壤杆菌只能感染双子叶植物, 不能感染单子叶植物。

利用动物病毒和植物病毒作为转移基因的载体, 不仅能将外源基因导入培养的细胞, 而且可以直接导入个体, 通常效率都比较高。然而使用病毒载体应特别注意安全性, 在构建载体时通常需将病毒的毒性基因删除, 并有效防止病毒基因组在细胞内发生重组。在个体水平上进行转基因的另一有效方法是采用高速微弹发射装置 (high-velocity microprojectiles bombardment), 俗称基因枪 (gene gun)。常用直径为 $1 \mu\text{m}$ 左右的惰性强金属粉末作为微弹, 如钨粉或金粉, 其上沾有 DNA, 置于档板的凹穴内。当用火药或高压气体发射弹头撞击档板时, 微弹即以极高的速度射向靶目标。基因枪在植物基因工程中使用较多, 常用携带外源 DNA 的微弹射击植物的分生组织, 获得转基因植物。用基因枪射击动物的表皮、肌肉和乳房等获得成功的例子也有报道。

二、基因的分离、合成和测序

从事一项基因工程。通常总是先要获得目的基因, 倘若基因的序列是已知的, 可以用化学方法合成, 或者用聚合酶链式反应 (PCR) 由模板扩增。此外, 最常用并且无需已知序列的方法是建立一个基因文库

(genomic library)或 cDNA 文库(cDNA library),从中筛选出目的基因的克隆。

(一) 基因文库的构建

基因文库是指整套由基因组 DNA 片段插入克隆载体获得的分子克隆之总和。在理想情况下基因文库应包含该基因组的全部遗传信息。究竟基因文库中应包含多少 DNA 克隆才能使任意所需要的基因以极高的概率存在于该库中? 其计算公式如下:

$$N = \ln(1 - p) / \ln(1 - f)$$

式中: N —基因文库所包含克隆的数目;

p —任意所需基因存在于基因文库中的概率,通常要求其大于 99%;

f —克隆的 DNA 片段大小(bp)占基因组大小(bp)的分数。

例如,哺乳动物单倍体基因组含有 3×10^9 (bp),用 λ 噬菌体为基因文库的克隆载体,所克隆基因组 DNA 片段的大小为 2×10^4 bp,为使目的基因存在库中的概率大于 99%,该基因文库含有重组体克隆数应大于:

$$N = \ln(1 - 0.99) / \ln[1 - (2 \times 10^4 / 3 \times 10^9)] = 6.9 \times 10^5$$

在构建基因文库时按上公式计算,可以估计各步操作所应达到的数量。

基因文库的构建,大致可分为五个步骤:

(1) 染色体 DNA 的片段化 从生物组织中提取染色体 DNA 需将其切割成一定大小的片段,才能在插入 λ 噬菌体载体后被包装成噬菌体颗粒。DNA 的切割必须是随机的,这样才可使各种不同片段被克隆的概率相等。细长的 DNA 分子很容易用机械的方法随机切割,如 DNA 溶液用超声波处理、高速搅拌或通过细的注射器针头等。机械切割 DNA 片段的克隆操作比较麻烦,需要先将片段分级分离,取合适大小的片段,并使末端填平补齐,再连上衔接物,方能与相应切开的载体 DNA 两片段(臂)连接。而用限制酶部分消化的 DNA 片段克隆比较方便,只需将消化所得片段经分级分离后就可以直接与相应切开的载体 DNA 连接。但是由于限制酶的切点在染色体 DNA 中的分布并非随机的,采用识别序列较短的限制酶部分消化所得片段的随机程度比识别序列长的限制酶消化片段要高些。经常用来构建基因文库的限制酶是识别 4 bp 的 *Mbo* I 和 *Sau* 3A 等,它们接近于随机切割,称为准随机切割(quasi-random cutting)。此外,限制片段超过一定大小范围就不能在 λ 噬菌体载体中克隆,因此,在构建基因文库过程中可能会丢失一部分遗传信息。

(2) 载体 DNA 的制备 选择适当的 λ 噬菌体载体或柯斯质粒 DNA,用限制酶切开,得到左、右两臂,以便分别与染色体 DNA 片段的两端连接。

(3) 体外连接与包装 将染色体 DNA 片段与载体 DNA 片段用 T_4 DNA 连接酶连接。然后重组体 DNA 与 λ 噬菌体包装蛋白在体外进行包装。

(4) 重组噬菌体感染大肠杆菌 将 λ 噬菌体载体与外源 DNA 连接和包装得到的重组噬菌体,用以感染大肠杆菌。重组体 DNA 在大肠杆菌细胞内经增殖并裂解宿主细胞,产生的溶菌产物组成重组噬菌体克隆库,即基因文库。柯斯质粒具有更大的容载外源 DNA 的能力,它虽然也能包装成噬菌体类似的颗粒并按噬菌体感染的方式将重组 DNA 导入大肠杆菌细胞,但载体中已将噬菌体增殖和裂解的基因删除,重组体 DNA 进入宿主细胞后只能以质粒的形式存在和复制,不再能包装成噬菌体颗粒。因此,由柯斯质粒构建的基因文库是以细菌克隆组成的,而不是噬菌体克隆库。

(5) 基因文库的鉴定和扩增 构建得到的基因文库应测定其库容量,即库中包含的克隆数,通常以噬菌斑形成单位或菌落形成单位(colony forming unit, cfu)来表示,前者指重组噬菌体克隆数,后者指含重组体 DNA 的细菌克隆数。对于文库的鉴定,可以通过随机挑选一定数量的克隆,用限制酶切、PCR 或其他方法分析其重组体 DNA 来进行。一个基因文库可以多次使用,从中筛选出各种克隆的基因,如果需要可以适当对文库加以扩增。但是在扩增基因文库时必须认识到并不是所有克隆成员都是等速增殖的,插入外源 DNA 在大小及序列上的差异可能会影响重组体的复制速度。这样,当基因文库经过扩增后,某些重组体的比例可能会增加,而另一些重组体可能会减少,甚至全然丢失。现在由于新的载体和克隆技术的发展,

构建基因文库的程序已大为简化,一些工作者宁愿在每次筛选基因时重新构建,而不喜欢使用经过贮存和扩增的基因文库。构建基因文库的全部过程可以归纳为图 40-8。

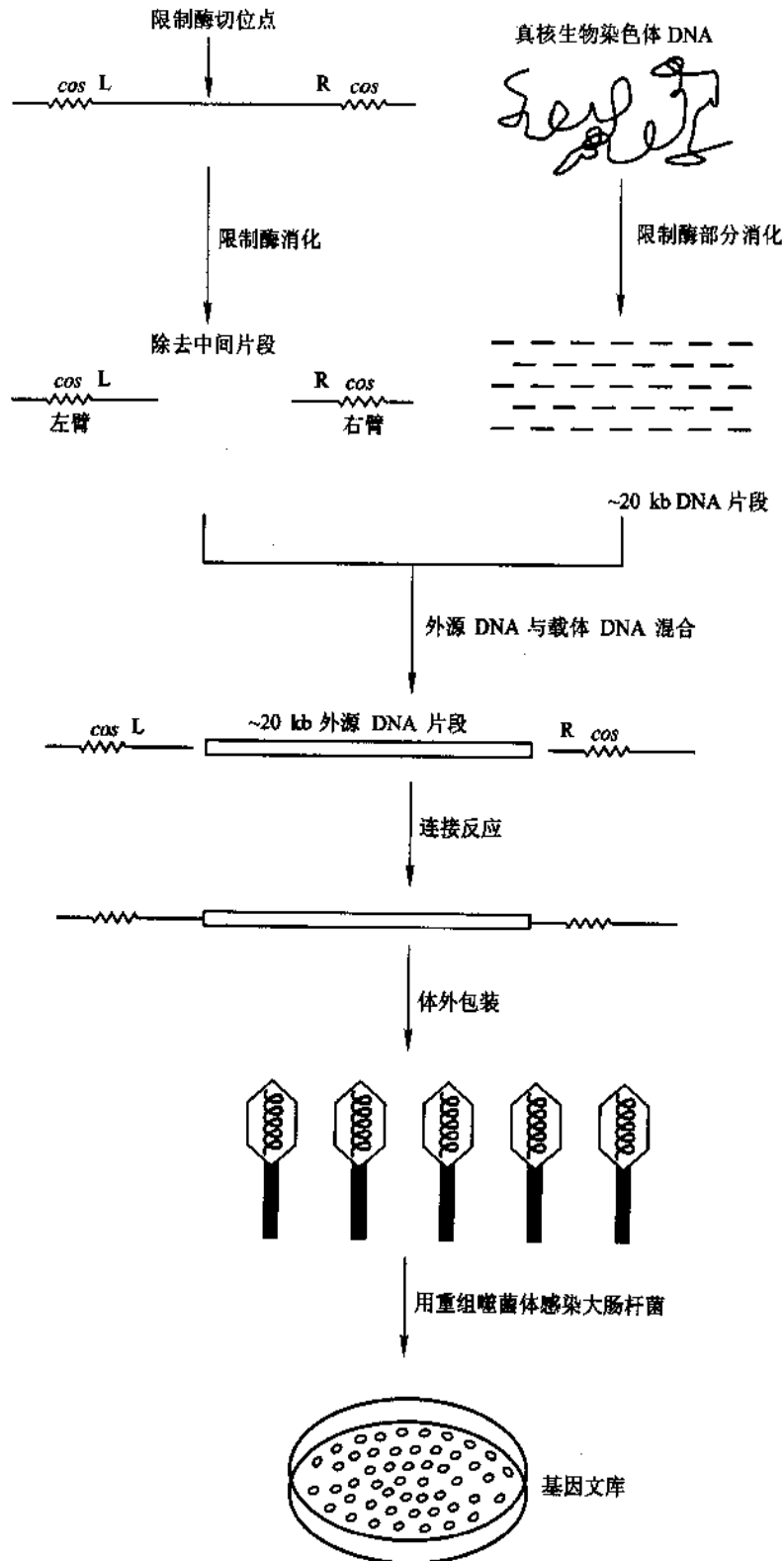


图 40-8 用随机切割的真核生物染色体 DNA 片段构建基因文库

(二) cDNA 文库的构建

1. cDNA 文库构建的原理

真核生物基因的结构和表达控制元件与原核生物有很大的不同。真核生物的基因是断裂的,在基因

最后产物中表达的编码序列(外显子)被非编码序列(内含子)分隔开,需经 RNA 转录后加工过程才使编码序列拼接在一起。真核生物的基因不能直接在原核生物中表达,只有将加工成熟的 mRNA 经逆转录合成互补的 DNA(complementary DNA, cDNA)接上原核生物表达控制元件,才能在原核生物中表达。再有,真核细胞的基因通常只有一小部分进行表达,由于 mRNA 的不稳定性,对基因表达和有关 mRNA 都常通过对其 cDNA 来进行研究的。为分离 cDNA 克隆或研究细胞的 cDNA 谱,需要先构建 cDNA 文库。所谓 cDNA 文库是指细胞全部 mRNA 逆转录成 cDNA 并被克隆的总和。

高等动、植物机体在发育过程中随着各种组织的分化,一些基因被永久性封闭,表达的基因随之减少。例如,哺乳类动物胚胎时期表达的 mRNA 种类大约为 30 000,分化成熟的组织 mRNA 种类只有 10 000 左右。在表达的 mRNA 中,有些 mRNA 的丰度极高,每种有几十万个拷贝,有些 mRNA 丰度极低,只有几个或几十个拷贝。显然,从 cDNA 文库中分离高丰度的 cDNA 克隆很容易,但要分离低丰度的 cDNA 克隆就难多了。为使低丰度 mRNA 的 cDNA 克隆存在的概率大于 99%,cDNA 文库应包含多少克隆?可由以下公式来计算:

$$N = \ln(1 - p) / \ln(1 - 1/n)$$

式中: N —cDNA 文库所包含的克隆数目;

p —低丰度 cDNA 存在于库中的概率,通常要求其大于 99%;

$1/n$ —每一种低丰度 mRNA 占总 mRNA 的分数。

例如,人的成纤维细胞 mRNA,经分子杂交动力学测定,共有 12 000 种分子,其中低丰度 mRNA 为 11 000 种,占总 mRNA 量的 30%,故 n 为 11 000/30%,即 3.67×10^4 。代入上述公式得到 N 为 1.69×10^5 。这就是说,由人的成纤维细胞 mRNA 构建的 cDNA 文库必需超过 1.69×10^5 克隆才能使低丰度 cDNA 克隆存在的概率大于 99%。

2. mRNA 的分离制备

构建 cDNA 文库质量好坏的关键是制得高质量的 mRNA。无处不在的 RNA 酶极易降解 mRNA,在 mRNA 的操作过程中自始至终都必须防止 RNA 酶的降解作用。①所有用于 mRNA 实验的器皿都要高温烘烤或是用 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)洗涤,所有试剂都要用 DEPC 处理过的水配制,DEPC 是 RNA 酶的强变性剂,经煮沸 DEPC 即分解除去,避免残留物影响 mRNA 的实验;②在破碎细胞的同时用强变性剂(如酚、胍盐等)使 RNA 酶失活;③在 mRNA 反应中加 RNA 酶的抑制剂 RNasin。

目前实验室中提取细胞总 RNA 的方法主要有:胍盐/氯化铯密度梯度超速离心法和酸性胍/酚/氯仿抽提法。前一方法常用于大量制备 RNA;后一方法用于一般小量制备 RNA,因此更为常用。真核生物的 mRNA 3'端通常都含有聚腺苷酸[poly(A)],可以用寡聚胸苷酸[oligo(dT)]纤维素或琼脂糖亲和层析法来分离纯化。在高盐缓冲溶液中 poly(A)⁺RNA 与 oligo(dT)结合,低盐缓冲液使它们解离。

3. cDNA 的合成

合成 cDNA 的逆转录酶有两种,一种来自禽成髓细胞性白血病病毒(avian myeloblastosis virus, AMV),另一种来自莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus, M - MuLV)。逆转录酶为多功能酶,它能以 RNA 链为模板合成第一条 cDNA 链,并具有 RNase H 活性,水解杂合分子中的 RNA 链,再以第一条 cDNA 链为模板合成第二条 cDNA 链。逆转录酶以 4 种 dNTP 为底物,合成 cDNA 时需要引物,无校对功能。AMV 逆转录酶由两条多肽链组成,它们由同一基因编码,但在翻译后加工不同,使 A 链比 B 链短。AMV 逆转录酶反应的最适温度为 42℃,最适 pH8.3,并且具有较强的 RNase H 活性。M - MuLV 逆转录酶由一条多肽链构成,反应最适温度为 37℃,最适 pH7.6,具有较弱的 RNase H 活性。

第一条 cDNA 链的合成常用的引物为 oligo(dT)₁₂₋₁₈,或是六核苷酸的随机引物(dN)₆,如果序列是已知的,也可以用与 mRNA 3'端序列互补的引物。杂合分子中的 RNA 链用 RNase H 或碱溶液水解除去。

第二条 cDNA 链可用以下方法合成:①回折法,利用第一条 cDNA 链自身回折来引发第二条链的合成,双链合成后用核酸酶 S1(nuclease S1)切去回折处的单链 DNA。这一步操作常使 cDNA 失去 5'端的部分序列,因此现在较少使用。②取代法,用 RNase H 部分水解 DNA - RNA 杂合分子中的 RNA 链,留下一些小片段 RNA 作为合成 cDNA 第二条链的引物,除加入 DNA 聚合酶 I 和 4 种 dNTP 底物进行 DNA 合成外,还需加

入大肠杆菌 DNA 连接酶和 NAD^+ , 使各片段连接。③随机引物法, 用六核苷酸在 DNA 链上随机引发合成第二条链。④均聚物引发法 (homopolymer priming), 用末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, tdt), 简称末端转移酶, 加一种 dNTP, 在 cDNA 第一条链 3' 端加上均聚物尾巴, 然后用配对的寡聚物作为引物合成第二条链。⑤如果序列是已知的, 也可用特异引物来合成第二条链。

4. 双链 cDNA 的克隆

用来克隆 cDNA 的载体主要为质粒和 λ 噬菌体载体。克隆的常用方法有: ①平端连接法, 需先用 Klenow 酶或 T_4 DNA 聚合酶将双链 cDNA 两端填平补齐, 然后用平末端与载体 DNA 连接, 平端连接效率较低。②cDNA 两端加接头或衔接物, 接头需用限制酶水解, 因此加接头前 cDNA 应先用对应甲基化酶加以甲基化, 以保护 cDNA 不被消化。用衔接物则无需使 cDNA 甲基化。二者都可使 cDNA 以黏性末端与载体 DNA 连接。③均聚物加尾法, 用末端转移酶在 cDNA 两条链的 3' 端各加均聚(A)或均聚(G), 载体 DNA 的 3' 端加配对的均聚(T)或均聚(C), 当 cDNA 末端与载体 DNA 末端“退火”(annealing)后彼此“粘合”, 即可用于转化宿主细胞。④在几种改进的方法中可以将上述几步合并进行, 例如, 用衔接物与引物合在一起, 当合成 cDNA 后即具有黏性末端, 或者将引物加在载体 DNA 上, cDNA 合成后直接连在载体上。

5. 构建 cDNA 文库的基本步骤

构建 cDNA 文库的基本步骤有五步: ①制备 mRNA; ②合成 cDNA; ③制备载体 DNA; ④双链 cDNA 的分子克隆; ⑤对构建的 cDNA 文库进行鉴定, 测定文库包含的克隆数, 抽查克隆的质量和异质性, 如果需要可适当扩增。上述步骤与基因文库的构建十分相似。对 cDNA 文库的要求: 一是希望文库能包括各种稀有 mRNA 的 cDNA 克隆; 二是克隆的 cDNA 应是全长的, 避免丢掉 5' 端的序列。现在已有一些改进的方法可以达到上述要求。cDNA 文库的构建如图 40-9 所示。

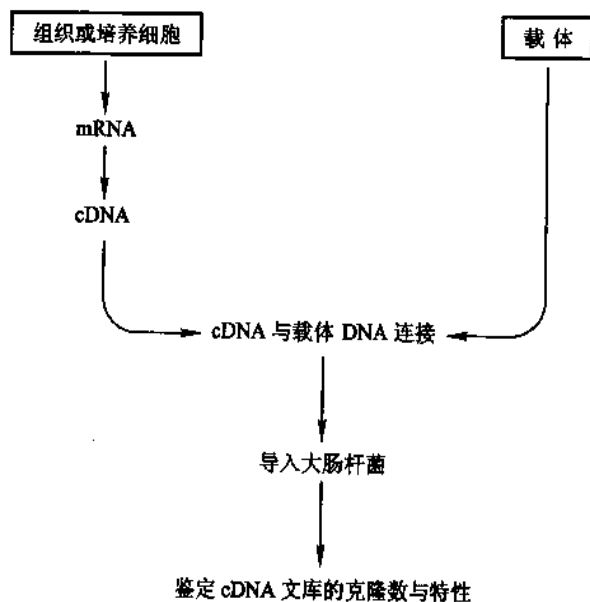


图 40-9 构建 cDNA 文库示意图

(三) 克隆基因的分离与鉴定

从一个庞大的库中分离出所需要重组体克隆, 这是一项难度很大, 费时费力的工作。现在虽然已经发展出一系列构思巧妙, 效率极高的方法, 但要分离得到目的基因, 仍然是技术繁杂, 工作量很大的操作。分离带有目的基因的重组体克隆, 通常或是按照重组体某种特征直接从库中挑选出来, 称为选择(selection); 或是将库筛一遍, 从中得到所要的重组体, 称为筛选(screening)。无论是选择或是筛选, 所选的依据或者是载体的特征, 或是目的基因的序列, 或是基因的产物。

1. 载体特征的直接选择

根据载体的表型特征直接选择重组体克隆是十分有效也是最常用的办法。将它与微生物学的方法技术相配合使用, 常能处理大量的微生物群体。通常载体都带有可选择的遗传标志, 最常用的是抗药性标记、营养标记和显色标记。对噬菌体而言, 噬菌斑的形成则是其自我选择的结果。

(1) 抗药性选择 载体常携带氨苄青霉素抗性基因 (amp^r), 氯霉素抗性基因 (chl^r), 四环素抗性基因 (tet^r) 等。将细胞培养在含抗生素的选择培养基中, 便可以检测出获得此种载体的转化子细胞。若将外源 DNA 插在抗性基因编码序列内, 可通过插入失活进行选择。例如, 外源 DNA 插在 tet^r 基因内, 抗性基因失活成为对四环素敏感的表型 Tet^s , 将转化子培养在加有环丝氨酸和四环素的培养基中, 环丝氨酸能杀死生长的细胞, 四环素只是抑制敏感细胞生长。经此处理的细胞, 凡载体带有四环素抗性基因未被失活的 Tet^r 细胞均被杀死; 抗性基因插入失活的重组体 Tet^s 细胞便被保存下来, 及至转移到不含环丝氨酸和四环素的培养基中就能正常生长。

(2) 营养标记选择 当细胞生物合成途径某个酶的编码基因失活,就成为营养缺陷型(auxotroph),但如果导入细胞的重组体 DNA 能够弥补缺陷的基因,培养基中就无需补充有关的营养成分。营养标记为重组体克隆的选择提供了方便的技术。

(3) β -半乳糖苷酶显色反应选择法 当载体的 *lac Z'* 区插入外源 DNA 后就失去编码 α -肽的活性,在显色反应后带有外源 DNA 的菌落呈白色,不带外源 DNA 的菌落呈蓝色,由此将二者区分。

2. 细菌菌落或噬菌斑的原位杂交

利用载体的表型特征可以从培养物中直接选择出带有外源 DNA 的重组体克隆。从众多重组体中分离目的基因克隆则要用特异的探针进行原位杂交(in situ hybridization)。这是一种十分灵敏,而且快速的方法。其大致步骤如下:将生长在平皿上的菌落转移到硝酸纤维素滤膜(nitrocellulose filter)或尼龙膜(Nylon membrane)上,然后用 NaOH 处理膜上的菌落,使菌体裂解,DNA 变性并释放到纤维素膜上。中和并将膜在 80℃ 烘干 2 h,使 DNA 牢固地吸附在膜上。将纤维素膜与放射性同位素标记的探针在封闭的塑料袋内进行杂交。杂交液中一个极重要的因素是盐的浓度。探针可以是一小段与所要筛选的 DNA 互补的 DNA 或 RNA。杂交一般要十多小时以上,视样品浓度而定,然后用一定离子强度的溶液将非专一结合的仅仅是吸附在膜上的放射性物质除去,再烘干纤维素膜,进行放射自显影。从显影后的底片上,可以显示出曝光的黑点,即代表杂交上的菌落。全部过程如图 40-10 所示。再按底片上菌落的位置找出培养基上相应的菌落,将它扩大培养后,制备出重组体 DNA,作进一步分析。这些分析包括:插入 DNA 的长度,限制酶图谱,甚至 DNA 序列等等。硝酸纤维素滤膜置于琼脂平板培养基上,细菌可以直接在滤膜上生长并形成菌落。通过滤膜与滤膜接触,还可复印滤膜。借此可以在一张滤膜上筛选 50 000 个菌落。

对于噬菌体载体的克隆,可以通过噬菌斑的原位杂交来筛选。用硝酸纤维素滤膜置于含噬菌斑的平板表面,使滤膜与噬菌斑直接接触,噬菌体 DNA 即转移到滤膜上,用 NaOH 溶液处理,然后中和,烘干以固定 DNA,用 ^{32}P -标记探针杂交,最后进行放射自显影,噬菌斑原位杂交与菌落原位杂交十分类似。

用于杂交的探针可以是双链 DNA,也可以是单链 DNA,或是 RNA。杂交的检测常用放射性同位素标记探针,通过自显影来进行。现在已发展出多种非放射性的检测方法。如探针偶联能产生颜色反应的酶,或偶联发光物质等。

显然,有效进行杂交筛选的关键是获得特异的探针。如果目的基因的序列是已知的。或部分序列是已知的,探针可以从已有的克隆中制备,或是设计一对引物从基因组序列中扩增,也可以用化学法合成一段短的探针(一般都要大于 16 个核苷酸)。但如果目的基因是未知的,而有其他种生物同一基因的序列是已知的,因同源基因间有较大的相同性,故可用同源基因的序列作为探针。若基因的序列不知道,但其蛋白质的序列是已知的,或部分序列已知,可以按照密码子的简并性,合成简并探针。选择简并探针的序列应使其简并性尽可能小。简并密码子的第三位加入 A、G、C、T 四种核苷酸,或用 I(次黄嘌呤核苷酸)代替。利用遗传突变找出突变的序列,或利用基因表达差异找出差异的 cDNA,可以用来筛选出特异的基因克隆。

3. 差别杂交或扣除杂交法分离克隆基因

细胞在不同的发育、分化和生理状态下其基因表达往往有差别,有些决定某种状态的特异基因只在该

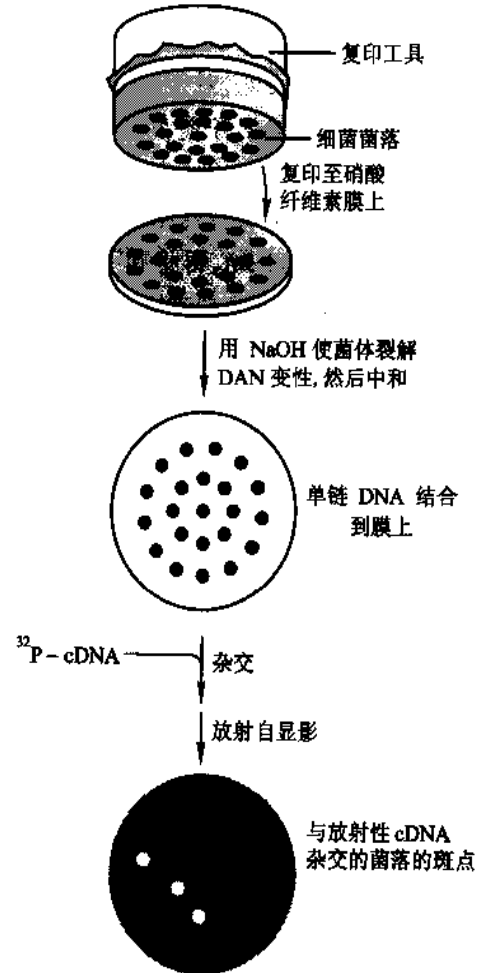


图 40-10 原位杂交法筛选 DNA 重组体图解

状态的细胞中表达,利用差别杂交法(differential hybridization)可以分离出该特异的基因克隆。例如,为了了解生长因子对激活细胞基因表达的调节作用,将细胞培养物分成 A、B 两组,A 组用生长因子激活,B 组细胞不经处理。从激活细胞中提取 poly(A) mRNA,逆转录成 cDNA,经克隆构建成 cDNA 文库。然后分别用 A、B 两组细胞的 mRNA 或 cDNA 作探针进行杂交筛选。A、B 两组细胞的 mRNA 是绝大多数相同的,因此两组杂交 cDNA 克隆大多为阳性,少数 A 组探针为阳性,B 组探针不能杂交的克隆即为生长因子特异诱导表达的 mRNA 之 cDNA 克隆。

在差别杂交法中比较两组杂交的结果十分费时、费力,灵敏度又低,对于低丰度 cDNA 克隆的检测往往难以成功。于是发展出了扣除杂交法(subtractive hybridization)。所谓扣除杂交就是用一般细胞的 mRNA 与特殊细胞的 cDNA 杂交,先扣除一般共有的 cDNA,再将剩下特异的 cDNA 进行克隆,用此方法已成功克隆出控制动物胚胎发育和组织分化的基因。扣除杂交的操作流程是,从 A 组(特异)细胞中提取 mRNA,合成其第一条 cDNA 链,并与从 B 组(非特异)细胞中提取的过量(20 倍)mRNA 杂交,将杂交溶液通过羟基磷灰石(hydroxylapatite)柱。在适当盐浓度条件下,羟基磷灰石能吸附双链核酸,而使单链 cDNA 和 mRNA 流走。过量的与 A 组细胞特征无关的 mRNA 和其 cDNA 杂交并被羟基磷灰石吸附,以除去非特异的 cDNA。一次杂交可能扣除不完全,再用 50 倍和 100 倍过量的 mRNA 杂交,最后剩下特异的 cDNA,与自身 mRNA 杂交,并用羟基磷灰石吸附,洗脱后进行克隆,由此分离出与细胞特征相关的 cDNA 克隆。扣除杂交流程如图 40-11 所示。

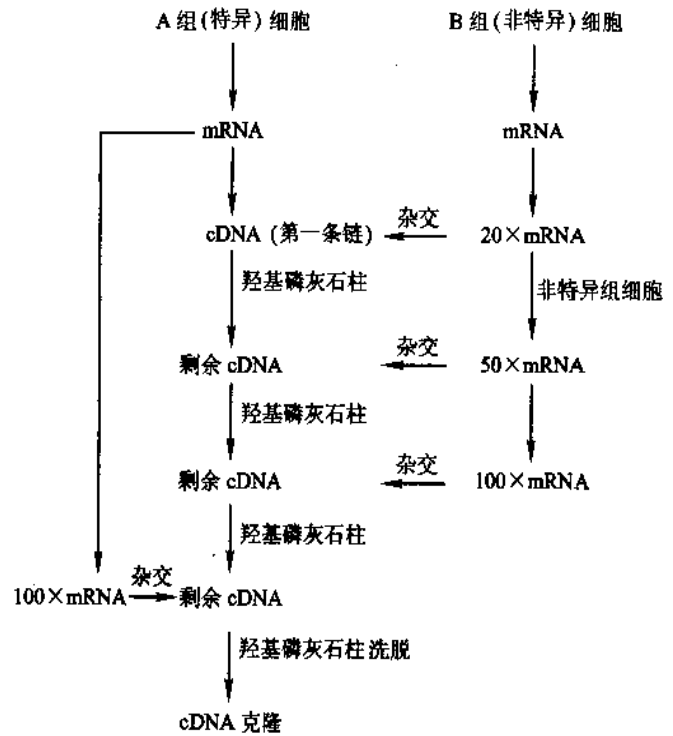


图 40-11 扣除杂交流程图

扣除杂交法也可以用来分离缺失突变基因。原核生物基因组小,扣除杂交较易成功。从缺失突变的菌株制备染色体 DNA,随机构成片段,用生物素进行标记。同时从野生型菌株制备染色体 DNA,用限制酶部分水解成小片段。将过量缺失突变株生物素化的 DNA 片段与野生型 DNA 片段杂交,通过亲和素柱(avidin column)。亲和素与生物素有高度亲和力,将所有杂交片段均吸附在柱上,流出的是不与缺失突变株 DNA 杂交的片段,即缺失突变基因。一次杂交可能不完全,可以多次重复杂交,最后得到的 DNA 片段予以克隆。

4. 从表达文库中分离克隆基因

真核生物与原核生物的密码规则是相同的,只不过不同生物对各种简并密码子的使用频率不同,即存在偏爱性。但是真核生物与原核生物基因表达的调控机制却有很大不同,因此真核生物的 cDNA 或编码序列必须接上原核生物基因调控元件,其中包括启动子、SD 序列和终止子等,才能在原核细胞中表达,就是说外源 DNA 编码序列的表达依赖于原核表达载体。将真核生物的 cDNA 或原核生物染色体 DNA 片段插入表达载体并导入宿主细胞即构建成表达文库。真核生物的基因是断裂的,原核生物缺乏对其转录产物的加工机制,因此真核生物基因不能在原核生物表达,但可以表达其外显子序列,但表达效率较低。考虑到外显子片段插入表达载体的方向和阅读框架,实际上只有六分之一的量得到表达。

从表达文库中可通过表达产物来分离克隆的基因。常用的方法主要有:①免疫学方法。用放射性、显色酶或发光物质标记抗体,可以十分灵敏检测到克隆的表达产物。②检测产物的功能活性。如果产物是酶,或酶的激活剂与抑制剂,可通过酶促反应来检测;酶反应如是显色反应,甚至可以不转接克隆进行培养,直接在平板菌落上就能显色筛选。如产物是配体,可通过与受体的结合来筛选。③检测产物的蛋白质

结构和性质,如产物的相对分子质量、肽谱等。

5. 克隆基因的鉴定

无论用哪种方法分离克隆的基因,首先要重复核实,避免假阳性,然后进一步对基因进行鉴定。通常用来鉴定基因的方法主要有:①基于基因的结构和序列,如限制酶切图谱、分子杂交、测序等;②基于表型特征,如抗性、报导基因的性状等;③基于基因产物的性质,如与抗体反应、肽谱、蛋白质活性等。

(四) 聚合酶链式反应扩增基因

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是 DNA 的体外酶促扩增,故又称为无细胞分子克隆法。

1. PCR 的基本原理

1985 年 Mullis K 发明 PCR 快速扩增 DNA 的方法。最初采用的 DNA 聚合酶是 Klenow 酶,因此每轮加热变性 DNA 都会使酶失活,需要补充酶。PCR 方法模仿体内 DNA 的复制过程,首先使 DNA 变性,两条链解开;然后使引物模板退火,二者碱基配对;DNA 聚合酶随即以 4 种 dNTP 为底物,在引物的引导下合成与模板互补的 DNA 新链。重复此过程, DNA 以指数方式扩增。1988 年 Saiki 等人从栖热水生菌(*Thermus aquaticus*)中分离出耐热的 DNA 聚合酶,称为 Taq DNA 聚合酶,用以取代 Klenow 酶,从而使 PCR 技术成熟并得到广泛应用。该技术可用于扩增任意 DNA 片段,只要设计出片段的两端引物。DNA 正链 5' 端的引物又称为正向引物、右向引物、上游引物、有义链引物及 Watson 引物,简称为 5' 引物;与正链 3' 端互补的引物称为反向引物、左向引物、下游引物、反义链引物及 Crick 引物,简称为 3' 引物。PCR 技术操作简便,只需加入试剂并控制三步反应的温度和时间,然而其扩增效率却是惊人的。扩增的公式为:

$$Y = (1 + X)^n$$

式中: Y—产量;

X—扩增效率;

n—循环次数。

设扩增效率为 60%, 经过 30 次循环, DNA 量即可扩增 1.33×10^6 倍, 只要极其痕量的 DNA 就可扩增达到能检测的水平。PCR 的原理如图 40-12 所示。

2. PCR 的最适条件

为取得 PCR 的成功,首要条件是设计好引物。设计引物的主要原则为:①引物长度应大于 16 个核苷酸,一般为 20~24 个核苷酸。这是因为 $4^{16} = 4.29 \times 10^9$, 已大于哺乳类动物单倍体基因组 3×10^9 bp, 故 16 个以上核苷酸的引物可防止随机结合。②引物与靶序列间的 T_m 值不应过低(一般不低于 55°C)。小于 30 个核苷酸的引物可按公式 $T_m = (G + C) \times 4 + (A + T) \times 2$ 来计算变性温度,即每个 G 或 C 为 4°C , 每个 A 或 T 为 2°C 。③引物不应有发夹结构,即不能有 4 bp 以上的回文序列。④两引物间不应有大于 4 bp 以上的互补序列或同源序列,在 3' 端不应有任何互补的碱基。实验证明,两引物 3' 端如有两个互补碱基,经 PCR 即可产生显著的引物二聚体。⑤引物中碱基的分布尽可能均匀, G + C 含量接近 50%。

PCR 的温度控制十分关键。通常在反应开始时先在 94°C 加热 5~10 min 使 DNA 完全变性, 然进入热循环。循环包括三步反应: 变性, 94°C , 45 s~1 min; 退火 1 min, 退火温度约比引物变性温度低 2~3 $^\circ\text{C}$, 实际最适退火温度要通过实验来确定; 延伸, 72°C , 1~1.5 min, 经过 25~30 次循环扩增后, 最后一次延伸时间延长到 10 min。以上条件用于扩增 300~500 bp 长的 DNA 片段, 如果扩增更长的 DNA, 反应时间可以适

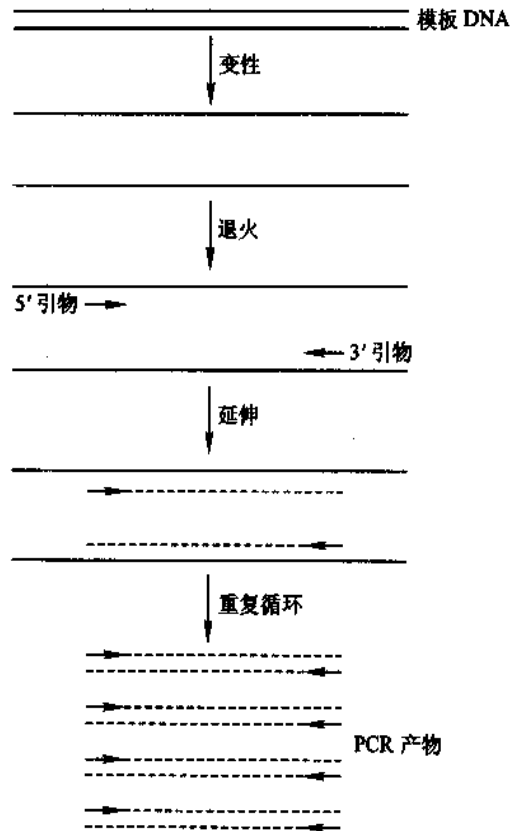


图 40-12 聚合酶链式反应示意图

当延长。

Taq DNA 聚合酶在 100 μl 反应溶液中约加 2 单位。Taq DNA 聚合酶无校正功能,故 PCR 产物易发生错误。现在已有多种具有校正功能的耐热 DNA 聚合酶作为商品出售。作为模板的 DNA 靶序列通常用量为 1 μg 至 1 ng 。缓冲溶液与底物按规定用量,一般不再变动。

3. PCR 技术的发展与应用

在所有生物技术中,PCR 技术是发展最迅速,应用最广泛的一项技术;它对生物学、医学和相邻学科带来了最巨大的影响。它发展的新技术和用途大约有以下几个方面:

(1) PCR 常用于合成特异探针 通常 PCR 所加两端引物的摩尔数是相等的,若加入不等量的引物,例如 60:1,即为不对称 PCR(asymmetric PCR),可用于合成单链探针或其他用途的单链模板。

(2) 用于 DNA 的测序 PCR 可用于制备测序用样品。在 PCR 系统中加入测序引物和 4 种中各有一种双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)的底物,即可按 Sanger 的双脱氧链终止法测定 DNA 序列。在染色体 DNA 中依次加入各种测序引物可以完成整个基因组测序(genomic sequencing)。

(3) RT-PCR 将逆转录与 PCR 相偶联 该技术可用于扩增被逆转录成 cDNA 形式的特定 RNA 序列。单个细胞或少数细胞中少于 10 个拷贝的特异 RNA 都能用此技术检测出来,故 Rappolee 等提出可用于“单个细胞 mRNA 的表型鉴定”。逆转录反应与 PCR 可分开进行,也可以合在一个系统中进行,在合成第一条 cDNA 链后即作为 PCR 的模板进行扩增。RT-PCR 主要用途为:①分析基因转录产物,②构建 cDNA 库,③克隆特异 cDNA,④合成 cRNA 探针,⑤构建 RNA 高效转录系统。

(4) 产生和分析基因突变 PCR 技术十分容易用于基因定位诱变。利用寡核苷酸引物可在扩增 DNA 片段末端引入附加序列,或造成碱基的取代,缺失和插入。设计引物时应使与模板不配对的碱基安置在引物中间或是 5'端,在不配对碱基的 3'端必须有 15 个以上配对碱基。PCR 的引物通常总是在扩增 DNA 片段的两端,但有时需要诱变的部位在片段的中间,这时可在 DNA 片段中间设置引物,引入变异,然后在变异位点外侧再用引物延伸,此称为嵌套式 PCR(nested PCR)。有关 PCR 诱变技术在下一节中有较详细介绍,这里不再赘述。

PCR 技术不仅可以有效促使基因定位诱变,而且也是检测基因突变的灵敏方法。已知人类的癌症和遗传疾病都与基因突变有关。应用 PCR 扩增可以快速获得患者需要检查的基因片段,通过分子杂交检测突变;也可以用特殊的引物,通过 PCR 来直接判断突变。

(5) 重组 PCR(recombinant PCR)将 DNA 不同序列连在一起 重组 PCR 在基因工程操作中十分有用,用酶切割和连接常常找不到合适的酶切位点,而且引入的多余序列无法删除。重组 PCR 只需设计 3 个引物,①左边 DNA 片段的 5'引物;②连接两片段的引物;③右边片段的 3'引物,经过数轮 PCR 即可将两片段连在一起,如图 40-13 所示。

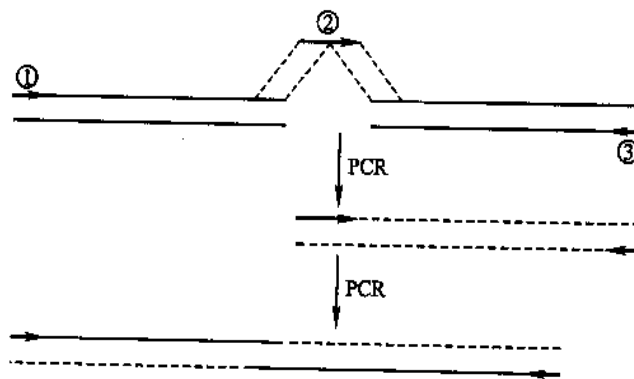


图 40-13 重组 PCR 示意图

①左边 DNA 片段的 5'引物;②连接引物;③右边片段 3'引物

(6) 未知序列的 PCR 扩增 通常 PCR 必须知道欲扩增 DNA 片段两端的序列,才能设计一对引物用以

扩增该片段。但在许多情况下需要扩增的片段序列并不知道,为此发展出一些特殊的 PCR 技术,可以用来扩增未知序列,或者从已知序列扩增出其上游或下游未知序列。反向 PCR(inverse PCR)通过使部分序列已知的限制片段自身环化连接,然后在已知序列部位设计一对反向的引物,经 PCR 而使未知序列得到扩增(图 40-14A)。重复进行反向 PCR,从染色体已知序列出发,逐步扩增出未知序列,称为染色体步移(chromosome walking),为染色体 DNA 的研究提供了有用的手段。与反向 PCR 类似,锅柄 PCR(panhandle PCR)也能由已知序列扩增邻侧未知序列,但避开了限制片段自身环化的步骤,提高了效率。其操作首先选择限制酶将染色体 DNA 切成适当大小片段,末端填平补齐,用碱性磷酸酯酶去除 5'磷酸,合成已知序列(-)链 5'端互补的寡核苷酸参与 DNA 片段连接,寡核苷酸的 5'-P 只能与片段 3'-OH 连接。因此(-)链在未知序列的两端均有彼此互补的已知序列,变性后退火可形成链内二级结构,犹如锅柄故而得名。将两端已知序列的引物进行 PCR 即可扩增出未知序列(图 40-14B)。此外还有一些 PCR 技术可以扩增未知序列。例如,锚定 PCR(anchored PCR),用末端核苷酸转移酶在合成 DNA 链的 3'端加上均聚物,再用此均聚物互补的寡聚核苷酸作为另一引物进行 PCR。利用人类基因组 DNA 中分散分布的 Alu 序列,用一段已知序列和 Alu 序列作为一对引物,也可以扩增出未知序列。

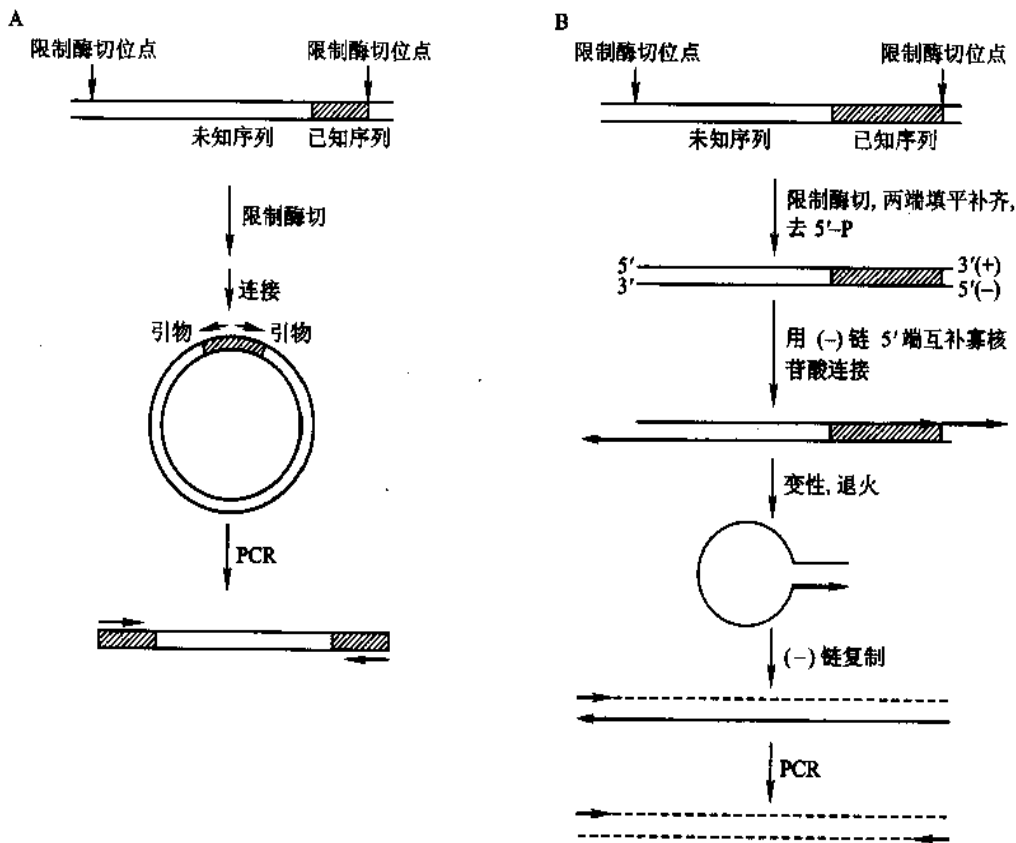


图 40-14 未知序列的 PCR 扩增

A. 反向 PCR; B. 锅柄 PCR

(7) 基因组序列的比较研究 应用随机引物的 PCR 扩增,便能测定两个生物基因组之间的差异。这种技术称为随机扩增多态 DNA 分析(random amplified polymorphic DNA, RAPD)。如用随机引物寻找生物表达基因的差异,称为 mRNA 的差异显示(differential display)。PCR 技术在人类学、古生物学、进化论等的研究中也起了重要作用。

(8) 在临床医学和法医学中的应用 PCR 技术已被广泛用于临床诊断,如对肿瘤、遗传病等疑难病和恶性疾病的确诊,病原体的检测,胎儿的早期检查等。由于 PCR 技术的高度灵敏性,即使多年残存的痕量 DNA 也能够被检测出来,因此对刑侦工作,亲缘关系的确证等也起着重要作用。

(五) DNA 的化学合成

早在 20 世纪 50 年代, Khorana H G 就开始了寡核苷酸的化学合成研究, 并于 1956 年首次成功合成了二核苷酸。其基本指导思想是将核苷酸所有活性基团都用保护剂加以封闭, 只留下需要反应的基团, 用活化剂使反应基团激活; 用缩合剂使一核苷酸羟基与另一核苷酸磷酸基之间形成磷酸二酯键, 从而定向发生聚合。他的工作为核酸的化学合成奠定了基础。由于他解决了核酸的化学合成技术, 而与第一个测定 tRNA 序列的 Holley 以及从事遗传密码子解译研究的 Nirenburg 共获 1968 年诺贝尔生理学 and 医学奖。

Khorana 采用的 DNA 合成法是磷酸二酯法。Letsinger 等人于 1960 年发明了磷酸三酯法, 由于磷酸基有 3 个酸根(P—OH), 将其中之一保护起, 剩下 2 个酸根可以形成二酯, 这样将能减少副反应, 简化分离纯化步骤, 提高产率。其后又发明亚磷酸三酯法, 使反应速度大大提高。因为 Khorana 的工作非常出色, 以至于掩盖了 Letsinger 等人在技术上的改进。Khorana 在合成酵母丙氨酸 tRNA 的编码序列后, 又于 1979 年第一个用人工方法合成了具有生物活性的基因, 即 126 bp 的大肠杆菌酪氨酸 tRNA 的基因, 它包括启动子和编码序列, 因而能在大肠杆菌中表达。DNA 化学合成技术的进一步发展实现了固相化, 也即将第一个核苷酸 3' - 羟基固定在可控孔径玻璃微球(controllable pored glass bead, CPG)上, 因此冲洗十分方便, 在此基础上出现自动化 DNA 合成仪。

DNA 自动化合成均采用快速的亚磷酸三酯法。腺嘌呤、胞嘧啶碱基上的氨基都用苯甲酰基(bz)保护, 鸟嘌呤碱基的氨基用异丁酰基(Ib)保护, 5' - 羟基用二甲氧三苯甲基(DMT)保护。合成的一个循环周期分为以下四步反应:

第一步, 脱去保护基(deprotection)。用酸处理, 使核苷酸 5' - 羟基上的保护基 DMT 被水解除去。

第二步, 偶联反应(coupling)。用二异丙基氨基亚磷酰氯甲酯(diisopropyl phosphoramidite)作为活化剂和缩合剂, 在弱碱性化合物四唑催化下, 偶联形成亚磷酸三酯。

第三步, 封端反应(capping)。加入乙酸酐使未参与偶联反应的 5' - 羟基均被乙酰化, 以免与以后加入的核苷酸反应, 出现错误序列。

第四步, 氧化作用(oxidation)。合成亚磷酸三酯后用碘溶液氧化, 使之成为较稳定的磷酸三酯。

按照事先设计的程序逐个加入核苷酸使之缩合, 待合成结束后用硫脲和三乙胺脱掉保护基, 并用氨水将合成的全长序列寡核苷酸水解下来, 然后用高效液相色谱仪(HPLC)和凝胶电泳纯化并鉴定。每个核苷酸合成循环大约要 7 ~ 10 min, 50 个核苷酸的 DNA 片段合成仅需 6 ~ 8 h, 十分方便。

(六) 基因定位诱变

基因定位诱变(site - directed mutagenesis)是基因工程的一项关键技术, 借助这一技术才使基因有效表达和定向改造成为可能。基因定位诱变是指按照设计的要求, 使基因的特定序列发生插入、删除、置换和重组等变异。目前常用的定位诱变方法主要有: 在酶切位点处插入、删除和置换序列, 用寡核苷酸指导的诱变(oligonucleotide - directed mutagenesis)和 PCR 诱变。

1. 酶切诱变

利用基因的酶切位点, 可以在切点处改造基因序列。先选择合适的限制酶将基因切开, 然后插入或删除有关序列。如若基因内部在需要诱变的部位缺乏可被利用的限制酶酶切位点, 就要先用寡核苷酸指导的诱变或 PCR 诱变引入酶切位点。有时不能确定插入或删除的最适序列, 可以插入一组变异的序列或是进行系统的插入或删除, 由此构建成突变体库, 从中再挑选最理想的突变体。

用一段人工合成具有变异序列的 DNA 片段, 取代野生型基因中相应两酶切位点间的序列, 如同置换盒式录音带, 称为盒式诱变。应用简并寡核苷酸作盒式诱变, 可在一次盒式置换中产生一群随机突变体, 增加了选择的可能性。

2. 寡核苷酸指导的诱变

DNA 化学合成技术的发展, 使得合成寡核苷酸十分方便, 于是在单链噬菌体 DNA 体外复制的基础上产生了寡核苷酸指导的定位诱变技术。早在 20 世纪 70 年代末 Hutchison C A 及其同事就用合成的寡核苷

酸在体外诱导单链噬菌体 $\Phi X-174$ 发生变异。他们用带有错配碱基的寡核苷酸与 $\Phi X-174$ 的单链 DNA 退火, 并以其作为引物用 Klenow 酶合成 DNA, 所产生局部异源双链的 DNA 转染细菌, 结果使得显示预期表型噬菌体的频率有明显增加。1983 年 Smith M 改进了寡核苷酸指导的诱变技术, 他用噬菌体 M13 载体克隆基因作定位诱变, 使定位诱变技术趋于成熟并得到广泛应用。寡核苷酸指导的定位诱变包括以下步骤 (图 40-15A):

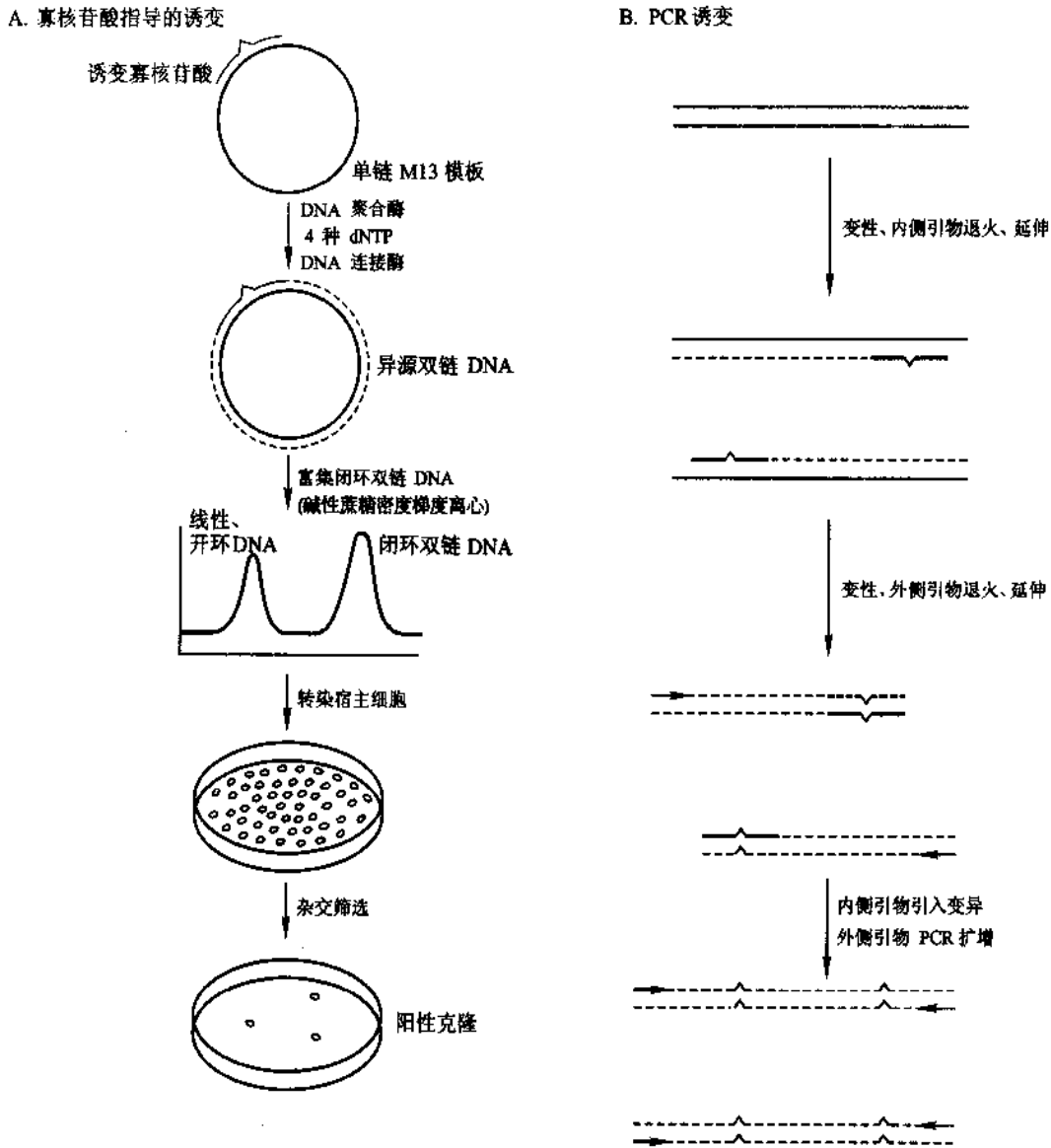


图 40-15 寡核苷酸指导的诱变与 PCR 诱变

(1) 制备单链 DNA 模板 将外源基因插入 M13 载体复制型(RF)双链 DNA 的克隆位点, 转化大肠杆菌, 制备噬菌体单链 DNA 模板。

(2) 合成诱变寡核苷酸 作为诱变剂的寡核苷酸, 除定位诱变的错配碱基外其余部分应和模板完全配对, 如仅需引入一个核苷酸的取代、插入和删除, 其长度约为 17~19 个核苷酸, 错配碱基应置于中间; 如引入两个核苷酸的变异, 其长度应在 25 个核苷酸以上。

(3) 寡核苷酸与模板退火并合成异源双链 DNA 磷酸化的寡核苷酸引物与模板混合后加热变性, 去除二级结构; 再缓慢退火至室温, 用 Klenow 酶或 T_4 DNA 聚合酶合成互补链, DNA 连接酶封闭缺口。

(4) 闭环异源双链 DNA 分子的富集 单链 M13DNA 和未完全合成与封闭的双链 DNA 会转染宿主, 产生高的本底, 这部分 DNA 应用 S1 核酸酶处理除去, 或用碱性蔗糖密度梯度离心法纯化闭环异源双链 DNA。

(5) 转染宿主细胞 异源双链 DNA 进入宿主细胞后进行复制,产生两类复制的双链 DNA,一类是野生型的,另一类是突变型的。

(6) 突变体的筛选与鉴定 可以用限制位点筛选法、杂交筛选法和生物学筛选法来筛选突变体克隆。当诱变寡核苷酸引入新的酶切位点时,用限制酶来筛选比较简单和方便。一般可用杂交法筛选,这是因为诱变引物与突变型基因完全同源,而与野生型基因有不配对碱基,前者的变性温度高于后者,故而在较高杂交温度下出现的阳性噬菌斑可能含有突变型基因。如果突变体的表型易于检测,也可用生物学方法来筛选。筛选到的突变体最后需要经 DNA 测序,鉴定突变基因是否正确。

3. PCR 诱变

PCR 技术的发展,使定位诱变得更为容易。通过 PCR 引物可以在扩增 DNA 片段的两端引入各种变异,嵌套式 PCR 还可以在基因内部或在一次 PCR 中同时在多处引入变异。各种变异,包括插入、删除、置换和重组,都可用 PCR 的方法来进行。图 40-15B 表示嵌套式 PCR。

(七) DNA 序列的测定

DNA 体外重组工作中往往需要有关 DNA 序列的信息,以便于设计载体及重组体。DNA 重组技术,可使任何 DNA 片段进行克隆,制备出较大量的高纯度的 DNA 片段,以供进一步研究之用(包括进行序列测定)。

目前通用的两种 DNA 序列测定法——Maxam 和 Gilbert 的化学法和 Sanger 的双脱氧终止法(酶法)都是建立在分辨力极高的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的基础上的。这种电泳可将相差仅为一个核苷酸的单链 DNA 区分开来。化学法可以提供比较清晰的结果,但比较费事。Sanger 提出的酶法十分快速,省事,也不需要比强很高的³²P-dNTP,但有时会出现一些不够清晰的实验结果。目前实用中,往往以 Sanger 法为主,结合使用化学法。

获得的 DNA 序列信息,需要用计算机的程序加以处理,以建立限制酶图谱,确定编码蛋白质的序列,找出 DNA 重复序列,以及提出可能的二级结构等。

1. 化学法

化学法(chemical method)由 Maxam 和 Gilbert(1977)发明,化学法的原理是用特异的化学试剂修饰 DNA 分子中的不同碱基,然后用哌啶切断多核苷酸链。所以,用四组不同的特异反应,就可以将末端(3'或 5' - 端)用放射性标记的 DNA 分子形成不同长度的寡核苷酸。这些寡核苷酸的长度相当于从特异反应引起的切点到标记末端之间的长度。用凝胶电泳将这些不同长度的寡核苷酸分离开来,即可读出所测定的 DNA 的序列。

这四组特异反应如下:

(1) G 反应 用硫酸二甲脂(dimethyl sulfate,简称 DMS)使鸟嘌呤上的 N₇ 原子甲基化。甲基化的鸟嘌呤与脱氧戊糖之间的糖苷键在中性环境中加热而断裂,鸟嘌呤碱基脱落,多核苷酸骨架在鸟嘌呤处发生断裂。

(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,再用哌啶使嘌呤脱落。

(3) T + C 反应 用肼(hydrazine)使 T 和 C 的嘧啶环断裂,再用派啶除去碱基。

(4) C 反应 当有 NaCl 存在时,只有 C 与肼发生反应,T 不发生反应。断裂的 C 可用哌啶除去。哌啶也可使脱去碱基处的磷酸二酯键断裂。

上述四组反应中,都只有很小一部分碱基被修饰。但用哌啶切断链的反应必须是定量的。

反应完毕后,一般用 7 mol/L 尿素和 5% ~ 20% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,凝胶浓度决定于测定 DNA 链的长度。电泳时电压在 1 500 V,凝胶的温度应保持在 65℃ 左右,以保证 DNA 在变性状态下进行电泳。电泳完毕后,将胶抽干,放射自显影。从照片上即可读出 DNA 序列。图 40-16 为化学法测 DNA 序列的图解。

2. 双脱氧法(酶法)

双脱氧法 (dideoxy method), 也称酶法 (enzyme method), 是由 Sanger 于 1977 年建立的。其原理是利用 2',3'-双脱氧三磷酸核苷(2',3'-ddNTP)来终止 DNA 的复制反应。大肠杆菌 DNA 聚合酶(或 Klenow 片段)在 DNA 复制过程中催化多核苷酸链的延伸,单核苷酸是接在延伸链的 3'-OH 上。所以,如果掺入的底物中有 2',3'-ddNTP,延伸反应即告终止。这样设计四组反应,每组反应中都含有正常的四种脱氧核苷酸 dNTP(其中一种为 ³²P-标记的),单链 DNA 模板(即待测的 DNA)和引物(primer),各组反应还加入一种 2',3'-ddNTP。当然反应液中还应用 DNA 聚合酶 I。反应结果,在加入 2',3'-ddATP 的反应中,凡碰到需要 dATP 的时候,如果掺入的不是 dATP,而是 2',3'-ddATP 时,链延伸反应即告终止。用凝胶电泳分析这四组反应的产物,即可从放射自显影上读出 DNA 的序列。图 40-17 为双脱氧法的图解。目前,都应用 ³⁵S 标记的 dNTP 来代替 ³²P-dNTP,所得的电泳图谱比较清晰,分辨力较高,每次实验可以读出更多的碱基序列。

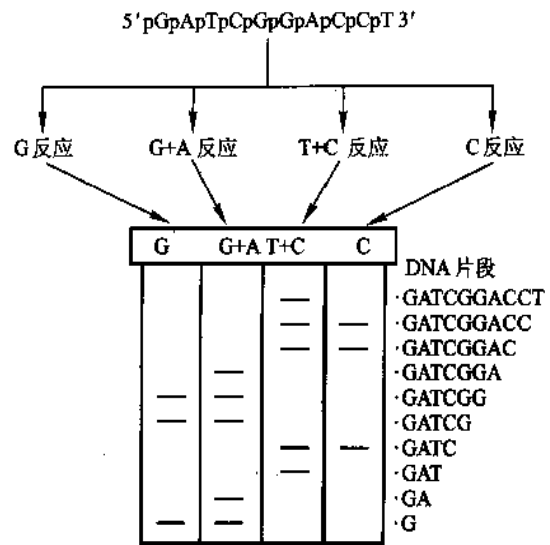


图 40-16 化学法测定 DNA 序列图解

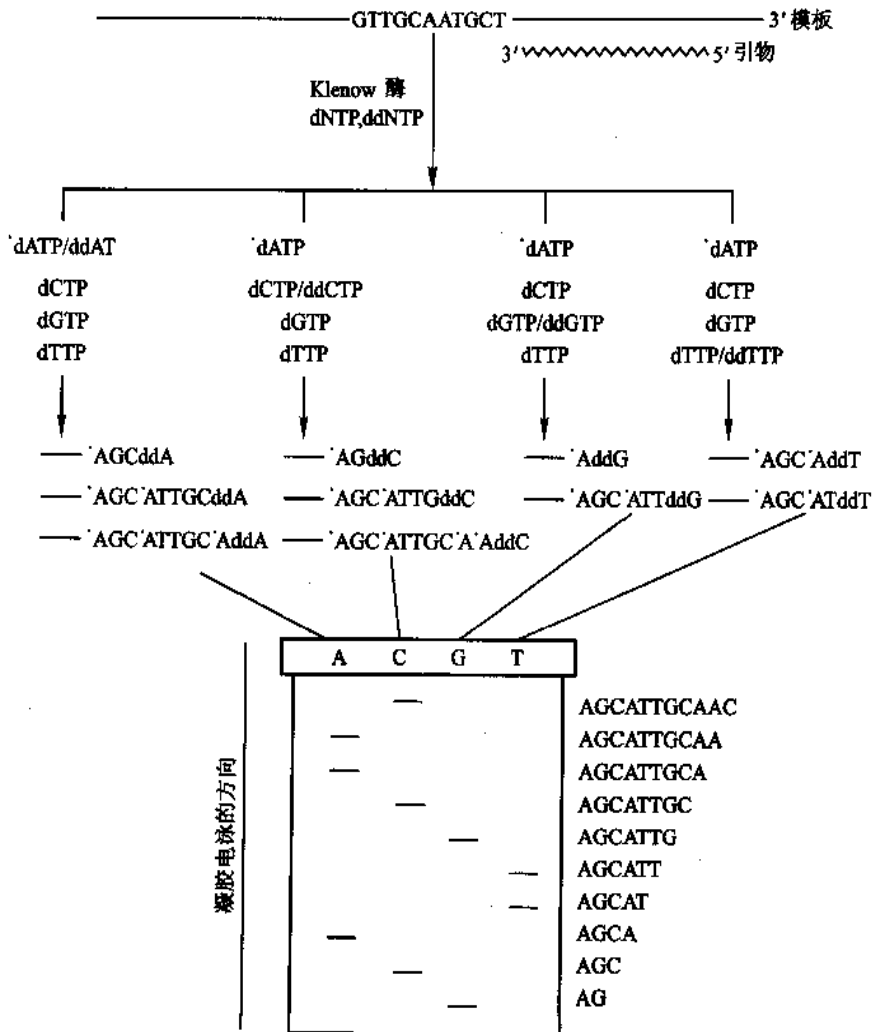


图 40-17 Sanger 双脱氧链终止法测定 DNA 序列图解

三、克隆基因的表达

真核生物与原核生物基因的遗传密码是相同的,虽然简并密码子的使用频率各不相同,然而真核生物与原核生物基因的表达调控有很大差别,真核生物的 cDNA 必须接上原核生物的调控制元件,才能在原核细胞内表达。

(一) 基因表达的控制元件

1. 启动子

基因的转录由启动子控制,选用强启动子可使克隆基因高水平表达。在原核细胞内表达外源基因常用的强启动子主要有:① *lac UV5*, 即乳糖操纵子的启动子,经紫外线诱变其活性无需 cAMP 活化,但被调节基因 *lac i* 的阻遏蛋白所关闭,受异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG) 诱导表达。通常基因工程采用的强启动子都是可诱导的,以便待菌体适度生长后再诱导外源基因表达。② *tac* 启动子,由 *trp* 启动子的-35 区和 *lac* 启动子的-10 区融合而成,可被 IPTG 诱导。③ λP_L 或 P_R 启动子受 λ 阻遏蛋白调节,其温度敏感突变体(λ Clt_s 857)在 30℃ 时启动子处于阻遏状态,温度升高超过 40℃ 使阻遏蛋白失活,基因即表达。④ *omp F* 是低渗透压外膜蛋白基因的启动子,受 *omp R* 基因编码的正调节蛋白控制,其冷敏感突变体在较低温度时无活性,温度升高后呈现活性,活化 *omp F* 启动子。它与 λ clt_s 857 在表现效应上一样,但作用机制不同。⑤ T_7 噬菌体的启动子,可被 T_7 RNA 聚合酶特异识别并高效转录,常用于构建高效表达系统或体外转录系统。

2. 核糖体结合位点

为使外源基因能在大肠杆菌中高水平表达,不仅要用强启动子以产生大量 mRNA,而且还要强的核糖体结合位点,使 mRNA 高效翻译。大肠杆菌的核糖体结合位点是一段 3~9 个核苷酸长富含嘌呤的序列,位于起始密码子(AUG)上游 3~11 个核苷酸处。该序列与 16S rRNA 3'末端互补,因其由 Shine 和 Dalgarno 所发现,故称为 SD 序列。mRNA 的翻译效率受 SD 序列与 16S rRNA 3'末端互补程度的影响,还受 SD 序列与起始密码子间距离以及起始密码子上、下游序列的影响。

3. 终止信号

基因表达水平也受转录终止信号(终止子)和翻译终止信号(终止密码子)的影响。如果转录的 mRNA 过长,不仅耗费能量和底物,而且 3'端序列易于和前导序列或编码序列形成二级结构,妨碍翻译进行。在 UAA、UAG 和 UGA 三个终止密码子中以 UAA 的终止能力最强。

(二) 非融合蛋白和融合蛋白的表达

外源基因直接在宿主细胞内表达可以简化产品的后加工处理,但在有些情况下外源基因不能直接表达。①外源基因的活性蛋白质第一个氨基酸可能不是蛋氨酸,在表达时需要加上作为起始氨基酸的蛋氨酸密码子,有时外加的蛋氨酸会影响产物活性。②蛋白质的 N 端序列对其合成和折叠有较大影响,如外源基因在宿主细胞内表达量过低,将外源基因编码序列与宿主细胞高表达基因 N 端序列融合,以融合蛋白形式表达可以提高表达水平。③外源蛋白在宿主细胞内往往不稳定,易被宿主细胞蛋白酶降解,含有宿主蛋白 N 端序列的融合蛋白则比较稳定。④融合蛋白不影响某些表位结构,而易进行抗体工程。⑤与某些特定多肽和蛋白质融合易于分离纯化和检测。

融合蛋白在分离制备后需要切除 N 端融合的附加部分。常用的方法有:①利用特异的蛋白酶水解融合部位的肽键。例如,若外源蛋白内没有可被胰蛋白酶水解的碱性氨基酸,就可使融合处的氨基酸为精氨酸或赖氨酸,然后用胰蛋白酶水解。②利用特异的化学试剂裂解肽键。如用溴化氰可裂解蛋氨酸。③利用凝血酶(凝血因子 Xa)识别和裂解特异的序列(异亮·谷·甘·精⁺)。

无论是真核生物还是原核生物,其分泌蛋白质 N 端都有一段信号肽引导新合成的肽链穿过细胞膜,然后由信号肽酶将信号肽切除。利用此机制,将外源蛋白和信号肽的编码序列融合,表达的蛋白质即被分

泌到细菌的周质或培养基中,在此过程中,信号肽被切除产生有活性的蛋白质。

当外源蛋白在宿主细胞内高水平表达时常产生不溶性颗粒,称为包涵体(inclusion body)。细胞经破碎和离心可得到包涵体沉淀。包涵体主要由不溶性外源蛋白和杂质所组成,经溶解和再折叠可获得有活性的蛋白质。溶解包涵体常用的试剂为 5~8 mol/L 盐酸胍,6~8 mol/L 尿素,SDS,碱性 pH 或乙腈/丙醇等。通过稀释、透析或流经分子筛层析柱,逐渐降低变性剂浓度而使外源蛋白进行再折叠,从而获得有活性的蛋白质。

(三) 外源基因在真核细胞中的表达

基因工程涉及的真核细胞主要有酵母(真菌)、昆虫、高等动植物等的细胞,其表达载体通常由质粒、病毒和染色体 DNA 改造而成。为便于操作,真核生物表达载体都含有在大肠杆菌中复制的起点,构建和鉴定操作都可以通过大肠杆菌进行。真核生物基因表达的调节主要在转录和翻译水平上进行,但还增加了转录后加工的调节,其控制元件比原核生物更为复杂。

1. 外源基因在酵母细胞中的克隆与表达

酵母是单细胞真核生物。因其基因组小($\sim 1.3 \times 10^7$ bp),世代时间短(在丰富培养基中仅 90 min),遗传学背景清楚(约 6 000 多个基因,一半已知),故常作为真核生物细胞结构和基因表达调节研究的对象,真核生物基因工程也以它为首选,因而有真核生物大肠杆菌之称。1996 年完成其基因组全序列的测定,更有助于酵母的基因操作。

酵母细胞的克隆载体共有五类:整合质粒(yeast integrating plasmid, YIP)含有酵母可选择遗传标记,但无酵母复制起点,在酵母细胞内只有整合到染色体中才能稳定存在。附加体质粒(yeast episomal plasmid, YEP)含有酵母可选择遗传标记和酵母 2 μ 质粒的复制起点,在酵母细胞内以高拷贝数存在。复制质粒(yeast replicating plasmid, YRP)含有酵母染色体 DNA 的自主复制序列(autonomous replicating sequence, ARS),以中等拷贝数存在于酵母细胞内。含着丝粒(CEN)的质粒(yeast centromere-containing plasmid, YCP),含有 ARS 和 CEN,后者在有丝分裂时与纺锤体结合,以单拷贝稳定存在。酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC),含有构成染色体的关键序列 ARS、CEN 和 TEL(telomere,端粒),能以微型染色体的形式存在,可用以克隆超过 100 kb 的大片段 DNA。上述载体的酵母选择标记常用生物合成基因,如尿苷酸合成的 URA3,以使用营养缺陷型宿主细胞进行选择。为便于操作,除酵母选择标记和复制起点外,还常加入大肠杆菌的选择标记和复制起点,构成穿梭载体(图 40-18)。

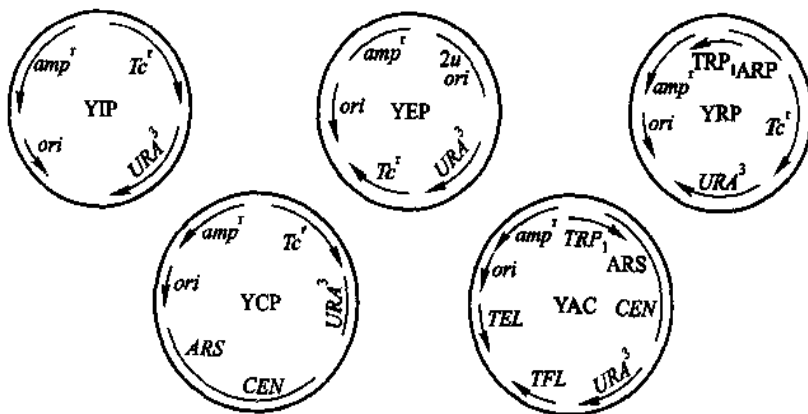


图 40-18 酵母克隆载体

用于基因表达的酵母载体,需要具有酵母的各种表达控制元件。首先,要有可被 RNA 聚合酶 II 识别的强启动子,或者是可诱导的(如 GAL、PHO5),或者是组成型的(如 ADH1、PGK、GPD)。GAL1(半乳糖激酶)启动子受其正调节和负调节蛋白的调节。当激活因子(GAL4)结合于转录起点上游的 UAS 位点时,转录即开始。而细胞在含葡萄糖的培养基中,它的负调节因子(GAL80 产物)可以与 GAL4 形成复合物,阻止

启动子的活化;但在含半乳糖的培养基中,GAL80 与 GAL4 解离,GAL4 即结合到 UAS 上。与此类似,PHO5 (碱性磷酸酯酶)启动子受激活因子(PHO4)和负调节因子(PHO80)的调节。细胞在缺无机磷的培养基中 PHO5 启动子被活化,而在富含磷的培养基中 PHO80 阻止 PHO4 的活化作用。有些组成型的启动子能维持较高水平的转录,其 mRNA 可占细胞总 mRNA 的 1% 以上,这类启动子常用的有 ADH1(醇脱氢酶)、PGK(磷酸甘油酸激酶)和 GPD(葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)的启动子。组成型启动子虽说是不可诱导的,但其转录活性仍受各种生理条件的影响,当酵母生长在非葡萄糖碳源的培养基中时这类启动子的表达活性都较低。

mRNA 的翻译活性受前导序列的影响较大,但是其间的关系还并不十分清楚。此外,转录的终止子包括形成 3' 末端和腺苷酸化的信号序列,对于表达效率都是十分重要的。

2. 克隆基因在植物细胞中的表达

根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是诱发裸子植物和双子叶植物产生冠瘿(crown gall)的病原菌。在植物创伤部位,这类病原土壤杆菌侵入并附着在植物细胞壁表面,产生细纤丝将细菌裹起来形成细菌集结。随后,根瘤土壤杆菌细胞内质粒上的一段 DNA 转移到植物细胞内,并整合到染色体 DNA 中,导致植物细胞形成肿瘤,然后大量合成和分泌冠瘿碱,以供细菌营养的需要。根瘤土壤杆菌携带的特殊质粒受到分子生物学家们的关注并被开发成植物基因工程广泛使用的克隆载体。

根瘤土壤杆菌的质粒称为 Ti 质粒,即诱发寄主植物产生肿瘤的质粒(tumor-inducing plasmid),其大小在 200 kb 左右($90 \times 10^6 \sim 150 \times 10^6$),为双链闭环分子。Ti 质粒中与诱发肿瘤有关的基因区段有两个,即 T- 区段和毒性(*vir*)区段,其余的基因分别控制冠瘿碱代谢、细菌的生长周期、宿主特异性以及 Ti 质粒的接合转移等。

T- DNA 长度约为 15~30 kb,相当于 Ti 质粒 DNA 长度的十分之一,其两端为 25 bp 的正向重复,分别称为左端边缘(left-handed border, LB)和右端边缘(right-handed border, RB)。T- DNA 的转移同细菌的接合作用十分相似。*vir* 基因区段编码多种蛋白质,分别参与 T- DNA 的转移与整合,其中一种为核酸内切酶,可在 T- DNA 两端造成单链切口,单链分子从 Ti 质粒上脱离,5' 端 RB 序列与 *vir* 基因编码的蛋白质共价结合,在其引导下转移到植物细胞的核内,并整合到染色体中去。

T- DNA 携带的基因只有在插入植物染色体后才被激活表达,其中包括:①冠瘿碱合成酶的基因(opine synthetase gene),不同 Ti 质粒合成不同的冠瘿碱,章鱼碱(octopine)Ti 质粒含有章鱼碱合成酶的基因 *ocs*,胭脂碱(nopaline)Ti 质粒含有胭脂碱合成酶的基因 *nos*。②编码细胞分裂素合成酶的基因 *tmr*,这个基因突变的结果激发肿瘤出现大量根的增生,故又称为根性肿瘤(rooty tumor)基因。③编码植物生长素合成酶的基因 *tms1* 和 *tms2*,这两个基因中任何一个发生突变都会激发肿瘤出现芽的增生,故称为芽性肿瘤(shooty tumor)基因。*tmr*、*tms1* 和 *tms2* 这三个基因统称为致瘤基因(*onc*)。

Ti 质粒是理想的植物基因工程载体,将外源基因插入 T- DNA,即可借以转化植物细胞。但是 Ti 质粒太大,操作十分不便,对此提出了两种解决的谋略:一是构建二元载体系统(binary vector system);另一是用共整合载体(cointegrate vector)。二元载体系统是将 Ti 质粒的 T- DNA 和 *vir* 基因区段分置于两个载体。T- DNA 通常插在易于操作的细菌小的质粒载体中,为免于引起宿主产生肿瘤,将 T- DNA 的致瘤基因全部除去,但保留合成胭脂碱的基因 *nos*,作为遗传标记。*vir* 基因则仍留在缺失 T- DNA 的 Ti 质粒内。外源基因插入小质粒的 T- DNA 中后,将质粒转移到根瘤土壤杆菌中,在 *vir* 基因产物的作用下 T- DNA 即转入植物细胞核染色体内。

共整合载体是使用无致瘤基因(*onc*⁻)的 Ti 质粒作载体,其中 T- DNA 只保留边缘区和 *nos* 基因,其余部分被删除,而代之以 pBR 型质粒的一段序列,例如,氨苄青霉素抗性基因(*amp*^r)序列。外源基因插入 pBR 型的质粒内。为便于 T- DNA 转化后植物细胞的筛选,pBR 型质粒带有对植物细胞有剧毒的新霉素的抗性基因(*neo*),并与胭脂碱合成酶基因(*nos*)的启动子融合,*nos-neo* 杂合基因可在植物细胞内表达。此外,pBR 型质粒还带有细菌选择标记卡那霉素的抗性基因(*kan*^r)。携带外源基因的 pBR 型质粒转入根瘤土壤杆菌后,*onc*⁻ Ti 质粒与 pBR 型质粒都存在一段相同的序列,很容易发生同源重组,形成两质粒的共整合体,其中外源基因被包围在 T- DNA 的边缘区之间,因此可转化植物细胞。图 40-19 表示二元载体系统与共整合载体的结构。

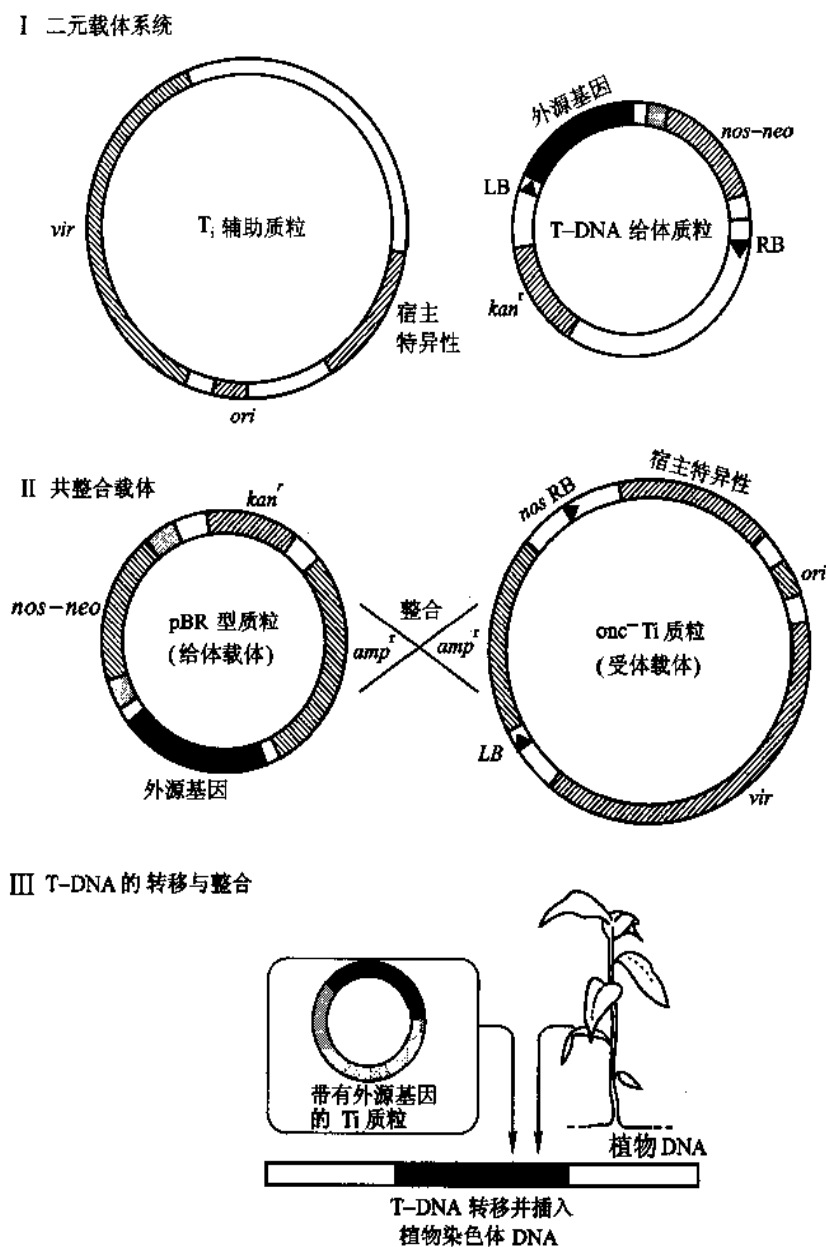


图 40-19 用 Ti 质粒为载体进行植物基因工程图解

pBR 型质粒与一般细菌小的质粒一样,其自身无接合转移的能力,转移需要在携带转移基因 *tra* 和牵引蛋白基因 *mob* 的质粒(如 R 质粒的衍生质粒 R64drr11)帮助下才能发生。pBR 型质粒上有结合 Mob 蛋白的位点 *bom*,故能被转移。因此,将带有外源基因的重组质粒由大肠杆菌转移到土壤杆菌还需要另外一个细菌菌株提供辅助转移的质粒。由三种有关的细菌菌株共同培养,彼此配对,促使质粒转移,称为三亲株配对(triparental mating)。三个菌株是:①具有辅助转移的质粒的大肠杆菌菌株,②具有携带外源基因的给体载体的大肠杆菌菌株,③具 *onc*⁻ Ti 质粒衍生的受体载体的根瘤土壤杆菌菌株。它们共同培养时,辅助质粒即转移到给体载体的宿主细胞内,并帮助给体载体转入根瘤土壤杆菌细胞内,随之发生 T-DNA 携带外源基因转移。三亲株配对有较高的转移效率。

用于植物基因工程的克隆载体除 Ti 质粒外,还有另一种诱发植物形成肿瘤的质粒,即发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 的产生毛根质粒(root-inducing plasmid, Ri)。与 Ti 质粒类似,Ri 质粒诱发植物产生茎瘿(cane gall),在茎部表面密布毛根。Ri 质粒已被改造成各种用途的载体。特别值得提出的是,Ri 质粒产生的不定根切下来经培养可以再生成可育的植株。此外,各种植物病毒也可改造成成为基因载体,如花椰菜花叶病毒(CaMV)DNA 载体即是一例。花椰菜花叶病毒的 35S 启动子被广泛用于构建植物基因工程的

表达载体。烟草花叶病毒(TMV)是单链 RNA 病毒,将其 RNA 逆转录成 cDNA 再插入质粒载体,由此构建成重组病毒载体。植物病毒载体易于操作,可以高效感染植物细胞,并在植物细胞中高水平表达。但一般植物病毒载体在植物细胞内并不发生整合,故其携带的外源基因不能通过种子稳定传代。

植物细胞具有全能性。转化的胚性悬浮细胞、胚性愈伤组织或者用叶盘转化法(leaf disc transformation)获得的转化叶片,可用植物激素诱导生芽和生根,产生转基因的再生植株。

3. 克隆基因在哺乳动物细胞中的表达

哺乳动物基因工程的表达载体通常都由动物病毒改造而得,常用的病毒如猴空泡病毒 40(Simian vacuolating virus 40, SV40)、逆转录病毒和腺病毒等。载体的功能组分包括:①原核生物的复制起点和选择标记,常选用 pBR 型的基本序列,以构成穿梭质粒,便于操作。②真核生物的表达控制元件,如启动子和增强子,转录终止和腺苷酸化信号,拼接的信号等。③在真核细胞中复制和选择的遗传因子。

SV40 是一种小的二十面体病毒,含双链环状 DNA,长约 5 kb,它感染猴细胞,如 CV-1 细胞,便产生感染性病毒颗粒,并使寄主细胞裂解,故称猴细胞为容纳细胞(permissive cell)。但如果感染啮齿动物的细胞,就不产生感染性颗粒,病毒 DNA 整合到寄主 DNA 中去,细胞被转化,也就是说发生癌变,啮齿类细胞为非容纳细胞(non-permissive cell)。人体细胞是半容纳细胞(semi-permissive cell),只有 1%~2%的细胞产生感染性病毒颗粒,在极少的例子中发生整合。在容纳细胞内,SV40 的基因组的表达受严格的时序控制,早期基因转录产物经加工产生两种早期 mRNA,它们分别编码 T 抗原和 t 抗原,T 抗原的功能为启动复制,t 抗原功能尚不清楚。晚期基因转录产物经加工产生三种晚期 mRNA,它们分别产生病毒外壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3。SV40 的基因组结构见图 40-20。

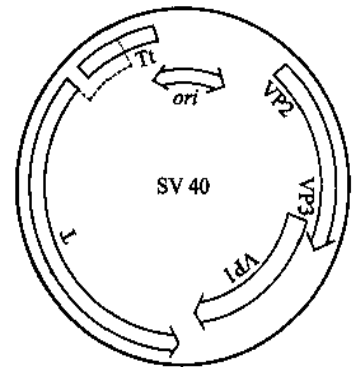


图 40-20 SV40 病毒基因组结构

SV40 病毒载体有两类:一类是取代型重组病毒载体(substitution recombinant virus vector)。在这种类型载体中,外源基因取代病毒基因组的一定区段,二者大小相等,因此形成的重组体 DNA 能够在哺乳动物容纳细胞中增殖,并被包装成具有感染活性的病毒颗粒。但是重组体中一部分病毒基因被取代,必须用与之互补的辅助病毒或辅助细胞补充缺失的基因功能。较常用的载体是晚期基因取代载体。而其互补的辅助病毒用温度敏感突变体 tsA58,它合成一种温度敏感的 T 抗原,在 41℃时 T 抗原不再合成,但能正常合成病毒外壳蛋白。重组体病毒能提供 T 抗原,结果重组体病毒与突变体 tsA58 均得到复制与包装。如果用早期基因取代载体,复制所需 T 抗原需要由辅助细胞来提供。将复制起点失活的 SV40 早期基因区段转化猴容纳细胞 CV-1,由此得到的细胞株称为 COS(CV-1, origin of SV40)细胞,该细胞能组成地表达 T 抗原,故早期基因取代载体可在其中繁殖,最终导致寄主细胞裂解。

另一类载体称为重组病毒质粒载体(recombinant virus plasmid vector)。它是将 SV40 复制起点的 DNA 片段插入大肠杆菌质粒载体中,由此构建一种病毒复制子-质粒载体,当它在 COS 细胞内就能利用细胞提供的 T 抗原进行质粒的大量复制。无论是上述病毒载体,或是病毒-质粒载体,都只能短时间保留在寄主细胞中,外源基因只能作瞬时表达(transient expression),因为病毒的感染或复制子的复制失控,最终都会导致寄主细胞的裂解死亡。

逆转录病毒以其高效感染和整合而受关注,并被构建成基因工程的重要载体。逆转录病毒为致瘤 RNA 病毒,其病毒 RNA 经逆转录产生原病毒 DNA,两端为重复逆转录形成的长末端重复序列(long terminal repeats, LTR),5'端附近有负链引物结合位点(negative strand primer binding site, PBS-ve),和包装位点 ψ ,3'端附近有正链引物结合位点(PBS+ve)。共有三个编码基因,*gag*(种群特异性抗原,group specific antigen)、*pol*(聚合酶,polymerase)和 *env*(被膜, envelope),在 *gag-pol* 左边有 5'拼接位点(splicing site, SS),右边有 3'拼接位点。在构建病毒质粒载体时,将原病毒 DNA 插入大肠杆菌质粒 pBR322,然后删除 *gag*、*pol* 和 *env* 三个基因的大部或全部序列,加入选择标记和外源基因,常用的选择标记为 *neo*(新霉素抗性基因)、*gpt*(黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因)、*dhfr*(二氢叶酸还原酶基因)。重组体 DNA 用以转化适当的受体细胞,并

用辅助病毒超感染转化细胞,产生“假型包装”(pseudotype)的病毒颗粒,就是说它具有感染所需的全部必要蛋白质,而其中基因组 RNA 却是重组体 DNA 转录的 RNA。如果用包装缺陷的原病毒 DNA 转化寄主细胞,并发生整合,由此可以得到辅助细胞,用以取代辅助病毒。它产生的重组病毒产量甚高,转移基因成功率几可达 100%。病毒载体的 LTR 具有控制基因整合和表达的能力,可使转化细胞持久表达外源基因,故广泛用于转基因动物和基因治疗。图 40-21 所示为逆转录病毒质粒载体及其 RNA 转录物之一般结构。



图 40-21 逆转录病毒载体之一般结构

各种动物病毒构成之载体各有其特点和特殊用途。逆转录病毒载体具有较高整合和表达外源基因的效率,但只能转染正在分裂的细胞。腺病毒较大,其载体可以容纳较大的外源基因片段,并且可以转染非分裂细胞。痘病毒可用于构建工程疫苗。这里不多作介绍。

四、蛋白质工程

通过基因工程能够大规模生产生物体内微量存在的活性物质,并借助转移基因而改变动、植物性状,得以在人类医疗保健中进行基因诊断和基因治疗。然而,在广泛利用自然界存在的各种蛋白质的过程中就发现,这些蛋白质只是适应生物自身的需要,而对它们产业化开发往往并不合意,需要加以改造。1983年美国基因公司的 Ulmer 首先提出蛋白质工程这个名词,它是指按照特定的需要,对蛋白质进行分子设计和改造的工程。自此之后,蛋白质工程迅速发展,已成为生物工程的重要组成部分。

(一) 蛋白质的分子设计和改造

蛋白质工程的产生和发展是许多学科相互融合、共同努力的结果,它涉及包括生物物理学、生物化学、分子生物学、计算机科学和化学工程学以及一些相关的相邻学科和交叉学科。蛋白质工程首先是以蛋白质的结构为基础的,通过蛋白质一级结构、晶体结构和溶液构象的研究,积累了成千上万蛋白质一级结构和高级结构的数据资料,并编制成系统的数据库,得以从中找出蛋白质分子间的进化关系、一级结构和高级结构的关系、结构与功能的关系方面的规律。特别值得指出的是,计算机科学技术和图像显示的迅猛发展,已使蛋白质结构分析、三维结构预测和模型构建,分子设计和能量计算等理论与技术以及相关软件,正在发展成为一个独立的研究领域,而成为生物信息学的一门分支。它在蛋白质工程定向改造的分子设计中是必不可少的条件和重要手段。

蛋白质作为生物大分子是生物化学与分子生物学的研究重点,大量蛋白质被分离纯化,测定了它们的结构、性质和生物学作用。分子生物学有关基因组的研究,也可用以推测出一些未知蛋白质的结构与功能。采用定位诱变的方法,可以对编码蛋白质的基因进行核苷酸密码子的插入、删除、置换和改组,其结果为分子改造提供新的设计方案。现有的蛋白质是生物长期进化的结果,蛋白质工程则是对生物进化的模拟,按照蛋白质形成的规律,改造蛋白质或构建新的蛋白质。

蛋白质工程是基因工程的重要组成部分,或者说说是新一代的基因工程。蛋白质的改造通常需要先经周密的分子设计,然后依赖基因工程获得突变型蛋白质(mutein),以检验其是否达到了预期的效果。如果改造的结果并不理想,还需要从新设计再进行改造,往往要经历多次实践摸索才能达到改进蛋白质性能的预定目标。

(二) 蛋白质的实验进化

蛋白质的分子设计和结构改造在技术上取得重大突破后,备受各界关注,十多年来发展极为迅速,取得了一系列重要成果。然而,这些成果多数属于理论上的,或是技术上的,获得改进性能的实用蛋白质并不多。其主要原因在于分子设计的不精确性。分子设计的主要依据来自三个方面关系的知识:①蛋白质分子间的进化关系,从同源蛋白质序列的微观差异可找出其对空间结构和生物功能的影响;另一方面蛋白质的进化研究也为蛋白质的构造规则提供了信息。②蛋白质一级结构与空间结构的关系,由此可以从一级结构预测三级结构。③蛋白质结构与功能的关系,找出结构改变对功能的影响。从已知蛋白质的上述关系可用以推测一级结构的改变对空间结构和生物功能可能的影响,而目前对蛋白质结构规律的认识还十分有限,这种推测也就并不可靠,往往差之毫厘,失之千里。于是蛋白质改造的另一途径即在实验室条件下模拟生物分子的进化,通过随机变异和靶功能的选择,多次重复,从而获得改进性能的蛋白质。此过程称为实验进化。

达尔文式的进化基本上是一个过程的循环重复:变异—选择—增殖。可遗传的变异是进化的基础,只有从足够庞大的随机突变体库中才能选择到适宜的突变体。选择,无论是自然选择或是人工选择,都是把“优者”从“劣者”中分离出来的过程,因此选择具有方向性。增殖是使选择到的突变体保存下来。生物分子(包括基因和蛋白质)实验进化的技术已日趋成熟。

遗传变异包括突变和重组。在实验室条件下,基因突变可以用错误倾向 PCR(error-prone PCR)来获得。Tag DNA 聚合酶缺乏校正功能,其核苷酸掺入错误率为 2×10^{-4} ,积 30 次循环,错误率可达 0.25%。如果提高反应底物 dNTP 的浓度,加入 Mn^{2+} 或 Co^{3+} 等,错误率能够提高到 2%,此即为错误倾向 PCR。有害变异往往远比有益变异为多,变异率过大易造成变异分子群丢失有用信息。DNA 改组(DNA shuffling)是一种体外基因重组技术。将错误倾向 PCR 产物进行 DNA 改组,可以增加异质性,促使有害变异与有益变异分离,通过选择获得有益变异的优化组合。DNA 改组包括三个主要步骤:①DNA 随机片段化(random fragmentation),在 Mn^{2+} 存在下用 DNase I 部分消化 DNA, Mn^{2+} 使 DNase I 在 DNA 双链相同部位切断,得到平端的片段或接近平端的片段。②自身引发 PCR(self-priming PCR),DNA 片段重叠部分两互补链的 3'端彼此配对,各作为引物,以互补链为模板向前延伸,然后以同样方式与互补配对延伸,直至合成出全长的基因。③重组 PCR(ressembly PCR),用基因 5'端和 3'端引物将上述经重组的全长基因扩增出来,即可用于表达和选择。DNA 改组的流程见图 40-22。

自然选择是通过选择生物的表现型来选择基因型的,在分子水平上则是通过选择蛋白质来选择基因。噬菌体展示技术将展示的蛋白质与其基因偶联在一起,因此,在选择到突变型蛋白质的同时也选择到了它的基因。1985 年 Smith G P 最先将外源基因插入丝状噬菌体 $\phi 1$ 的基因 III,使目的基因编码的多肽链与外壳蛋白 gp3 融合,以相对独立的空间结构展示在噬菌体表面,为表面展示技术奠定了基础。表面展示主要以丝状噬菌体 M13 或其噬菌质粒作为载体。噬菌体主要外壳蛋白 gp8 分子很小,围绕基因组 DNA 呈螺旋对称排列;低拷贝数(3~5)外壳蛋白 gp3 分子较大,在尾部,具有识别大肠杆菌性纤毛并引导噬菌体进入宿主细胞的功能,它们的 N 端均游离在外,外源蛋白与之融合而被展示。外壳蛋白融合外源蛋白后会影其正常功能,因此噬菌体载体采用双拷贝的基因 III 或基因 VII,使一个拷贝为正常(野生型)基因,另一拷贝为融合基因。噬菌质粒除含质粒复制起点和选择标记外,只含丝状噬菌体的复制起点与基因间隔区(IG)以及外源基因与外壳蛋白的融合基因,其 ssDNA 的产生与装配依赖于辅助噬菌体。

选择可以用各种方式进行,或是正选择(挑选有益突变),或是负选择(淘汰有害突变),最简单和常用的是亲和选择(affinity selection),因其犹如淘金故称为亲和淘选(affinity panning)。亲和淘选常将选择剂固定在支持物上,用以吸附高亲和力的突变型蛋白质,例如,用于选择受体的配体、酶的抑制剂、靶蛋白的作用物等。噬菌体表面展示与特异选择见图 40-23。

(三) 蛋白质工程的进展

蛋白质工程的出现标志着人类征服自然进入一个新的发展阶段。蛋白质工程使我们能更充分地利用

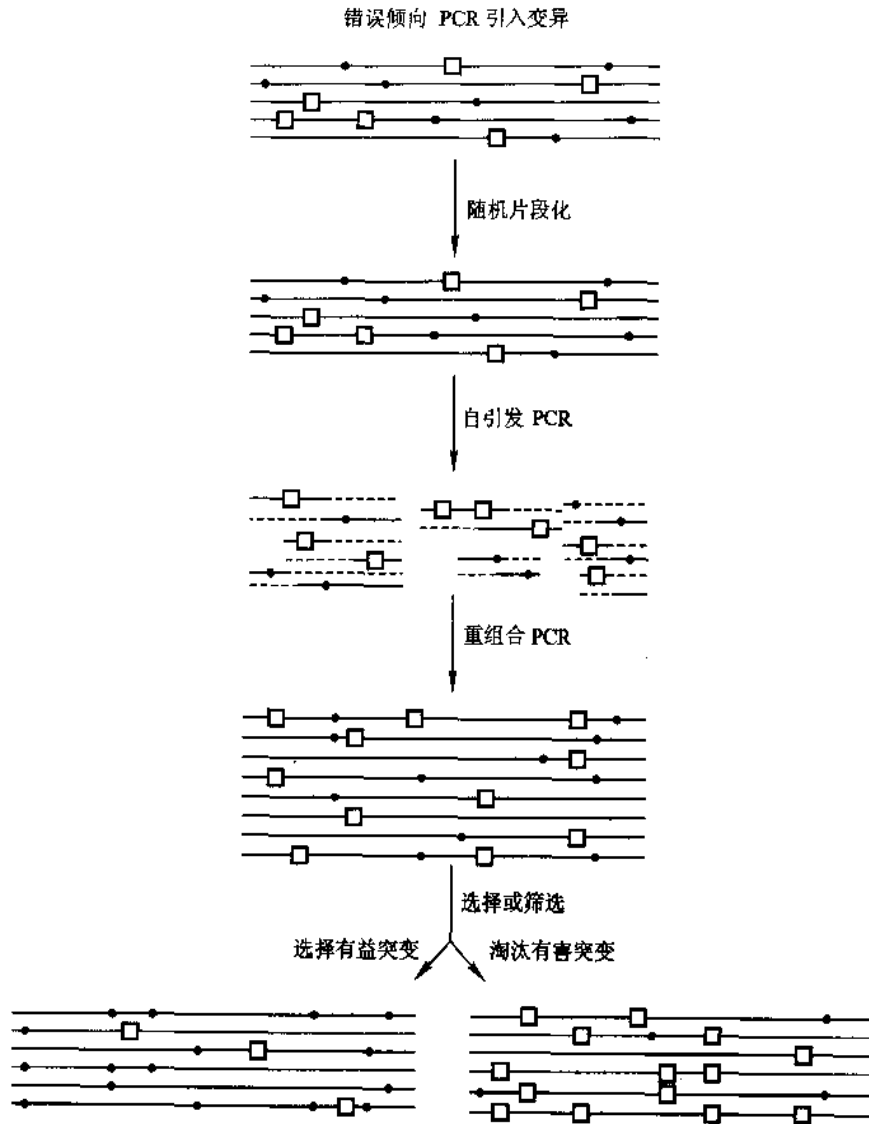


图 40-22 DNA 改组流程
 —□—有害变异 —●—有益变异

自然界存在的基因和蛋白质,而且还能在分子水平上对基因和蛋白质进行再设计和改造,进而创造出自然界不存在的基因和蛋白质,在短期内完成自然界几百万年进化才能完成的过程。新的方法不仅改进了过去传统的方法,而且还开辟了新的研究领域。蛋白质工程的应用主要在两个方面:它为蛋白质及其基因的科学研究提供了强有力的手段,它还能改进基因工程产品,开发新的应用领域。

目前蛋白质工程更多侧重于对蛋白质的理论研究,并已成为常用的不可或缺的方法。对于蛋白质的研究,大致有以下几个方面:①有助于对蛋白质结构的解析,揭示蛋白质分子结构的规律,由一级结构预测空间结构。②确定蛋白质分子间的相互关系,找出相互作用的氨基酸残基。③阐明蛋白质结构与功能的关系,了解蛋白质的活性部位和一级结构对生物功能的影响。例如,为了弄清楚蛋白质

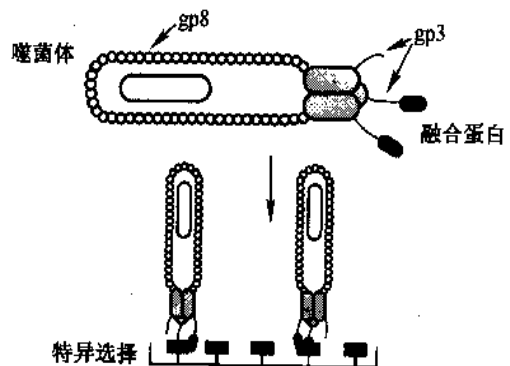


图 40-23 噬菌体表面展示与特异选择
 表达的外源肽以融合蛋白质形式展现在噬菌体表面,通过适当的选择可获得具有特定功能的多肽结构

中各半胱氨酸的作用,可逐个用丝氨酸残基取代,之后观察其对结构和功能的影响。同样,对关键氨基酸残基可予以删除或置换,以确定其作用。有赖于蛋白质工程和其他一些新的研究技术,近年来蛋白质结构和功能的研究取得突飞猛进的发展。

在应用方面,几乎所有类型具有开发前景的蛋白质和多肽都用蛋白质工程作过改造的尝试,并取得不同程度的成果。研究最多、取得成果最显著的是生物技术药物和工业用酶的蛋白质工程。蛋白质和多肽类药物包括激素、细胞因子、酶、酶的激活剂和抑制剂、受体和配体、细胞毒素和杀菌肽以及抗体等。作为药物,希望通过改造以提高其活性、特异性和稳定性,控制分子聚集,降低免疫原性和毒副反应,延长在体内的半寿期,增强对靶位点的导向性等。

例如,水蛭素是水蛭唾液腺分泌的凝血酶特异抑制剂,它有多种变异体,由65或66个氨基酸残基组成。水蛭素在临床上可作为抗栓药物用于治疗血栓疾病。为提高水蛭素活性,在综合各变异体结构特点的基础上提出改造水蛭素主要变异体HV2的设计方案,将47位的Asn变成Lys,使其与分子内Thr4或Asp5间形成氢键来帮助水蛭素N端肽段正确取向,从而提高抗凝血效率,试管试验提高达4倍,在动物模型上检验抗血栓形成的效果,提高20倍。

生长激素通过对它特异受体的作用促进细胞和机体的生长发育,然而它不仅可以直接结合生长激素受体,还可以结合许多种不同类型细胞的催乳激素受体,引起其他生理过程。在治疗过程中为减少副作用,需使人的重组生长激素(rh-GH)只与生长激素受体结合,尽可能减少与其他激素受体的结合。经研究发现,二者受体结合区有一部分重叠,但并不完全相同,有可能通过改造加以区别。由于人的生长激素和催乳激素受体结合需要锌离子参与作用,而它与生长激素受体结合则无需锌离子,于是考虑取代充当锌离子配基的氨基酸侧链,如第18和21位的His和第174位的Glu。实验结果与预先设想一致,但要开发作为临床用药物还有大量研究工作要做。

组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)和单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(scu-PA)是两种具有血纤维蛋白专一性的溶栓剂,可在血栓(血纤维蛋白)表面激活纤溶酶原,有效溶解血栓。但在临床治疗中大剂量使用的情况下二者的专一性均有限,仍可引起全身性纤溶酶原的激活而造成出血倾向。与u-PA相比,t-PA与纤溶酶原的亲合力较低,而与血纤维蛋白的亲合力较高;当血纤维蛋白与纤溶酶原结合形成复合物时与t-PA的亲合力就大为提高。于是设想构建嵌合型溶栓剂,期望综合二者之长,即将t-PA的识别控制序列(1~263)与u-PA激活纤溶酶原的蛋白酶序列(144~408)融合在一起,并删除内源性抑制剂作用位点的4个氨基酸残基(178~181)。所得嵌合分子tu-PA同时获得了亲本t-PA的反应专一性和对血纤维蛋白的亲合性以及亲本u-PA的激活性,并消除了内源抑制剂的抑制作用,体外溶栓能力较强,而血纤维蛋白原消耗较小。如果用识别血纤维蛋白或血小板表面糖蛋白的单链抗体与u-PA活性区融合,其嵌合分子对血栓的导向功能更强。

已得到分离并进行生物化学研究的酶不下数千种,然而应用于工业生产的酶却只有数十种,可见工业用酶的开发潜力还很大。用蛋白质工程的方法提高酶的活性、特异性和稳定性,改变反应介质和动力学的性质,从而可以改进现有的工业用酶,开发更多新的工业用酶。去污剂中添加的蛋白酶和脂酶需要具有耐热、耐碱、耐氧化剂的性能,从生物体内分离的酶往往达不到要求,这就要加以改造。为提高酶的热稳定性,可在蛋白质分子中引入二硫键、置换不稳定的氨基酸残基、增加内部疏水性氨基酸等。枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)是去污剂的一种成分,它的活性中心附近有一个Met,易被氧化并失去活性,如以Ala取代Met,虽然酶的活性略有下降,但有明显抗氧化的能力。Chao H等利用定向进化的方法得到一系列热稳定的突变型蛋白,其中一种突变型1E2A含有4个错义突变,V93I、N109S、N181D和N218S,用DNA改组技术进行回交(back-crossing),即以此突变型与野生型基因等量改组,任何一个突变将以1/2的概率出现在改组群体的基因中,通过筛选和测序,发现中性突变占50%,不利突变已在选择过程中全部排除,将两个有利突变(N218S和N181D)组合在一起得到的突变型与野生型相比,在65℃的半寿期提高近10倍,变性温度提高6.5℃,比活提高2倍多。上述实验中枯草杆菌蛋白酶E突变型的稳定性和活性列于表40-2。

表 40-2 枯草杆菌蛋白酶 E 突变型的稳定性和活性

突变型	65℃的 $t_{1/2}$, min	T_m , °C	比活, 单位/mg
WT	5.1 ± 0.2	68.1	17.2 ± 0.1
1E2A	42.8 ± 0.1	74.4	33.7 ± 0.7
V93I	5.0 ± 0.1	68.1	21.6 ± 0.2
N109S	5.2 ± 0.1	68.2	16.1 ± 0.4
N181D	16.5 ± 0.6	71.8	18.0 ± 0.6
N218S	10.9 ± 0.1	71.3	38.6 ± 0.6
N218S + N181D	49.9 ± 0.8	74.6	38.4 ± 0.1

蛋白质工程的发展很快,研究工作很多,这里仅介绍几个例子。

五、基因工程的应用与展望

在基因工程技术的带动下生物技术获得迅猛发展,从而改变了分子生物学的面貌,并促进了生物技术产业的兴起,由此开始了一个新的科技时代。

(一) 基因工程开辟了生物学研究的新纪元

基因工程的新技术和新方法为解决生物化学、分子生物学和医学中的一些重大问题提供了强有力的手段。过去分离一个基因,测定基因的序列,确定基因的功能,用以改变生物性状,都是十分困难的事,往往需要数年,甚至数十年的时间,现在任何生物学实验室都能在短时间内完成。测定蛋白质分子的氨基酸序列原是一项十分费时费力的工作,现在可由 DNA 的快速测序法来代替;一些生物体内微量存在的蛋白质也可通过克隆基因的大量表达来制备。借助基因工程,分子生物学的发展达到了空前的速度和规模,重大突破不断出现,研究成果日新月异,生物化学与分子生物学已成为自然科学中最富挑战性、发展最快的学科之一。

生物化学与分子生物学是生物学各分支学科的领头学科,生物化学与分子生物学带动了生物学的发展。基因工程已成为生物学各分支学科在分子水平上研究生命活动规律所不可缺少的重要手段。新的生物技术不仅为分子生物学家所掌握,也为生物科学其他分支学科的研究者所掌握,各学科都能在分子水平上,在基因、基因表达和其调控的水平上阐明生命活动过程,分子生物学已渗透到生物科学的各分支学科中去,学科的界线已不那么分明了。一些过去难以研究的问题,如细胞识别、发育的基因控制、神经系统和大脑活动的分子基础等,借助新的技术都得到蓬勃发展,从而开辟了许多新的研究领域。结构分子生物学、发育分子生物学和神经分子生物学成为当今最活跃、发展最快的分支学科。

按照传统的方法,生物学的研究通常是根据生物的性状,找到有关的蛋白质,再确定其基因,在这条途径上生物学家已经摸索了一个半世纪;利用基因工程则可以先分离出基因,经克隆后测序并进行表达,然后再研究其功能,这一研究途径要容易得多。由于这一途径与传统生物学相反,故称为反向生物学(inverse biology)。反向生物学不仅是生物学的一种新的研究方法,而是一种新的思路和新的理论系统。

由于基因工程的迅速进展,绘制人类基因组图谱已成为可能。人类细胞含有 23 对染色体,单倍体基因组 DNA 由大约 3×10^9 bp 所组成,共有约 3 万~4 万个基因。科学家们认为,通过完成全部基因序列的测定,人们将能够更有效的找到新的方法来治疗和预防许多疾病,如癌症和心脏病等。1986 年,著名生物学家、诺贝尔奖获得者 Dulbecco R 在 Science 杂志上率先提出“人类基因组计划”,该建议引发了科学界长达 3 年的激烈争论。美国政府决定用 15 年时间(1990—2005 年)出资 30 亿美元来完成这一计划。各国科学家和政府也纷纷响应美国科学家的倡议。包括美国、英国、日本、中国、德国及法国六国科学家参与了这项生命科学历史上迄今最为浩大的科学工程的研究。经过 10 年努力,于 2000 年 6 月人类基因组草图宣告完成。目前已基本完成基因组的测序工作,核对了 4 至 5 次,而按照要求需核对 10 次以上,下一阶段的工作需要填补已测序列之间的空隙,将基因组序列准确率提高到 99.99%,预计这项工作将于 2003 年全部

完成。

人类基因组的研究带动了有关技术的突破和发展,在测定人类基因组序列的同时数十种从低等生物到高等动、植物的基因组完成全序列的测定,其中包括大肠杆菌、枯草杆菌、酿酒酵母、一种线虫(沙虫, *Caenorhabditis elegans*)以及多种病原体,果蝇、水稻和拟南芥菜的基因组全序列也已接近完成,建立几十个“模式生物”(model organisms)基因组和代表性物种的基因组对于生命科学的发展至关重要。

人类基因组计划的顺利进展鼓励了科学家们进一步规划后基因组时代(post-genome era)的研究任务,由此提出了功能基因组的研究方案。也就是说不仅要了解人类基因组的语言信息,即测定其全序列;还要了解其语义信息,弄清全部编码的基因;并进而了解其语用信息,阐明基因表达的时空调节。基因组学(genomics)的任务已不仅限于研究基因组的结构,还要研究基因组的功能,研究基因组表达的产物。然而,生命的分子逻辑在于系统内生物分子的相互作用,仅从基因组水平进行研究不足以揭示复杂的生命活动规律。1994年 Wilkins M 和 Williams K 提出蛋白质组(proteome)的概念,从而产生了一门新的学科——蛋白质组学(proteomics),即研究细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式。这标志着生物化学与分子生物学已从研究单个蛋白质分子的结构与功能进入研究蛋白质群体(组)的结构与功能。基因组的产物不仅仅是蛋白质,还有许多具有复杂功能的 RNA,于是 1997 年提出了转录组学(transcriptomics),用以表示对基因组全部转录物的研究。1999 年又提出了 RNA 组学(RNomics)的研究任务。

基因工程的发展不但改变了生物化学与分子生物学的面貌,而且给整个生物学带来巨大影响,新的发现不断涌现,新的研究领域不断开拓,一个生物学的新纪元已经开始。

(二) 基因工程促进了生物技术产业的兴起

现在是新技术革命的时代。基因工程的诞生带动了现代生物技术的不断突破和迅猛发展,依赖于生物技术的产业随之兴起。生物技术以基因重组技术为前沿和核心,还包括细胞技术、酶技术、微生物发酵技术、生化工程技术和生物模拟技术等内容。基因工程的产业化往往涉及不止一种技术,而是配套的技术,或者说综合的生物技术。

基因工程首先在医药和化工等领域中崭露头角。其实,它的最大用武之地是在农业领域和医疗保健领域。基因工程产业化的范围十分宽广,这里仅就主要方面举例加以说明。

1. 基因工程药物

1977 年 Itakura K 和 Boyer H 利用当时刚趋成熟的基因工程技术,在大肠杆菌中产生下丘脑激素 14 肽生长素释放抑制激素,商品名 Somatostatin(SMT)。他们将化学合成的 14 肽基因与 β -半乳糖苷酶基因融合,插入质粒载体 pBR322,在 *lac* 启动子控制下表达融合蛋白。表达产物用溴化氰处理,溴化氰使蛋氨酸裂解,由此分离得到 14 肽的激素。该激素可用于治疗儿童发育时期因生长素分泌过多造成的四肢巨大症。从 1 L 工程菌发酵液中可得到 50 mg 的基因表达产物,相当于 50 万头羊下丘脑提取的该激素量,由此可以了解到基因工程产业化的意义。

其后,基因工程药物不断成功问世。1978 年胰岛素原在大肠杆菌中表达成功。1979 年人生长素基因在大肠杆菌中获得直接表达。1980 年人白细胞干扰素基因获得克隆和表达。1981 年抗口蹄疫的基因工程抗原研制成功。1982 年乙肝抗原在酵母菌中表达成功。同年转基因植物和转基因动物也分别获得成功。

基因工程药物包括各类激素、酶、酶的激活剂和抑制剂、受体和配体、细胞因子和调节肽、抗原和抗体等。体内微量存在的细胞因子,采用基因工程大量制备,才得以确定其生物功能和临床应用价值。借助蛋白质工程不断改进蛋白质和多肽药物性能,并设计和制造出自然界不存在的新的蛋白质和多肽。其意义远比抗生素的发现和應用更为深远。一些恶性疾病,过去无药可治,现在有了特异的基因工程药。将识别肽段、配基或抗体与蛋白质药物融合,可构成分子导向药物,它们能够选择性作用于靶部位,从而大大提高了疗效。应用基因工程产生抗体称为抗体工程。通过免疫动物获得的抗体为第一代抗体,由杂交瘤产生的单克隆抗体为第二代抗体,抗体工程产生的抗体则为第三代抗体。利用噬菌体展示技术,使抗体基因的表达产物展示于噬菌体表面,由此构建成噬菌体抗体库,可以在体外进行克隆选择,而无需免疫动物。总

之,基因工程正在改变,今后将更大改变化学治疗面貌和生产途径。

2. 基因工程在农业上的应用

20世纪50年代开始的“绿色革命”,对全世界范围内重要粮食作物,如小麦、玉米和水稻等的改良与产量提高,做出了重要贡献。农业生产的惊人进步,是由于作物育种的成就同农业机械化和化学化的发展相配合的结果。然而,传统的育种方法有其局限性,并且费时费力。高产的农作物新品种往往需要大量施用优质化肥,各种杀虫剂和除草剂等化学药品,这就造成环境污染,土壤肥力下降,农业成本增加等新的问题。而且,传统的育种方法难以克服物种之间的遗传屏障,高度近亲繁殖造成作物遗传背景越来越窄,容易发生病虫害。70年代兴起的生物技术应用于农业,于是出现了第二次“绿色革命”。

转基因技术改变了传统的育种方法,通过导入优良基因而使作物获得新的性状。最早进行的基因工程育种是使作物获得各种抗性,抗病毒、抗病菌、抗虫害、抗除草剂、抗寒、抗涝、抗干旱及抗盐碱等等。通过转基因可以控制作物的生长发育,缩短生长期,影响各器官的形成。新的育种方法增加了农产品的产量,还可改良农产品的品质,增加营养成分,并使农产品便于保存。基因工程促进了对光合作用和固氮作用的基础研究,可望提高栽培作物的光合作用效率,直接从空气中利用氮源。基因工程也改变了作物的栽培技术和田间管理,技术上落后的农业正在变成高新技术的产业。

畜牧饲养业也得益于基因工程,在短时间内就培育出各种高产、优质、抗病及短生长期的新品种,新的转基因动物获得许多优良性状,改变了饲养条件,也改善了畜牧产品的性能和品质。

基因工程还可将栽培植物和饲养动物作为生物反应器通过转基因使植物的茎、根和种子或禽类的蛋、哺乳类动物的奶汁中含有大量珍贵的药物或疫苗。基因工程使得人类能够充分利用自然界的基因资源。

3. 基因治疗

所谓基因治疗(gene therapy)是指向受体细胞中引入具有正常功能的基因,以纠正或补偿基因的缺陷,也可以是利用引入基因以杀死体内的病原体或恶性细胞。基因工程的兴起,使得基因治疗成为可能。一些目前尚无有效治疗手段的疾病,如遗传病、肿瘤、心脑血管疾病、老年痴呆症及艾滋病等,可望通过基因治疗来达到防治的目的。

1990年,美国正式开始首例临床基因治疗,患儿由于腺苷脱氨酶(ADA)基因缺陷,而患重度免疫缺陷症(SCID)。研究人员将克隆的腺苷脱氨酶基因(*ada*)导入患者淋巴细胞,经体外培养淋巴细胞可以产生腺苷脱氨酶,然后再将这种淋巴细胞转入患者体内,患者症状有明显缓解,治疗取得令人鼓舞的成功。继美国之后,许多国家都开始了基因治疗试验。我国于1991年首例B型血友病基因治疗也获得满意结果。然而目前基因治疗在技术上还未成熟,许多试验都没有成功。关键问题是:①如何选择有效的治疗基因。②如何构建安全载体,病毒载体效率较高,但却有潜在的危险性。③如何定向导入靶细胞,并获得高表达。人类基因组计划的完成必将有助于人类重要疾病基因的发现,基因治疗技术也在不断改进。根据乐观的估计,在今后20年中,基因治疗有可能取得重大突破,成为临床广泛采用的有效治疗手段。

(三) 基因工程研究的展望

20世纪70年代初基因工程的出现带动了生物技术的兴起和发展,由此使生物科学进入了一个新的发展时期,其主要特点是:第一,生物科学得以前所未有的高速度向前发展。技术上的不断创新和突破,使得生物科学具有赖以迅猛发展的方法和手段。第二,生物科学与工程学相结合,出现空前规模大科学工程的研究。巨大的信息网将世界各实验室相连,生物科学的研究变得更有计划、更有组织、更有规模了。第三,生物科学进入了一个创造和实践的新时代。如果说过去生物学主要是在认识生物的基础上研究怎样利用生物,那么今天已能够在分子水平上重新设计和创建自然界未曾出现过的基因、蛋白质和生物新品种。

基因工程和有关的生物技术为人类认识生命世界,认识人类自己提供了有效手段。首先,人类需要了解自身基因组编码的遗传信息。只有在基因工程的基础上才有可能提出和完成“人类基因组计划”这样一个生物学历史上最宏大的科学工程。“人类基因组计划”即将提前完成,科学家们又在制定“后基因组研究计划”,着手功能基因组学的研究。这项工作具有巨大的理论意义和实践意义,对生物学和医学将产生深

远的影响,由此发展起来的新策略、新技术在生物技术产业中也能发挥重大作用,有关基因序列的信息在科学研究和实践应用中的价值也会越来越大。

其次,高等动、植物及至人体如何从一个受精卵开始发育成为成体的,这也是人们长期以来不断探索以求解决的基本问题之一。由于采用了基因工程技术,对发育过程的研究才深入到基因选择性表达和其产物对发育过程的控制等分子水平。通过基因标签技术,即利用转位因子插入控制发育的基因内使其失活,或是通过基因敲除(knock-out),生物发育就停留在该基因控制的阶段,用这样的方法及其他一些方法,可以克隆到控制发育的基因。现在知道,发育程序并不是在受精卵中早已完全确定的,而是在发育过程中通过有关基因系统间一系列相互作用而逐渐展开的。果蝇发育的遗传实验表明,决定胚胎体轴和分节的基因形成一个分层次的网络。决定初级体轴的基因是原初基因,这些基因产物不均匀地分布在卵子中,从而使卵裂过程产生并到达一定空间的细胞核基因组选择性激活。被激活的分节基因又对体轴和分节的发育进一步起作用。第三个层次是同源异型基因(homeotic genes),它们决定体节分化为头、胸和腹的器官。目前已经克隆了许多同源异型基因,它们都具有一个类似的框架(box)序列,这类框架也存在于脊椎动物的基因组中,估计这些同源异型基因的产物是一类转录因子。目前即使是果蝇的发育都还远未弄清楚,更何况是人的发育。但重要的是,生物发育已不再是不可捉摸的事,它被归结为一系列连续发生、彼此相关的基因事件,只要假以时日,这一系列基因事件都将会研究清楚。

第三,最重要也是最困难的研究课题是了解人类大脑的活动规律。当代自然科学面临的最大挑战之一是揭开大脑的秘密。基因工程作为研究分子生物学的重要手段,在神经生物学的研究中也发挥了重要作用。神经信号的基本形式是沿神经元质膜迅速传播的动作电位或神经脉冲,它由神经细胞膜发生瞬间离子通道透性改变而引起的。现已将多种离子通道蛋白的基因及神经递质受体的基因克隆出来,因而能够通过克隆基因的表达获得足够量的通道受体蛋白,在体外研究它们的作用,了解神经回路的作用机制。更引人注目的是学习和记忆分子基础的研究。学习可能使神经细胞突触连接的有效性产生长期的变化,其中涉及基因表达的改变和第二信使系统的信号转导,前者与长期记忆有关,后者参与短期记忆。对大脑的研究是人类探索自然的重要组成部分,它不仅反映了人类对自然和人类自己的认识水平,认识能力,并将直接影响到人类的思想和意识形态。

在基因工程的带动下,有关的生物技术得到迅速发展,构成了一个新兴的综合技术领域,它们运用生命科学和邻近基础学科的知识,并结合工程学的现代技术,成为巨大的生产力。一批以生物技术为基础的新产业群得以迅速兴起。这些产业能为社会提供大量商品和各种社会服务,创造出庞大的财富,其发展规模更是始料不及的。它们提供的商品或是生物技术药物、食品、化工产品、生物材料和加工制品,或是优良的生物品种。社会服务的含义也很宽,它们产生的直接效果是社会效益,如疾病诊断和医疗保健,水的净化和废物处理等。

新技术革命引起新的产业革命,促使世界产业迅速地朝向尖端技术化、知识密集化、高增殖价值化方向发生结构性的变化。领头产业正在更替。当今是信息经济时代,信息技术改变了整个社会面貌。任何经济形式都有始有终,都要经历形成、成长、成熟和转化四个明确的阶段。20世纪从电讯技术诞生、计算机出现、网络的形成到大规模使用芯片,信息经济进入了它的成熟阶段。据估计,再过20~30年,生物经济可能进入成熟阶段,并将取代目前的信息经济。到那时生物技术产业将会是领头的产业,生物技术会影响到经济结构、生活方式和社会的各个主要方面。

提 要

基因工程是对携带遗传信息的分子进行设计和施工的分子工程,包括基因重组、克隆和表达。基因工程的核心技术是DNA重组。蛋白质工程是在基因工程基础上发展起来的,它是指通过对蛋白质已知结构与功能的认识,借助计算机辅助设计,利用基因定位诱变等技术改造蛋白质,以达到改进其某些性能的目的。

DNA分子克隆,即将DNA的限制片段插入克隆载体,导入宿主细胞,经无性繁殖,获得相同的DNA扩

增分子。

切割 DNA 分子需要用限制性核酸内切酶。生物来源不同但识别序列与切割序列相同的限制酶,称为同裂酶;切割产生单链末端相同的限制酶,称为同尾酶。相容的限制片段可用 DNA 连接酶相连接。平末端连接效率较低,利用接头、衔接物或在平末端加上互补均聚物可以帮助平末端连接。

将外源 DNA 带入宿主细胞并进行复制的运载工具,称为载体。克隆载体通常是由质粒、病毒或一段染色体 DNA 改造而成。大肠杆菌载体主要有:质粒载体、 λ 噬菌体载体、柯斯质粒和丝状噬菌体 M13 载体等,它们能够携带的外源 DNA 片段大小不同,用途也各异。宿主细胞应根据载体的性质来选定。

将外源 DNA 导入宿主细胞,从而改变细胞遗传性状,称为转化;将病毒 DNA 直接导入细胞,称为转染。用氯化钙处理大肠杆菌细胞,使处于感受态,可以促进转化。 λ 噬菌体和柯斯质粒的重组体在体外包装后可用以感染大肠杆菌,柯斯质粒在大肠杆菌细胞内以质粒形式存在。外源 DNA 导入真核细胞常用 DNA 复合物、脂质体、电穿孔等方法。

基因文库是指整套基因组 DNA 片段分子克隆的总体。基因文库的构建包括基因组 DNA 的随机片段化、载体 DNA 的制备、重组体 DNA 的体外包装、重组噬菌体感染大肠杆菌、基因文库的鉴定和扩增等步骤。由于真核细胞的基因是断裂的,只有用它的 mRNA 经逆转录获得 cDNA,才能得到连续的编码序列。细胞全部 mRNA 的 cDNA 克隆之总体,称为 cDNA 文库。从文库中筛选基因或 cDNA 克隆主要依据重组体的特征、原位杂交或表达产物的性质。

聚合酶链式反应(PCR)借助一对引物,在耐热 DNA 聚合酶作用下,通过多轮酶促反应,使基因序列得到指数级的扩增。PCR 技术因其检测和扩增基因十分快速高效,并且简单易行,而被广泛用于生物学、医学、刑侦和其他有关领域。DNA 可用化学反应合成。在寡核苷酸指导下可使 DNA 定位诱变。常用的 DNA 快速测序法有化学法和酶法(双脱氧核苷酸法)两种。

基因表达的主要控制元件有:启动子和有关的调控序列、核糖体结合位点、转录终止信号和终止密码子等。外源基因在宿主细胞内可以非融合蛋白形式表达,也可以融合蛋白形式表达。在信号肽的引导下表达蛋白可以穿过细胞膜,分泌到细菌的周质或培养基中。外源蛋白较高水平表达时常产生不溶性的包涵体。为便于操作,真核生物表达载体通常都含有在大肠杆菌中复制的起点,因此都是穿梭载体。酵母菌的克隆和表达载体常用整合质粒、附加体质粒、复制质粒构建而成。为克隆基因组 DNA 大片段,常用酵母人工染色体(YAC)。植物基因工程最常用的载体是 Ti 质粒。高等动物常用各种病毒构建表达载体。

蛋白质的改造通常需要先经周密的分子设计,然后依赖基因工程获得突变型蛋白质。蛋白质的实验进化为蛋白质改造提供了又一条有效途径。蛋白质工程已成为研究蛋白质结构和功能最重要的手段之一,并在改进和开发蛋白质产品中日益发挥重要作用。

基因工程开辟了生物学研究的新纪元。借助基因工程,分子生物学的发展达到空前的速度和规模,新的研究领域不断被开拓。“人类基因组计划”是生物学历史上最巨大的科学工程;后基因组的时代已经到来。

基因工程带动了生物技术产业的兴起。制药、化工、食品、农业和医疗保健业无不得益于基因工程。基因工程帮助人类认识和改造生命世界,也帮助人类认识自己。

习 题

1. DNA 分子克隆包括哪些步骤?有何应用价值?
2. 大肠杆菌质粒 pBR322 含有 10 个 *Hinf*I 的酶切位点,当以此酶部分水解时可得到多少种限制片段?(91 种)
3. 克隆载体的必要条件是哪些?
4. 比较柯斯质粒和 λ 噬菌体为载体进行 DNA 克隆的异同。
5. 如何进行单链 DNA 的克隆?
6. 有哪些方法可以使外源 DNA 与载体 DNA 相连接?比较它们的优缺点。
7. 将重组 DNA 导入细胞内有哪些方法?它们的原理是什么?
8. 基因文库和 cDNA 文库有何不同?为什么要建 cDNA 文库?

9. 建立人胚 cDNA 文库,已知人胚低丰度 mRNA 为 28 000 种,占总 mRNA 的 40%,为使低丰度 cDNA 存在的概率大于 99%,此 cDNA 文库应包含多少克隆? (3.22×10^5)
10. 原位杂交的原理是什么?有何用途?
11. 何谓差别杂交和扣除杂交?举例说明用以分离基因的过程。
12. 说明聚合酶链式反应(PCR)的原理和用途。
13. 基因定位诱变的主要方法有几种?它们的原理是什么?
14. 比较两种 DNA 快速测序的方法,包括方法的原理和优缺点。
15. 基因表达的主要控制元件有哪些?真核生物与原核生物有何差别?
16. 分析融合蛋白表达和非融合蛋白表达的利弊。
17. 酵母的克隆载体有几种?它们的基本特点是什么?
18. 如何将外源基因导入植物细胞并使之表达?
19. 什么是基因治疗?常用的载体有几种?
20. 什么是蛋白质工程?举例说明蛋白质工程的意义。
21. 叙述 DNA 改组的步骤和原理。
22. 提出你对基因工程未来发展的看法。

主要参考书目

1. Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
2. Watson J D, Gilman M, Winkowski J *et al.* *Recombinant DNA*. 2nd ed. New York: Scientific American Books, 1992
3. Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc, 1995
4. 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京:高等教育出版社, 1993
5. 吴乃虎. 基因工程原理. 第二版. 北京:科学出版社, 1998

(朱圣庚)

生化名词英汉对照

A

- α -1-antitrypsin α -1-抗胰蛋白酶
 abequeose 3-脱氧岩藻糖
 abetalipoproteinemia 无 β -脂蛋白血症
 abiologic process 非生物过程
 abnormal hemoglobin 异常血红蛋白
 abnormal metabolism 异常代谢
 abrin 红豆碱
 abscisic acid 脱落酸
 absolute configuration 绝对构型
 absolute specificity 绝对专一性,绝对特异性
 absorbance 吸光率
 absorbent 吸收剂
 absorption coefficient 吸收系数
 absorption spectrum 吸收光谱(absorption spectra 吸收光谱复数)
 abzyme 抗体酶
 accelerator globulin (proaccelerin) 促凝血球蛋白
 acceptor 受体
 acceptor control 受体调控
 acceptor site 受体部位
 acetal 缩醛
 acetaldehyde 乙醛
 2-acetamidoglucal 2-乙酰氨基葡萄糖
 acetic acid 乙酸
 acetosacetate 乙酰乙酸(盐)
 acetoacetate decarboxylase 乙酰乙酸脱羧酶
 acetoacetyl-acyl carrier protein 乙酰乙酰-酰基载体蛋白
 acetoacetyl coenzyme A acetoacetyl CoA 乙酰乙酰-CoA
 acetyl CoA carboxylase 乙酰 CoA 羧化酶
 α -aceto- α -hydroxybutyric acid α -乙酰- α -羟丁酸
 acetoin 3-羟丁酮
 acetone 丙酮
 acetolactate mutase 乙酰乳酸变位酶
 α -acetolactate synthetase α -乙酰乳酸合成酶
 acetylcholine 乙酰胆碱
 acetylcholine receptor 乙酰胆碱受体
 N-acetylglutamic acid N-乙酰谷氨酸
 N-acetylglutamic γ -semialdehyde N-乙酰谷氨酸半醛
 acetylglutamate kinase 乙酰谷氨酸激酶
 α -N-acetylglutamyl phosphate α -N-乙酰谷氨酰磷酸
 N-acetyl- γ -glutamyl phosphate reductase N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸还原酶
 N-acetylglycine N-乙酰甘氨酸
 N-acetylheparin monosulfate N-乙酰肝素-硫酸
 N-acetylhexosamine N-乙酰氨基己糖
 N-acetyl- β -hexosaminidase N-乙酰- β -氨基己糖苷酶
 N-acetylhistamine N-乙酰组胺
 N-acetylhomoserine N-乙酰高丝氨酸(N-乙酰同型丝氨酸)
 N-acetyl-5-hydroxytryptamine N-乙酰-5-羟色胺
 N-acetyllactosamine N-乙酰乳糖胺
 acetylipoamide 乙酰辅基酰胺
 ϵ -N-acetyllysine ϵ -N-乙酰赖氨酸
 N-acetylmannosamine N-乙酰甘露糖胺
 N-acetylmannosamine-6-phosphate N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸
 N-acetylmuramic acid N-乙酰胞壁酸
 N-acetylneuraminic acid N-乙酰神经氨酸
 N-acetylneuraminic acid-1-cytidine monophosphate N-乙酰神经氨酸-1-胞苷酸
 acetyl number 乙酰值
 N- α -acetylornithine N- α -乙酰鸟氨酸
 N-acetylornithine cycle N-乙酰鸟氨酸循环
 acetylornithine transaminase 乙酰鸟氨酸转氨酶
 acetylornithine deacetylase 乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶
 acetylphosphate 乙酰磷酸
 acetyl-S-coenzyme A 乙酰-S-辅酶 A
 O-acetylserinesulfhydrylase O-乙酰丝氨酸硫氢解酶
 N-acetylserotonin N-乙酰5-羟色胺
 acetyl thioester 乙酰硫酯
 acetyl transacylase 乙酰转酰基酶
 acetyl transferase 乙酰基转移酶
 acetyl-L-tyrosinamide 乙酰-L-酪氨酰胺
 acetyl-L-tyrosine ethyl ester 乙酰-L-酪氨酸乙酯
 acetyl adenosine 5'-monophosphate(acetyl AMP) 乙酰腺苷酸
 acetyladenylate 乙酰腺苷酸
 N-acetylalanine N-乙酰丙氨酸
 N-acetylamino acids N-乙酰氨基酸
 N-acetylamino sugars N-乙酰氨基糖
 acetylase 乙酰化酶
 N-acetylaspartic acid N-乙酰天冬氨酸
 N-acetylated protein N-乙酰化蛋白质
 acetylation 乙酰化作用
 acetyl chloride 氯化乙酰
 acetylcholine 乙酰胆碱
 acetylcholine esterase 乙酰胆碱酯酶
 acetyl-CoA(acetyl coenzyme A) 乙酰-CoA
 acetyl-CoA acyltransferase 乙酰-CoA 转乙酰酶
 acetyl coenzyme A carboxylase 乙酰辅酶 A 羧化酶
 acetyl coenzyme A carnitine acetyl transferase 乙酰辅酶 A 肉碱乙酰基转移酶
 acetyl coenzyme A decarboxylase 乙酰辅酶 A 脱羧酶
 acetyl coenzyme A synthetase 乙酰辅酶 A 合成酶
 β -N-acetylgalactosamidase β -N-乙酰氨基半乳糖苷酶
 N-acetylgalactosamine N-乙酰氨基半乳糖
 N-acetyl-D-galactosamine-4-sulfate N-乙酰氨基半乳糖-4-硫酸
 N-acetylgalactosaminyl transferase N-乙酰基半乳糖转移酶
 N-acetylglucosamine N-乙酰氨基葡萄糖
 N-acetyl-D-glucosamine-1-phosphate N-乙酰-D-氨基葡萄糖-1-磷酸
 N-acetyl- α -D-glucosaminidase N-乙酰- α -D-氨基葡萄糖苷酶
 acid dissociation 酸解离
 acid amide 酰胺
 acid anhydride 酸酐
 acid azide 酰基叠氮
 acid-base balance 酸碱平衡
 acidic amino acid 酸性氨基酸
 acid lipase 酸性脂肪酶
 acidity 酸度
 acid mucopolysaccharide 酸性黏多糖
 acid phosphatase 酸性磷酸酶
 acid seromucoid 酸性血清黏蛋白
 acidic activation domain 酸性激活区
 acidification 酸化(作用)

- Ac-globulin 促凝血球蛋白
acidosis 酸中毒
aconitase 乌头酸酶, *cis*-aconitase 顺-乌头酸酶
aconitatehydratase 乌头酸水合酶
cis-aconitic acid 顺乌头酸
acquired immune deficiency 艾滋病(获得性免疫缺损综合症)(ADIS)
acrolein 丙烯醛
acrylyl coenzyme A 丙烯酰辅酶 A
ACTH 促肾上腺皮质激素
actidione 放线菌酮
actin 肌动蛋白
actinomycin D 放线菌素 D
activation 活化, 激活(作用)
activation domain 激活区
activation energy 活化能
activation of gene structure 基因结构的活化
activating enzyme 活化酶
activating transcription factor 转录激活因子
activator 激活剂
activators of enzymes 酶的激活物
active acetaldehyde 活性乙醛
active center 活性中心
active chromosome 活性染色体
active glycolaldehyde 活性羟乙醛
active site 活性部位
active transport 主动运送
activity 活性, 活力
actomyosin 肌动球蛋白
acyl - acyl carrier protein 酰 - 酰载体蛋白
acyl - CoA dehydrogenase 脂酰 - CoA 脱氢酶
acyl - CoA cholesterol acyl - transferase (ACAT) 脂酰 - CoA 胆固醇脂酰转移酶
acyl - acyl carrier protein dehydrase 酰 - 酰载体蛋白脱水酶
acyl adenylate 酰基腺苷酸
N - acyl - α - amino acids N - 酰基 - α - 氨基酸
acyl carnitine 酰基肉碱
acyl carrier protein (ACP) 酰基载体蛋白
acyl carrier protein acyltransferase 酰基载体蛋白酰基转移酶
acyl carrier protein malonyl transferase 酰基载体蛋白丙二酰转移酶
acyl carrier protein holoprotein synthetase 酰基载体蛋白全蛋白合成酶
acyl coenzyme A 酰基辅酶 A
acyl CoA: cholesterol acyltransferase 脂酰 CoA: 胆固醇脂酰转移酶
acyl - CoA dehydrogenase 酰基 - CoA 脱氢酶
acyl - CoA synthetase 酰基 - CoA 合成酶
acyl - enzyme (带) 酰基酶
acylglycerol palmitoyl transfrase 酰基甘油转软脂酰酶
acylphenylalanine amide 酰基苯丙氨酸酰胺
acylphenylalanine ester 酰基苯丙氨酸酯
acyl phosphate 酰基磷酸
acyl transferase 脂酰转移酶
adaptive enzyme 适应酶
adaptor 接合器, 连接物
adaptor RNA 连接 RNA
adenine(6 - aminopurine) 腺嘌呤(6 - 氨基嘌呤)
adenine deaminase 腺嘌呤脱氨基酶
adenine deoxyribonucleoside 腺嘌呤脱氧核苷
adenine - guanine ratio 腺嘌呤 - 鸟嘌呤比例
adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 腺嘌呤磷酸核糖转移酶
adeninyl 腺嘌呤基
adenosine 腺苷
adenosine deaminase 腺苷脱氨基酶
adenosine diphosphate(ADP) 二磷酸腺苷, 腺二磷
adenosine diphosphate glucose 二磷酸腺苷葡萄糖, 腺二磷酸葡萄糖
adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase 二磷酸腺苷葡萄糖焦磷酸化酶
adenosine 3', 5' - cyclic monophosphate 3', 5' - 环化腺苷酸
adenosin deaminase 腺苷脱氨基酶
adenosine kinase 腺苷激酶
adenosine 3' - monophosphate(3' - adenylic acid, 3' - AMP) 3' - 腺苷一磷酸, 腺一磷, 腺苷酸
adenosine 5' - monophosphate deaminase 腺苷酸脱氨基酶
adenosin 5' - phosphosulfate 5' - 腺苷酰硫酸
adenosine triphosphate 腺苷三磷酸
adenosine triphosphate phosphorylase(ATP) 腺苷三磷酸磷酸化酶, 腺三磷
adenosine triphosphatase 腺苷三磷酸酶
adenosine triphosphate - citrate lyase 腺苷三磷酸柠檬酸裂合酶
adenylate deaminase 腺(嘌呤)核苷酸脱氨基酶
adenylosuccinate 腺苷酸琥珀酸(盐)
adenylosuccinate lyase 腺苷酸琥珀酸裂解酶
adenylosuccinate synthetase 腺苷酸琥珀酸合成酶
adenylosuccinic acid 腺苷酸琥珀酸
adenylation 腺苷酸化(作用)
adenosine triphosphate sulfurylase 腺苷三磷酸硫酸化酶
S - adenosylhomocysteine 腺苷高半胱氨酸酶
S - adenosylhomocysteine S - 腺苷高半胱氨酸
- S - adenosylhomocysteine hydrolase S - 腺苷高半胱氨酸水解酶
S - adenosylmethionine S - 腺苷甲硫氨酸
adenylate cyclase(adenyl cyclase) 腺苷酸环化酶
adenylate deaminase 腺苷酸脱氨基酶
adenylate kinase 腺苷酸激酶
adenyl - citrulline 腺苷酸瓜氨酸
adenylic acid(adenosine 5' - monophosphate) 腺苷酸
adenylic acid deaminase 腺苷酸脱氨基酶
adenylic acid kinase 腺苷酸激酶
adenylosuccinate 腺苷酸琥珀酸
adenylosuccinate lyase 腺苷酸琥珀酸裂解酶
adipokinetic hormone 脂动激素(昆虫)
adiposis 肥胖症
adrenal cortical hormone 肾上腺皮质激素
adrenal cortical steroid 肾上腺皮质类固醇
adrenal steroids 肾上腺类固醇
adrenocorticotropic hormone(ACTH) 促肾上腺皮质激素
adrenocorticotropic hormone regulatory factors (CRFS) 促肾上腺皮质激素调节因子
adrenocorticotropin (adrenocorticotropic hormone) 促肾上腺皮质激素
adrenodoxin 肾上腺皮质铁氧还蛋白
adrenosterone 肾上腺雄酮
Aerobacter aerogenes 产气气杆菌
 α - fetoprotein 胎儿甲种球蛋白, 胎甲球蛋白
affinity chromatography 亲和层析
afibrinogenemia 无纤维蛋白原血
agamaglobulinemia 无 γ - 球蛋白血
aglycon 糖苷配基
agmatine 胍精胺
agmatine ureohydrolase 胍胺尿水解酶
alanine 丙氨酸
alanine aminotransferase 丙氨酸转氨酶
alanine glucose cycle 丙氨酸 - 葡萄糖循环
alanine transaminase 丙氨酸转氨酶
alanyl - 丙氨酰基
D - alanyl - D - alanine D - 丙氨酰 - D - 丙氨酸
alanylglycine 丙氨酰甘氨酸
alanylglycyltyrosylglutamic acid 丙氨酰甘氨酸酪氨酸谷氨酸
 β - alanyl - L - histidine(anserine) β - 丙氨酰 - L - 组氨酸
 β - alanyl - N - methyl - L - histidine(anserine) β - 丙氨酰 - N - 甲基 - L - 组氨酸(鹅肌肽)
alanyl - transfer ribonucleic acid 丙氨酰 - tRNA
albinism 白化病

- albumin 清蛋白
- alcohol 乙醇
- alcohol dehydrogenase 乙醇脱氢酶
- alcoholic fermentation 生醇发酵
- aldaric acid 醛糖二酸
- aldehyde 醛
- aldehyde dehydrogenase 醛脱氢酶
- aldehyde oxidase 醛氧化酶
- aldehyde reaction 醛反应
- aldehyde reductase 醛还原酶
- aldehydrol 水合醛
- aldimine 醛亚胺
- aldobionuronic acid 醛糖二糖酸
- aldohexose 己醛糖
- aldolase 醛缩酶
- aldol 醇醛
- aldonic acid 醛糖糖酸
- aldopentose 戊醛糖
- aldose 醛糖
- aldose reductase 醛糖还原酶
- aldosterone 醛固酮
- aldosteronism primary 原发性醛固酮增多症
- aldotriose 丙醛糖
- alga 藻类
- algal pigments 藻类色素
- alginate acid 藻酸
- alicyclic esterase 脂族酯酶
- aliphatic amino acid 脂肪族氨基酸
- alkali 碱
- alkaline phosphatase 碱性磷酸(酯)酶
- alkaline reserve 碱储备
- alkalinity 碱度, 碱性
- alkaloid 生物碱
- alkaptonuria 尿黑酸症
- alkylating agent 烷化剂
- allantoin 尿囊素
- allantoinase 尿囊素酶
- allantoic acid 尿囊酸
- allele 等位基因
- alloconfiguration 别位构型
- allocortol 别皮甾五醇
- allocortolone 别皮甾酮四醇
- alloisoleucine 别异亮氨酸
- allolactose 别乳糖
- D - alloisomer D - 别位异构体
- allophycocyanin 别藻蓝蛋白
- allopregnane 别孕烷
- allopurinol (4 - hydroxypyrazolo - 3, 4 - d pyrimidi - ne) 别嘌呤醇(4 - 羟吡嗪嘧啶)
- D - allose D - 阿洛糖
- allosteric control 别构调节
- allosteric effect 别构效应
- allosteric effector(allosteric modulator) 别构效应物
- allosteric enzyme 别构酶/别位酶
- allosteric inhibition 别构抑制
- allosteric modulator(allosteric effector) 别构效应物
- allosteric regulation 别构调节
- allosteric site 别构部位
- allosterism 别构性
- allosteric transition 别构转变
- allothreonine 别苏氨酸
- alloxan 四氧嘧啶
- alloxan diabetes 四氧嘧啶性糖尿病
- all trans 全反式
- all - trans - retinal 全反视黄醛
- allysine ϵ - 醛基赖氨酸
- Alzheimer's disease(AD) 老年性痴呆症
- Amanita bhalloides 鬼笔鹅膏蕈
- α - amanitine α - 鹅膏蕈碱
- amber triplet 琥珀型三联体
- ambiguous codon 双关密码子
- ambiguous enzyme 双关酶
- amethopterin 氨甲蝶呤
- amidase 酰胺酶
- amide 酰胺
- amide linkage 酰胺键
- amide transaminase 酰胺转氨基酶
- amido - ligase 酰胺连接酶
- amines 胺类
- amine oxidase 胺氧化酶
- aminoacetic acid 氨基乙酸
- aminoacetone 氨基丙酮
- amino acid 氨基酸
- amino acid acetyltransferase 氨基酸转乙酰基酶
- amino acid analyzer 氨基酸分析仪
- amino acid composition 氨基酸组成
- amino acid decarboxylase 氨基酸脱羧酶
- amino acid hydrazide 氨基酸酰肼
- amino acid oxidase 氨基酸氧化酶
- D - amino acid oxidase D - 氨基酸氧化酶
- L - amino acid oxidase L - 氨基酸氧化酶
- amino acid residues 氨基酸残基
- amino acid sequence 氨基酸(排列)顺序
- aminoaciduria 氨基酸尿症
- aminoacyl adenylate 氨酰基腺苷酸
- aminoacyl - AMP - enzyme 氨酰腺苷酸酶
- amino acid ester 氨酰基酯
- aminoacyl - tRNA 氨酰基 - tRNA
- aminoacyl site A 位
- aminoacyl synthetase 氨酰合成酶
- aminoacyl - tRNA 氨酰基 - tRNA
- aminoacyl - tRNA synthetase 氨酰基 - tRNA 合成酶
- δ - aminolevulinic acid δ - 氨基 - γ - 酮戊酸
- aminotransferase 转氨酶
- α - aminoadipic acid α - 氨基己二酸
- α - aminoadipic acid semialdehyde α - 氨基己二酸半醛
- aminoadipic acid semialdehyde dehydrogenase 氨基己二酸半醛脱氢酶
- α - aminoadipic semialdehyde - glutamate reductase α - 氨基己二酸半醛 - 谷氨酸还原酶
- α - aminoadipic acid transaminase α - 氨基己二酸转氨酶
- P - aminobenzoic acid(PABA) 对氨基苯甲酸
- γ - aminobutyric acid(GABA) γ - 氨基丁酸
- 2 - amino - 4 - butyrolactone 2 - 氨基 - 4 - 丁酰内酯
- γ - amino - butyrylhistidine(homocarnosine) γ - 氨基 - 丁酰组氨酸(高肌肽)
- α - amino - δ - carbamidovaleric acid(citrulline) α - 氨基 - δ - 脲基戊酸(瓜氨酸)
- 2 - amino - 3 - carboxymuconic acid semialdehyde 2 - 氨基 - 3 - 羧基黏康酸半醛
- amino carbaxymuconic acid semialdehyde decarboxylase 氨基羧基黏康酸半醛脱羧酶
- 2 - aminomuconic acid 2 - 氨基黏康酸
- 2 - aminomuconic acid semialdehyde dehydrogenase 2 - 氨基黏康酸半醛脱氢酶
- aminoethylcysteine 氨乙基半胱氨酸
- α - aminoglutaric acid(glutamic acid) α - 氨基戊二酸(谷氨酸)
- amino group 氨基
- aminoguanidine 氨基胍
- α - amino - δ - guanidovaleric acid(arginine) α - 氨基 - δ - 胍戊酸(精氨酸)
- amino hexose 氨基己糖
- p - aminohippurate (PAH) 对氨基马尿酸
- aminohippuric acid clearance 对氨基马尿酸清除率试验
- p - amino - β - hydroxy - n - butyric acid (threonine) 对氨基 - β - 羟基正丁酸(苏氨酸)
- 2 - amino - 4 - hydroxy - 6 - hydroxymethyl - dihydropteridine 2 - 氨基 - 4 - 羟 - 6 - 羟甲基二氢蝶呤
- 4 - amino - 5 - hydroxymethyl - 2 - methylpyrimidine 4 - 氨基 - 5 - 羟甲基 - 2 - 甲基嘧啶
- 2 - amino - 5 - hydroxymethyl - 2 - methylpyrimidine 2 - 氨基 - 4 - 羟 - 5 - 甲基嘧啶
- α - amino - β - (p - hydroxyphenyl)propionic acid

- (tyrosine) α -氨基- β -(对羟基)-丙氨酸 (酪氨酸)
- α -amino- β -hydroxypropionic acid (serine) α -氨基- β -羟丙氨酸(丝氨酸)
- α -amino- β -imidazolepropionic acid (histidine) α -氨基- β -异吡唑基丙氨酸(组氨酸)
- 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸
- 5-aminoimidazole-4-carboxylate ribotide 5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸
- aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase 氨基咪唑甲酰胺核苷酸转甲酰基酶
- aminoimidazole ribotide carboxylase 氨基咪唑核苷酸羧化酶
- 5-aminoimidazole-4-(N-succino)-carboxamide ribotide 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀基)甲酰胺核苷酸
- 5-aminoimidazole-4-(N-succino)-carboxamide ribotide synthetase 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀基)甲酰胺核苷酸合成酶
- 5-aminoimidazole ribotide 氨基咪唑核苷酸
- α -amino- β -indole propionic acid (tryptophan) α -氨基- β -吲哚基丙氨酸(色氨酸)
- β -aminoisobutyric acid β -氨基异丁酸
- α -aminoisocaproic acid (leucine) α -氨基异戊酸(缬氨酸)
- α -amino- β -ketoacid α -氨基- β -酮己二酸
- α -amino- ϵ -ketopimelic acid α -氨基- ϵ -酮庚二酸
- δ -aminolevulinic acid synthetase δ -氨基乙酰丙酸合成酶
- δ -aminolevulinic acid δ -氨基乙酰丙酸(δ -氨基酮戊酸)
- δ -aminolevulinic acid dehydrase δ -氨基乙酰丙酸脱水酶
- α -amino- β -mercaptopropionic acid (cysteine) α -氨基- β -巯基丙氨酸(半胱氨酸)
- α -amino- γ -methylthio- n -butyric acid (methionine) α -氨基- γ -甲硫基正丁酸(甲硫氨酸)
- α -amino- β -methylvaleric acid (isoleucine) α -氨基- β -甲基戊酸(异亮氨酸)
- α -aminomuconic acid α -氨基己二烯二酸
- α -aminomuconic- δ -semialdehyde α -氨基己二烯二酸- δ -半醛
- aminomutase 氨基变位酶
- amino nitrogen 氨基氮
- 2-amino-6-oxypurine 2-氨基-6-氧嘌呤
- aminopeptidase 氨基肽酶
- O-aminophenol 邻-氨基苯酚
- α -amino- β -phenylpropionic acid (phenylalanine) α -氨基- β -苯丙氨酸(苯丙氨酸)
- aminopherase (aminotransferase) 转氨酶
- aminopolysaccharide 氨基多糖
- α -aminopropionic acid (alanine) α -氨基丙氨酸(丙氨酸)
- β -aminopropionitrile β -氨基丙腈
- aminopterin 氨基蝶呤
- 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin) 4-氨基蝶酰谷氨酸(氨基蝶呤)
- 6-aminopurine (adenine) 6-氨基嘌呤(腺嘌呤)
- aminosuccinic acid (aspartic acid) 氨基琥珀酸(天冬氨酸)
- amino sugar 氨基糖
- amino-terminal 氨基末端, N端
- aminotransferase (transaminase) 转氨酶
- 3-amino-1,2,4-triazole 3-氨基-1,2,4-三唑
- δ -amino-valeramide δ -氨基戊酰胺
- δ -aminovaleric acid δ -氨基戊酸
- ammonia 氨
- ammonium ion 铵离子
- ammonotelic 排氨动物
- anobarbital 异戊巴比妥
- amphetamine 苯异丙胺
- amphibolic pathway 两用代谢途径
- amphipathic molecules 两性性分子
- ampholyte 两性电解质
- amygdalin 苦杏仁苷
- amylase 淀粉酶
- amylodextrin 淀粉糊精
- amyloid precursor protein (APP) 淀粉样前体蛋白
- amylol- α -1,4-glucosidase 淀粉- α -1,4-葡萄糖苷酶
- amylomaltase 淀粉麦芽糖酶
- amylpectin 支链淀粉
- amylpectinase 胰淀粉酶
- amylose 直链淀粉
- amylose synthetase 直链淀粉合成酶
- amylsucrase 淀粉蔗糖酶
- amylol(1,4-1,6)-transglucosylase 淀粉转葡萄糖苷酶
- amyltal 安密妥(5-乙基-5异戊基巴比妥酸)
- anabolic effect 合成效应
- anabolic pathway 合成途径
- anabolism 合成代谢
- anaerobic dehydrogenase 不需氧脱氢酶
- anaerobic glycolysis 无氧酵解
- analogue 类似物
- anaplerosis (糖) 添补(加碳作用)
- anaplerotic reaction 添补反应
- anion exchange protein 阴离子交换蛋白
- androgen 雄激素
- androstane 雄甾烷
- androstane-3 α -ol-17-one (aldosterone) 3 α -羟-17-酮雄甾烷(醛甾酮)
- 5 α -androstane-17 β -ol-3one (dihydrotestosterone) 17 β -羟-3-酮-5 α -雄甾烷
- androstenedione 雄甾烯二酮
- 5 α -androstene 5 α -雄甾酮
- angiotensin 血管紧张肽
- angiotensinase 血管紧张肽酶
- angiotensinogen 血管紧张肽原
- anhydrase, carbonic 碳酸酐酶
- animal starch 动物淀粉
- ankyrin 锚蛋白
- anneal 退火
- annealing of DNA DNA 的退火
- anserine 鹅肌肽
- antagonism 颞颥作用
- antagonist 颞颥物
- anthranilate phosphoribosyl transferase 氨基苯甲酸转磷酸核糖酶
- anthranilate synthetase 氨基苯甲酸合成酶
- anthranilic acid 邻-氨基苯甲酸
- anthrone reagent 蒽酮试剂
- antandrogen 抗雄激素
- antibiotic 抗生素, 抗菌的
- antibody 抗体
- anticoagulant 抗凝(血)剂
- anticodon 反密码子
- antidiuretic hormone 抗利尿激素
- antienzyme 抗酶
- antifreeze proteins 抗冻蛋白
- antigen 抗原
- antigenicity 抗原性
- antihemophilic factor (AHF) 抗血友病因子
- antihemophilic factor B (christmas factor) 抗血友病因子 B
- antihemophilic globulin (AHG) 抗血友病球蛋白
- antihemorrhagic factor (vitamin K) 抗出血因子(维生素 K)
- antihormone 抗激素
- antiketogenesis 抗生酮作用
- antiketogenic substance 抗生酮物质
- antipotrophic substance 抗脂肪肝物质
- antimetabolite 代谢颞颥物
- antimutator 抗突变因子
- antimycin A 抗霉素 A

antioncogene 抑癌基因
 antiparallel β -structure 反向平行的 β 结构
 antipode 对映体
 antipod, optical (optical antipod) 旋光对映体
 antiport 反向运送
 antirepressor 抗阻遏物
 antisense 反义
 antisense oncogene 反义癌基因
 antisense strand 反义链
 antitermination 抗终止作用
 antithrombin 抗凝血酶
 antithyroid agent 抗甲状腺物质
 α -antitrypsin α -抗胰蛋白酶
 aphidicolin 杀蚜虫毒素
 apocobalamin 辅酶 B₁₂ 脱辅基
 apoenzyme 脱辅基酶
 apolipoprotein 载脂蛋白
 apoprotein 脱辅基蛋白质
 apurinic 无嘌呤的
 apyrimidinic 无嘧啶的
 apoferritin 脱铁蛋白
 aporepressor 阻遏物蛋白
 apurinic acid 无嘌呤核酸
 L-arabinan L-阿拉伯糖胶
 α -L-arabinofuranose α -L-阿拉伯呋喃糖
 arabinose 阿拉伯糖
 arabinose isomerase 阿拉伯糖异构酶
 arachidic acid 二十烷酸, 花生酸
 arachidonic acid 花生四烯酸, 二十碳四烯酸
 arginase 精氨酸酶
 arginine 精氨酸
 arginine decarboxylase 精氨酸脱羧酶
 arginine vasopressin 精氨酸抗利尿素
 arginine vasotocin [8-精]加压催产素
 argininosuccinase 精氨酸琥珀酸(裂解)酶
 argininosuccinate synthetase 精氨酸琥珀酸合成酶
 argininosuccinate lyase 精氨酸琥珀酸裂解酶
 argininosuccinic acid 精氨酸琥珀酸
 argininosuccinic aciduria 精氨酸琥珀酸尿(症)
 argininosuccinuria 精氨酸琥珀酸尿(症)
 aromatic amino acid 芳香族氨基酸
 aromatic amino acid decarboxylase 芳香族氨基酸脱羧酶
 aromatic α -keto acid reductase 芳香族 α -酮酸还原酶
 aryl sulfatase A (sulfatidate sulfatase) 芳香基硫酸酯酶 A (硫酸脑苷脂硫酸酯酶)
 ascorbic acid 抗坏血酸(维生素 C)
 ascorbic acid oxidase 抗坏血酸氧化酶
 asparaginase 天冬酰胺酶
 asparagine 天冬酰胺
 asparaginyl group 天冬酰胺基

aspartate 天冬氨酸(盐)
 aspartate amino transferase 天冬氨酸氨基转移酶
 aspartate transaminase (Ast) 天冬氨酸转氨酶
 aspartate carbamoyl transferase (aspartate transcarbamoylase) 天冬氨酸转氨甲酰酶, 天冬氨酸氨基甲酰转移酶
 aspartic acid 天冬氨酸
 aspartic acid β -decarboxylase 天冬氨酸 β -脱羧酶
 aspartic β -semialdehyde 天冬氨酸 β -半醛(丁氨酸)
 aspartic semialdehyde dehydrogenase 天冬氨酸半醛脱氢酶
 Asp-N-protease 天冬氨酸-N-蛋白酶
 aspartokinase 天冬氨酸激酶
 aspartyl glycosaminuria 天冬氨酸氨基葡萄糖(症)
 aspartyl group 天冬氨酸基
 β -aspartyl phosphate β -天冬氨酸磷酸
 aspartyl transcarbamoylase 天冬氨酸转氨甲酰酶
 asymmetric carbon 不对称碳原子
 asymmetric center 不对称中心
 asymmetric compound 不对称化合物
 asymmetric transcription 不对称转录
 ATPase activity ATP 酶活力
 ATP phosphoribosyl transferase ATP 转磷酸核糖基酶
 ATP synthase ATP 合酶
 atractyloside 苍术苷
 attransferritinemia 无铁运铁蛋白血
 Attenuation 衰减
 attenuator 衰减子
 aureomycin 金霉素
 aurovertin 金轮霉素
 autocatalysis 自身激活作用
 autocrine 自分泌
 autoimmunity disease 自身免疫病
 autoradiography/radiography 放射自显影
 autoregulation 自身调节
 autoregulation of gene expression 基因自体调节系统
 auxin (植物)生长素
 avidin 抗生物素蛋白
 avitaminosis 维生素缺乏症
 axial bond 垂直键(轴键)(α -键)
 axial hydroxyl group 轴位羟基
 axial ratio 轴比
 axoplasmic flow 轴浆流动
 8-azaguanine 8-氮鸟嘌呤
 azaserine (O-diazoacetyl-L-serine)

氮杂氨酸(O-重氮乙酰丝氨酸)
 azauracil 氮尿嘧啶
 azelaic acid 壬二酸
 azelaoyl coenzyme A 壬二酰辅酶 A
 azide 叠氮化合物
 aziridine 氮丙啶
 azoferriodxin 偶氮铁氧化还原蛋白

B

backbone 主链(大分子)
 bacillin 杆菌素
 Bacillus brevis 短芽孢杆菌
 Bacillus cereus 蜡状芽孢杆菌
 Bacillus subtilis 枯草杆菌
 bacteriorhodopsin 细菌视紫红质/菌紫质
 bactoprenol 细菌萜醇
 balance study 平衡研究
 β -aminobutyrate (GABA) β -氨基丁酸
 basal metabolic rate 基础代谢率
 basal metabolism 基础代谢
 base 碱, 碱基
 base amino acids 碱性氨基酸
 base analogs 碱基类似物
 base complementary 碱基互补
 base composition 碱基组成
 base ferriporphyrin 碱性高铁卟啉
 base ferroporphyrin 碱性亚铁卟啉
 basic groups 碱性基
 base pair 碱基对
 base pairing mistake 碱基配对错误
 base sequence 碱基顺序(序列)
 base stacking 碱基堆积
 base substitution 碱基替换
 base transversion 碱基颠换
 basic helix-loop-helix (bHLH) 碱性螺旋-环-螺旋
 basic leucine zipper (bZIP) 碱性亮氨酸拉链
 batyl alcohol 鲨肝醇
 bidirectional replication 双向复制
 beeswax 蜂蜡
 behenic acid 二十二烷酸, 山萘酸
 benemid (probenecid) 对二丙磺酰胺苯甲酸
 benzaldehyde 苯甲醛
 benzoic acid 苯甲酸
 benzoylation 苯甲酰化作用
 α -benzoyl-L-argininamide α -苯甲酰-L-精氨酸酰胺
 benzoyl coenzyme A 苯甲酰辅酶 A
 N-benzoylglycine (hippuric acid) N-苯甲酰甘氨酸(马尿酸)
 benzoylglycylglycine 苯甲酰甘氨酸甘氨酸
 α -benzoyl-L-homoargininamide

- α -苯甲酰-L-高精氨酸胺
 α -benzoyl-L-lysine α -苯甲酰-L-赖氨酸胺
 α -benzoyl-L-ornithinamide α -苯甲酰-L-鸟氨酸胺
 benzphetamine 甲基苯异丙基苯胺
 benzyl alcohol 苯甲醇
 benzyl group 苯甲基(苄基)
 benzyloxycarbonyl chloride 苄氧基碳酸酐氯
 benzyloxycarbonylglycine 苄氧基碳酸酐甘氨酸
 benzyloxycarbonylphenylalanine 苄氧基碳酸酐苯丙氨酸
 betaine 甜菜碱
 betaine aldehyde 甜菜醛
 betaine hydrochloride 甜菜碱盐酸盐
 (Ginard reagent) 甜菜碱盐酸盐
 β -oxidation of fatty acids 脂肪酸的 β -氧化作用
 bicarbonate 碳酸氢盐
 bicarbonate-carbonic acid buffer 碳酸缓冲体系
 bidirectional 双向的
 biguanide 双缩脲
 bile 胆汁
 bile acid 胆汁酸
 bile pigment 胆色素
 bile salts 胆汁(酸)盐
 bilirubin 胆红素
 bilirubin diglucuronide 胆红素葡萄糖醛酸二酯
 bilirubin monoglucuronide 胆红素葡萄糖醛酸一酯
 bilirubin-UDP-glucuronyl transferase 胆红素-UDP葡萄糖醛酸转移酶
 bilirubinuria 胆红素尿(症)
 biliverdin 胆绿素
 biliverdin reductase 胆绿素还原酶
 biochemical energetics 生物能学
 biochemical transformation 生物化学转化作用
 biochemistry 生物化学
 biocytin 生物胞素
 biocytinase 生物胞素酶
 bioflavonoids 生物类黄酮
 biologic oxidation 生物氧化
 biological oxidation 生物氧化
 biologic substrate 生物作用物
 biosphere 生物界
 biosynthesis 生物合成
 biotin 生物素
 biotin-carbon dioxide enzyme complex 生物素-二氧化碳酶复合体
 biotin carboxylase 生物素羧化酶
 biotin carboxyl-carrier protein 生物素羧基载体蛋白
 biotransformation 生物转化
 binding site 结合部位
 binding, cooperative (cooperative binding) 配位结合
 binding change 结合变构
 binding site 结合位点
 bishomo- γ -linoleic acid 二十碳三烯酸(双高- γ -亚麻酸)
 bishydroxycoumarin (dicoumarol) 双香豆素
 biuret 双缩脲
 biuret reaction 双缩脲反应
 biuret test 双缩脲试验
 bleomycin 博莱霉素
 blood plasma 血浆
 blood sugar 血糖
 blood urea clearance test 血尿素清除试验
 blunt 平头(线性)末端
 BMR (basal metabolic rate) 基础代谢率
 boat conformation 船式构象
 bond 键
 borohydride 氢硼化物
 bound water 结合水
 bradykinin 舒张激肽
 branched-chain amino acid transaminase 分支氨基酸转氨酶
 branching enzyme 分支酶
 breakage 断裂
 bristlike 似短刚毛
 bromide 溴化物
 bromelin 菠萝蛋白酶
 bromoacetate 溴乙酸(盐)
 bromoacetyl-N-methylalanine 溴乙酰-N-甲基丙氨酸
 S-bromophenylcysteine S-溴苯基半胱氨酸
 P-bromophenyl mercapturic acid 对溴苯基磺胺尿酸
 N-bromo succinimide N-溴代琥珀酰亚胺
 bromosulfalein 四溴酚酞磺酸
 bromosulphthalein (bromosulfalein) 四溴酚酞磺酸钠
 Brownian movement 布朗运动
 L-brocine-d-tartrate L-二甲氨基马钱子碱-d-酒石酸(盐)
 buffer 缓冲液
 bufotenin N-二甲基-5-羟色胺, 嗜毒色胺
 butanol 丁醇
 2-butanone 2-丁酮
 tri-butyl ester group 三丁基酯基
 n-butyric acid 正丁酸
 γ -butyrobetaine γ -丁酰甜菜碱
 butyryl-acyl carrier protein 丁酰-脂酰载体蛋白
 butyryl coenzyme A 丁酰辅酶 A
 butyryl coenzyme A dehydrogenase 丁酰辅酶 A 脱氢酶
- ### C
- Ca-binding protein 钙结合蛋白
 Ca pump Ca 泵
 Ca^{2+} - Na^{+} exchange carrier Ca^{2+} - Na^{+} 交换体
 CAAT box CAAT 盒
 cadaverine 1,5-戊二胺
 caerulin 雨蛙肽
 calciferol 钙化醇(维生素 D_2)
 calcitonin 降血钙素
 Calcitonin gene-related peptide 降钙素基因相关肽
 Calcitriol 1,25 二羟维生素 D_3
 calcium binding protein (CBP) 钙结合蛋白
 calcium caseinate 酪蛋白钙
 calmodulin (CaM) 钙调蛋白
 caloric intake 热量摄入(以卡计算)
 caloric requirement 热量需要(以卡计算)
 caloric value of foods 食物卡价
 calorie 卡(热量)
 calsequestrin [肌]集钙蛋白
 CaM Kinase 钙调蛋白激酶
 cAMP 环化腺苷酸
 cAMP receptor protein 环腺苷酸受体蛋白
 cAMP dependent protein kinase 依赖 cAMP 的蛋白激酶
 cAMP dependent protein kinase A 依赖 cAMP 的蛋白激酶 A
 cAMP response element (CRE) cAMP 应答元件
 cAMP response element binding protein (CREB) cAMP 应答元件结合蛋白
 capping 帽子生成
 CAP Site CAP 位点
 d-camphoric acid d-樟脑酸
 canaline 副刀豆氨酸
 canavanine 刀豆氨酸
 capillary exchange 毛细交换
 capric acid 癸酸(十碳酸)
 caprylic acid 辛酸
 capsular polysaccharide 荚膜多糖
 carbaminohemoglobin 氮甲酰血红蛋白
 carbamoylaspartic acid 氮甲酰天冬氨酸
 carbamoyl phosphate (carbamyl phosphate) 氮甲酰磷酸
 carbamoyl phosphate synthetase 氮甲酰磷酸合成酶
 carbobenzoyloxy chloride 苄氧(苯甲氧)甲酰氯

- carbohydrase 糖酶
 carbohydrate 糖类(碳水化合物)
 carbonic anhydrase 碳酸酐酶
 carbon monoxide 一氧化碳
 carbon monoxide hemoglobin (carboxyhemoglobin) 一氧化碳血红蛋白
 carboxybiotin 羧化生物素
 carboxy - N,N - diisopropylsulfonamide 羧化 - N,N - 二异丙基磺酰胺
 carboxylated polystyrene resin 羧化聚苯乙烯树脂
 carboxylation 羧化作用
 carboxyl group 羧基
 carboxylic acid 羧酸
 carboxyl terminal 羧基末端
 carboxyl - terminal residue 羧基末端残基
 carboxymethyl cellulose 羧甲基纤维素
 carboxypeptidase A 羧基肽酶 A
 6 - carboxyuracil 6 - 羧基尿嘧啶
 carcinogen 致癌物
 cardiac glycoside 强心苷
 cardiolipin (cardiolipid) 二磷脂酰甘油(心磷脂)
 cardiovascular disease 心血管疾病
 Ca²⁺ mobilization 钙离子动员
 carnitine 肉碱
 carnitine acyl - CoA transferase 肉碱脂酰 - CoA 转移酶
 carnitine acyl transuase 肉碱酰基转移酶
 carnosinase 肌肽酶
 carnosine 肌肽
 carosinemia 肌肽血
 carotene 胡萝卜素
 carotenoid 类胡萝卜素
 carrier 载体
 carrier protein 载体蛋白
 cascade system 级联系统
 casein 酪蛋白
 castor oil 蓖麻油
 catabolic enzyme 分解代谢酶
 catabolic gene activator protein (CAP) 分解代谢基因激活蛋白
 catabolic pathway 分解代谢途径
 catabolic repression 分解代谢阻遏
 catabolism 分解代谢
 catalase 过氧化氢酶
 catalysis 催化作用
 catalyst 催化剂
 catalytic cycle 催化性循环
 catalytic site 催化部位
 catechol 邻苯二酚,儿茶酚
 catecholamines 儿茶酚胺
 catechol - O - methyl transferase 邻苯二酚 - O - 甲基转移酶
 cathepsin 组织蛋白酶
 cDNA library cDNA 文库
 cell cycle 细胞周期
 cell division cycle gene (cdc) 细胞分裂周期基因
 cell to cell communication 细胞间信息沟通
 cellobiose 纤维二糖
 cell free system 无细胞体系
 cell - receptor protein 细胞受体蛋白
 cellulase 纤维素酶
 cellulose 纤维素
 cellular metabolism 细胞代谢
 cellular oxidation 细胞氧化
 cellular respiration 细胞呼吸
 cellular retinoic acid binding protein (CRABP) 细胞视黄酸结合蛋白
 cellular retinol binding protein (CRBP) 细胞视黄醇结合蛋白
 cellular oncogene (c - onc) 细胞癌基因
 centrifugation 离心作用
 central cavity 中心空穴
 central metabolic pathway 中枢性代谢途径,中心代谢途径
 central dogma 中心法则
 cephalothin 头孢霉素,先锋霉素 I
 ceramide 神经酰胺
 ceramide disaccharide 神经酰胺二糖
 ceramide galactosylglucose (cytolipin H) 神经酰胺半乳糖葡萄糖
 cerebrocuprein 脑铜蛋白
 cerebronic acid α - 羟二十四烷酸
 cerebroside 脑苷脂
 cerebrospinal fluid 脑脊液
 cerotic acid 二十六烷酸
 ceruloplasmin 血浆铜蓝蛋白
 cesium chloride 氯化铯
 cetyl alcohol 十六烷醇
 cetyl palmitate 十六烷醇软脂酸
 chain elongation 链延伸
 chain folding 链折叠
 chain - initiating codon 链起始密码
 chain initiation 链起始作用
 chain - terminating codon 链终止密码子
 chain termination 链终止作用
 channel former 通道形成体
 chalone 抑素
 chaperone 陪伴分子,伴伴分子
 chelate 螯合物
 chemical modification 化学修饰
 chemical mutagen 化学诱变剂
 chemiosmotic mechanism 化学渗透机制
 chemodeoxycholic acid 鹅胆酸
 chickenpox virus 水痘病毒
 chelating agent 螯合剂
 chelate ring 螯合环
 chinyl alcohol 鲛肝醇
 chitin 壳多糖
 chloral hydrate 水合三氯乙醛
 chlorambucil 苯丁酸氮芥
 chloramphenicol 氯霉素
 chlorotoxin/cholera toxin 霍乱毒素
 chloride shift 氯(离子)转移
 chloroacetyl - DL - phenylalanine 氯乙酰苯丙氨酸
 chlorocruorins 血氯蛋白
 chlorophyll 叶绿素
 chlorophyllase 叶绿素酶
 chloroplast 叶绿体
 cholecalciferase 胆钙化醇酶
 cholecalciferol 胆钙化醇/维生素 D₃
 cholecystokinin 肠促胰酶肽
 choleglobin 胆绿蛋白
 choleic acid 络胆酸
 cholestanol 二氢胆固醇
 cholestanone 二氢胆固醇酮
 cholestenone 胆甾烯酮
 cholesterol 胆固醇,胆固醇
 cholesterol ester deficiency 胆固醇酯缺乏
 cholesterol oxidase 胆固醇氧化酶
 cholic acid 胆酸
 choline 胆碱
 choline acetylase 胆碱乙酰化酶
 cholin acetyl transferase 胆碱转乙酰酶
 cholin chloride 氯化胆碱
 choline esterase 胆碱酯酶
 cholin oxidase 胆碱氧化酶
 cholinium ion 胆碱离子
 cholyglycine 甘氨酸胆酸
 chemical - coupling hypothesis 化学偶联假说
 chemiosmotic - coupling hypothesis 化学渗透偶联假说
 chondroitin 软骨素
 chondroitin sulfate 硫酸软骨素
 chorionic gonadotropin 绒毛膜促性腺激素
 chorionic somatomammotropin 绒毛膜生长促乳素
 chorismate mutase 分支酸变位酶
 chorismic acid 分支酸
 chorismic acid synthetase 分支酸合成酶
 Chromatium 色紫菌属
 chromatogram 色谱、层析谱
 chromatography 色谱法、层析法

- chromatophoric hormone (melanocyte - stimulating hormone) 色素细胞激素(促黑激素)
- chromomycin A₃ 色霉素 A₃
- chromoprotein 色蛋白
- chromosome walking 染色体步移
- chronic granulomatous disease 慢性肉芽肿
- chylomicron 乳糜微粒(血沉)
- chymotrypsin 胰凝乳蛋白酶, 糜蛋白酶
- chymotrypsinogen 胰凝乳蛋白酶原
- circular DNA 环形 DNA
- cis - acting element 顺式作用元件
- cis - isomer 顺式异构体
- cis - Peptide unit 顺式肽单元
- cistron 顺反子
- cis - vacoic acid 顺 - 十八碳烯 - 11 - 酸
- citrate lyase 柠檬酸裂解酶
- citrate pyruvate cycle 柠檬酸丙酮酸循环
- citrate synthase 柠檬酸合酶
- citral 柠檬醛
- citric acid 柠檬酸
- citric acid cycle 柠檬酸循环
- citric acid lyase 柠檬酸裂解酶
- citroyl coenzyme A 柠檬酰辅酶 A
- citroyl phosphate 柠檬酰磷酸
- citrulline 瓜氨酸
- citrullinemia 瓜氨酸血症
- citrullinuria 瓜氨酸尿症
- citryl - CoA 柠檬酰辅酶 A
- clearance test 清除率试验
- clearing factor 清除因子
- cleavage 剪切
- clone 克隆, 无性繁殖系
- cloning 克隆化
- cloning vector 克隆载体
- closed circle DNA (cDNA) 封闭环状 DNA
- DNA clostripain 梭菌蛋白酶
- coactivator 辅助激活因子
- coagulation vitamin 凝血维生素
- coacervation of colloid 胶体凝聚
- coat protein 外壳蛋白
- coated vesicles 被膜泡
- coated region 被膜区
- cobalamine 钴胺素(维生素 B₁₂)
- cobalt 钴
- cobamide 钴胺酰胺
- cobamide coenzyme 钴胺酰胺辅酶
- code 密码
- code, genetic 遗传密码
- code, degenerate 简并密码
- coding strand 编码链
- codon 密码子
- codon, ambiguous 双关密码子
- codon, nonsense 无意义密码子(终止密码子)
- coenzyme 辅酶
- coenzyme A 辅酶 A
- coenzyme Q 辅酶 Q(泛醌)
- coenzyme I 辅酶 I (NAD)
- coenzyme II 辅酶 II (NADP)
- coenzyme nucleotide 辅酶核苷酸
- cofactor 辅助因子
- cohesive end 黏性末端
- colchicine 秋水仙素
- colipase 共脂肪酶/辅脂酶
- collagen 胶原
- collagenase 胶原酶
- collection 集合作用
- colloidal gold test 胶体金试验
- colloidal state 胶体状态
- coloid 胶体
- colominic acid 多聚乙酰神经氨酸
- colony stimulating factor (CSF) 集落刺激因素
- committed step 关键步骤(枢纽反应)
- compartmentation 区域化
- competent cell 感受态细胞
- compatibe end 配伍末端
- α - complementation α - 互补
- complement system 补体系统
- complementary DNA (cDNA) 互补 DNA
- competitive inhibition 竞争性抑制
- complex IX 复合物 IX
- complex X 复合物 X
- complex XI 复合物 XI
- compound F (cortisol) 化合物 F(皮质醇)
- conalbumin 伴清蛋白
- α - conarachin 伴花生球蛋白
- conarium 松果体
- concanavalin 伴刀豆球蛋白
- concerted feedback inhibition 协同反馈抑制
- concatemer 连环
- concatenate 连环
- concerted inhibition 协同抑制作用
- condensation 缩合作用
- condensing enzyme 缩合酶
- configuration 构型
- conformation 构象
- conformational coupling hypothesis 构象变化偶联假说
- conformational hypothesis 构象假说
- conformational representation 构象表示
- conjugation, detoxication 结合解毒
- conjugation (mating) 接合作用
- conjugated double bond 共轭双键
- conjugated bilirubin 结合胆红素
- conjugated protein 结合蛋白
- consensus sequence 一致序列/共有序列
- conservative mode 全保留方式
- conservative substitution 保守替换
- constitutive gene expression 基本的基因表达
- constitutive enzyme 组成酶, 原有酶
- contact factor (hagenan factor) 接触因子(血凝的起动力因子)
- continuous turnover concept 连续转换概念
- control mechanism 控制机制
- cooperative binding 协同结合
- coordinated bond 配价键
- coordinate expression 协调表达
- coordinate regulation 协调调节
- copolymer 共聚物
- copper - dependent superoxide dismutase 铜依赖超氧化物歧化酶
- copper - protein 铜蛋白
- copper uroporphyrin III 铜尿卟啉 III
- coproporphyrin 粪卟啉
- coproporphyrinogen oxidase 粪卟啉原氧化酶
- coprostanol 粪甾醇
- coprostanone 粪甾酮
- coprotease activity 辅助蛋白酶活性
- coprosterol 粪甾醇
- copy 拷贝
- coreductant 辅还原剂
- core enzyme 核心酶
- creatine kinase 肌酸激酶
- Cori's ester Cori I - 磷酸葡萄糖(可立氏酯)
- corin 咕啉
- corrin ring 咕啉环(维生素 B₁₂所含)
- cortex 皮质
- cotransport 协同运送
- cortical granule 皮质颗粒
- corticosterone 皮质酮
- corticotropin 促皮质激素
- corticotropin - regulatory factor 促皮质素调节因子
- corticotropin - releasing factor 促皮质素释放因子
- cortisol 皮质醇(氢化可的松)
- cortisone 可的松
- cortol 皮甾醇
- cortolone 皮甾酮四醇
- cosmid vector 柯斯质粒载体
- coumestrol 香豆素
- countercurrent distribution 逆流分溶
- coupling agent 偶联剂
- covalent backbone 共价主链
- covalent bond 共价键
- covalent linkage 共价连接
- covalent modification 共价修饰

- cozymase 辅酶
Crabtree effect 克雷布特里效应
creatine 肌酸
creatine kinase 肌酸激酶
creatine phosphate 磷酸肌酸
creatine phosphokinase (CPK) 磷酸肌酸激酶
creatinine 肌酸酐
creatinine coefficient 肌酸酐系数
cross-link 交联
cross talk 交叉联系
(enoyl coenzyme A hydratase)
巴豆酸酶(烯酰辅酶 A 水合酶)
crotonyl coenzyme A 巴豆酰-CoA(丁烯酰辅酶 A)
cryoglobulin 冷球蛋白
crystallin 眼晶体蛋白
crystal 结晶
C-terminal(c-terminal residue)羧基末端
CTP(cytidine triphosphate)胞三磷
CTP synthetase 合成酶胞三磷
cumulative inhibition 积累抑制作用
cyanate 氰酸(盐)
cyanide ferroporphyrin 氰化亚铁血红素
cyanide 氰化物
cyanide ferroporphyrin 氰化亚铁卟啉
cyanide sensitive factor 氰化物敏感因子
cyanocobalamin(vitamin B₁₂) 氰钴胺素(维生素 B₁₂)
cyanogen bromide 溴化氰
cyclase in inositol formation 肌醇形成环化酶
3',5'-cyclic adenylic acid(cAMP)
3',5'-环化腺苷酸
cyclic AMP receptor protein 环 AMP 受体蛋白
cyclic AMP synthetase(adenylate cyclase)
环 AMP 合成酶(腺苷酸环化酶)
cyclic coil (random coil) 环状卷曲(无规卷曲)
cyclic diester 环状二脂
cyclic fatty acid 环状脂肪酸
cyclic GMP 环状鸟苷酸
cyclic phosphorylation 循环磷酸化
cyclin 细胞周期蛋白质/细胞周期因子 cyclin
dependent protein kinase (CDK) 依赖于细胞周期因子的蛋白激酶
cyclobutadipyridine 环丁二嘧啶
cyclobutane ring 环丁基环
cyclodeaminase 环化脱氨酶
cyclohexane 环己烷
cycloheximide 亚胺环己酮
cyclohydrolase 环水解酶
cyclohexanol 环己六醇,肌醇
cycloxygenase 环加氧酶
cycloheximide 亚胺环己酮,放线菌酮
cyclopentanopethydropheanthrene ring
环戊烷多氢菲环
cyclophosphamide 环磷酰胺
cycloserine 环丝氨酸
cystathionase 胱硫醚酶
cystathionine - γ - lyase 胱硫醚 - γ - 裂合酶
cystathionine - β - synthase 胱硫醚 - β - 合酶
cystathionuria 胱硫醚尿症
cysteamine 半胱胺
cysteamine oxygenase 半胱胺加氧酶
cysteic acid 磺基丙氨酸
cysteine 半胱氨酸
cysteine desulfhydrase 半胱氨酸脱硫酶
cysteine sulfenic acid 半胱次磺酸
cysteine sulfinic acid 半胱亚磺酸
cysteinyl-tRNA 半胱氨酰-tRNA
cystine 胱氨酸
cystine reductase 胱氨酸还原酶
cystinuria 胱氨酸尿(症)
cytidine 胞嘧啶核苷
cytidine - 2',3' - cyclic monophosphate
胞苷 2',3' - 环化一磷酸
cytidine diphosphate(CDP) 胞二磷
cytidine diphosphate choline(cytidine diphospho-choline)CDP - 胆碱
cytidine diphosphate diacylglycerol
胞二磷二酰甘油
cytidine diphosphoethanolamine
胞二磷乙醇胺
cytidine monophosphate (CMP) 胞苷酸
cytidine monophosphate - N - acetylneuraminic acid CMP - 乙酰神经氨酸
cytidine triphosphate(CTP) 胞三磷
cytidylic acid(cytidine 5' - monophosphate)
胞苷酸(5' - 胞苷酸)
cytochrome a₃ 细胞色素 a₃
cytochrome 细胞色素
cytochrome c 细胞色素 c
cytochrome oxidase 细胞色素氧化酶
cytochrome P₄₅₀ 细胞色素 P₄₅₀
cytochrome reductase 细胞色素还原酶
cytochromoid c 类细胞色素 c
cytogenetics 细胞遗传学
cytokine 细胞因子
cytokine - receptor superfamily 细胞因子受体超家族
cytokinin 细胞分裂素
cytollemma 质膜
cytolysin 溶细胞素
cytolipin H 细胞糖苷脂 H
cytosine 胞嘧啶
cytosine arabinoside 胞嘧啶阿拉伯糖苷,阿胞糖苷
cytosine deoxyribonucleoside(deoxycytidine)
脱氧胞苷
cytosol 细胞溶胶
- ## D
- dabyl - Cl 丹伯磷酰氯
dactinomycin 放线菌素 D
dalton 道尔顿(相对分子质量单位)
damage 损伤
dansyl - Cl 丹磷酰氯
dark repair 暗修复
D - configuration D - 构型
deacylase 脱酰酶
DEAE cellulose (diethylaminoethyl cellulose)
二乙胺乙基纤维素
deamidase 脱酰胺酶
deamidation 脱酰胺基作用
deaminase 脱氨基酶
deamination 脱氨基作用
debranching enzyme 脱支酶,去分支酶
decanoic acid 癸酸
decarboxylase 脱羧酶
decarboxylation 脱羧基作用
decosahexenoic acid 二十二碳六烯酸
dedifferentiation 去分化作用
deformylase 去甲酰化酶
degeneracy 密码的简并性
degenerate code 简并密码子
degeneration 变性,退化
degradation 降解作用
dehydrase 脱水酶
dehydration 脱水作用
dehydroalanine 脱氢丙氨酸
dehydroascorbic acid 脱氢抗坏血酸
7 - dehydrocholesterol 7 - 脱氢胆固醇
11 - dehydrocorticosterone 11 - 脱氢皮质酮
dehydroepiandrosterone 脱氢表雄酮
dehydrogenase 脱氢酶
dehydrogenation 脱氢作用
11 - dehydro - 17 α - hydroxycorticosterone
(cortisone) 11 - 脱氢 - 17 α - 羟皮质酮(可的松)
dehydrolysinonorleucine 脱氢赖氨酸正亮氨酸
5 - dehydroquinic acid 5 - 脱氢奎尼酸
dehydroquinic acid synthetase 脱氢奎尼酸合成酶
3 - dehydroshikimic acid 3 - 脱氢莽草酸
dehydroshikimic acid reductase
脱氢莽草酸还原酶
3 - dehydroshinganine 3 - 脱氢二氢鞘氨醇

- dehydroshingosine 脱氢神经鞘氨醇
 delayed early mRNA 晚早期 mRNA
 deletion 删去, 缺失
 denaturation 变性作用
 de novo synthesis 从头合成
 density gradient centrifugation 密度梯度离心
 deoxyadenosine 脱氧腺苷
 deoxyadenosine diphosphate(dADP)
 脱氧腺苷二磷酸
 deoxyadenosine 3' - monophosphate(3'dAMP)
 3' - 脱氧腺苷酸
 deoxyadenylic acid 脱氧腺苷酸
 6 - deoxyaldohexose 6 - 脱氧己醛糖
 3 - deoxy - α - arabinoheptulosonic acid - 7 -
 phosphoric acid 3 - 脱氧 - α - 阿拉伯庚酮
 糖酸 - 7 - 磷酸
 deoxycholic acid 脱氧胆酸
 deoxycorticosterone 脱氧皮质酮
 11 - deoxycortisol 11 - 脱氧皮质醇
 deoxycytidine 脱氧胞苷
 deoxycytidine 5' - monophosphate deaminase
 5' - 脱氧胞苷酸脱氨酶
 deoxycytidinephosphate deaminase
 胞嘧啶脱氧核苷酸脱氨酶
 deoxycytidylic acid (deoxycytidine 5' - monophos-
 - phate) 脱氧胞苷酸
 deoxycytidylic acid aminohydrolase
 脱氧胞苷酸氨基水化酶
 6 - deoxy - L - galactose 6 - 脱氧 - L - 半乳糖
 deoxyglucose 脱氧葡萄糖
 deoxyguanosine(dG, dGuo) 脱氧鸟苷
 Ca²⁺ - dependent protein kinase C(PKC) 蛋白
 激酶 C
 1 - deoxyglucose 1 - 脱氧葡萄糖
 2 - deoxyglucose 6 - phosphate 2 - 脱氧葡萄糖
 6 - 磷酸
 deoxyguanosine 3' - monophosphate(deoxy - 3' -
 guanylic, 3' - dGMP) 3' - 脱氧鸟苷酸
 deoxyguanylic acid(deoxyguanosine 5' -
 monophosphate) 5' - 脱氧鸟苷酸
 deoxyhemoglobin 去氧血红蛋白
 deoxyhexose 脱氧己糖
 deoxyheptulosonic - 7 - phosphate
 脱氧庚糖酸 - 7 - 磷酸
 11 - deoxy - 17 α - hydroxycorticosterone (11 -
 deoxy - cortisol) 11 - 脱氧 - 17 α - 羟皮质酮
 (11 - 脱氧皮质醇)
 deoxy - 5' - inosinic acid(deoxyinosine 5' - mono-
 - phosphate) 5' - 脱氧次黄苷酸
 6 - deoxy - L - mannose 6 - 脱氧 - L - 甘露糖
 deoxymoglobin 去氧肌红蛋白
 deoxypentose 脱氧戊糖
 deoxyribose 脱氧核糖
 α - D - 2' - deoxyribofuranose (D - 2 -
 deoxyribose)
 α - D - 2' - 脱氧呋喃核糖(D - α - 脱氧核糖)
 1 - β - D - 2' - deoxyribofuranoside
 1 - β - D - 2' - 脱氧呋喃核糖苷
 deoxyribonuclease(DNase) 脱氧核糖核酸酶
 deoxyribonucleic acid(DNA) 脱氧核糖核酸
 deoxyribonucleic acid ligase DNA 连接酶
 deoxyribonucleic acid polymerase (DNA polyme -
 - rase) 脱氧核糖核酸聚合酶(DNA 聚合酶)
 deoxyribonucleic acid repair endonuclease
 修复 DNA 的内切核酸酶
 deoxyribonucleoprotein 脱氧核糖核蛋白
 deoxyribonucleoside 脱氧核糖核苷
 deoxyribonucleotide 脱氧核糖核苷酸
 deoxyribonucleoside polyphosphate
 多磷酸脱氧核苷酸
 deoxyribose 脱氧核糖
 D - 2 - deoxyribose D - 2 - 脱氧核糖
 deoxyribose 5 - phosphate - 5 - 磷酸脱氧核糖
 deoxyribosylthymine (deoxythymidine) 脱氧胸苷
 deoxysugar 脱氧糖
 deoxythymidine kinase 脱氧胸苷激酶
 deoxyuridine 5' - phosphate 5' - 磷酸脱氧尿苷
 deoxy - 5' - uridylic acid 5' - 脱氧尿苷酸
 dephosphocoenzyme A 脱磷酸辅酶 A
 dephosphocoenzyme A kinase 脱磷酸辅酶 A 激
 酶
 dephospho - CoA pyrophosphorylase
 脱磷酸 - CoA 焦磷酸化酶
 depot lipid(fat) 贮存脂肪
 derivative 衍生物
 dermatan sulfate 硫酸皮肤素
 (chondroitin sulfate B)(硫酸软骨素 B)
 deamido - NAD 脱酰胺辅酶 I
 desaturase 去饱和脱氢酶
 desmoenzyme 固定酶, 不溶性酶
 desmolase 碳链裂解酶
 desmosine 锁链素
 deanoesterol 链甾醇, 脱氢胆固醇
 desthiobiotin 脱硫生物素
 desulfinae 脱亚硫酸酶
 detector 检测器
 detergency 去垢性
 detergent 去垢剂
 detoxification 解毒作用
 deuterium 氘
 deuteroporphyrin 次卟啉
 dextran 葡聚糖
 dextranucrase 葡聚糖蔗糖酶
 dextrin 糊精
 dextrose 右旋糖
 DFP 二异丙基氟磷酸
 diabetes mellitus 糖尿病
 diacylglycerol, (DAG) 二脂酰甘油, 甘油二脂
 dialysis 透析
 diamine oxidase 二胺氧化酶
 4,4' - diaminobenzil 4,4' - 二氨基联苯酰
 1,4 - diaminobutane 1,4 - 二氨基丁烷
 2,4 - diaminobutyric acid 2,4 - 二氨基丁酸
 α - ϵ - diaminocaproic acid (lysine)
 α - ϵ - 二氨基己酸(赖氨酸)
 7,8 - diaminopelargonic acid 7,8 - 二氨基壬烷
 1,5 - diaminopentane 1,5 - 二氨基戊烷
 L,L - α , ϵ - diaminopimelic acid
 L,L - α , ϵ - 二氨基庚二酸
 diaminopimelic acid decarboxylase
 二氨基庚二酸脱羧酶
 diaminopimelate epimerase
 二氨基庚二酸差向异构酶
 1,3 - diaminopropane 1,3 - 二氨基丙烷
 1,6 - diaminopurine 1,6 - 二氨基嘌呤
 diastase 淀粉酶制剂
 diastereoisomers 非对映体异构物
 diazo 重氮
 6 - diazoacetyl - L - serine (azaserine)
 6 - 重氮乙酰丝氨酸(重氮丝氨酸)
 6 - diazo - 5 - oxo - L - norleucine
 6 - 重氮 - 5 - 氧 - 正亮氨酸
 N², N₅ - dibenzoylornithine (ornithuric acid)
 N², N⁵ - 二苯甲酰鸟氨酸(鸟尿酸)
 dicarboxylic acid 二羧酸
 dicarboxylic amino acid 二羧氨基酸
 dichlorophenyl dimethyl urea 二氯苯二甲基脲
 dicumarol 双香豆素
 dielectric constant 介电常数
 diesterase 二酯酶
 diester linkage 二酯键
 diethylaminoethyl cellulose (DEAE - cellulose)
 二乙氨基纤维素
 diethylidithio - carbamate 二乙基二硫氨基甲酸
 酯
 diethylstilbestrol 二乙基己烯雌酚
 diffraction pattern 衍射图样
 diffraction of Xray X 线衍射
 diffusion constant 扩散常数
 digalactosylglycerol 二半乳糖甘油
 digitalis glycoside 毛地黄糖苷
 digitonin 毛地黄皂苷
 digitoxigenin 毛地黄毒苷配基
 diglyceride (diacylglycerol) 二酰甘油(甘油二
 酯)
 diglyceride transacylase 二酰甘油转酰基酶

- dihydrobiopterin 二氢生物蝶呤
dihydrobiopterin reductase 二氢生物蝶呤还原酶
1,25 - dihydrocholecalciferol 1,25 - 二氢胆钙化醇
dihydrocholesterol(β -cholestanol)二氢胆固醇
20 α - dihydrocorticosterone 20 α - 二氢皮质酮
2,3 - dihydrodipicolinic acid 2,3 - 二氢吡啶二羧酸
dihydrodipicolinate synthase 二氢吡啶二羧酸合酶
dihydrofolic acid 二氢叶酸
dihydrofolate reductase 二氢叶酸还原酶
dihydrolipoamide 二氢硫辛酰胺
dihydrolipoyl dehydrogenase 二氢硫辛酰脱氢酶
dihydrolipoyl transacylase 二氢硫辛酰转乙酰酶
dihydroneopterin 二氢新蝶呤
dihydroorotase 二氢乳清酸酶
dihydroorotate dehydrogenase 二氢乳清酸脱氢酶
dihydroorotic acid 二氢乳清酸
dihydroopteroic acid 二氢蝶酸
dihydrosphingosine 二氢(神经)鞘氨醇
dihydrotestosterone 二氢睾丸酮
dihydrothymine 二氢胸腺嘧啶
dihydroubiquinone 二氢辅酶 Q
dihydrouracil 二氢尿嘧啶
dihydrouracil dehydrogenase 二氢尿嘧啶脱氢酶
dihydrouracil hydratase 二氢尿嘧啶水化酶
dihydroxyacetone 二羟丙酮
dihydroxyacetone phosphate 二羟丙酮磷酸
dihydroxyacid dehydratase 二羧酸脱水酶
dihydroxybenzene 二羟苯基
1,25 - dihydroxycholecalciferol 1,25 - 二羟胆钙化醇
20 α - 22 - dihydroxycholesterol 20 α - 22 - 二羟胆固醇
3,5 - dihydroxy - 3 - methylvaleric acid (mevalonic acid) 3,5 - 二羟 - 3 - 甲基戊酸
 α , β - dihydroxy - β - methylvaleric acid α , β - 二羟 - β - 甲基戊酸
3,4 - dihydroxyphenylacetic acid 3,4 - 二羟苯乙酸
L-3,4 - dihydroxyphenylalanine L-3,4 - 二羟苯丙氨酸
L-3,4 - dihydroxyphenylacetic acid L-3,4 - 二羟乙酸
5,6 - dihydroxyindole 5,6 - 二羟吲哚
 α , β - dihydroxyisovaleric acid α , β - 二羟异戊酸
3,4 - dihydroxymandelic acid 3,4 - 二羟扁桃酸,二羟扁桃酸
 α , β - dihydroxy - β - methylvaleric acid α , β - 二羟 - β - 甲基戊酸
3,4 - dihydroxyphenylethylamine 3,4 - 二羟苯乙胺
3,4 - dihydroxyphenylethylamine β - hydroxylase 3,4 - 二羟苯乙胺 - β - 羟化酶
9,10 - dihydroxystearic acid 9,10 - 二羟硬脂酸
diiodotyrosine 二碘酪氨酸
diisopropylfluorophosphate 二异丙基氟磷酸
L - diketogluconic acid L - 二酮古洛糖酸
dimer 二聚体
dimerization 二聚化
N,N - dimethylacetamide N,N - 二甲基乙酰胺
N⁶,N⁶ - dimethyladenosine (N⁶,N⁶dimethyladenine) 6,6 - 二甲基氨基嘌呤(N⁶,N⁶ - 二甲基腺嘌呤)
dimethylglycine 二甲基甘氨酸
N²,N² - dimethylguanine N²,N² - 二甲基鸟嘌呤
dimethylbetin 二甲基噻亭
dimethylphosphate 二甲基磷酸
7,8 - dimethyl - 10 - (1' - D - ribitol) isoalloxazine (riboflavin) 7,8 - 二甲基 - 10 - (1' - D - 核糖醇)异咯嗪(核黄素)
3,7 - dimethylxanthine(theobromine) 3,7 - 二甲基黄嘌呤(可可碱)
deoxyinosine 5' - monophosphate, DIMP 5' - 脱氧次黄苷酸
dinicotinylornithine 二烟酰鸟氨酸
dinitrofluorobenzene 二硝基氟苯
2,4 - dinitrophenol(DNP) 2,4 - 二硝基酚
dinitrophenyl amino acids 二硝基苯胺基酸
dinucleotide 二核苷酸
dinucleotide frequency 二核苷酸频率
dioxygenase 二氧化酶
2,6 - dioxypurine(xanthine) 2,6 - 二氧嘌呤(黄嘌呤)
2,4 - dioxypyrimidine(uracil) 2,4 - 二氧嘧啶(尿嘧啶)
dipeptidase 二肽酶
dipeptide 二肽
N²,N⁵ - diphenylacetylornithine N²,N⁵ - 二苯乙酰鸟氨酸
diphenylamine 二苯胺
diphosphatidylglycerol 二磷脂酰甘油;心磷脂
diphosphofructose phosphatase 二磷酸果糖磷酸酶
1,3 - diphosphoglycerate 1,3 - 二磷酸甘油酸
2,3 - diphosphoglycerate 2,3 - 二磷酸甘油酸
diphosphoglycerate mutase 二磷酸甘油酸变位酶
diphosphoglycerate phosphatase 二磷酸甘油酸磷酸酶
diphosphoglyceric acid 二磷酸甘油酸
diphosphoinositide 二磷酸肌醇磷脂
diphthamide 白喉酰胺
diphtherotoxin 白喉毒素
diploidy 二倍体
dipolarion 偶极离子
 α , α' - dipyrrolyl α , α' - 二吡啶(基)
direct bilirubin 直接胆红素
direct selection 直接选择法
disaccharidase 二糖酶
disaccharide 二糖
disaccharide intolerance 二糖不耐性
diisopropylphosphofluoride 二异丙基磷酸氟化物
dissociation curve 解离曲线
distribution coefficient 分配系数
disulfides 二硫化物
disulfide bond 二硫键
disulfide group 二硫基
dithionite 连二亚硫酸
dithiothreitol(DTT) 二硫苏糖醇
dityrosine 二酪氨酸
divalent feedback inhibition 二价反馈抑制
DNA binding domain DNA 结合区
DNA central dogma DNA 中心法则
DNA chimaeras 嵌合 DNA
DNA cloning DNA 克隆
DNA diagnostics DNA 诊断学
DNA dependent RNA polymerase 依赖 DNA 的 RNA 聚合酶,DDRP
DNA - directed RNA polymerase DNA 指导的 RNA 聚合酶
DNA - RNA hybrid DNA - RNA 杂交体
DNA polymerase(deoxyribonucleic acid polymerase) DNA 聚合酶
DnaA protein DnaA 蛋白
DnaG protein DnaG 蛋白
DNA - protein interaction DNA - 蛋白质相互作用
DNase(deoxyribonuclease) 脱氧核糖核酸酶
DNase I hypersensitive site(DH) DNase 高敏位点
docosahexenoic acid(DNA) 二十二碳六烯酸
n - docosanoic acid(behenic acid) 正二十二烷酸
n - dodecanoic acid(lauric acid) 正十二烷酸
dodecanoyl coenzyme A synthetase 十二酰辅酶 A 合成酶
dodecyl sodium sulfate 十二烷基硫酸钠
docking protein 停泊蛋白

- dulcitol phosphate 磷酸多萹醇
 domain 结构域
 dominance 显性
 Donnan equilibrium 道南平衡
 donor site 给位
 Dopa(3,4-dihydroxyphenylalanine) 多巴(3,4-二羟苯丙氨酸)
 Dopa decarboxylase 多巴脱羧酶
 dopamine 多巴胺
 dopamine hydroxylase 多巴胺羟化酶
 double bond 双键
 double helical double helix 双螺旋形的双螺旋
 double helix 双螺旋
 double hlix model 双螺旋模型
 down regulation 下调
 down stream 下游
 DPN(nicotinamide adenine dinucleotide) 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸
 DPNase(nicotinamide adenine dinucleotidase) DPN 酶
 DPNH(nicotinamide adenine dinucleotidase) 还原型 DPNH
 D-sphinganine D-二氢神经鞘氨醇
 dulcitol 半乳糖醇
 duplex DNA 双链 DNA
 dynamic action of food 食物的动力作用
 dynamic equilibrium 动态平衡
 dynein 动力蛋白
 dynorphin 强啡肽
- ### E
- early mRNA 早期 mRNA
 ecdysone 蜕化激素, 蜕皮激素
 edestin 麻仁球蛋白
 editosome 编辑体(RNA 编辑的)
 Edman degradation Edman 降解法
 Edman's reagent Edman 氏试剂(测肽链 N-末端)
 effector 效应物
 egg albumin(ovalbumin) 卵清蛋白
 egg white protein 卵清蛋白
 eicosadienoic acid 二十碳二烯酸
 edicosapentaenoic acid(EPA) 二十碳五烯酸
 eicosatrienoic acid 二十碳-5,8,11-三烯酸
 n-eicosanoic acid (arachidonic acid) 花生酸
 elaidic acid 反油酸
 elastase 弹性蛋白酶
 elastin 弹性蛋白
 electric double layer 双电层
 electrode potential 电极势
 electrolyte 电解质
 electrolyte pump 电解质泵
 electromotive force 电动势
 electron 电子
 electron acceptor 电子受体
 electron carrier 电子载体
 electron carrier protein 电子传递蛋白
 electron density map 电子密度图
 electron donor 电子给体
 electron spin resonance signals 顺磁共振现象
 electron transfer 电子传递
 electron-transferring flavoprotein 电子传递黄素蛋白
 electron transport 电子传递
 electron transport chain 电子传递链(呼吸链)
 electron transport system 电子传递系统
 electrophilic group 亲电子基团
 electrophoresis 电泳
 electrostatic forces 静电力
 eleostearic acid 十八碳三烯酸
 β -elimination reaction β -消去反应
 elongation 延伸
 elongation factor 延伸因子
 eluant 洗脱液
 eluate 洗脱物
 eluent 洗脱液
 elution 洗脱
 emetine 吐根碱
 emulsifier 乳化剂
 emulsin 苦杏仁酶
 emulsion 乳胶, 乳剂
 enamel protein 釉质蛋白
 enantiomorph 对映体
 endergonic process 吸能过程
 endergonic reactions 吸能反应
 end group 末端基团
 end group analysis 末端分析
 endocrine 内分泌
 endocytosis 内吞作用/胞吞
 endogenous 内源
 endonuclease 内切核酸酶
 endopeptidase 内肽酶, 肽链内切酶
 endoplasmic reticulum membrane 内质网膜
 endorphin 内啡肽
 endotoxin 内毒素
 endosome 内吞小体
 energy 能量
 energy metabolism 能量代谢
 energy-rich compounds 高能化合物
 energy-rich bond 高能键
 energy-rich phosphate 高能磷酸
 energy transformations 能量转变
 energy-yielding reactions 产能反应
 enhancer 增强子
 enhancer binding factors 增强子结合因子
 enhancer insertion 增强了插入
 enkephalin 脑啡肽
 enol 烯醇
 enol-1-O-carboxyphenylamino-1-deoxyribose phosphate 烯醇-1-O-羧苯氨基-1-脱氧核糖磷酸
 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphoric acid 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸
 enolase 烯醇化酶
 enoyl-ACP reductase 脂烯酰-ACP 还原酶
 enoyl-acyl carrier protein reductase 烯酰基-酰基载体蛋白还原酶
 enoyl coenzyme A hydratase(crotomase) 烯酰辅酶 A 水合酶, 巴豆酸酶
 enoyl reductase 烯酰还原酶
 entatic state 拉紧态
 enterocinin 促肠液激素
 enterogastrone 肠抑胃素
 entero-hepatic bilinogen cycle 肠肝胆汁烧循环
 enterokinase 肠激酶, 肠肽酶
 enthalpy 热焓
 entropy 熵
 entry site 进入部位
 enzyme immunodetection assay 酶免疫检测分析
 enzymology 酶学
 epidermal growth factor(EGF) 表皮生长因子
 epimerase 差向异构酶
 epinephrine 肾上腺素
 epinine 麻黄宁, N-甲基-二羟苯乙胺
 episome 附加体
 epoxide 环氧化物
 equilibrium constant 平衡常数
 equivalent 当量, 当量的, 相当的
 equilin 马烯雌酮
 ergocalci ferol 麦角钙化固醇, 维生素 D₂
 ergosterol 麦角固醇
 error free repair 避免差错的修复
 error prone repair 倾向差错的修复
 erythrocrucorine 无脊椎动物血红蛋白
 erythrocyuprein 血球铜蛋白, 超氧化物歧化酶
 erythrocyte 红细胞, 红血球
 erythromycin 红霉素
 erythropoiesis 红细胞生成
 erythropoietin [促]红细胞生成素
 D-erythrose D-赤藓糖
 erythrose-4-phosphate 赤藓糖-4-磷酸
 D-erythrulose D-赤藓酮糖
 essential amino acids 必需氨基酸

- essential fatty acids 必需脂肪酸
 ester 酯
 esterase 酯酶
 ester bond 酯键
 esterification 酯化作用
 estradiol 雌二醇
 estrane 雌烷
 estriol 雌三醇
 estrogen 雌激素
 estrone 雌酮
 ethanolamine 乙醇胺, 胆胺
 ethanolamine kinase 乙醇胺激酶
 ethanol dehydrogenase 乙醇脱氢酶
 ethyl acetate 乙酸乙酯
 ethyl alcohol 乙醇
 ethyl butyrate 丁酸乙酯
 ethylenic diamine tetraacetic acid (EDTA)
 乙二胺四乙酸
 ethylenimine 乙撑亚胺
 ethylglycinate 甘氨酸乙酯
 etioporphyrin 本叶啉
 eucaryote 真核细胞
 euchromatin 常染色质
 evolution 进化
 exchange reaction 交换反应
 excision repair 切除修复
 exclusion - chromatography 排阻层析
 exergonic process 放能过程
 exergonic reaction 放能反应
 exit site 出中部位(E位)
 exocytosis 外吐作用
 exogenous 外源的
 exon 外显子
 exonuclease 外切核酸酶
 exopeptidase 外肽酶(肽链外切酶)
 expression vector 表达载体
 extensin 伸展蛋白
 extinction 消化
 exocytosis 外排
 extracellular fluid 细胞外液
 extract 提取, 提取液
 extron 外显子
- F**
- facultative 兼性的
 FAD pyrophosphorylase FAD 焦磷酸化酶
 f_0 (molar frictional coefficient) 摩尔摩擦系数
 f/f_0 (frictional ratio) 摩擦比
 facilitated transport 易化转运
 false neurotransmitter 假神经递质
 family 家族
 FAD pyrophosphorylase FAD 焦磷酸化酶
 familial high - density lipoprotein deficiency
 家族性高密度脂蛋白缺乏
 (farnesy) 法尼基
 farnesyl pyrophosphate 焦磷酸法呢酯
 fat factor of food 食物脂肪因子
 fat soluble vitamin 脂溶性维生素
 fatty acid 脂肪酸
 fatty - acid synthetase system
 脂肪酸合成酶复合体系
 fatty acyl - acyl carrier protein 脂肪酰基载体
 蛋白
 fatty acyl coenzyme A 脂肪酰辅酶 A
 fatty acyl coenzyme A dehydrogenase
 脂肪酰辅酶 A 脱氢酶
 fatty acyl - CoA oxidation enzyme
 脂酰 - CoA 氧化酶
 fatty aldehyde 脂肪醛
 fatty liver 脂肪肝
 fecal fat 粪便脂肪
 feedback inhibition 反馈抑制
 feedforward 前馈
 feedback regulation 反馈调节
 female sex hormone 雌性激素
 fermentation 发酵
 ferment 酵素, 酶
 ferredoxin 铁氧(化)还(原)蛋白
 ferredoxin - reducing substance
 铁氧还蛋白还原物质
 ferricyanide 高铁氰化物
 ferricytochrome c 高铁细胞色素 c
 ferricytochrome oxidase 高铁细胞色素氧化酶
 ferridoxin 铁氧还蛋白
 ferrihemoglobin (methemoglobin) 高铁血红蛋白
 ferric hydroxide 氢氧化高铁
 ferriprotoporphyrin (Hemin) 高铁原叶啉
 ferriprotoporphyrin hydroxide (Hematin)
 羟高铁血红素
 ferritin 铁蛋白
 ferrochelatae 亚铁螯合酶
 ferrocyanide 亚铁氰化物
 ferrocyanide 亚铁细胞色素
 ferrocyanide c 亚铁细胞色素 c
 ferrocyanide oxidase 亚铁细胞色素氧化酶
 ferrocyanide c - oxidoreductase
 亚铁细胞色素 c - 氧化还原酶
 ferrohematoporphyrin 亚铁血叶啉
 ferroheme (亚铁) 血红素
 ferroheme - imidazole (亚铁) 血红素 - 异吡唑
 ferroporphyrin 铁叶啉
 ferroporphyrin (Heme) 亚铁原叶啉(血红
 素)
 fetuin 胎球蛋白
 fertility factor (sex factor) (F factor)
 致育因子(性因子)(F因子)
 fibril 原纤维
 fibrin (血) 纤维蛋白(单体)
 fibroblast 成纤维细胞
 fibrinase (血) 纤维形成酶
 fibrinogen (血) 纤维蛋白原
 fibrinopeptide 血纤肽, (血) 纤维蛋白肽
 fibrin stabilizing factor (FSF) 血纤蛋白稳定因
 子
 fibroblast growth factor, FGF 成纤维细胞生长因
 子
 fibrous DNA 纤维状 DNA
 fibrous protein 纤维状蛋白质
 ficin 无花果蛋白酶
 first messenger 第一信使
 first - order reaction 一级反应
 flagellin 鞭毛蛋白
 flavanone 黄烷酮
 flavin 黄素
 flavin adenine dinucleotide (FAD)
 黄素腺嘌呤二核苷酸
 flavin adenine dinucleotide reduced (FADH₂)
 还原型黄素单核苷酸
 flavin nucleotide 黄素核苷酸
 flavin nucleotide pyrophosphorylase
 黄素核苷酸焦磷酸化酶
 flavodoxin 黄素氧(化)还(原)蛋白
 flavokinase 黄素激酶
 flavones 黄酮
 flavonol 黄酮醇
 flavoprotein 黄素蛋白
 flavoprotein dehydrogenase 黄素蛋白脱氢酶
 flip - flop 翻转(运动)
 flocculation of protein 蛋白质结絮(作用)
 flotation constants 漂浮常数
 'flower' model 花状模型
 fluorouridine 5 - 氟脱氧尿苷
 fluid 液体
 fluorescamine 荧光胺
 fluorescein 荧光素
 fluorescence activated cell sorter (FACS) 荧光激
 活细胞分选仪
 fluorescence photobleaching recovery (FPR) 荧光
 漂白恢复
 fluorescence polarization 荧光光偏振
 fluorescence spectra 荧光光谱
 fluorocitrate 氟代柠檬酸盐
 9 α - fluoro - Δ^1 - cortisol 9 α - 氟 - Δ^1 皮质醇
 5 - fluorodeoxyuridine 5 - 氟脱氧尿苷
 1 - fluoro - 2,4 - dinitrobenzene (FDNB)
 1 - 氟 - 2,4 - 二硝基苯

- 5 - fluorouracil 5 - 氟尿嘧啶
flux 通量
folacin 叶酸
foldase 折叠酶
folding 折叠
folic acid(pteroylglutamic acid) 叶酸
folinic acid 亚叶酸
follicle stimulating hormone(FSH) 促卵泡激素
follicle - stimulating hormone releasing factor (FRF) 促卵泡激素释放因子
formaldehyde 甲醛
formaldehyde - activating enzyme 甲醛活化酶
formamidase 甲酰胺酶
formamide 甲酰胺
5 - formamidoimidazole - 4 - carboxamide ribonucleotide 5 - 甲酰氨基咪唑 - 4 - 甲酰胺核苷酸
formic acid 甲酸
formimino - 亚氨基
formiminoglutamate formiminotransferase 亚胺甲基谷氨酸亚胺甲基转移酶
formiminoglutamate hydratase 亚胺甲基谷氨水化酶
formiminoglutamic acid 甲胺亚基谷氨酸
N - formiminoglutamic acid N - 甲亚氨基谷氨酸
 β - formimino - THF 5 - 甲亚氨基 - THF
formiminoglycine 亚胺甲基甘氨酸
formiminoglycine formimino transferase 亚胺甲基甘氨酸亚胺甲基转移酶
formimino group 亚胺甲基
N⁵ - formiminotetrahydrofolate cyclodeaminase N⁵ - 亚胺甲基四氢叶酸环化脱胺酶
N⁵ - formiminotetrahydrofolic acid N⁵ - 亚胺甲基四氢叶酸
formiminotransferase 亚胺甲基转移酶
formyl - 甲酰(基)
formylglutamate formyl transferase 甲酰谷氨酸甲酰基转移酶
N - formyl - L - glutamate iminohydrolase N - 甲酰基 - L - 谷氨酸亚氨基水解酶
formylglutamic acid 甲酰谷氨酸
formylglycinamide ribonucleotide 甲酰甘氨酸胺核苷酸
formylglycinamide ribotide 甲酰甘氨酸胺核苷酸
formylglycinamide ribotide synthetase 甲酰甘氨酸核苷酸合成酶
N¹⁰ - formyl - tetrahydrofolate N¹⁰ - 甲酰四氢叶酸
 α - N - formylglycinamide ribonucleotide α - N - 甲酰甘氨酸胺核苷酸
 α - N - 甲酰甘氨酸胺核苷酸
N - formylkynurenine N - 醛基犬尿酸
N - formylmethionine N - 甲酰甲硫氨酸
N - formylmethionyl - tRNA N - 甲酰甲硫氨酰 - tRNA
N⁵ - formyltetrahydrofolate isomerase (cyclohydrase) N⁵ - 甲酰四氢叶酸异构酶(环化脱水酶)
fos family fos 家族
formyltetrahydrofolate synthetase 甲酰四氢叶酸合成酶
N⁵ - formyltetrahydrofolic acid N⁵ - 甲酰四氢叶酸
N¹⁰ - formyltetrahydrofolic acid N¹⁰ - 甲酰四氢叶酸
frameshift mutation (phase - shift mutation) 移码突变(相移突变)
fragile site 脆性定位
fragile X syndrome 脆性 X 综合征
fragment 碎片, 片段
free energy 自由能
free fatty acid 游离脂肪酸
free radical 游离基
friction ratio(f/f_0) 摩擦比
 α - D - fructofuranose(α - D - fructose) α - D - 呋喃果糖
 β - D - fructofuranose β - D - 呋喃果糖
fructokinase 果糖激酶
D - fructose D - 果糖
 α - D - fructose α - D - 果糖
fructose diphosphate 果糖二磷酸
fructose 1,6 - diphosphate(FDP) 果糖 1,6 - 二磷酸
fructose diphosphate aldolase 果糖二磷酸醛缩酶
fructose 1,6 - diphosphate phosphatase 1,6 - 二磷酸果糖磷酸酶
fructose phenylsazone 果糖苯肼
fructose 1 - phosphate 果糖 1 - 磷酸
fructose 1 - phosphate aldolase 果糖 1 - 磷酸醛缩酶
FSH(follicle stimulating hormone) 促卵泡激素
fucose 岩藻糖
fucosidase 岩藻糖苷酶
fumarase 延胡索酸酶
fumarate 延胡索酸(盐)
fumarate hydratase 延胡索酸水合酶
fumaric acid 延胡索酸
4 - fumarylacetoacetic acid 4 - 延胡索酰乙酰乙酸
fumarylacetoacetase 延胡索酰乙酰乙酸酶
furan 呋喃
- furanose 呋喃糖
furfural 糠醛
futile cycle (耗能性) 无效循环(反应)
- ## G
- gadoleic acid 二十碳 - 9 - 烯酸
D - galactans D - 半乳聚糖
galactocerebrosidase 半乳糖脑苷脂酶
galactocerebroside sulfokinase 半乳糖脑苷脂硫激酶
galactokinase 半乳糖激酶
galactolipide 半乳糖脂
 α - D - galactopyranose 吡喃型半乳糖
4 - O - β - D - galactopyranosyl - D - glucopyranose(β - lactose) β - 乳糖
galactosamine 半乳糖胺
D - galactose D - 半乳糖
galactose oxidase 半乳糖氧化酶
galactose permease 半乳糖透性酶
galactose - 1 - phosphate 半乳糖 1 - 磷酸
galactose 1 - phosphate uridylyl transferase 半乳糖 - 1 - 磷酸尿苷酰转移酶
galactosemia 半乳糖血症
 α - galactosidase α - 半乳糖苷酶
 β - galactosidase β - 半乳糖苷酶
galactosphingolipid 半乳糖神经鞘脂
galactosuria 半乳糖尿症
galactosylation 半乳糖苷化
galactosyl ceramide 半乳糖苷神经酰胺
galactosyl ceramide - β - galactosylhydrolase 半乳糖苷神经酰胺 - β - 半乳糖苷水解酶
galactosylglucose(lactose) 乳糖
galactosylglyceride 半乳糖甘油
 β - galactosyl hydrolase β - 半乳糖苷水解酶
galactosylsphingene 半乳糖鞘氨醇
galactosylsphingene transferase 半乳糖鞘氨醇转移酶
D - galacturonic acid D - 半乳糖醛酸
gamma globulin 丙种球蛋白
ganglioside 神经节苷脂
gastrin 胃泌素
gangliosidosis 神经节苷脂沉积症
gap 缺口
gas constant 气体常数
gas liquid chromatography 气液色谱法
gastric lipase 胃脂肪酶
gastricin 胃亚蛋白酶
gastrins 促胃液素
gauche 偏转
GC box GC 盒
gelatin 白明胶
gel filtration 凝胶过滤

- gene 基因
- gene amplification 基因放大
- gene cloning 基因克隆
- gene colon 基因密码
- gene control 基因调控
- gene expression 基因表达
- gene family 基因族
- gene library 基因库
- gene marking 基因标志
- gene mutation 基因突变
- gene order 基因序列
- genetic code 遗传密码
- genetic information 遗传信息
- genetic map 遗传图
- genetic repair mechanism 遗传修复机制
- gene territorial effect 基因领域效应
- gene therapy 基因治疗
- gene transfer 转基因
- genetic transcription 基因转录
- genetic transcription factor 基因转录因子
- genetics 遗传学
- genetic engineering 遗传工程
- genetic recombination 基因重组
- genome 基因组
- genomic DNA 基因组 DNA
- genomic DNA library 基因组 DNA 文库
- genotype 基因型
- gentiobiose 龙胆二糖
- geraniol 牻牛儿醇
- geranyl pyrophosphate synthetase 牻牛儿(基)焦磷酸合成酶
- germ line 胚原系
- germ line gene therapy 性细胞基因治疗
- giant RNA 巨型 RNA
- Girard's reagent Girard 氏试剂(用于提取酮类固醇的试剂)
- gliadin 麦醇溶蛋白
- globin 珠蛋白
- globin ferroporphyrin 珠蛋白铁卟啉
- globoside 红细胞糖苷
- globular confirmation 球状构象
- glucose transporter 葡萄糖转运蛋白
- glucogenic amino acid 生糖氨基酸
- globular DNA 球状 DNA
- globular protein 球状蛋白质
- globulin 球蛋白
- glomerular filtration 肾小球滤过作用
- glomerular membrane 肾小球膜
- glomerulus 肾小球
- glucagon 胰高血糖素
- glucan 葡聚糖
- α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase α -1,4-葡聚糖-4-葡聚糖水解酶
- α -1,4-glucan maltohydrolase(β -amylase) β -淀粉酶
- α 1,4 \rightarrow α -1,4-glucantransferase α -1,4 \rightarrow α -1,4-葡聚糖转移酶
- glucocerebrosidase 葡萄糖脑苷脂酶
- glucocerebroside 葡萄糖脑苷脂
- glucogenesis 葡萄糖生成作用(生糖作用),糖再生
- glucokinase 葡萄糖激酶
- glucoseogenesis 糖原异生作用
- D-gluconic acid D-葡萄糖酸
- δ -gluconolactone δ -葡萄糖酸内酯
- glucopyranose 吡喃型葡萄糖
- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside (sucrose)蔗糖
- 4-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucopyranose(β -maltose) β -麦芽糖
- glucosamine 氨基葡萄糖
- glucosamine 6-phosphate 氨基葡萄糖 6-磷酸
- α -D-glucose α -D-葡萄糖
- glucose 1,6 diphosphate 葡萄糖 1,6-二磷酸
- glucose:nitrogen ratio 葡萄糖:氮比例
- glucose oxidase 葡萄糖氧化酶
- D-glucose phenylosazone D-葡萄糖苯腙
- glucose-6-phosphatase 葡萄糖-6-磷酸酶
- glucose 1-phosphate 葡萄糖 1-磷酸
- glucose 6-phosphate dehydrogenase 葡萄糖 6-磷酸脱氢酶
- glucose phosphate isomerase 磷酸葡萄糖异构酶
- glucose-sorbitol 葡萄糖-山梨糖苷
- glucose tolerance 葡萄糖耐量
- glucosidase 葡萄糖苷酶
- glucoside 葡萄糖苷
- glucosidic bond 葡萄糖苷键
- D-glucosyl-L-arabinoide D-葡萄糖基-L-阿拉伯糖苷
- D-glucosid-L-sorbitol D-葡萄糖苷基-L-山梨糖苷
- 3-glucosiduronate 3-葡萄糖苷醛酸
- glucosiduronic acid 葡萄糖苷醛酸
- glucosiduronic acid 葡萄糖苷醛酸
- glucosphingolipid 葡萄糖鞘脂类
- glucosylceramide 葡萄糖神经酰胺
- glucosyl diacylglycerol 葡萄糖二酰基甘油
- β -glucosyl enzyme β -葡萄糖基酶
- glucuronic acid 葡萄糖醛酸
- glucuronic acid cycle 糖醛酸循环
- D-glucuronic acid D-葡萄糖醛酸
- L-glucuronic acid L-葡萄糖醛酸
- β -glucuronidase β -葡萄糖醛酸酶
- glucuronyl transferase 葡萄糖醛酸转移酶,转葡糖醛酸酶
- glutamic acid 谷氨酸
- glutamic acid semialdehyde 谷氨酸半醛
- glutamic acid formimino transferase 谷氨酸转甲亚胺酶
- glutamic-lysine 谷氨酸-赖氨酸
- glutamic-oxaloacetic aminotransferase/glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) (glutamic-aspartic aminotransferase) 谷草转氨酶
- glutamic pyruvic transaminase 谷丙转氨酶
- glutamic- γ -semialdehyde 谷氨酸- γ -半醛
- glutamic- γ -semialdehyde dehydrogenase (GOT) 谷氨酸半醛脱氢酶
- glutaminase 谷氨酰胺酶
- glutamine 谷氨酰胺
- glutamine synthetase 谷氨酰胺合成酶
- glutamine-rich domain 谷氨酰胺富含结构域
- glutamyl 谷氨酰(基)
- γ -glutamylalanine γ -谷氨酰丙氨酸
- γ -glutamylamino acids γ -谷氨酰氨基酸
- γ -glutamyl-amino-butyric acid γ -谷氨酰- α -氨基丁酸
- γ -glutamyl cycle γ -谷氨酰循环
- γ -glutamyl cyclotransferase γ -谷氨酰环化转移酶
- γ -glutamyl cysteine γ -谷氨酰半胱氨酸
- α -glutamylcysteine synthetase α -谷氨酰半胱氨酸合成酶
- γ -glutamylcysteine synthetase γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶
- γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine (glutathione) 谷胱甘肽
- γ -glutamyl phosphate γ -谷氨酰磷酸
- γ -glutamyl transpeptidase γ -谷氨酰转肽酶
- glutaryl semialdehyde 戊二酰半醛
- glutaryl-CoA 戊二酰-CoA
- glutaric acid 戊二酸
- glutaryl coenzyme A 戊二酰辅酶 A
- glutaryl-CoA dehydrogenase 戊二酰-CoA 脱氢酶
- glutathione(GSSG) 谷胱甘肽, GSH 还原型谷胱甘肽
- glutathione-insulin transhydrogenase 谷胱甘肽

- 胰岛素转氨酶
 glutathione peroxidase 谷胱甘肽过氧化物酶
 glutathione synthetase 谷胱甘肽合成酶
 glyceraldehyde 甘油醛
 glyceraldehyde 3-phosphate 甘油醛 3-磷酸
 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 3-磷酸甘油醛脱氢酶
 D-glycerate dehydrogenase D-甘油酸脱氢酶
 glyceric acid 甘油酸
 glycerin 甘油
 glycerokinase 甘油激酶
 glycerol 甘油
 glycerol phosphate 磷酸甘油
 glycerol 3-phosphate 甘油 3-磷酸
 glycerol 3-phosphate phosphatase 甘油 3-磷酸磷酸酶
 glycerol- α -phosphate shuttle α -甘油磷酸穿梭
 glycerophosphate transacylase 甘油磷酸转酰基酶
 glycerophosphatidate 甘油磷脂
 glyceryl ester 甘油酯
 glycidol acid 缩水甘油酸, 环氧丙酸
 glycidol 缩水甘油
 glycidol phosphate 磷酸缩水甘油
 glycinamide ribonucleotide 甘氨酸胺核苷酸
 glycinamide ribonucleotide transformylase 甘氨酸胺核苷酸转甲酰酶
 glyciamide ribotide 甘氨酸胺核苷酸
 glycinamide ribotide synthetase 甘氨酸胺核苷酸合成酶
 glycinamide ribotide transformylase 甘氨酸胺核苷酸转甲酰酶
 glycine 甘氨酸
 glycine amidine transferase 甘氨酸咪基转移酶
 glycine oxidase 甘氨酸氧化酶
 glycocholic acid 甘氨酸胆酸
 glycoamine(guanidinoacetic acid) 胍基乙酸
 glycogen 糖原
 glycogenesis 糖原生成作用
 glycogenolysis 糖原分解作用
 glycogenic amino acid 生糖氨基酸
 glycogenosis(glycogen storage disease) 糖原积累症
 glycogen phosphorylase 糖原磷酸化酶
 glycogen(storage)disease 糖原病
 glycogen synthetase 糖原合成酶
 glycogen synthetase D 糖原合成酶 D
 glycogen synthetase kinase 糖原合成酶激酶
 glycogen synthetase phosphatase 糖原合成酶磷酸酶
 glyco kinase 葡萄糖激酶
 glycolipid 糖脂
 glycolipid galactose transferase 糖脂半乳糖转移酶
 N-glycolylneuraminic acid N-羟乙酰神经氨酸(糖酸)
 glycosphingolipid 鞘糖脂
 glycolysis 糖酵解
 glycophorin 血型糖蛋白
 glycoprotein 糖蛋白
 glycoprotein- α_1 -globulin 糖蛋白- α_1 -球蛋白
 glycoside 糖苷
 glycosidic bond 糖苷键
 glycosidic linkage 糖苷键
 glycosphingolipid 鞘糖脂类
 glycophorin 血型糖蛋白
 glycosuria 糖尿
 glycosyl-糖基
 glycosylation 糖苷化作用
 glycosylglycerol 甘油葡萄糖苷
 glycosyltransferase 糖基转移酶, 转葡萄糖基酶
 glycol-甘氨酸
 glycyglycine dipeptidase 甘氨酸甘氨酸二肽酶
 glycyglycylglycine 甘氨酸甘氨酸甘氨酸
 glycol-L-proline 甘氨酸-L-脯氨酸
 glyoxylase 乙二醛酶
 glyoxylate aminotransferase 乙醛酸转氨酶
 glyoxylate carboxylase 乙醛酸碳连接酶
 glyoxylate reductase 乙醛还原酶
 glyoxylic acid 乙醛酸
 GMP(guanosine 5'-monophosphate) 鸟苷一磷酸
 Golgi apparatus 高尔基体
 Gomori trichrome Gomori 三色
 gonadotropic hormone 促性腺激素
 gonadotropins 促性腺激素
 G-protein G 蛋白
 G₃ protein G₃ 蛋白
 gramicidin S 短杆菌肽 S
 griseoflavin 灰黄霉素
 group displacement in enzyme reactions 酶反应中基团置换
 group exchange in enzyme reactions 酶反应中基团交换
 growth factor 生长因子
 growing point 生长点
 growth hormone(somatotropin) 生长激素
 growth hormone regulatory factors 生长激素调节因子
 growth hormone releasing factor(GRF) 生长激素释放因子
 GTP(guanosine triphosphate) 鸟三磷
 GTP binding protein GTP 结合蛋白(G 蛋白)
 GTPase activating protein(GAP) GTP 酶活化蛋白
 quadridentate “四爪”状
 guanidine 胍
 guanidinium group 胍基
 guanidino acetate methyltransferase 胍乙酸转甲基酶
 guanidinoacetic acid 胍基乙酸
 γ -guanidino butyric acid γ -胍丁酸
 guanidino ethylserylphosphate 胍乙基丝氨酸磷酸
 guanine(2-aminohypoxanthine) 鸟嘌呤(2-氨基次黄嘌呤)
 guanine deaminase 鸟嘌呤脱氨酶
 guanine deoxyribonucleoside 鸟嘌呤脱氧核苷
 guanine nucleotide-exchange factor(GEF) 鸟苷酸交换因子
 guanosine 鸟苷
 guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(cGNP) 3',5'-环化鸟苷酸
 guanosine deaminase 鸟苷脱氨酶
 guanosine diphosphate(GDP) 鸟二磷
 guanosine diphosphate colitose 鸟二磷可立糖
 guanosine diphosphate fucose 鸟二磷岩藻糖
 guanosine diphosphate galactose 鸟二磷半乳糖
 guanosine diphosphate glucose 鸟二磷葡萄糖
 guanosine diphosphate mannose 鸟二磷甘露糖
 guanosine diphosphate phosphorylase 鸟二磷磷酸化酶
 guanosine diphosphate rhamnose 鸟二磷鼠李糖
 guanosine diphosphate sugars 鸟二磷糖类
 guanosine 5'-monophosphate(guanic acid, CMP) 鸟苷酸
 guanosine triphosphate(GTP) 鸟三磷
 guanyl nucleotide exchange factor 鸟苷核苷酸交换因子
 guanylate synthetase 鸟苷酸合成酶
 guanylic acid(guanosine 5'-monophosphate) 鸟苷酸
 L-gulononic acid L-古洛糖酸
 L-gulonolactone 古洛糖酸内脂
 D-gulose D-古洛糖
 gyrase 旋转酶

H

hadacidin 羽田杀菌素
 haem(heme) 血红素
 haemagglutination 血凝集作用

- Hageman factor Hageman
因子(一种血凝起动因子)
- hairpin structure 发夹结构
- halfcystine(cysteine) 半胱氨酸
- half-life 半寿期
- half-time 半寿期
- halogen 卤素
- hammer-head structure 锤头结构
- hapten 半抗原
- haptoglobin 结合珠蛋白, 触珠蛋白
- Harden-young ester 哈杨二氏酯(1,6-二磷酸果糖)
- Hartnup's disease 色氨酸加氧酶缺乏病
- Hb 血红蛋白
- HbCO(carbon monoxide hemoglobin)
一氧化碳血红蛋白
- hemorrhage bias 出血倾向
- heat combustion 燃烧热
- heat shock protein 热休克蛋白
- heat shock protein 90(hsp 90) 热休克蛋白 90
- heat shock response 热休克反应
- heavy chain, immunoglobulin 免疫球蛋白重链
- helical conformation 螺旋构型
- helical content 螺旋含量
- helical structure 螺旋结构
- helical structure of protein 蛋白质螺旋结构
- helical turn 螺旋圈数
- helicase 解螺旋酶(解链酶)
- α -helix α -螺旋
- helix-coil transition 螺旋线团转变
- helix destabilizing protein 螺旋去稳定蛋白
- hematoporphyrin 血卟啉
- heme 血红素
- heme A 血红素 A
- heme oxygenase 血红素加氧酶
- heme protein 血红素蛋白
- heme synthetase 血红素合成酶
- hemiacetal 半缩醛
- hemiacetal bond 半缩醛键
- hemiacetal carbon atom 半缩醛碳原子
- hemicellulose 半纤维素
- hemiketal 半酮缩醇
- hemin 氯高铁血红素
- hemin test 氯高铁血红素试验
- hemochrome 血色原
- hemochromogen 血色原
- hemocuprein 血铜蛋白
- hemocyanin 血蓝蛋白
- hemoflavoprotein 血黄素蛋白
- hemoglobin(Hb) 血红蛋白
- hemoglobinopathies 血红蛋白病
- hemopexin 血液结合素
- hemoprotein 血红素蛋白
- hemosiderin 血铁黄蛋白, 含血铁黄素
- hepadnavirus 嗜肝 DNA 病毒
- heparan sulfate(heparitin sulfate)
硫酸乙酰肝素
- heparan sulfate sulfatase 硫酸乙酰肝素硫酸酯酶
- heparin 肝素
- β -heparin(dermatan sulfate)
 β -肝素(硫酸皮肤素)
- heparinase 肝素酶
- heparitin 类肝素
- heparitin sulfate 硫酸类肝素
- hepatic fructokinase 肝果糖激酶
- hepatic phosphorylase kinase 肝磷酸化酶激酶
- hepatic phosphorylase kinase deficiency disease
肝磷酸化酶激酶缺乏病
- hepatitis B virus 乙型肝炎病毒
- heptocellular jaundice 肝性黄疸
- hepatocerin 促肝泌素
- hepatocuprein 肝铜蛋白
- hepatocyte growth factor(HGF) 肝细胞生长因子
- hepatophosphorylase-deficiency glyco-genosis
肝磷酸化酶缺乏性糖原积累病
- heterodimer 杂二聚体
- heteroduplex 杂化双链
- heterogenous nuclear RNA 核不均一 RNA
- heptose 庚糖
- heptulose 庚铜糖
- hexagonal 六角形相
- D-galacto-heptulose D-半乳-庚铜糖
- D-gulo-heptulose D-古洛-庚铜糖
- D-ido-heptulose D-艾杜-庚铜糖
- D-manno-heptulose D-甘露-庚铜糖
- D-talo-heptulose D-塔罗-庚铜糖
- hereditary disease 遗传病
- herpesvirus 疱疹病毒
- heterochromatin(dense chromatin)
异染色质(稠密染色质)
- heterochromatinization 异染色质化
- heterochromosome 异染色体
- heteroduplex 异源双链, 杂交双链
- heterogeneous nuclear RNA 核内不均一核糖核酸
- heterogalactosidase 异半乳糖苷酶
- heteroglycan 杂聚糖
- heterokaryon 异核体, 杂核体
- heterooligosaccharide 杂寡糖
- heteropolysaccharide 杂多糖
- n-hexacosanoic acid(cerotic acid)
正-二十六(烷)酸, 蜡酸
- n-hexadecanoic acid(palmitic acid)
正-十六(烷)酸, 软脂酸
- hexadecanoyl coenzyme A dehydrogenase
软脂酰辅酶 A 脱氢酶
- 9-hexadecanoic acid(palmitoleic acid)
棕榈脱酸, 9-十六碳烯酸
- hexahydroxycyclohexane(inositol)
肌醇, 环己六醇
- hexan 己烷
- n-hexanoic acid(caproic acid) 正-己酸
- hexasaccharide 己糖类
- hexitol 己糖醇
- hexokinase 己糖激酶
- hexonic acid 己糖酸
- hexosamines 己糖胺, 氨基己糖
- hexosamidase A 己糖酰胺酶 A
- hexose 己糖
- hexose diphosphate 二磷酸己糖
- hexoseisomerase 己糖异构酶
- hexose phosphate 磷酸己糖
- hexose phosphate isomerase 磷酸己糖异构酶
- hexose phosphate shunt 磷酸己糖旁路
- hexulose 己酮糖
- hexuronic acid 己糖醛酸
- high density lipoprotein(HDL) 高密度脂蛋白
- high energy bond 高能键
- high energy phosphate 高能磷酸
- high repeat sequence 高重复序列
- hippuric acid 马尿酸
- histamine 组胺
- histidase 组氨酸酶
- L-histidine L-组氨酸
- histidine ammonia-lyase 组氨酸 NH₂ 裂合酶
- histidine decarboxylase 组氨酸脱羧酶
- histidine ferroporphyrin 组氨酸亚铁原卟啉
- histidinenemia 组氨酸血症
- histidinal 组氨酸
- histidinol 组氨酸醇
- histidinol dehydrogenase 组氨酸醇脱氢酶
- L-histidinol phosphate L-组氨酸醇磷酸
- histidinol phosphatase 组氨酸醇磷酸酶
- L-histidinol phosphate-glutamate aminotransferase
L-组氨酸醇磷酸-谷氨酸氨基转移酶
- histidinol phosphate phosphatase
组氨酸醇磷酸酶
- histidinol phosphate transaminase
组氨酸醇磷酸转氨酶
- histidyl-acryl peptides 组氨酸-丝氨酸肽类
- histone 组蛋白
- histone repression 组蛋白阻遏作用
- Hogness box Hogness 盒

- holocarboxylase 羧化全酶
- holocarboxylase synthetase 羧化全酶合成酶
- holoenzyme 全酶
- cis-homoaconitase 顺高乌头酸酶
- cis-homoaconitic acid 顺高乌头酸
- homoaconitate hydratase 高乌头酸水合酶
- homoarginine 高氨酸
- homodimer 同二聚体
- homoserine 高丝氨酸
- homocitrate synthase 高柠檬酸合酶
- homocitric acid 高柠檬酸
- homoisocitric acid 高异柠檬酸
- homocysteine 高半胱氨酸
- homocysteine methyltransferase 高半胱氨酸甲基转移酶
- homocystine 高胱氨酸
- homogentisate oxidase 尿黑酸氧化酶
- homogentisic acid 尿黑酸
- homogentisic acid 1,2-dioxygenase 尿黑酸 1,2-二加氧酶
- homogentisic acid oxygenase 尿黑酸加氧酶
- homogentisase 尿黑酸酶
- homogentisate oxidase 尿黑酸氧化酶
- holoenzyme 全酶
- homologous protein 同源蛋白质
- homopolymer 同聚物,均聚体
- homopolysaccharide 同聚多糖
- homoserine phosphate 高丝氨酸磷酸
- homoserine dehydrogenase 高丝氨酸脱氢酶
- homoserine kinase 高丝氨酸激酶
- homoserine succinylase 高丝氨酸琥珀酸酶
- homoserine transacetylase 高丝氨酸转乙酰基酶
- hormone 激素
- hormone receptor 激素受体
- hormone response element (HRE) 激素反应元件
- housekeeping gene 管家基因
- human chorionic gonadotropin (chorionic gonadotropin) 人绒毛膜促性腺激素
- human chorionic somatotropin (HCS) 人绒毛膜生长素
- human genome project 人类基因组计划
- human immunodeficiency virus (HIV) 人类免疫缺陷病毒
- Huntington's disease (HD) 亨廷顿病
- hyaluronic acid 透明质酸
- hyaluronidase 透明质酸酶
- hybridization technique 杂交技术
- hybrid tumor 杂交瘤
- hydantoin 5-propionic acid 乙内酰脲 5-丙酸
- hydrase 水化酶
- hydride ion 氢阴离子,带一对电子的质子
- hydrindatin 还原卟啉三酮
- hydrocarbons 烃类,碳氢化合物
- hydrocortisone (cortisol) 氢化可的松(皮质醇)
- hydrodynamic pressure 流体压
- hydrogen acceptor 受氢体
- hydrogen activation 氢激活
- hydrogenase 氢化酶
- hydrogen bond 氢键
- hydrogen carrier 氢载体
- hydrogen cyanide 氰化氢
- hydrogen ion concentration 氢离子浓度
- hydrogen peroxide 过氧化氢
- hydrogen sulfide 硫化氢
- hydrogen transfer 转氢
- D- α -hydroperoxyfatty acid D- α -氢过氧脂肪酸
- hydrolase 水解酶
- hydrolysis 水解
- hydroperoxidase 氢过氧化物酶
- hydrophilic group 亲水基
- hydrophobic bond 疏水键
- hydrophobic group 疏水基
- hydropyrimidine hydrase 氢嘧啶水化酶
- hydroquinone 氢醌
- hydrostatic pressure 静水压
- α -hydroxy- ϵ -acetamidocaproic acid α -羟- ϵ -乙酰氨基己酸
- hydroxocobalamin 羟钴胺素
- β -hydroxy acid dehydrogenase β -羟酸脱氢酶
- β -hydroxy acid oxidative decarboxylase β -羟酸氧化脱羧酶
- β -hydroxyacyl-ACP dehydrase β -羟酰基-ACP脱水酶
- β -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase β -羟酰基辅酶 A 脱氢酶
- β -hydroxyacyl-CoA epimerase β -羟酰基-CoA 差向异构酶
- β -hydroxyacyl dehydrase β -羟酰基脱水酶
- β -hydroxyacyl dehydrogenase β -羟酰基脱氢酶
- hydroxyalysine 6-羟基羟赖氨酸
- 2-hydroxy-4-aminobutyrate 2-羟-4-氨基丁酸
- α -hydroxy- ϵ -aminocaproic acid α -羟- ϵ -氨基己酸
- 11- β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione 11- β -羟雄(固)4-烯-3,17-二酮
- 3-hydroxyanthranilate oxygenase 3-羟基-2-氨基苯甲酸加氧酶
- 3-hydroxyanthranilic acid oxidase 3-羟基-2-氨基苯甲酸氧化酶
- 3-hydroxyanthranilic acid 3,4-dioxygenase 3-羟邻氨基甲酸 3,4-二加氧酶
- hydroxyapatite 羟磷化石
- D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase D- β -羟丁酸脱氢酶
- D- β -hydroxybutyric acid D- β -羟丁酸
- γ -hydroxybutyric acid γ -羟丁酸
- D- β -hydroxybutyryl-acyl carrier protein D- β -羟丁酰-酰基载体蛋白
- L- β -hydroxybutyryl coenzyme A L- β -羟丁酰辅酶 A
- hydroxycobalamin 羟钴胺素
- α -hydroxy- γ -carboxypropyl thiamine pyrophosphate α -羟- γ -羧丙基焦磷酸硫胺素
- 25-hydroxycholecalciferol 25-羟胆钙化醇,25-羟维生素 D₃
- 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase 25-羟维生素 D₃-1-羟化酶
- 7 α -hydroxycholesterol 7 α -羟胆固醇
- 17-hydroxycorticosterone (cortisol) 17-羟皮质酮,氢化可的松,皮质醇
- β -hydroxydecanoylthioester dehydrase β -羟癸酰硫酯脱水酶
- 2-(β -hydroxyethyl)-4-methylthiazole 2-(β -羟乙基)-4-甲基噻唑
- α -hydroxyethyl thiamine pyrophosphate α -羟乙基焦磷酸硫胺素
- hydroxy fatty acids 羟脂肪酸
- γ -hydroxyglutamic acid δ -semialdehyde γ -羟谷氨酸- δ -半醛
- hydroxy group 羟基
- hydroxyhematin (hematin) 羟高铁血红素
- 6-hydroxyindole 6-羟吲哚
- 5-hydroxyindole acetic acid 5-羟吲哚乙酸
- 5-hydroxyindolepyruvic acid 5-羟吲哚丙酮酸
- hydroxyindole-O-methyltransferase 羟基吲哚-O-甲基转移酶
- β -hydroxyisobutyric acid β -羟异丁酸
- β -hydroxyisobutyryl coenzyme A β -羟异丁酰辅酶 A
- β -hydroxy-isobutyric acid dehydrogenase β -羟异丁酰 CoA 水解酶
- β -hydroxyisovaleric aciduria β -羟异戊酸尿
- hydroxy keto acids 羟酮酸
- α -hydroxy- β -keto adipic acid α -羟- β -酮己二酸
- 3-hydroxykynurenine 3-羟犬尿氨酸
- hydroxylamine 羟胺
- hydroxylamine reductase 羟胺还原酶
- hydroxylase 羟化酶
- hydroxylation 羟化作用

- 2-hydroxylignoceric acid (cerebronic acid) 2-羟(基)二十四(烷)酸
- hydroxyl ion 羟离子
- hydroxyl radical 羟游离基
- hydroxyllysine 羟赖氨酸
- hydroxymethyl-羟甲基
- 5-hydroxymethylcytosine (HMC) 5-羟甲基胞嘧啶
- 5-hydroxymethylcytosine α -glucoside 5-羟甲基胞嘧啶- α -葡萄糖苷
- 5-hydroxymethyldeoxyuridylylate 5-羟甲基脱氧尿苷酸
- 5-hydroxymethyl-2,4-dioxypyrimidine (5-hydroxymethyluracil) 5-羟甲基-2,4,二氧嘧啶(5-羟甲基尿嘧啶)
- 5-hydroxymethylfurfural 5-羟甲基糠醛
- β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A β -羟- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A
- hydroxy methylglutaryl coenzyme A lyase 羟甲基戊二酰辅酶 A 裂合酶
- 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶
- 5-hydroxymethyl-2-oxy-4-aminopyrimidine (5-hydroxymethylcytosine) 5-羟甲基-2-氧-4-氨基嘧啶(5-羟甲基胞嘧啶)
- hydroxymethylpyrimidine kinase 羟甲基嘧啶激酶
- hydroxymethylpyrimidine phosphokinase 羟甲基嘧啶磷酸激酶
- 5-hydroxymethyluracil 5-羟甲基尿嘧啶
- β -hydroxymyristic acid β -羟基豆蔻酸
- 12-hydroxyoleic acid (ricinoleic acid) 12-羟油酸, 蓖麻酸
- o-hydroxyphenylacetic acid 邻-羟苯乙酸
- p-hydroxyphenyllactic acid 对-羟苯乳酸
- p-hydroxyphenylpyruvate oxidase 对-羟苯丙酮酸氧化酶
- p-hydroxyphenylpyruvate 对-羟苯丙酮酸
- 4-hydroxyphenylpyruvic acid 4-羟苯丙酮酸
- 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase 4-羟苯丙酮酸二加氧酶
- 17- α -hydroxypregnenolone 17- α -羟孕烯醇酮
- 17-hydroxypregesterone 17-羟黄体酮
- hydroxyproline 羟脯氨酸
- hydroxyprolinemia 羟脯氨酸血症
- hydroxyproline oxidase 羟脯氨酸氧化酶
- 3-hydroxypropionate 3-羟丙酸
- 3-hydroxypropionate dehydrogenase 3-羟丙酸脱氢酶
- β -hydroxypropionyl coenzyme A β -羟丙酰辅酶 A
- β -羟丙酰辅酶 A
- 4-hydroxypyrazol(3,4-d)pyrimidine (allpurion) 别嘌呤酸
- 4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid (hydroxyprolin) 羟脯氨酸(4-羟吡咯烷-2-羧酸)
- 8-hydroxyquinaleic acid 8-羟喹啉-2-羧酸
- 10-hydroxystearic acid 10-羟硬脂酸
- 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 3 α -羟类固醇脱氢酶
- 16-hydroxytestosterone 16-羟-睾酮
- 3'-hydroxytyrosine 3'-羟甲状腺原氨酸
- 5-hydroxytryptamine (serotonin) 5-羟色胺
- hydroxytryptophan 5-羟色氨酸
- 5-hydroxytryptophan decarboxylase 5-羟色氨酸脱羧酶
- 5-hydroxytryptophol 5-羟色醇, 5-羟- β -吲哚乙醇
- o-hydroxytyramine 邻羟酪胺(3,4-二羟苯乙酸)
- hypercalcemia 高血钙
- hypercholesterolemia 高胆固醇血症
- hyperchromic effect 增色效应
- hyperchromicity 增色性
- hyperglycemia 高血糖症
- hyperglycemic-glycogenolytic factor (glucagon) 胰高血糖素
- hyperglycinemia 高甘氨酸血症
- hyperhemoglobinemia 高血红素血症
- hyperinsulinism 胰岛素过多症
- hyperlipoproteinemia 高脂蛋白血症
- hyperlipidemia 高脂血症
- hyperlysinemia 赖氨酸血症
- hyperosmotic effect 高渗效应
- hyperoxaluria 高草酸尿症
- hyperpotassemia 高血钾症
- hyperprolinemia I 高脯氨酸血症 I
- hypersensitivity 过敏性
- hypertonic contraction 高渗性收缩
- hypertonic solution 高渗溶液
- hypertonicity 高渗性
- hypoalbuminemia 低清蛋白血症
- hypocalcemia 低血钙
- hypochromic effect 减色效应
- hypochromicity 减色性
- hypofibrinogenemia 低纤维蛋白血症
- hypoglycemia 低血糖(症)
- hypoglycemic coma 低血糖昏迷
- hypoglycemic factor (insulin) 低血糖因子(胰岛素)
- hypophosphatemia 低磷酸盐血症
- hypotaurine 亚牛黄酸, 氨基亚磷酸
- hypotension 低渗, 低张
- hypotonic contraction 低渗性收缩
- hypotonic expansion 低渗性膨胀
- hypotonic solution 低渗溶液
- hypoxanthine 次黄嘌呤
- hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
- hypoxanthine ribonucleotide (inosine 5'-mono-phosphate) 次黄嘌呤核苷酸
- hypoxanthine ribotide (inosine 5'-monophosphate) 次黄嘌呤核苷酸
- I**
- ibotenic acid 熟蕈草氨酸
- ichitulin 鱼卵磷蛋白
- D-idose D-艾杜糖
- α -L-iduronase α -L-艾杜糖醛酶
- iduronic acid 艾杜糖醛酸
- IGF binding protein IGF 结合蛋白
- phenylketonuria 苯丙酮尿症
- imidazole 咪唑, 异吡唑
- imidazoleacetic acid 咪唑乙酸
- imidazole acetal phosphate 咪唑缩醛磷酸
- imidazole acetal phosphatide 咪唑缩醛磷脂
- β -imidazolealanine (histidine) β -咪唑丙氨酸(组氨酸)
- imidazoleglycerol phosphate 咪唑甘油磷酸
- imidazoleglycerol phosphate dehydrogenase 咪唑甘油磷酸脱氢酶
- imidazoleglycerol phosphate dehydratase 咪唑甘油磷酸脱水酶
- imidazole group 咪唑基
- imidazolepyruvic acid 咪唑丙酮酸
- imidazole ring 咪唑环
- imidazolone propionase 咪唑酮丙酸酶
- 4-imidazolone-5-propionic acid 4-咪唑酮-5-丙酸
- imino acid 亚氨基酸
- immobilized enzyme 固相酶
- insemination 无限增殖化
- immune response 免疫反应
- immunoelectrophoresis 免疫电泳
- immunoglobulin (Ig) 免疫球蛋白
- immunological activity 免疫活性
- IMP cyclohydrolase 次黄嘌呤核苷酸环水解酶
- inclusion body 内含体
- incompatibility 不相容性
- incorporation 掺入作用
- incretion 内分泌
- incrine 内分泌
- indole 吲哚
- indoleacetic acid 吲哚乙酸

- β -indole alanine(tryptophan)色氨酸
 indolglycerol phosphate 吲哚甘油磷酸酯
 indole-3-glycerolphosphate synthase
 吲哚-3-甘油磷酸合酶
 indolepyruvic acid 吲哚丙酮酸
 indole-5,6-quinone 吲哚-5,6-醌
 indoxyl 吲哚酚
 indoxylsulfate 吲哚硫酸(酯)
 induce 诱导
 inducer 诱导物
 induced enzyme 诱导酶
 induced-fit conformation“诱导适合”构象
 induction 诱导作用
 induction repair 诱导修复 inductor 诱导剂
 infection 感染
 informational macromolecule 信息大分子
 informational RNA(messengerRNA)信使 RNA
 informoer 信息子
 informosome 信息体
 infraredspectroscopy 红外分光镜
 inheritance 遗传
 inhibition 抑制作用
 inhibitor 抑制剂
 inhibitory modulator 抑制调节物
 insertion mutagenesis 插入突变
 insertion vector 插入型载体
 initial velocity 初速度
 initiation 起始,起动力
 initiation codon 起动力密码子,起动力信号
 initiation factor 起动力因子,起动力因子
 initiator element 起动力元件
 initiator sequence 起动力序列
 inner membrane 内膜
 inner membrane sphere 内膜球体
 inoculation 接种
 inorganic composition 无机成分
 inosine 次黄(嘌呤核)苷,肌苷
 inosine diphosphate 次黄(嘌呤核)苷二磷酸
 inosine monophosphate(IMP)次黄嘌呤核苷酸
 inosine-5'-phosphate dehydrogenase 次黄嘌呤核苷酸脱氢酶
 inosine triphosphate 次黄(嘌呤核)苷三磷酸
 inosinic acid(inosine monophosphate)次黄嘌呤核苷酸(次黄苷酸)
 inosinase 次黄(嘌呤核)苷酸酶
 inositides 次黄(嘌呤核)苷酸,肌苷酸
 inositol 肌醇
 inositol triphosphate(IP₃)肌醇三磷酸
 in situ hybridization 原位杂交
 instruction 指令
 integration 整合,整体性
 interferon 干扰素
 interleukin(IL)白细胞介素
 intermediate density lipoprotein 中密度脂蛋白
 internal ribosome entry site(IRES)核糖蛋白体
 进入位点
 internalization 内移作用
 intervening sequence 插入序列
 interinsic factor(IF)内因子
 interon 内含子
 intermediary metabolism 中间代谢
 internal compensation 内部补偿
 internucleotide linkage 核苷酸间键
 interstitial cell-stimulating hormone 促间质细
 胞激素,促黄体生成激素
 intertwinning number 互绕数
 inositol hexaphosphate 肌醇六磷酸(酯)
 inositol oxygenase 肌醇加氧酶
 insecticide 杀虫剂
 insertase 插入酶
 insertion 插入
 insulin 胰岛素
 insulin like growth factor(IGF)胰岛素样生长因
 子
 insulinase 胰岛素酶
 intervening 插入序列
 intramolecular migration 分子内迁移作用
 intrinsic factor 内(源)因素
 intron 内含子
 invariant residue 不变残基
 invert sugar 转化糖
 invertase 转化酶,蔗糖酶
 inverted repeat 反向重复
 inverted repeat sequence 反向重复序列
 in vitro 体外(活体外),试管内
 in vivo 体内,活体内
 iodide 碘化物
 iodination 碘化作用
 iodine 碘
 indine number 碘价,碘值
 iodacetamide 碘乙酰胺
 iodacetate 碘乙酸(盐)
 iodogorgic acid(3,5-diiodotyrosine)3,5-二碘
 酪氨酸
 iodopsin 视青质
 iodopyracet clearance test 碘吡拉舍清除率试验
 iodothyronine 碘化甲状腺氨酸
 iodotyrosin 碘化酪氨酸
 5-iodouridine-2'(3')-phosphate
 5-碘尿苷-2'(3')-磷酸
 ion channel 离子通道
 ion exchange chromatography 离子交换层析
 ionic strength 离子强度
 ionization constant 解离常数
 β -ionone β -萜香酮
 ionophore 离子载体
 ionophoresis 离子泳
 ion permeability 离子通透性
 iron-flavoprotein 含铁黄素蛋白
 iron- α -ketoglutarate hydroxylase
 含铁- α -酮戊二酸羟化酶
 iron-porphyrin 铁卟啉
 iron-porphyrin protein 铁卟啉蛋白质
 iron-protoporphyrin 铁原卟啉
 iron-sulfur protein 铁硫蛋白
 isoacceptor 同功受体
 isalloxazine 异咯嗪
 isobutyl chlorocarbonate 氯甲酸异丁酯
 isobutyl chloroformate 氯甲酸异丁酯
 isobutyl coenzyme 异丁基辅酶
 isocaproic aldehyde 异己醛
 isocitrate(isocitrate lyase)异柠檬酸裂解酶
 isocitrate 异柠檬酸(盐)
 isocitrate dehydrogenase 异柠檬酸脱氢酶
 isodesmosine 异锁链(赖氨酸)
 isoelectric point 等电点
 isoelectric precipitation 等电沉淀
 isoelectric state 等电状态
 isoleucine(Ile)异亮氨酸
 isoenzyme 同工酶
 isoferritin 异铁蛋白
 D-isoglutamine D-异谷氨酰胺
 isohydric shift 等氢离子转移
 isoionic point 等离子点
 isoleucine 异亮氨酸
 isoleucyl-tRNA synthetase 异亮氨酰-tRNA
 合成酶
 isomaltase 异麦芽糖酶
 α -isomaltose α -异麦芽糖
 isomer-异构体
 isomerase 异构酶
 isomerism(cis-trans)顺-反异构
 isomerization 同分异构化反应
 isomorphous replacement 同晶替换
 isoniazide(isonicotinylhydrazide)异烟肼
 N⁶-2-isopentenyladenosine N⁶-2-异戊烯腺
 苷
 isopentenyl pyrophosphate 异戊烯焦磷酸酯
 isopentenyl pyrophosphate isomerase 异戊烯焦磷
 酸异构酶
 isophane insulin 鱼精蛋白锌胰岛素
 isoprene 异戊二烯
 isoprenol 异戊二烯醇
 isoprenoid side chain 异戊二烯侧链
 isopropylmalate dehydratase 异丙基苹果酸脱水
 酶

isopropylmalate dehydrogenase 异丙基苹果酸脱氢酶

isopropylmalate isomerase 异丙基苹果酸异构酶

isopropylmalate synthetase 异丙基苹果酸合成酶

isopropylmalic acid 异丙基苹果酸

isopropylthiogalactoside (IPTG) 异丙基硫代半乳糖苷

isopycnic density gradient centrifugation 等密度梯度离心[法]

isosmotic 等渗的

isosuccinyl coenzyme A (methylmalonyl coenzyme A) 异琥珀酰辅酶 A

isothiocyanate 异硫氰酸(盐)

isothiourrea 异硫基尿素

isotocin 硬骨鱼催产素

isotonic contraction 等张收缩

isotonic expansion 等张扩张

isotonic solution 等渗溶液

isotope 同位素

isotope dilution analysis 同位素稀释分析法

isovaleric acidemia 异戊酸血症

isovaleryl coenzyme A 异戊酰辅酶 A

isovaleryl coenzyme A dehydrogenase 异戊酰辅酶 A 脱氢酶

isozyme 同工酶

J

jalapinolic acid 11-羟(基)十六(烷)酸

jaundice 黄疸

jeoric acid 十八(碳)三烯酸

jecorin 肝糖磷脂

joining enzyme 连接酶

josamycin 交沙霉素

joule 焦耳(能量单位)

junk DNA 无用 DNA, 无功能 DNA(基因组中)

K

kainic acid 高粱酸

kallidin 赖氨酰舒缓激肽, 胰激肽

kallidinogen 胰激肽原

kanamycin 卡那霉素

kallikreins 激肽释放酶

KcsA 钾通道

keratan sulfate 硫酸角质素

keratin 角蛋白

keratin sulfate 硫酸角蛋白

ketal 酮缩醇, 缩酮

ketimine 酮亚胺

α -keto- ϵ -acetamidocaproic acid

α -酮- ϵ -乙酰氨基己酸

keto acid 酮酸

keto acid decarboxylase 酮酸脱羧酶

keto acid dehydrogenase 酮酸脱氢酶

β -ketoacyl coenzyme A β -酮脂酰辅酶 A

β -ketoacyl-CoA thiolase β -酮脂酰辅酶 A 硫解酶

β -ketoacyl-ACP reductase β -酮酰基-ACP 还原酶

β -ketoacyl-ACP synthase β -酮酰基-ACP 合酶

α -keto adipic acid α -酮己二酸

α -keto- ϵ -amino caproic acid α -酮- ϵ -氨基己酸

7-keto- δ -aminopelargonic acid 7-酮- δ -氨基壬酸

α -ketobutyric acid α -酮丁酸

α -keto- β -carboxyisocaproic acid

α -酮- β -羧基己二酸

4-keto-6-deoxynucleoside diphosphate

4-酮-6-脱氧核苷二磷酸

4-ketodeoxy sugar 4-酮脱氧糖

α -ketofatty acid α -酮脂肪酸

ketogenesis 生酮作用

ketogenic amino acid 生酮氨基酸, 成酮氨基酸

3-keto L-gulonolactone 3-酮 L-古洛糖酸内酯

α -ketoglutaric acid α -酮谷酰胺酸

α -ketoglutarate α -酮戊二酸(盐)

α -ketoglutarate dehydrogenase

α -酮戊二酸脱氢酶

α -ketoglutarate-glyoxylate carboligase

α -酮戊二酸-乙醛酸, 醛连接酶

α -ketoglutaric acid α -酮戊二酸

ketohexose 己酮糖

α -keto- γ -hydroxyglutaric acid

α -酮- γ -羟戊二酸

ketoisocaproic 酮异丙酸

α -ketoisocaproate acid α -酮异己酸

α -ketoisovaleric acid dehydrogenase

α -酮戊酸脱氢酶

α -ketoisovaleric acid α -酮异戊酸

α -keto- β -methylvaleric acid α -酮- β -甲基戊酸

ketones 酮类

ketone bodies 酮体

ketonemia 酮血症

ketoctulosonic acid 酮辛酮糖酸

ketopantoic acid 酮泛解酸

3-keto-6-phospho-gluconic acid

3-酮-6-磷酸葡萄糖酸

2-ketopropanol 2-酮丙醇

ketose 酮糖

ketose reductase 酮糖还原酶

ktosis 酮症

ketosteroids 酮类固醇类

β -ketothiolase β -酮硫解酶

ketotriose 酮丙糖

kilocalorie 千卡(kcal)

key enzyme 关键酶

kinase 激酶

kinetics 动力学

kinetic equilibrium 动态平衡

kenetin 激动素

kininogen 激肽原

kinin 激肽

klenow fragment klenow 片段

kynurenic acid 犬尿酸

kynureninase 犬尿氨酸酶

kynurenine 犬尿氨酸

kynurenine formylase 犬尿氨酸甲酰化酶

kynurenine-3-hydroxylase 犬尿氨酸-3-羟化酶

kynurenine-3-monoxygenase 犬尿氨酸-3-单加氧酶

L

labeled atom 标记原子

labile factor (proaccelerin) 不稳定因素(促凝血球蛋白原)

L- β -hydroxy acyl CoA L- β -羟化酶

laccase 漆酶, 对苯二酚氧化酶

lac operon lac 操纵子

lactam-lactim tautomerism (pruines) 环酰胺-环酰胺互变异构现象(嘌呤的酮式-烯醇式互变现象)

lactase 乳糖酶

lactate 乳酸(盐)

lactate acidosis 乳酸酸中毒

lactate dehydrogenase 乳酸脱氢酶

lactate-malate-transhydrogenase 乳酸-苹果酸转氢酶

lactic acid 乳酸

lactic acid dehydrogenase (lactate dehydrogenase) 乳酸脱氢酶

lactic acid monooxygenase 乳糖单加氧酶

α -1ctoalbumin α -乳清蛋白

lactogenic hormone (prolactin) 生乳激素

β -lactoglobulin β -乳球蛋白

lactonase 内酯酶

lactone 内酯

lactoperoxidase 乳过氧化物酶

lactose 乳糖

lactose synthetase 乳糖合成酶

lactosuria 乳糖血症

lactosyl ceramide galactosylhydrolase 乳糖苷神经

- 酰胺半乳糖苷水解酶
 lactosyl ceramidase 乳糖苷神经酰胺酶
 lactylglutathione 乳酰谷胱甘肽
 lagging strand 滞后链, 从链
 Laki - Lorand factor (fibrinase) 血纤维形成酶
 Laminarin 昆布多糖
 Lange's colloidal gold test Lange 氏胶体金试验
 lanosterol 羊毛脂甾醇, 羊毛固醇
 LATS (long - acting thyroid stimulator) 长作用甲状腺刺激剂
 lauric acid 月桂酸
 law of mass action 质量作用定律
 λ bacteriophage λ 噬菌体
 L - configuration L - 构型
 L - 3,4 - dihydroxyphenylalanine
 L - 3,4, 二羟苯丙氨酸 (左旋多巴)
 leader peptide 前导肽
 leader sequence 前导序列
 leading strand 前导链
 lecithin (phosphatidylcholine) 卵磷脂 (磷脂酰胆碱)
 lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT) 卵磷脂胆固醇酯转移酶
 L - leucine L - 亮氨酸
 leucine aminopeptidase 亮氨酸氨基肽酶
 leucine transaminase 亮氨酸转氨酶
 L - leucylglycine L - 亮氨酸甘氨酸
 leucylglycylglycylglycine 亮氨酸甘氨酸甘氨酸甘氨酸
 lac repression protein Lac 阻遏蛋白
 leukotrienes 白三烯
 levansucrase 蔗糖 - 6 - 果糖基转移酶
 levo - 左旋
 levorotatory designation 左旋标示
 levulinic acid 乙酰丙酸
 levulose (D - fructose) 果糖
 ligase 连接酶
 ligase chain reaction 连接酶链反应
 ligand 配基, 配位体
 ligandin 配体蛋白
 ligand gated channels 配体 - 闸门通道
 light chain (immunoglobulin) 轻链 (免疫球蛋白)
 light harvesting complex 捕光色素复合体
 light quantum 光子
 light scattering 光散射
 lignoceric acid 二十四烷酸
 lingual lipase 舌脂酶
 limit dextrins 极限糊精
 liner minus 19 intervening sequence (L - 19 IVS) L - 19 插入序列
 linkage 链
 linker 接头
 linoleic acid 亚油酸, 十八碳二烯酸
 linolenic acid 亚麻酸, 十八碳三烯酸
 linoleate 亚麻酸
 lipase 脂肪酶
 lipemia 脂血
 lipid 脂肪
 lipid bilayer 脂双分子层
 lipid soluble hormones 脂溶性激素
 lipid soluble vitamin 脂溶性维生素
 lipoamide 硫辛酰胺
 lipoamide dehydrogenase 硫辛酰胺脱氢酶
 lipoamide disulfide 硫辛酰胺二硫化物
 lipoamino acid 脂氨基酸
 lipote acetyltransferase (dihydrolipoyl transacetylase) 二硫辛酰乙酰转移酶
 lipogenesis 脂肪形成
 lipoglobulin 脂球蛋白
 lipoic acid 硫辛酸
 lipolysis 脂解作用
 lipolytic hormone 脂解激素
 lipophilic 亲脂性的
 lipopolysaccharide 脂多糖
 lipoprotein 脂蛋白
 lipoprotein lipase 脂蛋白脂肪酶
 lipotropic hormone (adipokinetic hormones) 脂肪释放激素
 lipotropic substance 抗脂肪肝物质
 β - lipotropin β - 脂肪酸释放激素
 lipotropins 脂肪酸释放激素类
 lipoxygenase 脂氧合酶, 脂加氧酶
 lipoyl dehydrogenase 硫辛酰脱氢酶
 lipoyllysyl 硫辛酰赖氨酸
 lipuria 脂尿
 liquid scintillation counter 液体闪烁计数器
 lithocholic acid 石胆酸
 Lock - and key theory 锁钥学说
 locus 位点
 long terminal repeat (LTB) 长末端重复
 loop 环
 long - term - potentiation 长期增效作用
 Lowry method for protein determination Lowry 氏法测定蛋白质
 low density lipoprotein (LDL) 低密度脂蛋白
 lumichrome 光色素, 二甲基异咯嗪
 lumiflavin 光黄素, 三甲基异咯嗪
 lumirhodopsin 光视紫红质
 luteinizing hormone (LH, ICSH) 促黄体生成素
 luteinizing hormone releasing factor (LRF) 促黄体生成激素释放因子
 leuteotropin (prolactin) 催乳激素
 lyase 裂合酶
 lycopene 番茄红素
 lyophilic colloid 亲水胶体
 lyophobic colloid 疏水胶体
 lysin 细胞溶素
 L - lysine L - 赖氨酸
 lysine decarboxylase 赖氨酸脱羧酶
 lysine dihydrochloride 赖氨酸二盐酸盐
 lysine - ketoglutarate reductase 赖氨酸 - 酮戊二酸还原酶
 lysine - monohydrochloride 赖氨酸单盐酸盐
 lysine oxidase 赖氨酸氧化酶
 lysine oxygenase 赖氨酸加氧酶
 lysine vasopressin 赖氨酸后叶加压素
 lysis 溶菌
 lysogeny 溶原, 溶原性
 lysolecithin 溶血卵磷脂, 溶血磷脂酰胆碱
 lysophosphatidic acid 溶血磷脂酸
 lysophosphatidyl choline 溶血磷脂酰胆碱
 lysophosphatidyl ethanolamine 溶血磷脂酰乙醇胺
 lysophospholipase 溶血磷脂酶
 lysophospholipid 溶血磷脂
 lysophosphoglyceride 溶血磷脂甘油酯
 lysosomal acid phosphatase 溶酶体的酸性磷酸酶
 lysosome 溶酶体
 lysozyme 溶菌酶
 lysyl - bradykinin 赖氨酸舒缓激肽
 lytic agent 溶解剂
 D - lyxose D - 来苏糖
- ## M
- maodougallin 甲基胆甾烯二醇
 macro - 大
 macrocytic anemia 巨幼细胞性贫血
 α_2 - macroglobulin α_2 - 巨球蛋白
 M₁₃ bacteriophage M₁₃ 噬菌体
 macroglobulinemia 巨球蛋白血症
 macromolecule 大分子
 magnesium fluorophosphate 氟磷酸镁
 magnetic molecule 磁性分子
 magnetic moment 磁矩
 magnetic susceptibility 磁体感受性
 major groove 大沟
 malabsorption of lipid 脂类吸收障碍
 malate 苹果酸 (盐)
 malate - aspartate shuttle 苹果酸 - 天冬氨酸穿梭
 malate dehydrogenase 苹果酸脱氢酶
 malate - isocitrate cycle 苹果酸 - 异柠檬酸循环
 malate synthetase 苹果酸合成酶
 male sex hormone 雄性激素

- maleic acid 顺丁烯二酸
- 4 - maleoylacetacetic acid 4 - 顺丁烯二酰乙酸
- maleoylacetacetic acid isomerase 顺丁烯二酰乙酸异构酶
- malic acid 苹果酸
- malic enzyme 苹果酸酶
- malonate 丙二酸盐
- malonic acid 丙二酸
- malonic semialdehyde 丙二酸半醛
- malonyl coenzyme A 丙二酰单酰辅酶 A
- malonyl semialdehyde CoA 丙二酰半醛 CoA
- malonyl transacylase 丙二酰转酰基酶
- malonyl transferase (MT) 丙二酰基转移酶
- maltase 麦芽糖酶
- β - maltose β - 麦芽糖
- mannans 甘露聚糖
- D - mannitol D - 甘露醇
- D - mannoheptulose D - 甘露庚酮糖
- α - D - mannopyranose α - D - 吡喃甘露糖
- D - mannosamine D - 氨基甘露糖
- mannose 甘露糖
- mannose - 1,6 - diphosphate 甘露糖 1,6 - 二磷酸
- mannose phenylhydrazine 甘露糖苯肼
- mannose - 1 - phosphate 甘露糖 1 - 磷酸
- α - mannosidase α - 甘露糖苷酶
- mannosidosis 甘露糖苷过多症
- D - manuronic acid D - 甘露糖醛酸
- manometric technique 测压技术
- maple sugar 槭糖
- maple syrup urine disease 槭糖尿病
- marker rescue 标志补救
- mass action law 质量作用定律
- mass spectrometer 质谱仪
- mast cell 柱细胞
- maternal retinitis pigmentosa - RP RP 母系视网膜炎
- matrix 基质
- maturation factor 成熟因子
- mature mRNA 成熟 mRNA
- megaloblastic anemia 巨成红细胞性贫血
- melanin 黑色素
- melanocyte inhibitory factor 黑色素细胞抑制因子
- melanocyte regulatory factors 黑色素细胞调节因子
- melanocyte - stimulating hormone 促黑色素细胞激素
- melanophore - stimulating hormone (melanocyte stimulating hormone) 促黑色素细胞激素
- melatonin 褪黑激素
- melting factor 熔解因子
- melting temperature 熔解温度
- melting curve of DNA DNA 熔解曲线
- membrane 膜
- membrane anchor sequence 膜锚序列
- membrane fluidity 膜流动性
- membrane fusion 膜融合
- membrane potential 膜电位
- membrane protein 膜蛋白质
- membrane receptor binding hormone 膜受体结合激素
- membrane skeleton 膜骨架
- menadione α - 甲基萘醌, 维生素 K₃
- menadione sodium bisulfite 甲萘醌亚硫酸氢钠
- menadione sodium diphosphate 甲萘醌二磷酸钠
- mercaptoethanol 巯基乙醇
- mercaptoethanolamine 巯基乙醇胺
- mercaptoethylamine 巯基乙醇胺
- 6 - mercaptopurine 巯基嘌呤
- β - mercaptopyruvic acid 巯基丙酮酸
- mercapturic acid 巯基尿酸
- meso acid 内消旋酸
- meso atom 内消旋原子
- meso - bilirubinogen 四氢中胆红素
- meso carbon atom 内消旋碳原子
- mesoform 内消旋型
- meso - α ϵ - diamino pimelic acid 内消旋 - α ϵ - 二氨基庚二酸
- mesoporphyrin 中卟啉
- mesosome 中隔体/间体
- mesosymmetry 内消旋对称
- mesotocin 中催产素
- messenger ribonucleic acid (mRNA) 信使 RNA
- metabolic acidosis 代谢性酸中毒
- metabolic alkalosis 代谢性碱中毒
- metabolic antagonism 代谢拮抗作用
- metabolic antagonist 代谢拮抗物
- metabolic block 代谢障碍
- metabolic cooperation 代谢配合
- metabolic pathway 代谢途径
- metabolic pool 代谢池, 代谢库
- metabolic reaction 代谢反应
- metabolic regulation 代谢调节
- metabolic sequence 代谢顺序
- metabolism 代谢
- metabolite 代谢物
- metal - binding proteins 金属结合蛋白
- metal enzyme 含金属酶
- metalloflavoproteins 金属黄素蛋白
- metalloprotein 金属蛋白质
- metallothionein (MT) 金属硫蛋白
- metamorphosis hormone 变态激素
- metanephrine 变肾上腺素
- metapyrocatechase 变儿茶酚酶
- metarhodopsin 变视紫质
- metastable state 亚稳状态
- metathetical reaction 置换反应, 复分解反应
- methemoglobin 高铁血红蛋白
- methemoglobinemia 高铁血红蛋白血症
- methenyl 甲川基/次甲基/甲炔基
- N⁵, N¹⁰ - methenyltetrahydrofolate
- N⁵, N¹⁰ - 甲川四氢叶酸
- L - methionine L - 甲硫氨酸
- methionine aminopeptidase 甲硫氨酸氨基肽酶
- methionine adenosyltransferase 甲硫氨酸腺苷转移酶
- methionine cycle 甲硫氨酸循环
- methionine tRNA 甲硫氨酸转运 RNA
- methionine synthetase (homocysteine methyltransferase) 甲硫氨酸合成酶 (高半胱氨酸甲基转移酶)
- methotrexate (amethoptarin) MTX 氨甲蝶呤
- 3 - methoxyepinephrine (metaepinephrine)
- 3 - 甲氧基去甲肾上腺素
- 3 - methoxy - 4 - hydroxymandelic acid
- 3 - 甲氧基 - 4 - 羟扁桃酸
- 3 - methoxy - 4 - hydroxymandelic aldehyde
- 3 - 甲氧基 - 4 - 羟扁桃醛
- 3 - methoxy - 4 - hydroxyphenylethanol
- 3 - 甲氧基 - 4 - 羟苯乙醇
- 3 - methoxy - 4 - hydroxyphenylglycol
- 3 - 甲氧基 - 4 - 羟苯乙二醇
- methoxy group 甲氧基
- 5 - methoxyindoleacetic acid 5 - 甲氧基吲哚乙酸
- 3 - methoxynorepinephrine 3 - 甲氧基去甲肾上腺素
- 5 - methoxytryptophol 5 - 甲氧基色醇
- methyl acetate 乙酸甲酯
- α - methylacetoacetyl coenzyme A
- α - 甲基乙酰乙酰辅酶 A
- methylacrylyl coenzyme A 甲基丙烯酸辅酶 A
- 1 - methyladenosine 1 - 甲基腺苷
- methylacrylyl - CoA 甲基丙烯酸 - CoA
- N - methyl arginine N - 甲基精氨酸
- β - methylaspartic acid β - 甲基天冬氨酸
- methylase 甲基化酶
- methylation 甲基化作用
- 2 - methylbutadiene (isoprene) 2 - 甲基丁二烯 [1,2] (异戊二烯)
- α - methylbutyryl coenzyme A α - 甲基丁酰辅酶 A
- α - methyl - β - hydroxybutyryl - CoA
- α - 甲基 - β - 羟基丁酰 - CoA
- methylcholanthrene 甲基胆蒽
- methylcitrate 柠檬酸甲酯

- methylcobalamin 甲基钴胺素
 6 α -methyl- Δ^1 -cortisol 6 α -甲基- Δ^1 -皮质醇
 β -methylcrotonyl coenzyme A
 β -甲巴豆酰辅酶 A
 β -methylcrotonyl coenzyme A carboxylase
 β -甲巴豆酰辅酶 A 羧化酶
 β -methylcrotonylglycuria
 β -甲巴豆酰甘氨酸尿
 methylcyclohexane 甲基环己烷
 S-methylcysteine S-甲基半胱氨酸
 2'-O-methylcytidine 2'-O-甲基胞苷
 methylcytosine 甲基胞嘧啶
 5-methyldeoxycytidylate 5-甲基脱氧胞苷酸
 α -methylidihydroxyphenylalanine
 α -甲基二羟苯丙氨酸
 5-methyl-2,4-dioxypyrimidine(thymine)
 5-甲基-2,4-二氧嘧啶(胸腺嘧啶)
 methyl elaidate 甲基反油酸
 methylene 亚甲基/亚甲基/甲叉基
 3,3'-methylenebis-4-hydroxycoumarin
 3,3'-亚甲双-4-羟香豆素
 methylene blue 亚甲蓝,美蓝
 N⁵-N¹⁰-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase
 N⁵,N¹⁰-甲叉四氢叶酸脱氢酶
 N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydrofolate reductase
 N⁵,N¹⁰-甲叉四氢叶酸还原酶
 3-O-methylepinephrine(metanephrine)
 3-O-甲基肾上腺素
 methylferase 转甲基酶
 2-methyl-9 α -fluorocortisol 2-甲基-9 α -氟氏皮质醇
 16-methyl-9 α -fluoro- Δ^1 -cortisol
 16 α -甲基-9 α -氟代- Δ^1 -皮质醇
 methyl galacturonate 甲基半乳糖酸
 methyl- α -D-glucopyranoside
 甲基- α -D-吡喃葡萄糖苷
 3-O-methylglucose 3-O-甲基葡萄糖
 β -methylglucoside β -甲基葡萄糖苷
 methyl- α -D-glucoside 甲基- α -D-葡萄糖苷
 4-O-methylglucuronic acid 4-O-甲基葡萄糖醛酸
 β -methylglutaconyl coenzyme A
 β -甲基戊烯二酰辅酶 A
 N-methylglycine(sarcosine)
 N-甲基甘氨酸(肌氨酸)
 methylglyoxal 甲基乙二醛
 methylglyoxal synthetase 甲基乙二醛合成酶
 1-methylguanosine 1-甲基鸟苷
 methylguanosine 甲基鸟苷
 2-methyl-3-hexaprenyl-1,4-naphthoquinone
 (vitaminK₂)2-甲基-3-六异戊基-1,4-萘醌(维生素K₂)
 N-methylhistamine N-甲基组胺
 methylhistidine 甲基组氨酸
 α -methyl- β -hydroxybutyryl coenzyme A
 α -甲基- β -羟丁酰辅酶 A
 1-methylinosine 1-甲基次黄嘌呤核苷(1-甲基肌苷)
 N-methyllysine N-甲基赖氨酸
 methylmalonate semialdehyde 甲基丙二酸半醛
 methylmalonic acidemia 甲基丙二酸血症(症)
 methylmalonic acid 甲基丙二酸
 methylmalonyl coenzyme A 甲基丙二酰辅酶 A
 D₄-methylmalonyl coenzyme A
 D₄-甲基丙二酰辅酶 A
 L₄-methylmalonyl coenzyme A
 L₄-甲基丙二酰辅酶 A
 methylmalonyl-coenzyme A carboxymutase
 甲基丙二酰单酰辅酶 A 羧基变位酶
 methylmalonyl coenzyme A mutase
 甲基丙二酰单酰辅酶 A 变位酶
 methylmalonylcoenzyme A racemase
 甲基丙二酰辅 A 消旋酶
 N'-methylnicotinamide N'-甲基烟酰胺
 methylol derivative of amino acids
 氨基酸的羟甲基衍生物
 methylmalonyl-oxaloacetic acid transcarboxylase
 甲基丙二酰草酰乙酰转羧基酶
 methyloxaloacetic acid 草酰乙酸甲酯
 5-methyl-2-oxy-4-aminopyrimidine(methylcytosine)5-甲基胞嘧啶
 α -methyl oxygenase α -甲基加氧酶
 methyl pentose 甲基戊糖
 methylperase(methyltransferase)转甲基酶
 2'-O-methyl pseudouriding 2'-O-甲基假尿苷
 N'-methyl-6-pyridone-3-carboxamide
 N'-甲基-6-吡啶酮-3-羧酰胺
 N'-methylserotonin N'-甲基5-羟色胺
 10-methylstearic acid 10-甲基硬脂酸
 methyltestosterone 甲基睾酮
 N⁵-methyltetrahydrofolic acid N⁵-甲基四氢叶酸
 methyltetrose 1-phosphate 1-磷酸甲基四糖
 5'-methylthioadenosine 5'-甲硫腺苷
 5'-methylthioadenosine phosphorylase
 5'-甲硫腺苷磷酸化酶
 5'-methylthioribose-1-phosphate
 5'-甲硫基-1-磷酸核糖
 methyltransferase 甲基转移酶,转甲基酶
 methylxanthine 甲基黄嘌呤
 metmyoglobin 高铁肌红蛋白
 mevalonate kinase 甲羟戊酸激酶
 mevalonic acid(MVA)甲羟戊酸,二羟甲基戊酸(3-甲(基)-3,5-二羟(基)戊酸)
 micella 微团
 Michaelis constant(Michaelis-Menten constant)
 米氏常数(米-曼氏常数)
 Michaelis-Menten complex 米-曼氏复合体
 Michaelis-Menten kinetics 米-曼氏动力学
 microsomes 微粒体
 microbiological method 微生物学方法
 mic RNA = mRNA interfering complementary RNA
 干扰 mRNA 的互补 RNA,反义 RNA
 middle repeat sequence 中度重复序列
 midpoint potential 电极电位中点
 milk sugar 乳糖
 millipore filter 微孔滤膜
 Millon reaction 米隆氏反应(测酪氨酸)
 minced tissue 组织糜
 mineral 无机盐
 mineralization 骨盐沉积
 mineralized tissue 无机化组织
 mineral nutrient 无机营养素
 mineralocorticoids 盐皮质激素
 minor groove 浅沟,小沟
 minus strand 负链
 mirror image 镜像
 mitochondria 线粒体
 mitochondria myopathy 线粒体肌病
 mitochondria entry sequence 线粒体入场肽
 mithramycin 光辉霉素
 mitogenic hormone 有丝分裂激素
 mitomycin c 丝裂霉素 c
 mixed function oxidase 混合功能氧化酶
 MhV 鼠白血病病毒
 mobile promoter 启动子
 mobility 运动性
 model(模)型
 modification 修饰
 modification enzyme 修饰酶
 modifier 调节物,修饰因子
 modulator 调节剂
 module 控制元件
 molar frictional coefficient 摩尔摩擦系数
 molar gas constant(R) 摩尔气体常数
 mold 模(型),霉菌
 molecular asymmetry 分子不对称性
 molecular chaperons 分子伴侣
 molecular cloning 分子克隆
 molecular disease 分子病
 molecular medicine 分子医学
 molting 蜕皮
 molybdoferredoxin 固氮铁蛋白

molybdoflavoprotein 黄素钼蛋白(钼黄素蛋白)
 monellin 莫涅林
 monoacylglycerol 单酰甘油
 monoamine oxidase 单胺氧化酶
 monochromatic light 单色光
 monocistron 单作用子,单顺反子
 monoclonal antibody 单克隆抗体
 monocopy sequence 单拷贝序列
 monoenoic acid 烯脂酸
 monoesterase 单酯酶
 monoglyceride 甘油脂
 3 - moniodotyrosine 3 - 碘酪氨酸
 monomer 单体
 N - monomethylglycine(sarcosine)
 N - 甲基甘氨酸(肌氨酸)
 mononucleotide 单核苷酸
 monoxygenase 单加氧酶
 monoxygenase system 单加氧酶系
 monophosphatidylglycerol 单磷脂酰甘油
 monosaccharides 单糖类
 monosialoganglioside 单唾液酰神经节苷脂
 monovalent feedback inhibition 单价反馈抑制
 montanic acid 褐煤酸,二十九烷酸
 more folded 多折叠性
 morphine 吗啡
 mRNA(messenger ribonucleic acid)信使核糖核酸
 MSG(monosodium glutamate)谷氨酸单钠盐
 MSH(melanocyte - stimulating hormone)黑色素细胞刺激素
 mucaric receptor 毒蕈碱受体
 mucia clot 黏蛋白凝块
 mucoid 类黏蛋白
 mucopolysaccharie 黏多糖
 mucoprotein 黏蛋白
 multienzyme system 多酶体系
 multimeric enzyme 多聚体酶
 multivalent feedback inhibition 多价反馈抑制
 multireplicon 多复制子
 muramic acid 胞壁酸
 murein 胞壁质
 muscle phosphofructokinase deficiency 肌肉磷酸果糖激酶缺乏
 muscular work 肌肉活动
 mutagenesis 突变发生
 mutagenic radicle 突变基
 mutant RNA 突变 RNA
 mutarotase 变旋酶
 mutarotation 变旋(作用)
 mutase 变位酶
 mutation 突变
 mutator 促突变因子,增变因子

muton 突变子
 myashenia gravis 重症肌无力
 Mycobacterium 分枝杆菌属
 Mycobacterium phlei 草分枝杆菌
 Mycobacterium tuberculosis 结核分枝杆菌
 myelin 髓磷脂
 myb gene myb 基因
 myc family myc 家族
 myeloperoxidase 髓过氧化酶
 myocardium 心肌
 myoclonus epilepsy with RRF 肌阵挛癫痫
 myofibril 肌原纤维
 myogenic factors 生肌因子
 myoglobin 肌红蛋白
 myoinositol 肌醇
 myokinase 肌激酶
 myosin 肌球蛋白
 myricyl palmitate 十六酸蜂花酯
 myristic acid 豆蔻酸(十四酸)

N

N - acetyl glutamic acid(AGA)N - 乙酰谷氨酸
 NAD - adenylyl transferase NAD - 腺苷酸转移酶
 NAD or NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(辅酶 I)
 NAD - dehydrogenase (nicotinamide adeninedinucleotide dehydrogenase)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶
 NAD - kinase NAD - 激酶
 NAD - synthetase NAD - 合成酶
 NADHdehydrogenase NADH 脱氢酶
 NADH - ferridoxin reductase NADH - 铁氧还蛋白还原酶
 NADP (or NADP⁺) (nicotinamide adeninedinucleotide phosphate)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(辅酶 II)
 NADP dehydrogenase (nicotinamide adeninedinucleotide phosphate dehydrogenase)烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸脱氢酶
 NADPH oxidase NADPH 氧化酶
 Naja nigricolis 眼镜蛇
 nalidixic acid 萘啶酮酸
 α - naphthol α - 萘酚
 1,4 - naphthoquinone 1,4 - 萘醌
 naphthoresorcinol reagent 萘 - 间苯二酚试剂
 natriuretic hormone 钠尿激素
 nearest neighbour frequency 最近邻频率
 nearest neighbour sequency analysis 最近邻位顺序分析
 nebularine 水粉草素
 negative control 负控制
 negative feedback 负反馈

negative growth factor 负性生长因子
 negative regulation 负性调节
 negative supercoil 负超螺旋
 neochymotrypsinogen 新糜蛋白酶原
 neomycin 新霉素
 necstignine 新斯的明
 nerve growth factor(NGF)神经生长因子
 nervonic acid 神经酸,二十四碳烯酸
 neuraminic acid 神经氨酸
 neuraminidase 神经氨酸苷酶
 neurohormones 神经激素
 neurotensin 神经降压素
 neurotransmitter substances 神经传递物质
 neurohypophydeal hormone 垂体后叶激素
 neurohypophysis 垂体神经叶
 neurophysin 垂体后叶激素运载蛋白
 Neurospora crassa 粗糙链孢霉,粗糙链孢菌
 neurotransmitter substances 神经传递物质
 neutral amino acid 中性氨基酸
 neutral fat 中性脂肪
 NGF(nerve growth factor)神经生长因子
 nicacin(nicotinic acid)烟酸,尼克酸
 niacinamide(nicotinamide)烟酰胺,尼克酰胺
 nick 缺口
 nick translation 缺口平移
 nicotinamidase 烟酰胺酶
 nicotinamide(niacinamide)烟酰胺,尼克酰胺
 nicotinamide adenine dinucleotide 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸
 nicotinamide adenine dinucleotide - reduced (NADH)还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
 nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶
 nicotinamide mononucleotide(NMN)烟酰胺单核苷酸
 nicotinate nononucleotide pyrophosphorylase 烟酰胺单核苷酸焦磷酸化酶
 nicotinic acid 烟酸
 nicotinic acid amide(nicotinamide)烟酰胺,尼克酰胺
 nicotinic receptor 烟碱样受体
 nicotine ferroprotoporphyrin 烟碱血红素,烟碱亚铁原卟啉
 nicotinoylglycin (nicotinuric acid)烟酰甘氨酸(烟尿酸)
 N - formylmethionine 甲酰甲硫氨酸
 N - formylmethionyl - tRNA 甲酰甲硫氨酰 tRNA

ninhydrin reaction 茚三酮反应
 nitrate 硝酸(盐)
 nitrate reductase 硝酸盐还原酶
 nitric monoxide 一氧化氮
 nitric oxide 氧化氮
 nitrite 亚硝酸(盐)
 nitrite - indole reagent 亚硝酸(盐)吲哚试剂
 nitrite reductase 亚硝酸还原酶
 nitrogenase 固氮酶
 nitrogen balance 氮平衡
 nitrogen fixation 固氮(作用)
 nitrogen mustars 氮芥
 P - nitrophenyl ester 对硝基苯酯
 nitroprusside test 硝普盐试验
 nitrosylhemoglobin 亚硝酰血红蛋白
 NMDA receptor NMDA 受体
 N - methyl - D - aspartate(NMDA)N - 甲基 - D - 天冬氨酸
 non - bilayer lipid structure 非双层脂结构
 nonorcharin 苦瓜素
 n - nonanoic acid(pelargonic acid)正壬酸
 noncompetitive inhibition 非竞争性抑制
 noncovalent bond 非共价键
 non - equilibrium 不平衡
 nonessential amino acids 非必需氨基酸
 non - heme iron 非正铁血红素铁蛋白
 nonhistone chromosomal protein 非组蛋白染色
 体蛋白
 non - nitrogenous organic compounds 不含氮有
 机物
 non - NMDA receptor 非 NMDA 受体
 non - protein nitrogen 非蛋白氮
 nonsense codon 无意义码,终止码
 nonsaponifiable fraction 不皂化部分
 nonspherocytic hemolytic anemia 非球形细胞溶
 血性贫血
 nor - dihydroguaiaretic acid 正二氢愈创酸
 norepinephrine 去甲肾上腺素
 normal 标准的,正常的,当量的
 normal hydrogen electrode 标准氢电极
 normetanephrine(3 - methoxynorepinephrin)去甲
 变肾上腺素(3 - 甲氧基去甲肾上腺素)
 norsteroids 去甲类固醇
 19 - nortestosterone 19 - 去甲睾酮;诺龙
 novobiocin 新生霉素
 NPH insulin(insulin, isophane)鱼精蛋白锌胰岛
 素
 N protein N 蛋白
 nuclear magnetic resonance 核磁共振
 nuclease 核酸酶
 nucleic acid 核酸
 nuclein 核素

nucleoprotein 核蛋白
 nucleohiston chromatin 染色质核组蛋白
 nucleolus 核仁
 nucleon 核子
 nucleophilic group 亲核基
 nucleoprotein 核蛋白
 nucleosidase 核苷酶
 nucleoside 核苷
 nucleoside diphosphate(NDP)核苷二磷酸
 nucleoside diphosphate hexose NDP - 己糖
 nucleoside diphosphate kinase 核苷二磷酸激酶
 nucleoside diphosphate sugar NDP - 糖
 nucleoside diphosphokinase 核苷二磷酸激酶
 nucleoside hydrolase 核苷水解酶
 nucleoside monophosphate kinase 核苷酸激酶
 nucleoside phosphorylase 核苷磷酸化酶
 nucleoside pyrophosphorylase 核苷酸焦磷酸化
 酶
 nucleoside triphosphate 核苷三磷酸
 nucleosome 核小体
 nucleotidase 核苷酸酶
 nucleotide 核苷酸
 nucleotide copolymer 核苷酸共聚物
 nucleotide homopolymer 核苷酸同聚物
 nucleotide pyrophosphatase 核苷酸焦磷酸酶
 neuroglial cell(神经)胶质细胞
 nucleus 核
 nutrient 营养物质
 nutrition 营养
 nutrition value 营养价值
 nyctalopia(night blindness)夜盲症

O

obesity 肥胖
 obligate anaerobe 专性厌氧微生物
 ochre triple codon(= ochre triple codon)赭石型
 三联体密码子(终止密码子)
 ochronosis 褐黄病
 n - octacosanoic acid(montanic acid)正二十八
 酸,褐煤酸
 n - octadecanoic acid(stearic acid)正十八碳酸,
 硬脂酸
 6,9,12 - octadecatrienoic acid(γ - linolenic acid)
 6,9,12 - 十八碳三烯酸(γ - 亚麻)
 9,11,13 - octadecatrienoic acid(eleo - stearic
 acid) 9,11,13 - 十八碳三烯酸(桐酸)
 9 - octadecenoic acid 9 - 十八碳烯酸
 11 - octadecenoic acid(vaccenic acid)11 - 十八
 碳烯酸(异油酸)
 octadecyl alcohol 十八醇
 octane diacid 辛二酸
 n - octanoic acid(caprylic acid)正辛酸(辛酸)
 octanol 辛醇
 octanoyl acyl - carrier protein 辛酸脂酰载体蛋
 白质
 octanoyl coenzyme A dehydrogenase 辛酸辅酶 A
 脱氢酶
 octanoyl coenzyme A 辛酸辅酶 A
 octopamine 章鱼胺,对羟苯 β - 羟乙胺
 octulosonic acid 辛酮糖酸
 Okazaki fragment 冈崎片段,冈崎碎片
 oleic acid 油酸
 oleyl coenzyme A 油酰辅酶 A
 oligomeric 寡聚
 oligomer 寡聚体
 oligomycin 寡霉素
 oligomycin - sensitivity - conferring factor 寡霉素
 敏感性授予因素
 oligomycin - sensitivity - conferring protein
 (DSCP)寡霉素敏感蛋白
 oligonucleotide 寡核苷酸
 oligopeptide 寡肽
 oligomeric protein 寡聚蛋白质
 oligosaccharidase 寡糖酶
 oligosaccharide core 寡聚糖核
 oligosaccharide 寡糖
 olivomycin 橄榄霉素
 oncogene complementation 癌基因互补
 oncogene family 癌基因家族
 oncogene theory 癌基因学说
 one - carbon compounds 一碳化合物
 one - carbon unit 一碳单位
 one gene one enzyme hypothesis 一个基因一个
 酶假说
 oocyte 卵母细胞
 open - circular DNA 开环 DNA
 open reading frame 开放阅读框
 operator 操纵序列,操纵基因
 operator gene 操纵基因
 operator site 操纵基因部位
 operon 操纵子
 operon theory 操纵子学说
 opsin 视蛋白
 optical activity 旋光度,旋光性
 optical antipodes 旋光对映体
 optical density 光密度
 optical isomers 旋光异构体
 optical isomerism 旋光异构现象
 optical recording system 光学记录系统
 optical rotation 旋光
 optical rotatory power 旋光强度
 optimum pH 最适 pH
 optimum temperature 最适温度
 oreinol 5 - 甲基苯二酚 - (1,3)

- organism 生物有机体
organelle 细胞器
organic acid 有机酸
organic matrix 骨有机质
organization 编制, 组织
oligo U 寡聚尿核苷酸
orientation 定位, 定向
origin 起源
origin of replication 复制起始点
ornithine 鸟氨酸
ornithine carbamoyl transferase (OCT) 鸟氨酸氨基甲酰转移酶
ornithine cycle 鸟氨酸循环(尿素循环)
ornithine decarboxylase (ODC) 鸟氨酸脱羧酶
ornithine - glutamate transacetylase 鸟氨酸 - 谷氨酸转乙酰酶
ornithine transaminase 鸟氨酸转氨酶
ornithine carbamoyl transferase 鸟氨酸转氨甲酰酶
ornithuric acid 鸟尿酸
ornithyl - 鸟氨酸(基)
orosomucoid 血清类黏蛋白, α -酸性糖蛋白
orotate phosphoribosyl transferase 乳清酸磷酸糖基转移酶
orotic acid 乳清酸
orotic aciduria 乳清酸尿
orotidine 5' - phosphate (orotidylic acid) 乳清酸核苷 5' - 磷酸
orotidine 5' - phosphate decarboxylase 乳清酸核苷 5' - 磷酸脱羧酶
orotidylate pyrophosphorylase 乳清酸核苷酸焦磷酸化酶
orotidylic acid 乳清苷酸
orotidylic decarboxylase 乳清苷酸脱羧酶
orotidylic pyrophosphorylase 乳清苷酸焦磷酸化酶
orthophosphate 正磷酸(盐)
orthophosphoric acid 正磷酸
orthoquinone 邻醌
osazone 脲
osmometer 渗透压计
osmosis 渗透
osmotic pressure 渗透压
osmotic shock 渗透性休克
ossification 成骨作用
osteomalacia 骨软化
osteoporosis 骨质疏松
ouabain 毒毛旋花苷
outer membrane 外膜
ovalbumin 卵清蛋白
ovarian cycle 卵巢周期
ovarian hormone 卵巢激素
ovary 卵巢
overlap 重叠, 交错
overlapping sequence 重叠序列
ovomucoid 卵巢黏蛋白
ovulation 排卵
ovum 卵, 卵细胞
oxaloacetic acid 草酰乙酸
oxaloglutaric acid 草酰戊二酸
oxalosuccinic acid 草酰琥珀酸
oxaluria 草酸尿
oxamate 草氨酸(盐)
oxidant 氧化剂
oxidase 氧化酶
oxidation 氧化
oxidation - potential 氧化 - 还原电势
oxidation - reduction - reaction 氧化 - 还原反应
oxidative deamination 氧化脱氨基作用
oxidative pathway 氧化途径
oxidative phosphorylation 氧化磷酸化
oxido - reductase 氧化 - 还原酶
oxilinic acid 奥咪酸
oxitocin 催产素
5 - oxoprolinase 5 - 羟脯氨酸酶
5 - oxoprolin (pyroglutamic acid) 5 - 羟脯氨酸(焦谷氨酸)
19 - oxotestosterone 睾酮
2 - oxy - 4 - aminopyrimidine 2 - 氧 - 4 - 氨基嘧啶
oxybiotin 氧化生物素
oxygen 氧
oxygen activation 氧激活作用
oxygenase 加氧酶
oxygen debt 氧债
oxygen electrode 氧电极
oxygen tension 氧张力
oxyhemoglobin 氧合血红蛋白
11 - oxy - 17 - ketosteroid 11 - 氧 - 17 - 酮类甾醇
oxymyoglobin 氧合肌红蛋白
oxypressin 催产加压素
6 - oxypurine (hypoxanthine) 6 - 氧嘌呤(次黄嘌呤)
oxytetracycline 羟四环素, 土霉素
oxythiamine 羟基硫胺素
oxytocic hormone 催产素
oxytocin 催产素
ozone 臭氧
ozonide 臭氧化物
- P**
- palindrome structure 回文结构
palmitate synthesizing system 软脂酸盐(棕榈酸盐)合成系统
palmitic acid 软脂酸, 棕榈酸, 十六(烷)酸
palmitoleic acid 棕榈油酸, 十六(碳)烯 - 9 - 酸
palmitoleostearin 棕榈硬酸甘油三脂
palmitoleoyl acyl carrier protein 软脂酰基载体蛋白
palmitoyl carnitine 软脂酰肉碱
palmitoyl coenzyme A 软脂酰辅酶 A
palmitoyl coenzyme A carnitine 软脂酰辅酶 A - 肉碱
palmitoyl transferase 软脂酰转移酶
palmitoyl deacylase 软脂酰脱酰酶
pancreas 胰脏
pancreatic lipase 胰脂肪酶
pancreatic ribonuclease 胰核糖核酸酶
pancreozymin 促胰酶素
pantetheine 泛酰巯基乙胺, 遍多酰氨基乙醇
pantoic acid 泛解酸
pantothenic acid 遍多酸, 泛酸
pantoyl - β - alanine (pantothenic acid) 泛解酰 - β - 丙氨酸(遍多酸)
papain 木瓜蛋白酶
paper chromatography 纸层析法, 纸色谱法
para - aminobenzoic acid 对氨基马尿酸
para - aminohippuric acid 对氨基苯甲酸
paracasein 衍酪蛋白, 副酪蛋白
paracine, paracrine 旁分泌
parahydroxyphenylpyruvate oxidase 对羟基苯丙酮酸氧化酶
paramagnetism 顺磁性
paromyosin 副肌球蛋白, 副肌凝蛋白
parathormone, parathyroid hormone (PTH) 甲状旁腺(激素)
Parkinson's disease 帕金森氏病
parotid gland 腮腺
parotin 唾液腺素
partial pressure 分压力
partial reaction 局部反应
partial specific volume 微分比容, 定浓比容
partition chromatography 分配层析法, 分配层析法
partition coefficient 分配系数
passive absorption 被动吸收
passive transport 非主动运输/被动运送
pasteur effect 巴斯德效应
patch clamp 膜片钳
Pauly reaction Pauly 氏反应(组氨酸颜色反应)
pectin 果胶
pelargonic acid 壬酸
pellagra 癞皮病, 糙皮病

- pellagra - preventive factor 抗糙皮病因子, 抗癞
皮病维生素
- penicillamine 青霉胺
- penicillin 青霉素
- penicillinase 青霉素酶
- penicillium notatum 青霉菌
- pentachlorophenol 五氯苯酚
- pentaglutamic acid 五谷氨酸
- pentaglycine 五甘氨酸
- pentobarbital 戊巴比妥(二乙基丙二酰脲)
- pentosan 戊素糖
- pantothenic acid 遍多酸
- pentose 戊糖
- pentose epimerase 戊糖差向(异构)酶
- pentose phosphate cycle 戊糖磷酸循环
- pentose phosphate pathway 戊糖磷酸途径
- pentosuria 戊糖尿(症)
- pepsin 胃蛋白酶
- pepsinogen 胃蛋白酶原
- peptidase 肽酶
- peptide 肽
- peptide bond 肽键
- peptide chain 肽链
- peptide deformylase 肽链脱甲酰基酶
- peptide fragment 肽段
- peptide linkage 肽键
- peptide synthetase 肽合成酶
- peptide unit 肽单元
- peptidoglycan (murein) 肽多糖(胞壁质)
- peptidyl site P 单元
- peptidyl transfer 肽基转移
- peptidyl transferase 肽基转移酶
- peptone 胨
- perchlorate 高氯酸(盐)
- perchloric acid 高氯酸
- performic acid 过甲酸
- perfusion 灌注, 灌注法
- perhydrocyclopentanophenanthrene 环戊烷多氢
菲
- periodate oxidation 高碘酸盐氧化作用
- periodic acid 高碘酸
- peristalsis(肠壁的)蠕动
- permeability 渗透性, 透过性
- permease 透(性)酶, 半乳糖苷转运酶
- permissive cell 受纳细胞, 允许细胞
- peroxidase 过氧化物酶
- peroxidatic reaction 过氧化反应
- peroxide 过氧化物
- peroxide radicle 过氧化物基团
- peroxisome 过氧化物酶体
- pertussis toxin 百日咳
- petroleum ether 石油醚
- phage 噬菌体
- phagocyte 吞噬细胞
- phagocytosis 吞噬作用
- phase separation 分相
- phase microscopy 相差显微镜
- phase rule 相律
- phase shift mutation 移码突变
- phase variation 相变异
- phenacetic acid 苯乙酸
- phenanthrene 菲
- O - phenanthroline O - 菲绕咪, 二氮杂菲
- phenobarbital 苯巴比妥
- phenol red 酚红
- phenolase 酚酶
- phenolate 酚(盐)
- phenolic group 酚基, 苯酚基
- phenol oxidase 酚氧化酶
- phenotype 表型, 表现型
- phenoxazone 吩恶嗪酮稠环
- phenylacetic acid 苯乙酸
- phenylacetylglutamine 苯乙酸谷氨酰胺
- DL - phenylalanine DL - 苯丙氨酸
- phenylalanine aminotransferase 苯丙氨酸氨基转
移酶
- phenylalanine hydroxylase 苯丙氨酸羟化酶
- phenylalanine 4 - monooxygenase 苯丙氨酸 4 -
单加氧酶
- phenylethanolamine - N - methyl - transferase 苯
乙醇胺 - N - 甲基转移酶
- phenylethylimidazole hemochromogen 苯乙基咪
唑血色原
- phenylhydrazine 苯肼
- phenyl isothiocyanate (PITC) 苯异硫氰酸
- phenylketonuria (PKU) 苯丙酮酸尿(症)/苯酮
酸症
- phenyllactic acid 苯乳酸
- phenylsazone 苯脲
- phenylpropionic acid 苯丙氨酸
- phenylpyruvic acid 苯丙酮酸
- phenylpyruvic oligophrenia (phenyletonuria) 苯丙
酮酸性智力发育不全
- phenylsulfate 硫酸苯脂
- phenylthiocarbonyl (PTC) 苯氨基硫甲酰
- phenylthiohydantoin amino acid 苯基乙内酰氨基
酸
- pheophytin 脱镁叶绿素
- phorbol ester 佛波酯
- phloretic 根皮素
- phlorizin 根皮苷
- phosphagen 磷酸原(高能磷酸化合物)
- phosphamic acid 磷酰胺
- phosphatase 磷酸酶
- phosphate 磷酸, 磷酸盐, 磷酸酯
- phosphate - ATP exchange 磷酸 - ATP 交换反
应
- phosphate bond energy 磷酸键能
- phosphate carrier 磷酸载体
- phosphate ester 磷酸酯
- phosphate - group transfer potential 磷酸基团转
移势能
- phosphate ion 磷酸离子
- phosphate - water exchange 磷酸 - 水交换反应
- phosphatidyl choline 缩醛磷脂酰胆碱
- phosphatidyl ethanolamine 缩醛磷脂酰乙醇胺
- phosphatidyl serine 缩醛磷脂酰丝氨酸
- phosphatidate 磷脂酸
- phosphatidate phosphatase 磷脂酸磷酸酶
- phosphatidic acid 磷脂酸
- phosphatidylcholinase 磷脂酰胆碱酶
- phosphatidylcholine 磷脂酰胆碱(卵磷脂)
- phosphatidylcholine - cholesterol acyltransferase
磷脂酰 - 胆固醇酰基转移酶
- phosphatidyl dimethyl ethanolamine 磷脂酰二甲
基乙醇胺
- phosphatidylethanolamine 磷脂酰乙醇胺
- phosphatidylglycerol 磷脂酰甘油
- phosphatidylinositol 磷脂酰次黄嘌呤苷酸
- phosphatidyl inositol 磷脂酰肌醇
- phosphatidylinositol kinase 磷脂酰肌醇激酶
- phosphatidylmonomethylethanolamine 磷脂酰单
甲基乙醇胺
- phosphatidylserine 磷脂酰丝氨酸
- phosphatidylserine decarboxylase 磷脂酰丝氨酸
脱羧酶
- phosphaturia 磷酸盐尿
- phosphoarginine 磷酸精氨酸
- phosphocholine - ceramide transferase 磷酸胆碱
- 神经酰胺转移酶
- phosphocholin cytidyl transferase 磷酸胆碱胞
嘧啶核苷酸转移酶
- phosphocreatine 磷酸肌酸
- phosphodiester 磷酸二酯
- phosphodiester bond 磷酸二酯键
- phosphodiesterase 磷酸二酯酶
- phosphodoxin 磷酸氧还素
- phosphoenopyruvate carboxykinase 磷酸烯醇式丙
酮酸羧激酶
- phosphoethanolamine 磷酸乙醇胺
- phosphoethanolamine cytidyl transferase 磷酸乙
醇胺嘧啶核苷酸转移酶
- phosphoethanolamine transferase 磷酸乙醇胺转
移酶
- phosphofructokinase 磷酸果糖激酶
- phosphogalactouridyl transferase 磷酸半乳糖尿

- 苷酰转移酶
 phosphoglucokinase 磷酸葡萄糖激酶
 phosphoglucomutase 磷酸葡萄糖变位酶
 6-phosphogluconate dehydrogenase
 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶
 phosphogluconate shunt 磷酸葡萄糖酸旁路
 6-phosphogluconic acid 6-磷酸葡萄糖酸
 6-phosphogluconu- δ -lactone
 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内脂
 phosphoglucose isomerase 磷酸葡萄糖同分异构酶
 α -phosphoglycerol dehydrogenase
 α -磷酸甘油脱氢酶
 3-phosphoglyceraldehyde 3-磷酸甘油醛
 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
 3-磷酸甘油醛脱氢酶
 2-phosphoglycerate 2-磷酸甘油
 phosphoglycerate kinase 磷酸甘油酸激酶
 phosphoglycerate mutase 磷酸甘油酸变位酶
 3-phosphoglyceric acid 3-磷酸甘油酸
 3-phosphoglyceric acid dehydrogenase
 3-磷酸甘油酸脱氢酶
 phosphoglyceride 甘油磷脂
 phosphoglycerokinase 磷酸甘油激酶
 α -phosphoglycerol dehydrogenase
 α -磷酸甘油脱氢酶
 3-phosphoglycerol-N-imidazole
 3-磷酸甘油-N-咪唑
 phosphoglyceromutase 磷酸甘油酸变位酶
 3-phosphoglycerol-1-arsenate 3-磷酸甘油-1-砷酸
 phosphoglycolic acid 磷酸羟基乙酸
 phosphoguanidinoacetic acid 磷酸胍基乙酸
 phosphoguanidoethylserylphosphate 磷酸胍基乙基丝氨酸磷酸
 phosphohexose isomerase 磷酸乙糖异构酶
 0-phosphohomoserine 0-磷酸高丝氨酸
 3-phosphohydroxypyruvic acid
 3-磷酸羟基丙酮酸
 1-phosphoimidazole 1-磷酸咪唑
 phosphoinositide 磷酸次黄嘌呤苷酸
 phosphokinase 磷酸激酶
 phospholipase 磷酸甘油酯酶, 磷脂酶
 phospholipase A₂ 磷酸甘油酯酶 A₂, 磷脂酶 A₂
 phosphomannose isomerase 磷酸甘露糖异构酶
 phosphomevalonate kinase 磷酸甲羟戊酸激酶
 phosphonate ester 磷酸酯
 phosphonoacetic acid 膦羧基乙酸
 4'-phosphopantetheine 4'-磷酸泛酰硫基胺
 4'-phosphopantothenic acid
 4'-磷酸泛酸(4'-磷酸遍多酸)
 4'-phosphopantothienylcysteine
 4'-磷酸泛酰半胱氨酸
 4'-磷酸泛酰半胱氨酸
 phosphopantothienylcysteine decarboxylase 磷酸泛酰半胱氨酸脱羧酶
 phosphopentose epimerase 磷酸戊糖差向异构酶
 phosphopentose isomerase 磷酸戊糖差向异构酶
 phosphorylase 磷酸化酶
 phosphoprotein 磷蛋白(类)
 phosphoprotein phosphatase 磷蛋白磷酸(脂)酶
 phosphoenolpyruvate 磷酸烯醇式丙酮酸
 phosphoenolpyruvate carboxykinase 磷酸烯醇式丙酮酸羧基激酶
 3-phosphopyruvic acid 3-磷酸丙酮酸
 phosphoenolpyruvic acid 磷酸烯醇式丙酮酸
 phosphoribosylamine 磷酸核糖胺
 5-phosphoribosyl-1-amine 5-磷酸核糖-1-胺
 N'-(5'-phosphoribosyl)-AMP
 N'-(5'-磷酸核糖)-AMP
 phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase 磷酸核糖-AMP 环化水解酶
 N'-5'-phosphoribosyl-ATP
 N'-(5'-磷酸核糖)-ATP
 N-5'-phosphoribosylanthranilate isomerase N-5'-磷酸核糖氨基苯甲酸异构酶
 N-5'-phosphoribosyl anthranilic acid
 N-5'-磷酸核糖氨基苯甲酸
 phosphoribosyl formimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide 磷酸核糖亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸
 phosphoribosyl formimino-5-aminoimidazole carboxamide ribonucleotide 磷酸核糖亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸
 phosphoribosyl glycoamide synthetase 磷酸核糖-甘氨酸胺合成酶
 9- β -5'-phospho-D-ribose 9- β -5'-磷酸-D-核糖
 (inosine 5'-monophosphate) 9- β -5'-磷酸-D-核糖次黄嘌呤(5'-次黄嘌呤)
 5-phosphoribose pyrophosphate
 5-磷酸核糖焦磷酸
 phosphoribose pyrophosphokinase 磷酸核糖焦磷酸激酶
 phosphoribosyl pyrophosphate 磷酸核糖焦磷酸
 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
 5-磷酸核糖-1-焦磷酸
 phosphoribosyl pyrophosphate transamidase 磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶
 phosphoribosyl transferase 磷酸核糖转移酶
 phosphoribulokinase 磷酸核糖激酶
 phosphoric anhydride 磷(酸)酐
 phosphoroclastic cleavage 磷酸裂解
 phosphorolysis 磷酸解(作用)
 phosphorylase 磷酸化酶
 phosphorylase b kinase 磷酸化酶 b 激酶
 phosphorylase kinase 磷酸化酶激酶
 phosphorylase phosphatase 磷酸化酶磷酸酶
 phosphorylation 磷酸化(作用)
 3-phosphoserine 3-磷酸丝氨酸
 phosphoserine phosphatase 磷酸丝氨酸磷酸酶
 phosphotaurocaryamine 磷酸脒基牛磺酸
 phosphotransacetylase 磷酸转乙酰酶
 phosphotriose isomerase (triosephosphate isomerase) 磷酸丙糖异构酶
 phosphotungstic acid 磷钨酸
 photochemical reactions 光化学反应
 photon 光子
 photophosphorylation 光(合)磷酸化(作用)
 photoreactivating enzyme 光复活酶
 photoreactivation 光活化作用, 光复活
 photosynthesis 光合作用
 phthaloyl group 邻苯二甲酰基
 phycobillin 藻胆色素
 phycobiliprotein 藻胆蛋白
 phycobilisome 藻胆蛋白体
 phycoerythrin R-藻红蛋白
 physicochemical principle 物化原理
 physostigmine 毒扁豆碱
 phytanate oxidase 植烷酸氧化酶
 phytanic acid 植烷酸
 phytase 肌醇六磷酸酶
 phytate 肌醇六磷酸盐(或根)
 phytate α -oxidase 肌醇六磷酸 α -氧化酶
 phytic acid 肌醇六磷酸
 phytin 肌醇六磷酸钙镁, 非丁
 phytol 植醇, 叶绿醇
 PI-3 kinase PI-3 激酶
 picorna virus 小 RNA 病毒
 piericidin A 粉紫霉素 A
 pigment 色素
 pimeloyl coenzyme A 庚二酰辅酶 A
 pinene 蒎烯
 pine apple 菠萝
 pinocytosis 胞饮作用
 pinocytotic transport 胞饮运输
 piperidine 六氢吡啶
 piperidine-6-carboxylic acid Δ^1 -烯六氢吡啶-6-羧酸
 piperidine-2-carboxylic acid Δ^1 -烯六氢吡啶-2-羧酸
 piperidine-2,6-dicarboxylate Δ^1 -piperidine-2,6-dicarboxylate

- Δ' -吡啶烯-2,6-二羧酸
 Δ' -piperidine-2,6-dicarboxylate dehydrogenase
 Δ' -吡啶烯-2,6-二羧酸脱氢酶
 piperidine-2-carboxylic acid reductase 六氢吡啶-2-羧酸还原酶
 piperidine ferroprotoporphyrin 六氢吡啶亚铁原卟啉
 pitch 螺距
 pK value pK 值
 picric acid 苦味酸
 plane-polarized light 偏振光
 plasma 血浆
 plasmalogen 缩醛磷脂
 plasma albumin 血浆清蛋白
 plasma kinin 血浆激肽
 plasma protein 血浆蛋白
 plasma thromboplastin antecedent (PTA) 血浆促凝血酶原激酶前体(血浆凝血酶激酶原)
 plasmalogen 缩醛磷脂
 plasmid 质粒
 plasmin 纤维蛋白溶酶
 plasminogen 血纤维蛋白溶酶原
 platelet activating factor (PAF) 血小板活化因子
 platelet derived growth factor (PDGF) 血小板生长因子
 plastid 质体
 plastocyanin 质体菁, 质体蓝素
 plastoquinone A 质体醌 A
 plastoquinone 质体醌
 platelet 血小板
 platelet factor I (antihemophilic factor) 血小板因子 I (抗血友病因子)
 platelet cofactor II (christmas factor) 血小板辅助因子 II
 platinum black 铂黑
 platinum electrode 铂电极
 β -pleated sheet β 折叠片
 plus strand 正链
 podophyllotoxin 鬼臼素
 poliovirus 灰质炎病毒
 point mutation 点突变
 poisoning 中毒
 polarimeter 旋光计, 偏振计
 polarimetry 旋光测定(法), 偏振测定(法)
 polarity 极性
 polarized light 偏振光, 旋光
 poliomyelitis virus/poliavirus 脊髓灰质炎病毒
 poly(dA-T) 多聚脱氧腺苷酸-胸腺苷酸
 poly(dG) = poly(deoxyguanylic acid) 多聚脱氧鸟苷酸
 poly(U) = poly(uridylic acid) 多聚尿苷酸
 polyacrylamide 聚丙烯酰胺
 poly(A) (polyadenylic acid) 多聚腺苷酸
 poly A polymerase 多聚 A 聚合酶
 polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 polyamine 多胺
 polycistron 多作用子, 多顺反子
 polycistronic messenger 多顺反子信使
 polycistronic mRNA 多顺反子 mRNA
 polydispersity 多分散度, 分散性
 polyenoic acid 多烯酸(多不饱和酸)
 polygalacturonate 多聚半乳糖醛酸盐
 polyglucose 多聚葡萄糖
 polyglucoside 多聚葡萄糖苷
 poly-L-glutamic acid 多聚-L-谷氨酸
 polyglycerol phospholipid 多聚甘油磷脂
 polyglycine 多聚甘氨酸
 polyhydroxyaldehyde 多聚醇醛
 polyhydroxyketone 多聚羟基酮
 polyisoprene 多聚异戊二烯
 polymannan 多聚甘露糖(甘露糖胶)
 polymannuronic acid 多聚甘露糖醛酸
 polymer 聚合物
 polymerase A 聚合酶 A
 polymerase chain reaction (PCR) 聚合酶链反应
 polymerization 聚合作用
 polymorphism 多态性/多型性
 polynucleotide(聚) 多核苷酸
 polyol 多元醇
 polynucleotide kinase 多核苷酸激酶
 polynucleotide ligase (polynucleotide synthetase) 多核苷酸连接酶
 polynucleotide phosphorylase 多核苷酸磷酸化酶
 polypeptide 多肽
 polypeptide chain 多肽链
 polyphenol oxidase 多酚氧化酶
 polyploidy 多倍态
 polyproline 多聚脯氨酸
 polyribosome 多核糖体
 polysaccharide 多糖
 polysaccharide phosphorylase 多糖磷酸化酶
 polysomes (polyribosomes) 多核糖体
 polystyrene 聚苯乙烯
 polyubiquitinated 多泛素化
 polyphobilinogen (PBG) 卟胆原, 胆色素原
 polyunsaturated fatty acid 多不饱和脂肪酸
 polyuridylic acid [poly(U)] 多聚尿苷酸
 polyxylan 多聚木糖(木糖胶)
 P/O ratio P/O 比值, 磷氧比
 pool 库池
 porphin 卟吩
 porphobilinogen 胆色素原
 porphobilinogen deaminase 胆色素原脱氨酶
 porphyrins 卟啉类
 porphyrin "a" 卟啉 a
 porphyrin ring 卟啉环
 porphyrinogen 卟啉原, 还原卟啉
 porphyrinuria 卟啉尿
 porphyropsin 视紫质
 postranslation modification 翻译后加工
 positive control 正控制
 positive feedback 正反馈
 positive growth factor 正性生长因子
 positive regulation 正性调节
 positive supercoil 正超螺旋
 postreplication repair 复制后修复
 posttranscriptional processing 转录后加工
 potassium linoleate 亚油酸钾
 potential 电动势
 potential difference 势差, 位差, 电位差
 potentiometer 电位计
 poxvirus 痘病毒
 P_i (inorganic pyrophosphate) 无机焦磷酸盐
 prealbumin 前清蛋白
 precursor 前体
 preexisting structure 先存结构
 pregnane 孕烷
 pregnancy 妊娠
 pregnanediol 孕二醇
 preg-4-ene-3one-20-ol 孕-4-烯-3-酮-20-醇
 pre- β -lipoprotein 前 β 脂蛋白
 prealbumin/proalbumin 清蛋白原
 preinitiation complex (PIC) 前起始复合物
 preinitiator complex 起始前复合体
 pre-mRNA mRNA 前体
 prephenic acid 预苯酸
 prephenic acid dehydratase 预苯酸脱水酶
 prephenic acid dehydrogenase 预苯酸脱氢酶
 preprimosome 引发前体
 preproalbumin 前清蛋白原
 preproinsulin 前胰岛素原
 pribnow box pribnow 盒子
 primary bile acid 初级胆汁酸
 primary structure 一级结构
 primary transcript 初级转录本
 primase 引物合成酶
 primer 引物, 引子
 primer strand 引物链
 priming 引发
 primosome 引发体
 prion 朊病毒
 pristanic acid 降植烷酸
 proaccelerin 促凝血球蛋白原
 procarboxypeptidase A and B 羧肽酶原 A 和 B

- probe 探针
- processing 加工过程
- procollagen 原胶原
- procollagen peptidase 原胶原肽酶
- procarboxypeptidase 羧肽酶原
- proconvertin(血消凝血酶原)转变加速因子前体
- proconvertin 产物抑制(作用)
- proelastase 弹性蛋白酶原
- proenzyme 酶原
- profibrinolysin(plasminogen)血纤维蛋白溶酶原
- progesterone 黄体酮,孕酮
- progestins 黄体制剂,孕酮
- progressive displacement model 进行性置换模型
- prohormones 激素原
- prohydrolase 水解酶原
- proinsulin 胰岛素原
- prokaryocyte 原核细胞
- prokaryote 原核生物
- prokaryotic cell 原核细胞
- prolactin(luteotropin)催乳素
- prolactin inhibitory factor 催乳素-抑制因子
- prolactin releasing factor 催乳素释放因子
- proliferating cell nucleus antigen(PCNA)增殖细胞核抗原
- D - proline D - 脯氨酸
- proline oxidase 脯氨酸氧化酶
- prolipase 脂酶原
- prolyleucylglycinamide (melanocyte inhibitory factor)脯氨酰亮氨酸甘氨酸胺(黑素细胞抑制因子)
- promoter 启动子/启动序列
- promoter insertion 启动子插入
- promotor site 启动子位点
- proofreading function 校对的功能
- propanediol 丙二醇
- propane - 1,2 - diol 丙烷 - 1,2 - 二醇
- prophage 原噬菌体
- propionaldehyde 丙醛
- propionate 丙酸(盐)
- propionate carboxylase 丙酸羧化酶
- propionic acid 丙酸
- propionic acidemia 丙酸血
- propionic aciduria 丙酸尿
- propionyl coenzyme A 丙酰辅酶 A
- propionyl coenzyme A carboxylase 丙酰辅酶 A 羧化酶
- proto - oncogene 原癌基因
- prostaglandin(PG)前列腺素
- prostaglandin dehydrogenase 前列腺素脱氢酶
- prostaglandin endoperoxide 前列腺素内过氧化物
- prostaglandin reductase 前列腺素还原酶
- prostaglandin synthetase 前列腺素合成酶
- prostanic acid 前列腺烷酸
- prosthetic group 辅基
- protein 蛋白质
- protein biosynthesis 蛋白质生物合成
- protein coagulation 蛋白质的凝固作用
- protein expression 蛋白质表达
- protein kinase 蛋白激酶
- protein methylase II 蛋白甲基化酶 II
- protein nitrogen 蛋白氮
- protein phosphatase 蛋白磷酸酶
- protein - protein interaction 蛋白质 - 蛋白质相互作用
- protein polysaccharide 蛋白多糖
- protease 蛋白水解酶
- proteinoid 类蛋白质
- proteinase 蛋白酶
- protein bound iodine 蛋白结合碘
- proteinuria 蛋白尿
- proteoglycan 蛋白多糖
- proteolipid 蛋白脂质(脂蛋白)
- proteolysis 蛋白质水解(作用)
- proteolytic enzymes 蛋白质(水解)酶类
- protease 酶
- proteosome 蛋白酶体
- prethrombin 凝血酶原/凝血因子 II
- proteus vulgaris 普通变形杆菌
- prothrombin 凝血酶原
- prothrombin time 凝血酶原时间
- protocatechuate oxygenase 原儿茶酸加氧酶
- protocollagen 原胶原
- protocollagen lysine hydroxylase 原胶原赖氨酸羟化酶
- protocollagen proline hydroxylase 原胶原脯氨酸羟化酶
- protoheme 原血红素
- proton 质子
- proto oncogene(pro - onc)原癌基因
- proton pump 质子泵
- proton motive force 质子推动力
- protoplasm 原生质
- protoplast 原生质体
- protoporphyrin 原卟啉
- protovirus theory 原始病毒假说
- provirus 原病毒,前病毒
- provitaminA(β - carotene)维生素 A 原(β - 胡萝卜素)
- pseudocholinesterase 拟胆碱酯酶
- Pseudomonas 假单胞杆菌属
- Pseudomonas fluorescens 荧光极毛杆菌
- pseudo - 拟,假
- pseudouridine 假尿(嘧啶核)苷
- pseudogene 假基因
- pseudosubstrate 假底物
- D - psicose D - 阿洛酮糖
- psychosine 鞘氨醇半乳糖苷
- PTC peptide (phenylthiocarbamoyl peptide) 苯氨基硫甲酰胺
- pteridine 蝶呤,蝶啶
- pteroylglutamic acid(folic acid) 蝶酰谷氨酸(叶酸)
- ptyalin(α - 1,4 - glucan 4 - glucanase - hydrolase) 唾液淀粉酶
- puff 疏松,膨大
- pulse labelling 脉冲标记
- purification 提纯
- purine 嘌呤
- purine bases 嘌呤碱基
- purine nucleosidase 嘌呤核苷酸酶
- purine nucleoside 嘌呤核苷
- purine nucleoside phosphorylase 嘌呤核苷磷酸化酶
- purine nucleotide 嘌呤核苷酸
- purine nucleotide cycle 嘌呤核苷酸循环
- purine - pyrimidine ratio 嘌呤 - 嘧啶比值
- purromycin 嘌呤霉素
- putrefaction 腐败(作用)
- putrescence 腐败,腐烂
- putrescine 腐胺
- pyran 吡喃
- pyranose 吡喃糖、六环糖
- 2 - pyridine aldoxime methiodide 2 - 吡啶醛肟甲碘化物
- pyridine ferroporphyrin 吡啶亚铁卟啉
- pyridine ferroprotoporphyrin 吡啶亚铁原卟啉
- pyridine nucleotide 吡啶核苷酸
- pyridine - 3 - sulfonic acid 吡啶 - 3 - 磺酸
- pyridoxal 吡哆醛,维生素 B₆
- 4 - pyridoxic acid 4 - 吡哆酸
- pyridoxine 吡哆醇,维生素 B₆
- β - pyridyl - 4 - alanine β - 吡啶 - 4 - 氨酸
- pyrimidine 嘧啶
- pyrimidine bases 嘧啶碱基
- pyrimidine cluster 嘧啶聚簇
- pyrimidine dimer 嘧啶二聚体
- pyrimidine nucleosidase 嘧啶核苷酸酶
- pyrimidine nucleoside 嘧啶核苷
- pyrimidine nucleoside kinase 嘧啶核苷激酶
- pyrimidine nucleotide 嘧啶核苷酸
- pyrimidine ring 嘧啶环
- pyrocatechase 邻苯二酚酶
- pyrocatechol(catechol) 邻苯二酚
- pyroglutamate hydrolase 焦谷氨酸羧化酶

pyroglutamic acid 焦谷氨酸
 pyroglutamic acid peptidase 焦谷氨酸肽酶
 pyroglutamic aciduria 焦谷氨酸尿
 pyroglutamyl histidyl - prolinamide
 焦谷氨酰 - 组氨酰 - 脯氨酰胺
 pyrophosphatase 焦磷酸酶
 pyrophosphate 焦磷酸(盐)(或酯)
 5 - pyrophosphomevalonic acid
 5 - 焦磷酸 - β, δ - 二羟 - β - 甲基戊酸
 pyrophosphorylase 焦磷酸化酶
 pycnolase 吡咯酶
 pyrrole 吡咯
 pyrrolidine 2 - carboxylic acid 吡咯烷 - 2 - 羧酸
 Δ' - pyrrolidine 5 - carboxylic acid
 Δ' - 二氢吡咯 5 - 羧酸
 pyrrolidine ring 吡咯烷环, 四氢吡咯
 pyrrolidone carboxylic acid(5 - oxoproline) 吡咯烷酮羧酸
 pyruvate aminotransferase 丙酮酸氨基转移酶
 pyruvate 丙酮酸(或酯)
 pyruvate carboxykinase 丙酮酸羧化激酶
 pyruvate carboxylase 丙酮酸羧化酶
 pyruvate decarboxylase 丙酮酸脱羧酶
 pyruvate dehydrogenase 丙酮酸脱氢酶
 pyruvate dehydrogenase complex 丙酮酸脱氢酶复合体
 pyruvate kinase 丙酮酸激酶
 pyruvic acid kinase(pyruvate kinase) 丙酮酸激酶
 pyruvic acid dehydrogenase 丙酮酸脱氢酶
 pyruvic acid 丙酮酸
 pyruvyl shikimate phosphate synthase 丙酮酰莽草酸磷酸合酶

Q

Q - band Q 带[相当于 AT 丰富区] Q protein Q 蛋白
 quadridentate 四配位体
 quantasome 量子体, 光能转化体
 quantum 量子
 quaternary struture 四极结构
 quaternary ammonium compounds 季铵化合物
 quercitol 栎醇环己五醇
 quinaldic acid 喹啉 - 2 - 羧酸
 quinolate transphosphoribosylase 喹啉酸转磷酸核糖基酶
 quinoline 喹啉
 quinolinic acid 喹啉酸(吡啶 - 2,3 - 二羧酸)
 quinol phosphate 磷酸对苯二酚
 quinone 醌
 O - quinone 邻醌, 邻 - 苯醌
 quinovose(6 - deoxyglucose) 异鼠李糖(6 - 脱氧

葡萄糖)

R

rabies virus 狂犬病病毒
 racemase 消旋酶
 racemate 消旋物
 racemic acid 消旋酸
 racemic compound 消旋化合物
 racemic mixture 消旋混合物
 radiant energy 辐射能
 rdiation sensitive(RAD) 辐射敏感
 radioactive decay 放射衰变
 radioactive isotope 放射性同位素
 radioactivity 放射强度, 放射性
 radioautography(autoradiography) 放射自显影
 radioimmunoassay 放射免疫测定
 RAF kinase RAF 激酶
 ragged red fiber(RRF) 破碎红纤维
 rancidification 腐败作用, 酸败作用
 random coil 无规卷曲
 random - coil conformation 无规线团构象
 rare bases 稀有碱基
 rate constant 速率常数
 rate - limiting enzyme 限速酶
 rauwolfia 萝芙木植物, 蛇根木浸剂
 reaction rate 反应速度
 reaction velocity constant 反应速度常数
 read - through 通读
 reagent 试剂
 rearrangement 重排
 RecA protein RecA 蛋白
 recemization 消旋作用
 receptor 受体
 receptor - mediated endocytosis 受体介导的内吞作用
 receptorsome 受体小体
 recessive jaundice 隐性黄疸
 recessive oncogene 隐性癌基因
 recognition among cells 细胞间的识别
 recombinant 重组体
 recombinant DNA 重组 DNA
 recombinant DNA technology 重组 DNA 技术
 recombination 重组
 recombination repair 重组修复
 recon 重组子, 交换子
 reconstitution 重建
 recycling 回流
 redox potential 氧化还原电位, 氧化还原势
 redox reaction 氧化还原反应
 reduced hemoglobin(hemoglobin) 还原的血红蛋白(血红蛋白)
 reducing agent 还原剂

reductant 还原剂
 reductase 还原酶
 reduction 还原作用
 reduction reaction 还原反应
 refractive index 折光指数
 reductive equivalent 还原当量
 regulatable enzyme 可调节酶
 regulation of gene expression 基因表达调控
 regulatory enzyme 调节酶
 regulatory gene 调节基因
 regulatory network 调节网络
 regulatory protein 调节蛋白
 regulatory sequence 调节序列
 restriction site 限制点
 restriction - modification 限制 - 修饰体系
 regulator site, regulatory site 调节部位
 regulatory inhibition 调节性抑制
 regulatory mechanism 调节机制(理)
 regulon 调节子
 reiterative(repetitive) sequences 重复序列
 release factor 释放因子
 relaxation 松弛, 舒张
 relaxin 松弛素
 relaxed circular DNA(open - circle DNA) 松环 DNA(开环 DNA)
 relaxed control 松弛控制
 relaxed state 松弛态
 renaturation 复性
 renin 肾素, 血管紧张肽酶
 rennins 凝乳酶
 reovirus 呼肠孤病毒
 repair 修复
 repair mechanism 修复机制
 repeat sequence 重复序列
 replacement 置换
 replacement vector 置换型载体
 replicase 复制酶
 replication 复制
 replication factor A 复制因子 A
 replication factor C 复制因子 C
 replication fork 复制叉
 replication protein A 复制蛋白 A
 replicator 复制基因
 peplicon 复制子
 replisome 复制体
 repression 阻遏
 repressor 阻遏物
 reproduction 再生作用
 reproductive cycle 再生循环
 reserpine 利血平
 reserves 储备
 residue 残基

- resilin 节枝弹性蛋白
- resin 树脂
- resolution of racemic mixture 消旋混合物的分离
- resonance 共振
- resorcinol reaction for sugars 糖的间苯二酚反应
- respiration 呼吸作用
- respiratory acidosis 呼吸性酸中毒
- respiratory burst 呼吸爆发
- respiratory alkalosis 呼吸性碱中毒
- respiratory carrier 呼吸载体, 呼吸传递体
- respiratory chain 呼吸链
- respiratory control 呼吸调控
- respiratory enzymes 呼吸酶类
- respiratory gases 呼吸气体
- respiratory quotient 呼吸商
- respiratory system 呼吸系统
- restriction endonuclease 限制性(核酸)内切酶
- restriction fragment length polymorphism (RFLP) 限制性片段长度多态性
- retention 滞留, 滞留
- reticulin 网理蛋白, 网壮菌素
- retinal 视黄醛
- 11 - cis - retinal 11 - 顺 - 视黄醛
- retinal isomerase 视黄醛异构酶
- retinal reductase 视黄醛还原酶
- retinol 视黄醇
- retinoblastoma (Rb) 视网膜母细胞瘤
- retinoic acid 视黄酸
- retinoids 类视黄醇
- retinol 视黄醇
- retinol binding protein (RBP) 视黄醇结合蛋白
- retinol equivalents 视黄醇当量
- retrovirus 反转录病毒
- reversed electron flow 逆(反)电子流
- reverse mutation 回复突变
- reverse transcriptase 反(逆)转录酶
- reverse transcription 反转录
- revolutions per minute (rpm) 每分钟转速
- Rf 比移值
- rhamnose 鼠李糖
- Rhizobium* 固氮菌属
- rhodamine 碱性蕊香红
- retinyl phosphate 视黄醇磷酸酯
- rhodanase 硫氰酸酶
- rhodospirillum capsulata* 囊胞红硫菌
- rhodospirillum spheroides* 螺旋红硫菌
- rhodospirillum viridis* 紫色细菌
- rhodopsin 视紫红质, 视紫质
- rhodospirillum rubrum* 红色红硫菌
- riboflavin 核黄素
- riboflavin synthetase 核黄素合成酶
- α - D - ribofuranose α - D - 呋喃核糖
- 9 - β - D - ribofuranosyladenine (adenosine) 9 - β - D - 呋喃核糖腺嘌呤(腺苷)
- 1 - β - D - ribofuranosylcytosine (cytidine) 1 - β - D - 呋喃核糖胞嘧啶(胞苷)
- ribonuclease 核糖核酸酶
- ribonucleic acid 核糖核酸
- ribonucleic acid bacteriophage 核糖核酸噬菌体
- ribonucleic acid polymerase 核糖核酸聚合酶
- ribonucleoprotein 核糖核蛋白
- ribonucleoside 核糖核苷
- ribonucleic acid - dependent DNA polymerase 依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶
- ribonucleic acid - dependent RNA polymerase 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶
- ribonucleic acid replicase 核糖核酸复制酶
- ribonucleic acid synthetase 核糖核酸合成酶
- ribonucleic acid virus 核糖核酸病毒
- ribonucleoside diphosphate reductase 核苷二磷酸还原酶
- ribonucleotide 核苷酸
- ribonucleotide reductase 核苷酸还原酶
- D - ribose D - 核糖
- ribose 1 - phosphate 核糖 1 - 磷酸
- riboside 核苷
- ribosomal particle 核糖体颗粒
- ribosomal ribonucleic acid (rRNA) 核糖体 RNA
- ribosomal subunit 核糖体亚基
- ribosomal RNA 核糖体 RNA
- ribosome 核糖体
- ribosome cycle 核糖体循环
- ribosome dependent GTPase 依赖核糖体的 GTP 酶
- ribosome dissociating factor 核糖体解离因子
- ribosome - inactivating protein 核糖体灭活蛋白
- ribosome releasing factor 核糖体释放因子
- ribosylthymine (thymine ribonucleoside) 胸腺嘧啶核苷
- 5 - ribosyluracil (pseudouridine) 尿嘧啶 5 - 核苷(假尿嘧啶核苷)
- ribothymidine 胸苷(胸腺嘧啶核糖核苷)
- ribotide 核苷酸
- ribozyme 核酶
- ribulokinase 核酮糖激酶
- ribulose 核酮糖
- ribulose 1,5 - diphosphate 核酮糖 1,5 - 二磷酸
- ribulose diphosphate carboxylase 核酮糖二磷酸羧化酶
- ribulose 5 - phosphate 核酮糖 5 - 磷酸
- ribulose phosphate epimerase 核酮糖磷酸差向异构酶
- 5 - ribulose phosphate kinase 核酮糖 5 - 磷酸激酶
- ricin 蓖麻蛋白
- ricinoleic acid 蓖麻酸 12 - 羟(基)油酸
- ricinoleyl coenzyme A 12 - 羟油酰辅酶 A
- ricketts 痢疾
- rifampicin 利福平
- rifamycin 利福霉素
- rigid plane 刚性平面
- RNA tumor virus 核糖核酸肿瘤病毒
- RNA editing RNA 编辑
- RNA genome RNA 基因组
- RNA polymerase RNA 聚合酶
- RNA primer RNA 引物
- RNA replicase RNA 复制酶
- RNA - directed RNA polymerase (RDRP) RNA 指导的 RNA 聚合酶
- rolling circle 滚动环
- rolling circle model 滚动环模型
- rotenone 鱼藤酮
- R. Q. (respiratory quotient) 呼吸商
- rotation, specific 比旋
- rotational symmetry 旋转对称
- Rous sarcoma virus 劳氏肉瘤病毒
- rRNA precursor rRNA 前体
- rubredoxin 铁硫蛋白

S

- S - adenosyl methionine (SAM) S 腺苷甲硫氨酸
- saccharamide 糖二酰胺
- saccharase 蔗糖酶
- saccharic acid 糖二酸
- saccharification 糖化作用
- Saccharomyces cerevisiae* 啤酒酵母
- saccharopine 酵母氨酸, ϵ - N - (2 - 戊二酸基) 赖氨酸
- saccharopine dehydrogenase 酵母氨酸脱氢酶 ϵ - N(2 - 专二酰) 脱氢酶
- saccharose 蔗糖
- sacculus 小囊
- Sakaguchi reaction 坂口反应(测精氨酸)
- salicylate hydroxylase 水杨酸羟化酶
- salivary α - amylase 唾液 - α - 淀粉酶
- salmine 鲑精蛋白
- Salmonella typhimurium* 鼠伤寒沙门氏菌
- salt bond 盐键
- salting in 盐溶
- salting out 盐析
- salt linkage 盐键
- salvage "补救"作用
- salvage pathway 补救(合成)途径
- Sanger's reagent Sanger 氏试剂(二硝基氟化苯)
- sapogenin 皂角苷配基

- saponification 皂化作用
saponification number 皂化价
saponins 皂角苷
saporin 肥皂草素
sarcine 次黄嘌呤
sarcoma virus 肉瘤病毒
sarcosine 肌氨酸, N-甲基甘氨酸
sarcosine dehydrogenase 肌氨酸脱氢酶
sarcosinemia 肌氨酸血症
saroplasmic reticulum 肌质网
satellite DNA 卫星 DNA
saturation 饱和作用
Schiff's base 席夫碱(伯胺与醛或酮的缩合物)
scotophobin 恐暗素
screening 筛选
scripton 转录子
scyllitol 蜜肌醇
second messenger 第二信使
second-order reaction 二级反应
secondary bile acid 次级胆汁酸
secondary structure 二级结构
secondary targeted gene 次级靶基因
secretory protein 分泌蛋白
secretin 促胰液素
secretion 分泌, 分泌物
sedimentation 沉降
sedimentation constant 沉降系数
sedimentation equilibrium 沉降平衡
sedimentation velocity 沉降速度
sedoheptulose 景天庚酮糖
selachyl alcohol 鲨油醇
selective permeability 选择性通透性
selenocystein 硒半胱氨酸
self-replication 自我复制
Seliwanoff reaction 塞氏反应(测糖)
semen 精液
semiconservative replication 半保留复制
semidiscontinuous replication 半不连续复制
semipermeable membrane 半透膜
semiquinone 半醌
sense strand(plus stand) 有意义链(正链)
senser 感受器
sequence homology 顺序同源
sequenator 序列分析仪
serioin 丝胶蛋白
L-serine L-丝氨酸
serine acetyltransferase 丝氨酸转乙酰基酶
serine dehydrase 丝氨酸脱水酶
serine hydroxymethyl transferase 丝氨酸转羟甲基酶
serine phosphatase 丝氨酸磷酸酶
serine phosphate 磷酸丝氨酸
serine protease 丝氨酸蛋白酶
serine transacetylase 丝氨酸转乙酰酶
serotonin 5-羟色胺
serum 血清
serum albumin 血清清蛋白
serum amylase 血清淀粉酶
serum cholesterol 血清胆固醇
serum globulins 血清球蛋白
serum γ -globulin 血清 γ -球蛋白
serum protein 血清蛋白质
serum prothrombin conversion accelerator (con-vertin) 血清凝血酶原转变加速因子(因子 VII)
serum transaminase 血清转氨酶
seryl- 丝氨酸基
sex factor(fertility factor) 性因子
sex-linkage inheritance 伴性遗传
sex hormone 性激素
shells polysacchride 壳多糖
shikimate kinase 莽草酸激酶
shikimic acid 莽草酸
shikimic acid phosphate 莽草酸磷酸
shikimic acid 5-phosphate 莽草酸 5-磷酸
Shine-Dalgarno sequence SD 区段
shock 休克, 爆破
shunt 支路
shuttle system 穿梭系统
sialic acid 唾液酸
sialidase(neuraminidase) 唾液酸酶
sialyl transferase 唾液酸转移酶
sickle-cell anemia 镰刀形红细胞贫血(症)
sickle-cell hemoglobin(hemoglobin S) 镰刀形红细胞血红蛋白
siderophilin(transferrin) 运铁蛋白
sigma factor(σ factor) σ 因子
signal detector 信号检测器
signal peptide 信号肽
signal recognition particle 信号肽识别颗粒
signal sequence 信号序列
signalling molecule 信号分子
signaltransducer 信号转导体
silencer 静息子/沉默子
silica gel 硅胶
silicates 硅酸盐
simian virus 40(SV-40) 猴病毒 40
simple diffusion 单纯扩散
simple protein 单纯蛋白质
single stranded NDA 单链 NDA
single stranded binding proteins(SSB) 单链结合蛋白
single stranded conformation 单链构象
 β -sitosterol β -谷甾醇
skatole 甲基吲哚
skatoyl 羟甲基吲哚
skeletal proteins 骨骼蛋白质
small cytosol RNA(scRNA) 小胞浆 RNA
small nuclear RNA(snRNA) 核小 RNA
snake venos 蛇毒
sodium ammonium tartrate 酒石酸铵钠
sodium pump 钠泵
soluble ribonucleic acid(transfer ribonucleic acid) 可溶性 RNA(转运 RNA)
solubility 溶解度
somatic cell gene therapy 体细胞基因治疗
somatostatin(SRIH) 生长激素释放抑制因子
somatotropic hormone 生长激素, 促生长素
somatotropin 生长激素
somatotropin releasing factor(SRF) 生长激素释放因子
sorbitol 山梨醇
 α -L-sorbofuranose(L-sorbose) 山梨吡喃糖
L-sorbose-1-phosphate L-山梨糖-1-磷酸
sos repair sos 修复
sos response sos 反应
southern blotting southern 印迹
space between the membranes 膜间空隙
spacer 间隔区
spatial configuration 空间构型
spatial specificity 空间特异性
specific activity 比活力(性)
specific dynamic action of food 食物特别动力作用
specific superhelix 比超螺旋
specific factor 特异因子
specificity 特异性, 专一性
specific rotation 比旋
specificity 特异性
spectrin 血影(收缩)蛋白
spectrophotometry 分光光度法
spectrin 血影蛋白
spectrum 光谱
speridine 精胺
spermidine 亚精胺
spermine 精胺
spherocytosis 球形细胞(症)
D-sphinganine 二氢(神经)鞘氨醇
sphingenine 鞘氨醇
sphingolipase 鞘脂酶
sphingolipid 鞘脂类
sphingomyelin 鞘磷脂
sphingomyelinase 鞘磷脂酶
sphingosine 鞘氨醇

- spliceosome 拼接体, 剪接体
 splice site 剪接点
 splicing enzyme 剪接酶
 squalene 鲨烯
 squalene oxide cyclase 鲨烯氧化物环化酶
 squalene synthetase 鲨烯合成酶
 src family src 家族
 src homology 2 domain SH2 区
 stage specificity 阶段特异性
 stability of colloid 胶体稳定性
 stable isotope 稳定同位素
 stalk 颈部
 standard free energy 标准自由能
 standard redox potential 标准氧化还原电位
 starch 淀粉
 steapsin 胰脂酶
 stearic acid 硬脂酸
 steardioleoin 一硬二油酸甘油酯
 stearyl coenzyme A 硬脂酰辅酶 A
 stearyl coenzyme A desaturase 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶
 stercobilin 粪胆素
 stercobilinogen 粪胆素原
 stereochemical reaction 立体化学反应
 stereochemical structure 立体结构
 stereoisomer 立体异构体
 stereoisomerism 立体异构现象
 steroid 类固醇
 sterol hormone 固醇类激素
 sticky end 黏性末端
 storage polysaccharide 贮存多糖
 storage of fat 贮存脂肪
 stop codon/nonsense codon 终止码, 无意义码
 stopprotein 终止蛋白
 streptokinase 链激酶
 Streptomyces griseus (lividans) 链霉菌
 streptomycin 链霉素
 stimulating G protein 刺激型 G 蛋白
 strong electrolytes 强电解质
 strain 菌株, 品系, 应变
 stringent control 严密控制
 structural gene 结构基因
 structural polysaccharide 结构多糖
 β -structures (proteins) β -结构 (蛋白质)
 sturine 鲟鲛蛋白
 subfamily 亚族
 substance P P 物质
 substrate 作用物, 底物
 subtilin 枯草菌素
 subtilisin 枯草蛋白酶
 subunit, enzyme 亚单位, 亚基(酶)
 succinate 琥珀酸(盐)
 succinate dehydrogenase 琥珀酸脱氢酶
 succinate oxidase 琥珀酸氧化酶
 succinate thiokinase 琥珀酸硫激酶
 succinic acid 琥珀酸
 succinic anhydride 琥珀酸酐
 succinic semialdehyde 琥珀酸半醛
 succinyl coenzyme A 琥珀酰辅酶 A
 succinyl - CoA synthetase 琥珀酰 - CoA 合成酶
 O - succinyl homoserine 琥珀酰高丝氨酸
 N - succinyl - 2 - amino - 6 - keto - L - pimelic acid N - 琥珀酰 - 2 - 氨基 - 6 - 酮 - L - 庚二酸
 N - succinyl - L, L - 2, 6 - diamino - pimelic acid desuccinylase N - 琥珀酰 - 二氨基庚二酸脱琥珀酰酶
 succinyl lipoyl enzyme 琥珀酰脂肪酰酶
 sucrose 蔗糖酶
 supercoil 超螺旋
 superfamily 超家族
 superoxide 超氧化物
 superoxide dismutase (SOD) 超氧化物歧化酶
 supersecondary structure 超二级结构
 sucrose 蔗糖酶
 sucrose 蔗糖
 sucrose gradient sedimentation 蔗糖梯度沉降法
 sucrose intolerance 不耐蔗糖性
 sucrose 6 - phosphate synthetase 蔗糖[6]磷酸合成酶
 sucrose phosphorylase 蔗糖磷酸化酶
 sucrose synthetase 蔗糖合成酶
 sugar 糖
 sulfatase 硫酸酯酶
 sulfate 硫酸(盐)
 sulfatidase 硫酸脑苷脂酶
 sulfhydryl group 硫氢基, 巯基
 sulfide 硫化物
 β - sulfinytpyruvic acid β - 亚磺酰丙酮酸
 sulfite 亚硫酸盐
 sulfite oxidase 亚硫酸盐氧化酶
 sulfite reductase 亚硫酸盐还原酶
 sulfhemoglobin 硫血红蛋白
 S - sulfocysteine S - 磺酸半胱氨酸
 S - sulfogluthatione S - 磺酸谷胱甘肽
 sulfolipid 硫酸脂, 脑硫脂
 sulfonate 磺酸酯
 sulfonated polystyrene resins 磺酸化聚苯乙烯树脂
 sulfonylearea 磺酰脲
 sulfosalicylic acid 磺基水杨酸
 sulfoxides 亚砷化合物
 sulfur - containing amino acids 含硫氨基酸
 supercoil 超卷曲(超级线团)
 superhelical density 超螺旋密度
 superhelical turn 超螺旋数
 superhelix 超螺旋
 superhelix relaxation protein 超螺旋松弛蛋白
 superoxide anion 超氧化物阴离子
 superoxide dismutase 超氧化物歧化酶
 suppressor gene 抑制基因
 supramolecular complex 超分子复合物
 surface active agent 表面活性剂
 surface factor (Hageman factor) 表面因子
 surface reation of colloid 胶体的表面作用
 surface tension 表面张力
 swivelase 转辅酶
 symmetrical compound 对称性化合物
 symport 同向运动
 synapse 突触
 synapsin 突触素
 synaptophysin 突触泡蛋白
 synaptotamin 突触结合蛋白
 syndrome 症候群, 综合征
 synonymous codon 同义密码子
 synephrine 脱氧肾上腺素
 synthase 合酶
 syntaxin 突触结合蛋白
 synthetase 合成酶
- ## T
- tabersonine 水甘, 草碱
 tachysterol 速(变)甾醇(速甾醇)
 D - tagatose D - 塔格糖
 D - talose D - 塔罗糖
 Taq DNA polymerase Taq DNA 聚合酶
 tars from sugats 糖类焦油
 tartar 酒石酸氢钾, 酒石
 tartaric acid 酒石酸
 meso - tartaric acid 内消旋 - 酒石酸
 racemic - tartaric acid 外消旋 - 酒石酸
 target cell 靶细胞
 target DNA 目的 DNA
 target gene 目的基因
 target theory 靶子学说
 dl - tartrates dl - 酒石酸
 TATA binding protein (TBP) TATA 结合蛋白
 TAT box TATA 盒
 Tau protein Tau 蛋白
 taurine 牛磺酸, 氨基乙磺酸
 taurocholic acid (cholytaurine) 牛磺胆酸
 taurocyanine 豚基牛黄酸
 tautomerism 互变(异构)现象
 TBP associate factors (TFs) TBP 相关因子
 teichoic acid 磷壁酸
 teichuronic acid 糖醛酸磷壁(酸)质

- telomere 端区(端粒)
- template 模板
- template ribonucleic acid (messenger ribonucleic acid) 模板核糖核酸(信使核糖核酸)
- template strand 模板链
- temporal regulation 时序调节
- tension 张力
- terminal addition 末端添加
- terminal transferase 末端转移酶
- terminal repetition 末端重复
- C-terminal residu C-末端残基(羧基末端残基)
- N-terminal residue N-末端残基(氨基末端残基)
- termination 终止
- terminator 终止子
- termination codon 终止密码子
- termination factor 终止因子
- termination region 终止区
- terminator codon 终止密子
- temporal specificity 时间特异性
- tensestate 紧张态
- terminus 终点
- ternary complex 三元络合物
- terpene 萜
- terpene acids 萜酸类
- terpenol phosphate 磷酸萜烯醇
- tetracyclin (oxytetracyclin) 土霉素(氧四环素)
- tertiary structure 三级结构
- testicular hormone 睾丸激素
- testodioxin 睾丸毒蛋白
- testosterone 睾(甾)酮, 睾丸素
- tetany 搐搦
- N-tetracosanoic acid (Lignoceric acid) 二十四(烷)酸
- cis-15-tetracosenic acid (nervonic acid) 顺式-15-二十四碳烯酸(神经酸)
- tetracycline 四环素
- N-teradecanoic acid (myristic acid) 正-十四(烷)酸(豆蔻酸)
- tetrahedron structure 四面体结构
- 3 α ,5 α -tetrahydroaldosterone 3 α ,5 α -四氢醛固酮
- tetrahydroallopregnone 四氢别孕烷
- tetrahydrobiopterin 四氢生物蝶呤
- 3 α ,5 α -tetrahydrocorticosterone 3 α ,5 α -四氢皮质酮
- 3 α ,5 α -tetrahydrocortisol 3 α ,5 α -四氢皮质醇
- tetrahydrofolate 四氢叶酸(盐)
- tetrahydrofolic acid 四氢叶酸
- 5,6,7,8-tetrahydrofolic acid 5,6,7,8-四氢叶酸
- N¹⁰-tetrahydrofolic acid N¹⁰-四氢叶酸
- tetrahydropteridin 四氢蝶呤
- 3,5,3',5'-tetraiodothyronine (thyroxine) 3,5,3',5'-四碘甲状腺氨酸(甲状腺素)
- tetramer 四聚体
- 2,3,4,6-tetra-O-methylglucose 2,3,4,6-四-O-甲基葡萄糖
- 2,4,5,6-tetraoxypyrimidine (alloxan) 2,4,5,6-四氧嘧啶(四氮嘧啶)
- tetrapeptide 四肽
- thalassemia 地中海贫血
- thenoyltrifluoroacetone 噻吩甲酰三氟丙酮
- thermodynamics 热力学
- thermolysin 嗜热菌蛋白酶
- thermolysis 散热作用, 热分散
- thetin 硫代甜菜碱
- thiaminase 硫胺素酶
- thiamine 硫胺素
- thiamine chloride 盐酸硫胺素
- thiamine monophosphate 硫胺素-1-磷酸
- thiamine phosphate pyrophosphorylase 磷酸硫胺素焦磷酸化酶
- thiamine phosphoric acid 硫胺素磷酸
- thiamine pyrophosphate 硫胺素焦磷酸
- thin-layer chromatography 薄层层析
- thiobarbituric acid reagent 硫代巴比土酸试剂
- thiocarbamide (thiourea) 硫脲
- thiochrome 硫色素
- thiol group 硫醇基
- thiotic acid (lipoic acid) 二硫辛酸
- thiocyanate 硫氰酸(盐)
- thiocyanate detoxication 硫氰酸盐解毒
- thiocysteine 硫代半胱氨酸
- thioethanolamine (cysteamine) 硫代乙醇胺(半胱胺)
- thioesterase 硫酯酶
- thioester bond 硫酯键
- thiogalactoside transacetylase 硫代半乳糖苷乙酰基酶
- 5-thio-D-glucopyranose 5-硫-D-吡喃葡萄糖
- thioguanine 硫鸟嘌呤
- thiolacetic acid 硫羟乙酸
- thiolase 硫解酶
- thioester 硫酯
- thiol group 硫醇基
- β -thiolpyruvate cleavage enzyme β -硫醇基丙酮酸分裂酶
- thiolysis 硫解作用
- thiolpyruvate transsulfurase β -硫醇基丙酮酸转硫酶
- β -thiolpyruvic acid β -硫醇基丙酮酸
- thiophorase 辅酶 A 转移酶
- thioredoxin reductase 硫氧化还原蛋白还原酶
- thioredoxin 硫氧化还原蛋白
- thioredoxin-S₂ 二巯基硫氧还蛋白
- thioredoxin-(SH)₂ 巯基硫氧还蛋白
- thiosemicarbazide 氨基硫脲
- thiosulfate 硫代硫酸(盐)
- thiosulfate transsulfurase 硫代硫酸(盐)转移酶
- 2-thiouracil 2-硫尿嘧啶
- thiourea 硫脲
- third factor 第三因子
- third messenger 第三信使
- three-site model 三位模式
- D-threonine D-苏氨酸
- L-threonine L-苏氨酸
- threonine aldolase 苏氨酸醛缩酶
- threonine deaminase 苏氨酸脱氨酶
- threonine dehydratase 苏氨酸脱水酶
- threonine synthetase 苏氨酸合成酶
- D-threose D-苏糖
- threshold 阈
- thrombin 凝血酶
- thrombin zymogen 凝血酶原
- thrombokinas 凝血酶原激酶
- thromboplastin 促凝血酶原激酶
- thromboplastin antecedent 促凝血酶原激酶前生物
- thrombosthenin 血栓收缩蛋白
- thromboxane (TX) 血栓素
- thymidine (deoxyribosylthymine) 脱氧胸(嘧啶)核苷
- thymidine diphosphate (dTDP) 脱氧胸苷二磷酸
- thymidine diphosphate N-acetylgalactosamine (dTDP-N-acetylgalactosamine) 脱氧胸苷二磷酸-N-乙酰氨基半乳糖
- thymidine diphosphate galactose (dTDP galactose) 脱氧胸苷二磷酸-半乳糖
- thymidine diphosphate glucosamine (dTDP-glucose) 脱氧胸苷二磷酸-葡萄糖
- thymidine diphosphate glucosamine (dTDP-glucose) 脱氧胸苷二磷酸-葡萄糖
- thymidine diphosphate mannose (dTDP-mannose) 脱氧胸苷二磷酸-甘露糖
- thymidine diphosphate rhamnose (dTDP-sugars) 脱氧胸苷二磷酸-鼠李糖
- thymidine monophosphate 胸苷酸
- thymidylate synthetase 胸苷酸合成酶
- thymine 胸腺嘧啶
- thymine deoxyribonucleoside (thymidine) 胸腺嘧啶脱氧核苷(脱氧胸苷)
- thymine dimer 胸腺嘧啶二聚体
- thymine ribonucleoside 胸腺嘧啶核糖核苷

- thymine ribonucleoside phosphate(TMP)胸苷酸
 thymelytic steroids 抑制胸腺细胞类固醇(甾)醇
 thymosin 胸腺素
 thymoacetic acid 百里香乙酸
 thyrocalcitonin(calctonin)降钙素
 thyroglobulin 甲状腺球蛋白
 thyroid binding globulin 甲状腺结合球蛋白
 thyroid peroxidase 甲状腺过氧化物酶
 thyroid-stimulating hormone(thyrotropic hormone, TSH)促甲状腺素
 thyrotropic factor 促甲状腺因子
 thyrotropic hormone(TSH)促甲状腺(激)素
 thyrotropic hormone regulatory factor 促甲状腺激素调节因子
 thyrotropic stimulating hormone(TSH)促甲状腺激素
 thyrotropin(thyrotropic hormone)促甲状腺素
 thyrotropin-releasing factor(hormone)(TRF, TRH)促甲状腺素释放因子
 thyroxine 甲状腺素
 thyroxine dehalogenase 甲状腺素脱卤素酶
 tidal air 潮气(每次呼吸运动的气体量)
 tilyl coenzyme A 甲基巴豆酰辅酶 A
 tissue respiration 组织呼吸
 titration curve 滴定曲线
 toad poisons 蟾蜍毒(素)
 tobacco mosaic virus(TMV)烟草斑纹病毒
 tobacco necrosis satellite virus 烟草坏死卫星病毒
 tocopherol(vitamin E)生育酚(维生素 E)
 α -tocopherylquinone α -生育醌
 tolerance test 耐量试验
 toluene 甲苯
 topoisomerase 拓扑异构酶
 topology 拓扑学
 topological linking number 拓扑连环数
p-toluene sulfonyl group 对-甲苯磺酰基
 tosyl group 甲苯磺酰基
 total acidity 总酸度
 total metabolism 总代谢
 totipotency 全息性/全能性
 toxicity 毒性
 TPN(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)(NAD⁺)磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
 TPNH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-reduced)(NADPH)还原型磷酸烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
 trace element 微量元素
 tracer 示踪物
 tracers, isotopic 同位素示踪物
 transaldolase 转醛醇酶
 trans- Δ ,enoyl CoA 反- Δ^2 -烯酰 CoA
 trans,acting factor 反式作用因子
 trans-acting protein 反式作用蛋白
 trans isomer 反式异构体
 transacetylase 转乙酰基酶
 transaldimintion 转醛亚胺作用
 transaldolase 转醛酶
 transaldolase reaction 转醛酶反应
 transamidinase 转脘基酶
 transaminase(aminotransfurase)转氨酶(氨基转移酶)
 transamination 转氨基作用(转氨作用)
 transmittancy 透光率(度)
 transcaboxylase 转羧基酶
 transcobalamin I 转钴胺素 I
 transcobalamin II 转钴胺素 II
 transcortin 皮质(激)素传递蛋白
 transcript 转录本,转录物
 transcriptase 转录酶
 transcription 转录(作用)
 transcription attenuation 转录衰减
 transcription inhibitor 转录抑制因子
 transcription initiation site 转录起始点
 transcription factor 转录因子
 transcription bubble 转录泡
 transcription(scription)转录子
 transducer 转导体
 transduction 转导作用
 transesterification 转酯基作用
 transfection 转染
 transfer RNA(tRNA)转运 RNA
 transfer factor 转移因子
 transfer reaction 转移反应
 transfer ribonucleic acid(tRNA)转移 RNA(转运 RNA)
 transferring enzyme 转移酶
 transferrin 铁传递蛋白,铁运送蛋白
 transferase 转移酶
 transformation 转化(作用)
 transformant 转化子
 transforming factor 转化因子
 transforming growth factor 转化生长因子
 transformylase 转甲酰基酶
 transglutaminase 转谷氨酰胺酶
 transglycosylase 转糖基酶
 transglycosylation 转糖基作用
 transhydrogenase 转氢酶
 transhydrogenation 转氢作用
 trans-isomer 反式异构体
 transition 转换
 transation state 过渡态
 fransation state analogs 过渡态类似物
 transketolase 转酮醇酶
 transaldolase 转醛糖酶
 translation 翻译
 translocase 移位酶
 translocation 移位(作用)
 transmembrane signalling 跨膜信号传递
 transmethylation 转甲基作用
 transmission of genetic information 遗传信息的传递
 transmitter 神经递质
 transpeptidase 转肽酶
 trans-peptide unit 反式肽单元
 transeptidation 转肽(作用)
 transport protein 运送蛋白
 transphosphatidylaton 转磷脂酰作用
 transport, active 主动转运
 transport maximum 最大转运(量)
 transsulfurase 转硫酶
 transhiocesterase 转硫酯酶
 transudates 渗出物
 transsulfuration 转硫醇作用
 transversion 颠换
 traumatin 创伤因子
 trehalose 海藻糖
 TR factor TR 因子
 tri-N-acetylglucosamine 三-N-乙酰氨基葡萄糖
 tri-acylglycerol 三酰甘油酯
 tributyrin 三丁酸甘油酯
 tricarboxylic acid cycle(citric acid cycle)三羧酸循环(柠檬酸循环)
 trichloroacetic acid 三氯醋酸
 trichosanthin 天花粉蛋白
 triglyceride(triacylglycerol)三酰甘油(甘油三脂)
 trigonelline 葫芦巴碱,N-甲基烟酸内盐
 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy cholanic acid(cholic acid)3 α ,7 α ,12 α -三羟基胆烷酸(胆酸)
 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanone 3 α ,7 α ,12 α -三羟基粪烷
 3 α ,7 α ,12 α -trihydroxycoprostanic acid 3 α ,7 α ,12 α -三羟基粪烷酸
 triiodothyronine 三碘甲状腺氨酸
 3,3',5'-triiodothyronine 3,3',5'-三碘甲状腺氨酸
 3,5,3'-triiodothyronine 3,5,3'-三碘甲状腺氨酸
 triketohydrindene hydrate(ninhydrin)水合茚三酮
 trimer 三聚体
 trimethylamine oxide 氧化三甲胺
 2,3,6-tri-O-methyl glucose 2,3,6-三氧甲基葡萄糖

- 5,7,8 - trimethylcoel(α tocopherol)
5,7,8 - 三甲基生育酚(α - 生育酚)
- 1,3,7 - trimethylxanthine(caffeine)
1,3,7 - 三甲基黄嘌呤(咖啡因)
- trinitucleotide(in nucleic acids)三核苷酸
- triolein 三油酸甘油酯
- triose 丙糖
- triose isomerase 丙糖异构酶
- triose oxidation 丙糖氧化作用
- triose phosphate dehydrogenase 磷酸丙糖脱氢酶
- triose phosphate 丙糖磷酸
- triose phosphate isomerase 丙糖磷酸异构酶
- 2,6,8 - trioxypurine(uric acid)
2,6,8 - 三羟基嘌呤(尿酸)
- tripalmitin 三软脂酸甘油酯
- tripeptide 三肽
- triphenylethylgroup 三苯甲基
- triplet code 三联体密码
- triplet hypothesis 三联体假说
- triplet state 三联体状态
- triploide 三倍体
- trisaccharide 三糖
- tristearin 三硬脂酸甘油酯
- triterpene 三萜烯
- tritium labeling 氚标记
- trityl group 三苯甲基
- trityrosine 三酪氨酸(肽)
- tRNA(transfer ribonucleic acid)转移 RNA(转运 RNA)
- tRNA precursor tRNA 前体
- tropocollagen 原胶原蛋白
- troelastin 原弹性蛋白
- tropomyosin A 原肌球蛋白 A
- troponin 肌钙蛋白,肌原蛋白
- tropone C 钙结合亚基
- truncated receptor 抬头受体
- trypsin 胰蛋白酶
- trypsinogen 胰蛋白酶原
- tryptamine 色胺
- tryptophan 色氨酸
- tryptophanase 色氨酸酶
- tryptophan 2,3 - dioxygenase 色氨酸 2,3 - 二加氧酶
- tryptophan 5 - monooxygenase 色氨酸 5 - 单加氧酶
- tryptophan synthetase 色氨酸合成酶
- tryptophanyl - tRNA synthetase 色氨酸 - 转移核糖核酸合成酶
- TSH(thyrotropic hormone)促甲状腺素
- tuberculoostearic acid 结核硬脂酸
(10 - 甲基硬脂酸)
- tubulin 微管蛋白
- tumor suppressor gene 肿瘤抑制基因
- Tus protein Tus 蛋白
- turacin 羽红素,羽红铜卟啉
- turbidity of urine 尿的混浊度
- turnover number 转换数
- turnover rate 转移率
- twistin number 绕数
- two - electron donor 双电子供体
- two fold rotationally symmetry 二元旋转对称
- two - state gated - pore mechanism 两态闸门 - 孔道机制
- tyramine 酪胺
- tyrosinase 酪氨酸酶
- tyrosine 酪氨酸
- tyrosine aminotransferase 酪氨酸氨基转移酶
- tyrosine - glutamate aminotransferase 酪氨酸 - 谷氨酸氨基转移酶
- tyrosin hydroxylase 酪氨酸羟化酶
- tyrosinemia 酪氨酸血症
- tyrosine protein kinase 酪氨酸蛋白激酶
- tyrosyl - tRNA 酪氨酰 - 转移核糖核酸

U

- ubiquinone(coenzymeQ)泛醌(辅酶 Q)
- ubiquinone - 9 泛醌 - 9
- ubiquitin 泛肽
- ubiquitin ligase 泛肽连接酶
- UDP - D - galactose UDP - D - 半乳糖
- UDP - galactose - 4 - epimerase UDP - 乳糖 4 - 差向酶
- UDP - galactose pyrophosphorylase
UDP - 半乳糖焦磷酸化酶
- UDP - glucose pyrophosphorylase
UDP - 葡萄糖焦磷酸化酶,尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶
- UDPG - glycogen transglucosylase
UDPG - 糖原转葡萄糖基酶
- ultracentrifugation 超速离心
- ultracentrifuge 超速离心机
- ultrasonic vibration 超声波振动
- ultraviolet absorption spectra 紫外吸收光谱
- ultraviolet irradiation 紫外线照射
- ultraviolet light 紫外光(线)
- UMP(uridine5' - monophosphate)5' - 尿苷酸
- uncompetitive inhibition 反竞争性抑制
- uncoupling 解偶联
- uncoupling factors 解偶联因子
- unesterified fatty acid 非脂化的脂肪酸,自由脂肪酸
- ungglic acid 蒎酸
- unidirectional 单向
- unique sequence 单一顺序
- unit 单位
- unit membrane 单位膜
- uniport transport 单向运送
- unsaturated compound 不饱和化合物
- unsaturated ether 不饱和醚
- unsaturated fatty acid 不饱和脂肪酸
- unsaturated lipid 不饱和脂
- unspecific small unclear ribonucleo - protein 非特异的小核糖核蛋白
- unstream activator sequence 上游激活序列
- untwistin protein(topoisomerase)解旋蛋白
- unwinding 解链
- unwindase 解链酶
- unwinding protein 解链蛋白
- uptake 吸收
- uracil 尿嘧啶(2 氧嘧啶)
- uracil arabinoside 尿嘧啶阿拉伯糖苷
- urate oxidase 尿酸氧化酶
- urea 尿素,脲
- urea cycle 尿素循环(鸟氨酸循环)
- urea nitrogen 尿素氮,尿氮
- urease 尿酶
- β - ureidoisobutyric acid β - 脲基异丁酸
- β - ureidopropionase β - 脲基丙酸酶
- β - ureidopropionic acid β - 脲基丙酸
- ureotelic animal 排尿酸动物
- uric acid 尿酸
- uricase 尿酸酶
- uricotelic animal 排尿酸动物
- uridine 尿(嘧啶核)苷
- uridine monophosphate 尿苷酸
- uridine 2',3' - cyclic monophosphate
2',3' - 环尿苷酸
- uridine diphosphate(UDP)尿苷二磷酸
- uridine diphosphate arabinose 尿苷二磷酸阿拉伯糖
- uridine diphosphate galactose 尿苷二磷酸半乳糖
- uridine diphosphate galacturonic acid 尿苷二磷酸半乳糖醛酸
- uridine diphosphate glucosamine 尿苷二磷酸氨基葡萄糖
- uridine diphosphate glucose(UDP - glucose)尿苷二磷酸葡萄糖(UDP - 葡萄糖)
- uridine diphosphate glucose epimerase 尿苷二磷酸葡萄糖差向异构酶
- uridine diphosphate glucuronic acid 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸
- uridine diphosphate iduronic acid 尿苷二磷酸艾杜糖醛酸
- uridine diphosphate mannosamine 尿苷二磷酸甘露糖胺

uridine diphosphate muramic acid 尿苷二磷酸胞壁酸
 uridine diphosphate rhamnose 尿苷二磷酸鼠李糖
 uridine diphosphate xylose 尿苷二磷酸木糖
 uridine 5' - monophosphate (uridylic acid, UMP) 5' - 磷酸尿苷(尿苷酸)
 uridine 5 - phosphate kinase 尿嘧啶核苷酸激酶
 uridine triphosphate(UTP)尿苷三磷酸
 urinary ammonia 尿氨
 urobilin 尿胆素
 urobilinogen 尿胆素原
 urobilirubin 尿胆红素
 urocanase 尿刊酸酶
 urocanic acid 尿刊酸, 咪唑丙烯酸
 urocanic acid hydratase 尿刊酸水合酶
 urochrome 尿色素
 uroconisol 尿皮质醇
 urocortisone 尿可的松, 四氢可的松
 uroerythrin 尿赤素
 urokinase 尿激酶
 uromucoid 尿类黏蛋白
 uronic acid 糖醛酸
 uroporphyrin 尿卟啉
 uroporphyrin I synthetase 尿卟啉 I 合成酶
 uroporphyrinogen 尿卟啉原
 uroporphyrinogen decarboxylase 尿卟啉原脱羧酶
 urorosein 原蔷薇红素

V

vaccenic acid 11 - 十八(碳)烯酸
 vaccinia virus (cowpox virus) 牛痘病毒
 vacuoles 液泡
 valeric acid 戊酸
 D - valine D - 缬氨酸
 valine aminotransferase 缬氨酸转氨酶
 valine transaminase 缬氨酸转氨酶
 valinemia 缬氨酸血症
 valinomycin 缬氨霉素
 Van der waal 范德华
 vanilic acid 香草酸, 4 - 羧(基) - 3 甲氧(基)苯甲酸
 valinomycin 缬氨霉素
 vascular endothelial growth factor 血管内皮生长因子
 vasoactive peptide 血管活性肽
 vasoconstrictor 血管收缩剂
 vasodepressor 血管减压剂
 vasodilator 血管舒张剂
 vasomotor 血管收缩剂
 vasopressin 加压素(抗利尿素)
 vasopressor 血管加压剂

vasotocin 催产素, 8 - 精催产素
 vaccine 菌苗, 疫苗
 vector(运)载体
 vegetable protein 植物蛋白
 velocity constant 速度常数
 venom 毒液
 verdohemochrome 胆绿素, 胆绿血色素
 verdohemochromogen 胆绿素原, 胆绿血色素原
 verdoperoxidase 绿过氧化物酶, 髓过氧化物酶
 very high density lipoprotein (VHDL) 极高密度脂蛋白
 very low density lipoprotein (VLDL) 极低密度脂蛋白
 vesicle 囊泡
 vibration, ultrasonic 超声波振动
 vinblastin 长春花碱
 vinylacetic acid 乙烯醋酸
 viroid 类病毒
 viscosity 黏度
 visual pigment 视色素
 visual violet 视素质
 visual purple (rhodopsin) 视紫红质
 visual threshold 视阈
 vitalism 生机论, 活力论
 vitamin 维生素
 vitamin A 维生素 A (抗干眼醇)
 vitamin A₁ (retinol) 维生素 A₁ (视黄醇)
 vitamin A₁ acid (retinoic acid) 维生素 A₁ 酸 (视黄酸)
 vitamin A aldehyde (retinol) 维生素 A₁ 醛 (视黄醛)
 vitamin A₁ ester (retinyl ester) 维生素 A₁ 酯 (视黄酯)
 vitamin A₂ 维生素 A₂
 vitamin B₁ (thiamine) 维生素 B₁ (硫胺素)
 vitamin B₂ (riboflavin) 维生素 B₂ (核黄素)
 vitamin B₆ (pyridoxin) 维生素 B₆ (吡哆醇)
 vitamin B₁₂ (cobalamin) 维生素 B₁₂ (钴胺素)
 vitamin C (ascorbic acid) 维生素 C (抗坏血酸)
 vitamin D 维生素 D
 vitamin D₃ 25 - hydroxylase 维生素 D₃ 25 羟化酶
 vitamin E (tocopherol) 维生素 E (生育酚)
 vitamin K 维生素 K
 vitamin PP (nicotinic acid, nicotinamide) 维生素 PP (烟酸, 尼克酰胺)
 virus 病毒
 virus oncogene (v - onc) 病毒癌基因
 voltage - dependent Ca²⁺ channel 电压控制 Ca²⁺ 通道
 voltage - gated channels 电压 - 闸门通道
 V_s protease V_s 蛋白酶

W

walden inversion 旋光转化作用
 warburg apparatus 瓦氏呼吸器
 waring blender 韦林氏搅碎器
 wasp venom 蚂蜂毒液
 water soluble vitamin 水溶性维生素
 Watson Crick model of DNA Watson Crick DNA 模型
 wax 蜡
 weak electrolyte 弱电解质
 whey 乳清
 wild type 野生型
 willardin 尿嘧啶丙氨酸
 Willson's disease 血铜蓝蛋白缺乏病/Wilson 病
 winding number (DNA) 匝数
 wobble 变偶性, 摆动性
 wobble base pair 不稳定配对
 wobble hypothesis 摆动假说
 wound hormone 愈伤激素
 writhing number 拧数

X

xanthine 黄嘌呤
 xanthine nucleotide 黄苷酸
 xanthine dehydrogenase 黄嘌呤脱氢酶
 xanthine oxidase 黄嘌呤氧化酶
 xanthine ribotide (xathylic acid) 黄嘌呤苷酸
 xanthomycin 链霉素
 xanthophyll 叶黄素, 胡萝卜醇
 xanthopterin 黄嘌呤
 xanthosine 黄(嘌呤核)苷
 xanthurenic acid 黄尿酸
 xanthydrol 二苯吡喃醇
 xanthylic acid (XMP) 黄苷酸
 xenogenetic 异种的
 xenograft 异种移植
 Xenopus 爪蟾, 非洲蟾蜍
 xeroderma pigmentosa 着色性干皮病
 Xray analysis X 射线分析
 Xray crystal analysis X 射线结晶分析
 Xray diffraction X 射线衍射
 xylan 木聚糖
 xylitol 木糖醇
 xyloascorbic acid (ascorbic acid) 木糖型抗坏血酸(抗坏血酸)
 α - D - xylopyranose α - D - 吡喃木糖
 xylose 木糖
 xyloside 木糖苷
 xylulose 木酮糖
 xylulose dehydrogenase 木酮糖脱氢酶
 xylulose 5 - phosphate 木酮糖 - 5 - 磷酸

Y

yeast 酵母
yeast artificial chromosome 酵母人工染色体
yest extract 酵母抽提物
yeast fermentation(酵母)生醇发酵
yellow enzyme 黄酶
yolk 蛋黄,卵黄

Z

zeatin 玉米素
zein 玉米胶蛋白
zero - order reaction 零级反应
zinc 锌
zinc finger 锌指结构
zonal centrifugation 区带离心

zonal electrophoresis 区带电泳
zoomeric acid 棕榈油酸;鲨油酸
zwitter ion 两性离子,兼性离子
zymogen 酶原
zymogen granules 酶原小粒
zymolysis 酶解作用
zymoprotein 酶蛋白
zymosterol 酵母甾(固)醇

常用生化名词缩写

缩写	英文名称	中文名称
A	adenine adenosine, alanine	腺嘌呤, 腺嘌呤核苷, 丙氨酸
ACTA	acylCoA, cholesterol, acyltransferase	酯酰 - CoA; 胆固醇, 脂酰转移酶
Ach	acetylcholine	乙酰胆碱
AchR	acetylcholine receptor	乙酰胆碱受体
ACP	acid phosphatase	酸性磷酸酶
ACP	acyl carrier protein	酰基载体蛋白
ACTH	adrenocorticotrophic hormone	促肾上腺皮质激素
Ad	adrenaline, adenovirus	肾上腺素, 腺病毒
ADA	adenosine deaminase	腺苷脱氨酶
ADH	alcohol dehydrogenase, antidiuretic hormone	乙醇脱氢酶, 抗利尿素
ADP	adenosine diphosphate	腺嘌呤核苷二磷酸(腺二磷)
AdR	adenosine deoxyribose	脱氧核糖腺苷
AFP	α - fetoprotein	甲胎蛋白(胎甲球蛋白)
AFS	atomic fluorescence spectroscopy	原子荧光光谱(法)
AHH	aryl hydrocarbon hydroxylase	芳香羟化酶
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome	获得性免疫缺损综合征, 艾滋病
AKP	alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ALA	δ - amino - levulinic acid	δ - 氨基 - γ - 酮戊酸(δ - 氨基乙酰丙酸)
Ala	alanine	丙氨酸(α - 氨基丙酸)
Ala-tRNA ^{ala}	alanyl-tRNA ^{ala}	丙氨酰 - 丙氨酸 tRNA
AMP	adenosine monophosphate	腺嘌呤核苷一磷酸(腺一磷)
ANP	atrial natriuretic peptide	心钠素, 心房肽
6 - APA	6 - amino penicillanic acid	6 - 氨基青霉烷酸
APH	aminoglucoiside phospho transferase	氨基糖苷磷酸转移酶
APO	apolipoprotein	载脂蛋白
APRT	adenine phosphoribosyl transferase	腺嘌呤磷酸核糖转移酶
Arg	arginine	精氨酸(δ - 胍基 - α - 氨基戊酸)
ARS	autonomously replicating sequence	自主复制序列
Asn	asparagine	天冬酰胺
Asp	aspartic acid	天冬氨酸(α - 氨基丁二酸)
AT	acetyltransferase	乙酰基转移酶
ATCase	aspartate carbamyl transferase	天冬氨酸转氨甲酰酶
ATF	activating transcription factor	活化转录因子
ATP	adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸(腺三磷)
ATPase	adenosine triphosphatase	腺苷三磷酸酶
ARF	ADPriboseylation factor	ADP 核糖基化因子
araA	adenin arabinoside	阿糖腺苷
araC	cytosine arabinoside	阿糖胞苷
araT	thymine arabinoside	阿糖胸苷
B	(Asx) asparagine or aspartic acid, boron	天冬酰胺或天冬氨酸, 硼
BBB	blood-brain barrier	血脑屏障
BC	biotin carboxylase	生物素羧化酶
BCCP	biotin carboxyl-carrier protein	生物素羧基载体蛋白
BME	β - mercaptoethanol	β - 巯基乙醇
BMR	basal metabolic rate	基础代谢率
Boc	t-butylloxycarbonyl	叔丁氧羰基
Bom	benzyloxymethyl	苄氧甲基
bp	base pair	碱基对

BSA	bovine serum albumin	牛血清清蛋白
C	cysteine, cytidine, cytosine, coulome	半胱氨酸, 胞(嘧啶核)苷, 胞嘧啶, 库仑
CA	catecholamine	儿茶酚胺
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	环化腺苷酸(环腺一磷)
CAP	catabolite activator protein	分解代谢物激活蛋白
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CD	circular dichroism	圆二色性
CDP	cytidine diphosphate	胞嘧啶核苷二磷酸(胞二磷), 胞苷二磷酸
CEA	carcino-embryonic antigen	癌胚抗原
CG	chorionic gonadotropin	绒毛膜促性腺激素
cGMP	cyclic guanylic acid	环鸟苷酸(环鸟一磷)
Cit	citrulline	瓜氨酸
CMP	cytidine monophosphate	5'-胞嘧啶核苷一磷酸(胞苷酸、胞一磷)
CM-cellulose	carboxymethyl cellulose	羧甲基纤维素
CMcys	S-carboxymethyl cysteine	S-羧甲基半胱氨酸
CNBr	cyanogen bromide	溴化氢
Co I	coenzym I	辅酶 I
Co II	coenzyme II	辅酶 II
CoA	coenzyme A	辅酶 A
CoA-S-Ac	acetyl coenzyme A	乙酰辅酶 A
CoQ	coenzyme Q	辅酶 Q
CRE	cAMP response element	cAMP 效应元件
CPK	creatin phosphokinase	肌酸磷酸激酶
CRF	corticotropin releasing factor(corticoliberin)	促肾上腺皮质激素释放因子
CTP	cytidine triphosphate	胞嘧啶核苷三磷酸(胞三磷)
Cys	cysteine	半胱氨酸(β -巯基- α -氨基丙酸)
Cyt	cytosine	胞嘧啶
Cyt b	cytochrome b	细胞色素 b
Cyt c	cytochrome c	细胞色素 c
Cyt p	cytochrome p	细胞色素 p
CTL	cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 细胞
D	aspartic acid	天冬氨酸
dA	5'-deoxy-ribosyladenosine	5'-脱氧(脱氧腺苷)
dADP	deoxyadenosine diphosphate	脱氧腺苷二磷酸, 脱氧腺二磷
dAMP	deoxyadenosine monophosphate	脱氧腺苷一磷酸(脱氧腺苷酸)
dATP	deoxyadenosine triphosphate	腺嘌呤脱氧核苷三磷酸, 脱氧腺三磷
dC	5'-deoxycytidine	脱氧胞苷
DCCI(=DCC)	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide	N,N'-二环己碳二亚胺
dCMP	deoxycytidine monophosphate	脱氧胞苷(一磷)酸
ddC	2',3'-dideoxycytidine	2',3'-双脱氧胞苷
DHU	dihydrouracil	二氢尿嘧啶
DIFP(=DFP)	diisopropyl fluorophosphate	二异丙基氟磷酸
dIMP	deoxyinosine-5'-monophosphate	脱氧次黄苷(一磷)酸, 脱氧肌苷酸
DIT	diiodotyrosine	二碘酪氨酸
dITP	deoxyinosine triphosphate	脱氧次黄苷三磷酸, 脱氧肌苷三磷酸
dG	5'-deoxyguanosine	5'-脱氧鸟苷(脱氧鸟苷)
dGMP	deoxyguanosine monophosphate	脱氧鸟苷(一磷)酸
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	deoxyribonuclease	脱氧核糖核酸酶
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzene	2,4-二硝基氟苯
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DOPA	3,4-dihydroxyphenylalanine	多巴, 3,4-二羟苯丙氨酸
2,3-DPG	2,3-diphosphoglyceric acid(-rate)	2,3-二磷酸甘油酸
DPN	diphosphopyridine nucleotide	二磷酸吡啶核苷酸(辅酶 I)
DPP	dimethylallyl pyrophosphate	二甲基丙烯焦磷酸

dT	deoxy thymidine	脱氧胸苷
dTMP	deoxythymidine monophosphate	脱氧胸苷(一磷)酸
dUMP	deoxyuridine monophosphate	脱氧尿苷(一磷)酸
E	glutamic acid, erythrocyte	谷氨酸, 红细胞
EBER	EBV-encoded RNA	EB 病毒编码 RNA
EBS	exon-binding site	外显子结合部位
EBV	Epstein-Barr virus	EB 病毒
EC	enzyme classification	酶分类由国际生化联合会公布的酶分类标志
EF(eIF)	elongation factor	延伸因子
EIA	enzyme immunoassay	酶免疫测定
eIF	eukaryotic initiation factor	真核起始因子
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
EPR	electron paramagnetic resonance	电子顺磁共振
ER	endoplasmic reticulum	内质网
exo III	exonuclease III	外切核酸酶 III
F	phenylalanine	苯丙氨酸
FAD	flavin-adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
FADH ₂	flavin adenine dinucleotide reduced	还原型黄素腺嘌呤二核苷酸
F-1,6-BP	fructose - 1,6 - bisphosphate	果糖 - 1,6 - 二磷酸
F-2,6-BP	fructose - 2,6 - bisphosphate	果糖 - 2,6 - 二磷酸
FCS	fetal calf serum	胎牛血清
FBPase	fructose bisphosphatase	果糖二磷酸酶
FDNB(= DNEFB)	1 - fluoro - 2,4 - dinitrobenzene	1 - 氟 - 2,4 - 二硝基苯
FH ₂ (DHF)	dihydrofolic acid	二氢叶酸
FH ₄ (THF)	tetrahydrofolic acid	四氢叶酸
FISH	fluorescence in situ hybridization	荧光原位杂交
Fld	flavodoxin	黄氧还蛋白
FMN	flavin mononucleotide	黄素单核苷酸
FMNH ₂	flavin adenine dinucleotide reduced	还原型黄素腺嘌呤单核苷酸
FP	flavin protein	黄素蛋白
FPIC	fast protein liquid chromatography	快速蛋白质液相层析
F-6-P	fructose - 6 - phosphate	果糖 - 6 - 磷酸
FSH	follicle stimulating hormone	促卵泡激素释放激素
FRF	follicle stimulating hormone releasing factor(= gonadoliberin)	促卵泡激素释放因子
FRH	follicle stimulating hormone releasing hormone	促卵泡激素释放激素
5 - FU	5 - fluorouracil	5 - 氟尿嘧啶
G	glycine, guanosine	甘氨酸, 鸟嘌呤核苷(鸟苷)
GA	glucuronic acid, gibberellic acid	葡萄糖醛酸, 赤霉素
GABA	γ - amino - butyric acid	γ - 氨基丁酸
Gal	galactose	半乳糖
GAL	galactose - dependent activator	依赖半乳糖的激活蛋白
GalNAC	N - acetylgalactosamine	N - 乙酰半乳糖胺
GAP	GTPase activating protein	GTP 酶活化蛋白
Gal - 1 - P	galactose - 1 - phosphate	半乳糖 - 1 - 磷酸
GC	gas chromatography	气相色谱
GCD	general control derepressive gene	可去阻抑的通用调节基因
GCN	general control nondepressive gene	无阻抑的通用调节基因
GDP	guanosine diphosphate	鸟苷二磷酸(鸟二磷)
GiR(= dG)	guanosine deoxyribose	脱氧核糖鸟苷
GH	growth hormone	生长素
GHRH	growth hormone releasing hormone(= somatoliberin)	生长素释放激素
GIH	growth hormone release inhibiting hormone(= somatostatin)	生长素释放抑制激素
GIP	gastric inhibitory polypeptide	肠抑胃肽
GIP	glucose - dependent insulinotropic peptide	糖依赖性促胰岛素释放肽

GlcNAc	N - acetylglucosamine	N - 乙酰葡萄糖胺
GLI	glucagon - like immunoreactivity	高血糖素样免疫反应活性
Gln	glutamine	谷氨酰胺
Glu	glutamic acid (glutamate)	谷氨酸 (α - 氨基戊二酸)
Gly	glycine	甘氨酸 (α - 氨基乙酸)
GMP	guanosine monophosphate	鸟嘌呤核苷一磷酸 (鸟苷酸, 鸟一磷)
GnRH	gonadotropin releasing hormone (gonadoliberin)	促性腺素释放激素
GOT	glutamate - oxaloacetate transaminase	谷草转氨酶
G - 1 - P	glucose - 1 - phosphate	葡萄糖 - 1 - 磷酸
G6PD	glucose 6 - phosphate dehydrogenase	葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶
G - PI	glycan - phosphatidylinositol, glycosyl - phosphatidyl inositol	聚糖磷脂酰肌醇, 糖基磷脂酰肌醇
G protein	GTP binding protein, guanine nucleotide regulatory protein	GTP 结合蛋白, 鸟嘌呤核苷酸调节蛋白, G 蛋白
GPT	glutamate - pyruvate transaminase	谷丙转氨酶
GSH	glutathione	还原型谷胱甘肽
GSSG	glutathione	氧化型谷胱甘肽
γ - GT	γ - Glutamyl transpeptidase	γ - 谷氨酰转肽酶
GTP	guanosine triphosphate	鸟嘌呤核苷三磷酸 (鸟三磷)
Gua	guanine	鸟嘌呤
H	histidine	组氨酸
HA	hemagglutinin	血凝素
Hb	hemoglobin	血红蛋白
HbCO	carboxyhemoglobin	一氧化碳血红蛋白
HbCO ₂	carbamino hemoglobin	氨基甲酸血红蛋白
HbO ₂	oxyhemoglobin	氧合血红蛋白
HCG	human chorionic gonadotropin	人绒毛膜促性腺激素
Hchain	heavy chain	H 链, 重链
HDL	high density lipoprotein	高密度脂蛋白
HCS	human chorionic somatomammotropin	人绒毛膜生长促乳素
HD	homeodomain	同源 (异型) 域
Hfr	high frequency of recombination	高频重组
HGPRT	hypoxanthine - guanine phosphoribosyl transferase	次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HDL	high density lipoprotein	高密度脂蛋白
HDP	helix - destabilising protein	螺旋失稳蛋白
His	histidine	组氨酸 (β - 咪唑 - α - 氨基丙酸)
HLH	helix - loop - helix	螺旋环螺旋
HMC	hydroxymethylcytosine	羟甲基胞嘧啶
HMG - CoA	β - hydroxy - β - methyl - glutaryl - CoA	β - 羟 - β - 甲戊二酰 - CoA
HMM	hexamethylolmelmine, heavy meromyosin	六羟甲基三聚氰胺, 重 (酶解) 肌球蛋白
Hp	haptoglobin	触珠蛋白
HPAC	high - performance affinity chromatography	高效亲和层析
HPCE	high - performance capillary electrophoresis	高效毛细管电泳
HPL	human placental lactogen	人胎盘促乳素
HPLC	high - performance liquid chromatography	高效液相层析
H - RNA	heterogenous - RNA	不均一核糖核酸
hnRNA	nuclear heterogenous RNA	核内不均一核糖核酸
hsp	heat shock protein	热激蛋白
5HT	5 - hydroxytryptamine	5 - 羟色胺
HVR	hypervariable region	高变区
HVA	homovanillic acid	高香草酸
Hyl	5 - hydroxylysine	5 - 羟 (基) 赖氨酸
Hyp	4 - hydroxyproline	4 - 羟脯氨酸
I	inosine	肌苷, 次黄苷
I (Ile)	isoleucine	异亮氨酸
IAA	iodoacetic acid	碘乙酸
IAA	indoleacetic acid	吲哚乙酸

IBP	initiator - binding protein	起始子结合蛋白
IBS	intron - binding site	内含子结合部位
Ibu(= Ib)	isobutyryl	异丁酰基
ICR	internal control region	(序列)内控区
ICSH(= LH)	interstitial cell - stimulating hormone	促间质细胞激素
ID	immunodiffusion	免疫扩散
IDh	intermediate density lipoprotein	中密度脂蛋白
IDP	inosine diphosphate	肌苷二磷酸
IE	immunoelectrophoresis	免疫电泳
IEC	ion - exchange chromatography	离子交换层析
IEF	isoelectrofocusing	等电聚焦
IF	immunofluorescence	免疫荧光
IF	initiation factor	起始因子
IFN	interferon	干扰素
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IGF	insulin - like growth factor	胰岛素样生长因子
IgR	immunoglobulin receptor	免疫球蛋白受体
IGregion	intergenic region	基因间(隔)区
IGS	internal guide sequence	内部指导序列
IL	interleukin	白细胞介素,白介素
Ile	isoleucine	异亮氨酸
IMP	inosine monophosphate	肌苷酸
INR, Inr	initiator	起始子
IP ₃	inositol 1,4,5 - triphosphate	肌醇 - 1,4,5 - 三磷酸
IPTG	isopropylthio - β - D - galactoside	异丙基硫代 - β - D - 半乳糖苷
IS	insertion sequence	插入序列
ITP	inosine triphosphate	肌苷三磷酸
IUB	International Union of Biochemistry	国际生物化学联合会
IUPAC	International Union of pure and Applied chemistry	国际纯粹与应用化学联合会
J gene	joining gene	J基因(为连接区编码的基因)
J region	joining region	连接区, J区
K(= Lys)	lysine	赖氨酸
K	equilibrium constant	平衡常数
Kat	Katal	开特(每秒转化 1mol 底物所需的酶量)
kb	kilobase	千碱基
kD	kilodalton	千道尔顿
K _m	Michaelis constant	米氏常数
L(= leu)	leucine	亮氨酸
LCAT	lecithin - cholesterol acyltransferase	卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶
L chain	light chain	L链,轻链
LCR	ligase chain reaction	连接酶链(式)反应
LD ₅₀	50% lethal dose	半数致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LDL	low density lipoprotein	低密度脂蛋白
Leu	leucine	亮氨酸
LH	lutinizing hormone	促黄体素
LHCP	light harvesting chlorophyll - protein complex	集光叶绿素蛋白复合体
LHRH	lutinizing hormone releasing hormone(= gonadoliberin)	促黄体素释放激素
LMM	light meromyosin	轻酶解肌球蛋白
LT	leucotriene	白三烯
LTR	long terminal repeat	长末端重复序列
Lys	lysine	赖氨酸
M(= Met)	methionine	甲硫氨酸

mAb(= McAb)	monoclonal antibody	单克隆抗体
MAG	monoacylglycerol	单酰甘油
MAO	monoamine oxidase	单胺氧化酶
Mb	megabase	兆碱基
MBP	maltose - binding protein	麦芽糖结合蛋白
MDH	malate dehydrogenase	苹果酸脱氢酶
Met	methionine	甲硫氨酸
MHb	methemoglobin	高铁血红蛋白
mic RNA	miRNA - interfering complementary RNA(= antisense RNA)	mRNA 干扰互补 RNA, 反义 RNA
MIF(= MIRIF)	melanotropin release inhibiting factor(= melanostatin)	促黑素释放抑制因子
mIg	membrane immunoglobulin	膜免疫球蛋白
MRH	melanotropin release hormone(= melanoliberin)	促黑素释放激素
5MOT	5 - methoxy tryptamine	5 - 甲氧色胺
6MP	6 - mercaptopurine	6 - 巯基嘌呤
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
MT	metallothionein	金属硫蛋白
mtDNA	mitochondrial DNA	线粒体 DNA
MVA	mevalonic acid	二羟甲基戊酸
N	asparagine	天冬酰胺
NA	noradrenaline	去甲肾上腺素
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸, 辅酶 I
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, 辅酶 II
NAM	n - acetylmuramic acid	N - 乙酰胞壁酸
5' - NDP	5' - nucleoside diphosphate	5' - 核苷二磷酸
NE	norepinephrine(= noradrenalin)	去甲肾上腺素, 正肾上腺素
NF	nuclear factor	核因子(核内转录调节因子)
NGF	nerve growth factor	神经生长因子
NHP	nonhistone protein	非组蛋白
NMR	nuclear magnetic resonance	核磁共振
NPN	non - protein nitrogen	非蛋白氮
NRD	negative regulatory domain	负调节域
NRE	negative regulatory element	负调节元件
nRNA	nuclear ribonucleic acid	核内核糖核酸
NS protein	non - structural protein	非结构蛋白
nt	nucleotide(residues)	核苷酸(残基)
5' - NTP	5' - nucleoside triphosphate	核苷三磷酸
Oct, OCT	octamer - binding protein	八聚体结合蛋白
Oligo(dG)	oligodeoxyguanylic acid	寡脱氧鸟苷酸
Oligo(dT)	oligodeoxythymidylic acid	寡脱氧胸苷酸
OMP	orotidine monophosphate	乳清苷酸
ONPG	o - nitrophenyl - β - D - galactopyranoside	邻硝基苯 - β - D - 半乳糖苷
ORC	origin recognition complex	起点识别复合体
Orn	ornithine	鸟氨酸
OSCP	oligomycin sensitivity conferring protein	寡霉素敏感性赋予蛋白
OVA	ovalbumin	卵清蛋白
P(= pro)	proline	脯氨酸
P 或 Pi	inorganic phosphate	无机磷酸, 正磷酸
PA	phosphatidic acid	磷脂酸
PABA	para - aminobenzoic acid	对氨基苯甲酸
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PAH	para - aminohippuric acid	对氨基马尿酸
PALA	L - phosphoacetyl - L - aspartate	L - 磷酸乙酰 - L - 天冬氨酸
PAM	percentage of accepted point mutation	可接受点突变百分率
PAPMSF	p - aminophenyl methylsulfonyl fluoride	(对胙基苯基)甲基磺酰氟化物(丝氨酸蛋白酶抑制剂)

PAPS	3' - phosphoadenosine 5' - phosphosulfate	3' - 磷酸腺苷 5' - 磷酸硫酸
PAR	photosynthetically active radiation	光合有效辐射
PB	phosphate buffer	磷酸缓冲液
PBP	platelet basic protein, PSE - binding protein	血小板碱性蛋白, 近侧序列原件结合蛋白
PBS	phosphate - buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PC	phosphatidylcholine, plastoeyarin	磷脂酰胆碱, 质体蓝素
P _{CO₂}	carbon dioxide tension	二氧化碳分压
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链(式)反应
PDI	protein disulfide isomerase	蛋白质二硫键异构酶
PE	phosphatidylethanolamine	磷脂酰乙醇胺
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PEP	phosphoenolpyruvic acid	磷酸烯醇式丙酮酸
PFK	phosphofructokinase	果糖磷酸激酶
Pfu	plaque forming unit	噬斑形成单位
PG	phosphatidylglycerol, prostaglandin	磷脂酰甘油, 前列腺素
PGM	phosphoglucomutase	葡糖磷酸变位酶
3 - PG	3 - phosphoglyceric acid	3 - 磷酸甘油酸
PGA	pteroylglutamic acid	蝶酰谷氨酸
PHA	phytohemagglutinin	植物凝集素
Phab	phage antibody	噬菌体抗体
Phe	phenylalanine	苯丙氨酸
pl	isoelectric point	等电点
PI	phosphatidylinositol	磷脂酰肌醇
PIC	preinitiation complex	前起始复合物
PIP	phosphatidylinositol phosphate	磷脂酰肌醇磷酸
PIP ₂	phosphatidylinositol diphosphate	磷脂酰肌醇二磷酸
PIR	Protein Information Resource	蛋白质信息库
PITC	phenylisothiocyanate	异硫氰酸苯酯
PK	dissociation constant	解离常数
PKA	protein kinase A	蛋白激酶 A
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PL	phospholipid	磷脂
PLA	phospholipase A	磷脂酶 A
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PLD	phospholipase D	磷脂酶 D
PLP	proteolipid protein	蛋白脂质蛋白
PMBS	p - hydroxymercuriphenylsulfonate	对 - 羟苯磺汞(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)
PMSF	phenylmethylsulfony fluoride	苯甲基磺酰氟(丝氨酸蛋白酶抑制剂)
PNP	purine nucleotide phosphorylase	嘌呤核苷磷酸化酶
Pol	polymerase	聚合酶
poly(A)	polyadenylic acid	聚腺苷酸
poly(N)	nucleotide polymer	多聚核苷酸
poly(dN)	deoxynucleotide polymer	多聚脱氧核苷酸
poly(N - N')	N - N' copolymer, regular sequence	共聚(N - N')核苷酸, 规则序列
polyd(N - N')	dN - N' copolymer, regular sequence	共聚(dN - dN')脱氧核苷酸, 规则的序列
poly(N, N')	N, N copolymer, irregular sequence	共聚(N, N')核苷酸, 不规则序列
PP _i	inorganic pyrophosphate	无机焦磷酸
Pro	proline	脯氨酸
pro - UK	prourokinase	尿激酶原
PRPP	phosphoribosyl pyrophosphate	磷酸核糖焦磷酸
PQ	plastoquinone	质体醌
PS	phosphatidyl serine	磷脂酰丝氨酸
PSE	proximal sequence element	[启动子]近侧序列元件
psi	pounds per square inch	磅(力)每平方吋
PS I, PS II	photosystem I, photosystem II	光合系统 I, 光合系统 II
PTH	parathyroid hormone(= parathyrin)	甲状旁腺素
PTH	phenylthiohydantoin	乙酰苯硫脲

PTK	protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
PTP	phosphotyrosine phosphatase protein tyrosine phosphatase	磷酸酪氨酸磷酸酶, 蛋白酪氨酸磷酸酶
Pu	purine	嘌呤
Py	pyrimidine	嘧啶
Pyr	pyridine	吡啶
PZ	pancreozymin	促胰酶素
Q(= Gln)	glutamine	谷氨酰胺
Q	ubiquinone(coenzyme Q)	泛醌(辅酶 Q)
Q ₁₀	temperature quotient	温度系数, 温度商
QH ₂	ubiquinol(coQH ₂)	泛醌醇(辅酶 QH)
R(= Arg)	arginine	精氨酸
R	receptor	受体
RAAS	renin - angiotensin - aldosterone	肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统
RER	rough endoplasmic reticulum	粗(糙)面内质网
RF	replicative form	复制型
RFLP	restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
RI	replicative intermediate	复制中间体
rDNA	ribosomal DNA	核糖体 DNA
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
rRNA	ribosomal ribonucleic acid	核糖体核糖核酸
RT	reverse transcription, reverse transcriptase	逆转录, 逆转录酶
S	serine, sedimentation constant, svedberg unit	丝氨酸, 沉降系数, 沉降系数单位(S 单位)
SAAB	selected and amplified binding site	选择扩增结合位点
SAM	S - adenosylmethionine	S - 腺苷甲硫氨酸
SCP	steroid carrier protein	类固醇载体蛋白
scRNA	small cytoplasmic RNA	胞质内小 RNA
SDA	strand displacement amplification	链置换扩增
SDBS	sodium dodecyl benzene sulfonate	十二烷基苯磺酸钠
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS - PAGE	SDS - polyacrylamide gel electrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDBP	sequence - specific DNA binding protein	序列特异性 DNA 结合蛋白
Ser	serine	丝氨酸
SER	smooth endoplasmic reticulum	光面内质网
Serpin	serine protease inhibitor	丝氨酸蛋白酶抑制剂
SIF(= SRIF)	somatotropin release inhibiting factor(= somatostatin)	促生长素释放抑制因子
sIg	secreted immunoglobulin	分泌型免疫球蛋白
SIP	sleep inducing peptide	睡眠肽
SISPA	sequence - independent single - primer amplification	不依赖于序列的单引物扩增
SK	streptokinase	链激酶
SL1	selectivity factor 1	选择性因子 1
SNAP	snRNA activating protein	核(内)小 RNA 活化蛋白
snoRNA	small nucleolar RNA	核仁小 RNA
snoRNP	small nucleolar ribonucleoprotein	核仁小核糖核蛋白
snRNA	small nuclear RNA	(细胞)核小 RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein	核内小核糖核蛋白
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
sp. act	specific activity	比活
SPM system	suppressor - promoter - mutator system	抑制因子 - 启动子 - 突变基因系统
SPPS	solid - phase peptide synthesis	固相多肽合成
SRH	somatotropin releasing hormone	促生长素释放激素
SRIH	somatotropin release inhibiting hormone(= somatostatin)	促生长素释放抑制激素
SRP	signal recognition particle	信号识别颗粒
SSB	single - stranded DNA binding protein	单链 DNA 结合蛋白
ssDNA	single - stranded DNA	单链 DNA

ssRNA	single - stranded RNA	单链 RNA
STI	soybean trypsin inhibitor	大豆胰蛋白酶抑制剂
STS	sequence - tagged site	序列标志位点
SV40	simian virus 40	猴病毒 40
T = Thr	threonine	苏氨酸
T	thymidine	胸苷
T	twisting number	扭转数, 盘绕数(DNA 双螺旋的盘绕程度)
T ₄	tetraiodothyronine	四碘甲状腺原氨酸
TAG	triacylglycerol	三酰甘油
T - band	telomere band	T 带, 端粒带
TBG	thyroxine binding globulin	甲状腺素结合球蛋白
TBP	TATA(- box)binding protein	TATA(框)结合蛋白
TBPA	thyroxine binding prealbumin	甲状腺素结合前清蛋白
tdt	terminal deoxynucleotidyl transferase	末端脱氧核苷酸转移酶
TF	transcription factor, transfer factor	转录因子, 转移因子
TF II	transcription factor for RNA polymerase II	RNA 聚合酶 II 的转录因子
TG	thyroglobulin	甲状腺球蛋白
6TG	6 - thioguanine	6 - 硫代鸟嘌呤
THF	tetrahydrofolic acid	四氢叶酸
Thr	threonine	苏氨酸
TIC	transcription initiation complex	转录起始复合物
TIF	transcriptional intermediary factor	转录中介因子
Tm	melting temperature	解链温度
TMG	trimethylguanosine	三甲基鸟苷
Tn	transposon	转座子
tRNA	transfer RNA	转移 RNA
Trp	tryptophan	色氨酸
Tyr	tyrosine	酪氨酸
TPP	thiamine pyrophosphate	硫胺素焦磷酸
T ψ C arm	thymidine - pseudouridine - cytidine arm	胸苷假尿苷胞苷臂
T ψ C loop	thymidine - pseudouridine - cytidine loop	胸苷假尿苷胞苷环
U	uracil uridine	尿嘧啶, 尿苷
UAS	upstream activating sequence	上游激活序列
UBF	upstream binding factor	上游结合因子
UBP	untranslated(region)binding protein	非翻译结合蛋白
UCE	upstream control element	上游控制元件
UDG	uracil DNA glycosylase	尿嘧啶 DNA 糖基化酶
UDP	uridine diphosphate	尿苷二磷酸
UDPG	uridine diphosphate glucose	尿(苷)二磷酸葡萄糖
UDPGA	uridine diphosphateglucuronic acid	尿二磷酸葡萄糖醛酸
UdR	uridine deoxyribose	脱氧尿苷
UES	upstream expressing sequence	上游表达序列
UIS	upstream inducing sequence	上游诱导序列
UK	urokinase	尿激酶
ULDPE	ultra low density polyethylene	超低密度聚乙烯
UMP	uridine monophosphate	尿苷(一磷)酸
UPE	upstream promoter element	上游启动子元件
UPG I	uroporphyrinogen	尿卟啉原 I
URS	upstream regulatory sequence	上游调节序列
URS	upstream repressing sequence	上游阻抑序列
US	upstream sequence	上游序列
USF	upstream stimulating factor	上游刺激因子
UTP	uridine 5' - triphosphate	尿苷 - 5' - 三磷酸(尿三磷)
UTR	untranslated region	非翻译区
UV	ultraviolet	紫外线

V(= Val)	valine	缬氨酸
V ₀	initial rate of reaction	反应起始速度
V gene	variable gene	V 基因(为 V 区编码的基因)
VIC	vasoactive intestinal contractor	血管活性肠收缩肽
VIP	vasoactive intestinal peptide	血管活性肠肽
Vit	vitamin	维生素
VLDL	very low density lipoprotein	极低密度脂蛋白
V _{max}	maximum rate of reaction	最大反应速度
V - oncogen	viral oncogene	病毒原癌基因
VP	viral protein	病毒蛋白
vRNA	viral RNA	病毒 RNA
W(= Trp)	tryptophane	色氨酸
W	watt	瓦(瓦特)
W	writhing number	缠绕数(DNA 超螺旋的缠绕程度)
X(= Xao)	xanthosine	黄(嘌呤核)苷
xan	xanthine	黄嘌呤
XGPRT	xanthine - guanine phosphoribosyl transferase	黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
XMP	xanthylic acid, xanthosin monophosphate	黄嘌呤核苷一磷酸(黄苷酸)
Y(= Tyr)	tyrosine	酪氨酸
Z(= Glx)	glutamine or glutamic acid	谷氨酰胺或谷氨酸
ψ	pseudouridine	假尿核苷

名词索引

A

阿司匹林 153,280
癌基因 435,560
氨基苯甲酸合酶 358
氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶 359
氨基蝶呤 400
氨基甲酸酯 312
氨基咪唑氨甲酰核苷酸转甲酰基酶 393
氨基咪唑核苷酸合成酶 393
氨基咪唑核苷酸羧化酶 393
氨基咪唑琥珀基氨甲酰核苷酸合成酶 393
氨基酸代谢缺陷症 336
氨基酸的分解途径 315
氨基酸的脱氨基作用 303,308
氨基酸饥饿 567
氨基酸结合部位 520
氨基酸生物合成的调节 361
氨基酸受体通道 555
氨基酸脱羧酶 308
氨基酸语言 507
氨基转移酶 303,306
氨甲蝶呤 400
氨甲酰磷酸 34,312,342
氨甲酰磷酸合成酶 312,342
氨甲酰磷酸合成酶 I 342
氨甲酰磷酸合成酶 II 342
氨甲酰天冬氨酸 396
氨酶 - tRNA 518,520
氨肽酶 302
氨酰 - tRNA 合成酶 525
氨酰腺苷酸 34
胺氧化酶 308
暗反应 200
暗修复 428
奥啉酸 420

B

靶位点 426
白谷氧还蛋白 399
白喉棒状杆菌 533
白喉毒素 533
白三烯 A 282

白三烯 C₄ 282
白三烯 D₄ 282
白三烯 E₄ 282
白三烯类 280
白细胞 283
百日咳毒素 557
斑点系统 451
半保留复制 406
半不连续复制 418
半不连续性 406
半胱氨酸 317
半胱氨酸的生物合成 354
半胱氨酸二加氧酶 317
半胱氨酸去硫氢基酶 317
半甲基化 DNA 580
半甲基化的 DNA 422
半乳糖 87,161,165
半乳糖醇 88
半乳糖苷通透酶 164
半乳糖基转移酶 162
半乳糖激活蛋白 574
半乳糖激酶 87
半乳糖 - 神经酰胺 276
半乳糖血症 88,514
半接纳细胞 606
半缩醛 75
伴刀豆球蛋白 A 169
包被小泡 293
包涵体 603
包装位点 606
胞苷转移酶 268
胞吐 55,550
胞吞 56,293,550
胞液 551
胞饮 551
保留性转座 449
被动运输 46
被膜 606
苯丙氨酸 317,357
苯丙氨酸 - 3,4 - 酮 332
苯丙氨酸 - 4 - 单加氧酶 337,358
苯丙氨酸羟化酶 358
苯丙酮酸 357
苯丙酮酸尿症 17,358
苯并芘鸟嘌呤 430

比超螺旋 419
吡哆胺 - 5' - 磷酸 303
吡哆醇 303
吡哆醛 - 5' - 磷酸 303
吡哆醛磷酸 179
必需氨基酸 340
必需脂肪酸 265
避免差错的修复 431
编辑 576
编码序列加工 507
鞭毛蛋白 445
变构调节酶 306
变构激活剂 544
变构抑制 69
变构抑制剂 544
变偶性 512
变态 548
变位酶 77
标准生成自由能 30
标准自由 29
表达文库 594
表达载体 584
表面排斥蛋白 440
表皮生长因子(EGF)受体 556
表皮生长因子 293
表皮生长因子受体 558
别构激活剂 155
别黄嘌呤 389
别嘌呤醇 389
别乳糖 164
丙氨酸 315
丙氨酸的生物合成 353
丙氨酸消旋酶 375
丙二酸单酰 - CoA 263
丙二酸单酰 - CoA - ACP 转酰酶 262
丙二酰 - CoA 254,258
丙糖磷酸异构酶 72,87
丙酮酸 81,258
丙酮酸激酶 85,158
丙酮酸羧化酶 110,154,158
丙酮酸脱氢酶 92
丙酮酸脱氢酶复合体 258
丙酮酸脱氢酶复合体的调控 96
丙酮酰 - CoA 100
丙酰 - CoA 239

伯氨唑 153
 卟啉 366
 卟淋症 371
 不对称 PCR 596
 不产氧光合作用 211
 部分二倍体 440

C

操纵基因 562
 操纵子模型 561
 草酰乙酸 106,108,140,159,258,326
 插入型 585
 插入序列 447
 差别杂交法 594
 差异显示 597
 拆装 440
 缠绕数 419
 产热素 139
 产生毛根质粒 605
 长醇 167
 长醇-焦磷酸-寡糖 167
 长链多萜醇 167
 长末端重复序列 606
 长片段修复 429
 长期调控 570
 肠促胰液肽 302
 肠激酶 302
 超螺旋密度 419
 超螺旋数 419
 超每感位点 572
 超氧化物歧化酶 143
 成肌素 575
 成纤维细胞生长因子(FGF)受体 556
 程序性 DNA 重排 443
 程序性解读框架移位跳跃 508
 程序性死亡 561
 持续合成能力 415
 持续性 416
 赤藓糖-4-磷酸 150
 穿梭质粒 584
 醇脱氢酶 86
 次黄嘌呤(鸟嘌呤)磷酸核糖转移酶 395
 次黄嘌呤-N-糖苷酶 429
 次黄嘌呤核苷酸 307,392
 次黄嘌呤核苷酸合酶 393
 次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 395
 粗面内质网 551
 促M期因子 559
 促分裂原活化的蛋白激酶 559
 促突变因子 415

促细胞分裂周期素 559
 催乳激素受体 610
 错配核苷酸 415
 错配修复 427
 错误倾向 PCR 608
 错误倾向修复 417
 错义突变 432,507

D

达尔文式的进化 608
 大肠杆菌 518
 大肠杆菌 DNA 连接酶 581
 大豆根瘤菌 381
 代谢中常见的有机反应机制 5
 代谢中间产物 1
 单胺类受体通道 555
 单纯乳酸发酵 89
 单加氧酶 243
 单克隆抗体 612
 单链结合蛋白 421
 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 610
 单态氧 274
 单特异性 446
 单特异性的抗体 447
 单向复制 409
 单向运输 48
 胆固醇 231,284
 胆固醇的代谢 251
 胆固醇脂 253
 胆固醇脂累积症 294
 胆固醇酯转移蛋白 293,294
 胆红素二葡萄糖苷酸 371
 胆碱 257,271
 胆绿素 372
 胆色素原 367
 胆色素原脱氢酶 368
 胆酸 231
 胆盐 295
 胆汁酸 252,284,295
 胆汁盐 231
 弹性蛋白酶 302,548
 蛋氨酸 520
 蛋白 C 548
 蛋白 S 548
 蛋白激酶 548
 蛋白激酶 a 185
 蛋白激酶 A 188,189,558
 蛋白激酶 C 273,558
 蛋白激酶 G 558
 蛋白磷酸酶 286
 蛋白磷酸酶-1 188
 蛋白磷酸酶-2A 188
 蛋白磷酸酶-2B 188
 蛋白磷酸酶 2C 188
 蛋白磷酸酶抑制剂 188
 蛋白磷酸酯酶 548
 蛋白酶解级联激活 549
 蛋白酶体 559
 蛋白质的运输 533
 蛋白质工程 580,607
 蛋白质降解 300
 蛋白质裂解酶 577
 蛋白质组学 612
 氟芥 433
 导肽 554
 倒位酶 445
 等位基因排斥 446
 低密度脂蛋白 293
 底物水平的磷酸化作用 104
 底物水平磷酸化 130
 第二套固氮系统 381
 第二信使 191,556
 颠换 432
 点突变 432
 碘乙酸 17,64,75
 电穿孔法 587,588
 电化学势 216
 电突触 555
 电子传递的抑制剂 128
 电子传递过程 118
 电子传递黄素蛋白 237
 电子传递链 119,211
 电子传递体系 265
 电子载体 120
 淀粉 176
 淀粉 1,4→1,6-转葡萄糖基酶 185
 凋亡 561
 调节蛋白 P 549
 调节肽 554,556
 调节子 564
 调控网络 538
 调控信息 504
 丁酰-ACP 263
 定位诱变 596,598
 动脉粥样硬化 294,295
 动作电位 554
 豆血红蛋白 378
 读码框架 511,520
 端粒 426
 端粒酶 426
 短杆菌肽 A 59
 短杆菌肽 S 373

- 短片段的修复 429
 短期调控 570
 断裂基因 507
 对-氨基苯甲酸 330
 对-羟苯丙酮酸 357
 多胺 302,335
 多巴胺 332
 多巴醌 332
 多复制子 408
 多级调节系统 570
 多接头 581
 多聚氨基酸 510
 多聚核糖体 518
 多聚腺苷酸尾巴 576
 多聚腺嘌呤核苷酸 520
 多克隆位点 584
 多联体 585
 多顺反子 mRNA 562
 多萜醇 167
 多样性片段 445
 多重性抑制 361
- E**
- 鹅脱氧胆酸 295
 儿茶酚胺 332
 二氨基庚二酸差向异构酶 349
 二氨基庚二酸脱羧酶 349
 二甲烯丙基焦磷酸 287
 二磷酸甘油酸变位酶 78
 二磷酸腺苷 35
 二磷脂酰甘油 268
 二羟苯丙氨酸 332
 二羟丙酮磷酸 72,139,232,283
 二氢硫辛酸脱氢酶 92
 二氢硫辛酰转乙酰基酶 92
 二氢嘧啶酶 390
 二氢尿嘧啶 390
 二氢尿嘧啶脱氢酶 390
 二氢鞘氨醇 276
 二氢乳酸 396
 二氢乳酸酶 396
 二氢乳酸脱氢酶 396
 二氢胸腺嘧啶 390
 二氢叶酸还原酶 331
 二氢叶酸还原酶基因 606
 二软脂酰磷脂酰胆碱 272
 二元载体系统 604
 二脂酰甘油 557
- F**
- 发根土壤杆菌 605
 发育分子生物学 611
 法尼焦磷酸 288
 法尼酰转移酶 288
 翻译后运输 534
 翻译控制 RNA 577
 翻译内含子 508
 翻译水平的调节 568
 翻译跳跃 531
 翻译抑制物 577
 翻译中运输 536
 翻译阻遏 566,568
 钒铁蛋白 381
 反馈和抑制 545
 反密码子 512,520
 反密码子臂 521
 反密码子环 520
 反式- Δ^2 -烯醇-CoA 236
 反式作用因子 572
 反向 PCR 597
 反向生物学 611
 反向运输 48
 反向重复 448
 反义 RNA 568,569
 泛醌 120
 泛醌氧化还原酶 237
 泛素 559
 泛酸激酶 402
 泛肽 301
 泛肽-蛋白连接酶 301
 泛肽-活化酶 301
 泛肽-连接的降解酶 301
 泛肽-携带蛋白 301
 防错功能 515
 放氧复合体 213
 非必需氨基酸 340
 非编码区 520
 非复制转座 449
 非融合蛋白 602
 非受纳细胞 606
 非循环光合磷酸化 217
 非胰岛素依赖 193
 非战栗性产热 138
 非自主因子 451
 分化 570
 分解代谢 1
 分泌到胞外的蛋白 533
 分泌型抗体 576
 分支酸 356
 分支酸变位酶 357
 分支酸变位酶 P-预苯酸脱水酶 357
 分子克隆 580
 分子设计 608
 分子重排 583
 分子重排反应 11
 粪固醇 252
 佛波酯促肿瘤剂 573
 氟化物 17,64,79
 氟柠檬酸 100
 氟乙酸 100
 氟乙酰-CoA 100
 脯氨酸 324,345
 辅蛋白酶 431
 辅酶 A 4
 辅酶 Q 120,122
 辅酶 Q 氧化还原酶 237
 辅脂肪酶 231
 辅助色素 202
 辅阻遏物 562
 腐胺 335
 负超螺旋 420
 负调节 564
 负反馈 544
 负链引物结合位点 606
 负前馈 544
 负楠 538
 负选择 608
 附加体 440
 附加体质粒 603
 附着位点 444
 复合黄素酶 389
 复合体 I 121
 复合体 II 123
 复合体 III 123,131
 复合体 IV 126,131
 复合体 V 131
 复合因子 448
 复制叉 408,421
 复制的终点 408
 复制后修复 430
 复制基因 425
 复制酶 415
 复制起点 409
 复制前修复 430
 复制时间控制 426
 复制体 421
 复制许可因子 427
 复制因子 426
 复制质粒 603
 复制转座 449
 复制子 408
- G**
- 钙泵 553

- 钙结合蛋白 557
 甘氨酸 231
 甘氨酸 315,316
 甘氨酸胺核苷酸 392
 甘氨酸胺核苷酸合成酶 392
 甘氨酸胺核苷酸转甲酰基酶 392
 甘露糖 89,161,165
 甘油-3-磷酸 39
 甘油-3-磷酸穿梭途径 139
 甘油-3-磷酸脱氢酶 139,232
 甘油激酶 86,232
 甘油磷酸脱氢酶 87
 甘油磷脂 268,268
 甘油醛-3-磷酸 66,72,150
 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 74
 甘油醛激酶 86
 甘油酸-1,3-二磷酸 75
 甘油酸-2-磷酸 17,77
 甘油酸-3-磷酸 17,76,77
 杆菌肽 170
 肝素 548
 感染 587
 感染丝状体 378
 感受态特异蛋白 441
 感受态细胞 441,587
 感受态因子 441
 冈崎片段 415,418
 高胆固醇血症 294
 高尔基体 536,551
 高能磷酸化合物 34
 高柠檬酸 346
 高柠檬酸合酶 346
 高速微弹发射装置 588
 高效转录系统 596
 高血氨症 314
 高异柠檬酸 346
 给体拼接点 576
 根据机体代谢需要的调控 255
 根瘤 378
 根瘤固氮 377
 根瘤菌 377,378,381
 根瘤土壤杆菌 604
 根性肿瘤基因 604
 共价交替 266
 共价修饰 549
 共价修饰作用 178
 共聚核苷酸 509
 共生固氮 379,383
 共生型固氮微生物 378
 共同代谢途径 16
 共同结瘤基因 383
 共线性 508
 共线性关系 507
 共整合体 449
 共整合载体 604
 构成质膜骨架的蛋白 533
 构象偶联假说 131
 构造单元 542
 谷氨酸 160,325
 谷氨酸-草酰乙酸转氨酶 308
 谷氨酸合成酶 324
 谷氨酸合酶 343
 谷氨酸-天冬氨酸氨基转移酶 305
 谷氨酸-天冬氨酸载体 140
 谷氨酸脱氢酶 303,306,342
 谷氨酰-5-磷酸 309
 谷氨酰胺 309
 谷氨酰胺合成酶 309,343,344,383
 谷氨酰胺酶 310,324
 谷氨酰胺酰-tRNA合成酶 526
 谷-丙转氨酶 315
 谷草转氨酶 308
 谷胱甘肽 153,363
 谷胱甘肽过氧化物 515
 谷胱甘肽过氧化物酶 144
 谷胱甘肽合成酶 365
 谷氧还蛋白还原酶 399
 钴胺素 239
 固氮基因群 382
 固氮酶 377,379,380
 故障-安全系统 515
 瓜氨酸 310,312
 瓜氨酸-AMP 312
 胍基 365
 钨盐/氯化铯密度梯度超速离心法 591
 寡核苷酸指导的诱变 598
 寡霉素 138
 冠瘿碱合成酶 604
 管家基因 561
 光反应 199
 光复活酶 429
 光复活修复 428
 光合单位 204
 光合磷酸化 215
 光合细菌 381
 光呼吸 225
 光量子 200
 光面内质网 551
 光系统 209
 光子 200
 胱硫醚- β -合酶 355
 胱硫醚- β -裂解酶 351
 胱硫醚- γ -合酶 350
 胱硫醚- γ -水解酶 355
 滚动环(rolling circle)式 410
 柄柄 PCR 597
 果糖 85
 果糖-1,6-二磷酸 17,156
 果糖-1,6-二磷酸酶 156,157
 果糖-1-磷酸 86
 果糖-2,6-二磷酸 84,193
 果糖-6-磷酸 71,150,156,158
 果糖不耐症 87
 果糖激酶 86
 过氧化氢酶 143
 过氧化物酶 143,280,553
 过氧羟自由基 372
- ### H
- 含着丝粒的质粒 603
 焙 23
 合成代谢 1
 核磁共振波谱法 20
 核定位序列 554
 核苷单磷酸激酶 42
 核苷二磷酸激酶 400
 核苷二酸激酶 397
 核苷磷酸化酶 387,388
 核苷酶 388
 核苷水解酶 388
 核苷酸焦磷酸化酶 395
 核苷酸酶 387
 核苷酸切除修复 429
 核苷酸三联体 504
 核苷酸语言 507
 核苷脱氧核糖基转移酶 400
 核苷-磷酸激酶 399
 核膜 551
 核酸酶 387
 核酸内切酶 387
 核酸外切酶 387
 核酸外切酶 I 428
 核酸外切酶 VI 428
 核酸外切酶 X 428
 核糖-5-磷酸 147,149
 核糖核苷酸还原酶 398
 核糖体 518,522
 核糖体 RNA 518,522
 核糖体蛋白 522
 核糖体的结构模型 523
 核糖体结合部位 SD 序列 568
 核糖体结合技术 509

- 核糖体结合位点序列 520
 核糖体释放因子 531
 核糖体移码 508
 核小体装配蛋白 572
 核心酶 416
 盒式诱变 598
 褐色脂肪 138
 黑色素 332
 恒定片段 445
 横向遗传传递 440
 红降 208
 后基因组时代 612
 呼吸控制 140
 呼吸链概念的建立 119
 琥珀酸 103,160
 琥珀酸-Q还原酶 123
 琥珀酸脱氢酶 98,123
 琥珀酰-CoA 103,103,240,245
 琥珀酰-CoA合成酶 98,104
 琥珀酰-二氨基庚二酸脱琥珀酸酶 349
 琥珀酰硫激酶 104
 琥珀酰脱氢酶 104
 琥珀型 507
 互变异构 433
 互绕数 419
 花生四烯酸 279
 化学能的转化 25
 化学偶联假说 131
 化学渗透假说 131
 化学突触 555
 化学信号分子 554
 化学诱变剂 430
 还原力 211,541
 环加氧酶 280
 环戊烷酸 279
 环腺苷酸受体蛋白 564
 黄胆 371
 黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因 606
 黄嘌呤氧化酶 389
 黄素激酶 402
 黄素-硫蛋白 237
 黄素腺嘌呤单核苷酸 3
 黄素腺嘌呤二核苷酸 3
 磺胺类药物 153
 磺基转移酶 171
 回复突变 521
 混合功能氧化酶 265
 活性甲硫氨酸 36
 霍乱毒素 557
- J**
- 机械随机切割 589
 肌醇-1,4,5-三磷酸 273
 肌浆网 553
 肌酸 333,365
 肌酸磷酸 40
 基础水平元件 573
 基粒 198
 基因运输 54
 基因转移反应 7
 基因工程 577
 基因间隔区 584,586
 基因间校正突变 521
 基因枪 588
 基因位移 446
 基因文库 584
 基因治疗 613
 基因重排 438
 基因资源 613
 基因组测序 596
 基质 198
 激活-解离系统 451
 激活效应物 546
 激酶 68
 激素对脂肪酸代谢的调节 254
 级联反应 547
 级联激活 549
 级联系统 192
 极限糊精 180
 己糖单磷酸途径 147
 己糖激酶 66,68
 夹子装置器 416
 甲基丙二酰-CoA变位酶 240
 甲基丙二酰-CoA消旋酶 239
 甲基转移酶 330,571
 甲硫氨酸 257,326,527
 甲羟戊酸 284,285
 甲羟戊酸激酶 287
 甲酸脱氢酶 515
 甲酰甘氨酸核苷酸 392
 甲酰甘氨酸核苷酸合成酶 392
 甲酰甘氨酸酰胺核苷酸 392
 甲酰化酶 527
 甲酰甲硫氨酸 510
 假菌体 381
 假型包装 607
 简并探针 593
 简并性 512
 碱基的修饰剂 433
 碱基对的转换 432
- 碱基类似物 433
 碱基切除修复 429
 浆细胞 447
 降解物基因活化蛋白 564
 降解物阻遏 564
 降糖氨酸 A 238
 降植烷酸 243
 交换蛋白 276
 胶原蛋白 166,548
 胶原蛋白酶 548
 胶原蛋白酶原 548
 焦磷酸 41
 焦碳酸二乙酯 591
 醇解过程 65
 酵母氨酸 319
 酵母人工染色体 603
 酵母甾醇 290
 接合 440
 接合质粒 440
 接受臂 521
 接头 581
 结构分子生物学 611
 结瘤基因 383
 结瘤素基因 384
 解离酶 448
 解链蛋白 421
 解链区 422
 解螺旋酶 I、II 和 III 421
 解偶联剂 137
 金属硫蛋白 573
 金属应答元件 573
 茎瘦 605
 精氨酸琥珀酸 313,345
 精氨酸琥珀酸合成酶 312
 精氨酸 310,345
 精氨酸酶 310
 精胺 335
 景天庚酮糖-7-磷酸 150
 景天酸代谢 227
 静息电位 554
 酒精发酵 65
 局限性转导 441
 聚吡咯基甲烷 368
 聚代环 410
 聚合酶链式反应 588,595
 聚阳离子 588
 均聚核苷酸 509,582
 均裂断键 6
 菌落形成单位 589
 菌毛蛋白 440

K

开链复合物 422
 凯伦 585
 抗癌治疗 426
 抗蛋白酶 300
 抗凝血酶Ⅲ 548
 抗体工程 612
 抗突变因子 415
 抗性基因 583
 抗血友病因子 547
 抗氧化剂 372
 抗终止因子 568
 抗阻遏物 568
 柯斯质粒 585
 颗粒内质网 551
 可变环 520
 可变片段 445
 可调基因 561
 可调型表达 561
 可立氏循环 158
 克隆选择学说 445
 克氏肺炎杆菌 383
 孔道蛋白质 60
 孔道模型(通道模型) 60
 孔酸发酵 82
 控制因子 447
 扣除杂交法 594
 枯草杆菌 306
 枯草杆菌蛋白酶 610
 跨膜信号传递 556

L

赖氨酸 301,319
 蓝藻 381
 劳氏肉瘤病毒 560
 酪氨酸 319,357
 酪氨酸氨基转移酶 302
 酪氨酸蛋白激酶 556,558
 酪氨酸酶 332
 酪氨酰-tRNA合成酶 525
 酪胺 308
 类IS因子 448
 类二十烷酸 279
 类固醇 284
 类固醇激素 253,284
 类胡萝卜素类 204
 类囊体膜 198
 类囊体腔 198
 类囊体小泡 198
 类型I酶 580

类型II酶 581
 类型转换 447
 冷敏感突变体 602
 离子浓度梯度 553
 离子载体 58
 连接片段 445
 连锁体 420,424
 连续产物抑制 361
 联合脱氨基作用 307
 链霉素 531
 链甾醇 290
 两用代谢途径 2
 亮氨酸 319
 量子 200
 量子产额 204
 量子效率 204
 裂合酶 307
 裂解 443,567
 裂解途径 585
 邻-氨基苯甲酸 358
 淋巴瘤 168
 磷蛋白磷酸酶 1 188
 磷酸吡哆醛 180,308,366
 磷酸胆碱 271
 磷酸胆碱转移酶 276
 磷酸二酯酶 192,387
 磷酸泛酰巯基乙胺 260
 磷酸钙共沉淀法 588
 磷酸甘露糖异构酶 89
 磷酸甘油酸变位酶 77
 磷酸甘油酸激酶 76
 磷酸果糖激酶 157
 磷酸果糖激酶 2 158
 磷酸核糖焦磷酸激酶 392
 磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶 392
 磷酸核糖转移酶 395
 磷酸化酶 183
 磷酸化酶 a 178
 磷酸化酶 b 178
 磷酸化酶激酶 179,188
 磷酸化势能 43
 磷酸肌酸 35,40,333,365
 磷酸基转移 8
 磷酸甲羟戊酸激酶 287
 磷酸解 178
 磷酸精氨酸 35,40
 磷酸酪氨酸键 443
 磷酸酶 78,179
 磷酸葡萄糖氧化途径 147
 磷酸葡萄糖变位酶 181
 磷酸葡萄糖激酶 182

磷酸葡萄糖异构酶 70,151
 磷酸丝氨酸键 443
 磷酸丝氨酸磷酸酶 354
 磷酸丝氨酸转氨酶 353
 磷酸戊糖异构酶 149
 磷酸烯醇式丙酮酸 35,39,155
 磷酸烯醇式丙酮酸激酶 158
 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 155,302
 磷脂的代谢 247
 磷脂酶 231,247,257
 磷脂酶 A2 272
 磷脂酶 A₂ 280
 磷脂酶 C 273,557
 磷脂酸肌醇 167
 磷脂酰胆碱 271,272
 磷脂酰甘油 268
 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 273
 磷脂酰肌醇-4-磷酸 273
 磷脂酰肌醇专一的磷脂酶 279
 磷脂酰乙醇胺 268,271
 硫代半乳糖苷转乙酰基酶 164
 硫解酶 238,258,286
 硫解酶的反应 238
 硫芥 433
 硫氧还蛋白 399
 硫氧还蛋白还原酶 399
 六碳糖激酶 68
 氯代奎宁 300
 氯霉素 531
 卵磷脂:胆固醇酯转移酶 294
 螺旋去稳定蛋白 421
 螺旋数 419

M

莽草酸 356
 锚定 PCR 597
 帽子 576
 帽子结构 520
 酶的抑制 16
 酶切诱变 598
 咪唑甘油磷酸脱水酶 359
 咪唑酮丙酮酶 321
 醚脂质 274
 糜蛋白酶 302
 密码偏爱性 594
 密码子 508
 嘧啶二聚体 415,428
 嘧啶核苷激酶 398
 免疫球蛋白 533
 模板 507
 模式生物 612

- 膜本体蛋白 534
膜电位 553,554
膜结合的抗体 576
魔点 567
末端核苷酸转移酶 582
末端脱氧核苷酸转移酶 592
莫洛尼鼠白血病毒 591
木酮糖-5-磷酸 149
钼铁蛋白 377,380
- N
- 内分泌 556
内含子 507
内基因子 440
内膜系统 553
内能 23
内酮酸脱羧酶 82
内质网 551
内转换 204
萘啶酮酸 420
脑苷脂 249
脑磷脂 249
能荷 42
能量偶联 131
能量偶联假说 131
能量载体 131,541
能量子 200
尼龙膜 593
尼日利亚菌素 59
逆转录病毒 560,606
黏性末端 417,581
鸟氨酸 310,312
鸟氨酸脱羧酶 302
鸟氨酸转氨甲酰酶 312
鸟苷酸环化酶 558
鸟类成红细胞增多症病毒 558
鸟嘌呤核苷酸合成酶 395
鸟嘌呤脱氢酶 388
尿卟淋原 369
尿苷二磷酸葡萄糖 183
尿苷酰转移酶 87,549
尿刊酸水合酶 321
尿嘧啶-DNA-糖苷酶 418
尿嘧啶-N-糖苷酶 429
尿嘧啶核苷二磷酸-半乳糖 87
尿嘧啶核苷酸激酶 397
尿囊素 389
尿囊素酶 389
尿囊酸 389
尿囊酸酶 389
尿素 303,389
- 尿素循环 310
尿素循环的调节 313
尿酸 388
尿酸氧化酶 389
尿型纤溶酶原激活剂 548
柠檬酸 160
柠檬酸合成酶 108
柠檬酸合酶 98,99
柠檬酸裂解酶 258
柠檬酸缩合酶 99
柠檬酸循环 2,16,92,159
柠檬酸循环的调控 108
柠檬酸循环的发现历史 111
柠檬酸循环的化学总结算 107
柠檬酸循环的双重作用 110
柠檬酸循环概貌 97
柠檬酰-CoA 100
凝血 547
凝血酶 548
凝血因子Ⅲ 547
牛磺胆酸 231
牛磺酸 336
- P
- 排氮动物 309
排尿酸动物 309
旁分泌 556
疱疹性口腔炎病毒 169
胚原型 570
配体门控通道 555
片段重组体 438
嘌呤霉素 530
拼接 507
拼接重组体 438
平末端 581
平头双链 417
苹果酸 155,258
苹果酸- α -酮戊二酸载体 139
苹果酸合酶 159
苹果酸酶 290
苹果酸-天冬氨酸穿梭途径 139
苹果酸脱氢酶 98,106,155
- Q
- 葡聚糖 176
葡糖基转移 8
葡糖激酶 68
葡糖-神经酰胺 276
葡糖异生 154
葡糖异生作用的调节 157
葡萄糖彻底氧化的总结算 141
葡萄糖彻底氧化生成 ATP 分子的统计 142
葡萄糖 161,176,189
葡萄糖-1,6-二磷酸 181
葡萄糖-1-磷酸 176
葡萄糖-6-磷酸 66,147,148,156,176
葡萄糖-6-磷酸酶 156,182
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 147,148,153
葡萄糖-丙氨酸循环 306
葡萄糖激酶 68
葡萄糖效应 564
葡萄糖运载蛋白 158
普遍性转导 441
奇数碳原子脂肪酸的氧化途径 239
起点 440
起点识别复合物 425
起始氨基酸 511
起始复合物 421
起始密码 520
起始密码子 511
起始因子 528,577
气体测量法 18
牵引蛋白基因 605
前导链 418,423
前导片段 445
前导肽 565
前导序列 565
前胶原蛋白 548
前馈刺激作用 85
前列环素 279
前列环素合酶 282
前列腺素 279
前列腺素内过氧(化)物合酶 280
前列腺烷酸 279
前突触膜 555
前引发蛋白 424
前引发复合物 422
前引发体 424
嵌入染料 434
嵌套式 PCR 596,600
羟脯氨酸 324
羟基磷灰石 594
羟醛缩合反应 12
鞘磷脂 248,276
切除酶 429
切除修复 427
切口封闭酶 420
切口酶 440
亲电体 7

亲和淘选 608
亲和选择 608
禽成髓细胞性白血病病毒 591
清蛋白 232
取代型重组病毒载体 606
去甲肾上腺素 332
去脂酰化作用 273
全甲基化 422
全能性 570
醛醇 - 克莱森酯缩合反应 99
醛缩酶 17,72

R

染色体 DNA 518
染色体步移 597
染色体交叉 438
染色体外的遗传因子 406
染色体外基因 504
染色质改建 572
染色质装配因子 572
热力学第二定律 25
热力学第一定律 24
人类基因组计划 611
溶酶体 173,293,300,551
溶酶体蛋白 533
溶酶体糖蛋白 170
溶栓 547
溶 - 血小板活化因子 283
溶血性贫血症 153
溶原 443,567
溶原途径 585
溶原性噬菌体 533
溶解蛋白 421
融合蛋白 602
肉碱/脂酰肉碱移位酶 234
肉碱/脂酰肉碱移位酶 II 234
肉碱 233
肉碱酰基转移酶 254
肉碱酰基转移酶 I 254
肉碱酰基转移酶 II 254
乳白型 507
乳酸微粒 232,291
乳清苷酸 396
乳清苷酸焦磷酸化酶 397
乳清苷酸脱羧酶 397
乳清酸 396
乳酸 81,158
乳酸脱氢酶 81
乳糖不耐症 163
乳糖操纵子 561
乳糖合酶 162

乳糖酶 162
软脂酰 - ACP 硫酯酶 261,263

S

三氟甲氧基苯胺羰基氰化物 138
三联体 508
三联体密码 406
三磷酸肌醇 557
三亲株配对 605
三羧酸循环 92
三羧酸转运体系 258
三叶草根瘤菌 381
三叶草型结构 520
三脂酰甘油 232
三脂酰甘油脂肪酶 253
色氨酸 319
色氨酸 2,3 - 二加氧酶 319
色氨酸吡咯酶 319
色氨酸合酶 359
色氨酸氧化酶 302
上游控制元件 572
蛇毒磷酸二酯酶 387
砷化物对硫辛酰胺的毒害作用 96
砷酸盐 75
神经递质 308,554,555
神经调质 555
神经分子生物学 611
神经节苷脂 249
神经脉冲 554
神经内分泌 556
神经肽 555
神经 - 体液性分泌 556
神经酰胺 276
神经元 554
肾上腺素 190,332
肾细胞 283
渗透压调节 569
生长点 421
生长素释放抑制激素 612
生长素 378
生长因子受体 558
生根培养基 588
生脾磷酸二酯酶 387
生糖氨基酸 329,539
生糖原蛋白 184
生酮氨基酸 329,539
生酮和生糖氨基酸 329
生物固氮 377
生物固氮的基因工程 384
生物合成 1
生物膜 46
生物能学 23
生物素 154
生物素羧化酶 259
生物素羧基载体蛋白 259
生物体中某些重要的氧化 - 还原电势 116
生物信息学 607
生物形态建成 543
生物氧化 114
生氧光合作用 211
时序调节 561
时序控制 567
识别序列 583
实验进化 608
使用频率 512
适应调节 561
释放因子 531
噬菌斑形成单位 587,589
噬菌体 T₂ 519
噬菌质粒 584
受纳细胞 606
受体端 520
受体酶 558
受体拼接点 576
衰减子 564
衰减作用 564
双关酶 553
双核锰中心 399
双核铁(Fe³⁺)辅因子 398
双链 RNA 熔解因子 577
双链断裂 430
双链交联 430
双向复制 409
水裂解复合体 213
顺 - 高乌头酸 346
顺式显性 451
顺式作用元件 572
顺 - 乌头酸酶 100
瞬时表达 606
丝氨酸 316
丝氨酸蛋白酶抑制剂 548
丝氨酸羟甲基转移酶 317
丝氨酸脱氢酶 302
丝氨酸脱水酶 316,317
丝氨酸转羟甲基酶 354
丝氨酸转乙酰基酶 354
四环素 531
四硼酸钠 180
四氢叶酸 330
松弛控制质粒 406
松弛突变 567

松弛型控制 583
 苏氨酸 316,317
 苏氨酸的生物合成 351
 苏氨酸醛缩酶 316
 苏氨酸脱氢酶 317
 宿主专一结瘤基因 383
 酸核糖 - AMP 解环酶 359
 酸性瓠/酚/氯仿抽提法 591
 酸性脂肪酶 294
 酸中毒 245
 随机扩增多态 DNA 597
 羧肽酶 302
 缩醛磷脂 274,282

T

肽酰嘌呤霉素 530
 肽酰转移酶 529
 碳固定 218
 羧基磷酸 312
 糖蛋白 535
 糖蛋白的分解代谢 173
 糖和氨基酶的运送 53
 糖基 4→6 - 转移酶 185
 糖基磷酸酰肌醇 172
 糖基糖酯酰肌醇 - 锚 167
 糖基转移酶 161,164,181,277
 糖酵解作用的调节 83
 糖尿病 69,192,193
 糖皮质激素 573
 糖酸解 65
 糖原 176
 糖原代谢的调控 187
 糖原分支酶 185
 糖原合酶 184
 糖原合酶 a 189
 糖原合酶 b 189
 糖原累积症 194
 糖原磷酸化酶 177,177
 糖原磷酸化酶的调控机制 187
 糖原素 184
 糖原脱支酶 180
 糖原引物蛋白 184
 特异位点重组 438
 体内研究 16
 体外包装 587
 体细胞重排 446
 体液系统 544
 天冬氨酸 140,160,326
 天冬氨酸氨基移换酶 160
 天冬氨酸的生物合成 347
 天冬氨酸 - 谷氨酸转氨酶 347

天冬氨酸激酶 348
 天冬氨酸转氨酶 396
 天冬氨酸 - β - 半醛 349
 天冬氨酸 - β - 半醛脱氢酶 348
 天冬氨酸 - γ - 半醛 348
 天冬氨酸磷酸 349
 天冬氨酸 - β - 磷酸 348
 天冬酰胺 326
 天冬酰胺的生物合成 348
 天冬酰胺合成酶 348
 天冬酰胺酶 326
 填补反应 110
 铁蛋白 377,380,381
 铁硫簇 399
 铁钼辅因子 380
 铁氧还蛋白 377
 同工酶 545
 同裂酶 581
 同尾酶 581
 同位素示踪法 18
 同向运输 48
 同型性排斥 446
 同义密码子 512
 同源体 507
 同源重组 438
 铜 - 锌超氧化物歧化酶 143
 酮病 245
 酮糖 - 5 - 磷酸 149
 酮体 243,539
 突变型蛋白质 607
 突触 555
 突触裂隙 555
 突触泡 555
 退火 592
 吞噬 551
 脱磷酸辅酶 A 激酶 403
 脱羧酶 308
 脱酰胺 - NAD 焦磷酸化酶 402
 脱腺苷酰 549
 脱氧胆酸 295,522
 脱氧核糖核苷激酶 400
 脱氧腺苷钴胺素 242
 拓扑变化 169
 拓扑结 420
 拓扑结构 419
 拓扑连环数 419
 拓扑学 406
 拓扑异构酶 420
 拓扑异构酶 II 420
 拓扑异构酶 II α II β 421
 拓扑异构酶 III 420

拓扑异构酶 IV 420
 拓扑异构体 420
 唾液酸 161,165

W

外因子 440
 外显子 507
 烷化剂 433
 网织红细胞 523
 维生素 B₁₂ 239,240,381
 未负载 tRNA 567
 位点 *nic/bom* 584
 胃蛋白酶 302
 胃蛋白酶原 302
 胃泌素 302
 胃脂肪酶 231
 温度敏感突变体 602
 蜗牛消化酶 588
 乌本苷 49
 乌头酸酶 98,101
 无机焦磷酸酶 183
 无机磷酸 176
 无嘧啶位点 429
 无嘌呤 429
 无细胞分子克隆法 595
 无细胞体系 513
 无性繁殖系 580
 无义突变 432,507
 无意义突变 521
 五糖核心 165
 戊糖磷酸途径 147
 戊糖磷酸循环 147
 戊糖支路 147

X

协调单位 561
 烯醇化酶 17
 烯醇式 1 - (O - 羧基苯氨基) - 1 - 脱氧核酮糖 - 5' - 磷酸 359
 烯醇式丙酮酸 155
 烯二醇 149
 烯酰 - ACP 还原酶 263
 烯酰 - CoA 水合酶 236,238
 烯酰 - CoA 异构酶 239
 硒代半胱氨酸 514,515
 硒代半胱氨酸插入序列 515
 硒蛋白 515
 硒酶 515
 细胞的决定 570
 细胞分裂素合成酶 604
 细胞分裂周期 559

- 细胞分裂周期基因 559
 细胞核 551
 细胞呼吸 114
 细胞间隙接头 556
 细胞溶胶内 NADH 的再氧化 139
 细胞融合 440
 细胞色素 123
 细胞色素 b₅ 283
 细胞色素 c 125
 细胞色素 c 氧化酶 126
 细胞色素 c₁ 前体蛋白 535
 细胞色素 P₄₅₀ 243,295
 细胞色素还原酶 123,126
 细胞氧化 114
 细胞周期 427
 细菌叶绿体 201
 先存结构 538,550
 纤溶酶原 548
 酰基辅酶 A 36
 酰基腺苷酸 34
 酰基转移 7
 酰基转移酶 268
 衔接物 581
 显微注射法 588
 线粒体 552
 线粒体 ATP 酶 131
 线粒体的结构 129
 线性脂加氧酶 280
 限速反应 151
 限制酶 580
 限制酶谱 581
 限制性核酸内切酶 580
 限制性内切酶 388
 腺病毒 606
 腺二磷酸糖基化 557
 腺苷酸琥珀酸合成酶 394
 腺苷硫酸焦磷酸化酶 354
 腺苷三磷酸 2
 腺苷酸代琥珀酸 307
 腺苷酸琥珀酸 394
 腺苷酸琥珀酸裂解酶 393,394
 腺苷酸环化酶 191,275
 腺苷酸激酶 42
 腺苷酰化 549
 腺苷酰转移酶 549
 腺嘌呤-5'-磷酸硫酸 354
 腺嘌呤核苷酸脱氨酶 388
 腺嘌呤核苷脱氨酶 388
 腺嘌呤磷酸核糖转 395
 腺嘌呤脱氨酶 388,390
 相对立的单向反应 541
 相容末端 581
 香豆霉素 A₁ 420
 消除反应 10
 消旋酶 375
 消旋- α, ϵ -二氨基庚二酸 349
 硝基血管舒张药物 559
 硝酸纤维素滤膜 593
 销毁序列识别蛋白 559
 小分子物质的运输 47
 校对的功能 415
 校正 tRNA 507
 协同控制作用 85
 协同性 416
 协同抑制 361
 协同运输 48
 缬氨霉素 59
 缬氨酸 299,326
 心脏中脂肪酸氧化的调节 254
 新陈代谢 1
 新陈代谢的调节 5
 新霉素抗性基因 606
 新生霉素 420
 信号分子作用的位点 572
 信号假说 554
 信号识别体 534
 信号肽酶 533
 信号肽序列 533
 信号转导蛋白 556
 信号转换器 507
 信息加工 506
 信息体 577
 形态发生素 574
 性导 440
 性因子 440
 胸腺嘧啶核苷激酶 401
 胸腺嘧啶核苷酸合酶 400
 修饰酶 580
 修饰性甲基化酶 580
 选择标记 583
 选择培养基 583
 选择透性 553
 选择性拼接 507
 血红蛋白 299,523
 血红蛋白脱辅基蛋白质 371
 血红素 378
 血红素控制的翻译抑制物 577
 血红素生物合成 370
 血检调节蛋白 548
 血栓 547
 血栓烷 279
 血栓烷合酶 282
 血糖 177
 血纤肽 A B 548
 血纤维蛋白 548
 血纤维蛋白多聚体 548
 血纤维蛋白原 548
 血小板 283
 血小板活化因子 283
 血小板聚集 548
 血小板衍生的生长因子受体 556
 血友病 547
 循环光合磷酸化 217
- Y
- 芽性肿瘤基因 604
 亚胺环己酮 532
 亚精胺 335
 亚麻酸 265
 亚铁螯合酶 370
 亚线粒体结构 134
 亚硝基胍 433
 亚油酸 265
 亚油酰-CoA 239
 烟酸单核苷酸焦磷酸化酶 402
 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 401
 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 401
 胭脂碱合成酶 604
 延长因子 528
 延胡索酸 104,105,326,345
 延胡索酸酶 98,106
 严谨控制 566
 严谨控制因子 567
 严谨控制质粒 406
 严谨型控制 583
 岩藻糖 161
 研究材料 15
 羊毛固醇 289
 氧鎓离子 179
 氧的不完全还原 142
 氧化氮合酶 363
 氧化还原蛋白 380
 氧化-还原电势 114
 氧化-还原反应 9
 氧化-还原回路机制 133
 氧化磷酸化 2,114
 氧化磷酸化的调控 140
 氧化磷酸化的解偶联和抑制 137
 氧化磷酸化抑制剂 138
 氧化磷酸化作用机制 130
 氧化脱氨基作用 303,306
 氧偶联剂 372
 叶黄素 204

- 叶绿体 198
 叶绿体蛋白质 535
 叶绿体转移肽 535
 叶盘转化法 588
 一般性加工 507
 一般性重组 438
 一氧化氮合酶 558
 一氧化氮受体 558
 衣霉素 170
 依赖于周期素的蛋白激酶 559
 依赖于周期素的激酶 427
 胰蛋白酶 302
 胰岛素 69,192
 胰岛素敏感蛋白激酶 192
 胰岛素受体 556
 胰岛素依赖型 193
 胰高血糖素 85,158,190
 胰脂肪酶 231
 移动性载体模型 60
 移码突变 432,507,511
 移位 530
 遗传密码 504
 遗传密码第二 525
 遗传信息 504
 遗传性非息肉结肠直肠癌 428
 遗传重组 438
 乙醇 82
 乙醇胺 271
 乙醇脱氢酶 83
 乙基甲烷磺酸 433
 乙基乙烷磺酸 433
 乙醛 82,316
 乙醛酸 159,389
 乙醛酸途径 159
 乙醛酸循环 159,539
 乙酰 - CoA 92, 108, 159, 258, 284, 286,346,353
 乙酰 - CoA 羧化酶 254,258,265
 乙酰胆碱受体通道 555
 乙酰磷酸 34
 乙酰乙酰 - CoA 286
 异丙基硫代半乳糖苷 519
 异丙基硫代 - β - D - 半乳糖苷 584
 异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷 164
 异二聚体 416
 异构化反应 11
 异构酶 I 420
 异亮氨酸 326
 异亮氨酸的生物合成 351
 异亮氨酰 - tRNA 合成酶 526
 异裂斯键 6
 异咯嗪核苷酸 402
 异柠檬酸 100,101,160,380
 异柠檬酸裂合酶 159
 异柠檬酸裂解酶 102
 异柠檬酸脱氢酶 98,101,108
 异柠檬酸脱氢酶激酶 102
 异柠檬酸脱氢酶磷酸酶 102
 异染色质化 571
 异肽键 330
 异戊酰 - CoA 319
 异戊酰焦磷酸 287
 异戊酰焦磷酸异构酶 287
 异形体 576
 异源双链 DNA 438
 抑癌基因 435,561
 抑制 - 促进 - 增变系统 451
 抑制效应物 546
 易产生错误的修复 431
 易错修复 427
 阴离子运输 53
 引导肽 536
 引导肽酶 536
 引发体 423
 引物合成酶 419,422
 引物链 412
 吲哚 - 3 - 甘油磷酸 359
 吲哚 - 3 - 甘油磷酸合酶 359
 吲哚乙酸 332
 应答元件 572,573
 应急反应 431
 营养缺陷型 583
 油酰 - CoA 239
 游离胆酸 295
 有义信息 505
 右端边缘 604
 诱变剂 432
 诱变作用 435
 羽田杀菌素 395
 语言信息 508
 语义信息 508
 语用信息 508
 原癌基因 435,560
 原叶淋Ⅹ 370
 原叶淋Ⅹ氧化酶 370
 原奎宁 153
 原生质体 588
 原噬菌体 444
 原位杂交 593
 圆褐固氮菌 377
 猿猴空泡病毒 606
 阅读框架 507
 运蛋白(T₁) 182
 运输蛋白的构象 60
 运输泡 551
- Z**
- 杂种不育 451
 甾醇的代谢 251
 载色体 215
 载体 583
 载脂蛋白 291,292
 再编码 508
 再生植株 606
 再脂酰化作用 273
 藻胆素类 203
 藻胆体 203
 藻红蛋白 203
 藻红素 203
 藻蓝蛋白 203
 藻蓝素 203
 增强子静默子 572
 增效剂 331
 增殖细胞核抗原 426
 章鱼碱合成酶 604
 赭石型 507
 整合酶 444
 整合宿主因子 444
 整合质粒 603
 正调节 564
 正反馈 544
 正链引物结合位点 606
 正前馈 544
 正肾上腺素 191
 正铁血红素 371
 正选择 608
 支链淀粉 176
 脂蛋白 232,258
 脂蛋白脂肪酶 232,293
 脂蛋白脂酶 291
 脂肪肝 257
 脂肪酸代谢的调节 253
 脂肪酸的生物合成 258
 脂肪酸合酶 260
 脂肪酸合酶复合体 260
 脂肪酸进入线粒体的调控 254
 脂肪酸转入线粒体 233
 脂肪酸 α - 羟化酶 243
 脂肪酸 - CoA 去饱和酶 265
 脂肪小滴 551
 脂肪族氨基酸的生物合成 343
 脂肪组织 257
 脂加氧酶 282

- 脂酶 231,257
 脂酰 - CoA:胆固醇酰基转移酶 293
 脂酰 - CoA 胆固醇脂酰转移酶 ACAT 253
 脂酰 - CoA 脱氢酶 236
 脂酰 - CoA 脱氢酶缺乏症 238
 脂酰辅酶 A 41
 脂质体 588
 脂质转染法 588
 直接修复 427
 植烷酸 243
 指导 RNA 507
 质量作用比 545
 质膜 550
 质膜体 553
 质体蓝素:铁氧还蛋白氧化还原酶 212
 质子泵 128,130
 质子泵机制 134
 质子动势 208
 质子通道 134
 质子载体 138
 致癌 RNA 病毒 561
 致癌剂 433,435
 致癌作用 435
 致育因子 440
 滞后链 418
 中间代谢 1,16
 中性漂移 505
 忠实性 415,416
 终端产物抑制 361
 终止密码 520
 终止密码子 531
 终止区 424
 终止信号 510
 终止子 424,565
 种群特异性抗原 606
 重氮丝氨酸 392
 重叠基因 511
 重组 PCR 596
 重组病毒质粒载体 606
 重组 PCR 608
 重组酶 443
 重组体 DNA 的技术 580
 重组位点 443
 重组信号序列 446
 重组修复 427
 周期素家族 559
 珠蛋白 378
 主动运输 46,553
 主要代谢途径 1
 主要色素 202
 贮存脂肪 257
 柱孢鱼腥藻 381
 转氨基作用 303
 转氨甲酰酶催化 345
 转氨酶 306
 转导 440,441
 转化 440,505,587
 转换 432
 转换型 585
 转录初产物 507
 转录物组学 612
 转醛酶 150
 转染 587
 转羧酶 259
 转肽 529
 转酮酶 149
 转移基因 605
 转运蛋白 T₂ 182
 转运蛋白 T₃ 182
 转座酶 448
 转座频率 448
 转座因子 447
 转座重组 438
 转座子 447
 装配起始信号 586
 装配者 507
 准随机切割 589
 着色性干皮病 430
 自动催化作用 185
 自动糖基化 185
 自发过程 25
 自发突变 432
 自分泌 556
 自溶素 441
 自杀作用物 389
 自身催化 528
 自身环化 581
 自生固氮 377,379
 自生固氮细菌 381
 自生型固氮微生物 378
 自由能 2,26
 自由能变化公式 28
 自主复制 583
 自主复制序列 425
 自主因子 451
 棕色固氮菌 381
 阻遏蛋白 562
 阻遏酶 362
 阻遏物蛋白 564
 组氨酸磷酸磷酸酶 359
 组氨酸脱氢酶 359
 组氨酸的生物合成 359
 组氨酸脱羧酶 308
 组胺 308,333
 组成酶 564
 组成型表达 561
 组蛋白乙酰基转移酶 572
 组合因子 448
 组织胺 308
 组织蛋白酶 300
 组织呼吸 114
 组织型纤溶酶原激活剂 548,610
 左端边缘 604
 作用中心色素 204
 长芽培养基 588
 滞后链 423
- ### A
- AC 链 426
 Ames 试验 435
 AMP 41,179,187
 apo A - I 292
 apo A - II 292
 apo B - 100 292
 apo C - I 292
 apo C - II 292
 apo C - III 292
 apo C - E 293
 AP 核酸内切酶 429
 AP 位点 429
 ATP/ADP 交换体 54
 ATP 188,377
 ATP 的合成部位 131
 ATP 的结构特性 37
 ATP 合成机制 134
 ATP 酶 52
 ATP 系统的动态平衡 42
 AT 共聚物 412
 AUG 520,527
 A 蛋白 410
- ### B
- BRCA1 431
 BRCA2 431
- ### C
- CAAT 框 572
 Calvin-Bensen 循环 218
 Calvin 循环 218
 cAMP 188
 cAMP - 依赖性蛋白激酶 139,188,

191
 cAMP 应答元件结合蛋白 575
 CAM 植物 227
 Ca²⁺ 188
 Ca²⁺ - ATP 酶 51
 Ca²⁺ 泵 51
 Ca²⁺ 的运输 51
 Ca²⁺ 动员 557
 Ca²⁺ 激活的 K⁺ 通道 555
 Ca²⁺ 梯度差 51
 Ca²⁺ 通道 555
 Ca²⁺ 通道蛋白 553
 CCA 520
 cDNA 文库 589
 CDP:磷酸胆碱胞苷转移酶 271
 CDP 268
 CDP - 胆碱 271
 Cl⁻ 通道 555
 CMP 161
 coleicin E3 527
 COS 细胞 606
 CO₂ 固定 218
 CTP 合成酶 397
 C 值佯谬 504

D

Dam 甲基化酶 422,428
 Dna A 蛋白 421
 Dna B 422
 Dna C 422
 DNA 单链的同化 441
 DNA 的复杂度 505
 DNA 的体外酶促扩增 595
 DNA 复制酶 415
 DNA 改组 608
 DNA 结合蛋白 441
 DNA 解螺旋酶 421
 DNA 聚合酶 410
 DNA 聚合酶 I 414
 DNA 聚合酶 II 和 III 415
 DNA 聚合酶 III 415
 DNA 聚合酶 IV 417
 DNA 聚合酶 V 417
 DNA 聚合酶 E 430
 DNA 聚合酶全酶 416
 DNA 聚合酶 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ 425
 DNA 连接酶 417
 DNA 弯曲 422
 DNA 旋转酶 420
 D - 氨基酸 375
 D - 氨基酸氧化酶 306

D - 环 410
 D 环 520
 D - 环复制 410
 D - 甲基丙二酰 - CoA 239
 D - 葡萄糖 - 6 - 磷酸 39
 D - α, β - 羟丁酰 ACP 263
 D - β - 羟丁酸 244
 D - β - 羟丁酸脱氢酶 244

E

EF - 1 529
 EF - 2 533
 EF - Ts 529
 EF - Tu 529
 EF - Tu - GTP 529
 eIF - 2 528
 eIF - 3 528
 eIF - 4 528
 Emerson 增益效应 208

F

FAD 焦磷酸化酶 402
 fMet - tRNA^{fMet} 528
 F 性菌毛 440
 F 因子 440
 F₁ 单元 134
 F₀F₁ - ATP 酶 134
 F₀ 单元 134

G

GC 框 572
 GDP 161
 GDP - 甘露糖 168
 Gi 193
 GLUT1 159
 GLUT2 159
 GLUT3 159
 GLUT4 159
 GLUT5 159
 GLUT6 159
 GLUT7 159
 G_s 193
 GTP 528,530
 G 蛋白 191,193,531

H

h MSH1 428
 h MSH2 428
 H - ATP 酶 131
 HDL 高密度脂蛋白 253
 Hfr 菌株 440

Hill 反应 199
 HMG - CoA 244
 HMG - CoA 还原酶 286,293
 HMG - CoA 还原酶激酶 286
 HMG - CoA 还原酶激酶的激酶 286
 HMG - CoA 裂解酶 244
 Holliday 模型 438
 Holliday 中间体 439
 HU 蛋白 421
 H 抗原 445
 H 片段 445

I

IF - 1 528
 IF - 2 528
 IF - 3 528
 IPTG 584

J

JAK - STAT 通路 560

K

Klenow 片段 414
 Kornberg 酶 414
 K⁺ 通道 555

L

L, L - 2, 6 - 二氨基庚二酸 349
 L, L - 胱硫醚 351
 L - 3 - 羟脂酰 - CoA 245
 L - 3 - 羟脂酰 - CoA 脱氢酶 236
 LDL 低密度脂蛋白 253
 LDL 受体 293
 Lesch - Nyhan 综合征 396
 Lex A 阻遏物 431
 lovastatin 287
 Lynch 综合征 428
 L - 氨基酸氧化酶 306
 L - 脯氨酸的合成 345
 L - 高丝氨酸 350
 L - 谷氨酰胺 344
 L - 胱硫醚 355
 L - 甲基丙二酰 - CoA 239
 L - 精氨酸的生物合成 345
 L - 赖氨酸 346
 L - 赖氨酸的生物合成 346
 L - 鸟氨酸 345
 L - 苹果酸 105
 L - 天冬氨酸 347
 L - 组氨醇磷酸 359
 L - 组氨醛 359

- L- α , ϵ -二氨基庚二酸 349
- M**
- MAPK 559
Met-tRNA^{Met} 528
MF-1 核酸酶 426
Mg²⁺ 原卟啉 IX 371
mRNA 518,519,520
mRNA 的表型鉴定 596
mRNA 的结合部位 520
Mut H 428
Mut S 428
- N**
- N-1-(5'-磷酸核糖-ATP) 359
N-5'-磷酸核糖-氨基苯甲酸 359
NADH 108,153,290
NADH-Q 还原酶 121
NADPH:细胞色素 P₄₅₀ 还原酶 295
NADPH 148,151,153,290
NADP⁺ 151
NAD 合成酶 402
NAD⁺ 依赖性分支酸变位酶 T- 预苯
酸脱氢酶 357
Na⁺,K⁺-ATP 酶 49
Na⁺-K⁺ 泵 554
Na⁺ 通道 554,555
NH₃ 377
N 核苷酸 447
N-琥珀酰-2-氨基-6-酮庚二酸
348
N-琥珀酰-L,L-2,6-二氨基庚二
酸 348
N-连寡糖 165
N-连寡糖的生物合成 167
N-醛基犬尿氨酸 319
N-乙酰- γ -谷氨酰磷酸 345
N-乙酰氨基葡萄糖 165
N-乙酰半乳糖胺 161
N-乙酰胞壁酸 161
N-乙酰谷氨酸 γ -半醛 345
N-乙酰葡糖胺 161,168
N-乙酰神经氨酸 161,165
N-脂酰-二氢鞘氨醇 276
N⁵,N¹⁰-次甲基 THF 330
N⁵,N¹⁰-亚甲基 THF 330
N⁵-甲基四氢叶酸 351
N¹⁰-甲酰四氢叶酸 392
- O**
- O-琥珀酰基高丝氨酸 351
O-连寡糖 165
O-连寡糖的生物合成 171
O-磷酸-L-高丝氨酸 351
O-磷酸高丝氨酸 350
O-糖链的非还原末端 167
O-乙酰丝氨酸 354
O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶
429
- P**
- P/O 比 131
P680 209
P700 209
P870 205,207
PCR 595
PCR 诱变 598
P 核苷酸 447
- Q**
- Q 循环 126,133
- R**
- Rad 51 431
Ras 蛋白 559
Rec A 蛋白 430,441
Rec BCD 430
Rec BCD 酶 441
Rec J 428
rep 蛋白 421
RF-1 531
RF-2 531
RF-3 531
RF-C 426
Ri 质粒 605
RNase H1 426
RNasin 591
RNA 聚合酶 I 302
RNA 突环 422
RNA 引物 415,418,422
RNA 组学 612
RP-A 426
rRNA 522
Ruv A 蛋白 442
Ruv B 442
Ruv C 442
- S**
- SD 序列 527,602
Shapiro 中间体 449
SP6 启动子 584
SRP-核糖体复合体 534
SRP-受体停泊蛋白 534
S-腺苷高半胱氨酸 330
S-腺苷甲硫氨酸 271,330
- T**
- Taq DNA 聚合酶 595
TATA 框 572
TG 链 426
Ti 质粒 588,604
Tra D 蛋白 440
tRNA 520
tRNA^{Met} 527
tRNA_i^{Met} 527
tRNA^{Phe} 520
Tus 424
T 抗原 606
t 抗原 606
T 淋巴细胞的受体 447
T ϕ C 520
T₂ DNA 519
T₃ T₇ 启动子 584
T₄ DNA 连接酶 581
- U**
- UAA 520
UAG 520
UDP 161,268
UDP-半乳糖 87,162
UDP-葡萄糖 162,183
UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 87,183
UGA 520
Uvr A 429
Uvr B 429
Uvr C 蛋白 429
Uvr D 解螺旋酶 429
- V**
- V-D-J 复合体 446
V-D-J 连接 446
- W**
- Weigle 效应 431
- X**
- X-gal 584
- Z**
- Z 图式 211
 α -(1,6)-糖苷酶 181
 α -酮戊二酸 101
 α -酮戊二酸脱氢酶 108

- α -酮戊二酸脱氢酶复合体 98
 Δ' -呱啶-2,6-二羧酸 348
 Δ^2 -反式-十二烯酰-CoA 239
 Δ^3 -顺式-十二烯酰-CoA 239
 λ gt 系列 585
 ^{14}N - ^{15}N 杂合分子 407
 chi 位点 441
 dna E(pol C)基因 415
 fix 基因 383
 nif 基因 383
 ori V 440
 Paraasponia 根瘤菌 381
 pol A 1 变异株 415
 pol B 1 415
 α, β -反式-丁烯酰-ACP 263
 $\alpha\beta$ 受体 447
 α -N-乙酰鸟氨酸 345
 α -氨基己二酸- δ -半醛 346
 α -氨基- β -氯代丁酸 299
 α -氨基- β -酮丁酸裂解酶 317
 α -氨基- β -酮己二酸 366
 α -互补 584
 α -乳清蛋白 162
 α -肽 584
 α -酮己二酸 346
 α -酮戊二酸 342
 α -酮异戊酸 353
 α -酮异己酸 353
 α -异丙基苹果酸 353
 α -异丙基苹果酸合酶 353
 α_1 -抗胰蛋白酶 548
 β -氨基异丁酸 390
 β -半乳糖苷酶 163, 164, 299
 β -丙氨酸 390
 β -胱硫醚酶 351
 β 胡萝卜素 204
 β -脲基丙酸 390
 β -脲基异丁酸 390
 β -羟酰-ACP脱水酶 263
 β -羟- β -甲基戊二酰-CoA 244, 319
 β -酮硫解酶 236
 β -酮酰-ACP合酶 263
 β -酮酰 ACP 还原酶 263
 β -异丙基苹果酸 353
 $\gamma\delta$ 受体 447
 γ -氨基丁酸 308, 335
 γ 复合物 423
 γ -谷氨酸半胱氨酸合成酶 365
 γ -谷氨酰磷酸 365
 γ -谷氨酰循环 364
 γ -谷氨酰转肽酶 364
 γ -羟谷氨酸的过程 324
 δ -氨基乙酰丙酸 366
 δ -氨基乙酰丙酸合成酶 366
 δ -氨基乙酰丙酸脱水酶 367
 δ -腺苷- α -氨基己二酸 346
 ϵ' -N(2-戊二酸)-赖氨酸脱氢酶 346
 ϵ -N(2-戊二酸)-赖氨酸 346
 θ 形结构 408
 ω 蛋白 420
 (角)鲨烯单加氧酶 289
 "A23187"载体 59
 "补救"途径 395
 "一碳单位" 329
 犊牛儿焦磷酸 288
 1-(链)烯基-2-脂酰磷脂酰乙醇胺 274
 1,2,4-二羟基维生素 D₃ 253
 1,2-二酰甘油 231
 1,3-二磷酸甘油酸 34, 39
 1,5-葡萄糖酸内酯 179
 12-23 规则 446
 16S rRNA 527
 16S 核糖体 527
 1-磷酸半乳糖尿苷酰转移酶 514
 1-神酸-3-磷酸甘油酸 75
 1-烷基-2-乙酰甘油磷酸胆碱 273
 1-烷基-2-脂酰磷脂酰乙醇胺 274
 1-烷基-2-脂酰乙醇胺去饱和酶 274
 1-脂酰甘油磷酸胆碱酰基转移酶 272
 2,3,4,5-四氢吡啶-2,6-二羧酸 348
 2,3-二磷酸甘油酸 77
 2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶 78
 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸 348
 2,3-二氢吡啶-2,6-二羧酸合酶 348
 2,3-氧化(角)鲨烯羊毛固醇环化酶 289
 2,4-二硝基苯酚 137
 25-羟基维生素 D₃ 253
 2D-环复制 410
 2-氨基嘌呤 433
 2-单酰甘油 232
 3,3-二甲烯丙基焦磷酸 287
 3'-腺苷磷酸 5'-磷酸硫酸 35
 3'引物 595
 30S 小亚基 528
 3-L-羟酰-CoA 脱氢酶 238
 3-磷酸甘油酸磷酸 39
 3-磷酸羟基丙酮酸 353
 3-羟脂酰-CoA 236
 3-酮鞘氨醇 276
 3-酮鞘氨醇合酶 276
 3-酮鞘氨醇还原酶 276
 3-酮脂酰-CoA 236
 3-脱氢奎尼酸 356
 3-脱氧- α -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 356
 4'-磷酸泛酰氨基乙硫醇 260
 40S 小亚基 527, 528
 4-羟胺胞嘧啶 433
 5'-脱氧腺苷钴胺素 399
 5'引物 595
 50S 大亚基 528
 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀基)氮甲酰核苷酸 393
 5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸 393
 5-氨基咪唑核苷酸 392, 393
 5-氟脱氧尿苷 425
 5-甲酰胺基咪唑-4-氮甲酰核苷酸 393
 5-焦磷酸甲酰戊酸 287
 5-磷酸核糖胺 392
 5-磷酸核糖焦磷酸 392
 5-羟赖氨酸 166
 5-羟色胺 332
 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸 356
 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 584
 5-溴尿嘧啶 433
 5-氧代脯氨酸 364
 5-氧过氧化二十碳四烯酸 282
 6-磷酸甘露糖酯 536
 6-磷酸葡萄糖酸 147
 6-磷酸葡萄糖酸- δ -内酯 148
 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 147
 6-酮 PGF₁ 282
 6-重氮-5-氧-正亮氨酸 392
 70S 核糖体 531
 7-脱氢胆固醇 253
 7-脱氢酶 253
 7- α -羟胆固醇 252
 7- α -羟化酶 252
 7 α -羟化酶 295
 80S 核糖体 531