

第一章 氨基酸(amino acid)的结构与性质

第一节 氨基酸的结构与分类

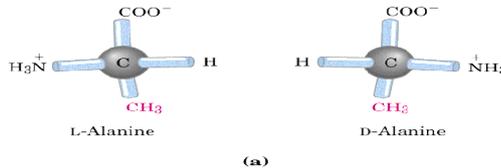
一、氨基酸的结构

组成蛋白质的基本单位是氨基酸。如将天然的蛋白质完全水解，最后都可得到约二十种不同的氨基酸。从氨基酸的结构通式可以看出：

构成蛋白质的氨基酸均为 L- α 一氨基酸。

除 R 为 H（甘氨酸）外，其余氨基酸均具有旋光性。

*在空间各原子有两种排列方式：**L-构型**与**D-构型**，它们的关系就像左右手的关系，互为镜像关系，下图以丙氨酸为例：



二、氨基酸的分类：

1.按氨基酸分子中羧基与氨基的数目分：

酸性氨基酸：一氨基二羧基氨基酸，有天冬氨酸、谷氨酸；

碱性氨基酸：二氨基一羧基氨基酸，有赖氨酸、精氨酸、组氨酸；

中性氨基酸：一氨基一羧基氨基酸，有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、脯氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸。

2.按侧基 R 基的结构特点分：

脂肪族氨基酸

芳香族氨基酸：苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸

杂环氨基酸：脯氨酸、组氨酸

3.按侧基 R 基与水的关系分：

非极性氨基酸：有甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、脯氨酸；

极性不带电氨基酸：天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸；

极性带电氨基酸：天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸。

4. 按氨基酸是否能在人体内合成分：

必需氨基酸：指人体内不能合成的氨基酸，必须从食物中摄取，有八种：赖氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苏氨酸。

非必需氨基酸：指人体内可以合成的氨基酸。有十种。

半必需氨基酸：指人体内可以合成但合成量不能满足人体需要（特别是婴幼儿时期）的氨基酸，有两种：组氨酸、精氨酸。

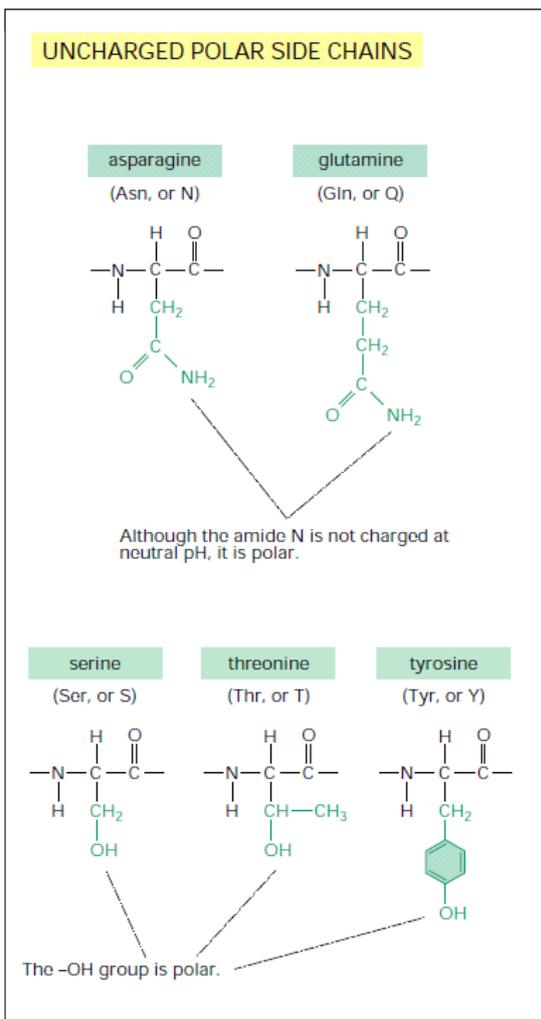
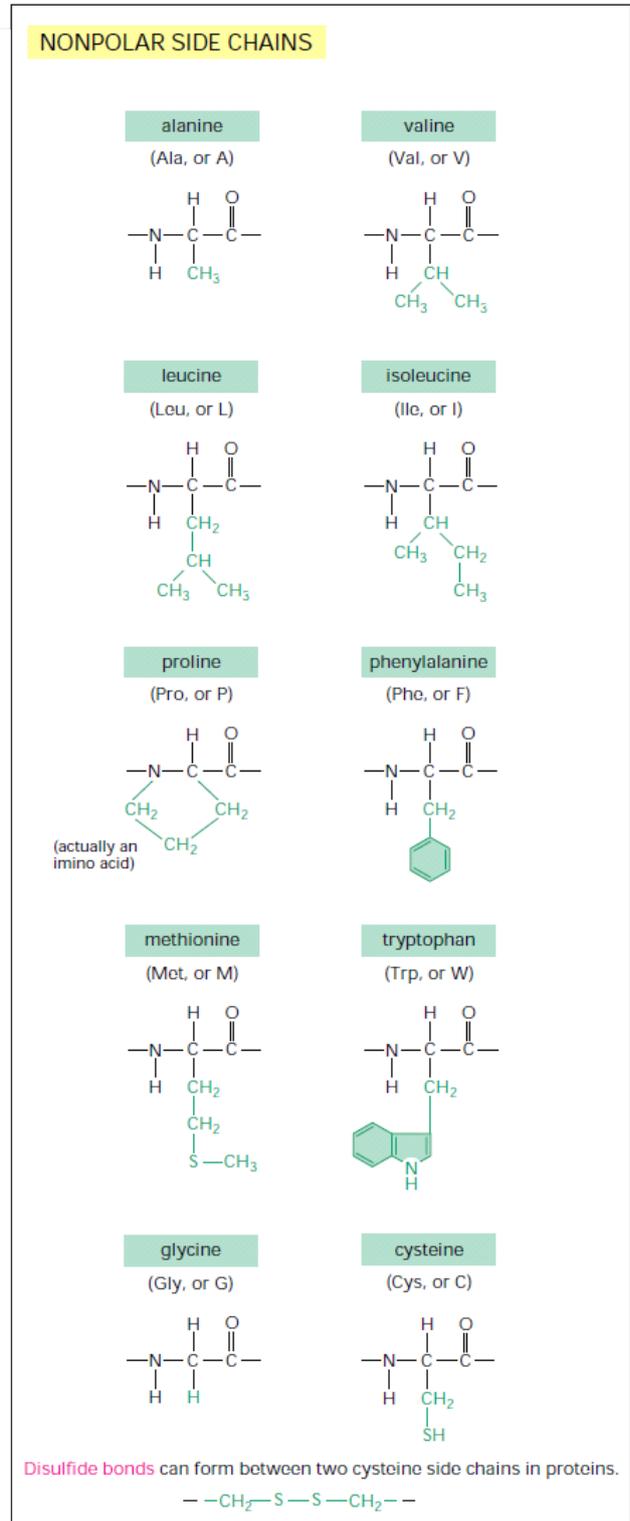
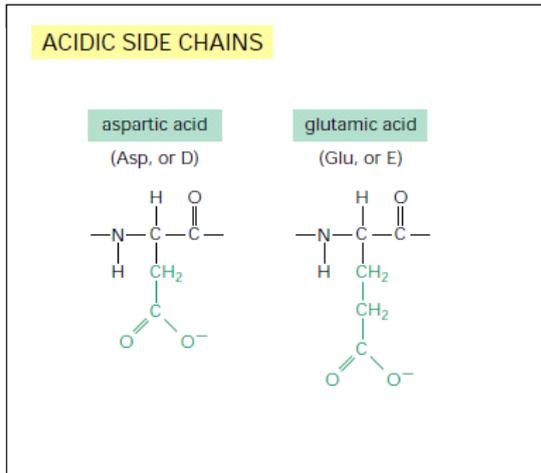
三、稀有氨基酸：

参加天然蛋白质分子组成的氨基酸，除了上述 20 种有遗传密码的基本氨基酸之外，在少数蛋白质分子中还有一些不常见的氨基酸，称为稀有氨基酸。

它们都是在蛋白质分子合成之后，由相应的常见氨基酸分子经酶促化学修饰而成的衍生物。

二十种氨基酸的名称和结构如图所示：

(注：缺脯氨酸)



第二节 氨基酸的理化性质

一、物理性质

形态：均为白色结晶或粉末，不同氨基酸的晶型结构不同。

溶解性：一般都溶于水，不溶或微溶于醇，不溶于丙酮，在稀酸和稀碱中溶解性好。

熔点：氨基酸的熔点一般都比较高，一般都大于 200℃，超过熔点以上氨基酸分解产生胺和二氧化碳。

光吸收：氨基酸在可见光范围内无光吸收，在近紫外区含苯环氨基酸有光的吸收。

旋光性：除甘氨酸外的氨基酸均有旋光性。

二、氨基酸的化学性质

1. 两性解离及等电点

氨基酸分子是一种两性电解质。

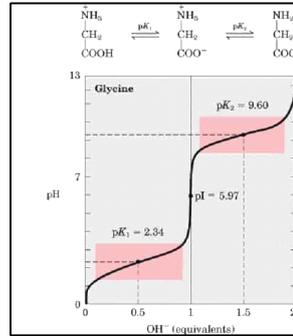
通过改变溶液的 pH 可使氨基酸分子的解离状态发生改变。

氨基酸分子带有相等正、负电荷时，溶液的 pH 值称为该氨基酸的**等电点(pI)**。

在某一 pH 环境下，以两性离子（兼性离子）的形式存在。该 pH 称为该氨基酸的等电点。所以氨基酸的等电点可以定义为：**氨基酸所带正负电荷相等时的溶液 pH。**

以甘氨酸为例，从左向右是用 NaOH 滴定的曲线，溶液的 pH 由小到大逐渐升高；从右向左是用 HCl 滴定的曲线，溶液的 pH 由大到小逐渐降低。曲线中从左向右第一个拐点是氨基酸羧基解离 50% 的状态，第二个拐点是氨基酸的等电点，第三个拐点是氨基酸氨基解离 50% 的状态。

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



通过氨基酸的滴定曲线，可用下列 Henderson—Hasselbalch 方程求出各解离基团的解离常数(pK₁) 根据 pK₁，可求出氨基酸的等电点，其等电点左右两个 pK₁ 值的算术平均值求出。

中性及酸性氨基酸：

$$pI = (pK_1 + pK_2) / 2$$

中性氨基酸：pK₁，为 α—羧基的解离常数，pK₂，为 α—氨基的解离常数。

酸性氨基酸：pK₁，为 α—羧基的解离常数，pK₂，为侧链羧基的解离常数。

碱性氨基酸：

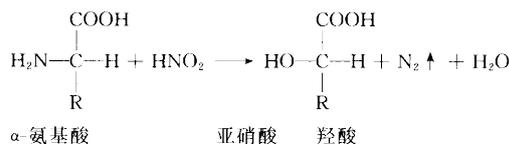
$$pI = (pK_2 + pK_3) / 2$$

其中：pK₂，为 α—氨基的解离常数，pK₃，为侧链氨基的解离常数。

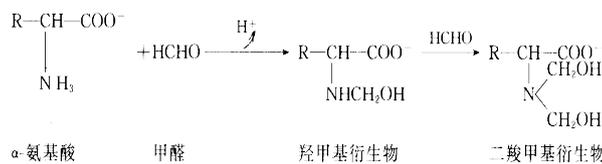
二十种氨基酸的 pK₁，及等电点(P133)：

2. 由 α—氨基参加的反应

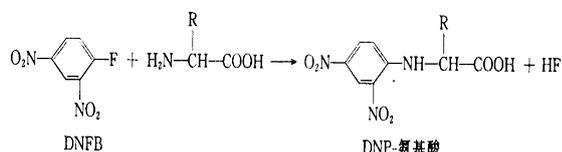
① 亚硝酸反应 放出氮气，氮气的一半来自氨基氮，一半来自亚硝酸，在通常情况下测定生成的氮气的体积量可计算氨基酸的量，此反应可用于测定蛋白质的水解程度。



② 与甲醛的反应 用过量的中性甲醛与氨基酸反应，可游离出氢离子，然后用 NaOH 滴定，从消耗的碱量可以计算出氨基酸的含量。此法称为间接滴定法。



③ 与 2, 4—二硝基氟苯 (2, 4—DNFB) 的反应 (**Sanger 反应**) 生成黄色的二硝基苯—氨基酸衍生物。

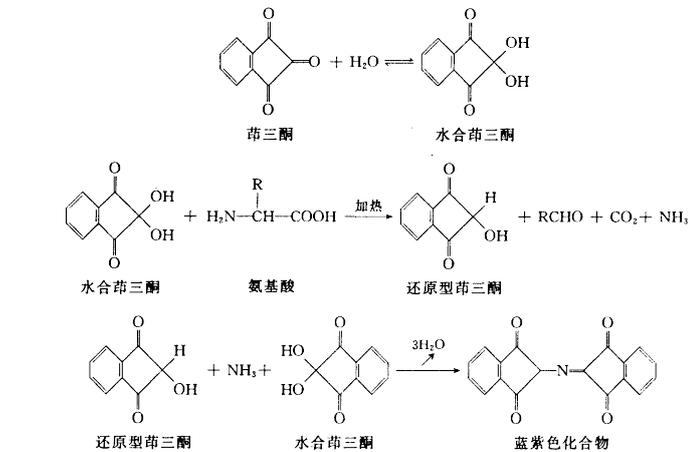


3. α -羧基参加的反应

与碱反应成盐 与醇反应成酯

4. α -氨基与 α -羧基共同参加的反应

与茛三酮的反应：除脯氨酸与羟脯氨酸外，可与其它氨基酸生成**蓝紫色化合物**。脯氨酸与羟脯氨酸为**黄色化合物**。



第一节 概述

一、蛋白质的生物学意义

(一)、蛋白质是生命活动的物质基础

生物体内的蛋白质是除水以外，机体组织中最多的组分，占人体干重的 45%。占细菌干重的 50—70%。

(二)、蛋白质的生物学功能

- 作为生物催化剂：在体内催化各种物质代谢反应的酶几乎都是蛋白质。
- 调节代谢反应：一些激素是蛋白质或肽，如胰岛素、生长素。
- 运输载体：如红细胞中运输 O₂、CO₂ 要靠 Hb (Hemoglobin 血红蛋白)、运输脂类物质的是载脂蛋白、运铁蛋白等转运蛋白或叫载体蛋白。
- 参与机体的运动：如心跳、胃肠蠕动等，依靠与肌肉收缩有关的蛋白质来实现，如肌球蛋白、肌动蛋白。
- 参与机体的防御：机体抵抗外来侵害的防御机能，靠抗体，抗体也称免疫球蛋白，是蛋白质。
- 接受传递信息：如口腔中的味觉蛋白、视网膜中的视觉蛋白。
- 调节或控制细胞的生长、分化、遗传信息的表达。
- 其它：如鸡蛋清蛋白、牛奶中的酪蛋白是营养和储存蛋白；胶原蛋白、纤维蛋白等属于结构蛋白。还有甜味蛋白、毒素蛋白等都具有特异的生物学功能

所以，没有蛋白质就没有生命。

二、蛋白质的分类

(一) 根据分子形状分：球状蛋白质、纤维状蛋白质。

(二) 根据功能分：活性蛋白质、结构蛋白质。

(三) 根据组成分：

- 简单蛋白质：清蛋白、球蛋白、谷蛋白、醇溶谷蛋白、组蛋白、精蛋白、硬蛋白。
- 结合蛋白质：色素蛋白、金属蛋白、磷蛋白、核蛋白、脂蛋白、糖蛋白。

(四) 根据营养价值分：完全蛋白质、不完全蛋白质。

三、蛋白质的水解

- 蛋白质 → 蛋白胨 → 多肽 → 二肽 → 氨基酸
- Mr: > 10⁴ > 2x10³ 1000—500 200 100

1. 酸水解

- 条件：5—10 倍的 20% 的盐酸煮沸回流 16—24 小时，或加压于 120℃ 水解 2 小时。
- 优点：可蒸发除去盐酸，水解彻底，终产物为 L—α—氨基酸，产物单一，无消旋现象。
- 缺点：色氨酸破坏，并产生一种黑色的物质：腐黑质，水解液呈黑色。

2. 碱水解

- 条件：4mol/L Ba(OH)₂ 或 6mol/L NaOH 煮沸 6 小时。
- 优点：水解彻底，色氨酸不被破坏，水解液清亮。
- 缺点：产生消旋产物，破坏的氨基酸多，一般很少使用。

3. 蛋白酶水解

- 条件：蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶，常温 37—40℃，pH 值 5—8
- 优点：氨基酸不被破坏，不发生消旋现象。
- 缺点：水解不完全，中间产物多。

蛋白质酸碱水解常用于蛋白质的组成分析，而酶水解用于制备蛋白质水解产物。

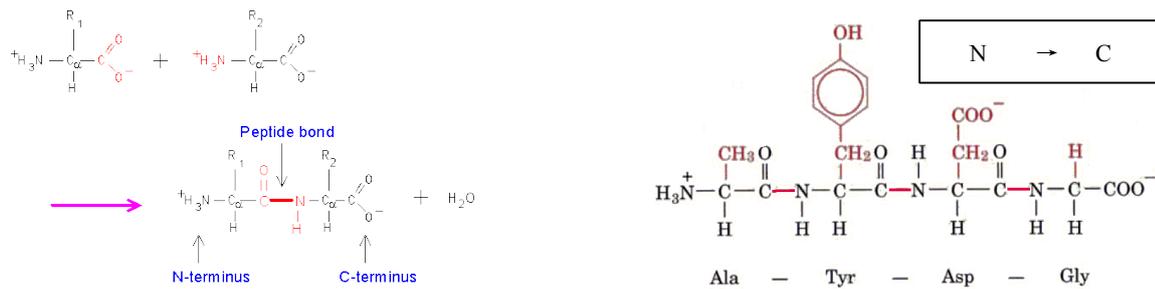
第二节 蛋白质的分子结构

- 蛋白质是由许多氨基酸单位通过肽键连接起来的，具有特定分子结构的高分子化合物。
- 蛋白质的分子结构可人为划分为一、二、三、四级结构。除一级结构外，蛋白质的二、三、四级结构均属于空间结构，即**构象**。
- 构象是由于有机分子中单键的旋转所形成的。蛋白质的构象通常由**非共价键（次级键）**来维系。

一、蛋白质的一级结构

(一) 肽键与肽链

蛋白质是由若干氨基酸的氨基与羧基经脱水缩合而连接起来形成的长链化合物。一个氨基酸分子的 α -羧基与另一个氨基酸分子的 α -氨基在适当的条件下经脱水缩合即生成**肽(peptide)**。



- 两氨基酸单位之间的酰胺键，称为**肽键**。多肽链中的氨基酸单位称为**氨基酸残基**。
- 多肽链具有方向性，头端为**氨基端**（N端），尾端为**羧基端**（C端）。
- 凡氨基酸残基数目在 50 个以上，且具有特定空间结构的肽称蛋白质；凡氨基酸残基数目在 50 个以下，且无特定空间结构者称多肽。

（二）生物活性肽：

生物体内具有一定生物学活性的肽类物质称**生物活性肽**。重要的有谷胱甘肽、神经肽、肽类激素等。

1. 谷胱甘肽（GSH）：

全称为 γ -谷氨酰半胱氨酰甘氨酸。其巯基可氧化、还原，故有还原型（GSH）与氧化型（GSSG）两种存在形式。

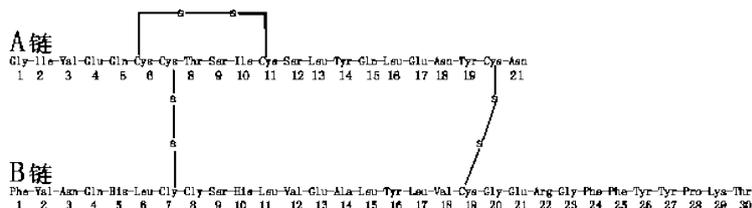
谷胱甘肽的生理功用：

- 解毒作用：与毒物或药物结合，消除其毒性作用；
- 参与氧化还原反应：作为重要的还原剂，参与体内多种氧化还原反应；
- 保护巯基酶的活性：使巯基酶的活性基团-SH 维持还原状态；
- 维持红细胞膜结构的稳定：消除氧化剂对红细胞膜结构的破坏作用。

2. 多肽类激素：

种类较多，生理功能各异。主要见于下丘脑及垂体分泌的激素。

- 胰岛素（Insulin）由 **51** 个氨基酸残基组成，分为 A、B 两条链。**A 链 21** 个氨基酸残基，**B 链 30** 个氨基酸残基。A、B 两条链之间通过**两个二硫键**联结在一起，A 链另有一个**链内二硫键**。



（三）、蛋白质的一级结构

- **蛋白质的一级结构**是指蛋白质多肽链中通过肽键连接起来的氨基酸的排列顺序，即多肽链的线状结构。
- 维系蛋白质一级结构的主要化学键为**肽键**。

中文氨基酸残基命名法：酪氨酰甘氨酰甘氨酰苯丙氨酰甲硫氨酸

中文单字表示法：酪—甘—甘—苯丙—甲硫

三字母符号表示法：Tyr Gly Gly Phe Met

单字母符号表示法：Y · G · G · F · M

蛋白质一级结构与功能的关系

a. 一级结构是空间构象的基础

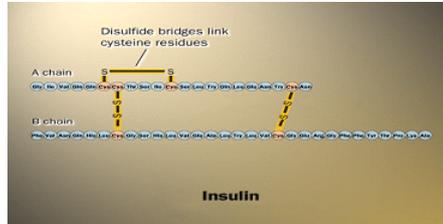
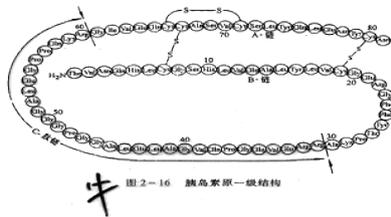
- RNase 是由 124 氨基酸残基组成的单肽链，分子中 8 个 Cys 的-SH 构成 4 对二硫键，形成具有一定空间构象的蛋白质分子。
- 在蛋白质变性剂（如 8 摩尔的尿素）和一些还原剂（如巯基乙醇）存在下，酶分子中的二硫键全部被

还原，酶的空间结构破坏，肽链完全伸展，酶的催化活性完全丧失。

➤ 当用透析的方法除去变性剂和巯基乙醇后，发现酶大部分活性恢复，所有的二硫键准确无误地恢复原来状态。

b. 前体与活性蛋白质一级结构的关系

由 108 个氨基酸残基构成的前胰岛素原 (pre-proinsulin)，在合成的时候完全没有活性，当切去 N-端的 24 个氨基酸信号肽，形成 84 个氨基酸的胰岛素原 (proinsulin)，胰岛素原也没活性，在包装分泌时，A、B 链之间的 33 个氨基酸残基被切除，才形成具有活性的胰岛素。



c. 在镰刀状红细胞贫血患者中，由于基因突变导致血红蛋白 β -链第六位氨基酸残基由谷氨酸改变为缬氨酸，血红蛋白的亲水性明显下降，从而发生聚集，使红细胞变为镰刀状。

d. 细胞色素 c 的一级结构与生物进化的关系

二、蛋白质分子中的非共价键(次级键)

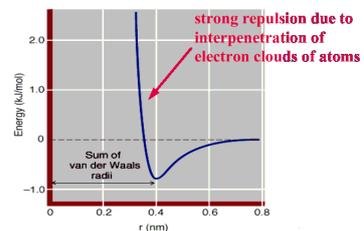
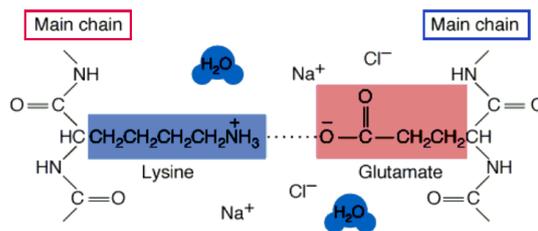
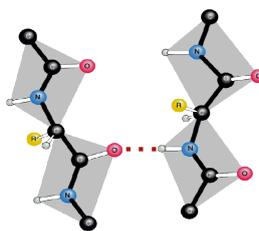
1. 氢键:

- 氢键(hydrogen bond)的形成常见于连接在一电负性很强的原子上的氢原子，与另一电负性很强的原子之间。
- 氢键在维系蛋白质的空间结构稳定上起着重要的作用。
- 氢键的键能较低(-12kJ/mol)，因而易被破坏。

蛋白质分子中氢键的形成

蛋白质分子中离子键的形成

范德华氏引力



2. 疏水键:

- 非极性物质在含水的极性环境中存在时，会产生一种相互聚集的力，这种力称为疏水键或疏水作用力。
- 蛋白质分子中的许多氨基酸残基侧链也是非极性的，这些非极性的基团在水中也可相互聚集，形成疏水键，如 Leu, Ile, Val, Phe, Ala 等的侧链基团。

3. 离子键 (盐键):

- 离子键(salt bond)是由带正电荷基团与带负电荷基团之间相互吸引而形成的化学键。
- 在近中性环境中，蛋白质分子中的酸性氨基酸残基侧链电离后带负电荷，而碱性氨基酸残基侧链电离后带正电荷，二者之间可形成离子键。

4. 范德华氏 (van der Waals)引力: 原子之间存在的相互作用力。

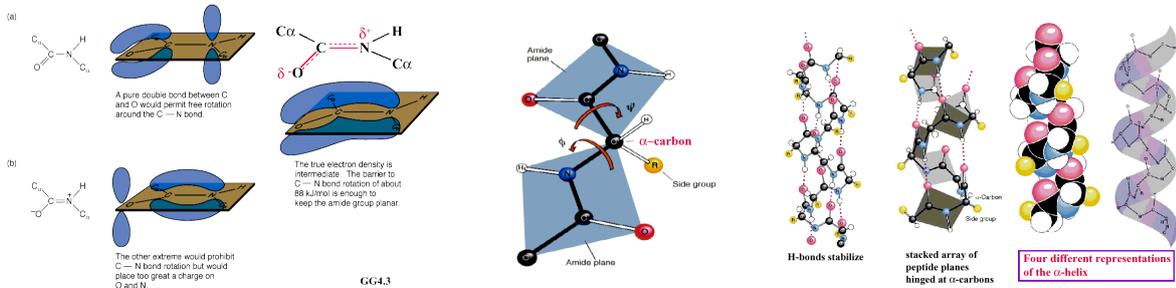
三、蛋白质的二级结构

- 蛋白质的二级结构是指蛋白质多肽链主链原子局部的空间结构，但不包括与其他肽段的相互关系及侧链构象的内容。维系蛋白质二级结构的主要化学键是氢键。

(一) 蛋白质立体结构原则:

1. 由于 C=O 双键中的 π 电子云与 N 原子上的未共用电子对发生“电子共振”，使肽键具有部分双键的性质，不能自由旋转。

2. 与肽键相连的六个原子构成刚性平面结构，称为肽单元或肽键平面。但由于 α -碳原子与其他原子之间均形成单键，因此两相邻的肽键平面可以作相对旋转。



- 肽键平面——由于肽键具有部分双键的性质，使参与肽键构成的六个原子被束缚在同一平面上，这一平面称为**肽键平面**或**肽单元**。

(二) 蛋白质二级结构的类型：

蛋白质的二级结构主要包括 α -螺旋， β -折叠， β -转角及无规卷曲等几种类型。

1. α -螺旋：

- α -螺旋是多肽链的主链原子沿一中心轴盘绕所形成的有规律的螺旋构象，其结构特征为：

- (1) 为**右手螺旋**；
- (2) 螺旋每圈包含 **3.6** 个氨基酸残基，每个残基沿轴旋转 100 度，螺距为 **0.54nm**；
- (3) 螺旋以**氢键**维系。

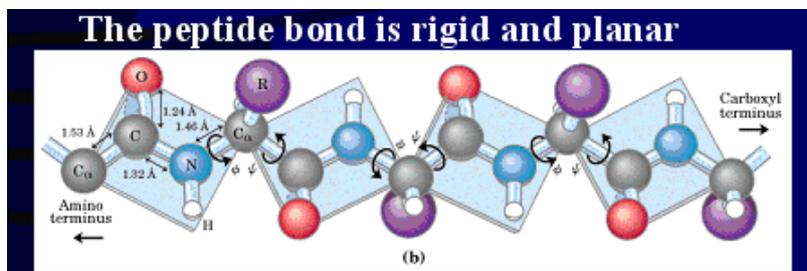
每个肽键的羰基氧与远在第四个氨基酸氨基上的氢形成氢键 (hydrogen bond)，氢键的走向平行于螺旋轴，所有肽键都能参与链内氢键的形成。

➢ 蛋白质分子构象的立体化学原则

Linus Pauling 和 Robert Corey 于 20 世纪 40 年代末至 50 年代初，应用 X—射线衍射法 (X—ray diffraction) 技术对 α -角蛋白等研究结果，提出了蛋白质分子构象的立体化学原则，要点如下：

(1) 肽链空间构象的基本结构单位为肽平面或肽单元。

所谓的肽平面是指肽链中从一个 $C\alpha$ 原子到另一个 $C\alpha$ 原子之间的结构，共包含 6 个原子 ($C\alpha$ 、C、O、N、H、 $C\alpha$)，它们在空间共处于同一个平面。如下图所示：



(2) 肽键上的原子呈反式构型

(3) 肽键 C-N 键长为 0.132nm,比一般的 C—N 单键 (0.147nm) 短,比 C=N 双键 (0.128nm) 要长,具有部分双键的性质 (partial double-bond character),不能旋转。而 $C\alpha$ -COOH、C-NH₂,为真正单键 (pure single bond),可以旋转。

➢ 影响 α -螺旋稳定的因素

(1) 极大的侧链基团

较大的 R(如苯丙氨酸、色氨酸、异亮氨酸)集中的区域,妨碍 α -螺旋形成,主要由 α -螺旋结构组成,存在空间位阻。

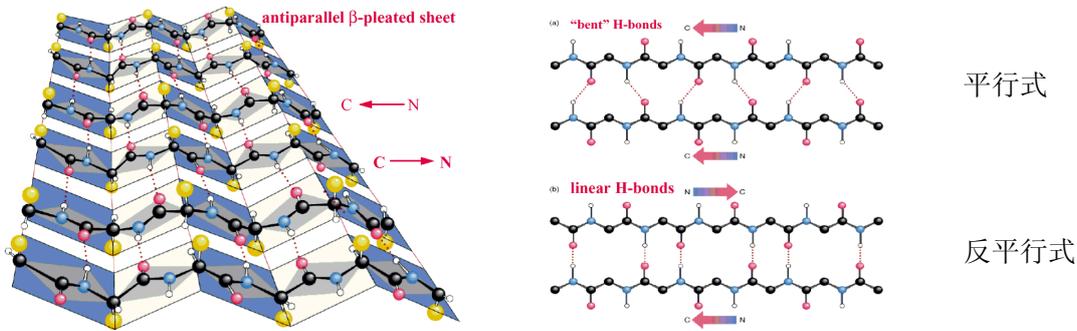
(2) 有 Pro 等亚氨基酸存在

Pro 的 N 上缺少 H,不能形成氢键。

(3) 连续存在的侧链带有相同电荷的氨基酸残基 (同种电荷的互斥效应)

酸性或碱性氨基酸集中的区域,由于同电荷相斥,不利于 α -螺旋形成;较大的 R(如苯丙氨酸、色氨酸、异亮氨酸)集中的区域,也妨碍 α -螺旋形成;脯氨酸因其 α -碳原子位于五元环上,不易扭转,加之它是亚氨基酸,不易形成氢键,故不易形成上述 α -螺旋;甘氨酸的 R 基为 H,空间占位很小,也会影响该处螺旋的稳定。

2. β -折叠



➤ β -折叠是由若干肽段或肽链排列起来所形成的扇面状片层构象，其结构特征为：

- 1) 由若干条肽段或肽链平行或反平行排列组成片状结构；
- 2) 主链骨架伸展呈锯齿状；
- 3) 借相邻主链之间的氢键维系。相邻两个氨基酸残基的轴心距离为 3.5 埃(0.35nm)，侧链 R 基团交替地分布在片层平面的上下方，片层间有氢键相连。

➤ β -折叠包括平行式和反平行式两种类型

3. β -转角

➤ β -转角是多肽链 180° 回折部分所形成的一种二级结构，其结构特征为：

- (1) 主链骨架本身以大约 180° 回折；
- (2) 回折部分通常由四个氨基酸残基构成；
- (3) 构象依靠第一残基的-CO 基与第四残基的-NH 基之间形成氢键来维系。也有一些是由第一个氨基酸的羧基与第三个氨基酸的氨基形成氢键。

4. 无规卷曲

无规卷曲是指多肽链主链部分形成的无规律的卷曲构象。

5. 超二级结构 (Super-secondary structure)

在蛋白质分子中，若干具有二级结构的肽段在空间上相互接近，形成具有特殊功能的结构区域，称**模序 (motif)或超二级结构**。

超二级结构的概念是 M.Rossmann 于 1973 年提出来的。蛋白质分子中的多肽链在三维折叠中往往形成有规则的二级结构聚集体，在球蛋白中充当三级结构的构件。常见的有： $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\beta\alpha\beta$ 、 $\alpha\beta$ 等。

6. 结构域 (structural domain)

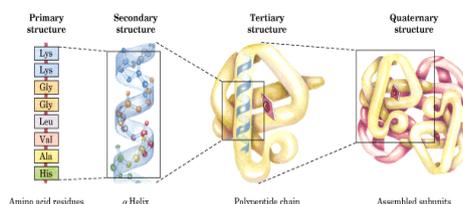
在一些相对较大的蛋白质分子中，在空间折叠时往往先分别折叠成几个相对独立的区域，再组装成更复杂的球状结构，这种在二级或超二级结构基础上形成的特定区域称为结构域。它的结构层次介于超二级结构和三级结构之间。如图所示：

四、蛋白质的三级结构

- 蛋白质的三级结构是指蛋白质分子或亚基内所有原子的空间排布，也就是一条多肽链的完整的三维结构。大多数蛋白质的三级结构为球状或近似球状。在三级结构中，大多数的亲水的 R 侧基分布于球形结构的表面，而疏水的 R 侧基分布于球形结构的内部，形成疏水的核心。
- 维系三级结构的化学键主要是非共价键 (noncovalent, 次级键)，如**疏水键、氢键、盐键、范德华力**等，但也有共价键，如**二硫键**等。

五、蛋白质的四级结构 (quaternary structure)

- 指蛋白质分子中亚基的立体排布，亚基间的相互作用与接触部位的布局。具有独立三级结构的多肽链单位，称为**亚基或亚单位 (subunit)**，亚基可以相同，亦可以不同。四级结构的实质是亚基在空间排列的方式。
- 单独亚基，多无生物学功能，二个以上亚基聚合成为有完整四级结构的蛋白质，才有功能。
- 维系蛋白质四级结构的是**氢键、盐键、范氏引力、疏水键**等非共价键。



六、蛋白质四级结构与功能的关系

——变构效应

当血红蛋白的一个 α 亚基与氧分子结合以后，可引起其他亚基的构象发生改变，对氧的亲合力增加，从而导致整个分子的氧结合力迅速增高，使血红蛋白的氧饱和曲线呈“S”形。这种由于蛋白质分子构象改变而导致蛋白质分子功能发生改变的现象称为**变构效应**。

像血红蛋白这种具有变构效应的蛋白质称为**变构蛋白**（allosteric protein）。血红蛋白的这种变构效应能更有效地行使其运氧的生物学功能。

Hb 由 4 条肽链组成：2 α 、2 β ，功能是运载 O₂；在去氧 Hb 亚基中有下列几对盐键：

α_1 - α_2 ： α_2 亚基 Arg₁₄₁-COOH - α_1 亚基 Val₁₁-NH₂

α_1 - α_2 ： α_2 亚基 Arg₁₄₁-胍基 - α_1 亚基 Asp₁₂₆-COOH

α_1 - β_2 ： α_1 亚基 Lys₄₀ 的 ξ -NH₂ - β_2 亚基 His₁₄₆-COOH

β_1 - β_2 ： β_2 亚基 His₁₄₆-咪唑基 - β_1 亚基 Asp₉₄- β -COOH

由于血红蛋白亚基之间存在大量盐键，使其构象呈紧张态，对氧的亲合力很低，第一个亚基与 O₂ 结合时，盐键的破坏较难，所需要的能量较多。当血红蛋白的一个亚基结合氧之后引起它的构象从紧张态变成松弛态，其它的盐键也依次破坏，此时破坏盐键所需要的能量也少，构象的变化导致血红蛋白对氧的亲合力大大增强，因此第四个亚基结合氧的能力比第一个大几百倍。

总之，各种蛋白质都有特定的空间构象，而特定的空间构象又与它们特定的生物学功能相适应，蛋白质的结构与功能是高度统一的。

第三节 蛋白质的理化性质及分离纯化

一、蛋白质的理化性质

（一）蛋白质的两性解离与等电点：

由于蛋白质分子中氨基酸残基的侧链上存在游离的氨基和游离的羧基，因此蛋白质与氨基酸一样具有两性解离的性质，因而也具有特定的等电点。

（二）蛋白质的胶体性质

- 蛋白质分子的颗粒直径已达 1~100nm，处于胶体颗粒的范围。因此，蛋白质具有亲水溶胶的性质。布朗运动、丁道尔现象、电泳现象，不能透过半透膜，具有吸附能力。
- 蛋白质分子表面的**水化膜和表面电荷**是稳定蛋白质亲水溶胶的两个重要因素。
- 电泳：带电颗粒在电场中移动的现象。分子大小不同的蛋白质所带净电荷密度不同，迁移率即异，在电泳时可以分开。

（三）蛋白质的变性

在某些物理或化学因素的作用下，蛋白质严格的**空间结构**被破坏（不包括肽键的断裂），从而引起蛋白质若干理化性质和生物学性质的改变，称为**蛋白质的变性**(denaturation)。

引起蛋白质变性的因素

- ① 物理因素：高温、高压、紫外线、电离辐射、超声波等；
- ② 化学因素：强酸、强碱、有机溶剂、重金属盐等。

变性蛋白质的性质改变

- 物理性质：旋光性改变，溶解度下降，沉降率升高，粘度升高，光吸收度增加等；
- 化学性质：官能团反应性增加，易被蛋白酶水解；
- 生物学性质：原有生物学活性丧失，抗原性改变。变性蛋白质主要标志是生物学功能的丧失。溶解度降低，易形成沉淀析出，结晶能力丧失，分子形状改变，肽链松散，反应基团增加，易被酶消化；
- 变性蛋白质分子互相凝集为固体的现象称**凝固**。

蛋白质变性的可逆性

- a) 蛋白质在体外变性后，绝大多数情况下是不能复性的；
- b) 如变性程度浅，蛋白质分子的构象未被严重破坏；或者蛋白质具有特殊的分子结构，并经特殊处理则可以复性。

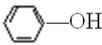
（四）蛋白质的沉淀反应

- 加高浓度盐类（盐析）：加盐使蛋白质沉淀析出。
- 分段盐析：调节盐浓度，可使混合蛋白质溶液中的几种蛋白质分段析出。血清球蛋白（50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

饱和度)，清蛋白（饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）。

- 加有机溶剂
- 加重金属盐
- 加生物碱试剂 单宁酸、苦味酸、钼酸、钨酸、三氯乙酸能沉淀生物碱，称生物碱试剂。

(六) 蛋白质的颜色反应

| 反应名称 | 试剂 | 颜色 | 反应有关基团 | 有此反应的蛋白质或氨基酸 |
|----------------------------|---|--------|---|---------------|
| 双缩脲反应 | NaOH, CuSO_4 | 紫色或粉红色 | 二个以上肽键 | 所有蛋白质 |
| 米伦反应 | HgNO_3 、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 及 HNO_3 混合物 | 红色 |  | Tyr |
| 黄色反应 | 浓 HNO_3 及 NH_3 | 黄色、橘色 |  | Tyr, Phe |
| 乙醛酸反应 (Hopking-Cole 反应) | 乙醛酸试剂及浓 H_2SO_4 | 紫色 |  | Trp |
| 坂口反应 (Sakaguchi 反应) | α -萘酚, NaClO | 红色 | 胍基 | Arg |
| 酚试剂反应 (Folin-Ciocalteu 反应) | 碱性 CuSO_4 及 磷钨酸-钼酸 | 蓝色 | 酚基、吲哚基 | Tyr |
| 茚三酮反应 | 茚三酮 | 蓝色 | 自由氨基及羧基 | α -氨基酸 |

二、蛋白质的分离与纯化

(一) 盐析与有机溶剂沉淀：

1. 盐析：

在蛋白质溶液中加入大量中性盐，以破坏蛋白质的胶体性质，使蛋白质从溶液中沉淀析出，称为**盐析**。

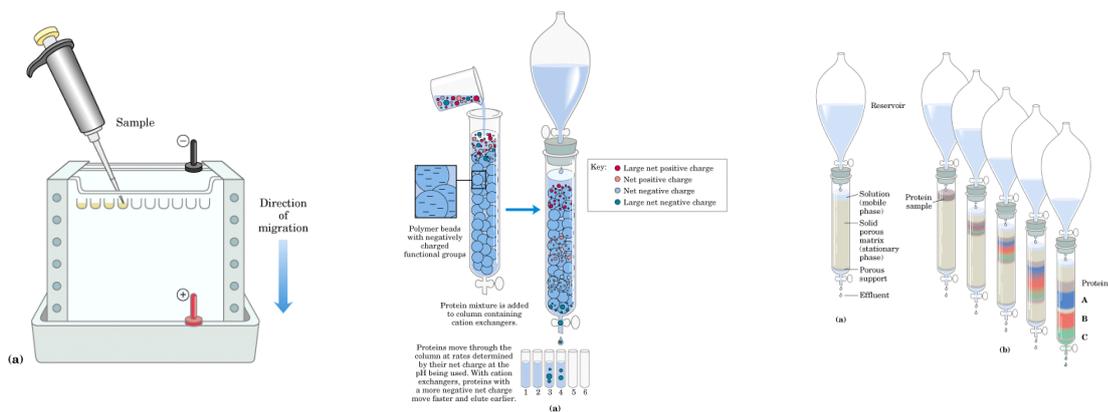
- 常用的中性盐有：硫酸铵、氯化钠、硫酸钠等。
- 盐析时，溶液的 pH 在蛋白质的等电点处效果最好。
- 盐析沉淀蛋白质时，通常不会引起蛋白质的变性。

➤ 分段盐析：

半饱和硫酸铵溶液可沉淀血浆球蛋白，而饱和硫酸铵溶液可沉淀血浆清蛋白。

2. 有机溶剂沉淀蛋白质

- 凡能与水以任意比例混合的有机溶剂，如乙醇、甲醇、丙酮等，均可用于沉淀蛋白质。
- 沉淀原理是：① 脱水作用；② 使水的介电常数降低，蛋白质溶解度降低。



(二) 电泳：

(三) 离子交换层析

(四) 凝胶过滤层析

(五) 超速离心：

- 利用物质密度的不同，经超速离心后，分布于不同的液层而分离。
- 超速离心也可用来测定蛋白质的分子量，蛋白质的分子量与其沉降系数 S 成正比。

第三章 核酸

- 核酸与蛋白质一样，是一切生物机体不可缺少的组成部分。
- 核酸是生命遗传信息的携带者和传递者，它不仅对于生命的延续，生物物种遗传特性的保持，生长发育，细胞分化等起着重要的作用，而且与生物变异，如肿瘤、遗传病、代谢病等也密切相关。因此，核酸是现代生物化学、分子生物学和医学的重要基础之一。

核酸与遗传

- 早在 1868 年，F. Miescher 从细胞核中分离得到一种酸性物质，即现在被称为核酸的物质。
- 1939 年，E. Knapp 等第一次用实验方法证实核酸是生命遗传的基础物质。

第一节 概述

一、核酸的分类

- 核酸分为两大类。
 - 脱氧核糖核酸 (DNA) Deoxyribonucleic Acid
 - 核糖核酸 (RNA) Ribonucleic Acid。

脱氧核糖核酸 (DNA)

- DNA 分子含有生物物种的所有遗传信息，分子量一般都很大。
- DNA 为双链分子，其中大多数是链状结构大分子，也有少部分呈环状结构。

核糖核酸 (RNA)

RNA 主要是负责 DNA 遗传信息的翻译和表达，分子量要比 DNA 小得多。RNA 为单链分子。

RNA 的类别

根据 RNA 的功能，可以分为 mRNA、tRNA 和 rRNA 三种，存在于胞质中。

另外，在胞质里还存在胞质小 RNA(sc RNA)。

上述 RNA 存在于胞质，另外在细胞核里面还存在一些 RNA，如核不均一 RNA (hnRNA)、核内小 RNA (snRNA)、核仁小 RNA、反义 RNA (asRNA) 等。

mRNA (信使 RNA) Messenger RNA

- 约占总 RNA 的 5%。
- 不同细胞的 mRNA 的链长和分子量差异很大。
- 它的功能是将 DNA 的遗传信息传递到蛋白质合成基地 - 核糖核蛋白体。

tRNA (转移 RNA) Transfer RNA

- 约占总 RNA 的 10-15%。
- 它在蛋白质生物合成中起翻译氨基酸信息，并将相应的氨基酸转运到核糖核蛋白体的作用。
- 已知每一个氨基酸至少有一个相应的 tRNA。
- RNA 分子的大小很相似，链长一般在 73-78 个核苷酸之间。

rRNA (核糖体 RNA) Ribosome RNA

- 约占全部 RNA 的 80%，
- 是核糖核蛋白体的主要组成部分。
- rRNA 的功能与蛋白质生物合成相关。

| | 细胞核和胞液 | 功能 |
|----------|---------------|-----------------------|
| 核不均一 RNA | hnRNA | 成熟 mRNA 的前体 |
| 核内小 RNA | snRNA | 参与 hnRNA 的剪接、转运 |
| 胞质小 RNA | scRNA/7SL-RNA | 蛋白质内质网定位合成的信号识别体的组成成分 |

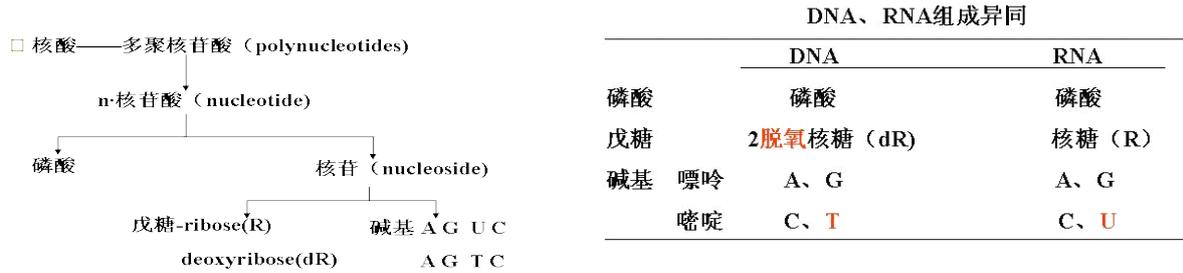
*存在于真核生物中

二、基本结构单位--核苷酸

(一) 核酸的水解

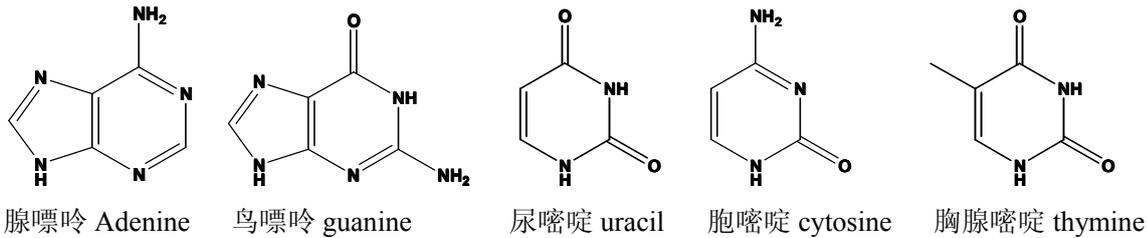
核酸经水解可得到很多核苷酸，因此核苷酸是核酸的基本单位。核酸就是由很多单核苷酸聚合形成的

多聚核苷酸。核苷酸可被水解产生核苷和磷酸，核苷还可再进一步水解，产生戊糖和含氮碱基。如下图所示：



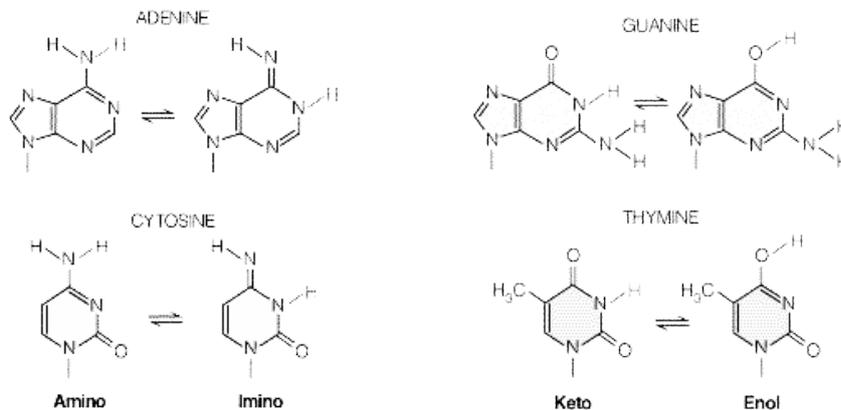
1. 核苷酸

(1) 组成核酸的碱基



碱基的结构特征

- ◆ 碱基都具有芳香环的结构特征。嘌呤环和嘧啶环均呈平面或接近于平面的结构。
- ◆ 碱基的芳香环与环外基团可以发生酮式—烯醇式或胺式—亚胺式互变异构。
- ◆ 有些核酸中还含有修饰碱基(modified component)或稀有碱基 (unusual component)，这些碱基大多是在上述嘌呤或嘧啶碱的不同部位被甲基化(methylation)或进行其它的化学修饰而形成的衍生物。



胺式亚胺式互变异构

酮式烯醇式互变异构

- 嘌呤碱和嘧啶碱分子中都含有共轭双键体系，在紫外区有吸收 (260 nm 左右)。

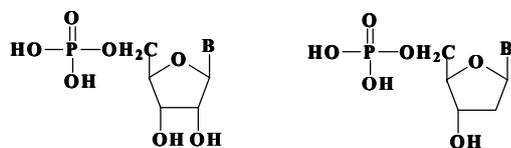
(2) 戊糖

- 组成核酸的戊糖有两种。DNA 所含的糖为 β-D-2-脱氧核糖；RNA 所含的糖则为 β-D-核糖。

(3) 核苷 nucleoside

- 糖与碱基之间的 C-N 键，称为 C-N 糖苷键。

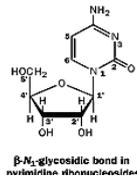
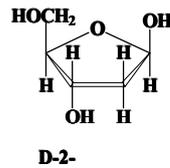
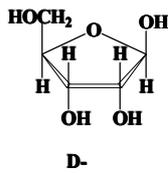
(4) 核苷酸 nucleotide



B= , , ,

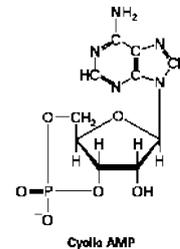
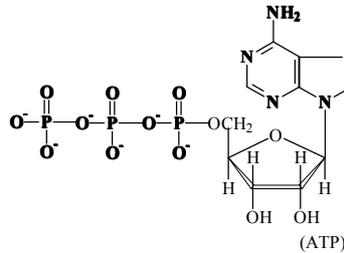
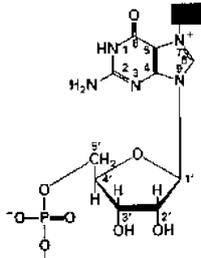
- 核苷酸是核苷的磷酸酯。作为 DNA 或 RNA 结构单元的核苷酸分别是 5' -磷酸-脱氧核糖核苷和 5

’-磷酸-核糖核苷。



(5) 修饰成分

■ 核酸中也存在一些不常见的稀有碱基。稀有碱基的种类很多，大部分是上述碱基的甲基化产物。



甲基化产物

2. 核苷酸的衍生物

(1) ATP (腺嘌呤核糖核苷三磷酸)

- ATP 是生物体内分布最广和最重要的一种核苷酸衍生物。

ATP 的性质

- ◆ ATP 分子的最显著特点是含有两个高能磷酸键。ATP 水解时，可以释放出大量自由能。
- ◆ ATP 是生物体内最重要的能量转换中间体。ATP 水解释放出来的能量用于推动生物体内各种需能的生化反应。
- ◆ ATP 也是一种很好的磷酸化剂。磷酸化反应的底物可以是普通的有机分子，也可以是酶。磷酸化的底物分子具有较高的能量（活化分子），是许多生物化学反应的激活步骤。

(2) GTP (鸟嘌呤核糖核苷三磷酸)

第三节 GTP 是生物体内游离存在的另一种重要的核苷酸衍生物。它具有 ATP 类似的结构，也是一种高能化合物。

第四节 GTP 主要是作为蛋白质合成中磷酸基供体。在许多情况下,ATP 和 GTP 可以相互转换。

(3) cAMP 和 cGMP

- cAMP(3',5'-环腺嘌呤核苷一磷酸)和 cGMP(3',5'-环鸟嘌呤核苷一磷酸)的主要功能作为细胞之间传递信息的信使。
- cAMP 和 cGMP 的环状磷酸酯键是一个高能键。在 pH 7.4 条件下,cAMP 和 cGMP 的水解能约为 43.9 kJ/mol,比 ATP 水解能高得多。

3. 多聚核苷酸

- 多聚核苷酸是通过核苷酸的 5'-磷酸基与另一分子核苷酸的 C_{3'}-OH 形成磷酸二酯键相连而成的链状聚合物。
- DNA 链
- RNA 链

多聚核苷酸的特点

- 在多聚核苷酸中，两个核苷酸之间形成的磷酸二酯键通常称为 5'—3' 磷酸二酯键。
- 多聚核苷酸链一端的 C_{5'} 带有一个自由磷酸基，称为 5' -磷酸端（常用 5'-P 表示）；另一端 C_{3'} 带有自由的羟基，称为 3' -羟基端（常用 3'-OH 表示）。
- 多聚核苷酸链具有方向性，当表示一个多聚核苷酸链时，必须注明它的方向是 5' → 3' 或是 3' → 5' 。

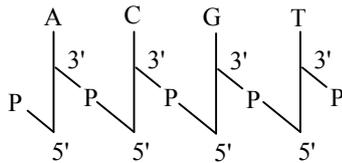
问题：DNA、RNA 那个结构更稳定？Why？

方向性

在多聚核苷酸（DNA 或 RNA）链中，由于构成核苷酸单元的戊糖和磷酸基是相同的，体现核苷酸差

别的实际上只是它所带的碱基，所以多聚核苷酸链结构也可表示为(1)

在讨论有关核酸问题时，一般只关心其中碱基的种类和顺序，所以上式可以进一步简化为(2)



(1)



(2)

第三节 核酸的结构

一、核酸的一级结构

- 多聚核苷酸是由四种不同的核苷酸单元按特定的顺序组合而成的线性结构聚合物，因此，它具有一定的核苷酸顺序，即碱基顺序。
- 核酸的碱基顺序是核酸的一级结构。
- DNA 的碱基顺序本身就是遗传信息存储的分子形式。生物界物种的多样性即寓于 DNA 分子中四种核苷酸千变万化的不同排列组合之中。
- 而 mRNA(信息 RNA)的碱基顺序，则直接为蛋白质的氨基酸编码，并决定蛋白质的氨基酸顺序。

RNA 一级结构的特点

- RNA 一级结构研究最多的是 tRNA、rRNA 以及一些小分子的 RNA。其中
- tRNA 分子具有以下特点：
 - 分子量 25000 左右，大约由 70—90 个核苷酸组成，沉降系数为 4S 左右。
 - 分子中含有较多的修饰成分。
 - 3' -末端都具有 CpCpAOH 的结构。

mRNA 一级结构的特点

真核细胞 mRNA 的 3'-末端有一段长达 200 个核苷酸左右的聚腺苷酸(polyA)，称为“尾结构”，5'-末端有一个甲基化的鸟苷酸，称为“帽结构”。

极大多数真核细胞 mRNA 在 3'-末端有一段长约 200 核苷酸的 polyA。polyA 是在转录后经 polyA 聚合酶的作用而添加上去的。原核生物的 mRNA 一般无 polyA，但某些病毒 mRNA 也有 3'-polyA，polyA 可能有多方面功能，与 mRNA 从细胞核到细胞质的转移有关；与 mRNA 的半寿期有关，新合成的 mRNA，polyA 链较长，而衰老的 mRNA，polyA 链缩短。

rRNA

动物细胞核糖体 rRNA 有四类：5SrRNA，5.8SrRNA，18SrRNA，28SRNA。许多 rRNA 的一级结构及由一级结构推导出来的二级结构都已阐明，但是对许多 rRNA 的功能迄今仍不十分清楚。

RNA 的高级结构特点

- RNA 是单链分子，因此，在 RNA 分子中，并不遵守碱基种类的数量比例关系，即分子中的嘌呤碱基总数不一定等于嘧啶碱基的总数。
- RNA 分子中，部分区域也能形成双螺旋结构，不能形成双螺旋的部分，则形成突环。这种结构可以形象地称为“发夹型”结构。
- 在 RNA 的双螺旋结构中，碱基的配对情况不象 DNA 中严格。G 除了可以和 C 配对外，也可以和 U 配对。G-U 配对形成的氢键较弱。不同类型的 RNA，其二级结构有明显的差异。
- tRNA 中除了常见的碱基外，还存在一些稀有碱基，这类碱基大部分位于突环部分。

tRNA 的高级结构

1. tRNA 的二级结构

tRNA 的二级结构都呈“三叶草”形状，在结构上具有某些共同之处，一般可将其分为五臂四环：包括氨基酸接受区、反密码区、二氢尿嘧啶区、TψC 区和可变区。除了氨基酸接受区外，其余每个区均含有一个突环和一个臂。

(1)氨基酸接受区

包含有 tRNA 的 3'-末端和 5'-末端，3'-末端的最后 3 个核苷酸残基都是 CCA，A 为核苷。氨基酸可与其成酯，该区在蛋白质合成中起携带氨基酸的作用。

(2)反密码区

与氨基酸接受区相对的一般含有 7 个核苷酸残基的区域，其中正中的 3 个核苷酸残基称为反密码

(3)二氢尿嘧啶区

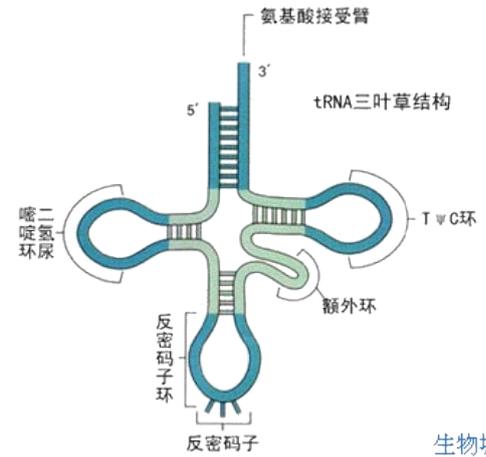
该区含有二氢尿嘧啶。

(4) T Ψ C 区

该区与二氢尿嘧啶区相对，假尿嘧啶核苷—胸腺嘧啶核糖核苷环(T Ψ C)由 7 个核苷酸组成，通过由 5 对碱基组成的双螺旋区(T Ψ C 臂)与 tRNA 的其余部分相连。除个别例外，几乎所有 tRNA 在此环中都含有 T Ψ C。

(5)可变区

位于反密码区与 T Ψ C 区之间，不同的 tRNA 该区变化较大。



2. tRNA 的三级结构

在三叶草型二级结构的基础上，突环上未配对的碱基由于整个分子的扭曲而配成对，目前已知的 tRNA 的三级结构均为倒 L 型

二、DNA 的二级结构

1953 年，J. Watson 和 F. Crick 在前人研究工作的基础上，根据 DNA 结晶的 X-衍射图谱和分子模型，提出了著名的 DNA 双螺旋结构模型，并对模型的生物学意义作出了科学的解释和预测。

1. DNA 双螺旋结构

- DNA 分子由两条 DNA 单链组成。
- DNA 的双螺旋结构是分子中两条 DNA 单链之间基团相互识别和作用的结果。
- 双螺旋结构是 DNA 二级结构的最基本形式。

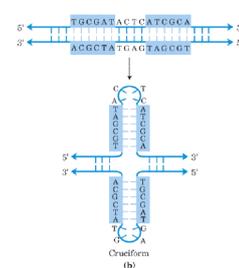
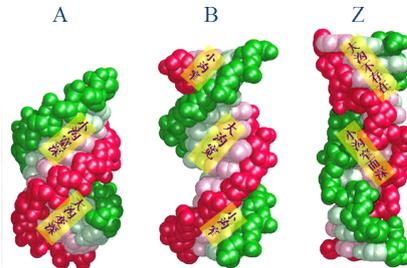
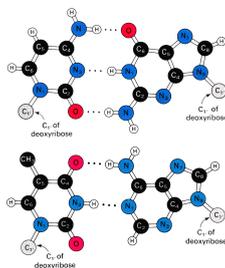
*DNA 双螺旋结构的要点

(1) DNA 分子由两条多聚脱氧核糖核苷酸链(简称 DNA 单链)组成。两条链沿着同一根轴平行盘绕，形成右手双螺旋结构。螺旋中的两条链方向相反，即其中一条链的方向为 5' \rightarrow 3'，而另一条链的方向为 3' \rightarrow 5'。

(2) 嘌呤碱和嘧啶碱基位于螺旋的内侧，磷酸和脱氧核糖基位于螺旋外侧。碱基环平面与螺旋轴垂直，糖基环平面与碱基环平面成 90° 角。

(3) 螺旋横截面的直径约为 2nm，每条链相邻两个碱基平面之间的距离为 0.34 nm，每 10 个核苷酸形成一个螺旋，其螺距（即螺旋旋转一圈）高度为 3.4 nm。

(4) 两条 DNA 链相互结合以及形成双螺旋的力是链间的碱基对所形成的氢键。碱基的相互结合具有严格的配对规律，即腺嘌呤 (A) 与胸腺嘧啶 (T) 结合，鸟嘌呤 (G) 与胞嘧啶 (C) 结合，这种配对关系，称为碱基互补。A 和 T 之间形成两个氢键，G 与 C 之间形成三个氢键。在 DNA 分子中，嘌呤碱基的总数与嘧啶碱基的总数相等。



(5) 有大沟和小沟

配对碱基并不充满双螺旋空间，且碱基对占据的空间不对称

2. DNA 双螺旋的稳定性

- DNA 双螺旋结构在生理条件下是很稳定的。
- 维持这种稳定性的因素包括：
 - ✓ 两条 DNA 链之间形成的氢键；
 - ✓ 碱基堆积力:由于双螺旋结构内部碱基形成的疏水区；

- ✓ 介质中的阳离子（如 Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} ）中和了磷酸基团的负电荷，降低了 DNA 链之间的排斥力、范德华引力等。
- ◆ 改变介质条件和环境温度，将影响双螺旋的稳定性。

3. DNA 二级结构的多态性

- ✓ 所谓 DNA 二级结构的多态性，是指 DNA 不仅具有多种形式的双螺旋结构，而且还能形成三链、四链结构，说明 DNA 的结构是动态的，而不是静态的。
- ✓ DNA 双螺旋的不同构型：
 - B-DNA 螺旋：标准的 Watson, Crick 双螺旋，细胞正常状态下 DNA 存在的构型。
 - A-DNA 螺旋：DNA 在 75% 相对湿度的钠盐中的构型。
 - C-DNA 螺旋：DNA 在 66% 相对湿度的锂盐中的构型。
 - Z-DNA 螺旋：左手的 DNA 螺旋，这种螺旋可能在基因表达或遗传重组中起作用。

4. 与 DNA 碱基顺序相关的特殊二级结构

(1) 回文序列

所谓回文序列就是指 DNA 某一片段旋转 180° 后，顺序不变的序列，回文序列中的单链可形成发夹结构，双链可形成十字架结构。这种发夹结构或十字架结构在大肠杆菌细胞 DNA 中已有发现。

(2) 镜像结构

指 DNA 某一片段在一条链上出现颠倒重复的序列。

多嘌呤-多嘧啶的镜像序列可形成三螺旋结构(H-螺旋或 Hoogsteen 螺旋):该螺旋常处在许多真核细胞基因的表达调节区.可能与基因表达的调节有关.

(3) 四链 DNA

可能存在于真核细胞染色体的端粒中

稳定 DNA 二级结构的作用力：氢键（横向作用力）、碱基堆积力（纵向作用力）

三、DNA 的三级结构和真核细胞 DNA 的组装

DNA 的三级结构: 超螺旋

自从 1965 年 Vinograd 等人发现多瘤病毒的环形 DNA 的超螺旋以来，现已知道绝大多数原核生物都是共价封闭环(covalently closed circle,CCC)分子，这种双螺旋环状分子再度螺旋化成为超螺旋结构(superhelix 或 supercoil)。

对于真核生物来说，虽然其染色体多为线形分子但其 DNA 均与蛋白质相结合，两个结合点之间的 DNA 形成一个突环(loop)结构，同样具有超螺旋形式。超螺旋按其方向分为正超螺旋和负超螺旋两种。真核生物中，DNA 与组蛋白八聚体形成核小体结构时，存在着负超螺旋。研究发现，所有的 DNA 超螺旋都是由 DNA 拓扑异构酶产生的。

真核细胞染色体的组装

在真核细胞染色质(chromatin，在细胞分裂时期形成染色体 chromosome)中，染色体的基本结构单位是核小体。核小体是由 DNA 和组蛋白组成的,组蛋白有五种，H2A,H2B,H3,H4 各两分子构成一个八聚体，其外再由双螺旋 DNA 绕其旋转 1.75 圈(为 DNA 的三级结构)，约含 140bp。称为核小体的核心颗粒(core particle)。

若干个核小体再螺旋形成核小体纤维，再进一步螺旋化形成染色体。从双螺旋 DNA 到染色体，DNA 总共压缩了约 8000-10000 倍。

第四节、核酸的性质

一、含氮碱基的性质

嘌呤碱基和嘧啶碱基是核酸中最重要的组分。它们的性质对于核酸的性质和生物功能具有重要影响作用。

1. 含氮碱基具有芳香环的结构特点

由于环上极性基团（如羰基、氨基等）的存在，碱基能够发生酮式—烯醇式或氨基—亚氨基的互变异构。因此，碱基既有芳香环的特性，也具有氨、酮和烯醇等相应的化学性质。

2、含氮碱基的碱性

- 嘌呤碱基和嘧啶碱基都具有弱碱性。
- 环内氨基的 pKa 值约为 9.5。

- 碱基环外的氨基（存在于 A、G 和 C）的碱性很弱，在生理 pH 条件下不能被质子化。这种情况与苯胺分子中的氨基相似。
- 因此嘌呤和嘧啶碱基的碱性主要是环内氨基的贡献。

二、核酸的性质

1. 核酸的两性性质及等电点

- 与蛋白质相似，核酸分子中既含有酸性基团（磷酸基）也含有碱性基团（氨基），因而核酸也具有两性性质。
- 由于核酸分子中的磷酸是一个中等强度的酸，而碱性（氨基）是一个弱碱，所以核酸的等电点比较低。如 DNA 的等电点为 4~4.5，RNA 的等电点为 2~2.5。
- RNA 的等电点比 DNA 低的原因，是 RNA 分子中核糖基 2' -OH 通过氢键促进了磷酸基上质子的解离。DNA 没有这种作用。

2. 核酸的水解

(1) 酸或碱水解

- 核酸分子中的磷酸二酯键可在酸或碱性条件下水解切断。
- DNA 和 RNA 对酸或碱的耐受程度有很大差别。例如，在 0.1 mol/L NaOH 溶液中，RNA 几乎可以完全水解，生成 2' -或 3' -磷酸核昔；DNA 在同样条件下则不受影响。这种水解性能上的差别，与 RNA 核糖基上 2' -OH 的邻基参与作用有很大的关系。在 RNA 水解时，2' -OH 首先进攻磷酸基，在断开磷酸酯键的同时形成环状磷酸二酯，再在碱的作用形成水解产物。

(2) 酶水解

- 生物体内存在多种核酸水解酶。这些酶可以催化水解多聚核苷酸链中的磷酸二酯键。
- 以 DNA 为底物的 DNA 水解酶（DNases）和以 RNA 为底物的 RNA 水解酶（RNases）。
- 根据作用方式又分作两类：核酸外切酶和核酸内切酶。
- 核酸外切酶的作用方式是从多聚核苷酸链的一端（3' -端或 5' -端）开始，逐个水解切除核苷酸；核酸内切酶的作用方式刚好和外切酶相反，它从多聚核苷酸链中间开始，在某个位点切断磷酸二酯键。
- 在分子生物学研究中最有应用价值的是限制性核酸内切酶。这种酶可以特异性的水解核酸中某些特定碱基顺序部位。

3. 核酸的紫外吸收

在核酸分子中，由于嘌呤碱和嘧啶碱具有共轭双键体系，因而具有独特的紫外线吸收光谱，一般在 260nm 左右有最大吸收峰，可以作为核酸及其组份定性和定量测定的依据。

4. 核酸的变性、复性与杂交

(1) 核酸的变性

- 核酸的变性是指核酸双螺旋区的多聚核苷酸链间的氢键断裂，变成单链结构的过程。变性核酸将失去其部分或全部的生物活性。核酸的变性并不涉及磷酸二酯键的断裂，所以它的一级结构(碱基顺序)保持不变。
- 能够引起核酸变性的因素很多。温度升高、酸碱度改变、甲醛和尿素等的存在均可引起核酸的变性。
- RNA 本身只有局部的双螺旋区，所以变性行为所引起的性质变化没有 DNA 那样明显。
- 利用紫外吸收的变化，可以检测核酸变性的情况。
- 例如，天然状态的 DNA 在完全变性后，紫外吸收(260 nm)值增加 25—40%。而 RNA 变性后，约增加 1.1%。这种现象称为增色效应(hyperchromic effect)。

DNA 变性的特征

- DNA 的变性过程是突变性的，它在很窄的温度区间内完成。因此，通常将引起 DNA 变性的温度称为熔点，用 T_m 表示。
- 一般 DNA 的 T_m 值在 70-85°C 之间。DNA 的 T_m 值与分子中的 G 和 C 的含量有关。
- G 和 C 的含量高， T_m 值高。因而测定 T_m 值，可反映 DNA 分子中 G, C 含量，可通过经验公式计算：

$$(G+C)\%=(T_m-69.3)\times 2.44$$

DNA 变性

- ◆ 当 DNA 的稀盐溶液加热到 80-100℃ 时，双螺旋结构即发生解体，两条链彼此分开，形成无规线团。
- ◆ DNA 变性后，它的一系列性质也随之发生变化

变性 DNA 的特征

- 溶液粘度降低 DNA 双螺旋是紧密的刚性结构，变性后转化成柔软而松散的无规则单股线性结构，因此粘度明显下降。
- 旋光性发生变化 变性后整个 DNA 分子的对称性及分子构型改变，使 DNA 溶液的旋光性发生变化。
- 紫外吸收增强

DNA 分子中碱基间电子的相互作用使 DNA 分子具有吸收 260nm 波长紫外光的特性。在 DNA 双螺旋结构中碱基藏入内侧，变性时 DNA 双螺旋解开，于是碱基外露，碱基中电子的相互作用更有利于紫外吸收，故而产生增色效应。

(2) 核酸的复性(退火)

- 变性 DNA 在适当的条件下，两条彼此分开的单链可以重新缔合成为双螺旋结构，这一过程称为复性。DNA 复性后，一系列性质将得到恢复，但是生物活性一般只能得到部分的恢复。
- DNA 复性的程度、速率与复性过程的条件有关(温度和时间、DNA 浓度等)。

将热变性的 DNA 骤然冷却至低温时，DNA 不可能复性。但是将变性的 DNA 缓慢冷却时，可以复性。分子量越大复性越难。浓度越大，复性越容易。此外，DNA 的复性也与它本身的组成和结构有关。

DNA 复性

(3) 核酸的杂交

- ✓ 热变性的 DNA 单链，在复性时并不一定与同源 DNA 互补链形成双螺旋结构，它也可以与在某些区域有互补序列的异源 DNA 单链形成双螺旋结构。
- ✓ 这样形成的新分子称为杂交 DNA 分子。DNA 单链与互补的 RNA 链之间也可以发生杂交。
- ✓ 核酸的杂交在分子生物学和遗传学的研究中具有重要意义。

重组 DNA 技术有三个关键步骤

- ✓ 限制性内切酶可以在特定的位点切割 DNA。
- ✓ 分离出的 DNA 片段能与作为载体的另一种 DNA（如来自大肠杆菌的质粒）连接
- ✓ 有能力鉴别出含有重组 DNA 的质粒克隆，这可利用 DNA 杂化技术来实现。
- ✓ 主要包括 6 个基本步骤：
 - ① 制备 DNA。
 - ② 在特定位点切割 DNA。
 - ③ 连接 DNA 片段。
 - ④ 将重组质粒导入合适的宿主细胞。
 - ⑤ 重组 DNA 在宿主细胞内大量复制。
 - ⑥ 筛选和鉴别含有重组 DNA 的宿主细胞。

第五节 核酸研究方法

5.1 密度梯度离心

核酸在具有密度梯度的介质中离心时，质量和密度大的颗粒比质量和密度小的颗粒沉降得快，且每种蛋白质颗粒沉降到与其自身密度相等的介质密度梯度时，即停止不前，最后各种蛋白质在离心管中被分离成不同的区带。

5.2 核酸的凝胶电泳

DNA 一级结构的测定

- DNA 的一级结构决定了基因的功能，欲想解释基因的生物学含义，首先必须知道其 DNA 顺序。
- 测序方法：
 - ✓ Sanger 的核酸链合成终止法
 - ✓ Maxam 和 Gilbert 的化学降解法

1. Sanger 双脱氧链终止法

DNA 的合成总是从 5' 端向 3' 端进行的。DNA 的合成需要模板以及相应的引物链。DNA 的合成过程中，在合成的 DNA 链的 3' 末端，依据碱基配对的原则，通过生成新的 3', 5' - 磷酸二酯键，使 DNA 链合成终止，产生短的 DNA 链。具体测序工作中，平行进行四组反应，每组反应均使用相同的模板，相同的引物以及四种脱氧核苷酸；并在四组反应中各加入适量的四种之一的双脱氧核苷酸，使其随机地接入 DNA 链中，使链合成终止，产生相应的四组具有特定长度的、不同长短的 DNA 链。经过聚丙烯酰胺凝胶电泳按链的长短分离开，经过放射自显影显示区带，就可以直接读出被测 DNA 的核苷酸序列。

2. Maxam 和 Gilbert DNA 化学降解法

这一方法的基本步骤为：

1. 先将 DNA 的末端之一进行标记(通常为放射性同位素 ^{32}P)
2. 在多组互相独立的化学反应中分别进行特定碱基的化学修饰
3. 在修饰碱基位置化学法断开 DNA 链
4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳将 DNA 链按长短分开
5. 根据放射自显影显示区带，直接读出 DNA 的核苷酸序列

第一节 酶的命名及分类

一、酶的命名

(1) 习惯命名法:

- 根据其催化底物来命名;
- 根据所催化反应的性质来命名;
- 结合上述两个原则来命名,
- 有时在这些命名基础上加上酶的来源或其它特点。

(2) 国际系统命名法

- 系统名称包括底物名称、构型、反应性质，最后加一个酶字。
- 例如：习惯名称:谷丙转氨酶
系统名称:丙氨酸： α -酮戊二酸氨基转移酶
- 酶催化的反应: 谷氨酸 + 丙酮酸 \longrightarrow α -酮戊二酸 + 丙氨酸

二、酶的分类

(1) 水解酶 hydrolase

- c) 水解酶催化底物的加水分解反应。
- d) 主要包括淀粉酶、蛋白酶、核酸酶及脂酶等。
- e) 例如，脂肪酶(Lipase)催化的脂的水解反应:

(2) 氧化-还原酶 Oxidoreductase

- 氧化-还原酶催化氧化-还原反应。
- 主要包括脱氢酶(dehydrogenase)和氧化酶(Oxidase)。
- 如，乳酸(Lactate)脱氢酶催化乳酸的脱氢反应。

(3) 转移酶 Transferase

- 转移酶催化基团转移反应，即将一个底物分子的基团或原子转移到另一个底物的分子上。
例如，谷丙转氨酶催化的氨基转移反应。

(4) 裂合酶 Lyase

- 裂合酶催化从底物分子中移去一个基团或原子形成双键的反应及其逆反应。
- 主要包括醛缩酶、水化酶及脱氨酶等。
- 例如，延胡索酸水合酶催化的反应。

(5) 异构酶 Isomerase

- 异构酶催化各种同分异构体的相互转化，即底物分子内基团或原子的重排过程。
例如，6-磷酸葡萄糖异构酶催化的反应。

(6) 合成酶 Ligase or Synthetase

- 6. 合成酶，又称为连接酶，能够催化 C-C、C-O、C-N 以及 C-S 键的形成反应。这类反应必须与 ATP 分解反应相互偶联。
- 7. $A + B + ATP + H-O-H \rightleftharpoons A - B + ADP + Pi$
- 8. 例如，丙酮酸羧化酶催化的反应。



(7) 核酶（催化核酸） ribozyme

- 核酶是唯一的非蛋白酶。它是一类特殊的 RNA，能够催化 RNA 分子中的磷酸酯键的水解及其逆反应。

第二节 维生素与辅酶

- 维生素是机体维持正常生命活动所必不可少的一类有机物质。
- 维生素一般习惯分为脂溶性和水溶性两大类。其中脂溶性维生素在体内可直接参与代谢的调节作用，而水溶性维生素是通过转变成辅酶对代谢起调节作用。

辅酶 coenzyme 和金属离子

- 根据酶的组成情况，可以将酶分为两大类:
- 单纯蛋白酶：它们的组成为单一蛋白质。

- 结合蛋白酶：某些酶，例如氧化-还原酶等，其分子中除了蛋白质外，还含有非蛋白组分。
- 结合蛋白酶的蛋白质部分称为酶蛋白，非蛋白质部分包括辅酶及金属离子(或辅因子 cofactor)。
- 酶蛋白与辅助成分组成的完整分子称为全酶。单纯的酶蛋白无催化功能。

一、水溶性维生素与辅酶

某些小分子有机化合物与酶蛋白结合在一起并协同实施催化作用，这类分子被称为辅酶（或辅基）。辅酶是一类具有特殊化学结构和功能的化合物。参与的酶促反应主要为氧化-还原反应或基团转移反应。大多数辅酶的前体主要是水溶性 B 族维生素。许多维生素的生理功能与辅酶的作用密切相关。

辅酶、辅基的区别：能否用物理方法去除

(1) 维生素 PP

- 烟酸和烟酰胺，在体内转变为辅酶 I 和辅酶 II。
- 能维持神经组织的健康。缺乏时表现出神经营养障碍，出现皮炎。
- NAD^+ (烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸，又称为辅酶 I) 和 NADP^+ (烟酰胺-腺嘌呤磷酸二核苷酸,又称为辅酶 II) 是维生素烟酰胺的衍生物，
- 功能：是多种重要脱氢酶的辅酶。

(2) 核黄素 (VB₂)

- 核黄素(维生素 B₂)由核糖醇和 6, 7-二甲基异咯嗪两部分组成。
- 缺乏时组织呼吸减弱，代谢强度降低。主要症状为口腔发炎，舌炎、角膜炎、皮炎等。
- FAD(黄素-腺嘌呤二核苷酸)和 FMN(黄素单核苷酸)是核黄素(维生素 B₂)的衍生物
- 功能：在脱氢酶催化的氧化-还原反应中，起着电子和质子的传递体作用。

(3) 泛酸和辅酶 A(CoA)

- 维生素(B₃)-泛酸是由 α , γ -二羟基- β -二甲基丁酸和一分子 β -丙氨酸缩合而成。
- 辅酶 A 是生物体内代谢反应中乙酰化酶的辅酶，它的前体是维生素(B₃)泛酸。
- 功能：是传递酰基，是形成代谢中间产物的重要辅酶。

(4) 叶酸和四氢叶酸(FH₄ 或 THFA)

- 四氢叶酸是合成酶的辅酶，其前体是叶酸(又称为蝶酰谷氨酸，维生素 B₁₁)。
- 四氢叶酸的主要作用是作为一碳基团，如-CH₃, -CH₂-, -CHO 等的载体，参与多种生物合成过程。

(5) 硫胺素

- 硫胺素(维生素 B₁)在体内以焦磷酸硫胺素(TPP)形式存在。缺乏时表现出多发性神经炎、皮肤麻木、心力衰竭、四肢无力、下肢水肿。
- 焦磷酸硫胺素是脱羧酶的辅酶，它的前体是硫胺素(维生素 B₁)。
- 功能：是催化酮酸的脱羧反应

(6) 吡哆素

- 吡多素(维生素 B₆，包括吡哆醇、吡哆醛和吡哆胺)。
- 磷酸吡哆素主要包括磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺。
- 磷酸吡多素是转氨酶的辅酶，转氨酶通过磷酸吡多醛和磷酸吡多胺的相互转换，起转移氨基的作用。

(7) 生物素

- 生物素是羧化酶的辅酶，它本身就是一种 B 族维生素 B₇。
- 生物素的功能是作为 CO₂ 的递体，在生物合成中起传递和固定 CO₂ 的作用。

(8) 维生素 B₁₂ 辅酶

- 维生素 B₁₂ 又称为钴胺素。维生素 B₁₂ 分子中与 Co⁺相连的 CN 基被 5'-脱氧腺苷所取代，形成维生素 B₁₂ 辅酶。
- 维生素 B₁₂ 辅酶的主要功能是作为变位酶的辅酶，催化底物分子内基团(主要为甲基)的变位反应。

(9) 硫辛酸

- 硫辛酸是少数不属于维生素的辅酶。硫辛酸是 6,8-二硫辛酸，有两种形式，即硫辛酸（氧化型）和二氢硫辛酸（还原型）。

(10) 辅酶 Q (Co Q)

- 辅酶 Q 又称为泛醌，广泛存在与动物和细菌的线粒体中。
- 辅酶 Q 的活性部分是它的醌环结构，主要功能是作为线粒体呼吸链氧化-还原酶的辅酶，在酶与底

物分子之间传递电子。

(11)维生素 C

- 在体内参与氧化还原反应，羟化反应。人体不能合成。

二、脂溶性维生素

维生素 A,D,E,K 均溶于脂类溶剂，不溶于水，在食物中通常与脂肪一起存在，吸收它们，需要脂肪和胆汁酸。

- 1、维生素 A：分 A₁, A₂ 两种，是不饱和一元醇类。维生素 A₁ 又称为视黄醇，A₂ 称为脱氢视黄醇。
- 2、维生素 D：固醇类化合物，主要有 D₂, D₃, D₄, D₅。其中 D₂, D₃ 活性最高。在生物体内，D₂ 和 D₃ 本身不具有生物活性。它们在肝脏和肾脏中进行羟化后，形成 1, 25-二羟基维生素 D。其中 1, 25-二羟基维生素 D₃ 是生物活性最强的。
- 3、维生素 E：又叫做生育酚，目前发现的有 6 种，其中 α, β, γ, δ 四种有生理活性。
- 4、维生素 K：维生素 K 有 3 种，K₁, K₂, K₃。其中 K₃ 是人工合成的。维生素 K 是 2-甲基萘醌的衍生物。

三、辅酶在酶促反应中的作用特点

- 辅酶在催化反应过程中，直接参加了反应。
- 每一种辅酶都具有特殊的功能，可以特定地催化某一类型的反应。
- 同一种辅酶可以和多种不同的酶蛋白结合形成不同的全酶。
- 一般来说，全酶中的辅酶决定了酶所催化的类型（反应专一性），而酶蛋白则决定了所催化的底物类型（底物专一性）。

四、酶分子中的金属离子

- 根据金属离子与酶蛋白结合程度，可分为两类：金属酶和金属激酶。
- 在金属酶中，酶蛋白与金属离子结合紧密。如 Fe²⁺/Fe³⁺、Cu⁺/Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Co²⁺ 等。
- 金属酶中的金属离子作为酶的辅助因子，在酶促反应中传递电子，原子或功能团。

金属酶中的金属离子与配体

| 金属离子 | 配体 | 酶或蛋白 |
|------------------------------------|----------------------------|------------------|
| Mn ²⁺ | 咪唑 | 丙酮酸脱氢酶 |
| Fe ²⁺ /Fe ³⁺ | 卟啉环，咪唑，含硫配体 | 血红素，氧化-还原酶，过氧化氢酶 |
| Cu ⁺ /Cu ²⁺ | 咪唑，酰胺 | 细胞色素氧化酶 |
| Co ²⁺ | 卟啉环 | 变位酶 |
| Zn ²⁺ | -NH ₃ ，咪唑，(-RS) | 碳酸酐酶，醇脱氢酶 |
| Pb ²⁺ | -SH | d-氨基-g-酮戊二酸脱水酶 |
| Ni ²⁺ | -SH | 尿酶 |

金属激酶中的金属离子

- ✓ 激酶是一种磷酸化酶类，在 ATP 存在下催化葡萄糖，甘油等磷酸化。
- ✓ 其中的金属离子与酶的结合一般较松散。在溶液中，酶与这类离子结合而被激活。
- ✓ 如 Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 等。金属离子对酶有一定的选择性,某种金属只对某一种或几种酶有激活作用。

第三节 酶的结构及催化作用机制

一、酶分子的结构特点

酶的活性中心(active center)

- 与底物相结合并将底物转化为产物的区域
- 对于结合酶来说，辅酶或辅基往往是活性中心的组成成分

1. 结合部位 *Binding site*

酶分子中与底物结合的部位或区域一般称为结合部位。

2. 催化部位 *catalytic site*

- 酶分子中促使底物发生化学变化的部位称为催化部位。
- 通常将酶的结合部位和催化部位总称为酶的活性部位或活性中心。

- 结合部位决定酶的专一性，
- 催化部位决定酶所催化反应的性质。

3. 调控部位 Regulatory site

- ✓ 酶分子中存在着一些可以与其他分子发生某种程度的结合的部位，从而引起酶分子空间构象的变化，对酶起激活或抑制作用。

4. 酶活性中心的必需基团(essential group)

酶的分子中存在着许多功能基团，例如， $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$ 等，但并不是这些基团都与酶活性性有关。一般将与酶活性有关的基团称为酶的必需基团。必需基团可分为四种：

1) 接触残基 (contact residue)

直接与底物接触的基团，它们参与底物的化学转变，是活性中心的主要必需基团。

- 结合基团(binding group): 与底物结合
- 催化基团(catalytic group): 催化底物发生化学变化

还有些必需基团虽然不参加酶的活性中心的组成，但为维持酶活性中心应有的空间构象所必需，这些基团是酶的活性中心以外的必需基团。

2) 辅助残基(auxiliary residue)

这种残基既不直接与底物结合，也不催化底物的化学反应，但对接触残基的功能有促进作用。它可促进结合基团对底物的结合，促进催化基团对底物的催化反应。它也是活性中心不可缺少的组成部分。

3) 结构残基 (structure residue)

这是活性中心以外的必需基团，它们与酶的活性不发生直接关系，但它们可稳定酶的分子构象，特别是稳定酶活性中心的构象，因而对酶的活性也是不可缺少的基团，只是起间接作用而已。

4) 非贡献残基 (noncontribution residue)

- 酶分子中除上述基团外的其它基团，它们对酶的活性“没有贡献”，也称为非必需基团。
- 它们可能在系统发育的物种专一性方面、免疫方面或者在体内的运输转移、分泌、防止蛋白酶降解的方面起一定作用
- 这些基团的存在也可能是该酶迄今未发现的新的活力类型的活力中心。

5. 酶活性中心证明方法

1) 切除法

对小分子且结构已知的酶多用此法。用专一性的酶切除一段肽链后剩余的肽链仍有活性，说明切除的肽链与活性无关，反之，切除的肽链与活性有关。

2) 化学修饰法

用化学试剂与酶蛋白中的氨基酸残基的侧链基团发生反应引起共价结合、氧化或还原等修饰，称之为化学修饰。酶分子中可以修饰的基团有： $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$ 、咪唑基、氨基、羧基、胍基等，修饰剂已有七十多种，但专一性的修饰剂不多。

- 判断方法
- 缺点：也有可能酶活性部位外的某个氨基酸残基侧链的修饰而影响酶分子的正常空间结构，而导致酶活性的丧失。
- 排除方法：底物保护法

根据修饰剂是否专一性结合酶的活性中心的特定基团，化学修饰可分为：

- 非特异性共价共接修饰：

修饰试剂既可与酶的活性部位的某特异基团结合，又可与酶的非活性部位的同一基团结合，称之为非特异性共价共价修饰。

此法适用于所修饰的基团只存在与活性部位，在非活性部位不存在或极少存在。判断标准是一：酶活力的丧失程度与修饰剂的浓度成正比；二：底物或竞争性抑制剂保护下可防止修饰剂的抑制作用。

- 特异性的共价修饰：

DIFP（二异丙基氟磷酸）可专一性地结合丝氨酸蛋白酶活性部位的丝氨酸—OH而使酶失活。DIFP一般不与蛋白质反应，也不与含丝氨酸的蛋白酶原或变性的酶反应，只与活性的酶且活性部位含丝氨酸的酶结合。

3) 亲和标记法

含反应基团的底物类似物，作为活性部位的标记试剂，它能象底物一样进入酶的活性部位，并以其活泼的化学基团与酶的活性基团的某些特定基团共价结合，使酶失去活性。

如胰凝乳蛋白酶最适底物为：N—对甲苯磺酰—L—苯丙氨酰乙酯或甲酯，根据此结构设计的亲和标记试剂为：N—对甲苯磺酰—苯丙氨酰氯甲基酮（TPCK）。

4) X—射线衍射法

把一纯酶的 X—射线晶体衍射图谱与酶与底物反应后的 X-射线图谱相比较，即可确定酶的活性中心。

6.酶的活性中心的一级结构

应用化学修饰法对多种酶的活性中心进行研究发现，在酶的活性中心处存在频率最高的氨基酸残基是：丝氨酸、组氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、赖氨酸和半胱氨酸。如果用同位素标记酶的活性中心后，将酶水解，分离带标记水解片段，对其进行一级结构测定，就可了解酶的活性中心的一级结构。

对各种蛋白水解酶进行类似的分析，功能类似的酶在一级结构上有惊人的相似性。见下表所示：

| 酶 | 氨基酸顺序 | |
|-----------|-----------------|------------------|
| 胰蛋白酶（牛） | -天冬. 丝.半胱.谷酰胺. | 甘.天冬.丝.甘.甘.脯.缬- |
| 胰凝乳蛋白酶（牛） | - 丝. 丝.半胱.甲硫. | 甘.天冬.丝.甘.甘.脯.亮- |
| 弹性蛋白酶（猪） | - 丝. 甘.半胱.谷酰胺 | 甘.天冬.丝.甘.甘.脯.亮- |
| 凝血酶（牛） | - 天冬. 丙.半胱.谷. - | 甘.天冬.丝.甘.甘.脯.苯丙 |
| 蛋白酶 | - 苏.半胱.谷. | 甘.天冬.丝.甘.甘.脯.甲硫- |

从上表可知，一些丝氨酸蛋白酶在活性丝氨酸附近的氨基酸几乎完全一样，而且这个活性丝氨酸最邻近的 5-6 氨基酸顺序，从微生物到哺乳动物都一样，说明蛋白质活性中心在种系进化上有严格的保守性。

7.酶的活性与高级结构的关系

酶的活性不仅与一级结构有关，而且与其高级结构密切相关。就某种程度而言，在酶的活性表现上，高级结构甚至比一级结构更为重要。高级结构是形成酶特定空间结构的保证，高级结构破坏，酶失去活性。

8.酶原激活

有些酶在细胞内合成时，或初分泌时，没有催化活性，这种无活性状态的酶的前体称为酶原(zymogen)。酶原向活性的酶转化的过程称为酶原激活。酶原激活实际上是酶的活性中心形成或暴露的过程。

胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰糜蛋白酶、羧肽酶、弹性蛋白酶等等

例如：

胰蛋白酶原进入小肠后，受肠激酶或胰蛋白酶本身的激活，第 6 位赖氨酸与第 7 位异亮氨酸残基之间的肽键被切断，水解掉一个六肽，酶分子空间构象发生改变，产生酶的活性中心，于是胰蛋白酶原变成了有活性的胰蛋白酶。

除消化道的蛋白酶外，血液中有关凝血和纤维蛋白溶解的酶类，也都以酶原的形式存在。

二、酶的作用机制

1、酶为什么能催化化学反应

一个化学反应要能够发生，关键的是反应体系中的分子必须具有一定能量即分子处于活化状态，活化分子比一般分子多含的能量就称为活化能。反应体系中活化分子越多，反应就越快。因此，设法增加活化分子数量，是加快化学反应的唯一途径。增加反应体系的活化分子数有两条途径：一是向反应体系中加入能量，如通过加热、加压、光照等，另一途径是降低反应活化能。酶的作用就在于降低化学反应活化能。

2、酶如何降低化学反应的活化能-----中间产物学说

中间产物学说认为：酶在催化化学反应时，酶与底物首先形成不稳定的中间物，然后分解酶与产物。即酶将原来活化能很高的反应分成两个活化能较低的反应来进行，因而加快了反应速度。



底物 酶 中间产物 产物

中间产物学说已经得到一些可靠的实验依据。如，用吸光法证明了含铁卟啉的过氧化物酶参加反应时，单纯的酶的吸收光谱与加入了第一个底物 H₂O₂ 后确实产生了变化。

- 反应方向，即化学平衡方向，主要取决于反应自由能变化 ΔH° 。
- 而反应速度快慢，则主要取决于反应的活化能。
- 催化剂的作用是降低反应活化能，从而起到提高反应速度的作用
- 酶催化作用的本质是酶的活性中心与底物分子通过短程非共价力(如氢键,离子键和疏水键等)的作

用，形成 E-S 反应中间物

- 其结果使底物的价键状态发生形变或极化，起到激活底物分子和降低过渡态活化能作用。

邻近效应和定向效应

- 在酶促反应中，底物分子结合到酶的活性中心，一方面底物在酶活性中心的有效浓度大大增加，有利于提高反应速度；
- 另一方面，由于活性中心的立体结构和相关基团的诱导和定向作用，使底物分子中参与反应的基团相互接近，并被严格定向定位，使酶促反应具有高效率 and 专一性特点。

3、酶的高效性的解释

- 1) 底物与酶的邻近效应和定向效应
- 2) 底物分子的形变和扭曲
- 3) 共价催化
- 4) 酸碱催化
- 5) 活性部位微环境的影响

4、酶的专一性的解释

(a) “三点结合”的催化理论

第五节 认为酶与底物的结合处至少有三个点，而且只有一种情况是完全结合的形式。只有这种情况下，不对称催化作用才能实现。

(b) 锁钥学说：

- 认为整个酶分子的天然构象是具有刚性结构的，酶表面具有特定的形状。酶与底物的结合如同一把钥匙对一把锁一样

(c) 诱导契合学说

- 该学说认为酶表面并没有一种与底物互补的固定形状，而只是由于底物的诱导才形成了互补形状。

第四节 酶促反应的速度和影响因素

1、底物浓度对酶促反应速度的影响

- 在低底物浓度时，反应速度与底物浓度成正比，表现为一级反应特征。
- 当底物浓度达到一定值，几乎所有的酶都与底物结合后，反应速度达到最大值 (V_{max})，此时再增加底物浓度，反应速度不再增加，表现为零级反应。

1) . 米氏方程

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

K_m 即为米氏常数，
 V_{max} 为最大反应速度
 当反应速度等于最大速度一半时，即 $V = 1/2 V_{max}$ ， $K_m = [S]$
 上式表示，米氏常数是反应速度为最大值的一半时的底物浓度。
 因此，米氏常数的单位为 mol/L。

米氏常数 K_m 的意义

- 不同的酶具有不同 K_m 值，它是酶的一个重要的特征物理常数。
- K_m 值只是在固定的底物，一定的温度和 pH 条件下，一定的缓冲体系中测定的，不同条件下具有不同的 K_m 值。
- K_m 值表示酶与底物之间的亲和程度： K_m 值大表示亲和程度小，酶的催化活性低； K_m 值小表示亲和程度大，酶的催化活性高。

2) . 米氏常数的求法

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

双倒数作图法

2、酶浓度的影响

在一定温度和 pH 下，酶促反应在底物浓度大大超过酶浓度时，速度与酶的浓度呈正比。

酶浓度对速度的影响机理：酶浓度增加，[ES]也增加，而 $V = k_3[ES]$ ，故反应速度增加。

3、pH 的影响

①pH 影响酶和底物的解离:酶的活性基团的解离受 pH 影响，底物有的也能解离，其解离状态也受 pH 的影响，在某一反应 pH 下，二者的解离状态最有利于它们的结合，酶促反应表现出最大活力，即-酶的最适 pH；当反应 pH 偏离最适 pH 时，酶促反应速度显著下降。

②pH 影响酶分子的构象：过高或过低 pH 都会影响酶分子活性中心的构象，或引起酶的变性失活。

4、温度的影响

- 一方面是温度升高,酶促反应速度加快。
- 另一方面,温度升高,酶的高级结构将发生变化或变性，导致酶活性降低甚至丧失。
- 因此大多数酶都有一个最适温度。在最适温度条件下,反应速度最大。

温度对酶促反应速度的影响机理：

- 1.温度影响反应体系中的活化分子数：温度增加，活化分子数增加，反应速度增加。
- 2.温度影响酶的活性：过高的温度使酶变性失活，反应速度下降。

最适温度不是酶的特征常数，因为一种酶的最适温度不是一成不变的，它要受到酶的纯度、底物、激活剂、抑制剂、酶反应时间等因素的影响。因此，酶的最适温度与其它反应条件有关。

5、激活剂对酶反应速度的影响

- 能使酶活性提高的物质,都称为激活剂(activator),其中大部分是离子或简单的有机化合物。如 Mg^{2+} 是多种激酶和合成酶的激活剂，动物唾液中的 α -淀粉酶则受 Cl^- 的激活。
- 通常，酶对激活剂有一定的选择性，且有一定的浓度要求，一种酶的激活剂对另一种酶来说可能是抑制剂，当激活剂的浓度超过一定的范围时，它就成为抑制剂。

6、抑制剂对酶活性的影响

- ◆ 使酶的活性降低或丧失的现象，称为酶的抑制作用。
- ◆ 能够引起酶的抑制作用的化合物则称为抑制剂。
- ◆ 酶的抑制剂一般具备两个方面的特点：
 - a.在化学结构上与被抑制的底物分子或底物的过渡状态相似。
 - b.能够与酶的活性中心以非共价或共价的方式形成比较稳定的复合体或结合物。

1) 抑制剂的作用方式

a. 不可逆抑制

不可逆性抑制作用的抑制剂，通常以共价键方式与酶的必需基团进行不可逆结合而使酶丧失活性，按其作用特点，又有专一性及非专一性之分。

➤ 专一性不可逆抑制

抑制剂与酶反应中心的活性基团以共价形式结合，引起酶的永久性失活。如有机磷毒剂。

有机磷杀虫剂能专一作用于胆碱酯酶活性中心的丝氨酸残基，使其磷酸化而不可逆抑制酶的活性。

➤ 非专一性不可逆抑制

抑制剂与酶分子中一类或几类基团作用，不论是必需基团与否，皆可共价结合，由于其中必需基团也被抑制剂结合，从而导致酶的抑制失活。某些重金属(Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+})及对氯汞苯甲酸等，能与酶分子的巯基进行不可逆结合，许多以巯基作为必需基团的酶(通称巯基酶)，会因此而遭受抑制，属于此种类型。用二巯基丙醇(british anti lewisite,BAL)或二巯基丁二酸钠等含巯基的化合物可使酶复活。

b. 可逆抑制

抑制剂与酶蛋白以非共价方式结合，引起酶活性暂时性丧失。抑制剂可以通过透析等方法被除去，并且能部分或全部恢复酶的活性。根据抑制剂与酶结合的情况，又可以分为三类。

(1) 竞争性抑制

- ◆ 某些抑制剂的化学结构与底物相似，因而能与底物竞争与酶活性中心结合。当抑制剂与活性中心结合后，底物被排斥在反应中心之外，其结果是酶促反应被抑制了。
- ◆ 竞争性抑制通常可以通过增大底物浓度，即提高底物的竞争能力来消除。

很多药物都是酶的竞争性抑制剂。

磺胺药与对氨基苯甲酸具有类似的结构，而对氨基苯甲酸、二氢喋呤及谷氨酸是某些细菌合成二氢叶酸的原料，后者能转变为四氢叶酸，它是细菌合成核酸不可缺少的辅酶。由于磺胺药是二氢叶酸合成酶的竞争性抑制剂，进而减少细菌体内四氢叶酸的合成，使核酸合成障碍，导致细菌死亡。抗菌增效剂-甲氧

甲氨嘧啶(TMP)能特异地抑制细菌的二氢叶酸还原为四氢叶酸，故能增强磺胺药的作用。

(2) 非竞争性抑制

- 酶可同时与底物及抑制剂结合，引起酶分子构象变化，并导致酶活性下降。由于这类物质并不是与底物竞争与活性中心的结合，所以称为非竞争性抑制剂。

抑制剂 I 可以和酶 E 结合生成 EI，也可以和 ES 复合物结合生成 ESI。底物 S 和酶 E 结合成 ES 后，仍可与 I 结合生成 ESI，但一旦形成 ESI 复合物，再不能释放形成产物 P。

- ✓ 如某些金属离子 (Cu^{2+} 、 Ag^{+} 、 Hg^{2+}) 以及 EDTA 等，通常能与酶分子的调控部位中的-SH 基团作用，改变酶的空间构象，引起非竞争性抑制。

特点：

- ✓ I 和 S 在结构上一般无相似之处，I 常与酶分子上结合基团以外的化学基团结合，这种结合并不影响底物和酶的结合，增加底物浓度并不能减少 I 对酶的抑制程度。
- ✓ 非竞争性抑制剂的双倒数曲线：有非竞争性抑制剂存在的曲线与无抑制剂的曲线相交于横坐标 $-1/K_m$ 处，但纵坐标的截距，因竞争性抑制存在变大，说明该抑制作用，并不影响酶促反应的 K_m 值，而使 V_{\max} 值变小。

(3) 反竞争性抑制

含义和反应式

反竞争性抑制剂必须在酶结合了底物之后才能与酶与底物的中间产物结合，该抑制剂与单独的酶不结合。

反竞争性抑制的特点：

- ◆ 反竞争性抑制剂的化学结构不一定与底物的分子结构类似；
- ◆ 抑制剂与底物可同时与酶的不同部位结合；
- ◆ 必须有底物存在，抑制剂才能对酶产生抑制作用；抑制程度随底物浓度的增加而增加；
- ◆ 动力学参数： K_m 减小， V_m 降低。

第六节 酶的调节

- 生物体内的各种生理活动均以一定的物质代谢为基础。为了适应某种生理活动的变化，需要对一定的代谢活动进行调节。
- 通过对酶的催化活性的调节，就可以达到调节代谢活动的目的。
- 可以通过改变其催化活性而使整个代谢反应的速度或方向发生改变的酶就称为限速酶或关键酶。

一、酶结构的调节

- 酶结构的调节是通过对现有酶分子结构的影响来改变酶的催化活性的调节方式。
- 酶结构的调节是一种快速调节方式。

(一) 变构调节 (别构调节)：

- 某些代谢物能与变构酶分子上的变构部位特异性结合，使酶的分子构象发生改变，从而改变酶的催化活性以及代谢反应的速度，这种调节作用就称为变构调节(allosteric regulation)。
- 具有变构调节作用的酶就称为变构酶。
- 凡能使酶分子变构并使酶的催化活性发生改变的代谢物就称为变构剂。

1. 变构调节的机制：

- ✓ 变构酶一般是多亚基构成的聚合物，一些亚基为催化亚基，另一些亚基为调节亚基。
- ✓ 当调节亚基或调节部位与变构剂结合后，就可导致酶的空间构象发生改变，从而导致酶的催化活性中心的构象发生改变而致酶活性的改变。

2. 协同效应：

- 当变构酶的一个亚基与其配体 (底物或变构剂) 结合后，能够通过改变相邻亚基的构象而使其对配体的亲和力发生改变，这种效应就称为变构酶的协同效应。
- 如果对相邻亚基的影响是导致其对配体的亲和力增加，则称为正协同效应；反之，则称为负协同效应。
- 如果是同种配体所产生的影响，则称为同促协同效应。如果是不同配体之间产生的影响则称为异促协同效应。
- 观察变构酶的底物浓度对酶促反应速度影响时，可发现 $v \sim [S]$ 为一“S”形曲线。这是由于底物对变构酶存在同促正协同效应。

- 当存在异促正协同效应时，“S”形曲线左移，酶促反应速度加快；当存在异促负协同效应时，“S”形曲线右移，酶促反应速度减慢。

3. 变构调节的方式：

- 变构酶通常为代谢途径的起始关键酶，而变构剂则为代谢途径的终产物。因此，变构剂一般以反馈方式对代谢途径的起始关键酶进行调节，最常见的为负反馈调节。

例如：葡萄糖的氧化分解可提供能量使 AMP、ADP 转变成 ATP，当 ATP 过多时，通过变构抑制剂 ATP 抑制磷酸果糖激酶的活性，可限制葡萄糖的分解，而 ADP、AMP 增多时，则可通过变构激活剂 AMP、ADP 激活磷酸果糖激酶的活性促进糖的分解。随时调节 ATP/ADP 的水平，可以维持细胞内能量的正常供应。

4. 变构调节的特点：

- (1) 酶活性的改变通过酶分子构象的改变而实现；
- (2) 酶的变构仅涉及非共价键的变化；
- (3) 调节酶活性的因素为代谢物；
- (4) 为一非耗能过程；
- (5) 无放大效应。

(二) 共价修饰调节：

- 酶蛋白分子中的某些基团可以在其他酶的催化下发生共价修饰，从而导致酶活性的改变，称为共价修饰调节。
- 共价修饰调节也是体内快速调节代谢活动的一种重要的方式。
- 最常见的共价修饰方式有：磷酸化-脱磷酸化，-SH- -S-S-，乙酰化-脱乙酰化，腺苷化-脱腺苷化等。

1. 共价修饰的机制：

共价修饰酶通常在两种不同的酶的催化下发生修饰或去修饰，从而引起酶分子在有活性形式与无活性形式之间进行相互转变。

2. 共价修饰调节的方式：

共价修饰调节一般与激素的调节相联系，其调节方式为级联反应。

3. 共价修饰调节的特点：

- (1) 酶以两种不同修饰和不同活性的形式存在；
- (2) 有共价键的变化；
- (3) 受其他调节因素（如激素）的影响；
- (4) 一般为耗能过程；
- (5) 存在放大效应。

(三) 同工酶的调节

同工酶(isoenzyme)是指催化的化学反应相同，酶蛋白的分子结构、理化性质乃至免疫学性质不同的一组酶。这类酶存在于生物的同一种属或同一个体的不同组织、甚至同一组织或细胞中。

第七节 酶的分离提纯及活力测定

一、酶的分离提纯

(一)酶在细胞中的分布：

胞外酶：水解酶类，易收集，不必破碎细胞，缓冲液或水浸泡细胞或发酵液离心得到上清液即为含酶液。

胞内酶：除水解酶类外的其它酶类，需破碎细胞，不同的酶分布部位不同，最好先将酶存在的细胞器分离后再破碎该细胞器，然后将酶用适当的缓冲溶液或水抽提。

(三) 原则：

在增加酶得率和纯度的同时，尽可能避免高温、过酸、过碱、剧烈的震荡及其它可能使酶丧失活力的一切操作过程。尽最大可能保存酶的活力。

(四) 分离提纯：

1.酶的抽提：将酶溶解出来就称为抽提。

胞外酶：固体培养的菌体加水或适当缓冲溶液浸泡过滤即可。液体培养的菌体将发酵液离心分离除去菌体收集离心液即可。

胞内酶：先破碎细胞，再用水或适当的缓冲溶液抽提。

2.酶的纯化：

纯化的关键是维持酶的活性，因为随着酶的逐渐提纯，一些天然的可保持酶活力的其它成分逐渐减少，酶的稳定性变差，所以整个纯化过程应维持低温。

(1) 酶的沉淀方法：与蛋白质的沉淀方法相同，常用：

A. 盐析法：常用硫酸铵盐析，有分段盐析和一次性盐析两种方法。

B. 有机溶剂沉淀法：用乙醇、丙酮等。应低温操作，溶剂少量分批加入。

(2) 酶的纯化方法：

有吸附层析、离子交换层析、凝胶过滤层析、亲和层析等。

3. 酶的结晶：

纯化以后的酶液再次沉淀，仍采用沉淀法。

4. 酶的保存：一般在 -20°C 以下低温保存。

二. 酶活力的测定

定性鉴定提取物中某一酶是否存在，一般是根据此酶引起的化学反应来判断。

酶活力的测定：实际上是酶定量测定的方法，酶制剂因含杂质多易失活等原因，故不能用称重或测量体积来定量。

(一) 酶活力的概念：指酶催化特定化学反应的能力。其大小通常用在一定条件下酶催化某一特定化学反应的速度来表示。一定量的酶制剂催化某一化学反应速度快，活力大；反之，活力小。

速度表示法常用 $-dS/dt$ 或 dP/dt ，测初速度，多用后者。因为反应初期底物过量，底物的减少量不容易测定，而产物从无到有，易测定。

(二) 酶的活力单位：1961年国际生化协会酶学委员会统一规定，酶的国际单位(IU)规定为：在最适反应条件(温度 25°C)下，每分钟内催化1微摩尔(μmol)底物转化为产物所需的酶量(或1分钟内转化底物生成1微摩尔产物的酶量)称为1标准单位。

测定条件：最佳的反应条件，如最适的 T_m (或 25°C)、 pH_m 、 $[\text{S}] \gg [\text{E}]$ 、初速度下。

1972年国际生化协会又推荐一种新单位，即Katal(Kat)单位。规定：在最适温度下，每秒钟能催化1摩尔底物转化为称为所需要的酶量定义为1Kat。1Kat= 60×10^6 IU。

(三) 酶的比活力：每单位酶蛋白所含的活力单位数。对固体酶：用活力单位/毫克酶蛋白、或活力单位/毫克酶蛋白氮来表示，对液体酶：用活力单位/毫升酶液来表示。很明显，比活力越大，酶的活力越大。

(四)、酶活力的测定方法

1、分光光度法：产物与适当的化学试剂生成有色物质或产物有紫外吸收的能力可采用此法。

2、测压法：产物中有气体，测气压增加量。

3、滴定法：产物中有酸生成，用碱滴定。

4、荧光法：产物中有荧光物质生成或产物与荧光试剂反应生成荧光产物可用此法。

5、旋光法：产物中有旋光物质可采用此法。

除了以上方法外，还可根据产物的性质采用其它方法。

第一节 概述(introduction)

一、生物代谢

二、糖的生理功能

一、生物代谢

- 生物代谢是指生物活体与外界环境不断进行的物质（包括气体、液体和固体）交换过程。
- 合成代谢一般是指将简单的小分子物质转变成复杂的大分子物质的过程。分解代谢则是将复杂的大分子物质转变成小分子物质的过程。
- 糖、脂和蛋白质的合成代谢途径各不相同，但是它们的分解代谢途径则有共同之处，即糖、脂和蛋白质经过一系列分解反应后都生成了酮酸并进入三羧酸循环，最后被氧化成 CO_2 和 H_2O 。

二、糖的生理功能

糖类是指多羟基醛或酮及其衍生物。糖类在生物体的生理功能主要有：

- ① **氧化供能**：糖类占人体全部供能量的 70%。
- ② **作为结构成分**：作为生物膜、神经组织等的组分。
- ③ **作为核酸类化合物的成分**：构成核苷酸，DNA，RNA 等。
- ④ **转变为其他物质**：转变为脂肪或氨基酸等化合物。

三、糖的分类与结构

单糖、双糖和多糖

单糖：不能水解的多羟基醛和多羟基酮。

如：丙糖、丁糖、戊糖、己糖

丙糖、丁糖、戊糖、己糖。

在糖类代谢中丙糖、丁糖、戊糖都是中间产物，以后所说单糖都是己糖。

1、单糖的结构

- ✓ 葡萄糖分子的开链结构及构型
- ✓ 果糖的分子的开链结构及构型

2、双糖：

两个单糖（通过糖苷键连接而成）脱水而形成的化合物。

如：麦芽糖和蔗糖

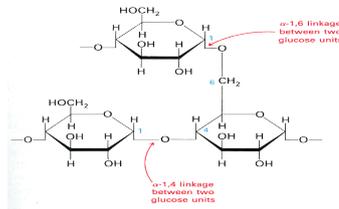
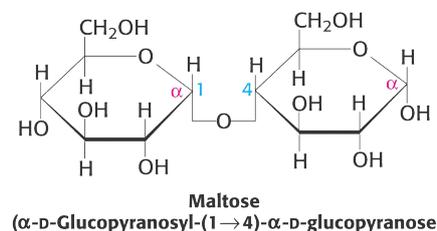
3、多糖：多个单糖分子脱水缩合而成的生物大分子。

淀粉、纤维素、果胶

1) 淀粉

(1) 直链淀粉：葡萄糖以 α -1, 4-糖苷键连接形成线性大分子，不分支。

(2) 支链淀粉：主链是由葡萄糖以 α -1, 4-糖苷键相链，通过 α -1, 6-糖苷键形成支链。



2) 纤维素

葡萄糖通过 β -1, 4-葡萄糖苷键相连，无分支。

纤维素是植物细胞壁的主要成分。

第二节 糖的无氧分解

■ **糖的无氧酵解** (glycolysis)是指葡萄糖在无氧条件下分解生成乳酸并释放出能量的过程。

一、糖酵解的反应过程

- 无氧酵解的全部反应过程在**胞液**(cytoplasm)中进行，代谢的终产物为**乳酸**(lactate)，一分子葡萄糖经无

氧酵解可净生成两分子 ATP。

- 无氧酵解的反应过程可分为活化、裂解、放能和还原四个阶段。

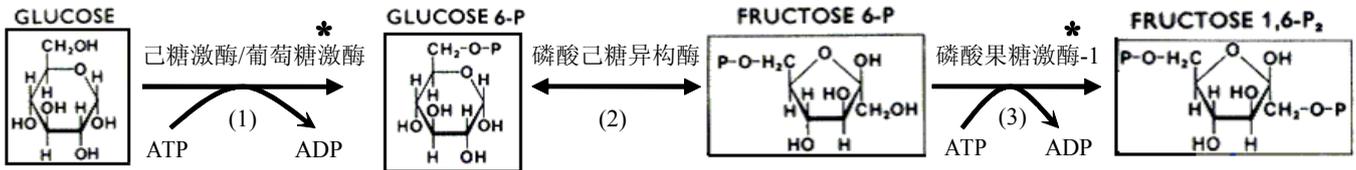
1. 活化(activation)——己糖磷酸酯的生成:

- 活化阶段是指葡萄糖经磷酸化和异构反应生成 1,6-双磷酸果糖(FBP, FDP)的反应过程。该过程共由三步化学反应组成。

(1)葡萄糖(glucose)磷酸化生成 6-磷酸葡萄糖(glucose-6-phosphate,G-6-P);

(2)G-6-P 异构为 6-磷酸果糖(fructose-6-phosphate,F-6-P);

(3)F-6-P 再磷酸化为 1,6-双磷酸果糖(fructose-1,6-biphosphate,F-1,6-BP).

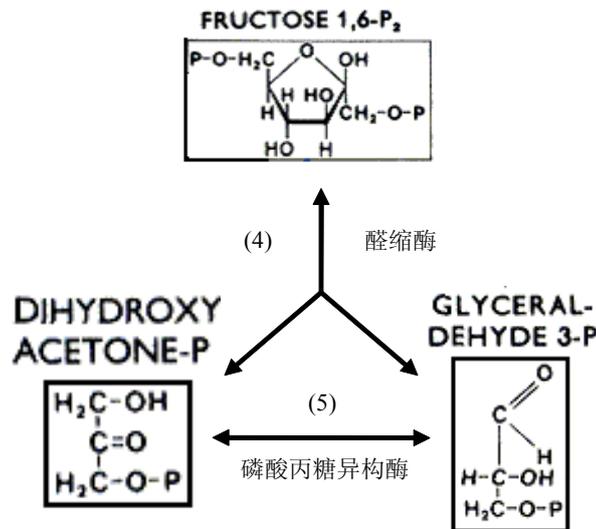


2. 裂解 (lysis)——磷酸丙糖的生成:

- 一分子 F-1,6-BP 裂解为两分子可以互变的磷酸丙糖 (triose phosphate)，包括两步反应:

(4) F-1,6-BP 裂解为 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde-3-phosphate) 和 磷酸二羟丙酮 (dihydroxyacetone phosphate);

(5) 磷酸二羟丙酮异构为 3-磷酸甘油醛。



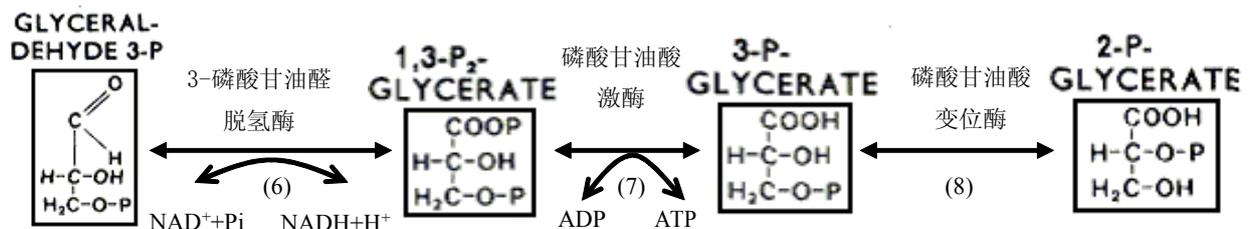
3. 放能(releasing energy)——丙酮酸的生成:

3-磷酸甘油醛经脱氢、磷酸化、脱水及放能等反应生成丙酮酸，包括六步反应。

(6) 3-磷酸甘油醛脱氢并磷酸化生成 1,3-二磷酸甘油酸 (glycerate-1,3-diphosphate);

(7) 1,3-二磷酸甘油酸脱磷酸,将其交给 ADP 生成 ATP;

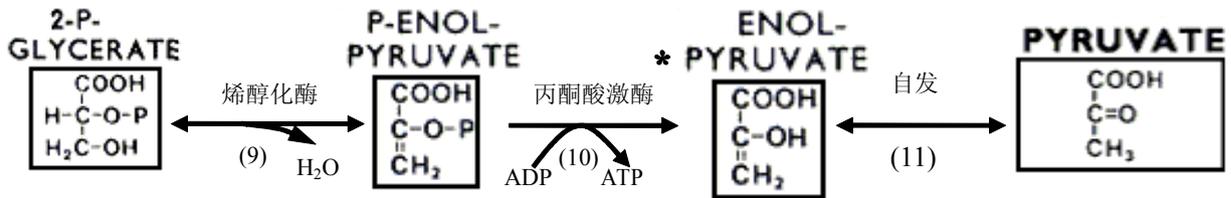
(8) 3-磷酸甘油酸异构为 2-磷酸甘油酸;



(9)2-磷酸甘油酸(glycerate-2-phosphate)脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate,PEP);

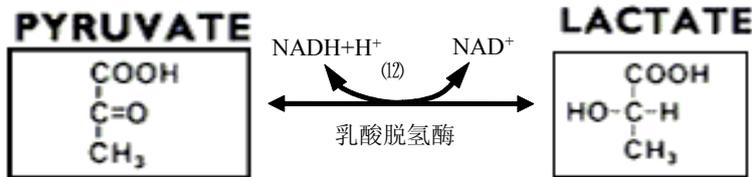
(10) 磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 将高能磷酸基交给 ADP 生成 ATP;

(11) 烯醇式丙酮酸自发转变为丙酮酸(pyruvate)。



4. 还原(reduction)—乳酸的生成:

◆ 利用丙酮酸接受酵解代谢过程中产生的 NADH, 使 NADH 重新氧化为 NAD⁺, 以确保反应的继续进行。



9. 糖酵解代谢途径可将一分子葡萄糖分解为两分子乳酸, 净生成两分子 ATP。

10. 糖酵解代谢途径有三个关键酶, 即己糖激酶 (葡萄糖激酶)、磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶。

二、糖酵解的调节

糖酵解代谢途径的调节主要是通过通过各种变构剂对三个关键酶进行变构调节。

1. 己糖激酶或葡萄糖激酶:

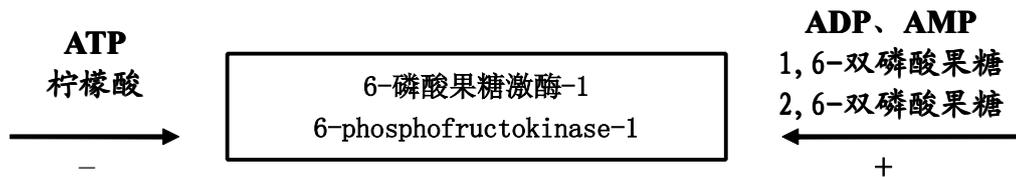
➢ 葡萄糖激酶是肝脏调节葡萄糖吸收的主要的关键酶。

己糖激酶及葡萄糖激酶的变构剂



2. 6-磷酸果糖激酶-1:

6-磷酸果糖激酶-1 是调节糖酵解代谢途径流量的主要因素。

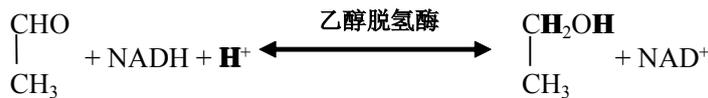
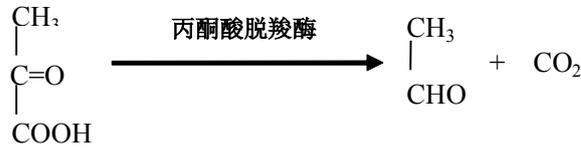
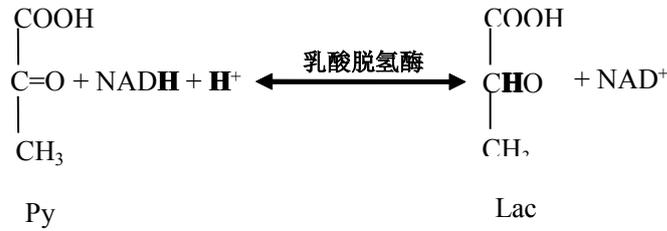


3. 丙酮酸激酶:



三、糖酵解的生理意义

1. 在无氧和缺氧条件下, 作为糖分解供能的补充途径。
2. 在有氧条件下, 作为某些组织细胞主要的供能途径。
3. 生成乳酸或乙醇。



第三节 糖的有氧氧化

葡萄糖在有氧条件下彻底氧化分解生成 CO_2 和 H_2O ，并释放出大量能量的过程称为**糖的有氧氧化 (aerobic oxidation)**。

■ 绝大多数组织细胞通过糖的有氧氧化途径获得能量。此代谢过程在**细胞胞液和线粒体 (cytoplasm and mitochondrion)**内进行。

■ 一分子葡萄糖 (glucose) 彻底氧化分解可产生 **36/38** 分子 **ATP**。

一、有氧氧化的反应过程

■ 糖的有氧氧化代谢途径可分为：葡萄糖酵解、丙酮酸氧化脱羧和三羧酸循环三个阶段。

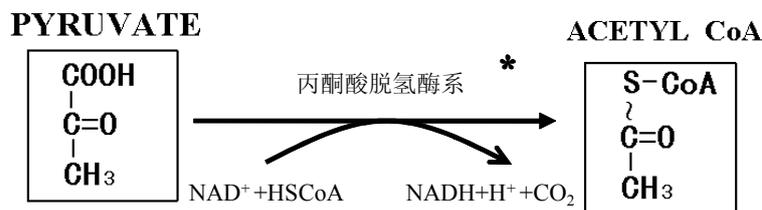
(一) 葡萄糖经酵解途径生成丙酮酸：

➢ 此阶段在**细胞胞液 (cytoplasm)**中进行，一分子葡萄糖 (glucose) 分解后净生成 **2** 分子**丙酮酸 (pyruvate)**，2 分子 **ATP**，和 2 分子 $(\text{NADH} + \text{H}^+)$ 。

➢ 两分子 $(\text{NADH} + \text{H}^+)$ 在有氧条件下可进入线粒体 (mitochondrion) 产能，共可得到 2×2 或者 2×3 分子 **ATP**。故第一阶段可**净生成 6 或 8 分子 ATP**。

(二) 丙酮酸氧化脱羧生成乙酰 CoA：

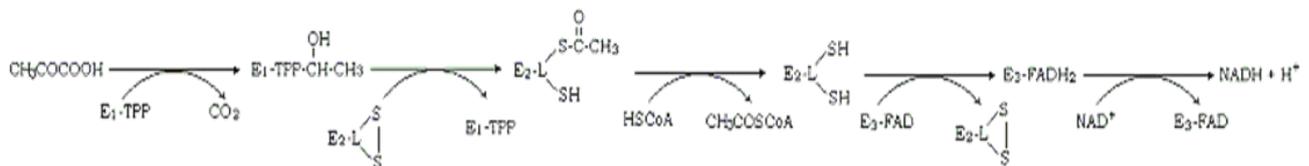
◆ 丙酮酸进入线粒体 (mitochondrion)，在**丙酮酸脱氢酶系 (pyruvate dehydrogenase complex)**的催化下氧化脱羧生成**乙酰 CoA (acetyl CoA)**。



➢ 由一分子葡萄糖氧化分解产生两分子丙酮酸 (pyruvate)，故可生成**两分子乙酰 CoA (acetyl CoA)**，两分子 CO_2 和两分子 $(\text{NADH} + \text{H}^+)$ ，可生成 **2×3 分子 ATP**。

➢ 反应为不可逆；**丙酮酸脱氢酶系 (pyruvate dehydrogenase complex)**是糖有氧氧化途径的关键酶之一。

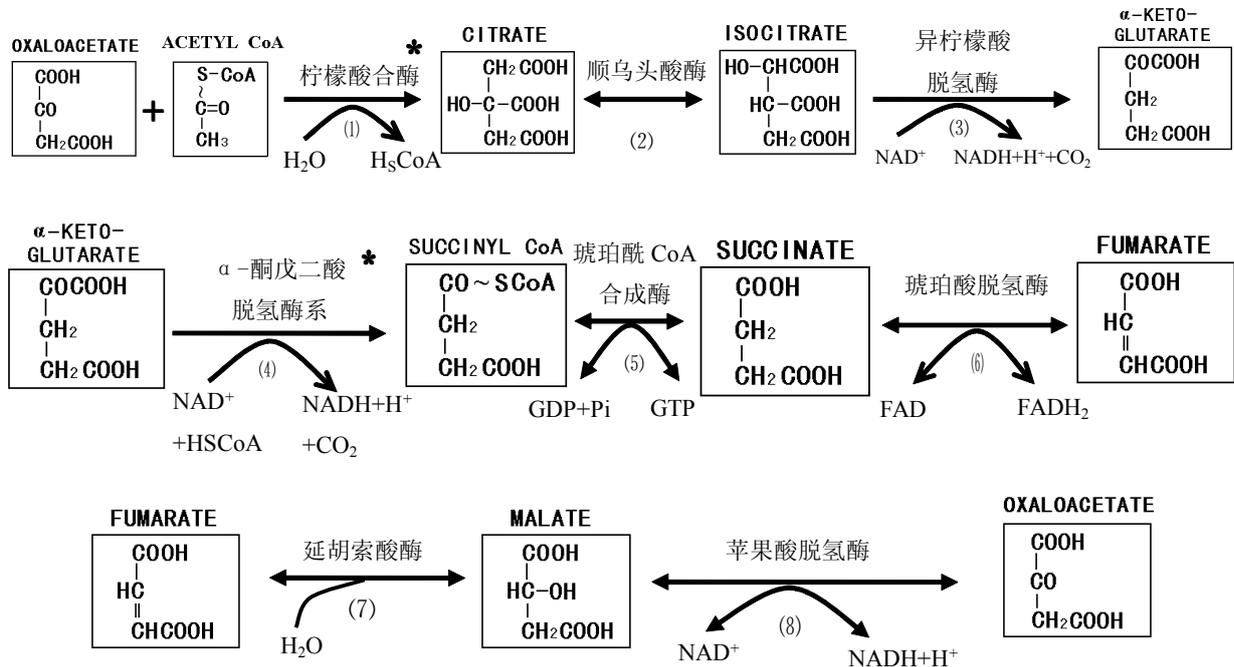
➢ 丙酮酸脱氢酶系由三种酶单体构成：丙酮酸脱羧酶 (E1)，硫辛酸乙酰基转移酶 (E2)，二氢硫辛酸脱氢酶 (E3)。该多酶复合体有六种辅助因子：**TPP**，**硫辛酸**， **NAD^+** ，**FAD**，**HSCoA** 和 **Mg^{2+}** 。



(三) 经三羧酸循环彻底氧化分解：

第六节 三羧酸循环（柠檬酸循环或 Krebs 循环）是指在线粒体中，乙酰 CoA 首先与草酰乙酸缩合生成柠檬酸，然后经过一系列的代谢反应，乙酰基被氧化分解，而草酰乙酸再生的循环反应过程。

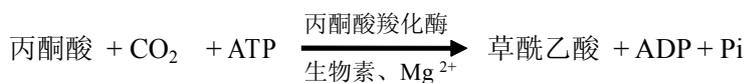
第七节 三羧酸循环在线粒体中进行。一分子乙酰 CoA 氧化分解后共可生成 12 分子 ATP，故此阶段可生成 $2 \times 12 = 24$ 分子 ATP。



➤ 三羧酸循环的特点：

- ① 循环反应在线粒体(mitochondrion)中进行，为不可逆反应。
- ② 每完成一次循环，氧化分解掉一分子乙酰基，可生成 12 分子 ATP。
- ③ 循环的中间产物既不能通过此循环反应生成，也不被此循环反应所消耗。
- ④ 三羧酸循环中有两次脱羧反应，生成两分子 CO₂。
- ⑤ 循环中有四次脱氢反应，生成三分子 NADH 和一分子 FADH₂。
- ⑥ 循环中有一次底物水平磷酸化，生成一分子 GTP。
- ⑦ 三羧酸循环的关键酶是柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶系。

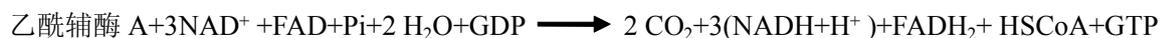
三羧酸循环中草酰乙酸的来源(1)



三羧酸循环中草酰乙酸的来源(2)



三羧酸循环小结



- TAC 运转一周的净结果是氧化 1 分子乙酰 CoA，草酰乙酸仅起载体作用，反应前后无改变。
- ¹⁴C 标记乙酰 CoA 进行研究结果，第一周循环中并无 ¹⁴C 出现 CO₂，即 CO₂ 的碳原子来自草酰乙酸而不是来自乙酰 CoA，第二周循环时，才有 ¹⁴CO₂ 出现。
- TAC 中的一些反应在生理条件下是不可逆的，所以整个三羧酸循环是一个不可逆的系统

- TAC 的中间产物可转化为其他物质，故需不断补充
- 乙酰 CoA 的二碳片段结合到草酰乙酸上，脱羧时并不是立刻形成 CO₂ 而脱去。

糖有氧氧化的生理意义

- 糖有氧氧化的基本生理功能是氧化供能。
- 糖有氧氧化是体内三大营养物质代谢的总枢纽。
- 糖有氧氧化途径与体内其他代谢途径有着密切的联系。

(二) 糖有氧氧化过程中 ATP 的生成

| 糖 的 有 氧 氧 化 | 底物磷酸化 | 氧化磷酸化 |
|--|--------|-----------|
| 第一阶段：葡萄糖→2 丙酮酸 | 2ATP | 2×2/3ATP |
| 第二阶段：2 丙酮酸→2 乙酰 CoA | 2×3ATP | |
| 第三阶段：2 乙酰 CoA→2CO ₂ +4H ₂ O | 2×ATP | 2×11ATP |
| 葡萄糖→ 6 CO ₂ + 6H ₂ O + ? mol ATP | | 36/38 ATP |

| | 反 应 | ATP |
|------|-----------------------------|-----------|
| 第一阶段 | 两次耗能反应 | -2 |
| | 两次生成 ATP 的反应 | 2×2 |
| | 一次脱氢 (NADH+H ⁺) | 2×2 或 2×3 |
| 第二阶段 | 一次脱氢 (NADH+H ⁺) | 2×3 |
| 第三阶段 | 三次脱氢 (NADH+H ⁺) | 2×3×3 |
| | 一次脱氢 (FADH ₂) | 2×2 |
| | 一次生成 ATP 的反应 | 2×1 |
| 净生成 | | 36 或 38 |

(三) 三羧酸循环的限速酶及其调节

| 酶 的 名 称 | 变构激活剂 | 变构抑制剂 |
|------------|-------|------------------|
| 柠檬酸合酶 | | ATP |
| *异柠檬酸脱氢酶 | ADP | NADH |
| α-酮戊二酸脱氢酶系 | | ATP、NADH、琥珀酰 CoA |

(四) 巴斯德效应

巴斯德效应是指糖的有氧氧化可以抑制糖的无氧酵解的现象。

机理：

有氧时 NADH+H⁺可进入线粒体内氧化，于是丙酮酸就进行有氧氧化而不生成乳酸---有氧氧化可抑制糖酵解。

缺氧时，氧化磷酸化受阻，ADP 与 Pi 不能合成 ATP，致使 ADP/ATP 比值升高，而激活糖酵解途径的限速酶，故糖酵解消耗的葡萄糖量增加。

(五) Crabtree 效应

■ Crabtree 效应 (亦称反 Pasteur 作用)：

一些组织细胞给予葡萄糖时，无论供氧充足与否，均呈现很强的酵解反应，而糖的有氧氧化受抑制，这种作用称为 Crabtree 效应。

■ 实验现象：

在癌细胞中有 Crabtree 现象，后发现某些正常组织细胞(如视网膜、睾丸、小肠粘膜、颗粒性白细胞、肾髓质、成熟红细胞等)亦有此现象。

■ 解释：

此类细胞糖酵解酶系较强，而线粒体中某些氧化酶系如细胞色素氧化酶活性较低，争夺氧化磷酸化底物处劣势。

二、磷酸戊糖途径

(一) 磷酸戊糖途径的概念

以 6-葡萄糖开始，在 6-磷酸葡萄糖脱氢酶催化下形成 6-磷酸葡萄糖酸，进而代谢生成磷酸戊糖为中间代谢物的过程，称为磷酸戊糖途径。

磷酸戊糖途径(phosphopentose pathway) 又称磷酸己糖旁路(hexose monophosphate shunt,HMS) 或 Warburg-Dikens 途径。



(二) 磷酸戊糖途径的过程

第一阶段：

氧化反应

生成 NADPH 和 CO_2

第二阶段：

非氧化反应

一系列基团转移反应(生成 3-磷酸甘油醛和 6-磷酸果糖)

(1) 6-磷酸葡萄糖转变为 6-磷酸葡萄糖酸内酯

(2) 6-磷酸葡萄糖酸内酯转变为 6-磷酸葡萄糖酸

(3) 6-磷酸葡萄糖酸转变为 5-磷酸核酮糖

(4) 三种五碳糖的互换

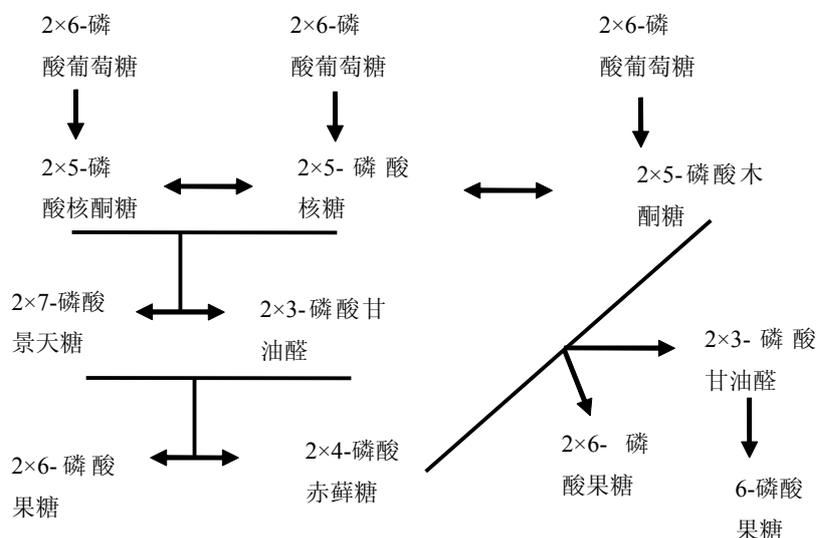
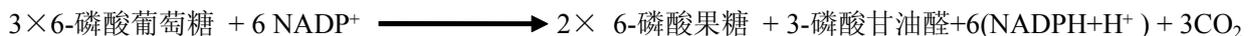
(5) 二分子五碳糖的基团转移反应

(6) 七碳糖与三碳糖的基团转移反应

(7) 四碳糖与五碳糖的基团转移反应

(三) 磷酸戊糖途径的小结

1. 磷酸戊糖途径两个阶段的反应式



2. 转酮醇酶与转醛缩酶

- 转酮醇酶(transketolase)就是催化含有一个酮基、一个醇基的 2 碳基团转移的酶。其受体是醛，辅酶是 TPP。
- 转醛缩酶(transaldolase)是催化含有一个酮基、二个醇基的 3 碳基团转移的酶。其受体也是醛，但不需要 TPP。

3.磷酸戊糖途径小结

反应部位：胞浆（肝脏、脂肪组织、泌乳期乳腺、肾上腺皮质、骨髓、红细胞、嗜中性粒细胞等）

反应底物：6-磷酸葡萄糖

重要反应产物：NADPH、5-磷酸核糖

限速酶：6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PD)

（四）磷酸戊糖途径的意义

1、产生 5-磷酸核糖

5-磷酸核糖参与各种核苷酸辅酶及核苷酸的合成

2、产生 NADPH

- 作为供氢体-----参与体内多种生物合成反应
- 是谷胱甘肽还原酶的辅酶-----对维持细胞中还原型谷胱甘肽的正常含量起重要作用
- 作为加单氧酶的辅酶-----参与肝脏对激素、药物和毒物的生物转化作用
- 清除自由基的作用

（六）磷酸戊糖途径的调节

- 最重要的调节因素是：NADP⁺的水平

餐后的兔肝胞浆中，NADP⁺/NADPH 的比值为 0.014

某些条件下，NADP⁺/NADPH 的比值为 700

- NADPH、NADP⁺竞争与 G-6-PD 结合
- ATP、6-磷酸葡萄糖竞争与 G-6-PD 结合

✓ 低聚糖和多糖的降解

一、果糖(fructose)代谢

1. 果糖代谢概况

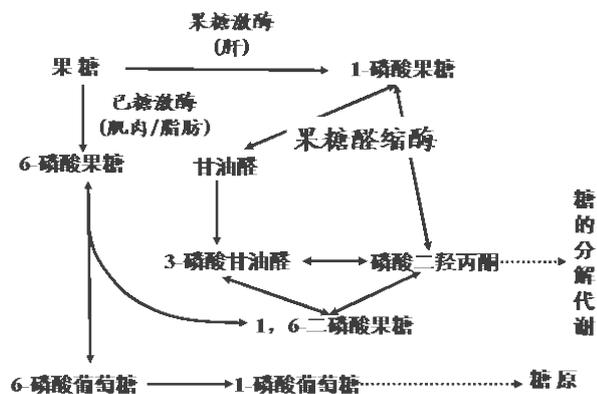
- 来源：食物中的蔗糖
- 代谢部位：肝脏、肌肉和脂肪组织
- 代谢总况：转换成糖酵解的中间产物

（1）氧化供能

（2）糖原合成的原料

2. 果糖的结构

3. 果糖的代谢



四、糖原的代谢

- 糖原是一种无还原性的多糖。
- 糖原合成或分解时，其葡萄糖残基的添加或删除，均在其非还原端进行。
- 糖原的合成与分解代谢主要发生在肝、肾和肌肉组织细胞的胞液中。

肝脏 5%，骨骼肌 1.5%

70kg man 30kg 骨骼肌（450g 糖原），但只有 1.6kg 肝脏（80g 糖原）

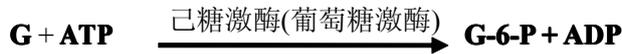
（一）糖原的合成代谢

1.反应过程：

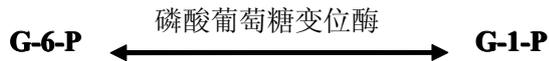
糖原合成的反应过程可分为三个阶段：

(1)活化：由葡萄糖生成 UDPG(uridine diphosphate glucose)，是一耗能过程。

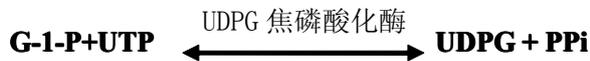
a.磷酸化：



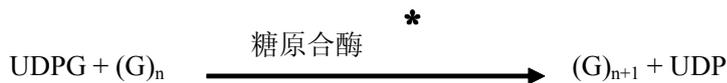
b.异构：G-6-P 转变为 G-1-P:



c.转形：G-1-P 转变为尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG):

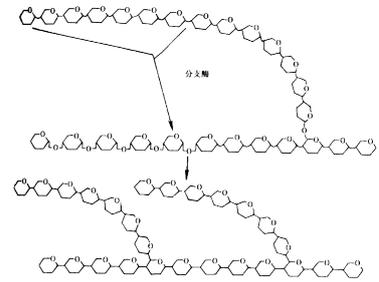


(2)缩合:



(3)分支:

当直链长度达 12 个葡萄糖残基以上时，在分支酶(branching enzyme)的催化下，将距末端 6~7 个葡萄糖残基组成的寡糖链由 α -1,4-糖苷键转变为 α -1,6-糖苷键，使糖原出现分支。



(3) 分支

2.糖原合成的特点:

- ✓ 必须以原有糖原分子作为引物;
- ✓ 合成反应在糖原的非还原端进行;
- ✓ 合成为一耗能过程，每增加一个葡萄糖残基，需消耗 2 个高能磷酸键 (2 分子 ATP);
- ✓ 其关键酶是糖原合酶(glycogen synthase)，为一共价修饰酶;
- ✓ 需 UTP 参与 (以 UDP 为载体)。

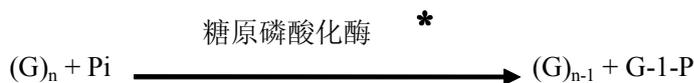
(二) 糖原的分解代谢

1.反应过程:

糖原的分解代谢可分为三个阶段:

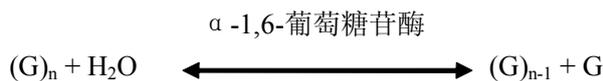
(1)水解: 包括三步反应，循环交替进行。

a.磷酸解: 由糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase)催化对 α -1,4-糖苷键磷酸解，生成 G-1-P。

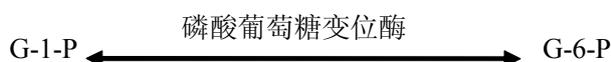


b.转寡糖链: 当糖原被水解到离分支点四个葡萄糖残基时，由葡聚糖转移酶催化，将分支链上的三个葡萄糖残基转移到直链的非还原端，使分支点暴露。

c.脱支: 由 α -1,6-葡萄糖苷酶催化。将 α -1,6-糖苷键水解，生成一分子自由葡萄糖。

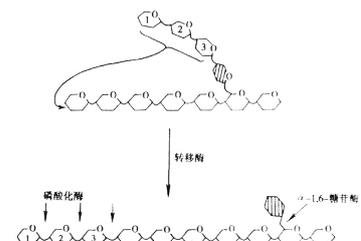


(2)异构:



(3)脱磷酸:

由葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase)催化，生成自由葡萄糖。该酶只存在于肝及肾中。



b.转寡糖链

2.糖原分解的特点：

- a) 水解反应在糖原的非还原端进行；
- b) 是一非耗能过程；
- c) 关键酶是糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase)，为一共价修饰酶，其辅酶是磷酸吡哆醛。

(三) 意义

- 生物体所需能量的贮存库
- 维持血糖平衡
- 利用乳酸：肝中可经糖异生途径利用糖无氧酵解产生的乳酸来合成糖原。这就是肝糖原合成的三碳途径或间接途径。

第五节 糖异生

- 由非糖物质转变为葡萄糖或糖原的过程称为糖异生(gluconeogenesis)。
- 糖异生代谢途径主要存在于肝及肾中

一、糖异生途径

糖异生主要沿酵解途径逆行，仅有三步反应为不可逆反应，故需经其他的代谢反应绕行。

1. G-6-P → G :

由葡萄糖-6-磷酸酶催化进行水解。该酶不存在于肌肉组织中，故肌肉组织不能生成自由葡萄糖。



2. F-1,6-BP → F-6-P:



3. 丙酮酸 → 磷酸烯醇式丙酮酸:

经由丙酮酸羧化支路完成。

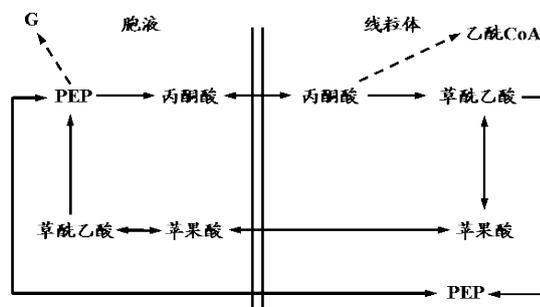
(1) 丙酮酸 → 草酰乙酸:



(2) 草酰乙酸 → 磷酸烯醇式丙酮酸(PEP):



线粒体中草酰乙酸的转运



丙酮酸羧化酶是一个生物素蛋白，需乙酰 CoA 和 Mg^{2+} 激活。该酶定位于线粒体，丙酮酸需经运载系统进入线粒体后才能羧化成草酰乙酸，后者只有在转变为苹果酸后才能再进入细胞质。

二、糖异生的调节



三、糖异生的原料

1. 生糖氨基酸：

Ala (丙), Cys (半胱), Gly (甘), Ser (丝), Thr(苏), Trp (色) → 丙酮酸
Pro (脯), His (组), Gln (谷氨), Arg (精) → Glu (谷) → α -酮戊二酸
Ile (异亮), Met (甲硫), Ser (丝), Thr (苏), Val (缬) → 琥珀酰 CoA
Phe (苯), Tyr (酪) → 延胡索酸
Asn (天氨), Asp (天冬) → 草酰乙酸

2. 甘油：

甘油三酯 → 甘油 → α -磷酸甘油 → 磷酸二羟丙酮。

3. 乳酸：

乳酸 → 丙酮酸。

四、糖异生的生理意义

- 在饥饿情况下保证血糖浓度的相对恒定
- 补充糖原贮备
- 有利于乳酸的利用

第六节 血 糖

血液中的葡萄糖含量称为血糖。按真糖法测定，正常空腹血糖浓度为 3.89~6.11mmol/L (70~100mg%)。

一、血糖的来源与去路

来源：消化吸收 肝糖异生 肝糖原分解

去路：氧化供能 合成糖原 转变为脂肪或氨基酸 转变为其他糖类物质

二、血糖水平的调节

(一) 组织器官：

1. 肝脏。
2. 肌肉等外周组织。

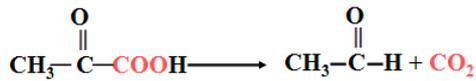
(二) 激素：

1. 降低血糖浓度的激素——胰岛素。
2. 升高血糖浓度的激素——胰高血糖素、肾上腺素、糖皮质激素、生长激素、甲状腺激素。

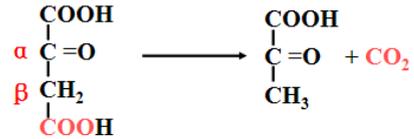
(三) 神经系统。

(一) 单纯脱羧

1. α -单纯脱羧

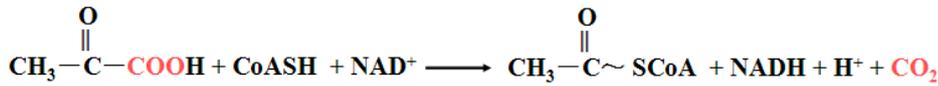


2. β -单纯脱羧

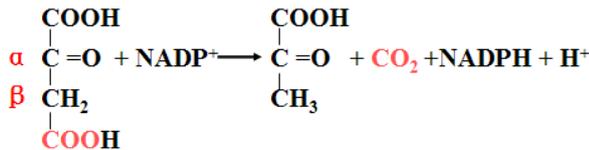


(二) 氧化脱羧

1. α -氧化脱羧



2. β -氧化脱羧



二、呼吸链

- 细胞内的线粒体是生物氧化的主要场所，主要功能是将代谢物脱下的氢通过多种酶及辅酶所组成的传递体系的传递，最终与氧结合生成水。
- 由供氢体、传递体、受氢体以及相应的酶催化系统组成的这种代谢途径一般称为生物氧化还原链，当受氢体是氧时，称为呼吸链。

1. 呼吸链的种类

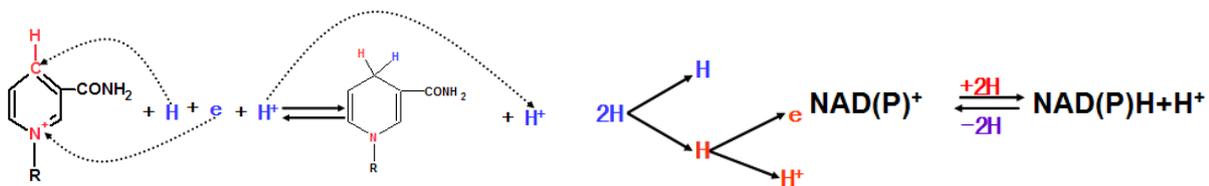
NADH 呼吸链 FADH₂ 呼吸链

2. 呼吸链的组成

呼吸链由一系列的氢传递体和电子传递体组成。

(1) 以 NAD 或 NADP 为辅酶的脱氢酶

尼克酰胺核苷酸的作用原理



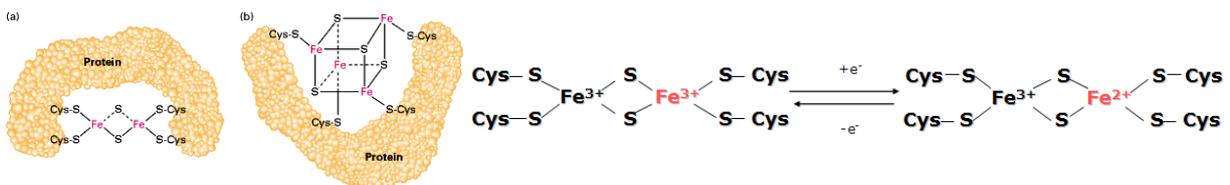
(2) NADH-Q 还原酶 (复合体 I)

NADH 还原酶 + 2 (Fe-S) + CoQ

(3) 铁硫蛋白

11. 铁硫聚簇 (Fe-S 中心) 主要以 (Fe-S) (2Fe-2S) 或 (4Fe-4S) 形式存在，铁硫聚簇与蛋白质结合称为铁硫蛋白。

12. 铁硫聚簇通过 Fe³⁺ ↔ Fe²⁺ 变化，将氢从 FMN₂ 上脱下传给 CoQ，同时起传递电子的作用，每次传递一个电子。



(4) 琥珀酸-泛醌还原酶 (复合体 II)

琥珀酸脱氢酶 + 2 (Fe-S) + 2 (Cyt b₅₆₀)

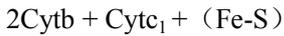
细胞色素 (cytochrome, cyt)

13. 是以铁卟啉 (血红素) 为辅基的蛋白质 (有颜色)，高等动物线粒体呼吸链中主要含有 5 种细胞色素 a、a₃、

b、c、c₁等，细胞色素 b,c₁,c 的辅基都是铁-原卟啉IV，细胞色素 a、a₃ 的辅基为血红素 A。

14. 细胞色素主要是通过辅基中 Fe³⁺ ↔ Fe²⁺ 的互变起传递电子的作用。一个细胞色素每次传递一个电子。

3. 复合体III（泛醌-细胞色素 c 还原酶）：



细胞色素 c

15. 在复合体 III 和IV之间传递电子。（细胞色素 c 交互地与细胞色素还原酶的 C₁ 和细胞色素氧化酶接触）

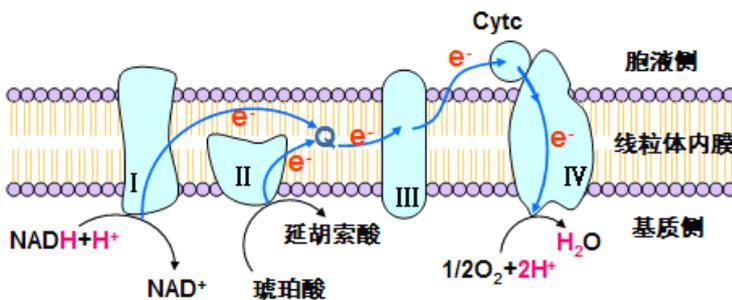
16. 是唯一能溶于水的细胞色素

(5) 细胞色素 c 氧化酶复合体IV

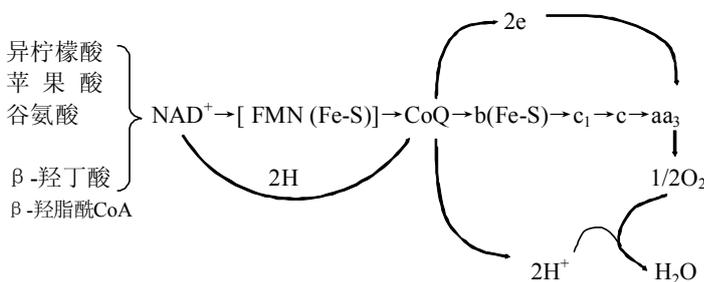
17. 由 Cyt.a 和 a₃ 组成。大约 20 万 Da

18. 复合物中除了含有铁卟啉外，还含有 2 个铜原子（CuA，CuB）。Cyt_a 与 CuA 相配合，Cyt_{a3} 与 CuB 相配合，当电子传递时，细胞色素的 Fe³⁺ ↔ Fe²⁺ 间循环，同时 Cu²⁺ ↔ Cu⁺ 间循环，将电子从 Cyt_c 直接传递给 O₂。也叫末端氧化酶。

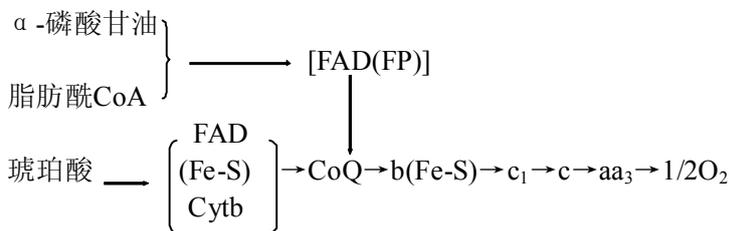
三、呼吸链成分的排列顺序



1. NADH 氧化呼吸链



2. 琥珀酸氧化呼吸链：

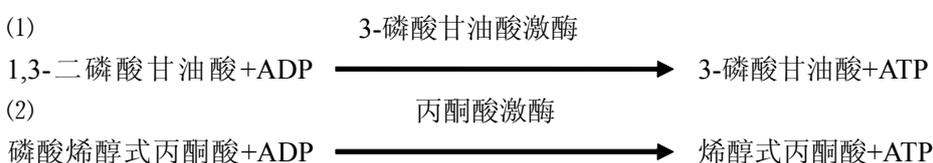


四、氧化磷酸化

▶ 在线粒体中，底物分子脱下的氢原子经递氢体系传递给氧，在此过程中释放能量使 ADP 磷酸化生成 ATP，这种能量的生成方式就称为氧化磷酸化。

▶ 直接将底物分子中的高能键转变为 ATP 分子中的末端高能磷酸键的过程称为底物水平磷酸化。

底物水平磷酸化仅见于下列三个反应：



之间。进一步说明细胞内 ATP 的产生和利用都处于一个相对稳定的状态。

(二) 甲状腺激素:

➢ 甲状腺激素可间接影响氧化磷酸化的速度。其原因是甲状腺激素可以激活细胞膜上的 Na^+, K^+ -ATP 酶, 使 ATP 水解增加, 因而使 ATP/ADP 比值下降, 氧化磷酸化速度加快。

(三) 药物和毒物:

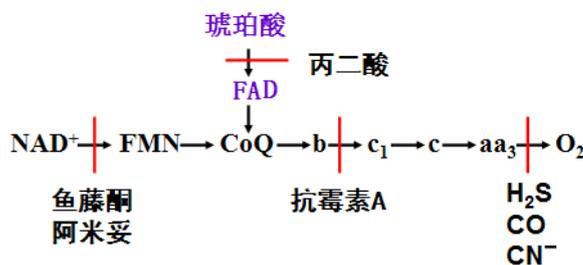
1. 呼吸链的抑制剂:

- 能够抑制呼吸链递氢或递电子过程的药物或毒物称为氧化磷酸化的抑制剂;
- 能够抑制第一位点的有异戊巴比妥、粉蝶霉素 A、鱼藤酮等;
- 能够抑制第二位点的有抗霉素 A 和二巯基丙醇;
- 能够抑制第三位点的有 CO 、 H_2S 和 CN^- 、 N_3^- 。其中, CN^- 和 N_3^- 主要抑制氧化型 $\text{Cytaa}_3\text{-Fe}^{3+}$, 而 CO 和 H_2S 主要抑制还原型 $\text{Cytaa}_3\text{-Fe}^{2+}$ 。

(2) 氧化磷酸化抑制剂的作用

① 呼吸链抑制剂

作用: 阻断电子传递



2. 解偶联剂:

➢ 不抑制呼吸链的递氢或递电子过程, 但能使氧化产生的能量不能用于 ADP 磷酸化的药物或毒物称为解偶联剂。

➢ 主要的解偶联剂有 2,4-二硝基酚。

3. 氧化磷酸化的抑制剂:

➢ 对电子传递和 ADP 磷酸化均有抑制作用的药物和毒物称为氧化磷酸化的抑制剂, 如寡霉素。

(四) 高能磷酸键的储存与释放

◇ 高能磷酸键的类型:

生物化学中常将水解时释放的能量 $>20\text{kJ/mol}$ 的磷酸键称为高能磷酸键。生物体内的高能磷酸键主要有以下几种类型:

1. 磷酸酐键: 包括各种多磷酸核苷类化合物, 如 ADP, ATP, GDP, GTP, CDP, CTP, GDP, GTP 及 PPi 等, 水解后可释放出 30.5kJ/mol 的自由能。
2. 混合酐键: 由磷酸与羧酸脱水后形成的酐键, 主要有 1,3-二磷酸甘油酸等化合物。在标准条件下水解可释放出 61.9kJ/mol 的自由能。
3. 烯醇磷酸键: 见于磷酸烯醇式丙酮酸中, 水解后可释放出 61.9kJ/mol 的自由能。
4. 磷酸肌键: 见于磷酸肌酸中, 水解后可释放出 43.9kJ/mol 的自由能。

◇ 磷酸肌酸 (C~P)

肌肉和脑组织中能量的贮存形式。但磷酸肌酸中的高能磷酸键不能被直接利用, 而必须先将其高能磷酸键转移给 ATP, 才能供生理活动之需。这一反应过程由肌酸磷酸激酶 (CPK) 催化完成。



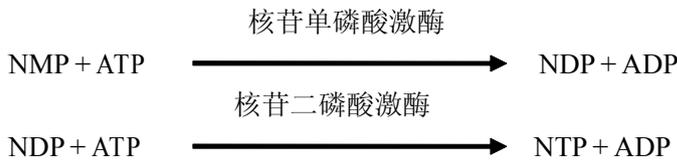
◇ ATP 循环

- ATP 是生物界普遍使用的供能物质, 有“通用货币”之称。ATP 分子中含有两个高能磷酸酐键, 均可以水解供能。
- ATP 水解为 ADP 并供出能量之后, 又可通过氧化磷酸化重新合成, 从而形成 ATP 循环。

◇ 多磷酸核苷间的能量转移

➢ 在生物体内, 除了可直接使用 ATP 供能外, 还用使用其他形式的高能磷酸键供能, 如 UTP 用于糖原

的合成，CTP 用于磷脂的合成，GTP 用于蛋白质的合成等。



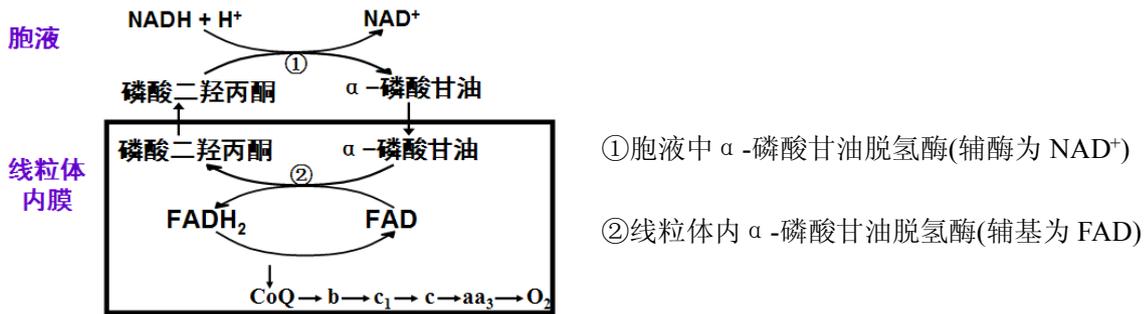
第二节 线粒体外 NADH 的穿梭

胞液中的 3-磷酸甘油醛或乳酸脱氢，均可产生 NADH。这些 NADH 可经穿梭系统而进入线粒体氧化磷酸化，产生 H₂O 和 ATP。

一、磷酸甘油穿梭系统

NADH 通过此穿梭系统带一对氢原子进入线粒体，只产生 2 分子 ATP。

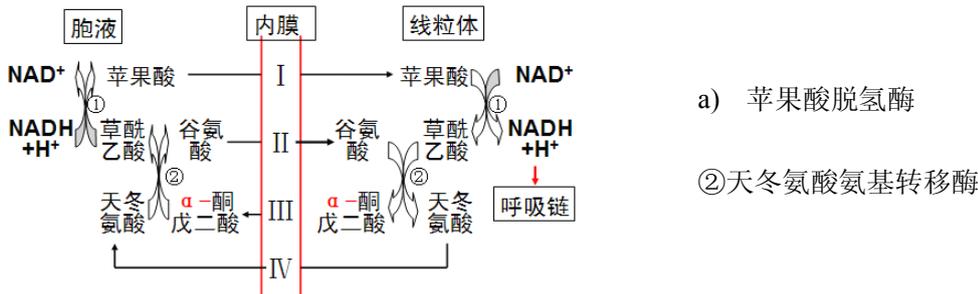
(一) α-磷酸甘油穿梭 某些肌肉、神经组织



二、苹果酸穿梭系统：

胞液中 NADH+H⁺ 的一对氢原子经此穿梭系统带入一对氢原子可生成 3 分子 ATP。

(二) 苹果酸-天冬氨酸穿梭 存在部位：肝脏、心肌组织



(三) 两种穿梭系统的比较

| | α-磷酸甘油穿梭 | 苹果酸-天冬氨酸穿梭 |
|--------------|------------------------|-----------------------|
| 穿梭物质 | α-磷酸甘油 | 苹果酸、谷氨酸 |
| | 磷酸二羟丙酮 | 天冬 aa、α-酮戊二酸 |
| 进入线粒体后转变成的物质 | FADH ₂ | NADH + H ⁺ |
| 进入呼吸链 | 琥珀酸氧化呼吸链 | NADH 氧化呼吸链 |
| 生成 ATP 数 | 2 | 3 |
| 存在组织 | 某些肌肉、神经组织 | 肝脏和心肌组织 |
| 相同点 | 将胞浆中 NADH 的还原当量转送到线粒体内 | |

第七章 脂类代谢

脂类的概念：脂类是脂肪和类脂的总称，不溶于水而溶于有机溶剂。

脂类包括：脂肪 又称三酯酰甘油或甘油三脂 (triglyceride, TG)

类脂、胆固醇(cholesterol, Ch)、胆固醇脂(cholesteryl ester, CE)、磷脂(phospholipid, PL)、糖脂

第一节 脂类概述

一、脂类的主要生理功能

1 储能和供能的主要物质

脂肪组织储存脂肪，约占体重 10~20%。1g 脂肪在体内彻底氧化供能约 38KJ，而 1g 糖彻底氧化仅供能 16.7KJ。

2 生物膜的重要结构成分

3 参与代谢调控

花生四烯酸 → 前列腺素等生物活性物质

磷脂酰肌醇 → 三磷酸肌醇、甘油二酯（第二信使）

胆固醇 → 类固醇激素

二、脂类的消化吸收

(一) 脂类的消化

小肠上段是主要的消化场所

(二) 脂类的吸收

在十二指肠下段及空肠上段吸收

第二节 脂肪的中间代谢

一、脂肪动员

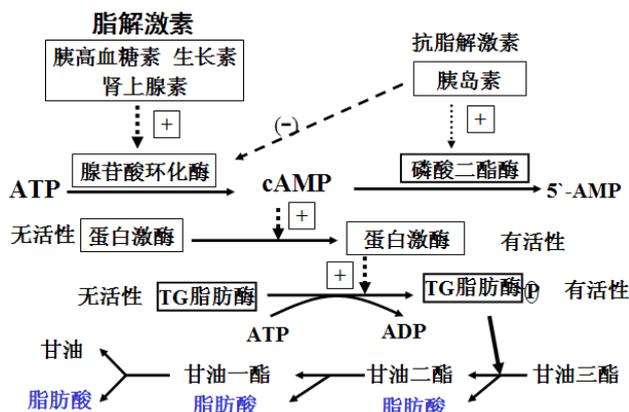
概念：储存于脂肪细胞中的脂肪，在 3 种脂肪酶作用下逐步水解为游离脂肪酸和甘油，释放入血供其他组织利用的过程，称脂肪动员。

激素敏感脂肪酶(HSL):甘油三酯脂肪酶是脂肪动员的限速酶，其活性受多种激素调节，故称~。

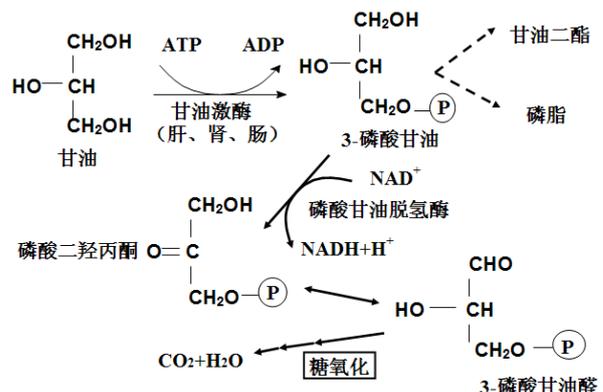
脂解激素：促进脂肪动员的激素。肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素、生长素等。

抗脂解激素：抑制脂肪动员的激素。胰岛素、前列腺素 E₁。

脂肪动员的激素调节作用



二、甘油代谢



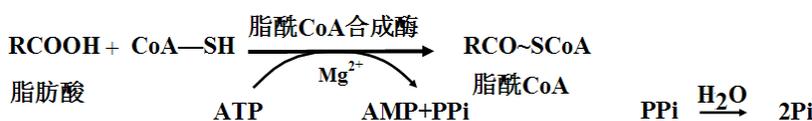
三、脂肪酸的氧化

(一) 饱和脂肪酸的β-氧化

脂肪酸β-氧化是在脂酰基β-碳原子上进行脱氢、加水、再脱氢和α与β-碳原子之间断裂的过程。此过程是在一系列酶的催化下完成的。脂肪酸必须先在线粒体中活化为脂酰 CoA，然后进入线粒体β-氧化。

1. 脂肪酸活化为脂酰 CoA (胞液)

位于内质网和线粒体外膜的脂酰 CoA 合成酶催化脂肪酸与 CoA-SH 生成活化的脂酰 CoA。

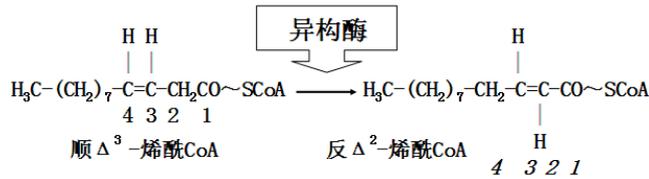


2. 脂酰 CoA 进入线粒体

脂肪酸氧化的酶系存在线粒体基质内，但胞液中活化的长链脂酰 CoA (12C 以上) 却不能直接透过

过程与饱和脂肪酸的β-氧化完全相同。

但天然脂肪酸的顺式双键需经线粒体特异Δ³-顺Δ²-反烯酰CoA异构酶催化：(如油酸=18:1, Δ⁹)



(三)、多不饱和脂肪酸的过氧化

体内产生的氧自由基(oxygen radical)，能攻击生物膜及血浆脂蛋白磷脂中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA) 引发脂质过氧化作用(lipid peroxidation)，即在PUFA中发生的一种自由基链式反应。

脂质过氧化物的危害：

- 1、生物膜脂质的过氧化，导致膜功能障碍及酶的损伤。
- 2、脂性自由基极活泼，能抽提Pr的氢，使Pr、酶等变性能失活。
- 3、脂质过氧化的分解产物，如丙二醛对细胞有毒性，能与Pr、DNA、RNA等的-NH₂反应，使之发生交联而失活。

四、酮体的生成

- 脂肪酸在心肌、骨骼肌等组织中β-氧化生成的大量乙酰CoA，通过TAC彻底氧化成CO₂和H₂O。
- 然而在肝脏中脂肪酸β-氧化生成的乙酰CoA，有一部分转变成乙酰乙酸、β-羟丁酸及丙酮。这三种中间产物统称为酮体(ketonebodies)。
- β-羟丁酸约70%，乙酰乙酸约30%，丙酮含量极微。

(一) 酮体的生成

肝细胞线粒体中含有活性较强的酮体合成的酶系。脂肪酸在线粒体β-氧化生成的乙酰CoA是合成酮体的原料。

(二) 酮体的利用

酮体在肝脏合成，但肝脏缺乏利用酮体的酶，因此不能利用酮体。酮体生成后进入血液，输送到肝外组织利用。——肝内生酮肝外用

(三) 酮体生成的调节

1. 脂肪动员的影响

饥饿或糖尿病时→胰岛素↓/胰高血糖素↑→脂肪动员↑→入肝脂肪酸↑→肝内脂肪酸β-氧化↑→肝内乙酰CoA↑→酮体生成↑

饱食及糖供应充足时，则相反。

2. 肉碱脂酰转移酶活性

饱食及糖供应充足→胰岛素/胰高血糖素↑→糖有氧氧化↑→乙酰CoA、柠檬酸↑变构激活→乙酰CoA羧化酶↑→乙酰CoA生成丙二酸单酰CoA↑(-)→CAT-1↓→长链脂酰CoA进入线粒体β-氧化↓→酮体生成↓

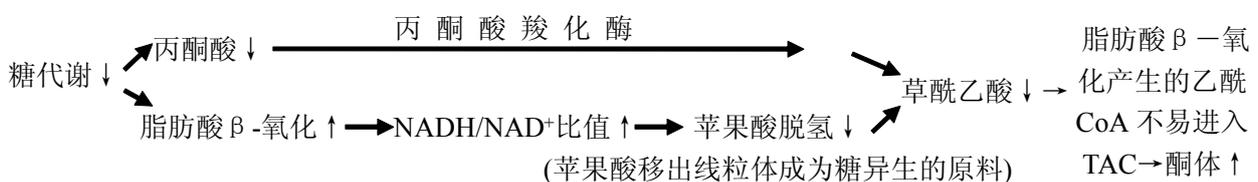
饥饿 or 糖尿病时，则相反。

3. 柠檬酸合酶的调节

饥饿或糖尿病时→胰岛素/胰高血糖素↓→脂肪动员↑→肝长链脂肪酸CoA↑(-)→肝柠檬酸合酶↓→肝内乙酰CoA↑→酮体生成↑

饱食及糖供应充足时，则相反。

4. 草酰乙酸的影响



饱食及糖供应充足时，则相反。

(四)酮体生成的生理意义

- ◆ 酮体具水溶性，能透过血脑屏障及毛细血管壁。是输出脂肪能源的一种形式。
- ◆ 禁食、应激及糖尿病时，心、肾、骨骼肌摄取酮体代替葡萄糖供能，节省葡萄糖以供脑和红细胞所需。并可防止肌肉蛋白的过多消耗。
- ◆ 长期饥饿时，酮体供给脑组织 50—70%的能量。
- ◆ 长期饥饿和糖尿病时，脂肪动员加强，酮体生成增多。当肝内产生酮体超过肝外组织氧化酮体的能力时，血中酮体蓄积，称为酮血症。尿中有酮体排出，称酮尿症。二者统称不酮体症(酮症)。可导致代谢性酸中毒，称酮症酸中毒。

五、脂肪酸的合成

(一)、软脂酸的合成

1. 合成部位

在肝、肾、脑、肺、乳腺及脂肪等多种组织的胞液中均含有从乙酰 CoA 合成脂肪酸的酶系，称为脂肪酸合成酶系。肝脏是人体合成脂肪酸的主要部位，其合成能力最强，约比脂肪组织大 8~9 倍。

从头合成途径

2. 合成原料

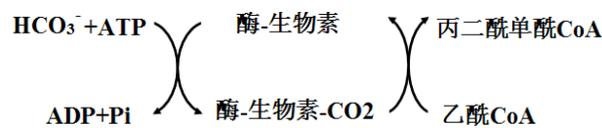
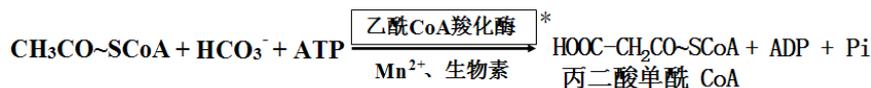
➢ 脂肪酸合成的碳源主要来自糖氧化产生的乙酰 CoA。前体是丙二酸单酰 CoA
线粒体产生的乙酰 CoA，需通过柠檬酸-丙酮酸循环运到胞液中，才能成为脂肪酸合成的原料。

➢ ATP、NADPH、HCO₃⁻ (CO₂)及 Mn²⁺等。

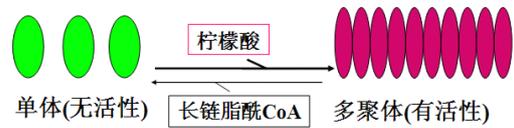
其中 NADPH 主要来自胞液中的磷酸戊糖途径，其次是柠檬酸—丙酮酸循环。

3. 合成过程 (在胞液中进行!)

(1) 丙二酸单酰 CoA 的合成



丙二酸单酰 CoA 的合成机理



乙酰 CoA 羧化酶活性的调节

(2) 丙二酸单酰 CoA 转变为软脂酸

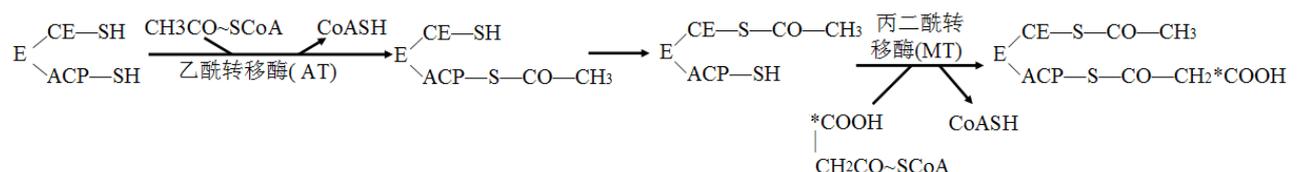
由脂肪酸合成酶系催化。包括 7 种不同功能的酶，都在一条肽链上，由一个基因编码。

活性酶是由 2 个相同亚基首尾相联组成的二聚体。

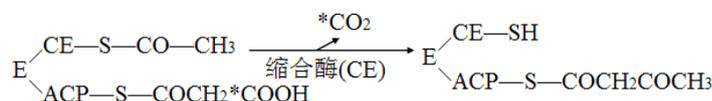
亚基均有酰基载体蛋白 (acyl carrier protein, ACP)，其辅基为 4' - 磷酸泛酰巯基乙胺连接在 Ser 残基上，称中心巯基 (ACP-SH)，起结合并转运脂酰基的作用。此为整个合成体系的中心。



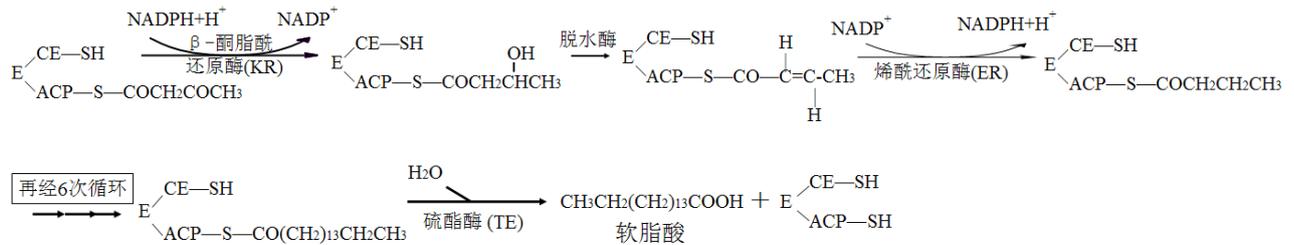
①转移



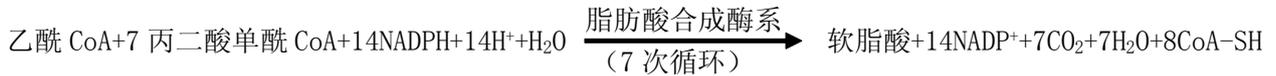
②缩合脱羧



③还原、脱水、再还原



软脂酸（16C）合成的总反应式：



(二) 脂肪酸碳链的延长

★软脂酰 CoA 或软脂酸生成后，可在滑面内质网及线粒体经脂肪酸碳链延长酶系的催化作用下，形成更长碳链的饱和脂肪酸。

(三) 不饱和脂肪酸的合成

- ◆ 人体内有 Δ^4 ， Δ^5 ， Δ^8 及 Δ^9 去饱和酶，催化饱和脂肪酸引入双键，使之转变为不饱和脂肪酸。
 - ◆ 至今在体内尚未发现有 Δ^9 以上的去饱和酶，即在第 10C 与 ω (24) 碳原子之间不能形成双键。
- 必需脂肪酸 指人体不能合成，必需由食物提供的脂肪酸，有 2 种：
 亚油酸(18C:2, $\Delta^{9,12}$) 亚麻酸(18C:3, $\Delta^{6,9,12}$)

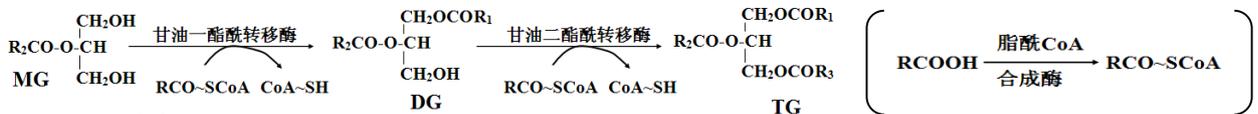
六、脂肪的合成

(一) 合成部位

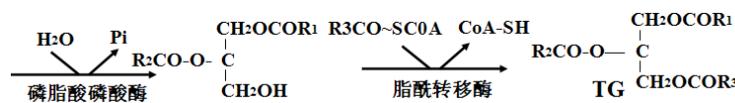
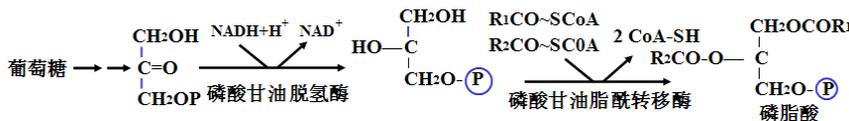
以肝、脂肪组织及小肠为主，肝的合成能力最强。

(二) 合成过程

1. 甘油一酯途径

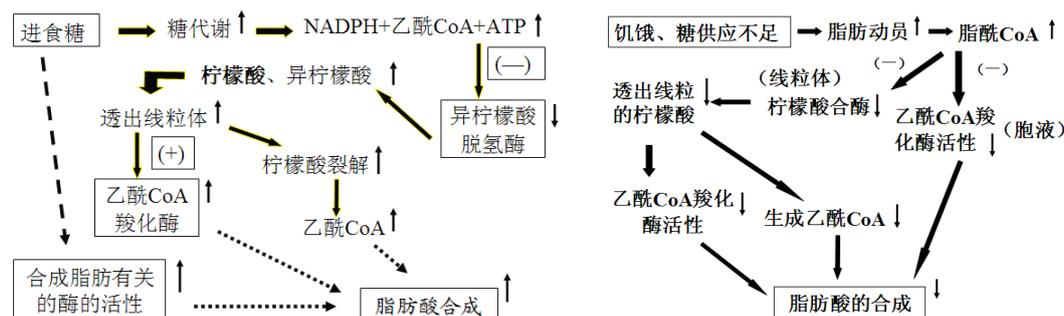


2. 磷脂酸—甘油二酯途径



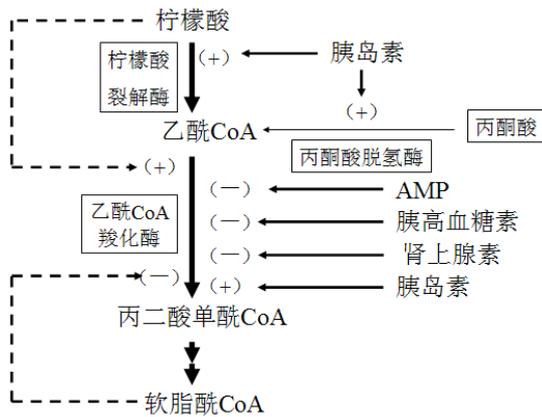
(三) 脂肪合成的调节

1. 代谢物的影响



2. 激素的调节

胰岛素是调节脂肪合成的主要激素。



第三节 磷脂的代谢

磷脂—分子中含磷酸的复合脂

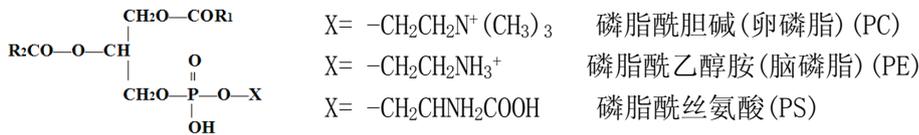
甘油磷脂（磷脂酰甘油）—由甘油构成的磷脂。是生物膜的主要组分。

鞘氨醇磷脂—含鞘氨醇而不含甘油的磷脂。是神经组织各种膜（如神经髓鞘）的主要结构脂之一。

一、甘油磷脂的代谢

(一) 甘油磷脂的组成及分类

甘油磷脂的分子结构



(二) 甘油磷脂的合成

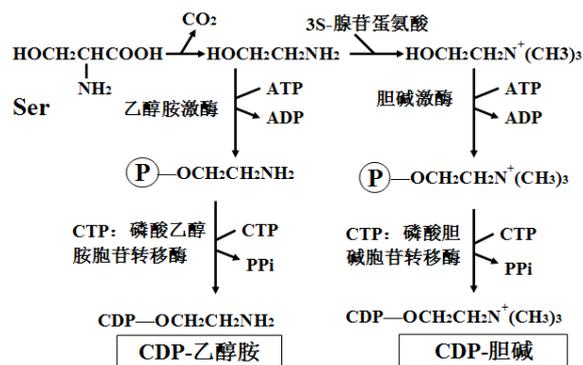
1. 合成部位：全身各组织，肝、肾、肠最活跃。

2. 合成原料

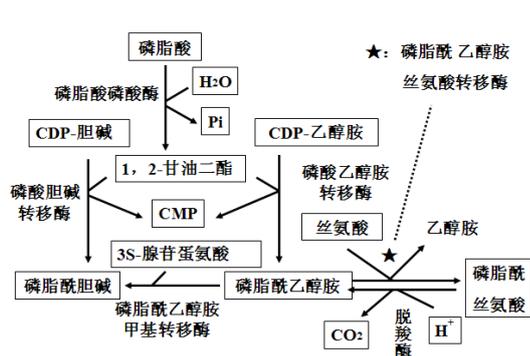
** 甘油、脂肪酸、磷酸盐、胆碱、乙醇胺 ** CTP、ATP、丝氨酸、肌醇等
 食物↑ 糖代谢↑ 丝氨酸↑、↑食物

3. 合成过程

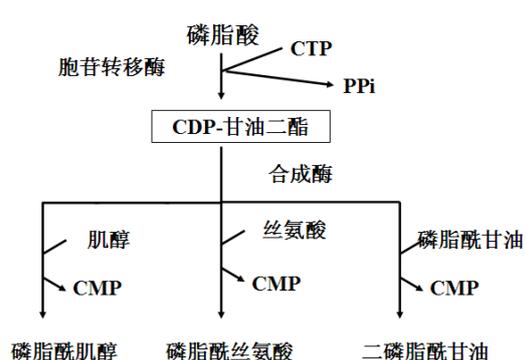
(1) CDP-胆碱、CDP-乙醇胺的生成 关键性步骤



(2) 甘油二酯途径



(3) CDP-甘油二酯途径



(三) 甘油磷脂的降解

- ◆ 磷脂酶 A₁ 存在于细胞溶酶体、蛇、蜂、蝎毒。产物为溶血磷脂 2
- ◆ 磷脂酶 A₂ 存在于细胞膜及线粒体膜、蛇、蜂、蝎毒。产物为溶血磷脂 1。

急性胰腺炎时，组织中的溶血磷脂 A₂ 原被激活

- 磷脂酶 B₁ 水解溶血磷脂 1
- 磷脂酶 B₂ 水解溶血磷脂 2
- 磷脂酶 C 存在于细胞膜、蛇毒及某些细菌
- 磷脂酶 D 主要存在于高等植物，动物脑组织

第四节 胆固醇的代谢

胆固醇的分布

广泛存在于全身各组织，2gCh/1000g 体重。脑、肝、肾、肠等内脏含量较高。

胆固醇的生理作用

- 是生物膜和神经髓鞘的重要组分，对调节膜的流动性、维持膜的结构与功能具有重要作用。
- 是合成类固醇激素、胆汁酸及维生素 D₃ 的前体。

一、食物胆固醇的吸收

(一) 来源

动物脑、内脏（肝）、蛋黄、肉类、鱼类等。

(二) 影响胆固醇吸收的因素

- | | |
|-------------|---------|
| 1. 食物胆固醇 | 2. 胆汁酸盐 |
| 3. 食物脂肪及脂肪酸 | 4. 植物固醇 |
| 5. 纤维素、果胶 | 6. 某些药物 |

此外，肠道细菌能转化 Ch 为类固醇排出，长期服用广谱抗生素，会增加 Ch 吸收。

二、胆固醇的生物合成

(一) 合成部位

全身各组织（特别是肝）的胞液及内质网。

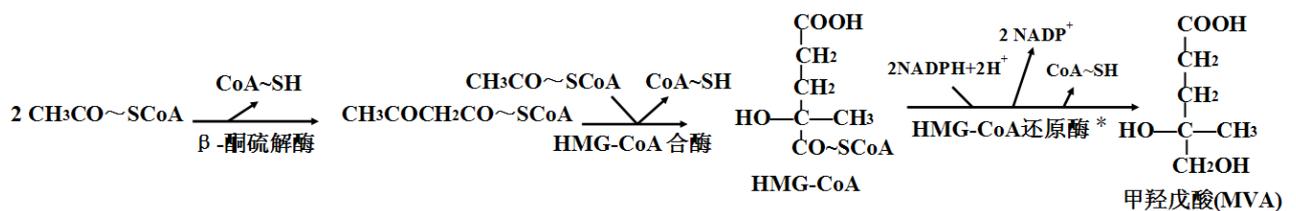
(二) 合成原料

乙酰 CoA（来自柠檬酸-丙酮酸循环）、NADPH+H⁺、ATP

(三) 合成的基本过程

包括近 30 步反应，分 3 个主要阶段。

1. 甲羟戊酸的生成

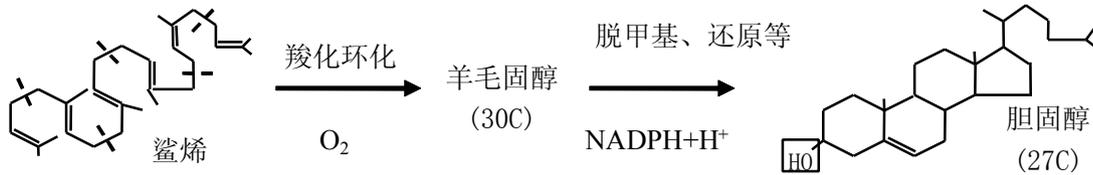


β-羟 β-甲基戊二酰辅酶 A HMG-CoA

2. 鲨烯的生成



3. 胆固醇的生成



(四) 胆固醇合成的调节

1. 食物种类的影响

- ★ 高糖、高饱和脂肪膳食时，能诱导肝 HMG-CoA 还原酶合成
 - ★ 糖及脂肪代谢产生的乙酰 CoA、ATP、NADPH+H⁺等增多
 - ★ 过多的蛋白质，因丙氨酸及丝氨酸等代谢提供了原料乙酰 CoA
- } 胆固醇合成增加
(饥饿、禁食则相反)

2. 食物胆固醇的影响

食物 Ch 有限地反馈抑制 HMG-CoA 合成 (~25%).

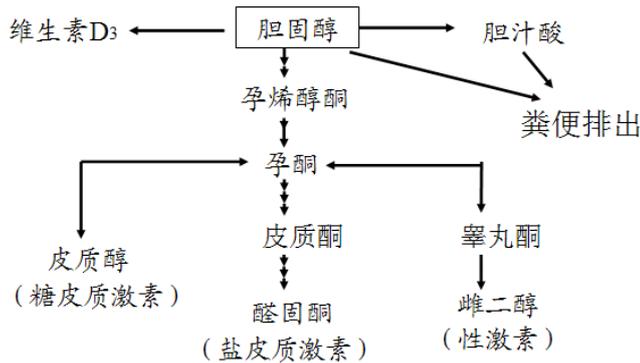
无 Ch 摄入时解除此种抑制，故适量的 Ch 摄入有利于此反馈抑制作用。

3. 激素的影响

- 胰高血糖素 \longrightarrow 胆固醇合成 ↓
- 胰岛素 \longrightarrow 胆固醇合成 ↑
- 甲状腺素 \longrightarrow 胆固醇合成 ↑ ↑ ↑ ↓ ↓

三、胆固醇的转化与排泄

胆固醇在体内不能被彻底分解为 CO₂ 和 H₂O，其代谢去路是转变为胆汁酸、类固醇激素及维生素 D₃



主要内容

第一节 蛋白质的营养作用

第二节 蛋白质的消化、吸收与腐败

第三节 氨基酸的一般代谢

第四节 个别氨基酸的代谢

第一节 蛋白质的营养作用

一、蛋白质的生理功能

- 是组织细胞的构件物质，维持细胞组织的生长、更新和修补
- 参与多种重要的生理活动(如酶、激素)
- 氧化供能（17.9KJ/g Pr）
- 氨基酸是各种含氮化合物的原料
- 可转化为糖和脂肪等

二、氮平衡

1. 氮平衡

食物摄入氮-(尿氮+粪氮)

反应体内 Pr 合成与分解的相对关系

- 总氮平衡：摄入氮=排出氮
(蛋白质分解与合成处于平衡) 如成人
- 正氮平衡：摄入氮>排出氮
(蛋白质合成量多于分解量) 如儿童、孕妇
- 负氮平衡：摄入氮<排出氮
(蛋白质分解量多于合成量) 如饥饿、消耗性疾病

2. 蛋白质的需要量

成人每日最低需要量: 30~50g/d

我国营养学会推荐的成人每日需要量: 80g/d

三、蛋白质的营养价值

蛋白质的营养价值取决于其含必需氨基酸数量及种类的多少

- ✓ 必需氨基酸
- ✓ 半必需氨基酸
- ✓ 非必需氨基酸

蛋白质营养价值的化学评分 (了解)

将其氨基酸组成与标准蛋白(鸡蛋或牛奶蛋白)或 FAO(世界粮农组织营养委员会)模型进行比较

- 蛋白质的生理价值(BV)

指食物蛋白的利用率

$$BV = \frac{\text{氮的保留量}}{\text{氮的吸收量}} \times 100\%$$

- 蛋白质的互补作用

指营养价值较低的蛋白质混合食用，必需氨基酸互相补充从而提高营养价值

第二节 蛋白质的消化、吸收与腐败

一、蛋白质的消化

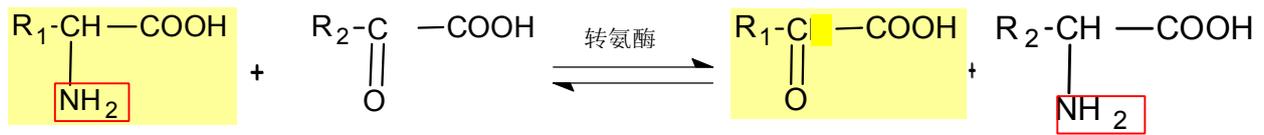
1. 主要的酶类

据水解肽键部位的不同分为两类:

- 内肽酶: 胃蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶(水解蛋白质内部肽键)
- 外肽酶: 氨基肽酶、羧基肽酶(从肽键两端开始水解)

- b. 为变构酶，受 ATP、ADP 等调节，辅酶为 NAD⁺或 NADP⁺
- c. 专一性强，只作用于谷氨酸，催化的反应可逆

2. 转氨基作用



(1) 转氨酶（其辅酶为磷酸吡哆醛）

☞ 丙氨酸氨基转移酶（ALT）又称谷丙转氨酶（GPT）

临床意义：急性肝炎患者血清 ALT 升高

☞ 天冬氨酸氨基转移酶（AST）又称谷草转氨酶(GOT)

临床意义：心肌梗患者血清 AST 升高

转氨基作用

特点：

只有氨基的转移，没有氨的生成

- * 催化的反应可逆
- * 其辅酶都是磷酸吡哆醛

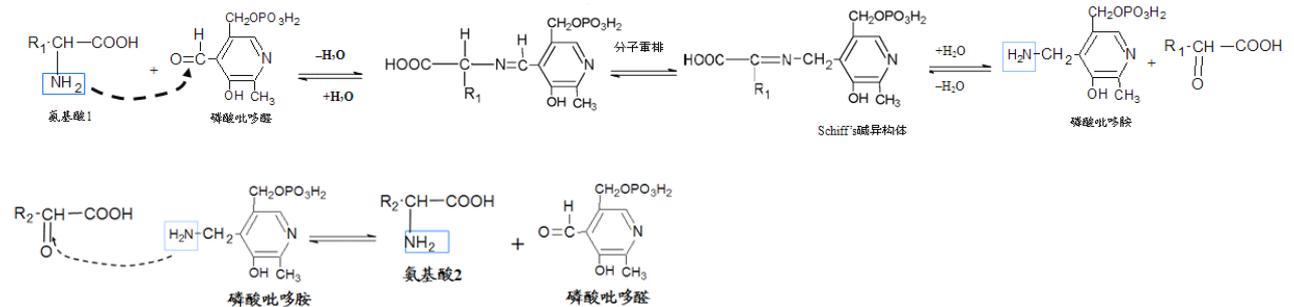
生理意义：

是体内合成非必需氨基酸的重要途径

接受氨基的主要酮酸有：

- *丙酮酸 *α-酮戊二酸 *草酰乙酸

(2) 转氨基作用机制



3. 联合脱氨基作用

(1) 转氨基作用和谷氨酸氧化脱氨基作用的联合

特点：有氨生成，反应过程可逆

生理意义：

- *体内合成非必需氨基酸的主要途径
- * 肝、肾等组织主要脱氨途径

(2) 嘌呤核苷酸循环脱氨反应（了解）

骨骼肌和心肌组织主要由该途径脱氨

二、氨的代谢

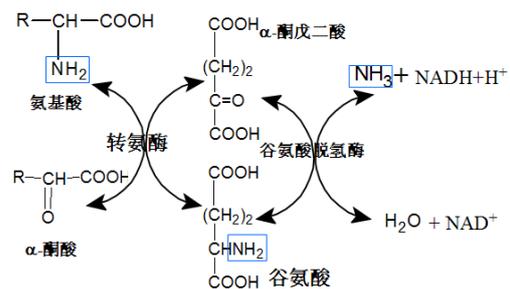
(一) 血氨的来源及去路

*来源：•氨基酸脱氨

- 从肠道吸收的氨
- 肾脏产生的氨
- 胺的氧化

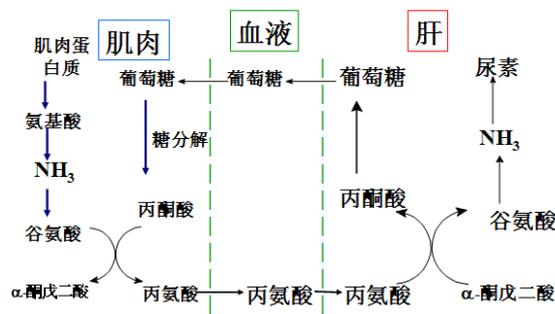
*去路：•合成尿素排出

- 与谷氨酸合成谷氨酰胺
- 合成非必需氨基酸及含氮物
- 经肾脏以铵盐形式排出

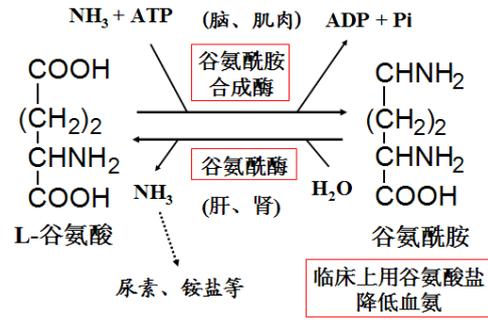


(二) 氨的转运

1. 丙氨酸-葡萄糖循环



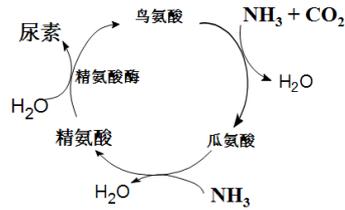
2. 谷氨酰胺的运氨作用



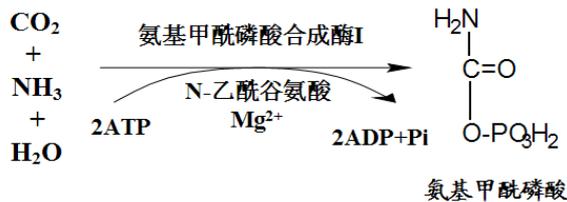
二、氨的代谢

(三) 尿素的生成

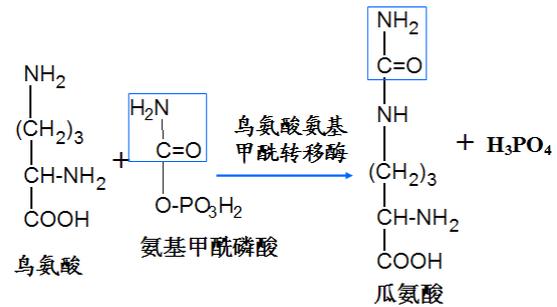
- 尿素生成的主要器官：肝脏
- 尿素生成的鸟氨酸循环
- 2 分子氨与 1 分子 CO₂ 结合生成 1 分子尿素及 1 分子水
- 尿素合成的详细步骤



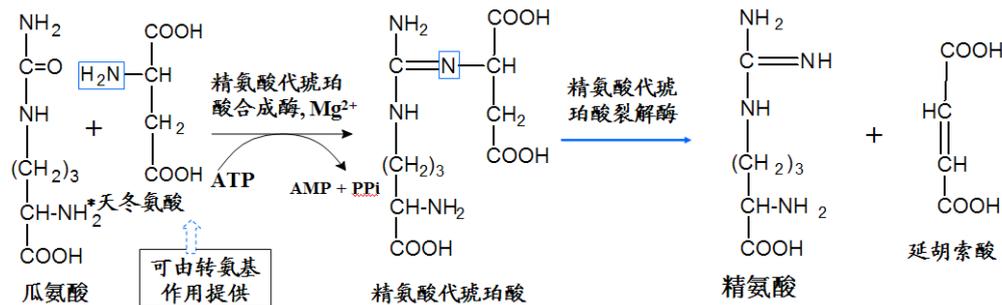
1. 氨基甲酰磷酸的合成 (反应部位：线粒体)



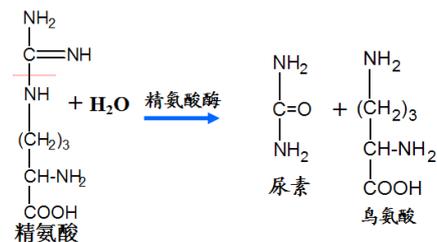
2. 瓜氨酸的合成 (反应部位：线粒体)



3. 精氨酸的合成 (反应部位：胞液)



4. 精氨酸水解为尿素



- ◆ 主要器官：肝脏
- ◆ 原料：合成 1 分子尿素需
 - CO₂
 - 2NH₃ (其中 1 分子来自于天冬氨酸*)

c. 4ATP

◆ 总反应方程式



◆ 生理意义

是体内氨的主要去路，解氨毒的重要途径。

(四) 高血氨症与肝昏迷

* 血氨正常参考值：5.54~65μmol/L

*引起高血氨症主要原因：肝功能严重损伤，尿素合成障碍

*机制：脑中氨升高，消耗α-酮戊二酸（转变为谷氨酸），使三羧酸循环减弱，ATP合成减少，引起大脑功能障碍，严重时昏迷。

*降低血氨的措施：限制蛋白进食量 给予谷氨酸使其与氨结合为谷氨酰胺

三、α-酮酸的代谢

- 经三羧酸循环氧化供能
- 由转氨基作用合成非必需氨基酸
- 转变为糖类或脂类

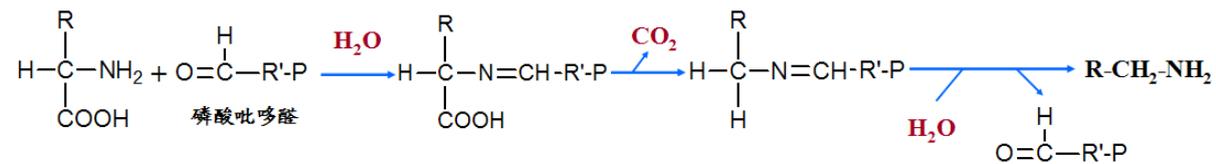
生酮氨基酸：亮氨酸、赖氨酸

生糖氨基酸：甘、丝、丙……等多种氨基酸

生酮兼生糖氨基酸：异亮、苯丙、酪、苏、色

四、氨基酸的脱羧基作用

氨基酸在氨基酸脱羧酶（辅酶为磷酸吡哆醛）作用下脱羧基生成相应的胺。



1. γ-氨基丁酸（GABA）

功能：为一种抑制性神经递质，对中枢神经系统有抑制作用。

2. 组胺

功能：*扩张血管、降低血压 *刺激胃酸分泌

3. 5-羟色胺（5-HT）

功能：*脑中的5-HT是一种抑制性神经递质
*外周组织的5-HT有收缩血管的作用

4. 牛磺酸

功能：结合胆汁酸的重要组成成分

5. 多胺

*腐胺 *精脍（亚精胺） *精胺

定义：分子中含有2个以上氨基的胺类物质

功能：调节细胞增长，促进细胞增殖。

血尿中多胺的水平可作为癌瘤病的辅助诊断及观察病情变化的指标

第四节 个别氨基酸的代谢

1. 一碳单位

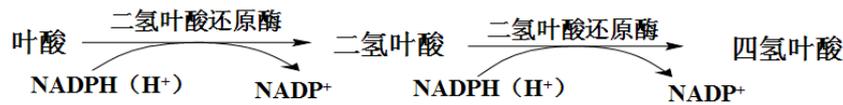
定义：氨基酸在分解过程中产生的含一个碳原子的基团。

- 种类：
- * 甲基（-CH₃）
 - * 亚甲基（-CH₂- 亚甲基）
 - * 次甲基（=CH- 亚甲基）
 - * 甲酰基（-CHO）
 - * 亚氨甲基（-CH=NH）

特点：不能游离存在，以四氢叶酸为载体参与反应。

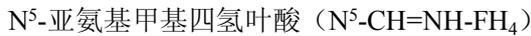
一、一碳单位的代谢

2. 一碳单位的载体（四氢叶酸, FH₄）

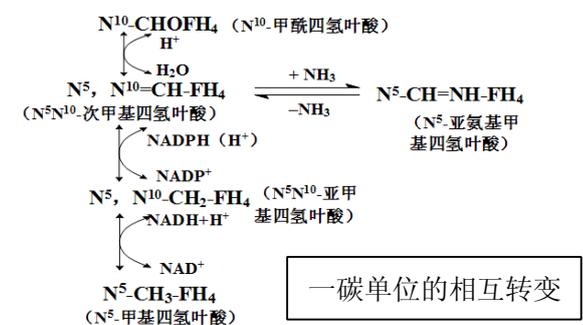
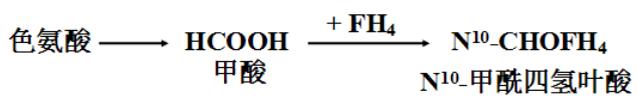
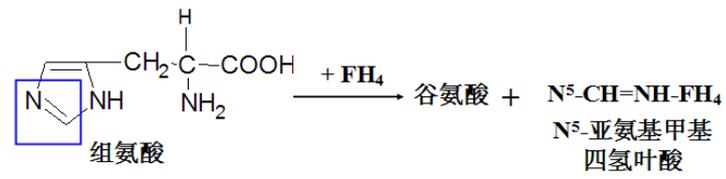
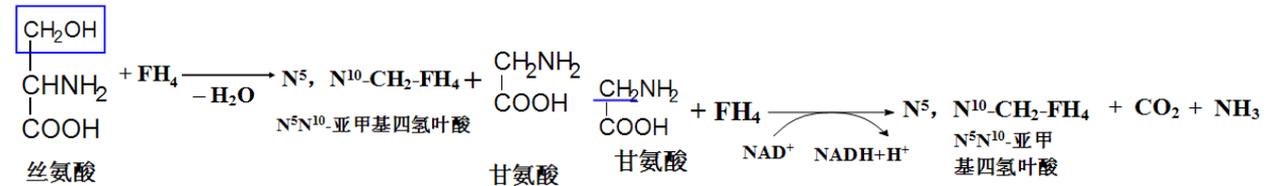


2. 一碳单位的载体（四氢叶酸）

一碳单位与四氢叶酸的结合形式：



3. 一碳单位的产生



4. 一碳单位的相互转变

5. 一碳单位的生理功用

- 参与嘌呤、嘧啶及蛋氨酸等的合成--将氨基酸与核苷酸代谢密切相连。
- 参与许多物质的甲基化过程。
- 一碳单位代谢障碍会影响 DNA、蛋白质的合成，引起巨幼红细胞性贫血。
- 磺胺类药及氨甲喋呤等是通过影响一碳

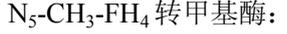
单位代谢及核苷酸合成而发挥药理作用。

二、含硫氨基酸的代谢

1. 蛋氨酸的代谢

(1) 蛋氨酸与转甲基作用

(2) 蛋氨酸循环



辅酶为维生素 B₁₂，当维生素 B₁₂ 缺乏时，影响四氢叶酸的再生，一碳单位转运受阻，导致核酸合成障碍，可产生巨幼红细胞性贫血。

蛋氨酸循环的生理意义：

- 使 N₅-CH₂FH₄ 释出 -CH₃ 重新变成游离的 FH₄，继续运载一碳单位。
- 减少蛋氨酸的净消耗，重复利用以满足机体对甲基化的供体的需要。

(3) 肌酸的合成

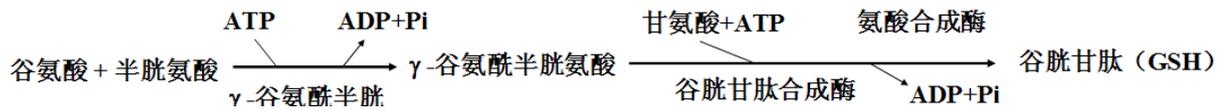
2. 半胱氨酸与胱氨酸的代谢

(1) 半胱氨酸与胱氨酸的互变

(2) 硫酸根的代谢

一些转化反应中的硫酸根主要来自半胱氨酸的氧化。

(3) 谷胱甘肽的生成和生理功用



谷胱甘肽的生理功用：

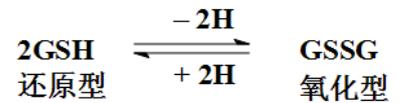
* 作为抗氧化剂，维持酶-SH 的还原性和膜的完整性



* $2\text{GSH} + 2\text{Hb-Fe}^{3+} \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{Hb-Fe}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$

* 参与生物转化

* 参与氨基酸转运



三、苯丙氨酸和酪氨酸的代谢

1、苯丙氨酸的代谢

(1) 苯丙氨酸的氧化

(2) 苯丙酮酸尿症

第九章 核苷酸代谢 Metabolism of nucleotide

- 核苷酸(nucleotide)是构成核酸(nucleic acid)的基本单位，人体所需的核苷酸都是由机体自身合成的。
- 食物中的核酸或核苷酸类物质基本上不能被人体所利用。
- 食物中的核酸通常以核蛋白的形式存在。核蛋白在胃中受胃酸作用，分解为核酸和蛋白质。
- 核酸在小肠由胰核酸酶催化，水解产生单核苷酸；后者核苷酸酶的催化下，进一步水解产生磷酸和核苷。
- 核苷在核苷酶的催化下，最后水解产生戊糖和含氮碱。这些水解产物中，只有磷酸和戊糖可被吸收利用。

核苷酸类物质的生理功用

- ① 作为合成核酸的原料
- ② 作为能量的贮存和供应形式：ATP、GTP 等。
- ③ 参与代谢或生理活动的调节：如环核苷酸 cAMP 和 cGMP 作为激素的第二信使。
- ④ 参与构成酶的辅酶或辅基：如在 NAD⁺，NADP⁺，FAD，FMN，CoA 中均含有核苷酸的成分。
- ⑤ 作为代谢中间物的载体：如用 UDP 携带糖基，用 CDP 携带胆碱，胆胺或甘油二酯，用腺苷携带蛋氨酸(SAM) 等。

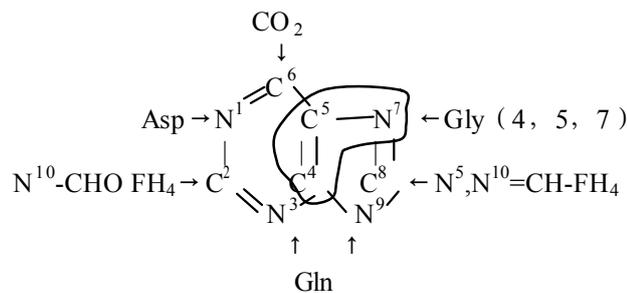
第一节 嘌呤核苷酸的代谢

一、嘌呤核苷酸的合成代谢

(一) 从头合成途径：

1. 概念：

通过利用一些简单的前体物，如 5-磷酸核糖，氨基酸，一碳单位及 CO₂ 等，逐步合成嘌呤核苷酸的过程称为从头合成途径(de novo synthesis)。这一途径主要见于肝脏，其次为小肠和胸腺。



2. 合成步骤：

可分为三个阶段：

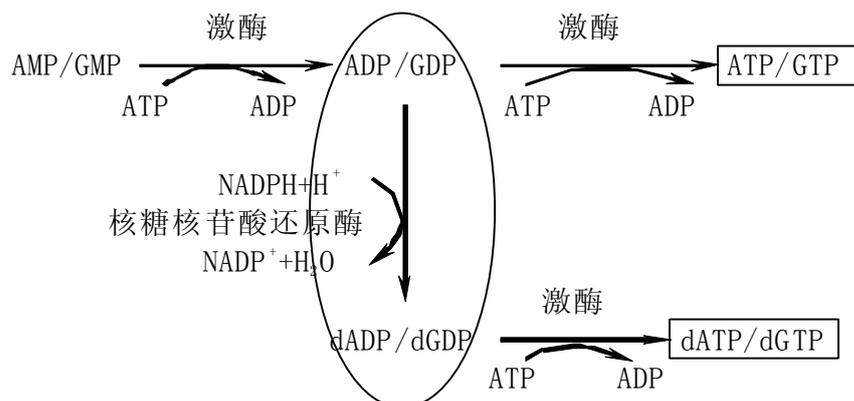
(1) 次黄嘌呤核苷酸的合成：

首先在磷酸核糖焦磷酸合成酶的催化下，消耗 ATP，由 5'-磷酸核糖合成 PRPP(1'-焦磷酸-5'-磷酸核糖)。然后再经过大约 10 步反应，合成第一个嘌呤核苷酸——次黄苷酸 (IMP)。

(2) 腺苷酸及鸟苷酸的合成：

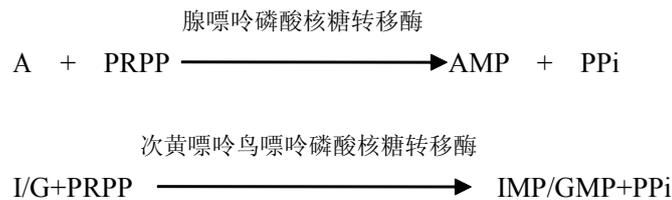
IMP 在腺苷酸琥珀酸合成酶的催化下，由天冬氨酸提供氨基合成腺苷酸琥珀酸 (AMP-S)，然后裂解产生 AMP；IMP 也可在 IMP 脱氢酶的催化下，以 NAD⁺为受氢体，脱氢氧化为黄苷酸 (XMP)，后者再在鸟苷酸合成酶催化下，由谷氨酰胺提供氨基合成鸟苷酸 (GMP)。

(3) 三磷酸嘌呤核苷的合成：



(二) 补救合成途径:

又称再利用合成途径(salvage pathway)。指利用分解代谢产生的自由嘌呤碱合成嘌呤核苷酸的过程。这一途径可在大多数组织细胞中进行。其反应为:

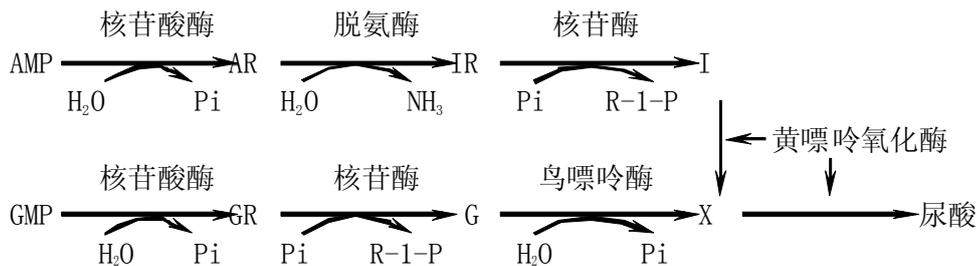


(三) 抗代谢药物对嘌呤核苷酸合成的抑制:

- ⌘ 能够抑制嘌呤核苷酸合成的一些抗代谢药物，通常是属于嘌呤、氨基酸或叶酸的类似物，主要通过其对代谢酶的竞争性抑制作用，来干扰或抑制嘌呤核苷酸的合成，因而具有抗肿瘤治疗作用。
- ⌘ 在临床上应用较多的嘌呤核苷酸类似物主要是 6-巯基嘌呤 (6-MP)。6-MP 的化学结构与次黄嘌呤类似，因而可以抑制 IMP 转变为 AMP 或 GMP，从而干扰嘌呤核苷酸的合成。

二、嘌呤核苷酸的分解代谢

- ☞ 首先是在核苷酸酶的催化下，脱去磷酸生成嘌呤核苷，然后再在核苷酶的催化下分解生成嘌呤碱，最后经氧化生成尿酸(uric acid)，经尿液排出体外。
- ☞ 尿酸是嘌呤核苷酸在人体内分解代谢的终产物。但在鸟类，尿酸则可继续分解产生尿囊素。
- ☞ 痛风症患者由于体内嘌呤核苷酸分解代谢异常，可致血中尿酸水平升高，以尿酸钠晶体沉积于软骨、关节、软组织及肾脏，临床上表现为皮下结节，关节疼痛等。



第二节 嘧啶核苷酸的代谢

一、嘧啶核苷酸的合成代谢

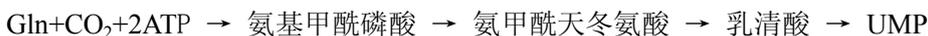
(一) 从头合成途径:

从头合成途径 (de novo synthesis)是指利用一些简单的前体物逐步合成嘧啶核苷酸的过程。该过程主要在肝脏的胞液中进行。

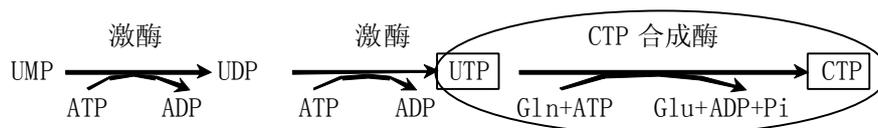
嘧啶核苷酸的主要合成步骤为:

1. 尿苷酸 (uridine monophosphate)的合成:

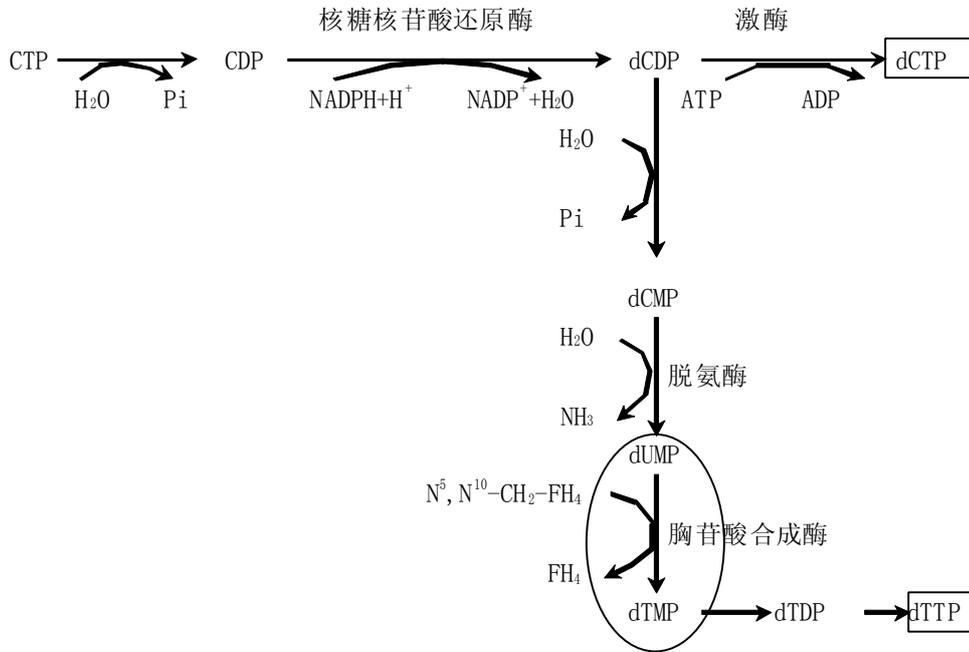
在氨基甲酰磷酸合成酶 II 的催化下，以 Gln, CO₂, ATP 为原料合成氨基甲酰磷酸。后者在天冬氨酸转氨甲酰酶的催化下，转移一分子天冬氨酸，从而合成氨甲酰天冬氨酸，然后再经脱氢、脱羧、环化等反应，合成第一个嘧啶核苷酸，即 UMP。



2. 胞苷酸的合成:



3. 脱氧嘧啶核苷酸的合成:



(二) 补救合成途径:

由分解代谢产生的嘧啶/嘧啶核苷转变为嘧啶核苷酸的过程称为补救合成途径(salvage pathway)。以嘧啶核苷的补救合成途径较重要。



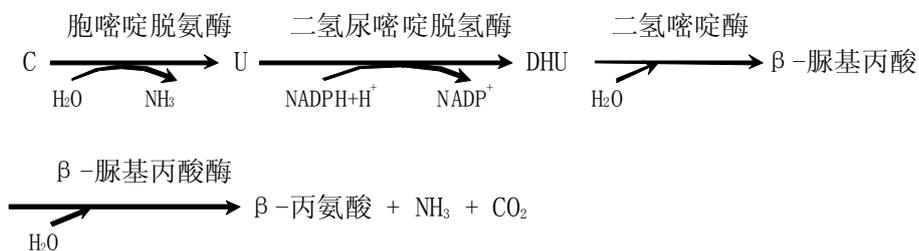
(三) 抗代谢药物对嘧啶核苷酸合成的抑制:

- 能够抑制嘧啶核苷酸合成的抗代谢药物也是一些嘧啶核苷酸的类似物，通过对酶的竞争性抑制而干扰或抑制嘧啶核苷酸的合成。
- 主要的抗代谢药物是 5-氟尿嘧啶 (5-FU)。5-FU 在体内可转变为 F-dUMP，其结构与 dUMP 相似，可竞争性抑制胸苷酸合成酶的活性，从而抑制胸苷酸的合成。

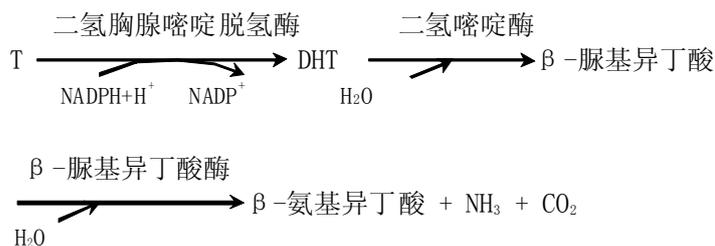
二、嘧啶核苷酸的分解代谢

嘧啶核苷酸可首先在核苷酸酶和核苷磷酸化酶的催化下，除去磷酸和核糖，产生的嘧啶碱可在体内进一步分解代谢。不同的嘧啶碱其分解代谢的产物不同，其降解过程主要在肝脏进行。

(一) 胞嘧啶和尿嘧啶的降解:

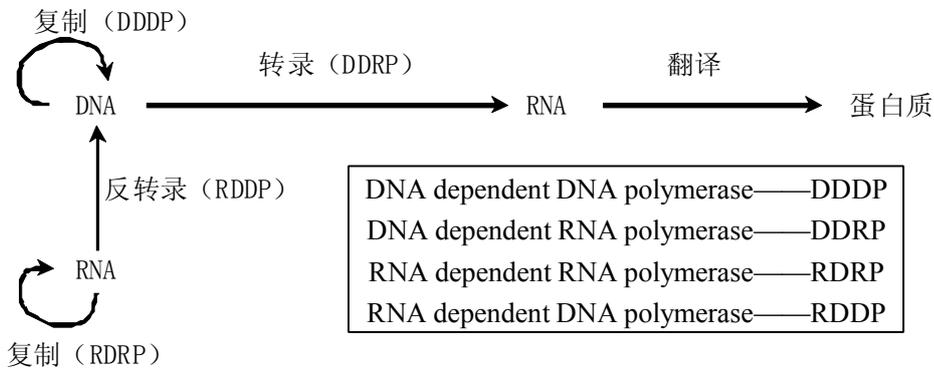


(二) 胸腺嘧啶的降解:



第十章 DNA 的生物合成 Biosynthesis of DNA

- DNA 通过复制将遗传信息由亲代传递给子代；通过转录和翻译，将遗传信息传递给蛋白质分子，从而决定生物的表现型。DNA 的复制、转录和翻译过程就构成了遗传学的中心法则。
- 在 RNA 病毒中，其遗传信息贮存在 RNA 分子中。因此，在这些生物体中，遗传信息的流向是 RNA 通过复制，将遗传信息由亲代传递给子代，通过反转录将遗传信息传递给 DNA，再由 DNA 通过转录和翻译传递给蛋白质，这种遗传信息的流向就称为反中心法则。



第一节 DNA 复制的特点

一、半保留复制

DNA 在复制时，以亲代 DNA 的每一股作模板，合成完全相同的两个双链子代 DNA，每个子代 DNA 中都含有一股亲代 DNA 链，这种现象称为 DNA 的半保留复制。(semi-conservative replication)

1958 年由 M. Meselson 和 F. Stahl 所完成的实验所证明。该实验首先将大肠杆菌在含 ^{15}N 的培养基中培养约十五代，使其 DNA 中的碱基氮均转变为 ^{15}N 。将大肠杆菌移至只含 ^{14}N 的培养基中同步培养一代、二代、三代。分别提取 DNA，作密度梯度离心，可得到下列结果：(略)

DNA 的半保留复制的生物学意义

DNA 的半保留复制表明 DNA 在代谢上的稳定性，保证亲代的遗传信息稳定地传递给后代。

二、复制起始点

DNA 在复制时，需在特定的位点起始，这是一些具有特定核苷酸排列顺序的片段，即复制起始点(origin of replication)；

在原核生物中，复制起始点通常为一个，而在真核生物中则为多个。

三、需要引物

- 参与 DNA 复制的 DNA 聚合酶，必须以一段具有 3'端自由羟基(3'-OH)的 RNA 作为引物(primer)，才能开始聚合子代 DNA 链。
- RNA 引物的大小，在原核生物中通常为 50~100 个核苷酸，而在真核生物中约为 10 个核苷酸。RNA 引物的碱基顺序，与其模板 DNA 的碱基顺序相配对。

四、双向复制

DNA 复制时，以复制起始点为中心，向两个方向进行复制。但在低等生物中，也可进行单向复制(如滚环复制)。

五、半不连续复制

- 由于 DNA 聚合酶只能以 5' → 3' 方向聚合子代 DNA 链，即模板 DNA 链的方向必须为 3' → 5'。因此，分别以两条亲代 DNA 链作为模板聚合子代 DNA 链时的方式是不同的。
- 以 3' → 5'方向的亲代 DNA 链作模板的子代链在复制时基本上是连续进行的，其子代链的聚合方向为 5' → 3'，这一条链被称为领头链(leading strand)。而以 5' → 3'方向的亲代 DNA 链为模板的子代链在复制时则是不连续的，其链的聚合方向也是 5' → 3'，这条链被称为随从链(lagging strand)。
- 由于亲代 DNA 双链在复制时是逐步解开的，因此，随从链的合成也是一段一段的。DNA 在复制时，由随从链所形成的一些子代 DNA 短链称为冈崎片段(Okazaki fragment)。
- 冈崎片段的大小，在原核生物中约为 1000~2000 个核苷酸，而在真核生物中约为 100 个核苷酸。

第二节 DNA 复制的条件

一、底物

以四种脱氧核糖核酸(deoxynucleotide triphosphate)为底物，即 dATP, dGTP, dCTP, dTTP。



二、模板(template)

DNA 复制是模板依赖性的，必须要以亲代 DNA 链作为模板。亲代 DNA 的两股链解开后，可分别作为模板进行复制。

三、引发体和 RNA 引物

- 引发体(primosome)由引发前体与引物酶 (primase) 组装而成。
- 引发前体是由若干蛋白因子聚合而成的复合体。在原核生物中，引发前体至少由六种蛋白因子构成。蛋白 i、蛋白 n、蛋白 n`、蛋白 dnaC 与引物预合成有关，蛋白 n`与蛋白 dnaB 与识别复制起始点有关，并具有 ATPase 活性。
- 引物酶本质上是一种依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 (DDRP)，该酶以 DNA 为模板，聚合一段 RNA 短链引物(primer)，以提供自由的 3'-OH，使子代 DNA 链能够开始聚合。

四、DNA 聚合酶 (DDDP)

(一) 种类和生理功能:

在原核生物中，目前发现的 DNA 聚合酶有三种，分别命名为 DNA 聚合酶 I (pol I)，DNA 聚合酶 II (pol II)，DNA 聚合酶 III (pol III)，这三种酶都属于具有多种酶活性的多功能酶。参与 DNA 复制的主要是 pol III 和 pol I。

- A. pol I 为单一肽链的大分子蛋白质,可被特异的蛋白酶水解为两个片段,其中的大片段称为 Klenow fragment，具有 5'→3'聚合酶活性和 3'→5'外切酶的活性。
- B. pol III 由十种亚基组成，其中 α 亚基具有 5'→3'聚合 DNA 的酶活性，因而具有复制 DNA 的功能；而 ε (epsilon)亚基具有 3'→5'外切酶的活性，因而与 DNA 复制的校正功能有关。
- C. DNA 聚合酶 II：多亚基酶，聚合作用，但聚合活力很低；具有 3'→5'外切酶活性。其它生理功能尚不清楚，可能在修复紫外光引起的 DNA 损伤中起作用。
- D. DNA 聚合酶 IV 和 V：1999 年发现，当 DNA 严重损伤时，诱导产生。

原核生物中的三种 DNA 聚合酶

| | DNA 聚合酶 I | DNA 聚合酶 II | DNA 聚合酶 III |
|------------------------------|---|-----------------|---|
| 亚基数目 | 1 (单体酶) > | 1 (多亚基酶) > | 1 (多亚基酶) |
| 5'→3'聚合活性 | + 中 | + 很低 | + 很高 |
| 3'→5'外切活性 | + | + | + |
| 5'→3'外切活性 (保护 DNA 复制的忠实性) | + | - | - |
| | 主要是对 DNA 损伤的修复；以及在 DNA 复制时切除 RNA 引物并填补其留下的空隙。 | 修复紫外光引起的 DNA 损伤 | DNA 复制的主要聚合酶，还具有 3'-5' 外切酶的校对功能，提高 DNA 复制的保真性 |

- 在真核生物中，目前发现的 DNA 聚合酶有五种，分别命名为 DNA 聚合酶 α (pol α)，DNA 聚合酶 β (pol β)，DNA 聚合酶 γ (pol γ)，DNA 聚合酶 δ --delta (pol δ)，DNA 聚合酶 ε (pol ε -epsilon)。
- 其中，参与染色体 DNA 复制的是 pol α (延长随从链)和 pol δ (延长领头链)，参与线粒体 DNA 复制的是 pol γ，pol ε 与 DNA 损伤修复、校读和填补缺口有关，pol β 只在其他聚合酶无活性时才发挥作用。

(二) DNA 复制的保真性:

为了保证遗传的稳定，DNA 的复制必须具有高保真性。DNA 复制时的保真性主要与下列因素有关:

1. 遵守严格的碱基配对规律；
2. DNA 聚合酶对碱基的正确选择；
3. 对复制过程中出现的错误及时校正。

五、DNA 连接酶(DNA ligase)

- 若双链 DNA 中一条链有切口，一端是 3'-OH，另一端是 5'-磷酸基，连接酶可催化这两端形成磷酸二酯键，而使切口连接。
- 不能将两条游离的 DNA 单链连接起来。
- 大肠杆菌和其它细菌的 DNA 连接酶要求 NAD⁺提供能量，在高等生物和噬菌体中，则要求 ATP 提供能量。T4 噬菌体的 DNA 连接酶不仅能在模板链上连接 DNA 和 DNA 链之间的切口，而且能连接无单链粘性末端的平头双链 DNA。
- 连接酶的反应机制：
酶 + NAD⁺(ATP) \rightleftharpoons 酶-AMP + 烟酰胺单核苷酸 (PPi)
酶-AMP + P-5'-DNA \rightleftharpoons 酶 + AMP-P-5'-DNA
DNA-3'-OH + AMP-P-5'-DNA \rightleftharpoons DNA-3'-O-P-5'-DNA + AMP
- DNA 连接酶在 DNA 复制、损伤修复、重组等过程中起重要作用

六、单链 DNA 结合蛋白

单链 DNA 结合蛋白 (single strand binding protein, *SSB*) 又称螺旋反稳蛋白 (HDP)。这是一些能够与单链 DNA 结合的蛋白质因子。其作用为：① 使解开双螺旋后的 DNA 单链能够稳定存在，即稳定单链 DNA，便于以其为模板复制子代 DNA；② 保护单链 DNA，避免核酸酶的降解。

七、解螺旋酶

解螺旋酶 (unwinding enzyme)，又称解链酶或 rep 蛋白，是用于解开 DNA 双链的酶蛋白，每解开一对碱基，需消耗两分子 ATP。目前发现存在至少存在两种解螺旋酶。

八、拓扑异构酶 (topoisomerase)

- * 拓扑异构酶 I 可使 DNA 双链中的一条链切断，作用是松解负超螺旋，松开双螺旋后再将 DNA 链连接起来，从而避免出现链的缠绕。
- * 拓扑异构酶 II 可切断 DNA 双链，使 DNA 的超螺旋松解后，再将其连接起来。

拓扑异构酶作用特点：既能水解、又能连接磷酸二酯键

第三节 DNA 生物合成过程

一、复制的起始

DNA 复制的起始阶段，由下列两步构成。

(一) 预引发：

1. 解旋酶解链，形成复制叉：

- 由拓扑异构酶和解链酶作用，使 DNA 的超螺旋及双螺旋结构解开，碱基间氢键断裂，形成两条单链 DNA。单链 DNA 结合蛋白 (SSB) 结合在两条单链 DNA 上，形成复制叉。
- DNA 复制时，局部双螺旋解开形成两条单链，这种叉状结构称为复制叉。
- 复制眼

2. 引发体组装：

- 由蛋白因子 (如 dnaB 等) 识别复制起始点，并与其他蛋白因子以及引物酶一起组装形成引发体。

(二) 引发：

- 在引物酶的催化下，以 DNA 为模板，合成一段短的 RNA 片段，从而获得 3'端自由羟基 (3'-OH)。

二、复制的延长

(一) 聚合子代 DNA：

- 由 DNA 聚合酶催化，以 3'→5'方向的亲代 DNA 链为模板，从 5'→3'方向聚合子代 DNA 链。在原核生物中，参与 DNA 复制延长的是 DNA 聚合酶 III；而在真核生物中，是 DNA 聚合酶 α (延长随从链) 和 δ (延长领头链)。

(二) 引发体移动：

- 引发体向前移动，解开新的局部双螺旋，形成新的复制叉，随从链重新合成 RNA 引物，继续进行链的延长。

三、复制的终止

(一) 去除引物，填补缺口：

- 在原核生物中，由 DNA 聚合酶 I 来水解去除 RNA 引物，并由该酶催化延长引物缺口处的 DNA，直到剩下最后一个磷酸酯键的缺口。而在真核生物中，RNA 引物的去除，由一种特殊的核酸酶来

水解，而冈崎片段仍由 DNA 聚合酶来延长。

(二) 连接冈崎片段：

在 DNA 连接酶的催化下，形成最后一个磷酸酯键，将冈崎片段连接起来，形成完整的 DNA 长链。

四、真核生物 DNA 的复制合成

真核 DNA 的合成的基本过程类似于原核 DNA，不同之处：

- 多复制起点
- 至少有五种聚合酶 α β γ δ ϵ
- 端粒的复制依赖于端粒酶

真核生物端粒的形成：

- 端粒 (telomere) 是指真核生物染色体线性 DNA 分子末端的结构部分，通常膨大成粒状。其共同的结构特征是由一些富含 G、C 的短重复序列构成，可重复数十次至数百次。
- 线性 DNA 在复制完成后，其末端由于引物 RNA 的水解而可能出现缩短。故需要在端粒酶 (telomerase) 的催化下，进行延长反应。
- 端粒酶是一种 RNA-蛋白质复合体，它可以其 RNA 为模板，通过逆转录过程对末端 DNA 链进行延长。

五、逆转录作用— (RNA 指导下的 DNA 合成)

1970 年，Temin 和 Baltimore 在致癌 RNA 病毒中发现了逆转录酶 (Reverse Transcriptase)，具有 DNA 聚合酶特性：需引物、dNTP、模板 (RNA、DNA)、5'-3' 方向聚合

◇ 交分子 H 键断开

核糖核酸酶 H 的活性，专一水解 RNA-DNA 杂交分子中的 RNA，可沿 5'3→'和 3' 5→'两个方向起核酸外切酶的作用。

◇ 病毒 DNA

合成的 DNA 链称负链，然后由依赖 DNA 的 DNA 聚合酶催化下，以负链为模板合成一正链这样形成的 DNA 称前病毒 DNA，前病毒 DNA 可嵌入宿主细胞 DNA 中(称整合)或潜伏于宿主细胞用其负链(依赖 DNA 的 RNA 聚合酶)合成 RNA，合成外壳蛋白

第四节 DNA 的损伤与修复

一、DNA 的损伤与突变

损伤可造成突变或致死

突变 (mutation)：指一种遗传状态，可以通过复制而遗传的 DNA 结构的任何永久性改变。携带突变基因的生物称为突变体，未突变的称为野生型。

(一) 引起突变的因素：

1. 自发因素：

- (1) 自发脱碱基：由于 N-糖苷键的自发断裂，引起嘌呤或嘧啶碱基的脱落。每日可达近万个核苷酸残基。
- (2) 自发脱氨基：胞嘧啶自发脱氨基可生成尿嘧啶，腺嘌呤自发脱氨基可生成次黄嘌呤。每日可达几十到几百个核苷酸残基。
- (3) 复制错配：由于复制时碱基配对错误引起的损伤，发生频率较低。

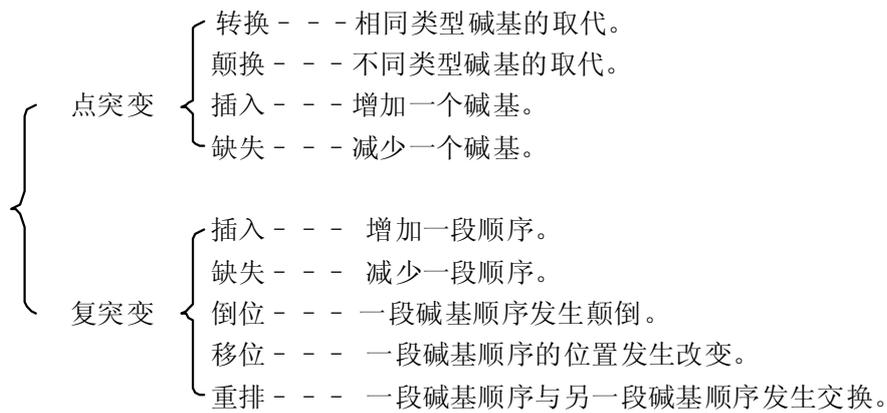
2. 物理因素：

由紫外线、电离辐射、X 射线等引起的 DNA 损伤。其中，X 射线和电离辐射常常引起 DNA 链的断裂，而紫外线常常引起嘧啶二聚体的形成，如 TT, TC, CC 等二聚体。这些嘧啶二聚体由于形成了共价键连接的环丁烷结构，因而会引起复制障碍。

3. 化学因素：

- (1) 脱氨基剂：如亚硝酸与亚硝酸盐，可加速 C 脱氨基生成 U，A 脱氨基生成 I。
- (2) 烷基化剂：这是一类带有活性烷基的化合物，可提供甲基或其他烷基，引起碱基或磷酸基的烷基化，甚至可引起邻近碱基的交联。
- (3) DNA 加合剂：如苯并芘，在体内代谢后生成四羟苯并芘，与嘌呤共价结合引起损伤。
- (4) 碱基类似物：如 5-FU, 6-MP 等，可掺入到 DNA 分子中引起损伤或突变。
- (5) 断链剂：如过氧化物，含巯基化合物等，可引起 DNA 链的断裂。

(二) DNA 突变的类型：

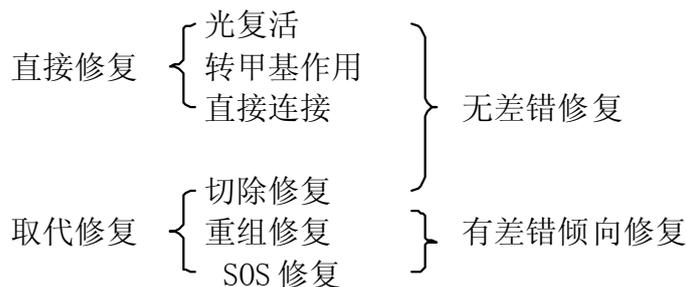


(三) DNA 突变的效应:

1. 同义突变: 基因突变导致 mRNA 密码子第三位碱基的改变但不引起密码子意义的改变, 其翻译产物中的氨基酸残基顺序不变, 但有时可引起翻译效率降低。
2. 误义突变: 基因突变导致 mRNA 密码子碱基被置换, 其意义发生改变, 翻译产物中的氨基酸残基顺序发生改变。
3. 无义突变: 基因突变导致 mRNA 密码子碱基被置换而改变成终止密码子, 引起多肽链合成的终止。
4. 移码突变: 基因突变导致 mRNA 密码子碱基被置换, 引起突变点之后的氨基酸残基顺序全部发生改变。

二、DNA 损伤的修复

- DNA 损伤的修复方式可分为直接修复和取代修复两大类。



(一) 直接修复:

1. 光复活: (light repairing):

- 这是一种广泛存在的修复作用。光复活能够修复任何嘧啶二聚体的损伤。其修复过程为: 光复活酶 (photo-lyase) 识别嘧啶二聚体并与之结合形成复合物 → 在 300~600nm 可见光照射下, 酶获得能量, 将嘧啶二聚体的丁酰环打开, 使之完全修复 → 光复活酶从 DNA 上解离。

2. 转甲基作用:

在转甲基酶的催化下, 将 DNA 上的被修饰的甲基去除。此时, 转甲基酶自身被甲基化而失活。后成为其自身基因和另外一些修复酶基因转录的活化物, 促使她们表达。

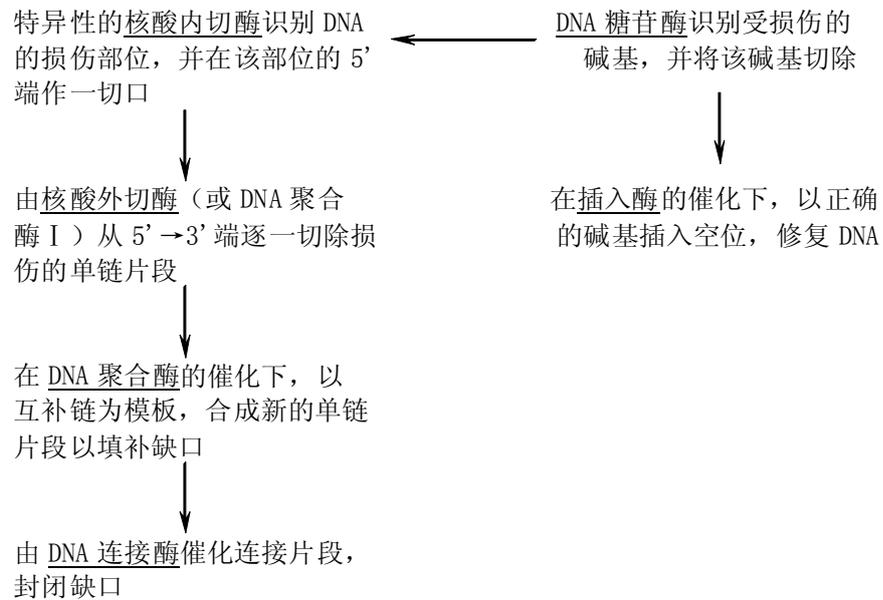
3. 直接连接:

DNA 断裂形成的缺口, 可以在 DNA 连接酶的催化下, 直接进行连接而封闭缺口。

(二) 取代修复:

1. 切除修复(excision repairing):

- 这也是一种广泛存在的修复机制, 可适用于多种 DNA 损伤的修复。该修复机制可以分别由两种不同的酶来发动, 一种是核酸内切酶, 另一种是 DNA 糖苷酶。



2. 重组修复(recombination repairing):

这是 DNA 的复制过程中所采用的一种有差错的修复方式。

- 复制后修复

3. SOS 修复:

- 这是一种在 DNA 分子受到较大范围损伤并且使复制受到抑制时出现的修复机制，以 SOS 借喻细胞处于危急状态。
- DNA 分子受到长片段高密度损伤，使 DNA 复制过程在损伤部位受到抑制。
- 损伤诱导一种特异性较低的新的 DNA 聚合酶，以及重组酶等的产生。
- 由这些特异性较低的酶继续催化损伤部位 DNA 的复制，复制完成后，保留许多错误的碱基，从而造成突变。

定义

- 以 DNA 的一条链为模板在 RNA 聚合酶催化下，按照碱基配对原则，合成一条与 DNA 链的一定区段互补的 RNA 链的过程称为转录。
- 经转录生成的 RNA 有多种，主要的是 rRNA, tRNA, mRNA, snRNA 和 HnRNA。

第一节 RNA 转录合成的特点

一、转录的不对称性

- ◆ 转录(transcription)的不对称性就是指以双链 DNA 中的一条链作为模板进行转录，从而将遗传信息由 DNA 传递给 RNA。
- ◆ 反义链（无意义链，负链）：在 RNA 的转录中，用作模板的 DNA 链称为反义链。
- ◆ 有义链（编码链，正链）：在 RNA 的转录中，不作为模板的 DNA 链称为有义链。

二、转录的连续性

- RNA 转录合成时，以 DNA 作为模板，在 RNA 聚合酶的催化下，连续合成一段 RNA 链，各条 RNA 链之间无需再进行连接。
- 合成的 RNA 中，如只含一个基因的遗传信息，称为单顺反子；如含有几个基因的遗传信息，则称为多顺反子。

三、转录的单向性

- RNA 转录合成时，只能向一个方向进行聚合，所依赖的模板 DNA 链的方向为 3'→5'，而 RNA 链的合成方向为 5'→3'。

四、有特定的起始和终止位点

- ◆ RNA 转录合成时，只能以 DNA 分子中的某一段作为模板，故存在特定的起始位点和特定的终止位点，特定起始点和特定终止点之间的 DNA 链构成一个转录单位，通常由转录区和有关的调节序列构成。

第二节 RNA 转录合成的条件

一、底物

- ✓ 四种核糖核苷酸，即 ATP, GTP, CTP, UTP。

二、模板

- 以一段单链 DNA 作为模板。

三、RNA 聚合酶（RRP）

- ✓ 这是一种不同于引物酶的依赖 DNA 的 RNA 聚合酶。该酶在单链 DNA 模板以及四种核糖核苷酸存在的条件下，不需要引物，即可从 5'→3'聚合 RNA。

（一）大肠杆菌的 RNA 聚合酶

全酶由 5 种亚基 α 2β β' $\omega(\omega)$, $\sigma(\sigma)$ 组成， σ 因子与其它部分的结合不是十分紧密，它易于与 $\beta'\beta\alpha 2$ 分离，没有 σ 、 ω 亚基的酶称为核心酶——只催化链的延长，对起始无作用。

五种亚基的功能分别为：

- α 亚基：与启动子结合功能。
- β 亚基：含催化部位，起催化作用，催化形成磷酸二酯键。
- ω 亚基：在全酶中存在，功能不清楚。
- β' 亚基：与 DNA 模板结合功能。
- σ 亚基：识别起始位点。

（二）真核细胞的 RNA 聚合酶

真核生物中的 RNA 聚合酶可按其对 α -鹅膏蕈(xun)碱敏感性而分为三种，它们均由 10~12 个大小不同的亚基所组成，结构非常复杂，其功能也不同。

真核细胞的 RNA 聚合酶

| 酶类 | 分布 | 产物 | α -鹅膏蕈碱对酶的作用 | 分子量 | 反应条件 |
|-----|----|--------------------------------|---------------------|---------------|--------------------------------|
| | | rRNA | | | |
| I | 核仁 | 5.8SrRNA 18SrRNA 28SrRNA | 不抑制 | 500000~700000 | 低离子强度,要求 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} |
| II | 核质 | mRNA | 低浓度抑制 | ~700000 | 高离子强度 |
| III | 核质 | tRNA 5SrRNA | 高浓度抑制 | - | 高 Mn^{2+} 浓度 |

(三) RNA 聚合酶的特点

- 反应底物：NTP，DNA 为模板、 Mg^{2+} 促进聚合反应。
- RNA 聚合酶不需要引物，合成方向 $5' \rightarrow 3'$ 。
- 真核生物与原核生物的 RNA 聚合酶结构不同。
- 利福平抑制原核生物 RNA 聚合酶活性； α -鹅膏蕈碱抑制真核生物 RNA 聚合酶活性。

四、终止因子

- ◆ ρ 蛋白：这是一种六聚体的蛋白质，亚基的分子量为 50kd。该蛋白因子能识别终止信号，并能与 RNA 紧密结合，导致 RNA 的释放。
- ◆ nusA 蛋白：为一分子量 69kd 的酸性蛋白，它能与 RNA 及 RNA 聚合酶相结合，在终止部位使两者被释放。

五、激活因子

- 目前已知激活因子为降解产物基因激活蛋白 (CAP)，又称为 cAMP 受体蛋白 (CRP)。是一种二聚体蛋白质，亚基分子量为 23kd。该蛋白与 cAMP 结合后，刺激 RNA 聚合酶与起始部位结合，从而起始转录过程。

第三节 RNA 转录合成的基本过程

- 起始位点的识别
- 转录起始
- 链的延伸
- 转录终止

一、识别

- 原核生物 RNA 聚合酶中的 σ 因子识别转录起始点，并促使核心酶结合形成全酶复合物。
- 被辨认的区段就是位于转录起始点-35 区的 TTGACA 序列 (Sextama box)。
- 酶与该区结合后，即滑动至-10 区的 TATAAT 序列 (Pribnow box)，并启动转录。

原核生物中转录起始区的共同序列

- 位于基因上游，与 RNA 聚合酶识别、结合并起始转录有关的一些 DNA 顺序称为启动子 (promoter)。
- 真核生物的转录起始区上游也存在一段富含 TA 的顺序，被称为 Hogness box 或 TATA box。
- 除此之外，在真核生物中还可见到其他带共性的序列，如 CAAT box 及 GC box 等。
- 真核生物的转录起始较为复杂。目前已知 RNA 聚合酶 II 至少有六种不同的蛋白因子参与转录复合体的形成。这些蛋白因子被称为转录因子 (trans-criptional factor, TF)。包括 TF II A, TF II B, TF II D, TF II E, TF II F, TF II-I。

真核生物 RNA 聚合酶 II 转录因子及其功能

| 转录因子 | 功 能 |
|---------|---------------|
| TF II A | 稳定 TF II D 结合 |
| TF II B | 促进 pol II 结合 |
| TF II D | 辨认 TATA 盒 |
| TF II E | ATPase |
| TF II F | 解旋酶 |

二、起始

- ✓ RNA 聚合酶全酶促使局部双链解开，并催化 ATP 或 GTP 与另外一个三磷酸核苷聚合，形成第一个 3',5'-磷酸二酯键。

三、延长

- σ 因子从全酶上脱离，余下的核心酶继续沿 DNA 链移动，按照碱基互补原则，不断聚合 RNA。

四、终止

在 DNA 分子上（基因末端）提供转录停止信号的 DNA 序列称为终止子（terminators），它能使 RNA 聚合酶停止合成 RNA 并释放出 RNA。

➤ 弱终止子：

缺少回文结构 需要 ρ 因子（终止因子，协助 RNA 聚合酶识别终止信号）帮助， ρ 因子能与 RNA 聚合酶结合但不是酶的组分，它的作用是阻止 RNA 聚合酶向前移动，于是转录终止，并释放出已转录完成的 RNA 链。

➤ 强终止子：

有回文结构 不依赖于 ρ 因子。强终止子序列有两个明显的特征：(1)在终止点之前具有一段富含 G-C 的回文区域。(2)富含 G-C 的区域之后是一连串的 dA 碱基序列，它们转录的 RNA 链的末端为一连串 U（连续 6 个）。

- ✓ 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，称为通读（readthrough）
- ✓ 能够引起抗终止作用的蛋白质称为抗终止因子（antitermination factors）

第四节 真核生物 RNA 转录后的加工修饰

一、mRNA 的转录后加工

1. 加帽(adding cap):

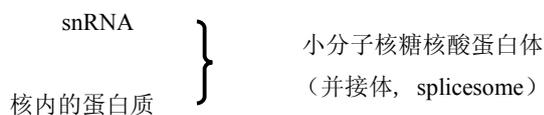
- ✓ 即在 mRNA 的 5'-端加上 m7GTP 的结构。此过程发生在细胞核内，即 hnRNA 即可进行加帽。
- ✓ 加工过程首先是在磷酸酶的作用下，将 5'-端的磷酸基水解，然后再加上鸟苷三磷酸，形成 GpppN 的结构，再对 G 进行甲基化。

2. 加尾(adding tail):

- ✓ 这一过程也是细胞核内完成，首先由核酸外切酶切去 3'-端一些过剩的核苷酸，然后再加入 polyA。polyA 结构与 mRNA 的半寿期有关。

3. 剪接 (splicing):

- ✓ hnRNA 和 snRNA
 - ✓ 核内的初级 mRNA 称为杂化核 RNA (hetero-nuclear RNA, hnRNA)
 - ✓ mRNA 来自 hnRNA（去掉中间片段）
- ✓ snRNA (small nuclear RNA)



mRNA 来自 hnRNA

- 核酸序列分析证明：
 - mRNA 是去掉大部分中间片段的 hnRNA。
- 核酸杂交实验证明：
 - hnRNA 与 DNA 模板链可以完全配对；
 - 而 mRNA 与 DNA 模板链杂交则出现部分配对的局部双链区域和中间相当多的鼓泡状突出的单链区段。
- 因此提出真核生物基因的断裂性的概念。

断裂基因(splite gene)

- 真核生物结构基因，由若干个编码区和非编码区互相间隔开但又连续镶嵌而成，去除非编码区再连接后，可翻译出由连续氨基酸组成的完整蛋白质，这些基因称为断裂基因。

外显子(exon)和内含子(intron)

- 外显子-----在断裂基因及其初级转录产物上出现，并表达为成熟 RNA 的核酸序列。
- 内含子-----隔断基因的线性表达而在剪接过程中被除去的核酸序列。

内含子的分类

- 根据基因的类型和剪接的方式，通常把内含子分为 4 类。
 - I: 主要存在于线粒体、叶绿体及某些低等真核生物的 rRNA 基因；
 - II: 也发现于线粒体、叶绿体，转录产物是 mRNA；
 - III: 是常见的形成套索结构后剪接，大多数 mRNA 基因有此类内含子；
 - IV: 是 tRNA 基因及其初级转录产物中的内含子，剪接过程需酶及 ATP。

mRNA 的剪接

除去 hnRNA 中的内含子，将外显子连接为成熟的 RNA 的过程称为剪接。

- 剪接的模式：
 - 内含子区段弯曲，使相邻的两个外显子互相靠近而利于剪接，称为套索 RNA (lariat RNA)
- 内含子结构特点：
 - 大多数内含子都以 5' -GU...开始，而其末端则为...AG-OH-3'。
 - 5' -GU.....AG-OH-3' 称为剪接接口 (splicing junction) 或边界序列。
 - 剪接后，GU 或 AG 不一定被剪除。

snRNA (small nuclear RNA)

19. 核内小 RNA

1. 由百余个至 300 个核苷酸组成，分子中以 U 含量最丰富，故以 U 作分类命名。现已发现有 snRNA U₁、U₂、U₃、U₄、U₅、U₆ 等类别。

20. 小分子核糖核蛋白体 (small nuclear ribonucleoprotein, snRNP):

1. 由 snRNA 和核内蛋白质组成，作为 RNA 剪接的场所。

21. 剪接体或并接体 (spliceosome):

1. 由 snRNP 与 hnRNA 结合形成套索并拉近上、下游外显子距离的复合体。

剪接过程 (A.Klessig 模式)

(1) 首先 snRNP 与 hnRNA 结合:

- snRNP 上的 U₁-snRNA 和 U₂-snRNA 分别靠碱基互补关系去辨认、结合 hnRNA 上内含子的 5' -GU 和 AG-OH-3' 末端。
- U₄、U₅、U₆ 加入形成完整的剪接体。
- 2 个外显子之间的内含子因为与剪接体的结合而弯曲，使两个末端互相靠近形成套索，上下游的外显子互相靠近，有利于进行转酯反应。
 - 内含子靠近 3' 端有一个甲基化的嘌呤核苷酸：
 - 如 ^{3m}G，是形成套索的关键所在。

(2) mRNA 的剪接过程

f) 除掉内含子、连接外显子:

g) 两次转酯反应 (transesterification)

4. 内部甲基化:

- 由甲基化酶催化，对某些碱基进行甲基化处理。

二、tRNA 的转录后加工

- 原核与真核生物的 tRNA 转录后都需要加工。包括：
 - 由核酸内切酶切除前体上 3' 和 5' 端上多余的核苷酸；
 - 由核酸外切酶逐个在 3' 切去附加序列，进行修剪。
 - 3' 端添加 CCAOH 序列，由核苷酰转移酶催化。(接受活化 AA)
 - 核苷的一些特定的碱基和戊糖进行修饰。

三、rRNA 前体的加工:

原核与真核生物的 rRNA 转录后也都需要进行加工。

原核: 刚转录的 rRNA 为 30S, 先在特定的碱基上进行甲基化 (核糖 2'-羟基) 修饰, 后逐步裂解 (核酸酶

的切割)。

真核：45S（哺乳动物）、38S（果蝇）、37S（酵母）

真核 rRNA 的甲基化程度比原核高（核糖 2'-羟基）

RNA 的复制（噬菌体 Q β 和灰质炎病毒）

➤ 某些 RNA 病毒可以以自身 RNA 为模板进行复制。

➤ 两个阶段

(1) 其单链 RNA 可充当 mRNA，利用寄主中的核糖体合成外壳蛋白和复制酶的 β 亚基。

(2) 复制酶的 β 亚基可与来自寄主细胞的亚基 $\alpha\gamma\delta$ （delt）自动装配成 RNA 复制酶，可进行 RNA 的复制，以分子中单链 RNA 为模板（正链），复制出一条新的 RNA 链（负链），再复制出正链，与外壳蛋白组装成新的噬菌体颗粒。

■ RNA⁻及 RNA⁺的合成方向均为 5' → 3'

第十二章 蛋白质的生物合成 Biosynthesis of Protein

蛋白质的生物合成过程，就是将 DNA 传递给 mRNA 的遗传信息，再具体的解译为蛋白质中氨基酸排列顺序的过程，这一过程被称为翻译(translation)。

第一节 参与蛋白质生物合成的物质

蛋白质合成体系：

- mRNA：作为蛋白质生物合成的模板，决定多肽链中氨基酸的排列顺序；
- tRNA：搬运氨基酸的工具；
- 核糖体：蛋白质生物合成的场所；
- 酶及其他蛋白质因子；
- 供能物质及无机离子。

一、mRNA

- 作为指导蛋白质生物合成的模板。mRNA 中每三个相邻的核苷酸组成三联体，代表一个氨基酸的信息，此三联体就称为密码(coden)。共有 64 种不同的密码。
- 遗传密码具有以下特点：① 连续性；② 简并性；③ 方向性，即解读方向为 5' → 3'；④ 通用性；⑤ 变偶性；⑥ 起始密码：AUG；终止密码：UAA、UAG、UGA。

遗传密码的发现

1961 年，M.Nirenberg 等人提出。 $4^3=64$

- 大肠杆菌中，以多聚 U 做为 mRNA，即 polyU+20 种放射性同位素标记的氨基酸，大肠杆菌合成体系，在外界环境合适下，合成了一条多聚苯丙氨酸 (phe) 肽链。
- UUU 为 phe 的三联体密码。
- 发现具有密码子功能的最短链为三个核苷酸，并且含 3' -OH 和 5' -磷酸基的三核苷酸最有效。
- 阅读方向为 5'-3'。至 1966 年，20 中氨基酸对应的 61 个密码子和三个终止密码子全部被查清。

1、遗传密码的连续性

从正确起点开始至终止信号，密码子的排列是连续的。既不存在间隔（无标点），也无重叠。在 mRNA 分子上插入或删除一个碱基，会使该点以后的读码发生错误，称为移码，由这种情况引起的突变称为移码突变。

2、密码子的简并性

$64-3=61$ 个代表 20 种氨基酸，仅甲硫氨酸、色氨酸只有一个密码子。一个氨基酸可以有几个不同的密码子，编码同一个氨基酸的一组密码子称为同义密码子。这种现象称为密码子的简并性。

3、密码子的方向性

密码子的阅读方向及它们在 mRNA 由起始信号到终止信号的排列方向均为 5'-3'，与 mRNA 链合成时延伸方向相同。

4、密码子的通用性（近于完全通用）

对于高等、低等生物都适用，只有一个例外：真核生物线粒体 DNA。一些原核生物中利用终止密码翻译。

5、密码子的摆动性（变偶性）

如丙氨酸：GCU, GCC, GCA, GCG，只第三位不同，显然密码子的专一性基本取决于前两位碱基，第三位碱基有较大灵活性。发现 tRNA 上的反密码子与 mRNA 上的密码子配对时，密码子的第一位、第二位碱基配对是严格的，第三位碱基可以有一定变动，这种现象称为密码的摆动性或变偶性 (wobble)。I→A、U、C 配对。

6、起始密码子和终止密码子

64 种密码子中，AUG 为甲硫氨酸的密码子，又是肽链合成的起始密码子，UAA, UAG, UGA 为终止密码子，不编码任何氨基酸，而成为肽链合成的终止部位（无义密码子）。

二、tRNA

- 在氨基酸 tRNA 合成酶催化下，特定的 tRNA 可与相应的氨基酸结合，生成氨基酸 tRNA，从而携带氨基酸参与蛋白质的生物合成。
- tRNA 反密码环中部的三个核苷酸构成三联体，可以识别 mRNA 上相应的密码，此三联体就称为反密码(anticoden)。

- 反密码对密码的识别，通常也是根据碱基互补原则，即 A—U，G—C 配对。但反密码的第一个核苷酸与密码第三核苷酸之间的配对，并不严格遵循碱基互补原则。如反密码第一个核苷酸为 I，则可与 A、U 或 C 配对，如为 U，则可与 A 或 G 配对，这种配对称为不稳定配对。
- 能够识别 mRNA 中 5' 端起动密码 AUG 的 tRNA 是一种特殊的 tRNA，称为起动 tRNA。在原核生物中，起动 tRNA 是一种携带甲酰蛋氨酸的 tRNA，即 tRNA^{fmet}；而在真核生物中，起动 tRNA 是一种携带蛋氨酸的 tRNA，即 tRNA^{imet}。
- 在原核生物和真核生物中，均存在另一种携带蛋氨酸的 tRNA，识别非起动部位的蛋氨酸密码，AUG。

三、rRNA 和核糖体

- 原核生物中的核糖体大小为 70S，可分为 30S 小亚基和 50S 大亚基。小亚基由 16SrRNA 和 21 种蛋白质构成，大亚基由 5SrRNA，23SRNA 和 35 种蛋白质构成。
- 真核生物中的核糖体大小为 80S，也分为 40S 小亚基和 60S 大亚基。小亚基由 18SrRNA 和 30 多种蛋白质构成，大亚基则由 5S rRNA，28S rRNA 和 50 多种蛋白质构成，在哺乳动物中还含有 5.8 S rRNA。

核糖体的组装

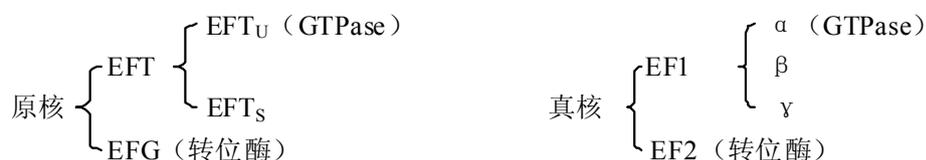
- 大肠杆菌核糖体的空间结构为一椭圆球体，其 30S 亚基呈哑铃状，50S 亚基带有三角，中间凹陷形成空穴，将 30S 小亚基抱住，两亚基的结合面为蛋白质生物合成的场所。
- 核糖体的大、小亚基分别有不同的功能：
 1. 小亚基：可与 mRNA、GTP 和起动 tRNA 结合。
 2. 大亚基：
 - (1) 具有两个不同的 tRNA 结合点。A 位（右）——受位或氨酰基位，可与新进入的氨基酰 tRNA 结合；P 位（左）——给位或肽酰基位，可与延伸中的肽酰基 tRNA 结合。
 - (2) 具有转肽酶活性：将给位上的肽酰基转移给受位上的氨基酰 tRNA，形成肽键。
 - (3) 具有 GTPase 活性，水解 GTP，获得能量。
 - (4) 具有起动因子、延长因子及释放因子的结合部位。
- 在蛋白质生物合成过程中，常常由若干核糖体结合在同一 mRNA 分子上，同时进行翻译，但每两个相邻核蛋白之间存在一定的间隔，形成念珠状结构。
- 由若干核糖体结合在一条 mRNA 上同时进行多肽链的翻译所形成的念珠状结构称为多核糖体。

四、起动因子 (IF)

- 这是一些与多肽链合成起动有关的蛋白因子。原核生物中存在 3 种起动因子，分别称为 IF_{1,3}。在真核生物中存在 9 种起动因子 (eIF)。其作用主要是促进核糖体小亚基与起动 tRNA 及模板 mRNA 结合。

五、延长因子 (EF)

原核生物中存在 3 种延长因子 (EFT_U, EFT_S, EFG)，真核生物中存在 2 种 (EF₁, EF₂)。其作用主要促使氨基酰 tRNA 进入核蛋白的受体，并可促进移位过程。



六、释放因子 (RF)

- 原核生物中有 4 种，在真核生物中只有 1 种。其主要作用是识别终止密码，协助多肽链的释放。

七、氨基酰 tRNA 合成酶

- 该酶存在于胞液中，与特异氨基酸的活化以及氨基酰 tRNA 的合成有关。
- 每种氨基酰 tRNA 合成酶对相应氨基酸以及携带氨基酸的数种 tRNA 具有高度特异性，这是保证 tRNA 能够携带正确的氨基酸对号入座必要条件。
- 目前认为，该酶对 tRNA 的识别，是因为在 tRNA 的氨基酸臂上存在特定的识别密码，即第二套遗传密码。

氨酰-tRNA 合成酶特点

- 此酶具有较高专一性，能有效识别 tRNA 和相应的氨基酸。
- 此酶具有校对功能。
- 活化一个氨基酸消耗 2 分子 ATP。

八、供能物质和无机离子

- 多肽链合成时，需 ATP、GTP 作为供能物质，并需 Mg^{2+} 、 K^+ 参与。
- 氨基酸活化时需消耗 2 分子高能磷酸键，肽键形成时又消耗 2 分子高能磷酸键，故缩合一分子氨基酸残基需消耗 4 分子高能磷酸键。

第二节 蛋白质生物合成过程

蛋白质生物合成过程包括三大步骤：

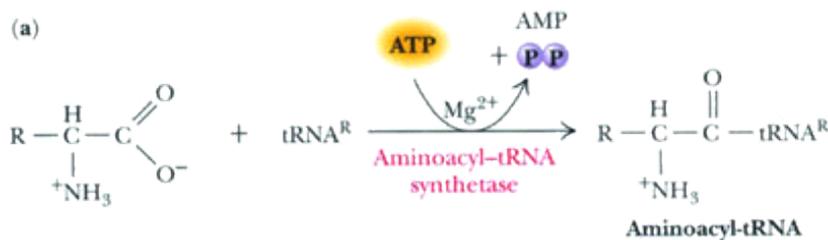
- ① 氨基酸的活化与搬运；
- ② 活化氨基酸在核糖体上的缩合；
- ③ 多肽链合成后的加工修饰。

一、氨基酸的活化与搬运

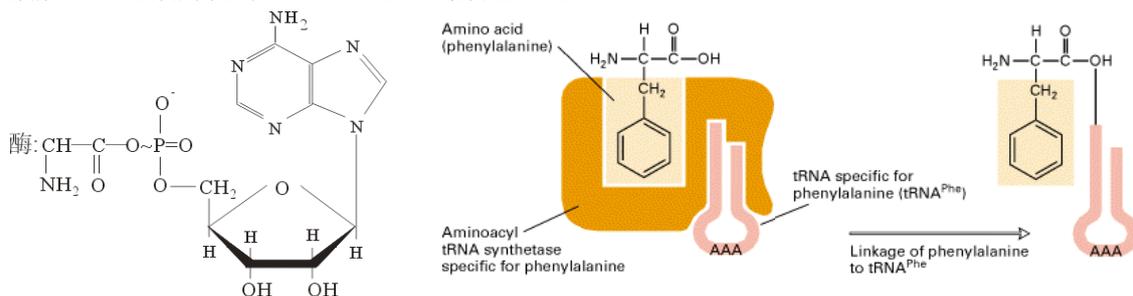
- 氨基酸的活化以及活化氨基酸与 tRNA 的结合，均由氨酰 tRNA 合成酶催化完成。
- tRNA 在氨酰-tRNA 合成酶的帮助下，能够识别相应的氨基酸，并通过 tRNA 氨基酸臂的 3'-OH 与氨基酸的羧基形成活化酯—氨酰-tRNA。
- 氨酰-tRNA 的形成是一个两步反应过程：第一步是氨基酸与 ATP 作用，形成氨酰腺嘌呤核苷酸；第二步是氨酰基转移到 tRNA 的 3'-OH 端上，形成氨酰-tRNA。

氨基酸的活化是指氨基酸与 tRNA 相连，形成氨酰-tRNA 的过程。

氨基酸的活化在细胞质中进行。反应由氨酰-tRNA 合成酶（又称氨基酸活化酶）催化。



氨基酸羧基通过酸酐键与 AMP 上的 5'-磷酸基相连



游离氨基酸掺入多肽链以前必须活化即氨基酸与特异 tRNA 形成氨酰-tRNA。

原因有两个：

第一：蛋白质的合成依赖于 tRNA 的接头作用，以保证正确的氨基酸得到整合，每个氨基酸为了参与蛋白质合成必须共价连接到 tRNA 分子上。

第二：氨基酸与 tRNA 之间形成的共价键是一个高能键，它使氨基酸和正在延伸的多肽链末端反应形成新的肽键，因此，这一氨酰-tRNA 的合成过程被称为氨基酸的活化。

起始氨酰 tRNA 的形成

1) 识别 mRNA 的起始密码子为 AUG，而 AUG 对应的氨基酸为 Met。

2) 有两种甲硫氨酸专一性的 tRNA：

- a. $\text{tRNA}_i^{\text{fmet}}$ —只与起始密码子结合
- b. $\text{tRNA}_i^{\text{met}}$ —只与肽链内部 AUG 有关

在原核生物中，多肽链起始的氨基酸均为甲酰甲硫氨酸。

由甲酰化酶催化 $tRNA_{i}^{met}$ 中的氨基甲酰化。

在真核生物中，多肽链起始的氨基酸均为甲硫氨酸

- $tRNA_{i}^{met}$ 只与起始密码子结合
- $tRNA^{met}$ 只与肽链内部的 AUG 有关

原核生物中的 fMet-tRNA 的合成



Met-tRNA 在转甲酰酶的作用下，在其 Met 的 $-\text{NH}_2$ 上甲酰化。



二、活化氨基酸的缩合——核糖体循环

- 活化氨基酸缩合生成多肽链的过程在核糖体上进行。活化氨基酸在核糖体上反复翻译 mRNA 上的密码并缩合生成多肽链的循环反应过程，称为核糖体循环。
- 核糖体循环过程可分为起动、延长和终止三个阶段，这三个阶段在原核生物和真核生物类似，现以原核生物中的过程加以介绍。

(一) 起动阶段：

1. 30S 起动复合物的形成：在起动因子的促进下，30S 小亚基与 mRNA 的起动部位，起动 tRNA ($fmet-tRNA^{fmet}$)，和 GTP 结合，形成复合物。

- 原核 mRNA 的起动部位由一段富含嘌呤的特殊核苷酸顺序组成，称为 SD 序列（核糖体结合位点，RBS），可被核糖体小亚基辨认结合。
- 被细菌核糖体保护的起始序列长约 30 个碱基。不同细菌 mRNA 的核糖体结合位点，显示两个共同的特征：
 - AUG（少数为 GUG 或 UUG）起始密码子总是包含在被保护的序列之中。
 - 在 AUG 上游 10 个碱基中间，有一个相应于下述六聚体部分或全部的序列。
 - 5' ...AGGAGG...3'
- 一切蛋白质的合成均始于相同的氨基酸：甲硫氨酸。起始一条多肽链的信号，是一个标志阅读框架起点的特殊的起始密码子。一般而言，起始密码是三联体 AUG，但在细菌中也使用 GUG 或 UUG。

fMet-tRNA 同 30S-mRNA 复合物结合需要 IF-2；在 50S 结合之后，所有 IF-2 因子全被释放，GDP 被切割。

2. 70S 起动前复合体的形成：IF3 从 30S 起动复合体上脱落，50S 大亚基与复合体结合，形成 70S 起动前复合体。

3. 70S 起动复合体的形成：GTP 被水解，IF1 和 IF2 从复合物上脱落。此时， $tRNA^{fmet}$ 的反密码 UAC 与 mRNA 上的起动密码 AUG 互补结合， $tRNA^{fmet}$ 结合在核蛋白的给位（P 位）。

- 在真核细胞，小亚基最先识别 mRNA 的 5' 端，再移动到起始位点并与大亚基结合。
- 真核细胞 mRNA 都是单顺反子，但是每一个 mRNA 通常都比编码蛋白所必需的序列更长。真核细胞细胞质中 mRNA 的平均长度是 1000-2000 个碱基。
- 非翻译的 5' 前导区较短，通常（但不总是）小于 100 个碱基。编码区的长度由蛋白质的大小所决定。非翻译的 3' 拖尾区往往相当长，有时约 1000 个碱基。
- 前导区由于其所在位置，在起始期间不可能被忽视，但是拖尾区的功能则不那么明显。

(二) 肽链延长阶段：

1. 进位：与 mRNA 下一个密码相对应的氨基酰 tRNA 进入核糖体的受位。此步骤需 GTP， Mg^{2+} ，和 EF 参与。

2. 成肽：在转肽酶的催化下，将给位上的 tRNA 所携带的甲酰蛋氨酰基或肽酰基转移到受位上的氨基酰 tRNA 上，与其 α -氨基缩合形成肽键。此步骤需 Mg^{2+} ， K^+ 。给位上已失去蛋氨酰基或肽酰基的 tRNA 从核蛋白上脱落。

3. 移位：核糖体向 mRNA 的 3' - 端滑动相当于一个密码的距离，同时使肽酰基 tRNA 从受位移到给位。此步骤需 EF (EFG)、GTP 和 Mg^{2+} 参与。此时，核糖体的受位留空，与下一个密码相对应的氨基酰 tRNA 即可再进入，重复以上循环过程，使多肽链不断延长。

(三) 肽链终止阶段：

● 核糖体沿 mRNA 链滑动，不断使多肽链延长，直到终止信号进入受位。

1. 识别：RF 识别终止密码，进入核糖体的受位。

2. 水解：RF 使转肽酶变为水解酶，多肽链与 tRNA 之间的酯键被水解，多肽链释放。

3. 解离：通过水解 GTP，使核糖体与 mRNA 分离，tRNA、RF 脱落，核糖体解离为大、小亚基。

(四)、多肽链合成的能量消耗

蛋白质的生物合成是个高耗能过程。

仅翻译过程，其能量消耗情况如下：

| | NTP | 高能磷酸键 |
|---------|-----|-----------|
| 氨基酸的活化 | ATP | 2/aa |
| 肽链合成的起始 | GTP | 1 |
| 肽链的延伸 | GTP | 2/轮 aa 添加 |
| 肽链合成的终止 | | 0 |

(五)、多肽链合成的能量消耗计算

例：以游离的氨基酸为原料，起始合成一个 100 肽，至少需要消耗多少 ATP？

(注：ATP→AMP 折算成 2 个 ATP，GTP 折算成 ATP)

解法一：分阶段累计

$$2 \times 100 + 1 + 2 \times 99 = 399$$

解法二：以 aa 为单位累计

∴ 每个游离的氨基酸参入到正在合成的多肽链中，至少需要消耗 4 个高能磷酸键（活化 — 2 个；氨基酰 tRNA 进入 A 位 — 1 个；核糖体移位 — 1 个）。

但起始的氨基酸要少消耗 1 个 GTP（可理解成它直接进入 P 位，不要移位）

$$\therefore 4n - 1 = 4 \times 100 - 1$$

(六)、多肽链合成的速度

蛋白质的生物合成的速度极快。在最适条件下，翻译速率 15 个氨基酸/每秒。

多核糖体：在一条 mRNA 链上，可以有多个核糖体同时进行翻译，每个核糖体上都附着一条正在延长的多肽链，越靠近 mRNA 的 3' 端的核糖体上的肽链越长。这种结构叫做多核糖体。

mRNA 上核糖体的多少，视 mRNA 链长而定。一般每隔 40 个核苷酸有一个核糖体。

多核糖体的结构可大大提高 mRNA 的翻译效率。

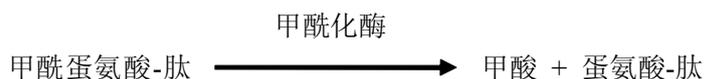
三、多肽链合成后的加工修饰

(一) 一级结构的加工修饰：

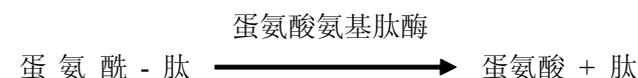
1. N 端甲酰蛋氨酸或蛋氨酸的切除：

● N 端甲酰蛋氨酸，必须在多肽链折迭成一定的空间结构之前被切除。

① 去甲酰化：



② 去蛋氨酰基：



2. 氨基酸的修饰：

由专一性的酶催化进行修饰，包括糖基化、羟基化、磷酸化、甲酰化等。

3. 二硫键的形成：

由专一性的氧化酶催化，将-SH 氧化为-S-S-。

4. 肽段的切除：

由专一性的蛋白酶催化，将部分肽段切除。

(二) 高级结构的形成:

1. 构象的形成:

在分子内伴侣、辅助酶及分子伴侣的协助下，形成特定的空间构象。

2. 亚基的聚合。

3. 辅基的连接。

(三) 靶向输送:

- 蛋白质合成后，定向地被输送到其执行功能的场所称为靶向输送。大多数情况下，被输送的蛋白质分子需穿过膜性结构，才能到达特定的地点。因此，在这些蛋白质分子的氨基端，一般都带有一段疏水的肽段，称为信号肽。
- 常见的信号肽由 10~40 个氨基酸残基组成，N 端为带正电荷的氨基酸残基，中间为疏水的核心区，而 C 端由小分子氨基酸残基组成，可被信号肽酶识别并裂解。
- 分泌型蛋白质的定向输送，就是靠信号肽与胞浆中的信号肽识别粒子 (SRP) 识别并特异结合，然后再通过 SRP 与膜上的对接蛋白 (DP) 识别并结合后，将所携带的蛋白质送出细胞。

四、蛋白质的定位

无论是原核还是真核细胞都是一个高度有序的结构，新生的蛋白质要被准确地运送到细胞的各个部分，如溶酶体、线粒体、叶绿体、细胞质和细胞核等，以更新其结构组成和维持其功能，这一过程称为蛋白质的定位。

多肽的转运有两种类型即共翻译转移 (co-translational translocation) 和翻译后转移 (post-translational translocation)。

1. 共翻译转移

蛋白质的定位 (Protein translocation) 主要由共翻译转移为特征，首先在游离核糖体上合成一段称为信号肽 (signal peptide) 的肽段，该信号肽指令核糖体结合到粗面内质网膜上，然后肽链边合成边进入内质网腔，经初步加工和修饰后，部分多肽以囊泡形式被运往高尔基体，再经进一步的加工和修饰后被运往质膜、溶酶体或被分泌到胞外。

- a. 信号肽通常在被转运的多肽链的 N 端，长度为 10~40 个氨基酸残基不等，氨基端至少含有一个带正电荷的氨基酸;
- b. 序列中心为含有 10~15 高度疏水的氨基酸残基，如丙氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和苯丙氨酸。
- c. 在信号肽的 C 末端有一个可被信号肽酶识别的位点，当蛋白质运送到目的地后，信号肽即被信号肽酶切去。
- d. 在信号肽酶识别位点上游常有一疏水性较强的 5 肽，信号肽酶切点上游的第一个(-1)及第 3 个(-3)氨基酸常为具有一个小侧链的氨基酸 (如丙氨酸)

信号肽是如何被识别的?含有这种顺序的蛋白质又是怎样被运过粗面内质网膜的?

Blobel 等已证明，有一种被称为信号识别颗粒 (signal recognition particle SPR) 的核糖核蛋白与合成分泌蛋白的核糖体结合到粗面内质网膜上密切相关。SPR 的相对分子质量为 325 kD，是由一种 300 个核苷酸的 RNA 分子 (名为 7SL RNA) 和 6 个不同的多肽链组成的。SPR 存在于细胞质中，其上有两个关键部位，即信号肽识别部位和翻译暂停功能域。

2. 翻译后转移

虽然线粒体和叶绿体均具有各自的基因组，但只编码其自身的一小部分蛋白质。大部分线粒体和叶绿体的蛋白质是由细胞核基因组编码的，并在细胞质游离核糖体上被完整合成后，通过新生肽的信号序列直接运往目的地 (线粒体和叶绿体)，这种转运方式属于翻译后转移。

第十三章 基因表达调控 Regulation of Gene Expression

通过基因表达，DNA 中的遗传信息即可用以决定细胞的表型和生物形状。但是，基因的表达随着组织细胞及个体发育的阶段的不同，随着内外环境的变化而不同，而表现为不同的基因的表达。

- 转录速率约为 40 个核苷酸/每秒
- 蛋白质翻译速率 15 个氨基酸/每秒
- DNA 复制速率 800 碱基对/秒
- 37°C

第一节 基因表达调控基本概念与原理

一、基因表达的概念

- 基因表达 (gene expression) 就是指在一定调节因素的作用下，DNA 分子上特定的基因被激活并转录生成特定的 RNA，或由此引起特异性蛋白质合成的过程。
- 人类基因组 DNA 中约含 5 万个基因，但在某一特定时期，只有少数的基因处于转录激活状态，其余大多数基因则处于静息状态。一般来说，在大部分情况下，处于转录激活状态的基因仅占 5%。
- 通过基因表达以合成特异性蛋白质，从而赋予细胞以特定的生理功能或形态，以适应内外环境的改变。

二、基因表达的时间性及空间性

(一) 时间特异性：

- 基因表达的时间特异性(temporal specificity)是指特定基因的表达严格按照特定的时间顺序发生，以适应细胞或个体特定分化、发育阶段的需要。故又称为阶段特异性。

(二) 空间特异性：

- 基因表达的空间特异性 (spatial specificity) 是指多细胞生物个体在某一特定生长发育阶段，同一基因的表达在不同的细胞或组织器官不同，从而导致特异性的蛋白质分布于不同的细胞或组织器官。故又称为细胞特异性或组织特异性。

三、基因表达的方式

(一) 组成性表达：

- 组成性基因表达 (constitutive gene expression) 是指在个体发育的任一阶段都能在大多数细胞中持续进行的基因表达。其基因表达产物通常是对生命过程必需的或必不可少的，且较少受环境因素的影响。这类基因通常被称为管家基因 (housekeeping gene)。

(二) 诱导和阻遏表达：

- 诱导表达 (induction) 是指在特定环境因素刺激下，基因被激活，从而使基因的表达产物增加。这类基因称为可诱导基因。
- 阻遏表达 (repression) 是指在特定环境因素刺激下，基因被抑制，从而使基因的表达产物减少。这类基因称为可阻遏基因。

四、基因表达的生物学意义

(一) 适应环境、维持生长和增殖。

(二) 维持个体发育与分化。

五、基因表达调控的基本原理

(一) 基因表达的多级调控：

- 基因表达调控可见于从基因激活到蛋白质生物合成的各个阶段，因此基因表达的调控可分为转录水平 (基因激活及转录起始)，转录后水平 (加工及转运)，翻译水平及翻译后水平，但以转录水平的基因表达调控最重要。

(二) 基因转录激活调节基本要素：

1. 顺式作用元件：

- 顺式作用元件 (cis-acting element) 又称分子内作用元件，指存在于 DNA 分子上的一些与基因转录调控有关的特殊顺序。
- 在原核生物中，大多数基因表达通过操纵子模型进行调控，其顺式作用元件主要由启动基因、操纵基因和调节基因组成。
- 在真核生物中，与基因表达调控有关的顺式作用元件主要有启动子 (promoter)、增强子 (enhancer)

和沉默子 (silencer)。

2. 反式作用因子：

- 反式作用因子 (trans-acting factor) 又称为分子间作用因子，指一些与基因表达调控有关的蛋白质因子。
- 反式作用因子与顺式作用元件之间的共同作用，才能够达到对特定基因进行调控的目的。
- 原核生物中的反式作用因子主要分为特异因子、激活蛋白和阻遏蛋白；而真核生物中的反式作用因子通常称为转录因子。

3. 顺式作用元件与反式作用因子之间的相互作用：

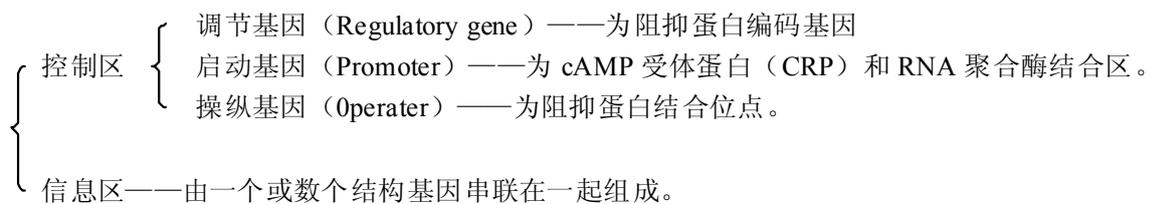
- 大多数调节蛋白在与 DNA 结合之前，需先通过蛋白质-蛋白质相互作用，形成二聚体或多聚体，然后再通过识别特定的顺式作用元件，而与 DNA 分子结合。这种结合通常是非共价键结合。

第二节 原核基因转录调节

- 存在于原核生物中的一种主要的调控模式是操纵子 (operon) 调控模式，该模式也见于低等真核生物中。
- 在原核生物中，若干结构基因可串联在一起，其表达受到同一调控系统的调控，这种基因的组织形式称为操纵子 (operon)。

一、操纵子的结构与功能

典型的操纵子可分为控制区和信息区两部分。控制区由各种调控基因所组成，而信息区则由若干结构基因串联在一起构成。



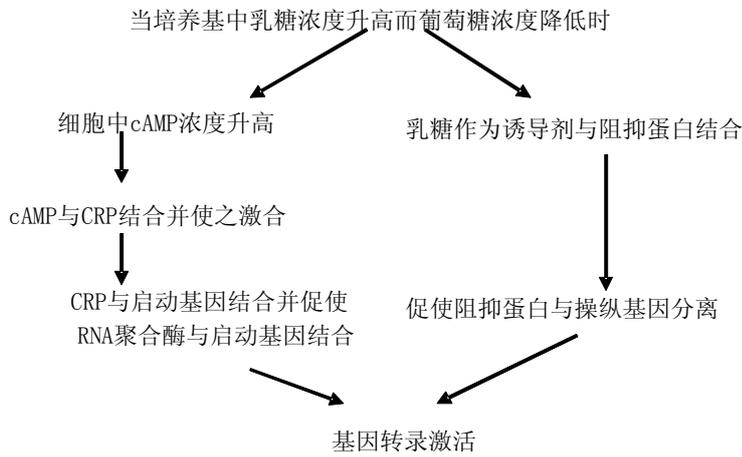
乳糖操纵子

1961 年, F. Jacob & J. Monod 提出。获 1965 年诺贝尔生理学 and 医学奖

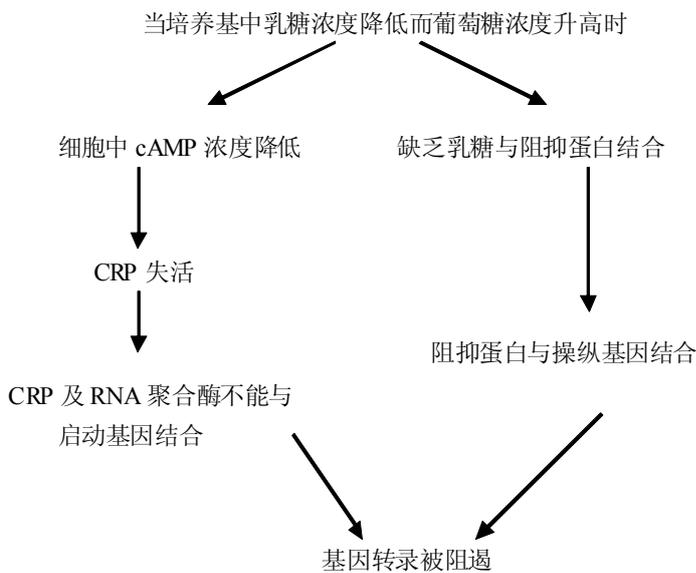
- 1940 年, Monod 发现: 细菌在含葡萄糖和乳糖的培养基上生长时, 细菌先利用葡萄糖, 葡萄糖用完后, 才利用乳糖; 在糖源转变期, 细菌的生长会出现停顿。即产生“二次生长曲线”。
- 1951 年, Monod 与 Jacob 合作, 发现两对基因:
 - Z 基因: 与合成 β -半乳糖苷酶有关;
 - I 基因: 决定细胞对诱导物的反应。
- Szilard: I 基因决定阻遏物的合成, 当阻遏物存在时, 酶无法合成, 只有有诱导物存在, 才能去掉该阻遏物。
- Jacob: 结构基因旁有开关基因 (操纵基因), 阻遏物通过与开关基因的结合, 控制结构基因的表达。
- 乳糖操纵子 (Lac operon) :
 - 其控制区包括调节基因 (阻遏基因), 启动基因 (其 CRP--cAMP 受体蛋白结合位点位于 RNA 聚合酶结合位点上游) 和操纵基因;
 - 信息区由 β -半乳糖苷酶基因 (lacZ), 通透酶基因 (lacY) 和乙酰化酶基因 (lacA) 串联在一起构成。

二、乳糖操纵子的调控机制

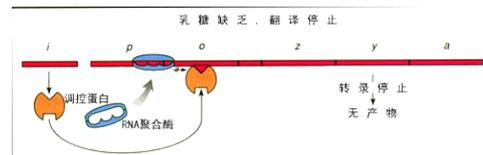
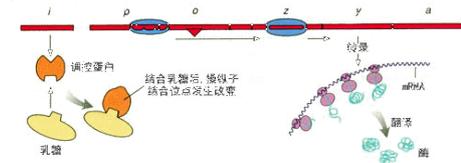
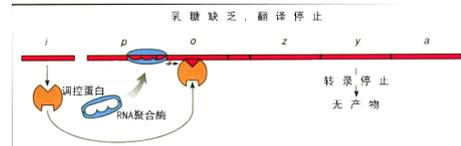
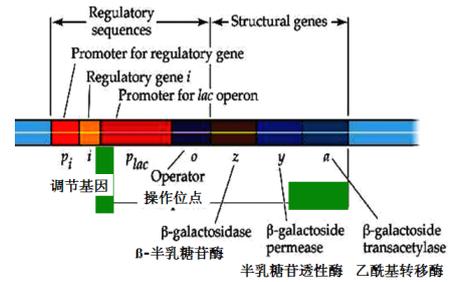
(一) 乳糖操纵子的诱导:



(二) 乳糖操纵子的阻遏:



乳糖操纵子结构



三、色氨酸操纵子的调控机制

- 色氨酸操纵子 (trp operon) 属于阻遏型操纵子，主要参与调控一系列用于色氨酸合成代谢的酶蛋白的转录合成。当细胞内缺乏色氨酸时，此操纵子开放，而当细胞内合成的色氨酸过多时，此操纵子被关闭。
- 色氨酸操纵子的调控机制与乳糖操纵子类似，但通常情况下，操纵子处于开放状态，其辅阻遏蛋白不能与操纵基因结合而阻遏转录。
- 而当色氨酸合成过多时，色氨酸作为辅阻遏物与辅阻遏蛋白结合而形成阻遏蛋白，后者与操纵基因结合而使基因转录关闭。

四、原核生物转录的整体调控模式

- 由成群的操纵子组成的基因转录调控网络称为调节子。通过组成调节子调控网络，对若干操纵子及若干蛋白质的合成进行协同调控，从而达到整体调控的目的。
- 典型的整体调控模式是 SOS 反应，这是由一组与 DNA 损伤修复有关的酶和蛋白质基因组成。在正常情况下，这些基因均被 LexA 阻遏蛋白封闭。当有紫外线照射时，细菌体内的 RecA 蛋白水解酶被激活，催化 LexA 阻遏蛋白裂解失活，从而导致与 DNA 损伤修复有关的基因表达。

第三节 真核基因转录调节

真核生物中基因表达的调控机制较原核生物复杂得多，许多细节还未弄清楚。就人类染色体 DNA 而言，就有 30 亿个碱基对，估计约有 3-5 万个基因。

一、真核基因组结构特点

(一) 转录产物为单顺反子:

- 真核基因的转录产物一般是单顺反子 (mono-cistron)，即一个编码基因转录生成一个 mRNA 分子，并指导翻译一条多肽链。

(二) 大量重复序列:

- 真核基因组中含大量的重复序列，这些重复序列大部分是没有特定生物学功能的 DNA 片段，可占整个基因组 DNA 的 90%。根据重复频率可将其分为高度重复序列、中度重复序列和单拷贝序列。

(三) 断裂基因:

- 真核生物中的基因具有不连续性，即一个基因的编码序列往往被一些非编码序列分隔开。基因中能够转录并进一步编码多肽链合成的部分称为外显子 (exon)，而在转录后会被剪除的部分则称为内含子 (intron)。

二、真核基因表达调控的特点

(一) RNA 聚合酶活性受转录因子调控:

- 真核生物中存在 RNA pol I、II、III 三种不同的 RNA 聚合酶，分别负责转录不同的 RNA。这些 RNA 聚合酶与相应的转录因子形成复合体，从而激活或抑制该酶的催化活性。

(二) 染色质结构改变参与基因表达的调控:

- 真核生物 DNA 与组蛋白结合并形成核小体的结构，再进一步形成染色质。当真核基因被激活时，染色质的结构也随之发生改变。主要的改变有:

1. 单链 DNA 形成: 基因被激活后，双链 DNA 解开成单链以利于转录，从而形成一些对 DNAase I 的超敏位点。
2. DNA 拓扑结构改变: 天然双链 DNA 均以负性超螺旋构象存在，当基因激活后，则转录区前方的 DNA 拓扑结构变为正性超螺旋。正性超螺旋可阻碍核小体形成，并促进组蛋白解聚。
3. 核小体不稳定性增加: 由于组蛋白修饰状态改变，巯基暴露等原因而引起核小体结构改变。

(四) 正性调节占主导:

- 真核基因一般都处于阻遏状态，RNA 聚合酶对启动子的亲和力很低。通过利用各种转录因子正性激活 RNA 聚合酶是真核基因调控的主要机制。

(五) 转录和翻译过程分别进行:

- 转录与翻译过程分别存在于不同的亚细胞部位，可分别进行调控。

(六) 转录后加工修饰过程复杂:

- 特别是 mRNA，转录后仅形成其初级转录产物——HnRNA，然后再经剪接、加帽、加尾等加工修饰，才能转变为成熟的 mRNA。

三、真核基因转录调控元件及激活机制

(一) 顺式作用元件 (分子内作用元件):

1. 启动子:

- 存在于结构基因上游，与基因转录启动有关的一段特殊 DNA 顺序称为启动子 (promoter)。与原核生物类似，也含有一段富含 TATA 的顺序，称为 TATA 盒。除此之外，还可见 CAAT 盒和 GC 盒。

2. 增强子:

- 位于结构基因附近，能够增强该基因转录活性的一段 DNA 顺序称为增强子 (enhancer)。
- 增强子是另一类顺式作用的 DNA 片段，可使基因转录的速率大大提高。其突出特点是: ①在转录起始点 5' 或 3' 侧均能起作用; ②相对于启动子的任一指向均能起作用; ③发挥作用与受控基因的距离远近相对无关; ④对异源性启动子也能发挥作用; ⑤通常具有一些短的重复顺序。

3. 沉默子:

- 能够对基因转录起阻遏作用的 DNA 片段，属于负性调控元件。

(二) 反式作用因子 (分子间作用因子):

- 真核生物反式作用因子通常属于转录因子 (transcription factor, TF)。

1. 转录因子的种类:

(1) 非特异性转录因子 (基本转录因子):

- 非选择性调控基因转录表达的蛋白质因子称为非特异性转录因子。真核生物中存在的三种 RNA 聚合酶分别有相应的转录因子，即 TF I，TF II，TF III。其中以 TF II 研究较清楚，TF II 一共有六种亚类，分别是 TF II A，TF II B，TF II D，TF II E，TF II F，TF II -I。

- TF II D 是唯一能识别启动子 TATA 盒并为之结合的转录因子，而 TF II B 则可促进聚合酶 II 与启动子的结合。

(2) 特异性转录因子：

- 能够选择性调控某种或某些基因转录表达的蛋白质因子称为特异性转录因子。
- 目前较清楚的是调控免疫球蛋白基因表达的核内蛋白质因子(NF)，已发现存在 NFA, NF2A, NFB, NFB4, NFIII 等亚类。

2. 转录因子的结构：

- 目前已知，反式作用因子至少含有三个功能域，即 DNA 结合功能域，转录活性功能域和其它转录因子结合功能域。
- 对各种转录因子 DNA 结合功能域的研究发现一些带共性的结构，主要有：

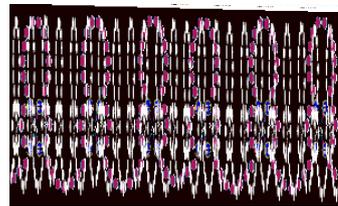
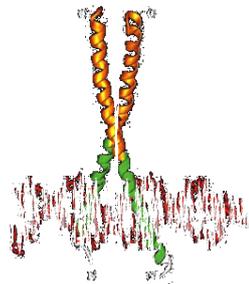
(1) HTH 和 HLH 结构：由两段 α -螺旋夹一段 β -折迭构成， α -螺旋与 β -折迭之间通过 β -转角或成环连接，即螺旋-转角-螺旋结构和螺旋-环-螺旋结构。典型的例子是 λ 噬菌体的 Cro 蛋白，该蛋白含三段 α -螺旋和三段 β -折迭，两亚基通过 β -折迭而形成二聚体，相当于 DNA 的一个螺距的长度，而每一亚基的一段 α -螺旋则刚好能嵌入 DNA 双螺旋的大沟中与 DNA 紧密结合。

(2) 锌指结构：

- 见于 TF IIIA 和类固醇激素受体中，由一段富含半胱氨酸的多肽链构成。每四个半胱氨酸残基或 His 残基螯合一分子 Zn^{2+} ，其余约 12-13 个残基则呈指样突出，刚好能嵌入 DNA 双螺旋的大沟中而与之相结合。每个蛋白质分子中可含 2-9 个锌指结构。

(3) 亮氨酸拉链结构：

- 见于真核生物 DNA 结合蛋白质的 C 端，与癌基因表达调控有关。由两段 α -螺旋平行排列构成，其 α -螺旋中存在每隔 7 个残基规律性排列的 Leu 残基，Leu 侧链交替排列而呈拉链状。两条肽链呈钳状与 DNA 结合。



3. 转录因子的作用特点：

- (1) 同一 DNA 顺式作用元件可被不同的转录因子所识别；
- (2) 同一转录因子也可识别不同的 DNA 顺式作用元件；
- (3) TF 与 TF 之间存在相互作用；
- (4) 当 TF 与 TF，TF 与 DNA 结合时，可导致构象改变；
- (5) TF 在合成过程中，有较大的可变性和可塑性。

(三) 转录激活及其调控：

- 真核 RNA 聚合酶 II 的激活需要依赖多种转录因子，并为之形成复合体。其过程首先是由 TF II D 识别启动子序列并为之结合；继而在 TF II A-F 的参与下，RNA 聚合酶 II 与 TF II D、B 聚合形成一个功能性的前起始复合体——PIC；最后，结合了增强子的转录因子与前起始复合体结合，从而形成稳定的转录起始复合体。