

 名校考研试题精选系列

生物化学

学习与考研指津

龚兴国 史 锋 史 影◎主编

第二版



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

名校考研试题精选系列

生物化学学习与考研指津 (第二版)

主编 龚兴国 史 锋 史 影



华东理工大学出版社
EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

生物化学学习与考研指津 / 龚兴国等主编. —2 版.

—上海: 华东理工大学出版社, 2010. 5

(名校考研试题精选系列)

ISBN 978-7-5628-2804-4

I. ①生… II. ①龚… III. ①生物化学—研究生—入学考试—自学参考资料 IV. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 082687 号

名校考研试题精选系列

生物化学学习与考研指津(第二版)

主 编/龚兴国 史 锋 史 影

责任编辑/胡 景

责任校对/李 晔

封面设计/陆丽君

出版发行/华东理工大学出版社

地址: 上海市梅陇路 130 号, 200237

电话: (021)64250306(营销部) 64252174(编辑室)

传真: (021)64252707

网址: press.ecust.edu.cn

印 刷/常熟华顺印刷有限公司

开 本/787 mm×1092 mm 1/16

印 张/17.25

字 数/510 千字

版 次/2006 年 4 月第 1 版 2010 年 5 月第 2 版

印 次/2010 年 5 月第 1 次

印 数/8071-11070 册

书 号/ISBN 978-7-5628-2804-4/Q·13

定 价/38.00 元

(本书如有印装质量问题,请到出版社营销部调换。)

第二版

前言

在我国大力提倡科技创新的今天,社会对高层次人才的需求有增无减。同时,全国重点大学都在努力建设成为研究型大学,也进一步提高了对研究生人才培养的规模。《生物化学学习与考研指津》第一版一经问世就受到莘莘学子的关注,部分学生使用后纷纷来电来信提出自己的建议与意见,间或有新学或备考学生询问改版计划。

为了适应新的形势与考试内容,满足各位学生复习“生物化学”的需要,我们决定对原书进行结构调整与内容更新,主要举措如下:

(1) 将原来的结构按照“总结、提高、训练、备考”的思路调整为四部分,即将结构调整“基本内容概述”、“本章重点与难点分析”、“复习备考实战训练”、“历年考研真题精析”。

(2) 在保留经典考题的基础上,用近年来的新考题替换原有考题。

(3) 增加全真实战机会,设置了4套全真考研试卷并附参考答案供备考者练习。

本次改版由龚兴国、史锋、史影担任主编,龚兴国负责统稿。我们一如既往地感谢兄弟院校设计考题的同行们。限于水平,不当与不足之处,恳请读者指出(cbsch@ecust.edu.cn)。

编者

2010年3月

前

言

生物化学研究生入学考试内容极为广泛,其命题范围包括生物大分子的结构、性质和功能;物质代谢、能量代谢和信息代谢;生物化学实验技术和分子生物学部分内容。为了更好地帮助考生考前系统复习,全面了解和掌握生物化学考试的题型和重点、难点,我们组织编写了此书。

本书中的试题主要来自全国高等院校和科研院所近五年的硕士研究生入学试题。全书共分为15章,每一章按照是非判断题、选择题、填空题、计算题、分析问答题和名词解释等题型排列。根据试题内容,我们在每一章中加编了内容概要、试题分析、知识点回顾和试题的参考答案等。书后还附录了生物化学常用缩写符号、3套模拟试题和2套2005年全真试题,以供考生参考和练习。其中第1至4章由龚兴国编写,第5、6、12至15章由史锋编写,第7至11章由史影编写。

本书所用的近年考研试题的单位有(排名不分先后):中国科学院、中国科学技术大学、北京大学、清华大学、复旦大学、南京大学、浙江大学、华中科技大学、华东理工大学、北京师范大学、上海交通大学、武汉大学、中山大学、四川大学、华南理工大学、大连理工大学、山东大学、湖南大学、南开大学、天津大学、南京工业大学、东南大学、河北工业大学、青岛科技大学、浙江工业大学等。在此特对以上单位的试题命题老师表示真诚的谢意。

本书编写过程中,得到浙江大学生命科学院生物化学教研室的大力支持。参与编写工作的有纪静、洪美亚等研究生,在此一并表示感谢。

由于编者水平有限,书中错误和不足之处在所难免,敬请考生及读者批评指正。

编者

浙江大学生命科学院

2006年2月

本书常用缩写符号

AC	腺苷酸环化酶	dNTP	三磷酸脱氧核苷酸
aa	氨基酸	DPG	2,3-二磷酸甘油酸
ACC	氨基环丙烷羧酸	E	氧化还原电位
ACH	乙酰胆碱	EF, eLF	延伸因子
ACP	酰基载体蛋白	EGF	表皮生长因子
ACTH	促肾上腺皮质激素	ELISA	酶联免疫吸附测定
AD	肾上腺素	EMP	糖酵解途径
ADP	腺嘌呤核苷二磷酸	ERE	雌激素反应元件
ADPG	腺苷二磷酸葡萄糖	FADH ₂	还原型黄素嘌呤二核苷酸
Ala (A)	丙氨酸	FH ₄	四氢叶酸
AMP	腺嘌呤核苷一磷酸	FISH	荧光原位杂交
AP	脱嘌呤	fMet	甲酰甲硫氨酸
Arg (R)	精氨酸	G	(吉布斯)自由能
Asn (N)	天冬酰胺	Gal	半乳糖
Asp (D)	天冬氨酸	GAL	依赖半乳糖的激活蛋白
ATP	腺嘌呤核苷三磷酸	GAP	GTP 酶活化蛋白
ATPase	腺嘌呤核苷三磷酸酶	GDPG	鸟苷二磷酸葡萄糖
BCCP	生物素羧基载体蛋白	Glc	葡萄糖
bp	碱基对	Gln (Q)	谷氨酰胺
cAMP	环化腺苷酸	Glu (E)	谷氨酸
5'-Cap	真核细胞 mRNA5'-帽子结构	Gly (G)	甘氨酸
CAP	分解代谢基因激活蛋白	GOT	谷草转氨酶
cccDNA	共价闭环状 DNA	GPT	谷丙转氨酶
cDNA	互补 DNA	GSH	谷胱甘肽(还原型)
cGMP	环化鸟苷酸	GSSG	谷胱甘肽(氧化型)
C ₂ H ₄	乙烯	GTP	鸟嘌呤核苷三磷酸
Co I	辅酶 I	Hb A	正常人血红蛋白
Co II	辅酶 II	Hb F	胎儿血红蛋白
Co A	辅酶 A	Hb S	镰刀型贫血血红蛋白
Co Q	辅酶 Q	Hchain	H 链, 重链
Cot	DNA 复性速度	His (H)	组氨酸
CRP	cAMP 受体蛋白	hnRNA	核不均一 RNA, mRNA 的前体
CT	降钙素	HPCE	高效毛细管电泳
Cys C	半胱氨酸	HPLC	高效液相色谱
Cyt b	细胞色素 b	HSP	热休克蛋白, 热激蛋白
Cyt c	细胞色素 c	IBP	起始子结合蛋白
Cyt p	细胞色素 p	IE	免疫电泳
DAG	二酰甘油	IEC	离子交换层析
DNFB	2,4-二硝基氟苯	IEF	等电聚焦

IF	启动因子	SAM	S-腺苷蛋氨酸
Ile (I)	异亮氨酸	scRNA	胞质内小 RNA
IP ₃	三磷酸肌醇	SDS	十二烷基磺酸钠
IPTG	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷	Ser (S)	丝氨酸
IU	酶的国际活力单位	SnoRNA	核仁小 RNA
K_{cat}	酶的转化数(催化常数)	SnRNA	核内小分子 RNA
kD	千道尔顿	SPPS	固相多肽合成
K_{eq}	反应平衡常数	SRP	信号识别颗粒
K_m	米氏常数	SSB	单链 DNA 结合蛋白
L-chain	L 链, 轻链	ssDNA	单链 DNA
Leu (L)	亮氨酸	ssRNA	单链 RNA
Ig	免疫球蛋白	T ₄	甲状腺素
Lys (K)	赖氨酸	TAG	三酰甘油
Met (M)	甲硫氨酸	TCA	三羧酸循环
mRNA	信使核糖核酸	TF	转录因子, 转移因子
NAD ⁺	尼克酰胺嘌呤二核苷酸, 辅酶 I	Thr (T)	苏氨酸
NADP	尼克酰胺嘌呤二核苷酸磷酸, 辅酶 II	TIC	转录起始复合物
NMR	核磁共振谱法	T _m	DNA 解链温度
Nt	核苷酸(残基)	TMG	三甲基鸟苷
ORC	起始识别复合体	Tn	转座子
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	TPK	酪氨酸激酶
PCR	聚合酶链式反应	TPP	焦磷酸硫胺素
Phe (F)	苯丙氨酸	Trp (W)	色氨酸
pI	等电点	Tyr (Y)	酪氨酸
Pi	磷脂酰肌醇	UCE	上游控制元件
PIP ₂	磷脂酰二磷酸肌醇	UDPG	尿苷二磷酸葡萄糖
PITC	苯异硫氰酸酯	UPE	上游启动子元件
pK	解离常数	Val (V)	缬氨酸
PK A	蛋白激酶 A	V_{max}	酶的最大反应速度
PK C	蛋白激酶 C	$\Delta E^{\ominus}$	生化反应标准氧化-还原电位差(反应物和产物浓度为 1 mol/L, 25 °C, 101 325 Pa, pH 为 7 时)
Pol	聚合酶	ΔG	自由能变化
Poly A	多聚腺苷酸	ΔG°	标准自由能变化
Poly (N)	多聚核苷酸	ΔG°	生理标准自由能变化(反应物和产物浓度为 1 mol/L, 25 °C, 1 atm, pH 为 7 时)
PPi	无机焦磷酸	[E]	酶浓度
Pro (P)	脯氨酸	[I]	抑制剂浓度
PTH	甲状旁腺激素	[S]	底物浓度
rDNA	核糖体 DNA		
RF	释放因子		
RFLP	限制性片段多态性		
S	沉降系数, 1S=10 ⁻¹³ 秒		

目 录

1 氨基酸与蛋白质

- 1.1 基本内容概述/1
 - 1.1.1 氨基酸和肽/1
 - 1.1.2 蛋白质的结构/2
 - 1.1.3 蛋白质的重要性质及蛋白质的分离纯化/3
 - 1.1.4 测定蛋白质相对分子质量的方法/4
- 1.2 本章重点与难点分析/4
 - 1.2.1 构成蛋白质的氨基酸的结构特征/4
 - 1.2.2 氨基酸的等电点(pI)和 pK 值/5
 - 1.2.3 氨基酸的重要化学反应/5
 - 1.2.4 氨基酸的分离与分析/6
 - 1.2.5 蛋白质结构分析/7
 - 1.2.6 蛋白质相对分子质量的计算/7
- 1.3 复习备考实战训练/9
- 1.4 历年考研真题精析/27

2 酶

- 2.1 基本内容概述 /34
 - 2.1.1 酶的基本概念/34
 - 2.1.2 酶催化反应动力学/34
 - 2.1.3 酶的催化机理和酶的活性调节/36
 - 2.1.4 酶的专一性 /36
 - 2.1.5 同工酶、别构酶和酶工程/36
- 2.2 本章重点与难点分析/37
 - 2.2.1 酶的活力分析/37
 - 2.2.2 酶催化反应动力学/38
- 2.3 复习备考实战训练/40
- 2.4 历年考研真题精析/55

3 维生素与辅酶

- 3.1 基本内容概述 /62

3.2 本章重点与难点分析/62

- 3.2.1 维生素的概念/62
- 3.2.2 脂溶性维生素/62
- 3.2.3 水溶性维生素/63
- 3.3 复习备考实战训练/64
- 3.4 历年考研真题精析/67

4 核酸

- 4.1 基本内容概述 /71
 - 4.1.1 核酸的化学结构/71
 - 4.1.2 核酸的重要理化性质/72
- 4.2 本章重点与难点分析/72
 - 4.2.1 核酸的分类/72
 - 4.2.2 DNA 的结构/73
 - 4.2.3 RNA 的结构/74
 - 4.2.4 核酸的性质/75
 - 4.2.5 核酸酶/76
- 4.3 复习备考实战训练/77
- 4.4 历年考研真题精析/92

5 激素

- 5.1 基本内容概述 /99
- 5.2 本章重点与难点分析/99
 - 5.2.1 激素分类/99
 - 5.2.2 激素作用的一般特性/99
 - 5.2.3 激素作用机制/100
 - 5.2.4 激素分泌调节/102
- 5.3 复习备考实战训练/102
- 5.4 历年考研真题精析/105

6 生物膜与物质运输

- 6.1 基本内容概述 /107

6.2 本章重点与难点分析/107

- 6.2.1 膜结构/107
- 6.2.2 生物膜的功能/108
- 6.2.3 膜受体/109

6.3 复习备考实战训练/109

6.4 历年考研真题精析/112

7 生物氧化

7.1 基本内容概述 /114

7.2 本章重点与难点分析/114

- 7.2.1 生物氧化的概念及特点/114
- 7.2.2 自由能和氧化还原电位/114
- 7.2.3 电子传递链/115
- 7.2.4 氧化磷酸化/116
- 7.2.5 细胞溶胶内 NADH 的再氧化/117

7.3 复习备考实战训练/117

7.4 历年考研真题精析/120

8 糖代谢

8.1 基本内容概述 /124

8.2 本章重点与难点分析/124

- 8.2.1 糖的基本知识/124
- 8.2.2 糖酵解(EMP)/125
- 8.2.3 乳酸发酵和乙醇发酵/126
- 8.2.4 三羧酸循环/126
- 8.2.5 乙醛酸循环/128
- 8.2.6 磷酸戊糖途径/128
- 8.2.7 糖异生/128
- 8.2.8 糖异生和糖酵解的协调调控/129
- 8.2.9 蔗糖和多糖的生物合成/129

8.3 复习备考实战训练/129

8.4 历年考研真题精析/135

9 脂类代谢

9.1 基本内容概述/138

9.2 本章重点与难点分析/138

- 9.2.1 甘油三酯的水解及激素调节/138
- 9.2.2 甘油代谢/139
- 9.2.3 脂肪酸的 β -氧化/139
- 9.2.4 酮体的代谢/139
- 9.2.5 脂肪酸的合成代谢/140
- 9.2.6 磷脂的代谢/141
- 9.2.7 其他脂类物质代谢/142

9.3 复习备考实战训练/142

9.4 历年考研真题精析/146

10 氨基酸代谢

10.1 基本内容概述 /150

10.2 本章重点与难点分析/150

- 10.2.1 氨基酸的脱氨基作用/150
- 10.2.2 氨基酸的脱羧基作用/151
- 10.2.3 氨的转运/151
- 10.2.4 尿素循环/152
- 10.2.5 氨基酸碳骨架的去向/152
- 10.2.6 生糖氨基酸和生酮氨基酸/152
- 10.2.7 一碳单位/152
- 10.2.8 必需氨基酸和非必需氨基酸/153
- 10.2.9 氨基酸的生物合成/153
- 10.2.10 重要的氨基酸衍生物/153

10.3 复习备考实战训练/153

10.4 历年考研真题精析/157

11 核苷酸代谢

11.1 基本内容概述/160

11.2 本章重点与难点分析/160

- 11.2.1 嘌呤碱的分解/160
- 11.2.2 嘧啶碱的分解/161
- 11.2.3 嘌呤核苷酸的合成/161
- 11.2.4 嘧啶核苷酸的合成/161
- 11.2.5 脱氧核糖核苷酸的合成/162
- 11.2.6 辅酶核苷酸的合成/162

11.3 复习备考实战训练/162

11.4 历年考研真题精析/165

12 核酸的生物合成

12.1 基本内容概述/167

12.2 本章重点与难点分析/167

- 12.2.1 DNA 的复制/167
- 12.2.2 逆转录/172
- 12.2.3 RNA 的生物合成/173

12.3 复习备考实战训练/176

12.4 历年考研真题精析/188

13 蛋白质的生物合成

13.1 基本内容概述/192

13.2 本章重点与难点分析/192

- 13.2.1 蛋白质生物合成体系的重要组分/192
- 13.2.2 蛋白质生物合成的过程/193
- 13.2.3 真核生物和原核生物蛋白质合成的区别/193
- 13.2.4 蛋白质合成后的修饰/194
- 13.2.5 蛋白质运输/194
- 13.2.6 分子伴侣/194
- 13.2.7 遗传密码特点/194
- 13.2.8 蛋白抑制剂/195
- 13.3 复习备考实战训练/195
- 13.4 历年考研真题精析/203

14 细胞代谢和基因表达的调控

- 14.1 基本内容概述/207
- 14.2 本章重点与难点分析/207
 - 14.2.1 代谢途径的相互联系/207
 - 14.2.2 物质代谢的特点/208
 - 14.2.3 代谢调控/209
 - 14.2.4 基因表达的调节/210
- 14.3 复习备考实战训练/212
- 14.4 历年考研真题精析/216

15 常用生物化学实验技术

- 15.1 基本内容概述/220

15.2 本章重点与难点分析/220

- 15.2.1 层析技术/220
- 15.2.2 电泳/226
- 15.2.3 离心/230
- 15.2.4 透析/231
- 15.2.5 超过滤/231
- 15.2.6 PCR 聚合酶链反应/231
- 15.2.7 分子杂交/231
- 15.2.8 蛋白质、核酸的定性定量检测/232

15.3 复习备考实战训练/232

15.4 历年考研真题精析/240

附录

- 附录1 浙江大学2010年攻读硕士学位研究生入学考试试题及参考答案/243
- 附录2 浙江大学2009年攻读硕士学位研究生入学考试试题及参考答案/248
- 附录3 厦门大学2009年攻读硕士学位研究生入学考试试题及参考答案/256
- 附录4 中山大学2009年攻读硕士学位研究生入学考试试题及参考答案/261

1

氨基酸与蛋白质

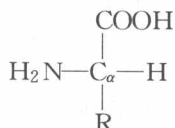
1.1 基本内容概述

1.1.1 氨基酸和肽

蛋白质是生物功能的体现者,而构成蛋白质的基本单位是氨基酸。蛋白质在酸、碱或酶的作用下,可逐步降解为氨基酸。组成蛋白质的氨基酸常见的有 20 种。成千上万的不同蛋白质实际上就是氨基酸的种类、数目及排列顺序不同。

1.1.1.1 氨基酸的结构

构成蛋白质的 20 种氨基酸,均为 α -氨基酸。每个氨基酸的 α -碳原子上都连接一个羧基和一个氨基。20 种氨基酸结构的差别就在于它们的 R 基团结构的不同。



根据 20 种氨基酸侧链 R 基团的极性,可将其分为四大类:非极性 R 基氨基酸(8 种);不带电荷的极性 R 基氨基酸(7 种);带负电荷的 R 基氨基酸(2 种);带正电荷的 R 基氨基酸(3 种)。

除常见的 20 种氨基酸以外,在生物体内还有其他氨基酸存在,如存在蛋白质中的羟脯氨酸(HyP)、羟赖氨酸(HyL)、甲基组氨酸(M-His)、焦谷氨酸(p-Glu)等。这些氨基酸都是蛋白质翻译后再由相应的常见的氨基酸修饰而来的。在代谢产物中还有鸟氨酸(Orn)、瓜氨酸(Cit)、高丝氨酸(h-Ser)、高半胱氨酸(H-Cys)、D-Glu 和 D-Phe 等。

1.1.1.2 氨基酸的性质

(1) 氨基酸的两性解离性质及等电点:由于氨基酸含有酸性的羧基和碱性的氨基,所以既是酸又是碱,是两性电解质。有些氨基酸的侧链还含有可解离的基团,其带电状况取决于它们的 pK 值。由于不同氨基酸所带的可解离基团不同,所以等电点不同。氨基酸在水溶液中是以兼性离子状态(偶极离子)存在的,在不同的 pH 溶液中带不同的电荷。

(2) 氨基酸的立体异构:除甘氨酸外,其他氨基酸都有不对称碳原子,所以具有 D-型和 L-型两种构型,具有旋光性。天然蛋白质中存在的氨基酸都是 L-型的。

(3) 氨基酸的紫外吸收特性:酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸具有紫外吸收特性,在 280 nm 处有最大吸收值。大多数蛋白质都具有这些氨基酸,所以蛋白质在 280 nm 处也有特征吸收,这是紫外分光光度法定量测定蛋白质的基础。

(4) 氨基酸的化学反应:氨基酸的 α -羧基和 α -氨基具有活泼的化学性质,能参与多种化学反应。另外,许多氨基酸的侧链还含有羟基、氨基、羧基等可解离基团,也具有化学反应性。较重要的化学反应有:① 茚三酮反应,除脯氨酸外,所有的 α -氨基酸都能与茚三酮发生颜色反应,生成蓝紫色化合物,脯氨酸与茚三酮生成黄色化合物;② Sanger 反应, α -NH₂ 与 2,4-二硝基氟苯作用产生相应的 DNP-氨基酸;③ Edman 反应, α -NH₂ 与苯异硫氰酸酯作用产生相应的氨基酸的苯氨基硫甲酰衍

物(PIT-氨基酸)。Sanger 反应和 Edman 反应均可用于蛋白质多肽链 N 端氨基酸的测定。

1.1.1.3 肽

(1) 肽和肽键的结构。氨基酸通过肽键相互连接而成的化合物称为肽,由 2 个氨基酸组成的肽称为二肽,由 3 个氨基酸组成的肽称为三肽,少于 10 个氨基酸的肽称为寡肽,由 10 个以上氨基酸组成的肽称为多肽。

(2) 肽的重要性质。含有两个以上肽键的化合物具有双缩脲反应。多肽含有多个肽键,因此具有强烈的双缩脲反应。某些寡肽具有重要的生理活性,如谷胱甘肽(GSH)、脑啡肽、催产素、加压素等。

(3) 肽的结构。多肽的主链结构是相同的,不同的多肽就是氨基酸的组成、排列顺序和数目不一样。具生命活性的高分子多肽就是蛋白质。大部分肽是线形结构,少部分多肽呈环状结构。

1.1.2 蛋白质的结构

1.1.2.1 蛋白质的结构

蛋白质是具有特定构象的大分子,为研究方便,将蛋白质结构分为四个结构层次,包括一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。一般将二级结构、三级结构和四级结构称为三维构象或高级结构。

一级结构内容包括蛋白质分子中的肽键、肽链、氨基酸的排列顺序和二硫键的位置。肽键是蛋白质中氨基酸之间的主要连接方式,即由一个氨基酸的 α -氨基和另一个氨基酸的 α -羧基之间脱去一分子水相互连接。肽键具有部分双键的性质,所以整个肽单位是一个刚性的平面结构。肽链中的 $C_{\alpha}-N$ 和 $C_{\alpha}-C$ 可以在一定范围内发生旋转,旋转所形成的角度即二面角 Φ 和 Ψ 。由于二面角的旋转又构成了蛋白质结构的柔性。在多肽链中含有游离氨基的一端称为肽链的氨基端或 N 端,而另一端含有一个游离羧基称为肽链的羧基端或 C 端。

蛋白质的二级结构是指多肽链主链盘绕折叠所形成的有规律性的空间结构。最基本的二级结构类型有 α -螺旋结构和 β -折叠结构,此外还有 β -转角和自由回转。右手 α -螺旋结构是在纤维蛋白和球蛋白中发现的最常见的二级结构,每圈螺旋含有 3.6 个氨基酸残基,螺距为 0.54 nm,螺旋中的每个肽键均参与氢键的形成以维持螺旋的稳定。 β -折叠结构也是一种常见的二级结构,在此结构中,多肽链以较伸展的曲折形式存在,肽链(或肽段)的排列可以有平行和反平行两种方式。氨基酸之间的轴心距为 0.35 nm,相邻肽链之间借助氢键彼此连成片层结构。

超二级结构是指蛋白质分子中的多肽链由若干相邻的二级结构单元彼此相互作用,形成有规则的二级结构组合体,充当蛋白质三级结构的构件,如 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 、 $\beta\beta$ 等。

结构域是在二级结构和超二级结构的基础上形成的三级结构的局部折叠区,是蛋白质多肽链中相对独立的紧密球状实体。结构域是球状蛋白质的独立折叠单位,对于较小的球状蛋白质分子或亚基来说,往往只有一个结构域。

蛋白质的三级结构是整个多肽链的三维构象,包括主链和侧链,它是在二级结构的基础上,多肽链进一步折叠卷曲形成复杂的球状分子结构。具有三级结构的蛋白质一般都是球蛋白,这类蛋白质的多肽链在三维空间中沿多个方向进行盘绕折叠,形成十分紧密的近似球形的结构,分子内部的空间只能容纳少数水分子,几乎所有的极性 R 基都分布在分子外表面,形成亲水的分子外壳,而非极性的基团则被埋在分子内部,不与水接触。蛋白质分子中侧链 R 基团的相互作用对稳定球状蛋白质的三级结构起着重要作用。

蛋白质的四级结构指数条具有独立的三级结构的多肽链通过非共价键相互连接而成的聚合体结构。在具有四级结构的蛋白质中,每一条具有独立三级结构的链称为亚基或亚单位,缺少一个亚基或亚基单独存在都不具有活性。四级结构涉及亚基在整个分子中的空间排布以及亚基之间的相互关系。

维持蛋白质空间结构的作用力主要是氢键、离子键、疏水作用力和范德瓦尔斯力等非共价键,又称次级键。此外,在某些蛋白质中还有二硫键,二硫键在维持蛋白质构象方面也起着重要作用。

蛋白质的空间结构取决于它的一级结构,其多肽主链上的氨基酸排列顺序包含了形成复杂的三

维结构(即正确的空间结构)所需要的全部信息。

1.1.2.2 蛋白质结构与功能的关系

不同的蛋白质,由于结构不同而具有不同的生物学功能。蛋白质的生物学功能是蛋白质分子的自然构象所具有的性质,功能与结构密切相关。

(1) 一级结构与功能的关系

蛋白质中某些氨基酸序列与生物功能密切相关。如镰刀型细胞贫血症,其病因是血红蛋白基因中的一个核苷酸的突变导致该蛋白分子中 β -链第6位谷氨酸被缬氨酸取代。这个一级结构上的细微差别使患者的血红蛋白分子容易发生凝聚,导致红细胞变成镰刀状,不能携带氧气而引起贫血,即血红蛋白的功能散失。

研究发现,同源蛋白质中有许多位置的氨基酸是相同的,而其他氨基酸差异较大。如比较不同生物的细胞色素C的一级结构,发现与人类亲缘关系接近,其氨基酸组成的差异越小,亲缘关系越远差异越大。这说明不是关键部位的氨基酸序列是可以替代的。

(2) 蛋白质空间结构与功能的关系

蛋白质的空间结构与功能之间有密切相关性,其特定的空间结构是行使生物功能的基础。以下两方面均可说明这种相关性。

核糖核酸酶是由124个氨基酸组成的一条多肽链,含有四对二硫键,空间构象为球状分子。将天然核糖核酸酶在8 mol/L脲中用 β -巯基乙醇处理,则分子内的四对二硫键断裂,分子变成一条松散的肽链,此时酶活性完全丧失。但用透析法除去 β -巯基乙醇和脲后,此酶经氧化又自发地折叠成原有的天然构象,同时酶活性又恢复。

血红蛋白是一个四聚体蛋白质,具有氧结合功能,可在血液中运输氧。研究发现,脱氧血红蛋白与氧的亲合力很低,不易与氧结合。一旦血红蛋白分子中的一个亚基与氧结合,就会引起该亚基构象发生改变,并引起其他三个亚基的构象相继发生变化,使它们易于和氧结合,说明变化后的构象最适合与氧结合。

从以上例子可以看出,只有当蛋白质以特定的空间构象存在时才具有生物活性。一旦空间构象遭到破坏,蛋白质就失去生物学活性。

1.1.3 蛋白质的重要性质及蛋白质的分离纯化

1.1.3.1 蛋白质的两性解离性质及其等电点

蛋白质的酸碱性质取决于肽链上的可解离的R基团。不同蛋白质所含有的氨基酸的种类、数目不同,所以具有不同的等电点。当蛋白质所处环境的pH大于pI时,蛋白质分子带负电荷;pH小于pI时,蛋白质带正电荷;pH等于pI时,蛋白质所带净电荷为零,此时溶解度最小。

1.1.3.2 蛋白质胶体性质和它的沉淀分离

蛋白质分子表面带有许多亲水基团,使蛋白质成为亲水的胶体溶液。蛋白质颗粒周围的水化膜(水化层)以及非等电状态时蛋白质颗粒所带的同性电荷的互相排斥是使蛋白质胶体系统稳定的主要因素。当这些稳定因素被破坏时,蛋白质会产生沉淀。高浓度中性盐可使蛋白质分子脱水并中和其所带电荷,从而降低蛋白质的溶解度并沉淀析出,即盐析。但这种作用并不引起蛋白质的变性。这个性质可用于蛋白质的分离。

1.1.3.3 蛋白质的变性和复性

蛋白质受到某些物理或化学因素作用,引起生物活性的丧失,溶解度的降低以及其他性质的改变,这种现象称为蛋白质的变性作用。变性作用的实质是由于维持蛋白质高级结构的次级键遭到破坏而造成空间构象的解体,但未涉及共价键的断裂。有些变性是可逆的,有些变性是不可逆的。当变性条件不剧烈时,变性是可逆的,除去变性因素后,变性蛋白又可重新回复到原有的天然构象,恢复或部分恢复其原有的生物活性,这种现象称为蛋白质的复性。

1.1.3.4 蛋白质的分离纯化方法

蛋白质的分离纯化方法主要有盐析、离子交换层析、分子筛层析、等电点沉淀、选择性吸附层析和亲和层析等。

1.1.4 测定蛋白质相对分子质量的方法

1.1.4.1 凝胶过滤法

凝胶过滤法分离蛋白质的原理是根据蛋白质相对分子质量的大小。由于不同排阻范围的葡聚糖凝胶有一特定的蛋白质相对分子质量范围,在此范围内,相对分子质量的对数和洗脱体积之间成线性关系。因此,用几种已知相对分子质量的蛋白质为标准,进行凝胶层析,以每种蛋白质的洗脱体积对它们的相对分子质量的对数作图,绘制出标准洗脱曲线。未知蛋白质在同样的条件下进行凝胶层析,根据其所用的洗脱体积,从标准洗脱曲线上可求出此未知蛋白质对应的相对分子质量。

1.1.4.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

蛋白质在普通聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度取决于蛋白质分子的大小、分子形状和所带电荷的多少。SDS(十二烷基磺酸钠)是一种去污剂,可使蛋白质变性并解离成亚基。当蛋白质样品中加入SDS后,SDS与蛋白质分子结合,使蛋白质分子带上大量的强负电荷,并且使蛋白质分子的形状都变成短棒状,从而消除了蛋白质分子之间原有的带电荷量和分子形状的差异。这样电泳的速度只取决于蛋白质相对分子质量的大小,蛋白质分子在电泳中的相对迁移率和相对分子质量的对数成直线关系。以标准蛋白质相对分子质量的对数和其相对迁移率作图,得到标准曲线,根据所测样品的相对迁移率,从标准曲线上便可查出其相对分子质量。

1.1.4.3 沉降法(超速离心法)

沉降系数(S)是指单位离心场强度溶质的沉降速度。S也常用于近似地描述生物大分子的大小。蛋白质溶液经高速离心分离时,由于密度关系,蛋白质分子趋于下沉,沉降速度与蛋白质颗粒大小成正比,应用光学方法观察离心过程中蛋白质颗粒的沉降行为,可判断出蛋白质的沉降速度。根据沉降速度可求出沉降系数,将S代入公式,即可计算出蛋白质的相对分子质量。

$$M = \frac{RTS}{D(1 - V\rho)}$$

1.2 本章重点与难点分析

1.2.1 构成蛋白质的氨基酸的结构特征

组成蛋白质的氨基酸主要有20种,不同氨基酸之间的差异就是R基团不同。它们的共同特征是:

- (1) 除Pro外,都属 α -氨基酸,Pro为 α -亚氨基酸;
- (2) 都属L-氨基酸;
- (3) 除Gly外,都具有旋光性;
- (4) 为两性电解质。

由于R基团不同,各种氨基酸在性质上的差异很大,如吸收光谱、等电点(pI)、解离常数(K_a)、颜色反应、稳定性、对金属的配合能力等。因此,不同氨基酸组成的蛋白质,性质和功能千差万别。

[例1] 在作氨基酸双向纸层析定性分析时,结构相似的氨基酸在一个轨迹上,例如Val、Ile、Gly、Ala、Leu应在同一个轨迹上。若用正丁醇:甲酸:水(15:3:2)对这几种氨基酸进行展层,展层结果这些氨基酸应该怎样排布?为什么?

[解答] 按 R_f 值由小到大排列, 应该是 Gly, Ala, Val, Ile 和 Leu。原理是 R_f 值与分子的极性有关。因为纸层析时, 固定相可以看作是有机溶剂饱和的水相, 而流动相是水饱和的有机相。分子极性越小, 在流动相的分配系数越大。上述这些氨基酸都属于一氨基一羧基氨基酸, 随着碳原子数目的增加极性减小, 在流动相中分配系数增加, 迁移率也随之增加。Ile 和 Leu 的碳原子数虽相同, 但碳链结构有差异, 对 R_f 值有一定的影响。

[例 2] 根据各种氨基酸的结构判断, 哪几种氨基酸在紫外区可能有特征吸收峰?

[解答] 具有芳香族结构和共轭双键结构的化合物在近紫外区 (200~400 nm) 表现出特征吸收。根据氨基酸的结构判断, 苯丙氨酸 (Phe)、酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp), 都有特征性的吸收峰 (Phe 为 257 nm, Tyr 为 275 nm, Trp 为 280 nm), 组氨酸 (His) 具有共轭双键结构, 也应有光吸收。在蛋白质的紫外吸收光谱中, 主要以酪氨酸为主, 因为色氨酸在蛋白质中所占的比例较低。

[例 3] 根据氨基酸的结构和配位化学理论, 你认为哪些氨基酸的何种基团可能与过渡金属配位?

[解答] (1) S 原子配位: Cys 的 $-SH$ 和 Met 的 $-SCH_3$ 。

(2) N 原子配位: Lys 的 $\epsilon-NH_3$, Arg 的胍基, Asn 和 Gln 的酰胺基, His 的咪唑基, Trp 的吲哚基及 Pro 的亚氨基。

(3) O 原子配位: Ser 和 Thr 的 $-OH$, 酪氨酸的苯酚基, Glu 和 Asp 的侧链 $-COOH$ 。

(4) 氨基酸所共有的 $\alpha-COOH$ 中的 O 和 $\alpha-NH_2$ 中的 N 原子也可参与配位。

1.2.2 氨基酸的等电点 (pI) 和 pK 值

氨基酸属于两性电解质, 同一种氨基酸分子在不同的 pH 条件下, 可以带正电荷、负电荷或不带电荷。当氨基酸处于兼性离子状态, 且解离成带正电荷和负电荷数目和趋势相等时溶液的 pH, 称为该氨基酸的等电点 (pI)。不同的氨基酸具有不同的等电点。

氨基酸的每一种酸、碱性功能基团 (如羧基、氨基等) 能分别被碱、酸所滴定, 其滴定的曲线是典型的弱碱或弱酸滴定曲线。当某一基团全被滴定时就全部转移成离子, 当被滴定一半时, 溶液中有一半是偶离子, 一半为离子状态, 此时溶液的 pH 即为 pK 值。因为每种氨基酸都有两种或两种以上可滴定基团, 因此可以有 pK_1 和 pK_2 等。中性氨基酸属于二元酸 (如 Gly、Ala、Ser、Thr 等), 其 $pI = 1/2 (pK_1 + pK_2)$; 酸性氨基酸 (Glu、Asp) 和碱性氨基酸 (Lys、Arg、His) 属于三元酸, pI 分别等于其兼性离子状态两边的两个 pK 值的算术平均值, 即酸性氨基酸的 $pI = 1/2 (pK_1 + pK_2)$, 碱性氨基酸的 $pI = 1/2 (pK_2 + pK_3)$ 。

[例 4] 向 1 L 1 mol/L 的处于等电点的甘氨酸溶液中加入 0.3 mol 的 HCl, 问所得溶液的 pH 是多少? 如果加入 0.3 mol 的 NaOH 以代替 HCl 时, pH 将是多少?

[解答] (1) 当加入 0.3 mol HCl 时,

$$\begin{aligned} pH &= pK_1 + \lg[R^\pm]/[R^+] \\ &= 2.34 + \lg(1-0.3)/0.3 \\ &= 2.71 \end{aligned}$$

(2) 当加入 0.3 mol NaOH 时, 则

$$\begin{aligned} pH &= pK_2 + \lg[R^-]/[R^\pm] \\ &= 9.60 + \lg 0.3/(1-0.3) \\ &= 9.23 \end{aligned}$$

1.2.3 氨基酸的重要化学反应

1. 与亚硝酸的反应

α -氨基酸在室温下可与亚硝酸反应, 很快生成 N_2 。在标准条件下, 根据生成 N_2 的体积即可计

算出氨基酸的含量。这是 Van Slyke(范氏)定氮法的基础。

用途: 对于蛋白质而言, 总氮量是不变的。随着水解程度的增加, 水解成氨基酸的量增加, 亦与亚硝酸反应生成的氮气量增加。因此, 此反应可用来测定蛋白质的水解程度。

2. 与甲醛的反应

氨基酸与甲醛反应生成二羟基甲基氨基酸, 用以保护氨基。因此, 可以用碱来滴定羧基上解离的 H^+ , 用碱的含量计算出氨基酸的含量。氨基酸为两性电解质, 故不能直接用酸碱滴定。

3. 与 2,4-二硝基氟苯(DNFB)的反应, 又称 Sanger 反应

氨基酸在弱碱性条件下, 与 2,4-二硝基氟苯反应生成黄色的 DNP-氨基酸。此反应主要用于氨基酸的 N 末端分析。

4. 与苯异硫氰酸酯(PITC)的反应, 又称分析法

氨基酸与 PITC 在弱碱性条件下反应生成苯氨基硫甲酰基氨基酸(PTC-氨基酸), 后者在无水三氟乙酸条件下发生内环化, 生成苯乙内酰硫脲氨基酸(PTC-氨基酸)。此反应主要用于多肽或蛋白质 N 端氨基酸的鉴定和氨基酸序列分析。

5. 与茚三酮的反应

氨基酸与茚三酮反应, 脱氨、脱羧, 生成相应的醛。 NH_3 再与还原型茚三酮和水合茚三酮作用生成紫色化合物(最大光吸收 570 nm)。但两个亚氨基酸(脯氨酸、羟脯氨酸)与茚三酮反应并不释放 NH_3 , 而直接生成亮黄色化合物, 最大光吸收 440 nm。该反应可根据颜色的深浅测定氨基酸的含量。

6. 由 R 基产生的反应

坂口(Sakaguchi)反应, Arg 的胍基与 α -萘酚在碱性的次溴酸钠溶液中生成红色物质, 用以鉴定 Arg 的存在。

黄色反应, 芳香族氨基酸(Tyr, Trp, Phe)与亚硝酸反应, 产生黄色物质。

偶氮反应, His 的咪唑基与偶氮试剂的特有反应, 生成棕红色物质。

Millon 反应, Tyr 的苯酚基与 Millon 试剂作用产生红色物质。

乙醛酸反应, Trp 的吲哚基与乙醛酸反应, 在界面处产生红色的环状物质。

以上这些特征反应可用来鉴定某些特定氨基酸的存在。

1.2.4 氨基酸的分离与分析

氨基酸的分离主要有两个目的, 即为了研究蛋白质的结构而进行的氨基酸分析工作和获得纯的氨基酸产品。

离子交换层析广泛地应用于氨基酸的分离和分析, 常用的有 CM-Sephrose FF、Dowex-50 磺酸型阳离子交换树脂、DEAE-Sephrose FF 等。

氨基酸用离子交换层析分离的原理主要是根据各种氨基酸所带的电荷差异, 其次与氨基酸的极性有关。氨基酸的混合物加到离子交换柱中后, 用一定 pH 和离子强度的缓冲液洗脱。在阳离子交换柱中, 带正电荷的氨基酸以静电引力吸附在柱子上, 氨基酸的疏水基团(如苯环)对此也有影响。带有较高 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率的氨基酸通过柱子的移动速度比具有同样非极性特征而 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率低的氨基酸移动的速度慢。也就是说, 在对离子交换剂的非极性吸附相同的情况下, 具有较低 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率的氨基酸比具有较高 $[AA^+]/[AA^0]$ 比率的氨基酸先洗脱下来。快速估计氨基酸的有效电荷, 可以用比较它的 pI 值与缓冲溶液的 pH 来确定。

假定 $\Delta P = pI - pH$

若 ΔP 为正值, 即氨基酸带正电荷。带有较大 ΔP 的氨基酸比具有同等疏水性但 ΔP 小的氨基酸能更紧密地吸附于阳离子交换树脂上。若 ΔP 是负值, 该氨基酸带负电荷, 因此与树脂吸附很小或没有吸附。

目前, 氨基酸分析仪就是根据该原理进行工作的。

【例5】 将 Asp($pI=2.98$), Gly($pI=5.97$), Thr($pI=6.53$), Leu($pI=5.98$) 和 Lys($pI=9.74$) 溶于 pH3.0 的柠檬酸缓冲液中, 加到用同种缓冲液平衡的 Dowex-50 阳离子交换树脂中。然后, 用提高离子强度的线性梯度缓冲液洗脱, 这 5 种氨基酸从柱上洗脱出来的顺序怎样?

【解答】 因 Asp 在 pH3.0 时, 静电荷接近于 0, 与树脂不发生吸附, 所以最先洗脱下来。三种中性氨基酸中, Thr 虽有较高的 ΔP , 但由于含有一个 $-OH$, 所以具有较高的极性, 减弱与树脂的吸附能力, 因此它在 Gly 和 Leu 之前洗脱下来。Gly 和 Leu 具有几乎相同的 ΔP , 但是 Gly 的极性较 Leu 强, 所以, Gly 的洗脱位置在第三, Leu 在第四。而 Lys 在四种氨基酸中由于具有最高的 ΔP , 带较高的有效正电荷, 只有在增加洗脱液的离子强度或提高溶液的 pH 时, 才能被洗脱下来。

1.2.5 蛋白质结构分析

进行一级结构测定之前, 要得到纯的蛋白质, 并用可靠的方法确定其纯度后才能进行工作。鉴定纯度的方法主要有超速离心、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦等。化学分析结果也可作为纯度的指标。一般用于分析的蛋白质纯度在 70% 以上即可。

1. 蛋白质一级结构分析的步骤

- (1) 确定蛋白质的肽链数目(末端分析法);
- (2) 拆开二硫键, 获得伸展的肽段(氧化还原法);
- (3) 氨基酸组成分析(用氨基酸自动分析仪测定蛋白质中各种氨基酸的组成比例);
- (4) 采用两种或两种以上的专一性水解方法, 将肽链切断, 分别获得一系列大小不同的肽段;
- (5) 测定每个肽段的氨基酸序列(Edman 降解法);
- (6) 采用片段重叠法, 拼凑出蛋白质完整的氨基酸序列;
- (7) 二硫键和酰胺基的确定(对角线电泳比较法确定二硫键的位置, 用 Conway 法测定酰胺氮确定酰胺的位置)。

【例6】 某五肽先经酸水解再经碱水解, 得到摩尔数相等的五种氨基酸的混合物。它们是 Ala, Cys, Lys, Phe 和 Ser。用 Edman 分析法进行 N 端分析, 获得 PTH-Ser。经胰蛋白酶水解可得到一种 N 端为 Cys 的三肽和另一种 N 端为 Ser 的二肽。用胰糜蛋白酶水解上述三肽, 得到 Ala 和另一个二肽。问该五肽的氨基酸顺序怎样?

【解答】 该五肽由五种氨基酸等量组成, 说明每种氨基酸在五肽分子中只含一个。已测得该五肽 N 端为 Ser。胰蛋白酶的水解部位必定是 Lys 或 Arg 的羧基端肽键。该五肽用胰蛋白酶水解得到一个 N 端为 Ser 的二肽, 该二肽一定位于 N 端, 且它的另一氨基酸一定是 Lys。

又已知 C 端三肽的 N 端为 Cys, 因胰糜蛋白酶只水解芳香族氨基酸的羧基端的肽键, 用它水解该三肽得到 Ala 和另一个二肽。可以得知此三肽的氨基酸顺序为: Cys-Phe-Ala。整个五肽的顺序是: Ser-Lys-Cys-Phe-Ala。

2. 蛋白质一级结构至四级结构的概念

【例7】 计算含有 78 个氨基酸的 α -螺旋的长度。如果是充分伸展的多肽链, 长度又是多少?

【解答】 α -螺旋每一个氨基酸残基在轴上向上升 0.15 nm, 每 3.6 个氨基酸残基螺旋一圈为 0.54 nm, 所以 78 个氨基酸的 α -螺旋长度为

$$0.15 \text{ nm} \times 78 = 11.7 \text{ nm}$$

充分伸展的多肽每一个氨基酸残基的长度为 0.36 nm, 则

$$0.36 \text{ nm} \times 78 = 28.08 \text{ nm}$$

1.2.6 蛋白质相对分子质量的计算

现在测定蛋白质相对分子质量的方法, 一是根据化学分析结果来计算相对分子质量。如根据氨