



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

全国高等医药院校规划教材

供医学院校研究生、长学制学生及临床医师培训使用

医学生物化学与分子生物学

第4版

主编 魏文祥 王明华 何凤田



科学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
全国高等医药院校规划教材

供医学院校研究生、长学制学生及临床医师培训使用

医学生物化学与分子生物学

第4版

主 编	魏文祥	王明华	何凤田	
主 审	吴士良			
副主编	周迎会	徐 岚	姜 智	俞慧君
	范 雁	顾建兰	沈宏杰	
编 委	(按姓氏拼音排序)			
	卜友泉	曹志飞	戴双双	范 雁
	高上上	顾范博	顾建兰	何凤田
	华 东	黄新祥	姜 智	姜旭淦
	连继勤	刘 君	彭 森	钱 晖
	仇 灏	邵雪君	沈宏杰	孙自玲
	万 璞	汪家敏	王金志	王明华
	王泽荣	魏文祥	徐 岚	徐顺高
	易光辉	赵 昀	周泉生	周迎会



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书为普通高等教育“十一五”国家级规划教材,并于2016年入选为“十二五”江苏省高等学校重点教材。全书共分为32章,分属生物化学、分子生物学、临床及专题三篇,主要涉及生物分子的结构与功能、遗传信息传递、信号转导及疾病、肿瘤转移的分子生物学及临床生化等内容。本书内容新颖,对基因组学、蛋白质组学、糖组学与代谢组学均有专门介绍,与临床医学密切相关的肿瘤生化、血液(含白血病)生化及骨、心血管生化更有详述,因此与医学相关性强。

本书主要面向医药类研究生和医学长学制学生,也可用作临床医师进修培训班(含研究生班)的教材及医学院校教师参考书。

图书在版编目(CIP)数据

医学生物化学与分子生物学 / 魏文祥, 王明华, 何凤田主编. —4 版.
—北京: 科学出版社, 2017.6

普通高等教育“十一五”国家级规划教材·全国高等医药院校规划教材
ISBN 978-7-03-053669-3

I. ①医… II. ①魏… ②王… ③何… III. ①医用化学-生物化学-高等学校-教材 ②医药学-分子生物学-高等学校-教材 IV. ①Q5 ②Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 137787 号

责任编辑: 张天佐 胡治国 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2005年4月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2017年6月第 四 版 印张: 39

2017年6月第十四次印刷 字数: 1 088 000

定价: 118.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

20 世纪以来,生物化学得到了飞速的发展,而在 20 世纪 50 年代,由 Watson 和 Crick 奠基的分子生物学更是在生命科学史上具有里程碑意义的发展,生物化学与分子生物学作为一门传统又新颖的学科,其重要性自不待言,而随着 20 世纪 90 年代人类基因组计划的起始和初步成功,也敲响了 21 世纪作为生命科学世纪的晨钟并预示着新的时代的来临。《医学生物化学与分子生物学》自吴士良教授领衔主编的第 1 版于 2005 年由科学出版社出版全国发行以来,深受广大师生的欢迎,畅销全国,已被国内苏州大学、第三军医大学、重庆医科大学、江苏大学、江南大学、南华大学、南通大学和湖北医药学院等 20 余所高等院校所采用。本书十多年来已再版 3 次,印刷十几次,对国内高校生物化学教学起到辐射与示范作用。2011 年,本教材被列为普通高等教育“十一五”国家级规划教材,2016 年入选为“十二五”江苏省高等学校重点教材。

《医学生物化学与分子生物学》(第 4 版)在原有版本的基础上对全书的内容进行了结构优化,内容更新和增减。新版全书分为三个部分。第 1 篇为生物化学篇,内容包括蛋白质结构与功能、蛋白质组学及其研究技术、物质代谢、糖组学及其与疾病的关系、酶学与酶工程相关内容、受体与细胞信号转导等。第 1 篇主要应用于本科生和硕士研究生的生物化学内容的教学。第 2 篇为分子生物学篇,内容包括基因和基因组、表观遗传学、核酸与蛋白质的生物合成、基因表达调控、基因工程技术等,主要适用于生命科学与医学专业的分子生物学内容的教学与研究。第 3 篇为临床及专题篇,主要包括肿瘤、白血病、心血管等疾病与分子生物学的关系,并介绍了近年来发展的生物芯片等分子生物学的常用技术。第 3 篇适用于博士研究生的教学,尤其适用于基础和临床医学专业长学制学生的教学与讨论。本书力求以新颖的知识体系激发学子们的创新思维。

参加本版教材编写工作的有苏州大学、第三军医大学、南通大学、重庆医科大学、江苏大学、江南大学、南华大学和湖北医药学院的多位教授和老师,在此一并致以衷心的感谢。尤其要感谢苏州大学及江苏省教育厅为本书列入“十二五”江苏省高等学校重点教材所给予的大力支持。

由于“十二五”江苏省高等学校重点教材要求出版的时间较为紧迫,更由于我们的学术水平有限,本书难免存在缺点或者不当之处,我们恭候同行专家和广大读者的批评指正,以便今后进一步改进和完善本书的编撰工作。

魏文祥

2017 年 5 月 20 日于苏州

目 录

第 1 篇 生物化学篇	1
第 1 章 蛋白质的结构与功能	1
第 2 章 酶与酶分子工程	14
第 3 章 物质代谢及调节	37
第 4 章 蛋白质组学	103
第 5 章 代谢组学	121
第 6 章 糖组学	125
第 7 章 细胞信号转导	162
第 8 章 细胞周期和细胞凋亡	210
第 9 章 血液生物化学	226
第 10 章 肝胆生化和肝性脑病	240
第 11 章 钙、磷及骨的代谢	249
第 2 篇 分子生物学篇	265
第 12 章 核酸、基因和基因组	265
第 13 章 基因组学及基因克隆常用策略与基因功能研究方法	280
第 14 章 表观遗传学	306
第 15 章 DNA 的生物合成	313
第 16 章 RNA 的生物合成	323
第 17 章 蛋白质的生物合成	339
第 18 章 基因表达调控	358
第 19 章 基因重组与基因工程	376
第 20 章 基因诊断和基因治疗	392
第 3 篇 临床及专题篇	409
第 21 章 心血管疾病的分子机制	409
第 22 章 肿瘤的生物化学与分子生物学	430
第 23 章 白血病的细胞与分子生物学	452
第 24 章 遗传性出血性疾病的分子生物学	461
第 25 章 肝纤维化的生化机制	469
第 26 章 天然毒素分子	486

第 27 章 生物芯片技术	492
第 28 章 分子生物学常用技术的原理及应用	505
第 29 章 放射损伤的分子机制与代谢改变	523
第 30 章 神经生化和分子生物学	540
第 31 章 激素生化	554
第 32 章 糖组学研究进展	572

第 1 篇 生物化学篇

第 1 章 蛋白质的结构与功能

蛋白质 (protein) 普遍存在于生物界, 是生物体的基本组成成分之一, 也是生物体中含量最丰富的生物大分子 (biomacromolecule)。它约占人体固体成分的 45%, 在细胞中可达细胞干重的 70% 以上。蛋白质分布广泛, 种类繁多, 结构和功能复杂, 承担着生物体内各种生理功能的任务。酶、抗体、大部分凝血因子、多肽激素、转运蛋白、收缩蛋白、基因调控蛋白等都是蛋白质, 但结构与功能截然不同。它们在物质代谢、机体防御、血液凝固、肌肉收缩、细胞信号转导、个体生长发育、组织修复等方面发挥着不可替代的重要作用。研究蛋白质的分子结构、组成和某些理化性质, 需要纯的、均一的、甚至是结晶的蛋白质样品。研究活性蛋白质的生物学功能, 需要样品保持它的天然构象, 尽量避免因变性而丧失活性。因此, 在实际工作中, 要根据研究工作和生产的具体目的和要求, 制订出分离和纯化蛋白质的合理程序。

第一节 蛋白质的分子组成与分子结构

一、蛋白质的分子组成

蛋白质的元素组成: 所有蛋白质都含有碳 (50%~55%)、氢 (6%~7%)、氧 (19%~24%)、氮 (13%~19%), 大多数蛋白质含有硫, 有些蛋白质还含有少量磷或金属元素铁、铜、锌、锰、钴、钼等, 个别蛋白质还含有碘。

氨基酸 (amino acid) 是蛋白质的基本组成单位。存在于自然界中的氨基酸有 300 余种, 但组成人体蛋白质的氨基酸仅有 20 种基本氨基酸。除甘氨酸和脯氨酸外, 其余均为 *L*- α -氨基酸 (图 1-1)。

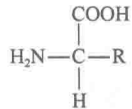


图 1-1 氨基酸分子的结构通式

各种蛋白质的含氮量相对恒定, 平均为 16%, 即 1g 氮相当于 6.25g 蛋白质。蛋白质是体内的主要含氮物, 因此可以根据公式: 每克样品中含氮克数 $\times 6.25 \times 100 = 100$ 克样品中所含蛋白质克数 (g%) 来推算出蛋白质的大约含量。

二、蛋白质的分子结构

(一) 蛋白质的一级结构

蛋白质分子中氨基酸通过肽键 (peptide bond) 相连。肽键是由一个氨基酸的 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基脱水缩合构成 (图 1-2)。肽链中的氨基酸分子称为氨基酸残基 (residue), 各氨基酸残基的 R 基团, 统称为多肽链的侧链 (side chain)。不同的 R 基团使多肽链折叠成独特的空间结构, 并赋予多肽或蛋白质不同的理化性质和功能。

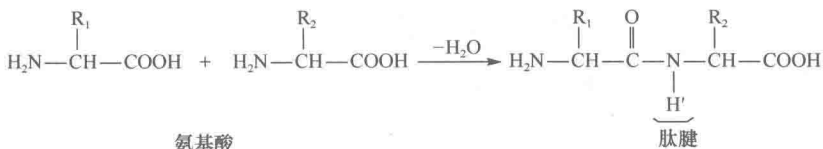


图 1-2 肽键的形成

蛋白质的一级结构 (primary structure) 是指蛋白质多肽链中氨基酸残基的排列顺序 (sequence), 即氨基酸序列 (amino acid sequence), 也是蛋白质最基本的结构。它是由基因上遗传密码的排列顺序所决定。一级结构中的主要化学键是肽键, 通过肽键连接起来, 成为多肽链, 由两个半胱氨酸脱氢而成的二硫键也属于一级结构范畴。迄今已有约一千多种蛋白质的一级结构被研究确定, 如胰岛素、胰核糖核酸酶、胰蛋白酶等。

蛋白质的一级结构决定了蛋白质的二级、三级等高级结构, 成百亿的天然蛋白质各有其特殊的生物学活性, 决定每一种蛋白质的生物学活性的结构特点, 首先在于其肽链的氨基酸序列, 由于组成蛋白质的 20 种氨基酸各具特殊的侧链, 侧链基团的理化性质和空间排布各不相同, 当它们按照不同的序列关系组合时, 就可形成多种多样的空间结构和不同生物学活性的蛋白质分子。因此, 一级结构是蛋白质空间构象的基础, 蛋白质有什么样的一级结构, 就必有其相应的空间构象。

(二) 蛋白质的空间构象

在正常情况下, 蛋白质并不是以完全伸展的多肽链存在, 而是以紧密折叠的结构行使其生理功能。而且, 一个特定蛋白质行使其功能的能力通常是由它的三维结构或空间构象决定的。蛋白质的这种天然折叠结构取决于氨基酸排列顺序、与溶剂分子的相互作用以及溶剂的 pH 和离子组成。其中, 氨基酸排列顺序是最重要的因素。蛋白质的空间构象包括二级结构、三级结构和四级结构。

1. 蛋白质的二级结构 蛋白质的二级结构 (secondary structure) 是指某段多肽链主链骨架有规律的盘绕和折叠, 即蛋白质分子中某段肽链主链原子的相对空间位置, 与 R 侧链无关。二级结构的主要形式是 α -螺旋 (α -helix) 和 β -折叠 (β -pleated sheet), 此外还有 β -转角 (β -turn) 和无规卷曲 (random coil)。

在许多蛋白质分子中, 还存在有介于二级结构与三级结构之间的超二级结构 (super secondary structure), 这是指多肽链内几个具有二级结构的肽段在空间上相互接近、相互作用, 形成特殊的空间构象, 也称为模体 (motif)。目前发现的超二级结构有三种基本组合形式: $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 和 $\beta\beta$ (图 1-3)。 $\alpha\alpha$ (图 1-3A) 经常是由两股平行或反向平行排列的右手螺旋段相互缠绕而成的左手卷曲螺旋, 是纤维状蛋白质如 α -角蛋白、肌球蛋白和原肌球蛋白的主要结构元件, 也存在于球状蛋白质中。 $\beta\alpha\beta$ (图 1-3B) 是由两段平行的 β -折叠股和一段作为连接链 (connector) 的 α -螺旋组成, β 股之间有氢键相连, 作为连接链的除了 α -螺旋, 还可以是无规卷曲。最常见的 $\beta\alpha\beta$ 组合是由三段平行的 β 股和两段 α -螺旋构成, 称为 Rossmann 折叠 ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$)。 $\beta\beta$ (图 1-3C) 是在球状蛋白质中由一条多肽链的若干段 β -折叠股反向平行组合而成的, 两个 β 股之间通过一个短回环 (发夹) 连接起来。

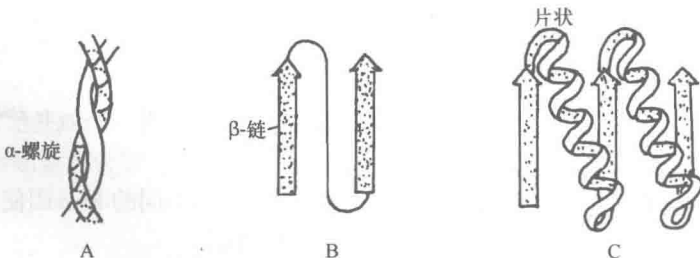


图 1-3 超二级结构的基本形式

超二级结构还可以形成紧密、稳定并且在蛋白分子构象上明显可分的区域, 称为结构域 (domain), 这是介于二级和三级结构之间的另一种结构层次。例如, 免疫球蛋白 (Ig) 分子通过链内二硫键折叠成 12 个能行使特定功能的球形单位, 即结构域, 每个球形结构域为一个功能

区,具有相应的生理功能(图1-4)。常见结构域的氨基酸残基数在100~400个,最小的结构域只含有40~50个氨基酸残基,大结构域的氨基酸残基超过400个。结构域之间的肽链松散弯曲,形成分子内裂隙结构。裂隙内有许多非极性氨基酸残基,因而是疏水的,不允许水分子进入,但能容纳蛋白质的辅基或酶的底物分子。结构域之间的连接具有一定的柔韧性,这使得每个结构域都能进行较大幅度的相对运动,使分子内裂隙开放或关闭,以便于蛋白质分子与其他分子相互作用,因此这些部位往往是活性中心和变构中心之所在。底物可在此与酶结合并产生效应,变构调节物亦可结合在此处,产生变构效应。

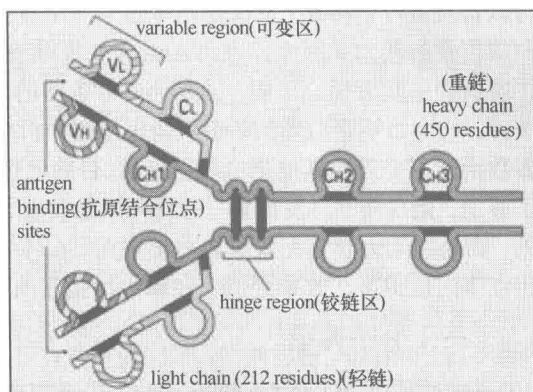


图1-4 免疫球蛋白的12个结构域

2. 蛋白质的三级结构 蛋白质的三级结构 (tertiary structure) 是指在二级结构、模序、乃至结构域的基础上,由于侧链R基团的相互作用,整条肽链进一步折叠和盘曲,形成球状、棒状、椭圆形、纤维状等。三级结构包括整条肽链所有原子在三维空间的排布位置,但不包括亚基间的相互作用。氨基酸侧链之间的疏水作用、氢键、范德瓦耳斯力和盐键是维持三级结构的主要力量。带有极性基团(羟基、羧基、酰胺基、氨基、胍基等)的亲水性氨基酸残基大多分布在分子表面,形成亲水面;而没有极性基团的疏水性氨基酸残基大多埋在分子内部,形成疏水核。这对稳定蛋白质的构象有十分重要的作用,而且这些疏水区域常常是蛋白质分子的功能部位或活性中心。

3. 蛋白质的四级结构 上述蛋白质的二、三级结构通常仅指一条多肽链的卷曲和折叠。然而在体内,有些蛋白质含有两条或多条多肽链,在这类蛋白质中,每一条多肽链都有其完整的三级结构,被称为该蛋白质的亚基(subunit),以 α 、 β 、 γ 等命名。有时也按照功能的不同称之为调节亚基(R)和催化亚基(C)。蛋白质的四级结构(quaternary structure)就是指蛋白质分子中亚基的空间排列和相互间的布局。亚基之间一般呈对称的三维空间排布,并以非共价键相连。例如,血红蛋白是由2个 α 亚基和2个 β 亚基通过8个离子键组成的四聚体,每个亚基都结合1分子血红素(heme)辅基(图1-5),具有运输 O_2 和 CO_2 的功能。

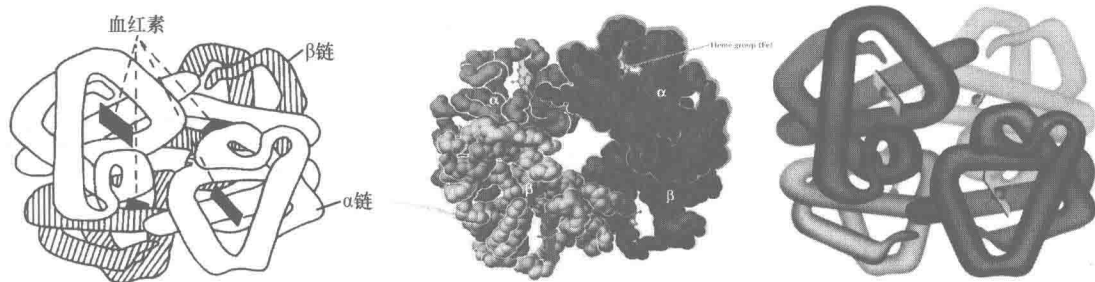


图1-5 血红蛋白结构示意图

第二节 蛋白质折叠和结构预测

一、体内蛋白质折叠

研究蛋白质的折叠机制对保留蛋白质活性、维持蛋白质稳定性和包涵体蛋白质折叠复性等具有重要意义。在20世纪60年代,Anfinsen通过研究核糖核酸酶A阐明去折叠的蛋白质在体外

可以自发进行再折叠,仅仅是氨基酸序列本身已经包含了蛋白质正确折叠的所有信息,并提出蛋白质折叠的热力学假说,为此 Anfinsen 获得 1972 年诺贝尔化学奖。尽管氨基酸序列在蛋白质的正确折叠中起着核心作用,但其他各种各样的因素,包括信号序列、辅助因子、分子伴侣及环境条件,均会影响蛋白质的折叠。新生蛋白质折叠并组装成有功能的蛋白质,并非都是自发的,在多数情况下是需要其他蛋白质帮助的。目前已经有许多参与蛋白质折叠的折叠酶和分子伴侣得到了鉴定,蛋白质“自发折叠”的经典概念发生了转变和更新,但这并不与折叠的热力学假说相矛盾,而是在动力学上完善了热力学观点。在体外,蛋白质的重折叠没有额外的分子参与,其折叠比在体内慢得多,效率很低。在体内,蛋白质折叠是在催化剂的帮助下进行的。

(一) 分子伴侣

分子伴侣 (molecular chaperone) 是细胞中一类保守蛋白质,可识别肽链的非天然构象,促进各功能域和整体蛋白质的正确折叠。而且在蛋白质折叠完毕后与之分离,不构成这些蛋白质执行功能时的组分。细胞内至少有两种分子伴侣家族。

1. 热休克蛋白 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 是细胞在高温应激及其他逆境中被诱导产生或增加的,包括 HSP70、HSP40 和 GrpE 三个家族。其中, HSP70 具有 ATP 酶活性, HSP40 能激活 HSP70 的 ATP 酶活性, GrpE 为核苷酸交换因子。热休克蛋白促进蛋白质折叠的基本作用原理是: 结合并保护待折叠多肽片段, 再释放该片段进行折叠, 形成 HSP70 和多肽片段依次结合-解离的循环。具体机制如下: HSP40 结合待折叠多肽片段, 并将其导向 HSP70-ATP 复合物。HSP40 激活 HSP70 的 ATP 酶活性, 水解 ATP 生成 ADP, 产生稳定的 HSP40-HSP70-ADP-多肽复合物。GrpE 与 HSP40 作用, 促进 ATP 交换 ADP, 使复合物变得不稳定而迅速解离, 该多肽片段被释放并进行正确折叠。多肽各区段依次进行上述的结合-解离循环, 完成折叠过程。

2. 伴侣素 伴侣素 (chaperonins) 是分子伴侣的另一家族, 与真核细胞的 HSP60 和 HSP10 同源的大肠杆菌 (*E. coli*) 的 GroEL 和 GroES 家族即属于此类, 主要作用是为非自发性折叠蛋白质提供能折叠形成天然空间构象的微环境。具体机制如下: GroEL 由 2 组 60kDa 同亚基 7 聚体形成桶状空腔, 组成未封闭的复合物。待折叠肽链进入该空腔后, GroES 的 10kDa 同亚基 7 聚体可作为“盖子”瞬时封闭 GroEL 复合物, 为该肽链完成折叠提供微环境。伴随 ATP 水解释能, GroEL 复合物构象周期性改变, 引起 GroES “盖子”解离和折叠后的肽链释放。以上过程不断重复, 直至蛋白质形成天然空间构象 (图 1-6)。

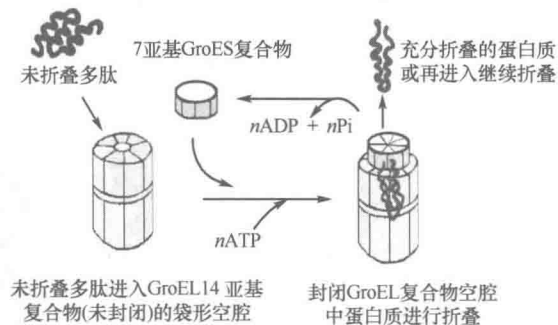


图 1-6 伴侣素 GroEL/GroES 系统促进蛋白质折叠机制

(二) 蛋白质二硫键异构酶

新生蛋白质中正确配对的二硫键的形成受蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 的催化, 这一过程主要在细胞内质网进行。PDI 与多肽主链结合, 优先与含半胱氨酸残基的肽段发生作用, 通过二硫键的改组使蛋白质很快找到热力学上最稳定的配对方式。

(三) 肽-脯氨酰顺反异构酶

天然蛋白质肽链中肽酰-脯氨酸之间的肽键 94%是反式构型,其余为顺式构型,自发的异构化很慢。肽-脯氨酰顺反异构酶(peptide prolylcis-trans isomerase, PPI)催化顺反异构体之间的转换,是蛋白质三维构象形成的限速酶。

二、蛋白质结构预测

一种生物体的基因组决定了构成该生物体的所有蛋白质,基因的碱基排列顺序决定了蛋白质的氨基酸序列。虽然蛋白质由氨基酸的线性序列组成,但它们只有折叠成特定的空间构象后才具有相应的活性和生物学功能。了解蛋白质的空间结构不仅有利于认识蛋白质的功能,也有利于认识蛋白质是如何执行其功能的。因此,确定蛋白质的结构对于生物学研究非常重要。只要掌握了蛋白质的折叠规律,那么,从它的一级结构出发,就可以预测其三维结构。20世纪60年代后期,Anfinsen首先发现变性蛋白质在允许重新折叠的实验条件下可以重新折叠到原来的结构,并提出蛋白质折叠的信息隐含在蛋白质的一级结构中。自此,科学家们对蛋白质结构的预测进行了大量的研究,分子生物学家将有可能直接运用适当的计算方法,从氨基酸序列出发,预测蛋白质的空间结构。

(一) 二级结构的预测

某些残基如 Glu、Met、Ala 和 Leu 在 α -螺旋中出现的频率比在其他二级结构元件中高,而 Gly 和 Pro 在 α -螺旋中出现频率很低,在 β -转角中却很高。在 β -折叠片中,Val、Ile 和芳香族氨基酸出现频率很高,而 Asp、Glu 和 Pro 出现频率却很低。这表明,不同氨基酸残基形成各种二级结构的倾向性是不同的。预测蛋白质的二级结构大多以已知三维结构的蛋白质为依据,用人工神经网络、遗传算法等技术构建预测方法。一般对于 α -螺旋预测精度较好,对 β -折叠差些,而对 α -螺旋和 β -折叠之外的无规则二级结构效果更差。常用的蛋白质二级结构预测方法有 Chou-Fasman 算法、GOR 算法、多序列列线预测、基于神经网络的序列预测、基于已有知识的预测方法及混合方法。目前预测准确率在 70%以上的都是混合方法,其中,同源性比较方法、神经网络方法和 GOR 算法应用最为广泛。

(二) 三级结构的预测

蛋白质三级结构的预测方法通常包括同源性建模和从头开始的预测方法。同源性建模是利用已知结构的蛋白质序列来比对某一个蛋白质的序列,即靶序列,如果靶序列和已知结构序列的全长有很高的相似性,在合理的信任度上,我们可以使用已知结构作为靶蛋白质的模板。同源建模的过程通常并不统一,但基本思路是一致的,基本包括如下几个步骤:①利用靶序列来搜索已知蛋白质结构;②产生靶序列和模板序列最可能的完整比对;③以模板结构骨架作为模型,建立蛋白质骨架模型;④在靶序列或者模板序列的有空位区域,使用环建模过程代替合适长度的片段;⑤给骨架模型加上侧链;⑥优化侧链的位置;⑦使用能量最小和已知的优化知识来优化结构。

在进行序列比对时,最容易使用 BLASTP 程序比对 NRL-3D 或 SCOP 数据库中的序列。如果发现有超过 100 个碱基并且有远高于 40%序列相同率的匹配序列,则未知序列蛋白与该匹配序列蛋白将有非常相似的结构。在这种情况下,同源性建模在预测该未知蛋白精细结构方面会有非常大的作用(表 1-1)。

表 1-1 蛋白质结构预测相关程序及数据库

数据库	说明	网址
PDB	蛋白质三维结构	http://www.rcsb.org/pdb
SWISS-PROT	蛋白质序列数据库	http://kr.expasy.org/sprot/

数据库	说明	网址
PIR	蛋白质序列数据库	http://pir.georgetown.edu/
OWL	非冗余蛋白质序列	http://www.bioinf.man.ac.uk/dbbrowser/OWL/
EMBL	核酸序列数据库	http://www.embl-heidelberg.de/
TrEMBL	EMBL的翻译数据库	http://kr.expasy.org/sprot/
GenBANK	核酸序列数据库	http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/
PROSITE	蛋白质功能位点	http://kr.expasy.org/prosite/
SWISS-MODEL	从序列建模结构	http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html
SWISS-3DIMAGE	三维结构图示	http://us.expasy.org/sw3d/
DSSP	蛋白质二级结构参数	http://www.cmbi.kun.nl/gv/dssp/
FSSP	已知空间结构的蛋白质家族	http://www.ebi.ac.uk/dali/fssp/fssp.html
SCOP	蛋白质分类数据库	http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/
CATH	蛋白质分类数据库	http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath/
Pfam	蛋白质家族和结构域	http://pfam.wustl.edu/

第三节 蛋白质的结构与功能的关系

研究蛋白质结构与功能的关系,是从分子水平上认识生命的一个极为重要的领域。各种蛋白质都有特异的生物学功能,而所有这些功能又是以其特异的结构为基础的。

一、蛋白质一级结构与功能的关系

(一) 一级结构是空间构象的基础

前已叙及,形成 β -折叠要求氨基酸的侧链较小,才能容许两条肽链或肽段彼此靠近,而多个酸性或多个碱性氨基酸残基相邻,则妨碍 α -螺旋的形成。因此,多肽链中氨基酸的种类及排列顺序决定了肽链的折叠和卷曲方式。

(二) 一级结构与功能的关系

1. 一级结构相似的多肽或蛋白质具有相似的空间构象及功能 例如,不同哺乳动物来源的胰岛素,都是由21个氨基酸残基的A链和30个氨基酸残基的B链组成。在不同哺乳动物对比中,胰岛素的51个氨基酸残基中有24个残基是恒定不变的,它们的一级结构虽不完全相同,但与其空间结构形成有关的氨基酸残基却完全一致,且二硫键的配对和空间构象也极相似,因而都执行着相同的调节糖代谢等生理功能。

2. 关键部位氨基酸残基的改变会引起蛋白质空间构象的改变乃至功能的异常 例如,镰状红细胞性贫血(sickle cell anemia)患者由于基因突变,血红蛋白中有一个氨基酸残基发生了改变,即HbA(正常血红蛋白) β 链的第6位为谷氨酸,而HbS(患者血红蛋白)的 β 链的第6位是缬氨酸,亲水侧链被非极性的疏水侧链所取代(图1-7),这样在 $\beta 6\text{Val}$ 与 $\beta 1\text{Val}$ 之间出现了一个因疏水作用而形成的局部结构。

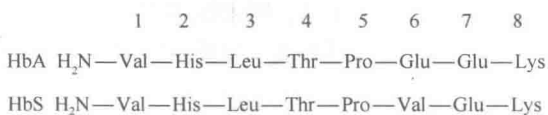


图1-7 HbA与HbS的一级结构对比

这一结构能使脱氧HbS进行线性缔合,导致氧结合能力过低,使得整个红细胞扭成镰刀状,导致溶血性贫血。可见一个氨基酸的变异,能引起空间结构改变,从而影响血红蛋白的正常功能。这种由蛋白质分子发生变异所导致的疾病,被称为“分子病”,为基因突变所致。

二、蛋白质空间构象与功能的关系

蛋白质的空间构象是其特定生物学功能的基础，空间构象发生改变，功能随之改变。

(一) 变性——蛋白质功能丧失

1. 变性的概念 蛋白质的二级结构以氢键来维系局部主链构象稳定，三、四级结构主要依赖于氨基酸残基侧链之间的相互作用，从而保持蛋白质的天然构象。但在某些物理和化学因素作用下，其特定的空间构象被破坏，有序的空间结构变成无序的空间结构，从而导致其理化性质的改变和生物活性的丧失，称为蛋白质的变性（denaturation）。一般认为蛋白质的变性主要发生二硫键和非共价键的破坏，而不涉及一级结构中氨基酸序列的改变。也就是说，生物活性的丧失是变性蛋白质的主要表现，而空间结构的破坏是蛋白质变性的结构基础。

2. 变性因素 鸡蛋清能够全溶于水，但经过煮沸之后就凝固，不再溶于水，这是众所周知的蛋白质变性现象。造成蛋白质变性的因素有多种，一类是化学因素，包括酸、碱、有机溶剂（如乙醇、甲醇、丙酮、乙醚等）、尿素、表面活性剂（如十二烷基磺酸钠）、生物碱试剂（如三氯乙酸）及重金属离子等。另一类是物理因素，包括加热、紫外线、X射线、超声波、高压及剧烈振荡等。蛋白质变性后，其溶解度降低，黏度增加，结晶能力消失，生物活性丧失，易被蛋白酶水解。

3. 变性的可逆性 若蛋白质变性程度较轻，去除变性因素后，有些蛋白质仍可恢复或部分恢复其原有的构象和功能，称为复性（renaturation）。例如，血红蛋白经酸变性后，加碱中和可恢复其原有性质的2/3；胰蛋白酶在酸性溶液中短时间加热（70~100℃）变性后，如适当冷却，仍可恢复其原有性质；在核糖核酸酶溶液中加入尿素和β-巯基乙醇，使其丧失生物活性，而经透析方法去除尿素和β-巯基乙醇，核糖核酸酶又可恢复其原有的构象，生物学活性也几乎全部重现。但是许多蛋白质变性后，空间构象严重被破坏，不能复原，称为不可逆性变性。

(二) 变构——蛋白质活性调节方式

一个蛋白质与它的配体（或其他蛋白质）结合后，蛋白质的空间结构发生改变，使它适合于功能的需要，这一类变化称为变构效应或别构效应（allosteric effect）。具有变构效应的蛋白质称为变构蛋白（allosteric protein）。能引起蛋白质发生变构效应的物质称为变构效应物（allosteric effector）。变构效应物都是正常体内的代谢物，如 H^+ 、 CO_2 、 O_2 、ATP、AMP、CTP及酶的底物等，也有某些生理活性物质如激素等。

血红蛋白是最早发现具有变构效应的蛋白质，下面以它为例阐述蛋白质空间结构的改变与功能之间的关系。

1. 血红蛋白（hemoglobin, Hb）的结构 血红蛋白存在于动物的红细胞中，是 O_2 和 CO_2 的运载体。血红蛋白含有辅基血红素，血红素是铁卟啉化合物（图1-8），由4个吡咯环通过4个甲炔基相连成为一个环形， Fe^{2+} 居于环中央。 Fe^{2+} 有6个配位键，其中4个与吡咯环的N配位结合，1个配位键和肌红蛋白的93位（F8）组氨酸残基结合，氧则与 Fe^{2+} 形成第6个配位键，接近第64位（E7）组氨酸。

血红蛋白分子是由4个亚基组成的四聚体，每个亚基结构中间有一个疏水局部，可结合1个血红素并携带1分子氧，因此1分子Hb共结合4分子氧。成年人红细胞中的Hb由两条 α 肽链和两条 β 肽链（ $\alpha_2\beta_2$ ）组成， α 链含141个氨基酸残基， β 链含146个氨基酸残基。胎儿期主要为 $\alpha_2\gamma_2$ ，胚胎期为 $\alpha_2\varepsilon_2$ 。亚基之间通过8对盐键（图1-9）紧密结合，形成亲水的球状蛋白。

2. 血红蛋白的变构效应 Hb与 O_2 呈可逆结合，形成 HbO_2 （氧合血红蛋白）。 HbO_2 占血液中总Hb的百分数称为氧饱和度，它随氧分压而改变的曲线（氧解离曲线）呈S形，提示Hb的四个亚基与 O_2 结合有四个不同的平衡常数。当第一个亚基与 O_2 结合后，促进第二、第三个亚基与 O_2 结合，当第三个亚基与 O_2 结合后，又大大促进第四个亚基与 O_2 结合。Perutz等利用X射线衍射

技术,分析 Hb 和 HbO₂ 结晶的三维结构图谱,认为这种与 O₂ 结合的特征与其空间构象改变有关。

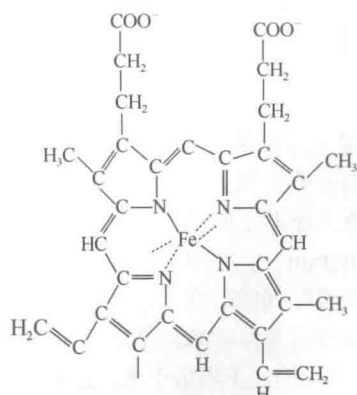


图 1-8 血红素结构

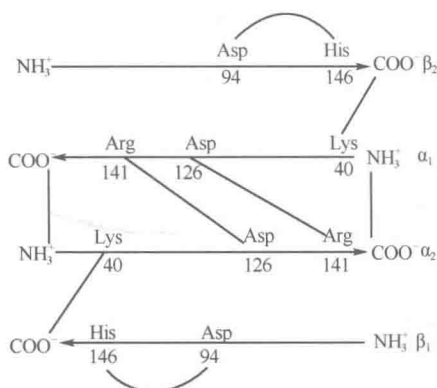


图 1-9 Hb 亚基间的盐键

未结合氧时, Hb 的 α_1/β_1 和 α_2/β_2 呈对角排列, 结构较为紧密, 称为紧张态 (tense state, T 态), T 态 Hb 与 O₂ 的亲合力小。随着 O₂ 的结合, 四个亚基羧基末端之间的盐键断裂, 使 α_1/β_1 和 α_2/β_2

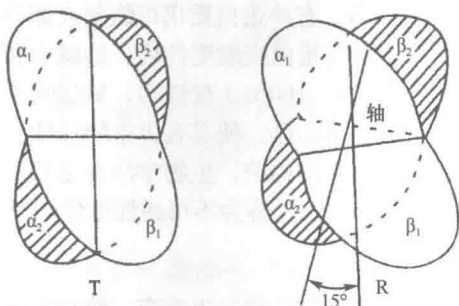


图 1-10 Hb T 态与 R 态的互变

的长轴形成 15° 的夹角, 结构显得相对松弛, 称为松驰态 (relaxed state, R 态) (图 1-10), R 态 Hb 与 O₂ 的亲合力大。T 态转变成 R 态是在逐个结合 O₂ 的过程中完成的。在脱氧 Hb 中, Fe²⁺ 的半径比卟啉环中间的孔大, 因此 Fe²⁺ 不能进入卟啉环小孔, 高出卟啉环平面 0.075nm。当第 1 个 O₂ 与血红素 Fe²⁺ 结合后, Fe²⁺ 的半径变小, 可进入到卟啉环的小孔中 (图 1-11), 引起 F 肽段微小的移动, 造成两个 α 亚基间盐键断裂, 使亚基间结合松弛。这种构象的细微变化可促进第二个亚基与 O₂ 结合, 最后使四个亚基全处于 R 态。这种一个亚基

与 O₂ 结合后引起亚基的构象变化, 就是典型的变构效应。小分子 O₂ 是变构效应剂, Hb 则是变构蛋白。携 O₂ 的 Hb 亚基促进不携 O₂ 的亚基与 O₂ 结合的现象称为正协同效应 (positive cooperativity)。协同效应是指一个亚基与其配体 (Hb 中的配体为 O₂) 结合后, 能影响此寡聚体中另一亚基与配体的结合能力。如果是促进作用则称为正协同效应; 反之则为负协同效应。

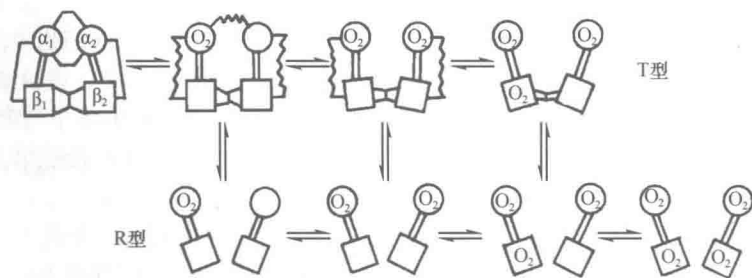


图 1-11 血红素与 O₂ 结合, Fe²⁺ 进入卟啉环小孔

(三) 蛋白质构象改变与疾病发生

生物体内蛋白质的合成、加工和成熟是一个复杂的过程, 其中多肽链的正确折叠对其正确构象形成和功能正常发挥至关重要。若蛋白质的折叠发生错误, 尽管其一级结构不变, 但空间构象发生改变, 其功能受到影响, 严重时可导致疾病发生, 有人将此类疾病称为蛋白构象疾病。

有些蛋白质错折叠后相互聚集，常形成抗蛋白水解酶的淀粉样纤维沉淀，产生毒性而致病，表现为蛋白质淀粉样纤维沉淀的病理改变，疯牛病就属于这样一类疾病。

疯牛病是由朊病毒蛋白 (prion protein, PrP) 引起的一组人和动物神经退行性病变，这类疾病具有传染性、遗传性或散在发病的特点，其在动物间的传播是由 PrP 组成的传染性颗粒完成的。PrP 是染色体基因编码的蛋白质。正常动物和人的 PrP 为分子量 33~35kDa 的蛋白质，水溶性强，对蛋白酶敏感，二级结构为多个 α -螺旋，称为 PrP^C。富含 α -螺旋的 PrP^C 在某种未知蛋白质的作用下可转变成致病分子，其二级结构全为 β -折叠，称为 PrP^{SC}，它与 PrP^C 的一级结构完全相同。可见 PrP^C 转变成 PrP^{SC} 只涉及蛋白质分子 α -螺旋重新折叠成 β -折叠的过程。PrP^{SC} 对蛋白酶不敏感，水溶性差，而且对热稳定，可以相互聚集，最终形成淀粉样纤维沉淀而致病。

第四节 蛋白质的分离与纯化

一、蛋白质分离纯化的一般程序

蛋白质的分离 (separation, isolation) 和纯化 (purification) 工作是生物化学中一项艰巨而繁重的任务，对于任何一种蛋白质都应该尽可能选择一套适当的分离纯化程序以获得高纯度的制品。蛋白质纯化的总目标是增加制品的纯度 (purity) 或比活 (specific activity)，以增加单位蛋白质重量中所需蛋白质的含量或生物活性，并设法除去变性的蛋白质和杂蛋白。分离纯化某一特定蛋白质的一般程序可以分为以下几个步骤。

(一) 材料的预处理及细胞破碎

分离提纯某一种蛋白质时，首先要把蛋白质从组织或细胞中以溶解的状态释放出来，并保持其天然状态和生物活性。所以要根据不同的情况，选择适当的方法，将组织和细胞破碎。常用的破碎组织细胞的方法有以下几种。

1. **机械破碎法** 这种方法是利用机械力的剪切作用，使细胞破碎。常用设备有高速组织捣碎机、匀浆器、研钵等。
2. **渗透破碎法** 这种方法是在低渗条件使细胞溶胀而破碎。
3. **反复冻融法** 生物组织经冻结后，细胞内液结冰膨胀而使细胞胀破。这种方法简单方便，但那些对温度变化敏感的蛋白质不宜采用此法。
4. **超声波法** 使用超声波振荡器使细胞膜上所受张力不均从而导致细胞破碎。
5. **酶法** 例如，使用溶菌酶破坏微生物细胞等。

(二) 蛋白质的抽提

蛋白质抽提是指选择适当的缓冲液溶剂把蛋白质提取出来。抽提缓冲液的 pH、离子强度、组成成分等条件的选择应根据欲制备的蛋白质的性质而定。例如，膜蛋白的抽提，抽提缓冲液中一般要加入表面活性剂如十二烷基磺酸钠、tritonX-100 等，使膜结构破坏，利于蛋白质与膜的分离。在抽提过程中，应注意控制温度，避免剧烈搅拌，以防止蛋白质变性。

(三) 蛋白质粗制品的获得

当获得蛋白质提取液 (有时还杂有核酸和多糖等) 后，选用适当的方法将所要的蛋白质与其他杂蛋白分离开来，以获取蛋白质粗制品。比较方便的有效方法是根据蛋白质溶解度的差异进行分离。常用的有下列几种方法。

1. **盐析法** 不同蛋白质盐析所需要的盐饱和度不同，所以可通过调节盐浓度将目的蛋白沉淀析出。被盐析沉淀下来的蛋白质仍保持其天然性质，并且能再度溶解。

2. 等电点沉淀法 不同蛋白质的等电点不同, 可用等电点沉淀法使它们相互分离。

3. 有机溶剂沉淀法 中性有机溶剂如乙醇、丙酮, 它们的介电常数比水低, 能使大多数球状蛋白质在水溶液中的溶解度降低, 进而从溶液中沉淀出来, 因此可用来沉淀蛋白质。此外, 有机溶剂会破坏蛋白质表面的水化层, 促使蛋白质分子变得不稳定而析出。由于有机溶剂会使蛋白质变性, 使用该方法时, 要注意在低温下操作, 选择合适的有机溶剂浓度。

(四) 样品的进一步纯化

用等电点沉淀法、盐析法等所得到的蛋白质一般含有其他蛋白质杂质, 必须进一步分离提纯才能得到有一定纯度的样品。常用的纯化方法有凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等, 有时还需要几种方法联合使用才能得到较高纯度的蛋白质样品。

结晶是蛋白质分离纯化的最后步骤, 只有某种蛋白质在溶液中数量上占优势时才能形成结晶。结晶过程本身也伴随着一定程度的纯化, 而重结晶又可以除去少量夹杂的蛋白质。由于结晶中从未发现过变性蛋白质, 因此蛋白质的结晶不仅是纯度的一个标志, 也是断定蛋白制品处于天然状态的有力指标。结晶也是进行 X 射线晶体学分析的前提。蛋白质纯度和浓度越高, 就越容易结晶。结晶的最佳条件是使溶液略处于过饱和状态, 可借助于控制温度、加盐盐析、加有机溶剂或调节 pH 等方法来获得适度的过饱和溶液。

二、蛋白质的分离纯化方法

可以根据蛋白质在溶液中的不同性质对其进行分离纯化。

(一) 根据分子大小不同的纯化方法

蛋白质分子最明显的特征之一就是颗粒大, 并且不同的蛋白质分子大小不同, 因此可以利用一些较简便的方法使蛋白质和小分子物质分开, 并使蛋白质混合物也得到分离。根据蛋白质分子大小不同进行分离的方法主要有透析、超滤、离心和凝胶过滤等。透析和超滤是分离蛋白质时常用的方法。

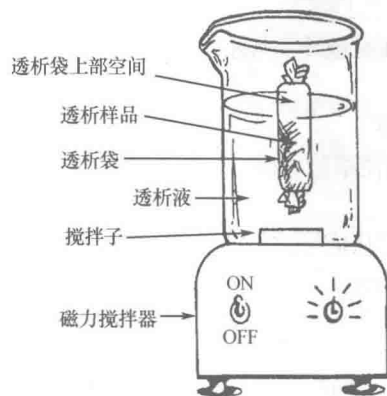


图 1-12 透析装置

1. 透析与超滤

(1) 透析 (dialysis): 是利用半透膜将蛋白质和其他小分子物质如无机盐、单糖等分开, 也可以将分子大小不同的蛋白质分开。半透膜的孔有大有小, 根据待分离物质的分子质量来选择适当的半透膜。将待纯化的蛋白质溶液装在半透膜做成的透析袋内, 放入透析液 (蒸馏水或缓冲液), 适时更换透析液, 直至透析袋内无机盐等小分子物质减少到最小值为止 (图 1-12)。

(2) 超滤 (ultrafiltration): 是利用压力或离心力, 强行使水和其他小分子溶质通过半透膜, 而蛋白质被截留在膜上, 以达到浓缩和脱盐的目的。可以选择不同孔径的滤膜截留不同分子质量的蛋白质。

这两种方法都可以将蛋白质大分子与以无机盐为主的小分子分开。它们经常和盐析、盐溶方法联合使用, 在进行盐析或盐溶后可以利用这两种方法除去引入的无机盐。由于超滤过程中滤膜表面容易被吸附的蛋白质堵塞, 以致超滤速度减慢, 截流物质的分子质量也越来越小。所以在使用超滤方法时要选择合适的滤膜, 也可以选择切向流过滤得到更理想的效果。

2. 凝胶过滤 凝胶过滤也称分子排阻层析或分子筛层析, 是根据分子大小分离蛋白质混合物最有效的方法之一。柱中最常用的填充材料是葡聚糖凝胶 (sephadex gel) 和琼脂糖凝胶 (agarose gel), 为惰性的多孔网状结构物质。当不同分子大小的蛋白质流经凝胶层析柱时, 比

凝胶孔径大的分子不能进入其内部，而是被排阻在凝胶颗粒外部，在颗粒之间的空隙中向下移动，并最先流出柱外。小分子物质能进入凝胶颗粒内部，因此流程较长。这样，不同大小的分子因所经路径不同而得到分离，大分子物质先被洗脱出来，小分子物质后被洗脱出来(图 1-13)。

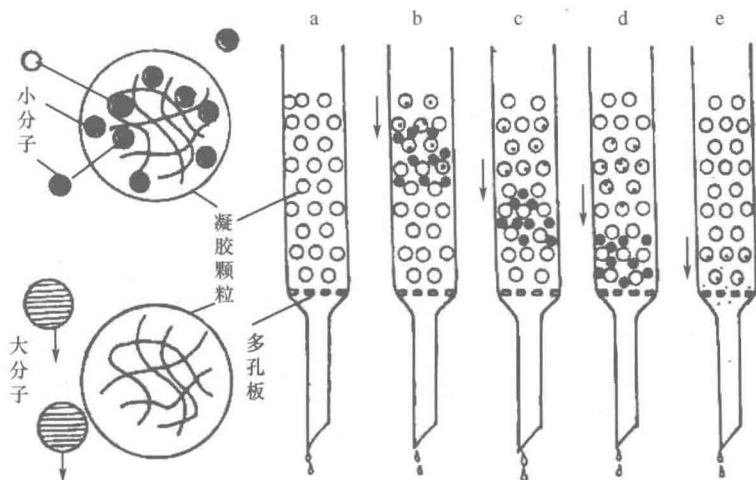


图 1-13 凝胶过滤原理

a. 层析前; b. 样品进入凝胶内部; c. 大小分子分离; d. 大分子流程短, 先被洗脱; e. 小分子流程长, 后被洗脱

(二) 根据溶解度不同的纯化方法

1. 蛋白质的盐析 中性盐对蛋白质的溶解度有显著影响。在低盐浓度时,随着盐浓度升高,蛋白质的溶解度增加,这种现象称盐溶(salting in);当盐浓度继续升高时,蛋白质的溶解度不同程度地下降并先后析出,这种现象称盐析(salting out)。盐析时若溶液 pH 在蛋白质等电点则效果更好。由于各种蛋白质分子大小和亲水程度不同,故盐析所需的盐浓度也不一样,因此调节混合蛋白质溶液中的中性盐浓度可使各种蛋白质分段沉淀。

2. 等电点沉淀 蛋白质在静电状态时,颗粒之间的静电斥力最小,因而溶解度也最小。各种蛋白质的等电点有差别,因此可以通过调节溶液的 pH 达到某一蛋白质的等电点而使之沉淀。此法常与盐析法结合使用。

(三) 根据带电性质不同进行分离

根据蛋白质的电荷不同分离蛋白质混合物的方法有电泳、等电聚焦、离子交换层析等。

1. 电泳 在外电场的作用下,带电颗粒向着与其所带净电荷相反的电极移动的现象称为电泳(electrophoresis)。蛋白质在电场中移动的速度和方向,取决于它所带电荷的性质、数目、分子质量大小和形状等。带电少、分子质量大的蛋白质,泳动速度慢;反之,泳动速度快。因此,混合在一起的蛋白质按照各自的带电特点,移动不同的距离从而得以分离。电泳结束后,用蛋白质显色剂显色,可看到一条条被分离的蛋白质条带。

最常用的蛋白质电泳方法是 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis),简称 SDS-PAGE。它以聚丙烯酰胺凝胶为支持物,一般制成凝胶柱或凝胶板。用还原剂 SDS,即十二烷基硫酸钠,加热处理蛋白质样品,蛋白质分子中的二硫键将被还原,并且每 1g 蛋白质可定量结合 1.4g SDS,亚基的构象呈长椭圆棒状(图 1-14)。由于与蛋白质结合的 SDS 呈解离状态,使蛋白质亚基带上大量负电荷,其数值大大超过蛋白质原有的电荷密度,掩盖了不同亚基间原有的电荷差异,使各种蛋白质-SDS 复合物具有相同的电荷密度,电泳时纯粹靠凝胶的分子筛效应进行分离,有效迁移率与分子质量的对数呈线性关系(图 1-15)。因