

高等医药院校教材

医学生物化学

第3版

魏湧 主编

13

图书馆

世界图书出版公司

高等医药院校教材

供医学、儿科、口腔、卫生、药学、检验专业用

医 学 生 物 化 学

(第三版)

主 编

魏 湧 (南京铁道医学院)

副 主 编

黄治森 (镇江医学院) 黄钦田 (南京医科大学)

编 委 (按姓氏笔画为序)

王武康 (江南大学医疗系)

吕灿群 (皖南医学院)

陈丙莺 (南京医科大学)

李新荣 (南京铁道医学院)

李学礼 (上海铁道大学医学院)

金淑仪 (南通医学院)

赵君庸 (西安医科大学)

赵鼎吕 (扬州大学医学院)

郝顺祖 (镇江医学院)

黄如彬 (首都医科大学)

蒋 滢 (苏州医学院)

世界图书出版公司

北京·广州·上海·西安

1998

图书在版编目 (CIP) 数据

医学生物化学/魏湧主编. - 3 版. - 北京: 世界图书出版公司北京公司, 1998.6
ISBN 7-5062-3731-8

I. 医… II. 魏… III. 人体生物化学-高等学校: 医学院校-教材 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 08553 号

书 名: 医学生物化学 第3版
主 编: 魏湧
责任编辑: 西世良
出 版: 世界图书出版公司北京公司
印 刷: 北京中西印刷厂
发 行: 世界图书出版公司北京公司 (北京朝内大街 137 号, 100010)
销 售: 各地新华书店和外文书店
开 本: 787×1092 1/16 印张: 27.5 字数: 680 千
版 次: 1998 年 8 月第 3 版 1988 年 8 月第 1 次印刷
印 数: 00001—13000
书 号: ISBN 7-5062-3731-8/R·95
定 价: 48.00 元

第二版前言

为了教学需要，由 12 所高等医学院校编写的《医学生物化学》教材第一版于 1992 年出版。经过各参编单位两年的教学试用，该教材得到了各使用院校师生和广大读者的欢迎。一致认为，该教材所编写的内容及其深度、广度，与国家教委 1991 年下达执行的“五年制高等医学院校生物化学课程基本要求”相符合。各参编单位决定对该教材第一版所存在的问题和不足之处进行修订改编，出版第二版。

编写第二版教材的原则和指导思想与第一版基本相同，改写及更新的内容占原教材的一半以上；对一些章节作了调整。生物化学的发展日新月异，在编写中作者们注意选择一些研究较成熟的新进展；努力避免一般性重复；注重专业名词统一；力求使用法定计量单位。

为使教学材料配套，另出版了《生化教学习题集》、《生物经学实验教程》和《考核题库》。本书对重要引证的书刊加了脚注，书后附有索引，便于读者查阅。

本书第一版作者有一部分未参加第二版的编写工作，这部分作者对第一版的写作有诸多贡献，特在此表示感谢。

江苏省生化学会和世界图书出版公司北京公司，对本书的编写、出版、发行给予了热情关怀和大力支持，沈士弼教授对第二版的编写工作给以热情恳切的指导，在此一并致谢。

本书各章共同采用的参考书，主要有：

Murray: Harper's Biochemistry, 22th ed. (1990); Mathews and van Holdo: Biochemistry, (1990); Stryer: Biochemistry, 3rd ed. (1988); Apps: Biochemistry (for medical students), 5th ed. (1992); Lehninger et al.: Principles of Biochemistry, 2nd ed. (1993).

由于编者水平和条件有限，本书难免还会有缺点，甚至错误，欢迎读者指正。

魏 湧 黄治森 黄钦田

1994 年 9 月

第三版前言

《医学生物化学》经各参编院校应用，深受欢迎，决定再次修订改编，出版第三版。

本版内容作了如下调整：物质代谢方面内容作了紧缩；生物膜生化内容并入代谢调节章；维生素一章放在书末供选用；新设糖复合物结构与功能章；分子生物学方面将基因表达的调控、DNA重组和基因工程分别独立成章，以使条理更加清晰；大多数章的内容均有程度不等的更新。我们认为，这些必要的改动，使本教材能与生物化学现代发展尤其是核酸的研究发展相适应，更能符合国家教委对高等医学院校生物化学教学基本要求的精神。

在修订时，第二版教材中的缺点得到了纠正，但由于编者水平限制，第三版教材还会出现新的问题，恳请读者指正。

本书采用的参考书主要有：

Lehninger et al: Principles of Biochemistry, 2nd ed. (1993)

Harvey Lodish et al: Molecular cell Biology 3rd ed. (1995)

Pamela C. champe et al: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 2nd ed. (1994)

对于江苏省生化学会和世界图书出版公司北京公司对本书再版的热情支持，在此致谢。

编 者

(1997年6月)

目 录

第三版前言

第二版前言

绪论	(1)
1. 蛋白质的结构和功能	(3)
2. 酶	(34)
3. 核酸化学	(57)
4. 糖代谢	(73)
5. 三羧酸循环与氧化磷酸化	(103)
6. 三脂酰甘油代谢	(129)
7. 类脂和脂蛋白代谢	(151)
8. 多糖复合物的结构与功能	(181)
9. 氨基酸代谢	(191)
10. 核苷酸代谢	(224)
11. 代谢调节	(239)
12. DNA 合成	(260)
13. RNA 的生物合成	(274)
14. 蛋白质生物合成	(285)
15. 基因表达的调控	(297)
16. 重组 DNA 与基因工程	(313)
17. 血液生物化学	(338)
18. 肝胆生化	(359)
19. 水盐代谢与酸碱平衡	(376)
20. 钙、磷、镁代谢及微量元素	(391)
21. 维生素	(409)

绪 论

生物化学 (Biochemistry) 是一门在分子水平上研究生命现象的科学, 它主要应用化学原理和方法来探讨生命体的奥秘和本质。在研究实践中, 生物化学虽然也要运用生物科学, 如生物学、生理学、微生物学以及生物物理学等有关学科的知识和技术, 但其宗旨总是着眼于搞清有机体的物质组成、维持生命活动的各种化学变化及其与生理机能的联系; 简言之, 生物化学即生命的化学。

医学生物化学是以人体为主要研究对象, 但直接研究人体存在不少困难, 即使是容易获取血、尿及病理组织作为研究样品, 所得结果也难免有很大的局限性。因此, 在教科书中很多资料和由此而构成的理论体系, 主要来自对微生物或其它动植物的研究结果, 关于这一点, 在教学中应当加以说明。

人类对生物机体化学现象的研究, 已经有两百余年的历史。本世纪初, 随着化学、生理学和发酵工业的迅速发展, 逐渐形成生物化学这门独立的科学。国内于 30 年代前后业已开设生物化学这门课, 并建立起相应的实验室。50 年代在组成分析和酶促化学变化等研究的基础上, 生物化学对蛋白质、酶、核酸等生物分子的结构与功能、对参与调节代谢作用的生物活性物质 (维生素、酶、激素), 已经获得十分丰富的资料; 同时糖、脂和蛋白质及其代谢中间产物在体内代谢变化和相互联系及能量转变等, 已构成一幅较为完整的物质代谢图。这些理论体系的确立, 为生物化学进一步深入发展奠定了基础。此后, 由于现代化仪器, 如电子显微镜、超速离心机、X 射线衍射仪等的开发与应用, 先进技术, 如各型电泳及各类层析方法的建立, 使得生物大分子能顺利地由细胞或亚细胞中提纯并得到结晶, 从而为研究它们的组成、排列顺序和空间结构开辟了新路, 并获得了重大突破。如五十年代初用 X 射线衍射法确定了 DNA 双螺旋的结构模型, 奠定了 DNA 是遗传信息载体的基础理论。与此同时, 人工合成生物大分子, 研究人工细胞器及建立模拟系统相继成功, 使分子水平、细胞或亚细胞水平两方面的研究结果得以相互补充和印证。在这些研究基础上, 分子生物学于 60 年代前后应运产生并获得迅速发展。到 80 年代, 生物科学在核酸方面的研究成就及技术发展令世人瞩目。从 70 年代初 Cohen 等人建立的 DNA 重组和重组体无性繁殖技术 (分子克隆技术) 以来, 又继而建立起细胞融合产生杂交瘤、并从中筛选出单一特异性抗体 (单克隆抗体) 的细胞克隆技术, 以至到 90 年代中期克隆动物的诞生。这些技术体系的建立, 不仅为科学研究提供了崭新的工具, 而且对医药技术的发展和工农业生产起到了积极的促进作用。因此可以说, 生物化学的发展, 已经步入了一个鼎盛时期。

生物化学的诞生与发展, 固然缘于化学和生理学, 然而医学的研究和实践, 对于生化理论的发展和技术进步也有很大的贡献。众所周知, 胰岛素、核酸和前列腺素是控制生命延续和调节代谢的生物分子, 然而它们却是由医生在医疗实践中发现的。诚然, 生物化学的发展

也必然要渗透到医药卫生各个领域。分子病理学、分子药理学、免疫化学、临床酶学以及生物工程学等相继应运崛起,使用生化药物和生物工程产品于临床实践,前景诱人。

医学生物化学是医学科学重要的一门基础课,作为医学生,应很好学习并系统地掌握其基础理论知识和必要的技术手段。生化的理论知识也是营养学的理论基础;生化与营养应用于医疗保健事业,历来是合纵连横。掌握了生物化学知识,对于学习基础及临床医学理论和在实践中应用会有很多帮助。现代的生化理论和技术有着广泛的实用价值。应用生化技术检查体内代谢改变的某些指标,对疾病的诊断可提供重要的参考;根据生化理论解释病因,对于某些疾病设立治疗方案具有针对性。一言以蔽之,医学生物化学的理论知识与技术,是现代基础和临床医学理论及实践体系中的一个重要组成部分。

从生物化学和分子生物学不断发展与其应用范围日益扩大的实际考虑,根据国家教委对医学生物化学教学要求的精神,为密切结合教学需要,本教材参考现行学时数主要介绍以下几方面内容:(1)生物大分子(包括蛋白质、酶及核酸等)的分子结构、主要理化性质,并在分子水平上阐述其结构与功能的关系;(2)物质代谢(包括糖类、脂类及蛋白质)的代谢变化,重点阐述主要代谢途径(减少逐步化学反应的讲解)、生物氧化与能量转换、代谢途径间的联系以及代谢调节原理及规律;(3)阐明遗传学中心法则所揭示的信息流向,包括DNA复制、RNA转录、翻译及基因表达调控,概要地介绍重组DNA和基因工程技术及其与医学应用的联系;(4)与临床教学及应用密切有关的内容,包括血液生化、肝胆生化、水盐代谢及酸碱平衡以及钙磷代谢等,这几章主要提供基础理论知识,减少应用方面的叙述,以免与后期课程重复。维生素一章放在书末,必要时可提前使用或作查索。各用书单位教学习惯不同;双休制以来,原有的教学时数都有所减少,个别章节的内容可以选用。

魏 湧

(1997年6月16日)

1

蛋白质的结构和功能

【提要】 蛋白质是一类生物大分子，种类繁多，每一种都有特定的功能，是基因表达的产物，蛋白质与核酸等其它大分子共同构成生命的物质基础。

所有蛋白质都是由基本的 20 种氨基酸所组成，不同氨基酸的侧链 R 基团不同，按照侧链 R 基团的极性不同，20 种氨基酸分为非极性侧链氨基酸、非电离的极性侧链氨基酸和电离的极性侧链氨基酸三类。许多氨基酸通过肽键相连成的多肽链是蛋白质分子的基本结构。

每种蛋白质都有其特征性的氨基酸排列顺序，这称为蛋白质的一级结构，是由遗传基因决定的。测定一级结构的基本方法是要用两种切点专一性不同的水解方法来水解蛋白质，以获得两组不同的肽片段，然后对各个肽片段用 Edman 降解法测定其氨基酸排列顺序，从两组肽片段的排列顺序进行拼接可推导出原来蛋白质的排列顺序。蛋白质的一级结构有种属差异，差异的变化量与生物的分类差距大体平行；蛋白质的一级结构有同种个体差异，这是由于基因突变所致。

多肽链通过键的旋转而盘曲、折叠，形成一定的空间结构，这称为蛋白质的构象。多肽链中的肽键具有部分双键性质，不能自由旋转，肽键与其两端的 α -碳原子处于同一平面上，称肽键平面，而多肽链中 α -碳原子两侧的键可以旋转，这是使多肽链形成不同构象的基础。蛋白质的二级结构、三级结构是用来描述蛋白质构象的。二级结构是指多肽链中主链原子在局部空间的排列分布状况，二级结构的结构单元有 α -螺旋、 β -结构、 β -转角和无规卷曲四种，稳定二级结构的主要因素是主链间形成的氢键；由于侧链的相互作用，多肽链进一步的盘曲折叠，多肽链中所有原子在空间的整体排布称为三级结构，稳定三级结构的是侧链之间的相互作用。折叠模色和结构域是蛋白质构象中介于二级结构与三级结构之间的一个层次。每种蛋白质在天然状态都有它特定的空间构象，这是由蛋白质一级结构决定的。

蛋白质的特征是有生物学作用，有特定的功能，这是由蛋白质的特定构象决定的。构象改变将引起蛋白质活性的改变，这称为变构；如构象破坏，则引起蛋白质活性丧失，这称为变性。

由遗传基因决定蛋白质的一级结构，一级结构决定蛋白质的特定构象，构象又决定蛋白质特定的功能，这是生物界的基本规律。

相当多的蛋白质有缔合现象，在不同的层次上有亚基缔合成分子（蛋白质的四级结构）、同种蛋白质分子的缔合和不同蛋白质分子间的缔合，这种缔合现象是专一、有序的，基于这种专一的缔合现象，使得蛋白质分子能在更高层次、更完美地表达功能，产生了一切活的系统的基础——“专一识别”，并组装成细胞器，向生命现象靠近了一步。

蛋白质 (protein) 是一类生物大分子 (biological macromolecules), 在细胞中含量高, 且种类繁多。单细胞的大肠杆菌就含有 3000 余种蛋白质, 人体结构复杂, 估计蛋白质的种类不下 10 万种, 地球上的生物约近 200 万种, 整个生物界的天然蛋白质估计约有百亿种之多。蛋白质的重要性不仅在于它的广泛、大量存在于生物界, 更在于它在生命活动过程中起着重要作用, 决定生物物种性状、新陈代谢类型、各种生命现象和生命活动的基因都是通过编码蛋白质来表达和实现的。蛋白质与核酸等其它生物大分子共同构成生命的物质基础。本章内容首先介绍蛋白质的化学组成和分子结构, 进而讨论蛋白质结构与理化性质和功能的关系。

1.1 蛋白质分子的化学组成

1.1.1 蛋白质的元素组成

各种蛋白质的元素组成很近似, 都含有碳 (50~55%)、氢 (6~8%)、氧 (19~24%)、氮 (13~19%) 四种元素。此外, 部分蛋白质含硫 (一般不超过 4%), 有些蛋白质还含有少量的磷或金属元素, 如铁、铜、锌、锰、钴、钼等, 个别蛋白质含有碘。

含氮是蛋白质元素组成的特点, 且各种蛋白质的氮含量都很相近, 平均约为 16%, 此值在生物样品中蛋白质含量的测定上极为有用, 因为动植物组织内的含氮物质以蛋白质为主, 其它含氮物很少。因此, 只要测出生物样品中的含氮量, 再乘 6.25 ($100/16 = 6.25$), 即可换算出蛋白质的含量。

1.1.2 蛋白质的组成单位——氨基酸

对于大分子物质组成的研究, 仅仅知道元素组成是很不够的, 一般都是将大分子物质进行水解, 以了解其基本组分, 蛋白质可在酸、碱或酶的作用下, 最终水解为其基本组成单位——氨基酸 (amino acid)。

1.1.2.1 氨基酸的结构通式

组成蛋白质的氨基酸, 其结构有共同的特点, 可用下面的结构通式表示。



(1) 氨基都接在 α 碳原子上, 都属于 α -氨基酸 (脯氨酸为 α -亚氨基酸)。

(2) R 基团称为氨基酸的侧链, 除了 R 为 H 的甘氨酸外, 其它氨基酸的 α 碳原子都是不对称碳原子, 都有 D- 及 L- 两种异构体, 蛋白质中的氨基酸均为 L- 型。

1.1.2.2 氨基酸的分类

自然界存在的氨基酸约有 300 种, 但合成蛋白质的氨基酸只有 20 种, 这 20 种氨基酸在基因 DNA 分子中有它们的特异遗传密码, 因而也叫编码氨基酸 (coding amino acid), 如表 1.1 所示。

20 种氨基酸有不同的中文名称和英文名称, 中文名称的第 1 个字和英文名称的前 3 个字母为其缩写代号, 现在更多地采用英文单字母为氨基酸的代号。

20 种氨基酸有不同的分类方法，目前多数按氨基酸侧链 R 基团的极性进行分类，这样的分类对了解蛋白质的结构和功能是有用的。

表 1—1 蛋白质分子中的编码氨基酸

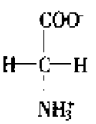
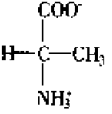
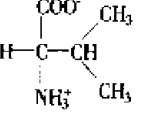
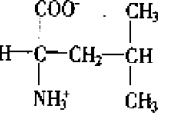
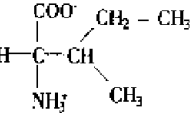
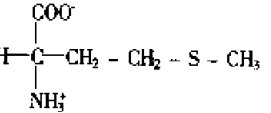
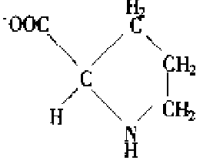
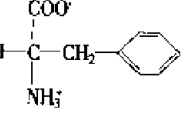
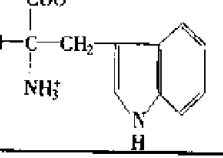
名称 (缩写代号)	分子结构	残基 分子量	pK ₁ α-COOH	pK ₂ α-NH ₃ ⁺	pK _R 侧链	pI
Amino acid with nonpolar side chains						
1. 甘氨酸 (甘) Glycine (Gly, G)		57.0	2.35	9.78		6.07
2. 丙氨酸 (丙) Alanine (Ala, A)		71.0	2.35	9.87		6.11
3. 缬氨酸 (缬) Valine (Val, V)		99.1	2.29	9.74		6.02
4. 亮氨酸 (亮) Leucine (Leu, L)		113.1	2.33	9.74		6.04
5. 异亮氨酸 (异) Isoleucine (Ile, I)		113.1	2.32	9.76		6.04
6. 蛋氨酸 (蛋) Methionine (Met, M)		131.1	2.13	9.28		5.71
7. 脯氨酸 (脯) Proline (Pro, P)		97.1	2.95	10.65		6.80
8. 苯丙氨酸 (苯) Phenylalanine (Phe, F)		147.1	2.16	9.18		5.67
9. 色氨酸 (色) Tryptophan (Trp, W)		186.2	2.43	9.44		5.94

表 1—1 蛋白质分子中的编码氨基酸 (续 1)

名称 (缩写代号)	分子结构	残基 分子量	pK ₁ α -COOH	pK ₂ α -NH ₃ ⁺	pK _R 侧链	pI
Amino acid with uncharged polar side chains						
10. 丝氨酸 (丝) Serine (Ser, S)		87. 0	2. 19	9. 21		5. 70
11. 苏氨酸 (苏) Threonine (Thr, T)		101. 1	2. 09	9. 10		5. 60
12. 天冬酰胺 (天胺 天-NH ₂) Asparagine (Asn, N)		114. 1	2. 1	8. 84		5. 47
13. 谷氨酰胺 (谷胺 谷-NH ₂) Glutamine (Gln, Q)		128. 1	2. 17	9. 13		5. 65
14. 酪氨酸 (酪) Tyrosine (Tyr, Y)		163. 1	2. 20	9. 11	10. 13 酚-OH	5. 66
15. 半胱氨酸 (半) Cysteine (Cys, C)		103. 1	1. 92	10. 78	8. 33 -SH	5. 07
Amino acid with charged polar side chains						
16. 天冬氨酸 (天) Aspartic acid (Asp, D)		114. 0	1. 99	9. 90	3. 90 β -COOH	2. 95
17. 谷氨酸 (谷) Glutamic acid (Glu, E)		128. 1	2. 10	9. 47	4. 07 γ -COOH	3. 09
18. 赖氨酸 (赖) Lysine (Lys, K)		129. 1	2. 16	9. 18	10. 79 ϵ -NH ₃ ⁺	9. 99
19. 精氨酸 (精) Arginine (Arg, R)		157. 2	1. 82	8. 99	12. 48 胍=NH ₂ ⁺	10. 74
20. 组氨酸 (组) Histidine (His, H)		137. 1	1. 80	9. 33	6. 04 咪唑	7. 69

(1) 非极性侧链氨基酸 包括 G、A、V、L、I、P、F、W、M 等 9 种。其侧链基团有烃基、吡啶环或甲硫基等非极性疏水基团。

(2) 非电离的极性侧链氨基酸 包括 S、T、C、Y、N、Q 等 6 种。其侧链上有羟基、巯基或酰胺基等极性基团，在中性水溶液中不电离，但这些基团均有亲水性。酚羟基和巯基在碱性溶液中可以电离出 H^+ 而荷负电。

(3) 电离的极性侧链氨基酸 有 K、R、H、D、E 等 5 种。其中 K、R、H 3 种为碱性氨基酸，侧链上的氨基、胍基或咪唑基不仅有极性、而且在中性和酸性水溶液中能结合 H^+ 而荷正电；D、E 2 种为酸性氨基酸，侧链上都有羧基，在中性和碱性水溶液中能释出 H^+ 而荷负电。

除上述 20 种氨基酸外，蛋白质分子中还有一些修饰 (modified) 氨基酸，它们都是在蛋白质合成过程中或合成后从相应的编码氨基酸经酶催化修饰而成的。因而，这类氨基酸在生物体内都没有相应的遗传密码，图 1-1 中列举了一些修饰氨基酸。

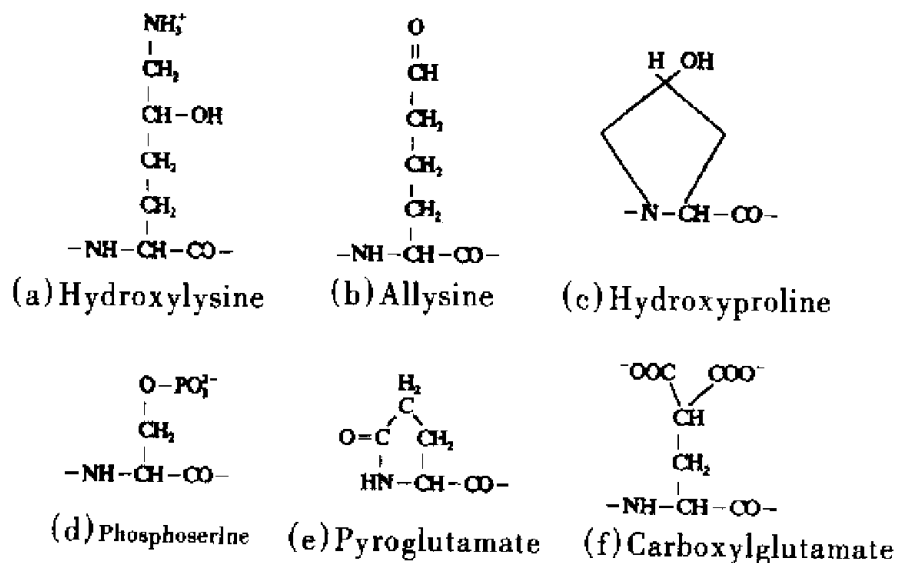


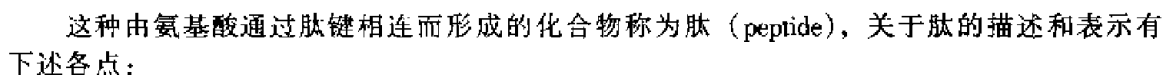
图 1-1 蛋白质分子中的某些修饰氨基酸

(a) 羟赖氨酸，存在于胶原中；(b) 醛基赖氨酸，存在于胶原中；
 (c) 羟脯氨酸，存在于胶原中；(d) 磷酸丝氨酸，存在于酪蛋白及其它磷蛋白中；
 (e) 焦谷氨酸，出现在促甲状腺素释放激素的 N 末端；(f) 羧基谷氨酸，存在于凝血酶原中

此外，哺乳动物体内还有许多氨基酸，它们并不参与构成蛋白质，例如鸟氨酸、瓜氨酸、精氨酸代琥珀酸、 γ -氨基丁酸、 β -丙氨酸、 β -氨基异丁酸、同型丝氨酸、同型半胱氨酸、牛磺酸、3,4-二羟苯丙氨酸等，这些氨基酸出现于代谢过程中，有些在代谢中还具有重要作用。

1.1.3 氨基酸通过肽键连接成肽

蛋白质是由氨基酸聚合成的高分子化合物，在蛋白质分子中，氨基酸之间通过肽键 (peptide bond) 相连，蛋白质分子中的肽键是由氨基酸的 α -羧基与另一个氨基酸的 α -氨基脱水形成的共价键 ($-CO-NH-$)，又称酰胺键，在肽类和其它化合物中偶尔可见到由非 α -羧基或非 α -氨基形成的肽键，但蛋白质分子中的肽键全部是 α -羧基和 α -氨基形成的，如下式所示：



(1) 氨基酸形成肽键后, 已不是完整的氨基酸, 故将肽中的氨基酸称为氨基酸残基 (residue)。

(2) 肽的命名按氨基酸残基数而不是按肽键数, 如 10 个氨基酸通过 9 个肽键缩合成的肽称 10 肽, 一般 10 肽以下称寡肽 (oligopeptide), 大于 10 肽称为多肽 (polypeptide) 或多肽链, 多肽链是蛋白质分子的基本结构。

(3) 由肽键连接各氨基酸残基形成的长链骨架, 即…… $\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}-\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}$ …… , 称为多肽链主链, 而连接于 C_α 上的各氨基酸残基的 R 基团, 统称为多肽链的侧链, R 基团不同, 会赋予多肽或蛋白质不同的理化性质, 并使多肽链折叠成具有特殊功能和作用的独特空间结构。

(4) 每条多肽链有一个游离 α -NH₂ 末端 (称 N-末端, 常用 H-表示) 和一个游离 α -COOH 末端 (称 C-末端, 常用 -OH 表示)。

(5) 肽链的书写可用中文或英文代号来表示, 并规定 N-端在左, C-端在右, 多肽链中氨基酸残基顺序编号从 N-端开始 (见图 1-2、1-3 和 1-15)。

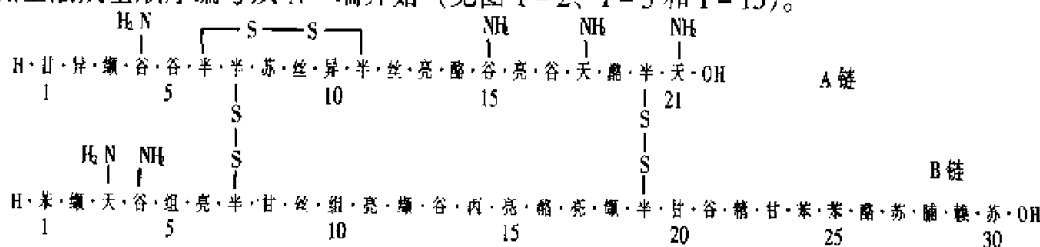


图 1-2 人胰岛素的—级结构

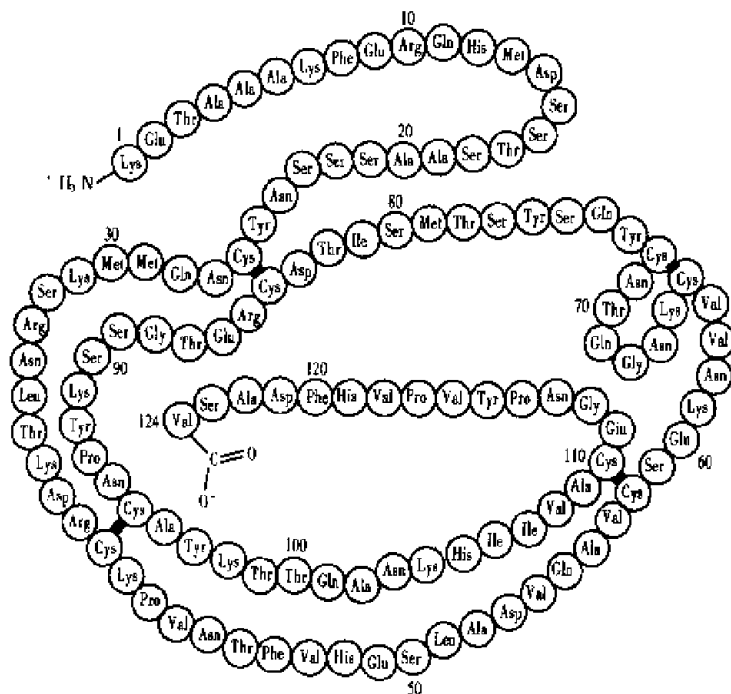


图 1-3 牛胰核糖核酸酶的一级结构(链间黑色部分为二硫键的位置)

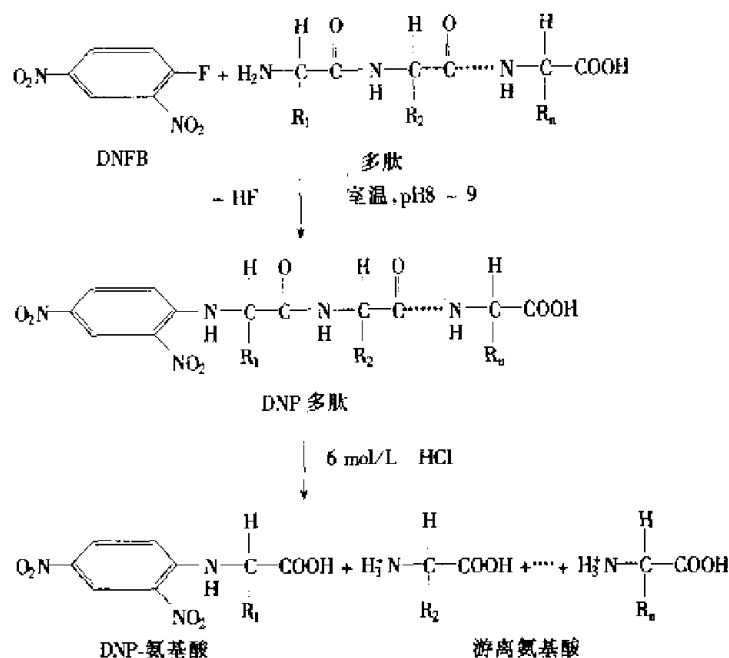


图 1—4 DNP 法测定 N-末端氨基酸

1.2 蛋白质的分子结构

蛋白质分子的基本结构就是多肽链，一般先了解其多肽链中的氨基酸排列顺序，然后再研究它们的空间（三维）结构——构象。

1.2.1 蛋白质的一级结构

1.2.1.1 一级结构的概念

1969 年国际理论和应用化学协会 (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 经过讨论，规定蛋白质的一级结构 (primary structure) 专指肽链中的氨基酸排列顺序 (sequence)，这种顺序是由基因上遗传信息所决定的。一级结构是蛋白质分子的基本结构，它是决定蛋白质空间结构的基础。蛋白质有什么样的一级结构，就必有其相应的空间结构和功能。因此，蛋白质一级结构的研究，是在分子水平上阐明蛋白质结构与其功能关系的基础。

1954 年，英国科学家 F. Sanger 发表了胰岛素 (insulin) 的全部氨基酸排列顺序 (图 1—2)，揭开了测定蛋白质一级结构的序幕，是分子生物学发展过程中的一个重要突破。

几年以后，美国科学家 Moore, Steine 及 Anfinsen 改进了 Sanger 的方法。测出了核糖核酸酶 (ribonuclease) 的一级结构 (图 1—3)，从此以后，蛋白质顺序测定的工作蓬勃发展，迄今已有约 1500 种蛋白质的氨基酸顺序被测定，而且测定技术也更趋成熟，测出顺序最大的蛋白质有一千多个残基。

1.2.1.2 测定一级结构的基本步骤

蛋白质一级结构测定技术是生化研究的基本技术，下面简要介绍确定蛋白质一级结构的基本步骤。

首先，必须在取得该蛋白质纯品的基础上确定 N-端和 C-端的氨基酸。Sanger 当年用 2, 4-二硝基氟苯 (DNFB) 与多肽链中的 N-端的 α -氨基作用，生成二硝基苯多肽 (DNP-多肽)，然后将 DNP-多肽水解，使肽键断裂，但与 N-端氨基酸结合的 DNP 并不脱落 (图 1—4)，这样可把 DNP-氨基酸与其它氨基酸分开，用层析法鉴定。

现在测定 N-末端氨基酸多用丹磺酰氯 (dansyl chloride, DNS-Cl) 作为 N-末端氨基酸的标记物 (图 1—5)，由于丹磺酰基具有强烈的荧光，所以生成的 DNS-氨基酸可以快速检测出来，灵敏度比 DNP 法高 100 倍。

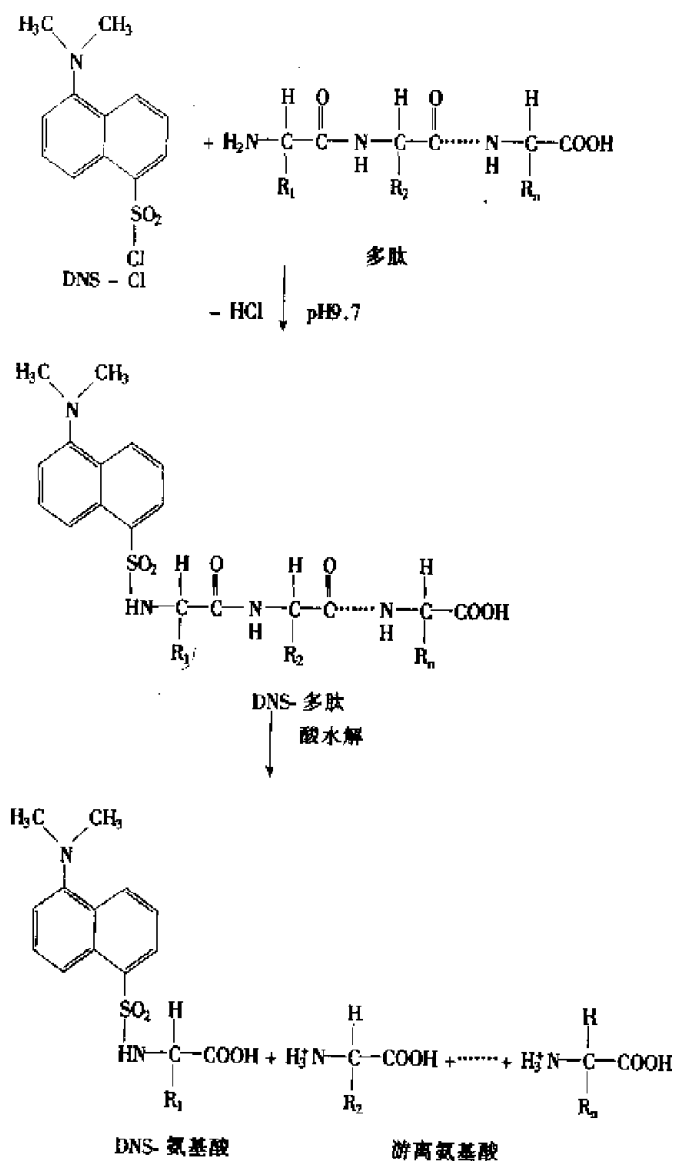


图 1—5 Dansyl 法测定 N-末端氨基酸

肽链的 C-末端氨基酸的确定可用羧肽酶法，羧肽酶是一种外肽酶，它专一地将 C-末端氨基酸残基水解下来，水解产生的氨基酸即为肽链 C-端第一个氨基酸残基。

第二步，是把肽链部分水解成多条小肽片段，这一步要求：①水解点少，切点专一性强，反应率高；②要选择切点专一性不同的两种水解方法，以便获得两组不同的肽片段。

常用的水解方法有：①胰蛋白酶法。胰蛋白酶能专一地水解由 Arg 和 Lys 的羧基构成的肽键，生成的肽段的 C-末端是 Arg 或 Lys；②胰凝乳蛋白酶法。此酶主要水解芳香族氨基酸（Phe 和 Tyr）的羧基构成的肽键，生成的肽段 C-末端是 Phe 或 Tyr；③溴化氰（CNBr）法。溴化氰能专一地切断 Met 羧基构成的肽键。

水解后的肽段可用离子交换层析或其它层析方法和电泳法将其分开。

第三步，是测定部分水解得到的各个肽片段的氨基酸排列顺序，常采用 Edman 降解法，此方法是 Edman 首创的，基本原理是在弱碱条件下，苯异硫氰酸（phenyl isothiocyanate, PITC）与多肽链的 N-末端氨基结合，生成苯氨基硫甲酰-多肽（PTC-肽），后者在酸性介质中，N-端残基的肽键断裂，释出的 PTC-氨基酸环化形成苯乙内酰硫脲（PTH）氨基酸，可用层析法鉴定，即可确定 N-端第一个是哪种氨基酸（图 1-6）。

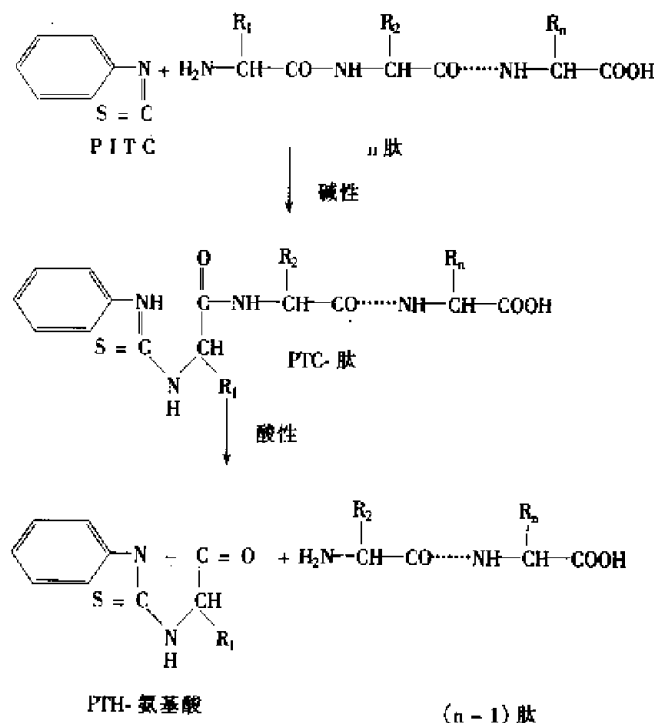


图 1-6 Edman 降解法测定氨基酸排列顺序

此法最大的优点是弱酸水解只切断 N-端结合有 PTC 的氨基酸的羧基构成的肽键，余下的肽链是完整的。这样就可按前法反复进行，从 N-端至 C-端逐个确定氨基酸残基的排列顺序。Edman 降解法一般适用于少于 30 个氨基酸残基构成的肽片段的分析，因为随着重复次数的增多，反应不完全的产物也随之增加，这将给以后的反应造成困难。

第四步，肽链顺序的拼接。将两种水解方法得到的两组肽片段的顺序相互比较，进行拼接，只有一种拼接方法对两组都是适合的，这样就可以得出一级结构。只要两种水解方法的切点专一性不同，从原则上讲，就能解出一级结构。现举一个 14 肽为例来加以说明：对此肽进行酶水解前先进行末端分析，测知 N-端为 Gly，C-端为 Gln。用胰凝乳蛋白酶水解得 4 个肽段，经 Edman 降解法测得 4 个肽段的顺序为：

C-1: Thr-Arg-Phe,

C-2: Asp-Gln,