

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学精要与技术原理

第2版

主编 黄 炜 陈新美



科学出版社

全国高等院校医学实验教学规划教材

生物化学精要与技术原理

第2版

主 编 黄 炜 陈新美

主 审 王燕菲

副主编 李雅楠 龚 青

编 委 (以姓氏笔画为序)

王晓华	王燕菲	朱文渊	李雅楠
余利红	陈克念	陈新美	欧阳永长
赵 青	黄 炜	龚 青	章喜明
路 蕾	廖兆全	戴建威	

科 学 出 版 社

北 京

· 版权所有 侵权必究 ·

举报电话:010-64030229;010-64034315;13501151303(打假办)

内 容 简 介

本书是编者依据全国高等学校《生物化学》教材编写而成。全书共分为三章,第一章是生物化学的内容精要,归纳总结生物化学各章的主要内容,指出各章的学习要求、重点和难点等,以帮助学生有针对性的复习或自学。第二章是介绍生物化学最常用的基本技术,侧重于技术原理,主要涉及生物高分子化合物——蛋白质和核酸的分离和纯化技术、离心技术、电泳技术等,以便学生能够更好地理解和掌握生化实验教学所涉及的技术和方法。第三章是生物化学实验项目,是根据本科生的实验教学要求,有针对性地分类介绍了生物化学实验技术和方法,依次为基础生化实验、临床生化实验、综合性生化实验和分子生物学实验,即注重培养学生的基本生化实验技能,也注重提高学生科研思维和动手的综合能力。

本书适合于医药院校各学制学生使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学精要与技术原理 / 黄炜, 陈新美主编. —2 版. —北京: 科学出版社, 2014. 1

全国高等院校医学实验教学规划教材

ISBN 978-7-03-039588-7

I. 生… II. ①黄… ②陈… III. 生物化学-医学院校-教材 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 011965 号

责任编辑:王 颖 周万灏 / 责任校对:赵桂芬

责任印制:肖 兴 / 封面设计:范璧合

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

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>

安泰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2010 年 5 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014 年 1 月第 二 版 印张:12 1/4

2014 年 1 月第二次印刷 字数:289 000

定价:39.80 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

第2版前言

由于当代生物化学领域迅猛发展,不仅在理论发现还是在技术创新方面所获得的成果层出不穷,因而生物化学在医学、生物学领域占据了非常重要的地位。为了让学生在有限的学习时间内对生化的主要理论知识和实验技术有一个较为全面、系统的认知,我们于2010年6月编写、出版了第1版《生物化学精要与技术原理》。经过三年的教学应用,取得了良好的教学效果,也发现一些需要提高、调整和修改的地方。为了更好地适用于教学需要,我们决定修订、出版第2版,其中修改较多的是第三章内容。

本书分为三章,第一章是生物化学的内容精要。依据全国高等学校《生物化学》教材,并结合多年教学经验,归纳总结生物化学各章的主要内容,指出各章的学习要求、重点和难点等,以帮助学生有针对性的复习或自学。第二章是介绍生物化学最常用的基本技术,侧重于技术原理,主要涉及生物高分子化合物——蛋白质和核酸的分离和纯化技术、离心技术、电泳技术等,以便学生能够更好地理解和掌握生化实验教学所涉及的技术和方法。第三章是生物化学实验项目。本章内容是根据本科生的实验教学要求,有针对性地分类介绍了生物化学实验技术和方法,依次为基础生化实验、临床生化实验、综合性生化实验和分子生物学实验,即注重培养学生的基本生化实验技能,也注重提高学生科研思维和动手的综合能力。

参加本教材编写的是广州医科大学生物化学与分子生物学教研室的教师,其中大部分参编教师具有长期专业教学和科研经历,因此本教材是多年的教学实践经验与生物化学技术新进展相结合的产物。本教材可供临床医学、医学检验、影像学、麻醉学、口腔学、预防医学、生物技术等相关学科本科学生使用。

最后,非常感谢第1版的主编王晓华和朱文渊老师为本教材再版编写打下了良好的基础;也感谢科学出版社做了大量细致的工作。

黄 炜 陈新美

2014年1月

第1版前言

随着当今生命科学领域突飞猛进的发展,生物化学的内容越来越丰富,涉及的范围越来越广泛,使之在医学、生物学等领域占据的地位越来越显著。生物化学实验技术也是生命科学许多相关学科研究的重要手段。这就要求教学一线的教师能够在有限的教学学时内讲授更多的知识,给学生展现出一个较为全面、系统的生物化学研究概况,培养学生的思维能力、实践能力和创新能力。我们编写本书力求简明、实用,旨在能够帮助学生学习和掌握生物化学课程各章节的重点内容,加深对生化技术基本原理的理解和应用,对学习生物化学课程具有一定的指导意义。

本书分为三章:第一章依据最新版本的《生物化学》教材,结合多年教学经验,归纳总结了各章的内容精要,指出了其中的重点、难点及提出目的要求,并选择了一些典型例题。第二章以实验项目为主线,介绍生物化学的基本实验技术,其中包括生物高分子化合物——蛋白质及核酸的分离和纯化技术、离心技术、电泳技术等。第三章包括生物化学基本实验,目的是加强基本技能训练和提高综合性实验能力,注重提高学生的创新能力、科研思维能力和综合素质。

本书可供临床医学、医学检验、影像学、预防医学、生物技术等相关学科本科学生使用。

参加本教材编写的广州医学院生物化学与分子生物学教研室教师从事生物化学教学多年,在自编教材的基础上,结合多年的教学实践经验和近年来最新进展完成此教材的编写。另外,科学出版社也做了大量细致的工作,编者在此对他们表示真挚的感谢!

由于编写本教材的时间仓促,加之编者水平有限,书中难免出现错误和不妥之处,恳请同行专家批评,也敬请使用本教材的读者指正,万分感激。

王晓华 朱文渊

2010年3月

目 录

第一章 生物化学精要与例题	(1)
第一节 蛋白质的结构与功能	(1)
第二节 核酸的结构与功能	(4)
第三节 酶	(8)
第四节 糖代谢	(11)
第五节 脂类代谢	(15)
第六节 生物氧化	(19)
第七节 氨基酸代谢	(22)
第八节 核苷酸代谢	(25)
第九节 物质代谢的联系与调节	(27)
第十节 DNA 的生物合成	(30)
第十一节 RNA 的生物合成	(33)
第十二节 蛋白质的生物合成	(36)
第十三节 基因表达调控	(40)
第十四节 癌基因、抑癌基因与生长因子	(42)
第十五节 细胞信息转导	(44)
第十六节 血液的生物化学	(47)
第十七节 肝的生物化学	(49)
第十八节 维生素	(52)
第二章 生物化学技术原理	(55)
第一节 离心技术	(55)
第二节 蛋白质的制备	(63)
第三节 蛋白质分离纯化技术	(73)
第四节 电泳技术	(86)
第五节 核酸分子杂交技术	(101)
第六节 核酸分子的分离与纯化	(109)
第三章 生物化学实验	(123)
第一节 基础生物化学实验	(123)
实验一 分光光度计的使用	(123)
实验二 Folin-酚试剂法(Lowry 法)测定蛋白质浓度	(126)
实验三 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清乳酸脱氢酶同工酶	(127)
实验四 过氧化氢酶 K_m 的测定	(130)
实验五 温度、pH 和抑制剂对酶活性的影响	(133)
实验六 蔗糖酶的专一性	(137)
实验七 运动对全血乳酸(Lactic Acid LD)含量的影响	(138)
实验八 转氨基作用(圆形纸层析鉴定)	(140)

第二节 临床生物化学实验	(143)
实验一 血清谷丙转氨酶活性的测定	(143)
实验二 血清钙的测定-甲基麝香草酚蓝比色法	(145)
实验三 尿淀粉酶活性测定	(146)
实验四 血清尿素氮的测定	(147)
实验五 血清载脂蛋白 AI 和载脂蛋白 B 测定免疫透射比浊法	(149)
实验六 过氧化脂质测定(丙二醛测定法)	(150)
实验七 维生素 C 的定量测定	(151)
实验八 维生素 B ₁ 的荧光测定法	(153)
实验九 免疫组化技术检测组织中 VEGF 的表达——链霉菌抗生物素蛋白-过氧化 物酶连结法	(154)
实验十 糖化血红蛋白的测定	(156)
第三节 综合性生物化学实验	(157)
实验一 激素对血糖浓度的影响	(157)
实验二 血清清蛋白的分离及电泳鉴定	(160)
实验三 血清 γ -球蛋白的分离与纯度鉴定	(163)
实验四 细胞 DNA 的分离提取、成分鉴定及含量测定	(165)
实验五 离子交换层析等方法纯化鸡卵黏蛋白及其活性测定	(173)
实验六 蛋白质的原核表达、分离、纯化和鉴定	(175)
第四节 分子生物学实验	(178)
实验一 感受态细胞制备及外源 DNA 的转化	(178)
实验二 质粒 DNA 的提取	(181)
实验三 限制性内切酶对质粒 DNA 的酶切	(183)
实验四 DNA 的琼脂糖凝胶电泳	(184)
实验五 PCR 基因扩增	(186)
实验六 核酸杂交	(188)
参考文献	(190)

三、内容精要

蛋白质是生物体内最重要的生物大分子之一,是生命的物质基础,没有蛋白质就没有生命。蛋白质种类和功能繁多,组成蛋白质分子的主要元素有碳、氢、氧、氮、硫,有些还含有少量磷或金属元素。各种蛋白质的含氮量很接近,平均为 16%。

蛋白质的基本组成单位是 *L*- α -氨基酸(甘氨酸除外),共有 20 种。根据它们的侧链 R 的结构和性质可分为:非极性脂肪族氨基酸、极性中性氨基酸、芳香族氨基酸、酸性氨基酸、碱性氨基酸。几种特殊的氨基酸:含硫氨基酸(甲硫氨酸),亚氨基酸(脯氨酸),支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)。氨基酸属于两性电解质,在溶液 pH 等于其 pI 时,氨基酸呈兼性离子,氨基酸的性质还有紫外吸收性质和茚三酮反应。氨基酸可通过肽键连接形成肽。由 10 个以内的氨基酸缩合而成的肽称为寡肽,更多的氨基酸相连而构成多肽。体内存在许多重要的生物活性肽,如谷胱甘肽、催产素、促肾上腺皮质激素、促甲状腺激素等。

蛋白质的分子结构可分为一级、二级、三级、四级结构,后三者统称为高级结构或空间构象。蛋白质的空间构象涵盖了蛋白质分子中每一个原子在三维空间的相对位置,并非所有蛋白质都有四级结构,由两条或两条以上多肽链形成的蛋白质才有四级结构。

蛋白质一级结构是指蛋白质分子中氨基酸的排列顺序,其连接键是肽键,还包括二硫键的位置。形成肽键的 6 个原子 $C_{\alpha 1}$ 、C、O、N、H、 $C_{\alpha 2}$ 位于同一平面,此 6 个原子即构成了肽单元,其中的肽键有一定程度双键性质,不能自由旋转。

蛋白质二级结构指蛋白质分子中某一段肽链的局部空间结构,也就是该段肽链主链骨架原子的相对空间位置,并不涉及氨基酸残基侧链的构象。维系二级结构的化学键主要是氢键。二级结构的主要形式包括: α -螺旋结构、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲。在许多蛋白质分子中,可发现两个或三个具有二级结构的肽段,在空间上相互接近,形成一个具有特殊功能的空间结构,称为模体,实际上它是一种超二级结构,如锌指结构。

蛋白质三级结构指整条肽链中全部氨基酸残基的相对空间位置,也就是整条肽链所有原子在三维空间的排布位置。三级结构的形成和稳定主要靠疏水键、盐键、二硫键、氢键和范德华力等次级键,其中疏水键是最主要的稳定力量。分子量大的蛋白质三级结构其整条肽链中常可分割成多折叠得转为紧密的结构域,实际上结构域也是一种介于二级和三级结构之间的结构层次,每个结构域执行一定的特殊功能。

蛋白质的四级结构是由有生物活性的两条或多条肽链组成,每条多肽链都有其完整的三级结构,称为蛋白质的亚基,这种蛋白质分子中各个亚基的空间排布及亚基接触部位的布局 and 相互作用,称为蛋白质的四级结构。在四级结构中,各亚基之间的结合力主要是疏水作用,氢键和离子键不通过共价键相连。单独的亚基一般没有生物学功能,只有完整的四级结构才有生物学功能。

蛋白质一级结构是空间构象和功能的基础,一级结构相似,其空间构象及功能也相似。但一级结构中有些氨基酸的作用非常重要,若蛋白质分子中起关键作用的氨基酸残基缺失或被替代,都会严重影响其空间构象或生理功能,产生某种疾病,这种由蛋白质分子发生变异所导致的疾病,称为“分子病”。蛋白质多种多样的功能与各种蛋白质特定的空间构象密切相关,其构象发生改变,功能活性也随之改变。

蛋白质既具有氨基酸的相关性质,又具有作为生物大分子的一些独特的性质。如蛋白质的两性电离、等电点、紫外吸收特性和呈色反应,这与氨基酸的性质相似。蛋白质区别于氨基酸的特有性质还有蛋白质的变性、沉淀和凝固。蛋白质作为生物大分子还具有胶体性质。可利用蛋白质的这些理化特性,来分离纯化蛋白质,如沉淀法、电泳法、层析法等。

四、例题

(一) A 型题: 请从备选答案中选出 1 个最佳答案。

- 测得某一蛋白质样品的氮含量为 0.40g, 此样品约含蛋白质()
A. 2.00g B. 2.50g
C. 6.40g D. 3.00g
E. 6.25g
- 下列含有两个羧基的氨基酸是()
A. 精氨酸 B. 赖氨酸
C. 甘氨酸 D. 色氨酸
E. 谷氨酸
- 下列有关蛋白质一级结构的描述, 错误的是()
A. 多肽链中氨基酸的排列顺序
B. 肽键是蛋白质一级结构中的主要化学键
C. 蛋白质一级结构包括各原子的空间位置
D. 从 N 至 C 端氨基酸残基排列顺序
E. 多肽链中的氨基酸分子因脱水缩合而基团不全
- 关于蛋白质二级结构的描述, 错误的是()
A. 有的蛋白质几乎全是 α -螺旋结构
B. 有的蛋白质几乎全是 β -折叠结构
C. 大多数蛋白质分子中有 β -转角结构
D. 每种蛋白质只能含有一种二级结构形式
E. 几种二级结构可同时出现于同一种蛋白质分子中
- 具有四级结构的蛋白质特征是()
A. 分子中必定含有辅基
B. 所有蛋白质均有四级结构
C. 每条多肽链都具有独立的生物学活性
D. 依赖肽键维系四级结构的稳定性
E. 由两条或两条以上具有完整三级结构的多肽链组成
- 蛋白质的等电点是()
A. 蛋白质溶液的 pH 等于 7 时溶液的 pH
B. 蛋白质溶液的 pH 等于 7.4 时溶液的 pH
C. 蛋白质分子呈正离子状态时溶液的 pH
D. 蛋白质分子呈负离子状态时溶液的 pH
E. 蛋白质的正电荷与负电荷相等时溶液的 pH
- 有一混合蛋白质溶液, 各种蛋白质的 pI 为 4.6, 5.0, 5.3, 6.7, 7.3。电泳时欲使其中 4 种泳向正极, 1 种泳向负极, 则缓冲液的 pH 应该是()
A. 4.0 B. 4.8

C. 6.0

D. 7.0

E. 8.0

- 蛋白质沉淀、变性和凝固的关系, 下面叙述正确的是()
A. 变性蛋白一定要凝固
B. 蛋白质凝固后一定变性
C. 蛋白质沉淀后必然变性
D. 变性蛋白一定沉淀
E. 变性蛋白不一定失去活性
- 用生牛奶或生蛋清解救重金属盐中毒是依据蛋白质具有()
A. 胶体性质 B. 兼性性质
C. 变性作用 D. 沉淀作用
E. 紫外吸收特性
- 有关蛋白质变性的描述, 下列正确的是()
A. 蛋白质变性后不易沉淀
B. 蛋白质变性后不易被蛋白酶水解
C. 蛋白质变性后理化性质不变
D. 蛋白质变性后丧失生物学活性
E. 蛋白质变性后导致分子量的下降

(二) X 型题: 请从备选答案中选出 2 个或 2 个以上正确答案。

- α -螺旋的特点是()
A. 一圈螺旋由 3.6 个氨基酸组成
B. 螺旋中的全部 N—H 都和 C=O 生成氢键
C. 氢键方向与螺旋的长轴基本平行
D. 氨基酸残基的侧链伸向外侧
E. 螺旋的走向都为顺时针方向
- 血清白蛋白(pI 为 4.7) 在下列哪种 pH 溶液中带正电荷()
A. pH 4.0 B. pH 3.0
C. pH 6.0 D. pH 7.0
E. pH 8.0
- 关于蛋白质的二级结构, 正确的说法是()
A. 一种蛋白质分子只存在一种二级结构类型
B. 是多肽链主链折叠盘曲而形成
C. 包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规卷曲结构
D. 维持二级结构稳定的键是肽键
E. 二级结构类型的形成受侧链基团的特性影响
- 蛋白质三级结构()
A. 存在于每个天然蛋白质分子中
B. 是指局部肽段空间构象
C. 包括模序(motif)结构

- D. 属于高级结构
E. 主要靠次级键维持稳定
5. 下列哪些 α -氨基酸可通过转氨基作用生成三羧酸循环中对应的 α -酮酸()
- A. 丙氨酸 B. 甘氨酸
C. 天冬氨酸 D. 谷氨酸
E. 色氨酸

(三) 名词解释

1. α -螺旋 2. 结构域(domain)

(四) 问答题

1. 为什么说蛋白质是生命重要的物质基础? 蛋白质在体内执行哪些功能?
2. 什么是蛋白质的变性作用? 举例说明实际工作中应用和避免蛋白质变性的例子。

五、参 考 答 案

(一) A 型题

1. B 2. E 3. C 4. D 5. E 6. E 7. D 8. B
9. D 10. D

(二) X 型题

1. ABCDE 2. AB 3. BCE 4. ABDE 5. ABCD

(三) 名词解释

1. α -螺旋:蛋白质二级结构类型之一。在 α -螺旋中,多肽链主链围绕中心轴作顺时针向的螺旋式上升,即所谓右手螺旋。每 3.6 个氨基酸残基上升一圈氨基酸残基的侧链伸向螺旋的外侧。 α -螺旋的稳定依靠 α -螺旋每个肽键的亚氨基氢和第四个肽键的羰基氧形成的氢键维系。

2. 结构域(domain):蛋白质三级结构中一个或数个折叠较紧密的区域,各行其功能,称为结构域。

(四) 问答题

1. 为什么说蛋白质是生命重要的物质基础? 蛋白质在体内执行哪些功能?

蛋白质是最重要的生命活动的载体,更是功能执行者。没有蛋白质就没有生命。蛋白质的重要作用主要有:

(1) 生物催化作用:酶是蛋白质,具有催化能力,新陈代谢的所有化学反应几乎都是在酶的催化下进行的。

(2) 结构蛋白:有些蛋白质参与细胞和组织的构成。

(3) 运输功能:如血红蛋白具有运输氧的功能。

(4) 收缩运动:收缩蛋白(如肌动蛋白和肌球蛋白)与肌肉收缩和细胞运动密切相关。

(5) 调节新陈代谢:动物体内的激素许多是蛋白质或多肽。

(6) 免疫保护功能:抗体是蛋白质,能与特异抗原结合,具有免疫功能。

(7) 储藏蛋白:有些蛋白质具有储藏功能,如植物种子的谷蛋白可供种子萌发时利用。

(8) 接受和传递信息:生物体中的受体蛋白能专一性地接受和传递外界的信息。

(9) 控制生长与分化:有些蛋白参与细胞生长与分化的调控。

(10) 毒蛋白能引起机体中毒症状和死亡的异体蛋白,如细菌毒素-蛇毒、蝎毒、蓖麻毒素等。

2. 什么是蛋白质的变性作用? 举例说明实际工作中应用和避免蛋白质变性的例子。

(1) 在某些理化因素作用下,蛋白质空间构象受到破坏,其理化性质改变及生物学活性丧失,称为蛋白质变性,而一级结构完整。

(2) 变性的应用:乙醇,加热和紫外线消毒灭菌;钨酸,三氯乙酸沉淀蛋白制备无蛋白血滤液用于化验室检测,热凝法检测尿蛋白。

(3) 避免变性:制备或保存酶、疫苗、免疫血清等蛋白质制剂时,应选用不引起变性的沉淀,并在低温等适当条件下保存。

(陈新美)

第二节 核酸的结构与功能

一、教学内容要求

(一) 掌握

1. 核苷酸的结构和 DNA、和 RNA 的分子组成。掌握核酸分子中核苷酸的连接方式,核酸的

一级结构及其表示法。

2. DNA 二级结构的特点,真核生物染色体的基本单位——核小体的结构以及 DNA 的生物学功能。

3. RNA 的种类与功能。信使 RNA、转运 RNA 二级结构的特点和功能。

4. DNA 的变性、复性和杂交的概念和特点,掌握核酸的紫外吸收、增色效应、 T_m 的概念。

5. 核酸酶的概念。

(二) 熟悉

1. 熟悉核蛋白体 RNA 的结构与功能。

2. 熟悉核酸分子杂交原理。

(三) 了解

1. 了解 snmRNAs 的概念与功能。

2. 了解核酸酶的分类与功能。

二、重点及难点

(一) 重点

1. 核酸分子的组成、结构特点。

2. DNA 二级结构特点、稳定力、三级结构特点及有关概念。

3. 真核 mRNA 一级结构特点;tRNA 二级结构特点、类型。

(二) 难点

1. DNA 二级结构要点与功能的关系。

2. tRNA 二级结构特点与功能的关系;真核生物 mRNA 一级结构特点。

3. 核酸理化性质的应用。

三、内容精要

核酸是以核苷酸为基本单位组成的线性多聚生物信息大分子,分为 DNA 和 RNA 两大类。3',5'-磷酸二酯键是基本结构键。核苷酸由碱基、戊糖(脱氧戊糖)和磷酸组成。DNA 分子中的碱基成分为 A、G、C 和 T 四种,戊糖是 β -D-2'脱氧核糖;而 RNA 分子中的碱基成分则为 A、G、C 和 U 四种,戊糖为 β -D-核糖。

DNA 的一级结构是指脱氧核苷酸的排列顺序。其二级结构是右手双螺旋,由两条反向平行的脱氧多核苷酸组成。双螺旋的稳定靠氢键和碱基堆积的疏水键维持。碱基之间形成氢键配对,即 A 与 T 形成两个氢键,G 与 C 形成三个氢键。DNA 在形成双链螺旋式结构的基础上还将进一步折叠成为超螺旋结构,并且在蛋白质的参与下构成核小体。DNA 的基本功能是以基因的形式携带遗传信息,并作为基因复制和转录的模板。

RNA 主要分为三大类。①mRNA 的功能是作为遗传信息的传递者,将核内 DNA 的碱基顺序(遗传信息)按碱基互补原则抄录并转送至核蛋白体,指导蛋白质的合成。真核生物成熟 mRNA 的结构特点是 5'-末端含有特殊的“帽子”结构,3'-末端具有多聚腺苷酸尾巴结构,中间是多肽链编码序列。②tRNA 的功能是在蛋白质生物合成过程中作为各种氨基酸的运载体和识别密码子的作用。tRNA 二级结构呈三叶草形,含有稀有碱基较多。③rRNA 的功能是与多种蛋白构成核蛋白体,为多肽链合成所需要的 mRNA、tRNA 以及多种蛋白因子提供了相互结合的位点和相互作用的空间环境。在蛋白质生物合成中起着“装配机”的作用。

核酸具有多种重要理化性质。核酸分子在紫外 260nm 波长处有最大吸收峰,这一特点常被

用来对核酸进行定性、定量分析。核酸在酸、碱或加热情况下可发生变性,即空间结构破坏;通常将加热变性使 DNA 的双螺旋结构失去一半时的温度称为该 DNA 的熔点或熔解温度,用 T_m 表示。变性的核酸可以复性。利用核酸变性、复性原理发明的核酸分子杂交,这一项分子生物学技术,已应用于核酸结构与功能研究的各个方面。

利用核酸的物理化学特点,采用酚抽提法、超速离心法、凝胶电泳法、层析法分离等方法对核酸进行分离与纯化。常用紫外分光光度法、定磷法、定糖法等测定核酸的含量。用酶法和化学法等对核酸进行序列分析。

核酸酶是指所有水解核酸的酶。依据作用底物的不同将其分为 DNA 酶和 RNA 酶两类;依据切割的部位不同分为核酸内切酶和核酸外切酶;具有序列特异性的核酸酶为限制性核酸内切酶。

四、例 题

- (一) A 型题:请从备选答案中选出 1 个最佳答案。
- DNA 与 RNA 完全水解后,其产物的特点是 ()
 - 核糖相同,碱基部分相同
 - 核糖不同,碱基相同
 - 核糖相同,碱基不同
 - 核糖不同,部分碱基不同
 - 磷酸核糖不同,稀有碱基种类含量相同
 - 有关 DNA 的二级结构,下列说法哪种是错误的 ()
 - DNA 双螺旋结构是二级结构
 - 双螺旋结构中碱基之间相互配对
 - 双螺旋结构中两条多核苷酸链方向相同
 - 双螺旋碱基之间借非共价键相连
 - 磷酸与脱氧核糖组成了双螺旋的骨架
 - 关于 tRNA 的叙述哪一项是错误的 ()
 - tRNA 的二级结构呈三叶草形
 - tRNA 分子中含有较多的稀有碱基
 - tRNA 的 3'末端为 CCA-3'
 - 反密码子能识别和结合氨基酸
 - tRNA 的三级结构呈倒 L 形
 - 关于碱基配对,下列哪项是错误的 ()
 - 嘌呤与嘧啶相配对比值相等
 - A 与 T(U), G 与 C 相配对
 - A 与 T 之间有两个氢键
 - G 与 C 之间有三个氢键
 - G 与 T(U), A 与 C 相配对
 - DNA 的 T_m 值较高是由于下列哪组核苷酸含量较高所致 ()
 - G+A
 - C+G
 - A+T
 - C+T
 - A+C
 - tRNA 在发挥功能时的两个重要部位是 ()
 - 密码子和反密码子
 - 氨基酸臂的 CCA-3'和 DHU 环
 - T ψ C 环与可变环
 - T ψ C 环与反密码子
 - 氨基酸臂的 CCA-3'和反密码子
 - 有关 RNA 结构的描述,下列哪一项是正确的 ()
 - 为双链结构
 - 单核苷酸之间是通过磷酸二酯键相连
 - 自身不能形成茎环(发夹)结构
 - 磷酸和脱氧核糖交替形成骨架
 - mRNA 的一级结构决定了 DNA 的核苷酸顺序
 - 与 mRNA 中的 ACG 密码相对应的 tRNA 反密码子是 ()
 - UGC
 - TGC
 - GCA
 - CGU
 - TGC
 - X 和 Y 两种核酸提取物,经紫外光检测,提取物 X 的 $A_{260}/A_{280}=2$,提取物 Y 的 $A_{260}/A_{280}=1$,结果表明 ()
 - 提取物 X 的纯度高于提取物 Y
 - 提取物 Y 的纯度高于提取物 X
 - 提取物 X 和 Y 的纯度都低
 - 提取物 X 和 Y 的纯度都高
 - 不能表明二者的纯度
 - 有关染色体的描述,下列哪一项是错误的 ()
 - 是 DNA 的高级结构
 - 包含超螺旋结构
 - 其基本组成单位为核小体
 - 蛋白质成分主要为组蛋白
 - 存在于原核细胞中

(二) X 型题:请从备选答案中选出 2 个或 2 个以上正确答案。

1. tRNA 的叙述是()
 - A. 分子中含有稀有碱基
 - B. 空间结构中含有密码环
 - C. 是细胞内含量最多的一种 RNA
 - D. 主要存在于胞液中
 - E. 每种 tRNA 可携带与其相对应的氨基酸
2. 维持 DNA 双螺旋结构稳定的因素有()
 - A. 分子中的磷酸二酯键
 - B. 配对碱基之间的氢键
 - C. 范德华力
 - D. 骨架上磷酸之间的负电斥力
 - E. 碱基平面间的疏水性堆积力
3. 蛋白质变性和 DNA 变性的共同点是()
 - A. 高温可导致变性
 - B. 不易恢复天然状态
 - C. 氢键断裂
 - D. 结构松散
 - E. 易恢复为天然构象
4. 关于 mRNA 的叙述,正确的是()

- A. 在三种 RNA 中代谢速度最快
 - B. 含有密码子
 - C. 由大小两个亚基构成
 - D. 有 m^7Gppp 帽子和 polyA 尾巴
 - E. 含有遗传信息
5. DNA 的 T_m 值的叙述,正确的是()
 - A. 与 DNA 的均一性有关
 - B. 与 DNA 中 (G+C) 含量呈正相关
 - C. DNA 链越长, T_m 值越大
 - D. DNA 中稀有碱基越多, T_m 值越大
 - E. 与 DNA 所处介质的离子强度有关

(三) 名词解释

1. 碱基互补
2. T_m

(四) 问答题

1. 简述 DNA 双螺旋结构模式的要点及其与 DNA 生物学功能的关系。
2. 试比较 RNA 和 DNA 在分子组成及结构上的异同点。

五、参考答案

(一) A 型题

1. D
2. C
3. D
4. E
5. B
6. E
7. B
8. D
9. A
10. E

(二) X 型题

1. ADE
2. BE
3. ACD
4. ABDE
5. BC

(三) 名词解释

1. 碱基互补:在核酸分子中,腺嘌呤与胸腺嘧啶、鸟嘌呤与胞嘧啶总是通过氢键相连形成固定的碱基配对,称为碱基互补。

2. T_m :核酸在加热变性过程中,对 260nm 紫外光吸收值达到最大值的 50% 时的温度称为 T_m (融解温度,也称为解链温度)。

(四) 问答题

1. 简述 DNA 双螺旋结构模式的要点及其与 DNA 生物学功能的关系。

(1) DNA 双螺旋结构模型的要点是:①两条反向平行的多核苷酸链围绕同一轴心盘绕成双螺旋结构,为右手螺旋。②脱氧核糖和磷酸骨架位于双链的外侧,碱基位于内部。两条链通过碱基之间形成的氢键并联起来,碱基互补配对的规律是 $A=T$ 、 $G=C$ 。③维持双螺旋稳定的力是横向的互补碱基间的氢键和纵向的碱基平面间的疏水性碱基堆积

力。④双螺旋表面有一个大沟和一个小沟。

(2) 与 DNA 生物学功能的关系:①DNA 链的碱基排列顺序携带了整套生物个体的遗传信息。②DNA 双链的碱基互补关系保证了遗传信息的稳定性;亲代 DNA 两条链都是作为复制子代 DNA 的模板;DNA 模板链是作为转录 RNA 的模板。

2. 试比较 RNA 和 DNA 在分子组成及结构上的异同点。

(1) 分子组成上的异同点:DNA 和 RNA 都含有碱基、戊糖和磷酸。DNA 中的戊糖为脱氧核糖,碱基为 A、T、G、C;RNA 中的戊糖为核糖,碱基为 A、U、G、C。

(2) 分子结构上的异同点:①两者都以单核苷酸为基本组成单位,都是以 3',5'-磷酸二酯键相连而成。②DNA 的一级结构指多核苷酸链中脱氧核糖核苷酸的排列顺序。二级结构为双螺旋结构。三级结构为超螺旋结构。③RNA 的一级结构指多核苷酸链中核糖核苷酸的排列顺序。二级结构以单链为主,也有少部分形成局部双螺旋结构,进而形成发夹结构,tRNA 典型的二级结构为三叶草型结构,三级结构为倒“L”型结构。

(李雅楠)

第三节 酶

一、教学内容要求

(一) 掌握

1. 酶的概念,酶的化学本质。
2. 酶的分子组成,单纯酶和全酶。
3. 酶的活性中心的概念。必需基团的分类及其作用。
4. 酶促反应的特点:高效性、高特异性和可调节性。
5. 底物浓度对酶促反应的影响:米-曼氏方程, K_m 与 V_{max} 值的意义。
6. 抑制剂对酶促反应的影响:不可逆抑制的作用,可逆性抑制包括竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制的动力学特征及其生理学意义。
7. 酶原与酶原激活的过程与生理意义。
8. 变构酶和变构调节的概念、机理和动力学特征。掌握酶的共价修饰的概念和作用特点。
9. 同工酶的概念和生理意义。

(二) 熟悉

1. 酶促反应的机理,酶与底物复合物的形成即中间产物学说。
2. 酶浓度、底物浓度、温度、pH、激活剂对酶促反应的影响。
3. 酶活性的测定与酶活性单位概念。
4. 酶含量的调节特点和调控。

(三) 了解

1. 酶的作用原理:诱导契合学说、邻近反应及定向排列、多元催化、表面效应。
2. 酶的分类与命名的原则。
3. 酶在疾病发生、疾病诊断、疾病治疗中的应用。

二、重点及难点

(一) 重点

1. 酶的活性中心、酶与辅助因子的关系
2. 酶促反应特点。
3. K_m 与 V_m 的意义。
4. 多因素对酶促反应速度的影响。
5. 竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制作用特点。
6. 酶原的概念及酶原激活的机制及其生理意义。
7. 变构调节和变构酶。
8. 同工酶的概念及其意义。

(二) 难点

1. 诱导契合假说。
2. 酶促反应机制。
3. 底物浓度和酶促反应速度的关系。
4. 竞争性抑制的作用机制与应用。

5. 三种可逆性抑制作用的特征和比较。

三、内容精要

酶是由活细胞合成的对其特异底物起高效催化作用的蛋白质。单纯酶是仅由氨基酸残基组成的蛋白质,结合酶除含有蛋白质部分外,还含有非蛋白质辅助因子,为金属离子或小分子有机化合物,根据其于酶蛋白结合的紧密程度可分为辅酶与辅基。辅酶与酶蛋白结合疏松,可用透析或超滤的方法除去;辅基与酶蛋白结合紧密,不可用透析或超滤的方法除去。二者结合形成的复合酶-全酶才有催化作用。酶蛋白决定酶促反应的特异性,辅酶或辅基参与酶的活性中心,决定酶促反应的性质。

酶分子中一些在一级结构上可能相距很远的必需集团,在空间结构上彼此靠近,组成具有特定空间结构的区域,能与底物特异的结合并将底物转化为产物,这一区域称为酶的活性中心。酶促反应具有高效率、高度特异性和可调节性。其催化机制是酶与底物诱导契合形成酶-底物复合物,通过邻近效应、定向排列、多元催化及表面效应等使酶发挥高效催化作用。

酶促反应动力学研究影响酶促反应速度的各种因素,包括酶浓度、底物浓度、pH、温度、抑制剂和激活剂等。底物浓度对反应速度的影响可用米氏方程式表示。 K_m 为米氏常数,等于反应速度为最大速度一半时的底物浓度,具有重要意义。 V_{max} 和 K_m 可用双倒数作图法来求取。酶促反应在最适 pH 和最适温度时活性最高,但它们不是酶的特征性常数,受许多因素的影响。酶的抑制作用包括不可逆性抑制与可逆性抑制两种。竞争性抑制剂可与底物竞争酶的活性中心,使酶的表观 K_m 值增大;非竞争性抑制与酶活性中心外的必需基团结合,使酶促反应的 V_{max} 减小;反竞争性抑制剂与酶和底物形成的中间产物结合,使反应的 K_m 值和 V_{max} 均减小。酶活性单位是衡量酶活力大小的尺度,在适宜条件下以单位时间内底物的消耗量或产物的生成量来表示。在特定条件下,每分钟催化 $1\mu\text{mol}$ 底物转化为产物所需的酶量为 1 个国际单位。

机体内对酶的活性与含量的调节是调节代谢的重要途径。体内有些酶以无活性的酶原形式存在,只有在需要发挥作用时才转化为有活性的酶,酶原向酶的转化过程称为酶原的激活;变构酶可与一些效应剂可逆地结合,通过改变酶的构象而改变其活性。多亚基的变构酶具有协同效应,是体内快速调节酶活性的重要方式之一。通过共价修饰调节,酶蛋白肽链上的一些基团可逆地共价结合某些化学基团,实现由活性酶与无活性酶的互变。这是体内实现对代谢快速调节的另一重要方式。酶含量的调节包括酶蛋白合成的诱导与阻遏,对酶降解的调控。同工酶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,是由不同基因或等位基因编码的多肽链,或同一基因转录生成的不同 mRNA 翻译的不同多肽链组成的蛋白质。同工酶在不同的组织与细胞中具有不同的代谢特点。

酶可分为六大类,分别是氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂合酶类、异构酶类和合成酶类。酶的名称包括系统名称和习惯名称,酶的系统名称按照酶的分类而定,由四位数字的编号组成。

酶与医学的关系十分密切。某些疾病的发病机制直接或间接地与酶的异常或活性受到抑制有关。血清酶的测定可协助对某些疾病的诊断。许多药物可通过抑制生物体内的某些酶来达到治疗目的。酶作为试剂和药物对某些疾病进行诊断与治疗。固定化酶、抗体酶和模拟酶的应用可适应医药业、工业、农业等的多种需要。

四、例题

(一) A 型题:请从备选答案中选出 1 个最佳答案。

1. 关于酶的叙述哪项是正确的()

- A. 所有的酶都含有辅基或辅酶
- B. 都只能在体内起催化作用
- C. 绝大多数的酶都是蛋白质

- D. 都能增大化学反应的平衡常数加速反应
E. 都具有立体异构专一性
2. 关于温度对酶活性的影响,以下哪项不对()
A. 酶都有一个最适温度,是酶的特征性常数之一
B. 在一定范围内温度可加速酶促反应
C. 高温能使大多数酶变性
D. 温度降低,酶促反应减慢
E. 低温保存酶制剂不破坏酶活性
3. K_m 值与底物亲和力大小关系是()
A. K_m 值越小,亲和力越大
B. K_m 值越大,亲和力越大
C. K_m 值的大小与亲和力无关
D. K_m 值越小,亲和力越小
E. $1/K_m$ 越小,亲和力越大
4. K_m 值的概念是()
A. 与酶对底物的亲和力无关
B. 是达到 V_{max} 所必需的底物浓度
C. 同一组酶的各种同工酶的 K_m 值相同
D. 是 V 达到 $0.5V_{max}$ 的底物浓度
E. 与底物的性质无关
5. 某种酶以其反应速度对底物浓度作图,呈 S 型曲线,此种酶多属于()
A. 符合米氏动力学的酶 B. 变构酶
C. 单体酶 D. 结合酶
E. 多酶复合体
6. 下列关于酶活性中心的叙述,正确的是()
A. 所有的酶都有活性中心
B. 所有酶的活性中心都含有辅酶
C. 酶的必需基团都位于活性中心之内
D. 所有酶的活性中心都含有金属离子
E. 所有抑制剂全都作用于酶的活性中心
7. 砷化物对巯基酶的抑制作用属于()
A. 可逆性抑制剂 B. 非竞争性抑制剂
C. 反竞争性抑制剂 D. 不可逆抑制剂
E. 竞争性抑制剂
8. 血清中某些酶活性升高的原因是()
A. 细胞受损使细胞内酶释放入血
B. 体内代谢降低使酶的降解减少
C. 细胞内外某些酶被激活
D. 某些酶由尿中排出减少
E. 摄取某些维生素过多引起组织细胞内的辅酶含量增加
9. 多酶体系是指()
A. 某种生物体内所有的酶
B. 某种细胞内所有的酶
C. 某种亚细胞结构内所有的酶
D. 某种代谢途径反应链中所有的酶
E. 催化某种代谢过程的几个酶构成的复合体
10. 竞争性抑制体系中,不会出现()
A. E B. EI
C. ES D. ESI
E. P
- (二) X 型题:请从备选答案中选出 2 个或 2 个以上正确答案。
1. 关于酶的非竞争性抑制作用的说法哪些是正确的()
A. K_m 值降低
B. V_{max} 降低
C. 抑制剂结构与底物无相似之处
D. K_m 值不变
E. 增加底物浓度能减少抑制剂的影响
2. 常见的酶活性中心的必需基团有()
A. 半胱氨酸的巯基 B. 组氨酸的咪唑基
C. 谷氨酸的侧链羧基 D. 丝氨酸的羟基
E. 天冬酰胺的酰胺基
3. 酶蛋白和辅酶之间有下列关系()
A. 两者以共价键相结合
B. 只有全酶才有催化活性,二者缺一不可
C. 辅酶种类很多,其数量与酶相当
D. 酶蛋白决定反应的特异性,辅酶决定反应的种类和性质
E. 不同的酶蛋白可使用相同辅酶,催化不同反应
4. 关于同工酶,哪些说明是正确的()
A. 是由不同的亚基组成的多聚复合物
B. 对同一底物具有不同的专一性
C. 对同一底物具有不同的 K_m 值
D. 在电泳分离时它们的迁移率相同
E. 免疫学性质相同
5. 快速调节可通过()
A. 磷酸化与去磷酸化
B. 腺苷酸化与去腺苷酸化
C. 变构调节
D. 改变酶的合成速度
E. 改变酶的降解速度
- (三) 名词解释
1. 同工酶 2. 抗体酶
- (四) 问答题
1. 说明温度对酶促反应影响的双重性。
2. 丙二酸为什么可抑制琥珀酸脱氢酶的催化活性?

五、参考答案

(一) A 型题

1. C 2. A 3. A 4. D 5. B 6. A 7. D 8. A
9. E 10. D

(二) X 型题

1. BCD 2. ABCD 3. BDE 4. AC 5. ABC

(三) 名词解释

1. 同工酶:在同一种属或同一个体中,不同组织细胞内存在着能催化相同的化学反应,而分子结构、理化性质和免疫学性质不同的一组酶,称同工酶。如乳酸脱氢酶。

2. 抗体酶:人工将底物的过渡态类似物作为抗原,注入动物体内产生抗体。当抗体与底物结合时,就可使底物转变为过渡态而发生催化反应。这种抗体兼有抗体和酶的双重性质,酶的活性中心位于抗体的可变区。人们将这种具有催化功能的抗体分子称为抗体酶。

(四) 问答题

1. 说明温度对酶促反应影响的双重性。

一般化学反应速度随温度升高,反应速度加快,

酶促反应在一定温度范围内遵循这个规律,但酶是一种蛋白质,温度的升高可影响其空间构象的稳定性,促使酶蛋白变性,因此反应温度既可以加速反应的进行,又能促使酶失去催化能力,故温度对酶促反应具有双重性。升高温度一方面可加快酶促反应速率,同时也增加酶变性的机会。酶的活性随温度的下降而降低,但低温一般不使酶破坏,温度回升后,酶又恢复其活性。

2. 丙二酸为什么可抑制琥珀酸脱氢酶的催化活性?

丙二酸之所以可以抑制琥珀酸脱氢酶的催化活性,是因为丙二酸的分子结构类似琥珀酸脱氢酶的正常底物——琥珀酸的分子结构(化学结构为丁二酸),故可以竞争地结合于琥珀酸脱氢酶活性中心,其抑制作用的强弱决定于丙二酸与琥珀酸两者的浓度之比,当丙二酸浓度仅为琥珀酸浓度的 1/50 时,酶活性便被抑制 50%,若增大琥珀酸浓度,此抑制作用可被削弱。

(余利红)

第四节 糖 代 谢

一、教学内容要求

(一) 掌握

1. 糖酵解的概念、发生场所、主要反应过程、特点、关键酶、ATP 生成量及生理意义。
2. 糖有氧氧化的概念、发生场所、主要反应过程、特点、关键酶、ATP 生成量及生理意义;掌握三羧酸循环的概念、反应过程、特点、关键酶、生理意义。
3. 磷酸戊糖途径的生理意义, NADPH 的功能。
4. 糖原合成与分解的主要反应过程、关键酶、调节方式。
5. 糖异生的概念、进行的部位、原料、主要反应过程、关键酶及生理意义。
6. 乳酸循环的概念及其生理意义。
7. 血糖的概念、正常人的血糖浓度、血糖的来源与去路。激素对血糖水平的调节作用及其机理。

(二) 熟悉

1. 糖酵解代谢中两个重要的调节点。
2. 糖的有氧氧化的变构调节。
3. 巴斯德效应的概念。
4. 磷酸戊糖途径的主要反应过程和调节。
5. 肝糖原合成与分解的化学修饰调节。