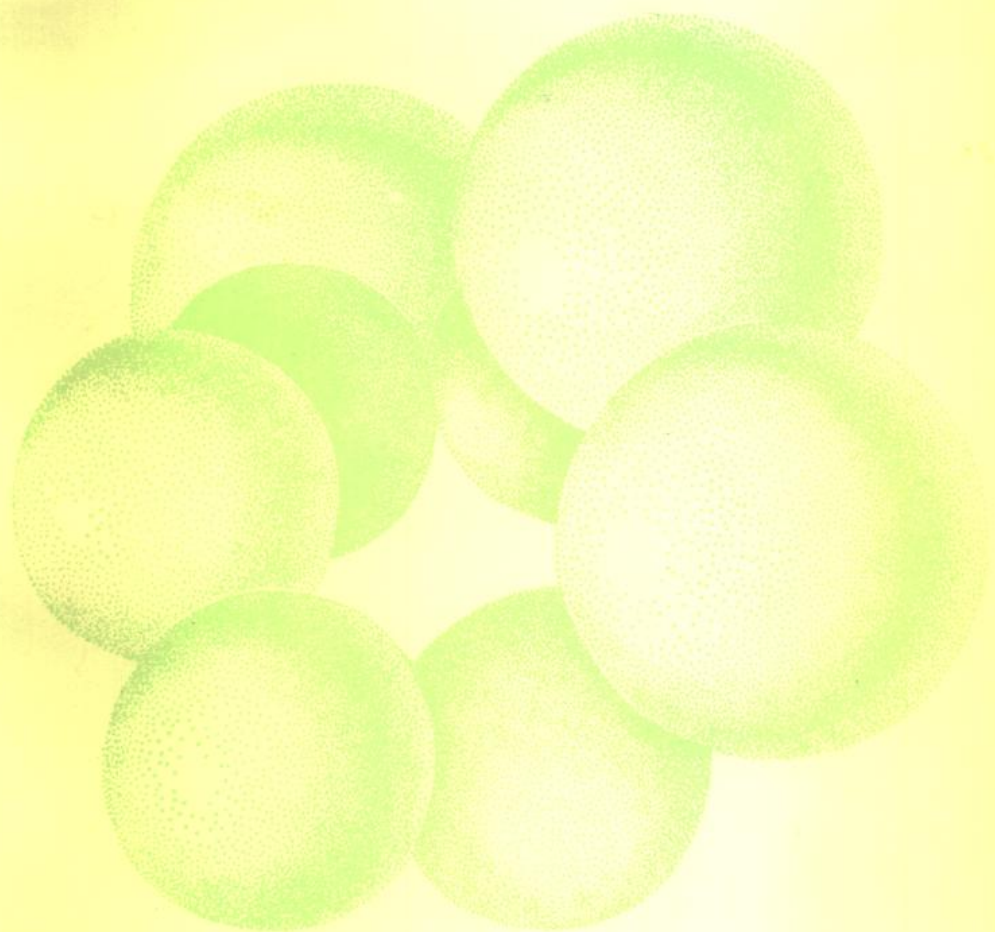


DANBAIZHI FENZI JICHU

蛋白质分子基础

陶慰孙等编著



人民教育出版社

蛋白质分子基础

陶慰孙 李 惟 姜涌明

罗贵民 林永齐

编著



北林图 A00067356



295140

人民教育出版社

内 容 简 介

本书共十四章，除绪言一章介绍蛋白质的重要性及有关问题而外，其余十三章主要介绍了蛋白质的分离与精制、蛋白质的一级结构测定、化学修饰、蛋白质的立体结构、结构和功能的某些问题、酶的催化原理和酶催化反应动力学等方面。书末列有简单的附表。

本书可作综合大学生化专业的大学生、研究生以及青年教师的专业参考用书，其中的某些章节对医、农、师范院校以及从事蛋白质工作的有关人员也会有所帮助。

蛋 白 质 分 子 基 础

陶慰孙 李 惟 姜涌明 编著
罗贵民 林永齐

*

人 民 教 育 出 版 社 出 版

新华书店北京发行所发行

河北省香河县印刷厂印装

*

开本 787×1092¹/₁₆ 印张 27 字数 620,000

1981年6月第1版 1982年8月第2次印刷

印数 5,801—10,800

书号 13012·0626 定价 1.95 元

序

近些年来,以生物大分子为核心的分子生物学发展非常迅速。与之有关的各种书籍也极其繁多。国外的情况自不必谈,国内的情况近年来也大有改观。除了一些翻译书而外,也有了一些自编的普通生物化学教科书,实验参考书以及一些专门性的小册子。但是,我们在工作中仍感到缺少蛋白质和酶方面的教学参考用书。本书即是应专业教学和自学上的需要而作的一种尝试。

“蛋白质分子基础”一书以我们自编的专业教材“生物大分子的结构与功能”为基础,在编写中,从章节的按排上,内容的深度和广度上,都作了较大的改动和增添。“蛋白分子”所涉及的范围极其广泛,但本书的目的只是作为教学参考书,因此,只注重蛋白质和酶的基本原理的阐述,既不专门论述个别蛋白质和酶类,也不过多的涉及蛋白质和酶类在医、农、工等方面的应用。这样,本书的重点主要放在以下几个方面:①、蛋白质(酶)的纯化和分析的基本原理。本书的这一部分与一般参考书写法不同,我们认为这是非常实用的一部分,仅仅说明方法的原理是不够的,应该简要地说明方法的要点和某些成熟的经验,以求对教师 and 学生的实际工作有所帮助。②、一、二、三、四级结构及其与功能的关系。③、酶催化活性的结构基础及反应动力学的某些问题。全书力求既能较清楚地阐述与蛋白分子有关的基本问题,又尽可能地反映现代科学的发展水平。应该说明的是,书中个别处引用了我们自己的工作,如尿激酶和固氮酶的某些成熟并公开发表了的结果。另外,为了学习上的方便,在每章之后列了一些问题和习题,以增进对内容的理解。习题中的一部分是我们自己作的,一部分取自有关的参考书。

由于科学日新月异的发展,文献资料非常多,而我们编写人员的水平又极有限,在书中必然要出现各种各样的错误与不足,望读者提出批评和指正。

本书在编写过程中,得到了许多同志的帮助和鼓励,特别是韩素珍、刘兰英、程文继、张德安、李青山等同志对本书的某些章节提出了宝贵的改进意见。江福康、程玉华、傅海荣、杨世忱、赵静宜等同志为本书的编写提供了多方面的帮助和鼓励,在此一并予以感谢。

陶慰孙

吉林大学化学系生化教研室

1980年3月

目 录

第一章 绪言	1
一、蛋白质在生物体内的重要作用	1
二、生物化学与分子生物学	2
三、新技术的采用促进了生命科学的发展	2
四、蛋白质的应用与现实生活	3
第二章 蛋白质的组成	5
第一节 氨基酸	5
一、氨基酸的构型	8
二、氨基酸的酸碱性质与 pK 值	10
三、氨基酸的反应	14
第二节 蛋白质的其它组分	17
习题	18
参考文献	18
第三章 蛋白质的分离、提纯与 纯度标准	20
第一节 蛋白质的酸碱性质	20
第二节 蛋白质提纯的一般方法	22
第三节 材料的选择与处理	24
一、材料的选择	24
二、细胞破碎的方法	25
三、抽提	26
第四节 蛋白质的初步提纯	27
一、蛋白质性质上差异的利用	27
二、沉淀技术	28
三、透析与浓缩	32
第五节 蛋白质的进一步提纯	34
一、层析方法的一般原理	34
二、分配层析	37
三、逆流分配	39
四、吸附层析	41
五、离子交换层析	43
六、凝胶过滤	54
七、亲和层析	64
八、超离心法	69
九、电泳法	75
十、蛋白质的结晶	87
第六节 纯化步骤的顺序编排	88

第七节 提纯过程中的定量	89
一、分光光度测定法的原理	89
二、蛋白质浓度的测定	92
第八节 纯度标准	93
习题	95
参考文献	95
第四章 蛋白质分子量的测定	98
第一节 分子量的平均值	98
第二节 最小二乘法的应用	99
第三节 超离心沉降速度法	101
第四节 沉降平衡法	103
第五节 凝胶色谱法(凝胶层析法) 测定分子量	103
一、凝胶柱层析测定分子量	103
二、凝胶薄板层析测定分子量	105
第六节 十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺 凝胶电泳法	106
习题	106
参考文献	108
第五章 蛋白质一级结构的测定	109
第一节 蛋白质一级结构研究的程序	109
第二节 蛋白质和肽的氨基酸组成的测定	110
一、蛋白质的水解	110
二、氨基酸的定性分析	111
三、氨基酸的柱层析定量测定	112
第三节 蛋白质中特殊基团的测定	113
一、色氨酸的测定	114
二、巯基测定	114
三、二硫键的测定	116
四、氨基和酰胺基的测定	117
第四节 蛋白质和肽的末端测定	118
一、N-末端的测定	118
二、C-末端的测定	121
第五节 蛋白质中肽链的拆离和分离提纯	122
一、温和条件下拆离亚单位	122
二、二硫键的拆开	122
三、肽链的鉴定及分离	123

第六节 肽链的部分裂解及肽片段的分离	123
一、肽链的部分裂解	123
二、肽链部分裂解后肽片段的分离	127
第七节 肽段氨基酸排列顺序的测定	128
一、苯异硫氰降解法(Edman 降解法)	128
二、DNS-Cl-Edman 方法	130
三、蛋白质顺序测定仪	131
四、酶解法测定顺序	131
第八节 从已知顺序肽段复现肽链的	
一级结构	132
一、N-端基肽段的确定	132
二、C-端基肽段的确定	133
三、重迭肽	133
第九节 蛋白质分子中二硫桥及	
酰胺基位置的确定	134
一、二硫桥位置的确定	134
二、酰胺基位置的确定	134
第十节 蛋白质一级结构测定的实例	135
一、胰岛素一级结构的测定	135
二、巴氏梭菌固氮酶组分——铁蛋白的氨基酸排列顺序	137
第十一节 蛋白质一级结构研究展望	139
第十二节 蛋白质的一级结构与生物进化	139
习题	141
参考文献	142
第六章 蛋白质的化学合成	143
第一节 液相合成法的基本原理	143
一、基团的保护	144
二、酰胺键形成的缩合反应	146
三、胰岛素的液相合成	147
四、RNA 酶的液相合成	150
第二节 固相合成法的基本原理	150
习题	153
参考文献	153
第七章 蛋白质的化学修饰	154
第一节 化学修饰的原理	154
一、影响蛋白质功能基反应性的各因素	154
二、有关蛋白质功能基反应性的几个问题	156
三、修饰剂反应性的决定因素	159
第二节 化学修饰的方法学	160

一、蛋白质修饰试剂和修饰条件的选择	161
二、修饰程度和修饰部位的测定	162
第三节 蛋白质侧链的修饰	163
第四节 亲和标记	171
第五节 光化学标记	172
第六节 敏化光氧化	173
第七节 双功能试剂	173
第八节 化学修饰的某些应用	175
习题	176
参考文献	176
第八章 蛋白质分子构象	178
第一节 引言	178
第二节 维持蛋白质分子构象的化学键	179
一、氢键	179
二、疏水键	181
三、范德华引力	181
四、离子键	181
五、配位键	182
六、二硫键	182
第三节 X-射线结构分析的基本原理	182
一、晶体结构的基本知识	183
二、X-射线结构分析的基本原理	184
三、单晶回转法基本原理	187
第四节 蛋白质分子的二、三级结构	189
一、蛋白质的立体结构原理	189
二、球蛋白分子的二、三级结构	198
第五节 蛋白质分子的四级结构	216
一、基本概念	216
二、亚单位之间的结合力	216
三、四级结构	217
第六节 纤维状蛋白的构象	221
一、 α -角蛋白组	221
二、丝心蛋白组	222
三、胶原组	222
思考题	223
参考文献	224

第九章 溶液中蛋白质分子构象的研究	
方法及蛋白质变性	225
第一节 溶液中蛋白质分子构象的研究方法	225
一、紫外吸收法	225

二、荧光光谱法	227
三、旋光色散和圆二色性	231
四、三种新技术的简单介绍	236
1. 核磁共振	236
2. 激光拉曼光谱	238
3. 中子衍射	238
第二节 蛋白质的变性	239
一、蛋白质变性的基本概念	239
二、各种变性因素对蛋白质构象的影响	241
三、变性产物的构象	248
四、复性	248
五、抗变性手段	249
思考题	250
参考文献	251
第十章 蛋白质分子构象与功能的 关系	252
第一节 血红蛋白分子构象与功能的 关系	252
一、血红蛋白的变构作用与 O_2 的运输	253
二、DPG 对血红蛋白氧亲和力的影响	255
三、 H^+ 浓度、 CO_2 分压对血红蛋白氧亲和力的 影响	256
四、血红蛋白分子病	258
第二节 细胞色素 c 分子构象与功能 的关系	260
思考题	262
参考文献	262
第十一章 蛋白质分子相互作用	263
第一节 蛋白质分子相互作用概述	263
一、亚单位的聚合与解离	263
二、分子杂交	263
三、分子聚合	263
四、分子识别	266
五、自装配	266
六、多酶复合物	266
七、非酶蛋白改变寡聚酶的专一性	267
八、双功能寡聚酶	267
第二节 肌肉收缩的分子机理	268
一、肌原纤维的结构	268
二、粗丝结构	270
三、细丝结构	271
四、肌肉收缩的分子机理	272

第三节 血液凝固的分子机理	273
一、凝血因子	273
二、血液凝固的分子机理	273
第四节 抗体与抗原、补体的相互作用	280
一、IgG 和 IgM 的结构	281
二、抗原与抗体的相互作用	286
三、补体的激活	286
思考题	288
参考文献	288
第十二章 酶的结构与活性	290
第一节 酶催化活性的结构基础	290
一、活性部位	290
二、催化部位与底物结合部位	292
三、活性部位的研究方法	297
四、别构部位	303
五、酶的专一性与诱导契合理论	304
六、酶原激活	310
七、同工酶	312
第二节 酶的催化机制	313
一、过渡态与活化能	313
二、微观可逆性	315
三、降低活化自由能的几个因素	315
四、酶催化反应机制的实例	321
习题	328
参考文献	328
第十三章 酶催化反应动力学	330
第一节 酶催化反应初速的测定	330
一、反应速度	330
二、酶对催化反应速度的影响	331
三、初速的测定	332
第二节 底物浓度对催化反应速度的 影响	334
一、中心复合物的存在	334
二、单底物—单产物系统 ($S \rightleftharpoons P$ 系统)	335
三、双底物双产物反应	350
第三节 酶浓度与催化反应速度	360
一、酶浓度与反应初速的关系	360
二、两个实际问题	364
第四节 抑制剂和活化剂对催化反应 速度的影响	366
一、竞争性抑制	367

二、非竞争性抑制剂	369
三、反竞争性抑制	371
四、线性混合型抑制	372
五、酶催化反应的活化剂	375
第五节 pH 对酶催化反应速度的影响	377
一、pH 对酶稳定性的影响	377
二、pH 与催化反应速度	379
第六节 温度对酶催化反应速度的影响	384
一、酶的热稳定性与最适温度	384
二、酶催化反应的温度系数 Q_{10}	384
第七节 变构酶(别构酶)与协同性	386
一、催化反应速度与底物浓度的双曲线及 S 形曲线	386
二、简化的变构酶的速度方程——Hill 方程	388
三、M.W.C. 模型	390
四、Koshland 序变模型(KNF 理论)	394
习题	395

参考文献	399
第十四章 辅酶	400
一、与转移氢(电子)有关的辅酶(氧化还 原反应的辅酶)	400
二、与其他基团(除氢而外)转移有关的辅酶	405
参考文献	413
附录一、蛋白质的存在与分类	414
附录二、酶的命名和分类	417
附录三、固体硫铵添加量与浓度(% 饱和度)的关系	420
附录四、离子交换树脂	421
附录五、Whatman 离子交换纤维素的有关 数据	422
附录六、DNP 氨基酸纸层析几种常 用试剂	423
附录七、分离 DNS 氨基酸用的溶剂系统	424

第一章 绪 言

组成生物体的成分很复杂,有许多的有机分子和无机离子;也有各种各样的生物大分子,如多糖类的纤维素、淀粉、蛋白质和核酸。这些大分子、小分子在生物体内都担负着不同的任务,但是蛋白质和核酸的作用最重要,是和生命直接相关的两类物质。

一、蛋白质在生物体内的重要作用

生命最基本的特性是能够进行新陈代谢和自我复制。活的有机体从环境中得到物质和能量,用以本身的繁殖,并能发生传给后代的永久变化。就这一生命的重要过程来说,脱氧核糖核酸当然是第一位的。它是基因的载体。但是蛋白质也是极重要的,没有各种蛋白质的作用,DNA的复制,信息的转录,遗传密码的翻译都无从谈起。众所周知,DNA大分子是由糖、磷酸基团交替组成的长链,碱基连在糖环上,是两条互绕的双螺旋。DNA的复制首先是两股链分开,然后以每股单链作为模板,依碱基配对原理形成新链,两股链精确地复制出四种碱基的特定顺序,产生了两个与原来全同的双螺旋。因遗传信息贮存于DNA碱基顺序之中,因此,每一世代必然保持这个顺序。DNA分子并不直接支配蛋白质的生物合成,DNA分子的遗传信息要转录到信使RNA分子上,信使RNA成为蛋白质合成的直接模板。每一种氨基酸都分别结合于转移RNA分子上,一个转移RNA只能结合一个特定的氨基酸,此转移RNA携带氨基酸在核糖体上进行蛋白质的生物合成。可以说,上述过程不管是那一步都离不开蛋白质的作用。就以DNA链复制来说,并不是只要有了各种核苷酸等基本材料,DNA就能正确地复制。为了合成出一种具有生物活性的DNA,人们花费了十多年的时间才发现了DNA聚合酶的作用。就目前所知,DNA复制过程是极其复杂的,DNA是由一个多酶的复合体,有时称之为“复制装置”来复制的。DNA聚合酶是其中的一个组份,它是以DNA碱基顺序为指令催化聚合的酶系。最近对“复制装置”的另一成分也有所了解,一般称这种组份为“螺旋-去稳定蛋白”,有时也叫作HD-蛋白质。是一种分子量较小的蛋白质。这种蛋白质紧密地、协同地、特异地结合到单链上,大大降低了细胞内DNA螺旋解链的热力学值。除了这两类蛋白质外,还有其他一系列蛋白质与DNA聚合酶和螺旋-去稳定蛋白共同构成“复制装置”,虽然,目前对这些成分知道得并不详细,但已取得很大进展。现已有可能利用原核的酶系统在离体条件下重现DNA复制的大多数反应,充分揭示了DNA的复制是一种依赖于多种蛋白质作用的复杂过程。不仅DNA复制过程如此,遗传信息的转录也是由RNA聚合酶来催化的。这个过程要有高度的准确性,酶系统必需保证正确地读出碱基顺序,以及为选择转录的适当地点作准备等。核糖体是个翻译的核心,这是一个含有RNA和蛋白质的颗粒,由两个亚单位组成,大的亚单位比小的大一倍左右。较小的亚单位结合着信息组分,较大的亚单位结合着正在合成的蛋白质链和正在进入的氨基酸转移RNA。新近的研究证明,核糖体内各种蛋白质具有结合信息、翻译起始、转位、肽链延长、终止及释放等多种机能。

生物体内的蛋白质的种类极其繁多,分布极其广泛,所担负的任务也是多种多样的。除了上述过程涉及蛋白质而外,众所周知,构成生物体新陈代谢的几乎全部的化学反应都是在活性蛋白质——酶的催化下进行的。现在,已知的酶没有一个不是蛋白质的。此外,高等动物的免疫反应,也主要是通过蛋白质来完成的。运动时的肌肉收缩,运输氧和营养物质的载体以及结缔、皮肤、毛发等也都是靠蛋白质实现的。最近的分子生物学研究表明,在细胞膜的通透性、高等动物的记忆活动等多方面,蛋白质都起着重要作用。基于上述,有人把核酸称为“遗传大分子”,而把蛋白质称为“功能大分子”,我们认为这种叫法还是比较确切的。

二、生物化学与分子生物学

正如大家所熟知的那样,生物化学是研究存在于生物体内的化合物及其化学过程的科学。主要以组成生物体的组份为对象,研究其性质,相互关系和新陈代谢的规律等方面。生物体内的成分虽然很多,但蛋白质的重要性很早就被认识到,是生物化学的重点研究对象。尤其是认识到所有的酶都是蛋白质之后,蛋白质的重要性就更是不言而喻了。在生物化学发展过程中,核酸的研究并不算晚,是于1872年从白血球和精细胞中离析得到,但其重要性一直未得到应有的重视,就是在遗传方面也认为蛋白质是主要的,而核酸不可能负有这样的任务。直到本世纪五十年代,才认识到DNA是一个非常重要的大分子,有见识的科学家都敏感地意识到,DNA是生命科学的最重要的对象。

在生物化学发展的同时,遗传学也沿着自主的道路发展起来,并逐渐与生物化学联系起来,开始从生物化学反应的角度分析基因的机能。进入五十年代之后,接受了DNA是遗传物质的概念,此概念与当时已经得到承认的蛋白质具有特定的氨基酸顺序的概念相结合,自然就产生了DNA分子中某一片断的核苷酸顺序对应某一蛋白质的氨基酸顺序(共线性原理)这样一个命题。这样,遗传学也就进入到一个新的阶段——分子遗传学。相关科学之间,尤其是生物化学,微生物学和遗传学在五十年代初期的会合,使人们坚信DNA分子结构必然是蛋白质合成的模板。这样一个认识上的飞跃,产生了一门新的边缘科学——分子生物学。因此,分子生物学是以蛋白质和核酸的结构与功能及其相互关系为中心,在分子水平研究生命过程的一门科学。特别是研究细胞组份的物理化学性质和变化,以及这些变化与生命现象的联系。分子遗传、神经传导、视觉、膜传导等都是分子生物学的重要课题。

三、新技术的采用促进了生命科学的发展

今日的生物科学已经从描述性的科学发展成一门精确的和定量的科学了。现在可以用 2×10^{-6} 毫克的核酸样品进行定量分析,快速反应技术可以测定 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ 秒的动力学反应过程,电子显微镜的分辨率可达 $2\text{\AA}$ 。这些成就的取得是与各学科人员在边缘科学中的会合以及不断地采用新技术新仪器分不开的。

生物化学和分子生物学本来就是边缘科学,当然,从事这些学科研究的人员除了生物学领域的人员而外,化学家,物理学家以及其他方面人员也都纷纷从事近代生物科学的研究。比如,对蛋白质螺旋构象作出卓越贡献的里努斯·鲍林(L. Pauling)是大家都熟知的理论化学家,但他

把生命科学中的蛋白质和核酸作为自己的研究对象,并通过自己的工作取得了巨大的成就。法兰西斯·克里克(F. Crick)本是一位年青的物理学家,后来从事蛋白质方面的研究,同时又非常注意 DNA 大分子,并和另一位青年生物化学家詹姆士·D·沃森(J. D. Watson)合作,利用X-射线衍射分析所得到的结果,发现了 DNA 分子的双螺旋结构。另外,从事蛋白质和核酸化学合成的人,大多数是非常熟悉有机化学合成的专业人员。没有这些人员的工作,人工合成生物大分子是很难想象的。显然,科学分类的本身只是便于人们对科学领域的理解,有利于人们展望科学发展的前景,它不是限制人们工作范围的壁垒,一个有见识的科学研究人员绝不会把自己的科研课题局限在传统的范围之内。如果结晶学家只研究小分子晶体的话,当然 X-射线晶体学的知识也就不会及时地用于分析蛋白质和核酸了。事实并非如此,各方面的科学工作者在生物化学、分子生物学等领域内的协同工作促成了生命科学的高速发展。

如果回顾一下生物化学和分子生物学近二、三十年取得的成就,就会发现新技术的引入和仪器设备的完备是非常重要的。蛋白质一级结构的解决是与蛋白质和肽的分离和纯化技术的进步分不开的。正是由于在一级结构研究之中使用了电泳技术,超离心,各种层析分离以及工具酶等各种技术,桑格(F. Sanger)才能在 1956 年完成胰岛素一级结构的测定工作。近年来,蛋白质的分离技术不断的进步,如气相色谱,各种离子交换剂用于分离提纯、亲和层析、分子筛以及用超离心进行梯度离心等,人们用于纯化蛋白质的手段越来越多,而且越来越精巧了。X-射线衍射技术对解决大分子的构象发挥了极大的作用,如 1953 年克里克(F. Crick)等人发现 DNA 的双螺旋结构,1958 年至 1960 年彼鲁茨(M. Perutz)和肯德鲁(J. Kendrew)又弄清了肌红蛋白和血红蛋白的单晶结构。此后又以 X-射线衍射技术得到了一系列酶的构象,大大加深了人们对催化机制的了解。近些年来,核磁共振,激光拉曼光谱也用于大分子构象的研究之中,而且取得了部分成果。此外电子显微镜的应用,快速反应技术等都在推动着生物化学和分子生物学及相关领域的发展。

四、蛋白质的应用与现实生活

科学工作者一方面注视与揭开生命奥秘有关的一些大课题,另一方面也无时无刻不在考虑现实生活,把现有的科学成果应用于人类社会,以改善人们的生活,增加生产,减少和根治疾病等实用方面。单就蛋白质而言,其应用范围也是很广泛的,与人民生活息息相关。其中大部分是涉及活性蛋白酶的应用。首先在临床化学分析上,不仅包括生物体化学成分的分析,也包括了各种酶的活力测定作为临床诊断的指标,如乳酸脱氢酶同工酶的检定作为心肌梗塞诊断的指标,转氨酶(GPT)作为肝病变的指标等。除了检查血液中成分与疾病的关系外,目前对尿的分析也很受重视。其次,许多蛋白制剂是安全有效的药品。比如蛋白水解酶复剂作为消化药物广泛使用。最近把种种蛋白水解酶作为口服药也收到了较好的疗效,不仅可以减轻炎症性浮肿、肿胀、血肿,而且有消痰和促进浓汁排泄的作用。胰岛素,人胎盘血丙种球蛋白,细胞色素 c,胰酶抑制剂等也都是有效的药物。近些年来尿激酶的应用很受人重视,尿激酶是目前治疗各种血栓性疾病的最好药物。此药尚属新药,其使用方法和应用范围正在成熟和扩大之中。第三,酶法分析也用于食品分析上,其对象主要是辅酶和有机酸,有些酶法分析很灵敏,如 L-乳酸, DL-柠檬酸可测定

范围分别为 $0.2-10 \mu\text{g/ml}$, $2-50 \mu\text{g/ml}$, D-异柠檬酸为 $0.02-1.0 \mu\text{g/ml}$ 等。食品分析中还包括农药毒物分析,利用毒物可以非竞争性地抑制某些酶的活性,求出毒物在食品中的浓度。例如有机磷杀虫剂抑制胆碱酯酶(牛红血球),从而降低水解乙酰胆碱的能力。如果小麦受了 DDT 的污染,可用牛红血球碳酸酐酶测定,可检查出 1 克中含有 10 微克的毒物。第四,在一些工业生产上也常常利用酶制剂,如生丝的处理,天然生丝是互相粘着在一起的,为了使生丝分开,就要破坏粘着天然生丝的“天然胶水”,以肥皂和苏打水洗煮生丝,生丝的结构受到破坏,如果以酶制剂处理生丝,对生丝无害并可大大提高丝线的质量。我国是世界上盛产蚕丝的国家,不仅有家蚕丝,还有柞蚕丝,因此,有关生丝的处理和加工是非常有意义的工作。同样,制革工业也采用了酶法制革新工艺。还有许多方面可利用酶制剂,如生物高分子分解为低分子或单体,化学基团的引入或去除,异构化,光学异构体的分离以及一些合成反应等。第五,在日常生活中所使用的合成洗涤剂若以蛋白水解酶为添料,可以去除牛乳、蛋白、血液等不易去除的污物等。总之,蛋白质的知识以及蛋白制品的利用已经成为某些生产和人们生活的组成部分,而且随着科学的发展,应用范围还会有更大的扩展。因此,从事生物化学和分子生物学研究的人,既要注意大的基本理论课题,又要注意实际而有价值的应用课题,既要放眼未来,又要注意当前迫切需要解决的实际问题。

第二章 蛋白质的组成^[1-4]

早在 1838 年就已经确定,大多数蛋白质含 50—55% 的碳,6—7% 的氢,20—23% 的氧,12—19% 的氮,0.2—3% 的硫,还发现某些蛋白质含有磷(3%),有的还含有微量金属。各种蛋白质的含氮量很接近,其平均值为 16%。因此,只要测出生物样品中的氮含量,就可推算出蛋白质的大约含量。到十九世纪末,已经确切知道了,氨基酸是蛋白质的基本结构单位,而且大多数蛋白质含有二十种不同的氨基酸。根据目前我们对蛋白质化学和蛋白质合成的了解,可以把蛋白质的成分分成两大类。第一类是以肽键形式存在于蛋白质中的氨基酸。这类包括二十种现在认为有确定的遗传密码的氨基酸以及由特殊反应产生的氨基酸,这种特殊反应是在前体氨基酸加入肽链后发生的。但这类不包括生物合成时仅短暂存在于多肽中的氨基酸,如 N-甲酰甲硫氨酸。蛋白质的第二类成分是各种非氨基酸物质,它们与蛋白质的结合可能是共价结合,也可能通过强的非共价力结合。含这类物质的蛋白质叫结合蛋白质(其分类见本章第二节)。水解后仅得到氨基酸的蛋白质叫简单蛋白质。因为简单蛋白质全由氨基酸组成,而结合蛋白质的主要部分也是由氨基酸组成的,所以,我们要了解蛋白质的结构、性质和生物功能,必须对氨基酸有一概括性的了解。不但要知道氨基酸的一般物理、化学性质,还要知道氨基酸的立体结构原则。

第一节 氨基酸

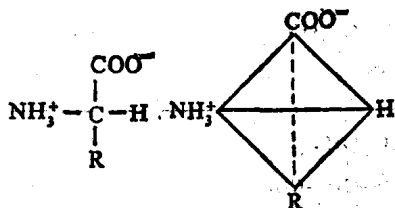


图 2-1 α -氨基酸结构示意图

组成蛋白质基本结构的二十种氨基酸及其确定的遗传密码列于表 2-1 中。除脯氨酸外,所有的氨基酸均有

一通式 ($\text{NH}_2-\text{CH}-\text{COOH}$) 和如图 2-1 所示的空间构型。其中, R 代表侧链基团,不同的氨基酸, R 基团不同。

表 2-1 中的二十种氨基酸是按其侧链基团的物理性质、特别是根据与水的相互作用分类的。这样的分类对我们以后研究蛋白质的三维空间结构是有用的。由此表可发现一个明显的特点,有些氨基酸的侧链,相对来说,不溶于水(如 Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Try),有些氨基酸在生命自然条件下总可以电离,因而是强亲水性的(如 Asp, Glu, Lys, Arg)。组氨酸由于在 pH 7 时能变成质子化的形式,因而很接近于后一类。所有其它的氨基酸处于这两个极端之间。如果按带电荷情况,又可分为:① 不带电荷的,如 Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, ② 在中性溶液中带负电荷的,如 Asp, Glu, 叫酸性氨基酸,③ 在中性溶液中带正电荷的,如 His, Arg, Lys, 叫碱性氨基酸。

丝氨酸和苏氨酸带有脂肪族羟基侧链,其侧链羟基能和适当的给体和受体基团形成氢键,如和亚氨基的氮原子或蛋白质主链的羰基氧形成氢键;谷氨酸和门冬氨酸的侧链都有第二个羧基基团,在 pH 4 以上处于解离状态;门冬酰胺和谷氨酰胺,既是 H^+ 的给体,又是 H^+ 的受体,这种特



北林图 A00067356

295140

表 2-1 基本氨基酸分类表

分 类	名 称	三字母代号	单字母代号	遗传密码*	结 构 式
脂 肪 族 类	甘 氨 酸	Gly	G	GG(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	丙 氨 酸	Ala	A	GC(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	缬 氨 酸	Val	V	GU(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{CH}_3 \\ \quad / \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \backslash \\ \text{COOH} \quad \text{CH}_3 \end{array}$
	亮 氨 酸	Leu	L	CU(N), UUA, UUG	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad / \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} \\ \quad \quad \backslash \\ \text{COOH} \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
	异亮氨酸	Ile	I	AUU AUC AUA	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{CH}_3 \\ \quad / \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH} \\ \quad \backslash \\ \text{COOH} \quad \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{array}$
羟 基 类	丝 氨 酸	Ser	S	UC(N) AGU AGC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	苏 氨 酸	Thr	T	AC(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
酸 性 氨 基 酸	门冬氨酸	Asp	D	GAU GAC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	谷 氨 酸	Glu	E	EAA GAG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
碱 性 氨 基 酸	组 氨 酸	His	H	CAU CAC	$\begin{array}{c} \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{HN} \quad \text{C} \quad \text{N} \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} = \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$

续表

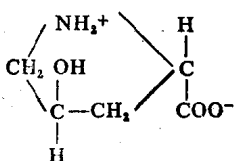
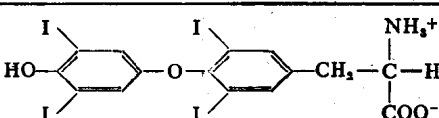
分 类	名 称	三字母代号	单字母代号	遗传密码 ^a	结 构 式
碱性氨基酸	赖氨酸	Lys	K	AAA AAG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	精氨酸	Arg	R	CG(N) AGA AGG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{NH}_2 \\ \searrow \text{NH} \end{array} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
酰胺类	门冬酰胺	Asn	N	AAU AAC	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
含硫类	半胱氨酸	Cys	C	UGU UGC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	蛋氨酸	Met	M	AUG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
芳香族类	苯丙氨酸	Phe	F	UUU UUC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	酪氨酸	Tyr	Y	UAU UAC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	色氨酸	Try	W	UGG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C}_6\text{H}_4 \\ \searrow \text{N} - \text{H} \end{array} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
亚氨基酸	脯氨酸	Pro	P	CC(N)	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_2\text{C} \quad \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \quad \text{COOH} \end{array}$

a. 现在确定的遗传密码排列,指的是信使核糖核酸的核苷酸顺序,其中,A是腺苷酸,C是胞苷酸,G是鸟苷酸,U是尿苷酸,N是上述四种核苷酸中的一种。

性与蛋白质的结构和功能有重要联系；赖氨酸和精氨酸带有碱性的侧链基团，此基团在 pH 9 以下处于正电状态。这两个碱性氨基酸和带两个羧基的氨基酸，基本上决定了蛋白质所带的电荷。组氨酸的咪唑基往往能和 Fe^{2+} 和其它金属离子形成配位化合物；三个带芳环侧链的氨基酸中的苯丙氨酸是非极性的，而酪氨酸和色氨酸的侧链具有形成氢键的能力。色氨酸的结构比其它氨基酸复杂，也比较特殊，但它具有什么特殊作用还有待继续研究。半胱氨酸的侧链为 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ ，此巯基既不易解离，也不参与形成氢键，但它的反应活性很高，二个巯基氧化后形成二硫桥；蛋氨酸的硫原子有时参与形成配位键，此外未发现有什么特殊功能。有些氨基酸的侧链基团可与某些化学试剂反应，这将在“氨基酸的反应”一节中详加介绍，此外，还可参阅“蛋白质的化学修饰”一章中的“蛋白质侧链的修饰”一节。

蛋白质中的第二类氨基酸，包括遗传密码尚未确定的那些氨基酸，其中大多数显然是由前体氨基酸通过特殊反应形成的，这种特殊反应是在多肽的生物合成中间或合成之后发生的。这类氨基酸的结构列于表 2-2 中。

表 2-2 蛋白质中某些被修饰了的氨基酸的结构(均属前述二十种氨基酸的衍生物)

L-胱氨酸	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \quad \text{COO}^- \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ - \text{C} - \text{H} \quad \text{NH}_3^+ - \text{C} - \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 \end{array}$
L-羟脯氨酸 (Hyp)	
L-羟赖氨酸 (Hyl)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{NH}_3^+ \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{COO}^- \end{array}$
L-甲状腺素 (T ₄)	

胱氨酸是这些衍生氨基酸中最重要的一种。它是由氧化同一肽链或不同肽链上的二个半胱氨酸的巯基形成的，把二个半胱氨酸连成胱氨酸后就形成一个二硫桥。这对维持蛋白质的结构具有重要作用。羟脯氨酸和羟赖氨酸仅存在于骨胶原和弹性硬蛋白中。甲状腺素存在于甲状腺球蛋白中。丝氨酸和苏氨酸通过其羟基的磷酸化作用能衍生出磷丝氨酸和磷苏氨酸。在纤维蛋白原中，还发现有 O-磺化酪氨酸。现在还知道几种酶(如，大肠杆菌谷酰胺合成酶)含有腺苷化了的氨基酸。

一、氨基酸的构型

实际上，一个分子并不是写在纸面上的一些原子的平面组合，而是在三维空间中有一定的排布方式。同一组成的分子，其原子或基团的几何排布可以不同。一般称这种结构上的差异为立

体异构。在生物化学中,立体异构这个概念很重要,这一方面是由于天然存在的生物碱和氨基酸等都有其特异的立体构型,另一方面,蛋白质、酶等生物大分子的反应特异性,若不是建立在立体化学的基础上,很多问题很难得到确切的回答。

前已述及,除脯氨酸外(它实际是一个亚氨基酸),所有的氨基酸均由一个碳原子(即 α -碳原子)和四个取代基构成,即羧基、氨基、氢原子和一个R基团,不同的氨基酸R基团不同。如果 α -碳原子的四个取代基各不相同,那么该原子就叫做不对称碳原子。天然存在的二十种氨基酸,除甘氨酸外(它的R基团是H),都有一个不对称碳原子,即 α -碳原子。这四个不同的取代基有二种不同的排布形式,结果形成彼此成镜象的结构。这是因为碳原子的 sp^3 -轨道具有四面体结构,因此,四个取代基可以有二种方式排布在这个碳原子的周围。当然还可以有一些其它的排布方式,但都与这二种排布形式中的一种等效,因为只要简单地转动,就可以互相代替。我们可以把彼此成镜象的两个结构分别称为D-构型和L-构型。因此,每种氨基酸都可能具有D-构型和L-构型之分。图2-2即表示丙氨酸的立体异构体。

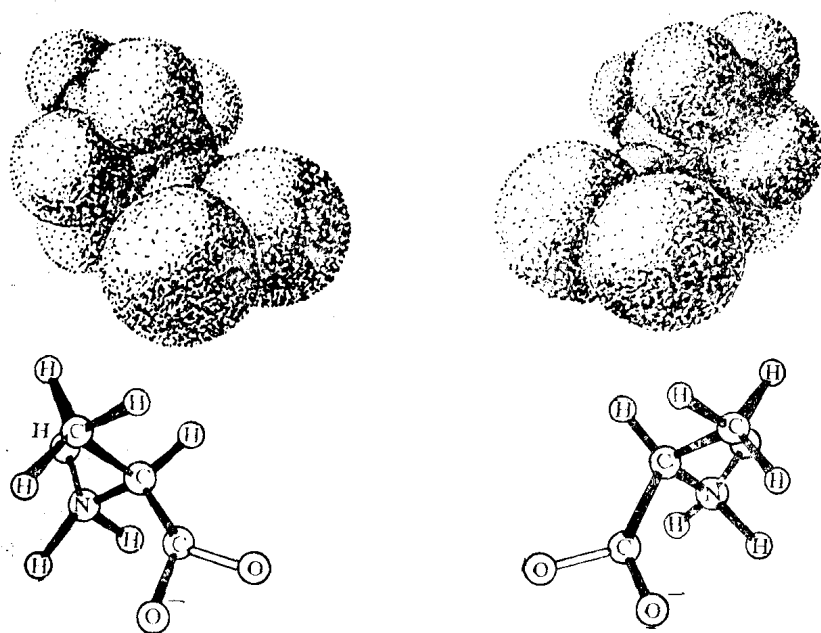


图 2-2 丙氨酸的立体异构体

在比较温和的条件下,水解蛋白质所得到的所有氨基酸都具有旋光性。这是由于 α -碳原子上的四个取代基的不对称性引起的。D-型氨基酸和L-型氨基酸的区别在于,它们能使平面偏振光向相反的方向转动,但它们的熔点、溶解度和其它物理性质相同。这种彼此成镜象的化合物(即D-型氨基酸和L-型氨基酸)称为对映结构体。等量混合D-和L-型物质,所得到的混合物称为外消旋混合物或DL型物质。它没有旋光性。虽然自然界也有D-氨基酸,但蛋白质中的所有氨基酸都是L-构型。

如果有多于1个不对称碳原子的话,则可能存在 2^n 个不同的构型,其中 n 是不对称碳原子