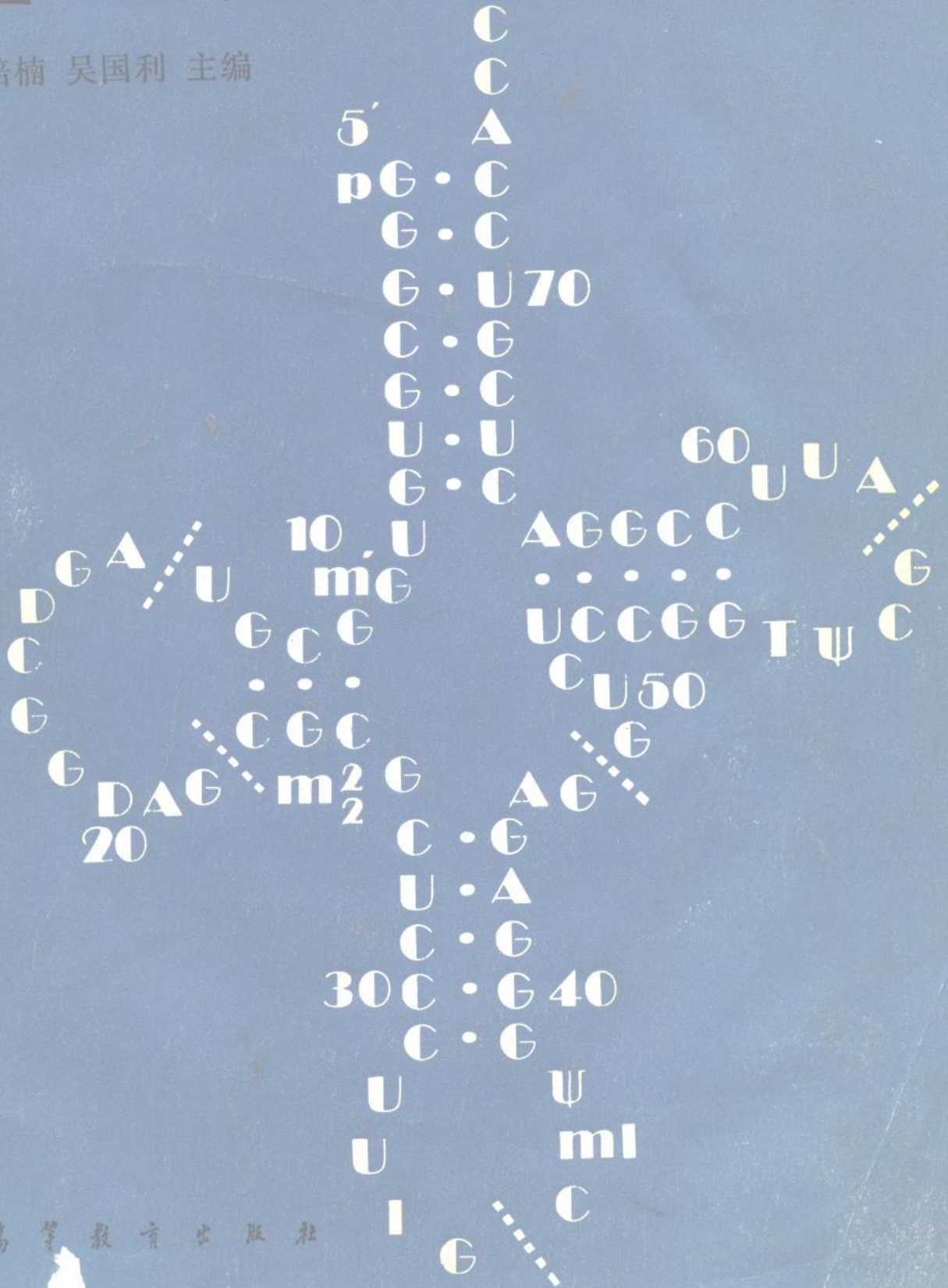


3'
A 76

基础分子生物学

刘培楠 吴国利 主编



高等教育出版社

58.17
192

基础分子生物学

刘培楠 吴国利 主编

2/C548/28

高等教育出版社

内 容 提 要

本书是我国自编的第一本分子生物学教材。它是根据北京师范大学生化教研室和北京肿瘤研究所生化室为北京市有关高等学校和研究单位的研究生、高年级本科生和科研工作者开设的分子生物学课程的讲义整理改写而成。

全书内容共分18章,除绪论外,共分三大部分:第一部分是蛋白质体系,其中包括蛋白质的一级结构、纤维状蛋白、结构蛋白、蛋白质的二级结构、蛋白质的三级结构、球状蛋白、酶的作用机理、免疫球蛋白、蛋白质的四级结构、球蛋白组装,共7章;第二部分是脂质体系(即生物膜),其中包括质膜、叶绿体的结构与功能、生物能的转换、激素的作用机理与激素受体,共4章;第三部分是蛋白质-核酸体系,其中包括遗传信息的传递、DNA的结构和复制、染色质和染色体的结构、遗传信息的贮存、遗传信息的转译、病毒的分子生物学,共6章。

全书内容全面,选材较新,反映了近代分子生物学方面的成就,还介绍了一些发展史。各章均由本领域的专家执笔写成,叙述清楚,便于学习。

本书既适于理、农、医、师范等大专院校有关专业高年级学生、研究生教学之用,也可供有关教师、科技、生物工程技术人员等学习和参考。

基础分子生物学

刘培楠 吴国利 主编

人民卫生出版社

新华书店北京发行所发行

河北香河县印刷厂印装

开本 787×1092 1/16 印张 22.25 字数 510,000

1983年5月第1版 1985年5月第3次印刷

印数 15,101—18,280

书号 13010-0860 定价 4.30元

序

分子生物学成为一门独立的学科是本世纪生物学领域的一项重大发展。近几年来, 基因工程研究工作又有了新的成就, 即是分子生物学迅速发展中的一个标志。这门学科不仅是一门发展较快的新兴学科, 而且是一门十分重要的学科, 它牵涉的面很广, 是许多生物学之边缘学科的理论基础。

分子生物学领域的研究工作, 在我国已受到重视。近年来在科学院和一些高等学校相继建立了研究机构, 而且在蛋白质和核酸的人工合成的某些方面, 已经取得了重大的研究成果。但是, 在高等学校里还没有普遍开设这门课程, 很显然这是不利于培养具有现代生物学水平的生物学教师和科学研究人员的。如果我们再不注意培养这方面的人才, 我们将难以满足生物科学研究和教学, 以及促进医学、农业应用分子生物学技术等方面的需要。北京师范大学生物学系生物化学教研室有鉴于斯, 决定增设这门新课程, 供高年级学生和研究生修习。因教学需要, 我们组织编写了这本教材。

这门课程的内容, 不可能罗列万象, 而应以阐明基本原理和重要规律, 以及近年来若干重大的发现作为重点, 使学生能从中理解生物体中物质的结构与功能的关系, 并学习如何进行科学研究的方法, 因此, 本课程的内容只是选择了分子生物学发展中的主要问题, 分为十八章, 称为“基础分子生物学”。为了使每个问题的讲授精炼扼要, 又能反映出当前的进展, 北师大生物化学教研室与北京市肿瘤防治研究所生物化学室联合邀请在北京从事分子生物学方面研究工作的生物化学家分别讲授各有关章节。由于各人的见解不同, 每一章节的编排与深度, 难求水平一致, 各章之间的前后呼应与关联, 也不能尽善, 而且也难免有重复之处, 这是本课程设计与实践中难以解决的一项缺点。但是从提供分子生物学的基础知识而言, 基本上是符合原定方向的。

在本课程讲授过程中, 由于准备匆促, 只能印发讲义, 供学生作学习参考之用, 为了便于今后继续讲授此课程, 有必要将此讲义重新整理、补充、修订为教材。现承高等教育出版社的支持允予出版。特于卷首略述此课程设置经过与意图。并谨在此对讲授本课程付出辛勤劳动的各位教师, 对给予支持帮助的北京师范大学生物系生物化学教研室诸位同志, 对协助作了大量编辑工作的谢安琪同志, 对担任本书责任编辑, 并对本书一些章节作了修改补充的高等教育出版社安名勋同志, 一并表示衷心的感谢。

刘培楠 吴国利

一九八三年四月五日

目 录

序.....刘培楠、吴国利(1)

第一章 绪论.....邹承鲁(1)

一、生物大分子.....(1)

1. 生物大分子化学结构的测定.....(1)

2. 生物大分子的高级结构.....(2)

3. 低温酶学.....(3)

4. 酶作用的过渡态.....(4)

5. 记忆性酶——单体酶的别构现象.....(5)

6. 生物大分子的人工合成.....(6)

二、分子遗传学.....(7)

1. 左旋 DNA 双螺旋的发现.....(7)

2. 遗传密码的例外.....(8)

3. 染色体的结构与功能.....(8)

4. 真核基因的插入顺序.....(9)

三、生物膜.....(10)

1. 蛋白质在生物合成中的前导肽段.....(11)

2. 化学渗透学说.....(11)

3. 膜表面的受体物质.....(11)

四、分子生物学在其它领域的渗透和应用.....(12)

1. 进化论.....(12)

2. 生态学.....(12)

3. 老年学.....(13)

4. 基因工程.....(13)

5. 肿瘤.....(14)

参考文献.....(14)

第二章 蛋白质的一级结构

.....王琳芳、廖时英(16)

一、一级结构的内容.....(16)

二、测定蛋白质一级结构的重要意义.....(17)

1. 蛋白质的一级结构与分子进化.....(17)

2. 一级结构与脑激素.....(20)

3. 一级结构与分子病.....(20)

4. 一级结构与记忆.....(22)

5. 蛋白质的一级结构与生物功能.....(22)

三、蛋白质一级结构的测定方法.....(28)

1. 多肽键的分离.....(28)

2. 多肽键的降解.....(32)

3. 肽段的分离.....(35)

4. 肽的顺序分析.....(35)

5. 二硫键定位.....(37)

参考文献.....(38)

第三章 蛋白质分子的二级结构

.....王大成(39)

一、多肽链的折叠.....(40)

二、 α 螺旋·角蛋白.....(45)

三、 β 折叠层·丝蛋白.....(47)

四、三股螺旋·胶原.....(50)

五、回折结构和 3_{10} 螺旋.....(52)

参考文献.....(55)

第四章 纤维状蛋白质.....李玉瑞(56)

一、胶原蛋白(collagen).....(56)

1. 胶原(蛋白)的组成.....(56)

2. 原胶原的结构.....(58)

3. 胶原的合成.....(61)

4. 胶原的分解.....(63)

二、弹性蛋白(elastin).....(64)

三、角蛋白(keratin).....(65)

四、肌细胞中的蛋白质.....(67)

1. 肌原纤维的结构.....(67)

2. 肌原纤维的收缩——细丝的滑动.....(71)

五、纤维蛋白原(fibrinogen).....(72)

1. 纤维蛋白原的分子组成.....(72)

2. 纤维蛋白原转变为纤维蛋白.....(75)

参考文献.....(76)

第五章 蛋白质分子的三级结构·球蛋白

.....王大成(77)

一、球蛋白分子结构的一些规律.....(77)

二、稳定三级折叠的主要作用力.....(83)

1. 二硫键.....(83)

2. 氢键.....(84)

3. 疏水键——非极性作用.....(87)

4. 离子键(盐键).....(87)

5. 范氏引力.....(88)

• 1 •

39519

三、蛋白质分子三级折叠的形成	(88)
四、球蛋白结构的预测	(91)
五、球蛋白结构的测定	(95)
参考文献	(98)

第六章 酶的作用原理.....李士谔(99)

一、“锁与钥匙”假说	(99)
二、酶与底物的“诱导契合”假说	(100)
三、酶促反应的本质和机制	(101)
1. 通过“应激”和“张力”效应使底物激活	(101)
2. 碰撞机率增强与“定向”效应	(102)
3. 催化基团的异常活性	(103)
4. 酶反应过程中过渡性共价中间物的形成	(104)
5. 活性中心部位的疏水环境效应	(104)
四、辅助因子在酶促反应中的作用	(105)
1. 包含金属离子的催化反应	(106)
2. 包含辅酶的催化反应	(107)
五、酶原的激活	(108)
参考文献	(110)

第七章 抗体——免疫球蛋白

.....王世中、赵武述、陈正之(111)

一、抗体和本质及一般性质	(111)
二、抗原-抗体反应及抗体结合部位	(112)
三、抗体的特异性和半抗原	(114)
四、 γ 免疫球蛋白的结构	(115)
五、抗体分子的一级结构	(116)
六、人类免疫球蛋白的类别	(118)
七、抗体特异性的来源和多样性的分子基础	(118)
八、关于抗体的来源和合成的理论	(122)
1. 指令或者模板学说	(122)
2. 克隆选择学说	(122)
参考文献	(123)

第八章 球蛋白的组装·四级结构

.....吴国利(125)

一、概述	(125)
1. 亚基数目和种类的确定	(125)
2. 亚基的排布	(126)
3. 亚基间的结合力	(127)
二、血红蛋白的结构与功能的关系	(127)
1. 血红蛋白与氧的结合	(127)
2. H^+ 、 CO_2 和 2,3-二磷酸甘油酸(DPG)对血红蛋白结合 O_2 的影响	(131)

3. 血红蛋白分子病与四级结构	(133)
三、无脊椎动物的携氧蛋白	(133)
1. 血蓝蛋白	(133)
2. 血绿蛋白	(133)
3. 无脊椎动物的血红蛋白	(134)
4. 红蛋白	(134)
四、同功酶——乳酸脱氢酶(LDH)	(134)
五、四级结构与代谢反应的调节	(135)
1. 终产物抑制作用	(135)
2. 终产物抑制的机制——变构效应	(137)
3. 变构酶的动力学	(138)
4. 变构酶调节酶活力的机理	(138)
5. 天冬氨酸转氨甲酰酶的变构调节	(139)
6. 酶分子的解离和聚合	(140)
六、多酶体系	(141)
七、结论	(143)
参考文献	(143)

第九章 膜分子生物学.....刘树森(144)

一、引言	(144)
二、生物膜与细胞结构	(144)
1. 细胞中的膜系统	(144)
2. 细胞膜系统的分离和研究技术	(146)
3. 功能膜的重组和人工膜模拟	(148)
三、生物膜的化学成分	(150)
1. 生物膜的一般成分	(150)
2. 膜蛋白	(151)
3. 膜脂	(152)
4. 糖类和其它成分	(154)
四、生物膜的基本结构	(156)
1. 膜结构和膜分子之间力的作用	(156)
2. 脂双分子层的动态性质	(157)
3. 膜蛋白的结构和动态	(162)
4. 膜蛋白-脂相互作用	(166)
5. 生物膜结构模型	(168)
五、生物膜的透性	(171)
1. 膜的物质转运的一般性质	(172)
2. 钠钾泵和 Na^+-K^+ ATP 酶	(176)
六、膜的能量转换和信息传递	(179)
1. 光感受器膜	(179)
2. 突触膜及其受体	(184)
七、总结和展望	(186)
参考文献	(186)

第十章 生物换能器——叶绿体的结构与

功能.....匡廷云(187)

一、叶绿体膜的基本结构	(187)
二、叶绿体的功能——光合作用反应	(192)
1. 光能的吸收、传递和转化	(192)
2. 水的光解和氧的释放	(194)
3. 电子传递和光合磷酸化	(194)
4. 二氧化碳的同化	(197)
参考文献	(199)

第十一章 生物膜与能量转换

.....杨福愉	(200)
一、线粒体内膜的能量转换	(200)
1. 线粒体结构的共同性和变异性	(201)
2. 线粒体内膜的超微结构和功能	(202)
二、脊椎动物光感受器膜的能量转换	(209)
1. 视细胞的超微结构	(209)
2. 视紫红质的分子结构	(209)
3. 视觉过程的分子机理	(210)
三、嗜盐菌 <i>Halobacterium halobium</i> 紫色膜的 能量转换	(211)
1. 嗜盐菌的生理	(211)
2. 嗜盐菌紫膜的结 构	(212)
3. 紫膜能量转换的分子机理	(212)
参考文献	(214)

第十二章 激素作用原理与激素受体

.....张世荣	(215)
第一部份: 激素作用原理	(215)
一、类固醇激素的作用原理	(215)
二、多肽激素的作用原理	(216)
1. 激素与受体的相互作用	(217)
2. 腺苷酸环化酶(或效应器)的活化	(218)
3. “第二信使”cAMP 的作用与调节	(220)
4. 蛋白激酶的活化与生理效应的关系	(223)
第二部份: 激素受体	(223)
一、受体与化学信号	(223)
1. 化学信号——内源配体	(224)
2. 激素受体及其特性	(224)
3. 激素受体敏感性调节与组织的效应	(228)
二、激素与受体结合的物理化学特性	(230)
三、受体控制离子的通透和神经兴奋传导	(231)
四、受体的化学性质	(232)
五、膜上激素受体的研究方法及受体蛋白的分 离纯化	(233)
1. 激素受体的放射配体结合测定	(234)

2. 膜上受体蛋白的分离和纯化	(234)
参考文献	(237)

第十三章 遗传信息的传递

.....吴鹤龄	(239)
一、细胞繁殖	(239)
1. 细胞周期	(239)
2. 有性生殖	(244)
二、遗传的三大规律	(247)
1. 分离规律	(247)
2. 自由组合律	(250)
3. 连锁规律	(251)
三、遗传的染色体学说	(253)
四、基因的功能	(254)
五、基因的精细结构	(258)
参考文献	(261)

第十四章 染色质和染色体结构

.....吴 昊	(262)
一、核粒	(262)
二、染色体结构模型	(270)
参考文献	(271)

第十五章 DNA 结构和复制

.....刘培楠	(272)
一、引言	(272)
二、DNA 的双螺旋结构	(273)
三、DNA 的合成与复制——DNA 的聚合作用	(276)
1. DNA 的生物合成	(276)
2. DNA 的复制	(277)
3. DNA 复制中启动的调节	(282)
参考文献	(283)

第十六章 遗传信息的贮存——遗传密码

.....吴冠基	(284)
一、DNA 是遗传信息的贮存所	(284)
1. 细胞核中的 DNA 含量是恒定的	(284)
2. DNA 的稳定性及其在细胞分裂中的完整传递	(285)
3. 物理与化学诱变剂的本质	(285)
4. 细菌的转化	(285)
5. 病毒复制、感染和细胞转化	(286)
二、蛋白质生物合成中氨基酸序列问题	(287)
1. 遗传密码的提出	(287)
2. 不重叠的三联体密码	(289)
3. 遗传密码的转录——mRNA 的合成	(289)

4. 密码的解译	(290)
5. 遗传密码的特点	(292)
6. 起始密码和终止密码	(295)
7. 线粒体的遗传密码	(296)
参考文献	(297)
第十七章 遗传信息的转译	刘培楠 (298)
一、引言	(298)
二、转运核糖核酸	(299)
1. 转运核糖核酸的命名	(299)
2. 转运核糖核酸的结构	(299)
3. 转运核糖核酸的结合与识别部位	(300)
三、核糖体	(301)
1. 核糖体的核糖核酸(rRNA)	(302)
2. rRNA 的功能	(302)
3. 5sRNA 的功能	(302)
4. 核糖体的蛋白质	(302)
5. 核糖体蛋白质的功能	(302)
6. 蛋白质与核糖体核糖核酸的相互作用	(303)
四、细胞中蛋白质生物合成(转译作用)	(303)
1. 氨基酸的激活	(303)
2. 核糖体的作用	(304)
3. 遗传信息的“读出”方向	(305)
4. 多肽链的启动、延伸和终止	(305)
5. 蛋白质构象的形成	(310)

6. 抗菌素对蛋白质合成的效应	(310)
7. 聚核糖体	(311)
8. 单顺反子的和多顺反子的信使核糖核酸	(312)
9. 蛋白质生物合成的基因控制(调节)	(313)
参考文献	(315)
第十八章 病毒的分子生物学	田 波 (316)
一、病毒的概念——从分子生物学看病毒	(316)
1. 病毒的定义	(316)
2. 病毒的形态结构	(316)
3. 病毒的化学组成	(319)
二、病毒的蛋白质	(320)
1. 病毒蛋白的组成	(320)
2. 病毒蛋白的结构	(321)
3. 人工变异病毒株的蛋白质	(322)
三、病毒核酸的结构与功能	(323)
1. 病毒 RNA 的结构与功能	(324)
2. 病毒 DNA 的结构与功能	(332)
四、类病毒	(336)
1. 类病毒的发现	(337)
2. 类病毒的提纯	(338)
3. 类病毒的结构	(338)
4. 类病毒的复制和致病性	(342)
5. 类病毒的起源	(343)
参考文献	(345)

第一章 绪 论

邹 承 鲁

(中国科学院生物物理研究所)

分子生物学是当前生物学发展的主流。自本世纪后半叶以来它是整个自然科学中发展最迅速的学科之一,不仅带动了生物学的全面发展,并且为农业、工业、医学以及国防方面的研究开辟了广阔的前景。

分子生物学大体可分为三大领域:一是蛋白质体系(包括酶),二是蛋白质-核酸体系(中心问题是分子遗传学),三是蛋白质-脂质体系(即生物膜)。现围绕这三大领域以及分子生物学在其他领域中的应用作些介绍。

一、生物大分子

1. 生物大分子化学结构的测定

这是研究生物大分子结构与功能关系的基础。在蛋白质方面,已经测定化学结构的蛋白质(如果把不同种属的同一种蛋白质都计算在内),总数在一千种以上。其中最大的分子量已超过十万,如大肠杆菌的半乳糖苷酶和胶原蛋白。回想当初 Sanger 实验室,前后共五、六个人参加,历时八年,才完成了胰岛素这个仅 51 个氨基酸组成的最小的蛋白质化学结构的测定工作。二十多年来,蛋白质化学结构的分析技术有很大发展,如今借助于氨基酸自动分析仪和氨基酸顺序自动测定仪,顺利时一次可完成长达六、七十个氨基酸残基的顺序测定。但总的说来,毕竟还是比较麻烦的。

核酸化学结构的测定在七十年代初期还落后于蛋白质顺序的测定。那时已知化学结构的核酸为数有限;测定一个由二十个核苷酸组成的核酸结构,一个熟练工作者需工作三年。但是近年来,核酸,特别是 DNA 化学结构的测定,有了飞跃的发展。一个熟练工作者,只需一天功夫,就可测定 250 个核苷酸组成的 DNA 链的顺序。所用方法主要有两种:一是英国发展起来的“正负法”,最近又改进为新的“末端终止法”,另一是美国发展的化学断裂法。迄今已知序列的最长的是 MS₂ 噬菌体 RNA,共 3569 个核苷酸;DNA 顺序测定以 1977 年完成的 ϕ X-174 噬菌体 DNA-(5386 个核苷酸)为标志。近年来许多实验室竞相测定更大的 DNA,所含核苷酸数已激增至几万个,如线粒体 DNA(约 17,000 个核苷酸)的序列测定已经完成,λ 噬菌体 DNA(5 万个核苷酸)片段顺序的测定已完成十分之九。可以预期今后几年将会有为数百万核苷酸的 DNA 顺序问世,甚至连过去不敢想象的数以亿计的核苷酸顺序的测定(如人的单个染色体 DNA)也有可能

得以实现。

对比之下, 蛋白质结构分析技术相形见绌了; 已经测定的序列还未曾达到象核酸这样的长度。看来, 今后蛋白质的顺序分析最好的方法是先搞到蛋白质的 mRNA, 再反转录成 DNA, 然后分析 DNA 的序列; 同时在蛋白质的头尾选几部分作顺序分析, 若能与 DNA 序列相互对应就可以推出蛋白质中的序列。这已经成为蛋白质序列测定的重要方法。例如, 根据人干扰素基因 DNA 序列的测定和干扰素 N-末端部分序列的测定, 推断出人干扰素的全部氨基酸排列顺序。

2. 生物大分子的高级结构

X 光晶体衍射技术的发展解决了生物大分子三度空间结构, 使人们几乎可看到每个原子的位置。这方面的工作对分子生物学的发展作出了重要的贡献。现在已有几十个蛋白质通过 X 光晶体衍射获得了高分辨率的三度空间的结构。核酸的空间结构测定还仅仅限于少数几个 RNA。

不同种属执行同一生物功能的蛋白质, 其化学结构有一定的相似性, 而空间结构的相似性表现得更为突出。鱼线粒体和细菌的细胞色素 c, 在氨基酸序列中相差 60 多处, 即差别达到百分之六十左右, 但从 X 光晶体衍射的结果看, 二者的空间结构却非常近似。

用 X 光晶体衍射测定比较大的蛋白质分子是一些激酶、脱氢和转换酶, 如乳酸脱氢酶, 甘油

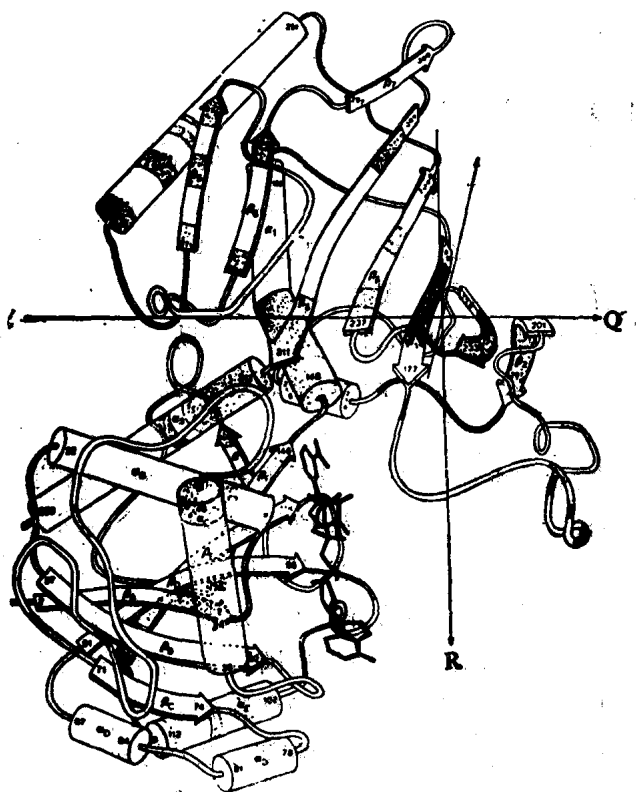


图 1-1 甘油醛-3-磷酸脱氢酶示意图

上半是底物结合及催化结构域, 下半是 NAD 结合结构域。圆筒代表 α -螺旋, 箭头代表 β -折叠。黑线结构是 NAD, 灰色部分是已知 5 个种属的酶分子中氨基酸序列完全相同的部分。

醛-3-磷酸脱氢酶和磷酸化酶等,分子量从14万—20万左右。由于脱氢酶和激酶都以核苷酸化合物为底物,它们在空间结构上有很多相似之处。脱氢酶空间结构大体可分为两部分,这两部分都是较紧凑的结构,在蛋白质结晶学上称为结构域(Domain),其中一部分与底物结合有关,另一部分则是与 NAD^+ 结合有关(图1-1),这一部分结构域与许多激酶的空间结构有不少相似之处,这些相似之处可能是由于这两类酶都要和核苷酸结合所决定的。

对上述现象现在有两种解释。一种是“分化进化说”,即在很原始时脱氢酶和激酶是同一个酶,承担两个不同的任务;随着生物的进化,逐渐分化成两类酶,但仍保持着原始祖先的某些相似之处。另一种是“聚合进化说”即这两类酶原来是无关的,但由于都要和核苷酸相结合,遂演变成了类似的结构。这两种学说不一定矛盾。即对整个生命世界,这两种情况也许都会发生,但对某一种酶,它只有一种可能性。看来在多数情况下分化进化的可能性比较大。

X光晶体衍射也有它的缺点和不足之处。它测的是生物大分子晶态的结构,而绝大多数生物大分子在生物体内不是处于晶态,而是处于溶液状态或者是与膜紧密结合的。从晶态结构能否了解其生物功能?晶态结构与溶液结构及连在膜上时的结构是否一样?对此可以作一些回答。有一些蛋白质在晶态下仍表现一定的生物功能,如血红蛋白与氧的结合在晶态下一样可以进行。某些酶在晶态仍能表现其活性。经过这样的比较得出的一个大致的结论是:二者基本相同,但有时有细微差异。这个差异用酶来说明是最恰当的,因为可对晶态与溶液的酶活性进行比较。当然,由于测定晶态酶活性的方法和计算不同,得出的结果总是基于一定的假设之上,不那么可靠,但如果一个酶其晶态与溶液的活性在同一数量级,则可认为晶态结构基本上反应了溶液结构,反之,若二者有差别,像醇脱氢酶二者差一千倍,则两种状态可能会不大一样。

3. 低温酶学

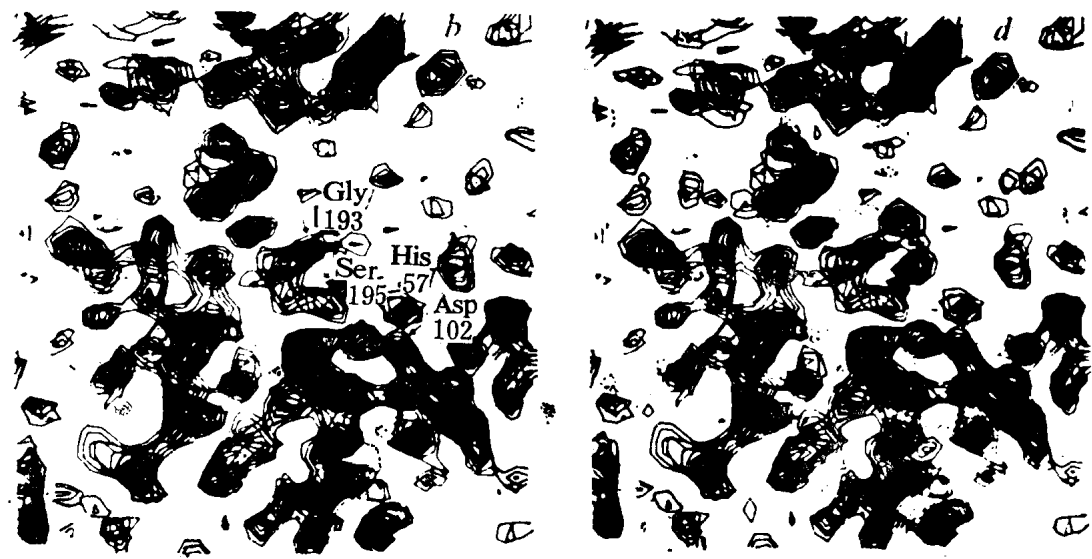


图1-2 弹性蛋白酶的酰化中间物

A: 弹性蛋白酶晶体在70% 甲醇溶液中在-55°C的X光衍射电子密度图,活性部位 Ser, His和 Asp 的位置已在图上标明。
B: 与底物苯氧羰基丙氨酸脂浸泡后的电子密度图。与A相比在丝氨酸上新增的电子密度代表苯氧羰基丙氨酸。

X光晶体衍射的另一不足之处是它测的是静态的结构，而生物大分子的功能则存在于运动之中，因此，我们关心的是动态，希望能看到如何变化的过程。解决这一问题的手段之一是将X光晶体衍射与低温生化结合起来。以酶催化的反应为例，这是非常快的过程。但温度每降低10°C，反应速度就可降低一半，如果把温度降至-50°C左右，反应速度就大大降低了，本来不稳定的中间物相对来说稳定了。如弹性蛋白酶的晶体在70%的甲醇溶液中冷至-55°C，然后用它的专一性底物苄氧羰基丙氨酸对硝基苯酯浸泡，可以得到酶的酰化中间物，在上述条件下可稳定二天，仍维持相当高的酰化比例，因此就有可能进行晶体衍射分析。从底物浸泡前后的差电子密度图(图1-2)可清楚地看出在活性部位丝氨酸羟基上的苄氧羰基丙氨酸的酰化物。这是人们第一次直接观察到一个酶和它的专一性底物形成的，本来是不稳定的共价中间物。

4. 酶作用的过渡态

70年代以来酶学另一新进展是关于酶作用的过渡态的研究。过渡态的概念 Pauling 早在40年代就把它从化学动力学引入到生化领域，但当时并未引起重视。近十几年来由于积累了许多实验证据，才渐渐地受到注意。

根据这个理论，酶所以具有很高的催化效率就是由于它与过渡态中间物紧密结合，从而降低了底物形成它的过渡态时所需克服的能障(图1-3)。可见研究酶与过渡态中间物的结合方式对于了解酶作用的机理非常重要。但是ES^{*}的半寿期很短，约在10⁻¹⁰—10⁻¹²秒的范围内，要研究它是很不容易的。目前的做法是寻找过渡态中间物的类似物，由于这些物质在结构上与S^{*}类似，它们与酶结合常常比底物还要紧密，研究它们与酶的结合方式对于说明酶的作用机理也是很有帮助的。现在已经有六十多个酶发现了过渡态中间物的类似物。表1-1中是几个例子，从中可见，这些类似物通常都是酶的抑制剂。它们与酶的结合比底物还要牢固3—5个数量级，即K_i/K_m约为1000至10万，说明它们在结构上比底物更接近于在反应过程中生成的过

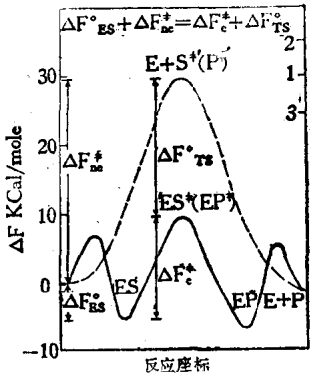


图 1-3 酶催化反应的过渡态
图中虚线代表非酶反应，实线代表酶反应；S^{*}是反应物(底物)的过渡态中间物；ES、EP分别代表酶与底物及产物的络合物；ES^{*}是酶与过渡态中间物的络合物。

表 1-1 一些酶的过渡态中间物的类似物

系 统 号	酶	底 物	类 似 物	K _i /K _m
1.1.3.2	乳酸氧化酶	乳 酸	草 酸	10 ⁻³
1.1.1.27	乳酸脱氢酶	乳 酸	草 酸	10 ⁻⁴
2.7.4.3	腺苷酸激酶	ATP	Ap ₅ A [*]	10 ⁻⁵
3.4.4.10	木瓜蛋白酶	Ac-Phe-GlyOCH ₃	Ac-Phe-Glycinal [*]	10 ⁻³
4.1.2.7	醛 缩 酶	磷酸丙糖	磷酸乙醇酸	10 ⁻⁴

* Ap₅A，见正文

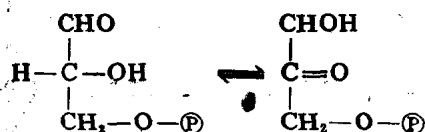
≠ 底物和类似物羧基末端的结构分别为 $\text{—C}(=\text{O})\text{—OCH}_3$ 和 $\text{—C}(=\text{O})\text{—H}$

渡态中间物（真正的过渡态中间物与酶的结合应该比底物要牢固 10^7-10^{17} 倍）。这些抑制剂本身的结构，往往已经能对酶反应的机理提供重要线索。例如腺苷酸激酶催化的反应是：

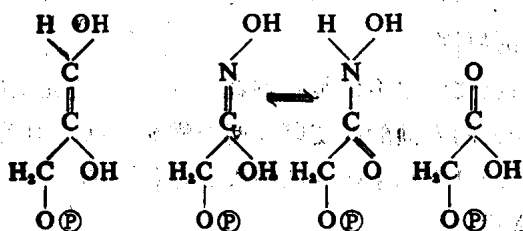


后来发现，两个腺苷分子在各自的核糖 5' 位上以五聚磷酸连接的分子 ($\text{A}_{\text{p}_5}\text{A}$) 和相应以四聚磷酸连接的分子 ($\text{A}_{\text{p}_4}\text{A}$) 对腺苷酸激酶的抑制能力极为不同；前者极强，后者很弱。这一事实表明在酶的活性部位同时存在结合 ATP 和 AMP 的部位，两者大体上是线性排列。处于过渡态时，ATP 分子的末端磷酸已略为离开它原来的位置，而趋近于 AMP 分子的磷酸基团。此时 ATP 和 AMP 两个分子的腺苷的距离大约相当于五聚磷酸的长度。

磷酸丙糖异构酶催化的反应是 D-甘油醛-3-磷酸和磷酸二羟丙酮的互变。



它的过渡态中间物可能具有烯醇类物质的结构。这一结构和磷酸乙醇酸及其羟肟酸的结构相比较时，可以看到其相似性。这些类似物不仅是酶的强烈抑制剂，并且引人注意的是，丙糖磷酸异构酶的晶体浸泡在类似物的溶液中后，引起酶的晶体形状明显改变，使得棒状晶体比浸泡前缩短了百分之五左右。这种差别肉眼都可以觉察，但是在用底物浸泡时则观察不到。由此推断，过渡态中间物与酶的结合非常牢固，而且使酶分子发生明显的结构变化。



酶的过渡态的研究不仅对了解酶的催化机理有重要意义，而且也为药物设计指出了一条新的途径。过去设计药物总以为药物和底物的结构越象越好，而现在应从与酶的过渡态中间物的结构类似去考虑，才能获得更佳的效果。

5. 记忆性酶——单体酶的别构现象

酶的调节性质的研究已受到越来越多的重视。别构作用过去都认为是寡聚体蛋白才具有的功能，但近年来发现有些酶明明是一个单体，也具有类似于别构的现象。这种酶可称为滞后酶 (hysteretic) 或记忆性酶 (mnemonical)。如肝脏的葡萄糖激酶是一个单体的酶，分子量 4 万左右，其反应速度相对底物浓度作图所得曲线明显地呈 S 形。为何有此现象？有一种解释是^[1]：游离的酶在开始时以两种构象状态存在（图 1-4，分别以圆圈和菱形代表），这两种构象的互变是一个相对缓慢的过程；而在平衡时酶主要是以圆圈所代表的构象形式存在。当配基（底物或效应剂）与上述任一种构象状态的酶结合后，都能将酶诱导变成相同的第三种构象状态，以方形代表（□）。但□不能直接释放出产物，必须经过△才能放出产物。所谓记忆性酶就是指酶在释放产

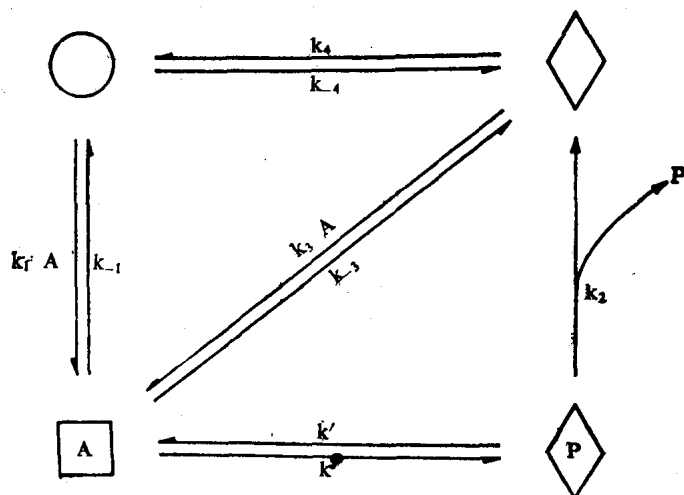


图 1-4 滞后酶构象变化示意图(说明见正文)

物之后仍“记得”它在结合产物之前的构象是菱形的，不再回到圆圈形了。由于开始反应时大部分酶是以圆圈形存在的，而圆圈变成菱形的构象变化是一个比较慢的过程，随着反应的进行，酶不再经历这一慢的过程了，这是反应开始时有一段滞后期的原因。这也是以反应速度相对底物浓度作图时得到 S 形曲线的原因。

这种慢构象转变，在蛋白质化学中不仅是有解释的，而且是有先例的。比如两个结构域之间相互关系的变化，肽链的比较大的卷曲的改变以及两个螺旋之间相对关系的变化都是慢过程，所以滞后现象不仅有实验证据，而且和构象研究的结果也是符合的。

6. 生物大分子的人工合成

我们国家首先合成了胰岛素，现在又合成了酵母丙氨酸转移核糖核酸，在生物大分子的人工合成方面做出了不少成绩。但是无论是国际还是国内，在蛋白质的合成方面十几年来没有重大的突破，至今要合成一个蛋白质仍是非常艰巨的工作。在核酸的合成方面，美国 Khorana 和 24 位共同工作者经过 9 年努力，报道了大肠杆菌酪氨酸转移核糖核酸前体基因包括起始和终止信息的全合成工作。他们用的方法是化学合成和酶促合成相结合，合成的量极少，以至要设计出非常灵敏的测活方法，才能测出转录活性，即利用 *E. Coli* 噬菌体的变种，灵敏度为 10^{-14} 克分子。

我国科学工作者于 1968 年开始了人工合成酵母丙氨酸转移核糖核酸的研究工作。这种核糖核酸由 76 个核苷酸组成，其中除 4 种常见的核苷酸外，还有九个 7 种稀有核苷酸(分别为 Tp, ψ p, m'Gp, m₂Gp, m'Ip, Dp 和 Ip)。我国的生物化学家们经过千百次探寻和摸索，采取有机化学和酶促合成的方法，把核苷酸连接成小片段，然后分别连接成含有 35 个和 41 个核苷酸的两个半分子。终于在 1981 年人工合成了具有生物活性的核糖核酸(见图 1-5)。

总的看来,蛋白质和核酸的人工合成仍是一项十分艰难的任务。一个简单的细胞,如支原体就含有六、七百种蛋白质和相应的核酸。大肠杆菌有人估计约含一千种以上的蛋白质。合成一个最小的蛋白质和核酸尚且如此困难,因此要合成一个完整的细胞恐怕还是相当遥远的事。

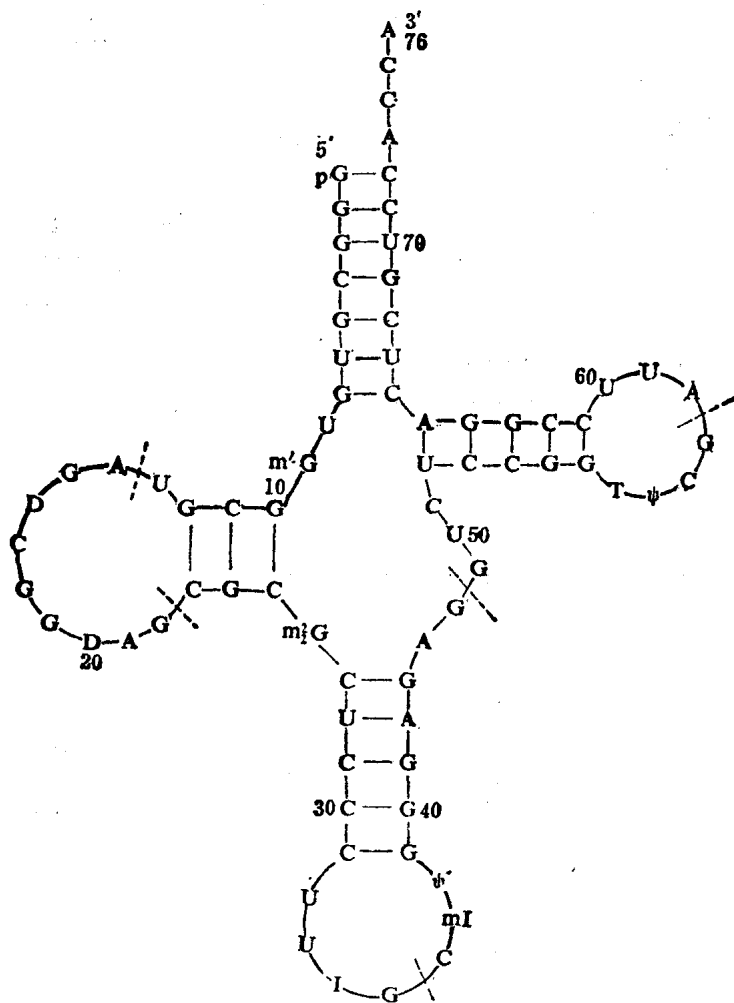


图 1-5 酵母 tRNA^{Ala}

二、分子遗传学

1. 左旋 DNA 双螺旋的发现

DNA 分子双螺旋模型的提出是分子生物学发展史上的一个里程碑,它打开了探索生物体遗传奥秘的大门,奠定了分子遗传学的基础。随着遗传密码的发现,“中心法则”的确立,以及基因工程的出现,分子遗传学以其一系列的重大成果有力地推动了分子生物学的发展。

最近关于左旋 DNA 的报道,又一次引起了人们的重视。这是根据人工合成的胞嘧啶和鸟

嘌呤相间排列的寡聚脱氧核苷酸得到的结果;在天然的 DNA 分子中,类似的序列也是肯定存在的。但是这种结构在天然 DNA 分子中究竟是广泛存在,还是在少数情况下的一种特例,它的生物功能又是什么,都有待于进一步研究。

根据X射线结构分析的结果,左旋 DNA 呈细长而伸展的状态,碱基对偏离轴心而靠近双螺旋的外侧。碱基的这种暴露状态使其更易受外界因素的影响。由于磷原子的连接线呈左旋锯齿状,因此称为 Z-DNA,以区别通常的 B-DNA。

2. 遗传密码的例外

遗传密码最初主要是根据以大肠杆菌为实验材料所取得的结果测定出来的。近几年来,由于蛋白质和核酸顺序分析的进展,遗传密码也就可以通过比较蛋白质的顺序, RNA 的顺序和 DNA 的顺序来加以验证。一直到不久以前,还没有发现有一处与遗传密码表有出入的,这说明遗传密码表在生物界是广泛适用的。但是最近在测定线粒体 DNA 全部顺序的过程中,将其序列与由线粒体 DNA 编码合成的蛋白质序列相对照,发现通用的遗传密码表出现了三处例外(表 1-2 中加括号处), CUA 应是 Leu,但是在线粒体中却是 Thr; AUA 由 Ile 变为 Met; UGA 由终止信号变为 Trp。这一发现最近已得到不同实验室的工作者证实。

表 1-2 遗传密码表

	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	终止	终止(Trp)	A
	Leu	Ser	终止	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu(Thr)	Pro	Glu	Arg	A
	Leu	Pro	Glu	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile(Met)	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

这是一个意外的重要发现。过去认为线粒体在某些方面类似于原核生物,并以此做为真核生物的共生起源学说的依据。但是,现已证明线粒体遗传密码和真核及原核生物的不同,这对于我们探讨生物体早期的进化,是一个有价值的线索。

3. 染色体的结构与功能

真核细胞基因表达的调节控制是分子遗传学当前面临的重要问题之一。不同生物的不同器官例如大脑、肌肉、肝脏,或是植物的花、叶、茎等,分别由不同类型的细胞组

成。这些不同类型的细胞却是由同一个受精卵分化出来的，并都含有发育成为一个完整个体所需的全部遗传信息。近年来，从一个植物体细胞培养成为一个完整的植株已经成功。在动物方面也有不同类型的体细胞都含有相同的基因的实验根据。这些体细胞都携带着相同的遗传信息，为什么又各不相同呢？这是因为基因表达的全过程是在严格的调节和控制之下进行的。

染色体的结构大体上像串珠，但线不从珠子中心穿过，而是绕在它外面。珠子由 8 个蛋白质分子构成。DNA 的双螺旋就绕在珠子的外面，两个珠子之间有一段游离的 DNA 结构，把这样的结构用一定的 DNA 酶处理，两个珠子之间的 DNA 被去掉，得到的东西暂名为核小体。用 X 光衍射和电镜观察可以看到它的粗结构是一个扁圆体，长 $110\text{\AA}$ ，厚 $57\text{\AA}$ ，蛋白质在中心，有 140—200 个残基对的 DNA 双螺旋绕在碱性蛋白质(组蛋白)的外面。扁圆体好象一个半张开的蚌，中间较空。这样的结构比较稳定。从这一结构还看不出蛋白质的调控作用。组蛋白的作用看来是维系 DNA 稳定的结构。另一类种类很多的蛋白质是酸性蛋白和中性蛋白，统称非组蛋白。现在看来主要是这些蛋白质对调控起作用。但由于非组蛋白种类多，含量低，变化快，所以分离很困难。近年来技术上有所突破，发展了两向凝胶电泳：一向是凝胶等电聚焦，根据蛋白质的等电点来分离，另一向是十二烷基硫酸钠-凝胶电泳，根据蛋白质的分子大小来分离。采用这一技术，大肠杆菌细胞破碎后在电泳图上可分辨出 1000 种蛋白质的点子。虽然分出的量很少，但用荧光标记抗体法测定，相当灵敏，最低量可测出 1000 个分子。此法加以改进后，一次两向凝胶电泳，在理论上可分出 7000 个点。离体培养的 Hela 细胞，发生一个单一的基因突变后，仅影响到一个蛋白质的改变，在两向电泳中就可看出差别。这一方法为分析基因表达的调节控制反映在细胞内所合成的蛋白质的种类和数量的差异，提供了极为灵敏的手段。

4. 真核基因的插入顺序

真核生物的多数基因都是不连续的，存在有插入序列。这些插入序列在基因表达过程中的加工与剪接是近二、三年来最受关注的问题之一。

以胰岛素为例，胰岛素分子由 A、B 两条肽链组成，但实际上，生物体首先合成的是一个称为前胰岛素原的分子(即在 B 链之前有一段 24 肽称为前肽；B 链和 A 链之间有一段 35 肽，称为 C 肽)，它需要经过两步加工，切去前肽和 C 肽，才形成胰岛素分子，把人胰岛素基因与胰岛素结构相比较，可看到这个基因。在 C 肽编码区的中间有 786 个碱基的插入序列(图 1-6)。

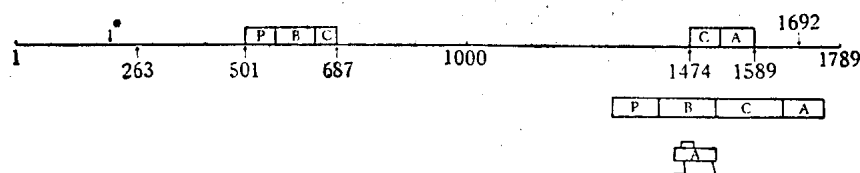


图 1-6 人胰岛素基因简图

图中 P、B、C、A 分别为前肽、B 链、C 链和 A 链，其长度分别为 24、30、35、21 个氨基酸；* 所标位置的 DNA 序列为 TATAAAG，是 RNA 多聚酶结合位点，转录从核苷酸顺序号 263 处开始，在 688 至 1473 之间有一段 786 个核苷酸的插入序列；在 1692 处是信使 RNA 和多聚 A 的连接点，值得注意的是 C 链插入段，插在 C 链第 9 个氨基酸缬氨酸密码 GTG 的 GT 之间。