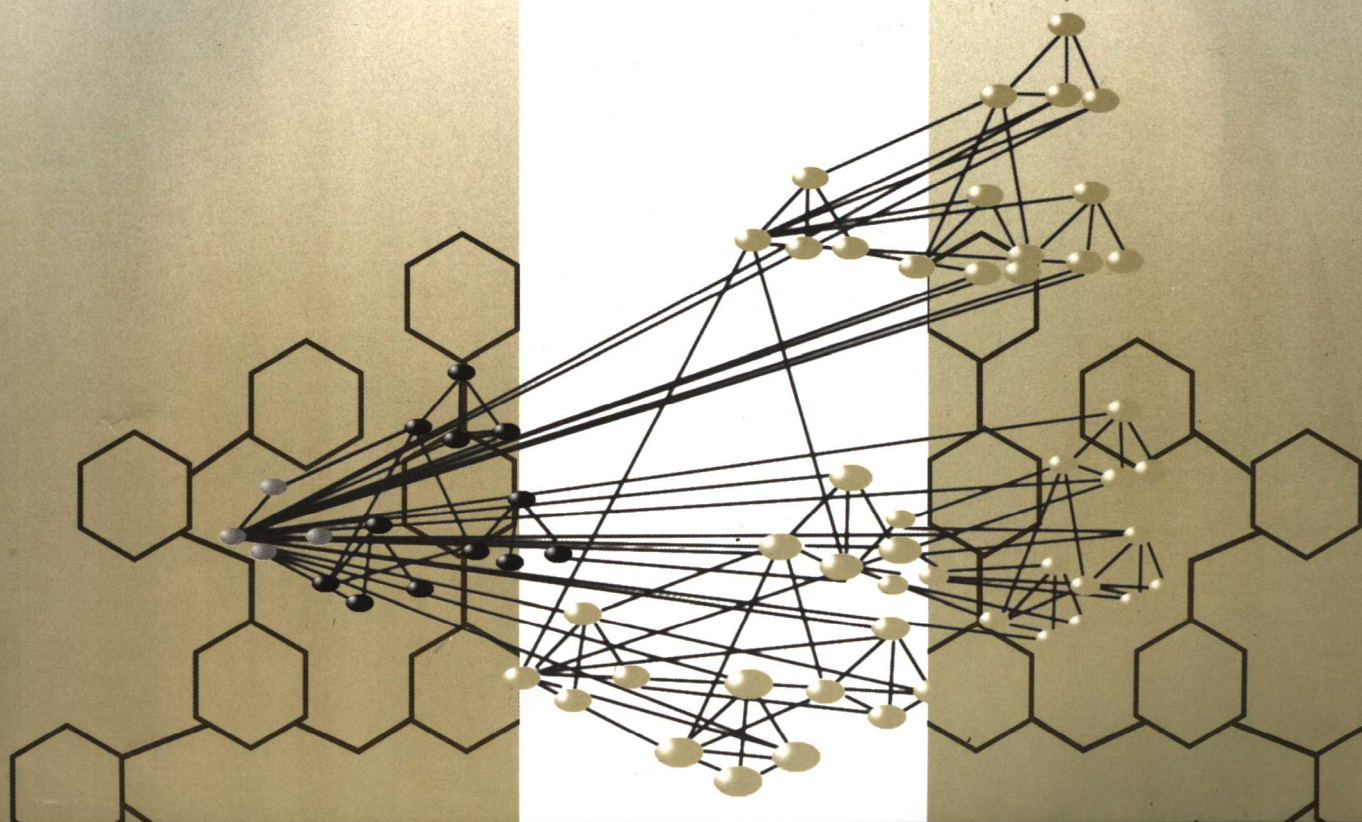




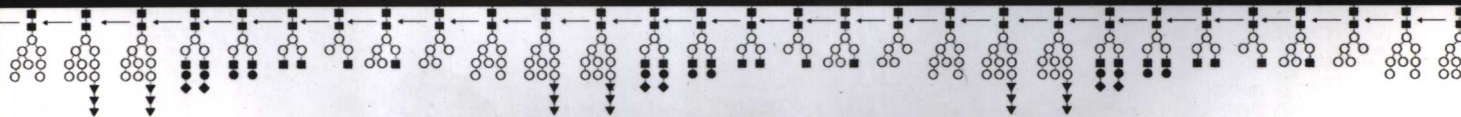
高等学校教材

分子生物学

余多慰 龚祝南 刘平 编著



FENZI SHENGWUXUE



南京师范大学出版社
NANJING NORMAL UNIVERSITY PRESS



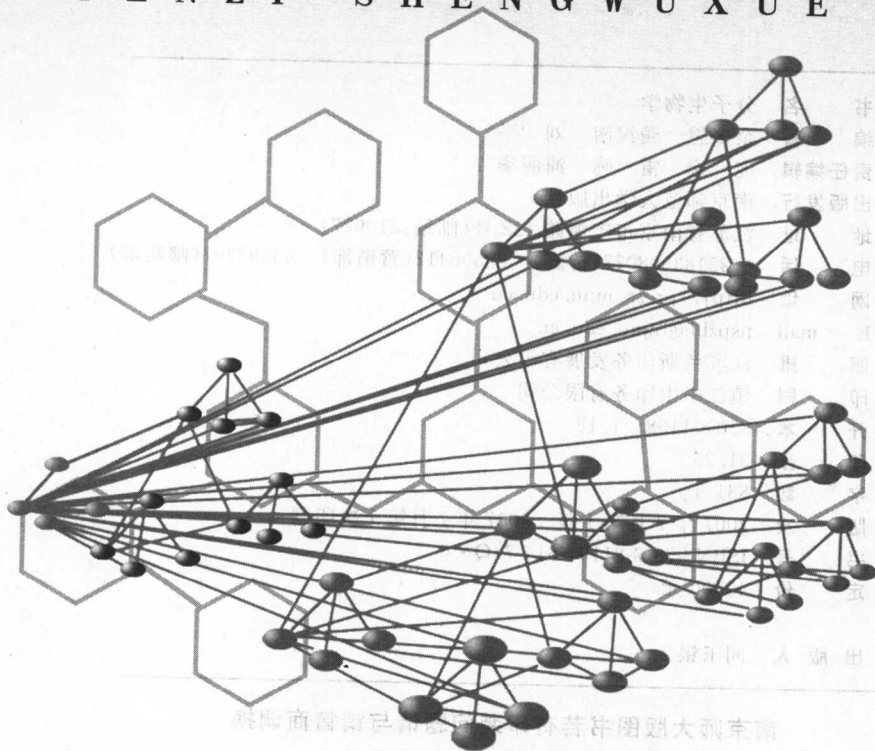
高等学校教材

南京师范大学出版资助金资助出版

分子生物学

余多慰 龚祝南 刘平 编著

F E N Z I S H E N G W U X U E



南京师范大学出版社
NANJING NORMAL UNIVERSITY PRESS

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学/余多慰,龚祝南,刘平编著. —南京:南京师范大学出版社,2007.7
优秀教材

ISBN 978-7-81101-614-7/Q·6

I. 分... II. ①余...②龚...③刘... III. 分子生物学—高等学校—教材
IV. Q7

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 100406 号

书 名	分子生物学
编 著	余多慰 龚祝南 刘 平
责任编辑	庞 宏 雷 鸣 浦丽华
出版发行	南京师范大学出版社
地 址	江苏省南京市宁海路 122 号(邮编:210097)
电 话	(025)83598077(传真) 83598412(营销部) 83598297(邮购部)
网 址	http://press.njnu.edu.cn
E-mail	nspzbb@njnu.edu.cn
照 排	江苏兰斯印务发展有限公司
印 刷	镇江中山印务有限公司
开 本	850×1168 1/16
印 张	31.25
字 数	861 千
版 次	2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月第 1 次印刷
书 号	ISBN 978-7-81101-614-7/Q·6
定 价	49.00 元

出 版 人 闻玉银

南京师大版图书若有印装问题请与销售商调换
版权所有 侵犯必究

前 言

分子生物学是研究核酸、蛋白质等生物分子的形态、结构和特征,以及它们与功能之间相互关系的规律性的科学;是人类真正从分子水平上揭示生命现象的机理,由被动地适应自然界,转向能动地改造和重组自然界的应用基础型学科。

国际上有关分子生物学的知识和技术正以迅猛的速度向前发展。如何及时反映学科知识的进步,如何使培养的本科生的知识结构能与学科发展水平相衔接,并因此能从事国内外有关分子生物学的研究、教学、产品研发、企业管理、商业流通、行政监控等领域的相应工作,这样的问题使担负着培养新一代生命科学工作者重任的高校教师,正面临着本科教学改革带来的巨大压力。

本书的编者都在各自的分子生物学研究领域不断地进行着卓有成效的科研工作,了解分子生物学学科发展现状,在各自的教学过程中使用过多种版本的教材,并遇到因教材内容缺少新意或与学生已经学过的其他课程内容重复等等而带来的各种问题之后,编写了这本可以适合目前本科生教学以及本科生发展(包括升学与就业)需要的新教材,力图在本科生能力培养方面,以教材建设为突破口,来取得有成效的进展。本书编写的指导思想主要体现在以下几个方面。

一、在师范教育基础上展示分子生物学知识的多学科交叉性

本书采纳了国内外较多新的分子生物学研究成果,对于生命科学研究前沿,特别是即将成为分子生物学应用技术前沿的知识给予了必要的展示,这在其他教材中是不多见的。这样做的原因,根源在于对师范院校理科人才培养模式的冷静思考。同样是理科人才培养,综合性大学与师范院校应该是分层次开展教学活动的。师范院校有理科,当初设置理科的主要目的是为中学的理科课程的开设提供师资,而不可能是和综合性大学一样,以培养基础科学研究人才为宗旨。所以按照师范办学目标决定教学内容是实事求是的。

不过,目前的情况已经发生了变化。首先,少数重点师范院校由于集中了优秀的学者,已经成为实际意义上的综合性大学(研究型大学);或为国家培养一定规模的基础科学研究人才的大学,比如一些拥有国家理科基地的院校(教学研究型大学)。但绝大多数师范院校,依然是教学型大学。他们培养的学生,即使可能在少数院校有60%能升入研究生层次,但办学实体的性质没有改变。所以,师范院校培养人才要兼顾升学与就业两方面的需要。

其次,目前师范院校的师范类学生比例大幅下降,他(她)们和非师范专业的学生一样,面临就业市场的双向选择,尤其是生命科学类的毕业生,在我国目前“生物经济”还不够发达的情况下,将可能转向从事相关性不够强的各种类型的职业。

第三,“生物经济”不可阻挡地将成为国民经济中的重要成分,不仅将会在生物技术领域本身容纳更多的生命科学类的毕业生,还将会在相关的各种类型的职业中容纳高比例的具备生命科学素养的各类人才,例如懂生物知识的律师,懂生物知识的电子工程师等等。最起码上述这三个现实变化,决定了全国师范院校开设的分子生物学课程,必须把介绍基础理论与介绍多学科交叉应用知识并举,并将之摆在教学理念的首要位置,成为创新能力培养的坚实基础。

二、突出生物大分子与生物小分子的相互关系

本书反映了我校近年来在本科生的分子生物学教学中形成的新知识体系,不同于以往国内

2 分子生物学

外绝大多数分子生物学教材,不再采用过去的体系,即以中心法则为纲领的遗传信息表达过程,或者以基因工程技术为知识主线的体系,或者以病毒分子生物学、肿瘤分子生物学、免疫分子生物学、神经分子生物学、细胞分子生物学等分别按照学科分支或按照热点分支为串联的体系。本书的新知识体系立足于各类生物分子结构与功能知识的介绍,立足于阐述各类生物分子在细胞中存在的相互关系,立足于对生物分子已有的海量信息的梳理与归纳。

本书对生物大分子与细胞内出现的各种小分子、离子都给予了重视;在核酸与蛋白质的内容中相对增加后者的比重,以顺应蛋白质科学正在成为分子生物学核心内容的潮流;对学习与记忆、分子传感器、基因治疗、生物反应器等学习者自身将会接触到的应用性分子生物学知识,给予了较为系统的介绍;对各种“组学”的思想给予了必要的集中和对比。尤其是容纳了较多的植物方面(包括中药)的分子生物学研究成果,弥补了通常的分子生物学教材仅以微生物和动物材料为知识主体的缺憾。本书引入了一批分子生物学新词汇,如伪肽、M-DNA 等,目的是开拓学习者的视野,完善本科学习阶段应了解的分子生物学发展现状。

三、在教学内容中增强应用性

在本科生学习微生物学、生物化学、遗传学、细胞生物学等这些饱含经典分子生物学内容的专业必修课的同时或学习过之后,本书大幅度地减少了重复的知识,转而对各种生物分子(包括生物大分子和细胞内的各种小分子)的结构与功能这一核心问题给予了重点关注,实行有利于培养学生创新能力的探索。

本书对知识点的选择,以较大的比例突出反映现代分子生物学融会了数学、物理、化学、信息、材料科学等基础学科知识内容的特征,紧密联系医学(含医学工程,如诊疗设备)、农学、药学、生物化工、环境保护等应用学科实践的特点,把分子生物学从高深莫测的基础研究介绍,转变成既可以满足国家基础研究对人才的需求,又可以直接服务于“生物经济”的实用科学。体现了现代生命科学的综合性、系统性、交叉性,改变生命科学类大学本科过去所学的分子生物学知识——仅服务于攻读研究生,而不适合国民经济发展现实要求的弊病。

四、倡导研究性学习方式

本书共分为 21 章,是为了便于高等院校一个学期的教学而安排的。全书内容并不要求在课堂上全部讲完,而是拿出知识框架,以若干案例的重点介绍为研究性学习的范本,方便学生在课后有系统地了解某一知识点,启发学生从中选择自己的重点思考范围。本书各章内容中论述的不同主题有简有繁,描述内容多的部分是便于学习者课后的自学与思考,描述内容简单的部分可以作为研究性学习的入口,有不同方向兴趣的学习者可以挑选不同内容做重点的消化。

五、在编排上减少重复性

除了避免与已经包含了经典分子生物学内容的其他学科的教学内容重复,本书没有单独把分子生物学常用技术列为一章,原因有三:

其一,各校都有专门的分子生物学实验课程或课时,将进行相关实验原理和实验操作的教学,与此相关的内容,如基因工程常规操作技术,不需在理论课教材中重复。

其二,许多分子生物学重点技术是攻读研究生时才需要进一步掌握的,绝大多数本科毕业生将长期不会有接触机会,而分子生物学技术的更新换代又非常之快,因此没有必要占用十分有限的教学课时资源。

其三,本书将另一些有关的分子生物学常用技术,分散在与其直接相关的章节内容中,使学习者真正认识到相关的技术与相应的研究内容是一个有机的整体。

本书的编写与定稿,是在南京师范大学积极推进研究性教学的大背景下进行的,同时,也是南京师范大学国家基础科学研究与人才培养理科基地(生物学)的建设内容之一,是江苏省生命科学品牌专业建设内容之一,得到了各级领导和国家基础科学研究与人才培养理科基地班本科生的支持,并获得南京师范大学优秀教材出版基金的立项资助,在此,谨表衷心的感谢!

本书为集体编写,因而在风格、文字等方面或许还有不够统一之处;另外,由于分子生物学发展迅猛,编写中采纳与引用的内容众多,不方便把参考文献一一列出,对于这些原始工作的作者,我们表示敬意和歉意,并希望读者根据本书中的主题词,通过先进的计算机网络搜索功能,去拜读原始论文。书中会有某些欠缺或错漏之处,敬请读者批评指正,我们希望在以后的分子生物学教学中,本书能根据科学的发展和教学实践加以完善。

2007年6月30日

目 录

前 言

第一章 氨基酸序列中的功能性密码	(1)
第一节 氨基酸序列的合成	(1)
第二节 氨基酸序列与蛋白质分选	(3)
第三节 氨基酸序列与信号肽	(5)
第四节 氨基酸序列与导肽	(6)
第五节 氨基酸序列与蛋白质折叠	(8)
第六节 氨基酸序列与酶的活性	(14)
第七节 氨基酸序列与细胞凋亡	(15)
第二章 蛋白质结构与功能——受体	(17)
第一节 分子识别	(17)
第二节 离子通道偶联型受体	(18)
第三节 G 蛋白偶联型受体	(20)
第四节 酶偶联型受体	(35)
第五节 细胞内受体	(41)
第三章 蛋白质结构与功能——通道蛋白	(45)
第一节 载体蛋白和通道蛋白	(45)
第二节 细胞膜通道蛋白的研究历史	(47)
第三节 电压门控离子通道的结构与功能	(49)
第四节 配体门控离子通道	(52)
第五节 机械门控离子通道	(55)
第六节 水通道蛋白	(56)
第七节 离子通道与疾病	(58)
第四章 蛋白质结构与功能——细胞因子及其受体	(61)
第一节 细胞因子的定义及其分类	(61)
第二节 细胞因子的结构	(65)
第三节 细胞因子受体的结构及其分类	(68)
第四节 细胞因子的信号传递	(73)
第五节 细胞因子的应用领域	(81)
第五章 蛋白质结构与功能——转录因子	(83)
第一节 转录因子的结构	(83)
第二节 作用方式特点和研究方法	(86)
第三节 一些常见的植物转录因子	(87)
第四节 动物中的转录因子——MyoD	(91)

2 分子生物学

第五节 热休克转录因子——HSF	(94)
第六节 一些转录因子的实例	(97)
第七节 人工转录因子	(100)
第六章 生物超分子体系	(106)
第一节 生物超分子体系的特征	(106)
第二节 核糖体超分子体系	(107)
第三节 转录起始阶段的超分子复合体	(114)
第四节 成纤维细胞因子受体——配体超分子体系	(120)
第五节 端粒酶超分子体系	(127)
第七章 蛋白质变异效应与短肽生物学效应	(135)
第一节 氨基酸突变引起的变异效应	(135)
第二节 氨基酸异常修饰引起的变异效应	(137)
第三节 错误折叠蛋白质引起的变异效应	(139)
第四节 蛋白质序列缺失引起的效应	(144)
第五节 未折叠蛋白应答引起的效应	(145)
第六节 短肽的效应	(148)
第八章 学习与记忆的分子基础	(163)
第一节 学习记忆中 LTP 发生的精微区域	(163)
第二节 LTP、LTD 与学习记忆的关系	(166)
第三节 CaMK II 与学习记忆的关系	(167)
第四节 LTP 与学习记忆有关的受体	(168)
第五节 神经细胞黏附分子与学习记忆	(174)
第六节 MAPK 级联信号通路与 LTP	(175)
第七节 逆行信使及其作用机制	(178)
第八节 与 LTP 形成相关的基因表达	(179)
第九节 RNA 与学习和记忆	(182)
第十节 与学习记忆有关的神经肽	(183)
第九章 DNA 的结构与功能	(187)
第一节 DNA 和氢键	(187)
第二节 与 DNA 相关的单分子操作技术	(189)
第三节 弹性竿模型下超螺旋 DNA 分子的构象研究	(195)
第四节 二维 DNA 晶体与 DNA 自组装	(196)
第五节 与 DNA 发生作用的各类小分子	(202)
第六节 DNA 作为遗传信息载体之外的作用	(206)
第七节 DNA 计算机	(221)
第八节 DNA 降解	(225)
第十章 RNA 的结构与功能	(229)
第一节 RNA 的结构	(229)
第二节 tRNA 的结构与功能	(230)
第三节 rRNA 的结构与功能	(233)

第四节	mRNA 的结构与功能	(236)
第五节	若干种小分子量 RNA	(238)
第十一章	基因治疗	(252)
第一节	基因治疗的发展及研究概况	(252)
第二节	基因诊断与基因治疗	(253)
第三节	基因治疗的策略	(262)
第四节	基因治疗的应用	(265)
第五节	基因治疗药物的安全性评价	(268)
第十二章	功能基因组学	(270)
第一节	功能基因组学的内涵	(270)
第二节	功能基因组学相关技术	(271)
第三节	药物基因组学和元基因组学等分支领域	(276)
第四节	中药基因组学与中药化学组学	(286)
第十三章	蛋白质组学	(289)
第一节	蛋白质组学基本概念	(289)
第二节	蛋白信息提取	(291)
第三节	蛋白质分离技术	(292)
第四节	蛋白质鉴定技术	(294)
第五节	蛋白质翻译后修饰的鉴定	(295)
第六节	蛋白质芯片	(296)
第七节	软件工具	(302)
第八节	数据库与生物信息学	(304)
第九节	蛋白质的糖组学研究	(306)
第十四章	基因芯片与芯片实验室	(311)
第一节	基因芯片	(311)
第二节	蛋白芯片与基因芯片技术的对比	(320)
第三节	微操作器	(321)
第四节	芯片实验室	(324)
第十五章	代谢组中的生物小分子	(337)
第一节	代谢组学的概念	(337)
第二节	代谢组学与其他组学的联系及比较	(339)
第三节	代谢组学研究方法	(341)
第四节	代谢组学在药物研究中的意义	(348)
第五节	金属组学	(352)
第十六章	生物系统内的分子作用网络	(355)
第一节	分子作用网络概述	(355)
第二节	生命网络结构形式及其自组织特征	(358)
第三节	研究分子作用网络的学科——系统生物学	(361)
第四节	基因网络	(363)
第五节	蛋白质相互作用网络的负反馈控制及其建模	(366)

4 分子生物学

第六节	氨酰 tRNA 合成酶的分子网络和功能	(368)
第七节	植物保卫细胞中 ABA、H ₂ O ₂ 和 NO 信号网络	(371)
第八节	细胞复杂信号传导的调控模式	(377)
第九节	细胞信号网络作用机制	(380)
第十七章	糖生物学功能的分子基础	(384)
第一节	糖分子的结构	(384)
第二节	主要的生物多糖	(398)
第三节	多糖的生物学功能及其分子机制	(400)
第四节	多糖功能的分子结构基础	(406)
第十八章	膜分子的结构与功能	(411)
第一节	生物膜研究重点	(411)
第二节	生物膜的主要作用	(413)
第三节	生物膜分子的组装与运动	(415)
第四节	光合膜蛋白的晶体结构	(422)
第五节	内在膜蛋白三维结构的解析	(424)
第六节	生物膜模拟体系的研究	(427)
第七节	生物膜细菌的研究	(429)
第十九章	转基因动物与生物反应器	(433)
第一节	转基因动物研究的历史及现状	(433)
第二节	转基因表达载体的一些设计考虑	(434)
第三节	转基因动物的研究技术	(437)
第四节	转基因动物的类型	(443)
第五节	转基因动物的应用	(444)
第六节	生物反应器	(446)
第二十章	生物传感器的分子基础	(451)
第一节	生物分子传感器概述	(452)
第二节	生物敏感膜的制备技术	(456)
第三节	各类生物传感器的研究	(458)
第四节	分子发动机	(470)
第二十一章	个体发育中的某些分子机制	(475)
第一节	参与发育调控的基因	(475)
第二节	RNA 水平的发育调控	(479)
第三节	蛋白质在发育调控中的作用	(480)
第四节	其他物质在动植物发育中的调控作用	(482)
主要参考文献		(486)

第一章 氨基酸序列中的功能性密码

[摘要] 氨基酸序列是指由 20 种常见氨基酸按照遗传信息组合连接而成的序列,即我们通常所说的肽链,它是蛋白质结构的基础。然而,其功能不仅仅局限于作为蛋白质中的结构基础,在多肽的转运与定位,蛋白质的折叠,蛋白质的分泌与分选,蛋白质的降解以及细胞的信号传导等众多机制中,氨基酸序列都有着重要的信号作用。

Protein(蛋白质)一词,是取自希腊词汇 protos,原意是“第一”的意思。它是一切生物借以表现生命的最重要的基本单元,它可以算是自然界最微小的自动机器。蛋白质的一级结构是氨基酸序列,氨基酸序列是指由 20 种常见氨基酸(表 1-1)按照遗传信息组合连接而成的序列,即我们通常所说的肽链,它是蛋白质结构的基础。然而,其功能不仅仅局限于作为蛋白质中的结构基础,在多肽的转运与定位、蛋白质的折叠、蛋白质的分泌与分选、蛋白质的降解、酶活性以及细胞的信号传导(transduction,在遗传学中译为“转导”,与病毒有关;在涉及信号传递的意义时,本书采用“传导”一词)机制中,氨基酸序列都有着重要的信号作用。

表 1-1 氨基酸以及缩写符号

1. 色氨酸 Tryptophan(Trp)	11. 丙氨酸 Alanine(Ala)
2. 异亮氨酸 Isoleucine(Ile)	12. 精氨酸 Arginine(Arg)
3. 酪氨酸 Tyrosine(Tyr)	12. 半胱氨酸 Cysteine(Cys)
4. 苯丙氨酸 Phenylalanine(Phe)	14. 谷氨酸 Glutamicacid(Glu)
5. 脯氨酸 Proline(Pro)	15. 天门冬氨酸 Asparticacid(Asp)
6. 亮氨酸 Leucine(Leu)	16. 苏氨酸 Threonine(Thr)
7. 缬氨酸 Valine(Val)	17. 丝氨酸 Serine(Ser)
8. 赖氨酸 Lysine(Lys)	18. 甘氨酸 Glycine(Gly)
9. 组氨酸 Histidine(His)	19. 天门冬酰胺 Asparagine(Asn)
10. 甲硫氨酸 Methionine(Met)	20. 谷氨酰胺 Glutamine(Gln)

第一节 氨基酸序列的合成

氨基酸彼此在核糖体上缩合成多肽链,是通过核糖体循环而实现的。此循环可分为肽链合成的起始(intiation),肽链的延伸(elongation)和肽链合成的终止(termination)三个主要过程。

一、肽链合成的起始

以原核生物的类型为例进行介绍。三元复合物(trimer complex),是核糖体 30S 小亚基由起始因子 3(IF3)介导,另外有 Mg^{2+} 的参与,附着于 mRNA 的起始信号部位所形成。又称 IF3-30S 亚基-mRNA 三元复合物。在起始因子 2(IF2)的作用下,甲酰甲硫氨酸一起始型 tRNA(fMet-tRNA)依靠密码子与反密码子相互反应,与 mRNA 分子中的起始密码子(AUG 或 GUG)相结合。同时 IF3 从三元复合物脱落,形成 30S 前起始复合物(30S pre-initiation complex),即 IF2-30S 亚基-mRNA-fMet-tRNA 复合物。此步需要 GTP 和 Mg^{2+} 参与。50S 亚基与上述的 30S 前起始复合物结合,同时 IF2 脱落,形成 70S 起始复合物,即 30S 亚基-mRNA-50S 亚基-fMet-tRNA 复合物。此时 fMet-tRNA 占据着 50S 亚基的肽酰位(peptidyl site, 简称为 P 位或给位),而 50S 的氨基酰位(aminoacyl site, 简称为 A 位或受位)暂为空位(图 1-1、图 1-2)。

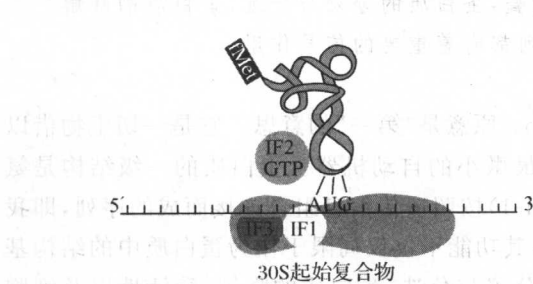


图1-1 肽链合成的30S起始复合物

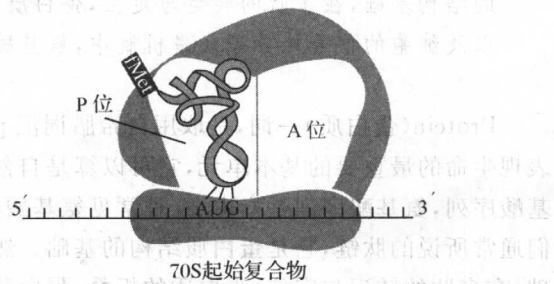


图1-2 肽链合成的70S起始复合物

二、肽链的延伸

这一过程包括进位、肽键形成、脱落和移位等 4 个步骤。肽链合成的延长需 2 种延长因子(elongation factor, 简称为 EF), 分别称为 EF-T 和 EF-G, 此外尚需 GTP 供能以加速翻译过程。

①进位, 即新的氨基酰-tRNA 进入 50S 大亚基 A 位, 并与 mRNA 分子上相应的密码子结合。在 70S 起始复合物的基础上, 原来结合在 mRNA 上的 fMet-tRNA 占据着 50S 亚基的 P 位点(当延长步骤循环进行 2 次以上时, 在 P 位点则为肽酰-tRNA), 新进入的氨基酰-tRNA 则结合到大亚基的 A 位点, 并与 mRNA 上起始密码子随后的第二个密码子结合。此步需 GTP、EF-T 及 Mg^{2+} 的参与。

②肽键形成, 在大亚基上肽酰转移酶的催化下, 将 P 位点上的 tRNA 所携带的甲酰甲硫氨酸(或肽酰基)转移给 A 位上新进入的氨基酰-tRNA 的氨基酸上, 即由 P 位上的氨基酸(或肽的羧基端氨基酸)提供 α -COOH 基, 与 A 位上的氨基酸的 α -NH₂ 基形成肽链。此后, 在 P 位点上的 tRNA 成为无负载的 tRNA, 而 A 位上的 tRNA 负载的是二肽酰基(或多肽酰基)。此步需 Mg^{2+} 及 K^{+} 的存在。

③脱落, 即 50S 亚基 P 位上无氨基酸负载的 tRNA 脱落。

④移位, 指在 EF-G 和 GTP 的作用下, 核糖体沿 mRNA 链(5'→3')做相对移动。每次移动相当于一个密码子的距离, 使得下一个密码子能准确地定位于 A 位点处。与此同时, 原来处于 A 位点上的二肽酰 tRNA(或多肽酰 tRNA)转移到 P 位点上, 空出 A 位点。随后再依次按上述的进位、肽键形成和脱落步骤进行下一循环, 即第三个氨基酰-tRNA 进入 A 位点, 然后在肽酰转移酶催化下, P 位上的肽酰 tRNA 又将此肽基转移给第三个氨基酰-tRNA, 形成更长的肽酰 tRNA。同时, 卸下肽酰的 tRNA 又迅速从核糖体脱落。像这样继续下去, 延长过程每重复一次, 肽链就延伸一个氨基酸残基。多次重复, 就使肽链不断地延长, 一直延长到 mRNA 上出现终止密码子。通过实验已经证明, mRNA 上信息的阅读, 是从多核苷酸链的 5'端向 3'端进行的, 而肽链的延伸是从 N 端开始的。

三、肽链合成的终止

肽链合成的终止,需终止因子或释放因子(releasing factor, RF)参与。在 *E. coli* 中已分离出 3 种 RF: RF1(MW36 000), RF2(MW38 000)和 RF3(MW46 000)。其中,只有 RF3 与 GTP(或 GDP)能结合。它们均具有识别 mRNA 链上终止密码子使肽链释放、核糖体解聚的作用。①多肽链的合成已经完毕,这时,虽然多肽链仍然附着在核糖体及 tRNA 上,但 mRNA 上肽链合成终止密码子 UAA(亦可以是 UAG 或 UGA)已在核糖体的 A 位点上出现。终止因子用以识别这些密码子,并在 A 位点上与终止密码子相结合,从而阻止肽链的继续延伸。RF3 的作用还不能肯定,可能具有加强 RF1 和 RF2 的终止作用。RF1 和 RF2 对终止密码子的识别具有一定的特异性,RF1 可识别 UAA 和 UAG, RF2 识别 UAA 和 UGA。RF 与 EF 在核糖体上的结合部位是同一处,它们重叠的结合部位,防止了 EF 与 RF 同时结合于核糖体上,而扰乱正常的功能。②终止因子可能还可以使核糖体 P 位点上的肽酰转移酶发生变构,酶的活性从转肽作用改变为水解作用,从而使 tRNA 所携带的多肽链与 tRNA 之间的酯键被水解切断,多肽链从 tRNA 及核糖体上释放出来。最后,核糖体与 mRNA 分离,同时,在核糖体 P 位上的 tRNA 和 A 位上的 RF 亦即脱落。与 mRNA 分离的核糖体又分离为大小两个亚基,可重新投入另一条肽链的合成过程。核蛋白体分离为大小两个亚基的反应需要起始因子 3(IF3)的参与。必须指出,上述只是单个核糖体的循环,即单个核糖体的翻译过程。采用温和的条件小心地从细胞中分离核糖体时,可以得到 3~4 个甚至上百个成串的核糖体,称为多核糖体。即在一条 mRNA 链上同一时间内结合着许多个核糖体,两个核糖体之间有一定的长度间隔,是裸露的 mRNA 链段,所以多核糖体可以在一条 mRNA 链上同时合成几条多肽链,这就大大提高了翻译的效率。

在开始合成蛋白质时,一个核糖体先附着在 mRNA 链的起始部位,再沿着 mRNA 链由 5'端向 3'端移动,根据 mRNA 链的信息,有次序地接受携带氨基酸的各种 tRNA,并合成肽链。当这一核糖体移动到足够远的位置时,另一核糖体又可附着此 mRNA 的起始部位,并开始合成另一条同样的多肽链。每当一个核糖体到此 mRNA 上的终止密码子时,多肽链即合成完毕,并从 tRNA 及核糖体上释放出。同时,此核糖体随之从 mRNA 链上脱落分离为两个亚基,而脱落下来的大小亚基又可重新投入核糖体循环的翻译过程。多核糖体中的核糖体个数,视其所附着的 mRNA 大小以及所在细胞的生理状态而定。例如,血红蛋白的多肽链约由 150 个氨基酸残基组成,相应的 mRNA 的编码区应有 450 个碱基组成的多核苷酸,长约 150 nm。网织红细胞核糖体的直径为 22 nm,所以每条 mRNA 足以容纳好几个核糖体。现已证明,网织红细胞多核糖体由 5~6 个核糖体串联而成,两个核糖体之间的间隔约为 3 nm。肌球蛋白(即肌凝蛋白)的重链由 1 800 个氨基酸残基组成,相应的 mRNA 链的编码区应当是 5 400 个核苷酸组成的长链,多核糖体由 60 多个核糖体串联而成。

第二节 氨基酸序列与蛋白质分选

从系统发生来看,真核细胞内膜系统起源于质膜的内陷和内共生(线粒体、叶绿体),从个体发生来看新细胞的内膜系统来源于原有内膜系统的分裂。当细胞进行分裂时,不仅要进行染色体和细胞核的复制,同时各种细胞器通过吸收新合成的成分长大,然后随着细胞的分裂分配到子细胞中去。细胞不能从无到有产生所有膜性细胞器,新的膜性细胞器来源于已存在细胞器的分裂。如果彻底移除细胞内所有的过氧化物酶体,细胞根本不能重建新的过氧化物酶体。过氧化物酶体中具有选择性地接受细胞质内合成的蛋白质的特殊转位因子(translocator)信号,从而接

受这些特殊的蛋白质入内。细胞内合成的蛋白质、脂类等物质之所以能够定向地转运到特定的细胞器,取决于两个方面的因素:其一是蛋白质中包含特殊的信号序列(signal sequence or targeting sequence),其二是细胞器上具特定的信号识别装置(分选受体,sorting receptor)。内膜系统的发生具有核外遗传的特性,是因为细胞器基因中也有决定蛋白质定位的编码信号。细胞中至少存在两类蛋白质的分选信号(图 1-3):①信号序列:存在于蛋白质一级结构上的线性序列,通常含 15~60 个氨基酸残基,有些信号序列在完成蛋白质的定向转移后被信号肽酶(signal peptidase)切除。②信号斑(signal patch):存在于完成折叠的蛋白质中,构成信号斑的信号序列之间可以不相邻,折叠在一起构成蛋白质分选的信号。

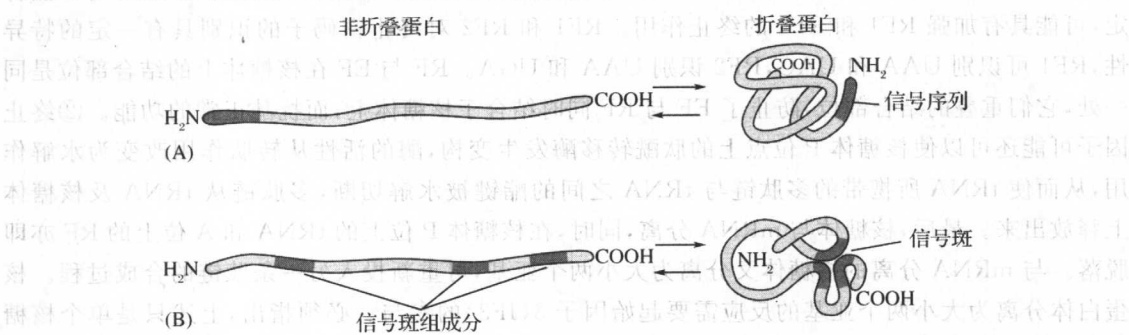


图 1-3 两类分选信号

真核类蛋白质分选信号的作用,是引导蛋白质从胞质溶胶进入细胞核、内质网、线粒体、叶绿体、溶酶体和过氧化物酶体,也可以引导蛋白质从细胞核进入细胞质或从高尔基(Golgi)体进入内质网。这种分选信号的氨基酸残基有时呈线性排列,有时折叠成信号斑,如引导蛋白质定向运输到溶酶体的信号斑,是溶酶体酸性水解酶被高尔基体选择性加工成的标识。每一种信号序列决定特殊的蛋白质转运方向,如输入内质网的蛋白质通常 N 端具有一段信号序列,含有 6~15 个带正电荷的非极性氨基酸。由高尔基体返回内质网的蛋白质,其 C 端有特殊的四肽序列。一些已知的分选信号见表 1-2。目前对于信号斑了解较少,主要是因为它存在于复杂的三维结构中,很难将其分离出来研究。

表 1-2 蛋白质分子上一些典型的分选信号

功 能	信号序列
输入细胞核	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
输出细胞核	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
输入线粒体	+ H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
输入质体	+ H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
输入过氧化物酶体	-Ser-Lys-Leu-COO ⁻
输入内质网	+ H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
返回内质网	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO ⁻ (KDEL)

第三节 氨基酸序列与信号肽

经典的信号肽(signal peptide)概念,是指某种分泌蛋白质及细胞膜蛋白质等,以前体多肽的形式合成,其N末端含有通过膜时作为信号的氨基酸序列,这种氨基酸序列称信号肽或信号序列。它一般由15~25个氨基酸所组成,在N末端附近除有碱性氨基酸外,主要含疏水性氨基酸,特别是在其中部没有带电荷的氨基酸。人们提出了信号假说(signal hypothesis)去解释分泌蛋白质的分泌。其机理是:在蛋白合成过程中前体多肽靠此序列与膜结合(图1-4)。当新生肽链准备跨越膜时,信号序列和其后段折成两个短的螺旋段,并曲成一个反向平行的螺旋发夹,该发夹结构可插入到疏水的脂质双层中。接着形成膜结合型多核糖体,多肽链在被合成的同时,伴随着多肽链通过膜。一旦分泌蛋白质的N端锚在膜内,后续合成的其他肽链部分将顺利通过膜。疏水性信号肽对于新生肽链跨越膜及把它固定在膜上起了一个“拐棍”作用。信号肽引导多肽链通过膜时,信号肽在完成功能后,随即被一种特异的存在于膜上的信号肽酶水解,将信号肽切断而除掉,其他肽链则顺利进入膜内。为了解释动物细胞的分泌蛋白质通过细胞膜的机理而提出的信号学说很受人们的重视。后来也发现了膜蛋白质的前体物质,而且已经知道这个机制在真核细胞和原核细胞中都存在,被认为与蛋白质的局部分布有关。

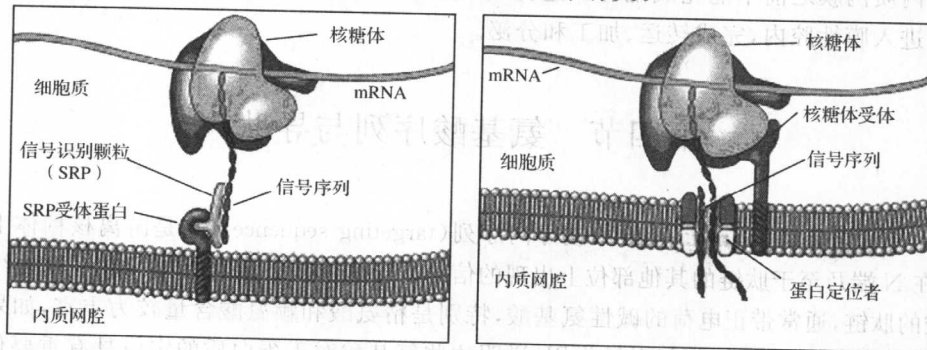


图1-4 分泌蛋白质通过内质网膜的机理

各种结合在膜上或越膜的蛋白,其特点是利用导肽上的各种信息来到达目的地。然而在一个细胞器外被翻译后再转运的导肽,与伴随着翻译同时进入分泌途径的导肽的作用是不同的,后者常被称为信号肽。由此,有两种模型:翻译与转运同步模型,翻译后转运模型。留在ER(内质网)中、高尔基体中、质膜中或分泌到细胞外的蛋白,它们与ER膜结合有一个明显的共同特点。核糖体合成这些蛋白与ER结合,这样新生蛋白能以共翻译的形式转运到ER中。ER可以分成两种类型:①膜结合核糖体的称为粗面内质网(rough ER, RER),为扁囊网;②未结合核糖体的称为滑面内质网(smooth ER, SER),为小管网。分泌蛋白都在ER上合成。在RER上合成的蛋白质,是从核糖体直接越过膜进入ER,然后,蛋白质从ER膜再转运到高尔基体,导向它们的最终目的地,如溶酶体、分泌胞或质膜,免疫球蛋白和多肽激素都是通过此途经分泌到细胞外。

不论原核生物还是真核生物,在细胞浆内合成的蛋白质需定位于细胞的特异区域,或者分泌出细胞。将蛋白质分泌出细胞,在真核细胞比原核细胞更困难,因为真核细胞胞体大,而且还有大量的膜性间隔。一些蛋白质被合成后分泌到细胞外,这些蛋白质统称为分泌蛋白。人们发现,将某些分泌蛋白质 mRNA 在体外进行翻译时,其翻译产物的分子量比预计的要大得多。例如胰岛素由51个氨基酸残基组成,但胰岛素 mRNA 的翻译产物在兔网织红细胞无细胞翻译体系中为86个氨基酸残基,称为胰岛素原(proinsulin);在麦胚无细胞翻译系统中为110个氨基酸残基

组成的前胰岛素原。后来证明,在前胰岛素原的 N-末端有一段富含疏水氨基酸的肽段作为信号肽,切除信号肽使前胰岛素原成为胰岛素原。然后胰岛素原被运到高尔基复合体,切去 C 肽形成成熟的胰岛素,最终排出胞外。后来发现,几乎各种分泌蛋白质(如真核细胞的前清蛋白、免疫球蛋白轻链、催乳素等,原核细胞的脂蛋白、青霉素酶等)均含有信号肽,约由 15~30 个疏水氨基酸残基构成。在 20 世纪 80 年代中期,Walter 等人已提出了肯定的证据表明:在启动分泌和控制分泌方面,有一小分子 RNA-蛋白质复合物起着关键作用。由于该复合物能与新生的信号肽发生特异性反应,故被命名为信号识别颗粒(signal recognition particle,SRP)。SRP 由 7S rRNA(约 300 个碱基)和 6 种不同的蛋白质紧密结合组成。蛋白质的分子量为 9~72 ku 不等。SRP 的作用是能与核糖体结合并停止蛋白质合成,阻止翻译发生在肽链延长至约 70 个氨基酸残基长时。这个长度正好是信号肽完全从核糖体出来时的长度(随信号肽后的 30~40 个氨基酸残基此时被埋在核糖体内)。当 SRP 与内质网膜上的船坞蛋白(docking protein)接触后,翻译阻滞发生逆转,SRP 扩散开再去启动另一蛋白质的转运。

SRP 对翻译起负调节作用,具有极重要的生物学意义。SRP 在胞浆内含量很高,约有 10^6 个拷贝(约相当哺乳动物细胞核糖体数量的 1/10)。哺乳动物分泌蛋白质中的许多种都是降解酶类(如核酸酶、蛋白酶等),即使它们偶然出现在胞浆内也会造成细胞内的大灾难(当然它们多数是先以酶原的形式出现,暂时无活性)。通过用 SRP 暂时中止这些蛋白质的翻译,确保这些蛋白质未到达内质网膜之前不能完成翻译。这样,在信号肽和 SRP 的共同作用下,使得这些分泌蛋白能及时进入膜性腔内,完成转运、加工和分泌。

第四节 氨基酸序列与导肽

导肽,又称转运肽(transit peptide)或导向序列(targeting sequence),它是游离核糖体上合成的蛋白质,在 N 端乃至肽链的其他部位上出现的信号。导肽可以是新生蛋白 N 端一段大约 20~80 个氨基酸的肽链,通常带正电荷的碱性氨基酸,特别是精氨酸和赖氨酸含量较为丰富,如果它们被不带电荷的氨基酸取代就不能起引导作用,说明这些氨基酸对于蛋白质的定位具有重要作用。这些氨基酸分散于不带电荷的氨基酸序列之间。转运肽序列中不含有或基本不含有带负电荷的酸性氨基酸,并且有形成两性 α 螺旋的倾向。转运肽的这种特征性的结构有利于穿过线粒体的双层膜。不同的转运肽之间没有同源性,说明导肽的序列与识别的特异性有关,与二级或高级结构也有关系。导肽运送蛋白质时具有以下特点:①需要受体;②消耗 ATP;③需要分子伴侣;④要电化学梯度驱动;⑤要信号肽酶切除信号肽;⑥通过接触点进入靶细胞器;⑦非折叠形式运输。

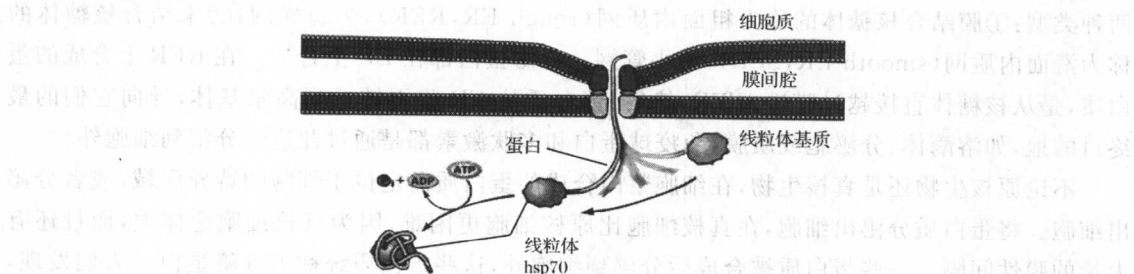


图 1-5 穿越线粒体膜的蛋白需要一系列的去折叠和折叠

当合成完成后,新合成的蛋白被释放到胞液中后就形成了折叠。而穿越线粒体膜时又需要非折叠的构象(图 1-5)。蛋白越膜时以非折叠的状态存在,但需进一步折叠成成熟的构象,最后的折叠需要一种附属蛋白——分子伴侣(chaperon)的存在。翻译后膜内蛋白的插入依赖于前导顺序。线粒体和叶绿体都能合成其本身的核酸和某些蛋白。线粒体只合成约 10 种细胞器蛋白,叶绿体合成 20% 的细胞器蛋白,细胞器蛋白大多是在细胞液中合成的,和通过游离的核糖体合成胞液蛋白的方式相同,合成后再转运到细胞器中。进入线粒体或叶绿体的蛋白,是要通过翻译后加工,初始合成的前体要比成熟的蛋白长 12~20 氨基酸残基,前导肽负责细胞器外膜的初始识别,导肽起始了前体蛋白和细胞器膜的相互作用。导肽穿越过膜后被细胞器的蛋白酶切下,转运继续进行,整个蛋白都穿越过膜,或直到蛋白中部的停止顺序从而导致转运的停止,该蛋白就定位在这个膜上。输入到线粒体或叶绿体的蛋白的导肽有很少的同源性。导肽通常是疏水的,由非电负性氨基酸构成,中间夹有碱性氨基酸,而没有酸性氨基酸,羟基氨基酸含量高(特别是 Ser),易形成双亲 α 螺旋(amphiphilic α -helix) 轮。不同的前导顺序缺乏同源性,这意味着和识别有关的信号,不仅仅是一级结构,而是涉及到二级甚至三级结构,或这一区域产生的立体结构化学特点。有一种可能,是此前导肽形成一种双亲螺旋,即带电荷的基团在螺旋的一侧,不带电荷的在另一侧。

前导肽含有作为细胞器蛋白定位所需的重要信息(不是所有的信息)。导肽的这种能力可以通过构建人工蛋白来检验,将来自细胞器的导肽和位于胞液中的蛋白连接起来,具体方法是构建融合基因(fusion gene)然后翻译成融合蛋白。各种导肽通过这种实验表现出具有独立引导附着顺序进入线粒体或叶绿体靶位点的功能。导肽加到小鼠胞液蛋白二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)上,此 DHFR 就可变成定位于线粒体的蛋白。导肽和转运蛋白存在着独立折叠的结构域。如不改变附加上的顺序,导肽必须能折叠成一个适当的结构,供细胞器表面受体识别。附加顺序对识别不起作用。越膜运输需要 ATP 的水解,蛋白磷酸化和转运直接相关,它需要 ATP 为转运装置的成分提供能量,或者为转运时多肽的去折叠所需。看来越膜转运过程中,导肽与膜的结合早期阶段并不需要 ATP 水解,而是进入膜以后或转运的本身需要 ATP。是什么为越膜提供了力量呢? 进入线粒体(及细菌的输出)需要一种电化学的电势(electrochemical potential)使导肽的 N 端穿过内膜(inner membrane)进行转运。蛋白质其余部分的转运并不需膜电位,这就意味着导肽结构就足以越过脂双层所构成的障碍。是什么限制了转运的亲水蛋白通过疏水性的膜呢? 氨甲喋呤(methotrexate)的发现解决了这一问题。它可作 DHFR 结构状态的标识,并阻碍线粒体导肽融合的 DHFR 转运到线粒体中与靶结合,氨甲喋呤在 DHFR 越膜时阻碍了此酶形成非折叠形式。因此,虽然转运蛋白的氨基酸序列与功能不适合于靶目标,但为了使它穿过膜就需要随导肽而形成非折叠的构象。穿越线粒体膜需要一系列的折叠和去折叠。线粒体输入装置的很多成分已被鉴别出来,在输入的第一阶段是与外膜(outer membrane)上的受体结合,蛋白再进入输入孔道。各种受体对于输入蛋白存着特异性。有的蛋白只有一种受体,有的具多种受体。当已输入的蛋白锚定在基质上时,它和基质中的热休克(heat shock)蛋白 hsp70 结合,这是一种和其他应激(stress)蛋白有关的分子伴侣,应激蛋白或热休克蛋白都是因应激而产生的分子伴侣,其作用是和不适当折叠的蛋白相结合。很可能当 hsp70 从内膜露出时,对于靶蛋白的非折叠构象的形成是高效的,它可帮着把蛋白拉过孔道。在线粒体基质中应激蛋白 hsp60 可激活分子伴侣。hsp60 是以一种大的寡聚体形式存在(14 个亚基,60 ku)。它和细菌的分子伴侣 GroEL 同源。当 hsp60 和输入蛋白结合时,它维持这些蛋白的松散折叠的形式。通过 ATP 的裂解它可被释放出来。此 hsp60 寡聚体可以提供一个基质蛋白上的支架,将输入蛋白装配成成熟型。对于输入蛋白亚基连接形成寡聚复合体是需要与 hsp60 结合的,一种输入蛋白在形成适当构象的过程中,可以由 hsp70 传递给 hsp60。线粒体蛋白在两种不同的条件下折叠,需要离子