

研究生教学用书

教育部研究生工作办公室推荐

现代动物生物化学

(第三版)

Modern Animal Biochemistry
(Third Edition)

汪玉松 邹思湘 张玉静 主编

高等教育出版社

研究生教学用书

教育部研究生工作办公室推荐

现代动物生物化学

(第三版)

Modern Animal Biochemistry

(Third Edition)

汪玉松 邹思湘 张玉静 主编

高等教育出版社

内 容 提 要

本书共 21 章。第 1 至 6 章介绍蛋白质的结构和功能及蛋白质分离纯化与鉴定的基本技术;第 7 至 11 章介绍生物催化剂,包括酶催化机理、酶促反应动力学、酶活性调节、核酶及抗体酶;第 12 至 17 章介绍遗传分子结构、功能及调节,包括核酸的结构、DNA 复制、基因转录、蛋白质生物合成、基因表达的调控、基因工程原理及其在动物科学中的应用;第 18 至 21 章讨论动物细胞形态的生物化学、生物膜与物质转运、细胞信号转导机制及动物机体物质代谢的相互联系及调节。书中对现代生物化学和分子生物学的基本理论与基本知识作了重点论述,并对学科的新发展、新成果作了较为详细的介绍,突出动物科学特点。

本书可作为畜牧、兽医、水产养殖、动物营养及食品专业的研究生教材,科研人员和教师的参考书,对其他从事生物科学技术工作的教学和科研人员也有参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

现代动物生物化学 / 汪玉松, 邹思相, 张玉静主编.

3 版. —北京:高等教育出版社, 2005

ISBN 7-04-015859-0

I. 现… II. ①汪… ②邹… ③张… III. 动物学:
生物化学—研究生—教材 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 137354 号

策划编辑 林金安

责任编辑 邹学英

封面设计 李卫青

责任绘图 朱 静

责任印制 韩 刚

出版发行 高等教育出版社
社 址 北京市西城区德外大街 4 号
邮政编码 100011
总 机 010-58581000

购书热线 010-58581100
免费咨询 800-810-0598
网 址 <http://www.hep.edu.cn>
<http://www.hep.com.cn>

经 销 新华书店北京发行所
印 刷 高等教育出版社印刷厂

开 本 787×1092 1/16
印 张 32.5
字 数 790 000

版 次 2002 年 1 月第 1 版
2005 年 1 月第 3 版
印 次 2005 年 1 月第 1 次印刷
定 价 58.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号: 15859-00

第一版前言

生物化学在 20 世纪取得了巨大的发展,数理科学广泛而又深刻地渗透到生物学的各个领域,全面改变了这门学科的面貌,由此应运而生的分子生物学,又极大地扩展了生物化学的内涵。分子生物学的兴起还不到半个世纪,而一系列新的理论和技术成就不断涌现出来,令人们兴奋不已,目不暇接。一些传统的观点正在受到质疑和挑战。许多新的研究成果,已经和正在工业、农业以及医药卫生等各个领域发挥重要作用并展示出广阔的前景。把现代生物化学和分子生物学的新发展尽可能全面系统地介绍给大家已是一项十分迫切的工作。

编写一本适用于畜牧、兽医、水产养殖、动物营养、兽医公共卫生、生物制药、食品等专业研究生、科研人员和教师使用的现代动物生物化学参考书是学科发展的需要,也是我们多年的愿望。直到 1997 年夏,全国高等农业院校研究生生物化学教学大纲审定会(山东泰安)的召开,使大家更加明确了目标,加快了编写的进度。本书共分 20 章。除了系统阐述现代生物化学基本理论和基本知识,注意突出动物科学特点,还较为详细地介绍了生物化学在蛋白质变性复性、活性肽、核酶和抗体酶、分子克隆、基因表达调控、细胞信号转导、生物大分子的膜转运等领域的重大进展,较为系统完整地阐述了动物机体代谢联系及调节机理。并对酶的动力学和催化活性调节、基因工程在动物科学中的应用、主要生化技术的原理及进展作了充分的讨论。

参加本书编写的成员都有一定的教学经验和科研实践,但学科发展日新月异,使我们深感学识浅薄,加之编者经验不足,致使本书虽经多次讨论、修改和审校,疏漏和错误仍然难免,热忱期望专家、读者批评指正。

本书的编写得到了中国农业大学齐顺章教授的热情鼓励。国务院学位委员会兽医学科组组长、中国畜牧兽医学会全国动物生理生化分会理事长、南京农业大学陈杰教授对本书的出版给予了有力支持和热忱推荐。中国生物化学和分子生物学会理事、农业生化专业委员会理事长、中国农业大学周顺伍教授对本书作了详细的审阅并提出宝贵的意见。编者所在各院校,特别是主编和副主编所在的解放军农牧大学、南京农业大学和河南农业大学给予了极大支持,在此一并表示诚挚的感谢。

编 者

1999 年 1 月

第二版前言

本书从1999年初版以来,受到了广大读者的热烈欢迎和好评。可以预见,在新的世纪里动物医学和动物科学高等教育对生物化学与分子生物学知识的需求将不断增长,为此我们决定将本书修订再版。再版的指导原则与第一版基本相同,但在有些章节中补进了一些较新的内容,同时增编了动物细胞形态的生物化学一章,以使读者更好地理解动物细胞的形态结构与其生物化学功能之间的关系,也使本书再具自身的特色;我们还特别采纳了读者们的宝贵建议,对原书中的和增补的绝大部分插图用电脑绘制,使图像画面大有改进。

由于编者的水平有限,在新版中缺点和错误仍然难免,诚请专家和读者一如既往给予批评指正。

本书的再版继续得到了编者所在的学校领导和有关同行专家的大力支持,中国农业大学周顺伍教授对修改和补充的内容作了仔细审阅,在此一并表示衷心感谢。

编 者

2001年10月

第三版前言

本书初版于1999年,由中国农业科技出版社出版,2002年修订再版。2003年本书经教育部委托全国学位与研究生教育发展中心组织专家评议,国务院学位委员会学科评议组会议审定,由教育部研究生工作办公室审查和推荐为研究生教学用书。修订后的新版改由高等教育出版社出版。

本书虽经多次改编,但生物化学的高速发展,庞大的信息量和广泛的内容更新,使内容广度和深度都在发生深刻变化,虽然在恰当反映生物化学进展和动物科学特点,适应教学需要方面尽了最大努力,但编者水平有限,书中不当和错误之处仍然难免,热忱期望专家和读者批评指正。

本书的修订新版得到了教育部研究生工作办公室,全国学位与研究生教育发展中心和学科评议组及专家,本书编者所在院校,特别是主编和副主编所在的吉林大学(原解放军军需大学)、南京农业大学和河南农业大学,以及高等教育出版社研究生教育与学术著作分社领导和具体参与本书出版工作的老师,特别是策划、责编和绘图老师的大力支持和热情帮助,在此我们一并表示诚挚的感谢。

编 者

2004年8月

目 录

第 1 章 蛋白质的一级结构	1
1-1 蛋白质的构件分子	1
1-2 肽键与肽链	3
1-3 蛋白质一级结构内容	5
1-4 蛋白质一级结构的测定方法与原理	5
第 2 章 蛋白质一级结构与功能的关系	18
2-1 同源蛋白质一级结构差异与分子进化	18
2-2 同种蛋白质一级结构差异与分子病	25
2-3 活性肽一级结构与功能	26
第 3 章 蛋白质分子构象	33
3-1 蛋白质结构的层次	33
3-2 维持蛋白质构象的化学键	34
3-3 主链构象	36
3-4 侧链构象	42
3-5 蛋白质分子的二级结构	43
3-6 超二级结构和结构域	46
3-7 蛋白质分子的三级结构	53
3-8 蛋白质分子的四级结构	56
3-9 蛋白质分子的缔合	58
第 4 章 蛋白质构象与功能的关系	62
4-1 分子识别	62
4-2 蛋白质的折叠	66
4-3 蛋白质空间结构的测定和预测	72
4-4 蛋白质的变性	77
4-5 蛋白质的变构	81
4-6 构象的运动性和结构转换	85
第 5 章 糖蛋白	89
5-1 糖蛋白的种类与分布	89
5-2 糖蛋白的组成	91
5-3 糖蛋白的结构	92
5-4 糖链的生物合成	98
5-5 糖蛋白的功能	101
第 6 章 蛋白质的分离纯化与鉴定	106
6-1 分离纯化蛋白质的意义	106
6-2 蛋白质分离纯化的一般程序	107
6-3 前处理	107

6-4	蛋白质的分离纯化方法	109
6-5	蛋白质的纯度鉴定	116
第7章	酶的催化机理	131
7-1	酶的化学结构与活性中心	131
7-2	酶的催化机制	139
第8章	酶促反应动力学	147
8-1	化学反应动力学	148
8-2	底物反应动力学	149
8-3	抑制反应动力学	157
第9章	酶活性的调节	168
9-1	别构调节	168
9-2	酶的化学修饰	179
9-3	限制性蛋白水解对酶活性的调节	184
第10章	核酶的催化作用	187
10-1	概述	187
10-2	剪接型核酶	189
10-3	剪切型核酶	196
10-4	核酶的应用	203
第11章	抗体酶	205
11-1	抗体酶的催化特征	205
11-2	抗体酶的催化作用机理	207
11-3	抗体酶的催化反应类型	210
11-4	抗体酶的制备	213
11-5	抗体酶的应用前景	216
第12章	核酸的结构	219
12-1	DNA 的结构	220
12-2	RNA 的结构	241
第13章	DNA 的复制	254
13-1	DNA 复制过程基本要点	254
13-2	复制过程所需主要酶类及相关蛋白	262
13-3	原核生物 DNA 复制模型和真核生物 DNA 复制的特点	270
13-4	DNA 的损伤及修复	276
13-5	在 RNA 指导下 DNA 的合成(反转录)	280
第14章	基因转录与转录后加工	283
14-1	原核生物基因的转录	284
14-2	真核生物基因的转录	294
第15章	蛋白质生物合成	306
15-1	遗传密码	307
15-2	核糖体	310
15-3	原核生物蛋白质生物合成的过程	314
15-4	真核生物的蛋白质生物合成	318

15-5	蛋白质生物合成初始产物的后处理	323
15-6	蛋白质生物合成的抑制剂	325
第16章	基因表达的调控	328
16-1	原核生物基因表达的调控	328
16-2	真核生物基因表达的调控	344
第17章	基因工程的原理和应用	366
17-1	基因工程一般原理	366
17-2	基因工程技术在动物科学中的应用及其前景	384
第18章	动物细胞形态的生物化学	389
18-1	细胞核	389
18-2	线粒体	395
18-3	内质网	397
18-4	高尔基复合体	399
18-5	溶酶体	401
18-6	过氧化物酶体	401
18-7	细胞骨架	402
18-8	细胞外基质	405
第19章	生物膜与物质转运	410
19-1	膜的化学组成	410
19-2	生物膜研究技术	414
19-3	生物膜的结构与特性	418
19-4	生物膜的转运功能	423
第20章	细胞信号转导机制	435
20-1	信号转导的生理意义	435
20-2	细胞间和细胞环境间信号转导的类型	436
20-3	细胞信号转导中的配体与受体	437
20-4	细胞信号转导机制	440
20-5	细胞信号转导的基本规律	463
20-6	细胞信号转导的研究前景	464
第21章	动物机体物质代谢的相互关系及调节	466
21-1	动物机体物质代谢的基本要略和调节方式	466
21-2	动物机体物质代谢关系概述	469
21-3	动物机体中主要物质代谢途径的调节	473
21-4	动物组织器官的代谢特点	479
21-5	非反刍动物与反刍动物糖、脂代谢的比较	483
21-6	物质代谢的整体调节	485
名词索引		491
主要参考书目		506

第1章

蛋白质的一级结构

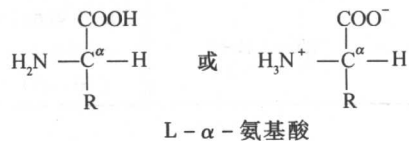
蛋白质(protein)是一类生物大分子,是生物体最重要的组成成分,含量丰富,种类繁多。如单细胞的大肠杆菌就含有3 000余种不同结构的蛋白质,复杂的动物体则含有10万种以上的蛋白质。在整个生物界,天然蛋白质估计有百亿种之多。不同的蛋白质结构,体现各种不同的特殊功能,在生命活动过程中起非常重要的作用。

蛋白质的功能,都与它的一级结构和空间结构密切相关。一级结构是空间结构的基础。一定的蛋白质结构决定特定的功能。

本章简要介绍蛋白质的构件分子(氨基酸)、肽键与肽链的基本结构、一级结构的内容和测定的原理。

1-1 蛋白质的构件分子

蛋白质的构件分子(building block molecule)是氨基酸(amino acid)。氨基酸是蛋白质的基本结构单位。自然界存在的氨基酸有300多种,但合成蛋白质的氨基酸只有20种,都属于 α -氨基酸。其中除甘氨酸外,其余都是L- α -氨基酸。天然存在的肽类中,有的含D-系或 β -氨基酸。除脯氨酸为 α -亚氨基酸外,其余19种氨基酸都有一部分相同的结构和不同的侧链(R-基团),通式为:



在20种氨基酸中,按R-基团的极性和有无电荷分为非极性侧链氨基酸(表1-1的1~9)、不带电荷的极性侧链氨基酸(表1-1的10~15)、带电荷的极性侧链氨基酸(表1-1的16~20)。其中Asp、Glu带负电荷,His、Lys、Arg带正电荷。

蛋白质分子中的20种氨基酸在DNA分子中有它们特异的遗传密码(genetic code)相对应,因而也称编码氨基酸(coding amino acid)。新近发现的硒代半胱氨酸(selenocysteine, SeCys)也是一种编码氨基酸,在原核生物和真核生物的某些蛋白质中都已发现,但种类不多,所以未列入。此外,原核生物中参与蛋白质合成起始的甲酰蛋氨酸不出现在成熟蛋白质中,所以也不计在内。20种编码氨基酸的中英文名称、缩写代号、侧链结构及主要特性如表1-1、表1-2所示。中文名称的第1个字母和英文名称前3个字母为其缩写代号。现多采用英文单字母代号。

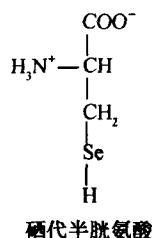


表1-1 蛋白质分子中的编码氨基酸

名称(缩写代号)	侧链结构(R-)	名称(缩写代号)	侧链结构(R-)
1. 甘氨酸(甘) glycine (Gly, G)	H—	11. 苏氨酸(苏) threonine (Thr, T)	$\begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{CH} - \end{array}$
2. 丙氨酸(丙) alanine (Ala, A)	CH ₃ —	12. 天冬酰胺(天胺,天-NH ₂) asparagine (Asn, N)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 - \end{array}$
3. 缬氨酸(缬) valine (Val, V)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} - \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	13. 谷氨酰胺(谷胺,谷-NH ₂) glutamine (Gln, Q)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \\ \\ \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_2 - \end{array}$
4. 亮氨酸(亮) leucine (Leu, L)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	14. 酪氨酸(酪) tyrosine (Tyr, Y)	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \end{array}$
5. 异亮氨酸(异) isoleucine (Ile, I)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \end{array}$	15. 半胱氨酸(半) cysteine (Cys, C)	HS—CH ₂ —
6. 蛋氨酸(蛋) methionine (Met, M)	CH ₃ S(CH ₂) ₂ —	16. 天冬氨酸(天) aspartic acid (Asp, D)	⁻ OOCCH ₂ —
7. 脯氨酸(脯) proline (Pro, P)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \\ \\ \text{H}_2\text{C} \\ \\ \text{CH}_2 - \end{array}$	17. 谷氨酸(谷) glutamic acid (Glu, E)	⁻ OOC(CH ₂) ₂ —
8. 苯丙氨酸(苯) phenylalanine (Phe, F)	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \end{array}$	18. 赖氨酸(赖) lysine (Lys, K)	H ₃ N ⁺ —(CH ₂) ₄ —
9. 色氨酸(色) tryptophan (Trp, W)	$\begin{array}{c} \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 - \text{CH}_2 - \end{array}$	19. 精氨酸(精) arginine (Arg, R)	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}^+ \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{NH}(\text{CH}_2)_3 - \end{array}$
10. 丝氨酸(丝) serine (Ser, S)	HO—CH ₂ —	20. 组氨酸(组) histidine (His, H)	$\begin{array}{c} \text{N}^+ \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 - \text{CH}_2 - \end{array}$

表 1-2 蛋白质分子中编码氨基酸的性质

名称	pK ₁ (α -羧基)	pK ₂ (α -氨基)	pK _R (侧链)	pI	残基 相对分子质量	蛋白质中含量 /(mol · L ⁻¹)
Gly	2.35	9.78	—	6.07	57.06	75
Ala	2.35	9.87	—	6.11	71.08	90
Val	2.29	9.74	—	6.02	99.14	69
Leu	2.33	9.74	—	6.04	113.17	75
Ile	2.32	9.76	—	6.04	113.17	46
Met	2.13	9.28	—	5.71	113.21	17
Pro	2.95	10.65	—	6.80	97.12	46
Phe	2.16	9.18	—	5.67	147.18	35
Trp	2.43	9.44	—	5.94	186.21	11
Ser	2.19	9.21	—	5.70	87.08	71
Thr	2.09	9.10	—	5.60	101.11	60
Asn	2.10	8.84	—	5.47	114.11	44
Gln	2.17	9.13	—	5.65	128.14	39
Tyr	2.20	9.11	10.13	5.66	163.18	35
Cys	1.92	10.78	8.33	5.07	103.14	28
Asp	1.99	9.90	3.90	2.95	115.09	55
Glu	2.10	9.47	4.07	3.09	129.12	62
Lys	2.16	9.18	10.79	9.99	113.17	75
Arg	1.82	8.99	12.48	10.74	156.20	47
His	1.80	9.33	6.04	7.69	137.15	21

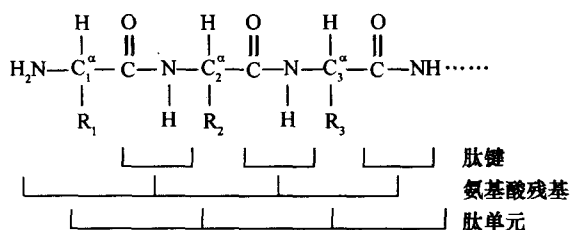
在天然蛋白质中还存在一些非编码氨基酸。这些氨基酸都是在蛋白质合成后或合成过程中由相应的氨基酸残基经过修饰而成的,包括胱氨酸(cystine)、羟赖氨酸(hydroxylysine)、羟脯氨酸(hydroxyproline)、醛基赖氨酸(allysine)、磷酸丝氨酸(phosphoserine)、焦谷氨酸(pyroglutamic acid)、羧基谷氨酸(carboxylglutamic acid)、甲基组氨酸(methylhistidine)、甲基赖氨酸(methyllysine)等。

1-2 肽键与肽链

1-2-1 肽键

蛋白质分子是由构件分子氨基酸通过肽键(peptide bond)连接而成的多聚生物大分子多肽(polypeptide)。

肽键是一分子氨基酸的 α -羧基与另一分子氨基酸的 α -氨基脱水缩合而成的酰胺键($-\text{CO}-\text{NH}-$),是蛋白质结构中的主要化学键(主键)。肽键中的氨基酸由于参加肽键的形成,已经不是原来完整的分子,因此称为氨基酸残基(amino acid residue)。由肽键连接各氨基酸残基形成的长链骨架称为多肽链主链,连接于 C^α 上的各氨基酸残基(R-基团)统称为多肽链的侧链。多肽链结构中的 $-\text{C}^\alpha-\text{CO}-\text{NH}-$ 或 $-\text{C}^\alpha-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}^\alpha-$ 结构是肽链骨架重复单位,称肽单元(peptide unit)。肽单元和氨基酸残基的结构比较如下:



多肽链就是由许多肽单元的 α -碳原子 (C^{α}) 互相连接而成。肽单元是各种构象的结构基础,由于肽单元的互相旋转,使主链出现各种构象。

肽键易被酸、碱和蛋白质水解酶水解。水解肽键的酶有内肽酶(endopeptidase)和外肽酶(exopeptidase)两大类。内肽酶水解的肽键对氨基酸种类有选择性,而外肽酶中羧基肽酶(羧肽酶)和氨基肽酶(氨肽酶)分别水解肽链游离的 C 末端和 N 末端的氨基酸,对氨基酸的种类无特殊选择性。这些水解酶类,是蛋白质分子氨基酸序列分析时的工具酶。

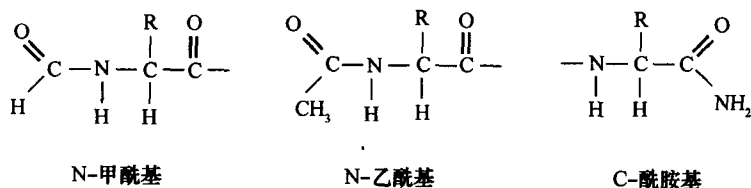
1-2-2 肽链

肽的命名,是根据参与其组成的氨基酸残基来确定的。通常从肽链的氨基 ($-\text{NH}_2$) 末端氨基酸残基开始,称为某氨基酸某氨基酸……氨基酸。如依次由丝氨酸、甘氨酸、酪氨酸、丙氨酸和亮氨酸组成的 5 肽,称为丝氨酰甘氨酰酪氨酰丙氨酰亮氨酸。一般由 10 个以下氨基酸残基组成的肽称寡肽(oligopeptide),而由 10 个以上氨基酸残基组成的肽称多肽。因为多肽呈链状,所以又称为多肽链(polypeptide chain)。

一条多肽链通常有两个游离末端。一末端是未参与肽键形成的 α -氨基,称为氨基端(amino terminal),简写为 $-\text{NH}$ 末端或 N 末端,用 H-表示,习惯上写在肽链的左侧;另一末端是 α -羧基,称为羧基端(carboxy terminal),简写为 $-\text{COOH}$ 末端或 C 末端,用 $-\text{OH}$ 表示,写在肽链的右侧。

多肽链的 N 末端与 C 末端有时也可再形成肽链连接,而形成环形多肽,见于某些抗生素。当谷氨酸成为多肽链的 N 末端时,如免疫球蛋白的 λ 链及 γ -1 链,常可脱水形成焦谷氨酸,简称焦谷。

有些多肽链中的 N 末端被 N-甲酰基(N-formyl)或 N-乙酰基(N-acetyl)封闭,少数 C 末端的氨基酸残基被修饰而形成酰胺基(如甘氨酰胺)。



在肽链中,除肽键是主要连接方式之外,在一条肽链之内或两条肽链之间还可通过二硫键 ($-\text{S}-\text{S}-$) 连接起来,二硫键在多肽链或蛋白质分子结构中是一种常见的共价连接键。如猪赖氨酸加压素、牛乳 β -乳球蛋白和 α -乳清蛋白分子内的二硫键及牛胰岛素分子内和分子间的二硫键等。二硫键在巯基化合物存在下可被还原为自由巯基 ($-\text{SH}$),因而二硫键的形成是

可逆反应。二硫键对蛋白质构象有稳定作用。

在体内,除构成蛋白质的多肽链之外,还存在一些具有生物活性的短肽,称为活性肽(active peptide)或生物活性肽(bioactive peptide, BAP)。活性肽在体内具有重要的生物功能。

多肽和蛋白质都是氨基酸的多聚物,多肽是指氨基酸残基较少的多聚物,而蛋白质则是指氨基酸残基较多的多聚物。多与少的界限也很难明确划分。习惯上,把由 39 个氨基酸残基组成的促肾上腺激素(ACTH)作为多肽,而把 51 个氨基酸残基组成的胰岛素归为蛋白质。一般以 50~100 个氨基酸残基组成作为界限,但也并非绝对。多肽与蛋白质之间的界限不能简单地由氨基酸残基数或相对分子质量(M_r)大小来决定,还得看分子空间结构的稳定性。有生物功能的多肽和蛋白质都是有序结构,但多肽一般不具有稳定的空间结构,所以在加热、加酸后无变性作用,而蛋白质具有特定且复杂的空间结构和新的性质。人们为了叙述方便,多肽与蛋白质常混为一体,如化学性质为多肽或蛋白质的激素统称多肽激素,多肽与蛋白质的化学统称为多肽化学等。多肽和蛋白质又都对蛋白水解酶敏感,两者无绝对区别,因此,虽大多数人认为胰岛素是蛋白质,但仍有人称之为多肽。

1-3 蛋白质一级结构内容

蛋白质一级结构(primary structure)是指多肽链中氨基酸的排列顺序(sequence),也称化学结构。一级结构是蛋白质分子的基本结构,是高级结构的基础。一级结构内容,包括多肽链数目,每一条多肽链中末端氨基酸种类,每一条多肽链中氨基酸的数目、种类和排列顺序,链内和链间二硫键的位置和数目。

蛋白质一级结构是由遗传信息决定的,信息量很大,20 种不同氨基酸组成包含有 100 个氨基酸的蛋白质理论上就有 100^{100} 种结构形式。可见蛋白质一级结构也是蛋白质结构与功能多样性和高度特异性的基础。

一级结构表示方法,一般都从左到右,即 N 末端到 C 末端。序号以氨基末端为 1 号,自左向右排列,氨基酸顺序用代号表示。每一代号间用一点或一横线隔开,有时不用。

1-4 蛋白质一级结构的测定方法与原理

蛋白质一级结构的测定是蛋白质高级结构和酶活性部位研究的前提,并为生物进化的研究提供重要依据。一些遗传性疾病往往由于一级结构的少许变化而发生。

英国科学家 Sanger(1954)发表了胰岛素的全部氨基酸排列顺序,揭开了测定蛋白质一级结构的序幕,是生物化学和分子生物学发展过程的一个重要突破。随后,Moore 等改进了 Sanger 的方法,测定了核糖核酸酶的一级结构。随着测序技术的不断改进,一系列新技术的问世,如蛋白质的层析技术、电泳技术、多种自动分析仪的使用,使测序的精确度越来越高,速度越来越快,亦使测序工作向自动化迈进了一步。已测出的最大的蛋白质有 1 000 多个氨基酸残基的序列。

自 DNA 测序工作开展以来,迄今 DNA 测序效率已超过蛋白质测序的效率。这样,可先测出 DNA 的序列,再翻译出相应的蛋白质的一级结构,有时如此操作反而来得快速、精确。

一级结构测定方法的基本战略是用两套断链方法分别将纯化的蛋白质的肽链专一性地裂解成肽段;再将各个肽段分离纯化,并测定每个肽段的顺序;然后比较两套肽段氨基酸顺序以排定蛋白质一级结构。从原则上讲,只要两套断链方法的切点都不相同,就能得出蛋白质一级结构。

具体测定的主要内容包括:测定前的准备、氨基酸组成的测定、肽链的拆离与纯化、末端氨基酸的测定、肽链的专一性裂解与肽段的分离纯化、肽段氨基酸顺序的测定、蛋白质一级结构的建立、蛋白质分子中二硫键位置的确定等。

1-4-1 一级结构测定前的准备

1. 蛋白质的纯化 蛋白质序列测定对蛋白质样品的纯度要求很严。如果含有一定量的杂蛋白,一级结构研究将是没有意义的。一般要求蛋白质的纯度必须达到98%以上。这样的样品,通常需用层析和电泳纯化。如用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和高效液相层析(high performance liquid chromatography, HPLC)等。从SDS-PAGE纯化的蛋白质必须经过特殊处理,使SDS浓度低于0.0005%,否则SDS会影响胰蛋白酶的酶解,也会大大降低HPLC分离肽时的分辨力。在SDS-PAGE后,采用电印迹(blotting)到PVDF膜上,这也是常用的方法,经过这样处理,能用CNBr化学裂解或酶解。如果蛋白质是用反相HPLC纯化的,因为流动相是挥发性溶剂,应进一步利用真空离心干燥或冻干除去溶剂;如果蛋白质是用离子交换HPLC或疏水HPLC或凝胶过滤HPLC纯化的,则要进行脱盐。

蛋白质纯度鉴定方法通常有分析电泳和层析法(常用HPLC)。近年来,质谱法在生物大分子中的应用也很活跃。化学方法检测蛋白质末端的均一性也是评价纯度的好方法。

2. 蛋白质分子质量的测定 蛋白质分子质量的测定对研究蛋白质肽链组成是很重要的。测定蛋白质的分子质量常用凝胶过滤、SDS-PAGE、超速离心等方法。近年来毛细管电泳测定蛋白质分子质量,所需蛋白质的量和测定的精确性都优于SDS-PAGE;质谱,尤其是电喷雾质谱的发展,可在pmol水平上测定蛋白质的分子质量,精确度约为0.02%。

3. 蛋白质多肽链数目和大小的测定 将待测蛋白质作还原型SDS-PAGE分析,若分子质量变小,则说明此蛋白质是由2条以上多肽链组成。根据几条多肽链是非共价键结合或以二硫键连接的不同,采取不同的方法将肽链分离出来,再分别测定每一条链的一级结构。如果链是相同的,就不需要分离。

4. 封闭自由巯基 蛋白质分子中的游离巯基必须封闭,否则在纯化肽段时易氧化为各种产物,包括形成无序的二硫键,因此需将半胱氨酸先转变成稳定的衍生物。常用碘代乙酸使巯基烷基化,因为这个反应是快速和专一的,同时这类试剂保存在暗处很稳定。

5. 去除N端封闭的基团 蛋白质N端有时会被封闭,应用相应的方法去除一些N端封闭基团,如去除N-乙酰丝氨酸和N-乙酰苏氨酸残基,去除N-甲酰蛋氨酸的甲酰基,去除N端的焦谷氨酸,去除N-乙酰基封闭的氨基酸残基等。

1-4-2 氨基酸组成的测定

在蛋白质测序前测定氨基酸组成,可推算出蛋白量的可靠值和了解蛋白质中氨基酸的分

布情况;在蛋白质测序中,有时可能由于蛋白质 N 端封闭或可能样品本身不是蛋白质或大部分是非蛋白质而测不出结果,此时氨基酸组成测定是解决这些问题的有效手段。

1. 蛋白质的水解 在测定氨基酸组成之前,将蛋白质水解成游离氨基酸。蛋白质的水解一般有酸水解、碱水解和酶水解三种方法。最常用的是酸水解法,常规方法是采用 6.0 mol/L HCl,真空状态下,在 110℃ 水解 24 h,也有在 150℃ 快速水解 90 min。评价降解蛋白质方法的有效性,应从降解蛋白质效果和待分析样品的回收两方面来评价。

在酸水解过程中,色氨酸全部被破坏,所以要另取样品用碱水解后,再进行分析,或在水解液中添加巯基乙醇作为保护剂。丝氨酸、苏氨酸及酪氨酸等含羟基的氨基酸会有一部分遭到破坏,可以用 24 h、48 h 及 72 h 水解结果,用内推法求得零时各氨基酸的数量,就是该氨基酸的真正含量。天冬酰胺和谷氨酰胺在水解后转变成天冬氨酸和谷氨酸、但是含有酰胺氨基酸和没有酰胺氨基酸的肽段,其电泳结果不同,所以在氨基酸成分测定后再辅以电泳法,即可解决。含硫氨基酸,如半胱氨酸、胱氨酸及蛋氨酸均易被氧化,最好方法是用过甲酸(performic acid)来氧化成氧化物,再进行分析。

酶水解一般不能将蛋白质彻底水解成游离氨基酸,因此,作氨基酸分析时常不采用。碱水解法虽属完全水解,但遭到破坏的氨基酸较多,所以也不采用。

2. 氨基酸的组成 蛋白质完全水解为游离氨基酸,然后冷却、干燥,进行氨基酸组成的分析。氨基酸组成分析可分为柱后分析法和柱前分析法两大类。前一类方法是将游离氨基酸经过层析柱分离后,各种氨基酸再与显色剂(茚三酮、荧光胺、邻苯二甲醛)作用,这类方法比较稳定,对样品预处理要求低,容易定量和自动化操作,但检测灵敏度不高,分析时间长。后一类方法是将氨基酸和化学偶联试剂反应生成氨基酸衍生物,然后再用层析柱将各种衍生物分离,直接检测衍生物的光吸收或荧光发射,此类方法可检测 OPA-、PTC-、PTH-、DABS-、dansyl-和 DABTH-氨基酸,分析灵敏度高,可用 HPLC 进行氨基酸分析,缺点是有的衍生物不稳定,衍生试剂可能干扰氨基酸检测。

经典的氨基酸组成分析法是茚三酮法。水解后的氨基酸样品,用氨基酸自动分析仪经离子交换层析相继分离,各种氨基酸与茚三酮(ninhydrin)反应形成紫色化合物,与脯氨酸和羟脯氨酸形成黄色化合物。显色后溶液在 570 nm 及 440 nm 波长测定光吸收。从记录峰面积可以计算出样品中各氨基酸的含量。现在有自动进样、氨基酸分析和定量报告联为一体的氨基酸自动分析仪出售,可自动得出结果。茚三酮柱后法氨基酸图谱如图 1-1 所示。

1-4-3 肽链的拆离与纯化

一种由几个亚单位或由几条多肽链组成的蛋白质,必须先将不同的亚单位或多肽链之间的连接拆开,并分离纯化。

1. 二硫键的拆开 在多肽链之间如有二硫键连接,或链内有二硫键的,需将二硫键切断,拆开二硫键。二硫键拆开主要有如下两种方法。

(1) 氧化法。氧化剂过甲酸可拆开二硫键,生成相应的磺酸基。在酸性条件下氧化时,胱氨酸残基生成稳定的磺基丙氨酸残基。

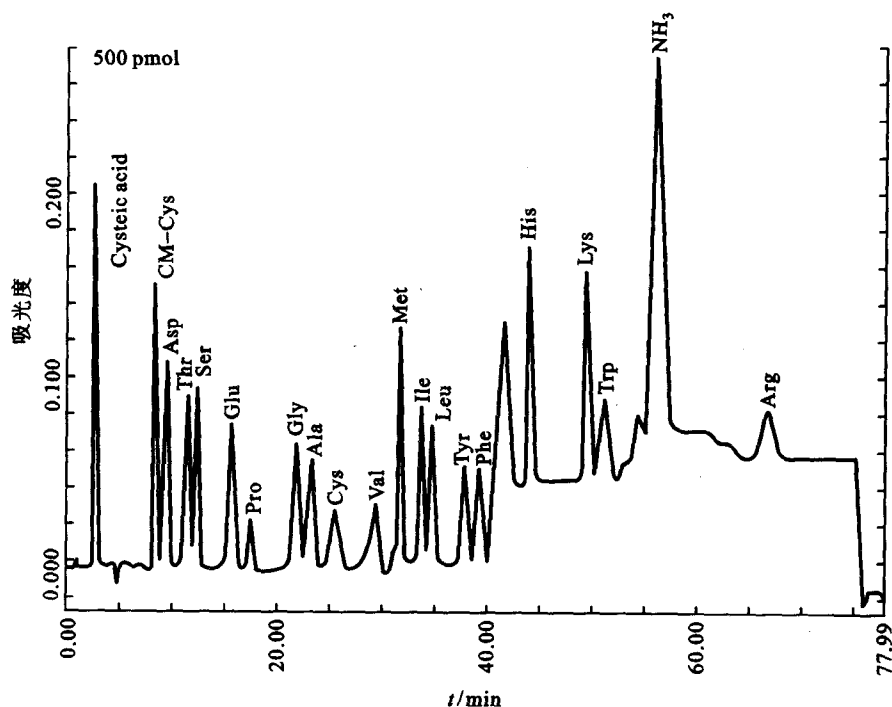
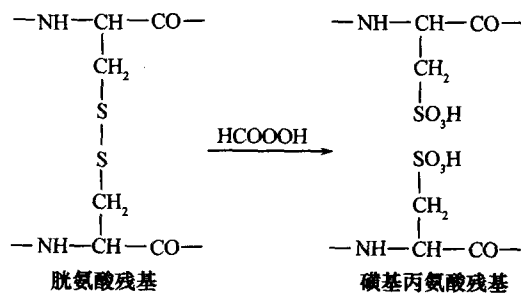


图 1-1 茚三酮柱后法氨基酸图谱



氧化法优点是拆开二硫键后,肽链不能重新形成二硫键,便于肽链的分离。缺点是在氧化过程中,蛋氨酸侧链被氧化,色氨酸侧链被完全破坏,增加了反应的复杂性。

(2) 还原法。用还原剂,如巯基乙醇、巯基乙酸、赤藓醇、二巯基丁二醇等也能拆开二硫键,使二硫键还原为—SH。巯基乙醇拆开二硫键反应式如下:

