

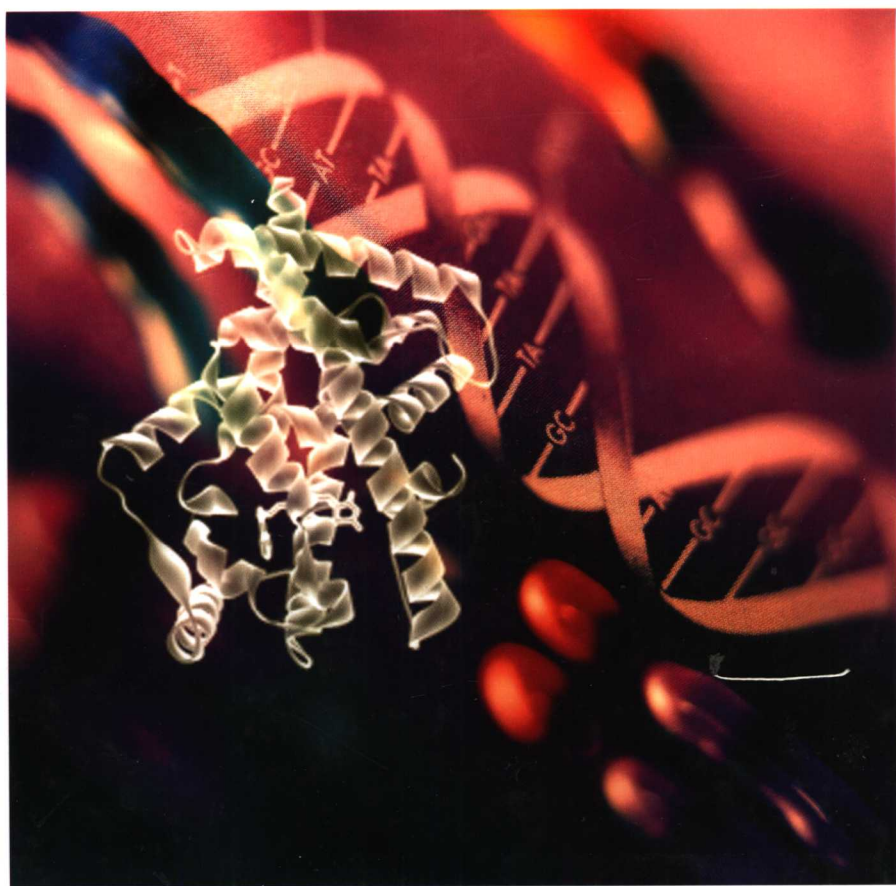
“十五”国家重点图书

化学进展丛书

化学生物学进展

Advances in Chemicobiology

张礼和 王梅祥 主编



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

“十五”国家重点图书

化学进展丛书

化学生物学进展

张礼和 王梅祥 主编



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

化学生物学进展/张礼和, 王梅祥主编. —北京: 化学工业出版社, 2005. 6
(化学进展丛书)
ISBN 7-5025-7300-3

I. 化… II. ①张…②王… III. 生物化学-研究-进展-世界 IV. Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 062981 号

“十五”国家重点图书

化学进展丛书

化学生物学进展

张礼和 王梅祥 主编

责任编辑: 梁虹 成荣霞

责任校对: 李林

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社 出版发行
化学与应用化学出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 34 字数 686 千字

2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7300-3

定 价: 75.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

进入 21 世纪后,人类对化学世界的探索 and 认识不断向新的深度和广度延伸和拓展,化学学科的发展将迎来新的飞跃,它必将对人类社会的进步产生更大影响。

近 20 多年来,我国化学研究的发展取得了显著成绩,正步入最好的发展时期。化学研究整体水平明显提升,2002 年 SCI 论文数量已居世界第三位,论文引用率也在快速增长。我国已组成了具有相当规模的老、中、青相结合的科研人员队伍,建立了上百个国家和部门重点实验室,涌现出一批能与国际化学界对话的研究群体。当然,我们清醒地认识到,与国际先进水平以及国家经济社会持续快速发展的需求相比,我们仍存在着不小差距,面临着极大挑战。在今后 20 年,我国化学应大幅度提高自主创新能力,加快提高综合实力,这样才有可能跻身于化学大国的前列。

为了实现上述目标,中国的化学界和出版界都在努力做出新的贡献,化学工业出版社推出的这套《化学进展丛书》就是这种努力的一个部分。“丛书”从化学发展趋势和国家持续发展的需求出发,选择了一些近年来发展迅速且备受广大科研工作者广泛关注的重要研究领域,组织编写并出版《化学学科进展》、《化学生物学进展》、《功能材料化学进展》、《结构材料化学进展》、《能源化学进展》、《环境化学进展》、《天然产物化学进展》、《药物化学进展》、《海洋化学进展》、《地球化学进展》等十本书。希望该“丛书”的出版有助于科研工作者更多地了解和掌握相关学科和领域的发展现状与未来,能对开展创新性研究工作有所指导;同时也希望“丛书”有助于青年学生增长更多的近代化学知识,以适应时代的需求。

为本“丛书”撰稿的专家学者以无私的奉献精神,付出了辛勤的劳动,在此对他们表示衷心的感谢。化学工业出版社的编辑同志认真审阅、精心编排和修改,做了大量工作,在此对他们一并表示诚挚的谢意。

朱道本

2005 年 3 月

前 言

自 20 世纪 90 年代中期以来,国际上出现了若干以化学生物学命名或为主要报道内容的学术刊物,如“Current Opinion in Chemical Biology”(《化学生物学时论》)、“Nature: Chemical Biology”(《自然:化学生物学》)等。西文一些著名的大学,如美国哈佛大学等的化学系则更名为“化学和化学生物学系”,欧美的诸多大学为研究生和高年级学生开设了化学生物学课程。同时,以化学生物学为主要研究内容的研究机构也相继成立,如在美国加利福尼亚州的 The Scripps Research Institute (Scripps 研究所) 中成立了“The Skaggs Institute for Chemical Biology”。我国研究机构和大学中也分别出现了若干化学生物学研究中心和化学生物学系,为学生开设课程并在相关领域开展了研究工作。国家自然科学基金委员会在化学学部设立了受理化学生物学研究经费申请的管理部門。中国化学会也增设了化学生物学专业委员会,并在 2001 年由北京大学组织召开了第一届化学生物学学术讨论会,2003 年湖南大学组织召开了第二届化学生物学学术讨论会,第三届会议将于 2005 年由武汉大学组织召开。

作为一门新型交叉学科,化学生物学的萌生缘于化学的长期发展和成熟以及生物科学和生物技术研究的积累,特别是世纪之交基因组学、蛋白质组学的兴起和迅猛发展。化学生物学的出现是几十年来化学与生命科学交叉研究的必然结果。为了向大家介绍化学生物学的研究现状和发展趋势,同时介绍我国科研人员在化学生物学研究方面的进展,我们邀请了海外、香港地区和内地的一批专家学者为本书撰写专论,内容涉及生物大分子结构与功能、化学基因组学、新一代治疗方法、生物合成、生物催化和生物转化、生物体系和功能的模拟、分子间相互作用、各种生物检测分析新方法等化学生物学的前沿领域。需要说明的是,由于时间紧迫,有些专家未能提供原来计划的章节内容,这给本书留下了一些遗憾。希望遗漏的内容能出现在以后第二版的《化学生物学进展》一书中。

能够参与《化学生物学进展》一书的编撰,我们深感荣幸,谨借此机会向本书的全体作者表示衷心的感谢。同时也要感谢化学工业出版社相关同志的大力支持和帮助。希望本书的出版能为推动和促进我国化学生物学的研究发挥作用。

张礼和(北京大学医学部药学院)

王梅祥(中国科学院化学研究所)

2005.5.28 于北京

目 录

第 1 章 从生物有机化学到化学生物学	张礼和	1
1.1 酶化学的研究推动了生物有机化学的发展		2
1.2 化学对生命体系很多复杂过程的研究推动了化学生物学的发展		8
1.3 化学生物学的进展将推动研究生物的复杂体系		11
参考文献		14
第 2 章 生物大分子研究进展		15
2.1 核酸动态学	席真, 张铭瑜	15
2.1.1 核酸的结构		15
2.1.2 对核酸的识别与作用		23
2.1.3 基于核酸动态学的衍生技术		32
参考文献		40
2.2 蛋白质组学	杨芃原, 贺福初, 夏其昌	45
2.2.1 蛋白质组学现状和发展趋势		45
2.2.2 蛋白质组学技术平台		47
2.2.3 人类蛋白质组学和疾病蛋白质组学		52
2.2.4 与其他组学的交叉		55
2.2.5 蛋白质组学将来的发展和挑战		56
参考文献		57
2.3 金属蛋白的结构-性质-反应-功能关系的研究	黄仲贤	58
2.3.1 血红素金属蛋白		59
2.3.2 细胞色素 b_5 的组成和结构		61
2.3.3 表面带负电荷残基的研究		62
2.3.4 血红素疏水腔中疏水残基的研究		67
2.3.5 细胞色素 b_5 和细胞色素 c 之间的电子传递		70
参考文献		75
2.4 寡糖的合成与糖微阵列技术	叶新山	77
2.4.1 寡糖的液相合成		77
2.4.2 寡糖的固相合成		80
2.4.3 酶催化的寡糖合成		81
2.4.4 糖库的合成		83
2.4.5 糖的微阵列技术		86

参考文献	90
2.5 糖生物学..... 张页	91
2.5.1 概述.....	91
2.5.2 生物体合成的糖类和含糖物质.....	94
2.5.3 糖基化与糖链信息的多样性.....	96
2.5.4 糖链介导的相互作用.....	99
2.5.5 细胞表面的糖类	103
2.5.6 细胞内部膜限区室中的糖类	108
2.5.7 糖免疫学与疾病防治	109
2.5.8 糖蛋白的糖链改造和人源化	114
参考文献.....	117
第3章 新一代治疗方法与药物化学	121
3.1 化学基因组学	121
3.1.1 遗传学	121
3.1.2 化学基因组学提出的背景和意义	122
3.1.3 化学基因组学主要用到的三项技术	128
3.1.4 结束语	137
参考文献.....	138
3.2 化学生物学方式研究代谢型谷氨酸受体信号传导通路及其功能的 一些例子	140
参考文献.....	147
3.3 以核酸为作用靶的药物研究	148
3.3.1 概述	148
3.3.2 反义寡核苷酸药物研究	149
3.3.3 反义寡核苷酸的化学修饰	152
3.3.4 RNA 干扰.....	157
3.3.5 基于 RNA 三维结构的氨基糖苷类药物研究	158
参考文献.....	163
3.4 虚拟筛选与虚拟库技术	164
3.4.1 引言	164
3.4.2 虚拟筛选研究进展	166
3.4.3 基于分子多样性的虚拟库技术	177
3.4.4 虚拟筛选应用实例	181
3.4.5 展望	185
参考文献.....	186
第4章 生物催化与生物合成	189

4.1 代谢工程与组合生物合成	刘文, 唐功利; 沈犇	189
4.1.1 从分子水平深入复杂天然产物的生物合成、克隆生物合成 基因簇的方法		192
4.1.2 酶学水平上天然产物生物合成的途径和机制及其组合生物 合成		198
4.1.3 代谢工程和组合生物合成的 DNA 重组技术		208
4.1.4 展望——代谢工程和组合生物合成面临的问题及今后的发展 方向		210
参考文献		212
4.2 定向进化技术的回顾与展望	李爽, 徐丽华, 林章凛	215
4.2.1 表达体系		218
4.2.2 文库的构建		219
4.2.3 筛选或选择策略		221
4.2.4 结束语		222
参考文献		222
4.3 酶催化还原反应	李祖义	224
4.3.1 引言		224
4.3.2 酶还原反应机理		224
4.3.3 生物催化剂的形态: 纯酶和全细胞		226
4.3.4 酶的来源		227
4.3.5 生物还原反应对映选择性控制		228
4.3.6 通过基因方法改良用于还原反应的脱氢酶		238
4.3.7 生物还原制备手性药物实例		242
4.3.8 结束语		249
参考文献		250
4.4 腈的对映选择性生物转化反应	高明, 袁红杰, 王梅祥	253
4.4.1 概述		253
4.4.2 腈的生物水解		254
4.4.3 外消旋腈的对映选择性生物转化		257
4.4.4 二腈的立体选择性生物转化		269
4.4.5 结论和展望		270
参考文献		271
第5章 分子识别、组装及生物体系模拟		275
5.1 β -多肽及其类似物	杨丹, 陈飞, 张丹维, 吴云东	275
5.1.1 引言		275
5.1.2 β -多肽		275

5.1.3 β 多肽的生物活性	283
5.1.4 γ 多肽与 δ -多肽	288
5.1.5 氨基酸多肽	291
5.1.6 总结	295
参考文献	295
5.2 金属水解酶模拟的合成模型	陈传峰 298
5.2.1 引言	298
5.2.2 肽酶模拟的合成模型	299
5.2.3 磷酸酯酶模拟的合成模型	301
5.2.4 尿酶模拟的合成模型	308
5.2.5 脲水合酶模拟的合成模型	310
5.2.6 总结	314
参考文献	314
第6章 化学生物学研究新技术、新方法	317
6.1 芯片技术	殷学锋, 方肇伦 317
6.1.1 概述	317
6.1.2 微流控芯片技术	318
6.1.3 微阵列(生物)芯片技术	336
参考文献	340
6.2 生物核磁共振	林东海 345
6.2.1 蛋白质溶液空间结构的测定	345
6.2.2 蛋白质-配体相互作用的研究	351
6.2.3 用NMR研究蛋白质动力学	359
参考文献	364
6.3 生物质谱	钱小红, 王京兰, 戴舒佳, 应万涛 365
6.3.1 概述	365
6.3.2 质谱的历史沿革与生物质谱的产生	366
6.3.3 生物质谱的原理与仪器	368
6.3.4 生物质谱的应用	375
参考文献	389
6.4 生物传感器	董绍俊, 郝建波 390
6.4.1 生物传感器的发展过程	391
6.4.2 生物传感器的制备	394
6.4.3 溶胶-凝胶法	397
6.4.4 流动注射分析(FIA)及微型化	401
6.4.5 纳米技术在生物传感器中的应用	402

6.4.6 生物传感器的应用及展望	403
参考文献	405
6.5 单细胞检测	邵元华 408
6.5.1 引言	408
6.5.2 单细胞操纵	409
6.5.3 单细胞图像分析	411
6.5.4 实时动态检测单细胞	415
6.5.5 单细胞分析化学研究平台	417
6.5.6 展望	418
参考文献	418
6.6 生物分子和生物体原位、实时、在线分析和检测 徐静娟, 陈洪渊	420
6.6.1 活体分析中的微透析法	421
6.6.2 活体分析和检测中的电化学微传感器	422
6.6.3 光学成像检测技术实时检测化学生物学过程	428
参考文献	430
6.7 扫描隧道显微术在生物科学研究中的应用	张慧敏, 万立骏 432
6.7.1 扫描隧道显微镜工作原理	433
6.7.2 与生物相关的有机小分子在固体表面的吸附研究	437
6.7.3 生物大分子在固体表面的吸附	450
参考文献	455
6.8 表面等离子体共振	陈义 456
6.8.1 引言	456
6.8.2 基本原理	458
6.8.3 仪器	463
6.8.4 方法发展与应用	468
6.8.5 发展动态	482
参考文献	484
6.9 单分子检测	麻宝成, 林毅, 方晓红 487
6.9.1 单分子荧光显微术	488
6.9.2 单分子力显微术	492
6.9.3 展望	496
参考文献	496
6.10 小分子与蛋白质靶分子相互作用研究方法及应用 沈旭, 蒋华良, 余长缨, 陈莉莉	498
6.10.1 引言	498

6.10.2	小分子与生物大分子的相互作用方式·····	498
6.10.3	研究小分子与靶标蛋白相互作用的方法·····	500
6.10.4	研究蛋白质与小分子作用实例·····	515
6.10.5	展望·····	526
参考文献 ·····		526

第 1 章 从生物有机化学到化学生物学

张礼和

(北京大学药学院)

生物学在 20 世纪取得了巨大进展,以基因重组技术为代表的一批新成果标志着生命科学研究进入了一个崭新的时代,人们不但可以从分子水平了解生命现象的本质,而且可以从更新的高度去揭示生命的奥秘。生命科学研究从宏观向微观发展,从最简单的体系去了解基本规律,向最复杂的体系去探索相互关系。1990 年美国启动的人类基因组计划(human genome project)可能是 20 世纪生物学领域最大胆、最富有想像力的研究工作。该计划目前已完成了人类的全部约 3.5 万条基因的结构和位置,测定了这些基因的全部 3×10^9 个核苷酸的序列,是生物学研究中的里程碑。人们已经开始后基因组计划,即从结构基因到功能基因的研究。这一宏伟计划的进行必将影响到其他基础学科,特别是化学学科。生命过程的大量化学问题也将成为化学家关心的焦点。

近代科学技术的发展带有明显的多学科协同促进的性质,特别是基础研究,它是科技和经济发展的推动力以及新学科发展的源泉。20 世纪生命科学的进展包含了无数化学家基础研究的成果。1953 年 Watson 和 Crick 在 DNA 纤维的 X 射线衍射图像的基础上提出了双螺旋结构的分子模型^[1],为今天分子生物学奠定了基础。在这模型中,碱基之间形成氢键相互配对的原则(图 1-1),决定了各种生物的遗传本质和 DNA 复制的化学基础。

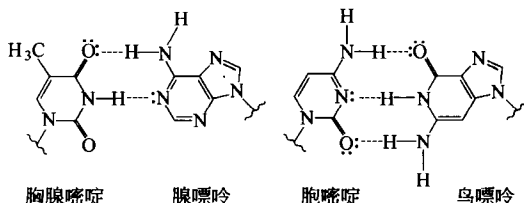


图 1-1 双螺旋结构分子模型中碱基之间氢键相互配对

1985 年 Smith 和 Mullis 利用 DNA 双螺旋解链可以每条单链为模板进行复制,然后再聚合的性质,发明了聚合酶链式反应(PCR),从而使分子生物学在技术上有了一个突破和飞跃。20 世纪 60 年代, Khorana 开创的磷酸二酯法合成寡核苷酸不但证明了 DNA 上每 3 个碱基组成 1 个三联体密码子并编码一个氨基酸,从而提出了一套遗传密码,而且也开始了人工合成 DNA 的研究。从此,磷酸三酯法、结合固相合成的亚磷酸酰胺法以及氢亚磷酸三酯法,使 DNA 的合成方法日趋完善,每步收率达到 99% 以上。目前每一个分子生物学的实验室都可以利用 DNA 自动合成仪合成所需要的寡聚核苷酸。DNA 合成成为一项常规技术。基因重组在此基础

上成为人类改造物种、改变遗传过程的一个崭新技术。生命科学的进展给化学家提出很多问题,而化学学科的成就在这一过程中又推动了生命科学的进展。基因的转录表达在生命过程中有着非常精确的“时”、“空”控制机制,在这一过程中联系到一系列的生物大分子与生物大分子的相互作用,如 DNA, RNA 与蛋白,蛋白与蛋白;也联系到一系列生物大分子与传递信息的有机小分子和无机离子之间的相互作用。搞清这些复杂过程的基本规律将有助于对这些生命过程的了解。化学家也将用化学小分子和化学工具研究生命体系,为此继生物有机化学、生物无机化学之后又出现了一个新的学科——化学生物学(chemical biology)。

1.1 酶化学的研究推动了生物有机化学的发展

新学科的发展是老的各学科间相互渗透、相互融合的过程,生物有机化学的兴起是一个很好的例子。生物化学家利用生物化学的技术研究生命体系,他们分离纯化了各种酶,并且用同位素跟踪的办法了解到这些酶的底物的反应特异性。化学家发展了合成方法以及利用对有机化学的反应机理的了解,设计合成酶的模拟物以及不同结构特点的底物,从而进一步揭示了酶在生物体系中的催化机理。早在 100 年前,有机化学家 Emil Fischer 就曾提出了酶与底物的关系是“钥匙与锁”的关系(“lock and key” principle)。1950 年 Friedman 就提出生物等排体(bioisosteric group)的概念,用合成分子代替天然生物分子,从而在药物设计中产生了巨大影响。1966 年 Tom Bruice 和 Steve Benkovic 出版了“Bioorganic Mechanisms”。书中提出:生物有机机理的研究是酶学家和物理有机化学家的共同兴趣……当今时代的特征是,在科学的广阔领域中开创出杂合的团队(hybrid terms)。1970 年 Tom Kaisen 和 Francois kézdz 编辑了“Progress in Bioorganic Chemistry”,并且指出生物有机化学是生物化学和物理有机化学相互融合的新学科。而且不久就由 Gene Van Tamelen 创办了“Journal of Bioorganic Chemistry”^[2]。1986 年 Tom Kaiser, Ron Breslow 和 Koji Nakanishi 在纽约组织了第一届生物有机化学学术讨论会^[3]。生物有机化学得到了国际科学界重视的标志是 1987 年诺贝尔化学奖授予了 D. J. Cram, J. M. Lehn 和 C. J. Pederson。D. J. Cram 在“主-客体化学”(hosts-guests chemistry)方面, J. M. Lehn 在超分子化学(supra molecular chemistry)以及 C. J. Pederson 冠醚(crown ethers)的发现,开创了分子识别(molecular recognition)的广阔研究领域^[4~6]。今天分子识别的概念不仅用于酶的催化反应,而且发展到生物体的受体系统、信号传导通路、基因的调控和转录、药物设计等一系列重要过程。

化学家对酶反应机理的研究是利用有机化学的反应理论和合成的工具,使得人们更深入地了解了生命体中这些特异性酶反应的分子基础。核酸酶 A(RNase A)是从小牛胰腺中得到的相对分子质量为 13680,由 124 个氨基酸组成的水解 RNA

磷酸二酯键的酶。对酶的活性位点氨基酸残基的研究说明, 2 个组氨酸和 1 个赖氨酸残基在 RNA 水解过程中起着重要的作用。RNA 断裂的产物是单一的 3'-磷酸片段, 反应经过酯交换和水解两个步骤。组氨酸中的咪唑基和赖氨酸中的 NH_2 基在反应中起着“酸-碱”催化的过程^[7], 如图 1-2 所示。

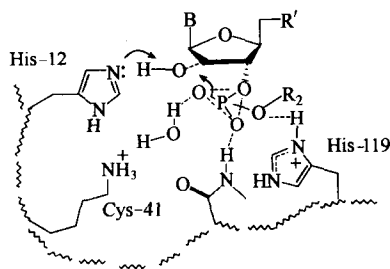
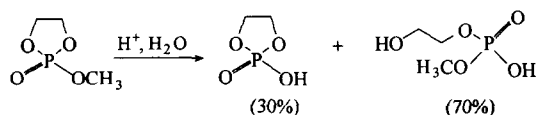
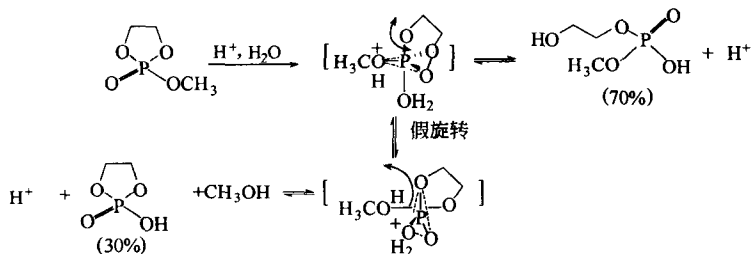


图 1-2 核酶 A 对磷酸二酯键的“酸-碱”催化过程

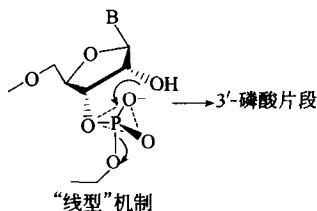
问题是为什么反应中只有单一的 3'-磷酸片段, 而没有 2'-磷酸片段。在磷酸酯水解研究中, 1966 年 Westheimer 和 Dennis 在研究乙二醇环磷酸甲酯的酸性水解反应时, 发现有不同的水解物产生, 从而提出了五配位磷的“假旋规则”(pseudorotation)^[8]。

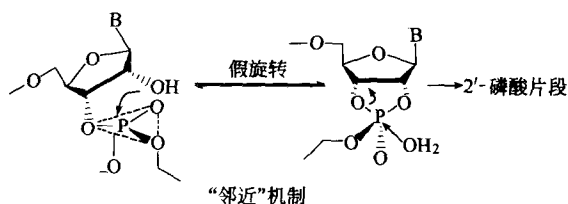


他们指出, 水解过程首先是生成一个“三角双锥”构型的五配位磷的过渡态, 水解过程中进攻基团和离去基团必须是处于“竖键”位置, 五元环由 1 个竖键和 1 个横键构成, 配位基团可以通过“假旋”改变“竖键”或“横键”位置, 而电负性强的基团优先占领竖键, 因此以下机理很好地预测了磷酸酯的水解过程和产物。



核酶在断裂 RNA 的磷酸酯键的过程中首先是使 2'-OH 进攻磷酸生成 2',3'-环磷酸酯。如果也存在这种五配位磷的假旋现象, 则应该也有 2'-磷酸片段和 3'-磷酸片段的同时存在。RNA 水解反应应该有两个可能的机制, 即“线型 (in-line)”机制没有假旋发生, 或“邻近 (adjacent)”机制经过假旋生成 2'-磷酸片段^[9]。





Cornell 大学的 Usher 用有机化学的方法合成了一对核苷，2',3'-环硫代磷酸的

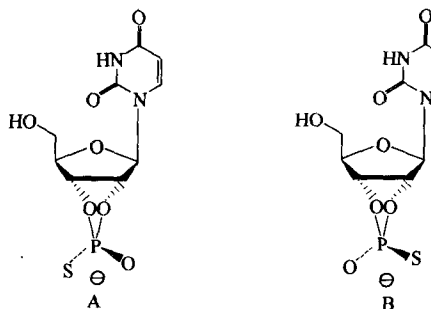


图 1-3 2',3'-环硫代磷酸的异构体

异构体 A 和 B (图 1-3)，用做模型底物，研究核酸酶 A (RnaseA) 在标记¹⁸O 的水中对它们的不同水解产物^[8]。

这样两个手性磷的模型底物在水解过程中可以通过是否有构型的变化和¹⁸O 的位置来判断酶的催化过程。以异构体 A 为例，如果 H₂O¹⁸ 进攻经过“线型”机理，则生成 3'-硫代磷酸，其磷原子构型应该翻转；而如果 H₂O¹⁸ 进攻经过“邻近”机理，则磷原子经过“假旋”又会恢复原构型，因此构型不变。

而这两种 3'-硫代磷酸核苷可以通过已知的不改变磷构型的成环反应来加以确定。结果证明，“线型”机理是核酸酶断裂 RNA 的惟一机理，反应中没有“假旋”过程。其他来源的核酸酶以及碱性磷酸酯酶也是这样。1986 年 Breslow 和 Labelle 用咪唑缓冲液对 Poly-U 进行研究，从而进一步对咪唑基在酶催化中的作用做出了解释。他们认为酶中 12 位组氨酸的咪唑基不仅在反应开始时吸取核苷 2'-OH 上的质子同时也负责转移这个质子到磷酸根上去形成五配位磷酸根的一价负离子^[9]。

酶性核酸 (ribozyme) 是近年来发现的一类具有催化断裂 RNA 的核酸分子，由于过去具有生物催化作用的酶都是蛋白质，因此酶性核酸的出现突破了酶都是蛋白质的传统观念，从而酶性核酸的发现者 Cech 和 Altman 获得了 1989 年诺贝尔化学奖。

近年来，已发现有 7 类天然存在的酶性核酸分布在真菌、植物病毒、人类病毒等核酸中，研究主要集中在如下 3 个方面：a. 酶性核酸作为一个金属酶的催化机制研究；b. 越来越多的证据说明，酶性核酸不仅催化核酸的剪接，而且在蛋白质的生物合成过程中也能起到酶的作用，可以催化肽键的水解和合成；c. 利用酶性核酸可以催化断裂特定序列的寡核苷酸的性质，设计酶性核酸，以达到治疗的目的。这些研究中以“锤头”型酶性核酸研究最多。“锤头”型酶性核酸自身的催化断裂的作用方式称为“顺式 (cis)”。如果把“锤头”型酶性核酸切割成“酶”部分和“底物”部分 (图 1-4)，则理论上合成有催化作用的酶部分使其与相应的底

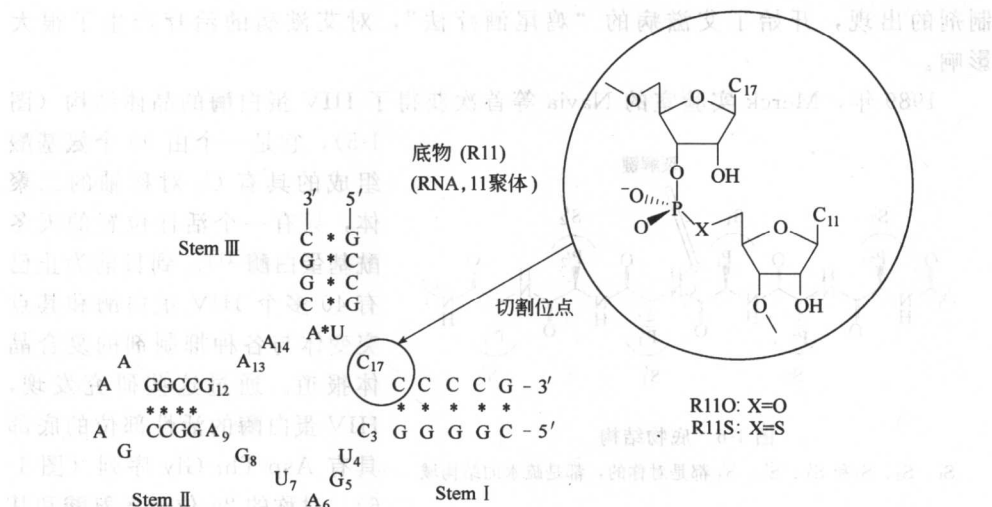


图 1-4 “锤头”型酶性核酸催化 Stem I、Stem II、Stem III 及硫代底物部分的结构

物作用，同样有催化底物断裂的作用，这种作用方式称为“反式 (trans)”，现已有不少人工合成的按“反式”作用的酶性核酸。

酶性核酸催化断裂 RNA 的机理是：反应经过两步，先是 2'-OH 进攻磷酸酯的磷原子，紧接着是 5'-O 部位的离去并使 RNA 降解。以前认为第一步是慢反应，决定整个反应速度，同时 Mg^{2+} 催化只作用于 2'-OH。周德敏等用离去能力更强的 S 原子代替 5'-O 合成了酶性核酸不同结构的底物，并用软硬程度不同的 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 催化断裂 5'-离去部位而引入硫原子的底物，用于酶性核酸断裂 RNA 的机理研究。研究结果显示，水解反应中决定反应速度的是 5'-O 离去基团的离去速度；反应是酶中含有的 Mg^{2+} 对 2'-O 和 5'-O 的双离子催化反应^[10]。

酶的催化过程由于可以获得酶和底物的复合物晶体结构，而更加加深了对酶的三维结构与底物相互作用的了解。结构生物学的进展推动了对重要生命过程的研究。对艾滋病病毒的生命周期的研究，知道 HIV 病毒是逆转录病毒，病毒 RNA 通过逆转录酶逆转录成 DNA，再经过整合酶进入宿主的细胞核。整合后的病毒 DNA 再转录成 mRNA，从而翻译成复合蛋白前体。复合蛋白前体经过 HIV 蛋白酶 (protease) 水解成成熟的有功能的蛋白，开始下

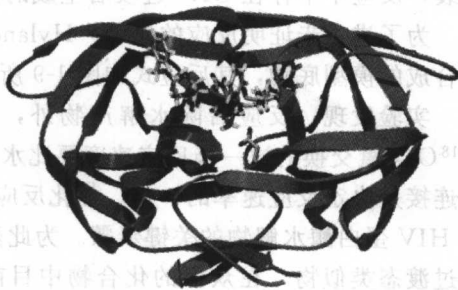


图 1-5 HIV 蛋白酶复合物晶体结构

一个周期的复制。对 HIV 蛋白酶水解机理的研究导致了一系列 HIV 蛋白酶抑制剂的出现,开始了艾滋病的“鸡尾酒疗法”,对艾滋病的治疗产生了很大影响。

1989 年, Merck 实验室的 Navia 等首次获得了 HIV 蛋白酶的晶体结构 (图

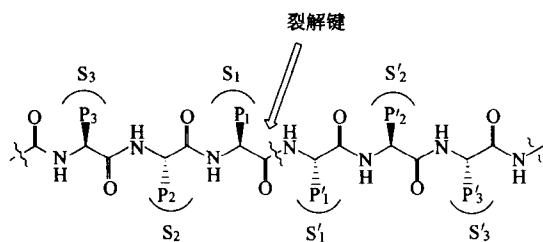


图 1-6 底物结构

S₁、S₂、S₃和 S'₁、S'₂、S'₃ 都是对称的,都是疏水的结构域

1-5),它是一个由 99 个氨基酸组成的具有 C₂-对称轴的二聚体,只有一个活性位置的天冬酰基蛋白酶^[11]。到目前为止已有 40 多个 HIV 蛋白酶和其点突变体与各种抑制剂的复合晶体报道。通过这些研究发现, HIV 蛋白酶的活性部位的底部具有 Asp-Thr-Gly 序列 (图 1-6),对称的 25-位天冬氨酸和其

对映的 25'-位天冬氨酸在水解过程中起着重要作用,这两个位置的天冬氨酸同时作用于水解底物。HIV 蛋白酶复合物的结构见图 1-5。

化学家对 HIV 蛋白酶的水解机理 (图 1-7) 进行了深入研究。一般来说蛋白酶的水解机制有两种类型,一种是活化的水分子进攻断裂部位酰胺键的羰基。这种活化的水分子是由 Zn²⁺ 离子活化生成 (这在含锌金属蛋白酶中可以见到),也可以由酶活化部位的 2 个天冬氨酸的 β-羧酸来生成 (如在其他天冬酰蛋白酶中见到的)。另一种水解类型是氨基酸侧链的基团亲核性进攻造成断裂位置的酰胺键水解,如侧链中的羟基或巯基被另一氨基酸活化而进攻断裂处的酰胺键羰基。HIV 蛋白酶的作用机理一般认为是属于邻近两个 25 (25')-位的天冬氨酸活化水分子的结果^[12]。

从以上的机理来看反应是分步进行的,但是也不能排除反应是同步进行的机理 (图 1-8)。同步反应中 2 个 Asp-25 残基同时作为酸和碱活化水分子而使酰胺键断裂,反应中不存在 OH⁻ 进攻后生成的四价碳中间体。

为了进一步证明反应的机理, Hyland 等用 H₂O¹⁸ 在 HIV 蛋白酶作用下水解人工合成的模型底物,其反应式如图 1-9 所示。

实验发现,反应后除水解产物外,底物中有¹⁸O。¹⁸O 可以掺入到底物中。但¹⁸O 与氧交换的这一步反应速度要比水解慢 100 倍。结果也证明了酶与酰胺水合物连接是决定反应速率的一步。催化反应开始是水分子的活化,生成四价碳中间体是 HIV 蛋白酶水解物的关键步骤。为此药物化学家针对这一模型设计合成了一系列过渡态类似物。在众多的化合物中目前已开发出 6 个 HIV 蛋白酶抑制剂 (saquinavir, amprenavir, nelfinavir, indinavir, ritonavir and lopinavir) 用于艾滋病的治疗。