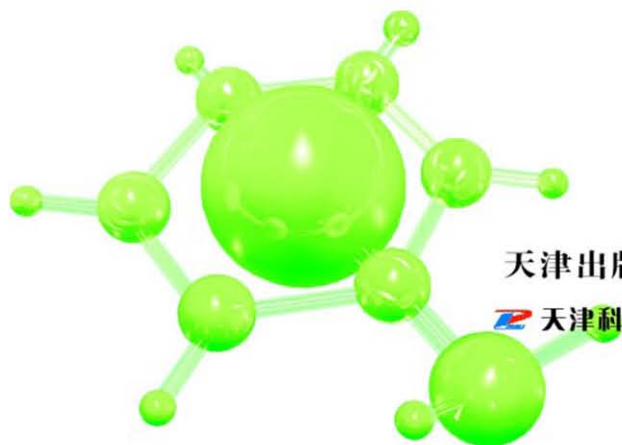


基础生物 化学与临床

主编



天津出版传媒集团

 天津科学技术出版社

基础生物化学与临床

李元宏 张笑添 主编

天津出版传媒集团

 天津科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学与临床 / 李元宏, 张笑添编著. -- 天津: 天津科学技术出版社, 2017.4

ISBN 978-7-5576-2541-2


I. ①基… II. ①李… ②张… III. ①生物化学
IV. ①Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2017)第 070646 号

责任编辑: 刘 磊

版式设计: 新 知

天津出版传媒集团

 **天津科学技术出版社出版**

出版人: 蔡 颢

天津市西康路 35 号 邮编: 300051

电话: (022)23332400(编辑室)

网址: www.tjkjcs.com.cn

新华书店经销

廊坊市海涛印刷有限公司印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 15.25 字数 310 000

2017 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

定价: 40.00 元

前 言

“不积跬步,无以至千里;不积小流,无以成江海”,一名优秀的医务工作者或者是一名优秀的医学生首先应该具备扎实的基本理论水平。“生物化学”是一门重要的医学基础课程,阐述人体正常情况下体内重要物质的结构、功能、代谢、及变化情况。但是,绝大多数的临床医师工作面对的主要为病理情况下的患者群体。因此,病理情况下的生物化学所阐述的内容有别于正常情况下的人体生物化学。本书将基础生物化学与临床生物化学有机融合,并对相关疾病的生化机制及生化改变加以介绍。

本书的编者都是有多年“生物化学”“临床生物化学”“生物化学检验”教学经历的高等医学院校教师。多年的教学经验得出一个结论,医学生对医学专业课程兴趣较为浓厚,而容易忽视医学基础课程的重要性。当医学生学习完基础生物化学以后,依然迷茫于学习该课程有多大意义,然而部分专业学生在学习“临床生物化学”课程时又对基础知识印象不深。因此,我们利用大约一年时间,把生物化学的基础知识与临床知识加以融合并整理。希望该书出版后能对医学生及医务工作者有所帮助。

本书以物质代谢或器官为知识核心,逐步拓展物质代谢紊乱或器官功能改变而引起的机体变化和疾病种类。针对相关疾病的定义、临床特点、生化改变重点介绍,另外结合介绍某些疾病的预防与治疗。本书共十二部分,分别为蛋白质与临床、酶与临床、糖代谢与临床、脂代谢与临床、氨基酸代谢与临床、核酸代谢与临床、维生素与临床、微量元素与临床、钙磷代谢与临床、体液平衡和酸碱平衡与临床、肝脏生物化学与临床、肾脏生物化学。本书所涵盖内容基本包括了生物化学的基本知识,常见临床疾病的生物化学改变等。本书可以作为临床医学、护理、检验等科室工作人员及以上专业医学生的参考材料。

本书编写人员通过总结知识,查阅大量相关文献资料,收集素材等大量工作完成了此书的编写。但是由于编者水平所限,不免出现表达不妥、错误、疏漏之处,望各位读者不吝赐教,给予批评指正。

目 录

第一章 蛋白质与临床	1
第一节 蛋白质的分子组成	1
第二节 蛋白质的分子结构	1
第三节 蛋白质结构与功能之间的关系	5
第四节 蛋白质的理化性质及分离纯化	6
第五节 血浆蛋白质的临床生物化学	10
第六节 疾病时血浆蛋白质异常电泳图谱及临床意义	22
第七节 血浆蛋白的测定方法及意义	26
第二章 酶与临床	29
第一节 酶的基本知识	29
第二节 同工酶	32
第三节 酶促反应的影响因素	33
第四节 酶活性的调节	35
第五节 酶的命名与分类	35
第六节 血浆酶活性的测定	37
第七节 酶与临床疾病的关系	39
第八节 酶的缺失与疾病的发生	41
第九节 血清中常见酶活性测定与临床	49
第三章 糖代谢与临床	55
第一节 糖代谢基本途径	55
第二节 血糖及血糖浓度的调节	67
第三节 糖代谢调控紊乱的相关疾病	69
第四节 糖代谢紊乱的主要检测项目	81
第四章 脂代谢与临床	90
第一节 血脂与脂蛋白	90
第二节 脂代谢基本途径	92
第三节 脂蛋白代谢	100
第四节 脂代谢有关的酶与蛋白质	102
第五节 脂代谢异常导致的疾病	106
第五章 氨基酸代谢与临床	128
第一节 氨基酸的结构、理化性质及功能	128

第二节	氨基酸的代谢	133
第三节	氨基酸代谢紊乱	139
第六章	核酸代谢与临床	143
第一节	核酸的组成	143
第二节	核酸的结构与功能	144
第三节	核苷酸代谢	149
第四节	核苷酸代谢紊乱	151
第五节	核苷酸代谢紊乱的检测	153
第七章	维生素与临床	154
第一节	脂溶性维生素与临床	154
第二节	水溶性维生素与临床	159
第八章	微量元素与临床	167
第一节	铁代谢与临床	167
第二节	碘代谢与临床	169
第三节	铜代谢与临床	175
第四节	硒代谢与临床	176
第五节	锌与临床	178
第六节	铬、锰、钴代谢与临床	180
第九章	钙磷代谢与临床	182
第一节	钙、磷代谢与代谢紊乱	182
第二节	骨代谢及异常	184
第三节	骨代谢异常引起的疾病	185
第十章	体液平衡、酸碱平衡与临床	187
第一节	体液平衡	189
第二节	酸碱平衡	195
第三节	酸碱平衡紊乱与临床	197
第十一章	肝脏生物化学与临床	205
第一节	肝脏在物质代谢中的作用	205
第二节	肝脏的生物转化作用	207
第三节	胆色素代谢与黄疸	210
第四节	胆汁酸代谢与临床	213
第五节	常见肝病的生化改变	216
第十二章	肾脏生化与临床	227
第一节	肾脏的结构与功能	227
第二节	肾脏功能改变对物质代谢的影响	229

第一章 蛋白质与临床

蛋白质是人类生命活动中最重要的物质,其含量在血浆成分中最多,约占细胞干重的45%,种类有一千种以上,目前人类有所了解的血浆蛋白有500种之多,其中已被分离的约有200种左右。许多疾病可引发机体出现体液蛋白质代谢紊乱,本章主要介绍蛋白质的结构与功能、蛋白质代谢紊乱时相关指标的变化及其临床价值。

第一节 蛋白质的分子组成

一、蛋白质的元素组成

根据元素分析可知,蛋白质主要由碳、氢、氧、氮、硫等元素组成,除此之外,有些蛋白质还含有微量磷、铁、铜、锌等金属元素。因为大多数蛋白质含氮的量比较接近,平均16%,可以通过测定样品中氮的含量计算其中蛋白质含量。即所测得的样本的含氮量乘以6.25即可算出样品中蛋白质的含量。

二、蛋白质的基本组成单位 - 氨基酸

蛋白质虽种类繁多,功能多样,结构复杂,但其彻底水解的终产物都是氨基酸,因此氨基酸是蛋白质的基本结构单位。自然界的氨基酸种类有300余种,组成人体蛋白质的氨基酸种类有约20种。除了甘氨酸和脯氨酸以外,天然蛋白质中的氨基酸皆为L- α -氨基酸。

第二节 蛋白质的分子结构

蛋白质的基本结构是由氨基酸通过肽键相连而成的多肽链,并在此基础上形成特定的三维空间结构,才能执行独特的功能。蛋白质的分子结构可分为一级、二级、三级、四级结构四个层次,后三者统称为蛋白质的高级结构或空间结构,它们是蛋白质特有性质和功能的结构基础。

一、蛋白质的一级结构

蛋白质的一级结构是指蛋白质分子中,从N-端至C-端的氨基酸排列顺序。各种蛋

白质中氨基酸的排列顺序是由该生物遗传信息决定的,体内种类繁多的蛋白质的一级结构各不相同。一级结构主要的化学键是肽键,肽键是一个氨基酸的 α -氨基和另一个氨基酸的 α -羧基脱水形成的酰胺键。而蛋白质就是由几十个到几百个甚至几千个氨基酸分子借肽键相互连接起来的多肽链。有的蛋白质分子是多条肽链组成,还有的成环状,多肽链的共价结构除肽键外,还有二硫键。这是由肽链上两个半胱氨酸残基的巯基脱氢形成,又称“硫桥”。含二硫键多的蛋白质结构稳定,如皮、毛、发、角质的蛋白质含二硫键较多。由于是共价结构,可在两条多肽链之间形成,也可在一条多肽链上形成,二硫键对蛋白质空间结构很重要。

我们以胰岛素为例说明蛋白质的一级结构,胰岛素是世界上第一个被确定一级结构的蛋白质,1953年被sanger提出并于1958年获诺贝尔奖,牛胰岛素是我国科学家1965年完成的世界上第一个人工合成的天然蛋白质。它是由A、B两条多肽链通过两对二硫键相连,A链含21个氨基酸,B链中有30个氨基酸,A链本身第6位和第11位两个半胱氨酸之间形成一个链内的二硫键。另两个二硫键位于A、B二链间。

蛋白质的一级结构决定了蛋白质的二级、三级等高级结构,而蛋白质的空间构象则是实现其生物学功能的基础。组成蛋白质的20种氨基酸各具特殊的R侧链,侧链基团的理化性质和空间排布各不相同,当它们按照不同的序列关系组合时,就可形成多种多样的空间结构和不同的生物学活性的蛋白质分子。

二、蛋白质的空间结构

蛋白质的空间结构又称高级结构,是指蛋白质分子中原子和基团在空间的排列分布和肽链的走向。蛋白质分子的多肽链并不是线形伸展,而是按一定方式折叠盘绕成特有的空间结构,通常称为蛋白质的构象,根据折叠的程度不同可细分为蛋白质的二、三、四级结构。

(一) 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构是指多肽链中主链原子在各局部区段空间的排列分布状况,而不涉及各R侧链的空间排布。

1. 肽平面

肽键中的酰胺氮上孤对电子的电子云与羧基碳轨道重叠,因此在酰胺氮和羧基氧之间发生共振相互作用,结果使得C-N肽键具有了部分双键的性质,不能自由旋转。因肽键不能自由旋转而使涉及肽键的6个原子共处于同一个平面,而称为肽平面或肽单元。多肽链实际上就是各个肽单元之间通过C α 连接成规律结构,在此基础上盘曲折叠产生蛋白质的空间构象。相连两个肽单元之间的相互位置关系就取决于 α -碳两侧单链旋转的角度。此种以肽单元为基本单位的旋转就是肽链折叠、盘旋的基础。

2. 蛋白质二级结构的主要构象形式

α -螺旋和 β -折叠是蛋白质二级结构的主要形式。除此之外,蛋白质的二级结构还

包括 β -转角和无规则卷曲。氢键是维持蛋白质二级结构主要的化学键。

(1) α -螺旋

是指多肽链主链骨架围绕螺旋的中心轴一圈一圈地上升而形成螺旋式构象，其螺旋构象主要依靠氢键来维持。其结构特点主要包括：

肽单元围绕中心轴呈有规律右手螺旋，但 α -螺旋可以是左手或右手螺旋，这使得它具有不对称特性和相应的旋光性，但是右手螺旋比左手螺旋更加稳定；螺旋体中每隔 3.6 个氨基酸残基螺旋上升一圈，螺距约 0.54 nm，每个残基上升 0.15 nm，螺旋半径为 0.23 nm；氨基酸残基侧链伸向螺旋体外侧，不参与 α -螺旋的形成，但其形状大小及电荷影响到螺旋的稳定性，每个肽单元的 N-H 上的 H 和它后面的第四个肽单元羰基上 O 之间形成氢键，氢键的方向几乎与中心轴平行。 α 螺旋中所有的肽键都能参与链内氢键的形成，因此 α 螺旋的构象是相当稳定的。

(2) β -折叠

两段以上的肽链折叠成锯齿状，通过氢键相连而平行成片状的结构称为 β -折叠。 β -折叠的结构特点主要包括：肽链充分伸展，肽键平面之间以 $C\alpha$ 为旋转点，依次折叠形成锯齿状，相邻肽平面之间形成 110° 角，氨基酸残基的 R 侧链伸出在锯齿状的上方或下方；依靠两条或者一条肽链的两段肽段间的 C=O 或 N-H 形成氢键，这是维持 β 折叠构象稳定的主要因素；两条链可以是平行的即相互平行的肽段的 N 端在同一侧，也可以是反平行的，即相互平行的肽段的 N 端不在同一侧。从能量角度分析，反平行 β 折叠更稳定。 β 折叠涉及的肽段一般比较短，只含 5-10 个氨基酸残基。

(3) β 转角

蛋白质二级结构中，有时多肽链主链可以出现 180° 的回折，这就是 β 转角结构。其结构特征主要包括： β 转角结构较特殊，回折部分通常有 4 个氨基酸残基组成；主链结构本身以 180° 回折；第一个氨基酸残基的 C-O 与第四个氨基酸残基的 N-H 之间形成氢键，形成一个稳定的环，使其成为一个稳定的结构；其第二个氨基酸残基常为脯氨酸或者甘氨酸。 β 转角多处于蛋白质的分子表面，且在球形蛋白质中的含量相当丰富，约占全部残基的 $1/4$ 。

(4) 无规则卷曲

在蛋白质分子结构中还存在没有确定规律性的局部肽链结构，虽然相对没有规律性排布，但是同样表现出重要的生物学功能，这部分结构被称为无规则卷曲。

(三) 超二级结构

在蛋白质分子中，特别是球状蛋白质中常看到若干相邻的二级结构组合在一起相互作用，形成有规则的二级结构组合体，充当二级结构的构件，称超二级结构或模序。超二级结构是蛋白质二级结构到三级结构组织层次上的一种过度构象层次，虽高于二级结构，但还没有构成完整的结构域。超二级结构的基本组合形式有几种，如 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\alpha\beta$ 、 $\beta\beta\beta$ 。

其中, $\alpha\alpha$ 是一种 α 螺旋束, 经常有两股平行或反平行的右手 α -螺旋相互缠绕而成的。 α -螺旋束有时也由三股或者四股 α 螺旋组成。在纤维蛋白中, α -螺旋束是其主要结构元件, 并且由几条链的 α -螺旋缠绕而成。 $\beta\alpha\beta$ 则由两段平行的 β 折叠和一段连接链组成, 连接链可是 α -螺旋或无规则卷曲。此种最常见的组合是由三段平行的 β 折叠和两段 α 螺旋构成。 $\beta\beta\beta$ 则由一级结构上连续的反平行的 β -折叠通过紧凑的 β 转角连接而成。

(四) 蛋白质的三级结构与结构域

1. 蛋白质的三级结构

指在蛋白质分子在二级结构的基础上进一步卷曲折叠, 构成一个具有特定空间构象的蛋白质分子, 这种由 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角等二级结构之间相互配置而成的构象称为三级结构, 它也是指多肽链中所有原子或基团的空间排列。稳定三级结构的因素是侧链基团的相互作用, 包括氢键、离子键、疏水作用, 范德华力等, 其中以疏水键最为重要。此外, 两个半胱氨酸巯基共价结合而成的二硫键, 也参与稳定三级结构。

2. 结构域

在一级结构上相距较远的氨基酸残基, 通过三级结构的形成, 多肽链的弯折, 彼此聚集在一起, 从而形成一些在功能上相对独立, 结构较为紧凑的区域, 称为结构域。结构域在空间上相对独立的, 它是三级结构与超二级结构之间的一个组织层次。一条长的多肽链可折叠成几个相对独立的结构域, 在缔合成三级结构, 这在动力学上比直接折叠更为合理。

结构域在功能上也有意义。结构域常有相对独立的生理功能, 如与残基修饰有关的结构域、酶原激活有关的结构域等。各结构域之间常只有一段肽链相连, 称为铰链区, 使结构域可以发生相对运动。结构域之间的这种特性有利于活性中心与底物结合, 也有利于别构中心结合调节物和发生别构效应。

一般而言, 小蛋白多由一个结构域构成, 分子量大的蛋白质三级结构常分割成一个或数个结构域如胰岛素含有两个结构域, 中间有一个裂隙相隔, 此裂隙中包含底物结合催化位点。而大分子蛋白如纤连蛋白, 则由两条多肽链通过近 C 端的两个二硫键相连而成, 含有 6 个结构域, 各个结构域分别代表一种功能。

(五) 蛋白质四级结构

由两条或者两条以上具有三级结构的肽链通过非共价键构成的蛋白质称为寡聚蛋白。其中每一条肽链称为亚基, 蛋白质分子中各亚基之间相对空间位置为蛋白质四级结构。连接亚基的非共价键主要为疏水键、氢键、盐键。而亚基单独存在时无生物学功能, 只有聚集成特定构象时才具有完整的生物活性。具有四级结构的蛋白质, 可以由相向或不同种类的亚基组成。前者称为同聚体, 后者称为异聚体。

一级、二级和三级结构是所有蛋白质必需具有的空间构象, 有的蛋白质还有四级结构。蛋白质构象的正确形成, 除一级结构为决定因素外, 还需要一类称为分子伴侣的蛋白

质参与。蛋白质在合成时,还未折叠的肽段有许多疏水基团暴露在外,致使蛋白质不能形成正确空间构象,分子伴侣可逆的与未折叠肽段的疏水部分结合后松开,如此反复进行可以防止错误聚集的发生,使肽链正确折叠。此外,分子伴侣还可以与错误聚集的肽段结合,使之解聚后,再诱导正确折叠。

第三节 蛋白质结构与功能之间的关系

蛋白质分子具有多种多样的生物功能,显然它不仅需要一定的化学结构,还需要一定的空间构象。

一、蛋白质一级结构与功能的关系

(一) 一级结构是空间构象的基础

核糖核酸酶是由 124 个氨基酸残基组成的单链蛋白质,依靠分子内 4 个二硫键及其他非共价键维系其构象稳定。用蛋白变性剂尿素和 β 巯基乙醇处理核糖核酸酶,分别破坏次级键和二硫键,使其二、三级结构遭到破坏,但肽键不受影响,此时该酶活性丧失。若通过透折方法,将尿素和 β 巯基乙醇变性剂除去,因其一级结构没有被破坏,核糖核酸酶分子中的巯基还可以缓慢地氧化形成二硫键,构象得到恢复,重现其酶活性。因此蛋白质的空间构象,以其一级结构为基础,并与其生物功能存在密切的关系。

(二) 蛋白质一级结构与功能的关系

经对大量蛋白质结构与功能关系进行研究,发现凡有相似一级结构的多肽或蛋白质,其功能也相似。例如腺垂体分泌的多肽激素,39 肽的促肾上腺皮质激素和促黑素之间有一段相同的氨基酸序列,因此促肾上腺皮质激素具有较弱的促黑素作用。不同哺乳类动物,相同蛋白质的结构有相似之处,它们执行的生物学功能也相同。如胰岛素分子由 A 和 B 两条多肽链通过二个链间二硫键相连而成,多种哺乳动物的胰岛素 A、B 链氨基酸序列仅有个别氨基酸差异,因而它们都有相同的调节糖代谢等的生理功能。比如,猪和牛的胰岛素与人胰岛素相比氨基酸序列的差异较小,三维结构相近,因此在临床中,猪和牛胰岛素均可用于治疗人类糖尿病,而就两者来说,由于猪胰岛素与人胰岛素有更大的相似性,因此较为常用。而利用基因工程细菌或修饰猪胰岛素而得到人胰岛素现在正在初步应用于发达国家。

而蛋白质分子一级结构的改变时常导致其功能发生变化。如镰刀状红细胞性贫血患者,就是其血红蛋白中的一个氨基酸残基即 β 亚基 N 端的第 6 号氨基酸残基谷氨酸被缬氨酸代替所造成的,这是一种非保守型突变,结果使得分子外表面的一极性侧链基团替换为非极性疏水性侧链,通过与缬氨酸相关的疏水性相互作用,HbS 脱氧并与其他脱氧的 HbS 分子形成多聚体,进而导致红细胞中形成小纤维、血红蛋白沉淀,使得红细胞呈镰刀状,失去弹性,还可以阻塞小毛细血管。而这种变异来源于基因上遗传信息的突变。

二、蛋白质空间结构与功能的关系

蛋白质分子一级结构可以决定其三维空间结构,而蛋白质的构象是其生物活性的基础。若蛋白质一级结构保持不变,而构象的改变即可导致其功能的变化。如血红蛋白与 O_2 的结合就是很好的例子。

血红蛋白都是结合蛋白,辅基为血红素,主要功能是在循环中转运氧,这一功能依赖于血红蛋白具有四级结构的构象。它是由4个亚基之间依靠盐键相连接而成四级结构,每个亚基的结构中有一孔穴,嵌合一个亚铁血红素辅基,此亚铁能与 O_2 可逆的结合。1分子Hb可结合4分子 O_2 ,起到运输氧的作用。当第一个亚基与 O_2 结合后此亚基构象发生了改变,使亚基间的盐键断裂,从而促进了第二个亚基与 O_2 结合即亚基与 O_2 的亲合力,依次类推,这种一个亚基与其配体 O_2 结合后能促进此寡聚体中其他亚基与配体结合的能力,称为正协同效应或变构激活;反之则为负协同或变构抑制效应。在上述Hb正协同效应中,我们可以看出,血红蛋白及亚基与 O_2 结合后可发生构象变化,从而引起其生物功能改变。

凡蛋白质与小分子物质相互作用而发生构象变化,导致蛋白质功能的变化,称为蛋白质变构效应。其中能促使蛋白质构象变化的小分子化合物称为变构剂。变构效应除了对于Hb的运氧功能具有重要的调节作用外,它还是体内普遍存在的对于已合成蛋白质生物活性进行细微调控的重要方式之一。如人体血红蛋白特定空间构象及亚基间的正协同效应,则有利于血红蛋白在氧分压高的肺部迅速充分地与 O_2 结合;而在氧分压低的组织发生相反过程,又迅速最大限度地释出转运的 O_2 ,完成血红蛋白的生理功能。

三 蛋白质的结构与生物进化

核酸是遗传信息的携带者,而蛋白质是遗传信息表达的结果。生物在长期进化的过程中,遗传信息的携带者核酸在不断的受到外界环境影响,不可逆地发生变化,也就是基因突变,导致蛋白质分子中的氨基酸组成会出现变异,但是一般而言这些变异并不在蛋白质的‘关键’部位,因此不至于影响生物体的正常生命活动,所以它是非致死性的,也就是因为这个原因,这些变异也就在生物的进化过程中保留下来。变异也有可能也会导致程度不同的疾病,如遗传性分子病,但是也可能产生功能更加完备的蛋白质,或者为了适应新的环境而产生新功能的蛋白质。生物体的进化程度越复杂,生物体的功能越强大,而蛋白质的种类也会越多。

第四节 蛋白质的理化性质及分离纯化

蛋白质是由氨基酸组成的,它的理化性质与氨基酸的性质有些相似,但是,多种氨基酸构成蛋白质,从量变到质变,与氨基酸已有质的区别,因而表现出一些特有的性质。

一、蛋白质的理化性质

1. 蛋白质的两性解离

蛋白质分子中,除 N- 端的氨基和 C- 端的羧基外,肽链内多种氨基酸残基的 R 侧链可解离成正、负离子的化学基团,因此,蛋白质分子可呈两性解离,其电离过程和带电状态决定于溶液的 PH 值。在某一 pH 值条件下,蛋白质解离成正、负离子的数相等,净电荷为零,此时溶液的 pH 值称为蛋白质的等电点(PI)。各种蛋白质的等电点和它所含有的氨基酸残基的种类和数量有关,含碱性氨基酸残基较多,等电点偏碱,而含有酸性氨基酸残基较多,其等电点偏酸。对于某种蛋白质溶液,当 pH 值大于其 PI,该蛋白质带负电荷;反之,当溶液的 pH 小于其 PI 时,则蛋白质带正电荷。而体内大多数蛋白质的等电点接近于 5.0,在体液 pH 值为 7.4 的环境下可解离成负离子。

电泳、等点聚集和离子交换层析技术分离特定的蛋白质就是以其 PI 为基础的,电泳分离血浆蛋白是根据其电泳迁移率进行分类的。某个条带代表了数十个或数百个蛋白质,特定的蛋白质主要位于一个峰内,它们相对含量的改变是某些疾病的特征。

2. 蛋白质的胶体性质

蛋白质是含氮高分子化合物,其相对分子质量在 1 万 -100 万之间,分子颗粒大小达胶体范围,具有胶体溶液的性质。而维持蛋白质胶体稳定的重要因素有两个:一个是蛋白质颗粒表面大多为亲水基团,因其吸引水分子,使蛋白质分子表面形成一层水化膜,使其溶解在水溶液中;另一个是同种蛋白质胶粒表面带有同种电荷,电荷的相互排斥作用使蛋白质胶体颗粒最大限度分散在溶液。如去除蛋白质胶粒的上述两个稳定因素,可使蛋白质易从溶液中析出。在实际中,改变蛋白质溶液的 pH 值,可影响蛋白质分子表面亲水基团的解离,当溶液 pH 值调节至蛋白质的等电点时,蛋白质净电荷为零,也易于从溶液中析出。

蛋白质的亲水胶体性质具有重要的生物意义。生物体中最多的成分是水,蛋白质的生物学作用主要就是在水中表现出来的,如细胞的原生质等便为具各种流动性胶体系统。各种细胞组织之间具有一定形状、弹性、黏度等性质,这些都与蛋白质胶体性质有关。

蛋白质胶体颗粒不易透过半透膜,因此利用这一性质,蛋白质装入半透膜制成的透析袋进行透析可将蛋白质和能透过半透膜的小分子化合物分离,是蛋白质分离纯化中常用的简便方法之一,实验室或者工业生产上超滤技术提纯蛋白质就是基于这个特性。

3. 蛋白质的变性

蛋白质在某些理化因素如加热、酸、碱、有机溶液、重金属离子等的作用下,而使得蛋白质的空间构象遭到破坏,导致其理化性质改变和生物活性的丢失,这称为蛋白质变性;一般认为蛋白质的变性的实质是空间构象的改变,涉及二、三、四级结构的破坏,主要发生非共价键和二硫键的破坏,并不涉及一级结构改变。

蛋白质变性后可引起下列各种变化,物理性质改变包括:蛋白质的旋光值改变、黏度增加、扩散系数降低、溶解度下降、结晶能力丧失,有时甚至发生凝聚、沉淀等;化学性质改

变包括:肽链变松散,被酶水解的速度加快;生物活性丧失或降低;如酶失活、激素失去调节作用、抗体失去免疫作用、血红蛋白变性后失去运输氧和二氧化碳的功能。

在临床医学上,蛋白质的变性有很多的用途,如加热灭菌、乙醇消毒、高压及紫外线杀菌就是使细菌等病原体蛋白质变性而失活来达到消毒、抗感染的目的;而制备酶制剂和蛋白类激素时,要注意在处理过程中防止蛋白质变性失活;而免疫球蛋白或生物制剂(如疫苗等)需保存在 4℃,才能防止蛋白质变性从而有效保持生物制剂的活性;也可以利用蛋白质对变性剂的不同敏感性,在提取、分离和纯化蛋白质时,选择适当的处理条件,可以使需要的蛋白质不变性,不需要的蛋白质通过变性后除去。

4. 蛋白质的复性

蛋白质变性具有可逆性。若蛋白质变性程度较轻,则消除变性因素条件下使蛋白质恢复或部分恢复其原来的构象和功能,称为复性。如核糖核酸酶在实验条件下的变性和复性。但是许多蛋白质变性后空间构象破坏严重,不可能发生复性,称为不可逆变性。

5. 蛋白质的沉淀和凝固

蛋白质分子相互聚集而从溶液中析出现象称为沉淀。变性后的蛋白质由于疏水基团的暴露而易于沉淀,但沉淀的蛋白质不一定是变性后的蛋白质。加热使蛋白质变性时使其变成比较坚固的凝块,但此凝块不易再溶于强酸和强碱中,这种现象称为蛋白质的凝固。实际上凝固是蛋白质变性后进一步发展的不可逆的结果。

蛋白质的变性、沉淀、凝固之间有很密切的关系。沉淀不一定变性,如加入中性盐能使蛋白质沉淀,但没有变性;变性也不一定沉淀,如强酸、强碱作用使蛋白质变性,但不沉淀;或者牛奶加热沸腾,酪蛋白变性,但不沉淀;变性蛋白质一般易于沉淀,在一定条件下,蛋白质变性后才会沉淀,如调节 pH 值接近等电点附近后变性蛋白质才沉淀。沉淀的变性蛋白质也不一定凝固,例如,蛋白质被强酸、强碱变性后由于蛋白质颗粒带着大量电荷,故仍溶于强酸或强碱之中;但若将强碱和强酸溶液的 pH 值调到等电点,则变性蛋白质凝集成絮状沉淀物。若将此絮状物加热,则分子间相互盘缠而坐成较为坚固的凝块。

6. 蛋白质的紫外吸收

蛋白质在紫外光波长 280 nm 处有最大吸收,这是因为芳香族氨基酸残基(色氨酸及酪氨酸残基)内存在共轭双键引起的,可根据 280 nm 处光吸收值的大小来定量测定蛋白质的含量。

7. 蛋白质的呈色反应

某些试剂可使蛋白质分子中肽键或特殊氨基酸残基发生显色反应,产生的有色物质量与蛋白质浓度相关,这一现象可用于蛋白质定性、定量检测。如双缩脲反应、酚试剂、考马斯亮蓝、茚三酮等显色反应。

8. 蛋白质的免疫学性质

人和动物抵抗和消灭入侵病原微生物,以及对某些物质产生特异的排除或处理反应

称为免疫反应。能够刺激人和动物机体免疫系统产生特异性免疫反应的物质为抗原。蛋白质多为大分子的异物物质,具有强抗原性,而许多抗原便是蛋白质,小分子抗原本身没有抗原性,但是与蛋白质结合后则具有抗原性,如青霉素、磺胺,这也是它们引起过敏反应的原因。抗体是免疫球蛋白,可以与特异地与抗原发生反应。

蛋白质的免疫性质的临床应用较多,如制造疫苗,卡介苗、脊髓灰质炎糖丸等;疾病诊断方面,如人血型的鉴定,甲胎蛋白(AFP)检测诊断原发性肝癌;疾病治疗方面,如破伤风抗毒素、干扰素等;免疫分析方面,有免疫方面、免疫扩散、放射免疫分析等;此外还可以利用免疫反应性质进行亲和色谱纯化特殊的蛋白质。

二、蛋白质的分离纯化和结构测定

无论是对蛋白质结构与功能的研究,或是制备或生产人们所需要的蛋白质产品,都涉及蛋白质的分离和纯化问题。选择合理的蛋白质分离、纯化方法对分离效率有决定性的作用。蛋白质分离与纯化方法一般是根据蛋白质的分子量、溶解性等性质确定的。人们常利用不同蛋白质的性质差异确定分离方法,蛋白质性质主要包括溶解度、电荷性质、分子量大小、特异亲和力等。

1. 利用溶解度不同的分离方法

盐析就是一种利用蛋白质溶解度不同而建立起的分离方法,由于蛋白质溶液是胶体溶液,破坏蛋白质颗粒表面的水化膜和带电性可以降低蛋白质的溶解度。常用的中性盐有硫酸铵、氯化钠、硫酸钠等。盐析时,溶液的pH值在蛋白质的等电点处效果最好。但盐析沉淀蛋白质时通常不会引起蛋白质的变性。

2. 有机溶剂沉淀蛋白质

凡能与水以任意比例混合的有机溶剂,如乙醇、甲醛、丙酮等,均可用于沉淀蛋白质。丙酮、乙醇等有机溶剂可吸引破坏蛋白质分子的水化层促进蛋白质沉淀分离。为防止蛋白质失去活性,使用丙酮沉淀时,应在0-4℃低温下进行,控制丙酮用量约10倍于蛋白质溶液的体积。用丙酮沉淀的蛋白质,应立即分离。

3. 透析

利用半透膜把大分子蛋白质与小分子化合物分开的方法叫透析。透析袋是有超小微孔的膜,将透析袋内放蛋白质溶液,再置于缓冲液中,小分子杂质成分即透出薄膜,通过几次更换袋外的缓冲液可把透析袋内小分子杂质去除。如在袋外加吸水剂如聚乙二醇则吸走过多水分,从而浓缩袋内纯化的蛋白质溶液。

4. 电泳

带电粒子在电场中的定向移动的现象称为电泳。蛋白质所在溶液的pH值不等于其PI时带有电荷,能在电场的作用下移动。由于不同的蛋白质分子其等电点不同,因而其所带净电荷的也不同,而且不同蛋白质的相对分子量大小的不同,因而它们在电场中移动的速度也就不同,从而将其彼此分离。根据支持物的不同,电泳可以分为薄膜电泳、凝胶电

泳等,而凝胶电泳的支持物又有琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶等多种。其中,等点聚焦电泳是种分离效果很好的技术,即采用一定 PI 范围的两性电解质混合物在电场内建立 pH 值梯度,电泳时,蛋白质迁移至与其 PI 相等的区域,进而被观察到,即使只有 0.0025 的 PI 差异,蛋白质仍然可以在合适的 pH 值梯度内被分离。因此,电泳可用于检测和分离蛋白质,在临床中还可以根据其图谱特征广泛应用于疾病的诊断。

5.层析

层析是蛋白质分离纯化的重要手段之一,是一种利用混合物中各组分理化性质的差异,在固定相与流动相两相之间的分配系数而进行分离分析技术。层析种类很多,有离子交换层析、凝胶过滤层析、分配层析、亲和层析等。凝胶过滤层析是根据分子大小不同来分离蛋白质混合物最有效的方法之一。根据分子筛层析理论,当不同分子大小的蛋白流经凝胶层析柱时,比孔径小的细颗粒蛋白质分子扩散进入凝胶颗粒内,比孔径大的粗颗粒蛋白质分子不能进入孔内而直接流出,这样,由于不同大小的蛋白质分子而得到分离。离子交换层析分离蛋白质是根据不同蛋白质在同一个 pH 值条件下所带电荷不同而进行的分离方法。常用于蛋白质分离的离子交换剂有阳离子交换剂和阴离子交换剂。蛋白质与离子交换剂的结合是靠相反电荷的静电引力,吸引力的大小与溶液的 pH 值有关。我们经常通过改变溶液中盐类离子强度和 pH 值来完成蛋白质混合物的分离,结合力小的蛋白质先被洗脱出来。亲和层析是根据不同蛋白质对特定配体特异结合的能力不同,从而对蛋白质进行分离的,它是分离蛋白质的一种有效的方法,常只需一步处理即可得到纯度较高的某种蛋白质。

6.超速离心

利用物质密度的不同,经超速离心后,不同密度的物质分布于不同的液层而分离。超速离心法可以用来分离纯化蛋白质,也可用来测定蛋白质的相对分子质量。相对分子质量不同的蛋白质在高达 50 万 G(G 为地心引力)的强大离心力作用,在形成有密度梯度的溶液中逐渐沉降,直至与其浮力相等,沉降停止。利用超速离心可将不同密度与形态的蛋白质分开。

第五节 血浆蛋白质的临床生物化学

目前研究有关个别蛋白质的结构、功能、代谢以及在病例情况下的变化已经越来越多受到基础医学、临床医学及生物化学家的重视,并且成为很活跃的研究领域。体现在以下几个方面:

1. 生物化学家分离纯化各种血浆蛋白质成分,研究它们的氨基酸的组成及顺序,理化性质,同时还研究血浆蛋白质的生理功能,在运输脂类、金属和微量元素中所起的作用,在结合和调节激素作用,在药物代谢中的作用,在反映肾小球滤过、肾小管重吸收功能以及反映肝细胞功能方面的意义。血浆蛋白质还可以广泛地应用于研究营养学问题,尤其是蛋

白质的营养不良。

2. 遗传学家常利用血浆蛋白质结构上的差异作为研究人群与家族遗传特征的标志,一些血浆蛋白质在不同人群中常有结构上的差异,如结合珠蛋白和转铁蛋白,而且表现一定的临床症状,亦具有临床医学上的意义,常用于一些疾病的诊断。

3. 在生物化学检验实验室中血浆蛋白质的分析一直是最主要的常规工作之一,可以用于肝及肾疾病和血液恶性肿瘤的诊断与预后的监测。随着近年来技术的发展,微量蛋白质的测定成为可能,也能为很多疾病的诊断提供新的信息。

4. 在生物进化与个体发育的研究中,已发现有一些只在正常胎儿时期出现的蛋白质可以在恶性肿瘤病人中重新出现,如甲胎蛋白,癌胚抗原等。这些蛋白质在预测、诊断和检测肿瘤过程中都起到了重要的作用。另外在一些特殊病理过程中,如炎症时,机体对急性时相反应蛋白的调控,还有在血液循环里的一些蛋白水解酶的抑制物,它们也具有十分重要的代谢调控作用。

5. 血浆蛋白质中有一些特殊成份,如血液凝固因子、免疫球蛋白组分及补体系统成分的检测,为血液学与免疫学的发展提供了重要的理论基础。

6. 血浆蛋白质还可以广泛地应用于研究营养学问题,特别是蛋白质的营养不良。

总之,血浆蛋白质作为血浆固体成份中含量最多、组成极为复杂、功能广泛的一类化合物,目前已经研究的血浆蛋白质不下 300 种,其和已分离出接近纯品者有 100 多种。近些年来出现和使用了不少新技术,血浆内微量蛋白质分析已经变得容易,在不同的疾病时,血浆中的蛋白质会发生改变,这些改变有助于疾病的临床诊断和病情监测,并提供有价值的病理生理信息。

一、血浆蛋白质的功能和分类

(一) 血浆蛋白质的功能

蛋白质在哺乳动物机体内发挥着许多重要的动力学和结构学功能。其中动力学功能主要包括物质运输、催化化学反应、调控新陈代谢以及肌肉收缩。结构学功能主要包括为骨骼和结缔组织提供基质,形成结构并组成人体。发挥催化功能的蛋白质主要是指酶,在活性位点可以将底物转变成产物,而临床中许多遗传性疾病是由酶的水平异常或其氨基酸序列的改变引起的。动力学功能中的另一主要功能是物质运输,如血红蛋白和肌红蛋白,在血液中及肌肉中运输氧气。其他的运输蛋白还可以运输血液中的类固醇激素,或者药物和有毒复合物。机体的肌动蛋白和肌球蛋白在肌肉收缩以及肌细胞变形过程中起到了重要的作用。机体中有许多激素是蛋白质或多肽,如胰岛素、促甲状腺激素、生长激素等。这些激素可以调控机体的代谢过程。另外有些蛋白质还可以控制和调节基因的转录和翻译,这些蛋白质包括与 DNA 紧密结合的组分,或者一些控制基因转录的抑制子和增强子等。机体有的蛋白质还具有保护功能,如免疫球蛋白和干扰素,它们可以起到抵抗细菌或病毒感染的作用。还有一些蛋白质是属于结构蛋白,如胶原蛋白或弹性蛋白,可以形成