

北京大学化学科学译丛-5

生物化学简明教程

Harry R. Matthews

〔美〕 Richard A. Freedland 编著

Roger L. Miesfeld

吴相钰 译

北京大学出版社
北 京

图书在版编目(CIP)数据 图字: 01-2001-0295

生物化学简明教程/(美)马休兹(Mattews, H. R.), (美)佛里兰德(Freedland, R. A.), (美)米斯菲尔德(Miesfeld, R. L.)编著;吴相钰译. - 北京:北京大学出版社, 2001
(北京大学化学科学译丛)

书名原文: Biochemistry: A Short Course

ISBN 7-301-04863-7

. 生... . 马... 佛... 米... 吴... . 生物化学-高等学校-教材 . Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2001)第 09795 号

书 名: 生物化学简明教程

译作责任者: 吴相钰

责任编辑: 赵学范

标准书号: ISBN 7-301-04863-7/O·501

出版者: 北京大学出版社

地址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

网 址: <http://cbs.pku.edu.cn>

电 话: 出版部 62752015 发行部 62754140 编辑部 62752021

电子信箱: zpup@pup.pku.edu.cn

排版者: 兴盛达打字服务社 62549189

印刷者: 北京大学印刷厂

发行者: 北京大学出版社

经销者: 新华书店

787 毫米× 1092 毫米 16 开本 31.75 印张 800 千字

2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月第 1 次印刷

定 价: 50.00 元

本文中文版由美国 Wiley-Liss, Inc. 授予北京大学出版社出版

Originally published in English under the title: " Biochemistry: A Short Course " by Harry R. Matthews, Richard A. Freedland and Roger L. Miesfeld.

内 容 简 介

本书是一本比较简明的生物化学教材,与许多大部头的生化教材相比,字数约少一半。其优势在于集中注意于引导读者理解和掌握现代生物化学的基本概念和探究途径。

全书共分 31 章,可概括为 3 大部分。第一部分(1~10 章)讨论生物分子,包括蛋白质、核酸、脂类以及酶和生物膜等;第二部分(11~20 章)讨论糖、氨基酸、脂类、核苷酸等的代谢;第三部分(21~31 章)讨论现代分子生物学的内容。可以说本书既包括了传统的生物化学内容(约 60% 篇幅),又介绍了分子生物学的新进展(占 40%),而且力图把这两部分有机地结合起来。本书的另一个特点是特别注重与疾病的联系,最后一章专门讨论癌,特别是癌基因。此外,本书每章后附有简明的复习题及参考答案,利于读者自学。

本书可作为大专院校生物化学的教材,尤其适于在教学时数不多的情况下使用,如医学院、农学院或兽医学院的学生学习生物化学。也适于一般的生物学工作者、教师和研究人員学习参考。

译 序

生命科学在 20 世纪已经取得举世瞩目的成就, 进入 21 世纪, 生命科学将肯定成为带头科学之一。它与相关学科如化学、物理学、数学、信息科学、材料科学、医药科学以及其他技术科学的交叉渗透, 必将进一步推动科学技术和社会生产力的发展。现代生物科学的进展, 离不开生物化学和分子生物学, 所以当前不仅学习生命科学和密切有关的学科, 如农、医等领域的学生需要学习生物化学, 就是学习化学、物理学等自然科学其他领域的学生也要对生物化学和分子生物学有所了解。

当前国内外生物化学教材种类很多, 其中脍炙人口的著作大都篇幅巨大, 动辄上千页。国内已有的比较简明的教本又往往内容不够新颖, 特别是现代分子生物学的内容太过简略或陈旧。

美国 John Wiley 出版社 1998 年出版的由 H. R. Matthews 等编写的“Biochemistry: A Short Course”恰好弥补了这个不足。这本书篇幅适中, 约 80 万字(中译本), 集中介绍生物化学的基本原理和当代成就, 其中约有 40% 的篇幅讨论分子生物学方面的内容。本书有三个特点: 第一是尽可能将分子水平的内容与生理, 特别是人体生理结合起来, 使得这些原理更为生动有趣; 第二是与医药问题, 特别是人的疾病密切结合, 强调了生物化学在实践中的应用; 第三是为了便于读者学习, 对一些生物学和化学方面的基础知识作了简要介绍。例如第一章《分子和细胞》, 就是对生物分子和细胞的基本内容作概括的介绍。又如最后的附录是介绍孟德尔遗传学的最基本的内容。这样就可以使本课程在先修课很少的情况下也有可能开设。所以本书不仅便于医学、兽医方面的学生使用, 也便于化学、物理等方面的学生使用。生物学领域以外的科学工作者要想了解生物化学和分子生物学的基本内容, 本书也是一本可供选择的读物。

感谢北京大学出版社组织本书的翻译和进行有关编辑出版的各项工。感谢徐长法教授在百忙之中审阅译稿, 并提出了宝贵的修改意见。由于译者水平所限, 不妥之处在所难免, 敬希读者不吝指正。

译 者

2000 年秋于中关村

原 序

生物化学的教材很多。有几本综合性的生物化学教材堪称博大精深,图文并茂,是极有价值的参考书。实在不再需要这类教材了,我们的同行已经做了大量工作。从我们对本科生、研究生、医学和兽医学的学生进行生物化学教学的经验中,直接感觉到需要有一本像本书这样的教本。我们体会到学生们的时间有限,也听到他们的意见,希望教材能集中于本门学科的基本概念——把细节都忘记了也仍然会留在脑海中的概念和探讨问题的途径。教师的基本任务就是明确指出关键性的概念并且对学生作出清晰的解释。正如 Nicholas Allison 所说的 (Aldus Magazine, 1, 16) :

教育(education)一词来源于拉丁文 educere,从字面上讲,就是“引导”。虽然一般认为教师的工作就是灌输——向学生灌输知识、礼仪、行为——但多数大教育家都同意“引导”是真正的任务,要帮助学生发展求知的渴望,享受求知的成果,并且指导他们如何获得这些成果。教育的力量是无穷的。

在编写这本教材时,确认关键性的概念和摒弃多余的资料是首要的任务。在教学中我们曾作出过多次决定,有时候是勉为其难的决定,省略掉了不少曾对我们自己理解生物化学至关重要的细节和话题,这些内容或十分精彩,或引人入胜,是大多数作者舍不得省略的。《生物化学简明教程》是按照我们的深入理解编写的,重点在于讲解清晰,并辅以许多插图。这不是一本压缩的教材或仅仅是提要。篇幅少的原因是由于合乎逻辑地发展了那些对现代生物化学至关紧要的概念和探究方法。

我们也听到学生们的意见,他们欣赏联系到人类健康和疾病的生物化学内容,所以我们在讨论有关低等生物的有时是比较全面的内容的同时,也常常——虽然并不总是——举出有关人的例子。生物化学,包括分子生物学(像本书这样),既是实践现代医学所不能缺少的,又是发展未来医学的基础。我们有责任把生物化学与现代的生和死之间的关系告诉我们的学生和读者。

因为我们相信生物化学非常重要,必须要求许多学生学习这门课,所以我们试图把学习本书之前所必备的知识减到最少。因此列有一个孟德尔遗传学的简要附录,而第1章则对包括结构生物学和细胞生物学在内的关键性要点作了简短介绍,这些内容都是以后的讨论所必需的。不过,基本必备的有机化学知识对于理解特别是有关代谢作用的几章是有帮助的。集中注意力于概念并没有缩小本书包括的范围,本书既包括了传统的生物化学,又包括了近年出现的领域,即称为分子生物学的领域。本书封面上是一种称为糖皮质激素受体的蛋白质的部分模

型,这帧图说明上述两大领域的结合。在适当的细胞中,这种蛋白质把起源于该细胞以外的激素信号与细胞内的代谢联系起来,所利用的是存在于细胞中的遗传信息*。

可喜的是,有些学生会有好奇心并决定较深入地研究某些论题。为了鼓励这些学生,我们在每章之后列有参考资料目录。这些读物发展了本章中讲述的关键概念并且指出了寻找原始文献的途径。作为学习的补充手段,每章之后都有复习题以及关于答案的简短讨论。

大多数生物化学教材篇幅太大,内容太多,使学生望而却步,反而不能读完。《生物化学简明教程》却与此不同,它有助于学生加强自信心并且比较清楚地明确自己的学习目的,从而有助于学生的学习。

计算机是使三维结构具体化的独一无二的方法,也是用相互影响的卡通描述生物化学过程的独一无二的方式。我们之中的一位,Harry R. Matthews 为此设立了一个网站,网址为 <http://moby.ucdavis.edu/HRM>。

* 根据 X 射线结晶学得出的蛋白质结构模型,代表糖皮质激素受体的 66 个氨基酸的 DNA 结合域(Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. and Sigler, P. B. " Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. " *Nature* 352: 497-505, 1991.) 在第 5 章中,我们讨论了几种 DNA 结合蛋白的生化特性,其中之一就是封面上糖皮质激素受体的所谓“锌指”结构域。第 11 ~20 章描述了细胞中关键性代谢过程的控制,一个例子就是糖皮质激素受体在调节肝中葡萄糖生成方面的作用。最后,在第 29 章中,我们又讲述了糖皮质激素受体如何因激素的结合而被激活,起着真核生物中转录因子的作用,能够改变专一基因的表达。因此,《生物化学简明教程》不是把基本原理分为生物化学概念和分子生物学概念,而是利用整合起来的例子,如糖皮质激素受体,强调细胞水平上的关键性分子原理。

目 录

第 1 章 分子和细胞

1.1 引言	(1)
1.2 分子和细胞	(1)
(一) 亚细胞结构	(1)
(二) 超细胞结构	(4)
1.3 细胞过程需要 ATP 提供的 能量	(4)
1.4 分子间的力	(4)
(一) 静电的相互作用	(4)
(二) 氢键	(5)
(三) 位阻	(5)
(四) 范德华力	(5)
(五) 疏水的相互作用	(5)
1.5 小结	(5)
参考资料	(6)
复习题	(6)
参考答案	(6)

第 2 章 核酸

2.1 引言	(7)
2.2 结构	(7)
(一) DNA 和 RNA 的化学(一级) 结构	(7)
(二) 核酸的二级结构	(9)
(三) 核酸的三级结构	(12)
2.3 域和超螺旋	(13)
2.4 DNA 变性	(15)
(一) 复性	(15)
(二) 杂交	(17)
2.5 核酸的序列测定	(19)
2.6 用 Sanger 法测定 DNA 的序列	(20)
2.7 小结	(22)

参考资料	(22)
复习题	(22)
参考答案	(23)

第 3 章 蛋白质

3.1 引言	(24)
3.2 氨基酸	(24)
(一) 静电特性	(25)
(二) 疏水性	(26)
(三) 化学反应性	(27)
3.3 多肽	(27)
3.4 蛋白质结构	(29)
(一) 二级结构	(29)
(二) 功能基元和功能域	(33)
(三) 结构域	(34)
(四) 三级结构	(34)
(五) 四级结构	(35)
3.5 翻译后的修饰	(35)
3.6 蛋白质的纯化	(35)
(一) 柱层析	(36)
(二) 蛋白质的凝胶电泳	(37)

附录	(38)
附录 3.1 pK 和 pI 的定义	(38)
附录 3.2 与决定蛋白质结构有关 的力	(38)
附录 3.3 Henderson-Hasselbach 方程 应用举例	(39)
附录 3.4 氨基酸的三字母符号和 单字母符号	(40)
3.7 小结	(40)
参考资料	(40)
复习题	(41)
参考答案	(41)

	(五) 二磷酸甘油酯(BPG)	(64)
第4章 膜	6.3 氧的转运	(65)
4.1 引言	(一) 肌红蛋白中氧的贮存.....	(66)
4.2 脂类、磷脂和膜结构	(二) 由血红蛋白转运氧	(67)
4.3 膜中的蛋白质	(三) 从肺到肌肉线粒体的氧的	
4.4 膜转运蛋白	转运	(67)
4.5 与膜结合的受体和其他胞内的信号	(四) Hill 系数	(68)
分子	(五) 别构效应	(69)
4.6 小结	(六) 2,3-二磷酸甘油酯.....	(69)
参考资料	(七) Bohr 效应	(70)
复习题	6.4 成年人的正常血红蛋白	(71)
参考答案	(一) 发育中的血红蛋白	(72)
	(二) 胎儿的血红蛋白(HbF)	(72)
第5章 核蛋白复合体	6.5 血红蛋白疾病	(73)
5.1 引言	(一) -地中海贫血	(74)
5.2 染色体	(二) -地中海贫血	(74)
(一) 染色质	(三) 血红蛋白病	(74)
(二) 染色体蛋白质	6.6 小结	(76)
(三) 核小体	参考资料	(77)
(四) 染色质的高级结构	复习题	(77)
(五) 有活性的染色质的结构	参考答案	(78)
(六) 序列专一的 DNA-结合蛋白 ...		
5.3 核糖核蛋白复合体	第7章 酶引论	
(一) 细胞核的核糖核蛋白复合体	7.1 引言	(79)
.....	7.2 酶催化的反应的特点	(80)
(二) 核糖体	(一) 活性部位	(81)
(三) 信号识别颗粒	(二) 机制	(81)
5.4 小结	7.3 酶动力学	(83)
参考资料	(一) Michaelis-Menten 方程的不同	
复习题	形式	(85)
参考答案	(二) Michaelis-Menten 方程的理论	
	基础	(86)
第6章 以血红蛋白说明蛋白质的行为	(三) v_{max} 和 K_M 的含义	(86)
6.1 引言	(四) 酶不能改变平衡	(87)
6.2 血红蛋白	(五) 双底物反应	(87)
(一) 血红素	(六) Michaelis-Menten 方程的	
(二) 珠蛋白的结构	用途	(88)
(三) 结合氧的机制	7.4 同功酶和诊断	(88)
(四) 血红蛋白的四级结构.....	(一) 心肌梗塞的诊断	(89)

(二) 同功酶	(89)	(五) 共同途径	(113)
(三) 乳酸脱氢酶的同功酶	(90)	(六) 因子	(113)
(四) 肌酸激酶的同功酶	(90)	(七) 凝血酶原和凝血酶	(113)
(五) 临床实验室中酶的检测	(90)	(八) 纤溶酶原和纤溶酶	(116)
7.5 酶的命名	(90)	9.4 酶的可逆的共价修饰	(117)
7.6 酶的辅因子和辅酶: 维生素和 微量元素	(91)	(一) 共价修饰的放大	(117)
7.7 小结	(93)	9.5 小结	(118)
参考资料	(94)	参考资料	(118)
复习题	(94)	复习题	(119)
参考答案	(94)	参考答案	(119)
第 8 章 酶活性的非共价调节		第 10 章 细胞骨架和胞外基质中的蛋白质	
8.1 引言	(95)	10.1 引言	(120)
8.2 酶的调节	(95)	10.2 细胞骨架	(120)
8.3 酶的可逆抑制	(97)	(一) 微管	(120)
(一) 竞争性抑制	(97)	(二) 微管相关蛋白	(121)
(二) 反竞争性抑制	(98)	(三) 肌动蛋白丝	(122)
(三) 非竞争性抑制	(98)	(四) 中间丝	(124)
8.4 酶抑制剂应用举例	(100)	10.3 肌肉	(125)
(一) 毒物受害者的治疗	(100)	10.4 细胞与细胞的接触和胞外 基质	(126)
(二) 乙酰胆碱酯酶的抑制剂	(101)	(一) 细胞连接	(126)
8.5 代谢途径	(102)	(二) 胞外基质中的蛋白质	(127)
(一) 癌症化疗中 TTP 合成的抑制—— 代谢途径的一例	(102)	(三) 糖胺聚糖和蛋白聚糖	(130)
(二) 别构酶	(104)	10.5 小结	(130)
8.6 小结	(107)	参考资料	(130)
参考资料	(107)	复习题	(131)
复习题	(107)	参考答案	(131)
参考答案	(108)	第 11 章 糖酵解、柠檬酸循环和电子 传递系统	
第 9 章 酶活性的共价调节		11.1 引言	(132)
9.1 引言	(109)	11.2 热力学	(132)
9.2 消化作用中的酶原	(109)	11.3 代谢控制概论	(132)
9.3 血液凝固中的酶原	(111)	11.4 糖酵解	(134)
(一) 血小板	(111)	11.5 糖酵解的控制	(134)
(二) 凝固途径	(111)	(一) 转运	(134)
(三) 内在途径	(111)	(二) 己糖激酶	(135)
(四) 外在途径	(113)	(三) 葡萄糖激酶	(136)
		(四) 磷酸果糖激酶	(136)

(五) 丙酮酸激酶	(138)	13.5 葡糖异生的控制	(172)
11.6 糖酵解的细节	(138)	13.6 丙酮酸羧化酶	(173)
11.7 柠檬酸循环	(141)	13.7 PEP 羧激酶	(174)
(一) 丙酮酸脱氢酶	(141)	13.8 丙酮酸激酶	(174)
(二) 柠檬酸合酶	(143)	13.9 果糖-1,6-二磷酸酶(FBP 酶)	(176)
(三) 异柠檬酸脱氢酶	(143)	13.10 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P 酶) ...	(177)
(四) 柠檬酸循环的细节	(144)	13.11 小结	(177)
11.8 电子传递系统和氧化磷酸化 作用	(147)	参考资料	(178)
11.9 苹果酸和 -甘油磷酸穿梭	(150)	复习题	(178)
11.10 小结	(151)	参考答案	(179)
参考资料	(152)		
复习题	(152)		
参考答案	(154)		
第 12 章 糖原代谢、戊糖磷酸途径和 其他糖类的代谢		第 14 章 脂肪酸代谢: 分解代谢	
12.1 引言	(156)	14.1 引言	(180)
12.2 糖原代谢	(156)	14.2 脂质的贮存和周转	(180)
(一) 糖原的生物合成	(156)	(一) 三酰甘油的水解	(180)
(二) 降解	(157)	(二) 激活和 -氧化	(181)
(三) 糖原贮存方面的疾病	(158)	(三) 酮体	(183)
(四) 糖原合成的控制	(158)	(四) 奇数链脂肪酸	(186)
(五) 糖原降解的控制	(160)	14.3 小结	(187)
12.3 戊糖磷酸途径	(163)	参考资料	(187)
12.4 其他己糖	(164)	复习题	(188)
(一) 半乳糖代谢	(164)	参考答案	(188)
(二) 果糖	(165)		
12.5 小结	(166)	第 15 章 脂质代谢: 合成和转运	
参考资料	(167)	15.1 引言	(189)
复习题	(168)	15.2 由乙酰 CoA 合成脂肪酸	(189)
参考答案	(169)	(一) 将乙酰单位从线粒体移到细胞 溶胶中	(189)
第 13 章 葡糖异生作用		(二) 脂肪酸合成的控制	(190)
13.1 引言	(170)	(三) 乙酰 CoA 羧化酶	(192)
13.2 葡糖异生的途径	(170)	(四) 氧化作用与合成作用	(193)
13.3 甘油和氨基酸	(172)	(五) 脂肪酸的去饱和与延伸	(194)
13.4 由乙酰 CoA 不能异生葡萄糖	(172)	15.3 磷脂类和三酰甘油类(甘油三酯类) 的合成	(194)
		(一) 磷脂酰胆碱	(194)
		(二) 脂蛋白和脂质的转运	(195)
		15.4 胆固醇	(197)
		15.5 乙醇	(199)

15.6 小结	(199)	18.2 丙氨酸	(231)
参考资料	(200)	18.3 丝氨酸和苏氨酸	(232)
复习题	(200)	(一) 丝氨酸	(232)
参考答案	(201)	(二) 苏氨酸	(234)
第 16 章 激素		18.4 半胱氨酸	(234)
16.1 引言	(202)	18.5 胱氨酸	(235)
16.2 激素的相互作用	(202)	18.6 支链氨基酸	(235)
(一) 信号的转导	(202)	(一) 降解	(235)
(二) cAMP	(203)	(二) 支链酮酸脱氢酶的控制	(236)
(三) 肌醇三磷酸和二酰甘油	(205)	(三) 异亮氨酸	(236)
16.3 胰高血糖素	(207)	(四) 槭糖浆尿毒症	(236)
16.4 肾上腺素	(211)	18.7 赖氨酸	(237)
16.5 胰岛素	(214)	18.8 含硫氨基酸	(238)
16.6 小结	(216)	(一) 甲硫氨酸的分解代谢	(239)
参考资料	(217)	(二) 胱硫醚尿	(240)
复习题	(218)	(三) 高半胱氨酸的再度甲基化 ...	(240)
参考答案	(218)	18.9 脂肪转运因素	(240)
第 17 章 氨基酸代谢: 脲、谷氨酸、谷酰胺 和天冬氨酸		18.10 甘氨酸: 利用甘氨酸形成共轭产物 或其他产物	(242)
17.1 引言	(220)	18.11 肌酸: 肌酸的合成和肌酸酐排泄的 控制	(242)
17.2 氮素的排泄	(220)	18.12 小结	(244)
17.3 氨的产生	(221)	参考资料	(245)
17.4 转氨作用	(221)	复习题	(245)
17.5 脲循环	(223)	参考答案	(246)
(一) 脲循环的控制	(223)	第 19 章 芳香族氨基酸的代谢和蛋白质 的经济利用	
(二) 脲循环的代谢病	(224)	19.1 引言	(247)
17.6 精氨酸	(225)	19.2 组氨酸	(247)
17.7 谷氨酸	(226)	19.3 苯丙氨酸和酪氨酸	(248)
17.8 鸟氨酸	(227)	(一) 苯丙氨酸转变为酪氨酸	(248)
17.9 谷酰胺	(227)	(二) 苯丙酮尿	(248)
17.10 天冬氨酸	(228)	19.4 酪氨酸的分解代谢	(249)
17.11 小结	(228)	(一) 酪氨酸的其他产物	(250)
参考资料	(229)	(二) 儿茶酚胺的形成	(250)
复习题	(229)	(三) 帕金森(Parkinson 氏)病	(251)
参考答案	(230)	19.5 色氨酸	(252)
第 18 章 其他脂肪族氨基酸的代谢		(一) 5-羟基色氨酸及其衍生物 ...	(253)
18.1 引言	(231)		

(二) 单胺氧化酶	(254)	(二) 人类的基因组	(277)
(三) 褪黑素	(254)	(三) C-值悖理	(278)
19.6 总论:蛋白质的经济利用	(254)	21.3 细胞器中的基因组	(278)
19.7 小结	(255)	21.4 真核生物的染色体	(279)
参考资料	(256)	(一) 染色体的组织	(279)
复习题	(256)	(二) 端粒	(279)
参考答案	(257)	(三) 着丝粒	(280)
第 20 章 嘌呤、嘧啶和血红素的代谢		21.5 真核基因的组织	(280)
20.1 引言	(258)	21.6 DNA 中的重复序列	(281)
20.2 嘌呤	(258)	(一) 二核苷酸和三核苷酸的	
(一) IMP 的形成	(258)	重复	(281)
(二) 腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸的		(二) 短的和长的散布元件	(282)
形成	(260)	21.7 基因组作图	(282)
(三) 嘌呤合成的控制	(261)	(一) 限制性片段长度多态性	
(四) 嘌呤的降解	(262)	(RFLP)	(282)
(五) 痛风	(264)	(二) 人类基因组计划	(284)
20.3 嘧啶	(264)	(三) 人 Y 染色体的物理作图	(285)
(一) 嘧啶的合成	(264)	附录 21.1 利用专一的修饰 DNA 的	
(二) 嘧啶合成的控制	(265)	酶,以操作 DNA	(286)
(三) 嘧啶的降解	(266)	21.8 小结	(287)
(四) 胸嘧啶的形成	(267)	参考资料	(288)
(五) 抗代谢物	(267)	复习题	(289)
20.4 血红素	(268)	参考答案	(290)
(一) 血红素合成的控制	(270)	第 22 章 DNA 复制	
(二) 血红蛋白的维持	(271)	22.1 引言	(291)
(三) 卟啉的非正常合成和血卟		22.2 DNA 复制概要	(291)
卟啉病	(271)	(一) DNA 复制是半保留的	(291)
(四) 血红素的降解	(272)	(二) DNA 复制是双向进行的	(292)
(五) 黄疸	(273)	(三) 复制叉有前导链和后随链 ...	(293)
20.5 小结	(273)	22.3 DNA 聚合酶	(294)
参考资料	(274)	(一) DNA 复制的酶学	(294)
复习题	(275)	(二) DNA 聚合酶有校正活性	(296)
参考答案	(275)	(三) 细菌和哺乳动物 DNA 聚合酶	
第 21 章 基因组的组织		的相似性	(297)
21.1 引言	(276)	22.4 复制叉的移动需要一种多蛋白	
21.2 基因组的大小	(277)	的复合体	(298)
(一) 原核生物的基因组	(277)	(一) 复制叉上的各类蛋白质	(299)
		(二) 多蛋白复合体称为复制体 ...	(300)

22.5 DNA 复制的起点 (300)	的基因片段组成 (316)
(一) 大肠杆菌中的复制起始点 ... (301)	(二) V-D-J 的重组产生抗体的
(二) 真核生物中的复制起始点 ... (302)	多样性 (317)
(三) 酵母中自动复制的序列 (302)	23.8 由同源重组实现基因寻靶 (318)
22.6 DNA 复制酶有许多用途 (303)	附录 23.1 利用同源重组作为基因寻靶
(一) DNA 的放射性标记 (303)	的方法 (318)
(二) 互补 DNA(cDNA) 的合成 ... (303)	23.9 小结 (320)
(三) DNA 测序 (304)	参考资料 (321)
(四) 选择性的 DNA 扩增 (304)	复习题 (322)
附录 22.1 利用 Taq DNA 聚合酶的	参考答案 (323)
聚合酶链反应(PCR) 及	
其应用 (304)	
22.7 小结 (305)	
参考资料 (305)	
复习题 (306)	
参考答案 (307)	
第 23 章 DNA 的修复和重组	第 24 章 RNA 合成
23.1 引言 (308)	24.1 引言 (324)
23.2 突变是 DNA 破坏的结果 (308)	24.2 基因转录需要依赖于 DNA 的 RNA
(一) 脱嘌呤作用、脱氨作用和胸腺嘧	聚合酶 (324)
啶二聚体 (308)	(一) 大肠杆菌的聚合酶全酶是多亚基
(二) 自然选择需要基底水平的 DNA	的蛋白质 (324)
破坏 (308)	(二) 真核生物有三种不同的 RNA
23.3 DNA 修复的机制 (310)	聚合酶全酶 (325)
(一) 核苷酸切除修复 (310)	24.3 RNA 合成的三阶段: 起始、延伸和
(二) 错配修复 (311)	终止 (326)
(三) 碱基切除修复 (312)	(一) 大肠杆菌中转录的起始 (326)
(四) 直接修复 (313)	(二) 转录的延伸阶段 (327)
23.4 DNA 重组的两种机制 (313)	(三) 转录的终止机制 (327)
23.5 交换频率和基因图 (313)	24.4 某些抗生素是 RNA 合成的
23.6 同源重组的分子机制 (313)	抑制剂 (328)
(一) 第 1 步: 链的侵入和分支的	(一) 放线菌素 D (328)
移动 (314)	(二) 利福霉素 (328)
(二) 第 2 步: 异构化作用和 Holliday	24.5 真核生物的转录起始需要大的多
连接体的分解 (315)	亚基复合体 (329)
23.7 免疫球蛋白基因的位点专一	(一) RNA pol 起始复合体中的蛋
重组 (315)	白质组分 (329)
(一) 免疫球蛋白基因由可变的和恒定	(二) RNA pol 中有磷酸化的羧基
	末端重复域 (329)
	24.6 可将真核生物基因的启动子分为
	几类 (330)
	24.7 TATA 结合蛋白(TBP) 是通用的
	真核转录因子 (331)
	附录 (334)
	附录 24.1 定点诱变 (334)

附录 24.2 序列专一的蛋白质-DNA 相互作用的分析	(335)	26.1 引言	(356)
24.8 小结	(336)	26.2 蛋白质合成概要	(356)
参考资料	(336)	26.3 遗传密码以三联体为基础	(358)
复习题	(338)	26.4 密码子-反密码子配对中的摆动 位置	(360)
参考答案	(338)	26.5 根据 cDNA 序列预测可读框 ...	(360)
第 25 章 RNA 加工		26.6 分子生物学中心法则的例外 ...	(361)
25.1 引言	(339)	26.7 tRNA 是蛋白质合成中的分子 连接物	(362)
25.2 RNA 剪接机制大多需要 RNA 催化 的两步反应	(340)	26.8 专一的氨酰-tRNA 合成酶将氨基 酸连接到 tRNA 上	(363)
(一) 第 I 类内含子的自剪接由外面的 鸟核苷介导	(341)	26.9 多肽合成的三个阶段	(364)
(二) 第 II 类内含子的自剪接由内部的 腺苷酸残基催化	(341)	(一) 起始	(364)
(三) hnRNA 的剪接需要 snRNP 剪接 体复合体	(342)	(二) 延伸	(367)
25.3 核酶是位点专一的内切核糖 核酸酶	(344)	(三) 终止	(368)
25.4 rRNA 和 tRNA 前体转录物的 加工	(345)	26.10 蛋白质合成的翻译控制	(369)
(一) rRNA 加工	(345)	26.11 蛋白质合成的抑制剂	(370)
(二) tRNA 加工	(346)	26.12 小结	(371)
25.5 加工过的 mRNA 有一 5'-甲基鸟苷 的帽和一 3'-聚腺苷酸的尾	(347)	参考资料	(372)
25.6 mRNA 加工可由剪接反应和聚腺 苷酸化作用调节	(348)	复习题	(373)
25.7 RNA 降解的机制和 5' 和 3' 外切核酸 酶有关	(349)	参考答案	(374)
附录 25.1 利用重组 DNA 技术鉴定 mRNA 转录物	(351)	第 27 章 蛋白质到位和周转	
(一) 互补 DNA(cDNA) 的分离	(351)	27.1 引言	(375)
(二) 用 Northern 印迹法分析 mRNA	(352)	27.2 信号肽序列指导蛋白质到位 ...	(375)
25.8 小结	(352)	27.3 通过细胞质的蛋白质到位	(377)
参考资料	(353)	(一) 膜的胞质面	(377)
复习题	(354)	(二) 线粒体	(377)
参考答案	(355)	(三) 细胞核	(377)
第 26 章 蛋白质合成		(四) 过氧化酶体	(377)
		27.4 通过膜区室的蛋白质到位	(378)
		(一) 高尔基体	(379)
		(二) 溶酶体	(380)
		(三) 分泌小泡	(380)
		(四) 质膜	(380)
		27.5 蛋白质周转	(380)
		(一) 大肠杆菌中的蛋白质降解 ...	(381)
		(二) 依赖于遍在蛋白质的蛋白质降解 途径	(381)

(三) 蛋白体是细胞中处理垃圾的场所	(382)	(一) 类固醇受体以同二聚体的形式起作用	(405)
(四) PEST 序列	(383)	(二) 核受体以异二聚体的形式与 DNA 结合	(407)
27.6 小结	(383)	29.5 磷酸化作用的级联将调节信号传递给细胞核	(408)
参考资料	(384)	(一) 依赖于 cAMP 的激酶 A 诱导 CREB 激活剂的功能	(409)
复习题	(385)	(二) 干扰素激活 STAT 在核中的定位和 Jak 酪氨酸激酶	(410)
参考答案	(385)	29.6 染色质结构是基因表达的重要调节者	(411)
第 28 章 原核生物基因调节的机制		29.7 CpG 二核苷酸的甲基化对转录有抑制作用	(412)
28.1 引言	(386)	附录 29.1 可用瞬时共转染试法研究体内的转录	(412)
28.2 转录因子可能起转录激活剂或阻抑物的作用	(386)	29.8 小结	(413)
28.3 大肠杆菌中 lac 操纵子的转录控制	(389)	参考资料	(414)
(一) IPTG 通过使阻抑物失活而使 lac 操纵子去阻抑	(391)	复习题	(415)
(二) 分解代谢基因-激活蛋白(CAP)对 lac 操纵子起正调节作用	(392)	参考答案	(416)
28.4 AraC 既是阿拉伯糖操纵子的阻抑物, 又是激活剂	(394)	第 30 章 动物病毒的分子生物学	
28.5 细胞中色氨酸的浓度对 trp 操纵子的双重控制	(396)	30.1 引言	(417)
(一) Trp 阻抑物结合 DNA 的活性由色氨酸控制	(397)	30.2 利用无限增殖化的细胞系研究动物病毒	(417)
(二) trp 多顺反子 mRNA 转录延伸的弱化控制	(397)	30.3 病毒利用细胞膜的特性出入宿主细胞	(418)
28.6 小结	(398)	30.4 四大类动物病毒	(420)
参考资料	(398)	30.5 RNA-RNA 病毒: 脊髓灰质炎病毒	(420)
复习题	(399)	(一) 脊髓灰质炎 RNA 被翻译成一条多肽	(420)
参考答案	(400)	(二) 脊髓灰质炎病毒基因组的复制	(422)
第 29 章 真核生物基因调节的机制		30.6 DNA-DNA 病毒: SV40 病毒和腺病毒	(422)
29.1 引言	(401)	(一) SV40 病毒曾用于 DNA 复制和细胞转化的研究	(423)
29.2 真核生物基因表达的调节需要许多种蛋白质	(401)	(二) 腺病毒利用复杂的转录和 RNA 剪接策略	(424)
29.3 多数真核生物的转录调节物中有独立的功能域	(403)		
29.4 由依赖于配体的类固醇/核受体控制转录	(404)		

30.7 DNA-RNA 病毒: 乙型肝炎病毒	基因	(439)
毒	(四) 癌抑制基因中的隐性突变也是	
30.8 RNA-DNA 病毒: 反转录病毒	生癌的	(441)
毒	31.5 癌基因产物改变多个控制生长的	
30.9 人类基因疗法中病毒表达载体的使用	步骤	(443)
30.10 小结	31.6 癌基因 ras 和 p53 的突变极为	
参考资料	常见	(443)
复习题	(一) Ras 将生长因子的信号传递与	
参考答案	细胞内的一连串磷酸化作用联系起来	
	起来	(444)
	(二) p53 的正常功能是当 DNA 被破	
	坏时抑制细胞周期	(446)
第 31 章 癌基因和人的癌症	31.7 小结	(448)
31.1 引言	参考资料	(449)
31.2 DNA 的破坏是癌发生的先决条件的早期证据	复习题	(450)
31.3 在恶性阶段之前失控的细胞生长有几个阶段	参考答案	(451)
31.4 癌的发生: 好的基因变坏了	附录 孟德尔遗传学	(452)
(一) 复合反转录病毒中有癌基因	附录 词汇简释	(453)
因	附录 汉英名词对照表	(462)
(二) 人的某些癌细胞中有显性癌基因	附录 英汉名词对照表	(475)
基因		
(三) 可在染色体的断裂点上找到癌		

第 1 章 分子和细胞

1.1 引 言

分子和离子是所有生物和它们所吃食物的基本构件,食物被摄取后会被分解为简单的分子,但在被利用之前不会发生进一步的变化。分子可以贮藏能量,可以使能量与功相互转变,可以是体内的信号,也可以是光或气味等外部信号的受体。现代科学的发现正在导致解决人类疾病的重要的新途径,包括合理药物的设计和基因疗法。药物的范围很广,从碳酸钠丸剂到组织纤溶酶原激活剂这样的合成蛋白质,后者是用于帮助人体溶解血栓的。绝大多数药物都是分子,我们现在学会制造大分子复合体——合成的病毒——来增强药物治疗的专一性和效率。因此,除实际应用上的价值以外,生物分子的研究还使我们能够洞察我们如何发挥进一步的作用。生物化学(和分子生物学)研究的就是生物体内能在分子水平上了解的那些过程。

本章介绍有关细胞生物学和分子间力的重要的必须先学习的内容,为理解以后的内容打下必要的基础。对于后面几章,遗传学更为重要,附录中有遗传学基础。

1.2 分子和细胞

分子是由共价键——共用电子云——连在一起的一组特定的原子。人体内的分子可能是相当简单的(如氧分子 $O=O$),也可能是非常复杂的(如巨大的糖蛋白),它使细胞受不到机械的冲击。生物分子主要是通过非共价相互作用彼此互相影响。一般来说,个别的这种相互作用是微弱的和不专一的,但是生物体却利用这些看起来微不足道的力量产生了异乎寻常的专一性和强大的力量。许多个别的相互作用以高度专一的方式集中在一起,使生化反应的过渡态稳定化,传递精巧细致的信息,并生成复杂的大分子结构和细胞结构。

科学家们喜欢把研究对象分类,作为了解它们的第一步。对生物的研究也不例外,像人体这样复杂的生物则要用一系列越来越复杂的结构进行描述,从分子起,以下依次是大分子、细胞、器官或组织、整个生物体,然后是各类生物之中或之间的相互关系以及生物与环境之间的相互关系。细胞是大分子结构的集合体,即分子的集群,细胞包括包被着整个细胞的质膜以及其中的各种结构,这些结构维持着细胞的生命,使之能够繁殖,并进行各种具体的细胞功能。

(一) 亚细胞结构

亚细胞结构属于细胞生物学的范畴,但是我们需要了解其概要,以便把它们与生物化学和分子生物学的研究联系起来。细胞可分真核细胞和原核细胞。真核细胞存在于从酵母到人的高等生物中,其特点是有特殊的亚细胞结构细胞核,核有核膜和发生有丝分裂的染色体。细菌和其他简单的生物为原核细胞;它们没有真核细胞中的那么多结构,特别是没有细胞核。在所有的细胞中,质膜之内的东西称为细胞质。细胞质是非常浓的小分子和大分子的水溶液,在哺乳动物细胞中,此溶液与一种动态的结构——细胞骨架——裹在一起,细胞骨架给细胞内提供了一个三维的形状和秩序。

在真核细胞的细胞质内,细胞核是最为显著的亚细胞结构或细胞器(图 1.1 和 1.2)。细胞核有它自己的膜,即核膜,围绕着核质。核质中有:

- (1) 核纤层,在核膜之下
- (2) 核基质,起着组织核内的染色体的作用
- (3) 核仁,核糖体 RNA 分子在其中合成(第 24 章)

细胞核既是细胞中几乎所有核酸合成的部位(第 24 章),又是细胞中大部分遗传物质的存在部位。在本书的分子生物学部分(第 21 ~31 章)中,我们将会了解到,在把转录(RNA 合成)从翻译(蛋白质合成)中分开方面,细胞核怎样起着关键的作用。

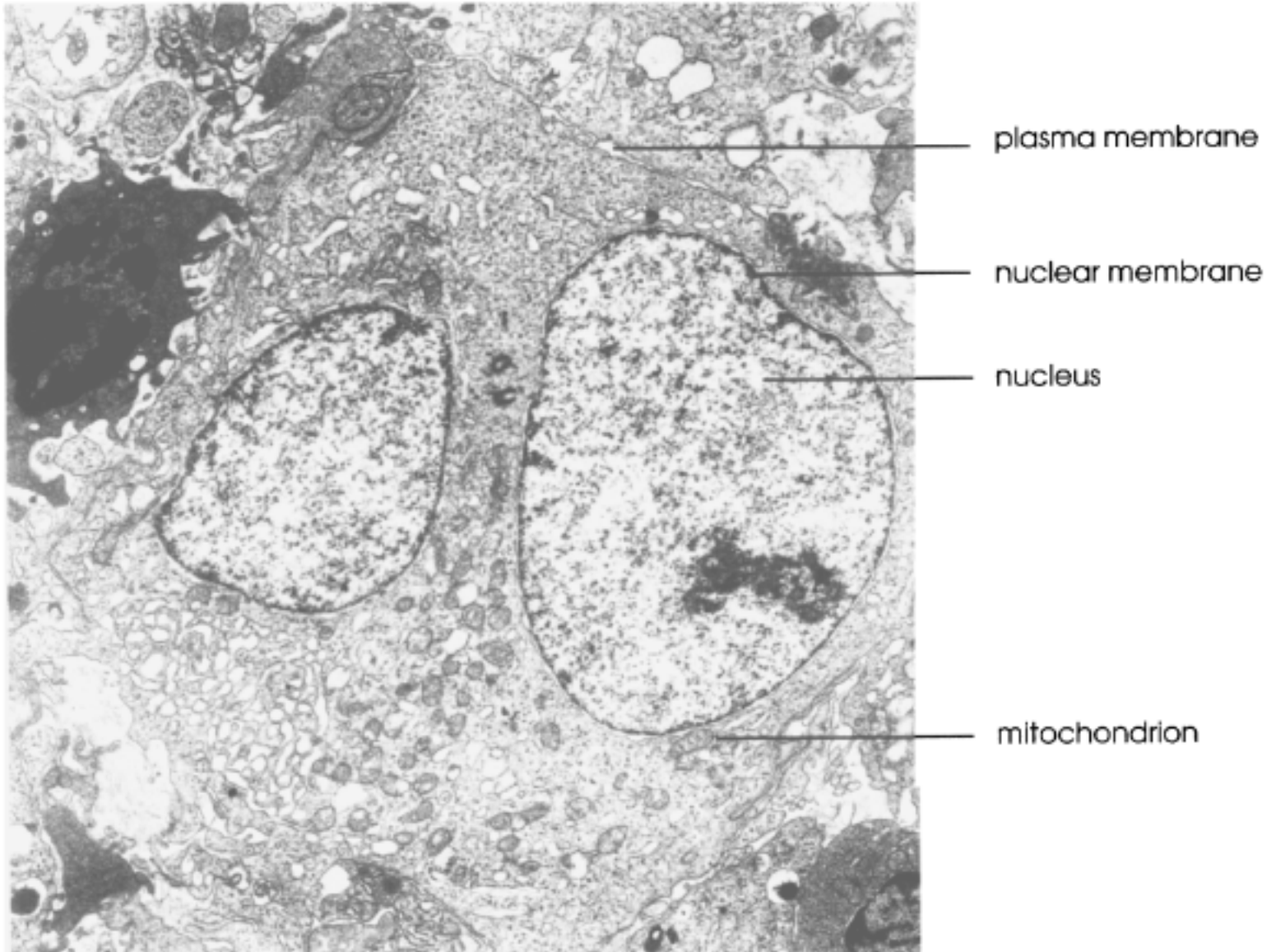


图 1.1 真核细胞的电子显微照片

此细胞为哺乳动物的巨核细胞,即存在于血液中的细胞,它含有如图 1.2 中所示意的真核细胞中通常存在的细胞器(这种特殊的细胞有两个细胞核——巨核细胞的共性——大多数类型的细胞中只有一个细胞核,这说明细胞结构的多样性以及相似性)。

核膜与内质网膜(ER)是相连的,ER 是一种膜结构,它把细胞质分隔成拓扑学上不同的两个区域。ER 的一面是细胞的真正的“内部”;另一侧称为“腔”,在拓扑学上是细胞的外部。从这个意义上说,分子就可以在拓扑学上相等的两个区域之间移动或被转运而不必跨过膜(第 4 章)。这样,在细胞质中合成的蛋白质就可以在整个细胞质中自由扩散,而不通过一种膜就不能到细胞外面或进入细胞核。蛋白质在细胞质中通过 ER 或通过核膜有专门的机制。把细胞中的每一种分子放在适当的亚细胞区室中对于细胞中执行有序的功能有着关键的作

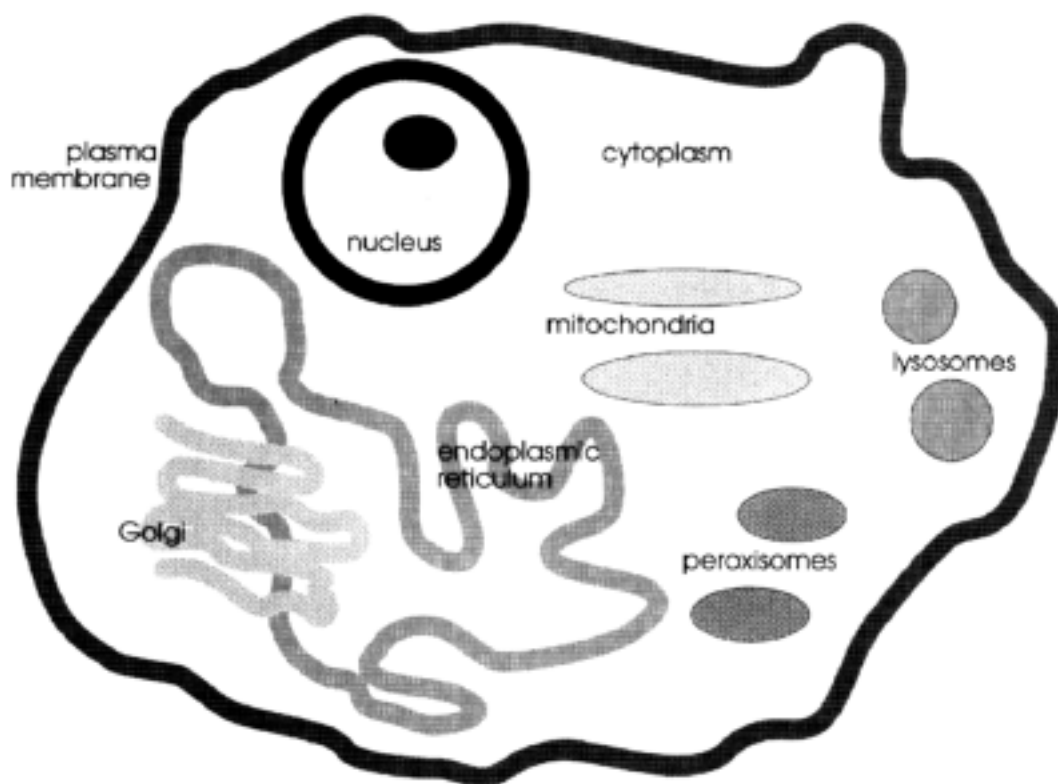


图 1.2 真核细胞及其主要细胞器示意图

虽然各种细胞在外观上差别很大,但生物体内的大多数细胞都有图中所列的细胞器。

用。

线粒体在拓扑学上是独立的,它们存在于细胞质中。它们与细胞质合作,利用分子态氧去“燃烧”由食物产生的分子,产生腺苷三磷酸(ATP),为细胞活动提供能量。在其他特化的细胞中还有其他亚细胞器,如植物细胞中的叶绿体。

电子显微术揭示了更小的细胞器,如核糖体(蛋白质合成的部位)或中心粒(细胞分裂的组织者),这些都是大分子结构的实例。当前的研究还说明,可能还有许多其他大分子结构,常常是高度动态的,例如受体蛋白激酶与其底物的组装体和衔接分子,即细胞骨架或核骨架的一种组分。

细胞结构是动态的。当一个细胞分裂为两个子细胞时——这是细胞增殖过程的一个部分——发生的变化最剧烈。真核生物的细胞分裂包括有丝分裂过程,此时核膜溶解,染色体凝聚并分为两组,而且围绕着这两组染色体重新形成核膜。最后,在胞质分裂的过程中,细胞膜在中间收缩,呈“8”字的形状,两半个分开,形成两个独立的细胞。显然在显微镜下,这是看得见的剧烈的变化,但分裂本身不过是一种分子变化的循环过程中的一部分,这个过程就是细胞为分裂作准备然后进行分裂(图 1.3)。

分裂产生的新细胞进入细胞周期中称为 G1 的阶段,对于细胞增殖的控制大多发生在这一阶段。当细胞接受了离开 G1 阶段的信号时,它就过渡到 S 阶段,这时染色体复制。复制完成,细胞就进入 G2 阶段,并为有丝分裂作好分子准备,然后发生分裂。虽然关键性的控制点通常在 G1 阶段,但在某些细胞中从 G2 阶段过渡到有丝分裂却是关键的控制点,而在另一些细胞中则没有 G1 阶段。一般来说,细胞周期中阶段的顺序是非常保守的。

(二) 超细胞结构

在足够复杂的生物体内,细胞组装成器官或器官系统,包括血液、脑、肝、肾、皮肤和许多其

他器官。虽然很难在分子水平上讨论器官,我们还是讨论到分子在器官内和器官间提供通讯的方式。

1.3 细胞过程需要 ATP 提供的能量

细胞服从热力学第二定律,必须继续不断地消耗能量以维持其有序的结构和进行其特有的功能。除去地热之外,我们的能量都来自太阳。热可以直接被吸收,从而减轻生物体内生热系统的负担,但生物体所需的能量大部分是通过植物的光合作用由太阳能转化成的化学能。当动物吃植物并吸入氧时,所获得的化学能就变成了细胞所能利用的形式。

体内能量的产生通常有几个阶段。如前所述,食物首先被消化为简单的分子,然后这些高能分子——大多是单糖——通过血液被运送到身体的各个细胞。

多余的能量则由个别的细胞或超细胞的贮能系统所贮存,在需要时,则以酮体的形式再回到血流中去。细胞吸收糖或酮体,并利用分子态氧合成 ATP,可以把 ATP 看做是细胞中的能量通货。ATP 是在细胞质和线粒体中合成的,并在需要时在整个细胞中被利用。这些过程在第 11 章中有较详细的讨论。

细胞中所进行的许多反应在能量上都不是有利的,也就是说,产物所含的内能比起始化合物中的多。细胞把这种反应与 ATP 的水解相偶联,于是总的最后状态(包括已水解的 ATP)中的内能就比总的起始状态(包括 ATP)中的内能少,这样就符合了热力学第二定律。

1.4 分子间的力

按照定义,作用于分子间的力是非共价的。关于分子间力的充分讨论完全超出了本书的范围,但其中的一些显著特点对于了解大分子的结构和相互作用却是重要的,而这些结构和相互作用又是生命的分子观点的核心。此外,作用于一个别大分子的相邻部分之间的非共价的力又是决定其最佳形状的因素。不同的分子之间的力是分子间的力;作用于一个分子内部同样的力是分子内的力。

主要的非共价的分子力有:

- (1) 静电的相互作用(亦称离子键或盐键)
- (2) 氢键
- (3) 位阻
- (4) 范德华引力
- (5) 疏水的相互作用

(一) 静电的相互作用

静电的相互作用发生在带电荷的化学基团之间,如离子间的相互作用,同电荷相斥,异电荷相吸。这种相互作用很强,但与两种电荷间距离的平方成反比。在某些情况下,虽然分子中没有完全带电荷的基团,但可能发生部分的电荷分离——如 α -螺旋中(第 3 章)——从而形成

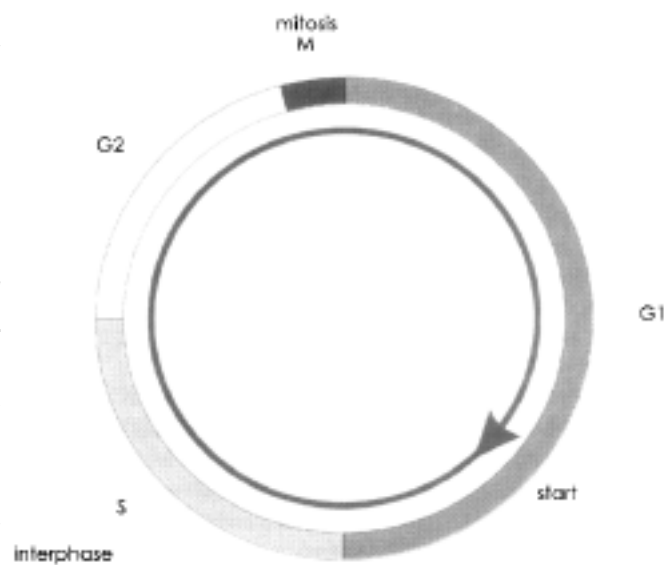


图 1.3 细胞周期大意

细胞周期始于 G1 阶段;然后按顺时针方向通过 S 阶段、G2 阶段和有丝分裂;然后细胞一分为二,再进入 G1 阶段。

电偶极子, 它与其他电荷或偶极子发生静电相互作用。静电相互作用对环境非常敏感。水环境就会使它变弱, 小的离子(如 Na^+ 或 Cl^- 存在)更会使它变弱。因此, 盐浓度的改变, 包括二价离子 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 浓度的改变都会对大分子的结构发生重大的影响。

(二) 氢键

氢键是非共价的相互作用, 是一个氢原子为两个别的原子所共用, 如 $\text{>N}\rightarrow\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}<$ 中, 氢为氮和氧原子所共用。在这个例子中, 被共用的氢与氮结合得较近, 因此氮是氢的供体, 而氧是氢的受体。在其他例子中, 氧原子也可像氮原子一样, 起着氢供体的作用, 而氧或氮则起着氢受体的作用。氢键有最适长度, 而且是有方向的, 共用的氢在连接供体原子和受体原子的直线上是最佳状态。因此, 有关的原子必须彼此处于精确的相互位置上, 使得氢键具有重要的特征, 从而确定分子相互作用的专一性。

一个氢键的能量和体温下的热能差不多, 所以氢键是弱的, 易被破坏。不过, 典型的大分子形成许多氢键, 它们叠加起来的作用是决定性的。大分子可能以不同的形状或构象存在, 而能量类似。氢键的形成可能在决定哪种构象最佳方面是主要因素。

(三) 位阻

最最强的非共价相互作用是当两个原子靠得足够近时, 两者的电子云直接相互作用时所发生的斥力。这种斥力非常强, 但当两个原子相互移开后, 就会迅速减弱。这种力——常称为位阻——防止任何无共价键连接的原子间发生空间的交叠。

(四) 范德华力

范德华(van der Waals)力存在于靠得近但又不交叠的原子之间, 是一种弱的吸引力。虽然个别的范德华力微弱, 但生物大分子一般是密实的结构, 其中许多原子都靠得很近。这些范德华力的总和就成为一个重要因素, 可以维持生物结构的稳定。

(五) 疏水的相互作用

疏水的相互作用将在第 3 章中联系蛋白质的结构进行较详细的解释。简而言之, 不能形成氢键的原子或原子团在水溶液中趋于聚集在一起, 使它们在水中暴露得最少, 水会破坏它们的结构。

1.5 小 结

(1) 生物体是由一系列从简单到复杂的结构组成的, 最小的单位是分子——有些离子也是——然后依次是大分子、大分子复合体、细胞器、细胞、组织和器官、完整的生物体和生物类群。

(2) 细胞分为原核和真核两类。原核细胞, 如细菌的细胞, 无独立的细胞核。真核细胞较复杂, 如人体的细胞。

(3) 真核细胞有许多种独立的细胞器。线粒体是合成 ATP 的部位; 细胞核含有真核细胞中的大部分核酸, 包括染色体; 内质网把细胞分为拓扑学上不同的区域。

(4) 细胞需要能量以维持其有序的状态。这些能量大多以 ATP 的形式被利用, ATP 迅速被分解, 释放出细胞所需要的能量。

(5) 从根本上说, 分子是由共价键连在一起的。

(6) 分子间的相互作用是细胞执行其功能的关键, 这种相互作用是通过许多种小的非共价力而发生的, 这些力包括静电相互作用、氢键、位阻、范德华力相互作用和疏水相互作用。

参 考 资 料

Learning Biochemistry, Richard F. Ludueña, 1995, Wiley, New York, NY.

Introduction to Cell and Molecular Biology, Stephen L. Wolfe, 1995, Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA.

Medical Cell Biology, Steven R. Goodman, 1994, J. B. Lippincott, Philadelphia, PA.

Principles of Protein Structure, G. E. Schultz and R. H. Schirmer, 1979, Springer, New York, NY.

Principles that determine the structure of proteins, C. Chothia, 1984, Annu. Rev. Biochem., 53: 537 ~572.

复 习 题

1. 与大分子结构有关的下列说法中, 哪一条是错误的?

- a) 共价键是有方向的, 平均长度是固定的。
- b) 氢键是有方向的, 平均长度固定。
- c) 静电的相互作用或是相互吸引的, 或是相互排斥的。
- d) 疏水的相互作用是有方向的, 也有固定的平均长度。
- e) 位阻相互作用与距离关系极大。

参 考 答 案

1. d 是错误的。疏水的相互作用排斥水, 而不是提供一种专门的“键”, 像共价键、氢键或静电的键那样。位阻的相互作用与距离关系极大, 因为它是当两个原子要在空间上相互交叠时发生的极强的斥力, 当原子互相离开时, 实际上就没有位阻的相互作用了。

第 2 章 核 酸

2.1 引 言

脱氧核糖核酸(DNA)是所有细胞的遗传物质——基因就是由 DNA 组成的。过去 30 年中,我们对 DNA 的了解、操作 DNA 的能力都有了很大的进展,这导致了生物技术工业的兴起和在新的水平上理解细胞生物学的开始。技术上的进步已经引来了重要的应用(例如,人生长因子、组织纤溶酶原激活剂,新的临床诊断工具和植物的基因工程),而基因疗法已处在临床试验阶段。但是我们仍然不过是处于应用这些强有力的知识的初始阶段。在下一个 30 年中,我们将会看到,把 DNA 的知识用于临床及其他问题方面的同样显著的突飞猛进。我们利用这些新的工具已经得到了许多新的知识并且提出了许多新的概念。不过,这样说大概是公正的:我们不过是已经开始了这一新水平知识的探索,分子遗传学及其在诸如癌症这样的疾病方面的应用只是刚刚露出曙光,还需要多年的坚持不懈但会激动人心的工作,这些工作包括但不限于人类基因组计划中关于基因和 DNA 序列的研究。核糖核酸(RNA)与细胞中许多不同的过程有关,这些过程都与基因中的信息转变为有活性的基因产物有关。

2.2 结 构

(一) DNA 和 RNA 的化学(一级)结构

20 世纪 50 年代 DNA 的全部化学结构导致了对于遗传过程的一条简单概念的理解。我们目前正在开始更详细地了解 DNA 的结构与功能,而人类基因组计划(第 21 章)则打算在 21 世纪初得出人 DNA 的完全的化学描述。

DNA 和 RNA 都是核酸,也就是核苷酸的长链或多聚体。DNA 或 RNA 中的每一个核苷酸都是由三种化学单位组成的:这就是碱基、糖和磷酸根(图 2.1)。一个碱基加上糖称为核苷。RNA 中的糖为 5-碳分子,即核糖,以环式结构存在;DNA 中核糖的 2-碳被还原,失去一个氧而成为脱氧核糖。

DNA 中的碱基是嘌呤(腺嘌呤或鸟嘌呤)或嘧啶碱(胞嘧啶或胸嘧啶),不过也有某些修饰碱基,如 5-甲基胞嘧啶。核糖核酸也和 DNA 一样,含有腺嘌呤、胞嘧啶和鸟嘌呤,但胸嘧啶则通常为尿嘧啶所取代,尿嘧啶没有胸嘧啶中的 5-甲基(图 2.2)。在某些类型的 RNA 中,修饰碱基是常见的,与 DNA 中不同。

在 DNA 和 RNA 中,碱基都是通过氮而连接在糖的 1-碳上,形成核苷。核酸中一个核苷的 5-碳与下一个核苷的 3-碳是通过磷酸根而连接起来。因此,核酸是有方向的:当将游离的 5-OH

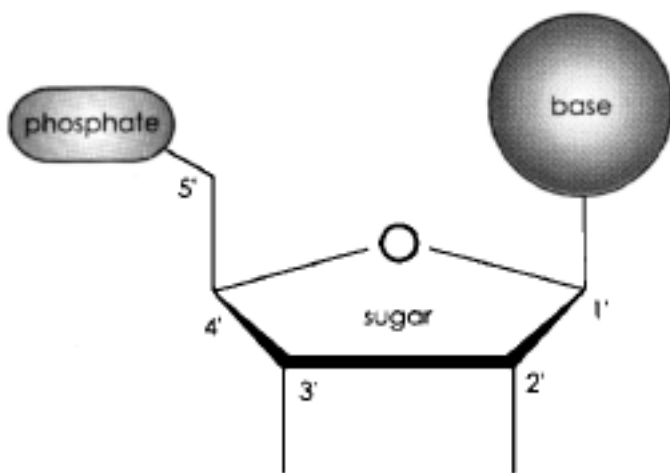


图 2.1 DNA 和 RNA 的化学结构
示意出核苷酸的 3 个组分——碱基、
糖和磷酸基团。

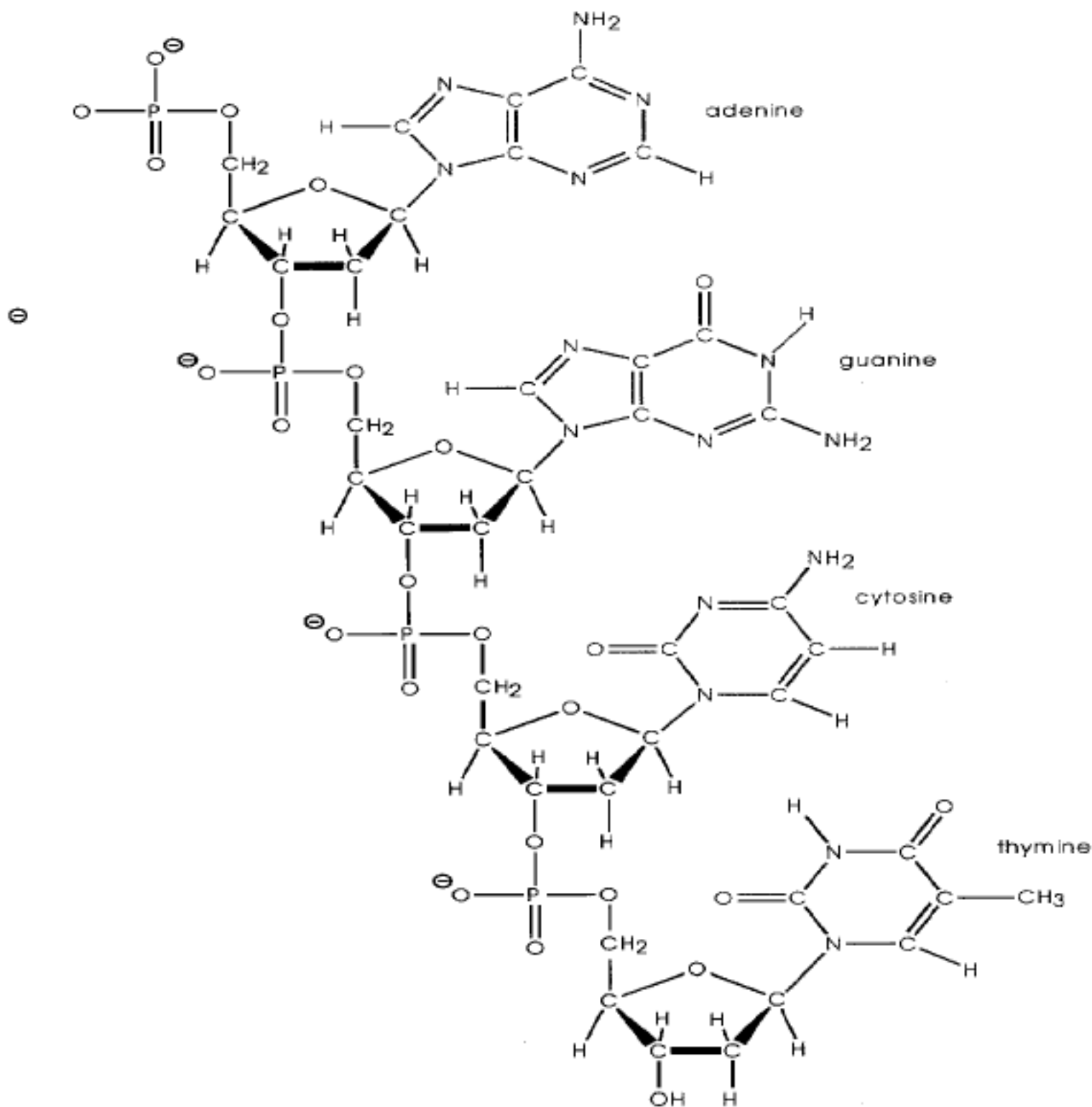


图 2.2 多核苷酸中残基的化学结构

图示为 4 个碱基组成的一条 DNA 单链的化学式(碱基在右侧,均列有名称;左侧为糖-磷酸酯主链)。

画在左侧而将游离的 3 -OH 画在右侧时,链的方向是由左侧的 5 到右侧的 3 。多聚体的主链是由糖磷酸酯形成的,碱基则形成侧链,如图 2.2 所示。

真核 DNA 中的某些碱基序列很简单,即多个级联的重复的短序列,如人染色体的末端(端粒)中的重复序列 TTAGGG。高度重复的元件可以解释这类短序列的存在,例如分散在人的整个基因组中的长度为 123 个碱基对的称为 Alu 序列就有上百万个重复的拷贝。还有其他序列,如专一的与蛋白质结合的部位,还有可能经常存在的序列,如靠近许多基因的起点的 TATAA 序列,都是简单的序列。不过,多数序列是复杂的,反映了蛋白质序列的复杂性或进化的变化中的随机本质。

人类基因组包括了存在于人体内的一整套染色体中的信息,人共有 24 条染色体(22 条常

染色体和 2 条性染色体; 染色体在第 5 章中讨论), 含有约 30 亿个碱基对(bp)。每一个 DNA 分子都是一个线状、不分枝的多聚体, 非常长(以厘米计), 而粗不过 2 nm(纳米)。计算存在于成年人体内的 DNA 的长度可以说明 DNA 分子有多么长。此长度为:(1 bp 的长度)(每个细胞中的 bp 数)(人体的细胞数), 即(0.34 nm)(6×10^9)(10^{13})或 2×10^{10} km, 约为从地球到太阳往返一次的距离! RNA 分子要比染色体 DNA 短得多, 其长度为 100 个核苷酸以下到数千个核苷酸。

(二) 核酸的二级结构

在 DNA 分子中, 两条糖磷酸酯的主链彼此缠绕, 碱基夹在中间。碱基垛叠起来, 一方面屏蔽其疏水面使不与溶剂相遇, 另一方面又以两种专一的形式形成氢键, 如图 2.3 所示, 腺嘌呤与胸嘧啶(或尿嘧啶)成对, 而鸟嘌呤与胞嘧啶成对。这种专一的碱基配对方式称为 Watson-Crick 碱基配对, 以纪念 1953 年英国剑桥大学的 James Watson 和 Francis Crick 对它的发现, 他们的发现是以 Wilkins、Chargaff 和其他人的实验数据为根据的。Watson-Crick 及其他形式的配对也存于 RNA 分子的一部分中。还有一种另外的配对方式称为 Hoogsteen 配对, 其他形式的配对则统称为非 Watson-Crick 碱基配对。

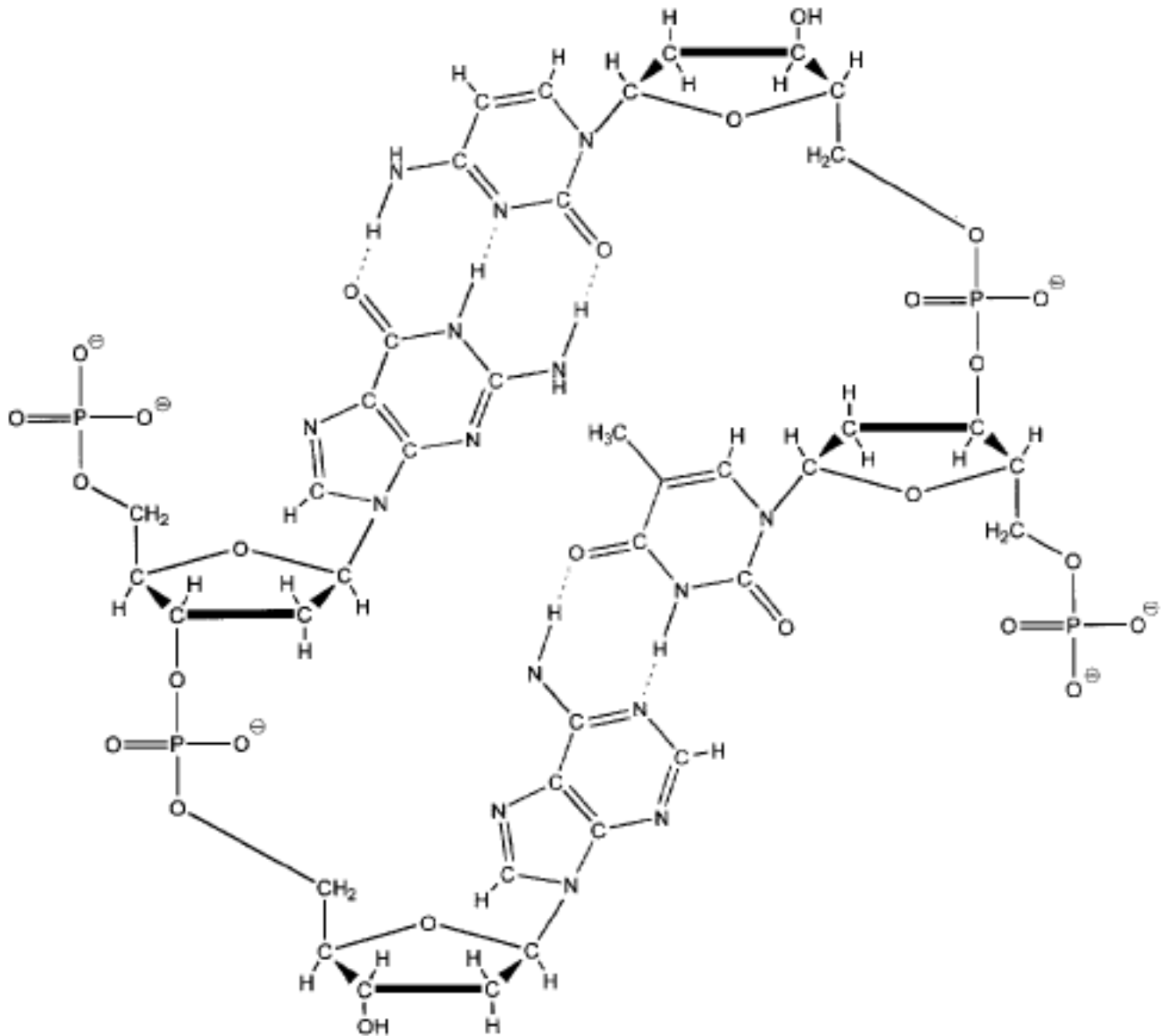


图 2.3 碱基对的化学结构

双链 DNA 的化学式, 示 2 个碱基对(中间为碱基对, 上面的为 G—C 碱基对, 下面的为 A—T 碱基对; 氢键用虚线表示; 两边外侧为糖磷酸酯主链)。

在 DNA 中,实质上每一个碱基都参与配对;而在 RNA 中,则只有一部分碱基发生配对。细胞中的大部分 DNA 的结构称为 B-型 DNA(图 2.4)。B-型 DNA 实际上是类似结构的一个家族,其成员的结构因其详细的构象而异,而构象则决定于主链上个别碱基的精确序列。B-型 DNA 由两条互补序列的糖磷酸酯链组成,当这两条链以相反的(反向平行)方向绕在一起时,就形成了右手双螺旋,每个碱基都与其 Watson-Crick 配偶体相对,形成碱基对(图 2.5)。这个螺旋是右手的,因为当你顺着 DNA 链向前看时,残基形成顺时针方向的螺旋。磷酸基团在结构外面,溶剂的离子可与其电荷相互作用,在磷酸根的链之间有“沟”——一个大沟和一个小沟。碱基对的边缘可与沟中的溶剂接触并提供专一的区域使蛋白质能与 DNA 结合,这种结合的方式当然是由序列决定的。B-DNA 双螺旋的每一回转有 10 ~10.5 个 bp,各个残基之间的螺距为 0.34 nm,直径约 2 nm。可在常规的电子显微镜下“看”到 DNA 分子,假若它们被染色或被喷涂而增加了对比度,或用原子力显微镜。



图 2.4 B-型 DNA 分子模型
示 B-DNA 的空间充满模型,螺旋轴是直立的(B-DNA 结构可从下列网址上看到:

<http://moby.ucdavis.edu/HRM/Bio-chemistry/molecules.htm>.)



图 2.5 B-型 DNA 的卡通
着重指出两条糖磷酸酯主链像两条丝带一样,由碱基对连接在一起。

在适宜条件下, DNA 可能形成根本不同的二级结构, 如 A-DNA、H-DNA、Z-DNA 或十字形 DNA。A-DNA 也是 Watson-Crick 碱基配对双螺旋, 不过比 B-DNA 短而粗。这种结构在 RNA 中和当一条 RNA 链与一条 DNA 链形成杂交链时会存在; RNA 中的 2'-OH 与 B-DNA 不相容, 因为有位阻。H-DNA 中包括一个三链区, Z-DNA 是 Watson-Crick 碱基对的左手螺旋, 十字形结构主要是 B-DNA, 不过其中一部分结构是由链内的碱基配对形成的, 所以每条链中又有一部分自身形成环而卷回去。四元 DNA 含有 4 条彼此缠绕在一起的 DNA。

在所有的双链形式中, DNA 的两条链都是以反向平行的方式缠绕在一起的。因此, 两条单链: 5'-ATTCGAAT-3' 和 3'-TAAGCTTA-5', 就会合到一起而形成双链:

ATTCGAAT
TAAGCTTA

双链中上面的链通常按 5' 到 3' 的方向书写。链的方向可以明确无误地规定如下: 5'-ATTCGAAT-3'。末端基团的性质也可以明确加上; 例如: 5'-ppp-ATTCGAAT-3'-OH 就是在一端有 5' 三磷酸, 另一端有一个 OH。

RNA 分子也可能以完全的双螺旋形式存在, 双螺旋为两条反向平行的 RNA 链, 与 A-DNA 构象中的 DNA 双螺旋类似。不过, 在许多 RNA 分子中, 虽有双链结构, 但其中插入有单链区。RNA 双螺旋可能是分子内的, 即 RNA 链本身卷起来。要在分子内的双螺旋中形成 Watson-Crick 碱基配对, 螺旋一侧的核苷酸序列必须是另一侧序列的反向重复。例如, 下列序列 ACUGGAAU CCUC AUUCCAGU 中, 第二段黑体字的序列是第二段黑体序列的反向重复。把两条互补链都写出来, 就容易看出这一点了:

ACUGGAAU CCUC AUUCCAGU
UGACCUUA GGAG UAAGGUCA

现在你可以看到上面一条链的序列从左到右是以 ACUGGAAU 开始, 而下面一条链从右到左也是 ACUGGAAU。我们对上面那条链从左到右读, 下面一条链从右到左读, 这样我们就总是以 5' 到 3' 的方向读写核酸链。这两个反向序列中插入了一个任意序列 CCUC, 它能形成环, 使得第二个拷贝只能折回去与第一个拷贝的重复序列发生碱基配对(图 2.6)。DNA 中的十字型结构(图 2.7)也是以类似方式形成的。

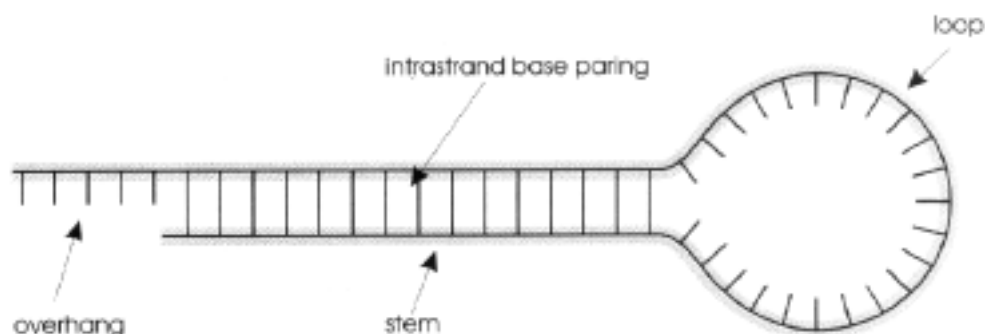


图 2.6 RNA 分子发夹环结构示意图

模糊的粗线表示糖磷酸酯主链, 与主链垂直的短线代表个别的碱基。

相连的反向序列(即反向重复序列之间没有间隔区)就是回文序列。回文序列从右向左和从左到右读是一样的, 如“deed”这个字。回文的 DNA 或 RNA 序列都可以折回去形成“发夹式”双螺旋结构(图 2.6)。

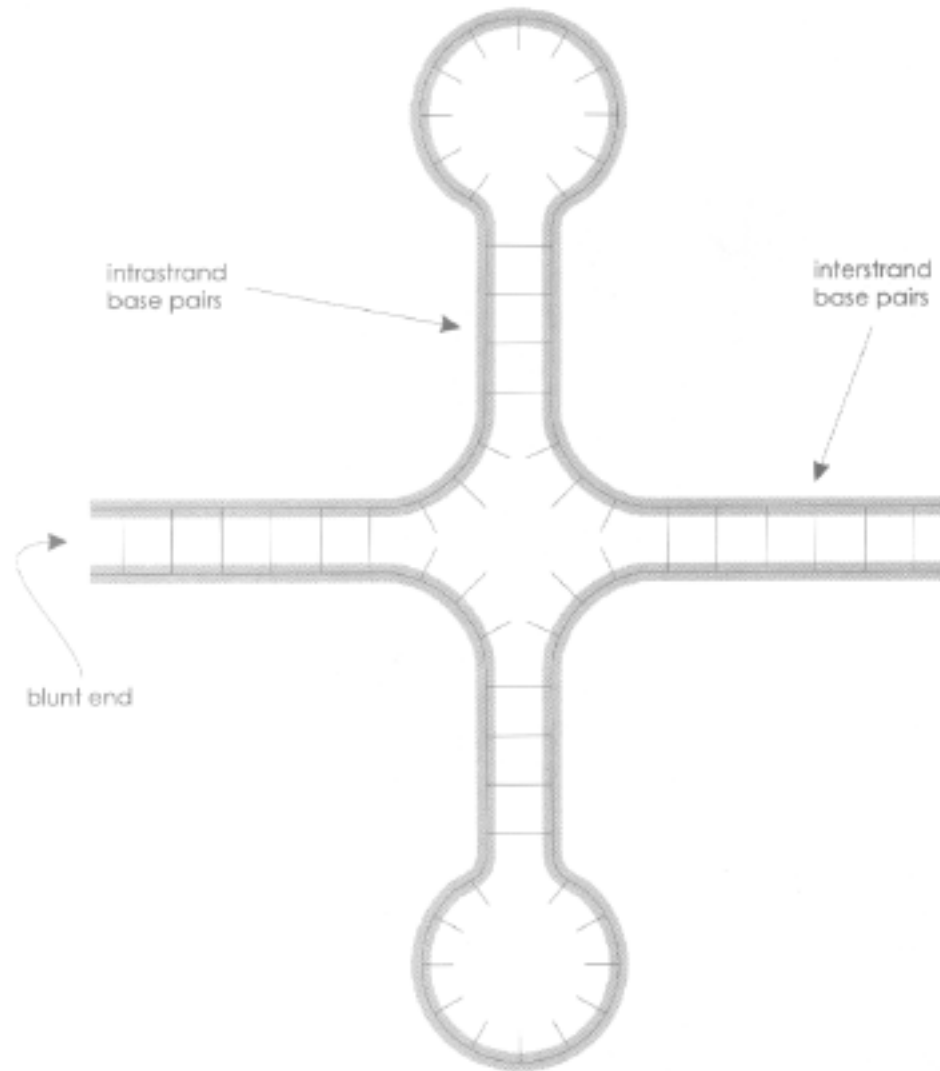


图 2.7 十字形结构的核酸分子

模糊的粗线代表两条链的主链,与主链垂直的短线代表个别的碱基(将碱基画成与其配偶体相连即表示发生了碱基配对;注意,既有链内的又有链间的碱基配对)。

不是反向的重复序列称为同向重复或级联重复序列。ATTCGAAT ATTCGAAT 就是同向重复序列(第一个拷贝是黑体字,着重指明其重复)。

DNA 中的所有核苷酸都在双链的二级结构中,但 RNA 则不然。此外, RNA 双螺旋不像 B-DNA 那样有规则,有一些嘧啶-嘧啶碱基配对,有时还有一些环外碱基(图 2.8)。要测定 RNA 分子中哪些核苷酸在双螺旋结构之内需要系统发生的和生物化学的资料。在系统发生的研究中,要寻找不同物种的同源 RNA 分子中成对的突变以检验碱基配对的模型。假如在所要求的双链区中发生了突变,那么在螺旋的相对一侧就应该找到互补的突变,否则该突变体中不可能保持正确的碱基互补。生物化学数据应该用特殊试验得到的,这些试验能区别存在于双链二级结构中的碱基和存在于单链区的碱基。这两种方法结合起来,已阐明了核糖体 RNA 分子和其他 RNA 分子的大量二级结构图。三级结构的测定在大多数情况下仍是一种挑战。

(三) 核酸的三级结构

纯 DNA 在溶液中随机折叠,如何折叠则因其天然的僵硬性和某些序列发生弯曲的趋势而定。B-DNA 十分易变,200 bp 的序列很容易弯折 90°。与蛋白质结合的 DNA 中有稳定的弯曲是常见的特征,而且,一般而言, DNA 与蛋白质形成复合体后,就会产生特定的折叠结构,这是其功能所必需的。例子有核小体中 DNA 的折叠(第 5 章), DNA 与重组酶的相互作用(第 23



图 2.8 tRNA 分子的三级结构

示 tRNA 分子的结构,是用 X 射线结晶学的方法测定的。注意右上方的单链 5 -端,和顶部碱基配对的茎,一直到图下部的反密码子环(此结构可从下列网址上看到:

www. <http://moby.ucdavis.edu/HRM/Biochemistry/molecules.htm>.)

章)。还有, DNA 的三级结构可能在转录的控制(第 29 章)中起重要作用。染色体中 DNA 的折叠是一件了不起的事,将在第 5 章中讨论。

在某些情况下,对 RNA 的三级结构比对 DNA 的了解得多一些。根据 X 射线结晶学的资料,某些 tRNA 分子的全部三维结构已经清楚。此结构包括几个二级结构的茎-环区,它们相互作用,产生特殊的三级结构。图 2.8 所示的 tRNA 结构包括茎-环区、稀有碱基、嘧啶-嘧啶碱基配对和环外的碱基。RNA 所固有的结构显然是其功能所必需的,核糖体 RNA 中二级结构的保守(下文)和催化性 RNA 及 RNA 剪接的研究(第 25 章)都说明了这一点。

2.3 域和超螺旋

上述讨论假定核酸的末端是游离的。实际上,对于 DNA 来说,这并不是细胞中的情形。质粒和细菌的染色体是环状的,真核的染色体虽是线状的,但在每隔 50 ~100 kb(1 kb = 1000 bp)处被固定,这样染色体 DNA 就被分隔成了拓扑域(图 2.9)。域的末端是不能自由运动的,而是与细胞核中的基质结构结合在一起的,基质中有一种酶叫做 DNA 拓扑异构酶,将在下文进一步讨论。

在一段有游离末端的 DNA 中,如果有一个扭曲了,那么这个扭曲就会在 DNA 上沿着两个方向推进,并在末端解开。向一个方向移动的扭曲是右手的,那么另一个方向的就是左手的。

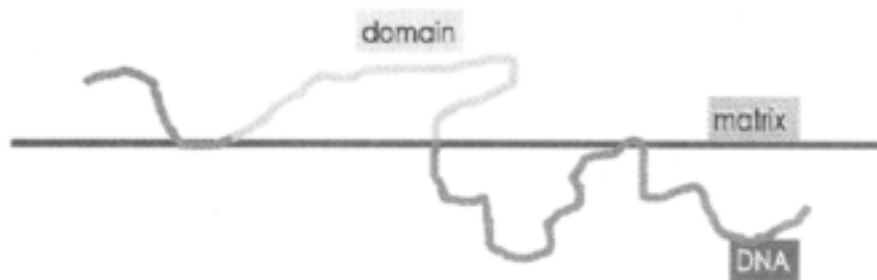


图 2.9 染色体的域

直线代表部分核基质, 曲折的线代表染色体的一部分(两条线相遇或交叉处表示染色体连在基质上, 曲折线上浅的部分代表染色体的一个域)。

对于 DNA 的这些额外的扭曲称为正或负的超螺旋。正的超螺旋趋向于增加一个核苷酸和下一个核苷酸之间的扭曲, 负的超螺旋则趋向于减少之。在环状 DNA 中, 当超螺旋与原来的相反的超螺旋相遇时, 就会被勾销。DNA 中超螺旋的问题可称为 DNA 拓扑学。

如果一般末端固定的 DNA 在中央发生了扭曲, 那么超螺旋就只能移动到固定处, 而且如果原来的扭曲被保留下来, 那么超螺旋也就保留下来了。在细菌中有一种酶, DNA 回旋酶, 能产生超螺旋, 在真核生物中尚未发现这种酶。在所有细胞中, 当 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶沿着核苷酸链移动, “读”碱基序列时, 就会产生超螺旋(图 2.10)。其他蛋白质也会诱导出超螺旋, 例如当 DNA 被卷入核小体(第 5 章)时组蛋白的作用就是这样。当 DNA 被分离并与核基质和与之相结合的蛋白质分开后, 它就会松开, 呈无超螺旋的形式, 除非它是环状的, 那样超螺旋就会保留下来。

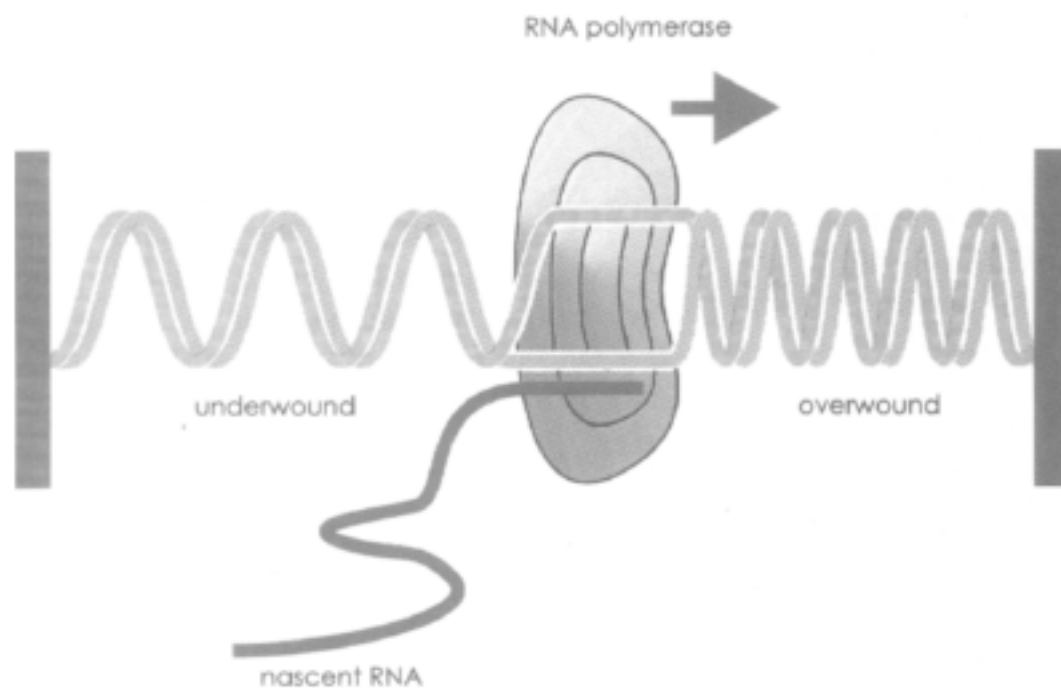


图 2.10 RNA 聚合酶引起超螺旋

两条 DNA 模板链固定在核基质上, 两端的两条粗直线代表核基质, 椭圆形代表正在合成 RNA 的 RNA 聚合酶。

在细胞中, 只有切断 DNA 才能使超螺旋解开。切开一条链就足够了, 因为围绕着留下的糖-磷酸酯键发生的旋转就会将超螺旋除去。这种解扭曲的反应是由 DNA 拓扑异构酶催化的, 在超螺旋解开后, 此酶也会把单链的缺口封闭起来。DNA 拓扑异构酶也能解开超螺旋的 DNA, 不过它是暂时将双链切开, 而不是暂时切开单链。细胞中是利用 DNA 拓扑异构酶类

使 DNA 解旋以进行复制(第 22 章)和转录(第 24 章),而 DNA 拓扑异构酶 则在有丝分裂中用于“解开”DNA,使之能折叠成特殊的结构以适于有丝分裂过程中染色体所发生的变化。

2.4 DNA 变性

提高 pH 或温度或急剧降低离子强度,都能使 DNA 双链变性。变性的 DNA 就是溶液中的两条游离的单链。由于进行这些实验时是增高 DNA 溶液的温度,所以常常把变性过程说成是 DNA 的“熔解”。

双链结构的强度与溶液的离子强度和 pH 关系极大,也与碱基组成关系很大:GC 碱基对有 3 个氢键,就比只有 2 个氢键的 AT 碱基对稳定。因此, DNA 双链的变性是分阶段的, AT 多的区域先变性, GC 多的区域后变性。用电子显微镜观察 AT 多的区域中“发泡”的中间阶段,或测定随着变性过程而发生的对紫外线吸收的增加(反映碱基堆积的丢失),就可看出这一点(图 2.11)。

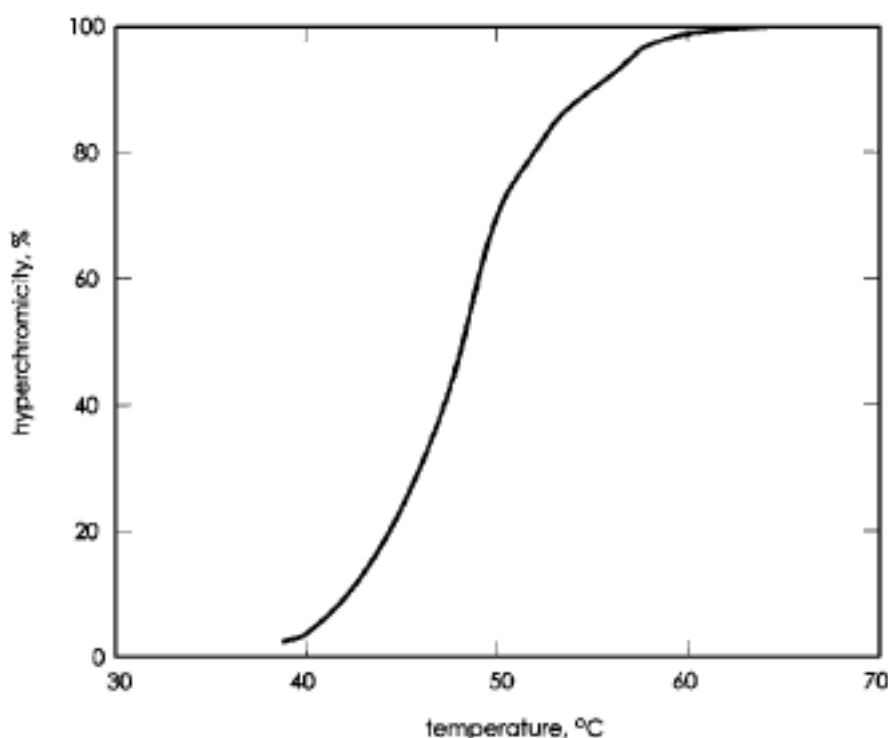


图 2.11 DNA 的热变性(UV 解链曲线)

将双链 DNA 的溶液放在分光光度计中,然后在样品的温度不断增高的情况下,测定 260 nm 吸收率的变化。

(一) 复性

当变性的 DNA 回到生理状态(体内的状态)时,单链又聚到一起,再生 B-型 DNA,这一过程称为复性。复性需要碱基进行配对。因此,一定的单链只能与具有互补序列的单链重新组合。复性的速率决定于互补序列的浓度。这不过是单位体积溶液中有多少 DNA,这是复性(和杂交——见“杂交”节)中的一个关键的参数。若互补链的浓度高,复性就快;浓度低,复性就慢。因此,在做实验时,重要的是让欲使其复性的单链浓度尽可能高。在体内,染色体的结构和专一的蛋白质会使分开的 DNA 链靠近,因而局部的浓度很高。由于 DNA 的复杂性,浓度的影响很复杂。一个极端的情况是:由 poly dA(多聚脱氧腺苷酸)和 poly dT(多聚脱氧胸苷酸)组成同多聚体经过变性后再复性,复性的过程特别快,因为任何 poly dA 的链可以和任何

poly dT 的链配对。考虑一条断裂成许多个 200 ~500 片段的细菌 DNA, 变性后复性时, 这一混合物的复性过程就慢得多, 因为细菌 DNA 的每一个片段都要“寻找”与它互补的片段, 而不是碰到什么片段就可复性。

人的细胞含有的 DNA 比细菌多得多, 切成片段的人的 DNA 的复性也应该比细菌 DNA 的慢得多。对于大部分人的 DNA 来说, 情况确实如此, 看到的复性速率非常之小。不过对于相当一部分人的 DNA 来说, 看到的复性速率要大得多。真核 DNA 的复性速率, 分为 4 类(图 2.12)。

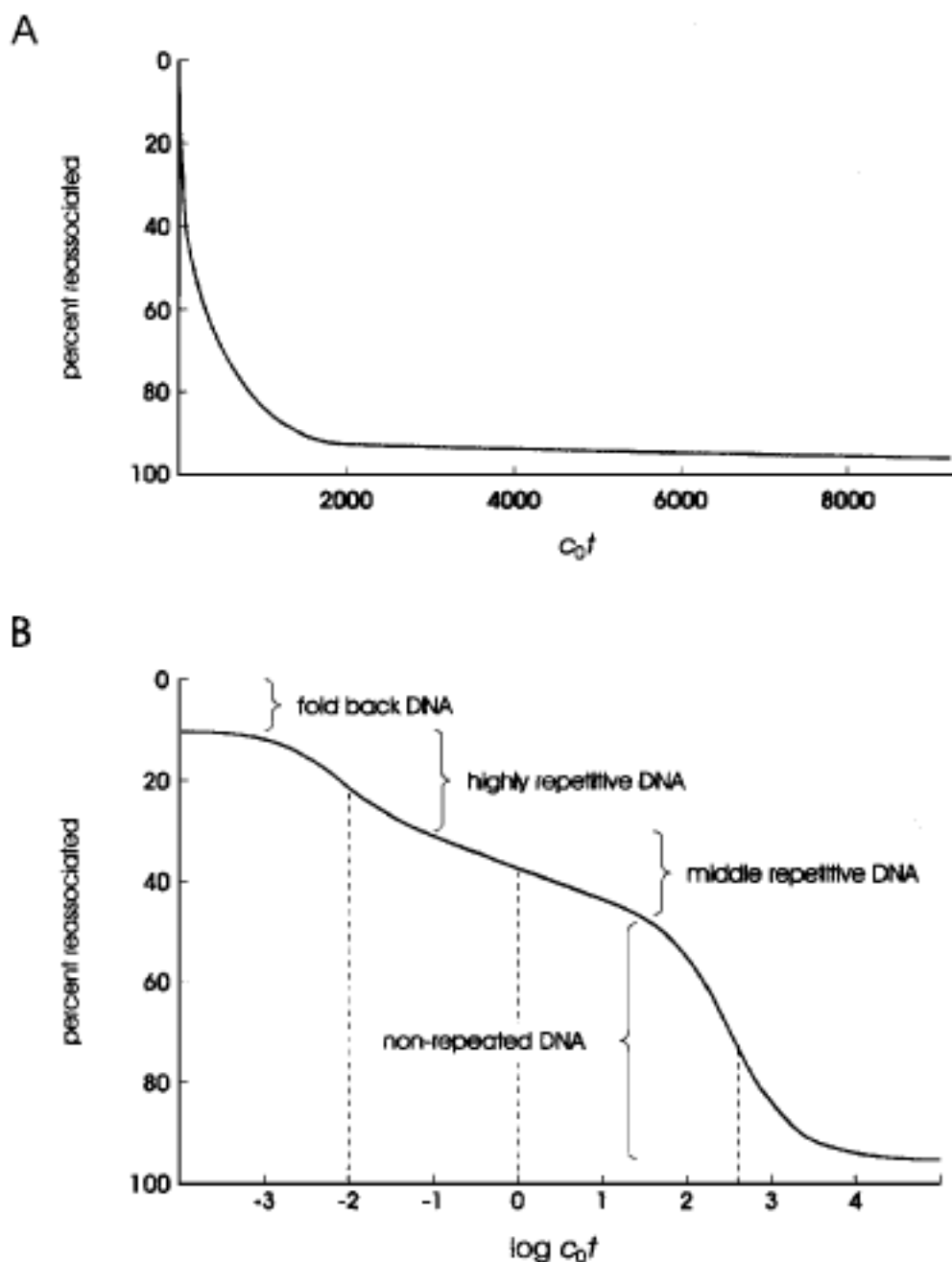


图 2.12 复性(重缔合)的动力学

(a) 变性 DNA 的复性: C_0 为变性 DNA 的原始浓度, t 为时间, C_0t 表示复性反应的速度(复性百分率越高, C_0t 之值越大); (b) 同样数据, 以对数表示: C_0t 之值与 DNA 中序列重复的程度有关, 余见正文。

(1) 零时的复性, 来自于回文序列, 它能形成“折返”或“发夹”结构。这种分子复性非常快, 速率与其浓度无关, 因为它们不需要与任何其他分子相互作用就可形成双链结构。

(2) 复性非常快的序列, 这是一簇簇级联的重复序列中同一种简单序列(每个细胞重复达百万次)的复性。这种 DNA 也称为卫星 DNA, 因为其碱基组成均一, 所以在密度梯度中形成一个单纯的卫星峰。一种卫星 DNA 存在于染色体的端粒(末端)中; 另一种存在于中心粒中。

(3) 复性速率居中的序列, 是细胞中重复 10 ~10 000 次的不均一的一类序列。这些序列

中有许多是插在,即分散在整个基因组中的。其他一些这样的序列则是有高度重复序列的基因中的级联重复,例如核糖体 RNA 的基因或组蛋白基因(第 21 章)。

(4) 复性缓慢的序列是不重复的、独特的序列,这包括大部分基因。

这种分类在某种程度上是交叉的,特别是当复性条件改变时。在“严格”的条件下,只有确实互补的碱基对才会复性。在不太严格的条件下,会发生某些错配,而有密切关系的序列也会复性。

(二) 杂交

可将另外的 DNA 链或 RNA 链加到已变性的 DNA 中,使它们参与复性反应。当外加的 DNA 或 RNA 与一条原来的 DNA 单链缔合时,就叫做杂交。杂交是检测特定的 DNA 或 RNA 序列的强有力的手段,特别是与电泳配合使用(DNA 印迹法和 RNA 印迹法)或在聚合酶链反应(PCR,第 22 章)中的启动子退火中使用。

DNA 印迹法和 RNA 印迹法是将 DNA 或 RNA 的混合物进行凝胶电泳(图 2.13)。这种技术是将含有核酸混合物的溶液放在琼脂糖或其他凝胶物质的板上。用电场推动分子使经过凝胶,当这些分子在凝胶板上散开之后,就断电以除去电场。在电泳过程中分子通过凝胶移动的

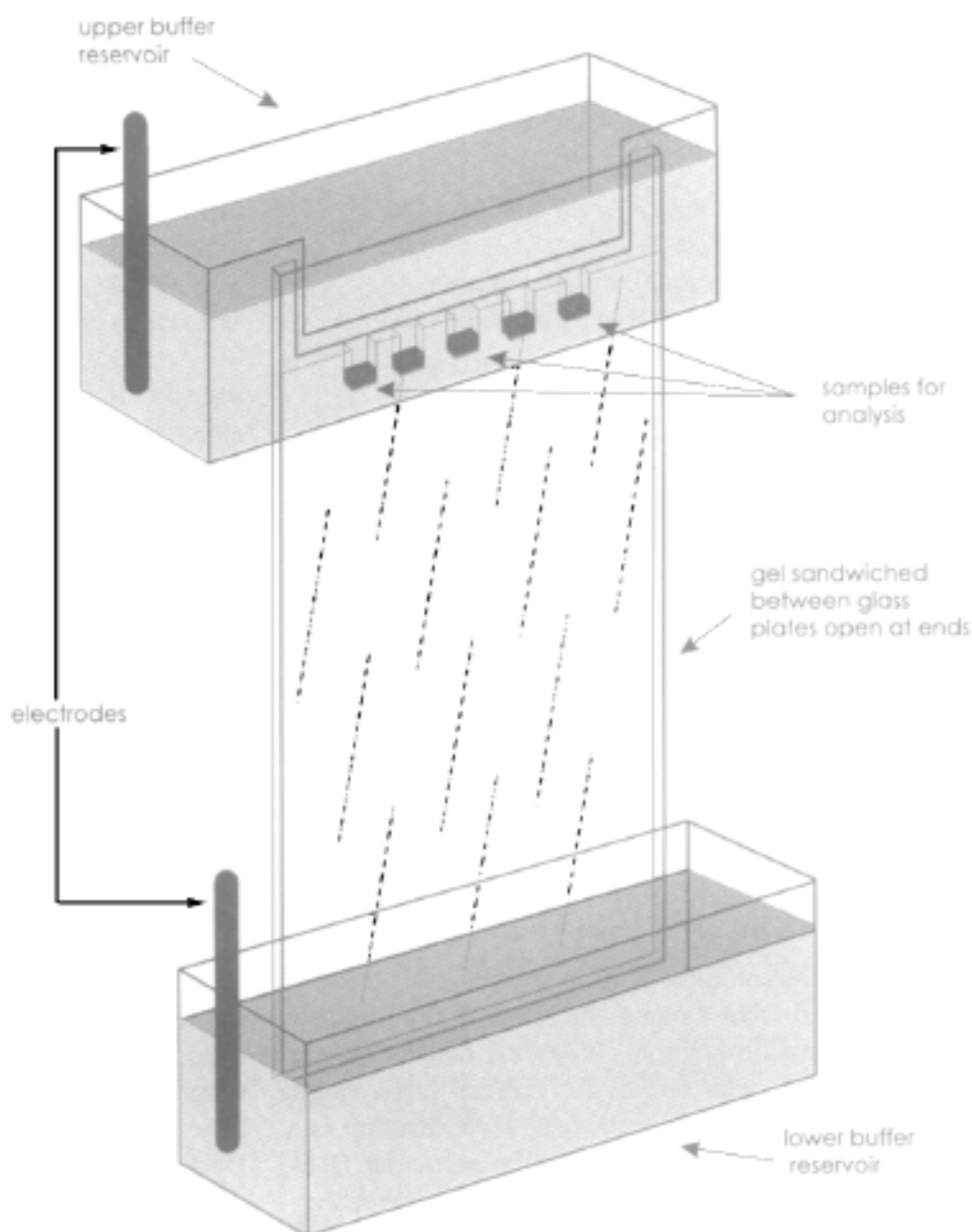


图 2.13 DNA 电泳装置

速率决定于分子所带的电荷和分子的大小。DNA 的电荷密度是均匀的, 又是易变的棒形, 所以它们通过凝胶的速率完全决定于大小, 较小的分子移动得较快。RNA 分子会折叠成各种形状, 电荷密度也不同, 但在强的变性溶液中它会伸展开, 因而也是根据大小而移动。因此, 在两种情况下核酸分子都是按照其大小而在凝胶上分散开, 大小则以 bp(DNA) 或碱基(RNA) 为单位(图 2.14)。

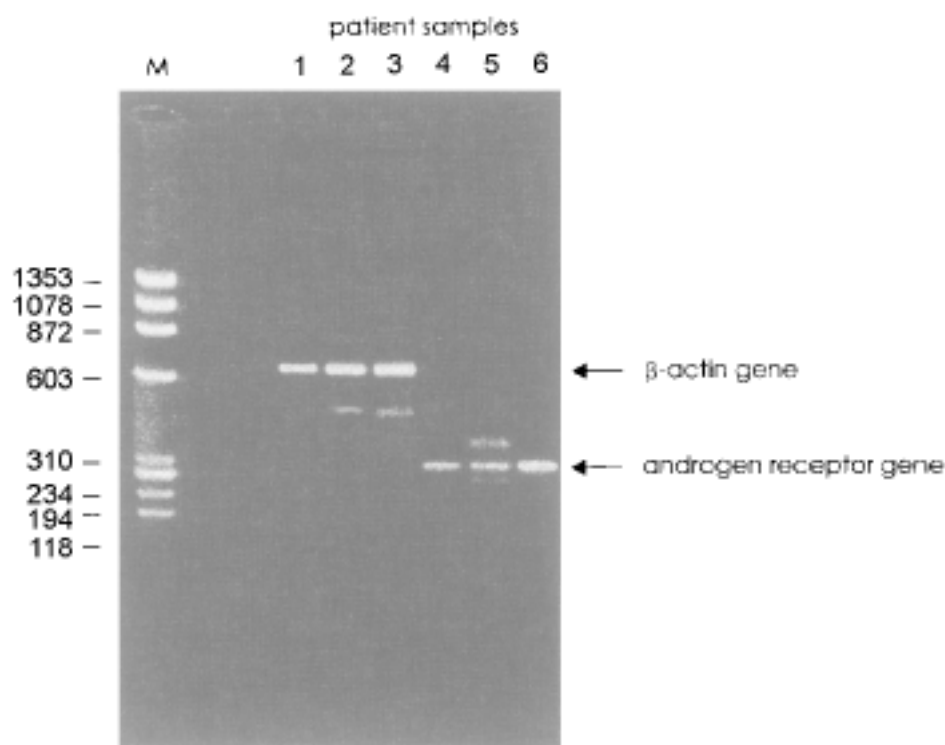


图 2.14 DNA 电泳结果

DNA 电泳后的凝胶(M 行为分子量的标记; 左侧的数字为各个标记分子的大小, 单位为 bp)。

DNA 在凝胶上变性(RNA 在电泳前变性), 使凝胶板的面与硝酸纤维、尼龙或其他材料的膜接触。然后单链的核酸分子就会由于毛细管转移或其他转移途径而转到(印迹)膜上。其上有转移的核酸的膜就是印迹膜。

要检测具有特定序列的核酸, 先要制备核酸探针, 其序列与所要找到的核酸序列应是互补的。探针或是放射性的, 或是带有荧光的或化学发光的标志物。将印迹膜与探针在适于发生杂交的条件下保温, 于是探针就与印迹上的互补序列结合并被固定在印迹上。经过足够的时间使重新组合完成后, 洗去未结合的探针, 就可根据放射性或其他标志来确定已杂交的探针是否存在及其位置, 以表明原来的印迹上是否有互补序列(图 2.15)。

在实际操作上, 重要的是使滤膜上 DNA 的浓度足够高, 还有溶液中的探针浓度也高。当用基因组 DNA 时, 膜上单拷贝基因片段的量平均约为 $1 \text{ pg} (\times 10^{-12} \text{ g})$, 而该基因的专一探针约为 $1 \text{ ng/mL} (10^{-9} \text{ g/mL})$ 的溶液。因此, 由于基因组 DNA 的复杂性以及专一序列的量少这两个原因, 杂交需要进行足够长的时间(约 24 小时)。与此相反, 当克隆的 DNA 被固定在膜上时, 滤膜上基因所专有的 DNA 约有 $1 \text{ } \mu\text{g} (10^{-6} \text{ g})$; 而且, 膜上的其他序列, 如质粒 DNA, 也较少。在这种情况下, 利用同样的探针, 杂交时间只要 1 h(小时) 或更少, 就可得到差不多同样的结果。重要的是要记住, 像 DNA 印迹这样的杂交, 决定于序列的复杂程度、核酸的浓度和时间。序列的复杂程度越低, 核酸的浓度越高, 杂化物的形成所需要的时间就越少。

DNA 印迹法也叫 Southern 印迹法, 因为此法是由 E. M. Southern 发明的, 因此对于 RNA

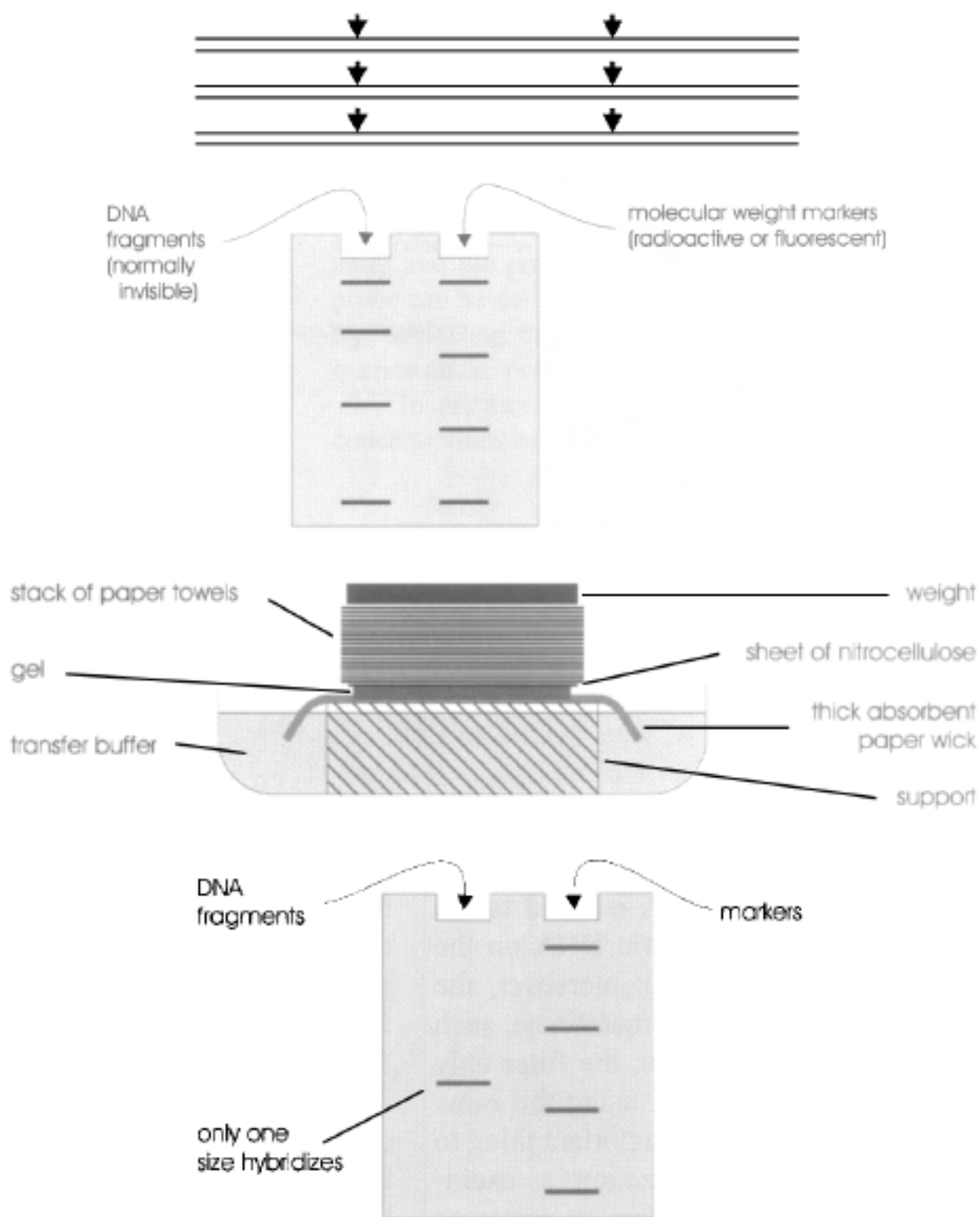


图 2.15 DNA 印迹法过程示意

印迹法就用了 Northern 印迹法一词。后来,蛋白质化学家又发明了蛋白质印迹法,即将电泳后的蛋白质印在膜上,再用专一的抗体去检测蛋白质分子,蛋白质印迹法名为 Western 印迹法。最后,还有一种 Southwestern 印迹法,即蛋白质-DNA 印迹法,是用复性的蛋白质印迹和 DNA 探针研究蛋白质-DNA 相互作用的方法。

2.5 核酸的序列测定

DNA 的最重要的结构特点就是分子中碱基对的序列。对于 RNA,碱基序列和高级结构都是关键性的。RNA 的直接测序是困难的,此处不讨论。可将 RNA 反转录为 DNA,然后测定 DNA 的序列(第 22 章)。DNA 的测序是发展中的技术,目前以 Sanger 及其同事和 Maxam、Gilbert 所提出的原理为根据。DNA 的序列是先用 200 ~600 个碱基的片段进行测定,然后再将这些小片段组织起来成为更大的片段或“重叠群”,得到成千上万个碱基的很长的序列,最终得

上数百万个碱基的序列。下面是 Sanger 法原理的大意。

2.6 用 Sanger 法测定 DNA 的序列

Sanger 测序法大意如下。此法的原理是 DNA 聚合酶能制成一条 DNA 链(模板链)的准确无误的互补拷贝。聚合酶需要模板链上有一个起始点,还要核苷三磷酸(DNA 聚合酶的底物)的供应。用化学合成法合成一个引物分子作为起始点,引物分子是一条链,包括与模板链的部分序列互补的短的 DNA 序列,其终点则为所要求的起始点。将引物与模板链混合并令其杂交,于是引物与模板链上的互补序列结合。然后引物的一端就给聚合酶提供了一个游离的 3-OH 基团,使它能将新的核苷酸加上去(图 2.16)。

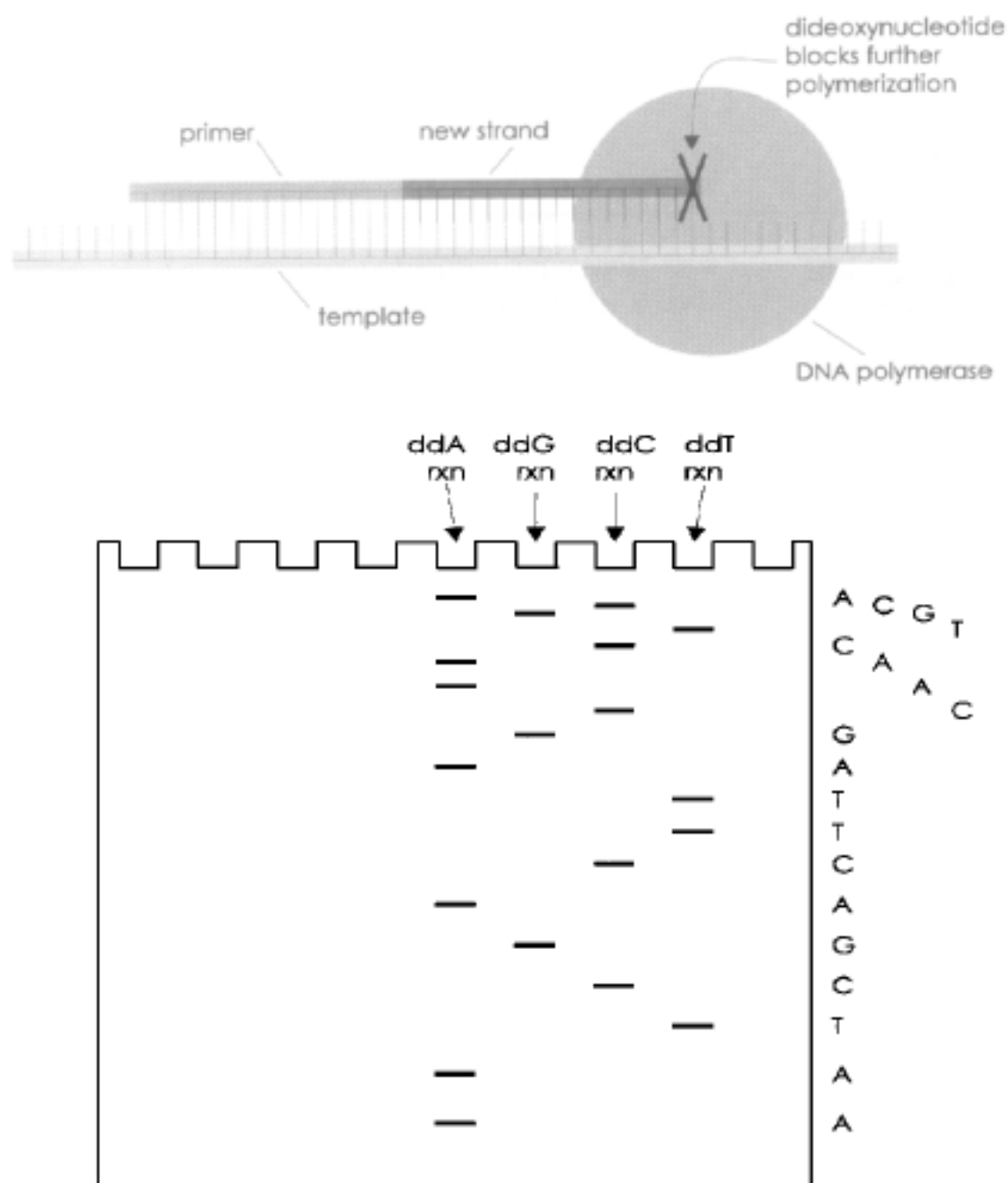


图 2.16 Sanger 测序法中的引物和模板

(a) 表示一条长的单链 DNA(标为“模板”)已与引物结合,引物的序列与模板的部分序列互补;DNA 聚合酶已合成了一条 DNA 的“新链”(从引物的 3 端开始,沿模板链继续,直到双脱氧核苷掺入处为止。聚合酶的反应已经终止,因为已无 3-OH,合成不能继续)。(b) 表示图(a)所产生的许多 DNA 分子凝胶电泳的理想结果(标为“ddA rxn”的一行为来自含有双脱氧腺苷三磷酸的反应混合物中的 DNA;同样,ddG、ddC 和 ddT 行均为相应的双脱氧核苷酸)。

聚合酶在所提供的起始点上开始反应, 沿着 DNA 链继续进行特别长的距离, 把新核苷酸的 5 -磷酸连接到正在合成中的链的游离的 3 -OH 上, 从而合成一互补的拷贝。必须具备所有四种核苷酸, 否则当需要的核苷酸没有时, 合成就会终止。假若没有 3 -OH, 合成也会停止。在 Sanger 法中, 4 个合成反应是同时进行的, 都从同一起点开始。除去正常的四种 2 -脱氧核苷酸外, 每个反应还有一种 2, 3 -双脱氧核苷酸(反应 1, 2, 3, 4 中分别为 ddA, ddC, ddG 和 ddT)。每个合成反应都会继续正常进行, 到双脱氧核苷酸偶然掺入时为止。这时因为 3 -OH 没有了, 链不能再延伸。这样, 每个反应结束后, 都会得到合成的 DNA 链的混合物, 每条链都在同一点起始, 但终点是双脱氧核苷酸所能掺入的任何一点。于是, 含有 ddA 的反应产物中只有以 ddA 为末端的链(相当于模板链上的 T), 含 ddC 的反应产物中只有以 ddC 为末端的链, 含有 ddG 或 ddT 的亦如此。

然后将每一反应所产生的分子按其长度分开。因为它们的起点都一样, 所以每个片段的长度就是起始的核苷酸到终止的核苷酸之间的距离。在含有 ddA 的反应中, 所有产物的最后一个碱基都是 A, 所以这个反应所产生的片段的长度就是所有 A 的位置。同样, 含有 ddC 的反应就给出所有 C 的位置, ddG 和 ddT 亦如此。通常是将反应混合物在聚丙烯酰胺凝胶上相邻的 4 行中进行电泳, 就可从最短的序列起“ 读出 ”序列。假若最短的序列在 ddA 反应的那行, 那么它就表明了 A 的位置, 下一个最短的片段所在的那行就是 A 下面的碱基, 以此类推, 直到将凝胶读完为止(图 2. 17)。

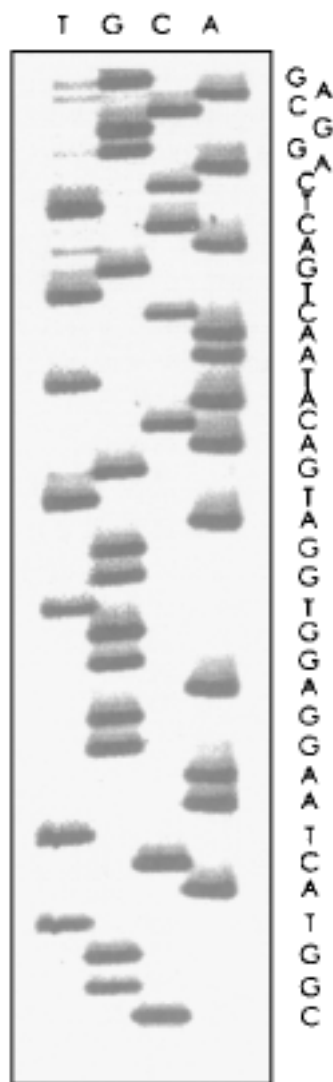


图 2. 17 Sanger 测序实验的凝胶放射自显影图
可以直接从凝胶上读出核苷酸序列, 如凝胶右侧所示。

2.7 小 结

(1) 核酸贮存遗传信息并在蛋白质的帮助下加工遗传信息。

(2) 核酸是长的多聚体,有重复的结构,其中有由磷酸基团将3和5碳连起来的糖。每个糖的1碳上连着碱基。

(3) DNA只含有脱氧核糖而RNA只含有核糖。存在于DNA中的碱基主要是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸嘧啶。RNA大多含有腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。碱基互相配对形成A-T、G-C和A-U碱基对。

(4) 两种核酸都能形成反向平行的双链结构,碱基在双链中间堆叠并配对,磷酸根缠绕在外面。DNA中主要的结构是B-DNA,其中碱基与螺旋垂直,螺旋中每转一圈约有10个碱基对。RNA中,大部分结构是单链构象,其中有相当一部分是分子内的双链。

(5) 许多DNA分子的末端是受到扭力限制的,或是环状的,因而没有末端,或是连接在蛋白质的结构上,即核基质上。在真核细胞中,由相邻的与基质连接的部位所包围的区域就是拓扑学上的域。

(6) 核酸合成的过程向DNA中引入了超螺旋。细胞中在拓扑异构酶的作用下超螺旋可被解开,此酶暂时切断DNA使之松弛,然后将链连接起来。

(7) 提高温度或pH使DNA变性就很容易把DNA双螺旋的两条链分开。当条件回到生理状态时,两条链又可再汇合起来。复性的速率决定于互补链的浓度。

(8) 在复性反应中可以将额外的核酸序列,即探针,通过复性反应而引入并与起始DNA中的组分形成双链。这种杂交反应就是DNA印迹和RNA印迹技术的根据,这些技术可用于确定在一核酸序列的混合物中是否存在某种已知的核酸序列。

(9) 核苷酸的序列中就有此分子所携带的信息。用“Sanger”的序列测定技术可以测定序列,此技术为从一已知起点合成DNA,使之终于一已知碱基,然后测定所合成的各序列的长度。

参 考 资 料

Understanding DNA, C. R. Calladine and Horace R. Drew, 1992, Academic Press, San Diego, CA.

What Mad Pursuit, F. H. C. Crick, 1988, Weidenfeld and Nicholson, London.

“DNA Topoisomerase Poisons as Anti-Tumor Drugs,” I. F. Liu, 1989, Ann. Rev. Biochem., 58:351 ~375.

World Wide Web at <http://moby.ucdavis.edu/HRM/Biochemistry/molecules.htm>.

复 习 题

1. 下列各序列均为一双链寡核苷酸的一条链。哪种寡核苷酸中有反向重复?

- a) ATTGGCATGCG
- b) ATTGGTATTGG
- c) ATTGGTGGTTA
- d) ATTGGTCCAAT
- e) AAGTAAGTAAG

2. 将 2 个长度和浓度均相同的单链 DNA 探针加于从人的细胞系得到的 DNA 片段的混合物中。一个探针与核糖体 RNA 的一个区域互补;另一个探针与珠蛋白 mRNA 的一个区域互补。将混合物加热使 DNA 片段变性,然后令其冷却。为什么核糖体 RNA 探针先于珠蛋白的 mRNA 探针形成双链结构?
- a) 核糖体 RNA 探针的 A + T 含量较高。
 - b) 核糖体 RNA 探针的 G + C 含量较高。
 - c) 细胞中核糖体 RNA 较多。
 - d) 核糖体 RNA 基因中有重复序列。
 - e) 核糖体 RNA 的序列较简单。

参 考 答 案

1. d 你应该将互补链写出来,看看哪一条有反向重复。寡核苷酸 d 的互补链是 3'-TAACCAGGTTA-5'。在此情况下,上一条链中的 5'-ATTGG 序列正是下一条链中 5'-ATTGG 序列的反向重复。
2. c 在任何的人细胞中,核糖体 RNA(rRNA) 基因的数目都比珠蛋白基因的数目多,所以 rRNA 探针遇到互补的人 DNA 序列的机会就比珠蛋白基因遇到其互补基因的机会多。因此,在复性或杂交时,rRNA 探针就会先于珠蛋白探针而形成杂交的双链。

第 3 章 蛋 白 质

3.1 引 言

蛋白质是功能特别多的分子。它们存在于细胞中和细胞外的地方。它们可能起结构作用,如胶原蛋白,或者有特殊的功能,如酶、转运蛋白、肌肉、激素和受体。蛋白质是由 19 种氨基酸和 1 种亚氨基酸合成的线状多聚体(通常说由 20 种氨基酸组成,稍欠精确)。最初的多聚体,或称多肽被合成后,可能就能够执行其功能,也可能其结构还要发生更多的化学修饰。事实上在所有的情况下,蛋白质还要发生特定的折叠,成为固定的三维结构。蛋白质与 RNA 和多糖一起,在它们自己的合成、修饰和折叠中起着主要的作用。

3.2 氨 基 酸

组成蛋白质的每一种氨基酸都有其中心的碳原子, α -碳, 其上连接着氢原子、-氨基、-羧基和各种各样的侧链。图3.1所示为19种不同氨基酸的侧链。甘氨酸中的侧链就是一个氢原

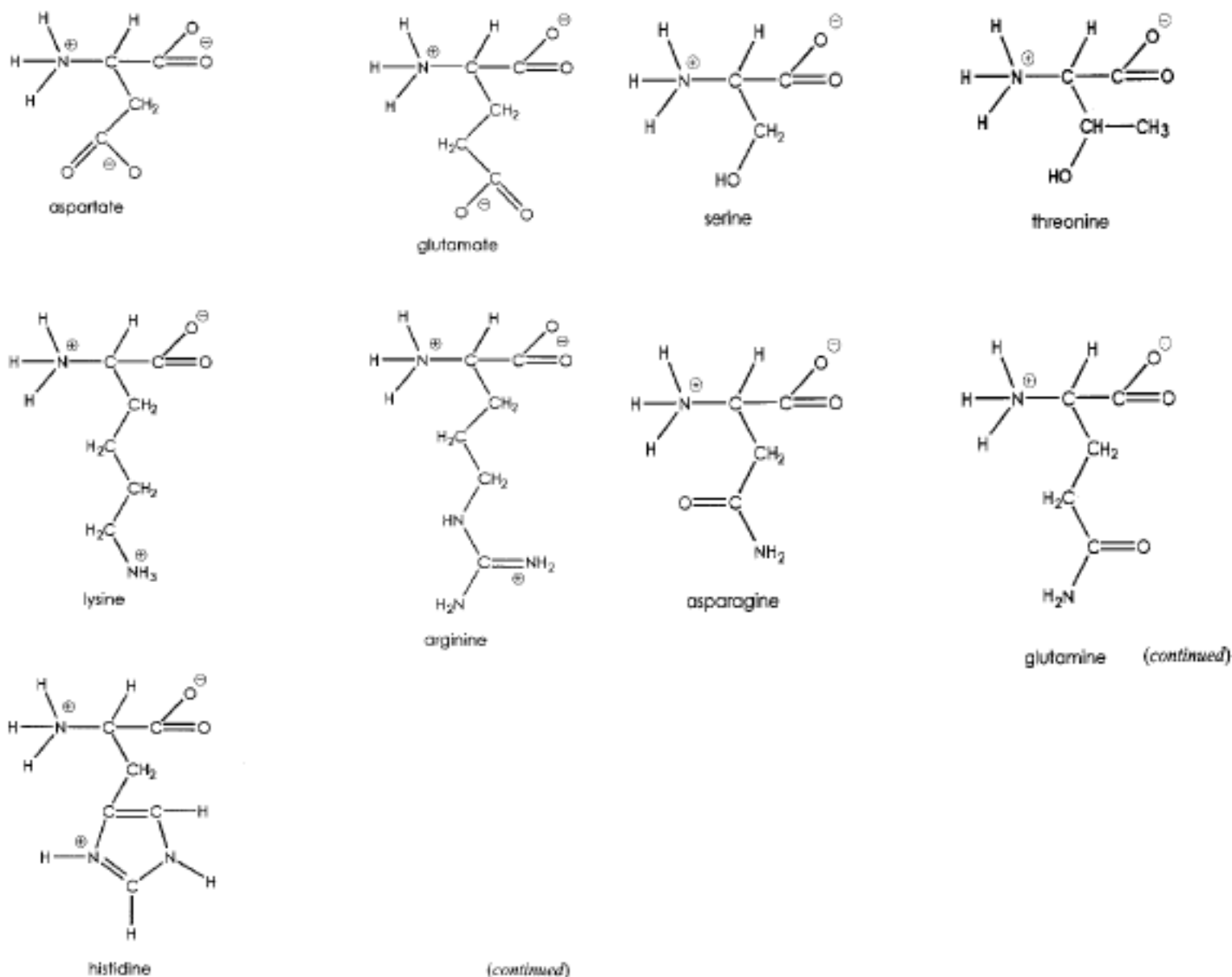


图 3.1 蛋白质中的氨基酸

(a) 在生理条件下其侧链通常带电荷的氨基酸; (b) 在生理条件下其侧链有极性但不带电荷的氨基酸。

子,除此之外, α -碳是不对称的,所以氨基酸有光学活性(即它们的溶液使偏振光的偏振面旋转)。存在于蛋白质中的氨基酸是 L-构型的,不过自然界中其他地方有 D-氨基酸。蛋白质中存在的第 20 个残基来自脯氨酸,它是亚氨基酸,其侧链折回到主链与 α -氨基形成环(图 3.1)。

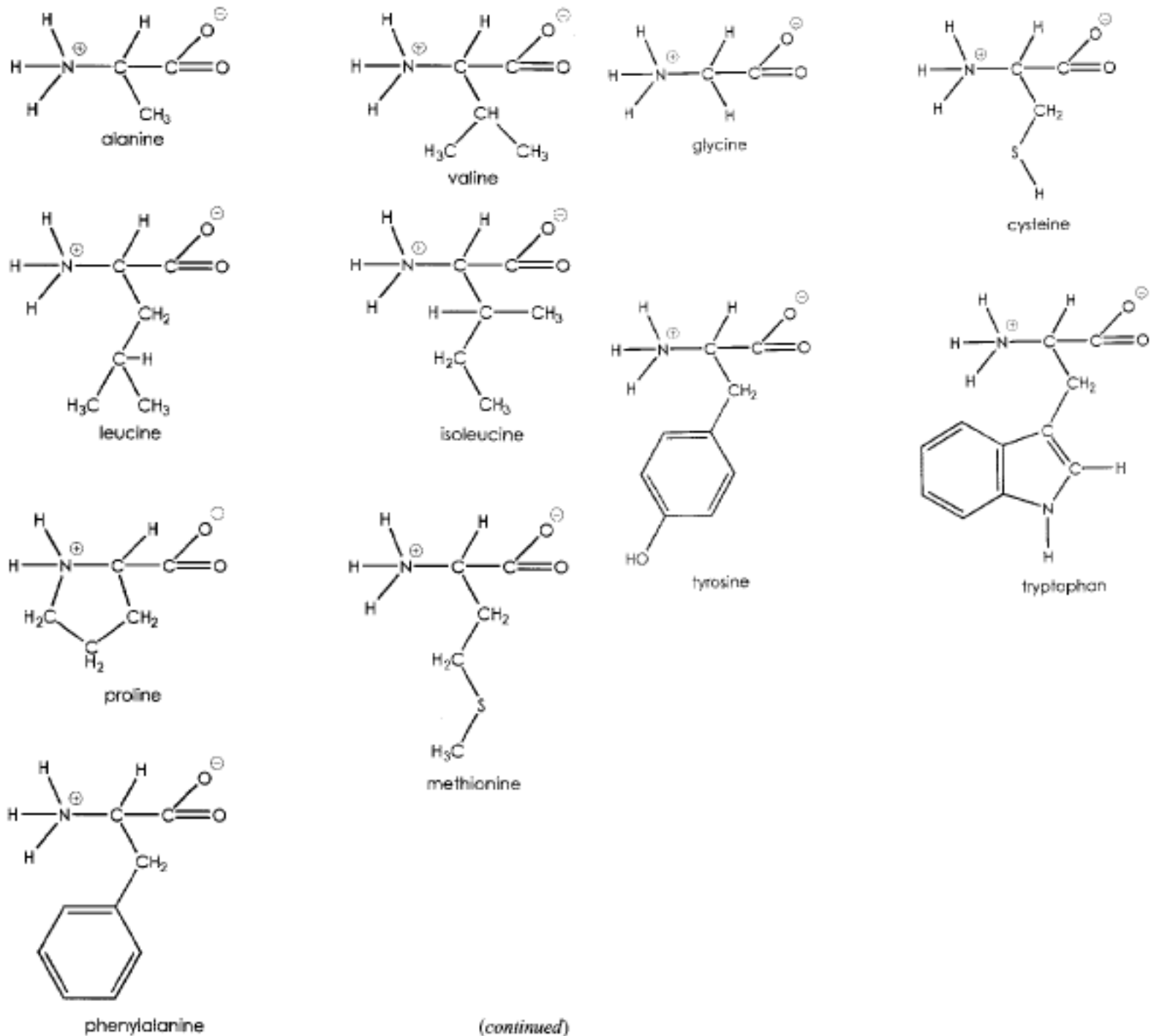


图 3.1(续) 蛋白质中的氨基酸
(c) 有疏水性侧链的氨基酸; (d) 其他氨基酸。

氨基酸的性质部分决定于其 α -氨基($-\text{NH}_3^+$)和 α -羧基($-\text{COO}^-$),部分决定于其侧链。在蛋白质中,重要的主要是侧链的特性,还有肽键(见下文)。不过,许多氨基酸以游离状态存在于体液中,而且在分析蛋白质时通常要将其分解为氨基酸,所以游离氨基酸的性质也是重要的。血浆或尿中游离氨基酸浓度的测定就用作诊断的指标(例如,苯丙氨酸浓度的测定就用于苯丙酮酸尿症的诊断)。

(一) 静电特性

带电荷的基团之间的静电相互作用影响着蛋白质的折叠及其与其他分子的相互作用。因此,了解存在于氨基酸和蛋白质上的电荷很重要。本章末的附录中有 pK (即 pK_a)和 pI 的

定义。

所有的氨基酸都有带电荷的 α -氨基和 α -羧基。在蛋白质或多肽中,肽键的形成(详见下文)把这些电荷去掉了,但多肽链的两个末端除外。有些氨基酸除 α -氨基和 α -羧基外,还有带电荷的侧链。用生物化学的说法,酸性的侧链是带负电荷的,只有在 pH 远低于其 pK 时是例外;碱性的侧链是带正电荷的,只有在 pH 远高于其 pK 时是例外。氨基酸侧链上电荷的大小决定于该基团的 pK 以及其周围溶液的 pH。

当这样一种氨基酸掺入蛋白质之后,蛋白质中局部的化学环境会影响基团的 pK 从而改变其电荷。对于蛋白质的功能,这种改变可能非常重要(例如,血红蛋白中的 Bohr 效应就决定于影响组氨酸残基的 pK 的结构性变化)。在大多数情况下,在 pH 7.5 下带有显著电荷的为下列氨基酸(括弧中为所带电荷):天冬氨酸(-1),谷氨酸(-1),精氨酸(+1),赖氨酸(+1),组氨酸(在 0 与 +1 之间),在此 pH 下蛋白质中 α -羧基的电荷为 -1 而 α -氨基的电荷则在 0 与 +1 之间变动,视蛋白质及其环境而定(表 3.1)。

表 3.1 蛋白质中重要的酸性基团和碱性基团

pK	化学基团	体内的常见状态
3.0 ~3.2	C-末端羧基	负电荷
3.0 ~4.7	天冬氨酸侧链羧基	负电荷
4.5	谷氨酸侧链羧基	负电荷
5.6 ~7.0	组氨酸的咪唑基	部分带电荷(正)
7.8 ~8.4	N-端氨基	部分带电荷(正)
9.8 ~10.4	酪氨酸的羟基	不带电荷
9.1 ~10.8	半胱氨酸的巯基	不带电荷
9.4 ~10.6	赖氨酸侧链的氨基	正电荷
11.6 ~12.6	精氨酸的胍基	正电荷

(二) 疏水性

由于氢键的相互作用,水是一种有高度结构的溶剂。纯水是相当无序的(熵很高),因为其中的水分子是无法区分开的。加入溶质后,有些水分子就与溶质分子相邻。假若溶质分子能与这些水分子形成氢键,那么许多水分子就与溶剂中的大部分分子没有区别。所以,加入溶质后水的有序性只是增加了一点点。这是亲水性溶质。另一方面,如果溶质不能与水分子形成氢键,那么靠近溶质的水分子就与其他大部分水分子有区别了(因为形成氢键的可能性没有实现)。这是疏水性溶质。当将疏水性溶质加于纯水中时,水的熵大为减小(有序性增加)。因为熵趋向于增加,水中的疏水性分子就趋向于聚集在一起以使其暴露给水分子的面积最小。

疏水基团趋向于聚积在一起的作用是推动蛋白质、脂类、核酸以及其他分子的结构形成相互作用的强大力量。许多氨基酸的侧链既有一些亲水特性,又有一些疏水特性。碳氢基团毫无疑问是疏水的,而能形成氢键并带电荷的基团则是亲水的。甘氨酸、半胱氨酸和丙氨酸都有疏水的侧链,但它们的疏水性不强,因为它们的分子小。脯氨酸是疏水的,亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸中的大的疏水性侧链使它们的疏水性很强,甲硫氨酸亦然。

苯丙氨酸是疏水的,而与环上下的 π 电子有关的更多的相互作用更促使蛋白质和核酸中的环结构垛叠起来。其他氨基酸,酪氨酸和色氨酸中的环结构,也能垛叠起来,但它们既有疏

水的部分(环结构),又有能形成氢键的基团(分别是 $\rightarrow\text{OH}$ 和 $\searrow\text{NH}$)。

上列带电荷的氨基酸侧链基本上是亲水的,但是带电荷基团与 α -碳之间的“连接物”,特别是赖氨酸和精氨酸中的“连接物”,则有疏水性。天冬酰胺、谷酰胺、丝氨酸和苏氨酸虽然不带电荷,但基本上是亲水的(表 3.2)。

表 3.2 按极性和非极性划分的氨基酸的分类^a

基本上极性(亲水的)	基本上非极性(疏水的)
天冬氨酸	丙氨酸
谷氨酸	缬氨酸
赖氨酸	异亮氨酸
精氨酸	亮氨酸
组氨酸	苯丙氨酸
丝氨酸	甲硫氨酸
苏氨酸	脯氨酸
天冬酰胺	色氨酸
谷酰胺	

^a 注意,许多氨基酸既有极性部分又有非极性部分。

(三) 化学反应性

掺入到蛋白质中的所有氨基酸,在体内在生理条件下都是稳定的。不过,有些易于被化学反应或酶促反应修饰,有些则难于发生变化。较易发生反应的氨基酸是那些侧链上有酸性或碱性基团的(天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸)或巯基(图 3.2)或羟基的(半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸)。反应性较强的氨基酸常常是酶的活性部位的一部分(第 7 章),参与酶所催化的反应。

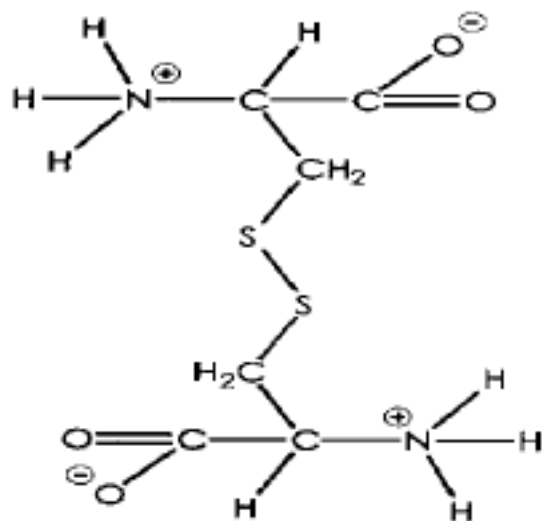
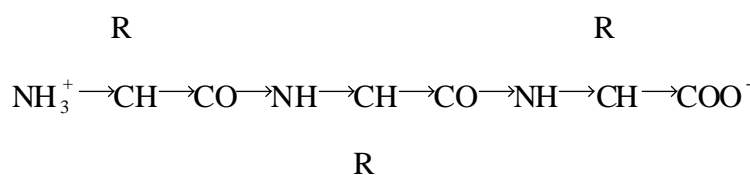


图 3.2 两个半胱氨酸侧链可以交联起来形成胱氨酸

3.3 多 肽

氨基酸可以连接成无限长的不分支的序列,连接方式是氨基和羧基一起脱去一分子水而形成亚胺基和羰基,中间由肽键连接起来(图 3.3)。在细胞中,这是由一种复杂的机制完成的,该机制与核糖体及许多别的复杂分子有关。必须要有这种复杂的机制,才能使蛋白质分子保真,也就是说,在合成的每一点上都必须使正确的氨基酸加上去。也可以用化学方法进行多肽的合成,用 Merrifield 合成法可以合成有意义但长度有限的多肽。

这两种过程产生的多肽主链,除在链的两端外,带电荷的 α -氨基和 α -羧基都没有了。每一个肽基团都形成很好的氢键, $\searrow\text{N}\rightarrow\text{H}$ (胺基) 呈阳离子态而 $\searrow\text{C}\Rightarrow\text{O}$ (羰基) 呈阴离子态。链有独特的方向,习惯上是将氨基末端(N-端)写在左边,羧基末端(C-端)写在右边:



每种蛋白质都有其特有的氨基酸序列。序列的写法是从氨基端写到羧基端,例如胰岛素的 A 链的序列: NH_3^+ -甘-异亮-缬-谷-谷胺-半胱-半胱-丙-丝-缬-半胱-丝-亮-酪-谷胺-亮-谷-天胺-酪-半胱-天胺- COO^- 。当仅仅知道组成时(即序列未知时),则氨基酸由逗号分开并用括号括起来,例如(丙,半胱₂,甘)的意思就是由 1 个丙、2 个半胱和 1 个甘组成的肽,其序列未知。习惯上“多肽链”就是仅仅由肽键连接起来的连续的链。一种蛋白质可能只有一条多肽链,这时多肽与蛋白质就是同义语。在另一些情况下,一种蛋白质可能有一条以上的多肽链,如胰岛素。在这种情况下,蛋白质内的不同多肽链可能是由非共价的力联系在一起,如血红蛋白中的情况,有时也可能是由起补充作用的共价的胱氨酸的交联连接在一起的,如胰岛素中的情况。在许多情况下,非共价的相互作用使得有一种以上的构象存在,而蛋白质则可以从一种构象转变为另一种构象,从而执行其功能。

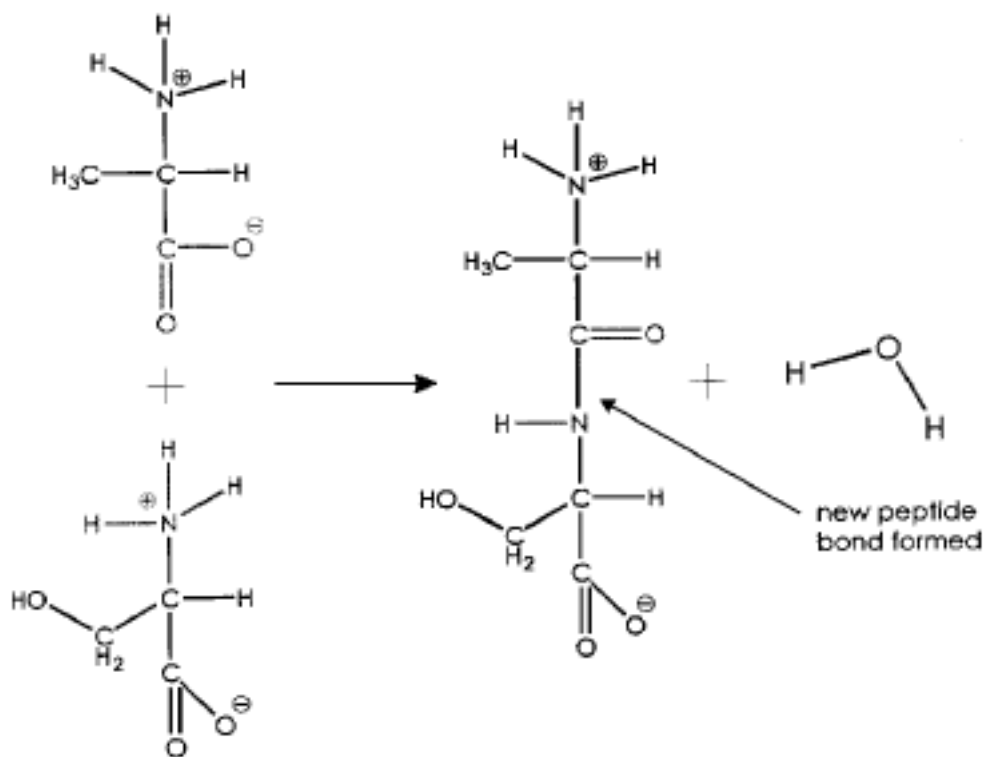


图 3.3 肽键的结构及形成

蛋白质中占压倒多数的肽键都是在 α -氨基和 α -羧基之间的,形成的是一条线状的不分支的链。在少数但重要的情况下,侧链上的氨基和羧基也能形成异肽键而连接起来形成一个分支(如一种小的蛋白质遍在蛋白的 C-端与另一种蛋白质的连接)或形成交联(如血液凝固中血纤蛋白多聚体中的情况)。

在生物体内,一种特定的蛋白质有固定的序列,是由基因决定的。不同物种中功能相似的蛋白质通常具有相关但不同的序列,这决定于进化过程中物种及有关蛋白质的分隔。残基特性无显著改变的一种氨基酸的变化,如缬氨酸 异亮氨酸,是最常见的。这些是保守替换。许多种蛋白质都有在进化过程中高度保守的序列区域,这些序列常常代表着形状和(或)功能均保守的结构域。我们现在开始来学习识别这些区域,并在某些情况下,从氨基酸序列推导其功能。在某些蛋白质中,结构是保守的,但序列不一定保守。

3.4 蛋白质结构

蛋白质中的化学基团及它们之间的共价键(一级结构)仅仅是蛋白质结构的一部分,因此蛋白质在合成过程中或其后一般都要呈现一定的形状或折叠形式。正是这种特定的形状或曰结构,把其功能所需要的各个部分拉到了一起。蛋白质折叠成复杂而又独特的形状,X射线结晶学和磁共振技术已非常详细地揭示了许多种蛋白质的结构。几种常见的重复出现的序列片段帮助我们了解蛋白质是如何折叠的以及折叠如何影响它们的功能。构象一词是通常用来描述空间排列的,这种排列是由个别的弱的非共价键所决定的。

蛋白质之所以引起疾病就可能是因为没有正确的结构,以后我们会了解,血红蛋白中的一种先天性障碍,就是因为一种小的氨基酸甘氨酸为一种大的氨基酸苯丙氨酸所取代,而正常血红蛋白结构中的一个小的空间装不下苯丙氨酸。这样,血红蛋白的结构就不稳定了,于是出现了贫血。

主链围绕着每一个残基的 α -碳原子的每一侧的单键旋转就可形成非常复杂的形状。旋转的角度称为 ϕ 和 ψ , 对于每一个 α -碳原子, ϕ 和 ψ 的值均不同。

一条多肽链可以形成许多不同的结构,但这些结构的稳定性则与侧链有极大的关系。侧链之间,侧链与主链,侧链与溶剂之间都发生非共价的相互作用而决定蛋白质的形状。从细胞中运出的蛋白质中,或者在胞外的结构域中,常常会形成二硫桥,严重限制蛋白质的形状。因此实际的折叠形式是由蛋白质的环境及其氨基酸序列所决定的。主链的折叠可以用两个角度来描述,每个肽键都有 ϕ 和 ψ 两个角,因为 $\text{N}-\text{C}$ 键的角是由 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{C}-\text{N}$ 键之间的共振所固定的,所以二者都有双键的部分特性,于是 $\text{C}-\text{N}$ 键不能旋转并位于 $\text{C}=\text{O}$ 键的平面上(图 3.4)。需要详细的原子坐标才能描述侧链的位置,位置是可变的。

任何一种蛋白质的结构都可用各级的结构来描述:一级、二级、三级和四级。一级结构就是多肽链中氨基酸的序列。这通常就是蛋白质共价结构的

同义语,不过双硫键有时可算是三级或四级结构的一部分。二级结构指的是大分子主链的局部折叠,可由相邻的肽基团间的角度具体描述。蛋白质的二级结构中,很大一部分是固定的,在许多种蛋白质中都有。三级结构指的是多肽链的下一个层次的折叠,此时二级结构的元件又发生彼此相对应的排列。只有具有一条以上多肽链的蛋白质才有四级结构,它指的是蛋白质中不同多肽链的数目、类型和排列。

(一) 二级结构

蛋白质的二级结构可能是均一的,也可能是不规则的。均匀的结构是说每一个氨基酸都以同样的方式与前一个氨基酸连接。均一的结构在结构蛋白中特别显著,特别是有重复氨基酸序列的结构蛋白中(如角蛋白、丝心蛋白、胶原蛋白),在球状蛋白的短的片段中也有(如血红蛋白、酶)。大多数氨基酸序列理论上可以形成几种类型的二级结构,但实际上存在的都是

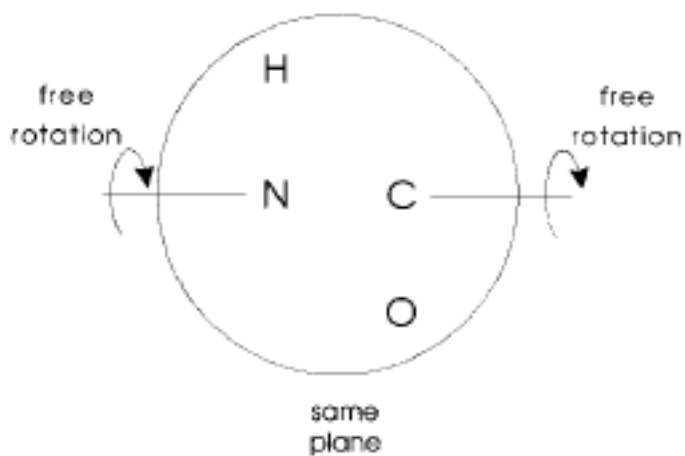


图 3.4 平面的肽键(圆圈中)

肽键两侧的键均可发生自由旋转,但肽键本身却是在平面上,不能自由旋转,其原因是虚线所示的共振。一种共振形式是 $\text{N}=\text{C}$ 是双键,而另一种形式是 $\text{C}=\text{O}$ 是双键。

一种特定的结构,因为侧链的相互作用会使一些具体的结构变得稳定或不稳定。实际上观察到的结构是由氨基酸序列和溶液的条件所决定的。存在于蛋白质中的常见的均一的结构有两种, α -螺旋和 β -片,经常出现的第三类结构是回折。

最为常见的螺旋形结构就是 α -螺旋。多肽键像一个右手螺旋那样卷曲,形成一个密实的圆柱。氨基酸的侧链从中轴向外出伸,包在圆柱外面。每个氨基酸残基升高 0.15 nm,使得螺距(螺距是指螺旋上每转一圈在中轴上的距离)为 0.54 nm,所以螺旋是相当紧密的。卷曲的多肽主链的直径约为 0.7 nm,但侧链会使它变得大些。每一个残基相对于前一个残基而言,旋转 100°;每转 3.6 个残基即为 360°。这就使得一个残基的 $\text{C}=\text{O}$ 与前面的第 4 个残基的 $\text{N}-\text{H}$ 在一条线上(沿螺旋轴的方向),以此类推。于是在主链上每一对 $\text{C}=\text{O} \cdots \text{H}-\text{N}$ 之间都形成一个氢键,只有两端是例外。就是说同一链内的每一个肽键的 $\text{N}-\text{H}$ 和 $\text{C}=\text{O}$ 都与另一个肽键之间形成氢键(链内的氢键)。 α -螺旋特别稳定,因为氢键($\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}$)几乎是排成一条直线。这条线与螺旋的轴是平行的(图 3.5)。

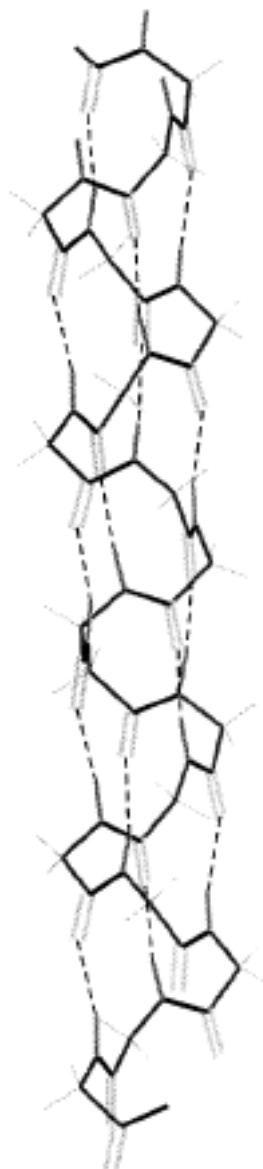


图 3.5 α -螺旋

(a) α -螺旋的肽主链(肽基团中的 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 为浅色,浅色的虚线表示螺旋上相邻两转的 $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 之间的氢键,侧链未画出,这是根据 X-射线衍射数据画出的结构;(b)中,上图为两维的氢键形成示意图(从此图中可看到螺旋一端的所有 $\text{C}=\text{O}$ 基团都暴露出来,而另一端则所有 $\text{N}-\text{H}$ 都暴露出来;但在螺旋中, $\text{C}=\text{O}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 都不会暴露,因为它们彼此之间以氢键相连)。

由 L-氨基酸组成的多肽理论上可以形成左、右手两种螺旋,但右手的 α -螺旋要稳定得多,是存在于蛋白质中的形式。另一种类型的螺旋也可能存在,但仅在蛋白质的 α -螺旋区的末端以短的片段存在(不过某些合成的多肽会形成异常的螺旋)。

酰胺基和羰基的极性意味着在 α -螺旋的一端有多余的正电荷,而在另一端有多余的负电荷,因为形成氢键的形式使得一端有未形成氢键的酰胺基,而另一端又有未形成氢键的羰基。这就是说, α -螺旋形成了一个电偶极子,能参与静电的相互作用。

某些氨基酸残基形成 α -螺旋比形成别的结构容易。但有些氨基酸残基则不是这样,特别是脯氨酸,常被称为“螺旋破坏者”,因为它阻止多肽链折叠成 α -螺旋。根据对结构已知的蛋白质的考察,可以列出一个表,说明某种残基存在于 α -螺旋或其他二级结构中的几率。在研究结构未知的蛋白质时,参考此几率表和经常存在于 α -螺旋中的残基的种类,就可以预测新

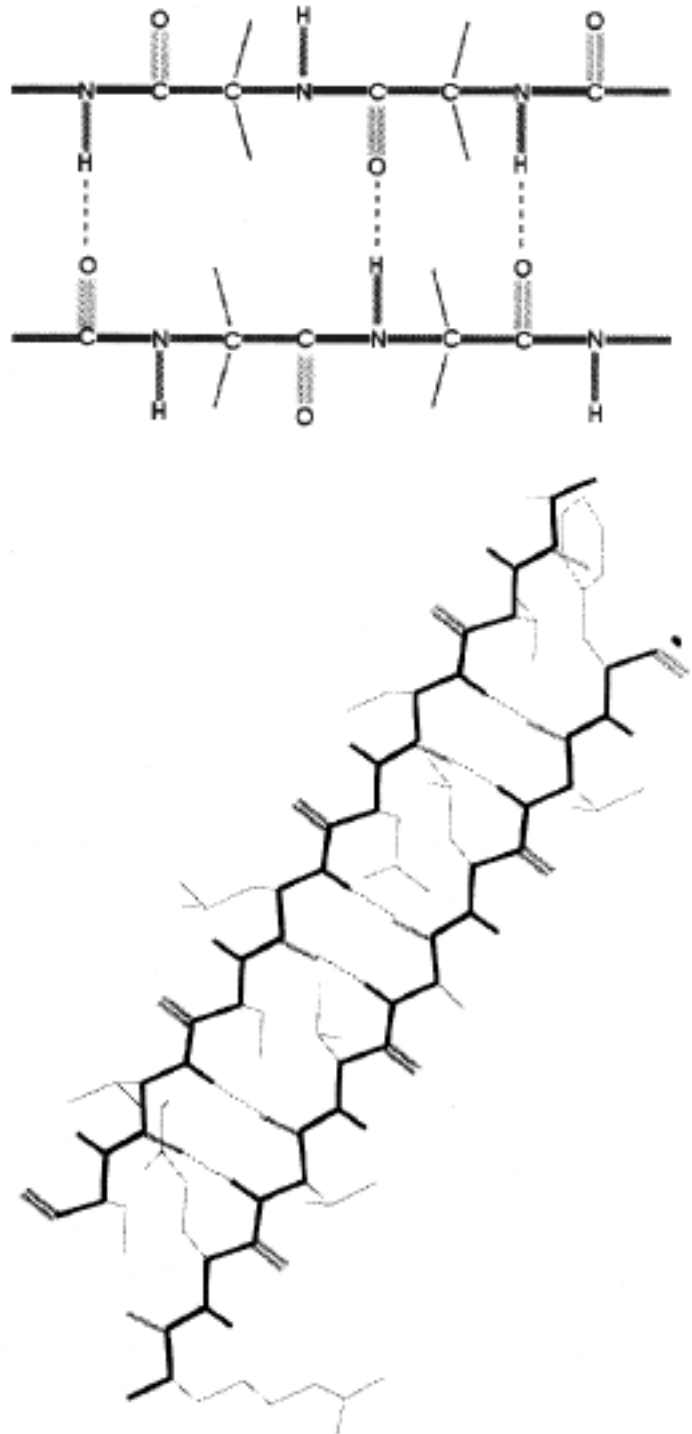


图 3.6 β -片

- (a) 氢键形成的二维示意图: 表明在反向平行的排列中,片的每个边缘都有暴露的 $N-H$ 和 $C=O$ 基团;
- (b) 图的主要部分: β -片结构中两条反向平行的多肽链(多肽主链色深,侧链、 $C=O$ 和 $N-H$ 基团色浅;虚线示两条主链间的氢键)。

的蛋白质中有多少 α -螺旋。结合其他因素,如螺旋的一面上疏水残基的聚集,这类预测方法是有用的,虽然不是决定性的。

第二类常见的二级结构是 β -结构,常称为 β -片或 β -桶。在这些结构中,多肽链要伸展得多,相邻的肽基团之间的距离是 0.35 nm 而不是 α -螺旋中的 0.15 nm。每个残基旋转 180° ;每一“转”有 2 个残基。这种结构中,相邻的主链的 $\text{N}\rightarrow\text{H}$ 和 $\text{C}\Rightarrow\text{O}$ 基团之间也都有氢键 ($\text{N}\rightarrow\text{H}\Rightarrow\text{O}\Rightarrow\text{C}$),只有边缘除外。在 β -结构中,由氢键连接的 $\text{N}\rightarrow\text{H}$ 和 $\text{C}\Rightarrow\text{O}$ 基团是在两条不同的链上(或在同一条链上不同的部分,因形成环而折回)。氢键与多肽链的方向相垂直。数目不定的链可由氢键连在一起,形成 β -片或桶状结构 β -桶。片并不很平,因为 β -碳交替地在片平面的略上或略下处。因此, β -片又称为 β -折叠片。肽基团在“折叠”的平面上,而侧链则伸到平面的上面或下面(图 3.6)。

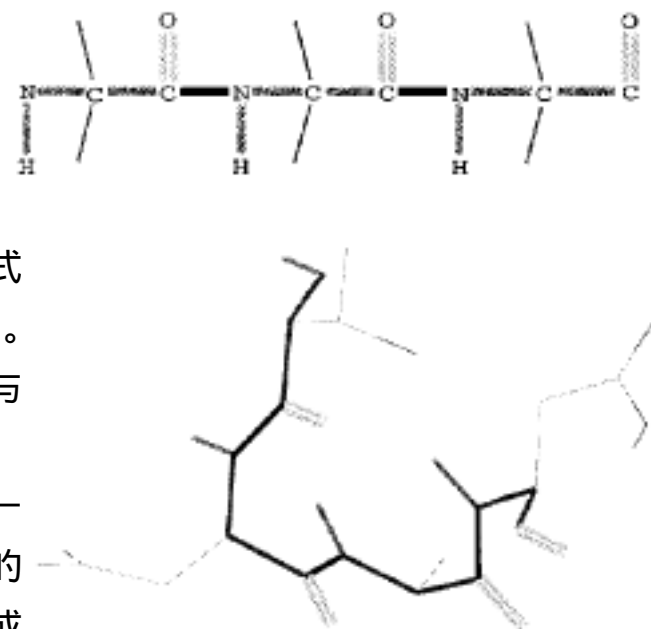
β -结构中相邻的链可以是平行的或反向平行的,两种类型均存在于蛋白质中。 β -片的最好的例子是蚕的丝心蛋白,链是反向平行的。丝心蛋白有一种氨基酸序列类似于 $\dots\rightarrow(\text{甘}-\text{丙})_n\rightarrow\dots$ 。 β -片中此序列使片的一面只有 $-\text{H}$ (R 基团),而另一面只有 $-\text{CH}_3$ (R 基团)。这两种非常小的 R 基团特别适于形成 β -结构,因为较大的 R 基团就趋向于发生不利的相互作用而妨碍主链的正确折叠。更为复杂的蛋白质序列中 β -结构的存在可根据已知的蛋白结构的资料进行预测,像 α -螺旋那样。

第三类构象是回折(或转角)。在球状蛋白中这是重要的和常见的构象要素,它使得链能够反折回来而自身折叠起来。常用脯氨酸引起结构的回折。回折也可因第 1 个和第 3 个残基之间氢键的形成而稳定化。链可以 6 种不同的方式折叠形成氢键,其中的两种方式就像修饰的 α -螺旋的一部分,称为 3_{10} 螺旋(3_{10} 弯曲)。有些其他形式曾被称为 γ -弯曲,因为形成氢键的形式与 β -片中的类似(图 3.7)。

蛋白质中的其余残基则存在于两种结构类型之一中。第一种类型存在于球状蛋白中,是固定的、唯一的或不重复的结构。第二种类型存在于非球状蛋白中或球状蛋白的非球状部分中。这种结构中,多肽链的构象不是固定不变的,在溶液中当链来回移动时,其角度会不断变化。这种没有结构的状态称为无规卷曲。至少在某些情况下,存在于分离的蛋白质中的无规卷曲形式在细胞中会结合在另一种结构(如核酸)上,因而是有固定构象的。在酶中无规卷曲不很多,但在另外一些蛋白质,如染色体中的组蛋白中,无规卷曲却是重要的特征。

(二) 功能基元和功能域

一级、二级、三级、四级这些术语用于蛋白质结构的各个等级。不过,我们考虑得越来越多



N 图 3.7 多肽链中的回折

(b) 结构示多肽链中明显回折的一例。主链色深, $\text{C}\Rightarrow\text{O}$ 和 $\text{N}\rightarrow\text{H}$ 基团色浅。视回折的具体构型而定,主链的基团之间或主链基团与侧链之间可能有氢键。此例中无氢键形成,见(a)。

的是蛋白质的功能基元和功能域。功能基元或域是指蛋白质中起着特定功能的部分。现在已经认识到相当多数的基元和域,而且数目正在增多。简言之,基元是氨基酸序列中的一小段,其功能已属公认,而功能域则是氨基酸序列中的较大的片段。大小的范围并不明确,不过功能已被公认的小于25个氨基酸的序列通常称为基元,而功能已被公认的大于50个氨基酸的序列则通常称为域。

一个基元可能小到2个氨基酸。例如,脯氨酸指导的蛋白激酶识别—丝/苏-脯—这一序列,并将丝氨酸或苏氨酸磷酸化。并非基元中的所有残基都必须是固定不变的。例如,添加N-连接的寡糖的识别信号是一天胺-Xxx-丝/苏—,其中“Xxx”符号意即“任何”,代表任何一种氨基酸。较常见的基元要长一些,如依赖于环AMP的蛋白激酶的识别信号所识别的就是基元中的3个或4个氨基酸(...苯丙...7个氨基酸...精-精-任何-丝-疏水的-...),或蛋白质到位信号中的这种序列。基元可以用结构定义,也可以用序列定义。例如,锌指基元就是许多种结构,它们与锌结合并参与蛋白质与DNA的序列专一的结合。

功能域是蛋白质中大得多的部分。例如SH2域是100个左右氨基酸的序列(图3.8),它形成一个专一与磷酸酪氨酸结合的单位;同样,SH3域形成一个与聚脯氨酸序列基元结合的单位。已鉴定出与DNA结合并影响RNA合成的功能域。蛋白质中与DNA结合的域在某些情况下可与调节转录的域分开。在类固醇激素受体中,有3个功能域,一个是基因活化域,一个是与DNA结合的域,还有一个激素结合域。功能域常常是蛋白质的催化活性所在;例如,恰恰有两类蛋白激酶的催化域就存在于1000种以上的蛋白激酶之中。

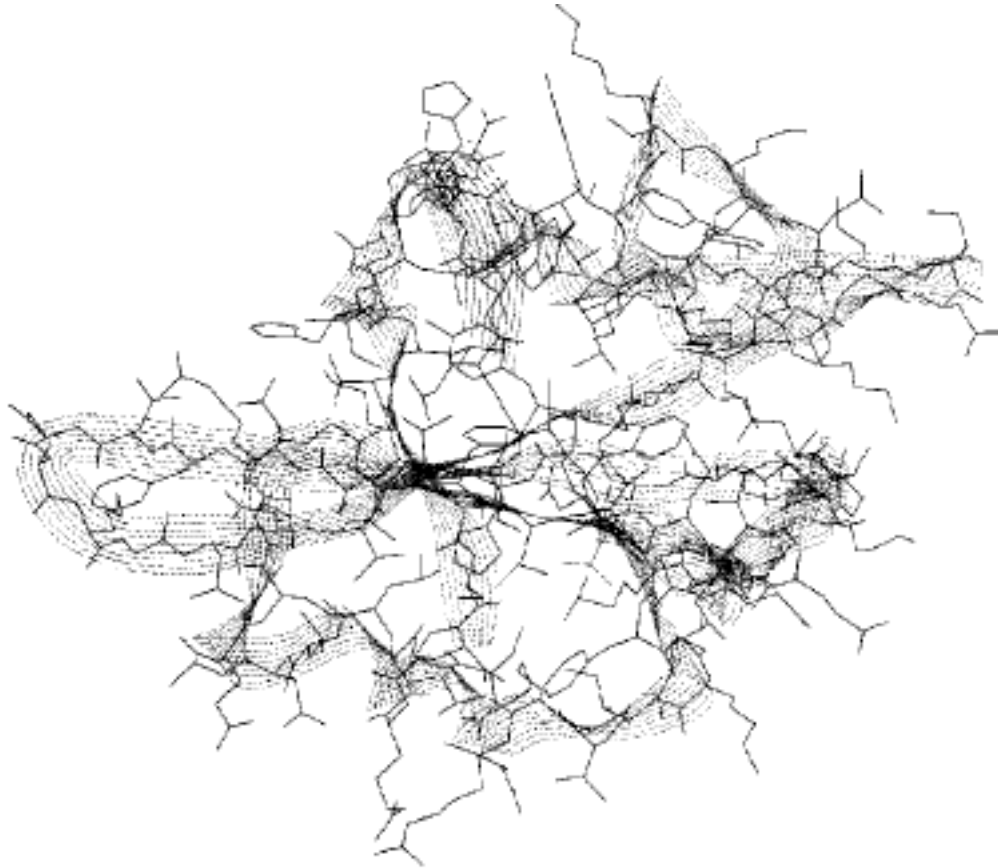


图3.8 蛋白质的域

这是SH2域,其功能是与磷酸酪氨酸结合。有横纹的带表示主链的方向。

(三) 结构域

域在结构上和功能上都是保守的。根据情况,既可以认为它是功能的,也可认为它是结

构的。

结构域的一个最简单的例子是跨膜蛋白。通常这种蛋白质有一个域的序列, 其中有一个跨膜域, 此域在胞外域之后而在胞内域之前。在一个蛋白质分子中, 这种序列可能有好几个重复。在这种情况下, 各个域的区别可能如下: 胞外域通常有 O-连接的寡糖链和氧化为胱氨酸而形成二硫桥的半胱氨酸; 跨膜域通常形成 α -螺旋, 主要有疏水的氨基酸侧链, 以与膜的疏水核心相互作用。在跨膜蛋白的细胞外域中广泛存在的结构域是免疫球蛋白的折叠。

另一个重要的例子是所谓的“核苷酸折叠”。这是一种与核苷酸结合的域, 存在于许多种与 ATP 或 GTP 结合的蛋白质中。核苷酸折叠域中的氨基酸序列非常保守, 即使在功能未知的蛋白质中也能将其识别出来。

许多与 DNA 结合的蛋白质可依其可被识别的域而归入已被鉴定的类别之中。例如, 许多细菌的 DNA-结合蛋白利用“螺旋-转角-螺旋”结构基元, 而许多高等生物的 DNA-结合蛋白则有另一种称为“锌指”的结构基元。

随着功能已知的已被识别的域的数目的增加, 越来越容易根据蛋白质的序列至少部分地推出其功能以及结构。蛋白质激酶就是非常好的例子。

(四) 三级结构

三级结构是二级结构以上的层次。例如, 在上述锌指基元中, 就有二级结构的 α -螺旋和 β -片的区域。这些区域相互作用而形成一种特有的高级结构, 即三级结构。

利用 X 射线衍射法分析蛋白质晶体, 近年来又利用磁共振技术研究溶液中的蛋白质, 已经测定了相当多数的三级结构。在某些情况下, 已有可能证明晶体结构与溶液中的结构关系密切。例如, 已有可能示证某些酶(核糖核酸酶、胰糜蛋白酶、羧肽酶)甚至用化学交联法被固定在晶体的构象中时仍有催化活性。对于溶菌酶, 已经可能用非常详细的磁共振波谱测定法证实, 它在溶液中的构象与晶体结构相似。磁共振波谱术的发展已有可能直接测定溶液中的小的蛋白质分子或分离的域的结构。

结构域可能在功能相似的蛋白质(如肌红蛋白和血红蛋白)中重复出现, 也可在不同的蛋白质中出现。不过, 蛋白质的结构变化多端, 对三级结构的详细了解和预测远非目前的知识所能及。结构上相近的蛋白质常常有相似的氨基酸序列, 但毫无关系的序列也可能形成相似的结构。

有些一般的规律有助于对蛋白质三级结构的一般了解, 但并非普遍正确。

- (1) 构象非常密实, 其中留下的空间最小, 而且内部只有少数位点可容纳束缚水。
- (2) 所有带电荷的侧链都存在于分子表面, 并与溶剂相互作用。
- (3) 大的疏水侧链趋向于深藏在分子内部。
- (4) 大多数氨基酸残基均存在于二级结构的 3 种主要形式之一中。
- (5) 三级结构的稳定主要靠的是半胱氨酸(只要它存在)的交联和疏水力的配合。疏水力是由多肽链的不同区域间的相互作用而产生的。例如, 两个 α -螺旋可以相互作用而形成 α -螺旋的卷曲螺旋, 或者 β -桶可能成为一个核心而为 α -螺旋所围绕, 等等。
- (6) 三级结构常与蛋白质的功能有密切关系, 如肌红蛋白的结合血红素的小袋和酶的底物裂缝。
- (7) 蛋白质可能包括好几个彼此分开的域。

(五) 四级结构

许多种蛋白质把两个或更多个多肽亚基密装在一起,形成二聚、三聚、四聚或更大的蛋白质,从而将其结构再推进一步。异二聚体有不同的亚基;同二聚体则有完全相同的单体。例如,称为限制性内切酶的与DNA结合的蛋白质可能是对称的同二聚体。这就使得它们可能沿着DNA链的任何一个方向去接近识别序列。蛋白质的亚基是由非共价力和二硫桥结合在一起的,类似于三级结构中有关的相互作用。相互作用的净效应是亚基的非常专一的结合,这通常是对蛋白质的功能至关紧要的。

四级结构常常与功能有密切关系。例如,可能同时存在一种以上的酶活性,使得一个反应的产物立即被下一个反应用作底物,从而避免了从一种酶扩散到另一种酶在时间上的延误。在许多情况下,同样的配体结合位点或酶活性可能位于蛋白质的一个以上的亚基之上,于是四级结构就能介导亚基之间的相互作用。例如,在血红蛋白结合氧(将在第6章中详细讨论)时,4个亚基均与氧结合,但任何一个亚基的亲和力决定于另一个亚基上有无氧。这种变动的亲和力称为协同性,是血红蛋白传送氧的关键所在。同样,某些酶的四级结构介导的协同性也是代谢途径的反馈调节的基础。

3.5 翻译后的修饰

多肽链是通过称为翻译的过程在细胞质中合成的。翻译后蛋白质可能立即就有用,或者它还需要一个进一步成熟的过程,例如易化折叠、复合体形成、转运至另一细胞区室中,或者蛋白质上化学基团的共价修饰。最后一个过程就称为翻译后共价修饰。有些修饰发生在细胞质或细胞核中,特别是磷酸化和乙酰化;有些则发生在内质网或高尔基体中,特别是糖或多糖残基的加成。

蛋白质磷酸化是细胞中普遍发生的翻译后修饰。它是可逆的,会显著影响被修饰的蛋白质。蛋白质磷酸化是细胞所用的信号转导的最重要的机制。在原核生物中,人所熟知的可逆的蛋白磷酸化发生在组氨酸和天冬氨酸上;在真核生物中,最熟知的磷酸化发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的羟基上,不过组氨酸也可能被磷酸化(图3.9)。还有其他的可逆修饰,如组蛋白中赖氨酸残基的乙酰化。

许多修饰作用似乎是不可逆的,这些修饰有:脯氨酸的羟基化,结构蛋白如胶原蛋白中存在的其他修饰的氨基酸,血液和骨骼蛋白中 γ -羧基谷氨酸的形成,许多蛋白质的 ϵ -氨基的乙酰化,以及蛋白质的异戊二烯化。后一作用是使蛋白质锚定在质膜的胞质面上。

3.6 蛋白质的纯化

在生物体内蛋白质一般存在于非常复杂的混合物中。虽然运用现代的许多方法和技术可以用这些复杂的混合物进行许多种实验,但是只能从纯粹的蛋白质得到关键性的信息。蛋白质纯化的过程,一般而论,是费时费力而又难以预料的。有必要连续地将好几种纯化步骤用于一个样品。最强有力而又用途广泛的两类方法是柱层析和凝胶电泳。

(一) 柱层析

层析柱很简单,只是一根玻璃管或钢管,其中填有层析介质。层析介质是小珠子——典型

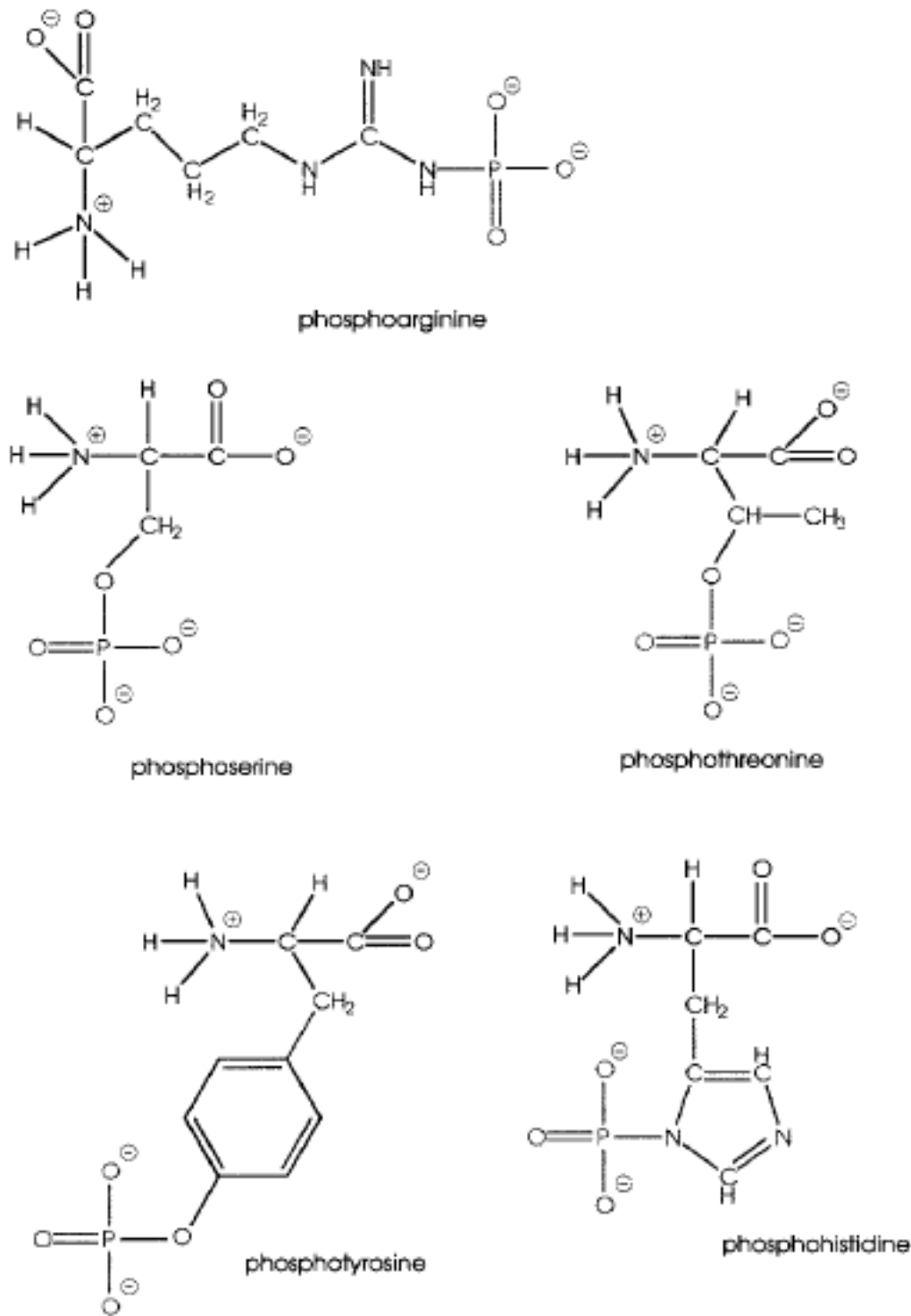


图 3.9 蛋白质中存在的几种磷酸氨基酸

的直径为 10 或 15 μm ——紧密地填装在柱中, 这些小珠子的性质就决定了层析法的性质。先将要分离的蛋白质混合物溶于适当的溶剂中, 再迫使它通过层析柱, 于是蛋白质即与层析介质发生相互作用。介质会与某些蛋白质结合, 使它们走得慢一些, 于是会与那些不和介质结合的蛋白质分开而被洗脱下来。因此, 可根据蛋白质对层析介质的亲和力而将其分开。

最常用的层析介质有亲和介质、离子交换介质、反相介质和分子筛介质。亲和介质含有专一的配体, 只与所研究的蛋白质结合, 可用于此目的配体有酶的专一抑制剂或特定的 DNA 序列。所研究的蛋白质与层析柱结合, 混合物中的其他蛋白质则通行无阻。然后用一种能破坏配体与蛋白质之间相互作用的溶剂将蛋白质洗脱下来。这样洗脱下来的就是纯的蛋白质。

离子交换介质含有带电荷的基团——或是带正电荷的阳离子交换剂, 或是带负电荷的阴离子交换剂。所带电荷与层析介质的电荷相反的蛋白质就会结合上去, 而电荷相同的则径直流走。然后用盐浓度不断增高的洗脱溶剂进行洗脱。盐溶液中的离子与结合的蛋白质竞相争夺树脂上的带电荷的基团, 当盐浓度增加时, 介质或树脂上的蛋白质便被替换下来。结合得较

弱的蛋白质先被洗脱下来。用这种方法,可以利用盐浓度的梯度将蛋白质分成许多不同的部分,其中有的部分就可能含有一种纯的蛋白质。

反向层析介质是一个疏水的表面,例如二氧化硅。先将蛋白质混合物放在比较亲水的溶剂中,于是表面上带有疏水斑块的蛋白质便会结合在柱上。再用疏水性越来越强的溶液洗脱层析柱,蛋白质就会按照其疏水性的大小而被洗脱下来,因为它们会依溶剂的梯度而被取代。这个方法也能将蛋白质混合物分为许多不同的部分。

分子筛介质——亦称凝胶过滤——不是与被分离的蛋白质结合,而是因小珠中孔隙的大小而使小的蛋白质进入小珠内,大的蛋白质则被排除在珠外。这样,小的蛋白质就要在柱内长途旅行,因而最后被洗脱出来,大的蛋白质先出来。这样,蛋白质混合物就可根据其大小而被分成几个部分。

柱层析的装置可以很简单,用开口的柱和手工洗脱并收集洗脱液,也可以十分复杂,用 FPLC(快速蛋白质液相层析)或 HPLC(高效液相层析)技术。虽然原理相同,但 FPLC 和 HPLC 的设备比手工方法要快得多,重复性也好得多。

(二) 蛋白质的凝胶电泳

凝胶电泳的原理在第2章中已有说明。在这方面,蛋白质要比核酸复杂得多,因为蛋白质所带的电荷可能是正的,可能是负的,也可能是零,而核酸总是带负电荷的。蛋白质凝胶电泳所用的凝胶是聚丙烯酰胺。也可以在没有凝胶的情况下进行蛋白质电泳,即在非常细的管子中进行实验,以减少侧向的扩散。这种技术称为毛细管凝胶电泳,由于其分辨率高、速度快、重复性好,正在得到推广,但需要复杂的设备。

蛋白质凝胶电泳可分为三类:非变性凝胶电泳、SDS 凝胶电泳和等电聚焦。在非变性凝胶中,蛋白质是在保持其天然结构的溶剂中发生电泳。因此,移动方向决定于蛋白质所带的电荷,移动速率则决定于蛋白质上的电荷及其大小。对于电荷上的差别比大小上的差别大的蛋白质的分离,这种方法非常有用。

SDS 凝胶含有去污剂十二烷基硫酸钠。SDS 在每一个蛋白质分子上形成一个“外壳”,使之变性并且盖住了它的电荷。这样,在 SDS 凝胶上,所有的蛋白质都向阳极移动,因为 SDS “壳”上带的是负电荷,“壳”的电荷密度均匀意味着蛋白质主要根据其已变性的大小移动,而这种大小则决定于其分子量。SDS 凝胶电泳很有用,因为它能分离几乎所有蛋白质的混合物,包括在没有去污剂和标准条件下不溶性的膜蛋白的混合物。SDS 凝胶电泳也可用于测定蛋白质的分子量,只要与分子量已知的标准蛋白质的迁移率相比就可以了。

等电聚焦利用凝胶和 pH 梯度。将蛋白质混合物放在梯度的一端,几乎所有的蛋白质都会移动到凝胶内,因为在极端的 pH 下,它们所带的电荷是相同的。当蛋白质沿着 pH 梯度移动时,改变着的 pH 会使每种蛋白质上的电荷发生变化,最后在梯度中的 pH 等于蛋白质的 pI 时,蛋白质的电荷便为零。因为电荷为零,蛋白质便会停止不动,最后所有的蛋白质已达到其等电点,在凝胶内静止不动。

双向凝胶电泳是把 SDS 凝胶电泳和等电聚焦结合起来。先用等电聚焦把蛋白质分开,然后再将一条条的凝胶放在 SDS 凝胶板上端,再进行电泳。这是一种非常强有力的分离方法。

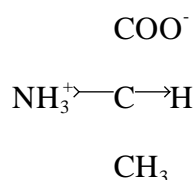
一般来说,在分析少量蛋白质时或在纯化的最后阶段,凝胶电泳最有用。虽然柱层析可用于少量材料,但最有用的是在处理大量蛋白质时。

附 录

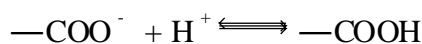
附录 3.1 pK 和 pI 的定义

水溶液中, $\text{pH} = -\log_{10}([\text{H}^+])$ 。例如, 在“中性”pH 下, $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ mol/L}$, pH 为 $-\log_{10}(10^{-7}) = 7$ 。注意 pH 低相当于 $[\text{H}^+]$ 高。细胞或体液内的 pH 称为生理的 pH, 是会变的, 典型的是稍高于中性 pH, 常在 pH 7.6 左右。

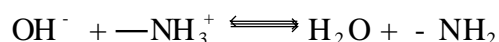
在生理 pH 下, 侧链不带电荷的氨基酸(例如丙氨酸)



的溶液中, 羧基和氨基都会电离, 如上式所示。若加入氢离子(H^+)使 pH 降低, 则羧基不电离:



若加入羟离子(OH^-)使 pH 升高, 则氨基不电离:



因此, 氨基酸既是酸又是碱, 是两性电解质。在中性 pH 下, 氨基和羧基都电离, 分子是偶极的, 或称为兼性离子。

特定化学基团的 pK 是该基团有一半电离时的 pH。一半羧基电离的 pH 是 pK_1 (例如, 丙氨酸的 pK_1 为 2.3), 一半氨基电离的 pH 是 pK_2 (丙氨酸的 pK_2 为 9.6)。

氨基酸溶液的 pH 可根据 Henderson-Hasselbalch 方程进行计算: $\text{pH} = \text{pK} + \log[(\text{质子受体})/(\text{质子供体})]$ 。对于 pK_1 , 质子受体为 $-\text{COO}^-$, 质子供体为 $-\text{COOH}$ 。对于 pK_2 , 它们分别是 $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{NH}_3^+$ 。本章附录 3.3 中有一个例子, 说明如何利用 Henderson-Hasselbalch 方程计算一个分子的电荷。我们用 pK 表示表观的或测得的数值, 用 pK 表示经过热力学校正的数值。在多数情况下, 这种区别可以忽略。

在一特定 pH 之下分子的净电荷为零, 也就是说, 假若我们把分子上的所有电荷加在一起, 其和为零。这一 pH 就是等电点 pI。丙氨酸的 pI 约为 6.0。蛋白质的 pI 可用于以等电聚焦法分离极为相近的蛋白质。若 pI 大于 7, 则说该蛋白质是碱性的; 若 pI 小于 7, 则说该蛋白质是酸性的, 虽然这两种蛋白质都是既有酸性基团, 又有碱性基团。

附录 3.2 与决定蛋白质结构有关的力

与决定 α -碳的角度有关的主要的力有:

(1) 胱氨酸的交联提供结构中非常稳定的结合点。用还原剂可以除去半胱氨酸的交联, 用氧化剂可以取代它。

(2) 疏水的相互作用。盐类可使疏水的相互作用稳定。胍基、脲、硫氰酸盐等离液序列高的化合物则使之不稳定。

(3) 氢键(H-键)。个别的氢键虽弱, 但典型蛋白质中许多氢键的作用聚集在一起却是重要的结构特点。氢键是有方向的, 对蛋白质内和蛋白质与其他分子(包括其他蛋白质和核酸)之间的相互作用的专一性方面有重要作用。主链和侧链上均可形成氢键, 其集聚的影响是重

要的。氢键可因离液序列高的化合物而变得不稳定。

(4) 静电力, 亦称离子键或盐桥, 仅存在于带电荷的化学基团之间。因此, 这种相互作用仅存在于带电荷的残基的侧链之间或者当偶极子形成时, 在无水电时(例如在结构内部)静电的相互作用较强, 盐类则使之不稳定化。

(5) 原子占据一定的空间, 只有通过共价键的形成才能压缩其体积。因此, 原子的位置不能重叠。对蛋白质结构的这种影响称为空间位阻。可以预期, 体积大的侧链如色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸等, 由于空间位阻, 其位置受到很大限制, 而小的侧链如甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸则可占据各种各样的位置, 使得多肽链的方向可以发生显著的变化。脯氨酸是一个特殊的情况, 因为多肽链的折叠受到侧链与 α -氨基之间的共价键的限制。

(6) 其他相互作用。还有各种各样更多的相互作用也是重要的, 例如当环堆叠时的 π - π 相互作用, α -螺旋中偶极子的形成会产生更多的静电相互作用, 还有范德华相互作用, 它促进原子与其他力接触。

附录 3.3 Henderson-Hasselbalch 方程应用举例

问题: 考虑血红蛋白中的一个组氨酸残基, 它在血液中质子的转运方面有作用。在毛细血管中的一个特定位置上, 血红蛋白分子释放氧, 使该蛋白质转变为互变异构的结构。其结果, 组氨酸的 pK 由 7.0 变为 7.4。若在这一点的血液 pH 仍为 7.4, 这种构象的变化使组氨酸残基取得多少个质子?

这个问题可归结为求出组氨酸电荷的变化。 pK 增加, 电荷就增多, 而增多的量就相当于取得的质子数。(实际上, 答案应该是一个质子的几分之几。这实际上就意味着反复不断地结合质子和释放质子的组氨酸与质子结合的时间较长。)

当 pK 为 7.0 时电荷是多少? 利用 Henderson-Hasselbalch 方程计算带电荷的和不带电荷的形式之比, 再用此比值计算组氨酸上的平均电荷如下:

pH 为 7.4 和 7.0 时, Henderson-Hasselbalch 方程为:

$$7.4 = 7.0 + \log([\text{质子受体}] / [\text{质子供体}])$$

组氨酸的质子受体的形式是不带电荷的, 而质子供体的形式是带电荷的, 于是:

$$7.0 = 7.4 + \log([\text{不带电荷的}] / [\text{带电荷的}])$$

解此方程式, 则:

$$[\text{不带电荷的}] / [\text{带电荷的}] = 10^{(7.4 - 7.0)} = 2.5$$

这就是说, 在这种情况下, 每有一个带电荷的组氨酸残基, 就必须还有 2.5 个不带电荷的组氨酸残基, 或者说, 每 3.5 个组氨酸残基中, 就有 1 个是带电荷的。因此, 平均电荷为 $1.0 / 3.5$, 即 0.29。

现在, 我们要求得 pK 为 7.4 时的平均电荷。我们可以再用 Henderson-Hasselbalch 方程进行计算, 用新的 pK 值, 或者只要记住当 pH 等于 pK 时, 有一半组氨酸残基是带电的, 就可简化计算方法, 于是平均电荷为 0.5。

这样, 当 pK 由 7.0 变为 7.4 时, 组氨酸上的电荷由 0.29 变为 0.50, 变化为 0.21。上述问题的答案是: “在 pH 为 7.4 时, pK 由 7.0 变为 7.4 需要取得 0.21 个质子。”

附录 3.4 氨基酸的三字母符号和单字母符号

丙氨酸(Alanine) Ala, A

亮氨酸(Leucine) Leu, L

精氨酸(Arginine) Arg, R	赖氨酸(Lysine) Lys, K
天冬酰胺(Asparagine) Asn, N	甲硫氨酸(Methionine) Met, M
天冬氨酸(Aspartic acid) Asp, D	苯丙氨酸(Phenylalanine) Phe, F
半胱氨酸(Cysteine) Cys, C	脯氨酸(Proline) Pro, P
谷氨酰胺(Glutamine) Gln, Q	丝氨酸(Serine) Ser, S
谷氨酸(Glutamic acid) Glu, E	苏氨酸(Threonine) Thr, T
甘氨酸(Glycine) Gly, G	色氨酸(Tryptophan) Trp, W
组氨酸(Histidine) His, H	酪氨酸(Tyrosine) Tyr, Y
异亮氨酸(Isoleucine) Ile. I	缬氨酸(Valine) Val, V

3.7 小 结

- (1) 蛋白质执行生物体内的大多数分子活动,有时是与核酸和糖类合作。
- (2) 蛋白质是氨基酸的多聚体。
- (3) 氨基酸的主要的氨基端和羧基端是带电荷的;精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸和赖氨酸的侧链在生理 pH 下也是带电荷的。带电荷的分子通过静电力彼此相互作用。
- (4) 许多氨基酸有非极性侧链。这种基团不适于水的结构,因而它们在水溶液中趋于聚集在一起以减少与水相互作用的面积。这种趋势称为疏水的相互作用。
- (5) 氨基酸的主要的氨基和羧基是有化学反应性的,许多氨基酸也有具化学反应性的侧链,这些侧链上有羟基、氨基或羧基;其他侧链如苯丙氨酸的侧链,则无化学反应性。
- (6) 蛋白质是由氨基酸聚合而成的。每一个氨基酸与下一个氨基酸通过氨基与羧基的反应而连接起来,其结果是形成肽键和除去水。
- (7) 蛋白质有几种不同的二级结构,包括 α -螺旋、 β -片 and 回折。肽链的形状受到平面的肽键和非共价相互作用的限制。
- (8) 蛋白质的序列和结构中有许多可被识别的基元和域。
- (9) 单条多肽链之内二级结构的相互作用产生三级结构——蛋白质的复杂的三维形状。同一个蛋白质中不同多肽链之间的相互作用产生四级结构,它介导的是亚基之间的相互作用。半胱氨酸残基之间形成胱氨酸的二硫桥可使三级和四级结构稳定化。
- (10) 生物体内蛋白质的合成仅限于 20 种氨基酸(包括一种亚氨基酸脯氨酸),但翻译后的修饰却大大地扩大了成熟蛋白质中侧链的范围。可逆的修饰作用提供了调节蛋白质功能的机会。
- (11) 细胞中的蛋白质存在于拥挤复杂的混合物之中。个别蛋白质的纯化是由一系列的纯化步骤而完成的,这些步骤包括柱层析。蛋白质样品可用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

参 考 资 料

- Introduction to Protein Structure, Carl Branden and John Tooze, 1991, Garland Publishing, New York.
- Proteins: Structures and Molecular Properties, 2nd ed., Thomas E. Creighton, 1993): Freeman and Co., New York.
- " The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, " J. S. Richardson, 1981, Adv. Prot. Chem., 34: 167 ~ 339.

“ Protein Folding in the Cell, ” M. J. Gething and J. Sambrook, 1992, Nature 355:33 ~45.

The “ bio ” in biochemistry: protein folding inside and outside the cell, R. J. Ellis, 1996, Science, 272:1448 ~ 1449.

World Wide Web at <http://moby.ucdavis.edu/HRM/Biochemistry/molecules.htm>.

复 习 题

1. 蛋白质 α -螺旋部分中的下列哪一种取代最可能影响蛋白质的功能?
 - a) 谷 \rightarrow 天冬
 - b) 赖 \rightarrow 天冬
 - c) 缬 \rightarrow 苯丙
 - d) 丝 \rightarrow 半胱
 - e) 谷胺 \rightarrow 脯
2. 有一种氨基酸有 3 个可电离的基团, α -氨基、 γ -羧基和可能带上正电荷的侧链。pK 分别为 7,3 和 11。下列 pH 中哪一个最接近于此氨基酸的 pI?
 - a) 3
 - b) 5
 - c) 7
 - d) 9
 - e) 11
3. 下列部分的氨基酸序列中, 哪一种最可能存在于蛋白质的跨膜结构域中?
 - a) -亮-异亮-谷胺-天胺-半胱-色-
 - b) -亮-天胺-丙-丝-缬-苯丙-
 - c) -亮-缬-脯-天胺-异亮-赖-
 - d) -亮-精-异亮-天冬-缬-赖-
 - e) -亮-缬-甲硫-苯丙-丙-异亮-

参 考 答 案

1. e 所有这些取代都是保守性的, 只有谷胺 \rightarrow 脯是例外。此外, 脯氨酸不能被安在 α -螺旋中, 所以它肯定会破坏此结构。
2. d 一个分子的等电点 pI 是该分子上总的净电荷为零时的 pH。计算在所列出的各 pH 下的净电荷是多少, 再看看哪一个净电荷最接近于零。在 pH 9 时, 来自羧基($-\text{COO}^-$)的净电荷为 -1, 来自 α -氨基($-\text{NH}_2$)的为 0, 来自侧链($-\text{NH}_3^+$)的为 +1。净电荷为 0, 因此 pI 为 pH 9。
3. e 所有这些序列都至少含有一个极性残基, 但 e 是例外。没有极性残基的序列最可能存在于孤立的跨膜域中。

第 4 章 膜

4.1 引 言

许多分子都足够小,亲水性也足够大,即使在细胞质中分子密集的条件下,也能在细胞的有水环境中自由移动。因此,为了保证所有需要的分子进来和所有不需要的分子出去,所有的分子都包在一层膜内,这层膜称为质膜。真核细胞还有众多的胞内的膜结构,以调节胞内的区室之间分子的运动。因为在水相中移动分子都是亲水的,因此细胞所用的屏障就是连续的疏水的一片,亲水分子不能透过它。为防止这种二维的疏水的一片不致折叠起来成为一个三维的球,这一个片的两面都有一个亲水层,使得膜完全处于张开的状态。疏水的屏障由脂类组成,而亲水的覆盖物则为脂类分子头部的基团。这种结构称为脂双层。因为这种屏障必须调节分子的进出,所以其中还有各种蛋白质,它们运载离子、分子或信号跨过膜。

4.2 脂类、磷脂和膜结构

膜的疏水部分是由脂类分子组成的。脂类则由脂肪酸和甘油或丝氨酸衍生物组成。脂肪酸以共价键连接到极性的“头”上,“头”就是甘油。比如,二酰甘油或三酰甘油就分别有两个或三个脂肪酸与甘油发生酯化。具有这类一般结构的膜脂是磷脂和糖脂(图 4.1)。膜的主要

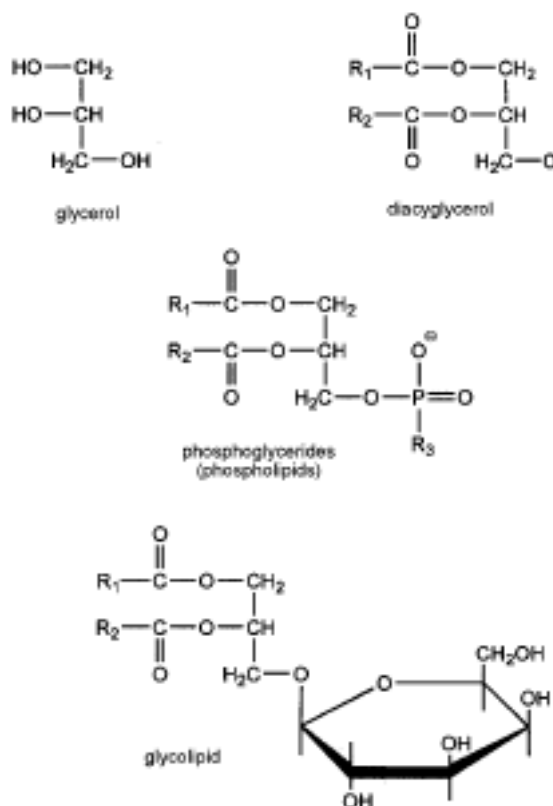


图 4.1(a) 磷脂、糖脂和鞘脂的一般结构特征

甘油有一 3-C 的“主链”,其上有 3 个羟基;二酰甘油是甘油的衍生物,前 2 个羟基被酯化;磷酸甘油酯(磷脂)是由二酰甘油衍生的,余下的羟基被磷酸化,再通过磷酸根加上第三个基团 R₃;糖脂是由二酰甘油衍生的,一个糖或多糖连在余下的羟基上。

成分是磷脂如磷脂酰胆碱(图 4.2)、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺。糖脂以糖的残基为其极性头部的基团,糖脂包括神经节苷脂,其极性基团为唾液酸。糖脂存在于质膜双层的面向胞外的一层中,而肌醇磷脂则存在于胞质侧中,而且在细胞信号转导中很重要。真核细胞的

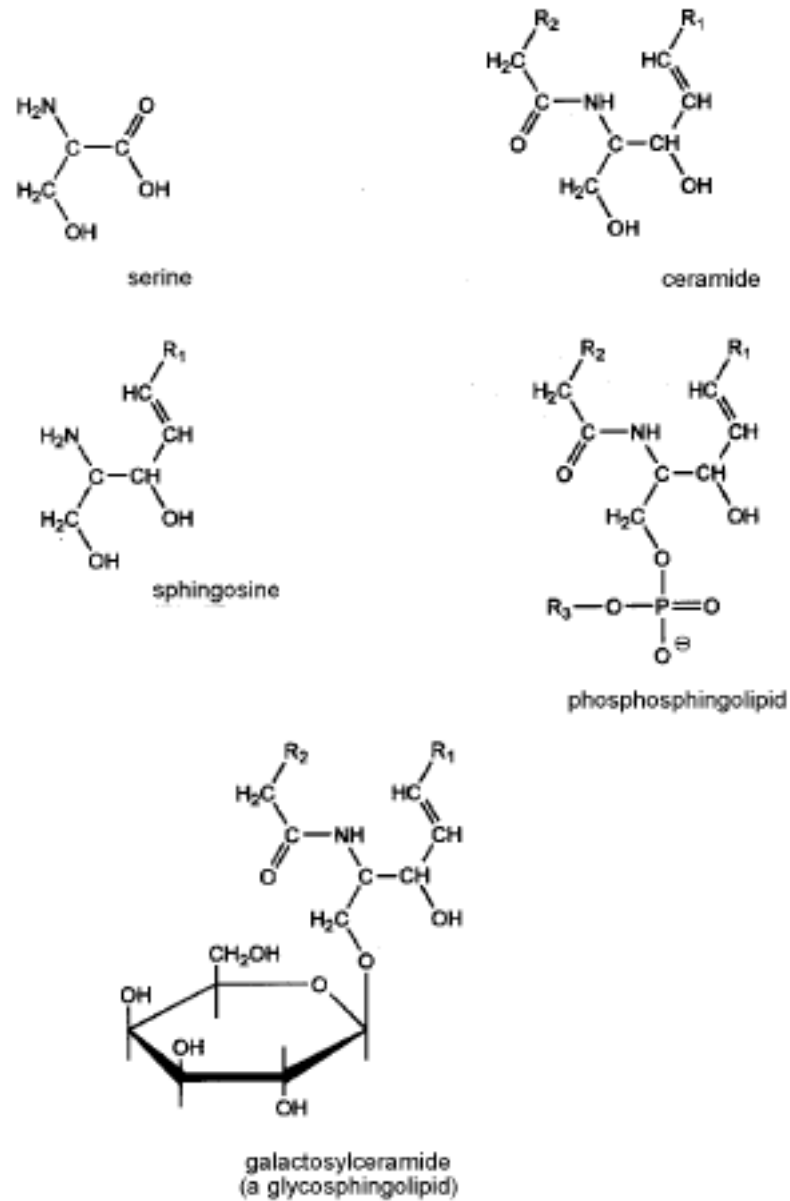


图 4.1(b) 丝氨酸也是存在于脂类中的氨基酸

鞘氨醇是由丝氨酸的羧基被一碳氢侧链取代而形成的;神经酰胺是由鞘氨醇衍生的,加上一个侧链连在氨基上;磷酸鞘脂是由神经酰胺衍生而来的,在丝氨酸原来的羟基的侧链上再加上第三个侧链;糖鞘脂是由神经酰胺衍生的,在丝氨酸原来的羟基上的侧链上再加一个糖或多糖。

质膜中还有的脂类没有较大的亲水性部分,特别是胆固醇(图 4.2b)。膜是很大的大分子复合体,厚约 5 nm,两排磷脂聚在一起,疏水的脂类部分夹在两个外层中间,外层由亲水的头部组成(图 4.3)。这样形成的“脂双层”就成为亲水的离子和分子的实质上不可透过的屏障。膜是由脂双层中非特异的疏水相互作用和头部基团的非共价极性相互作用而形成的。与球状蛋白质的结构中原子的运动受到很大限制的情况不同,相对来说,膜是液态的,膜中的个别分子可以在两相的范围内在整个膜中随机移动(图 4.3)。

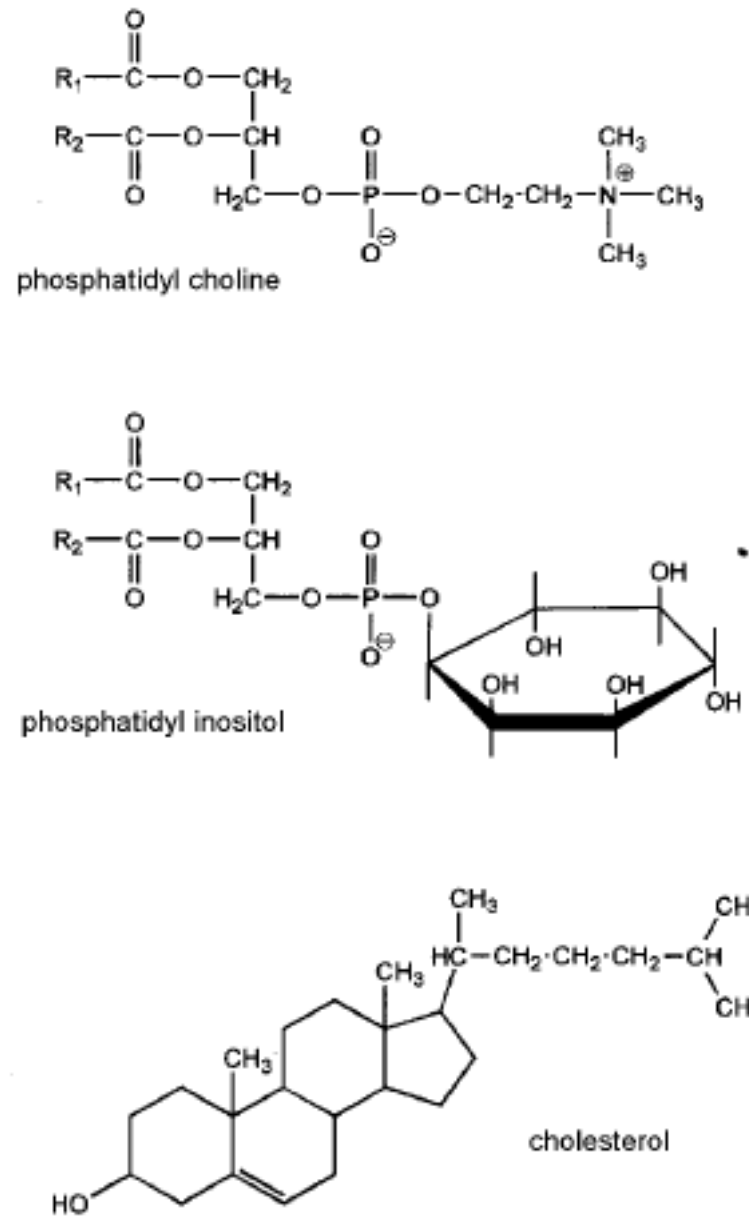


图 4.2 三种重要的脂类: 磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和胆固醇

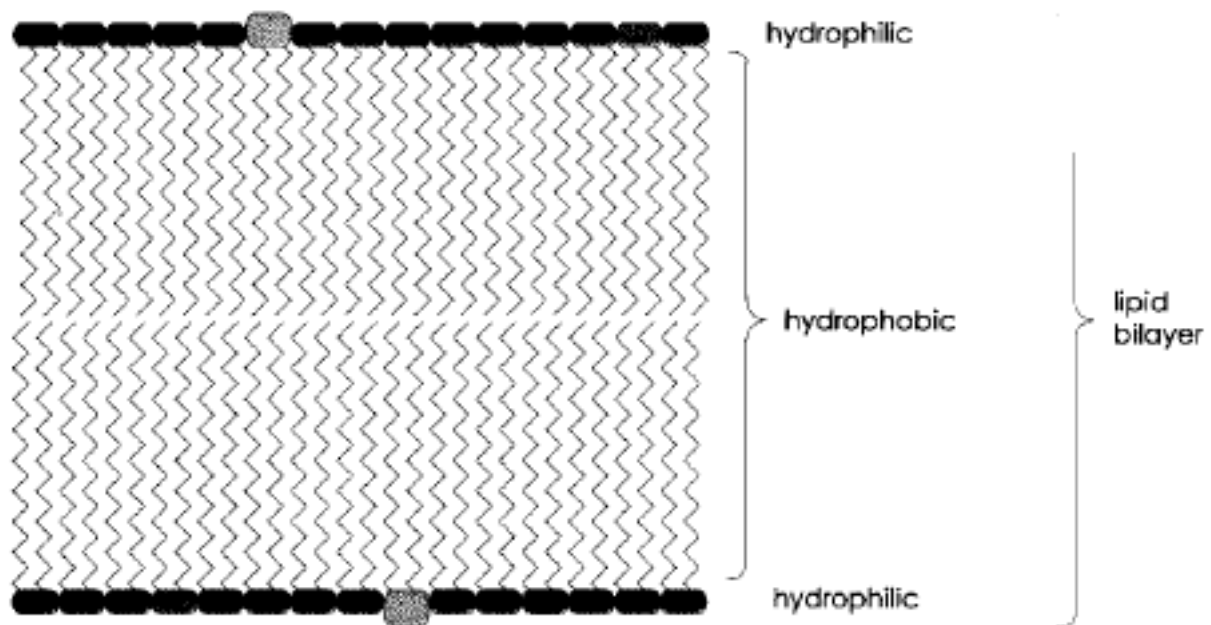


图 4.3(a) 膜结构(脂双层)

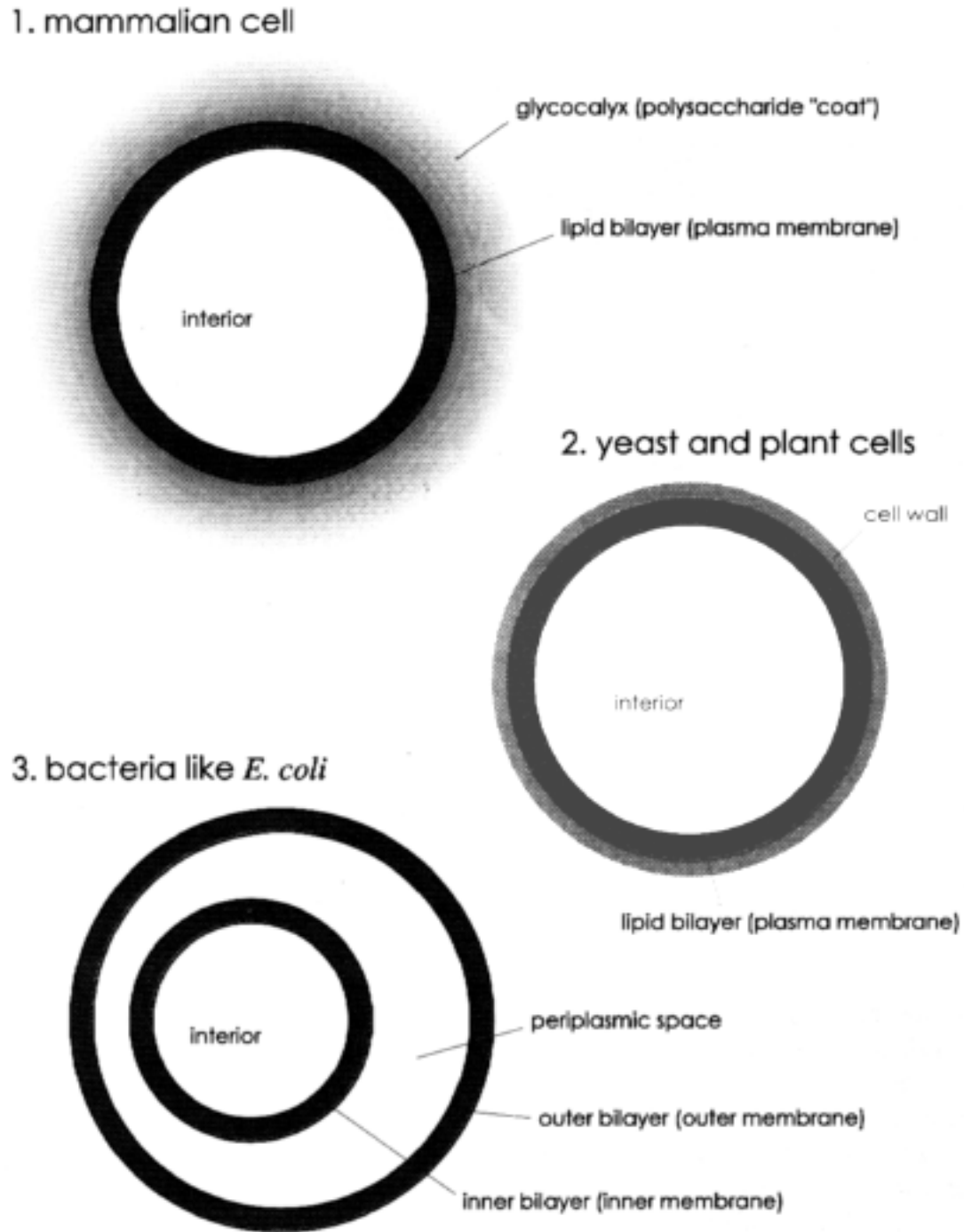


图 4.3(b) 膜结构

(i) 哺乳动物细胞; (ii) 酵母和植物细胞; (iii) 细菌细胞中质膜的组织。

膜自然趋向于形成封闭的结构, 以避免脂双层的疏水端暴露在溶剂中。用膜的碎片或合成的磷脂可以制成合成的封闭的结构, 称为脂质体。可以作成使某些化合物藏在膜中的脂质体, 也可以作成它们完全封闭在膜内的脂质体, 作为药物或基团的载体, 将它们运入有病的细胞内。脂质体是一种大家感兴趣的工具。可以用膜包被着的组分把脂质体引向适当的细胞, 而它与细胞膜的融合则可用以把脂质体的内含物送入细胞内部。

虽然在生物体内通常遇到的水环境中膜是稳定的, 但它极易被有机溶剂或去污剂所破坏, 有可能这就足以解释乙醇的一些破坏作用, 例如对胰脏的破坏作用。有机溶剂和其他物质如胍盐, 会使水的结构不稳定, 因而减低了使脂双层结合在一起的疏水相互作用。去污剂有疏水区, 能透入脂双层并破坏其结构。

许多细胞质膜的外表面是暴露在胞外的环境之中的。哺乳动物的细胞中, 外表面上的主要化学基团是糖类, 包括膜内在蛋白质和糖脂的多糖部分。含有特别大量的以共价连接的糖类的蛋白质称为蛋白聚糖, 有些蛋白聚糖就结合在质膜上, 不过大部分均存在于胞外基质中。

细胞表面上这一糖类的区域可称为糖萼,与细胞-细胞的相互作用有关,大概也是细胞的保护性外壳。酵母和植物细胞有坚固的细胞壁围绕着质膜。细菌如大肠杆菌,则有一双层的膜结构,在外面的和里面的脂双层之间有一个含水的空间,即壁膜间隙。

能透过质膜并使离子能通过的药物对细胞可能有重大影响。例如, A23187 这种药物就是称为离子载体的这类药物的一个实例。离子载体使专一的离子能够穿过磷脂的膜。A23187 让 Ca^{2+} 离子透过,于是模仿或破坏正常的细胞信号传递,这种传递本来是由 $[\text{Ca}^{2+}]$ 调节的。短杆菌肽可用作抗生素,它使 H^+ 、 Na^+ 和 K^+ 透过革兰氏阳性细菌的磷脂膜,从而杀死这类细菌。

4.3 膜中的蛋白质

膜中蛋白质的存在使得极性分子和离子可能穿过膜,蛋白质约占膜中干物质的 50%。蛋白质可能以三种常见的方式与膜的脂双层结合(图 4.4):

(1) 蛋白质可结合在膜的表面上(称为膜周边蛋白质)。

(2) 蛋白质可通过共价键与脂类的辅基结合,如与异戊二烯基结合,此辅基藏在脂双层之内(第 3 章)。

(3) 蛋白质可以跨越膜(称为跨膜蛋白质,图 4.4),或是牢固地埋在脂双层内并不跨越膜(膜内在蛋白质)。

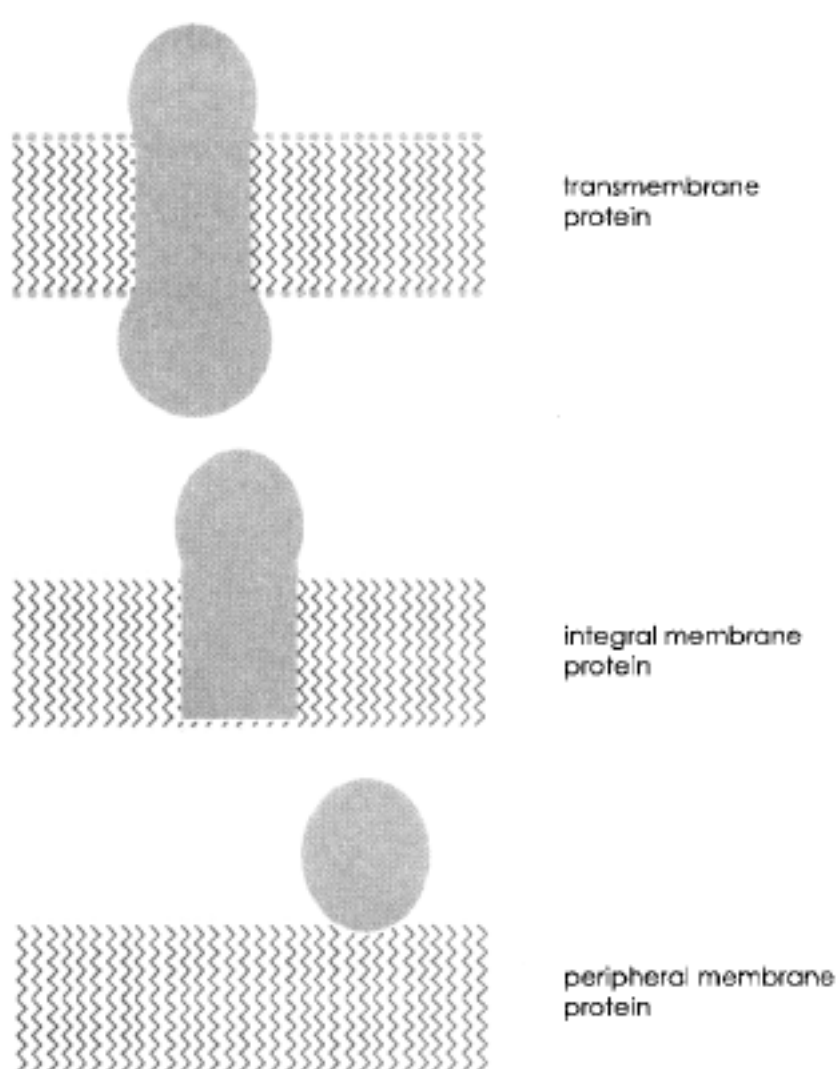


图 4.4 蛋白质和脂双层

从上到下分别为蛋白质存在于膜中的情况:或是跨越膜(跨膜蛋白质),或是藏在膜内(膜内在蛋白质),或是连在膜表面上(膜周边蛋白质)。

跨膜蛋白质中跨过脂双层的部分有特殊的结构。这种结构通常是由疏水的氨基酸侧链组

成的 α -螺旋, 不过也有 β -桶结构。 α -螺旋结构把极性的酰胺基团藏在里面, 围着螺旋的则是疏水的侧链, 于是形成了一个以疏水基团为外壳的圆筒。这种疏水的 α -螺旋很容易“溶解”在疏水的脂双层中, 称为“跨膜螺旋”。虽然一个这样的螺旋就可以把蛋白质固定在膜中, 但许多跨膜蛋白质却有多个疏水的 α -螺旋, 它们的主链在膜中穿进穿出, 蜿蜒曲折。这种蛋白质的氨基酸序列有独特的排列, 可用亲水性图识别。

亲水性图表明的是连续的氨基酸的短序列的平均疏水性与其在蛋白质序列上的位置的函数关系。例如, 一种蛋白质中位置 1 的疏水性指标可能是序列中开头 20 个氨基酸的平均疏水性。然后, 位置 2 的疏水性指标就应该是第 2 ~21 个氨基酸的平均疏水性; 位置 3 是 3 ~22 个氨基酸的平均疏水性; 以此类推。疏水性强的区域, 至少要有 20 残基那么长, 就表明是一个跨膜 α -螺旋结构, 而其他部分则只有较弱的疏水性或亲水性(图 4.5)。虽然亲水性图并不是决定性的, 但在识别膜内在蛋白和预测其拓扑结构方面都很有用。

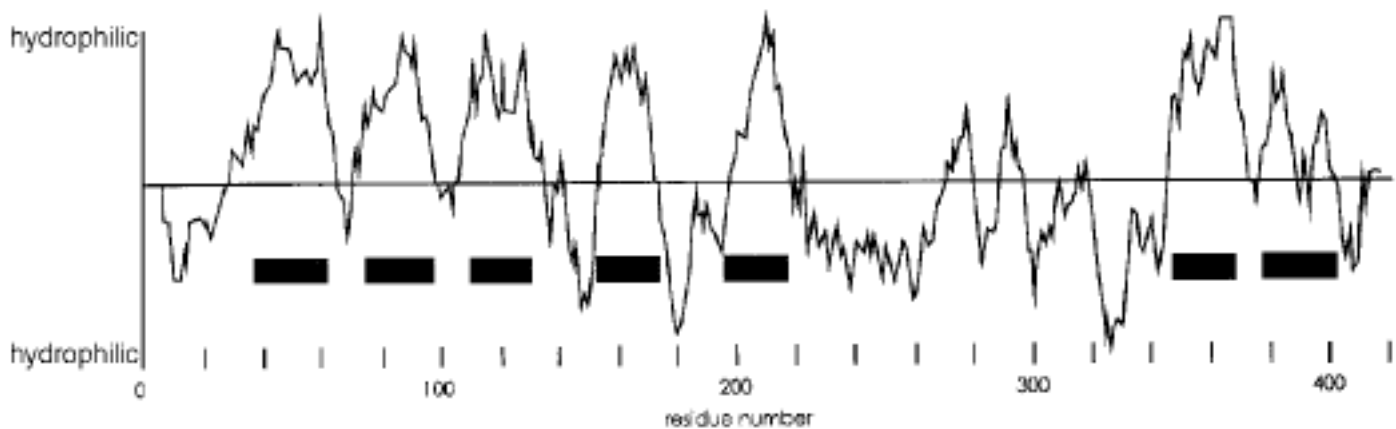


图 4.5 亲水性图

y 轴为疏水性指标, 疏水域在上面, 亲水域在下面; x 轴为从氨基到羧基的氨基酸残基的号数。此蛋白质有 7 个跨膜受体(5-羟色胺受体), 与肾上腺素受体类似。7 个跨膜片段的位置为黑色横杆所示。

膜内在蛋白在膜内是有一定取向的。在质膜中, 蛋白质的胞外部分的特点常常是有 O-连接的多糖基团和二硫桥(胱氨酸), 而胞质侧却没有这些特点。膜内在蛋白可能允许和(或)调节亲水性离子和分子通过膜, 也可能跨膜传递信息, 或者可能在结构上起作用, 把膜与细胞骨架或胞外基质联系起来, 或在细胞的紧密连接中把两个细胞联系起来。

膜内在蛋白有很强的疏水性, 所以它们在许多水环境中均不溶解。不过, 在去污剂的存在下可使之溶解, 这种去污剂如 SDS(十二烷基硫酸钠, 带电荷的)和去利通 X-100(中性去污剂)。

4.4 膜转运蛋白

把分子转运过质膜是所有生物不可缺少的功能。转运蛋白的一个基因发生突变就会引起疾病, 例如, 胱氨酸尿。膳食中的半胱氨酸会以小肽的形式被小肠吸收, 随后又以游离氨基酸的形式被释放到血流中, 正常情况下组织就吸收这种氨基酸。但胱氨酸尿的患者体内, 由于转运蛋白方面的遗传缺陷, 半胱氨酸不能被运入细胞中而是进入肾脏, 而肾中又不能再吸收它, 于是半胱氨酸沉淀在肾结石中。

像氧气这样的分子, 疏水性足够大, 可以不需要帮助就在脂双层中扩散, 其净转运是从高浓度到低浓度——被动扩散。像一些不带电荷的极性分子, 它们在脂双层中扩散得极其缓慢, 所以需要一种蛋白质打开一个通道, 或是携带该分子穿过膜。这种过程叫易化扩散, 它不改变

扩散的方向,只是使之加速。对于带电荷的分子,净扩散的方向决定于浓度梯度和电势梯度二者。这两个因素合在一起就是电化学梯度,和中性的极性分子一样,带电荷的分子和离子顺电化学梯度的扩散也可由被动的转运蛋白加速或易化,这些蛋白质或是打开一个通道或是携带分子穿过膜。通过通道的扩散比通过载体的快得多,但两者都可被调节以控制扩散的速率。

在另外一些情况下,细胞需要分子逆浓度梯度或电化学梯度而移动。这就要由载体蛋白或“泵”来完成,这就是主动转运。分子的运动与另一个作用相偶联,例如与 ATP 水解相偶联,ATP 提供能量使分子能够逆这种梯度而移动。当只有一种类型的分子这样转运时,载体蛋白就称为单转运体。

在某些情况下,载体蛋白更为多样化。一种类型分子的转运与另一种类型分子的转运相偶联,或是方向相同,即同向转运;或是方向相反,即逆向转运。

膜转运蛋白有几个超家族。最大的超家族,ABC 转运蛋白超家族,在临床上最重要,因为细胞能利用这一超家族的成员发展对多种药物的抗性。在用毒害细胞的药物杀死癌细胞时,这就是化疗中的一个特殊问题。对多种药物有抗性的(MDR)蛋白质过量表达的癌细胞群体会发展起来。MDR 蛋白把疏水性药物运出细胞,和药物扩散到细胞中一样快,于是药物毒害细胞的活性化为乌有。MDR 蛋白能够转运范围广泛的疏水性药物;一旦发展了对一种药物的抗性,许许多多其他的药物也变得无效了。囊性纤维化,一种常见的遗传疾病,就是由于 ABC 转运蛋白基因的缺失,这种转运蛋白的功能是起着上皮细胞中氯离子通道的作用,和在肺中一样。这一点特别重要,因为有可能将正确的基因包装在脂质体或失活的病毒之内,通过鼻腔的喷射而引入肺中。

细胞之间神经冲动的传递是由于一个细胞释放神经递质。神经递质扩散通过突触,并与靶细胞上的一个离子通道蛋白相互作用。神经递质的作用打开了离子通道,把信号传递给靶细胞。这就是递质控制的离子通道,这种通道正是许多种药物的靶子,例如在外科中用于松弛骨骼肌的乙酰胆碱的竞争性抑制剂琥珀酰胆碱,还有巴比妥盐和安定药如安定等就是与 γ -氨基丁酸的受体蛋白结合的。

4.5 与膜结合的受体和其他胞内的信号分子

质膜在细胞间的通讯方面起着关键的作用。这种通讯对于复杂的多细胞生物的存活至关重要。相邻的细胞之间通过直接的相互作用而进行通讯,距离较远的细胞之间则利用胞外的信号分子进行通讯,一个或一群细胞分泌信号分子,另一些细胞,即靶细胞则识别这些信号分子。胞外的信号分子有两种类型:一类是能通过质膜并与靶细胞中的受体直接作用的(如类固醇激素);另一类是不能通过质膜的(如肽激素和结合在传递信号的细胞的膜上的分子)。

质膜在对类固醇激素的响应方面并不起直接的作用,只是让类固醇进入细胞。质膜是与所有其他胞外信号接触的起点。质膜中有跨膜蛋白质,其受体域在胞外的表面上,而响应域则在胞内的表面上——这就是胞质域。胞外的信号分子,即配体,与受体域结合并引起其变化——例如两个受体的二聚化——这种变化又导致胞质域的变化。这些变化的结果是产生次级信使——胞内的信号分子——或是发生蛋白质的磷酸化。这些过程又引发一个信号转导途径,将信号从膜上带到细胞中适当的部分如细胞核或线粒体或细胞骨架中,于是细胞核中的基因表达发生变化,或是线粒体中的 $[Ca^{2+}]$ 得到调节。

次级信使的产生可能是直接的,也可能是间接的。直接的如配体控制的离子通道,间接的

如肌醇磷酸或环核苷酸的产生(图 4.6)。次级信使的产生是由一种膜蛋白介导的。这种膜蛋白有膜中的域,也有胞质域,但没有胞外域:即异三聚的 G 蛋白。配体与受体的结合使受体-G 蛋白发生变化, G 蛋白分为 α -亚基和一个由 β 和 γ 亚基组成的异二聚体。然后已分开的亚基就可被其他分子——如腺苷酸环化酶或磷脂酶——所活化(图 4.7)而产生次级信使,如环 AMP 或肌醇磷酸和二酰甘油。

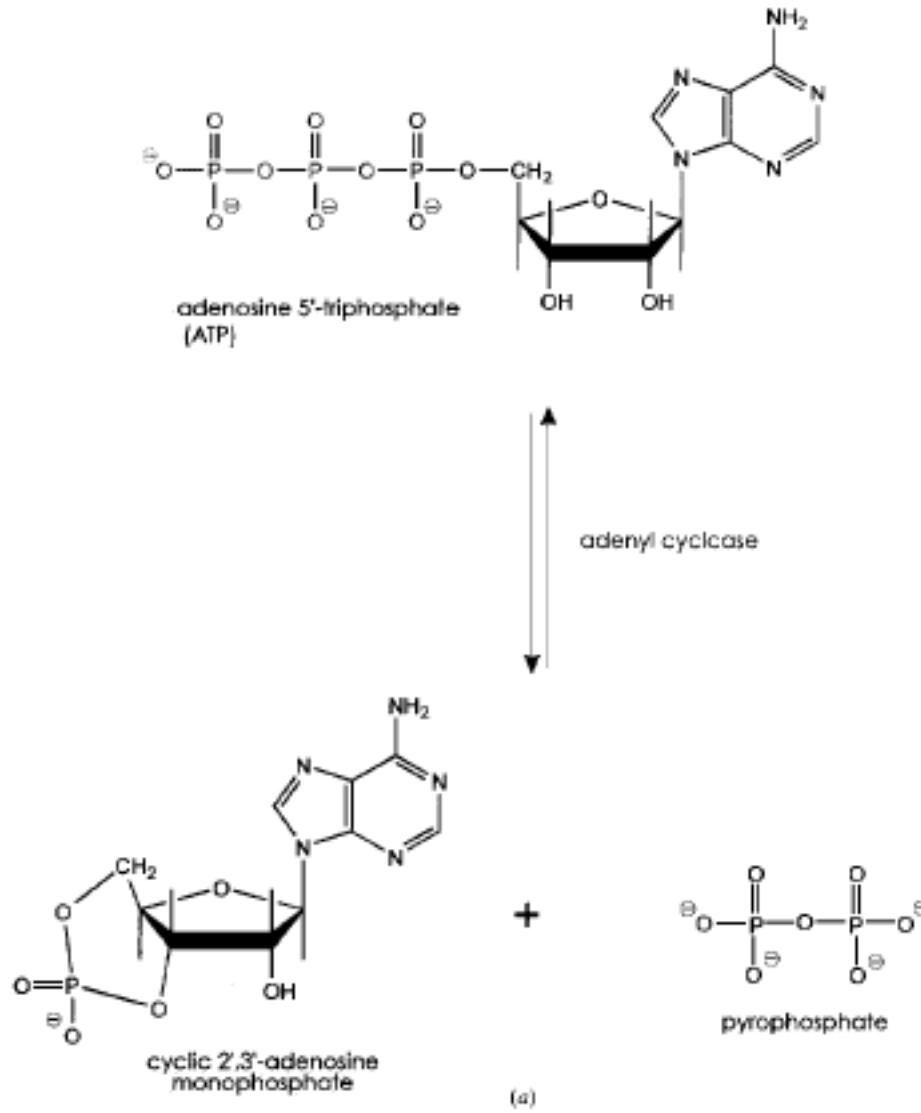


图 4.6 (a) 次级信使的形成

腺苷酸环化酶使 ATP 形成环 AMP, 反应中形成的焦磷酸的水解推动此反应。

腺苷酸环化酶是与膜结合的蛋白质, 反应在细胞质中进行, 靠近膜。

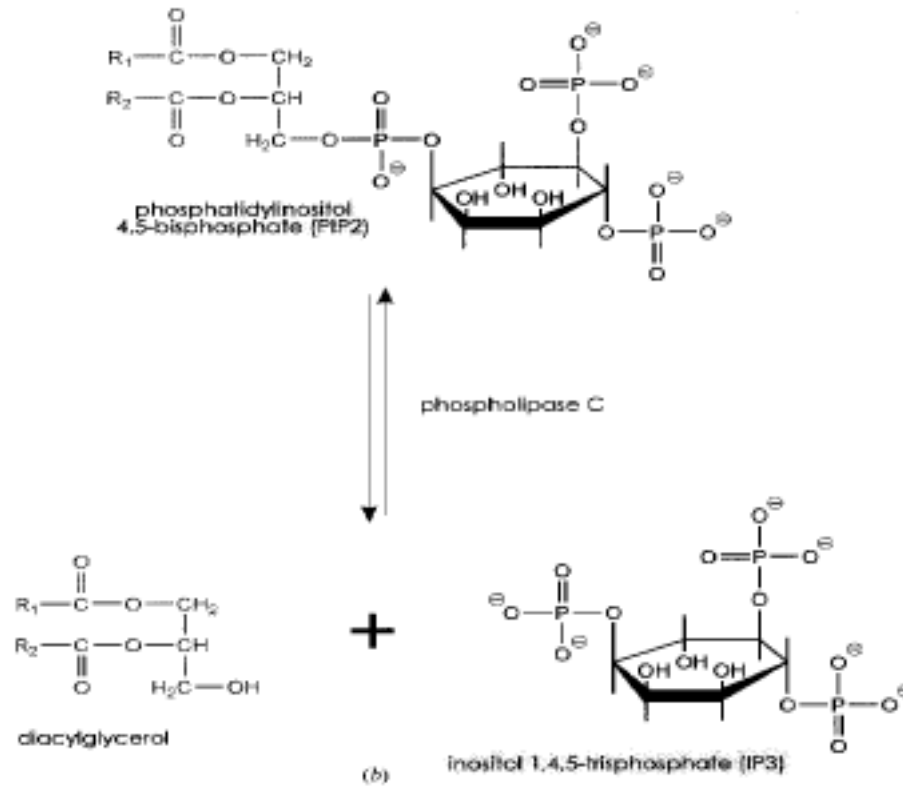


图 4.6(b) 次级信使的形成

膜中的磷脂、磷脂酰肌醇被磷脂酶 C 水解, 将肌醇磷酸释放到细胞质中, 而所形成的二酰甘油则留在膜内。

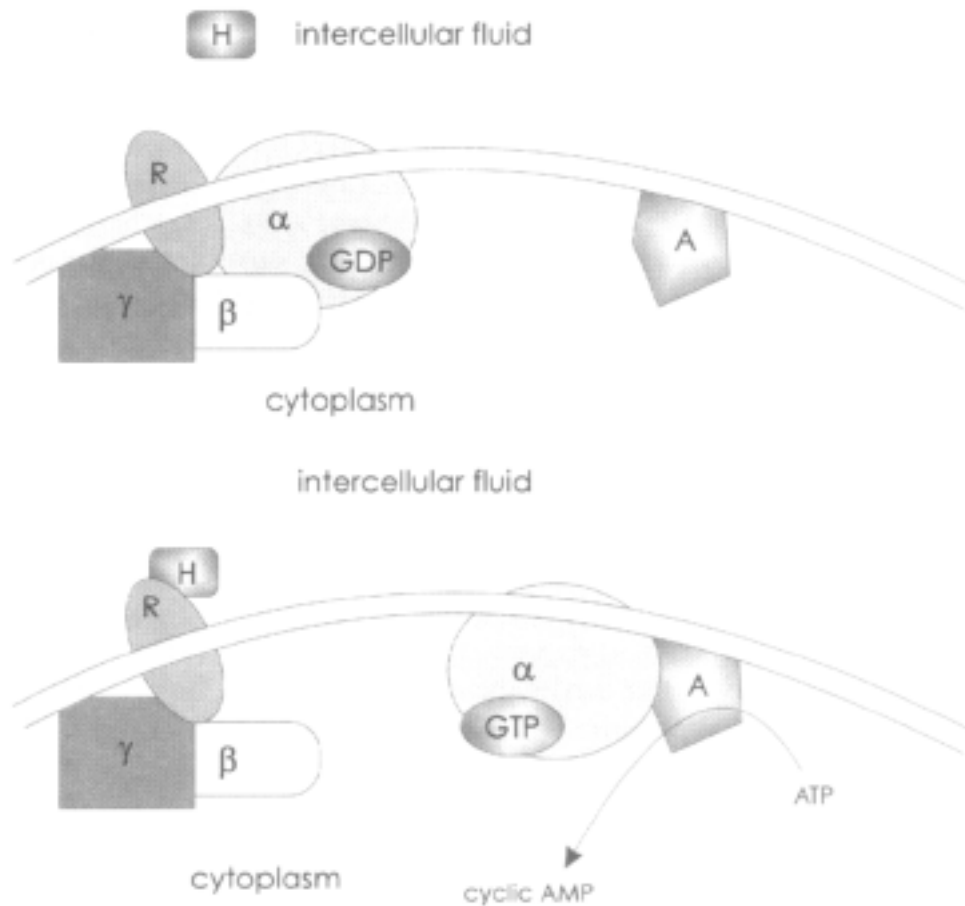


图 4.7 由异三聚体 G 蛋白介导的跨膜信号转导

(a) 静息状态: 配体尚未与受体 R 结合; 异三聚体的 G 蛋白的亚基 α 、 β 、 γ 彼此聚在一起, 与受体 R 也在一起。 α -亚基上有结合的 GDP。腺苷酸环化酶 A, 不活跃。激素 H 在细胞间的液体中游离。
 (b) 活化状态: 激素或称配体, 与受体结合。受体的活化使异三聚体 G 蛋白的 α -亚基上的 GDP 换成了 GTP。 α -亚基已与受体复合体分开, 正在与腺苷酸环化酶相互作用。腺苷酸环化酶由于这种相互作用而被活化, 于是催化 ATP 转变为环 AMP 的反应。

蛋白质磷酸化可通过下列作用发生:

- (1) 直接通过受体本身的蛋白质激酶的作用
- (2) 由于次级信使活化蛋白质激酶
- (3) 由于其他机制活化了胞质中的蛋白质激酶

某些跨膜的受体有胞质的蛋白质磷酸酶活性。可溶性的蛋白质磷酸酶, 如钙调磷酸酶、PP1、PP2A、PP2C 和蛋白质酪氨酸磷酸酶, 也能介导胞内信号。

4.6 小 结

- (1) 脂类是有极性头部的碳氢链。
- (2) 在水溶液中, 脂类聚集在一起, 碳氢链紧密地排列在里面, 极性的头部包在外面。细胞的膜就是这样组成的, 两层脂类面对面地排列在一起。
- (3) 膜中的物质有一大部分是蛋白质, 或是完全在膜内, 或是连在膜中, 或是连在膜上。
- (4) 膜蛋白的作用可能是转运蛋白, 允许或主动促进分子通过膜。主动转运能维持逆浓度梯度的转运。
- (5) 质膜中的蛋白质受体与胞外的信号分子(如激素)结合, 并将信号传递至细胞之内。

参 考 资 料

Introduction to Protein Structure, Carl Branden and John Tooze, 1991, Garland Publishing, New York.

Biomembranes: Molecular Structure and Function, R. B. Gennis, 1989, Springer-Verlag, New York.

Membranes and Their Cellular Functions, J. B. Finean and R. Coleman, 1984, Blackwell Scientific, Oxford, UK.

A collection of review articles in Science 258:917 ~969(1992).

复 习 题

1. 关于磷脂酰胆碱的下列说法, 哪一项是错误的?
 - a) 它是一种磷脂
 - b) 它是二酰甘油的衍生物
 - c) 它有三个脂肪酸链
 - d) 它存在于质膜中
 - e) 它是两种重要的第二信使的前体
2. 肾结石是胱氨酸尿的主要病征。这种疾病的原因是什么?
 - a) 休眠型的酵母在肾中积累
 - b) 食物中的胱氨酸或半胱氨酸都没有进入血流中
 - c) 没有二硫化物异构化酶
 - d) 没有氨基酸转运蛋白
 - e) 膳食中有缺失

参 考 答 案

1. c 磷脂酰肌醇是一种含糖的磷脂,糖(肌醇)通过磷酸基团,连接在二酰甘油上。所以 a 和 b 是正确的,而 c 是错误的。磷脂酰肌醇确实存在于质膜中,在此处它被磷脂酶分解,产生次级信使二酰甘油和肌醇三磷酸,所以 d 和 e 也都是正确的。
2. d 胱氨酸尿是由于缺少把半胱氨酸和胱氨酸运入细胞的氨基酸转运蛋白。结石是因胱氨酸在肾脏内沉淀而形成的。胱氨酸从消化的食物进入血流,因为小肠内壁的细胞吸收寡肽,而有一些寡肽就会产生胱氨酸,胱氨酸再被运入血流中。胱氨酸尿与酵母、二硫化物异构酶或膳食中养分的缺乏均无关;它是一种遗传病。

第 5 章 核蛋白复合体

5.1 引言

虽然在许多情况下蛋白质和核酸有着完全独立的功能,但在特殊的既有蛋白质又有核酸的复合体中它们的合作却非常密切。某些核蛋白复合体非常稳定,有些只是瞬间存在,其他一些稳定性居中。蛋白质组分可能在结构上支持着核酸,但在多数情况下,这两种类型的分子对复合体的功能都有直接的贡献。虽然纯粹的 RNA 分子具有酶的作用只是稀有的情况,但在核蛋白复合体中 RNA 分子却常常起着催化作用。染色体是首先被发现的核蛋白复合体,也是本章中首先要讨论的。对核糖体已有多年的详细研究,细胞中的 RNA 大多也在其中。最近,像端粒酶、剪接体和信号识别颗粒这样一些核蛋白的结构已说明核蛋白复合体的多种多样性。

5.2 染色体

染色体是含有存在于细胞核中的基因——DNA——的核蛋白复合体。当看到分裂中的真核细胞中有染色体时,就引入了这个术语,通常只把真核细胞中的细胞核中的 DNA-蛋白质复合体称为染色体。不过,可将“细菌染色体”一词用于细菌细胞中的 DNA-蛋白质复合体。细菌“染色体”在蛋白质含量和结构上都与真核细胞的染色体不同。

正常人的体细胞有 46 条染色体,分为常染色体和称为 X 和 Y 的性染色体两类;有 44 条常染色体 + 2X(女)或 44 条常染色体 + XY(男)。常染色体是成对的,每对中的各条分别来自父亲和母亲。因此,有 22 条不同的常染色体。

有些疾病的原因就是由于染色体的结构或基因表达发生了变化。染色体中可能发生大规模的变化,包括失去或获得染色体,每个细胞中染色体的数目发生变化、或是染色体间发生了易位(遗传物质的交换)。这种变化可能引起疾病:染色体 21 的三体性(3 个拷贝)引起 Down 氏综合症(先天愚症),染色体 22 与 9 之间的某些易位会引起慢性髓细胞性白血病,染色体 8 与 14 之间的易位会引起 Burkitt 氏淋巴瘤。基因表达中的某些变化也会引起疾病。例如,丢失一单个基因,成视网膜细胞瘤基因,就会引起成视网膜细胞瘤,这是发育中的眼睛内的一种癌。原癌基因的过量表达或结构变化,就会引起别的癌症。

染色体位于细胞核中,只有在有丝分裂或减数分裂时是例外,这时核膜消失,染色体凝聚成“中期染色体”并分成两组,分别到达“子细胞”中。当细胞处于有丝分裂或减数分裂时,可以在光学显微镜下看到染色体是轮廓清楚的结构。在分裂间期,这些密实的结构就分散在整个细胞核中,不能在光学显微镜下分辨出来。

每一条染色体都是由 DNA 组成的, DNA 与染色体中的蛋白质相互作用,发生系统的折叠。在几个层次或等级上发生折叠。最低的层次是 DNA 围绕着蛋白质核缠绕,形成核小体,下文将详细描述。第二个等级是几条核小体卷成螺旋,这种螺旋称为 30 nm 纤维,因为在电子显微镜下其表面宽度为 30 nm。然后 30 nm 纤维再次卷曲,也可能还要卷曲一次,才能形成完全凝聚的中期染色体。在分裂间期,有些这样的卷曲螺旋会解旋,使 DNA 发挥其功能。这些

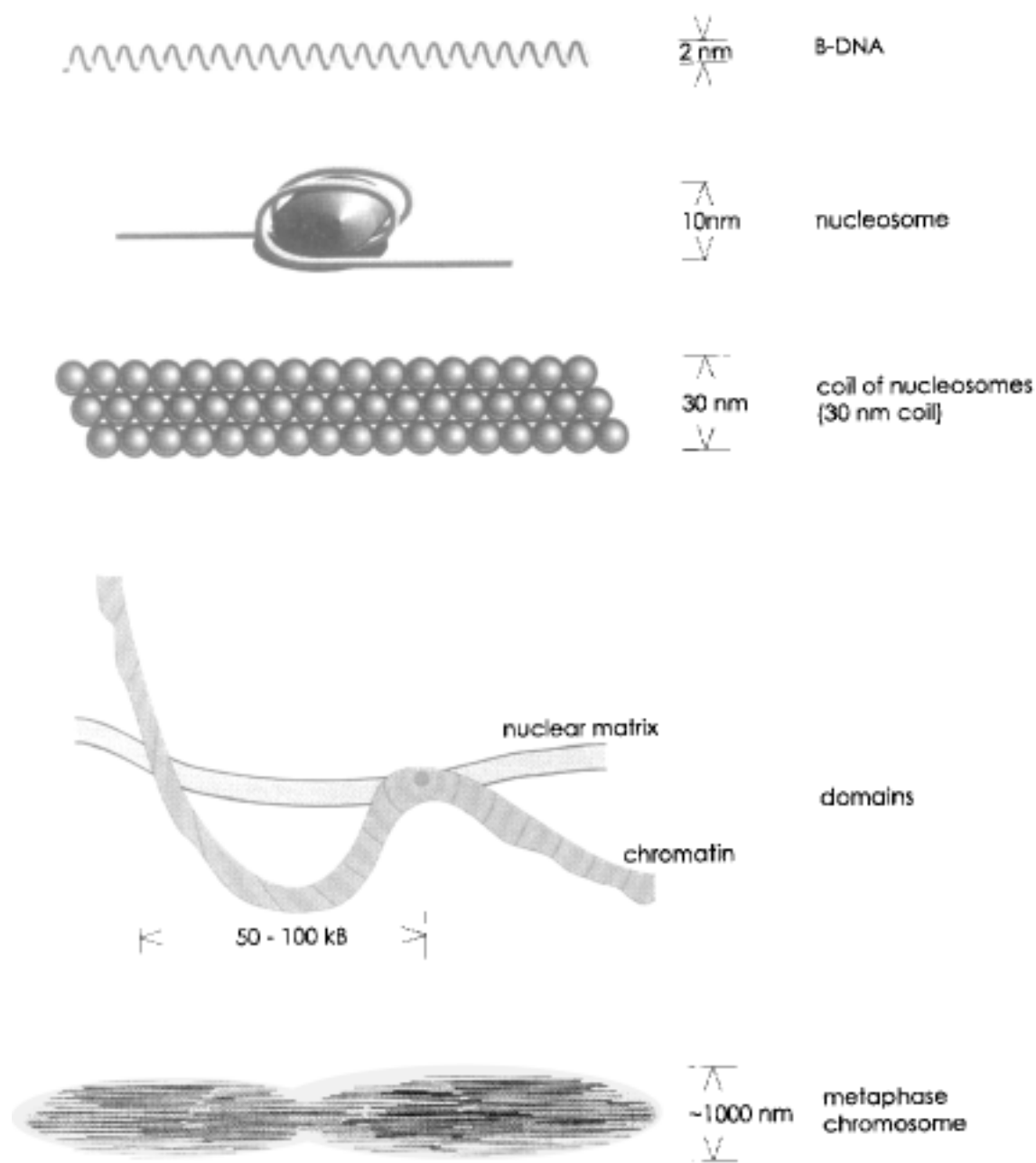


图 5.1 染色体结构的等级

此图说明染色体中 DNA 折叠的已知的不同层次：第一个层次(最上)是两条 DNA 链彼此缠绕在一起，即 B-DNA 双螺旋；然后双螺旋又围着组蛋白的八聚体再卷一次，形成核小体的核心颗粒；在染色质的无活性的区域内，核小体核心颗粒再次卷曲形成 30 nm 的卷，产生纤维；此纤维和(或)一串串的核小体，又连在核基质上，各连接点相距约 50 ~100 kb，造成了每对连接点之间的染色质的一个域；在中期的染色体中，30 nm 的纤维进一步卷曲，产生了完全凝聚的染色体(最下图)。

结构等级可归纳为图 5.1, 下文是较详细的描述。

染色体有下列功能：

(1) 贮存和传递遗传信息。贮存包括将染色体包装成足够小的结构以适于放在细胞核中。传递包括把重复的染色体分成为完全的两组并分送到新的细胞核中，使每一新的细胞核都得到每对染色体中的一条。

(2) 遗传信息的表达。表达包括许多步骤。在染色体水平上，基因及与之有关的调节序列必需能够与转录因子(见第 29 章)以及酶结合，而且必须使它们能合成 RNA。

(3) 遗传信息的保持。保持主要是修复 DNA 中发生的损伤，损伤可能来自化学物质(尤其是致癌化合物)或辐射(如日光或 X 射线)的作用。

(4) 遗传信息的重组。发生生殖时，基因或基因的一部分会在染色体之间发生交换，以产

生新的组合并使进化过程继续进行。

(一) 染色质

染色体是由染色质组成的,染色质则主要由 DNA 和蛋白质组成。RNA 也与染色质在一起,它与转录有关。如第 2 章所述,染色体中的 DNA 主要是右手的双螺旋结构(B-DNA)。染色体中的 RNA 大多是正在进行的转录的产物。染色质是复杂的动态结构,主要由与蛋白质的结合决定其结构。许多与 DNA 结合的蛋白质,其结合与 DNA 序列无关;其他一些 DNA 则非常偏爱特定的序列。

(二) 染色体蛋白质

最常见的染色体中的结构蛋白是组蛋白。其他常见的染色体蛋白质为“非组蛋白”,包括一些别的结构蛋白和一些专一的酶如 RNA 聚合酶类和 DNA 拓扑异构酶类。组蛋白和许多酶在与 DNA 结合的特性中很少或没有序列的专一性。也就是说,它们与几乎所有的 DNA 分子都结合得同样好,而与其核苷酸序列无关。许多调节性的蛋白质需要 DNA 有专一的序列才能与其结合;调节性蛋白质可能浓度极低。

组蛋白占染色体蛋白质总量的一半或更多。在大多数真核细胞中有 5 种组蛋白: H1, H2A, H2B, H3 和 H4。H1 称为“连接体”组蛋白;其他几种则称为“核心”组蛋白,这反映了它们在核小体中的作用——染色体结构的第一个等级。H1 的分子量约为 21000,由 3 个结构域组成,一个中央结构域和两个末端的无规卷曲结构域。核心组蛋白都是小的蛋白质,分子量 11 000 ~15 000,每一种的分子结构中都有一 N-末端的无规卷曲结构域, H3 和 H4 的 C-端有少数几个残基是例外。组蛋白的碱性非常强,因为其中碱性氨基酸赖氨酸和精氨酸的含量很高,这些氨基酸都集中在无规卷曲的末端域中。

核心组蛋白以等分子比的量存在,大约 DNA 的每 200 bp 就有各种组蛋白,每种两分子。组蛋白 H1 的存在量大约是核心蛋白类浓度(摩尔浓度)的一半。

除组蛋白 H4 外,每种组蛋白都有几种不同但密切相关的形式,它们仅在氨基酸序列上稍有差异。不同组织中各种形式的比例不同,但是还不知道这种组织中的专一性在功能上有什么意义。组蛋白 H1 的一种重要的不同形式 H1⁰ 与细胞生长的停止有关,不过它在调节或维持缓慢的生长状态方面起什么作用尚属未知。在某些情况下,具体的形式是在不同的细胞周期的控制之下,所以有一组是在细胞的分裂间期中连续不断地被合成,而另一组则专一地在 S 期与 DNA 一起被合成。

组蛋白也会发生合成后的修饰,包括磷酸化、乙酰化和多聚 ADP-核糖基化。这些修饰的功能仍有待于充分阐明,但已有证据指明:

- (1) H1 的磷酸化与有丝分裂和减数分裂中染色体的凝聚有关。
- (2) H3 和 H4 的乙酰化与转录的加强有关。
- (3) 所有核心组蛋白的乙酰化与染色体的组装有关,而组装是其复制的一部分。
- (4) 多聚 ADP-核糖基化与 DNA 的修复有关。

(三) 核小体

核心组蛋白形成一多亚基的复合体,一个八聚体,由核心组蛋白及其结构域各两分子形成一近似于圆筒状的核心,无规卷曲域则在溶液中形成。圆筒状的核心由 H3 和 H4 的四聚体组成,两端各为 H2A 和 H2B 的二聚体。然后 146 bp 的 DNA 围在核心组蛋白的八聚体外面,形成 1.7 转的超螺旋。这种颗粒即称为“核小体核心颗粒”。

大多数核小体核心颗粒都有组蛋白 H1 和它在一起,每个核心颗粒一分子 H1。H1 分子又将 DNA 的另外 22 个碱基对组织起来,形成总共为 2 转的超螺旋。这种颗粒称为“染色小体”,不过这一术语并非广泛使用的(图 5.2)。

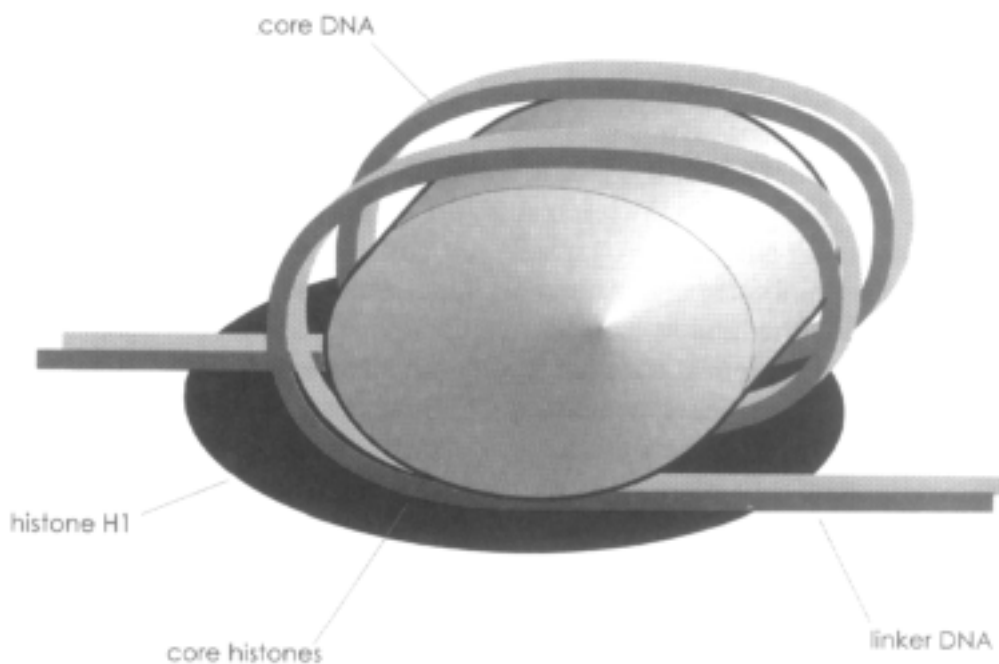


图 5.2 核小体结构示意图

两条深浅不同的粗线代表 DNA 双螺旋,中间一个大的扁圆柱代表核心组蛋白的八聚体,黑色的椭圆代表组蛋白 H1(此图仅示意出各个组分及其间的大致关系)。

在染色质中,有一段“连接体”DNA(0 ~80 个碱基对,典型的是 30 个碱基对)存在于相邻的染色小体之间。这整个的重复的结构称为核小体,它有 8 个核心组蛋白 + 组蛋白 H1 + 168 个碱基对(与组蛋白结合的 DNA 的) + 连接体 DNA。在电子显微镜下,可以“看到”核小体像是许多颗粒排列在一条细的 DNA 分子上,因此这种结构就根据它的样子被命名为“一串珠子”。在染色质的某些区域可能没有组蛋白 H1,于是核小体核心颗粒就由连接体 DNA 连接起来。

在小体中, DNA 的磷酸基团上的负电荷约有一半为组蛋白中的组氨酸、赖氨酸和精氨酸的正电荷所中和。剩下的磷酸基团上的电荷则可用于与其他蛋白质或与离子或多胺发生相互作用。细胞中的 DNA 绝大部分是在核小体结构中,不过也有些小的区域与核小体无关,因为它们是与非组蛋白结合的。

(四) 染色质的高级结构

染色体中的核小体又进一步折叠,至少还有 3 个结构等级。这些等级都称为高级结构。

在染色质的被阻抑的、或无活性的区域内,几个核小体会形成螺旋称为 30 nm 纤维或螺线

管。这种螺旋每一转似乎有 6 个核小体,但 DNA 在核小体之间的走向尚属未知。在 30 nm 纤维以上,还需要更多的包装层次,才能达到我们都看到的染色体中那么密实的情况。

有很好的证据表明染色体中还有独立的域,大约是 DNA 的 5 ~10 万个(50 ~100 kb) 碱基对。这种域的末端可能是固定的,因而它可能是受到张力的限制的,即使染色体仍是线状的。一个域中可能有染色质中上述的任何一种或所有的结构元件。目前的假说是,这些域的末端固定在一个大的、稳定的蛋白结构中,该结构称为核基质(在分裂间期内)或核支架(在中期内)。在某些情况下,一个域可能代表一个独立地被控制的转录单位。第 2 章中已讨论过,在一个受到张力限制的域内, DNA 可能形成超螺旋。

(五) 有活性的染色质的结构

有活性的染色质是一笼统的术语,指的是染色体中参与某种酶活性的部分(图 5.3)。活性常常是指转录,但有时这个术语的使用范围更广。细胞生物学家用常染色质一词表示分散的染色质,它也许大致上相当于有“活性”的染色质。在特化的细胞中,染色体的某些部分折叠得非常紧密,不可能与酶和蛋白质接近。这种不可接近的染色质就代表无活性的染色质,可能相当于称为异染色质的物质。

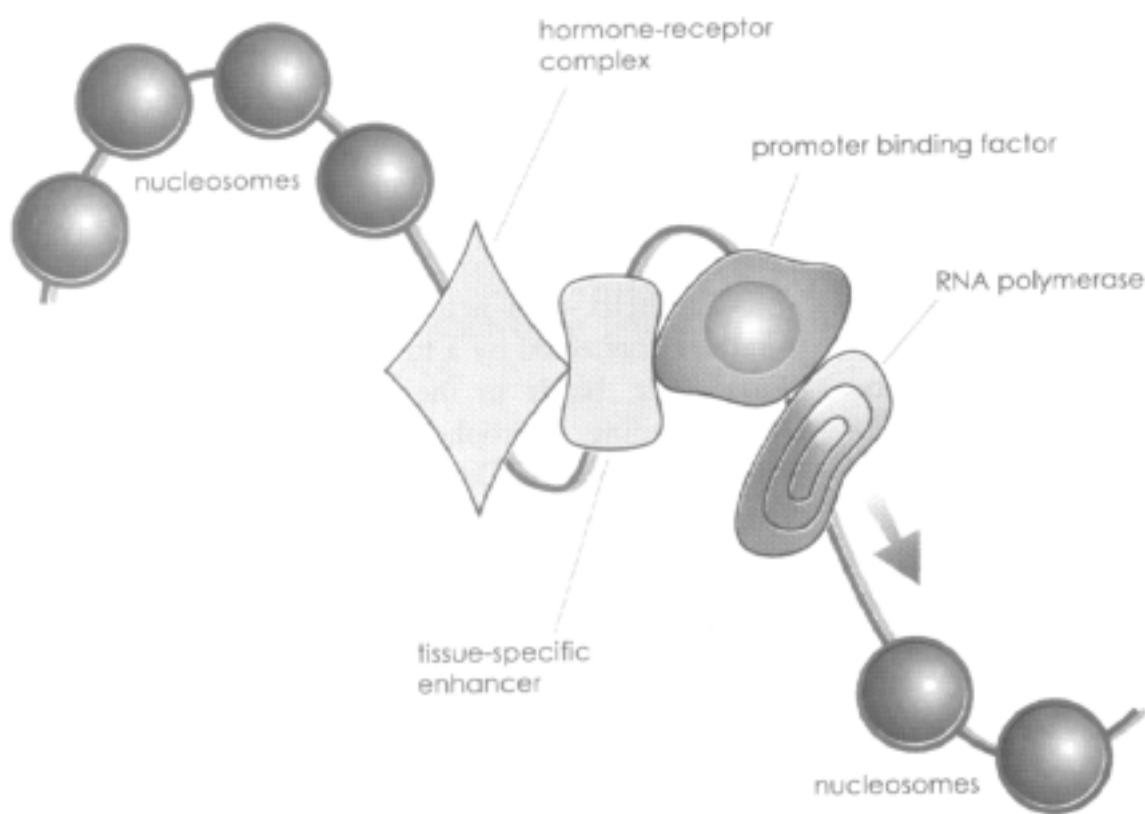


图 5.3 有活性的染色质示意图

深浅的双线表示 DNA 双螺旋;核小体由小球代表;其他形状则代表 RNA 聚合酶和三种转录因子,它们在 DNA 上彼此相互作用(此示意图并不合乎比例,转录复合物中的组分大概比图上画的复杂;

不过此图说明有多种因子彼此相互作用,也与 DNA 和 RNA 聚合酶相互作用)。

在分裂间期,染色体的其他区域是可以接近的,可能与转录或复制这样的活动有关,也可能会有“潜力”对一些蛋白质信号直接发生响应,这些信号是在转录时发出的。因此,染色体的活性有 3 个总的层次:

- (1) 无活性或被阻抑的区域
- (2) 有潜在活性的区域
- (3) 有活性的区域

在大规模的水平上,可根据它们接近核酸酶的程度而将这些区域区别开来。

核小体在不同程度上保护着 DNA 使不受核酸酶的作用,其程度因核酸酶和核小体被密装得多么紧而定。脱氧核糖核酸酶- (DNAase- 或 DNAse-) 切断 DNA 的单链,很少有序列的专一性,最终是把裸露的 DNA 分子切成单核苷酸或小的寡核苷酸。用 DNAse- 进行部分的消化的方法广泛用于染色质结构的研究。微球菌核酸酶(亦称葡萄球菌核酸酶)则切割双链,在核小体之间的连接体 DNA 上开始切割,这种酶在确定核小体的位置上很有用。对微球菌核酸酶消化的结果,解释时要谨慎,因为在用纯化的 DNA 作为对照进行部分消化时,这种酶表现出某种序列的专一性。除去这些酶的探针外,还有一些切割 DNA 的化学试剂。这些试剂的序列依赖性甚至比 DNAase- 的还小。还可以用甲基化酶去标记可接近的 DNA。

染色质中 DNA 对 DNAase- 的灵敏度有 3 个水平:

- (1) 在被阻抑的染色质中,灵敏度非常低(抗 DNAase)。
- (2) 在有转录能力的区域和大部分有活性的区域,灵敏度约高 10 倍(DNAase- 敏感)
- (3) 在有转录能力的区域或有活性的区域之中或附近的某些专一位点上,则灵敏度接近于游离 DNA 的(超敏感位点)。

染色质纤维中超敏感位点的数目和位置,个别基因各有其特点,而且也因基因是否有活性或仅仅是有能力而不同。

在对 DNAase 有抗性和敏感的结构之间有差别的准确原因尚属未知;可能与核心组蛋白的乙酰化有关,因为这种组蛋白存在于同一区域,还可能与缺少组蛋白 H1 有关。也会发生 DNA 的修饰,主要是 DNA 的无活性区域中胞嘧啶的甲基化(第 28 章)。

对 DNAase 超敏感的位点很小,而且分散在全部染色质中;这种现象的解释是因为没有组蛋白或核小体。利用精巧的“足迹”技术,常常可以检测到与其他蛋白质的结合。有越来越多的证据表明,存在着多亚基的蛋白质组分结合在超敏感位点上,它们可能控制着转录的起始。

在许多情况下,核小体几乎是随机地排列在其所保护的 DNA 序列之上。在另外一些情况下,核小体又可能专一地处于特定的 DNA 序列上。在这些情况下,核小体在调节转录方面可能起着更为专一的作用。例如,特定的核小体可能与专一的 DNA-结合蛋白质竞相争夺特定的 DNA 序列元件。在第 28 章中还要继续讨论核小体在控制转录中的作用。

(六) 序列专一的 DNA-结合蛋白

在特殊的结构蛋白或专一的酶活性方面,会看到序列专一的结合,例如,在染色体的末端(称为端粒),特殊的 DNA 序列就与特殊的结构蛋白结合,在某些细胞中,又与特殊的酶,端粒酶结合,端粒酶维持着线状染色体的两端。其他序列专一的结合发生在调节基因转录的 DNA 序列上。许多基因都有这种序列,例如,有助于确定被转录序列的起点和终点的序列;其他一些专一性更强,与成组的基因一道存在,这些基因的转录有着协同的调节。虽然有许许多多这种调节转录的因子,但是这类因子却有着共同的结构基元。许多原核的和某些真核的 DNA-结合蛋白中用于与 DNA 的专一序列结合的基元是螺旋-转角-螺旋基元;在许多真核的转录因子中,锌指基元是重要的;而亮氨酸拉链基元则在蛋白质-蛋白质相互作用中是重要的。

蛋白质-蛋白质相互作用是蛋白质-DNA 结合中的关键部分。许多专一的转录因子都以同二聚体或异二聚体的形式与 DNA 结合。二聚体结构所引入的协同性使结合作用加强了,并且由于调节着这些转录因子的活性而改进了协调基因转录的能力。

螺旋-转角-螺旋基元是由两个 α -螺旋中间连接着一个转角而组成的。一个 α -螺旋,即识别螺旋,与 B 型 DNA 的大沟结合,形成与碱基对的疏水接触,还形成 α -螺旋偶极子与 DNA 的磷酸基团之间的静电相互作用。识别螺旋的氨基酸侧链可能与 DNA 形成疏水键、氢键和静电的键。DNA 常常弯曲以优化这些相互作用。识别螺旋中氨基酸侧链的相互作用要求专一的 DNA 序列,因此这种结合有顺序性,但也会发生与其他 DNA 序列的弱的结合,这样就使得蛋白质能够以一种双向的找寻方式沿着 DNA 滑动以“找到”最合适的结合位点。在二聚体中,两个单体结合在一起,所以它们的识别螺旋就结合在 DNA 大沟中相邻的转角上。因为蛋白质-蛋白质的相互作用域的方向是彼此相对的,所以蛋白质的单体是指向相反的方向。因此,要与一个同二聚体相结合,专一的 DNA 序列必须有回文结构——这是 DNA 上许多蛋白质的专一结合位点的共同特性。在原核系统中已仔细鉴定出了螺旋-转角-螺旋蛋白质,但它们也存在于真核生物中,例如同源框蛋白质中。

锌指基元是完全不同的结构,它存在于某些真核生物的与 DNA 结合的蛋白质中。一种蛋白质中存在的锌指的数目变化很大。一种锌指蛋白 TF A 能够结合在基因的被转录部分之内的控制区域上,调节着小的核糖体 RNA,即 5S rRNA。TF A 有 9 个锌指,每一个均与锌离子结合,结合方式是每个“指”均以 2 个组氨酸和 2 个半胱氨酸与锌形成配位键。这些就是“组-半胱”指;还有一种相关的结构利用 4 个半胱氨酸与 Zn^{2+} 结合。

亮氨酸拉链基元是一种 α -螺旋序列,每隔 6 个氨基酸就有一个亮氨酸。来自不同的蛋白质或亚基的这种 α -螺旋会互相缠绕在一起,于是亮氨酸就在缠成的圈内垛叠起来。这是存在于丝状蛋白质以及转录因子中的 α -螺旋的卷曲螺旋的一个实例。因为一个 α -螺旋上的重复是每转 3.4 个残基,所以在直的螺旋中,大约、但不是十分肯定,每第 7 个残基就以同样的角度盘旋在螺旋上。稍微使螺旋卷曲一下,各第 7 个螺旋就会排列得更为准确。因此,相邻的链中的亮氨酸就会互相对应并形成一种疏水的相互垛叠的作用,使两个 α -螺旋结合得更紧密。各种各样真核的转录因子都利用这种基元来产生与 DNA 结合的二聚体结构。

5.3 核糖核蛋白复合体

真核生物中基因表达的过程将在第 29 章中详细讨论,这一过程涉及一系列核蛋白复合体,从染色质起,依次是剪接体、核糖体和信号识别颗粒。

基因表达开始于正确的蛋白质(转录因子)在染色质上的组装,组装的部位是将要被表达的基因所在的区域。转录复合体组装的结果是 RNA 的合成,以 DNA 序列为模板,其过程称为转录。RNA 产物称为转录物;其初始形式称为新生的转录物。新生的转录物迅即被包装成为核蛋白颗粒(hnRNP)。这些颗粒又与小的细胞核核蛋白颗粒(snRNP)相互作用,将转录物加工成 mRNA(信使 RNA),mRNA 就离开细胞核。在细胞质中,mRNA 是核糖体上蛋白质合成的模板。最后,信号识别颗粒选出那些在其合成过程中需要通过内质网的那些蛋白质。

(一) 细胞核的核糖核蛋白复合体

一旦新生的转录物被合成,它上面便形成了不均一的细胞核的核糖核蛋白颗粒。每一个

hn RNP 颗粒含有转录物的约 500 bp 和蛋白质的不同组合; 一个新生的转录物上会形成几个 hn RNP。hn RNP 颗粒包装着转录物, 直到它被进一步加工为 mRNA 为止。

小的细胞核的核糖核蛋白含有小的核 RNA (snRNA) ——已知的有 U1、U2, 等等——它们又与蛋白质形成复合体, 即 snRNP。各种 snRNP 识别新生的转录物上的专一核苷酸序列并与转录物结合。与 RNA 剪接有关的 snRNP 形成一种称为剪接体的复合体, 它们从新生的转录物上将内含子除去。剪接体几乎和核糖体一样大。剪接体中个别 snRNP 的作用有待阐明; RNA 和蛋白质都有其功能。

(二) 核糖体

核糖体是比核小体大得多的核蛋白结构, 它含有 RNA 和蛋白质而不是 DNA 和蛋白质。虽然核糖体有一部分是在细胞核中组装的, 但是它却在细胞质中执行其大部分功能。核糖体由两种核蛋白亚基各一个组成, 这两种亚基是根据其沉降系数命名的, 沉降系数是颗粒在超速离心机中沉降速率的度量。(沉降速率的单位为 S, 1 S 为 10^{-13} s)。原核生物的核糖体有 30 S 和 50 S 亚基, 二者合在一起成为 70 S 核糖体。真核细胞的线粒体中的核糖体是利用线粒体基因和核基因合成的, 与原核生物的核糖体类似。真核细胞的核糖体存在于细胞质中, 是由 40 S 和 60 S 的亚基组成的, 二者结合形成 80 S 核糖体。在合成蛋白质时, 许多个核糖体结合在每一条 mRNA 分子上, 形成一种称为多核糖体的结构。多核糖体负责细胞中所有蛋白质的合成。许多别的分子也与核糖体在一起, 这些分子包括 tRNA, 新生的多肽, 辅助性蛋白质因子和辅因子。

“纯粹”的核糖体可被分离出来, 不带任何其他的分子, 它是一种界限明确的颗粒, 由 RNA 和蛋白质组成。原核生物的核糖体有 3 种 RNA 分子和 55 种蛋白质分子。蛋白质分子中的 53 种每个核糖体中只有一个分子, 两种则各有两个。真核生物的核糖体中有 4 种 RNA 分子, 其中 3 种与原核生物的同源, 一种则仅存在于真核生物的核糖体中。每个真核的核糖体中约有 82 个蛋白质分子。

核糖体太大, 那些测定酶和小分子复合体如核小体的分子结构的技术都不适用。因此, 还没有原子水平的信息。不过, 正在用许多巧妙的实验方法来测定核糖体中 RNA 的结构和电镜术中所界定的总结构中蛋白质的定位。第 26 章中将叙述一些结构特征。

(三) 信号识别颗粒

信号识别颗粒 (SRP) 识别专一蛋白质的 N-端并帮助它们通过 ER 以便进行进一步的加工和转运。SRP 所识别的 N-端的氨基酸序列称为信号序列。每一个 SRP 都有一个小的 RNA 分子, 称为 SRP RNA, 还有 6 个蛋白质亚基。SRP 的功能域中, 有两个位于复合体的一端, 而第三个功能域则在复合物的另一端 (图 5.4)。

第一个域的功能是结合信号序列; 这在细胞质中是随时都可发生的。然后 SRP 另一面的域便与多核糖体相互作用, 使蛋白质的合成暂停。然后暂停的结构就扩散到 ER, 在此处第三个功能域就与 SRP 受体结合, SRP 受体是 ER 的膜内在蛋白。这时, SRP 就被取代了, 留下多核糖体连在 ER 上, 于是蛋白质合成恢复, 新生的蛋白质, 随合成随着就通过 ER。

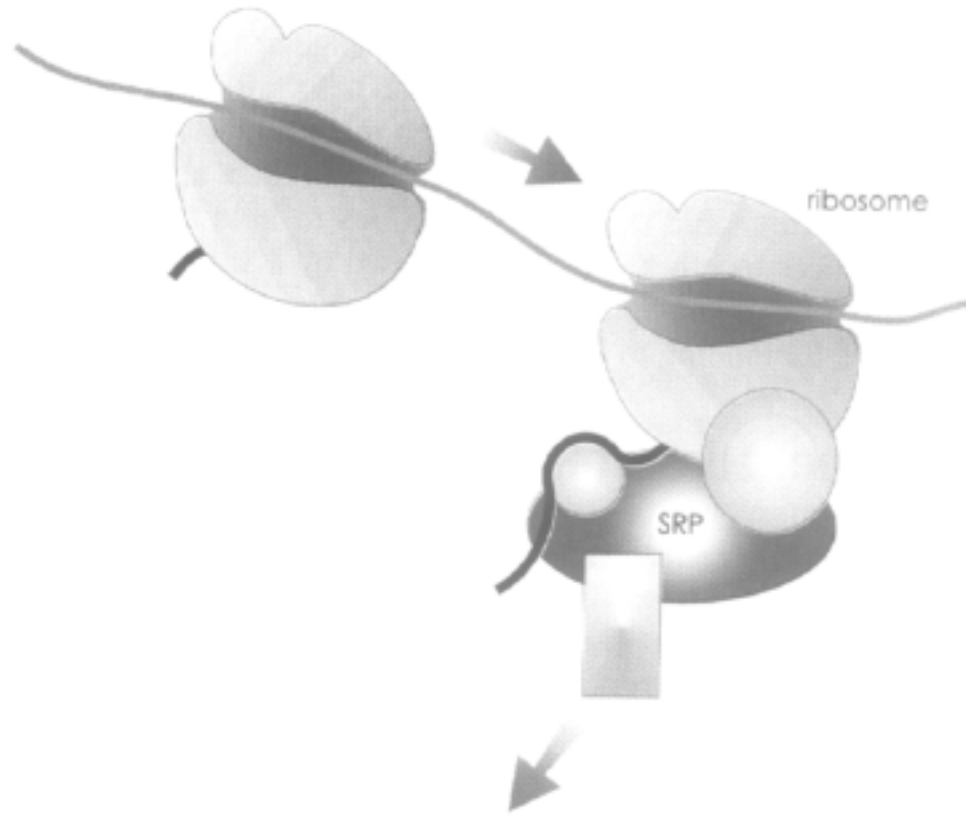


图 5.4 信号识别颗粒(SRP)的域示意图

信号识别颗粒(标有 SRP)上画有 3 个结构域(一个长方形,两个圆形,一大一小):一个域(小圆形)结合着新生的多肽链(弯曲的粗线);另一个则与多核糖结合,使翻译暂停;第三个域(长方形)则当复合体到达 ER(未画出)时,将与 SRP 受体结合(此图非常粗略,SRP 画得很大,与多核糖体不成比例)。

5.4 小 结

(1) 细胞中的许多结构既有核酸,又有蛋白质。这种核蛋白复合体一般都与遗传信息的贮存和利用有关。

(2) 核 DNA 由蛋白质包装形成染色体。染色质是核蛋白物质,组成染色体。

(3) 染色质中的蛋白质或是组蛋白,或是非组蛋白。有 5 种不同类型的组蛋白, H1, H2A, H2B, H3 和 H4。H1 称为“连接体”组蛋白,其他各种均称为“核心”组蛋白。在染色质中,两个 H2A/H2B 二聚体和一个 H3/H4 四聚体形成一个八聚体, DNA 则缠绕在八聚体上,形成一个约 1.7 转的超螺旋,就是核小体的核心颗粒。加上组蛋白 H1 和更多的 DNA,核心颗粒就形成了核小体,染色质中主要的重复结构。相邻的核小体由 DNA—连接体 DNA——连接,此 DNA 典型的长度为 30 bp。

(4) 染色质的结构可分为 3 类——无转录活性的,有潜在转录活性的和有转录活性的——可用核酸酶消化实验进行区分。DNA 序列在这几类中的分布因组织种类而异,这反映了基因表达的组织专一性的情况。

(5) 有活性的染色质有结构特点,如组蛋白 H1 的缺少和组蛋白 H3 和 H4 中专一的赖氨酸残基的乙酰化。DNA 中还有一些短的区域是核小体中所没有的,通常是由于专一的非组蛋白——转录因子——结合到 DNA 上而形成了转录复合体。

(6) 多个核小体可以进一步卷曲成更高级的结构,每转约 6 个核小体。这种“30 nm 纤维”又进一步被组织和包装,形成更高级的染色体结构——异染色质、常染色质和中期染色体。

(7) 转录水平上基因表达的调节是通过蛋白质的作用完成的,这些蛋白质识别专一的

DNA 序列并与之结合。许多这类蛋白质都有重复的基元,如螺旋-转角-螺旋,或锌指,这些结构提供了识别专一 DNA 序列的框架。

(8) 基因表达的以后几步, RNA 加工, 肽键的合成和蛋白质的分选则与核糖核蛋白复合体中的剪接体、核糖体和信号识别颗粒有关。

参 考 资 料

Introduction to Protein Structure, Carl Branden and John Tooze, 1991, Garland Publishing, New York.

Understanding DNA, C. R. Calladine and Horace R. Drew, 1992, Academic Press, San Diego, CA.

Chromatin, K. E. van Holde, 1988, Springer-Verlag, New York.

Chromatin unfolds, G. Felsenfeld, 1996, Cell, 86: 13 ~19.

Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones, A. P. Wolfe and D. Pruss, Cell, 84: 817 ~819.

World Wide Web at <http://moby.ucdavis.edu/HRM/Biochemistry/animations.htm>.

复 习 题

1. 下列为一段 DNA 与染色体的一个结构组分配对。哪种配对最不可能是正确的?
 - a) 20 bp DNA 双螺旋中的 1 转
 - b) 146 bp 核小体核心颗粒
 - c) 168 bp 染色小体
 - c) 195 bp 核小体
 - d) 100 kbp 拓扑学上受限制的域
2. 下列颗粒中哪一种含有一种类型的核酸是与其他各种中都不同的?
 - a) 信号识别颗粒
 - b) 剪接体
 - c) 核小体
 - d) 核糖体
 - e) 端粒酶

参 考 答 案

1. a DNA 双螺旋的 B-DNA 中每转有约 10 bp, B-DNA 是染色体中 DNA 的主要形式。即使在 Z-DNA 中, 每转的碱基对数目也只为 12。因此, a 是错误的配对, 其余均正确。
2. c 题中所列除核小体外, 均有 RNA; 核小体有 DNA。端粒酶未在本章讨论, 将在第 22 章 DNA 复制中讨论, 端粒酶催化与模板无关的 DNA 端粒的合成。

第 6 章 以血红蛋白说明蛋白质的行为

6.1 引言

镰状细胞贫血、地中海贫血和几种其他遗传病都是由于血红蛋白的基因发生了变化。许多环境因素,如吸烟、锻炼、空气中的一氧化碳浓度、高山、肺功能的损伤等都影响血红蛋白的功能。了解血红蛋白和肌红蛋白的功能有助于安排和处理这些临床的和环境的因素。关于血红蛋白的深入的知识也是一个很好的例子,说明蛋白质是如何起作用的。

肌红蛋白是哺乳动物体内贮存和转运氧的蛋白质。肌红蛋白存在于需要贮存氧的肌肉细胞之中。血红蛋白存在于红细胞中。肌红细胞和血红细胞在结构上,在与氧结合的机制上,在许多为其专门功能所需要的重要的个别特性上,都有许多相似之处。

6.2 血红蛋白

(一) 血红素

肌红蛋白和血红蛋白都有一辅基(蛋白质中非多肽的部分)称为血红素。辅基通过共价键、非共价键或是两者,与蛋白质总是结合在一起。没有辅基的蛋白质称为脱辅基蛋白质。对于酶,脱辅基蛋白质加上辅基可称为全酶。

脱辅基蛋白 + 辅基 \longrightarrow 蛋白质(全酶)

血红素辅基的大的、疏水的、平面的卟啉环中有一个还原型的铁(Fe^{2+})原子。卟啉环的 4 个氮原子几乎都在环的平面上与铁原子结合,把还原型铁的另外两个配位留下来,于是还可形成两个与血红素平面垂直的键(图 6.1)。

(二) 珠蛋白的结构

肌红蛋白的脱辅基蛋白称为珠蛋白,是一个单个的多肽链,分子量 17 800。这条链折叠成 8 个 α -螺旋区,标号为 A 至 H,这些区段相互作用,产生一特异的三级结构,形成一单个的域。

这种结构大致是球形的,非常密实,但有一深的疏松裂隙或洞是例外。这个洞就是血红素结合的位点。洞的周围是一层疏水的残基,这就为血红素提供了一个疏水的环境,血红素刚好装在这个口袋之内,其带电荷的羧基面向外面。

血红素的结合位点除去内衬一疏水层之外,还有两个组氨酸残基,它们在与氧的结合中起关键作用。第一个,组 F8(F-螺旋中的第 8 个残基)称为近端组氨酸,其咪唑环靠近铁原子并

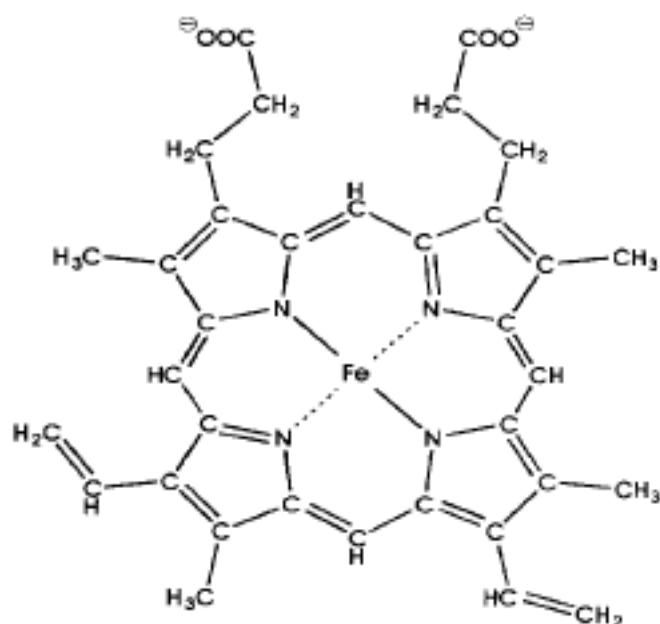


图 6.1 血红素的化学结构
结构表明亚铁在中心,周围是疏水环境,两个极性的丙酸基团在上端。

与铁的第 5 个配位点形成共价键。第二个组氨酸, 组 E7, 在血红素基团的相对一侧, 距离较远, 称为远端组氨酸, 不与铁原子形成键。

(三) 结合氧的机制

氧会与游离的血红素基团结合, 但该基团会立即被氧化, 使血红素基团变为三价铁 (Fe^{3+}) 的形式, 这种形式就不再能与氧结合了。在肌红蛋白中, 血红素基团中的铁总是处于二价状态 (Fe^{2+})。肌红蛋白中多肽框架的空间位阻减少了其中血红素基团的氧化。一种血红素-血红素的中间产物会增强氧化作用, 但多肽使两个血红素基团不能靠得足够近, 因而不能发生相互作用。

在肌红蛋白对一氧化碳 (CO) 的亲合力减低方面, 考虑空间也是重要的。游离的血红素对 CO 的亲合力比对 O_2 的大 25 000 倍, 而 CO 又存在于大气中, 也存在于血红素已被分解的组织中, 所以游离的血红素在不可逆地与 CO 结合后, 会迅速被用完。在肌红蛋白中, 远端组氨酸的存在防止了 CO 与血红素基团的高亲合力, 使得血红素对 CO 的亲合力仅为对 O_2 的亲合力的 200 倍 (图 6.2)。

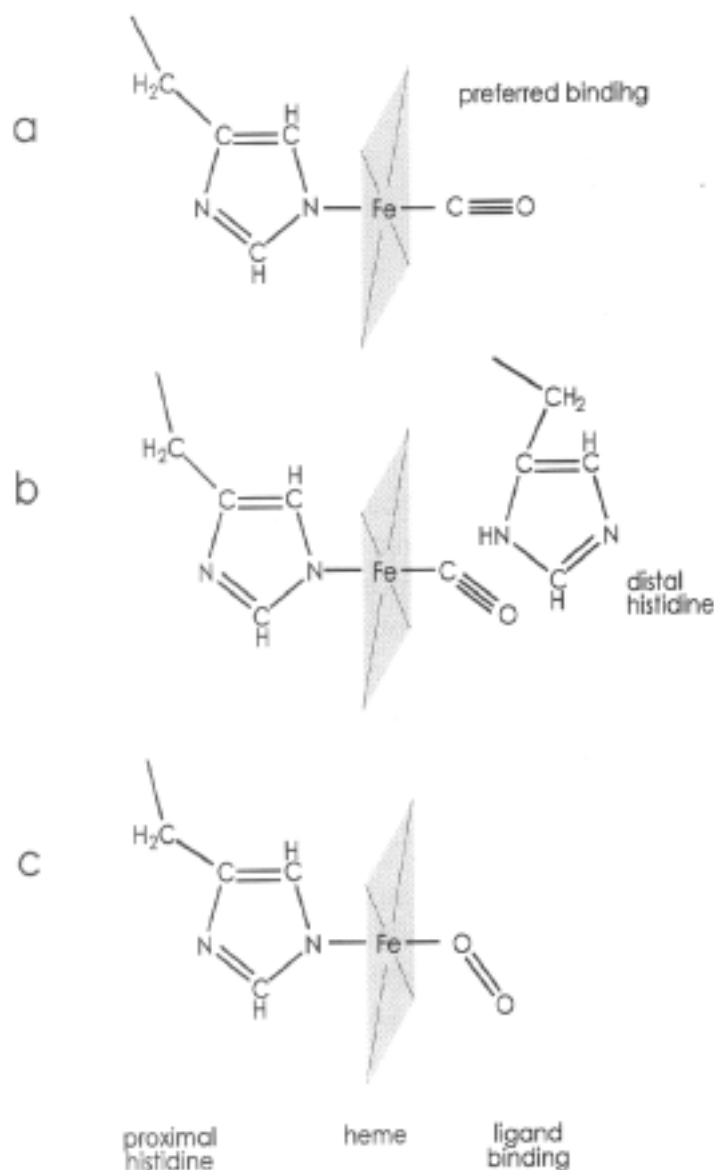


图 6.2 远端 His 与 CO 结合

远端组氨酸与一氧化碳的结合造成空间位阻的效应, 从而降低了血红蛋白对一氧化碳的亲合力。血红素基团均由灰色的菱形表示, 近端组氨酸在左边而远端组氨酸在右边。(a) 假设无远端组氨酸, 想像中的与一氧化碳的结合; (b) 有远端组氨酸时, 实际的与一氧化碳的结合, 空间位阻使结合的程度减弱; (c) 对与氧结合有利的角度避免了远端组氨酸的空间位阻。

(四) 血红蛋白的四级结构

血红蛋白由 4 个多肽亚基, 即 2 个 α -亚基和 2 个 β -亚基组成成为四肽结构^{2 2}。 α -和 β -链彼此非常相似, 与肌红蛋白也非常相似, 在氨基酸和二级以及三级结构方面均如此。不过, 在血红蛋白中 α -与 β -亚基发生专一的相互作用而形成四聚体。因此一个血红蛋白分子就有 4 个血红素基团, 能够结合 4 个氧分子。血红蛋白中血红素的起结合氧作用的口袋与肌红蛋白中的相似, 特别是两个组氨酸 (E7 和 F8) 和两个关键性的疏水残基 (Phe-CD1, 连接 C 和 D 螺旋的部分中的第 1 个残基, 以及 Leu-F4)。注意血红素结合位点的这些关键性特征在多肽链中距离较远的残基, 但当链折叠时它们就靠近了。和肌红蛋白中一样, 血红素上的结合位点使氧可逆地与血红素结合而不将它氧化, 并且减低了血红素与 CO 的亲合力。

血红蛋白的四级结构还产生了另外两个结构特点, 它们对于血红蛋白的功能都是重要的。第一个特点是分子中央的另一个配体结合位点, 是与 2, 3-二磷酸甘油酯 (BPG) 结合的, 第二个特点是一个亚基之间相互作用的区域, 特别是 β -的相互作用。

(五) 二磷酸甘油酯 (BPG)

二磷酸甘油酯是带有许多电荷的分子, 而血红蛋白中 BPG 的结合位点上则有 6 个带电荷

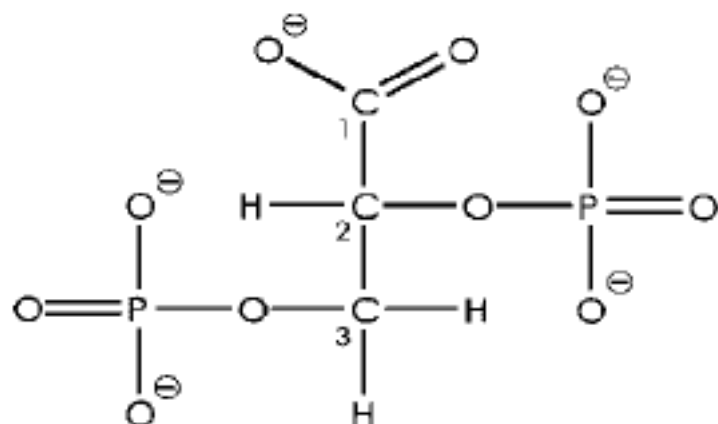


图 6.3 二磷酸甘油酯的化学结构
结构表示母体甘油的 3 个碳(1 ~3)和外加的两个磷酸根。注意, 在生理条件下这种分子的特点是带有许多电荷。

的氨基酸残基和两个 β -氨基(图 6.3)。BPG 结合位点是由两条 β -链的一部分构成的, 每个血红蛋白四聚体只能结合一个 BPG 分子。结合在血红蛋白上的 BPG 使得两个 β -链之间发生交联并且使得血红蛋白的紧张结构稳定化。

二磷酸甘油酯的结合控制血红蛋白对氧的亲合力。它是在红细胞内由主要代谢途径中的一种中间产物合成的, 这一代谢途径中的缺陷有时会对氧的转运产生严重后果, 原因就是使红细胞中 BPG 的水平发生了变化。

这一有关的途径是糖酵解, 即葡萄糖转变为丙酮酸的途径。最初的步骤是己糖激酶使葡萄糖

磷酸化, 而最后一步是丙酮酸激酶使磷酸烯醇丙酮酸形成丙酮酸(第 11 章)。BPG 是在二磷酸甘油酯变位酶催化下由一种中间产物 1, 3-二磷酸甘油酯产生的。

大多数细胞中 BPG 的浓度低, 但在正常人的红细胞中却高。当存在己糖激酶的遗传病时, 糖酵解途径中的中间产物浓度降低, 因而 BPG 的浓度也降低; 反之, 缺乏丙酮酸激酶时, 糖酵解的中间产物积累起来, BPG 的浓度也增高。因此这些病通过 BPG 的作用而影响血红蛋白的功能。

当血液被贮存在柠檬酸-葡萄糖介质中时, 二磷酸甘油酯也是血红蛋白发生显著变化(对氧的亲合力增加)的原因。在这些条件下, 糖酵解停止, BPG 的合成也停止。然而 BPG 的降解却继续进行, 其结果是 BPG 浓度降低。这种情况不能因直接加入 BPG 而逆转, 因为这种带电荷的分子不能透过红细胞的膜。不过加入肌醇可以防止这种情况, 肌醇在红血细胞中会转变为 BPG。

血红蛋白的四聚体结构所产生的另一个新的区域就是不同的亚基之间的界面， α - β 界面。在这个界面上，两个亚基是通过许多盐键——静电键——和氢键连在一起的。

亚基相互作用的关键性特点是存在两种构象：

- (1) 紧张或 T 结构，其中盐桥的数目最多。
- (2) 松弛或 R 结构，其中有些盐桥被破坏了，使得蛋白质的其余部分能自由旋转。

盐桥的一个例子就是 α -链中位置 C-5 上的 Lys。这一 Lys 只能与 T 结构中的 β -链的羧基末端形成桥。这两种结构也有不同的氢键，例如，T 结构中 α -链(C-7)的 Tyr 就与 β -链(G1)中的 Asp 形成键，而 R 结构中该 Tyr 就与 β -链(G4)中的 Asn 形成键。

R 和 T 结构对于血红蛋白的功能至关重要。在 R 状态下，氧的结合大大地被促进。反之，在 T 状态下，则 BPG, CO_2 和 H^+ 的结合被促进。因此，红细胞中 BPG 的存在会驱使血红蛋白转变为 T 即交联的状态而迫使结合态的氧被释放，然后氧就可被组织吸收。

6.3 氧的转运

细胞的线粒体需要分子态氧以产生像 ATP 这样的分子。ATP 提供化学能以推重细胞执行其功能所需要的化学反应，这些功能有大分子的合成、视觉或肌肉收缩等。氧从大气到达线粒体的基本过程是扩散。扩散是一随机过程，分子的运动都是独立的，彼此无关。扩散的结果是分子发生从高浓度区到低浓度区的净转运，因此氧从空气中向其浓度低的线粒体中扩散。但由于分子态氧在血液中的溶解度很小，所以氧的扩散速率很小。扩散速率决定于：(i) 浓度梯度；(ii) 运动中的分子数；(iii) 分子运动的速率。

空气中氧的浓度是固定的，线粒体则需要一定的氧浓度。因此，浓度梯度有一个上限，所以能增加扩散速率的惟一办法就是使运动中的分子数增加。肌红蛋白和血红蛋白能完成这一任务，因为它们的溶解度很高，又能结合氧。这就等于增加了氧的溶解度，因而使运动中的氧的分子数增多了。

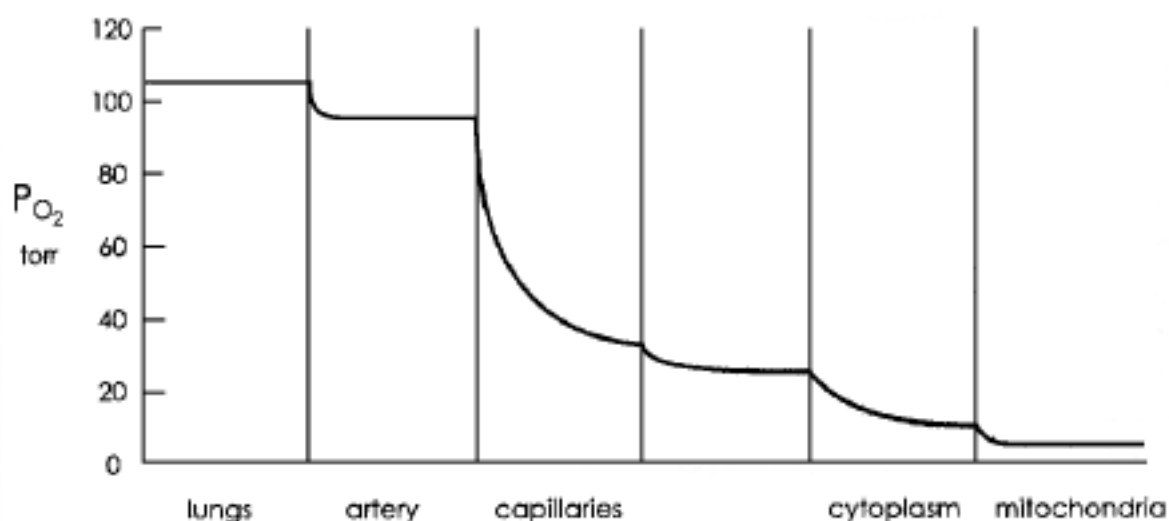


图 6.4 人体内的氧浓度梯度

肺中的氧分压高而线粒体中的低，氧顺着浓度梯度的下降而流动。

氧从空气到线粒体的途径包括许多个步骤(图 6.4)：

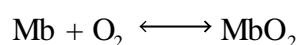
- (1) 肺中红细胞内的血红蛋白吸收氧；
- (2) 血液流到组织中；
- (3) 氧从红细胞扩散到组织中的细胞内；

(4) 细胞内氧的扩散(肌肉细胞中的肌红蛋白可使之易化)。

(一) 肌红蛋白中氧的贮存

氧通过质膜扩散到细胞内,在肌肉细胞中,还与肌红蛋白结合。然后氧合肌红蛋白通过细胞质扩散到线粒体中。线粒体中氧浓度低,于是氧释放出来,产生脱氧肌红蛋白。脱氧肌红蛋白再扩散到质膜处,由于质膜中氧浓度高,肌红蛋白再变回为氧合状态。在氧供应适当的正常情况下,大部分血红蛋白均处于氧合状态,这是一种贮存机制,一旦需要量突然增加,就能迅速释放氧。肌红蛋白仅存在于肌肉细胞中。

肌红蛋白通过简单的化学平衡与氧结合:



式中 Mb 代表脱氧肌红蛋白而 MbO₂ 代表氧合肌红蛋白。

平衡常数 K 为:

$$K = [\text{Mb}] \cdot [\text{O}_2] / [\text{MbO}_2]$$

式中方括号代表浓度。

所以,氧合肌红蛋白与脱氧肌红蛋白之比就与氧浓度恰好成正比:

$$[\text{MbO}_2] / [\text{Mb}] = [\text{O}_2] / K$$

另一种方法是计算肌红蛋白中氧合形式所占的比例,即肌红蛋白的部分饱和率:

$$\begin{aligned} \text{饱和率} &= [\text{MbO}_2] / ([\text{Mb}] + [\text{MbO}_2]) \\ &= [\text{O}_2] / ([\text{O}_2] + K) \end{aligned}$$

这一方程式是肌红蛋白的氧合比例,它可产生脱氧肌红蛋白的氧合作用的双曲线(图6.5),与符合 Michaelis-Menten 方程的酶的双曲线非常类似(第7章)。

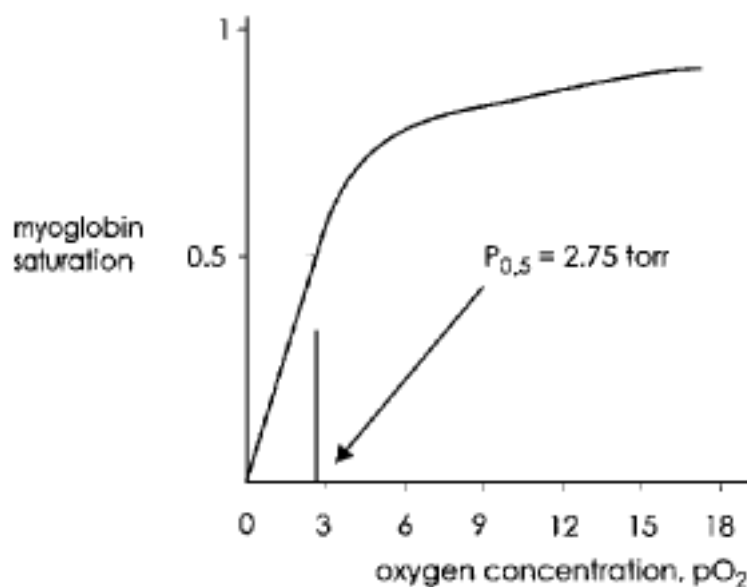


图 6.5 肌红蛋白的饱和与氧浓度的函数关系曲线

氧浓度或氧张力,常以与溶液平衡的气相中氧的分压 $p(\text{O}_2)$ 表示。压力的单位可以是托 (mmHg) 或毫巴 (dyn/cm^2) 或帕 (N/m^2)。1 Torr(托) = 1.333 mbar(毫巴) = 133.3 Pa(帕)。

使肌红蛋白达到 50% 氧饱和的氧分压称为 p_{50} 或 $p_{0.5}$ 。 $p_{0.5}$ 的压力与平衡常数有关,因为在 50% 饱和的情况下,上述方程变为 $0.5 = p_{0.5} / (p_{0.5} + K)$, 因为饱和率 = 0.5, 而 $[\text{O}_2] = p_{0.5}$, 所以 $K = 0.5$ 。

线粒体中的氧浓度为 0 ~10 Torr, 静脉血中则为 15 Torr 或更高。肌红蛋白的半饱和分压,

即 $p_{0.5}$, 为 2.75 Torr; 因此, 在大多数情况下, 肌红蛋白是高度氧合的, 是氧的贮库, 假若由于肌肉收缩而线粒体中氧含量下降, 它就可以立即供应氧。这种高的氧合程度也有利于细胞内的氧从细胞内表面向线粒体转运, 因为这种转运是顺浓度梯度的。细胞内表面约为 10 Torr(肌红蛋白约为 80% 饱和), 而线粒体约为 1 Torr(肌红蛋白约 25% 饱和), 所以当需要迫切时, 氧极易转运。

(二) 由血红蛋白转运氧

在红细胞中血红蛋白的浓度高。当氧浓度高时, 它的血红素与氧结合, 形成氧合血红蛋白, 而当氧浓度低时, 它又释放氧, 变成脱氧血红蛋白。在 $[O_2]$ 范围很广的情况下都可释放氧, 从以毛细血管血为营养的耗氧中等的组织的 30 ~40 Torr, 直到耗氧很多的组织中的 10 Torr。当然, 血红蛋白有 4 个亚基, 每分子能结合 4 个氧分子, 但它对氧的亲合力也比肌红蛋白低。红细胞中血红蛋白的 $p_{0.5}$ 约为 27 Torr。

肌红蛋白与血红蛋白之间的另一主要差别是结合曲线的形状。以饱和程度对氧浓度作图, 所得曲线不是双曲线而是 S 形曲线(图 6.6)。之所以形成 S 形曲线, 是因为一个亚基与氧结合, 就提高了其他亚基与氧结合的能力。当然, 氧张力很低时, 结合的氧很少, 但当氧的张力增高时, 氧合作用的进行会增加结合的亲和力, 所以结合的氧越来越多。这就增加了血红蛋白转运氧的效率, 因为当氧张力高时, 它的表现就像与氧的亲合力很高的分子, 而在氧张力低时, 则表现为氧亲合力低的分子。这种性质称为正协同性。

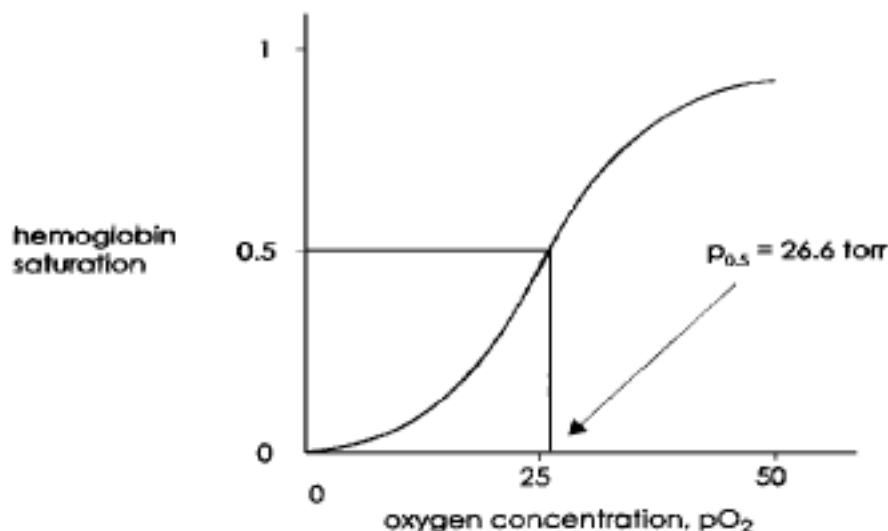


图 6.6 血红蛋白的饱和曲线

图示血红蛋白的饱和是氧浓度的函数。

在血流中, 红细胞中的血红蛋白遇到的是肺中很高的氧张力(100 Torr), 这使得它发生 97% 的饱和, 每个血红蛋白分子平均结合 $0.97 \times 4 = 3.88$ 个氧分子。在红细胞遇到外周组织的毛细血管中较低的氧张力之前, 很少有氧释放出来。在耗氧量中等的组织中, 氧张力为 30 ~40 Torr, 大约每分子血红蛋白会释放出 1 分子氧。这使得余下的氧分子对于氧张力进一步的微小降低都非常敏感, 所以下一个氧分子被释放出来就比较容易。

(三) 从肺到肌肉线粒体的氧的转运

注意图 6.7 中肌红蛋白曲线的非常陡的部分如何变为其正常工作范围内的以及血红蛋白曲线的陡的部分如何变为其正常工作范围内的。血红蛋白利用正协同性来完成这种变化。

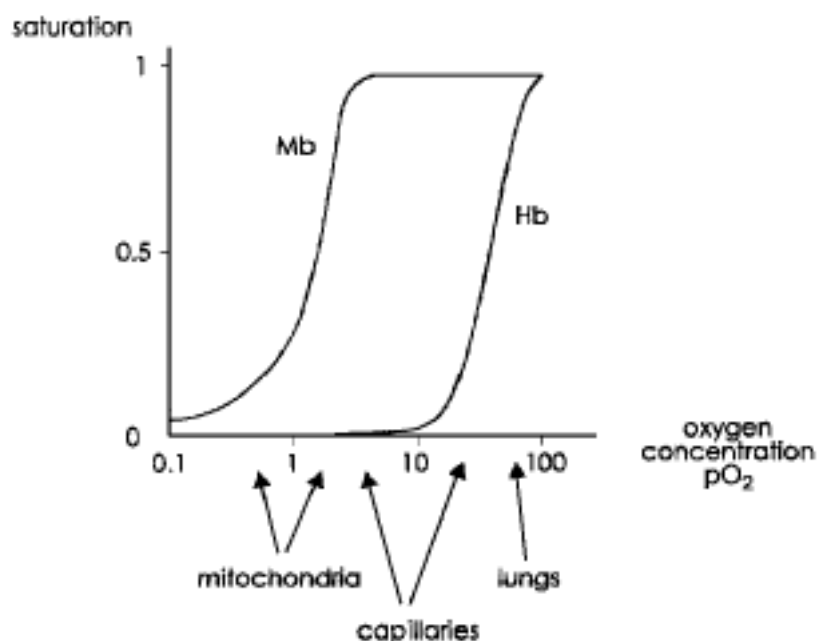


图 6.7 氧的转运——肌红蛋白(Mb)与血红蛋白(Hb)的饱和氧浓度的关系

为了清楚地表达各自的功能, 氧浓度以对数标度表示, 这就使得氧浓度低的标度拉长了, 而浓度高的标度压缩了(在氧浓度的轴上指明了肺、毛细血管和线粒体中的氧浓度)。

在耗氧速率高的组织, 如心脏或迅速工作的骨骼肌中, 氧张力可低至 15 Torr, 这就使得血红蛋白落到 20% 饱和, 每分子血红蛋白释放约 3.1 个氧分子(假定它开始时为 97% 饱和)。氧张力进一步下降很少, 从 15 ~10 Torr时, 每分子血红蛋白就会再释放 0.5 个氧分子。因此血红蛋白就成为氧的贮库, 只要氧张力下降很少, 它就会释放氧。

(四) Hill 系数

氧与肌红蛋白的结合依下列方程

$$K = \frac{[Mb] \cdot [O_2]}{[MbO_2]}$$

式中 K 为平衡常数。将方程式两侧均取对数并移项, 即得

$$\log\left(\frac{[MbO_2]}{[Mb]}\right) = \log[O_2] - \log K$$

Hill 图即为以 $\log\left(\frac{[MbO_2]}{[Mb]}\right)$ 对 $\log[O_2]$ 作图。对于肌红蛋白, 此图为一一直线, 斜率等于 1, 即 Hill 系数(图 6.8)。

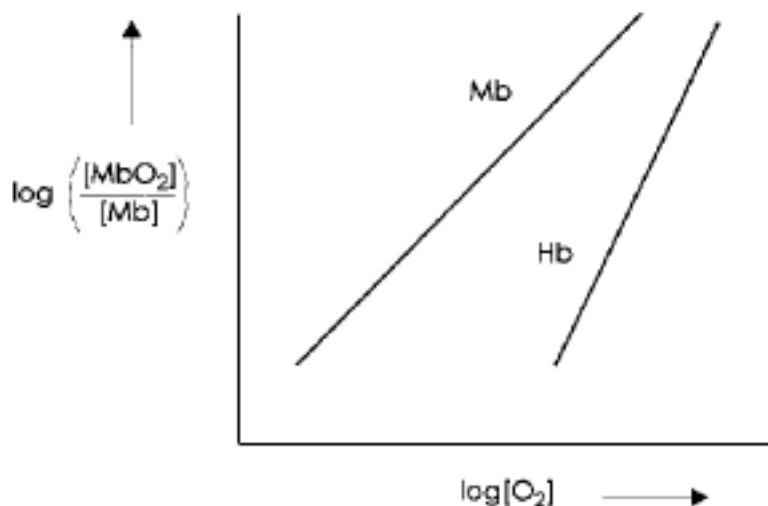


图 6.8 肌红蛋白(Mb)与血红蛋白(Hb)的 Hill 图

肌红蛋白(Mb)的 Hill 图是一条直线, 斜率等于 1; 血红蛋白(Hb)的是一条直线, 此线的 y 轴应为已被占据的位点与未被占据的位点数之比的对数, 位点指的是血红蛋白的氧结合位点。

对于血红蛋白,相继的各个结合位点的平衡常数不同,因此上述方程式必须加以改变。已发现血红蛋白的 Hill 作图所得的最大斜率为 2.8,故 Hill 系数为 2.8(图 6.8)。大于 1.0 的 Hill 系数表示有正协同性。

(五) 别构效应

结合在蛋白质分子上的特定部位上的配体对该分子的另一部位所发生的效应称为别构效应。这通常是通过分子中构象的变化而实现的。

在许多情况下,包括血红蛋白在内,有两种可能的别构分子的状态——R(松弛的)和 T(紧张的)。对于血红蛋白,形成这两种形式的条件是:(i) R——氧被结合, BPG 被释放;(ii) T——氧被释放, BPG 被结合。此外, H^+ 和 CO_2 会结合在 T 形式上并使之稳定化。

氧结合在脱氧血红蛋白上会使铁原子的直径减小,于是铁就落入卟啉环的平面之内。这种移动通过近端组氨酸传递到多肽,最后引起亚基相互滑动。界面上的盐桥断开,并把 BPG“挤”出来。这些变化使得该分子中其余的几个血红素基更易与 O_2 结合;因此,以后的 O_2 就更容易结合上去。

O_2 结合的协同性称为血红素-血红素相互作用。

(六) 2,3-二磷酸甘油酯

因为 BPG 结合位点上 BPG 的结合会取代血红素上的 O_2 ,这是一种别构效应。二磷酸甘油酯使紧张形式稳定化。

我们前已指出, BPG 代谢受到干扰会影响血红蛋白与氧的结合。图 6.9 所示为氧饱和曲线所受到的影响。

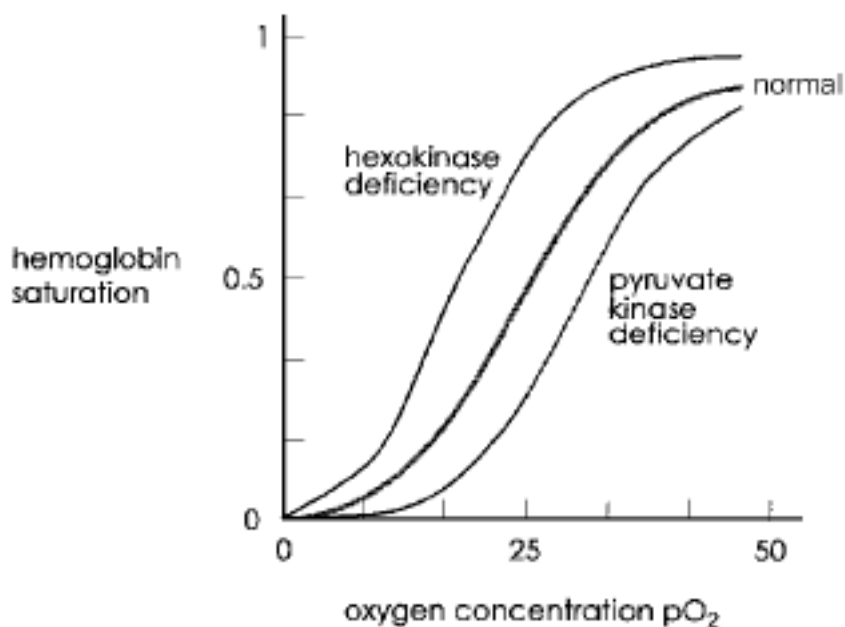


图 6.9 己糖激酶和丙酮酸激酶的缺少

图示正常人和缺少己糖激酶或丙酮酸激酶的病人的吸收氧的曲线。

缺少己糖激酶时, [BPG] 低,因而 O_2 的结合就增加,且不能被正常地释放出来。缺少丙酮酸激酶时, [BPG] 高, O_2 的结合受到损害,而且血红蛋白不能把 O_2 带到周围的组织中去。

二磷酸甘油酯也与高山的适应有关。当一个人从低处向高处移动时,例如在高山滑雪区中,

高处的 $[O_2]$ 低,会使血红蛋白的氧合作用减少,从而减少了对组织的氧供应。其结果是即使稍稍活动,呼吸也会加快,其他症状有头疼和恶心。人体以各种方式适应,这些方式包括增快血流、增加红细胞的数目和[BPG]。在约 24h(小时)之内,[BPG]就可显著增加,比红细胞数目的增加快得多,红细胞要好几周才能增多。然而矛盾的是,[BPG]进一步增加又会减少肺中血红蛋白的氧合作用,不过这种影响较小。更重要的是,[BPG]增高使得组织中释放出来的氧更多,因为血红蛋白上的氧会比正常情况下卸载得更完全(图 6.10)。虽然在正常的高山条件下,运动轻微或中度时,这对于供应充足的氧十分有效,但血液中贮备的结合在血红蛋白上的氧却丢失了,因而更剧烈的运动就无氧可资利用。对于镰状细胞贫血的患者,或有些情况下,对于有镰状细胞性状的人,血液中氧含量降低会引起严重后果。关于镰状细胞,将在下文详述。

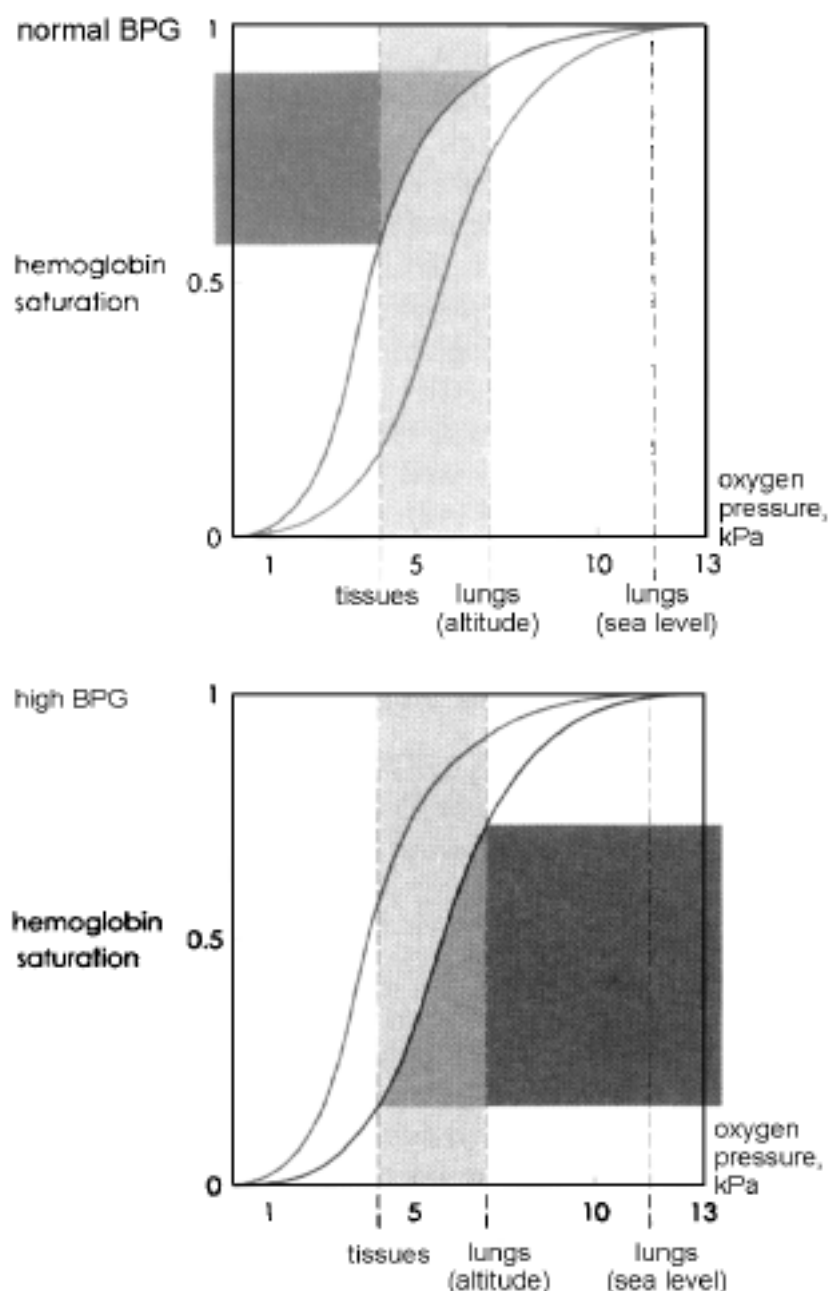


图 6.10 高山适应

此图综合了在高山上氧的转运: (a) (BPG 正常) 所示为适应前的情况; (b) (BPG 高) 为适应后的情况(两图中曲线 1 为血红蛋白对氧的吸收;肺与组织之间氧的梯度为深色的区域,浅色的区域则指出当氧从肺移到组织中时血红蛋白氧饱和的变化)。

(七) Bohr 效应

组织中的代谢作用既产生 H^+ , 也产生 CO_2 。代谢越旺盛的组织,需要的氧越多,产生的

H^+ 和 CO_2 也越多。 $[H^+]$ 较高, 即 pH 较低, 和 $[CO_2]$ 较高, 对于血红蛋白都是释放更多氧的信号, 因此血红蛋白可以“合理分配”氧的供应, 给最需要氧的组织以较多的氧。 H^+ 和(或) CO_2 与血红蛋白结合并通过别构作用减少血红蛋白对氧的亲和力。因此, 氧就被释放出来了。

pH 对血红蛋白与氧的亲合性的影响称为“Bohr 效应”, 它有助于血红蛋白把氧传送到最需要的地方去(图 6.11)。结合在血红蛋白上的 H^+ 和 CO_2 被转运回肺中, 肺中的氧张力高, 于是氧取代了它们, 恢复了血红蛋白对氧的高亲和力, CO_2 则散失到大气中。

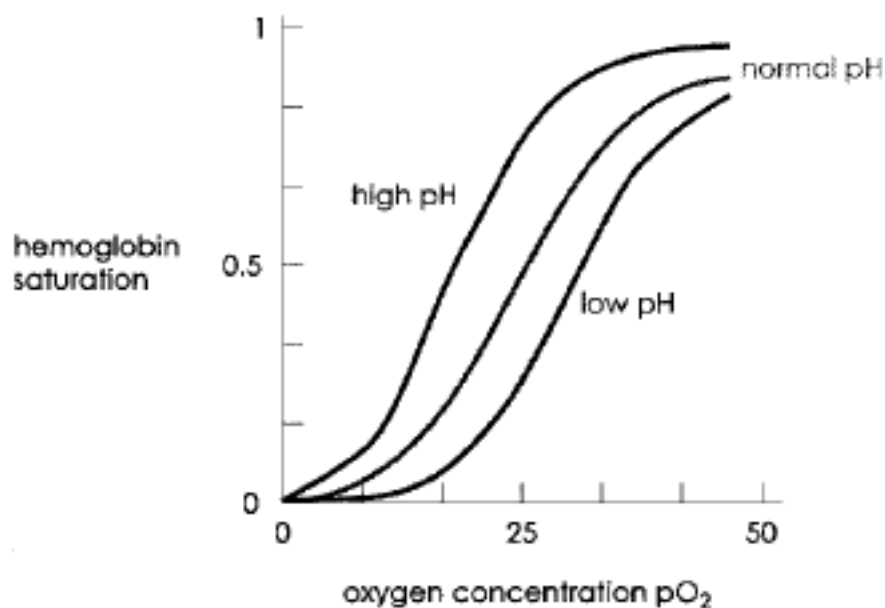
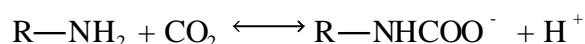


图 6.11 Bohr 效应

血红蛋白在正常的血液 pH 下和较高和较低 pH 下吸收氧的曲线。

CO_2 以共价结合到血红蛋白的游离 α -氨基上, 形成氨基甲酸。于是氨基甲酸基团上的负电荷取代了游离 α -氨基上的部分的正电荷, 此负电荷又参与更多盐桥的形成, 使得血红蛋白的 T 形式更加稳定:



这时 H^+ 与几个基团(一对末端氨基和两对组氨酸)结合, 这些基团的 pK 因 T 形式中的环境而增高了。 H^+ 和 CO_2 的结合增加了血液的缓冲能力并且有助于维持血液的 pH。(CO_2 的转运只有部分是由于血红蛋白; 碳酸酐酶把 CO_2 变为重碳酸, 重碳酸极易溶于水, 被运出红细胞后就进入血液中。)

6.4 成年人的正常血红蛋白

成年人的血红蛋白主要是 Hb A(亦称 Hb A₀), 其亚基组成为 $\alpha_2\beta_2$ 。在红细胞的生活周期内, 由于与葡萄糖和其他化合物的化学反应, 也会偶然产生 Hb A 的一些变异的形式, 包括 Hb A_{1a}, Hb A_{1b} 和 Hb A_{1c}。

Hb A_{1c} 是 Hb A 的葡萄糖基化的形式, 其形成与血液中的葡萄糖浓度 $[Glc]$ 有关。当然, 可以用 Hb A_{1c} 的浓度来监测糖尿病人的病情。因为糖尿病患者体内的 $[Glc]$ 不能被调节, 所以这些病人必须控制糖的直接摄入。当患者的 $[Glc]$ 高时, 形成 Hb A_{1c} 的速率就快, 而 Hb A_{1c} 的水平也就高。因为血红蛋白的寿命长, 所以 Hb A_{1c} 在血红蛋白中的比例就是在红细胞生活周期内平均 $[Glc]$ 的度量。因此, 即使检查过了一个月, 医生都能告诉病人在两次就诊之间血糖控制得怎样(图 6.12)。

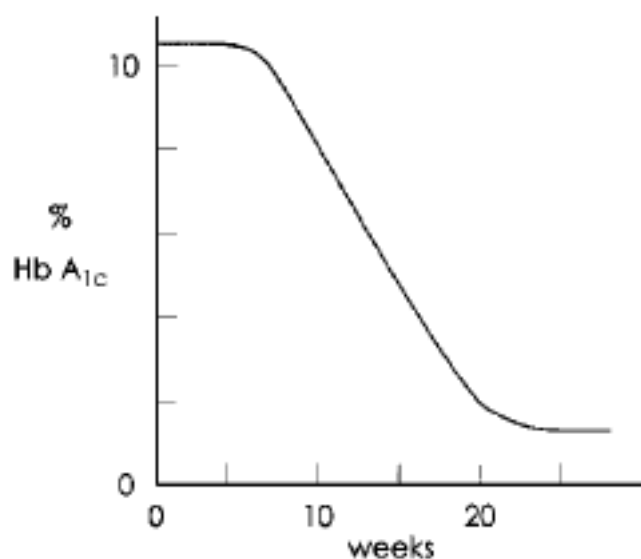


图 6.12 治疗糖尿病过程中 Hb A_{1c} 的时间进程

图示治疗开始后糖尿病人血液中 Hb A_{1c} 的浓度与时间的关系。

HbA₂ 这种形式, 亚基组成为 $\alpha_2\beta_2$, 是成年人正常血红蛋白中的次要组分。HbA 和 HbA₂ 的 α -链是完全相同的。 β -链是由别的基因以低速产生的, 与 β -链类似。

(一) 发育中的血红蛋白

在人的早期发育中, 有不同的正常的血红蛋白。这是因为在发展的不同阶段使用了不同的基因。人体内用了至少 7 种不同的基因: α , β , γ , δ , ϵ , ζ , 和 η 。胎儿的血红蛋白为 HbF, 是 $\alpha_2\gamma_2$ (α 和 γ 均存在于胎儿的血红蛋白中; 其差别仅在于 136 位上的丙氨酸改变为甘氨酸)。胚胎的血红蛋白为 $\zeta_2\epsilon_2$ 。

表 6.1 人体内有正常功能的血红蛋白

发育阶段 ^a	名称	或类似的链	或类似的链	亚基组成
胚胎				$\zeta_2\epsilon_2$
胎儿	Hb F			$\alpha_2\gamma_2$
出生到死亡	Hb A			$\alpha_2\beta_2$
出生到死亡	Hb A ₂			$\alpha_2\beta_2$

^a 各阶段间有相当多的重叠。

(二) 胎儿的血红蛋白(HbF)

胎儿需要一种不同的血红蛋白 HbF, 因为它必须从胎盘中吸收氧, 而胎盘的氧张力低于肺中的。所需要的对氧的高亲和力来自于对 BPG 的低亲和力, 这自然就提高了对氧的亲和力。

对 BPG 的亲和力较低是由 BPG 的结合位点发生了变化(图 6.13)。特别是 γ -链中的 H21 残基是 Ser, 而不是 β -链中的 His, 此外, γ -链中的一小部分(10%)的 ϵ -氨基(在氨基端)发生了乙酰化, 这就减少了 BPG 结合位点上的正电荷, 因而降低了对 BPG 的亲和力。

HbF 对 BPG 的亲和力降低使得它对氧的亲和力增强了。这就使得 O₂ 能够从 HbA 传递到胎盘中的 HbF 上, 从而给胎组织提供了良好的氧合作用。

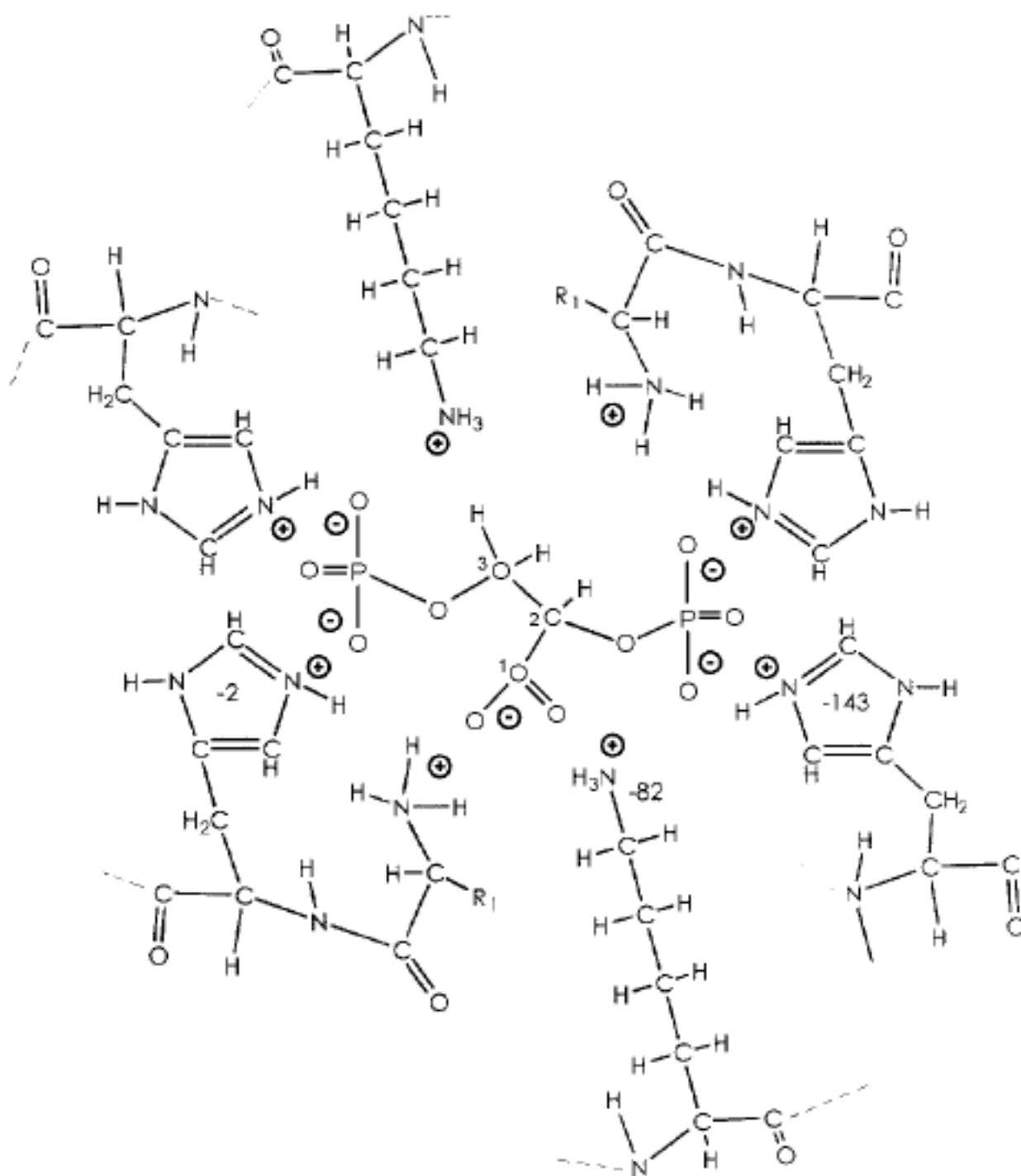


图 6.13 HbA 中的 BPG 结合位点

BPG 在中央; 右侧为 α -链的 4 个关键性残基, 从上到下为 α -氨基, 第 2 位的组氨酸, 第 143 位的组氨酸和第 82 位的赖氨酸; 第 2 条 α -链上的相应的 2 个残基在左侧。

6.5 血红蛋白疾病

血红蛋白的异常是由突变引起的, 然后通过遗传在群体中散布。这是进化的基础, 但许多突变是有害的, 会产生遗传病。除去男性的性染色体外, 每一个基因在每一个细胞中至少出现两次, 每个拷贝来自双亲中的一方。因此, 假若有缺陷的基因仅由双亲中的一方遗传而来, 这种情况就是杂合的, 假若其效果(表现型)是隐性的, 这个人就没有或只有轻微的症状。假若有缺陷的基因来自双亲, 那么情况就是纯合的, 症状就会充分表现, 不管这种缺陷是否属于隐性。

与有缺损的血红蛋白有关的疾病分为两类:

- (1) 血红蛋白病, 是由于 α -或 β -链发生了变化
- (2) 地中海贫血, 是由于缺少了 α -或 β -链

(一) δ -地中海贫血

没有能起作用的 δ -链(由于 δ -链基因的突变或其表达的控制)的个体既不能合成 HbF, 也不能合成 HbA。胎儿可能因制成一种杂交的胎儿-胚胎血红蛋白而存活下来, 但通常会在出生前死去或出生后不久死亡。在这种情况下的血红蛋白称为 Hb-Portland($\alpha_2 \cdot \delta_2$)。这类个体中通常会产生正常的 α -, β -和 δ -链, 而这些链会聚集成四聚体 α_4 (Hb H), δ_4 (Hb Barts) 或 $\alpha_2\delta_2$ 。在正常个体中很少有同四聚体, 但在杂合子或“载体”中找到。同四聚体能与 O_2 结合, 但无血红蛋白的协同性或别构效应, 因此不能发挥有用的功能。协同性或别构效应来自于不同亚基的相互作用。

这种杂合的状态又称为 δ -地中海贫血性状。每条染色体上有两个拷贝的 δ -链基因, 意味着一个人可能有 4, 3, 2, 1 或 0 个 δ -链基因。4 个基因是正常的, 2 个或 3 个基因是不对称的, 1 个基因可能表现轻微的症状(δ -地中海贫血性状), 0 个基因则是致死的(δ -地中海贫血)。

(二) β -地中海贫血

假若不能产生起作用的 β -链(通过 β -链基因的突变或其表达), β -地中海贫血症就发生了。正常情况下, 假若没有 β -链, 就会有 α -和 δ -链(以及 γ -链), 但在染色体上 β -链的基因和 δ -链的基因靠得很近, 故在某些情况下会同时没有 β -和 δ -链。 β -地中海贫血对胎儿无影响, 但出生后纯合的个体会贫血。他们的血液中有大量的 HbF($\alpha_2 \cdot \gamma_2$) 和 HbA₂($\alpha_2 \cdot \delta_2$)。

每个染色体上只有一个 β -链基因的拷贝, 所以纯合状态或是有该基因的 2 个拷贝(正常), 或是没有(β -地中海贫血症), 杂合状态下则有该基因的一个拷贝(β -地中海贫血性状)。

β -和 δ -地中海贫血性状通常都会使杂合体能对疟疾有些防护; 因此, 这种突变会存活下来并且在疟疾高发地区存在。

(三) 血红蛋白病

血红蛋白的突变会影响血红蛋白分子中 4 个关键区域之一如下:

(1) 整个分子的外表面会发生变化。这种突变的影响常常是近于中性的, 除非它降低了血红蛋白的溶解度, 如镰状细胞贫血的情况。

(2) 对于那种允许血红素铁发生氧化并破坏其结合氧的能力的突变, 氧结合部位(或称活性部位)是敏感的。发生了这种突变的血红蛋白称为高铁血红蛋白(HbM)。

(3) 专一的突变, 例如由于有一大的侧链而发生空间位阻的突变, 会使正确的三级结构不能形成。三级结构是血红素的必需的环境, 也是形成四级结构和发生血红素-血红素相互作用所必需的。

(4) 四级结构中亚基的相互作用是血红蛋白结合 O_2 的别构控制所不可缺少的, 亚基界面上残基的突变就会影响这种相互作用, 其结果常常是对 O_2 的亲合力不正常。

这些影响的例子分别为:

1. HbS, $\alpha_2 \cdot \beta_2^{6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}}$ 。这种命名法的意思是 β -链中的第 6 个残基(正常为 Glu) 为 Val 所代替。血红蛋白 S 存在于镰状细胞贫血的患者体内。如所预期, 极性残基 Glu6 存在于分子表面。可以预料, 在此处插入缬氨酸会降低血红蛋白的溶解度并促进其聚集。

正如所预料, 镰状脱氧血红蛋白在红细胞中呈细长结晶而沉淀。结晶的形成压迫原生质

膜,使它弯曲成镰刀状而不呈正常的碟状,镰状细胞贫血即因此而得名。不过,氧合血红蛋白仍是可溶的,这就是说,如果氧张力仍然相当高,镰状血红蛋白仍然可以转运氧。在肺中,氧张力很高,意味着其中几乎没有什么脱氧血红蛋白,因而也没有镰状细胞。在其他组织中,较低的氧浓度(较高的 $[H^+]$ 和 $[CO_2]$)会引起氧的释放,于是脱氧血红蛋白形成并开始沉淀。假若只有一部分血红蛋白脱氧,镰状化的过程会较慢,而且在镰状化严重之前,血流已把红细胞送回肺中,于是脱氧血红蛋白再度发生氧合作用。不过,在需氧量高的组织中,会有较多的脱氧血红蛋白形成,发生镰状化。在此情况下,红细胞就会在正常形状和镰状之间循环变化,在动脉中含有氧化血红蛋白,形状正常,在静脉中含有脱氧血红蛋白,呈镰状。这一过程会损害质膜,使红细胞的寿命缩短(典型的是从120天缩短为17天),使血液中的红细胞数目减少而引起贫血。

镰状细胞不像正常细胞那样形状平滑而且有弹性,因此不易通过毛细血管。假设氧张力低到足以引起严重的局部镰状化的程度,有些镰状细胞就会在血管中结成胶冻状而限制血流。血流变慢又使组织中的氧张力进一步下降,生成更多的脱氧血红蛋白,于是镰状细胞更多,导致受影响的组织得不到血液的供应。这就可能产生危机,结果是过早死亡。

杂合个体有镰状细胞性状。患者血液中的HbS很少,不足以产生临床症状,但在高山或长期运动的情况下,会发生镰状化和临床症状。

用氰酸钾处理HbS可防止镰状化。氰酸根离子与血红蛋白链的末端氨基发生不可逆反应,使得 CO_2 和BPG与血红蛋白的结合减少(图6.14)。其结果是对 O_2 的亲合力增高,脱氧血红蛋白减少,因而镰状化减轻。氰酸盐有毒,所以有副作用,正在寻找更专一的Hb的修饰剂。

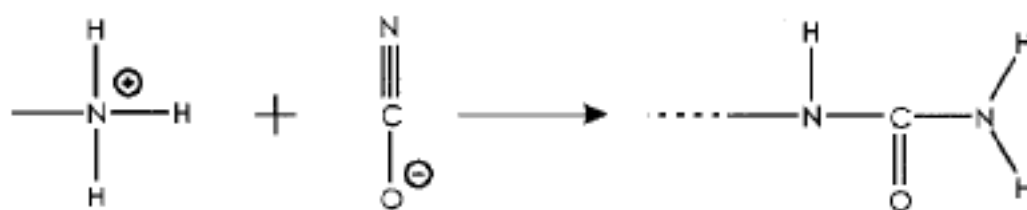


图 6.14 氰酸盐与 Hb 的 N-末端起反应
氰酸盐与血红蛋白链的氨基末端反应,除去其电荷。

镰状细胞贫血的其他药物治疗途径是发展镰状化的竞争性抑制剂,使胎儿的Hb基因在成年人体内关闭,寻找使红细胞扩大的办法以提高血红蛋白的浓度。

2. HbM, 例如 HbM Osaka, ${}^2_{58\text{His}} \cdot {}^2_{\text{Tyr}}$; HbM Milwaukee, ${}^2_{\text{Val}} \cdot {}^2_{67\text{Val}} \text{Glu}$ 。His·58 就是 HisF8, 近端的组氨酸, 而 HbM Osaka 中, 血红素中的此 His 改为 Tyr, 就会使血红素存在于 Fe^{3+} 状态, 不与 O_2 结合而与水分子结合。

Val-67 是珠蛋白链与血红素基团间发生疏水接触的一个位置。在 HbM Milwaukee 中, 它被一个极性基团取代就破坏了血红素的结合而使得水可能进入血红素的口袋。

在纯合状态下, 这些突变体的血红蛋白分子有两条正常的链(HbM Osaka 中是两条 α -链, 在 HbM Milwaukee 中是两条 β -链) 和两条突变链。突变链不能与 O_2 结合, 因而不能从 T 状态转换到 R 状态。当然, 也就没有氧结合的协同性, 而两条正常链对 O_2 的亲合性又太高, 以致毫无用处。

3. Hb Riverdale-Bronx, ${}^2_{25\text{Gly}} \cdot {}^2_{\text{Arg}}$ 。三级结构由于 α -螺旋间的疏水相互作用而变得

稳定。这要求包装紧密的结构,使水无容身之处。在这个例子中,甘氨酸为精氨酸所取代。没有足够的空间来安置这样一个大的极性侧链,因而三级结构被扭曲了,也不稳定了。

4. Hb Kempsey, $\alpha_2 \cdot \beta_2^{99\text{Asp} \rightarrow \text{Asn}}$ 。-链中第 99 位的 Asp 与脱氧血红蛋白,即 T 状态的稳定化有关,它与 -链的 C-7 上的 Tyr 形成氢键(图 6.15)。99 位上的 Asn 不能形成这种氢键因而 T 状态就不能建立起来。因此, Hb Kempsey 对氧的亲和力特别高,不能在组织中释放氧。在 Hb Kansas 中情况恰好相反, Asn 102 为 Thr 所取代,使 R 状态不稳定,结果是对 O₂ 的亲和力非常低。

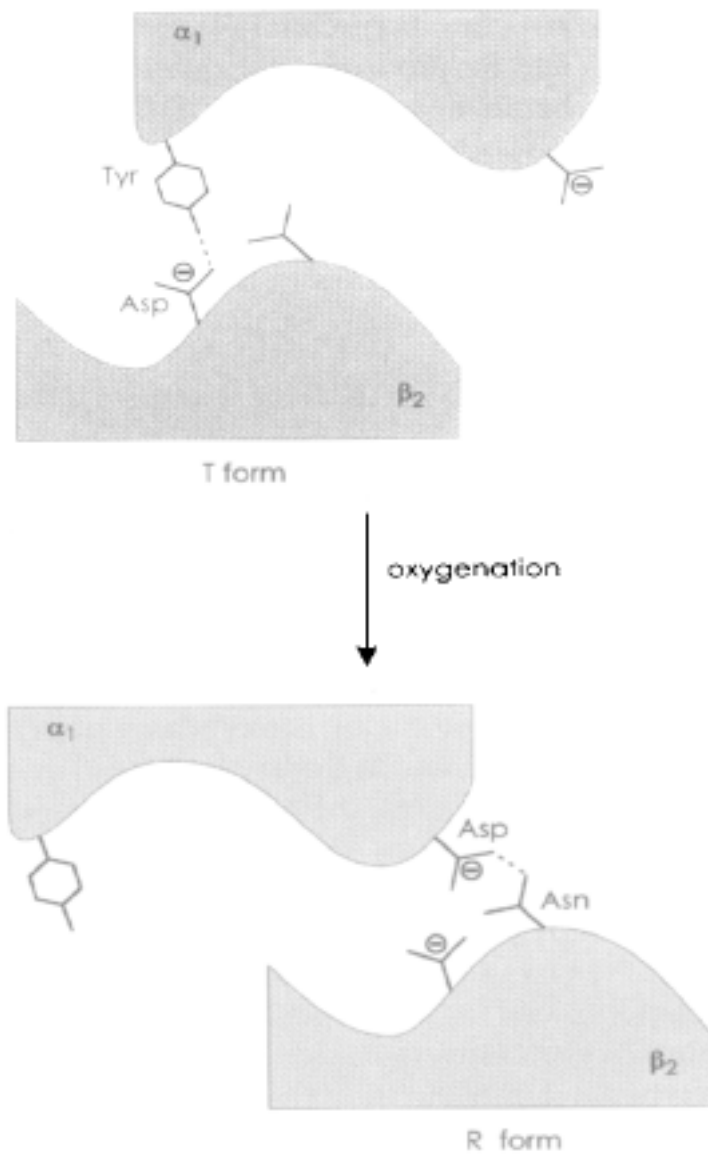


图 6.15 不同亚基间氢键的形成

弯曲的形状代表血红蛋白中两个亚基间表面的一部分。(a) 血红蛋白处于脱氧(T) 状态, 图示酪氨酸与天冬氨酸之间有一氢键; (b) 血红蛋白处于与氧结合的状态(R), 亚基已彼此错位, 酪氨酸-天冬氨酸间的氢键已断开, 使得一个新的氢键形成了, 这次是在天冬酰胺和另一天冬氨酸之间形成了氢键。

6.6 小 结

- (1) 血红蛋白是一个有用的蛋白质的模型。它存在于红细胞中, 在其中结合和释放氧。
- (2) 血红蛋白是含有非多肽部分, 即辅基的蛋白质的一例。血红素是血红蛋白以及各种其他蛋白质的辅基。
- (3) 血红蛋白的蛋白质部分, 即其脱辅基蛋白, 折叠成好几个 α -螺旋, 这些螺旋又被包装

在一起形成一个密实的分子, 该分子有一个深的口袋, 血红素就结合在其中。

(4) 氧与血红素中的铁原子结合, 铁仍停留在亚铁状态, 因为珠蛋白的结构阻止着氧同时与一个以上的血红素相互作用。

(5) 血红蛋白是珠蛋白链的四聚体, 每条链有一个结合的血红素。一个或多个血红素与氧结合就引起构象的变化, 这种变化增强了与下一个氧分子结合的亲和性。这种变化为氢离子、二氧化碳和 BPG 的结合所抑制。

(6) 在肺中, 高的氧浓度迫使氢离子、二氧化碳和 BPG 离开, 血红蛋白几乎为氧所饱和。当血流将氧饱和的血红蛋白带给组织时, 血液中氧浓度降低, 释放出一些氧并使得氢离子、二氧化碳和 BPG 能与血红蛋白结合, 从而释放出更多的氧。这些协同的别构效应使得血红蛋白能够向组织中有效地传递氧。

(7) 在血液的 pH 较低处, 血红蛋白就释放氧。

(8) 在发育过程中血红蛋白发生变化。胎儿的血红蛋白有两条 α -链(与成年人的 α -链完全相同)和两条 γ -链(为胎儿所特有)。成年人有两条 α -链和两条 β -链, 还有占比例很小的类似的 δ -链。

(9) 已知血红蛋白有许多种遗传形式。其中有一些会引起疾病, 如镰状细胞贫血。

参 考 资 料

Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy, Max Perutz, 1992, Freeman, New York.

Mechanisms regulating the reactions of human hemoglobin with oxygen and carbon monoxide, 1990, Ann. Rev. Phys., 52: 1 ~25.

The Molecular Basis of Blood Diseases, G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, and P. W. Majerus, 1987, W. B. Saunders, Philadelphia, PA.

Thalassemia—a global public health problem, 1996, D. J. Weatherall and J. B. Clegg, Nature Medicine, 2: 847 ~849.

Cuts and scrapes? Plasmin heals! J. D. Vassalli and J. H. Seurat, 1996, Nature Medicine, 2: 284 ~285.

复 习 题

- 下列说法哪一项不正确? 肌红蛋白的辅基...
 - 主要是疏水的
 - 有 2 个负电荷
 - 有还原形式的铁
 - 与近端组氨酸有共价连接
 - 在某些血红蛋白病中发生了变化
- 下列各项中, 哪一项是错误的? 人体内氧的转运...
 - 依赖于血流
 - 依赖于不同组织附近 pH 的变化
 - 与血液中 pH 的缓冲有关系
 - 与氧透过细胞膜的主动转运有关
 - 需要红细胞中的 BPG
- 下列各项中, 哪一项引起镰状细胞危机?

- a) 血红蛋白 β -链的第 6 位上存在谷氨酸
- b) 脱氧血红蛋白的浓度增高
- c) 血流增加
- d) 红细胞寿命缩短
- e) 氧浓度高

参 考 答 案

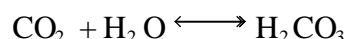
1. e 肌红蛋白的辅基是血红素,它具有 a ~d 的所有特性。血红蛋白病是由于血红蛋白中的珠蛋白部分有遗传的变化而与血红素辅基毫无关系。
2. d 没有血流,氧在体内会移动得太慢。pH 的变化对于把氧导向最需要它的组织是关键性的(Bohr 效应)。氧的释放与氢离子的吸收有联系。没有 BPG,血红蛋白对氧的亲合力就会太高。只有 d 是错误的;氧分子是疏水的,极易扩散过质膜——不需要主动转运,也从未发现过氧的主动转运。
3. b 在氧张力低时,脱氧血红蛋白在红细胞中沉淀,使之呈镰刀状。镰状细胞会在血管中成胶冻状并积累起来,切断了对组织的氧的供应,使得镰状化更为严重,从而造成镰状细胞危机。注意血红蛋白 β -链第 6 位上的谷氨酸存在于正常的血红蛋白中;镰状血红蛋白的这个位置上是缬氨酸。红细胞寿命缩短会引起贫血,它肯定会增加镰状细胞危机,但并不是直接原因。

第 7 章 酶 引 论

7.1 引 言

酶是催化化学反应的蛋白质和(或) RNA 分子。生物体系中的化学反应几乎都是有催化剂的, 否则就会进行得太慢。所用的催化剂是蛋白质(除去极少几种由 RNA 催化的以外), 不过其他分子(辅基、辅酶)也可能是需要的。与化学催化剂相比, 酶的主要的功能上的特点是它们的高效率、专一性和调节能力。酶催化的反应可以使能量从一种状态转化为另一种状态。酶催化的反应也和化学反应和机械一样, 遵循同样的热力学定律。

酶所催化的反应有一些是非常复杂的; 另外一些又非常简单。许多反应进行得非常之快。例如, 组织所产生的 CO_2 将近一半是溶解在血液中而被血流带到肺部的(其余的则由血红蛋白携带)。对于这个过程来说, CO_2 溶于水中的速率是太慢了, 所以它是由碳酸酐酶催化的:



碳酸酐酶使这一过程的速率加快了 1000 万倍。注意酶本身并不以化学平衡的一部分而出现, 不过有时将酶的名称写在箭头之上。在反应过程中, 每个酶分子都与其底物, CO_2 和 H_2O 结合, 将其转变为产物 H_2CO_3 。然后酶和产物分开, 酶又和更多的底物分子结合, 继续催化进一步的反应。这样, 一个碳酸酐酶分子每秒钟能使 10 万个 CO_2 分子与水化合。

酶不能改变化学反应的平衡, 只能改变反应速率。在生物体内的许多反应可以按照两个方向进行, 通常在方程式中用双箭头(\rightleftharpoons)表示。在某些情况下, 生物体内反应物的浓度使得反应只能朝一个方向进行。这种反应就称为生理上不可逆的, 用单箭头(\rightarrow)表示。这并不是酶的特性, 而是决定于反应和反应物的浓度。

细胞通过化学反应运作。不过, 生物与其环境的相互作用中, 许多都与化学能以外的能量形式有关。酶和类似酶的蛋白质能将化学能转变为别的形式能量或反之。最简单的就是将化学能转变为热以维持体温。还有一些冷却的酶促机制, 例如分泌汗液。运动是由肌肉收缩完成的, 这包括把贮存在 ATP 中的化学能转变为体力。光合作用把日光能转变为化学能, 而眼睛中的视紫红质则把光转变为化学信号。小的离子和分子能够逆浓度梯度而进行跨膜运动。信息以化学方式贮存在染色体中和脑中。神经冲动的传递也需要酶。

与化学催化剂相比, 酶的专一性总是非常高的, 但在各种酶之间变化很大。通常专一性包括两个方面: 对反应物的选择和对所催化的反应的选择。反应物称为底物:



作为一个例子, 我们研究胰蛋白酶的专一性, 此酶水解肽键从而切断蛋白质链。胰蛋白酶也能催化酯键的水解。胰蛋白酶需要一个碱性氨基酸、赖氨酸或精氨酸, 然后裂解此氨基酸的羧基侧上的肽键(图 7.1)。底物, 即肽, 被裂解为两个产物。胰蛋白酶也能催化酯键的水解。因此, 胰蛋白酶有明确的专一性, 它包括范围很小的底物和反应。其他蛋白酶的专一性或强或弱。

另一个例子, 枯草蛋白酶, 它催化的反应和蛋白酶的一样, 但它能催化任何氨基酸之间的肽键。反之, 凝血酶只催化精氨酸和甘氨酸之间肽键的水解。

高度专一的另一种酶的例子是葡萄糖激酶。此酶作用于 D-葡萄糖, 使之磷酸化为葡萄

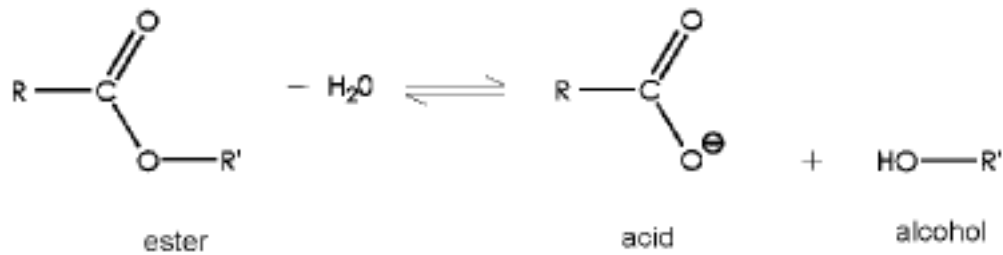


图 7.1 胰蛋白酶的专一性

除去切断肽键外,还能切断酯键,产生羧酸和醇。

糖-6-磷酸。葡萄糖激酶在肝脏中的糖代谢方面很重要。糖尿病人肝内没有这种酶,糖尿病人血液中糖浓度高,因为不能分泌胰岛素的激素胰岛素。在肌肉中这同样的反应则由专一性弱得多的己糖激酶催化。

酶的专一性的一项非常重要的用处就是常常能够在许多种其他酶和分子的存在下检查一种特定的酶,甚至测定其催化活性。(当然,该酶必须能在许多种其他酶和分子存在下,在细胞内执行其功能。)只要加入底物并测定所生成的产物的量,常常就可以测定细胞中或未经纯化的细胞抽提物中单一的一种酶。但必须小心控制几个条件,考虑到酶的动力学和起调节作用的物质以及辅因子的存在。不过在正确条件下体液或未经纯化的抽提物中酶的测定常常是有价值的临床检验和研究方法。

7.2 酶催化的反应的特点

酶是催化剂,因此它不能改变反应的平衡。在平衡时,不管酶是否存在,底物浓度与产物浓度之比都是相同的。酶的作用是加速反应,使得平衡迅速达到。假若一酶促反应在酶存在下需要 1 s 达到平衡,在没有酶时可能需要 10^8 s(约 3 年)才能达到平衡。

酶因降低反应的活化能而提高反应的速率。一个简单的化学反应的活化能可用该体系的自由能与反应进程(反应坐标)的函数关系的曲线表示(图 7.2)。在此情况下,整个反应中,自由能减少,但是要从起始状态到达最终状态,该体系必须通过一个过渡状态。这种状态的能量来自于热能。

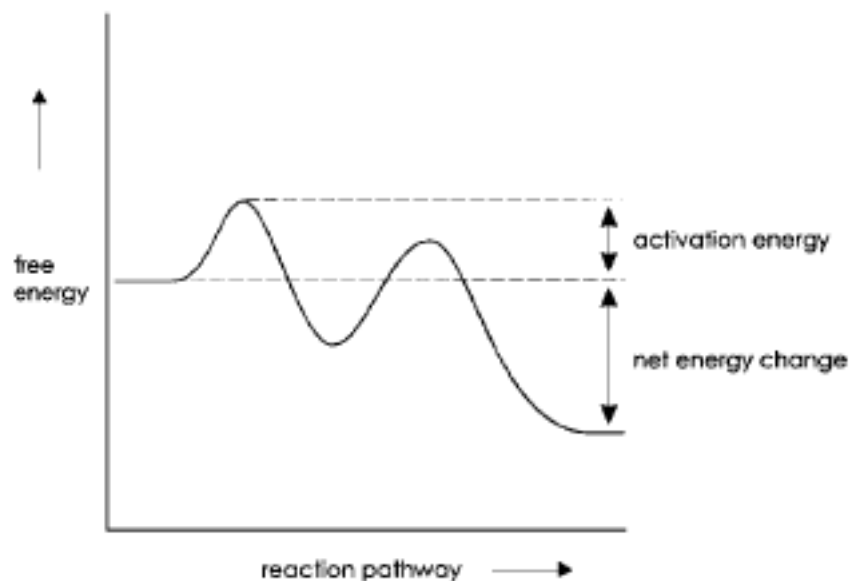


图 7.2 自由能与反应坐标的关系

两图中的曲线都表明反应物(底物加酶,再加产物)体系的自由能如何因底物变为产物而变化:(a)无催化剂,曲线表示有很高的过渡能障,它抑制着底物到产物的转变;(b)中酶的催化作用把反应分成为几个部分,于是每一个步骤的过渡能量都小得多。

在酶促反应中,反应分几个步骤发生,每个步骤的活化能都很低;因此,许多个分子都有足够的热能以克服活化能障,反应进行得快得多。最简单的情况就是一种酶和一种简单的底物和一种简单的产物。

(一) 活性部位

酶的催化作用发生在酶的活性部位上,底物就结合在该部位上。活性部位的一般特点是:

- (1) 活性部位仅占酶的整个体积的相当小的一部分。
- (2) 活性部位是一个三维的实体。
- (3) 结合的专一性决定于活性部位中精确规定的原子的排列,即直接契合或诱导契合。
- (4) 大多数底物都以相当弱的力结合在酶上。
- (5) 活性部位是裂隙或裂缝。

通常活性部位裂隙是由多肽链折叠成专一的形状而形成的。蛋白质中对活性部位没有直接贡献的那些部分可能是形成结构或使之稳定所必需的。酶的其余部分的其他功能有调节功能(特别是别构酶)和把酶引向细胞的正确部位的信号(第27章)。在某些酶中,就形状和与底物成键的相互作用而言,活性部位可能是直接契合的。在其他酶中,活性部位的结构必须发生变化才能与底物结合,这称为诱导契合。己糖激酶是诱导契合的一个精彩的实例——酶的两半把底物包起来。

(二) 机制

对于许多种酶催化其专一反应的机制,已有详细程度不同的了解,例如核糖核酸酶、溶菌酶、丝氨酸蛋白酶、羧肽酶、天冬氨酸氨基转移酶和乳酸脱氢酶。机制不同,但从个别酶的研究中已得出了一些有用的一般原理。酶利用的是有机化学中的普通原理。

对酶的催化作用有贡献的主要因素是:

(1) 酶与底物(和辅因子)结合使得敏感的键,即:(i)与活性部位上的起催化作用的基团靠得很近(称为熵效应),或是(ii)与起催化作用的基团在彼此的取向上非常有利于过渡状态的形成(轨道导向)。

(2) 某些酶可与底物结合,形成一种不稳定的共价中间产物,而此中间产物极易发生形成产物的反应。

(3) 酶可因提供能起质子供体或受体的官能团而引起一般的酸或碱催化作用。

(4) 酶可能诱导底物中敏感键的张力或扭曲,而使此键更易断裂。

(5) 结合在活性部位上的基团的位置可能使有反应活性的中间产物稳定化(接近效应)。

1. 熵效应和轨道导向。与底物结合的活性部位的基团使得底物的有效浓度增加了,因为它们对底物有亲和力,又“抓住”了底物分子使之处于一种催化基团对它起作用的适当位置。假设活性部位中没有这种结合,催化作用就只能依靠与底物分子的随机碰撞,那时接触的时间很少能够长到足以发生催化作用。底物的结合部位也依赖于随机碰撞,但它实际上可能会通过静电引力而吸引底物,而一旦发生了碰撞,底物就会被活性部位中的许多非共价键牢牢地结合上。这种把底物抓在催化部位附近的效应称为熵效应。除去与底物结合外,活性部位还可以转向,使自己处于对催化基团最佳的方向上。这就加强了熵效应,这种作用称为轨道导向(图7.3)。

2. 共价催化。所有的酶都利用熵效应和轨道转向。有些酶利用共价催化, 这些酶形成共价的酶-底物中间产物。这种中间产物反应性极强, 或不稳定, 进入过渡状态并完成反应的可能性极大。丝氨酸蛋白酶类就是利用共价催化的酶类的实例, 这类酶的活性部位中有一个反应性强的丝氨酸。其他酶也利用与丝氨酸或半胱氨酸或组氨酸或赖氨酸形成的共价键。

3. 酸-碱催化。蛋白质中的酸性或碱性基团也可以提供一种催化机制, 其功能可以是取代共价催化或是与共价催化共同起作用。一般的酸是能够供给质子的官能团, 碱则是接受质子的。图 7.4 所示为蛋白质中重要的酸性或碱性基团。

最常见的酸-碱催化剂是组氨酸, 其 pK 的范围是 5.6 ~7, 视其在蛋白质中的环境而定, 因此它极易接受或供给质子。

4. 底物的扭曲。许多活性部位并不直接与底物契合, 而是必须扭曲才能与底物结合(诱导契合)。一旦结合上, 酶就能使底物扭曲从而使已有的键变弱并促进新键的形成。这有助于解释为什么通过过渡状态所需要的活化能会降低, 因为使底物改变到过渡状态所需要增

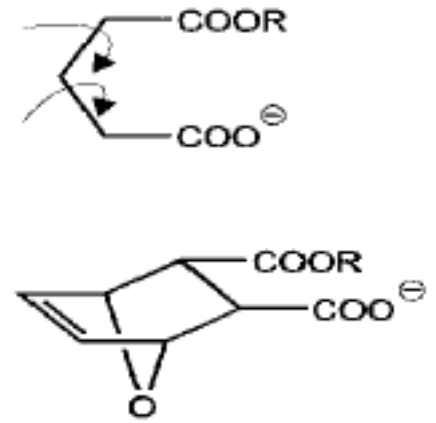


图 7.3 化学催化

在图示的分子中, R 基团可在所画出的两个碳之间交换: (a) 中箭头所示的自由旋转意味着这两个碳很不容易靠近, 因为分子扭曲了; (b) 中分子结构使得两个碳的位置固定, 有利于交换反应。

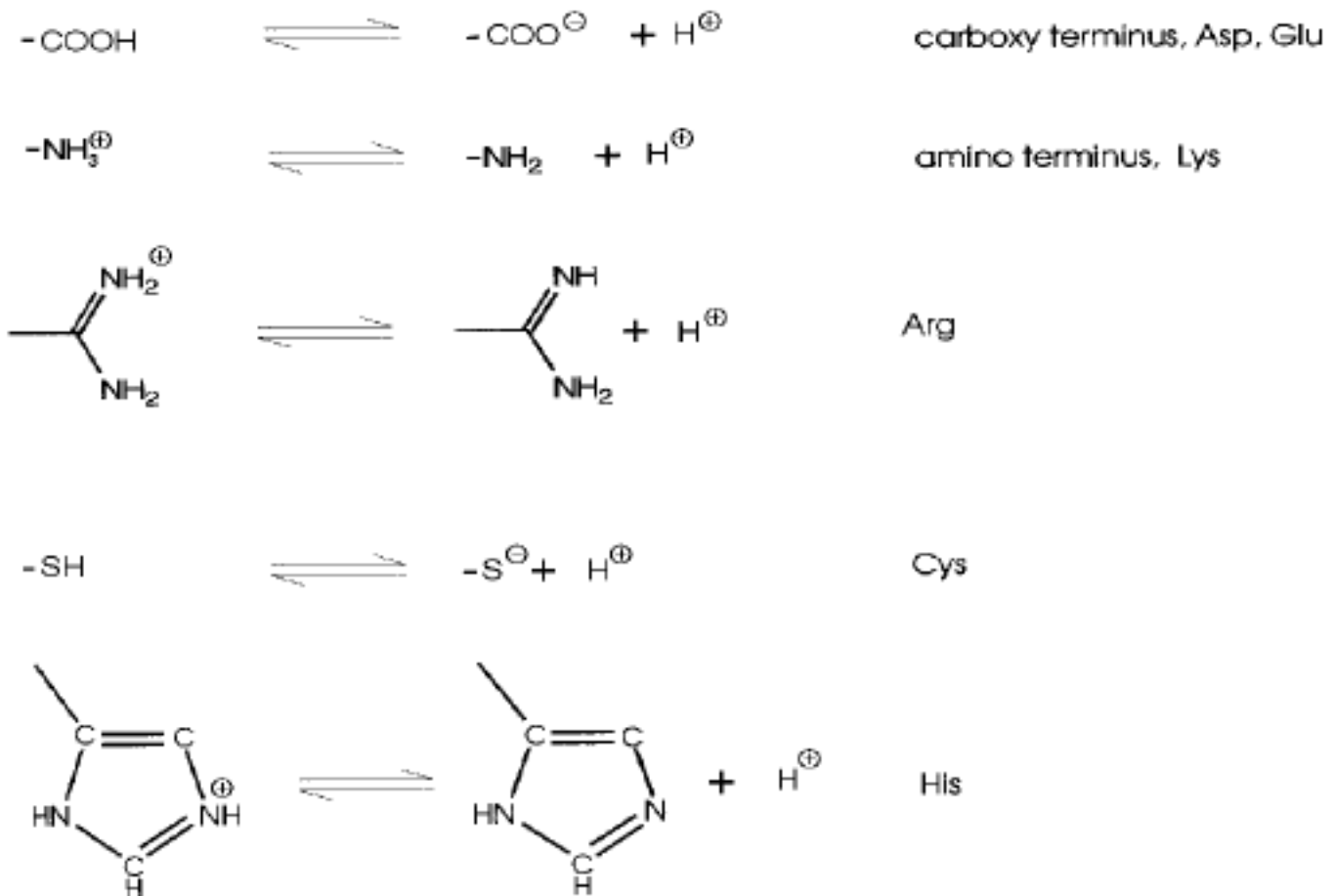


图 7.4 蛋白质中的酸性和碱性基团

图示的每一种基团均存在于未发生变化的蛋白质中, 都可能对蛋白质上的电荷有贡献。右侧所示为离解的形式。

加的能量与酶进入过渡状态所减少的能量相互抵消了。有利于这种解释的很好的实验模型是下列发现: 与底物的过渡状态类似、但不能形成产物的分子(过渡状态类似物)常常与酶结合得非常牢固并且在抑制其活性方面极端有效。一般而论, 过渡状态类似物是最强有力的药物。

5. 接近效应。酶的活性部位中能使反应活性强的中间产物稳定的化学基团会促进催化作用,帮助酶与底物结合并催化高速的正确的专一反应。

另一个一般的特点是任何特定的酶都会利用所有各种不同的方法和相互作用以达到其目的。

7.3 酶动力学

动力学——反应速率——对于身体维持其稳态是非常重要的,身体要调节各种反应速率以响应于环境和激素的控制。我们从讨论孤立系统中化学反应的速率开始,然后讨论如何用这些知识去研究体内的酶。

化学反应可根据其反应物种类的数目而分类。最简单的情况是一级反应,只有一种反应物,而且反应速率与反应物的浓度成正比。因此,对一级化学反应来说,以反应速率对反应物浓度所作的图就是一条直线(图 7.5)。

酶催化的反应则不然,除非在极其仔细地选择的条件下,动力学曲线并不是直线。酶催化的反应(或称酶促反应)的时间进程一般都较复杂,通常是测定初始反应速率 v_0 来确定酶促反应的特点, v_0 是零时的反应速率。在某种情况下,例如在试管中,可以向底物及其他必需分子的溶液中加入酶使反应开始。反应会立即以高速率开始,然后随着时间的延续而减慢,其理由有:

(1) 底物会被用掉,反应速率也会减小,因为每一个酶分子必须用更多的时间在溶液中扩散才能与一个新的底物分子碰撞。

(2) 随着反应的进行,产物会积累,它可能会抑制酶。

(3) 由于无规的水解或变性,酶分子可能逐渐失活。

为了使动力学简化,我们先研究反应刚刚开始时的情况。零时的反应速率 v_0 是产物浓度对时间的直线的初始斜率(图 7.6)。

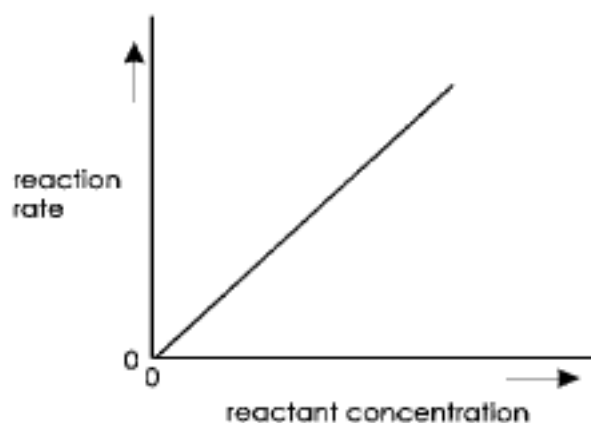


图 7.5 一级化学反应
直线表示反应速率(y轴)与底物浓度(x轴)成正比。

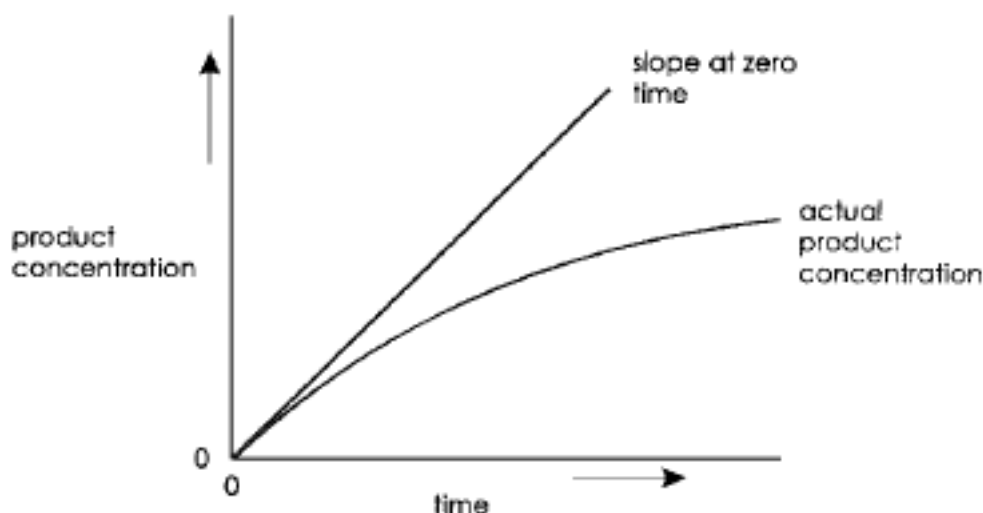


图 7.6 酶促反应的时间进程

曲线所示为酶促反应的产物浓度(y轴)与时间(x轴)的函数关系;

直线所示为曲线的初始斜率,即为反应的初始速率。

我们可以测定各种各样初始底物浓度下的 v_0 以了解反应速率如何随底物浓度的改变而改变。也就是说,在简化的实验室实验中,可以研究初始反应速率 v_0 与底物浓度的函数关系。在极低的底物浓度下,反应速率对底物浓度的关系是一条直线(图 7.7)。可是对于酶促反应,即使是只有一种底物和一种产物,在底物浓度高时这条直线就变成了曲线,在非常高的底物浓度下则会弯下来。这样想一想:当底物浓度低时,它是限制因素,所以增加底物浓度就会成比例地增加反应速率。可是当底物浓度增高后,酶浓度又变成了限制因素,所以此时增加底物浓度并不能成比例地增加反应速率。最后,酶变得“饱和”了,反应速率达到一恒定值,再多加底物并不能使它有什么明显的增加。这时所达到最大反应速率称为 v_{max} 。

对于大多数酶,这条曲线(图 7.7)是一条比较简单的数学形式——双曲线——这种关系是有用的,因为它使我们很容易计算酶促反应的速率而不必每次都画曲线。描述这一曲线的

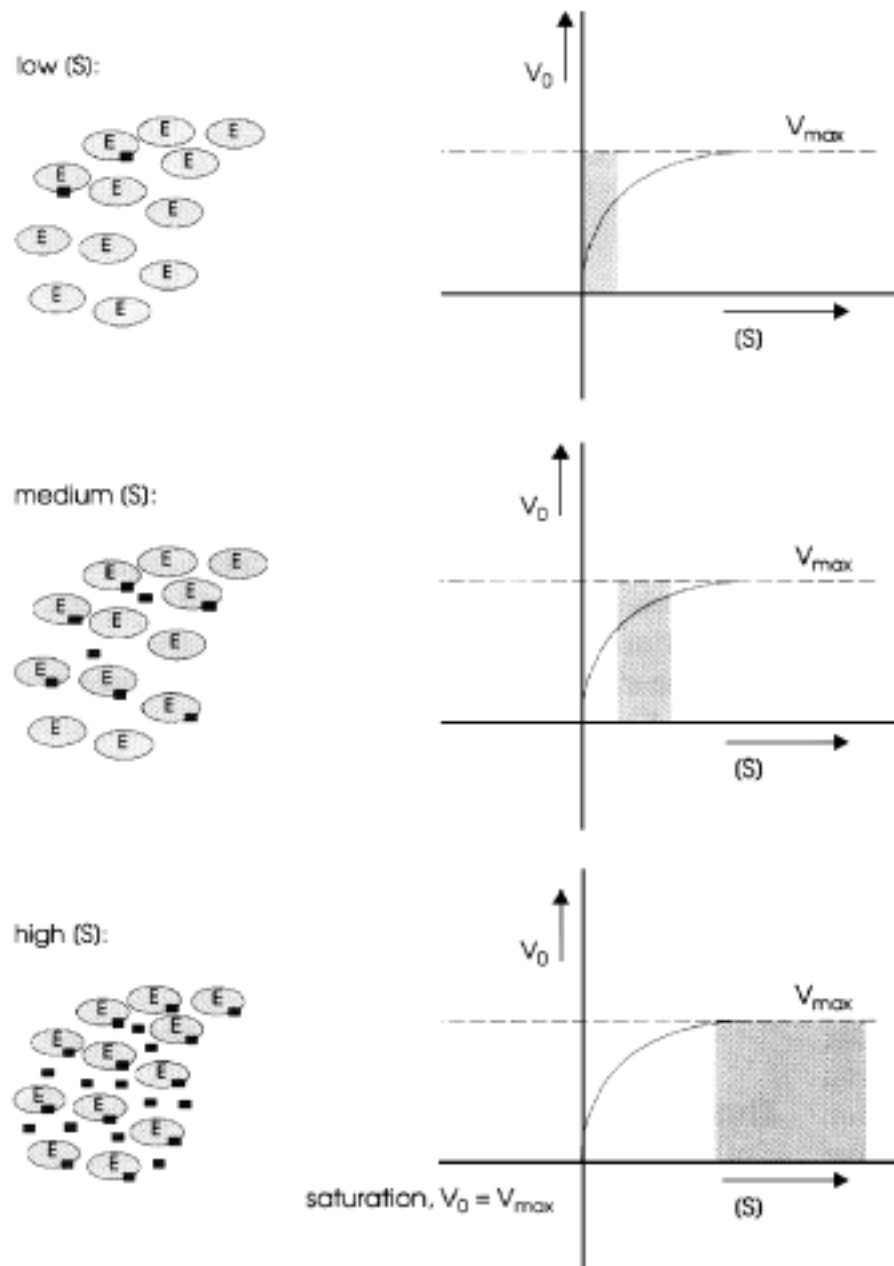


图 7.7 酶促反应的 v_0 与 $[S]$ 的关系

左侧卡通中,标有 E 的椭圆代表酶分子,涂黑的小长方形代表底物分子:(a) 只有很少几个底物分子,它们都结合在酶上;(b) 底物分子较多,其中有一些游离在溶液中,未与酶结合;(c) 有许多底物分子,而且所有酶分子上都结合了底物分子(与底物结合的酶分子的数目代表反应速率,因为这些酶分子有机会起作用,把底物转变为产物)。右侧各图为初始反应速率(y轴)与底物浓度(x轴)的函数关系,阴影表示各曲线中与左方卡通中相应的区域。

方程式称为 Michaelis-Menten 方程。它包括两个常数(每种酶有其独特的常数), 即 v_{max} 和 K_M , 即米氏常数, 将在下文解释。Michaelis-Menten 方程为

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

这里, $[S]$ 为底物浓度, v_{max} 是在 v_0 对 $[S]$ 的曲线中所看到的最大速率。 K_M 是从哪里来的呢? 它是产生最大速率一半的底物浓度(图 7.8)。若 K_M 大, 则在底物浓度低时的反应速率就比较低; 反之, 若 K_M 小, 底物浓度低时的反应速率就比较高。若 K_M 小, 速率对底物的曲线就会迅速上升, 并很快就达到 v_{max} ; 若 K_M 大, 则曲线将一直向右延伸, 只在底物浓度很高时才接近 v_{max} 。有时把 K_M 写成 $[S]_{0.5}$ 。

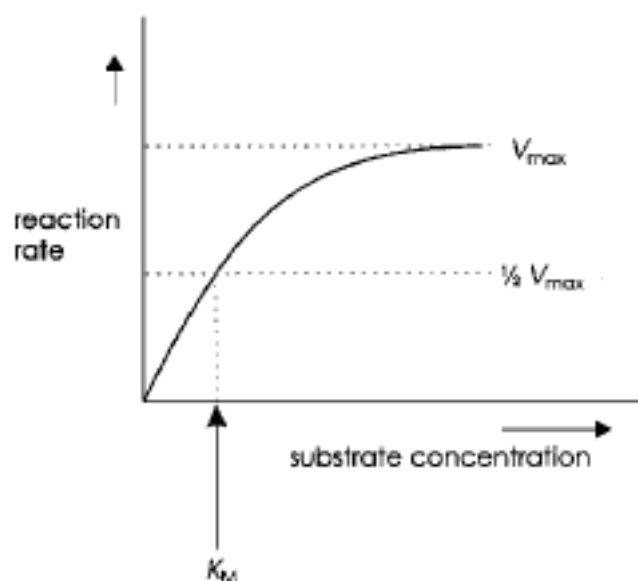


图 7.8 K_M 的定义

曲线表示酶促反应的速率如何随底物浓度的变化而变化(下面的虚线画在最大反应速率的一半处, 此虚线与曲线的交点就是底物浓度等于 K_M 处)。

假如我们知道一给定酶的 K_M 和 v_{max} , 我们就可利用 Michaelis-Menten 方程去计算反应速率 v_0 。因此, 这是一个非常有用的方程式。

(一) Michaelis-Menten 方程的不同形式

初始速率对底物浓度的曲线形状是双曲线。但很难画得正确, 也很难分析。例如, v_{max} 在哪里?

用 $1/v_0$ 对 $1/[S]$ 作图就可将上述曲线变成直线, 这种方法叫做双倒数图或 Lineweaver-Burk 图。在确定酶的方面, 此法广泛运用。直线的方程是:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

因此, Lineweaver-Burk 曲线的斜率是 K_M/v_{max} (图 7.9)。这种作图法得出的是直线这一事实说明 Michaelis-Menten 方程确实描述了所研究的酶的动力学。Michaelis-Menten 方程也可“直线化”为 Eadie-Hofstee 图(图 7.10)。这种方法是

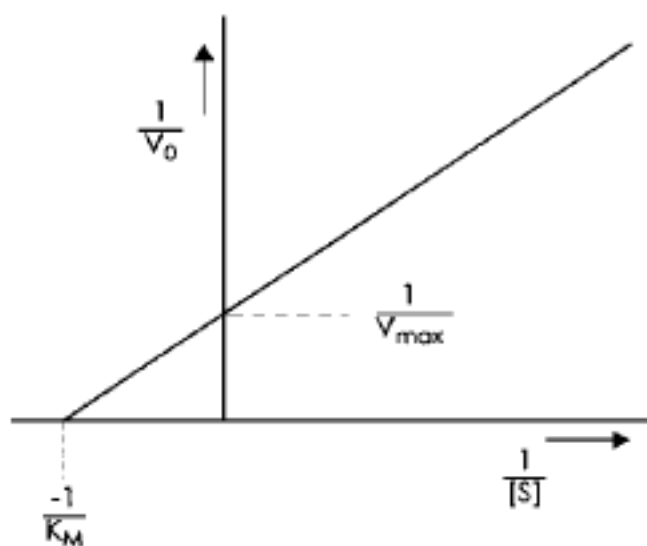


图 7.9 Lineweaver-Burk 图

直线表示初始反应速率的倒数(y轴)如何随底物浓度的倒数(x轴)而变。在底物浓度非常大——其倒数非常小——时, 直线在 y 轴上的截距为此反应最大速率的倒数。

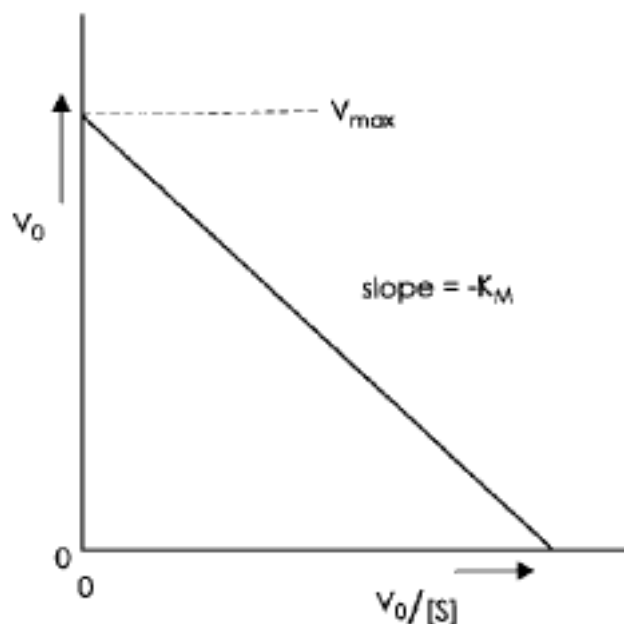


图 7.10 Eadie-Hofstee 图

直线表示酶促反应的速率如何随速率/底物的比值而变化,此直线的斜率为 $-K_M$ 。

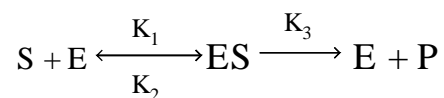
图,其结果 K_M 为 $-1 \times$ (曲线的斜率) 而 v_{max} 为在 v_0 轴上的截距。

这些作图法中应该用哪一种?为了一般地了解酶的作用,用初始速率对底物浓度作简单曲线。直线化的形式在计算 K_M 和 v_{max} 时有用。Lineweaver-Burk 作图法在区别抑制类型(第8章)时有用。要找出与 Michaelis-Menten 方程的偏差,Eadie-Hofstee 作图法比 Lineweaver-Burk 作图法好。

酶促反应比这里的简单描述要复杂得多,但 Michaelis-Menten 方程不失为非常有用的描述酶的经验性工具。

(二) Michaelis-Menten 方程的理论基础

Michaelis-Menten 方程可以从非常简化的酶促反应的化学动力学推导出来。主要的假设就是只有一个中间状态,即酶-底物复合。因为我们研究的是初始速率,所以没有必要考虑逆反应(产物转变为底物)。因此,反应的化学方程式是:



从这个化学反应就可以推导出 Michaelis-Menten 方程,但这里没有必要讨论其细节。

(三) v_{max} 和 K_M 的含义

酶促反应的速率因 $[S]$ 的增加而增加。当 $[S]$ 比 K_M 大得多时,速率接近于常数,即当 $[S]$ 时, $v_0 = v_{max}$ 。因此,在一定的总的酶浓度之下, v_{max} 就是所能达到的最大速率,它也是当 $[S]$ 增加时所能测得的起限制作用的(最大的)速率; v_{max} 与酶浓度成正比。因此, v_{max} 是酶及其底物的特性,也决定于酶浓度以及溶液的温度、pH 和离子强度等条件。

酶的 v_{max} 是一旦酶-底物复合物形成后,它所催化的反应进行得多么快的一种度量。这与转换数有关,转换数是在底物浓度极高时每单位时间内每个活性部位能把多少个分子的底物转变为产物。转换数大小不同,从非常大(如碳酸酐酶 $600\,000\text{ s}^{-1}$)到相当小(如溶菌酶 0.5 s^{-1})。转换数的另一个名称是 k_{cat} ,它与 v_{max} 和酶的总浓度 $[E]$ (单位体积溶液中活性部位的数

目)的关系如下:

$$v_{\max} = k_{\text{cat}} \times [E]$$

米氏常数 K_M 决定于特定的酶和所用的底物以及溶液的温度、pH 和离子强度。注意 K_M 与 v_{\max} 不同, K_M 与酶的浓度无关。理论证明 K_M 大致等于酶-底物复合物的解离常数, 条件是酶-底物复合物转变为酶与底物的速率比转变为产物的速率快。因此, K_M 低就相当于酶与底物结合得牢, 反之亦然。 K_M 的单位为 mol/L。

当底物浓度大于 K_M 时, 酶促反应的速率就高。利用天冬酰胺酶治疗白血病正好说明这一原理。白血病是白细胞的增殖失控, 但已发现其增殖与血液中天冬酰胺的存在有关。天冬酰胺酶把天冬酰胺水解为天冬氨酸, 当把它注射入血流时, 它就会把天冬酰胺去掉而使恶性白细胞的生长变慢。不过, 已发现不同来源的天冬酰胺酶疗效十分不同, 后来发现是由于 K_M 不同。无效的天冬酰胺酶的 K_M 比血液中的天冬酰胺浓度高得太多。

(四) 酶不能改变平衡

所有的酶催化的反应都是可逆的, 假若产物的浓度高, 逆反应就会与前向反应争夺酶。逆反应的 v_{\max} 和 K_M 通常与前向反应的不同。前向反应与逆反应的特点如 Haldane 方程所示:

$$K_{\text{eq}} = v_F \cdot K_B / (v_B \cdot K_F)$$

式中 K_{eq} 为反应的平衡常数, v_F 和 v_B 分别为前反应和逆反应的 v_{\max} , K_F 和 K_B 分别为前反应和逆反应的 K_M 。酶不能改变 K_{eq} , 因此 Haldane 方程表明酶可以有在两个方向同样起作用的 K_M 和 v_{\max} , 也可以有对前反应大而对逆反应小的 v_{\max} , 但必须是前反应的 K_M 大而逆反应的 K_M 小才能平衡。

对于许多种酶, 生物体需要它们在不同的时候和不同的地点有不同的动力学参数。这可以由调节一种酶而达到, 或者有多种酶而达到。当存在许多种酶时, 它们通常非常相似, 称为同功酶。

(五) 双底物反应

生物体内的许多酶促反应有两种底物。在这种情况下, 用于描述单底物反应的模式就不适用了。然而, K_M 和 v_{\max} 的概念仍可用于双底物反应如下。假设有两种底物 A 和 B 和两种产物 P 和 Q, 总反应如下:

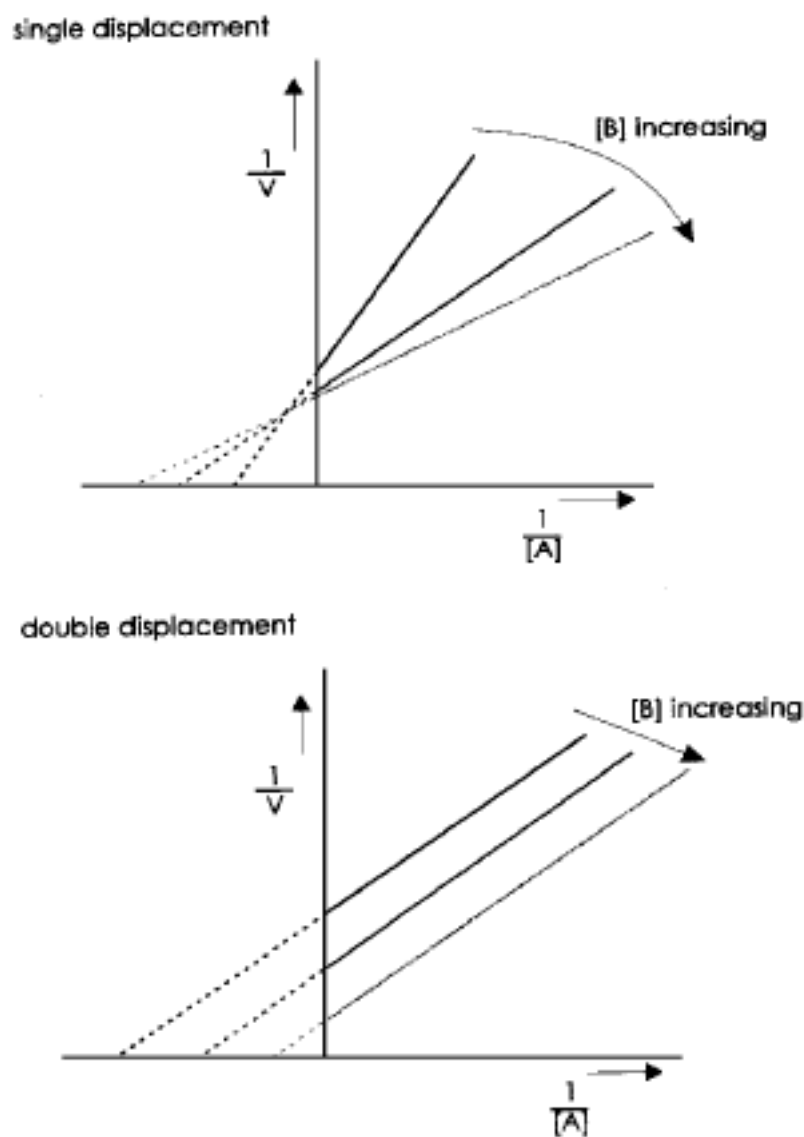
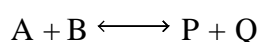


图 7.11 双底物酶的双倒数图

有两种底物 A 和 B 的酶的双倒数作图举例: (a) 一种类型的双底物酶(单置换的酶)的典型图示; (b) 另一种类型的双底物酶(双置换的酶)的典型图示。两图中各有 3 条线, 每条线都是 B 的浓度不变而另一种底物的浓度 [A] 变化。两图中的每一条线都相当于 B 的浓度(即 [B]) 不同的情况。

可在底物 B 浓度不变的情况下,测定 P + Q 形成的速率与底物 A 浓度的关系。在许多情况下,当 A 的浓度变化而 B 的浓度不变时,可以这样运用 Michaelis-Menten 方程,即在 K_M 和 v_{max} 的右上角加一个 A 字:

$$v_0 = v_{max}^A \cdot [A] / (K_M^A + [A])$$

同样,如果 [B] 变化而 [A] 不变,就用 K_M^B 和 v_{max}^B :

$$v_0 = v_{max}^B \cdot [B] / (K_M^B + [B])$$

当然, K_M^A 决定于所用的 B 的浓度。实质上, K_M^A 和 v_{max}^A 只能用于预测 A 的浓度变化时的影响。 K_M^A 和 K_M^B 都可用双倒数作图法求得,像单底物反应一样。如果用几个浓度的 B 重复进行实验,就可得到几条直线(图 7.11)。

(六) Michaelis-Menten 方程的用途

在代谢途径中,初始的酶是由别构机理或其他机理所调节的,如下文所述。在途径中相继起作用的各种酶都服从 Michaelis-Menten 动力学。假若初始的酶是减量调节的(其反应速率降低),那么其产物的浓度就会降低。因为这一产物是下一个酶的底物,根据米氏方程,下一个反应的速率将下降。因此,其产物的浓度又会降低,如此类推,直到整个途径走完。

这种简捷了当的控制系统在一种重要情况下就失灵了。首先,考虑一下有一种酶的速率是 v_{max} ,会发生什么情况:底物浓度的增加,无论多大都不会有任何影响,而减少则只有其浓度低于产生 v_{max} 的浓度时才会有影响。在体内,酶通常不会达到 v_{max} ,但是假若一种酶被严重抑制,例如在某种药物作用下,就会发生这种情况。反应速率会下降,使得底物浓度增加,而被抑制的反应则达到表观的 v_{max} 。继续增加底物浓度对代谢途径也没有什么影响。这种影响会通过这一途径而传递回去,使得所有中间产物的浓度都提高,然后整个途径被阻断。当然,阻断后所有中间产物的浓度以及终产物的浓度都会很低,这是由被抑制的酶的 v_{max} 所决定的。

重要的是要认识到药物不仅会阻止产物的合成,而且会把前面的中间产物的浓度提高到非生理的水平。这会引起严重的副作用。

再考虑另一个例子。假若底物浓度 [S] 低于某种酶和某种底物的 K_M ,那么底物浓度的变化会直接影响该反应的速率 v_0 。例如,假若开始时 [S] 为 K_M ,然后突然增为两倍,那么 v_0 就会由 $v_{max}/2$ 增为 $2 \times v_{max}/3$,增加约 33%。同样,若 [S] 降低为 $K_M/2$,那么 v_0 就降低到 $v_{max}/3$,降低约 33%。若 [S] $\gg K_M$,那么 v_0 对 [S] 的变化就不敏感。在葡萄糖为己糖激酶所代谢时,可以看到这些情况:



从血液中得到葡萄糖的供应对脑的功能是必需的,所以脑中的己糖激酶必须使此反应的速率稳定,虽然血液中的葡萄糖浓度通常在 3 ~ 9 mmol/L 之间变动。脑己糖激酶对葡萄糖的 K_M 是 0.05 mmol/L,所以在葡萄糖浓度的正常范围内,脑己糖激酶催化的葡萄糖磷酸化反应几乎与葡萄糖浓度无关。反之,肝脏通常合成葡萄糖并将其输送到血液中,但当血液中葡萄糖浓度非常高时,肝脏也会吸收葡萄糖。肝己糖激酶对葡萄糖的 K_M 为 2 mmol/L;因此,它对血糖的水平很敏感。

7.4 同功酶和诊断

人的血液中有非常复杂而且精细平衡的许许多多细胞、血小板、大分子、小分子和离子。

细胞和血小板可用离心法除去,剩下的是血浆。如果让血浆凝固,剩下的溶液就是血清。血清通常含有很少几种酶,但组织受伤或患病常会把酶从组织的细胞中释放到血液中去。这些酶中有一些是有组织专一性的,异常的血清酶的鉴定在诊断中有着一般的应用价值。理想的是每种组织都有一种专一的“标志”酶,那么血清中标志酶的检查就可鉴定出受伤的或患病的细胞是什么。目前并没有所有细胞类型的标志酶,不过有几个重要的例子。

(一) 心肌梗塞的诊断

急诊室中有一位突然严重胸痛的患者。疼痛是由于心脏病突发还是其他内脏器官或结构受到伤害?心脏的伤害会向血液中释放许多种酶,包括肌酸激酶(CK,亦称CPK)和乳酸脱氢酶(LDH)。这两种酶水平的增高就是心肌梗塞的指示物。

图 7.12 就是心肌梗塞(MI)后血液中这两种酶的某些变化,这些酶是在血清中测得的。非常重要的一点是制得血清时不使血液中的细胞裂解,因为这些细胞所释放的酶会干扰真正的血清中酶的检测。

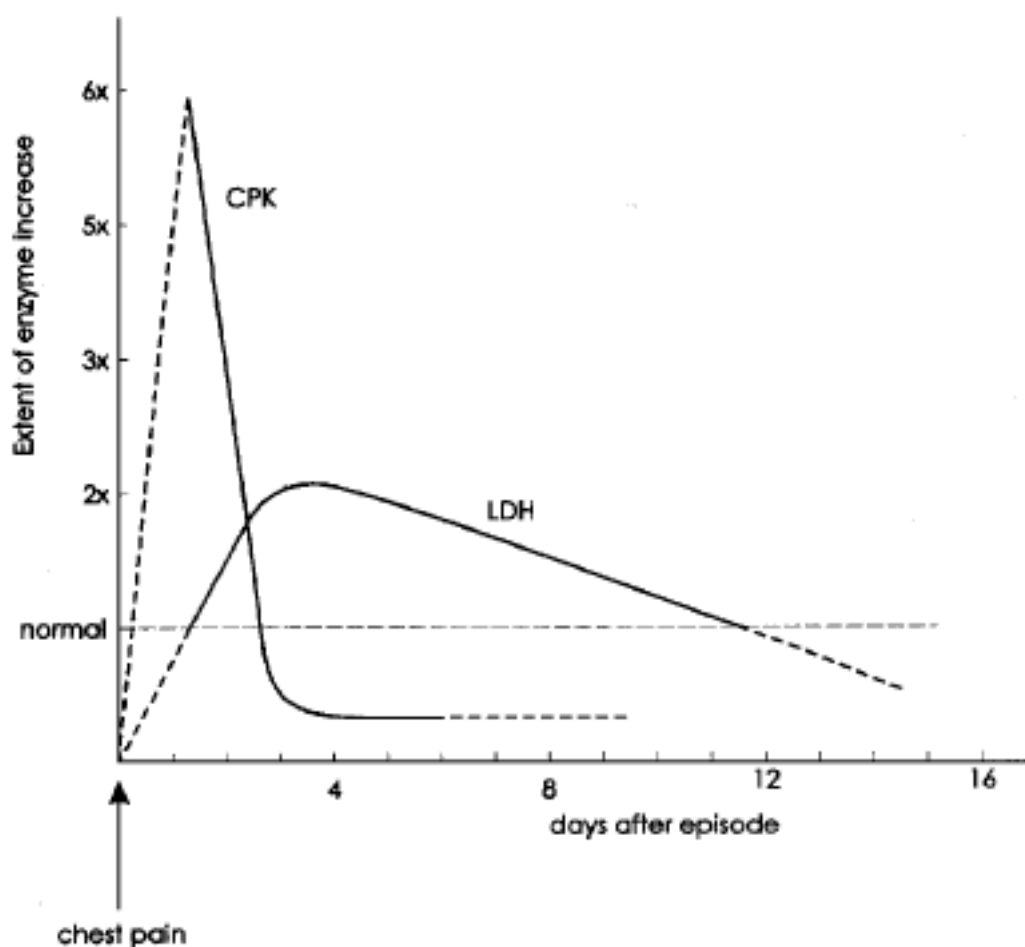


图 7.12 心肌梗塞后,患者血液中的酶

图示心肌梗塞后不同时间患者血浆中肌酸激酶(CPK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性。

(二) 同功酶

这种简单的酶活性的测定可能不完全是专一的。例如,伤害了肝脏或骨骼肌也会使血清中的LDH增多。不过,心肌所释放的LDH与肝脏或骨骼肌所释放的LDH是不同的。这些不同的酶称为同功酶,也就是说,它们催化同一种反应。LDH的同功酶受到不同的调节而且分别适应于适当组织的代谢需要。

(三) 乳酸脱氢酶的同功酶

LDH 这种酶是一个四聚体, 有两种不同的亚基 H 和 M。心肌细胞中的主要亚基是 H, 而肌肉或肝细胞中的主要亚基是 M。各种同功酶含有不同比例的这两种亚基, 即 H_4 、 H_3M 、 H_2M_2 、 HM_3 和 M_4 。可用电泳法将这些同功酶分开。

在正常血清中, LDH-2(H_3M) 是主要的同功酶。心肌梗塞后, LDH-1(H_4) 就是主要的了。因此 $[LDH-1] < [LDH-2]$ 这种关系在心肌梗塞后就反过来了, 变成了 $[LDH-1] > [LDH-2]$ 。另一方面, 肝脏或骨骼肌的疾病则使 LDH-5(M_4) 的水平提高。

(四) 肌酸激酶的同功酶

CK 这种酶是两种亚基 M(存在于骨骼肌中) 和 B(存在于脑中) 的二聚体。心肌中有两种亚基, 主要的同功酶为 MB, 而骨骼肌中的为 MM, 脑中的为 BB。心肌梗塞时部分心肌由于血流变慢而缺氧(部分缺氧) 而受到伤害, 于是血液中 MB 同功酶特别增多。

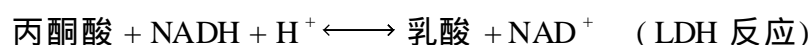
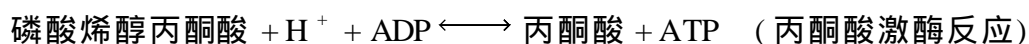
(五) 临床实验室中酶的检测

酶活性的检测是重要的诊断和筛查步骤。要测得真正反映酶浓度的结果而且所得结果与物质的浓度和其他因素无关, 就必须在仔细控制的条件下测定 v_{max} 。具体做法是测定初始速率 v_0 与 $[S]$ 的函数关系, 然后把所得结果代入 Michaelis-Menten 方程。

在临床上要求操作更简单, 通常是在底物极为过量 ($[S] > 10 K_M$) 的条件下直接测定反应速率即 v_{max} 。若酶对产物的 K_M (K_M^P) 极高, 也就是说逆反应的 K_M 极高, 则可根据反应进行一个固定时间后所形成的产物的量来求得 v_{max} 。若产物的 K_M 不够高, 那么产物就会使反应变慢而表现的 v_{max} 就会太低。

加入另一种反应物使产物刚刚形成就被除去即可避免这种情况, 因为这样就可以维持 $[P] \ll K_M^P$ 的条件。这种反应称为偶联反应。在这种条件下 ($[S] \gg K_M^S; [P] \ll K_M^P$), 反应速率是根据固定时间内 P 的形成来测定的。例如, 在乳酸脱氢酶所催化的反应(乳酸 + NAD^+ \(\rightarrow\) 丙酮酸 + $NADH + H^+$) 中, $NADH$ 吸收 340 nm 的光(靠近紫外光) 而其他组分均不吸收, 因此对 340 nm 的吸收率就是 $NADH$ 形成量的测定。可以用偶联反应来产生分光光度上的变化。

例如, 可用下列偶联反应来检测丙酮酸激酶:



这时加入的乳酸脱氢酶是过量的, 丙酮酸一形成就被除去, 每利用 1 分子丙酮酸, 就氧化 1 分子 $NADH$ 。检测丙酮酸激酶的办法就是测定对 340 nm 吸收的减少。

酶活性的单位是每分钟消耗的底物的微摩尔数(U 或 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度、pH 及其他条件均固定)。酶浓度 = 最大反应速度(v_{max}) / 转换数。比活性 = 酶活性 / 蛋白质总量。

反应的条件很重要, 特别是辅因子、二价离子和一价离子的浓度, 温度和 pH。酶活性一般随温度的增高而增高, 直到热变性破坏酶活性为止。大多数酶有一最适 pH, 通常在 6 ~ 8 之间。pH 对酶活性的曲线形状主要决定于酶。

7.5 酶的命名

已描述过的不同的酶有许许多多, 其命名多无规律, 不过许多酶的名字是在底物后加一

个-ase 字尾(中文即加一个酶字);其他一些则称为其产物的合成酶。把 ATP 上的磷酸根转移到底物上的酶称为底物的激酶。国际酶委员会(EC)曾提出分类的号码,系统的名称和推荐的名称。推荐的名称已被广泛使用,但 EC 号码和系统名称也使用得越来越多,为避免混乱,常常是放在脚注内。

7.6 酶的辅因子和辅酶: 维生素和微量元素

辅因子或辅酶是酶的非蛋白部分。它可能总是与酶结合在一起的,这时也可称之为辅基。另一种情况是,它的作用很像是酶的第二种底物。

许多辅因子是金属离子,如羧肽酶中的 Zn^{2+} 。膳食中可能需要这些金属离子,即所谓微量元素。许多其他辅因子是专一的有机分子,常常是由维生素衍生而来的。例如,吡哆醛磷酸(图 7.13)是由维生素 B₆ 衍生而来的。有些维生素提供生物体所不能合成的辅因子。在这类情况下,维生素就是膳食中的必要成分。只需很少量,因为作为酶的一部分,辅因子可被重复使用多次。

1. 硫胺素(维生素 B₁)

硫胺素是大多数脊椎动物膳食中所必需的。人所摄取的硫胺素接近于最低需要量,所以有些食物中补加了硫胺素。有些组织对维生素的需要多于其他组织,硫胺素的周转率也不同,所以不同组织中缺乏硫胺素的严重程度不同。不同个体之间的严重程度也可能不同,所以硫胺素缺乏症(脚气病)会表现出不同的症状,如神经系统异常,导致四肢瘫痪和萎缩(干脚气病),或心血管系统会感受到严重的缺乏症,而产生充血性心力衰竭,向组织中渗出水分(水肿)以至组织肿胀(湿脚气病)。这些疾病的发生通常是由于膳食中缺少了麦粒或米粒的麸皮,硫胺素就集中在那里。在醇中毒的人中也常会发生硫胺素缺乏症,称为 Wernicke 氏脑病,通常表现为中枢神经系统的缺陷。如果病人接受葡萄糖的输液而又没有补加维生素,也会发生这种疾病。

硫胺素有一取代的噻唑基团,与丙酮酸脱羧酶催化的丙酮酸脱羧作用有关。细胞中的硫胺素主要以其有活性的辅酶即硫胺素焦磷酸的形式存在(图 7.14)。

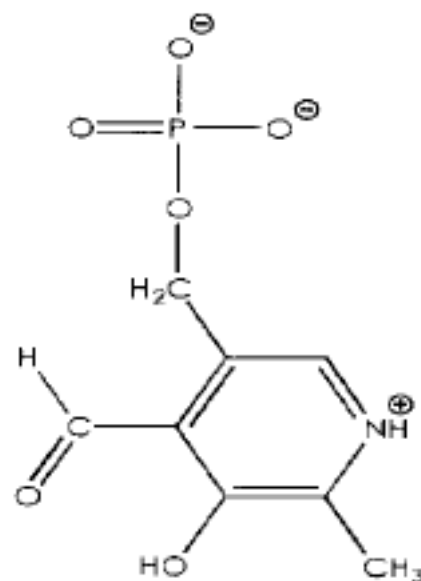


图 7.13 吡哆醛磷酸
一种辅因子的结构。

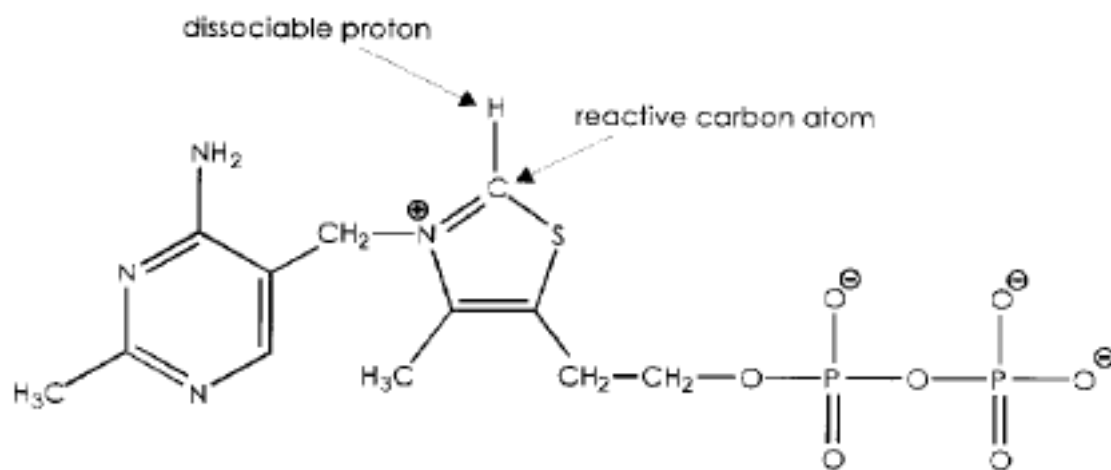


图 7.14 硫胺素焦磷酸(TPP)

图中注有字的 C→H 是此辅因子中直接参与酶促反应的部分。

2. 其他关键性的辅酶: FMN、FAD、NAD 和 CoA

FMN 和 FAD 均以牢固结合的辅酶形式(图 7.15)存在。它们参与氧化还原反应,其核黄素部分被氧化或被还原,同时底物被还原或被氧化。这类酶称为黄素蛋白类,其氧化形式颜色深(黄、红或绿),而还原形式则无色。NADH 脱氢酶类是黄素蛋白中重要的例子;其他黄素蛋白与丙酮酸、脂肪酸和氨基酸的氧化性降解有关。

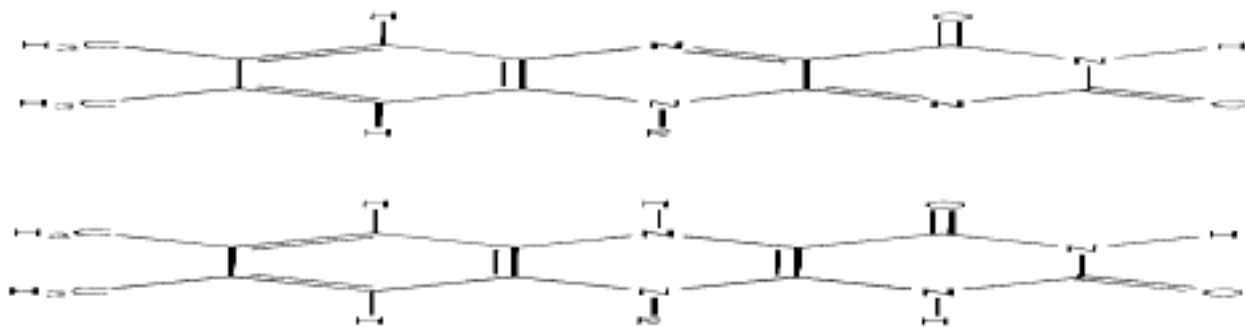


图 7.15 FAD 和 FADH₂

图中所示的两个结构都是 FAD 作为辅因子参加反应时的存在形式:左图为 FAD,它还原为右面的 FADH₂(分子中的变化见灰度部分)。

烟酸是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的前体,NAD 作为辅酶在代谢中起着核心作用。它可由色氨酸合成。色氨酸和烟酸的缺乏引起癞皮病,此病的特点是腹泻、皮炎和痴呆。玉米等

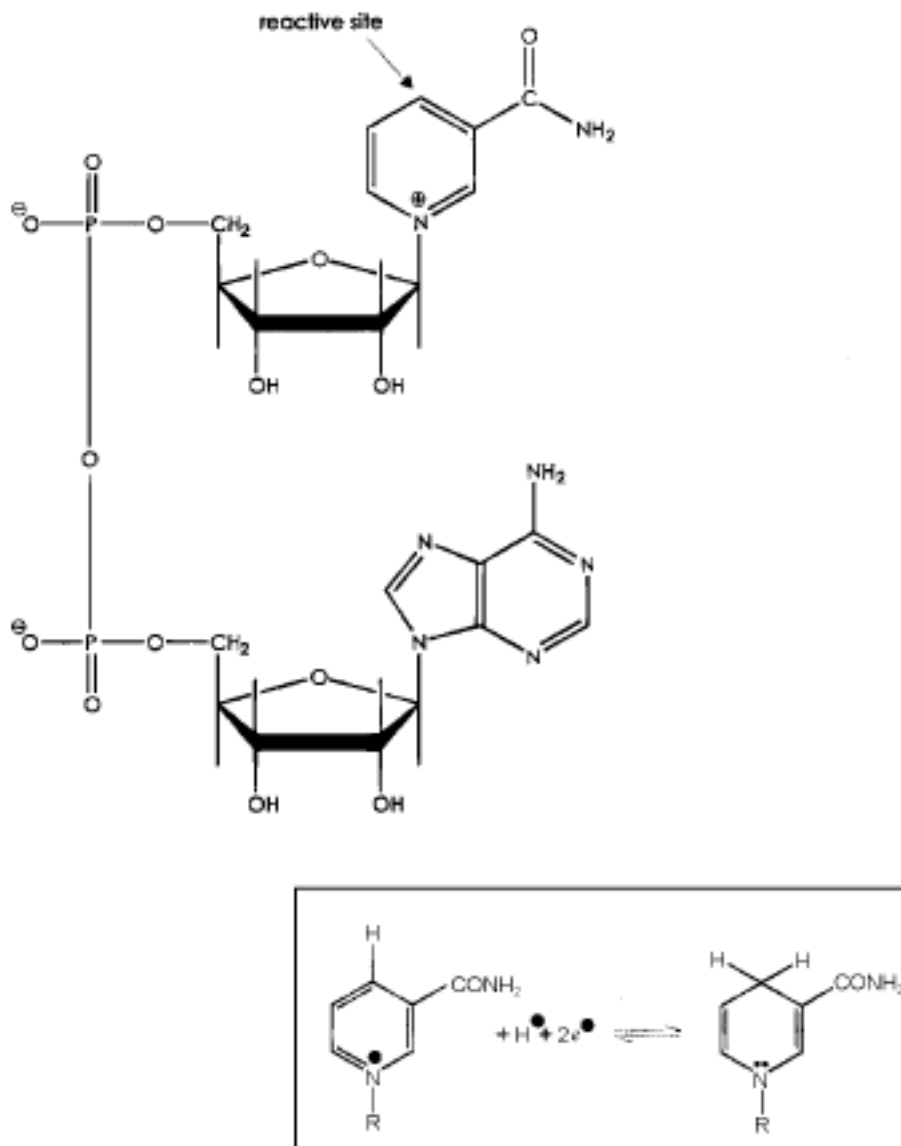


图 7.16 NADH 和 NAD⁺

框内图示表明在 NAD⁺ 作为辅因子的酶促反应中,烟酰胺部分怎样发生变化。

很多的膳食会导致这类问题。大剂量的烟酸是有毒的,但烟酰胺无毒。烟酸和烟酰胺均在两种辅酶 NAD 和 NADP (NAD 磷酸) 中(图 7.16), 它们催化氧化/还原反应。在还原反应中, 底物丢掉两个氢原子。两个电子都传递给 NAD^+ , 剩下的质子则进入溶剂。所形成的 NAD^+ 的还原形式是 NADH。

泛酸为辅酶 A (CoA) (图 7.17) 所需。尚不知 CoA 的缺乏症。CoA 是广泛存在的辅酶, 起着酰基载体的作用(乙酰-CoA), 它把乙酰基与 CoA 的巯基连接起来。

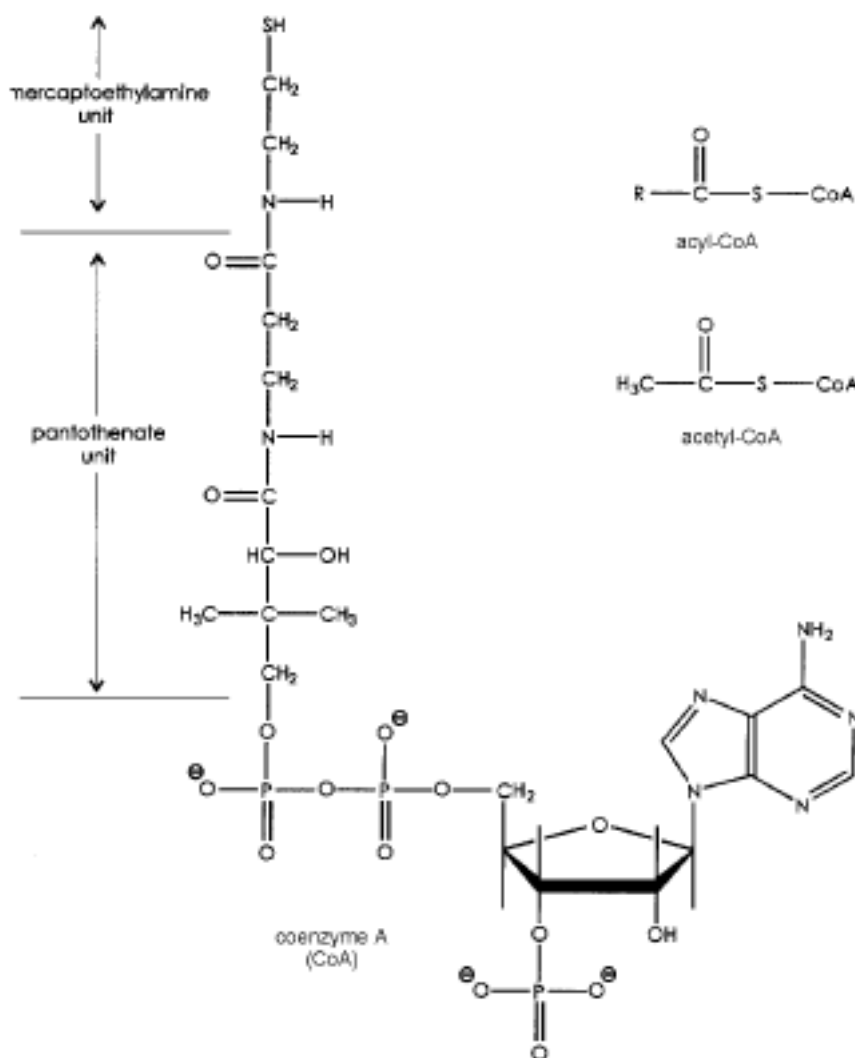


图 7.17 辅酶 A 的全结构

图中右上角为 CoA 的两种衍生的形式(酰基-CoA 和乙酰基 CoA): 在这两种形式中辅酶 A 分子的大部分以 CoA 代表, 只有硫原子写出来, 硫把辅酶 A 和酰基或乙酰基连接起来。

7.7 小 结

(1) 酶是催化剂。它们不影响化学平衡, 但它们影响接近平衡的速率。酶对于它所催化的反应通常是十分专一的。

(2) 底物的结合和催化作用均发生在酶的一个有限的部分——活性部位——之中。这一部位的三维结构对于酶的活性是至关重要的。

(3) 酶的催化作用由各种各样的机制完成, 这些机制包括共价的和非共价的相互作用。酶降低其所催化的反应的活化能。

(4) 对于一定量的酶, 加入底物会使反应速率增加, 直至酶被底物所饱和达到 v_{max} 为止。对于大多数酶, 反应速率与底物浓度的关系曲线为双曲线的形状, 如 Michaelis-Menten 方程所描绘。

(5) 酶对一种底物的 K_M 常反映酶与底物的亲和力。

(6) 血浆中有来自细胞的不同的酶。细胞的损伤会使细胞中的酶释放到血流内,这就提供了一种重要的诊断工具。在许多情况下,诊断可以集中在同功酶的识别上,同功酶是催化同一反应的不同的酶。

(7) 许多酶都有辅因子或辅酶。这些都是小分子,其作用类似酶的底物,但它们会被其他反应在细胞中周转并被利用多次。

参 考 资 料

Enzymes in Metabolic Pathways: A Comparative Study of Mechanism, Structure, Evolution and Control, Milton H. Saier, Jr., 1987, Harper and Row, New York.

Structure and catalysis of enzymes, W.N. Lipscomb, 1983, Ann. Rev. Biochem., 52: 17 ~34.

Enzyme Structure and Mechanism, 2nd ed., Alan Fersht, 1985, Freeman, New York.

复 习 题

- 一种位于体内代谢途径中点附近的单亚基的酶在病人体内发生了突变,对于此酶的惟一底物的 K_M 变为正常值的 2 倍。假若其他方面没有任何变化,那么底物浓度必须发生什么变化才能使该途径仍以同样的速率运转?
 - 正好加倍
 - 正好减半
 - 比 2 倍多
 - 比一半少
 - 在一半和加倍之间
- 白血病的一种疗法是用天冬酰胺酶使血液中的天冬酰胺水平降低。假若血液中天冬酰胺的水平是 0.2 mmol/L, 那么哪种形式的天冬酰胺酶最有用?
 - $K_M = 0.2 \text{ mmol/L}; v_{\max} = 0.1 \text{ mmol/L/h}$
 - $K_M = 0.2 \text{ mmol/L}; v_{\max} = 0.5 \text{ mmol/L/h}$
 - $K_M = 2.0 \text{ mmol/L}; v_{\max} = 0.1 \text{ mmol/L/h}$
 - $K_M = 0.1 \text{ mmol/L}; v_{\max} = 0.5 \text{ mmol/L/h}$
 - $K_M = 0.1 \text{ mmol/L}; v_{\max} = 0.1 \text{ mmol/L/h}$
- 关于同功酶的下列说法,哪一项是错误的?
 - 在诊断心肌梗塞中是重要的
 - 在诊断前列腺癌方面是重要的
 - 有组织专一性
 - 它在临床上的价值决定于个体之间的遗传差异
 - 只有某些酶才有

参 考 答 案

- a 反应速率由 Michaelis-Menten 方程决定: $v = v_{\max} [S] / (K_M + [S])$ 。假若将 $2 \times [S]$ 和 $2 \times K_M$ 代入,即得: $v = v_{\max} \cdot 2[S] / (2K_M + 2[S])$ 。2 全都消掉,得到的仍是原来的速率。所以, a 是正确答案。
- d 这种酶最好,因为它会产生最快的速率。可以利用 Michaelis-Menten 方程进行计算,或只要简单地看一看只有这种选择的 v_{\max} 最高而 K_M 最低,因而它必定使反应速率最快。
- d 一个个体内就有多种同功酶是由各种各样机制产生的。正是由于每人体内都有组织专一的不同的同功酶的存在才使得同功酶在临床上有用。要使同功酶在临床上有用,并不需要遗传上的变异。

第 8 章 酶活性的非共价调节

8.1 引言

生物体产生许多种酶。有些是永远需要的,是保证基本生命活动所必需的,例如那些用于产生可利用能量的酶。大多数细胞在大多数时刻都需要的酶,有时称为管家酶。虽然管家酶一般都是存在的,但它们的活性却是受到调节的,每时每刻都在根据需要而上下波动,以保持体内代谢的平衡。例如,与能量的产生有关的酶在需要能量时会增加,如运动时,而与能量贮存有关的酶在能量过剩时会增加,如饭后。酶活性的增高称为上调,降低则为下调。

其他酶则只在特别的情况下才需要。例如,DNA复制的酶只在细胞开始其增殖周期时才需要。这类酶在不需要时可能以极低的量存在或者根本就不存在,但需要时则迅猛增加。在这种情况下,可以说酶被“启动”或“关闭”。

8.2 酶的调节

生物体以许多方式调节酶活性。它可以改变合成或降解速率以改变存在的酶蛋白的量。在另外的情况下,酶蛋白的共价修饰会使酶的活性增高或减低。另一种方式是,其他分子会可逆地与酶结合以改变其活性。我们将讨论存在于生物体内每一种类型的酶调节的实例。

影响酶活性的最重要的因素有:

底物浓度的改变

途径的终产物的抑制作用(负反馈)

不可逆的抑制

协同性

离子条件的改变

酶的不可逆的共价修饰

酶降解的变化

产物浓度的改变

别构活化和抑制

阻抑物亚基或专一性-修饰物亚基的缔合/解离

pH的改变

酶的可逆的共价修饰

酶合成的变化

这些变化中大多数都会改变反应速率。有时反应的专一性会发生变化。

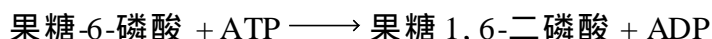
1. 底物浓度的改变。在底物浓度极低的情况下,有大量的酶能与底物相互作用;因此,反应速率大致与底物浓度成正比。在底物浓度较高时,可利用的酶相对要少一些;因此,反应速率的增加比底物浓度的增加要慢一些。最后,酶的浓度成为限制因素,继续增加底物浓度对反应速率很少或没有影响,已在第7章详细讨论过(图7.7)。在最大速率 v_{max} 下,酶被说成是为底物所“饱和”。体内的酶广泛运用这一简单的调节反应速率的机制。当然,还有其他方法进行更为专一的,或更为精细的控制和反馈控制。

2. 产物浓度的变化(产物抑制)。产物会与底物竞争酶的活性部位,视对产物和底物的相对亲和力而定。假若对产物的亲和力在产物浓度的范围之内,酶就会在相当时间内一直与产物结合。这时酶就不能与底物结合,而随着产物浓度的增加,反应速率就会降下来。这样的结

果可能是简单的反馈抑制,但生物体通常会使用更为精巧的反馈抑制的方式,也包括别构酶。

3. 负反馈。一特定反应常常是由一连串的酶催化的,这一连串的酶促反应称为途径。此途径的最终产物可能是同一途径中第一个酶的抑制剂。抑制第一个酶就会使其产物形成的速率降低,而此产物又是下一个酶反应的底物。这样,第二个酶的反应速率就会下降,如此下去,最后整个途径的所有反应的速率都下降了。因此,物质在整个途径中的流动为最终产物的浓度所调节。这种抑制作用可能是由别构效应所引起的,即抑制剂结合在酶上一个与活性部位不同的部位,引起酶构象的变化,使之处于一种失活或比较不活泼的状态。本章后面还要回过头来再讨论这一重要机制。

4. 别构活化或抑制。别构效应可以是正的,即一种特定的分子能使一种活性构象形成。例如,磷酸果糖激酶所催化的反应:

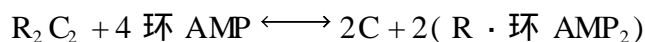
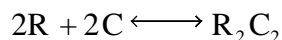


即受 AMP 浓度的影响,AMP 浓度增加时,因 AMP 与酶结合而使反应加快。

在负反馈的情况下,别构调节的结果是抑制。

5. 不可逆的抑制作用。不可逆抑制的最好的例子是丝氨酸蛋白酶的失活,凡能改变活性部位的丝氨酸的试剂都能使此类酶失活。例如,马拉硫磷是一种杀虫剂,还是一种神经毒素,会使乙酰胆碱酯酶这种丝氨酸酶失活(下文将详细讨论)。苯甲磺酰氟(PMSF)用于抑制丝氨酸蛋白酶。

6. 亚基的缔合与解离 举一个例子,调节糖原代谢的蛋白激酶为一种阻抑物亚基所调节,而该亚基又能为环 AMP 所取代。



式中 C 为催化性亚基,它本身就有活性;R 为阻抑物亚基, R_2C_2 为无活性的复合物。

再举一个例子,细菌 RNA 聚合酶的 亚基使该酶对特定的(DNA)序列有专一性。还有,乳腺中的乳糖合成酶的反应因与一种蛋白质亚基结合而改变。

7. 协同性。血红蛋白与氧的结合就是协同性的一例。与此类似的是,许多调节酶都有多个底物结合部位,对底物的结合都有协同性。在别构酶一节中对协同性有进一步的讨论。

8. pH 的改变。已知细胞中会发生 pH 的变化,例如,血液中 pH 的变化对血红蛋白的作用就很重要。这类变化可能有多种影响,因为大多数酶都对 pH 敏感。胃蛋白酶在 pH 低时活性很高(在胃中),但在合成它的细胞中的中性 pH 下则无活性。

9. 离子条件的变化。离子条件的总的变化会影响大多数酶,特别当酶需要特定离子参加其反应时,如 Mg^{2+} 与蛋白激酶的情况。 $[Ca^{2+}]$ 有专一的影响,其影响是由与钙结合的蛋白质钙调蛋白介导的。

10. 酶的共价修饰。这包括可逆的变化和不可逆的变化。前者如糖原代谢中酶的专一丝氨酸的磷酸化,后者如消化作用和血液凝固中蛋白质水解使酶原活化。这些机制将在以后详细讨论。

11. 酶合成的变化。合成的速率影响酶的浓度,因而影响反应速率。酶合成发生变化的原因可能是 mRNA 合成、稳定性或被核糖体利用的变化。

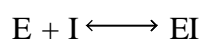
12. 酶降解的变化。降解的速率也影响酶的浓度,因而影响反应速率。人体内调节程度最高的酶之一,鸟氨酸脱羧酶,主要是由控制酶的存在量调节的。下面比较详细地研究这些过程。

8.3 酶的可逆抑制

专一的代谢物对某些酶的抑制是调节中间代谢的重要因素,最常与别构调节的协同性酶共同存在。对于那些服从 Michaelis-Menten 方程的酶,即非协同性酶的抑制,是药物学家最常用来改变病人代谢的方法。非协同性酶的可逆抑制可分为 3 类:竞争性、反竞争性和非竞争性抑制。这三类可用动力学的方法区别开,它们的机理不同,施用后效果也不同。也存在混合抑制。在所有这些类型的抑制中,抑制剂(通常是小分子)会可逆地迅速与酶结合。

(一) 竞争性抑制

在竞争性抑制中,抑制剂 I 可逆地与酶的活性部位结合。抑制剂当然与底物竞争活性部位。抑制剂浓度不变,加入更多的底物,抑制剂就被取代了,反应速率就接近于无抑制剂时的同样的最大速率。不过,在抑制剂存在下需要加入更多的底物才能达到无抑制剂时的反应速率。抑制的程度决定于抑制剂常数 K_i ,它也是抑制剂与酶结合的解离常数:



$$K_i = [E] \times [I] / [EI]$$

反应速率 v_0 对底物浓度 $[S]$ 的曲线表明在底物浓度低时抑制很厉害,而底物浓度高时则无抑制。这一曲线(图 8.1 b)是竞争性抑制所特有的。竞争性抑制剂有效地降低了酶与其底物的表面亲和力,因而影响了其表面 K_M 。底物浓度高时,底物有效地阻断了抑制剂与酶的相互作用,因而最终的最大速率 v_{max} 未受竞争性抑制剂的影响。

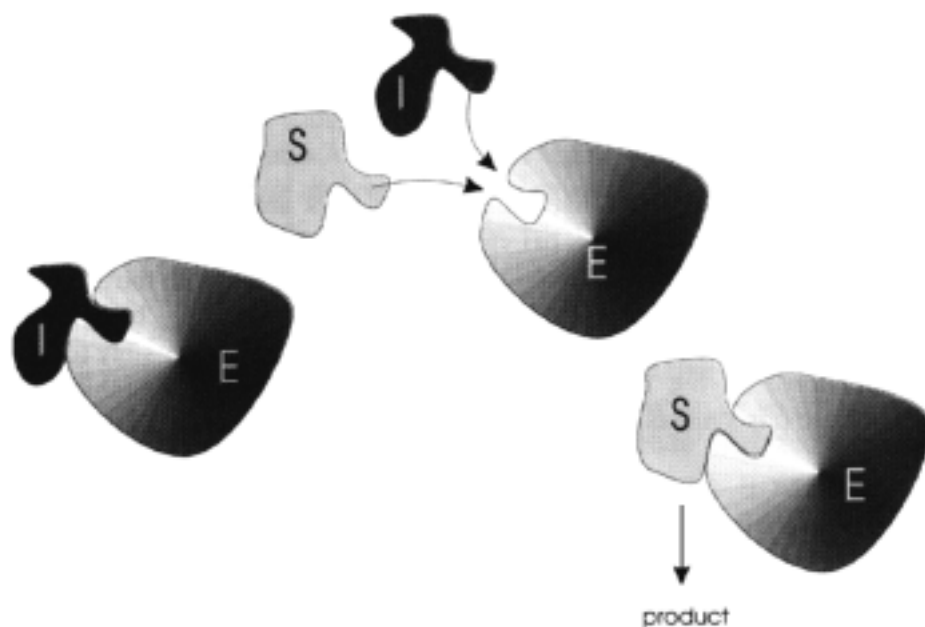


图 8.1(a) 竞争性抑制

E—酶分子, S—底物分子, I—抑制剂分子(酶上的一个缺口表示与底物结合的部位,底物和抑制剂都可以结合在这个部位上)。

竞争性抑制的另一个特点是底物与竞争性抑制剂在结构上的相似性。这种相似性使得抑制剂能结合在酶的活性部位上。例如,二氢叶酸还原酶(DHFR)为氨甲蝶呤及其他化合物所抑制。氨甲蝶呤用于癌的化疗,因 DHFR 为胸嘧啶三磷酸的合成所必需,而胸嘧啶三磷酸是 DNA 的专一前体(图 8.8)。DHFR 的正常底物是叶酸,氨甲蝶呤与它极为相似(图 8.2)。

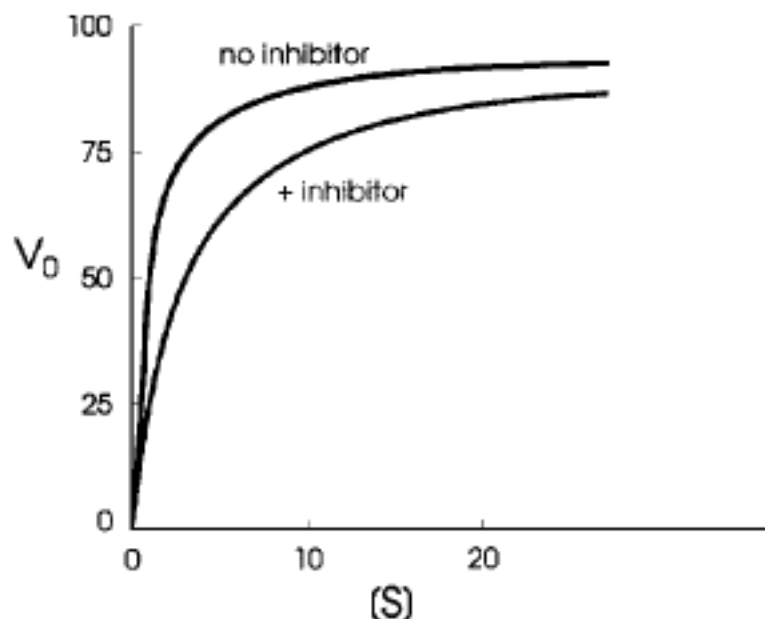


图 8.1(b) 竞争性抑制——酶所催化的反应速率与底物浓度的关系
无抑制剂时所得曲线是上面的一条, 下面的是加了抑制时(情况如卡通所示)的曲线。

(二) 反竞争性抑制

在反竞争性抑制中, 抑制剂只与酶-底物复合物结合。它不影响酶与底物的结合, 但它却阻止复合物解离, 生成产物。因此, 反竞争性抑制剂趋于使酶-底物复合物稳定, 其结果是表面 K_M 减小。通常 K_M 减小会使反应速率增加; 但在这一情况下, K_M 的减小为 v_{max} 的减小所抵消, 净结果是抑制。实际上, K_M 与 v_{max} 的比值一直无变化。加入更多底物时, 反应速率增加, 但总是比无抑制剂时的反应速率小, 与竞争性抑制不同(图 8.3)。抑制剂常数 K_I 为:

$$K_I = [ES] \times [I] / [ESI]$$

式中 ES 代表酶-底物复合物。

反竞争性抑制在双底物反应中常见。

(三) 非竞争性抑制

在非竞争性抑制中, 抑制剂与酶和酶-底物复合物均能结合。它的结合部位与活性部位不同, 它修饰酶的构象而抑制产物的形成, 因而使 v_{max} 减小。这种抑制剂通常并不影响底物的结合, 因而不影响 K_M 。和反竞争性抑制一样, 加入更多的底物会使反应速率增加, 但在任何一定的底物浓度下, 速率总是比无抑制剂时小。在大多数情况下, 抑制常数 K_I 可被定义为抑制剂与游离的酶或与酶-底物复合物的反应产物的解离常数, 通常二者是相同的。反应速率对底物浓度的曲线(图 8.4)形状与反竞争性抑制的稍有不同。在有些情况下, 抑制剂的结合影响底物的结合, 因而影响 K_M 以及 v_{max} 。这就更为复杂, 通常称为混合抑制。和反抑制性竞争一样, 非竞争性抑制和混合抑制都是有一种以上底物的酶的特点。

用双倒数——Lineweaver-Burke——作图法极易区分这些类型的可逆抑制。在几种不同的抑制剂浓度下测定反应速率与底物浓度的关系并进行双倒数作图。对于每一种抑制剂浓度, 可以根据实验数据得到一条直线。竞争性抑制的直线在 $1/[S]$ 为零处与 $1/v$ 轴相交, 因为 v_{max} 不受竞争性抑制剂的影响。反竞争性抑制产生平行的直线, 因为 K_M 和 v_{max} 都会改变但其

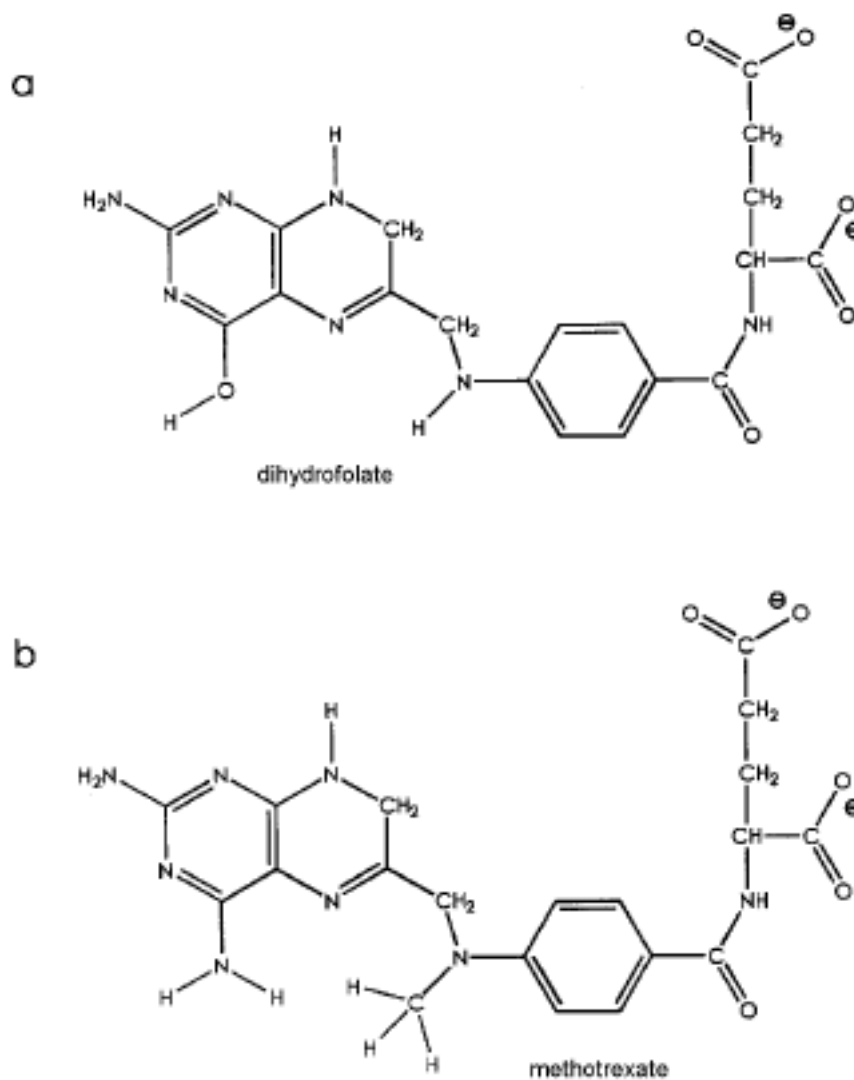


图 8.2 二氢叶酸还原酶的抑制

(a) 二氢叶酸, 为二氢叶酸还原酶的天然抑制剂; (b) 氨甲蝶呤, 为竞争性抑制剂。

比值不变。非竞争性抑制所产生的直线在 $1/v$ 为零处与 $1/[S]$ 轴相交, 因为 K_M 不受影响而 v_{max} 发生了变化(图 8.5)。

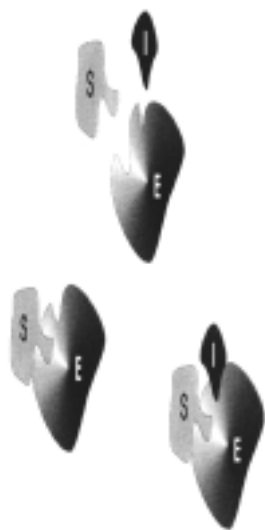


图 8.3 反竞争性抑制

(a) E—酶分子, S—底物分子, I—抑制剂分子(底物结合部位和抑制剂结合部位分别由酶分子上的不同缺口表示); (b) 曲线说明酶所催化的反应的速率与底物浓度的关系(1—无抑制剂时的数据所构成的曲线; 3—有反竞争性抑制剂时的曲线, 如卡通所示; 2—有竞争性抑制剂存在时, 参看图 8.1; 4—有非竞争性抑制剂存在时, 参看图 8.4)。

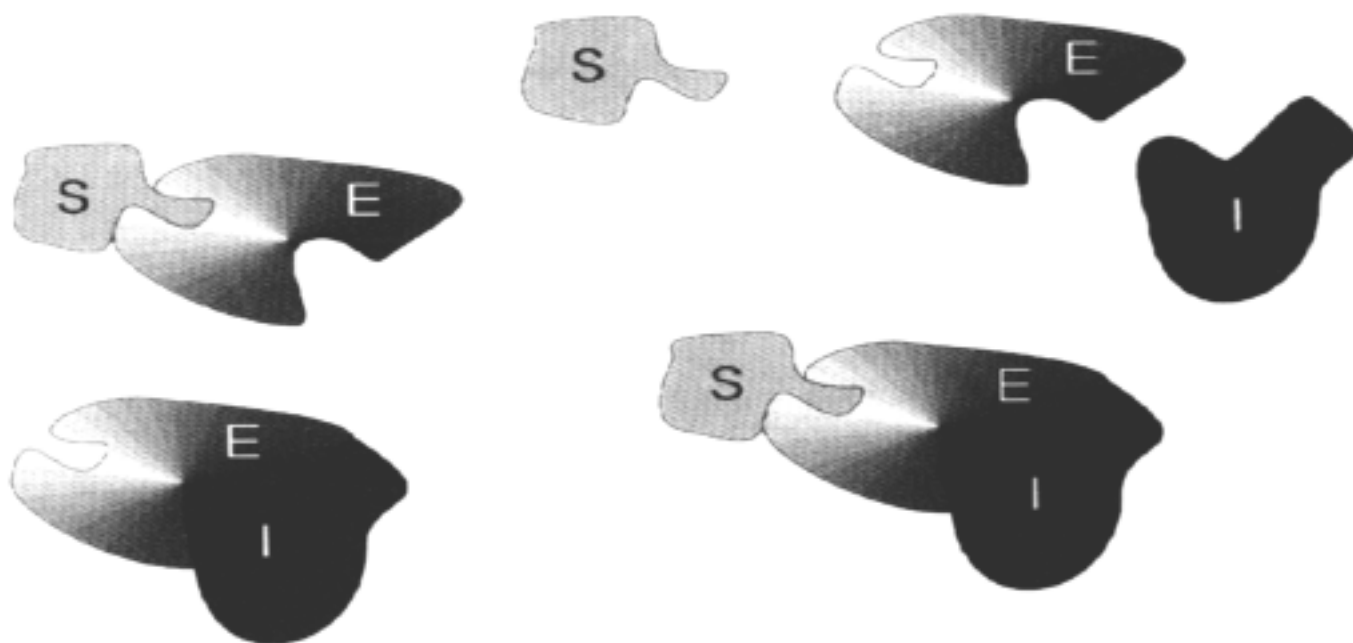


图 8.4 非竞争性抑制

(a) E—酶, S—底物, I—抑制剂(底物结合部位和抑制剂结合部位分别由酶上的不同缺口代表); (b) 表示酶所催化的反应速率与底物浓度的关系(1—无抑制剂时; 4—有非竞争性抑制剂时, 情况如卡通所示; 2—竞争性抑制剂存在时, 参看图 8.1; 3—反竞争性抑制剂存在时, 参看图 8.3)。

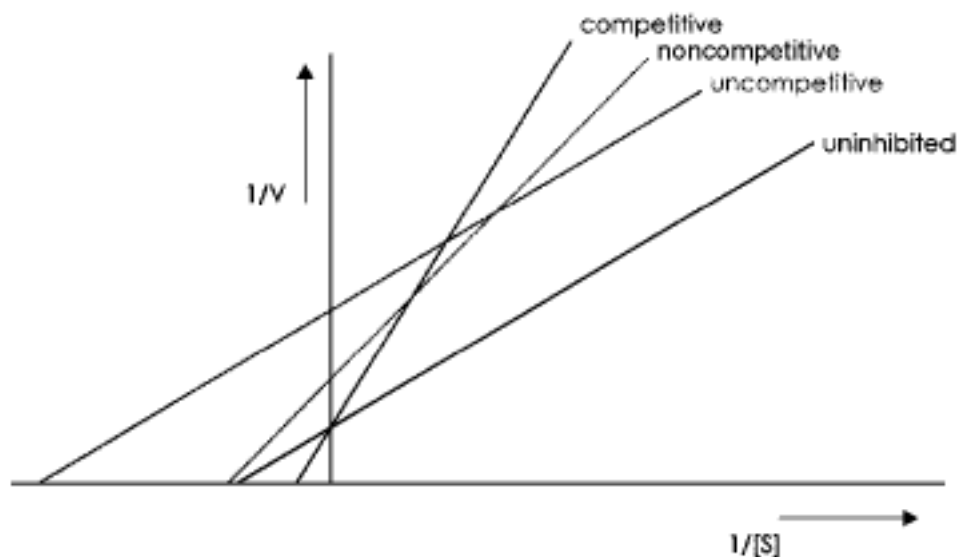


图 8.5 被抑制的酶的双倒数曲线

无抑制剂时和有各种类型抑制剂时的双倒数曲线。

简单的酶(所谓 Michaelis-Menten 酶)表现这些类型的抑制。有些酶对抑制剂的行为要复杂得多, 对活化剂也有响应。这类酶的反应速率对底物浓度的曲线并不是如此简单的。

8.4 酶抑制剂应用举例

(一) 毒物受害者的治疗

这是竞争性抑制剂临床应用的一例。乙二醇是用作抗冻剂的, 本身无毒。但在人体内, 一种酶促途径能将它转变为草酸, 此途径从乙醇脱氢酶开始。这一反应可为竞争性抑制剂乙醇 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 所抑制; 这样, 几乎可以解毒的静脉注射剂量的乙醇就可与乙二醇竞争, 使之排出体外而对人体无害(图 8.6)。类似的办法也可用于甲醇中毒。

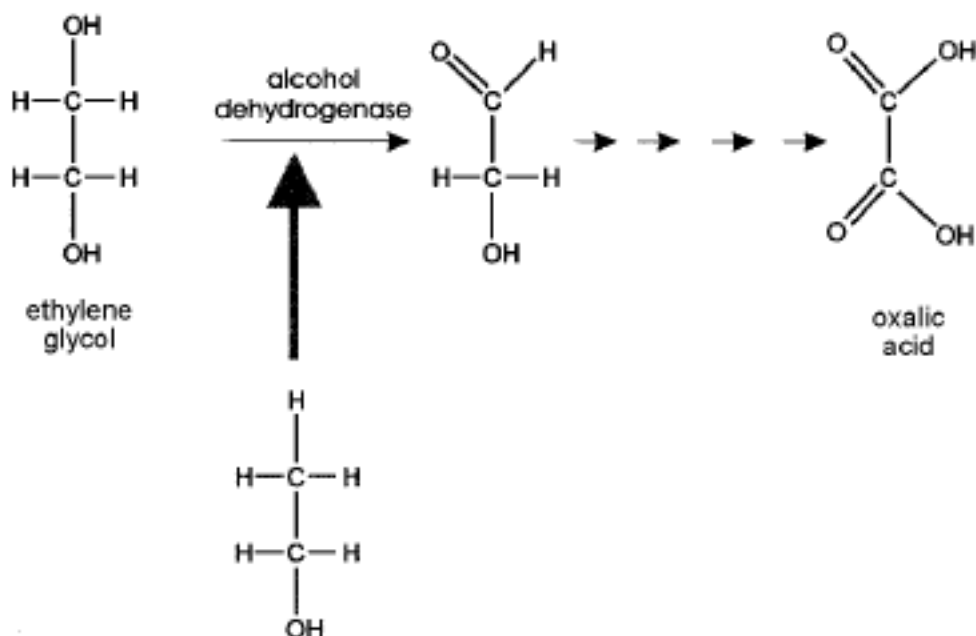


图 8.6 乙二醇中毒的治疗

上部的反应途径说明乙二醇如何转变为草酸, 此反应可为竞争性抑制剂乙醇所抑制。

(二) 乙酰胆碱酯酶的抑制剂

当神经冲动跨过细胞之间的结头——轴突而传递时, 起传递作用的细胞就向轴突中释放乙酰胆碱。乙酰胆碱扩散到接受的细胞中, 与该细胞膜上的乙酰胆碱受体分子结合。然后乙酰胆碱被乙酰胆碱酯酶降解, 受体被释放, 又可对下一个信号发生响应。

乙酰胆碱酯酶通过丝氨酸残基起作用, 该残基与乙酰胆碱形成一共价的中间产物。然后中间产物被水解, 产生游离的酶、乙酸和胆碱。

琥珀酰胆碱是乙酰胆碱酯酶和乙酰胆碱受体的竞争性抑制剂。在琥珀酰胆碱的存在下, 乙酰胆碱受体会一直被封阻, 使得肌肉舒张, 这在施行外科手术时可能有用。因为琥珀酰胆碱是竞争性抑制剂, 所以高于正常浓度的乙酰胆碱能克服其抑制。抑制是可逆的, 当琥珀酰胆碱降解后(它会被乙酰胆碱酯酶慢慢水解)或扩散出轴突后, 抑制的影响就会减弱。

其他类型的抑制剂可能没有这么好。用为神经气体和杀虫剂(对硫磷, 即一六五)的有机磷化合物与活性丝氨酸不可逆地形成共价键, 并且使乙酰胆碱酯酶永久失活。这是一种类型的自杀抑制, 因为抑制剂很像底物那样与酶作用, 但在中间状态就被阻断了, 这对酶-磷酰键是稳定的, 与可被水解的酶-乙酰键不同。这些化合物是致命的。

对有机磷化合物有效的解毒剂必须能水解酶-磷酰键以释放乙酰胆碱酯酶。有这种作用的最简单的化合物是羟胺。可惜的是, 羟胺在所需浓度下是有毒的。不过, 可以制备一些在低得多的浓度下就有效的衍生物。一种这样的衍生物是吡啶醛肟甲碘化物(图 8.7)。在这种化合物中,

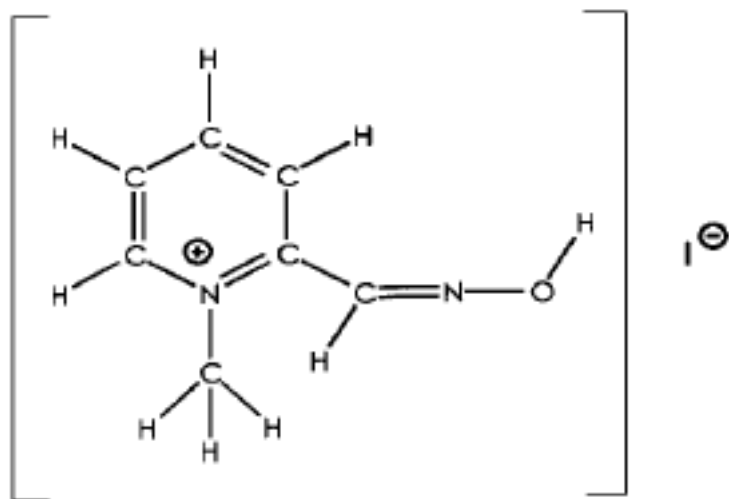


图 8.7 吡啶醛肟甲碘化物
这种解毒剂的有效部分是羟胺的类似物。

羟胺被固定在与吡啶环相对应的位置上。吡啶环结合在乙酰胆碱酯酶上并将羟胺基团固定在正确位置上,使酶-磷酸键水解。

8.5 代谢途径

许多先天性代谢缺陷就是因为人体内丢失了一种酶的活性。要了解这种缺陷如何影响人体的功能并学会如何治疗这类疾病,我们需要应用代谢途径的概念去了解个别的酶与体内代谢的全局的关系。

细胞很少能够一步就催化一个所需要的反应。理由是各种各样的,分别与能量守恒、控制和进化有关。例如,葡萄糖的分解(糖酵解)就分许多步骤进行,包括产生尽可能多的 ATP 和其他高能分子,以便使细胞从每一个葡萄糖分子得到尽可能多的可利用的能量。这样,反应就通过一系列的步骤进行,这些步骤称为代谢途径。在体内这些途径是以复杂的方式控制的,对于成功地治疗与代谢过程或酶有关的疾病,了解这些控制机制是至关重要的。控制是指决定在许多可能的反应中,实际上催化哪一种反应(专一性)以及以何种速率催化这一反应(动力学)。

反应的专一性是由细胞中有什么酶所决定的,酶则由基因的编码所决定。不同的细胞可以通过对基因表达的控制来改变其所利用的酶的种类。因此,所有细胞都利用的某些酶(有时称为“管家”酶)总是存在的。其他一些更为专一的酶则只在适当的细胞中才有。这后一类酶中有一些并不是响应于细胞的需要才合成的;许多是由细胞的类型所决定的,在完全分化的细胞的一生中并没有什么变化。

细胞必须对变化着的环境和变化着的需要发生响应。这种响应常常是由催化某种专一反应的速率而完成的,也就是由改变专一的酶的活性而完成的。酶活性的变化实际上是作为一个继续不断的过程在进行的,它是保证身体代谢的平衡所必需的。糖尿病就是这种平衡丧失后发生问题的一个实例。

细胞通过利用代谢途径来实现其效率、稳定性和响应性。代谢途径是一系列酶催化的反应,前一反应的产物是下一个反应的底物。通常,途径的终点是产生一种特定的产物,例如蛋白质合成所需要的一种氨基酸。一种特定的起始材料,例如葡萄糖,可能用于各种各样的目的。在这种情况下,代谢途径有一个起始的部分是每一个目的所共有的;最后,各条途径分开,进入各自所特有的部分。在这一分支点上,一种关键性的酶控制着底物流向途径的特殊部分。这种酶通常是别构控制的,典型的是由该途径中的一种产物以负反馈环的方式控制,如下文所述。在一独特途径中这第一个步骤称为关键步骤或关键反应。

既然所有的酶促反应在理论上都是可逆的,细胞又怎能保证化学物质流向途径中的正确方向去?一般来说,在生理条件下关键反应实质上是不可逆的。有时这是由于反应与 ATP 的水解偶联起来而实现的,ATP 的水解是非常容易发生的。

关键反应可以有效地控制物质流经该途径。关键反应之后的每一反应的速率是由该反应的底物浓度所决定的。关键反应加速,下一个反应的底物就增多,其速率也增加,以此类推,整个途径都是如此。因此,反馈机制只需要作用于途径中起始的、关键的步骤。

(一) 癌症化疗中 TTP 合成的抑制——代谢途径的一例

癌细胞一般比人体中大多数细胞都生长和增殖得快。因此,治疗的一种办法就是攻击生

长迅速的细胞使之减缓。增殖中的细胞需要复制其 DNA, 而其他细胞则否。有一种化合物仅为 DNA 合成所必需, 这就是胸苷三磷酸(TTP)。有两种化疗药物是通过抑制 TTP 的合成而起作用的。

要了解这一过程, 我们必须研究以 TTP 为终产物的代谢途径。图 8.8 概括的就是这一途径, 其中: rNDP 代表 4 种核糖核苷二磷酸中的任何一种——ADP, CDP, GDP 或 UDP; dNDP 代表 4 种脱氧核糖核苷二磷酸中的任何一种——dADP, dCDP, dGDP 或 dUDP; dNTP 代表 4 种脱氧核糖核苷三磷酸中的任何一种——dATP, dCTP, dGTP 或 dTTP。

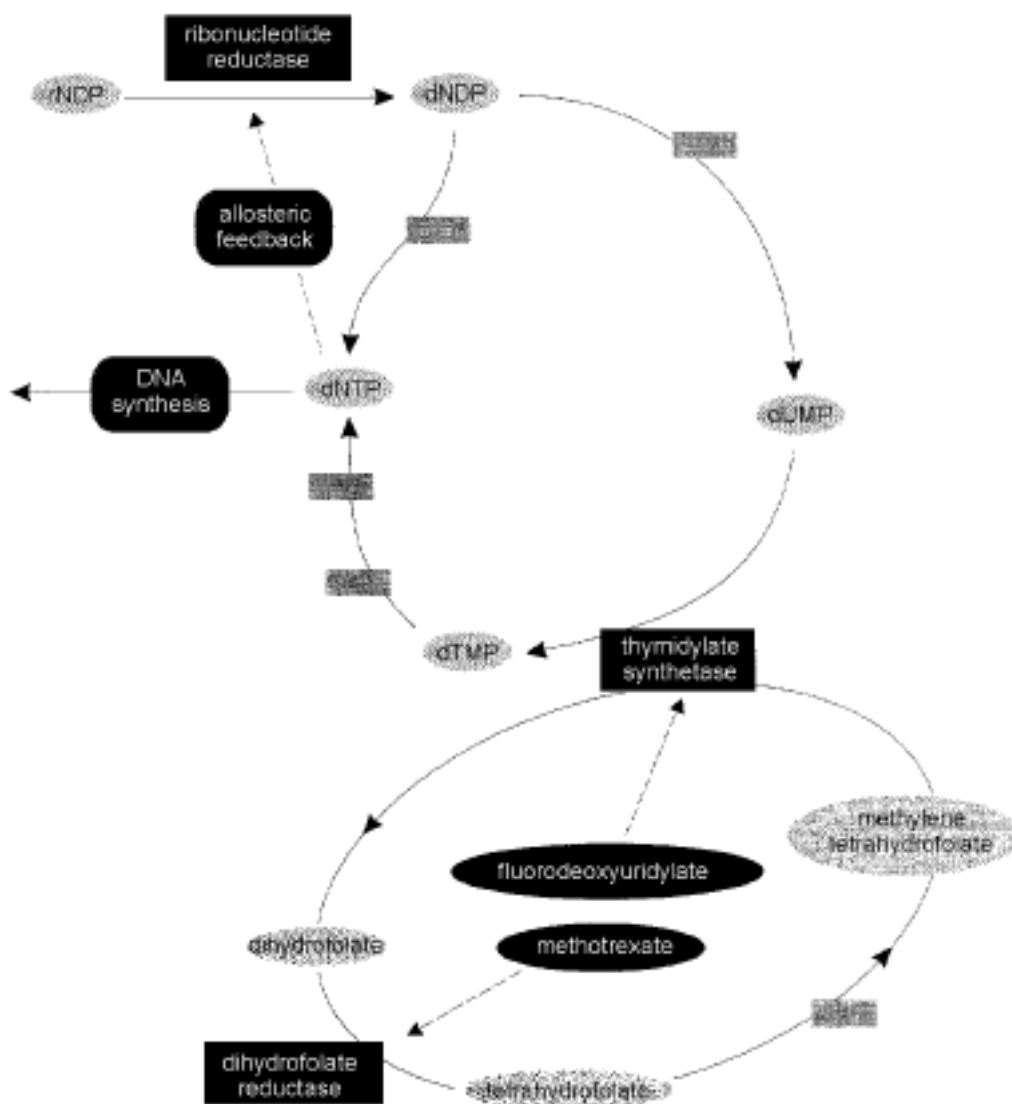


图 8.8 TTP 合成和化疗

rNDP 代表 4 种核糖核苷二磷酸, 即腺苷、胞苷、鸟苷和尿苷二磷酸; dNDP 代表 4 种相应的脱氧核苷二磷酸; dNTP 代表 4 种脱氧核苷三磷酸, 即脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷三磷酸。在此途径中 dNDP 中的 3 种直接被磷酸化, 形成相应的 dNTP。但第 4 种 dNDP(脱氧尿苷二磷酸), 则途径不同, 其中包括 dUMP(脱氧尿苷-磷酸)和 TMP(胸苷-磷酸), 最终转变为胸苷三磷酸, 第 4 种 dNDP。小的长方形表示途径中的酶, 椭圆形代表途径中的底物和产物, 两个长椭圆形代表两种抑制剂。

有一种药物 5-氟尿嘧啶, 是氟脱氧尿苷酸的前体, 它是尿苷酸合成酶的抑制剂——它像尿苷酸一样与酶结合, 但氟原子阻止甲基的加成。

另一种药物, 氨甲蝶呤, 可用于治疗某些形式的白血病, 其作用更为间接。它是二氢叶酸还原酶的竞争性抑制剂。它阻止了二氢叶酸再生四氢叶酸, 从而阻断了胸苷酸合成酶的反应。当然, 这两种药物都影响正常细胞, 但在小心控制的剂量下, 在没有更好的化疗药剂的情况下,

它们在临床上是有用的。结肠癌的患者很多, 氟尿嘧啶正在用于他们的临床试验。

(二) 别构酶

生物体利用别构酶对代谢途径进行反馈控制并将其产物控制在适当水平上。别构酶活性的调节是由于与底物和(或)非底物效应物的结合。“别构”的意思是指在一个与直接有关的部位不同的部位。这可能是由于在一非底物部位结合上了一个不同的分子——别构效应物。

例如, 核糖核苷酸还原酶的反应速率是由脱氧腺苷三磷酸(dATP)调节的, 而它是以核糖核苷酸还原酶为关键步骤的途径的产物(图 8.9)。注意 dATP 既不是核糖核苷酸还原酶本身的底物, 也不是产物; 它只是一种别构抑制剂。假若此途径(NDP → dNTP)进行得太快, dNTP 的利用速率跟不上(DNA 合成跟不上), 那么 dNTPs 的浓度就会增高, [dATP] 也增高。由于 dATP 结合到核糖核苷酸还原酶的别构部位上, 这种增高就会“反馈”给这种酶, 抑制其活性, 使此途径的运转变慢; 反之, 假若此途径运转太慢, DNA 的合成就会将已有的 dATP 用尽, 其浓度就会降低。这就会使核糖核苷酸还原酶上的 dATP 释放出来, 缓解抑制作用, 使得核糖核苷酸还原酶的反应速率增加, 加速 dNTP 的产生。

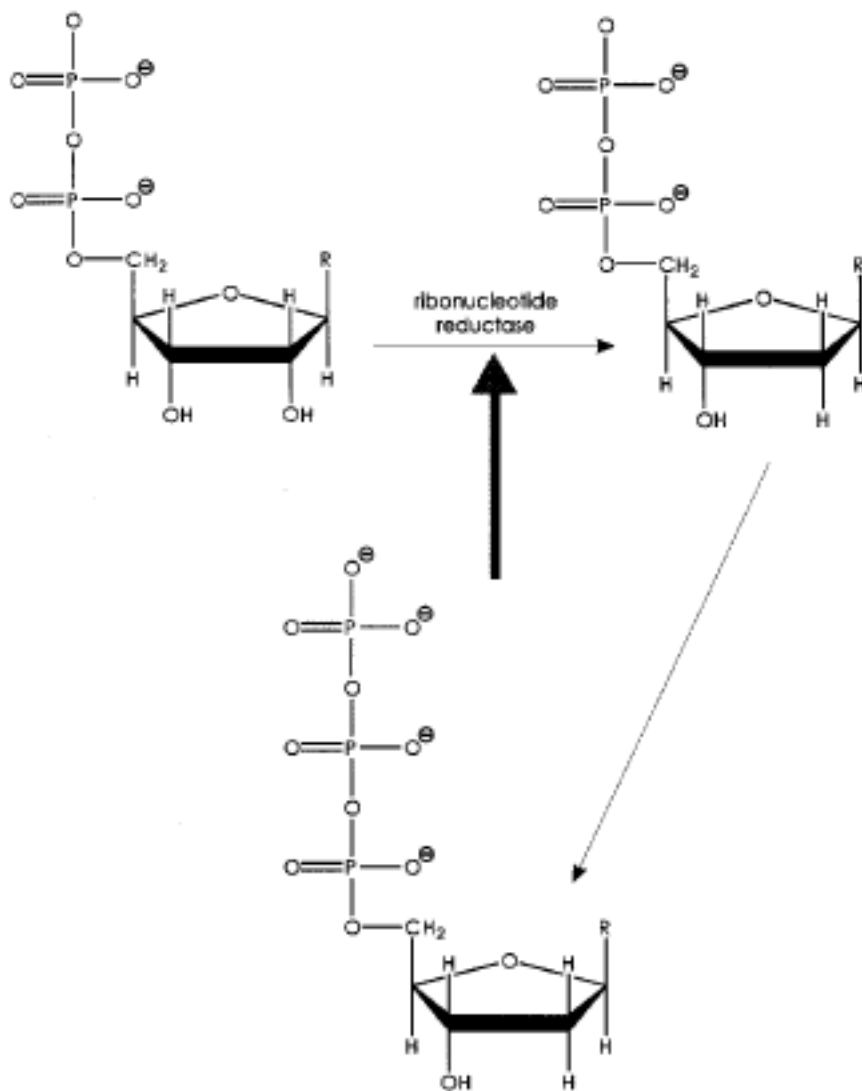


图 8.9 负反馈

核糖核苷二磷酸转变为相应的脱氧核糖二磷酸: 上半部所示为此反应, 然后脱氧核糖二磷酸被磷酸化为相应的脱氧核糖三磷酸(多一个 $-$ 磷酸根)。这就是此途径的终产物, 它是初始酶的负别构抑制剂, 如大的箭头所示。

这种类型的别构调节有几个名称: 终产物抑制、反馈抑制或逆向抑制。在这一实例中,

dATP 是负调节物或负效应物。被它直接调节的反应,即核糖核苷酸还原酶所催化的反应是关键反应或限速步骤,因为以后的各种酶只是在底物一出现时,就把它转变为产物。因此,初始反应的速率就确定了整个途径的速率。这样,只要调节一种酶,就保证了 dNTP 和所有中间产物的生产不会过量。图 8.10 所示为较一般化的过程。

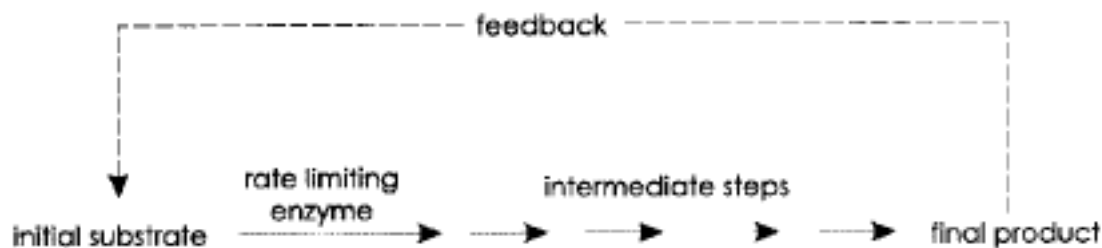


图 8.10 反馈抑制的一般过程

代谢途径中的酶促反应如实线箭头所示,终产物对初始的酶促反应的反馈抑制如虚线箭头所示。

一种别构酶既可以是正调节物,也可以是负调节物。别构酶一般是大的有多个亚基的酶。别构部位和催化部位可能在同一个亚基上,也可能在不同的亚基上。别构部位的数目与催化部位的数目可以相同,也可能不同。在生理条件下,不管有无效应物存在,大多数别构酶都不表现出符合 Michaelis-Menten 方程的动力学。

别构酶反应的初始速率与底物浓度的关系为 S 形曲线(图 8.11)。这种 S 形曲线起始时上升很慢,因为酶与底物的亲和力很小。然而结合上一个分子底物后,酶对以后的底物分子的亲和力就增大了,曲线就一直上升,很快就达到最大速率。这是正协同性的一个例子。

在文献中关于酶的“别构”一词的用法有些混乱。有些作者把这一名词限于具有底物协同性与 S 形动力学曲线的多亚基酶。但其他一些作者使用得比较普遍,他们的定义包括那些符合 Michaelis-Menten 动力学并且有非竞争性或反竞争性抑制剂的酶。幸运的是,代谢作用中的调节酶一般都是有多个亚基的、有协同性的酶,都符合于比较严格的“别构”的定义。

别构酶的 $S_{0.5}$ 的定义为反应速率达到最大速率一半时的 $[S]$ (图 8.12)。最大速率即称为 v_{max} 。正协同性的作用就是当底物浓度低时,酶几乎没有活性,而当底物浓度达到 $[S]_{0.5}$ 后,酶迅速被活化。这就使得酶在这一底物浓度范围内极为敏感,而这通常就是生理的浓度范围。例如,在典型情况下,非协同性酶需要 $[S]$ 增加 81 倍才能使反应速率从 $0.1 \times v_{max}$ 增为 $0.9 \times v_{max}$,而具有正协同性的酶只要 $[S]$ 增加 9 倍就能使反应速率发生同样的变化。

Hill 图是 $\log(v/v_{max})$ 对 $\log[S]$ 的函数(第 6 章),是常用于鉴定协同性酶的。Hill 图的中央部分是直线,其斜率称为 Hill 系数;对于非协同性酶此斜率为 1,对于正协同性酶则大于 1。

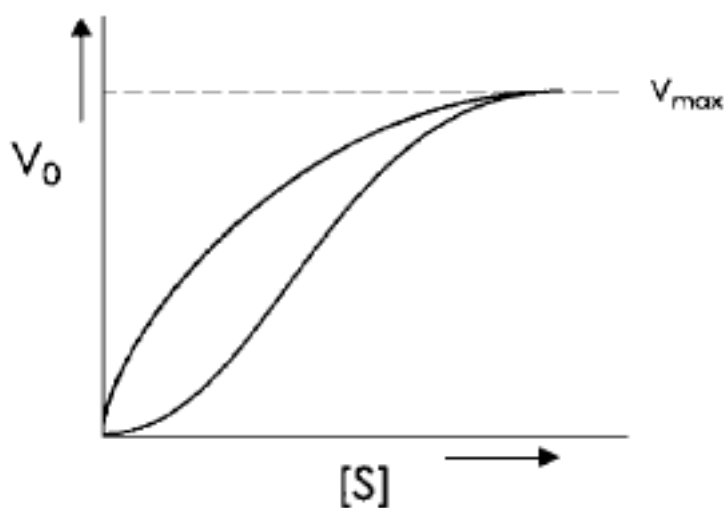


图 8.11 S 形速率曲线

曲线 2—协同性酶的反应速率与底物浓度的关系;曲线 1—服从 Michaelis-Menten 方程的酶所催化的反应的双曲线,供比较用。

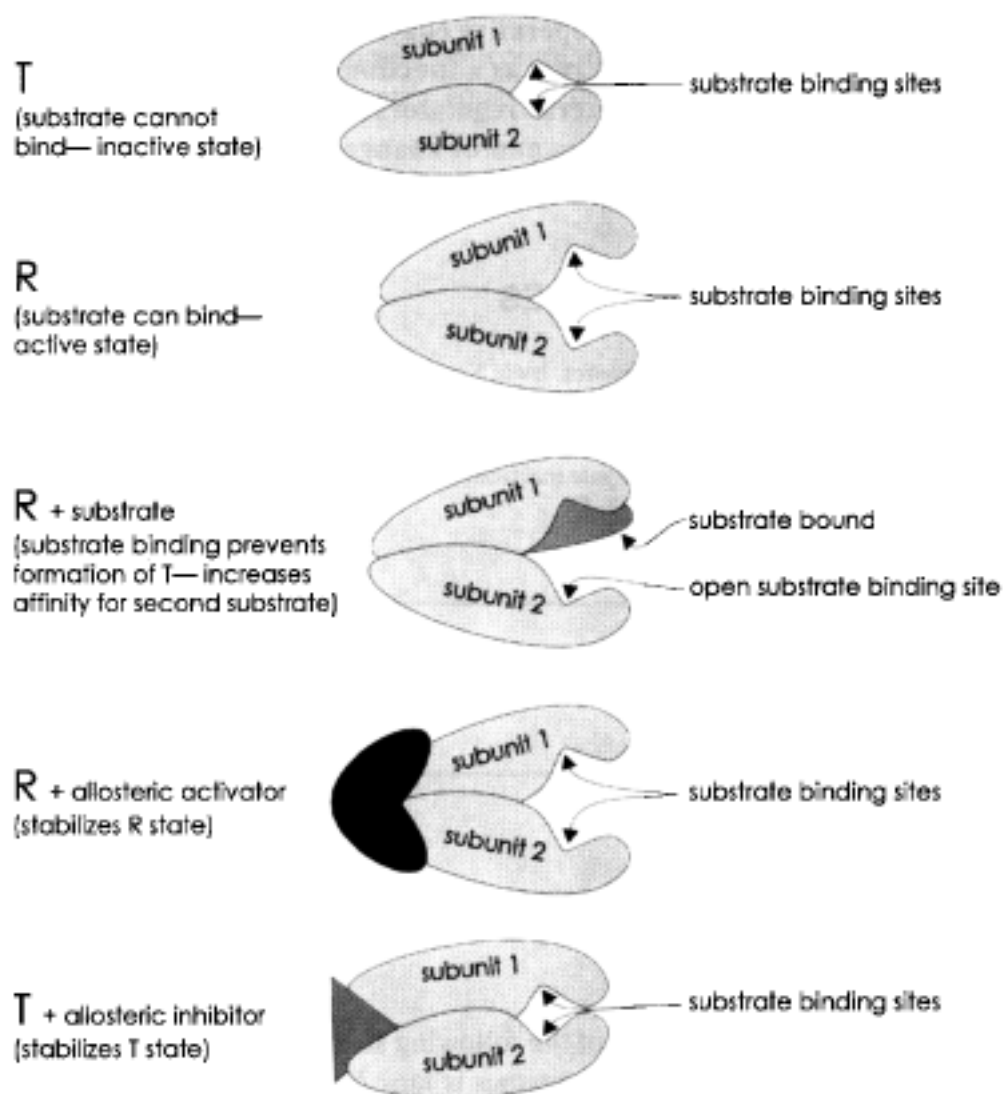


图 8.12 别构酶示意图

酶由两个亚基组成;深色的为活化剂,浅色的分别为底物和抑制剂。

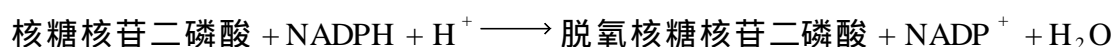
Hill 系数是酶上面最小的相互作用部位的数目。

有些正调节物的作用是把所有底物结合部位(催化部位)的亲和力都调节到最大,与 $[S]$ 无关,因而破坏了协同性并把低 $[S]$ 下的反应速率都提高了。这种行为的一个例子就是 AMP (腺苷-5'-磷酸)对磷酸果糖激酶的调节。

有些负调节物作用相反。游离的酶表现 Michaelis-Menten 动力学,而调节物则使之移向正协同性,因此对于大部分活性 $[S]_{0.5}$ 太高了。这种行为的一个例子是酰胺基磷酸核糖基转移酶。这种酶是嘌呤合成的初始步骤,其中有负反馈的控制。负调节物是一种嘌呤核苷酸如 AMP 或 GMP。无调节物时,嘌呤合成很快,酰胺基磷酸核糖基转移酶运作正常, $[S]_{0.5}$ 低。调节物浓度高就表明不再需要嘌呤的合成了,嘌呤核苷酸作为调节物就与酰胺基磷酸核糖基转移酶结合而将其转变为具有正协同性的酶,从而把它的 $[S]_{0.5}$ 推向高于正常生理范围的底物浓度。

注意在两种情况下 AMP 都是调节物。在一种情况下它的作用为正调节物;在另一种情况下是负调节物。在上例中,调节物或效应物改变了表面的 $[S]_{0.5}$;在另一种情况下,则表面的 v_{max} 或表面的 v_{max} 和表面的 $[S]_{0.5}$ 都改变了。

别构效应物可能改变酶对底物的专一性以及反应速率。核糖核苷酸还原酶就是一个好的例子:



这一反应是产生脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)的第一步, dNTPs 为 dATP、dCTP、dGTP 和 TTP(TTP 来自于 dUTP), 是 DNA 合成所需要的。这些 dNTP 的比例需要平衡, 才能使 DNA 的合成效率高。反馈分子或效应物就是这一途径的终产物, 即 dNTP。它们作用于核糖核苷酸还原酶, 改变此酶对底物的专一性, 就可以平衡各种 dNTP 的产生。除去专一性的控制部位外, 还有一个别构控制部位决定着反应的总速率。在这一部位上, ATP 起着正调节物的作用, 而 dATP 则起着负调节物的作用。

8.6 小 结

(1) 细胞可以使酶“开”或“关”以调节细胞本身的活性, 但更经常的是连续不断地使一种酶的活性加强或减弱, 即将其调高或调低。

(2) 酶的调节可以通过多种过程进行; 有些是可逆的, 有些是不可逆的。这些机制中有许多作用于所有的酶。然而也有一些仅作用于一类表现底物结合的协同性的酶, 这些酶不符合 Michaelis-Menten 方程。

(3) 重要的可逆的抑制作用因抑制剂结合在酶上而发生。假若抑制剂与底物竞争活性部位, 抑制作用就是竞争性的, 可以增加底物浓度而将其克服。

(4) 例如, 乙二醇中毒可用乙醇治疗, 乙醇是乙醇脱氢酶的竞争性抑制剂。传递神经冲动的抑制剂作用于乙酰胆碱酯酶对受体的活化作用, 这些抑制剂在医学和农业中有各种用途。

(5) 生物体内的许多反应都是分许多步骤进行的, 每一步骤都由一种专一的酶催化。这类代谢途径的调节是由该途径的产物对关键酶的反馈抑制来完成的。抑制剂结合在酶的活性部位之外的一个部位上而发生抑制作用。典型的是, 这类酶由于底物的结合而表现协同性, 这种抑制称为别构抑制。

(6) 有协同性的酶, 其反应速率对底物浓度的曲线为 S 形曲线。别构调节物可能改变这类酶的 v_{\max} 和(或)其协同性。

参 考 资 料

Enzyme Kinetics, Irwin Segel, 1975, Wiley, New York.

Allosteric proteins and cellular control systems, J. Monod, J.-P. Changeux, and F. Jacob, 1963, J. Mol. Biol., 6: 306 ~329.

Suicide enzyme inactivators, R. H. Abeles, 1983, Chem. Eng. News, 61: 48 ~56.

复 习 题

- 协同性酶在下面例举的哪一方面与不表现协同性的酶类似?
 - 均服从下列方程: $v = v_{\max} \cdot [S] / (K_M + [S])$
 - 受别构调节物的影响
 - 其 v_{\max} 不受竞争性抑制剂的影响
 - 只有一种底物
 - 可在代谢途径的终端找到
- 关于 Michaelis-Menten 酶类, 下列哪一条说法不对?
 - $1/\text{初始速率}(1/v_0)$ 对 $1/[\text{底物}]$ 作图得一直线, 在 $1/v_{\max}$ 处与 $1/v_0$ 轴相交
 - 只有单底物的酶才服从 Michaelis-Menten 方程

- c) Michaelis-Menten 方程不适用于表现协同性的酶
 - d) K_M 与酶的浓度无关
 - e) v_{max} 依赖于酶浓度
3. 在处于稳态的任何特定的代谢途径中, 限速酶所催化的反应总是比该途径中非限速酶所催化的反应慢。这句话...
- a) 总是错误的
 - b) 常常是错误的
 - c) 对错各半
 - d) 常常是对的
 - e) 总是对的

参 考 答 案

1. c 对于任何一种酶, 竞争性抑制剂是与底物竞争酶的活性部位的抑制剂。因此, 在底物浓度足够高时, 竞争性抑制剂的影响就会消失, v_{max} 不会受到影响。
2. b 两底物的酶在体内是常见的。将一种底物的浓度固定, 应用另一种底物的适当的动力学常数, 就可以应用 Michaelis-Menten 方程。因此 b 是错误的答案。
3. a 仔细注意问题中的措词:“ 在稳态中 比 ... 慢 ”。假若某途径处于稳态, 则所有的反应都必须以相同的速率进行。因此, a 是错误的答案。

第 9 章 酶活性的共价调节

9.1 引言

上一章讨论了调节酶活性的非共价相互作用。生物体也利用共价变化以调节酶。在有些情况下,变化是可逆的,如蛋白质的磷酸化作用;在其他情况下,变化是不可逆的,例如利用蛋白质的水解作为活化机制。

9.2 消化作用中的酶原

酶原是一种无活性的蛋白质,专一的蛋白酶解(肽键的水解)使之转变为有活性的蛋白质。当酶必须以无活性的形式贮存而又必须为迅速活化作好准备时,如血液凝固中或酶必须以无活性的形式从其合成部位被运到作用部位时,用的就是这种机制。消化系统对酶原的利用就是后一种情况的精彩事例。消化是使食物中的蛋白质和其他分子分解而又不伤害动物体的组织(图 9.1)。

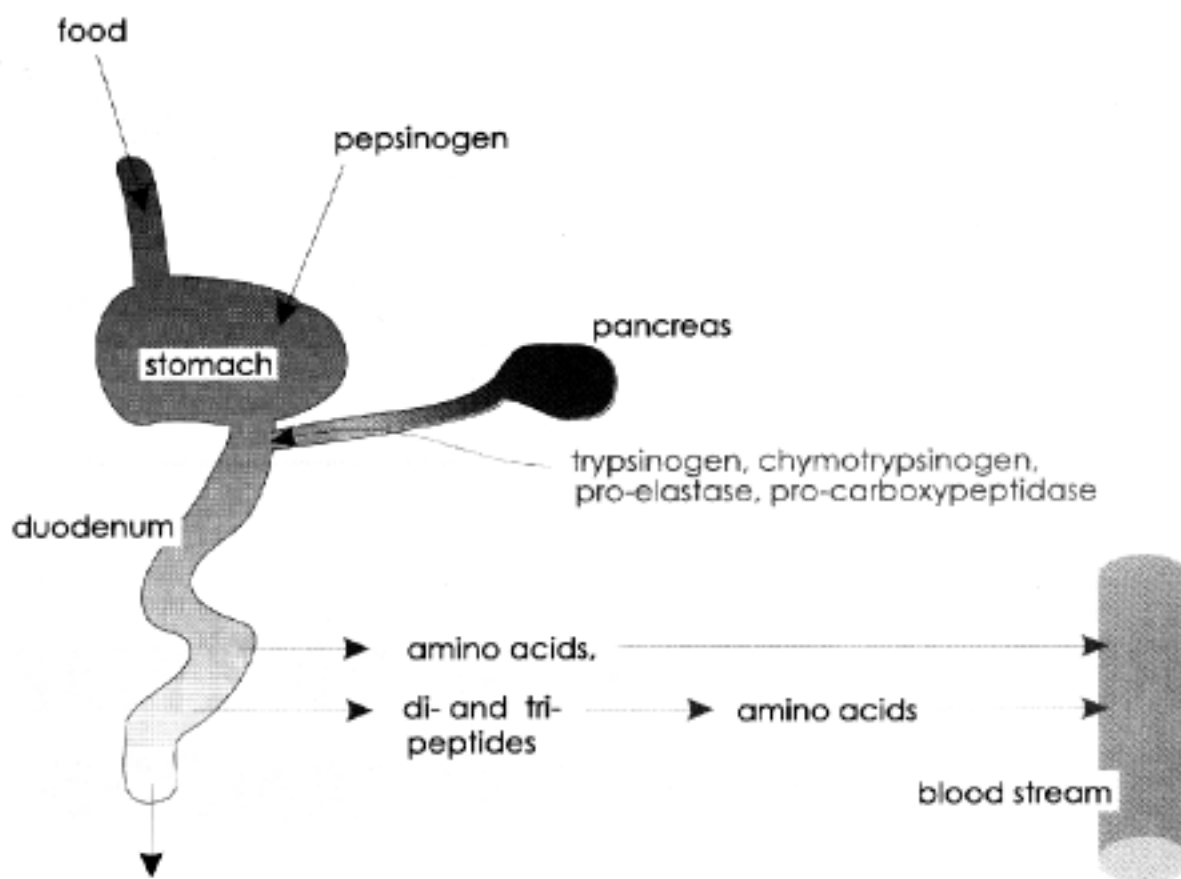


图 9.1 蛋白质的消化

胃、肠和胰脏的示意图(胰与十二指肠之间有胰管连通,箭头所示为氨基酸、肽及其他养分为小肠壁所吸收并运至血流中)。

食物中的蛋白质开始时是由内肽酶分解成小的多肽,内肽酶水解链内的肽键。消化酶对它所要切开的肽键旁边的特定侧链有专一性或者偏爱,但是有种类足够多的蛋白酶将绝大部分蛋白质分解为小的多肽。内肽酶包括胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰糜蛋白酶和弹性蛋白酶。

胃蛋白酶为胃粘膜所分泌。它们在胃中的酸性条件下催化内部肽键的水解。

胰蛋白酶、胰糜蛋白酶和弹性蛋白酶都是丝氨酸蛋白酶,这就是说它们利用丝氨酸残基作为其反应机制中的关键部分。它们都是在胰脏中合成然后被运到或分泌到胰管中,再进入十二指肠。所有的丝氨酸蛋白酶的催化机制都相同,只是活性部位中有微小的差别,使它们对底物的专一性不同。胰糜蛋白酶有一个深的疏水口袋,适于底物上芳香族的或大的疏水侧链;胰蛋白酶在口袋底上有一天冬氨酸残基取代了丝氨酸。带电荷的天冬氨酸欢迎 Lys 或 Arg 侧链而排斥其他侧链,所以胰蛋白酶只在 Lys 或 Arg 处切断肽键。弹性蛋白酶有一小的疏水口袋,因为它的类似胰糜蛋白酶的口袋为 Val 和 Thr 所充满,取代了胰蛋白酶和胰糜蛋白酶中的两个 Gly 残基。

胰液的羧肽酶也是由胰脏分泌的,其作用是在小肠内起一种外肽酶的作用,它每次都从肽的一端切掉一个氨基酸。羧肽酶 A 优先切去羧基端的中性或芳香族的残基;其他羧肽酶则优先切去精氨酸或赖氨酸或其他末端氨基酸。这些外肽酶善于作用于短的肽,在内肽酶停止工作处继续进行消化。肠粘膜吸收氨基酸、二肽和三肽。

肠粘膜中有氨基肽酶,此酶将二肽和三肽完全消化为氨基酸。

胰脏和任何别的细胞一样,对蛋白酶解的破坏作用敏感,破坏会使胰脏中有活性的消化酶分泌出来,从而产生严重的胰腺炎,这常常是致命的。正常情况下,胰脏有3种保护自身的机制:(i)蛋白酶以无活性的酶原形式被合成;(ii)酶原包装在脂蛋白颗粒中;(iii)胰脏合成一种专一的胰蛋白酶抑制剂。

酶原比有活性的酶长,多余的氨基酸或者使底物不能接近其活性部位,或者使此蛋白质处于一种无活性的构象。活化就是酶原中的一个或多个肽键水解。

胃蛋白酶原有41个“额外”的氨基酸残基,这些残基使得此酶原在中性 pH 下完全没有活性。在胃中的低 pH 下,它有微弱的活性,这就使得它能水解其他胃蛋白酶原而产生胃蛋白酶,胃蛋白酶又水解更多的胃蛋白酶原,产生更多的胃蛋白酶。即使在中性 pH 下胃蛋白酶原被裂解,有一些“额外”的氨基酸仍然结合在其上,起着抑制剂的作用,直到 pH 几乎低到2为止。肽对胃蛋白酶原的抑制作用防止胃蛋白酶原攻击胃粘膜,一旦胃蛋白酶原到达了胃内的胃液中,其中的胃蛋白酶和低 pH 就立即产生充分的活性(胃蛋白酶本身的极低的最适 pH 就成为进一步的保护措施)。

肽或者蛋白质的一部分可以结合在酶的活性部位上而抑制之。就蛋白酶而言,抑制剂的氨基酸序列常常与底物相似。这种起抑制作用的序列称为假底物序列。

胰液中的蛋白酶也是以酶原的形式(胰蛋白酶原、胰糜蛋白酶原、弹性蛋白酶原和羧肽酶原)分泌出来的。它们是在胰细胞中合成的,并被脂-蛋白的“外壳”包装成颗粒。这些颗粒聚集在细胞的顶端,再被分泌到胰管中,然后进入肠内。

酶原的稳定性并不强,极少量有活性的胰蛋白酶就能活化胰蛋白酶原,产生更多的胰蛋白酶并引起自动催化反应。胰蛋白酶也活化其他酶原。正常的胰脏保护自身免受这种灾难的办法是用胰蛋白酶抑制剂,一种小肽,它能有效地抑制胰蛋白酶活性。假若胰脏释放的胰蛋白酶超过了此抑制剂所能控制的量,就会发生胰腺炎的症状。胰腺炎与过量饮酒有关,不过还不知

道为什么。

在酶原离开胰管进入肠中后,其正常的活化作用便发生了。肠粘膜分泌被称为肠肽酶(以前称为肠激酶)的高度专一的蛋白酶,将胰蛋白酶原氨基端的一段特定的氨基酸去掉。胰蛋白酶原以 1~3 个非极性残基打头,后面便是 -sp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ile-。天冬氨酸上的 4 个负电荷使得胰蛋白酶原的构象无活性。肠肽酶去掉氨基末端的一段,包括以上序列,到 Lys 为止。这段带有很多电荷的肽掉下去以后,胰蛋白酶的构象就成为有活性的。

同样,胰糜蛋白酶原也是被胰蛋白酶切去 Arg-15 后一段之后而被活化的。活化的胰糜蛋白酶(称为 α -胰糜蛋白酶)又能进一步消化其他 α -胰糜蛋白酶分子产生两种小肽和 α -胰糜蛋白酶。此 α -酶也有活性。

弹性蛋白酶原和羧肽酶原也以类似方式被活化。

9.3 血液凝固中的酶原

血液凝固是这样一种情况:形成血凝块所需要的酶必须存在于血液中并作好准备在血管受到外伤时立即起作用。然而在正常的血管中一定不能形成血凝块,否则就会发生心脏病猝发。凝血系统是复杂的和高度调节的机制,它利用酶原活化的许多步骤,其中有许多丝氨酸蛋白酶的例子。

(一) 血小板

血小板是存在于骨髓中的巨核细胞的胞质碎片。血小板在血流中循环。它们含有线粒体和胞质酶并形成血液中的相当大的部分。血小板彼此粘附在一起并且也粘附在其他表面上,这种性质就称为血小板粘附或血小板凝集。血小板凝集是形成血凝块的初始阶段,与磷脂和专一的凝血因子的释放同时发生,凝血因子引发血液凝固。

(二) 凝固途径

血凝块主要是由相互交联的血纤蛋白分子的网络形成的,此网络收集了血小板、红细胞和其他物质形成一固体凝块。血纤蛋白的聚集和交联是一套蛋白酶级联反应或途径的最后阶段,而这一套反应又是由两种机制或其中之一引发的,这两种机制是:内在途径和外在途径。

内在系统的成分都在血浆或血小板之内。它们因与外部的表面,特别是与胶原,接触而被引发。外在系统则需要更多的成分才能被活化。特别是受伤后释放到血管壁并引发外在系统的一种因素,称为组织因子或组织促凝血酶原激酶。

这两条途径会合,然后导致血纤蛋白的聚集和交联(图 9.2)。这些途径称为蛋白酶的级联,因为这些因子以无活性的酶原状态存在于血液中。每一种因子都因前一种因子而被活化,变成了专一的蛋白酶,它又剪切掉下一个酶原的起抑制作用的部分而使之活化,成为有活性的蛋白酶。这种级联使得初始的极弱的信号放大成产生宏观的结果,就是我们看到的血凝块。

(三) 内在途径

内在途径从因子 X (这些因子以罗马数字定名,有活性的形式加一下缀“a”)开始。因子 X 为其他蛋白质所活化,这些蛋白质包括激肽原和激肽释放酶。然后因子 X_a 活化因子 XII ,

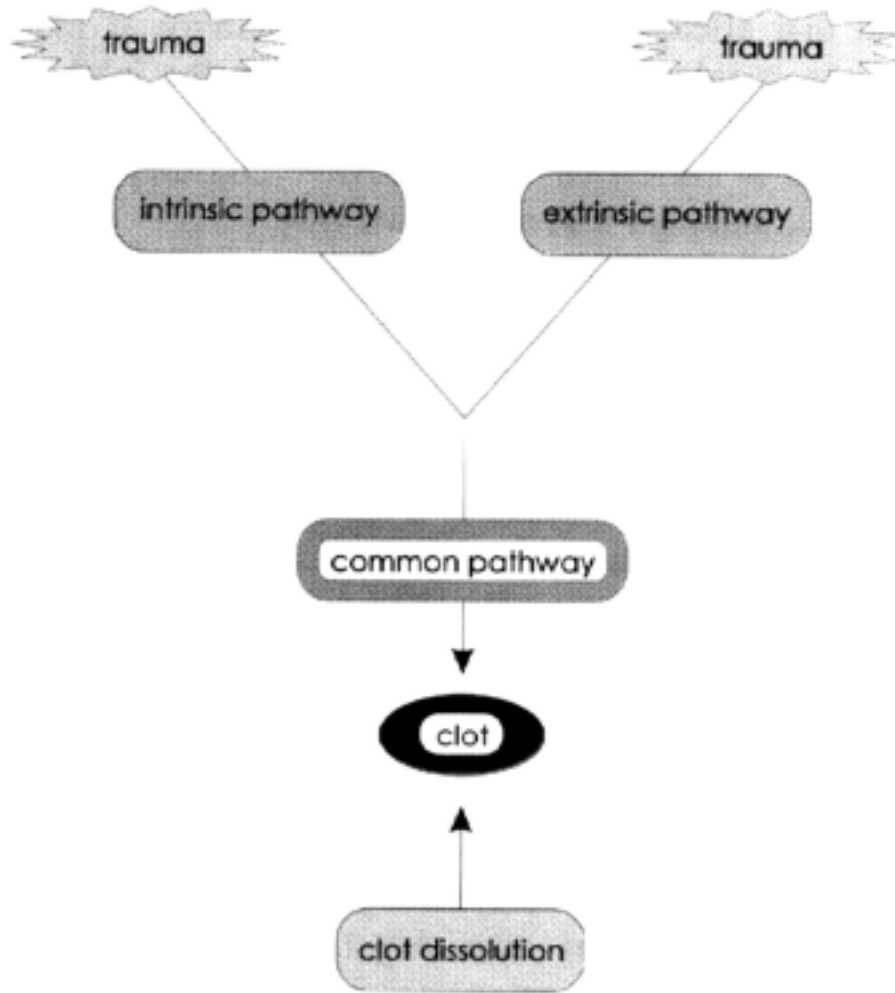


图 9.2 血液凝固途径——概要

它又活化因子_a。因子_a与另一种因子,即因子_a一起,又活化因子_a,两条途径在此处汇合(图 9.3)。

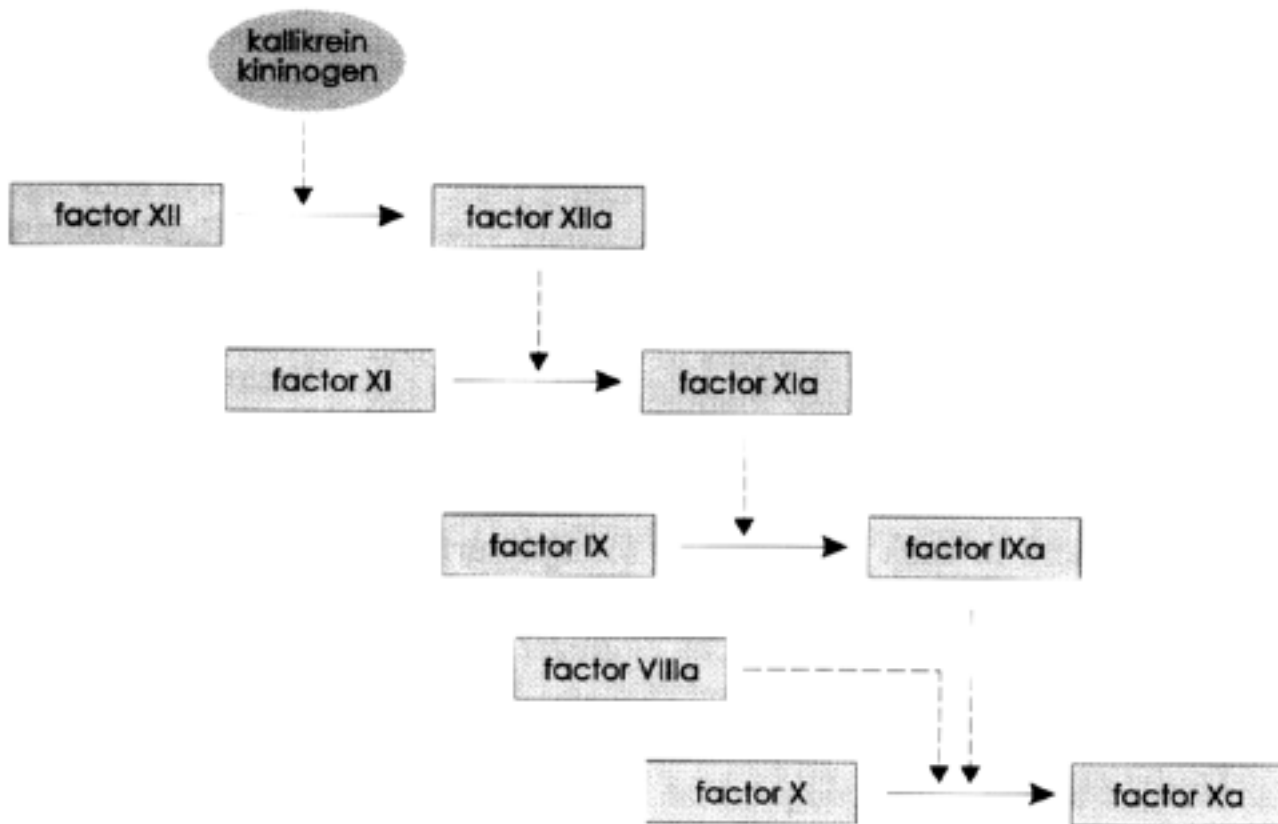


图 9.3 内在途径

实线箭头表示酶促反应,左边的无活性的蛋白因子或酶原有一部分被切掉,形成了有活性的因子;虚线箭头则表示催化这些反应的酶或有活性的因子。

重组 DNA 技术已能克隆因子 VII ，患遗传性的血液病——血友病——的人大多缺乏这种基因。因子 VII 是血液正常凝固所必需的，未接受治疗的血友病患者苦于严重的不能控制的流血。重组的 VII 可用于恢复血友病人血液的凝血活性。

(四) 外在途径

外在途径中，组织因子活化因子 VII 产生因子 VIIa ， VIIa 又活化因子 X 。除去两条途径在因子的活化处汇合外，这两条途径间还有相互作用，因为因子 VIIa 能活化因子 X ，而激肽释放酶能活化因子 VII （图 9.4）。

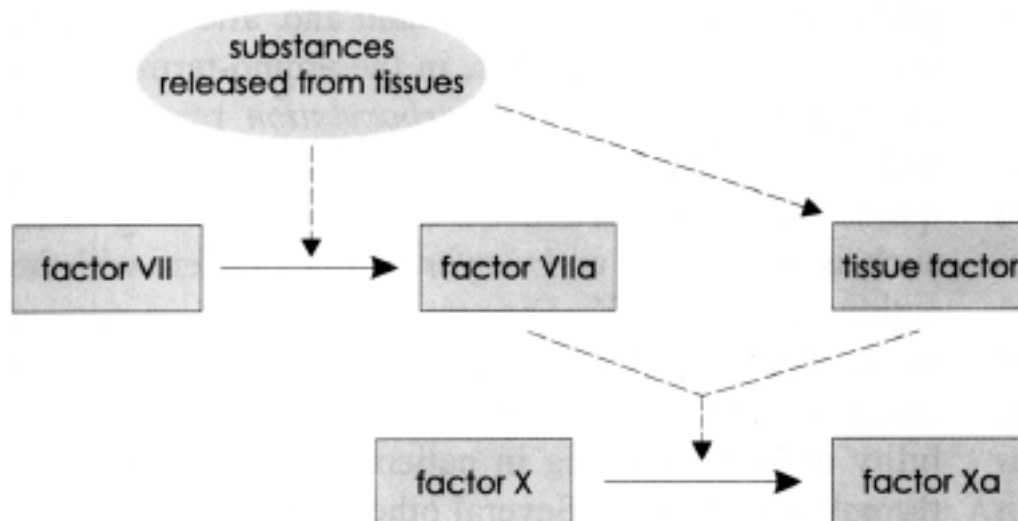


图 9.4 外在途径

实线箭头表示酶促反应，左边的无活性的蛋白因子或酶原有一部分被切掉，形成了有活性的因子；虚线箭头表示催化这些反应的酶或有活性的因子。

(五) 共同途径

对共同途径各阶段的了解比对以前一些阶段的了解要多得多，因为各种因子的浓度要高得多，因而较易研究。第一个阶段是因子 X 的活化（图 9.5）。

(六) 因子 X

因子 X 是丝氨酸蛋白酶，像激肽酶、凝血酶和几种其他因子一样。丝氨酸蛋白酶是一类蛋白酶家族的一个成员，这个家族有共同的催化机制但对其所剪切的氨基酸序列的专一性不同。丝氨酸蛋白酶的其他例子包括胰蛋白酶、胰糜蛋白酶和弹性蛋白酶。共同的催化机理包括酶的活性部位中有一个丝氨酸。这一丝氨酸的—OH 与断裂的多肽链形成一共价的中间产物。

因子 X 与血小板聚集所释放的磷脂膜结合。因子 X 在两个专一位点上切割凝血酶原，产生有活性的凝血酶。

(七) 凝血酶原和凝血酶

凝血酶原有两个域。羧基端域为催化域，因子 X 的作用使之释放。氨基端域有双重功能：(i) 抑制催化域的蛋白酶活性；(ii) 使凝血酶原结合到含有因子 X 的同一磷脂表面。由

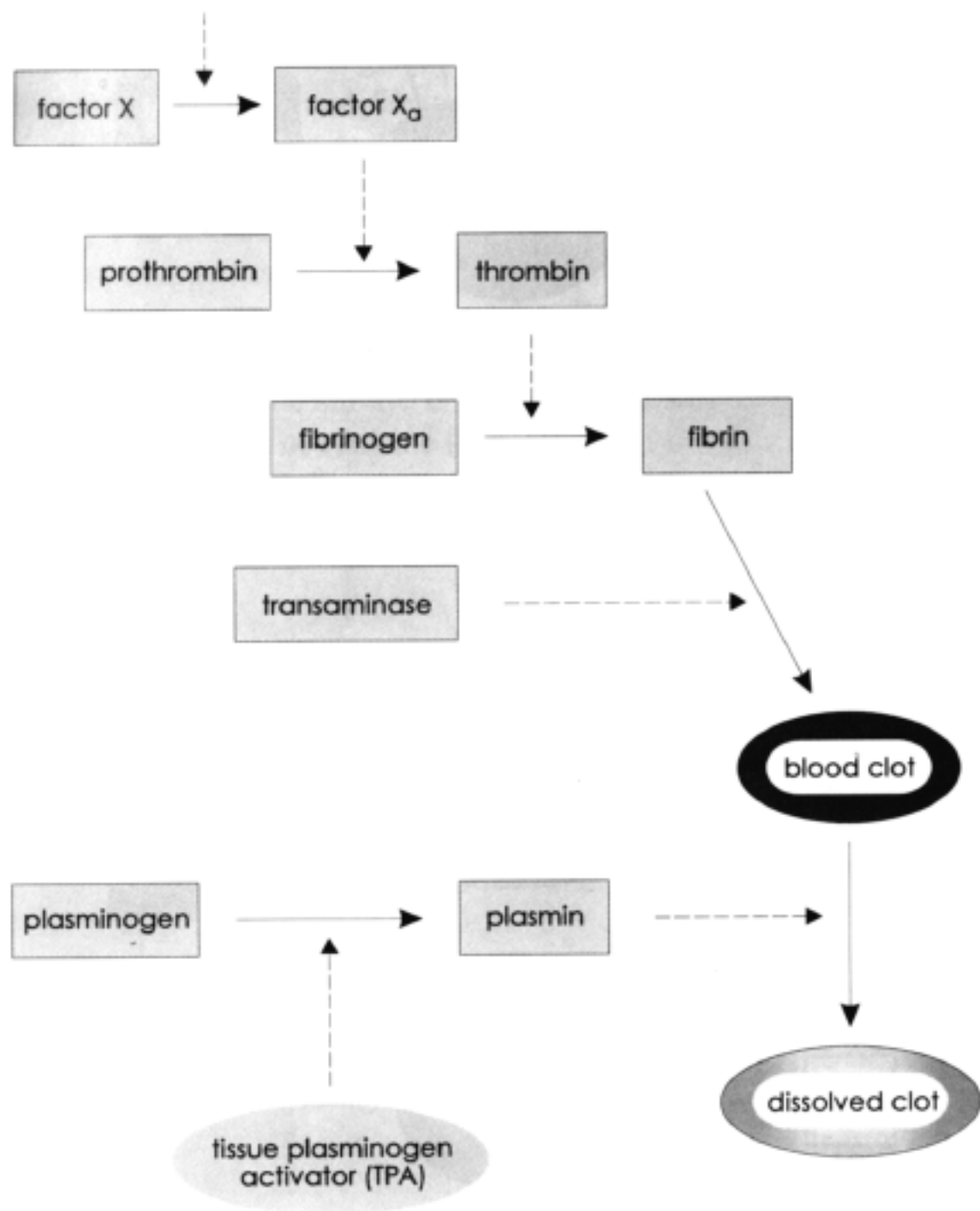


图 9.5 共同途径

实线箭头表示酶促反应,左边的无活性的蛋白因子或酶原有一部分被切掉,形成有活性的因子;虚线箭头表示催化这些反应的酶或有活性的因子。图
示血凝块的形成和溶解。

此而产生的因子 X_a 与凝血酶原的接近是其发生有效作用所必需的(图 9.6)。凝血酶原与磷脂表面的结合是由 Ca^{2+} 介导的,因为 Ca^{2+} 一方面与磷脂紧密结合,另一方面又与凝血酶原中异常的残基 γ -羧基谷氨酸(图 9.7)结合。没有 γ -羧基谷氨酸,凝血酶原与磷脂结合得不牢固,因而不能有效地被因子 X_a 所活化。用与 Ca^{2+} 结合的化合物,如柠檬酸或 EDTA 将血液中的 Ca^{2+} 除去(螯合)也会得到类似的结果。为了抑制从病人体内抽出的血液样品凝固,常用这些试剂。

γ -羧基谷氨酸是翻译后合成的,也就是在合成了氨基酸长链中有谷氨酸的凝血酶原之后,氨基端域中专一的谷氨酸残基又被羧化反应所修饰,加上了一个羧基。羧化反应需要维生素 K,因此它对维生素 K 的拮抗物敏感,如双香豆素和杀鼠灵都会干扰维生素 K 的作用,是拮抗物。双香豆素存在于腐烂的甜苜蓿中,杀鼠灵是常用的杀鼠药。对于易形成血栓的病人,临床

上也可以用类似的拮抗物减轻病人血液凝固的可能性。还有几种其他的凝血因子也含有 γ -羧基谷氨酸, 它们也会受到维生素 K 拮抗物的影响。

凝血酶原与磷脂的结合可因 EDTA(乙二胺四乙酸)螯合 Ca^{2+} 而被抑制, EDTA 能螯合

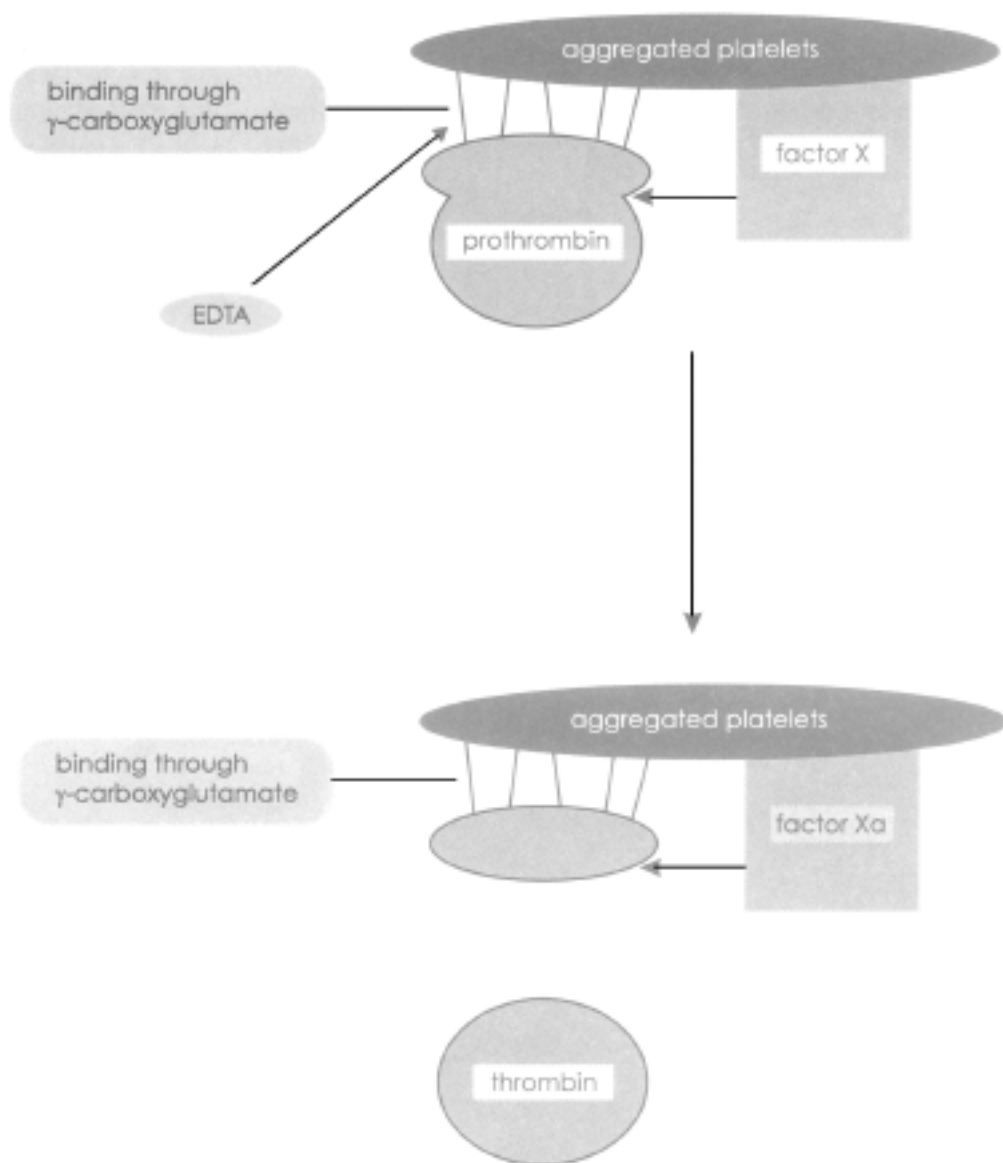


图 9.6 凝血酶原的活化

上半表示血液凝固的共同途径被活化前的情况: 凝血酶原通过静电作用连接在血小板上, 这种连接可被 EDTA 破坏; 下半表示血液凝固的共同途径被活化; 因子 X 已被活化, 变成了因子 X_a, X_a 立即作用于相邻的凝血酶原分子并使凝血酶被释放到血浆中。

Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 并抑制血液凝固的几个阶段; 它也可用于抑制血液样品的凝固。凝血酶可被肝素抑制, 肝素是一种复杂的多糖, 存在于血管壁和其他组织中。肝素的作用是促进凝血酶与抗凝血酶的相互作用。抗凝血酶是存在于血浆中的一种蛋白质, 它与凝血酶结合并阻止凝血酶对其他蛋白质起作用。凝血酶与抗凝血酶的平衡对于凝血系统的正常运作至关重要。肝素在临床上可用于防止血液凝固。

凝血酶在几个 γ -Gly-部位剪切血纤蛋白原, 并将其转变为血纤蛋白。血纤蛋白原的剪切产生血纤蛋白和几种血纤肽。血纤蛋白中血纤肽的作用是保证血纤蛋白

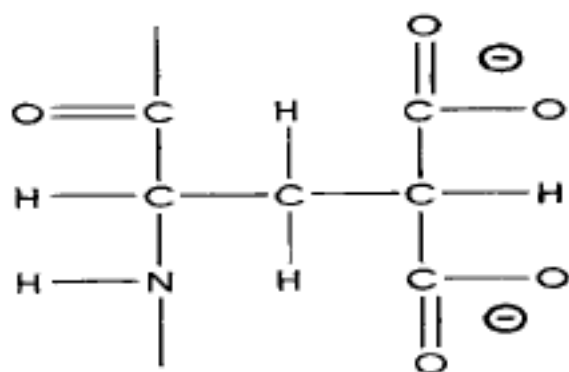


图 9.7 γ -羧基谷氨酸

额外的羧基(右上角)加到蛋白质中的谷氨酸上, 结构左侧为多肽主链的一部分。

原分子分散开, 从而防止它们聚集到一起。这是由于血纤肽中的谷氨酸、天冬氨酸和酪氨酸硫酸酯残基上负电荷的静电斥力而造成的。去掉血纤肽就会使留下的血纤蛋白迅速聚集到一起。酪氨酸硫酸酯是酪氨酸的翻译后不寻常修饰的产物(图 9.8)。

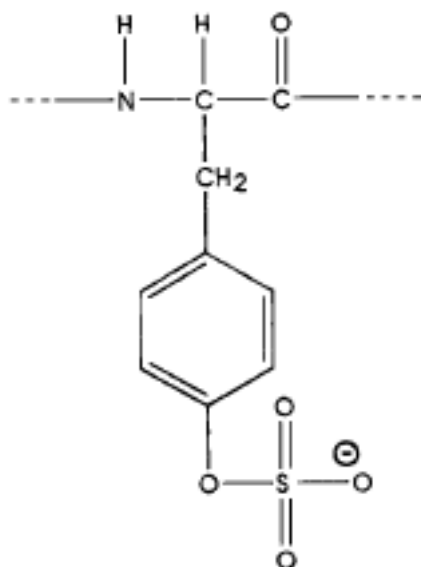


图 9.8 酪氨酸硫酸酯

硫酸基团加在蛋白质中的酪氨酸残基上, 结构上方为多肽主链的一部分。

聚集在一起的血纤蛋白分子形成疏松的血凝块。转酰胺基酶(因子 a)的作用使它变成硬块, 此酶使血纤蛋白链之间形成不寻常的共价的交联。Lys 和 Gln 残基连接起来, 同时释放氨(图 9.9)。

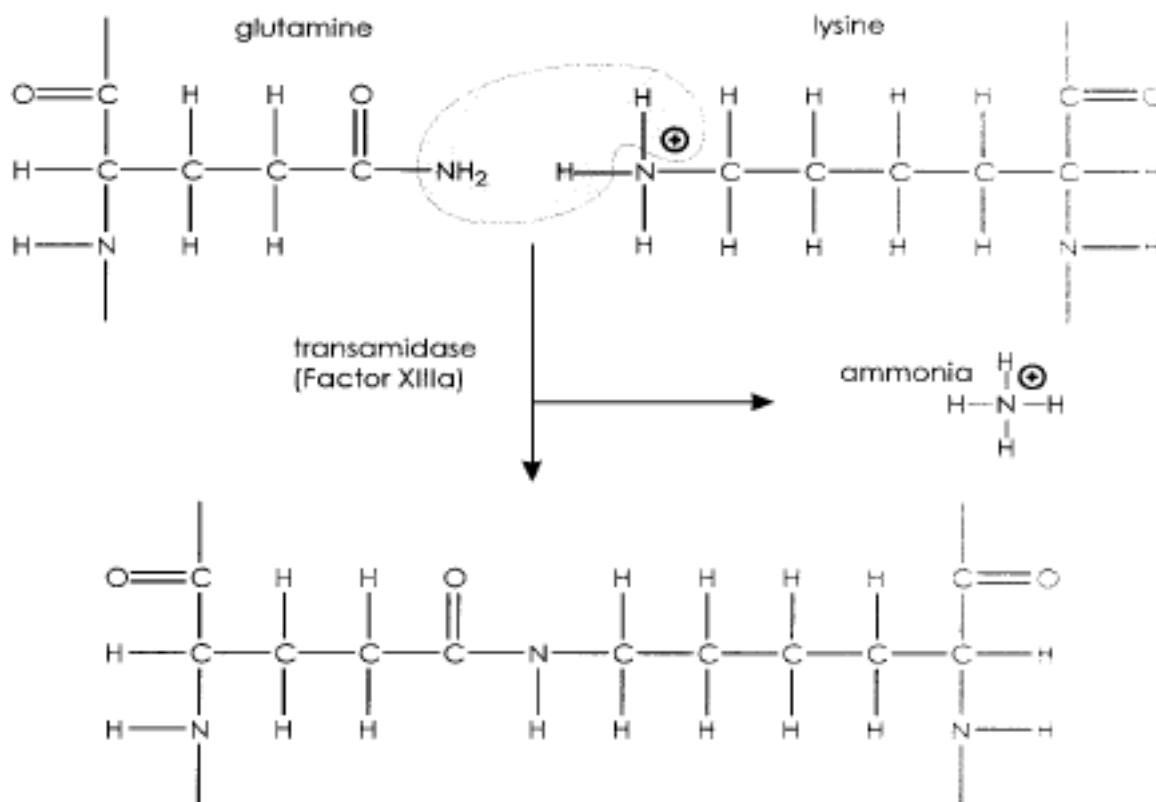


图 9.9 血纤蛋白的交联

(a) 两个分开的血纤蛋白分子(分子的最左和最右边是多肽主链, 左边的血纤蛋白分子有一个谷氨酸侧链, 右边的有一赖氨酸侧链); (b) 同样两个血纤蛋白分子, 但两个侧链已被一个异肽键连接起来, 形成共价交联(此反应释放氨, 此反应由转酰胺基酶催化)。

(八) 纤溶酶原和纤溶酶

血凝块最终是要溶解的。其机制包括纤溶酶消化交联的血纤蛋白的作用, 纤溶酶是另一种丝氨酸蛋白酶, 通常以纤溶酶原的形式存在。纤溶酶原为组织类型的纤溶酶原活化剂 (TPA) 所活化。TPA 仅能有效地作用于粘附在血凝块上的纤溶酶原。因此, 它不影响在血液中游离的纤溶酶原。

近年来已有供临床应用的称为活化酶的 TPA, 因为利用重组 DNA 技术在哺乳动物细胞中进行生产。临床上利用活化酶溶解血凝块。

9.4 酶的可逆的共价修饰

我们已经看到别构控制怎样提供反馈调节以维持体内的秩序并对其需要作出响应。别构控制是可逆的, 同样类型的共价调节也是对氨基酸侧链的可逆的修饰。有些酶直接受到这两种类型的控制。特别常见的蛋白质的修饰是丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化, 而酪氨酸的磷酸化则是许多控制机制中的关键部分。下面讨论的是蛋白质的磷酸化。还存在许多其他类型的蛋白质的修饰——有些是可逆的, 有些是不可逆的。

酶的可逆的共价修饰在控制代谢、细胞生长和分裂、对激素的响应以及其他过程方面都是重要的。细胞中存在的可逆的侧链修饰的类型有许多, 例如:

- (1) 氨基酸侧链的磷酸化, 有丝氨酸、苏氨酸、组氨酸和酪氨酸;
- (2) 氨基酸侧链的 ADP-核糖基化(腺苷二磷酸核糖基化);
- (3) 赖氨酸残基中氨基的乙酰化。

这里列举的并不完全。此外, 许多侧链和 N-或 C-端的修饰是不可逆的。

在可逆修饰的情况下, 蛋白质最少有两种存在形式, 名为 o-(原来的未修饰的) 和 m-(修饰过的)。还有两类酶实际上是进行修饰的: 一类加以修饰, 例如蛋白激酶; 另一类去掉修饰, 例如蛋白磷酸酶。利用不同的酶进行修饰和去掉修饰就提供了一种控制修饰程度的机制。

一般来说, 修饰所以影响酶的活性, 或是直接的, 或是改变了酶对别构效应的应答。常常称酶的活化的形式为“a”, 而失活的形式为“b”。

(一) 共价修饰的放大

酶的直接别构控制(别构调节物与被调节的酶直接发生相互作用)和通过共价修饰的控制的主要区别在于:

- (1) 共价修饰系统能把调节物的效应放大, 既可催化放大, 又可级联放大。
- (2) 共价修饰系统有较大的能力进行生物学整合。

这两种控制系统都会使受控制的酶处于一种稳态, 有一些有活性的分子, 有一些无活性的分子, 而这种稳态又会由于代谢物水平的改变或外界的刺激而改变。在很少的情况下, 酶会完全失活(关闭)或全都有活性(打开); 一般是把稳态调控到一种活性形式和失活形式的平衡状态, 使其总的活性在完全有活性和完全失活之间的某种状况下。

当一种酶要修饰许许多多, 比如说 N 个, 被控制的分子时, 就发生催化放大。因此, 当一个起调节作用的分子可以影响 N 个被控制的酶分子时, 放大因子为 N。例如, MAP 激酶活化核糖体 S6 激酶(Rsk) 这种蛋白质; 每一个分子 MAP 激酶可以磷酸化许多个 Rsk 分子, 这就

是催化放大(图 31.13)。

当一种以上的共价修饰依次发生时,就会有级联放大。例如, Mek 通过磷酸化而活化 MAP 激酶。一个 Mek 分子活化许多个 MAP 激酶,每一个 MAP 激酶又可以活化许多个 Rsk 分子。假若 Mek 的放大是 N 倍,而 MAP 激酶的放大是 M 倍,那么总的级联的放大就是 $N \times M$ 倍。例如,若 $N = M = 100$,那么总的放大就是 10 000 倍。级联极易扩大,所以 5 个阶段的级联,每个阶段放大 100 倍,那么潜在的总的放大倍数就是 100^5 或 100 亿。

假若级联中的一种酶被修饰了,例如通过其基因的突变被修饰,于是它就变得具有了固有的活性(即不依赖于级联中前一种酶对它的活化),那么这一套级联的反应就会失控。癌中发生的就是这种变化,其中具有固有活性的组分就是导致癌变的癌基因(第 30 章)。

生物体趋向于将别构调节用于细胞内在数秒或更短时间内起作用的控制机制。共价修饰则用于胞内或胞外的机制,而且即使在细胞之内,这种修饰也常常是胞外信号所引发的信号传递过程的一部分。虽然以共价修饰为基础的某些系统发生响应非常快,但其他一些则响应要慢得多,要在数分钟而不是数秒钟之后才能看见效应。

9.5 小 结

- (1) 酶中的共价变化是重要的调节机制,与非共价的别构调节有互补性。
- (2) 共价变化可能是可逆的——典型的是去掉 N-端的序列使酶活化,因为该序列使酶处于失活状态。这种酶的无活性的状态就是酶原。
- (3) 胰脏中酶原对于产生消化酶是至关重要的。产生酶原可以保护胰脏正常,免于自消化。当酶原离开胰管并为消化蛋白质和其他食物分子所需要时,就被活化。
- (4) 酶原的活化作用可以级联起来,例如血液凝固中那样。
- (5) 级联使得连在一起的放大作用增加许多倍,使得很小的初始事件变成为非常迅速的大规模的放大。
- (6) 血液凝固始于血小板的聚集和两条途径——内在的和外在的——的活化,这两条途径汇合成共同途径。共同途径以一种酶原即因子 的活化开始,产生因子 a 。 a 又活化另一种酶原,凝血酶原,而产生凝血酶。然后凝血酶剪切血纤蛋白原,产生血纤蛋白,血纤蛋白形成血凝块。
- (7) 血凝块为纤溶酶所消化,组织纤溶酶原活化剂将血纤酶原活化为纤溶酶。现在此活化剂已经是一种溶解血凝块的药物。
- (8) 共价的变化可以是可逆的,这种变化中最重要的一类就是蛋白质的磷酸化,它发生在几种侧链上,这些侧链有丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。
- (9) 蛋白质磷酸化的级联与许多种胞内的信号传递途径有关。

参 考 资 料

- Introduction to the blood coagulation cascade and the cloning of blood coagulation factors, E. W. Davie, 1986, J. Prot. Chem., 5: 247 ~253.
- Growth factors and cancer, S. A. Aaronson, 1991, Science, 254: 1146 ~1153.
- The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity, P. Cohen, 1982, Nature, 296: 613 ~620.

Molecular and Cellular Basis of Digestion, P. Desnuell, H. Sjorstrom, and O. Noren, (Eds.), 1986, Elsevier, New York.

PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface, M. A. Lemmon, K. M. Ferguson and J. Schlessinger, 1996, Cell, 85: 621624.

Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, L. N. Johnson, M. E. Noble and D. J. Owen, 1996, Cell, 85: 149 ~158.

复 习 题

1. 杀鼠灵(一种维生素 K 的拮抗物)的作用是什么?
 - a) 抑制凝血酶原的翻译后修饰
 - b) 迅速溶解血凝块
 - c) 仅仅影响内在的凝血途径
 - d) 抑制酪氨酸硫酸酯的形成
 - e) 促进因子 对凝血酶原的裂解
2. 胰腺炎中哪种酶原不是过早地被活化了?
 - a) 胰蛋白酶原
 - b) 胰糜蛋白酶原
 - c) 胃蛋白酶原
 - d) 羧肽酶原
 - e) 弹性蛋白酶原
3. Raf-Mek 途径对 MAP 激酶的活化被称为级联反应的主要理由是什么?
 - a) MAP 激酶为磷酸化作用所活化
 - b) Ras 促进此途径
 - c) 具有内在酪氨酸激酶活性的生长因素受体引发 MAP 激酶的活化
 - d) 在 Raf-Mek-MAP 激酶活化途径中有两个相继发生的磷酸化活化步骤
 - e) Mek 是一种蛋白激酶

参 考 答 案

1. a 包括凝血酶原在内的许多种蛋白质都发生翻译后的修饰,即 γ -羧基谷氨酸的形成,此反应需要维生素 K。因此, a 是正确答案。
2. c 胃蛋白酶原是在胃壁中合成并在胃中被活化的。这与胰脏的酶毫无关系,胰脏的酶是在胰中合成并运至胃以下的消化道中的。胰炎对胃蛋白酶原的活化没有影响。习题中的所有其他酶原都是在胰中合成的。
3. 所有这些说法都正确。应用级联一词的理由是有一种以上的催化性活化依次发生作用,此题中 Raf 磷酸化 Mek,使之活化并让它磷酸化 MAP 激酶,从而使之活化。这种级联式的排列能够将原来的信号进行大规模的放大。

第 10 章 细胞骨架和胞外基质中的蛋白质

10.1 引言

蛋白质在细胞结构中起着主要的作用,它们产生肌肉收缩,控制细胞的形状和运动,并提供细胞的外部环境。

10.2 细胞骨架

真核细胞有许多丝状结构,这些结构决定细胞的总的形状,使细胞能够运动,并且形成了细胞质内的结构,许多细胞中的事件都在这种结构上发生。这种结构非常复杂,涉及千百种不同的蛋白质,称为细胞骨架。细胞骨架中的丝分为 3 类:微管、微丝和中间丝。

(一) 微管

微管是由微管蛋白构成的。它们在组织细胞质方面起着重要作用,而且是一种基底,蛋白质和小泡可在其上从细胞的一个部分主动转运到另一个部分去。在全身的细胞中均有微管,在脑的神经细胞中尤为显著。

每一个微管蛋白分子是由 α -微管蛋白和 β -微管蛋白组成的杂二聚体。微管蛋白基因由 α -和 β -微管蛋白基因的一个小家族组成,这两种微管蛋白大概各有独特的功能。不过微管的形成则是所有微管蛋白的共同的功能。微管是长的、细的、中空的筒或管,直径 25 nm。管的壁由 13 根长的、细的原丝组成,原丝并排在一起,从一端看去,是一个十三边的多角形,大概是一个筒状结构。每一条原丝是 α -和 β -微管蛋白亚基沿着原丝相互交替而组成的线。所以,原丝的一端是 α -微管蛋白分子,而另一端是 β -微管蛋白分子。原丝以平行的方式(与反向平行相反)排列着,所以微管的一端是一个长的 α -亚基的螺旋的开头,该螺旋每转 13 个残基——从一端看去,它就像 13 个亚基的环。同样,另一端是 β -亚基长螺旋的开始,从另一端看去,也像是 13 个亚基的环。两端的行为是不同的(图 10.1)。

除去纤毛和鞭毛中高度稳定的微管而外,大多数微管都是不稳定的结构;它们有动态的不稳定性。它们在细胞中连续不断地伸缩。因此,微管的生命就由起始、延伸和缩短(也称为成核、聚合和解聚)组成。可能有几个循环的聚合和解聚,但解聚常常是完全的,使得一条微管的寿命相当短。另一方面,微管蛋白分子寿命却长,可参与许多个微管的构成。微管的寿命因细胞的类型而异,在神经细胞中相当长,因为神经细胞有稳定的结构;在成纤维细胞中则相当短,此种细胞存在于结缔组织中,对于像组织受伤这样的变化响应迅速。

微管从两端生长或收缩。不过,一端是“正”端,比另一端即“负”端变化得快得多。聚合的 α -管蛋白由于其 N-端的酪氨酸被除去和专一的赖氨酸残基被乙酰化而慢慢地被修饰。当 α -管蛋白聚合后这些修饰积累起来,而当 β -微管蛋白被解聚时则这些修饰迅速被除去。将微管蛋白加到生长中的一端时需要辅因子 GTP 结合在微管蛋白上。GTP 的水解并不是加成过程的一部分,但之后不久,它就被水解了。微管蛋白中 GTP 的存在使微管稳定;GDP 则使它不

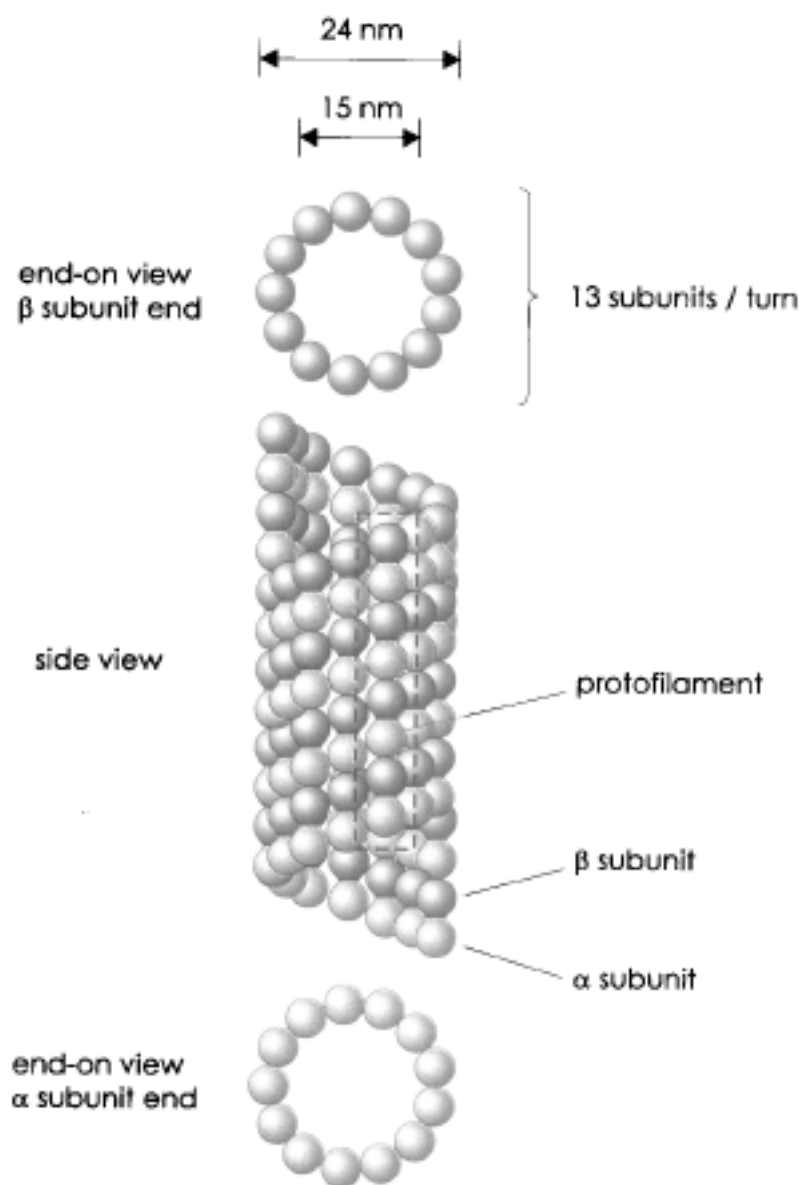


图 10.1 微管

微管为微管蛋白排列而成, 每个微管蛋白分子是 α -亚基(浅色)和 β -亚基(深色)的二聚体。

稳定。因此, 假若生长速率慢下来, 在下一个微管蛋白加上去之前就形成了 GDP, 微管就会趋于缩短, 而微管中“老的”微管蛋白上 GDP 的存在就会使缩短成为一个快速的过程, 结果是微管的收缩(图 10.2)。微管可因蛋白质结合到末端上而稳定化。

因为有丝分裂中染色体在纺锤体上的分离需要微管, 所以干扰微管的聚合和解聚的药物就可用于有选择地攻击处于有丝分裂中的细胞。这是治疗癌症的策略之一, 像长春花碱和长春花新碱这样的药物是破坏纺锤体微管的, 紫杉醇则使微管稳定化, 它们都可用为抗癌药物。

(二) 微管相关蛋白

微管蛋白以外的许多种蛋白质也结合在微管上。这些蛋白质统称为微管相关蛋白或 MAP(这同一缩写 MAP 也用于促分裂原相关蛋白——对促分裂原发生响应的蛋白质, 分裂原是使细胞增殖加快的因素)。微管的 MAP 可分为两大类: 高分子量的一类和低分子量的一类, 前者有 MAP-1、MAP-2 等等, 后者称为 tan 蛋白类(微管聚合蛋白)。MAP 类结合在整条微管上并帮助微管与细胞的其他组分联系。它们也结合在几个微管蛋白分子上, 从而有助于微管形成的开始, 它们也会使微管稳定。目前对于 tan 蛋白及其磷酸化在 Alzheimer 氏病中的可能作用十分关注。

微管也是细胞内分子和小泡主动转运的通道。转运是由依赖于微管的动力蛋白即胞质动

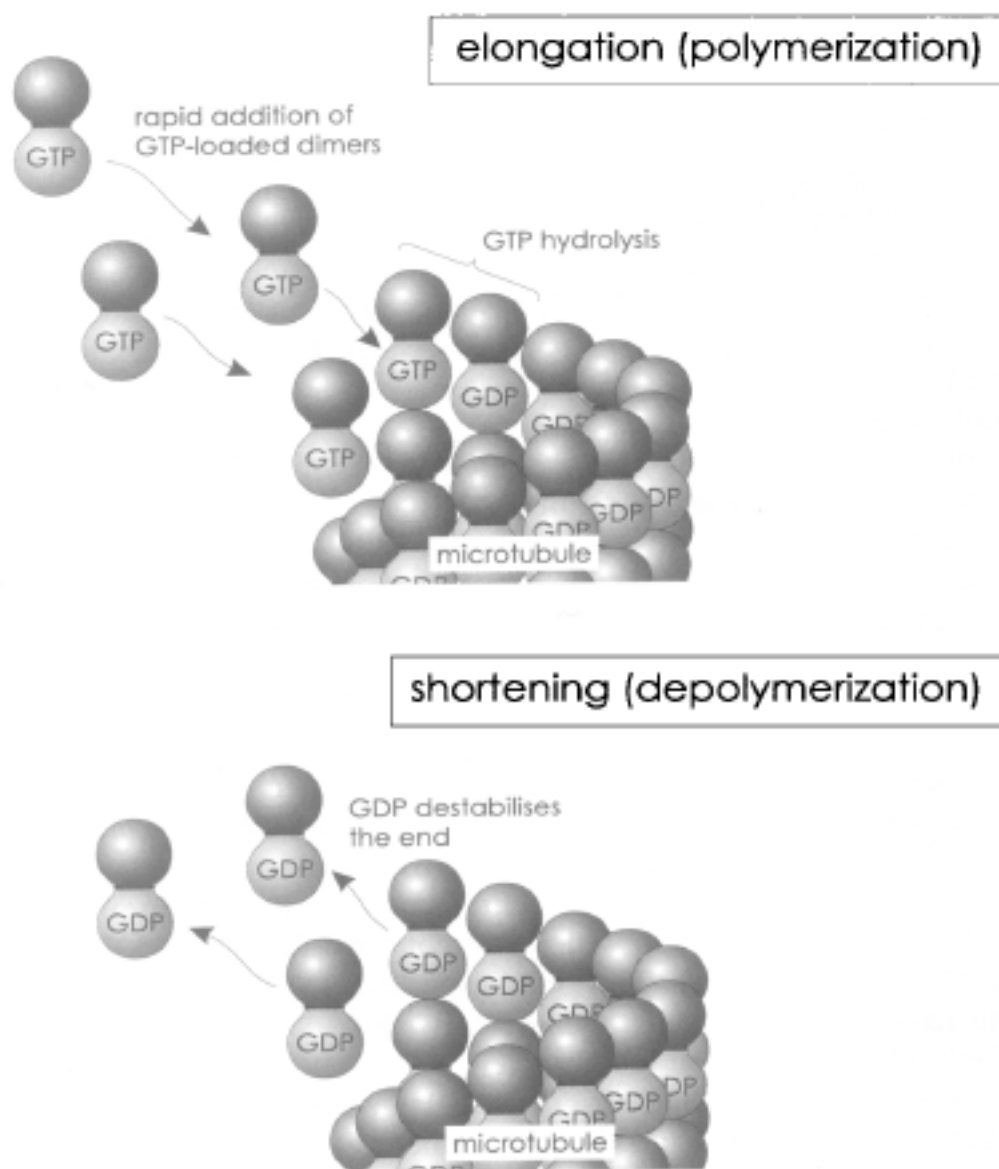


图 10.2 GTP 水解和微管

(a) 微管的延伸过程, 带有 GTP 的微管蛋白分子加到生长中的末端上; (b) 微管的缩短过程, 带有 GDP 的微管蛋白分子解离。

力蛋白和驱动蛋白进行的。胞质动力蛋白与纤毛虫和鞭毛生物中的纤毛动力蛋白极为相近。各种不同的驱动蛋白, 在某种程度上还有动力蛋白都与不同的细胞过程有关, 这些过程如有丝分裂中染色体的分离, 通过细胞质的转运等。发生细胞质中的转运时, 动力蛋白的一部分连在微管上, 另一部分则连在蛋白质复合体或细胞器上, 即连在“货物”上。由 ATP 的水解推动的构象变化使动力蛋白, 带着“货物”, 沿着微管运动。驱动蛋白将“货物”向微管的正端运送; 动力蛋白则向负端运送。因为微管常常是在细胞中的专一位置起始的, 所以微管的方向就反映了细胞的组织, 而因此微管也为运输指出了方向和提供了空间的途径。

(三) 肌动蛋白丝

肌动蛋白是一种丰富而又独特的蛋白质。它既以稳定的螺旋丝状而存在, 也以不稳定的结构状态存在于细胞中, 并与单体一道存在。单体形式是分子量为 42 000 的球状蛋白质, 称为 G-肌动蛋白。在生理条件下, G-肌动蛋白的单体自动聚集形成细而长的螺旋, 即肌动蛋白丝, 这种丝状的形式称为 F-肌动蛋白。肌动蛋白是一个小家族, 其序列大多是高度保守的。这一家族中的成员有组织专一性, α -肌动蛋白存在于肌肉细胞中, β -和 γ -肌动蛋白存在于非肌肉细胞中。在非肌肉细胞中, 肌动蛋白丝存在于整个细胞中, 但集中在细胞外层内的质膜附近。

和微管一样,肌动蛋白丝也是从两端延伸或收缩,但一端变化得比另一端快一些。对于肌动蛋白丝,这种两端的差异要大一些,正负两端常分别称为有刺毛端和尖端,因为肌动蛋白丝在电子显微镜下呈箭形。肌动蛋白丝也像微管一样是动态的,但又与微管不同,微管的动态是踏车式的,肌动蛋白单体在一端加上去,在另一端又被移去。这样,丝中的肌动蛋白单体连续不断地被取代,而丝本身则处于长度恒定的稳态之中。

细胞中肌动蛋白丝的聚合和组织是由一大类不同的肌动蛋白-结合蛋白所控制的。例如,抑制蛋白就是结合在质膜上的,它有助于肌动蛋白丝形成的开始。其他与肌动蛋白结合的蛋白质,如 β -辅肌动蛋白,则将肌动蛋白丝连接到质膜上。

细胞中称为肌动蛋白外层的成排的肌动蛋白丝,能够对许多通过质膜传递的信号迅速作出响应。例如,T细胞识别受感染细胞表面上的抗原。当有细胞毒素的或称杀伤T细胞与抗原结合时,所产生的信号——在T细胞中产生——就会引起肌动蛋白外层的重组,随后就是微管的运动,最后是高尔基体的运动,这些运动然后就能有效地把有毒产物外运到靶子中(图10.3)。同样,血液中的其他白细胞,嗜中性粒细胞,也有受体,对专一的细菌产物,即N-甲酰

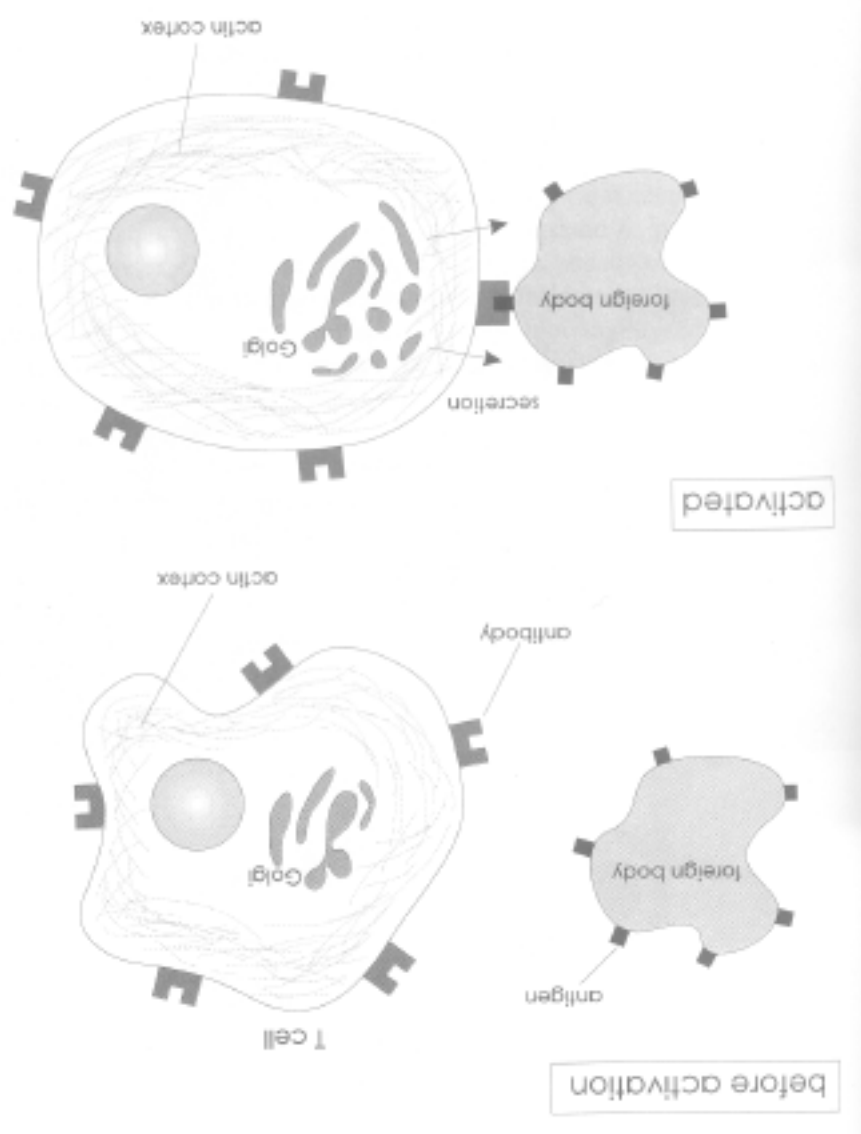


图 10.3 杀伤 T 细胞的活化

化称为异物的细胞,可能是一受染的细胞,其表面上有抗原;T细胞有类似抗体的分子在其表面上,抗体识别并与抗原结合(结合后,类似抗体的分子向细胞内发出信号,表明它已结合了抗原,于是各种变化就发生了)。此图表明肌动蛋白外层中发生的变化使高尔基体接近于已被结合的抗原,因而可将毒素外运以杀死被感染的细胞。

的肽, 发生响应。当受体被引发时, 肌动蛋白外层就极化, 而细胞则由于趋化性而移向细菌产物浓度高的区域。这些变化是通过与 Ras 相关的 G-蛋白的活化而引发的(见第 30 章)。

(四) 中间丝

中间丝是中等纤维蛋白质的组装体, 包括角蛋白、结蛋白丝、波形蛋白丝、核纤层蛋白和神经丝。它们使动物细胞的机械强度增加。这些丝的直径(约 10 nm) 介于细的肌动蛋白丝(约 7 nm) 和较粗的微管(约 25 nm) 之间。胞质中间丝的网络存在于大多数动物细胞的整个细胞质中, 围绕着细胞核处稍多一些。核纤层蛋白形成一中间丝的网络(核纤层), 仅存在于核膜之内。

每一中间丝蛋白都有一个球状的头部和一个尾部域, 中间由一长的 α -螺旋域连接起来。 α -螺旋域有许多个由 7 个氨基酸组成的序列的重复。因为一个 α -螺旋在 7 个残基内只有两个转角, 所以这 7 个残基的重复区内的每一个残基都会围着螺旋转。因此, 假若两个这样的有 7-残基重复的螺旋彼此发生侧链间的疏水相互作用, 它们就会慢慢地彼此缠绕起来。这种结构就称为 α -螺旋的卷曲螺旋, 在重复区的第 1 位和第 4 位上疏水残基的存在使这种结构稳定化了。中间丝就是由卷曲螺旋构型中成对的蛋白质建造起来的。这些对中每两对又结合在一起, 呈反向平行的、交错的构型。在发生交叠处, 更多的对又可以加上来(图 10.4)。

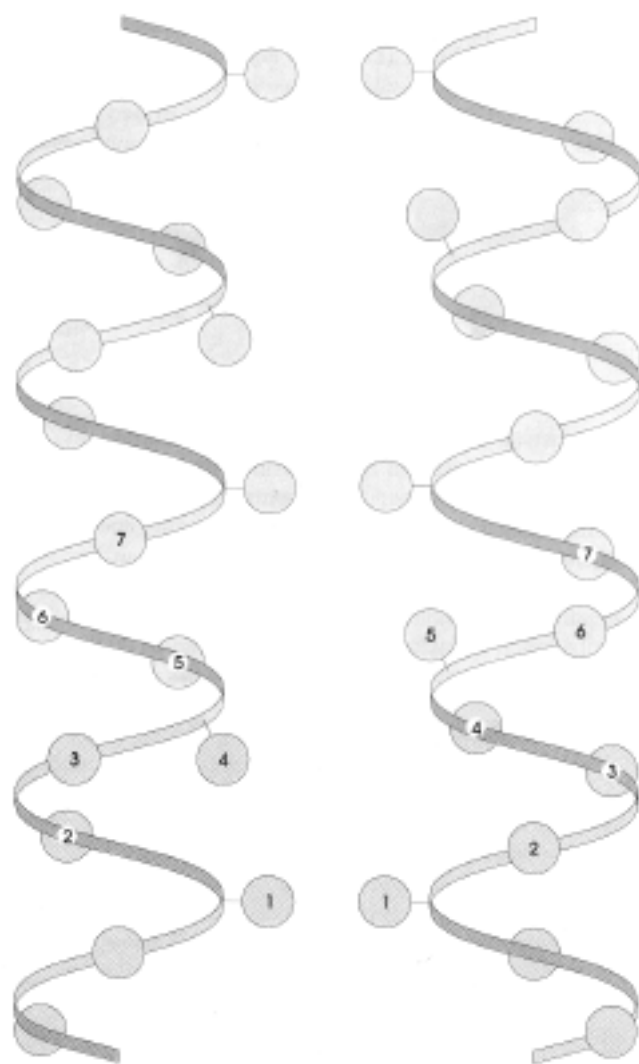


图 10.4 卷曲螺旋

两条带各代表一条 α -螺旋, 圆圈为氨基酸侧链。两条 α -螺旋彼此平行, 侧链的编号表明每到第 7 个侧链就大致重合了, 可以发生密切的相互作用。实际上, 这两条链彼此缠绕在一起, 成一疏松的双螺旋, 使得第 7 个氨基酸残基能够配合得更准确。

中间丝是相当稳定的。它们也是受到调节的,在有丝分裂中这种剧烈变化十分清楚,此时核纤层蛋白的磷酸化使核纤层在有丝分裂开始时解组装,而这种蛋白质的去磷酸化又使两个子核中的核纤层在有丝分裂结束时重新组装起来。

10.3 肌 肉

肌动蛋白和原肌球蛋白以及肌钙蛋白一起形成了肌肉细胞中的细丝。肌肉细胞中,细丝和由肌球蛋白组成的粗丝平行地结合在一起。肌球蛋白很大,有两条相同的重链。每一重链又有一长而直的 α -螺旋域和一球状域。肌球蛋白中,两个 α -螺旋域形成一平行的卷曲螺旋结构,每端各有一球状域(图 10.5)。肌球蛋白还有两种轻链各二条,都结合在重链的球状域上。这些肌球蛋白分子专一地聚积在一起形成粗丝。细丝中的肌动蛋白与肌球蛋白结合产生一肌动蛋白与肌球蛋白的复合体,称肌动球蛋白。肌球蛋白使 ATP 水解引起粗丝中球状域的构象变化,导致粗丝在细丝上的滑动,使肌肉收缩。

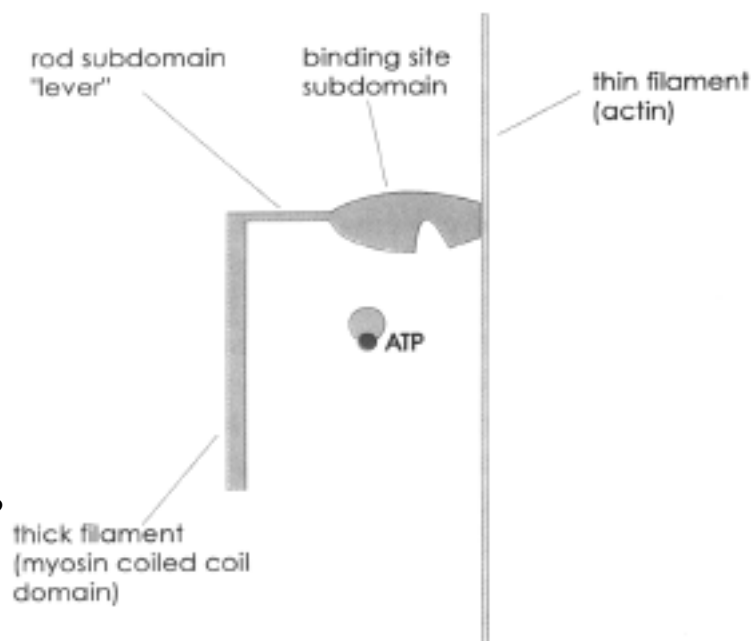


图 10.5 肌动球蛋白的结构

右侧的长线表示肌动蛋白的细丝;单独的圆表示肌动蛋白的单体;左边的粗线代表粗丝的一部分。为清晰起见,二聚体中的另一个单体,即粗丝中的另一个肌动蛋白分子,在图中没有画(图示粗丝中肌动蛋白头部与细丝相互作用,头部上的缺口代表 ATP 的结合部位)。

由于测定了肌动蛋白和肌球蛋白球状域的三维结构,上述构象变化的本质开始被人们了解。肌球蛋白的球状域,亦称“头部”或肌球蛋白 S1 形成两个亚域。其中一个有一 ATP 结合部位和一个肌动蛋白结合部位;另一个亚域是一个由 α -螺旋形成的长杆, α -螺旋是重链中为轻链所保护的一部分。杆亚域起着杠杆的作用,把重链的卷曲螺旋域与具有肌动蛋白和 ATP 结合部位的亚域连接起来。无 ATP 时,ATP 结合部位呈宽楔形。ATP 结合上以后,肌球蛋白就从肌动蛋白上被释放出来。ATP 结合部位关闭,把 ATP 关在里面,于是楔形的开口就没有了,杆状的亚域杠杆会摆动很长的距离。ATP 发生水解,游离的磷酸根被释放,ADP 仍结合在上面,结合部位仍是关闭的。磷酸根的释放改变了肌动蛋白结合部位的构象,它与肌动蛋白结合得更牢。下一步就是有力的一击,ADP 结合部位打开回到原来宽楔形状,使杆状的亚域“杠杆”摆动,于是肌球蛋白的粗丝域在肌动蛋白的细丝上移动相当的距离,同时释放 ADP。然后这一循环再重复。虽然这一模型还有待证实,特别是在细节上,但是对于肌动球蛋白中 ATP 的化学能如何转变为运动中的动能提出一种有说服力的解释。

虽然肌肉收缩的能量来自 ATP,但引起收缩的刺激却是 $[Ca^{2+}]$ 的提高。 $[Ca^{2+}]$ 是由肌质网(肌肉细胞中相当于内质网的部分)调节的,肌质网通常将 Ca^{2+} 封闭起来,而在受到神经冲动的引发时则释放 Ca^{2+} 。

在骨骼肌中, Ca^{2+} 与肌钙蛋白结合,使原肌钙蛋白发生变化,最后引起收缩。反之,平滑肌不利用 Ca^{2+} -肌钙蛋白-原肌钙蛋白机制。当肌球蛋白轻链中的一条被肌球蛋白轻链激酶

(MLCK) 磷酸化时, 平滑肌就收缩。MLCK 则为结合在另一种蛋白质(钙调蛋白)上的 Ca^{2+} 所活化。当肌球蛋白轻链被蛋白质磷酸酶(PP2C)去磷酸化时, 肌肉舒张。因此, 要维持收缩, 就必须有继续不断的去磷酸化作用(图 10.6)。磷酸化机制是对平滑肌收缩的又一种通过激素作用的控制。依赖于环 AMP 的蛋白激酶——结合在细胞表面的激素使之活化——将 MLCK 磷酸化, 降低其对 Ca^{2+} 的亲合力, 从而使肌肉舒张。

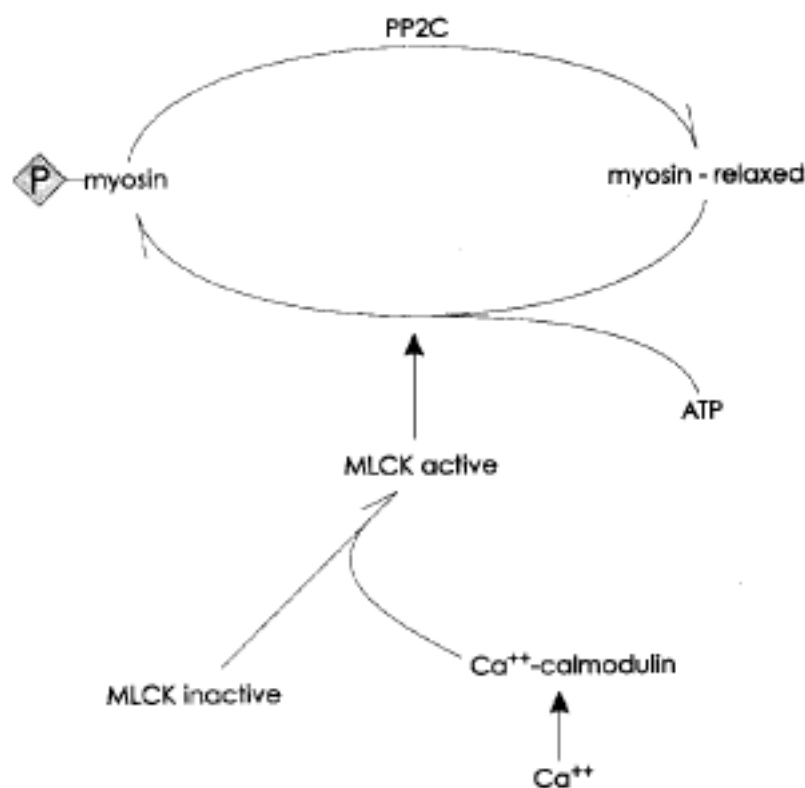


图 10.6 Ca^{2+} 对平滑肌的调节

肌球蛋白轻链激酶(MLCK)将肌球蛋白磷酸化并引起收缩, 这种作用是对钙的响应, 如图中信号传递途径所示。

通过一般的细胞机制所维持的[ATP]是相当低的, 脊椎动物的肌肉细胞以磷酸肌酸的形式贮存能量, 它能迅速将其高能磷酸基团供给 ADP, 以维持[ATP]。

10.4 细胞与细胞的接触和胞外基质

虽然生物体的绝大部分是由细胞组成的, 但也有细胞外的成分, 例如血浆。组织也含有胞外的物质, 这些物质有助于决定并维持组织的结构。这些物质是在细胞内合成并运至胞外间隙中组装成胞外基质。细胞与细胞的直接接触也与组织的结构很有关系。

(一) 细胞连接

从化学上讲, 细胞与细胞接触的最密切的形式是间隙连接。在这种结构中, 形成了一个通道, 把两个细胞的细胞质连起来。通道的蛋白质调节着两个细胞间小分子和离子的流动。通道蛋白使质膜分开, 因此名为间隙连接。

细胞与细胞的接触是在细胞间的连接上发生的。相邻细胞间质膜的直接接触, 特别是在上皮组织中的, 称为紧密连接(图 10.7)。

紧密连接阻止胞外分子通过, 在不同程度上也阻止离子在细胞间移动, 甚至限制跨膜组分

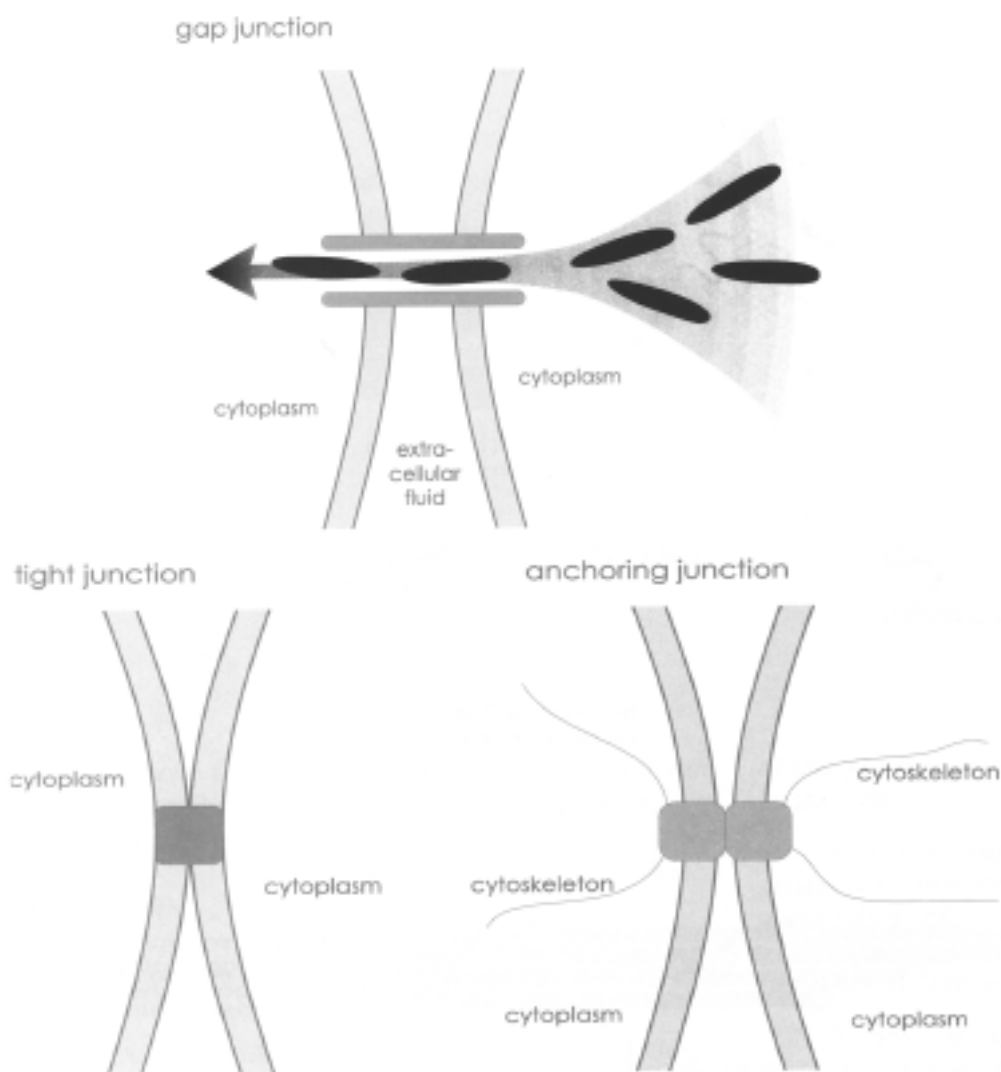


图 10.7 细胞连接

三图中都画出了两个质膜的一部分,它们都形成了两个细胞间的一种连接。间隙连接中所画的深色长椭圆代表通过连接交换的分子。

在其本身的质膜内的扩散,使细胞发生极化,所以膜的不同功能,例如仅表现在上皮的一侧或另一侧的专一的受体,就被限制在质膜中它自己的区域之内扩散。

锚定连接可以通过质膜使细胞骨架蛋白与胞外基质或相邻的细胞连接。这种锚定连接包括一种跨膜蛋白质,它与质膜的胞质面上的细胞骨架结合。在质膜的胞外面上,锚定连接或是与胞外基质(粘着斑或半桥粒)结合,或是与另一细胞的受体(粘着带或桥粒)结合。

(二) 胞外基质中的蛋白质

许多胞外物质都是丝,由纤维状蛋白质(主要是胶原和弹性蛋白)和粘着蛋白(如纤连蛋白和层粘连蛋白)构成。胶原形成一个蛋白质家族,其分布有组织专一性,此家族包括类型 I,存在于结缔组织中,呈丝状,还有类型 II 和 III,存在于基板中,呈片状。

胶原以前肽的形式被合成,前肽形成一种分子内的三链螺旋,即前胶原,其中每一条链称为 α -链。细胞分泌前胶原,酶将其剪切为原胶原,原胶原再聚集成为胶原纤丝(图 10.8)。前胶原的三螺旋中的紧密包装要求每条 α -链中每隔两个残基就有一个甘氨酸。前胶原也有特点,即脯氨酸和赖氨酸发生专一的翻译后修饰,形成羟脯氨酸和羟赖氨酸。羟脯氨酸发生氢键的相互作用而使三螺旋稳定。羟赖氨酸则是前胶原糖基化作用的连接点,也是原胶原聚集成胶原纤丝时形成纤丝的连接点。脯氨酸的羟基化作用需要维生素 C; 维生素 C 缺乏产生坏血

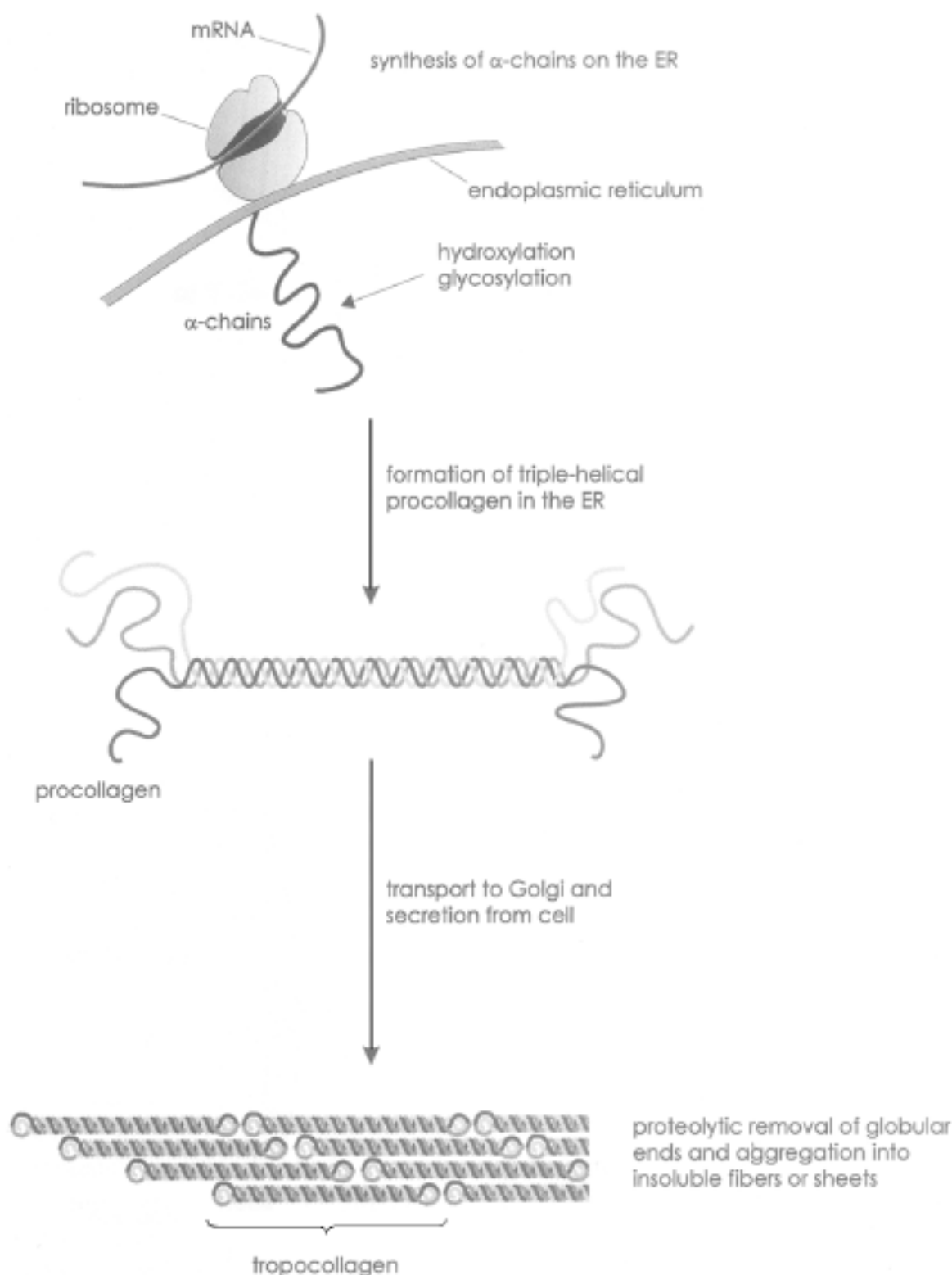


图 10.8 胶原的成熟

图的最上部示一核糖体, 其上有 mRNA 和新生的胶原链, α -链 (核糖体连在内质网上, 新生的多肽链则直接进入内质网的腔内); 下一步, 3 条胶原单体形成三股螺旋 (有两个头部区域), 此三螺旋称为前胶原; 最后, 头部区域经蛋白酶水解去掉, 在细胞外形成原胶原分子, 这些分子再聚集形成胶原纤维。

病, 就是由于脯氨酸的羟基化作用减少。胶原的形成异常也是几种人的遗传病症状的原因, 这些病包括 Ehlers-Danlos 综合症、成骨不全等, 如表 10.1 所概括。

在人的一生中所积累的胶原的正常修饰是某些赖氨酸侧链的氧化, 于是原胶原之间发生共价交联, 减少了胶原结构的可变性, 使得人们老龄化时骨质变脆, 皮肤的弹性变小。

弹性蛋白是胞外基质中另一种主要的蛋白质。在被成纤维细胞合成并运出之后, 弹性蛋白分子在胞外基质中发生交联, 产生弹性蛋白纤维的网络, 使得组织有弹性。

表 10.1 某些胶原结构的疾病^a

病名	胶原的缺陷	临床表现
Ehlers-Danlos	类型 减少	动脉、肠或子宫破裂, 皮肤薄, 易擦伤
成骨不全	类型 减少	蓝巩膜, 多处骨折和骨变形
坏血病	羟脯氨酸减少	伤口难愈合; 生长迟滞; 毛细血管脆弱
Ehlers-Danlos	羟赖氨酸减少	皮肤和关节极易伸展; 伤口难愈合; 肌肉骨骼变形
Ehlers-Danlos	存在氨基末端前肽	极易伸展; 皮肤易擦伤; 臀部脱位
Ehlers-Danlos 和皮肤松弛症	交联减少	皮肤和关节极易伸展

^a 选自 T. M. Devlin, Biochemistry with Clinical Correlations, Wiley, New York, 1992.

粘连蛋白和层粘连蛋白是主要的粘连性糖蛋白, 分别存在于结缔组织和基板(形成片状结构的组织下面的结构)中。粘连性糖蛋白把细胞的外表面与胞外基质中的胶原和蛋白聚糖连接起来。粘连蛋白通过一称为 RGD(这是一字母的氨基酸序列)的三肽序列(-Arg-Gly-Glu-)结合在细胞上。RGD 基元结合在粘连蛋白受体上, 这种受体是称为整联蛋白一个跨细胞膜蛋白家族的一员。这种整联蛋白的粘连蛋白受体域在细胞的外表面上, 其胞质域则与肌动蛋白细胞骨架相互作用。这样, 整联蛋白就把胞外基质与细胞骨架联系起来(图 10.9)。

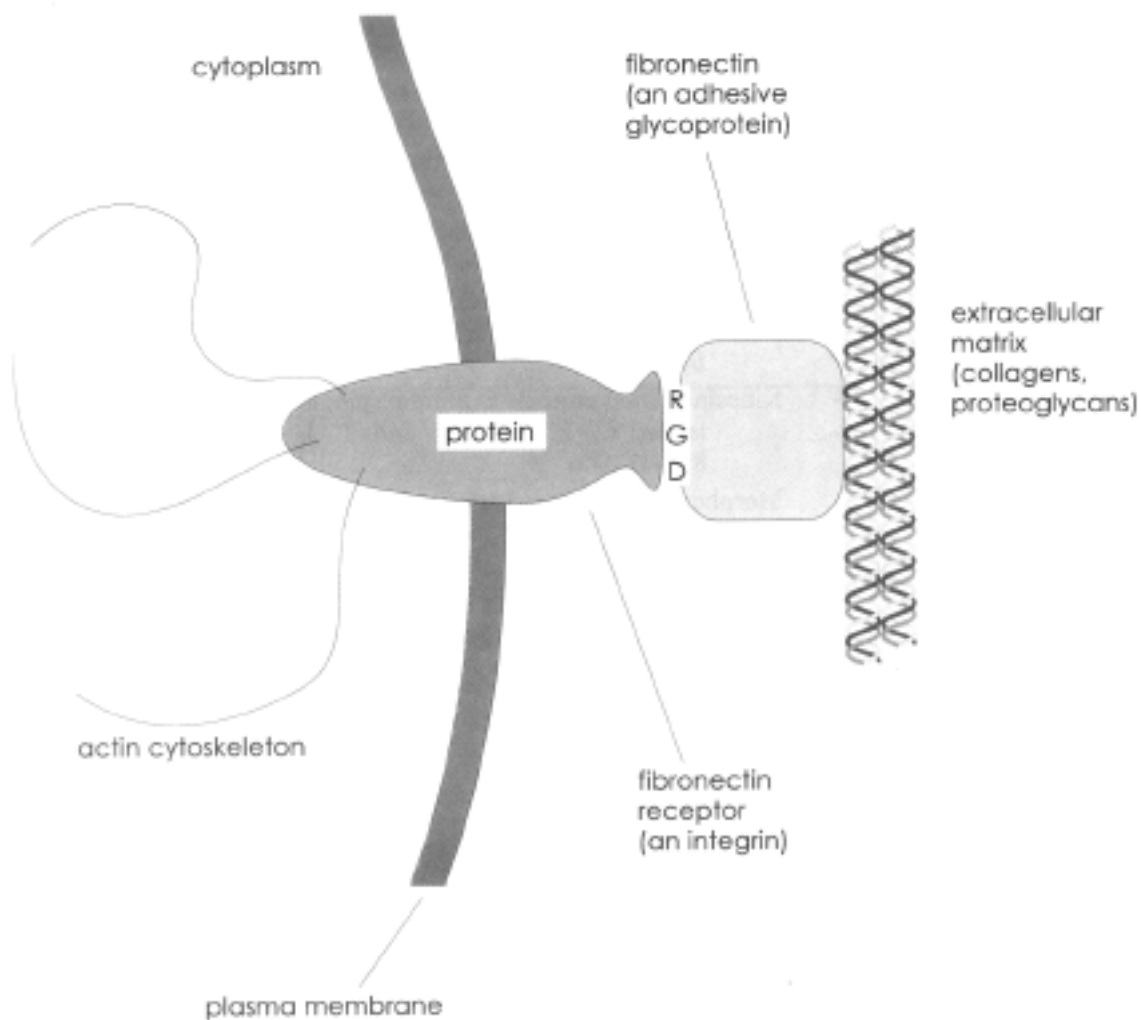


图 10.9 整连蛋白的功能

细胞质在左侧, 由质膜与胞外的空间隔开; 跨膜的蛋白质是一种整连蛋白, 它一方面连在细胞内的肌动蛋白细胞骨架上, 另一方面又通过与粘连蛋白上的 RGD基元的相互作用而连在胞外基质上。

(三) 糖胺聚糖和蛋白聚糖

其他重要的胞外物质有糖胺聚糖(GAG)和蛋白聚糖。糖胺聚糖是多糖,其中有重复的双糖结构。所有的GAG,除透明质酸外,都以共价键与蛋白质连接形成蛋白聚糖。蛋白质部分形成“主链”,蛋白聚糖在高尔基体中成熟时,一个个GAG会连接上去,然后蛋白聚糖被运出细胞之外。

透明质酸是由葡萄糖醛酸和N-乙酰氨基葡萄糖组成的,其分子量可高达 1×10^7 (1000万),比其他GAG都大得多。在胞外基质中,透明质酸把蛋白聚糖组成大的、含水很多的结构,能承受膝关节和其他处的压缩应力。

10.5 小 结

- (1) 蛋白质类是细胞和胞外间隙的结构物质。
- (2) 微管是由 α -和 β -微管蛋白分子组成的。
- (3) 微管在动力学上是不稳定的,因为它们不断地生长然后收缩。
- (4) 微管通过动力蛋白——胞质动力蛋白和驱动蛋白——为其他蛋白质的转运提供通道。
- (5) 动力蛋白丝是由F-动力蛋白组成的,F-动力蛋白是丝状的动力蛋白。F-动力蛋白是由球状G-动力蛋白分子排列成的细而长的螺旋组成的。
- (6) 动力蛋白丝也是动态的,动力蛋白单体连续不断地加到一端又从另一端被除去(踏板模型)。
- (7) 大部分肌动蛋白存在于质膜内面周围,控制着细胞的形状。
- (8) 中间丝是一个结构家族,其粗细在细的肌动蛋白丝与粗的微管之间。中间丝是由中间丝蛋白之间的卷曲螺旋相互作用而形成的。
- (9) 肌肉由散开的细(肌动蛋白)和粗(肌球蛋白)丝组成。
- (10) 肌肉收缩是由ATP水解所引起的肌球蛋白构象变化而产生的。结构方面的研究正在阐明这种化学能到力的转变是如何完成的。
- (11) 肌肉收缩由钙离子的浓度调节。
- (12) 细胞通过紧密连接、间隙连接和锚定连接而彼此接触。
- (13) 细胞间的连接组织是由胶原蛋白组成的。胶原具有三螺旋结构,需要几种修饰的氨基酸,包括羟脯氨酸和羟赖氨酸。
- (14) 胞外基质的弹性来自于胶原分子与弹性蛋白分子的交联。
- (15) 胞外基质是通过粘连的糖蛋白,即粘连蛋白和层粘连蛋白而与细胞连接的,这两种蛋白结合在质膜中的整连蛋白上。
- (16) 糖胺聚糖和蛋白聚糖形成一种含水很多的蛋白质-糖类结构,能承受对胞外基质的压缩应力。

参 考 资 料

Kinesin , a membrane traffic motor in axons, axonemes and spindles, J. M. Scholey, J. Cell Biol., 133: 1 ~ 4.

- The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology, E. J. Kucharz, 1991, Springer Verlag, New York.
- The molecular biology of intermediate filament proteins, K. Albers and E. Fuchs, 1992, *Int. Cytol.*, 134: 243 ~279.
- Microfilament structure and function, A. Bretscher, 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 7: 337 ~374.
- Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion, R. O. Hynes, 1992, *Cell*, 69: 11 ~25.
- Cell-matrix interactions and cell adhesion during development, P. Ekblom, D. Vestveber, and R. Kemler, 1986, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 2: 28 ~47.
- Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation, C. E. Walczak and T. J. Mitchison, 1996, *Cell*, 85: 943 ~946.
- Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly, A. A. Hyman and E. Karsenti, 1996, *Cell*, 84: 401 ~410.
- New clues to Alzheimer's disease: unraveling the roles of amyloid and tau, B. a. Yankner, 1996, *Nature Medicine*, 2: 850 ~852.

复 习 题

- 下列细胞连接中,哪一种允许细胞质中的分子在两个细胞之间交换?
 - 间隙连接
 - 紧密连接
 - 锚定连接
 - 所有上述连接都可以
 - 所有上述连接都不可以
- 关于微管的下列说法,哪一项不对?
 - 直径比中间丝的小
 - 因加上含有 GTP 的微管蛋白二聚体而生长
 - 因失去含有结合的 GTP 的微管蛋白二聚体而收缩
 - 在有丝分裂中发生大规模的重排
 - 直径比微丝的大
- 在何处没有胶原的三螺旋结构?
 - 细胞质
 - 内质网的腔
 - 高尔基体
 - 胞内小泡
 - 胞外基质

参 考 答 案

- a 只有间隙连接中有细胞间的通道。通过紧密连接或锚定连接不能发生细胞质中分子的交换。
- a 微管的直径比中间丝的大,中间丝的直径在微管的和微丝之间。因此 a 是不对的,其他都对。
- a 在胶原的个别的 α -链合成之后,就形成前胶原,在内质网的腔中形成三螺旋。因此,胶原的三螺旋根本不存在于细胞质中。

第 11 章 糖酵解、柠檬酸循环和电子传递系统

11.1 引言

本章介绍新陈代谢或简称代谢。我们研究葡萄糖如何转变为乳酸并产生 ATP 形式的高能磷酸酯, 这是无氧条件下发生的。由葡萄糖形成的乳酸或丙酮酸会进一步被氧化成 CO_2 和 H_2O , 产生更多的高能磷酸酯。这一过程需要 O_2 , 因为产生了还原型辅酶, 它们在细胞中被氧化时会产生能量。然后利用代谢的概要图研究这些系统的主要控制。首先会介绍关键的潜在控制步骤以便于了解和综合。在每一节的最后为全部反应途径和结构式以及有关的酶的介绍。

代谢是一种化合物(即底物), 或是通过一个反应, 或是通过一系列反应, 转变为另一种化合物的过程。代谢的正常功能有三: (i) 产生能量, (ii) 生物合成, (iii) 排泄。在这一部分中, 我们要讨论许多种代谢途径, 特别是它们之间的相互关系和控制。当研究一条代谢途径时, 我们着重于整个途径的概貌, 包括所有的步骤和中间产物。不过着重点是那些可能控制速率的或者有助于确定净通量及方向的步骤。

11.2 热力学

代谢的几乎所有步骤都是由酶催化的。反应的平衡决定于反应物和产物的能级。假若这些差别小(即 1000 cal/mol 或更少), 此反应通常是可逆的。假若能量的差别 G^\ddagger 在 3000 cal/mol 或更高的范围内, 此反应在生理条件下通常就是单方向的。例如, A 到 B 的简单反应, 其 G^\ddagger 为 1000 cal/mol , 在平衡时两种反应物的相对浓度应分别为 5 和 1。化合物 A 和 B 的能量相差不大, 所以此反应极易逆转过来。 G^\ddagger 为 3000 cal/mol , 平衡时的相对浓度为 128 : 1, 逆反应就难得多; G^\ddagger 的值越大(正或负), 反应物与产物浓度之差就越大。 G^\ddagger 约为 9000 cal/mol 时, 平衡比应在 2 000 000 : 1 以上。

G^\ddagger 之差与平衡并不成比例, 因为下列方程式 - $G^\ddagger = RT \ln K_{eq}$ 是对数性质的。就像跳高栏一样, 3 尺的高栏, 许多人都能跳过去, 但 9 尺的高栏, 就几乎没有人能跳过去。因此, 跨过 9 尺的难度并不是跨过 3 尺的 3 倍, 对于 G^\ddagger 不同的反应的可逆性与此完全相同。 G 是在能量方面确实应该考虑的问题, 这与反应物和产物的浓度以及 G^0 之值均有关, 方程式为

$$G = G^0 + RT \ln \frac{[\text{产物 1}][\text{产物 2}] \dots}{[\text{反应物 1}][\text{反应物 2}] \dots}$$

11.3 代谢控制概论

因为代谢中的许多反应都是平衡类型的(即酶活性高, 在组织中达到平衡), 所以这些反应不能产生物质流或是决定流动的方向, 但是能允许物质沿任何方向流动, 这取决于在某一不可逆的步骤上底物是进入此途径还是离开此途径的速率。因为不可逆步骤(或控制并产生物质流的步骤) 不仅决定着流动速率, 而且还决定着流动方向, 所以我们要非常详细地研究这些步骤。也很明显的是, 别构效应物、共价修饰等等就在这些步骤上控制组织的代谢。我们先个别研究许多

途径, 然后试图将这些控制综合起来, 重点是控制的基本原理以及这些控制的细节。

控制的另一种方法是利用同功酶。同功酶是具有不同的基因座位和不同的多肽组成的蛋白质。它们有效地催化同一反应的酶类, 例如, 有一个家族的不同的己糖激酶催化葡萄糖的磷酸化。同功酶的生理基础是, 虽然它们催化同一种反应, 但它们的底物专一性、动力学和控制机制不同。由于这些同功酶中有许多有不同的器官专一性, 所以在医学上也有大用处, 当从该器官中渗漏至血液的酶增多时, 即可根据酶活确定受伤害的器官。这种应用的一个例子就是乳酸脱氢酶的各种同功酶, 因为心脏和骨骼肌中有不同的同功酶。如果血液中这种酶增多了, 用像电泳这样的方法研究同功酶的分布, 就可确定增多的酶的主要来源是骨骼肌还是心脏。

在人体内代谢是有精细控制的。这种控制通常位于关键的单方向的步骤或是代谢途径的分支点上。控制这些关键步骤的酶的方法, 或是改变酶量, 或是改变其动力学, 或是二者兼而有之。改变酶量是一个缓慢的过程(从 10 分钟到数天), 因而是慢性的, 而不是急性的变化。动力学的改变可以影响 K_M 或 v_{max} , 或影响 v 对 $[S]$ 的曲线的形状, 或对所有这三者都有影响。动力学的变化可因酶的共价修饰(如磷酸化)而实现。磷酸化很迅速, 但其逆转(去磷酸化)则通常较慢。这些变化通常是响应于激素而发生的, 其影响可维持数分钟至数小时。代谢的以秒计的控制是由于别构效应物的影响, 细胞内效应物的浓度变化很快。这些别构效应物通常是小分子, 是正常的代谢物。它们对酶发生作用的部位不是活性部位, 虽然某些具有 S 形动力学曲线的酶, 反应于一个亚基的活性部位上的底物, 会影响另一个亚基上与后来的底物结合的动力学(如血红蛋白)。

许多重要的受控制的酶都表现 S 形的动力学。其优点是把响应曲线(v 随 $[S]$ 或效应物的变化而变化)中陡度大的部分移到生理范围之内。所有底物和效应物都在细胞中正常的浓度范围之内, 其变化为 $nmol$ 至 $mmol$ 。在大多 S 形反应中, $K_s(0.5)$ 、 $K_a(0.5)$ 和 $K_i(0.5)$ 都靠近底物、活化剂或抑制剂生理浓度范围的中点。

若比较双曲线(Michaelis-Menten 动力学)和 S 形曲线, 其 K_m 和 $K_s(0.5)$ 都在底物浓度的生理范围的中点, 那么差别是明显的(图 11.1)。对于简单的 Michaelis-Menten 动力学, 生理范围内随着 $[S]$ 的变化, v 有一些变化, 但不大。对于 Michaelis-Menten 动力学, v 随 $[S]$ 发生的最大变化是底物浓度为零到它比 K_M 小很多时, 这种情况在生理条件下是不大可能发生的。对于 S 形动力学, $K_s(0.5)$ 在生理范围中央, v 随 $[S]$ 迅速变化, 这样酶活性对 $[S]$ 、活化剂或抑制剂都有强烈的响应。还应注意到曲线的最陡的部分(v 对 $[S]$ 变化的响应)正是在生理范围之内。S 形反应的动力学也能受效应物的影响而使曲线的形状向左(活化)或向右(抑制)偏移。把 S 形曲线移向右方的抑制作用可因过量的底物而被克服, 但在许多情况下这种能克服抑制作用的浓度在生理条件下是达不到的。

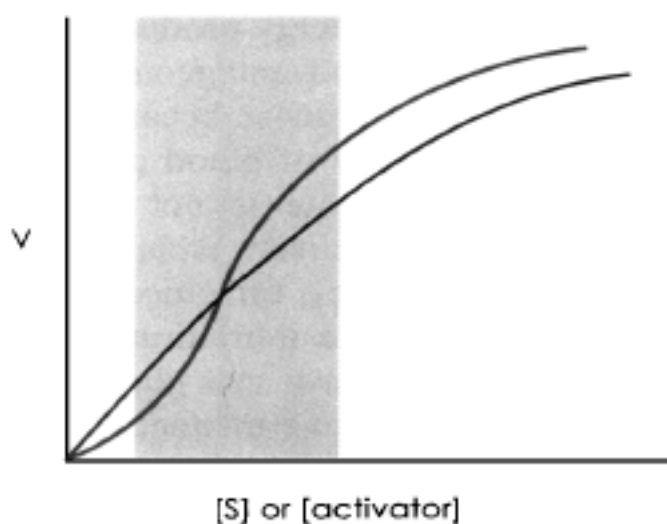


图 11.1 双曲线和 S 形曲线动力学的比较
反应速率与底物或活化剂浓度的曲线:
1—双曲线(Michaelis-Menten)反应;
2—S 形反应。有阴影的区域为底物或活化剂浓度的生理范围。

11.4 糖 酵 解

要研究控制的基本原理, 必须首先考虑各种途径的生物学功能。我们首先考虑糖酵解(即葡萄糖转变为乳酸, 这是无氧条件下就能完成的)。糖酵解有 3 个主要功能: (i) 产生能量(即 ATP), 特别是在无氧条件下的无氧糖酵解; (ii) 把葡萄糖转变为丙酮酸(有氧糖酵解), 为柠檬酸循环中最终的氧化作准备; (iii) 形成一些在生物合成中可能重要的化合物, 例如磷脂和三酰甘油的合成中所需要的 α -甘油磷酸, 还有形成氨基酸的中间产物, 即糖酵解的中间产物在有适当的氮供体时能转变为丙氨酸和丝氨酸。

要彻底了解控制及其中的道理, 必须研究这些途径中的每一个步骤。不过, 在研究控制时还会遇到两种复杂的情况。这就是不同的组织优先利用不同的代谢途径, 因此为了保证这些途径的优先利用, 不同组织中的控制方式可能不同。其次, 因生物体的需要而异, 这些优先利用的途径在方向和规模上会发生变化——许多响应是因激素信号而发生的。所以至少需要大略地研究一下激素与不同组织的信息联系以及它们与代谢控制有什么关系。我们首先要研究潜在的控制步骤以及这种控制的机制, 然后再研究控制的细节。糖酵解中有 3 个生理上不可逆的反应——己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的反应。

要了解代谢途径控制的意义, 有用的是对某些激素给代谢带来的信息有一般的理解。这些激素如何影响代谢过程的功能及其与某种组织功能的全面控制有何关系也是重要的。因此, 在这一部分中, 贯穿始终的是强调 3 种激素, 不过有更多的激素以复杂的方式相互作用。

1. 胰岛素。它是由胰脏的 β -细胞分泌的, 是体内惟一真正的和完全的分解代谢的激素。胰岛素通常是一种指标, 表明生物体已经进食并且食物已超过能量的需要而应该贮存起来, 它促进糖原、脂肪和蛋白质的合成以增加物质的贮存。

2. 胰高血糖素。它是由胰脏的 α -细胞分泌的, 它是血中葡萄糖浓度低的指标。胰高血糖素给生物体的一般信息是提高葡萄糖的合成速率而降低其利用速率以增加血液中葡萄糖的浓度。在某些情况下, 例如糖尿病人, 这可能是不适当的信息, 因为血液中的葡萄糖的浓度已经高了, 这样就会增加疾病的严重程度。

3. 肾上腺素。它是肾上腺皮质产生的儿茶酚胺。这种激素产生经典的应急反应。肾上腺素增多就告诉生物体必须将所有的能量调动起来, 为应急的逃跑或战斗作好准备。这种激素会影响许多种组织, 特别是肌肉, 其中力和能量对收缩都是至关重要的。

因此, 对于这三种激素中的任何一种对全身发出的总的信息就可以进行比较基本的原理方面的研究。我们要研究这些信息在代谢上有利的方面, 而如果这些信息是不适当的, 则研究其在代谢上不利的方面。

11.5 糖酵解的控制

(一) 转运

葡萄糖的流程可由 4 个主要步骤控制——3 个是酶促步骤, 一个是转运。葡萄糖要被代谢, 必须进入细胞。第 4 章已讨论了一般的转运现象。血液中的葡萄糖进入躯体的组织中主要是通过细胞膜上的易化转运系统进行的。这有几种类型的转运蛋白。其中有些对胰岛素敏感, 如骨骼肌和脂肪组织中的; 有些对胰岛素不敏感, 如脑、肝和红细胞。因为这些都是易化扩散系统, 所以葡萄糖不能逆浓度梯度而积累。无论在对胰岛素敏感的组织中当胰岛素浓度低

时,还是在脑中当血糖浓度降到血糖的 $K_s(0.5)$ 以下足够多时,这一过程都可能是限速的。

(二) 己糖激酶

葡萄糖一旦进入细胞,下一个控制步骤便是己糖激酶,它催化葡萄糖的磷酸化,形成葡萄糖-6-磷酸(G-6-P),并且需要 ATP。因为质膜主要是非极性的(见第 4 章),磷酸化产生的带电荷的分子 G-6-P 就限制在细胞之内。假若催化着生理上不可逆反应的己糖激酶一直发生作用而毫不衰弱,血液中的葡萄糖就可能耗尽,因为肌肉是大量的,己糖激酶的活性又高。

除葡萄糖激酶外,己糖激酶的同功酶都为葡萄糖-6-磷酸所抑制。葡萄糖-6-磷酸进入细胞后,可能发生多数变化,其中之一是产生能量的糖酵解。然而,即使在能量有余时,葡萄糖-6-磷酸也可用作糖原的前体。因此,ATP 起抑制作用不合适,因为某些高能条件有利于糖原合成(图 11.2)。假若葡萄糖-6-磷酸积累起来而且不再为能量的产生或糖原的贮藏所需要,继续

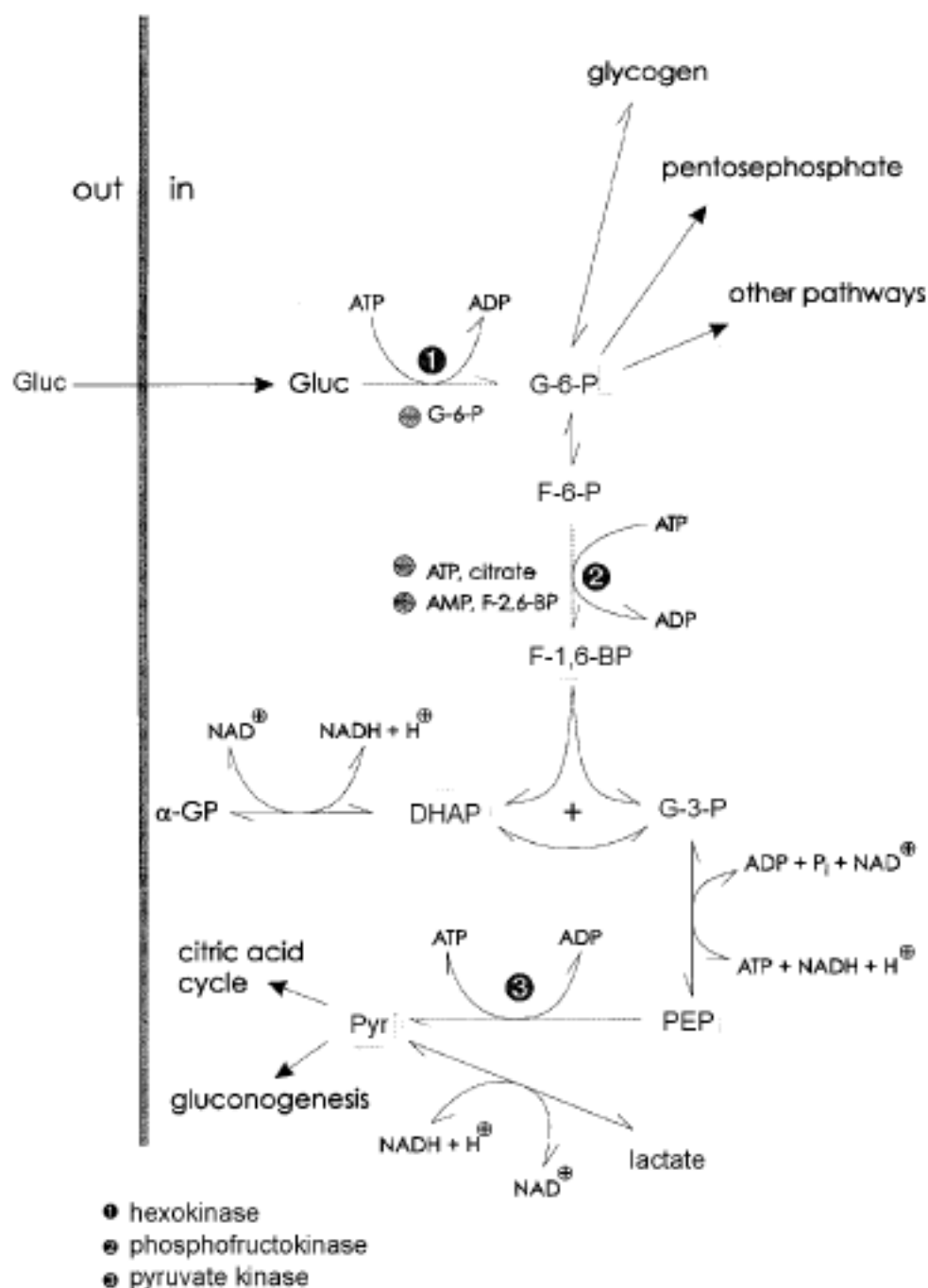


图 11.2 糖酵解主要步骤及所联系的途径示意

此图列有糖酵解的控制步骤,也指出了糖酵解中间产物的其他变化以表明葡萄糖代谢的更一般的情况。注意,单向的关键性的反应以及圈中的中间产物(圈中的数字也表示单向的反应)。图 11.5 为糖酵解的全图及有关的结构式,图中还列有前两个不可逆反应的正负效应物。

从血液中取得葡萄糖对躯体不利,因为这有可能把血液中的葡萄糖耗尽。因此,当葡萄糖-6-磷酸不再迅速被进一步代谢时,己糖激酶就被抑制了。因为此酶对葡萄糖的 K_M 很低,在 10^{-4} ~ 10^{-6} mol/L 之间,竞争性抑制是无效的,已经证明,葡萄糖-6-磷酸的抑制是非竞争性的。在正常情况下,肌肉中的己糖激酶有 95% 是被抑制的。与潜在的最大活性相比,这种稳态活性是很低的,这是有利的,因为在极端的情况下潜在的活性约为稳态条件下的 20 倍。

(三) 葡萄糖激酶

己糖激酶中的一种,通常称为葡萄糖激酶,存在于肝中。葡萄糖激酶的动力学曲线稍呈 S 形,与己糖激酶的双曲线不同。葡萄糖激酶对葡萄糖的 K_s (0.5) 也高得多——10 mmol/L,而其他己糖激酶的为 0.1 ~ 0.01 mmol/L。因此,肝中的磷酸化作用对血液中葡萄糖的浓度(约 5 mmol/L)敏感,特别是对门静脉中的浓度(1 ~ 20 mmol/L,因进食量和进食后的时间而异)敏感。葡萄糖激酶不受 G-6-P 的抑制。葡萄糖激酶的主要功能似乎是使肝脏能够摄取葡萄糖用于糖原的合成和潜在的 α -甘油磷酸的合成,后者在三酰甘油的形成中是重要的。肌肉中因移去血糖而使其浓度过低的问题,在肝中没有,其理由有二:(i) 葡萄糖激酶对葡萄糖的 K_M 高;(ii) 肝中有葡萄糖-6-磷酸酶,它能催化葡萄糖-6-磷酸转化为无机磷酸和葡萄糖的反应,因而提高了血中葡萄糖的浓度。肌肉中没有这种酶。

(四) 磷酸果糖激酶

糖酵解中独一无二的第一个不可逆的步骤是由磷酸果糖激酶(PFK)催化的,它用 ATP 使 F-6-P 在第一位上磷酸化而形成果糖-1,6-二磷酸。磷酸果糖激酶是在调节方面研究得最多的酶类之一,它受到高度的调节。它是糖酵解中的主要调节部位。PFK 有十几种效应物,既有正的,也有负的;不过,为易于弄懂,本章中仅讨论看来是主要的效应物。葡萄糖代谢到果糖-1,6-二磷酸阶段通常还要沿糖酵解途径继续进行下去。就 F-6-P 而言,磷酸果糖激酶属 S 形动力学(图 11.3)。PFK 的动力学曲线会有变化,从 Michaelis-Menten 动力学到曲线极端的 S 形

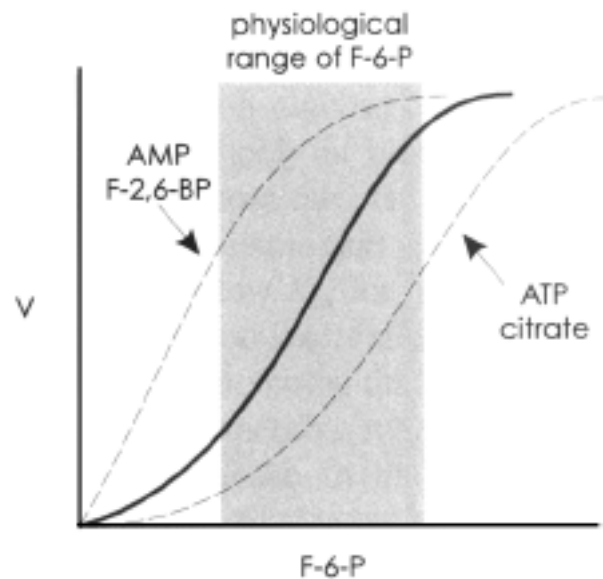


图 11.3 磷酸果糖激酶的动力学

就 F-6- 浓度而论,磷酸果糖激酶的动力学曲线是 S 形的。实线为效应物的浓度正常时的响应,虚线表示效应物使动力学变化的方向。这些变化实际上是无限多的向左或向右偏移的曲线,这里只是各画一条:向右偏移,如 ATP 和(或)柠檬酸盐增多,会使任何生理浓度的 F-6-P 下的反应速率降低;向左偏移,如 AMP 或 F-2,6-BP 增多,会使任何生理浓度的 F-6-P 下的反应速率增高。阴影部分为 F-6-P 浓度的生理范围(外周组织)。

曲线。所以,在一定的果糖-6-磷酸浓度下,细胞中此酶的活性会因曲线的相对 S 形而异。动力学的 S 形程度越小,在一固定的 F-6-P 浓度下,活性就越高;而 S 形程度越大,活性就越低。看来甚至曲线向右偏移更多时,果糖-6-磷酸还会继续积累直至其浓度达到使酶的活性相当高时为止。然而,因为果糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸是呈平衡的,当果糖-6-磷酸积累时,葡萄糖-6-磷酸也会积累,而如前所述,葡萄糖-6-磷酸浓度增加就会抑制己糖激酶。这种抑制作用会阻止 G-6-P 和 F-6-P 的以葡萄糖为碳源的进一步的增多。

在任何恒定的 F-6-P 浓度下,磷酸果糖激酶都因 ATP 的增多而被抑制,而且柠檬酸盐的增多更会加强这种抑制作用(图 11.4)。在 ATP 处于非抑制水平时,柠檬酸盐本身并无抑制作用。这种情况下的作用是一种协同作用。PFK 的活化剂包括 5'-AMP 和果糖-2,6-二磷酸(它是在激素控制之下的,见第 13 章)。

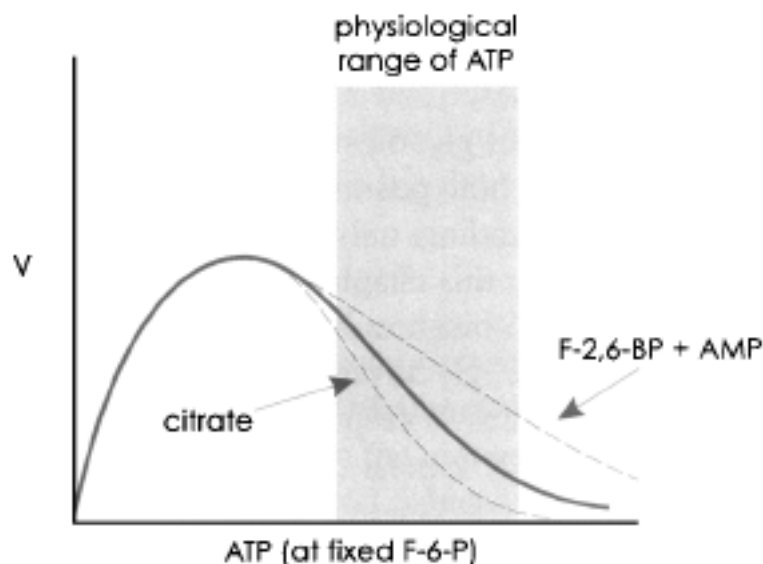


图 11.4 ATP 对磷酸果糖激酶活性的影响

实线为 F-6-P 浓度固定时不同浓度 ATP 的影响,阴影中为 ATP 浓度的生理范围(在此生理范围内,进一步增加 ATP 浓度,抑制作用会更强;在此范围内,柠檬酸盐会引起 PFK 的更多的抑制,而 F-2,6-BP 或 AMP 都会引起一些抑制解除,如虚线所示)。

PKF 的这种控制也说明了别构调节的某些重要方面。例如,ATP 在一个部位作为此反应的底物而发生反应,而在较高浓度下则会与一别构部位结合,引起抑制,如 S 形曲线向右偏移所示。ATP 浓度低时,其行为就像 Michaelis-Menten 动力学所应有的那样。当 ATP 浓度继续增加时,反应不是停留在 v_{max} 上,而是在 F-6-P 浓度固定时活性显著降低,特别是当浓度类似于完整细胞中的浓度时。大多数细胞中的 ATP 浓度都是强烈的抑制性的,除非细胞中的 ATP 已用尽,如连续不断地收缩后的肌肉细胞中那样。因此,这一反应的独特之处在于,虽然 ATP 是 PFK 的底物,细胞中此酶的活性实际上却因 ATP 浓度的降低而增高,由于抑制部分地解除了。因为糖酵解的主要功能是形成 ATP,ATP 浓度降低而活性反而增高在生理上的优点是显而易见的。在柠檬酸盐的存在下,ATP 的抑制作用进一步增强,柠檬酸的存在表示线粒体中强有力的产生能量的系统已发挥了最大的作用或接近于发挥最大作用。ATP 是高能的信号,AMP 是低能的信号。AMP 使得通过 PFK 的代谢流增加,有助于通过糖酵解产生能量(ATP),这种作用能克服一些 ATP 的抑制作用。

细胞的相对能量状态可用腺苷酸荷估计,即

$$\text{腺苷酸荷} = \frac{2(\text{ATP}) + (\text{ADP})}{2(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})}$$

这个公式基本上指的是存在的高能磷酸基团的数目(即 ATP 中 2 个, ADP 中 1 个)除以潜在的高能磷酸的数目(每一个腺嘌呤核苷酸都可能有 2 个高能磷酸基团)。这表明实际存在的高能磷酸基团与可能有的磷酸基团之比。在正常的静息的细胞中这一比值在 0.85 ~0.9 的范围内。就电荷方面来说,多数核苷酸都是互成平衡的。假若我们测定尿苷酸荷、胞苷酸荷或鸟苷酸荷,其结果会与腺苷酸荷类似。不过,因为腺苷酸比其他核苷酸都多得多,所以常用腺苷酸荷来代表能荷。当腺苷酸荷高时,ATP 浓度就高,PFK 就会被抑制。腺苷酸荷低时,ATP 减少而 AMP 增多,PFK 的活性就会增高。

果糖-2,6-二磷酸(F-2,6-BP)的形成是由 PFK2 催化的。F-2,6-BP 可因对激素,如肝中的胰岛素和肌肉中的肾上腺素的响应而增加。肝中的 F-2,6-BP 将在糖原异生部分讨论;肌肉方面则与肾上腺素的作用关系密切。肾上腺素增加肌肉中的 cAMP(3,5-环 AMP),cAMP 又活化一种依赖于它的蛋白质激酶,引起许多种酶的磷酸化。这些酶中的一种,即肌肉中的 PFK2 被磷酸化后其活性就增高,于是产生更多的 F-2,6-BP。而 F-2,6-BP 的增加又会促进磷酸果糖激酶的活性($F-6-P + ATP \longrightarrow F-1,6-BP + ADP$),增加糖酵解的速率,使肌肉能够在肾上腺素的应急信号之下获得更多的能量。F-2,6-BP 是 PFK 的强有力的活化剂,以微摩或纳摩的浓度存在于组织中。F-1,6-BP 是糖酵解的中间产物,是以底物浓度被利用的,它以毫摩范围的浓度存在。而且果糖-2,6-二磷酸不在任何主要的代谢途径上,并且它的唯一的最终的代谢途径是在果糖-2,6-二磷酸酶的催化下去磷酸化,变回到果糖-6-磷酸。因此,这种活化剂的水平决定于其合成和分解的相对速率。肌肉中的分解是相当稳定的,而肌肉中的合成则可由于 PFK2 的磷酸化而增加。

这样,我们可以明白,PFK1 是一种由许多种效应物精细控制的酶;这种酶的活性依赖于细胞中几种代谢物的浓度。这些代谢物包括 ATP、AMP、柠檬酸盐、F-6-P 和 F-2,6-BP。

(五) 丙酮酸激酶

丙酮酸激酶是糖酵解中的下一个单方向反应,而且能被高水平的 ATP 所抑制,不过通常细胞中 ATP 水平不会高到足以显著地降低此酶的活性。大多数细胞中丙酮酸激酶的活性比己糖激酶和磷酸果糖激酶的活性高得多。因此,丙酮酸激酶在外周组织中似乎不起主要的控制作用。但在肝中有一种丙酮酸激酶的同功酶是处于严格控制之下的,它在葡糖异生作用中起着重要作用;这一方面将在讨论葡糖异生作用时进行研究。

11.6 糖酵解的细节

下面是关于无氧的糖酵解,特别是与肌肉有关的糖酵解中有关步骤的描述,肌肉是人体中的主要组织。下列各步骤的编号相当于图 11.5 中的数字:

(1) 葡萄糖必须被转运到细胞之内,才能发生糖酵解。大多数细胞中有专一的葡萄糖转运蛋白;有些是由胰岛素控制的,其他则对胰岛素发生响应。

(2) 己糖激酶。此酶利用 ATP 和 Mg^{2+} 催化葡萄糖的第 6 位上的磷酸化,此反应在生理条件下是不可逆的。这就需要输入能量而且也把葡萄糖局限在细胞之内。我们会看到在整个葡萄糖代谢中,在有能量的静产生之前,所有的中间产物都是磷酸化的,因此都被限制在细胞之内。在不同的细胞中有己糖激酶的许多不同的同功酶,它们对葡萄糖的 K_M 都不同,潜在的生理上的抑制作用也不同。

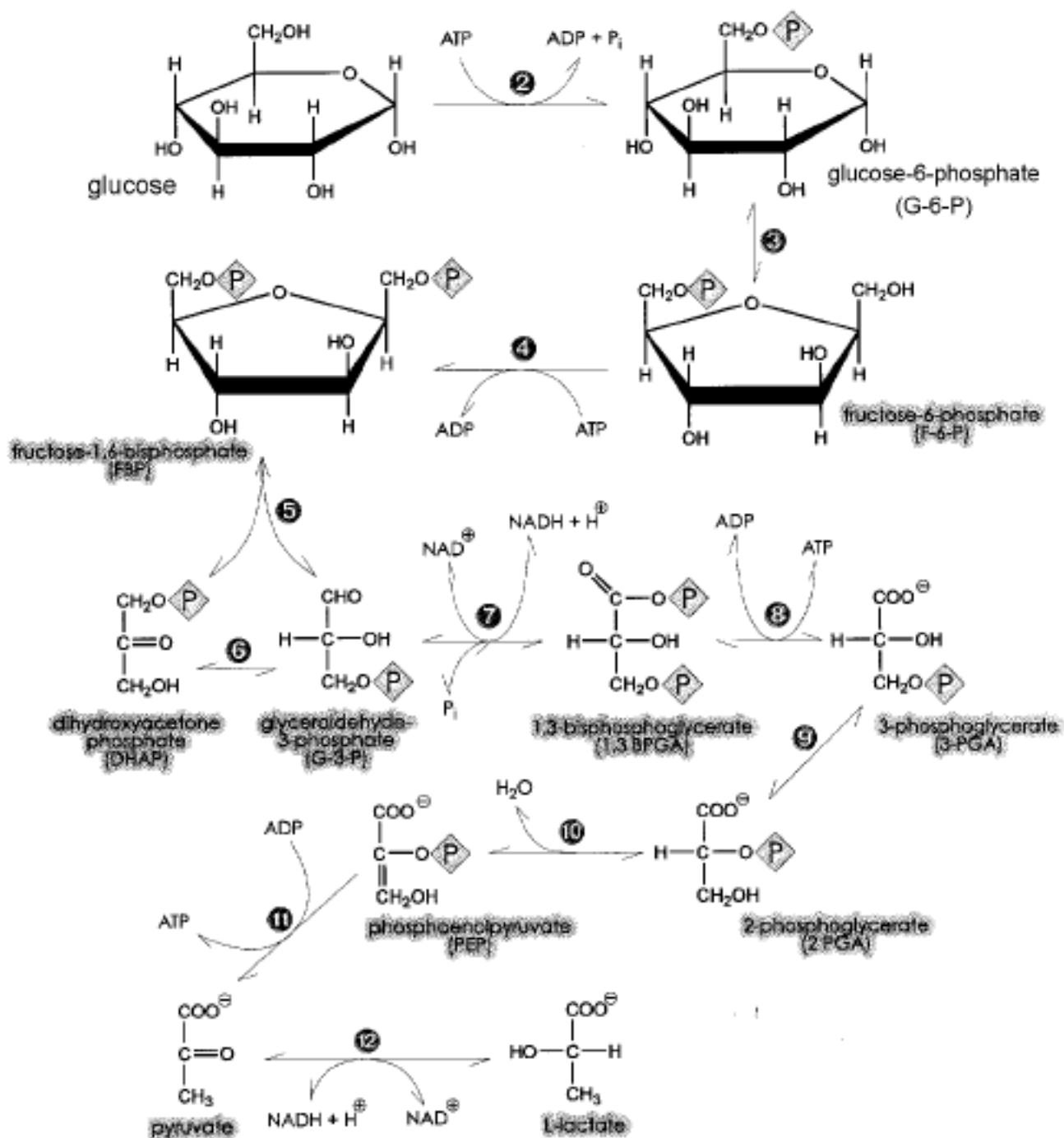


图 11.5 糖酵解的详细步骤和结构式

图中的数码与正文中有关糖酵解讨论中的编号一致。

(3) 磷酸葡萄糖异构酶催化葡萄糖-6-磷酸与果糖-6-磷酸之间的平衡。此酶通常是过量的, 产生这两种己糖磷酸的平衡混合物。

(4) 磷酸果糖激酶。传统上认为此酶是使葡萄糖代谢进入糖酵解途径的第一个酶。此酶需要 ATP 和 Mg^{2+} , 和己糖激酶一样, 它催化果糖-6-磷酸第 1 位上的磷酸化, 形成果糖-1, 6-二磷酸。

(5) 醛缩酶是使组织中达到或接近于平衡的酶。它催化果糖-1, 6-二磷酸转化为 2 个丙糖磷酸。一个是甘油醛-3-磷酸, 它继续通过糖酵解。另一个是二羟丙酮磷酸, 它可作为 -甘油磷酸的前体而参与脂肪的合成, 或是转变为甘油醛-3-磷酸继续参与糖酵解。

(6) 丙糖磷酸异构酶。此酶负责平衡。必须注意, 在这类情况下, 平衡并不意味着 1 : 1。就此酶而言, 丙糖磷酸的平衡比是 24 份二羟丙酮磷酸对 1 份甘油醛-3-磷酸。这一反应是重要的, 因为它使得由果糖-1, 6-二磷酸形成的二羟丙酮磷酸能转变为甘油醛-3-磷酸, 继续参与糖酵解。没有这种酶, 由果糖-1, 6-二磷酸形成的三碳糖磷酸只有一半(即甘油醛-3-磷酸)能参

与糖酵解而二羟丙酮磷酸只能继续不断地累积起来。

(7) 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。此酶有巯基(来自多肽结构中的半胱氨酸)和一个紧密结合的 NAD^+ 。此酶的作用机制是巯基与 G-3-P 的醛基形成一加成物,从而形成一个表面上新的羟基。然后结合在酶上的 NAD^+ 氧化这一羟基,使之形成硫酯(即 SH 与磷酸化的中间产物 3-碳上的羧基所形成的酯)。硫酯是高能化合物。这一氧化过程中所形成的 NADH 可由细胞溶胶中未结合的 NAD^+ 再生为 NAD^+ ,于是产生一游离的(未结合的) NADH (图 11.6)。硫酯键中的能量由磷酸解作用而被保存,产生带有游离的 SH 的酶和 1,3-二磷酸甘油酸。第 1 位上的磷酸基团是羧基和磷酸之间的酐;因此,就有了一个高能键。这两个协同反应——脱氢和磷酸解——是由一种酶即甘油醛-3-磷酸脱氢酶催化的。

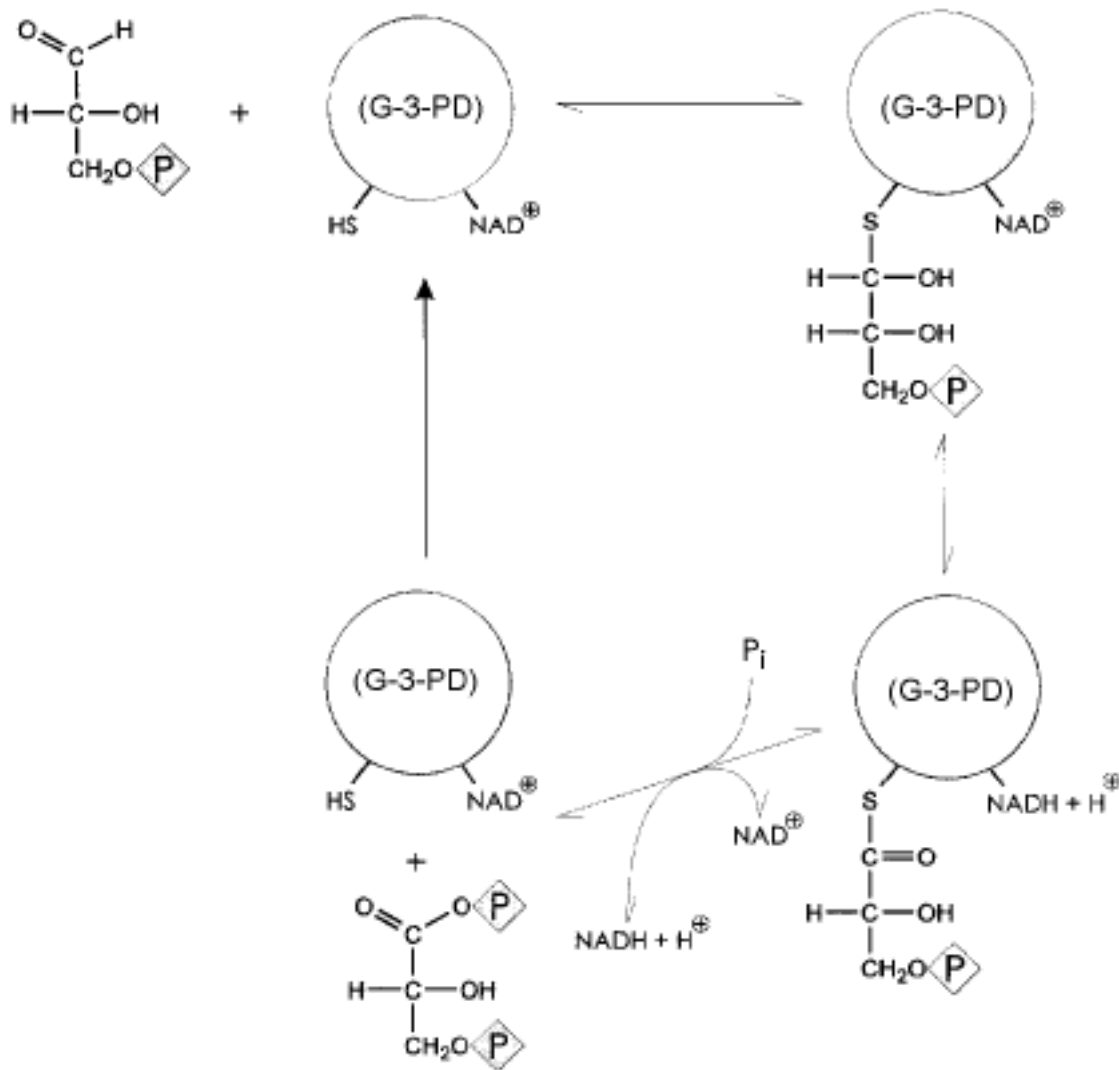


图 11.6 甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机制示意图

甘油醛-3-磷酸转变为 1,3-二磷酸甘油酸,而 NAD^+ 转变为 NADH 。

(8) 3-磷酸甘油酸激酶会可逆地催化 1,3-二磷酸甘油酸和 ADP 转变为 3-磷酸甘油酸和 ATP 的反应。细胞已在糖酵解中投入了两个高能磷酸——一个在己糖激酶处,一个在磷酸果糖激酶处。己糖转变为两个丙糖,而当两个丙糖都经过了磷酸甘油酸激酶这一步时,就会形成两个高能磷酸(每个磷酸丙糖形成一个)。因此,在糖酵解的这一点上,就高能磷酸而论,细胞已是收支相抵了。底物水平磷酸化发生在几个反应中,像 3-磷酸甘油酸激酶的反应就是一例,这时 ADP 形成 ATP 所需要的能量直接来自高能中间产物(如 1-3-二磷酸甘油酸或磷酸烯醇丙酮酸)的裂解。底物水平磷酸化不需要氧,是糖酵解中形成 ATP 的机制。

(9) 磷酸甘油酸变位酶催化 3-磷酸甘油酸转变为 2-磷酸并达到平衡。这一反应需要一种辅因子 2,3-二磷酸甘油酸。它是一种不寻常的反应,其中的每一种产物,不管哪个方向的,都

暂时转变为 2,3-二磷酸甘油酸然后再形成终产物。

(10) 烯醇化酶催化 2-磷酸甘油酸脱水而形成磷酸烯醇丙酮酸。这一反应完全是可逆的。烯醇基团是弱酸,因此烯醇磷酸就是酸酐,具有高能键的特性。此反应为氟离子所抑制,可将氟化物加于红血细胞中以阻止葡萄糖的消耗或加于其他制剂中以阻止糖酵解。

(11) 丙酮酸激酶不可逆地催化磷酸烯醇丙酮酸(PEP)和 ADP 形成 ATP 和丙酮酸。这一反应是与流程相反的方向命名的。因为以前已经在磷酸甘油酸激酶这一步出现了高能磷酸的收支平衡,所以这一步是获得两个高能磷酸。因此无氧糖酵解每消耗一分子葡萄糖产生两个高能磷酸,其形式为 ATP。丙酮酸是糖酵解途径中第一个不再被磷酸化的产物。到此为止,糖酵解已达到了 ATP 的净收入,中间产物(丙酮酸和乳酸)不必再局限于细胞中了。

(12) 乳酸脱氢酶。甘油醛-3-磷酸脱氢酶那一步使 NAD^+ 产生了 NADH。在无氧情况下, NADH 必须再被氧化为 NAD^+ 糖酵解才能继续进行下去,因为可利用的核苷酸的量是有限的。这是由乳酸脱氢酶所催化的一个可逆的反应来完成的,此酶存在于许多种组织中,这个反应会达到平衡。这种酶催化的是丙酮酸加 NADH 形成乳酸和 NAD^+ 。在细胞中正常的 NAD^+ 和 NADH 的水平上,乳酸与丙酮酸之比大约是 10 : 1。例如,在无氧下进行运动时,会有乳酸的形成和积累,还有一些丙酮酸,它们都会被释放到血流中去;这就是运动后血液中乳酸增多的原因。

11.7 柠檬酸循环

糖酵解中产生的丙酮酸会在柠檬酸循环中被氧化,产生 CO_2 、水,主要的还有还原型辅酶。这些辅酶通过电子传递系统(细胞色素类)的再氧化能够将能量转换,形成 ATP,这一转换过程称为氧化磷酸化。

葡萄糖通过糖酵解和柠檬酸的代谢,假若把细胞溶胶中由糖酵解形成的 NADH 均包括在内,共计产生 38 个高能磷酸。实际上产生的是 40 个高能磷酸,但是这一过程需要消耗两个高能磷酸。6 个高能磷酸是通过底物水平磷酸化形成的,34 个是通过氧化磷酸化形成的。这说明在糖类的分解代谢中,在高能磷酸方面 O_2 和氧化作用的重要性。

线粒体系统包括丙酮酸脱氢酶和柠檬酸循环,其中有 4 个生理上不可逆的步骤(见图 11.7)。这些步骤是:丙酮酸脱氢酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶(与 NAD 相连的)和 α -酮戊二酸脱氢酶。这些都是代谢中可能的控制点。我们将就下列三方面研究上述每一种酶:(i) 其作用,(ii) 在每一步骤进行控制的优点,(iii) 可能的控制和利用这种控制的机理。

(一) 丙酮酸脱氢酶

第一个酶,即丙酮酸脱氢酶,实在并不是柠檬酸循环的一部分,而是糖类如葡萄糖进入此循环的有效入口。

丙酮酸是糖酵解的后期产物,它或是被还原为乳酸,产生 NAD^+ 而使糖酵解继续进行,或是通过丙酮酸脱氢酶进入柠檬酸循环。为了充分认识控制此酶的意义,必须了解体内葡萄糖的有效利用;因此,在讨论丙酮酸脱氢酶之前,先讨论葡萄糖的有效利用。

丙酮酸和乳酸都是葡萄糖的潜在的前体。然而在丙酮酸被丙酮酸脱氢酶转变为乙酰 CoA 以后,它就不再是形成葡萄糖的潜在的前体。因此,在需要形成葡萄糖时,任何已转变为乙酰 CoA 的丙酮酸就是丢失了的葡萄糖的可能前体,而任何没有经过丙酮酸脱氢酶的作用而

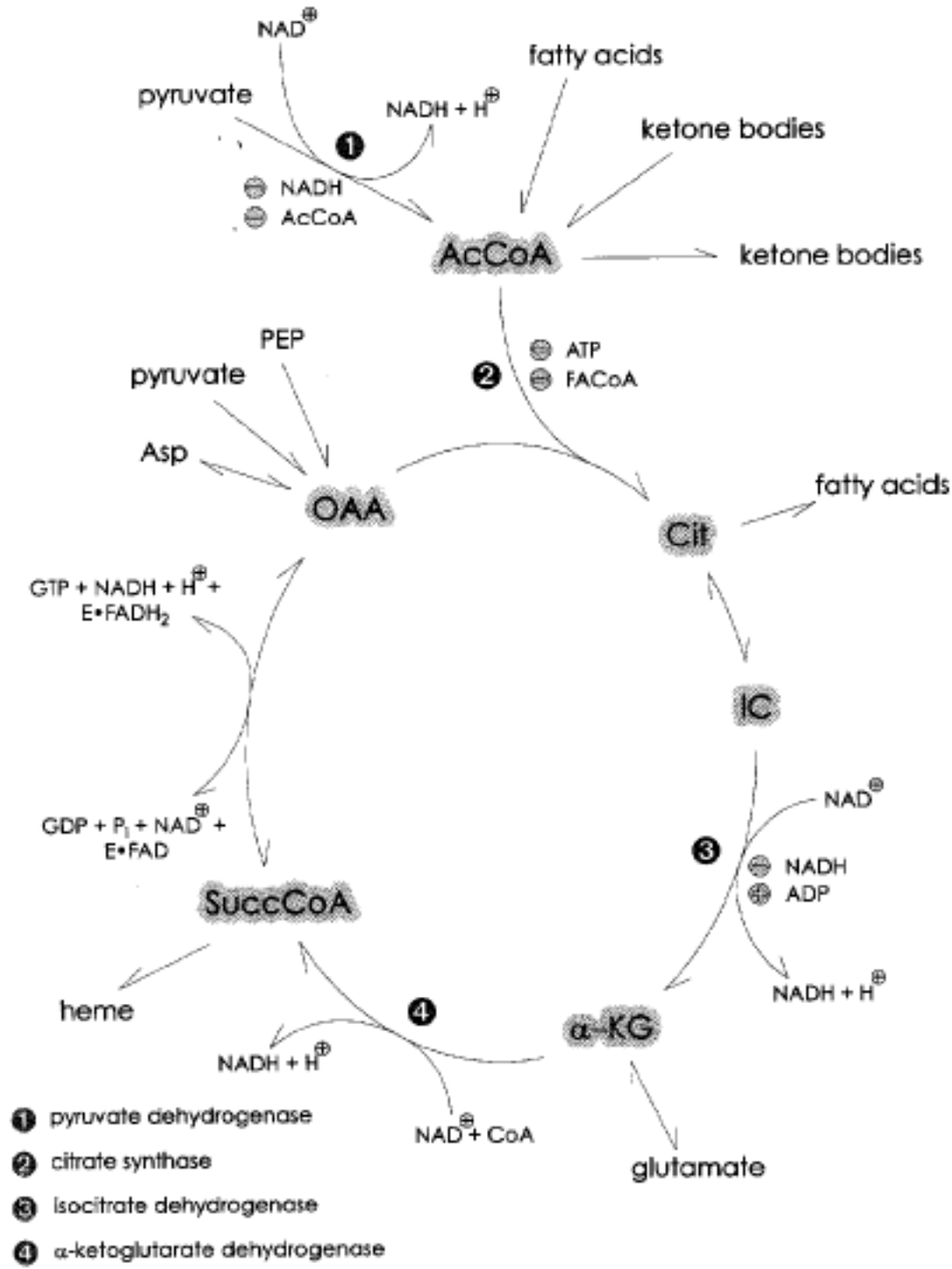


图 11.7 柠檬酸循环和其他与柠檬酸循环有关的代谢途径的主要步骤
柠檬酸循环的中间产物均有阴影, 注意其中的可逆步骤。3 个主要的控制步骤——丙酮酸脱氢酶、柠檬酸合酶和异柠檬酸脱氢酶——均附有其主要的负和(或)正效应物。

图 11.9 为柠檬酸循环的全图, 并列有结构式。

保存下来的丙酮酸都可能再生葡萄糖。虽然肝脏和肾脏皮质是葡萄糖再生的主要器官, 但甚至在肌肉中节省下来的丙酮酸都可经由血液以丙酮酸或乳酸的形式被运至肝脏, 并在其中转变为葡萄糖供躯体利用, 特别是那些绝对需要葡萄糖的器官和细胞, 如中枢神经系统和红细胞。

丙酮酸脱氢酶是介于糖酵解和柠檬酸循环之间并被精细控制的酶。丙酮酸脱氢酶的控制机制既有别构作用又有共价修饰。第一类作用中包括产物乙酰 CoA 的抑制作用。重要的是要认识到, 乙酰 CoA 不仅来自于丙酮酸, 也来自于脂肪酸、酮体和氨基酸的代谢。所以乙酰 CoA 的来源很多。在饥饿和可能发生低血糖时, 乙酰 CoA 的一个较重要来源是脂肪酸或其代谢产物酮体(第 14 章)。在大量脂肪酸被代谢时, 乙酰 CoA 就会增多, 于是丙酮酸脱氢酶受到

抑制,而葡萄糖和葡萄糖前体就得以保留。由于这一反应如此重要,因此单一的一种控制方法是不够的。这一反应也为高浓度的 NADH 所抑制,这种高浓度是线粒体中高势能的信号。

丙酮酸脱氢酶也能为共价修饰(磷酸化/去磷酸化)所控制。在线粒体中乙酰 CoA 和(或) NADH(这两者都可由脂肪酸和酮体的代谢产生)的浓度高时,以及线粒体中 ATP 与 ADP 的比值高时,由丙酮酸脱氢酶激酶催化的这一磷酸化作用更易发生。丙酮酸脱氢酶的磷酸化产生相当失活的或活性较小的丙酮酸脱氢酶。在这些情况下,乙酰 CoA 浓度的增高不仅以别构方式抑制此酶,而且也促进它转变为活性较低的磷酸化的形式。这种磷酸化的丙酮酸脱氢酶可以由需要 Ca^{2+} 的磷酸酶转变,回到有活性的形式。因此,这种酶的活性决定于磷酸化和去磷酸化的速率以及别构效应。看来,糖酵解迅速时存在而饥饿时不太可能存在的高浓度的丙酮酸会抑制丙酮酸脱氢酶激酶而使该脱氢酶保持活化状态,而乙酰 CoA 和 NADH 的高浓度则有助于促进此酶的磷酸化。丙酮酸脱氢酶激酶和磷酸酶均在线粒体中而不在细胞溶胶中,而依赖于 cAMP 的蛋白激酶的活性却在细胞溶胶中。因此, cAMP 本身并不是决定此酶的磷酸化状况的主要因素。躯体的大多数器官都有线粒体,它们都通过磷酸化作用而有效地控制丙酮酸脱氢酶。中枢神经系统是通常不氧化脂肪酸的一种组织。在所有已研究过的情况下,脑中的丙酮酸脱氢酶都存在于非磷酸化的(有活性的)状态。在其他组织中,在进食高糖类膳食时,丙酮酸脱氢酶主要处于非磷酸化的状态。而在饥饿时或糖尿病人体内或用高脂肪的膳食时,则处于磷酸化的(无活性的)状态。

(二) 柠檬酸合酶

由草酰乙酸和乙酰 CoA 在柠檬酸合酶催化下形成柠檬酸也是一个被控制的单方向反应。它为 ATP 所抑制。这是一种对漏出的控制,它与其他受 ATP 抑制的反应不同,这些反应均为 AMP 或 ADP 所活化。对于柠檬酸合酶,所有 3 种腺嘌呤核苷酸,即 ATP、ADP 和 AMP,好像都起抑制作用,不过 ATP 的作用比 ADP 和 AMP 的都强一些。ATP 抑制此酶的生理意义似乎是成问题的,因为在高能状态下,形成柠檬酸可能是有利的。当细胞中能量高时,柠檬酸会从线粒体中漏至细胞溶胶中,起着 PFK 的抑制剂的作用;假若 ATP 抑制了柠檬酸的合成,柠檬酸就不会积累,也就不能有这种效应了。脂酰 CoA(脂肪酸分解代谢的中间产物)有强烈的抑制作用,它好像是抑制柠檬酸合酶。这就使得草酰乙酸和乙酰 CoA 积累起来,这在葡糖异生过程中可能是重要的(见第 13 章)。

(三) 异柠檬酸脱氢酶

线粒体中需要 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶是线粒体中柠檬酸循环的主要控制所在。此酶与异柠檬酸浓度相关的动力学曲线是 S 形的。当 NADH 水平增高时,动力学曲线向右偏移(即产生更大的相对抑制)。若令动力学曲线向左偏移,它就会被活化;这是由 ADP 促进的。在线粒体中,这些都是很合理的效应物。柠檬酸循环中和通过丙酮酸脱氢酶所产生的势能大多为还原型辅酶的形式,如 NADH。当 NADH 浓度增加而其能量又不能迅速转入 ATP 时(由于缺少氧或可利用的 ADP),积累更多的 NADH 是不利的。因此, NADH 浓度的增加是线粒体中有潜力形成 ATP 的指示物,这种增加就抑制异柠檬酸脱氢酶。ADP 是 NADH 转变为电子传递系统中的势能的关键,它活化此酶并表明有 ADP 可以为 ATP 的形成所利用。因此,能量水平是异柠檬酸控制的决定性因素。在这一情况下,高能的指示物并不是 ATP 本身,而是 NADH,它

通过电子传递系统可以形成 3 个高能磷酸(即 ADP 形成 ATP, 图 11.8)。

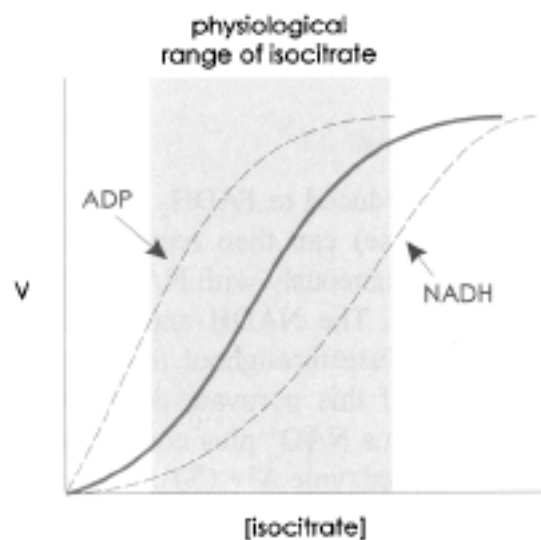


图 11.8 异柠檬酸脱氢酶的动力学

对于异柠檬酸浓度, 异柠檬酸脱氢酶的动力学曲线为 S 形(实线为效应物浓度正常时的响应, 虚线表明由于效应物而产生的变化的方向): 这些变化的数目实际上是无限的, 图中只画了左右各一条; NADH 增加时向右偏移, 在异柠檬酸的生理浓度范围内, 反应速率降低; ADP 增多时向左偏移, 反应速率随异柠檬酸生理范围内浓度的增加而增加; 阴影所示为异柠檬酸浓度的生理范围。

在这一情况下, 线粒体中低能的指示物是 ADP, 它与细胞溶胶中作为低能指示物的 AMP 类似。在这一步发生抑制作用的一个优点是, 当线粒体中潜在的能量水平很高时, 柠檬酸会积累, 而柠檬酸又会漏至细胞溶胶中, 在 ATP 的存在下, 增加对 PFK 的抑制程度。这样, 线粒体和细胞溶胶中的能量水平能够联合起作用, 控制葡萄糖中的碳通过糖酵解的流程。

(四) 柠檬酸循环的细节

假若有氧, 糖酵解中形成的丙酮酸就会进一步被氧化成 CO_2 和水, 以 ATP 或高能磷酸化合物的最终形式产生大量可利用的能。下文为这一循环及其各个步骤的详述, 每步的编号与图 11.9 中一致。此过程由丙酮酸进入线粒体基质开始, 在基质中丙酮酸脱氢酶不可逆地将丙酮酸转变为乙酰 CoA。这种酶是许多个独立的然而其个别活性又相互合作的亚基的复合体。

(1) 第一个亚基(丙酮酸脱羧酶)使丙酮酸脱羧, 需要硫胺素焦磷酸。形成二碳与硫胺素焦磷酸的加合物, 然后再由这一亚基转移到第二个含有氧化型硫辛酸(即 $\text{S} \rightarrow \text{S}$)的亚基上。

O

(2) 二碳加合物被转移, 在硫辛酸上形成一个 HS 和一个 $\text{S}-\text{C} \rightarrow \text{CH}_3$ 。

(3) 然后同一亚基将乙酰基转移到辅酶 A 上, 形成乙酰 $\rightarrow \text{CoA}$, 在整个线粒基质中扩散。

(4) 现在, 亚基上的硫辛酸有 2 个 SH 基团, 必须将其再氧化为 $\text{S} \rightarrow \text{S}$ 。这是由另一个亚基硫辛酸脱氢酶催化的, 此酶有一结合的辅基 FAD。此酶催化硫辛酸的再氧化, 同时 FAD 被还原为 FADH_2 。这一亚基(即硫辛酸脱氢酶)又可把 FADH_2 转变为 FAD, 同时 NAD^+ 转变为 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 。然后 NADH 和 H^+ 离开这一复合体, 在整个基质中扩散。所以, 丙酮酸脱氢酶的全部作用就是将丙酮酸加上 NAD^+ , 加上辅酶 A, 产生 $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{乙酰 CoA} + \text{CO}_2$ 。这一步是不可逆的, 也不是柠檬酸循环中真正的一个步骤, 但它是糖酵解与柠檬酸之间重要的中间步

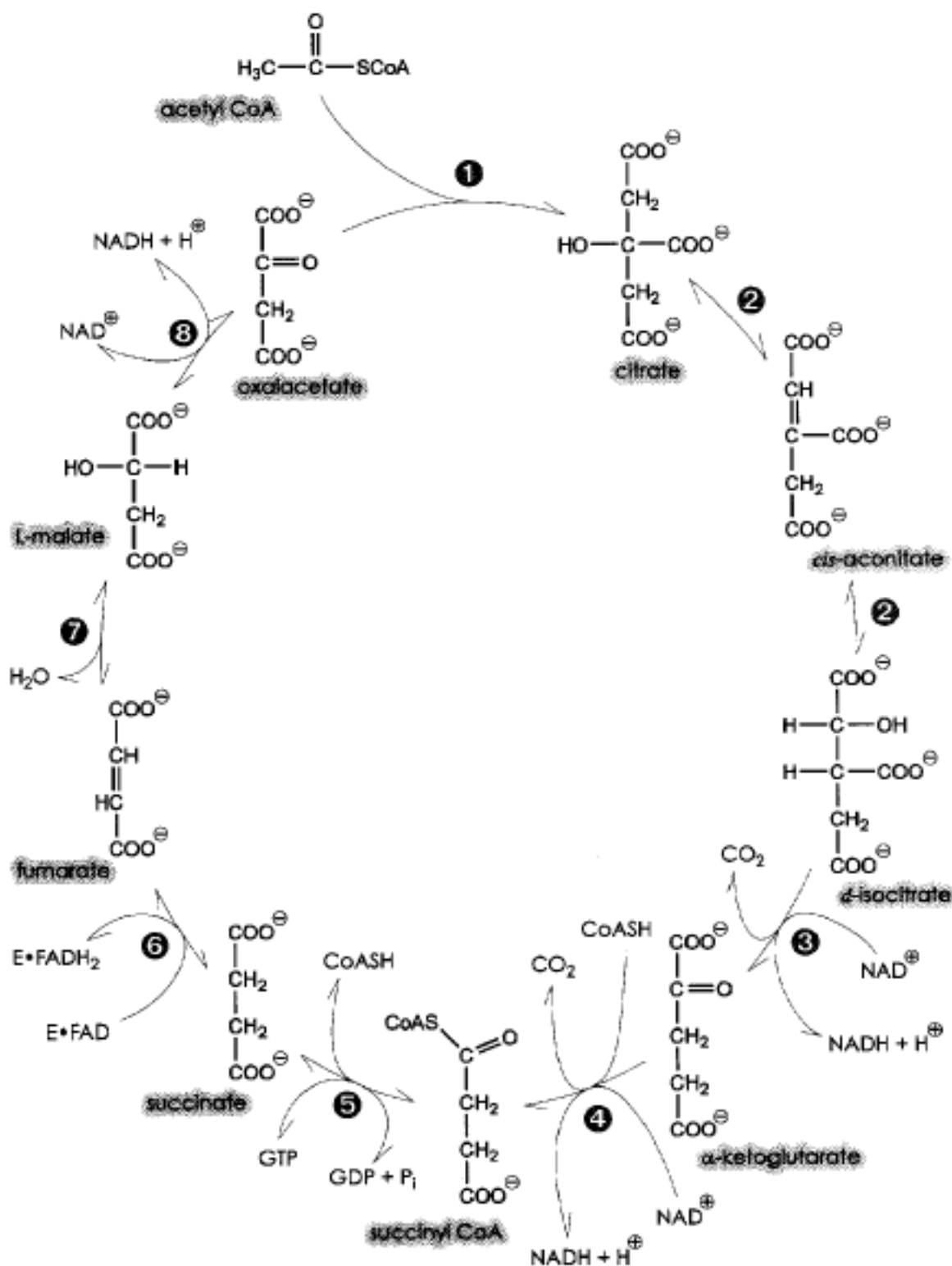


图 11.9 柠檬酸循环

图中所列为柠檬酸循环的详细步骤和结构式。每一反应的编号与正文中关于此循环的编号相同。新进入循环的乙酰-CoA 的两个碳上有星号以表示循环中的柠檬酸是不对称的。所有的碳都在琥珀酸处达到平衡; 因此, 在形成琥珀酸以后, 就无法再区分碳了。

骤。

丙酮酸脱氢酶可被亚砷酸盐抑制, 亚砷酸盐与还原型硫辛酸形成复合物, 使得硫辛酸不能参加下一步的反应。在硫胺素缺乏时, 此酶的量 and 活性都下降(图 11.10)。

(1) 现在所形成的乙酰 CoA 就可以进入柠檬酸循环了(亦称三羧酸循环和 Krebs 循环, 因发现此循环的人而得名)。第一步是草酰乙酸和乙酰 CoA 的缩合, 形成柠檬酸, 是由柠檬酸合酶催化的。这一反应生理上是不可逆的。由乙酰 CoA 释放的辅酶 A 可以再进入辅酶 A 的总库并且再参加丙酮酸脱氢酶或其他有关反应。

(2) 乌头酸酶催化柠檬酸脱水的反应, 形成顺-乌头酸, 水可再加到顺-乌头酸上, 或是形

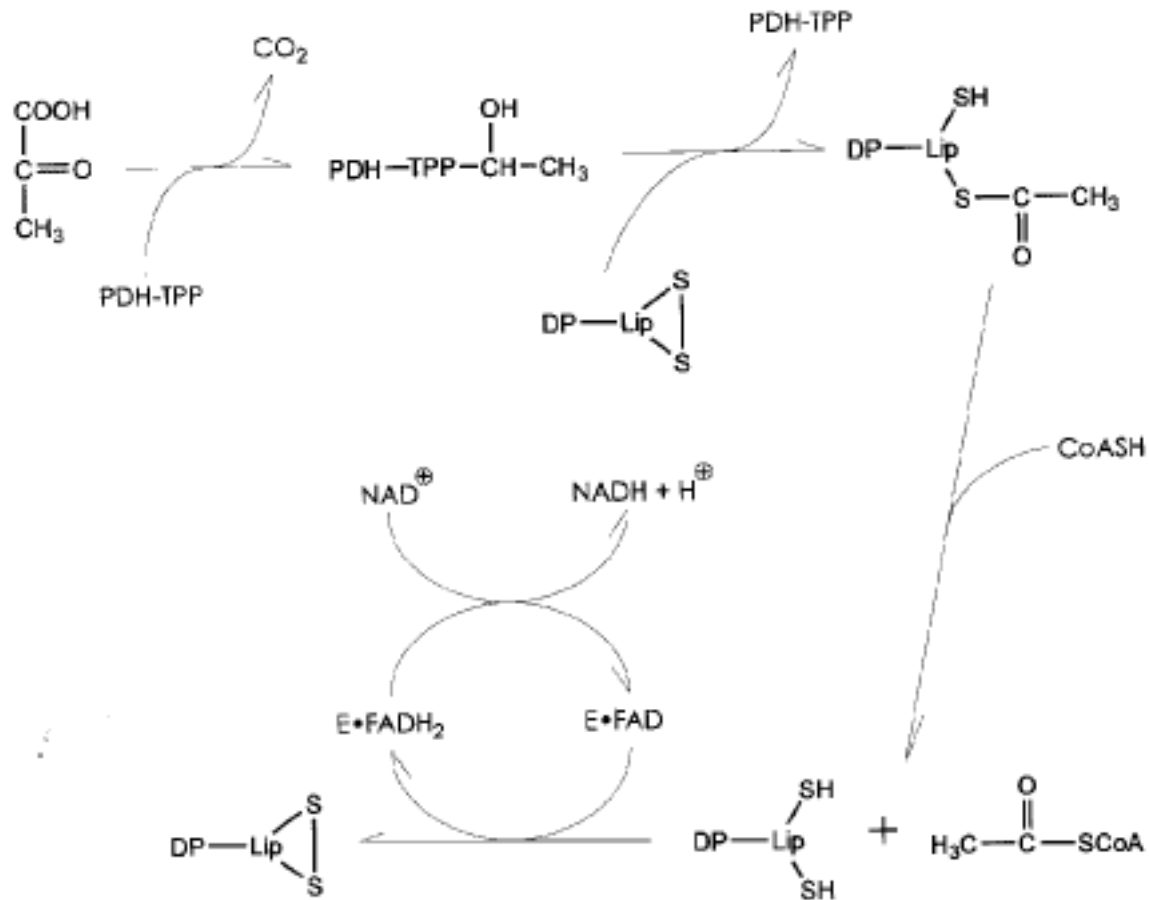


图 11.10 丙酮酸脱氢酶的机制

此图说明丙酮酸脱氢酶各个亚基的活性,丙酮酸中的碳上一直都有星号。

成柠檬酸,或是形成 d-异柠檬酸,视羟基是在第三个还是第二个碳上而定。这种酶活性尚高,达到平衡后中间产物的 90% 是柠檬酸,7% 是 D-异柠檬酸,3% 是顺-乌头酸。这一反应的一个有趣的方面是,虽然柠檬酸是一个对称的分子,但乌头酸酶作用于它时好像它是不对称的。这是由于底物与酶的三点连接,酶在水加到顺-乌头酸的位置上有立体结构的专一性。异柠檬酸上的羟基总是在新加上去的乙酰基的远端,因而立体结构的专一性就形成了 D-异柠檬酸。

乌头酸酶可被氟柠檬酸抑制,它会形成氟乙酸。氟乙酸曾被用作动物的毒药,偶然也让婴儿吞服。

(3) 需要 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶把异柠檬酸 + NAD^+ 转变为 α -酮戊二酸 + CO_2 + $\text{NADH} + \text{H}^+$, 是单方向反应。本章前面已讨论过此反应及其控制的细节。

(4) α -酮戊二酸脱氢酶,一多酶系统,其机制与丙酮酸脱氢酶类似,不过是对 α -酮戊二酸专一的,把 α -酮戊二酸 + NAD^+ + 辅酶 A 转变为琥珀酰 CoA + $\text{NADH} + \text{H}^+$ + CO_2 。乙酰 CoA 是丙酮酸脱氢酶的产物(乙酰 CoA 即比原来的丙酮酸少一个碳的酰基 CoA);在这一情况下,琥珀酰 CoA 是产物,它也是比原来的 α -酮戊二酸少一个碳的酰基 CoA。

(5) 琥珀酰 CoA 合成酶,或称琥珀酸硫激酶,把琥珀酰 CoA + GDP + 无机磷酸盐转变为琥珀酸、辅酶 A 和 GTP 。这是柠檬酸循环中惟一发生像糖酵解中那样的底物水平磷酸化的反应。这使得这个系统能把琥珀酰 CoA 这一硫酯中的能量转变为可利用的形式。注意,从能量上说,在第一和第二个磷酸基团之间以及第二和第三个磷酸基团之间的键能方面, GTP 、 ATP 、 CTP 和 UTP 都是完全相同的。因此, GTP 是和 ATP 一样的高能磷酸酯。在体内也有一些酶,极易使磷酸基团在核苷酸之间可逆地相互转换,例如 $\text{GDP} + \text{ATP}$ 可逆地转变为 $\text{GTP} + \text{ADP}$ 。

(6) 琥珀酸脱氢酶在柠檬酸循环的酶中是独一无二的,因为它结合在线粒体内膜上。此

酶中有 FAD 作为辅因子, 催化琥珀酸脱去两个氢形成延胡索酸和与酶结合的 FADH₂。通常, NAD⁺ 是与醇或醛的脱氢作用以及 α -酮酸脱氢酶联系着的。还原型辅酶(NADH) 形成后, 不能自动氧化, 因此是相当稳定的。FAD 则通常伴随着碳-碳双键的形成。FAD 和 FADH₂ 几乎总是作为辅基而与酶连接, 与 NAD⁺ 和 NADH 不同, 后二者很易与酶解离。还原型 FAD(即 E-FADH₂) 可自动氧化, 而且如果它与 O₂ 接触, 能形成 E-FAD + H₂O₂ (过氧化氢)。因此 FADH₂ 是被保护起来不与 O₂ 接触的, 只有在过氧化酶体的反应中是例外, 这种反应中所形成的 H₂O₂ 会被过氧化氢酶破坏。

(7) 所形成的延胡索酸可被延胡索酸酶可逆地转变为 L-苹果酸。这是一个迅速达到平衡的反应。

(8) 柠檬酸循环的最后一个反应是再生草酰乙酸以使此循环再度开始。这是由苹果酸脱氢酶完成的, 它可逆地催化 NAD⁺ + 苹果酸转变为 NADH + H⁺ + 草酰乙酸。像这一循环中的许多酶一样, 这种酶在线粒体内显然也能足够快地达到平衡。乌头酸酶、延胡索酸酶和苹果酸脱氢酶似乎都是如此。柠檬酸循环还有 3 个有效的单向反应, 即柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的反应。此外, 在大多数情况下, 另外两种酶, 即琥珀酰 CoA 合成酶和琥珀酸脱氢酶的反应是向前的, 不过在某些异常的情况下, 这些反应可以逆转。

11.8 电子传递系统和氧化磷酸化作用

对细胞来说, 重要的是把糖酵解, 特别是柠檬酸循环中形成的还原型辅酶中的潜能转变为 ATP 形式的可利用的能量。这是由作为内膜一部分的线粒体系统所完成的, 这个系统称为电子传递系统(图 11.11)。

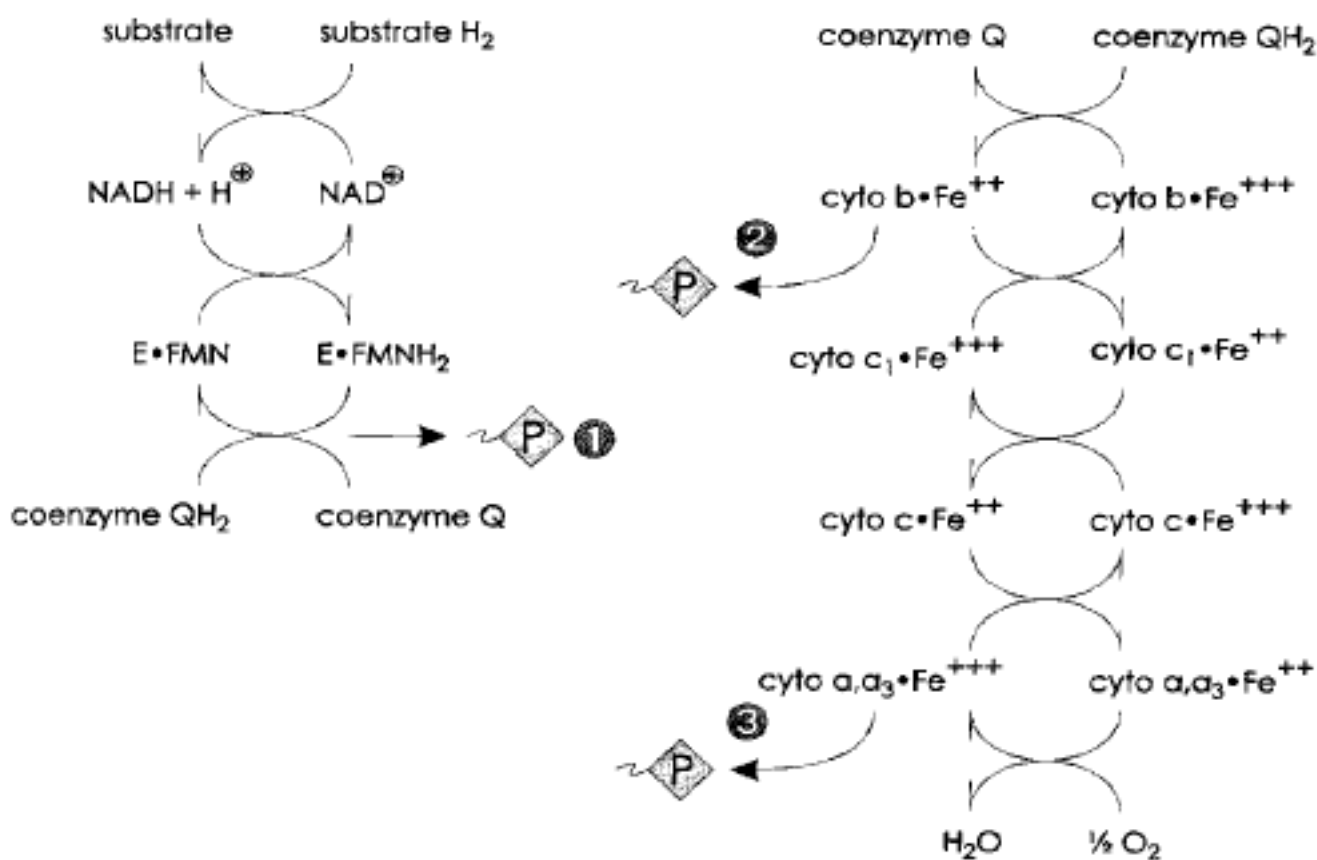


图 11.11 电子传递系统

(a) 氢传递部分和 (b) 电子传递部分: 表示有足够的能量落差以形成高能磷酸键, 数目字表示相应的电子传递系统的抑制剂发挥作用之处。

这一传递途径是有效地将 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 的氢传递给与酶结合的 FMN, 形成 E-FMNH_2 。然后 E-FMNH_2 将两个氢传递给一种醌的衍生物, 辅酶 Q, 在此过程中辅酶 Q 被定位在线粒体的嵴内。还原型 CoQ 将电子传递给细胞色素 b, 并将 H^+ 释放到线粒体基质中。然后电子从细胞色素 b 传递到细胞色素 c, 再到细胞色素 a, 最后到细胞色素 a_3 。来自细胞色素 a_3 的电子, 加上来自线粒体基质的 H^+ 和分子态氧化合形成水。因此, 总的来说, 还原型辅酶, 无论是 NADH 还是与酶结合的 FMNH_2 , 都是与氢一道被氧化的, 形成代谢的水。还有其他的黄蛋白与细胞色素系统相联系, 把氢直接传递给 CoQ, 例如 α -甘油磷酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶。这两个系统与氧化 NADH 的链内的与蛋白质结合的 FMN 不是一回事。

在整个传递过程中, 能量水平不断跌落(图 11.12)。电子传递系统中有 3 个步骤其能量的落差足以形成一个高能磷酸键, 即: (i) NADH 到与蛋白结合的 FMN 之间, (ii) 细胞色素 b 到 c 之间, (iii) 细胞色素 a/ a_3 到 O_2 之间。细胞色素系统是利用含铁的血红蛋白起作用, 其中铁的化合价是可以变化的。当细胞色素被还原时(即接受一个电子时), 铁由 Fe^{3+} 变为 Fe^{2+} 。然后细胞色素再把电子沿着这个系统往下传, 给出电子的细胞色素被再氧化为 Fe^{3+} , 而接受电子的则被还原为 Fe^{2+} 。在这一向下传递的过程中所获得的势能则用于将氢离子逆浓度梯度而从线粒体基质中运至细胞溶胶中。估计线粒体中的 pH 约为 7.4, 而细胞溶胶中的约为 7.0。因此, 任何氢离子由线粒体运出至细胞溶质都需要电子传递系统供应的能量。氢离子可以顺浓度梯度由细胞溶胶回到线粒体中, 通过的是称为 F_0 通道(图 11.13)的线粒体膜中的选择性通道。

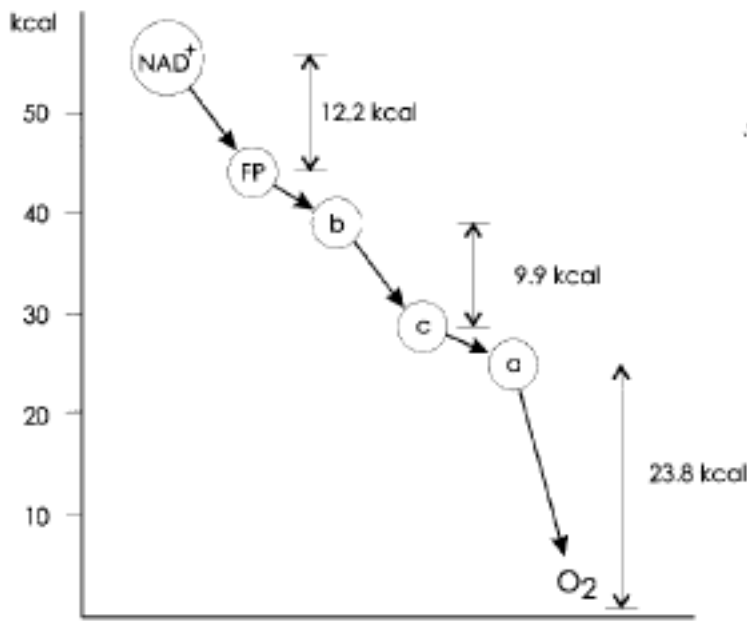


图 11.12 电子传递系统的能量水平
图示电子传递系统中的能量水平和能量落差。

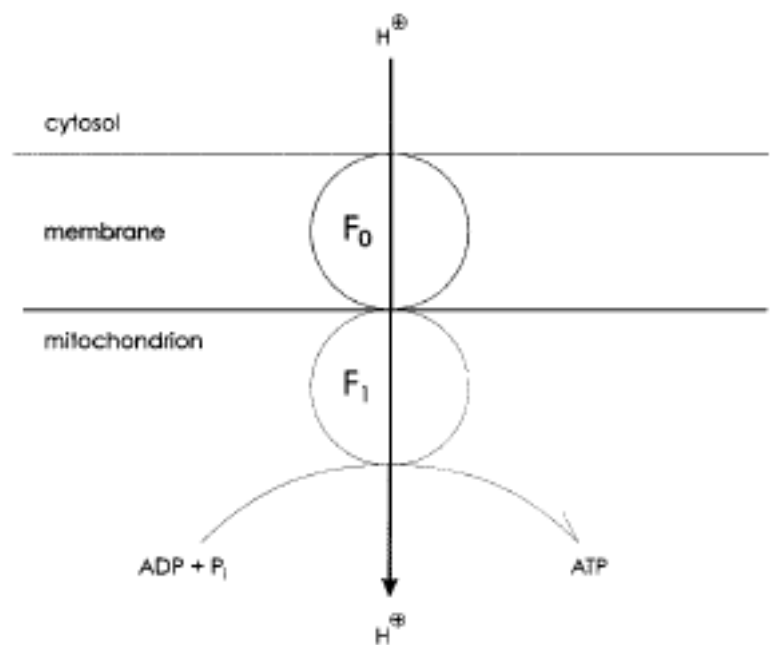


图 11.13 ATP 的形成
示形成 ATP 的 F_0/F_1 作用大意。

在通过 F_0 通道并与 F_1 ATP 酶相互作用的过程中, 氢离子进入线粒体的作用是与 ADP 和无机磷酸盐形成 ATP 的作用相偶联的。这一磷酸化作用的推动力是线粒体与细胞溶胶之间的 pH 梯度, 加上同时发生的氢离子顺着浓度梯度而回到线粒体的移动。这一 pH 梯度是由电子传递系统将氢离子泵至线粒体外而形成的。

大多数细胞中电子传递系统和氧化磷酸化作用是密切偶联的。也就是说, 当电子沿着电子传递系统流动时, 没有不同时发生 ATP 形成的。从 NADH 形成 ATP 或高能磷酸的产率是 3

个高能磷酸; 从与蛋白质结合的 FADH_2 起始的反应(如甘油磷酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶或脂肪酸代谢中的其他反应), 产率为 2 个高能磷酸。因为两个电子沿着电子传递系统下移时, 最终是与一个氧(即 $1/2 \text{O}_2$) 形成水, 所以与高能磷酸的形成同时发生的是氧的吸收。之所以称为氧化磷酸化, 是因为细胞色素的供应量是有限的, 除非它们能被再生, 即以氧为氢的最终受体, 否则这个系统不能继续发挥作用, 因而也就不再能产生高能磷酸。

P/O 比是一种有用的测定项目和概念, 它表示的是每利用 1 个原子的氧, 能获得几个高能磷酸。对于 NADH , 此比值为 3/1, 对于 FADH_2 , 则为 2/1。利用氧电极可以测定高能磷酸的形成和氧的消耗。在许多情况下, 是用分离的线粒体, 配合各种底物, 进行 P/O 比的测定。假若所得比值接近于理论值, 就认为线粒体是密切偶联的。假若所得的比值比理论值低得多, 就认为线粒体偶联得不好, 这可能是由于生理状况或制备过程中破坏了线粒体。

在正常的代谢过程中, 氧化磷酸化的限速因素通常是 ADP 的可利用性。有可被氧化的底物存在而 ADP 少时, 用线粒体只能观察到很少的氧被利用, 这可能是由于内源的 ADP 被解偶联, 或是由于 ATP 被水解而形成低水平的 ADP。这称为静息呼吸或状态 4。向这些线粒体内加入 ADP, 氧的利用迅速增多, 同时加入的 ADP 与无机磷酸形成 ATP; 这种状态称为活化的呼吸或状态 3。当加入的 ADP 全部变成 ATP 后, 线粒体又回到缓慢的静息呼吸状态; 因此, 可以清楚地看到与氧化作用同时发生的 ATP 形成何等重要。苍术苷是内膜上 ATP-ADP 转运蛋白的抑制剂, 阻断 ADP 进入线粒体基质, 若将苍术苷加于线粒体制剂中, 即使在 ADP 存在下, 也只能观察到静息呼吸。这证明线粒体内的 ADP 对于氧化磷酸化是至关重要的。这也说明在线粒体中形成的 ATP 是通过专一的转运蛋白而与细胞溶胶中的 ADP 交换, 从而保证细胞溶胶中有源源不断的 ATP 的供应, 而线粒体也得到连续不断的 ADP 供应以维持呼吸作用和需能的功能继续进行。也有电子传递系统中氧化磷酸化的抑制剂和解偶联剂。抑制 NADH 与辅酶 Q (泛醌) 之间电子传递的两种物质是鱼藤酮和安米妥(5-乙基-2-异戊基巴比妥酸)。当氢供体是 NADH 时, 这两种物质有效地抑制电子传递系统的运转; 像琥珀酸脱氢酶的反应, 产生的是与蛋白质结合的 FADH_2 , 其电子传递和氧化磷酸化作用仍可进行。抗霉素 A 抑制细胞色素 b 和 c 之间的电子传递, 对所有正常底物的电子流和氧化磷酸作用都有抑制作用。这种系统的另一种抑制剂是氰化物, 它作用于细胞色素 a_3 (细胞色素氧化酶); 你可能会问这为什么会抑制氧化磷酸化作用, 因为产生足够的能量以将氢离子排出到线粒体以外的步骤都在 a_3 之前。原因是细胞色素类的量是有限的, 当电子流在细胞色素 a_3 处被抑制时, 所有的细胞色素都处于还原状态, 不能让电子再在链上流动; 因此, 氢离子和电子不能传递到 O_2 , 因为细胞色素氧化酶被抑制了。人体内血红蛋白的量比细胞色素的量大多; 因此, 在某些情况下, 有氰化物中毒的可能时, 特别是当缓解可能要很长时间时(例如, 吃了含有复杂的氰化物衍生物的种子时), 利用亚硝酸异戊酯将一些血红蛋白氧化成 Fe^{3+} 状态(即高铁血红蛋白)就是一种疗法, 高铁血红蛋白能与氰化物反应。这样, 在氰化物到达细胞并完全抑制细胞色素系统之前, 高铁血红蛋白就把氰化物固定起来了。

氧化磷酸化作用的一种解偶联剂是二硝基酚, 其作用是将氢离子带回到线粒体中而不经过密切偶联的 F_0/F_1 系统。虽然电子走过了电子传递系统, 氧化作用本身也很快(类似状态 3), 但很少或没有(因二硝基酚的浓度而定) ATP 形成, 因为氢离子通过 F_0/F_1 通道以外的途径返回到线粒体中时, 不会发生高能磷酸的形成。解偶联剂与抑制剂的主要区别是抑制剂既抑制电子传递系统也抑制氧化磷酸化, 而解偶联剂则令氧化作用迅速进行, 而高能磷酸的产生

则较少。

11.9 苹果酸和 α -甘油磷酸穿梭

假若葡萄糖发生糖酵解而所形成的丙酮酸又在柠檬酸循环中被氧化, 丙酮酸就不能也被还原为乳酸。因此甘油醛-3-磷酸脱氢酶所产生的 NADH 就停留在细胞溶胶中。NADH 不能越过线粒体膜因而不能直接进入电子传递系统。糖酵解依赖于 NAD^+ 而细胞溶胶中 NAD^+ + NADH 的量是有限的。因此, 细胞溶胶中形成的 NADH 必须再生为 NAD^+ 。这种再生作用是利用小分子的穿梭来完成的, 小分子的穿梭使 NADH 中的还原力再生细胞溶胶中的 NAD^+ 。这些小分子是苹果酸穿梭中的苹果酸和 α -甘油磷酸穿梭中的 α -甘油磷酸(图 11.14)。

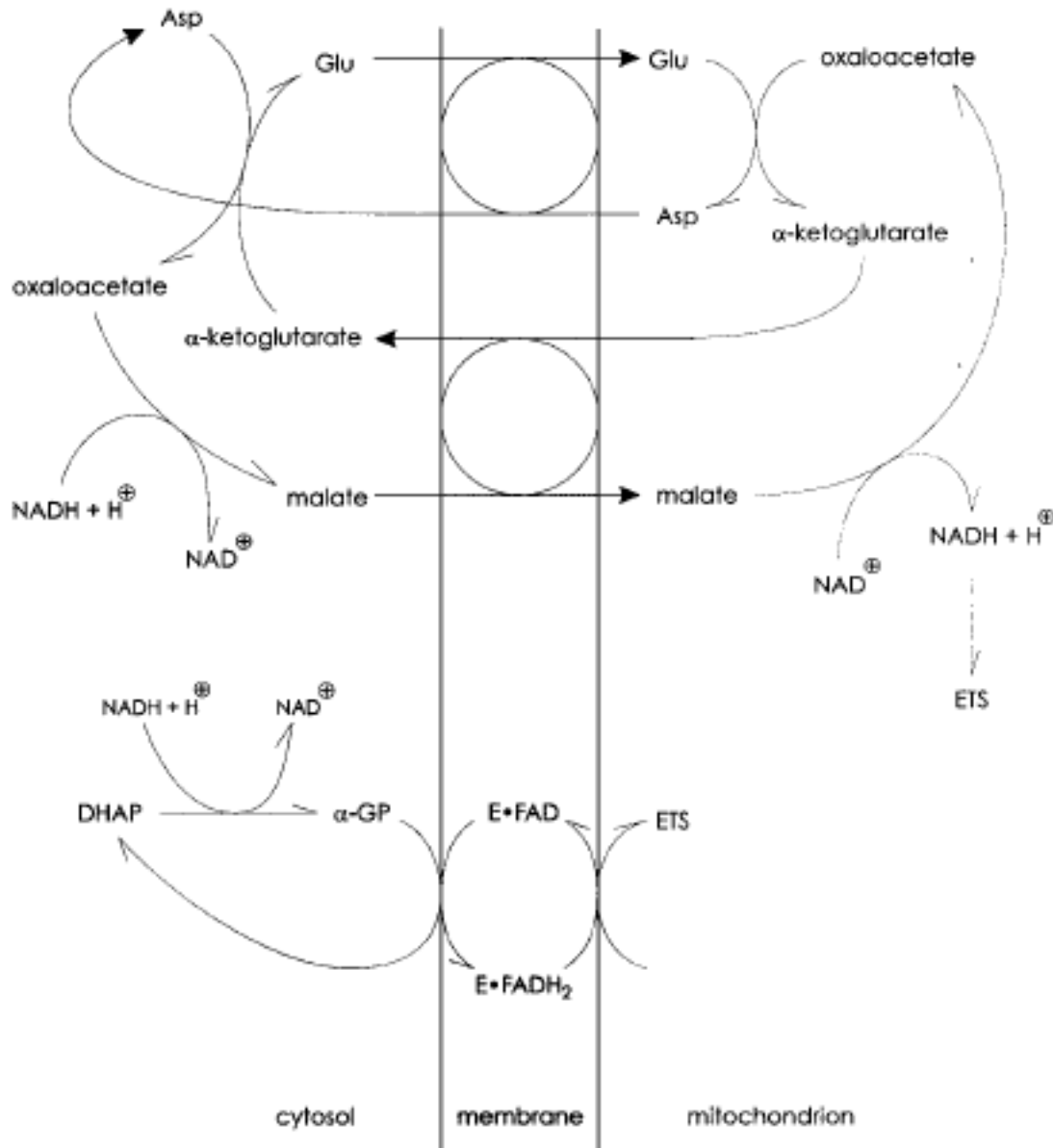


图 11.14 苹果酸和 α -甘油磷酸穿梭

还原力从细胞溶胶中的 NADH 穿梭到线粒体中: 苹果酸穿梭(上部分)较复杂, 但产生较多的高能磷酸, 苹果酸穿梭可将还原力运入或运出线粒体; α -甘油磷酸(α -GP)穿梭只能把还原力从细胞溶胶运至线粒体中; ETS 为电子传递系统。

苹果酸穿梭的作用是将细胞溶胶中的草酰乙酸还原为苹果酸, 使 NADH 再生 NAD^+ 。苹果酸通过专一的转运蛋白跨过线粒体膜, 与别的离子, 如 α -酮戊二酸进行交换。进入线粒体后, 苹果酸再被氧化为草酰乙酸, 产生线粒体中的 NADH, 然后线粒体中的电子传递系统再利用这些 NADH。所形成的草酰乙酸不能跨越线粒体膜, 则与谷氨酸在天冬氨酸氨基转移酶的

作用下发生转氨作用,在线粒体基质中形成 α -酮戊二酸和天冬氨酸。天冬氨酸可以出到线粒体外并在细胞溶胶中在天冬氨酸氨基转移酶作用下形成草酰乙酸和谷氨酸。谷氨酸可以与天冬氨酸交换,再进入线粒体中,继续参与转氨酶的作用。细胞溶质中所形成的草酰乙酸然后再被还原为苹果酸,循环又重新开始。这样,像苹果酸和天冬氨酸这样的小分子,在专一的转运蛋白的参与下,就能越过线粒体膜而使氢发生有效的穿梭,使细胞溶胶中的 NADH 再生为 NAD^+ 。这一循环要求天冬氨酸氨基转移酶和苹果酸脱氢酶均存在于细胞溶胶和线粒体二者之中。转氨作用是需要,因为线粒体内膜对草酰乙酸的透性不大,而且没有这种中间产物的专一的转运蛋白。但是有天冬氨酸、谷氨酸和 α -酮戊二酸的转运蛋白。这就使得转氨作用成为苹果酸穿梭的必不可少的部分。

第二种氢穿梭系统在哺乳动物(包括人在内)体内活性不高,但在昆虫体内活性很高,这就是 β -甘油磷酸穿梭。这种穿梭由 β -甘油磷酸脱氢酶组成,此酶将二羟丙酮磷酸和 NADH 转变为 β -甘油磷酸和 NAD^+ 。 β -甘油磷酸通过一种转运蛋白进入线粒体,线粒体中还有另一种 β -磷酸甘油脱氢酶,它是黄蛋白。这种线粒体中的酶含有 FAD,它把 β -甘油磷酸氧化为二羟丙酮磷酸并形成与蛋白质结合的 FADH_2 。所形成的二羟丙酮磷酸于是离开线粒体,循环又重新开始。还原型黄蛋白(FADH_2)将氢给予线粒体内电子传递系统中的辅酶 Q 而再生 FAD。

这两种穿梭系统均各有其明显的优点和缺点。苹果酸穿梭的优点是线粒体基质中形成的 NADH 能产生 3 个高能磷酸,而 β -甘油磷酸穿梭形成的 FADH_2 只能产生 2 个高能磷酸。苹果酸穿梭是部分可逆的,所以还原力既可以从细胞溶质移动到线粒体中,如肌肉和脑中的情况,又可以从线粒体移动到细胞溶质中,如肝中葡糖异生作用时苹果酸的移动。 β -甘油磷酸穿梭只能使还原力从细胞溶质内移到线粒体中。

11.10 小 结

(1) S 形动力学比 Michaelis-Menten 动力学产生更为精细的对酶活性的控制,使其因底物变化而发生的变化更为灵巧。

(2) 在无氧时葡萄糖可转变为乳酸,产生 2 个高能磷酸(ATP)。

(3) 葡萄糖向细胞内的转会限制糖酵解。

(4) 磷酸果糖激酶是糖酵解中第一个关键步骤,它似乎是糖酵解的限速酶。

(5) ATP 和柠檬酸是 PFK 的主要的负效应物(抑制),而 AMP 和 F-2,6-BP 是 PFK 的主要的活化剂。

(6) 有氧时,糖酵解中形成的丙酮酸会在柠檬酸循环中被代谢为 CO_2 和水。

(7) 连接糖酵解与柠檬酸循环之间的纽带是丙酮酸脱氢酶。线粒体中的这种酶为乙酰 CoA 和 NADH 所抑制,也为磷酸化作用所抑制。

(8) 柠檬酸循环是线粒体内发生的过程,它始于柠檬酸合酶所催化的草酰乙酸和乙酰 CoA 转变为柠檬酸的反应。ATP 对此酶稍有抑制,脂酰 CoA 则有强烈的抑制。

(9) 柠檬酸循环中主要的控制酶是异柠檬酸脱氢酶。此酶为 NADH 所抑制而为 ADP 所活化。

(10) 柠檬酸循环所产生的势能大部分在还原型辅酶 NADH 和与酶结合的 FADH_2 中。

(11) 这些还原型辅酶在电子传递系统中可被氧化,产生代谢水和 ATP。

(12) 细胞色素类通过血红素铁传递电子, H^+ 则从线粒体中被泵至细胞溶胶中。

(13) H^+ 返回到线粒体中的过程与 ATP 的形成相偶联。

(14) NADH 的氧化可产生 3 个高能磷酸(ATP), 而与酶结合的 $FADH_2$ (如琥珀酸脱氢酶反应) 则产生 2 个高能磷酸。

(15) 还原力(即 NADH) 可以通过苹果酸穿梭被转运到线粒体内。苹果酸穿梭也可将还原力运出线粒体。-甘油磷酸穿梭也可将还原力从细胞溶胶运至线粒体中。人体内, 苹果酸穿梭起着比 -甘油磷酸穿梭大的作用。

参 考 资 料

- Facilitative glucose transporters: An expanding family, G. W. Gould and G. I. Bell, 1990, Trends Biochem. Sci., 15: 18 ~23.
- Flux-generating and regulatory steps in metabolic control, E. A. Newsholme and B. Crabtree, 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 53 ~56.
- Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex, R. H. Behal, D. B. Buxton, V. G. Robertson, and M. S. Olson, 1993, Ann, Rev. Nutr., 13: 497 ~520.
- Enzymatic regulation of liver acetyl-CoA metabolism in relation to ketogenesis, O. Wieland, L. Weiss, and I. Eger-Neufeldt, 1964, Adv. Enzyme Reg., 85 ~99.
- The glucose paradox: New perspectives on hepatic carbohydrate metabolism, J. Katz, M. Kawajima, D. W. Foster, and J. D. McGarry, 1986, Trends Biochem. Sci., 11: 136 ~140.
- Pyruvate kinase and other enzyme deficiency disorders of the erythrocyte, W. N. Valentine, K. R. Tanaka and D. E. Paglia, in The Metabolic Basis of Inherited Disease, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, McGraw-Hill—New York, Eds. 1989, pp. 2341 ~2365.

复 习 题

- 下列化合物中哪一种不是 PFK 的效应物?
 - ATP
 - ADP
 - AMP
 - F-2, 6-BP
 - 柠檬酸
- 下列各种酶中, 哪一个是糖酵解中的第一个关键酶?
 - 己糖激酶
 - 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
 - PFK
 - 醛缩酶
 - 乳酸脱氢酶
- 糖酵解中第一个产生 ATP 的步骤是:
 - PFK
 - 丙酮酸激酶
 - 烯醇化酶
 - 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
 - 3-磷酸甘油酸激酶

4. 下列各化合物中, 哪一个不是丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的辅因子?
 - a) FAD
 - b) 硫辛酸
 - c) ATP
 - d) NAD^+
 - e) 辅酶 A
5. 柠檬酸循环中发生底物水平磷酸化的惟一反应是由下列哪种酶催化的?
 - a) 琥珀酰 CoA 合成酶
 - b) 丙酮酸脱氢酶
 - c) 柠檬酸合酶
 - d) 琥珀酸脱氢酶
 - e) α -酮戊二酸脱氢酶
6. 人体内将还原力运至线粒体中的主要系统是下列哪一项?
 - a) 乙醛酸穿梭
 - b) α -甘油磷酸穿梭
 - c) 肉碱穿梭
 - d) 苹果酸穿梭
 - e) 磷酸穿梭
7. 下列哪一种 是异柠檬酸脱氢酶的主要正效应物(活化剂)?
 - a) AMP
 - b) ADP
 - c) ATP
 - d) NAD^+
 - e) NADH
8. 己糖激酶基本上是由下列哪一项控制的?
 - a) ATP 浓度
 - b) NADH 浓度
 - c) F-1, 6-BP 浓度
 - d) G-6-P 浓度
 - e) AMP 浓度
9. 对于生理条件下的反应方向, 由于别构部位的原因, ATP 对于下列哪种酶既是底物又是抑制剂?
 - a) 己糖激酶
 - b) PFK
 - c) 丙酮酸激酶
 - d) 丙酮酸脱氢酶
 - e) 柠檬酸合酶
10. 下列哪一项不是丙酮酸脱氢酶的生理的控制因素?
 - a) 乙酰 CoA
 - b) NADH
 - c) 共价修饰
 - d) FADH_2
 - e) ATP

11. 异柠檬酸脱氢酶的作为能量信号的负效应物为什么是 NADH, 而不是 ATP?
 - a) NADH 的浓度比 ATP 的高
 - b) NADH 所相当的势能比 ATP 的高得多
 - c) 苹果酸穿梭移动的是还原力而不是 ATP
 - d) ATP、ADP 和 AMP 是通过腺苷酸激酶而成平衡的
 - e) 柠檬酸循环中产生的主要势能化合物是 NADH 而不是 ATP
12. 苹果酸脱氢酶催化的不是柠檬酸循环中起控制作用的反应, 因为:
 - a) 它既可存在于细胞溶胶中, 又可存在于线粒体中
 - b) 它是循环中的最后一步
 - c) 它是处于平衡状态的
 - d) 它能形成天冬氨酸
 - e) 苹果酸和草酰乙酸都是双羧酸
13. 假若氢离子从细胞溶胶进入线粒体而不通过 F_1/F_0 通道, 结果如何?
 - a) 偶联极好
 - b) 氧化
 - c) 还原
 - d) 解偶联
 - e) 主动转运
14. 在一种可被氧化的底物存在下, 应向完整的分离的线粒体加入什么, 才能使还原力和电子的流动以及耗氧量增加?
 - a) 更多的柠檬酸循环的酶
 - b) ADP
 - c) $FADH_2$
 - d) NADH
 - e) 氰化物

参 考 答 案

1. b 答案是 ADP。ATP 和柠檬酸都是 PFK 的负效应物。AMP 和 F-2, 6-BP 都是 PFK 的正效应物。
2. c 答案是 PFK, 它驱使己糖-6-磷酸进入糖酵解。己糖激酶启动葡萄糖代谢; 但所形成的 G-6-P 能形成糖原, 能进入戊糖磷酸途径, 或产生糖酵解中间产物以外的代谢物。另外 3 种酶都催化糖酵解中的反应, 但都发生在 PFK 的作用之后。这些糖酵解的酶催化的都是生理上可逆的反应, 而 PFK 催化的则是生理上不可逆的反应。
3. e 答案是 3-磷酸甘油酸激酶。此酶催化 ADP 形成 ATP, 同时, 1, 3-BP-甘油酸转变为 3-P-甘油酸。丙酮酸激酶的反应也形成 ATP, 但这是在糖酵解的后期。其他 3 种酶所催化的反应都不产生 ATP。
4. c 答案是 ATP。所有其他辅因子都参与丙酮酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶的作用。
5. a 答案是琥珀酰 CoA 合成酶, 它催化琥珀酰 CoA 和 $GDP + Pi$ 转变为琥珀酸, CoA 和 GTP。其他反应都不能直接产生高能磷酸。
6. d 答案是苹果酸穿梭, 它存在于几乎所有的需氧组织中。有一些通过 β -甘油磷酸穿梭的转运, 但比通过苹果酸穿梭的少得多。其他系统都不转运还原力(即 NADH)。
7. b 答案是 ADP。NADH 是异柠檬酸脱氢酶的负效应物。其他 3 种都不是异柠檬酸脱氢酶的主要效应物。
8. d 答案是 G-6-P 的浓度。其他代谢物的浓度在代谢控制中有别的作用。

9. b 答案是 PFK。ATP 是己糖激酶的底物,但不是抑制剂。ATP 仅仅是在非生理方向的反应中才是丙酮酸激酶的底物。ATP 不是丙酮酸脱氢酶和柠檬酸合酶的直接底物。
10. d 答案是 FADH_2 。其他 4 种都是丙酮酸脱氢酶的可能负效应物。
11. e 答案是因为只有琥珀酰 CoA 合成酶直接产生高能磷酸。柠檬酸循环的其他酶催化分子重排和(或)还原型辅酶(即 NADH 或与酶结合的 FADH_2)。
12. c 答案是成平衡。酶完成反应的平衡就是最好的结果;达成平衡的反应不可能控制流程。
13. d 答案是解偶联。不流经 F_1/F_0 通道而再进入线粒体的氢离子不能形成 ATP,但氧的消耗却继续进行,这就是所谓解偶联。
14. b 答案是 ADP。形成 ATP 需要 ADP,在偶联良好的线粒体中,不同时发生 ATP 的形成,就不会有电子流动和氧的吸收。

第 12 章 糖原代谢、戊糖磷酸途径和其他糖类的代谢

12.1 引言

本章要研究利用糖原贮存葡萄糖和葡萄糖磷酸在代谢上和生理上的优点。用于控制糖原合成和降解的方式包括代谢的效应物、共价修饰和激素控制。有关的是两种不同的限速酶,一种是控制合成的,一种是控制降解的。糖原在肌肉中和在肝脏中的生理作用是不同的。因此,如所预期,这两种组织中的控制也不同,利用的是不同的同功酶的功能。合成糖原所需要的能量比糖原再转变为己糖磷酸所产生的能量要多一些;不过,因为糖原的循环被限制到最低的程度,所以不会有过多的能量损失。为了使循环达到最低的程度,当降解被活化时,细胞就停止合成,反之亦然。在本章中我们还要研究葡萄糖代谢的另一种途径,即戊糖磷酸途径,还有其他糖类的代谢。要研究的两种主要的己糖是果糖和半乳糖,两者都是人的膳食中二糖的一部分。

糖原是动物体内葡萄糖的贮存形式。贮存糖原而不贮存游离的葡萄糖的优点是,糖原是葡萄糖的很大的多聚体,其渗透效应很小,而在细胞中贮存数量相等的葡萄糖会产生极大的渗透效应。在大多数细胞中,既可合成也可降解糖原。虽然糖原是广泛存在的,但只有两种组织中有大量的糖原,这就是肌肉和肝脏。

12.2 糖原代谢

(一) 糖原的生物合成

糖原的生物合成由葡萄糖-6-磷酸开始。如前所述,这是糖酵解以外的葡萄糖-6-磷酸的几种不同的去向之一。葡萄糖-6-磷酸在磷酸葡萄糖变位酶的作用下,经过葡萄糖-1,6-二磷酸,可以可逆地转变为葡萄糖-1-磷酸。这一反应机制和前已讨论过的磷酸甘油酸变位酶的相同。葡萄糖-1-磷酸可以与 UTP 发生可逆反应而被活化,此反应形成 UDP-葡萄糖(UDPG) + 焦磷酸。虽然这一反应是可逆的,但在细胞内焦磷酸迅速变为 2 个无机磷酸;这样,由于去掉了反应的一个产物(即焦磷酸),所以此反应的方向主要是形成 UDPG。这是一个投入比所需要的多一个高能磷酸而保证反应单方向进行的例子,虽然从能量上考虑这是不利的。例如,体内可以形成 UDP 葡萄糖和无机磷酸;然而平衡会限制此反应,高浓度的无机磷酸会阻止此反应向前进行到足够的程度。

UDPG 这种物质是两个代谢过程中的反应物,这两个过程是糖原合成和解毒反应。它可被 NAD^+ 氧化为 UDP-葡萄糖酸,这是缀合和解毒过程(如药物代谢和胆色素的排泄)中的重要中间产物。糖原合成从量上说是更为重要的,它是由糖原合成酶催化的,其反应是 n 个葡萄糖单位的糖原 + UDPG 形成 $n + 1$ 个葡萄糖单位的糖原 + UDP(图 12.1)。这一反应是单方向的,是在别构和激素两者的控制之下的。糖原中的键主要是 -1,4 和 -1,6 键。糖原合酶仅形成 1,4 键。当糖原链伸长时,分支酶作用于由 n 个 1,4 键连接的葡萄糖的部分,并将这一部分转

移到 -1,6 分支上, 于是形成了高度分支的多糖; 这与直链淀粉的合成不同, 此合成中所有的链都是 -1,4 键的直链。因为糖原中的所有分支在其游离的末端葡萄糖上都有 4 个游离的羟基, 所以只要从 UDPG 上向任何分支的末端加上葡萄糖, 糖原合成就可继续进行。当分支变长时, 又会形成新的 -1,6 分支。

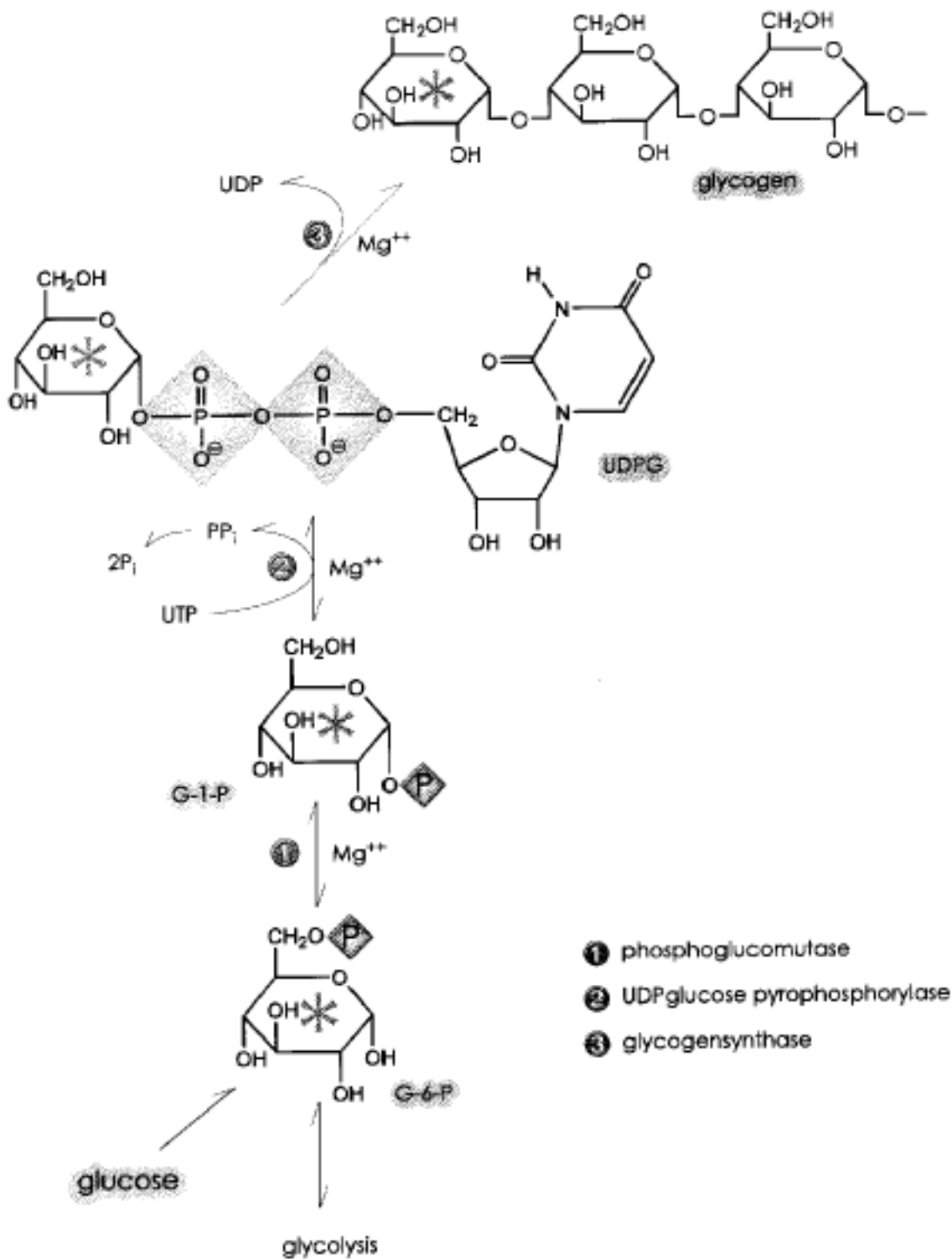


图 12.1 糖原合成的总途径

(二) 降解

糖原的分解发生于 -1,4 键的磷酸解, 产生葡萄糖-1-磷酸和少 1 个葡萄糖基的糖原。催化此反应的酶是磷酸化酶。这一反应在试管中是可逆的, 但在细胞中, 由于无机磷酸的水平很高而葡萄糖-1-磷酸的水平低, 它以单方向进行。糖原在肌肉和肝中的作用是不同的。在肝脏中, 糖原主要是潜在血糖的贮备; 在肌肉中, 它主要是能源。高度分支的糖原有许多末端的 -1,4 键, 磷酸化酶对这种键的专一性要比对线状的多糖如直链淀粉中的 -1,4 键的专一性强。这就提供了更多能发生反应的末端, 因而分解以产生 G-1-P 更快, 利于产生能量。支链和直链

多糖的在功能上的对比是很有意义的。对于植物,移动位置和迅速发生响应并不重要,作为能源而贮存的多糖主要是直链的或稍有分支的多糖。与此相反,对于动物,运动和迅速作出响应是至关重要的,所以贮存的多糖是高度分支的糖原。糖原可被迅速降解为 G-1-P,或是用于产生能量,或是作为血糖的来源。

磷酸化酶催化糖原降解为葡萄糖-1-磷酸和极限糊精。当连在 -1,6 键上的分支在 4 个葡萄糖单位以内时,磷酸化酶就不能催化它分解为葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖单位更少的分支了。糖原的进一步降解需要脱支酶,此酶会去掉连在 -1,6 键上的 4 个由 -1,4 键连接的葡萄糖单位中的 3 个,并将它们移到另一条链的末端,于是磷酸化酶就可继续将其分解为葡萄糖-1-磷酸。最后一个葡萄糖基(即连在 -1,6 键上的)则在 -1,6-葡萄糖苷酶催化的反应中被除去,形成游离的葡萄糖。由磷酸化酶的作用所形成的葡萄糖-1-磷酸,可由磷酸葡萄糖变位酶的作用转变为葡萄糖-6-磷酸。G-6-P 在肌肉中可进入糖酵解,在肝中则转变为葡萄糖,以后将会讨论到。

糖原代谢在医学上是有意义的,因为有许多关于糖原贮存的疾病,糖原不能以适当的方式被降解。在所有这些疾病中,糖原过量积累可能产生的显著后果是肌肉衰弱,细胞不能利用糖原作为能源。假若肝中糖原的降解受到损害,那就不仅会有过量的贮存,而且还可能出现低血糖(还可能死亡),因为缺乏动员糖原以产生血糖的能力。

(三) 糖原贮存方面的疾病

有许多种糖原贮存方面的疾病。在将要讨论的几种疾病中,三种缺乏直接关系到糖原降解的系统;另一种与糖原降解产物的异常代谢有关,具体地说,是与己糖磷酸的代谢有关。

类型 (von Gierke 氏病)。这是最常见的糖原贮存疾病,是由于缺乏一种隐性基因,致使糖原主要在肝中积累而不在肾中积累。这两种器官都与葡糖异生有关(见第 13 章),葡糖异生需要葡萄糖-6-磷酸以将游离的葡萄糖释放到血液中。von Gierke 氏病的患者没有这种酶;因此 G-6-P 在肝中积累而不能释放出葡萄糖。来自糖原降解或葡糖异生的 G-6-P 通常是转变成葡萄糖,现在则有两种命运:再形成糖原,其结果是糖原累积过多;或是糖酵解,其结果是血液中乳酸过多。除去肝中糖原过多以外,主要的问题是不能从葡糖异生和糖原分解获得葡萄糖,于是发生低血糖。可以由糖原释放出少量的葡萄糖,但是只能通过淀粉-1,6-葡萄糖苷酶(即脱支酶)催化的反应从 -1,6 分支上释放葡萄糖。

类型 (Pompe 氏病)。这是由于缺乏溶酶体中的淀粉-1,6-葡萄糖苷酶,此酶催化 -1,6-分支上的葡萄糖的释放,通过非磷酸解的方式产生葡萄糖而不是葡萄糖-6-磷酸。这种病人体内所有贮存糖原的组织中都有糖原积累。溶酶体中积累糖原颗粒但不能同时使之降解,于是使溶酶体的功能有缺陷。这种疾病导致早年心力衰竭。

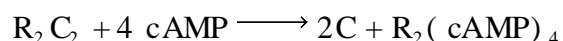
类型 (Cori 氏病)。这是由于没有脱支酶。糖原积累,因为只有分支的外部能被磷酸化酶去掉。因此,高度分支的糖原积累起来,而由于糖原降解不完全,所以偶尔会有低血糖发生。

类型 (McArdle 氏病)。这是由于肌肉中没有磷酸化酶,严重地限制了糖原的分解和持续的紧张锻炼的能力,因为肌肉中的糖原不能被用作为能源。有这种病时,肌肉通常会受到损伤。

(四) 糖原合成的控制

对于糖原的合成,既有别构控制,又有激素控制。可以观察到试管中的某些别构效应物对

糖原代谢的作用,但没有什么生理意义。肌肉中的糖原代谢是由两种作用相反的激素即肾上腺素和胰岛素控制的。肾上腺素是应急响应的激素,胰岛素是主要的组成代谢的激素。胰岛素促进糖原的合成而肾上腺素加速糖原的分解。肌肉中糖原合成的控制主要是糖原合酶的活性状态。这种酶可存在于磷酸化的和非磷酸化的状态。糖原合酶和丙酮酸脱氢酶一样,磷酸化的形式无活性,而非磷酸化的形式有活性。葡萄糖-6-磷酸也是这种酶的可能的别构活化剂,特别是对于无活性的形式。糖原合酶的磷酸化的形式曾被称为 D-形式,以表示它的活化依赖于高水平的葡萄糖-6-磷酸。不过,对于肌肉而言,从生理上看这似乎并不重要,在由葡萄糖合成糖原时,不会积累大量的葡萄糖-6-磷酸,因为它抑制己糖激酶。肾上腺素使肌肉中环 AMP(cAMP) 的量增加,cAMP 是许多种激素的第二信使。cAMP 的增多会使一种依赖于 cAMP 的蛋白激酶活化,其方式如下:



C 亚基是起催化作用的亚基,它能使适当的靶蛋白如糖原合酶磷酸化。R 亚基起调节作用,当它与催化亚基结合时就使之失活,不能使蛋白质磷酸化(见第 16 章,有详述)。胰岛素的许多种作用之一就是使 cAMP 减少和(或)蛋白质的去磷酸化作用速率加快。依赖于 cAMP 的蛋白激酶能催化某些蛋白质的磷酸化,而磷酸蛋白磷酸酶又能去掉这种磷酸。这种依赖于 cAMP 的蛋白激酶的催化作用能使 ATP 和蛋白质产生磷酸化的蛋白质和 ADP。磷酸蛋白磷酸酶则催化磷酸化的蛋白质产生蛋白质 + 无机磷酸。肌肉中,糖元合成的速率取决于糖原合酶的磷酸化状态。这种酶的去磷酸化形式越多,糖原合成速率越快;磷酸化的形式越多,合成就越慢。肌肉中,磷酸化酶和糖原合酶好像都结合在大的糖原颗粒上。当颗粒变大和当组织中约有 2% 的湿重为糖原时,大部分糖原合酶存在于失活的或磷酸化的状态,不管胰岛素的水平如何和是否没有肾上腺素(图 12.2)。这就将肌肉中贮存的糖原量限制在湿重的 2% 左右。在某些情况下,长跑运动员会进入一特殊的“糖原装载”状态,使得肌肉中的糖原稍高于 2% 的水平,但不会像肝中那么高。

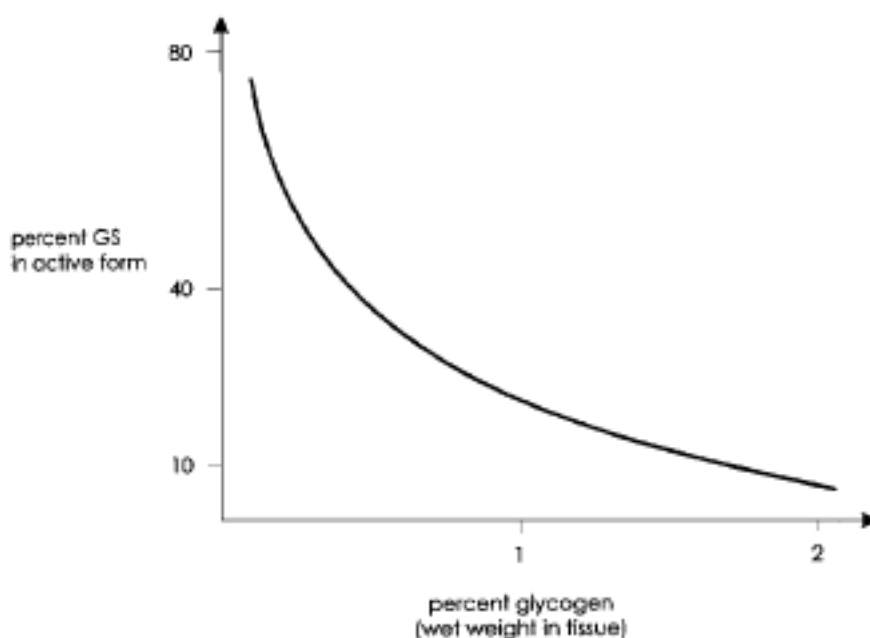


图 12.2 糖原合酶(GS)的活性形式与糖原浓度的关系
随着糖原浓度的加大,糖原合酶活性形式的百分率减少。

肝细胞中也有同样的控制;不过肝中积聚糖原的能力要大得多。例如,在饥饿而后进食的情况下,肝中可以有多达 8% 的糖原。有可能肝中葡萄糖-6-磷酸使糖原合酶发生别构活化,因

而使糖原大量聚积。之所以这样,可能是因为某些葡萄糖激酶可能未被抑制,特别是在 F-1-P 存在下,而在称为葡糖异生(第 13 章)的过程中又会形成相当量的葡萄糖-6-磷酸。这种现象的一个例子就是 von Gierke 氏病,葡萄糖-6-磷酸和糖原都会积累。

肝与肌肉的一个主要区别就是对激素的敏感性。肾上腺素和胰高血糖素都对糖原的合成有影响,肌肉中肾上腺素促进磷酸化的糖原合酶,即无活性的糖原合酶的形成,而肝脏中起主要作用的却是响应于低血糖而被释放出来的胰高血糖素。这与肝中的糖原起着血糖贮备的作用是一致的。胰高血糖素使糖原合酶磷酸化而失活。在肌肉和肝这两种组织中,这种酶的响应都是与激素的信息一致的,即胰岛素给的信号是适于贮存糖原,而肾上腺素和胰高血糖素的信号是动员糖原,或是提供能量(应急反应),或是作为血糖的来源以使血糖水平恢复正常。

(五) 糖原降解的控制

和糖原合酶一样,磷酸化酶也是受到别构控制和激素控制的。前已指出,用于糖原合成的是一种特别高能的磷酸。虽然这是不能直接回收的,但在肌肉中利用糖原方面却有许多优点。若由糖原分解而形成的葡萄糖-1-磷酸通过磷酸化酶而转变为乳酸,则高能磷酸的净收获量是 3 个,而由葡萄糖只能得到 2 个。这种差别的原因是细胞是从磷酸化的中间产物开始的,不需要用于葡萄糖的磷酸化的第一个 ATP。已经提到过,无氧条件下能量的来源只有葡萄糖和(或)糖原;因此,在无氧条件下这种差别是很显著的——通过糖原到乳酸(以每个葡萄糖单位计)有 3 个高能磷酸,而由葡萄糖到乳酸则只有 2 个高能磷酸,在无氧条件下产量增加 50%。糖原分解的另一个优点是没有己糖磷酸对磷酸化酶的强烈的反馈抑制。这样,细胞内就会有高水平的葡萄糖-6-磷酸和果糖-6-磷酸,使得 PFK 反应能够进行;否则,在果糖-6-磷酸水平低的情况下,这一反应的速率是极低的。从葡萄糖开始就不可能有这样的己糖磷酸的积累,因为 G-6-P 对己糖激酶有抑制作用。这样,在紧急情况下,细胞中就能动员大量的产生能量的底物,这对细胞、组织和生物体都是有利的。

糖原分解的控制比糖原合成的控制更为复杂,而且有许多地方可以有各种因素介入。能源的动员通常要比贮备物的动员快得多,因为从能源立即供应能量可能是至关重要的,而贮存则可在很长时间内进行,而且贮备物长期有效。动员糖原的主要信号是细胞内 cAMP 的增多,cAMP 活化一种依赖于 AMP 的蛋白激酶。磷酸化酶与许多其他酶系统不同,依赖于 AMP 的蛋白激酶并不是催化最终的酶,即磷酸化酶的磷酸化(图 12.3)。

有一套级联反应,依赖于 AMP 的蛋白激酶催化其中的磷酸化酶激酶的磷酸化。于是磷酸化酶激酶被活化,它又催化磷酸化酶的磷酸化,使它从无活性的形式变为有活性的形式,活化的磷酸化酶再迅速催化糖原的动员。级联系统的优点是倍增效应。这就是每一个依赖于 AMP 的蛋白激酶能够催化许多个磷酸化酶激酶的磷酸化,而后者又能催化许多个无活性的磷酸化酶(即磷酸化酶 b) 分子变为活化的磷酸化的形式(磷酸化酶 a),而每一活化的磷酸化酶都能加速糖原产生己糖磷酸的反应。这就放大了 cAMP 的刺激效应并引起迅速得多的糖原的动员,比依赖于 AMP 的蛋白激酶直接催化磷酸化酶的磷酸化作用要快得多。cAMP 的增多是一种激素信号,它对两种主要的靶器官即肝脏和肌肉起作用,但是引起这两种器官中 cAMP 增多的激素效应是不同的。在肝中,这种激素是胰高血糖素,肌肉中则是肾上腺素。肝中,糖原分解是己糖磷酸的来源,而肝中的己糖磷酸就是血中葡萄糖的前体,因而血糖是靠糖原而增多的。肌肉中,这一过程可以利用糖原使己糖磷酸增多,以供糖酵解之用;而且所产生的丙酮酸还可用于氧化性代谢。在

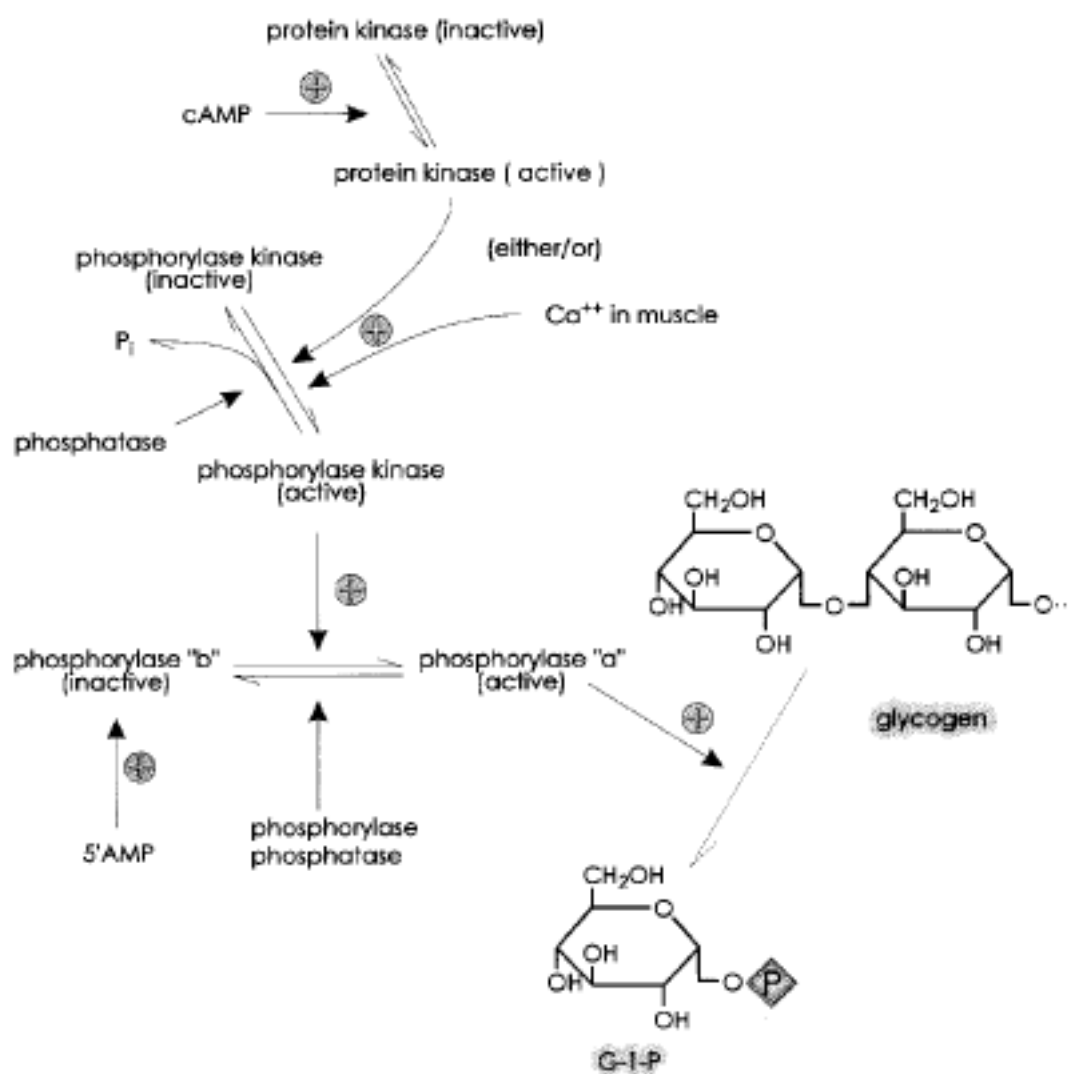


图 12.3 糖原降解中的关键酶——磷酸化酶通过共价修饰和别构作用的活化

应急反应中,这就保证了在有氧和无氧条件下,肌肉的持续能量供应。

级联反应的另一个优点是可能在其中的任何一点进行干预,而不仅限于起点。就磷酸化酶级联反应而言,无活性的磷酸化酶激酶(即非磷酸化的形式)可以由钙使之发生别构活化,因而使之催化磷酸化酶的磷酸化,变为有活性的形式,使糖原分解增强。磷酸化酶激酶的一个亚基是称为钙调蛋白的多肽。这种多肽存在于许多种蛋白质中,它们需要 Ca²⁺ 或者含有 Ca²⁺ 作为效应物。磷酸化酶激酶中的这种多肽使得 Ca²⁺ 能活化此酶。磷酸化酶激酶中钙调蛋白亚基对 Ca²⁺ 的结合也促使依赖于 cAMP 的蛋白激酶对这种酶的磷酸化更为迅速。

肌肉中对钙的这种响应在收缩时会增强,这就使得人体中活跃的肌肉可以增强糖原分解而不需要肾上腺素的信号,肾上腺素会影响所有的肌肉。在肝中,肾上腺素通过一种 β -受体而起作用,引起钙的增多,然后钙再活化磷酸化酶激酶,以活化磷酸化酶而加强糖原分解。代谢上的优越之处就是在应急情况下,提高血糖水平,保证出现紧急情况时中枢神经系统和脑有可利用的底物。

重要的是要明确区分共价修饰活化和别构活化。共价修饰活化剂在修饰被酶促逆转之前一直在酶分子上。例如,磷酸化酶激酶和磷酸化酶经过磷酸化以后一直是有活性的,只有酶在蛋白磷酸酶的催化下发生去磷酸化作用之后才失去活性。别构活化则不然,只要酶的一种别构活化剂,例如钙的浓度高,酶就有活性。一旦钙被集中到亚细胞部分或细胞器中和(或)被排出到细胞之外,酶的活性就变小,因为不再有别构活化剂存在了。别构抑制剂也是如此。因此,同时利用两种机制,对细胞是有利的。

通常共价修饰是激素的信息引起的,而别构活化和抑制则是与代谢或活动的局部变化有

关。糖原分解中别构干预的另一个例子是肌肉中 5 AMP 对磷酸化酶 b 的别构活化。这种活化作用的有利之处是在一个细胞中腺苷酸荷或能荷低与 AMP 浓度高是相关的,因此糖原会被分解以提供己糖磷酸从而重新提高能荷。当能荷重新提高后,AMP 就会减少,变成了 ADP 和 ATP,于是别构信号就消失了,糖原分解就可减少。这有其优越性,因为不同的细胞是处于不同的能量状态的。这就使得每一个细胞都能利用糖原而保持其能荷,不要邻近的细胞都进行糖原分解。肌肉中钙增多为惟一信号,或是所有肌肉都对肾上腺素的存在发生响应,就是另一种与此不同的情况。

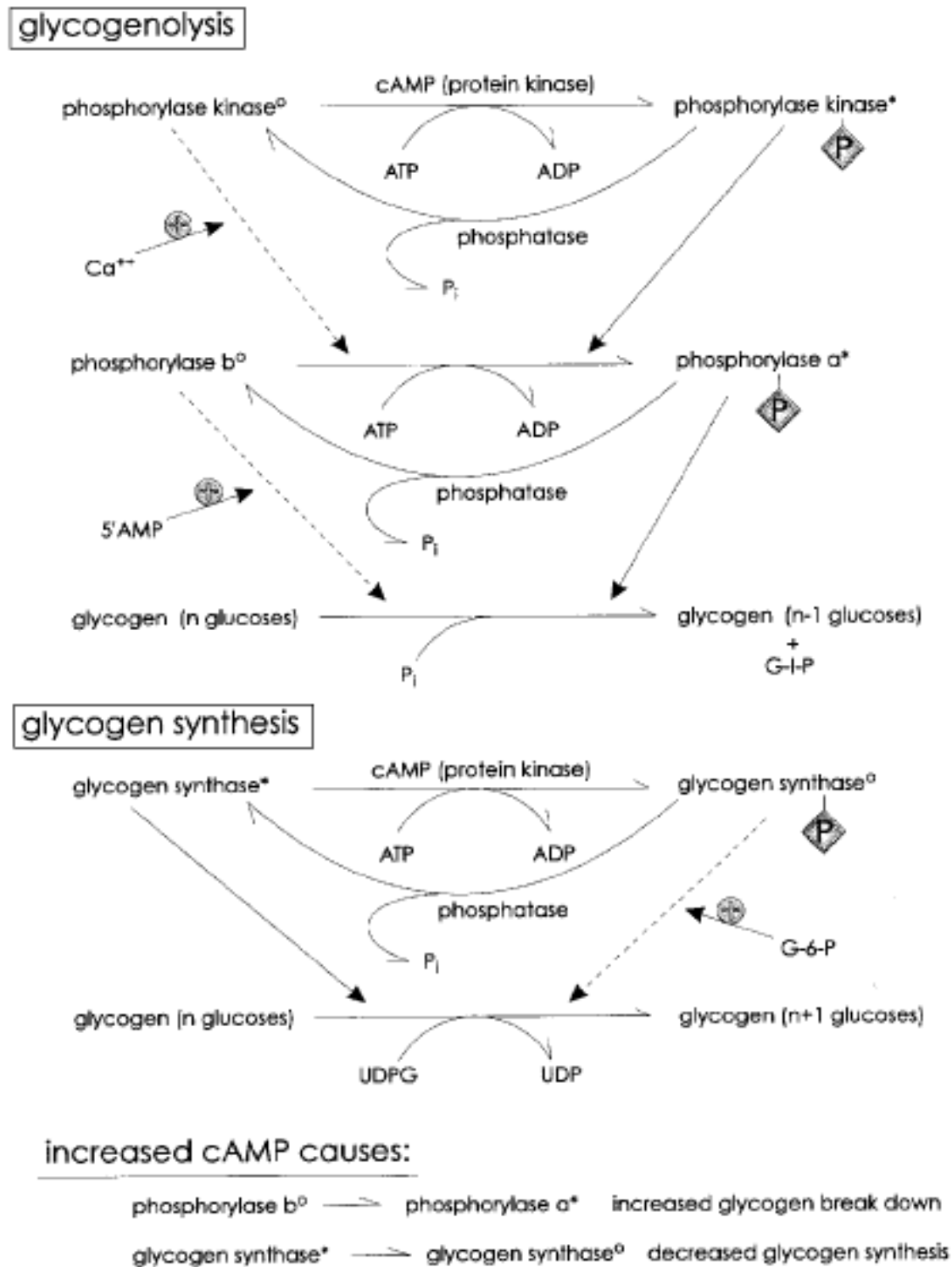


图 12.4 磷酸化酶和糖原合酶的修饰

示与糖原合成和分解有关的共价和别构修饰。注意对激素的响应,增加 cAMP, 通过级联反应引起磷酸化酶的活化和糖原合酶的失活,从而引起糖原分解。

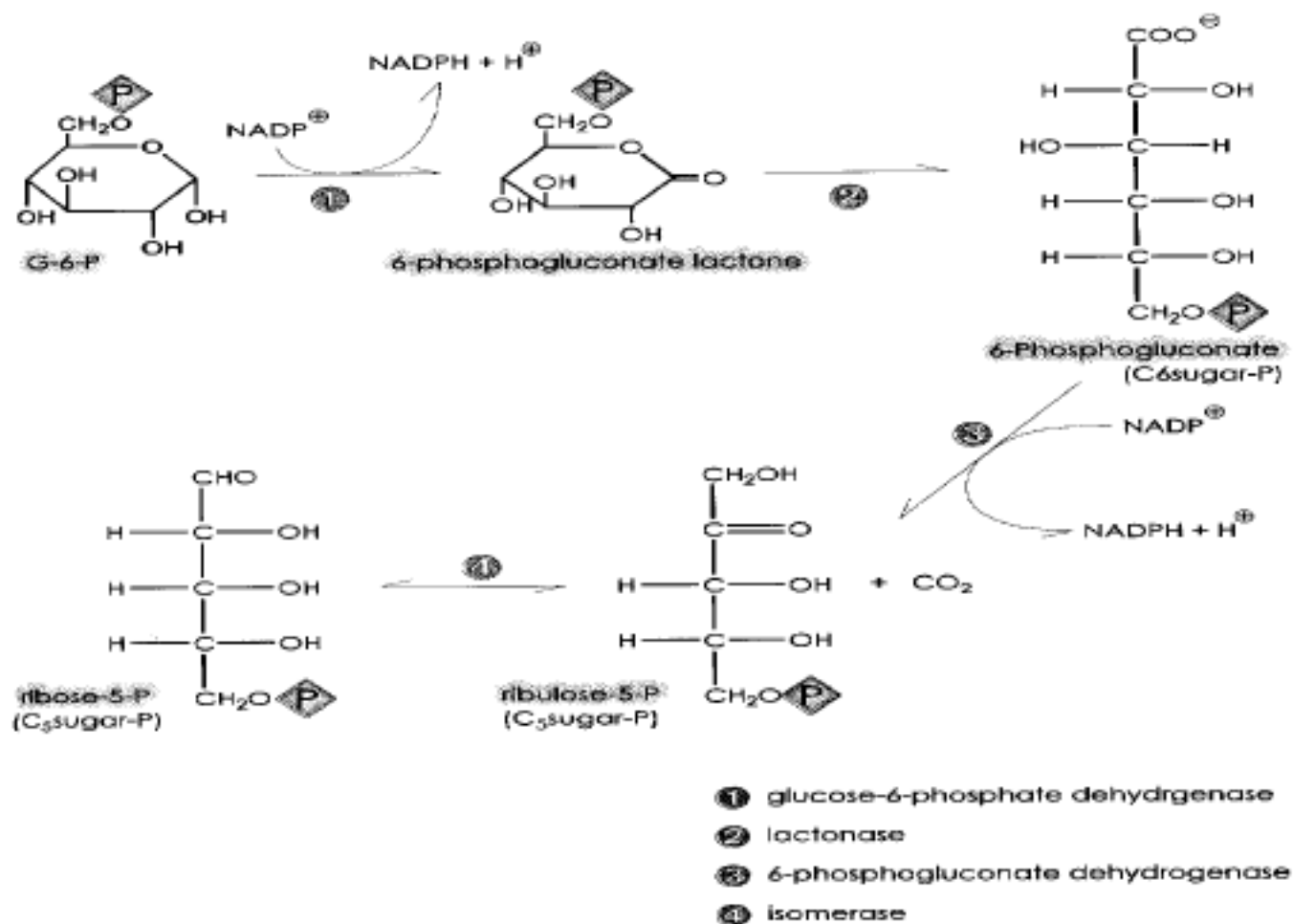
肝中有一种磷酸化酶的同功酶,它与肌肉中的不同,不为 5 AMP 所活化。从生理上看,这是合理的,因为肝中的糖原是血糖的源泉,肝并不以之为能源。因此,肝中能荷低并不是提高

血糖水平的信号。和前面讨论肌肉中的糖原分解时所说的一样, 肝脏中的磷酸化的磷酸化酶和(或)磷酸化酶激酶, 也能因脱磷酸化作用而变回为无活性的酶。这一过程为胰岛素所促进, 这在生理上也是有利的, 因为在血糖高时胰岛素就增多, 它呼唤的是以一般的合成代谢代替分解代谢。因此, 磷酸化酶和磷酸化酶激酶的去磷酸化使糖原分解降到最低, 并使得糖原迅速合成(图 12.4)。

糖原的合成和分解是由级联的激素控制的, 也就是说, 那些使糖原合酶和磷酸化酶都发生磷酸化的激素会活化磷酸化酶, 钝化糖原合酶, 并使糖原得到最大的动员, 而像胰岛素这样的激素, 则促进这两种系统的去磷酸化, 使糖原分解最少, 而糖原合成最多。因此, 这两种酶是以非竞争的方式由共价修饰控制的, 通常是在激素信号的引导之下发生控制, 因而取得了最大限度的单方向流动和最小限度的再循环。

12.3 戊糖磷酸途径

戊糖磷酸途径亦称己糖—磷酸途径, 是有着两项重要后效的代谢途径。第一个后效是产生用于生物合成的 NADPH, 第二个是产生用于核苷酸和辅酶生物合成的核糖-5-磷酸(图12.5)。



following is sugar rearrangements with only number of carbons shown:

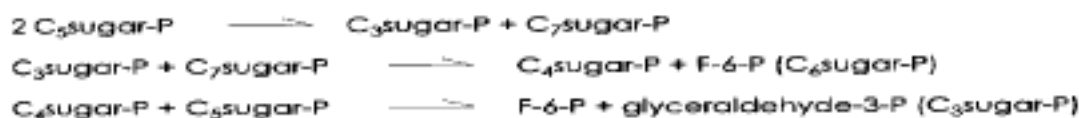


图 12.5 戊糖磷酸途径的几个阶段(到戊糖磷酸形成为止)

此途径产生 2 个 NADPH 和核糖-5-磷酸; 己糖磷酸的再形成包括 C₃-、C₄-、C₅-和 C₇-糖(细节略)。

这一途径的第一步是葡萄糖-6-磷酸 + NADP⁺ 转变为 6-磷酸葡萄糖酸 + NADPH + H⁺, 第

二步则是 6-磷酸葡萄糖酸 + NADP^+ 转变为核酮糖-5-磷酸 + $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 。可以认为这两个反应是戊糖磷酸途径的氧化部分,在产生用于生物合成途径的大部分 NADPH 方面是关键性的。本途径的其余部分(即非氧化部分)是把磷酸化的 5-碳的糖转变为 3-, 4-, 5-和 7-碳的中间产物,最后完成己糖-6-磷酸和丙糖磷酸的再合成。这些反应中有一些是利用转羟乙醛酶(它需要硫胺素焦磷酸盐)和转醛酶以及异构酶和差向异构酶以将戊糖磷酸最终转变为己糖和丙糖磷酸。有些组织没有戊糖磷酸途径的氧化部分,但有非氧化部分,因此能利用丙糖磷酸和己糖磷酸产生戊糖磷酸,用以形成核酸和辅酶。在生物合成活跃的组织如肝脏和内分泌腺体中,氧化部分最为活跃,肝中发生脂肪酸的合成,内分泌腺中则发生类固醇激素的合成。这一系统的主要控制似乎在第一步——葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化的反应——当 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 的比值不断降低时,其活性就越来越受到抑制。通常 $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 在大多数组织中为 0.01 左右, NADPH 超过 100 倍就提供了生物合成反应所需要的还原当量。反之,在大多数组织中 NAD^+/NADH 为 400 或更高,所以这样一对核苷酸就不可能接受来自生物氧化的还原当量。我们在后文将会看到, NADPH 广泛用于还原性的生物合成,而 NAD^+ 则经常用于氧化反应,尤其是与能量的产生有关的反应。

服用磺胺类抗生药剂或抗疟药后,会由于红血细胞中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的缺乏而发生溶血现象。

12.4 其他己糖

除去葡萄糖和葡萄糖多聚体外,在膳食中通常还有两种糖。这就是来自乳糖中的半乳糖和来自常用的食糖蔗糖中的果糖。半乳糖和果糖都是主要由肝脏吸收并在其中转变为葡萄糖或糖原。

(一) 半乳糖代谢

被吸收后,半乳糖即进入肝脏并在其中被磷酸化为半乳糖-1-磷酸。然后半乳糖-1-磷酸通过两种机制转变为 UDP -半乳糖。第一种,也是主要的机制是半乳糖-1-磷酸和 UDP -葡萄糖之间发生反应,形成 UDP -半乳糖和葡萄糖-1-磷酸(图 12.6)。

第二种机制较不活跃,是半乳糖-1-磷酸 + $\text{UTP} \longrightarrow \text{UDP}$ -半乳糖 + 焦磷酸。又是焦磷酸水解为 2 个无机磷酸的反应把这一反应推向右方。然后 UDP -半乳糖通过有一紧密结合的 NAD^+ 的差向异构酶的反应转变为 UDP -葡萄糖。注意葡萄糖和半乳糖是差向异构体,差别仅在于第 4 个碳上羟基的取向。因此,当 UDP -半乳糖仍然牢固地结合在酶上而发生第 4 位上的脱氢作用,而后又再被还原形成羟基时,羟基就可能有两种取向,或是形成 UDP -半乳糖,或是形成 UDP -葡萄糖。这是一个可逆的反应,平衡比约为 3 : 1,葡萄糖占优势。一旦形成了 UDP -葡萄糖,它就能或是用于糖原和其他产物的形成,或是与另一个半乳糖-1-磷酸反应,形成葡萄糖-1-磷酸,这个葡萄糖是来源于半乳糖的。然后肝中的葡萄糖-1-磷酸经过几个反应后,可以游离葡萄糖的形式被释放,或者形成 UDP -葡萄糖而参与糖原的合成。如上所述,肝脏中半乳糖的代谢有助于向躯体的其他组织或器官供应葡萄糖。因此,许多其他细胞并不需要表达进行半乳糖代谢所需要的全部的酶。许多非肝脏的细胞确实有这种代谢途径的一部分,特别是 UDP -葡萄糖— UDP 半乳糖差向异构酶。这就使得这些细胞能够利用葡萄糖形成 UDP -葡萄糖和 UDP -半乳糖, UDP -半乳糖是必要的含有半乳糖的化合物(如半乳糖脂)的前体。其次, UDP -

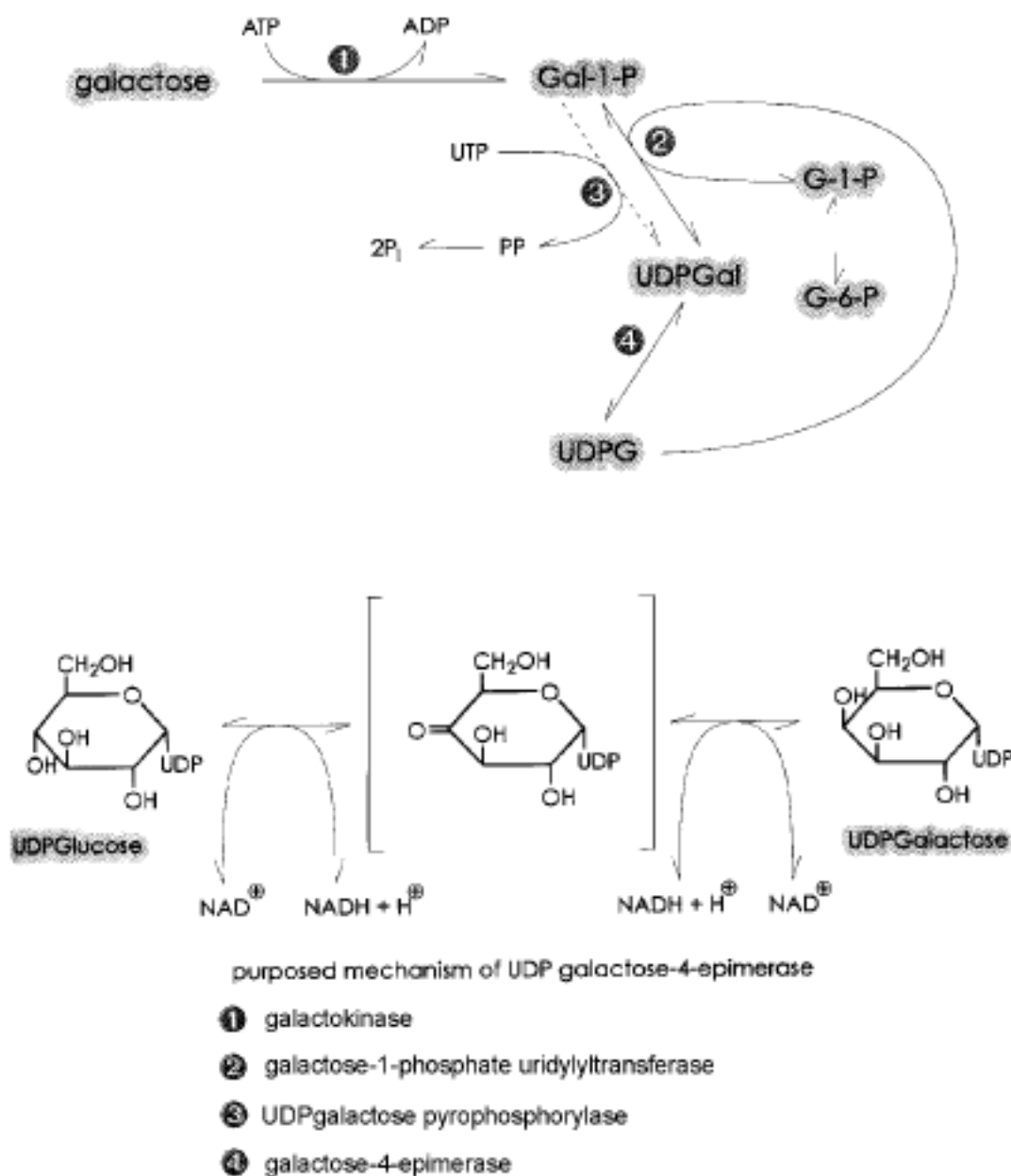


图 12.6 半乳糖代谢形成葡萄糖磷酸

编号的酶的名称列在图下, 图中还有 UDP-半乳糖-4 差向异构酶的可能机制。

半乳糖是乳腺中乳糖的半乳糖部分的前体。

有一种遗传的隐性的半乳糖代谢的疾病, 称为半乳糖血。这种疾病是在纯合的个体中, 没有催化半乳糖-1-磷酸 + UDPG \longrightarrow UDP-半乳糖 + G-1-P 这一反应的酶。因此, 半乳糖能被磷酸化, 但半乳糖-1-磷酸却不能进一步被利用。当这种病的患者食用乳糖或半乳糖时, 肝脏内会积累大量半乳糖-1-磷酸。过量的半乳糖也可能在眼睛内转变为半乳糖醇, 引起白内障。这种病不可与不能忍受半乳糖的病相混淆, 后者是因为小肠内不能水解乳糖, 结果吃进去的乳糖进入大肠而成为栖息在该处的细菌的丰富的养分, 引起胃肠不适。

(二) 果糖

果糖主要是在肝内通过果糖激酶被磷酸化为果糖-1-磷酸。果糖也能在各种己糖激酶的催化下形成果糖-6-磷酸。不过, 这些酶对于果糖的 K_M 特别大, 而对葡萄糖的 K_M 却要小一个数量级。因此, 这些己糖激酶基本不催化果糖的磷酸化, 尤其是在 5 mmol/L 葡萄糖的存在下, 这是血糖的正常浓度(图 12.7)。

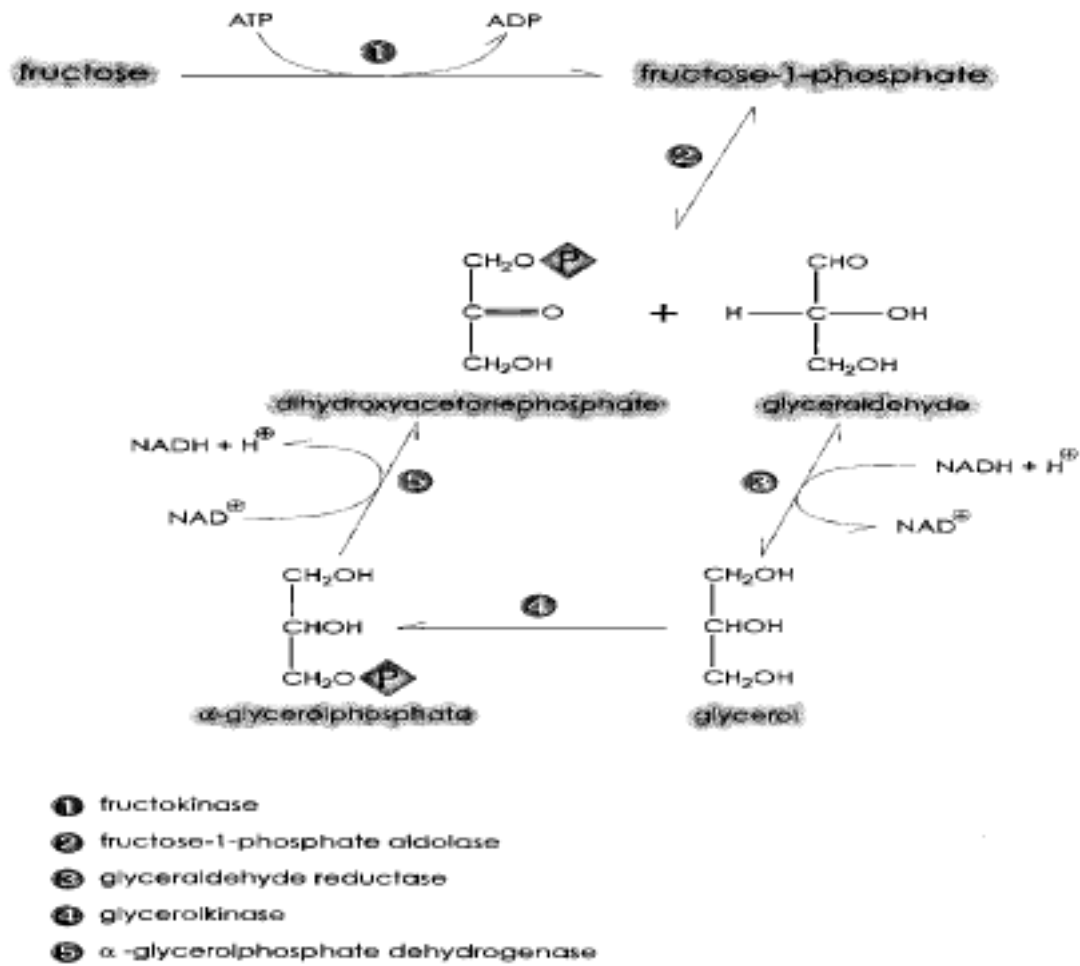


图 12.7 果糖代谢到丙糖磷酸水平
 编号的酶, 其名称列在图旁。

果糖-1-磷酸的下一步裂解是由肝中特有的一种醛缩酶的同功酶催化的, 形成的是二羟丙酮磷酸和甘油醛。然后, 甘油醛或是直接地, 或是经过几个步骤转变为甘油醛-3-磷酸。甘油醛-3-磷酸和二羟丙酮磷酸可以或者通过糖酵解, 或者通过醛缩酶形成果糖-1, 6-二磷酸, 并由此形成葡萄糖-6-磷酸, G-6-P 可以呈葡萄糖的形式被释放到血液中, 或者以糖原的形式贮存在肝中。肝所特有的醛缩酶以大致同样的速率裂解果糖-1-磷酸和果糖-1, 6-二磷酸; 因此, 这种酶对于果糖代谢和糖酵解都有用, 而且, 如第 13 章要讨论的, 对葡糖异生作用也有用。与此相反, 肌肉和其他组织中的醛缩酶剪切果糖-1, 6-二磷酸的速率约为剪切果糖-1-磷酸的 50 倍。外周组织中没有果糖激酶限制了这些组织对果糖的利用。

有两种与果糖代谢有关的遗传病。一种是果糖尿, 原因是肝中缺乏果糖激酶。于是果糖不能被代谢而是在血液中积累并进入尿中。这种情况下, 果糖不能被用作能源或糖类的来源, 膳食中应避免蔗糖和果糖。第二种病是果糖不耐性, 后果严重得多。这种情况是肝中没有其所特有的醛缩酶, 肝中所表达的是肌肉类型的醛缩酶。有这种醛缩酶可进行正常的糖酵解和葡糖异生作用, 但不能进行足够的果糖代谢。果糖激酶催化果糖的磷酸化, 形成果糖-1-磷酸, 但因为没有肝脏类型的醛缩酶, 果糖-1-磷酸不能裂解为二羟丙酮磷酸和甘油醛。有这种病的人, 果糖-1-磷酸在肝中积累, 干扰正常的肝代谢, 其后果可能十分严重, 包括死亡。对于这种病人, 必须尽最大努力去掉膳食中的果糖或含有果糖的化合物, 就像对半乳糖尿病人要避免膳食中的半乳糖和含有半乳糖的糖类一样。

12.5 小 结

(1) 糖原是细胞中葡萄糖的贮藏形式, 是高度分支的葡萄糖的多聚体。

(2) 糖原可经由 UDPG 从葡萄糖合成。糖原合酶能催化葡萄糖从 UDPG 上转移并加到糖原上。

(3) 糖原合酶有两种主要形式：磷酸化的形式(无活性)和非磷酸化的形式(有活性)。

(4) 一种依赖于 cAMP 的蛋白激酶催化糖原合酶的磷酸化, 而肾上腺素和(或)胰高血糖素则促进此蛋白激酶。胰岛素有助于促进糖原合酶的去磷酸化。

(5) 糖原为磷酸化酶所分解, 形成葡萄糖磷酸。

(6) 磷酸化酶有两种形式：磷酸化的形式(磷酸化酶 a)是有活性的, 非磷酸化的形式(磷酸化酶 b)是无活性的。

(7) 磷酸化酶激酶催化磷酸化酶的磷酸化作用。磷酸化酶激酶的非磷酸化状态是无活性的, 磷酸化后才有活性。依赖于 cAMP 的蛋白激酶催化磷酸化酶激酶的磷酸化作用。

(8) 磷酸化酶激酶和肌肉的磷酸化酶都有别构活化剂, 前者的是 Ca^{2+} , 后者的是 AMP, 它们都使适当的酶活化而不需要共价修饰。

(9) cAMP 最终会引起糖原合酶和磷酸化酶二者的磷酸化, 产生糖原的净分解。胰岛素则促进去磷酸化作用而产生糖原的净合成。

(10) 戊糖磷酸途径产生 NADPH 和戊糖磷酸, 前者用于还原性的生物合成, 后者用于核苷酸的合成。

(11) 戊糖磷酸途径的前两步是氧化性的; 其他步骤是形成 3-、4-、5-、6-或 7-碳糖, 最后再生成己糖磷酸。

(12) 当肌肉中的糖原达到一定水平后, 它就阻止糖原合酶的磷酸化, 使得糖原的进一步合成停止。

(13) 半乳糖主要是在肝中经由半乳糖-1-磷酸和 UDP-半乳糖代谢的。肝中半乳糖可转变为葡萄糖。在大多数组织中, UDP-半乳糖差向异构酶能使 UDPG 和 UDP-半乳糖相互转变, 因而体内能形成含有半乳糖的化合物。

(14) 果糖主要是在肝中经由果糖-1-磷酸被代谢。所形成的 F-1-P 可在肝中所特有的醛缩酶的同功酶催化下转变为糖酵解的中间产物, 并进一步转变为葡萄糖、糖原或乳酸。

参 考 资 料

- Short-term hormonal control of protein phosphatases involved in hepatic glycogen metabolism, W. Stalmans, M. Bollen, B. Toth, and P. Gergely, 1990, *Adv. Enzyme Reg.*, 305 ~327.
- From dietary glucose to liver glycogen: The full circle round. J. D. McGarry, M. Kawajima, C. B. Newgard, D. W. Foster, and J. Katz, 1987, *Ann. Rev. Nutr.*, 7: 51 ~73.
- Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase: Domain structure and regulation, H. Schulman and L. L. Lou, 1989, *Trends Biochem. Sci.*, 14: 52 ~66.
- Glycogen storage diseases. H-G Hers, F. Van Hoof, and T. de Barsey, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill: New York, pp. 425 ~452.
- The regulation of the pentose phosphate cycle in rat liver, H. A. Krebs and L. V. Eggleston, 1974, *Adv. Enzyme Reg.*, 421 ~434.
- Current issues in fructose metabolism, R. R. Henry, P. A. Crapo, and A. W. Thorburn, 1991, *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 21 ~40.

Disorders of fructose metabolism, R. Gitzelmann, B. Steinmann and G. Van Den Berghe, in: The Metabolic Basis of Inherited Disease, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, McGraw-Hill: New York, pp. 399 ~424.

Disorders of galactose metabolism, S. Segal, in The Metabolic Basis of Inherited Disease, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, pp. 453 ~480.

The genetic polymorphism of lactase activity in adult humans, G. Flatz, in The Metabolic Basis of Inherited Disease, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, pp. 2999 ~3006.

复 习 题

1. 戊糖磷酸途径的主要功能是产生什么?
 - a) 核糖-5-磷酸和葡萄糖
 - b) NADPH 和甘油醛-3-磷酸
 - c) NADH 和核糖-5-磷酸
 - d) 核糖-5-磷酸和 NADPH
 - e) 核酮糖-5-磷酸和 NADH
2. 半乳糖通过什么转变为葡萄糖?
 - a) ADP-葡萄糖
 - b) UDP-葡萄糖
 - c) 半乳糖-6-磷酸
 - d) 山梨醇
 - e) 半乳糖醇
3. UDP-葡萄糖形成的不利平衡是如何被克服的?
 - a) 利用 2 个 UTP 形成 1 个 UDPG
 - b) 产生较多的酶
 - c) 产生焦磷酸,它水解为 2 个无机磷酸
 - d) 利用葡萄糖-1,6-二磷酸为前体,以后它会丢失一个磷酸
 - e) 酶的共价修饰
4. 当依赖于 cAMP 的蛋白激酶使磷酸化酶和糖原合酶都被磷酸化后,下列哪一项是正确的?
 - a) 一个过程是直接的,一个是通过级联反应,两种酶都有活性。
 - b) 两个过程都是直接的,磷酸化酶有活性,糖原合酶无活性。
 - c) 两个过程都是通过级联反应,磷酸化酶无活性,糖原合酶有活性。
 - d) 一个过程是直接的,一个是通过级联反应,磷酸化酶有活性,糖原合酶无活性。
 - e) 一个过程是直接的,一个是通过级联反应,两种酶都无活性
5. 下列各项中,符合“虽然在生理上可能无意义,但它是糖原合酶的磷酸化形式的活化剂”的是
 - a) UTP
 - b) G-6-P
 - c) F-1,6-BP
 - d) 5 AMP
 - e) PEP

6. 运动中的肌肉内, Ca^{2+} 的增能通过什么而引起糖原分解的加强?
- 直接活化磷酸化酶
 - 引起 cAMP 的增多
 - 抑制糖原合酶
 - 活化磷酸化酶激酶
 - 与糖原颗粒发生反应
7. 半乳糖尿是因缺少了什么酶?
- 半乳糖激酶 ($\text{Gal} + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{Gal-1-P} + \text{ADP}$, Gal 代表半乳糖)
 - UDPG-UDP Gal 差向异构酶 ($\text{UDPG} \longleftrightarrow \text{UDP Gal}$)
 - UTP, Gal-1-P 焦磷酸化酶 ($\text{UTP} + \text{Gal-1-P} \longleftrightarrow \text{UDP-Gal} + \text{PP}_i$)
 - UDPG, Gal-1-P 转移酶 ($\text{UDPG} + \text{Gal-1-P} \longleftrightarrow \text{UDP Gal} + \text{G-1-P}$)
 - UDPG 激酶 ($\text{UDP} + \text{ATP} \longleftrightarrow \text{UTP} + \text{ADP}$)
8. 果糖不耐受性是因为缺少了什么酶?
- 肝所特有的醛缩酶
 - 丙糖激酶
 - 果糖激酶
 - 果糖-1,6-二磷酸酶
 - PFK
9. 果糖尿是因为缺乏了什么酶?
- 肝脏特有的醛缩酶
 - 丙糖激酶
 - 果糖激酶
 - 果糖-1,6-二磷酸酶
 - PFK

参 考 答 案

- d 戊糖磷酸途径产生用于还原性生物合成的 NADPH 和用于核苷酸合成的核糖-5-磷酸。
- b UDP-葡萄糖是半乳糖转变为葡萄糖、糖原或其他产物的中间产物。半乳糖的磷酸化形成半乳糖-1-磷酸, 不是半乳糖-6-P。
- c 去掉一种产物, 例如焦磷酸转变为 2 个无机磷酸而被除去, 就可将反应推向热力学上较为不利的方向。
- d 磷酸化酶是在级联反应中被磷酸化酶激酶磷酸化的, 其磷酸化的形式有活性。糖原合酶是直接依赖于 cAMP 的蛋白激酶中的催化性亚基磷酸化的, 其磷酸化的形式无活性。
- b G-6-P 是糖原合酶的磷酸化形式的活化剂, 但生理上不可能达到足以活化此酶的高浓度。G-6-P 对己糖激酶的抑制作用阻止过量 G-6-P 的积累。
- d 磷酸化酶激酶的别构活化促进磷酸化酶被磷酸化为有活性的形式。磷酸化酶有活性的形式催化糖原分解。
- d UDPG, Gal-1-P 引起 UDP Gal 和 Gal-1-P 浓度的增加。
- a 这种酶能把 F-1-P 裂解为 DHAP 和甘油醛, 果糖在肝中被磷酸化为 F-1-P, 不是 F-6-P。这种病人的肝中积累 F-1-P。
- c 在肝中这种酶会将果糖转变为 F-1-P。缺乏此酶, 食用的果糖就会积累在血液中并在尿中排出。

第 13 章 葡糖异生作用

13.1 引言

葡糖异生作用是指各种化合物转变为葡萄糖的过程。这一过程主要发生在肝脏和肾脏皮质中。葡糖异生的天然前体主要是其他糖类如果糖和半乳糖以及氨基酸、乳糖、丙酮酸和氨基酸。只要有水的供应,人能够不进食而存活相当长的时间(即长达 30 天或更多)。没有葡糖异生作用,最长的饥饿期大概只有几天。维持血糖水平是至关重要的,特别是那些依靠葡萄糖获取能量的组织,如中枢神经系统和红血细胞。许多人在禁食过夜之后,血糖水平为 80 ~120 mg/dL (4.4 ~6.7 mmol/L)。长期饥饿之后,虽然继续不断将葡萄糖用于特殊的代谢需要,通常血糖不会降至 70 ~80 mg/dL(3.9 ~4.4 mmol/L) 以下。因此,在各种各样的营养和生理条件之下,维持血液中的葡萄糖水平是至为重要的。许多催化糖酵解中可逆反应的酶也参与葡糖异生作用。

13.2 葡糖异生的途径

4 种酶是葡糖异生过程所特有的,也是阻止糖酵解中的单方向步骤所需要的(图 13.1)。其中的两种为丙酮酸羧化酶和 PEP 羧激酶,它们都是有效地逆转丙酮酸激酶的作用所必需的:前者将丙酮酸转化为草酰乙酸,后者将草酰乙酸转化为磷酸烯醇丙酮酸。另外两种酶是果糖-1,6-二磷酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶,它们有效地逆转 PFK 和己糖激酶和葡萄糖激酶的作用。

丙酮酸羧化酶是由乳酸和丙酮酸形成葡萄糖的异生作用中的关键酶和可能的限速酶,它位于线粒体中,不仅需要 ATP 和 CO_2 ,而且需要乙酰 CoA 作为必需的活化剂。如前所述,乙酰 CoA 通常是在线粒体中由丙酮酸形成的,也可在脂肪酸氧化中形成。在这一反应中要利用一个高能磷酸,所形成的草酰乙酸会通过各种步骤发生葡糖异生,通过什么步骤则决定于物种以及 PEP 羧激酶的分布,此酶催化草酰乙酸和 GTP 形成 GDP、磷酸烯醇丙酮酸和 CO_2 。若 PEP 羧激酶定位于细胞溶胶中,那么 PEP 就在细胞溶胶中形成,然后再被转运到线粒体中。若 PEP 羧激酶定位于线粒体中,则草酰乙酸会转变为苹果酸或天冬氨酸,然后再被运至细胞溶胶中,并再度转变为草酰乙酸。草酰乙酸通过 PEP 羧激酶的作用,即形成 PEP。若此酶既定位于线粒体中又定位于细胞溶胶中,那么两种过程都会发生。为了保持电中性,这些化合物即 PEP、天冬氨酸和苹果酸转运出线粒体,需要其他离子由专一的转运蛋白共转运到线粒体中。许多转运蛋白只能使专一的阴离子互相交换,这些过程所需要的可能是复杂的转运过程。

将丙酮酸转变为磷酸烯醇丙酮酸需要消耗两个高能磷酸。这种两个步骤的过程克服了使丙酮酸激酶反应逆转的热力学上的困难。若 PEP 再形成丙酮酸,如丙酮酸激酶所催化的那样,就只能产生一个高能磷酸。因此,已形成的 PEP 再变回为丙酮酸,在能量上就是浪费,即损失一个高能磷酸。这种再循环也会迫使丙酮酸通过丙酮酸羧化酶和 PEP 羧激酶这两种限速酶的

“d”为 SI 分数单位词头 10^{-1} , dL = 100 mL。

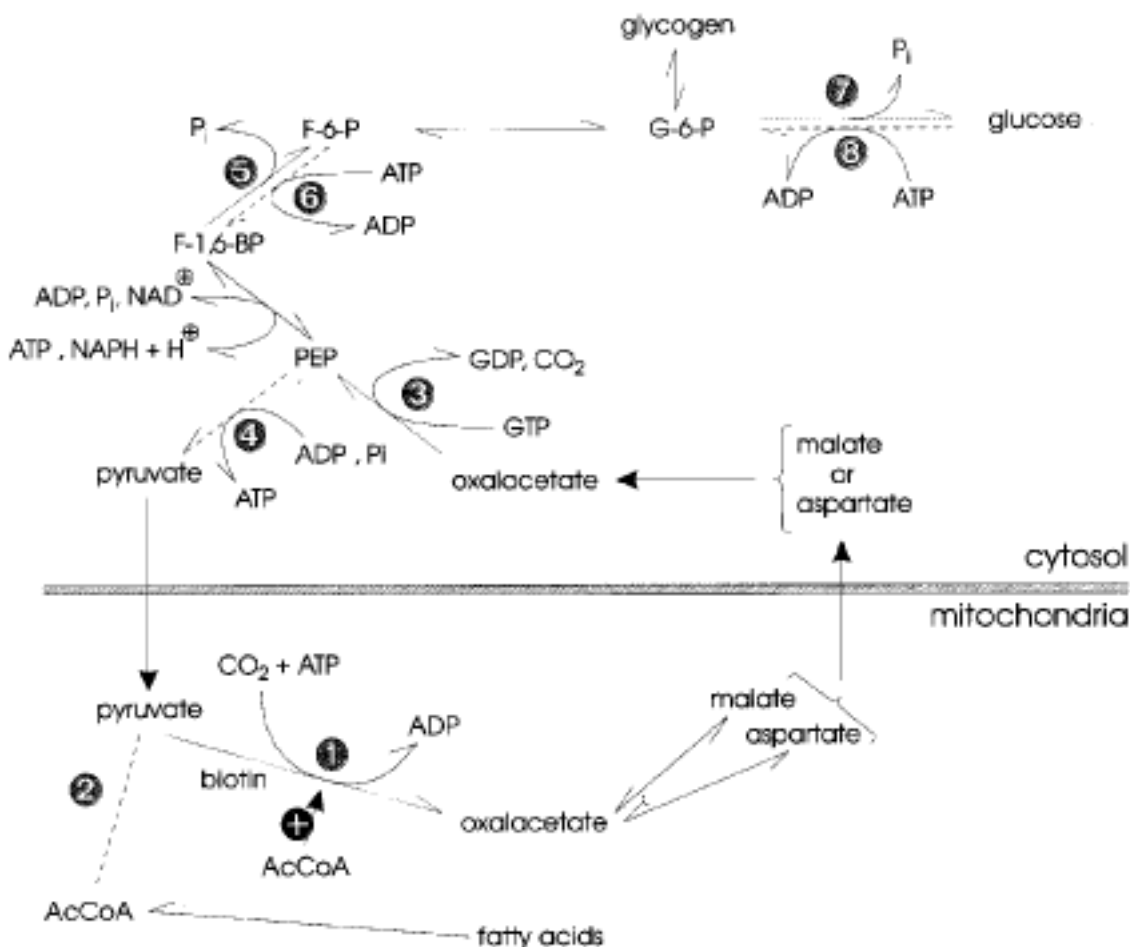


图 13.1 葡糖异生途径和相反途径示意

实线表示与葡糖异生有关的主要步骤, 虚线表示与葡糖异生相反的步骤, 双线是隔开线粒体与细胞溶胶的。编号的关键反应的酶见下表, 表中还指出了此反应是促进(正)还是减少

(负) 葡糖异生; 每一反应的正、负效应物及磷酸化作用对活性的影响也列于下表。

关键反应	在葡糖异生中的作用	效应物		磷酸化作用
		正	负	
丙酮酸羧化酶	正	AcCoA	ADP	
丙酮酸脱氢酶	负	AcCoA, NADH		抑制
PEP 羧化酶	正			
丙酮酸激酶	负	F-1, 6-BP	丙氨酸, ATP	抑制
果糖-1, 6-二磷酸酶	正		AMP, F-2, 6-BP	
磷酸果糖激酶	负	F-2, 6-BP, AMP	ATP, 柠檬酸	
葡萄糖-6-磷酸酶	正		葡萄糖	
葡萄糖激酶或己糖激酶	负		G-6-P(己糖激酶) F-6-P(葡糖激酶)	

作用完成葡糖异生作用。

然后这两个反应所形成的 PEP 就会通过逆转的糖酵解途径转变到 F-1, 6-BP 的水平。因为 PFK 的反应是不能逆转的, 所以有效地逆转这一反应的酶是果糖-1, 6-二磷酸酶, 它催化果糖-1, 6-二磷酸水解为果糖-6-磷酸和无机磷酸的反应。在此逆行的反应中, 不能获得高能磷酸, 但是在前向反应中却已投入了一个高能磷酸。以后果糖-6-磷酸可异构化为葡糖-6-磷酸;

葡糖-6-P 又可被专一的葡糖-6-磷酸酶水解为游离的葡萄糖和无机磷酸。葡糖-6-磷酸酶定位于内质网,其作用需要一个以上的过程。有一种专一的转运系统负责将葡糖-6-磷酸从细胞溶胶中运至内质网中;而后葡糖-6-磷酸酶才能将 G-6-P 水解并使游离的葡萄糖进入血液循环。

葡糖异生作用是消耗能量的过程。由乳酸形成葡萄糖需要 6 个高能磷酸,每一丙糖 3 个。丙酮酸羧化酶、PEP 羧激酶和 3-磷酸甘油酸激酶这 3 个步骤各需要一个高能磷酸。消耗的高能磷酸比糖酵解中所获得的高能磷酸多。此外,由丙酮酸或许多氨基酸再生葡萄糖还需要细胞溶胶中的 NADH,每个磷酸甘油醛步骤需要 1 个 NADH,或者说每形成 1 个葡萄糖需要 2 个 NADH。

13.3 甘油和氨基酸

甘油也可进入葡糖异生途径。甘油先被磷酸化为磷酸甘油,再被氧化为二羟丙酮磷酸,再形成果糖-1,6-二磷酸并进入葡糖异生途径如前所述。能产生糖酵解中间产物的任何氨基酸,或任何能产生柠檬酸循环中间产物的氨基酸,都能产生葡萄糖。因为糖酵解中间产物都能形成丙酮酸,而 TCA 循环的中间产物都能通过该循环而形成草酰乙酸,也就是都能继续反应形成 PEP,由 PEP 则能形成葡萄糖。

13.4 由乙酰 CoA 不能异生葡萄糖

任何已转变为乙酰 CoA 的化合物都不可能是葡糖异生的原料。这包括已变成乙酰 CoA 的丙酮酸和由脂肪酸氧化产生的乙酰 CoA。在研究葡糖异生和某些保护性控制时,这是很重要的。高等动物体内不能由乙酰 CoA 发生葡糖异生的原因如下:假若细胞从两个草酰乙酸开始,并且有足够的能量加上还原力的供应,就会形成 1 个葡萄糖。假若有两个化合物也净形成两个新的草酰乙酸,那就有 4 个草酰乙酸,在足够的能量和还原力供应下,就可形成 2 个葡萄糖。然而,假若 2 个草酰乙酸与乙酰 CoA 形成柠檬酸并进入葡糖异生作用,柠檬酸就必须参加柠檬酸循环,形成草酰乙酸。这时每丢失 2 个 CO₂ 就相当于丢失 1 个乙酰 CoA 中的乙酰单位,而当柠檬酸通过循环后,再形成的草酰乙酸只有 2 个(和开始时一样),只能形成 1 个葡萄糖。因此,无论乙酰-CoA 在柠檬酸循环中转多少次,尽管它能提供能量和还原力,但不能提供用于葡糖异生的碳。不过,由于柠檬酸循环的某些特点,在¹⁴C-标记的乙酸盐代谢中,通过乙酰 CoA 而掺入所形成的葡萄糖中会有¹⁴C,这是不对称化和随机化带来的,但是仍不会有葡萄糖的净合成。从果糖和半乳糖发生的葡糖异生作用已在前一章中讨论过。

13.5 葡糖异生的控制

葡糖异生是体内至关重要的过程,是受到严格控制的。葡糖异生的控制以及可能的葡糖异生前体的保护(以维持其葡糖异生潜势)都是通过前面(第 11 章)已经讨论过的机制进行的。这些机制包括别构控制、共价修饰和酶合成速率的改变。这些方面最好是逐项研究,以了解其最广泛的实际表现。首先,要考虑葡糖异生起着极端重要作用的情况,例如饥饿。主要的问题是保留葡糖异生的前体,特别是那些在外周组织中产生的,如乳糖和丙酮酸,使它们不会形成乙酰 CoA。

如前所述,丙酮酸脱氢酶是通过乙酰 CoA 对它的抑制和磷酸化为无活性的形式而得到控制的。线粒体中乙酰 CoA 和 NADH 的增多都会促进这两种机制。如果只考虑糖类的代谢,乙

酰 CoA 只能由于丙酮酸脱氢酶的作用而增多;可是,外周组织线粒体中的乙酰 CoA 也可能来自于脂肪酸和(或)酮体的代谢,在饥饿时血液中这些化合物都会增多(第 14 章)。因此,这些极易被利用的底物(脂肪酸和酮体)的增多就会抑制丙酮酸脱氢酶并保护葡糖异生的前体。外周组织中脂肪的分解代谢所造成的柠檬酸和 ATP 浓度的提高会有效地抑制 PFK,这又使得 F-6-P 和 G-6-P 浓度提高,从而抑制己糖激酶。这是提高和维持血糖水平的另一种方式(即减少许多外周组织对葡萄糖的利用)。

在脑中,脂肪酸的分解代谢是微不足道的,在饥饿时葡萄糖继续以正常的或近于正常的速率被利用,而且葡萄糖仍是通过完全的氧化基本上转化为 CO_2 和水。中枢神经系统(包括脑)是体内在饥饿时丙酮酸脱氢酶仍处于活性状态的少数组织之一。这再一次指明,中枢神经系统中始终利用葡萄糖以及维持血糖水平对于这种系统是重要的。

像丙酮酸这样的葡萄糖前体,不管是在哪里节约下来的,都有可能产生一半葡萄糖。假若肌肉中保存了丙酮酸,它会从肌肉进入血液,然后再进入肝脏,转变为葡萄糖。假若肝中保存有葡萄糖,它会通过葡糖异生途径产生葡萄糖。重要的是要认识到,不仅形成葡萄糖的肝脏和肾脏皮质中要节约葡萄糖的前体,而且所有的组织都应这样,因为在全部外周组织中,葡萄糖代谢以及全部代谢都比肝脏和肾脏中的代谢强得多。

13.6 丙酮酸羧化酶

肝脏和肾脏皮质在葡糖异生作用中有一个独特的作用——将丙酮酸转变为葡萄糖。有些控制是双功能的,例如,肝中由脂肪酸代谢使乙酰 CoA 增多不仅会抑制丙酮酸脱氢酶,而且会活化丙酮酸羧化酶,因为乙酰 CoA 是此酶的必要活化剂(图 13.2)。

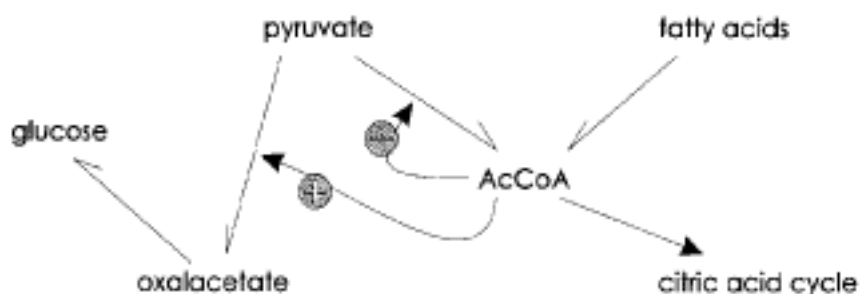


图 13.2 乙酰 CoA 控制丙酮酸代谢示意

所研究的两条主要途径是丙酮酸脱氢酶和丙酮酸羧化酶。

乙酰 CoA 对丙酮酸羧化酶的活化作用是一种 S 形曲线的响应,最陡的部分在乙酰 CoA 的正常的高低变化范围内。这样,当乙酰 CoA 浓度增高时,对丙酮酸羧化酶会有明显的促进作用(图 13.3)。

肝中丙酮酸脱氢酶与丙酮酸羧化酶对乙酰 CoA 发生响应的相互关系与组织中 cAMP 浓度增加对磷酸化酶和糖原合酶的影响类似,只是丙酮酸羧化酶不发生共价的变化。自然界中代谢的调节原理是相同的;在许多情况下,一条途径被活化,另一条与之相对抗的相反的途径的活性就会减小。丙酮酸羧化酶好像是一种组成酶,也就是说其量不会有很大变化的酶,主要是由乙酰 CoA 的浓度控制,在较小的程度上也由丙酮酸的浓度和 ATP 与 ADP 的比值控制。饥饿时可能发生的脂肪酸代谢加强会使肝脏和肾脏中线粒体内乙酰 CoA 显著增多。另外一种代谢物 CO_2 通常不是限制因素。

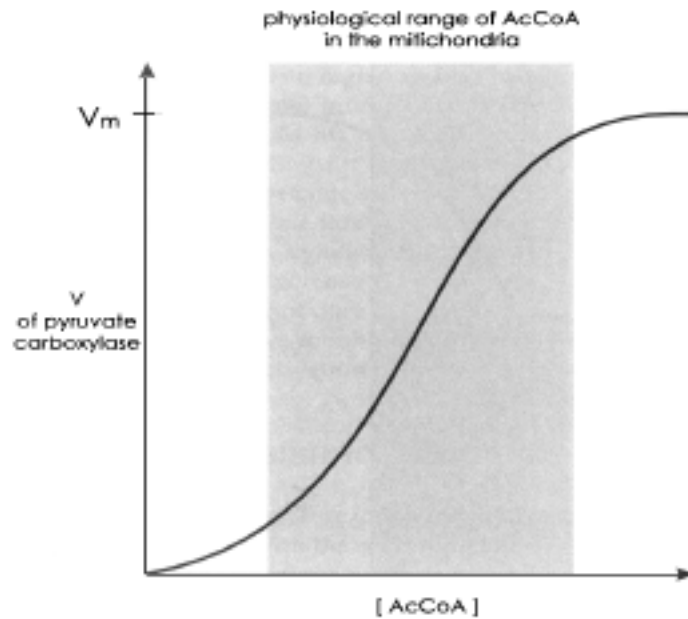


图 13.3 丙酮酸羧化酶之 v 值对乙酰 CoA 浓度的曲线

此酶与底物丙酮酸、 CO_2 和 ATP 的动力学曲线为双曲线, 但对必需的别构活化剂乙酰 CoA 的动力学则为 S 形曲线; 阴影部分为线粒体(此酶定位处)中乙酰 CoA 的浓度范围。

13.7 PEP 羧激酶

葡糖异生的下一步是由 PEP 羧激酶催化的, 这种酶既没有由别构效应物发生的通常的生理修饰, 也没有共价修饰。饥饿时或其他葡糖异生加强的情况下, 这种酶的主要控制似乎是合成速率提高; 因此, 它是一种适应酶。PEP 羧激酶的半寿期较短; 所以它可以通过量的增减以发生迅速的响应。在这一点上的主要控制看来是酶量的变化。用各种不同的动物进行的许多研究说明, 葡糖异生的限速酶或控制酶似乎更可能是丙酮酸羧化酶而不是 PEP 羧激酶。

13.8 丙酮酸激酶

与葡糖异生有间接关系, 但似乎又极端重要的一种主要的酶是丙酮酸激酶。如前所述, 很少看到丙酮酸激酶与葡糖异生有直接关系, 然而这种酶的作用会使 PEP 变回为丙酮酸, 实际上造成了葡糖异生的短路。这会耗费高能磷酸以及迫使丙酮酸变回来, 这是通过丙酮酸羧化酶和 PEP 羧激酶这两个可能的限速步骤而实现的。肌肉中丙酮酸激酶不受到什么控制而是其反应一直向前进行(第 11 章), 但肝中则不同, 这种酶受到严格的控制。肌肉和肝中丙酮酸激酶的同功酶的主要区别在于肝中的同功酶多一个 28 个氨基酸的额外序列。肝中的丙酮酸激酶既受到别构效应物的控制, 又受到共价修饰的控制, 而且这二者还相互作用。肝中的丙酮酸激酶既有正的又有负的别构效应物, 丙酮酸激酶反应速率相对于 PEP 浓度的曲线是 S 形的(图 13.4)。这种 S 形的动力学使得细胞中的 PEP 水平在 PEP 显著地转变为丙酮酸之前就升高了。PEP 水平的升高使得其他起竞争作用的酶, 特别是烯醇化酶和磷酸甘油酸变位酶, 将碳的流程推向葡萄糖的合成。这种酶的一种可能的效应物是果糖-1, 6-二磷酸, 它趋向于使反应动力学中相对于 PEP 的 S 形程度减小[使得对于 PEP 的 $K_s(0.5)$ 减少], 因而通过丙酮酸激酶的流通量会增加。当细胞需要经过糖酵解的流通量大时这是有利的。果糖-1, 6-二磷酸的增多可能是经过 PFK 的流通量增加的结果, 也表明有足够的果糖-1, 6-二磷酸供葡糖异生之需。

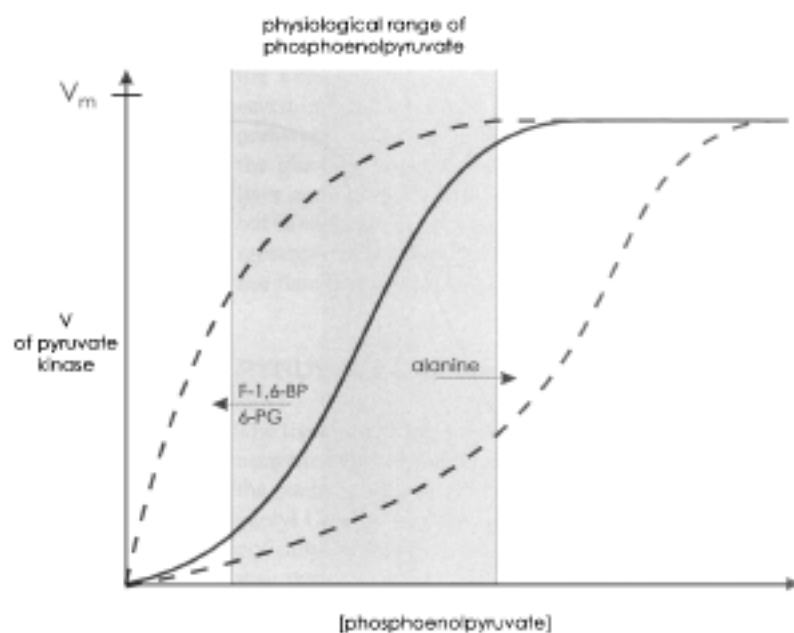


图 13.4 肝中的丙酮酸激酶活性对 PEP 浓度的曲线

活性对 PEP 浓度的响应为 S 形曲线：虚线所示为正 (F-1,6-BP 和 6-PG) 和负 (丙氨酸) 两个方向曲线的偏移, 只是因效应物浓度不同而出现的无数个偏移之一; 阴影部分为肝中 PEP 的生理范围。

当通过 FBP 酶走向葡糖异生的流量减少而糖酵解增强时, 这是合适的。另一种别构效应物是丙氨酸, 它起着负效应物的作用, 使曲线变得更加 S 形 [使对 PEP 的 K_s (0.5) 增加], 这就会使在任何 PEP 水平下经过丙酮酸激酶流量减少而不是达到饱和, 而使得用于葡糖异生的 PEP 积累较多。这些控制和以前在 PFK 方面看到的控制类似, 那里是 AMP 和 ATP 使曲线偏移。丙氨酸是蛋白质分解代谢的指示物, 是一种适当的信号, 在许多情况下都会发生蛋白质的分解以供应葡糖异生所需要的碳。共价修饰是依赖于 cAMP 的蛋白激酶所促进的磷酸化作用。这也会使得相对于 PEP 的反应更加 S 形化, 因而不是饱和的, 任何 PEP 浓度都会使经过丙酮酸激酶的流通减慢。这就会增加 PEP 变为葡萄糖的可能性。肝中使 cAMP 增多的激素是胰高血糖素, 因此这种响应与增高血糖水平的激素信号是一致的。这种情况下血液中增加的葡萄糖来自于葡糖异生作用, 前面已经讲过, 同样的信号也会通过糖原分解而使血液中葡萄糖增多。

在依赖于 cAMP 的蛋白激酶和丙氨酸之间有一种相互作用。磷酸化使得丙酮酸激酶对丙氨酸的抑制作用反响更强烈; 因此同样量的丙氨酸对此酶的磷酸化形式的抑制作用比对非磷酸化形式的抑制作用较为强烈。丙氨酸的存在也使得丙酮酸激酶成为依赖于 cAMP 的蛋白激酶的更好的底物; 也就是说, 酶与丙氨酸的复合物比没有丙氨酸时的酶更易于和会更快地被磷酸化。所以, 在这两种效应物之间有一种相互作用。胰高血糖素的激素信号和丙氨酸的存在, 在对于这种酶的影响方面是累加性的或协同性的。

丙酮酸激酶的另一活化剂是 6-磷酸葡萄糖酸, 它是在戊糖磷酸途径中形成的。在脂肪酸合成的条件下, 肝中的戊糖磷酸途径特别活跃。6-磷酸葡萄糖很可能是戊糖磷酸途径与糖酵解之间的信号, 因为丙酮酸激酶活性提高就会产生更多的丙酮酸, 它有可能产生乙酰 CoA, 然后进行脂肪酸合成 (第 15 章)。在胰岛素水平高时, 未磷酸化的丙酮酸激酶占优势 (图 13.5)。这是葡萄糖浓度较高的信号, 也是要发生脂肪生成的最佳条件。未磷酸化的丙酮酸激酶对 6-磷酸葡萄糖酸较为敏感, 而对抑制剂丙氨酸不太敏感。由于胰高血糖素的增高血糖的激素信号而发生磷酸化作用以后, 丙酮酸激酶变得不仅在任何 PEP 水平下活性都不太高, 而且对丙氨酸的抑制作用更为敏感, 对 6-磷酸葡萄糖酸的活化作用也比较迟钝。

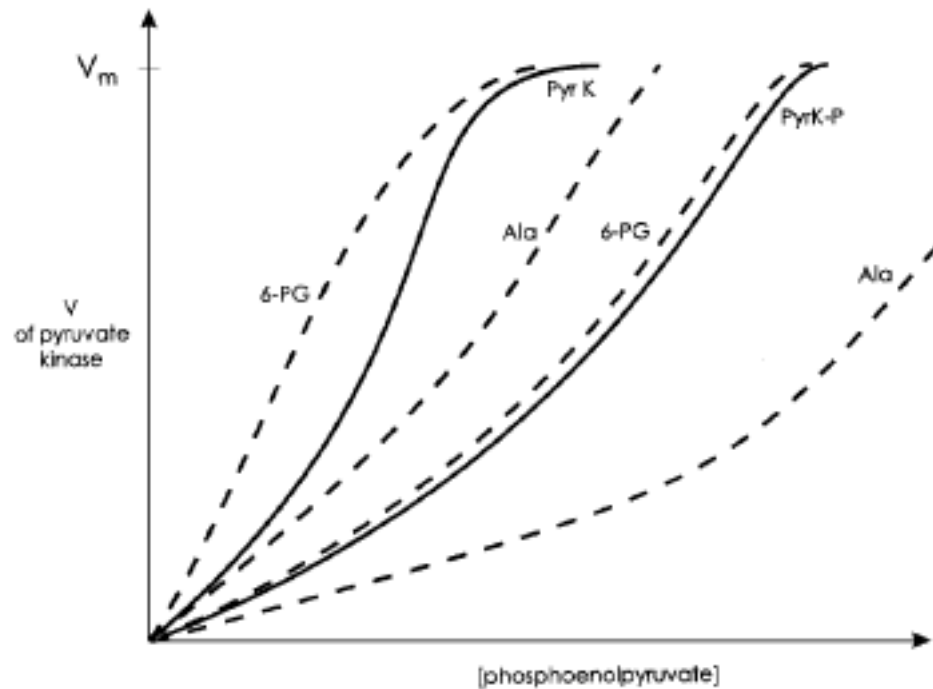
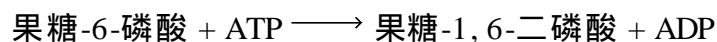


图 13.5 肝中丙酮酸激酶的共价修饰

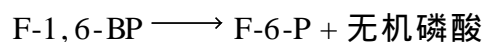
图示丙酮酸激酶反应速率对 PEP 浓度的曲线: 1—无正或负效应物时未磷酸化的酶的反应速率与 PEP 浓度的关系, 两侧的两条虚线为正效应物(6-PG)或负效应物(丙氨酸)存在下酶活性的曲线; 2—在正或负效应物存在下酶活性与 PEP 浓度的关系, 两侧的虚线为磷酸化的酶在正效应物(6-PG)和负效应物(丙氨酸)的存在下活性的变化。

13.9 果糖-1,6-二磷酸酶(FBP 酶)

必须研究葡糖异生中下一个单向反应的逆反应。葡糖异生的这一反应为 FBP 酶; 而 PFK 的反应却是与 FBP 酶的反应相反的。因此, 假若两种机制都迅速发生, 我们就会有:



随后又有 FBP 酶的反应:



这两个反应之和是 $\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$, 即所谓底物循环或无效循环。在肝中, FBP 的活性比 PFK 的活性高得多, 而且 PFK 的活性在某种程度上还受到 ATP 的抑制。然而, 假若两个反应都以最大速率进行, 结果是相当多的糖流向 F-6-P 和葡糖异生。对这两个反应是有控制的——主要的别构效应物是果糖-2,6-二磷酸, 它起着 PFK 的活化剂和 FBP 的抑制剂的作用。果糖-2,6-二磷酸不是任何代谢途径的一部分, 而是响应于激素信号而积累或被破坏的。肝脏中有一种酶称为 PFK2, 其未磷酸化的形式催化果糖-2,6-二磷酸的形成(图 13.6)。

PFK2 很可能也是由于胰岛素的存在与否而发生磷酸化或去磷酸化, 胰岛素这种激素指示的是贮存或合成脂类和糖原的时刻。未磷酸化的 PFK2 引起果糖-2,6-二磷酸的积累, F-2,6-P₂ 则抑制 FBP 而促进 PFK, 使得净流程是沿着糖酵解的方向, 虽然正常情况下 FBP 的活性远高于 PFK 的活性。当被依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化时, PFK2 会响应于胰高血糖素, 而有效地从激酶变成了磷酸酶。也就是说, 磷酸化的 PFK2 是果糖-2,6-二磷酸酶。因此, 它就会催化果糖-2,6-二磷酸 \longrightarrow 果糖-6-磷酸 + 无机磷酸这一反应。这就降低了果糖-2,6-二磷酸的水平, 去掉了 PFK 的活化和对 FBP 酶的抑制作用, 使得净流程是走向 F-6-P 和葡糖异生作用。FBP 酶也为高水平的 5 AMP 所抑制, 但对肝脏中这种控制的生理意义尚有疑义。

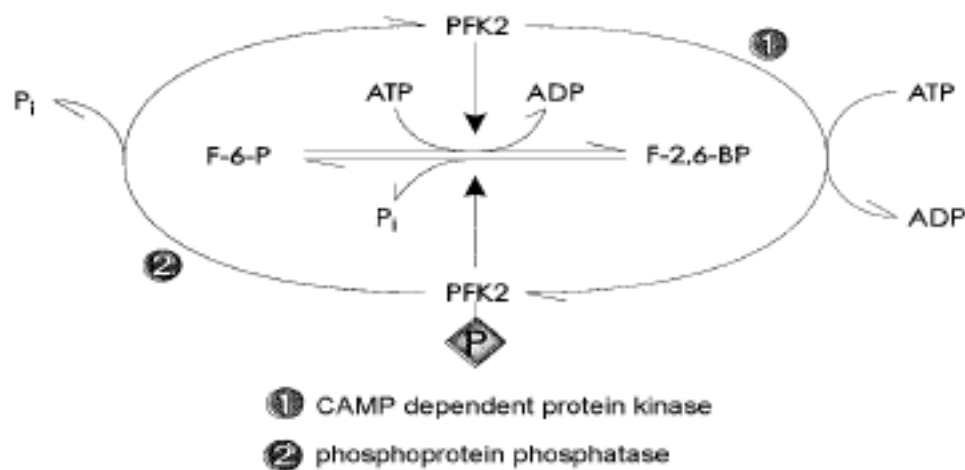


图 13.6 肝中 F-2,6-BP 水平的控制

此略图表明 PFK2 使 F-6-P 形成 F-2,6-BP: 磷酸化后, 则 PFK2 变为 F-2,6-BP 磷酸酶, 把 F-2,6-BP 转变为 F-6-P, PFK2 的磷酸化受到依赖于 cAMP 的蛋白激酶的影响; 这种磷酸化的 PFK2 又可被专一的磷酸蛋白磷酸酶去磷酸化。

13.10 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P 酶)

葡糖异生中的最后一种酶是 G-6-P 酶, 它没有很强的别构控制, 但在葡萄糖浓度很高时会显得受抑制。在葡萄糖-6-磷酸的水解过程中, 有一种酶-磷酰基的中间物, 以后它可以将磷酸基团或是传递给水, 完成水解作用, 或是传回给葡萄糖, 再形成葡萄糖-6-磷酸。因此当葡萄糖的浓度很高时, 就会有较大的可能性再转回给葡萄糖, 重新形成葡萄糖-6-磷酸, 好像其净效应是抑制葡萄糖-6-磷酸酶。

高浓度葡萄糖的这种表面上的抑制作用有几个可能的优点, 例如引起 G-6-P 的积累而不是当葡萄糖已经很多时还释放游离的葡萄糖。肝中这些增多的 G-6-P 然后可用于糖原的合成。FBP 酶和 G-6-P 酶都是适应酶, 和 PEP 羧激酶类似, 在发生慢性的葡糖异生的情况下, 它们的量会增多。这两种酶的活性也会增高, 不过在程度和速率上不如 PEP 羧激酶。因此可以看到葡糖异生作用是一个至关重要的过程, 在好几个步骤上都受到精细的控制, 有些步骤是距这一过程本身很远的, 例如保护外周组织中的丙酮酸和肝脏中与葡糖异生密切相关的反应。

13.11 小 结

- (1) 葡糖异生作用是从非葡萄糖的前体合成葡萄糖, 主要发生在肝脏和肾脏皮质中。
- (2) 与乳酸和(或)丙酮酸转变为葡萄糖有关的有 4 个独特的反应。这就是丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶、果糖-1,6-二磷酸酶和葡萄糖-6-磷酸酶催化的反应。
- (3) 有 3 个效果与葡糖异生相反的反应, 就是丙酮酸激酶、PFK1 和葡糖激酶(或己糖激酶)的反应。
- (4) 乙酰 CoA 不能为净葡糖异生提供碳; 因此丙酮酸转变为乙酰 CoA 就取消了丙酮酸转变为葡萄糖的可能性。
- (5) 来自于脂肪酸代谢以及丙酮酸的乙酰 CoA, 是丙酮酸羧化酶所必需的活化剂, 又是丙酮酸脱氢酶的抑制剂。
- (6) 果糖-2,6-二磷酸是果糖-1,6-二磷酸酶的抑制剂和 PFK1 的活化剂。
- (7) 果糖-2,6-二磷酸可由 PFK2 催化形成。当 PFK 被依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化

时,它就变成了果糖-2,6-二磷酸酶,并且破坏果糖-2,6-二磷酸。

(8) 肝中的丙酮酸激酶使葡糖异生中发生短路而有利于糖酵解,依赖于 cAMP 的蛋白激酶可使此酶磷酸化。此酶的磷酸化使它对 PEP 的 $K_s(0.5)$ 增大,因而发生有效的抑制作用。

(9) 肝中的丙酮酸激酶也有两种活化剂:果糖-1,6-二磷酸和 6-磷酸葡萄糖酸,还有一种抑制剂丙氨酸。

(10) 丙酮酸激酶的磷酸化降低了 6-磷酸葡萄糖酸对它的活化作用并增加了丙氨酸的抑制作用。

(11) 肝脏中 cAMP 的增加会通过依赖于 cAMP 的蛋白激酶而增强葡糖异生,而蛋白质的去磷酸化则引起葡糖异生的减少。

(12) 任何化合物只要能形成糖酵解或柠檬酸循环的中间产物,就可能是能异生葡萄糖的。

(13) 甘油可通过 β -甘油磷酸和二羟丙酮磷酸转变为葡萄糖。

(14) 从乳糖异生葡萄糖需要 6 个高能磷酸,而糖酵解则只能净产生 2 个高能磷酸。

参 考 资 料

Glucogenic substrate levels in fasting man, T. T. Aoki, C. J. Toews, A. A. Rossini, N. B. Ruderman, and G. F. Cahill Jr., 1975, *Adv. Enzyme Reg.*, 329 ~336.

Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, S. J. Pilkis, M. R. El-Magkrabi, and T. H. Claus, 1988, *Ann. Rev. Biochem.*, 57: 755 ~831.

Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: Regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes, S. J. Pilkis and T. H. Claus, 1991, *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 465 ~515.

Futile cycling in glucose metabolism, J. Katz and R. Rogustad, 1978, *Trends Biochem. Sci.*, 3: 171 ~174.

Substrate cycles: Their role in improving sensitivity in metabolic control. E. A. Newsholme, R. A. J. Challis, and B. Crabtree, 1984, *Trends Biochem. Sci.*, 9: 277 ~280.

复 习 题

1. 肝脏和肌肉线粒体中乙酰 CoA 的水平之所以重要,是因为这两种组织中乙酰 CoA 的高水平会:
 - a) 活化丙酮酸羧化酶
 - b) 抑制丙酮酸脱氢酶
 - c) 活化丙酮酸羧化酶而抑制丙酮酸脱氢酶
 - d) 抑制丙酮酸羧化酶而活化丙酮酸脱氢酶
 - e) 活化酮体
2. 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶在代谢中的重要性在于:
 - a) 利用细胞中的 GTP
 - b) 使磷酸烯醇丙酮酸形成草酰乙酸
 - c) 在肝中合成丙氨酸
 - d) 克服丙酮酸激酶反应的不可抑性
 - e) 提高丙酮酸羧化酶的活性
3. 肝中丙酮酸激酶由于 cAMP 的增多而发生的共价修饰以下列哪种方式改变了此酶?
 - a) 减少对 PEP 的 $K_s(0.5)$, 使之对丙氨酸的抑制作用更为敏感
 - b) 增加对 PEP 的 $K_s(0.5)$, 使之对丙氨酸的抑制作用不那么敏感

- c) 增加对 PEP 的 $K_s(0.5)$, 使之对丙氨酸的抑制作用更为敏感
- d) 减少对 PEP 的 $K_s(0.5)$, 使之对丙氨酸的抑制作用不那么敏感
- e) 对于对 PEP 的 $K_s(0.5)$ 无影响, 但能使此酶对丙氨酸的抑制作用更为敏感
4. 代谢效应物果糖-2,6-二磷酸可以:
- a) 抑制果糖-1,6-二磷酸酶而活化 PFK
- b) 活化果糖-1,6-二磷酸酶而抑制 PFK
- c) 活化丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶
- d) 抑制果糖-1,6-二磷酸酶和 PFK
- e) 活化磷酸烯醇丙酮酸羧激酶而抑制丙酮酸激酶
5. 当肝中的 PFK 响应于 cAMP 的增多而被磷酸后, 就会:
- a) 所有的功能都失去活性
- b) 变成活性更高的激酶
- c) 变为 G-6-P 磷酸酶
- d) 变为磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的活化剂
- e) 变为 F-2,6-BP 磷酸酶
6. 假若下列一对酶同时迅速起作用, 就会发生能量的无效循环:
- a) 葡糖激酶和 PFK
- b) PFK 和果糖-1,6-二磷酸酶
- c) PFK 和丙酮酸激酶
- d) 葡糖激酶和果糖-1,6-二磷酸酶
- e) 葡糖-6-磷酸酶和果糖-1,6-二磷酸酶

参 考 答 案

1. b 这会使丙酮酸积累并阻止丙酮酸的不可逆代谢。丙酮酸是葡糖异生的前体, 但丙酮酸脱氢酶的产物乙酰 CoA 却不能在人体内净产生葡萄糖。
2. d 因为丙酮酸激酶在生理上是不可逆的, 必须有另一条途径把丙酮酸转变为 PEP 以用于葡糖异生。这一条途径就是丙酮酸羧化酶使丙酮酸变为草酰乙酸, 和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶使草酰乙酸形成 PEP。
3. c 对 PEP 的 $K_s(0.5)$ 的增加和丙氨酸的抑制作用, 在 PEP 的生理浓度范围内, 都是使丙酮酸激酶的活性降低。因此, 葡糖异生的途径更易运行。
4. a 这会减缓葡糖异生而加速糖酵解。肝中此效应物的浓度会因葡萄糖和胰岛素浓度的增加而增加, 因胰高血糖素浓度的增加而减小。
5. e 肝中 F-2,6-BP 浓度的减小使得葡糖异生更快(见复习题 4 的解释)。
6. b 磷酸果糖激酶利用 ATP 将 F-6-P 转变为 F-1,6-BP。果糖-1,6-二磷酸酶将 F-1,6-BP 转变为 F-6-P 加无机磷酸。因此, 当两种酶都活跃时, 就会浪费掉一些 ATP:
- (1) $F-6-P + ATP \longrightarrow F-1,6-BP + ADP$
(PFK)
- (2) $F-1,6-BP \longrightarrow F-6-P + P_i$
(FBP酶)
- ATP \longrightarrow ADP + P_i 反应(1)和(2)相加

第 14 章 脂肪酸代谢：分解代谢

14.1 引言

在下面两章中,我们要研究脂质代谢及其控制的各个方面。人体内能量主要贮存在脂质中,其形式是三酰甘油(被3个脂肪酸酯化的甘油)。它们的合成和降解速率都受到精密的控制,这种控制的丧失就会导致肥胖症。脂肪酸可能来源于膳食或肝脏中的合成作用,在肝中转变为三酰甘油(甘油三酯),然后再以脂蛋白的形式重新包装起来,脂蛋白还含有磷脂、胆固醇、胆固醇酯和蛋白质。脂蛋白以极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)的形式在血液中运转。或是运转到脂肪组织中贮存起来,或是运转到其他组织,用于其他目的。像磷脂和胆固醇这样的脂质有重要的细胞功能,如合成膜、产生类固醇激素和作为细胞内的信号。在这两章中,我们研究脂肪酸和胆固醇的合成、产生能量的脂脂酸的氧化以及酮体的形成等。

14.2 脂质的贮存和周转

人体内潜在能量的主要来源是一种脂质,即三酰甘油。虽然三酰甘油是生物体内主要的贮存形式,但还有许多重要的脂质,包括磷脂、类固醇激素、前列腺素、脂溶性维生素等等。除去贮存能量之外,脂质还在膜和脂蛋白中起着重要作用,已在前面几章中讨论过。三酰甘油也在机械方面和隔热方面起作用。本章重点是介绍三酰甘油和脂肪酸作为能源而被利用的情况。三酰甘油主要是贮存在脂肪组织中。除去在某些解剖部分有大量脂肪的贮存外,脂肪细胞也存在于躯体的许多区域内,如肌肉中。用于三酰甘油合成的脂肪酸,或来自于食物,或在体内合成。贮存细胞中的三酰甘油继续不断地发生周转(即合成和分解)。在体重得到良好控制的许多个体中,周转的情况是三酰甘油的贮存和分解(即脂解作用)大致以等速进行。不过,这种平衡是长期性的;在短时期内,通常是进食后有净合成,而在两餐之间或饥饿时则有净脂解。

(一) 三酰甘油的水解

脂解的加强主要是响应于肾上腺素和胰高血糖素这两种激素而发生的,这两种激素都使脂肪细胞中的cAMP增多,其结果是对激素敏感的脂酶被磷酸化,从无活性的形式转变为有活性的形式(即磷酸化的酶是有活性的形式)。对激素敏感的脂酶通常是脂解的限速酶,它催化三酰甘油上第一个脂肪酸的水解,剩下1,2-二酰甘油,细胞中的其他脂酶会迅速水解后者。这种脂解释放的脂肪酸会离开脂肪细胞而进入血流,并在其中与循环中的清蛋白结合。未酯化的脂肪酸是良好的乳化剂,如果不结合在清蛋白上就会引起乳化和红血细胞的溶胞作用。因此,未酯化的脂肪酸在整个躯体内都是结合在清蛋白上而运转的,只有轻微的离解。这些脂肪酸可进入许多细胞内,包括肝脏、肾脏、肌肉和心脏。当它们进入这些组织并被吸收时,血浆中脂肪酸的浓度便降低了,于是由于平衡的作用,更多的清蛋白-脂肪酸复合体解离,重新建立起循环中游离的、未结合的脂肪酸的低水平。

(二) 激活和 β -氧化

当脂肪酸被能够将其代谢的细胞吸收后, 首先是通过两个反应被激活成辅酶 A 的衍生物。第一个反应是脂肪酸 + ATP \rightleftharpoons 脂肪酸-AMP + 焦磷酸。然后焦磷酸被水解为 2 个无机磷酸, 将反应拉向右方, 否则平衡将有利于脂肪酰和 ATP 的方面。脂肪酸-AMP 复合体中的脂肪酸部分, 在仍然结合在脂肪酸活化酶之上的情况下, 被转移给辅酶 A, AMP 则被释放。这种脂肪酰 CoA 也称为长链脂肪酰 CoA, 与以前讨论过的乙酰 CoA 类似, 不过这是长链脂肪酸通过硫酯链与辅酶 A 发生共价连接。这一激活过程发生在内质网上和线粒体的外膜上。不过, 脂肪酸的氧化主要发生在线粒体的基质中。因此就发生了大的脂肪酰 CoA 分子如何被运入线粒体的问题。正如 NADH 和苹果酸穿梭一样, 这里用的是另一种穿梭机制。位于线粒体外膜上的肉毒碱棕榈酰转移酶 I 先将脂肪酸部分转移到肉毒碱上(图 14.1)。所形成的较小的脂肪酰肉毒碱即可被转运入线粒体内, 然后肉毒碱棕榈酰转移酶 2 又将脂肪酸转移到线粒体基质中的辅酶 A 上, 形成脂肪酰 CoA。短链脂肪酸($C_4 \sim C_8$)是在线粒体中被激活, 不需要肉毒碱的转运即可发生分解代谢。

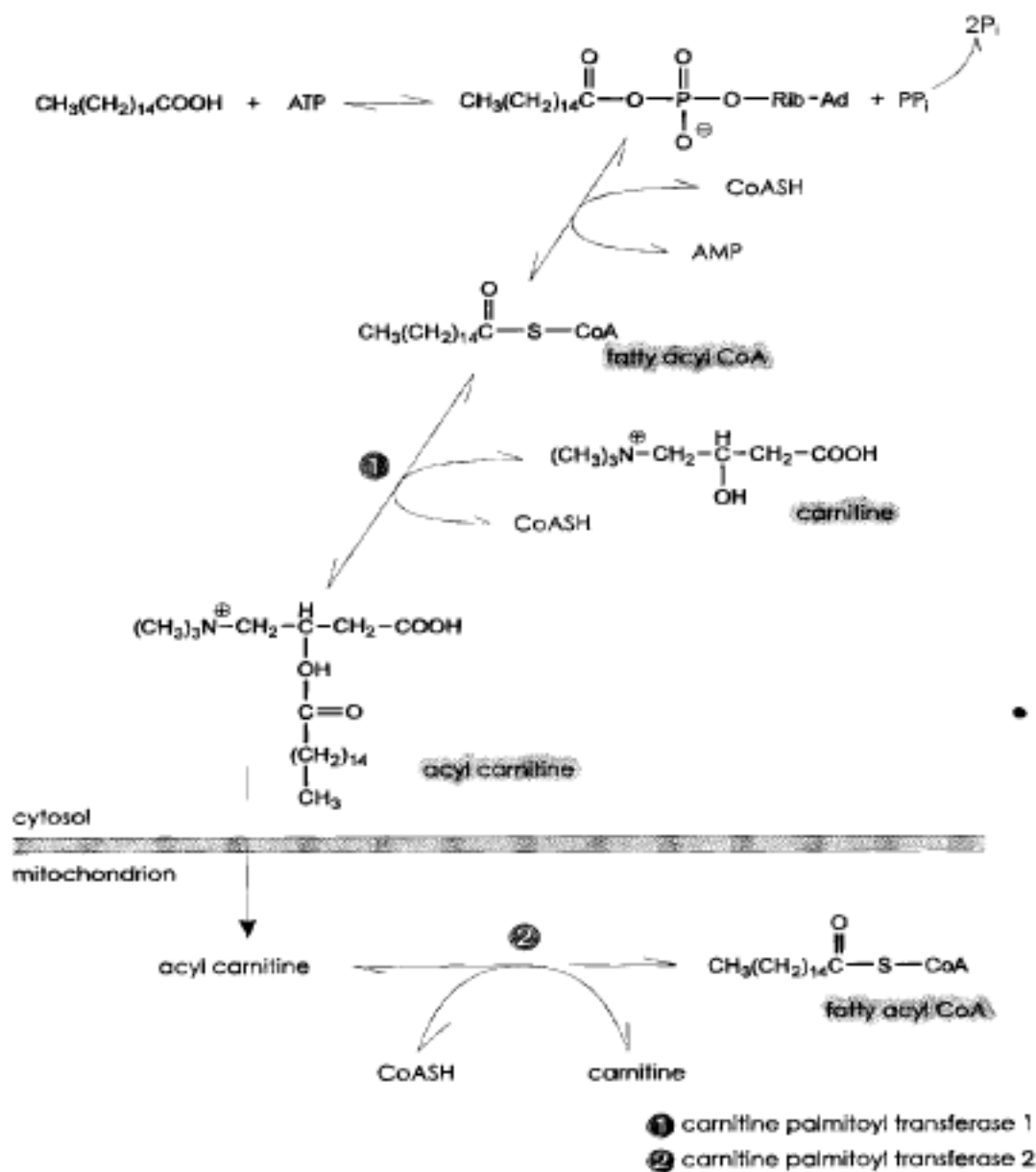


图 14.1 长链脂肪酸的激活和转移

图示长链脂肪酸被激活为其 CoA 衍生物, 随后又通过肉毒碱被转移到线粒体内。

然后脂肪酰 CoA 进行 β -氧化的过程(因为在氧化循环中 β -碳原子连续不断地被氧化, 故名 β -氧化)。此过程的结果是形成还原型的辅酶和乙酰 CoA(图 14.2)。此过程中的第一个

酶是脂肪酰 CoA 脱氢酶, 它利用 FAD 移去脂肪酸的 和 碳之间的 2 个氢而形成双键, 产生与酶结合的 FADH₂, FADH₂ 可通过电子传递系统被氧化, 产生高能磷酸。这一双键的构型是反式的, 我们将会看到, 它与天然存在的不饱和脂肪酸中的双键不同。下一步是烯酰 CoA 水合酶, 它将水加在双链上, 与延胡索酸酶的反应类似, 形成 -(或 3-) 羟基脂肪酰 CoA, 构型为 L。3-L-羟酰基 CoA 脱氢酶与 NAD⁺ 一起, 去掉第 3 个碳上的两个氢, 产生 -酮基-脂肪酰 CoA 和 NADH。NADH 也是通过电子传递链被氧化, 又会产生高能磷酸。然后 -酮基(或 3-酮基)脂肪酰 CoA 发生断裂, 产生比原来的脂肪酰 CoA 少两个碳的脂肪酰 CoA, 和一个乙酰 CoA, 此反应是由 -酮基硫解酶催化的, 有另一个辅酶 A 参加。一旦开始, 这一过程就会连续不断地进行, 直到全部脂肪酸都变成乙酰 CoA 为止。这些反应似乎进行得非常快, 至少到 4C 的中间产物是如此, 因为从棕榈酸(C16)——最主要的贮存的脂肪酸——开始时, 几乎没有找到 C6, C8, C10 或 C12 的脂肪酰 CoA。因此, 在 -氧化过程中, 脂肪酸转变成了乙酰 CoA 并产生还原型辅酶, 通过电子传递系统和氧化磷酸化作用, 还原型辅酶被用于产生 ATP。从 C16 的脂肪酸开始, 有 7 轮 -氧化, 产生 8 个乙酰 CoA, 因为最后一个乙酰 CoA 是两个末端的碳形成的。

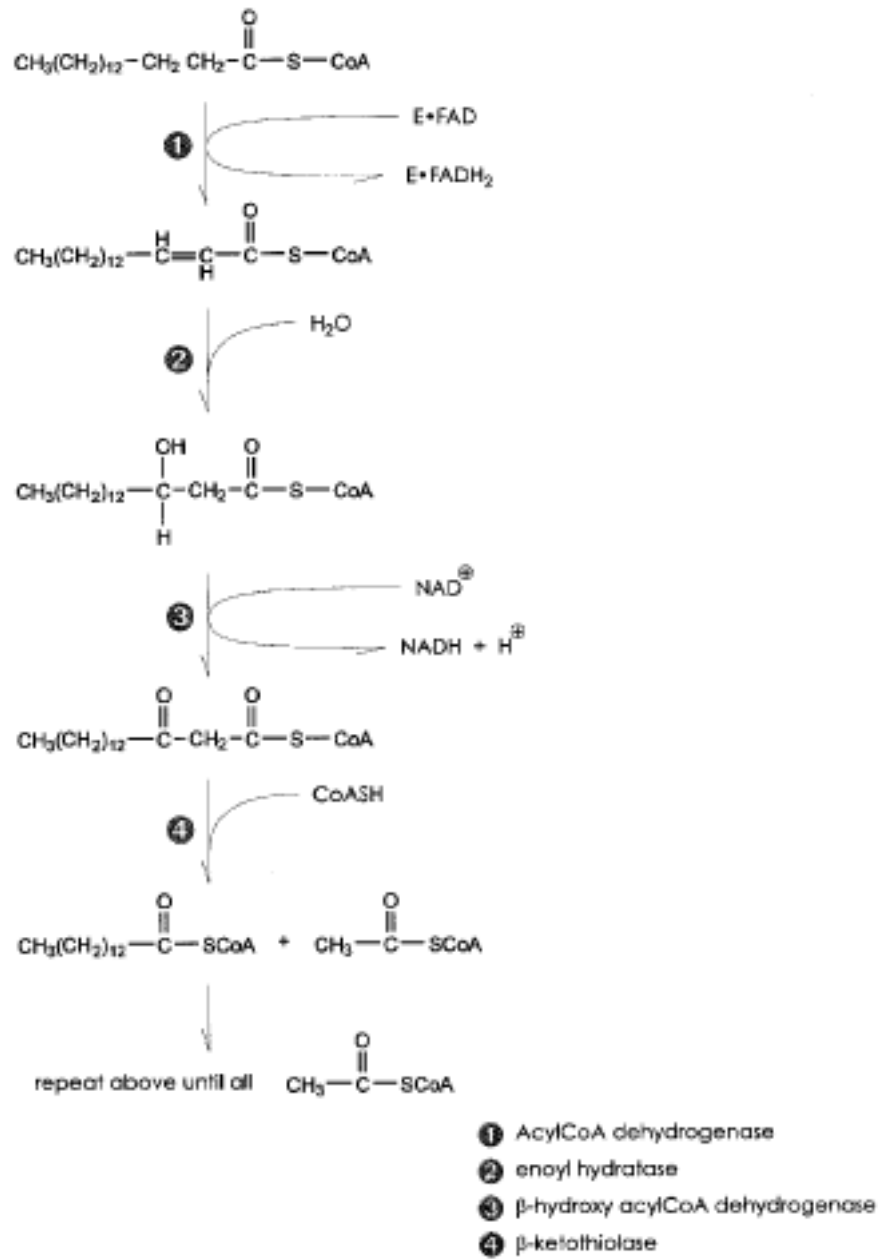


图 14.2 线粒体中发生的 -氧化的步骤

这些步骤重复进行, 直至整个脂肪酸都变为乙酰 CoA 为止。

从 C16 脂肪酸开始,通过 β -氧化共形成 7 个 FADH_2 和 7 个 NADH ,一共可以形成 35 个高能磷酸。有 8 个乙酰 CoA,其中每一个完全氧化之后,每个乙酸单位又可产生相当于 12 个高能磷酸的能量,所以 8 个乙酰 CoA 共形成 96 个高能磷酸。总共就是 131 个高能磷酸,但是还必须减去起始的激活作用所需要的 2 个高能磷酸(注意,只用了 1 个 ATP,但产生了 1 个 AMP,这就需要 2 个高能磷酸才能回到原来的 ATP 状态)。因此,C16 脂肪酸完全氧化的能量净产量为 129 个高能磷酸。为了进一步强调对于动物(例如人),将多余的能以三酰甘油的形式而不是以糖类的形式进行贮存的优点,还应指出三酰甘油的热量值(9.5 cal/g)比糖类如糖原的(4.0 cal/g)要高得多,以单位重量计,相差超过 2 倍。此外,多糖是亲水性很强的化合物,每贮存 1 g 糖原差不多就有 1 g 或很多的水结合在一起;而三酰甘油是疏水性极强的化合物,贮存它不会有带着水的需要。因此,1 g 贮存的三酰甘油的高能磷酸的产量超过 1 g 贮存的糖原的 5 倍。在非运动不可时,这是特别重要的。例如,植物是不怎么动的,就以糖类的形式贮存大部分多余的能量。与此相反,植物的种子需要较多的运动,就以脂质的形式贮存大部分的能量。

既然以脂质的形式贮存能量有那么多明显的优点,那么就要问,为什么还要把能量贮存在糖原中呢?在葡萄糖和脂肪酸的代谢之间,还有一些非常重要的区别。第一,也是最重要的,脂肪酸需要氧才能被用作能源,在无氧条件下不能提供能量。糖类是惟一能在无氧条件下产生能量的底物。由于膜的特点,中枢神经系统不能吸收多少脂肪酸,因而基本上不能利用脂肪酸作为能源。因此,在大多数情况下,中枢神经系统依赖于葡萄糖,虽然它是需氧的组织,而不是不需氧的组织。

用偶数碳链的脂肪酸(即碳为偶数的脂肪酸,人体内这虽不是惟一的,但却是主要的贮存于三酰甘油中的脂肪酸)不能有葡萄糖的净形成。偶数链脂肪酸只产生乙酰 CoA,这是不能产生任何净葡萄糖异生的。在有氧条件下,脂肪酸是优良的能源,如以前几章中所指出的,它们在节约葡萄糖中起着重要作用。这是由形成乙酰 CoA 而发生的,乙酰 CoA 是丙酮酸脱氢酶的重要抑制剂,并促进这种酶的磷酸化和失活。在肌肉中,脂肪酸降解过程中所产生的 ATP 和柠檬酸能抑制 PFK,使 F-6-P 和 G-6-P 增多从而抑制己糖激酶,这就减少了葡萄糖的利用。在肝脏中,乙酰 CoA 水平的提高不仅抑制丙酮酸脱氢酶,而且起着丙酮酸羧化酶的别构活化剂的作用,而这种羧化酶是葡萄糖异生中的关键酶。因此,正如我们在全部代谢作用中所要看到的,不能孤立地看待一条单独的途径或一个控制系统;途径之间有非常强的相互作用,这里人体内糖类和脂质代谢的情况就说明了这一点。

(三) 酮体

肌肉中,发生 β -氧化的脂肪酸大部分都被完全氧化为 CO_2 和水。然而在肝脏中,脂肪酸却有另一个主要的命运:这就是形成所谓的酮体,即乙酰乙酸和 β -羟基丁酸。脂肪酸必须被运入线粒体才能进行正常的 β -氧化。在许多组织中这可能是 β -氧化的限制因素,也是肝脏中形成酮体的原因。线粒体外的脂肪酰 CoA 的脂肪酸部分可以由肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT) 转运过线粒体外膜。这种酶定位于线粒体外膜的内侧。现在酰基肉毒碱位于线粒体的膜间空间。然后酰基肉毒碱中的脂肪酸部分又被转运过线粒体内膜而在线粒体基质中与辅酶形成脂酰基-CoA。这种转运是由肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT) 催化的(图 14.1),此酶位于线粒体内膜的内侧。肉毒碱-酰基肉毒碱移位酶也促进这种移位,此酶定位于线粒体内膜中。CPT 为丙二酸单酰 CoA 所抑制,丙二酸单酰 CoA 是脂肪酸合成的一个中间产物(第 15 章)。

所有氧化脂肪酸的组织中都发生这种抑制作用。不同组织中和不同的营养状况和激素状况下, 丙二酸单酰 CoA 的水平都不同。CPT 对丙二酸单酰 CoA 的敏感性也因组织而不同, 甚至在同一种组织中, 也因营养状况和激素状况而不同。因此, 脂肪酸的氧化可能为 CPT I 的活性和相对抑制所控制。

脂肪酸在肝脏中发生 β -氧化并形成乙酰 CoA。若乙酰 CoA 积累而不是进入柠檬酸循环, 肝脏就会更加依赖于 β -氧化而不是柠檬酸循环以获得高能磷酸。要继续进行 β -氧化, 就需要辅酶 A。假若所有的 CoA 都形成了脂肪酰 CoA 和乙酰 CoA, 就不能发生 β -氧化。有一条肝脏所特有的代谢途径, 通过它可以克服这种困境, 这就是酮体的形成(图 14.3)。它发生在线粒体基质中, 如下所述。

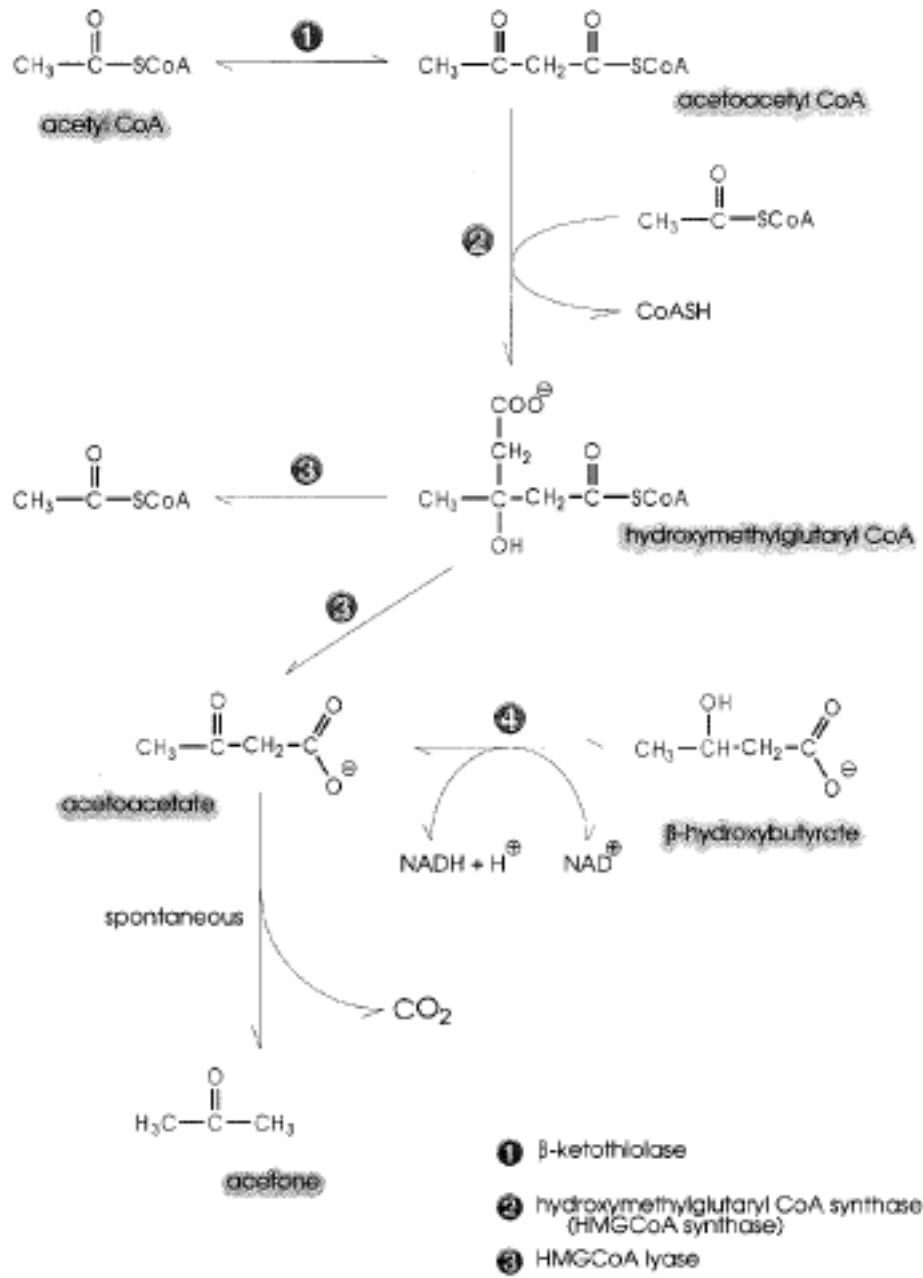


图 14.3 酮体形成的步骤

乙酰乙酸、 β -羟基丁酸和丙酮都是酮体, 丙酮(注意, 丙酮中的两个碳无法区分, 所以都标有星号)是乙酰乙酸脱羧的产物; 最后加进来的乙酰 CoA, 其甲基碳上带有星号。

通过 β -酮基硫解酶的逆反应, 乙酰 CoA 可以结合而形成乙酰乙酰 CoA。然后乙酰乙酰 CoA 又可与另一个乙酰 CoA 结合而形成羟甲基戊酰 CoA(HMG CoA), 催化此反应的酶是羟甲基戊酰 CoA 合酶。线粒体中的 HMG CoA 可由其中的 HMG CoA 裂解酶裂解为乙酰乙酸和乙酰 CoA。在这一转变中, 两个乙酰 CoA 形成乙酰乙酰 CoA 时释放一个游离的 CoA, 乙酰 CoA

和乙酰乙酰 CoA 形成 HMG CoA 时也释放一个游离的 CoA。这样, 游离 CoA 的释放就使得 β -氧化能够继续进行而产生乙酰乙酸。患糖尿病或饥饿时, 像油酸这样的脂肪酸中的碳约有 90% 存在于酮体中, 这是用灌注肝脏进行实验所得的结果。现在值得注意的是这一过程存在于线粒体中; 以后将会看到, 细胞溶胶中的 HMG CoA 是胆固醇合成的主要前体。

在包括肝细胞在内的大多数细胞的线粒体中, β -羟基丁酸脱氢酶能够可逆地催化这一反应: $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{乙酰乙酸} \rightleftharpoons \beta\text{-羟基丁酸} + \text{NAD}^+$ 。通过这一反应, 肝脏中所形成的乙酰乙酸大多变为 β -羟基丁酸。 β -羟基丁酸与乙酰乙酸的比值决定于线粒体中 $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ 之比。在人体内循环的 β -羟基丁酸与乙酰乙酸之比大约为 3 : 1 ~ 4 : 1。因为酮体是肝以外的组织的重要能源, β -羟基丁酸水平较高有优点, 因为它是一种稳定的化合物; 而乙酰乙酸是 β -酮酸, 不太稳定, 可以自发地脱羧, 形成 CO_2 和丙酮。这就是为什么患有酮病的人呼出的气体中有丙酮臭味, 不管是由于长期饥饿还是糖尿病未经治疗。然后酮体就在血液中循环并能达到高达 5 mmol/L 或更高的水平, 而脂肪酸总是在 1 mmol/L 或更低的水平。血液循环中酮体所以优于脂肪酸就是因为它们是小分子, 极易溶于水, 而且不会引起乳化和细胞的溶解, 而高水平的脂肪酸就会。还有, 几乎所有的细胞, 包括中枢神经系统的细胞, 都能利用酮体。不能利用酮体的细胞有两种, 即红细胞和肝细胞, 特别是实质细胞, 前者是因为没有线粒体, 后者是因为没有使这些化合物活化的主要的酶。

活化酮体的主要过程发生在线粒体中, 是由琥珀酰 CoA-乙酰乙酰硫转移酶催化的, 反应从琥珀酰 CoA + 乙酰乙酸开始, 形成琥珀酸 + 乙酰乙酰 CoA; 后者在 β -酮基硫解酶的催化下与 CoA 反应, 产生 2 个乙酰 CoA (图 14.4)。虽然没有得到应该从琥珀酰 CoA 得到的 GTP, 但是丢了一个高能磷酸却节约了 2 个高能磷酸, 因为假若活化乙酰乙酸的方式和活化脂肪酸的方式一样, 那就需要 2 个高能磷酸。在线粒体中活化的酮体转变成乙酰 CoA 以后, 这种乙酰 CoA 就可像任何其他的乙酰 CoA 一样被代谢。

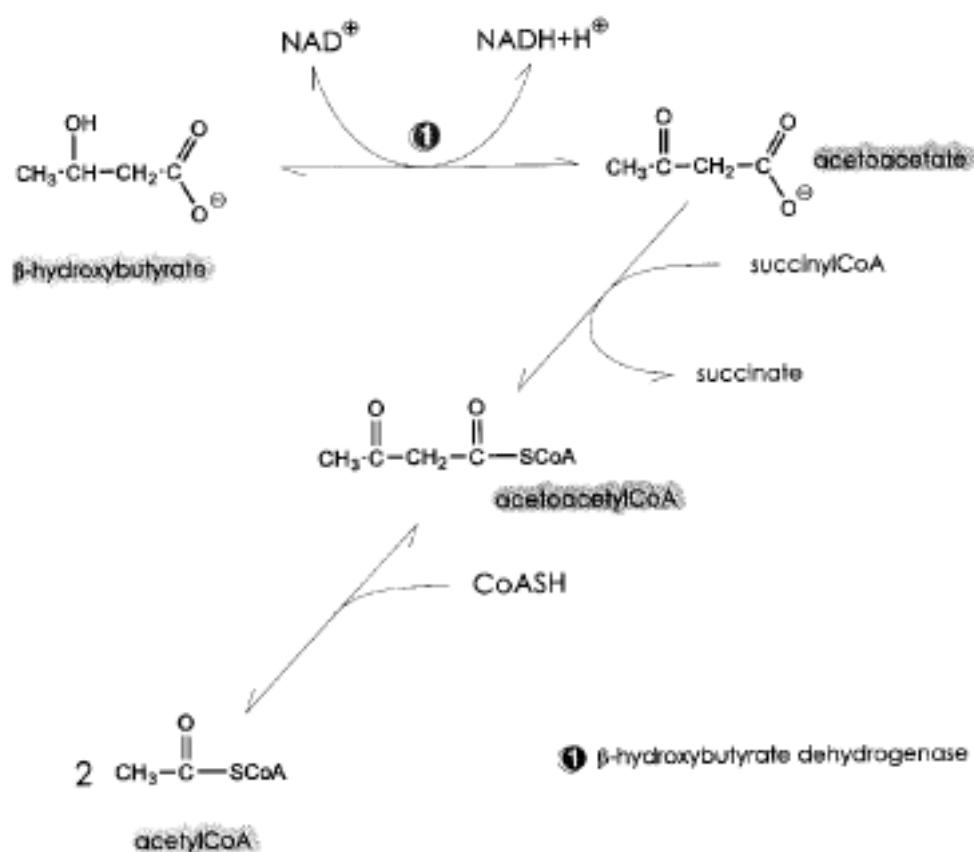


图 14.4 酮体的活化及转变为乙酰 CoA 的步骤

许多类型的细胞中均有此过程。

在某些细胞中, 酮体的活化方式与细胞溶胶中脂肪酸的活化方式类似, 即形成乙酰乙酰 CoA, 而后再被用作脂肪酸合成或胆固醇合成的碳源。

利用酮体有比利用脂肪酸和利用糖类都有优越之处。酮体是在线粒体内由柠檬酸循环的一个关键的中间产物活化的。因此, 即使 CoA 不多, 酮体仍可优先被活化; 在线粒体基质以外被活化的脂肪酸必须由肉毒碱穿梭带入线粒体基质内而且此处还必须有 CoA 才能再形成线粒体中的脂肪酰 CoA。在大多数组织中, 当所有三类底物和氧都存在时, 最不能优先被利用的是糖类, 因为与糖类代谢有关的控制种类很多(包括己糖激酶、PFK 和丙酮酸脱氢酶)。脑中酮体的利用可达能量需要量的 60%, 特别是在长期饥饿时。不过, 其余 40% 的能量需要仍要靠关键性的葡萄糖的供应。

酮体是正常的和有用的代谢物, 但是也像许多其他代谢物一样, 如果浓度过高, 也会产生问题。有关酮体的主要问题是: (i) 当酮体水平太高并从尿中排出时, 就会损失能量, (ii) 随着酮体的排泄又会损失阳离子。这些离子可能是钠、钾, 到后期甚至还有钙。以后将会了解到, 人体会排泄更多的铵离子以伴随酮体而免去其他离子的排泄。酮体的 pK 约为 4, 在血液的 pH 下, 甚至在酸性尿的 pH 下, 它们主要以离子的形式存在。因此, 假若被排泄出来, 就需要有阳离子伴随着。当这些化合物被代谢为 CO₂ 和水时, 与酮体有关的 pH 问题就反过来了。不过, 假若它们是在尿中从体内排出的话, 这是不可能发生的。因此, 虽然隐含着负电荷, 如果不过量, 酮体仍是正常的和有用的代谢物。只有当它们过量而且出现酮血(血液中酮体过量)、特别是酮尿(尿中酮体过多)时, 才成为问题。问题主要是酸碱平衡。长期饥饿或糖尿病很可能出现酮血和酮尿。

(四) 奇数链脂肪酸

奇数链脂肪酸(碳原子数为奇数的)也发生 β -氧化。不过, 在这种情况下, 最后的产物是 1 分子丙酸。这种酸不像乙酰 CoA, 不能直接在柠檬酸循环中被氧化。丙酰 CoA 是在线粒体中通过几个步骤被代谢的, 开始时是在一种含有生物素而且需要 ATP 和 CO₂ 的酶的催化下, 形成甲基丙二酸单酰 CoA(MMCoA, 见图 14.5)。

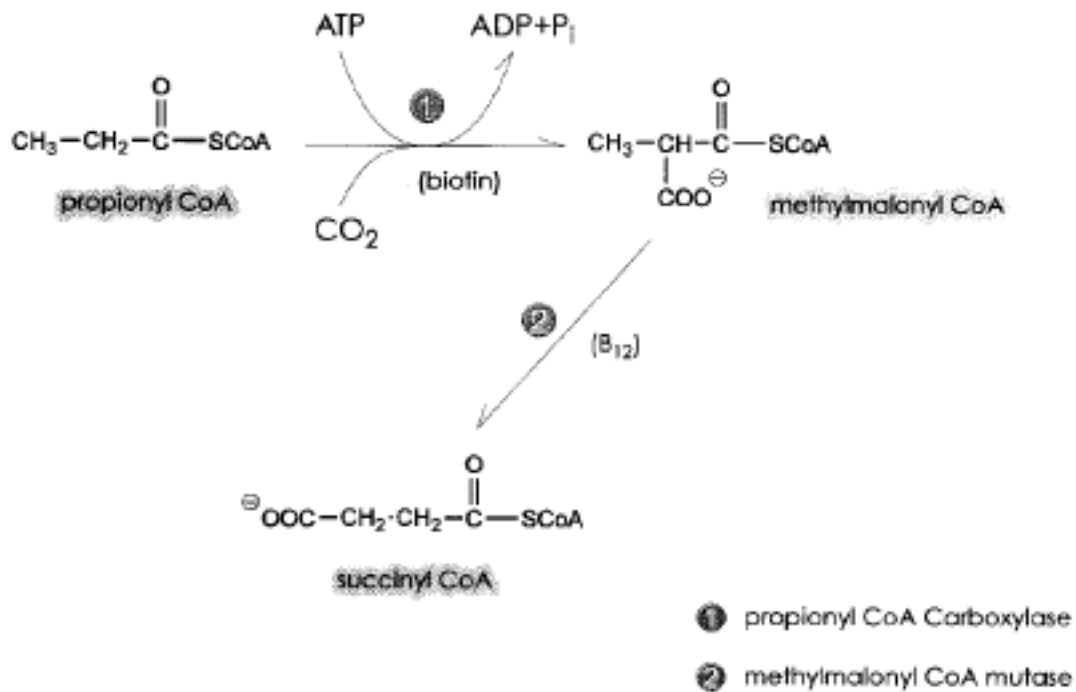


图 14.5 丙酰 CoA 转变为琥珀酰 CoA 的各个步骤

这些变化发生在线粒体中, 丙酰产生琥珀酰使得丙酰能异生葡萄糖。

然后,在一种需要维生素 B₁₂ 的变位酶的催化下,MMCoA 转变为琥珀酰 CoA,柠檬酸循环的一个中间产物。琥珀酰 CoA 可以通过柠檬酸循环形成草酰乙酸,而后形成葡萄糖。所以,由于 2 分子的奇数链脂肪酸能形成 1 分子葡萄糖,这些化合物本质上是葡糖异生的。

14.3 小 结

(1) 脂质是人体内主要的贮能物质。就贮存的重量而言,它们含有 5 倍于糖原的能量。

(2) 三酰甘油主要贮存在脂肪组织中。三酰甘油可被脂酶水解,一种脂酶能被胰高血糖素或肾上腺素所活化。这些激素使对激素敏感的脂酶活化,其结果是将未酯化的脂肪酸释放到血液中。

(3) 许多组织能在细胞溶胶中将脂肪酸激活为脂肪酰 CoA 并通过一种与肉毒碱有关的系统将其运至线粒体。脂肪酸运至线粒体基质的速率可能限制脂肪酸氧化和酮体生成的速率。这种转运是由肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT) 的活性控制的。CPT 为丙二酸单酰 CoA 所抑制。

(4) 脂肪酰 CoA 在线粒体中发生 β -氧化作用,产生多个乙酰 CoA、NADH 和结合在酶上的 FADH₂。NADH 和 FADH₂ 可通过电子传递系统而用于形成 ATP。脂肪酸的分解代谢需要氧。

(5) 肌肉中脂肪酸代谢会增加 ATP 和柠檬酸,它们会抑制 PFK 而提高 G-6-P 的水平,从而抑制己糖激酶而减少葡萄糖的利用。

(6) 肝中脂肪酸的代谢会增强葡糖异生作用,因为线粒体中乙酰 CoA 的水平提高了。

(7) 肝中酮体是由脂肪酸形成的。这会释放出游离的 CoA 使 β -氧化继续进行并给包括脑在内的其他组织供应补充的能量。在许多组织的线粒体中酮体可被活化并产生乙酰 CoA。

(8) 能够利用葡萄糖、脂肪酸和酮体的细胞,在氧的存在下,对这些物质优先利用的顺序是酮体 > 脂肪酸 > 葡萄糖。

(9) 含有奇数碳原子的脂肪酸能净产生葡萄糖。

参 考 资 料

Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production, J. D. McGarry and W. Foster, 1980, *Ann. Rev. Biochem.*, 49: 395 ~420.

Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase, J. D. McGarry, K. F. Woeltje, M. Kawajima, and D. W. Foster, 1989, *Diabetes Met. Rev.*, 5: 271 ~284.

Regulation of mitochondrial carnitine palmitoyltransferases from liver and extrahepatic tissues, D. Saggerson, I. Ghadiminejad, and M. Awan, 1992, *Adv. Enzyme Reg.*, 205 ~306.

Enzymatic regulation of liver acetyl-CoA metabolism in relation to ketogenesis, O. Wieland, L. Weiss, and I. Eger-Neufeldt, 1964, *Adv. Enzyme Reg.*, 85 ~99.

The AMP-activated proteinkinase: A multisubstrate regulator of lipid metabolism, D. G. Hardie, D. Carling, and A. T. R. Sim, 1989, *Trends Biochem. Sci.*, 14: 20 ~23.

复 习 题

1. 脂肪酸是通过下列哪一项运入线粒体的?
 - a) 辅酶 A
 - b) 肉毒碱
 - c) 1-甘油磷酸
 - d) 硫辛酸
 - e) 磷脂
2. 脂肪酸是通过下列哪一项的起始作用而从脂肪组织中贮存的甘油三酯中释放出来的?
 - a) 对激素敏感的脂酶
 - b) 脂蛋白脂酶
 - c) 卵磷脂酰基转移酶
 - d) 脂肪酰 CoA 水化酶
 - e) 羟甲基戊酰 CoA 裂解酶
3. 完整细胞中脂肪酸氧化的天然抑制剂是什么?
 - a) 柠檬酸
 - b) G-6-P
 - c) 丙二酸单酰 CoA
 - d) HMG CoA
 - e) NADPH
4. 脂肪酸通过什么影响糖类的氧化?
 - a) 直接影响己糖激酶
 - b) 间接影响丙酮酸激酶
 - c) 间接影响糖原合成
 - d) 间接影响草酰乙酸脱氢酶
 - e) 间接影响丙酮酸脱氢酶
5. 下列哪一项不能用酮体 (BHB 和乙酰乙酸) 取得能量?
 - a) 肌肉
 - b) 肾脏
 - c) 脑
 - d) 红血细胞
 - e) 心肌

参 考 答 案

1. b 答案是通过棕榈酰酰基肉毒碱转移酶 和 ，它们在线粒体基质中形成脂肪酰 CoA。
2. a 此酶为磷酸化作用所激活。
3. c 丙二酸单酰 CoA, 脂肪酸合成中的一种中间产物, 是棕榈酰酰基肉毒碱转移酶 的抑制剂, 也是脂肪酸转移到其氧化的主要部位线粒体基质的抑制剂。
4. e 由于脂肪酸氧化, 线粒体中乙酰 CoA 的浓度增高, 这就抑制了丙酮酸脱氢酶, 并且促进了此酶的磷酸化, 使之成为活性较低的酶。
5. d 红血细胞不能利用酮体获得能量, 因为它们没有线粒体。利用酮体获取能量是一个氧化过程, 需要线粒体的存在

第 15 章 脂质代谢：合成和转运

15.1 引言

脂质有许多种,包括三酰基甘油(亦称甘油三酯)、磷脂、鞘脂、糖脂、胆固醇等。本章将讨论这些脂质的合成和转运。在许多情况下,脂质合成指的是脂肪酸和胆固醇的从头合成,然后由此再形成更复杂的脂质,如三酰基甘油和磷脂。我们研究非脂肪酸前体(如葡萄糖和丙酮酸)合成为脂肪酸的过程。人体内脂肪酸从头合成的部位似乎是肝脏。在脂肪组织中可能有某种程度的脂肪从头合成;然而其量极少,除非膳食中的脂肪含量为 5% 或以下——在大多数现代社会中这是很不可能的。因为肝脏中糖酵解很少,脂肪酸合成的主要碳源似乎是由其他组织通过肝脏的血液循环回到肝中的乳酸和丙酮酸。

15.2 由乙酰 CoA 合成脂肪酸

这个过程基本上是用乙酰 CoA 的乙酰单位形成长链的脂肪酸。脂肪酸合成发生在细胞溶胶中。脂肪酸合成的第一个关键步骤是乙酰 CoA 羧化为丙二酸单酰 CoA,是由含有生物素的乙酰 CoA 羧化酶催化的。丙二酸单酰 CoA 的丙二酸单酰部分可被转移到脂肪酸合酶(FAS)上,此酶含有泛酸(类似于辅酶 A 但无腺嘌呤核苷酸核糖部分)。乙酰 CoA 的乙酰基再转递到 FAS 的另一个泛酰基上。与泛酰基的连接形式是硫酯。然后乙酰部分又转移到丙二酸单酰部分上并释放 CO_2 。 CO_2 的丢失有助于保证脂肪酸合成的单方向反应。于是形成了乙酰乙酰 FAS,它再被还原为 β -羟基丁酰 FAS。 β -羟基丁酰 FAS 再脱水并被还原;两个还原反应均由 NADPH 提供还原力(图 15.1)。来自丙二酸单酰 CoA 的另一个丙二酸单酰部分再加入到 FAS 上。然后丁酰部分加于 FAS 的丙二酸单酰部分上,并释放 CO_2 。像乙酰乙酰 FAS 一样,再次发生还原、脱水和还原反应。产物是连在 FAS 上的 6-碳脂肪酸。此过程重复发生,直到形成连接在 FAS 上的 C14 到 C18 的脂肪酸为止,通常是形成 C-16 的脂肪酸。这些脂肪酸-FAS 然后又裂解,形成游离的 FAS 和游离的脂肪酸。在此过程中,正在延伸的脂肪酸链总是加到新的丙二酸单酰部分上,因此第一次加上去的乙酰 CoA 总是在脂肪酸的甲基上。脂肪酸合成所需要的还原力是由 NADPH 供应的。整个过程都在一个多功能的蛋白质分子上进行的优点是,中间产物不必变成自由流动的化合物就可被转移。

(一) 将乙酰单位从线粒体移到细胞溶胶中

合成脂肪酸所需要的乙酰单位是在线粒体中产生的,但却在细胞溶胶中被利用。这种单位来源于丙酮酸脱氢酶的反应,形成的是乙酰 CoA,而乙酰 CoA 不能通过线粒体膜。有一种独特的穿梭系统解决了这个问题。在能量足够或过量时,肝中由于 NADH 多,ADP 又已用尽,异柠檬酸脱氢酶受到抑制,所以柠檬酸会积累。柠檬酸是比乙酰 CoA 小得多的分子,能通过专一的柠檬酸移位酶运出线粒体(图 15.2)。不过,与肌肉中不同的是,从线粒体中出来的柠檬酸并不是令糖酵解变慢的信号,因为肝中几乎没有糖酵解发生,柠檬酸只是促进脂肪酸合成

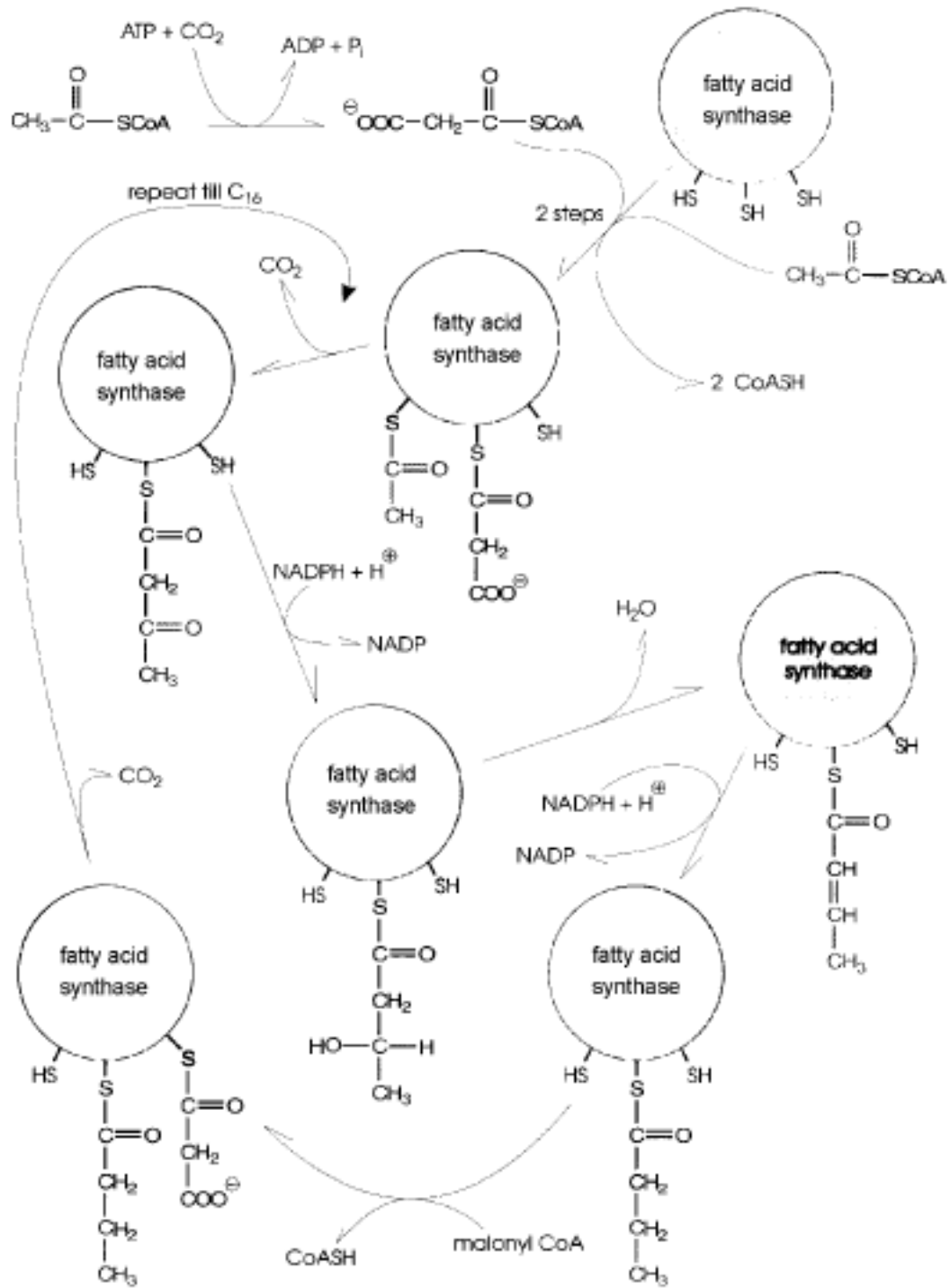


图 15.1 脂肪酸合成的途径和机制

脂肪酸合酶是一个大的酶复合体, 含有多种酶活性和酰基载体蛋白: 合成只进行到丁酰基-酰基载体蛋白, 然后每次加 2 个碳, 重复进行, 直到形成棕榈酰-酰基载体蛋白为止; 新加上去的乙酰 CoA, 而不是丙二酸单酰 CoA, 其 C 上标记星号, 以表明正在延伸的链每一步都是加到新的丙二酸单酰 CoA 上。

的信号。以后会明了, 柠檬酸在脂肪酸合成中起着多方面的作用, 既是底物的供应者, 又是效应物分子。

细胞溶胶中, 柠檬酸裂合酶催化柠檬酸 + CoA + ATP 转变为乙酰 CoA + 草酰乙酸 + ADP + 无机磷酸。这一反应需要能量, 因为柠檬酸合酶的反应是不可逆的。细胞溶胶中所形成的乙酰 CoA 然后作为脂肪酸合成的直接前体, 在乙酰 CoA 羧化酶和 FAS 的作用下形成脂肪酸, 如前所述。

(二) 脂肪酸合成的控制

脂肪酸合成为许多种机制所控制, 包括别构效应物、共价修饰和底物的可利用性。丙酮酸是脂肪酸的潜力最大的前体, 特别是在肝脏中。遇到的一个困难是在线粒体中丙酮酸会形成

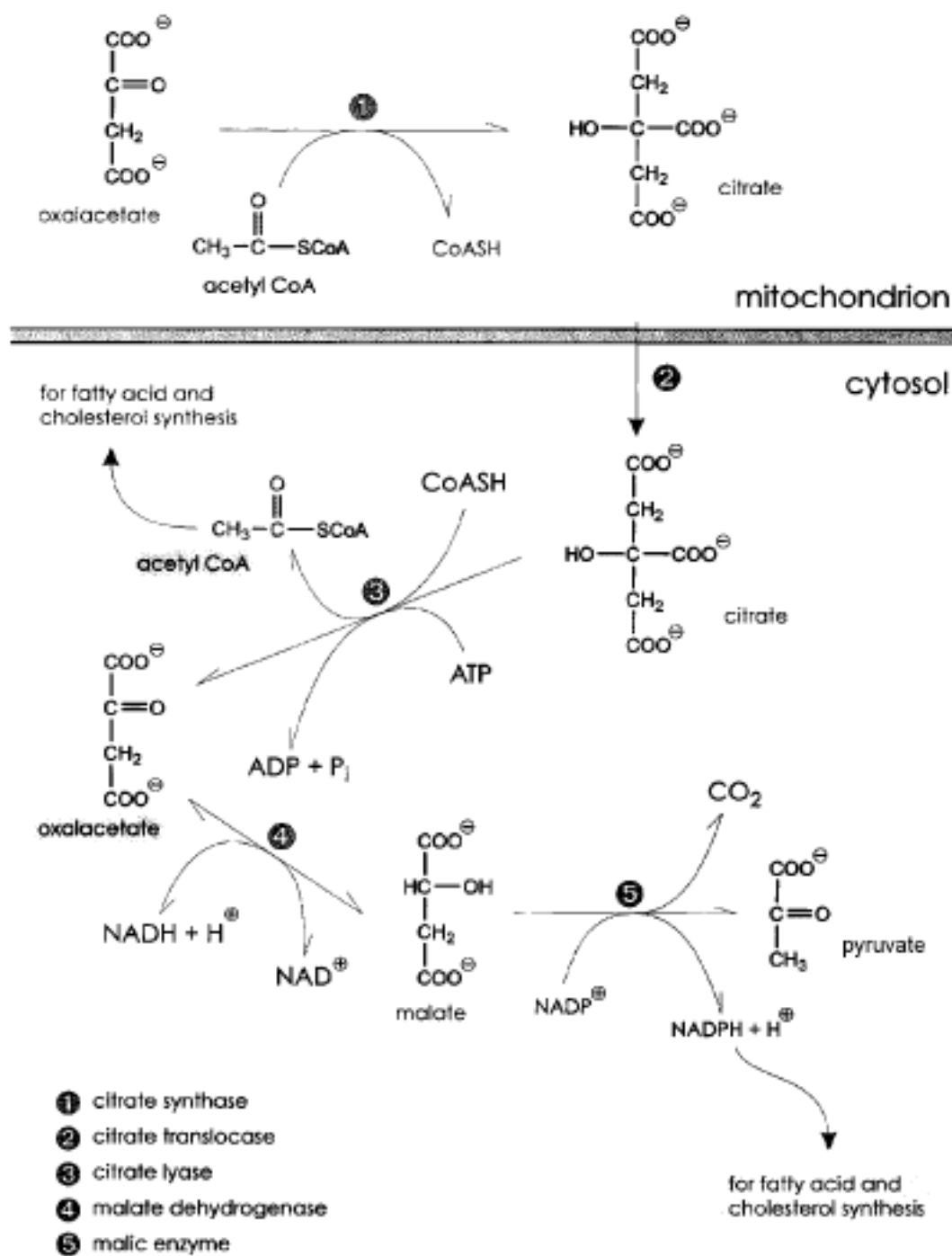


图 15.2 乙酰 CoA 从线粒体中运至细胞溶胶中

乙酰 CoA 以柠檬酸的形式移出线粒体,在细胞溶胶中又重新形成乙酰 CoA。所产生的草酰乙酸能够有效地将 NADH 转变为 NADPH, NADPH 参与胆固醇和脂肪酸的合成。乙酰 CoA 的 C 上标记星号以便于追踪它们从线粒体到细胞溶胶的移动。

乙酰 CoA; 而在线粒体中乙酰 CoA 不会直接产生脂肪酸, 因为其合成过程在细胞溶胶中进行。因此, 有一种重要的控制使线粒体中由丙酮酸形成的乙酰 CoA 转运到细胞溶胶中(图 15.3)。脂肪酸的合成需要足够的或过量的不是来自于脂肪酸本身的能量, 因为同时迅速合成又降解脂肪酸在能量上是浪费。当脂肪酸并不增多而又有大量胰岛素存在时, 比如食用高糖类的膳食时, 丙酮酸脱氢酶便处于一种有活性的形式。丙酮酸会迅速形成柠檬酸, 因为此时丙酮酸脱氢酶或柠檬酸合酶很少或没有受到抑制。随着细胞中能荷的提高, ATP 增多而 ADP 减少, 这就可能使电子传递变慢而使得线粒体中的 NADH 积累。NADH 浓度增高而 ADP 浓度又低于正常值就会抑制 NAD⁺-异柠檬酸脱氢酶。于是线粒体中的柠檬酸便会积累, 柠檬酸增多就会使它被运出线粒体外并为柠檬酸裂合酶所作用。当进食高葡萄糖或有脂肪合成潜力的膳食时, 柠檬酸裂合酶似乎是大量存在的; 而在脂肪合成最少的条件下, 此种酶的量也较小。柠檬酸裂合酶催化的是乙酰 CoA 和草酰乙酸的合成。苹果酸脱氢酶利用 NADH 将草酰乙酸还原

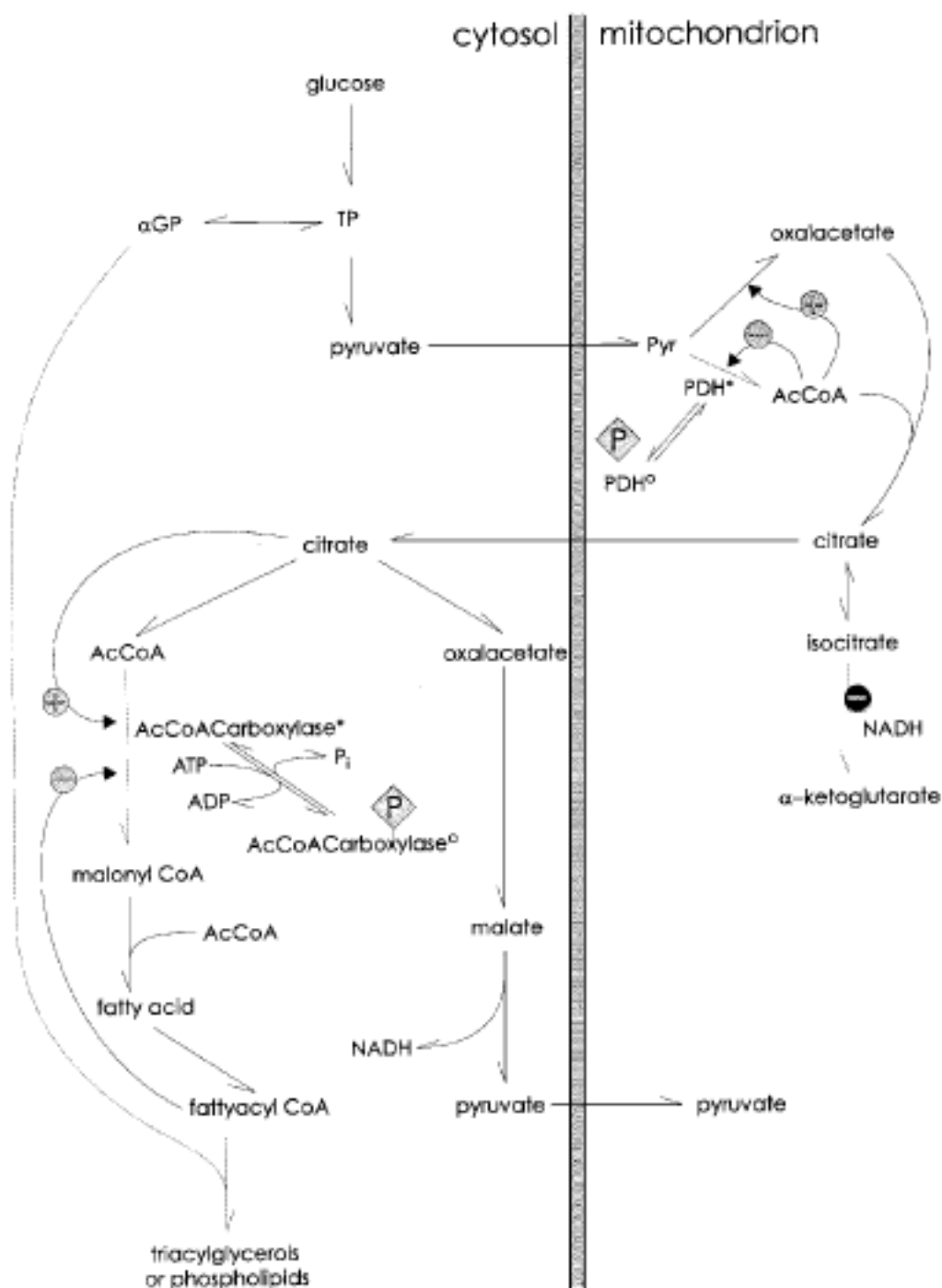


图 15.3 脂肪酸合成的控制

示脂肪酸合成控制的大意以及由效应物(正和负)控制的主要步骤。

为苹果酸, 而苹果酸酶又能使苹果酸形成 CO_2 , 丙酮酸和 NADPH , 后者则为脂肪生成提供还原能力。因此, NAD^+ -苹果酸脱氢酶和 NADP^+ -脱羧型苹果酸脱氢酶, 或称苹果酸酶的偶联的净效应就是把还原力有效地从 NADH 转到 NADPH , 使之用于脂肪生成(参看图 15.2)。

(三) 乙酰 CoA 羧化酶

如前所述, 乙酰 CoA 先转变为丙二酸单酰 CoA 而后进入脂肪酸。催化脂肪酸合成中第一个关键步骤的酶, 乙酰 CoA 羧化酶, 是受到别构的和共价的精细控制的。此酶可存在于单体的无活性的形式, 也可存在于多聚的有活性的形式。对此发生影响的一个因素就是柠檬酸, 它促进乙酰 CoA 羧化酶的多聚或有活性的形式的形成。因此, 柠檬酸在脂肪酸生成中起着重要作用: (i) 是细胞溶胶中乙酰 CoA 的来源, (ii) 是乙酰 CoA 羧化酶的别构正效应物和 (iii) 提供细胞溶胶中的草酰乙酸, 它使得 NADH 到 NADPH 的转氢作用成为可能。脂肪酰 CoA 是乙酰 CoA 羧化酶的别构抑制剂, 它使此酶解离为单体的形式。因此, 只要有内源的脂肪酸, 就不会合成更多的脂肪酸。细胞溶胶中的脂肪酰 CoA 通过抑制乙酰 CoA 羧化酶而减少丙二酸单

酰 CoA 的形成。

由依赖于 AMP 的蛋白激酶所催化的磷酸化作用会使乙酰 CoA 羧化酶变为无活性的形式,很可能是形成单体。胰高血糖素促进此种蛋白激酶的增多。同时,也不适于用丙酮酸作为脂肪生成的底物,而是利用丙酮酸进行葡糖异生的时刻。因此,磷酸化作用使此酶进入无活性的状态。去掉磷酸基团(例如胰岛素就会促进这种作用)就会使此酶转入活性较强的状态。脂肪酸合成的主要控制似乎在它的第一个关键步骤,丙二酸单酰 CoA 的形成和乙酰 CoA 羧化酶。假若有足够的还原能力如 NADPH,而且细胞溶胶中有足够的丙二酸单酰 CoA 和乙酰 CoA,脂肪酸就会迅速生成。

(四) 氧化作用与合成作用

脂肪酸氧化的控制与循环中的脂肪酸的多少和棕榈酰肉毒碱转移酶的活性有关。当血液循环中的脂肪酸增多时,在许多种组织,包括肝脏中,就会形成相当量的脂肪酰 CoA,足以抑制细胞溶胶中的乙酰 CoA 羧化酶并间接抑制线粒体中的丙酮酸脱氢酶。在这种情况下,丙二酸单酰 CoA 和柠檬酸都不会积累;因而脂肪酸合成也会减弱。当大量脂肪酸到达肝脏后,就足以使 β -甘油磷酸的酯化作用和 β -氧化作用迅速进行。为什么在细胞溶胶中合成的脂肪酸不会被运入线粒体并迅速降解呢?丙二酸单酰 CoA 对棕榈酰肉毒碱转移酶的抑制作用防止了这种浪费底物的循环发生,它使得新合成的脂肪酸不会进入线粒体并发生 β -氧化(图 15.4)。

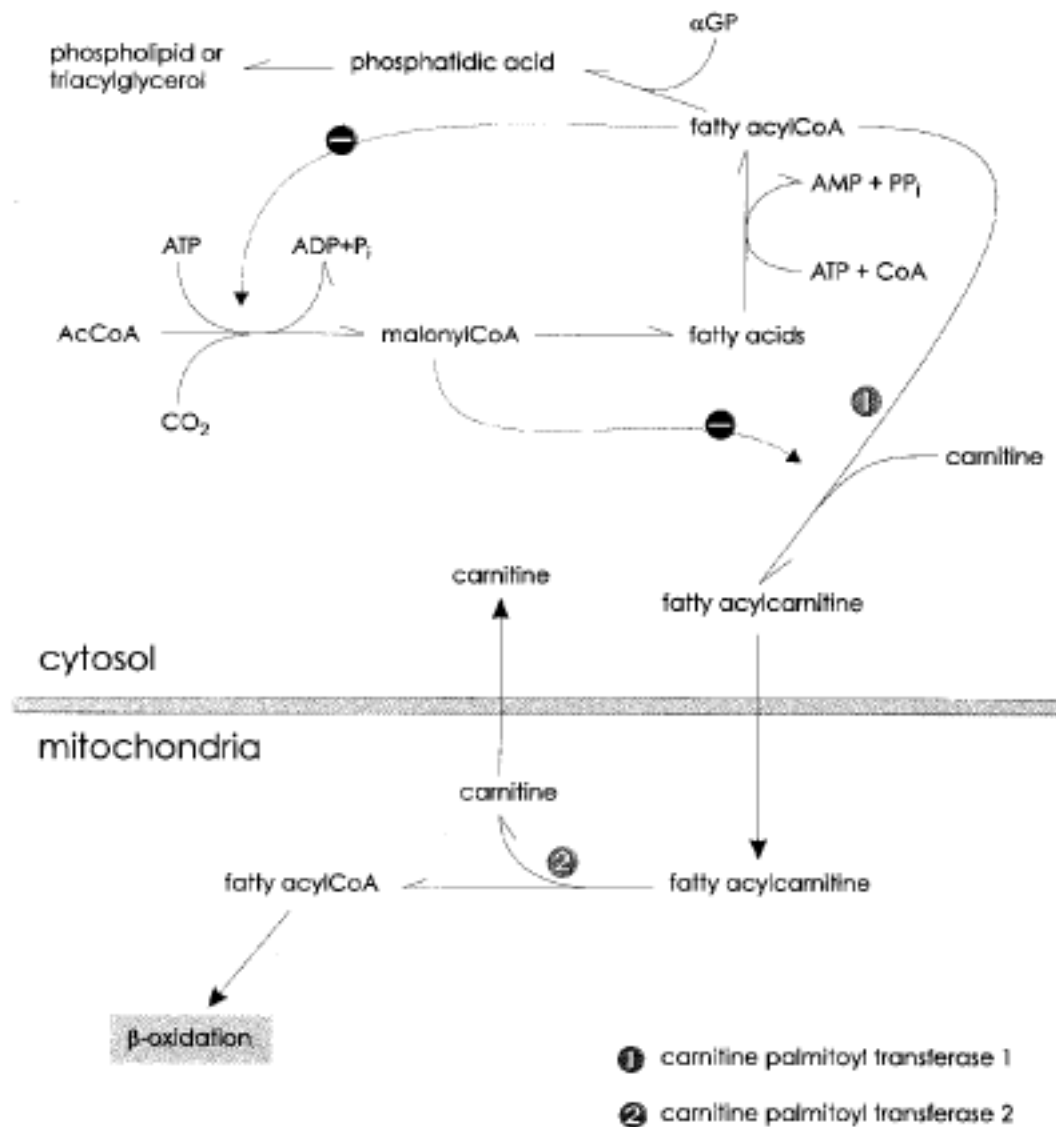


图 15.4 脂肪酸合成和降解之间的关系

此图表明丙二酸单酰 CoA 抑制 CPT1,从而抑制 β -氧化,避免了新合成的脂肪酸的氧化;脂肪酰 CoA 抑制乙酰 CoA 羧化酶,从而抑制脂肪酸的合成;当脂肪酰 CoA 转变为三酰甘油或磷脂后,它们就被有效地除去,并且不再起抑制作用。

于是新合成的脂肪酸掺入了三酰甘油和磷脂。当脂肪酸合成迅速进行时, 丙二酸单酰 CoA 的形成可能比脂肪酸合酶对它的利用快, 所以有一些丙二酸单酰 CoA 积累起来并抑制酰基肉毒碱转移酶。

当大量外源脂肪酸进入肝脏时, 它们又怎能在丙二酸单酰 CoA 的抑制作用下被运入线粒体而发生 β -氧化呢? 这个问题的解决是因为脂肪酰 CoA 抑制乙酰 CoA 羧化酶而所有的丙二酸单酰 CoA 都被用于脂肪酸的合成。当丙二酸单酰 CoA 转变为脂肪酸后, 丙二酸单酰 CoA 的水平下降, 而且不会恢复。因而对酰基肉毒碱转移酶的抑制作用就消除了, 脂肪酸的氧化就能进行。

(五) 脂肪酸的去饱和与延伸

生物体能将脂肪酸去饱和。去饱和作用产生顺式的双键, 与合成和降解时产生反式的双键适成对比。人体内的去饱和过程发生在 C9 位上或在靠近羧基的位置上。在 C9、C12 和 (或) C15 上或在 C9 和 C12 位上有双键的多不饱和脂肪酸在人体内不能合成, 为膳食中的必需成分。人体内能将棕榈酸主要延伸至 C18(硬脂酸) 脂肪酸和更多的 C20 ~C24 的酸。延伸作用在内质网上进行, 利用的是丙二酸单酰 CoA 和 NADPH, 但与脂肪酸合成不同的是, 延伸是在 CoA 的衍生物上进行的, 而不是在脂肪酸合酶上进行的。

亚油酸(18:2) 是一种必需的多不饱和脂肪酸, 它能被延伸并进一步去饱和化, 形成花生四烯酸。花生四烯酸是磷脂酰肌醇的正常组分, 位于 S_n2。在前列腺素合酶复合体的催化下, 花生四烯酸能转变为前列腺素。第一步是由此酶复合体中的环加氧酶组分所催化的。这一系统和与其密切相关的系统能够形成前列腺素类和血栓烷类。

15.3 磷脂类和三酰甘油类(甘油三酯类)的合成

从 FAS 的酰基载体蛋白部分释放的脂肪酸可在细胞溶胶中被活化并与 γ -磷酸甘油发生酯化作用, 形成磷脂酸。磷脂酸的主要去向有二: (i) 磷酸酶除去磷酸基团, 形成二酰甘油, 然后另一个脂肪酰 CoA 把脂肪酸转移给二酰甘油, 形成三酰甘油, 亦称甘油三酯。肝脏中形成的三酰甘油必须通过血液运至脂肪组织中贮存, 将在本章后面再讨论。(ii) 无论是新合成的脂肪酸, 还是膳食中的脂肪酸所形成的磷脂酸, 都还有另一个主要去向, 就是形成磷脂。磷脂的合成也要经由磷脂酸, 它与一系列 CDP 衍生物反应, 这些 CDP 衍生物可能包括胆碱和乙醇胺。磷脂酰丝氨酸是通过丝氨酸与乙醇胺交换的反应由磷脂酰乙醇胺形成的。

(一) 磷脂酰胆碱

磷脂酰胆碱(卵磷脂)合成的主要途径是通过已形成的胆碱(图 15.5)。磷脂酰乙醇胺转变为磷脂酰胆碱的次要途径是加入 3 个 CH₃ 基(来自甲硫氨酸)。因此, 假若没有胆碱而又有“CH₃”基团的来源, 也可从头合成磷脂酰胆碱。在主要途径中, 磷脂酰胆碱是直接从胆碱开始进行合成的。胆碱可被 ATP 磷酸化而形成磷酸胆碱。在磷酸胆碱胞苷酰转移酶的作用下和 CTP 存在时, 磷酸胆碱可发生反应, 形成 CDP 胆碱 + 焦磷酸, 焦磷酸的水解使反应向前进行。然后 CDP 胆碱与二酰甘油反应, 形成磷脂酰胆碱和 CMP。这一反应是由磷酸胆碱转移酶催化的。磷脂在细胞膜中的主要作用已在第 4 章中讨论过。

还有许多种其他的磷脂。一类就是磷脂酰肌醇及其磷酸化的衍生物(如磷脂酰肌醇 4, 5-

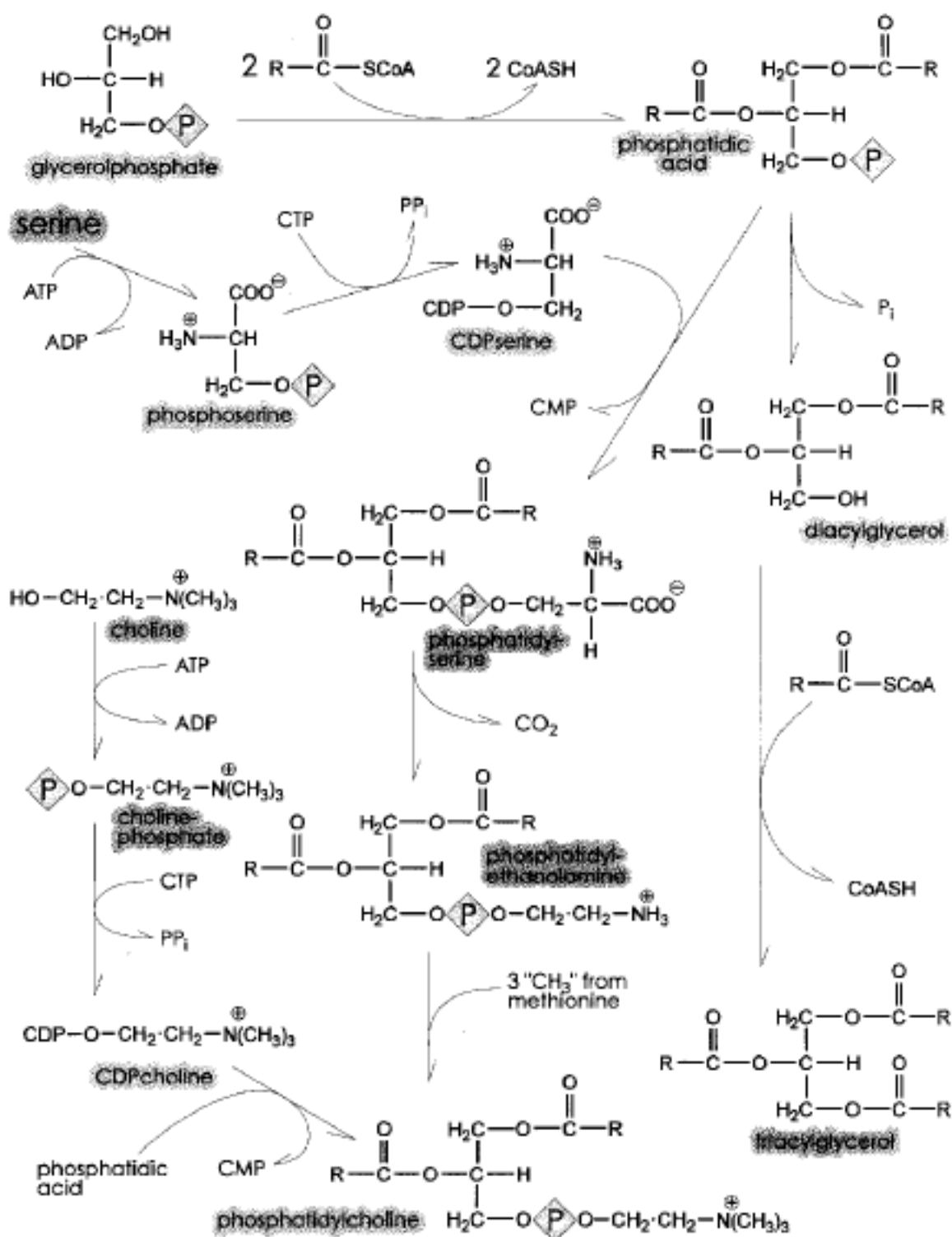


图 15.5 甘油三酯和磷脂的形成

此图说明由 1-磷酸甘油和脂肪酰 CoA 形成三酰甘油以及磷脂酰乙醇胺的形成和磷脂酰胆碱(由丝氨酸和甲硫氨酸的甲基)的形成。图中还有从胆碱开始的磷脂酰胆碱的形成(是其形成的主要途径)。

二磷酸),它在激素信号的转导方面很重要(见第 16 章)。磷脂酰肌醇在锚定许多种膜蛋白方面也很重要。由两个磷脂酸通过甘油而连接起来的心磷脂,在线粒体内膜中浓度很高。有一种缩醛磷脂与磷脂酰乙醇胺的区别在于以 O-(1-链烯基)取代基代替了酰基部分。这些乙醇胺缩醛磷脂主要存在于髓磷脂中。有一种特殊的磷脂酰胆碱,即二棕榈酰磷脂酰胆碱,是一种表面活性物质,为肺的正常功能所必须。

(二) 脂蛋白和脂质的转运

无论是在肝中合成的还是从膳食中摄取的,脂肪酸都必须通过血液转运,通常是运往脂肪组织中贮存。由于三酰甘油在血浆中的溶解度较小,所以呈脂蛋白的形式转运(图 15.6)。

脂蛋白类包括乳糜微粒、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白

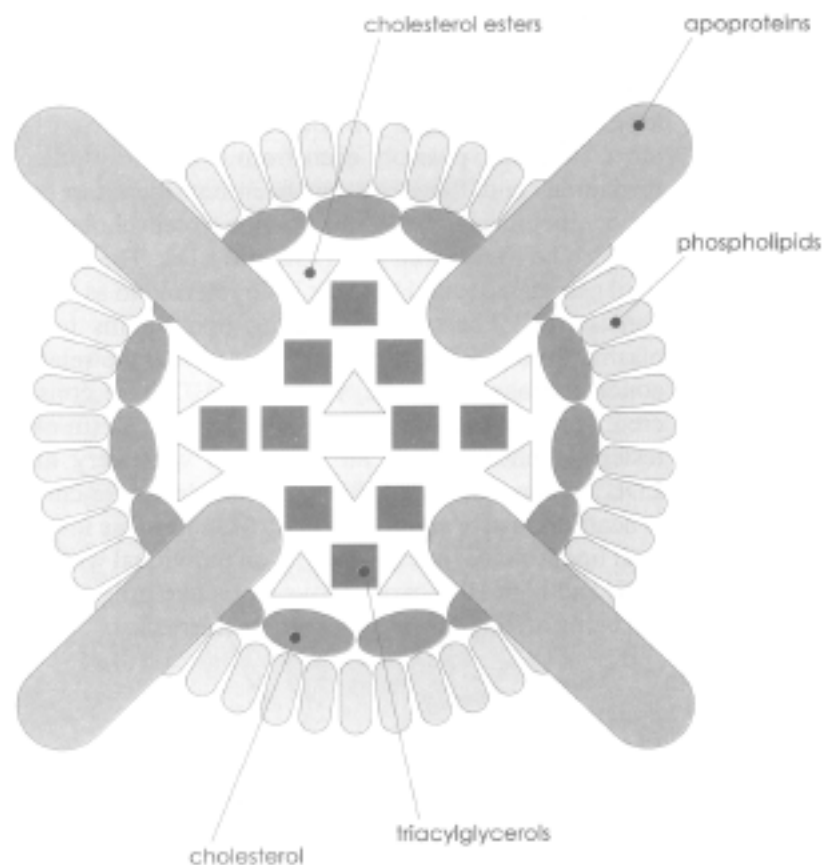


图 15.6 从中部切开的脂蛋白剖面概貌

注意：极性较强的化合物，如脱辅基蛋白质和磷脂，都在外表面上，与血浆接触；非极性较强的化合物，如三酰甘油和胆固醇，则靠近脂蛋白的中心。

(HDL)，乳糜微粒转运膳食中的脂肪，后三者转运内源的脂肪。这些脂蛋白在大小、密度以及甘油三酯、磷脂、胆固醇、胆固醇酯和蛋白质的相对含量方面都不同。此外，每一类脂蛋白可能含有不同的脱辅基蛋白质。这些专一的脱辅基蛋白质在脂肪颗粒内部的转化方面是重要的，也是对于细胞受体的信号，使得细胞进行吸收和(或)胞吞。

膳食中的三酰甘油在小肠中被脂肪酶水解，形成脂肪酸、甘油和单酰甘油。这些物质又被小肠吸收并且再合成为三酰甘油。小肠也合成磷脂和蛋白质，它们在形成乳糜微粒方面是重要的。乳糜微粒，大的脂蛋白，是在肠中形成并通过淋巴系统被吸收的，因而避免了经过肝门静脉而直接进入肝脏。乳糜微粒含有较高百分比的三酰甘油，磷脂、胆固醇、胆固醇酯和蛋白质的百分比则较低。由于乳糜微粒较大，所以循环中的血液内这些微粒的大量存在使得血浆或血清呈现乳白色。循环中的乳糜微粒会受到脂蛋白脂肪酶的作用。这种酶催化脂蛋白中的三酰甘油水解为脂肪酸。脂蛋白脂肪酶是在细胞中合成的，并被排出到各种组织，如脂肪组织、肌肉和肝脏的血管内壁上。从三酰甘油裂解产生的脂肪酸，会被相邻的细胞吸收，如肌肉则通过 β -氧化(第 14 章)将其用作能源，脂肪组织则将其贮存起来。甘油部分继续循环，然后在肾脏或肝脏中可被代谢，用作能源或用于形成葡萄糖，在肝脏中还可用于三酰甘油或磷脂的再合成。脂蛋白脂肪酶的反复作用会将乳糜微粒转变为乳糜微粒残迹，这种残迹有一种专一的脱辅基蛋白质，能为肝中的受体所“识别”。肝脏会吸收乳糜微粒残迹，重新包装脂质部分，并重新利用蛋白质部分中的氨基酸。

肝脏产生两种主要的脂蛋白以转运内源的胆固醇和三酰甘油，这就是 VLDL 类和 HDL 类(表 15.1)。顾名思义，这两类的差别就在于密度，可以用密度梯度离心法分开。和所有的脂蛋白一样，这两类也含有三酰甘油、胆固醇、胆固醇酯、磷脂和蛋白质。乳糜微粒是转运膳食中

的脂肪的,它含有约 90% ~95% 的三酰甘油以及少量蛋白质、磷脂和胆固醇。脂蛋白是转运内源的三酰甘油和肝脏所包装的胆固醇的,如 VLDL 类,仅含有 60% 的三酰甘油,和比较大量的总胆固醇和磷脂以及 10% 蛋白质。

表 15.1 血浆中脂蛋白的大致成分(质量分数 w)

脂蛋白	w/(%)				
	三酰甘油	磷脂	游离胆固醇	胆固醇酯	蛋白质
乳糜微粒	86	8	1	3	2
VLDL	52	18	7	14	9
IDL	27	23	8	31	11
LDL	10	23	8	38	21
HDL	8	25	4	18	45

当 VLDL 类循环而三酰甘油被脂蛋白脂肪酶水解时,特别是在脂肪组织中进行贮存时,颗粒的密度会减小,其三酰甘油的含量也会降至 10%,蛋白质为 25%,磷脂为 20%,而胆固醇的含量则增为 3 倍(与原来的 VLDL 相比),达到 45%。VLDL 类减去三酰甘油后即产生 IDL(中间密度脂蛋白),然后产生 LDL。在这些转变过程中,胆固醇的含量不仅增高,而且其酯化的形式也增多。循环中的 LDL 富于胆固醇,好像与慢性心脏病(CHD)和动脉粥样硬化有关。特别是在受到氧化性的伤害之后,LDL 特别易于使胆固醇在血管上已开始受到伤害的区域沉积。在大多数情况下,肝脏或其他器官如肾上腺会通过专一的受体将 LDL 除去。在这些组织中,胆固醇可用于类固醇激素或胆酸的形成,或在肝中用于 VLDL 的再包装。缺乏这种受体的人,几乎无例外地会在早年(即 20 或 30 岁时)就发生慢性心脏病。某些在这种隐性的缺陷方面杂合的人也很容易患心脏病。在这两种情况下,循环的血液中总胆固醇水平都异常高,除非进行治疗,大多数人会夭亡。即使进行了治疗,这些人早年发作心脏病的可能性仍然极大。

除去 VLDL 将三酰甘油分送到组织中之外,LDL 也能将胆固醇分送到外周组织中,也就是把胆固醇分送到不能合成这种化合物的组织中去。

第 4 种主要类型的脂蛋白是 HDL,它不是来自于 VLDL 或 LDL,而是由肝脏合成的。这种脂蛋白含有极高的蛋白质,可达 50%,而三酰甘油极少、磷脂多、胆固醇含量中等。这种脂蛋白的主要作用不是将三酰甘油从合成处,即肝脏,运至脂肪组织中贮存。HDL 含有来自乳糜微粒、VLDL 或 LDL 的一组不同的、专一的脱辅基蛋白质。虽然四种不同的脂蛋白中,有些脱辅基蛋白质(即多肽链)是类似的,但是每一种颗粒都有某些脱辅基蛋白质的独特的组合。HDL 颗粒含有一种脱辅基蛋白质,能使卵磷脂胆碱酰基转移酶(LCAT)活化,这种酶是把磷脂酰胆碱(卵磷脂)上的脂肪酸转移到胆固醇的 3 个羟基上形成酯化的胆固醇。胆固醇的酯比游离的胆固醇非极性更强,显然会移动到循环中的 HDL 的中心去。HDL 是其他处的胆固醇的清除剂,甚至可能是已形成斑块处胆固醇的清除剂,因此被认为是“良好脂蛋白”。高密度脂蛋白中的胆固醇也能被转移到 VLDL 和 LDL 中。与 LDL 结合的胆固醇称为“良好的胆固醇”。在血浆中循环的脂蛋白的总量并不说明问题,除非考虑了 VLDL、LDL 和 HDL 的相对浓度。例如,总的脂蛋白(或胆固醇)浓度相同的人,LDL 很多而 HDL 少的人就很容易患慢性心脏病或动脉粥样硬化;而 LDL 低而 HDL 高的人患上上述疾病的可能性就很小。

15.4 胆 固 醇

胆固醇是存在于膜和脂蛋白中的重要代谢物。它也是胆酸和类固醇激素的前体。各种类

固醇激素在结构上只有很小的差别,但在功能上却有重要的差异。这类激素包括孕酮、睾酮、矿质皮质激素、糖皮质激素(皮质醇)等等。人体能够合成胆固醇并将其再分配。合成胆固醇的主要器官是肝脏。人体所合成的胆固醇的量可能为摄入量的 2 至 3 倍或更多。胆固醇不是必需的养分,可以从简单的化合物经由乙酰 CoA 而合成。

3 个乙酰 CoA 可以有效地结合而形成 HMG CoA,而后再在 HMG CoA 还原酶催化下为 NADPH 所还原。此酶为胆固醇合成中的限速酶,位于内质网。胆固醇的合成在细胞中的位置是细胞溶胶和内质网,而酮体的形成则在线粒体中,这就保证了 HMG CoA 的命运决定于 HMG CoA 形成的亚细胞定位。HMG CoA 还原酶利用 2 NADPH 为还原力的来源将 HMG CoA 还原,形成羟甲戊酸(图 15.7)。羟甲戊酸,利用 2 个 ATP,即形成 5-焦磷酸羟甲戊酸。此化合物脱羧并发生分子内重排,形成 3,3-二甲烯丙焦磷酸和 3-异戊基焦磷酸,都是异戊二烯单位(C5)。3 个 C5 单位结合形成一个 C15 单位的焦磷酸,即法尼焦磷酸。2 个 C15 焦磷酸单位加上 NADPH 产生 C30 单位的鲨烯。经过酶促重排,氧化作用产生 3-OH,以及利用 NADPH 的

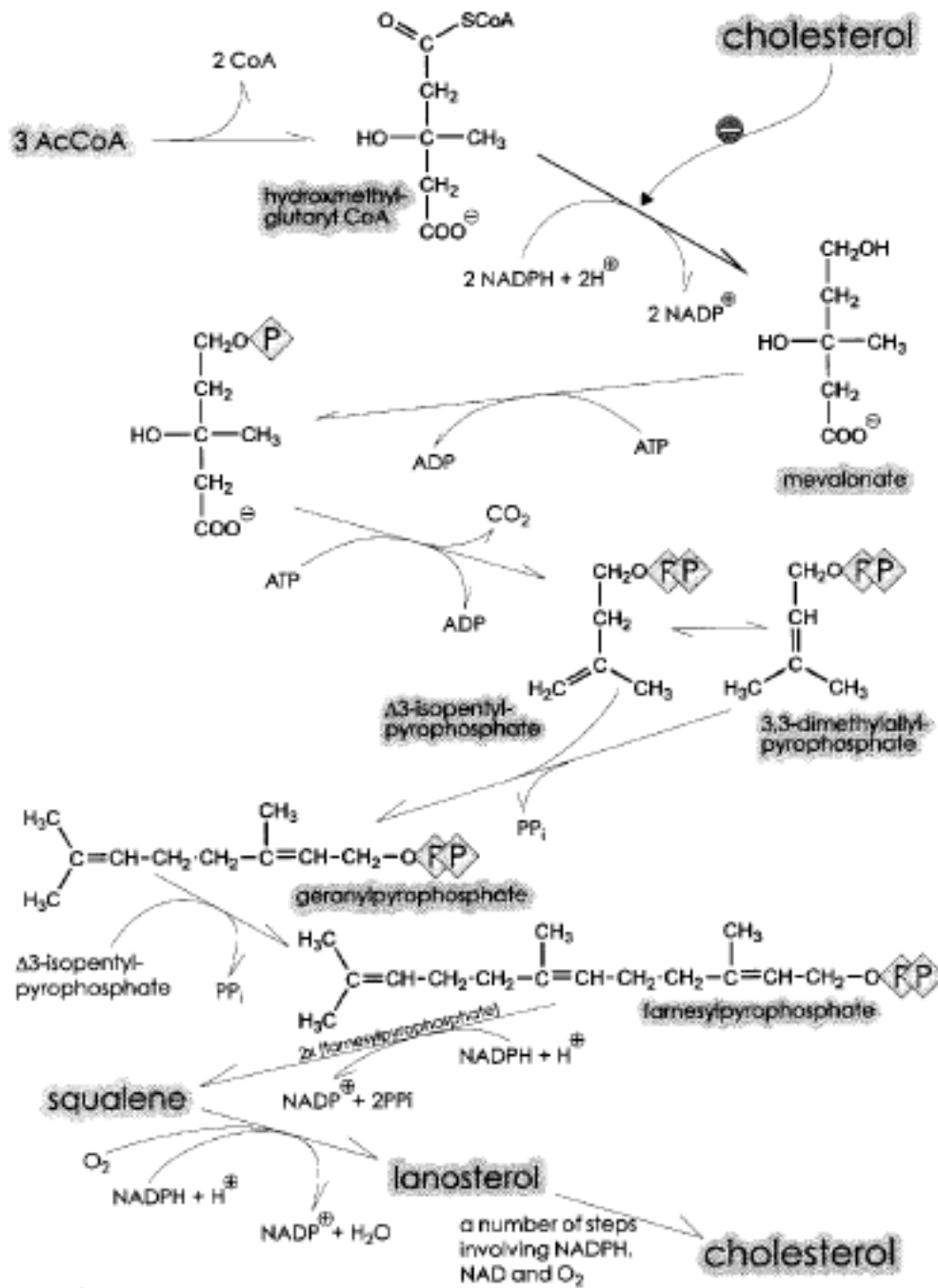


图 15.7 胆固醇合成的初期步骤

其中还包括限速的 HMG CoA 还原酶步骤,以后的步骤则仅列大意。
注意,和脂肪酸合成一样,NADPH 是还原能力的重要来源。

进一步还原后, 鲨烯形成胆固醇。

胆固醇的合成、贮存和传送都是受到控制的。胆固醇合成的主要控制在 HMG CoA 还原酶这一步, 这一步为胆固醇或酶的磷酸化所抑制, 细胞内 cAMP 的增多介导酶的磷酸化。严重的高胆固醇血症的患者可用 HMG CoA 还原酶的抑制剂如洛伐它丁(lovastatin) 进行治疗。胆固醇的贮存和传送则由许多种 LDL 受体所控制。低密度脂蛋白是富含胆固醇的脂蛋白, 它可通过 LDL 受体将胆固醇传送到许多组织中。当组织中的胆固醇水平升高时, 胆固醇的传送就不那么重要了。细胞中胆固醇水平高时, LDL 受体会发生下调(受体数目减少), 从而减少了胆固醇向这种组织中的传送。LDL 受体多的组织是肝脏、肾上腺、卵巢、睾丸和其他将胆固醇转变为重要代谢产物的组织。

大量的胆固醇是通过胆酸和胆盐损失的。胆酸和胆盐都是在肝脏中形成的, 它们在消化作用中都很重要, 是脂质, 包括脂溶性维生素的乳化剂。胆酸和胆盐是由肝脏通过胆汁向肠道中分泌的。相当一部分胆酸又通过肠肝循环回到肝脏中。这就减少了把许多胆固醇转变为胆酸的需要。因此, 另一种曾试用过的降低胆固醇水平的办法是使胆酸和胆盐的再循环变慢, 以增强胆固醇转变为胆酸的作用。这也被认为是增加膳食中纤维的优点之一, 因为纤维与胆酸结合, 使得胆酸在粪便中排泄出去, 而不再循环到肝脏中去。已用过的与胆酸结合的药物有好几种, 其中最常用的一种是消胆胺(cholestyramine)。

15.5 乙醇

乙醇的代谢主要在肝脏中。有两条主要的途径: (i) 长时间过量乙醇的代谢途径, 长期饮酒时, 一种与微粒体(ER) 过氧化氢酶有关的系统变得很重要; (ii) 途径是乙醇存在的所有情况下都起作用的。这就是乙醇脱氢酶, 它存在于细胞溶胶中, 催化的反应是 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$ 。所形成的乙醛进入线粒体, 然后乙醛脱氢酶将其转变为乙酸。乙醇代谢中的一个问题是 NADH/NAD^+ 的比值显著增高, 进而引起 GP 增多($\text{DHAP} + \text{NADH} \longrightarrow \text{GP} + \text{NAD}$)。GP 的增多又使得进入肝脏的脂肪酸更易形成三酰甘油。这可能是酒精中毒时出现脂肪肝的原因之一。

15.6 小结

- (1) 人体内肝脏是合成脂肪酸的主要器官。
- (2) 乙酰 CoA 是脂肪酸的前体。合成棕榈酸(C16) 时, 乙酰 CoA 羧化酶将 7 个乙酰 CoA 转变为丙二酸单酰 CoA。这 7 个丙二酸单酰 CoA, 加上 1 个乙酰 CoA, 在 FAS 上逐步结合起来, 每次加 1 个丙二酸单酰 CoA。
- (3) FAS 将在其上延伸的键中的酮基还原, 每个“乙酰单位”用 2 个 NADPH 作为还原力, 于是形成脂肪酸。
- (4) 线粒体中由丙酮酸形成的乙酰 CoA 可转变为柠檬酸。当肝中来自于非脂质的能量贮备(ATP 和 NADPH) 多时, 柠檬酸会积累。柠檬酸可以由线粒体中出来, 进入细胞溶胶。
- (5) 在肝脏的细胞溶胶, 即脂肪酸的合成部位中, 柠檬酸裂解, 产生乙酰 CoA 和草酰乙酸。
- (6) 草酰乙酸可被 NADH 还原为苹果酸, 并再由苹果酸酶氧化, 形成丙酮酸和 NADPH, NADPH 为脂肪酸合成所必需。
- (7) 脂肪酸合成似乎主要是由乙酰 CoA 羧化酶的活性所控制的。此酶为柠檬酸所活化,

而为脂肪酰 CoA 和(或)磷酸化作用所抑制。

(8) 柠檬酸在脂肪酸合成中起着出发点的作用, 它把乙酰 CoA 带出线粒体, 产生草酰乙酸, 而草酰乙酸又影响 NADH 到 NADPH 的转氢作用, 并激活乙酰 CoA 羧化酶。

(9) 脂肪酸可从 C₉ 起向前去饱和并可延伸至 C₂₄。

(10) 脂肪酸可被活化形成三酰甘油或磷脂, 如磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱。磷脂的形成包括与乙醇胺或胆碱结合的胞嘧啶核苷酸的利用。

(11) 肝脏中形成的或来自膳食的脂质必须通过血液转运才能被贮存或利用。从肠开始的这种转运与乳糜微粒有关, 从肝脏开始的转运则与 VLDL 类有关。这些脂蛋白含有三酰甘油、磷脂、胆固醇、胆固醇脂和蛋白质。有些蛋白质还帮助确定脂蛋白的作用组织或靶组织。

(12) 当 VLDL 失去一些三酰甘油后, 它就变成了 LDL。LDL 富含胆固醇, 并且在将胆固醇传送到不能合成它的组织中起着重要作用。假若 LDL 在血液中含有量太高或循环时间太长, 对健康似乎有很不好的影响。

(13) HDL 和 VLDL 一样, 是在肝中合成的, 但似乎有好的影响。HDL 能起到胆固醇清除剂的作用, 减少慢性心脏病的危险。

(14) 胆固醇可由 HMG CoA 合成, 主要是在肝脏中。在胆固醇合成中起控制作用的酶是 HMG CoA 还原酶, 胆固醇和(或)磷酸化作用抑制它。人体内大部分胆固醇的命运是形成胆酸或胆盐。

参 考 资 料

The activation of acetyl CoA carboxylase by tricarboxylic acids, M. D. Lane and J. Moss, 1971, *Adv. Enzyme Reg.*, 237 ~251.

Regulation of plasma LDL-cholesterol levels by dietary cholesterol and fatty acids, D. K. Spady, L. A. Woollett, and J. M. Dietschy, 1993, *Ann. Rev. Nutr.*, 13: 355 ~381.

Phosphorylation and degradation of HMG-CoA reductase, S. J. Miller, R. A. Parker, and D. M. Gibson, 1989, *Adv. Enzyme Reg.*, 65 ~77.

Familial hypercholesterolemia. J. L. Goldstein and M. S. Brown, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, McGraw-Hill, New York, pp. 1215 ~1250.

Familial lecithin: Cholesterol acyltransferase deficiency, including fish eye disease, K. R. Norum, E. Gjone and J. A. Glomset, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, pp. 1181 ~1194.

Biosynthesis of prostaglandins, W. E. M. Lands, 1991, *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 41 ~60.

复 习 题

1. 脂肪酸合成中主要的起控制作用的酶是下列中的哪一项?

- 脂肪酸合酶
- 柠檬酸裂合酶
- HMG CoA 裂合酶
- 乙酰 CoA 羧化酶
- 对激素敏感的脂酶

2. 固醇合成中主要的起控制作用的酶是下列中的哪一项?

- a) HMG CoA 合成酶
 - b) HMG CoA 还原酶
 - c) HMG CoA 裂合酶
 - d) 乙酰乙酰 CoA 合成酶
 - e) NADPH 的产生
3. 用于脂肪酸合成的乙酰单位是以下列哪种形式从线粒体中运出的?
- a) CoA 的衍生物
 - b) 肉毒碱的衍生物
 - c) 柠檬酸盐或酯
 - d) 甘油磷酸衍生物
 - e) 游离的乙酸根
4. 乙酰 CoA 羧化酶的正效应物是下面的哪一项?
- a) cAMP
 - b) 脂肪酰 CoA
 - c) -甘油磷酸
 - d) 柠檬酸
 - e) 丙二酸单酰 CoA
5. 脂肪酸通过什么从肝脏被运到脂肪组织中?
- a) 高密度脂蛋白
 - b) 极低密度脂蛋白
 - c) 低密度脂蛋白
 - d) 乳糜颗粒
 - e) 游离脂肪酸
6. 脂肪酸合成不需要下面的哪一项?
- a) ATP
 - b) CoA
 - c) NADPH
 - d) CO₂
 - e) 胆碱

参 考 答 案

1. d 虽然 a 和 b 都是脂肪酸合成所需要的, 但乙酰 CoA 羧化酶是主要的(注意: 并不一定是惟一的)起控制作用的酶。
2. b 此酶被认为是固醇合成中主要起控制作用的酶。在治疗高胆固醇血症时, 常用这种酶的抑制剂药物。
3. c 由草酰乙酸和乙酰 CoA 形成的草酰乙酸被转运到细胞溶胶中。然后柠檬酸又被柠檬酸裂合酶裂解为草酰乙酸和乙酰 CoA。后者可用于脂肪酸的合成。
4. d 柠檬酸不仅能将乙酰单位携出线粒体, 而且也是乙酰 CoA 羧化酶的别构活化剂。a 和 b 对乙酰 CoA 羧化酶都能分别起失活或抑制作用。
5. b (a) 也是由肝脏产生的, 但主要不是用于脂肪酸的转运; (c) 是在脂蛋白脂酶的作用下由 (b) 形成的; (d) 是由肠形成的, 主要用于转运食物中的脂肪酸。
6. e 虽然胆碱为许多种磷脂的合成所必需, 但不是脂肪酸合成所需要的。

第 16 章 激 素

16.1 引 言

我们现在要研究激素的作用机制和代谢效应。激素可以在膜上起作用或是进入细胞发挥其功能。作用于膜上的激素主要有 3 种机制, 都需要将信号转导至细胞内。这些转导包括: (i) cAMP 的形成, (ii) 肌醇三磷酸和二酰甘油的形成, (iii) 直接的共价修饰。进入细胞的激素则在细胞核中起作用。为了说明激素的生理作用和复习糖类和脂质代谢的整合, 我们将详细研究这些激素。我们要研究的效应不仅包括代谢及其控制, 而且包括个别组织的作用。

代谢和代谢途径的相互作用受到激素和激素平衡的极大影响。因此, 激素对代谢的影响以及激素作用的可能机制都是值得研究的。我们要研究以前讨论过的 3 种主要激素(即胰岛素、胰高血糖素和肾上腺素)以及其他激素(如类固醇激素)的作用机制。许多激素, 包括前面已经讨论过的激素, 虽然对代谢有强烈的影响, 但并不进入细胞。激素本身结合在膜上的受体上, 但必须发生转导以引起细胞内的效应。其他一些激素, 如类固醇和甲状腺类激素, 则进入细胞并在核内起作用。

16.2 激素的相互作用

(一) 信号的转导

激素只影响那些有专一受体的细胞。就许多激素而论, 这些受体都是在质膜的外面, 虽然它们也可能跨过膜, 但那些不进入细胞的激素的受体部分总是在细胞外侧。受体的作用是进行识别, 只对专一组织中的专一激素发生响应。例如, 肌肉和脂肪组织中有专一的 β -受体, 只会识别肾上腺素, 肌肉和肝脏中有专一的 α -受体, 能识别肾上腺素, 胰岛的 β -细胞中有 β_2 受体, 只识别肾上腺素。因此, 一种激素可能以不同的方式影响不同的细胞, 因专一的受体和转导的信息而异。在细胞外的激素信息和细胞内的活动之间主要的转导者是一种蛋白质, 称为 G 蛋白。G 蛋白由 α , β 和 γ 三种亚基组成。当 α -亚基与受体结合时, 就会结合上一个 GDP 分子(图 16.1)。得到激素的信号后, GDP 就与 GTP 互换而 α 亚基则移到方向朝膜内的效应物并活化此系统。这一系统不仅起着转导器的作用, 而且也是一个倍增系统, 因为一单个的激素分子就能引起极大的响应, 原因是这种转导作用有类似酶的活性。 β 亚基也含有 GTP 酶, 使 GTP 分解为 GDP 和无机磷酸。GTP 水解后, β 亚基就不能激活腺苷酸环化酶了, 它又回到受体上与 α 和 γ 亚基结合。假若激素仍然结合在受体上, GDP 就会与 GTP 交换, 上述活动又重新开始。假若没有激素信号, α 亚基就一直与 β 和 γ 亚基在一起直到受体接收到新的信号(激素)为止。

效应的专一性来自于 α -亚基的专一性, 因 α 亚基和受体的特性而定, β 亚基可以发生各种相互作用。一些相互作用是:

(1) 胰高血糖素和许多多肽激素受体以及 β 受体, 被肾上腺素和去甲肾上腺素激活后,

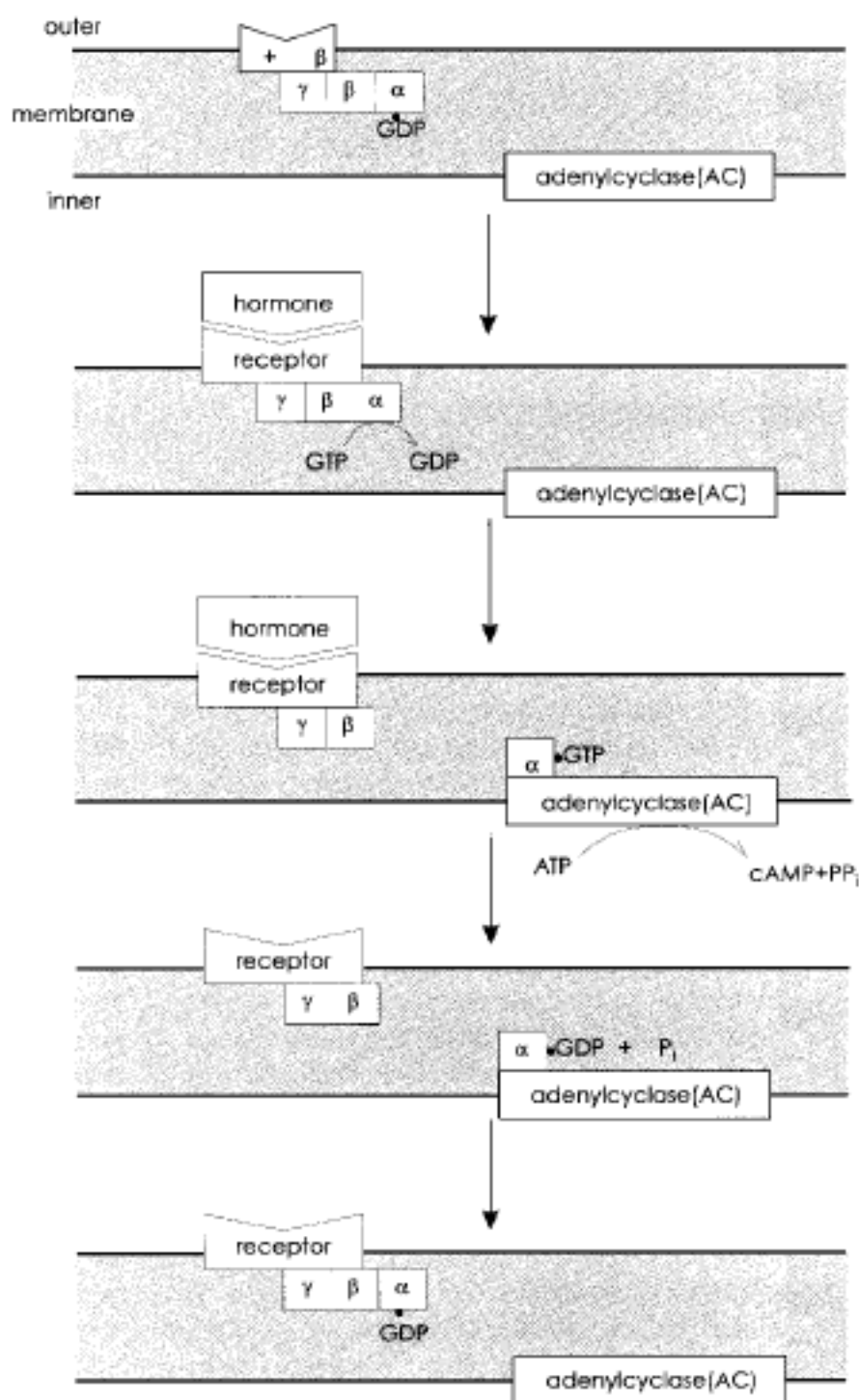


图 16.1 β -1、 β -2 和 β -受体通过 G 蛋白在激素转导中的作用
 虽然此图着重说明的是在 β -受体上使 cAMP 增多的作用, 其他两种受体作用也类似;
 β -2 受体的作用是抑制腺苷酸环化酶而不是像 β -受体那样使之活化; β -1 受体的作用
 与 β -受体的类似, 不过还能使磷脂酶 C 活化(见图 16.3, 进一步说明参考正文)。

使 β 亚基移动, 激活腺苷酸环化酶, 形成 cAMP(见图 16.1)。

(2) β -2 受体是另一种 β -亚基, 它与 GTP 发生反应并移向腺苷酸环化酶, 可以观察到腺苷酸环化酶被抑制。

(3) 肝脏和肌肉中, β -1 受体与某些兴奋剂如肾上腺素结合; 在这种情况下, G 蛋白的 β -亚基与 GTP 相互作用, 增加磷脂酶 C 的活性(见图 16.3)。

(二) cAMP

现在来研究与这些受体中的每一种发生相互作用的结果及其可能的意义。要研究的是这些各种各样的激素及其转导产物在细胞内的作用及其机制。第一种, 可能也是了解得最多的第二信使就是 cAMP, 它激活一种蛋白激酶(R_2C_2)。cAMP 的作用是与 R_2C_2 的 R 亚基反应,

产生 $2R(cAMP)_4 + 2C$ 。在 R_2C_2 复合体中, R 蛋白质是起调节作用的亚基, 而 C 是起催化作用的亚基。当起催化作用的亚基结合在起调节作用的亚基上时, 它没有活性。当催化性亚基游离时, 例如由于 cAMP 与调节性亚基发生反应时, C 亚基就具有了蛋白激酶的催化活性。在许多情况下, 这种系统称为依赖于 cAMP 的蛋白激酶, 是许多种蛋白激酶中的一类。催化性亚基会使许多种专一的蛋白质和酶的丝氨酸或苏氨酸的羟基发生磷酸化作用。这些蛋白质种类广泛, 从磷酸化后活性降低的糖原合酶和丙酮酸激酶到磷酸化后活性增高的对激素敏感的酯酶和磷酸化酶激酶。在后一情况下, 要使糖原发生分解, 磷酸化酶激酶必须催化磷酸化酶的磷酸化作用, 以使之从失活的形式转变为有活性的形式。依赖于 cAMP 的蛋白激酶的另一个例子就是肌钙蛋白的磷酸化, 肌钙蛋白是与肌肉收缩有关的蛋白质。

催化性亚基主要是催化细胞溶胶中的蛋白质。不过, 催化性亚基, 但不是 R_2C_2 , 能够进入细胞核并引起核中蛋白质的磷酸化。依赖于 cAMP 的蛋白激酶并不直接引起线粒体中蛋白质的磷酸化(图 16.2)。

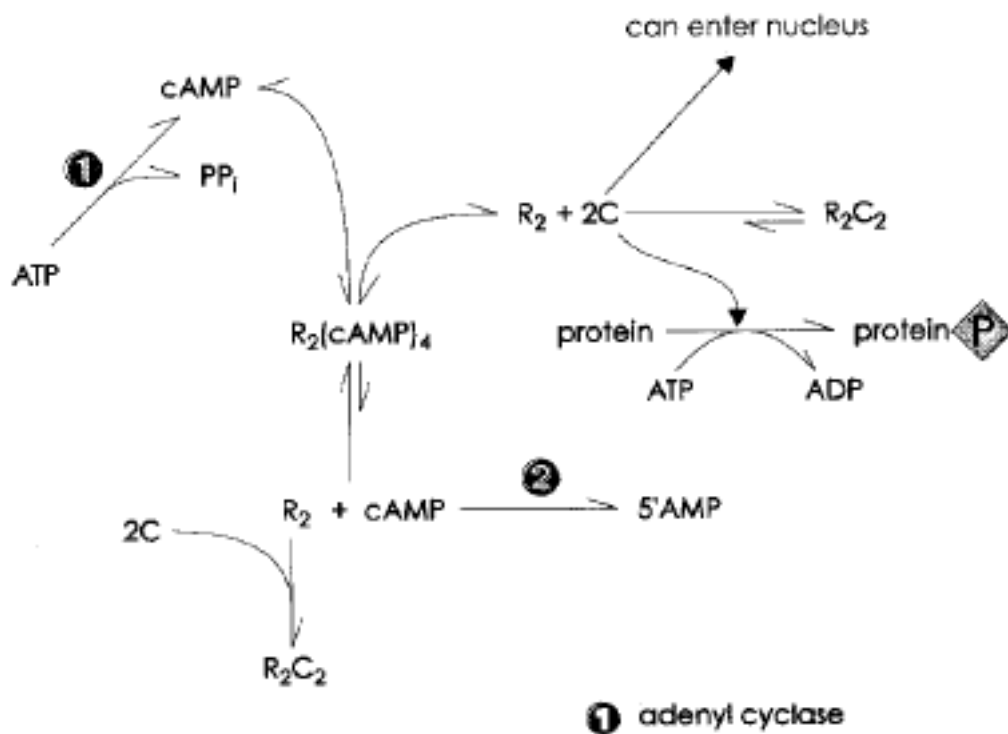


图 16.2 cAMP 的作用和机制

cAMP 的作用所释放的 C 亚基是有活性的、依赖于 cAMP 的蛋白激酶。虽然平衡有利于 $R_2(cAMP)_4$, 但还是有一些解离, 所以当磷酸二酯酶破坏了 cAMP 时, 就有更多的 R_2 单位被释放, 它又与 C 单位重组并形成无活性的 R_2C_2 。

cAMP 可被磷酸二酯酶分解为 5'-AMP。除去 cAMP 后, R 亚基就会与 C 亚基重新结合, 形成 R_2C_2 , 而 R_2C_2 是无活性的。磷酸二酯酶可被甲基黄嘌呤, 如咖啡碱或茶碱抑制, 从而在一定的激素刺激之下产生大量的 cAMP。多数细胞都根据专一的激素信息而使 cAMP 增多并引起各种各样的代谢变化。在多数情况下, 虽然所有的细胞对 cAMP 的响应都相似, 但由于各组织中的代谢情况不同, 不同组织中的结果会不一样; 例如, 肾上腺皮质对 ACTH 的响应是 cAMP 增多, 引起更多糖皮质激素的合成, 而多肽激素 TSH 引起甲状腺中 cAMP 的增多则使甲状腺激素(即甲状腺素和三碘甲腺原氨酸)的合成和释放增多。 β_2 受体的活化抑制腺苷酸环化酶和 cAMP 的产生。例如, 胰岛的 β -细胞中, 肾上腺素与 β_2 受体相互作用, 抑制腺苷酸环化酶, 并抑制胰岛素的释放; 胰高血糖素在胰岛的 β -细胞中与受体相互作用, 引起 cAMP 和胰

胰岛素分泌的加强。因此,可以看到,当 cAMP 是一个重要因素时,无论是其迅速形成或其形成受到抑制都起着重要的作用,磷酸二酯酶的破坏作用也同样起着重要作用。

(三) 肌醇三磷酸和二酰甘油

肌肉、心脏和肝脏中的 α_1 受体可被像肾上腺素这样的化合物所激活,然后经过转导就可以激活磷脂酶 C,此酶将膜中的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(二酰肌醇三磷酸)水解(图16.3)。

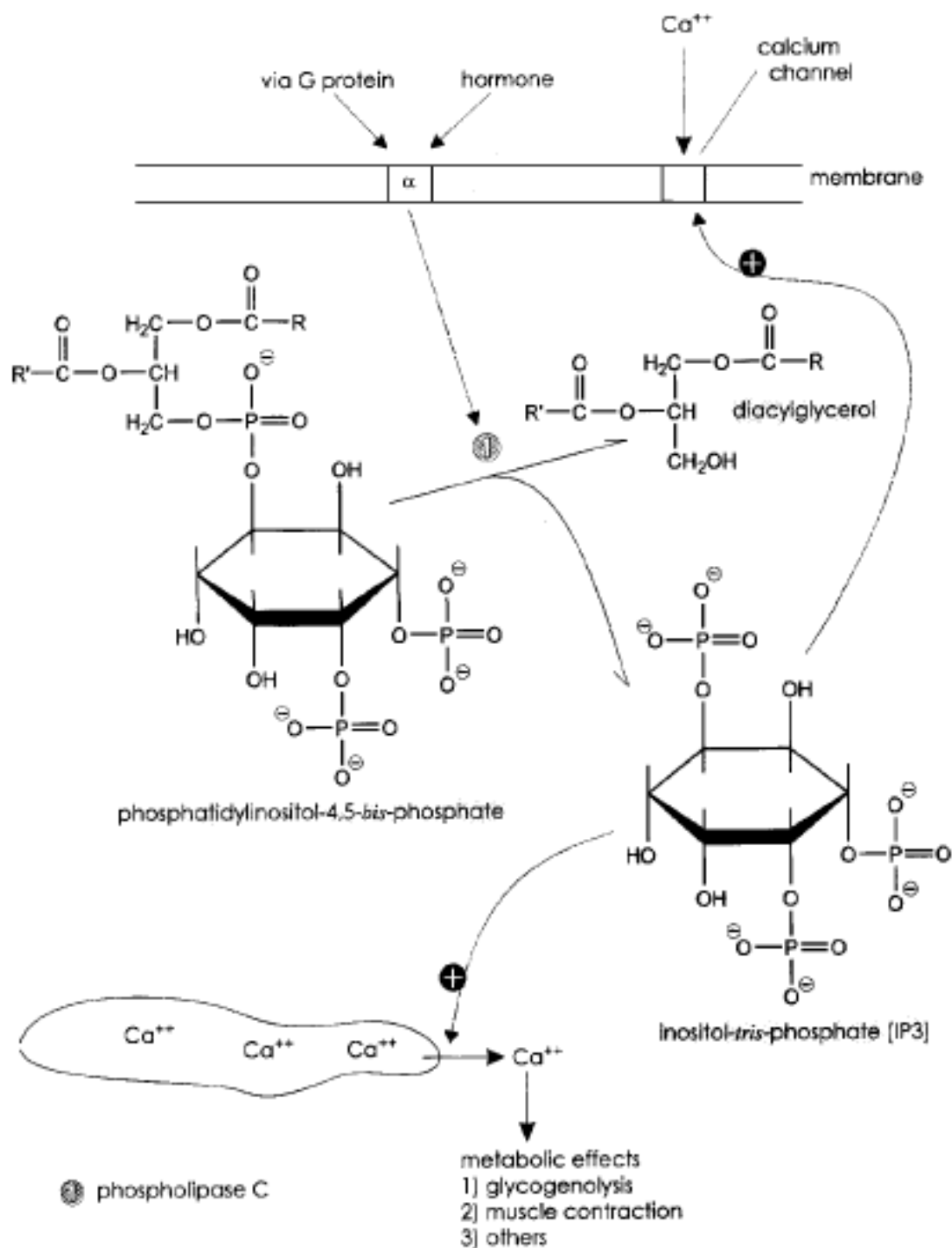


图 16.3 α_1 受体上的效应

当激素与 α_1 受体相互作用时,通过转导并利用 G 蛋白(如图 16.1 所示)引起磷脂酶 C 的活化。磷脂酶 C 作用的产物是肌醇三磷酸(IP_3)和二酰甘油(DAG), IP_3 使细胞溶胶中的 Ca^{2+} 增多,DAG 则激活蛋白激酶 C。

这种水解作用产生两种重要的第二信使。第一个是肌醇 1,4,5-三磷酸(IP_3),它可以释放贮存小泡(如 T 小管和肌质网)中的钙以及可能打开钙通道使胞外的钙进入细胞,从而提高细胞溶胶中钙的水平;二酰甘油(DAG)是上述水解的另一种产物,是蛋白激酶 C 的激活剂,它似

乎在细胞分裂和增殖中起重要作用。激活蛋白激酶 C 和促进细胞增殖的另一类化合物是佛波酯类, 已鉴定出佛波酯类是发生癌的促进剂, 但不一定是起始因素。似乎许多种生长因子都通过蛋白质的磷酸化和蛋白激酶 C 而起作用。DAG 和在磷酸酶作用下从 IP_3 去掉了 2 个磷酸而形成的肌醇磷酸, 能够重组而形成磷脂酰肌醇。磷脂酰肌醇又能再形成磷脂酰肌醇三磷酸。除这些效应外, 所形成的 DAG 中花生四烯酸特别多, 通过脂酶的作用, DAG 可被水解。花生四烯酸是前列腺素的前体, 能够改变激素的作用。

胰岛素受体系统的功能与 G 蛋白无关, 它使蛋白质的酪氨酸残基被磷酸化, 与依赖于 cAMP 的蛋白激酶使丝氨酸和苏氨酸磷酸化不同(图 16.4)。

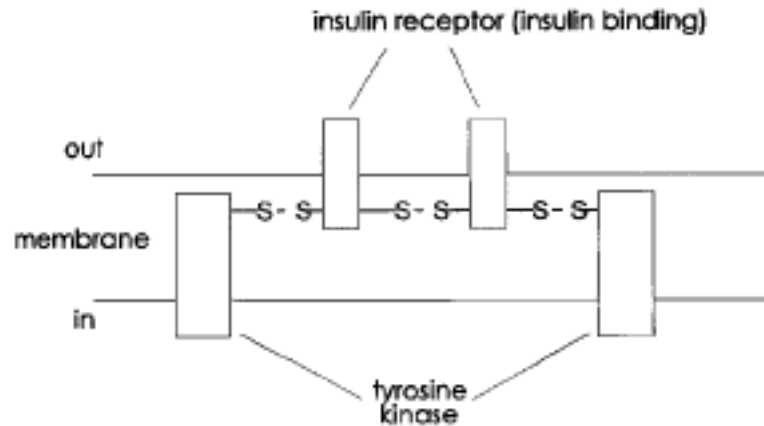


图 16.4 胰岛素受体示意图

注意此受体的作用与 G 蛋白无关。胰岛素信号的转导使酪氨酸激酶活化, 使细胞溶胶中的蛋白质在酪氨酸残基上发生磷酸化。

会发生许多种酪氨酸的磷酸化作用, 包括胰岛素本身的自磷酸化, 在胰岛素持续处于高水平时这种磷酸化作用对胰岛素受体的减量调节可能有某些重要关系。对酪氨酸激酶系统的研究并不像对 cAMP、 IP_3 或 DAG 的研究那样详细。许多种蛋白质似乎都能在酪氨酸残基上被磷酸化, 但是还没有证据表明哪种关键的酶会因此而被激活或被抑制。有理由认为它对磷酸酶有影响, 这种酶会引起蛋白质的去磷酸化, 其作用与 cAMP 的相反。在阐明胰岛素的作用和酪氨酸的磷酸化对蛋白质的影响方面所遇到的一个困难可能与蛋白质的相互作用有关。例如, 有可能在纯化过程中, 不仅可能有一种蛋白质发生了磷酸化而改变其性质, 也有可能有一种酪氨酸残基被磷酸化的蛋白质与所研究的蛋白质共同起作用。而在纯化过程中, 这两种相互作用的蛋白质可能被分开了。胰岛素对某些组织还有一种主要的影响就是使葡萄糖转运蛋白增多和使葡萄糖运入细胞中的速率加快, 这二者都与最大速率和对葡萄糖的灵敏度或 K_M 有关。

许多其他因素, 包括某些生长因子, 可能以类似于胰岛素的方式起作用, 使得蛋白质的酪氨酸和丝氨酸部分被磷酸化, 并使得蛋白质具有磷酸酶活性。

许多激素的作用是进入细胞并与细胞内的受体相互作用。这些激素包括类固醇激素、三碘甲腺原氨酸和其他化合物, 如视黄酸和 1, 2, 5-二羟基维生素 D。在多数情况下, 受体位于细胞核中, 有活性的效应物-受体复合体对细胞核有作用(见第 29 章, 图 16.5)。

糖皮质激素的受体位于细胞溶胶中。在形成糖皮质激素-受体复合物后, 此复合物就移入细胞核中(见第 29 章)。相互作用和循环中的激素的比例和绝对水平一样重要。因此, 例如胰高血糖素和胰岛素的绝对水平, 在不知道另一种激素的浓度时, 是无法解释的(即需要知道胰高血糖素/胰岛素之比而不仅是两者的浓度各是什么)。在许多情况下, 激素给出的是相反

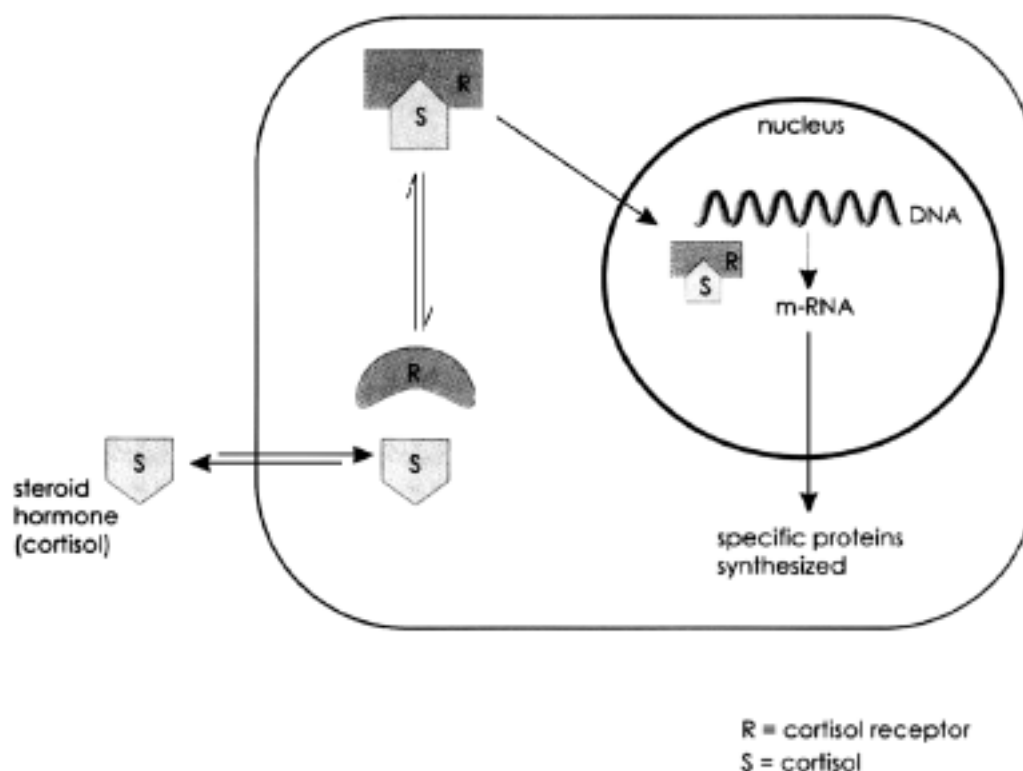


图 16.5 类固醇激素(皮质醇)及其受体的作用

此例中受体在细胞内并在细胞核中起作用;其他类固醇激素的受体在细胞核内,与皮质醇的不同;皮质醇的受体在细胞溶质内,与皮质醇结合后,进入核中。

的信号,当一种增多时,一般是另一种激素就减少,就像胰高血糖素和胰岛素的情况那样。

16.3 胰高血糖素

了解代谢整合的一种方法就是研究激素的控制。最好是研究引起激素增多的基本系统的信使,以及这种激素所产生的各种各样的代谢的波动及其所引发的效应。第一个要研究的例子是胰高血糖素。通常是胰岛的 α -细胞响应于低血糖或感受到低血糖而分泌胰高血糖素。因为 β -细胞需要有胰岛素才能使葡萄糖进入,对糖尿病人而言,虽然血糖很高,但 β -细胞的感觉则是缺乏血糖,因此增加胰高血糖素的分泌,从而又使糖尿病病情加剧。 α -细胞响应于低血糖而释放胰高血糖素,主要是对两种组织发生影响,这就是肝脏和脂肪组织。在两种组织中,胰高血糖素受体都会使cAMP增多。有趣的是,虽然胰高血糖素主要是对这两种组织的代谢发生影响,但这些变化的影响却遍及全身。

在脂肪组织中,增多的cAMP会通过一种依赖于cAMP的磷酸化作用而激活对激素敏感的酯酶。这就会使释放到血液中的脂肪酸增多,可供包括肝脏和肌肉在内的其他组织利用(图16.6)。胰高血糖素由于使cAMP增多而在肝中发生的影响很多,包括糖原合酶的磷酸化和磷酸化酶激酶的磷酸化,后者则使磷酸化酶发生磷酸化。这两个反应导致糖原合成的减弱和糖原分解显著增强,所形成的葡萄糖部分则在经过许多酶促转变后以葡萄糖的形式进入血液,这些转变从磷酸化酶开始而以葡萄糖-6-磷酸酶结束。cAMP增多也会有其他有利于糖原分解的效应。这些效应包括,在肝脏中使PFK2磷酸化,把PFK2转变为果糖-2,6-二磷酸酶,并使果糖-2,6-二磷酸的水平降低。F-2,6-BP是PFK的激活剂和果糖-1,6-二磷酸酶的抑制剂。这样,本来就比PFK的活性高很多的果糖-1,6-二磷酸酶的基本活性会占主导地位,而使底物通往葡糖异生的方向,形成果糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖。

cAMP增多也会使丙酮酸激酶发生磷酸化,使之对PEP的 K_s (0.5)增大,在生理的PEP水

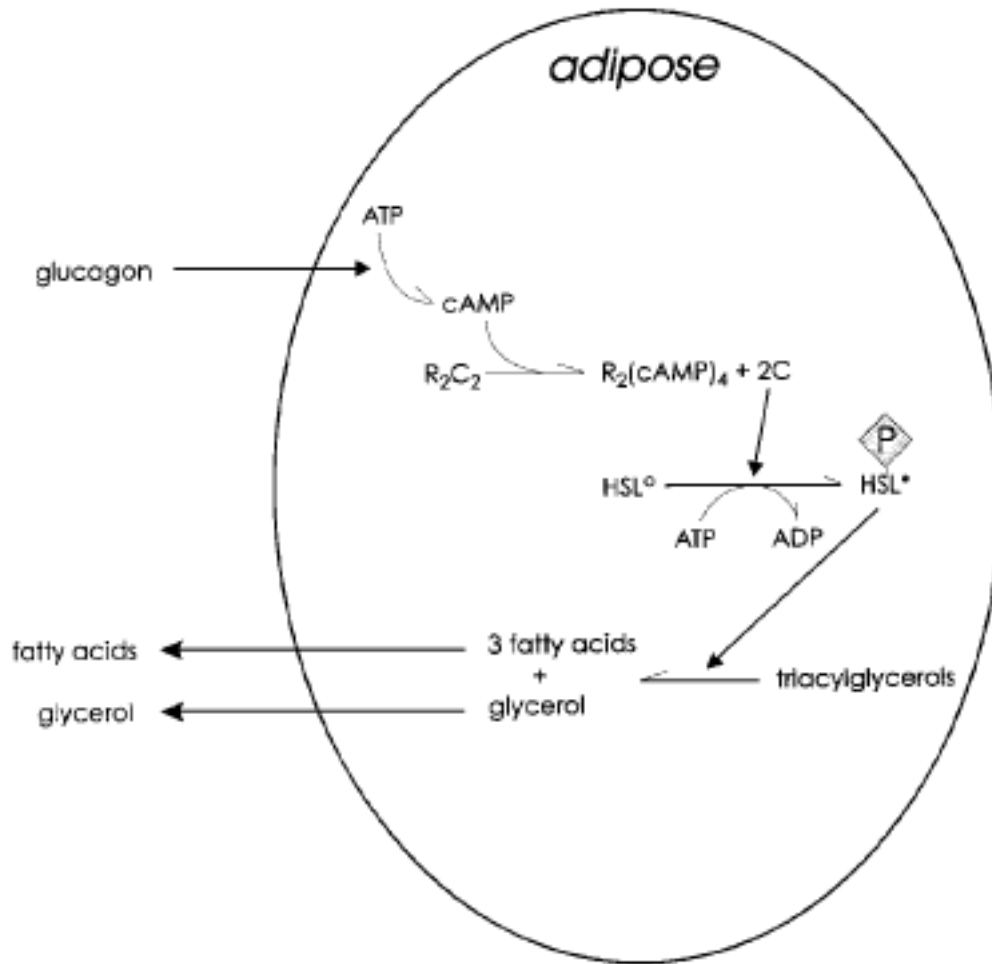


图 16.6 胰高血糖素对脂肪组织的影响

主要的总的响应是向血流中释放脂肪酸(详见正文)。

平上, 丙酮酸激酶的活性就会显著降低。这就使得烯醇化酶和可用于葡糖异生的其他多功能酶增加了葡糖异生的流向, FBP 酶的活性又会拉动这一流向。有报告说 cAMP 所引起的丙酮酸激酶的磷酸化作用是使葡糖异生作用显著加强的最重要的共价修饰, 因为丙酮酸激酶的活性通常较高, 这会使丙酮酸形成 PEP 的途径发生短路。来自 PEP 的丙酮酸会再次经过丙酮酸羧化酶被运出线粒体, 在回到 PEP 和葡萄糖之前受到 PEP 羧激酶的作用。这也会消耗高能磷酸。

除去共价修饰之外, 葡糖异生的重要控制是别构效应。许多别构效应可因脂肪组织中的脂肪分解产生大量脂肪酸而引起。脂肪酸在进入肝脏并被活化后, 即可进入线粒体并在其中通过 β -氧化而提供 ATP 形式的高能磷酸和 NADH 形式的还原能力; 这两者对葡糖异生都可能是重要的。从氨基酸和丙酮酸异生葡萄糖, 还原能力是关键性的。脂肪酸的分解代谢会使线粒体中的乙酰 CoA 积累, 而乙酰 CoA 与高浓度的 ATP 一起又会发生某些重要的影响。特别重要的是丙酮酸脱氢酶的抑制和丙酮酸羧化酶的活化。这保证了葡糖异生的前体丙酮酸不会转变为不能进行葡糖异生的乙酰 CoA, 而是大量变成了草酰乙酸, 一种可能的葡萄糖的前体。在脂肪酸代谢过程中, 高浓度的 NADH、乙酰 CoA 和 ATP 会导致丙酮酸脱氢酶的磷酸化, 又进一步使此系统失活, 从而维持着丙酮酸的水平(图 16.7)。

上述丙酮酸脱氢酶转变为活性较低的磷酸化的形式似乎并非直接由于 cAMP 的增多, 而似乎是与高速率的脂肪酸分解代谢有很大关系。高水平的脂肪酰 CoA 会使柠檬酸合酶被抑制, 这又使得乙酰 CoA 积累, 并迫使更多的草酰乙酸进入别的途径, 如葡糖异生。假若柠檬酸合酶未受到抑制, 而异柠檬酸脱氢酶受到了抑制, 那么高水平的草酰乙酸和乙酰 CoA 就会结

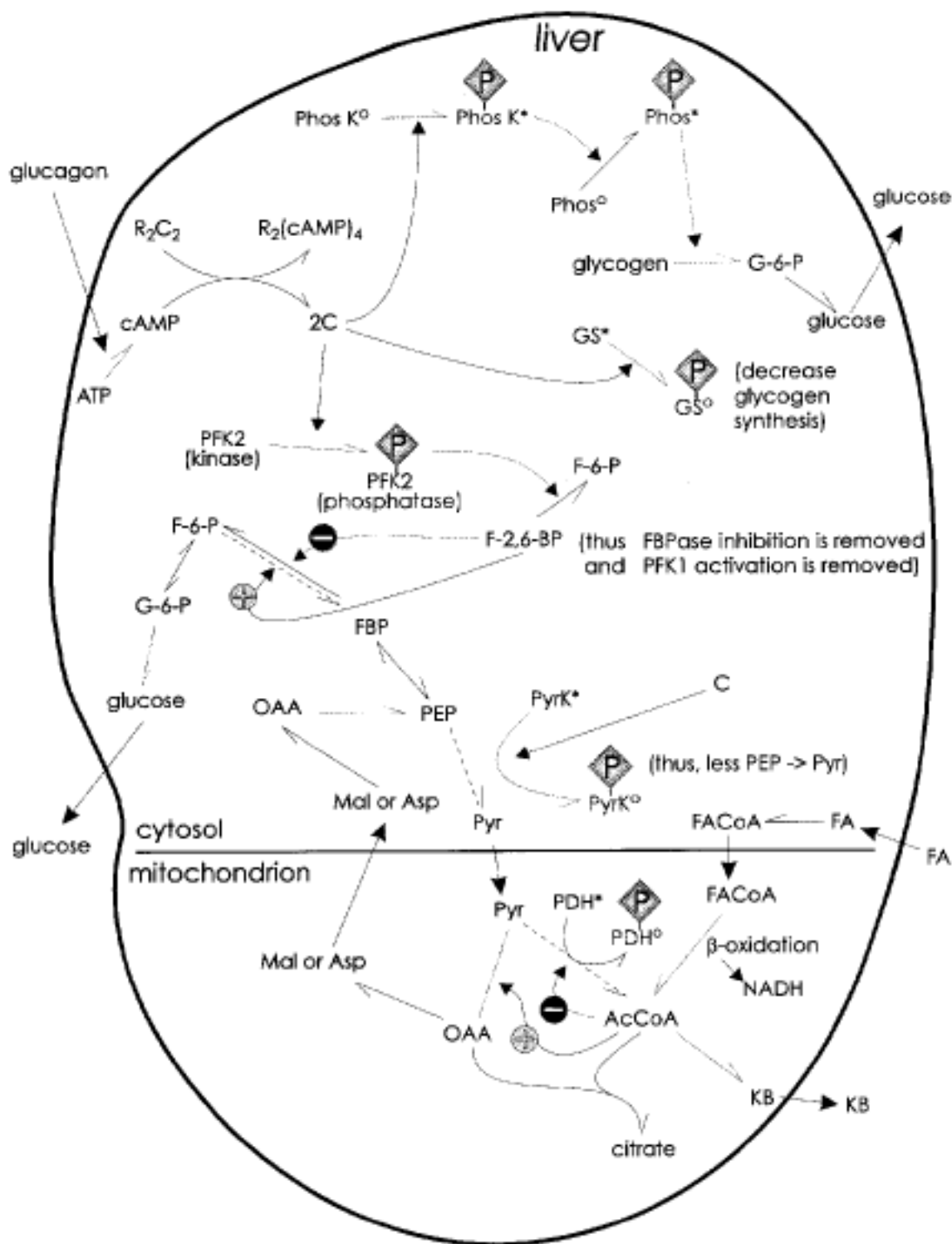


图 16.7 胰高血糖素对肝脏的作用

主要的总的效应是由糖原和葡糖异生增加血液中的葡萄糖以及增加酮体 (详见正文), 示主要的别构效应和共价修饰(详见正文)。

合而使柠檬酸和异柠檬酸积累。在饥饿时或用胰高血糖素处理整体动物或分离的细胞时, 都没有观察到这种现象。

因为与柠檬酸循环相比, 肝脏从 β -氧化得到的能量较多, 所以重要的是有可用于 β -氧化的 CoA。通过前述的许多步骤, 乙酰 CoA 可以转变为酮体, 再生游离的 CoA。这些酮体为肌肉、心脏、肾脏, 甚至脑提供潜在的能量。脂肪酰 CoA 和 cAMP 的增多也使脂肪酸合成受到抑制, 在血糖低时合成脂肪酸是不适当的。这是通过两种独立的机制完成的: 第一种是乙酰 CoA 羧化酶的磷酸化, 它产生活性较低的酶; 第二种是脂肪酰 CoA 对乙酰 CoA 羧化酶的抑制, 由于脂肪组织释放的脂肪酸进入肝脏, 此时脂肪酰 CoA 的浓度显著增高。

人体内有一种主要的组织, 即肌肉是既无胰高血糖素受体, 也不受到胰高血糖素的直接影响

的,但它受到这种激素的强烈的间接影响。提高血糖的方式有二: (i) 通过糖原分解或葡糖异生增加葡萄糖的生产; (ii) 减少葡萄糖的利用。因为肌肉不进行葡糖异生,这种组织,包括心脏,提高血糖的惟一途径就是减少葡萄糖的利用。肌肉是体内最大的组织,可能是体内利用葡萄糖最多的。减少肌肉对葡萄糖的利用对于提高血液中葡萄糖的水平应该是特别重要的贡献。这种减少利用之所以发生,主要是对于脂肪组织发生影响,使之释放脂肪酸,因为脂肪酸是肝中酮体的前体。肌肉可以利用葡萄糖、脂肪酸或酮体以获得能量。酮体是小的可溶性分子,能够穿越质膜和线粒体膜,在肌肉线粒体中可被活化,其活化是由乙酰乙酸: 琥珀酰 CoA-CoA 转移酶催化的,活化后形成乙酰乙酰 CoA。然后乙酰乙酰 CoA 又可转变为乙酰 CoA 而参与柠檬酸循环被代谢。酮体的这种代谢产生还原能力、ATP 和乙酰 CoA,乙酰 CoA 会引起肌肉中丙酮酸脱氢酶的磷酸化,从而使丙酮酸不会转变为不能异生葡萄糖的前体,即乙酰 CoA。

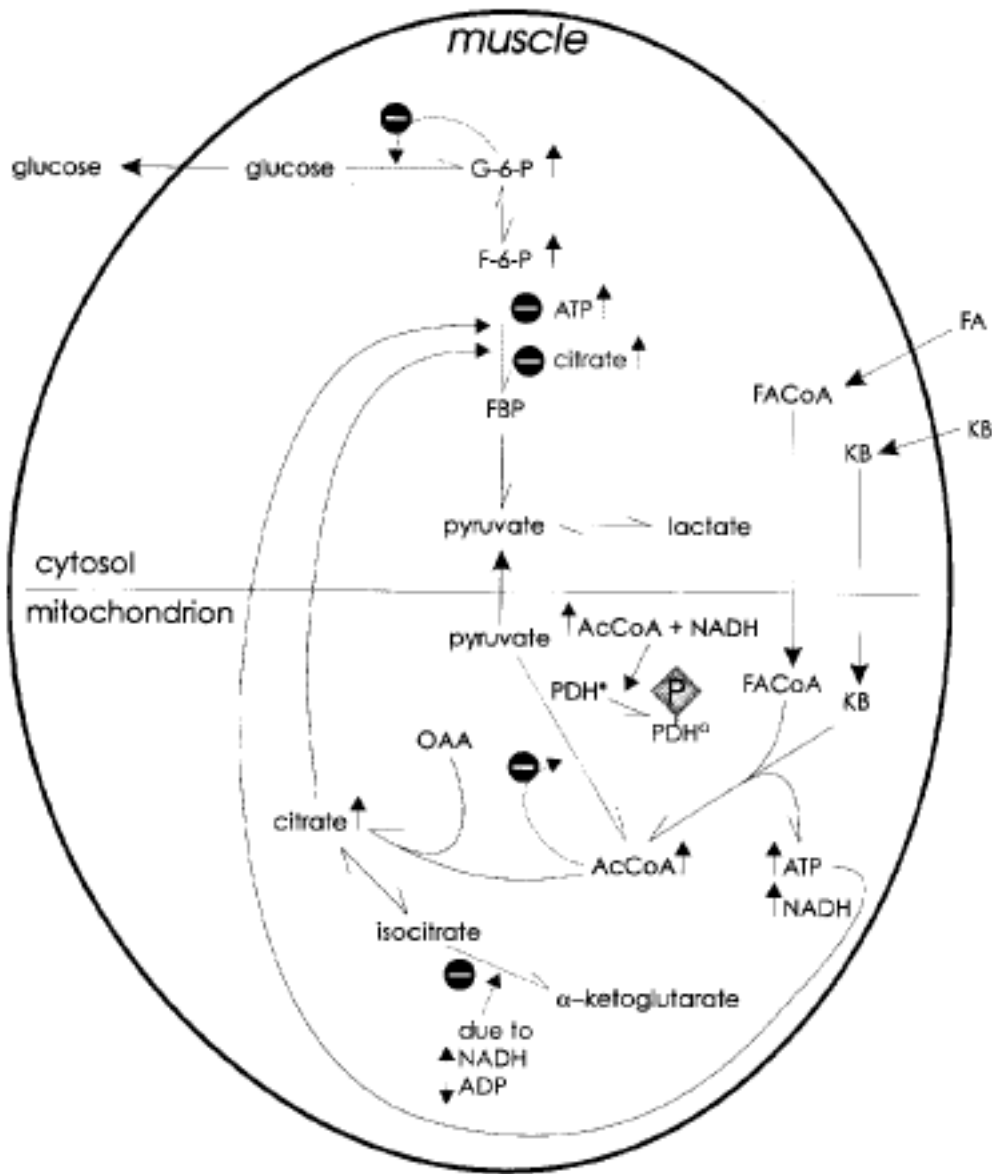


图 16.8 可利用的脂肪酸增多对肌肉的影响

示肌肉中脂肪酸(FA)和酮体(KB)的代谢对葡萄糖代谢的影响
(主要的影响是减少肌肉对葡萄糖的利用,详见正文)。

节约外周组织中的丙酮酸与节约肝脏中的丙酮酸大概同样重要,甚至更为重要,因为肌肉中转变为乙酰 CoA 的丙酮酸可能比肝脏中的多。任何时候,当丙酮酸不转变为乙酰 CoA 时,它就可能以丙酮酸或乳酸的形式离开这种组织而回到肝脏中,参与葡糖异生。只要以乙酰 CoA 的形式失去了丙酮酸,就失去了葡糖异生的前体。肌肉中脂肪酸也可被活化为脂肪酰 CoA,酰基肉毒碱转移酶系统可将脂肪酰 CoA 运到线粒体中。只要线粒体中有游离的 CoA,而

丙二酸单酰 CoA 又在强抑制性浓度以下, 通常这是一个非常有效的过程。就分解代谢而论, 酮体有比脂肪酸优越之处, 因为它能直接进入线粒体并通过柠檬酸循环的正常中间产物(即琥珀酰 CoA) 而被活化。-酮戊二酸脱氢酶对 CoA 的 K_M 比酰基肉毒碱转移酶 2 的小, 后一种酶是线粒体中将脂肪酸从酰基肉毒碱转移到 CoA 的。在没有高浓度酮体时, 脂肪酸会迅速通过 β -氧化而分解为乙酰 CoA, 它又可通过柠檬酸循环而形成还原能力(NADH) 和 ATP, 这是有利于丙酮酸脱氢酶发生磷酸化作用的条件。当脂肪酸或酮体迅速被代谢时, ATP 和 NADH 浓度的增高会减少经过异柠檬酸脱氢酶流量, 使得柠檬酸积累并被运出线粒体(图 16.8)。柠檬酸和 ATP 浓度的增高又会进一步抑制 PFK, 于是 F-6-P 和 G-6-P 积累, G-6-P 又抑制己糖激酶的活性。这就会减少葡萄糖的磷酸化, 于是使得来自于葡糖异生和糖原分解的血液中的葡萄糖增多得更快, 比肌肉中已有的葡萄糖被用掉时增加得还快。酮体也可被脑用于缓解对葡萄糖的需要, 在效率最高的情况下, 酮体可供应脑所需能量的 60%, 中枢神经系统所需要的能量仍有至少 40% 需来自葡萄糖。所以, 中枢神经系统中葡萄糖的利用量永远不会降至零, 而在肌肉中则几乎可以达到零。还有一些组织, 如红血细胞, 其代谢功能基本不需要氧, 它需要葡萄糖, 但只是转变为乳酸而已。

胰高血糖素以多种机制起作用, 使血糖增高, 虽然它直接影响的组织只有两种, 即肝和脂肪组织。胰高血糖素对外周组织甚至中枢神经系统的间接作用对葡萄糖的利用和代谢有着深远的影响。

16.4 肾上腺素

肾上腺素是肾上腺髓质响应于应急情况而产生的激素。今天其分泌与人在体力上或精神上的不安有关, 过去则人和动物分泌这种激素都是为决斗或逃跑作好准备。现在动物大概仍是如此, 但人已经不是这样了。这种激素引发一系列的变化, 都是与肌肉迅速收缩以及为中枢神经系统保持血糖水平有关的。这种激素能影响各种不同组织中的 α_1 、 α_2 和 β -受体。因此, 肾上腺素作用的机制和原理澄清了整体生物的代谢控制的整合, 它与许多组织相互作用以引发应急响应。

在骨骼肌和心脏中, 肾上腺素都影响 α_1 和 β -受体。对 α_1 受体的主要影响是使肌醇三磷酸(IP_3) 增多, 从而使细胞溶胶中的钙水平提高, 钙既可来源于细胞内, 如肌质网、T-小管等, 也可来源于细胞外, 即打开某些钙通道以增加细胞溶胶中的钙。钙的增多有几种作用, 首先是启动并加强骨骼肌和心肌的收缩, 前者是为应急响应作好准备, 后者是使心肌收缩更快和更强, 以增加输向体内各种组织的血液, 并增加底物和氧的供应(图 16.9)。

钙的第二个作用是增强糖原的降解, 其原因是进一步激活磷酸化酶激酶和促进磷酸化酶激酶的磷酸化, 因为 Ca^{2+} 对于即使未磷酸化的磷酸化酶激酶都是一种别构活化剂, 而促进其磷酸化的方式则是通过依赖于 cAMP 的蛋白质激酶。这种相互作用与磷酸化酶激酶的钙调蛋白亚基有关。这些活化作用增强了糖原分解和细胞内葡萄糖-6-磷酸的供应, 可用于糖酵解和在无氧条件下获取能量。所形成的丙酮酸又可通过丙酮酸脱氢酶和柠檬酸循环而进一步降解。这种糖原分解作用在骨骼肌中比在心肌中更为重要, 因为骨骼肌中其湿重的约 2% 是糖原, 而心脏中所含的糖原不过是百分之零点几。其次, 心脏在有氧条件下利用其他能源很有效; 某些骨骼肌则利用无氧的糖酵解特别有效, 可以产生高能磷酸和乳酸以形成葡萄糖-6-磷酸。

肾上腺素对肌肉的 β -受体的影响是引起 cAMP 的增多, cAMP 会使许多种蛋白质磷酸化,

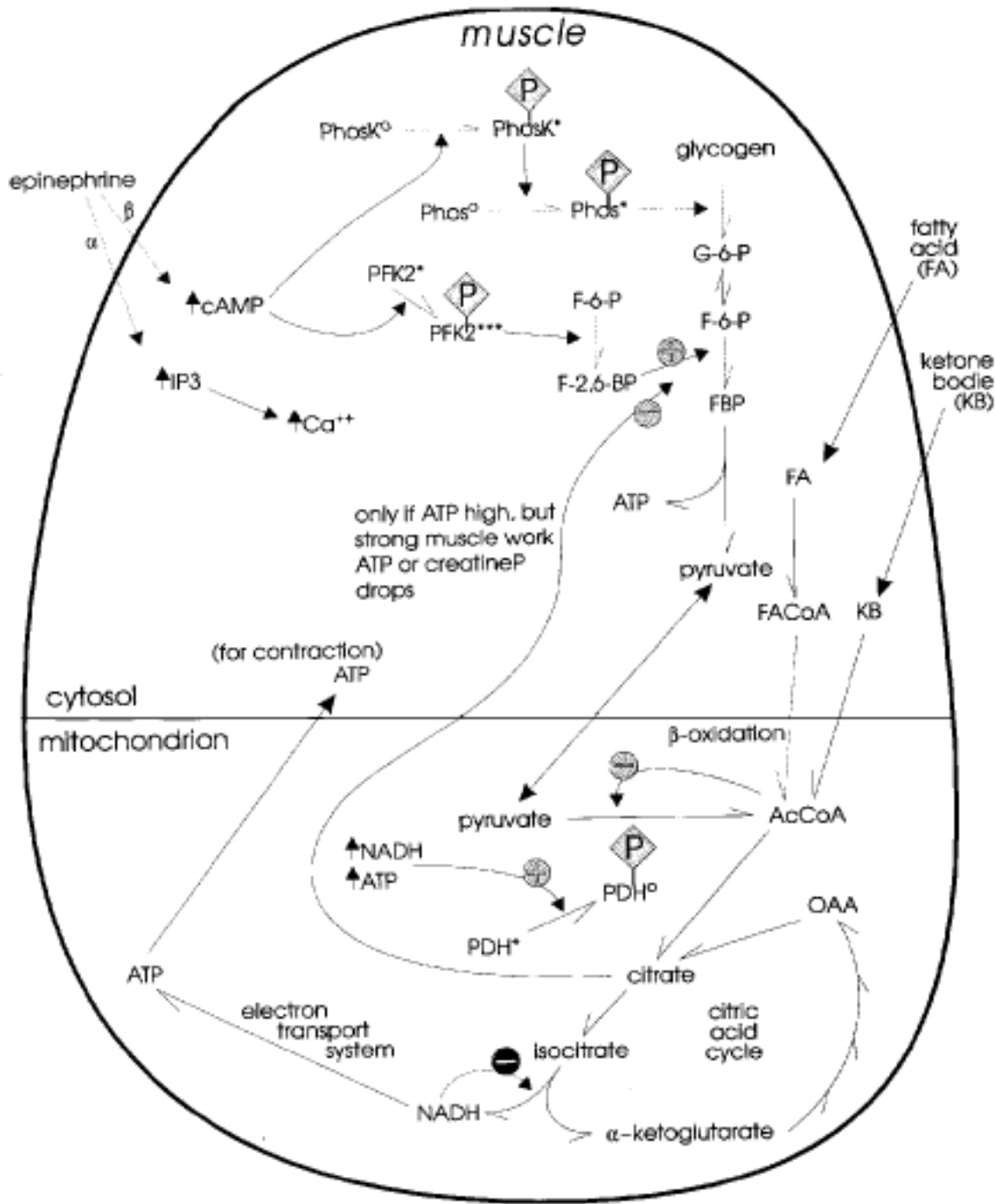


图 16.9 肾上腺素的作用和增加可利用的脂肪酸对肌肉代谢的影响

肾上腺素作用于 α -1 受体和 β -受体,前者使收缩所需要的细胞溶胶中的 Ca^{2+} 增多,后者使 cAMP 增多。cAMP 增多引起糖原分解和糖酵解更快,以便在无氧条件下获得能量(详见正文)。

特别是磷酸化酶激酶的磷酸化,于是此激酶使磷酸化酶磷酸化,使无活性的状态转变为有活性的状态,从而使糖原的分解加强。肌肉中被磷酸化的另一种主要的蛋白质是 PFK2,它与肝脏中的 PFK2 不同,磷酸化后活性增强并提高果糖-2,6-二磷酸的水平。果糖-2,6-二磷酸(F-2,6-BP)是 PFK 的重要的活化剂,而 PFK 又可能是糖酵解的限速酶,特别是例如在糖原分解时,当糖酵解从细胞内的己糖磷酸开始时,更是如此。F-2,6-BP 的增加使此酶对 F-6-P 的 K_m (0.5) 降低,从而有助于经过 PFK 的流量。糖原分解又能从葡萄糖以外的来源使 F-6-P (与 G-6-P 平衡) 增多,更加增大了经过 PFK 的流量。这种 F-6-P 的增加不可能来自于葡萄糖,因为 G-6-P 抑制己糖激酶。另一个被磷酸化的蛋白质的例子是肌钙蛋白,它是对肌肉收缩的效果和效率都可能具有重要影响的收缩元件。

肝脏也受肾上腺素的影响,其 α -1 受体为肾上腺素所活化。于是通过 IP_3 ,引起肝细胞内的 Ca^{2+} 增多, Ca^{2+} 是磷酸化酶激酶的别构激活剂,这种激酶催化磷酸化酶的磷酸化作用而使

之活化。有活性的磷酸化酶的增多会迅速加强糖原分解并提供己糖磷酸, 在肝中己糖磷酸主

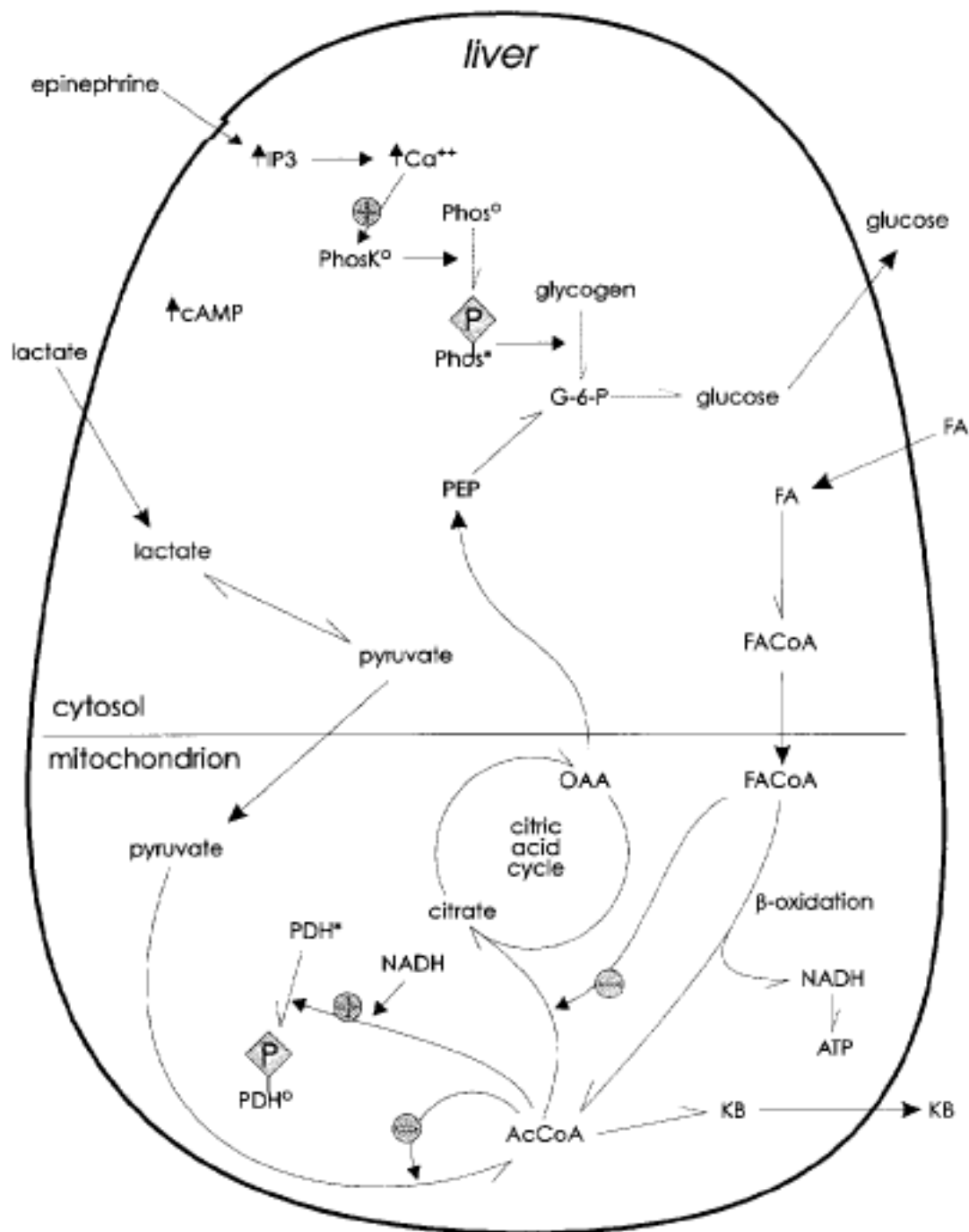


图 16.10 肾上腺素的作用和可利用的脂肪酸增多对肝脏的影响
肾上腺素作用于肝中的 α_1 受体, 使 IP_3 增多; IP_3 又使细胞溶胶中的 Ca^{2+} 增多, 于是糖原分解加强并向血液中释放葡萄糖(详见正文)。

要不是用于糖酵解, 而是通过葡萄糖-6-磷酸酶的作用, 提高血糖的水平(图 16.10)。

脂肪组织也受到肾上腺素的影响, 主要是在 α_1 -受体上, 使 cAMP 增多, 这又引起对激素敏感的脂酶的磷酸化, 因为这一磷酸化作用是由依赖于 cAMP 的蛋白激酶所催化的。对激素敏感的脂酶的磷酸化的形式(有活性的形式)会促进脂肪组织中脂肪的分解, 并使未酯化的脂肪酸被释放到血液中(其机制与胰高血糖素的相同, 见图 16.6)。这些未酯化的脂肪酸对于心脏和有氧条件下的肌肉可以起到能源的作用, 从而为应急的情况提供额外的能量。脂肪酸的增多也有助于葡萄糖的节约, 特别是在有氧条件下的肌肉中, 还由于提高了脂肪酰 CoA 和乙酰 CoA 的水平而有助于促进肝脏中的葡糖异生作用, 正如在胰高血糖素一节中已详述的那样。对脂肪组织的这种效应有助于释放体内所贮存的大量能量的一部分。

肾上腺素作用于胰岛的 β -细胞, 与 α_2 受体相互作用, 抑制 cAMP 的形成和胰岛素的释

放。在这种情况下这是有利的,因为运动时肌肉对胰岛素更为敏感。因此,在这种情况下胰岛素的释放增多会使进入肌肉的葡萄糖增多,而血糖水平显著降低,从而可能伤害中枢神经系统。肌肉会利用自身的糖原供应,脂肪组织也会释放脂肪酸。所以减少胰岛素的释放是重要的。类型 1 的糖尿病人在剧烈运动时为什么会出现低血糖,这就是根本原因。类型 2 糖尿病人摄取外源胰岛素,那不是由胰脏控制的。胰岛素的水平相对固定,而因为肌肉对胰岛素的敏感程度增加,“正常水平”变成了过量(血中的胰岛素相对过多),于是引起低血糖。运动和胰岛素的注射必须相互协调,因为类型 2 糖尿病人对于胰岛素的释放没有像正常人那样的有效的反馈。肾上腺素使人体为运动做好了一切准备。

过去的肾上腺素的优点在现代的西方文明中可能成为缺点,而且可能是紧张和冠心病之间的纽带。现代的紧张状况下,胰岛素的释放通常不是战斗或逃跑,而是面临截止时间或精神压力的问题。肾上腺素的释放引起上述的各项代谢变化。脂肪组织释放脂肪酸可能是特别有害的。假若利用的 ATP 很少,形成的 ADP 就少,底物的分解代谢也就最少,因为分解代谢的限制因素通常是可利用的 ADP 的多少。肌肉中糖原的分解所提供的能量可能超过需要量,而释放出来的脂肪酸的氧化则最少。血液循环中的未酯化的脂肪酸会被肝脏吸收并重新包装起来,主要是 VLDL 的形式, VLDL 又回到血液循环中去。脂肪组织会利用一些 VLDL,再形成三酰甘油并形成 LDL。时机不适当时(即不是合成脂肪酸之后,也不是进食含脂肪的膳食之后)血液循环中 LDL 的增多会导致胆固醇的沉积和血管中斑块的形成,其结果是动脉粥样硬化和冠心病。因此,史前的使人们对于危及生命的情况发生响应的天然机制,即释放肾上腺素后通常紧接着就是剧烈的运动,到今天已经变成了不利因素,使人体在不打算或不会进行剧烈运动的时刻不适当地释放脂肪酸。

16.5 胰 岛 素

本章中要讨论的下一一种激素是胰岛素。胰岛素是由胰脏中的 Langerhans 小岛的 β -细胞合成的。合成后它是一条单链的多肽,有几个二硫键。在释放之前,发生两次蛋白酶的裂解,产生 C-肽,胰岛素的 α -和 β -链由二硫键连在一起。成为一条肽的合成作用使之能正确折叠并形成二硫键。胰岛素是响应于多种刺激而分泌的;其中最有力的是葡萄糖的增多,而迅速增多又比缓慢增多更强。许多种氨基酸引起胰岛素的释放,其中最有力的是亮氨酸和精氨酸。亮氨酸是进食蛋白质的指示物,也是几乎所有蛋白质中摩尔分数相当高的独一无二的氨基酸。精氨酸似乎是由于形成氧化氮(NO)而引起胰岛素的释放,氧化氮是一种强有力的神经递质,作用于中枢神经系统以外的许多位点。使 cAMP 增多的因素,包括胰高血糖素在内,也会使胰岛素的分泌增多。一般来说,胰岛素的释放是对进食的响应,是由血液中的葡萄糖和某些氨基酸的浓度介导的。这些刺激引起胰岛素的释放,胰岛素是真正的合成代谢的激素,它促进蛋白质、糖原和脂质的合成。

胰岛素对全身的作用至少有两个方面:(i)增加葡萄糖转运蛋白的数目并改变对胰岛素敏感的细胞吸收葡萄糖的动力学,这可能与葡萄糖从细胞内移动到膜上有关;(ii)代谢的转化,这似乎是由对胰岛素灵敏的细胞中的胰岛素受体通过酪氨酸激酶而引发的。并非所有的细胞都对胰岛素敏感;中枢神经系统中的大多数细胞都不敏感,但下丘脑是例外,下丘脑中有摄食中枢和饱中枢。许多种组织,如肝,在代谢响应方面对胰岛素敏感,但在葡萄糖转运方面则否。其他细胞,如肌肉和脂肪组织的细胞,在葡萄糖转运和代谢转变两方面都对胰岛素敏感。胰

胰岛素,像其他激素一样,显然并不进入细胞,而是与细胞膜上的专一受体相结合,该受体再激活膜的胞内侧的酪氨酸激酶。酪氨酸激酶主要是磷酸化蛋白质的酪氨酸残基。酪氨酸激酶也会引起胰岛素受体的自磷酸化和可能的破坏,这种破坏现象称为减量调节。这是过量的胰岛素使对胰岛素发生响应的受体数目和(或)响应反而减少的情况,身体对于胰岛素的作用没有反应。类型的糖尿病人(即不依赖于胰岛素、不产生酮体的病人)会自然发生这种情况。

胰岛素的主要的总的的影响之一就是使肝脏和外周组织中为依赖于 cAMP 的蛋白激酶所磷酸化的许多种蛋白质发生去磷酸化。目前对于其确切的机制尚不完全清楚,不过已有证据表明很可能是胰岛素的作用使磷蛋白磷酸酶活化。蛋白质的这种去磷酸化作用和透性的增加以及葡萄糖和氨基酸运入细胞会产生许多重要的代谢后果(图 16.11)。已就各类组织逐一进行

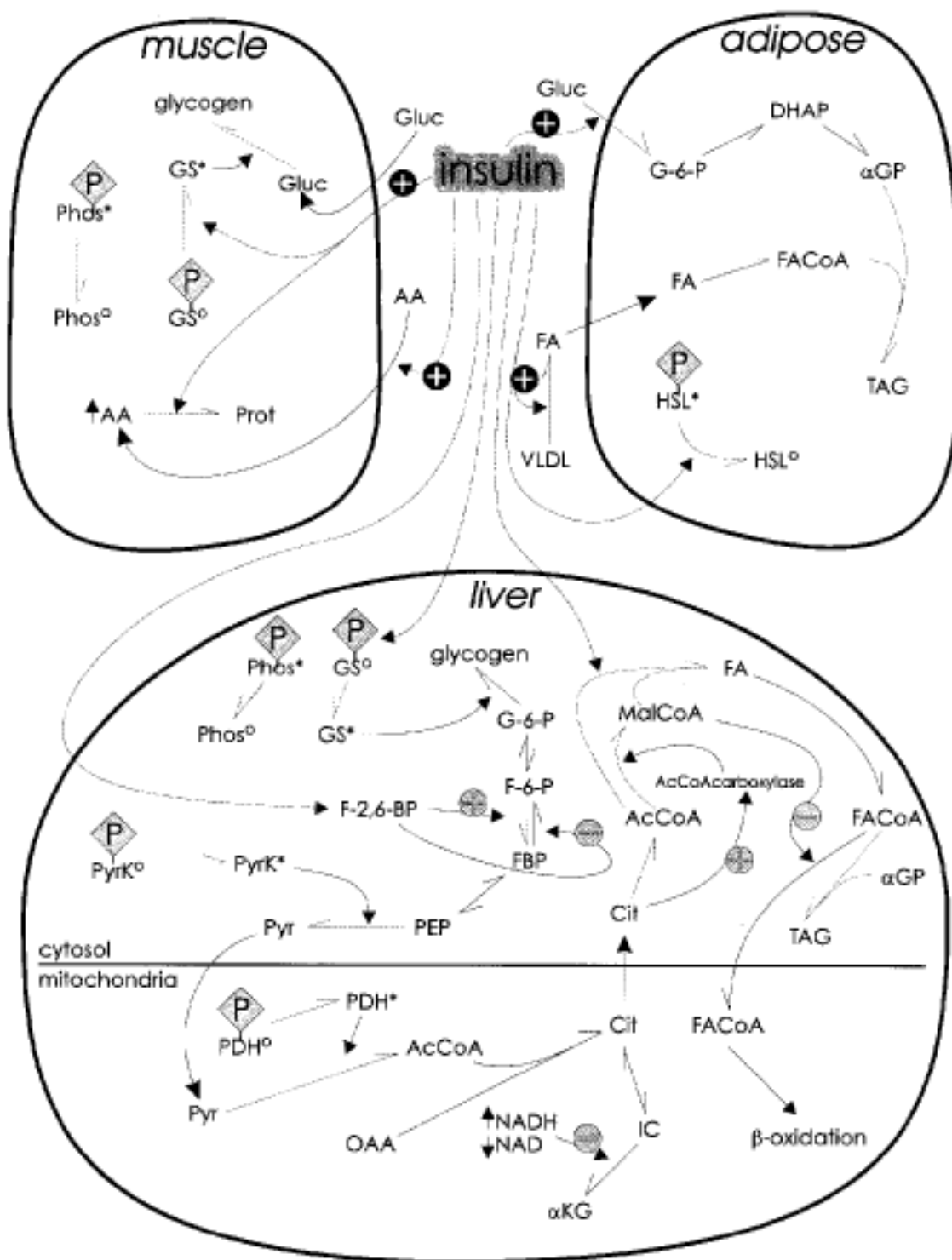


图 16.11 胰岛素对肝脏、脂肪组织和肌肉的影响

胰岛素促进许多种蛋白质的去磷酸化,这些蛋白质是由依赖于 cAMP 的蛋白激酶所磷酸化的。

胰岛素促进葡萄糖的转运、糖原的合成、脂肪的合成和贮存以及蛋白质的合成

——后者在肌肉中尤为显著(详见正文)。

了研究,从而认识到在各种不同的组织之间有整合作用和相互影响。在肌肉中,胰岛素的主要影响是蛋白质的水解减少而合成增加,以及细胞内可利用的葡萄糖增多。由于去磷酸化作用而使糖原合酶转变为有活性的形式而磷酸化酶转变为失活的形式,使得糖原被合成。曾有人注意到经胰岛素注射后,丙酮酸脱氢酶由失活的形式转变为有活性的形式。不过,这究竟是胰岛素的第二信使的直接作用还是血液循环中的脂肪酸和酮体减少以及细胞内葡萄糖增多的结果,尚有争论。

胰岛素对脂肪组织在葡萄糖的吸收和细胞内的代谢方面都有重要影响。响应于胰岛素的主要的代谢变化是对激素敏感的脂酶的去磷酸化,将其转变为失活的形式。第二个重要的代谢方面的作用是合成并向血管表面分泌脂蛋白脂酶。此酶负责分解循环中的三酰甘油,特别是 VLDL 和乳糜微粒中的三酰甘油,使成为脂肪酸和甘油。然后脂肪酸可被脂肪组织吸收。这些脂肪酸可能是由脂蛋白脂酶产生的,也可能是血液循环中未被酯化的。然后它们可被活化为脂肪酰 CoA。把酰基 CoA 以三酰甘油的形式贮存起来的一个困难可能是没有足够的 γ -甘油磷酸。脂肪组织的甘油激酶活性微乎其微,不能由组织内或循环中的三酰甘油所释放的甘油形成 γ -甘油磷酸。因此,葡萄糖进入细胞就具有重要的作用,而胰岛素正好促进这一过程。脂肪组织细胞内的葡萄糖可被磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,通过糖酵解可转变为 γ -甘油磷酸的前体,二羟丙酮磷酸。然后 γ -甘油磷酸和脂肪酰 CoA 就可结合成三酰甘油,即脂肪酸的贮存形式。因此,胰岛素对于脂肪组织中贮存甘油三酯有重要作用,这是通过细胞内的几种代谢效应以及使葡萄糖进入脂肪组织的细胞而实现的。胰岛素对于体内的一般合成代谢的效应,以及在具体个例中对脂肪组织中脂质贮存的效应,是显而易见的。

16.6 小 结

- (1) 激素可在细胞膜上或进入细胞发挥其作用。
- (2) 在细胞膜上起作用的激素必须与专一的受体相互作用并将信号转导以形成各种各样的第二信使或在细胞内起作用。
- (3) 这种转导通常是,但并非总是,与 G 蛋白有关的,G 蛋白把信息从膜的外面带到膜的内面。
- (4) 第二信使包括 cAMP、肌醇三磷酸(IP_3)和二酰甘油。
- (5) cAMP 使 R_2C_2 中的 C 亚基游离。游离的 C 亚基亦称依赖于 cAMP 的蛋白激酶,它催化专一的蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化。
- (6) IP_3 使细胞溶胶中的 Ca^{2+} 水平提高。 Ca^{2+} 来源于细胞内的细胞器和(或)细胞外的 Ca^{2+} 。
- (7) 二酰甘油活化蛋白激酶 C,此激酶可能与细胞增殖有关。
- (8) 胰岛素受体与 G 蛋白无关,其信号的转导激活酪氨酸蛋白激酶,此激酶使专一蛋白质的酪氨酸残基被磷酸化。
- (9) 类固醇激素、甲状腺激素和某些其他类似激素的化合物进入细胞,若有专一的受体,则与之结合,并在细胞核中发挥其作用。
- (10) 胰高血糖素使脂肪组织和肝脏中的 cAMP 增多。在脂肪组织中它使脂肪水解加强并向血液中释放未被酯化的脂肪酸。这些脂肪酸促进肝脏中的葡糖异生作用并减少肌肉中葡萄糖的利用。肝中 cAMP 的增多使糖原分解和葡糖异生都加强,这二者都有助于血糖水平的

提高。

(11) 肾上腺素使脂肪组织和肌肉中的 cAMP 增多, 又通过 IP_3 使肌肉和肝中细胞溶胶内的 Ca^{2+} 增多。在脂肪组织中的效果和胰高血糖素的类似。肝中 Ca^{2+} 的增多使糖原分解加强并向血液中释放葡萄糖。肌肉中 cAMP 和 Ca^{2+} 的增多使糖原分解加强和 G-6-P 形成。 Ca^{2+} 的增多可能有助于更有效的收缩。从脂肪组织释放更多脂肪酸对肝脏和肌肉的效应和胰高血糖素的情况类似。

(12) 胰岛素引起许多细胞中蛋白质酪氨酸激酶的活化。胰岛素也使得葡萄糖向某些组织中的转运加强。胰岛素会促进响应于 cAMP 而被磷酸化的许多种蛋白质的去磷酸化。胰岛素是一种合成代谢的激素, 增加许多组织中蛋白质和糖原的合成。胰岛素也使脂肪组织中脂蛋白脂酶增多和三酰甘油的贮存加强。

参 考 资 料

- The G protein connection: Molecular bases of membrane association, A. M. Spiegel, P. S. Backlund, Jr., J. E. Butrynski, T. L. Z. Jones, and W. F. Simonds, 1991, *Trends Biochem. Sci.*, 16: 338 ~341.
- cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes, S. S. Taylor, J. A. Buechler and W. Yonemoto, 1990, *Ann. Rev. Biochem.*, 59: 971 ~1005.
- Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases, P. J. Kennelly and E. G. Krebs, 1991, *J. Biol. Chem.*, 266: 15555 ~15558.
- Regulation of phospholipase C by G proteins, P. C. Sternweis and A. C. Simcka, 1992, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 502 ~506.
- Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isoenzyme, S. G. Rhee and K. D. Choi, 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 12393 ~12396.
- Structure of mammalian steroid receptors: Evolving concepts and methods, M. R. Sherman and J. Stevens, 1984, *Ann. Rev. Physiol.*, 46: 83 ~105.
- The insulin signaling system. M. F. White and C. R. Kahn, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 1 ~4.
- Signal transduction and protein phosphorylation in the regulation of cellular metabolism by insulin, J. C. Lawrence, Jr., 1992, *Ann. Rev. Physiol.*, 54: 177 ~193.
- The nature and regulation of the insulin receptor: Structure and function, M. P. Czech, 1985, *Ann. Rev. Physiol.*, 47: 357 ~382.
- Insulin, ketone bodies and mitochondrial energy transduction, K. Sato, Y. Kashiwaya, C. A. Keon, N. Tsuchiya, M. T. King, G. K. Radda, B. Chance, K. Clarke, and R. L. Veech, 1995, *FASEB J.*, 9: 651 ~658.
- Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport: An update. R. V. Farese, 1996, *Proc. Soc. Exp. Biol. NY*, 213: 1 ~12.
- Protein-tyrosine phosphatases, R. L. Stone and J. E. Dixon, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 31323 ~31326.
- Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. M. J. Tsai and B. W. O'Malley, 1994, *Ann. Rev. Biochem.*, 63: 451 ~486.

复 习 题

1. 激素仅作用于专一的组织而不作用于其他组织是由于:
 - a) 细胞中的酶含量
 - b) 细胞中的代谢物含量
 - c) 细胞的线粒体含量
 - d) 细胞上或细胞内的受体
 - e) 释放这种激素的内分泌腺
2. β -受体通过什么起作用?
 - a) G 蛋白和磷酸二酯酶
 - b) cAMP 和磷酸肌醇
 - c) G 蛋白和 cAMP
 - d) R 蛋白和 cAMP
 - e) R 蛋白和磷酸肌醇
3. 不同的细胞对于得到的第二信使(如 cAMP 增多)的响应不同,是因为它们有:
 - a) 不同的受体
 - b) 不同的酶组成
 - c) 不同的磷酸二酯酶水平
 - d) 不同的细胞核
 - e) 不同的膜脂质
4. 来自 β_1 -兴奋剂的可能的细胞内信使的数目是:
 - a) 2 个(都是直接形成的)
 - b) 3 个(2 个直接形成,1 个间接形成)
 - c) 3 个(都是直接形成)
 - d) 2 个(1 个直接形成,1 个间接形成)
 - e) 2 个(都是间接形成)
5. 指示血中葡萄糖浓度低的激素是:
 - a) 胰高血糖素
 - b) 肾上腺素
 - c) 胰岛素
 - d) 甲状腺素
 - e) 孕酮
6. 胰高血糖素不能促进下列哪个过程?
 - a) 葡糖异生
 - b) 脂解
 - c) 糖原分解
 - d) 生酮作用
 - e) 脂肪生成

参 考 答 案

1. d 因为多数激素都是在血液中转运的,所以组织之间对激素的分辨就在于专一的受体和各种不同的受体对专一激素的敏感性。

2. c β -受体上激素信号的转导是通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶。活化的腺苷酸环化酶会使细胞中的 cAMP 增多。
3. b 虽然依赖于 cAMP 的蛋白激酶能够使许多种蛋白质磷酸化, 从而影响许多种酶的活性, 但细胞必须有具有特定功能的酶, 才能发生功能的改变。
4. b 磷脂酶 C 作用所形成的两种化合物是肌醇三磷酸(IP_3) 和二酰甘油(DAG)。DAG 的水解产生前列腺素的前体。
5. a 胰岛的 β -细胞会释放较多的胰高血糖素以对低血糖发生响应。这种激素使肝中糖原分解和葡糖异生加强, 并使脂肪组织中的脂解加强。
6. e 脂肪生成。其他 4 种过程均因胰高血糖素作用使 cAMP 增多而被活化。

第 17 章 氨基酸代谢：脲、谷氨酸、谷酰胺和天冬氨酸

17.1 引言

本章研究氮素平衡的维持,包括氮以脲或氨的形式排泄的途径和控制。除叙述生物体内把氮从一种碳骨架转移到另一种碳骨架的方式外,还要研究几种氨基酸的代谢、它们的生理作用和它们的代谢产物。此外,还要讨论与几种氨基酸有关的特殊组织的代谢以及组织与组织的相互作用。

氮素在所有物种的代谢和结构方面都有重要作用。氮不仅存在于氨基酸中,而且存在于蛋白质、核酸、核苷酸、激素和许多至关重要的生物体内的其他化合物中。包括人在内的动物,代谢中的氮素是来自膳食的,与能够固氮的某些微生物不同。在生长过程中,从膳食中获得的氮素要比通过粪便、尿、皮肤和毛发的脱落所丢失的氮多——是一种正的氮平衡。在饥饿或蛋白质缺乏的情况下,则排出的氮素比摄入的氮素多——是一种负的平衡。大多数成年人则处于所谓中性氮平衡的状态之下。也就是说,摄入的和排出的成平衡。对于多数成年人,若体重增加,那是由于脂质增多,而不是蛋白质增多,除非他们在进行一种特殊的锻炼,或是增加蛋白质的特殊训练。无论如何,氮素的增加量通常不像体内的脂肪增加那么多。比如,在成年动物体内,所有摄入的氮都必须以相等的量排出体外。有些是通过脱皮或粪便丢失的,但大部分多余的氮是从尿液中排泄的。

17.2 氮素的排泄

氮素的排泄有 3 种主要方式,至于以哪种方式为主则视物种和代谢条件而定。

就对 ATP 的需要而言,最容易和最经济的方式是以氨的形式排泄。然而氨本身是剧毒的,而且能透过许多种膜。对海生动物而言,这种情况问题较少,因为氨会被周围的水稀释并被其他水生生物如植物利用。不过对于哺乳动物,包括人在内,过量的氨是有毒的。除非在酸尿的情况下,例如饥饿或患糖尿病时,人体内不广泛使用这种排泄方式。假若尿和血的 pH 差别不大,氨要从肾小管回到血液中就太困难了。在 pH 7.4 下,大部分氨的形式是铵离子,此时 $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ 约为 400/1。游离氨的透性加上它与 NH_4^+ 的迅速平衡会使得尿中不可能浓缩氮素,除非在 pH 低时以盐的形式浓缩。因此,要以氨的形式除去氮,就需要极其大量的尿,每天要好几百升。对于陆生动物这显然是不可能的,因此需要另一种氮的排泄产物,这就是脲。

以脲为氮素代谢的终产物有好几个优点。首先,它的毒性相当小而且极易溶于水,而且其形成是一个产生酸的过程($2\text{NH}_4^+ + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{脲} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$)。假若氨以铵离子的形式被排出,即使没有毒性,也会使体液碱化,因为氨变成铵离子时消耗了氢离子。在酸性条件下,这没有什么困难,因为有过量的 H^+ ,体内的 pH 低。在这种情况下,排泄 NH_4^+ 有其优越性。

排泄氮的第三种主要方式是尿酸,这在很大程度上存在于各种鸟类和爬行类中。这在代谢上和能量上都比形成脲昂贵,但尿酸毒性较小,也不易溶,对于下蛋的动物可能有某些优越

性。应该注意到人也以尿酸的形式排泄氮,不过不是氮素代谢的产物,而是嘌呤代谢的终产物。过量的尿酸能引起一种称为痛风的疾病,将在嘌呤代谢一章(第20章)中讨论。

17.3 氨的产生

本章中有关排泄的重点是氨和脲,特别是作为正常排泄产物脲的控制。有两种重要的脲的前体:氨和天冬氨酸。在讨论脲合成的机制和控制之前,有必要先了解一下这些前体的产生过程以及与脲合成有关的重要组织。人体内,脲的合成主要发生在肝脏中,在其他组织中有极少量的脲是由精氨酸形成的。从氨基酸和其他氮源合成脲的全部过程是通过脲循环发生的。

有两种重要的产生氨的酶,氨是脲合成的前体之一。第一种酶是谷氨酸脱氢酶,线粒体中的一种酶,在肝脏的线粒体中活性特别高。这种酶催化的是一可逆反应:



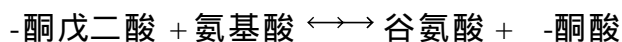
此酶促反应的平衡非常偏于谷氨酸的合成。然而,在哺乳动物系统中的流向却是氨的产生。使反应的流向与平衡趋势相反的办法之一就是除去终产物。这一反应的一种终产物是 α -酮戊二酸,是可在线粒体的柠檬酸循环中被代谢的;另一种产物是NADH,可通过线粒体的电子传递系统被重新氧化,形成水和高能磷酸;第三种产物就是氨本身,为了将反应从谷氨酸推向氨的方向,去掉它大概是至关重要的。在肝脏线粒体中氨可被活化以启动脲的形成。存在于线粒体中的谷氨酸脱氢酶的优点是显而易见的。

在其他组织中,有过量氨时,谷氨酸脱氢酶会催化 α -酮戊二酸的氨化作用以形成谷氨酸并可能除去 α -酮戊二酸。曾有人认为这是使氨解毒的可能机制,特别是当氨存在于中枢神经系统中时,要维持此系统的正常功能和能量水平,保持柠檬酸循环的中间产物及此循环的运转是极为重要的(见第11章)。

肝脏和肾脏中产生氨的第二个主要办法是通过谷酰胺酶,此酶催化谷酰胺水解以形成谷氨酸和氨。谷酰胺是血液循环中浓度很高的氨基酸,是将氨以无毒性的形式从其他组织中运送到肝中合成脲和运送到肾脏中以排泄氨的载体。这种酶的作用是单方向的,在线粒体中,并为无机磷酸所激活。谷酰胺酶是适应酶,肝和或肾中其量可增可减,分别使脲的合成或氨的排泄占优势。除去这两种产生氨的主要方式以外,还有许多种氨基酸在降解过程中直接产生氨。多数都是在肝中通过单向反应有选择地被分解。这些氨基酸包括苏氨酸、组氨酸、甘氨酸、天冬酰胺等等。因为大多数氨基酸不是被排泄的氨的主要来源,既不直接产生氨,又不是谷氨酸或谷酰胺,所以就需要有别的办法把这些氨基酸中的氮转移到可能产生氨的化合物中去。

17.4 转氨作用

将氮从一种碳架转移到另一种碳架的过程称为转氨作用。在这种可逆反应中氮的一种受体就是 α -酮戊二酸,而将氮转移到别的碳架上时,氮的供体通常是谷氨酸,其反应为:



(即相当于原来的氨基酸的 α -酮酸,图17.1)。

除去苏氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸和赖氨酸外,所有的氨基酸都能发生转氨作用,虽然在所有其他氨基酸的分解代谢中,这并不一定是正常的第一步。比如,可以使氮从一个氨基酸转移到另一个氨基酸并且将大部分氮转变为可能的氨的前体和脲合成的前体。有两种转氨作用是普遍存在的,也有重要意义。

第一个是天冬氨酸氨基转移酶,可逆地催化谷氨酸 + 草酰乙酸到天冬氨酸 + α -酮戊二酸。此酶活性存在于许多组织的线粒体和细胞溶胶中。它的活性远较任何别的转氨酶为高,而且在肝中特别活跃。此酶之所以重要,不仅因为它在谷氨酸和草酰乙酸之间转移氨以合成脲,而且因为它是苹果酸穿梭的重要参与者。在糖类的氧化性代谢发生处,这种穿梭就是重要的(第 11 章)。

第二种活跃的转氨作用是由丙氨酸氨基转移酶催化的,此酶分布广泛,在肝中特别活跃,主要存在于细胞溶胶中。它催化谷氨酸和丙酮酸形成丙氨酸和 α -酮戊二酸的可逆的转氨作用。这种转氨酶的重要性在于某些主要在肝脏之外发生转氨作用的氨基酸似乎都是主要以丙氨酸的形式将氮转移到肝中,这是所谓丙氨酸循环的一部分。在肝脏中, α -酮戊二酸从许多种氨基酸接受氮后便形成谷氨酸,谷氨酸则或是形成脲,或是发生转氨作用而形成天冬氨酸,这两种产物都是脲的前体。由此可见,谷氨酸在氮素代谢中起着重要的核心作用。

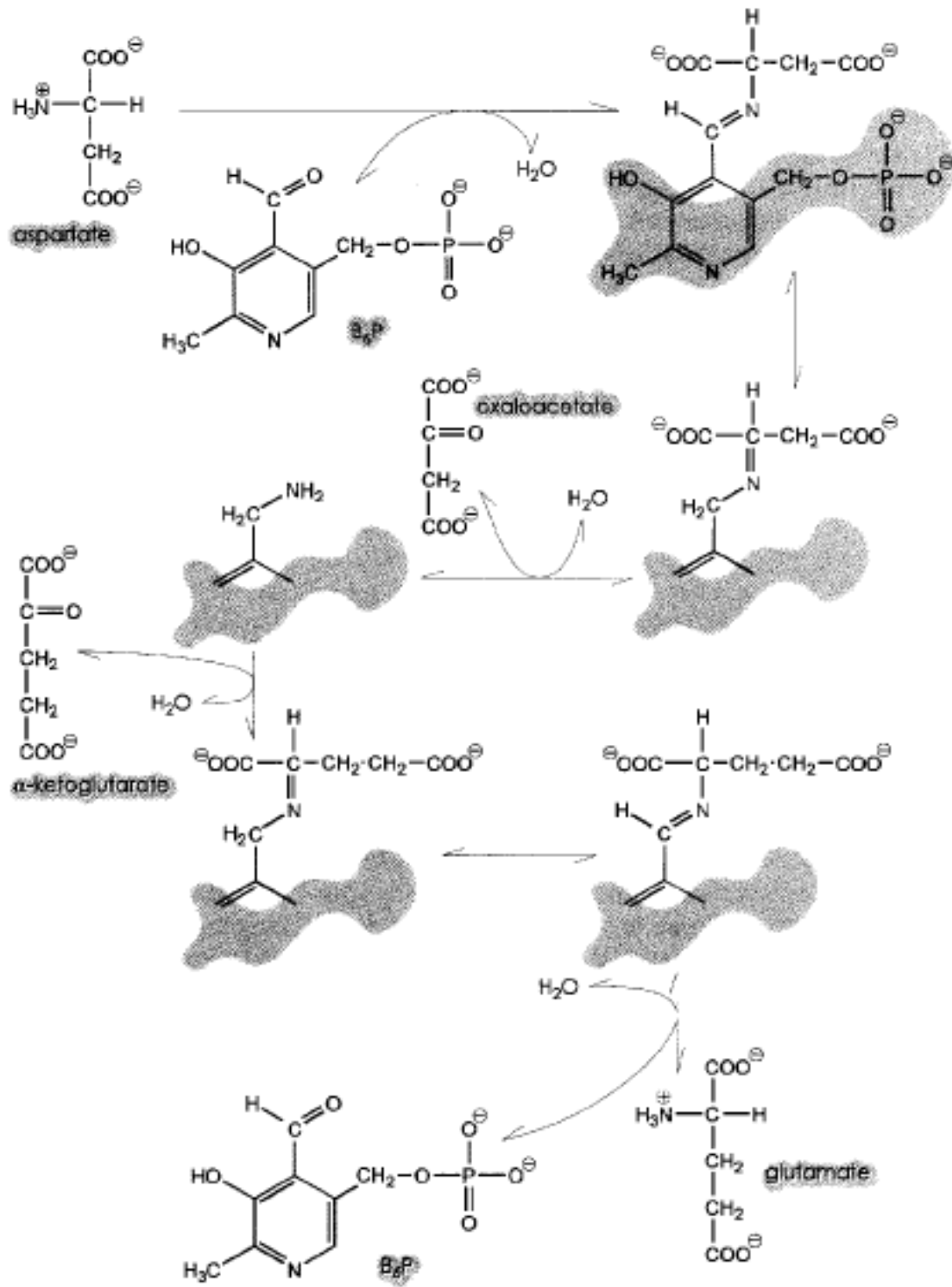


图 17.1 转氨作用的机制和中间产物

转氨作用是一可逆过程,使氨基从一个碳架转移到另一个碳架上(被转移的氮原子标有星号)。

17.5 脲循环

脲循环的第一步是由氨甲酰磷酸合成酶(CPSI)催化的。此反应需要氨、CO₂和2ATP。产物为氨甲酰磷酸、2ADP和无机磷酸。2ATP的需要保证了这一反应在生理上的不可逆性,并有助于将氨推向氨甲酰磷酸(图17.2)。N-乙酰谷氨酸是CPSI所需要的别构激活剂。下一个酶,鸟氨酸转甲酰酶也在线粒体内,它催化鸟氨酸与氨甲酰磷酸的反应,形成瓜氨酸和无机磷酸。然后瓜氨酸从线粒体出来,成为精氨酸琥珀酸合成酶所催化的反应的底物。这一反应使天冬氨酸与瓜氨酸化合,形成精氨酸琥珀酸,此反应需要ATP,ATP分解为AMP和焦磷酸。细胞中活跃的焦磷酸酶使焦磷酸水解,保证这一反应生理上的不可逆性。精氨酸琥珀酸裂合酶催化精氨酸琥珀酸的水解,形成延胡索酸+精氨酸。这样形成的延胡索酸可形成苹果酸,再通过苹果酸脱氢酶形成草酰乙酸,而草酰乙酸在天冬氨酸氨基转移酶的作用下又可再形成天冬氨酸。这是主要的脲循环的一个可能的副循环。现在主要的脲循环已经形成了精氨酸这一化合物。精氨酸可在精氨酸酶催化下,发生水解,形成脲和鸟氨酸。脲可以进入血液并通过肾脏排泄到体外,而鸟氨酸则再进入线粒体,再开始脲循环。

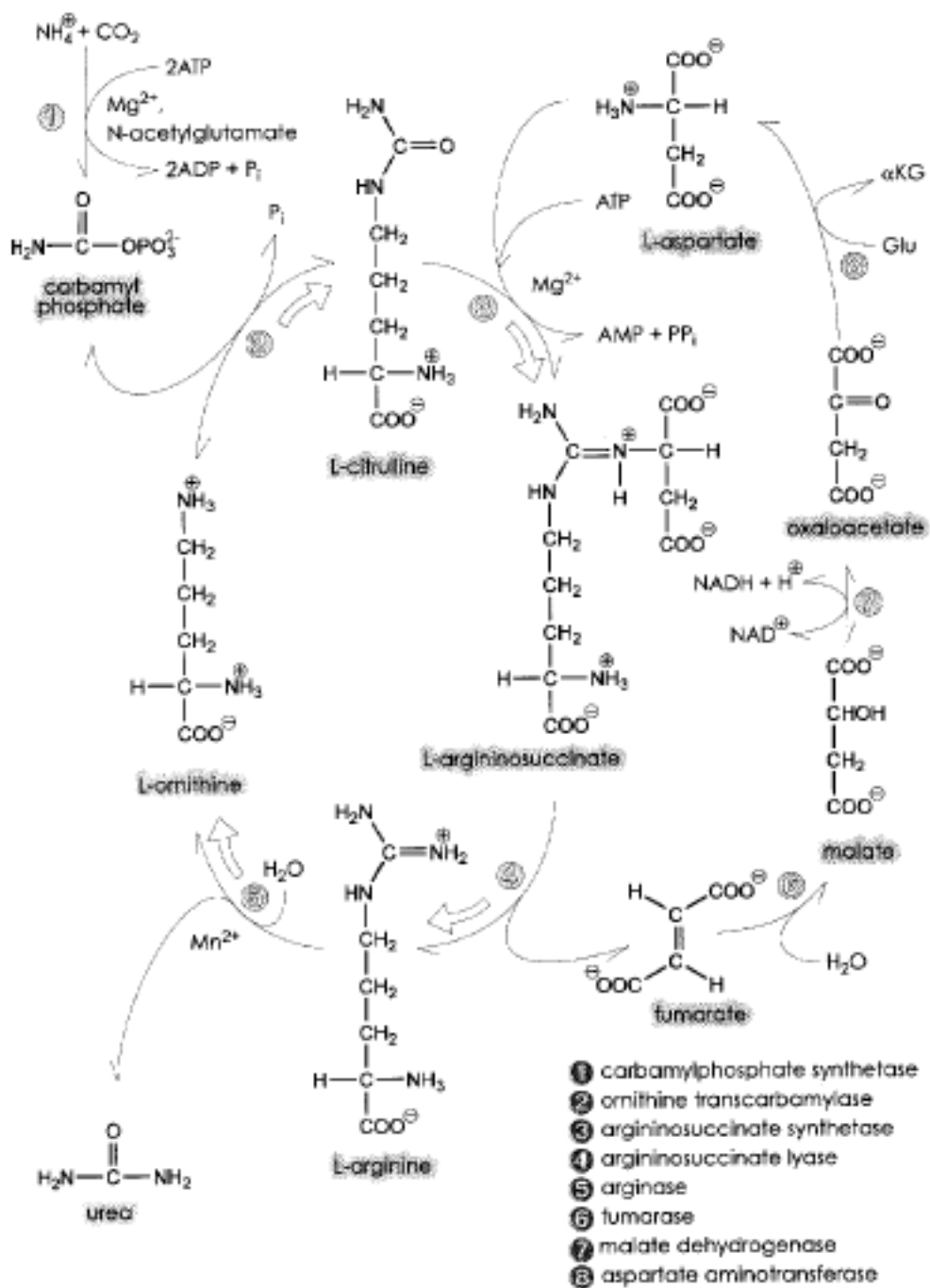


图 17.2 脲循环

示脲循环的步骤和结构式, 以及再生天冬氨酸的辅助性循环。

(一) 脲循环的控制

脲循环的主要控制,除了氮的多少之外,就是脲合成的第一个可能是不可逆的步骤,即氨甲酰磷酸合成酶。氨甲酰合成酶(CPSI)绝对需要一种别构效应物——N-乙酰谷氨酸。这种激活剂是由乙酰 CoA 与谷氨酸的反应形成的。十分清楚,在决定氨甲酰磷酸合成酶活性方面,N-乙酰谷氨酸起着关键性的作用,而且,假若氨不过量,这个反应就可能是限速系统。生理上这可能是有利的,因为当谷氨酸的浓度高时,肝脏中 N-乙酰谷氨酸的水平可能也较高。当有过量氨基酸时这是可能发生的,氨基酸通过转氨酶的作用,会将 α -酮戊二酸和谷氨酸的平衡推向谷氨酸的形成方面,这就有可能形成并积累 N-乙酰谷氨酸。在氮过量时这就引起甲酰磷酸合成酶活性的提高,这对于排泄过量的氮是适合的。

去掉氨基酸中的氮之后,分子中的碳架就可用于其他代谢目的,如能量、葡糖异生、甚至脂肪的生成。在可利用的氮不多时,其他酮酸可能过量,这就有降低谷氨酸的水平而使 α -酮戊二酸增多的趋势,于是 N-乙酰谷氨酸的形成减少。当可利用的氮少时,较低浓度的 N-乙酰谷氨酸会减低 CPSI 的活性,因而转变为脲的氮更少。这将有利于保存氮以合成非必需的氨基酸。诚然,当摄取的蛋白质多时,脲的合成和排泄显著增多;膳食中蛋白质少时,则脲的合成和排泄都显著减少。

脲循环中的下一个酶,鸟氨酸转氨甲酰酶的活性似乎极高。在氮过量时,几乎所有存在于肝中的鸟氨酸都转变为瓜氨酸,表明氨水平提高时氨甲酰磷酸合成酶和鸟氨酸转氨甲酰酶的活性都足够高。脲循环的下一步,精氨酸琥珀酸合成酶好像是此循环中活性最低的酶,这与氨水平高时瓜氨酸积累的事实是一致的。在用灌注的肝脏或分离的肝细胞进行实验的条件下,已证明当氨、鸟氨酸和一种能源如乳酸存在时,瓜氨酸显著积累,而脲循环的速率与精氨酸琥珀酸合成酶的活性非常相似。应该注意的是,虽然在脲循环中这种酶的活性最低,在正常条件下它并不受到别构控制,而且大概也不是限速的或控制流量的,因为多数人体内血液循环中氨和鸟氨酸的水平都不高。

精氨酸酶是催化精氨酸水解为鸟氨酸和脲的酶,肝脏中其活性极高;然而其 K_M 也很高,因而使得肝中的精氨酸首先用于蛋白质合成而不是脲合成。可是这种酶的高活性确实使肝中的精氨酸被用尽,不足以供应肝脏以外的蛋白质合成之用。事实上,肝中有足够的精氨酸酶活性,每天产生与人的体重相称的那么多脲。阻止脲产生的惟一方面是脲循环中其他酶的活性有限和精氨酸酶的高 K_M 。脲循环的酶都是适应酶,也就是说,它们的量会增多以响应于高蛋白的膳食、皮质醇疗法或糖尿病。这些增加都是慢性的(数小时到数日),与 N-乙酰谷氨酸浓度的急性变化适成对比,N-乙酰谷氨酸影响氨甲酰合成酶的活性,而不是量。

(二) 脲循环的代谢病

许多种遗传病都与脲循环有关。突变使得 v_m 或 K_m 改变,于是产生了有缺陷的蛋白质。这些包括 N-乙酰谷氨酸合成酶、氨甲酰磷酸合成酶、鸟氨酸转氨甲酰酶(最常见的脲循环的缺陷)、精氨酸琥珀酸合成酶、精氨酸琥珀酸裂合酶和精氨酸酶的破坏。对这些疾病的疗法有:低蛋白膳食以减轻对脲循环流量的压力;还可以添加所需要的氨基酸,如鸟氨酸和(或)精氨酸。

17.6 精氨酸

人体中可以从头合成精氨酸, 但不够快, 不能满足最大生长的需要。因此, 它被认为是成长中的儿童膳食中的氨基酸, 成年人则不需要。你可能会认为, 脲循环主要存在于肝脏中, 作为脲循环的一种中间产物, 人体内蛋白质合成所需要的精氨酸一定是在肝中合成的。脲循环是一个循环的过程, 并不能产生精氨酸的净合成。肝中所形成的大部分精氨酸都变成了脲或是肝中的蛋白质(图 17.3)。肝中蛋白质的合成有优先权, 氨基酸活化的 K_m 低, 而精氨酸酶的 K_m 低。体内蛋白质合成所需要的精氨酸是由两种组织即肠和肾合作而产生的。肠将谷酰胺或谷氨酸转变为瓜氨酸; 肠含有 CPSI, 但几乎没有精氨酸琥珀酸合成酶。肠中所形成的瓜氨酸经由血液流入肾脏, 肾将其转变为精氨酸再释放到血流中供其他组织利用。肾中精氨酸琥珀酸合成酶与精氨酸酶的比例远比肝中的高, 这对于精氨酸的净合成和积累是有利的。肾在精氨酸合成中的作用说明了为什么丧失肾功能的人血液中瓜氨酸的水平高。在用透析法治疗肾功能有缺陷的病人时, 必须在氨基酸混合物中加入精氨酸, 因为病人已不能合成足够的精氨酸以满足身体的需要。

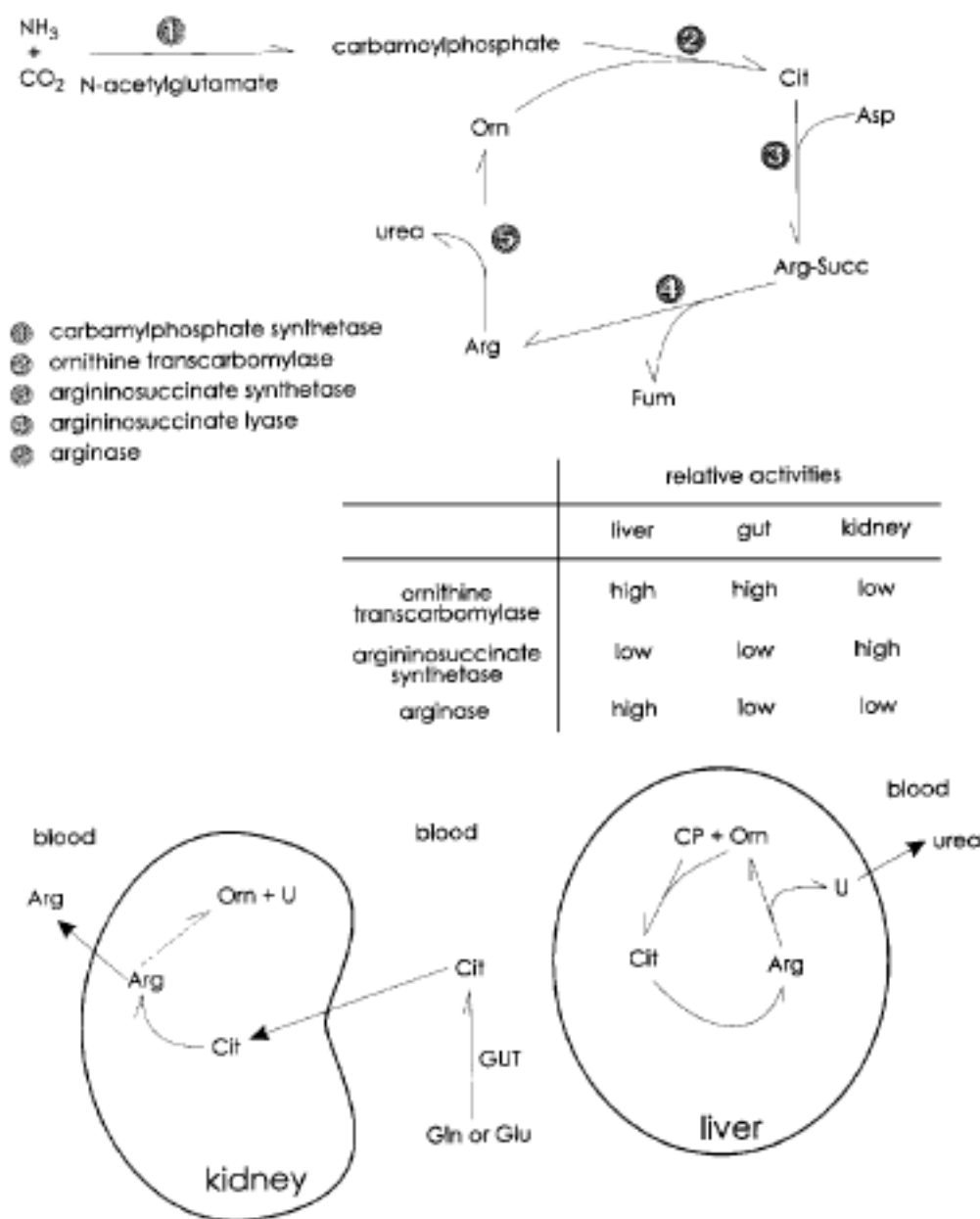


图 17.3 脲循环与精氨酸合成

示脲合成的概况及其控制以及肠和肾在精氨酸合成中的作用。

脑和神经细胞能利用血液循环中的瓜氨酸有效地合成精氨酸。在这些组织中, 氧化氮合酶能够把精氨酸转变为瓜氨酸和氧化氮 (NO), NO 是一种重要的神经递质, 据认为它在短期记忆以及许多其他功能中起作用。值得注意的是, 这些细胞有精氨酸琥珀酸合成酶和精氨酸琥珀酸裂合酶, 但无精氨酸酶。

精氨酸分解代谢的主要途径是精氨酸酶, 形成的是鸟氨酸, 随后鸟氨酸发生转氨作用, 而所形成的谷氨酸半醛的氧化则形成谷氨酸。这种分解代谢大部分发生在肝中。所形成的谷氨酸可转变为葡萄糖; 因此精氨酸是能异生葡萄糖的。

17.7 谷氨酸

现在要研究每种个别氨基酸的某些主要方面。在开始这一节之前, 必须认识到任何氨基酸的最重要一种功能就是合成为蛋白质。

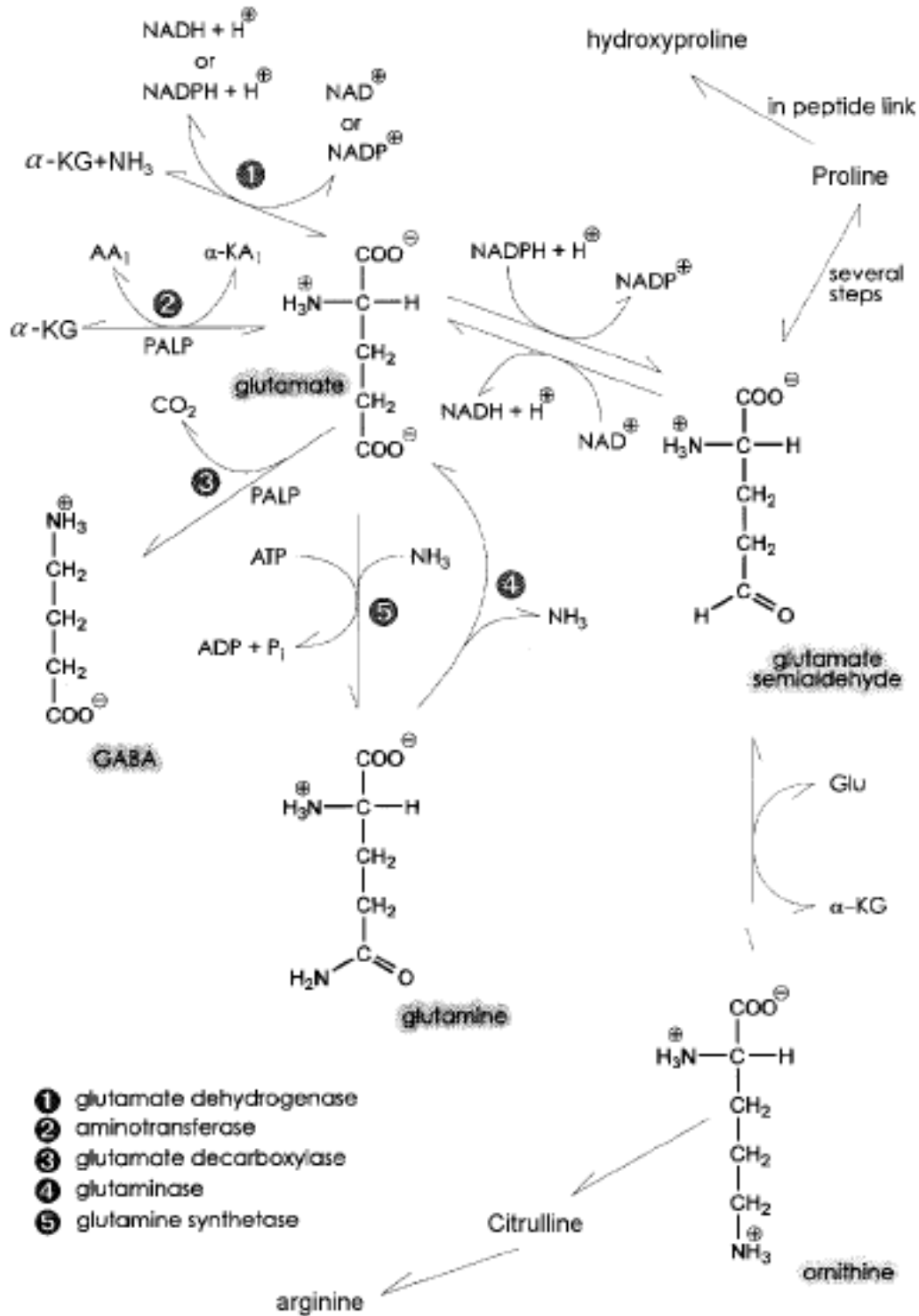


图 17.4 谷氨酸代谢
示谷氨酸代谢, 包括其去向和来源。

在体内谷氨酸以完全带电荷的兼性离子的形式存在。如前所述,谷氨酸是氨基酸代谢的核心。它可与多种 α -酮酸发生转氨作用而形成各种氨基酸和 α -酮戊二酸(图 17.4)。在逆反应中, α -酮戊二酸又可与许多种氨基酸发生转氨作用,产生相应的 α -酮酸和谷氨酸。如前所述,谷氨酸是氮素代谢的理想中心点,因为通过谷氨酸脱氢酶,谷氨酸能形成氨、NADH 和 α -酮戊二酸。氨可用于合成脲,以 NH_4^+ 的形式被排泄,或形成谷酰胺或天冬酰胺。由谷氨酸形成的酮酸是 α -酮戊二酸,它是柠檬酸循环的中间产物,这有助于柠檬酸循环的继续运转。在肝脏和肾脏中, α -酮戊二酸可转变为葡萄糖。在代谢中能净产生谷氨酸的任何氨基酸都可能异生为葡萄糖。谷氨酸也是谷酰胺的前体,本章后面还要谈到,在谷酰胺合成酶的催化下,氨、ATP 和谷氨酸会产生谷酰胺、ADP 和无机磷酸,这是一个生理上不可逆的反应。谷氨酸也是谷酰胺酶反应的产物,此酶催化谷酰胺水解为氨和谷氨酸。谷酰胺的合成和降解是由两个不同的不可逆的酶促反应完成的。因此,形成谷酰胺和分解谷酰胺的流量及它们的水平的控制,必须用两种不同的酶,每一种都是能单独控制的(即类似于 PFK 和果糖-1,6-二磷酸之控制糖酵解和葡萄糖异生以及己糖激酶与葡萄糖-6-磷酸酶的反作用)。

17.8 鸟氨酸

谷氨酸既是鸟氨酸的前体又是鸟氨酸循环的产物。这两种反应不但是由两种不同的酶催化的,而且是在不同的组织中进行的。鸟氨酸的降解主要在肝中进行,鸟氨酸氨基转移酶催化鸟氨酸和 α -酮戊二酸形成谷氨酸和谷氨酸半醛。这时鸟氨酸上远端的氨基而不是 α -氨基发生转移。谷氨酸半醛脱氢酶催化谷氨酸半醛的氧化,需要 NAD^+ ,形成谷氨酸和 NADH。肝中后一反应是单方向的,原因是肝中 NAD^+/NADH 的状态。因此,鸟氨酸主要在肝中发生分解代谢,除去来自精氨酸外,肝中没有什么鸟氨酸的净合成。肝中的精氨酸在精氨酸酶作用下也可形成鸟氨酸。

肠中与肝中相反,谷氨酸可被 NADPH 还原为谷氨酸半醛,这是有利于还原性的生物合成的,其原因是前已述及的(第 12 章) $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ 这一对核苷酸的还原特性。谷氨酸半醛可与谷氨酸发生转氨作用,在肠中形成 α -酮戊二酸和鸟氨酸。鸟氨酸可在肠中发生进一步的变化,与氨甲酰磷酸形成瓜氨酸。然后所产生的瓜氨酸可进入血液循环,并在肾中转变为精氨酸。

肠中所形成的谷氨酸半醛还可环化并被还原为脯氨酸。因此,脯氨酸并不是人体的必需氨基酸。任何能形成谷氨酸的氨基酸都能转变为葡萄糖。在能够产生谷氨酸的氨基酸中,要逐个详细讨论的是谷酰胺、通过鸟氨酸形成的精氨酸、脯氨酸或组氨酸。

脑和中枢神经系统中的谷氨酸能转变为 γ -氨基丁酸(GABA),这是由谷氨酸脱羧酶催化的。GABA 是神经递质的抑制剂,其代谢是转氨作用和随后的氧化作用。

17.9 谷酰胺

谷酰胺是代谢上重要的氨基酸,天然存在于蛋白质中,可在人体内合成,而且是血浆中浓度最高的两种氨基酸之一。在谷酰胺合成酶催化下,谷氨酸、氨和 ATP 可以发生反应,形成谷酰胺;其他产物是 ADP 和无机磷酸。此酶在肝中活性高,在肌肉、中枢神经系统和大多数其他组织中活性中等。谷酰胺的合成是氨的解毒机制,通过血流把潜在的氨从一种组织运送到另一种组织中。例如,肌肉中合成的谷酰胺可以通过血液运到肝中,用于脲合成的氨是由谷酰胺

酶的作用形成的。假若肾是运送谷酰胺的终点, 谷酰胺酶就能释放氨并以铵离子的形式排入尿中。除去转变为谷氨酸外, 谷酰胺还有许多别的重要代谢功能。这些功能中的第一个和最重要的就是蛋白质的合成, 以及谷胱甘肽这种三肽的合成, 还有嘌呤和嘧啶的合成(第 20 章)。谷酰胺能异生葡萄糖。谷酰胺是非必需的氨基酸, 说明不需要从膳食中摄取, 因为人体内能从简单的前体, 如氨和葡萄糖, 合成它。

17.10 天冬氨酸

天冬氨酸能通过转氨作用转变为草酰乙酸, 柠檬酸循环的一种中间产物。和大多数转氨作用一样, 这是一个可逆反应, 天冬氨酸也能由转氨作用形成, 即谷氨酸与草酰乙酸形成天冬氨酸和 α -酮戊二酸。因此, 天冬氨酸不是必需的氨基酸。天冬氨酸和 α -酮戊二酸的转氨酶在大多数组织中活性都特别高, 而且存在于线粒体和细胞溶胶中。这种反应的重要性比只是形成天冬氨酸或草酰乙酸的大得多。天冬氨酸转氨酶的反应是苹果酸穿梭(见第 11 章)中的重要反应, 将还原力从细胞溶胶转运至线粒体中。天冬氨酸也在嘌呤和嘧啶的合成中起作用, 在嘧啶合成中尤为重要, 它为这些化合物的合成供给氮和碳(第 20 章)。

天冬氨酸是脲合成的重要氮源。在完成从氮的前体合成脲时, 与谷氨酸的转氨反应很重要。大部分氮都会进入谷氨酸, 然后谷氨酸与草酰乙酸发生转氨反应为脲的形成作准备, 因为脲中的氮有一半必须来自天冬氨酸。天冬氨酸也可被天冬酰胺合成酶氨基化, 即利用天冬氨酸、谷酰胺和 ATP 产生谷氨酸、AMP、焦磷酸和天冬酰胺 ($\text{Asp} + \text{Gln} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Asn} + \text{Glu} + \text{AMP} + \text{PP}_i$)。天冬酰胺也是蛋白质的重要组分。天冬酰胺的形成比谷酰胺的形成慢得多。天冬酰胺可被天冬酰胺酶破坏, 许多种组织都含有这种酶。若将天冬酰胺酶加于血液中以破坏循环中的天冬酰胺, 就会使体内缺乏天冬酰胺。将天冬酰胺酶加于血液中曾被用作化疗的一种方式。没有足够的天冬酰胺可使许多肿瘤的快速生长变慢, 例如某些白血病。天冬氨酸也可脱羧形成 β -丙氨酸, 像辅酶 A 中就有 β -丙氨酸, 它是泛酸的一部分。不过, 这种反应通常发生在微生物中, 因为人体需要的是泛酸本身, 不能将 β -丙氨酸加到泛酰巯基乙胺上去。因此, 在大多数正常情况下, 天冬氨酸和天冬酰胺都不是必需的氨基酸, 膳食中并不需要它们。

17.11 小 结

- (1) 正常人排泄氮的主要形式是脲, 它是在肝中由氨和天冬氨酸形成的。
- (2) 谷氨酸通过谷氨酸脱氢酶, 或谷酰胺通过谷酰胺酶, 均可形成氨。
- (3) 作为 α -氨基氮的氮, 可以通过称为转氨作用的过程在碳架之间移动, 此反应需要吡哆醛磷酸。两种活性高的转氨酶是天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶。在大多数转氨作用中, 谷氨酸或是氨基的供体, 或是转氨作用的产物。
- (4) 脲是在肝中由脲循环合成的。第一步是由氨、 CO_2 和 ATP 形成氨甲酰磷酸。然后是许多其他步骤, 包括瓜氨酸、精氨琥珀酸和精氨酸的形成, 最后被精氨酸酶裂解为脲和鸟氨酸。脲的第二个氮是由天冬氨酸在形成精氨琥珀酸时供给的。
- (5) 脲循环的控制是可利用的氮的多少和氨甲基磷酸合成酶(CPSI)的活性。CPSI 的活化需要 N-乙酰谷氨酸作为别构效应物。
- (6) 谷氨酸是全部氨基酸代谢的核心。它在转氨作用, 氨的产生, 鸟氨酸、脯氨酸、谷酰胺和 γ -氨基丁酸(GABA)的形成中都起着主要作用。

(7) 谷酰胺是以无毒性的形式将氨从外周组织运至肝、肾和肠中的转运者。它是由谷酰胺合成酶从谷氨酸和氨合成的,又能在谷酰胺酶的催化下降解为谷氨酸和氨。假若谷酰胺酶在肝中起作用,氨的最可能的前途就是形成脲。假若谷酰胺酶在肾中起作用,氨的最可能的前途就是形成尿中的铵离子。在酸中毒的情况下,尿中铵离子形成的氨可能大大超过脲的形式。

(8) 天冬氨酸可通过转氨酶由草酰乙酸和谷氨酸形成。这在脲的合成、苹果酸穿梭、嘌呤和嘧啶合成中都很重要。

(9) 天冬氨酸可转变为天冬酰胺,它是蛋白质的重要组分。天冬酰胺可为天冬酰胺酶所破坏。

参 考 资 料

Regulation of enzymes of urea and arginine synthesis, S. M. Morris, 1992, *Ann. Rev. Nutr.* 12: 81 ~101.

Regulation of carbamoyl-phosphate synthase(ammonia) in liver in relation to urea cycle activity, A. J. Meijer, 1979, *Trends Biochem. Sci.*, 4: 83 ~86.

Regulation of hepatic ammonia metabolism: The intercellular glutamine cycle, D. Haussinger, 1986, *Adv. Enzyme Reg.*, 159 ~180.

Glutamine: A key substrate for the splanchnic bed, W. W. Souba, 1991, *Ann. Rev. Nutr.*, 11: 285 ~308.

Regulation of biosynthesis of nitric oxide, C. Nathan and Q. Xie, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269: 13725 ~13728.

Urea cycle enzymes, S. W. Brusilow and A. L. Horwich, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, McGraw-Hill, New York, pp. 629 ~630.

复 习 题

- 下列反应中,哪一个不产生氨(NH_3)?
 - 谷氨酸脱氢酶
 - 丙氨酸氨基转移酶
 - 苏氨酸脱水酶
 - 谷酰胺酶
 - 组氨酸酶
- 脲循环的主要的别构效应物是下列各项中的:
 - 谷酰胺
 - cAMP
 - 氨甲酰磷酸
 - N-乙酰谷氨酸
 - 精氨酸
- 下列化合物中,哪一种完全不能净形成谷氨酸?
 - 酮戊二酸
 - 油酸
 - 组氨酸
 - 谷酰胺
 - 精氨酸
- 用于体内蛋白质合成的精氨酸的合成原料是谷氨酸,与此有关的主要组织是:

- a) 肝和脑
- b) 肠和肝
- c) 肠和肾
- d) 肝和肾
- e) 肾和脑

参 考 答 案

1. b 这一反应将 α -氨基氮从一个碳架转移到另一个碳架, 完全不释放游离氨。
2. d N-乙酰谷氨酸是催化脲循环的第一个反应的酶——氨甲酰磷酸合成酶的必需的激活剂。
3. b 油酸能产生乙酰 CoA, 乙酰 CoA 能形成谷氨酸, 但只是从草酰乙酸开始。假若油酸能净形成谷氨酸(可能的葡萄糖的前体), 它就应该能形成葡萄糖。
4. c 肠将谷氨酸转变为瓜氨酸并释放到血液中, 肾又将循环中的瓜氨酸转变为精氨酸并释放到血液中。

第 18 章 其他脂肪族氨基酸的代谢

18.1 引言

本章研究脂肪族氨基酸,包括甘氨酸的代谢。所有这些氨基酸,除赖氨酸和亮氨酸外,都能至少部分地异生葡萄糖,并且能为半个葡萄糖分子的形成提供碳原子。这些氨基酸有些是简单的,只有碳氢侧链;其他一些则还有硫、羟基或远端氨基。除赖氨酸和苏氨酸外,都能发生转氨作用。我们将研究膳食中非必需氨基酸的合成以及分解代谢中共同的中间产物的形成。这些氨基酸中有许多是特殊代谢产物的前体,这些代谢产物有肉毒碱、胆碱、肌酸酐、牛磺酸等。还要讨论各种氨基酸的相互关系以及组织间的相互关系。

18.2 丙氨酸

丙氨酸是蛋白质中最简单的 L-氨基酸。它的代谢简单,但生理作用和功能却复杂。丙氨酸可与 α -酮戊二酸发生可逆的转氨作用,形成丙酮酸和谷氨酸。这种转氨作用存在于许多种组织中,包括肝脏和肌肉。这是除蛋白质合成外,丙氨酸的惟一去向。因此,丙氨酸是能生成葡萄糖的,也不需要由膳食中摄取。

除丙氨酸外,有几种氨基酸是在外周组织中发生转氨作用,形成谷氨酸,其碳架则被代谢。这就发生了一个问题:怎样把氮以无毒性的形式从外周组织运送到肝脏中,合成脲并使之排出体外?一种可能是利用谷氨酸,然而,利用谷氨酸也有两个问题:(i) 血液中谷氨酸大多是有毒的,关于双亲营养的研究已证明了这一点。用于静脉注射的氨基酸混合物中没有谷氨酸(也没有天冬氨酸,浓度高时它也有毒)以避免可能的毒性效应。(ii) 把柠檬酸循环的中间产物用尽($\text{KG} \rightarrow \text{Glu}$),这可能在此循环至关重要时(例如,中枢神经系统中出现 NH_3 的毒性时)其运转变慢。假若有一种中间产物被拉至循环之外,那么整个循环的中间产物就都被用尽了。为了在某种程度上克服这个问题,脑含有丙酮酸羧化酶,以便利用丙酮酸补充柠檬酸循环的中间产物。肌肉中没有丙酮酸羧化酶,因此,这种组织中补充柠檬酸循环的中间产物的惟一办法就是利用氨基酸,若谷氨酸被用作从肌肉中运走氮的载体的话,组织中就不会有大量的氨基酸。

有些氨基酸主要是在肌肉中发生转氨作用(见支链氨基酸)。在这种情况下,氮以丙氨酸的形式运入肝中进行脲的合成,或以谷酰胺的形式运入肝中进行脲的合成,或以此形式运入肾脏中以产生尿中的氮。运送丙氨酸相对于运送转氨作用形成的谷氨酸,其优越之处在于避免了谷氨酸和(或)天冬氨酸水平太高所产生的毒性。可能还有一个问题,就是膳食中的蛋白质水解时产生的天冬氨酸和谷氨酸会怎么样。回答似乎是它们会转变成丙氨酸和(或)谷酰胺,但主要是丙氨酸。当进食蛋白质后测定门静脉中的氨基酸水平时,会发现门静脉血中的谷氨酸和天冬氨酸都很少,而丙氨酸的水平比预期的要高得多。以后又证明了,天冬氨酸和谷氨酸中的氮已被转移到丙酮酸中,形成了丙氨酸这种无毒的氮载体。

肌肉中会形成异常大量的丙氨酸以通过丙氨酸循环向肝中运送。丙氨酸循环如图 18.1

所示,它包括肌肉中的丙酮酸转变为丙氨酸,然后丙氨酸又被运至肝中。肝中丙氨酸的氮转变为脲,而丙氨酸的碳(丙酮酸)则转变为葡萄糖,葡萄糖又回到肌肉中形成丙酮酸,又重新开始这一循环。丙氨酸的重要性不仅是氮的载体,而且也是葡糖异生的碳的载体。这大概解释了为什么丙氨酸是肝中丙酮酸激酶的负效应物,这种酶对于葡糖异生作用发生负面影响(第 13 章)。当肌肉中的蛋白质大量降解而为葡糖异生提供碳源时,血浆中的丙氨酸的增加也比预期的高,这不仅是供应碳源,也是对肝中的丙酮酸激酶进行别构抑制以帮助此过程的进行。

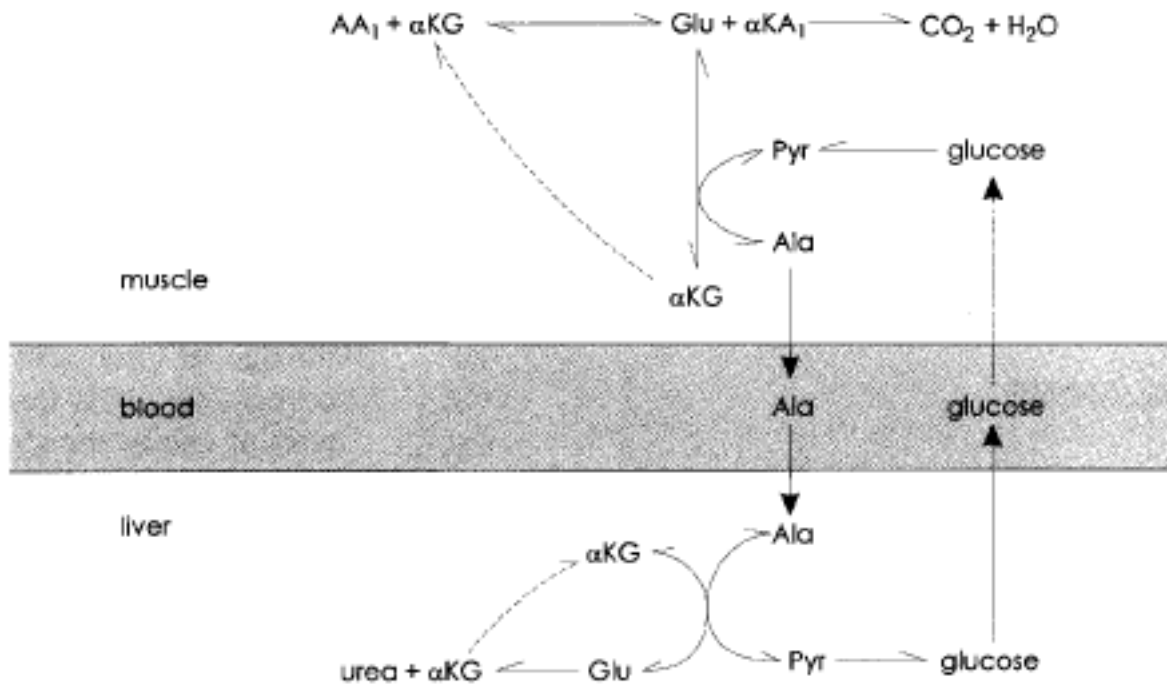


图 18.1 丙氨酸循环的要点
注意,此图中包括三种组织:肌肉、血液和肝。

催化丙氨酸和 α -酮戊二酸之间可逆的转氨作用的酶是丙氨酸氨基转移酶(ALT),其同功酶存在于细胞溶胶和线粒体中。这种酶存在于几种组织中,在肝中活性特别高。血清中这种酶活性的增高(有时称为血清谷丙转氨酶,SGPT)表示肝受到损伤。

18.3 丝氨酸和苏氨酸

丝氨酸和苏氨酸都是羟基氨基酸。

(一) 丝氨酸

丝氨酸有两条主要的分解代谢途径。第一条,显然也是主要的一条,在哺乳动物体内是由丝氨酸脱水酶催化的,反应中丝氨酸的 α -和 β -两个碳上的水被去掉。双键的重排形成了一种能够自动水解的氨基酸,水解产生的是丙酮酸和氨。然后丙酮酸可被代谢,如前面几章所述。此酶主要存在于肝中,在肝中氨可转变为脲而碳则转变为葡萄糖。丝氨酸脱水酶是适应酶,当膳食中蛋白质含量增多而对葡糖异生作用的要求也增大时,人体内这种酶的量也增多。这就保证了过量的丝氨酸能发生分解代谢,使得其碳架能用于生物合成和产生能量。丝氨酸也会发生转氨作用而形成羟丙酮酸,然后羟丙酮酸可被还原并被磷酸化,形成 3-磷酸甘油,并进一步转变为葡萄糖或进入糖酵解。这种转氨酶在肝中,在包括人在内的许多物种中,此酶都在丝氨酸分解代谢中起着重要的作用(图 18.2)。

这一途径优于丝氨酸脱水酶的一点是,在转氨作用中没有游离氨释放出来,因而氨的毒性造成的可能困难极小。人体内,丝氨酸不是必需氨基酸,可在肝中由糖酵解的中间产物 3-磷

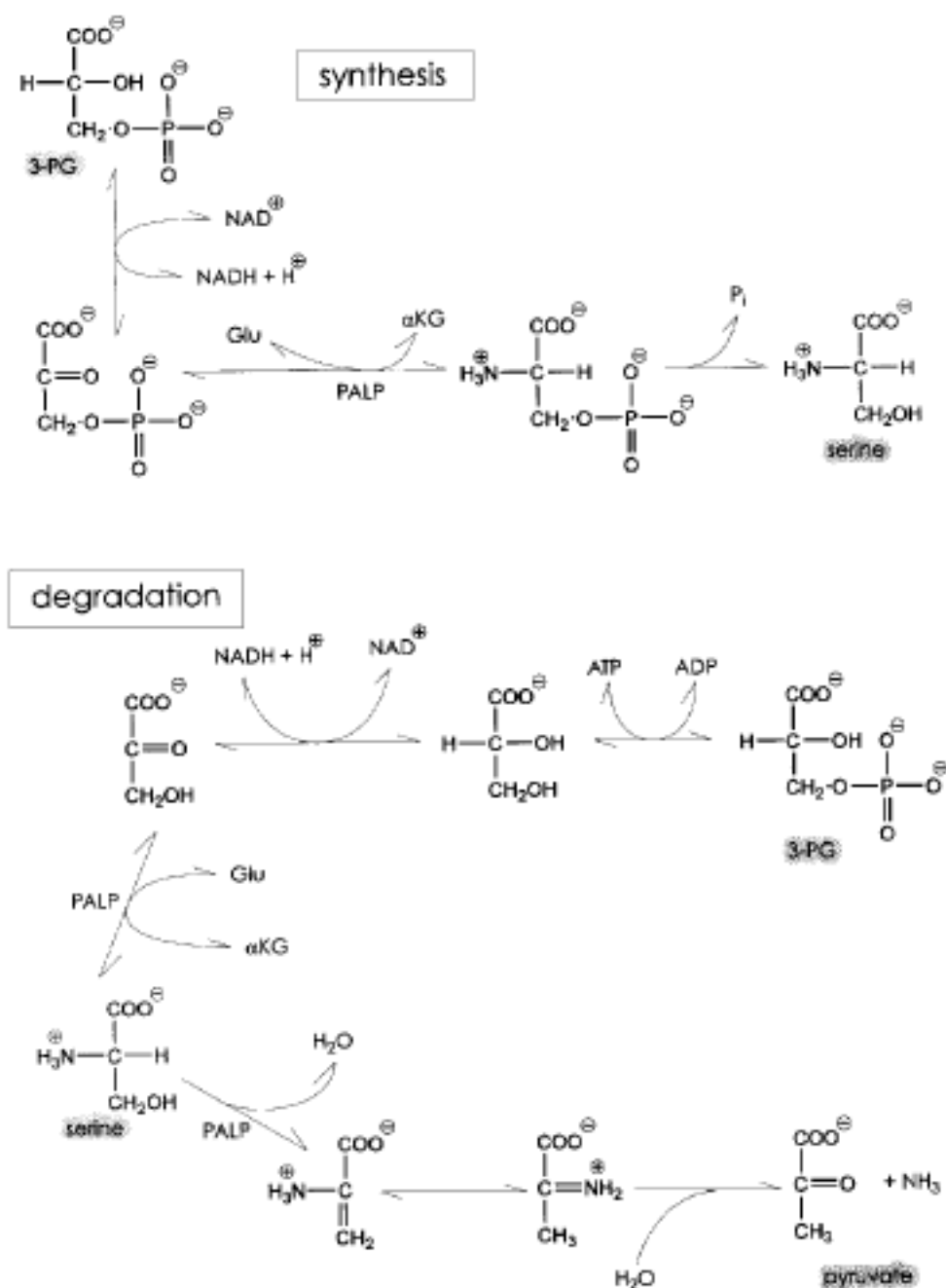


图 18.2 丝氨酸的代谢

示丝氨酸合成和降解的途径和结构式, 列有主要的合成途径和两条降解途径。

酸甘油酸合成, 3-磷酸甘油酸可被氧化为磷酸羟丙酮酸, 然后再与谷氨酸发生转氨作用形成磷酸丝氨酸, 后者水解即形成丝氨酸。丝氨酸再发生各种变化以满足对它的各种需要, 包括蛋白质的合成。磷酸丝氨酸存在于蛋白质中, 但掺入蛋白质中的只是丝氨酸, 并不是磷酸丝氨酸本身。存在于蛋白质中的专一的丝氨酸残基会被蛋白激酶磷酸化, 如依赖于 cAMP 的蛋白激酶。

除去简单的分解代谢之外, 丝氨酸还有许多其他的代谢变化。其脱羧作用产生乙醇胺, 它能掺入磷脂而形成磷脂酰乙醇胺。再加上 3 个甲基, 磷脂酰乙醇胺就转变为磷脂酰胆碱。磷脂酰胆碱的水解产生胆碱, 这时丝氨酸和甲硫氨酸的甲基就是前体(见图 15.3)。磷脂中的胆碱就是乙酰胆碱中的胆碱。有助于将脂肪从肝脏运至其适当的贮存处所即脂肪组织的化合物称为脂肪转运(lipotrophic)因素。虽然丝氨酸是胆碱的前体, 但是它并不属于这一类化合物, 因为它可迅速被合成。属于脂肪转运因素这一类的是胆碱和甲硫氨酸, 胆碱为磷酰胆碱的合成所必需, 甲硫氨酸是甲基的供体, 而甲基也是把丝氨酸转变为磷脂酰胆碱所必需的。

丝氨酸的另一个命运是失去羟甲基, 这是由丝氨酸羟甲基转移酶催化的, 利用四氢叶酸为辅酶, 形成的是甘氨酸和亚甲四氢叶酸。因为有这么个反应, 所以甘氨酸不是人体的必需氨基

酸。在某些物种,如鸟类和爬虫类中,主要的排泄物是尿酸,甘氨酸和(或)丝氨酸可能是必需氨基酸,但人类则否。丝氨酸也是产生半胱氨酸的前体,条件是带有 SH 基的整个碳链由甲硫氨酸的代谢物(高半胱氨酸)提供。

(二) 苏氨酸

苏氨酸是另一种羟基氨基酸,存在于蛋白质中,也能在蛋白质链中被好几种蛋白质激酶磷酸化。苏氨酸是必需的氨基酸,人类对它的必需性极高,因为在高等动物体内它既不能发生转氨作用也不能被合成。苏氨酸的分解代谢有两条途径,都存在于肝脏中。第一条是苏氨酸脱水酶,与丝氨酸脱水酶一样,产生氨和 α -酮基丁酸。 α -酮基丁酸在线粒体内可形成 CO_2 和丙酰 CoA;后者可转变为琥珀酰 CoA 再转变为葡萄糖。通过这条途径代谢的苏氨酸可能产生葡萄糖。另一种可能的途径是苏氨酸醛缩酶,它催化甘氨酸和乙醛的产生。乙醛可被氧化为乙酸并用于产生能量和形成脂肪,但不能产生葡萄糖。所形成的甘氨酸可能产生葡萄糖,但远不如 α -酮基丁酸和丙酰 CoA 效率高,也比较慢。

18.4 半胱氨酸

半胱氨酸在结构上和丝氨酸相似,但在 β -碳上有一 SH 基团,而不是像丝氨酸那样有一 OH 基团。在形成二硫键和可能螯合方面,这种氨基酸在蛋白质结构中极为重要。半胱氨酸在人体内不是必需氨基酸,因为丝氨酸和甲硫氨酸能形成它。不过,因为甲硫氨酸是必需氨基酸,在某些情况下向膳食中加入半胱氨酸会促进生长,因为这样能节约形成半胱氨酸所需要

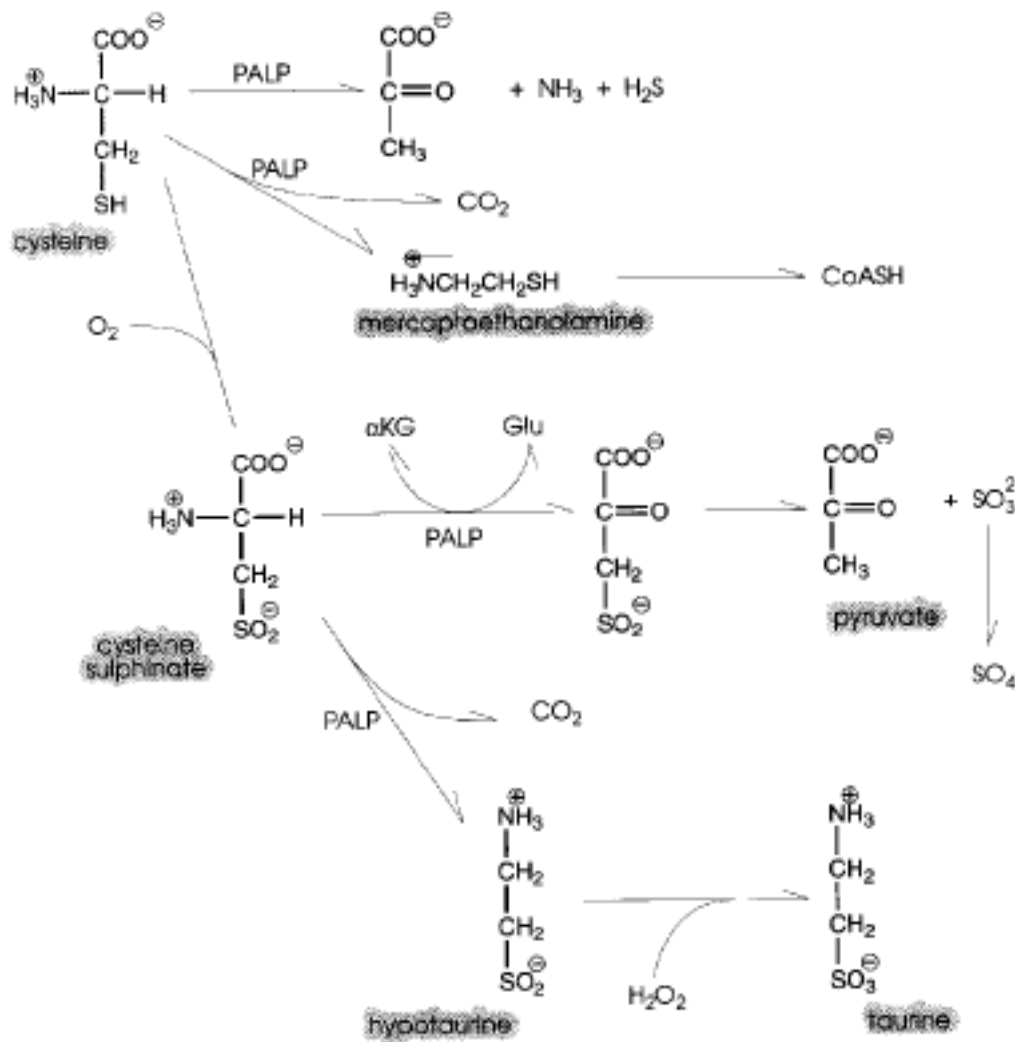


图 18.3 半胱氨酸分解代谢的几条途径

的甲硫氨酸的量。因此,当膳食中甲硫氨酸少时,半胱氨酸对生长可能有利。许多种蛋白质中含硫氨基酸很少,因此,这种甲硫氨酸-半胱氨酸的关系可能很重要。

半胱氨酸有许多可能的代谢途径。在摄入的半胱氨酸少时,半胱氨酸脱巯基酶可能是最重要的。这种酶需要吡哆醛磷酸作为辅酶并催化脱去 H_2S 的反应,就像丝氨酸脱水酶的脱水反应一样。于是终产物就是丙酮酸、氨和 H_2S 。这条途径会产生丙酮酸这种葡糖异生的前体。不过,这条途径必须受到限制,特别是在半胱氨酸过量的时候,因为所产生的 H_2S 有剧毒(图 18.3)。

半胱氨酸在需要吡哆醛磷酸(PALP)的半胱氨酸脱羧酶的催化下,会脱羧而形成巯基乙醇胺。巯基乙醇胺能与泛酸化合形成辅酶 A 或变成脂肪酸合酶的泛解酰部分。巯基乙醇胺是辅酶 A 中活跃的部分,来自已脱羧的半胱氨酸的 SH 基与酰基结合即形成硫酯。半胱氨酸也能被氧化,需要氧,在 SH 基氧化后产生半胱亚磺酸。半胱亚磺酸又可有两种变化。一种是氧化和脱羧,产生牛磺酸,牛磺酸有许多重要的功能,从眼睛的结构和心脏的功能到胆盐如牛磺胆酸的形成。半胱亚磺酸也能形成丙氨酸和硫酸盐。这一反应中所形成的硫酸盐是硫酸的重要来源,在膳食中硫酸盐低时尤为重要。某些含硫酸的多糖类如粘多糖的形成就需要硫酸盐。半胱氨酸也是谷胱甘肽的关键组分,这种三肽在高铁血红蛋白还原为血红蛋白、解毒、蛋白质中二硫键还原为巯基以及氨基酸转运方面都是重要的。

18.5 胱氨酸

仅在血液中有极少量游离的胱氨酸。当两个 SH 基团被氧化成二硫键时,大多数半胱氨酸以胱氨酸的形式存在。胱氨酸在需要处或需要时会被还原成半胱氨酸。通常肾脏吸收半胱氨酸和胱氨酸。在患胱氨酸尿这种疾病时,胱氨酸向许多细胞的运输受到干扰。这就使得血浆中胱氨酸增多,于是尿中出现胱氨酸。胱氨酸溶解度小,在肾、膀胱和尿道中会形成结石,这是极端痛苦的。pH 降低时,胱氨酸的溶解度变小。

18.6 支链氨基酸

有 3 种支链氨基酸:亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。对于高等动物,包括人在内,这些都是必需氨基酸,因为在体内不能从头合成。它们都能发生转氨作用,所以 D 型(经 D-氨基酸氧化酶的作用)和酮基氨基酸的衍生物都可用于形成 L-氨基酸,供生长和蛋白质合成之需。在成年人体内,蛋白质处于中性平衡状态;所以每天摄取的所有支链氨基酸的等当量的分子都必须发生分解代谢,虽然分解的不一定就是所摄取的分子。所摄取的支链氨基酸大多会掺入到蛋白质中;不过在蛋白质降解过程中会释放等当量的支链氨基酸。

(一) 降解

所有这 3 种氨基酸的代谢都类似,这是合乎逻辑的,因此在此一并讨论,并指出其微小差别。这些氨基酸的代谢从转氨作用开始, α -酮戊二酸是受体。这一反应的产物是谷氨酸和支链氨基酸的相应 α -酮基衍生物;这一反应是可逆的。支链氨基酸代谢的独特方面是它们是必需氨基酸中其降解的第一步是可逆反应。降解的这一方面比其他氨基酸以单向反应为第一步的情况较难控制。降解的第二步发生在线粒体中,是支链酮酸的不可逆的氧化性脱羧反应,由支链酮酸脱氢酶催化,形成的是支链脂肪酰脱氢酶。此反应的机理与丙酮酸脱氢酶的完全相

同。

支链氨基酸代谢中可能有助于其控制的方面是肌肉中其转氨酶活性很高,肝中几乎无活性,而肾中则活性中等;支链 α -酮酸脱氢酶的活性则在肝和肾中很高而肌肉中不高。肌肉中进行分解代谢而来自支链氨基酸的氮以丙氨酸的形式(如前面在丙氨酸循环中所述)或以谷氨酸的形式运至肝和肾中。此途径的第二步是不可逆的,也是支链氨基酸降解中的限速步骤。因此,相当比例的支链氨基酸可在肌肉中发生完全的代谢,尽管其中支链酮酸脱氢酶活性不高,但由于肌肉组织量大,这些氨基酸的代谢仍起着很大作用。也已证明血液循环中还有相当量的支链氨基酸;它们可在肝和肾中发生分解代谢。肌肉、肾脏、肝脏和其他组织在支链氨基酸代谢中的相对作用仍有争论,有待阐明。不过,肌肉在这一降解作用中显然有相当的作用。不同组织中主要活性是分开的这一点可能起着重要的控制作用。假若转氨作用发生在肝中,其中 α -酮酸的形成必定很快,而且会发生迅速的分解代谢。迅速除去酮酸又会将转氨作用推向支链 α -酮酸形成的方向。这就会引起支链氨基酸的缺乏。转氨作用发生在肌肉中就避免了这种缺乏,而且其中的氧化性脱羧的活性又不高。

(二) 支链酮酸脱氢酶的控制

支链氨基酸分解代谢的控制在于支链 α -酮酸酶的活性。这种类似于丙酮酸脱氢酶的酶可存在于两种状况:有活性的未磷酸化的状态和无活性的磷酸化的状态。专一的蛋白激酶使支链 α -酮酸脱氢酶磷酸化,这两种酶均定位于线粒体中。激酶为支链 α -酮酸所抑制;因此,当这种酮酸过量时,酶就不被磷酸化而有活性,于是过量的支链氨基酸就发生分解代谢。线粒体中还有支链 α -酮酸脱氢酶的磷酸酶,可使磷酸化的酶变回到有活性的状态。这样,支链氨基酸分解代谢的主要控制在于支链 α -酮酸脱氢酶的活性,而这种活性又为磷酸化作用控制,控制磷酸化的主要是专一的激酶和磷酸酶。

(三) 异亮氨酸

异亮氨酸是支链氨基酸中可以进行深入研究的好例子。缬氨酸和亮氨酸代谢的独特方面已经很清楚。转氨作用和氧化性脱羧作用形成支链脂肪酰 CoA 之后,利用 FAD 在 α -和 β -碳之间形成双键;然后加水形成 β -羟基衍生物(图 18.4)。然后依赖于 NAD^+ 的脱氢酶产生支链脂肪酰 CoA 的酮基衍生物。应该注意此处与直链脂肪酸氧化的相似性。这种酮基片段在辅酶 A 参与下形成乙酰 CoA,乙酰 CoA 或是进入柠檬酸循环,或是转变为酮体和丙酰 CoA,这是能产生葡萄糖的。虽然肌肉不能进行葡糖异生作用,但丙酰 CoA 可转变为柠檬酸循环的中间产物并进一步形成谷酰胺,谷酰胺可被运至肝和肾中。然后肝和肾利用氮产生尿中的氨,并将碳用于葡糖异生。丙酰 CoA 转变为琥珀酸之后,就能用于补充肌肉中柠檬酸循环的中间产物。所以,异亮氨酸既能产生葡萄糖,又能产生酮体。缬氨酸分解代谢的终产物主要是甲基丙二酸单酰 CoA,它能转变为柠檬酸循环的中间产物琥珀酰 CoA。甲基丙二酸单酰 CoA 是丙酰 CoA 与琥珀酸之间的中间产物。因此,缬氨酸是严格的产生葡萄糖的氨基酸,因为它不能形成酮体的前体。亮氨酸的代谢产生 β -羟基- β -甲基戊二酰 CoA(HMG CoA),它可分裂为乙酰乙酸和乙酰 CoA。所以这种氨基酸是严格的产生酮体的。

(四) 槭糖浆尿毒症

所有三种支链氨基酸的 α -酮基衍生物均存在于这种病人的尿中。氨基酸的转氨作用是

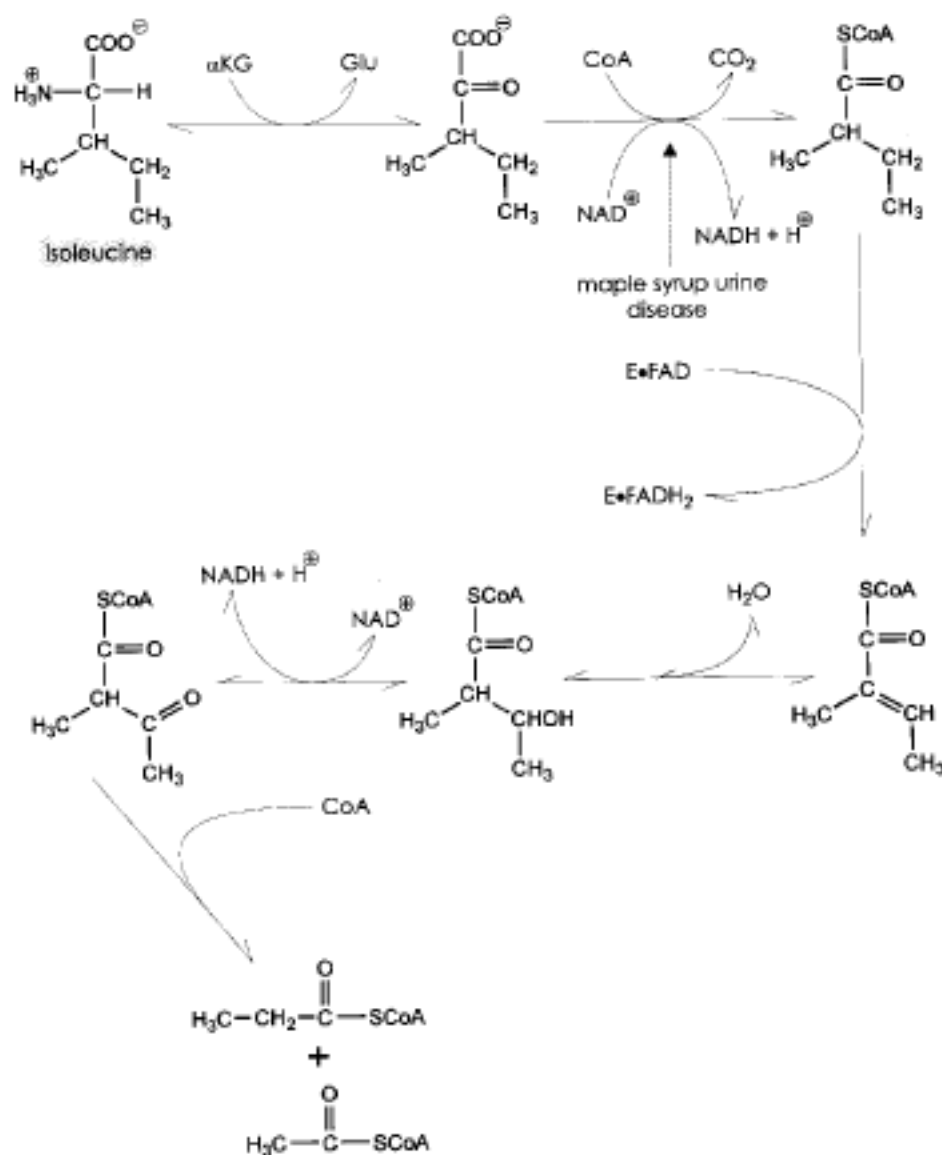


图 18.4 异亮氨酸的分解代谢

以支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)代谢为代表,示异亮氨酸的分解代谢。这些反应可发生于多种组织中(详见正文),槭糖浆尿毒症是相应的酶缺乏时发生的疾病。

正常的,但与 β -酮酸衍生物的氧化作用有关的酶(支链 β -酮酸脱氢酶)却有遗传上的缺陷或缺失。因此,就会有支链氨基酸和酮酸的积累,因为这二者是成平衡的。这使中枢神经系统的功能发生障碍,这种功能可能与中性氨基酸运入脑中有关。这种疾病的发病率约为 1/200000。槭糖浆尿毒症可用营养法治疗,不过效果并不太好,即用支链氨基酸含量低的膳食,以防止血液中这些氨基酸及相应 β -酮酸的积累。应该注意,病人对这些氨基酸的需要与生长有关,达到成年阶段后,需要极少。

尿中 β -酮酸的积累比氨基酸多,因为肾脏适应于有效地再吸收氨基酸,而对于支链 β -酮酸的再吸收却不那么有效。因而,漏掉的 β -酮酸就比氨基酸多。当我们讨论与芳香族氨基酸代谢有关的疾病时会看到同样的情况,即尿中的 β -酮酸比氨基酸多。

18.7 赖氨酸

赖氨酸和苏氨酸一样,是绝对的必需氨基酸,任何 D-氨基酸或酮酸都不能替代它而用于形成 L-赖氨酸以用于蛋白质的合成。赖氨酸的降解不通过 α -氨基的转氨作用。第一步是独特的。赖氨酸直接与 β -酮戊二酸反应,形成 α -氨基上的还原性复合物,利用的是 NADPH (图 18.5)。这一复合物然后利用 NAD^+ 发生氧化性分裂,形成谷氨酸和一个在原来赖氨酸的 γ -基

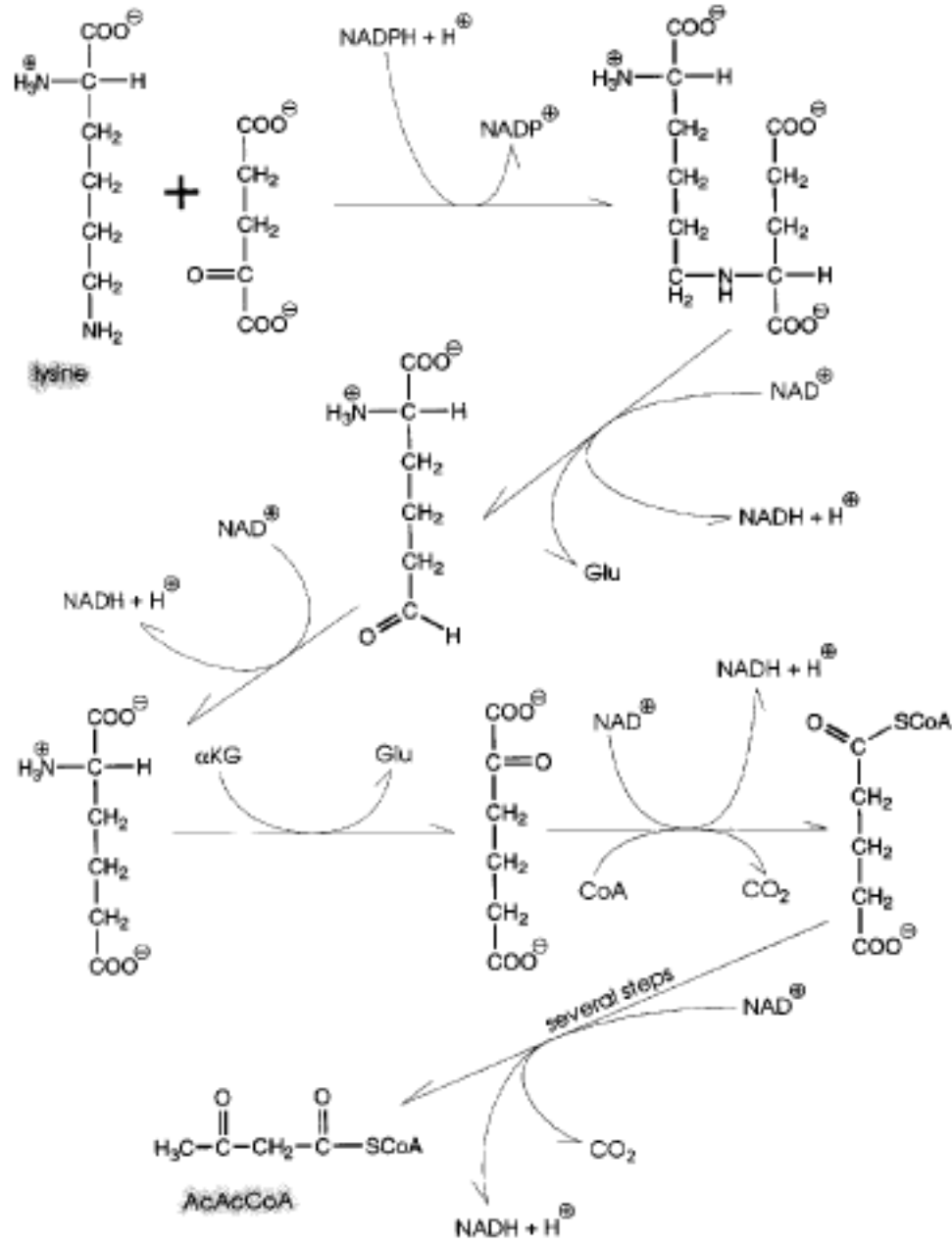


图 18.5 赖氨酸代谢——赖氨酸转变为乙酰乙酰 CoA 的途径示意

团上的醛(即 ϵ -氨基己二酸半醛)。 ϵ -氨基己二酸半醛然后经过许多代谢转化形成乙酰乙酰 CoA, 即一种酮体; 所以赖氨酸是严格的产生酮体的。赖氨酸的降解说明了氨基酸代谢的一个重要方面, 即所有必需氨基酸降解的第一步都是单向步骤, 但支链氨基酸是例外, 第二步才是单向反应。第一步是单向反应, 就易于控制必需氨基酸的水平和降解。降解的酶的 K_m 都比较高, 这保证了过量的氨基酸会迅速被代谢, 而当氨基酸浓度低时, 降解速率较低。对必需氨基酸总是有需要的, 因为即使浓度相当低, 也总有一些分解代谢在进行。赖氨酸和甲硫氨酸一起, 是肉毒碱的前体。

18.8 含硫氨基酸

有两种含硫氨基酸: 半胱氨酸和甲硫氨酸。半胱氨酸的代谢前面已讨论过。前面讲到甲基化作用时曾提到甲硫氨酸, 但没有详细讨论。甲硫氨酸是膳食中的必需氨基酸, 但值得注意的是, 过量却有毒。在正常食物中, 这不会成为问题; 不过, 在许多强化食物中, 是加了甲硫氨酸的, 因为许多植物蛋白质中, 含硫氨基酸少。对素食者这可能是一个问题, 他们想增加含硫氨基酸的摄入量而服用甲硫氨酸片太多, 这种药片药房均有售。

(一) 甲硫氨酸的分解代谢

甲硫氨酸可以发生转氨作用; 不过转氨作用通常是甲硫氨酸代谢的终点。甲硫氨酸代谢的主要途径是与 ATP 反应, 产生 S-腺苷甲硫氨酸、无机磷酸和焦磷酸(图 18.6)。焦磷酸被分解, 保证了这一反应的单向机制。S-腺苷甲硫氨酸中腺苷基连在甲硫氨酸的硫原子上。这种化合物(缩写为 SAM) 在供应甲基方面是有效的。生物体系中大多以来自 SAM 的甲基供给有关受体。这些甲基可用于形成肌酸、胆碱、褪黑素、肾上腺素等。甲基被转移后, SAM 就分离为腺苷和高半胱氨酸。高半胱氨酸与半胱氨酸极为相近, 只是多了一个亚甲基。许多对半胱氨酸起作用的酶都不与这种同系物起反应。高半胱氨酸的分解代谢是与丝氨酸反应形成胱硫醚同时失去水。胱硫醚又在胱硫醚酶催化下加水在原来形成二硫键处两个硫之间发生分裂, 形成半胱氨酸和高丝氨酸, 即比丝氨酸多一个亚甲基的同系物。体内所合成的半胱氨酸中的碳原子来自丝氨酸, 硫则来自甲硫氨酸, 高丝氨酸中的碳也来自甲硫氨酸。这就是为什么认为

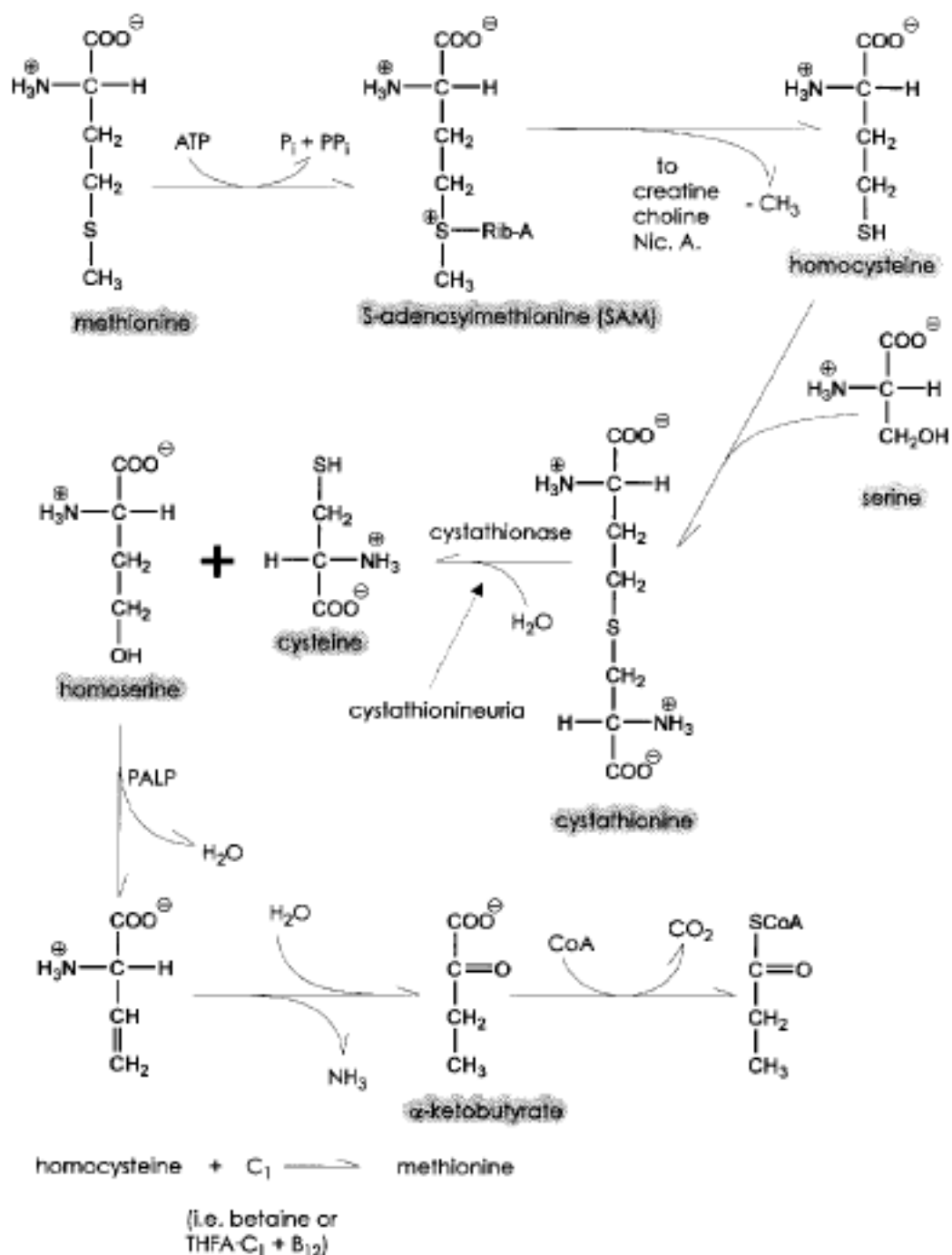


图 18.6 甲硫氨酸代谢的主要途径
包括甲基的供给、半胱氨酸的形成和高半胱氨酸的可能的再甲基化(胱硫醚尿是缺乏胱硫醚酶的一种疾病)。

半胱氨酸不是必需氨基酸的原因——它可由甲硫氨酸形成。因为这些反应中许多都是生理上不可逆的,所以半胱氨酸不能产生甲硫氨酸。当一种必需氨基酸能产生一种非必需氨基酸时,就会有一种节省效应。比如,在有半胱氨酸时,对甲硫氨酸的需要量就比没有半胱氨酸时多。在没有半胱氨酸时必须有足够的甲硫氨酸以执行甲硫氨酸的全部功能,同时又产生所需要的全部半胱氨酸。

高丝氨酸和丝氨酸一样,通过脱水酶反应产生一种中间产物,此中间产物又发生重排形成一种氨基酸,这种氨基酸又自行水解,产生氨和 β -丁酮酸(丙酮酸的同系物,多一个亚甲基)。在线粒体中, β -丁酮酸可在 β -酮酸脱氢酶催化下形成丙酰 CoA,此反应需要辅酶 A、硫胺素、焦磷酸和 NAD^+ 。丙酰 CoA 可重排形成琥珀酸,然后形成可以生成葡萄糖的草酰乙酸。通过这一途径的甲硫氨酸的分解代谢大都发生在肝脏中,甲硫氨酸转变为葡萄糖的可能性在这里可以实现。不过,这种代谢有些是在其他组织中发生的,因为像褪黑素和肾上腺素这样一些化合物的形成是在肝脏以外的组织中进行的。

(二) 胱硫醚尿

胱硫醚尿这种遗传病的原因是胱硫醚酶有缺失或缺乏。在这种情况下,胱硫醚积累并从尿中排出。因此,几乎所有与摄取量相当的甲硫氨酸都以胱硫醚的形式排泄到体外。假若胱硫醚丢失了,人体就不能将甲硫氨酸或高半胱氨酸转变为半胱氨酸。所以,这种病的患者就需要半胱氨酸,对于这些人,半胱氨酸成了必需氨基酸。

(三) 高半胱氨酸的再度甲基化

与半胱氨酸对甲硫氨酸的节约效应有关的重要因素就是高半胱氨酸有两个可能的代谢去向这一事实。第一个,如前所述,是形成胱硫醚,它又能导致半胱氨酸的形成。第二个是与 C-1 片段的转甲基作用,C-1 片段或是来自甜菜碱(胆碱的代谢物),或是来自 N^5 -甲基四氢叶酸(此反应也需要维生素 B_{12}),作用的结果是再形成甲硫氨酸。这样形成的甲硫氨酸可以或是参与蛋白质合成,或是成为甲基供体,使许多化合物甲基化,如前所述。因此,所形成的高半胱氨酸有可能在被 S-腺苷甲硫氨酸甲基化之后,再转变为甲硫氨酸,这种甲硫氨酸然后可以参与进一步的甲基化作用或是转变为胱硫醚,这就是再形成甲硫氨酸这一过程的终点。产生胱硫醚然后产生半胱氨酸的相对比例会因膳食中无半胱氨酸而增高,又因膳食中有半胱氨酸而降低,这就解释了半胱氨酸的节约效应。不过,在任何情况下这种再度甲基化的效率都不足以形成足够的甲硫氨酸而无胱硫醚的损失。总会有一定量的高半胱氨酸通过胱硫醚而被破坏。因此,在循环使用方面,高半胱氨酸不像某些辅酶如四氢叶酸或 NAD^+ 那样有效。

18.9 脂肪转运因素

脂肪转运因素是将三酰甘油从肝脏转运到脂肪组织中进行贮存时所需要的。这些因素是不能从膳食中的非脂肪转运组分合成的。脂肪转运因素的主要作用是形成磷脂酰胆碱,这是形成 VLDL 所必需的。

一种脂肪转运因素显然是胆碱,这是能掺入磷脂酰胆碱的。另外两种脂肪转运因素是与胆碱的可能的从头合成有关的。第一种也是最重要的一种就是甲硫氨酸,当膳食中没有胆碱时,能用它供给甲基以形成胆碱,于是就能让脂质从肝脏运到脂肪组织中(图 18.7)。

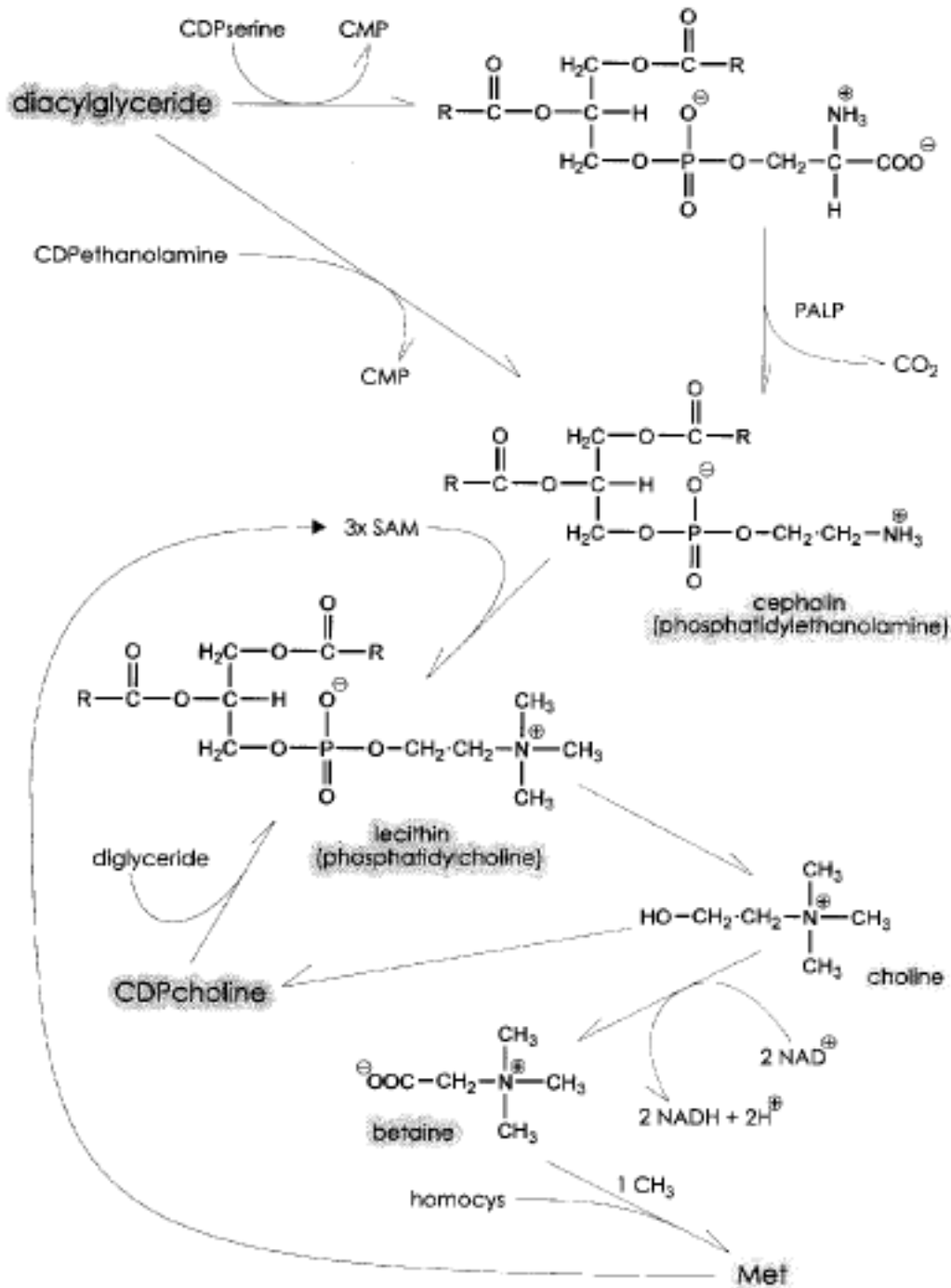


图 18.7 脂肪转运因素

此图为卵磷脂(磷脂酰胆碱,为三酰甘油由肝脏转运至脂肪组织或肌肉所必需)形成的几种主要途径,包括完全的从头合成、由胆碱形成和甜菜碱使高半胱氨酸(胆碱的分解代谢产物)再度甲基化。

第二种脂肪转运因素是甜菜碱,因为至少其中的一个甲基转移到高半胱氨酸上是非常有效的,能够补充甲硫氨酸以用于胆碱的形成。没有足够的脂肪转运因素时,就会出现脂肪肝,或是摄取的、或是肝中合成的脂肪,不能足量地运送到脂肪组织中。当脂肪进入肝脏或在肝脏中被合成时,它们就被重新包装或包装成 VLDL,以备移出并通过血液运往脂肪组织。VLDL 含有蛋白质、三酰甘油、胆固醇、胆固醇酯和磷脂,特别是磷脂酰胆碱(卵磷脂)。假若某人缺乏蛋白质或者缺乏脂肪转运因素,三酰甘油就不能有效地从肝脏转运到脂肪组织,脂肪肝就会发展。膳食中可能有胆碱而不需要从头合成。磷脂的合成已在前面(第 15 章)讨论过。

胆碱也发生分解代谢,因此需要不断补充。胆碱的分解代谢主要在肝脏的线粒体中进行,其乙醇的部分会被 2 分子 NAD^+ 氧化,产生甜菜碱。甜菜碱通常将其中的一个甲基供给高半胱氨酸而形成甲硫氨酸,如前所述;其余 2 个甲基则或是以 CO_2 的形式或是以 C-1 片段的形式被释放。

18.10 甘氨酸：利用甘氨酸形成共轭产物或其他产物

甘氨酸结构非常简单, 无 D-或 L-型。对人而言, 甘氨酸不是膳食中所必需的。它可由丝氨酸酶促合成, 去掉一个 C-1 单位(即羟甲基), 反应需要四氢叶酸。此反应足够快, 足以满足包括人在内的大多数哺乳类的需要。逆向途径也能发生, 即将羟甲基加到甘氨酸上。不过这个反应不快或不起重要作用。若甘氨酸转变为丝氨酸, 它就变成能生成葡萄糖的了。不过因为这个途径相当慢, 所以甘氨酸为葡萄糖合成提供碳的速率要比能产生葡萄糖的其他氨基酸慢。甘氨酸分解代谢中量最大的反应是由肾脏中的一种酶甘氨酸氧化酶(含有 FAD 的酶)催化的, 此反应直接产生氨和乙醛酸。这种酶是适应酶, 当人饥饿时, 或进食高蛋白的膳食时, 其活性非常高。所以, 假若对饥饿的动物大量饲喂甘氨酸, 它可能产生大量氨。

可以通过许多途径除去乙醛酸。对人而言, 最有利的是形成 CO_2 和一种四氢叶酸 C-1 片段, 而后这种片段可贮存在 C-1 库中。乙醛酸也可被 NAD^+ 氧化, 产生草酸。草酸是一种螯合剂, 能与钙反应形成不溶性的草酸钙。如果量足够, 草酸钙可在肾脏、膀胱和尿道中形成结石。

甘氨酸对于某些解毒作用也很重要。例如, 苯甲酸是许多食物中添加的防腐剂, 可因与甘氨酸发生共轭作用而被解毒, 共轭形成酰胺键, 产生马尿酸。马尿酸可通过肾脏迅速被除去。与羧基形成酰胺键并非苯甲酸所独有。它也以甘氨酸胆酸(甘氨酸与胆酸结合)和牛磺胆酸(牛磺酸与胆酸的结合)的形式存在, 这二者都是重要的胆盐。

甘氨酸在嘌呤合成中也很重要。在哺乳动物体内, 这是一个在量上重要的过程, 但并非甘氨酸或氮的主要代谢途径。这与对鸟类或爬行动物的观察结果不同, 这些动物体内, 嘌呤是氮素代谢的终产物。甘氨酸也是卟啉类的重要前体, 卟啉可形成血红素, 存在于血红蛋白和细胞色素中。第 20 章中将详细讨论嘌呤和卟啉的合成。

18.11 肌酸：肌酸的合成和肌酸酐排泄的控制

甘氨酸在肌酸合成中也很重要。肌酸在肌肉中特别重要, 以磷酸肌酸的形式贮存能量(图 18.8)。肌酸生物合成的第一步是由一种转酰酶催化的, 精氨酸的胍基转移到甘氨酸上形成胍基乙酸。这一步在肾脏中进行。在肾中进行的优点是其中精氨酸的活性低, 所以精氨酸能在其中积累到相当的量, 如以前讨论精氨酸合成时所述。假若这一反应在肝中进行, 它就很难与活性非常高的精氨酸酶竞争。胍基乙酸通过血液运至肝中, 与 S-腺苷甲硫氨酸反应, 将甲基转移到胍基乙酸上形成肌酸。这一反应发生在肝中的优点是这一器官是甲硫氨酸的分解代谢和 S-腺苷甲硫氨酸形成的主要部位。因此, 在形成肌酸方面是两种器官合作, 在贮存能量方面, 还有第三种器官(肌肉)的参与。这与支链氨基酸的代谢和精氨酸的生物合成类似; 由此可见, 在许多情况下, 要由几种器官共同合作以完成一种生物合成或生物降解途径。然后肌酸被运出肝外并通过血液运至肌肉中, 并于此处在此肌酸激酶的催化下被磷酸化为磷酸肌酸。磷酸肌酸可迅速水解高能磷酸键, 再生 ATP。肌酸的磷酸化作用继续不断地进行, 速率中等, 其反应是肌酸加 ATP 形成磷酸肌酸和 ADP(图 18.9)。在大多数组织中, 这一反应达到或接近平衡。其逆反应(即磷酸肌酸加 ADP 形成肌酸和 ATP)则进行得快得多, 这对于在需要 ATP 时从磷酸肌酸再得到高能磷酸是有利的。在许多情况下, 肌肉中所含的磷酸肌酸多达 ATP 的 4~5 倍。磷酸肌酸会自发地环化而形成肌酸酐, 因为胍基磷酸中的高能键并不是非常稳定的。每天约有 1.5% 的磷酸肌酸发生环化。肌酸酐的惟一命运就是从尿中被排泄掉。

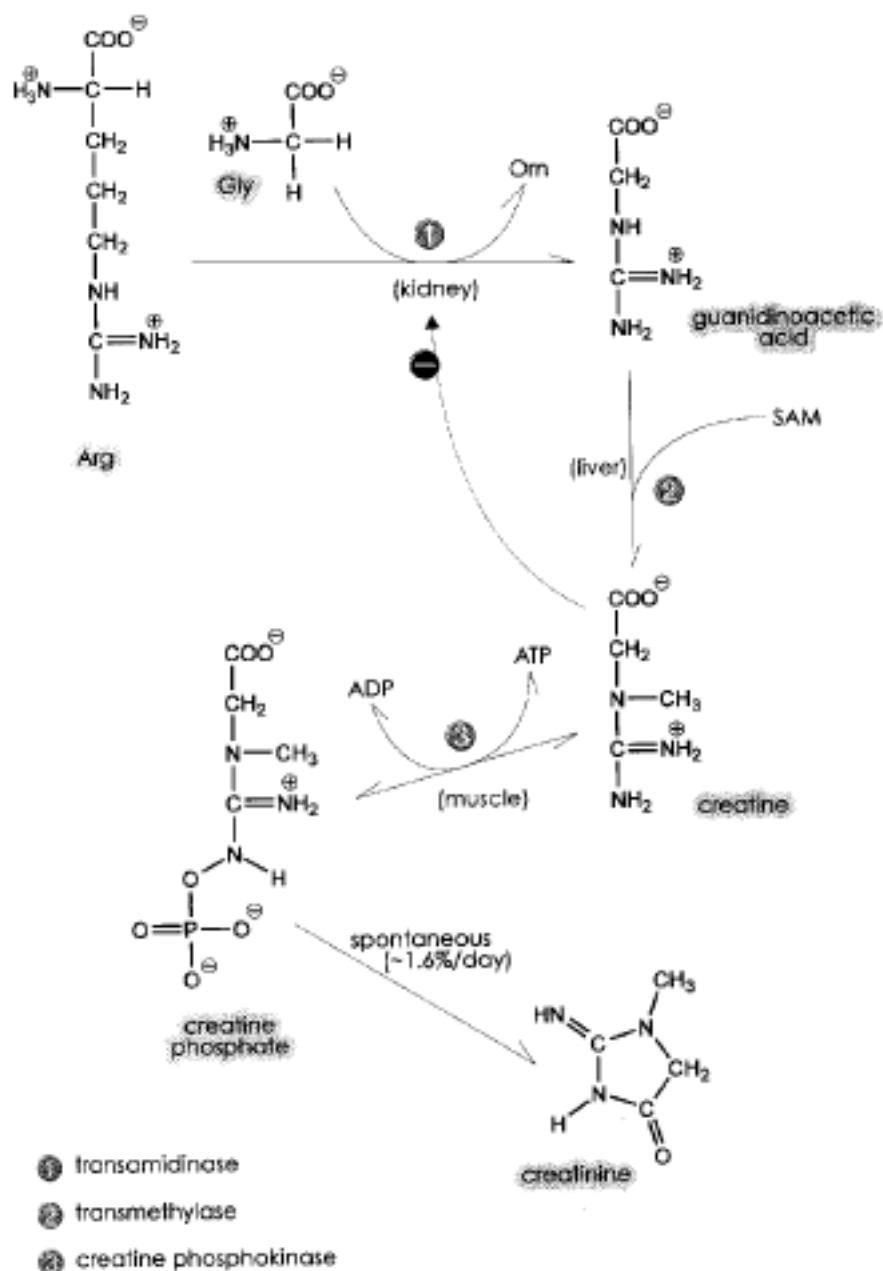


图 18.8 肌酸的合成及其主要控制

括弧中为发生各反应的组织, 图中还有磷酸肌酸形成肌酸酐的过程(详见正文)。

肌酸的合成受到良好的控制。控制发生在肾脏中的转酰胺基酶的步骤上。若饲喂肌酸, 转酰胺基酶的量就会显著下降。因此, 肌酸的过量产生就可以避免。饲喂肌酸酐对转酰胺基酶毫无影响, 因为肌酸酐仅仅是一种终产物, 是要被排泄掉的。

肌酸酐的产量是比较恒定的, 因为肌肉中磷酸肌酸的浓度是比较恒定的, 而且有一定比例

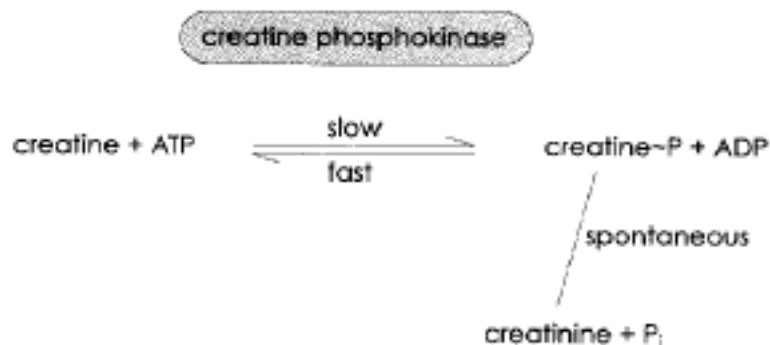


图 18.9 肌酸磷酸激酶

示磷酸肌酸的形成及其再形成 ATP 的利用。

会转变为肌酸酐,而肌酸酐只能被排泄掉。因此,在 24 小时的周期内,排出的肌酸酐的量是比较恒定的,在研究单个的尿样时,这一点是有用的。在临床实验室中,化验师测定的是尿中每克肌酸酐有多少所要测定的物质。这就部分地校正了饮用大量水而使尿稀释或饮水量显著减少而使尿浓缩所产生的误差。因为大部分肌酸酐是在尿中排泄的,所以血液中肌酸酐增多通常表明肾脏失调。

18.12 小 结

(1) 除赖氨酸和苏氨酸外,所有的氨基酸都能发生可逆的转氨作用。除赖氨酸和亮氨酸外,所有的氨基至少能部分地产生葡萄糖(即提供形成葡萄糖的碳原子)。

(2) 通过丙氨酸转氨酶,丙氨酸能形成丙酮酸或反之。

(3) 丙氨酸以无毒性的形式将氮从外周运至肝中以进行尿的合成;这是丙氨酸循环的一部分。

(4) 丙氨酸是肝脏中丙酮酸激酶的负效应物,可使葡糖异生作用进行得更快。

(5) 肝脏中由糖酵解的一种中间产物和来自谷氨酸的氮形成丝氨酸。肝脏中的转氨作用或一种脱水酶使丝氨酸降解。

(6) 丝氨酸是磷脂、甘氨酸和半胱氨酸的前体。

(7) L-苏氨酸是膳食中绝对的必需氨基酸。肝中的脱水酶或一种专一的醛缩酶能使苏氨酸降解。

(8) 半胱氨酸是含硫氨基酸。半胱氨酸是巯基乙醇胺、牛磺酸和硫酸盐的前体。半胱氨酸能够可逆地被氧化为胱氨酸。

(9) 支链氨基酸亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的代谢途径类似。它们主要在肌肉中发生转氨作用,然后在许多种组织中发生氧化性脱羧,形成支链脂肪酰 CoA。

(10) 这些支链脂肪酰 CoA 的代谢方式均类似。

(11) 支链氨基酸的正常分解代谢中第一步是可逆的而第二步是不可逆的,这在必需氨基酸中是独一无二的。

(12) 支链氨基酸代谢的控制在于支链酮酸脱氢酶。此酶被磷酸化即形成无活性的形式,而去磷酸化后则成为有活性的形式。

(13) 没有足够的支链 α -酮酸脱氢酶会引起槭糖浆尿毒症,导致支链 α -酮酸的排泄。对这种疾病可用营养疗法。

(14) L-赖氨酸是绝对的必需氨基酸。赖氨酸能产生酮体,也是肉毒碱的前体。

(15) 甲硫氨酸可发生可逆的转氨作用,主要形成一种死端终产物。

(16) 甲硫氨酸的正常分解代谢是转变为 S-腺苷甲硫氨酸。在许多甲基化作用中,它是重要的甲基供体。甲基化作用后形成的是高半胱氨酸。

(17) 高半胱氨酸可由甜菜碱或四氢叶酸- C_1 再形成甲硫氨酸。不过,大部分高半胱氨酸与丝氨酸结合形成胱硫醚。胱硫醚的裂解形成半胱氨酸和高丝氨酸。因此半胱氨酸不是必需氨基酸,但是它有节约甲硫氨酸的作用。

(18) 在遗传上缺失胱硫醚酶时就会发生胱硫醚尿。有这种病时,胱硫醚从尿中排出,半胱氨酸成为必需氨基酸。

(19) 甲硫氨酸、甜菜碱和胆碱是脂肪转运因素。它们有助于磷脂酰胆碱的形成,这是将

脂肪从肝中运到其他组织中所需要的。关键是胆碱的形成。胆碱可在肝中经由甜菜碱而被代谢。

(20) 甘氨酸的分解代谢产生 CO_2 、C-1 片段或草酸。甘氨酸也能形成丝氨酸, 发生共轭而形成胆酸, 或作为嘌呤和血红素合成的前体。

(21) 肌酸是由甘氨酸、精氨酸和甲硫氨酸形成的。第一步在肾脏中, 是受到精细控制的。第二步在肝脏中。肌酸主要是在肌肉中以磷酸肌酸这种贮存高能磷酸的形式起作用。磷酸肌酸会自发地环化形成肌酸酐, 从尿中排出。

参 考 资 料

- The regulation of the degradation of methionine and of the one-carbon units derived from histidine, serine, and glycine, H. A. Krebs and R. Hems, 1976, *Adv. Enzyme Reg.*, 493 ~513.
- Metabolism of sulfur-containing amino acids, M. H. Stipanuk, 1986, *Ann. Rev. Nutr.*, 6: 179 ~209.
- Regulation of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease, R. A. Harris, B. Zhang, G. W. Goodwin, M. J. Kuntz, Y. Shimomura, P. Rougraff, P. Dexter, Y. Zhao, R. Gibson, and D. W. Crabb, 1991, *Adv. Enzyme Reg.*, 1991, 245 ~263.
- Disorders of branched chain amino acid and keto acid metabolism, D. J. Danner and L. J. Elsas, II, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, 671 ~692.
- Disorders of transsulfuration, S. H. Mudd, H. L. Levy, and F. Skovby, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, 693 ~734.

复 习 题

1. 在体内, 甘氨酸是由什么形成的?
 - a) 天冬氨酸
 - b) 丝氨酸
 - c) 苏氨酸
 - d) 组氨酸
 - e) 色氨酸
2. 在氨基酸代谢中作为辅酶而起最大作用的维生素是:
 - a) 叶酸
 - b) 硫胺素
 - c) 核黄素
 - d) 吡哆醛
 - e) 生物素
3. 半胱氨酸不是哪种化合物的前体?
 - a) 硫酸酯
 - b) 牛磺酸
 - c) 甲硫氨酸
 - d) 谷胱甘肽
 - e) 巯基乙醇胺

4. 膳食中必须以 L-氨基酸(游离的或在蛋白质中的)的形式存在的必需氨基酸是:
 - a) 赖氨酸
 - b) 色氨酸
 - c) 甲硫氨酸
 - d) 苯丙氨酸
 - e) 异亮氨酸
5. 丙氨酸的作用是将碳和氮
 - a) 从肌肉中运到肾中
 - b) 从肌肉中运到肝中
 - c) 从肝中运到肾中
 - d) 从芳香族氨基酸中运出
 - e) 从脑运至肝
6. 肌酸的合成需要
 - a) 甲硫氨酸、甘氨酸和丝氨酸
 - b) 精氨酸、甘氨酸和丝氨酸
 - c) 色氨酸、精氨酸和甘氨酸
 - d) 甲硫氨酸、色氨酸和甘氨酸
 - e) 甲硫氨酸、精氨酸和甘氨酸

参 考 答 案

1. b 丝氨酸可由丝氨酸羟甲基转移酶的作用产生甘氨酸和 THFA。
2. d 吡哆醇辅酶在转氨作用、脱水酶、胱硫醚合成和其他反应中均起作用。
3. c 虽然甲硫氨酸可形成半胱氨酸,但甲硫氨酸是膳食中的必需氨基酸,不能由半胱氨酸或存在于蛋白质中的任何其他氨基酸形成。
4. a 赖氨酸和苏氨酸是不能发生 α -转氨作用的独特的两种氨基酸。这两种必需以 L-氨基酸的形式被利用; D-氨基酸或酮酸不能代替 L-氨基酸。
5. b 氮可用于脲的合成,碳用于葡糖异生,二者都发生在肝中。
6. e 甘氨酸加精氨酸形成胍基乙酸,加上来自甲硫氨酸的甲基即形成肌酸。

第 19 章 芳香族氨基酸的代谢和蛋白质的经济利用

19.1 引言

本章讨论芳香族氨基酸,包括组氨酸的代谢。芳香族氨基酸是膳食中的必需氨基酸,但酪氨酸除外,因为苯丙氨酸可以形成酪氨酸。这些氨基酸中,每一种都有其独特的代谢,包括形成蛋白质以外的其他化合物,如神经递质、色素和维生素。有许多代谢病也与芳香族氨基酸代谢有关。本章最后讨论关于氮素的经济利用和蛋白质代谢的总的看法。

19.2 组氨酸

组氨酸好像对于成长中的和成年的动物都是必需的。在确定其重要性方面所以有困难是因为血红蛋白中组氨酸很多但人对它的需要量却很少;因此为了研究成年的、已停止生长的动物体内组氨酸的缺失花费了很长的时间。虽然组氨酸也能发生转氨作用,但这一反应不在其分解代谢途径中。 α -酮酸不能进一步分解而必须再经氨化作用回到组氨酸才能继续被分解。L-组氨酸降解的第一步是由组氨酸酶催化的生理上不可逆的步骤。这一步骤产生氨和组氨酸侧链中的一个双键(即产生尿刊酸),然后水再到双键上(图 19.1)。

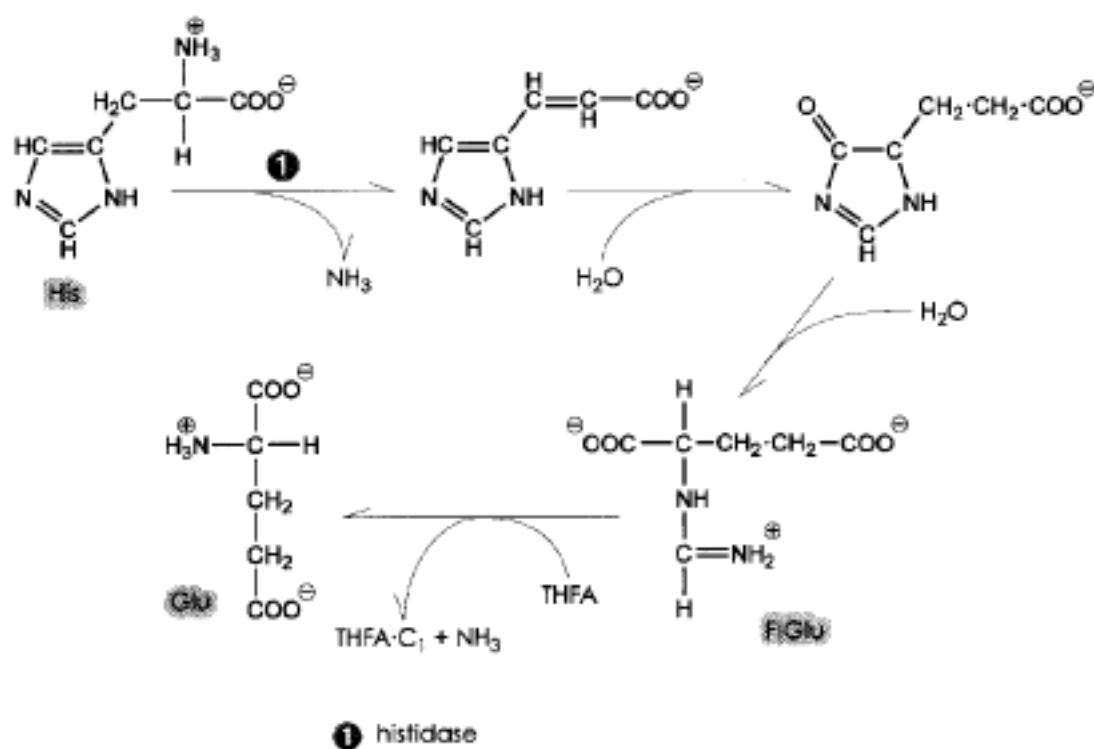


图 19.1 组氨酸的分解代谢

示组氨酸分解代谢的主要途径,形成氨和谷氨酸。

然后组氨酸的环破裂,加水产生一中间产物亚胺甲基谷氨酸。这一中间产物再转变为谷氨酸,这是由一种把亚胺甲基转移到四氢叶酸(THFA)的酶催化的,其反应即产生谷氨酸和N⁵-亚胺甲基 THFA。N⁵-亚胺甲基 THFA 再丢失 NH₃ 而转变为 N⁵, N¹⁰-亚甲基 THFA。THFA

参与亚胺甲基谷氨酸(FIGlu)转变的这一现象可用于检测可能的叶酸缺乏。假若给一个人大量的组氨酸,通常它会被分解为 C-1 片段、氨和谷氨酸,体内对所有这些产物的处理都很迅速。假若缺乏叶酸,则 FIGlu 就不能以与组氨酸代谢相匹配的速率转变为谷氨酸,于是 FIGlu 在血液中积累而从尿中排出。所以,尿中 FIGlu 增多就表明叶酸的缺乏。这在量上是组氨酸代谢的主要途径。因此,组氨酸根本上是一种能够产生葡萄糖的氨基酸,因为谷氨酸能够产生葡萄糖。

在此处,以及在研究芳香族氨基酸的代谢时,重要的是区分量上重要的流通量(如组氨酸变为谷氨酸)和质上重要的流通量——这是极端重要的——即使只有很小一部分氨基酸经过这种途径被代谢。组氨酸的另一条代谢途径在质上是重要的但量上是次要的,这就是由组氨酸脱羧酶所催化的组氨酸的脱羧反应,形成的是组胺。在对于许多种细胞的和躯体的伤害的响应中,组胺在生理上和药理上都是重要的。所形成的组胺有两种氨基方面的功能,一个是在碳链中,一个是在环内。组胺是二胺氧化酶的良好底物,这种酶有助于破坏组胺。二胺氧化酶是黄素酶,它催化伯胺的氧化,产生醛和氨;醛被氧化成酸,同时还原 NAD^+ ;酸可以进一步被代谢或被排泄掉,使得组胺被破坏,于是组胺的响应就不再继续下去了。因此,在许多过敏反应中先是形成组胺,发挥其作用,然后将其破坏。

19.3 苯丙氨酸和酪氨酸

苯丙氨酸和酪氨酸是密切相关的氨基酸。这两种氨基酸的代谢在医学上是重要的,理由有二:(i)许多种代谢病都与这两种氨基酸的代谢有关;(ii)蛋白质以外的许多种重要的生物化合物都是由这两种氨基酸形成的。苯丙氨酸可转变为酪氨酸,这是单向的、生理上不可逆的反应。苯丙氨酸是必需氨基酸,必须由膳食中供应,但酪氨酸不是必需氨基酸,因为可由 L-苯丙氨酸形成。然而,这种关系也很像前面讨论过的半胱氨酸和甲硫氨酸的关系一样;膳食中所需要的苯丙氨酸的量决定于其中酪氨酸的量,也就是说,酪氨酸含量越低,所需要的苯丙氨酸就越多。这就称为酪氨酸对苯丙氨酸需要的节约效应。

(一) 苯丙氨酸转变为酪氨酸

苯丙氨酸的分解代谢主要发生在肝中,第一步是由苯丙氨酸羟化酶催化的在对位上的羟化作用,形成 L-酪氨酸。此反应需要氧、NADH 和一种蝶呤衍生物。反应序列遵循必需氨基酸的一般规则——分解代谢的第一个步骤是不可逆反应。苯丙氨酸也能发生转氨作用形成苯丙酮酸,氨基受体可以是丙酮酸或 α -酮戊二酸,形成的分别是丙氨酸或谷氨酸。不过这是一个死端反应,因为没有苯丙酮酸的代谢途径。身体利用苯丙酮酸的惟一途径就是将苯丙酮酸再行氨化回到苯丙氨酸,再经由苯丙氨酸羟化酶进行分解代谢。所以,和甲硫氨酸一样,酮基衍生物是膳食中 L-氨基酸的良好前体。

(二) 苯丙酮尿

因缺乏苯丙氨酸羟化酶而产生的疾病主要是苯丙酮尿(PKU)。这种病如不治疗,会引起智力衰退,但不会像某些其他代谢病那样在早期就是致命的。这种疾病似乎起因于常染色体的一个隐性基因,两个这种基因的载体会生出患苯丙酮尿的后代,一个载体和一个患者也会生出这种后代。两个患者一定会生出患者。苯丙酮尿症也和槭糖浆尿毒症一样,可用营养法治

疗; 应从婴儿时起就用低苯丙氨酸的膳食, 使之能满足生长的需要。患苯丙酮尿的成年人则需要最低量的苯丙氨酸以维持生命, 因为这种氨基酸的分解代谢含量极少。PKU 的患者体内苯丙氨酸羟化酶不一定是 100% 的缺乏。可能有少量活性, 但是最低量, 不足以把苯丙氨酸以足够高的速率转变为酪氨酸。在这种病的患者体内似乎会产生苯丙氨酸羟化酶的蛋白质; 然而由于突变, 它没有酶活性。患这种病时, 苯丙氨酸不能转变为酪氨酸。于是血液中的苯丙氨酸增多。因为苯丙氨酸和它的酮酸是通过转氨作用而成平衡的, 所以血液中的酮基衍生物, 即苯丙酮酸, 也会同时增多。苯丙氨酸及其酮基衍生物都会从尿中排出, 但酮基衍生物较多, 因为肾脏没有重新吸收许多苯丙酮酸的能力。所以尿中苯丙酮酸(一种苯酮)较多, 苯丙酮尿因此而得名。PKU 的问题在于苯丙氨酸及其衍生物过量, 而不是不能合成酪氨酸(假若膳食中有足够量的酪氨酸)。对 PKU 患者, 酪氨酸成为一种必需的氨基酸, 因为这些人不再能从苯丙氨酸合成酪氨酸。

19.4 酪氨酸的分解代谢

酪氨酸有两个主要来源——一个是膳食中的酪氨酸, 另一个是由苯丙氨酸转变来的酪氨酸。酪氨酸的进一步代谢有多种不同的途径; 在量上占主要的代谢途径发生在肝脏中。差不多所有必需氨基酸(但支链氨基酸除外)的代谢都发生在肝脏中。酪氨酸发生转氨作用, 以 α -酮戊二酸为受体, 形成 p -羟基苯丙酮酸和谷氨酸(图 19.2)。

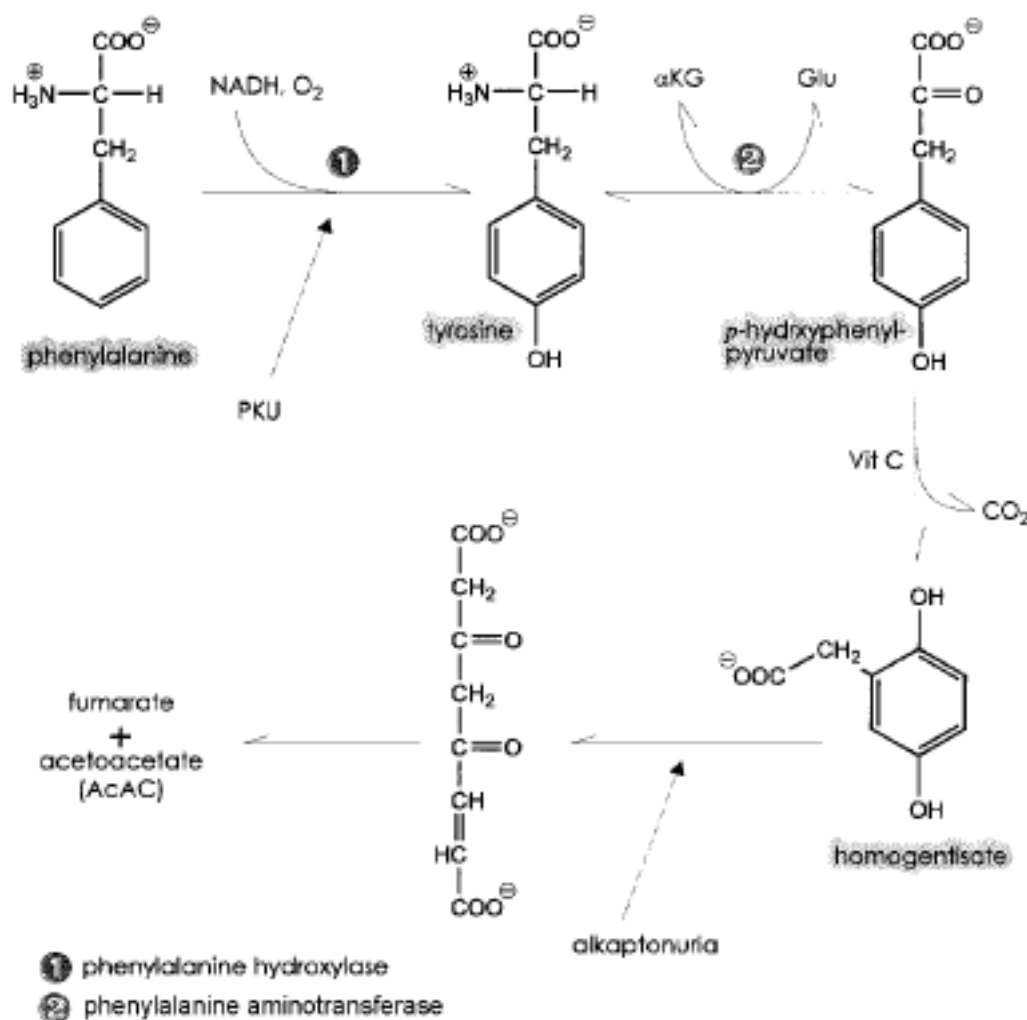


图 19.2 苯丙氨酸和酪氨酸分解代谢的主要途径
延胡索酸和乙酰乙酸的命运为本书读者所熟悉, 故未列出。

尿黑酸症为缺少该反应的酶所致的疾病。

这一反应完全是可逆的。因此, 酪氨酸不是必需氨基酸, 其第一步的可逆性并没有扰乱必

需氨基酸分解代谢在生理上是不可逆的这一法则。对-羟基苯丙酮酸是由一个复杂的反应所形成的,反应中酮基衍生物丢失羧基的 CO_2 ,环被羟基化,剩下的碳链仍在苯环上。这一反应需要抗坏血酸(维生素 C)。大多数动物能合成自身所需的抗坏血酸,但人、高等灵长类和豚鼠则否,所以可能患坏血症。测试某人是否患坏血病的方法之一就是输入酪氨酸。如果没有足够的抗坏血酸,本途径的第一个中间产物对-羟基丙酮酸就不能发生进一步的转变而在血液中积累并从尿中排出。

通常,对-羟基苯丙酮酸是转变为尿黑酸。尿黑酸的进一步代谢是在尿黑酸氧化酶的催化下打开苯环并异构化为延胡索酰乙酰乙酸,后者又裂解而形成乙酰乙酸(即产生酮体)和延胡索酸(能生成葡萄糖)。延胡索酸可通过柠檬酸循环而转变为草酰乙酸然后进入葡糖异生途径。

还有另一种与酪氨酸分解代谢有关的疾病名为尿黑酸症。这种病的患者体内没有尿黑酸氧化酶,因此尿黑酸积累并从尿中排出。尿黑酸在苯环上有两个羟基,所以它是一种鸡纳酚。这些羟基可被氧化为酮基,所形成的化合物有颜色,所以会有黑色的尿(尿黑酸症)。这种疾病不是致死的,但会在晚年发生关节炎。对代谢的影响很小,不能获得苯丙氨酸和酪氨酸代谢的正常产物和由此产生的能量,还有失去了从这两种芳香族氨基酸形成葡萄糖的可能。

苯丙氨酸和酪氨酸都能生成葡萄糖和酮体。虽然这些分子有 9 个碳,它们仍然只能产生葡萄糖分子的一半。因此,在大多数情况下,不管有多少个碳原子,能生成葡萄糖的氨基酸都只能产生半个葡萄糖分子。从丙氨酸(只有 3 个碳,只能产生相当于半个葡萄糖的部分)到苯丙氨酸和酪氨酸(有 9 个碳原子,然而仍然只能产生半个葡萄糖)都是如此。即使有 11 个碳原子的色氨酸,在其分解代谢过程中也只能形成葡萄糖的一半。

(一) 酪氨酸的其他产物

从酪氨酸可以形成许多重要的产物,虽然在量上不如上述的那么重要,但在质上却极端重要。这些化合物有甲状腺素这种激素,这是连在肽键上的酪氨酸在甲状腺中发生碘化并且一个芳香环移位而形成的。

酪氨酸还在中枢神经系统和黑素细胞中有重要作用,又是黑素和儿茶酚胺(肾上腺素和去甲肾上腺素)的前体。转变为这些产物的过程发生在适当的组织中,通常是黑素细胞、中枢神经系统或肾上腺中。在上述各种组织中,酪氨酸酶催化酪氨酸转变为二羟苯丙氨酸(DOPA,多巴),其反应是使环上靠近对位羟基的碳被羟基化,这是儿茶酚环。如果这是一个胺而不是氨基酸,它就是儿茶酚胺。DOPA 是肾上腺和中枢神经系统中儿茶酚胺的前体。在黑素细胞中,DOPA 转变为黑素。白化病就是黑素细胞中缺乏酪氨酸酶,但其他组织中仍有其同功酶,所以用于生成激素的儿茶酚胺的形成仍是正常的(图 19.3)。已经清楚地观察到白化病人体内仍能形成足够量的肾上腺素和去甲肾上腺素(儿茶酚胺),与不患白化病的人无异,但是不能有正常的色素形成。

(二) 儿茶酚胺的形成

二羟苯丙氨酸是有生物活性的胺类的重要前体,它们作用于全身,包括中枢神经系统。在中枢神经系统和肾上腺中,以及其他一些组织中,DOPA 脱羧(需要吡哆醛磷酸)形成多巴胺。然后多巴胺第 2 位上的侧链发生羟基化作用,转变为去甲肾上腺素。在形成去甲肾上腺素和

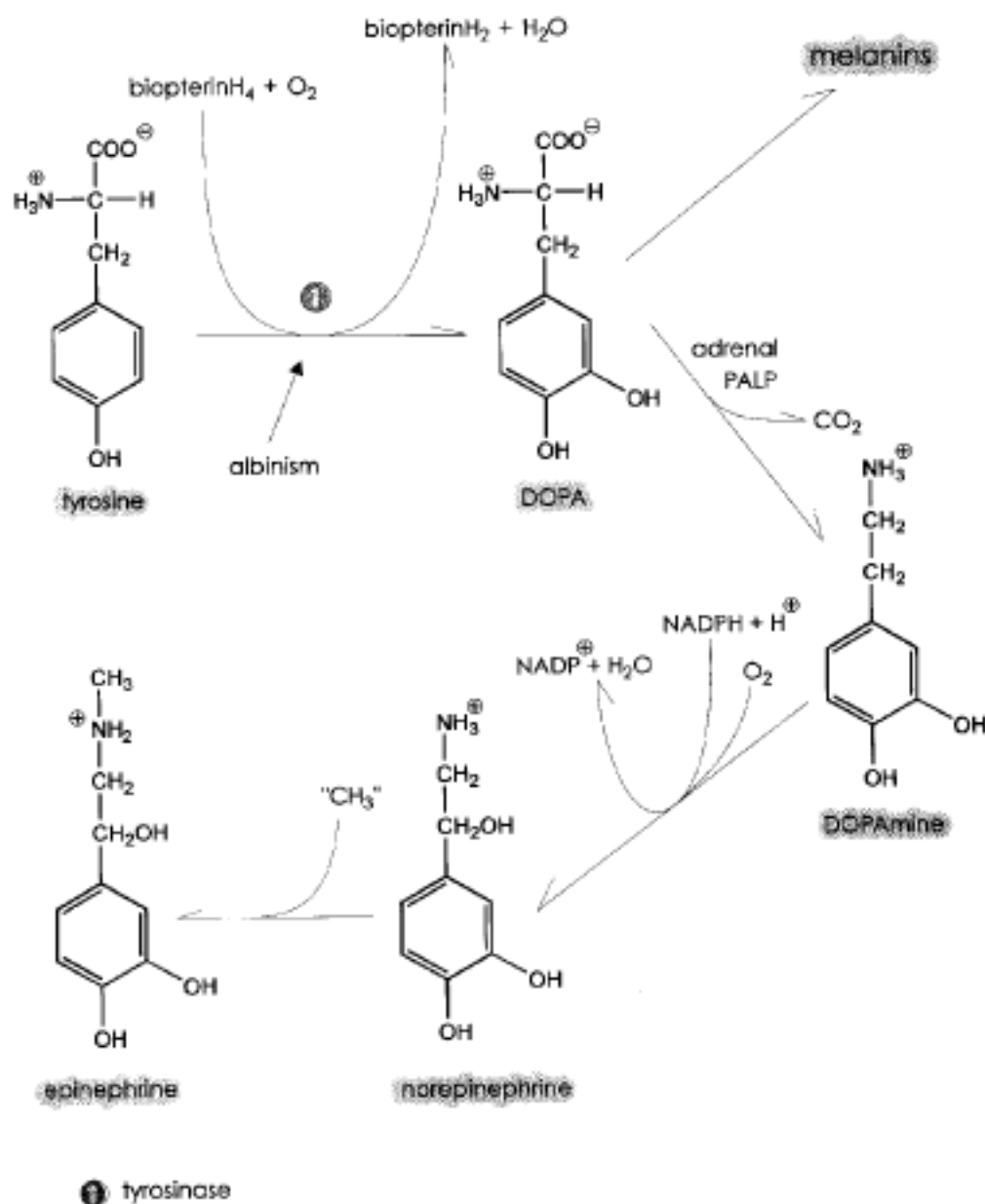


图 19.3 儿茶酚胺的形式

示酪氨酸转变为儿茶酚胺和黑素的大意。白化病是缺乏酪氨酸酶所致(患者缺乏黑素细胞中酪氨酸酶的同功酶,但不缺乏其他组织中的同功酶)。

肾上腺素的过程中,这一羟基化作用可能是决定速率的反应。去甲肾上腺素是神经末梢和组织内的主要信使。这种激素是单胺的优点在于:当一个信号从一个神经末梢转到另一个神经末梢后,在它作用后不久,单胺氧化酶就有可能破坏这种信使,使其作用的时间很短。这样它作为一种局部信号,而不是全身的信号就更为有效。在肾上腺中,来自 S-腺苷甲硫氨酸的甲基用于去甲肾上腺素的甲基化,产生肾上腺素。肾上腺素不是伯胺,而是仲胺,不是单胺氧化酶的底物。因此,它可被释放到血液中作为一种循环流动的激素而没有被广泛存在的单胺氧化酶破坏的危险。肾上腺素通常是通过环上一个羟基的甲基化而不是胺的氧化而被代谢以排出体外的。

(三) 帕金森(Parkinson 氏)病

在帕金森病的治疗中,存在着解剖学与生物化学之间有趣的相互关系。解剖学家注意到在帕金森病患者脑的黑质中没有色素形成。这说明可能缺乏足够的 DOPA 和多巴胺,因此可能缺乏去甲肾上腺素。生物化学家认识到这些途径的相互关系,在临床实验中用 L-DOPA 进行治疗, DOPA 确实进入了中枢神经系统。这就使得色素的形成比较正常,缓解了帕金森病的

许多症状。目前已用这种化合物的其他衍生物进行治疗。不过, 第一例成功的治疗还是用 L-DOPA 进行的。即使多巴胺似乎是更为有效的药剂, 但其使用有两个困难: 多巴胺是很强的神经递质, 能被单胺氧化酶破坏; 更大的问题是大多数胺类都不能越过血液-脑之间的障碍而进入脑中。可是 L-DOPA 却各方面都像芳香族氨基酸而不像胺, 所以它能进入脑和中枢神经系统, 在其中脱羧, 并转变为色素和去甲肾上腺素。

19.5 色氨酸

色氨酸是膳食中的必需氨基酸。色氨酸能发生转氨作用; 可是和苯丙氨酸和组氨酸一样, 这种转氨作用是死端, 对于主要的分解代谢, 酮基衍生物还须再发生转氨作用, 再形成 L-色氨酸, 才能发生进一步的正常降解。色氨酸的代谢也和其他芳香族氨基酸的一样, 有在量上占主要地位的途径, 也有某些在质上非常重要的途径。在量上占主要地位的途径是色氨酸加氧酶所催化的五元环的破裂, 形成 N-甲酰犬尿氨酸, 然后它再水解, 形成甲酰胺和犬尿氨酸(图 19.

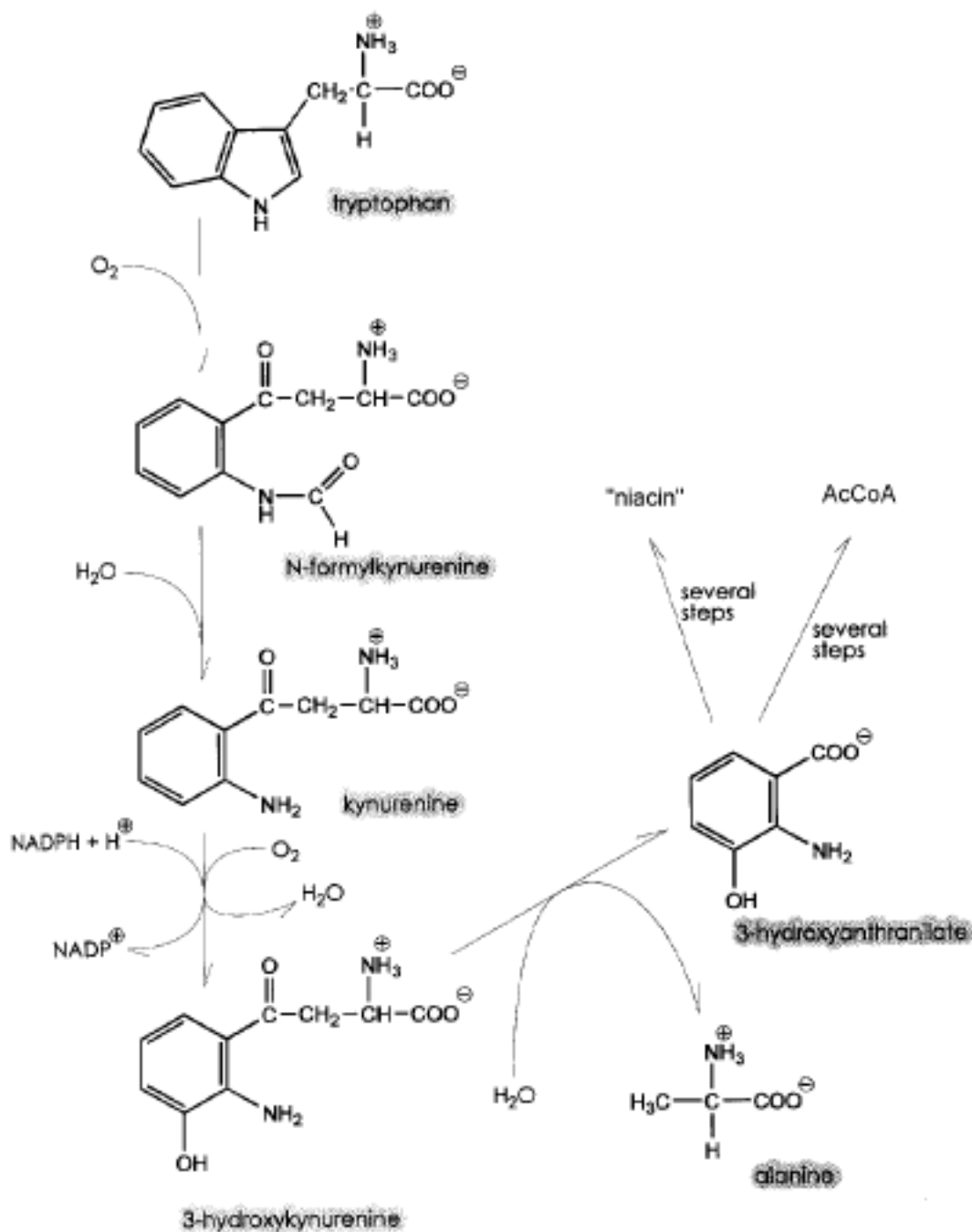


图 19.4 色氨酸分解代谢的主要途径

色氨酸分解代谢前面的步骤详细, 3-羟基邻氨基苯甲酸到烟酸和乙酰 CoA 的步骤不详细。

4)。随后发生许多其他步骤, 包括侧链的裂解, 产生丙氨酸。如前所述, 丙氨酸是能生成葡萄

糖的氨基酸,因此色氨酸也能形成葡萄糖。代谢作用的进行会产生 3-羟基邻-氨基苯甲酸。从这里就出现了分支;主要的方向是产生乙酰 CoA 类,是不能形成葡萄糖的,一条次要的途径则可产生烟酸。显然,能够转变为烟酸的不会多于色氨酸的 1/6。对于蛋白质含量正常的膳食,这足以满足对烟酸的需要。烟酸缺乏病是糙皮病,通常只在用蛋白质含量低的膳食时才会发生这种疾病,特别是质量低劣的食物,如加过工的玉米,其中色氨酸和烟酸含量都低。在 20 世纪 30 年代,这曾经是主要的营养缺乏病,今天我们已经认识了这种疾病及其疗法,此病已很不普遍。

(一) 5-羟基色氨酸及其衍生物

色氨酸代谢的另一条在质上重要,但在量上次要的途径是 5 位上的羟基化。此途径可能在许多组织中发生,但主要是在脑和松果体中特别重要。这种酶好像很特别,对色氨酸的 K_M 相当高。因此,若色氨酸不足,蛋白质合成会正常进行,因为活化色氨酸使形成氨酰 t-RNA 的 K_M 低;但此时色氨酸的羟基化却有问题(图 19.5)。

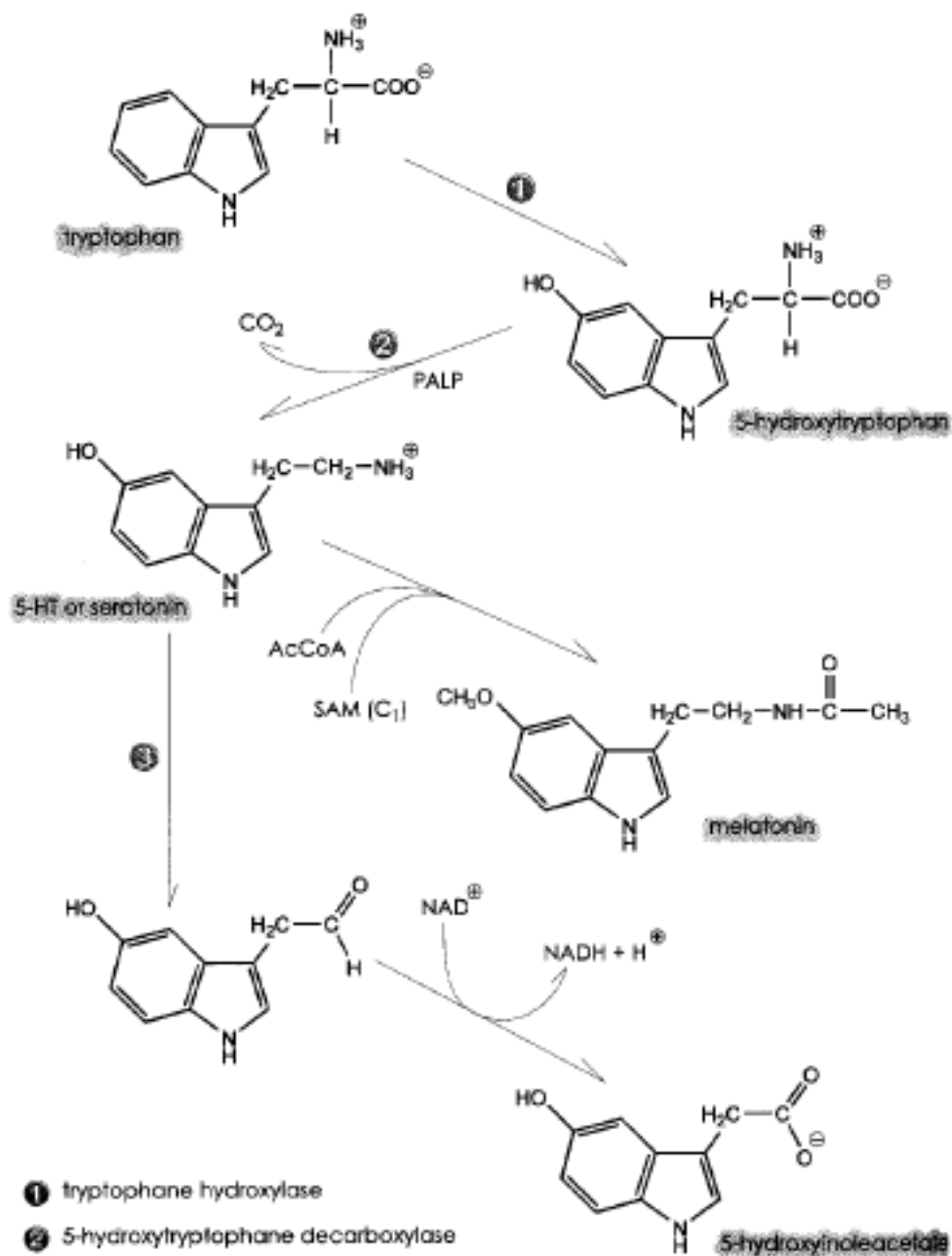


图 19.5 色氨酸在 5 位上的羟基化途径及其产物

图示包括 5-羟色胺的形成及其降解产物 5-羟吲哚乙酸以及褪黑素的形成(详见正文)。

色氨酸的羟基化产生 5-羟基色氨酸,然后它又在需要 PALP 的色氨酸脱羧酶催化下脱羧,

产生 5-羟色胺。在正常的脑功能和镇定安神方面 5-羟色胺是重要的化合物。因此,通过这一途径发生的对色氨酸代谢的扰乱都会引起精神上的扰乱。单胺氧化酶(一种黄素酶)可以破坏 5-羟色胺,这是一个不可逆的反应,产生氨和 5-羟吲哚乙醛。这种醛会迅速被酶促氧化,利用 NAD^+ 形成 5-羟吲哚乙酸,随后这种酸被排出体外。可以根据尿中 5-羟吲哚乙酸的输出量测定 5-羟色胺的形成和周转。

未经治疗的苯丙酮尿患者,其尿中 5-羟吲哚乙酸的量显著减少,表明过量苯丙氨酸干扰了这一系统。这可能是由于脑中吸收芳香族氨基酸的竞争和(或)脑中羟化酶的抑制或相关联的酶的变化。如给这种病的患者以低苯丙氨酸的膳食,5-羟吲哚乙酸的排泄就会恢复正常。这说明患者体内在没有过量苯丙氨酸时在摄取色氨酸和使之羟化方面没有什么根本的缺陷。

(二) 单胺氧化酶

单胺氧化酶能破坏许多种胺,包括去甲肾上腺素、5-羟色胺等等,此酶能影响脑中这些胺的相对水平。因此,在某些情况下,当这些胺的水平显然低时,可用单胺氧化酶抑制剂的一种药物或一组药物对病人进行治疗。在许多情况下,这些药物可以引起正当智力功能的恢复。然而服用这些药物的病人必须禁用某些食物,特别是发酵过分的食物,如瑞士乳酪。这些食物含有大量酪胺,如不被破坏,有致命危险。通常,酪胺在到达中枢神经系统并发生有害作用之前,就已被单胺氧化酶迅速破坏。然而在单胺氧化酶的抑制剂存在之下,这种破坏作用降至最低,酪胺可能产生极端有害的作用。

(三) 褪黑素

5-羟色胺在松果体中的另一个命运是氨基被乙酰化并有 S-腺苷甲硫氨酸的甲基加到羟基上形成褪黑素。在动物由于日照长度变化而发生的季节性习性中,这种化合物起着重要的作用。这种色素使鸟类在适当时候向北或向南迁飞,使北极兔改变毛中的色素形成,夏天变黑而冬天变白(因此名为褪黑素,因为它影响这些动物体内的黑素)。它也能影响人的行为,使其行为随季节和白天所得到的光量而变化,这种重新调节可能需要一些适应时间,特别是从北半球旅行到南半球时。

19.6 总论:蛋白质的经济利用

虽然各种氨基酸的结构差别很大,但大多数氨基酸都产生少数几种进入主要代谢途径的核心化合物。所有这些氨基酸都能有效地产生丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、琥珀酸、延胡索酸、乙酰乙酸或乙酰 CoA(图 19.6)。因此不会形成许多异常的化合物,那需要有一组新的酶推动代谢作用。这也有其优越之处,因为被降解的氨基酸中的碳就能统统进入代谢的主要途径,得到正常的代谢控制。

蛋白质和氨基酸总是在周转之中的。没有原样不变而贮存的蛋白质;所有的蛋白质都有其功能。这与糖类和脂质恰好相反,糖类以糖原为贮存形式,脂质以三酰甘油为贮存形式。为了使细胞和动物能够重新塑造其代谢机构,蛋白质必须不断地变换——被分解为氨基酸又被重新合成——这使得蛋白质能够重新被分配,而蛋白质和氨基酸的总量又不必发生变化。当蛋白质降解并产生氨基酸时,体内的一些氨基酸也会降解,因而膳食中需要蛋白质。蛋白质之所以需要是为补偿被分解的氨基酸。假设人体内的状况是氨基酸分解代谢减少到零,那么就

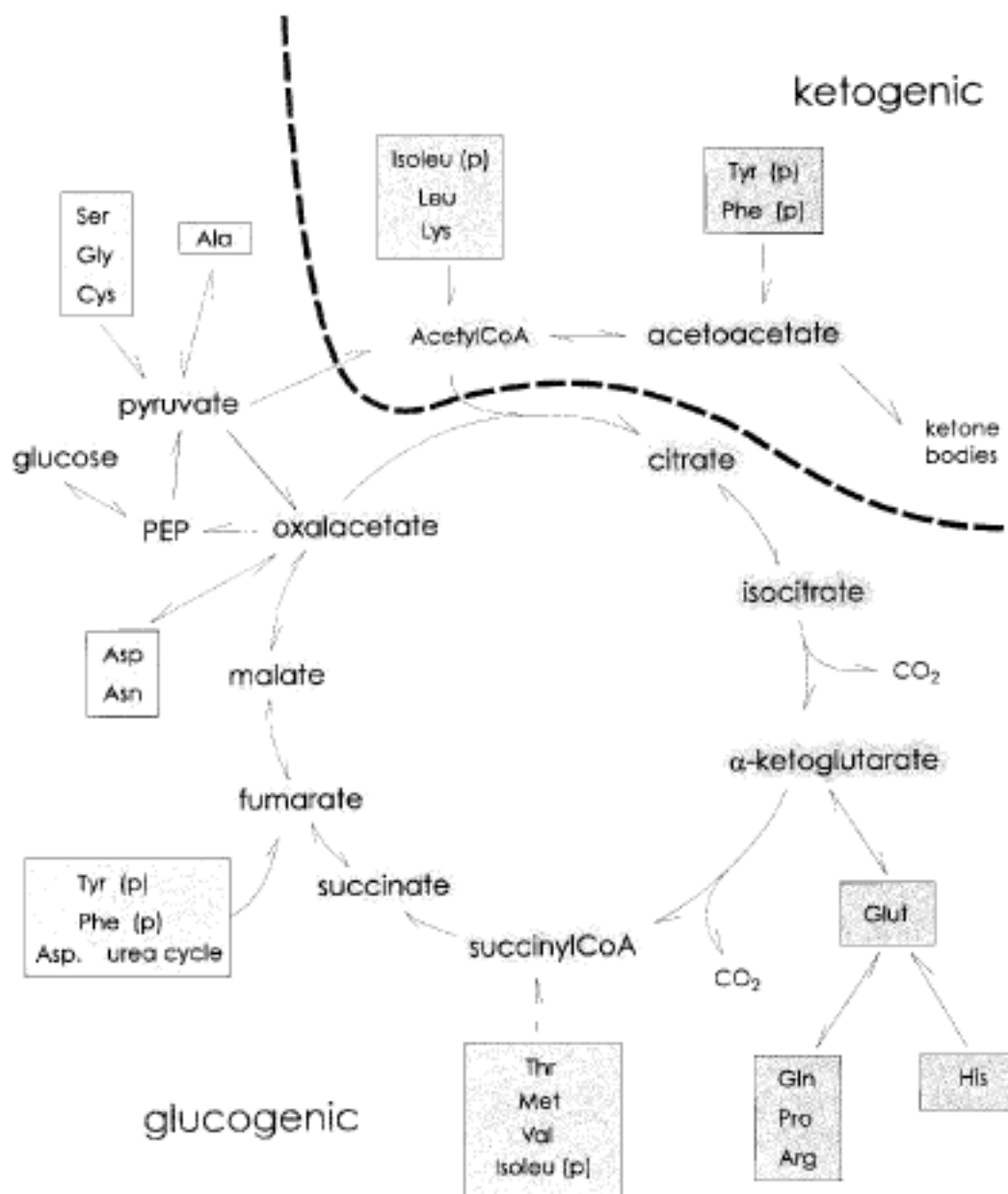


图 19.6 形成共同代谢中间产物的氨基酸的主要去向

虚线以上的化合物是生成酮体的, 以下是生成葡萄糖的; 后面有 (p) 的氨基酸, 因其代谢既形成生成酮体的产物, 又形成产生葡萄糖的产物, 故其分布于虚线两边。

会不需要(或需极少量)膳食中的蛋白质。所有的氨基酸之所以需要,都是为了合成蛋白质。假若缺少一种氨基酸,合成的蛋白质就不充足。假设缺乏的氨基酸以正常的量存在,加上所有其他氨基酸所形成的正常蛋白质就会降解,这些氨基酸就不再是蛋白质合成的前体。缺乏一种氨基酸在代谢上比低蛋白膳食或饥饿更为严重,因为高蛋白会加速氨基酸的降解。由于蛋白质的周转,这会使得氨基酸的缺失更快,比低蛋白膳食或饥饿时缺失得更快。

在饥饿时,维持体内的蛋白质水平和血糖水平同样重要。因为大量贮存的脂质只能产生少量葡萄糖(即只有甘油能产生葡萄糖),所以只能依靠糖原和氨基酸来维持葡萄糖的水平。饥饿时尿中的氮含量数天后就下降,而且会继续下降到一个稳定的水平。这种下降的原因是脂肪酸和酮体用于产生能量,于是葡萄糖的利用减少了,而通过激素的作用,又降低了蛋白质的分解代谢。在尿中以氨的形式排泄的氮的百分率在饥饿开始时很低;长期饥饿后,尿中的氮约有 80% 以氨的形式排泄。这种变化的优点不仅是产生氨比产生脲在能量更为有利,而且因为作为铵离子前体的氨能提供一种阳离子以帮助身体保存钠、钾和其他矿质。在饥饿时这种阳离子特别重要,因为不仅尿是酸性的,而且会排泄酮体,而酮体需要阳离子与之配合。比如,铵离子就可以取代钠或钾离子。其次,假若铵离子都转变为脲,不仅会引起阳离子的损失,而

且还会产生 2 个氢离子,加重了对酸性条件的负担。患糖尿病会发生禁食或饥饿一样的问题。

19.7 小 结

(1) 组氨酸降解形成氨和亚胺甲基谷氨酸。后者能与四氢叶酸形成 N^5, N^{10} -亚甲四氢叶酸和谷氨酸。

(2) 组氨酸脱羧形成组胺。

(3) 苯丙氨酸是必需氨基酸,在肝中,在苯丙氨酸羟化酶催化下,它能转变为酪氨酸。如果遗传上苯丙氨酸羟化酶不够,就会发生苯丙酮尿症,排泄苯丙酮酸。对这种病人,酪氨酸就成为必需氨基酸。此病可以进食低苯丙氨酸的膳食来治疗。

(4) 酪氨酸的在量上占主要地位的分解代谢途径产生乙酰乙酸和延胡索酸。若缺少尿黑酸氧化酶,就会产生尿黑酸尿——黑色的尿。

(5) 酪氨酸也是甲状腺素、去甲肾上腺素、肾上腺素、DOPA 和黑素的前体。

(6) 色氨酸可通过一复杂途径转变为丙氨酸和乙酰 CoA。

(7) 色氨酸也是烟酸、5-羟色胺和褪黑素的前体。

(8) 大多数氨基酸的代谢都产生简单的代谢产物,这些产物极易参与代谢的主流,包括乙酰 CoA、糖酵解和柠檬酸循环中间产物。

(9) 蛋白质连续不断地发生周转。饥饿时,蛋白质分解代谢随时间而减慢,尿中的氮素从以脲为主变到以氨为主。

参 考 资 料

Regulation of the activity of hepatic phenylalanine hydroxylase, S. Kaufman, 1986, *Adv. Enzyme Reg.*, 37 ~ 64.

Phenylketonuria, R. Koch and E. Wenz, 1987, *Ann. Rev. Nutr.*, 7: 115 ~117.

Albinism, C. J. Witkop, Jr., W. C. Quevedo, Jr., T. B. Fitzpatrick, and R. A. King, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, Eds., 1989, pp. 2905 ~2947.

Alcaptonuria, B. N. LaDu, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, (Eds), 1989, McGraw-Hill, New York, pp. 775 ~790.

The hyperphenylalaninemias, C. R. Scriver, S. Kaufman, and S. L. C. Woo, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle, (Eds.), 1989, pp. 495 ~546.

复 习 题

1. 儿茶酚胺的前体是下列中的哪一种?

- 丝氨酸
- 酪氨酸
- 色氨酸
- 组氨酸
- 谷酰胺

2. 下列哪一种氨基酸在其正常代谢中产生氨?

- a) 苯丙氨酸
 - b) 酪氨酸
 - c) 丙氨酸
 - d) 组氨酸
 - e) 缬氨酸
3. 下列哪一种疾病可用减少膳食中苯丙氨酸含量的办法治疗?
- a) 尿黑酸尿
 - b) 苯丙酮尿
 - c) 白化病
 - d) Parkinson 氏病
 - e) 高血压
4. 5-羟色胺的前体是下列哪一种?
- a) 苯丙氨酸
 - b) 酪氨酸
 - c) 组氨酸
 - d) 色氨酸
 - e) N^5, N^{10} -亚甲 THFA
5. 饥饿(长期)时会出现下列哪一种情况?
- a) 氮和尿的排泄增多
 - b) 氮及氨所占的比例增加
 - c) 氮及氨所占的比例减少
 - d) 氮的排泄不变,但氨的比例增加
 - e) 氮的排泄减少,氨的比例增加
6. 谷酰胺不是下列哪一种的前体?
- a) 精氨酸
 - b) 脯氨酸
 - c) 蛋白质
 - d) 嘌呤
 - e) 组氨酸

参 考 答 案

1. b 酪氨酸是儿茶酚胺类的前体,儿茶酚胺类包括 DOPA、多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素。
2. d 组氨酸酶作用于组氨酸,直接产生氨。
3. b 苯丙酮尿是因为不能把苯丙氨酸以足够快的速率转变为酪氨酸以维持血液中苯丙氨酸的正常浓度。用低苯丙氨酸的膳食可以将血液中苯丙氨酸的浓度维持在较低和(或)正常的水平。
4. d 色氨酸,在 5 位上羟化并脱羧后,形成 5-羟色胺。
5. e 氮的排泄减少以保存体内的蛋白质;脂质也提供较大百分率的能量。以氨的形式(NH_4^+)排泄氮有助于酸碱平衡,特别是酮体的排泄增多时。用低苯丙氨酸的膳食有助于维持血液中苯丙氨酸浓度正常。
6. e 组氨酸是膳食中必需的氨基酸,不能由其他氨基酸形成。

第 20 章 嘌呤、嘧啶和血红素的代谢

20.1 引言

我们在这一章中研究嘌呤、嘧啶和血红素的合成和降解。它们的结构复杂,但却是由简单的前体合成的。这三种物质都能在体内合成,其作用从核酸到血红蛋白。除去讨论这三类物质合成的控制外,还要讨论有关的代谢病,特别是与嘌呤和血红素代谢有关的疾病。要谈到化疗中抗代谢物的使用以及使用的基本原理。

这些物质的合成是受到精细控制的,因为无论就能量和前体分子而言,其合成在代谢上都是代价很高的。许多种,但不是所有的,嘌呤和嘧啶是可相互转变的。嘌呤和血红素的分解代谢生成独特的产物,而嘧啶的分解代谢则生成普通的产物。嘌呤的分解代谢产生尿酸,过量尿酸会引起痛风。血红素的分解代谢产生胆色素,血液循环中胆色素过多,即称为黄疸,正常排出时,则使粪便中色素增多。

20.2 嘌呤

嘌呤存在于核苷酸如 ATP、 NAD^+ 、FAD 中和辅酶 A 中,在 RNA 和 DNA 中都起着重要作用。嘌呤的复杂的合成过程中有许多步骤,其大意如图 20.1 所示。不过,简单地记住这些步骤只会得到相反的效果。重要的是要认识到简单的化合物如何转变为嘌呤,认识到一些重要的前体,特别是认识到抗代谢物在其中起作用的步骤。

嘌呤的合成从核糖-5-磷酸开始,它来自于戊糖磷酸途径,或是通过其氧化性分支,或反之,通过其非氧化性分支。许多组织都能形成核糖-5-磷酸和自身的嘌呤。第一个反应是 ATP 的参加,焦磷酸基加在核糖-5-磷酸上,产生磷酸核糖焦磷酸(PRPP)。

磷酸核糖焦磷酸可用于许多反应。在嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸和辅酶如 NAD^+ 的合成中,它都很重要。因此,由嘌呤本身来对这一系统进行严格控制是不合适的。在嘌呤合成中,碱基是在核糖磷酸上形成的。这就保证了细胞中合成的中间产物不会丢失。假若嘌呤碱是首先合成的,它们会很容易从细胞中丢失,因为不与糖磷酯结合的嘌呤碱很容易透出细胞,进入血流中。

(一) IMP 的形成

下一步就是与嘌呤合成有关的独一无二的第一个步骤,谷酰胺的酰胺氮加到 PRPP 上形成 5-磷酸核糖胺,这是由 PRPP 转酰胺酶催化的。这一步骤可为谷酰胺的抗代谢物重氮丝氨酸所抑制。然后甘氨酸加上去,形成酰胺键。这一步需要 ATP。在嘌呤合成中,甘氨酸是惟一的整个加进去的氨基酸。下一步,从 N^{10} -甲酰四氮叶酸来的 C-1 片段转移到甘氨酸的氨基上,形成醛衍生物。这与色氨酸的降解类似,那是四氢叶酸从氨基上移走了 C-1 醛。在这一步骤或其他步骤中,叶酸缺乏或可利用的量不够都会使核酸的合成变慢。所有的细胞都会受到影响,但显然那些生长最快需要用于核酸合成的嘌呤量最多的细胞受害最严重。因此,能够影响

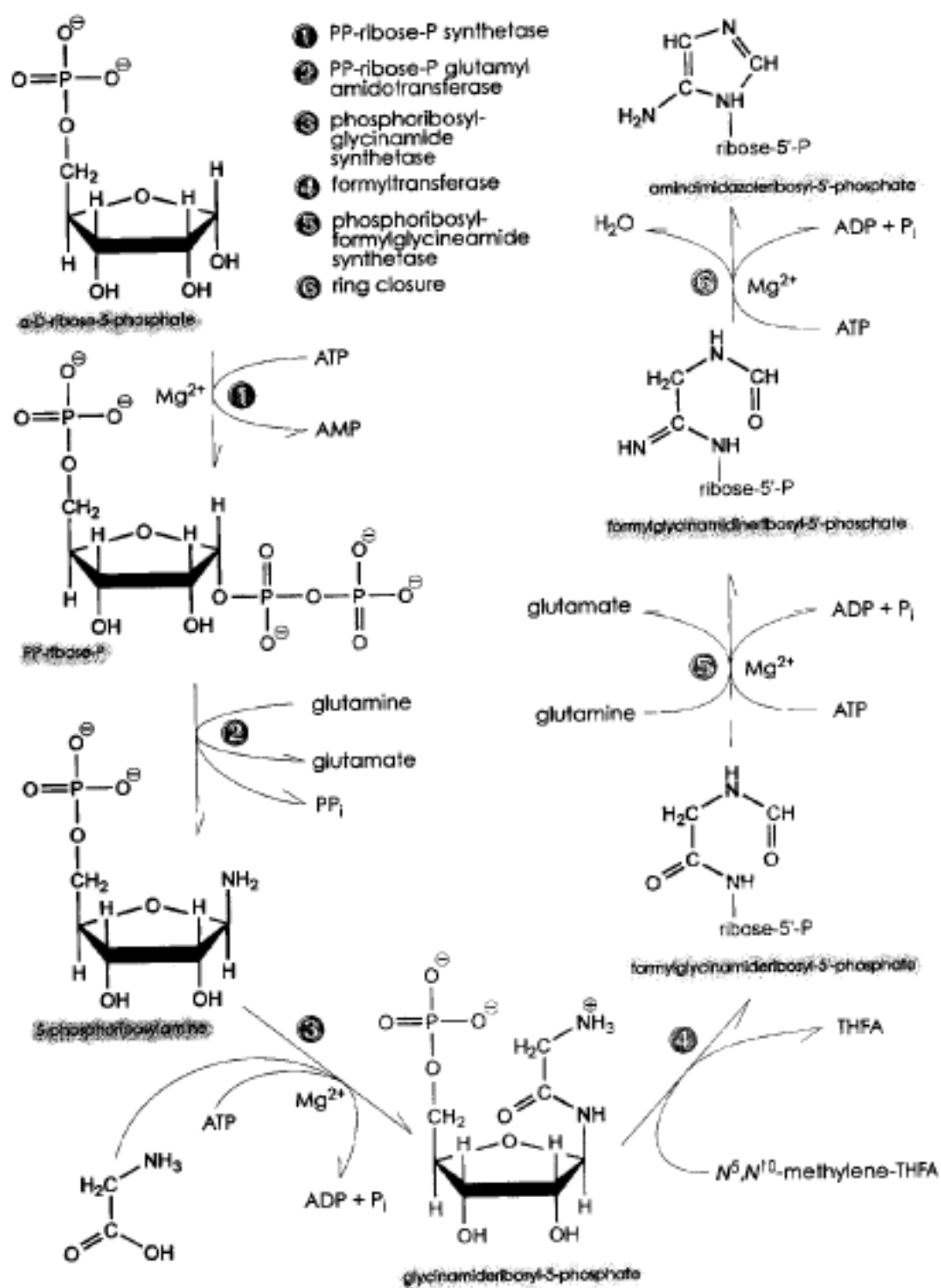


图 20.1(a) 嘌呤的合成

示 IMP 的合成及结构式和辅因子, THFA 为四氢叶酸。

这些反应的药物或抗代谢物可用于化疗以影响那些生长最快的细胞。四氢叶酸的抗代谢物的两个例子是氨甲蝶呤和氨基蝶呤, 它们阻止二氢叶酸形成四氢叶酸。所以, 即使在膳食中有足够叶酸的情况下, 都会发生四氢叶酸的缺乏。这两种及其他相关的药物都曾用于治疗白血病及其他癌症。这些药物主要对 TMP 的合成有影响[见 20.3(四)], 对嘌呤合成影响较小。

下一步, 谷酰胺的酰胺氮加到醛基上, 形成氨基衍生物; 重氮丝氨酸又能影响这一步骤。下一步需要 ATP, 是嘌呤的五元环的环化作用。随后是 CO₂ 固定, 五环的羧化开始了六元环的形成。这个反应是一个不同寻常的羧化反应, 既不需要生物素, 也不需要 ATP。这一中间产物然后与天冬氨酸反应, 在 ATP 参与下, 形成一天冬酰中间产物(这与脲循环中精氨酸的合成类似)。然后天冬酰中间产物裂解, 丢掉延胡索酸, 把氮留在中间产物上。然后从 N¹⁰-甲酰四氢叶酸上转移过来一个 C-1 单位到氨基上, 又一次形成醛类型的化合物。四氢叶酸的抗代谢

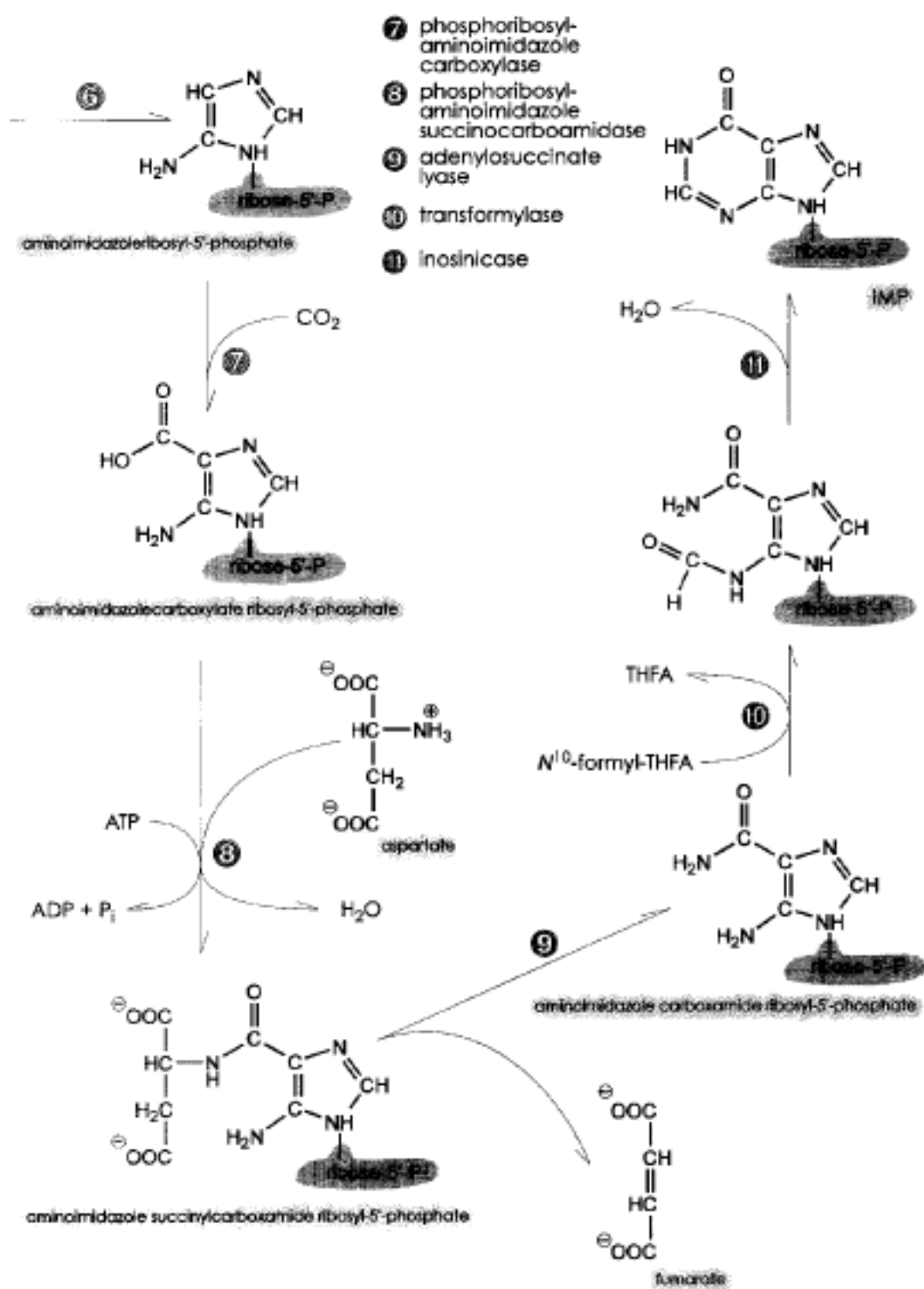


图 20.1(b) 嘌呤的合成

物能抑制这一步骤以及前面的步骤。醛与氨基 NH₂ 环化形成类似 Schiff 碱的化合物, 于是第二个环闭合。这就产生了第一个核苷酸, 即合成了肌苷酸(IMP)。注意, 这不仅是一个碱, 而且也是一个核苷酸; IMP 在十字路口上, 是其他嘌呤核苷酸的重要前体。形成鸟苷酸(GMP)和腺苷酸(AMP)的途径是不同的。

(二) 腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸的形成

肌苷酸通过一复杂反应为 NAD⁺ 所氧化, FAD 是此酶的辅因子, FAD 将还原力传至 NAD⁺, 形成 NADH。于是在环的第 2 位碳上形成一酮基。随后谷酰胺提供其酰胺氮, 在碳 2 上形成氨基, 产物为 GMP; 这一步需要 ATP 并产生焦磷酸(图 20.2)。这最后一步可被叠氮丝氨酸抑制。IMP 转变为 GMP 是重要的转折点, 一旦形成了 GMP, 嘌呤就不再能被有效地用于形成 IMP 或 AMP。还有, 形成 GMP 所需的能量来自 ATP; 后面将会提到, 形成 AMP 的能量来

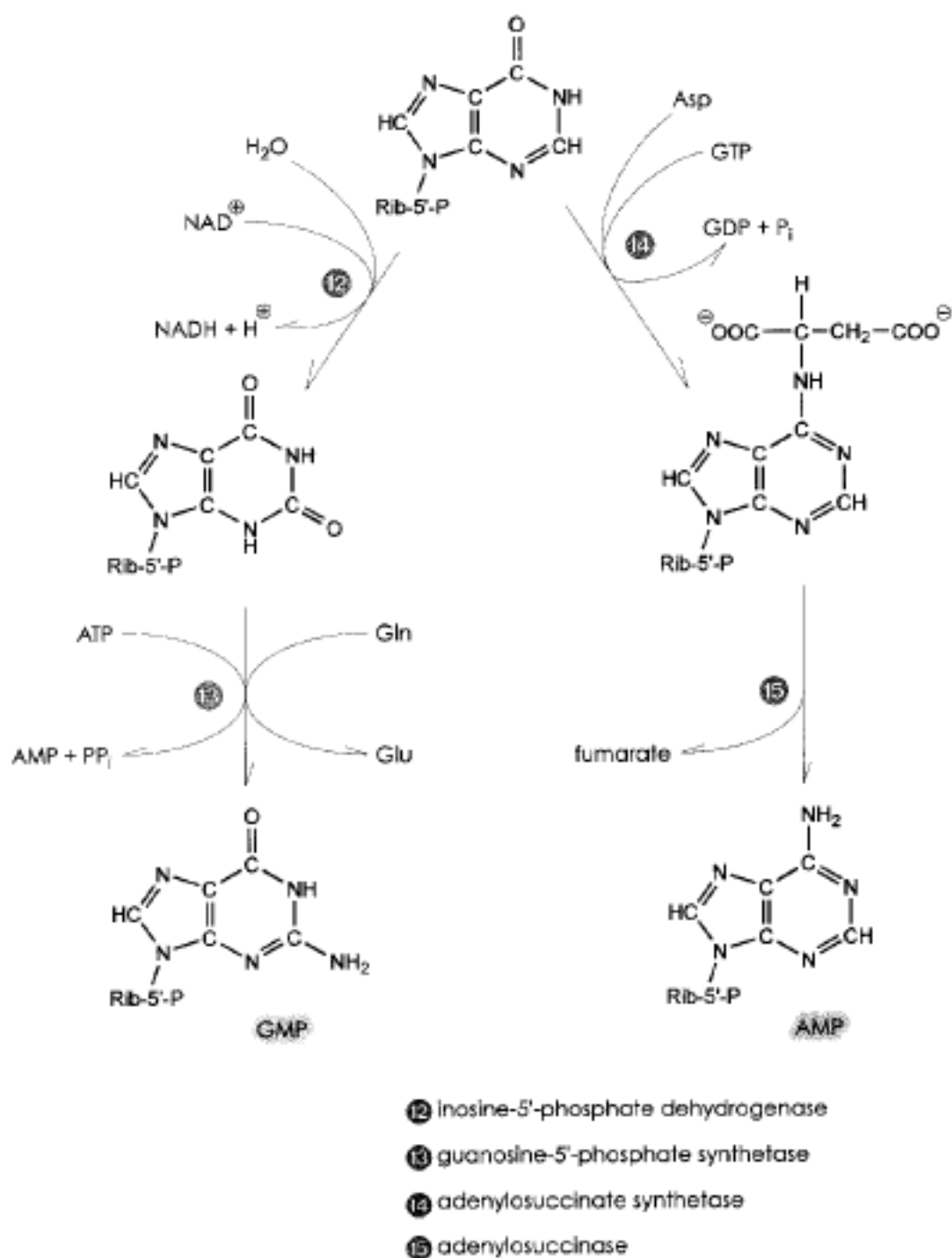


图 20.2 AMP 和 GMP 的合成

示 AMP 转变为 AMP 或 GMP 的途径, 每一步的数字相当于所列的酶。

自于 GTP。因此, 缺少专一的核苷酸不会阻止其本身的形成, 因为没有能量。

IMP 转变为 AMP 时, 有些反应类似于腺循环中的反应。天冬氨酸与 IMP 的酮基反应, 产生腺苷琥珀酸。此反应所需的能量来自于 GTP。然后发生裂解, 产生延胡索酸, 氮留在环上, 产生 AMP。AMP 和 GMP 不能直接相互转换; 因此, 细胞必须作出代谢上的决定, 使任何已有的 IMP 形成哪种核苷酸。可以重新利用 IMP 以形成 GMP; 不过, 一旦形成了 GMP, 再转变为 IMP 就较慢, 也较复杂。

(三) 嘌呤合成的控制

嘌呤合成的控制之一是 PRPP 的多少。形成这种化合物的酶活性较低, 又受到许多种中间产物的控制, 包括嘌呤核苷酸的控制(图 20.3)。因为 PRPP 可能形成嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸或辅酶, 所以控制必须是复杂的, 不能仅限于嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸或辅酶。下一个受到嘌呤核苷酸控制的酶是 PRPP 转脒基酶, 它催化磷酸核糖酰胺的形成 (PRPP + 谷酰胺 →

PRNH₂ + 谷氨酸), PRNH₂ 是嘌呤的第一个独一无二的前体。因为 PRPP 的合成慢, 所以当嘌呤库已满时, 必须有一种控制办法使之能被其他过程所利用。这一系统的控制很有趣, 它表现为协同现象。也就是说, 这条途径的一个分支的产物 AMP 能抑制酶活性的大约 10%; 而另一分支的产物 GMP, 也能引起约 10% 的抑制。然而, 当两者都足够多时, 却能使 PRPP 转脘基酶受到高达 90% 的抑制。因此, 当这两种效应物共同起作用时要比单独起作用时有效得多, 就是有协同作用。在这一步骤上和分支上, 对 GMP 的 K_i 较低, 反映了细胞中正常情况下腺嘌呤核苷酸比鸟嘌呤核苷酸多。

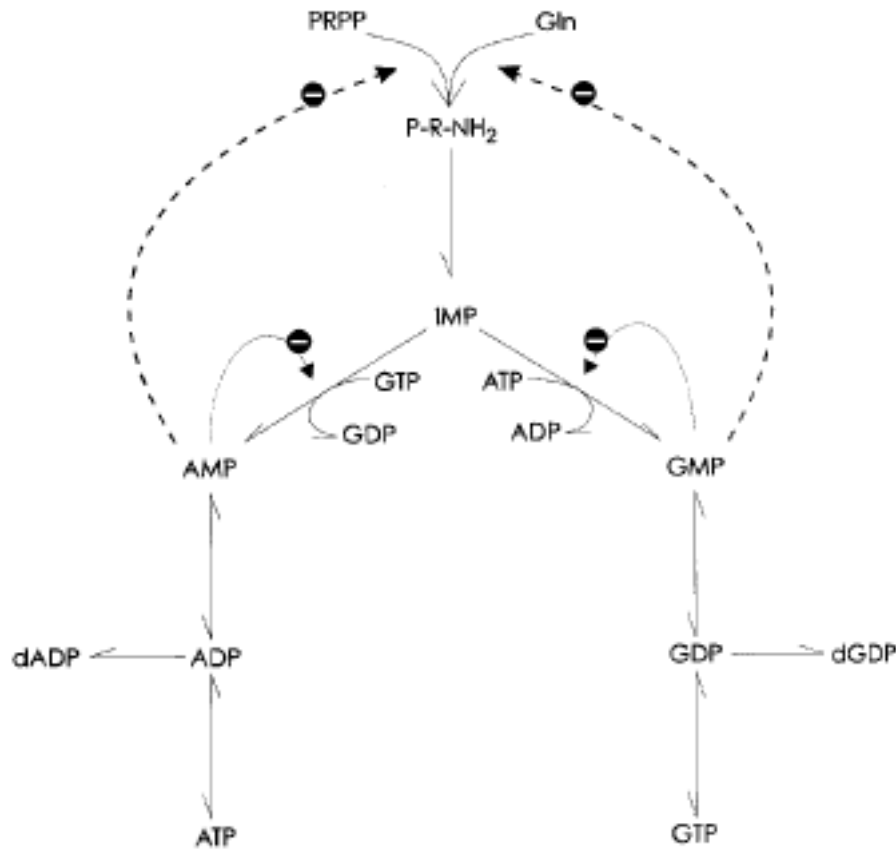


图 20.3 嘌呤合成的几个控制步骤

图示嘌呤合成控制的大意, 第一个反应的控制是协同的, AMP 和 GMP 都只有部分作用。

从 PRNH₂ 到肌苷酸显然没有什么主要的控制。GMP 或 AMP 中的每一种嘌呤核苷酸都抑制同样核苷酸的合成途径。例如, GMP 会抑制 IMP 的氧化, 这是通向 GMP 形成的第一个步骤, 而 AMP 又会抑制腺苷酰琥珀酸的形成, 这是 AMP 形成的第一步。GMP 和 AMP 都能形成二磷酸和三磷酸, 三者成平衡, 视能荷而定。嘌呤和嘧啶都能形成脱氧核苷酸, 基本上是通过类似的机制。核糖核苷酸和脱氧核苷酸之间的主要区别是前者在辅酶和 RNA 中起作用, 而后者在 DNA 中起作用。脱氧核苷酸的形成始于二磷酸核苷酸。形成脱氧核苷酸的辅因子是 NADPH, 要通过硫氧还蛋白。脱氧核苷酸的控制已在第 8 章中讨论过。

(四) 嘌呤的降解

核酸和核苷酸在体内不断发生周转和分解代谢。因此核苷酸和碱类都在不断地被破坏。AMP 降解中的第一个酶是 AMP 脱氨酶, 它催化 AMP 转变为 IMP 和氨。这一反应发生在许多组织中, 在大多数情况下, 所产生的氨以谷氨酸的形式离开组织, 如肌肉中就是这样。所形成的 IMP 或是进一步降解, 或是再被利用, 形成 AMP 或 GMP。假若有过量的 IMP 和足够的腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸, 由 IMP 形成更多的 AMP 或 GMP 的反应就会被抑制, IMP 就会降解。首

先, 磷酸酶除去无机磷酸, 磷酸解作用除去核糖产生次黄嘌呤和 R-1-P。通过次黄嘌呤 + PRPP 形成 IMP 和焦磷酸这一反应, 可将次黄嘌呤回收, 再产生 IMP。然而可利用的 PRPP 不多, 因此更多的次黄嘌呤会进一步降解。中枢神经系统和肝以外的许多细胞和组织要维持嘌呤核苷酸的水平, 对这种补救途径的依赖性很高。假若缺乏补救途径的酶, 特别是这些酶通常很多的中枢神经系统中, 就不可能挽救嘌呤碱, 使之变回为核苷酸, 结果就是 Lesch-Nyhan 综合症(图 20.4)。有这种综合症的病人中, 有些会自残, 咬断手指、脚趾等。在这种疾病与嘌呤碱补救途径的缺乏之间有相关性, 不能使嘌呤碱与 PRPP 再形成核苷酸。

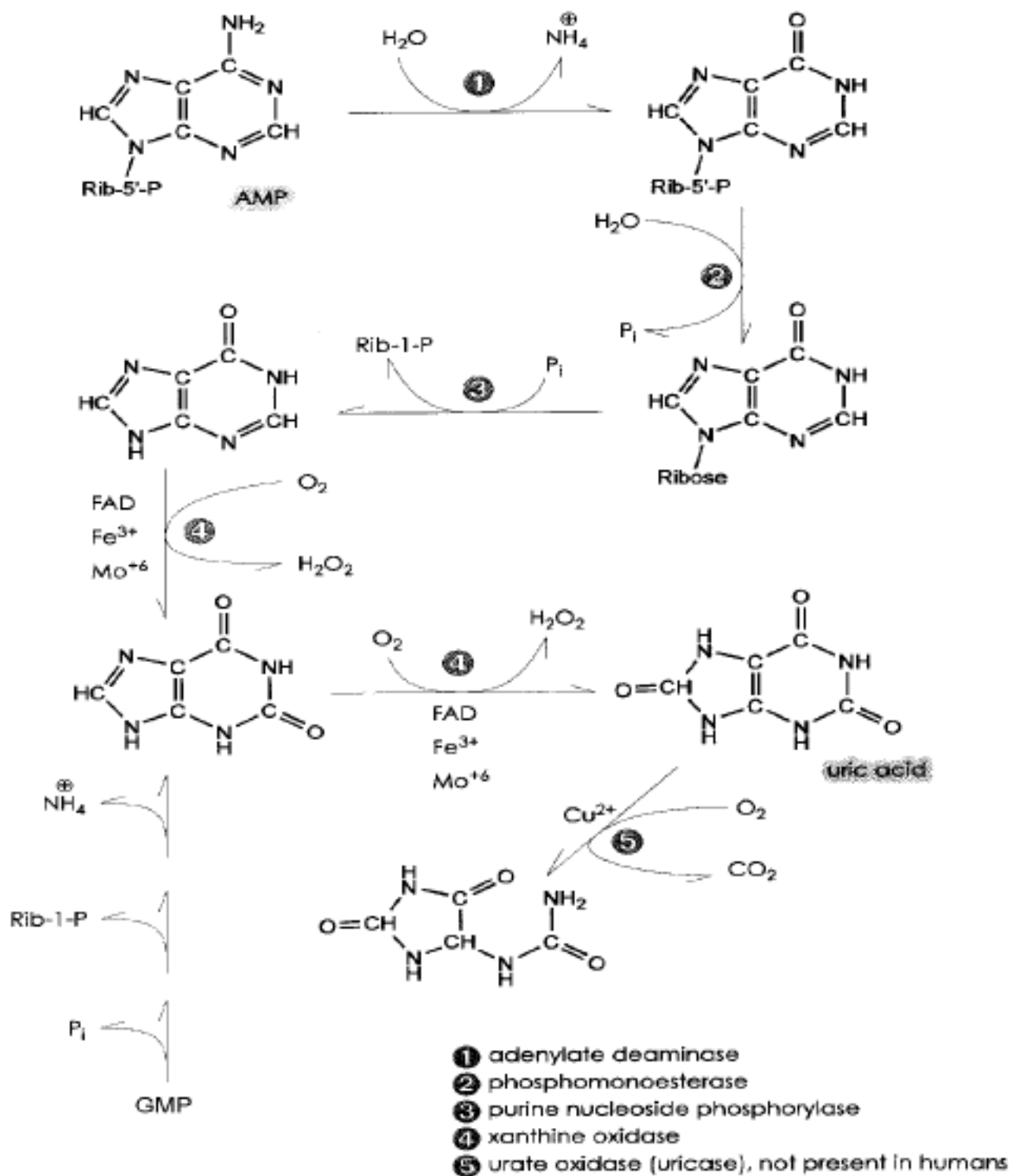


图 20.4 嘌呤的分解代谢

示鸟嘌呤和腺嘌呤核苷酸到尿酸的途径。

鸟嘌呤核苷酸的降解途径与此相似, 氨基被氧化成酮基, 磷酸基团被除去, 然后核糖被除去, 于是形成黄嘌呤。所以嘌呤代谢的两种产物是次黄嘌呤和黄嘌呤。它们都是水溶性的, 能够透出细胞并被送至肝脏中发生进一步的氧化。黄素脱氢酶(含钼)能将次黄嘌呤氧化为黄

嘌呤, 再将黄嘌呤氧化为尿酸。

鸟苷酸可通过还原性氨化作用转变为 IMP, 所形成的 IMP 又可产生 AMP。肝以外的细胞不能从头合成嘌呤或不能合成足够量的嘌呤, 这种补救途径对它们非常重要。由于此途径的存在, 化疗上才有可能使用一些嘌呤衍生物, 如 6-巯基嘌呤或 6-硫代鸟嘌呤作为抗代谢物。

(五) 痛风

尿酸是相当不溶于水的, 常形成晶体, 使人疼痛。若尿酸积累过多, 就会在某些骨关节处沉淀, 引起称为痛风的疾病。对于有这种问题的人, 食用核酸含量高的食物, 如肉、酵母, 会使病情加重。痛风的疗法之一就是使用称为别嘌呤醇(图 20.5)的尿酸类似物。

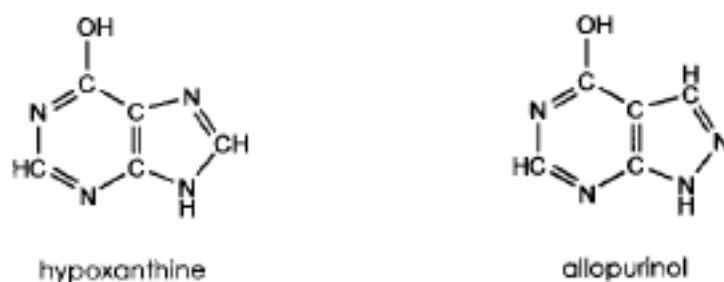


图 20.5 别嘌呤醇和次黄嘌呤结构上的相似性

别嘌呤醇的结构与次黄嘌呤类似, 是黄嘌呤脱氢酶的竞争性抑制剂, 因为能使次黄嘌呤和黄嘌呤转变为尿酸的速率变慢。这时血液中黄嘌呤和次黄嘌呤增多, 并会渗入尿中, 避免了高尿酸的问题, 因为黄嘌呤和次黄嘌呤均溶于水, 排泄时不会引起任何伤害。问题出在尿酸的相对不溶性。人体内嘌呤分解代谢的终产物是尿酸, 因此在尿酸被排泄而不可能再被利用时, 所有用于嘌呤合成的前体, 如 C-1 片段和甘氨酸, 就都丢失了。

20.3 嘧 啶

(一) 嘧啶的合成

嘧啶的合成存在于几乎所有的细胞中。嘧啶合成的第一步是氨甲酰磷酸的形成。合成嘧啶时, 氨甲酰磷酸是由谷酰胺的酰胺氮、 CO_2 和 2 个 ATP 形成的(利用 2 个 ATP 保证反应前向进行)。这些底物与脲合成时形成氨甲酰磷酸所用的底物不同。依赖于谷酰胺的羧甲基磷酸合成酶(CPS_{II})存在于细胞溶胶中, 而用于脲合成的酶(CPS_I)则存在于线粒体中。CPS_{II} 存在于大多数细胞中, 而 CPS_I 仅存在于肝、肾和肠中(图 20.6)。

在天冬氨酸转羧甲基酶催化下, 羧甲基磷酸与天冬氨酸化合, 羧甲基加到天冬氨酸的氨基上。这一反应与鸟氨酸和羧甲基磷酸形成瓜氨酸的反应相似。羧甲基天冬氨酸环化, 形成一个六元环。这时立刻就可以看到嘌呤合成与嘧啶合成之间的差别。嘌呤合成从在糖磷酸酯上建造碱基开始; 而嘧啶合成则从嘧啶碱的合成开始。然后, 在 FAD-酶的催化下, 环失去 2 个氢, 形成乳清酸。这 2 个氢随后传递给 NAD^+ 。乳清酸上的羧基有助于在合成完成之前使中间产物保留在细胞之内。下一步是 PRPP 加到乳清酸上, 形成乳清苷酸(OMP)。然后 OMP 脱羧, 形成 UMP。现在就不需要羧基将中间产物保留在细胞中了, 因为糖磷酸酯可以阻止它从细胞中漏出去。视能荷而定, UMP 可以可逆地形成 UDP 和 UTP。UTP 可以直接转变为 CTP,

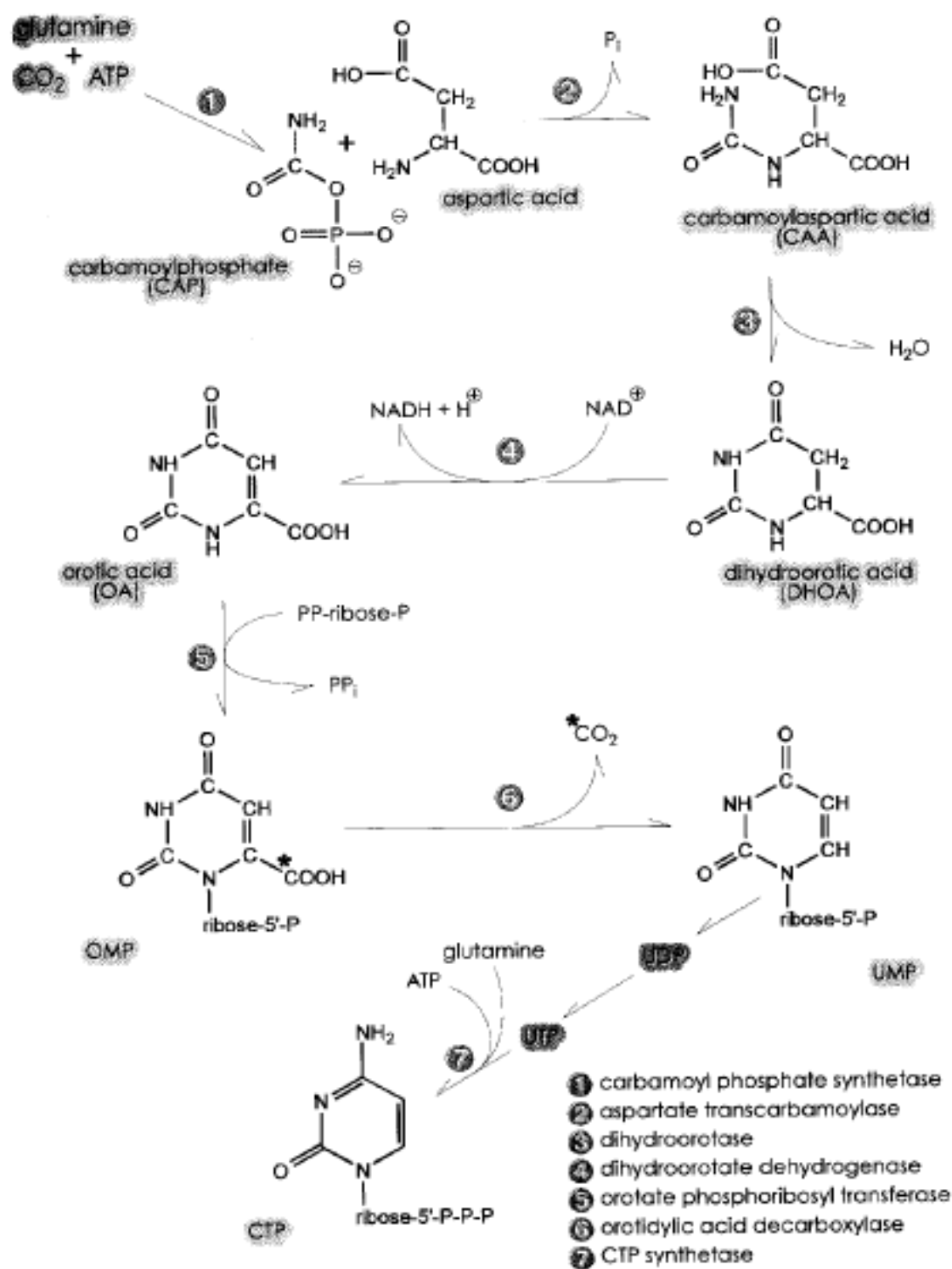


图 20.6 嘧啶的合成

示嘧啶、UTP 和 CTP 的合成及结构式和辅因子。

在结构上的惟一差别是 CTP 在第 4 位碳上有一酮基而不是氨基。这种转变利用的是谷酰胺的酰胺氮, 需要 ATP, GTP 能通过别构作用使此酶活化。胞核苷酸也可脱氨, 就像腺苷酸脱氨酶使 AMP 脱氨一样, 产生的是尿核苷酸。与嘌呤合成不同, 嘧啶合成途径没有分支, 两个终产物易发生相互转变。因此, 不大可能出现 CTP 与 UTP 不平衡的情况, 而且如果真的出现了这种情况, CTP 也会转变为 UTP 而重新建立起正常的平衡。反之亦然, UTP 过量时也会转变为 CTP 而重新达到平衡。

(二) 嘧啶合成的控制

有两个可能的控制步骤, 一个主要是细菌利用的, 另一个在动物系统内。细菌利用 CTP 对天冬氨酸转氨甲基酶的抑制, 此酶促反应为嘧啶合成的第二步。这在细菌中起控制作用, 因为同样的氨甲酰磷酸既用于嘧啶合成也用于精氨酸合成(图 20.7), 而不是仅用于嘧啶的合

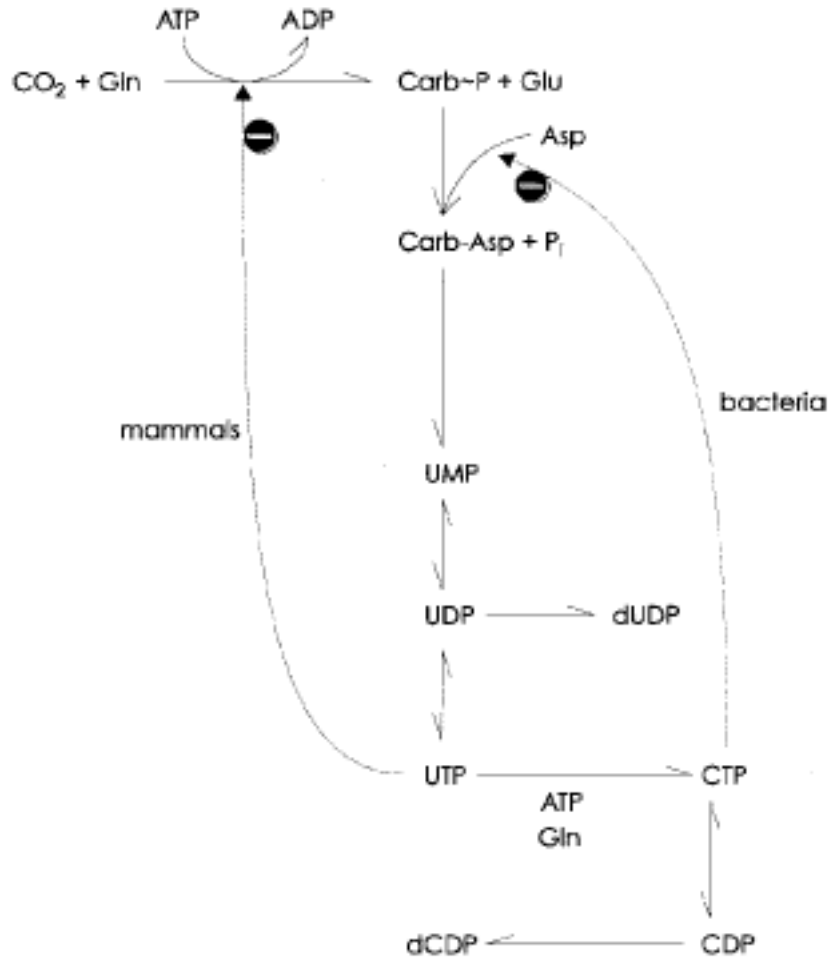


图 20.7 嘧啶合成控制的主要步骤
细菌和哺乳动物(包括人)的控制均示意于图内。

成。在动物系统中,用于精氨酸和脲合成的氨甲酰磷酸是由 CPS 在线粒体中合成的,细胞溶胶中的 CPS 仅在嘧啶合成中起作用;因此控制方式应该不同。在人体中,UTP 有反馈作用,它抑制细胞溶胶中的氨甲酰磷酸合成酶(CPS_{II});UTP 对于线粒体中的氨甲酰磷酸合成酶(CPS_I)无作用。嘧啶合成中的一个主要控制系统不要求在嘧啶合成中所看到的协同作用。之所以如此,是因尿嘧啶核苷酸和胞嘧啶核苷酸的合成是在一线状途径之内而无分支,而终产物又容易相互转变。这与嘌呤的合成显著不同。另一种控制和嘌呤核苷酸的一样,是 PRPP 的多少。因为嘧啶合成的正常途径是先形成碱基,然后糖磷酸酯再加上去,所以这一途径中的补救办法比嘌呤核苷酸的补救办法有效得多,嘌呤合成是在糖磷酸酯上形成碱基。尿嘧啶、乳清酸和胸嘧啶都可回收,但胞嘧啶则否。在精氨酸或鸟氨酸转甲酰酶严重缺乏的情况下,嘧啶合成中发生一个有关 PRPP 限制的有趣事例。这种情况下,肝的线粒体中形成氨甲酰磷酸,但没有足够的酶活性或鸟氨酸,通常鸟氨酸是由精氨酸产生的。氨甲酰磷酸就会积累起来并漏到线粒体之外。因为这已越过了动物体内正常的嘧啶合成的控制步骤,氨甲酰磷酸就会与天冬氨酸化合形成氨甲酰天冬氨酸和乳清酸。不过,由于 PRPP 有限,在这种情况下,乳清酸可能积累而从尿中排出体外。

(三) 嘧啶的降解

嘧啶的降解与嘌呤的降解有相同处也有不同处。相同之处是都是先去掉磷酸基团然后再去掉核糖,产生碱基胞嘧啶或尿嘧啶。对于某些碱基也有补救途径,如前所述。胞嘧啶的主要降解途径是丢失氨,产生尿嘧啶,尿嘧啶可被回收(图 20.8)。如未被回收,则尿嘧啶可转变为

二氢尿嘧啶; 环被打开, 随后失去氨和 CO_2 , 形成 β -丙氨酸。 β -丙氨酸会产生丙二酸并被活化为丙二酸单酰 CoA。所以, 嘧啶的分解代谢并不产生独一无二的产物排入尿中, 如嘌呤产生尿酸那样, 而是所有的组分都可能再被利用。

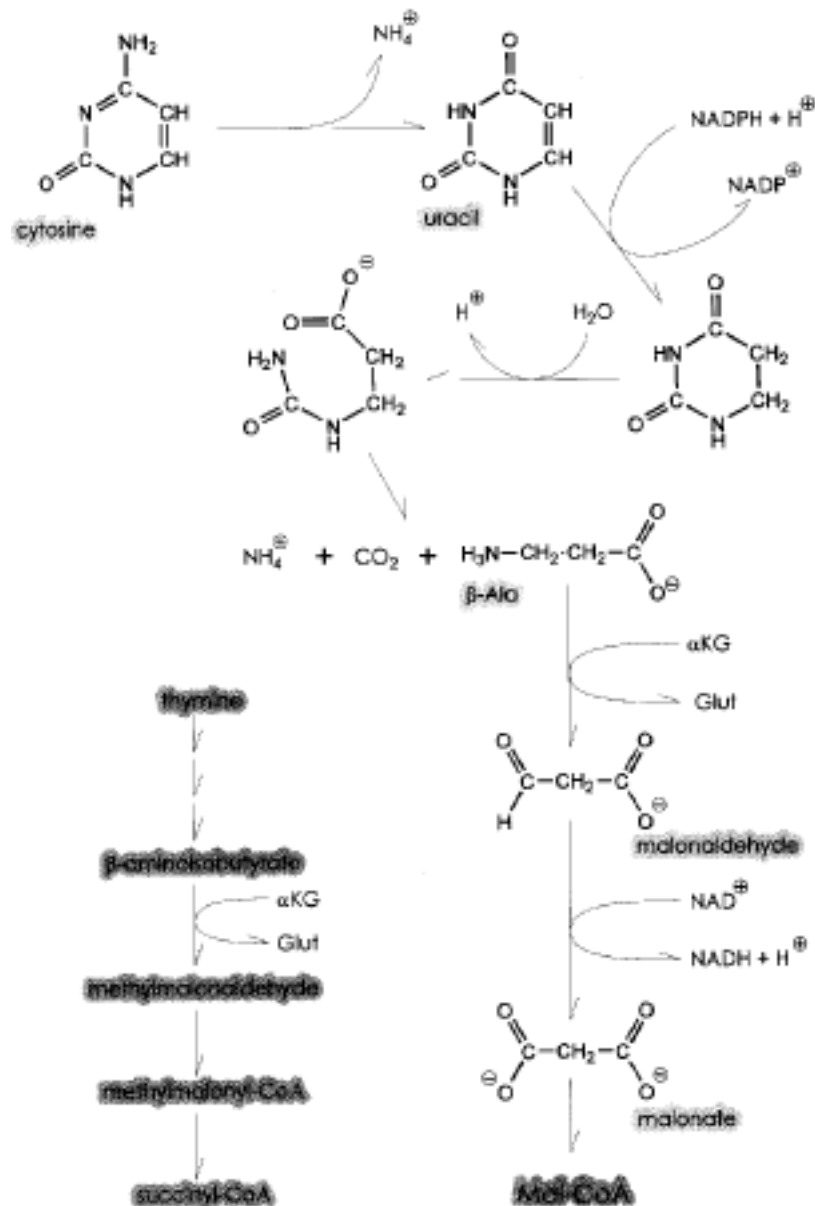


图 20.8 嘧啶的分解代谢

示胞嘧啶和尿嘧啶分解代谢的步骤及结构式, 胸嘧啶的步骤仅示大意。

(四) 胸嘧啶的形成

所有的嘧啶核苷酸都可能以二磷酸酯的形式转变为脱氧化合物, 和嘌呤核苷酸一样。尿嘧啶不存在于 DNA 中, 因此它必须转变为胸嘧啶衍生物。这是通过下列基本途径发生的: CDP 转变为 dCDP, dCDP 又转变为 dCMP, 它又产生 dUMP。然后 dUMP 在第 5 位上被甲基化, 中间经过 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲四氢叶酸。这又产生脱氧胸苷一磷酸(dTMP)和二氢叶酸。然后 dTMP 转变为 dTDP 和 dTTP, 它们即可掺入 DNA(图 20.9)。

(五) 抗代谢物

胸嘧啶合成的方面使得我们有可能设计在这一过程中专一性更强的抗代谢物。氨基蝶呤和氨甲蝶呤就是已使用过并有所成功的。这两种化合物是四氢叶酸形成的抑制剂, 剂量正确时, dUMP 到 dTMP 的转变好像比其他反应更为敏感而优先被抑制。这就抑制了 DNA 的形成

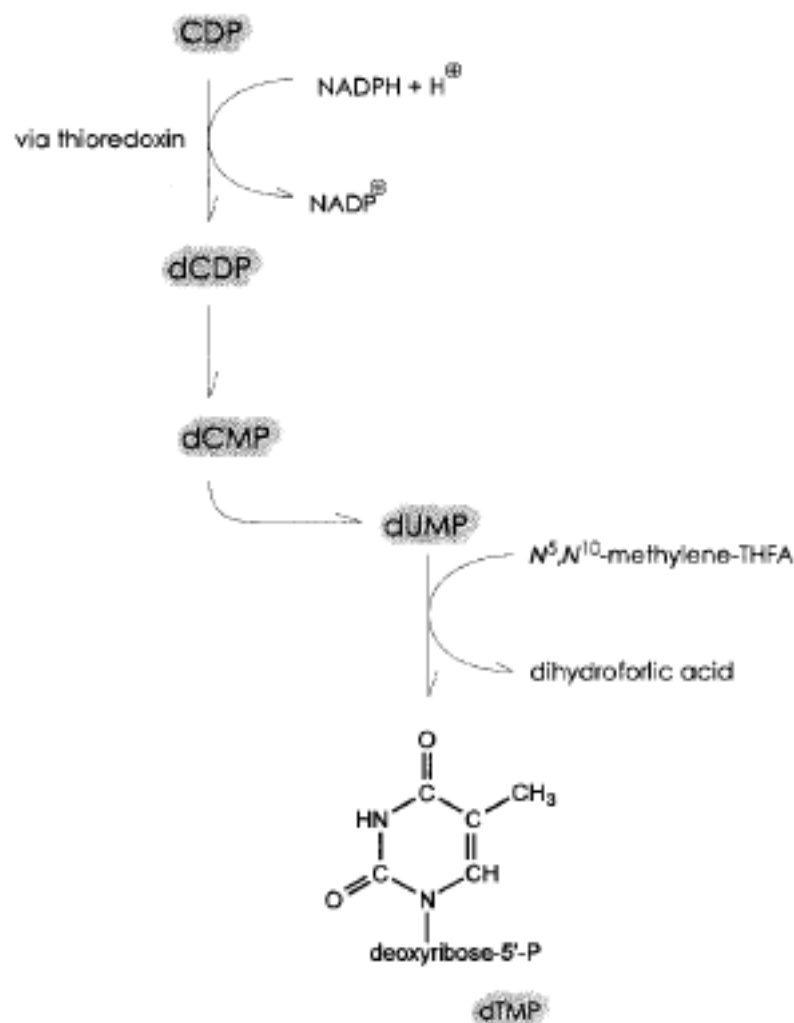


图 20.9 胸嘧啶的形成

示 CDP 到 dTMP 的途径, 仅列出 dTMP(d-5-甲基尿嘧啶-磷酸) 的结构式。

和细胞的增殖。其他抗代谢物如 5-溴尿嘧啶和 5-氟尿嘧啶也曾用于癌症的治疗, 这些化合物会和乳清酸一样被活化为核苷酸。5-溴尿嘧啶(现已不常用) 会掺入 DNA, 引起对遗传密码的误读, 其结果是合成无效的蛋白质, 但也能引起正常细胞的突变, 同时在恶性细胞中发挥其作用。溴原子足够大, 似乎像甲基, 所以这种化合物很像 dTTP, 但实际上是 5-溴 UTP, 当它代替胸嘧啶而掺入 DNA 后, 在产生子细胞方面保真性差了。5-氟尿嘧啶也会被活化并转变为 dUMP, 在 5 位上有一氟原子。氟小, 但与碳的结合比氢紧密, 所以氟不会与甲基交换。5-F dUMP 和四氢叶酸会与胸苷酸合酶形成一无活性的复合体, 从而阻止胸苷的合成, 其优点是几乎只抑制 DNA 的合成而不影响其他代谢途径, 不像氮甲蝶呤和重氮丝氨酸那样, 因而 5-氟尿嘧啶只影响生长最快的细胞。

还有许多其他的化疗药物, 包括 6-巯基嘌呤、胞嘧啶阿拉伯糖苷和 3-叠氮-脱氧胸苷 (AZT)。6-巯基嘌呤会转变为-6-巯基嘌呤核苷-5-磷酸, 它会积累并抑制 PRPP-转酰胺酶以及 IMP 到腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸的转变。胞嘧啶阿拉伯糖会转变为胞嘧啶阿拉伯糖苷-5-三磷酸, 它在 DNA 聚合酶反应中与 dCTP 竞争。胞嘧啶阿拉伯糖苷 5-三磷酸会掺入 DNA 中, 使 DNA 链的进一步合成停止。AZT 会被细胞中的激酶磷酸化为 AZT 三磷酸。此化合物抑制 HIV-DNA 聚合酶, 这是一种依赖于 RNA 的聚合酶。

20.4 血红素

血红素是由吡咯组成的卟啉环, 其中有一金属成分。人体内的血红素主要存在于血红蛋白

白中。还有其他重要的含血红素的蛋白质,如细胞色素和微粒体中的氧化酶,不过血红蛋白占有体内血红素的绝大部分。血红素与蛋白质结合便产生了专一的功能。例如,血红蛋白中,血红素与珠蛋白结合用于 O₂ 的转运。含有血红素的细胞色素类与电子传递有关。血红素可通过离子键和疏水键与蛋白质结合,如血红蛋白;也可通过共价键与蛋白质结合,如细胞色素 C。虽然结构复杂,血红素中的卟啉是由简单的分子合成的,金属则来自于膳食。

血红素合成的主要部位是形成中的红血细胞,称为网织红细胞。关于血红素的合成及其控制主要是用网织红细胞进行研究的。与成熟的红血细胞不同,网织红细胞有细胞核、线粒体和其他亚细胞的细胞器,成熟后这些东西便都消失了。所有的细胞都合成一些自身的酶所需要的血红素,如细胞色素和内质网的氧化酶的血红素,但网织红细胞在血红素合成方面异常活跃。

卟啉的合成涉及到线粒体和细胞溶胶之间的整合,和以前所研究过的许多代谢过程一样,这些过程有尿素的合成、葡糖异生和某些氨基酸的分解代谢。第一步在线粒体中,在依赖于吡哆醛磷酸的氨基酮戊酸合酶的催化下,甘氨酸与琥珀酰 CoA 结合(图 20.10)。

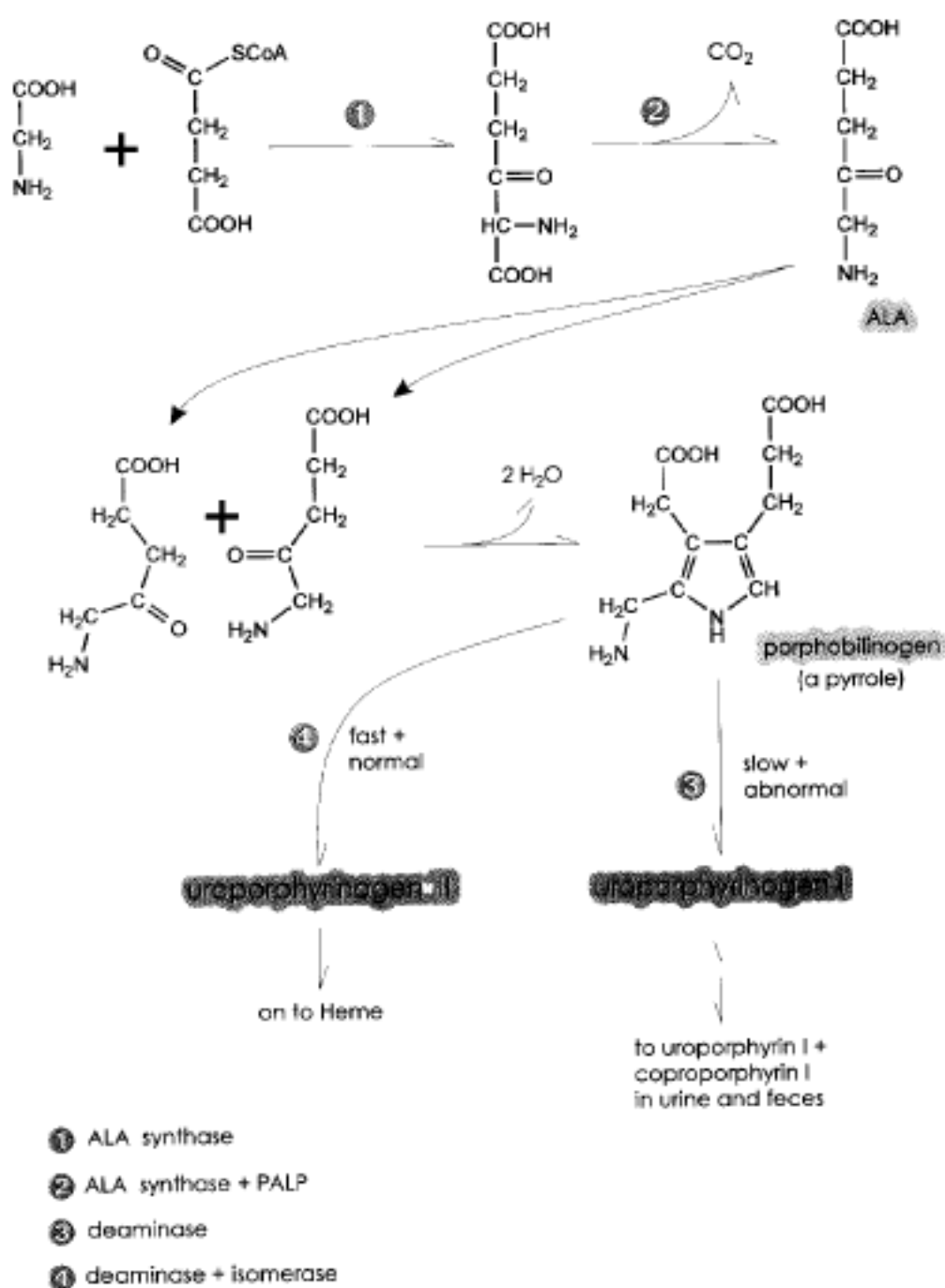


图 20.10 卟啉的合成

示卟啉的合成以及代谢物的结构式(到胆色素原——吡咯)为止,以后仅列大意。

必须认识到,起始步骤在线粒体中的优点是其中有琥珀酰 CoA 可资利用,琥珀酰 CoA 不能透过线粒体膜而进入细胞溶胶。第一步是血红素合成中的慢步骤,就像将要看到的,它也是主要的控制所在。形成一甘氨酸-琥珀酸中间产物,此产物结合在酶上时发生脱羧作用,释放 α -氨基戊酮酸(ALA)。然后 ALA 穿过线粒体膜进入细胞溶胶,除最后 3 个反应外,所有的反应均在细胞溶胶中进行。第一个反应是 2 分子 ALA 结合,失去 2 分子水,形成五元环,称为胆色素原。这是吡咯环,是卟啉合成的构件。胆色素原经过一系列的步骤转变为有 4 个吡咯环的化合物,称为尿卟啉原。这一过程需要许多种酶,形成的正常化合物会转变为血红素。这一过程中的关键酶之一是一种异构酶,它把一个胆色素原以“反方向”插入到四吡咯中。所以,虽然 4 个胆色素原中的 3 个是以所预期的排列方式插入的,但有一个却不是以所预期的方向,而是反着插入的(图 20.11)。形成后的四吡咯,每个吡咯上有两个侧链,一个乙酰基和一个丙酰基。在血红素中,所有的乙酰基都变成了甲基,两个丙酰基变成了乙烯基,于是形成了粪卟啉原。考虑到其起源,人们可能预期终产物中侧链的顺序是 a-p-a-p-a-p-a-p。

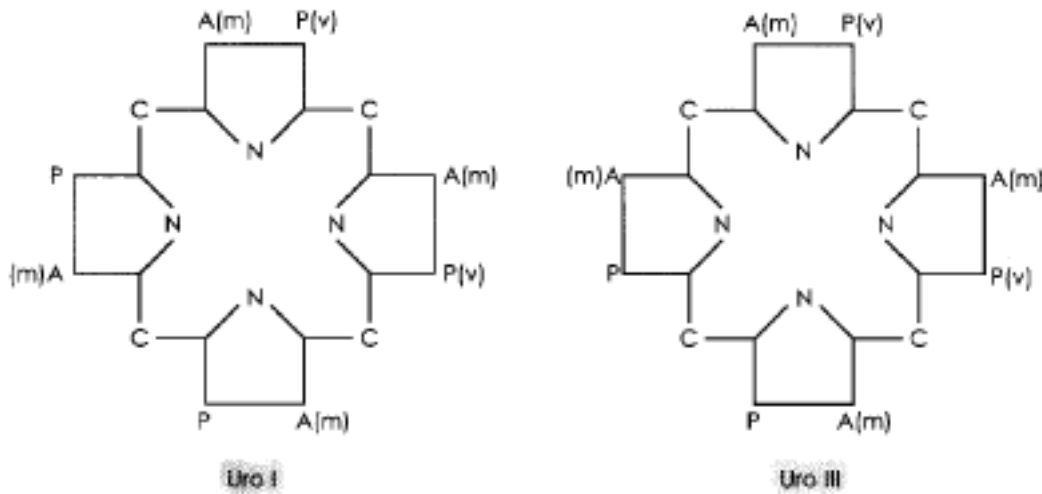


图 20.11 尿卟啉原

示预期的结构尿卟啉原 和血红素中实际存在的结构尿卟啉原 以供比较。原来形成的四吡咯中的侧链是丙基和乙酰基,这些基团发生了转变:乙酰基变成甲基[A(m)] ; 两个丙基变成乙烯基[P(v)] ; 两个丙基不变,成为丙酸。

然而,实际看到的排列是 a-p-a-p-a-p-a; 因此,一个吡咯显然是反着排列在血红素中的。帮助催化尿卟啉原的正常形成的辅酶(尿卟啉原 辅合酶)的量偶尔会很低。假若没有这种辅酶,结果是死亡,大概在胚胎阶段就死去了。如果量低,结果就会形成异常的卟啉,是没有生理功能的(即形成尿卟啉原)。这是一种不起作用的终产物,不能形成血红素。

尿卟啉原脱羧酶催化尿卟啉原转变为粪卟啉原。粪卟啉原 可被氧化为原卟啉原。然后亚铁螯合酶将亚铁插入而形成血红素。这最后三步发生在线粒体中。

(一) 血红素合成的控制

正常情况下,尿卟啉原 转变为原卟啉,然后 Fe^{2+} 插入,形成血红素。血红素能与珠蛋白结合,形成血红蛋白。要形成血红蛋白,我们需要的不仅是血红素,还有珠蛋白的合成。若是网织红细胞中已有足够的血红蛋白,反馈控制就会抑制珠蛋白的合成(图 20.12)。若无珠蛋白的合成,血红素就会积累,而在氧的存在下, Fe^{2+} 会变为 Fe^{3+} , 于是产生高铁血红素。血红素和高铁血红素都是有反馈作用的信号,能引起 ALA 合酶的合成减少并抑制此酶。这就

使得血红素的形成和珠蛋白的形成互相配合以合成足够的血红蛋白。当血红素的合成超过了珠蛋白的合成时, 反馈系统就会起作用。

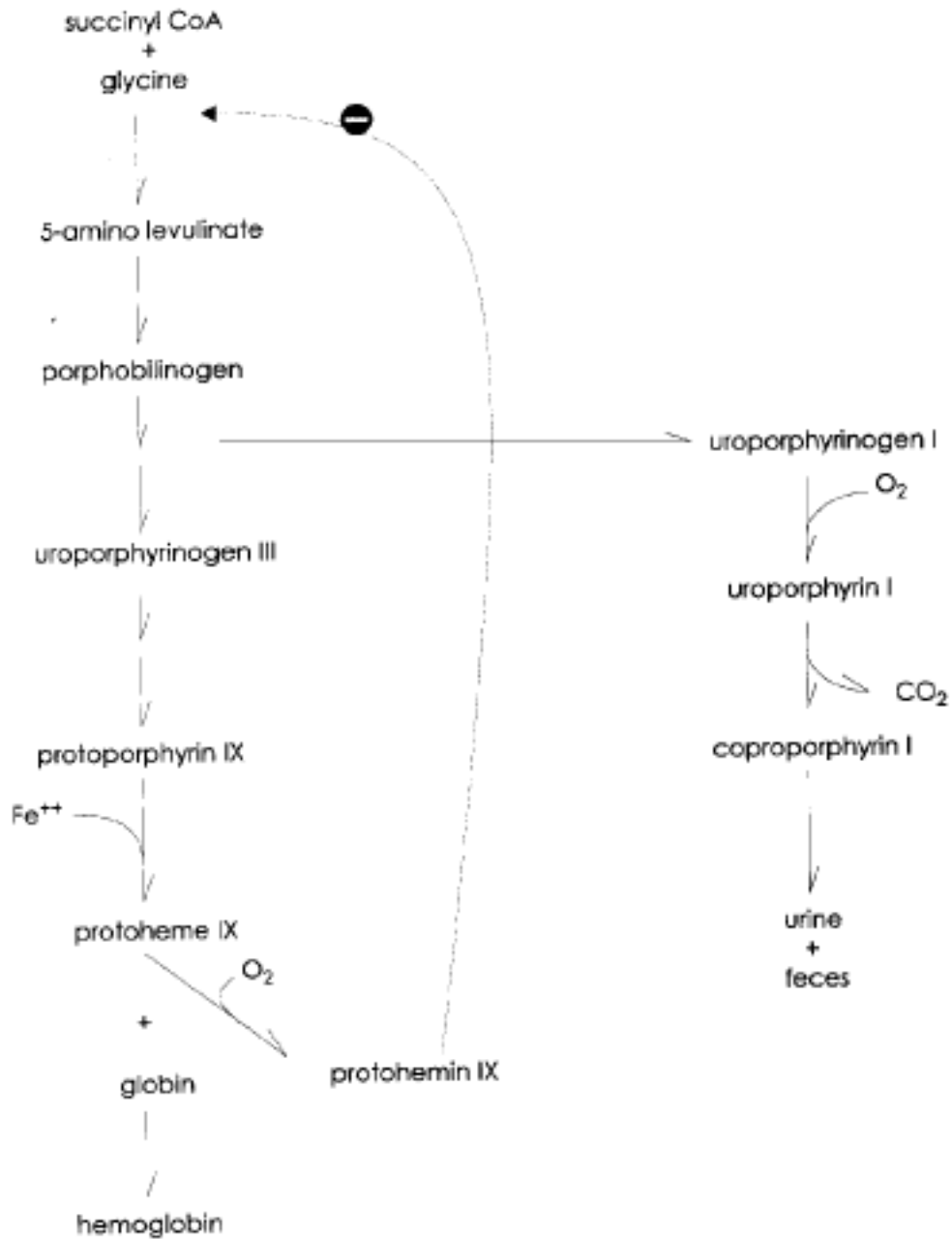


图 20.12 卟啉合成控制的主要步骤

包括第一步的抑制以及高铁血红素 (其中 Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+}) 使酶量减少, 还显示了卟啉的非正常的合成。

(二) 血红蛋白的维持

一个重要的问题是: 只有未成熟的红细胞才能合成血红蛋白, 而一旦成熟, 血红蛋白的量就不能由于新的合成而增加。在红细胞以其血红蛋白运载氧的过程中, 会有一些血红蛋白被氧化为高铁血红蛋白 ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), 这是不能运载氧的形式。假若这种过程继续下去, 红细胞很快就不能运载氧了。因此, 红细胞中有一种高铁血红蛋白还原酶, 它催化谷胱甘肽的氧化和高铁血红蛋白中的铁从 $3+$ 还原为 $2+$, 使得血红蛋白重新形成, 运载氧的能力也就恢复了。

(三) 卟啉的非正常合成和血卟啉病

有许多类型起因于遗传的卟啉病。最常见的一种是急性间歇性血卟啉病, 是一种遗传性的紊乱, ALA 合酶增多而尿卟啉原合酶 (即四吡咯的合成) 减少, 于是卟啉原增多而从尿中排出。血卟啉病患者使人觉得像吸血鬼的样子, 因为他们对光线特别敏感, 嘴唇又红得出

奇。据说英格兰王乔治三世曾患有这样疾病,使得有间歇性的癫狂。铅中毒会使血红素合成的两种酶受到抑制,这就是 ALA 脱水酶(即卟啉原的形成)和亚铁螯合酶(即血红素的形成),因此 ALA 积累并从尿中排出。

(四) 血红素的降解

血红蛋白可作为血红素的代表,其实体内的所有血红素都是一样的。人体内红细胞的寿命约为 120 天。一旦红细胞被破坏,血红蛋白就发生降解。这种降解可以发生在脾脏中或网状内皮细胞中。不再起作用的血红蛋白中的血红素被微粒体(内质网)中的一种血红素加氧酶转变为胆绿素,此酶使铁释放出来,并使亚甲基桥的碳变为 CO。这是人体内独一无二的、已确定为产生一氧化碳(CO)的反应。事实上,人体产生 CO 的测定可作为血红素降解的测定方法。环打开后,我们得到的就是线状的四吡咯,称为胆绿素。这种化合物呈绿色,皮肤碰伤出现青肿的绿色原因就在此,因为碰伤处的血细胞已死亡,产生胆绿素。在脾脏和肝脏中,胆绿素可利用 NADPH 而被还原为胆红素(呈红色)。胆红素可以与清蛋白结合而在血液中流动。胆红素通常被排出体外;不过它较不易溶而且非极性很高(图 20.13)。

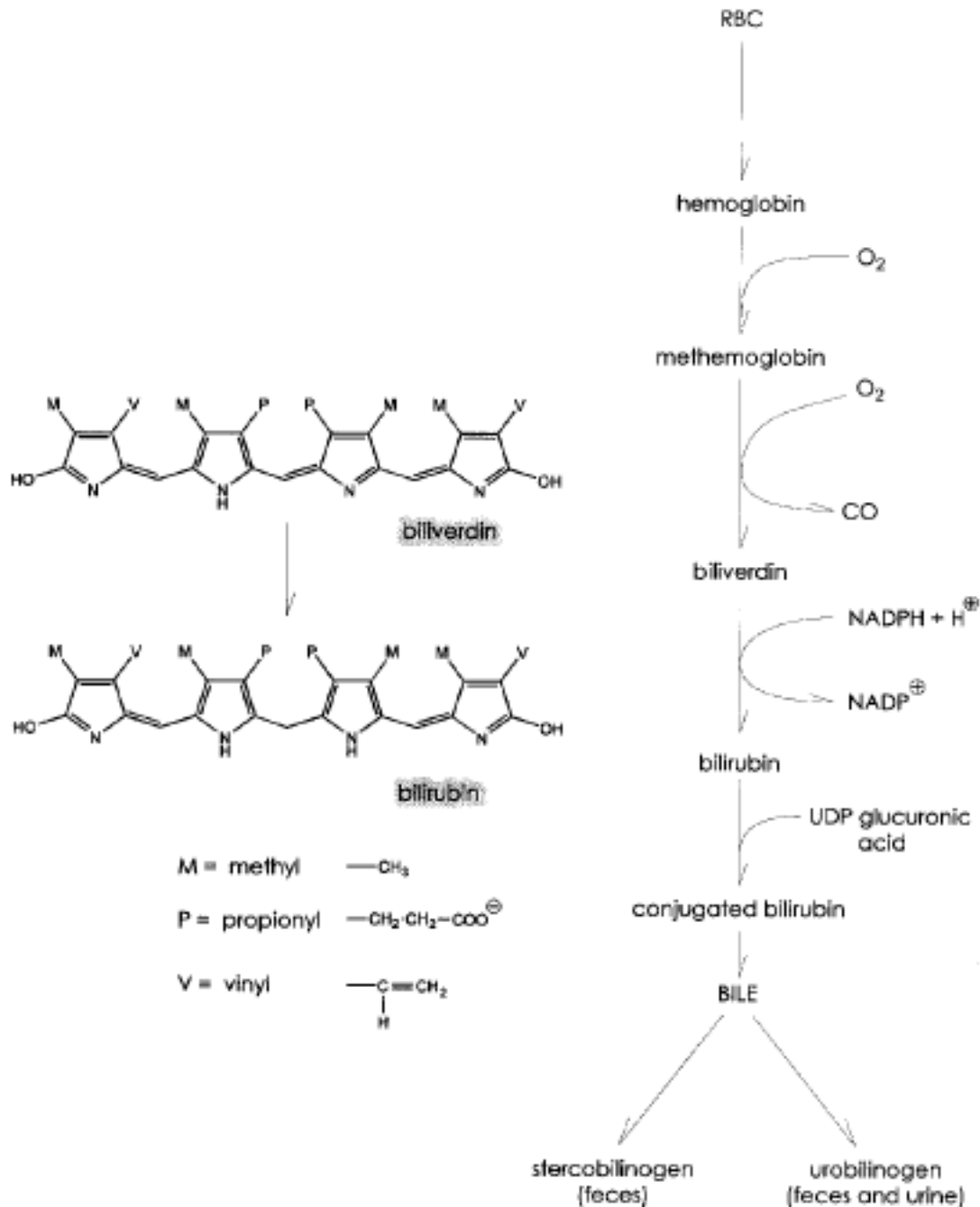


图 20.13 血红蛋白的降解
示血红蛋白降解大意,列出了胆绿素和胆红素的结构式。

如果胆红素很多,这种非极性就可能成为问题,它能够穿过脂质的膜,对正常的功能产生干扰,特别是对中枢神经系统。在肝中,来自 UDP-葡萄糖醛酸的 2 分子葡萄糖醛酸与胆红素缀合,形成胆红素二聚葡萄糖醛酸;缀合的胆红素会通过胆汁进入肠中,然后排出体外。粪便的颜色主要是由于排出的缀合的胆红素,也称为胆色素。胆绿素和胆红素都是胆色素。

早产婴儿的问题之一,即有过量胆色素积累(称为黄疸)可能与负责缀合这些胆色素的酶正在发展之中有关。即在胎儿中这种酶少或无,而在分娩之前增多。分娩之前,母体的系统能够处理这些化合物的解毒作用;但出生之后,新生儿就必须依靠自身的系统。在某些情况下,婴儿早产,还没有足够的起缀合作用的酶,就出现了有关去除胆红素和黄疸的问题。

(五) 黄疸

除去代谢中某些先天的错误之外,还有 3 种情况可以引起成年人的黄疸:

(1) 红血细胞的过度破坏和脆弱性,因此产生的胆色素超过了肝脏所能处理的量,胆色素不能被缀合并排出体外。

(2) 由于肝炎或肝硬化而引起的问题,例如酗酒引起的肝硬变。在这些情况下,肝脏不能以与胆色素形成的速率相配合的速率吸收和(或)缀合并排出胆色素。

(3) 胆道的堵塞,例如有结石,这时肝脏能够吸收并缀合胆色素,但不能将缀合的胆红素移入胆汁从而移入肠中。

因此,这些化合物就累积在肝中并运回到血液中,引起黄疸。黄疸使皮肤变色,并使白眼珠变得非常黄。黄疸可能成为严重问题,需要适当的治疗。

肝硬化和红细胞过分破坏时,许多胆色素可能处于未缀合的形式。胆道堵塞时,大部分胆色素可能处于缀合状态,因为肝功能正常,但不能使胆色素进入胆汁和胆囊以便排入肠道。黄疸的另一个指标是尿通常呈深桔红色,因为许多胆色素积累在尿中,显出其颜色。

20.5 小 结

(1) 嘌呤是由简单的化合物合成的,如甘氨酸、谷酰胺、天冬氨酸、 CO_2 和四氢叶酸- C_1 化合物。

(2) 嘌呤合成的控制在于早期的步骤——PRPP 转酰胺基酶催化的磷酸核糖胺的形成。单独的 AMP 或 GMP 仅部分抑制此酶,而 AMP 和 GMP 在一起则强烈抑制此酶。

(3) IMP 的合成是一个分支途径,它能转变为 AMP 或 GMP,各有足够量时就能抑制本身的形成。

(4) 嘌呤会降解为尿酸。也可以在尿酸形成之前得到补救,再合成为嘌呤核苷酸。形成过量尿酸可引起痛风。

(5) 嘧啶是由天冬氨酸、 CO_2 和谷酰胺形成的。

(6) 嘌呤是在核糖磷酸上形成的,嘧啶却不同,嘧啶碱先形成,然后核糖磷酸再加上去。

(7) 人体内,嘧啶合成的控制在于 UTP 抑制氨甲酰磷酸合酶,这是嘧啶合成的第二步。

(8) 嘌呤合成是有分支的途径;嘧啶合成是直线式的途径,其产物 UTP 和 CTP 可以相互转换。

(9) 嘧啶的降解不产生复杂的独特的产物,只产生一般的产物。

(10) 脱氧核苷酸是由二磷酸核苷酸形成的。

(11) dUMP 转变为 dTMP(加一个甲基,需要四氢叶酸参与),因为 DNA 中有胸嘧啶,而非尿嘧啶。

(12) 可以用许多种抗代谢物抑制嘌呤和嘧啶的降解和合成。这是化疗的根据之一。

(13) 血红素是由甘氨酸和琥珀酰 CoA 加上金属(通常是铁)合成的。血红素是四吡咯化合物。

(14) 若血红素未被用于血红素蛋白质的合成,那么血红素和高铁血红素都会抑制并减少-氨基戊酮酸——血红素合成中第一个独特的中间产物——的合成。

(15) 尿卟啉原 辅合酶使一个吡咯环以相反的方向插进去。假若缺乏这一过程,便会发生一种类型的血卟啉病。

(16) 有许多种与血红素合成有关的疾病,都是血卟啉病。

(17) 血红素可降解为线状的化合物如胆绿素和胆红素以及 CO。胆红素会与葡萄糖醛酸缀合并排入胆汁中。这些产物称为胆色素。

(18) 如果胆色素的排泄不正常,就会发生黄疸。

参 考 资 料

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency: The Lesch-Nyhan syndrome and gouty arthritis, J. T. Stout and C. T. Caskey, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill, New York, pp. 1007 ~1028.

Hyperuricemia and gout, T. D. Palella and I. H. Fox, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill, New York, pp. 965 ~1006.

Thymidylate synthase: A target for anticancer drug design, K. R. Harrap, A. L. Jackman, D. R. Newell, G. A. Taylor, L. R. Hughes, and A. H. Calvert, 1990, *Adv. Enzyme Reg.*, 161 ~179.

Methotrexate 5-aminoallyl-2'-deoxyuridine 5'-monophosphate: A potential bifunctional inhibitor of thymidylate synthase, L. M. Stuhmiller, R. Mazarbaghi, S. Webber, and J. M. Whiteley, 1990, *Adv. Enzyme Reg.*, 141 ~157.

Properties of purine and pyrimidine analogs, G. H. Hitchings, 1991, *Adv. Enzyme Reg.*, 433 ~443.

Hereditary orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism, D. P. Suttle, D. M. O. Becroft, and D. R. Webster in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill, New York, 1095 ~1126.

The porphyrias, A. Kappas, S. Sassa, R. A. Galbraith, and Y. Nordmann, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill, New York, 1305 ~1365.

Hereditary jaundice and disorders of bilirubin metabolism, J. R. Chowdhury, A. W. Wolkoff, and I. M. Arias, in *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, Vol. 1, 6th ed., C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, and D. Valle (Eds.), 1989, McGraw-Hill, New York, 1367 ~1408.

复 习 题

1. 嘌呤合成中被协同控制的步骤是下列各项中的哪一项?
 - a) 磷酸核糖基焦磷酸的形成
 - b) 磷酸核糖胺的形成
 - c) IMP 的形成
 - d) AMP 的形成
 - e) GMP 的形成
2. 控制痛风(或尿酸形成)的药物是下列各项中的哪一项?
 - a) 6-氨基嘌呤
 - b) 叠氮丝氨酸
 - c) 氨基蝶呤
 - d) 别嘌呤醇
 - e) 6-巯基嘌呤
3. 人体内嘧啶合成中主要的控制步骤是哪种化合物的形成?
 - a) 氨甲酰磷酸
 - b) 氨甲酰天冬氨酸
 - c) 乳清酸
 - d) UMP
 - e) CMP
4. 血红素合成需要哪两种前体?
 - a) 丙氨酸和琥珀酰 CoA
 - b) 甘氨酸和乙酰 CoA
 - c) 丙氨酸和乙酰 CoA
 - d) 甘氨酸和琥珀酰 CoA
 - e) 甘氨酸和精氨酸
5. dTMP 的直接(最近)前体是
 - a) dCMP
 - b) dAMP
 - c) dUMP
 - d) dGMP
 - e) dCDP

参 考 答 案

1. b 这一反应是嘌呤合成中的关键步骤, AMP 或 GMP 对此反应有微弱的抑制作用, 但二者以协同作用的方式会强烈地抑制此反应。
2. d 别嘌呤醇是黄嘌呤脱氢酶的竞争性抑制剂, 因而抑制尿酸的形成。
3. a 细胞溶胶中谷酰胺、 CO_2 和 ATP 形成氨甲酰磷酸的反应为 UTP 所抑制。
4. d 甘氨酸和琥珀酸先化合, 再脱羧, 然后在氨基戊酮酸合酶催化下在线粒体中形成 α -氨基戊酮酸, 这是血红素合成的第一步。
5. c dUMP 加上 $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -亚甲基 THFA 产生 dTMP。dUMP 的直接前体是 dCMP(a), 而不是 dTMP。

第 21 章 基因组的组织

21.1 引言

个别的细胞能够进行许许多多生物化学反应,并对多种刺激发生响应。在多细胞生物体内的细胞能够相互配合并将其作用特化,以完成在不同环境下的高度控制并有效地利用有限的资源。一个生物体的每一个细胞具有实际上完全相同的遗传信息,这些信息总称为基因组。必须用高度有序和有效的方式取出这些信息,就好像必须用软件程序寻找电脑中的数据库一样。在我们对处理和维持基因组的“数据库”所必需的生化过程的细节进行研究之前,本章将首先概括介绍基因组内的 DNA 是如何组织的。图21.1表示的是一般的信息流,从 DNA 通过称为转录的过程传至 RNA,再通过总称为翻译的一系列生化合成反应从 RNA 转至蛋白质。图21.1的示意图也着重指出基因是贮存在 DNA 中的信息的功能单位。

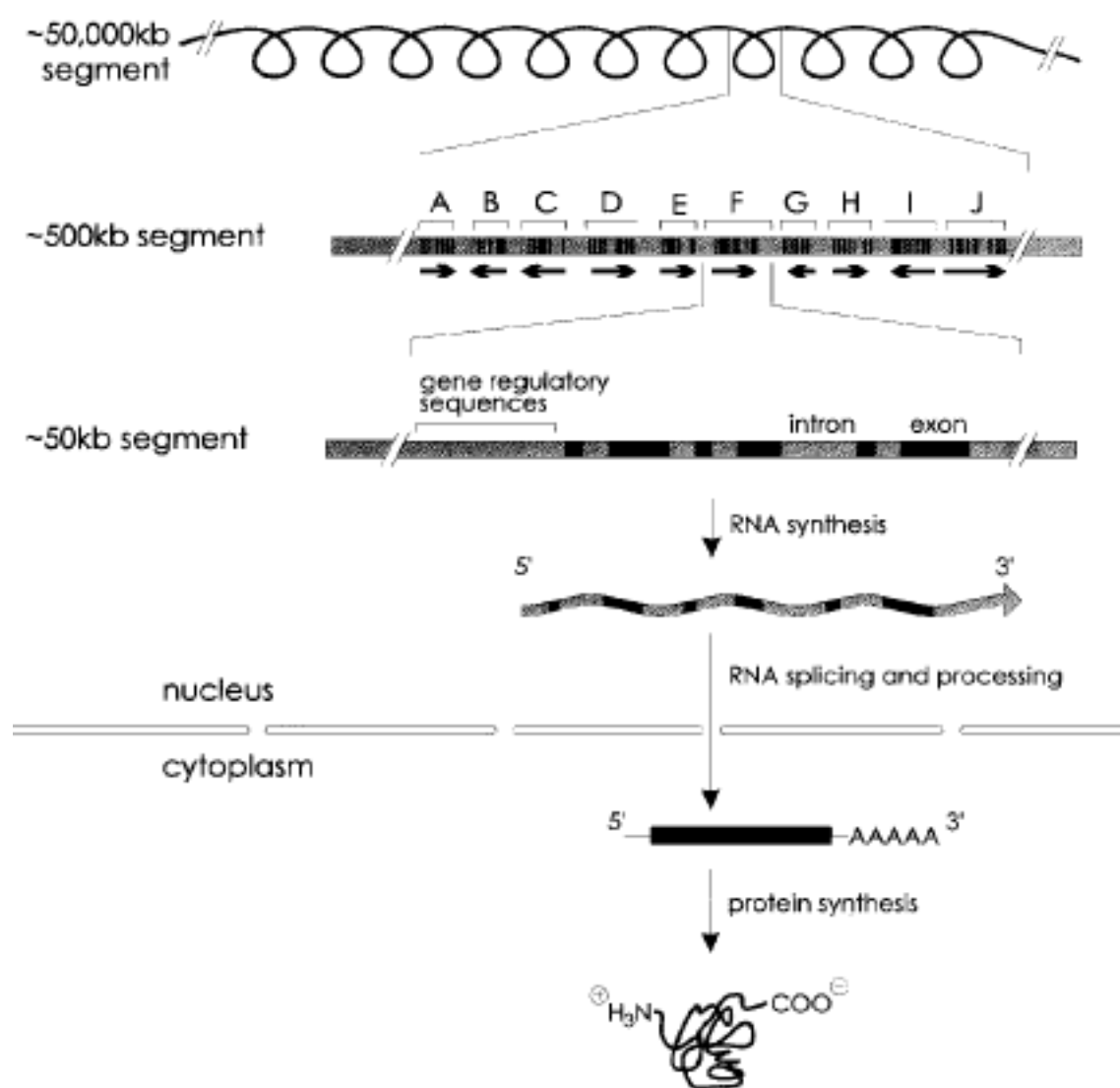


图 21.1 信息从 DNA 到 RNA 再到蛋白质的分子流

示脊椎动物的例子,基因的编码序列分为外显子和内含子,这在这些生物中是普遍的。基因 A ~J 分布在一条染色体的片段上,基因 F 的放大则表明它由调节基因和编码序列所组成。转录、RNA 的加工和翻译的过程在以后几章中详述。

本章叙述不同生物之间基因组如何不同, 以及用于分析和鉴定几种基因组的完整核苷酸序列的途径。因为有极大的可能性去了解人的发育和疾病, 现在有一项全球性计划, 试图获得人类基因组的全部序列。关于人类基因组是如何组织的, 许多问题尚待阐明, 一旦有了大量的人类 DNA 序列, 如何进行破译, 尚有争论。

21.2 基因组的大小

(一) 原核生物的基因组

对于任何一定的细胞类型所能容纳的基因组的大小, 进化曾有过巨大的影响。例如, 典型的细菌病毒(亦称噬菌体)是由一个蛋白质外壳包被着一个核壳核心组成的, 核壳中有一个比较小的基因组。噬菌体 $\times 174$ 是长 5386 个核苷酸的单链的环, 而噬菌体 T7 的基因组则长 39 936 个核苷酸、以双链的线状分子而存在。T7 基因组的遗传学和生物化学的分析表明, 由 T7 基因组产生的基因产物至少有 45 种。图 21.2 表明 T7 基因组是如何组织的, 可以看出许多 T7 基因编码的是 DNA 复制和 RNA 合成所需要的蛋白质。这些基因在基因组中以 5 到 3 的方向排列, 所以其时序表达使得 T7 的大量感染达到最优化。

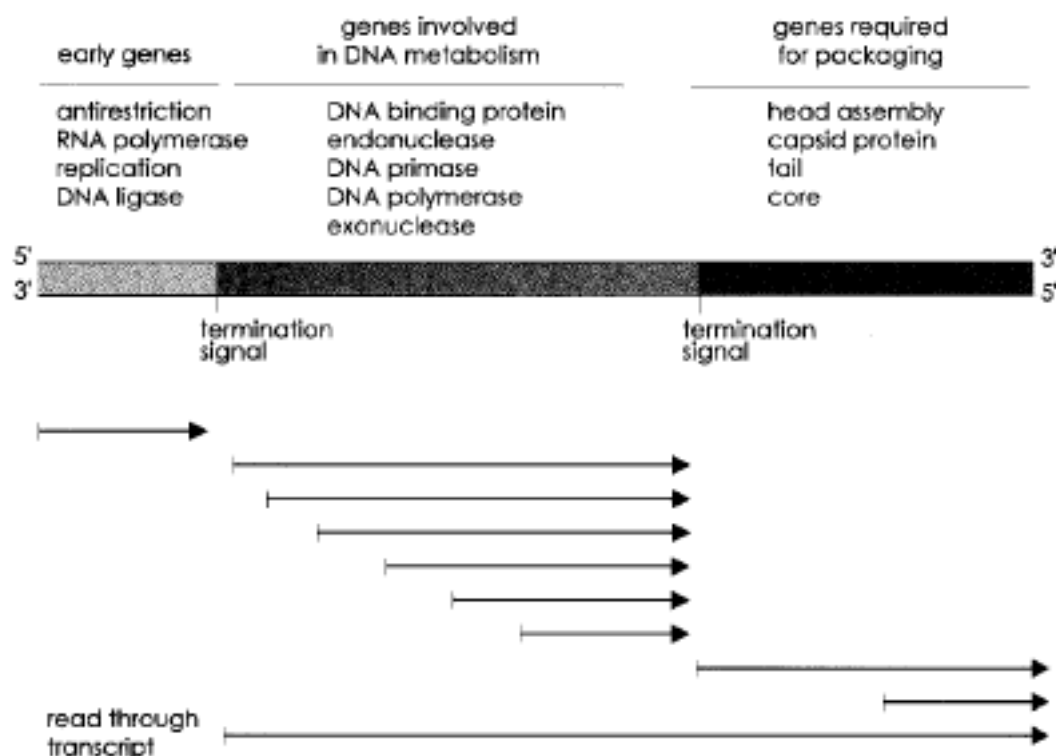


图 21.2 噬菌体 T7 基因组的图, 示基因组各个部分的基因的有序转录
噬菌体复制所需要的基因产物先合成, 病毒包装所需要的基因产物后合成。

E. coli (大肠杆菌) 的细菌基因组呈大的双链的环, 与细胞膜紧密结合。虽然其序列尚未完全测定出来, 但物理的测量估计它含有 5×10^6 DNA 碱基对。到目前为止, *E. coli* 的染色体图上已有将近 1000 个基因, 根据遗传分析和现有的 DNA 序列的信息, 估计共有约 5000 个 *E. coli* 的基因。

(二) 人类的基因组

人类可能是这个星球上最复杂的生物, 需要多少 DNA 来指定人的生活周期呢? 人的基因

组大概由 3.3×10^9 个 DNA 碱基对组成。这么多的遗传物质分布在精细胞和卵细胞的 23 条人的染色体上。人的体细胞(配子以外的所有其他类型的细胞)含有两倍的 DNA,因为它总共有 46 条染色体,来自双亲的各 23 条。目前的估计是人的基因组中约有 100 000 个基因。

(三) C-值悖理

人的基因组中基因的数目约为 *E. coli* 基因组中基因数的 20 倍,然而人的基因组约为 *E. coli* 基因组的 1000 倍。各物种之间、基因的数目(或遗传信息的复杂程度)与每个细胞中 DNA 总量之间不是正相关的现象,称为 C-值悖理。例如,某些类型的藻中的 DNA 约为人的 (10^{11} 碱基对) 100 倍以上,然而这种低等的植物中独特的基因序列数目却较少。基因组大小上有这种差别的原因是许多类型的藻含有大量重复的 DNA 序列。同样,人的 DNA 也含有比 *E. coli* 多得多的重复序列以及“间隔 DNA”,插在基因的编码序列之间。本章后面将叙述重复 DNA 和间隔 DNA 的性质。

21.3 细胞器中的基因组

有些细胞器也有 DNA,称为染色体外 DNA。已知人的线粒体基因组的全序列,它是 16 569 个核苷酸的双链的环。每个线粒体有 5 ~10 个拷贝的这种环状基因组。虽然进行复杂的细胞呼吸过程所需要的蛋白质大多是由核基因组编码的,但也有 13 种蛋白质是由线粒体基因组编码的,而其中 7 种为 NADH-Q 还原酶所特有的亚基。人体内还有 22 种线粒体的 tRNA 和 2 种 rRNA 是在线粒体基因组中编码,它们与线粒体内蛋白质的合成有密切关系。人的线粒体 DNA 如图 21.3 所示,图中还标出了引起人的 Leber 氏遗传性视神经萎缩病(LHON)

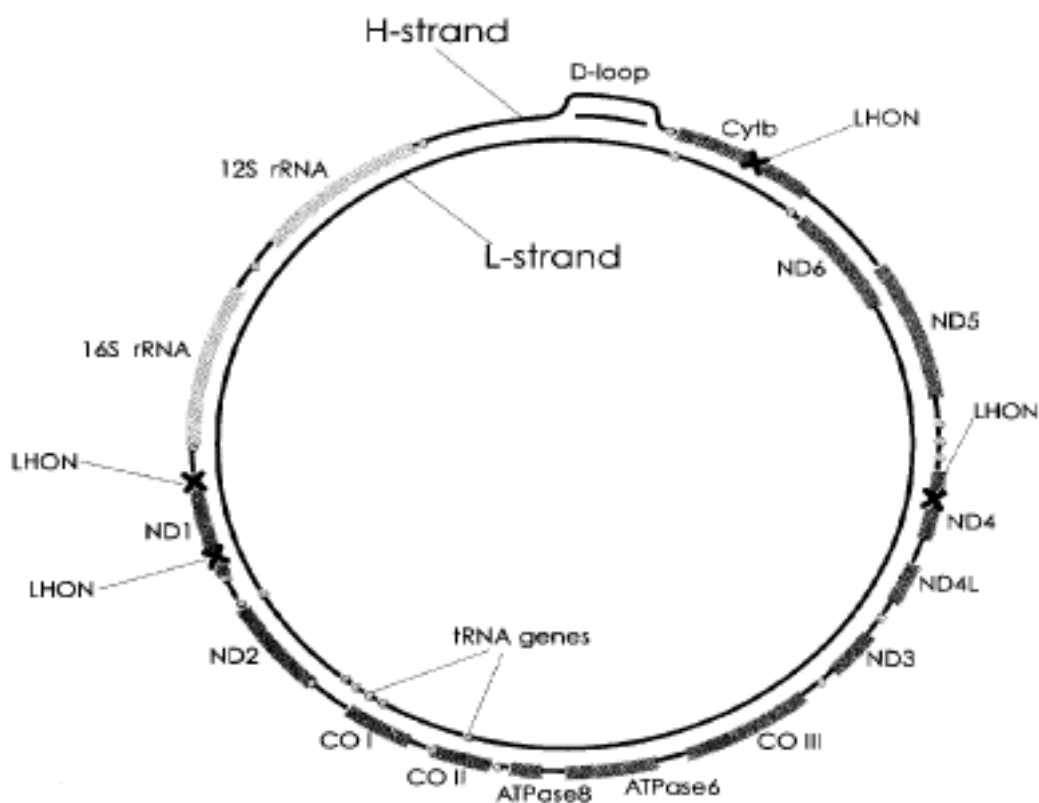


图 21.3 人的线粒体基因组

ND 代表 NADH 脱氢酶的亚基,CO 代表细胞色素氧化酶的亚基,cytb 为细胞色素 b。线粒体基因组的复制需要 D 环。大多数基因为 H 链(外圈)所编码。几种已知的 LHON 突变以“X”表示。

的线粒体基因组中突变的位置。LHON 为母性遗传的基因疾病,其特点是某些组织,如视神经的神经发育不健全。因为卵细胞给合子提供线粒体,所以线粒体 DNA 的突变是母性遗传的。

对植物叶绿体的基因组也有许多研究,有些序列已全部测出。例如,细小裸藻(*Euglena gracilis*, 即眼虫)的叶绿体基因组有143 172个碱基对,以双链的环存在。像线粒体一样,叶绿体中这种染色体外的 DNA 基因组也有多个拷贝,每个叶绿体中约有 50 个拷贝。根据细菌基因组的已知信息,以及线粒体和叶绿体在细胞中的功能,有人提出这些细胞器可能起源于早期的真核细胞与原核祖先的相互有利的共生关系。

21.4 真核生物的染色体

(一) 染色体的组织

所有的 DNA 怎么能放到一个细胞内,在细胞分裂过程中这些 DNA 又怎样复制并分开?就真核生物而言,答案是全部基因组 DNA 分散在许多大的称为染色体的线状分子之内。这些有高度组织的染色体结构中,除 DNA 外,还有蛋白质,如组蛋白(第 5 章)。DNA 复制和染色体分离等重要过程都必须在这些大的 DNA-蛋白质分子中发生。端粒是每一条染色体两端的结构,它有利于 DNA 的复制,着丝粒是每条染色体中央附近的结构,它是有丝分裂中正常的染色体分离所需要的(第 5 章)。图21.4所示为典型的真核染色体的概况,特别说明了已知对端粒和着丝粒的功能有重要意义的 DNA 序列。

(二) 端粒

端粒是由短的、高度重复的 DNA 序列组成的,这些序列是重复的(5') C_xA/TG_y (3')序列,在酵母的端粒中 x 和 y 代表 1 ~3 个碱基。人的端粒重复序列是(5')TTAGGG(3')。酵母中约有 100 个这样的重复序列,人体中这种重复的长度不定,可能包括多达数千个 DNA 碱基。除去有利于在线状的染色体两端的 DNA 合成外,端粒好像还有保护染色体两端使其不至降解的功能。在染色体末端的最远端的端粒重复序列中的 G 残基能够通过不标准的 G-G 碱基配对而形成发夹环。这种结构能够消除任何游离的单链末端,这种末端可能是细胞的外核酸酶的底物。有趣的是,已发现人的端粒在配子细胞中最长,在年龄较大的人的体细胞中则逐渐缩短,说明老龄化可能与端粒的缩短有关。支持这种看法的是,已证明某些组织培养的细胞,当它们经过所谓的衰老过程后端粒序列就会丢失。端粒的维持需要端粒酶。端粒酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,它将 T_xG_y 的重复序列加到染色体末端

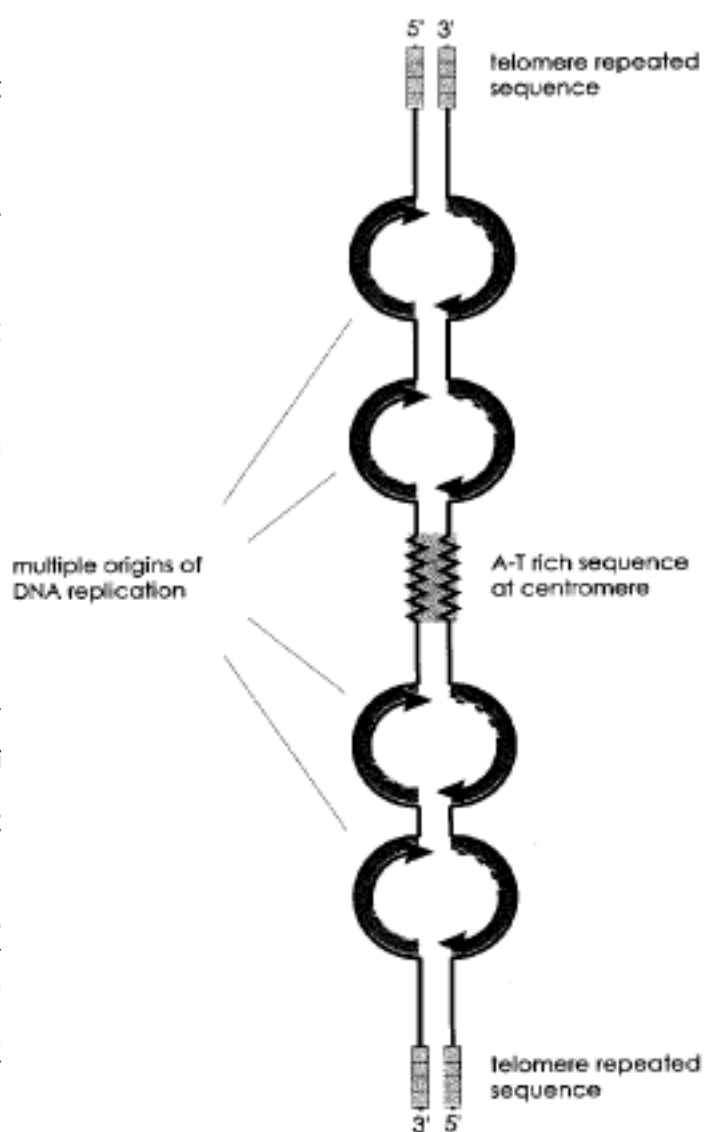


图 21.4 真核染色体的结构
示端粒和着丝粒的相对位置,以及
DNA 复制的多个起始点。

上。端粒酶核糖核蛋白复合体中有一 RNA 模板,它是酶的活性部分中不可分割的组分。

(三) 着丝粒

染色体中另一个重要的功能元件是着丝粒。已证明酵母的着丝粒有一个 A-T 特别丰富的区域,长约 130 个碱基对,与着丝粒-结合蛋白紧密连系在一起。染色体上的这种蛋白质-DNA 复合体称为动粒,它与有丝分裂纺锤体的微管相互作用。有丝分裂过程中,有丝分裂纺锤体连接在动粒上并提供了使染色体分开所需要的关键的力量,染色体分开后才能分离到两个子细胞中去。已证明人的端粒中也有一段长的富于 A-T 的序列,包括高度保守的重复序列 (GGAAT)_n。

21.5 真核基因的组织

基因是遗传信息的基本单位。单拷贝基因大多是编码蛋白质的,它们分散在基因组中,看不出有什么结构。因此,不可能预测功能上相关的基因在人的 22 个常染色体和 2 个性染色体 (X 或 Y) 上的位置在哪里。还有许多编码 RNA 的基因,如核糖体 RNA (rRNA) 和转移 RNA (tRNA) 的基因。细菌和病毒的基因组都小,相关的基因常常聚集在称为操纵子的 DNA 片段上,这便于相互协作的基因表达(第 28 章)。

在真核细胞中,情况却十分不同。除非有强大的进化压力使基因组织在一条染色体上,基因似乎是可以“打乱”的,很像基因重排的结果。小鼠和人有许多哺乳动物所共有的基因;然而这些基因的组织并不总是与小鼠和人的不同的染色共线性。这项观察说明,自从小鼠和人分散开时(约 7000 万年前)起,大的 DNA 片段就通过 DNA 重组(见第 23 章)和染色体易位(第 31 章)在染色体之间移动了。真核生物中,功能相似的基因有时会彼此连在一起成为基因聚簇。基因聚簇与细菌的操纵子相似,但每个基因在转录水平上的调节(第 29 章)是独立的。在真核的基因聚簇内基因的排列似乎有生物学意义,因为基因表达的模式常常是在时间上或空间上受到调节的。

通过基因重复和序列趋异这两种进化过程,某些相关的基因会存在于同一染色体位置上,彼此紧密地联系在一起。人染色体中的珠蛋白基因聚簇似乎是这种进化过程的很好的例证。

α -珠蛋白基因位于人染色体 16 上, β -珠蛋白基因聚簇位于染色体 11 上。如图 21.5 所示,5 个 β -珠蛋白基因(β^G , β^A , 和 β^D) 都按其在发育中表达的顺序排列在染色体上。 β -珠蛋白基因聚簇的一般特点也一样。 β -珠蛋白基因“切换”的机制(胎儿体内胚胎期 β^G 基因不表达,而成年人体内 β^A 基因不表达)仍不完全了解。解释 β -珠蛋白基因切换机制的一种模型是基因座控制区(LCR)通过专一的 DNA-结合蛋白(见第 29 章)的活性指导着适当的 β -珠蛋白基因的转录。还应注意有 β -珠蛋白的假基因(几乎完全相同但不能起作用的基因),这大概是基因重复和 DNA 突变的结果。

脊椎动物的 Hox 基因是聚簇基因中的第二个例子,其表达受到发育的限制。基因的这一个大家族是许多发育过程,例如胚胎发生中组织的构造所需要的。Hox 基因在染色体上的 5 到 3 的排列反映的就是在发育的最早期细胞中的基因沿着整个体轴的空间上表达的相对顺序。在胚胎的将要成为头部和颈部的区域中表达的 Hox 基因与那些为四肢而表达的 Hox 基因都在同一染色体上而且彼此邻近。因此,和 β -珠蛋白基因聚簇一样,Hox 基因聚簇也可能是起源于胚胎发育所需要的一种祖先基因的重复。

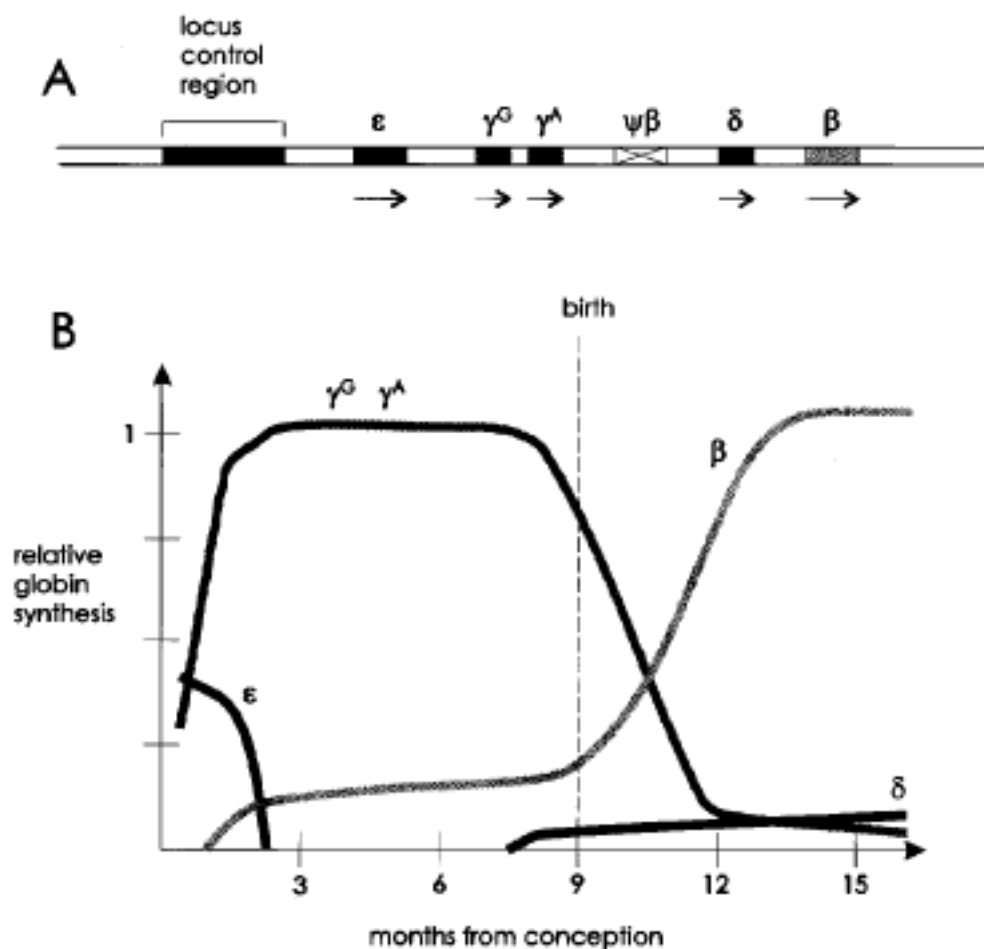


图 21.5 人的 β -珠蛋白基因在基因组中的排列和在发育中的表达

(a) 人 β -珠蛋白基因簇的示意图, 包括 β -珠蛋白假基因() 和上游的基因座控制区 (LCR), 这是珠蛋白基因表达的正常控制所需要的; (b) 人体内 β -珠蛋白基因簇的表达模式, 示年龄和专一的珠蛋白基因亚类的表达之间的关系。

多基因家族的另一种类型是同样的基因序列有许多几乎完全相同的拷贝。一个例子就是 rRNA 基因的级联排列。这种情况是编码几种 rRNA(哺乳动物中是 18S rRNA 和 28S rRNA) 和 5.8S RNA 的长的重复单位以多个头-尾相连拷贝存在于染色体中(见第 24 章)。在相邻的 rRNA 基因簇之间有不被转录的间隔区, 这些间隔区可能在控制 rRNA 基因的表达方面起着重要作用。人的每一单倍基因组中有约 200 个拷贝的 18S 和 28S rRNA 基因, 这些基因在 5 条染色体上组成级联排列。在细胞周期中需要组装大量核糖体时, rRNA 基因的长的级联排列会使 rRNA 合成的效率大为提高。

21.6 DNA 中的重复序列

推测人有约 100 000 个基因, 估计这些基因只占人基因组的 10% 左右。那么其余的 DNA 有什么用, 其功能是什么? 答案仍不清楚, 但似乎很可能这些 DNA 并不是以前所认为的都是“无用”的 DNA, 根据是已发现人的某些遗传病是由非编码区的 DNA 发生变化所引起的。

(一) 二核苷酸和三核苷酸的重复

非编码 DNA 中有一大部分是由高度重复的 DNA 序列组成的。其中最短的是二核苷酸的重复, 包括 CG, 它可能与基因表达的控制有关。这些重复称为 CpG 岛, 因为它们聚簇成大于 1 kb 的序列, 常存在于基因调节区的 5' 端附近。另一种二核苷酸重复的特点是 A 和 T 残基交替形成的一段长的序列。最近发现 AT 重复序列的长度有缺失与结肠癌有关。人基因组中最常见的

二核苷酸重复是 CA。基因组中专一的 CA 二核苷酸重复的长度,在不同人中是不同的。遗传学家曾利用这项观察推导出人基因组的基因连锁图。其他短的重复序列就是端粒中的卫星重复和着丝粒中和周围的富于 A-T 的序列。三核苷酸重复也存在于人的基因组中,现已证明有几种人类的疾病就是由于专一的染色体位置上三核苷酸重复单位的数目增多所致。表 21.1 列举的 5 种遗传病均与三核苷酸重复的增多有关,但这种增多如何引发疾病,尚属未知。

表 21.1 三核苷酸重复的疾病

病名	重复序列	正常数目	病人的数目	重复所在位置
Kennedy 氏	CAG	11 ~33	40 ~62	蛋白质编码区
Huntington 氏	CAG	11 ~34	42 ~100	蛋白质编码区
脊椎小脑共济失调类型	CAG	29 ~36	43 ~60	蛋白质编码区
脆性 X 染色体	CGG	6 ~54	250 ~4000	5'-不翻译区
肌强直性营养不良	CTG	5 ~30	>50	3'-不翻译区

(二) 短的和长的散布元件

下一大类重复元件,就大小和丰度而言,当属短的散布序列,称为短散布元件(SINE)。人的 DNA 有多达 500 000 拷贝的 SINE,通常称为 Alu 重复序列,其长度约为 300 个碱基对。SINE 好像能围绕着基因组“跳”,“跳”的过程与 RNA 中间体和 DNA 整合有关。所提出的这种机制很像反转录病毒的生活周期,它也利用一种 RNA 中间体(第 30 章)。SINE 的“跳跃”可能是致死的,因为它会导致插入突变,这种突变的一个例子就是神经纤维瘤-1 基因的破坏,从而导致象人病。LINE(长散布元件)与 SINE 类似,不过长度为 7000 碱基对左右。虽然还不清楚为什么这些不同类型的重复序列会在人的基因组中积累,但它们有重要的进化上的功能,如通过同源重组机制(第 23 章)促进基因的混杂。

21.7 基因组作图

随着分子生物学技术的进步,显然有可能得到人类基因组的全部核苷酸序列。鉴定了引起几种人类遗传病的基因突变以后,这种想法受到了进一步的鼓励。例如,患病家族成员的标准遗传学的分析与分子克隆技术的结合鉴定出了有关囊性纤维化(CF)的基因。这种研究方法最终导致了一个 DNA 区域的分离,正常人与这种疾病的患者之间,这段 DNA 不同。发现 CF 基因在第 7 条染色体上,它包括 250 000 个核苷酸。推想此基因产物编码一种与离子转运有关的跨膜蛋白。迄今为止,已发现的 CF 基因突变 70% 是由于其蛋白质编码序列中氨基酸 508 的苯丙氨酸残基缺失了。这种突变会引起 CF 蛋白与 ATP 结合的活性受到损害。

(一) 限制性片段长度多态性(RFLP)

鉴定可能有基因突变的 DNA 区域的一种技术名为限制性片段长度多态性(RFLP)。这种策略的根据是这一发现:没有两个人的 DNA 的 3.3×10^9 个碱基对的序列是完全相同的。这种差别称为 DNA 多态性,是核苷酸改变、DNA 缺失或 DNA 重排的结果。因为人基因组的许多区域中有非编码序列,DNA 多态性大多对于遗传信息没有什么影响。可是利用这种多态性作为基因组的“界标”,却有可能确定一个特定性状是否以 DNA 多态性一样的模式遗传。

如果发现一种遗传病的发生几乎总是与一种的 DNA 多态性有关, 那么常常有可能分离 RFLP 标志附近的 DNA 以开始寻找有缺陷的基因。

图 21.6 说明如何进行 RFLP 作图。注意 RFLP 并不一定要位于疾病基因之内, 只要离得足够近, 可作为附近序列的标志就够了, 这个附近的序列就是据认为是“连锁的”。RFLP 是克隆疾病基因的有效工具, 因为基因组中密切连锁的序列很少会因基因重组而被分开(见第 23 章)。因此, DNA 多态性与缺失基因距离越近, 它与疾病联系在一起的可能性就越大。假若 DNA 多态性就是疾病的遗传上的原因, 那么它的存在与疾病之间的相关性就应该是 100% 的, 不过这是很少有的情况。

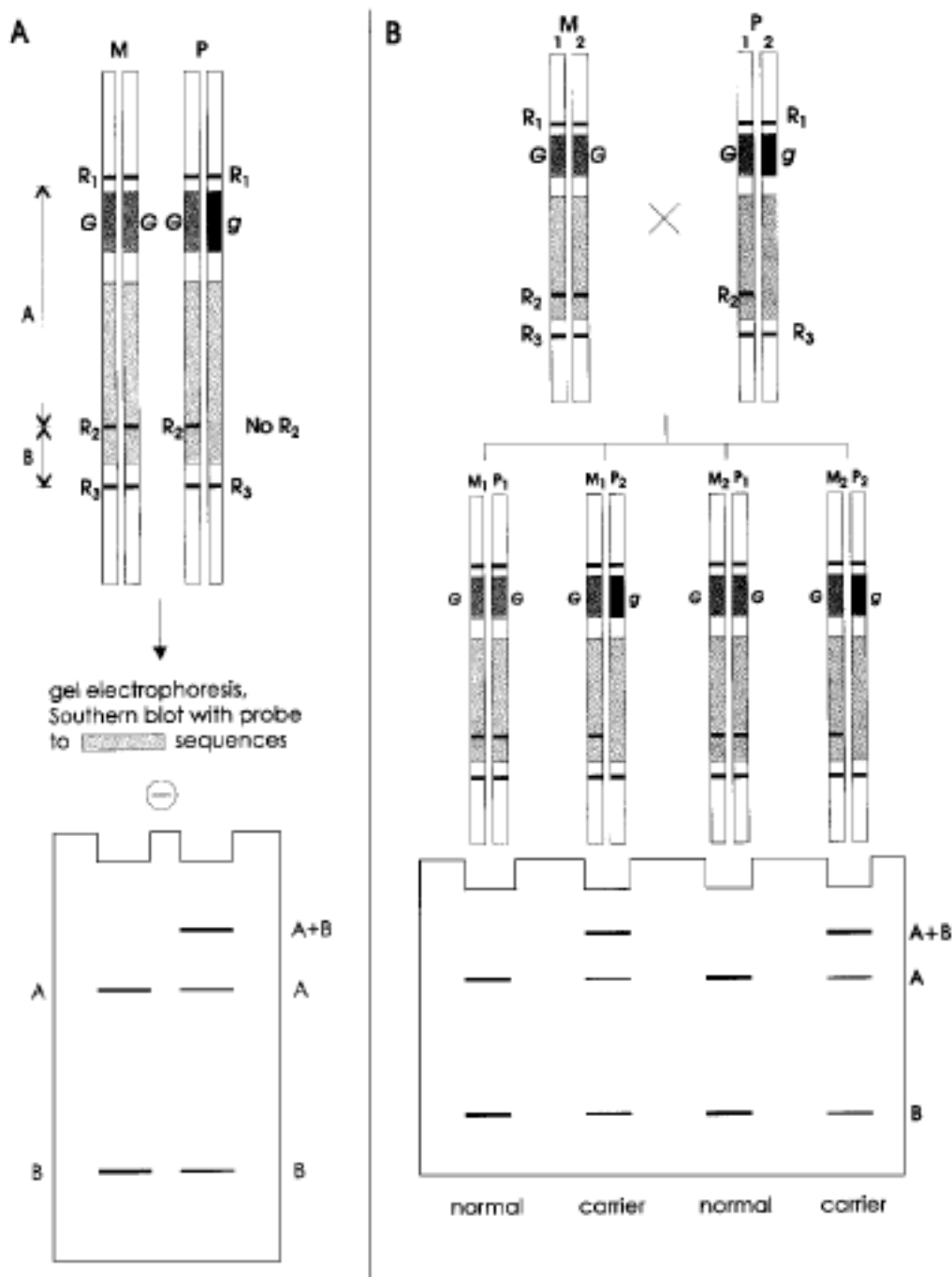


图 21.6 常染色体遗传(不在 X 或 Y 染色体的)基因的 RFLP 图

(a) 母体基因组(M)对于 R_2 限制位点和连锁的基因(G)都是纯合的, 而父体基因组(P)是杂合的, 因为其中同一个基因有正常拷贝(G)和缺损拷贝(g) [在此例中, 缺少 R_2 部位的父本染色体也有一个紧密连锁的缺损拷贝(g); 凝胶电泳和 Southern 印迹后, 可以看到, 由于失去了 R_2 位点, 父本基因组对于 RFLP 标志是杂合的]; (b) 谱系图, 表示 Southern 印迹所鉴定的 R_2 RFLP 标志与疾病载体的遗传表现型(G/g 杂合子)是联系在一起的。

(二) 人类基因组计划

分子遗传学家已开始认识到, 假若有人基因组的全部 DNA 序列, 那么就有可能更快地把由家族史所获得的遗传信息用于专一的疾病基因的鉴定。1988 年正式公布的人类基因组计划是由政府资助的, 其目的是测定人基因组的序列。这一计划已涉及大批美国、欧洲和日本的科学家, 中国也参加了这一计划。已分离出了个别的 DNA 片段, 并已开始鉴定它们在人基因组中的位置。考虑到人基因组的大小和处理数据的困难, 就可以知道这是一项极为庞大的计划。建立这样一个 DNA 片段的“文库”的基础是重组 DNA 的方法学的精髓和利用限制性内切核酸酶克隆 DNA 片段的能力, 此法如本章附录 21.1 所述。

必须要克服一个障碍, 才能有效地测定整个基因组的 DNA 序列, 这个障碍就是要设计出操作大片段 DNA 的方法。已研究出把人的基因组分割为兆碱基对 (Mbp, 10^6 碱基对) 或更大碱基对的方法, 比如把全部 3×10^9 碱基对分成 30 000 个片段。进一步把兆碱基对的片段分割为 1000 个小片段, 这才是标准的 DNA 测序法(见第 2 章)所能操作的大小。这种研究方

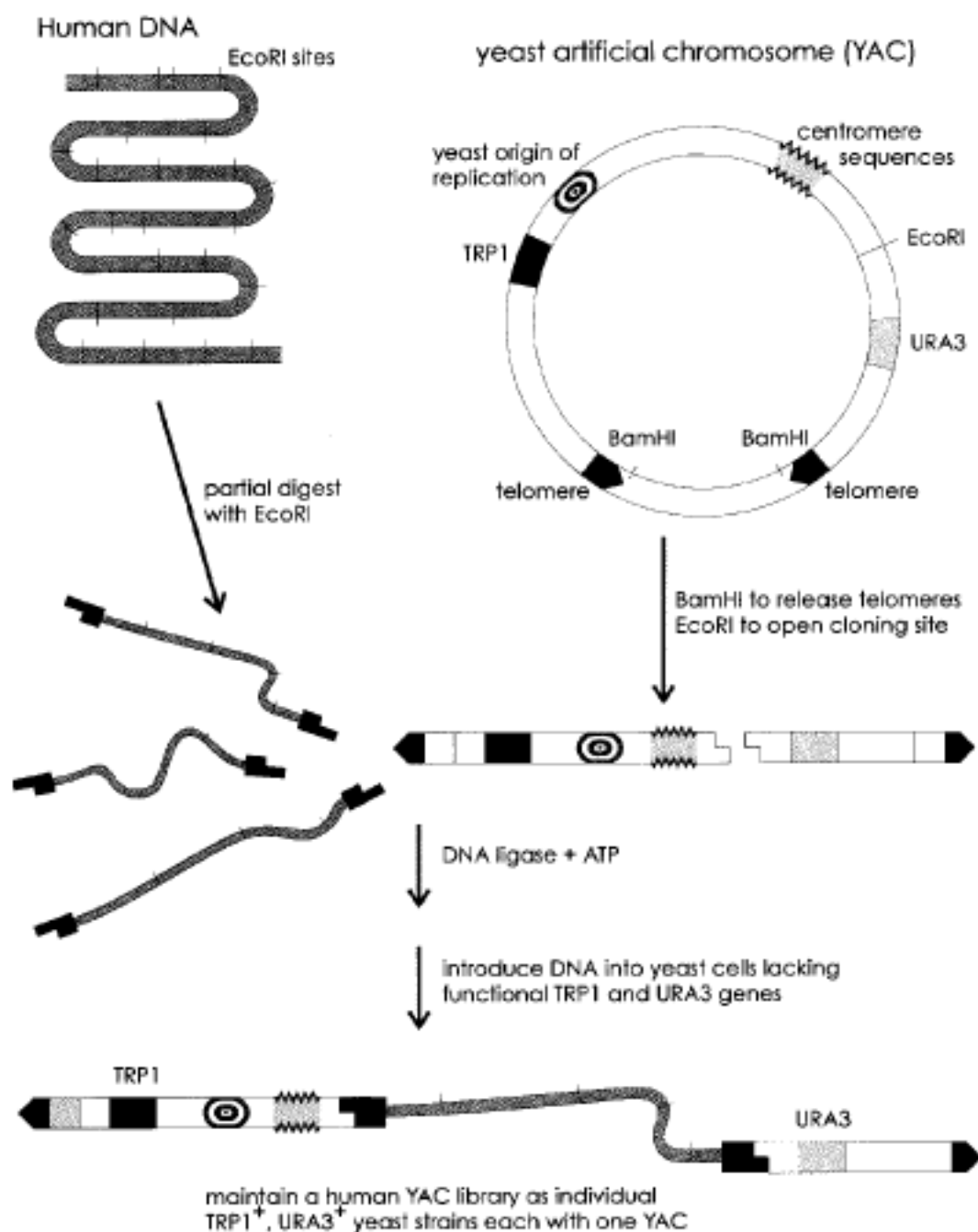


图 21.7 用 YAC 载体克隆 DNA 的策略

TRP1 和 UR3 是编码酵母中催化生物合成酶的基因, 可用这两个基因分别选择缺少合成色氨酸和尿嘧啶的酵母株系中的 YAC 载体。Bam HI 和 EcoRI 是位点专一的限制性内切酶。

法已应用于酵母和线虫(*C. elegans*)的基因组。把小的片段组装成大的、相互重叠的克隆,然后进行测序,迄今为止,研究工作者已得到 *C. elegans* 的第3号染色体的2 181 032个核苷酸的连续序列。

图21.7显示如何用酵母人工染色体(YAC)为主要工具以操作大的DNA片段。利用关于端粒保护染色体末端、有丝分裂时着丝粒使染色体正常分离和DNA复制起始点的已有知识,制成了YAC克隆载体,从而能用标准的克隆方法将大片的DNA插入到YAC载体中。

收集起来的代表全部基因组的人的YAC总称为“文库”,各YAC分别保存在各个酵母株系中,每一个株系都含有一单个的重复的带有一段人DNA的YAC,这段DNA的长度通常为0.5~2 Mbp(兆碱基)。为了保证整个YAC文库中有全部人基因组的至少一个拷贝,构建文库时使它有8倍的丰余性(所收集的酵母株系总共有 $8 \times 3 \times 10^9$ 个人基因组的碱基对)。一个典型的人YAC文库需要约500块微量滴定板,每板上有96个孔,每孔中放一个酵母株系。YAC文库可用放射性DNA探针进行筛选,探针中有所要研究的区域内的DNA序列,这些序列是用DNA杂交技术得到的。一旦鉴定出了适当的YAC,就可利用细菌质粒进行更多的克隆步骤将其再分为小的片段(见本章附录21.1)。

(三) 人Y染色体的物理作图

人基因组计划的目标之一就是构建一个由相互重叠的YAC组成的包括全部人基因组的物理图谱。最近利用160个序列标志位点(STS)已完成了人的Y染色体的这种图谱,STs是短的、独特的、可作为基因组界标的DNA序列,与RFLP中的界标类似。利用上述探讨方法,已将Y染色体的196个YAC彼此按顺序排列起来,共包括约60 Mbp,如图21.8所示。已经有*C. elegans*全部基因组的这种类型的YAC物理图谱,它共有100 Mbp(仅为人基因组的3%)

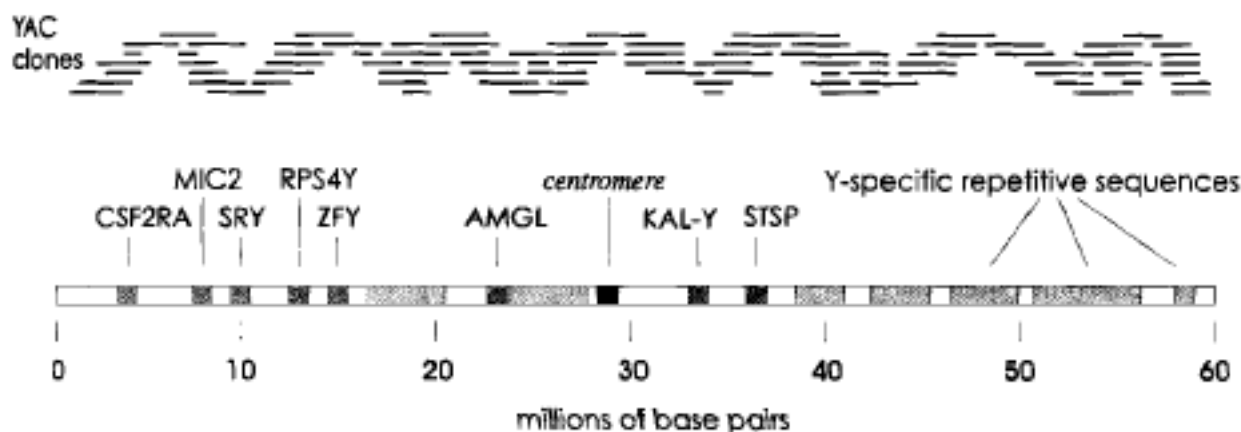


图21.8 人Y染色体的物理图谱略图

总共有196个YAC克隆,组装成10个相互连接的片段,各片间有9个小的缺口(标出了几个已知基因的位置和暂定的着丝点区域)。

下一个10年中,希望能将人的全部染色体的物理图谱组装起来,就像图21.8中人Y染色体的图谱那样,而且还希望确定人基因组中相当百分比的序列。不过在达到这一目标之前,还有许多技术难关需要克服,其中最大的问题就是如何处理和取出这些资料。无论如何,大多数研究工作者都同意,为达到人基因组计划的目的而发展的方法而获得的对事物的洞察力,以及这些知识本身,无疑会产生大量附带的、有益于全人类的发现。

附录 21.1 利用专一的修饰 DNA 的酶, 以操作 DNA

像科学中许多关键性的发现一样, 基因工程的诞生也是将纯粹的基础研究所得到的信息应用于新领域的结果。这种信息就是观察到细菌中的内切核酸酶能够在专一位点上把双链 DNA 切开, 产生一个或多个片段。这些酶称为限制性内切核酸酶, 它们不攻击细菌的 DNA, 因为这种 DNA 被位点专一的甲基化酶进行过碱基修饰而受到了保护。人们设想, 细菌所以进化出专一地降解 DNA 的能力是为了免受入侵的噬菌体或其他外源 DNA 的侵害。Paul Berg, Herbert Boyer 和 Stanley Cohen 因发现纯化的限制性酶可用作“分子剪力”于体外切割 DNA 而荣获 1970 年诺贝尔奖。他们证明, 所得到的 DNA 片段又可用第二种酶, 即 DNA 连接酶, 而与外源 DNA 再连接起来, 这种酶的作用好像是“分子胶带”, 能把 DNA 片段再共价连接起来。这种方法就称为重组 DNA 技术。

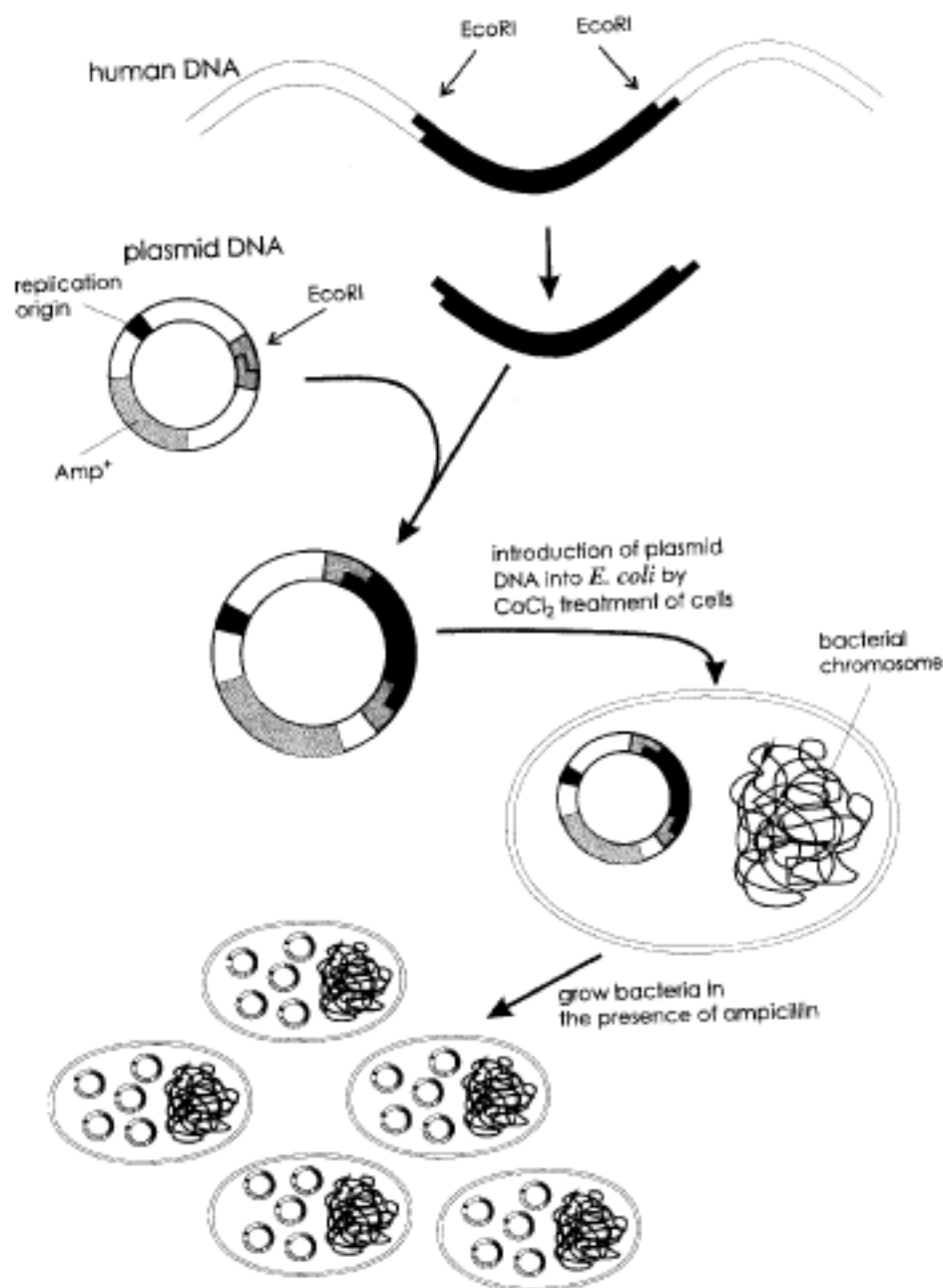


图 21.9 重组 DNA 的一般流程

EcoRI 是一种专一的内切核酸酶, 它识别(5') GAATTC(3') 并在两条链的 G 和 A 之间进行双链切割, 留下“粘性末端”。多克隆位点是在体外合成的一段 DNA, 其设计是含有许多种常见限制性内切酶的识别位点。

把重组 DNA 用作为工具的关键在于 3 个重要步骤:

(1) 限制性酶必须在专一位置上剪切 DNA 靶子, 例如, 在基因的 5' 和 3' 端。

(2) DNA 必须与第二个 DNA 片段重组, 这样才能分离基因片段。最常用的进行这一步骤的办法是利用称为质粒的修饰过的细菌 DNA 分子, 质粒保留着在细菌细胞中自动复制的能力, 而且, 重要的是它们能在细胞中保持下去, 因为其中有对苄青霉素的抗性基因(Amp^r)。利用细菌作为 DNA 扩增的宿主称为分子克隆, 因为以带有重组质粒 DNA 的单株系细菌为宿主而获得的所有质粒 DNA 都是完全相同的。

(3) 从随机的克隆文库中能够鉴定出含有所要研究的 DNA 的那些质粒克隆来。这最后一个步骤是用第 2 章中所描述的 DNA 杂交完成的。

图 21.9 表明重组 DNA 技术的基本步骤。注意已发现了近 500 种不同的限制性酶和其他修饰 DNA 的酶, 其中许多在市场上都买得到。因为多数限制性酶都以不对称的方式将 DNA 切开, 结果是得到相互重叠的和互补的末端。用同一种限制性酶如 Eco R 处理而得到的两个 DNA 片段的单链的游离末端之间, 可能发生碱基配对。随后在 ATP 存在下用 DNA 连接酶处理就会在连接 DNA 片段的 5' 与 3' 端之间形成共价键。然后将这种重组 DNA 引入到不含有内源限制性酶而且也对苄青霉素敏感的细菌株系中。生物技术工业的一个方面就是克隆有商业价值的基因以经济上切实可行的方式生产大量的蛋白质。

21.8 小 结

(1) 基因组的大小变化很大, 从噬菌体中的最小值(约 $10^3 \sim 10^4$ 碱基对)到细菌中大得多的数值(约 10^6 碱基对), 再到人的更大的数值(约 10^9 碱基对)。不过, 真核基因组的绝对大小与基因的数值并不直接相关, 因为许多生物含有大量重复的和间隔的 DNA。基因组大小与基因组的复杂性之间的不协调称为 C-值悖理。

(2) 线粒体和叶绿体也含有多个拷贝的双链环状基因组, 它们编码细胞器所特有的功能所需要的基因。已知代表性的线粒体和叶绿体的基因组的全部 DNA 序列, 并已用于鉴定基因突变。

(3) 真核细胞的染色体有 3 种关键的功能元件: 端粒、着丝粒和多个 DNA 复制起始点。端粒位于染色体末端, 保护末端使免受核酸降解。着丝粒存在于染色体中点附近, 其功能是在有丝分裂中帮助染色体发生分离。端粒和着丝粒都有多个拷贝的短的、重复的 DNA 序列。

(4) 单拷贝基因分散于整个真核基因组中并且散插在重复的和间隔的 DNA 中。有些真核基因以聚簇存在, 如 α -珠蛋白和 Hox 基因; rRNA 基因则呈长的级联排列。基因聚簇内基因在时间和空间上的表达与它们在染色体上的排列相一致。

(5) 真核基因组中有大量重复的 DNA。各个个体之间, 短的二和三核苷酸的重复, 其长度可能不同, 虽然它们的功能尚属未知, 但已发现这些短的重复的扩大与人的几种遗传病有关。较大的称为 SINE 和 LINE 的几种重复序列也存在于人基因组中。

(6) 已有几种途径有助于作人基因组的物理图谱。可用 RFLP 作图法确定可能的疾病基因所在的那一段 DNA, 也对遗传病的诊断有用。人基因组计划使用了酵母人工染色体(YAC)以分离大片段的 DNA, 这种大片段又可用重组 DNA 法再分为小片段并用 DNA 测序法进行鉴定。

参 考 资 料

- Antequera, F., Bird, A. (1993): Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 90: 11995.
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994): The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215.
- Collins, F. S. (1992): Cystic fibrosis: Molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256: 774.
- De Lange, T. (1994): Activation of telomerase in a human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 2882.
- Dib, C., Fauré S., Fizames, et al. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature*, 380: 152.
- Foote, S., Vollrath, D., Hilton, A., Page, D. C. (1992): The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science*, 258: 60.
- Grady, D. L., Ratliff, R. L., Robinson, D. L., McCanlies, E. C., Meyne, I., Moyzis, R. K. (1992): Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 89: 1695.
- Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1996): Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Am.*, 274: 92.
- Grivell, L. A. (1994): Intron mobility. *Current Biol.*, 4: 161.
- Huntington's Disease Collab Res Grp (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72: 971.
- Jakobovits, A. (1994): YAC vectors: Humanizing the mouse genome. *Curr. Biol.*, 4: 761.
- Jonsson, J. J., Weissman, S. M. (1995): From mutation mapping to phenotype cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 92: 83.
- Miklos, G. L., Rubing, G. M. (1996): The role of the genome project in determining gene function: Insights from model organisms. *Cell*, 86: 521.
- Newman, M., Strzelecka, T., Dorner, L. F., et al. (1994): Structure of restriction endonuclease BamHI and its relationship to EcoRI. *Nature*, 368: 660.
- Nowak, R. (1994): Mining treasures from "junk DNA." *Science*, 263: 608.
- Oliver, S. G. (1996): From DNA sequence to biological function. *Nature*, 379: 597.
- Singer, M. S., Gottschling, D. E. (1994): TLC1: Template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, 266: 404.
- Sulston, J., Du Z., Thomas, K., et al. (1992): The *C. elegans* genome sequencing project: A beginning. *Nature*, 356: 37.
- Wagner, A. (1994): Evolution of gene networks by gene duplications: A mathematical model and its implications on genome organization. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 91: 4387.
- Warren, S. T. (1996): The expanding world of trinucleotide repeats. *Science*, 271: 1374.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., et al. (1994): 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome of *C. elegans*. *Nature*, 368: 32.

复 习 题

1. 基因是:
 - a) 一段 DNA, 长 50 kb
 - b) 蛋白质合成的产物
 - c) 由突变所定义的最小的有功能的遗传单位
 - d) 病毒中核苷酸的数目
 - e) 总是编码蛋白质的一段 DNA
2. 关于基因组的复杂性(独有的序列信息的量)和基因组大小的相关性,下列哪种说法不对?
 - a) 一种生物的生活周期越复杂,其基因组越大
 - b) 细菌的基因组比人的小,也没有那么复杂
 - c) 在真核生物中,基因组大小与其复杂性之间的关系是 1 : 1
 - d) 关于 C-值悖理的解释是有些生物的基因组中重复的 DNA 序列比其他生物中的多
 - e) 人线粒体基因组中编码的仅仅是线粒体功能所需要的那一小部分基因
3. 端粒对于染色体的功能有重要性的证据是:
 - a) 复制的起始点含有端粒的序列
 - b) 端粒含有能形成发夹环的重复序列,此环保护染色体使免受外核酸酶的消化
 - c) 端粒的长度与细胞的年龄成反比
 - d) 线状的真核染色体的两端都有端粒的序列
 - e) b、c 和 d 都正确
4. 小鼠和人的许多基因在进化过程中似乎都发生了“打乱重排”,这项观察表示:
 - a) 小鼠和人有共同的祖先
 - b) 哺乳类的基因组太小,不能包括所有必需的信息
 - c) 分散在整个基因组中时,个别的基因不好起作用
 - d) 只要个别的基因未被破坏或发生变化,在进化过程中基因组的排列就能维持不变
 - e) 小鼠和人的大多数基因事实上是共线性的,在过去 7000 万年中没有重新排列过
5. 有些类型的 DNA 重复序列可用作分子标志以筛选某些类型人的疾病。请从下面提供的内容中选择一条最好的解释。
 - a) C_pG 岛的数目多与某些疾病有关
 - b) 重复序列太少的个体寿命短
 - c) 三核苷酸序列的扩大与某些具体的遗传疾病有关
 - d) SINE 和 LINE 的水平高表示有病毒的安装
 - e) 重复序列实际上是基因组中无用 DNA 的例子,与任何已知的遗传病均无关
6. RFLP 作图法可用作分离与遗传缺陷有关的 DNA 序列的工具,因为:
 - a) 它鉴定突变基因中发生点突变的准确位置
 - b) 与遗传表现型联系密切的 RFLP 代表分子界标,可用作开始寻找基因的起点
 - c) 在所研究的区域内男性和女性的 RFLP 图不同
 - d) 基因组中少了一个限制位点通常是致死的
 - e) 用 RFLP 标志的探针所作的 Southern 印迹可用于鉴定来自缺损基因的 mRNA 转录物

参 考 答 案

1. c 基因由编码序列和调节序列组成, 后者控制基因表达。
2. c 许多种植物的 DNA 比人细胞中的多, 但植物的基因组却没有那么复杂。这就是 C-值悖理, 其解释是基因组中重复 DNA 的量是不同的。
3. e 端粒是染色体端部 DNA 合成所必需, 也是保护染色体免被降解所必需(b), 这就解释了为什么端粒的缺失是致死的(c 和 d)。
4. d 散布的重复序列和独特的序列极可能在进化过程中有利于基因的“打乱重排”, 在大多数情况下只要基因本身未被破坏, 这种重排就不会变化。
5. c 测定三核苷酸重复的长度至少已指出了 5 种遗传病(表 21.1)。
6. b RFLP 标志常能发现位于突变的等位基因附近的 DNA 多态性, 因而能用作为开始克隆附近的 DNA 片段的入手处以寻找引起疾病的基因突变。

第 22 章 DNA 复制

22.1 引言

DNA 必须准确无误地复制后,才能传给两个子细胞。DNA 复制就是由负责合成 DNA 的 DNA 聚合酶将全部基因组复制的过程。DNA 合成所需要的时间,以及它必须达到的精确性,都是保证 DNA 复制过程不发生差错的必要因素。人体内,全部 3×10^9 bp(碱基对)复制的时间约为 8 h(小时),而大肠杆菌复制其 5×10^6 个碱基对要 30 min(分钟)。如何解释 DNA 复制的速率?哺乳动物复制 DNA 的时间又为什么比细菌的少那么多?另一个重要的问题是, DNA 复制中的错误(错误核苷酸的掺入)如何能保持在加入核苷酸时误差小于 1×10^{-9} ? 关于分子水平上 DNA 复制的知识大多来源于细菌和病毒的复制的研究。不过最近在阐明酵母中真核生物的 DNA 合成的调节方面已有一些进展,而且已研究出了利用人的复制 DNA 的蛋白质进行体外 DNA 复制的系统。本章首先以原核系统为例,叙述我们所熟悉的 DNA 复制的生物化学,然后讨论真核生物中 DNA 复制起始的控制,因为这在真核细胞的分裂中起着关键作用。

22.2 DNA 复制概要

如第 2 章所述,双链 DNA 主链上 G-C 和 A-T 残基的碱基配对是拷贝 DNA 的化学键中所存信息的基本规则。因为 DNA 的两条链是互补的(一条链上的 G 总是对着另一条链上的 C),所以读哪一条链都没有关系,你总可以确定另一条链的序列。同样,在 DNA 复制过程中, DNA 的每一单条链都被酶拷贝,酶只用一条链上的碱基序列就能聚合出一条新链中的互补序列。两条 DNA 互补链以非共价键互相结合在一起,一条链的 5 到 3 的极性与另一条链的 3 到 5 的极性是反向平行的。当你试图要了解 DNA 合成时,重要的是牢记这种关系,因为所有已知的 DNA 聚合酶都只能按 5 到 3 的方向合成 DNA,本章后面还要更详细地讨论这一点。

(一) DNA 复制是半保留的

曾提出过两种模型来解释一个 DNA 分子怎样才能复制成两个完全相同的“子”分子。第一个模型是 DNA 是保留复制的,即亲本 DNA 的两条链都被拷贝,于是产生了一个有两条新合成的“子”分子,如图 22.1 所示。另一种模型是 Watson 和 Crick 根据他们的 DNA 结构模型提出来的,亲本 DNA 分子发生的是半保留复制,产生的两个“子”分子中,每一个分子中都有一条来自亲本的链和一条新合成的互补的子链(图 22.1)。

在早期的分子生物学中,一个经典实验是 Matthew Meselson 和 Frank Stahl 设计的辨别这两种模型中哪一个正确的试验。他们用氮的重同位素 ^{15}N 通过代谢标记细菌的 DNA,然后在普通的轻同位素 ^{14}N 中培养细菌,使进行一次细胞分裂,然后分析 DNA 的子链,看看子链究竟是全部由轻氮(全为 ^{14}N)组成,还是由一半轻氮和一半重氮(^{14}N 和 ^{15}N 的混合物)组成。如图 22.1 所示,他们的实验结果支持 DNA 半保留复制的模型。事实上,如果他们让细胞进行第二次分裂,他们发现就没有重的 DNA 分子了,有的只是中间的(^{14}N 和 ^{15}N)和轻

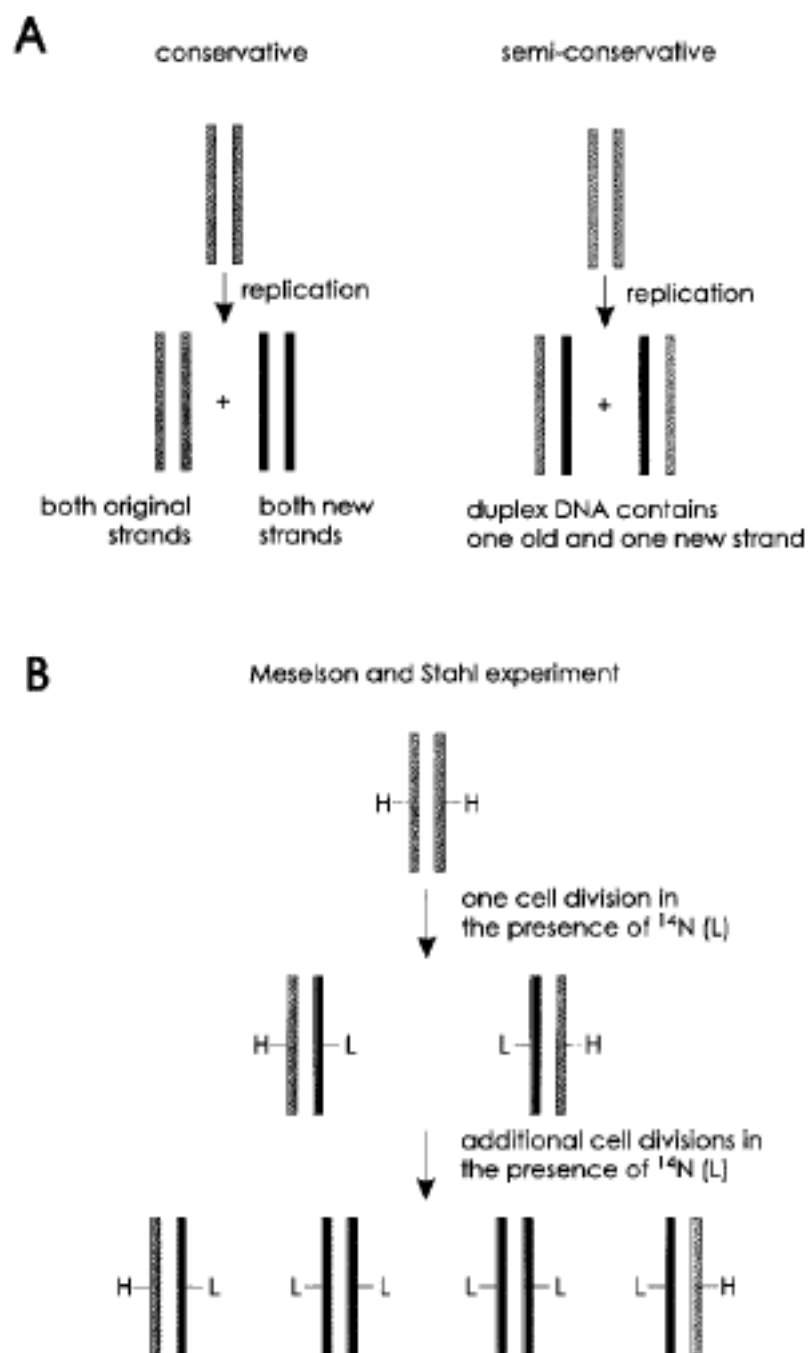


图 22.1 DNA 的半保留复制

(a) 表明保留复制和半保留复制的示意图; (b) Meselson 和 Stahl 的实验结果, 示证 DNA 的半保留复制。H 代表 N^{15} (重), L 代表 ^{14}N (轻) DNA。

的(^{14}N) 分子, 与根据半保留复制模型所预期的相同。

(二) DNA 复制是双向进行的

半保留复制的发现提出了几个新问题。例如, 在基因组中何处开始复制, 在同一时间内它是只以一个方向进行(单向复制), 还是同时以两个方向进行(双向复制)。用放射性胸苷标记分裂活跃的细胞中新合成的 DNA 的实验证明复制是双向的, 如图 22.2 所示。高放大倍数的电子显微镜揭示出, DNA 复制的第一步是形成“鼓泡”, 现在知道这相当于 DNA 螺旋在 DNA 复制的起始点局部解链。亲本 DNA 发生解链而新的 DNA 链正在合成的那一点, 称为复制叉(图 22.2)。以后的遗传学和生物化学的研究证实, 复制开始于一专一位点, 而且是双向进行的。用大肠杆菌最容易证实这一点, 因为细菌只有一单个的环状 DNA, 其上只有一个独一无二的复制起始点。

用电子显微镜研究复制中的 DNA 的结构, 然后找出复制起始点的具体位置, 就可发现在

复制开始后约 30 min(分钟), 在复制起始点处, 两个复制叉就在染色体的中点左右相遇。这正

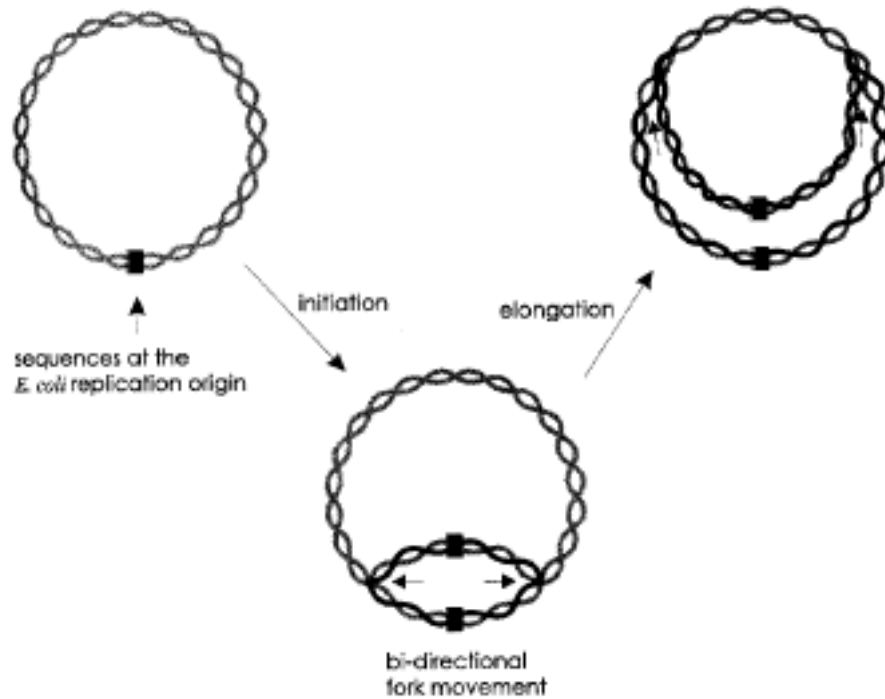


图 22.2 E. coli 中 DNA 复制起始于独特的称为复制起始点的部位
叉双向移动的结果是两个复制叉在染色体的中点附近相遇时, 染色体的复制完成。

是预期的环状基因组双向复制的结果(图 22.2)。

(三) 复制叉有前导链和后随链

生长中的复制叉如何能够同时进行 5 到 3 和 3 到 5 的聚合作用是更难解决的问题, 因为已知 DNA 聚合酶只能以 5 到 3 的方向合成 DNA。Reiji Okazaki(岗崎)利用 ^3H -胸苷酸测定

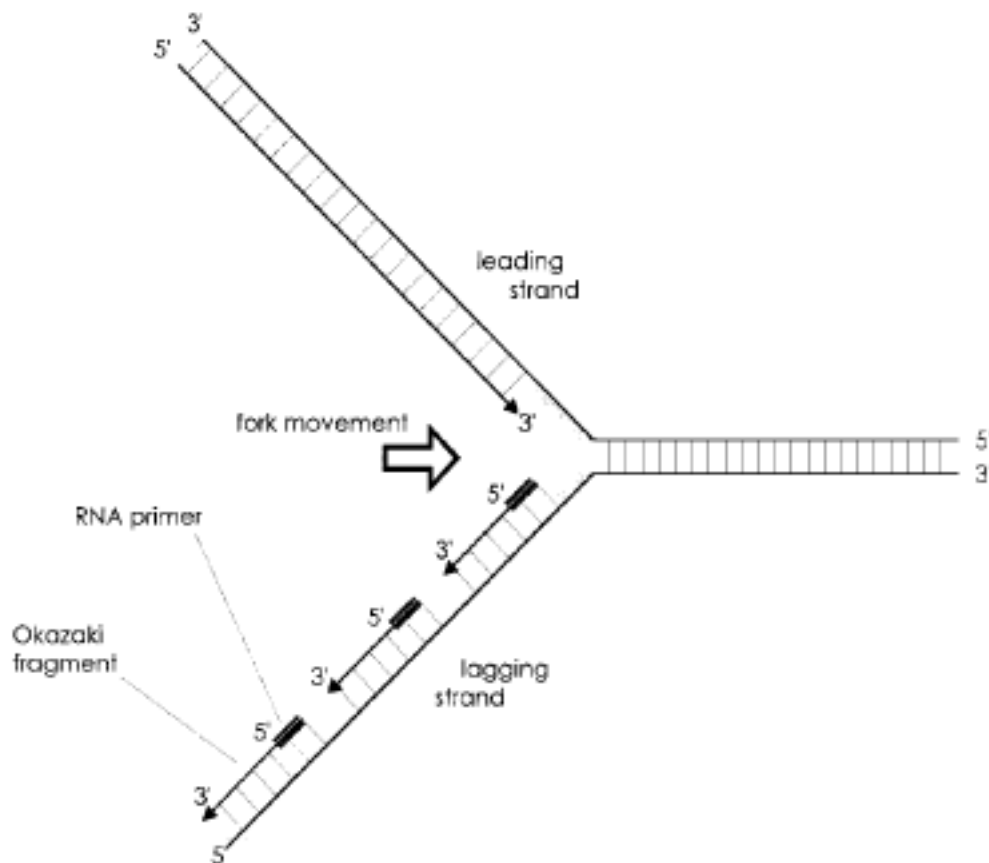


图 22.3 复制叉示意图

示前导链上连续不断的 5 到 3 的合成和后随链上通过岗崎片段的形成而进行的不连续的 5 到 3 的 DNA 合成。

了新合成的细菌 DNA 的大小, 他将细菌在含有放射性核苷酸的培养基中培养极短时间(数秒钟), 然后从细胞中分离 DNA。他发现大部分放射性 DNA 以相当小(1000 核苷酸)的片段而存在, 这些片段就是所谓冈崎片段。根据这些观察, 得知复制叉上的一条链是连续不断地以 5 到 3 的方向合成的(前导链), 而另一条链则需要通过短的冈崎片段的形成而进行不连续的 5 到 3 的合成(后随链)。如图 22.3 所示, 这种连续合成和不连续合成组合的结果, 便是整个复制叉沿一个方向移动。还要注意到后随链上 DNA 的合成需要多个 RNA 引物, 这是 DNA 聚合酶开始合成冈崎片段之前所需要的。本章后面将要谈到, 所有已知的 DNA 聚合酶都需要由 DNA 或 RNA 引物提供一游离的 3' OH 末端, 该引物应连接在模板链上。

22.3 DNA 聚合酶

在发现了冈崎片段之后的 10 年之内, 生物化学和遗传学研究的结合导致了 DNA 复制所需要的一大类蛋白质的分离和鉴定。第一类即将描述的酶就是 DNA 聚合酶。表 22.1 所列是从大肠杆菌和哺乳动物细胞中分离出来的几种 DNA 聚合酶。大肠杆菌中的 DNA 聚合酶 α 和 β 分别相当于哺乳动物细胞中的 DNA 聚合酶 δ 和 ϵ 。

所有 DNA 聚合酶都能将核苷酸加到业已存在的单链的 3' 端上, 条件是有模板链规定新生链的碱基顺序。到目前为止, 大肠杆菌的 DNA 复制的研究成果最多, 因为生物化学研究和遗传学研究结合起来了。已发现原核生物和真核生物的 DNA 聚合酶都是大的多亚基的复合体, 而且这两种系统中复制叉的移动都需要前导链和后随链的合成, 因此一般认为, DNA 复制的基本机制, 尤其是复制叉的移动, 在原核生物和真核生物中是类似的。

表 22.1 大肠杆菌和哺乳动物 DNA 聚合酶特性比较

DNA 聚合酶	主要功能	分子量 / Da	3'-5' 外核酸酶活性	说明
大肠杆菌的酶				
Pol α	填补缺口并除去后随链上的 RNA 引物	109 000	有	还有 5'-3' 外核酸酶活性
Pol β	DNA 修复	90 000	有	突变体能存活
Pol γ	DNA 合成中加工性链延伸	900 000	有	大肠杆菌的 DNA 复制绝对需要
哺乳动物的酶				
(δ)	后随链的合成	300 000	无	还有引物活性
(ϵ)	前导链的合成	200 000	有	
(ζ)	DNA 修复	250 000	有	
(η)	DNA 修复	40 000	无	
(θ)	线粒体 DNA 复制	250 000	有	核编码基因

(一) DNA 复制的酶学

DNA 合成的基本的酶促反应中包括生长中的链上的 3'-羟基对参与反应的 5'-磷酸基团的亲核攻击, 如图 22.4 所示。这一裂解反应的结果是每有一个核苷酸加到新生链上就生成一个焦磷酸(PPI)。随后焦磷酸酶将焦磷酸水解, 此水解反应非常有利于无机磷酸的形成。不过, DNA 聚合反应的进行并非绝对需要焦磷酸的裂解, 因此, 一般认为加入的碱基与另一条

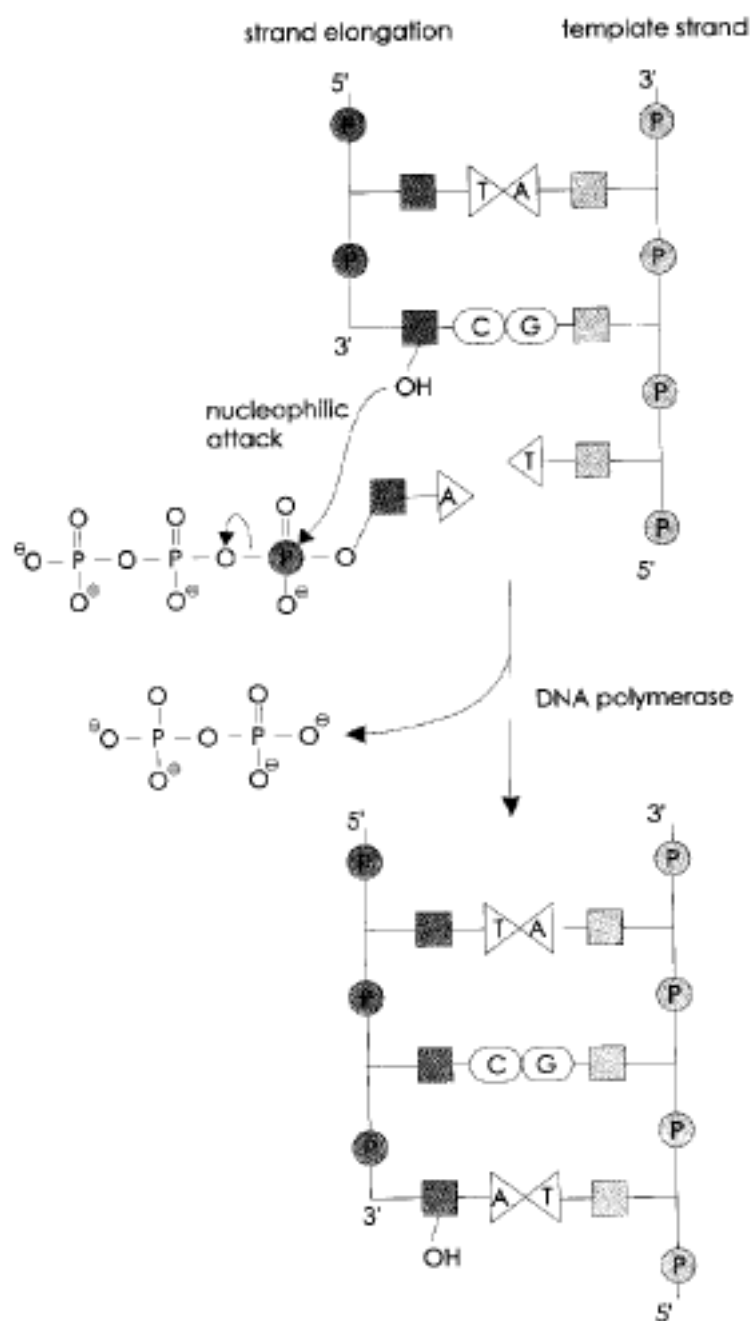


图 22.4 聚合反应的酶学

正在延伸的链上的 3 羟基的亲核攻击使得参加进来的 dNTP 的 α -磷酸基团与该羟基形成共价键。

DNA 链上的互补碱基之间的非共价键, 以及同一条链内碱基堆积的相互作用, 必定也对此反应的方向有所影响。

虽然细菌细胞中的大部分 DNA 聚合酶活性来自于 DNA 聚合酶 (DNA pol ϵ), 但多亚基的 DNA 聚合酶 (DNA pol δ) 却负责生长中的复制叉中 DNA 的复制。为完成后续链上冈崎片段之间的 DNA 复制, 需要 DNA pol δ , 而 DNA 聚合酶 (DNA pol ϵ) 则与 DNA 修复有关。除去催化图 22.4 中所示的聚合反应的能力外, 这 3 种 DNA 聚合酶还有另外 3 种重要的活性, 不过它们之间在量上有所不同。首先是链延伸的速率, DNA pol ϵ 的速率最高。这是可以理解的, 因为 DNA pol ϵ 必须能在相当短的时间内完成复制。

各种 DNA 聚合酶之间在功能上的第二个差别在于持续合成能力的水平, 这是聚合酶与模板离解之前, 加入的核苷酸的数目。DNA pol ϵ 又是冠军, 根据此酶在 DNA 复制中的核心作用, 就可预期这一点。DNA pol δ 的 ϵ 亚基被认为是有持续合成能力的亚基。两个 ϵ 亚基形成一个“钳子”, 夹着模板链, 然后模板链再沿着 DNA 滑动(图 22.5)。这种排列保证了有活性的全酶(所有结合在一起的 DNA pol δ 的亚基)一直与 DNA 紧密结合, 以促进持续的合成。

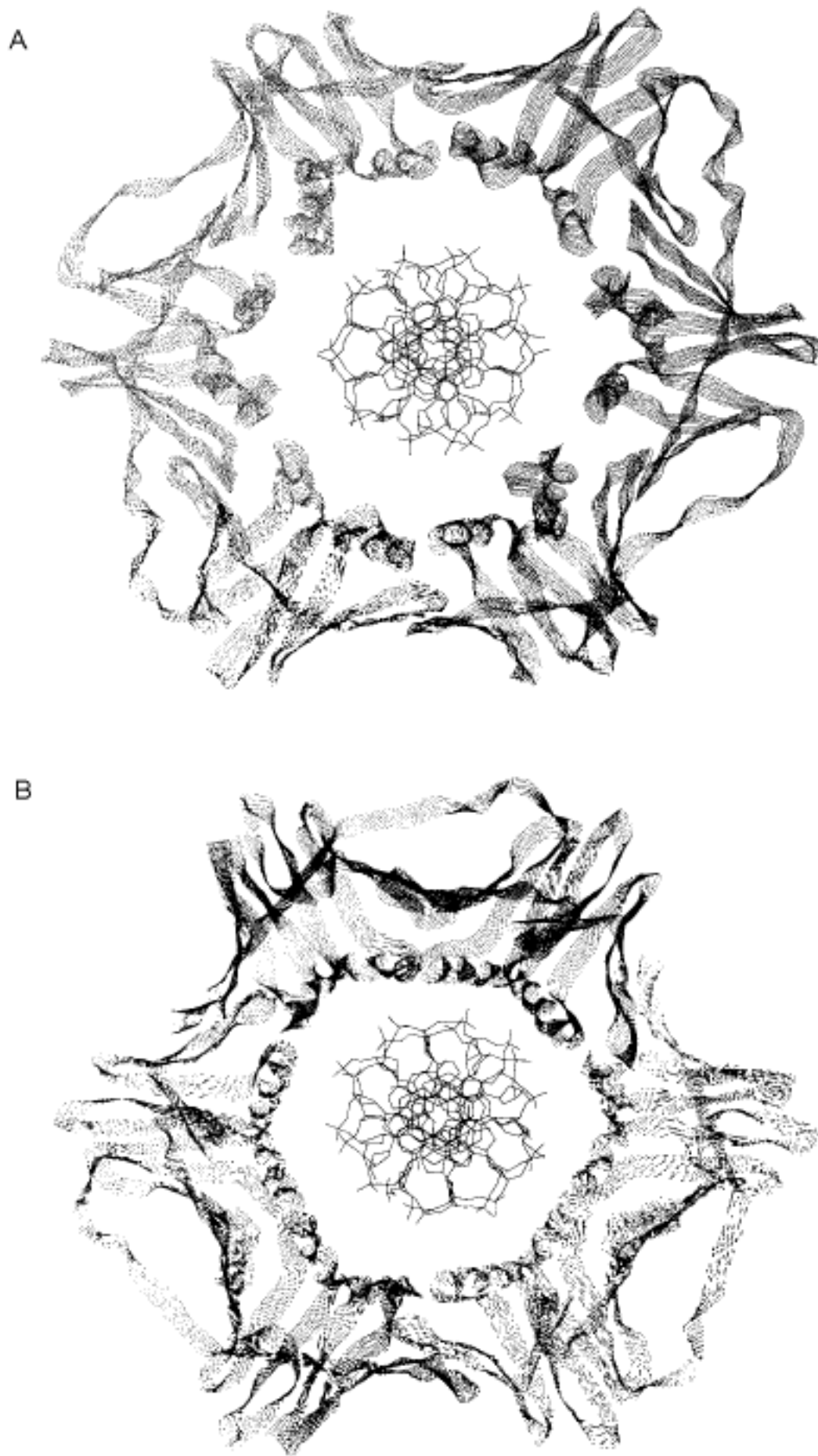


图 22.5 根据 X 射线结晶学数据绘制的 DNA pol β -亚基“钳子”

- (a) 2 个 β -亚基形成一个蛋白质的“钳子”，将 DNA 螺旋夹住(这种排列解释了它作为持续合成因子的作用,因为它防止了 DNA pol β 的催化亚基与 DNA 解离)；
- (b) 真核的持续合成因子 PCNA 也形成“钳子”，夹住 DNA,但其由 3 个亚基构成。

(二) DNA 聚合酶有校正活性

所有 3 种聚合酶都具有的、可能是最重要的特性,就是校正聚合反应的准确度。这要求外

核酸酶的活性, 才能以 3 到 5 的方向除去错误掺入的核苷酸。这和打字机中利用校正带去除打错的字一样。图 22.6 说明在聚合过程中这种 3 到 5 的外核酸酶活性如何起作用。

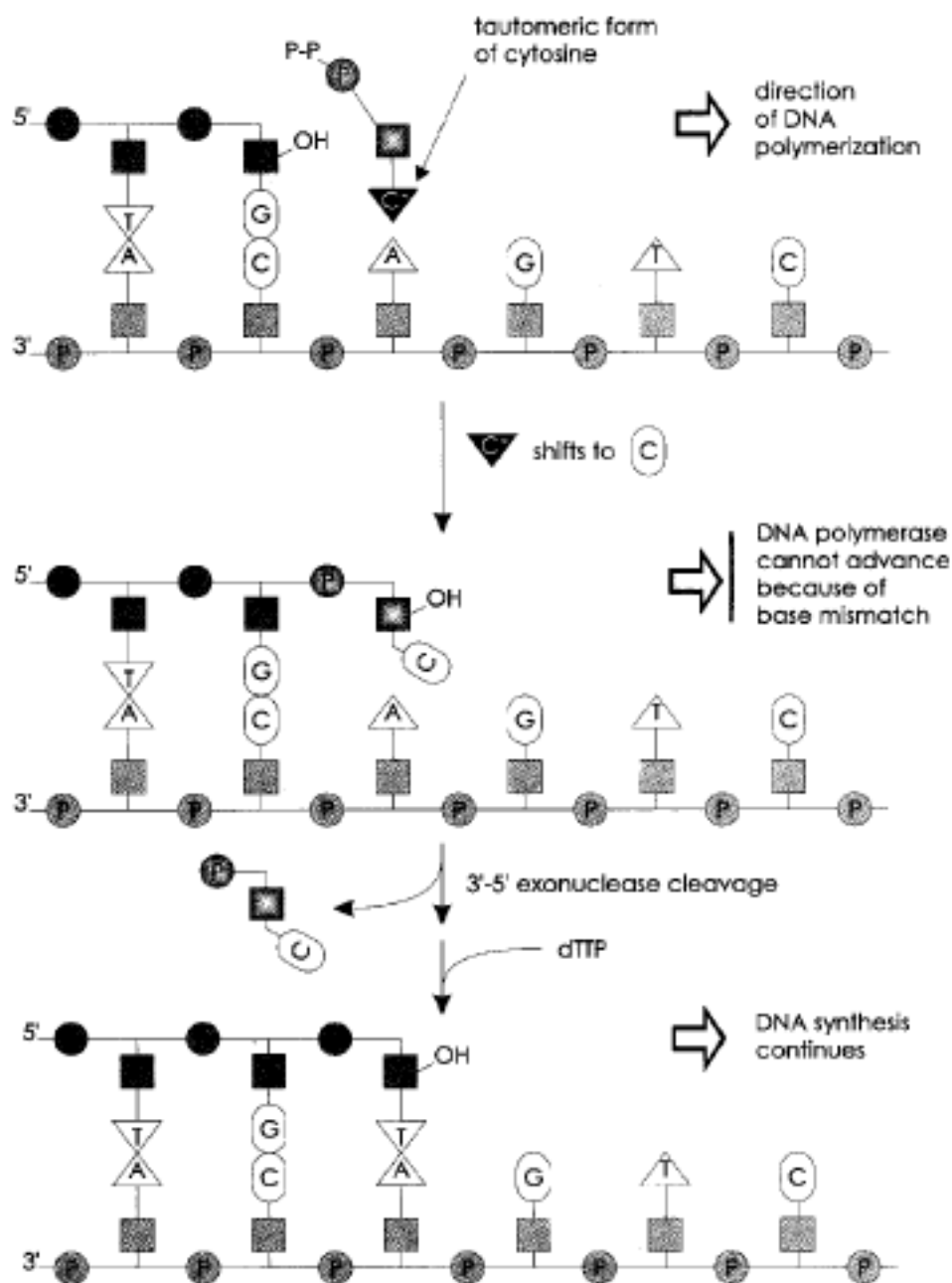


图 22.6 DNA 聚合酶的 3 到 5 的外核酸酶的校正活性

如果插入了一个错误的核苷酸, 它就不会发生正确的碱基配对, DNA 聚合酶就停止前进而退回去, 切断磷酸二酯键而去掉这个核苷酸。相当数目的这类校正这是由于插入了胞嘧啶的互变异构形式而发生的, 因为这种形式能与腺嘌呤形成氢键。当胞嘧啶发生互变异构转换而回到正常的构型时, 它与腺嘌呤之间的氢键就破裂了, 而校正活性就将错配的核苷酸除去。DNA pol 复合体的校正活性在一个单独的亚基上, 而这种活性却在单个的 DNA pol 多肽链中。

并非所有错误掺入的核苷酸都由 DNA 聚合酶的校正活性除去。称为错配修复的第二种机制也与除去错误掺入的核苷酸有关。如第 23 章中所述, 错误修复蛋白能够识别新生的 DNA 链中不成对的碱基。核苷酸剪除作用会除去包括错配核苷酸的一段 DNA, 然后 DNA pol 和 DNA 连接酶再修复这条链。DNA 聚合酶的校正机制和 DNA 错配修复机制一起, 使得 DNA 修复中的误差率极低(每复制一个碱基对的误差率 $< 1 \times 10^{-9}$)。

(三) 细菌和哺乳动物 DNA 聚合酶的相似性

如表 22.1 所列, 真核的 DNA 聚合酶也已被分离出来并进行了鉴定。根据对 SV40 DNA

在体外复制的研究,已发现 DNA 聚合酶 的持续合成能力高,而且是前导链合成所必需的,所以它与大肠杆菌的 DNA pol 类似。DNA 聚合酶 需要 ATP,还为另外两种 DNA 复制蛋白 RF-C 和 PCNA 所促进。DNA 聚合酶 起着与大肠杆菌 DNA pol 同样的作用,即为后随链的合成所必需。除去 DNA 聚合酶 和 外,还鉴定出了另外三种 DNA 的聚合活性。DNA 聚合酶 与 DNA 修复有关,与大肠杆菌的 DNA pol 最为相似。DNA 聚合酶 也是一种修复酶, DNA 聚合酶 则为线粒体中 DNA 合成所必需。

22.4 复制叉的移动需要一种多蛋白的复合体

要达到已观察到的体内 DNA 合成的高速率,必须要解决一些拓扑学上的和酶学上的问题,而图 22.3 所示的非常简化的复制叉模型不能解释所有这些问题。例如,复制叉在前进时如何能够不使它前面的双螺旋产生扭转应力?当 DNA 合成正在进行时,需要什么蛋白质维持复制叉的“开放”构型?什么酶给后随链提供 RNA 引物?对这些问题的大多数答案来自于有关大肠杆菌和噬菌体 T4 的 DNA 复制的研究工作。发明了体外 DNA 复制的试法以进行 DNA 合成所需蛋白质的生化鉴定,又进行了遗传学的研究以检查编码这些蛋白质的基因发生突变后有什么影响。这些体外和体内的研究共同产生了这一理论,即 DNA 复制体蛋白复合体协调着复制叉上 DNA 的合成,如下所述。

聚合反应除去需要 DNA pol 之外,至少还需要 4 类蛋白质,复制叉才能移动。这些关键性的蛋白质是解旋酶类、拓扑异构酶类、单链结合蛋白和 DNA 引发酶。这些蛋白质在叉移动和 DNA 复制中的功能如图 22.7 所示。

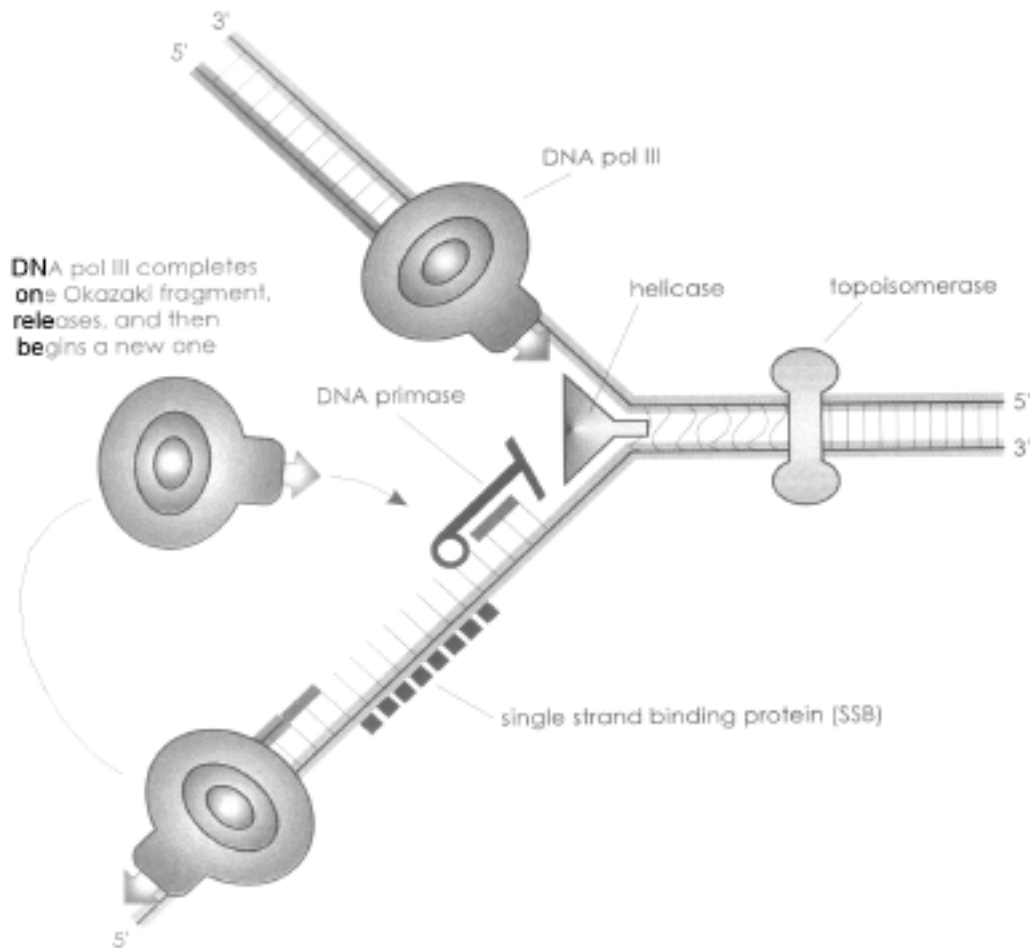


图 22.7 与 DNA 复制叉移动有关的蛋白质

DNA pol 负责前导链和后随链上 DNA 的从头合成:解旋酶在复制复合体前面将 DNA 双链解开;拓扑异构酶使叉移动所造成的 DNA 双螺旋上的扭转应力缓解;单链结合蛋白(SSB)防止单链区重新合成双链,DNA 引发酶则合成后随链上形成冈崎片段所需要的引物。

(一) 复制叉上的各类蛋白质

解旋酶类是需要 ATP 的酶,它恰好在移动着的复制叉前面沿着单链 DNA 滑动。解链酶前面的双链 DNA 的链是已解开的,形成了 DNA pol 和 DNA 引发酶所需要的单链模板。缓解扭转应力则需要另外两种酶,拓扑异构酶和 ,扭转应力是由解旋酶的解旋作用而产生的。拓扑异构酶 切开一条链上的 DNA,这使得 DNA 能够转过来,拓扑异构酶 则切开两条 DNA 链。

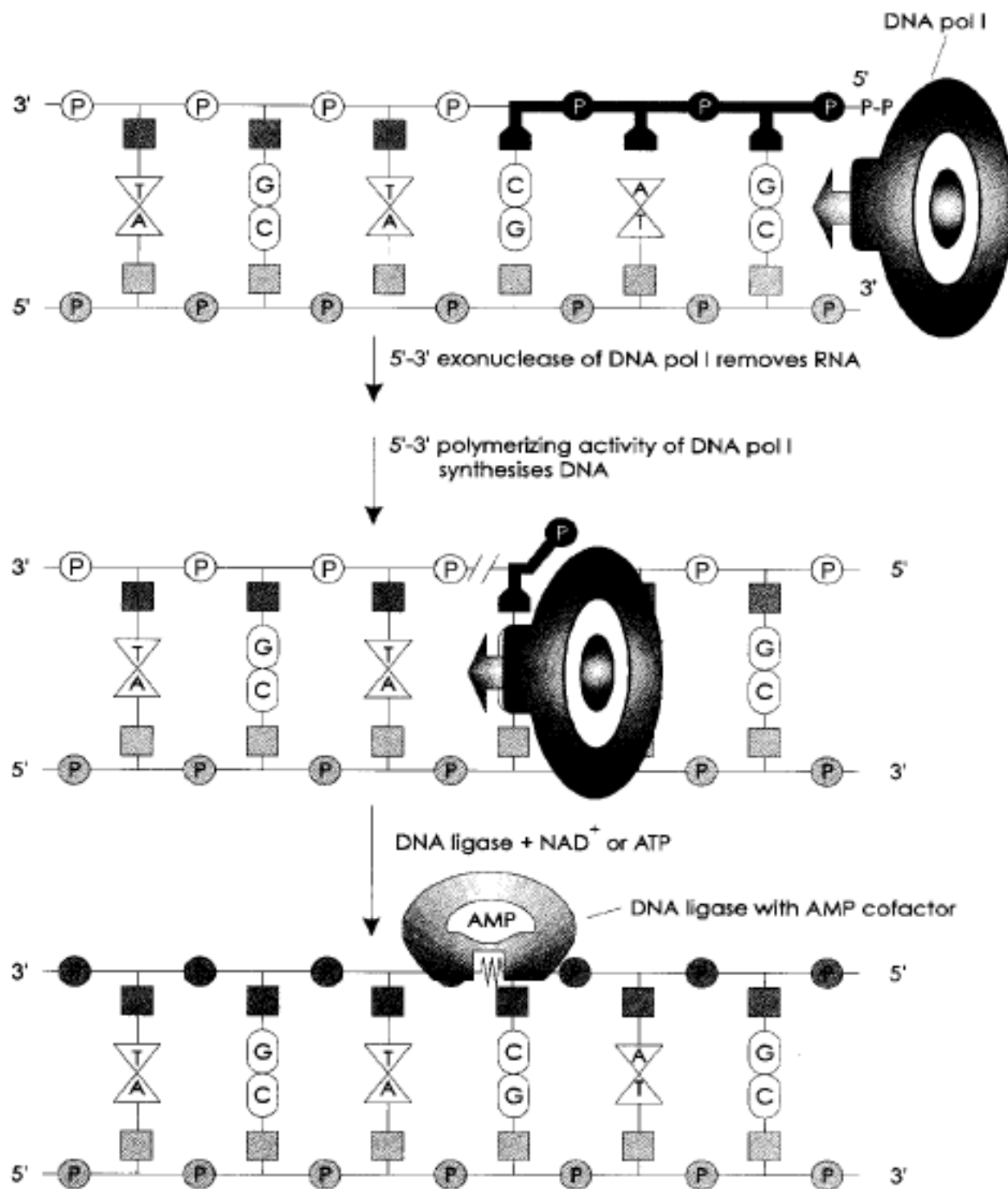


图 22.8 DNA 聚合酶 和 DNA 连接酶的活性为完成后随链上 DNA 的合成所必需
大肠杆菌的 DNA 连接酶需要 NAD⁺ 为辅因子,而 T4 DNA 连接酶则利用 ATP。

单链结合蛋白(SSB)则防止解旋酶一旦过去之后,螺旋又恢复原状。如图 22.7 所示,对于单链 DNA 亲和力极高的 SSB,主要为后随链所需要,因为前导链随着螺旋的解开,就会连续不断地被复制。复制机构中的第四种关键的酶是 DNA 引发酶。此酶在后随链上有规律的间隔处合成短的 RNA 引物。DNA pol 使这些引物以 5 到 3 的方向扩展就形成了冈崎片段,如

图 22.3 所示。DNA pol 的 5 到 3 外核酸酶活性(见表 22.1)会除去 RNA 引物并以相应的脱氧核苷酸取代之。注意在复制起始点,前导链合成的起始也需要 DNA 引发酶。

DNA 连接酶的作用是将后随链上生长中的链之间单链的缺口以及相邻的冈崎片段连接起来。大肠杆菌的 DNA 连接酶需要 NAD^+ 以提供 AMP, 而 T4 DNA 连接酶则在此反应中利用 ATP。图 22.8 说明 DNA pol 和 DNA 连接酶在后随链上 DNA 合成中的作用。

(二) 多蛋白复合体称为复制体

T4 DNA 复制中所用的大的多蛋白复合体的生物化学分析表明其分子量超过了 10^6 Da(道尔顿)。此外,还测定出复制叉移动所需要的许多种蛋白质(图 22.7)实际上是彼此紧密结合在一起的,形成所谓复制体。要解释复制体如何能执行多种功能(如后随链的合成)同时又保持着延伸的高速率(细菌中每秒钟 500 个核苷酸),方法之一就是假定后随链在复制体上发生回折,使得 RNA 3 末端的方向与前导链上新合成的 DNA 前进中的 3 末端的方向一致。这种 DNA 的回折模型如图 22.9 所示。

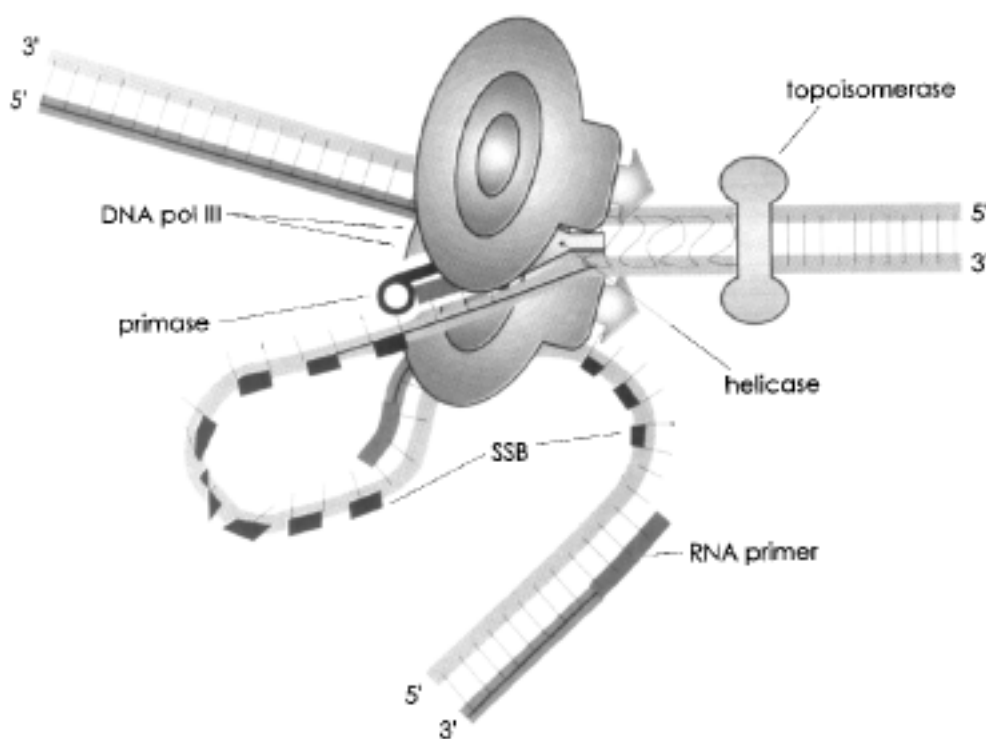


图 22.9 复制叉移动的复制体示意模型

说明复制叉的一条链回折到复制体上之后随链 DNA 的合成是如何完成的。

在复制体推动的叉移动中的两个关键性要素是 DNA 引发酶和解旋酶彼此紧密地联系在一起以及二分子 DNA pol 全酶互相合作以合成新链。后随链的合成仍是不连续的,为此当一个冈崎片段已完成而第二个片段开始之前,链上的 DNA pol 分子会间歇地被释放又重新连接上。可将 DNA 复制体与缝纫机相比,各个部分共同起作用完成顺利而连续的缝纫动作。

22.5 DNA 复制的起点

虽然关于 DNA 复制终止的步骤几乎一无所知,但我们对于复制起始点上 DNA 合成开始所需要的控制点却有所了解。例如,细菌中 DNA 复制的时间安排就与细胞分裂之间有密切联系,所以每个子细胞只接受基因组的一个拷贝。同样,真核细胞也以严格控制的一系列步骤仅在细胞分裂的 S 期复制其 DNA,这些步骤所用时间约为细胞周期的 $1/3$ 。与此相反,多数病毒

则以机会主义的方式复制其基因组,以使病毒的扩增最优化。在决定 DNA 复制何时开始方面的关键性因素是复制蛋白质及其与复制起点处的专一 DNA 序列的结合,而与基因组无关。本节将描述关于原核和真核复制起始点的内容以及在这些序列上使复制起始的相应蛋白质。

(一) 大肠杆菌中的复制起始点

在细菌和大多数病毒中,专一的 DNA 序列决定着复制从何处开始,在大肠杆菌中,这一单独的起始点位于称为 OriC 的基因位点上。在 OriC 上发生的起始事件的生化分析已鉴定出许多同样的与叉的移动有关的辅助性蛋白质,其中除 DNA pol 以外,还有解旋酶、DNA 引发酶、SSB 和拓扑异构酶类。这些研究还揭示出了一种称为 DnaA 蛋白的与起始点结合的蛋白质。根据 OriC 的突变会引起复制起始点方面缺少的发现,已预测到有这种专一的与 DNA 结合的蛋白质。

已发现 245 个碱基对的 OriC 区域中有多个拷贝的两种重复序列,如图 22.10 所示。与 DnaA 结合的部位有专一的 9 个碱基对的重复序列,共出现 4 次。第二种元件是富于 A-T 的重复序列,共出现 3 次。在 OriC 处复制起始的模型见图 22.10b。

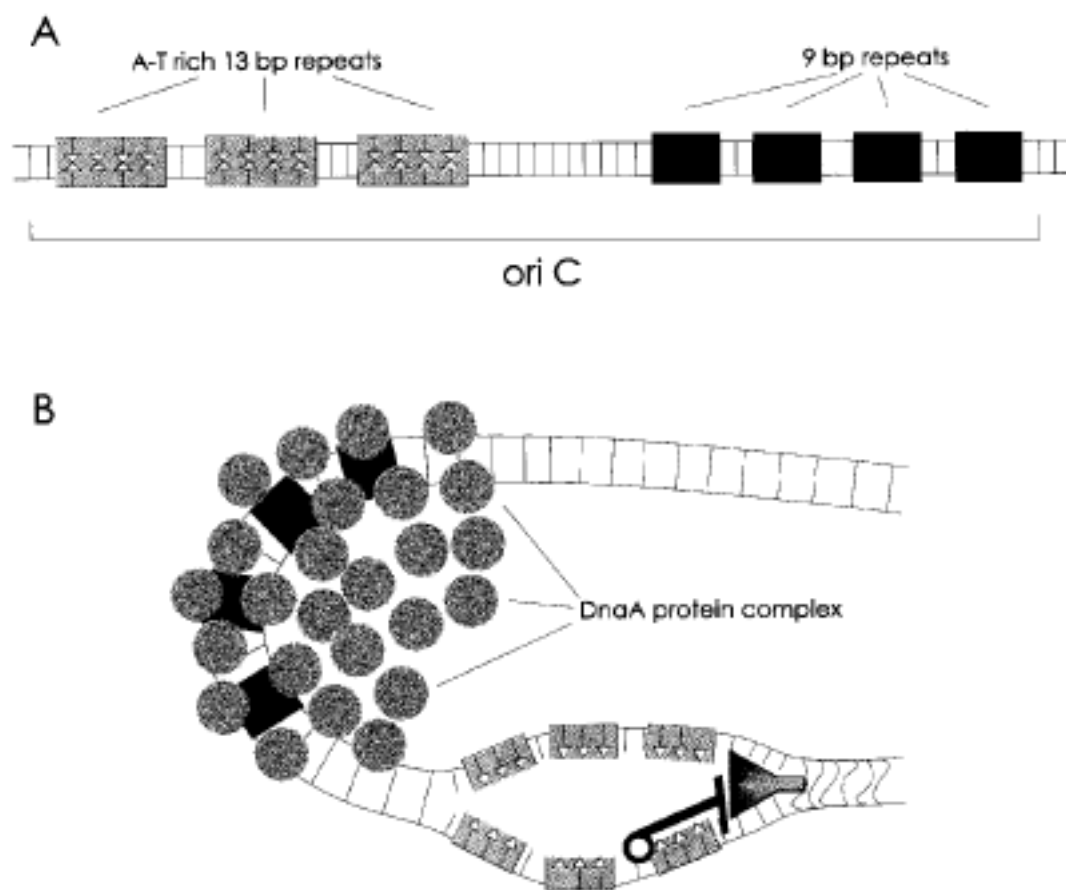


图 22.10 大肠杆菌中功能性序列元件的组织

(a) OriC 内富于 A-T 的序列和 4 个 9 碱基对重复序列的组织; (b) 结合在 9-碱基对重复序列上的 DnaA 蛋白如何导致富于 A-T 序列的解链和两个双向复制叉形成的模型。

一般认为约有 20 个分子的 DnaA 蛋白质结合在 9 个碱基对的重复序列上,使得 DNA 的结构发生变化,于是在 13 个富于 A-T 的碱基对重复序列区域内的双螺旋变性。因为 A-T 碱基对只有两个氢键,比有 3 个氢键的 G-C 对弱得多(第 2 章),所以富于 A-T 的重复序列部位的功能就是复制泡所在的中心。一旦这一区域为其他 DNA 复制蛋白所占有,解旋酶和 SSB 就会在两个方向上使复制泡扩大,创造出双向的复制叉。下一步, DNA 引发酶合成 RNA 引物, DNA pol 则使前导链和后随链的合成开始。与 DnaA 蛋白结合的位点和富于 A-T 的区域靠得很

近, 结果是 OriC 在基因上的位置与实际的复制起始点位置有重叠。

(二) 真核生物中的复制起始点

真核生物中 DNA 复制的起始似乎比所观察到的细菌中的更为复杂: (i) 因为其中的 DNA 多得多, 而且 DNA 在不同的染色体上, 所以需要多得多的复制起始点。根据人基因组的大小以及真核的 DNA 聚合酶的延伸速率(2000 核苷酸/min), 应该至少每隔 2×10^6 bp 就有一个双向的复制起始点, 才能完成 S 期间(8 h) 的复制。研究表明, 复制起始点存在的频率比这更高(约每 1×10^5 bp 1 个), 有些起始点在 S 期的前期使用, 有些在后期使用。(ii) 关于起始序列的遗传学和生物化学研究指出起始的功能可能需要相当大的区域。用双向电泳作图得到的双向复制的具体起始点存在于大的复制区中, 这一区中有一个别的复制起始点的聚簇。

总起来看, 这些发现表明, 真核的起始点中, 序列的专一性大概比细菌和病毒中的小。一种解释可能是, 真核生物中起作用的起始点大概更多是由染色质的结构和辅助性的与 DNA 结合的蛋白质所决定的(它们与距实际的双向起点相当远的序列相互作用), 而不是由复制起始点本身的专一序列所决定的。

(三) 酵母中自动复制的序列

因为研究高等真核生物的 DNA 复制有许多困难, 所以选择酵母作为研究材料, 因为这就有机会运用遗传分析。差不多 20 年前就已发现, 当将酵母基因组的序列克隆到没有内源复制起始点的酵母质粒中时, 这些序列有自动复制序列(ARS) 的功能。以后的研究证明, 这些 ARS 序列的亚群确实相当于酵母正常染色体部位上的复制起始点。ARS 类的分子遗传学的分析表明 ARS 与大肠杆菌的 OriC 有几个功能上相似之处。如图 22.11 所示, ARS 中有一称为起始点识别元件(ORE) 的 DNA 序列, 一套称为起始点识别复合体(ORC) 的蛋白质专一地与 ORE 结合。酵母的 ORC 包括 6 个蛋白质亚基, 它与 DNA 结合需要 ATP。

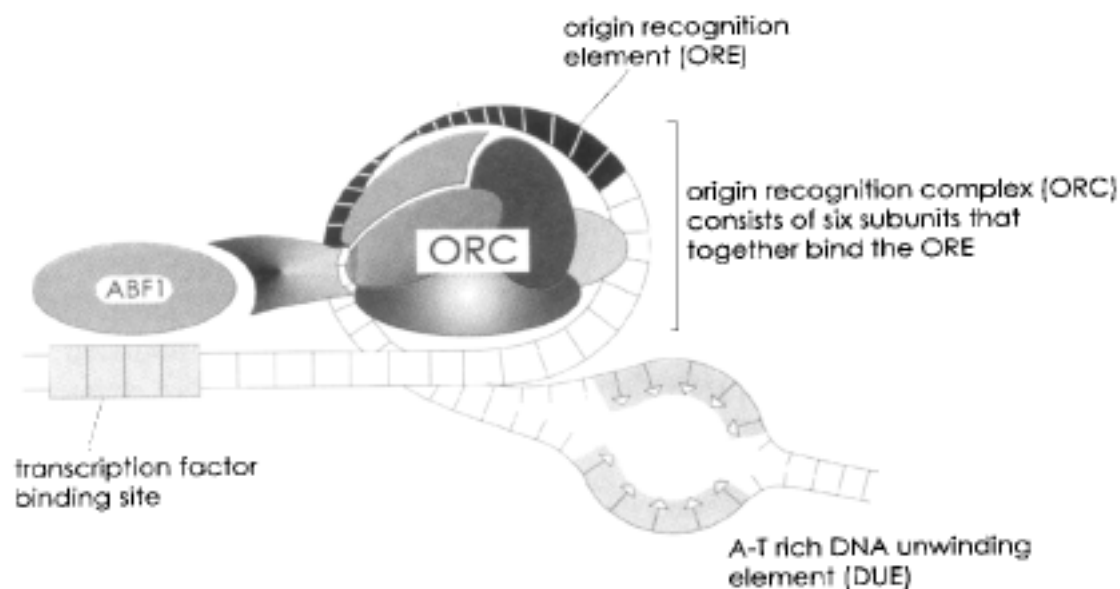


图 22.11 酵母复制起点示意图

酵母的 ORC 蛋白与 ORE DNA 序列的结合类似于大肠杆菌的 DnaA 蛋白与 OriC 的 9 个碱基对的重复序列的结合。酵母与大肠杆菌的第二个相似处是酵母的 ARS 中也有一富于 A-T 的序列, 称为 DNA 解链元件(DUE)。这一序列极易被解链, 并已被鉴定为 ARS 片段内实际的 DNA 复制起点。

酵母中还有第三类 DNA 序列也促进 ARS 起点处 DNA 的复制。这种序列相当于酵母中转录因子 ABF 1 的结合位点。对真核细胞中病毒的复制起点进行的研究说明,与 RNA 合成有关的某些蛋白质(亦称转录因子,见第 24 章)有双重功能,即转录的功能和使 DNA 复制起始的功能。流行的模型认为,所以必须有转录因子,可能在于使复制蛋白聚集到起点上。

真核生物中控制着转录起点的功能的调节机理尚未完全阐明。复制蛋白能否到达已变性的富于 A-T 区域中的单链 DNA 似乎是关键性的一步。将与起点结合的蛋白质的活化作用与细胞的信号转导联系起来可能是重要的起始点,这种联系可能是通过磷酸化作用(细胞周期的许多控制点都依赖于磷酸化-去磷酸化作用)。对于控制 DNA 复制起始的调节步骤的了解较多,我们就可能鉴定出那些使人的癌细胞开始生长的遗传缺陷(见第 31 章)。

22.6 DNA 复制酶有许多用途

(一) DNA 的放射性标记

对 DNA 复制的酶学的了解曾用于发展重要的方法学,而这些方法对现代分子生物学有重要的影响。表 22.2 所列为某些这类酶及其应用。在重组 DNA 方法学中 DNA 聚合酶的第一项应用就是利用所谓缺口平移反应,用³²P-dNTP 和大肠杆菌 DNA pol 对 DNA 进行放射标记。只要有带有随机的单链缺口(用内核酸酶 DNase 进行温和处理得到的)的双链 DNA 模板, DNA pol 就能以其 5 到 3 外核酸酶活性去掉脱氧核苷酸,然后利用其聚合和校正活性用放射性的³²P-dNTP 取代它们。称为 Klenow 片段的 DNA 聚合酶的一种修饰的形式,没有 5 到 3 外核酸酶活性,可将核苷酸加到双链 DNA 的 3 凹端上去。表 22.2 也列出了噬菌体 T4 DNA 聚合酶的特性,它具有 Klenow 片段的许多特性,但它的 3 -5 外核酸酶活性极高。这一特性使得 T4 DNA 聚合酶在含有³²P-dNTP 的反应中,在放射标记 DNA 方面很有用。

表 22.2 DNA 聚合酶及其在重组 DNA 方法学中的用途

酶	3 -5 外核酸酶	5 -3 外核酸酶	聚合酶 活性	持续合成 能力	应 用
E. coli DNA pol	是	是	中等	低	缺口平移聚合酶
Klenow 片段	是	不是	中等	低	使 DNA 成平端
T4 DNA 聚合酶	是	不是	中等	低	DNA 的放射性标记
反转录酶	不是	不是	低	中等	合成 cDNA
修饰的 T7 DNA 聚合酶	不是	不是	高	高	Sanger 双脱氧测序法
Taq DNA 聚合酶	不是	是	高	高	聚合酶链反应

(二) 互补 DNA(cDNA) 的合成

在第 30 章中将要详述的一种不寻常的 DNA 聚合酶是称为反转录酶的依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶。反转录酶是首先从称为反转录病毒的一类真核生物的病毒中鉴定出来的。这种酶能够利用连接在单链 RNA 模板上的 RNA 或 DNA 引物合成互补 DNA(cDNA)。Howard Temin 和 David Baltimore 共同发现了反转录酶,并荣获 1976 年诺贝尔医学奖。这样说绝不会错,那就是不利用这种奇异的 DNA 聚合酶,就不可能有现代生物技术,因为这种技术是依靠分离基因中的许多编码序列才获得了药学上的众多应用。

(三) DNA 测序

DNA 聚合酶也曾被用作基因组分析和鉴定的工具。这类酶之一就是噬菌体 T7 DNA 聚合酶的一种修饰的形式(没有 3 到 5 外核酸酶活性)。Sanger 于 1977 年所描述的、首次利用 Klenow 片段的基本的 DNA 测序反应,因利用这种修饰的 T7 DNA 聚合酶而得到了大大的改进。Sanger 双脱氧 DNA 测序法如第 2 章中所述。

(四) 选择性的 DNA 扩增

第二种 DNA 聚合酶彻底改变了分子生物学中的核酸分析,这就是从嗜热细菌栖热水生菌 (*Thermus aquaticus*) 中得到的不同寻常的 DNA 聚合酶,称 Taq 聚合酶。它是单个的多肽链,持续合成能力极高,聚合反应的最适温度为 80 °C。Taq 聚合酶可用于所谓聚合酶链反应(PCR)中,利用寡核苷酸引物,可用此反应扩增 DNA 中选定的区域。因为 Taq 聚合酶可在如此高的温度下使用,所以可以把引物设计成与靶 DNA 以高度的专一性相结合。

附录 22.1 利用 Taq DNA 聚合酶的聚合酶链反应(PCR) 及其应用

20 世纪 80 年代中期,美国加利福尼亚州的一个生物技术公司的研究人员描述了一种非

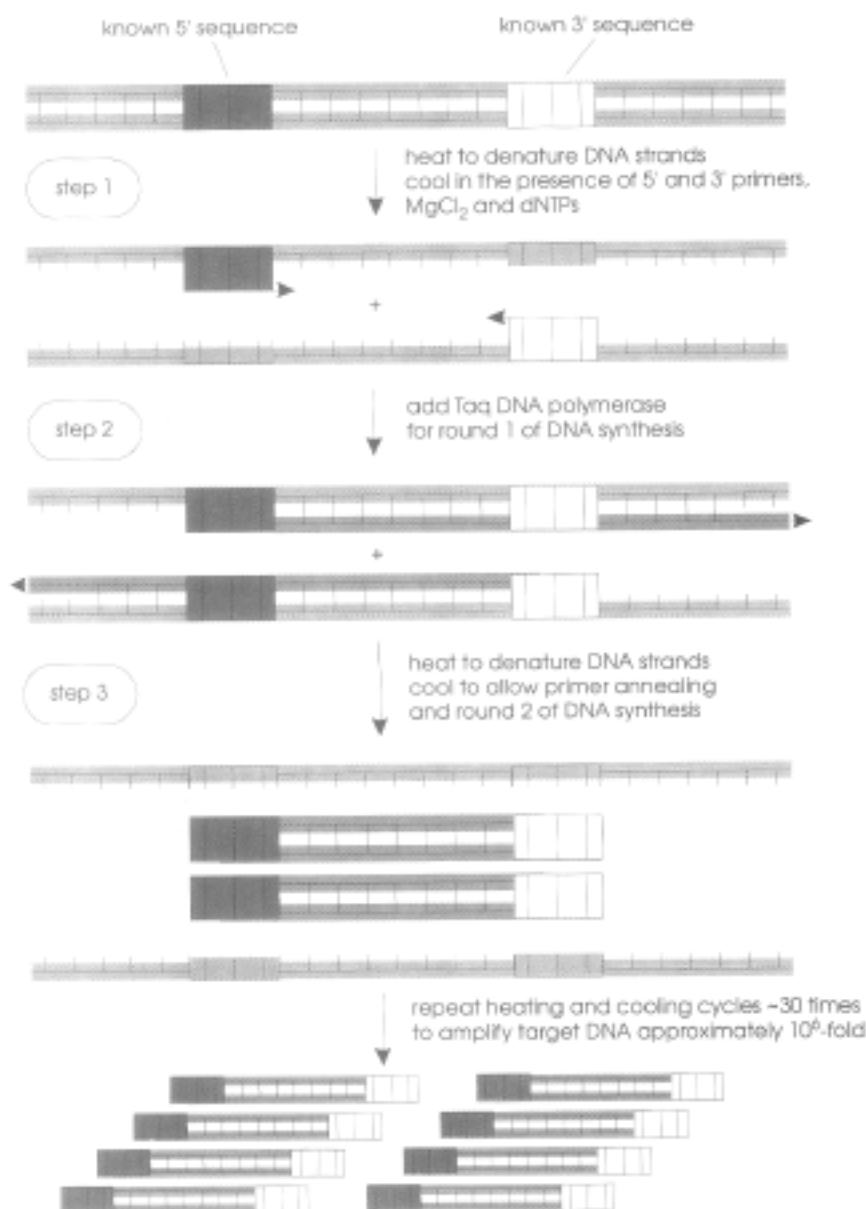


图 22.12 PCR 如何引起扩增的示意图

注意,原来的模板 DNA 链也参与每一轮的扩增(第 3 步中未画出);如图中所绘,极大量的扩增的材料都是由扩增的靶 DNA 的模板产生的。

常简单然而又极为强有力的在体外进行的一种 DNA 聚合反应。这种技术称为聚合酶链反应 (PCR), 其根据是下列想法: 假若有两个序列互补的引物在一个 DNA 区域两侧, 那么连续数轮的引物退火、DNA 合成和变性就能产生大量的 DNA 产物, 以这两个引物为其末端序列。这种高超的技术目前已在全世界广泛用于大量的研究工作和疾病的诊断。

把 PCR 用于分子生物的关键的技术性突破是用一种嗜热细菌的 DNA 聚合酶代替了大肠杆菌的 DNA 聚合酶。因为 3 个不同步骤所需要的最适温度不同: 退火, 约 50 °C; 聚合, 约 70 °C; 变性, 95 °C; 所以需要一种在比 37 °C 高得多的温度下能起作用的 DNA 聚合酶。PCR 的自动化是由于使用了特殊的温度部件, 这种部件能够使数百支反应试管的温度立刻改变, 这就使得 PCR 在实验室研究中的应用大为方便了。图 22.12 表明连续多轮的 PCR 如何能迅速产生大量的专一产物。PCR 的一些更为引人入胜的应用包括已灭绝的物种(如猛犸象)的古代基因的克隆, 法医中对犯罪嫌疑的排除以及人基因组计划(见第 21 章)中染色体作图研究中基因组标记(STS)的提供等。

22.7 小 结

(1) DNA 复制是半保留的, 并从复制起点以双向进行。DNA 合成的方向总是相对于模板链的 5 到 3。复制叉由前导链和后随链组成, 前导链中 DNA 的合成是连续的, 后随链的特点是不连续的短的冈崎片段的合成。

(2) 根据功能上的差异, 至少有 3 类 DNA 聚合酶。大肠杆菌中, 复制叉上 DNA 的合成需要 DNA pol α , DNA pol β 填满后随链中的缺口, 而 DNA pol γ 则为 DNA 修复所必需。哺乳动物的 DNA 聚合酶已被鉴定, 其功能与大肠杆菌的类似。

(3) 所有的 DNA 聚合酶都需要游离的 3 羟基以催化延伸步骤。RNA 或 DNA 引物可提供这种羟基。

(4) 复制体是复制叉的移动所需要的一种多蛋白质的复合体。复制叉上除去有 DNA 聚合酶外, 还有解旋酶、拓扑异构酶、单链结合蛋白、DNA 引发酶和 DNA 连接酶。

(5) DNA 复制起点是 DNA 合成起始的位点。大肠杆菌中, 称为 OriC 的 DNA 序列中有 DnaA 蛋白的许多个亚基的结合位点。DnaA 蛋白与 OriC 的结合使解旋易于发生并导致双向复制叉的建立。已证明酵母在复制起始点上有类似的 DNA 序列, 而且已分离并鉴定了酵母的与起始点结合的蛋白质。

(6) 许多 DNA 聚合酶已被用于各种各样的分子生物学方法。最值得称道的是 Taq DNA 聚合酶, 它是聚合酶链反应(PCR)所需要的关键酶。

参 考 资 料

- Botchan, M. (1996): Coordinating DNA replication with cell division: Current status of the licensing concept. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:9997.
- Burhans W. C., Huberman J. A. (1994): DNA replication origins in animal cells: A question of context? *Science*, 263:639.
- Coverley D., Laskey R. A. (1994): Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:745.
- DePamphilis M. L. (1993): Eukaryotic DNA replication: Anatomy of an origin. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:

29.

- Dutta A. (1993): DNA replication: Trans-plication factors? *Current Biol.*, 3:709.
- Erlich H. A., Gelfand D., Sninsky J. J. (1991): Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643.
- Herendeen, D. R. and Kelly, T. J. (1996): DNA polymerase III: Running rings around the fork. *Cell*, 84:5.
- Huberman J. A. (1995): Cell cycle: A license to replicate. *Nature*, 375:360.
- Joyce C. M., Steitz T. A. (1994): Function and sturcture relationships in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:777.
- Kornberg A. (1991): Control of initiation of the *Escherichia coli* chromosome. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 56:275.
- Krishna T. S. R., Kong X-P., Gary S., Burgers P. M., Kuriyan J. (1994): Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79:1233.
- Liang P., Pardee A. B. (1992): Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257:967.
- Marahrens Y., Stillman B. (1992): A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, 255:817.
- Newlon C. S. (1993): Two jobs for the origin replication complex. *Science*, 262:1830.
- Reiss J., Cooper D. N. (1990): Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. *Hum. Genet.*, 85:1.
- Stillman B. (1994): Smart machines at the DNA replication fork. *Cell*, 78:725.
- Stukenberg P. T., Turner J., O'Donnell M. (1994): An explanation for lagging strand replication: Polymerase hopping among DNA sliding clamps. *Cell*, 78:877.
- Yuzhakov, A., Turner, J., O'Donnell, M. (1996): Replisome assembly reveals the basis for asymmetric function in leading and lagging strand replication. *Cell*, 86:877.

复 习 题

- Meselson 和 Stahl 如何示证 DNA 复制是半保留的?
 - 他们用生化方法标记 DNA 并证明 DNA 合成的结果是形成旧链与新链为 1 : 1 的混合物
 - 他们将 ^{15}N 和 ^{14}N 之比为 1 : 1 的混合物加于细菌培养基中, 得到的新合成 DNA 中两条链都是均匀标记的
 - 他们比较了在体内和体外合成的线状和环状 DNA 的复制情况
 - 他们利用电子显微镜将 ^{15}N -标记的 DNA 与 ^{14}N -标记的 DNA 具体分开
 - 他们的实验结果实际上证明 DNA 的复制是保留的
- 岗崎片段是:
 - RNA 引物
 - Eco R1 的消化产物
 - DNA 聚合酶的催化域
 - 在后随链上合成的短的 DNA 片段
 - 酵母中自动复制的 DNA 片段
- DNA 合成过程中核苷酸错误掺入的误差率之所以低, 是由于:
 - DNA 聚合酶的持续合成能力低
 - DNA 聚合酶的持续合成能力高

- c) DNA 聚合酶的 3 到 5 外核酸酶活性和错配的修复
 - d) 仅仅是错配的修复
 - e) DNA pol 的 亚基
4. DNA 复制的复合体需要各种各样的蛋白质来促进复制叉的移动。下列答案中哪一条最好地表明了体外反应中大肠杆菌的 DNA 复制所需要的最小的一组蛋白质?
- a) DNA pol , 引发酶, SSB 和连接酶
 - b) SSB, 解旋酶和拓扑异构酶
 - c) 连接酶, DNA pol 和 DNA pol
 - d) DNA pol , 解旋酶, SSB 和引发酶
 - e) 拓扑异构酶, 解旋酶和 DNA pol
5. 在控制大肠杆菌中 DNA 合成方面, Dna A 蛋白的作用是:
- a) 功能上等于酵母的起始点识别复合体(ORC), 它与 DNA 结合并引起 DNA 螺旋的局部解旋
 - b) 防止由于叉上解旋酶的活性而造成的扭转应力
 - c) 增加 DNA pol 的持续合成能力
 - d) 引发后随链上冈崎片段的 DNA 合成
 - e) 结合起点中一系列的富于 A-T 的重复序列并阻止叉移动时 DNA 的弯曲
6. 聚合酶链反应是:
- a) 模仿氧化磷酸化的体外反应
 - b) 病毒所利用的合成 DNA 的形式
 - c) 利用寡核苷酸引物的一系列重复的 DNA 合成步骤
 - d) 促进 DNA 错配修复的专一性的一种方法
 - e) 以反转录酶合成 DNA 的特性为根据的一种技术

参 考 答 案

- 1. a 本实验要求有一种方法能够区分新合成的 DNA(轻链) 与模板 DNA(旧链)。
- 2. d 冈崎片段是后随链上 DNA 合成的产物。
- 3. c DNA 合成中的高保真性既需要 DNA 聚合酶的校正活性又需要错配的修复。
- 4. d DNA pol , 解旋酶, SSB 和引发酶对体外的叉移动就足够了; 体内的则还需要拓扑异构酶。
- 5. a DNA 在富于 A-T 的 13 bp 重复处的扭曲需要结合在 9 bp 重复处的 DnaA 蛋白, 与 ARS 复制中 ORC 的功能类似。
- 6. c 用 PCR 扩增 DNA 需要 DNA 变性、引物退火和 Taq DNA 聚合酶合成 DNA 的循环重复约 30 次, 以达到 DNA 靶的扩增约百万(10^6) 倍。

第 23 章 DNA 的修复和重组

23.1 引言

由 DNA 修复机制维持 DNA 的完整性和由重组过程改变 DNA 的组织是两个重要的过程,都对 DNA 中贮存的信息的变化有贡献。首先, DNA 的破坏若不在下一轮复制之前被修复,那就会使碱基发生变化而导致 DNA 序列的永久性变化。其次,通过重组过程的 DNA 的重排可能是对遗传多样性有贡献的随机事件的结果,也可能是一种高度特化的机制的结果,例如免疫球蛋白基因重排的结果。本章拟描述 DNA 修复和重组的一般过程并强调特殊的依赖于 DNA 的酶在维持基因组的完整性方面的作用。

23.2 突变是 DNA 破坏的结果

(一) 脱嘌呤作用、脱氨作用和胸腺嘧啶二聚体

由于 DNA 复制而错误掺入的核苷酸可以被 DNA 聚合酶的校正活性有效地除去。但是由暴露在化学诱变剂下或由于紫外线的照射而遭到破坏的 DNA 会怎样呢? DNA 破坏的常见形式是自发的脱嘌呤作用,即通过 N-糖基键的水解,鸟嘌呤或腺嘌呤与脱氧核糖分开。据估计在人体的细胞内每天每 10^9 bp 中有多达 10^3 次的脱嘌呤作用。另一种相关类型的化学变化是胞嘧啶自发的脱氨作用,形成尿嘧啶。如图 23.1 所示,假若这些变化得不到改正,在 DNA 复制后 C-G 碱基对就会变成 A-T 碱基对。

另一种常见类型的 DNA 破坏是由于紫外线或电离辐射引起的胸腺嘧啶二聚体的形成。这种链内的共价键使一个胸嘧啶的 C-5 和 C-6 与相邻的胸嘧啶的同样两个碳形成一环丁基的环,其结果是含有胸嘧啶的链的 DNA 主链在结构上发生了变化,这种变化可能使得与互补链上相应的腺嘌呤残基之间的氢键遭到破坏(图 23.2)。

(二) 自然选择需要基底水平的 DNA 破坏

存在于环境中的化学物质在某些情况下也会引起 DNA 的破坏。两类这种化合物是脱氨剂,如亚硝酸或亚硝酸盐以及烷化剂,如二甲基硫酸。有各种各样的试法来评估这些化合物作为诱变剂的能力大小。由 Bruce Ames 所提出的 Ames 试法利用细菌作为基因的宿主以确定各种各样的化合物对某种基因的突变频率有什么影响。假若某种特定的化合物有化学诱变的特性,那么就可用 Ames 试法立即鉴定出已发生突变的细菌的菌落。加入由哺乳动物的肝脏制得的提取物能改变这种试法中某些化合物的诱变性,因为肝中的酶会使某些代谢中间产物出现。

由于天然的或人为的来源而引起的 DNA 突变,绝大部分都能由细胞中 DNA 的修复系统改正。然而,根据真核基因组中非编码区的 DNA 序列的进化方面的研究结果,估计每一代每 10^9 bp 中约有 1 个未修复的突变掺入了基因组。假若将这一数据外推至一单个基因,那么基因的突变率就是每 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞世代中每个基因有一个突变。自然选择原理的根据就是假定

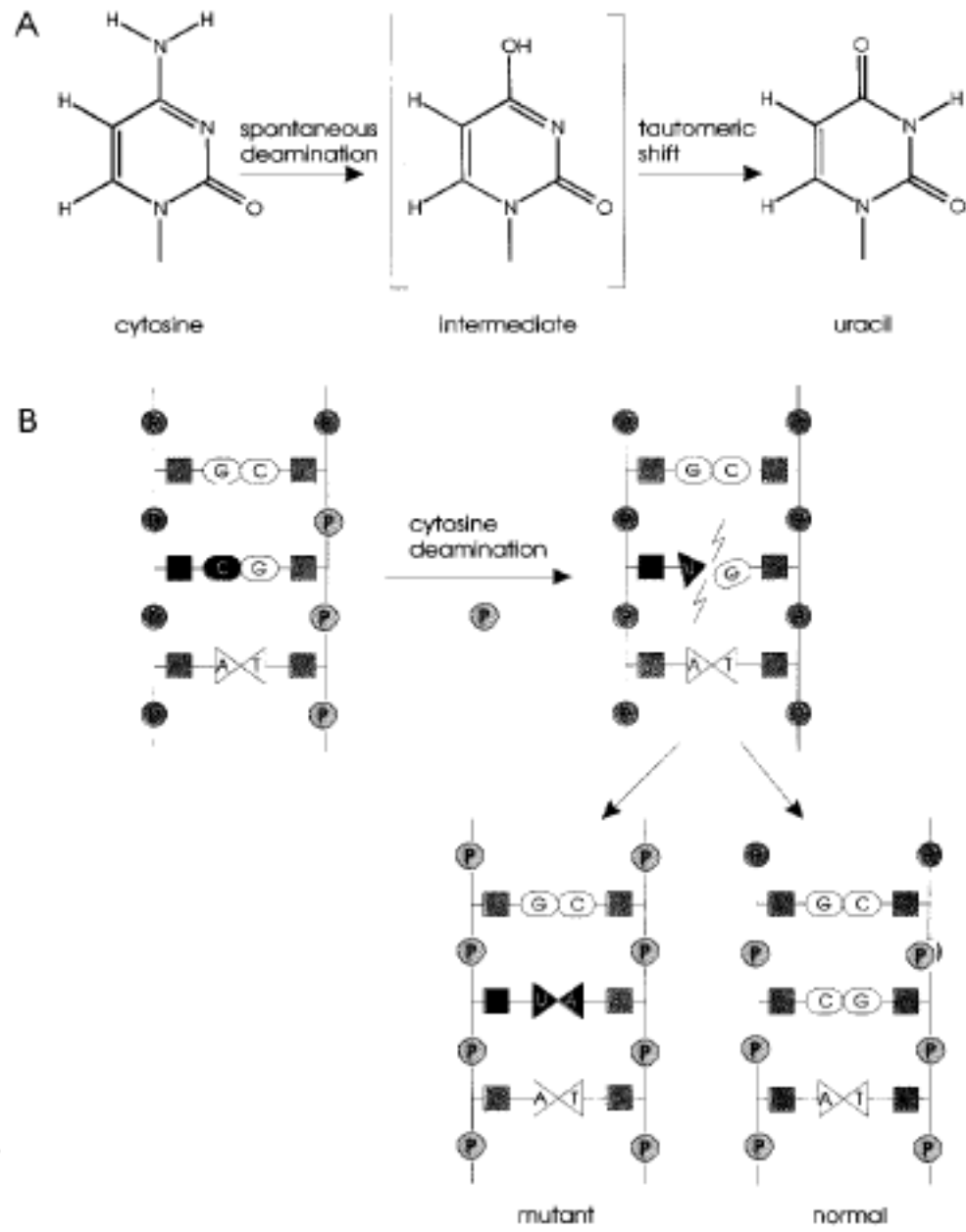


图 23.1 胞嘧啶脱氨引起突变示意图

(a) 脱氨作用使胞嘧啶转变为尿嘧啶；(b) 如果胞嘧啶的脱氨得不到改正，其结果就是经过以后几轮的 DNA 复制之后，G-C 就突变为 A-T。

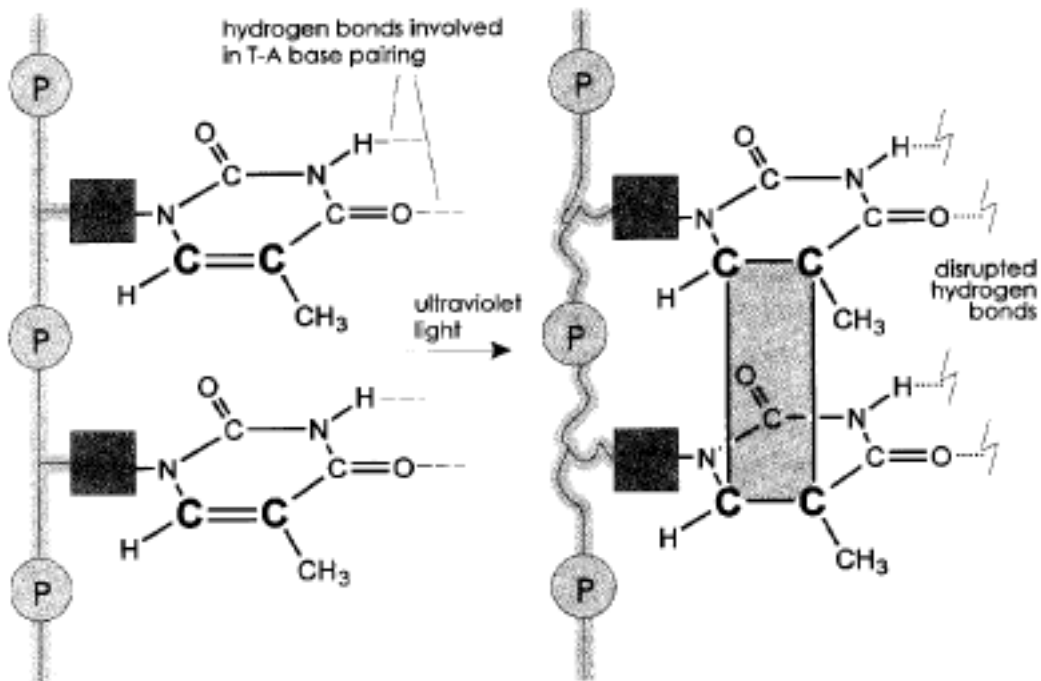


图 23.2 胸嘧啶二聚体形成示意图

某些突变对一个物种中的个体的存活优势是有利的。因此,并非所有的突变都是“坏的”,事实上,进化的推动依赖于 DNA 修复与基因多样性之间精巧的平衡。

23.3 DNA 修复的机制

人们认为每个基因组每天要发生 10^4 以上的突变,细胞如何能修复它们呢?答案是细胞消耗许多能量使得酶能够经常不断地控制 DNA 的突变。幸运的是, DNA 的本质是双螺旋,遗传信息都有两份拷贝(双螺旋两条链是互补的)。在许多类型的 DNA 破坏中,两条链中只有一条链是需要修复的。利用区分受伤害的和未受伤害的链的机制,修复酶能够利用互补链中的信息,取代已突变的 DNA。

和 DNA 复制一样,我们关于 DNA 修复机制的知识也大多来自于对大肠杆菌的研究。近年来关于真核生物中 DNA 修复的研究,主要是酵母的遗传学研究和人的疾病的遗传学研究,已揭示出这些生物中也存在类似的过程。表 23.1 所列为大肠杆菌中的 4 种基本的 DNA 修复系统和已鉴定出的蛋白质。凡已鉴定出的相应蛋白质的人的基因也列在表内。

表 23.1 大肠杆菌中的 4 种 DNA 修复系统和人的同系物

修复系统	破坏的类型	大肠杆菌的蛋白质	人的基因
核苷酸切除	嘧啶二聚体或其他结构上的干扰	ABC 外切核酸酶, DNA pol, 连接酶	XPA, XPB/ERCC3, XPC, XPD/ERCC2, XPE, XPF/ERCC1 和 XPG/ERCC5, ERCC4, ERCC6
错配	核苷酸错配	MutH, MutL, MutS, DNA 解旋酶, SSB, DNA pol, 连接酶, 外切核酸酶	MLH1, PMS1, PMS2 (MutL 同系物), MSH2 (MutS)
碱基切除	尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤和烷基化碱基的切除	DNA 糖基化酶, AP 内切核酸酶, DNA pol, 连接酶	酵母 DNA pol (哺乳类的 DNA pol), 人的 DNA 糖基化酶
直接修复	甲基化的化学逆转或光活化	O ⁶ -甲基鸟嘌呤 DNA 转甲基酶, DNA 光解酶	O ⁶ -甲基鸟嘌呤 DNA 转甲基酶

DNA 修复的 4 个基本步骤是识别、去除、重合成和重连接。识别破坏和去除破坏的 DNA 的酶是高度专一的,能够识别由于各种类型的 DNA 改变而产生的各种各样的结构。DNA 修复的最后两个步骤——重合成和重连接,在大肠杆菌中分别由 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶进行。

(一) 核苷酸切除修复

图 23.3 所示为胸腺嘧啶二聚体的核苷酸切除修复。有时这种修复称为整块损坏处的修复,因为 DNA 修复酶所识别的是 DNA 主链中的异常,例如由于胸腺嘧啶二聚体中形成了环丁基环所产生的变化(见图 23.2)。

着色性干皮病(XP)是人的遗传病,是缺失胸腺嘧啶二聚体的修复而产生的。这种情况是由于对日光极端敏感而引起的,是皮肤癌的诱因。对于 XP 病人的遗传分析已鉴定出了至少 7 个不同的互补群(至少有 7 个不同的基因发生了突变,见附录)。两个 XP 基因编码识别整块 DNA 的蛋白质(XPA 和 XPE),至少有两个是解旋酶的基因(XPB 和 XPD)。有趣的是,由 XPA 基因(亦称 ERCC3)编码的解旋酶是双功能的,也存在于 RNA 聚合酶复合体中,这种复合体

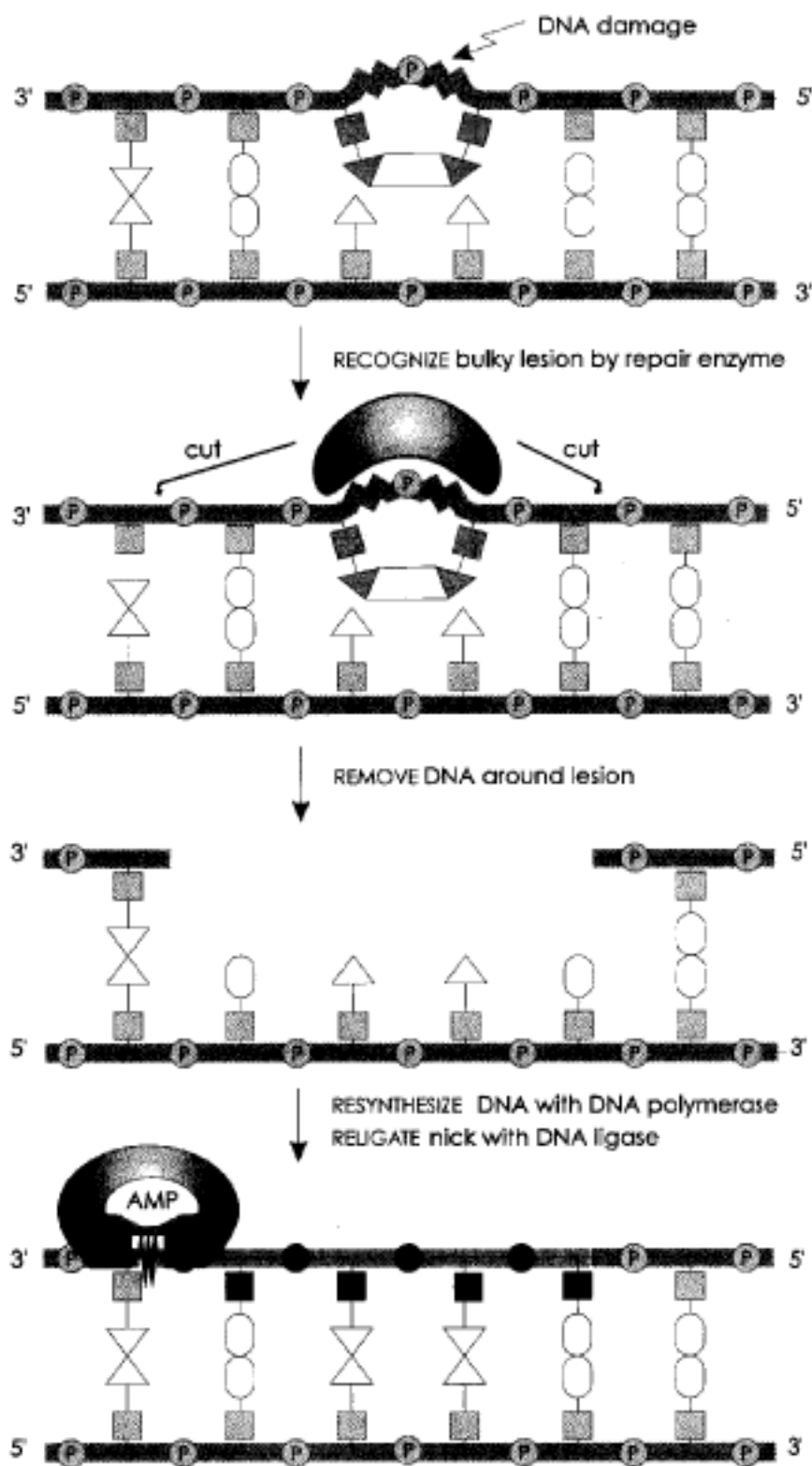


图 23.3 DNA 修复四步骤示意图: 识别、去除、重合成和重连接

与基因转录有关。已观察到与整块 DNA 相比, 转录的 DNA 优先被修复, 而 RNA 聚合酶就在被转录基因的模板链上胸嘧啶二聚体的部位上。

(二) 错配修复

第二种重要的修复系统称为错配修复。错误的 DNA 复制偶尔会使新生链与模板链的碱基错配。大肠杆菌中有 3 种蛋白质改正这些错误, 它们是 MutS、MutH 和 MutL。这种系统只能改正新合成的 DNA, 其保真性的基础是下列事实: 新的 DNA 链在开始时其 GATC 序列中的腺嘌呤残基尚未被甲基化。这种甲基化有差异的情况使得新链(未甲基化)与模板链(已甲基化)得以被区分开。这是很重要的, 因为修复酶需要识别哪两个核苷酸是错配的; 否则, 假若错误的核苷酸未被除去, 就可能导致突变。

图 23.4 说明 MutS、MutH 和 MutL 这三种蛋白质如何改正新合成的 DNA 中的错配。注

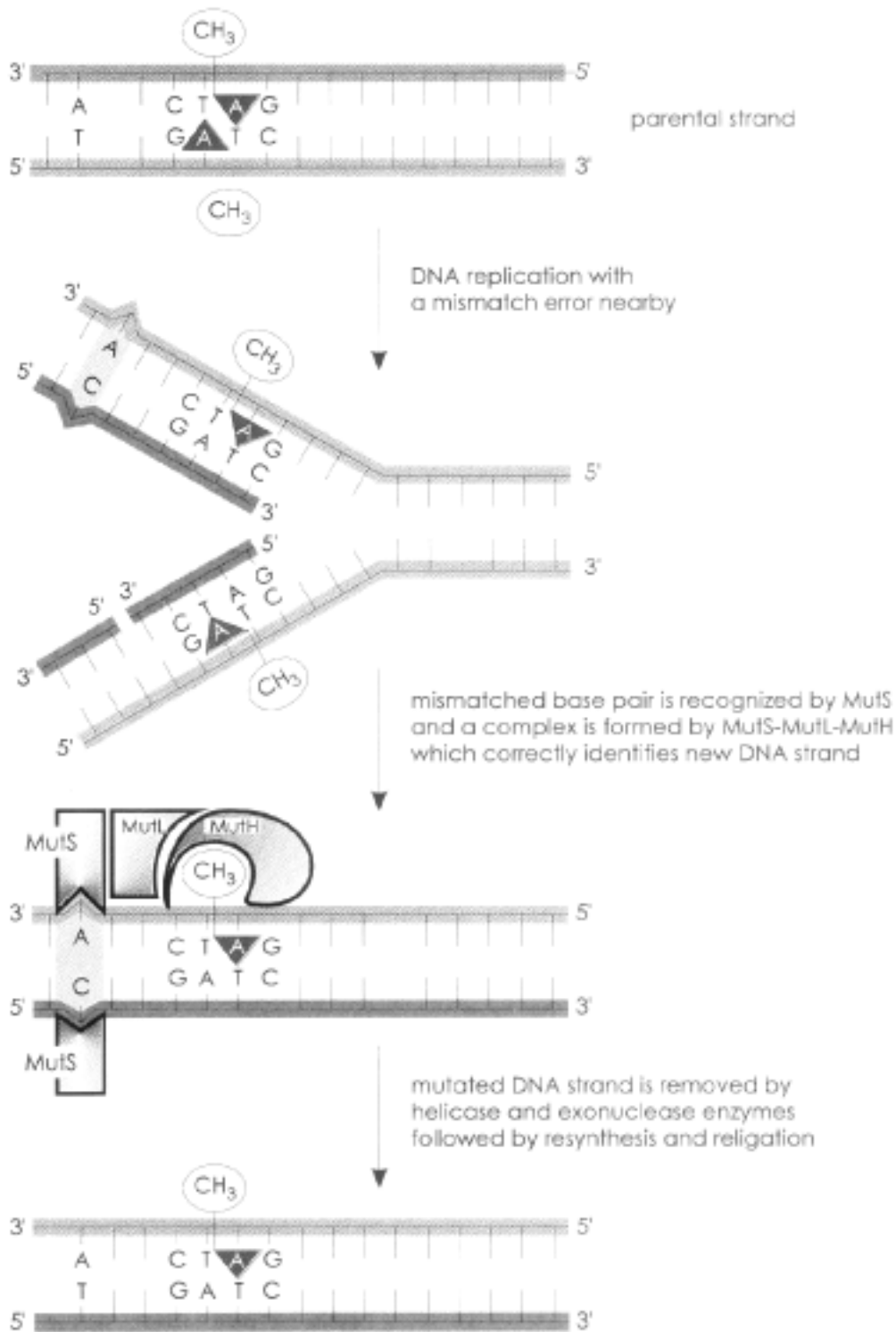


图 23.4 大肠杆菌中 MutH, MutS 和 MutL 3 种蛋白质进行错配修复

意, 未甲基化的 GATC 序列并不必紧靠着错配处, 因为外切核酸酶能以 3' 或 5' 的方向除去插入的 DNA, 什么方向则视错误核苷酸的相对位置而定。近年来发现大部分患有遗传性结肠癌 (hereditary nonpolyposis colon cancer, HPC) 的病人的某些基因中有突变, 这些突变基因起着类似于细菌的修复酶基因的功能, 据此已分离出了 MutS 和 MutL 的人的同系物 hMSH2 和 hMLH1。虽然关于人的细胞中 hMSH2 和 hMLH1 进行 DNA 修复的生物化学尚有待阐明, 但确证结肠癌细胞中缺失 DNA 修复的基因可以代表一种关键性的发现, 了解到癌细胞何以在相当短的时间内其基因组就会发生很多变化(第 31 章)。

(三) 碱基切除修复

碱基切除修复必然包括去除碱基部分已丢失的核苷酸, 碱基可因脱嘌呤作用或 DNA 糖基化酶(此酶除去异常碱基如脱氨基的胞嘧啶)的作用而丢失。和其他两种修复系统一样, 第一

步是通过内切核酸酶和磷酸二酯酶的作用除去脱氧核糖-5-磷酸,这就切开了磷酸的主链并造成了一个核苷酸的缺口。然后 DNA 聚合酶使核苷酸发生取代, DNA 连接酶将缺口封闭。DNA 糖基化酶识别 DNA 中不适当的碱基,如尿嘧啶、次黄嘌呤和黄嘌呤,这些分别是胞嘧啶、腺嘌呤和鸟嘌呤脱氨所生成的。DNA 糖基化酶切开 N-糖基键,除去异常的碱基,从而造成了一个“无碱基”位点。重要的是,尿嘧啶 DNA 糖基化酶不会从 RNA 上切下尿嘧啶残基和从 DNA 上切下胸嘧啶残基。因为尿嘧啶糖基化酶仅作用于 DNA,而在 DNA 合成过程中含有尿嘧啶的核苷酸并不掺入 DNA,于是任何时候除去尿嘧啶时, RNA 中仍有尿嘧啶。

(四) 直接修复

第四种已知的修复系统称为直接修复,因为它不需去掉任何核苷酸,而且与 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶无关。需要这种修复的最常见的例子是烷化剂将鸟嘌呤的 O⁶ 位甲基化。O⁶-甲基鸟嘌呤能与胸嘧啶发生碱基配对,如果不经改正,经过两轮复制以后就会引起突变,使 G-C 碱基对变成 A-T 碱基对,就像胞嘧啶脱氨形成尿嘧啶的情况一样。O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 转甲基酶会将甲基转移到酶中的半胱氨酸残基上而除去甲基,于是在原位重新产生了鸟嘌呤而直接修复了被破坏的 DNA。直接修复是高度专一的过程,事实上,已发现的直接修复的例子确实极少。

23.4 DNA 重组的两种机制

早期关于植物和细菌的遗传分析就已指出,简单的遗传模式不足以解释杂交实验中所观察到的多种多样的表现型。随着 DNA 结构的阐明,以及有关 DNA 复制和修复的蛋白质的鉴定,就有人提出, DNA 能够以随机的或定向的方式进行重排,从而产生遗传学家首先看到的遗传多样性。DNA 重组的基本机制包括 DNA 链的断裂和重新连接,使得遗传信息发生交换或打乱重排,视断裂的方式(单链断裂或双链断裂)和重组中有关 DNA 链的极性而定。已鉴定出分子水平上的两种主要类型的重组,同源重组和位点专一重组。这两种过程的一个重要区别是,位点专一重组需要能够识别重组位点专一序列的蛋白质,而同源重组能在 DNA 链上的任何部位发生,只要与之重组的 DNA 在序列上与之互补。同源重组是由 DNA 中的碱基配对推动的,利用的是其他修饰 DNA 的反应所需要的同样的酶。

23.5 交换频率和基因图

遗传学家有证据表明同源重组必定会发生,因为来自父本或母本的遗传标记有时会交换。两个基因在具体位置上离得越远,就越容易观察到表现型水平上的同源重组现象。假若基因彼此靠得很近,就不大可能在有关的 DNA 片段之内发生同源重组。图 23.5 所示为利用交换频率绘制基因图的原理。

23.6 同源重组的分子机制

假若比较详细地研究同源重组,我们就会发现它是一个复杂的过程,而且不太使人惊奇的是,它提出了许多必须解决的 DNA 结构和极性方面的问题。这一反应中的两个主要步骤是:

- (1) 单链的侵入促进了一种称为杂交链的交换或 Holliday 连接体的中间结构的形成;
- (2) 用异构化作用分辨这 4 条链,随后切割以释放重组的 DNA 分子。

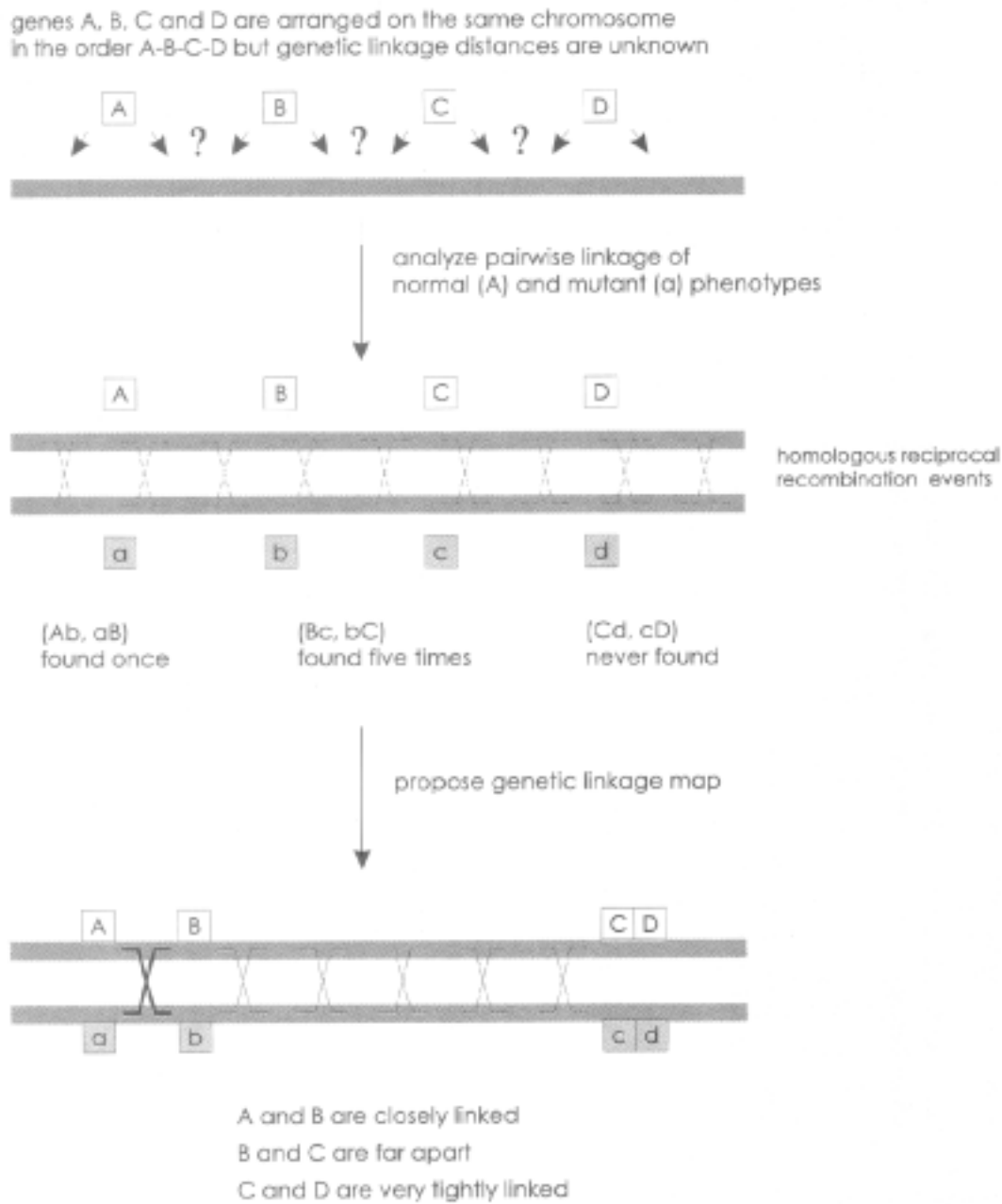


图 23.5 可用计算得到的交换频率绘制基因图

(一) 第一步：链的侵入和分支的移动

同源重组的第一步中，两个 DNA 分子中的一条链上的切口导致一条游离的单链的形成，这条链取代了同源染色体中相应的链，如图 23.6 所示。大肠杆菌中这一反应的最好的例子是由 RecA 蛋白所进行的反应，RecA 蛋白对于单链 DNA 的亲合力高，也能促进一条 DNA 链“侵入”到另一个 DNA 分子中。

这一反应的第二部分是产生切口以及被取代的单链的交换，于是它就能与侵入的 DNA 分子中相应的互补序列发生配对。这种结构称为异源双链，因为它是由来自两个供体分子的单链组成的。最后，通过所谓分支移位的过程，交换点（侵入的 DNA 链与靶 DNA 在此处发生碱基配对）就能在异源双链上面上下移动，好像拉链一样。因为异源双链中的每一条链都是与另一分子的互补链配对的，所以分支移位实际就像是两条平行的拉链。大肠杆菌中的分支移位是由蛋白质推动的，RecA 蛋白质对 ATP 的水解是驱动反应的动力来源。分支移位的净结果是它决定着多少遗传信息将发生交换。

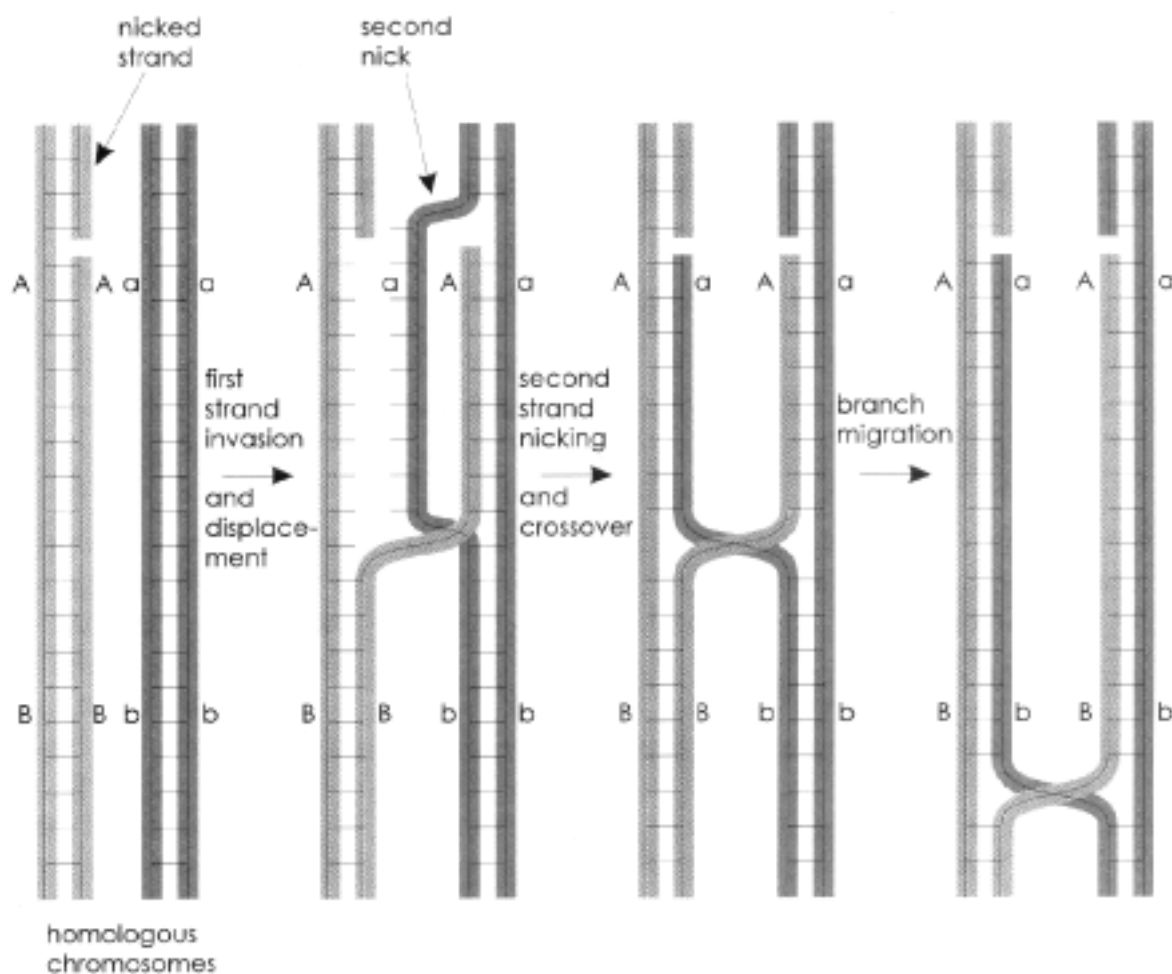


图 23.6 同源重组中的关键性起始步骤——链的交换, 产生切口和侵入以及分支的移动

(二) 第二步: 异构化作用和 Holliday 连接体的分解

同源重组的第二个关键性步骤是两个 DNA 分子的异构化作用和分解作用。两个异源双链中的 4 条 DNA 链均与其互补链配对, 这种结构称为 Holliday 连接体(因 Robin Holliday 而得名, 他首次提出这种结构)。图 23.7 示意的是人们设想的这种 DNA 的“体操”是如何表演的, 其结果是发生了 DNA 所特有的同源重组现象。从连接体的结构开始, DNA 必须先先在垂直的平面上旋转 180° ; 而后再在平行的平面上旋转 180° 才能形成图 23.7 中的异构化的结构。内切核酸酶把两条链切开, 由于切割而产生的单链上的切口再连接起来, 就会产生两个相互交换的 DNA 分子。

有些难以想像这种结构上的变化是如何完成的, 但是有使人不能不接受的证据支持这种重组模型: (i) 遗传分析已示证遗传信息肯定会在每条链之间发生交换; (ii) 已鉴定出几种生物中的修饰 DNA 的酶具有同源重组所必需的功能; (iii) 大肠杆菌的重组中间体的分辨率电子显微照片中已发现了预测的 Holliday 连接体的结构。

23.7 免疫球蛋白基因的位点专一重组

对于起作用的免疫系统, 抗体的多样性是至关重要的。在发育过程中, 抗体专一的淋巴细胞要一个一个地表达出 $10^6 \sim 10^8$ 种不同的抗体。根据所估计的人基因组中编码的基因的数目(10^5), 如果 1 个基因编码一种抗体, 就无法解释何以这么多抗体分子能得到表达。

20 世纪 70 年代, 编码抗体蛋白的免疫球蛋白的基因的编码序列被分离出并进行了分析。结果发现从不同克隆的细胞中得到的免疫球蛋白基因的序列有些部分是相同的, 而其他部分则很不相同。在蛋白质水平上已知抗体有恒定区和可变区。使抗体有其独特的专一性的是可

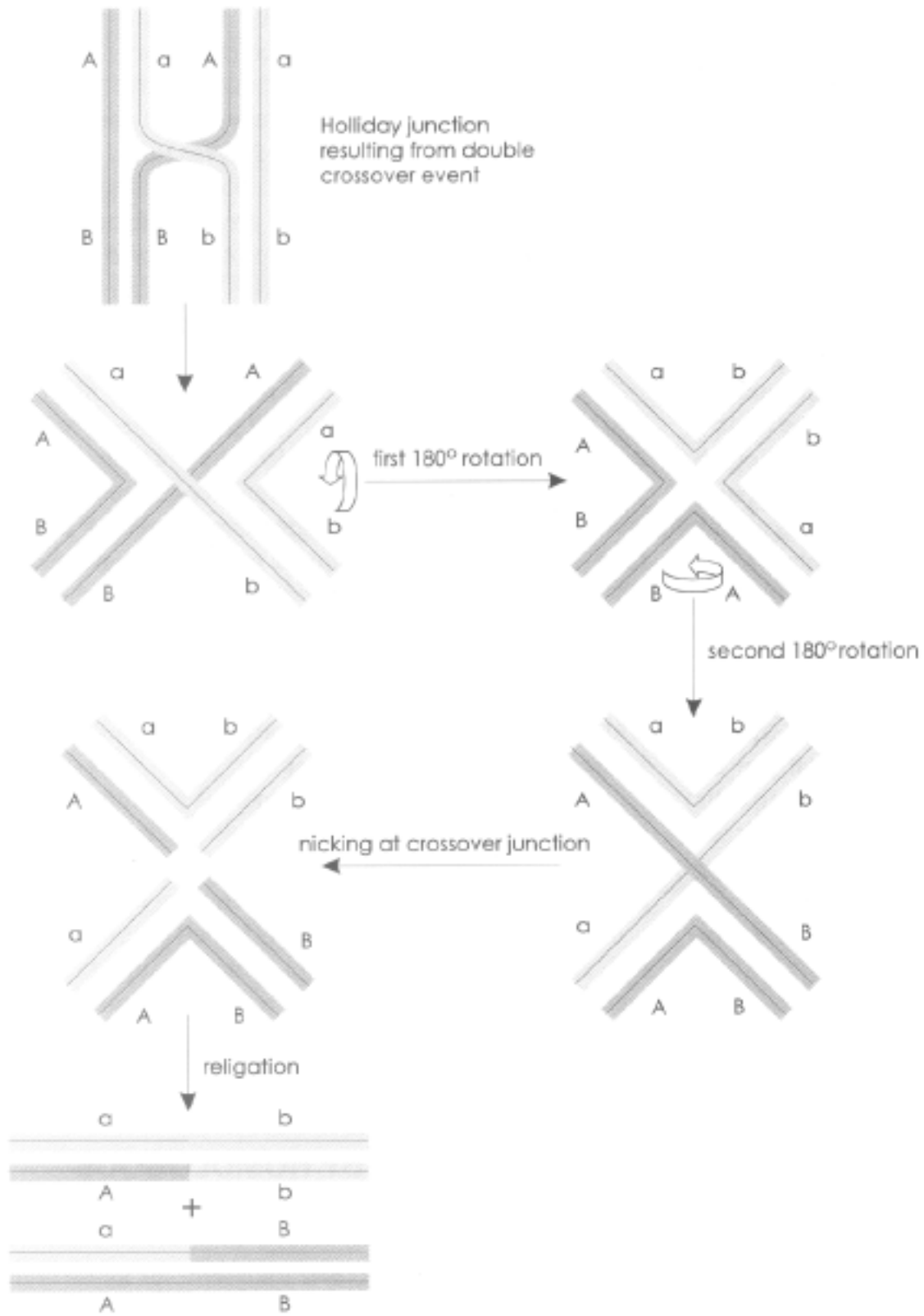


图 23.7 Holliday 连接体的异构化和分解

变区中的氨基酸序列。后来发现生殖细胞(精子和卵细胞)中的免疫球蛋白基因与成熟淋巴细胞中的不同,这是关键性的观察,可以解释何以抗体蛋白及其相应的基因会有如此多的序列上的排列。后来发现,在淋巴细胞中,在可变区基因片段(在基因组中有许多拷贝)和恒定区基因片段之间发生着位点专一重组。

(一) 免疫球蛋白基因由可变的和恒定的基因片段组成

规定着免疫球蛋白分子的重链的 DNA 的可变区(V)、连接片段(D和J)以及恒定区(C)的关系如图 23.8 所示。注意,生殖细胞中这些编码序列分散在一大段 DNA 中,有 V、D、J 和 C 区。在淋巴细胞中,这些基因片段的各个部分以不同的组合联系起来,反映了位点专一重组事件的发生。

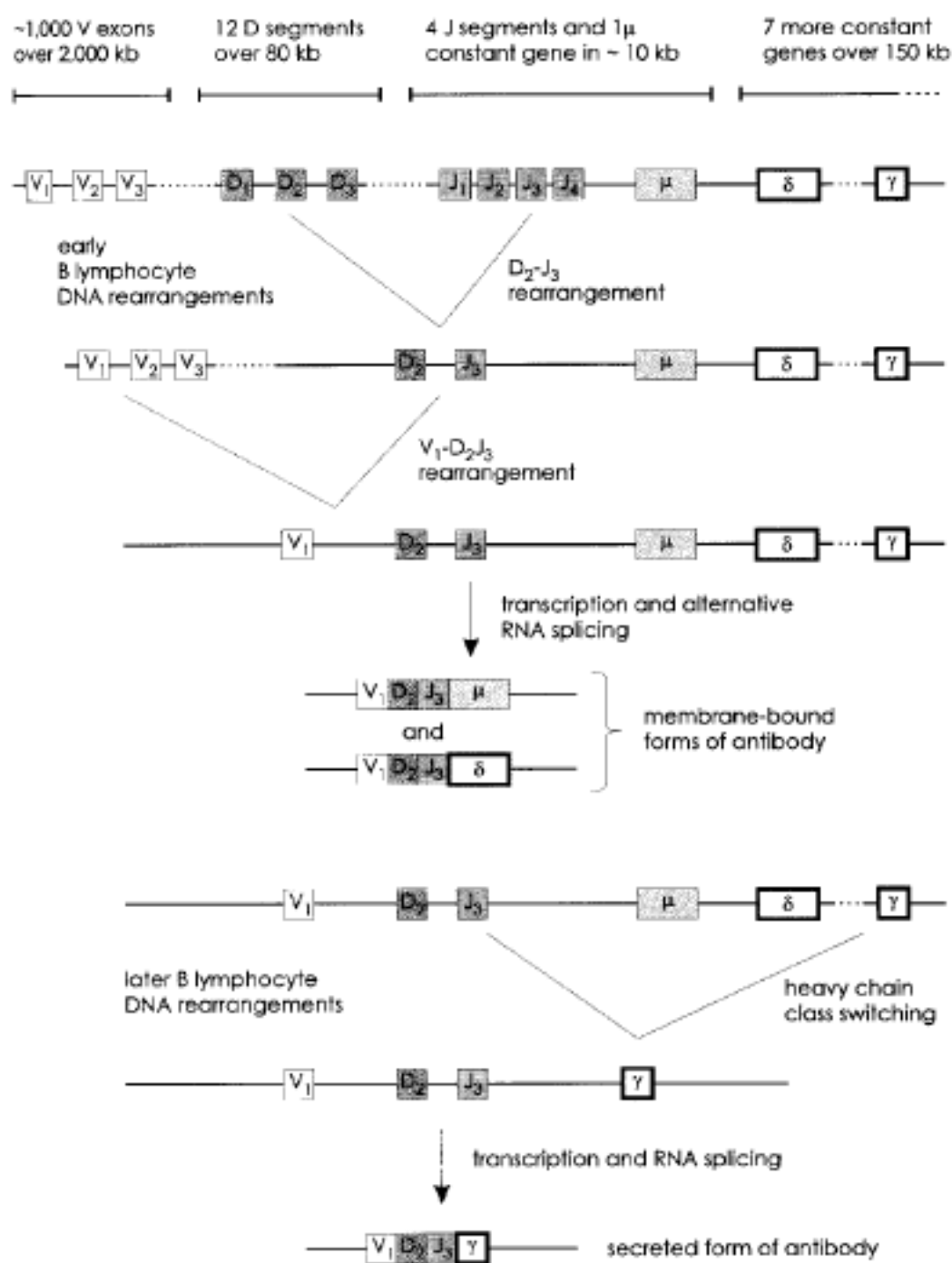


图 23.8 生殖细胞和体细胞中重链基因重排示意图

(二) V-D-J 的重组产生抗体的多样性

小鼠的重链基因座有约 1000 个 V 区, 12 个 D 区, 4 个 J 区和几个恒定区。在两步骤的重组途径中, D 和 J 区先重排, 然后再有 V 区与 D-J 片段的重组, 形成重链的 V-D-J 重组产物。这就会产生 $10^3 \times 12 \times 4 = 48\,000$ 个不同的可能的重链可变区。已发现有两个基因 rag-1 和 rag-2 是 V(D)J 重组所必需的, 因为 rag-1 和 rag-2 发生了突变的淋巴细胞中不能发生重组。近年来已发现 Rag-1 和 Rag-2 蛋白质在位点专一的 V(D)J 重组酶中共同起作用, 这是利用体外重组检测法得知的。

V-D-J 重组的机制包括两个重复的单位, 它们有 7 或 9 个核苷酸, 由 11 ~12 或 21 ~23 个核苷酸隔开, 在重组反应中这 11 ~12 或 21 ~23 个核苷酸起着“向导”的作用。这些重复序列之间的同源碱基配对有利于顺序排列和随后的重组事件的发生。V-D-J 重组的产物是重排的线状的基因和一个环状的 DNA 片段, 该片段中为被删除的原插在其中的序列。重要的是, V(D)J 的重组并不是十分精确的, 这就使得编码蛋白质的序列中的可变区的多样性更大。

恒定区中的 μ 片段是所有新的重组的免疫球蛋白基因的组分,但在细胞生命的后期,还要发生另一种称为重链转换的事件,这时 μ 链被删除而 δ -链则连接在同样的 V-D-J 片段上。有 μ -和(δ -)链的抗体是结合在膜上的,而有 δ -链的抗体(以及其他重链抗体)都是由细胞分泌的。

23.8 由同源重组实现基因寻靶

在标准的遗传分析中,是筛选大量的突变的细胞或整个生物体以寻找所希望的表现型,从而获得那种决定着所选定的表现型的基因突变。遗传操作最终可以产生所研究的基因中只有一个突变的后代。这种策略对于细菌、低等真核生物(酵母和线虫)以及无脊椎动物(果蝇)都很好用,因为这些生物的寿命短,也有大量的遗传连锁图。然而,要研究哺乳动物的遗传性状,如小鼠的,标准的遗传学方法就费时费力而且困难。由于重组 DNA 技术以及可资利用的克隆的基因序列的出现,研究工作者开始设计直接的方法来操作小鼠的基因组以发展研究人的遗传病的动物模型。这种策略是反求遗传学的一种形式,其基础是能够利用小鼠的胚胎干细胞系(ES 细胞)在体外进行 DNA 操作而引起所选定的基因中发生专一的突变。把这些已发生改变的胚细胞再引回到正常的小鼠胚中,就有可能产生其中有某种种系突变的转基因动物(见本章附录 23.1)。

小鼠的反求遗传学的分子基础是能够利用同源重组以得到所希望的基因突变。早期的开拓性工作称为定向基因转移,是由 Oliver Smithies 和 Mario Capecchi 所领导的两个研究小组进行的。随着酵母中同源重组的成功,这两个小组,还有其他人,最终发现了鉴定宿主基因与外加 DNA 之间已发生同源重组的 ES 细胞的方法。小鼠细胞中的定向基因转移决定于选择一种能够鉴定稀有细胞的方案,这种细胞中已发生了所希望的同源重组。利用 20 世纪 80 年代初期所用的方法,得到正确的重组的细胞的机会只有千分之一,而且需要繁冗的筛选技术。不过,在进行了这项实验的 10 年之后,已研究出了新的选择方案,能使同源重组的频率达到经过筛选后存活下来的细胞的 10%。

图 23.9 说明的是一种常用选择细胞的办法,所选的细胞由于同源重组已有一个靶基因被破坏。为了用标志基因序列取代靶基因序列需要双重重组事件,大概细胞中的重组酶类利用图 23.6 和 23.7 所示的键交换机制介导了这种双重重组。选择那些已稳定地整合了新霉素抗性基因(neo^r)而又对 DNA 合成的抑制剂 9-[1,3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤(ganciclovir)(疱疹病毒的胸苷激酶,而不是哺乳动物的胸苷激酶,能够磷酸化这种核苷酸类似物)有抗性的细胞,就可能使具有所希望的基因被破坏的细胞显著增多(图 23.9)。这称为基因剔除法,已有好几个用这种反求遗传学的方法建立人类疾病的模型的例子(见附录 23.1)。

附录 23.1 利用同源重组作为基因寻靶的方法

发展定向基因转移技术的初衷是建立动物模型,以便能够详细研究人的特异的疾病。如图 23.9 所示,可用同源重组法插入新霉素抗性基因以破坏原有基因。在利用这种技术时,发育生物学家使之最优化了,他们把具有定向突变的细胞再引入到小鼠中,于是被破坏的基因就会稳定地遗传下去。这种技术利用的是小鼠的胚胎干(ES)细胞,这是由怀孕母鼠的胚泡得来的。一旦分离出了突变的 ES 细胞的无性系,就将这些细胞注入第二个小鼠胚胎中,于是这一团细胞就植入在假孕的母鼠体内进行发育。小鼠出生后,它们既有定向基因转移的 ES 细胞,

又有来自宿主胚的细胞。这些嵌合的小鼠极易辨认, 因为 ES 细胞来自毛色不同的小鼠, 而母鼠则是提供宿主胚胎的。

如图 23.10 所示, 假若在子宫内发育的过程中, 任何 ES 细胞掺入到了生殖细胞系之中, 那么用这第一代小鼠进行杂交时, 就有可能获得其生殖细胞中带有突变的小鼠。这些杂合的小鼠的近交能产生纯合的后代。

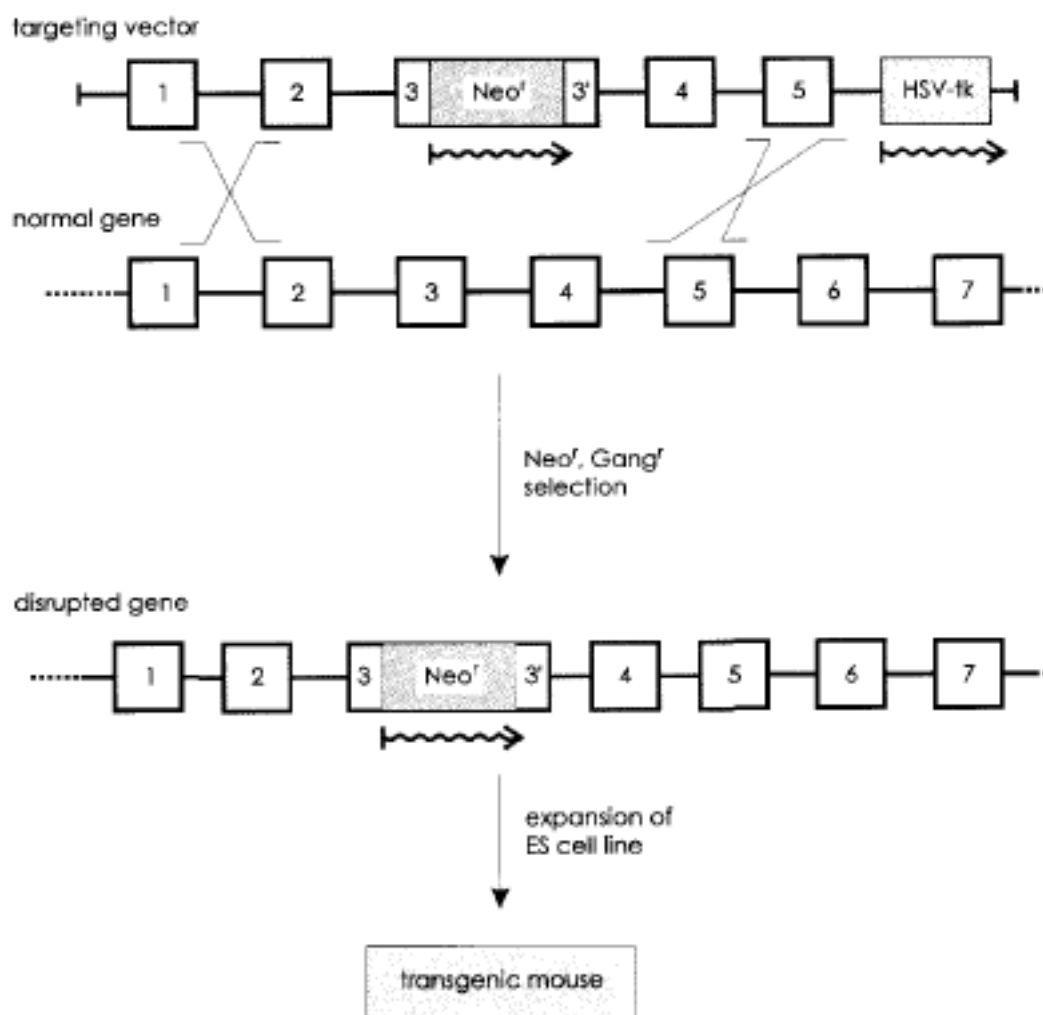


图 23.9 鉴定同源重组的一种办法——以选择对新霉素(neo^r)和 ganciclovir 都有抗性的细胞为基础

选择 neo^r 是为了鉴定已稳定地整合了导向载体的细胞。双交换同源重组的结果应该是载体中的疱疹病毒的胸苷激酶(tk)基因丢失了, 而随机的整合很可能包括 neo^r 和 tk 两种基因。

已建立了许多小鼠的品系, 由于 ES 细胞中的同源重组, 它们带有突变的基因或有的基因已被剔除。一个最激动人心的例子是建立了一个小鼠品系, 其中造成囊性纤维化的基因已被破坏, 这个基因就是囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)的基因。这些小鼠有几种囊性纤维化病人所有的问题, 最严重的就是几乎所有纯合的 CFTR 剔除的小鼠都在出生后 40 天内死亡, 死因是肠梗阻、肠穿孔和致死性腹膜炎。不过, 患此病的人所特有的呼吸减弱的问题在这些小鼠中没有表现。无论如何, 已进行了许多细胞生物学的研究, 现已开始研究能够治疗离子转运功能的变化药物, 通常失去 CFTR 功能就会引起离子转运的问题。另一个用定向基因破坏建立的人疾病的动物模型是 Gaucher 氏病, 这是由小鼠的葡糖脑苷酯酶基因的破坏引起的。令人奇怪的是, 过去几年中所建立起来的基因剔除的小鼠品系都没有可识别的表现型。曾有这样的解释, 说这意味着很可能还有更多重复的生化的、细胞的和生理的途径, 比以前认为的还要多。

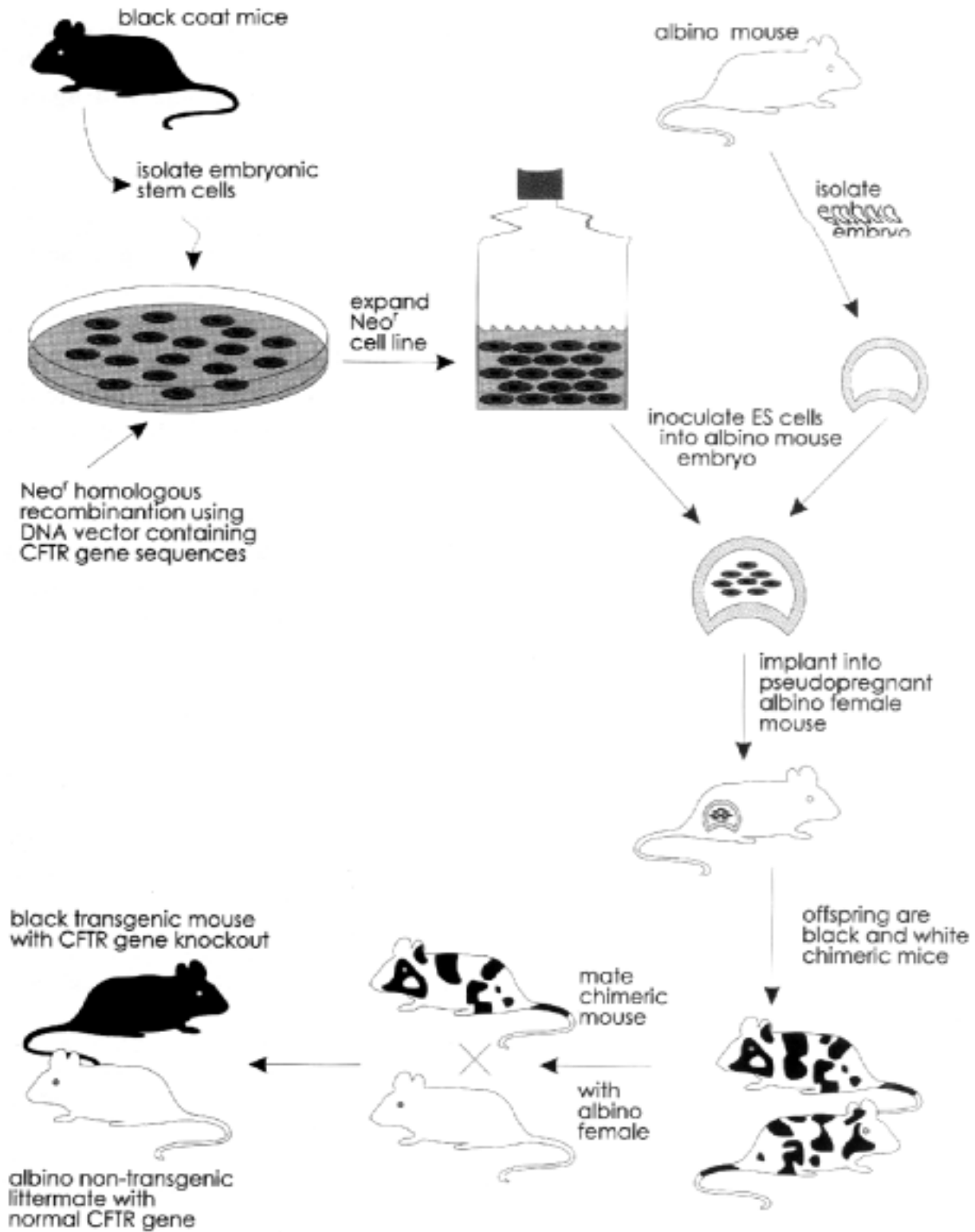


图 23.10 建立含有定向突变基因的转基因小鼠品系的方法

图 23.9 为选择 ES 细胞中同源重组事件的办法。产生转基因小鼠品系的关键步骤是鉴定小鼠的配子中有所要求的遗传变化。

23.9 小 结

(1) 多数的 DNA 修复中有 4 个基本步骤: 识别、去除、再合成和再连接。前两个步骤需要特殊的 DNA 修复蛋白, 后两个步骤则分别由 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶进行。

(2) 核苷酸切除修复包括除去 DNA 中的“整块”病灶, 如胸嘧啶二聚体。人的遗传病着色性干皮病是缺少核苷酸切除修复蛋白质所致。

(3) 错配修复是除去新合成的 DNA 中配对错误的核苷酸时所需要的。关键的是修复蛋白能够区别模板 DNA 链和新生的 DNA 链以免把正确的核苷酸也“改正”了。大肠杆菌中, 新生的 DNA 链中的 GATC 片段中的腺嘌呤瞬间不被甲基化。人体内, 细菌的错配修复酶的同系

物(hMSH2 和 hMLH1)可能与遗传性结肠癌有关。

(4) 碱基切除修复需要识别并除去 DNA 中不适当的碱基,如尿嘧啶、次黄嘌呤和黄嘌呤。DNA 糖基化酶会切断 N-糖基键而除去不适当的碱基。直接修复与其他修复机制都不同,突变的碱基是直接被修复的,不需要除去核苷酸。例如, O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 转甲基酶就进行直接修复。

(5) 大肠杆菌中的同源重组是分两步的过程,需要 RecA 蛋白。第一步是单链 DNA 侵入靶 DNA 分子并与其同源序列进行碱基配对。第二步,第一步所形成的异源双链异构化,形成 Holliday 连接体,随后的 DNA 切割和连接反应再将连接体分开。

(6) 免疫球蛋白基因的重组是高等真核生物中位点专一重组的例子。这一过程包括近于精确的 V-D-J 片段的重组,然后又与重链基因的恒定区的片段重组。淋巴细胞中的 Rag-1 和 Rag-2 蛋白起着位点专一重组酶的作用,介导免疫球蛋白基因的重排。

(7) 小鼠胚胎干细胞中的基因定向转移是同源重组原理的应用。这种研究方法利用“反求遗传学”,已用于小鼠以建立人的几种遗传病的动物模型。

参 考 资 料

- Aboussekhra A., Biggerstaff M., Shivji M. K. K., et al. (1995): Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, 80:859.
- Alani E., Chi N.-W., Kolodner R. (1995): The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 protein specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs and insertions. *Genes Dev.*, 9:234.
- Ariyoshi M., Vassylyev D. G., Iwasaki H., Nakamura H., Shinagawa H., Morikawa K. (1994): Atomic structure of the RuvC resolvase: A Holliday junction-specific endonuclease from *E. coli*. *Cell*, 78:1063.
- Bartl S., Baltimore D., Weissman I. L. (1994): Molecular evolution of the vertebrate immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:10769.
- Blunt T., Finnie N. J., Taccioli G. E., et al. (1995): Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine acid mutation. *Cell*, 80:813.
- Cpecchi M. R. (1994): Targeted gene replacement. *Sci. Am.*, 270:52.
- Cleaver J. E., Layher S. K. (1995): "If the shoe fits:" Clues on structural recognition of DNA damage. *Cell*, 80:825.
- Demple B., Harrison L. (1994): Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:915.
- Dorin J. R., Dickinson P., Alton E. W. F. W., et al. (1992): Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature*, 359:211.
- Dubrova, Y. E., Nesterov, V. N., Krouchinsky, N. G., et al. (1996): Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature*, 380:683.
- Kolodner, R. (1996): Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev.*, 10:1433.
- Lindahl T. (1994): DNA repair: DNA surveillance defect in cancer cells. *Current Biol.*, 4:249.
- Loeb L. A. (1994): Microsatellite instability: Marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 54:5059.
- Modrich P. (1994): Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, 266:1959.
- Mol C. D., Arvai A. S., Slupphaug G., et al. (1995): Crystal structure and mutational analysis of human u-

- racil-DNA glycosylase: Structural basis for specificity and catalysis. *Cell*, 80:869.
- Reardon J. T., Thompson L. H., Sancar A. (1993): Excision repair in man and the molecular basis of xeroderma pigmentosum syndrome. *Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol.*, 58:605.
- Sancar A. (1994): Mechanisms of DNA excision repair. *Science*, 266:1954.
- Shinagawa H., Iwasaki H. (1996): Processing the Holliday junction in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.*, 21:107.
- Svejstrup J. Q., Wang Z., Feaver W. J., et al. (1995): Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: Holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell*, 80:21.
- Tybulewicz V. L. J., Tremblay M. L., LaMarca M. E., et al. (1992): Animal model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature*, 357:407.
- Van Gent, D. C., Ramsden, D. A. and Gellert, M. (1996): The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell*, 85:107.
- van Vuuren A. J., Vermeulen W., Ma L., et al (1994): Correction of xeroderma pigmentosum repair defect by basal transcription factor BTF2 (TFIIH). *EMBO J*, 13:1645.
- Wu H., Liu X., Jaenisch R. (1994): Double replacement: Strategy for efficient introduction of subtle mutations into the murine Colla-1 gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:2819.

复 习 题

- 从进化观点来看, DNA 突变与 DNA 修复之间的平衡是重要的, 因为:
 - DNA 的伤害太多, 一定会导致物种的灭绝
 - DNA 修复需要 ATP 的能量, 以改正 DNA 的破坏处
 - DNA 破坏与 DNA 修复是细胞中彼此无关的过程
 - 胞嘧啶脱氨非常少见, 但常会引起突变
 - 生殖细胞中的 DNA 突变若不被修复, 就有可能进行自然选择
- 在大多数形式的 DNA 修复中的 4 个相继发生的步骤是:
 - 识别、去除、重合成和重连接
 - 重连接、重合成、去除和识别
 - 去除、重合成、重连接和识别
 - 重建结构、去除、重合成和重连接
 - 恢复、重建结构、重利用和修复
- 错配修复和核苷酸切除修复两种机制之间的重要差别是:
 - 错配修复中, 任一条链都可代表突变, 而核苷酸切除修复中, 破坏造成一种独特的结构
 - 错配修复只要取代错误的碱基, 而核苷酸切除修复则要取代整个核苷酸
 - 核苷酸切除修复仅存在于细菌中
 - 核苷酸切除修复在 DNA 复制中重要, 而错配修复则为修复环境造成的 DNA 破坏所必需
 - 这两种 DNA 修复途径实际上是完全相同的, 二者都利用 MutS、MutH 和 MutL 这些蛋白质
- 尿嘧啶糖基化酶
 - 除去胸嘧啶二聚体
 - 除去 RNA 中的尿嘧啶
 - 除去 DNA 中的尿嘧啶
 - 除去 DNA 中的胸嘧啶

- e) 除去 DNA 中的尿核苷
5. 同源重组是产生遗传多样性的重要过程。关于同源重组的机制,下列哪一项是不对的?
- a) 分支移动决定着交叉的范围
 - b) 同源重组不需要 DNA 链断开
 - c) 链的入侵需要序列的同源性
 - d) Holliday 连接体的分解需要两次 180° 的旋转
 - e) 重连接是同源重组的最后一步
6. 免疫球蛋白基因重排的结果是:
- a) 大范围的基因复制
 - b) 插入突变
 - c) 最多产生 48 000 个不同的抗体基因
 - d) 创造独特的可变区和恒定区的基因融合
 - e) 删除突变的免疫球蛋白基因
7. 定向基因转移原理是创造具有预定的基因突变的小鼠品系的方法,它取决于:
- a) 精心的杂交
 - b) 位点专一重组
 - c) 区别出黑毛的能力
 - d) DNA 的破坏率高于 DNA 修复率
 - e) 稀少的同源重组事件的选择

参 考 答 案

- 1. e 自然选择消除或确立生殖细胞中的突变。
- 2. a 错误的序列要被识别、除去,正确的序列再被重合成和重连接。
- 3. a 错配修复的功能是监控新合成的 DNA,而核苷酸切除修复是除去被破坏的核苷酸和胸腺嘧啶二聚体。
- 4. c 尿嘧啶糖基化酶仅除去 DNA 中的碱基(尿嘧啶),而不是整个核苷酸(尿苷酸)。
- 5. b 3 个步骤中都需要 DNA 链断开才能完成同源重组。
- 6. d 因为在 V-D-J 的重组过程中,发生更多的错配,所以可能的 V-C 组合多得多,超过了 50 000。
- 7. e 选择双药物的抗性,并利用 PCR 进行快速的 DNA 筛选,这些办法大大提高了定向基因转移的成功率。

第 24 章 RNA 合成

24.1 引言

脱氧核糖核酸实质上编码细胞中的每一个过程,然而这些核苷酸本身对细胞的活力没有直接影响。铭刻在 DNA 序列中的遗传蓝图必须被“解读”后才有用。这一过程的第一步称为 DNA 转录或 RNA 合成。从酶的方面看, RNA 和 DNA 的合成非常相似(第 22 章)。DNA 模板链上核酸合成的起始需要一种大的蛋白质复合体,链扩展的方向是 5 到 3。不过, DNA 与 RNA 合成之间有几个重要的区别: (i) RNA 是由核糖核苷酸,而不是由脱氧核糖核苷酸合成的; (ii) 尿嘧啶代替胸嘧啶与腺嘌呤配对,这对于 DNA 的修复可能在进化上有优越性(第 23 章); (iii) RNA 合成不需要先已存在的引物,事实上,通过 DNA 引发酶的作用, RNA 合成是引发 DNA 合成的事件; (iv) RNA 合成是选择性很高的,任何时刻,只有基因组中的一个小区域被转录。

细胞中有 4 类 RNA; 信使 RNA(mRNA)、核糖体 RNA(rRNA)、转移 RNA(tRNA) 和小核 RNA(snRNA)。这些 RNA 分子的相对丰度和复杂程度(各种类型的数目)十分不同。细胞中的 RNA 约 80% 是 rRNA, 即核糖体的 RNA 组分。只有 4 种类型的真核 rRNA(28S, 18S, 5.8S 和 5S), 因此这类 RNA 序列上的复杂性实际上很低。与此相反, mRNA 仅为细胞中全部 RNA 的 5%, 然而却极为多样化, 据估计有 $10^4 \sim 10^5$ 个不同种的 mRNA, 这相当于同样数目的编码蛋白质的基因。tRNA 和 snRNA(真核生物中) 为细胞中其余部分的 RNA(15%), 有约 50 种不同类型的 tRNA 和约 10 种不同的 snRNA。因此每个细胞中各类 RNA 分子的总数决定于每类 RNA 的总质量、该类 RNA 分子的平均长度和序列复杂性之间的关系。

24.2 基因转录需要依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶

就大部分 RNA 而言, 其合成局限于称为基因的信息单位中的 DNA 序列。基因通常可用两种方法之一界定。它可能是负责一种遗传表现型的 DNA 序列的具体位置(用遗传变异鉴定基因), 或者如“反求遗传学”所定义的, 基因是转录单位。例如, 人基因组计划就以对基因的转录的区域进行作图的办法作为鉴定基因的第一步。如第 21 章所述, 基因的分子生物学定义是规定并调节转录单位的一段 DNA。所有基因都有转录单位, 但并非基因中的所有序列都被转录。图 24.1 是典型的真核基因的示意图。转录从基因 5 端的称为启动子的区域开始, 在基因的 3 端终止。基因的其他功能性组分是调节序列, 常存在于起始位点的 5 端, 它控制基因转录的频率(第 28 章和 29 章)。

(一) 大肠杆菌的聚合酶全酶是多亚基的蛋白质

RNA 聚合酶是大的多亚基的蛋白质复合体, 其中有 RNA 合成所必需的催化活性。RNA 聚合酶的核心亚基通过“转录”DNA 模板的两条链中的一条以催化 RNA 的聚合。基因转录要求 RNA 聚合酶对着基因的 5 端的启动子中的专一位点, 如图 24.1 所示。这种专一性需要

RNA 聚合酶中另外的亚基。大肠杆菌的 RNA 聚合酶核心酶由 5 种蛋白质亚基组成, 分别称为 α , β , β' (2 个亚基) 和 ω 。据认为, ω -亚基是催化组分而核心复合物的 M_r 350 000。大肠杆菌 RNA 聚合酶全酶还含有第 6 个多肽, 称为 σ 亚基 (M_r 70 000), 它在瞬间协助核心 RNA 聚合酶发挥识别启动子的功能。一旦延伸开始, σ -亚基就解离。

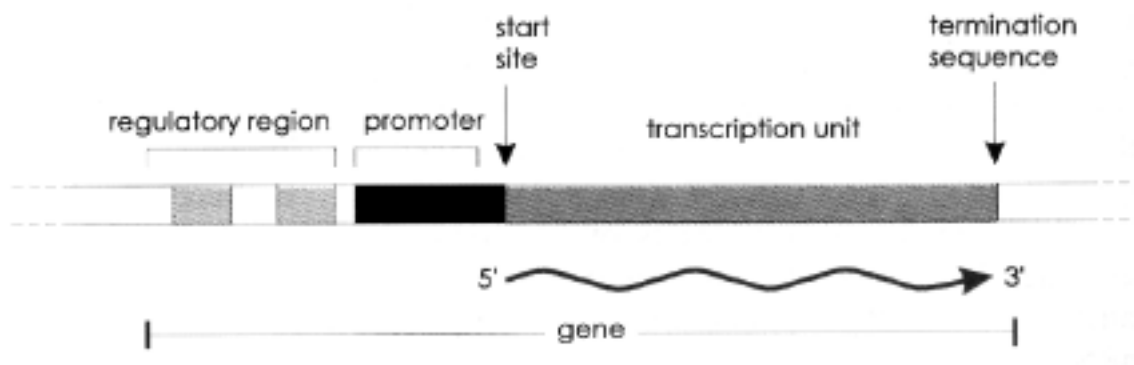
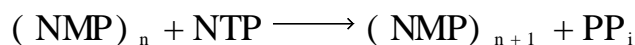


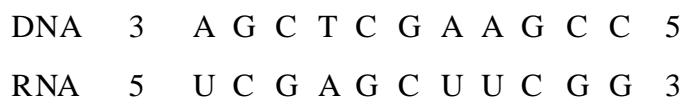
图 24.1 典型的真核基因示意图

波形线为新生的 RNA 链, 基因的调节区和启动子中的长方形表示蛋白质的结合位点, 这些蛋白质是 RNA 的合成所需要的。

除去 RNA 聚合酶全酶和其中有启动子的双链 DNA 模板外, RNA 的合成还需要所有 4 种核糖核苷三磷酸 (ATP, GTP, CTP 和 UTP) 以及作为辅因子的 Mg^{2+} 。RNA 聚合酶是金属酶, 含 Zn^{2+} 。第一个核苷酸常常是 ATP 或 GTP, 除非转录物发生了转录后的修饰, 否则三磷酸基团就一直在上面, 真核生物中就是如此 (第 25 章)。RNA 聚合反应在化学上与 DNA 合成相同, 即新生的 RNA 链是以 5' 到 3' 的方向合成的。在这一反应中, 已有的 RNA 链的 3' 羟基对新参加的核苷酸的 α -磷酸基团进行亲核攻击, 于是该核苷酸释放 PP_i 。



RNA 产物中的每一个碱基都与模板 DNA 链中相对的碱基互补, 如下所示:



与大肠杆菌的 DNA 聚合酶不同, 大肠杆菌的 RNA 聚合酶没有 3' 到 5' 的外切核酸酶的校正活性, 因此错误率较高 ($10^{-4} \sim 10^{-5}$)。因为 RNA 只代表 DNA 的瞬时拷贝, 而且也不通过生殖细胞遗传, 所以这种错误的频率是可以耐受的。正如第 30 章所述, 病毒的 RNA 聚合酶和另一种酶, 逆转录酶, 也没有校正活性, 其错误频率也在细菌 RNA 聚合酶的范围之内。这种突变频率很可能对某些病毒是有利的, 因为其结果是病毒蛋白的序列经常发生变化, 因而使得病毒能够逃避宿主中免疫系统的防护 (第 30 章)。

(二) 真核生物有三种不同的 RNA 聚合酶全酶

真核生物的 RNA 聚合酶不如细菌的酶研究得那么清楚。到目前为止, 生物化学的研究已鉴定出了由酵母细胞和人的细胞制备的真核细胞提取物中有三种明确不同的核中的 RNA 聚合酶活性。这些 RNA 聚合酶称为 RNA pol I、RNA pol II 和 RNA pol III, 每一种都有许多个亚基, 其中有些亚基好像是不同的 RNA 聚合酶亚类所共有的。如表 24.1 所示, RNA pol I 转录核糖体 RNA 基因, RNA pol II 将大部分编码蛋白质的基因转录为 mRNA, RNA pol III 则转录 tRNA、小核 RNA (snRNA) 和核糖体 5S RNA 的基因。还要注意线粒体基因组是由核编码的

线粒体 RNA 聚合酶转录的。酵母的线粒体 RNA 聚合酶全酶由 140 kd 的催化亚基和一个类似于细菌 σ 因子的 43 kd 的识别启动子的蛋白质组成。

真菌毒素 α -鹅膏蕈碱由一种有毒蘑菇产生, 是 RNA pol I 和 pol II 的抑制剂(表 24.1)。本章后面将要讨论到, 这 3 种 RNA 聚合酶的基因专一性是由于它们能识别不同的启动子元件(DNA 序列), 后者代表着每一类基因(rRNA、编码蛋白质的和 tRNA/snRNA 基因)。

表 24.1 真核生物细胞核中 RNA pol I, II, III 三种酶的功能特点及其所转录的基因类别为根据^a

RNA 聚合酶	所转录的基因	相对活性/(%)	对 α -鹅膏蕈碱的敏感性
	28S, 18S, 5.8S rRNA	60	不敏感
	mRNA 和 snRNA	30	非常敏感
	tRNA 和 5S rRNA	10	中度敏感

^a 注意, 细胞里这些酶中的每一种对全部 RNA 聚合酶活性的贡献以及它们对鹅膏蕈碱的敏感性不同。

24.3 RNA 合成的三个阶段: 起始、延伸和终止

因为 RNA 的合成只用 DNA 的两条链中的一条链作为模板, 所以重要的是要确定哪条链被“解读”。按惯例, 与 RNA 产物序列互补的链是模板链(除胸嘧啶代替尿嘧啶外), 而非模板链的序列则与 RNA 的相同。非模板链也称为编码链, 因为可以用这条链破译所编码的蛋白质的氨基酸序列(见第 26 章)。

(一) 大肠杆菌中转录的起始

已详细研究过大肠杆菌的 RNA 聚合酶全酶与细菌启动子的结合以及随后的 RNA 合成的起始, 图 24.2 所示为这些事件的概要。

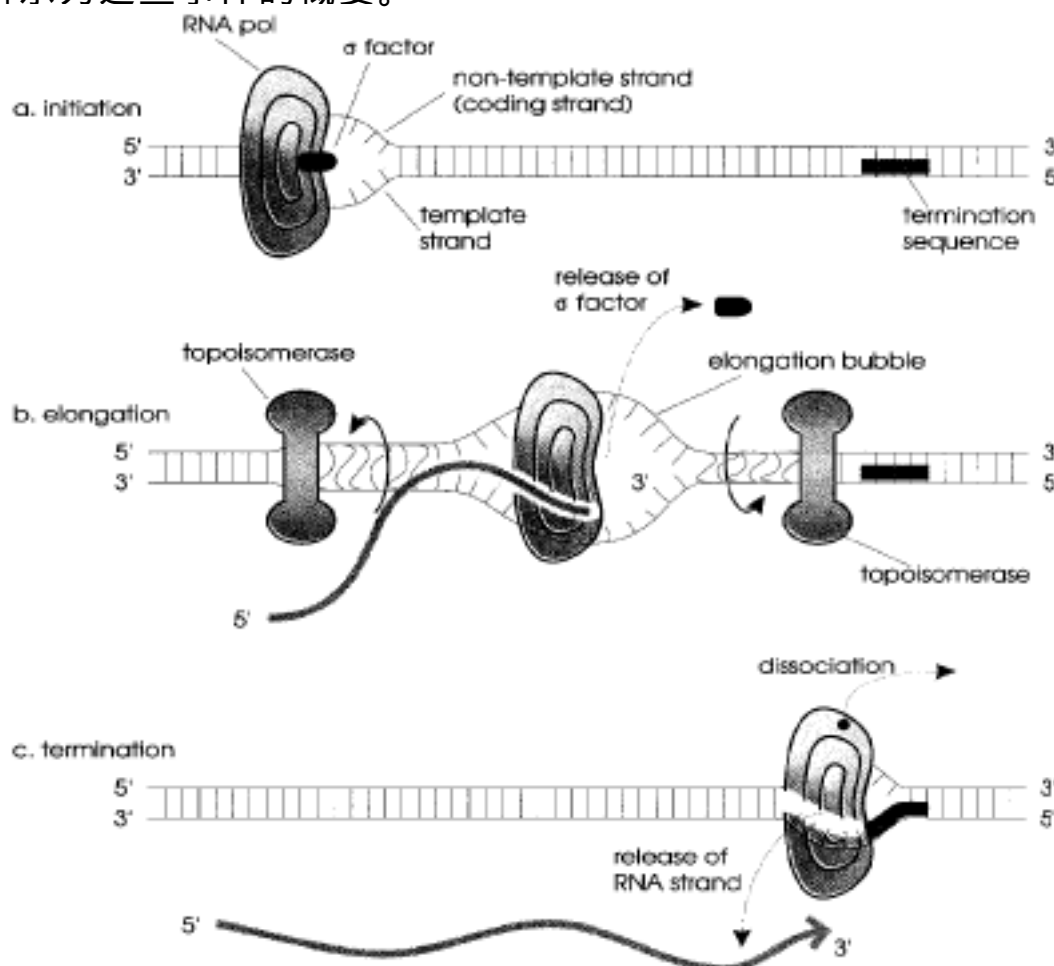


图 24.2 RNA 合成的三个阶段——转录的起始、延伸和终止

对几种不同的细菌启动子进行详细分析,然后收集大量启动子序列的信息,发现细菌的启动子的功能需要两种高度保守的 DNA 序列。其中的一种称为 -35 区,因为它集中在 RNA 合成的起始位点“上游”(5')约 35 个核苷酸处,这一位点上第一个核糖核苷酸与模板链中的相应碱基配对。另一个保守序列称为 -10 区,在起始位点上游约 10 个核苷酸处。RNA 聚合酶沿着 DNA 滑动,直到遇到可接近的 -35 区为止,在此处是形成起始的蛋白质-DNA 复合物,称为关闭的复合物。然后这一复合物(其中包括 σ 因子)沿 3' 的方向移动一点,到达 -10 区,在该处启动 DNA 双螺旋的解链,使模板链上的转录起始位点暴露出来。这第二种蛋白质-DNA 复合物称为开放复合物,其中存在有活性的转录单位。-10 区的富于 A-T 的序列可促进解链,因为 A-T 碱基对形成氢键的能量较低。用纯化的大肠杆菌聚合酶所进行的体外实验曾产生一动力学模型以说明开放复合物和关闭复合物的二步机制:



第一步是游离的 RNA 聚合酶(R)与启动子(P)发生可逆的相互作用,其平衡常数为 K_B ;第二步,与 DNA 结合的 RNA 聚合酶(RP_c)转运到 -10 区,开始发生异构化反应(其速率常数为 k_f),不可逆地形成开放复合物(RP_o)。第 28 和 29 章中将会谈到,目前流行的解释转录调节机制的模型是调节因子或是改变 K_B ,或是改变 k_f ,从而影响 RNA 合成起始的速率。

(二) 转录的延伸阶段

核糖核酸的聚合作用,亦称为延伸,是以 5' 到 3' 的方向进行的。延伸所需的能量,部分为参加反应的核糖核苷酸中的磷酸键的裂解所释放,部分为随后的焦磷酸水解为无机磷酸。已知延伸开始后 σ 因子就立即解离,留下核心 RNA 聚合酶完成基因的转录。许多个 RNA 聚合酶复合物实际上是一个一个顺序地结合在启动子区的,因此基因可以连续不断地被转录。大肠杆菌的 RNA 聚合酶的延伸速率约为每秒 30 个核苷酸,在一分稍多的时间内有约 2 kb 个转录单位被转录。RNA 转录物只在延伸泡(约 15 个核苷酸)的区域内与 DNA 模板发生碱基配对,因此当 DNA 双螺旋在延伸复合物之后再形成时,延伸中的 RNA 链留在后面(图 24.3)。RNA 聚合酶的解链活性会在延伸泡的前面产生扭转应力,但正如 DNA 合成中一样,拓扑异构酶会防止超螺旋的增多。一旦 RNA 聚合酶在转录终止位点上离开了 DNA 模板,已完成的 RNA 转录物就被释放出来。

(三) 转录的终止机制

细菌中转录的终止以两种机制中的一种进行,如图 24.3 所示。依赖于蛋白质的终止是由于终止子蛋白(λ)与 RNA 聚合酶延伸复合物的相互作用,当该复合物在新生的转录物上形成的发夹环上刚刚暂停时,就发生这种相互作用。 λ 蛋白是依赖于 ATP 的 RNA-DNA 解旋酶,其作用方式是破坏 RNA-DNA 杂化物,从而导致延伸复合体的解组装。不依赖于蛋白质的终止的特点是有类似的发夹环结构,但是在这种更为普遍的情况下,就在发夹的下游,模板链中有一串腺苷酸(这就决定了转录物中有一串尿苷酸)。大概是当延伸复合物在发夹结构处暂停而引起 RNA-DNA 杂化物中的 A-U 碱基对变得不稳定而复合物离开时,链终止便发生了。真核生物的转录终止似乎与不依赖于蛋白质的机制类似,并且与加入 3' 多腺苷酸帽的过程相偶联(第 25 章)。

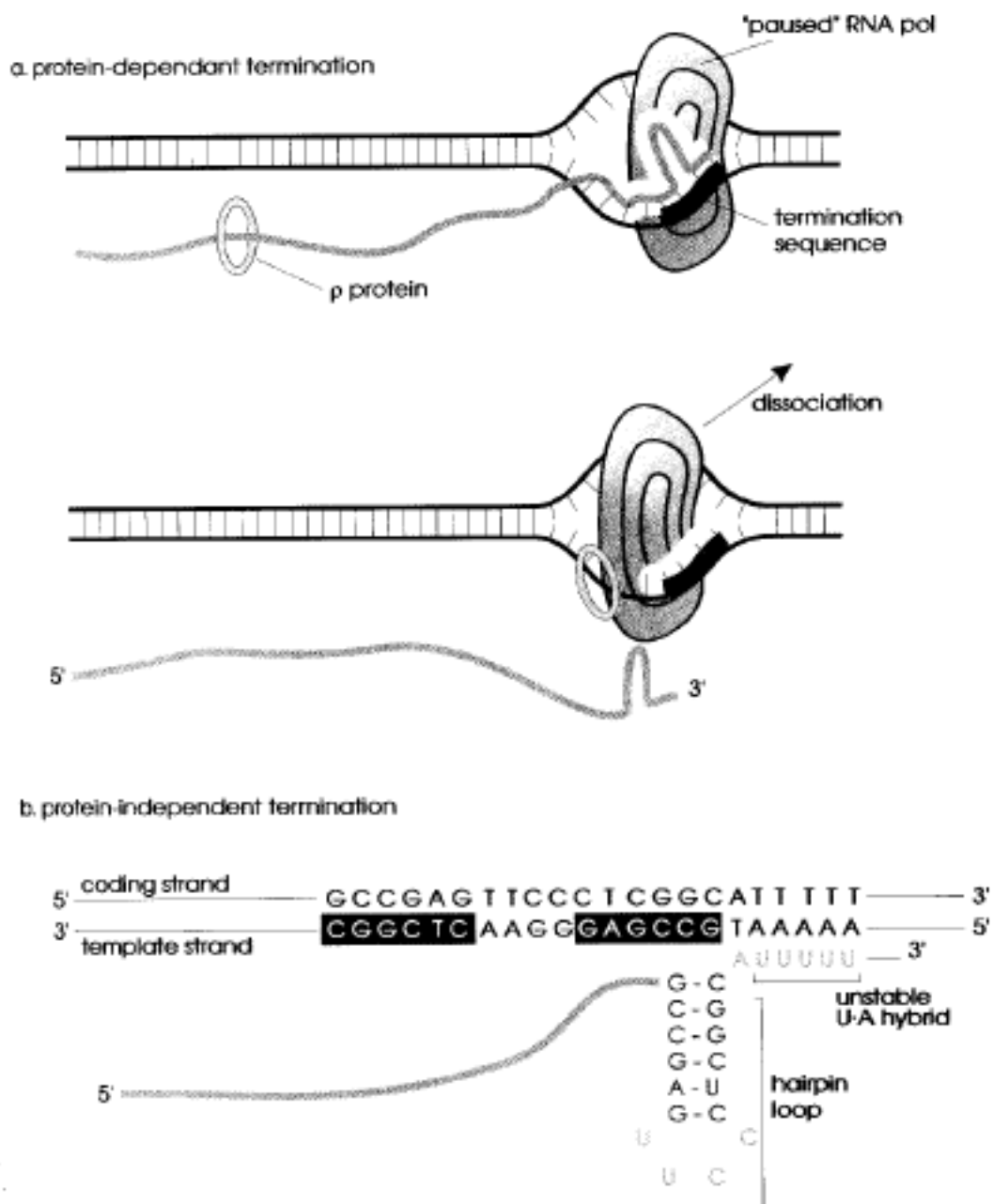


图 24.3 依赖于蛋白质和不依赖于蛋白质的转录终止的机制

24.4 某些抗生素是 RNA 合成的抑制剂

(一) 放线菌素 D

放线菌素 D 是链霉菌属产生的一种抗生素, 其结构异常, 故能插入到双链 DNA 中。吩嗪酮杂环则插入到 DNA 中相邻的 G-C 碱基对中, 可能环状的肽就在 DNA 螺旋中占据了一定的空间。即使在低浓度下, 这种结构也有效地阻断了原核生物和真核生物中转录的延伸阶段。放线菌素 D 是研究转录过程很有用的生化工具, 因为它对 DNA 复制或蛋白质翻译没有什么影响。向细胞中加入低浓度的放线菌素 D 一个短时间, 就可能确定所研究的细胞过程是否需要基因转录。

(二) 利福霉素

利福霉素是从链霉菌属分离得到的另一种抗生素。利福霉素与细菌的 RNA 聚合酶的亚基结合并且专一地抑制第一个磷酸二酯键的形成, 从而阻断 RNA 的合成。它与放线菌素 D 不同, 放线菌素 D 阻断延伸而不阻断起始。一种合成的利福霉素的衍生物称为利福平, 是为临床治疗细菌感染而开发的。

24.5 真核生物的转录起始需要大的多亚基复合体

真核系统中基因转录的基本原理与首先发现的细菌中的相同。不过,真核生物的转录要复杂得多,因为其中遗传信息多得多,必须进行选择加工。本节拟描述各种各样的辅助性蛋白质,它们协助真核生物的 RNA 聚合酶形成转录起始复合体。因为基因调节的机制与转录起始的调变速率有关(第 28,29 章),所以对于组成真核生物的起始复合体的蛋白质组分有一个基本了解是很重要的。为简明起见,本节暂不考虑染色质结构对真核生物的基因启动“构造”的影响,而将此重要概念留到第 29 章中介绍。

(一) RNA pol 起始复合体中的蛋白质组分

关于哺乳动物、果蝇和酵母细胞的研究已证明,在体外进行精确的转录起始需要多达 8 个蛋白质部分:其中有一个具有定义为 RNA pol 的催化活性;另一部分称为 TF D,内有与富含 A-T 的序列(后文将详述这种序列)结合的蛋白质;另外 6 个部分称为 TF A、TF B、TF E、TF F、TF H 和 TF J,是最高速率的转录所必需的。这些部分中有许多含有多个多肽,因此起始复合体中蛋白质亚基的总数多达 50 以上。在体外组装 RNA pol 起始复合体的办法常常是向含有 DNA 模板、rNTPs 和 Mg^{2+} 的反应混合物中顺序加入不同的部分。近年来发现在预先已组装的含有 TF B、TF F、TF H、TF J 和另外的由 SRB 基因所规定的酵母蛋白的复合体中,有约 5% ~ 10% 酵母 RNA pol 活性。在含有与 DNA 结合的 TF D/TF A 复合体以及可溶性 TF E 的混合物中进行的体外转录测试中,上述预先组装的复合体起着 RNA pol 全酶的作用。图 24.4 是真核生物的转录起始复合体的推测的组装途径。

(二) RNA pol 中有磷酸化的羧基末端重复域

核心 RNA pol 的遗传学和生物化学的研究表明,它本身就有 14 个蛋白质亚基。RNA

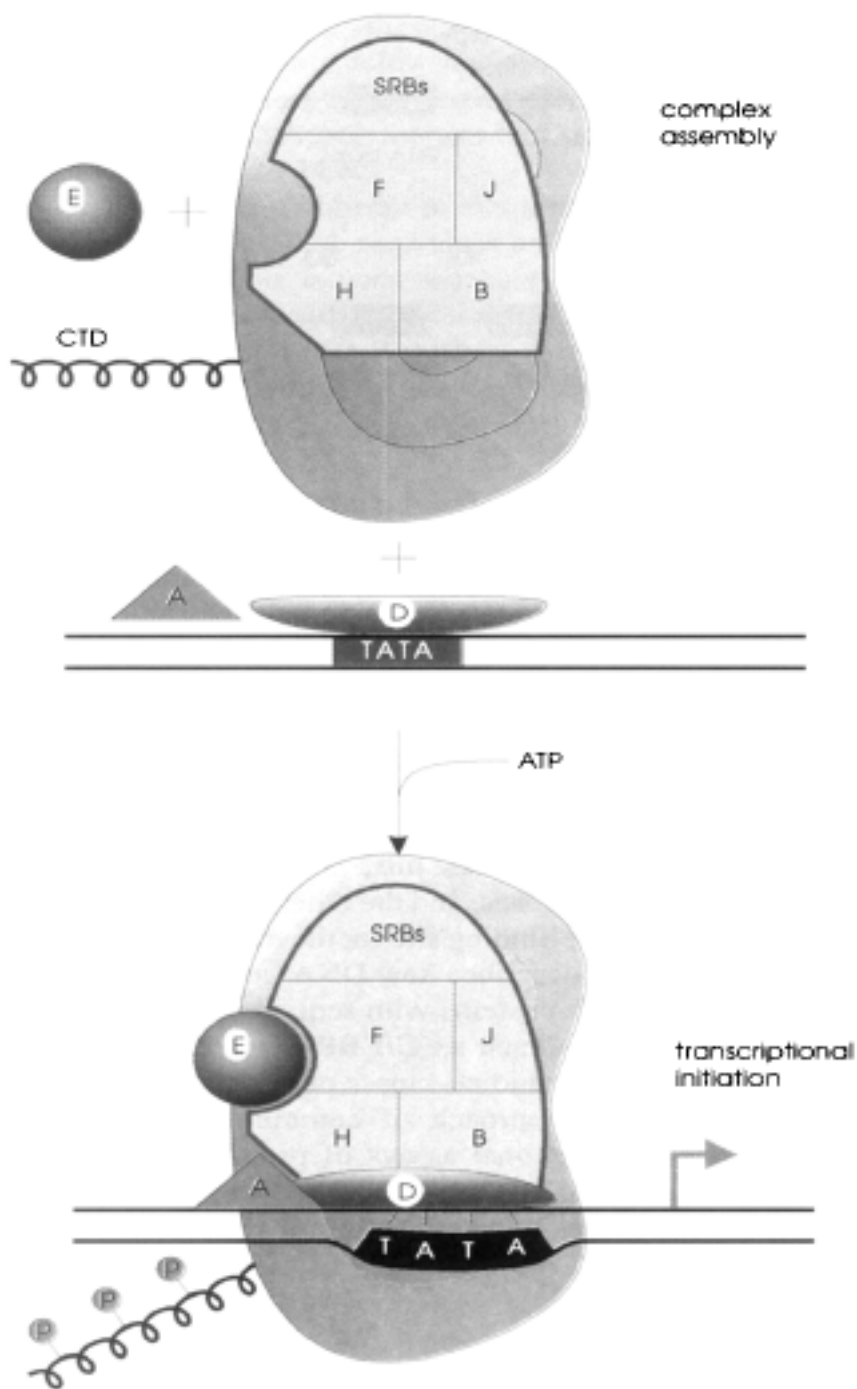


图 24.4 利用已形成的 RNA pol 全酶,把辅助性转录因子组装到酵母的 RNA pol 起始复合体中
推测 TF H 激酶使 RNA pol CTD 磷酸化是转录的关键起始步骤,粗箭头代表启动子的活化和转录的起始。

pol 的最大的亚基的基因已从各种真核生物中克隆得到,它编码一 200 kDa 左右的蛋白质,该蛋白质与细菌 RNA 聚合酶的 和 亚基有同源性。这种蛋白质的一个不寻常的特点是在称为 C-末端重复域(CTD)的羧基末端上有七聚体的重复序列。这一重复的共有序列是 Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser,其长度不同,酵母有 26 个这种七聚体的重复,哺乳动物有 52 个。生物化学上已鉴定出这种蛋白质有两种形式:一种是 RNA pol A,是未磷酸化的;另一种是 RNA pol O,是高度磷酸化的,主要在 CTD 的丝氨酸和苏氨酸残基上磷酸化。已鉴定出几种不同的 CTD 激酶,它们都能在体外使 CTD 的残基磷酸化。在体外和体内 CTD 尾的高度磷酸化都与 RNA pol (O) 的活化的形式相关。用酵母和小鼠进行的遗传学的实验已证明 CTD 是生存力所必需的,这说明 CTD 在 RNA pol 的功能中有着不可缺少的作用,可能是调节性蛋白质对转录进行控制的靶子。

除去 CTD 激酶外, RNA pol 全酶蛋白的 TF H 组分含有依赖于 DNA 的激酶活性,能利用 ATP 或 GTP 将 CTD 重复序列中的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化。而且,另一种需要的起始因子 TF E,能将 TH H CTD 的激酶活性提高 10 倍,表明 TF E 在复合体形成的短暂时刻有作用。TF H 不仅是激酶,它还有依赖于 ATP 的解旋酶活性,TF E 可将其提高 5 倍。如图 24.4 所示,推测 CTD 的磷酸化可能与 RNA pol 转变为有活性的构象有关。

24.6 可将真核生物基因的启动子分为几类

正如生物化学的研究已鉴定出 3 种不同的细胞核 RNA 聚合酶活性一样,分子遗传学的研究收集了许多启动子序列,这些序列相当于已知被 RNA pol 、 或 转录的基因。我们要详细研究的两个启动子是小鼠的 β -珠蛋白基因启动子和单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因启动子。这两种启动子都是由 RNA pol 转录的,而且有一些与细菌启动子共同的特点。图 24.5 综合了 β -珠蛋白基因和胸苷激酶基因的启动子作图研究的结果。这些 DNA 序列基元中的每一个都代表对真核生物转录因子有高亲和力的结合位点。

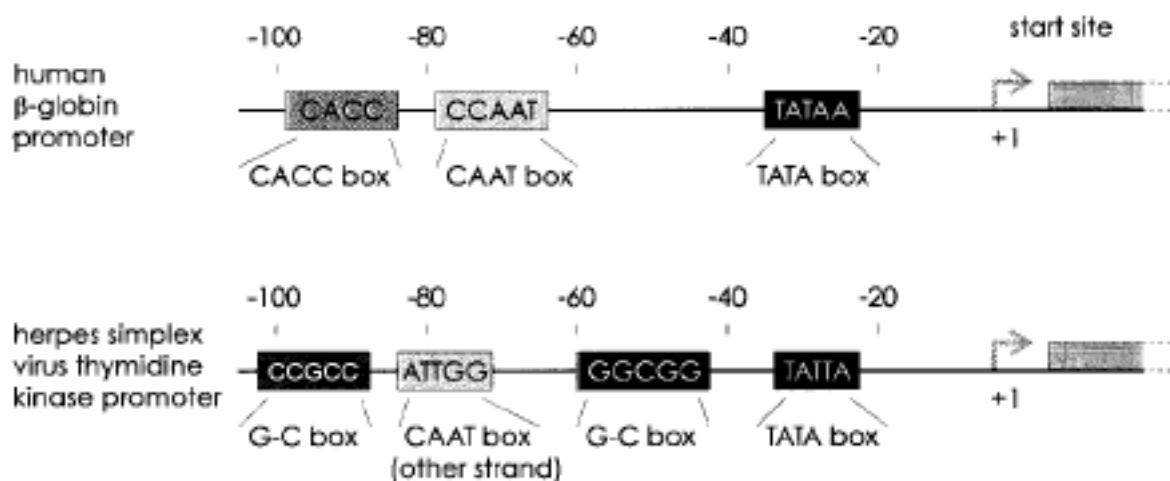


图 24.5 β -珠蛋白和胸苷激酶启动子中的功能元件示意图

DNA 诱变的研究揭示出,以转录起始位点-30 左右为中心的序列是 β -珠蛋白和胸苷激酶基因转录的精确起始所必需的。因为这一区域是富于 A-T 的序列(通常是 TATAA),因此称之为 TATA 框。关于 RNA pol 转录的各种其他基因的早期研究也曾指出 TATA 框是启动子功能的关键因素,其固定的位置大致在起始位点上游的 30 个核苷酸处,与原核生物启动子中的 -35 和 -10 区相仿。本章的附录 24.1 所述为位点定向诱变的一般方法,此法用于鉴定各种各样启动子的转录起始所需的必要 DNA 序列。

如图 24.5 所示,也鉴定出了 β -珠蛋白和胸苷激酶基因中有启动子功能的元件所需要的更多的序列。这种元件之一称为 CAAT 框,常存在于编码 mRNA 的基因中;另外一种常称为 GC 框,是转录因子 SP-1 的结合位点。本章的附录 24.2 叙述了如何利用与 DNA 结合的试法来提纯像 C/EBP 这样的与 DNA 中专一的序列结合的蛋白质,C/EBP 是对胸嘧啶-激酶启动子的 CAAT 框有高亲和力的蛋白质。

将突变发生的研究与体外和体内启动子活性的功能测定相结合的探讨方法已用于由所有 3 种 RNA 聚合酶所转录的许多基因的研究。从这些研究可以清楚地看出,几种重复出现的序列基元使我们能够根据转录启动子的 RNA 聚合酶的种类而将大多数启动子分为三大类,如图 24.6 所示。

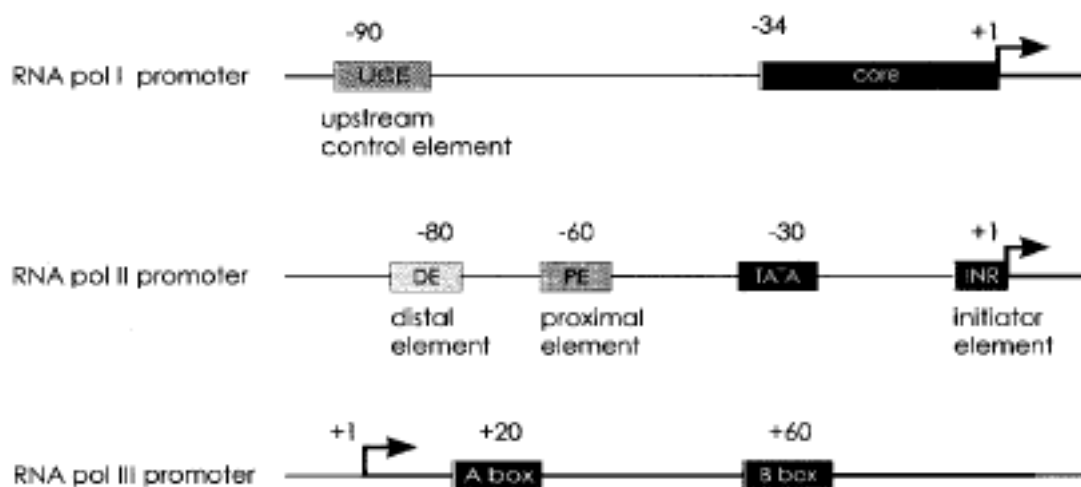


图 24.6 三类真核生物启动子示意图

方框中所示为精确的起始所需要的 DNA 序列元件。注意, tRNA 基因编码序列中有 RNA pol III 的启动子元件(A 框和 B 框)。

有一个重要的概念,就是专一的 DNA 序列和与之结合的蛋白质之间有一种相互关系。这种关系非常像建筑物的地基决定着墙要砌在哪里。事实上,已经造了一个术语“启动子建筑术”来说明这一点。第 29 章中将要讨论到,选择性的真核基因调节就是细胞专一的“启动子建筑术”所产生的结果。

24.7 TATA 结合蛋白(TBP)是通用的真核转录因子

从启动子的 DNA 序列是盖房的基础这样一个比方出发,下一步就应该确定作为建筑材料的蛋白质是什么。最简单的情况就是纯化和鉴定与 DNA 中专一序列结合的、为转录所需要的蛋白质。虽然根据这种方案已经鉴定出了许多种转录因子,我们将集中注意于 TATA 结合蛋白(TBP),这是 3 种 RNA 聚合酶都需要的转录起始复合体中的组分。

转录控制之所以多种多样和变化多端,是由于在启动子区组装了大的、高度专一的蛋白质复合体;这些起始复合体对细胞的起调节作用的信号非常敏感。专一性的关键是组合的决定子,即以不同的组合利用同样的建筑材料而组装成独特的转录复合体。如前所述,人可能有多达 10 万个转录调节的基因,但转录因子大概不会超过几百个。一个单独的、比较小的转录因子如何能够通过许多个不同的蛋白质-蛋白质相互作用而发挥多种功能,TATA 结合蛋白就是到目前为止已知的最好代表。TBP 以高亲和力与存在于许多种 RNA pol III 启动子中的 TATA 框结合(图 24.6),而 TBP 中与 DNA 结合域相结合的氨基酸残基,在进化上从古细菌到人一直是保守的。

X 射线结晶学已测定了结合在 DNA 上的酵母的 TBP 的生物化学结构, 已作出了两项非常重要的观察。

第一项观察是 TBP 内部的两个相邻的结构域之间有一种假二聚体相互作用, 形成了一种“马鞍形”结构, 结合在 DNA 上(图 24.7)。这种构型中 TBP 的暴露的表面就是各种各样其他转录因子与之接触的区域。

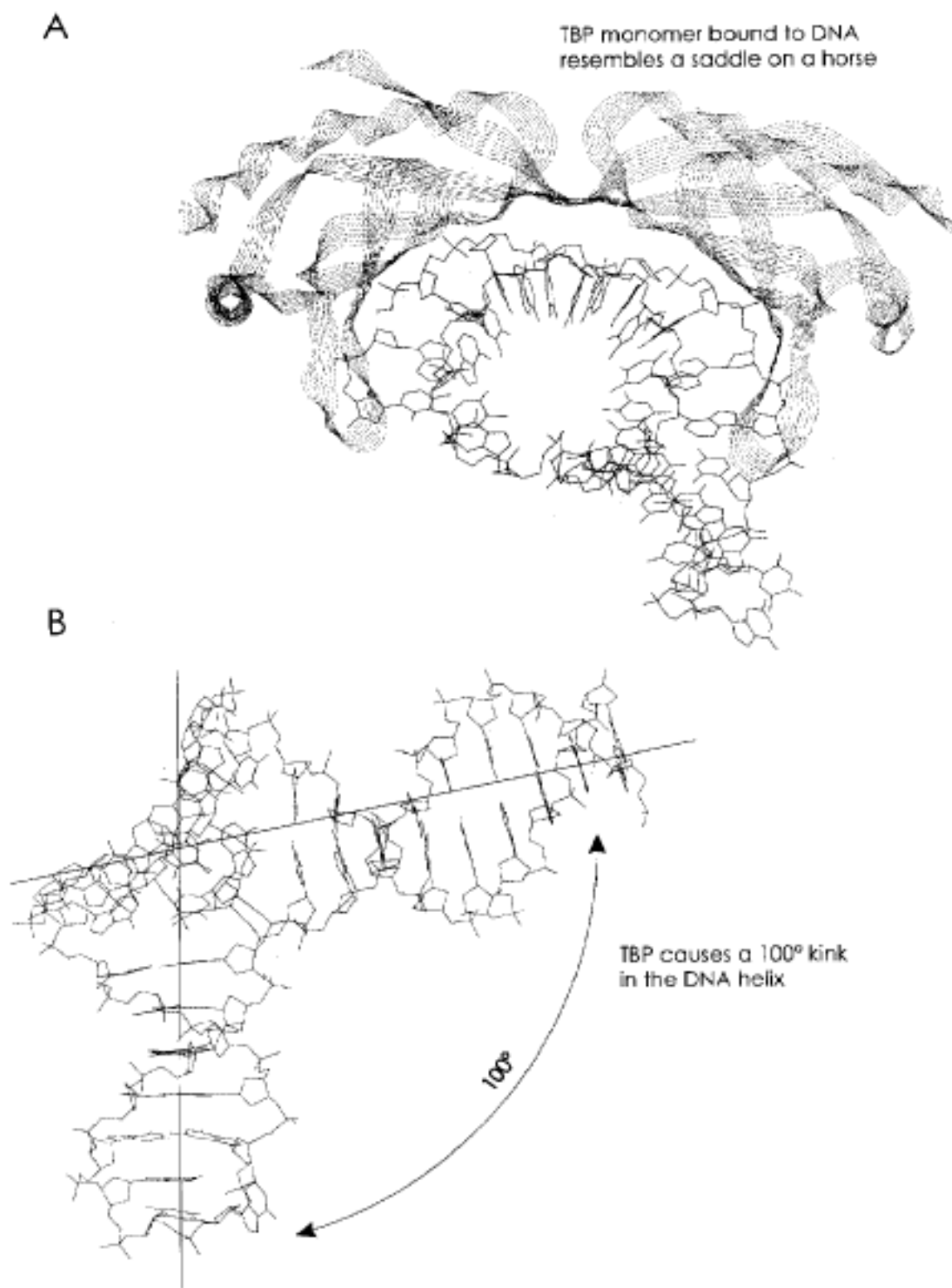


图 24.7 根据 X 射线结晶学资料提出的 TBP 与 DNA 结合的结构
 (a) TBP 单体好像形成一个蛋白质的“马鞍”, 安放在 DNA 螺旋上;
 (b) TBP 结合在 TATA 框上引起 DNA 双螺旋弯曲。

TBP 与 DNA 结合的第二个不寻常之处是蛋白质使 DNA 螺旋中出现一个约 100° 的大拐角。DNA 的这种大的弯曲可能促进辅助性的与 DNA 结合的蛋白质与 TBP 以及转录起始复合体中的其他蛋白质的相互作用。RNA 合成的方向是 5' 到 3', 据此可预期, TBP 与 DNA 的结合应该是有方向的。果然不出所料, 因为同一种蛋白质的表面总是朝向转录起始位点的。

虽然酵母细胞中的 TBP 可被纯化为单一的多肽,但从哺乳动物细胞中提纯的在体外依赖于 TATA 框和 TBP 的有转录活性的蛋白质却是大的多亚基的复合体。例如,人的 TF_{II}D 部分中有 38 kDa 的 TBP 多肽和 8 种其他的蛋白质亚基,它们共同形成一个大于 700 kDa 的复合体。这些额外的 TBP-伴随因子(TAF)是体外调节下的转录所必需的,不过 TAF 在体内的功能尚不清楚。类似于 TF_{II}D 中存在的 TBP/TAF 复合体,所有 RNA pol_I、_{II} 和 _{III} 启动子在体外的转录都需要其他大的蛋白质复合体(图 24.6)。令人惊奇的是, TBP 是所有 3 种类型启动子的起始复合体中不可缺少的组分,即使它们并不都有 TATA 框的结合位点(图 24.8)。

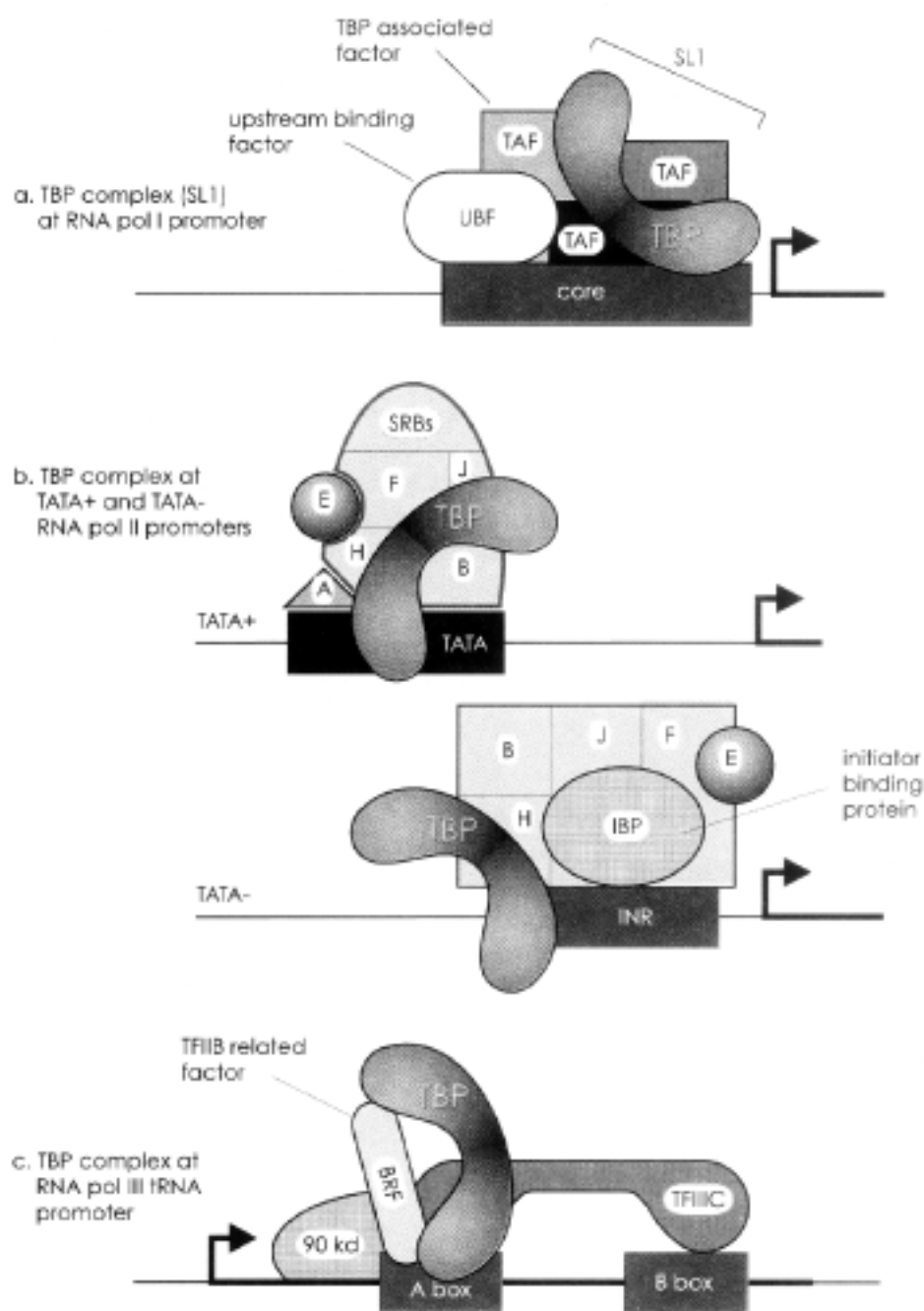


图 24.8 TBP 是依赖于 RNA pol_I、_{II} 和 _{III} 的起始复合体中的蛋白质组分
 (a) TBP 是依赖于 RNA pol_I 的启动子上的 SL1 的一部分;(b) 在 TATA+ 依赖于 RNA pol_{II} 的启动子中的 TATA 框上有 TBP 结合在其上,在 TATA-启动子的起始子区(INR)上也有 TBP 结合在其上;(c) 在 RNA pol_{III} 转录的基因上的起始复合体中的 TF_{II}B 相关因子(BRF)相伴随的 TBP,相应的 RNA 聚合酶的核心酶也存在于这些各种各样的起始复合体中。

在含有 TATA 的启动子中,例如 β -珠蛋白和胸嘧啶激酶基因的启动子中, TBP 的作用可能与其使 DNA 弯折并干扰其结构有关,如 X 射线结晶学的数据所示(图 24.7)。然而,为什么没有 TATA 的启动子的转录也需要 TBP,就不太清楚了。一种解释是 TBP 有多种功能,它结合在

DNA 上利用马鞍的内面改变 DNA 的结构,它是一种蛋白质协调物,通过马鞍的外面与各种 TAF 进行多点接触。在没有 TATA 的启动子中,把蛋白质聚在一起成为一正确构型的能力可能对于建造一个有功能的启动子复合体是至关重要的。有可能某些 TAF 是这些不同的起始子复合体所共用的,但是也还有更多的“类似 TAF”的蛋白质是对启动子有选择性的。

附 录

附录 24.1 定点诱变

在许多情况下希望已克隆到的 DNA 序列发生突变。为了确定专一的 DNA 序列在所研究的功能(蛋白质活性或启动子功能)中的作用,一般有两种途径:(i) 缺失诱变,用限制性酶或外切核酸酶消化线状 DNA,可以除去已克隆的 DNA 中大的和小的片段。然后将余下的质粒 DNA 重新连接并测序以确定缺失的终点。(ii) 定点诱变,将已突变的寡核苷酸退火到一互补的单链环状质粒上以创造点突变或小的缺失或插入。如图 24.9 所示,突变的寡核苷酸与野生型互补序列在突变区中发生错配。突变的寡核苷酸的 3 端与模板正确退火,因此能用作体外 DNA 合成的引物。然后可将已完成的质粒 DNA 引入细菌细胞中并分离含有单链质粒 DNA 的个别的克隆。

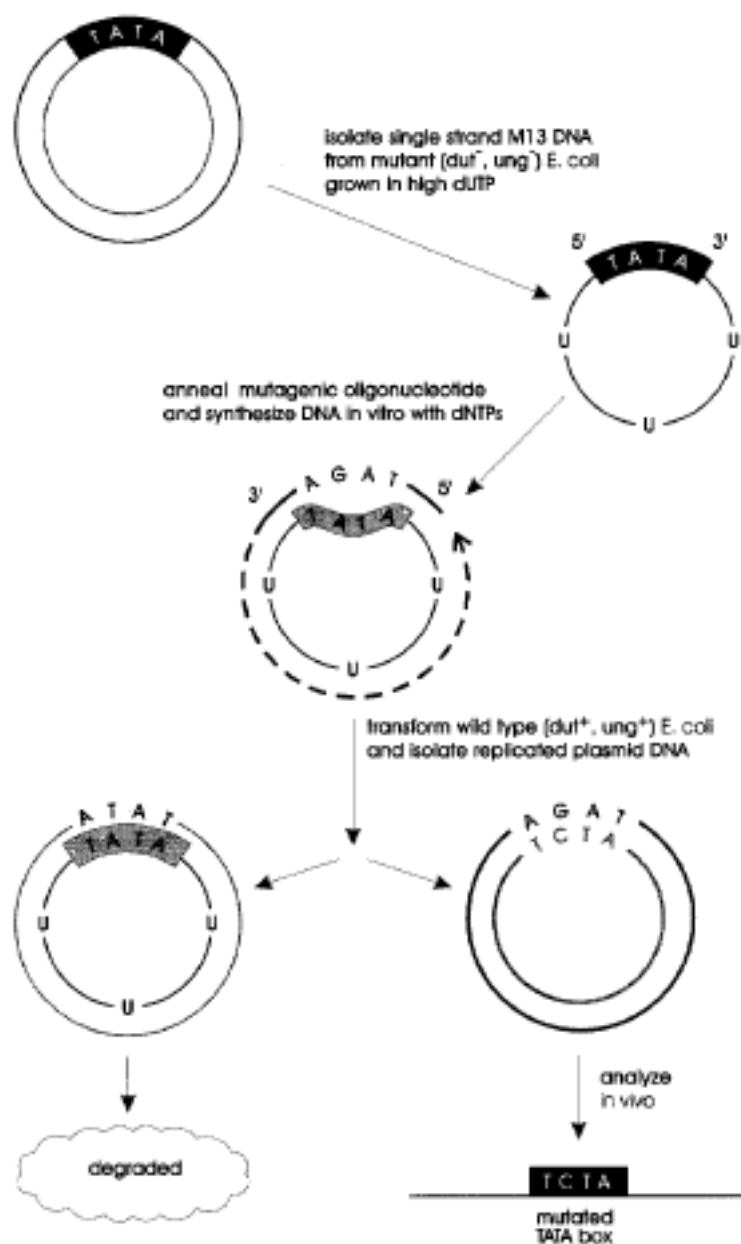


图 24.9 Kunkel 寡核苷酸定点诱变策略示意图

图中示意了以尿核苷的掺入作为从库中消除未突变的质粒 DNA 的方法。

Thomas Kunkel 曾将此法加以改进,目的是增加含有所需突变的质粒的产量,突变有时少于质粒库的 1%。在这一方案中,模板 DNA 带有尿嘧啶(代替胸嘧啶)的“记号”,这是由特殊品系大肠杆菌中分离单链 M13 噬菌体 DNA 而作到的,这一品系的大肠杆菌缺少 dUTP 酶(dut⁻),又缺少 N-葡萄糖基酶(ung⁻),所以 dUTP 库很大,N-葡萄糖基酶的作用通常是从 DNA 中除去尿嘧啶残基(第 23 章)。用体外制备的双链 DNA 转化野生型(dut⁺, ung⁺)大肠杆菌,再用标准的 dNTP 混合物,就可优先除去由未突变的 DNA(dU⁺)衍生的质粒。经过这一选择过程后,留下来的质粒中大部分将是利用突变的核苷酸作为引物,并以 dNTP 在体外合成的(约为质粒库的 60%~80%)。

附录 24.2 序列专一的蛋白质-DNA 相互作用的分析

与序列专一的 DNA 结合的活性可用几种方法测定,其中最灵敏和有用的两种方法是 DNA 足迹法和电泳迁移率变动分析(EMSA)。这些方法曾用于鉴定和纯化转录所需要的与 DNA 结合的各种蛋白质,如 C/EBP 蛋白质,它与 5'-CCAAT-3' 序列结合(图 24.5)。

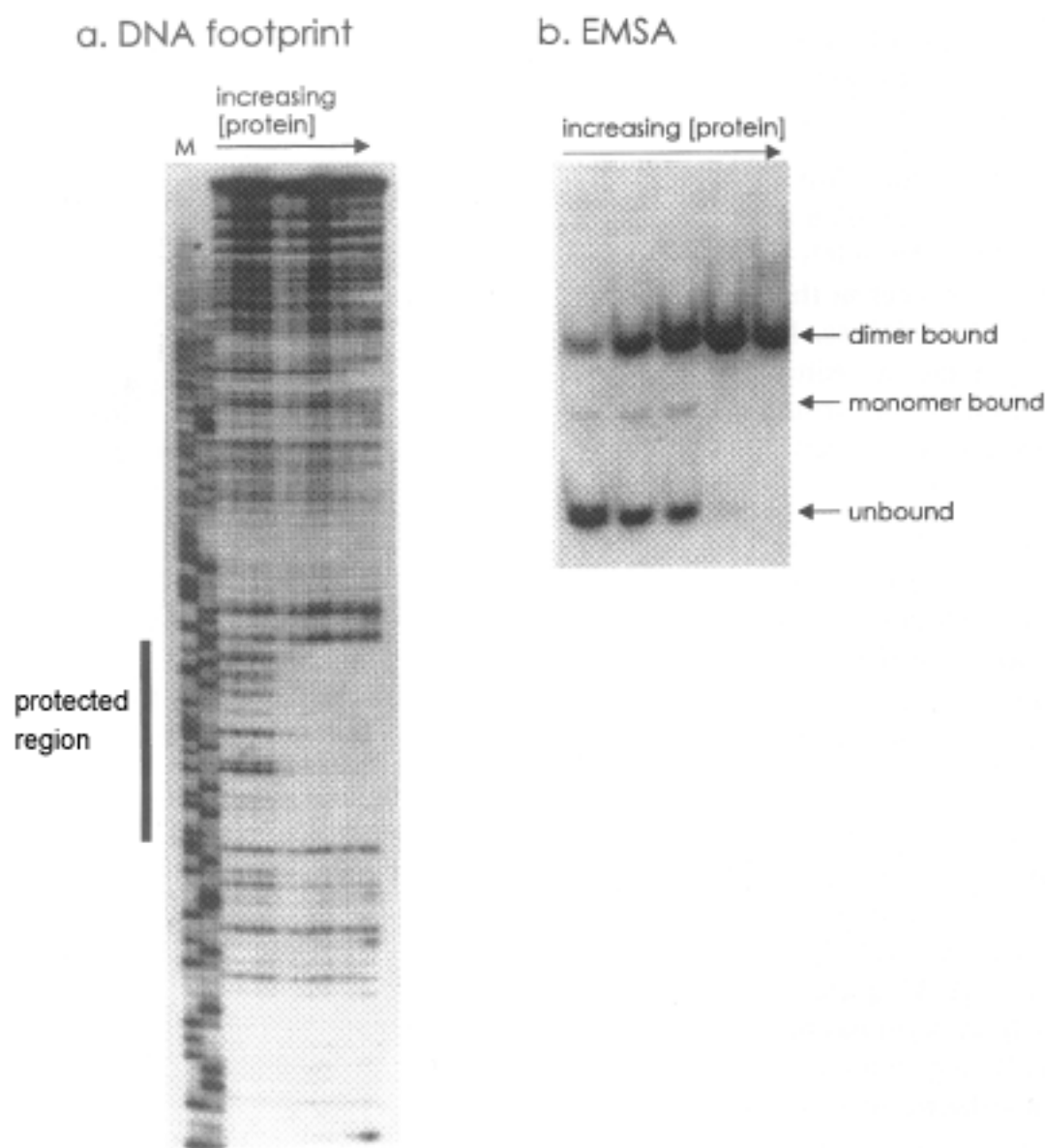


图 24.10 用 DNA 足迹技术和电泳迁移率变动分析(EMSA)鉴定蛋白质-DNA 的相互作用 (a) 体外的 DNA 酶 的足迹法;(b) EMSA。以末端放射标记的片段(a) 或寡核苷酸(b) 与糖皮质激素受体蛋白(真核生物的转录因子)的锌指 DNA 结合域进行温育的各个反应。

DNA 足迹法中,先用 ³²P 制备在一端有放射标记的靶子结合位点的 DNA 片段。然后在 一组反应中,将不同量的蛋白质提取物或纯化的蛋白质与末端有标记的 DNA 在促进 DNA 结合的条件下温育,再以仅含有 DNA 片段的反应作为对照。每一个反应完成后,再用或是随机

切割 DNA 的化学药剂, 或是在限定条件下平均每个分子只切一次的内切 DNA 酶 进行处理。然后在聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 再进行放射自显影, 得到如图 24.10a 所示的照片。“足迹”代表 DNA 片段上的位置, 大多数分子的这个位置上都专一地与蛋白质相结合, 因而排除了化学药剂或 DNA 酶 对它的攻击。足迹上面和下面条带的“梯子”和 DNA 测序的双脱氧终止法中所产生的结果相似。注意, 在未加入蛋白质处理的 DNA 的那一行中有一个均匀的梯子。

凝胶迁移率变动分析的根据是蛋白质-DNA 复合体在电泳试验中的迁移率比单独 DNA 的小。在这一过程中, 先将小的双链寡核苷酸(用 32 P 标记)与纯化的蛋白质或细胞核的提取物进行温育后, 立即向琼脂糖凝胶上加样。然后在低温条件下进行凝胶电泳, 用放射自显影法检测未与蛋白结合的和已与蛋白质结合的寡核苷酸。如图 24.10b 所示, 蛋白质的结合使得寡核苷酸在凝胶上的移动变慢, 产生了在相当于未结合的寡核苷酸带之上的一条已移动的带。把不同量的未标记的寡核苷酸放在结合反应中, 或是利用其中有突变序列的标记的寡核苷酸, 就可能分别测定结合的亲和力和专一性。

24.8 小 结

(1) RNA 合成, 亦称转录, 以 5 到 3 的方向进行, 其中包括新加入的核苷酸对游离的 3' OH 的亲核攻击。RNA 合成不需要已存在的引物。转录单位是基因中被转录的那部分, 与 5' 启动区截然分开。

(2) RNA 合成需要依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶全酶。大肠杆菌的 RNA 聚合酶由 5 个亚基组成, 其中之一为 σ 亚基, 仅用于起始时识别启动子。真核生物有 3 种不同的 RNA 聚合酶全酶, 称为 RNA pol I、RNA pol II 和 RNA pol III。

(3) 转录由 3 个阶段组成: 起始、延伸和终止。大肠杆菌中的转录起始包括 RNA 聚合酶全酶结合在启动子的称为 -35 和 -10 区的专一序列上。有人提出, RNA 聚合酶复合体必须先发生构象变化, 从无活性的“闭合”复合物转变为有活性的“开放”复合物, 然后 RNA 合成才能开始。

(4) 大肠杆菌中转录的终止或是依赖于蛋白质, 或是不依赖于蛋白质; 前者由一种终止蛋白(ρ)介导, 伴随着 RNA 聚合酶延伸复合物, 并引起模板的脱离; 后者是与一种抑制性的茎-环结构的形成有关的。

(5) 真核生物中依赖于 RNA pol II 的基因的转录起始涉及启动子上大的蛋白质复合体的组装, 这需要多达 8 种的多亚基组分, 即 RNA pol II, TF II D, TF II B, TF II E, TF II F, TF II H, TF II J 和 TF II A。RNA pol II 大亚基的羧基末端重复域(CTD)的磷酸化作用与 RNA 合成的起始同时发生。

(6) 与 TATA 结合的蛋白质(TBP)是普遍存在的真核生物的转录起始蛋白, 为依赖于 RNA pol I 的(rRNA), 依赖于 RNA pol II 的(mRNA 和 snRNA)和依赖于 RNA pol III 的(tRNA 和 5S rRNA)基因的转录所必需。称为 TBP-伴随因子(TAF)的辅助性蛋白质提供对 TBP 的选择启动子的特性并有利于转录的调节。

参 考 资 料

- karyotes. *Cell*, 79:743.
- Berk A. J. (1995): Biochemistry meets genetics in the holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:11952.
- Chao, D. M., Young, R. A. (1996): Activation without a vital ingredient. *Nature*, 383:119.
- Cormack B. P., Struhl K. (1992): The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell*, 69:685.
- Gill G. (1994): Transcriptional initiation: Tanking the initiative. *Curr. Biol.*, 4:374.
- Greenblatt J. (1992): Transcription: Riding high on the TATA box. *Nature*, 360:16.
- Hernandez N. (1993): TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.*, 7:1291.
- Kainz M., Roberts J. (1992): Structure of transcription elongation complexes in vivo. *Science*, 255:838.
- Kim Y., Geiger J. H., Hahn S., Sigler P. B. (1993): Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature*, 365:512.
- Koleske A. J., Young R. A. (1994): An RNA polymerase holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 368:466.
- Li, X-Y, Green, M. R. (1996): Tumorigenesis: Transcriptional elongation and cancer. *Curr. Biol.*, 6:943.
- Lu H., Zawel L., Fisher L., Egly J.-M., Reinberg D. (1992): Human general transcription factor H phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase. *Nature*, 358:641.
- Martinez E., Chiang C.-M., Ge H., Roeder R. G. (1994): TATA-binding protein-associated factor(s) in TF_D function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class promoter. *EMBO J.*, 13:3115.
- McDowell J. C., Roberts J. W., Jin D. J., Gross C. (1994): Determination of intrinsic transcription termination efficiency by RNA polymerase elongation rate. *Science*, 266:822.
- Oelgeschlager, T., Chiang, C-M, Roeder, R. G. (1996): Topology and reorganization of a human TF_D-promoter complex. *Nature*, 382:735.
- Peterson M. G., Tjian R. (1992): Transcription: The tell-tail trigger. *Nature*, 358:620.
- Reines, D., Conaway, J. A., Conaway, R. C. (1996): The RNA polymerase general elongation factors. *Trends Biochem. Sci.*, 21:351.
- Roeder, R.G. (1996): The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.*, 21:327.
- Rudloff U., Eberhard D., Tora L., Stunnenberg H., Grummt. (1994): TBP-associated factors interact with DNA and govern species specificity of RNA polymerase transcription. *EMBO J.*, 13:2611.
- Schaeffer L., Roy R., Humbert S., et al. (1993): DNA repair helicase: A component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science*, 260:58.
- Severinov K., Mustaev A., Severinova E., et al. (1995): Assembly of functional Escherichia coli RNA polymerase containing β -subunit fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:4591.
- Sheldon M, Reinberg D. (1995): Transcriptional activation: Tuning up transcription. *Curr. Biol.*, 5:43.
- Svejstrup, J.Q., Vichi, P., Egly, J-M. (1996): The multiple roles of transcription/repair factor TF_H. *Trends Biochem. Sci.*, 21:346.

复 习 题

1. DNA 和 RNA 合成在酶学上是非常相似的细胞过程,然而也有几个关键性的机制上的差别。关于 RNA 合成,下列说法中哪一项不对?
 - a) RNA 合成的链延伸需要游离的羟基

- b) RNA 聚合酶利用尿嘧啶而不是胸嘧啶
 c) DNA 合成需要已存在的引物而 RNA 合成则否
 d) RNA 合成以 3 到 5 的方向进行
 e) 基因的启动子决定 RNA 聚合酶的结合位点并决定 RNA 合成的起点
2. 转录终止的发生是由于:
- a) RNA 聚合酶把染色体的末端转录下来
 b) 形成一种促进聚合酶解离的 RNA 结构
 c) 插入到 DNA 中并阻断转录的与 DNA 结合的蛋白质
 d) RNA 由 3 端降解
 e) 因子从 RNA 聚合酶全酶上解离下来
3. 真核生物中 RNA pol 起始复合体的组装比原核生物中转录起始复合体的形成需要种类多得多的蛋白质。下列答案中,哪一项是对这种差别的最好的解释?
- a) 真核生物中细胞专一的调节要求转录的起始受到严格控制,而多亚基蛋白复合体有利于这种控制
 b) 真核生物的与 DNA 结合的蛋白质种类比原核生物中的多得多
 c) 真核生物的基因比原核生物中的多
 d) C-值悖理
 e) 真核生物启动子中的 TATA 框是 TBP 的结合处,原核生物启动子的 -35 和 -10 区是 RNA 聚合酶的结合处
4. RNA pol 、 和 与它们所转录的三类基因之间有什么关系?
- a) RNA pol 、 和 分别转录 tRNA、rRNA 和 mRNA
 b) 每一类基因的启动子构架反映了各自的 RNA 聚合酶的最适排列
 c) RNA pol 和 RNA pol 都转录编码蛋白质的基因
 d) 基因类别的复杂性直接与细胞中聚合酶的活性有关
 e) b 和 d
5. 你为什么认为酵母的 TBP 基因的突变是致死的?
- a) TBP 为转录终止所需要的蛋白质
 b) 没有能起作用的 TBP 的酵母细胞只能转录 rRNA 基因
 c) 伴随 TBP 的因子与 DNA 聚合酶结合并抑制之
 d) 缺少 TBP 的酵母细胞变得对光敏感
 e) 依赖于 RNA pol 、 和 的基因的转录都需要 TBP

参 考 答 案

1. d RNA 合成以 5 到 3 的方向进行,和 DNA 的合成完全相同。
 2. b 依赖于和不依赖于蛋白质的转录终止都与新生的 RNA 中茎-环结构的形成有关。
 3. a 真核生物中转录起始速率的控制是一种综合性的过程,需要多亚基的蛋白质复合体。
 4. b RNA pol 、 和 复合体分别识别编码 rRNA、mRNA 和 tRNA/snRNA 的基因,启动子序列和 RNA 聚合酶亚基的协同进化可解释这项观察。
 5. e 由于没有 TBP,酵母细胞不能转录任何基因,会死去。

第 25 章 RNA 加工

25.1 引 言

实质上真核生物中合成的所有 RNA 分子都需要某种形式的转录后加工。最简单的加工是初始转录物发生位点专一切割,成为较小的、但有功能的亚片段。有时碱基被甲基化作用或其他化学反应所修饰,如 tRNA 分子中,或者在无 DNA 的情况下核苷酸加到转录物上(5 甲基鸟苷帽加到转录物的 5 端上,或是 mRNA 的 3 端发生聚腺苷酸化)。真核生物中最最常见的 RNA 加工反应是通过称为 RNA 剪接的过程除去内含子。如第 21 章所述,真核生物的大多数编码蛋白质的基因都由外显子和内含子组成,前者规定蛋白质产物的氨基酸顺序,后者是分散的非编码序列。因此,在真核生物中,在 mRNA 被翻译成蛋白质之前,初级 RNA 转录物(异源 RNA 的初级转录物亦称 hnRNA)必须通过剪接进行加工(图 25.1)。

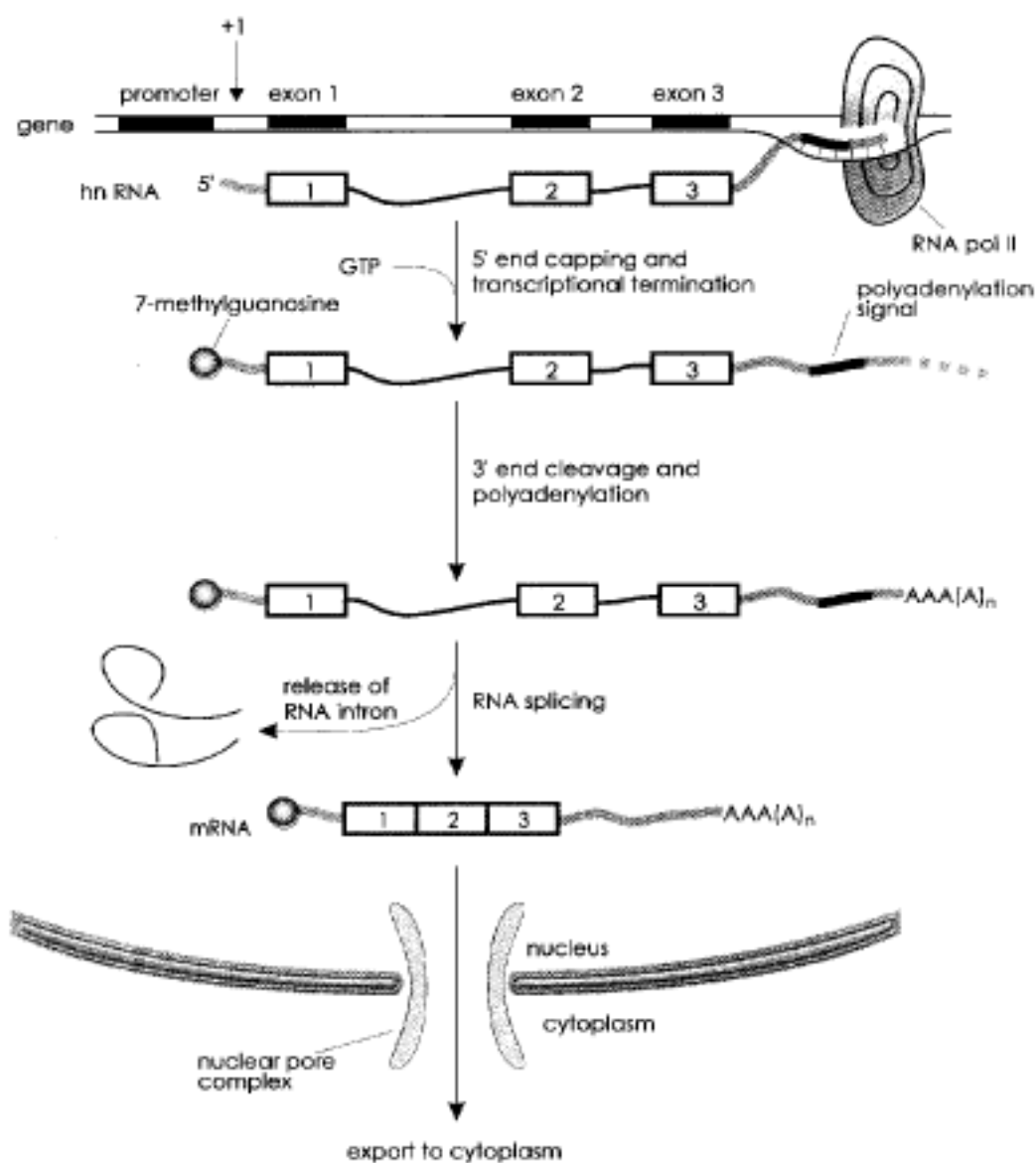


图 25.1 RNA 剪接加工过程概览

示意 5 端上的 7-甲基鸟苷加帽, RNA 剪接过程将 hnRNA 加工为 mRNA, 3 聚腺苷酸化作用以及向细胞质中的外运。注意, 5 加帽是在转录终止前在新生的 hnRNA 上进行的。

这与细菌基因的编码序列不同,那种序列中没有插入的非编码序列,可以作为一单个的 mRNA 被翻译成蛋白质,无须 RNA 加工。

本章拟描述 RNA 剪接的生物化学,并强调 RNA 本身在促进 RNA 分子的位点专一加工方面的催化作用。此外,还讨论了 RNA 加工的其他途径,包括 rRNA 和 tRNA 的加工、3' 聚腺苷酸化作用、受调节的可变 mRNA 剪接和 mRNA 降解。初级 RNA 转录物的这些各式各样的修饰合在一起,就能控制细胞中起作用的 RNA 的质和量。

25.2 RNA 剪接机制大多需要 RNA 催化的两步反应

20 多年以前发现真核生物的基因中有内含子,就已经明了,有必要将基因组 DNA 和 RNA 的序列具体分离出来(通常以互补 DNA 或“cDNA”的形式,如附录 25.1 所述)。图 25.2 所示为 mRNA 与模板的基因组 DNA 之间形成的 RNA-DNA 杂交体如何使得一些 DNA 片段被排出在杂交体之外。DNA 的单链上的环代表在 RNA 剪接过程中已被除去的内含子序列。用电子显微镜研究 β -珠蛋白基因与 β -珠蛋白 mRNA 时观察到了这种结构。

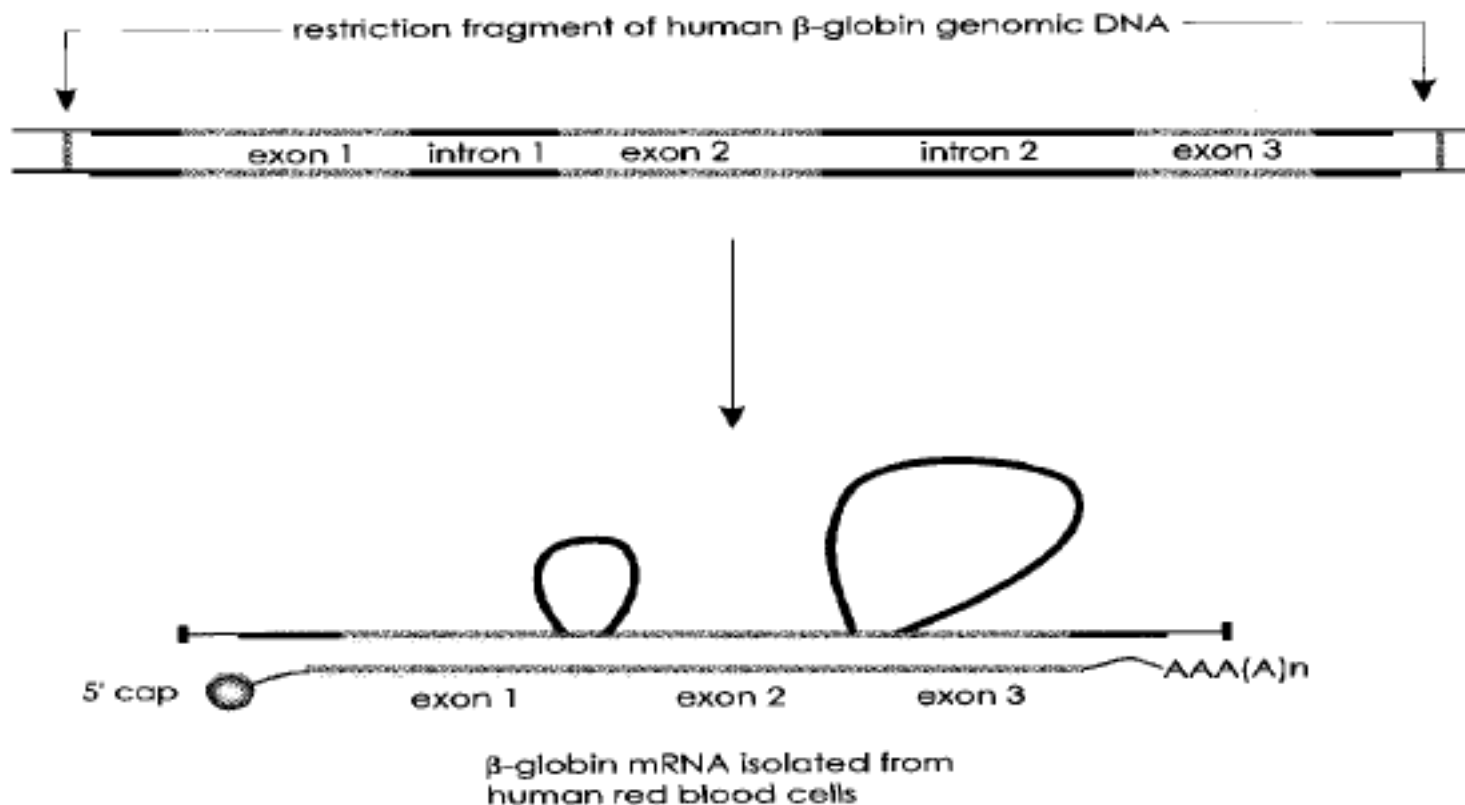


图 25.2 RNA-DNA 杂交示意图

示意人的 β -珠蛋白基因的 DNA 模板链中内含子 1 和 2 的环出,杂交反应中两个纯化的组分是 β -珠蛋白基因组 DNA 的热变性的片段和已加工完毕的 β -珠蛋白的 mRNA。

迄今已发现了 4 种常见类型的 RNA 剪接。本节中所叙述的前三种类型,即第 1 类和第 2 类的自剪接和 hnRNA 剪接,有两个明显的相似点:(i) 磷酸二酯键的断裂和再连接,它们维持着能量的平衡;(ii) RNA 本身以顺式(第 1 类和第 2 类内含子的自剪接)或反式(由称为剪接体的核糖核蛋白复合体剪接 hnRNA)起催化剂的作用。自剪接大概是比较古老的机制,因为它存在于植物和真菌的细胞器中,而剪接体对 hnRNA 剪接的出现可能是为了增加易变性并控制细胞专一的可变剪接。某些酵母 tRNA 的剪接是第 4 种类型的 RNA 剪接反应,它需要常规的内切核酸酶和依赖于 ATP 的连接酶。对于所有这 4 种 RNA 加工反应,RNA 的二级和三

级结构都提供了所需要的专一性, 并且由于使起反应的基团靠近而降低了反应的能障, 从而起到了重要的作用。

(一) 第 I 类内含子的自剪接由外面的鸟核苷介导

第 I 类内含子自剪接的第一步是对内含子 5' 端的外显子和内含子之间的 3'-5' 磷酸二酯键进行亲核攻击, 如图 25.3 所示。在第一个转酯步骤中, 游离鸟苷的 3' 羟基起着亲核物质的作用, 与内含子中的 5' 核苷酸形成新的 3'-5' 磷酸二酯键, 于是把上游的外显子释放出来成为游离的末端(极有可能是 RNA 分子的整体结构使它在原处不动)。

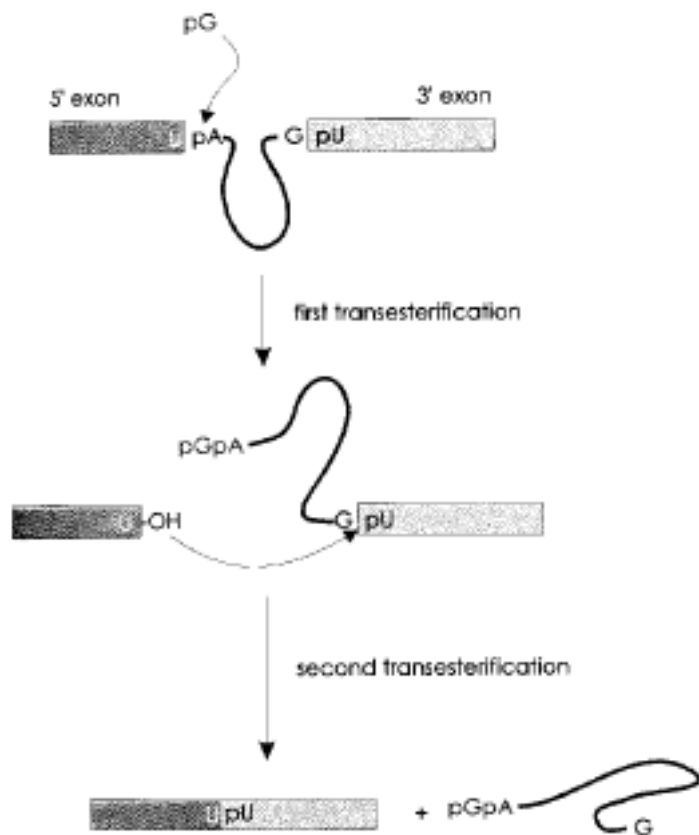


图 25.3 第 I 类自剪接的两个转酯步骤示意图

第一个步骤中, 鸟苷辅因子对内含子的 5' 上的磷酸二酯键进行亲核攻击; 在第二个转酯反应中, 游离的 3' 羟基攻击内含子-外显子下游的分界处的磷酸二酯键, 于是使得内含子以线状 RNA 片段的形式被释放出来, 而两个外显子之间形成了共价键。

第二个转酯步骤中, 上游的外显子的 3' 羟基起着亲核物质的作用, 攻击 3' 内含子-外显子交界处的 3'-5' -磷酸二酯键。其结果是准确地除去了线状的内含子序列, 并形成了两个外显子序列之间正常的共价键, 即 3'-5' -磷酸二酯键。在此反应中鸟苷起着辅因子的作用, 但由于键的数目没有变化, 所以认为这个反应在能量上是中性的。

(二) 第 II 类内含子的自剪接由内部的腺苷酸残基催化

图 25.4a 为自剪接除去第 II 类内含子的反应步骤。两个基本的转酯步骤与第 I 类内含子的剪接相同, 如前所述, 但亲核物质来自于内含子本身之中的腺苷酸残基的 2' 羟基。第一个亲核攻击的结果是在腺苷酸和内含子中的 5' 核苷酸之间形成异常的 2'-5' 磷酸二酯键(见图 25.4b)。然后上游外显子的 3' 羟基就能攻击下游外显子-内含子交界处的 5' 磷酸, 这就是第二个转酯步骤。这一剪接反应包括一个称为套索的中间结构的形成, 在第二个转酯步骤之后, 套

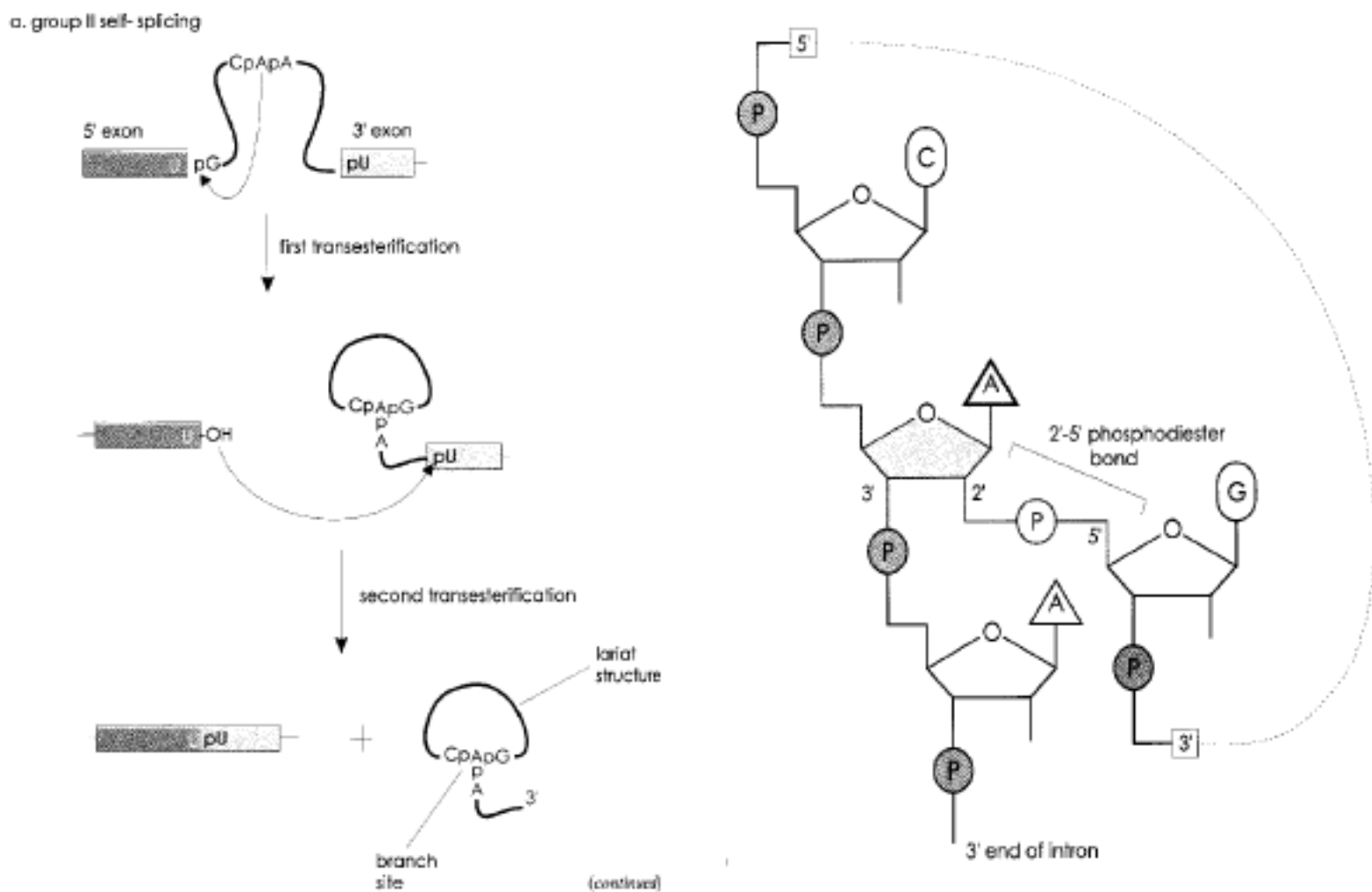


图 25.4 第 II 类自剪接的生物化学

(a) 第 II 类自剪接内含子的 RNA 加工途径; (b) 内含子中的腺苷酸与内含子-外显子交界处的 5 核苷酸之间形成的 2'-5' 磷酸二酯键的结构。

索被释放。套索中的异常的 2'-5' 磷酸二酯键则在称为分支位点的位置上形成一有 3 个磷酸二酯键的结构。如图 25.4b 所示, 腺苷酸残基仍通过标准的 3'-5' 磷酸二酯键与内含子的其余部分联系着。

第 II 类和第 III 类的自剪接反应中 RNA 结构的重要性可以证明如下: 将 RNA 加热使链内的碱基配对变性或加入变性剂, 如脲。这两种处理都会阻断体外的自剪接。1982 年 Thomas Cech 发现自剪接反应可以在完全没有蛋白质的情况下在体外进行, 这就支持了下列观点: RNA 可能是 DNA 和蛋白质之前的祖先大分子。

(三) hnRNA 的剪接需要 snRNP 剪接体复合体

真核生物中 RNA 剪接的主要形式是剪接体介导的内含子的去除。这一反应在化学上类似于第 II 类剪接, 即内含子中的腺苷酸残基起着亲核物质的作用, 攻击外显子的 5' 磷酸。其结果是在第 1 步中形成套索结构, 然后是第 2 个转酯步骤, 将两个外显子的 5' 和 3' 连接起来, 并释放内含子(图 25.5)。

自剪接与剪接体介导的 hnRNA 的剪接之间的区别是 hnRNA 剪接依赖于核内小 RNA (snRNA) 分子及与其伴随的蛋白质, 这两种物质常形成核微小核蛋白 (snRNP) 复合体。为什么 hnRNA 的剪接需要 snRNP, 一种解释是剪接体把剪接反应对结构的要求加于 RNA 底物上。这就意味着内含子序列本身不需要保留, 剪接就可以正确进行(而不是如图 25.5 所示保留内

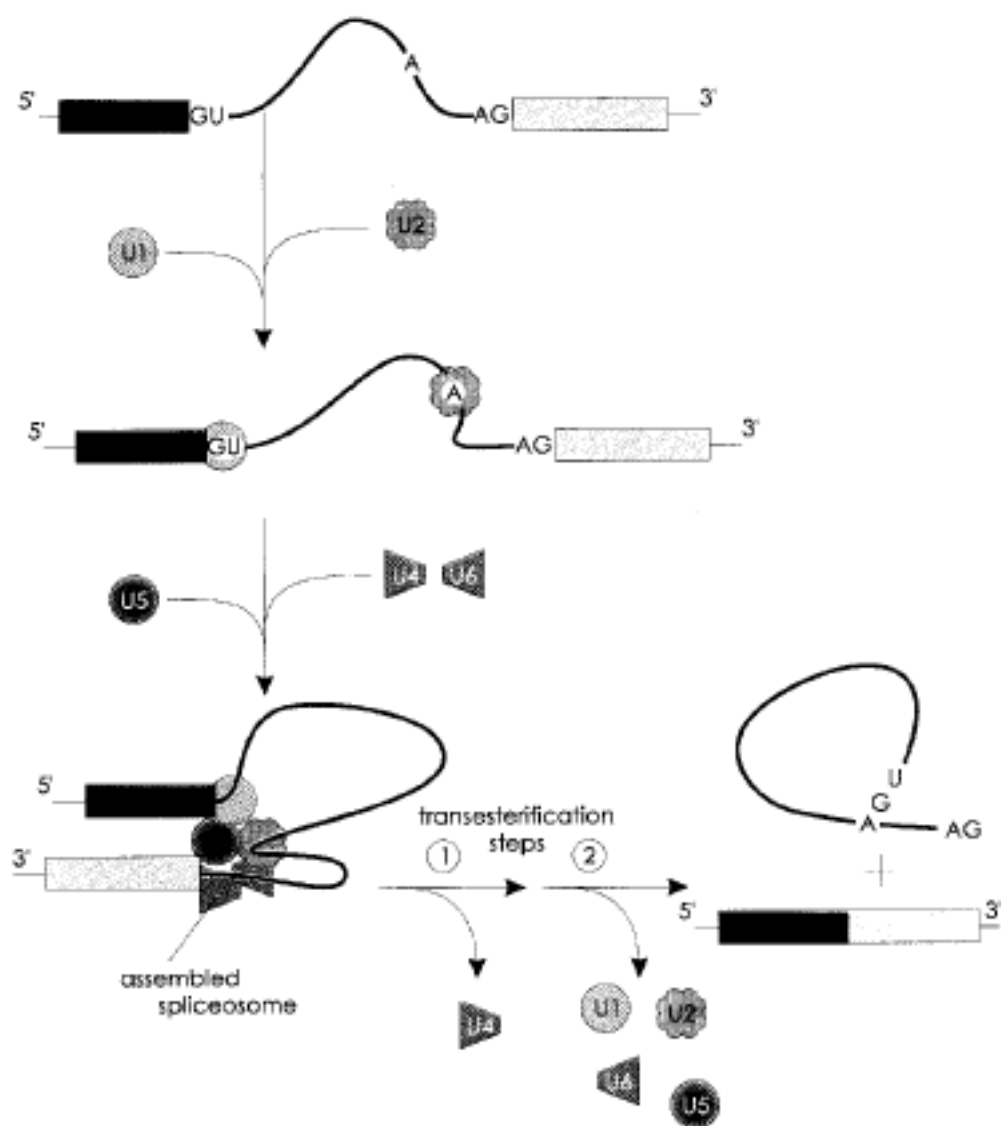


图 25.5 剪接体的组装途径

示内含子边界上保守的 GU-AG 残基和套索分支位点上的腺苷酸残基。注意, 第一步转酯作用后 U4-U6 复合体的解离导致 U2-U6 复合体的形成, 这是完成剪接反应的关键。

含子分界处的 GU-AG 残基)。从这个意义上说, 可以认为 hnRNA 剪接是第 类自剪接的高度进化的形式, 因为它提供了更大的灵活性和一个调节点。

有 4 种 snRNP, 即 U1、U2、U5 和 U4/U6, 它们伴随着内含子序列形成剪接体复合体, 此复合体中有 5 个 RNA 和 60 个以上的蛋白质分子。图 25.5 所示为 hnRNA 剪接反应的几个步骤和剪接体复合体的总的组装过程。两个关键性的 snRNA 相互作用为剪接体定向的途径提供了专一性: 第一个相互作用是 U1 RNA 与 5 外显子-内含子交界处的碱基配对; 第二个相互作用是 U2 RNA 与分支点的碱基配对, 这使得反应性强的腺苷酸残基被挤出来。一旦在一依赖于 ATP 的构象变化中 U4/U6 snRNP 发生重排使 U4 解离, U6 残基就游离出来, 先与 U2、再与 U1 发生相互作用。U6 使 5 分界处与分支点发生的精确的排列与 3 内含子分界处与 U5 snRNP 的反应中心的排列刚好互补。

酵母中 U6 基因的缺失是致死的, U6 序列在进化中又是高度保守的, 这两项发现支持下述观点: 在剪接反应中, U6 的作用是活性部位的中央“组织者”。根据第 类自剪接与 hnRNA 剪接反应的相似性, 根据 U6、U2 和 U5 复合体作用部位的构象, 似乎很明确, hnRNA 剪接也是 RNA 催化的事件。不过, 剪接体介导的 hnRNA 剪接仍有许多问题有待阐明。例如, 已证明有一类称为 SR 蛋白质的非 snRNP 蛋白质也是 5 剪接位点的识别和剪接体组装所需要的。

25.3 核酶是位点专一的内切核糖核酸酶

RNA 催化的四膜虫 (*Tetrahymena*) rRNA 内含子的切割是第一类 RNA 自剪接的经典事例。在鉴定这一反应的过程中, Cech 及其同事发现 RNA 本身的行为很像酶, 它加速转酯反应的速率, 并且有高度的专一性。而且, 他们还发现, 称为 L-19 IVS (插入序列) 的 rRNA 的内含子序列能够起一种真正的酶的作用, 即促进寡核苷酸底物 (如五胞苷酸, C_5) 与 L-19 IVS 3 端的鸟嘌呤残基之间的多个核苷酸转移反应。此反应可以是寡核苷酸中核苷酸的加入或减少, 其米-门 (Michaelis-Menten) 动力学常数 $K_M = 42 \mu\text{mol/L}$, $k_{\text{cat}} = 2/\text{min}$ 。虽然这一反应比大多数蛋白质酶所催化的反应慢些, 但它已将催化速率提高了 10^{10} 倍。根据这些性质, 有催化功能的 RNA 分子被称为核酶。核酶的另一个例子是 RNA 酶 P (RNase P), 它在加工大肠杆菌的 tRNA 时切割磷酸二酯键。这一反应可在体外无任何蛋白质存在的情况下进行; 不过在体内, 却必须有 17.5 kDa 的 RNA 酶 P 蛋白的存在, 很可能是将核酶维持在活性状态需要这种蛋白质。

已研究出了合成的核酶, 并证明它起着位点专一的内切核酸酶的作用。这些 RNA 酶有一个约 20 个核苷酸的序列, 其作用是催化部位, 还有侧翼序列, 它与靶子 RNA 中的序列互补。

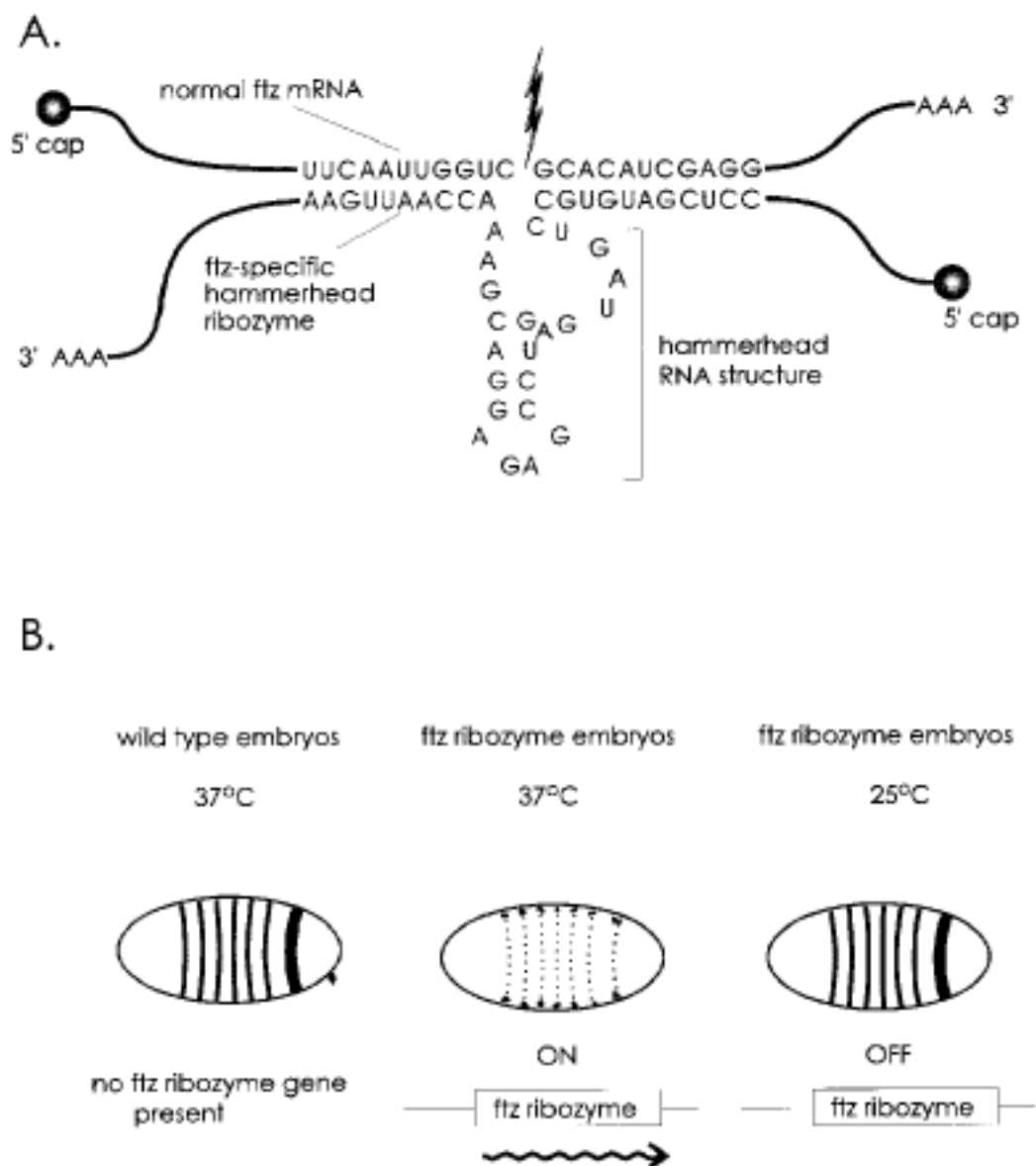


图 25.6 核酶曾用来在体内专一地切割 RNA 序列

(a) fushi tarazu (*ftz*) RNA 中的部分序列, 这是基因工程的 *ftz* 锤头核酶切割的靶子; (b) 含有 *ftz* 锤头核酶基因的蝇胚中所观察到结果的示意图。 *ftz* 基因表达的正常形式在野生型胚中是 7 条带 (左); 当 *ftz* 核酶基因关闭时在低温下在胚中也是 7 条带 (右); 可是加热诱导使有 *ftz* 核酶的胚中的 *ftz* 基因活化时, *ftz* RNA 则显著减少 (中), 这示证的是 *ftz* 核酶在体内的活性。

一种类型的反式作用的核酶是锤头状核酶,最早是在称为类病毒的与植物病毒相似的颗粒中发现的。对锤头病毒进行的分析表明,在核酶及其底物中都有有一些残基是核酶的功能和几项应用中都需要的。图 25.6 所示是一个例子,说明在体内如何用核酶通过内切核酸的作用使内源的 mRNA 失活。

将核酶技术用于治疗人的疾病是有可能的。体外的研究已证明,在培养的人细胞中能用锤头核酶使人的免疫缺陷病毒(HIV)失活。

25.4 rRNA 和 tRNA 前体转录物的加工

(一) rRNA 加工

大肠杆菌中,在一个转录单位中就有 rRNA 基因的 7 个拷贝。初级转录物长约 6500 个核苷酸,编码 23S rRNA 和 16S rRNA。这种转录物还编码几种 tRNA 和小的 5S rRNA,这种 rRNA 是细菌核糖体的组分。起初, rRNA 的鉴定方法是测定通过蔗糖梯度的沉降系数 Svedberg 单位(S)。分子克隆及核苷酸测序已证明大肠杆菌的 23S rRNA 长约 2900 个核苷酸,16S rRNA 长约 1600 个核苷酸。细菌中需要专一的 RNA 酶(RNases)将初级 rRNA 转录物加工为 23S 和 16S rRNA。

图 25.7 说明人的 45S rRNA 转变为起作用的 28S rRNA 和 18S rRNA 的加工途径。如第 24 章中所述,真核生物的 rRNA 基因是由 RNA pol 转录的。关于人的 rRNA 加工的酶学不如对细菌的了解得那么多;不过一般都假定位点专一的 RNA 酶也参与切割反应。

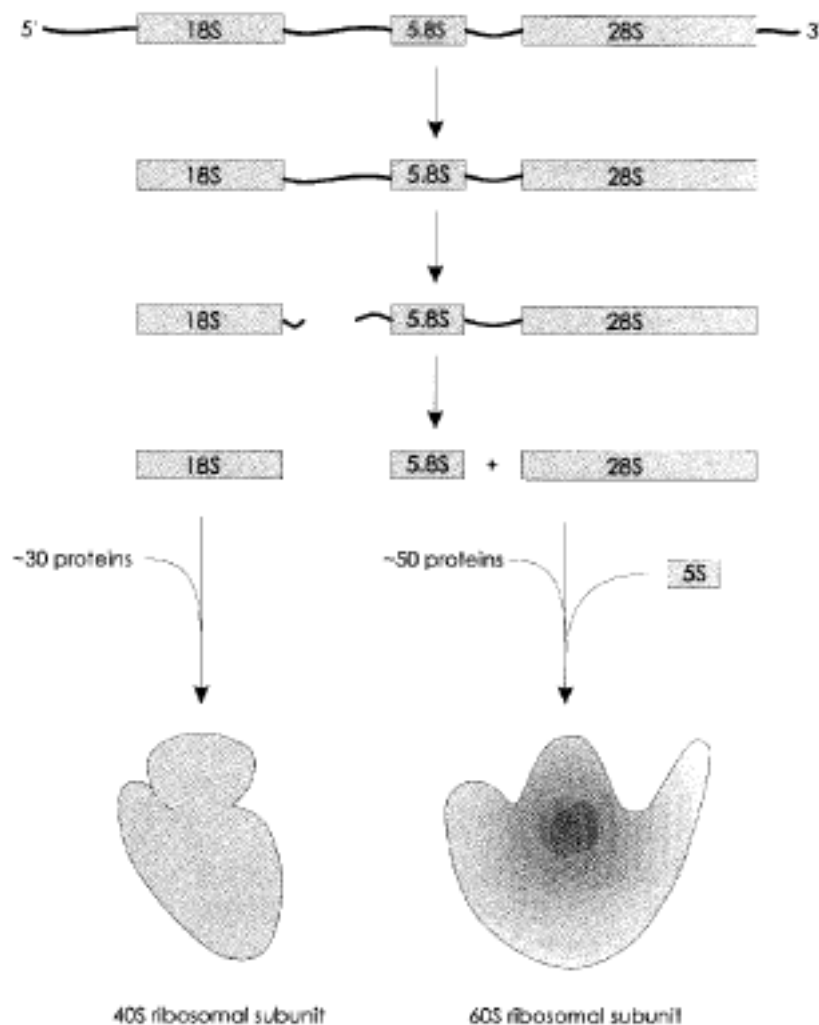


图 25.7 人的 45S rRNA 加工为起作用的 28S、18S 和 5.8S 产物

60S 核糖体大亚基的组装需要 28S、5.8S 和 5S rRNA, 而 40S 小亚基则含有 18S rRNA

人的 45S rRNA 初级转录物长约 14 500 个核苷酸, 编码 28S、18S 和 5.8S 的几种 rRNA。rRNA 的甲基化作用优先发生在编码 rRNA 产物的序列上, 有力地说明甲基化的模式指导着 rRNA 的加工反应。真核生物核糖体中的 5S rRNA 组分是由 5S rRNA 基因编码的, 此基因是由 RNA pol I 转录的(第 24 章)。

(二) tRNA 加工

tRNA 的转录后加工需要几个明确的步骤, 如图 25.8 所示: (i) 必须将 5 和 3 端切开以便从大的前体转录物中释放出 tRNA 序列来, 并且若有内含子则须除去; (ii) tRNA 3 端的 CCA 荷戴序列必须通过转核苷酸作用加上; (iii) 所有的 tRNA 都有许多修饰的碱基, 它们是由还原作用、甲基化作用或脱氨作用产生的。在蛋白质合成过程中这些修饰的碱基会影响 tRNA 对密码子的识别(第 26 章)。

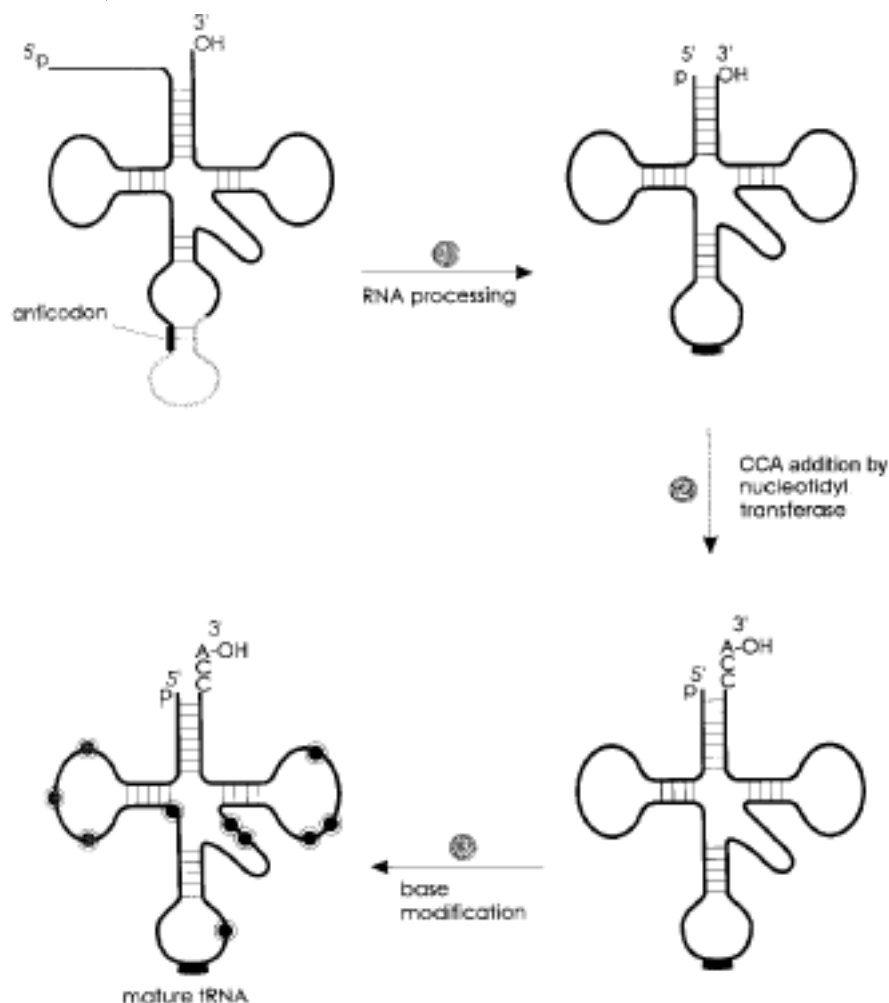


图 25.8 tRNA 加工步骤

第 1 步, RNA 酶切割和 tRNA 剪接反应除去内含子; 第 2 步, 有些 tRNA 的末端 CCA 是由转核苷酸酶加上去的; 第 3 步, 专一的碱基修饰。注意, 在有内含子的酵母 tRNA 中, 反密码子形成一茎-环结构, 其内含子中有互补的核苷酸, 这些核苷酸可能有利于剪接反应中的专一性。

酵母中大约有 400 种 tRNA 基因, 其中约有 40 种是有内含子的, 这些内含子须通过剪接反应除去, 这种反应就是依赖于蛋白质的切割反应和连接反应(这是第 4 种类型的 RNA 剪接)。酵母 tRNA 的长度不等(长约 15 ~50 个核苷酸), 没有可资辨认的保守序列。有趣的是, 在迄今已研究过的 tRNA 内含子中, 总有一个三核苷酸序列是与同一 tRNA 中的反密码子互补的(见图 25.8)。例如, 若反密码子是 5'-CUU-3', 那么内含子中就会有 5'-AAG-3' 这一序列。在前体 tRNA 转录物中, 这种序列与反密码子序列配对形成一茎-环结构, 而专一的 RNA 内切核酸酶识别的就是这一结构。

25.5 加工过的 mRNA 有一 5'-甲基鸟苷的帽和一 3'-聚腺苷酸的尾

真核生物的 mRNA 转录物的 5 端有一个称为 5 帽的不常见的 7-甲基鸟苷。这一鸟苷是在 RNA 合成开始后不久由伴随着 RNA pol 延伸复合物的酶加上去的。5 帽中在鸟苷和 mRNA 的第一个核苷酸(通常是腺苷酸)之间有一个不常见的 5,5'-三磷酸键,如图 25.9 所示。

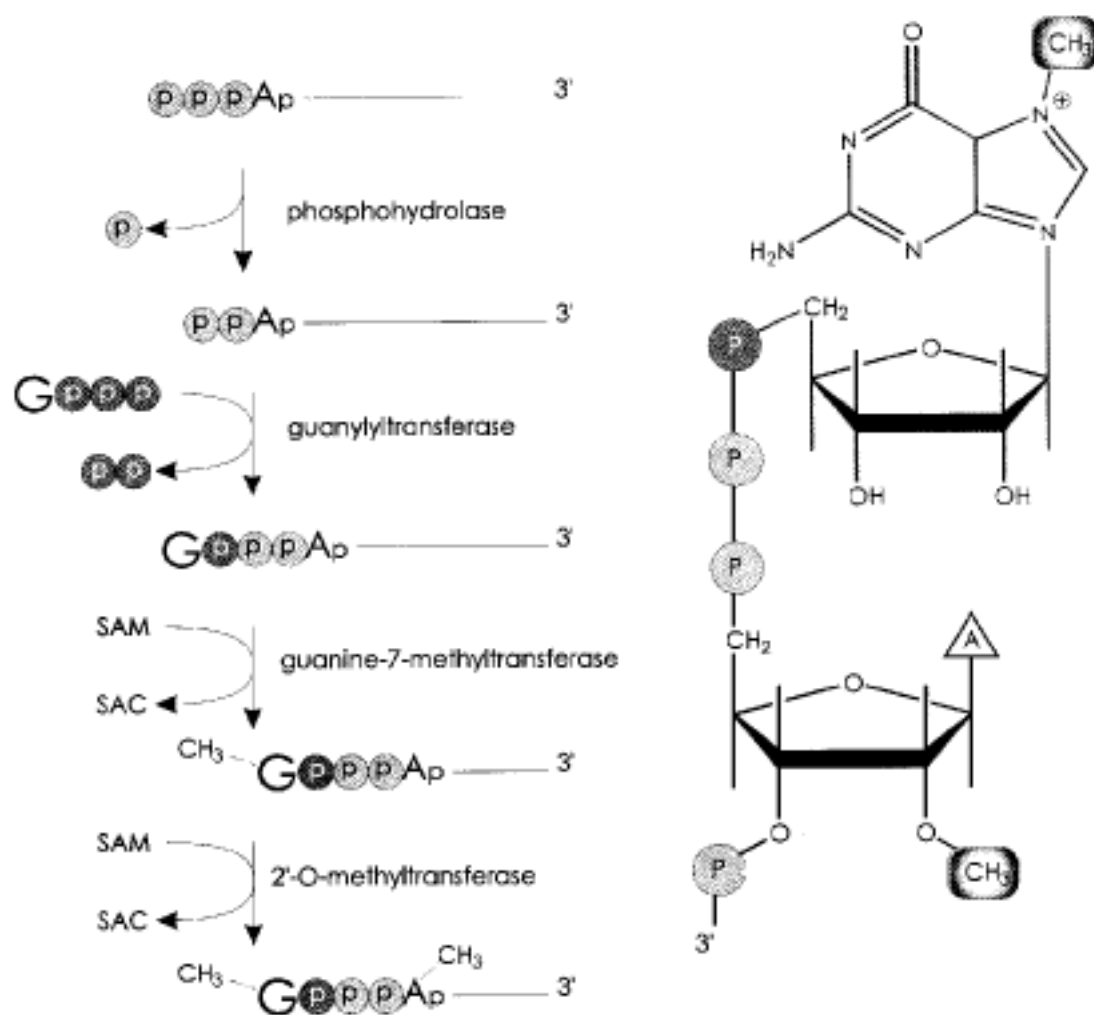


图 25.9 真核生物 mRNA 的 5'-加帽反应

(a) 5 加帽所需要的酶促反应, SAM 为 S-腺苷酰甲硫氨酸, SAC 为 S-腺苷酰高半胱氨酸; (b) 7-甲基鸟苷帽的结构。

mRNA 上的 5 帽对蛋白质合成的起始很重要, 它也保护 mRNA 转录物不被外切核酸酶降解。RNA pol 和 合成的转录物没有 5 帽。

真核生物 mRNA 的 3 端在转录后发生一个两步骤反应的修饰, 这个反应与一种大的蛋白质复合体有关。第一步是由切割-聚腺苷酸化专一性因子(CPSF) 识别存在于大多数 mRNA 中的 3 端的 AAUAA 序列并与其结合(图 25.10)。另一种称为切割促进因子(CStF) 的蛋白质复合体则与 CPSF 相互作用, 活化 mRNA 的切割, 切割位点在 AAUAA 下游约 20 个核苷酸处。第二个 3 加工步骤中, poly (A) 聚合酶(PAP) 与转录物的游离 3 端结合并开始将一约 20 个核苷酸的短的 poly A 尾加上去。在一种与寡聚(A) 结合的结合蛋白的作用下, PAP 活性受到促进后, 短的 poly (A) 尾随后延伸至约 200 个残基。聚腺苷酸化是一个重要的调节步骤, 因为 polyA 尾的长度既调节 mRNA 的稳定性, 又调节翻译的效率。有趣的是, 由细胞周期调节的组蛋白 mRNA 转录物不发生聚腺苷酸化; 而是其 3 端被切割, 切割点在 mRNA 中刚好在高度保守的茎-环结构下游的序列中。这种茎-环结构很可能是保护组蛋白 mRNA 使不发生 3 降解。

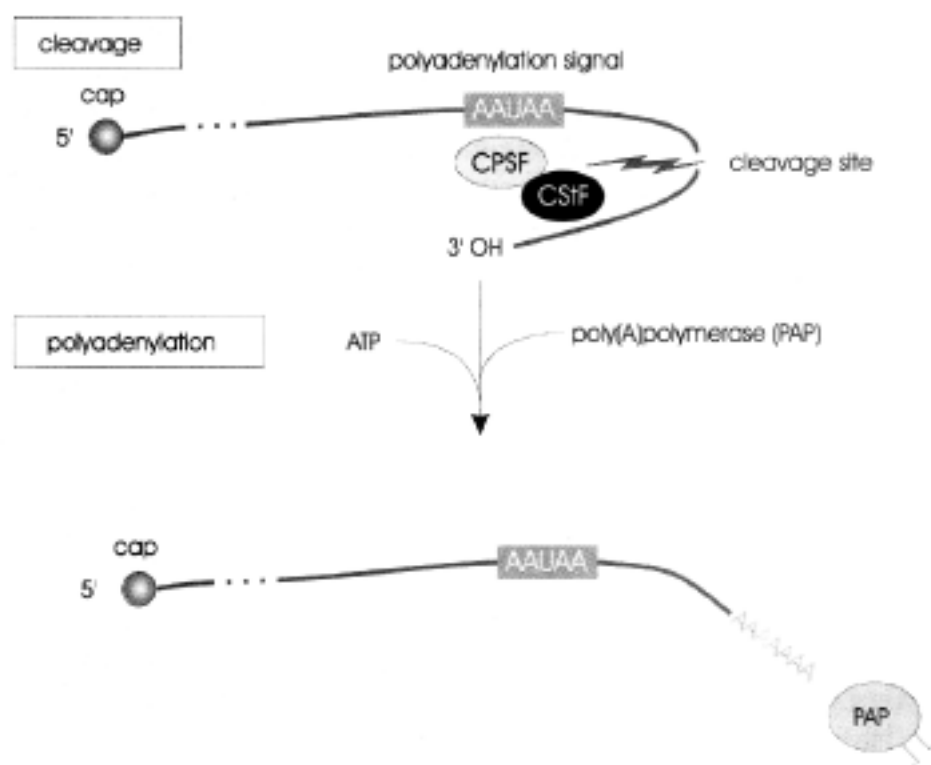


图 25.10 真核生物 mRNA 3 端的聚腺苷酸化包括在 AAUAA 序列下游一位点上的切割和 poly(A) 聚合酶所催化的游离 3 羟基的聚腺苷酸化。

25.6 mRNA 加工可由剪接反应和聚腺苷酸化作用调节

基因分裂为许多个外显子的优点之一就是有机会将小片段的信息混合和搭配。哺乳动物的多数基因都有 10 个或更多个外显子，有许多例子说明同一个基因能通过 mRNA 的可变加

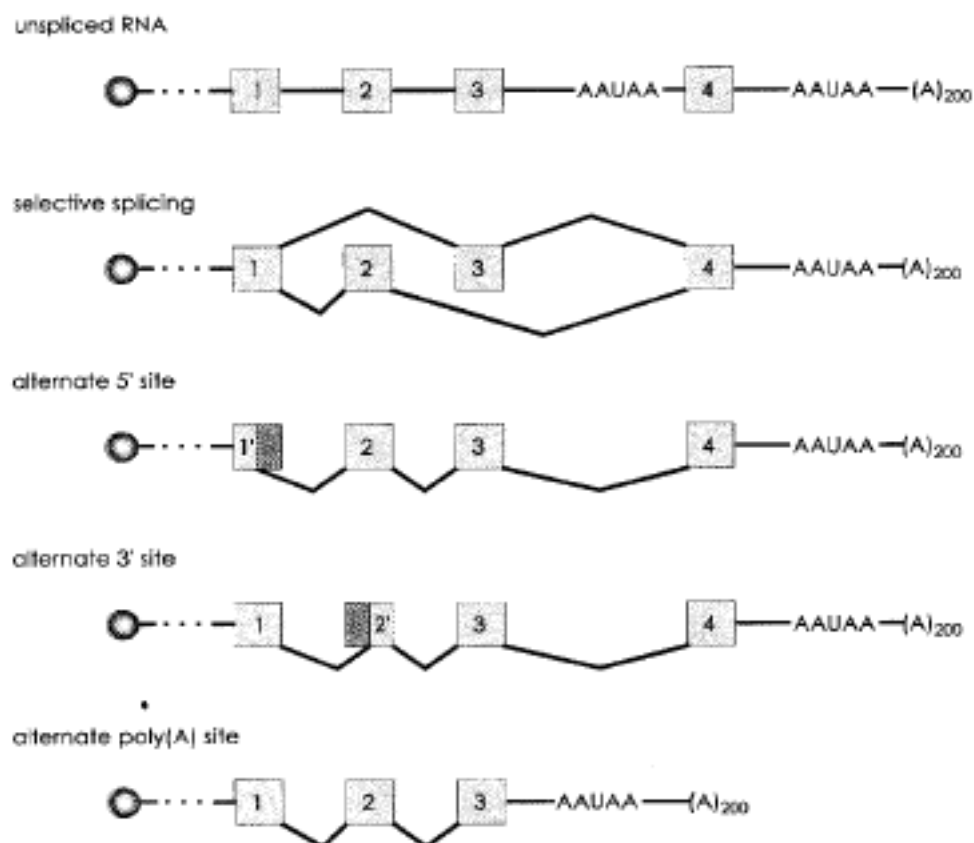


图 25.11 可变的 RNA 加工的 4 种基本模型包括选择性剪接, 利用另一个 5 供体位点, 利用另一个 3 供体位点和利用另一个聚腺苷酸化位点。

工途径而规定许多种蛋白质产物。考虑到 RNA 的二级和三级结构在决定 mRNA 许多性质方面的作用,就很容易想像到 5' 和 3' 的剪接位点能否与剪接机构接近会受到与 RNA 结合的蛋白质的影响。例如,细胞专一的与 RNA 结合的蛋白质能够掩盖优先的剪接位点,或是改变 RNA 的局部结构而促进另一位点的剪接。其次,细胞所特有的对切割和聚腺苷酸化反应的调节也能产生各种各样的转录物。图 25.11 概括了已发现的各种形式的可变的 mRNA 剪接。

细胞所特有的 mRNA 加工的最好的事例之一就是大鼠甲状腺和脑细胞中的降钙素/CGRP 转录物的可变剪接和聚腺苷酸化。甲状腺细胞中,细胞所特有的切割和聚腺苷酸化作用产生的是截短的甲状腺形式的转录物,它编码降钙素。而脑中这种初级转录物(CGRP)形式的剪接方式又不同,它去掉了编码降钙素的序列,而保留了 CGRP 所特有的 3' 外显子。细胞所特有的降钙素/CGRP 可变的聚腺苷酸和剪接的途径是由 cDNA 克隆技术所测定的,是从甲状腺和脑中分离并鉴定 cDNA 序列而得知的,cDNA 克隆技术见本章附录 25.1。

25.7 RNA 降解的机制与 5' 和 3' 外切核酸酶有关

所有的转录物在细胞中的寿命都是有限的。细胞中某一种 RNA 的稳态水平决定于其转录速率和降解速率。对于细菌和酵母系统的研究得到了一些线索,可以说明 RNA 序列在保护转录物使不为外切核酸酶所降解方面的作用,又鉴定了大肠杆菌中的几种 RNA 酶,它们负责 RNA 的周转。细菌中 RNA 的降解包括从未翻译区的 3' 端去掉 RNA 序列,通常这种序列保护 RNA 使之不受 3' 到 5' 的外切核酸酶的攻击。从二级结构作出的预测说明这些保护性的

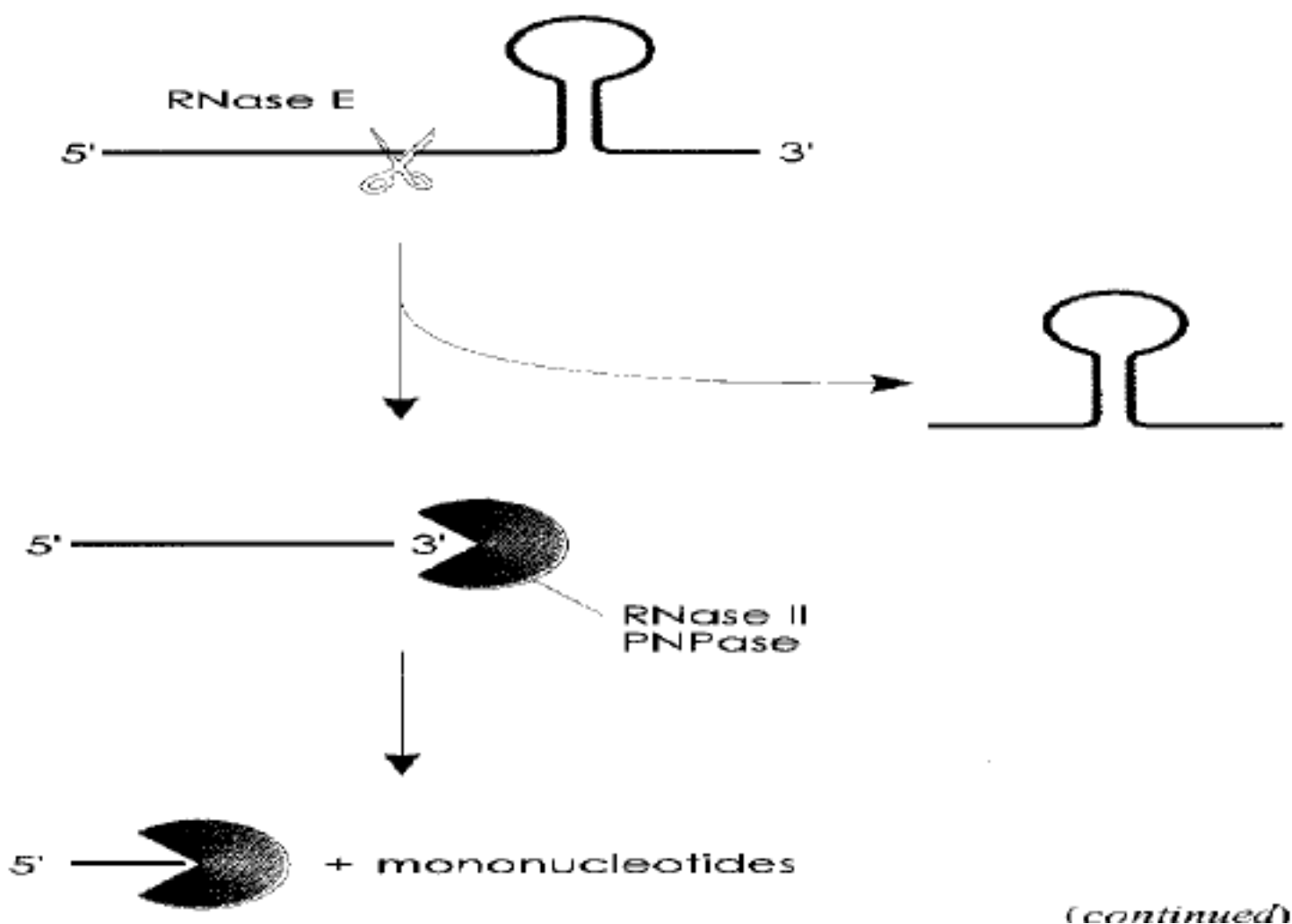


图 25.12 RNA 降解机制

剪刀代表内切核酸酶,带缺口的圆形代表外切核酸酶;
酵母中的“脱帽”降解途径是主要的机制。

RNA 序列形成一稳定的茎-环结构。如图 25.12a 所示,大肠杆菌中的 RNA 酶是一种内切核酸酶,它将茎-环结构切掉,于是使 RNA 的 3 端暴露出来,可以受到多核苷酸磷酸化酶(PNPase)和 RNase 的攻击。

用酵母作的实验证明, poly(A) 尾的逐渐缩短是 mRNA 降解中的关键步骤。在多数情况下, poly(A) 尾缩短的结果是 5 端的“脱帽”,随后是 5 到 3 的外切核酸酶的降解。另一种方式是,完全除去 poly(A) 尾,这有时也能导致 3 到 5 外切核酸酶的降解(图 25.12b)。真核生物中可能还有其他 RNA 降解途径,因为有证据表明,类似于大肠杆菌中的 RNA 酶所催化的内切核酸酶的切割,也起作用。

假设转录速率不变, mRNA 降解的调节就应是控制所合成的蛋白质量的方式。这方面的一个最好的例子是运铁蛋白受体(TfR) mRNA 水平的调节。在高等真核生物中,铁稳态的控制依靠的是一种称为铁效应元件结合蛋白(IRE-BP)的蛋白质与铁结合的活性,现在知道这种蛋白质就是胞质中的乌头酸酶。当铁量多时,胞质乌头酸酶有活性,但不能与 TfR RNA 结合;当铁的贮量减少时,胞质乌头酸酶就失去了其酶活性,而转变为有活性的 IRE-BP,它与 TfR RNA 的茎环结构结合,这种结构称为铁效应元件(IRE)。TfR mRNA 的 3 非翻译区中有许多个 IRE。如图 25.13 所示,当胞质乌头酸酶与 TfR IRE 结合时,TfR mRNA 降解的一个限速步骤被抑制了。

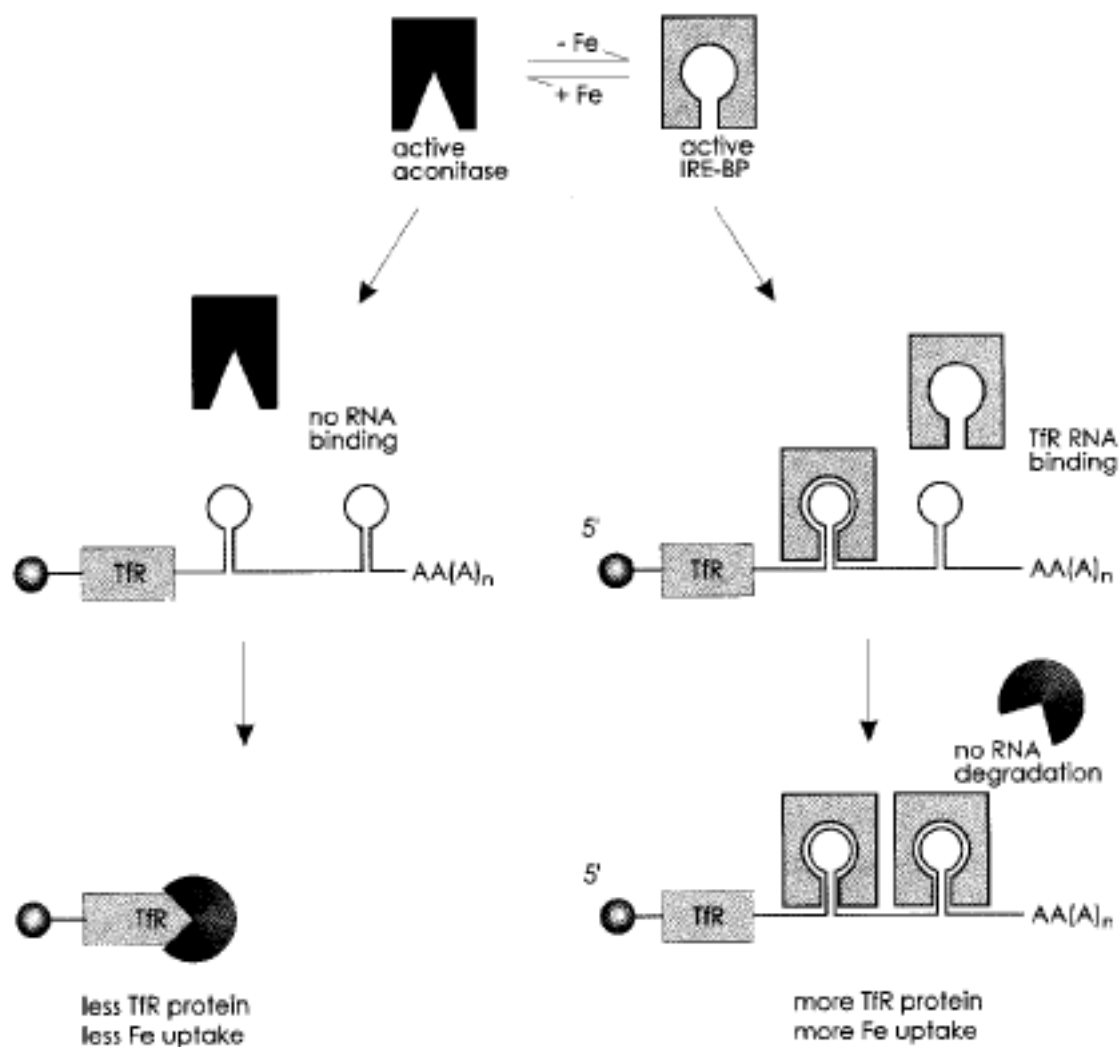


图 25.13 胞内的铁浓度调节运铁蛋白受体 mRNA 的稳定性以及胞质乌头酸酶转变为 IRE-BP

胞质乌头酸酶结合的结果导致运铁蛋白受体 mRNA 的稳态水平提高,随后 TfR 蛋白的水平也提高。一旦胞内的铁水平回到正常值,胞质乌头酸酶结合 IRE 的活性就失去,而 TfR mRNA 就迅速降解。

附录 25.1 利用重组 DNA 技术鉴定 mRNA 转录物

(一) 互补 DNA(cDNA) 的分离

核糖核酸是难于操作的核酸,因为它对 RNA 酶极为敏感,而 RNA 酶在实验室中又无处不在(你的手便是 RNA 酶的良好来源),因而 RNA 的测序是用间接的方法。为了解决这个问题,先把 mRNA 转变为 cDNA,用的是逆转录酶(第 30 章)。逆转录酶是一种依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶,它利用 RNA 作为模板,合成 cDNA。逆转录酶反应的产物是单链的 cDNA(相当于双链的基因组 DNA 中原来的模板链),在第二个 DNA 聚合酶的反应中,又可用它来合成双链 DNA(图 25.14)。

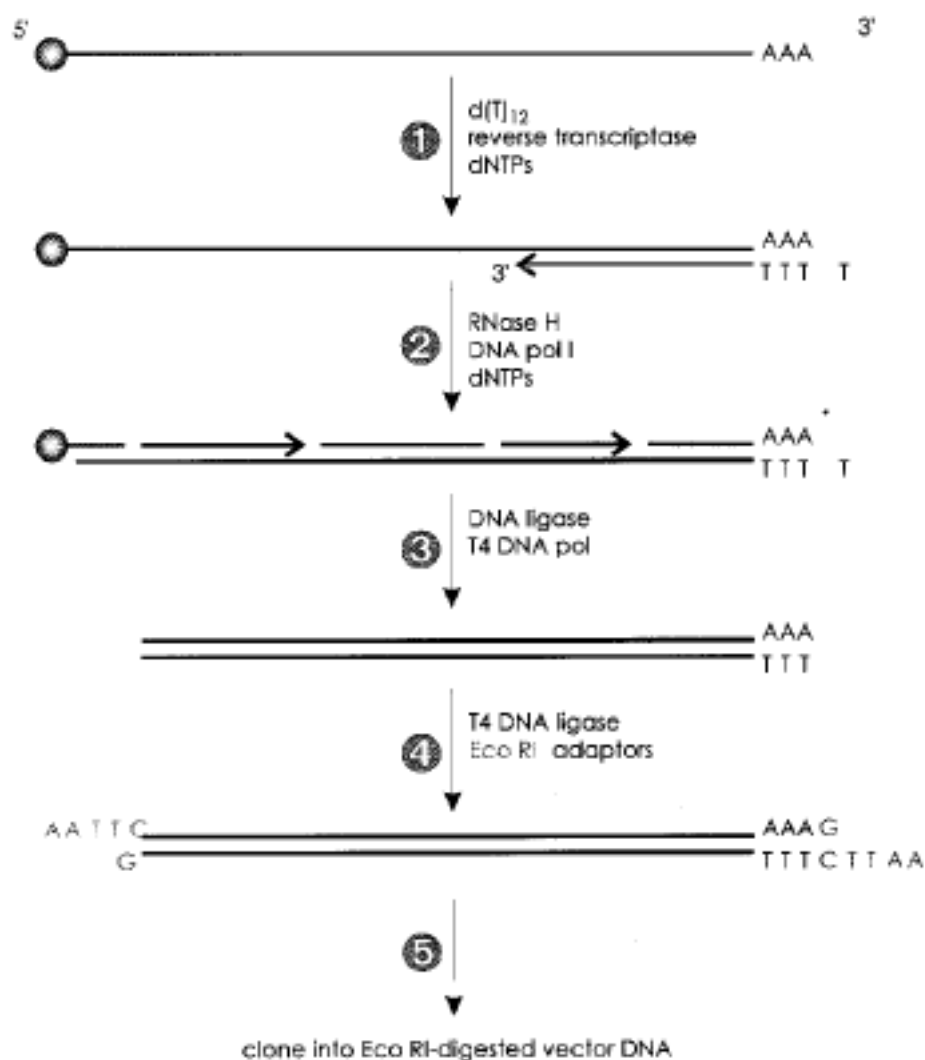


图 25.14 由 mRNA 和寡核苷酸引物如寡 d(T) 合成双链 cDNA 的常用酶促反应
 逆转录酶是首次发现于真核生物的逆转录病毒中的以 RNA 为模板的 DNA 聚合酶。第 2 步中 RNA 转变为 DNA 是将两种酶活性结合起来而完成的:一种是大肠杆菌 RNA 酶 H 的内切核酸酶活性,它使 RNA-DNA 杂交物形成一个切口;另一种是大肠杆菌 DNA pol I 的 DNA 聚合酶活性,它利用残余的 RNA 为引物,以 cDNA 的第一条链为模板。第 3 步则用大肠杆菌的 DNA 连接酶以修复单链的切口,并用 T4 DNA 连接酶造成平端。将 Eco RI 连接物连接到双链 cDNA 的平端上促进其克隆到质粒中或入 DNA 载体中,此载体是用限制性酶 Eco RI 切割的。

分离基因的克隆序列的两种常用的方法是:利用放射性核酸探针筛选 cDNA 文库;或制备所编码蛋白质的抗体,并筛选 cDNA 文库,于是在宿主细菌中产生融合蛋白(表达文库)。

(二) 用 Northern 印迹法分析 mRNA

因为基因表达常有细胞专一性,而有些转录物在各种不同类型的细胞中又会发生差异剪接,所以常用类似于 DNA 的 Southern 印迹法(见第 2 章)的印迹技术进行 mRNA 的分析。这种技术称为 Northern 印迹法(RNA 印迹法)。将 RNA 样品在琼脂糖凝胶上进行电泳,凝胶中有变性剂,如甲醛,其作用是破坏链内的碱基配对和 RNA 的二级结构。然后将 RNA 从凝胶上转移到一种固体支持物,如硝化纤维膜上,使凝胶上 RNA 的分布型式保留在膜上,如图 25.15 所示。然后含有单链 RNA 的滤膜就可与单链 cDNA 探针杂交,此探针是已在体外用 ^{32}P -NTP 和 DNA 聚合酶放射标记的。再将洗过的滤膜放在胶片上进行放射自显影。

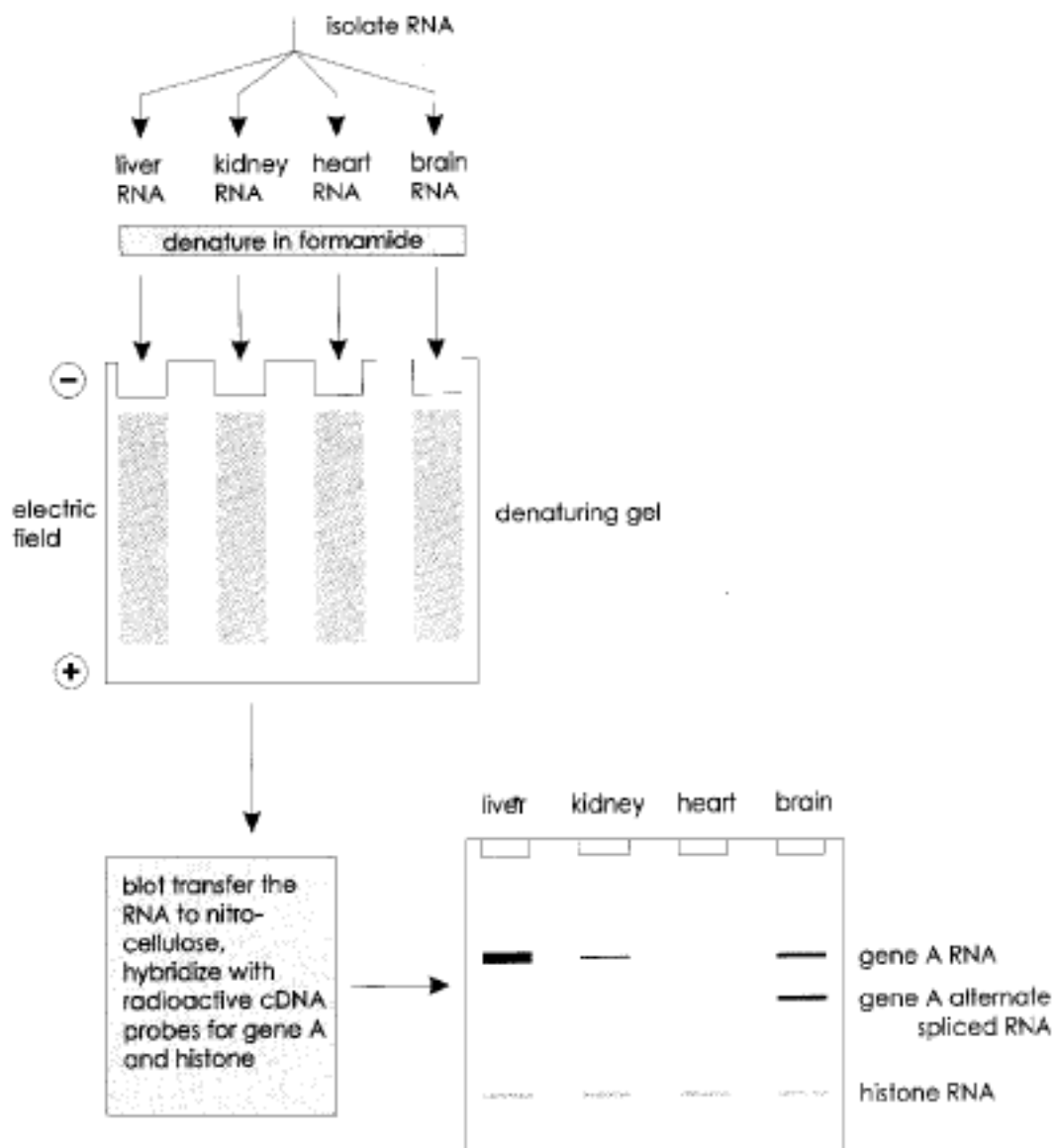


图 25.15 鉴定各种细胞类型中各种 RNA 的 Northern 印迹法

在变性用甲醛琼脂糖凝胶中以凝胶电泳法分离 RNA,再转移到硝化纤维滤膜上,并与专一基因的 cDNA 探针(基因 A 的 cDNA)杂交。注意,还用了第二种探针来检测另一种 RNA,如组蛋白 RNA 分子的存在,这是用来作为加样对照的。

25.8 小 结

(1) 初级 RNA 转录物的转录后加工包括 RNA 剪接、5' 加帽、3' 聚腺苷酸化和 tRNA 的碱基修饰。许多这类变化都会增加 RNA 的稳定性,并促进 mRNA 的翻译。

(2) 第一类内含子的自剪接是由外在的鸟嘌呤核苷介导的,它在两个转酯反应中的第一个反应中起着亲核物质的作用。这种无蛋白质参加的反应依赖于 RNA 分子内的结构。

(3) 第 I 类内含子的自剪接利用位于内含子中的腺苷酸残基作为第一个转酯步骤中的亲核物质。在第 II 类和第 III 类自剪接反应中, 上游的外显子-内含子分界处先被切割开, 然后上游外显子的 3' OH 对下游的外显子进行亲核攻击。

(4) hnRNA 的剪接过程需要大的 snRNP 剪接体复合体以促进两步骤的机制, 此机制与第 I 类自剪接所用的机制实质上是相同的。在 hnRNA 的剪接中, U6 snRNA 起着中央组织者的作用, 也参与催化第二个转酯步骤, 此步骤以套索的形式释放内含子。

(5) 核酶是有催化活性的 RNA 分子, 它能在专一位点上切割靶子 RNA 分子。锤头核酶是一种类型的反式作用核酶, 它可被用作为体内的位点专一的 RNA 酶。

(6) rRNA 和 tRNA 的加工都是把较大的前体转录物按顺序切割成起作用的 RNA 产物。人的 45S rRNA 前体转录物可被尚不太明确的切割反应加工为成熟的 28S、18S 和 5.8S RNA。tRNA 的加工包括许多种碱基的修饰。

(7) 真核生物的 mRNA 有 5' 的 7-甲基鸟苷帽和 3' 的聚腺苷酸尾, 两者都是由位于细胞核中的专一的酶加上去的。可变的 RNA 剪接和聚腺苷酸化使得转录物很不均一, 专一性也不同, 其结果是合成细胞所特有的蛋白质。

(8) 合成速率和降解速率的平衡可控制 RNA 的稳态水平。外切和内切核酸酶类都在 RNA 降解途径中起作用。细胞质中的乌头酸酶/IRE-BP 活性对运铁蛋白-受体 mRNA 水平的控制就是一个经典的例子, RNA 的周转速率会响应于生理信号而得到调节。

参 考 资 料

- Beelman C. A., Parker R. (1995): Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*, 81:179.
- Binder R, Horowitz J. A., Basilion J. P., Koeller D. M., Klausner R. D., Harford J. B. (1994): Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J.*, 13:1969.
- Cohen S. N. (1995): Surprises at the 3' end of prokaryotic RNA. *Cell*, 80:829.
- Flory C. M. Pavco P. A., Jarvis T. C., et al. (1996): Nuclease-resistant ribozymes decrease stromelysin mRNA levels in rabbit synovium following exogenous delivery to the knee joint. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:754.
- Harris M. E., Nolan J. M. Malhotra A., Brown J. W., Harvey S. C., Pace N. R. (1994): Use of photoaffinity crosslinking and molecular modeling to analyze the global architecture of ribonuclease P RNA. *EMBO J.*, 13:3953.
- Kiss-Lázló Z., Henry, Y., Bachellerie, et al. (1996): Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, 85:1077.
- Kohtz J. D., Jamison S. F., Will C. L., et al. (1994): Protein-protein interaction and 5' splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*, 368:119.
- Lou H., Cote G. J., Gagel R. F. (1994): The calcitonin exon and its flanking intron sequences are sufficient for the regulation of human calcitonin/calcitonin gene-related peptide alternative RNA splicing. *Mol. Endocrinol.*, 8:1618.
- Manley J. L. (1995): Messenger RNA polyadenylation: A universal modification. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:1800.
- Manley, J. L. and Tacke, R. (1996): SR proteins and splicing control *Genes Dev.*, 10:1569.

- Nilsen T. W. (1994): RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell*, 78:1.
- Pandey N. B., Williams A. S., Sun J.-H., Brown V. D., Bond U., Marzluff W. F. (1994): Point mutations in the stem-loop at the 3' end of mouse histone mRNA reduce expression by reducing the efficiency of 3' end formation. *Mol. Cell. Biol.*, 14:1709.
- Proudfoot N. J. (1994): Post-transcriptional regulation: Chasing your own poly(A) tail. *Curr. Biol.*, 4:359.
- Rossi J. J. (1994): Practical ribozymes: Making ribozymes work in cells. *Curr. Biol.*, 4:469.
- Scott W. G., Finch J. T., Klug A. (1995): The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: A proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell*, 81:991.
- Sharp P. A. (1994): Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77:805.
- Sun L.-Q., Warrilow D., Wang L., Witherington C., Macpherson J., Symonds G. (1994): Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type 1 replication in permissive cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:9715.
- Wahle, E. and Keller, W. (1996): The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.*, 21:247.
- Zhao J. J., Pick L. (1993): Generating loss-of-function phenotypes of the fushi tarazu gene with a targeted ribozyme in *Drosophila*. *Nature*, 365:448.

复 习 题

- 真核生物 mRNA 加工的 4 个相继发生的步骤是:
 - 5 加帽, 运至核外, 3 聚腺苷酸化和 RNA 剪接
 - RNA 剪接, 运至核外, 5 加帽和 3 聚腺苷酸化
 - 转录, 3 聚腺苷酸化, RNA 剪接和运至核外
 - 5 加帽, 3 聚腺苷酸化, RNA 剪接和运至核外
 - RNA 剪接, 5 加帽, 3 聚腺苷酸化和运至核外
- 第 I 类内含子的自剪接和剪接体介导的 hnRNA 的剪接之间在机制上有什么相似之处?
 - 在第一个转酯步骤中链内的腺苷酸进行亲核攻击
 - 在第一个转酯步骤中游离的鸟核苷进行亲核攻击
 - 在分支处形成套索结构和 2'-5' 磷酸二酯键
 - 在第二个转酯步骤中 5' 外显子的 3' 羟基进行亲核攻击
 - a, c 和 d 都对
- 在剪接体功能中, 伴随着 snRNP 的蛋白质的作用之一看来是:
 - 在第 1 个转酯步骤中由内切核酸酶进行核酸切割
 - 保护 snRNA 的组分使免于降解
 - 在剪接分界处与 GU-AG 序列形成互补碱基对
 - 启动 snRNAs 的正确折叠以促进 RNA 介导的催化作用
 - 促进已加工的 mRNA 分子被运出核外
- 绝大多数真核生物的 hnRNA 都是转录后发生修饰, 这种修饰是:
 - 在 3' 端加上 CCA 这种三核苷酸
 - 由外切核酸酶除去 5' 前导序列
 - 在 5' 端加上 7-甲基鸟核苷
 - 除去外显子并将内含子剪接到一起
 - 在 5' 端加上约 200 个腺核苷
- 细胞中 RNA 的稳态水平是由 RNA 合成速率和 RNA 周转所控制的。如何能利用聚腺苷酸化的另一个

位点来控制 RNA 的稳定性? 下列哪一条是这个问题的最佳答案?

- a) 保护 3 端的 RNA 结构可以包括在内或排除在外
 - b) 3 聚腺苷酸化的尾可长可短
 - c) 转录的终止可以被促进或被抑制
 - d) mRNA 中的 7-甲基鸟苷帽可以有或无
 - e) 运至核外可以是随机的或有选择性的
6. 逆转录酶的发现和随后的应用使现代分子生物学发生了革命性的变化, 这主要是由于
- a) 促进了人基因组计划中 YAC 文库的构建
 - b) 通过药物的发现提供了病毒侵染的治疗目标
 - c) 创造了一种由 DNA 在体外合成 RNA 的方法
 - d) 通过 cDNA 的克隆导致了生物技术工业的诞生
 - e) 提供了设计较长的核酶的简易途径

参 考 答 案

- 1. d 5 加帽和 3 聚腺苷酸化都在剪接和运出之前。
- 2. e 第 Ⅱ 类内含子的自剪接和剪接体介导的 hnRNA 剪接的生物化学之间的差别仅仅是它们分别需要顺式或反式组分。
- 3. d snRNA 分子(例如 U6, U2 和 U5) 形成剪接体中的催化中心, 而 snRNP RNA 的结构很可能受到 snRNP 蛋白质的影响。
- 4. c RNA 的稳定性和 mRNA 的翻译都需要 5 加帽。
- 5. a RNA 的稳定性常由位于 RNA 转录物 3 端的茎-环结构是否存在来控制。
- 6. d 克隆的 cDNA 表达蛋白质的能力是许多生物技术公司注意的焦点。

第 26 章 蛋白质合成

26.1 引言

蛋白质合成是细胞中消耗能量最多的过程,需要多达 90% 细胞所产生的 ATP。为了保证蛋白质合成的保真性,有许多控制质量的监控点,以产生高水平的精确度。本章将描述通过作为“连接物”的 tRNA 分子将信息从 mRNA 传递到蛋白质的一级氨基酸序列的过程,同时还要复习作为有效的核糖核蛋白机器的核糖体如何起作用,如何从 mRNA 的 5 端移动到 3 端。虽然有关蛋白质合成的基本机制已被阐明了将近 30 年,但近年的发现已证明早期的某些假定是错误的(例如,肽基转移酶不是蛋白质而是核酶)。此外,蛋白质合成的分子分析已证明分子生物学的一般法则确实有例外,其中 3 个例子是 mRNA 编辑、翻译移码和蛋白质剪接。

26.2 蛋白质合成概要

蛋白质合成中有两个步骤,信息的极性在其中很重要:第一个是 mRNA 的 5 和 3 的方向性之间的关系,以及蛋白质合成中 NH_3^+ 到 COO^- 末端的方向;第二步中利用 tRNA 作为连接物,信息的极性也是至关重要的。tRNA 有两极的功能,它需要把每一个氨基酸正确地连接到 mRNA 所编码的相应的位置上。

图 26.1 所示为 mRNA 合成和蛋白质翻译如何利用同一种极性的的大意。其次,和转录一样,翻译也分为 3 个明确的组分:起始、延伸和终止。

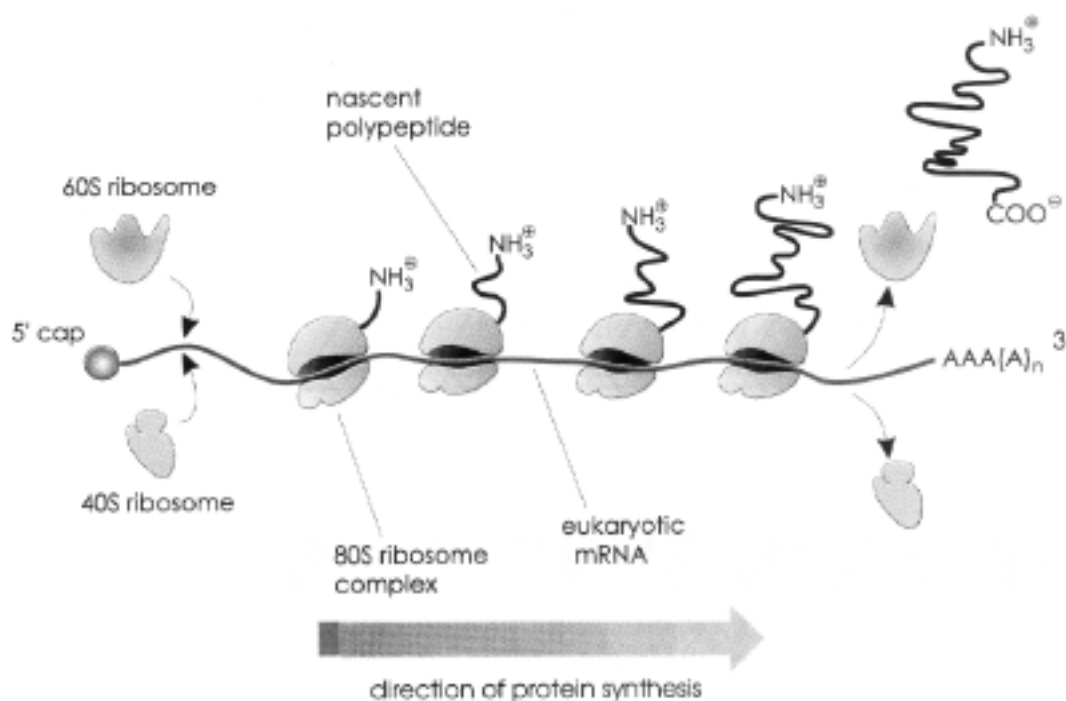


图 26.1 信息从 mRNA 流向蛋白质的概要

mRNA 和蛋白质序列的极性相同,它们都是由左向右合成的。

发现 DNA 的结构之后不久,Francis Crick 就提出假说,认为蛋白质合成应该需要一种连接物分子,如图 26.2 所示。后来发现 tRNA 就起连接物分子的作用,把 mRNA 中所贮存的信息

与多肽的一级序列联系起来。tRNA 的连接物功能是由碱基配对介导的,发生配对的是称为密码子的 mRNA 序列与称为反密码子的 tRNA 中的互补序列。mRNA 上的每一个密码子都会通过 tRNA 把一个氨基酸传送到生长中的肽链上。遗传密码一词指的就是 mRNA 密码子中的具体序列,它决定着哪一个具有互补的反密码子的 tRNA 分子被选中,因而也就决定着需要将哪种氨基酸放到最后的多肽链中的哪个位置上。

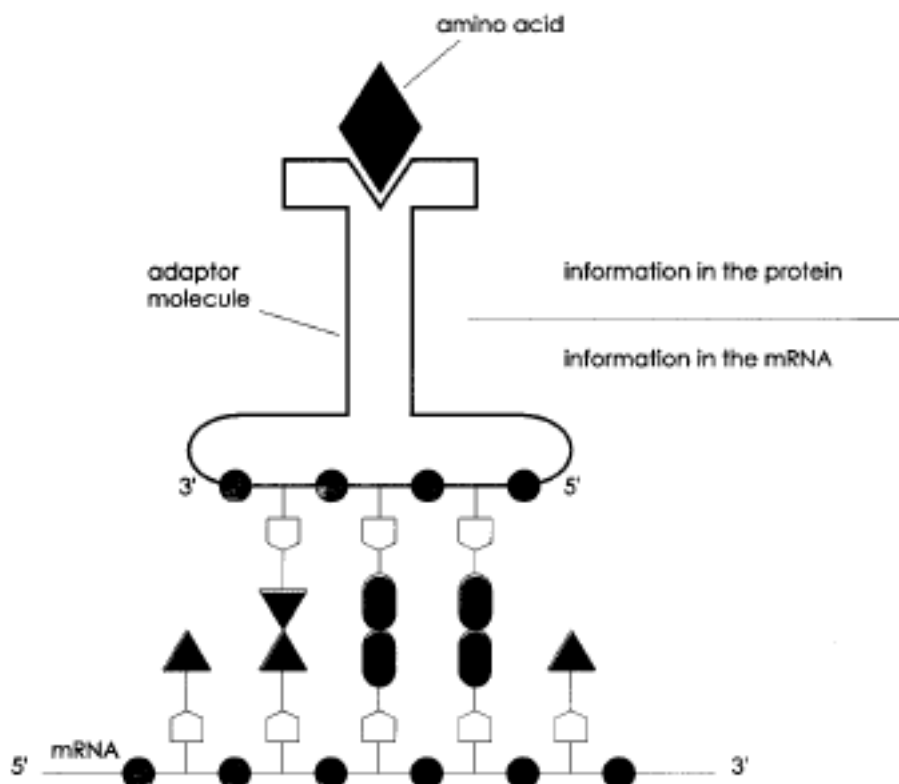


图 26.2 翻译需要一种连接物分子把 mRNA 和蛋白质中的一级序列信息相互沟通

除去 mRNA 和 tRNA 外,蛋白质合成所需要的第三大类 RNA 分子是 rRNA。rRNA 与多达 70 种的核糖体蛋白质一起,折叠成两个亚基的大分子复合体,称为核糖体(第 5 章)。在细菌中,当 mRNA 刚被合成时,就连接到核糖体上,从而把转录与翻译偶联起来。在真核生物中,蛋白质合成发生在细胞质中,或是细胞溶胶中的游离核糖体上,或是在结合在膜上而与内质网相伴的核糖体上。图 26.3 说明了原核生物与真核生物蛋白质合成的差别。

26.3 遗传密码以三联体为基础

简单的算术就说明,遗传密码不可能是二联体,因为细胞中的 RNA 只有 4 种碱基(A, G, C 和 U),而氨基酸却有 20 种(19 种氨基酸和 1 种亚氨基酸)。因此,在密码子中只用两种碱基,可能的组合数不够。例如,第一位有 4 种碱基,第二位也有 4 种碱基,只足以编码 16 种可能的氨基酸($4 \times 4 = 16$)。而以三联体为基础的密码就可编码 64 种可能的氨基酸($4 \times 4 \times 4 = 64$),不仅足够,而且有余。

20 世纪 60 年代初期,进行了三项不同的实验探讨来证明遗传密码是以 mRNA 中的三联体核糖核苷酸为基础的。图 26.4 说明的是每一项实验的一般概念。

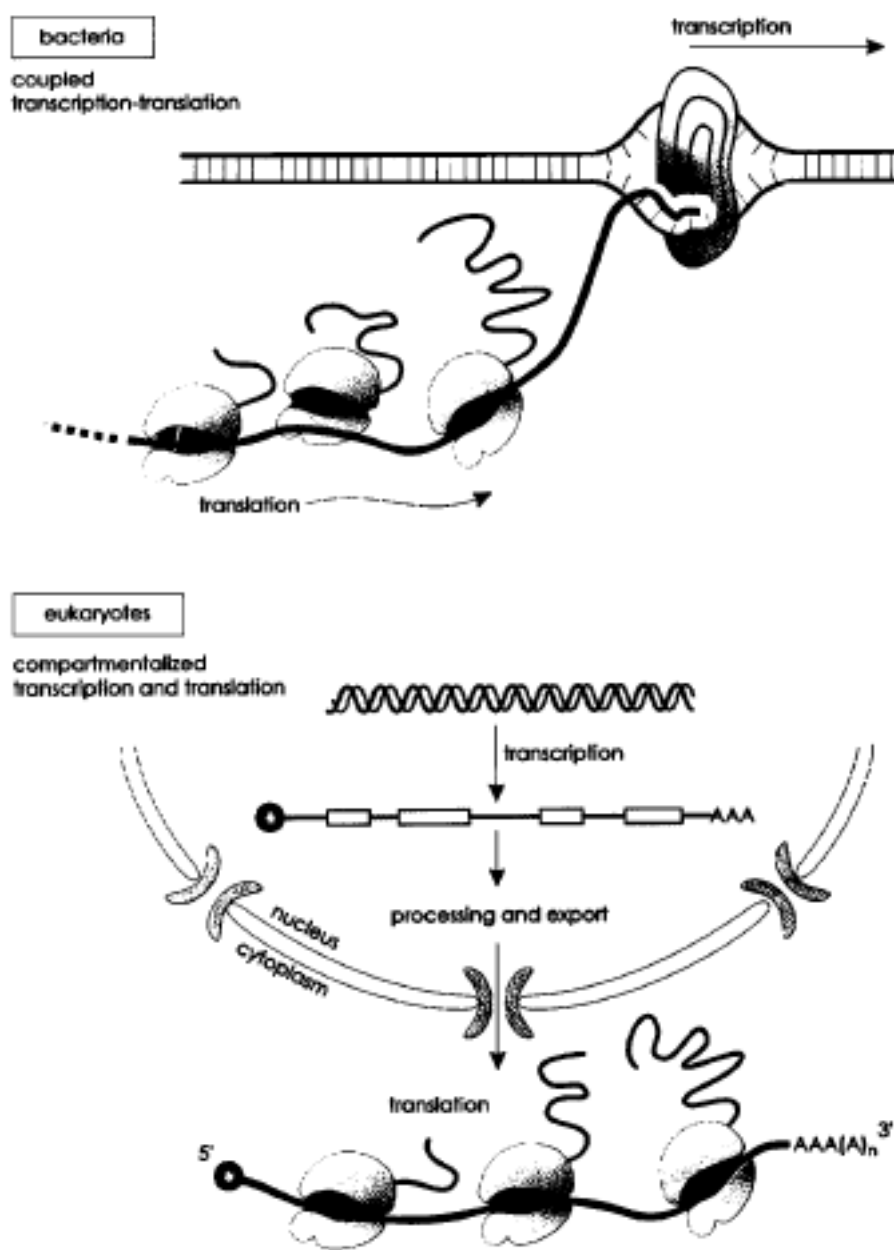


图 26.3(a) 细菌中转录和翻译相偶联

图 26.3(b) 真核生物中转录和翻译这两个过程是区室化的

第一项实验是合成 RNA 的同聚体并利用大肠杆菌的蛋白质提取物和 GTP 以此同聚体为模板进行体外的蛋白质合成。结果发现, poly(U) 产生 poly(Phe) 的合成, poly(A) 编码 poly(Lys), 而 poly(C) 则编码 poly(Pro) (图 26.4a)。将各种核糖核苷酸混合到一起, 就可能合成随机的杂聚体, 它会指导掺入了一种以上氨基酸的多肽的合成。

第二项实验是合成序列已知的核糖核苷酸的三聚体, 并与大肠杆菌的核糖体和氨酰 tRNA 共同温育。已知实验所用的三核苷酸的序列, 又能鉴定哪种氨基酸连在 tRNA 上, 就可能鉴定出 50 种三核苷酸, 它们相当于 20 种所有的氨基酸(图 26.4b)。这是首次得到的有说服力的证据, 说明可能用多个密码子来编码同一种氨基酸。

第三种探讨方法是用重复的核糖核苷酸聚合体进行实验, 其重复序列是已知的(图 26.4c)。当用这些聚合体为模板进行体外的蛋白质合成时, 发现每一种核糖核苷酸聚合体能编码多达三种不同的重复的多肽产物。在 64 种可能的密码子中, 发现有 61 种是编码氨基酸的, 后来其余 3 种是终止密码子。图 26.5 为大肠杆菌中蛋白质合成的遗传密码, 它很大程度上也适用于哺乳动物细胞中 mRNA 的翻译。注意, 只有甲硫氨酸和色氨酸是只由一个密码子

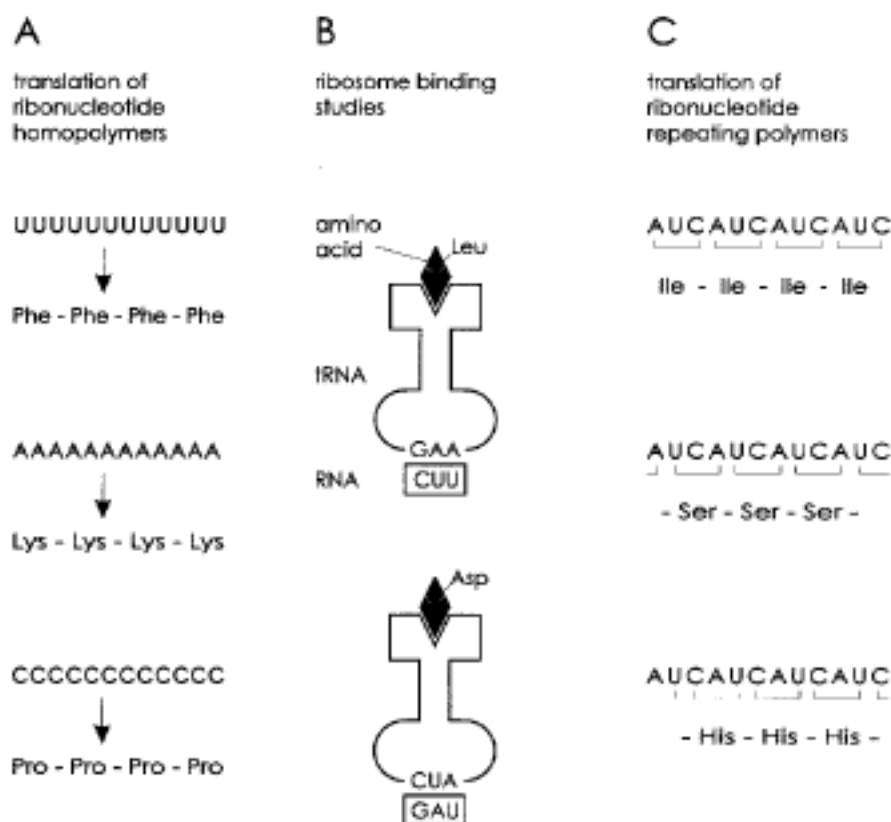


图 26.4 三种用以示证遗传密码是以三联体为基础的实验

编码的, 而几乎所有其他氨基酸都有 2 ~4 个密码子(亮氨酸和丝氨酸除外, 它们由 6 个密码子编码)。甲硫氨酸是实际上所有蛋白质中的第一个氨基酸; 不过甲硫氨酸残基也存在于多肽序列之内。氨基末端的甲硫氨酸称为起始甲硫氨酸。

		second nucleotide							
		U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	stop	UGA	stop	
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	stop	UGG	Trp	
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	

图 26.5 遗传密码表, 有 61 个氨基酸的密码子和 3 个终止密码子(stop) 密码子 AUG 编码甲硫氨酸(Met), 常称为起始密码子。

26.4 密码子-反密码子配对中的摆动位置

Francis Crick 仔细研究了遗传密码后发现,三联体密码子中的第三个碱基比前两个的变动性大。例如,脯氨酸的 4 个密码子都以两个胞核苷酸开头,但最后一个可能是 U、C、A 或 G (CCU, CCC, CCA 或 CCG)。此外, tRNA 的反密码子中常有肌苷酸(由腺嘌呤的脱氨作用产生),它与 mRNA 中密码子的第三个碱基配对。肌苷能与 U、C 或 A 形成氢键。根据这些观察, Crick 提出了摆动假说,即密码子的前两个位置严格遵循 Watson-Crick 的碱基配对规则(G-C 和 A-U),但第三个位置则能形成非常规的碱基配对,假若 tRNA 的相应反密码子位置上是 I、G 或 U 的话。图 26.6 示出了摆动假说的根据。

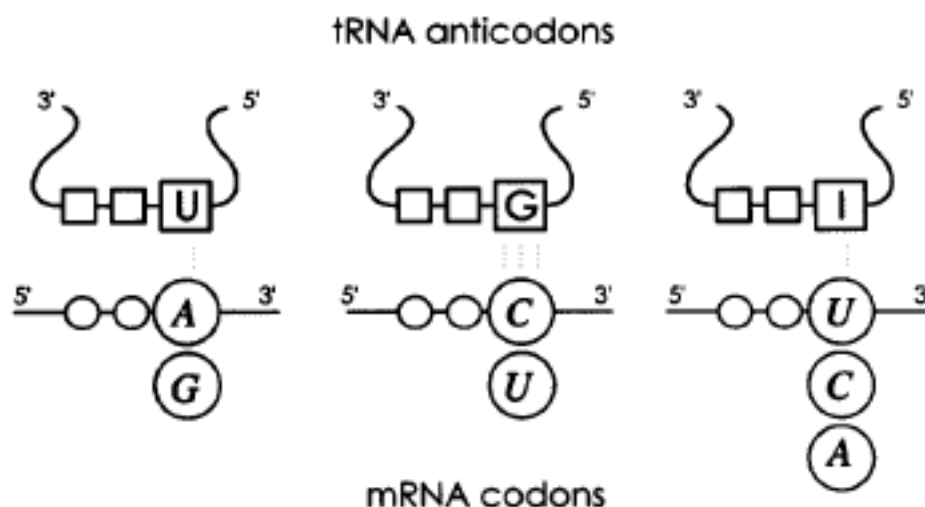


图 26.6 摆动假说原理示意

当 tRNA 反密码子(5 到 3)中第一位是 U、G 或 I 时的各种密码子/反密码子的碱基配对。

使摆动假说的原理形成概念的最佳方法就是研究 tRNA 的反密码子,因为它表明一种 tRNA 可以识别一个以上的 mRNA 密码子。tRNA 反密码子的第一个碱基相当于 mRNA 密码子的最后一个碱基,这个碱基称为摆动位置或变偶位置。例如,反密码子的 5 位上为肌苷酸的 tRNA,其易变性最大,可以与多达 3 种不同的密码子结合(图 26.6)。利用核糖体结合试法(图 26.4b),可以用实验方法确证摆动假说。注意,根据摆动假说,只要 32 种 tRNA 就足以翻译 61 种密码子。已发现多数遗传系统中的 tRNA 种类比 32 这最低数多,但通常少于 61 种。

26.5 根据 cDNA 序列预测可读框

正如一个句子以大写字母表示第一个字,以句点表示句子的终结一样,遗传密码也规定蛋白质序列应从何处开始,在何处终止。这是重要的,因为在三联体密码中,能够利用的可能的可读框有 3 种,视 tRNA 连接的位置而定。图 26.7a 表明在连续的一连串三联体中,只有一个可读框是以甲硫氨酸密码子开始而且中间没有被 3 个终止密码子(UAA, UAG, UGA)中的任何一个所打断。

利用遗传密码,根据克隆的 cDNA 序列,就可能推知一种可能的蛋白质的氨基酸序列。如图 26.7b 所示,计算机的演算能迅速扫描一个 2000 核苷酸的 cDNA 序列并确定可读框,可读框应以 AUG 密码子开始,而以 3 个终止密码子中的任何一个终结。因为大多数蛋白质通常为 15 kDa 或较大,而终止密码子出现的机会(3/64)大约是每隔 20 个密码子一次,所以克隆的 cDNA 序列中的可读框通常为 100 个密码子或更多。注意寻找甲硫氨酸残基并不是寻找真正

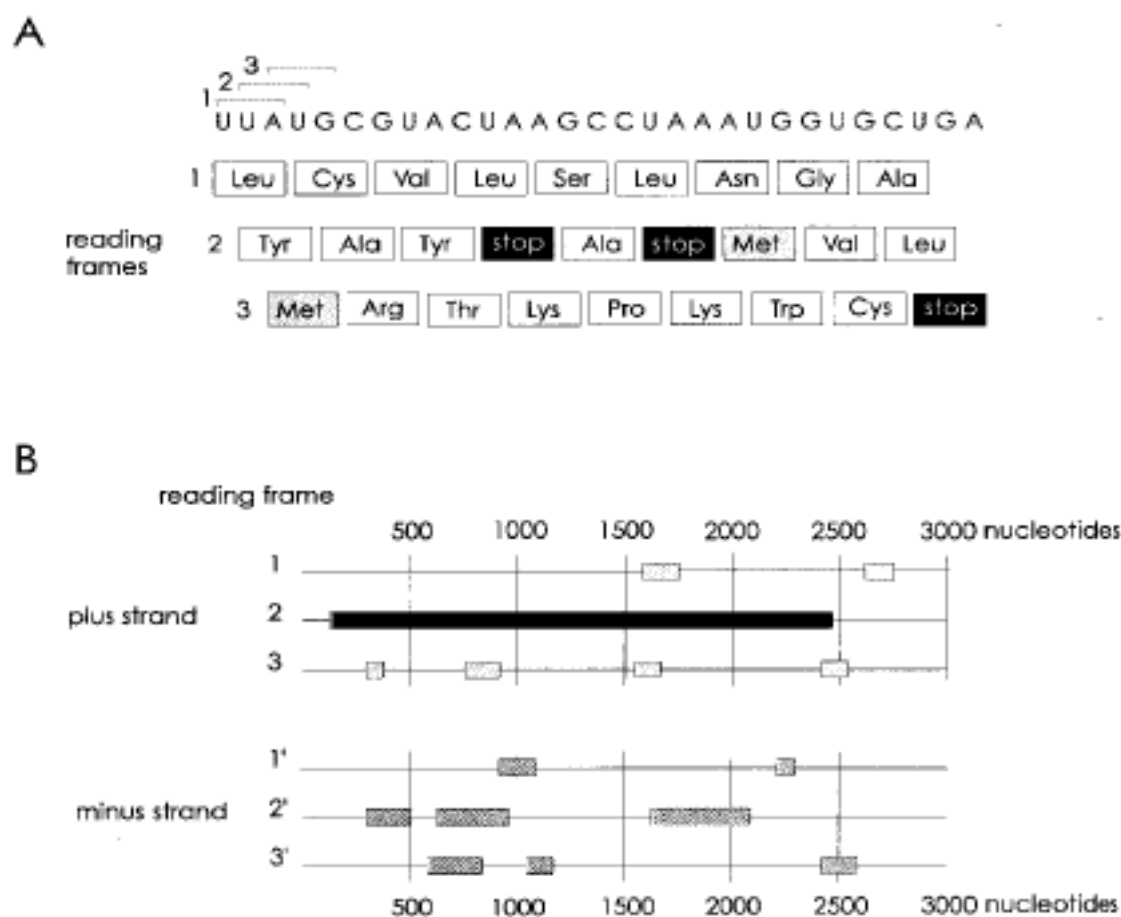


图 26.7 根据遗传密码,因密码子的记录而定,可以有 3 种可读框

(a) 把一个核苷酸序列破译为 3 种可能的可读框,可以看出只有可读框 3 编码一种蛋白质,因为它始于甲硫氨酸而终于终止密码子。(b) cDNA 序列的计算机分析是确定可能的可读框的简易方法。在此例中,人的糖皮质激素受体的编码序列中,只有 cRNA 正链中的可读框 2 中有一适当的甲硫氨酸和终止密码子能编码一 85 kDa 左右的蛋白质(777 个氨基酸)。

的起始甲硫氨酸密码子的可靠方法,因为多数蛋白质在编码序列之内也有甲硫氨酸。

26.6 分子生物学中心法则的例外

直到最近,真核生物中偏离遗传密码的情况仅发现于线粒体和叶绿体中,其中有些密码是不同的,摆动位置的变化甚至更大(线粒体只用 24 种 tRNA 翻译 13 种线粒中的蛋白质)。不过有 3 种现象,即翻译移码、RNA 编辑和蛋白质剪接,提醒我们自然界是充满意料不到的事情的。

翻译移码的一个例子是逆转录病毒的两种蛋白质 gag 和 pol(见第 30 章)的合成。在大部分时间内,单个的逆转录病毒的转录物被翻译产生 gag 蛋白,它终止于 UAG 密码子,编码它的可读框与 pol 蛋白的编码序列只差一位。可是,在约 5% 的时间内,核糖体恰好在 gag 的 UAG 终止密码子之前停止工作,然后又在 -1 的可读框上恢复翻译工作,于是产生一种 gag-pol 的融合蛋白。然后这种融合蛋白被内蛋白酶切开,释放有活性的逆转录酶。因为病毒的包装所需要的 gag 蛋白比病毒的复制所需要的聚合酶多,这种偶然的翻译移码是调节每一种蛋白质的相对水平的一种方法,可以最有效地利用编码的信息。

RNA 编辑一词是指翻译之前 mRNA 序列中转录后的变化。在锥虫的线粒体 mRNA 中,细胞色素氧化酶的亚基的 mRNA 中会插入或删除 U 残基,其机制与一种向导 RNA 有关。这是由比较线粒体基因组中的该基因的序列与克隆的细胞色素氧化酶亚基的 cDNA 序列而得知的。另一类型的 RNA 编辑发生于脱辅基脂蛋白 B 的 mRNA 的细胞专一的碱基修饰中。

在肠中,位点专一的胞苷脱氨酶把谷酰胺的密码子 CAA 变成了终止密码子 UAA。这种蛋白质的全长的肝中的形式(Apo B100)与截短的肠中的形式(Apo B48)有明显不同的功能特性。

分子生物学中心法则的第三个例外是称为蛋白质剪接的过程。在此过程中,多肽内部的称为 intein 的一段,被肽切割反应除去,产生了有分支的中间产物。然后与 intein 交界的多肽链又通过新的肽键再共价连接上去。蛋白质剪接的首次报道的例子来自于对酵母 ATP 酶基因的分析,其预测的可读框比 69 kDa 的 ATP 酶大 50 kDa。后来发现,先合成的是 119 kDa 的前体蛋白质,然后发生了蛋白质剪接,产生了有活性的 ATP 酶。

26.7 tRNA 是蛋白质合成中的分子连接物

氨酰 tRNA 合成酶将氨基连接在 tRNA 上称为 tRNA 装载。没有活化的氨基酸的 tRNA 会被翻译机构抛弃,因被认为是“无荷载的”。研究带有氨基酸的 tRNA 的结构后,得出了几条反复出现的主题:

- (1) 反密码子和氨基酸在位置上是分开的,可看做是在倒写的“L”的两端。
- (2) tRNA 中的许多碱基都是转录后修饰的,有些修饰在所有 tRNA 中都是一样的,而其他修饰则为每种 tRNA 所专有。
- (3) 结构的数据表明,有 4 种 RNA-RNA 链内螺旋,这是由标准的(G-C, A-U)和不标准的(G-U)碱基配对形成的。

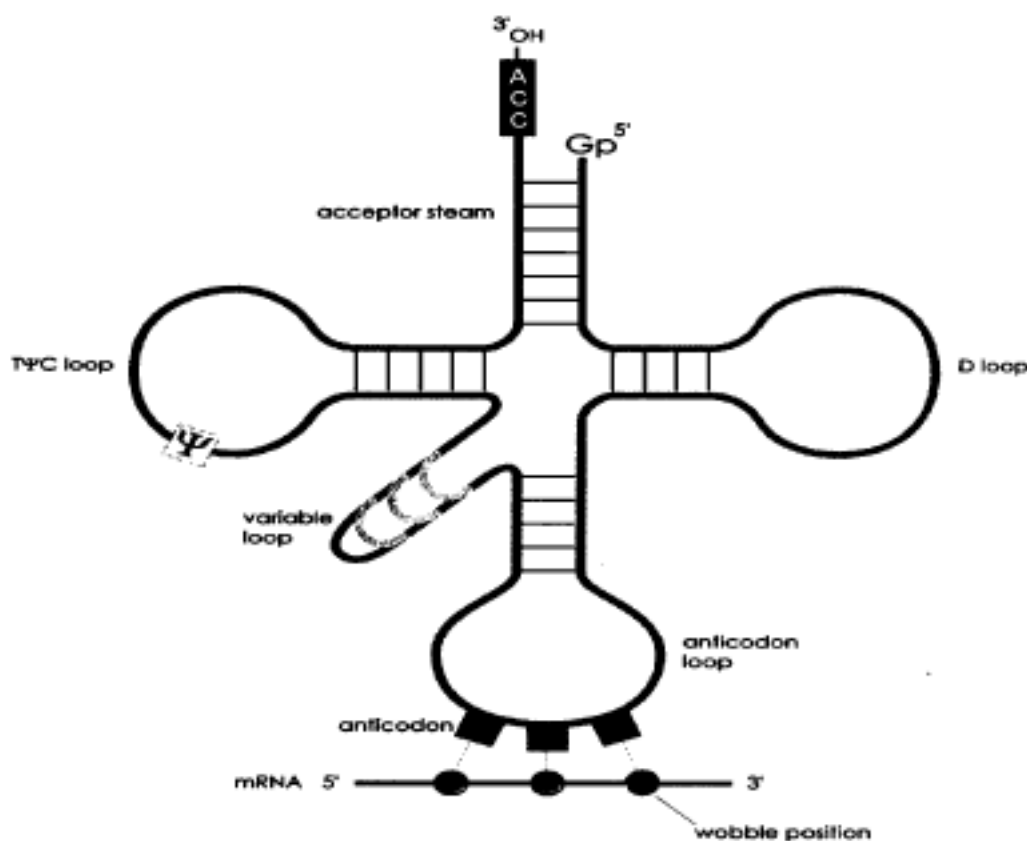


图 26.8 原型 tRNA 二维三叶草构型示意图

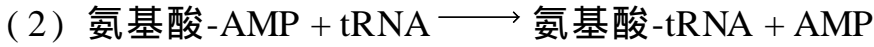
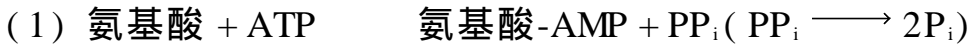
多数 tRNA 长 74 ~95 个核苷酸,差别在于可变环中核苷酸的数目。T C 环因其中有不会改变的假尿苷()而得名,D 环则以其中有几个二氢尿嘧啶而得名。

图 26.8 所示为典型 tRNA 的二维“三叶草”构型(还应参看第 2 章 tRNA 的三级结构)。根据对许多种 tRNA 的鉴定,很清楚的是,反密码子序列(碱基被修饰)和 tRNA 分子主链中的核苷酸(也被修饰)就足以使各种 tRNA 彼此区别开,而从总体来说又不影响其总的结构。注意 3 端有一 CCA 序列,而氨基酸连在腺嘌呤残基上。如第 25 章所述,假若这一末端的 CCA

序列不在 tRNA 序列中, tRNA-核苷酸转移酶就会在转录后将它加上去。

26.8 专一的氨酰-tRNA 合成酶将氨基酸连接到 tRNA 上

有 20 种不同的氨酰-tRNA 合成酶, 它们将氨基酸共价连接到正确的 tRNA 上。我们将用 $tRNA^{AA}$ 表示各种 tRNA, 而用 $AA-tRNA^{AA}$ 表示荷载有氨基酸的 tRNA。荷载必定是一个非常精确的系统, 因为所测得的误差率(tRNA 荷载上错误的氨基酸) 小于 10^{-4} 。氨酰-tRNA 合成酶是双功能的酶, 它们能区分 20 种氨基酸并能与细胞中的 tRNA 完全互补。已鉴定出大肠杆菌中的 20 种氨酰-tRNA 合成酶(每种氨基酸一种酶), 这说明同一种酶必须能识别相关的 tRNA, 例如 6 种可能的 $tRNA^{Leu}$ 。tRNA 的氨酰化需要一两步的反应:



第一个反应的产物氨基酸-AMP, 一直结合在酶上, 直到第二个反应完成为止。这一反应在生理上是不可逆的, 水解的标准自由能 = - 29 kJ/mol, 这是由于两个高能磷酸键的水解。

图 26.9 更详细地说明了这两个反应。第一步, 氨基酸的羧基通过与 ATP 的 γ -磷酸形成

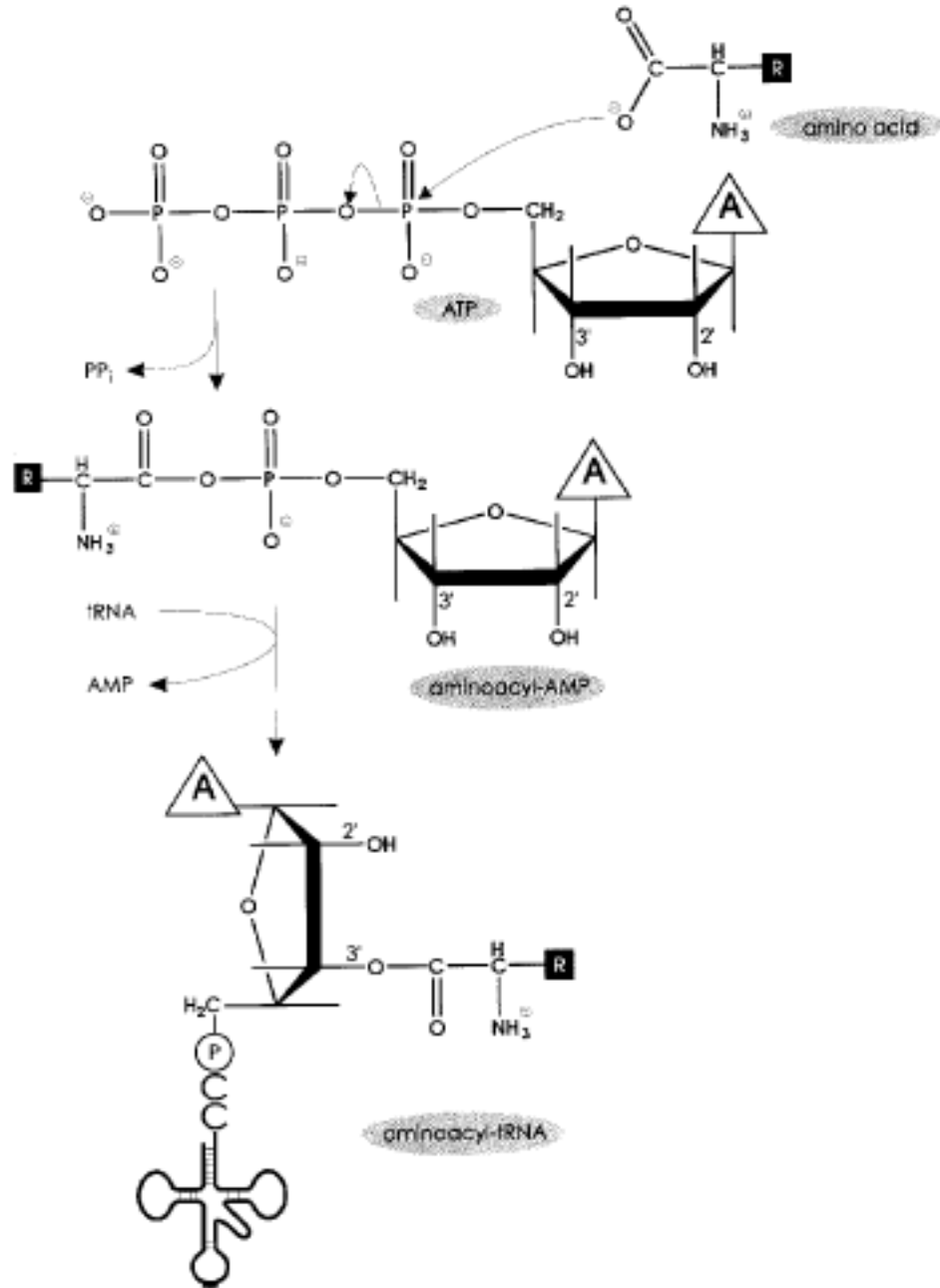


图 26.9 氨酰 tRNA 合成酶催化的 tRNA 氨酰化的两步反应

酸酐键并取代焦磷酸。氨酰腺苷酸一直停留在酶的活性部位上,然后被用于第二个反应,将氨酰基转移给前来的 tRNA 中腺苷酸残基的 2 或 3 OH(因氨基酸而定)。

因为在蛋白质合成的延伸反应中没有“校对”步骤,所以 tRNA 的荷载反应没有误差是至关重要的。氨酰-tRNA 合成酶有两种基本方法,以监控 tRNA 荷载反应是否正确。第一种机制要求正确的 tRNA 对 tRNA 结合位点有足够强的亲和性,使得酶中发生构象变化以促进氨酰化作用(图 26.9 中的第二步反应)。近年来对于 tRNA 的分子遗传学分析已有助于确定对这种结合的专一性和亲和性至关重要的 tRNA 的碱基。这一组规则现在称为第二种遗传密码,因为它们决定于 tRNA 主链中专一碱基的序列,这对于 tRNA 与酶的相互作用是极为重要的。对于大肠杆菌的全部 20 种氨酰-tRNA 合成酶的体外和体内的研究已证明,要达到完全的识别,需要 tRNA 上的至少两个独立的区域。对于多数氨酰-tRNA 合成酶,这意味着反密码子和受体茎中的序列都是正确识别所需要的。正如底物或配体识别的许多例子一样,有多个独立的接触点可保证最高水平的专一性。

消除错误的第二种机制在区分氨基酸的水平上。或是在第一步之后、第二步之前,水解氨酰腺苷酸化合物而除去错误的氨基酸,或是当错误的氨酰-tRNA 形成之后立即发生水解作用而除去错误的氨基酸。

26.9 多肽合成的三个阶段

算上荷载每个 tRNA 时水解的 2 个磷酸键,加上延伸的每个循环所需要的两个磷酸的水解步骤($2\text{GTP} \longrightarrow 2\text{GDP} + 2\text{P}_i$ 的水解),蛋白质合成中每形成 1 个肽键最低的净能量消耗是 -101 kJ/mol。

本节将描述蛋白质合成的 3 个基本阶段,即起始、延伸和终止。原核生物与真核生物的这三个阶段都很相似,只有两点不同:即已鉴定出真核生物的蛋白质合成需要更多的蛋白质因子;转录和翻译在原核生物中是在部位上联系在一起,而在真核生物中则不然。注意,在示意图中反应好像是一个穿越 mRNA 的核糖体上进行的,但实际上如图 26.3 所示,翻译是在多个核糖上进行的。

(一) 起始

翻译的第 1 步是起始复合物的组装。在细菌中,这一过程共分 3 步,包括起始因子 IF-1、IF-2 和 IF-3、30S 和 50S 核糖体亚基和 GTP 的水解。如图 26.10 所示,第一步是前起始复合体的形成,此复合体由 IF-1、IF-2、IF-3 和 30S 核糖体亚基组成。前起始复合体以高亲和力与 mRNA 转录物上的翻译起始位点相结合,该位点靠近 5 端并包括可读框的第 1 个密码子。这一密码子称为起始密码子,通常是 AUG,在遗传密码中(图 26.6),它是编码甲硫氨酸的。

第 2 步,由适当的荷载有氨基酸的 tRNA 和结合有 GTP 的 IF-2 组成的复合体通过 tRNA 反密码子与 mRNA 的密码子的配对而一起形成起始复合物。用于细菌中蛋白质合成的第 1 个 tRNA 是起始子 $\text{fMet-tRNA}^{\text{fMet}}$ ($\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ 的氨酰化产物)。这种特殊的起始 tRNA 将在下一节中描述。

第 3 步是 GTP 水解为 GDP; IF-1, IF-2 和 IF-3 解离;大的 50S 核糖体亚基结合上去形成起作用的起始复合体。

这 3 个步骤概括于图 26.10 中:称为 Shine-Dalgarno 序列的富于嘌呤的序列在多数细菌

的 mRNA 中集中在 AUG 上游约 10 个核苷酸处。已发现细菌的 16S rRNA 的 3 端有一段与 Shine-Dalgarno 序列发生碱基配对的互补序列,此序列会把 30S 亚基安放在与 AUG 密码子相关的位置上。真核生物中核糖体的安放较难预测,但是有两条一般的规则可用于鉴定最可能的真核生物的 AUG 起始密码子:(i) 它常是核糖体与 mRNA 的 5 帽结合并向 3 方向“筛选”时首次遇到的 AUG,(ii) 起始子 AUG 最合适的背景是由共有序列 GCCPuCCAUGG 决定的。

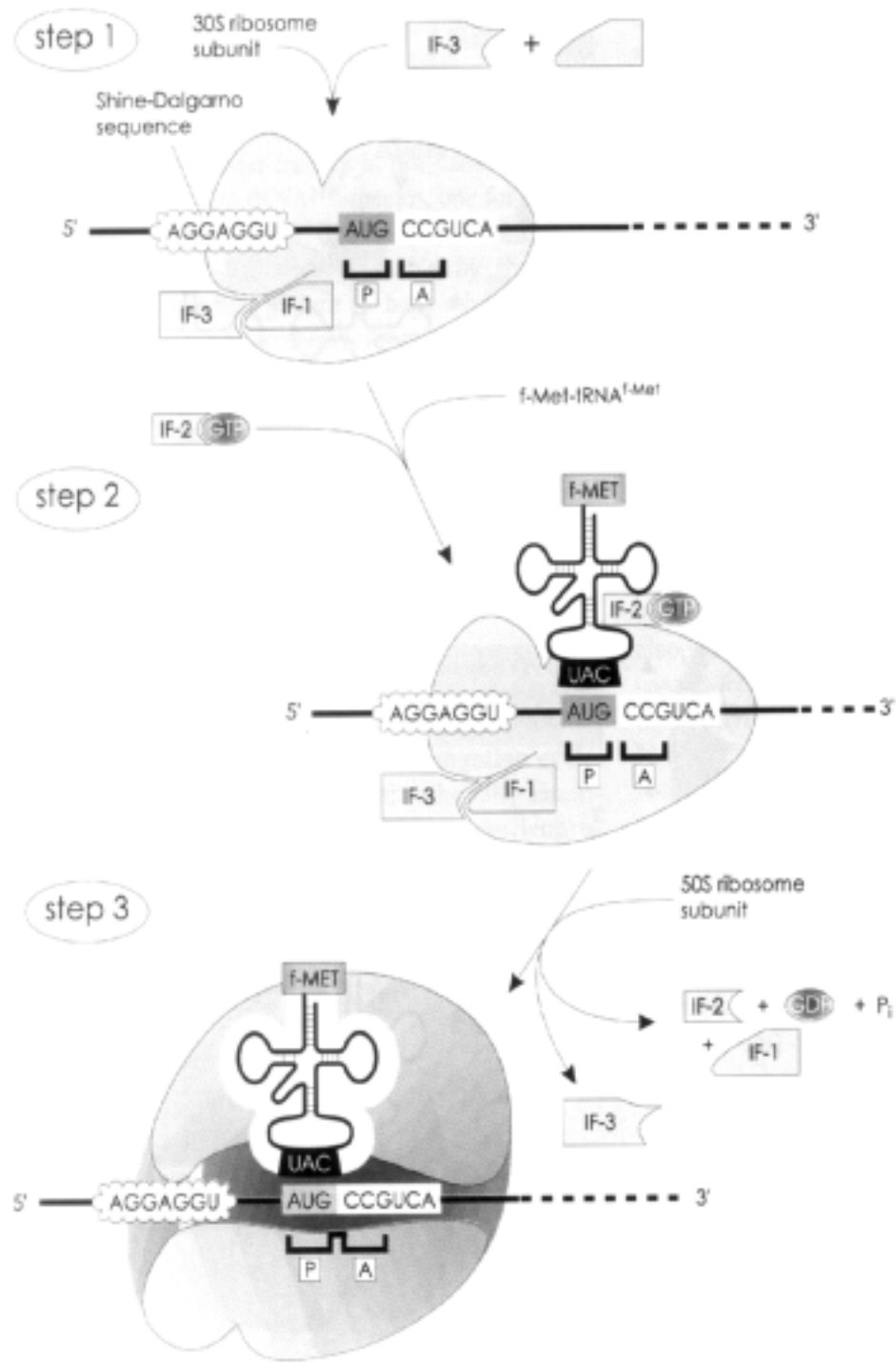


图 26.10 在细菌中,翻译前起始复合物的形成等 3 个步骤示意

首先是核糖体与 mRNA 中的一段序列的相互作用,此序列名为 Shine-Dalgarno 序列,在 AUG 上游(5')。富于嘌呤的此序列(AGGAGG)与 16S rRNA 的一部分互补。第 1 步包括 IF-1 和 IF-3 与 30S 核糖体亚基的相互作用,形成一复合体,其位置正好在起始密码子(AUG)上。加入 IF-2, GTP 和 f-Met-tRNA^{f-Met} 的结果是形成第 2 步中的前起始复合体。第 3 步中, GTP 的水解和 IF-2 及 IF-1 的释放使得 50S 核糖体亚基结合上去,于是起始复合体组装完毕。图中也示意出了 P、A 位点(详见上文)。

用于形成起始复合体的氨酰-tRNA 有什么特别之处吗? 用细菌进行的研究已证明起始的 Met-tRNA^{Met} 与在延伸过程中将甲硫氨酸残基插入的 Met-tRNA^{Met} 之间有差别。大肠杆菌中有两种 tRNA^{Met} 分子,一种用于起始的甲硫氨酸,一种用于插入的甲硫氨酸。起始的 tRNA 称为

tRNA^{fMet}, 它首先与甲硫氨酸结合, 然后 tRNA^{fMet} 甲基转移酶就会识别这种氨酰-tRNA, 利用 10-甲酰四氢叶酸将甲硫氨酸的氨基甲酰化。

这一甲酰化反应的产物, fMet-tRNA^{fMet}, 与 Met-tRNA^{Met} 不同, 只能用于形成起始复合体。在细菌中, 甲酰基(有时是整个 fMet), 会在翻译后从蛋白质的氨基端被除去。在真核生物中不用 fMet 部分; 不过也有两种不同的 tRNA^{Met}, 一种用于起始的甲硫氨酸, 一种用于内部的甲硫氨酸。这两种 tRNA 的区别在于其核苷酸序列和碱基修饰的模式。有趣的是, 线粒体和叶绿体中的蛋白质合成需要一种细胞器编码的 tRNA^{fMet} 作为起始的 tRNA, 这支持了真核生物的细胞器与细菌可能有进化关系的看法。

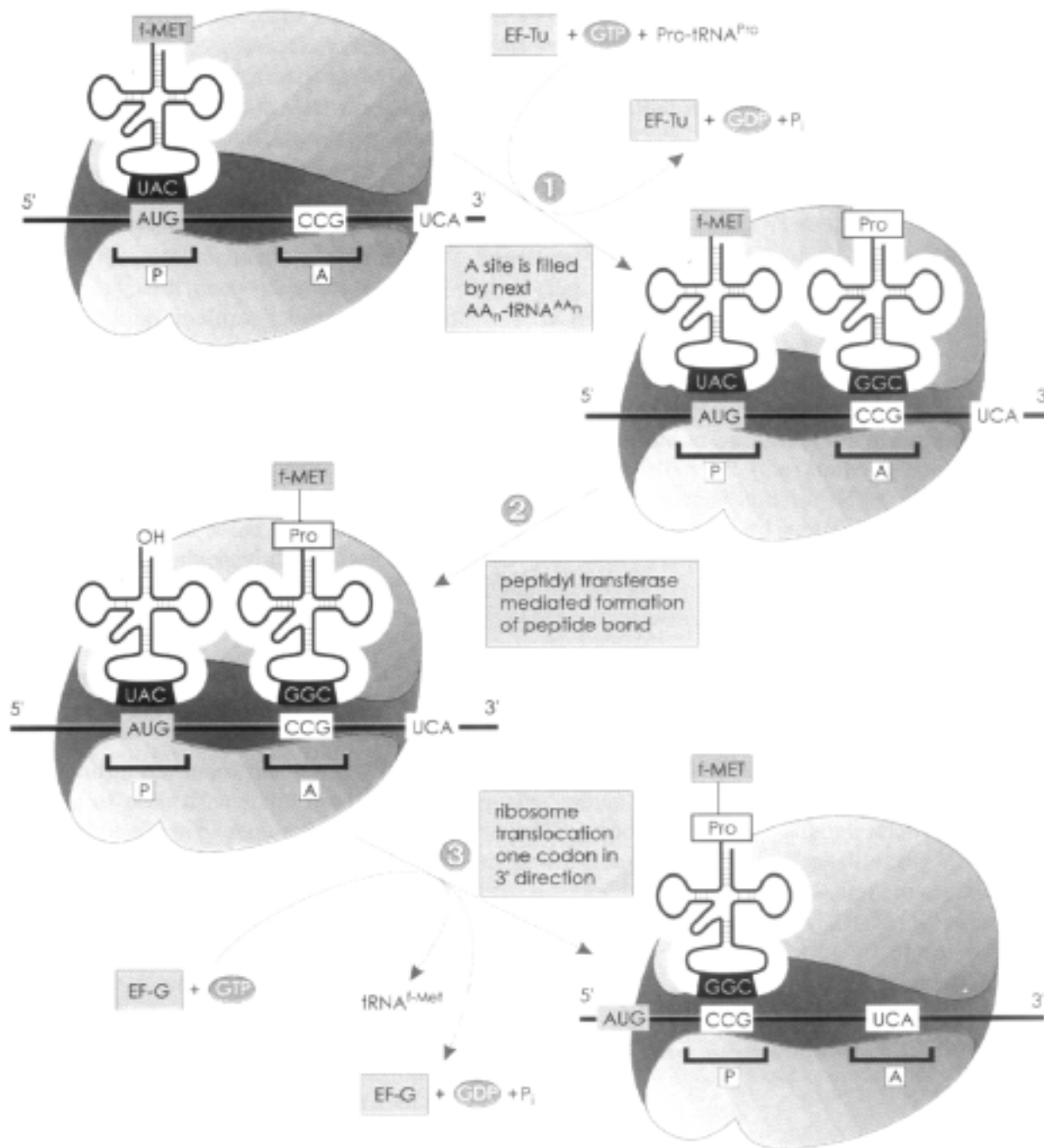


图 26.11 细菌中蛋白质合成的延伸反应需要 3 个步骤

第 1 步是氨酰-tRNA 进入核糖体的 A 位点, 此反应需要 GTP 的水解和延伸因子 EF-Tu; 第 2 步是新来的氨基酸的氨基攻击 P 位点中的氨基酸的羰基, 此反应由肽基转移核酶催化, 50S 亚基中的 23S RNA 编码此核酶; 第 3 步是 GTP-催化的 70S 核糖体在密码子上沿 3 方向的移位[这一步需要延伸因子 EF-G, 结果是 A 位点出现空位, 可以接受下一个氨酰-tRNA。若将 tRNA 的出口 (E 位点) 画在图内, 其位置应在 P 位点的左侧]。

(二) 延伸

蛋白质合成的延伸阶段中每加上一个氨基酸都需要 3 个关键步骤。因为每形成一个肽键, 这些步骤就要重复一次, 所以常称之为延伸循环。延伸中的核心问题是组装完毕的核糖体复合体起着核糖核蛋白机器的作用, 它沿着 5 到 3 的方向迅速在 mRNA 上移动。在这个复合体的中央, 有两个结合位点, 它们以两个三联体密码子排成一列, 如图 26.11 所示。这两个位点称为 P 和 A 位点, P 是肽基(或多肽)结合处, A 是氨酰基(或受体)结合处。还有第 3 个位点称为 E 位点, 是 tRNA 的出口处, 也是核糖体中一个起作用的组分, 但为简明起见, 图中未示出。形成起始复合体之后, 起始的 $fMet-tRNA^{fMet}$ 就通过与 AUG 密码子 1 (codon₁) 的碱基配对而被安放在 P 位点上。

在延伸的第 1 步中, A 位点为适当的氨酰-tRNA 所占据, 哪种氨酰-tRNA 则由密码子 2 (codon₂) 规定, 此反应需要延伸因子 EF-Tu 和 GTP。一旦氨酰-tRNA 被正确地安放在 A 位点上并与密码子 2 发生了碱基配对, GTP 就被水解, 而 EF-Tu-GDP 复合体就被释放。

延伸的第 2 步中, A 位点中的氨基酸的 α -氨基 (AA₂) 起着亲核物质的作用, 攻击 AA₁ (在此情况下是 $fMet$) 的羰基。这一反应导致 A 位点中二肽基-tRNA 的形成和 P 位点中脱酰基的 tRNA^{fMet} 的形成(图 26.12)。1992 年 Harry Noller 已证明, 这一肽基转移酶的反应是由 50S 核糖体亚基中的 23S rRNA(真核生物中则为 60S 核糖体亚基中的 28S rRNA) 的核酶活性所催化的, 而不是像原来所设想的是由核糖体中的蛋白质所催化的。

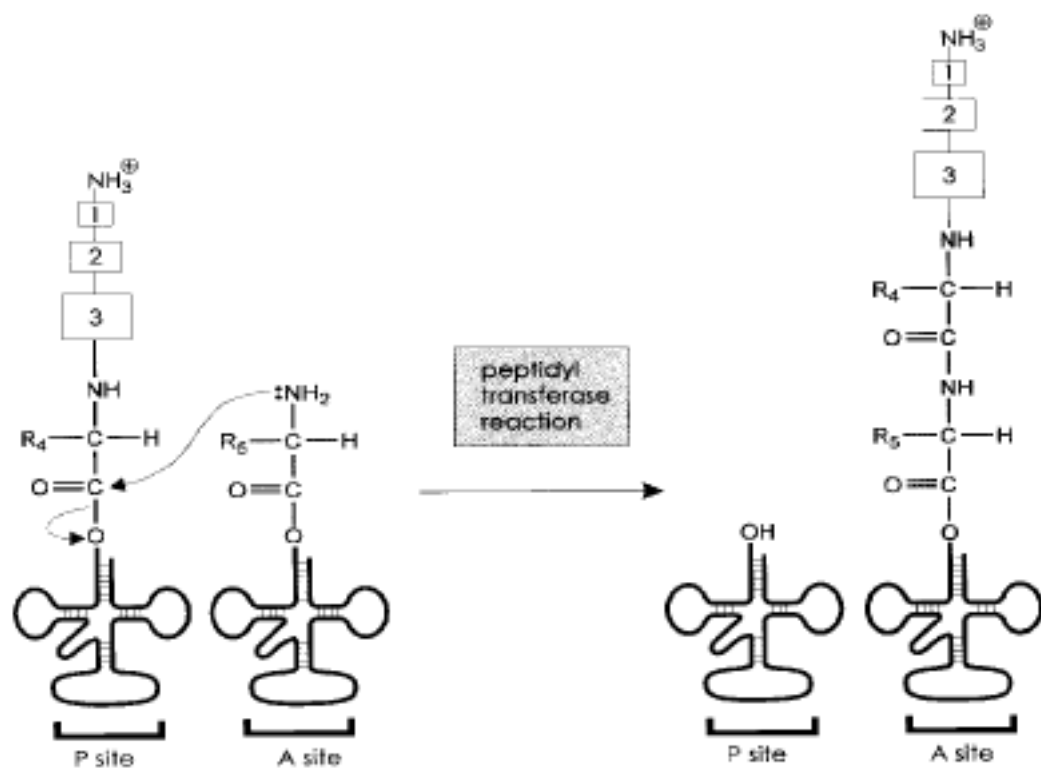


图 26.12 蛋白质合成的延伸阶段中的肽基转移反应

延伸的最后一步是核糖体沿 3 的方向移动一个密码子的距离。这一步需要另一个 GTP 的水解, 其结果是 A 位点移到密码子 3 (codon₃) 的位置上。二肽基-tRNA 仍然结合在 mRNA 的密码子 2 (codon₂) 上, 但因为核糖体已经移位, 这 tRNA 现在就在 P 位点上了。这一移位过程也给下一个氨酰-tRNA 创造了一个空的 A 位点, 而 E 位点(图 26.11 中未画出) 现在则为脱酰基的 tRNA 所占据。细菌中核糖体的移位需要延伸因子 EF-G, 推想 GTP 的水解使核糖体中发生构象的变化, 有利于移位的步骤。每向延伸中的肽链上加一个氨基酸, 这一系列的 3 个步

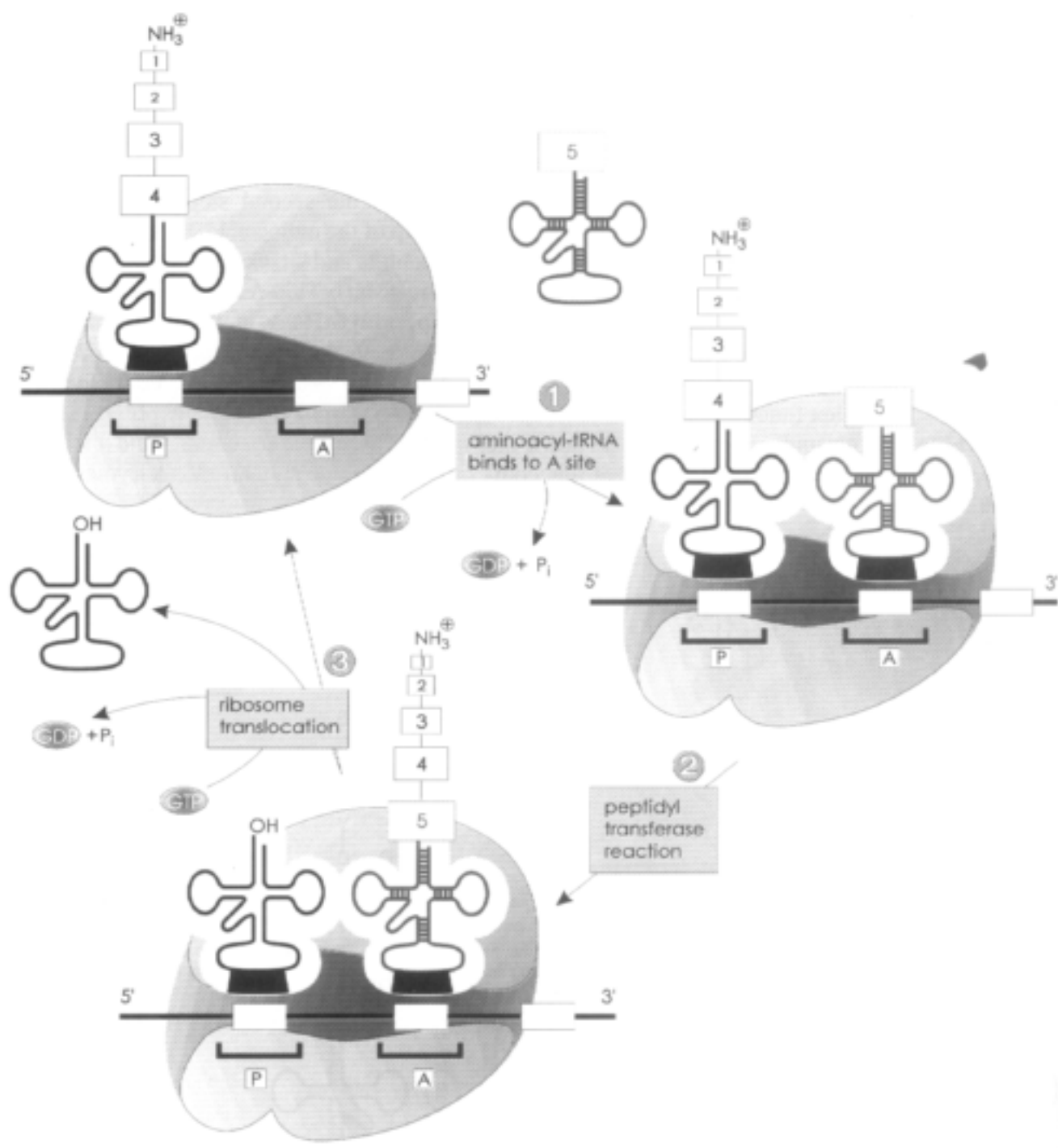


图 26.13 延伸循环中每加一个氨基酸就需要水解 2 个 GTP

只要 A 位点上有氨酰 tRNA 能起到肽基转移酶反应的受体的作用, 这一循环就会继续下去。

骤就重复一次(图 26.13)。

(三) 终止

蛋白质合成的最后阶段是多肽链延伸的终止。当 3 个终止密码子(UAA, UAG, UGA)中的一个到达 A 位点时就发生终止。通常并没有一种 tRNA 具有一个与终止信号配对的反密码子, 所以 A 位点是空的。在这种情况下, 终止因子结合在 A 位点上, 引起肽基转移酶的反应, 将生长中的链加到水分子上, 从而促进链的终止。如图 26.14 所示, 细菌有 3 种释放因子, RF-1、RF-2 和 RF-3。RF-1 识别终止密码子 UAA 和 UAG, 而 RF-2 识别 UAA 和 UGA。RF-3 是与 GTP 结合的蛋白质, 这是当终止密码子存在时, 促进 RF-1 和 RF-2 结合到 A 位点上所需要的。惟一已知的真核生物中的释放因子是 eRF, 它是使 GTP 水解的蛋白质, 它好像起着 RF-1、RF-2 和 RF-3 综合在一起的同样作用。

至少有两种情况是即使终止密码子已在 A 位点时, 反应仍不终止。这一过程会产生翻译

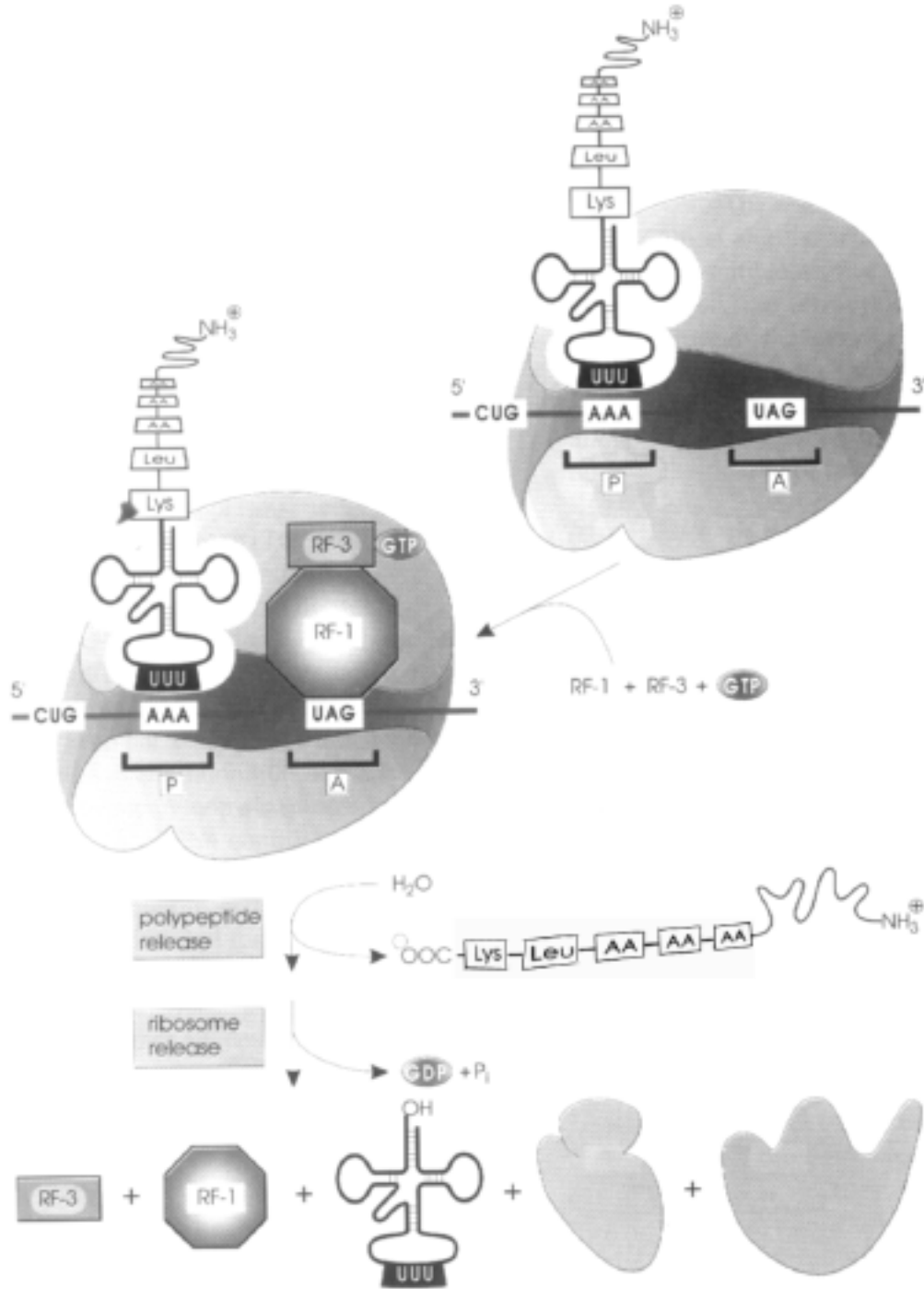


图 26.14 细菌中翻译的终止

在受到 RF-3-GTP 的促进之后, RF-1 和 RF-2 结合在 A 位点上; RF-3-GTP 这种蛋白质复合物使肽基转移酶将多肽链加到水上, 结果是链的终止和释放; 随后 RF-3 使 GTP 裂解, 于是 70S 核糖体从 mRNA 上解离下来。

连读。第一种是翻译移码, 前已述及, 是核糖体发生暂停。这时核糖体移到另外两个读框中的一个之上而避开了一个读框中的终止密码子。第二种情况是终止密码子不起终止蛋白质合成的作用, 这是假若细胞中有一种发生突变的氨酰-tRNA, 把终止密码子误认为是编码其氨基酸的密码子时发生的情况。这种 tRNA 是在对细菌的遗传分析中发现的, 称为抑制型 tRNA。

26.10 蛋白质合成的翻译控制

原核生物和真核生物中受到调控的基因表达的重要的机制是控制生产性的翻译起始的效率。真核细胞中的一个例子是铁蛋白翻译的控制。铁蛋白与铁结合, 其功能是在细胞中贮存铁。许多种生物中都有一种称为铁效应元件(IRE, 见第 25 章)的茎-环结构位于铁蛋白 mRNA 的 5'-非翻译区内。当铁含量高时, 这种双功能的 IRE 结合蛋白, 即胞质中的鸟头酸酶的构象是不能与铁蛋白 mRNA IRE 结合的, 因而会达到铁蛋白合成的最高速率; 而当铁含量低时, 胞

质中的乌头酸酶迅速与铁蛋白 IRE 结合并抑制翻译起始复合体的形成,使铁蛋白的合成减少。运铁蛋白受体(TfR) mRNA 中的 IRE 与胞质中乌头酸酶的结合则对 TfR 蛋白质的合成有相反的效果。当细胞中的铁不多时,胞质中乌头酸酶的结合保护 TfR mRNA 使不致发生迅速的降解,于是 TfR 的合成增加,结果是吸收更多胞外的铁。

真核生物中翻译控制的另一个例子是酵母中 GCN4 蛋白质合成的抑制,这种抑制来自于 mRNA 5 端中的茎-环结构。GCN4 控制,以及细菌中类似的情况,都是把氨基酸的生物合成与 mRNA 5 端的核糖体暂停联系起来。这种机制首次发现于大肠杆菌的色氨酸操纵子中,常称为弱化作用。色氨酸生物合成酶类的转录和翻译控制见第 28 章。

26.11 蛋白质合成的抑制剂

嘌呤霉素的结构很像氨酰 tRNA 中氨酰基的结构,如图 26.15 所示,这是翻译抑制机制的一个很好的例子。嘌呤霉素是氨酰-tRNA 的类似物,能在即使没有相应的 tRNA 时,也与原核生物和真核生物核糖体的 A 位点结合,从而起着肽基转移酶反应中受体的作用。其结果是翻

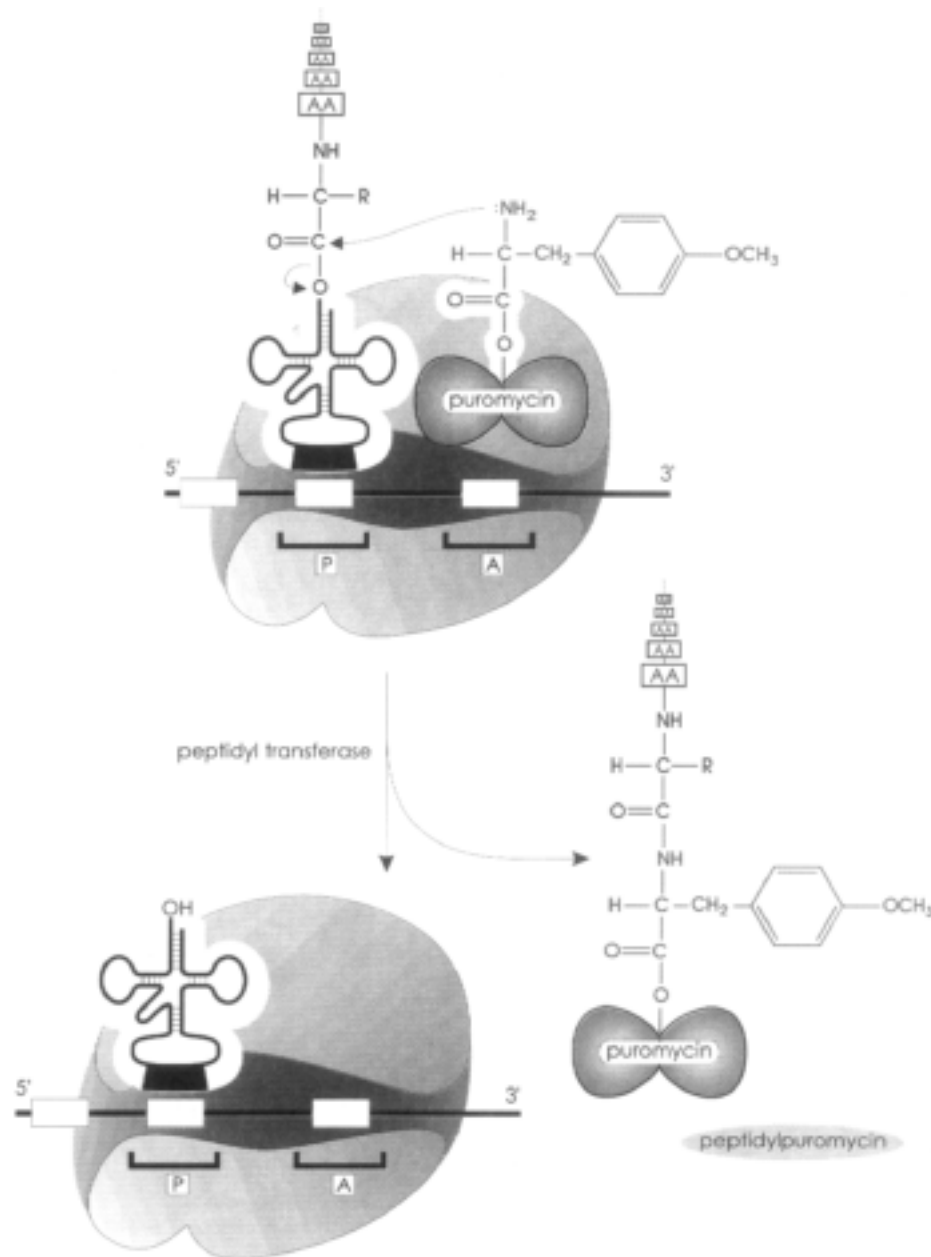


图 26.15 嘌呤霉素的作用机制

嘌呤霉素能进入核糖体的 A 位点并起着氨酰-tRNA 的作用,其结果是原核生物和真核生物中的多肽链合成的终止。

译立即终止, 释放的是未完成的半截蛋白质。

有两种效力很高的抗生素能专一地抑制细菌中的蛋白质合成。一种是四环素, 它阻断 A 位点, 阻止氨酰-tRNA 进入; 一种是氯霉素, 它抑制 23S RNA 的肽基转移酶活性。这些抗生素的作用机制, 以及改变细菌中翻译的保真性的链霉素的作用机制均列在表 26.1 中。

表 26.1 细菌和真核生物中蛋白质合成的抑制剂

抑制剂	专一性	作用机制
嘌呤霉素	原核生物, 真核生物	与 A 位点结合, 使未成熟的多肽链终止
四环素	原核生物	与 A 位点结合, 阻止氨酰 tRNA 进入
氯霉素	原核生物	抑制 50S 核糖体的肽基转移酶活性
链霉素	原核生物	抑制翻译起始的保真性
白喉毒素	真核生物	使真核生物的延伸因子 eEF-2 失活
蓖麻毒蛋白	真核生物	由于腺嘌呤的 N-糖基裂解而使 28S rRNA 失活
环己酰亚胺	真核生物	抑制 60S 核糖体的肽基转移酶活性

白喉毒素是已知的最强有力的毒素之一, 一单个的白喉毒素分子就足以使真核生物细胞中延伸因子 eEF-2 全都失活。蓖麻毒蛋白存在于蓖麻籽中, 其作用方式是通过 N-糖基裂解除去一个腺嘌呤残基而使真核生物的 28S rRNA 分子失活。表 26.1 中所列真核生物蛋白质合成的另一种抑制剂是环己酰亚胺, 它抑制 60S 核糖体亚基的肽基转移酶活性。

26.12 小 结

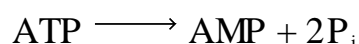
(1) 蛋白质合成需要 mRNA、核糖体、氨酰 tRNA 和高能磷酸键的水解, 每形成一个肽键需要 4 个高能磷酸键(将氨酰化步骤中水解的 2 个磷酸键计算在内)。mRNA 的翻译方向是从 5 到 3, 多肽链的合成是从氨基末端到羧基末端, 每次加一个氨基酸。

(2) tRNA 起着分子连接物的作用, 它阅读 mRNA 链内编码的遗传信息。遗传密码以三联体核苷酸序列为基础, 这种三联体称为密码子, tRNA 中有互补的反密码子序列。三种类型的实验证明 64 个可能的三联体中, 有 61 个为各种氨酰-tRNA 所特有, 每一个为 20 种可能的氨基酸中的一种; 另外 3 个密码子没有相应的 tRNA, 起着终止密码子的作用。

(3) 摆动假说的预测是密码子中的 3 个核苷酸中只有两个是与 tRNA 的反密码子发生碱基配对以识别三联体所必需。用实验检验摆动假说的结果确认了这种预测。已得出结论, 最少需要 32 种 tRNA 与全部 61 个密码子配合, 不过多数细胞中 tRNA 的种类都比这个最低数多。

(4) 翻译移码、RNA 编辑和蛋白质剪接是中心法则不完全适用的 3 个例子, 中心法则认为信息传递是 DNA → RNA → 蛋白质。由这三种反应产生的多肽产物的氨基酸序列不能由基因编码的 DNA 或 mRNA 序列预测出来。

(5) 有 20 种不同的氨酰 tRNA 合成酶, 每一种都识别不同的 tRNA 并使之“荷载”上适当的氨基酸。在这种氨酰化反应中有几个识别步骤有助于减少由于 tRNA 荷载的错误而产生的误差频率。氨酰化需要下列水解反应:



(6) 蛋白质合成需要 3 个不同的阶段: 起始、延伸和终止。起始包括起始复合体的组装和

GTP 的水解等步骤, 起始复合体由起始因子、核糖体亚基、mRNA 和起始的甲硫氨酸 tRNA 组成。延伸是连续的循环过程, 包括氨酰-tRNA 进入 A 位点、GTP 水解和肽基转移酶反应, 此反应是由大的 rRNA 中编码的核酶活性所催化的。当 3 个终止密码子中的一个存在于 A 位点中而没有 tRNA 起着肽基转移酶反应的受体作用时, 就发生终止。

(7) 蛋白质合成的抑制剂四环素、氯霉素和链霉素都阻断细菌中的蛋白质合成。已发现对于真核生物翻译的几种抑制剂, 包括白喉毒素、蓖麻毒蛋白和环己酰亚胺。嘌呤霉素以氨酰-tRNA 的类似物而起作用, 它能引起原核生物和真核生物中未成熟链延伸的终止。

参 考 资 料

- Cammack R. (1993): A new use for an old enzyme. *Current Biol.*, 3:41.
- Cattaneo R. (1991): Different types of messenger RNA editing. *Annu. Rev. Genet.*, 25:71.
- Cooper A. A., Stevens T. H. (1995): Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Bioc. Sciences*, 20:351.
- Ibba, M., Hong, K. W., Sherman, et al. (1996): Interactions between tRNA identity nucleotides and their recognition sites in glutamyl-tRNA synthetase determine the cognate amino acid affinity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:6953.
- Illangasekare M., Sanchez G., Nickles T., Yarus M. (1995): Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science*, 267:643.
- Jacks T., Madhani H. D., Masiarz F. R., Varmus H. E. (1998): Signals for ribosomal frameshifting in the rous sarcoma virus gag-pol region. *Cell*, 55:447.
- Kozak M. (1994): Features in the 5' non-coding sequences of rabbit α - and β -globin mRNAs that affect translational efficiency. *J. Mol. Biol.*, 235:95.
- Neupert W., Lill R. (1994): Protein synthesis: Cradle at the ribosome. *Nature*, 370:421.
- Nierhaus K. H. (1996): An elongation factor turn-on. *Nature*, 379:491.
- Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S., et al. (1995): Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science*, 270:1464.
- Rodin, S., Rodin, A. and Ohno, S. (1996): The presence of codonanticodon pairs in the acceptor stem of tRNAs. *Proc. Natl Acad. Sci., USA* 93:4537.
- Saks M. E., Sampson J. R., Abelson J. N. (1994): The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science*, 263:191.
- Samaha R. R., Green R., Noller H. F. (1995): A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase center of the ribosome. *Nature*, 377:309.
- Schimmel P., Ribas de Pouplana L. (1995): Transfer RNA: From minihelix to genetic code. *Cell*, 81:983.
- Schmidt E., Schimmel P. (1994): Mutational isolation of a sieve for editing in a transfer RNA synthetase. *Science*, 264:265.
- Sollner-Webb, B. (1996): Trypanosome RNA editing: Resolved. *Science*, 273:1182.
- Tuite M. F., Stansfield I. (1994): Translation: Knowing when to stop. *Nature*, 372:614.
- Von Ahlsen U., Noller H. F. (1995): Identification of bases in 16S rRNA essential for tRNA binding at the 30S ribosomal P site. *Science*, 267:234.

复 习 题

- tRNA 在蛋白质合成中称为连接物分子,其原因在于它:
 - 将 30S 和 50S 核糖体亚基联系在一起
 - 在蛋白质合成中能连接不同的构象
 - 起着把 mRNA 序列“解释”为相应的蛋白质序列的作用
 - “阅读”多肽序列以指导 RNA 的合成
 - 能被氨酰-tRNA 合成酶和氨基酸所识别
- 假若遗传密码以四联体密码子而不以三联体密码子为基础,而 tRNA 反密码子中的前两个 5 核苷酸处于摆动的位置,蛋白质合成所需要的不同的 tRNA 的种类会更多还是更少?
 - 会需要 256 种不同的 tRNA
 - 会需要多于 150 种但少于 250 种的 tRNA
 - 会需要少于 20 种不同的 tRNA
 - 这决定于细胞中有多少种氨酰-tRNA 合成酶
 - 同样数目(30 ~50 种 tRNA)就足够了
- AUG 和 UAG 分别编码蛋白质合成中的起始密码子和终止密码子,下列 mRNA 中的哪一种可读框会编码一种短的多肽?

5 -UUAUGAAUGUACCGUGGUAGUU-3

 - 读框 1
 - 读框 2
 - 读框 3
 - 读框 1 和 3
 - 读框 2 和 3
- 关于蛋白质合成的精确性,下列哪一种说法不正确?
 - 核糖体中有一种外切核酸酶进行校对
 - 氨酰-tRNA 合成酶水解错误的 AA-tRNA^{AA}
 - 结合到氨酰-tRNA 合成酶上的 tRNA 是高度专一的
 - 蛋白质合成中的误差率为万分之一
 - 密码子-反密码子的相互作用保证正确的 tRNA 进入 A 位点
- 蛋白质合成的延伸循环中需要 GTP 水解的两个步骤是:
 - 肽基转移酶反应和核糖体移位
 - 氨酰-tRNA 结合到 A 位点上和核糖体移位
 - fMet-tRNA^{fMet}结合到 A 位点上和核糖体移位
 - 肽基转移酶反应和氨酰 tRNA 结合到 P 位点上
 - RF-1 + RF-3 的结合和核糖体移位
- 嘌呤霉素:
 - 是 DNA 合成的抑制剂
 - 使延伸因子 eEF-2 失活
 - 结合到 P 位点上并阻止氨酰 tRNA 进入
 - 阻断核糖体移位,从而使蛋白质合成终止
 - 结合在 A 位点上并起着氨酰 tRNA 类似物的作用

参 考 答 案

1. c tRNA 有双功能, 与 mRNA 和氨基酸都结合。
2. e 因为反密码子中前两个位置都是摆动位置, 密码中的第 4 个核苷酸不会在三联体密码子可能有的专一性之外再增强专一性。
3. c 只有读框 3 能产生多肽。
4. a
5. b 延伸循环中两个需要能量的步骤是 tRNA 结合到 A 位点上和核糖体移位。
6. e 嘌呤霉素结合在 A 位点上并且作为氨酰 tRNA 类似物而起作用, 引起链成熟前的终止。

第 27 章 蛋白质到位和周转

27.1 引言

蛋白质合成之后还有各种加工过程。真核生物中,许多这种修饰作用都与专一的亚细胞区室有关。例如,蛋白质糖基化作用就需要存在于内质网和高尔基体中的酶。其他一些蛋白质需要定位在细胞的专一区域内,例如,膜内在蛋白需要定位在质膜内,核编码的线粒体蛋白质是在细胞溶胶中合成的,但必须被运入线粒体中。一般来说,蛋白质不能被动地穿过膜;因此就出现了把蛋白质引导到各种细胞区室(包括膜在内)的各种机制。此外,许多细胞还合成要运出细胞之外的蛋白质,例如,胰脏合成消化酶和酶原,或外分泌腺合成激素。如第 26 章所述,真核生物中的蛋白质合成发生在细胞质中。新合成的蛋白质穿过细胞质而移入不同的细胞区室中称为蛋白质运输或到位。

除去不需要的蛋白质和合成需要的蛋白质是同样重要的。细胞中蛋白质的稳定性变化幅度很大。有些不稳定的蛋白质,其半寿期以分计,而其他一些则存活时间和细胞一样长。短的半寿期蛋白质浓度的控制简化了,只要控制合成或降解即可。例如,在不分裂的细胞中,鸟氨酸脱羧酶的合成和降解通常都很迅速。当这些细胞受到刺激要进行增殖时,鸟氨酸脱羧酶的降解就变慢,结果是这种酶蛋白的浓度就有净增加。

27.2 信号肽序列指导蛋白质到位

每一种最后要到达专一的亚细胞区室的蛋白质都带有一个信号,这个信号决定它的最后位置,就像信封上的地址一样。蛋白质到位的分子信号,其形式是一段氨基酸序列。信号常位于蛋白质的氨基末端的序列中;不过,也可能用羧基末端的序列或内部的氨基酸序列。信号肽一词可用于专门表示指导蛋白质穿过内质网(endoplasmic reticulum, ER)的信号,或用于更一般的任何连续的氨基酸序列,其作用是指导蛋白质的到位。当提供信号的是不连续的序列时,则这种信号称为信号斑块。

功能相同的信号肽其具体序列可能很不相同,但它们都有共同的结构特点。图 27.1 所列为真核生物的几种蛋白质的信号序列及这些蛋白质在细胞中的最终目的地。将蛋白质引向 ER 的信号序列是研究得最清楚的。ER 的信号肽通常长约 10 个氨基酸,而且大多由疏水残基(常包括 Leu, Val, Ile, Tyr 或 Trp)组成。ER 信号肽常是以带正电荷的氨基酸,如 Arg 或 Lys 位于氨基端旁边;或以带极性的残基,如 Ala 位于羧基端旁边。

可以利用重组 DNA 的方法将信号肽从一种蛋白质上移到另一种蛋白质进行功能的检测而识别之。将信号肽除去,就会观察到正确的定位就消失了。甚至,更为惊人的是将信号肽放于被测试蛋白质的起始处,然后确定它对该蛋白质在细胞中的定位。甚至已经证明,导向核定位的信号肽能将胶体金颗粒引入细胞核中。

假若蛋白质的头 10 ~20 个氨基酸的合成不产生起作用的、将蛋白质引导到 ER 的膜区室中的信号肽,那么蛋白质合成就会在细胞质中在不与膜结合的核糖体上进行,而蛋白质则被释

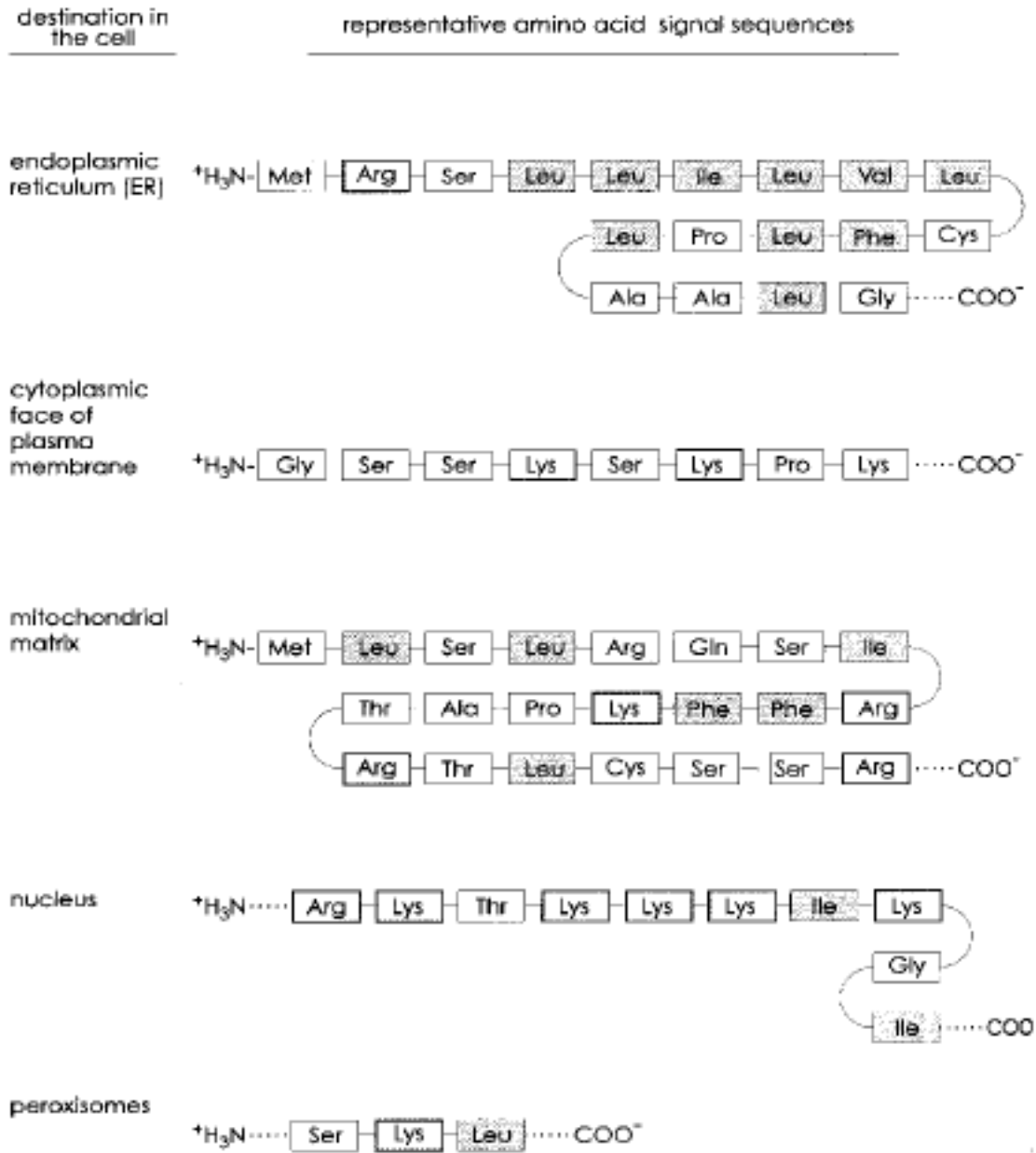


图 27.1 在真核生物的蛋白质中起作用的信号肽
阴影部分的氨基酸是疏水的, 有粗框者是带正电荷的。

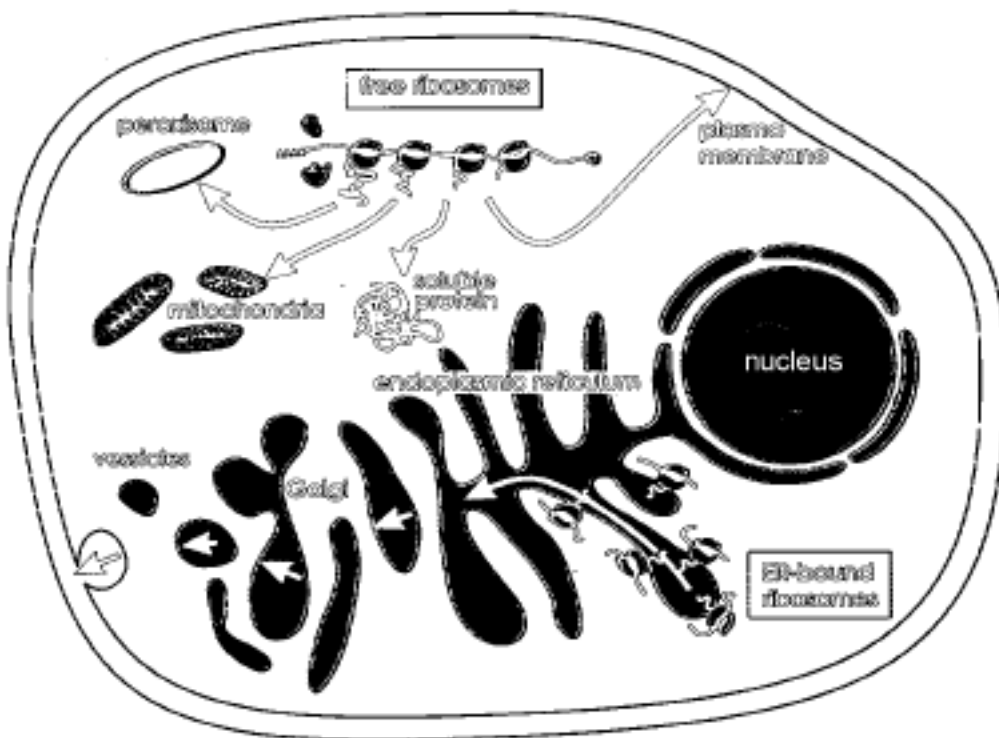


图 27.2 蛋白质到位的两种基本途径示意图
图中示出与膜无关的蛋白质合成和与 ER 结合的蛋白质合成。

放到细胞溶胶中。这些新合成细胞溶胶蛋白质有各种可能的目的地,包括细胞质、细胞核、线粒体和细胞质膜的内表面。每一种目的地都是由所存在的专一种类的信号肽决定的。对于每一个目的地,都有一种识别适当的信号序列的加工机制。有 ER 信号肽的蛋白质则到达 ER 膜,在其中恢复翻译,如下节所述。图 27.2 概括了蛋白质到位的两种主要途径。

27.3 通过细胞质的蛋白质到位

(一) 膜的胞质面

蛋白质要与膜连接,必须通过 ER 穿过膜如下文所述,或是连接上一个疏水基团,此基团的作用是锚定在膜中。在许多情况下,释放到细胞质中的蛋白质都有特殊的信号序列,修饰膜的蛋白质能识别这种序列。修饰方法可以是连接上一个脂肪酸,然后脂肪酸把分子锚定在膜中,把蛋白质留在膜的胞质面上。这种过程的例子如将豆蔻酰 CoA 的豆蔻酸连接在 Src 蛋白质酪氨酸激酶的氨基末端上和法尼基转移酶将棕榈酸连接到 Ras 蛋白的氨基末端附近的半胱氨酸上(第 31 章)。

(二) 线粒体

如前几章所述,线粒体是细胞质中的细胞器,其特有功能是通过电子传递和氧化磷酸化作用合成 ATP。线粒体有它自己的 DNA 和核糖体并合成自身的一些蛋白质。可是其中的许多种蛋白质仍是由核基因编码并在细胞质中合成的。需要有一种转运机制才能使适当的蛋白质从细胞质进入线粒体。

线粒体信号肽位于氨基末端,由多达 80 个氨基酸组成,并卷成 α -螺旋,极性基团在一侧,非极性基团在另一侧。这种蛋白质结构称为两亲性 α -螺旋。蛋白质运入线粒体过程的细节目前仍不清楚,它似乎是下列过程:在与膜相遇处信号肽先结合在线粒体外膜上,再穿过外、内两层膜(这需要内膜两侧有正常的电势梯度);一旦进入了内膜,信号肽就被基质的蛋白酶切割下来并发生降解;余下的蛋白质被一种依赖于 ATP 的过程伸展开并穿过膜进入线粒基质内,并且再折叠起来。

具有两种信号肽的蛋白质可以到达线粒体内外膜之间的空间。第一种信号肽把蛋白质插入到膜中并在基质中被切掉;第二种信号肽留下来并将蛋白质引入膜间空间。

(三) 细胞核

核膜有孔,让小分子自由扩散,但是大的蛋白质分子不能通过。不过,选择性的转运机制可以使大的蛋白质或蛋白质复合体通过这些小孔。确定哪种蛋白质能被运入细胞核的信号称为核输入信号。它可能存在于蛋白质的任何部分,不仅仅在氨基末端。这种序列通常很短(4~8 个氨基酸),通常富于 Lys 和 Arg 残基(图 27.1)。通过核孔而跨过核膜的转运的不同寻常之处在于转运后信号肽并不被切割掉,而且在经过核孔转运时蛋白质也不伸张开。

(四) 过氧化酶体

过氧化酶体是膜包被的细胞器,其特点是进行氧化反应。其中的蛋白质是从细胞质中运进去的。过氧化酶体的输入信号是一种三肽 Ser-Lys-Leu,其位置靠近蛋白质的羧基末端。蛋白质运入过氧化酶体是一种关键性的细胞过程,Zellweger 综合症遗传病患者有严重的组织异

常就足以证明这一点,因为这些病人的过氧化酶体中没有蛋白质。

27.4 通过膜区室的蛋白质到位

ER 信号肽是高度疏水的,如图 27.1 所示。疏水性大概有助于信号肽穿过膜。如果新生的多肽链中有把它引向 ER 的信号肽,蛋白质的这一部分就会与存在于细胞质中的信号识别颗粒 (SRP) 相互作用。SRP 是一种 RNA-蛋白质复合体,它既与新生蛋白质的信号肽结合,又与核糖体结合。它使蛋白质合成暂停,大概是与核糖体上即将过来的 tRNA 结合位点结合所致。

细胞质中的 SRP-肽-核糖体复合体与 SR 受体蛋白结合,这种受体蛋白则结合在 ER 的胞质面上。这种相互作用使得 SRP 从复合体上解离下来,留下的是结合在 ER 膜上的信号肽-核糖体复合体。一旦 SRP 解离下来而新生的蛋白质穿过膜进入 ER 的内部(图 27.3),蛋白质合成又会恢复。假若蛋白质在通过膜之前要折叠起来,那么在转运过程继续进行之前,它必须张开。一旦到了 ER 内部,蛋白会再折叠起来,这一过程是由一种能够识别折叠中的错误的结合蛋白和一种蛋白质二硫化物异构酶和脯氨酰异构酶所促进的。

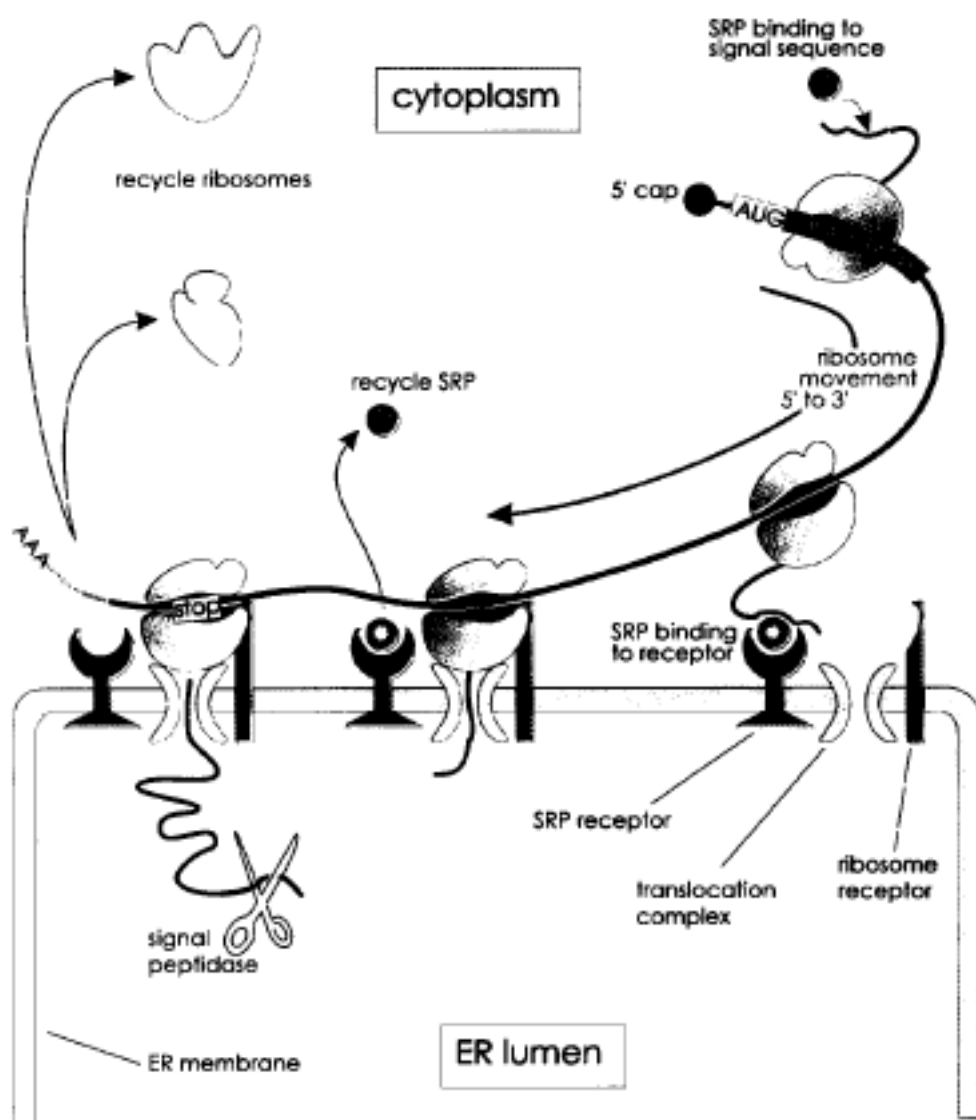


图 27.3 经由 SRP 循环的通过 ER 的蛋白质转运

SRP 与 SRP 受体结合的相互作用把有信号序列的新生多肽链引向 ER;核糖体受体和转运复合体促进蛋白质进入 ER 腔的转运,腔中的信号肽酶将信号肽切下去;SRP 和核糖体的组分又回到细胞质中再参加反应。

信号肽可能在 ER 膜之内被内肽酶切掉,或者仍留在那里将蛋白质引导到目的地。第三种可能性是信号肽留在 ER 膜中,将蛋白质锚定在那里。蛋白质也可能由于与膜中的磷脂酰

肌醇发生共价连接而被固定在 ER 膜的内侧。

在 ER 中,许多蛋白质发生各种修饰。最复杂的是加入糖,形成糖蛋白。虽然有些糖基化作用可以在细胞质中发生(例如,将N-乙酰葡萄糖胺以 O-糖苷键加到 Ser 上),但大多数糖蛋白是在 ER 中修饰的,加的是专一的 14 个残基的寡糖。这一过程是与翻译同时发生的,由一种与膜结合的糖基转移酶催化,被糖基化的是-Asn-Xxx-Ser-和 Asn-Any-Thr 序列中的 Asn。一旦到达了 ER 腔的一面上,蛋白质就会或是停留在 ER 中,或是移动到高尔基体中,进一步被分送到溶酶体、分泌囊泡或质膜中去,然后或者留在其中,或被运出细胞。图 27.4 说明蛋白质如何被运出 ER。

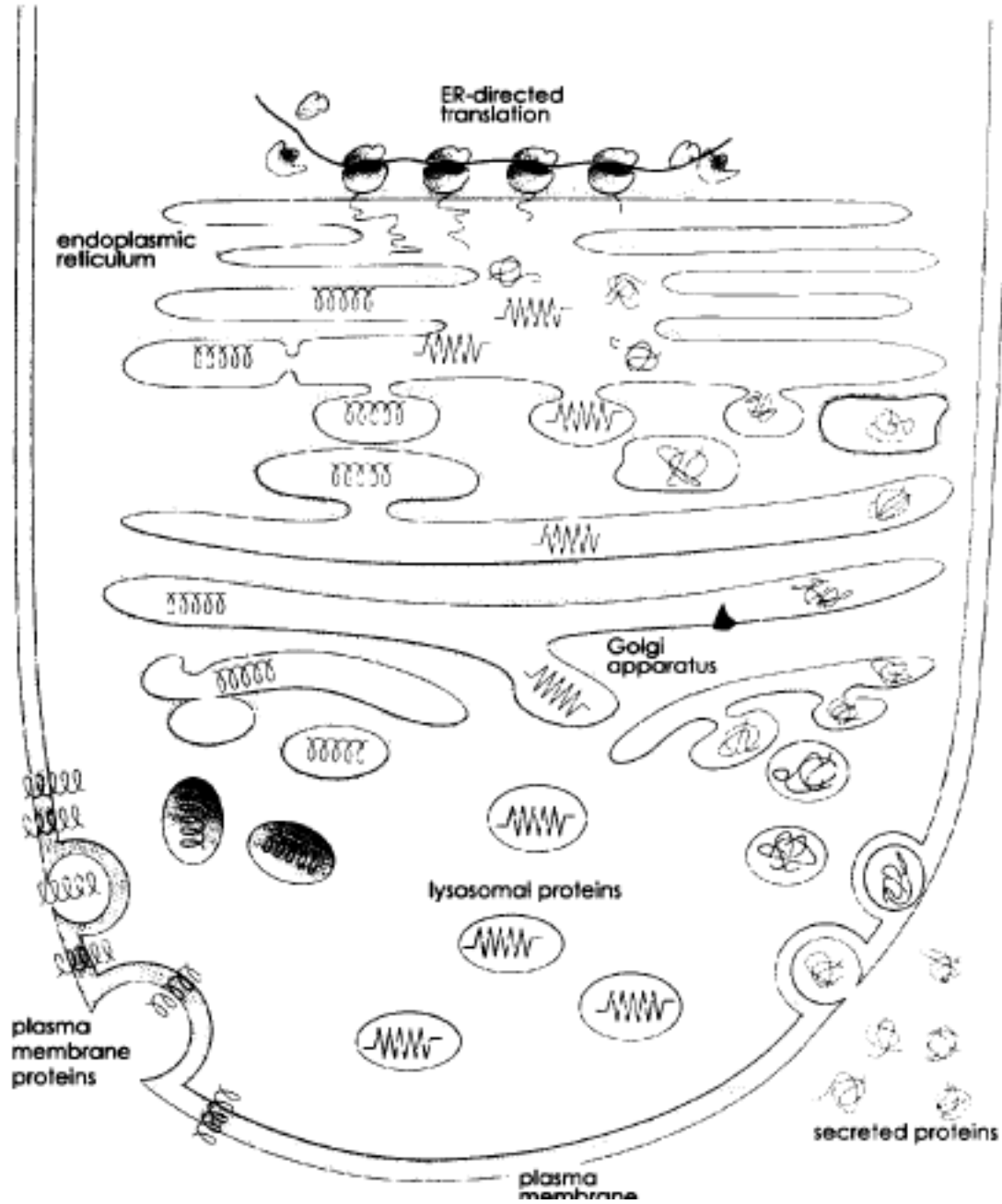


图 27.4 大多数由信号肽引导至 ER 中的蛋白质要被转移至高尔基体中进行进一步的筛选膜包被的小泡包着蛋白质离开高尔基体,目的是插入质膜中,变成溶酶体,或与质膜融合并将其中的蛋白质分泌到细胞外。

(一) 高尔基体

高尔基体从 ER 获得蛋白质,继续进行修饰,特别是糖基化作用,而且包括形成蛋白聚糖。有些蛋白质的水解过程也在此进行,尤其是多蛋白的水解。多蛋白是一种多肽,合成后在几个不同的位点上被切开,形成一种以上的成熟蛋白质。某些激素就是这样合成的。然后成熟的蛋白质被分配到质膜、溶酶体或分泌小泡中。

(二) 溶酶体

溶酶体中有起降解作用的酶, 它们水解细胞中不需要的分子。酶通过高尔基体到达溶酶体中。对于溶酶体中的某些酶, 高尔基体给加上专一的糖残基, 即甘露糖-6 磷酸。这些酶起着向溶酶体中转运的标志的作用。失去加有甘露糖-6-磷酸的酶就会发生 I-细胞病, 这是一种遗传疾病, 通常在童年就会致死。

(三) 分泌小泡

高尔基体所释放的蛋白质包装在小泡中, 于是在转运时蛋白质就与细胞质分开。分泌小泡把要被运出细胞之外的蛋白质包被起来, 然后小泡从高尔基体上脱落下来, 像芽殖一样。这些小泡扩散到目的地, 并与膜结合, 将其内含物释放出来。

(四) 质膜

蛋白质可以连接脂肪酸(胞质面)或磷脂酰肌醇(ER 膜的空腔侧)而锚定在膜上。蛋白质也可以跨越膜, 形成跨膜蛋白质。跨膜蛋白质穿过膜的机制大概和蛋白质跨过 ER 膜的机制一样, 也就是利用信号肽。

27.5 蛋白质周转

已鉴定出细胞中有几种系统通过降解而介导蛋白质的周转。溶酶体中有许多种蛋白酶和其他水解酶(图 27.5)。所有这些酶都是酸性的水解酶, 在 pH 5 左右活性最高。溶酶体的主要作用是降解由胞吞作用运至细胞中的蛋白质和其他大分子。胞吞是这样一种过程, 细胞表面上的受体与胞外的颗粒结合, 细胞膜内陷, 形成细胞内的小泡, 小泡再被运至溶酶体内。在溶酶体中被降解的蛋白质的另一种来源是通过自噬作用, 例如肝细胞中线粒体的周转。第三种机制是吞噬作用, 例如巨噬细胞和中性白细胞吞没细菌, 这两种都是存在于免疫系统中的细胞类型。

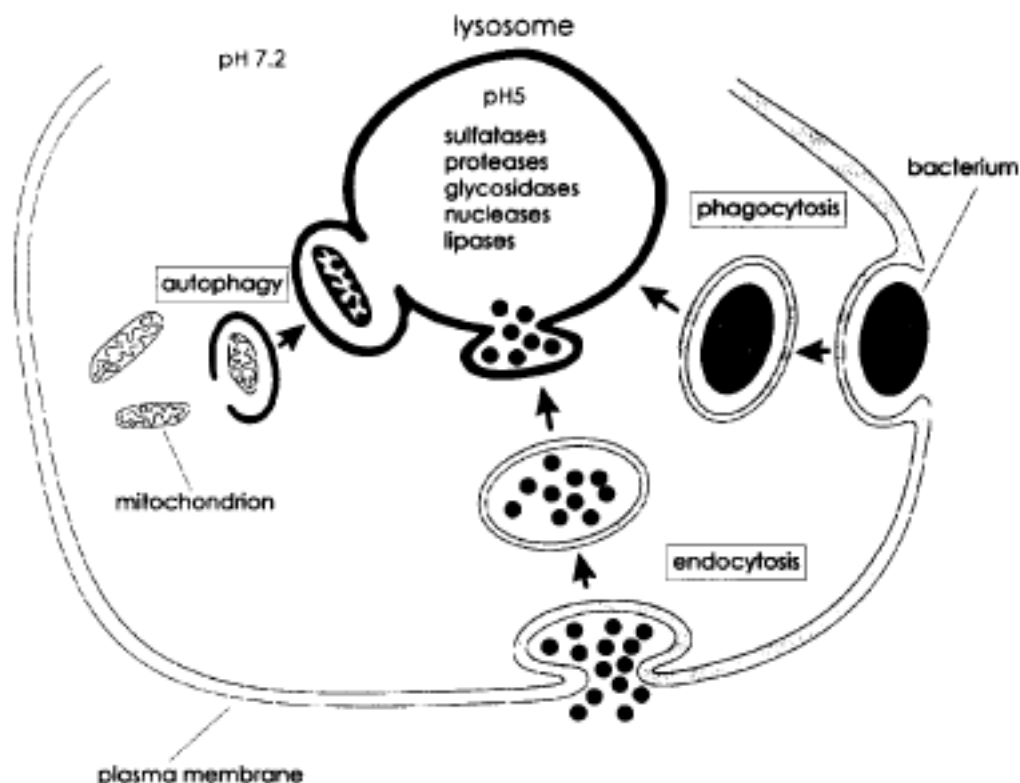


图 27.5 溶酶体中蛋白质酸水解的几种主要途径

即通过自噬、胞吞和吞噬作用, 与小泡的融合; 溶酶体中的低 pH 是由 ATP 推动的质子泵维持的。

蛋白质也和 RNA(第 25 章)一样,在细胞中是有寿命的,寿命决定于其周转速率。蛋白质的半寿期是指它降解 50% 的时段,它代表蛋白质的稳定性。如表 27.1 所示,不同蛋白质的半衰期是不同的,从若干分钟到若干天。一般来说,起调节作用的蛋白质,例如那些与代谢的控制点有关的蛋白质,半寿期短;而那些起“看家”作用的蛋白质则寿命长。

表 27.1 蛋白质半寿期

蛋白质	半寿期/h
-2 阻抑蛋白	0.1
c-Myc	0.5
RNA 聚合酶	1.3
色氨酸加氧酶	2.0
磷酸烯醇丙酮酸加氧酶	5.0
糖皮质激素受体	20
氯霉素乙酰转移酶	50
醛缩酶	120

(一) 大肠杆菌中的蛋白质降解

细菌和真核细胞中,肽键的裂解都需要 ATP 的水解。大肠杆菌中,全部依赖于 ATP 的蛋白质水解中,有 70% ~80% 是由各种蛋白酶系统进行的,这就是 Lon 蛋白酶和 Clp A/P 蛋白酶。Lon 蛋白酶是由 4 个完全相同的亚基组成的,而 Clp A/P 蛋白酶则为一种受到调节的复合体,由起催化作用的 Clp C 亚基和依赖于 ATP 的、起调节作用的 Clp A 亚基组成。控制 Lon 和 Clp A/C 活性的信号还不太清楚,但某种 NH_2 -末端氨基酸的存在可能有作用,大概因存在什么氨基酸而定,这种末端氨基酸或是使蛋白质稳定,或是促进其降解。Alexander Varshavsky 等根据对大肠杆菌和酵母菌的蛋白质降解的研究,提出了 N-端规则。他们利用同样的靶蛋白(-半乳糖苷酶)而且只改变其 N-端的氨基酸,发现 Arg、Lys、Phe、Leu 和 Trp 这些氨基酸使得 -半乳糖苷酸极易发生水解,在大肠杆菌和酵母中都是如此。很可能大肠杆菌的 Lon 和 Clp A/C 蛋白酶系统以某种方式把这些氨基酸认作为蛋白质水解的信号。

(二) 依赖于遍在蛋白质的蛋白质降解途径

Varshavsky 及其同事还鉴定出了真核细胞(主要是酵母)中的一条非溶酶体的蛋白质降解途径。除去确认了 N-端规则也适用于真核生物的蛋白质之外,他们还鉴定出了一种 76 个氨基酸的蛋白质,称为遍在蛋白质,它是蛋白质降解的主要信号之一。遍在蛋白质之所以得名,是因为在所有曾被研究过的细胞类型中都可以找到它。酵母和人的遍在蛋白质的序列几乎是完全相同的,说明强大的进化压力使它保持不变。遍在蛋白质是小的、高度保守的蛋白质,它与将被降解的靶蛋白之间的连接是通过其本身的 C-端甘氨酸与靶蛋白的专一的赖氨酸残基之间的异肽键。

单个的遍在蛋白质分子不足以作为降解的信号。例如,一小部分稳定的组蛋白 H2A 和 H2B 就带有单个的连在其上的遍在蛋白质。降解的信号需要许多个遍在蛋白质分子,通常是有分支的多遍在蛋白链。如图 27.6 所示,遍在蛋白质是经过一系列步骤以共价连接在赖氨酸的 γ -氨基上的,这些步骤至少需要三种酶(E1, E2 和 E3)和 ATP 的水解。

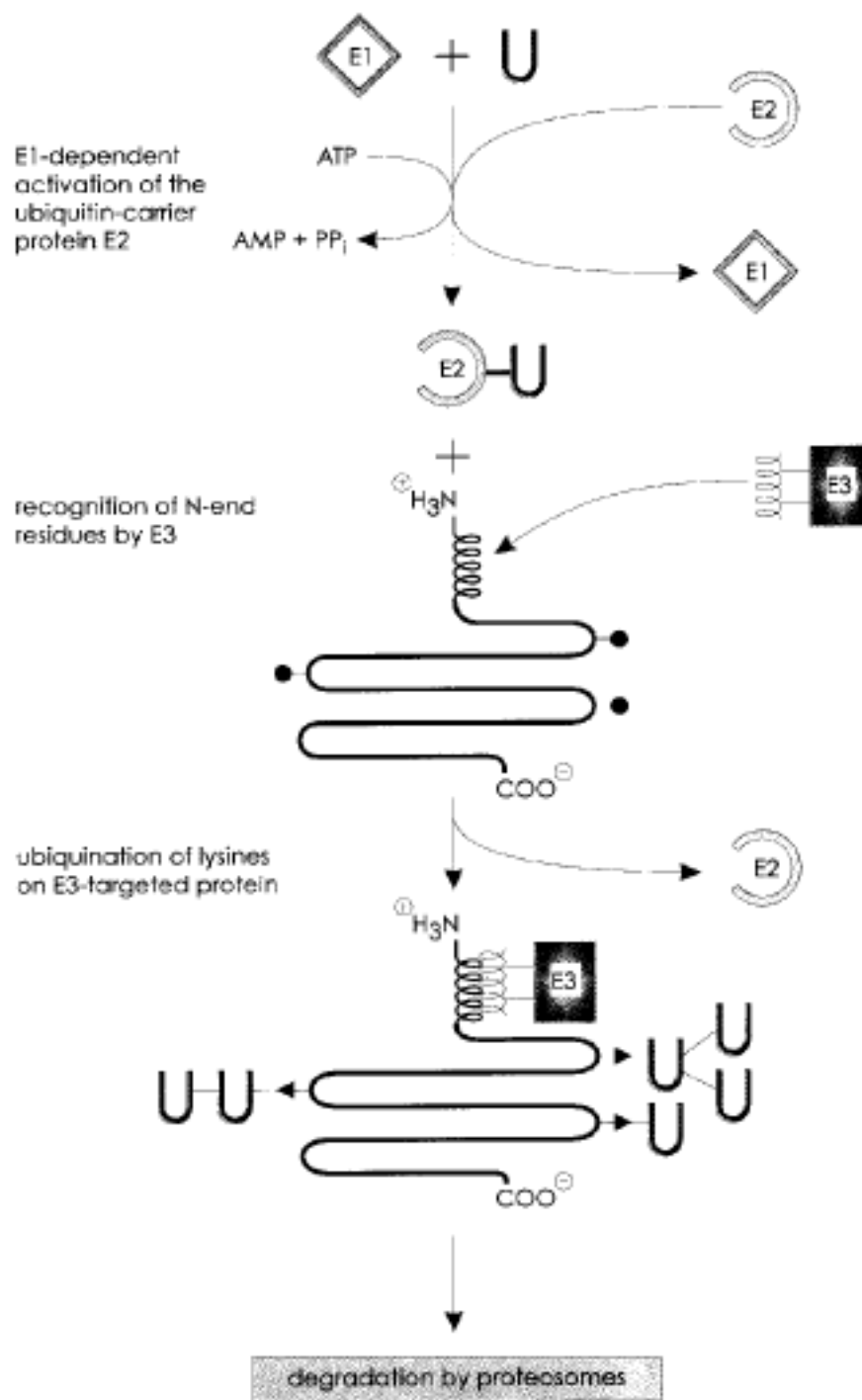


图 27.6 依赖于遍在蛋白质的蛋白质降解途径

遍在蛋白质连接到载体蛋白 E1 上需要 ATP 的水解, 然后 E1 将遍在蛋白质部分传递给起活化作用的蛋白质 E2; 蛋白质 E3 识别 NH₂ 末端的残基, 并引导 E2 将遍在蛋白质结合到蛋白质的赖氨酸残基上。

根据 Varshavsky 的 N-端规则, 某种 NH₂ 末端氨基酸和聚遍在蛋白二者的存在起着向细胞的水解蛋白质的机构发布降解蛋白质的信号。遍在蛋白途径中蛋白质降解的 N-端规则的生理底物之一是酵母中一种称为 G 的蛋白质, G 是异三聚体的与鸟核苷酸结合的蛋白质。小鼠细胞中也有一种类似 G 的 G 类型的短寿命蛋白质, 这表明高等真核生物中也存在 G 蛋白降解的类似机制。细胞周期蛋白是控制细胞周期运行的蛋白质, 它也是由遍在蛋白化作用在蛋白质降解的水平上被调节的,

(三) 蛋白体是细胞中处理垃圾的场所

虽然溶酶体以外的不依赖于遍在蛋白质的蛋白质降解由什么蛋白酶催化尚不清楚, 但细胞中降解蛋白质的部位似乎是称为蛋白体的大的大分子结构。这些大的蛋白体复合体需要至

少 10 种不同的多肽才能起作用。蛋白体结构的研究结果表明, 它们的形状是中空的圆筒, 一端的开口供遍在蛋白化的蛋白质进入, 中央区是多种蛋白酶的催化部位, 有一出口以排出肽的片段(图 27.7)。蛋白体复合体由两个功能单位组成, 一个是 26S 的“全”蛋白体, 其中有一 19S 的与遍在蛋白结合的复合体, 另一个是 20S 的“核心”蛋白体, 其中有 4 叠七层膜的环, 每个环又由 7 个 α -和 7 个 β -亚基组成。25.9 kDa 的 β -亚基形成了一个中央小室, 其中有降解蛋白质所需要的肽酶活性。曾有人称蛋白体是细胞的垃圾桶, 但可能称之为垃圾处理场更为恰当!

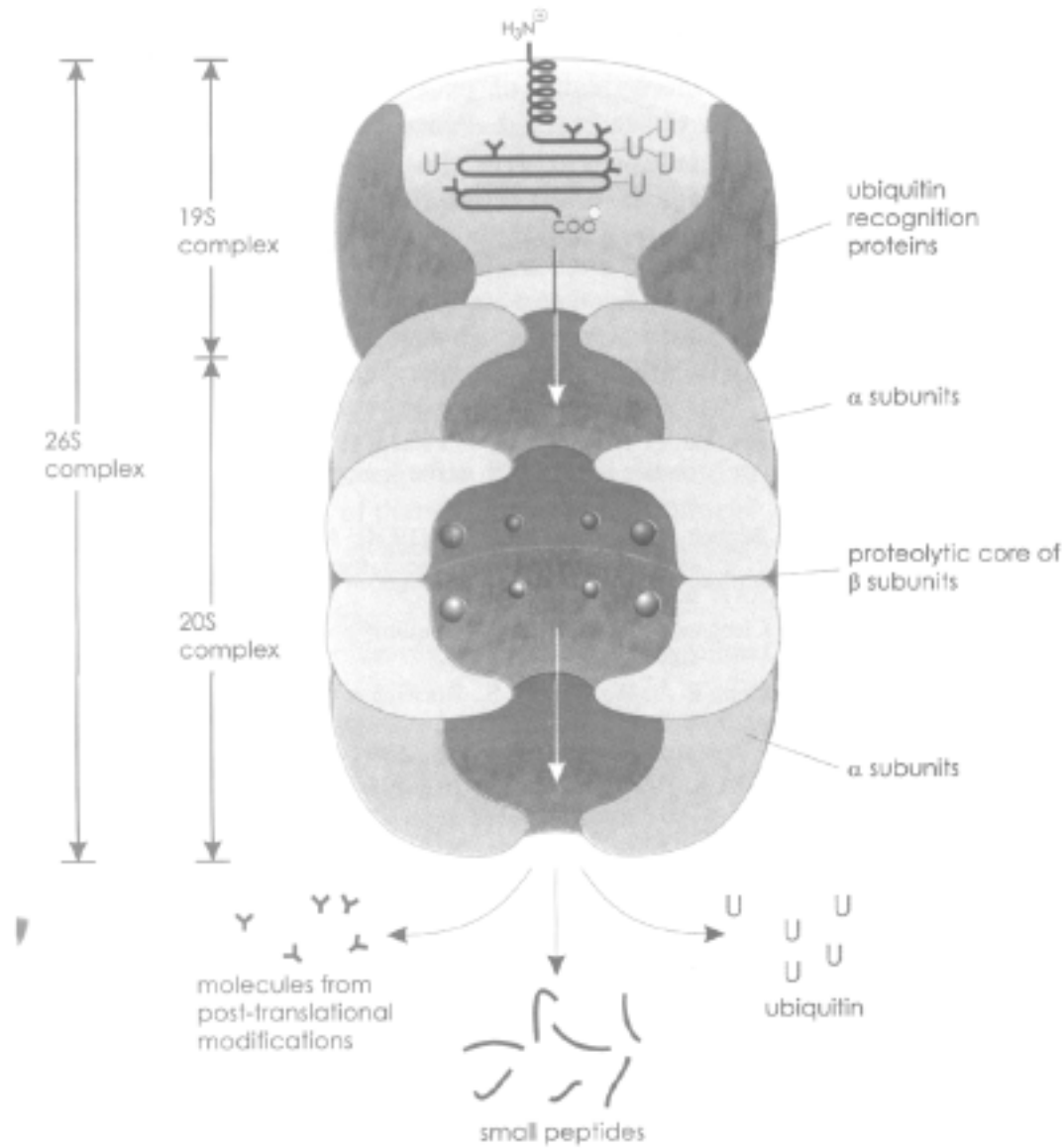


图 27.7 古细菌的蛋白体示意图

说明它的功能是细胞中降解遍在蛋白化的蛋白质的场所。

(四) PEST 序列

蛋白质降解的另一种信号与遍在蛋白化无关, 是 PEST 序列的存在, 这是含有大量 Pro (P)、Glu(E)、Ser(S) 和 Thr(T) 的氨基酸序列。多个 PEST 序列的存在与蛋白质的高周转率成正相关。实验已证明, 对于某些蛋白质, 除去 PEST 序列能使之变得稳定。不过, PEST 序列决定蛋白质周转率的机制尚属未知, 虽然有人认为它是由序列专一的蛋白酶所介导的。

27.6 小 结

(1) 信号肽的功能是亚细胞的“地址”, 将蛋白质引导到细胞中专一的区室中去。这些序列常在蛋白质的 NH_2 或 COOH 末端, 但也有一些位于序列之中的。

(2) ER 信号肽长约 10 个氨基酸, 存在于被导入 ER 的蛋白质的 NH₂ 末端, 大部分由疏水残基组成。多核糖体上的新生的多肽链, 只要其中有 ER 信号肽, 就会被引向 ER 膜以完成蛋白质合成; 没有这种信号肽的多肽就在细胞质中合成。

(3) 被引向细胞质中的区室的蛋白质有各种各样的信号序列, 这些序列将蛋白质引到膜的胞质面、线粒体、细胞核或过氧化酶体中。

(4) 蛋白质到达膜的过程包括 SRP 识别 ER 信号肽, 从而促进肽-核糖体复合体与 ER 上的 SRP 受体的连接。ER 膜上蛋白质合成的结果是新合成的蛋白质被运入 ER 腔内。一旦蛋白质在 ER 内重新折叠起来, 它就可被引到更多的细胞中的位置上, 如高尔基体、溶酶体、分泌小泡或质膜中, 视蛋白质中还存在什么样的其他信号而定。

(5) 细胞中由降解过程所引起的蛋白质周转是重要的调节机制, 因为它控制着蛋白质的浓度。大肠杆菌中的 Lon 和 Clp A/P 蛋白酶和真核生物中依赖于遍在蛋白质的蛋白质降解是两种已被鉴定的蛋白质降解机制。蛋白体是大的大分子结构, 其功能是细胞内的垃圾处理场, 把蛋白质水解为小的肽片段。

参 考 资 料

- Banfield D. K., Lewis M. J., Pelham HRB (1995): A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex. *Nature*, 375:806.
- Bennett M. K., Scheller R. H. (1994): A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:63.
- Ciechanover A. (1994): The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, 79:13.
- Craig E. A., Weissman J. S., Horwich A. L. (1994): Heat shock proteins and molecular chaperones: Mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*, 78:365.
- Ellis, R. J. (1996): The "bio" in biochemistry: Protein folding inside and outside the cell, *Science*, 272:1448.
- Fabre E., Hunt E. C. (1994): Nuclear transport. *Curr. Biol.*, 6:335.
- Goldberg A. L. (1995): Functions of the proteasome: The lysis at the end of the tunnel. *Science*, 268:522.
- Hilt W., Wolf D. (1996): Proteasomes: destruction as a program. *Trends Biochem. Science*, 21:96.
- Lord, J. M., (1996): Protein degradation: Go outside and see the proteasome. *Curr. Biol.*, 6:1067.
- Lowe J., Stock D., Jap B., Zwicky P., Baumeister W., Huber R. (1995): Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 268:533.
- Mellman I., Simons K. (1992): The Golgi complex: In vitro veritas? *Cell*, 68:829.
- Moore M. S. (1995): David and Goliath in nuclear transport. *Curr. Biology*, 5:1339.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, 21:267.
- Rothman J. E. (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372:55
- Schatz G., Dobberstein B. (1996): Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271:1519.
- Scheffner M., Nuber U., Huibregtse J. M. (1995): Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 373:81.
- Valle D., Gartner J. (1993): Human genetics: Penetrating the peroxisome. *Nature*, 361:682.
- Varshavsky A. (1992): The N-end rule. *Cell*, 69:725.

Wickner W. T. (1994): How ATP drives proteins across membranes. *Science*, 266:1197.

Wolin S. L. (1994): From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell*, 77:787.

Zheng, N., Gierasch, L. M. (1996): Signal sequences: The same yet different. *Cell*, 86:849.

复 习 题

1. 蛋白质中信号肽序列的主要功能是下列中的哪一项?
 - a) 将蛋白质的折叠引向正确的三级结构
 - b) 给蛋白质安上亚细胞到位的标志
 - c) 影响蛋白质的半寿期
 - d) 增加蛋白质与 DNA 结合的亲和性
 - e) 将蛋白质导向身体内的各种组织
2. 蛋白质氨基末端 ER 信号肽的存在常启动下列中的哪一项?
 - a) 蛋白质向线粒体中转运
 - b) 核糖体结合在核膜上
 - c) 蛋白质通过高尔基体转运
 - d) 蛋白质被引向过氧化酶体中
 - e) 蛋白质合成提前终止
3. SRP 结合在 ER 信号肽上怎样会使得该蛋白质定位于 ER 腔中?
 - a) 双功能的 SRP 在信号肽与 SRP 受体之间的相互作用使得核糖体结合在 ER 膜上
 - b) SRP 受体在与 SRP 结合后将信号肽切开
 - c) SRP 是与 RNA 结合的蛋白质,它将多核糖体与 SRP 受体交联
 - d) 细胞质中蛋白质合成结束后,SRP 将蛋白质引向 ER 膜的孔
 - e) SRP 阻断信号肽与核孔复合体的相互作用
4. 真核细胞中蛋白质降解的两种主要机制是:
 - a) 自噬和吞噬
 - b) 细胞溶质中的外肽酶和胞吞作用
 - c) 溶酶体的降解途径和 PEST 序列介导的降解
 - d) 溶酶体的降解途径和由遍在蛋白引导到蛋白体中
 - e) PEST 序列介导的降解和 Clp A/P 蛋白酶系统
5. 蛋白体是
 - a) 与蛋白质转运有关的细胞器
 - b) 水池中的小的单细胞水生生物
 - c) 蛋白质合成所需要的核糖核蛋白复合体
 - d) 自动消化线粒体的大分子
 - e) 降解遍在蛋白化的蛋白质的大分子

参 考 答 案

1. b 信号肽的功能就像信封上的投寄地址一样。
2. c 多数导向 ER 的蛋白质向高尔基体中移动。
3. a SRP 与信号肽和 SRP 两者结合,这促进了核糖体结合到 SRP 受体上以及随后的蛋白质转运。
4. d 溶酶体和蛋白体降解细胞中的大部分蛋白质。
5. e 蛋白体降解蛋白质并释放肽的碎片,其机制与蛋白酶的内部核心有关。

第 28 章 原核生物基因调节的机制

28.1 引言

在基因转录时进行控制是保存有限的细胞资源的有效途径。假若细胞不需要某种特定的基因产物,不生产它,就能节约能量。这种逻辑似乎可以解释,为什么在许多已研究过的基因表达的机制中,关键的控制点常常是在转录的起始。不过,正如第 25 ~27 章所述,还有许多种别的机制可以利用转录后和翻译后的过程来控制细胞中的蛋白质,使之处于稳态的水平。

我们从定义几个概念性的术语开始本章的讨论,这些术语适用于已得到充分认识的大肠杆菌中的系统,即乳糖(lac)操纵子的转录调节。之后,本章再描述大肠杆菌中 ara(阿拉伯糖)操纵子和 trp(色氨酸)操纵子,它们是原核生物中正和负转录控制的两个最好的例子。之所以专门选择大肠杆菌中这 3 个转录控制的事例,是因为它们说明了基因调节中的重要概念,当我们叙述真核生物中更为复杂的转录调节途径时,就以这些概念为基础。

注意,我们用斜体的小写字“gene”代表相当于这一基因的 DNA 片段,而用大写的正体字“Gene”代表这一基因的蛋白质产物。例如 lac Z 的表达结果是 Lac Z 的合成。

28.2 转录因子可能起转录激活剂或阻抑物的作用

如第 24 章所述,基因由调节和表达基因产物所需要的全部 DNA 序列所组成。在典型的编码蛋白质的基因中,这就是说启动子和上游的调节区在基因的非转录部分中,而 mRNA 转录物则代表转录单位。基因的调节区所以能控制启动子处转录起始速率的机制是什么?答案还不完全清楚;不过已经知道,与 DNA 结合的蛋白质会和基因调节区中专一的 DNA 序列相互作用。这些蛋白质通称为转录因子,推测它们与转录起始复合物中的蛋白质发生直接的或间接的相互作用。转录因子与 DNA 的结合和蛋白质-蛋白质的相互作用综合在一起的影响引起了转录起始复合体中的变化,这种变化又调节了 RNA 聚合酶的活性。常用转录诱导(起始速率增加)和转录阻抑(起始速率减小)两个术语来描述转录因子的功能。诱导转录的转录因子称为激活剂,而阻抑转录的则称为阻抑物(图 28.1)。

有些转录因子既能起激活剂的作用,又能起阻抑物的作用,这决定于细胞的生理状态和不同的启动子在 DNA 序列上的差异。转录因子与基因的调节区中的 DNA 序列结合,这些序列一般称为效应元件。转录因子结合到效应元件上的结果是转录起始的速率发生变化,这是蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质-DNA 相互作用的综合结果,这些相互作用改变了 RNA 聚合酶的活性。

基础转录速率低的基因常对激活剂发生响应(真核生物中常见的机制),而基础转录速率高的则对阻抑物发生响应(原核生物的典型机制)。而且,许多基因能够对激活剂和阻抑物二者都发生响应,视细胞的环境而定。

最后,某些称为管家基因(gene)的基因,编码的是重要的结构蛋白和代谢蛋白,它们可能对所有典型的转录调节物都不发生响应,而是进行组成性的表达。

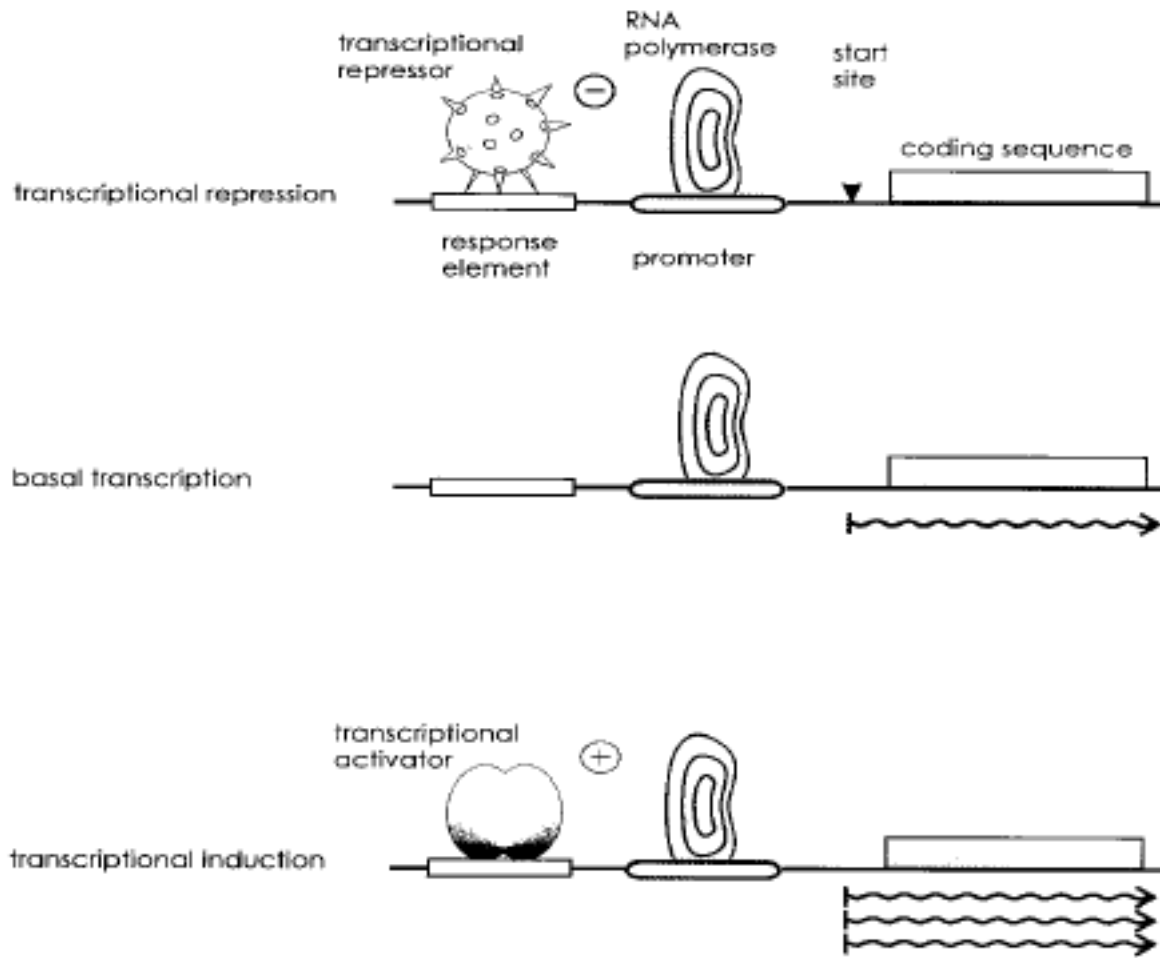


图 28.1 转录起始的 3 种速率可描述为阻抑的、基础的和诱导的转录因子对 RNA 聚合酶活性的调节产生了这些相对的启动子效率。

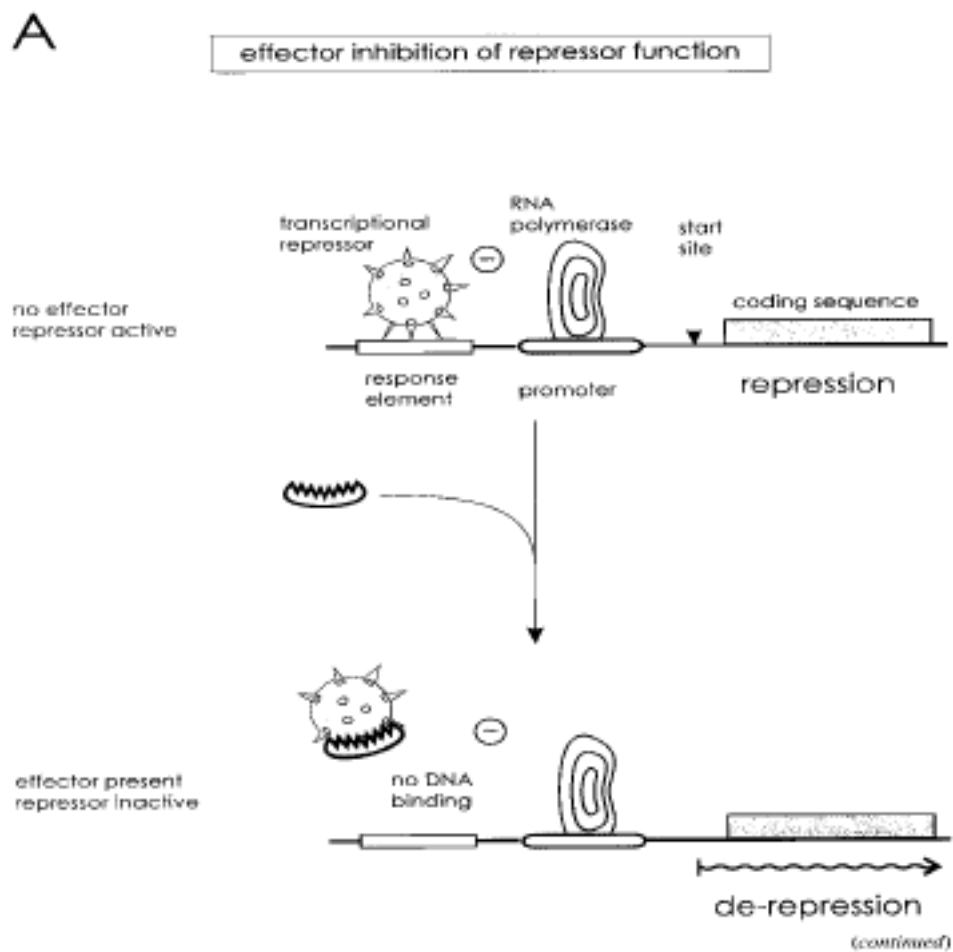


图 28.2(a) 由于与效应子分子相互作用, 阻抑物可被抑制转录因子的功能也可为翻译后的修饰(如磷酸化作用)所调节(见图 29.10)。

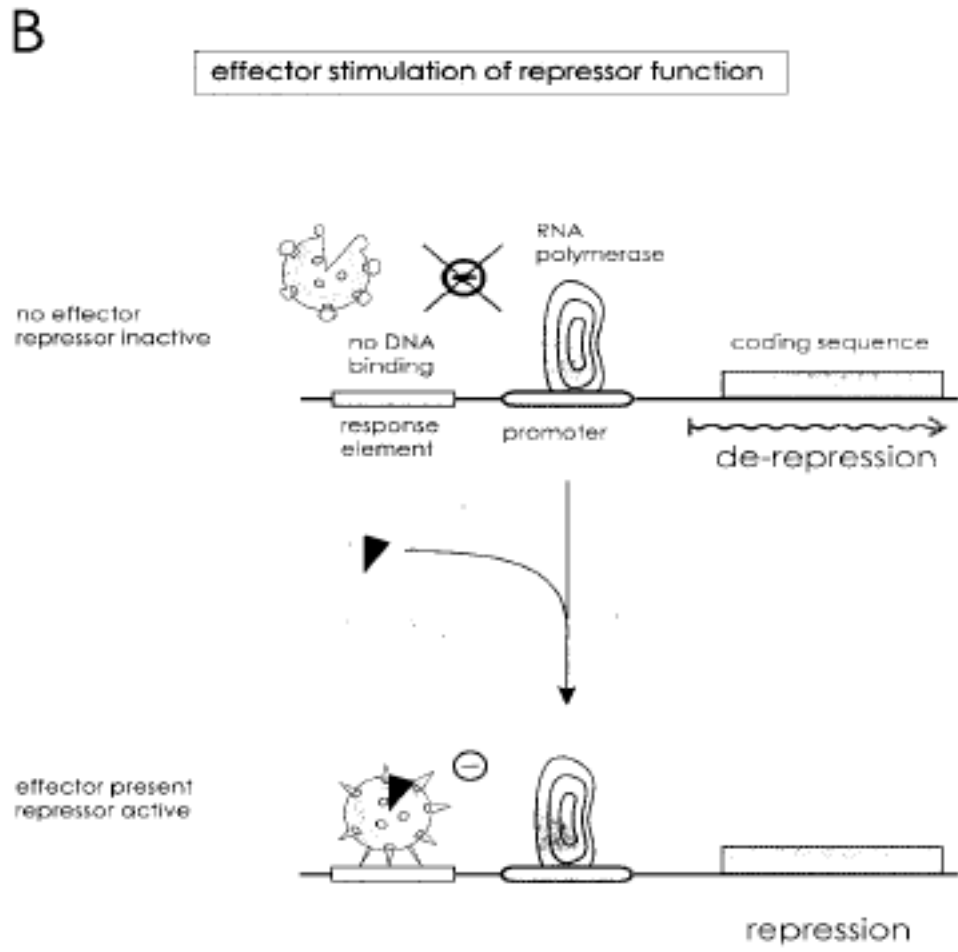


图 28.2(b) 由于与效应子分子相互作用,阻抑物可被激活
转录因子的功能也可为翻译后的修饰(如磷酸化作用)所调节(见图 29.10)。

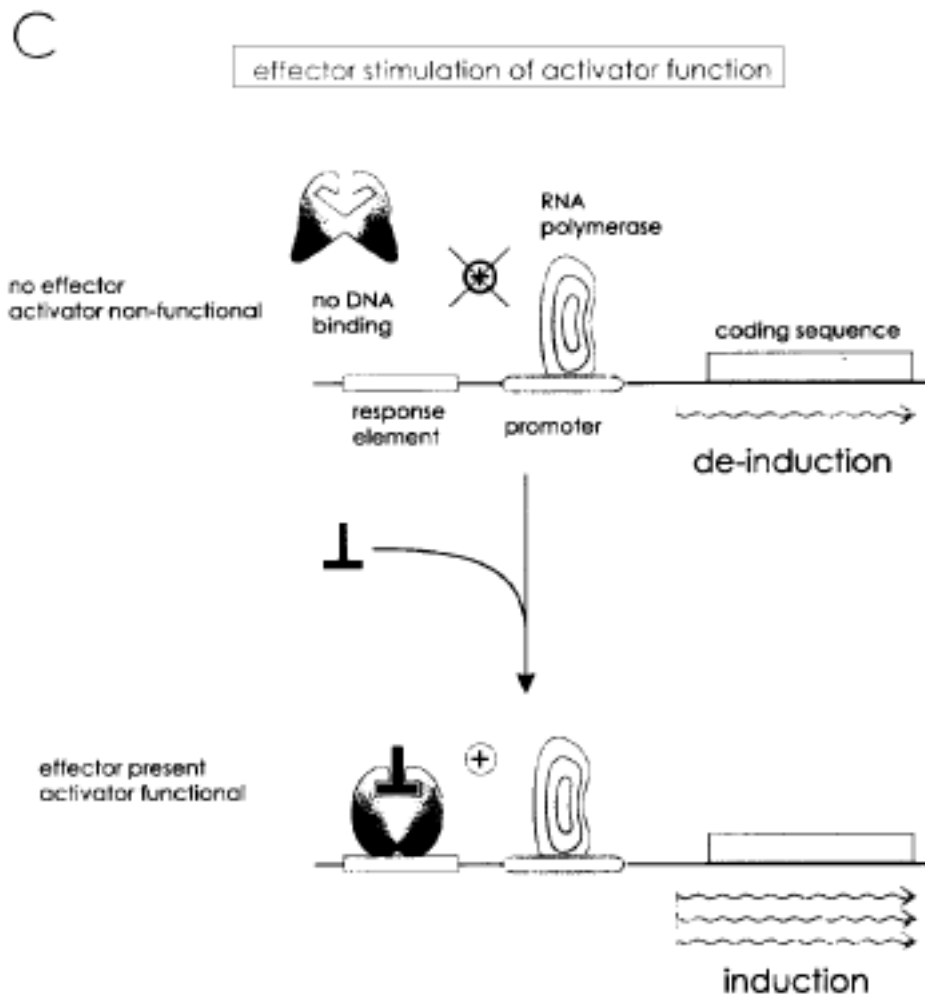


图 28.2(c) 由于与效应子分子相互作用,激活剂可被促进
转录因子的功能也可为翻译后的修饰(如磷酸化作用)所调节(见图 29.10)。

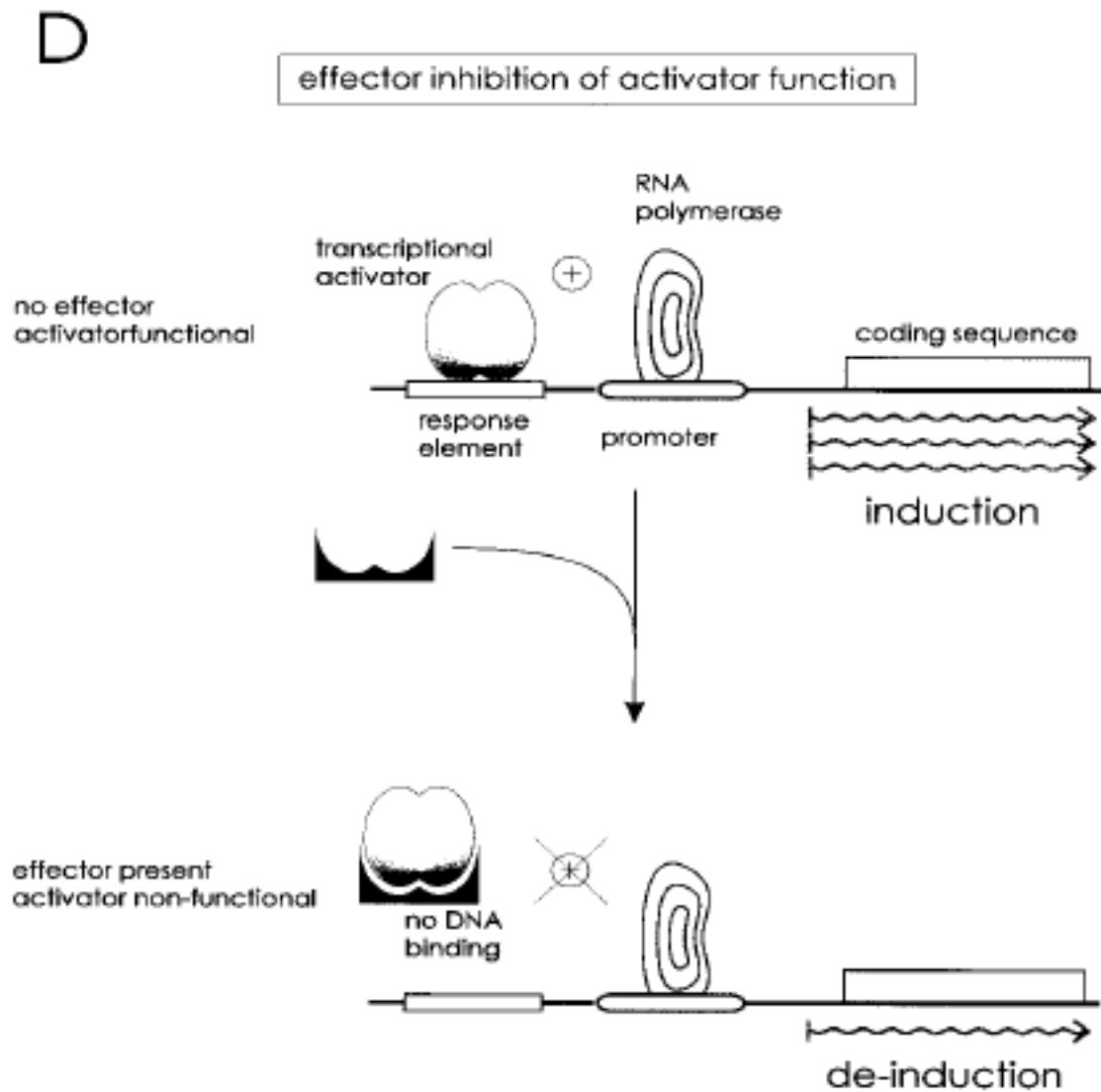


图 28.2(d) 由于与效应子分子相互作用, 激活剂可被抑制

细胞响应于胞外信号而对转录进行细调的机制常常是调节转录因子与 DNA 的结合。例如, 小的效应子分子与转录因子的相互作用就会改变其与 DNA 结合的活性。图 28.2 说明在效应子分子存在或不存在的条件下典型的激活剂和阻抑物如何能受到控制。

原核生物中, 效应子可能是 cAMP 或某些小分子的代谢产物, 而真核生物的转录因子则常由磷酸化作用来调节(第 29 章)。从图 28.2 中的示意模型可以看出至少各有两种机制可以增加(诱导和去阻抑)和减少(阻抑和去诱导)转录速率。在图中的例子中, 关键的调节步骤是调节与 DNA 结合的活性。正如第 5 章中所述, 在 DNA 存在或不存在情况下的许多种转录因子的分子结构已由 X-射线结晶学解答了。

28.3 大肠杆菌中 lac 操纵子的转录控制

要了解细胞环境中的变化如何能改变具体基因的转录速率, 我们首先研究乳糖和葡萄糖对大肠杆菌的 lac 操纵子中基因转录的影响。常会发现细菌中编码那些在代谢途径中共同起作用的蛋白质的基因, 其 DNA 片段在位置上是相连的, 事实上, 这些基因可能使用同一个启动子。像细菌中这样的基因簇称为操纵子。大肠杆菌中的 lac 操纵子长约 5000 个碱基对, 包括 lac 启动子和调节区(称为 lac 操纵基因)以及 3 个基因(lac Z, lac Y 和 lac A)的编码序列, 如图 28.3 所示。

当一个 mRNA 转录物中有一种以上蛋白质的编码信息, 而那些蛋白质又被翻译成独立的多肽时, 它就称为多顺反子 mRNA。这种多顺反子 mRNA 在细菌中是常见的。多顺反子

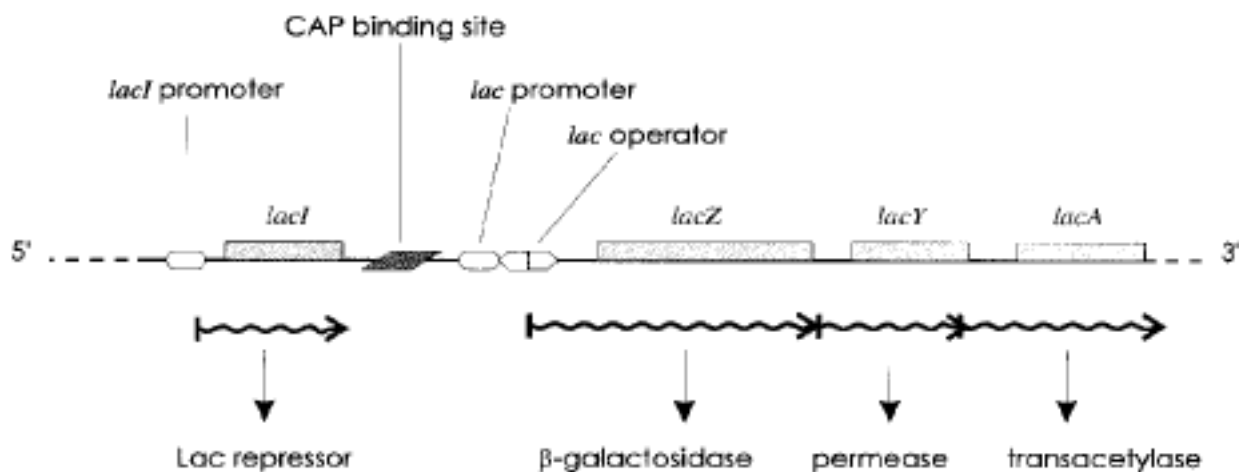


图 28.3 大肠杆菌中 lac 操纵子功能图

注意, lac I 基因的位置与 lac 操纵子相连,但并不认为它是 lac 操纵子的一部分,因为调节 lac I 启动子的因子并不是调节 lac 操纵子的因子。

lac mRNA 被翻译后产生 β -半乳糖苷酶(Lac Z)、通透酶(Lac Y) 和硫代半乳糖苷转乙酰基酶(Lac A)。环境中乳糖或其他 β -半乳糖苷,便会诱导 lac 操纵子的转录。其结果是所有这三种酶都增多,而最重要的是 β -半乳糖苷酶,此酶将乳糖转变为别乳糖;在第二个反应中又使别乳糖裂解,产生半乳糖和葡萄糖(图 28.4)。生物化学的研究说明别乳糖能有效地诱导 lac 操

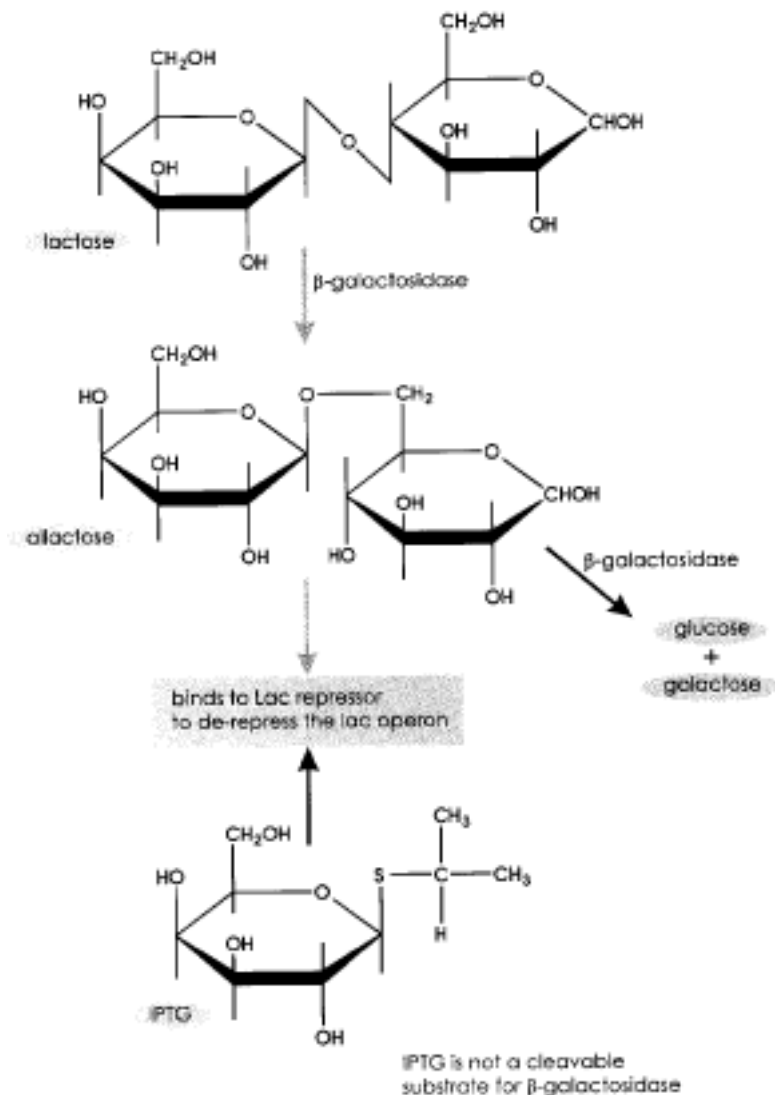


图 28.4 别乳糖和 IPTG 都是 lac 操纵子的诱导物

β -半乳糖苷酶迅速使乳糖产生半乳糖和葡萄糖,但 IPTG 不能被 β -半乳糖苷酶水解,因此在生理上是 lac 操纵子的更为强有力的诱导物。

纵子的转录, 据此发现了一种合成的不会被水解的 β -半乳糖苷, 名为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 它是 lac 操纵子的强有力的诱导物。有些细菌中有能够利用 lac 启动子的质粒载体, 对于这类细菌, 常利用 IPTG 诱导其中重组蛋白质的表达。

(一) IPTG 通过使阻抑物失活而使 lac 操纵子去阻抑

关于 IPTG 存在下 lac 操纵子的调节机制, 遗传学提供了第一条线索。已分离出了大肠杆菌的几个突变体, 它们在导致 lac mRNA 水平提高的调节途径方面都有缺陷。如图 28.5a 所示, 第一类突变体的 lac 操纵子的图和 DNA 序列的分析都表明突变在称为 lac 操纵基因(从功能上定义, 应为转录因子结合位点或效应元件)的 lac 启动子区域内。这些操纵基因突变体的表现型指明, lac 基因表达的水平是组成性的, 就是说不管有无 IPTG, 基因总是有活性的。这些突变体就称为 lac O^c 突变体, 即操纵基因是组成型的突变体。

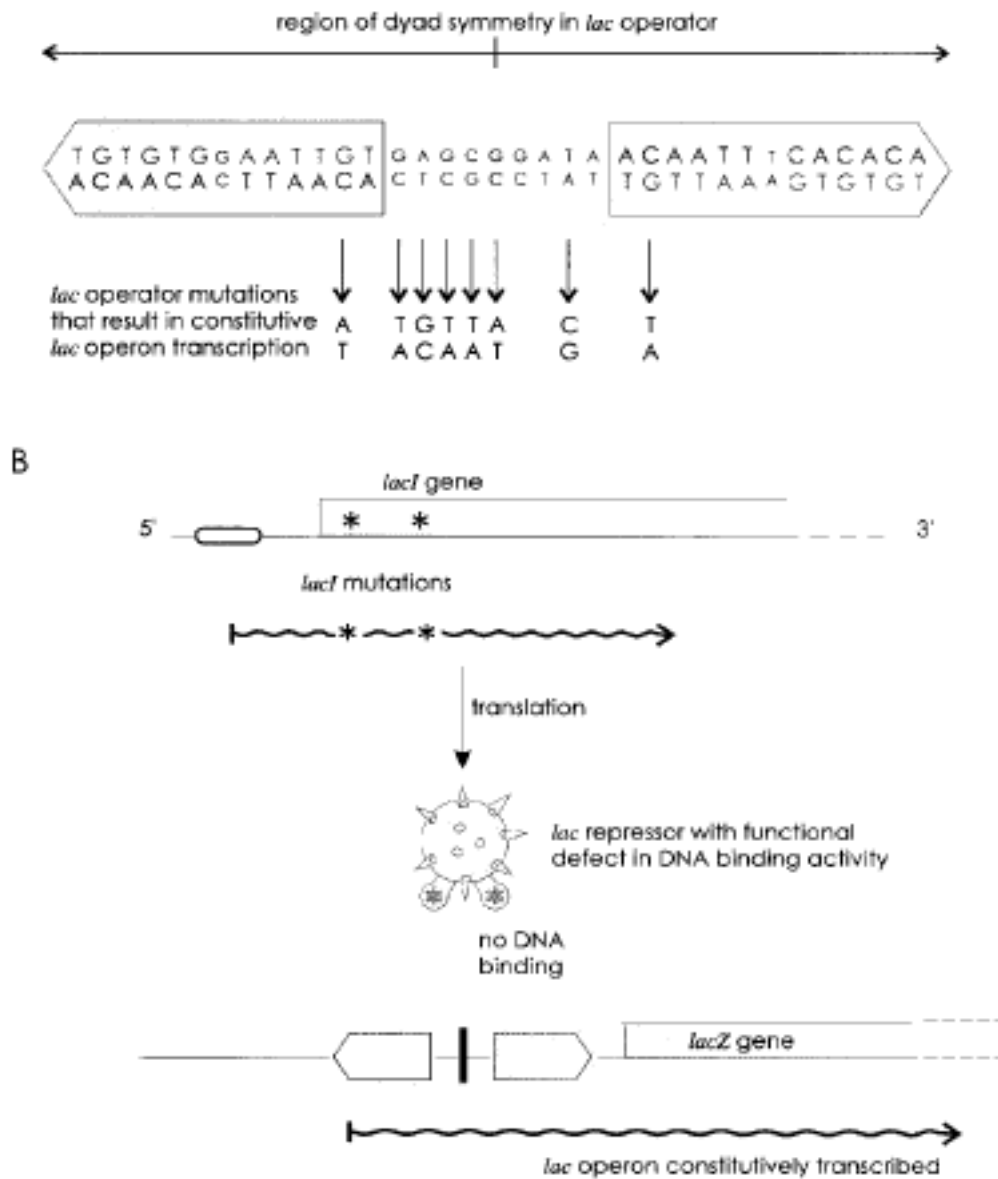


图 28.5 两类组成性的 lac 突变, 其结果是即使没有诱导物 lac 操纵子也会表达 (a) lac 操纵基因的突变改变了 Lac 阻抑物结合位的核苷酸序列, 此序列是具有反向重复序列的区域; (b) lac 阻抑物(LacI)的突变改变了其中与 DNA 结合的结构域中的氨基酸序列, 因而破坏了其与 DNA 结合的功能。

第二种组成性的表现型存在于 lacI 基因的图中, 此基因恰好在 lac 操纵子之外。lacI 突变体的分子分析表明它在阻抑物蛋白的编码序列中(图 28.5b)。体外的 DNA 结合分析示证有些 lac I 突变是由于合成了有缺陷的阻抑物蛋白, 这种蛋白质与 DNA 结合的活性低, 因为突变

发生在与 DNA 结合的功能域中。遗传学和生物化学的研究都证明 lac 操纵子是由 LacI 阻抑物蛋白质控制的。在没有诱导物(乳糖或 IPTG)的情况下, LacI 阻抑物与 lac 操纵基因的 DNA 序列结合得非常牢固。LacI 阻抑物与 lac 操纵基因结合的平衡常数约为 $2 \times 10^{13} (\text{mol/L})^{-1}$ 。与专一序列结合的亲和力比 LacI 阻抑物与非专一的 DNA 序列的亲和力高约 10^7 倍。

IPTG 与 LacI 阻抑物相互作用而起着调节其 DNA 结合活性的作用。体外的 DNA 结合实验揭示: LacI 阻抑物-IPTG 复合体与 lac 操纵基因序列的亲和性比单独的 LacI 阻抑物与该序列的亲和性低 10^3 倍, 虽然 IPTG 对阻抑物与非专一位点的结合无影响。总而言之, IPTG 作为 lac 基因表达的诱导物的机制是 lac 操纵子的转录去阻抑。如图 28.6 所示, lac 阻抑物的结合位点 (lac 操纵基因) 与 RNA 聚合酶的结合位点有重叠, 这就支持了 LacI 阻抑物的作用是转录起始的抑制剂的看法。体外的 DNA 足迹法研究也指出 RNA 聚合酶和 LacI 阻抑物与操纵基因序列的结合是相互排斥的。

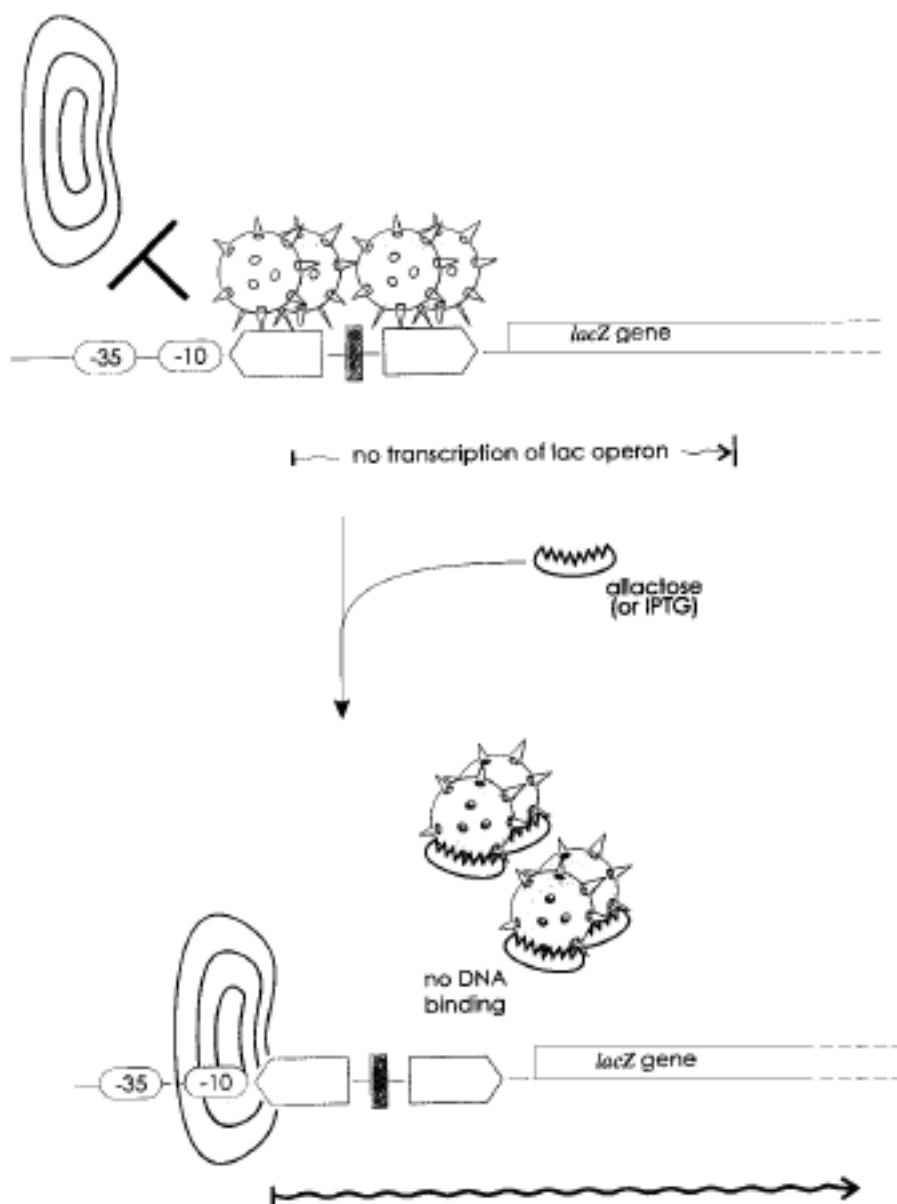


图 28.6 IPTG 对 lac 操纵子发生转录去阻抑的机理
注意, Lac 阻抑物以四聚体的形式结合在 lac 操纵子上, 此图中以两个二聚体结合在反向重复序列上的形式示其大意。

(二) 分解代谢基因-激活蛋白(CAP)对 lac 操纵子起正调节作用

由去阻抑而控制 lac 操纵子只是问题的一个方面。另一种调节系统也在 lac 操纵子的转

录诱导中起作用。葡萄糖是细菌优先利用的碳源,当葡萄糖和其他糖同时存在时,葡萄糖首先被代谢。这一途径部分为分解代谢基因-激活蛋白(CAP)所控制,CAP 激活操纵子(如 lac 操纵子)的转录,但只有当乳糖存在而葡萄糖水平低时才有作用。CAP 控制 lac 操纵子的机制是这样阐明的:发现 CAP 是以高亲和力与存在于基因启动子中 DNA 序列结合的转录因子,而这些基因是受分解代谢的控制的,如乳糖、半乳糖和阿拉伯糖操纵子。

为着了解 CAP 对转录的控制,我们来研究 CAP 对 lac 操纵子的调节。在葡萄糖和乳糖都存在的情况下,由 lac 启动子引发的转录是相当弱的,即使阻抑物未被结合也很弱。然而,当葡萄糖水平降低而乳糖仍然存在时,lac 操纵子的转录突然增加。其理由就是 CAP 是 lac 操纵子的激活剂,它对转录的起始有正调节作用。生物化学的交联研究已证明,已知为转录调节所需要的 CAP 上的一个区域与大肠杆菌 RNA 聚合酶 σ -亚基的羧基末端在位置上有直接接触,这是当它们在 lac 启动子上结合成一三元复合体时发生的。这些资料,加上遗传分析的结果,都表示 CAP 促进 RNA 聚合酶与启动子的结合和开放的复合体的形成。

葡萄糖的存在与否如何控制 CAP 与 lac 操纵子的结合呢?答案与在 lac 阻抑物方面已证明的类似。在此特例中,cAMP 起着调节者的作用,它与 CAP 结合,对其与 DNA 结合的活性发生正控制。大肠杆菌中葡萄糖的运入导致腺苷酸环化酶的去激活,其结果是细胞内 cAMP 的水平低而 CAP 失活。当葡萄糖水平低时,腺苷酸环化酶活化,胞内的 cAMP 水平升高,于是 CAP 活化。图 28.7 综合了葡萄糖和乳糖水平高和低的条件下 lac 操纵子的转录活性。只有在葡萄糖水平低而又有乳糖时,lac 操纵子的转录才最强,这是 LacI 阻抑物介导的去阻抑和依

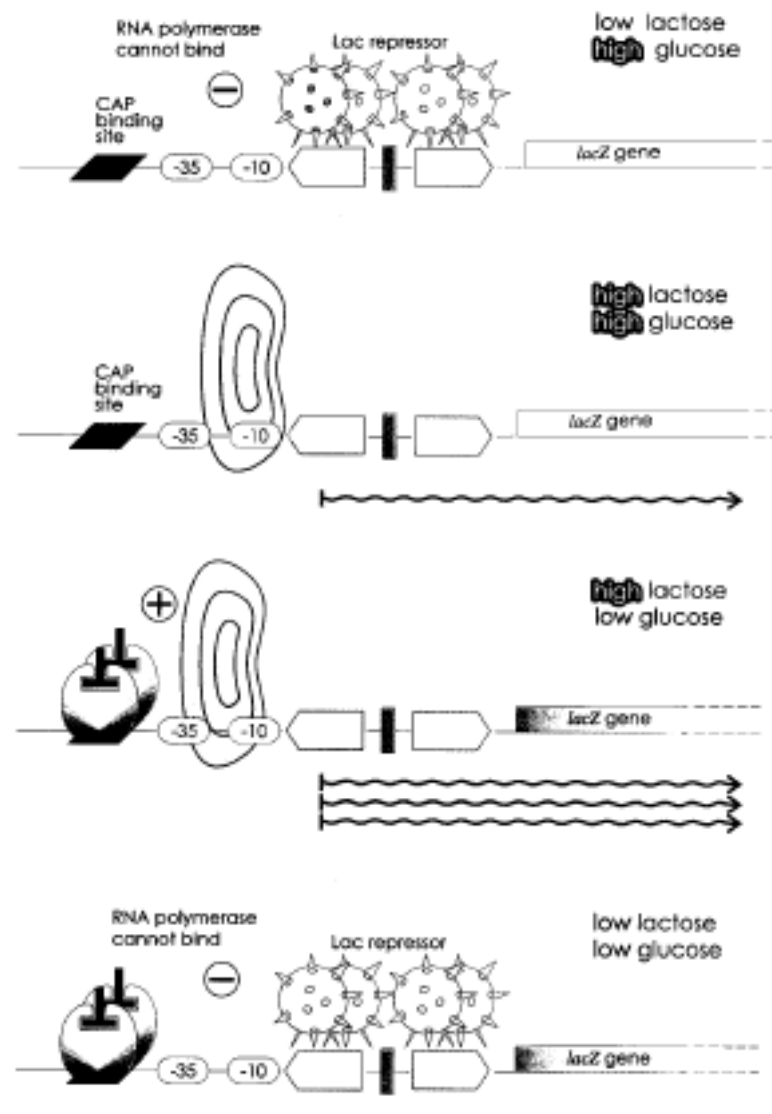


图 28.7 在可利用的乳糖和葡萄糖不同的情况下,lac 操纵子的去阻抑和活化的综合效应

赖于 CAP 的转录诱导的综合效应,而这种诱导又是通过与 RNA 聚合酶的 σ -亚基发生直接的相互作用实现的。当乳糖和葡萄糖都少时又会发生什么现象? 实验证明,结合在 lac 操纵基因上的 Lac 阻抑物即使在活化的 CAP 存在时,也能阻断 RNA 聚合酶与启动子的结合(图 28.7)。

基因表达调节方面的几个重要概念可综合如下, lac 操纵子就是代表,这些概念也适用于其他系统。

- (1) 细胞中环境的变化会通过转录因子与 DNA 结合的活性的变化而使基因表达发生变化。
- (2) 转录调节因子与 DNA 的结合有高度的专一性,常与亚基的多聚体的形成有关。
- (3) 转录因子能够或是抑制或是促进转录起始的速率,这最可能是通过与 RNA 聚合酶的直接或间接的蛋白质-蛋白质相互作用这样一种机制而发生的。

28.4 AraC 既是阿拉伯糖操纵子的阻抑物,又是激活剂

大肠杆菌中的阿拉伯糖(ara)操纵子利用某些和 lac 操纵子一样的调节原理,但是还发现了 3 种另外的机制: (i) 在 ara 操纵子中,转录因子基因的表达为其自身的基因产物所自调节(AraC 控制 araC 的表达); (ii) 转录因子可能以依赖于效应物的方式起阻抑物或激活剂的作用(阿拉伯糖 AraC 从阻抑物转变为激活剂); (iii) 转录因子常常共同起作用引起转录起始的变化(AraC 和 CAP 必须二者都被结合才能充分诱导 ara 操纵子)。

对于大肠杆菌,有阿拉伯糖作为碳源是诱导 ara 操纵子的信号,该操纵子编码阿拉伯糖代谢所需要的 3 种蛋白质:核酮糖激酶(araB 基因),阿拉伯糖异构酶(araA 基因)和核酮糖-5-磷酸差向异构酶(araD 基因)。这 3 个基因(araBAD)的表达为 AraC 所调节,它是由 ara 操纵子中的第四个基因 araC 编码的。图 28.8 说明 ara 操纵子的 3 个结构组分,它有助于说明何

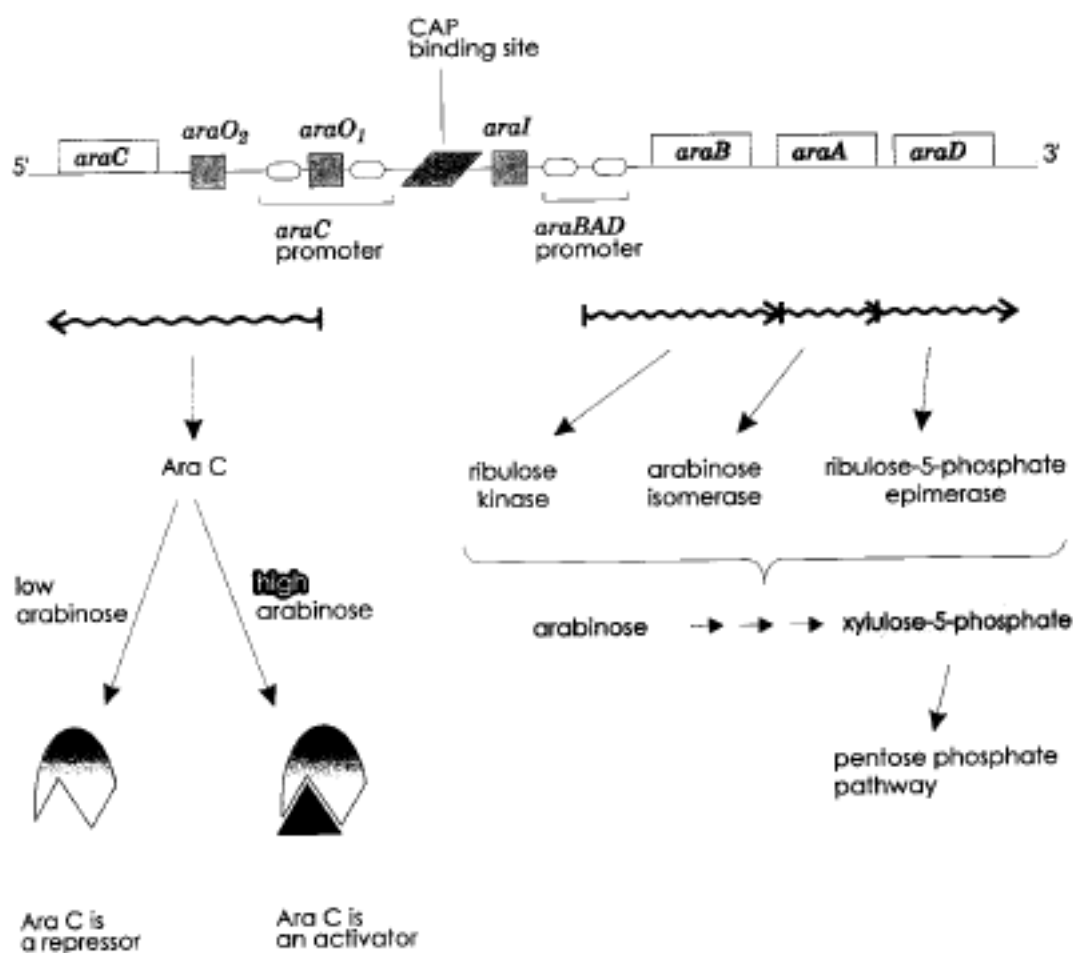


图 28.8 ara 操纵子, 示 AraC 和 CAP 的结合位点和 araC、araB、araA 和 araD 基因
阿拉伯糖结合到 AraC 上就把它由转录抑制物转变为转录激活剂,
araC 和 araBAD 启动子是由相对链上的 DNA 序列规定的。

以它们的调节是如此密切: (i) *araBAD* 和 *araC* 的转录单位在 DNA 的相对链上, 而且彼此是隔开的, 虽然它们是由一调节序列控制的(然而 *araC* 和 *araBAD* 基因是由独立的启动子转录的, 启动子分别为 P_C 和 P_{BAD}); (ii) 在 *ara* 操纵子的调节区内有 3 个不同的 AraC 的结合位点, 分别称为 $araO_1$ 、 $araO_2$ 和 *araI* 操纵基因位点; (iii) 在两个 *ara* 操纵基因位点之间有一个 CAP 结合位点。图 28.9 所示为 *ara* 操纵子的启动子结构。

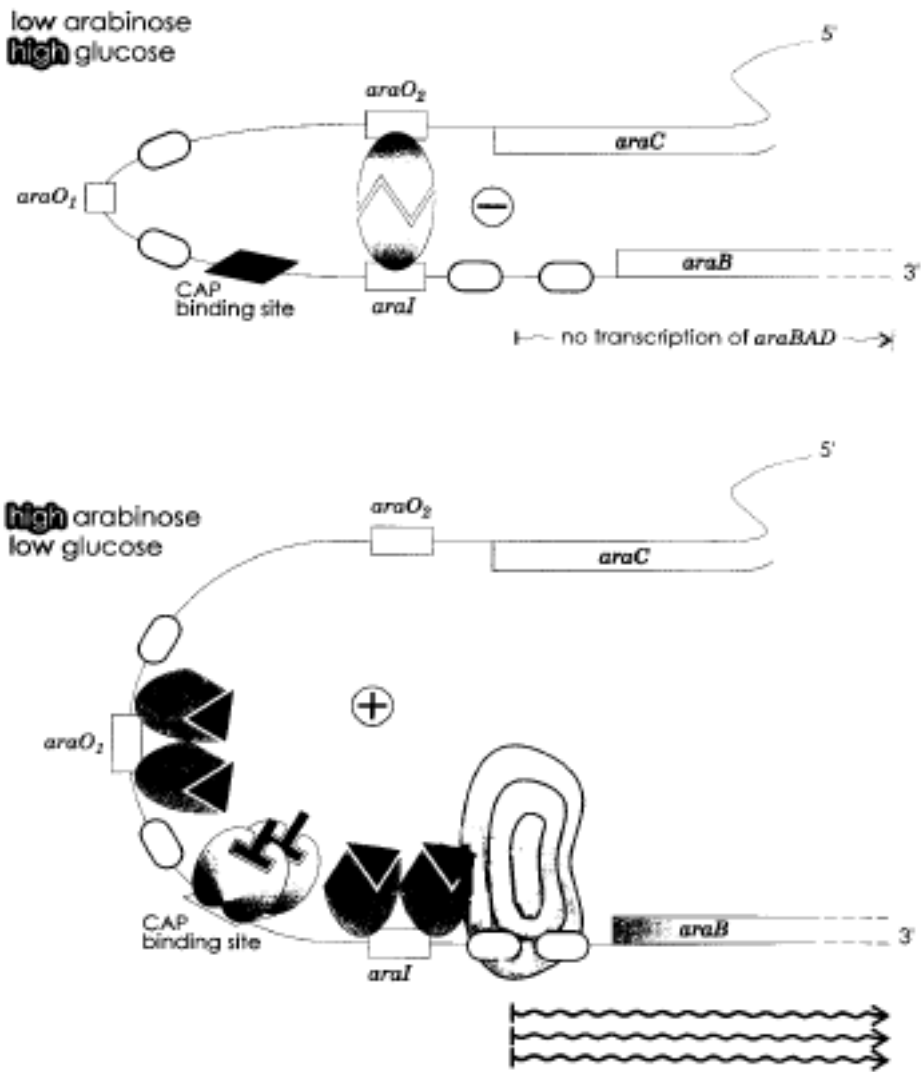


图 28.9 AraC 既是 *ara* 操纵子的阻抑物, 又是激活剂
阿拉伯糖水平低时, AraC 以单体的形式与 $araI$ 和 $araO_2$ 结合, 使 DNA 弯曲, 这会有效地阻断 *ara* 操纵子的转录。有阿拉伯糖时, AraC 以二聚体的形式与 $araO_1$ 和 *araI* 位点结合; 当 CAP 结合在其位点上时, 这会导致 *ara* 操纵子转录的增强。

araC 的表达是通过自调节机制控制的, 此机制与 AraC 蛋白有关。在无阿拉伯糖时, AraC 起着转录抑制物的作用。细胞中 AraC 蛋白的稳态水平的测定表明, 大约要 40 个 AraC 分子才能阻抑 *araC* 的转录。因此, 当 AraC 的水平低时(例如, 细胞分裂紧后), *araC* 一直在表达, 只有到有足够的 AraC 阻抑其转录时才停止。在原核生物和真核生物中, 转录的自调节机制控制着转录因子基因表达的例子有很多。

当细胞中葡萄糖水平高因而使 cAMP 浓度低, 而且阿拉伯糖水平也低时, AraC 就以二聚体的形式与 $araO_2$ 和 *araI* 两个操纵基因位点结合, 从而阻抑 *araBAD* 的转录。物理的、遗传的和生物化学的研究都已证明, 在这些条件下, 在 $araO_2$ 和 *araI* 之间, DNA 会环出序列之外, 如图 28.9 所示。然而当阿拉伯糖水平高而葡萄糖水平低(cAMP 多)时, CAP-cAMP 复合体就能结合在 *ara* 操纵子的 CAP 结合位点上并破坏 DNA 的环。此外, 阿拉伯糖还起着 AraC 的调节者的作用, 并将它由阻抑物转变为激活剂。结合在 AraC 上的阿拉伯糖好像会改变 AraC 的同

二聚化的性质并促进 AraC-CAP 复合体的形成。在这些条件下, AraC-阿拉伯糖起的是转录激活剂的作用, 因为它是 araBAD 转录的 CAP-cAMP 诱导所必需的。

随着阿拉伯糖被 araBAD-编码的蛋白质所代谢而水平降低, AraC 又转变回去, 成为阻抑物, 而 araBAD 的表达就减少, 即使细胞中仍有 CAP-cAMP 复合体也是如此。有趣的是, 当葡萄糖和阿拉伯糖都丰富时, ara 操纵子也被阻抑, 虽然其机制还不完全清楚, 但这项结果却支持这种模型, 即 araBAD 的诱导依赖于 AraC-阿拉伯糖和 CAP-cAMP 这两种复合体。

控制 ara 操纵子的两种机制, 即 DNA 成环和多种蛋白质的相互作用, 是真核生物中受调节的基因表达的标志。这些机制给转录提供了更大的灵活性和进行综合控制的机会。例如, DNA 成环使得效应元件可以与启动子之间有不同的距离, 从而增加了一个基因所能有的效应元件的数目(这也意味着基因组的进化不一定要精确)。此外, 假若基因的控制需要一个以上的转录因子, 那么多个信号可被整合起来并导致转录的细调。正如 ara 操纵子的控制这一事例所说明的, 转录的调节很少是全或无的现象, 而是在启动子利用的最优化(诱导)与次优化(阻抑)之间的平衡。

28.5 细胞中色氨酸的浓度对 trp 操纵子的双重控制

控制着 lac 和 ara 操纵子的生理信号是为了获得代谢能对碳源的利用。但色氨酸(trp)操纵子则不同, 它对生物合成的需要敏感, 当细胞内色氨酸的浓度在最适水平以下时, 它就被转

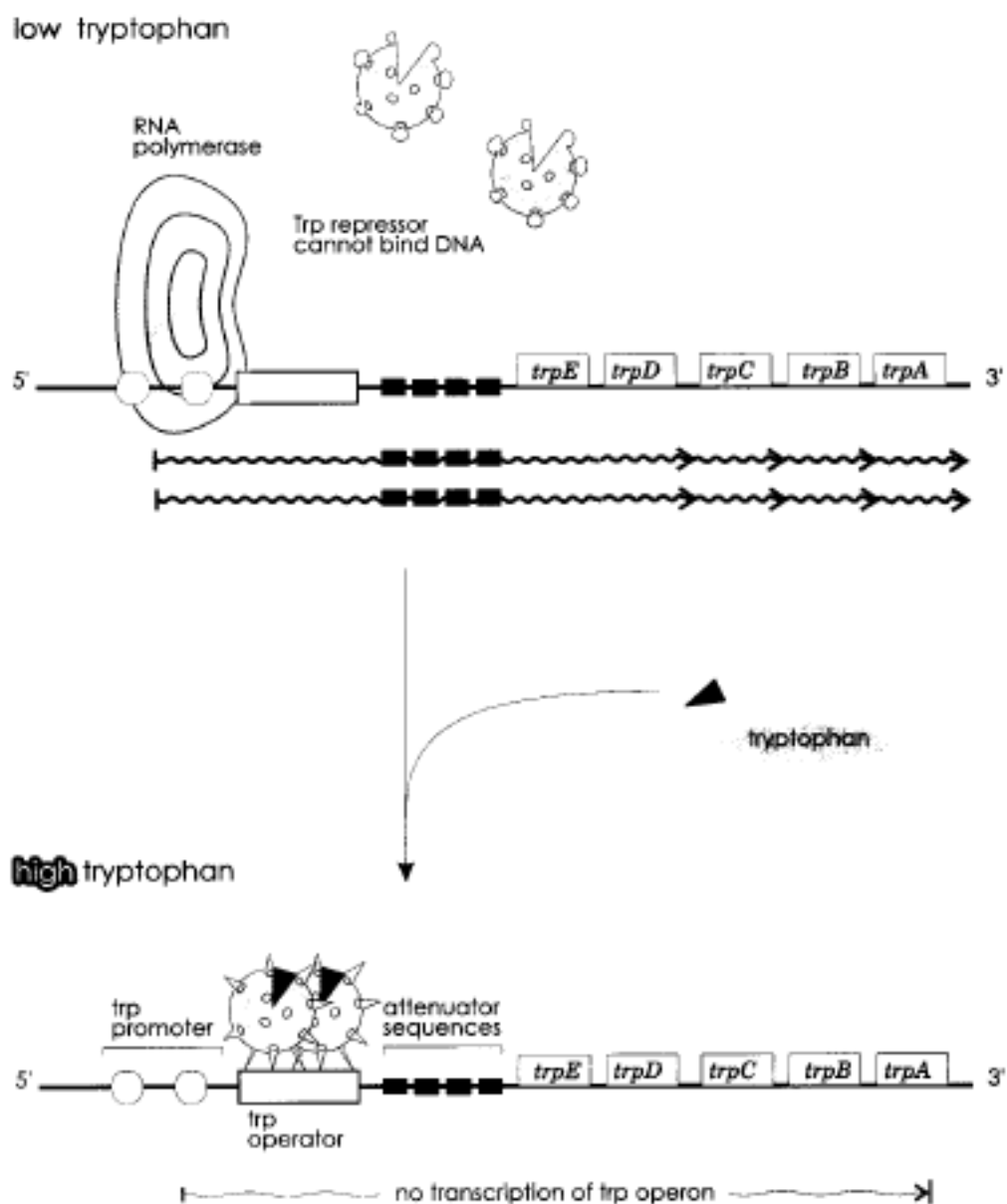


图 28.10 激活 Trp 阻抑物与 DNA 结合的活性对 trp 操纵子进行转录控制

录, 这里所说的最适水平是指有效地合成蛋白质所需要的最适水平。trp 操纵子由启动子和操纵基因区域组成, 操纵基因控制一种多聚顺反子 mRNA 的表达, 此 mRNA 编码色氨酸生物合成所需要的 5 种蛋白质。

(一) Trp 阻抑物结合 DNA 的活性由色氨酸控制

trp 操纵子的转录控制由 Trp 阻抑物这种蛋白质介导, 它与 trp 操纵子序列结合(图 28.10)。Trp 阻抑物与 DNA 结合的活性直接由色氨酸控制, 色氨酸直接结合在 Trp 阻抑物上并起着效应物分子的作用。在色氨酸浓度高时, Trp 阻抑物-色氨酸复合体形成同二聚体并紧密地结合在 trp 操纵基因序列上, 从而阻断转录。当色氨酸水平低时, 无色氨酸的 Trp 阻抑物则存在于一种无活性的形式, 不能与 DNA 结合。在这些条件下, trp 操纵子就被 RNA 聚合酶转录而色氨酸生物合成途径就被激活了。

(二) trp 多顺反子 mRNA 转录延伸的弱化控制

Charles Yanofsky 发现了色氨酸生物合成途径的第二个水平的控制, 他鉴定出了一种对结合 Trp 抑制物的能力不起作用的 trp 操纵子的突变。Yanofsky 及其同事鉴定出了一种新形式的转录控制, 他们称之为弱化作用, 这种作用依赖于原核生物中转录与翻译之间独特的联系。如图 28.11 所示, TRP-tRNA^{Trp} 在细胞内的浓度决定核糖体是否在 trp mRNA 的一组密码

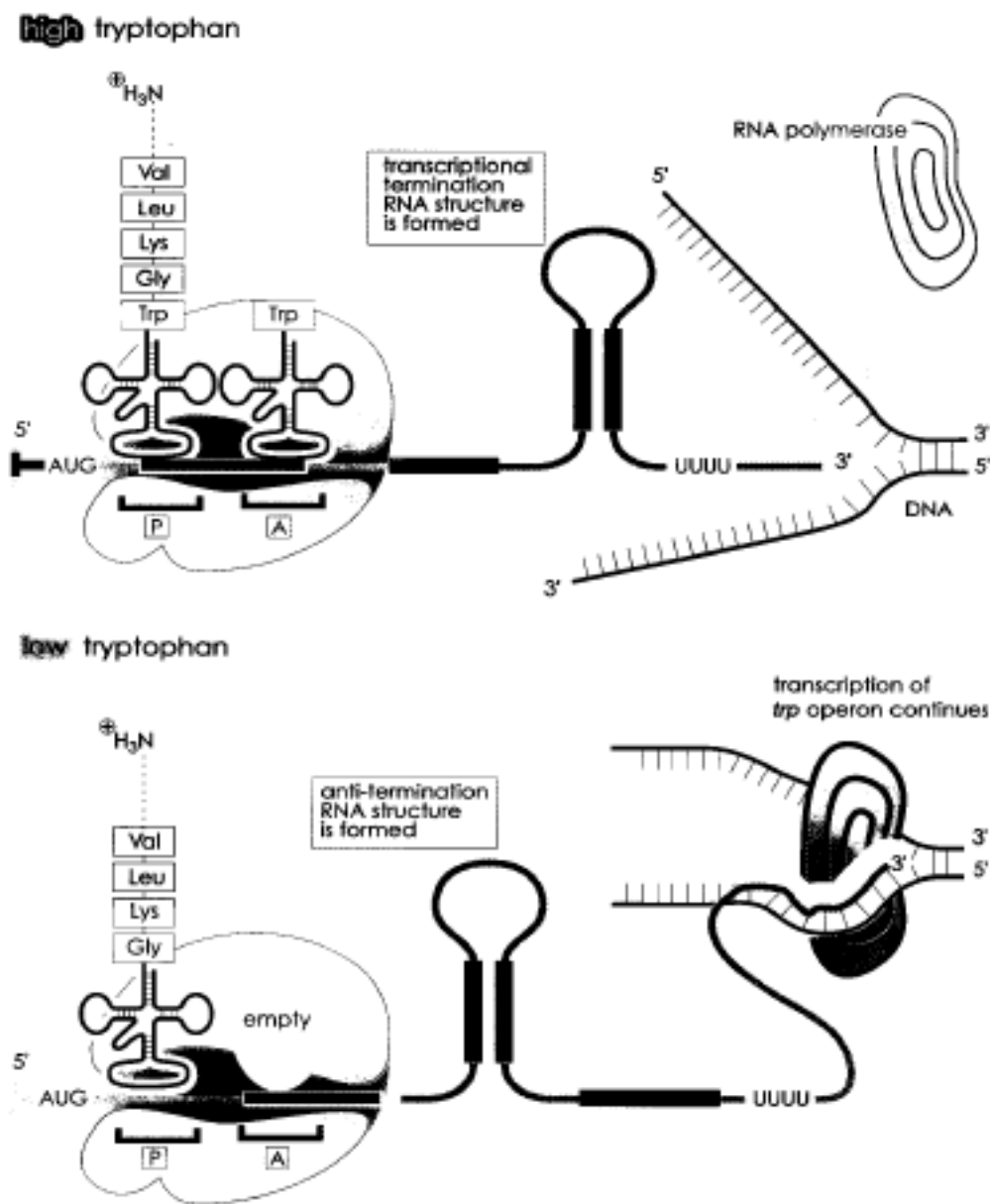


图 28.11 trp 操纵子转录弱化的机制

由于转录和翻译之间功能上的联系, 原核生物中可能发生转录的弱化, trp 操纵子即为其一例。

子上暂停, 这组密码子是编码下一个 Trp 残基的。当色氨酸水平高, 而且又有 TRP-tRNA^{Trp} 时, 就会形成转录终止发夹环而 RNA 聚合酶就从 DNA 模板上掉下来, 位置恰好在聚尿苷酸架的下游。这种将翻译与转录联系起来的控制机制称为弱化作用。由于色氨酸有限而细胞中 TRP-tRNA^{Trp} 水平低时, 核糖体就暂停在 RNA 中的一对色氨酸密码子上。这种瞬间的核糖体暂停就给新生的 RNA 中形成另一个发夹结构留出了时间, 这就破坏了转录终止信号, RNA 聚合酶又能继续翻译 DNA 模板, 而转录也能完成(图 28.11)。

综上所述, Trp 介导的转录阻抑和对 TRP-tRNA^{Trp} 敏感的弱化作用二者的综合效果是提供了一种灵敏的机制, 可以控制对色氨酸合成途径的利用。

28.6 小 结

(1) 转录因子是与 DNA 结合的蛋白质, 它与称为效应元件的专一的 DNA 序列相互作用, 效应元件位于基因的调节区或启动子区内。在细菌系统中, 这些效应元件称为操纵基因位点。转录因子可以激活或阻抑转录, 视启动子的前后序列和细胞的生理状态而定。转录因子与 DNA 结合的活性常可为效应物分子所调节。

(2) 大肠杆菌中的 lac 操纵子由一组基因簇组成, 这些基因编码乳糖代谢所需要的酶。这些基因作为单个多顺反子的一部分而全部被转录。lac 操纵子的转录为 LacI 阻抑物和分解代谢基因激活蛋白(CAP)二者所控制。乳糖和其他 β -半乳糖苷, 如 IPTG, 与 LacI 阻抑物结合并使其与 DNA 专一序列结合的能力降低约 1000 倍。在乳糖存在下, lac 操纵子被转录, 乳糖代谢所需要的蛋白质就会被合成。

(3) CAP 是 lac 操纵子的正调节剂, 在乳糖存在(LacI 无活性)和葡萄糖水平低(这使得 cAMP 水平提高, 因为腺苷酸环化酶被活化)时, CAP 能大大促进 lac 操纵子的表达。在这些情况下, CAP-cAMP 复合体结合在 lac 操纵子上, 并直接与 RNA 聚合酶的 σ -亚基相互作用。一般认为这种相互作用促进 RNA 聚合酶与启动子的结合和开放的启动子复合体的形成。

(4) ara 操纵子为 AraC 的活性所正控制, AraC 能对 ara 操纵子的转录既起阻抑物的作用, 又起激活剂的作用, 视细胞内阿拉伯糖和葡萄糖的浓度而定。无阿拉伯糖时, AraC 是阻抑物, 与 ara 操纵子中两个不同的操纵基因位点结合, 导致起抑制作用的 DNA 环的形成; 而在与 AraC 结合的阿拉伯糖存在时, 以及 CAP-cAMP 复合体存在时, 抑制性的 DNA 环被破坏, CAP-cAMP 复合体就能促进 ara 操纵子的转录。

(5) trp 操纵子在两个水平上控制色氨酸生物合成酶的产生, 视细胞内色氨酸的浓度而定。当色氨酸水平高时, Trp 阻抑物-色氨酸复合体就会形成, Trp 阻抑物就结合在 trp 操纵子上, 抑制其转录。第二个水平的控制称为弱化作用, 这是当 TRP-tRNA^{Trp} 很多而且形成终止结构时, 由于 RNA 聚合酶离开了 mRNA 而使转录提前终止。

参 考 资 料

Ansari A. Z., Bradner J. E., O'Halloran T. V. (1995): DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*, 374:371.

Antson A. A., Otridge J., Brzozowski A. M., et al. (1995): The structure of trp RNA-binding attenuation protein. *Nature*, 374:693.

Blatter E. E., Ross W., Tang H., Gourse R. I., Ebright R. H. (1994): Domain organization of RNA poly-

- merase a subunit C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding. *Cell*, 78: 889.
- Busby S. , Ebright R. H. (1994) : Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell*, 79: 743.
- Bushman F. D. (1992) : Activators, deactivators and deactivated activators. *Curr. Biol.* , 2: 673.
- Bustos S. A. , Schleif R. F. (1993) : Functional domains of the AraC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. , USA* 90: 5638.
- Chen Y. , Ebright Y. W. , Ebright R. H. (1994) : Identification of the target of a transcription activator protein by protein-protein photocrosslinking. *Science*, 265: 90.
- Crothers D. M. (1994) : Upsetting the balance of forces in DNA. *Science*, 266: 1819.
- Gralla J. D. (1991) : Transcriptional control—Lessons from an *E. coli* promoter data base. *Cell*, 66: 415.
- Matthews, K. S. (1996) : The whole lactose repressor. *Science*, 271: 1245.
- Kim B. , Little J. W. (1992) : Dimerization of a specific DNA-binding protein on the DNA. *Science*, 255: 203.
- Kustu S. , North A. K. , Weiss D. S. (1991) : Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* , 16: 397.
- Lewis M. , Chang G. , Horton N. C. , et al. (1996) : Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer. *Science*, 271: 1247.
- Ptashne M. , Gann A. A. F. (1990) : Activators and targets. *Nature*, 346: 329.
- Ross W. , Gosink K. K. , Salomon J. , et al. (1993) : A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α subunit of RNA polymerase. *Science*, 262: 1407.
- Shakked Z. , Guzikovich-Guerstein G. , Frolow F. , Rabinovich D. , Joachimiak A. , Sigler P. B. (1994) : Determinants of repressor/operator recognition from the structure of the *trp* operator binding site. *Nature*, 368: 469.
- Sogaard-Andersen L. , Valentin-Hansen P. (1993) : Protein-protein interactions in gene regulation: The cAMP-CRP complex sets the specificity of a second DNA-binding protein, the CytR repressor. *Cell*, 75: 557.
- Storz G. , Tartaglia L. A. , Ames B. N. (1990) : Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation. *Science*, 248: 189.
- Zhou Y. , Pendergrast P. S. , Bell A. , Williams R. , Busby S. , Ebright R. H. (1994) : The functional subunit of a dimeric transcription activator protein depends on promoter architecture *EMBO J.* , 13: 4549.

复 习 题

1. 转录因子是:
 - a) 调节 DNA 结合活性的效应物分子
 - b) 调节转录延伸速率的蛋白质
 - c) 调节转录起始速率的蛋白质
 - d) 向基因启动子发出信号的环境刺激
 - e) 保护 DNA 使免受内切核酸酶作用的 DNA 结合蛋白

2. 关于转录调节的机制, 下列哪一条不对?
 - a) 效应物分子能促进转录因子与 DNA 结合
 - b) 效应物分子能抑制转录因子与 DNA 结合
 - c) 去诱导的结果是转录速率下降
 - d) 去阻抑的结果是转录速率升高
 - e) 转录因子只能起阻抑物的作用
3. λ -半乳糖苷酶活性为 IPTG 所诱导是由于:
 - a) 促进了 Lac 抑制物的功能
 - b) IPTG 与 lac 操纵子结合并诱导转录
 - c) IPTG 与 lacI 基因的产物结合并抑制其活性
 - d) 抑制了 λ -半乳糖苷酶的降解
 - e) λ -半乳糖苷酶使 IPTG 裂解
4. 在什么条件下 RNA 聚合酶在 lac 操纵子上活性最高?
 - a) 高乳糖, 低葡萄糖
 - b) 高葡萄糖, 低乳糖
 - c) 高葡萄糖, 高乳糖
 - d) 低乳糖, 低葡萄糖
 - e) 高 IPTG, 高葡萄糖
5. 阿拉伯糖对 araBAD 转录的作用是:
 - a) 抑制 AraC 与 DNA 的结合而使转录减慢
 - b) 使 DNA 弯曲而使转录加快
 - c) 改变 AraC 与 DNA 结合的特性而引起去阻抑
 - d) 激活 CAP 与 DNA 的结合
 - e) 在高葡萄糖的存在下使转录加快
6. trp 操纵子上的弱化作用的结果是:
 - a) DNA 复制提前终止
 - b) RNA 中形成抗终止的发夹环
 - c) RNA 中形成翻译终止的发夹环
 - d) 合成色氨酸代谢的酶
 - e) RNA 聚合酶从 trp 操纵子的 DNA 序列上解离下来

参 考 答 案

1. c 转录因子是调节转录的蛋白质。
2. e 转录因子能起阻抑物和(或)激活剂的作用。
3. c IPTG 与 lacI 基因的产物, 即 Lac 阻抑物结合并抑制之。
4. a 在这种条件下, Lac 阻抑物被抑制并且 CAP 有活性。
5. c AraC-阿拉伯糖复合体与 DNA 结合的序列不同于 AraC-AraC 结合的序列。
6. e 在大多数生长条件下, TRP-tRNA^{TRP} 很多, 有利于弱化作用使转录终止。

第 29 章 真核生物基因调节的机制

29.1 引言

真核生物中基因表达的调节至少在两个方面比原核生物中复杂: (i) 真核生物中受到调节的转录后的步骤数目较大, 因为 mRNA 必须经过加工并运到细胞质中进行翻译; (ii) 因为多细胞生物的每个细胞中都有同样的 DNA, 但在任何一种类型的细胞中只有一部分被转录, 所以需要大量转录因子来控制基因在时间上和空间上的不同表达。本章将集中讨论真核生物中响应于不同的发育状况或环境状况的具体基因转录起始的变化。这包括使真核生物的转录因子如此变化多端的各种性质的描述。此外, 还举出了基因调节途径的两个具体实例: (i) 类固醇调节的基因表达, 这是由称为类固醇受体的配体激活的转录因子进行调节; (ii) 由细胞膜上的磷酸化作用引起的信号转导开始而终于细胞核中转录因子的翻译后修饰的事件。本章还讨论了染色质结构和 DNA 的甲基化对真核生物基因表达的抑制效应。

29.2 真核生物基因表达的调节需要许多种蛋白质

真核生物基因表达的主题是要求通过一种组合机制把信息整合起来。图 29.1 所示为原

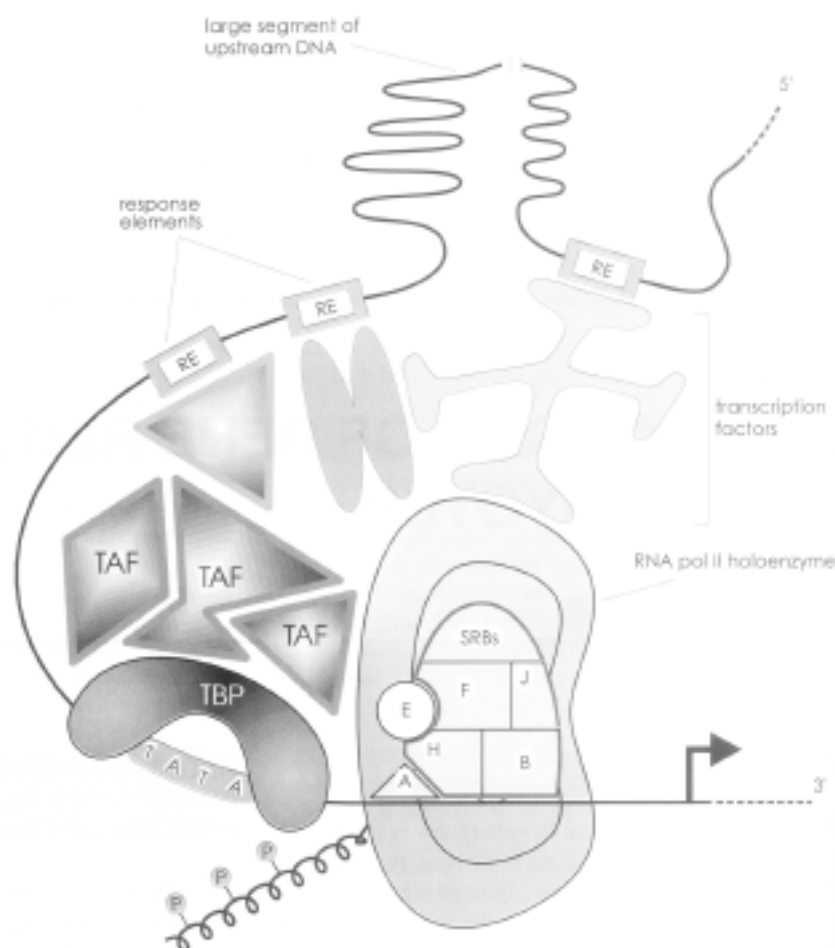


图 29.1 依赖于原型 RNA pol 的真核生物的启动子

图示三类转录因子的大意: TF 辅助因子(TF F, TF J, TF H 等), TBP 及与其伴随的因子(TAF), 还有结合在称为效应元件(RE)的 DNA 序列上的各种转录因子。关于 TBP 和 RNA pol 全酶的内容, 见第 24 章。

型的、依赖于 RNA 聚合酶 的真核生物的启动子及其上游的调节序列。如第 24 章所述, 转录起始复合体包括 RNA 聚合酶 全酶(RNA pol)、通用转录因子 TBP(与 TATA 结合的蛋白质)、许多辅助性转录因子, 其中有些是 TBP-伴随因子(TAF)。这种大的起始复合体与围绕着转录起始点区域内的 DNA 结合。其中有转录因子结合位点的 DNA 序列位于上游或下游靠近启动子处或远离(1 ~10 kb) 启动子处。

DNA 上与转录因子结合的位点通称效应元件。有些转录因子的作用是诱导转录; 而在同一调节区域内的其他转录因子则可能阻抑转录。许许多多调节因子具有相当于效应元件的 DNA 序列, 并存在于同一基因中, 所以对转录才有可能进行综合控制。例如, 假若转录的激活剂和阻抑物都在同一基因的调节区域内, 就可以根据正和负效应的相对“强度”对表达水平进行细调。除去这些综合的相互作用外, 有些转录因子只在专门类型的细胞中表达, 这就可以进行细胞专一的转录控制, 如图 29.2 所示。

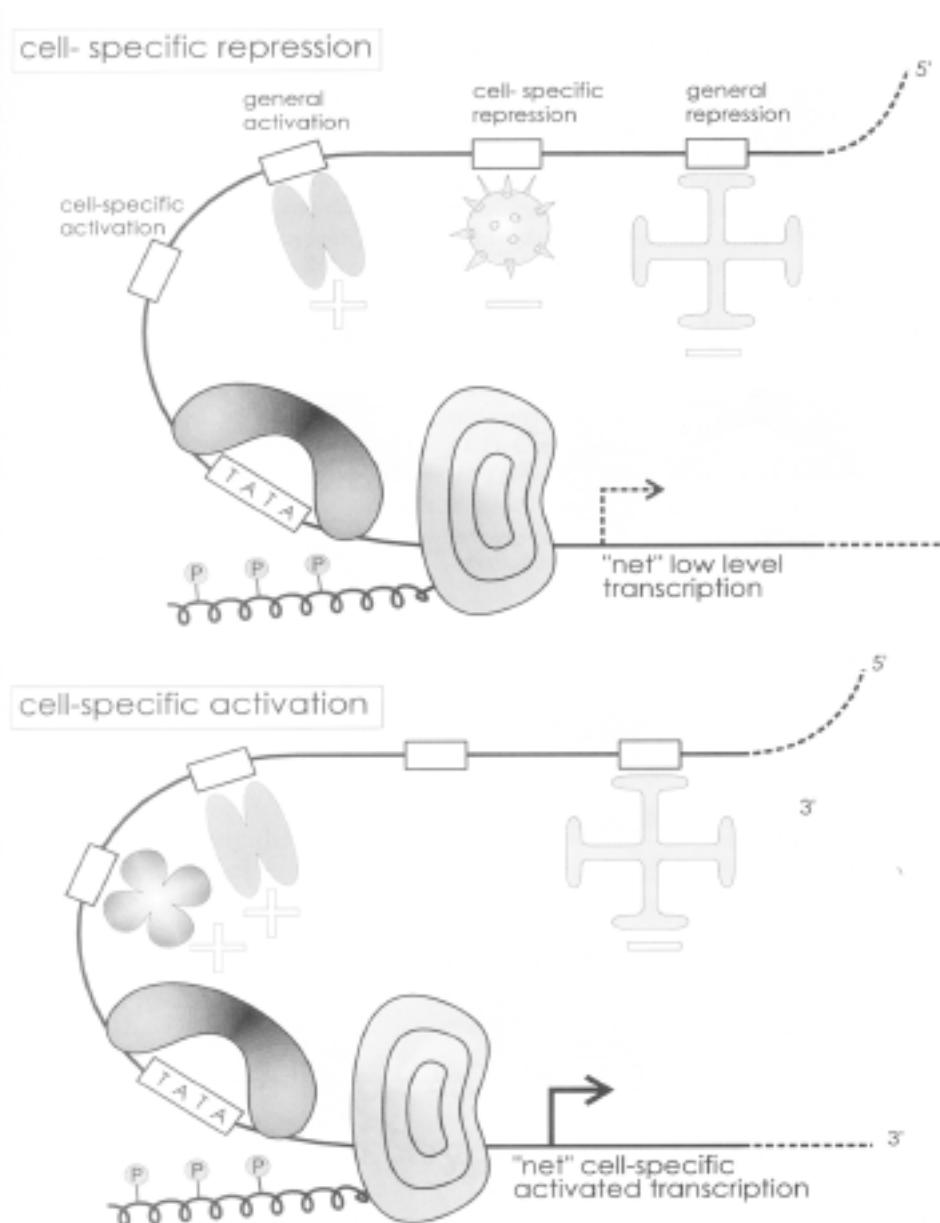


图 29.2 真核生物转录的组合控制

与转录起始复合物相互作用的多种转录因子的净效应既能使基因活化, 也能使基因被阻抑。因为有些转录因子自身的表达是细胞专一的, 所以这些特定的转录因子是否存在就能影响个别基因的转录速率。

增强子是一类 DNA 序列效应元件, 其功能是调节异源启动子(它们可以连接在无关系的启动子序列上) 的转录。增强子对于取向和与启动子之间的距离不敏感。一般都承认转录因子

结合在像增强子这样的真核生物的效应元件上, 就会使插在元件与转录起始复合体之间的 DNA 形成环出序列。这种排列类似于 AraC 对 ara 操纵子的转录阻抑的情况(第 28 章)。因为真核生物的 DNA 是伴随着染色体蛋白质的(第 3 章), 而且已知起始复合体中又有许多种转录因子(第 24 章), 所以应把转录活跃的真核生物的启动子看做是组装蛋白质的中心, 像第 22 章所描述的复制复合体一样。若给基因调节区的设计打个建筑方面的比方, 那么完整的真核生物启动子复合体的组装简直就和泰姬陵差不多!

29.3 多数真核生物的转录调节物中有独立的功能域

已对许多真核生物的转录因子进行了生化鉴定, 也已分离出了编码它们的基因。这些蛋白质中有许多是转录激活剂, 其中有第 5 章中所描述的与 DNA 结合的基元中的一种(锌指、基本的螺旋-环-螺旋或亮氨酸拉链)。除去专一的与 DNA 的结合外, 转录的激活似乎还需要转录因子与转录起始复合体之间的蛋白质与蛋白质的接触。利用重组 DNA 技术, 已经将不同的真核生物转录因子的编码序列融合在一起, 制成了嵌合的转录因子(嵌合蛋白是来自两种或更多种蛋白质的肽序列的蛋白质)。

如图 29.3 所示, 这些研究工作已证明, 有可能将酵母的 Gal4 蛋白的与 DNA 结合的基元

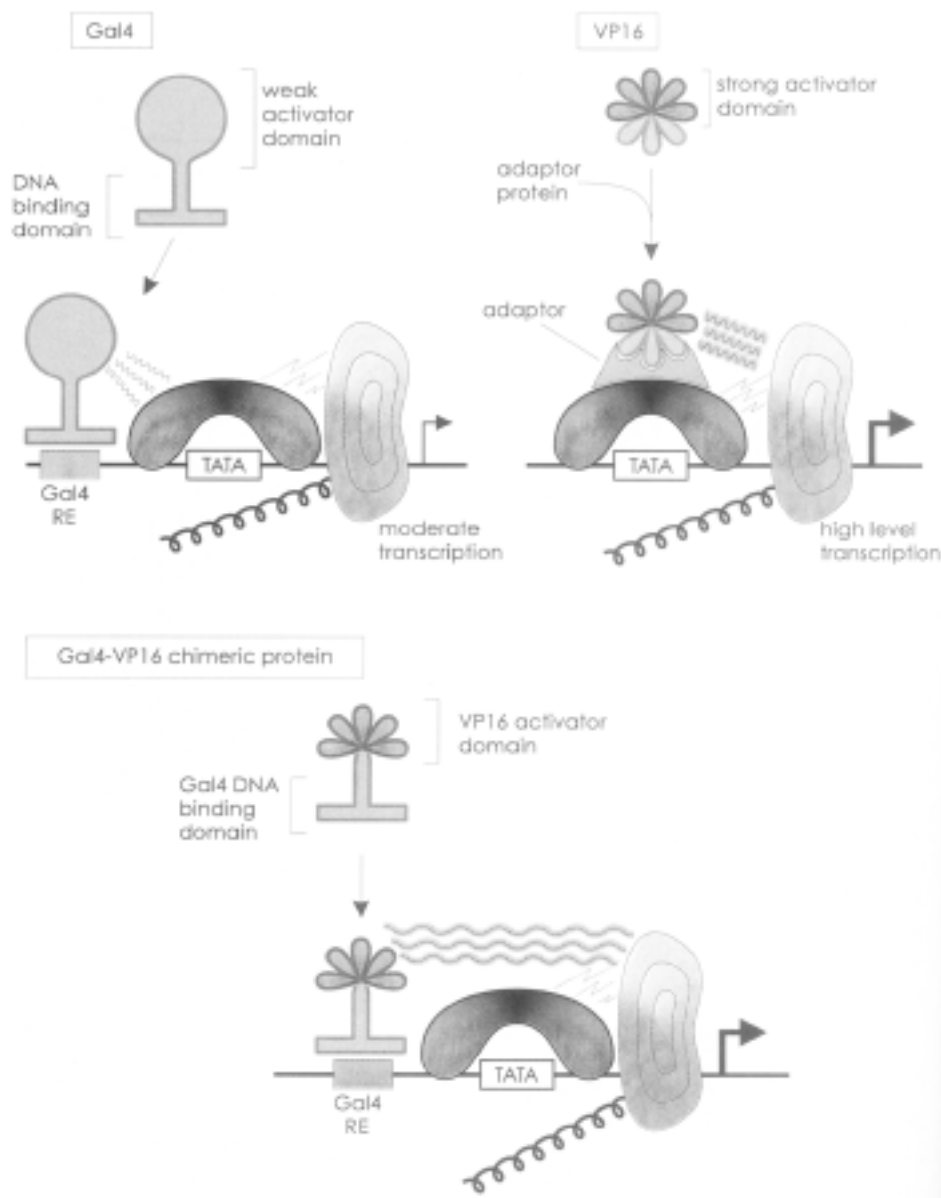


图 29.3 可制成异源蛋白质间的嵌合转录因子, 说明 DNA 的结合和转录的激活常是独立的活动
此图所示为下列实验结果: 将弱激活剂 Gal4 的与 DNA 结合的域与病毒蛋白 VP16 的
不与 DNA 结合的强有力的激活域融合在一起的实验。新的 Gal4-VP16 嵌合
蛋白是强有力的基因激活剂, 其中有 Gal4 的效应元件。

(锌指基元)与单纯疱疹病毒的 VP16 蛋白转录激活域相融合,制成能在酵母中起作用的转录激活剂。同样,也可将 Gal4 激活域连接到大肠杆菌的 LexA 抑制物的与 DNA 结合的域上,将这种转录抑制物转变为转录激活剂。本章后附录 29.1 描述的是如何用报告基因来鉴定效应元件和转录因子中控制着基因专一的转录调节的 DNA 序列。

除去独立的 DNA 结合和激活序列外,许多真核生物的转录因子中还有二聚化域,这是亚基的相互作用所需要的序列。原核生物中多数与 DNA 结合的蛋白质都是以同二聚体的形式结合在 DNA 的反向重复序列上。不过,真核生物的许多转录因子都是多基因家族的成员,由于蛋白质的二聚体界面上的保守的结构特性,两种相关的蛋白质常可形成异二聚体。因为这些相关的蛋白质在其 DNA 结合域上可能有微小的差别,这种异二聚体的配对可能造成不同的结合 DNA 的专一性。

二聚化控制转录因子的功能的最好的事例之一是基本的螺旋-环-螺旋(bHLH)蛋白质。图 29.4 表明同二聚体和异二聚体对于专一的 DNA 序列的亲合性可以反映出各种不同的 bHLH 蛋白质之间的相互作用。没有结合 DNA 所需要的基本区域的螺旋-环-螺旋蛋白质能够与 bHLH 蛋白质发生二聚化而抑制其结合 DNA 的活性。这些 HLH 蛋白质被称为具有对 bHLH 蛋白质的显性失活效应,因为它们是具有对 bHLH 活性的显性阻抑物(图 29.4)。

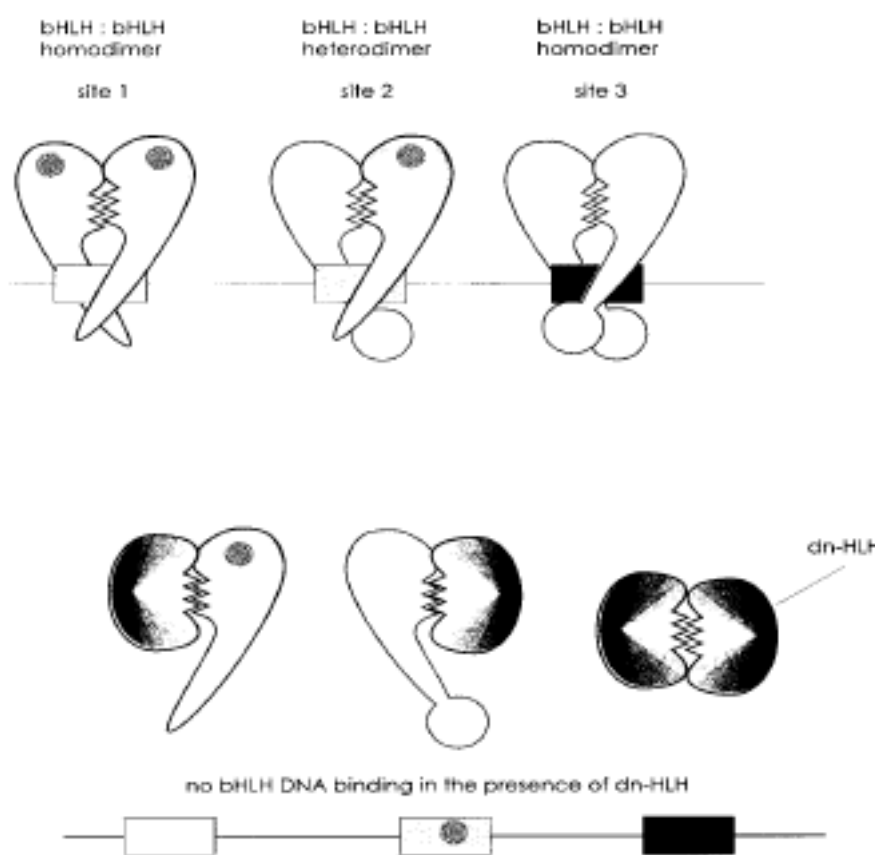


图 29.4 bHLH 蛋白质能形成异二聚体复合体,它们识别不同的结合位点
 图示两种相关的 bHLH 蛋白质,由于形成同二聚体或异二聚体,它们能与 3 种不同的效应元件相结合。没有基本区域的 HLH 蛋白质能由于形成异二聚体而对 bHLH 蛋白质起着显性负抑制剂(dn-HLH)的作用,因为该异二聚体不能与 DNA 结合。

29.4 由依赖于配体的类固醇/核受体控制转录

类固醇激素受体是由配体调节的转录因子的一个大家族的成员,这些转录因子包括核受体。这些受体的与 DNA 结合的结构域均类似,即由两个锌指组成,其羧基端的片段中有一个

与配体结合的域。图 29.5 为鉴定得最完全的核受体的功能图。糖皮质激素受体就是类固醇受体的代表,其基因因为这个转录因子家族中已被克隆的第一个基因。

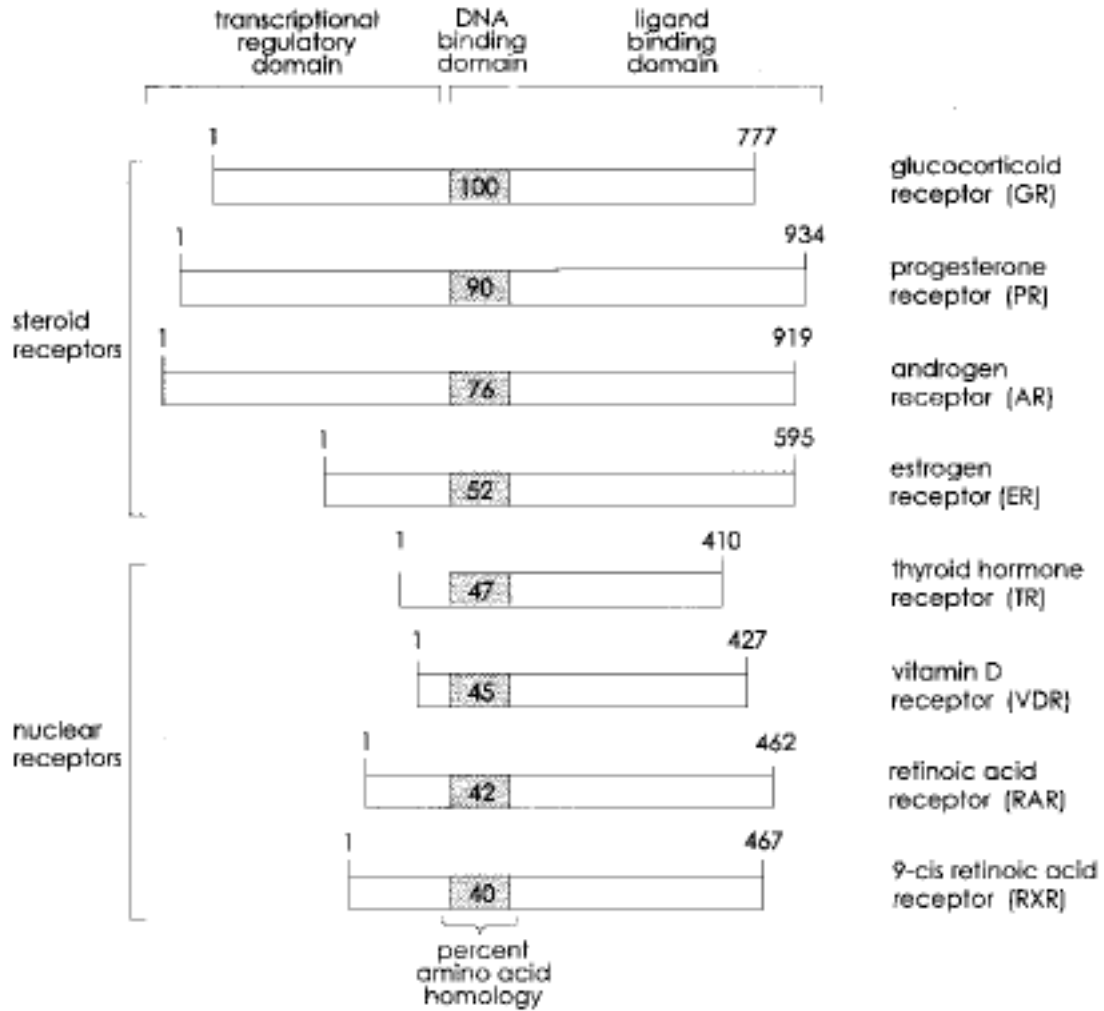


图 29.5 类固醇/核受体的超家族

类固醇/核受体是转录因子的一个大的基因家族的成员,它们在 DNA 结合域方面有重要的氨基酸同源性。在羧基端的配体结合域中同源性小得多,而氨基端的转录调节域的长短变化很大。图中列有每一种受体中氨基酸的总数。

如将许多种类固醇/核受体的氨基酸序列以 DNA-结合域为准进行排列,就会有几种受体与糖皮质激素受体非常相似(孕酮和雄酮),而其他受体如视黄酸、甲状腺素和维生素 D 受体则不太相似。雌激素受体是这一家族中的有些杂化的成员,其 DNA 结合域与核受体更为相似,但其配体结合域(及其配体)则与类固醇受体的相似。类固醇受体与核受体在功能上的区别在于它们与 DNA 结合的方式。类固醇受体以同二聚体的形式与反向重复的 DNA 效应元件结合,而核受体则以异二聚体的形式与 9-顺视黄酸受体(RXR)的直接重复效应元件结合,如图 29.6 所示。

(一) 类固醇受体以同二聚体的形式起作用

糖皮质激素亚族和雌激素受体与相关的、但不同的效应元件结合(图 29.6)。糖皮质激素和雌激素受体的分子遗传学分析已证明,这两种受体的第一个锌指中只有 3 个氨基酸是负责 DNA 结合专一性的(糖皮质激素受体不能与雌激素的效应元件结合,反之亦然)。糖皮质激素受体的 DNA 结合域与糖皮质激素的亲合力高的效应元件形成复合体后,其 X 射线结晶学的资料,确认这 3 个氨基酸与 DNA 发生了重要的接触。

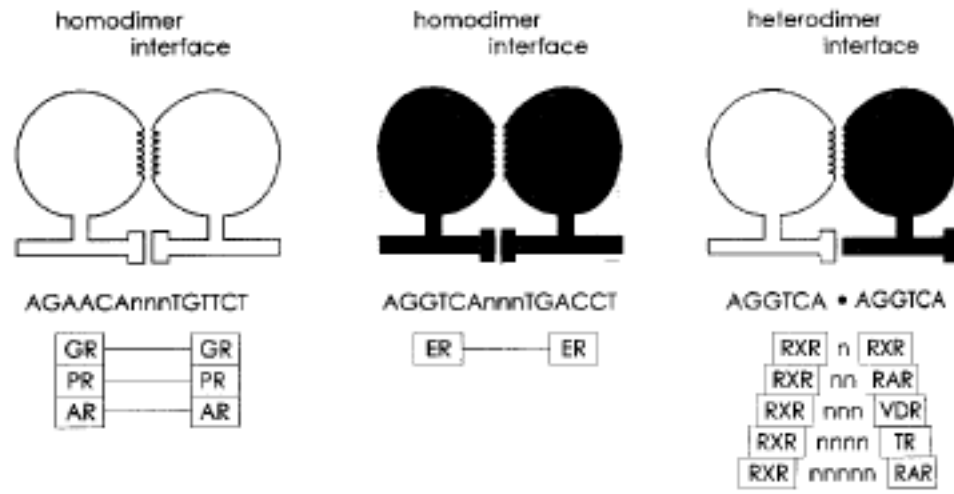


图 29.6 类固醇受体与核受体的区别在于它们与 DNA 结合的方式

GR、PR、AR 和 ER 均以同二聚体的形式与由三个核苷酸(nnn) 分开的反向重复序列相结合, 但 ER 的 DNA 结合域所识别的 DNA 序列却与核受体所识别的相同。核受体主要以异二聚体的形式结合到 RXR 上, 而与由 1 ~5 个核苷酸分开的直接重复序列相结合。结构方面的研究已证明 RXR 与效应元件的 5 半位点结合, 这对异二聚体的两半的依赖于配体的转录调节活性可能是重要的。

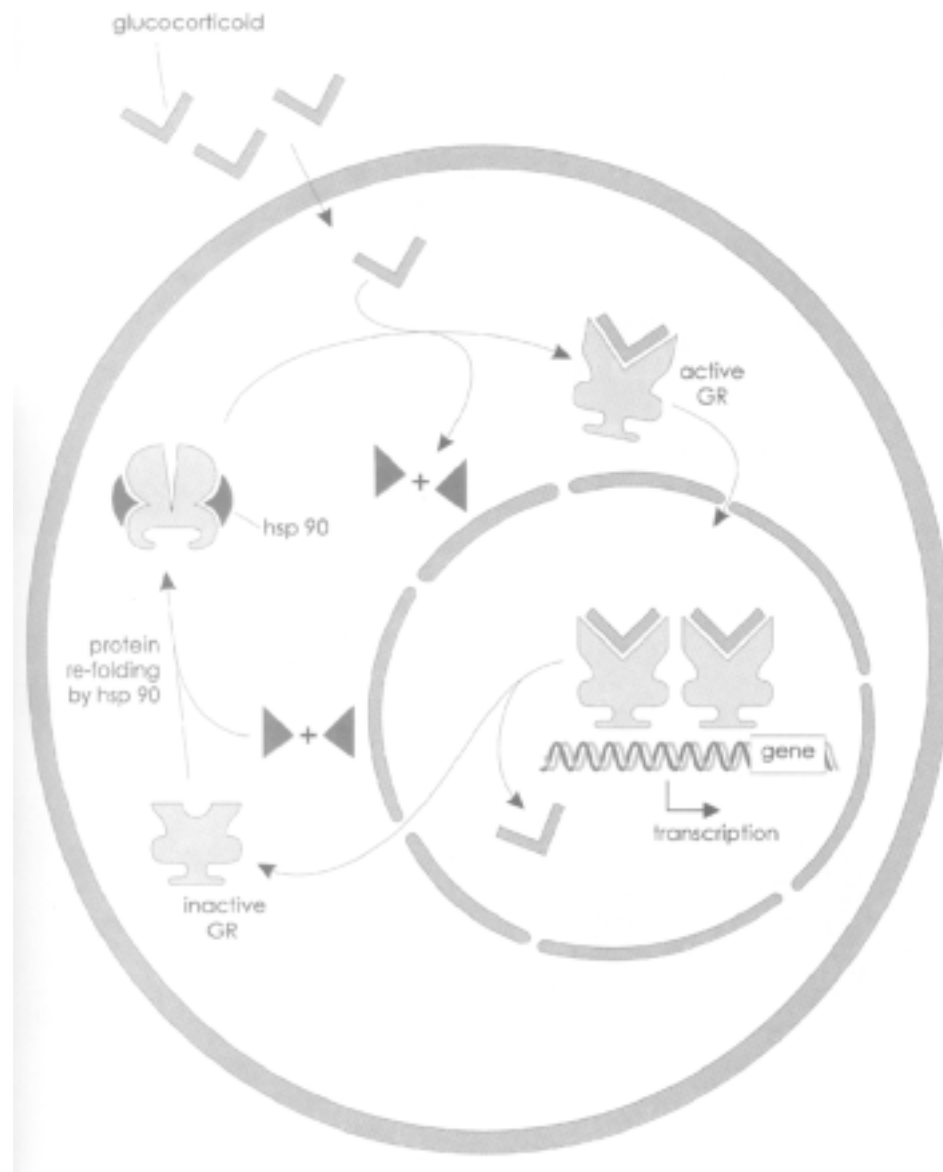


图 29.7 糖皮质激素受体功能的激活

糖皮质激素进入细胞并与 GR 结合, 形成有活性的复合体, 它释放两个 hsp90。GR-激素复合体被运入核中, 与 DNA 及其他转录因子相互作用。当激素水平下降时, 无配体的 GR 再循环到细胞质中, 由 hsp90 将其再折叠为能与激素结合的构象。

糖皮质激素受体(GR) 和雌激素受体(ER) 都是由类固醇激素激活的转录因子, 每一种都有多个转录激活序列。GR 中最强有力的激活序列在氨基端。如图 29.7 所示, 在无激素的情况下, GR 定位于细胞质中, 是一种蛋白质复合体的一部分, 此复合体包括 hsp90 热激蛋白。这是一种很丰富的蛋白质, 存在于所有细胞中, 其功能是分子陪伴, 促进蛋白质的折叠。热激一词来源于下列发现: 细胞中 hsp 的水平在细胞受到胁迫如加热时, hsp90 的水平便显著升高。研究已证明, 无配体的 GR 要折叠成能与糖皮质激素结合的构象必须有 hsp90(图 29.7)。

(二) 核受体以异二聚体的形式与 DNA 结合

3 种核受体, 即视黄酸受体(RAR)、甲状腺素受体(TR) 和维生素 D 受体(VDR), 原来都是由筛选 cDNA 文库而克隆出来的, 所筛选的序列是与类固醇受体的锌指结合域同源的序列。虽然核受体的配体在化学上与类固醇十分不同, 但这些蛋白质的功能却像是依赖于配体的转录因子的。RAR、TR 和 VDR 都结合在雌激素-DNA 效应元件的半位点(5'-AGGTCA-3') 上, 但与 ER 不同, 并不以同二聚体的形式以极高的亲和力结合在回文序列上。如图 29.6 所示, 9-顺视黄酸核受体, 通常以 RXR 代表, 是与 RAR、TR 和 VDR 形成异二聚体而与 DNA 结合所需要的。

假若 RAR、TR 和 VDR 核受体都结合在同样的 DNA 序列上, 它们如何能够调节不同的靶基因呢? 答案是每种异二聚体对不同的效应元件有高亲和力, 而这些效应元件的区别仅在于直接重复序列 AGGTCA 的间隔不同。这些异二聚体对半位点之间的不同间隔有偏爱是因为与 DNA 结合的结构域中的氨基酸有差别, 受体中的两个异二聚化的结构域之一就是 DNA-结合域(另一个在羧基端)。核受体羧基端的二聚化域是对称的, 就像类固醇受体中的一样; 位于核受体-DNA 结合域中的二聚化界面是极化的, 正好适于“头到尾”的相互作用。

RXR-RAR、RXR-TR 和 RXR-VDR 都需要同源的配体与核受体的配偶体(分别为视黄酸、甲状腺激素或维生素 D) 配合, 才能起转录激活剂的作用。不过, 这些异二聚体中的 RXR 配偶体是无配体的。这就发生了这样一个问题, RXR 是一种依赖于配体的转录调节物吗? 如果是, 配体是什么? 利用瞬时共转染试法(附录 29.1) 已发现 9-顺-视黄酸是 RXR 核受体的有高亲和力的配体。而且, RXR-9-顺-视黄酸同二聚体复合体能活化直接重复 AGGTCA 半位点的一个碱基对间隔的转录(见图 29.6)。

这一发现说明核受体的配体调节的复杂情况, 如图 29.8 所示。例如, 在有维生素 D 而无 9-顺-视黄酸时, RXR-VDR 异二聚体能结合到维生素 D 靶基因(有 3 个核苷酸间隔的 AGGTCA 效应元件) 上并激活转录作用。然而, 若 9-顺-视黄酸的水平提高, 甚至维生素 D 仍存在, 也会形成 RXR 同二聚体。这会产生两种结果:

(1) 维生素 D 效应基因的去诱导, 因为 VDR 需要 RXR 作为异二聚体的配偶体才能有充分的活性。

(2) RXR-RXR 同二聚体现在能够调节 RXR 靶基因(有一个核苷酸间隔的效应元件) 的转录。RAR、TR 和 VDR 对 RXR 的这种依赖性, 加上 RXR 同二聚体的独立的活性, 就使得多基因的网能够对适合的核受体的配体与 9-顺-视黄酸的相对比值发生响应而进行相互交叠的控制。

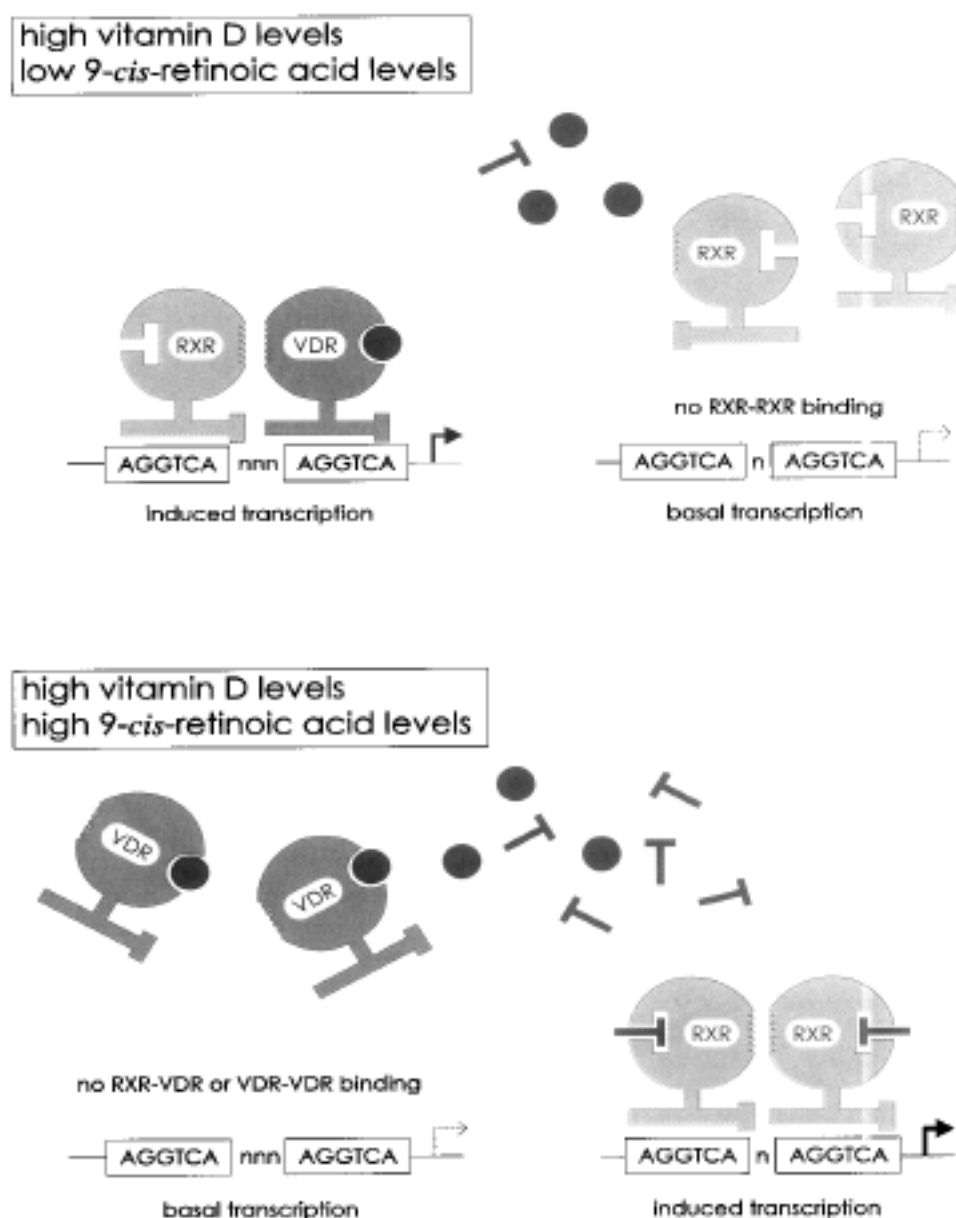


图 29.8 9-顺-视黄酸对核受体活性的影响

- (a) 当维生素 D 水平高而 9-顺-视黄酸水平低时, RXR-VDR 异二聚体优先激活维生素 D 效应基因; (b) 当 9-顺-视黄酸水平高时, 就会形成与配体结合的 RXR-RXR 同二聚体, 并优先激活 9-顺-视黄酸效应基因, 而且同时引起维生素 D 效应基因表达的减少。

29.5 磷酸化作用的级联将调节信号传递给细胞核

细胞膜中有许多受体蛋白质, 它们与胞外的配体结合。在许多情况下, 配体结合到受体上会激活内在的激酶, 而激酶则直接使其他蛋白质磷酸化。此外, 多数受体激酶发生自磷酸化作用, 此作用通过 S_H2 蛋白域的相互作用促进其与细胞质中的其他激酶缔合。多重磷酸化作用的结果常包括其他激酶的磷酸化和活化, 胞外信号就通过胞内磷酸化作用的级联而发生转导。这种级联的终点往往是磷酸化作用调节了转录因子的活性。图 29.9 所示为磷酸化作用改变转录因子活性的 4 种基本机制: (i) 核转运的调节, (ii) DNA 结合的调节, (iii) 直接激活的调节和 (iv) 多蛋白复合体形成的调节。

本节描述两种信号传递途径, 都是胞外信号通过磷酸化作用的级联而调节基因的表达。第一个例子与 cAMP 有关, cAMP 使激酶活化, 激酶被运入细胞核中并使一种与 DNA 结合的转录因子磷酸化。第二个例子说明, 与膜结合的激酶使细胞质中的蛋白质磷酸化如何调节了一种转录因子复合体在膜中的定位及其亚基的相互作用。

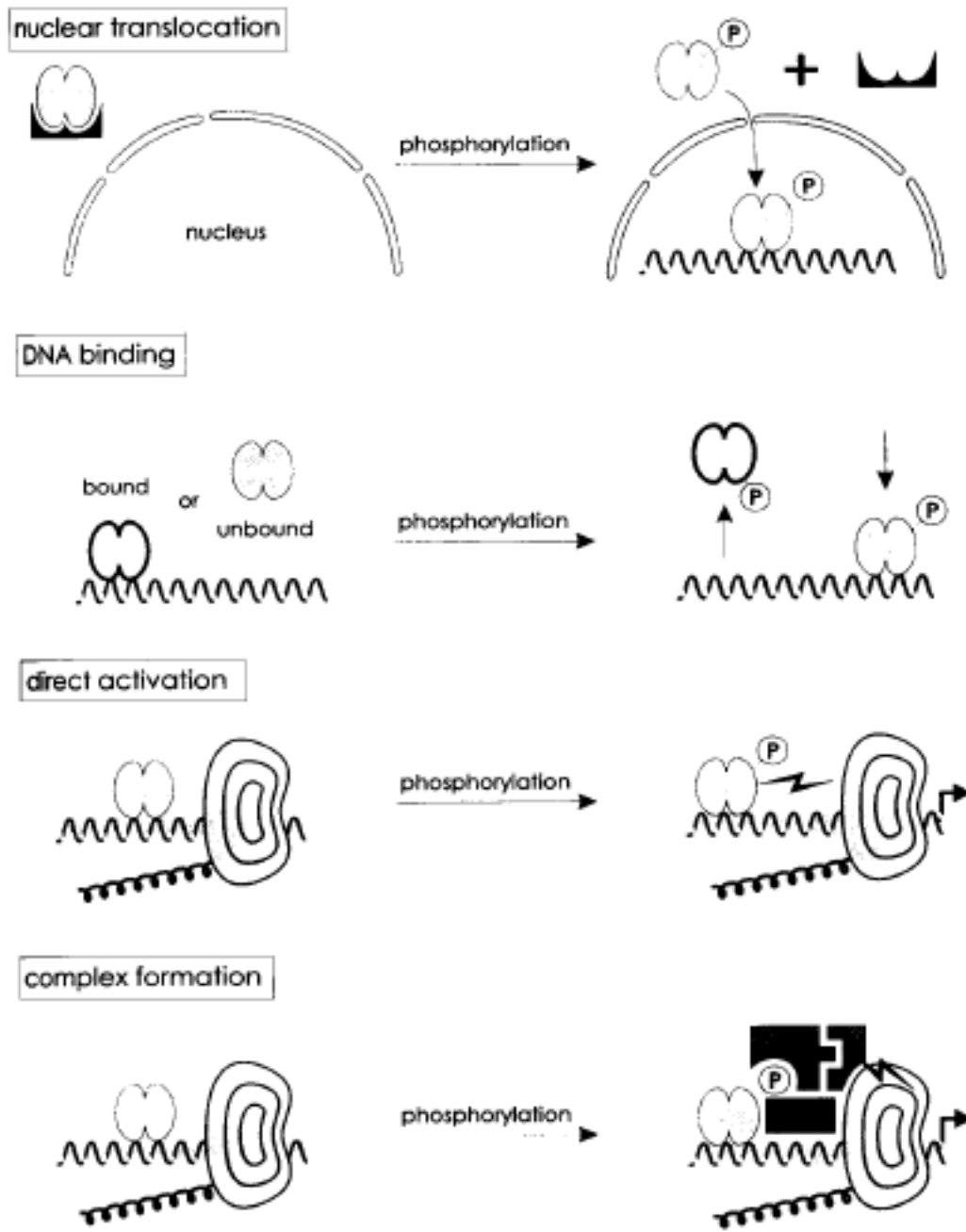


图 29.9 磷酸化作用调节转录因子活性的 4 种机制
 转录因子的磷酸化作用调节转录活性与磷酸化作用控制复合体形成之间的区别在于是否需要另外的蛋白质参与效应的介导。

(一) 依赖于 cAMP 的激酶 A 诱导 CREB 激活剂的功能

有些由配体激活的膜受体是因促进细胞内的腺苷酸环化酶的活性、产生 cAMP 而传递信号的。这种激活途径是由称为 G_s 的与受体缔合的 G 蛋白(第 16 章)介导的。哺乳动物中, cAMP 起第二信使作用的最常见的机制是 cAMP 与依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A(PKA)的调节性亚基相结合。调节性亚基的解离就使得催化性亚基定位于细胞核中,并在此处将 cAMP-效应元件结合蛋白(CREB)的丝氨酸 133 磷酸化,丝氨酸残基位于转录激活域内。如图 29.10 所示,磷酸化的 CREB 有活性并结合在 CREB 靶基因的 CAMP 效应元件上。

这一信号传递途径中的关键控制步骤是 PKA 对 CREB 的转录调节活性的激活。PKA 对丝氨酸 133 的磷酸化如何引起了 CREB 靶基因的转录诱导,还不完全清楚。不过,近年来已发现另一种称为 CBP(CREB 结合蛋白)的转录因子也被 PKA 磷酸化,导致其与磷酸化的 CREB 缔合。CBP 可能起着转录连接蛋白的作用,或者 CBP 和 CREB 一起可能接触起始复合体并促进转录作用。

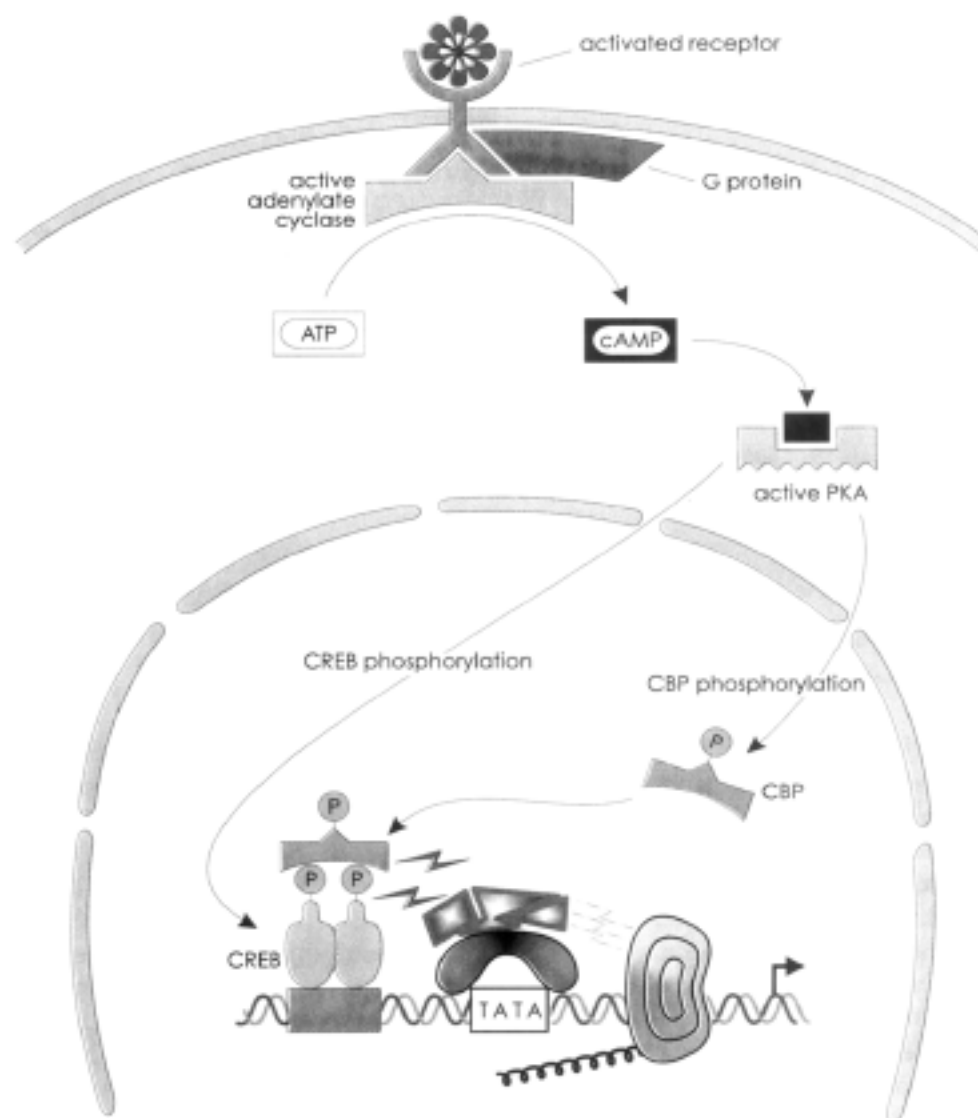


图 29.10 蛋白激酶 A(PKA)使 CREB 和 CBP 磷酸化的结果是 cAMP 效应基因的转录调节
G 蛋白通过膜受体接受信号而激活腺苷酸环化酶时, cAMP 水平增高, PKA 被激活,
CREB 和 CBP 都被磷酸化, 结果是 CREB 调节的基因发生转录诱导。

(二) 干扰素激活 STAT 在核中的定位和 Jak 酪氨酸激酶

生长因子信号的传递是由与膜结合的受体介导的, 此受体由于酪氨酸激酶的激活而将信号传递给细胞。这种磷酸化级联的最终结果会通过或是转录的诱导, 或是转录的阻抑而改变生长调节基因的表达。近年来, 关于干扰素调节生长调节基因的研究揭示出这种信号传递途径需要通过干扰素受体的缔合而激活 Jak 激酶家族中的酪氨酸激酶。

-干扰素受体使其酪氨酸残基磷酸化而激活 Jak1 和 Jak2 激酶。然后 Jak1 和 Jak2 又使称为 STAT1- 和 STAT1- (转录的信号转导物和激活剂) 的两种转录因子被磷酸化, 这两种转录因子通常以无活性的状态位于细胞质内。一旦被磷酸化, STAT1- 和 STAT1- 的同二聚体就被运入细胞核内并与定位于生长调节基因中的干扰素效应元件结合(图 29.11)。STAT1- 和 - 转录因子是由另外剪接的 STAT1 转录物合成的, 此转录物则由 STAT1 基因编码。

-干扰素途径更为复杂, 并且说明了激酶底物的专一性如何起作用。在这种途径中, 称为 Tyk2 的第三种酪氨酸激酶伴随着 -干扰素受体, 而且与 Jak1(但不是 Jak2) 一起, 使 STAT1 蛋白质类和另一种称为 STAT2 的蛋白质的酪氨酸残基发生磷酸化。STAT1 和 STAT2 这些蛋白质形成异二聚体, 此外, 还与 48 kDa 的蛋白质结合形成有活性的转录调节复合体。

在发现表皮生长因子受体也激发酪氨酸激酶, 而此激酶又使 STAT1- 和另一个家族的成

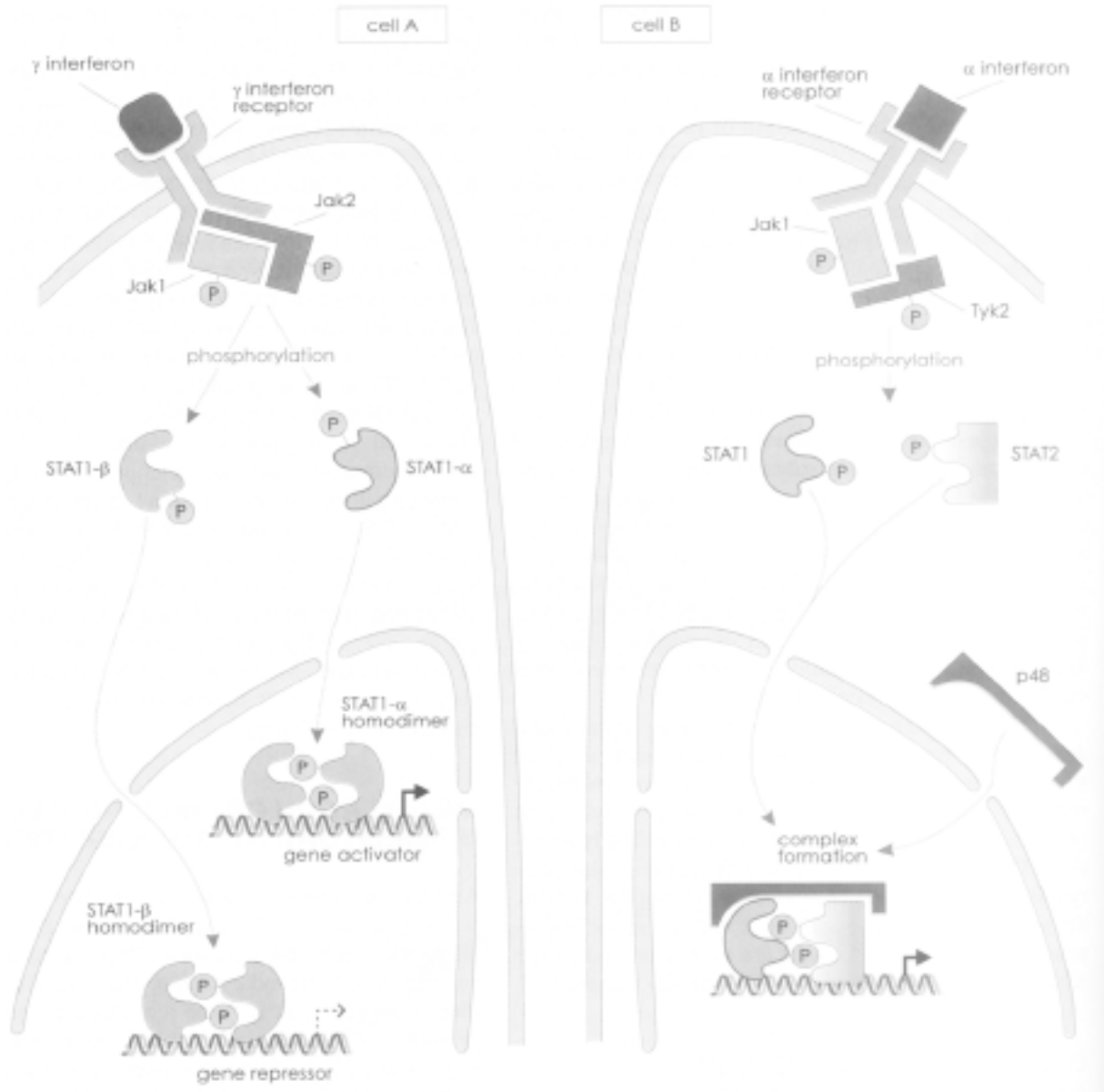


图 29.11 γ -和 α -干扰素对基因表达的控制由 Jak 激酶和 STAT 转录因子蛋白质介导

γ -干扰素在 A 细胞(左)中发出信号使得 STAT1- β 和 α - 这两种转录因子被磷酸化,它们形成同二聚体并转运到细胞核中诱导(STAT1- α 同二聚体)或阻抑(STAT1- β) 转录。 α -干扰素在细胞 B(右)中的信号传递除去需要 Jak1 和 STAT1 外,还需要 Tyk2 激酶和 STAT2 转录因子。由磷酸化的 STAT1(或 α) 和 STAT2 以及第 3 种蛋白质 p48 组成的复合体在 α -干扰素调节的启动子上组装,使基因活化。

员 STAT3 磷酸化以后,对于 STAT 蛋白质类的重要性在于它们既是信号转导者又是转录调节者这一点的重要意义就清楚了。因为 STAT 蛋白质类的功能是依赖于磷酸化的多亚基转录因子,所以信号传递途径可能对细胞类型有专一性,这决定于表达的是什么 Jak 激酶,还决定于 STAT 家族的各种成员的相对丰度。

29.6 染色质结构是基因表达的重要调节者

如第 5 章中所述,真核生物的 DNA 是包装在称为染色质的核蛋白结构中的。最低级的 DNA 包装形式是核小体,它由大约 140 bp 的 DNA 裹在复杂的组蛋白周围。较高级的 DNA 包装则对基因转录有影响。

两项观察说明,对于某些基因,核小体可能在抑制转录方面起作用。首先,有些基因在启动子区中有“相专一”的核小体,这就是说,核小体有着专一的而不是随机的排列。小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)的长末端重复序列启动子就是一个例子。糖皮质激素受体促进专一的核小体

的去除而激活此启动子, 而该核小体似乎是阻遏着称为 NF1 的另一种转录因子的结合位点。除去激素后, 核小体又回复到被抑制的状态。

认为染色质的局部结构限制转录诱导的第二个理由是发现了在 SNF/SWI 核内蛋白存在下, 有些激活剂蛋白质常常对专一的基因启动子发挥作用较好。SNF/SWI 蛋白类是一个相互有关的家族, 在从酵母到人类的进化过程中都是保守的。它们本身不与 DNA 结合, 但能与激活剂蛋白质的抗体共沉淀。有人提出, SNF/SWI 蛋白会伴随着激活剂蛋白质到达作用位点, 改造染色质的结构, 从而促进局部染色质的去阻抑。虽然 SNF/SWI 蛋白起作用的机制尚不清楚, 但其中有一种蛋白质 SNF2 是依赖于 DNA 的 ATP 酶, 这说明 ATP 水解可能是改造染色质所需要的。

29.7 CpG 二核苷酸的甲基化对转录有抑制作用

真核生物中对基因转录的另一种影响就是 CpG 二核苷酸中 5-甲基胞嘧啶的存在。人细胞中占很大百分率(质量分数)的 CpG 残基中有 5-甲基胞嘧啶, 几方面的证据都说明, 假若这种胞嘧啶聚在基因启动子附近, 该基因的表达就受到抑制。检测 CpG 甲基化的一种方法就是用不能切割 5-甲基胞嘧啶位点的限制性酶和 Southern 印迹法鉴定专一的启动子片段。用识别同样的切割位点但在 5-甲基胞嘧啶存在时切割能力不同的酶(例如 MspI 切割所有的 pCpCpG-pG 位点, 不论 CpG 上是否甲基化, 而 Hpa 只能切割 CpG 未被甲基化的这一位点)进行 DNA 的消化, 然后比较其结果, 就可检测 CpG 的甲基化。用这种类型的分析已证明, 对于某些基因, 启动子附近 CpG 甲基化的水平与缺乏转录是相关的。

支持 CpG 甲基化抑制转录这种观点的另一证据来自于在含有 5-氮胞苷的培养基中培养人细胞的研究。在复制过程中这种化合物取代了胞苷, 但它是不能被甲基化的。因此, 在这种条件下, 复制中的 DNA 甲基化得不够。这些实验的结果表明, 某些基因的转录增多了, 而且已证明这些基因中 5 调节区中 CpG 甲基化的水平降低了。

虽然还不确切知道 CpG 的甲基化如何抑制转录, 但有少数证据表明, 某些转录因子不能结合到甲基化的 DNA 上。另一种可能性是细胞中有抑制转录的蛋白质, 它们专一地结合在甲基化的 CpG 残基上, 因而将转录因子排斥在基因的调节区之外。

附录 29.1 可用瞬时共转染试法研究体内的转录

转录起始中的限速步骤的机制最好是用纯化的组分进行细心的体外实验进行研究。然而对于真核生物的系统, 这项任务非常复杂, 因为在体内有许多有关的因素, 而且染色质的结构也对转录有影响。另外一种与上述办法互补的途径是用 DNA 转染技术向组织培养的细胞系中引入外源的 DNA。用转染法使 DNA 进入活细胞的方法, 其根据是用物理方法扰乱细胞膜, 例如, 将细胞暴露在含有 DNA 的磷酸钙沉淀中或在含有 DNA 的缓冲液中施加电场。将含有特定的转录因子的 cDNA 的表达基因引入, 并将其与含有适当效应元件的报告基因组合在一起, 就可能迅速鉴定转录因子中的功能域并作出报告基因启动子中 DNA 效应元件的图。可以用定点诱变和缺失诱变检测各种基因的结构, 并可用各种各样的重组 DNA 策略(参见附录 24.1)创造嵌合的转录因子基因。研究哺乳动物的转录, 常用细菌的氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因和萤火虫的荧光素酶基因作为报告基因。这两种酶都易于检测, 又不存在于哺乳动物细胞中。图 29.12 说明的是瞬时共转染试法的原理。

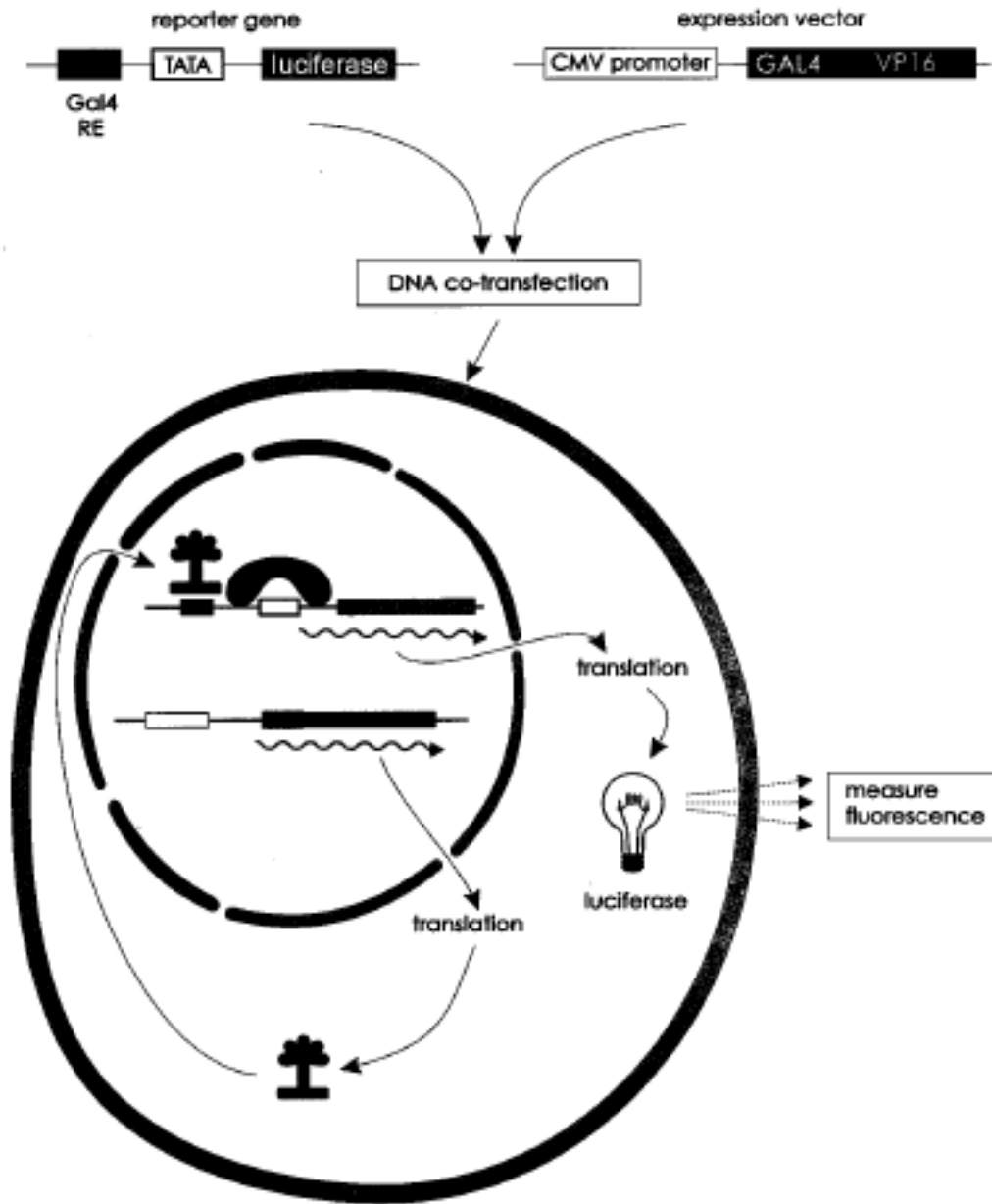


图 29.12 瞬时共转染试法, 利用报告基因和适当的表达载体进行
 此例中的报告基因中有 Gal4 效应元件, 连接在一最小的启动子上, 该启动子位于萤火虫的荧光素酶基因的上游。表达载体编码图 29.3 中所描述的 Gal-VP16 嵌合基因, 它位于巨细胞病毒(CMV)的一个强有力的增强子启动子下游。用电穿孔法将这两种 DNA 质粒引入到真核细胞中, 就会引起一连串转录和翻译事件, 其结果是产生荧光素酶, 可测量其所产生的荧光的量以测定此酶的活性。荧光素酶的水平是 Gal4 报告基因的转录的精确但间接的指示物。

29.8 小 结

(1) 真核生物的基因调节需要许多转录因子, 它们通过组合机制起作用, 以建立起对细胞有专一性和对启动子有选择性的基因表达模式。已观察到的原核细胞中转录控制的基本原理同样也适用于真核生物, 即转录因子与 DNA 效应元件会引起转录的诱导或阻抑, 其原因是 DNA 的成环或蛋白质-蛋白质的相互作用。

(2) 用嵌合的转录因子蛋白所进行的实验表明, 与 DNA 结合的活性和调节转录的活性常常是作为分散的功能域而组织在这些蛋白质之中的。这些资料说明, 与 DNA 的专一序列结合所起的作用是使转录因子定位于基因的调节区以促进其与起始复合体的蛋白质-蛋白质相互作用。

(3) 类固醇/核受体是依赖于配体的转录因子, 它们把激素信号直接传递给细胞核, 即与

靶基因的效应元件结合。这些受体或是诱导转录,或是阻抑转录,因生物体内配体的多少和启动子前后的序列而定。类固醇受体以同二聚体的形式与回文 DNA 序列结合,而核受体则以与 RXR 所形成的异二聚体的形式与直接重复的 DNA 序列结合。

(4) 真核生物中常见的转录调节机制是由一连串的磷酸化作用调节转录因子的活性。伴随受体的 G 蛋白通过促进腺苷酸环化酶活性而传递胞外的信号,并因而使胞内的 cAMP 的水平提高。依赖于 cAMP 的蛋白激酶 A 的活化导致两种转录因子 CREB 和 CBP 的磷酸化和激活,这两种因子又共同调节 CREB 靶基因的转录。

(5) α -和 β -干扰素受体的激发导致 Jak 激酶家族成员的激活,它们又使各种 STAT 转录因子发生磷酸化。干扰素-效应基因的调节是 STAT 转录因子的依赖于磷酸化的向核内的转运和二聚化的结果,而这种调节又是这种转录因子与 DNA 结合和调节转录的功能所必需的。

(6) 染色质的结构和 CpG 的甲基化似乎都对真核生物的基因有负面影响。这些因素调节转录的机理还不清楚,但许多资料说明,它们可能直接或间接影响转录因子与 DNA 效应元件的结合。很可能染色质结构和 DNA 的甲基化在细胞发育过程中基因表达模式的建立方面起主要作用。

参 考 资 料

- Bird A. P. (1993): Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harbor, Symp. Quant. Biol.*, 58:281.
- Briscoe J., Guschin D., Muller M. (1994): Signal transduction: Just another signalling pathway. *Curr. Biol.*, 4:1033.
- Cowell I. G. (1994): Repression versus activation in the control of gene transcription. *TIBS*, 1:38.
- Darnell J. E., Jr, Kerr I. M., Stark G. R. (1994): Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264:1415.
- Farrell, S., Simkovich, N., Wu Y., et al. (1996): Gene activation by recruitment of the RNA polymerase II holoenzyme. *Genes & Dev.*, 10:2359.
- Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., et al. (1996): Chromatin structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:9384.
- Glass C. K. (1994): Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocrine Rev.*, 15:391.
- Ihle, J. N. (1996): STATs: Signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 84:331.
- Janknecht, R., Hunter, T. (1996): A growing coactivator network. *Nature*, 383:22.
- Kadesch T. (1993): Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Diff.*, 4:49.
- Karin M. (1994): Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr. Opin Cell Biology*, 6:415.
- Ma P. C. M., Rould M. A., Weintraub H., Pabo C. O. (1994): Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: Perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell*, 77:451.
- Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., et al. (1995): The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83:835.

- McKnight S. L. (1996): Transcription revisited: A commentary of the 1995 Cold Spring Harbor Laboratory meeting "Mechanisms of Eukaryotic Transcription." *Genes & Dev.*, 10:367.
- Miesfeld R. L. (1995): Biochemistry of glucocorticoid action. In DeGroot LJ, Ed: *Endocrinology Philadelphia: W B Saunders.*
- Nordheim A. (1994): Transcription factors: CREB takes CBP to tango. *Nature*, 370:177.
- Paranjape S. M., Kamakaka R. T., Kadonaga J. T. (1994): Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:265.
- Qureshi S. A., Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., Jr (1995): Tyrosine-phosphorylated Stat1 and Stat2 plus a 48-kDa protein all contact DNA in forming interferon-stimulated gene factor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:3829.
- Sadowski I., Ma J., Triezenberg S., Ptashne M. (1988): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, 335:563.
- Sassone-Corsi P. (1994): Goals for signal transduction pathways: Linking up with transcriptional regulation. *EMBO J.*, 13:4717.
- Struhl K. (1996): Chromatin Structure and RNA polymerase II connection: Implications for transcription. *Cell*, 84:179.
- Tjian R. (1995): Molecular machines that control genes. *Sci. Am.*, 272:54.
- Tsai M. -J., OMalley B. W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:451.

复 习 题

- 真核生物中的基因调节区比典型的原核生物基因中的较大也较复杂,其原因为:
 - 真核细胞有核膜
 - 原核生物的基因总是聚成操纵子的
 - 原核生物的生命一般较短
 - 真核生物需要有控制细胞专一的基因表达的机制
 - 真核细胞的基因组中重复的 DNA 多得多
- 用 Gal4-VP16 嵌合转录因子进行实验的结果,在转录调节的机制方面阐明了什么?
 - 与 DNA 的结合和转录的激活可能是不同的功能
 - 蛋白质-DNA 和蛋白质-蛋白质的相互作用都与基因激活有关
 - 酵母和病毒的转录因子在细胞中有不同的功能
 - DNA 效应元件使激活剂蛋白质的局部浓度增加
 - a, b 和 d 都是正确答案
- 转录因子间二聚化的相互作用对转录调节的组合机制有什么贡献?
 - 更多的配偶体能与同一效应元件序列结合
 - 例如,它使得 3 种相关的蛋白质能与 6 种不同的效应元件结合
 - 需要较多种蛋白质与少数效应元件结合
 - 需要少数的效应元件去控制多个基因
 - 异二聚体和同二聚体都能结合在同一效应元件上
- 雌激素受体和维生素 D 受体...
 - 都是配体调节的转录因子
 - 识别不同的效应元件半位点

- c) 都以同二聚体的形式与 DNA 中的直接重复序列结合
 - d) 都与 RXR 形成异二聚体
 - e) 在其激素域中有重要的氨基酸的同源性
5. 关于转录因子的磷酸化作用对蛋白质活性的影响, 下列哪一条说法不对?
- a) 它能增加与 DNA 结合的活性
 - b) 它能促进向核内的转运
 - c) 它能活化二聚化的特性
 - d) 它能改变转录调节活性
 - e) a, b, c, d 的说法都不对
6. DNA 片段在核小体中的包装以及基因调节区中 CpG 的甲基化, 都与下列现象同时发生:
- a) 转录速率增加
 - b) 转录阻抑
 - c) 转录速率降低
 - d) 5-甲基胞嘧啶破坏 DNA
 - e) 表皮生长因子受体的激活

参 考 答 案

- 1. d 细胞专一的基因表达需要组合机制。
- 2. e 酵母和病毒的转录因子执行类似的功能。
- 3. b 蛋白质 A、B 和 C 能与 AA、AB、AC、BB、BC 和 CC 所识别的效应元件结合。
- 4. a 雌激素和维生素 D 的作用机制都是依赖于受体的转录调节作用。
- 5. e 因 a、b、c 和 d 都是对的, 故 e 不对。
- 6. c 染色质凝聚和 DNA 甲基化都抑制转录。

第 30 章 动物病毒的分子生物学

30.1 引言

细菌和动物细胞的基因组由大的 DNA 分子组成, 它们编码细胞存活所需要的一切。病毒则相反, 其中的核酸少得多, 核酸的形式可能是单链或双链的 DNA 或 RNA。动物病毒必须依靠其所侵入的寄主细胞帮助它们完成其生活周期。对人来说, 病毒的感染常常是无害的, 例如鼻病毒(普通的感冒)或大多数流感病毒的感染都是如此。然而, 它们也可能是耗损体力的, 或甚至是致死的, 例如出现人免疫缺陷病毒(HIV)的感染时。幸运的是, 在病毒学家、免疫学家和生物化学家的共同努力之下, 已生产了病毒疫苗, 至少已根除了少数几种由病毒传播的人的疾病(例如脊髓灰质炎和天花)。但无论如何, 对于这些生命形式我们仍有许多不了解的东西, 特别是当我们要设计安全而有效的方法去治疗多数常见的(如疱疹病毒)或多数致死的(如 HIV)病毒的感染时, 这一点尤为突出。

在现代生物学和重组 DNA 技术出现之前, 病毒的研究是探索基因表达机制的方便的途径。事实上, 我们现在所知真核细胞中信息加工的过程, 首先是在动物病毒中发现的。最近, 在人类的基因疗法方面病毒载体的利用已提供了一种有潜力的治疗疾病的新途径。在本章中, 我们首先叙述动物病毒的生物学和生物化学的基本概念, 然后描述各种各样的病毒以及对它们进行研究所得到的知识。最后, 我们讨论如何利用某些动物病毒来发展人类基因疗法的生物学工具。

30.2 利用无限增殖化的细胞系研究动物病毒

当细胞生物学家发展了用培养法繁殖动物细胞时, 就可以在分子水平上研究动物病毒了。最为广泛使用的体外的细胞模型就是由称为细胞系的无限增殖的已分化的细胞类型衍生而来的。无限增殖化的细胞系常常是由肿瘤建立起来的, 通常是由小鼠或人的肿瘤建立起来的。目前已经有 5000 种以上的动物细胞系可用于动物细胞的研究。表 30.1 所列为几种比较常用的动物细胞系。

表 30.1 几种常见哺乳动物细胞系的描述

细胞系	细胞类型	来源	分离的年份
CHO	卵巢上皮	仓鼠	1957
3T3	胚成纤维细胞	小鼠	1963
MDCK	肾	狗	1958
CV-1	肾	猴	1964
HeLa	宫颈癌	人的肿瘤	1951
MCF7	乳腺上皮	人的肿瘤	1973
LNCaP	前列腺上皮	人的肿瘤	1977

这些特化的细胞系之所以称为无限增殖化的, 是因为只要给它们提供最适的生长条件和新鲜的培养基, 它们就能够在组织培养中无限分裂。不过, 我们应该区分无限增殖化的细胞系

和转化细胞系。转化细胞系是指一种无限增殖化的细胞系,当注入到动物体内时,它有产生肿瘤的特性。也就是说,它能在动物体内形成肿瘤,而且有恶性癌细胞的某些表现。我们将在第31章中更为详细地描述转化的基因型,那时我们要讨论某些癌基因如何能转化无限增殖化的细胞系。

30.3 病毒利用细胞膜的特性出入宿主细胞

噬菌体是在连接到细菌细胞表面上之后,再将DNA注入细胞,动物病毒则不同,它们通常是通过胞吞作用进入细胞。所有的病毒都是包装在称为壳体的蛋白质外套之内的RNA或DNA(图30.1)。病毒中编码的壳体蛋白质是在细胞中组装,形成形状规则的囊以保护病毒基因组免于被降解。病毒蛋白的壳体和核酸的基因组形成一种称为核壳的结构。许多动物蛋白都有一种类似球形的核壳,称为二十面体。这种二十面体的形状解决了两个功能上的问题——把核酸包装起来,保护它不与环境接触;提供一种机制,使病毒在宿主细胞内自组装。

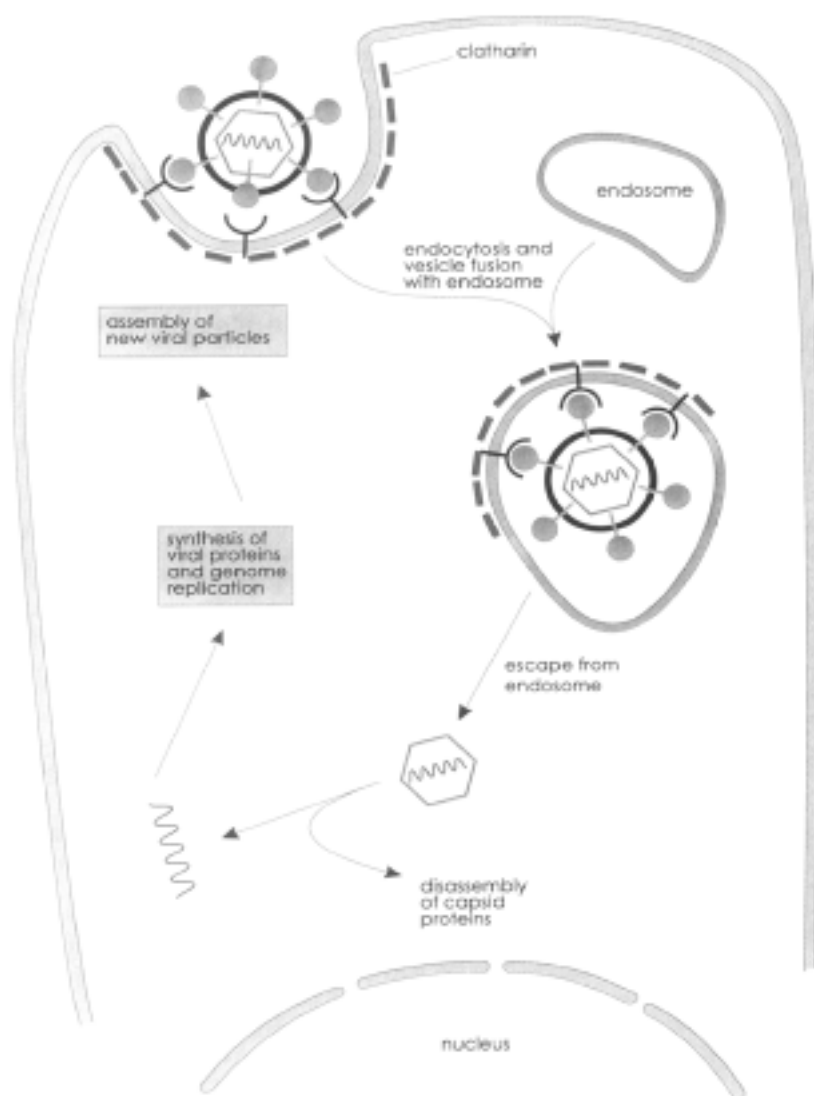


图 30.1 某些真核生物的病毒与膜融合并通过胞吞作用进入细胞
宿主细胞的受体与病毒蛋白相互作用,使胞吞作用开始;一旦进入细胞,
病毒就逃避开正常的降解途径并从其核壳中释放出遗传物质。

有些病毒也有一脂质膜,称为病毒被膜,包围着核壳。此被膜是由宿主细胞的质膜衍生而来的。曾根据病毒颗粒包装的类型(核壳,病毒被膜等)和病毒基因组的核酸组成(RNA或DNA),对病毒进行分类。

动物病毒可以侵入并溶解细胞,也可以长期栖息在细胞中并连续不断地释放后代侵入邻

近的细胞。不管结果如何,病毒必须与细胞膜蛋白结合而首先进入细胞。病毒常常是通过胞吞作用的自然过程而进入细胞的,如图 30.1 所示,病毒先由与披网格蛋白小窝有关的由受体介导的过程而进入细胞。当细胞膜围绕着病毒折叠时,就形成了有被小泡,这些小泡然后进入细胞质并与细胞内称为内小体的胞内其他小泡相融合。

在正常的胞吞过程中,内小体的内容物会经由膜融合而转入溶酶体内,然后溶酶体中的蛋白质就会降解所俘获的蛋白质。像塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)这样的病毒就会在与溶酶体的膜融合之前离开内小体而逃脱了被降解的命运。内小体中的低 pH 激活了病毒被膜中与内小体膜融合的糖蛋白,结果是核壳被释放到细胞质中。壳蛋白和病毒的基因组分开,病毒的产生开始。后文将详述病毒基因组的复制和病毒蛋白的合成。

图 30.2 所示为在非溶解性的侵染之后由被膜包被的病毒的合成和释放。病毒的组装过程利用了细胞内正常的蛋白质转运的作用(第 27 章)。可溶性的壳蛋白是在游离的核糖体上合成的,而被膜蛋白则被引向内质网进行合成和加工。新合成的病毒壳蛋白通过高尔基体被转运,最后则插入到宿主细胞的质膜中。壳蛋白和病毒的核酸在细胞质中聚在一起,然后就连接到被膜蛋白的胞质侧上。病毒的组装是一个热力学上有利的过程,其结果是排除细胞膜蛋白和通过出芽而将病毒排至胞外空间。

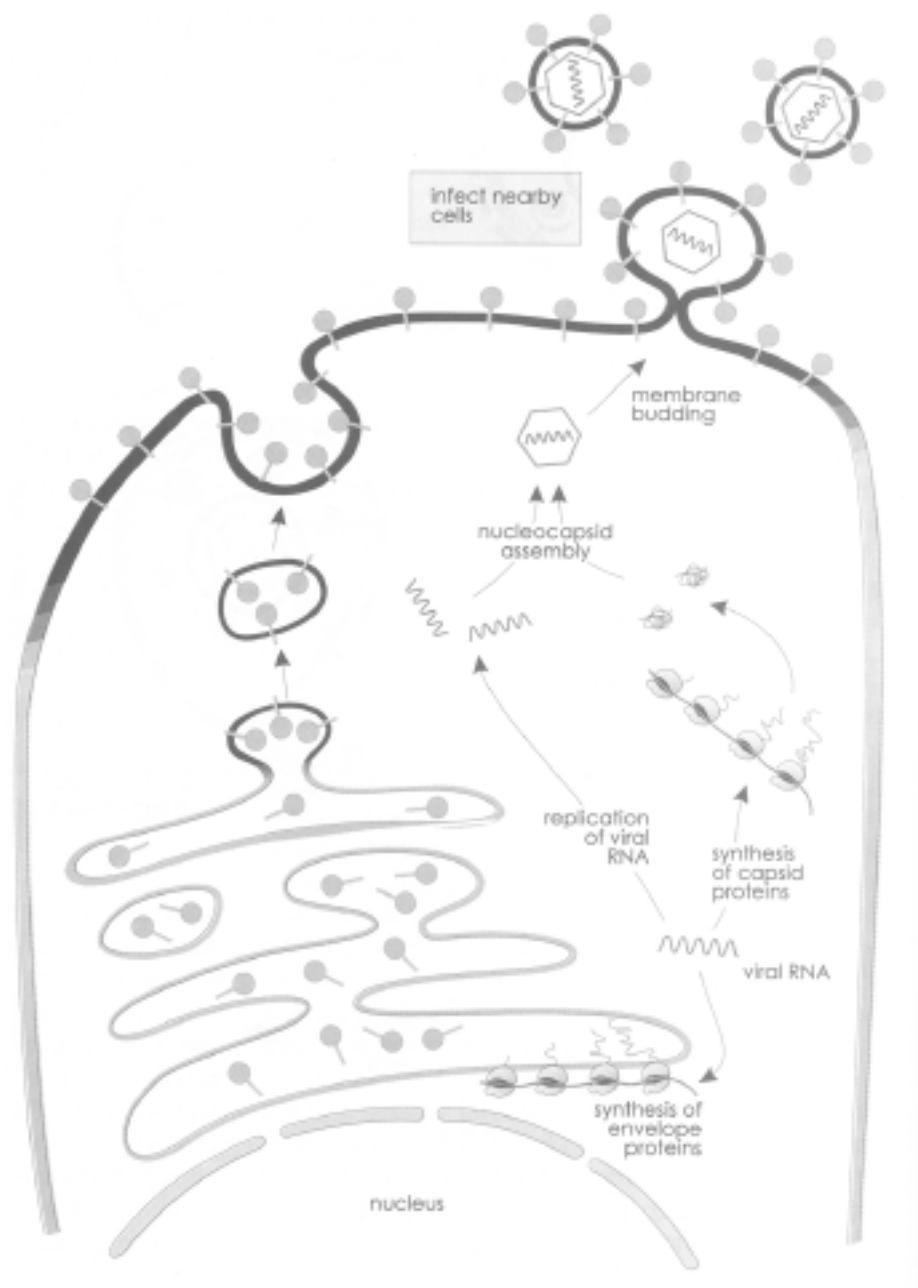


图 30.2 有被膜的病毒通过正常的蛋白质到位途径在宿主细胞膜上组装
病毒被膜的蛋白质与宿主细胞的质膜在一起,这就促进了病毒的包装和细胞表面的出芽。

多数病毒疫苗或是用病毒的被膜或壳的蛋白质制成的,或是用完整的已被中和的病毒制成的。这些制剂被注射到对象体内经过长时间以引发免疫应答。假若接受注射的人血液中有对该病毒蛋白专一的抗体,那么当遇到此病毒时,便能识别并破坏这种病毒。为什么有些疫苗无效呢?最常见的原因是,编码病毒壳蛋白的基因经常发生突变,因而使病毒逃避了免疫的检测。例如,每个季节的流感病毒的株系都需要新的疫苗。

30.4 四大类动物病毒

了解动物病毒的生活周期很有趣,因为我们不仅可以学到关于人的病原体的一些知识,还可以把前几章中讨论的关于 DNA、RNA 和蛋白质之间信息传递的基本原理加以扩展。已发现动物病毒似乎在其生活周期的各个点上能利用核酸复制的每一种方式(如表 30.2 所列):

RNA RNA, DNA DNA, DNA RNA 和 RNA DNA

表 30.2 四大类动物病毒^a

类别	病毒基因组类型	第一个复制产物	举例
RNA-RNA	(+) ss RNA	(-) ss RNA	脊髓灰质炎病毒, 塞姆利基病毒, 冠形病毒, 甲型肝炎病毒
	(-) ss RNA	(+) ss RNA	狂犬病毒, 流感病毒, 麻疹病毒
	ds RNA	(+) ss RNA	呼肠孤病毒
DNA-DNA	ds DNA(环状)	ds DNA	SV40 病毒, 多瘤病毒
	ds DNA(线状)	ds DNA	腺病毒, 疱疹病毒
	ss DNA	ds DNA	细小病毒
DNA-RNA	ds DNA	(+) ss RNA	乙型肝炎病毒
RNA-DNA	ss RNA	ds DNA	HTLV-1, HIV-1

^a ss 代表单链, ds 代表双链 RNA 或 DNA; (+) 为蛋白质编码链, (-) 为非编码链。

虽然已提出过更为复杂的分类方案,我们还是把动物病毒分为四大类,以反映病毒的核酸形式和第一个复制产物。例如,“RNA-RNA”类就代表 RNA 病毒,它将其 RNA 基因组转变为互补的 RNA 链,这就是复制的第一步。同样,“RNA-DNA”病毒就是在复制过程中把病毒体的 RNA 转变为 DNA 的病毒。

30.5 RNA-RNA 病毒: 脊髓灰质炎病毒

有两大类 RNA-RNA 病毒,差别在于其 RNA 基因组的链不同,有(+) RNA 病毒和(-) RNA 病毒。脊髓灰质炎病毒称为(+)链 RNA 病毒,因为 RNA 基因组就是感染后脊髓灰质炎病毒蛋白合成的 mRNA。流感病毒称为(-)链 RNA 病毒,因为起感染作用的病毒基因组必须先被病毒 RNA 转录酶拷贝成(+)链 mRNA。其他的 RNA-RNA 病毒有引起普通感冒的鼻病毒和冠形病毒,引起狂犬病的狂犬病毒和引起麻疹和腮腺炎的副粘病毒。

(一) 脊髓灰质炎 RNA 被翻译成一条多肽

脊髓灰质炎病毒是小核糖核酸病毒科的成员,由 7400 个核苷酸的(+)链 RNA 组成,具裸露的核壳。图 30.3 所示为翻译成单链的大的脊髓灰质炎病毒多肽后,病毒所编码的蛋白酶又如何将其加工,产生各种蛋白质产物。两类起作用的病毒蛋白是壳蛋白类(VP1, VP2, VP3

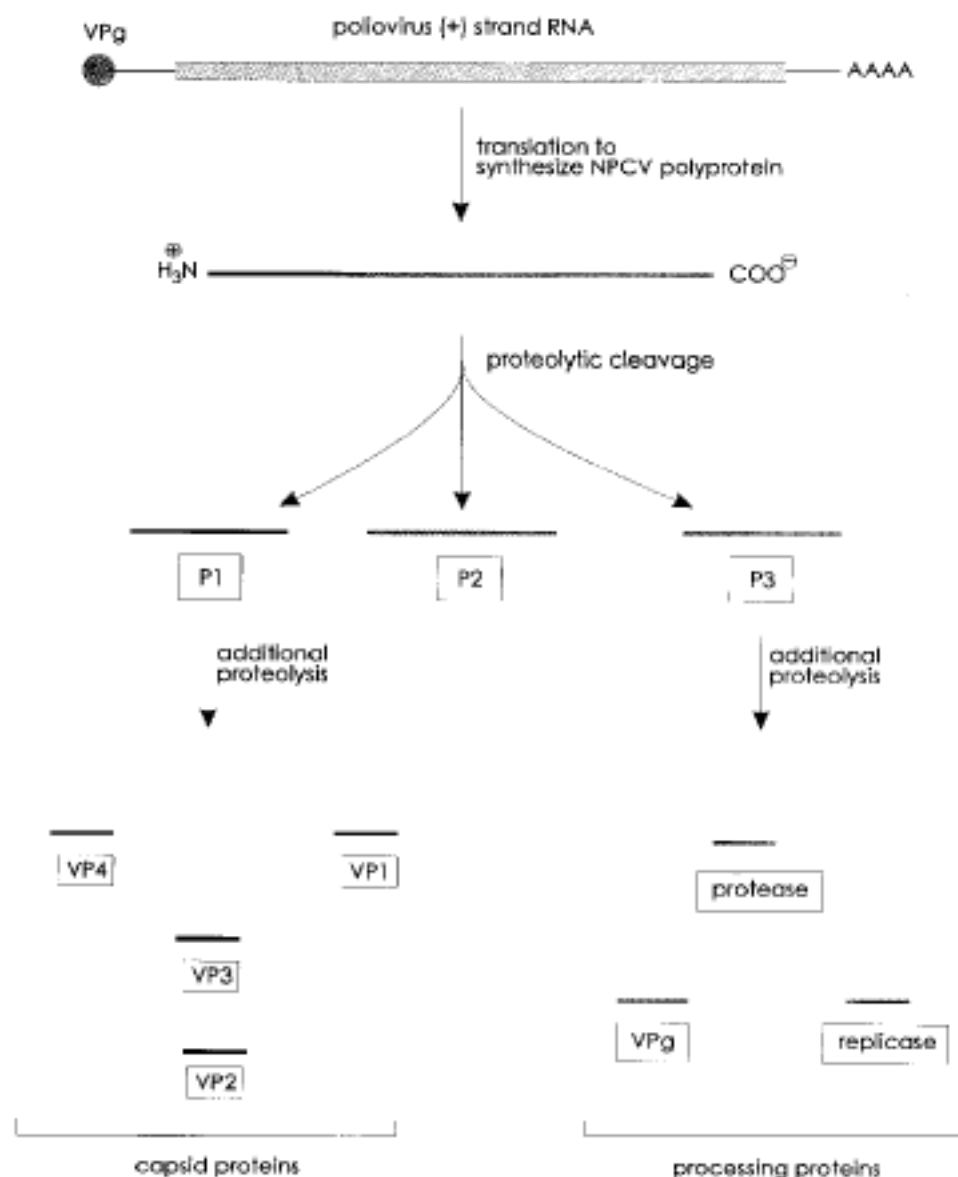


图 30.3 脊髓灰质炎病毒蛋白的水解加工

起感染作用的(+)链 RNA 先合成一单个的多蛋白, 随后的水解加工使得产生病毒所需要的各种脊髓灰质炎病毒蛋白质积累起来。

和 VP4) 和起加工作用的蛋白质(蛋白酶和复制酶)。

脊髓灰质炎病毒 RNA 在许多方面像典型的真核生物的 mRNA, 有聚腺苷酸的 3 尾和被保护的 5 端。不过, poly(A) 尾不是由 poly(A) 聚合酶的作用加上去的, 而是在病毒基因组中编码的。此外, 5 端并无 7-甲基鸟苷帽, 而是有一共价连接的病毒蛋白, 称为 VPg, 在 VPg 的酪氨酸残基和病毒 RNA 的尿核苷之间有一磷酸二酯键。

脊髓灰质炎病毒的 RNA 基因被翻译成一条多肽, 称为 NCVP, 病毒所编码的蛋白酶将 NCVP 加工, 产生等摩尔量的壳蛋白和复制酶。这种蛋白质合成的方式效率较低, 因为每一个重新包装起来的病毒粒需 60 个分子的壳蛋白, 虽然合成新的病毒基因组只需很少的复制酶蛋白质。其他病毒利用选择性更高的转录和翻译策略。脊髓灰质炎病毒没有进一步进化而使这一过程更为合理的一条理由, 可能是它已经利用了一种有效的办法去指导细胞中蛋白质合成的主要机制以翻译病毒 mRNA。例如, 脊髓灰质炎病毒的一种蛋白酶专一地切割细胞中的翻译-起始因子 eIF-4B 而使之失活。eIF-4B 在细胞中的作用是识别 5-甲基鸟苷帽作为核糖体装载的先决条件。因为脊髓灰质炎病毒 mRNA 的翻译并不需要这种起始因子, 所以细胞中的全部核糖体都可用于病毒蛋白的合成。

(二) 脊髓灰质炎病毒基因组的复制

脊髓灰质炎病毒的另一不寻常的特点是它的 RNA 复制机制。一旦壳蛋白的量足以供病毒粒包装之用, 这种病毒就转入其基因组的复制。复制酶是此病毒中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 它是(+)链转变为模板(-)链随后又合成新的(+)RNA 链以备包装这两步所必需的(图 30.4)。(-)链合成的引发需要 VPg 蛋白质, 这种引发包括连在 VPg 上的尿核苷残基与(+)链 3 端的腺嘌呤残基之间的退火。复制酶能够利用 VPg 蛋白-尿苷作为引物开始并完成(-)链的合成。

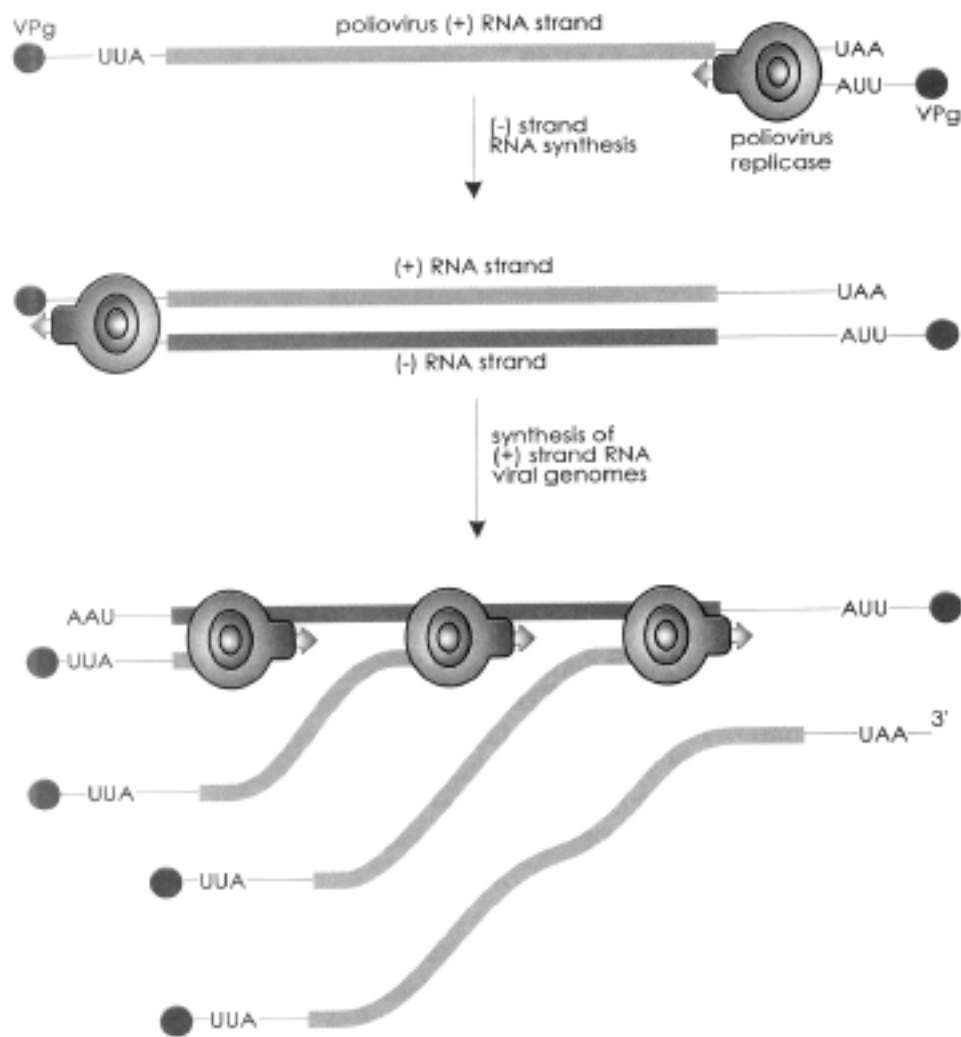


图 30.4 脊髓灰质炎病毒基因因素的复制

脊髓灰质炎病毒复制酶利用 VPg 的引发蛋白使(-)链 RNA 的合成开始, (-)链便成为产生(+)链 RNA 的模板。

一旦(-)RNA 链合成完毕, (+)链脊髓灰质炎病毒基因组的合成就开始。这时又需要 VPg 引发蛋白使(+)链的合成开始。某些起始时合成的(+)链是用于蛋白质合成的, 可是以后, 感染之后, 当壳蛋白开始组装之后, 大部分(+)链都包装在病毒粒(起感染作用的病毒颗粒)之中。利用(+)链进行病毒蛋白的翻译与基因组被包装成病毒粒之间的平衡是由壳蛋白的多少决定的。

30.6 DNA-DNA 病毒: SV40 病毒和腺病毒

DNA-DNA 病毒的生活周期与真核细胞的相似, 它们的遗传信息都以 DNA 的形式贮存。其次, 在病毒蛋白被合成以前, 必须先合成 RNA。DNA 病毒基因组的大小范围很广。有些 DNA 病毒的基因组小于 10 kb(引起乳头瘤的乳头瘤病毒), 有些大小中等, 约 40 kb(感染呼吸

道的腺病毒), 还有一些甚至更大, 其基因组大于 200 kb(疱疹病毒和天花病毒)。

较小的 DNA 病毒不编码 DNA 聚合酶, 因为能在处于 S 期的活跃的细胞中复制, 所以这些病毒的宿主范围有限。大的 DNA 病毒, 如单纯疱疹病毒(HSV) 则相反, 它们编码许多种蛋白质, 这就使得病毒能在任何它能感染的细胞的细胞核内复制。疱疹病毒引起几种人的疾病, 如唇疱疹(HSV 类型 I) 和生殖器官疱疹(HSV 类型 II)。用于治疗 HSV 感染的常用药物有两种: 羟甲基无环鸟苷(ganciclovir) 和无环鸟苷(阿昔洛维, aciclovir), 它们都是核苷酸类似物, 专一抑制病毒的复制。其作用机制的基础是: HSV 编码的胞苷酸激酶能够独一无二地使这些类似物磷酸化, 因而激活之使在复制过程中起到链的终止子的作用。因为人的胞苷酸激酶不能使羟甲基无环鸟苷或无环鸟苷磷酸化, 所以未受感染的细胞中 DNA 复制照常进行。除去本身的胸苷酸激酶和 DNA 聚合酶之外, 疱疹病毒基因组还编码许多与 DNA 复制有关的其他蛋白质, 包括一种与起始点结合的蛋白质、解旋酶/引发酶、与单链结合的蛋白质和核糖核苷酸还原酶。另一种已鉴定清楚的疱疹病毒蛋白质是 VP16, 一种强有力的转录激活剂蛋白质, 已在第 29 章中有所描述。

在本节中我们将简述两种研究得最清楚的 DNA 病毒——猿猴乳头多瘤空泡病毒 SV40 和腺病毒。SV40 给我们提供了许多关于 DNA 复制功能起源于真核生物的信息。它还编码一种最合适的转化蛋白, 已知它能引起动物的肿瘤, 是一种多功能的病毒蛋白, 称为 SV40T 抗原。腺病毒是极有价值的生物学试剂, 使我们获得了许多关于哺乳动物细胞中转录调节和 mRNA 剪接的信息。

(一) SV40 病毒曾用于 DNA 复制和细胞转化的研究

SV40 是环状的双链 DNA 病毒, 其基因组为 5243 个碱基对。它原来是在脊髓灰质炎病毒的疫苗中作为一种污染物而被发现的, 这种疫苗是用猿猴细胞制备的(猿猴病毒, simian virus, 故名 SV)。SV40 病毒通常会杀死猿猴细胞, 但也能感染许多种组织培养的哺乳动物细胞。在啮齿类动物细胞中, 有时甚至在人的细胞中, SV40 的感染并不引起细胞的溶解, 而是以低频率使细胞无限增殖, 或使许多种类型的细胞转化。目前使用的许多动物细胞系都是用 SV40 感染最初的细胞, 或是用 DNA 转导法, 将 SV40 DNA 直接引入细胞中而建立起来的。

如图 30.5 所示, SV40 基因组中有一个双向复制起点, 这与病毒基因组中只有一个转录启动子是一致的。从 SV40 启动子左侧(早期启动子) 以逆时针方向转录, 就会产生两种蛋白质, 小的 t 抗体和大的 T 抗体。这两种蛋白质在其氨基端约有 80 个氨基酸是相同的, 这是转录物差异剪接的结果。与大的 T 抗体相比, 小的 t 抗体蛋白较短, 这是因为在内含子的一部分中有一个框内的终止密码子, 而在 T-抗体的转录物中这个终止密码子被去掉了。

“ t/T ”代表转化蛋白, 这反映了这些蛋白质最初

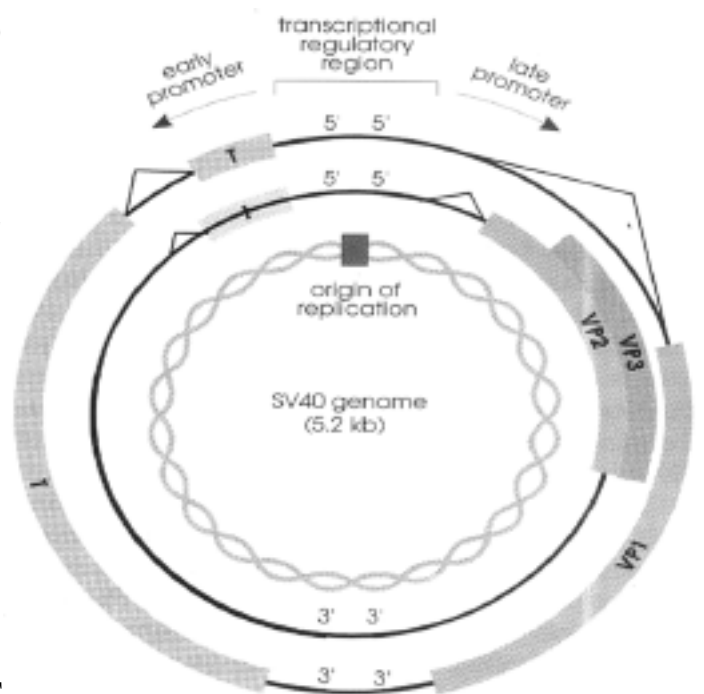


图 30.5 SV40 基因组的组织示主要的病毒蛋白的编码序列以及复制和转录的调节区。

是怎样被鉴定出来的。曾发现受感染的啮齿动物的细胞由于 T 抗体而发生了无限增殖化和转化。SV40 抗体是一种多功能的蛋白质,是 SV40 DNA 复制所需要的,它与病毒的复制起始点结合。SV40T 抗体也是转录的激活剂,能促进 SV40 启动子的转录。图 30.6 所示为 SV40T 抗体的功能域以及 SV40 复制起始点和转录调节区的有关 DNA 序列元件。

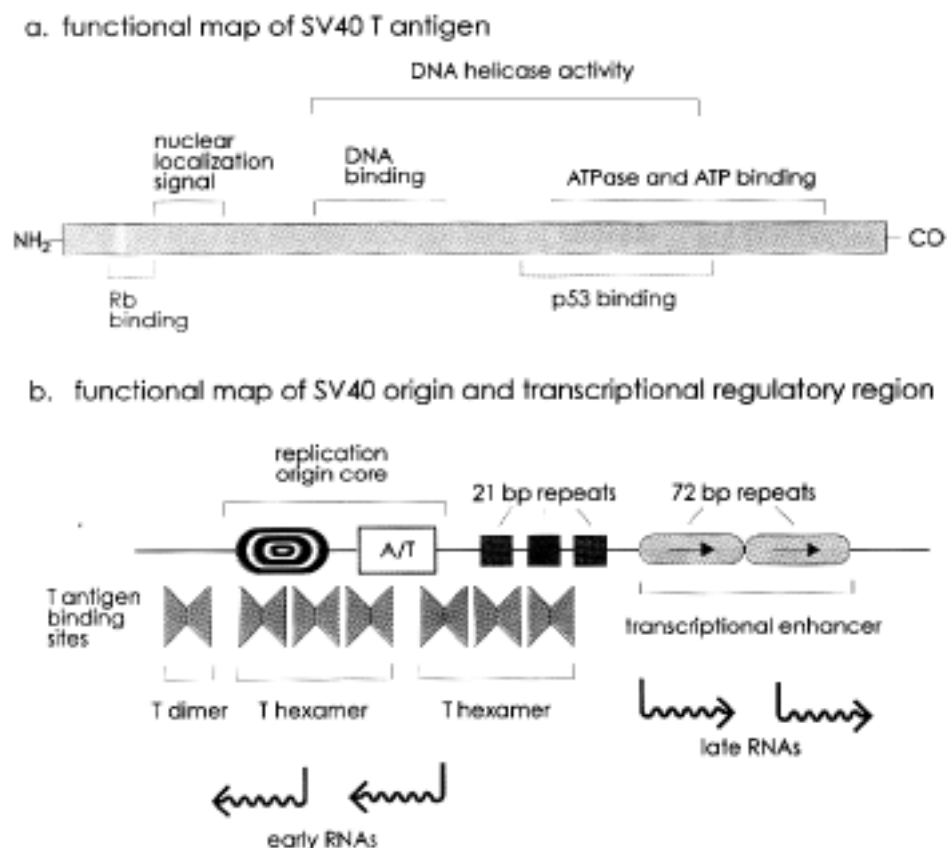


图 30.6 SV40 大的 T 抗体以及复制起始点周边区域的功能图

(a) T 抗体编码序列的遗传学和生物化学分析揭示了多个相互重叠的功能区。这些氨基酸序列中,有一些是 T 抗体的复制功能所必需的,其他一些则与宿主细胞中的调节蛋白(如 Rb 和 p53 的蛋白质)相互作用有关。(b) 有一约 300 bp 的区域,包括 SV40 复制起始点核心。这一区域内,除去有早期和晚期基因

转录所需要的调节序列(21 bp 和 72 bp 的重复序列)之外,还有多个 T 抗体的结合位点。

SV40T 抗体的无限增殖化和转化特性好像与宿主细胞生活周期中的至少两种生长调节物,即 Rb(成视网膜细胞瘤)蛋白和 p53 蛋白有关,SV40T 抗体能与它们结合并使之失活。我们将在第 31 章中讨论 Rb 和 p53 的正常功能,那就是阻止细胞进入 S 期并在不适当的时刻复制其 DNA 以控制细胞的周期。然而,若 Rb 和 p53 发生了突变,或是当它们的功能被 SV40T 抗体这样的病毒抑制时,那么细胞的增殖就会继续进行,基因组中也会积累更多的突变。Rb 和 p53 中的突变与人的许多种癌症都有关,因此,SV40T 抗体通过 Rb 或 p53 的失活而发生的转化很可能是人类癌发生的早期典型事件。

(二) 腺病毒利用复杂的转录和 RNA 剪接策略

腺病毒是线状的双链 DNA 病毒,它感染灵长类的呼吸道。腺病毒基因组有 36 000 个以上的碱基对,编码至少 40 种不同的病毒蛋白。感染后不久,6 种不同的腺病毒转录单位,各自都有本身的启动子,就利用宿主细胞的和病毒所编码的转录因子进行转录。所产生的第一种腺病毒蛋白就是 E1A,这是一种病毒的转录因子,为腺病毒的所有其他启动子(包括 E1A 启动

子) 的激活所必需。E1A 并不直接与 DNA 结合, 而是似乎很像是转录连接物或辅激活蛋白那样起作用(第 29 章)。E1A 的反式激活域的一部分与 RNA pol 起始复合物中的蛋白质, 如 TF B, 以及其他转录因子发生相互作用。转染的细胞系中 E1A 的表达能刺激细胞中的许多基因, 这说明, 除去有激活腺病毒启动子的功能以外, 它也能改变宿主细胞的基因表达。

图 30.7 所示为早期和晚期的腺病毒转录单位的转录模式, 它是从两条链上转录的。腺病毒的 mRNA 是由细胞的机构加工的, 并有 5 甲基鸟苷帽和 poly(A) 尾。腺病毒的晚期启动子负责指导一单个前体转录物的转录, 前体转录物产生不同种类的 mRNA, 其末端为 5 种多腺苷酸化信号之一。然后这些 mRNA 发生不同的剪接, 除去编码序列内中的部分。这些不同的主要的晚期 mRNA 的翻译产生许多种腺病毒蛋白, 都是病毒的复制和包装所需要的。

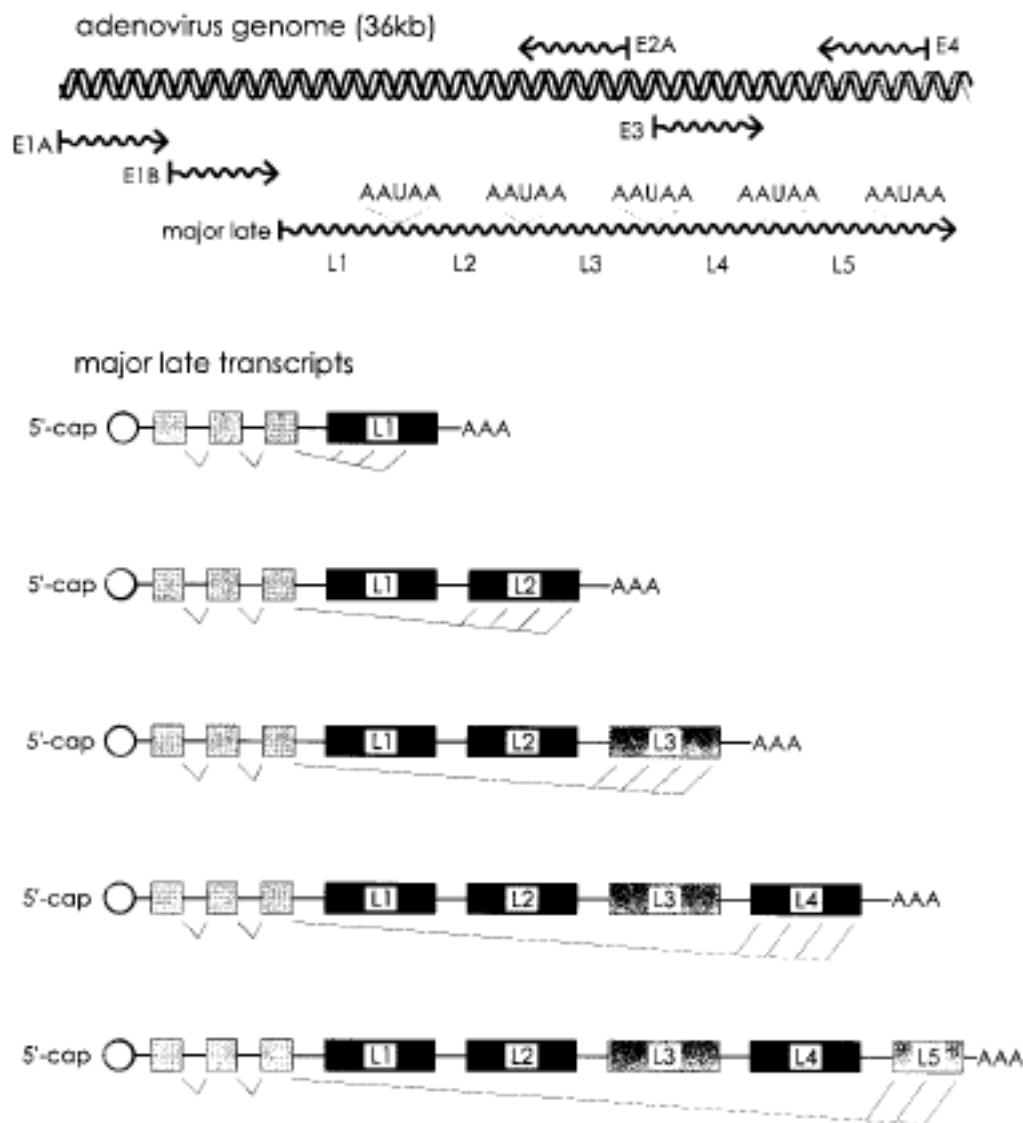


图 30.7 腺病毒转录物的合成和加工

腺病毒基因组中有 6 个启动子, 产生多种转录物。主要的晚期启动子特别活跃, 产生几类转录物, 其末端为 5 种腺苷酸化信号中的任何一种。通过复杂的不同的剪接途径, 每一类主要的晚期转录物都被加工成氨基端序列相同但羧基端残基不同的各种蛋白质。

30.7 DNA-RNA 病毒: 乙型肝炎病毒

这一类病毒中研究得最多的是乙型肝炎病毒(HBV), 即引起人患肝炎的病毒。在其生活周期中, 3.2 kb 的 DNA 基因组由细胞中的 RNA 聚合酶转变为 RNA。然后 HBV-编码的反转录酶再以这种 RNA 为模板合成新的病毒 DNA 链。完全的复制循环是 DNA RNA DNA。乙型肝炎病毒的生活周期与反转录病毒的生活周期相反, 它们以下列顺序复制其基因组: RNA

DNA RNA。

有两种不同的病毒与人的肝病有关: 甲型肝炎病毒是小核糖核酸病毒, 是 RNA 病毒, 它引起传染性肝炎; HBV 是 DNA 病毒, 它引起血清性肝炎。由 HBV 感染引起的人的肝炎是全世界严重的健康问题, 估计约有 2 亿以上的人受到了慢性的感染, 这些人中有很大会一部分会死于肝硬化或肝细胞癌。在亚洲, 乙型肝炎是地方病, 肝细胞癌是男性死亡的主要原因之一, 感染 HBV 的人比未感染的人死于肝癌很可能要多 100 倍以上。

与 HBV 有关的肝病以及肝细胞癌的机理仍未完全阐明, 曾有人提出两种可能性:

(1) 已证明病毒所编码的 HBV X 蛋白(HBx) 在仅仅表达 HBV 基因的转基因小鼠中会引起肝癌, 这说明 HBx 与转化直接有关。HBx 的分子研究已证明它能调节宿主基因的表达, 因为它能促进一连串的磷酸化作用而通过丝氨酸/苏氨酸激酶激活转录因子。

(2) HBV 慢性感染的结果, 常是 HBV 整合到宿主的基因组中, 而这就可能或因破坏而使基因失活, 或是因 HBV 的转录调节序列而使基因被不正常地激活。说明 HBV 感染何以导致肝细胞癌的两机制见图 30.8。

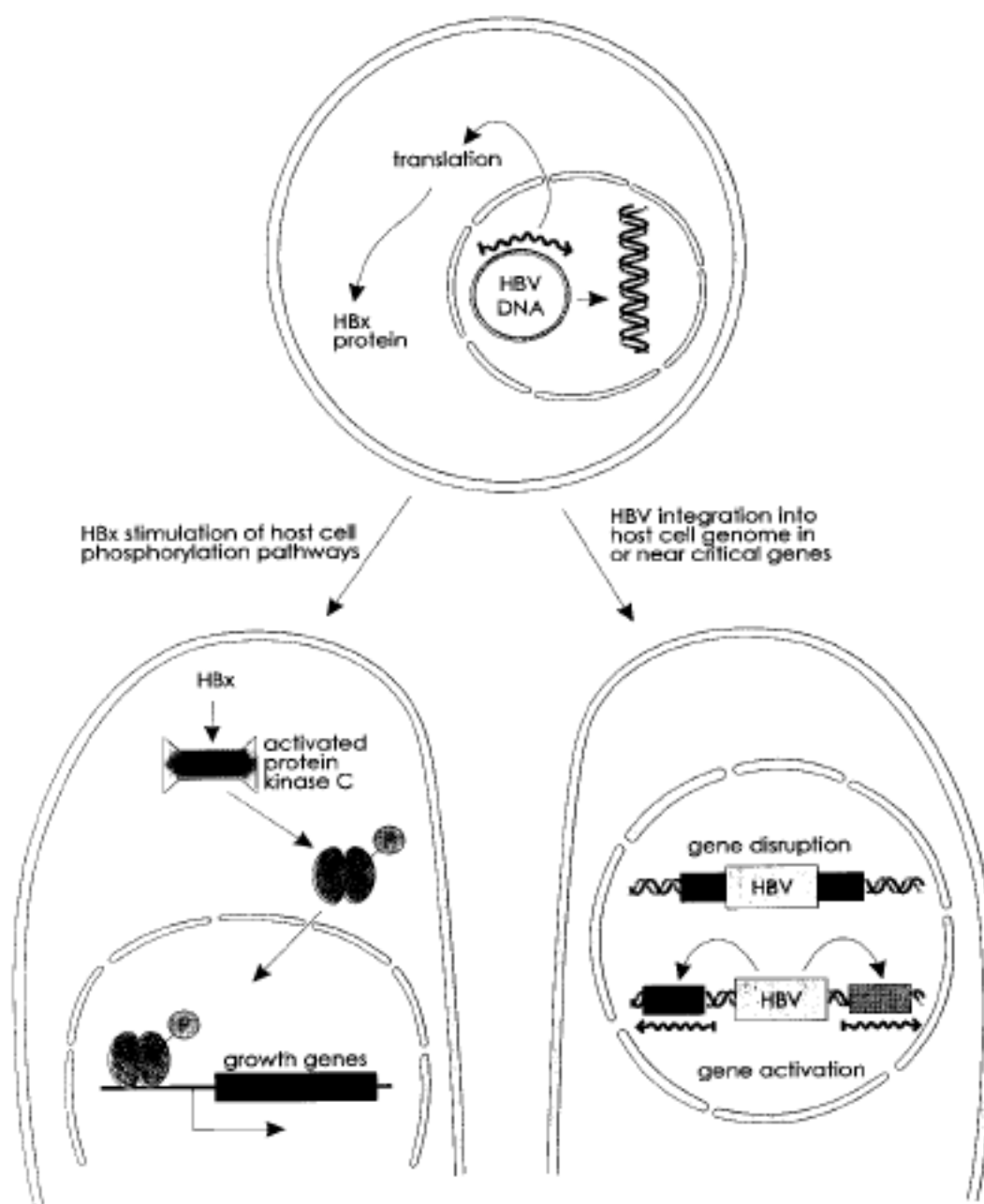


图 30.8 慢性的 HBV 感染促进肝病的两种方式

(a) 病毒的 HBx 蛋白质的作用是引发宿主细胞中蛋白激酶 C 的活性, 于是像 AP-1 这样的激活物蛋白就发生磷酸化。AP-1 诱导生长调节基因的转录导致肝细胞增殖。(b) HBV 基因组整合到宿主细胞的 DNA 中, 使抑制生长的基因被破坏, 或是使促进生长的基因被异常激活。

幸运的是,现在已经有了 HBV 疫苗,鼓励多数卫生保健工作者都进行免疫注射。首次广泛使用的生物技术产物之一就是第二代 HBV 疫苗,这是在酵母中表达 HBV 被膜壳蛋白,然后利用提纯的蛋白质作为免疫剂。

30.8 RNA-DNA 病毒: 反转录病毒

人类的所有病毒中最严重的是 RNA-DNA 类的反转录病毒。反转录病毒的生活周期如图 30.9 所示。反转录病毒的病毒粒由一个二十面体的核壳所包被,其中有 2 个拷贝的单链 RNA 基因组,一个对宿主细胞专一的 tRNA,这是感染后启动基因组复制的,还有 2 分子的反转录酶,这就是病毒的聚合酶。与细胞表面的受体蛋白结合以后,病毒颗粒被胞吞进入细胞,病毒 RNA 基因组则释放到细胞质中,并立即被拷贝成双链 DNA。这种双链的反转录病毒的 DNA 进入细胞核中并整合到宿主细胞的基因组中,起着转录单位的作用,产生反转录病毒 RNA。这种已被整合的反转录病毒基因组的 DNA 拷贝称为原病毒。最后一步是已完全加工的病毒转录物被运出到细胞质中,进行翻译,产生包装病毒的蛋白质,并且也被包装到后代病毒之中。

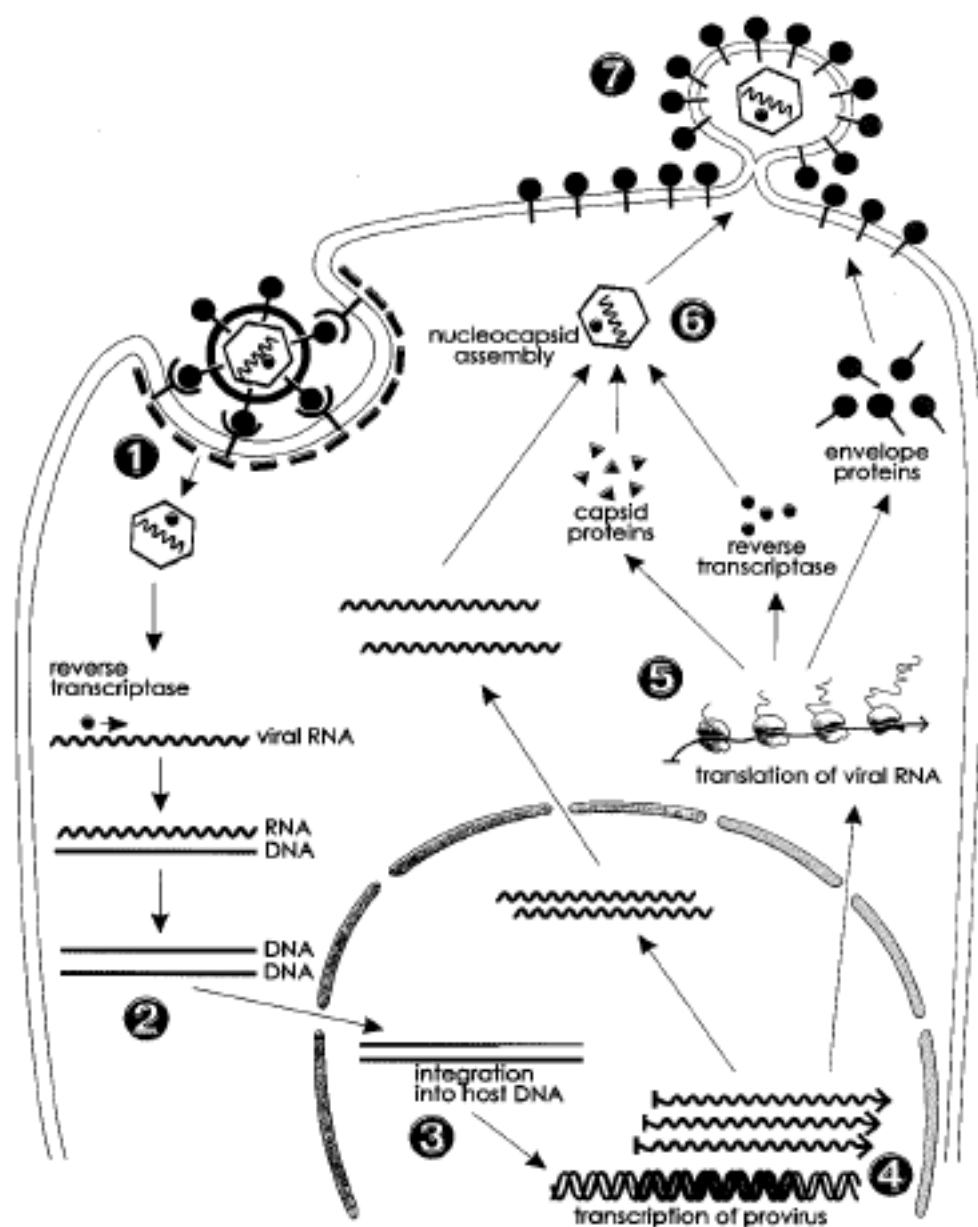


图 30.9 反转录病毒生活周期中的 7 个关键步骤

感染性病毒实际上有 2 个拷贝的 RNA 基因组和 2 分子的反转录酶。反转录病毒的胞吞过程(步骤 1)和膜的出芽过程(步骤 7)与图 30.1 和 30.2 中所画的一样。被感染的宿主细胞并不会被病毒立即杀死,而是起着大规模产生病毒粒的工厂的作用。

反转录病毒和其他类型动物病毒的重要差别就是前者必须被整合到宿主的基因组内才能发生反转录病毒基因的转录和复制。

过去 20 年中 有 4 项具有重大影响的发现使得反转录病毒的重要性突出表现出来:

(1) 20 世纪 70 年代初期, Howard Temin 和 David Baltimore 独立地分别发现了反转录病毒中的反转录酶, 一种由 RNA 指导的 DNA 聚合酶。这一发现不仅又一次证明了生物学中的所有规则都有例外(在那以前都认为基因组的信息只能由 DNA 流向 RNA), 而且还给重组 DNA 技术提供了极有价值的工具。正如第 22 章中所述, 反转录酶是分子生物学中很有用的试剂, 可将 RNA 转变为互补 DNA(cDNA) 而克隆 mRNA 转录物。

(2) 20 世纪 70 年代中期, Michael Bishop 和 Harold Varmus 证明动物的反转录病毒能改变宿主中称为癌基因的这种基因的表达而引起肿瘤。这一发现使得我们目前对于癌症的遗传学基础有所了解(这一原理将在第 31 章中阐述)。

(3) 1980 年, 研究工作者首次证明人的病毒能引起癌。这种病毒是一种反转录病毒, 称为人 T 细胞白血病病毒(HTLV-1)。在许多研究工作者的共同努力下, 发现了反转录病毒基因所编码的蛋白质, HTLV-1 Tax 蛋白质, 是引起成年人 T 细胞白血病的因素, 因为它是宿主细胞基因转录的反式激活物。

(4) 关于人的反转录病毒最为名声卓著的工作出现于 20 世纪 80 年代初期, 法国和美国的研究小组共同确定了人免疫缺陷病毒(HIV-1)——人类获得性免疫缺陷综合症, 即艾滋病(AIDS)的病原体。HIV 感染人的 T 细胞, 最终结果是 T 细胞死亡, 于是免疫系统中这些重要的细胞就失去了。艾滋病患者只有极少数 T 细胞, 对于偶然感染的疾病极为敏感, 这常常就是由于艾滋病而死亡的根本原因。

全世界与 HIV-1 感染的致命后果斗争的努力已取得一些成效, 我们现在对 HIV-1 的致病性有了更好的了解。这方面的研究大多集中在发展一种生物化学的办法来抑制 HIV-1 的反转录酶的活性。图 30.10 是用 X 射线结晶学的方法得到的 HIV-1 反转录酶的分子结构。曾利用这样的资料试图设计病毒 DNA 合成的酶的较好的抑制剂, 例如, 改进竞争性抑制剂 3'-叠氮-

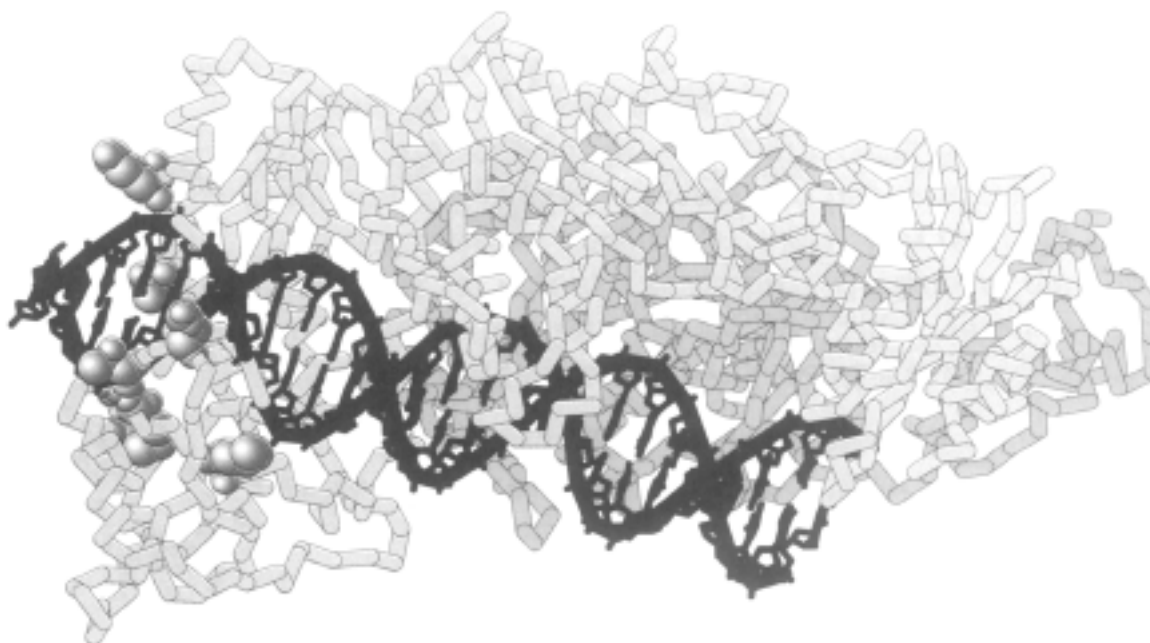


图 30.10 与 RNA-DNA 核酸链形成复合体的 HIV-1 反转录酶异二聚体(p66 和 p51 亚基)的分子结构
图中的球表示反转录酶复合体中对 AZT 和双脱氧肌苷(ddI)有抗性的氨基酸突变的相对位置。

2,3-双脱氧胸苷(AZT)的效力和对病毒的专一性。遗憾的是,反转录酶编码序列的高频率的突变与反转录病毒基因组的复制同时发生(反转录酶没有3、5'-外核酸酶的校对功能),加上这些药物能够交叉抑制人的DNA聚合酶因而具有毒性,因而作为治疗艾滋病的药物,其使用受到了严重的限制。

30.9 人类基因疗法中病毒表达载体的使用

分子遗传医学的一个长远目标是用基因置换法作为治疗手段,医治由于单个基因的缺乏而产生的人的疾病。目前考虑中的两条基本探索途径是用真核生物的病毒作载体和不用病毒而传递DNA。当前,在人类基因疗法中,病毒载体的发展比不用病毒的基因传递技术更为先进一些,不过随着技术的进步,这两种办法可能都会被使用。

到目前为止,最好用的病毒载体是从反转录病毒和腺病毒衍生而来的。如图30.11所示,除去病毒基因(gag-pol-env)而代之以治疗用的基因,加上抗药性的标志基因,就可能利用包装反转录病毒的细胞系来产生重组的反转录病毒,这种病毒能够作为不复制的原病毒而与宿主细胞的DNA整合。在一项试验性的研究中,曾对患有缺乏腺苷脱氨酶基因的遗传病患者用

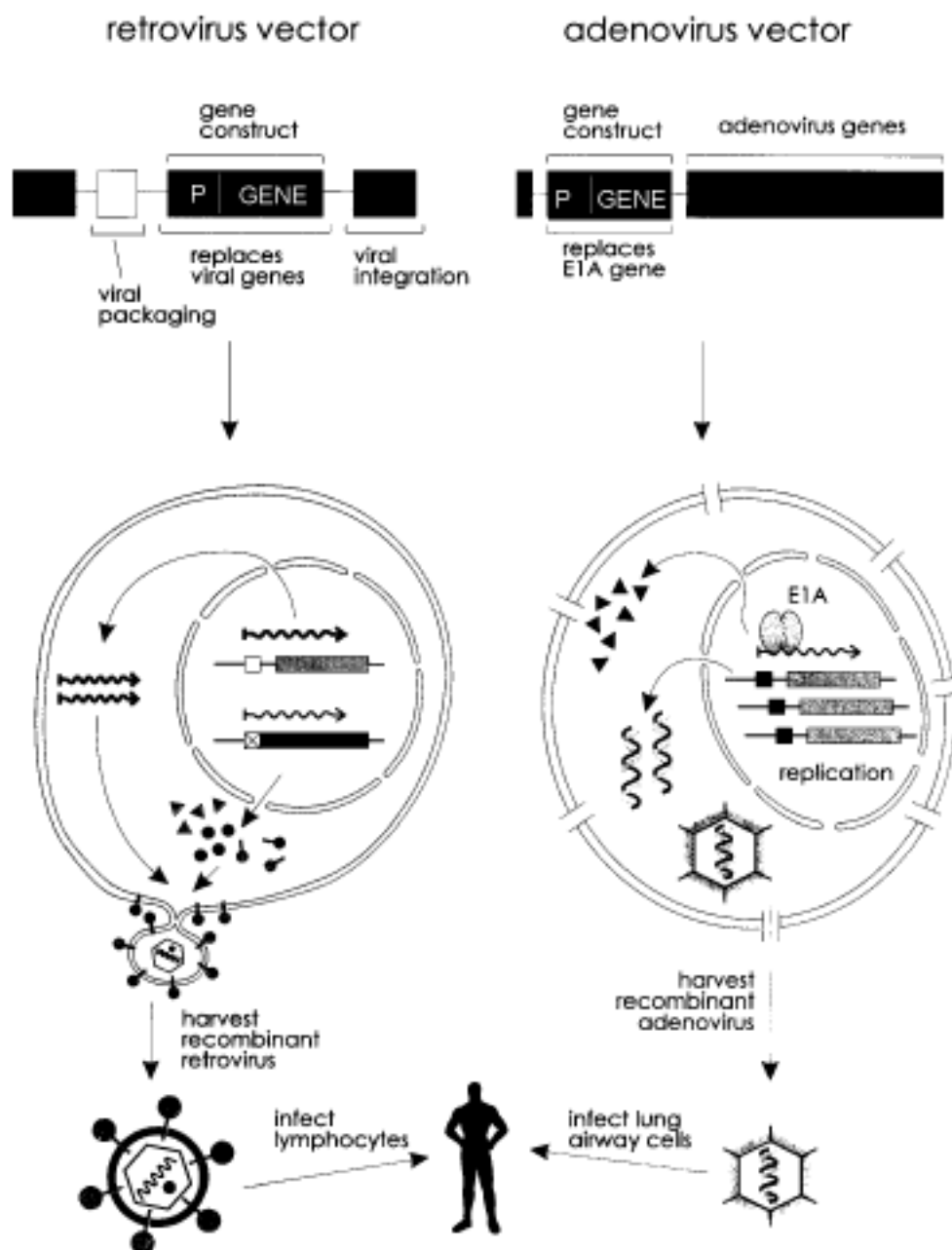


图 30.11 将要用于人的基因疗法的反转录病毒和腺病毒载体示意图

要补充丢失的基因功能而完成重组病毒的组装需要特殊的“包装病毒的细胞系”。用这些重组病毒感染宿主细胞应该不会让病毒大量复制,因为关键的病毒基因已被删除。

反转录病毒载体改正其缺陷。先用反转录病毒载体在体外感染这些病人的淋巴细胞,然后将再工程过的细胞送回到病人体内。

曾用重组的腺病毒把囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因传递给囊性纤维化患者的肺中。腺病毒在这方面是理想的载体,因为它们天然就会感染人的呼吸细胞。在这些腺病毒的载体中,CFTR基因是放在腺病毒的E1A基因的位置上。可将病毒载体包装在特化的人的细胞系中,该细胞系会表达E1A蛋白质以补偿病毒基本组中已缺失的这种基因。

将病毒载体用于人的基因疗法的优点是它能将DNA传递给大量的靶细胞。事实上,这正是大多数动物病毒对其宿主威胁极大的原因。然而,在病毒载体成为对人的遗传病的首选疗法之前,还有一些问题必须考虑,而且有几个问题必须得到解决。例如,病毒载体整合到宿主细胞的DNA中可能引起插入突变而使细胞失去对生长的控制(见第31章)。还有一种可能性,就是病毒载体中会发生突变,因而把无害的DNA变成了易发生感染的病毒,而且宿主细胞的范围也改变了。由于这些原因,也在研究别的不以病毒为基础的人的基因疗法。

30.10 小 结

(1) 可用无限增殖化的细胞系在实验室中繁殖并研究动物病毒。已证明动物病毒会利用宿主细胞的许多正常的过程,包括DNA复制、RNA和蛋白质合成,以及蛋白的到位和转运。细胞膜既可被用作港口,病毒通过胞吞作用由此进入细胞;又可被用作向邻近细胞传播感染的工具,传播的方式是膜的融合和病毒的芽生。

(2) 根据感染性病毒所含的核酸种类,以及第一个复制阶段的核酸产物,大多数常见的动物病毒可分为四大类。这4种复制方式是:

DNA DNA, RNA RNA, DNA RNA和RNA DNA

(3) 脊髓灰质炎病毒是RNA-RNA病毒,它指令其宿主细胞的蛋白质合成机构将它的RNA基因组翻译成蛋白质。脊髓灰质炎的多肽会被此病毒所编码的蛋白酶水解为有活性的亚基。脊髓灰质炎RNA的复制则利用新的蛋白质-尿苷引物使RNA合成起始,并利用其本身的依赖于RNA的RNA聚合酶进行。

(4) SV40是DNA-DNA病毒,通常感染猿猴细胞。曾详细地研究过SV40的复制起始点,它是真核细胞DNA复制起始的模型,因为其作用依赖于宿主细胞的蛋白质。SV40T抗体是多功能的蛋白质,为SV40的复制和SV40所编码的基因的转录所必需。已证明SV40T抗体会引起啮齿类细胞系的转化,这至少部分是由于它能使细胞中的调节蛋白(如Rb和p53)失活。

(5) 乙型肝炎病毒(HBV)是DNA-RNA病毒,它感染人的肝细胞。慢性的HBV感染是全球性的健康问题,因为它会引起肝硬化和肝细胞癌。与HBV有关的肝病有两种可能的机制,HBV的整合使宿主细胞的基因被破坏,或是此病毒编码的蛋白质(如HBx)改变了宿主细胞基因的转录。

(6) 反转录病毒是RNA-DNA病毒,它们需要整合到宿主细胞的基因组中才能完成其复制周期。反转录病毒中的反转录酶是一种依赖于RNA的DNA聚合酶,它在重组DNA的技术中十分重要,例如互补DNA(cDNA)的合成就要用它。人的免疫缺陷病毒(HIV)就是人的艾滋病的病原物。HIV感染并破坏人的T细胞,而T细胞是免疫系统起作用时所必需的。

(7) 正在开发的人基因疗法的一种策略就是利用重组的反转录病毒和腺病毒载体将基因的能起作用的拷贝传递给人的细胞。这两种策略都使用包装用的细胞系以提供丢失的基因功

能,并且能产生病毒的感染而不发生病毒的复制。以病毒介导的基因疗法的两个例子是利用重组的反转录病毒将腺苷脱氨酶基因引入到淋巴细胞中和吸入重组腺病毒将囊性纤维化跨膜传导调节蛋白基因传递给肺上皮细胞。

参 考 资 料

- Amalfitano, A., Begy, C., Chamberlain, J. S. (1996): Improved adenovirus packaging cell lines to support the growth of replication-defective gene-delivery vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:3352.
- Benn J., Schneider R. J. (1994): Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:10350.
- Bischoff, J. R., Kirn, D. H., Williams, A., et al. (1996): An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 274:373.
- Cohen J. (1994): Bumps on the vaccine road. *Science*, 265:1371.
- Condra J. H., Schleif W. A., Blahy O. M., et al. (1995): In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*, 374:569.
- Fauci A. S. (1993): Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: Implications for therapy. *Science*, 262:1011.
- Hill, C. M., Littman, D. R. (1996): Natural resistance to HIV? *Nature*, 382:668.
- Kasahara N., Dozy A. M., Kan Y. W. (1994): Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science*, 266:1373.
- Katz R. A., Skalka A. M. (1994): The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:133.
- Kitamura N. B., Semler B., Rothberg B. G., et al. (1981): Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291:547.
- Kohlstaedt L. A., Wang J., Friedman J. M., Rice P. A., Steitz T. A. (1992): Crystal structure at 3.5 resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256:1783.
- Liu F., Green M. R. (1994): Promoter targeting by adenovirus Ela through interaction with different cellular DNA-binding domains. *Nature*, 368:520.
- Morgan R. A., Anderson W. F. (1993): Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:191.
- Pear W. S., Nolan G. P., Scott M. L., Baltimore D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:8392.
- Perales J. C., Ferkol T., Beegen H., Ratnoff O. D., Hanson R. W. (1994): Gene transfer in vivo: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:4086.
- Price T. N. C., Moorwood K., James M. R., Burke J. F., Mayne L. V. (1994): Cell cycle progression, morphology and contact inhibition are regulated by the amount of SV40 T antigen in immortal human cells. *Oncogene*, 9:2897.
- Rabinovich N. R., McInnes P., Klein D. L., Hall B. F. (1994): Vaccine technologies: View to the future. *Science*, 265:1401.
- Spence R. A., Kati W. M., Anderson K. S., Johnson K. A. (1995): Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science*, 267:988.
- Tooze J. (1981): DNA tumor viruses. Part 2, Molecular biology of tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Varmus H. E. (1988): Retroviruses. Science, 240:1427.

复 习 题

1. 动物病毒的生物化学和分子生物学研究之所以有可能进行,得益于细胞生物学中哪一种技术的进展?
 - a) 披网格蛋白小窝的鉴定
 - b) 能够人工培养细胞系
 - c) 电子显微镜的发明
 - d) 单克隆抗体的发展
 - e) 由病毒引起的人类疾病的鉴定
2. 细胞中何种大分子的“起组织作用的复合体”指导着病毒蛋白质和核酸组装成有感染作用的病毒粒?
 - a) 高尔基体
 - b) 核基质
 - c) 披网格蛋白小窝
 - d) 特殊的多核糖体的集合体
 - e) 没有这种“起组织作用的复合体”
3. 下列哪一条途径是受感染人的 T 细胞中 HIV-1 基因组的完全复制所必经的?
 - a) DNA \longrightarrow RNA
 - b) DNA \longrightarrow RNA \longrightarrow DNA
 - c) RNA \longrightarrow DNA
 - d) RNA \longrightarrow DNA \longrightarrow RNA
 - e) RNA \longrightarrow DNA \longrightarrow DNA
4. 像流感病毒和 HIV-1 这样的病毒的下列哪一种特性,使得我们很难制成有效的疫苗?
 - a) 在复制过程中病毒的壳蛋白中迅速积累突变
 - b) 流感和 HIV-1 都有非常大而且复杂的基因组(> 100 kb)
 - c) RNA 不稳定;对抗 ss RNA 病毒的疫苗从来没有得到过
 - d) 病毒总是使被它感染的细胞溶解,这使得很难研究它们
 - e) 受到这些病毒感染的人非常少,因此几乎没有什么研究工作
5. 通过对不常见的 DNA-DNA 猿猴肾病毒 SV40 的研究,对于细胞过程得到了下列哪种知识?
 - a) 在复制起点上控制 DNA 的合成
 - b) DNA 效应元件与转录之间的关系
 - c) 细胞周期蛋白质在肿瘤发生中的作用
 - d) 核中定位信号肽的氨基酸组成
 - e) 所有上列各条
6. “病毒载体是人的基因疗法中有潜力的好的生物学媒介”的说法基于下列哪一项?
 - a) 它们可被随机整合到宿主的基因中去
 - b) 在选择什么类型的细胞进行感染方面它们是高度专一的
 - c) 它们是传递遗传信息的最有效的运载工具
 - d) 它们在感染后能够复制并进入邻近的细胞
 - e) 不必考虑突变会改变病毒载体

参 考 答 案

1. b 细胞培养使得动物病毒的研究成为可能,而且经济。
2. e 病毒的组装是在能量上有利的一套分子反应,每一个反应都是利用宿主的某种正常的细胞过程。
3. d HIV-1 是反转录病毒。
4. a 由于复制过程中发生的突变,壳蛋白和被膜蛋白的氨基酸发生变化,使得病毒逃脱了免疫的检测。
5. e SV40 生活周期的生物化学和分子生物学的分析提供了非常多的信息,主要是因为这种简单的病毒利用了宿主细胞中的各种各样的蛋白质。
6. c 要将 DNA(或 RNA)引入到细胞中,病毒载体非常有用;然而,仍然有许多技术上的困难需要克服,例如宿主细胞的专一性和病毒基因组的稳定性。

第 31 章 癌基因和人的癌症

31.1 引言

生物化学的主题就是了解调节的控制点,细胞如何在分子水平上感知环境中的变化,响应于这些信号的又是发生什么动作。我们现在知道大多数细胞,即使不是全部,会由于调节机制的扰乱而引起癌的突变。这些突变可能是基因产物丧失了控制细胞的功能,确定细胞何时分裂或如何修复其 DNA;也可能是获得了促进细胞生长的功能,即产生刺激生长的蛋白质。细胞的生长是由正的信号和负的信号控制的,正信号好比汽车的油门,负信号好比是车闸。癌细胞的生长可能是由于发生了突变,使得油门一直“开”着而失去了对生长的控制,或者,也许同时,又破坏了车闸,使得细胞分裂不能慢下来。近年来细胞生物学和癌症研究的进展已鉴定出了与控制癌细胞生长有关的关键性的基因,而且在某些情况下,甚至知道某些基因产物在癌细胞中和在正常细胞中的功能有何不同。

已观察到癌是细胞迅速分裂的结果,这项观察导致了用癌发生(oncogenesis)一词来描述失控的细胞生长。“onco”是希腊文,意即“大团物质”,“genesis”意即发生;因此,癌发生就是指癌生长的开始。本章先简述什么是癌和癌如何影响细胞的表现型的大意,并略述可能对癌的发展有作用的因素;然后讨论癌分子基础和癌基因的分类;最后,我们集中注意于两种与癌关系最大的基因,ras 和 p53,并讨论这两种基因的突变如何直接影响癌的发生。

31.2 DNA 的破坏是癌发生的先决条件的早期证据

研究者试图回答的第一个问题是:“什么东西引起癌?”三方面的证据都有力地说明,癌细胞的生长是 DNA 突变的结果。

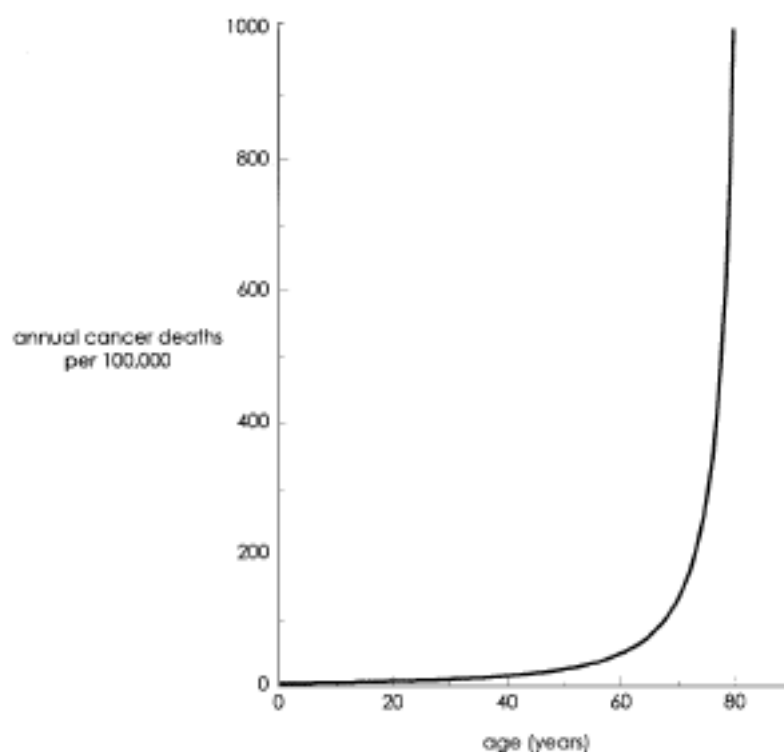


图 31.1 人群的癌症发病率随年龄而急剧增加

(1) 癌症的发病率随年龄而呈现指数增长。如图 31.1 所示, 50 岁以前, 人的癌症是比较少见的疾病; 但 50 岁以后, 发病率急剧上升。流行病学的研究指出, 年龄是发生癌症的重要因素, 这说明 DNA 的未修复的体细胞突变的积累可能是一个原因。

(2) 破坏 DNA 的药剂作为细菌的诱变剂的效价与其在极高剂量下引起动物癌症的能力 (作为致癌剂) 成正相关。虽然这样的实验有助于我们了解动物的致癌剂, 但要鉴定人的致癌剂仍有困难, 因为人接受到的剂量小得多, 时间又很长。例如, 流行病学的研究已证明吸烟与肺癌有关系。然而并不是每一个吸烟的人都患肺癌, 虽然吸烟的人中, 患肺癌的要比不吸烟的人多。

(3) 对人的白血病细胞中染色体的研究是支持 DNA 在癌症中起核心作用的第三项观察。核型分析是用于鉴定发生有丝分裂的细胞中染色体总体结构的细胞生物学技术。研究者注意到, 一种称之为慢性髓细胞性白血病患者的细胞中, 在染色体 9 ~22 之间, 几乎总有染色体的重排。这种相互易位就使人们鉴别出了小的 22-9 染色体, 称为费城染色体, 因为这是在美国费城的 Wistar Institute 发现的。重要的是, 这种白血病患者的非白血病细胞的核型是正常的。

31.3 在恶性阶段之前失控的细胞生长有几个阶段

大多数细胞在发育过程中分裂成新的细胞, 一旦到达了预定的状态就停止分裂并最终发生分化。已分化的细胞就是任何一定类型的细胞 (例如肝细胞、肌肉细胞和神经元) 发育的终点。不过, 这些细胞中偶然也会发生变化, 它们去分化, 并且又开始分裂, 进行所谓的良性生长。一种无害类型的良性生长就是瘰疬, 是由乳头瘤的局部感染引起的。可是, 研究皮肤癌的不同阶段, 就会看到不同的情况。如图 31.2 所示, 真皮的基细胞中由紫外线诱导的 DNA 突变能使单个细胞的分裂速率比周围细胞的都高。

当良性的瘤长大时, 由于细胞的增殖, 它可能在皮肤表面上很突出, 而这时能用外科手术切除。然而, 如果在细胞分裂失控的初始阶段没有检测出来, 瘤中的某些细胞就可能获得另一种性状, 它们的生长更加猛烈并且变成血管化的 (充满了血管)。当已发生变化的细胞能够降解基板并进入循环系统时, 良性瘤的生长就变成了恶性的。这种恶性的癌细胞常常能转移至淋巴结或肝脏中, 癌生长的第二个位点就发展起来了 (图 31.2)。

病理学家研究活体检查切片以寻找细胞侵入的证据, 就可将癌之前的细胞 (良性生长) 与恶性生长的阶段区分开来。组织学上可将癌分成不同的阶段, 第一级是有去分化的“癌前”细胞, 而第四级则是完全恶化的肿瘤, 已广泛侵入其他组织。乳腺癌和前列腺癌是两个肿瘤的例子, 可定出从良性到恶性的几个等级。

癌细胞的生长为什么会有不同的阶段呢?

(1) 首先, 良性的肿瘤细胞, 其基因中有突变, 使局部的细胞分裂。这些细胞的基因中会积累更多的突变, 控制着细胞的活动和与周围表面受体的连接。有些癌细胞会开始表达可分泌的蛋白酶, 促进基底的分解和向其他细胞的入侵。研究已证明细胞分裂速率的初始增高是积累更多突变的结果。这是可以理解的, 因为每一轮 DNA 复制中, 都有产生新突变的有限的机会 (见第 22 章)。多个基因突变的积累最终会导致恶性细胞亚群的建立, 从而引起癌的临床信号 (图 31.3a)。

(2) 良性分裂中的细胞变成更有侵略性的第二条途径是所谓的启动过程, 此过程引起不

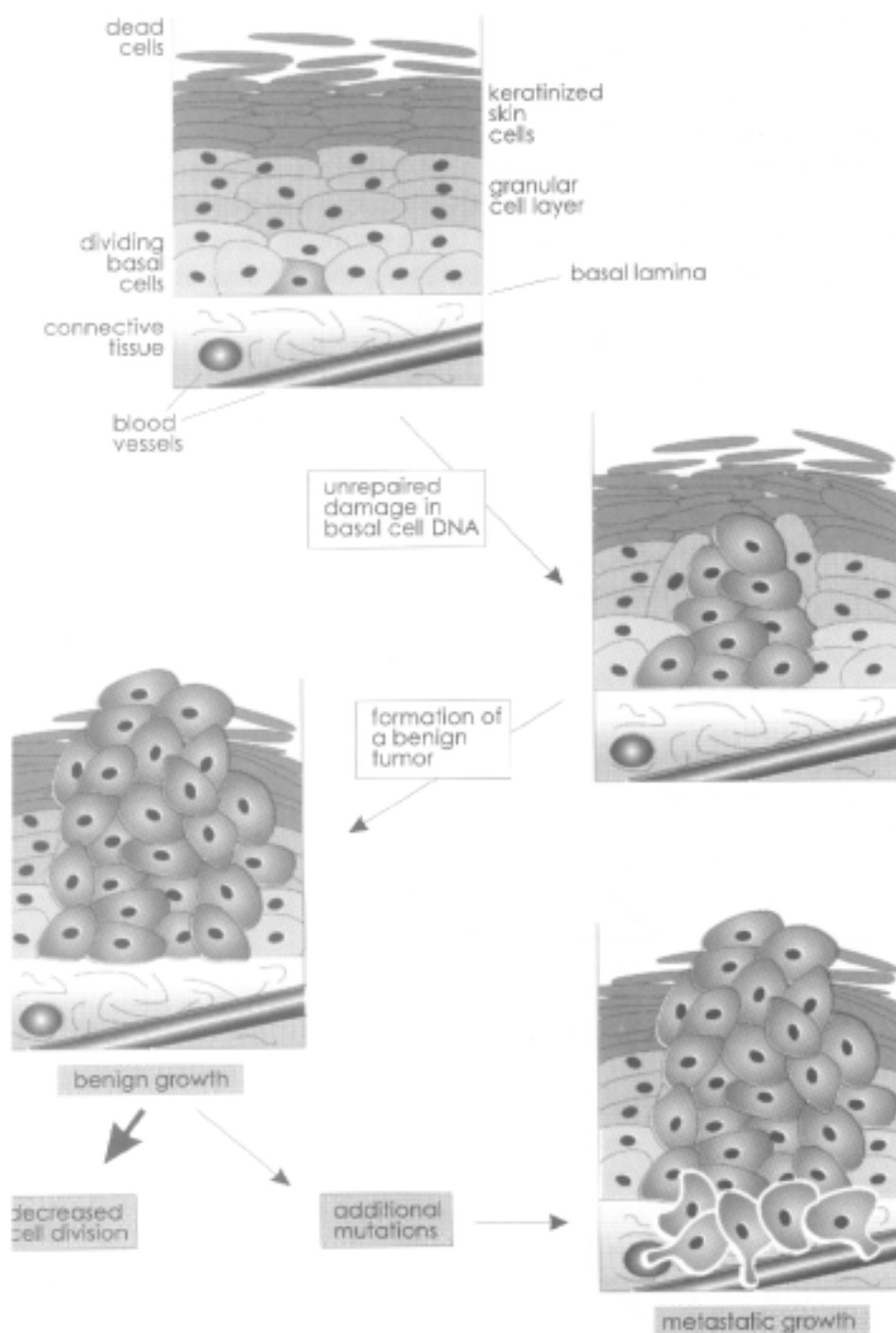


图 31.2 从良性到恶性生长的循序渐进的阶段

真皮中的基细胞通常以固定的速率分裂以取代死去的和丢失的细胞。假若基细胞中未被修复的伤害使得细胞分裂速率加快, 良性瘤最终就会出现在表面上; 需要有更多少见的遗传突变才能使良性瘤中的细胞转变成有侵略性的恶性细胞, 它们会通过基片而进入血流。

适当的基因表达而使小的基因缺陷加剧。研究已证明起始物是诱变化合物, 它们使 DNA 破坏, 只是当细胞先已与起始物接触后, 即 DNA 已被破坏后, 这种启动作用才是引起癌变的一个因素。

图 31.3b 所示为已突变的细胞当暴露在启动物(质如激素)之下后, 如何被刺激而进行分裂。例如, 类固醇激素、雌激素和睾酮水平的提高就分别与乳腺癌和前列腺癌相伴而生。这些激素本身并不是诱变剂, 因此, 它们不大可能引起细胞中额外的突变。但是, 它们确实会通过激活各自的激素受体而发出改变基因表达的信号。

其他促进肿瘤的药剂(如佛波酯类), 会激活细胞中一连串的磷酸化反应, 如第 29 章中所述, 这一连串反应会激活各种各样的转录因子。因此, 起始的 DNA 的突变, 加上由于长期与启动物质接触而使基因表达发生变化, 就会加速恶性生长的发展。

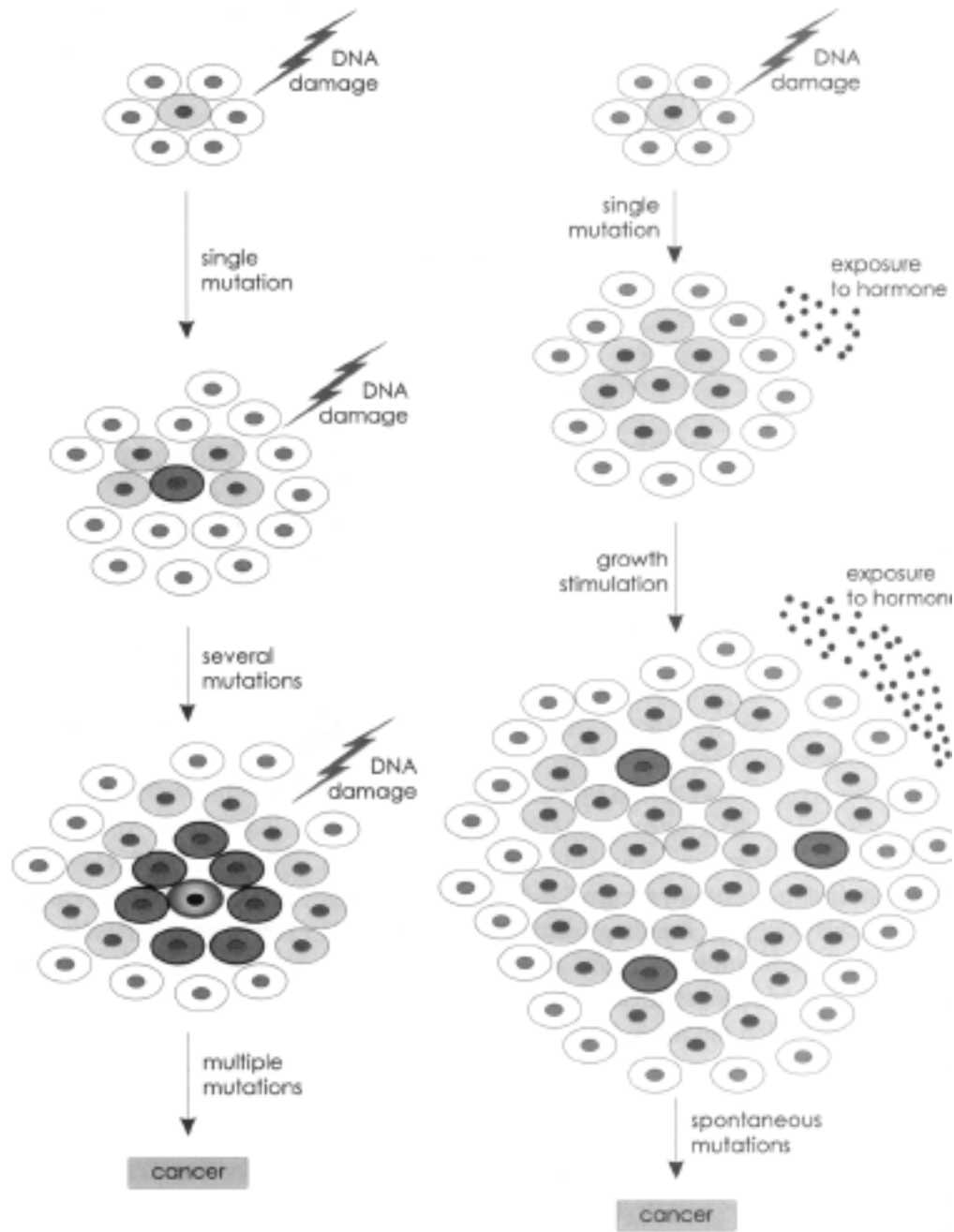


图 31.3 示意未修复的 DNA 破坏如何会引起癌的两个模型

(a) 少数细胞中多种基因突变的积累会导致恶性生长的表现型(若起始的突变发生在修复 DNA 的酶中,则更多的破坏性的突变很可能会迅速积累起来); (b) 关键性的调节生长的基因的突变,加上随后又长期与激素这样的启动物质接触,就会产生临床上的癌症,细胞分裂加速也会提高细胞获得更多突变的可能性。

31.4 癌的发生:好的基因变坏了

我们把已证明在癌症方面起作用的基因称为癌基因,当它们发生突变、缺失或表达异常时就出现癌。原癌基因一词则用来表示癌基因的正常未突变的形式。要了解这些癌基因是如何被发现的,我们必须首先复习无限增殖化的细胞与转化的细胞之间的差别,我们在第 30 章中描述 SV40T 抗体时曾介绍过这两个名词。无限增殖化指的是一种细胞系在组织培养中无限生长的能力;然而,就最简单的意义而言,这些细胞并不是癌细胞,因为它们在动物体内不形成癌,而且常常需要特殊的培养基才能在培养中存活下去。反之,转化的细胞系是已获得额外的生癌特性的无限增殖化细胞。伴随着转化的细胞表现型一般包括:

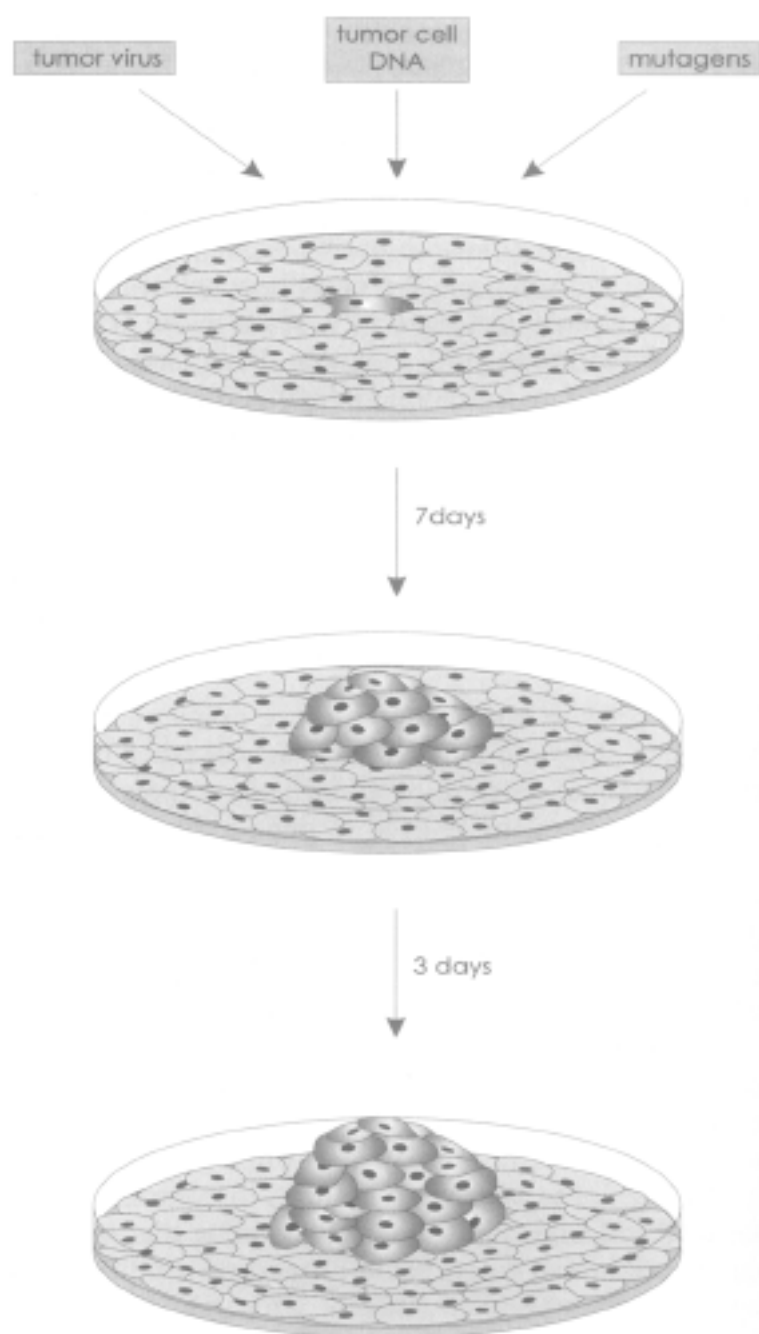
- (1) 变得不易粘在塑料上,细胞形态呈球状;

- (2) 长在软的琼脂中, 对连接在底物上的需要减少;
- (3) 在组织培养系统中有获得高密度生长的能力;
- (4) 对培养基中辅助性生长因子的需要减少;
- (5) 注射到未免疫的小鼠体内时会引起癌。

无限增殖化的细胞系发生转化的基本途径有 3 条: (i) 被 DNA 癌病毒或致癌基因的反转录病毒感染, (ii) 由已转化的细胞或原发的癌引入了已稳定地被整合的 DNA, 或 (iii) 在含有诱变剂的培养基中培养细胞。图 31.4 说明在许多未转化细胞的背景之上如何鉴定已转化的细胞。这种转化试法可用于鉴定并分离其中有被“激活”的癌基因的转化细胞。

(一) 复合反转录病毒中有癌基因

细胞可因正常基因有缺陷而发生转化的第一条线索来自于复合反转录病毒的研究。虽然



这种动物的反转录病毒与人的癌症没有什么关系, 但细胞培养的研究证明反转录病毒的基因组编码的是细胞转化所需要的全部信息。

随着重组 DNA 技术的出现, 对许多癌基因的反转录病毒基因的分离和测序成为可能。这些研究发现, 反转录病毒 gag-pol-env 基因的正常排列在癌基因的反转录病毒中发生了变化, 更为重要的是, 这一类反转录病毒中有特定株系所特有的 DNA。当把这些非典型的病毒 DNA 序列与基因库中核苷酸的数据库相比较时, 竟发生其中许多与已存在于数据库中的小鼠和人的基因同源(相似但并不完全相同)。而且, 这样的计算机分析还表明, 非病毒的序列与细胞中的蛋白激酶在氨基酸上有同源性。图 31.5 所示为几种癌基因反转录病毒基因组的比较排列, 它们都是已证明含有癌基因的。

要证明这些 DNA 序列是癌基因的关键实验是证明在利用真核生物的表达载体的情况下, 恰恰是病毒基因组的这一部分 DNA 的转导, 就足以转化细胞系。此外, 当使用这些被“俘获”的反转录病毒癌基因的原癌基因的对应物进行 DNA 转化实验时, 它们不是致癌的。比较这两种形式的基因的序列后发现, 反转录病毒的癌基因或是截短的, 或是有小缺失, 或有点突变, 而这些都是发生在已知为蛋白质的功能所必需的区域。因此基因的突变形式甚至在表达相应的原核基因的细胞中都能引起转化, 所以称之为显性癌基因。这些实验说明, 反转录病毒中这种蛋

图 31.4 转化试法的根据是: 已发现转化的细胞在组织培养中不受接触

抑制, 一种可以长在另一种上面培养 10 天后可以看到转化细胞的群落, 在位置上是孤立的, 而且会扩展成遗传上相似的细胞群体。

白质的形式已获得了一种活性,使它能干扰细胞中正常蛋白质的功能。反转录病毒癌基因因为害的分子机制很可能是与宿主细胞 mRNA 的重组有关,病毒编码的反转录酶把 mRNA 转变为 cDNA,因为反转录病毒的癌基因中没有内含子。

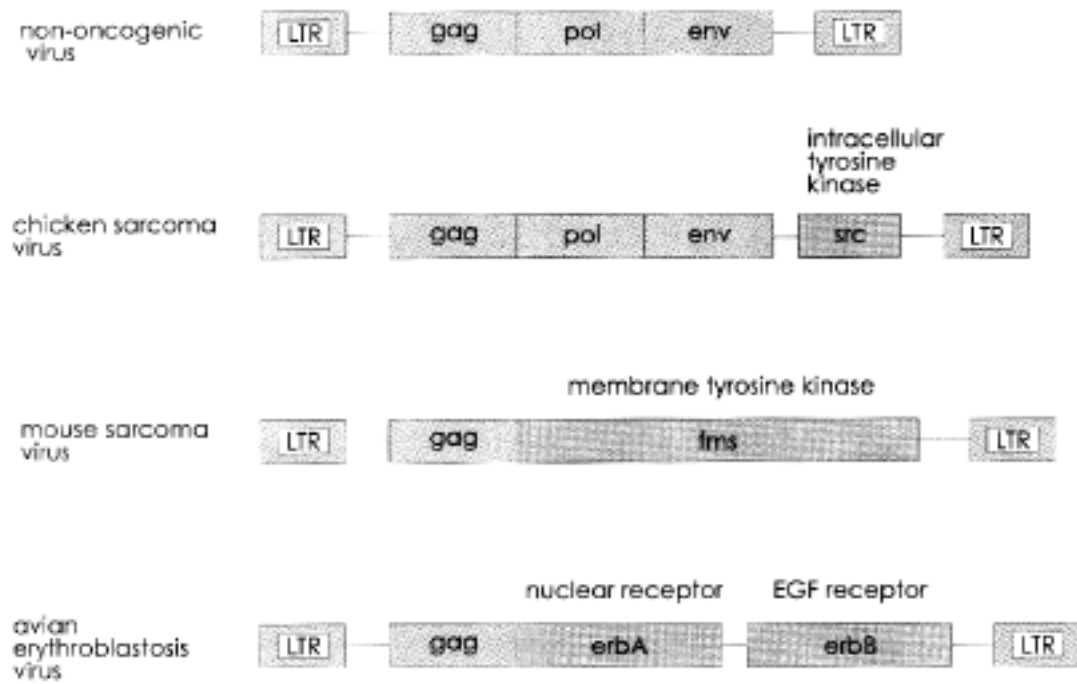


图 31.5 癌基因反转录病毒有额外的基因序列,其中有些取代了一部分病毒基因组典型的非癌基因反转录病毒有 3 个基因,称为 gag-pol-env,其旁侧为存在于长的末端重复区中的调节序列(LTR)。图示鸡、小鼠及鸟类反转录病毒癌基因的例子,其中有的有额外的基因序列(src),有的有与 gag 融合的基因(fms),有的两者都有(gag-erbA 和 erbB)。

(二) 人的某些癌细胞中有显性癌基因

因为动物的反转录病毒癌基因能转化培养的细胞,所以研究者进行实验以确定从人的原始癌中分离的 DNA 能否起同样的作用。如图 31.6 所示,利用一系列步骤,包括随机剪切的基因组 DNA 进行 DNA 转染,已可能鉴定出人的某些基因,它们能引起无限增殖化的小鼠细胞系的转化,这种细胞系称为 NIH 3T3。对这种人的癌基因 DNA 进行测序,发现它与已鉴定过的反转录病毒的癌基因同源。

用这种办法找到的人的第一个癌基因是 ras 基因,它编码与信号转导有关的一种单体的与 GTP 结合的蛋白质。也可能用化学致癌剂直接引起转化而使 NIH 3T3 发生突变。这些实验发现了化学处理 NIH 3T3 细胞而产生的最常见的突变之一就是 ras 基因的突变。事实上,用这两种方法鉴定出来的 ras 点突变几乎总是在密码子 12、13 或 61 中。这些 ras 突变和反转录病毒的癌基因一样,也有显性的表现型。本章后面将讨论这些“获得功能”的 ras 突变在功能上的意义。

(三) 可在染色体的断裂点上找到癌基因

细胞遗传学家多年来就知道许多类型的白血病与专一的染色体异常有关。随着癌基因研究的深入,分子生物学家与白血病的研究者组成小组,以克隆专一染色体的重组区域。图 31.7 所示为这样发现的两种基因: myc 基因,是首次从 Burkitts 淋巴瘤中常见的 8-14 易位的染色体中分离出来的;还有 abl 基因,是编码酪氨酸激酶的基因,由于 9-22 的易位,使染色体 9 上的这一基因被破坏,造成了慢性髓细胞性白血病人的费城染色体。

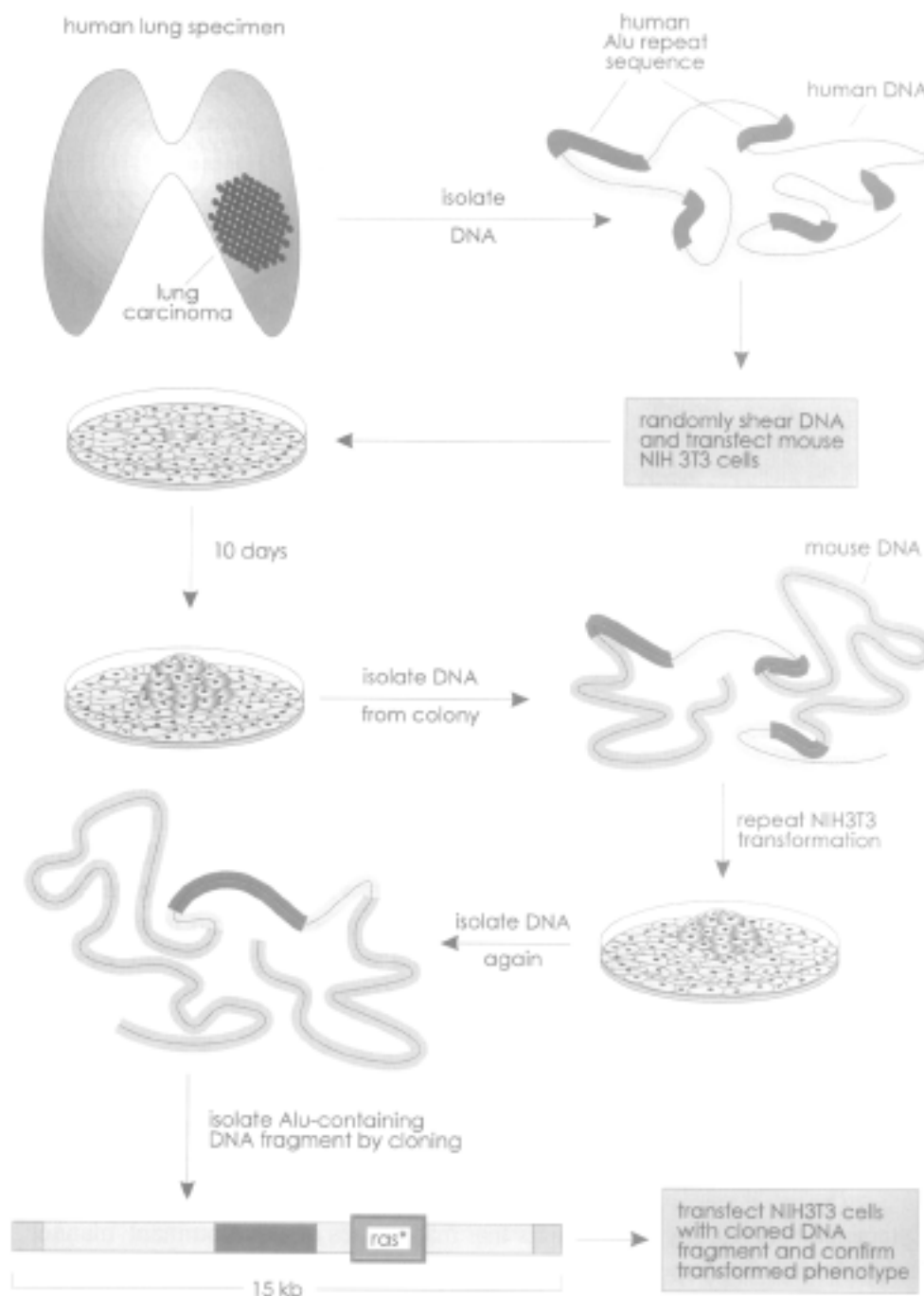


图 31.6 由人的癌 DNA 中分离 ras 基因

由肺癌细胞中得到随机切割的人的 DNA, 用以转染小鼠的 NIH 3T3 细胞, 然后分离(集中)一个集落已转化的细胞, 从中得到的 DNA 是人和鼠 DNA 的混合物; 再经过 1~2 轮转化试验后, 就建立起基因组 DNA 3, 然后分离出含有人所特有的 Alu 重复序列 DNA 的克隆; ras 基因的鉴定方法是将人 DNA 的功能片段作图, 这些片段是本身就能转化小鼠的 NIH 3T3 细胞的。ras* 代表其中有一个或多个点突变的 ras 癌基因。

Burkitts 淋巴瘤细胞中, 能够表达正常的 Myc 蛋白质, 但由于 myc 基因和非常活跃的免疫球蛋白启动子-增强子区位置并列, 所以已易位的 myc 基因高度过表达。慢性髓细胞性白血病的染色体易位(22-9 费城染色体) 则产生另一种问题, 两个基因的编码序列融合在一起了。其结果是产生了 abl 基因和 bcr 基因的融合蛋白, 其中有 Abl 蛋白的酪氨酸激酶域和 Bcr(断裂点簇区域) 蛋白的氨基端二者融合在一起。Bcr-Abl 蛋白是致癌的, 而正常的 Bcr 蛋白和 Abl 蛋白则否。

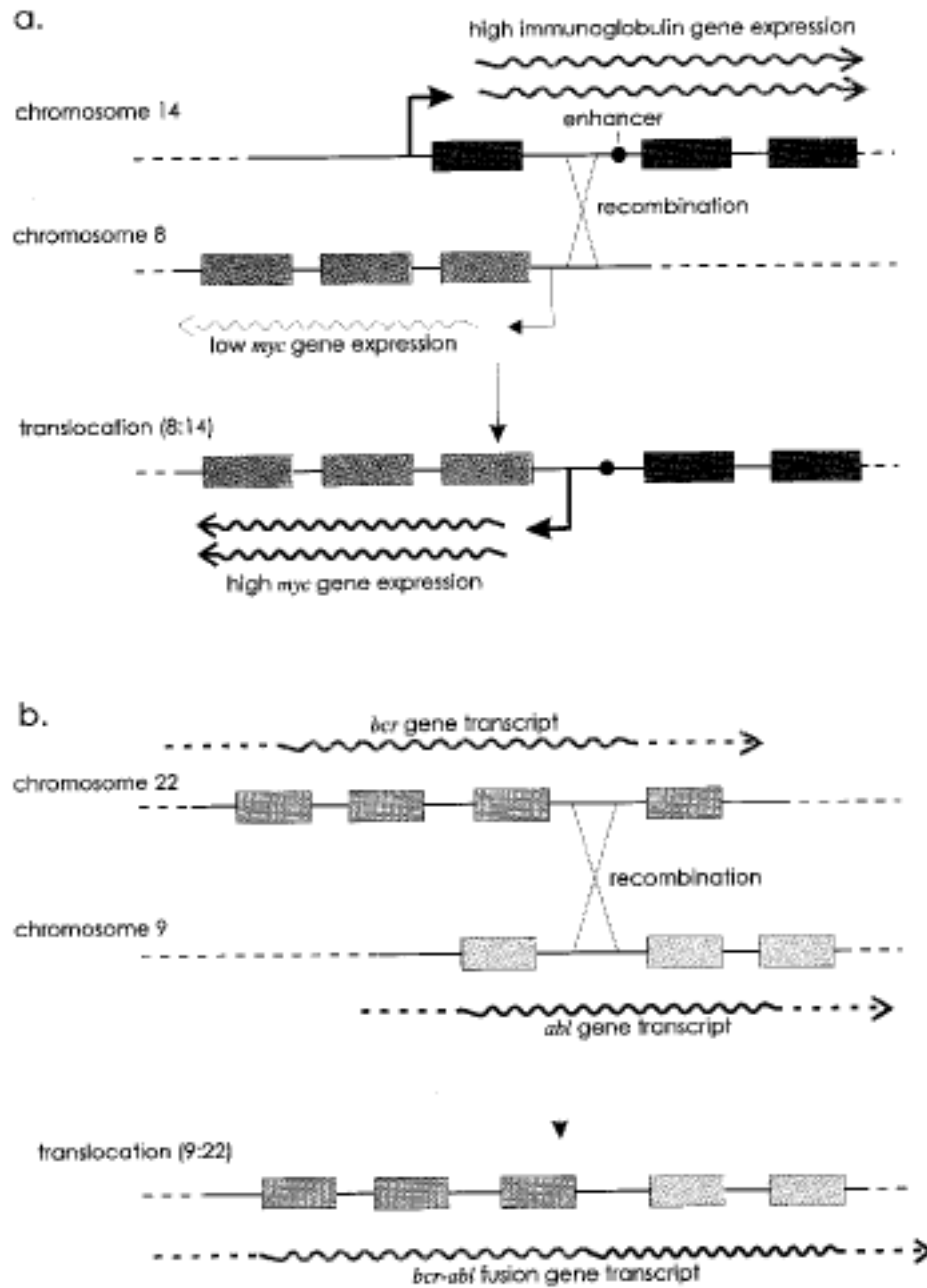


图 31.7 对癌细胞中染色体断裂点上的基因 DNA 进行分子分析是鉴定癌基因的另一种方法
 (a) Burkitts 淋巴瘤病人的癌细胞中的 myc 的转录异常高, 这是因为免疫球蛋白基因的
 转录增强子易位至 myc 基因启动子附近; (b) 染色体 22 与 9 之间的易位创造了一
 种融合基因(和蛋白质), 其中有 bcr 和 abl 这两种基因的部分。

(四) 癌抑制基因中的隐性突变也是生癌的

到此为止, 我们只描述了突变后以显性方式起作用的癌基因。例如, 根据“激活的”Ras 蛋白在含有正常 Ras 的细胞中能产生癌这一事实而进行的转化试验就成功了。有一类与此相反的癌基因, 是由于“丢失功能”的突变而产生的, 这类基因称为癌抑制基因。癌抑制基因的突变或缺失也促进癌的形成, 因为没有这种基因的活性, 细胞会在不应该分裂时继续不断地分裂。NIH 3T3 小鼠细胞转化试法不能检测出癌抑制基因, 因为这种类型的癌基因只能依据其不存在来鉴定。将人基因的分析 and 分子克隆技术结合在一起才找到了癌抑制基因。

癌抑制基因原来是根据其抑制细胞的转化表现型的能力来定义的, 转化是指未经突变的基因被转染后的变化。然而, 我们在此处使用的是癌抑制/隐性癌基因这一比较广泛的定义, 这种癌基因是指那些已被鉴定为癌细胞中丧失功能的基因。

第一个被克隆的癌抑制基因是成视网膜细胞瘤(Rb)基因。Alfred Knudson 曾研究某些家

族中儿童成视网膜细胞瘤发病率的诱因。他注意到这些儿童中遗传性成视网膜细胞瘤的发病率比正常人群中的预期值高达 1000 倍。此外,遗传性的成视网膜细胞瘤症在病人的双眼中都会产生多个独立的肿瘤,而其非遗传的形式却几乎总是在一只眼中有一个肿瘤。

根据自己的观察,Knudson 于 1971 年提出成视网膜细胞瘤的少见的非遗传的形式是由于两次自发的突变而产生的,一单独的 Rb 基因的两个拷贝中各发生一次突变。这就是关于成视网膜细胞瘤的所谓 Knudson 的双击中模型。Knudson 预测,遗传性的视网膜细胞瘤是由于儿童从双亲的一方遗传了一个有缺陷的 Rb 基因,而从双亲的另一方得来的 Rb 基因又有一次自发的突变。图 31.8 示意了 Knudson 关于成视网膜细胞瘤的二次击中模型,后来利用克隆的 Rb 基因研究成视网膜细胞瘤许多患者的不同类型细胞中 Rb DNA 的序列,证明这一模型是正确的。

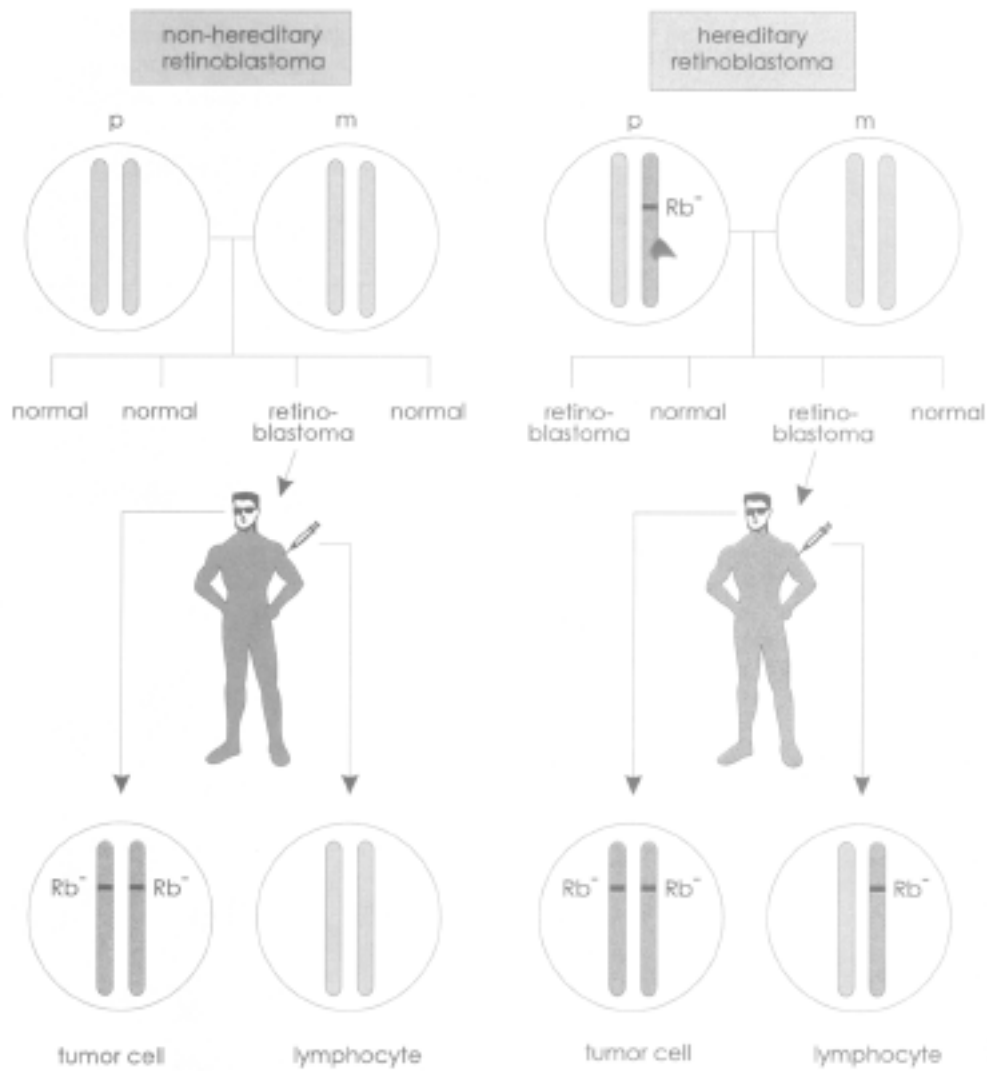


图 31.8 成视网膜细胞瘤患者的各种不同细胞类型中 Rb 基因的突变模式

成视网膜细胞瘤的细胞中 Rb 基因的分子分析表明此基因的两个拷贝都发生了突变或缺失,肯定了 Knudson 关于癌发生的二次击中模型。在患有非遗传性成视网膜细胞瘤(这是非常罕见的癌症)的病人体内,像淋巴细胞这样的非癌细胞中有两个起作用的 Rb 拷贝;而在遗传性成视网膜细胞瘤的患者的正常淋巴细胞中则证明有一个 Rb 的突变的拷贝,据此可以解释这种类型的成视网膜细胞瘤会使家族中的更多个体在年纪较轻时就得此病。

许多成视网膜细胞瘤患者的癌细胞核型表明,染色体 13 的一个小区常缺失或靠近染色体的断裂点。最后将 Rb 基因进行了克隆并测序,发现它编码一种细胞周期控制蛋白,此蛋白通常是阻止细胞在 S 期复制其 DNA。Rb 活性由磷酸化作用调节,其功能之一是抑制细胞增殖所需基因的转录。Rb 发生了突变或缺失的细胞就失去正常的“刹车”机制而不能阻止细胞进

入细胞周期。

表 31.1 列有已被鉴定的其他癌抑制基因/隐性癌基因, 包括两个 DNA 错配修复基因, MLH1 和 MSH2, 已发现遗传性非息肉结肠癌的患者中有相当百分率的人缺失这种基因。显然, 编码这两种 DNA 错配修复基因中的任何一种的突变都会导致基因组中更多突变的建立以及随后转化的表现型的发展。现在还有几个其他候选的癌抑制基因/隐性癌基因的例子, 这是由筛选某些遗传性癌症的遗传标志而鉴定出来的。例如, 已发现遗传性乳腺癌和卵巢癌病例中的 BRCA1 和 BRCA2 基因突变, 还有引起共济失调毛细血管扩张病的 ATM 基因中的缺失, 也可能引发许多人患各种癌症。分子遗传学的研究指出 BRCA1 是转录因子, 而 ATM 的功能是调节 DNA 的修复过程。

表 31.1 人的癌抑制基因/隐性癌基因^a

基 因	生化功能	染色体定位	疾 病
Rb	调节转录	13q14	成视网膜细胞瘤
p53	转录因子	17p13	许多类型的癌
WT-1	转录因子	11p13	Wilm 氏瘤
APC	细胞粘附	5q31	腺瘤性息肉
DCC	细胞粘附	18q21	结肠癌
hMLH1	DNA 修复	3p21	非息肉结肠癌
hMSH2	DNA 修复	2p16	非息肉结肠癌

^a 已证明这些基因的突变或缺失与细胞的转化有关。

31.5 癌基因产物改变多个控制生长的步骤

到目前为止, 已经鉴定出了 60 个以上的显性和隐性的癌基因。而且许多情况下, 原癌基因的正常功能也已得到广泛的确认。事实上, 和分子遗传学探讨中许多情况一样, 有缺失的癌基因产物的鉴定阐明了该蛋白质在细胞的正常过程中的作用。例如, Rb 基因是首先在成视网膜细胞瘤中鉴定出来的, 但其鉴定却导致了对细胞周期控制的更多了解。基础科学和癌研究的合作研究是最直接地得益于癌基因发现的事例之一。

图 31.9 综合了已证明癌基因在其中起作用的众多各式各样的细胞过程。可以看到, 实际上控制着细胞增殖的每个水平的调节作用都可能受到显性或隐性癌基因的破坏。分析许多种类型的癌中显性癌基因和隐性癌基因的突变, 已使我们了解到, 在原癌细胞发展到恶性的表现型的过程中, 多个独立的癌基因必须都发生突变。癌发生的这种多步骤的机制与已观察到的癌症病人的死亡与年龄有关的现象(图 31.1)是一致的。

31.6 癌基因 ras 和 p53 的突变极为常见

显性癌基因 ras 和癌抑制基因/隐性癌基因 p53 代表着人类癌症中两个最常发生突变的基因, 事实上许多被转化的细胞中都有这些基因的突变。为什么 ras 和 p53 的突变频率如此之高? 至少有两种解释: (i) 可能这两种癌基因直接控制着一个关键的调节生长的步骤, 而这一过程是细胞增殖的中心调节者, 而且为所有的癌细胞所共有, 也就是说, 只有细胞中这两个基因中有一个发生了突变, 细胞才能被转化; (ii) ras 和 p53 能控制基因组的稳定性, 或能使从膜到细胞核的一连串信号传递反应开始。因此, 它们在多步骤途径的早期就起作用, 以致于大

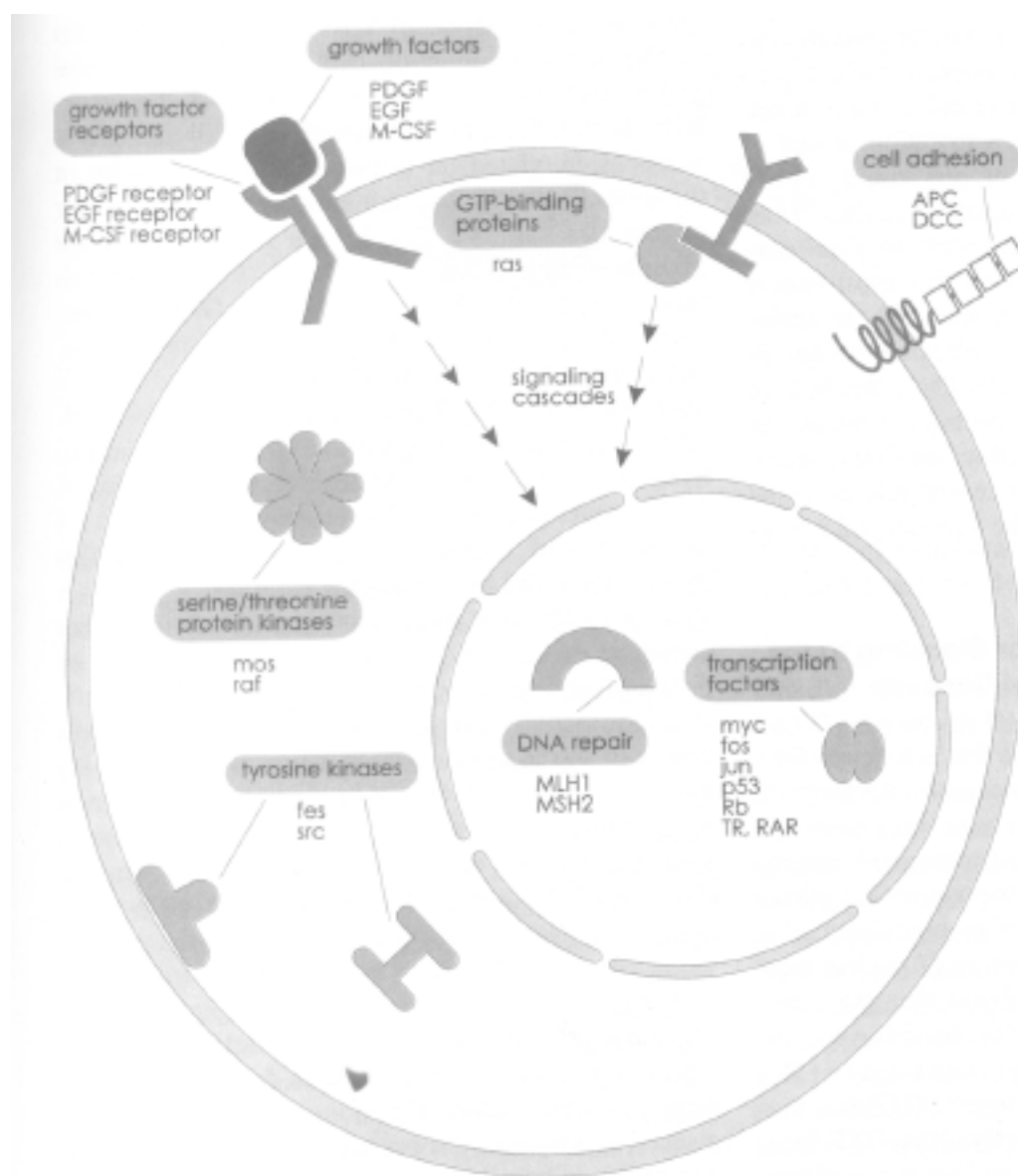


图 31.9 已发现癌基因控制各种各样的细胞过程

这些关键性基因获得功能(显性癌基因)或丧失功能(隐性癌基因)都会使细胞的正常功能被破坏。

多数癌细胞以这两种基因中的一个的突变为起点,虽然这些基因的产物本身并不引起转化。看来很可能这两种可能性都与 ras 和 p53 的高频率突变有关。本节先叙述关于 ras 的知识及其在信号转导中的核心作用,然后再讨论 p53 在控制细胞周期中的功能。

(一) Ras 将生长因子的信号传递与细胞内的一连串磷酸化作用联系起来

Ras 是结合在膜上的 GTP 酶,为各种信号转导所必需。虽然起初人们认为它就是 G 蛋白,因为其特性像 G 蛋白,但 Ras 实际上与异三聚体的 G 蛋白、和 (第 16 章)都不同。Ras 的正面作用是促进激酶推动的一连串磷酸化作用,其终点是细胞核中转录因子的激活。图31.10表明,Ras 的有活性的形式在其核苷酸结合位点上有一个 GTP 分子结合在上面,而 Ras 的无活性的形式中则该位点上为-GDP 分子。因此 Ras 所具有的 GTP 酶活性会把有活性的 Ras-GTP 形式转变为无活性的 Ras-GDP 形式。两种类型的蛋白质,即 GAP 类(使 GTP 酶激活的蛋白质)和 GNRIF 类(释放鸟核苷酸的因子),控制着 Ras 的活性: GAP 类为 Ras 的负调节物,而 GNRIF 类为正调节物。

ras 中最常发生的显性突变(密码子 12, 13 和 61)使 Ras GTP 酶活性发生缺陷,因而它总是处于有活性的 Ras-GTP 形式。在这些情况下,细胞接受了“假”信号,使促进生长的基因被激活,甚至在没有生长因子的情况下也是如此。因此,ras 的突变为什么会如此普遍的一个原

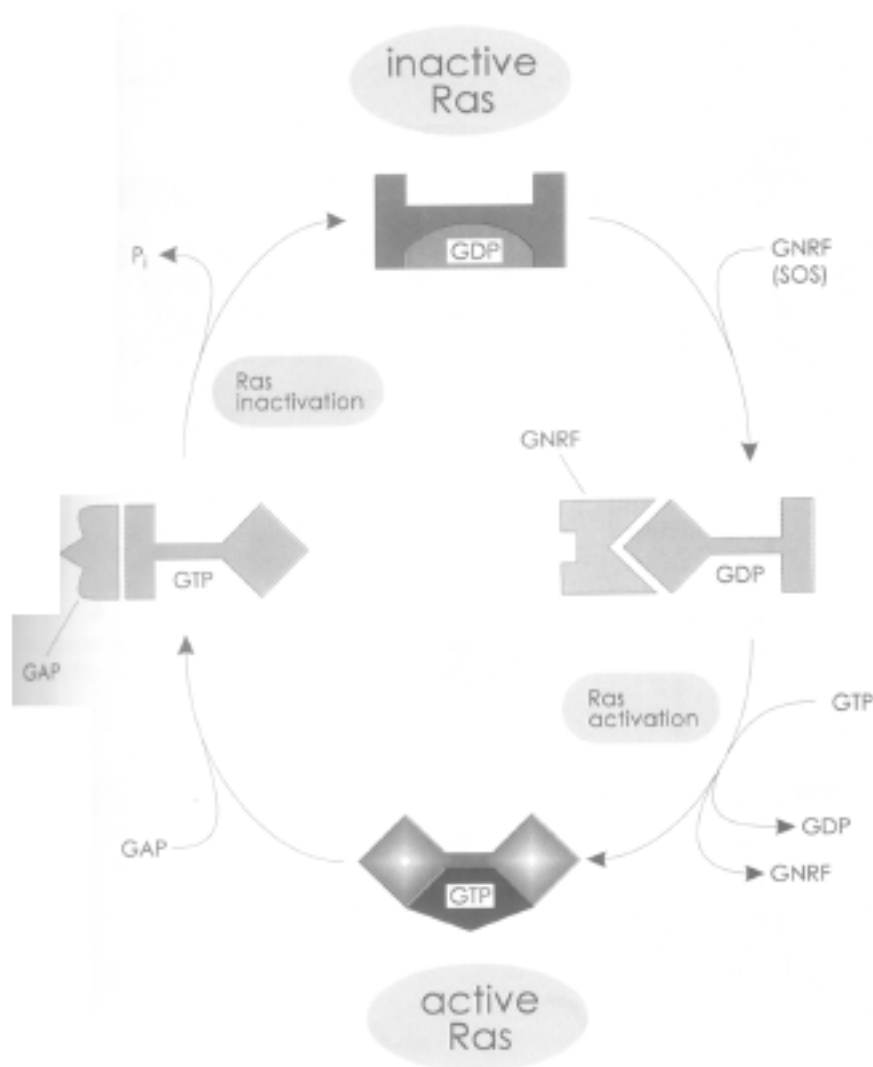


图 31.10 调节 Ras GTP 酶活性的蛋白质将 Ras 激活

Ras 在细胞的信号传递中的作用是它的核苷酸结合部位中 GTP 或 GDP 的存在所控制的: 与 GTP 结合的 Ras 有活性, 与 GDP 结合的 Ras 无活性; GAP 蛋白促进 Ras 的 GTP 酶活性, 而使 Ras 传递信号的功能失活; GNRF 蛋白(如 SOS)则促进 GDP-GTP 的交换因而激活 Ras。

因, 就是 Ras 在从膜到细胞核的信号转导中起着核心作用, 而 ras 中的显性突变仍可能是有害的, 即使有正常的 ras 基因存在也会有害。

生长因子受体如表皮生长因子受体(EGFR)是结合在膜上的酪氨酸激酶, 在这一信号转导途径中其位置在 Ras 上游。当表皮生长因子与 EGFR 结合时, 其酪氨酸激酶活性被激起, 而 EGFR 在细胞质中的尾部的酪氨酸残基则自磷酸化, 结果形成了 S_H2 蛋白质结合位点。连接物蛋白 Grb2 有一个 S_H2 域, 它与磷酸化的 EGFR 尾部结合, Grb2 还有两个 S_H3 域, 与 SOS(一种 GNRF)上的 S_H3 结合位点结合。这样, 当 EGFR 因与生长因子结合而被激活时, Grb2 就把 SOS 带到膜上去激发 Ras。如前所述, ErbB 是反转录病毒癌基因编码的蛋白质, 与 EGFR 同源, 即使没有生长因子, 也是本来就有活性的。表达 ErbB 的细胞(或 EGFR 的组成型突变体)因此就会通过 Grb2-SOS 连接物复合体而组成性地激活 Ras。

一旦 Ras 成为有活性的形式, 它就与称为 Raf 的另一种癌基因产物结合, 于是 Raf 被定位在膜上而激活其丝氨酸/苏氨酸专一的激酶活性。在 Raf 的许多磷酸化的靶子中有另一种激酶, 称为 MAP 激酶(也称为 MEK), 它为 Raf 所激活, 然后又激活细胞溶胶中 MAP 激酶中苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化。被激活的 MAP 激酶(亦称为 ERK1 和 ERK2)是丝氨酸/苏氨酸激酶, 它们一旦被激活, 就会定位于细胞核中, 而在该处磷酸化转录因子, 例如 Fos 和 Jun。MAP 激酶也将其他激酶(如 Rsk)磷酸化并激活, 然后这些激酶再将信号传递给更多的转录因子

(例如 SRF, 血清反应因子)。因此, 在 Ras 下游有一连串磷酸化反应, 最终使许多种转录因子被激活或失活。Raf、fos、jun 和 myc 都是癌基因, 这些基因中的任何一种发生突变后, 即使没有来自上游的 Ras 或 EGFR 的信号, 生长也会受到促进。

虽然图 31.11 中的 Ras-信号传递途径只是最近才被完全阐明, 研究者们早已设计了使突变的 ras 的显性活性发生短路的办法。办法之一就是抑制 Ras 的羧基端附近的半胱氨酸残基的法尼基化作用。需要法尼基化将 Ras 锚着在细胞膜中, 这显然是 Ras 所介导的 Raf 激酶的激活所需要的(图 31.11)。已发现了几种作用于法尼基转移酶的 Ras 的抑制剂。一种想法是抑制了 Ras 的法尼基化所需要的酶, 就有可能破坏癌细胞中突变的 Ras 的显性活性。利用细胞系所进行的初步实验结果是令人鼓舞的, 但是要论及此种办法用在人身上是否有效, 还为时过早, 因为细胞中的蛋白质除 Ras 外还有需要法尼基化的。

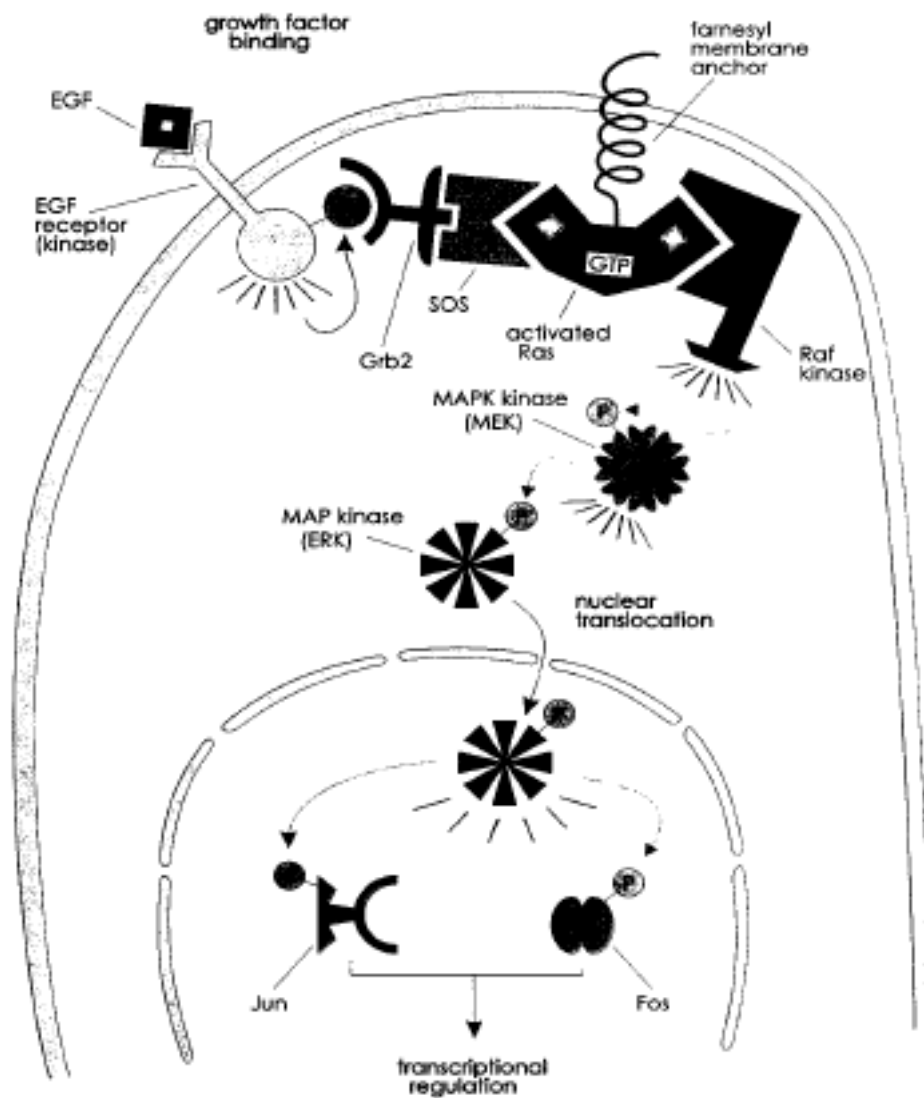


图 31.11 通过一连串激酶激活的步骤而将信号由 EGF 受体传递至 Fos 和 Jun 的磷酸化信号传递途径(拟议中的)

推想 Ras 在促进 Raf 激酶活性方面的作用与 Ras 介导的 Raf 在膜中的定位有关, 即可以解释为什么需要 Ras 的法尼基化作用。

(二) p53 的正常功能是当 DNA 被破坏时抑制细胞周期

成视网膜细胞瘤基因是癌抑制基因/隐性癌基因的经典例子。p53 也被认为是癌抑制基因/隐性癌基因, 因为能够证明野生型 p53 蛋白质会抑制缺失 p53 的已转化的细胞的生长。不过 p53 的癌基因特性比较复杂, 因为许多 p53 突变的结果是 p53 蛋白的异常形式的表达, 而这

种形式能抑制存在于细胞中的正常 p53 蛋白的功能。这种类型的突变称为显性负突变,因为它是一种丧失功能的突变,其作用好像是抑制获得功能的突变。推测 p53 显性负突变的机理是 p53 的功能依赖于一种多亚基蛋白质复合体的形成。这一复合体中有一个或多个显性负的 p53 分子就会使整个复合体丧失其功能。这就是“一马勺坏一锅”的生物化学的例子。

曾有人把 p53 称为“基因组的卫士”,因为它“注视”着 DNA 的破坏,例如照射所引起的破坏,然后把信号传达给细胞周期的机构,令 G1 阶段停止并等待着 DNA 的修复。而且,在某些情况下, p53 能够诱导已被破坏的细胞通过编程性细胞死亡的形式而死亡。p53 介导的这种细胞的编程性死亡可以消除这种细胞发生癌变的可能性。不过, p53 中取消这些重要的“卫士”功能的突变将使得细胞进入 S 期并试图复制已被破坏的 DNA 而不是先修复它们或发生编程性死亡(图 31.12)。在这些条件下通过了 S 阶段的细胞会积累基因组中各式各样的缺陷,包括总体的染色体重排。

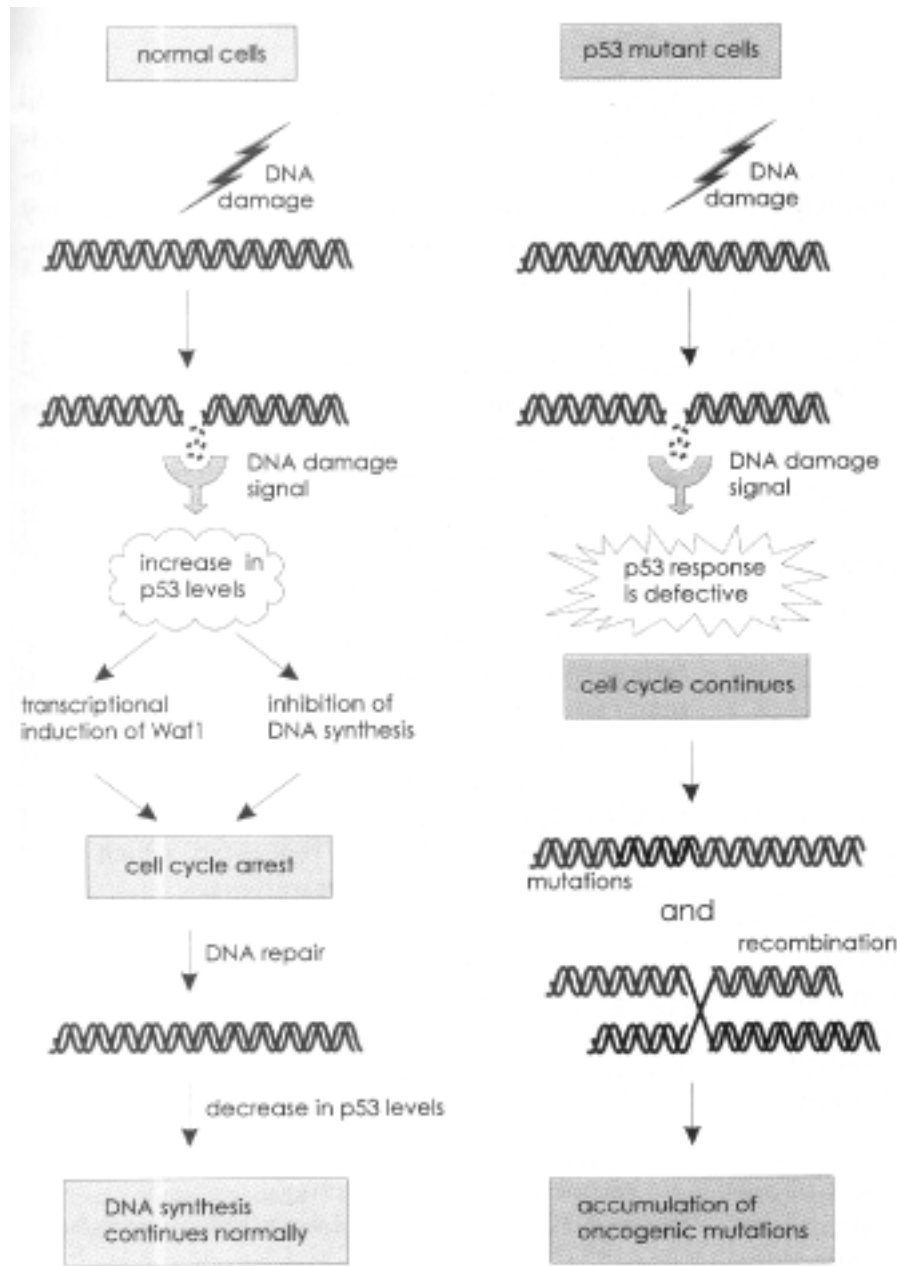


图 31.12 p 53 介导的对细胞周期的控制模型

图示推测的 p53 在正常细胞中的功能,还有在没有 p53 或表达了 p53 的显性形式的细胞中的情况,这些情况下 p53 的功能都有缺陷。

p53 的突变为什么如此普遍?

(1) p53 以四聚体的形式与 DNA 结合,显性的负突变体能够打乱这些多亚基复合体的形

式或活性。因此,细胞中只要有一个突变的 p53 的拷贝便足以引起细胞周期控制中的缺陷。

(2) p53 编码序列有相当一部分是易于发生突变的。许多癌细胞中 p53 基因的测序证明,使 200 个以上不同氨基酸残基发生变化的突变对 p53 的功能都有损害。这些突变的大多数都在 p53 DNA 的结合域中(图 31.13)。

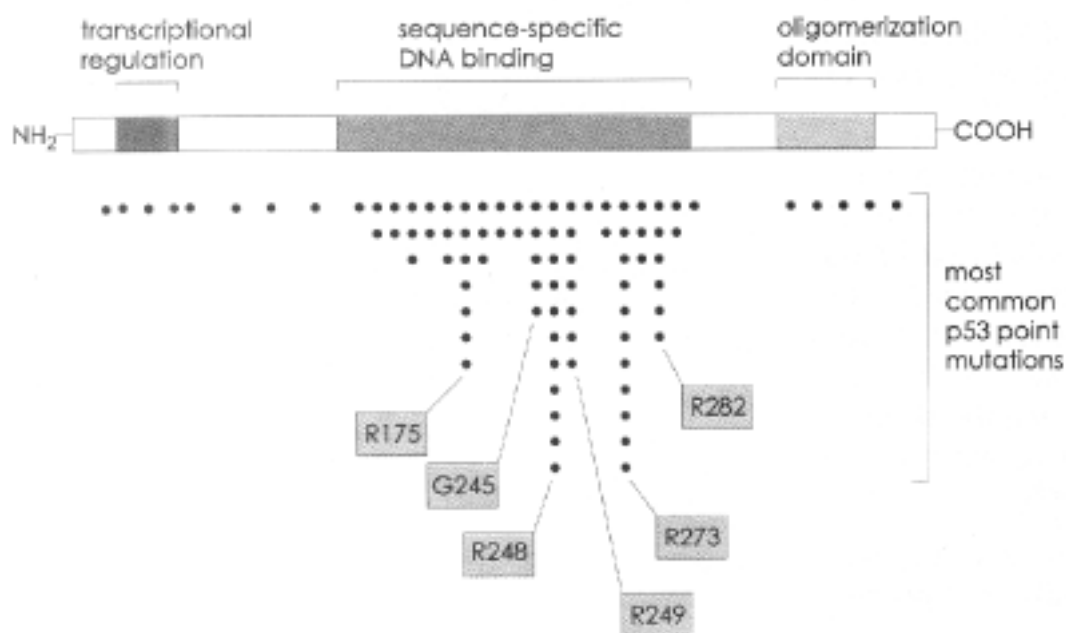


图 31.13 p 53 的突变绝大部分位于 DNA 结合域,并影响专一的蛋白质-DNA 相互作用

“·”表示 p53 突变在整个蛋白质编码序列中的分布,“□”则为最经常发生突变的氨基酸。

(3) p53 有一个重要的功能,就是保护细胞使它不复制已被破坏的 DNA。丧失了这种能力的细胞就会迅速积累起更多的突变和染色体重排,这些变化最终会引起细胞的转化。因此,p53 和 Ras 一样,其功能在细胞稳态中处于核心地位,在细胞周期的控制中也起着核心作用。

31.7 小 结

(1) 三项观察使得早期的研究癌的工作者提出 DNA 中的突变是癌发生机制的核心:

- 癌在老年人中最为流行,说明有一种体细胞突变的积累;
- 诱变剂也可以对动物起着致癌剂的作用;
- 人的白血病常与表明有染色体重排的异常核型同时存在。

20 年后关于人的癌基因的发现证实了上述推测。

(2) 从良性到恶性的癌的发展说明转移性癌的发展需要多个突变。起始物是破坏 DNA 的介质,癌的促进剂是生长刺激剂。人们认为细胞的增殖提高了积累更多 DNA 的可能性,这也许可以解释启动癌的物质效应。

(3) 复合的反转录病毒中有从宿主基因组中获得的突变基因的拷贝。这一发现导致人的突变基因的直接分离,这些基因是已被证明有“生癌”活性的。像 ras 这样的显性癌基因甚至在表达同样蛋白质的未突变形式的细胞中也能起作用。许多这类显性癌基因干扰激酶的信号传递途径,因为它们使磷酸化作用途径失去调节。

(4) 癌抑制基因是隐性癌基因,其正常功能是抑制细胞增殖。癌抑制基因的失去功能的突变或缺失导致细胞分裂的失控。Rb 和 p53 是两个这样的癌抑制基因/隐性基因,它们有调节细胞周期的作用,在范围广泛的各种癌中都发生了突变。

(5) Ras 是细胞中传递信号的分子, 在联系胞外信号与胞内的磷酸化级联反应方面起着关键作用, 这些磷酸化作用控制着细胞核内转录因子的活性。在相当高百分率的人的癌症中已发现 Ras 的突变引起其组成性活性的变化。这很可能是由于抑制了 Ras 羧基端的法尼基化作用而抵消了 Ras 的功能。

(6) p53 功能的丢失或显性负突变已在人的大多数癌中发现。人们认为 p53 的正常功能是在细胞中存在 DNA 的破坏时使细胞周期停止, 不进入 S 阶段, 不进行 DNA 的复制。p53 功能的缺失会使得破坏的 DNA 被复制, 其结果是使遗传上的变化扩大。

参 考 资 料

- Ames B. N., Gold L. S., Willett W. C. (1995): The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 92:5258.
- Armstrong J. F., Kaufman M. H., Harrison D. J., Clarke A. R. (1995): High frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr. Biol.*, 5:931.
- Baserga R. (1994): Oncogenes and the strategy of growth factors. *Cell*, 79:927.
- Bishop J. M. (1995): Cancer: The rise of the genetic paradigm. *Genes Dev.*, 9:1309.
- Black D. (1994): Familial breast cancer: BRCA1 down, BRCA2 to go. *Curr. Biol.*, 4:1023.
- Chapman, M. S., Verma, I. M. (1996): Transcriptional activation by BRCA1. *Nature*, 382:678.
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1994): Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265:346.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M-S, Pfeifer, G. P. (1996): Preferential formation of benzo[a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53. *Science*, 274:430.
- Fischer S. G., Cayanis E., Bonaldo M. F., et al. (1996): A high resolution annotated physical map of the human chromosome 13q12-13 region containing the breast cancer susceptibility locus BRCA2. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93:690.
- Gibbs J. B., Oliff A., Kohl N. E. (1994): Farnesyltransferase inhibitors: Ras research yields a potential cancer therapeutic. *Cell*, 77:175.
- Hartwell, L. H., Kastan M. B. (1994): Cell cycle control and cancer. *Science*, 266:1821.
- Hawley, R. S., Friend. S. H. (1996): Strange bedfellows in even stranger places: The role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors and its functional links to p53. *Genes & Dev.*, 10:2383.
- Hunter T. (1995): Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80:225.
- Karlovich C. A., Bonfini L., McCollam L., et al. (1995): In vivo functional analysis of the Ras exchange factor Son of Sevenless. *Science*, 268:576.
- Karp J. E., Broder S. (1994): New directions in molecular medicine. *Cancer Res.*, 54:653.
- Ko, L. J., Prives, C. (1996): p53: Puzzle and paradigm. *Genes & Dev.*, 10:1054.
- Levine A. J. (1993): The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:623.
- Maignan S., Guilloteau J.-P., Fromage N., Arnoux B., Becquart J., Ducruix A. (1995): Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science*, 268:291.
- Marshall, C. J. (1996): Raf gets it together. *Nature*, 383:127.
- Pawson T. (1995): Protein modules and signaling networks. *Nature*, 373:573.
- Rabbitts T. H. (1994): Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*, 372:143.

- Varmus, H., Wienberg, R. A. (1993): Genes and the biology of cancer. Scientific American Library, W. H. Freeman Co., New York.
- Verma I. M., Vogt P. K. (1995): Oncogenes: 20 years later. Genes Dev., 9:1289.
- Weinberg R. A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell, 81:323.
- White M. A., Nicolette C., Minden A., et al. (1995): Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. Cell, 80:533.
- Wynder E. L., Hoffmann D. (1994): Smoking and lung cancer: Scientific challenges and opportunities. Cancer Res., 54:5284.

复 习 题

- 把 DNA 的破坏与癌症联系起来的最直接的证据是:
 - 把吸烟与肺癌联系起来的流行病学的研究
 - 白血细胞中异常核型的鉴定
 - 发现高水平的诱变化合物使大鼠生癌
 - 发现由癌中分离出来的突变的基因能转化细胞
 - 家谱的研究证明癌的诱因能够遗传
- 去分化的细胞中细胞增殖速率的增加为什么可能是癌发展的一个因素?
 - 细胞越多,癌就会越大
 - 增殖中的细胞需要更多的血液和生长因子的供应
 - 由于未修复的 DNA 的复制,突变率会更高
 - 可能释放激素并使增殖中的细胞发生编程性死亡
 - 去分化的细胞可能开始重新分化
- 反转录病毒基因组的鉴定何以导致癌起始的癌基因学说的产生?
 - 发现某些反转录病毒能引起人的肺癌
 - 反转录病毒的 ras 基因在 DNA 序列上与人的 ras 基因完全相同
 - 反转录病毒基因中有费城染色体中的片段
 - 已证明反转录病毒的癌基因与人的基因同源
 - 所有以上各条
- ras 属于显性癌基因一类,其原因在于:
 - 突变的 Ras* 蛋白激活有正常 Ras 的细胞中的信号转导
 - 突变的 Ras* 比正常的 Ras 大得多
 - ras 的突变能从一代传至下一代
 - 突变的 Ras* 是强有力的 GTP 酶,它耗尽细胞中贮存的能量
 - ras 实际上是一种癌抑制基因,不是显性癌基因
- 为什么 p53 的某些突变使它被归入癌抑制基因/隐性癌基因一类,而 p53 的其他突变又使它被归为显性癌基因一类?
 - p53 基因很大而突变又很少
 - p53 是与信号转导有关的酪氨酸激酶
 - p53 是多基因家族中的一员,可能有几种突变
 - 正常 p53 水平的降低或过多突变 p53 的表达都是有害的
 - p53 是双功能蛋白质,在同一基因中可能有双重突变
- 假若癌症是由于关键的调节性基因的突变,那么为什么 50 岁以前的人比较不容易患癌症?

- a) DNA 修复机制极为有效
- b) 其中含有已被破坏的 DNA 的细胞常因编程性死亡而被除去了
- c) 在同一细胞中要积累多个突变需要时间
- d) 大多数原癌状态是良性的而且多年不能被检测出来
- e) 所有上列各条

参 考 答 案

1. d 最为直接的证据是癌基因的鉴定。
2. c 去分化的细胞中很可能有某些 DNA 的突变而复制会增加更多突变积累的机会。
3. d 生癌的反转录病毒基因(如 ras^*) 与 ras 相似,但不完全相同。
4. a 生癌的 Ras^* 是组成性地被激活的,不受正常 Ras 的影响。
5. d $p53$ 以四聚体蛋白的形式起作用,因此,无论是细胞中 $p53$ 的水平不够高,还是有异常的形式表达出来,都能造成 $p53$ 缺少的表现型。
6. e 真核细胞有许多高度进化的机制以避免灾难性的突变。而且,癌症是危及生命的疾病在临床上的术语,而大多数癌病变发生之前是良性的。

附录 孟德尔遗传学

遗传学是研究活的生物的非常有效的途径,与分子的研究途径是互补的;要理解和运用生物化学和分子生物学,遗传学是必不可少的。遗传学是以观察后代从其双亲所得到的特性为基础的,可以在整个生物体的层次上观察遗传性,也可以在细胞的层次上观察,而且可以用称为基因的独立单位描述遗传性。简单的情况是,一种特定的性状,例如眼睛的颜色或一种遗传病,是由一单个的可遗传单位或基因所决定的。其他情况则是多个基因的组合决定着较为复杂的性状。

真核细胞的几乎全部基因都在细胞核中的染色体内。在大多数真核细胞——体细胞——中,染色体是成对的,这种细胞就称为二倍体。在生殖过程中,染色体分为两组,每一种——称为单倍体基因组——中有各条染色体的一个拷贝。雌性的染色体包装在卵中,卵中也有细胞质和线粒体;雄性的染色体包装在精子中,精子中差不多只有 DNA,存在于其头部,后面有一长尾。每个卵中只有一套基因,和每个精子一样。精子和卵在随机碰撞过程中融合,产生受精卵,其中有每条染色体的正常的两个拷贝——从双亲中各得一个,因此,基因的遗传是由随机过程控制的,这种过程必须用统计学来描述。

遗传的定量方面在作基因位置的图时非常重要。考虑带有不同的性状 A 和 B 的双亲,假设一方有 a 和 b,另一方有 a 和 b,假若 A 和 B 在不同的染色体上,就会有不同组合的 A 和 B 遗传给下一代,就像双亲中各自的任何一种组合遗传给下一代一样。然而,假若 A 和 B 在同一染色体上,那么下一代就更可能像双亲中的任何一方而不太可能有 A 和 B 的不同组合。可是,甚至当 A 和 B 在同一染色体上时,A 和 B 的组合也可能通过重组过程而发生变化,重组就是成对染色体中有小的片段彼此交换。在此情况下,A 和 B 彼此靠近,很可能在生殖过程中它们一直在一起。测定通过许多代的 A 和 B 组合变化的频率,遗传学家就能确定基因在染色体上的相对位置。

将二倍体细胞变为单倍体细胞的过程称为减数分裂。二倍体细胞也可能通过生长而增加其数目——增殖,这包括复制每条染色体产生各 4 个拷贝,然后分裂,经过有丝分裂而产生 2 个二倍体细胞。

一特定基因的不同形式称为等位基因。当存在于一个细胞中的一个基因的 2 个拷贝明显不同时,细胞的特征可能由这个等位基因所决定,也可由另一个等位基因所决定,也可能由二者的混合所决定。有些等位基因在遗传上是隐性的,例如当突变的结果是失去功能时。其他等位基因可能是显性遗传的,例如当突变使正常的基因产物的形成失去调节时,此产物始终有活性——组成性的活性,而不受细胞的调节。其中有一特定基因的完全相同的等位基因的细胞就是对该基因纯合的,而其中有该基因的不同等位基因的细胞就是对该基因杂合的。因此,显性等位基因会使它所携带的特征表达出来,不管这种等位基因有一个还是两个拷贝。隐性基因所携带的特征则只有当基因的两个拷贝中都有这个等位基因时才会表达出来。换言之,在对相关基因纯合或杂合的细胞中显性特征总会表达出来,而隐性特征只有在纯合情况下才会出现。细胞或生物体的行为和外貌——所有表达出来的特征的总结果——是表现型;存在于细胞中全套基因就是其基因型或基因组。

小 结

(1) 许多遗传学的概念对于了解生物化学和分子生物学是重要的。一个个体的遗传性状是由该个体的细胞中所带的基因所决定的。一个基因的不同版本,即等位基因,产生不同的性状。

(2) 高等生物从双亲的每一方得到每个基因的一个拷贝。一个个体的全套基因就是基因型或基因组。有些基因以显性方式表达,有些以隐性方式表达。一个个体所表达出来的性状就是表现型。

附录 词汇简释

(以汉语拼音排序)

A

A-, B- 和 Z-DNA: DNA 是碱基配对的双链。A-, B-和 Z-DNA 是碱基对的排列相同而三维结构不同的双链结构。A-和 B-DNA 是右手螺旋; Z-DNA 是左手螺旋。B-DNA 是细胞中主要的 DNA 结构; A-DNA 存在于有 RNA 的双链结构中。

ATP: 即腺苷 5'-三磷酸(adenosine 5'-triphosphate), 是把贮藏形式的能量带给细胞中需能反应的主要分子。它好像是细胞中的能量通货。

癌基因(oncogene): 任何能启动癌生成的基因。显性癌基因是获得功能的突变所产生的, 隐性癌基因是失去功能的突变所产生的, 而原癌基因则是癌基因的突变前的形式。

癌生成(oncogenesis): 由于原癌基因发生突变所引起的癌的发端。

B

bp: 核酸双链中的碱基对(base pair)。

摆动假说(wobble hypothesis): Francis Crick 所提出的摆动假说解释了为什么 tRNA 的一个反密码子可以和一个以上的 mRNA 的密码子互补。

胞外基质(extracellular matrix): 组织中存在于细胞之间的富含蛋白聚糖的结构。

保守性替换(conservative replacement): 这是就蛋白质结构而言的, 在进化或遗传操作过程中, 当一个氨基酸被侧链的化学性质和结构均类似的另一个氨基酸取代时, 发生的就是保守性替换。

表现型(phenotype): 一个生物体所表现出来的遗传性状。

别构(allosteric): 酶的调节可因为与小的调节物分子结合而实现。当调节物的结合部位与酶的活性部位是分开的时, 就称这种酶为别构酶。

病毒粒(virion): 能起感染作用的病毒颗粒。

不均一核 RNA(heterogeneous RNA, hnRNA): 基因的初级转录物, 通常指未剪接的 mRNA 的前体。

C

cAMP: 环式(cyclic) AMP, 腺苷 3', 5'-环式-磷酸; cAMP 是原核生物和真核生物中信号传递的第二个信使分子。

cDNA: 互补(complementary) DNA; 用反转录酶合成 mRNA 的互补链, 从而制得 cDNA。

cDNA 文库(cDNA library): 收集的许多双链 cDNA, 其序列代表某一 mRNA 库; cDNA 文库可保存在噬菌体或质粒载体上。

C-值悖理(C-value paradox): 生物体的复杂性并不总是与其基因组的大小直接关系, 因为重复性 DNA 的多少是有差别的。

层析法(chromatography): 把不同分子的混合物分开, 使其成为纯的或部分纯的方法。混合物中的分子结合在一固定相——纸、薄层或装在柱中的小颗粒——上, 然后用移动相分别洗脱下来。

常染色体遗传的(autosomally inherited) 性状: 在性染色体以外的染色体上编码的遗传性状, 因此在

雄性和雌性个体中的遗传是相同的。

超螺旋(supercoiling): 在卷曲螺旋结构中, 第二级或更高等级的螺旋都称为超螺旋。

超敏位点(hypersensitive site): 染色质上的位点, 它对 DNA 酶-1 的敏感性和游离的 DNA 的一样。

成纤维细胞(fibroblast): 皮肤中的细胞, 存在于外面的表皮层或结缔组织之下。

重组(recombination): 减数分裂时发生的染色体之间遗传信息的交换。

重组 DNA 技术(recombinant DNA technology): 为了基因克隆的目的, 通过修饰 DNA 的酶, 对 DNA 片段进行生物化学操作。

级联重复(tandem repeat): 存在于一个序列中的级联重复是指一特定序列沿着一个方向重复出现。

纯合的(homozygous): 遗传学上, 当二倍体细胞中存在的同一基因的两个拷贝完全相同时, 就说此细胞就该特定基因而言是纯合的。

D

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid), 脱氧核糖核苷酸的多聚体。DNA 的整条链中的核苷酸序列中存在着细胞内的遗传信息。

DNA 多态性(DNA polymorphism): 在多于 1% 的许多 DNA 分子中, 序列有变化; 这种 DNA 的重排或核苷酸的交换对于进行 RFLP(限制性片段长度多态性, restriction fragment length polymorphism) 作图是有用的。

DNA 复制起点(origin of DNA replication): 染色体或基因组中的具体位置, DNA 复制由此处形成复制泡开始。

DNA 酶(DNAase): 将 DNA 切开的酶。DNA 酶-1 的切割是没有专一性的, 用于测定 DNA 与蛋白质结合的区域并区别不同的染色质结构。

大沟(major groove): 在 B 型 DNA 中, 磷酸主链形成一条贯串着堆叠的碱基的嵴。双链中两条主链之间的空隙就是大沟和小沟, 大沟较宽和较深。

代谢途径(metabolic pathway): 一系列的酶促反应, 其中前一个反应的产物就是该途径中下一个反应的底物。

蛋白激酶(protein kinase): 将 ATP 的 γ -磷酸转移到作为底物的蛋白质的一个氨基酸侧链上的酶。

蛋白磷酸酶(protein phosphatase): 从蛋白质底物上移去磷酸基团的酶, 形成的是无机磷酸。

等电点(isoelectric point, pI): 一个分子上的净电荷为零时其环境中的 pH。

底物(substrate): 在酶所催化的反应中转变为反应产物的化合物。

底物循环(substrate cycle): 指又形成原来底物同时损失一个或多个高能磷酸的反应, 又称耗能性无效循环。

第二信使(second messenger): 与膜结合的激素受体的激活在许多情况下会导致细胞内小分子——包括 cAMP, 肌醇三磷酸或二酰甘油——的释放, 这些分子把激素信号带给细胞的其他部分, 使靶子酶受到调节。细胞内的这些小分子就称为第二信使。

多基因家族(multigene family): 在进化过程中由基因的复制而产生的一组相关的基因; 这些基因的 DNA 序列是同源的, 但不是完全相同的。

E

恶性的(malignant): 能够从癌细胞的发生处转移到身体其他部分的细胞称为恶性细胞, 即癌细胞。

F

翻译(translation): 就基因表达而言, 翻译是指根据 mRNA 模板合成蛋白质的过程。

反密码子(anticodon): tRNA 中的 3 个核苷酸, 与 mRNA 中相应的密码子互补。

反求遗传学(reverse genetics): 研究遗传表现型的一系列操作, 先分离基因, 然后用重组 DNA 技术鉴定其在体内的功能; 经典的遗传学从已知的表现型开始, 随后再确定其基因型。

反向重复(inverted repeat): 就核酸序列而言, 反向重复是指方向相反的一个序列的拷贝。

反转录酶(reverse transcriptase): 首次从反转录病毒中鉴定出来的依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶, 此酶可用于在体外合成 DNA。

非竞争性抑制(noncompetitive inhibition): 一种抑制作用, 其 v_{\max} 改变, 而 K_M 不变。

辅酶, 辅因子(coenzyme, cofactor): 许多酶促反应都需要一种与酶合作以进行反应的分子。这类分子——辅酶或辅因子——可提供能量(如通过 ATP 的水解), 或提供反应所需要的化学基团(如 NADH 的氧化)。另一个反应会再生辅酶或辅因子并重新被利用。许多辅酶或辅因子是由维生素衍生的。

复制(replication): 一种从一个分子开始, 产生两个分子的过程, 所产生的两个分子与原来的那个分子完全一样。

G

G 蛋白(G protein): 一种与 GTP 结合并将其水解为 GDP 的蛋白质。G 蛋白是一种分子开关, 视 GTP 还是 GDP 被结合而定, 其结构状态发生变化。有两类 G 蛋白, 其中小的 G 蛋白, 如 Ras 和异三聚体 G 蛋白(如将腺苷酸环化酶与肾上腺素受体偶联的 G 蛋白)则提供一种联系, 使原初信使, 即细胞外的肾上腺素与细胞内由腺苷酸环化酶形成的环式 AMP 联系起来。

钙调蛋白(calmodulin): 一种蛋白质, 它与钙结合, 并以依赖于钙的方式调节别的蛋白质的活性。

冈崎片段(Okazaki fragment): 后随链的不连续复制过程中产生的短的 DNA 片段。这些片段是由冈崎(Reiji Okazaki)在他的实验中发现的, 实验是以放射性脱氧核糖核苷酸为前体合成 DNA。

共价修饰(covalent modification): 向蛋白质中加入特定基团或由其中除去特定基团, 通常会引起蛋白质性质的改变。

过渡态(transition state): 在酶促反应中, 酶和底物结合, 然后通过一个高能的过渡状态——过渡态——再形成酶与产物的复合物。

H

Holliday 连接体(Holliday junction): 同源重组过程中所形成的 DNA 中间产物, Robin Holliday 首先提出了这种结构的存在。

核苷(nucleoside): 核酸和其他生物分子的组分。核苷是糖, 如核糖与有机碱如腺嘌呤连接而成的。

核苷酸(nucleotide): 核酸和其他生物分子的组分。核苷酸是由糖(如核糖)与有机碱(如腺嘌呤), 再与一个或多个磷酸基团连接而成的。

核壳(nucleocapsid): 蛋白质和核酸的复合体, 形成病毒颗粒; 有被膜的病毒, 如 HIV-1, 具有为膜覆盖的核壳。

核酶(ribozyme): 催化性的 RNA 分子, 能够以反式修饰另一分子。已鉴定出能切割或合成 RNA 的核酶。

核仁(nucleolus): 细胞核中的细胞器, 大的 rRNA 的基因存在于核仁中并在其中转录。

核糖体(ribosome): 大的核糖核蛋白复合体, 是细胞中所有蛋白质的合成所需要的。

核小体(nucleosome): 染色体中主要的重复的亚基结构。

核型(karyotype): 体细胞间期染色体的具体形象, 其总体代表个体的染色体组成, 人的正常核型为 44 条常染色体(两套各 22 条)和 2 个性染色体。

核质(nucleoplasm): 核膜内的溶液, 不包括核仁或核基质。

后随链(lagging strand): DNA的模板链,是在DNA合成过程中不连续地产生的。

互补突变(complementary mutation): 就双链RNA结构而言,互补突变是第二次的突变,它保留了第一次突变中所丢失的碱基配对。

化疗(chemotherapy): 一种治疗方法,用化学药物治疗癌症的方法。

回文序列(palindrome): 回文序列是这样的序列,例如DNA中,当以5到3的方向阅读时,此序列与相对的DNA链上的序列完全相同。

混合抑制(mixed inhibition): v_{\max} 和 K_M 都改变的抑制。

活性部位(active site): 酶中与底物结合并直接参与催化作用的那一部分就是酶的活性部位。

J

肌质网(sarcoplasmic reticulum): 肌肉细胞中相当于内质网的部分。

级联(cascade): 在体内,有几种情况下发生一连串类似的酶促反应,传递某种信号,从这一连串反应的开始到终结,信号常得以放大。这一连串反应就称为一个级联。最常见的级联是蛋白质水解反应和蛋白质磷酸化反应的级联。

基因(gene): 基因决定遗传性状。细胞内DNA的序列编码基因。

基因剔除(gene knockout): 某专一基因的插入突变或缺失突变,其结果是使该基因的起作用的产物不能表达。

基因型(genotype): 存在于生物体内的遗传性状。基因由细胞中的DNA的序列编码。

基因组(genome): 一单个细胞中的全套遗传信息。

激活剂(activator): 促进转录起始速率的转录因子。

假基因(pseudogene): 与已知基因相似的一个基因片段,但不起作用,因为发生了遗传漂移(长时期中的突变)。一般认为假基因是由基因复制和由mRNA的反转录机制产生的。

减数分裂(meiosis): 由双倍体细胞产生单倍体细胞的过程。

剪接体(spliceosome): 介导hnRNA剪接的大的核糖核蛋白复合体。

胶原(collagen): 胶原是一个蛋白质家族,其分布有组织专一性,包括存在于结缔组织中的Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ类型——例如丝,还有存在于基板中的Ⅳ和Ⅴ类型——形成组织片。

酵母人工染色体(yeast artificial chromosome, YAC): 一种基因组的克隆载体,它在酵母细胞中像自复制的染色体那样增殖。

β -结构(beta-structure): 折叠成复杂形状的蛋白质。 β -结构是一大类结构,在蛋白质中频繁出现。在 β -结构中,多肽主链是相当展开的,每个残基旋转 180° 。此结构中有一条以上的多肽链,由于主链上的羰基与酰胺基之间形成了与多肽链方向垂直的许多氢键而形成了平行的或反向平行的构象,从而使此种结构稳定。

紧密连接(tight junction): 相邻细胞的质膜的直接接触,特别是表皮组织中的这种接触,称为紧密连接。

竞争性抑制(competitive inhibition): 一种使反应的 K_M 发生变化而 v_{\max} 不变的抑制作用。这可能是由于与底物竞争酶的结合部位而发生,这时抑制剂在化学上与底物相似。生理上这种抑制作用可能更常在不同的部位上发生,这时抑制剂不一定与底物在结构上相似。

静电相互作用(electrostatic interaction): 带电荷的原子或基团之间的力——同种电荷相排斥,异种电荷相吸引。

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR): 从多种DNA序列中选择专一的序列并将其放大的方法。

K

kb: 千碱基(kilobase)对, 10^3 个核苷酸。

kDa: 千道尔顿(kilodalton), 分子量的度量。

K_M : Michaelis-Menten 常数, 由 Michaelis-Menten 方程 $v = v_{\max} [S] / (K_M + [S])$ 定义。在许多情况下, K_M 与酶和底物的亲和力有关。

抗生素抗性基因(antibiotic resistance gene): 编码一种使专一的抗生素失活的酶的基因, β -内酰胺酶的基因就是对氨苄青霉素的抗性基因。

可读框(open-reading frame, ORF): 一段 DNA 或 RNA, 其中有连续的一组密码子而无终止密码子; ORF 与实际的蛋白质之间的相互关系, 要有直接的实验证据才能确定。

L

离子键(ionic bond): 静电相互作用。

磷酸化级联(phosphorylation cascade): 由磷酸化作用/去磷酸化作用控制的一连串激酶/磷酸酶的活动; 磷酸化级联的作用是信号转导的途径。

α -螺旋(alpha-helix): 蛋白质链折叠成复杂的形状。 α -螺旋是蛋白质中重复出现的结构基元, 螺旋中每一转有 3.6 个残基, 主链的羰基与酰胺基团之间的氢键使 α -螺旋稳定, 这些氢键是与主轴平行的。

M

Michaelis-Menten: Michaelis 和 Menten 是提出 Michaelis-Menten 方程的两位科学家, Menten 是极少数享此殊荣的女科学家之一。此方程描述的是酶催化的反应速率与底物浓度之间的关系。

酶原(zymogen): 一种蛋白质, 当其中的一部分被蛋白质水解作用除去时, 它就变成有活性的酶。

密码子(codon): mRNA 中 3 个连续的核苷酸, 它规定蛋白质合成中的一种特定的氨基酸; tRNA 中的反密码子与 mRNA 中的密码子互补。

模板链(template strand): 在核酸合成过程中被拷贝的 DNA 链。RNA 合成中的模板链代表非编码链, 其序列与 RNA 互补。

N

Northern 印迹法(Northern blotting): 一种实验技术, 将凝胶电泳后的许多 RNA 分子印在膜上, 然后与放射性探针温育, 探针会与互补的序列杂交, 从而证明某种 RNA 的存在。Northern 印迹法用于检测 RNA 分子混合物中专一的 RNA 序列, 亦称 RNA 印迹法。

内质网(endoplasmic reticulum, ER): 存在于细胞中的膜, 将细胞质与内质网的腔隔开。最终要穿过质膜或进入溶酶体的蛋白质, 起始时必须通过 ER 才能到达高尔基体。

脲循环(urea cycle): 由氨基和氨形成脲的过程。H. A. Krebs 发现了柠檬酸循环, 也阐明了脲循环。

柠檬酸循环(citric-acid cycle): 一种代谢过程, 使“乙酸”转变为 CO_2 , 并形成还原型辅酶以及 GTP。需要其中间产物激发其运行, 因而具有循环的性质。

凝胶电泳(gel electrophoresis, including SDS, 2D): 分离分子——如蛋白质或核酸——的方法, 原理是基于这些分子在电场中的迁移率不同。用凝胶来防止溶液在电泳过程中因对流而混合并限制扩散作用。SDS 凝胶中有去污剂 SDS, 其作用是变性剂并掩盖蛋白质上的电荷, 因此蛋白质在 SDS 凝胶电泳中就会按照其分子量而分开。双向(2D, 即二维)凝胶电泳是用长方形的凝胶使蛋白质在两个方向上分开, 通常一个方向用等电聚焦法, 另一个方向用 SDS 电泳, 这两个方向是相互垂直的。

P

胚胎干细胞(embryonic stem, ES, cell): 从核型上说,正常细胞是由小鼠的胚泡衍生出来的;ES细胞则作为多能祖先而用于产生转基因小鼠。

配体(ligand): 与另一种分子结合的一种分子。例如,当氧与血红蛋白结合时,氧就是配体。

配子(gamete): 单倍体细胞如精细胞和卵细胞,它们能融合而形成二倍体的合子细胞;配子中的突变能够遗传。

葡糖异生作用(gluconeogenesis): 从非葡萄糖的前体形成葡萄糖。

Q

前导链(leading strand): 在DNA合成过程中,以5到3的方向连续被拷贝的DNA的模板链。

亲水性作图(hydrophathy plot): 亲水性作图表明一个接着一个的短的氨基酸序列的平均亲水性,以及这种亲水性与各序列在整个蛋白质序列中的位置的关系。

氢键(hydrogen bond): 弱的非共价键,其形成是由于供体原子和受体原子之间共用一个氢原子。

R

RNA(ribonucleic acid): 核糖核酸是核糖核苷酸的聚合物。RNA在基因表达中起作用。

RNA剪接(RNA splicing): 由DNA产生的初级转录物中有内含子和外显子。除去内含子而将外显子连接起来的过程称为剪接。

rRNA: 存在于核糖体中的RNA。

染色体(chromosome): 其中有细胞核中的遗传物质——DNA——的颗粒,DNA与组蛋白和非组蛋白形成复合体。在细胞分裂过程中,可在光学显微镜下看到凝集的染色体。

染色体外DNA(extrachromosomal DNA): DNA分子,通常呈环状,能自复制,而且常与染色体无关;质粒和线粒体DNA就是染色体外DNA的例子。

染色质(chromatin): 主要是DNA-蛋白质复合体,其中有组蛋白和其他蛋白质。

人基因疗法(human gene therapy): 向具有遗传缺陷的细胞中引入DNA的一种治疗方法。人基因疗法仅处于实验阶段,但会提供一种不同于标准的药物疗法的办法。

S

Sanger测序法(Sanger sequencing): 以Fred Sanger命名的、测定DNA中核苷酸序列的方法。

snRNP: 核微小核糖核蛋白颗粒(small nuclear ribonucleoprotein particle)。许多snRNP与细胞核中RNA的剪接有关。

Southern印迹法(Southern blotting): 常用以检测DNA序列的混合物中专一DNA序列的方法,亦称DNA印迹法。

S形曲线(sigmoidal curve): 从原点开始,斜率为零,以后斜率逐渐增加,然后又减小,再接近于零。

上皮细胞,上皮组织(epithelial cell, epithelium): 上皮组织是成片的细胞,形成躯体的包被或界面。例如,皮肤就是上皮组织。

生癌的细胞(tumorigenic cell): 动物体内能够形成癌变的细胞;转化的细胞是生癌的,并且能在组织培养中长到高密度。

生理条件(physiological condition): 活细胞中的条件,如温度、离子强度、pH等。

噬菌体(bacteriophage): 细菌病毒,如 λ -噬菌体是用于重组DNA克隆中的一种生物试剂。

受体(receptor): 就激素或其他因素与细胞的相互作用而言,受体是细胞中的一种蛋白质,它直接与

激素或其他因素相互作用。

受体蛋白激酶(receptor protein kinase): 具有蛋白激酶活性的受体。

疏水的, 疏水相互作用(hydrophobic, hydrophobic interaction): 疏水性残基是指不与水相互作用的残基。“疏水相互作用”一词是指疏水基团在水溶液中聚集在一起的趋势。

双曲线(hyperbolic curve): $y = ax/(b + x)$ 这种形式的函数的曲线。靠近原点处, 曲线几乎成直线增加; 以后则斜率减小; 直到 x 的值很高时, 它接近于最大值。

T

Taq 聚合酶(taq polymerase): 一种依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶, 是由栖热水生菌(Thermus aquaticum) 中分离出来的。Taq 聚合酶在高温下起作用, 是聚合酶链反应(PCR) 中的关键酶。

tRNA: 转移(transfer) RNA, 作为连接物分子在核糖体上起作用, 将 mRNA 的核苷酸序列翻译为蛋白质的核苷酸序列。

tRNA 荷载(tRNA charging): 氨酰 tRNA 转移酶所催化的 tRNA 的氨酰化; 这是蛋白合成的先决步骤。

探针(probe): 就杂交而言, 探针是用于确定某专一的核苷酸序列是否存在于许多序列的混合物之中的工具。通常探针的序列与所希望的序列是互补的。

糖蛋白(glycoprotein): 含有多糖残基的蛋白质。

糖酵解(glycolysis): 葡萄糖或葡萄糖磷酸转变为丙酮酸或乳酸并产生 ATP 的过程。可在无氧条件下发生。

糖类(sugar, carbohydrate): 由 CH_2OH 单位组成的分子, 亦称碳水化合物类。

糖原分解作用(glycogenolysis): 糖原分解为葡萄糖磷酸和葡萄糖的作用。

套索(lariat): 闭合的、环状的 RNA 结构, 是第一类自剪接的内含子的 RNA 剪接和剪接体介导的 hnRNA 剪接中所形成的中间体。

体细胞(somatic cell): 生殖细胞以外的所有细胞; 体细胞的突变不能遗传。

调节区(regulatory region): 控制着基因表达的一段 DNA, 基因的调节区和转录单位共同组成有功能的基因。

同工酶(isozyme, isoenzyme): 同工酶是催化同样的化学反应但不同的酶。它们是不同的蛋白质, 通常有不同的动力学特性。

酮体(ketone body): 小的类似脂肪的分子, 通常是由肝脏中脂肪酸的部分代谢形成的。大多数组织, 包括脑组织都可利用酮体产生能量。

突变率(mutation rate): 单位时间内发生突变的次数, 常以每一代每个基因的突变次数表示。

突变频率(mutation frequency): 种群内每一代发生专一的基因突变的频率。

拓扑域(topological domain): 拓扑域是彼此分开的, 所以一个域内的拓扑变化(如 DNA 分子超螺旋的形成), 不能传到另一个域中。

V, W

v_{\max} : 在底物浓度极高时, 酶促反应的最大速度。

网格蛋白包被的小窝(clathrin-coated pit): 质膜上的区域, 其中有网格蛋白这种结构蛋白; 网格蛋白包被的小窝中与受体结合分子会由于形成小泡而进入细胞之内。

微管(microtubule): 细胞质中微管蛋白的细而长的聚集体, 是细胞骨架的一部分。

微球菌核酸酶(micrococcal nuclease): 切割双链 DNA 的酶。用于核小体位置的作图, 因为它有切割连接体 DNA 的优势, 对于核小体核心颗粒中的 DNA 则很不易切割。

维生素(vitamin): 辅酶或辅因子或它们的前体。

无限增殖化细胞系(immortalized cell line): 组织培养的细胞系,可在实验室中无限增殖;有些无限增殖化的细胞系具有已被转化的表现型。

X

X射线结晶学(X-Ray crystallography): 测定分子的三维结构的方法,这些分子包括蛋白质、各种tRNA和寡脱氧核糖核苷酸类。

系统发生的(phylogenetic): 与进化关系的研究有关的。

细胞骨架(cytoskeleton): 控制细胞形状并指导分子转运的蛋白质结构。

细胞核(nucleus): 细胞中的区室。核酸的合成在其中发生,细胞中几乎所有的DNA都贮存于其中。

细胞质(cytoplasm): 真核细胞中的区室。细胞质是细胞核与质膜之间的溶胶,其中还有别的细胞器,如线粒体和细胞骨架。

显性突变(dominant mutation): 这类突变的结果是观察到的杂合遗传基础上的表现型;显性癌基因如ras*在其中有野生型ras的细胞内是有活性的,因为Ras*是获得功能的突变。

线粒体(mitochondrion,复mitochondria): 存在于细胞质中的细胞器,其中有一套酶能利用分子态氧产生ATP作为细胞的能源。

限制性酶(restriction enzyme): 在专一位点上切割DNA的内切核酸酶;限制性酶是重组DNA技术的分子“剪刀”。

小沟(minor groove): B型DNA中,磷酸主链形成一条贯穿着堆叠的碱基的峭。双链中两条主链之间的空隙就是大沟和小沟,小沟较浅和较窄。

效应物(effector): 调节蛋白质功能的小分子;cAMP是CAP转录因子功能和蛋白激酶A活性的正效应物。

协同性(cooperativity): 就配体的结合而言,协同性意味着一个配体分子的结合会影响第二个分子的结合。例如,一个分子的氧与血红蛋白的结合会增加以后的氧分子的亲和性。

信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP): 有助于蛋白质穿越内质网膜的核糖核蛋白颗粒。

信号肽(signal peptide): 氨基酸的一种线状序列,它规定一种特定的亚细胞到位途径;ER信号肽的存在就使蛋白质到达ER,其中要经过一个与信号识别颗粒(SRP)有关的过程。

信号转导(signal transduction): 信号从一处移到另一处和从一个分子移到另一个分子的过程。

信使RNA(messenger RNA, mRNA): 作为蛋白质合成模板的RNA转录物;真核生物中,mRNA是经过充分加工的hnRNA。

性状(trait): 遗传学研究中,性状就是生物的一种特性,例如眼睛的颜色,可以利用它跟踪基因的分离。

序列趋异性(sequence divergence): 由于核苷酸水平上的遗传变化而造成的DNA序列之间的差异性。序列趋异性在长期进化过程中发生,反映的是自然选择的结果。

Y

盐键(salt link): 分子的静电相互作用。

-氧化(beta-oxidation): 脂肪分解的过程,产生乙酰CoA。

氧化磷酸化(oxidative phosphorylation): 在氢或电子沿着电子传递系统传递的过程中,由ADP和无机磷酸形成ATP的作用。

遗传密码(genetic code): mRNA中的一组密码子,它们分别与61种可能的tRNA的反密码子和3个无意义(终止)密码子相对应,其基础是 4^3 个三联体的组合。

异源双链(hetroduplex): 互补核酸的双链杂交物;重组时形成 DNA-DNA 的异源双链。

有丝分裂(mitosis): 细胞分裂的过程,此时染色体分离而子细胞形成。

有丝分裂的(mitotic): 有丝分裂的细胞就是正在进行有丝分裂的细胞。有丝分裂的染色体就是有丝分裂过程中处于凝聚状态的染色体。

原病毒(provirus): 反转录病毒的一种中间状态的生活形式,它以双链 DNA 的形式整合到宿主的基因组中。

原核的(prokaryotic): 原核细胞没有独立的细胞核。低等生物,如细菌就是原核生物。

原肌球蛋白,肌钙蛋白(tropomyosin, troponin): 与肌动蛋白一起存在于肌肉纤维中的蛋白质。

Z

杂合的(heterozygous): 遗传学中,就一特定基因而言,所谓杂合的细胞,就是一个二倍体细胞中该基因的两个拷贝是不同的。

增强子(enhancer): 相当于对专一的转录因子高亲和性结合位点的 DNA 序列。增强子是一类效应元件,能与异源的启动子和远距离的启动子的 5' 或 3' 端共同起作用。

兆碱基(megabase, Mb): 100 万个 DNA 的碱基,即 1000 kb。

真核的(eucaryotic): 真核细胞中有一个独立的细胞核,细胞中几乎所有的 DNA 都在细胞核内。酵母和高等生物,包括人在内,都有真核细胞,因此称为真核生物。低等生物是原核生物。

脂蛋白(lipoprotein): 三酰甘油、胆固醇、胆固醇酯、磷脂和蛋白质的复合体。脂蛋白包括极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、高密度脂蛋白(HDL)和乳糜微粒。

脂肪生成(lipogenesis): 脂类化合物的形成。也包括由非脂类的前体合成脂肪酸。

脂类(lipid): 疏水性极强的分子,用疏水溶剂可使之从细胞中释放出来。

脂双层(lipid bilayer): 生物膜的结构,其中脂类的疏水尾聚集在一起,故成两层。

质粒(plasmid): 环状 DNA 分子,通常比染色体中的 DNA 分子小。质粒通常在细胞内在染色体旁边起作用,提供更多的基因。

致癌剂(carcinogen): 任何引起癌的生物的、化学的或物理的因素。

中间丝(intermediate filament): 中间丝是由中间丝蛋白质组装起来的,对动物细胞提供机械强度。

主动转运(active transport): 分子和离子可由各种各样的机制进行跨膜转运。需要消耗能量——通常是 ATP 的水解——的转运机制称为主动转运机制。

转氨作用(transamination): 将氮从一个碳架转移到另一个碳架上的作用,通常是由转氨酶的作用而发生。

转导(transduction): 就细胞的信号传递而言,转导指的是信号(通常来自激素)跨过膜而形成效应物分子(通常是第二信使)。

转化的(transformed): 具有生癌特性的无限增殖化细胞的表现型的改变。这一术语也用于重组 DNA 技术中,表述将外源 DNA 引入到细菌中。

转录(transcription): 在 DNA 模板上合成 RNA 的过程。

转录单位(transcription unit): 基因中被转录的那一部分,包括 5' 和 3' 的非蛋白质编码序列。

转录物(transcript): 指的是 RNA 合成的产物,mRNA 常称为基因的转录物。

转录因子(transcription factor): 其功能是发动或调节转录作用。大多数(但不是全部)转录因子都是与 DNA 的专一序列结合的蛋白质。

自然选择(natural selection): 在长期的进化过程中,对遗传性状的正面的或负面的选择都会在生殖能力上反映出来,这种机制是达尔文进化论的中心法则。

组蛋白(histone): 小的碱性的蛋白质,是它将染色体中的 DNA 组成为核小体。

附录 汉英名词对照表

(以汉语拼音排序)

A

阿昔洛维(无环鸟苷): aciclovir
阿糖胞苷: cytosine arabinoside
癌: cancer
癌基因: oncogene
癌抑制基因: tumor-suppressor gene
艾滋病: AIDS
氨: ammonia
氨基蝶呤: aminopterin
氨基咪唑核糖基三嗪酮: azacytidine
氨基甲酸: carbamate
氨基酸: amino acid
氨甲蝶呤: methotrexate
氨甲酰磷酸: carbamoyl phosphate
氨米妥: amytal
氨肽酶: aminopeptidases
氨酰 tRNA: aminoacyl-tRNA
氨酰 tRNA 合成酶: aminoacyl-tRNA synthetase
氨苄青霉素: ampicillin

B

靶细胞: target cell
白喉毒素: diphtheria toxin
白血病: leukemia
摆动假说: wobble hypothesis
半保留 DNA 复制: semiconservative DNA replication
半胱氨酸: cysteine
半乳糖: galactose
半乳糖苷酶: galactosidase
半乳糖血: galactosemia
胞苷激酶基因启动子: thymidine-kinase gene promoter
胞嘧啶: cytosine
胞吞: endocytosis
胞外基质: extracellular matrix

胞外配体: extracellular ligand
胞外信号分子: extracellular signaling molecule
胞质动力蛋白: cytoplasmic dynein
胞质分裂: cytokinesis
保守性替换: conservative replacement
报道基因: reporter gene
被动扩散: passive diffusion
苯丙氨酸: phenylalanine
苯丙酮尿: phenylketonuria (PKU)
鼻病毒: rhinovirus
闭合的复合体: closed complex
蓖麻毒蛋白: ricin
壁膜间隙: periplasmic space
编程性细胞死亡: apoptosis
变性: denaturation
遍在蛋白: ubiquitin
表达的基因: expressed gene
表皮生长因子受体: epidermal growth factor receptor (EGFR)
表现型: phenotype
别构酶: allosteric enzyme
别构效应: allosteric effect
别嘌呤醇: allopurinol
丙氨酸: alanine
丙氨酸转氨酶: alanine aminotransferase (ALT)
丙酮酸: pyruvate
丙酮酸激酶: pyruvate kinase
丙酮酸羧化酶: pyruvate carboxylase
丙酮酸脱氢酶: pyruvate dehydrogenase
丙酮酸脱羧酶: pyruvate decarboxylase
丙酰 CoA: propionyl CoA
病毒: virus
病毒被膜: viral envelope
病毒体: virion
波形蛋白丝: vimentin filament

- 卟啉: porphyrin
哺乳动物细胞: mammalian cell
不均一 RNA: heterogeneous RNA (hnRNA)
不均一核蛋白颗粒: heterogenous nucleoprotein particle (hn-RNP)
不可逆抑制: irreversible inhibition
- C
- 操纵子: operon
糙皮病: pellagra
草酸: oxalic acid
草酰乙酸: oxaloacetate
层析法: chromatography
层粘连蛋白: laminin
插入的重复序列: inserted repeat
插入突变: insertional mutation
产物抑制: product inhibition
长散布元件: long interspersed element (LINE)
肠: intestine
肠肽酶: enteropeptidase
常染色体遗传: autosomal inheritance
常染色质: euchromatin
超螺旋: supercoiling
超敏位点: hypersensitive site
超细胞结构: supracellular structure
沉降系数: sedimentation coefficient
成骨不全: osteogenesis imperfecta
成视网膜细胞瘤基因: retinoblastoma (Rb) gene
成纤维细胞: fibroblast
持续合成能力: processivity
重复 DNA: repetitive DNA
重新组合: 复性: reassociation
重组: recombination
重组 DNA 技术: recombinant DNA technology
串联排列: tandem array
串联重复: tandem repeat
锤头核酶: hammerhead ribozyme
纯合性: homozygosity
磁共振: magnetic resonance
雌激素受体: estrogen receptor
促分裂原相关蛋白: mitogen-associated protein (MAP)
催化放大: catalytic amplification
- 错配修复: mismatch repair
- D
- 大肠杆菌: Escherichia coli (E. coli)
大分子: macromolecule
大分子结构: macromolecular structure
大沟: major groove (DNA)
代谢途径: metabolic pathway
单胺氧化酶: monoamine oxidase
单纯疱疹病毒: herpes simplex virus
单链结合蛋白: single-strand binding protein (SSB)
单向 DNA 复制: unidirectional DNA replication
单向转运蛋白: uniporter protein
胆固醇: cholesterol
胆红素: bilirubin
胆碱: choline
胆绿素: biliverdin
胆色素: bile pigment
弹状病毒: rhabdovirus
蛋白多糖: proteoglycan
蛋白激酶: protein kinase
蛋白磷酸酶: protein phosphatase
蛋白酶: protease
蛋白酶水解: proteolysis
蛋白酶水解级联: proteolytic cascade
蛋白体: proteosome
蛋白质: protein
蛋白质到位: protein targeting
蛋白质合成: protein synthesis
蛋白质剪接: protein splicing
蛋白质周转: protein turnover
等电点: isoelectric point
等电聚焦: isoelectric focusing
等位基因: allele
低密度脂蛋白: low-density lipoprotein (LDL)
底物: substrate
地中海贫血: thalassemia
第二信使系统: second messenger system
点突变: point mutation
电化学梯度: electrochemical gradient
电偶极子: electric dipole
电泳: electrophoresis
电泳迁移率变动分析: electrophoretic mobility shift

- assay (EMSA)
- 电子传递系统: electron-transport system
- 3-叠氮-3-脱氧胸腺嘧啶: AZT (3 -azido-3 -deoxy-thymidine)
- 定点诱变: site-directed mutagenesis
- 定向基因转移: targeted gene transfer
- 动力蛋白: dynein
- 动粒: kinetochore
- 动态不稳定性: dynamic instability
- 动物病毒: animal viruse
- 豆蔻酸: myristic acid
- 毒物解毒剂: poison antidote
- 读框: reading frame
- 端粒: telomere
- 短杆菌肽: gramicidin
- 短散布元件: short interspersed element (SINE)
- 对向运输: antiport
- 多 ADP-腺苷酸化: poly ADP-ribosylation
- 多胺: polyamine
- 多蛋白复合体: multiprotein complex
- 多蛋白相互作用: multiple-protein interaction
- 多核糖体: polysome
- 多基因家族: multigene family
- 多抗药性: multidrug resistance
- 多顺反子 mRNA: polycistronic mRNA
- 多肽链: polypeptide chain
- 多糖: polysaccharide
- 多腺苷酸化: polyadenylation
- E
- 儿茶酚胺: catecholamine
- 二核苷酸重复: dinucleotide repeat
- 二聚化: dimerization
- 二磷酸甘油酸: bisphosphoglycerate (BPG)
- 二硫键: disulfide bridge
- 二羟苯丙氨酸 (多巴): dihydroxyphenylalanine (DOPA)
- 二氢叶酸还原酶: dihydrofolate reductase (DHFR)
- 二十面体: icosahedron
- 二肽基-tRNA: dipeptidyl-tRNA
- 二酰甘油: diacylglycerol
- 二硝基酚: dinitrophenol
- F
- 发夹环: hairpin loop
- 法尼基化: farnesylation
- 翻译: translation
- 翻译后修饰: posttranslational modification
- 翻译连读: translational read-through
- 翻译移码: translational frameshifting
- 反馈抑制: feedback inhibition
- 反密码子: anticodon
- 反平行性: antiparallelism
- 反求遗传学: reverse genetics
- 反相层析: reverse-phase chromatography
- 反向重复: inverted repeat
- 泛酸: pantothenic acid
- 范德华力: van der Waals force
- 芳香族氨基酸: aromatic amino acid
- 放线菌素: actinomycin
- 非变性凝胶电泳: native gel electrophoresis
- 非共价相互作用: noncovalent interaction
- 非竞争性抑制: noncompetitive inhibition
- 非竞争性抑制: uncompetitive inhibition
- 非组蛋白蛋白质: nonhistone protein
- 费城染色体: Philadelphia chromosome
- 分化: differentiation
- 分解代谢: catabolism
- 分解代谢基因激活蛋白: catabolic gene-activator protein (CAP)
- 分泌小泡: secretory vesicle
- 分压: partial pressure
- 分支位点: branch site
- 分支移位: branch migration
- 分子: molecule
- 分子间力: intermolecular force
- 分子连接物: molecular adaptor
- 分子内的力: intramolecular force
- 分子筛: molecular sieve
- 辐射: radiation
- 辅基: prosthetic group
- 辅酶 A: coenzyme A (CoA)
- 辅酶 Q: coenzyme Q
- 辅因子: cofactor
- 负反馈: negative feedback
- 复性: renaturation

- 复制: replication
 复制叉: replication fork
 复制酶: replicase
 复制泡: replication bubble
 复制体: replisome
 氟尿嘧啶: flurouracil
 副粘病毒: paramyxovirus
- G
- 钙调蛋白: calmodulin
 钙离子: calcium ion (Ca^{2+})
 干扰素: interferon
 甘氨酸: glycine
 甘露糖-6-磷酸: mannose-6-phosphate
 甘油: glycerol
 甘油磷酸穿梭: glycerolphosphate shuttle
 甘油醛-3-磷酸脱氢酶: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
 甘油三酯: triglyceride
 肝素: heparin
 肝细胞癌: hepatocellular carcinoma
 岗崎片段: Okazaki fragment
 高半胱氨酸: homocysteine
 高尔基体: Golgi apparatus
 高密度脂蛋白: high-density lipoprotein (HDL)
 高铁血红蛋白: ferric-hemoglobin
 高铁血红蛋白: met-hemoglobin (Mbm)
 高效液相层析: high-performance liquid chromatography
 功能基元: functional motif
 功能域: functional domain
 共济现象: ataxia
 共价催化: covalent catalysis
 共价键: covalent bond
 共价修饰: covalent modification
 共同凝固途径: common coagulation pathway
 谷氨酸: glutamate (glutamic acid)
 谷氨酸脱氢酶: glutamate dehydrogenase
 谷胱甘肽: glutathione
 谷酰胺: glutamine
 谷酰胺酶: glutaminase
 骨骼肌: skeletal muscle
 瓜氨酸: citrulline
- 胍基乙酸: guanidoacetate
 寡糖: oligosaccharide
 冠形病毒: coronavirus
 管家基因: housekeeping gene
 管家酶: houskeeping enzyme
 光合作用: photosynthesis
 胱氨酸: cystine
 胱氨酸尿: cystinuria
 广谱抗药蛋白: multidrug resistance protein (MDR)
 轨道导向: orbital steering
 果糖: fructose
 果糖 1,6-二磷酸酶: fructose-1,6-bisphosphatase
 果糖 2,6-二磷酸: fructose-2,6-bisphosphate
 果糖不耐性: fructose intolerance
 果糖尿: fructosuria
 果糖-6-磷酸: fructose-6-phosphate
 过渡态: transition state
 过氧化物酶体: peroxisome
- H
- 含硫氨基酸: sulfur amino acid
 合理的药物设计: rational drug design
 核蛋白: nucleoprotein
 核苷: nucleoside
 核苷三磷酸: nucleoside triphosphate
 核苷酸: nucleotide
 核苷酸转移酶: nucleotidyl transferase
 核黄素: riboflavin
 核基质: nuclear matrix
 核壳: nucleocapsid
 核酶: ribozyme
 核膜: nuclear membrane
 核内核糖核蛋白复合体: nuclear ribonucleoprotein complex
 核内小核糖核蛋白: small nuclear ribonucleoprotein (snRNP)
 核仁: nucleolus
 核受体: nuclear receptor
 核输入信号: nuclear import signal
 核酸: nucleic acid
 核酸酶: nuclease
 核糖核蛋白复合体: ribonucleoprotein complexe
 核糖核苷二磷酸: ribonucleoside diphosphate

- (rNDP)
- 核糖核苷酸还原酶: ribonucleotide reductase
- 核糖核酸: RNA (ribonucleic acid)
- 核糖核酸酶: ribonuclease (RNase)
- 核糖体: ribosome
- 核糖体 RNA: ribosomal RNA (rRNA)
- 核糖体 S6 激酶: ribosomal S6 kinase (Rsk)
- 核糖体结合试法: ribosome binding assay
- 核糖体暂停: ribosomal pausing
- 核纤层: nuclear lamin
- 核小体: nucleosome
- 核型分析: karyotyping
- 核支架: nuclear scaffold
- 核质: nucleoplasm
- 黑素: melanin
- 痕量元素: trace element
- 红细胞: erythrocyte
- 红细胞: red blood cell
- 后随链: lagging strand
- 琥珀酸脱氢酶: succinate dehydrogenase
- 琥珀酰胆碱: succinylcholine
- 琥珀酰 CoA 合成酶: succinyl CoA synthetase
- 互补 DNA: complementary DNA (cDNA)
- 互补群: complementation group
- 互补突变: complementary mutation
- 互补序列: complementary sequence
- 化疗: chemotherapy
- 坏血病: scurvy
- 环核苷酸: cyclic nucleotide
- 环己酰亚胺: cycloheximide
- 环外碱基: looped-out base
- 环腺苷酸: cyclic AMP (cAMP)
- 黄疸: jaundice
- 黄素蛋白: flavoprotein
- 回文序列: palindrome
- 回折: reverse turn
- 活化能: activation energy
- 活性部位: aActive sites
- 活性染色质: active chromatin
- J
- 奇数链脂肪酸: odd-chain fatty acid
- 肌醇磷酸: inositol phosphate
- 肌醇磷脂: inositol phospholipid
- 肌醇三磷酸: inositol trisphosphate
- 肌动蛋白: actin
- 肌动蛋白丝: actin filament
- 肌动球蛋白: actomyosin
- 肌钙蛋白: troponin
- 肌苷激酶: creatine kinase (CK)
- 肌苷酸: inosine monophosphate (IMP)
- 肌红蛋白: myoglobin
- 肌球蛋白: myosin
- 肌球蛋白轻链激酶: myosin light-chain kinase (ML-CK)
- 肌肉: muscle
- 肌酸: creatine
- 肌酸酐: creatinine
- 肌酸磷酸激酶: creatine phosphokinase
- 肌质网: sarcoplasmic reticulum
- 基板: basal laminae
- 基因表达: gene expression
- 基因重复: gene duplication
- 基因簇: gene cluster
- 基因疗法: gene therapy
- 基因剔除: gene knockout
- 基因型: genotype
- 基因寻靶: gene targeting
- 基因组: genome
- 基因组 DNA: genomic DNA
- 基因座控制区: locus control region (LCR)
- 激活剂: activator
- 激素: hormone
- 极低密度脂蛋白: very-low-density lipoprotein (VLDL)
- 级联: cascade
- 己糖: hexose
- 己糖激酶: hexokinase
- 脊髓灰质炎病毒: poliovirus
- 甲基胞嘧啶: methyl cytosine
- 甲基鸟嘌呤: methylguanine
- 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶: methylguanine DNA methyltransferase
- 甲基鸟苷: methyl guanosine
- 甲硫氨酸: methionine

- 甲酰化肽: formylated peptide
 甲型肝炎病毒: hepatitis A virus
 甲状腺素: thyroxine
 假底物序列: pseudo-substrate sequence
 假基因: pseudogene
 减毒作用: attenuation
 减量调节: down-regulation
 减数分裂: meiosis
 剪接体: spliceosome
 碱基配对: base pairing
 碱基切除修复: base-excision repair
 碱性螺旋-环-螺旋蛋白: basic helix-loop-helix (bHLH) protein
 降钙素: calcitonin
 交换频率: crossover frequency
 胶原蛋白: collagen
 角蛋白: keratin
 脚气病: beri-beri
 校正: proofreading
 酵母人工染色体: yeast artificial chromosome (YAC)
 酵母细胞: yeast cells
 结蛋白丝: desmin filament
 结构域: structural domain
 解离常数: dissociation constant
 解旋酶: helicases
 金属离子: metal ions
 紧密连接: tight junction
 近端组氨酸: proximal histidine
 精氨酸: arginine
 精氨酸酶: arginase
 竞争性酶抑制: competitive enzyme inhibition
 静电相互作用: electrostatic interaction
 巨核: megakaryote
 聚丙烯酰胺凝胶: polyacrylamide gel
 聚合酶链反应: polymerase chain reaction (PCR)
- K
- 开放复合体: open complex
 抗代谢物: antimetabolites
 抗凝血酶: antithrombin
 抗生素抗性基因: antibiotic resistance gene
 抗体多样性: antibody diversity
 可读框: open-reading frame
 可逆抑制: reversible inhibition
 空间位阻: steric hindrance
 枯草杆菌蛋白酶: subtilisin
 跨膜蛋白: transmembrane protein
 快速蛋白质液相层析: fast protein liquid chromatography
 扩散: diffusion
- L
- 赖氨酸: lysine
 酪氨酸: tyrosine
 酪氨酸激酶: tyrosine kinase
 酪氨酸磷酸化: tyrosine phosphorylation
 类固醇激素: steroid hormone
 离子键: ionic bond
 离子交换: ion-exchange
 离子通道: ion channel
 离子载体: ionophore
 利福霉素: rifamycin
 连接的序列: linked sequence
 连接体: linker
 镰状细胞性状: sickle cell trait
 链霉素: streptomycin
 链延伸: chain elongation
 两亲性螺旋: amphipathic -helix
 亮氨酸拉链: leucine-zipper
 临床实验室: clinical laboratory
 磷酸氨基酸: phosphoamino acid
 磷酸吡哆醛: pyridoxal phosphate
 磷酸二酯键: phosphodiester bond
 磷酸二酯酶: phosphodiesterase
 磷酸甘油酸: phosphoglycerate
 磷酸甘油酸变位酶: phosphoglyceratemuase
 磷酸果糖激酶: phosphofructokinase (PFK)
 磷酸核糖焦磷酸: phosphoribosylpyrophosphate (PRPP)
 磷酸化(作用): phosphorylation
 磷酸化酶: phosphorylase
 磷酸葡糖酸: phosphogluconate
 磷酸葡糖异构酶: phosphoglucose isomerase
 磷酸鞘脂: phosphosphingolipid
 磷酸烯醇丙酮酸: phosphoenolpyruvate

- 磷酸酯: phosphate
 磷脂: phospholipid
 磷脂酶: phospholipase
 磷脂酰胆碱: phosphatidylcholine
 磷脂酰肌醇: phosphatidylinositol
 磷脂酰丝氨酸: phosphatidylserine
 磷脂酰乙醇胺: phosphatidylethanolamine
 零时重缔合: zero-time reassociation
 流感病毒: influenza virus
 硫胺素: thiamin
 硫胺素焦磷酸: thiamine pyrophosphate (TPP)
 氯霉素: chloramphenicol
 氯霉素乙酰转移酶: chloramphenicol acetyl transferase (CAT)
 卵磷脂: lecithin
 螺线管: solenoid
 螺旋: helix (复 helices)
 螺旋-转角-螺旋: helix-turn-helix
- M
- 马尿酸: hippuric acid
 慢性髓细胞性白血病: chronic myelogenous leukemia
 毛细管凝胶电泳: capillary gel electrophoresis
 毛细管转移: capillary transfer
 帽: cap
 酶: enzyme
 酶催化的反应: enzyme-catalyzed reaction
 酶的失控: up-regulation of enzyme
 酶原: zymogen
 酶-底物复合物: enzyme-substrate complex
 孟德尔遗传学: Mendelian genetics
 胱硫醚尿: cystathionuria
 密码子: codon
 嘧啶: pyrimidine
 免疫球蛋白基因: immunoglobulin gene
 模板链: template strand
 膜: membrane
 膜内在蛋白质: integral membrane protein
 膜外周蛋白: peripheral membrane protein
- N
- 囊性纤维化: cystic fibrosis
 囊性纤维化跨膜传导蛋白: cystic-fibrosis trans-
- membrane-conductance regulator
 内含子: intron
 内切核酸酶: endonuclease
 内切核糖核酸酶: endoribonuclease
 内肽酶: endopeptidase
 内体: endosome
 内源性凝血途径: intrinsic coagulation pathway
 内质网: endoplasmic reticulum (ER)
 尼龙: nylon
 逆转录: reverse transcription
 逆转录病毒: retrovirus
 逆转录病毒载体: retroviral vector
 逆转录酶: reverse transcriptase
 粘着蛋白: adhesion protein
 鸟氨酸: ornithine
 鸟氨酸脱羧酶: ornithine decarboxylase
 鸟氨酸转甲酰酶: ornithine transcarbamoylase
 鸟苷二磷酸: GDP
 鸟嘌呤: guanine
 尿卟啉原: uroporphyrinogen
 尿黑酸尿: alcaptonuria
 尿嘧啶: uracil
 尿酸: uric acid
 脲: urea
 脲循环: urea cycle
 柠檬酸合酶: citrate synthase
 柠檬酸裂合酶: citrate lyase
 柠檬酸循环: citric-acid cycle
 凝固途径: coagulation pathway
 凝胶电泳: gel electrophoresis
 凝胶迁移率变动分析: gel-mobility shift assay
 凝血酶: thrombin
 凝血酶原: prothrombin
 牛磺酸: taurine
- O
- 偶联反应: coupled reaction
 偶数碳链脂肪酸: even-chain fatty acid
- P
- 疱疹病毒: herpes virus
 胚干细胞: embryonic stem cell (ES cell)
 胚血红蛋白: embryonic hemoglobin
 配体: ligand

- 配子: gamete
 皮肤癌: skin cancer
 嘌呤: purine
 嘌呤霉素: puromycin
 平衡: equilibrium
 苹果酸穿梭: malate shuttle
 脯氨酸: proline
 葡糖激酶: glucokinase
 葡糖醛酸: glucuronic acid
 葡糖异生: gluconeogenesis
 葡糖-6-磷酸: glucose-6-phosphate
 葡萄糖: glucose
- Q
- 七碱基序列重复: heptamer repeat
 槭糖尿病: maple-syrup urine disease
 启动子: promotor
 起点识别复合体: origin recognition complex (ORC)
 起点识别元件: origin recognition element (ORE)
 起始: initiation
 起始因子: initiation factor (IF)
 器官: organ
 前导链: leading strand
 前胶原: procollagen
 前肽: propeptide
 嵌合转录因子: chimeric transcription factor
 羟胺: hydroxylamine
 羟脯氨酸: hydroxyproline
 羟甲基无环鸟苷: ganciclovir
 羟甲戊二酸单酰 CoA: hydroxymethyl glutaryl CoA (HMG CoA)
 羟赖氨酸: hydroxylysine
 羟色胺: hydroxytryptophan, serotonin
 鞘磷脂: sphingomyelin
 鞘糖脂: glycosphingolipid
 切割促进因子: cleavage stimulation factor (CStF)
 切割-聚腺苷酸化专一性因子: cleavage-polyadenylation specificity factor (CPSF)
 切口平移: nick translation
 亲和层析: affinity chromatography
 亲水性图: hydrophathy plot
 亲脂因子: lipotropic factor
- 氢键: hydrogen bond
 氰酸钾: potassium cyanate
 巯基嘌呤: mercaptopurine
 球状蛋白: globular protein
 驱动蛋白: kinesin
 趋化性: chemotaxis
 去甲肾上腺素: norepinephrine
 全酶: holoenzyme
 醛缩酶: aldolase
 缺失诱变: deletion mutagenesis
- R
- 染色体: chromosome
 染色体结构域: chromosomal domain
 染色体外 DNA: extrachromosomal DNA
 染色体易位: chromosome translocation
 染色小体: chromatosome
 染色质: chromatin
 热激蛋白: heat-shock protein
 热力学: thermodynamics
 热力学第二定律: second law of thermodynamics
 人 T 细胞白血病病毒: human T-cell leukemia virus (HTLV)
 人基因组计划: Human Genome Project
 人免疫缺陷病毒: human immunodeficiency virus (HIV)
 溶菌酶: lysozyme
 溶酶体: lysosome
 溶质分子: solute molecule
 肉碱棕榈酰转移酶: carnitine palmitoyltransferase
 乳糜微粒: chylomicron
 乳清苷酸: orotidine monophosphate (OMP)
 乳糖操纵子: lac operon
 乳糖脱氢酶: lactate dehydrogenase (LDH)
 乳头瘤病毒: papilloma virus
 乳腺癌: breast cancer
- S
- 塞姆利基森林病毒: Semliki forest virus
 三碘甲腺原氨酸: triiodothyronine
 三核苷酸重复: trinucleotide repeat
 三级结构: tertiary structure
 三联体: triplet
 三羧酸循环: tricarboxylic-acid cycle

- 三酰甘油: triacylglycerol
 色氨酸: tryptophan
 熵: entropy
 上皮组织: epithelial tissue
 神经冲动: nerver impulse
 神经递质: neurotransmitter
 神经节苷脂: ganglioside
 神经丝: neurofilament
 神经纤维瘤: neurofibromatosis
 神经酰胺: ceramide
 肾结石: kidney stone
 肾上腺素: epinephrine
 生长因子: growth factor
 生瘤的细胞系: tumorigenic cell line
 生物化学的: biochemical
 生物学的整合: biological integration
 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳: SDS (sodium dodecyl sulfonate) gel electrophore
 十字形 DNA: cruciform DNA
 识别螺旋: recognition helix
 视黄酸受体: retinoic acid (RAR) receptor
 视紫红质: rhodopsin
 嗜中性粒细胞: neutrophil
 噬菌体: bacteriophage
 受体: receptor
 受体蛋白激酶: receptor protein kinase
 疏水残基: hydrophobic residue
 疏水相互作用: hydrophobic interaction
 疏水性: hydrophobicity
 双螺旋: double helix
 双曲线: hyperbolic curve
 双香豆素: dicoumarol
 双向 DNA 复制: bidirectional DNA replication
 双向凝胶电泳: two-dimensional gel electrophoresis
 水解酶: hydrolytic enzyme
 瞬时共转染试法: transient cotransfection assay
 丝氨酸: serine
 丝氨酸蛋白酶: serine protease
 四环素: tetracycline
 四级结构: quaternary structure
 四氢叶酸: tetrahydrofolate
 苏氨酸: threonine
 苏氨酸醛缩酶: thereonine aldolase
 苏氨酸脱水酶: threonine dehydratase
 宿主基因组整合: host-genome integration
 酸碱催化: acid-base catalysis
 酸水解酶: acid hydrolase
 羧基: carboxylate group
 羧肽酶: carboxypeptidase
 羧肽酶原: procarboxypeptidase
 T
 胎儿积水: hydrops fetalis
 胎儿血红蛋白: fetal hemoglobin (HbF)
 肽激素: peptide hormone
 肽键: peptide bond
 弹性蛋白: elastin
 弹性蛋白酶: elastase
 探针: probe
 碳原子: carbon atom
 羰基: carbonyl group
 糖胺聚糖: glycosaminoglycan (GAG)
 糖蛋白: glycoprotein
 糖萼: glycocalyx
 糖基化(作用): glycosylation
 糖基转移酶: glycosyl transferase
 糖酵解: glycolysis
 糖尿病: diabetes mellitus
 糖皮质激素受体: glucocorticoid receptor
 糖原: glycogen
 糖原分解: glycogenolysis
 糖原合酶: glycogen synthase
 糖脂: glycolipid
 套索结构: lariat structure
 体温: body temperature
 体细胞: somatic cell
 天冬氨酸: aspartate
 天冬氨酸酶: asparaginase
 天冬氨酸转氨酶: aspartate aminotransferase
 天冬酰胺: asparagine
 天花病毒: smallpox virus
 甜菜碱: betaine
 铁蛋白: ferritin
 铁效应元件: iron-responsive element (IRE)
 铁效应元件结合蛋白: iron-responsive-element

binding protein (IRE-BP)	微球菌核酸酶: micrococcal nuclease
同二聚体: homodimer	维生素: vitamin
同工酶: isoenzyme(isozyme)	卫星 DNA: satellite DNA
同聚物: homopolymer	位点专一重组: site-specific recombination
同向转运: symport	胃蛋白酶: pepsin
同源框: homeobox	胃蛋白酶原: pepsinogen
同源重组: homologous recombination	乌头酸酶: aconitase
酮戊二酸脱氢酶: ketoglutarate dehydrogenase	无规卷曲: random coil
酮酸脱氢酶: keto-acid dehydrogenase	无限增殖化: immortalization
酮体: ketone body	无限增殖化细胞系: immortalized cell line
痛风: gout	戊糖磷酸途径: pentose-phosphate pathway
透明质酸: hyaluronic acid	X
突变: mutation	烯醇化酶: enolase
突触: synapse	系统发生数据: phylogenetic data
褪黑素: melatonin	细胞: cell
吞噬: phagocytosis	细胞毒性: cytotoxicity
脱氨剂: deaminating agent	细胞骨架: cytoskeleton
脱氨作用: deamination	细胞核: nucleus
脱辅基蛋白质: apoprotein	细胞器: organelle
脱嘌呤: depurination	细胞侵入: cell invasion
脱氧核糖核苷二磷酸: deoxyribonucleoside diphosphate (dNDP)	细胞溶胶: cytosol
脱氧核糖核苷三磷酸: deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP)	细胞信号传递机制: cell-signaling mechanism
脱氧核糖核酸: DNA (deoxyribonucleic acid)	细胞增殖: cell proliferation
脱氧肌红蛋白: deoxymyoglobin	细胞质: cytoplasm
脱氧腺苷三磷酸: deoxyadenosine triphosphate (dATP)	细胞周期: cell cycle
脱氧血红蛋白: deoxyhemoglobin	细胞-细胞相互作用: cell-cell interaction
拓扑域: topological domain	细菌染色体: bacterial chromosome
拓扑异构酶: topoisomerase	先天性代谢障碍: inborn errors of metabolism
唾液酸: sialic acid	纤连蛋白: fibronectin
W	纤溶酶: plasmin
外核酸酶: exonuclease	纤溶酶原: plasminogen
外核酸酶消化: exonucleolytic degradation	纤维状蛋白质: fibrous protein
外肽酶: exopeptidase	酰胺基团: amide group
外源性凝血途径: extrinsic coagulation pathway	显性突变: dominant mutation
烷化剂: alkylating agent	线粒体: mitochondrion(复 mitochondria)
网格蛋白: clathrin	线粒体信号肽: mitochondrial signal peptide
微管蛋白: tubulin	限制性内切核酸酶: restriction endonuclease
微管相关蛋白: microtubule-associated protein (MAP)	限制性片段长度多态性: restriction fragment-length polymorphism (RFLP)
	腺病毒: adenoviruse
	腺苷二磷酸: adenosine diphosphate (ADP)
	腺苷甲硫氨酸: adenosylmethionine

- 腺苷核糖基化: adenosine-ribosylation
 腺苷三磷酸: adenosine 5 -triphosphate (ATP)
 腺苷酸: adenosine monophosphate (AMP)
 腺苷酸残基: adenylate residues
 腺苷酸环化酶: adenylyl cyclase
 adenylate cyclase
 adenylyl cyclase
 腺苷脱氨酶: adenosine deaminase gene
 腺嘌呤: adenine
 消胆胺: cholestyramine
 消化: digestion
 硝化纤维: nitrocellulose
 小 t 抗体: small t antigen
 小沟: minor groove (DNA)
 小核 RNA: small nuclear RNA (snRNA)
 小鼠乳腺癌病毒: mouse mammary tumor virus
 (MMTV)
 效应物分子: effector molecule
 效应元件: response element
 协同性: cooperativity
 心肌梗死: myocardial infarction
 心磷脂: cardiolipin
 锌指基元: zinc-finger motif
 新陈代谢: metabolism
 新生的转录物: nascent transcript
 信号块: signal patch
 信号识别颗粒: signal recognition particle (SRP)
 信号肽: signal peptide
 信号转导: signal transduction
 信使 RNA: messenger RNA (mRNA)
 性状: trait
 胸苷三磷酸: thymidine triphosphate (TTP)
 胸腺嘧啶: thymine
 胸腺嘧啶二聚体: thymine dimer
 溴尿嘧啶: bromouracil
 序列标志位点: sequence tagged site (STS)
 序列差异性: sequence divergence
 序列专一的蛋白质: sequence-specific protein
 血红蛋白: hemoglobin
 血红蛋白病: hemoglobinopathy
 血红素: heme
 血凝块: blood clot
 血纤蛋白: fibrin
 血纤蛋白原: fibrinogen
 血纤肽: fibrinopeptide
 血小板: platelet
 血友病: hemophilia
 Y
 亚胺甲基谷氨酸: formimino glutamate (FIGlu)
 亚基缔合解离: subunit association/dissociation
 亚细胞结构: subcellular structure
 亚油酸: linoleic acid
 烟酸: nicotinic acid (Niacin)
 延胡索酸: fumarate
 延伸泡: elongation bubble
 延伸循环: elongation cycle
 盐桥: salt bridge
 氧分压: oxygen tension
 氧合肌红蛋白: oxymyoglobin
 氧化磷酸化: oxidative phosphorylation
 氧化作用: oxidation
 氧结合机制: oxygen binding mechanism
 氧转运: oxygen transport
 叶绿体: chloroplast
 一级化学反应: first-order chemical reaction
 一氧化碳: carbon monoxide
 胰: pancreas
 胰蛋白酶: trypsin
 胰蛋白酶原: trypsinogen
 胰岛素: insulin
 胰高血糖素: glucagon
 胰糜蛋白酶: chymotrypsin
 胰糜蛋白酶原: chymotrypsinogen
 胰羧肽酶: pancreatic carboxypeptidase
 胰炎: pancreatitis
 遗传病: inherited disease
 遗传连锁图: genetic linkage map
 遗传密码: genetic code
 遗传性结肠癌: hereditary nonpolyposis colon cancer
 (HPCC)
 遗传作图: genetic mapping
 乙醇: ethanol
 乙醇脱氢酶: alcohol dehydrogenase
 乙二醇: ethylene glycol

乙醛酸: glyoxylate	正协同性: positive cooperativity
乙酰 CoA: acetyl CoA	支链氨基酸: branched-chain amino acid
乙酰 CoA 羧化酶: acetyl CoA carboxylase	脂蛋白: lipoprotein
乙酰胆碱: acetylcholine	脂肪肝: fatty liver
乙酰胆碱酯酶: acetylcholinesterase	脂肪生成: lipogenesis
乙酰谷氨酸: acetylglutamate	脂肪酸: fatty acid
乙酰葡糖胺: acetylglucosamine	脂肪酸合酶: fatty-acid synthase (FAS)
乙酰化(作用): acetylation	脂肪酰 CoA: fatty-acyl CoA
乙型肝炎病毒: hepatitis B virus (HBV)	脂肪族氨基酸: aliphatic amino acid
异丙基- β -D-硫代半乳糖苷: isopropyl- β -D-thiogal-actoside (IPTG)	脂肪组织: adipose tissue
异二聚体: heterodimer	脂类: lipids
异构化: isomerization	脂双层: lipid bilayer
异亮氨酸: isoleucine	脂质体: liposome
异柠檬酸脱氢酶: isocitrate dehydrogenase	直接修复: direct repair
异染色质: heterochromatin	直接重复: direct repeat
异肽键: isopeptide linkage	植物细胞: plant cell
异源双链结构: heteroduplex structure	质粒: plasmid
易化扩散: facilitated diffusion	质膜: plasma membrane
荧光素酶: luciferase	致癌剂: carcinogen
有机磷化合物: organophosphorus compound	中间代谢: intermediary metabolism
有丝分裂: mitosis	中间丝: intermediate filament
有丝分裂纺锤丝: mitotic spindle	中期: metaphase
有丝分裂染色体: mitotic chromosome	中心粒: centriole
鱼藤酮: rotenone	终止: termination
原癌基因: protooncogene	珠蛋白: globin
原病毒: provirus	主动转运: active transport
原弹性蛋白酶: proelastase	柱层析: column chromatography
原核生物: prokaryote	专一性: specificity
原肌球蛋白: tropomyosin	转氨作用: transamination
原胶原: tropocollagen	转导: transduction
原生液瘤: primary humor tumor	转化蛋白: transforming protein
原丝: protofilament	转化细胞系: transformed cell line
远端组氨酸: distal histidine	转换数: turnover number
运铁蛋白受体: transferrin receptor (TfR)	转录: transcription
Z	转录物: transcript
杂合性: heterozygosity	转录因子: transcription factor
杂交: hybridization	转染技术: transfection technique
增强子: enhancer	转移 RNA: transfer RNA (tRNA)
兆碱基对: megabase	转运机制: transport mechanism
真核生物: eukaryote	转酯作用: transesterification
整联蛋白: integrin	着色性干皮病: xeroderma pigmentosa
	着丝粒: centromere

- 重链: heavy-chain
 子细胞: daughter cell
 紫外辐射: ultraviolet radiation
 自调节机制: autoregulatory mechanism
 自动催化作用: autocatalytic reaction
 自剪接 RNA: self-splicing RNA
 自磷酸化: autophosphorylation
 自然选择: natural selection
 自杀酶抑制: suicide enzyme inhibition
 自噬: autophagy
 自由能: free energy
 自主复制序列: autonomously replicating sequence (ARS)
 棕榈酸: palmitic acid
 足迹技术: “footprinting” technique
 阻抑物亚基: repressor subunit
 阻抑物转录因子: repressor transcription factor
 组氨酸: histidine
 组氨酸酶: histidase
 组胺: histamine
 组蛋白: histone
 组合机制: combinatorial mechanism
 组织型血纤维蛋白酶原活化因子: tissue-type plasminogen activator (TPA)
 组织因子: tissue factor
 Alu 序列: Alu sequence
 CAAT 框: CAAT box
 C 末端重复域: C-terminal repeat domain (CTD)
 C 值悖理: C-value paradox
 DNA 成环: DNA looping
 DNA 多态性: DNA polymorphism
 DNA 解旋元件: DNA unwinding element (DUE)
 DNA 聚合酶: DNA polymerase
 DNA 连接酶: DNA ligase
 DNA 回旋酶: DNA gyrase
 DNA 拓扑异构酶: DNA topoisomerase
 DNA 乙二醇酯酶: DNA glycolase
 DNA 引发酶: DNA primase
 DNA 结合蛋白: DNA-binding protein
 DNA 酶 1: DNAase-1 (deoxyribonuclease-I)
 DNA 印迹法: Southern blotting
 DNA-DNA 病毒: DNA-DNA virus
 DNA-RNA 病毒: DNA-RNA virus
 FAD 辅酶: FAD coenzyme
 FMN 辅酶: FMN coenzyme
 PEP 羧激酶: PEP carboxykinase
 Poly (A) 聚合酶: Poly (A) polymerase (PAP)
 Poly (A) 尾: Poly (A) tail
 Raf 癌基因: Raf oncogene
 RecA 蛋白: RecA protein
 RGD 基元: RGD motif
 RNA 编辑: RNA editing
 RNA 酶: RNAase
 RNA 印迹法: Northern blotting
 RNA 剪接: RNA splicing
 RNA 聚合酶: RNA polymerase
 RNA 细小核糖核酸病毒: RNA picornavirus
 RNA 引物: RNA primer
 RNA-DNA 杂交物: RNA-DNA hybrid
 RNA-DNA 病毒: RNA-DNA virus
 RNA-RNA 病毒: RNA-RNA virus
 S 形曲线动力学: sigmoidal kinetics
 tRNA 核苷酸转移酶: tRNA nucleotidyl transferase
 Trp 抑制蛋白: Trp repressor protein
 T 抗体: T-antigen
 T 细胞: T-cell
 UDP 葡萄糖: UDP glucose (UDPG)
 V-D-J 重组: V-D-J recombination
 X 射线结晶学: X-ray crystallography
 Y 染色体: Y chromosome
 -片: -sheet
 -氧化: beta oxidation
 -氨基丁酸: -aminobutyric acid (GABA)
 -羧基谷氨酸: -carboxyglutamate

附录 英汉名词对照表

A

- acetylation: 乙酰化(作用)
acetylcholine: 乙酰胆碱
acetylcholinesterase: 乙酰胆碱酯酶
acetyl CoA: 乙酰 CoA
acetyl CoA carboxylase: 乙酰 CoA 羧化酶
N-acetylglucosamine: N-乙酰葡萄糖胺
N-acetylglutamate: N-乙酰谷氨酸
aciclovir: 阿昔洛维(无环鸟苷)
acid-base catalysis: 酸碱催化
acid hydrolase: 酸水解酶
aconitase: 乌头酸酶
actin: 肌动蛋白
actin filament: 肌动蛋白丝
actionmycin D: 放线菌素
activation energy: 活化能
activator: 激活剂
active chromatin: 活性染色质
active sites: 活性部位
active transport: 主动转运
actomyosin: 肌动球蛋白
adenine: 腺嘌呤
adenosine deaminase: 腺苷脱氨酶
adenosine diphosphate (ADP): 腺苷二磷酸
adenosine monophosphate (AMP): 腺苷酸
adenosine-ribosylation: 腺苷核糖基化
adenosine 5'-triphosphate (ATP): 腺苷三磷酸
S-adenosylmethionine (SAM): S-腺苷甲硫氨酸
adenovirus: 腺病毒
adenylate cyclase: 腺苷酸环化酶
adenylate residue: 腺苷酸残基
adenyl cyclase: 腺苷酸环化酶
adhesion protein: 粘着蛋白
adipose tissue: 脂肪组织
affinity chromatography: 亲和层析
AIDS: 艾滋病
alanine: 丙氨酸
alanine aminotransferase (ALT): 丙氨酸转氨酶
alcaptonuria: 尿黑酸尿
alcohol dehydrogenase: 乙醇脱氢酶
aldolase: 醛缩酶
aliphatic amino acid: 脂肪族氨基酸
alkylating agent: 烷化剂
allele: 等位基因
allopurinol: 别嘌呤醇
allosteric effect: 别构效应
allosteric enzyme: 别构酶
Alu sequence: Alu 序列
amide group: 酰胺基团
amino acid: 氨基酸
aminoacyl-tRNA: 氨酰 tRNA
aminoacyl-tRNA synthetase: 氨酰 tRNA 合成酶
-aminobutyric acid (GABA): -氨基丁酸
aminopeptidase: 氨肽酶
aminopterin: 氨基蝶呤
ammonia: 氨
amphipathic α -helix: 两亲性螺旋
ampicillin: 氨苄青霉素
amytal: 氨米妥
animal virus: 动物病毒
antibiotic resistance gene: 抗生素抗性基因
antibody diversity: 抗体多样性
anticodon: 反密码子
antimetabolite: 抗代谢物
antiparallelism: 反平行性
antiport: 对向运输
antithrombin: 抗凝血酶
apoprotein: 脱辅基蛋白质
apoptosis: 编程性细胞死亡
arginase: 精氨酸酶

arginine: 精氨酸
 aromatic amino acid: 芳香族氨基酸
 asparaginase: 天冬氨酸酶
 asparagine: 天冬酰胺
 aspartate: 天冬氨酸
 aspartate aminotransferase: 天冬氨酸转氨酶
 ataxia: 共济现象
 attenuation: 减毒作用
 autocatalytic reaction: 自动催化作用
 autonomously replicating sequence (ARS): 自主复制序列
 autophagy: 自噬
 autophosphorylation: 自磷酸化
 autoregulatory mechanism: 自调节机制
 autosomal inheritance: 常染色体遗传
 5-azacytidine: 5-氨基咪唑核糖基三嗪酮
 AZT (3'-azido-2'-deoxythymidine): 3'-叠氮-2'-脱氧胸腺嘧啶

B

bacterial chromosome: 细菌染色体
 bacteriophage: 噬菌体
 basal laminae: 基板
 base-excision repair: 碱基切除修复
 base pairing: 碱基配对
 basic helix-loop-helix (bHLH) protein: 碱性螺旋-环-螺旋蛋白
 beri-beri: 脚气病
 -globin gene: -珠蛋白基因
 betaine: 甜菜碱
 beta oxidation: -氧化
 -structure: -结构
 -sheet: -片
 B-form DNA: B-形式 DNA
 bidirectional DNA replication: 双向 DNA 复制
 bile pigment: 胆色素
 bilirubin: 胆红素
 biliverdin: 胆绿素
 biochemical: 生物化学的
 biological integration: 生物学的整合
 bisphosphoglycerate (BPG): 二磷酸甘油酸
 blood clot: 血凝块

body temperature: 体温
 branched-chain amino acid: 支链氨基酸
 branch migration: 分支移位
 branch site: 分支位点
 breast cancer: 乳腺癌
 bromouracil: 溴尿嘧啶

C

CAAT box: CAAT 框
 calcitonin: 降钙素
 calcium ion (Ca^{2+}): 钙离子
 calmodulin: 钙调蛋白
 cancer: 癌
 5 cap: 5 帽
 capillary gel electrophoresis: 毛细管凝胶电泳
 capillary transfer: 毛细管转移
 carbamate: 氨基甲酸
 carbamoyl phosphate: 氨甲酰磷酸
 carbon atom: 碳原子
 carbon monoxide: 一氧化碳
 carbonyl group: 羰基
 -carboxylglutamate: -羧基谷氨酸
 -carboxylate group: -羧基
 carboxypeptidase: 羧肽酶
 carcinogen: 致癌剂
 cardiolipin: 心磷脂
 carnitine palmitoyltransferase: 肉碱棕榈酰转移酶
 cascade: 级联
 catabolic gene-activator protein (CAP): 分解代谢基因激活蛋白
 catabolism: 分解代谢
 catalytic amplification: 催化放大
 catecholamine: 儿茶酚胺
 cell: 细胞
 cell-cell interaction: 细胞-细胞相互作用
 cell cycle: 细胞周期
 cell invasion: 细胞侵入
 cell proliferation: 细胞增殖
 cell-signaling mechanism: 细胞信号传递机制
 centriole: 中心粒
 centromere: 着丝粒
 ceramide: 神经酰胺

- chain elongation: 链延伸
- chemotaxis: 趋化性
- chemotherapy: 化疗
- chimeric transcription factor: 嵌合转录因子
- chloramphenicol: 氯霉素
- chloramphenicol acetyl transferase (CAT): 氯霉素乙酰转移酶
- chloroplast: 叶绿体
- cholesterol: 胆固醇
- cholestyramine: 消胆胺
- choline: 胆碱
- chromatin: 染色质
- chromatography: 层析法
- chromatosome: 染色小体
- chromosomal domain: 染色体结构域
- chromosome: 染色体
- chronic myelogenous leukemia: 慢性髓细胞性白血病
- chylomicron: 乳糜微粒
- chymotrypsin: 胰糜蛋白酶
- chymotrypsinogen: 胰糜蛋白酶原
- citrate lyase: 柠檬酸裂合酶
- citrate synthase: 柠檬酸合酶
- citric-acid cycle: 柠檬酸循环
- citrulline: 瓜氨酸
- clathrin: 网格蛋白
- cleavage-polyadenylation specificity factor (CPSF): 切割-聚腺苷酸化专一性因子
- cleavage stimulation factor (CStF): 切割促进因子
- clinical laboratory: 临床实验室
- closed complex: 闭合的复合体
- coagulation pathway: 凝固途径
- codon: 密码子
- coenzyme A (CoA): 辅酶 A
- coenzyme Q: 辅酶 Q
- cofactor: 辅因子
- collagen: 胶原蛋白
- column chromatography: 柱层析
- combinatorial mechanism: 组合机制
- common coagulation pathway: 共同凝固途径
- competitive enzyme inhibition: 竞争性酶抑制
- complementary DNA (cDNA): 互补 DNA
- complementary mutation: 互补突变
- complementary sequence: 互补序列
- complementation group: 互补群
- conservative replacement: 保守性替换
- cooperativity: 协同性
- coronavirus: 冠形病毒
- coupled reaction: 偶联反应
- covalent bond: 共价键
- covalent catalysis: 共价催化
- covalent modification: 共价修饰
- creatine: 肌酸
- creatine kinase (CK): 肌酸激酶
- creatine phosphokinase: 肌酸磷酸激酶
- creatinine: 肌酸酐
- crossover frequency: 交换频率
- cruciform DNA: 十字形 DNA
- C-terminal repeat domain (CTD): C 末端重复域
- C-value paradox: C 值悖理
- cyclic AMP (cAMP): 环腺苷酸
- cyclic nucleotide: 环核苷酸
- cycloheximide: 环己酰亚胺
- cystathionuria: 胱硫醚尿
- cysteine: 半胱氨酸
- cystic fibrosis: 囊性纤维化
- cystic-fibrosis transmembrane-conductance regulator (CFTR): 囊性纤维化跨膜传导蛋白
- cystine: 胱氨酸
- cystinuria: 胱氨酸尿
- cytokinesis: 胞质分裂
- cytoplasm: 细胞质
- cytoplasmic dynein: 胞质动力蛋白
- cytosine: 胞嘧啶
- cytosine arabinoside: 阿糖胞苷
- cytoskeleton: 细胞骨架
- cytosol: 细胞溶胶
- cytotoxicity: 细胞毒性

D

- daughter cell: 子细胞
- deaminating agent: 脱氨剂
- deamination: 脱氨作用

deletion mutagenesis: 缺失诱变
denaturation: 变性
deoxyadenosine triphosphate (dATP): 脱氧腺苷三磷酸
deoxyhemoglobin: 脱氧血红蛋白
deoxymyoglobin: 脱氧肌红蛋白
deoxyribonucleoside diphosphate (dNDP): 脱氧核糖核苷二磷酸
deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP): 脱氧核糖核苷三磷酸
depurination: 脱嘌呤
desmin filament: 结蛋白丝
diabetes mellitus: 糖尿病
diacylglycerol: 二酰甘油
dicoumarol: 双香豆素
differentiation: 分化
diffusion: 扩散
digestion: 消化
dihydrofolate reductase (DHFR): 二氢叶酸还原酶
dihydroxyphenylalanine (DOPA): 二羟苯丙氨酸 (多巴)
dimerization: 二聚化
dinitrophenol: 二硝基酚
dinucleotide repeat: 二核苷酸重复
dipeptidyl-tRNA: 二肽基-tRNA
diphtheria toxin: 白喉毒素
direct repair: 直接修复
direct repeat: 直接重复
dissociation constant: 解离常数
distal histidine: 远端组氨酸
disulfide bridge: 二硫键
DNA (deoxyribonucleic acid): 脱氧核糖核酸
DNAase-1 (deoxyribonuclease-I): DNA 酶 1
DNA-binding protein: DNA 结合蛋白
DNA-DNA viruse: DNA-DNA 病毒
DNA glycolase: DNA 乙二醇酯酶
DNA gyrase: DNA 回旋酶
DNA ligase: DNA 连接酶
DNA looping: DNA 成环
DNA polymerase: DNA 聚合酶
DNA polymorphisms: DNA 多态性

DNA primase: DNA 引发酶
DNA-RNA viruse: DNA-RNA 病毒
DNA topoisomerase: DNA 拓扑异构酶
DNA unwinding element (DUE): DNA 解旋元件
dominant mutation: 显性突变
double helix: 双螺旋
down-regulation: 减量调节
dynamic instability: 动态不稳定性
dynein: 动力蛋白

E

effector molecule: 效应物分子
elastase: 弹性蛋白酶
elastin: 弹性蛋白
electric dipole: 电偶极子
electrochemical gradient: 电化学梯度
electron-transport system: 电子传递系统
electrophoresis: 电泳
electrophoretic mobility shift assay (EMSA): 电泳迁移率变动分析
electrostatic interaction: 静电相互作用
elongation bubble: 延伸泡
elongation cycle: 延伸循环
embryonic hemoglobin: 胚血红蛋白
embryonic stem cell (ES cell): 胚干细胞
endocytosis: 胞吞
endonuclease: 内切核酸酶
endopeptidase: 内肽酶
endoplasmic reticulum (ER): 内质网
endoribonuclease: 内切核糖核酸酶
endosome: 内体
enhancer: 增强子
enolase: 烯醇化酶
enteropeptidase: 肠肽酶
entropy: 熵
enzyme: 酶
enzyme-catalyzed reaction: 酶催化的反应
enzyme-substrate complex: 酶-底物复合物
epidermal growth factor receptor (EGFR): 表皮生长因子受体
epinephrine: 肾上腺素
epithelial tissue: 上皮组织

equilibrium: 平衡
 erythrocyte: 红细胞
 Escherichia coli (E. coli): 大肠杆菌
 estrogen receptor: 雌激素受体
 ethanol: 乙醇
 ethylene glycol: 乙二醇
 euchromatin: 常染色质
 eukaryote: 真核生物
 even-chain fatty acid: 偶数碳链脂肪酸
 exonuclease: 外核酸酶
 exonucleolytic degradation: 外核酸酶消化
 exopeptidase: 外肽酶
 expressed gene: 表达的基因
 extracellular ligand: 胞外配体
 extracellular matrix: 胞外基质
 extracellular signaling molecule: 胞外信号分子
 extrachromosomal DNA: 染色体外 DNA
 extrinsic coagulation pathway: 外源性凝血途径

F

facilitated diffusion: 易化扩散
 F-actin: F-肌动蛋白
 FAD coenzyme: FAD 辅酶
 farnesylation: 法尼基化
 fast protein liquid chromatography: 快速蛋白质液
 相层析
 fatty acid: 脂肪酸
 fatty-acid synthase (FAS): 脂肪酸合酶
 fatty-acyl CoA: 脂肪酰 CoA
 fatty liver: 脂肪肝
 feedback inhibition: 反馈抑制
 ferric-hemoglobin: 高铁血红蛋白
 ferritin: 铁蛋白
 fetal hemoglobin (HbF): 胎儿血红蛋白
 fibrin: 血纤蛋白
 fibrinogen: 血纤蛋白原
 fibrinopeptide: 血纤肽
 fibroblast: 成纤维细胞
 fibronectin: 纤连蛋白
 fibrous protein: 纤维状蛋白质
 first-order chemical reaction: 一级化学反应
 flavoprotein: 黄素蛋白

5-fluorouracil: 5-氟尿嘧啶
 FMN coenzyme: FMN 辅酶
 "footprinting" technique: 足迹技术
 formimino glutamate (FIGlu): 亚胺甲基谷氨酸
 free energy: 自由能
 fructose: 果糖
 fructose-1,6-bisphosphatase: 果糖 1,6-二磷酸酶
 fructose-2,6-bisphosphate: 果糖 2,6-二磷酸
 fructose-6-phosphate: 果糖-6-磷酸
 fructose intolerance: 果糖不耐性
 fructosuria: 果糖尿
 fumarate: 延胡索酸
 functional domain: 功能域
 functional motif: 功能基元

G

galactose: 半乳糖
 galactosemia: 半乳糖血
 -galactoside: -半乳糖苷酶
 gamete: 配子
 ganciclovir: 羟甲基无环鸟苷
 ganglioside: 神经节苷脂
 GC box: GC 框
 GDP: 鸟苷二磷酸
 gel electrophoresis: 凝胶电泳
 gel-mobility shift assay: 凝胶迁移率变动分析
 gene cluster: 基因簇
 gene duplication: 基因重复
 gene expression: 基因表达
 gene knockout: 基因剔除
 gene targeting: 基因寻靶
 gene therapy: 基因疗法
 genetic code: 遗传密码
 genetic linkage map: 遗传连锁图
 genetic mapping: 遗传作图
 genome: 基因组
 genomic DNA: 基因组 DNA
 genotype: 基因型
 globin: 珠蛋白
 globular protein: 球状蛋白质
 glucagon: 胰高血糖素
 glucocorticoid receptor: 糖皮质激素受体

- glucokinase: 葡糖激酶
 gluconeogenesis: 葡糖异生
 glucose: 葡萄糖
 glucose-6-phosphate: 葡糖-6-磷酸
 glucuronic acid: 葡糖醛酸
 glutamate (glutamic acid): 谷氨酸
 glutamate dehydrogenase: 谷氨酸脱氢酶
 glutaminase: 谷酰胺酶
 glutamine: 谷酰胺
 glutathione: 谷胱甘肽
 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶
 glycerol: 甘油
 -glycerolphosphate shuttle: -甘油磷酸穿梭
 glycine: 甘氨酸
 glycocalyx: 糖萼
 glycogen: 糖原
 glycogenolysis: 糖原分解
 glycogen synthase: 糖原合酶
 glycolipids: 糖脂
 glycolysis: 糖酵解
 glycoprotein: 糖蛋白
 glycosaminoglycan (GAG): 糖胺聚糖
 glycosphingolipid: 鞘糖脂
 glycosylation: 糖基化(作用)
 glycosyl transferase 糖基转移酶
 glyoxylate: 乙醛酸
 Golgi apparatus: 高尔基体
 gout: 痛风
 G protein: G 蛋白
 gramicidin: 短杆菌肽
 growth factor: 生长因子
 guanidoacetate: 胍基乙酸
 guanine: 鸟嘌呤
- H
- hairpin loop: 发夹环
 hammerhead ribozyme: 锤头核酶
 heat-shock protein: 热激蛋白
 heavy-chain: 重链
 helicases: 解旋酶
 helix (复 helices): 螺旋
 helix-turn-helix: 螺旋-转角-螺旋
 heme: 血红素
 hemoglobin: 血红蛋白
 hemoglobinopathy: 血红蛋白病
 hemophilia: 血友病
 heparin: 肝素
 hepatitis A virus: 甲型肝炎病毒
 hepatitis B virus (HBV): 乙型肝炎病毒
 hepatocellular carcinoma: 肝细胞癌
 heptamer repeat: 七碱基序列重复
 hereditary nonpolyposis colon cancer (HPCC): 遗传性结肠癌
 herpes simplex virus: 单纯疱疹病毒
 herpesvirus: 疱疹病毒
 heterochromatin: 异染色质
 heterodimer: 异二聚体
 heteroduplex structure: 异源双链结构
 heterogeneous RNA (hnRNA): 不均一 RNA
 heterogenous nucleoprotein particle (hn-RNP): 不均一核蛋白颗粒
 heterozygosity: 杂合性
 hexokinase: 己糖激酶
 hexose: 己糖
 high-density lipoprotein (HDL): 高密度脂蛋白
 high-performance liquid chromatography: 高效液相层析
 hippuric acid: 马尿酸
 histamine: 组胺
 histidase: 组氨酸酶
 histidine: 组氨酸
 histone: 组蛋白
 holoenzyme: 全酶
 homeobox: 同源框
 homocysteine: 高半胱氨酸
 homodimer: 同二聚体
 homologous recombination: 同源重组
 homopolymer: 同聚物
 homozygosity: 纯合性
 hormone: 激素
 host-genome integration: 宿主基因组整合
 housekeeping gene: 管家基因
 housekeeping enzyme: 管家酶

Human Genome Project: 人基因组计划
 human immunodeficiency virus (HIV): 人免疫缺陷病毒
 human T-cell leukemia virus (HTLV): 人 T 细胞白血病病毒
 hyaluronic acid: 透明质酸
 hybridization: 杂交
 hydrogen bond: 氢键
 hydrolytic enzyme: 水解酶
 hydrophobic plot: 亲水性图
 hydrophobic interaction: 疏水相互作用
 hydrophobicity: 疏水性
 hydrophobic residue: 疏水残基
 hydrops fetalis: 胎儿积水
 5-hydroxytryptophan: 5-羟色胺
 hydroxylamine: 羟胺
 hydroxylysine: 羟赖氨酸
 hydroxymethyl glutaryl CoA (HMG CoA): 羟甲戊二酸单酰 CoA
 hydroxyproline: 羟脯氨酸
 hyperbolic curve: 双曲线
 hypersensitive site: 超敏位点

I

I-cell disease: I-细胞病
 icosahedron: 二十面体
 immortalization: 无限增殖化
 immortalized cell line: 无限增殖化细胞系
 immunoglobulin gene: 免疫球蛋白基因
 inborn errors of metabolism: 先天性代谢障碍
 influenza virus: 流感病毒
 inherited disease: 遗传病
 initiation: 起始
 initiation factor (IF): 起始因子
 inosine monophosphate (IMP): 肌苷酸
 inositol phosphate: 肌醇磷酸
 inositol phospholipid: 肌醇磷脂
 inositol trisphosphate: 肌醇三磷酸
 inserted repeat: 插入的重复序列
 insertional mutation: 插入突变
 insulin: 胰岛素
 integral membrane protein: 膜内在蛋白质

integrin: 整联蛋白
 interferon: 干扰素
 intermediary metabolism: 中间代谢
 intermediate filament: 中间丝
 intermolecular force: 分子间力
 intestine: 肠
 intramolecular force: 分子内的力
 intrinsic coagulation pathway: 内源性凝血途径
 intron: 内含子
 inverted repeat: 反向重复
 ion channel: 离子通道
 ion-exchange: 离子交换
 ionic bond: 离子键
 ionophore: 离子载体
 iron-responsive element (IRE): 铁效应元件
 iron-responsive-element binding protein (IRE-BP): 铁效应元件结合蛋白
 irreversible inhibition: 不可逆抑制
 isocitrate dehydrogenase: 异柠檬酸脱氢酶
 isoelectric focusing: 等电聚焦
 isoelectric point: 等电点
 isoenzyme(isozyme): 同工酶
 isoleucine: 异亮氨酸
 isomerization: 异构化
 isopeptide linkage: 异肽键
 isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG): 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷

J

jaundice: 黄疸

K

karyotyping: 核型分析
 keratin: 角蛋白
 keto-acid dehydrogenase: 酮酸脱氢酶
 α -ketoglutarate dehydrogenase: α -酮戊二酸脱氢酶
 ketone body: 酮体
 kidney stone: 肾结石
 kinesin: 驱动蛋白
 kinetochore: 动粒

L

lac operon: 乳糖操纵子
 lactate dehydrogenase (LDH): 乳糖脱氢酶
 lagging strand: 后随链
 laminin: 层粘连蛋白
 lariat structure: 套索结构
 leading strand: 前导链
 lecithin: 卵磷脂
 leucine-zipper: 亮氨酸拉链
 leukemia: 白血病
 ligand: 配体
 linked sequence: 连接的序列
 linker: 连接体
 linoleic acid: 亚油酸
 lipid bilayer: 脂双层
 lipids: 脂类
 lipogenesis: 脂肪生成
 lipoprotein: 脂蛋白
 liposome: 脂质体
 lipotropic factor: 亲脂因子
 locus control region (LCR): 基因座控制区
 long interspersed element (LINE): 长散布元件
 looped-out base: 环外碱基
 low-density lipoprotein (LDL): 低密度脂蛋白
 luciferase: 荧光素酶
 lysine: 赖氨酸
 lysosome: 溶酶体
 lysozyme: 溶菌酶

M

macromolecular structure: 大分子结构
 macromolecule: 大分子
 magnetic resonance: 磁共振
 major groove (DNA): 大沟
 malate shuttle: 苹果酸穿梭
 mammalian cell: 哺乳动物细胞
 mannose-6-phosphate: 甘露糖-6-磷酸
 MAP kinase: MAP 激酶
 maple-syrup urine disease: 槭糖尿病
 megabase: 兆碱基
 megakaryote: 巨核

meiosis: 减数分裂
 melanin: 黑素
 melatonin: 褪黑素
 membrane: 膜
 Mendelian genetics: 孟德尔遗传学
 6-mercaptopurine: 6-巯基嘌呤
 messenger RNA (mRNA): 信使 RNA
 metabolic pathway: 代谢途径
 metabolism: (新陈)代谢
 metal ions: 金属离子
 metaphase: 中期
 met-hemoglobins (Mbm): 高铁血红蛋白
 methionine: 甲硫氨酸
 methotrexate: 氨甲蝶呤
 5-methyl cytosine: 5-甲基胞嘧啶
 methyl guanosine: 甲基鸟苷
 micrococcal nuclease: 微球菌核酸酶
 microtubule-associated protein (MAP): 微管相关蛋白
 minor groove (DNA): 小沟
 mismatch repair: 错配修复
 mitochondria: 线粒体
 mitochondrial signal peptide: 线粒体信号肽
 mitogen-associated protein (MAP): 促分裂原相关蛋白
 mitosis: 有丝分裂
 mitotic chromosome: 有丝分裂染色体
 mitotic spindle: 有丝分裂纺锤丝
 molecular adaptor: 分子连接物
 molecular sieve: 分子筛
 molecule: 分子
 monoamine oxidase: 单胺氧化酶
 mouse mammary tumor virus (MMTV): 小鼠乳腺瘤病毒
 multidrug resistance: 广谱抗药性
 multidrug resistance protein (MDR): 广谱抗药蛋白
 multigene family: 多基因家族
 multiple-protein interaction: 多蛋白相互作用
 multiprotein complex: 多蛋白复合体
 muscle: 肌肉
 mutation: 突变

myocardial infarction: 心肌梗死
 myoglobin: 肌红蛋白
 myosin: 肌球蛋白
 myosin light-chain kinase (MLCK): 肌球蛋白轻链激酶
 myristic acid: 豆蔻酸

N

nascent transcript: 新生的转录物
 native gel electrophoresis: 非变性凝胶电泳
 natural selection: 自然选择
 negative feedback: 负反馈
 nerver impulse: 神经冲动
 neurofibromatosis: 神经纤维瘤
 neurofilament: 神经丝
 neurotransmitter: 神经递质
 neutrophil: 嗜中性粒细胞
 N-formylated peptide: N-甲酰化肽
 nick translation: 切口平移
 nicotinic acid (niacin): 烟酸
 nitrocellulose: 硝化纤维
 noncompetitive inhibition: 非竞争性抑制
 noncovalent interaction: 非共价相互作用
 nonhistone protein: 非组蛋白蛋白质
 norepinephrine: 去甲肾上腺素
 Northern blotting: RNA 印迹法
 nuclear import signal: 核输入信号
 nuclear lamin: 核纤层
 nuclear matrix: 核基质
 nuclear membrane: 核膜
 nuclear receptor: 核受体
 nuclear ribonucleoprotein comple: 核内核糖核蛋白复合体
 nuclear scaffold: 核支架
 nuclease: 核酸酶
 nucleic acid: 核酸
 nucleocapsid: 核壳
 nucleolus: 核仁
 nucleoplasm: 核质
 nucleoprotein: 核蛋白
 nucleoside: 核苷
 nucleoside triphosphate: 核苷三磷酸

nucleosome: 核小体
 nucleotide: 核苷酸
 nucleotidyl transferase: 核苷酸转移酶
 nucleus: 细胞核
 nylon: 尼龙

O

oligosaccharide: 寡糖
 O⁶-methylguanine: O⁶-甲基鸟嘌呤
 O⁶-methylguanine DNA methyltransferase: O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶
 odd-chain fatty acid: 奇数链脂肪酸
 Okazaki fragment: 冈崎片段
 oncogene: 癌基因
 open complex: 开放复合体
 open-reading frame: 可读框
 operon: 操纵子
 orbital steering: 轨道导向
 organelle: 细胞器
 organophosphorus compound: 有机磷化合物
 organ: 器官
 origin recognition complex (ORC): 起点识别复合体
 origin recognition element (ORE): 起点识别元件
 ornithine: 鸟氨酸
 ornithine decarboxylase: 鸟氨酸脱羧酶
 ornithine transcarbamoylase: 鸟氨酸转甲酰酶
 orotidine monophosphate (OMP): 乳清苷酸
 osteogenesis imperfecta: 成骨不全
 oxalic acid: 草酸
 oxaloacetate: 草酰乙酸
 oxidation: 氧化作用
 oxidative phosphorylation: 氧化磷酸化
 oxygen binding mechanism: 氧结合机制
 oxygen tension: 氧分压
 oxygen transport: 氧转运
 oxymyoglobin: 氧合肌红蛋白

P

palindrome: 回文序列
 palmitic acid: 棕榈酸
 pancreas: 胰

- pancreatic carboxypeptidase: 胰羧肽酶
- pancreatitis: 胰炎
- pantothenic acid: 泛酸
- papilloma virus: 乳头瘤病毒
- paramyxovirus: 副粘病毒
- partial pressure: 分压
- passive diffusion: 被动扩散
- pellagra: 糙皮病
- pentose-phosphate pathway: 戊糖磷酸途径
- PEP carboxykinase: PEP 羧激酶
- pepsin: 胃蛋白酶
- pepsinogen: 胃蛋白酶原
- peptide bond: 肽键
- peptide hormone: 肽激素
- peripheral membrane protein: 膜外周蛋白
- periplasmic space: 壁膜间隙
- peroxisome: 过氧化物酶体
- phagocytosis: 吞噬
- phenotype: 表现型
- phenylalanine: 苯丙氨酸
- phenylketonuria (PKU): 苯丙酮尿
- Philadelphia chromosome: 费城染色体
- 3-phosphoglycerate: 3-磷酸甘油酸
- 6-phosphogluconate: 6-磷酸葡糖酸
- phosphate: 磷酸酯, 磷酸盐
- phosphatidylcholine: 磷脂酰胆碱
- phosphatidylethanolamine: 磷脂酰乙醇胺
- phosphatidylinositol: 磷脂酰肌醇
- phosphatidylserine: 磷脂酰丝氨酸
- phosphoamino acid: 磷酸氨基酸
- phosphodiester bond: 磷酸二酯键
- phosphodiesterase: 磷酸二酯酶
- phosphoenolpyruvate: 磷酸烯醇丙酮酸
- phosphofructokinase (PFK): 磷酸果糖激酶
- phosphoglucose isomerase: 磷酸葡糖异构酶
- phosphoglyceratmutase: 磷酸甘油酸变位酶
- phospholipase: 磷脂酶
- phospholipid: 磷脂
- phosphoribosylpyrophosphate (PRPP): 磷酸核糖
焦磷酸
- phosphorylase: 磷酸化酶
- phosphorylation: 磷酸化(作用)
- phosphosphingolipid: 磷酸鞘脂
- photosynthesis: 光合作用
- phylogenetic data: 系统发生数据
- plant cell: 植物细胞
- plasma membrane: 质膜
- plasmid: 质粒
- plasmin: 纤溶酶
- plasminogen: 纤溶酶原
- platelet: 血小板
- point mutation: 点突变
- poison antidote: 毒物解毒剂
- poliovirus: 脊髓灰质炎病毒
- polyacrylamide gel: 聚丙烯酰胺凝胶
- polyadenylation: 多腺苷酸化
- poly ADP-ribosylation: 多 ADP-腺苷酸化
- polyamine: 多胺
- polycistronic mRNA: 多顺反子 mRNA
- polymerase chain reaction (PCR): 聚合酶链反应
- polypeptide chain: 多肽链
- poly (A) polymerase (PAP): poly (A) 聚合酶
- poly (A) tail: poly (A) 尾
- polysaccharide: 多糖
- polysome: 多核糖体
- porphyrin: 卟啉
- positive cooperativity: 正协同性
- posttranslational modification: 翻译后修饰
- potassium cyanate: 氰酸钾
- primary humor tumor: 原生液瘤
- probe: 探针
- procarboxypeptidase: 羧肽酶原
- processivity: 持续合成能力
- procollagen: 前胶原
- product inhibition: 产物抑制
- proelastase: 原弹性蛋白酶
- prokaryote: 原核生物
- proline: 脯氨酸
- promotor: 启动子
- proofreading: 校正
- propeptide: 前肽
- propionyl CoA: 丙酰 CoA
- prosthetic group: 辅基
- protease: 蛋白酶

- protein: 蛋白质
- protein kinase: 蛋白激酶
- protein phosphatase: 蛋白磷酸酶
- protein splicing: 蛋白质剪接
- protein synthesis: 蛋白质合成
- protein targeting: 蛋白质到位
- protein turnover: 蛋白质周转
- proteoglycan: 蛋白多糖
- proteolysis: 蛋白酶水解
- proteolytic cascade: 蛋白酶水解级联
- proteasome: 蛋白体
- prothrombin: 凝血酶原
- protofilament: 原丝
- protooncogene: 原癌基因
- provirus: 原病毒
- proximal histidine: 近端组氨酸
- pseudogene: 假基因
- pseudo-substrate sequence: 假底物序列
- purine: 嘌呤
- puromycin: 嘌呤霉素
- pyridoxal phosphate: 磷酸吡哆醛
- pyrimidine: 嘧啶
- pyruvate: 丙酮酸
- pyruvate carboxylase: 丙酮酸羧化酶
- pyruvate decarboxylase: 丙酮酸脱羧酶
- pyruvate dehydrogenase: 丙酮酸脱氢酶
- pyruvate kinase: 丙酮酸激酶
- Q
- quaternary structure: 四级结构
- R
- radiation: 辐射
- Raf oncogene: Raf 癌基因
- random coil: 无规卷曲
- rational drug design: 合理的药物设计
- reading frame: 读框
- reassociation: 重新组合, 复性
- RecA protein: RecA 蛋白
- receptor protein kinase: 受体蛋白激酶
- receptor: 受体
- recognition helix: 识别螺旋
- recombinant DNA technology: 重组 DNA 技术
- recombination: 重组
- red blood cell: 红细胞
- renaturation: 复性
- repetitive DNA: 重复 DNA
- replicase: 复制酶
- replication: 复制
- replication bubble: 复制泡
- replication fork: 复制叉
- replisome: 复制体
- reporter gene: 报道基因
- repressor subunit: 阻抑物亚基
- repressor transcription factor: 阻抑物转录因子
- response element: 效应元件
- restriction endonuclease: 限制性内切核酸酶
- restriction fragment-length polymorphism (RFLP): 限制性片段长度多态性
- retinoblastoma (Rb) gene: 成视网膜细胞瘤基因
- retinoic acid (RAR) receptor: 视黄酸受体
- retroviral vector: 逆转录病毒载体
- retrovirus: 逆转录病毒
- reverse genetics: 反求遗传学
- reverse-phase chromatography: 反相层析
- reverse transcriptase: 逆转录酶
- reverse transcription: 逆转录
- reverse turn: 回折
- reversible inhibition: 可逆抑制
- RGD motif: RGD 基元
- rhabdovirus: 弹状病毒
- rhinovirus: 鼻病毒
- rhodopsin: 视紫红质
- riboflavin: 核黄素
- ribonuclease (RNase): 核糖核酸酶
- ribonucleoprotein complex: 核糖核蛋白复合体
- ribonucleoside diphosphate (rNDP): 核糖核苷二磷酸
- ribonucleotide reductase: 核糖核苷酸还原酶
- ribosomal pausing: 核糖体暂停
- ribosomal RNA (rRNA): 核糖体 RNA
- ribosomal S6 kinase (Rsk): 核糖体 S6 激酶
- ribosome: 核糖体
- ribosome binding assay: 核糖体结合试法

ribozyme: 核酶
 ricin: 蓖麻毒蛋白
 rifamycin: 利福霉素
 RNA (ribonucleic acid): 核糖核酸
 RNAase: RNA 酶
 RNA-DNA hybrid: RNA-DNA 杂交物
 RNA-DNA virus: RNA-DNA 病毒
 RNA editing: RNA 编辑
 RNA picornavirus: RNA 细小核糖核酸病毒
 RNA polymerase: RNA 聚合酶
 RNA primer: RNA 引物
 RNA-RNA virus: RNA-RNA 病毒
 RNA splicing: RNA 剪接
 rotenone: 鱼藤酮

S

salt bridge: 盐桥
 sarcoplasmic reticulum: 肌质网
 satellite DNA: 卫星 DNA
 scurvy: 坏血病
 SDS (sodium dodecyl sulfonate) gel electrophoresis: 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳
 second law of thermodynamics: 热力学第二定律
 second messenger system: 第二信使系统
 secretory vesicle: 分泌小泡
 sedimentation coefficient: 沉降系数
 self-splicing RNA: 自剪接 RNA
 semiconservative DNA replication: 半保留 DNA 复制
 Semliki forest virus: 塞姆利基森林病毒
 sequence divergence: 序列差异性
 sequence-specific protein-DNA interaction: 序列专一的蛋白质-DNA 相互作用
 sequence tagged site (STS): 序列标志位点
 serine: 丝氨酸
 serine protease: 丝氨酸蛋白酶
 serotonin: 5-羟色胺
 short interspersed element (SINE): 短散布元件
 sialic acid: 唾液酸
 sickle cell trait: 镰状细胞性状
 sigmoidal kinetics: S 形曲线动力学
 signal patch: 信号块

signal peptide: 信号肽
 signal recognition particle (SRP): 信号识别颗粒
 signal transduction: 信号转导
 single-strand binding protein (SSB): 单链结合蛋白
 site-directed mutagenesis: 定点诱变
 site-specific recombination: 位点专一重组
 skeletal muscle: 骨骼肌
 skin cancer: 皮肤癌
 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP): 核内小核糖核蛋白
 small nuclear RNA (snRNA): 小核 RNA
 smallpox virus: 天花病毒
 small t antigen: 小 t 抗体
 solenoid: 螺线管
 solute molecule: 溶质分子
 somatic cell: 体细胞
 Southern blotting: DNA 印迹法
 specificity: 专一性
 sphingomyelin: 鞘磷脂
 spliceosome: 剪接体
 steric hindrance: 空间位阻
 steroid hormone: 类固醇激素
 streptomycin: 链霉素
 structural domain: 结构域
 subcellular structure: 亚细胞结构
 substrate: 底物
 subtilisin: 枯草杆菌蛋白酶
 subunit association/dissociation: 亚基缔合解离
 succinate dehydrogenase: 琥珀酸脱氢酶
 succinylcholine: 琥珀酰胆碱
 succinyl CoA synthetase: 琥珀酰 CoA 合成酶
 suicide enzyme inhibition: 自杀酶抑制
 sulfur amino acid: 含硫氨基酸
 supercoiling: 超螺旋
 supracellular structure: 超细胞结构
 symport: 同向转运
 synapse: 突触

T

tandem array: 级联排列
 tandem repeat: 级联重复

- T-antigen: T 抗体
- Taq polymerase: Taq 聚合酶
- target cell: 靶细胞
- targeted gene transfer: 定向基因转移
- TATA binding protein (TBP): TATA 结合蛋白
- TATA box: TATA 框
- taurine: 牛磺酸
- TBP-associated factor (TAF): TBP 关联因子
- T-cell: T 细胞
- telomere: 端粒
- template strand: 模板链
- termination: 终止
- tertiary structure: 三级结构
- tetracycline: 四环素
- tetrahydrofolate: 四氢叶酸
- thalassemia: 地中海贫血
- threonine aldolase: 苏氨酸醛缩酶
- thermodynamics: 热力学
- thiamin: 硫胺素
- thiamine pyrophosphate (TPP): 硫胺素焦磷酸
- threonine: 苏氨酸
- threonine dehydratase: 苏氨酸脱水酶
- thrombin: 凝血酶
- thymidine-kinase gene promoter: 胞苷激酶基因启动子
- thymidine triphosphate (TTP): 胸苷三磷酸
- thymine: 胸腺嘧啶
- thymine dimer: 胸腺嘧啶二聚体
- thyroxine: 甲状腺素
- tight junction: 紧密连接
- tissue factor: 组织因子
- tissue-type plasminogen activator (TPA): 组织型血纤维蛋白酶原活化因子
- topoisomerase: 拓扑异构酶
- topological domain: 拓扑域
- trace element: 痕量元素
- trait: 性状
- transamination: 转氨作用
- transcript: 转录物
- transcription: 转录
- transcription factor: 转录因子
- transduction: 转导
- transesterification: 转酯作用
- transfection technique: 转染技术
- transferrin receptor (TfR): 运铁蛋白受体
- transfer RNA (tRNA): 转移 RNA
- transformed cell line: 转化细胞系
- transforming protein: 转化蛋白
- transient cotransfection assay: 瞬时共转染试法
- transition state: 过渡态
- translation: 翻译
- translational frameshifting: 翻译移码
- translational read-through: 翻译连读
- translocation chromosome: 染色体易位
- transmembrane protein: 跨膜蛋白
- transport mechanism: 转运机制
- triacylglycerol: 三酰甘油
- tricarboxylic-acid cycle: 三羧酸循环
- triglyceride: 甘油三酯
- triiodothyronine: 三碘甲腺原氨酸
- trinucleotide repeat: 三核苷酸重复
- triplet: 三联体
- tRNA nucleotidyl transferase: tRNA 核苷酸转移酶
- tropocollagen: 原胶原
- tropomyosin: 原肌球蛋白
- troponin: 肌钙蛋白
- Trp repressor protein: Trp 抑制蛋白
- trypsin: 胰蛋白酶
- trypsinogen: 胰蛋白酶原
- tryptophan: 色氨酸
- tubulin: 微管蛋白
- tumorigenic cell line: 生瘤的细胞系
- tumor-suppressor gene: 癌抑制基因
- turnover number: 转换数
- two-dimensional gel electrophoresis: 双向凝胶电泳
- tyrosine: 酪氨酸
- tyrosine kinase: 酪氨酸激酶
- tyrosine phosphorylation: 酪氨酸磷酸化

U

- ubiquitin: 遍在蛋白
- UDP glucose (UDPG): UDP 葡萄糖

ultraviolet radiation: 紫外辐射

uncompetitive inhibition: 非竞争性抑制

unidirectional DNA replication: 单向 DNA 复制

uniporter protein: 单向转运蛋白

up-regulation of enzyme: 酶的失控

uracil: 尿嘧啶

urea: 脲

urea cycle: 脲循环

uric acid: 尿酸

uroporphyrinogens: 尿卟啉原

V

v_0 reaction rate: v_0 反应速率

van der Waals force: 范德华力

V-D-J recombination: V-D-J 重组

very-low-density lipoprotein (VLDL): 极低密度脂蛋白

vimentin filament: 波形蛋白丝

viral envelope: 病毒被膜

virion: 病毒体

virus: 病毒

vitamin: 维生素

W

wobble hypothesis: 摆动假说

X

xeroderma pigmentosa: 着色性干皮病

X-ray crystallography: X 射线结晶学

Y

Y chromosome: Y 染色体

yeast artificial chromosome (YAC): 酵母人工染色体

yeast cells: 酵母细胞

Z

zero-time reassociation: 零时重缔合

zinc-finger motif: 锌指基元

zymogen: 酶原