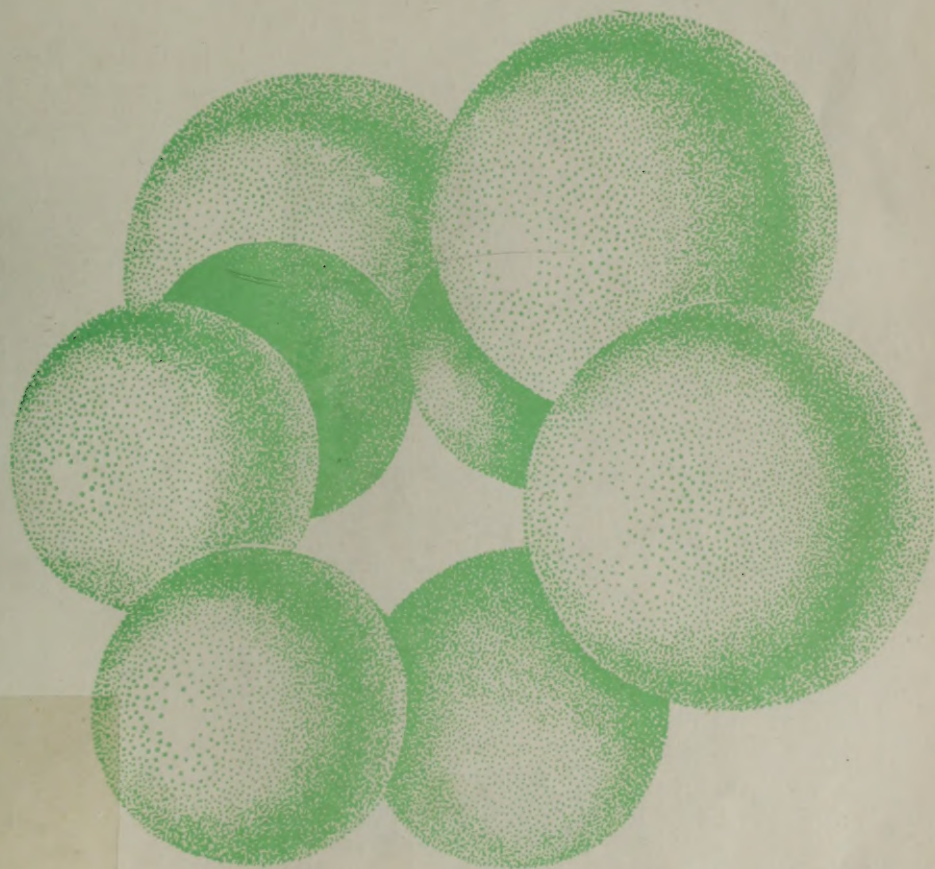


DANBAIZHI FENZI JICHU

蛋白质分子基础

陶慰孙等编著



人民教育出版社

58.17421
475

蛋白质分子基础

陶慰孙 李 惟 姜涌明

罗贵民 林永齐

编著



蛋白质分子基础

陶慰孙 李 惟 姜涌明
罗贵民 林永齐

中科院植物所图书馆

S0050323

人民教育出版社

82.12.17 刘子细 侯

内 容 简 介

本书共十四章，除绪言一章介绍蛋白质的重要性及有关问题而外，其余十三章主要介绍了蛋白质的分离与精制、蛋白质的一级结构测定、化学修饰、蛋白质的立体结构、结构和功能的某些问题、酶的催化原理和酶催化反应动力学等方面。书末列有简单的附表。

本书可作综合大学生生化专业的大学生、研究生以及青年教师的专业参考用书，其中的某些章节对医、农、师范院校以及从事蛋白质工作的有关人员也会有所帮助。

陶慰孙 李 惟 姜涌明

罗贵民 林永齐



蛋 白 质 分 子 基 础

陶慰孙 李 惟 姜涌明 编著
罗贵民 林永齐

人民教育出版社出版

新华书店北京发行所发行

河北省香河县印刷厂印装

开本 787×1092¹/₁₆ 印张 27 字数 620,000

1981年6月第1版 1982年8月第2次印刷

印数 5,801—10,800

书号 13012·062 定价 1.95 元

Handwritten notes in blue ink at the bottom right of the page, including the name '陶慰孙' and other illegible characters.

序

近些年来，以生物大分子为核心的分子生物学发展非常迅速。与之有关的各种书籍也极其繁多。国外的情况自不必谈，国内的情况近年来也大有改观。除了一些翻译书而外，也有了一些自编的普通生物化学教科书，实验参考书以及一些专门性的小册子。但是，我们在工作中仍感到缺少蛋白质和酶方面的教学参考用书。本书即是应专业教学和自学上的需要而作的一种尝试。

“蛋白质分子基础”一书以我们自编的专业教材“生物大分子的结构与功能”为基础，在编写中，从章节的按排上，内容的深度和广度上，都作了较大的改动和增添。“蛋白分子”所涉及的范围极其广泛，但本书的目的只是作为教学参考书，因此，只注重蛋白质和酶的基本原理的阐述，既不专门论述个别蛋白质和酶类，也不过多的涉及蛋白质和酶类在医、农、工等方面的应用。这样，本书的重点主要放在以下几个方面：①、蛋白质（酶）的纯化和分析的基本原理。本书的这一部分与一般参考书写法不同，我们认为这是非常实用的一部分，仅仅说明方法的原理是不够的，应该简要地说明方法的要点和某些成熟的经验，以求对教师 and 学生的实际工作有所帮助。②、一、二、三、四级结构及其与功能的关系。③、酶催化活性的结构基础及反应动力学的某些问题。全书力求既能较清楚地阐述与蛋白分子有关的基本问题，又尽可能地反映现代科学的发展水平。应该说明的是，书中个别处引用了我们自己的工作，如尿激酶和固氮酶的某些成熟并公开发表了的结果。另外，为了学习上的方便，在每章之后列了一些问题和习题，以增进对内容的理解。习题中的一部分是我们自己作的，一部分取自有关的参考书。

由于科学日新月异的发展，文献资料非常多，而我们编写人员的水平又极有限，在书中必然要出现各种各样的错误与不足，望读者提出批评和指正。

本书在编写过程中，得到了许多同志的帮助和鼓励，特别是韩素珍、刘兰英、程文继、张德安、李青山等同志对本书的某些章节提出了宝贵的改进意见。江福康、程玉华、傅海荣、杨世忱、赵静宜等同志为本书的编写提供了多方面的帮助和鼓励，在此一并予以感谢。

陶慰孙

吉林大学化学系生化教研室

1980年3月

目

录

第一章 绪言	1
一、蛋白质在生物体内的重要作用	1
二、生物化学与分子生物学	2
三、新技术的采用促进了生命科学的发展	2
四、蛋白质的应用与现实生活	3
第二章 蛋白质的组成	5
第一节 氨基酸	5
一、氨基酸的构型	8
二、氨基酸的酸碱性质与 pK 值	10
三、氨基酸的反应	14
第二节 蛋白质的其它组分	17
习题	18
参考文献	18
第三章 蛋白质的分离、提纯与 纯度标准	20
第一节 蛋白质的酸碱性质	20
第二节 蛋白质提纯的一般方法	22
第三节 材料的选择与处理	24
一、材料的选择	24
二、细胞破碎的方法	25
三、抽提	26
第四节 蛋白质的初步提纯	27
一、蛋白质性质上差异的利用	27
二、沉淀技术	28
三、透析与浓缩	32
第五节 蛋白质的进一步提纯	34
一、层析方法的一般原理	34
二、分配层析	37
三、逆流分配	39
四、吸附层析	41
五、离子交换层析	43
六、凝胶过滤	54
七、亲和层析	64
八、超离心法	69
九、电泳法	75
十、蛋白质的结晶	87
第六节 纯化步骤的顺序编排	88

第七节 提纯过程中的定量	89
一、分光光度测定法的原理	89
二、蛋白质浓度的测定	92
第八节 纯度标准	93
习题	95
参考文献	95
第四章 蛋白质分子量的测定	98
第一节 分子量的平均值	98
第二节 最小二乘法的应用	99
第三节 超离心沉降速度法	101
第四节 沉降平衡法	103
第五节 凝胶色谱法(凝胶层析法) 测定分子量	103
一、凝胶柱层析测定分子量	103
二、凝胶薄层板析测定分子量	105
第六节 十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺 凝胶电泳法	106
习题	106
参考文献	108
第五章 蛋白质一级结构的测定	109
第一节 蛋白质一级结构研究的程序	109
第二节 蛋白质和肽的氨基酸组成的测定	110
一、蛋白质的水解	110
二、氨基酸的定性分析	111
三、氨基酸的柱层析定量测定	112
第三节 蛋白质中特殊基团的测定	113
一、色氨酸的测定	114
二、巯基测定	114
三、二硫键的测定	116
四、氨基和酰胺基的测定	117
第四节 蛋白质和肽的末端测定	118
一、N-末端的测定	118
二、C-末端的测定	121
第五节 蛋白质中肽链的拆离和分离提纯	122
一、温和条件下拆离亚单位	122
二、二硫键的拆开	122
三、肽链的鉴定及分离	123

第六节 肽链的部分裂解及肽片段的分离.....123	一、蛋白质修饰试剂和修饰条件的选择..... 161
一、肽链的部分裂解..... 123	二、修饰程度和修饰部位的测定..... 162
二、肽链部分裂解后肽片段的分离..... 127	第三节 蛋白质侧链的修饰..... 163
第七节 肽段氨基酸排列顺序的测定..... 128	第四节 亲和标记..... 171
一、苯异硫氰酸解法(Edman 降解法)..... 128	第五节 光化学标记..... 172
二、DNS-Cl-Edman 方法..... 130	第六节 敏化光氧化..... 173
三、蛋白质顺序测定仪..... 131	第七节 双功能试剂..... 173
四、酶解法测定顺序..... 131	第八节 化学修饰的某些应用..... 175
第八节 从已知顺序肽段复现肽链的	习题..... 176
一级结构..... 132	参考文献..... 176
一、N-端基肽段的确定..... 132	第八章 蛋白质分子构象..... 178
二、C-端基肽段的确定..... 133	第一节 引言..... 178
三、重迭肽..... 133	第二节 维持蛋白质分子构象的化学键..... 179
第九节 蛋白质分子中二硫桥及	一、氢键..... 179
酰胺基位置的确定..... 134	二、疏水键..... 181
一、二硫桥位置的确定..... 134	三、范德华引力..... 181
二、酰胺基位置的确定..... 134	四、离子键..... 181
第十节 蛋白质一级结构测定的实例..... 135	五、配位键..... 182
一、胰岛素一级结构的测定..... 135	六、二硫键..... 182
二、巴氏梭菌固氮酶组分——铁蛋白的氨基酸	第三节 X-射线结构分析的基本原理..... 182
排列顺序..... 137	一、晶体结构的基本知识..... 183
第十一节 蛋白质一级结构研究展望..... 139	二、X-射线结构分析的基本原理..... 184
第十二节 蛋白质的一级结构与生物	三、单晶回转法基本原理..... 187
进化..... 139	第四节 蛋白质分子的二、三级结构..... 189
习题..... 141	一、蛋白质的立体结构原理..... 189
参考文献..... 142	二、球蛋白分子的二、三级结构..... 198
第六章 蛋白质的化学合成..... 143	第五节 蛋白质分子的四级结构..... 216
第一节 液相合成法的基本原理..... 143	一、基本概念..... 216
一、基团的保护..... 144	二、亚单位之间的结合力..... 216
二、酰胺键形成的缩合反应..... 146	三、四级结构..... 217
三、胰岛素的液相合成..... 147	第六节 纤维状蛋白的构象..... 221
四、RNA 酶的液相合成..... 150	一、 α -角蛋白组..... 221
第二节 固相合成法的基本原理..... 150	二、丝心蛋白组..... 222
习题..... 153	三、胶原组..... 222
参考文献..... 153	思考题..... 223
第七章 蛋白质的化学修饰..... 154	参考文献..... 224
第一节 化学修饰的原理..... 154	第九章 溶液中蛋白质分子构象的研究
一、影响蛋白质功能基反应性的各因素..... 154	方法及蛋白质变性..... 225
二、有关蛋白质功能基反应性的几个问题..... 156	第一节 溶液中蛋白质分子构象的
三、修饰剂反应性的决定因素..... 159	研究方法..... 225
第二节 化学修饰的方法学..... 160	一、紫外吸收法..... 225

二、荧光光谱法	227
三、旋光色散和圆二色性	231
四、三种新技术的简单介绍	236
1. 核磁共振	236
2. 激光拉曼光谱	238
3. 中子衍射	238
第二节 蛋白质的变性	239
一、蛋白质变性的基本概念	239
二、各种变性因素对蛋白质构象的影响	241
三、变性产物的构象	248
四、复性	248
五、抗变性手段	249
思考题	250
参考文献	251
第十章 蛋白质分子构象与功能的关系	252
第一节 血红蛋白分子构象与功能的关系	252
一、血红蛋白的变构作用与 O ₂ 的运输	253
二、DPG 对血红蛋白氧亲和力的影响	255
三、H ⁺ 浓度、CO ₂ 分压对血红蛋白氧亲和力的影响	256
四、血红蛋白分子病	258
第二节 细胞色素 c 分子构象与功能的关系	260
思考题	262
参考文献	262
第十一章 蛋白质分子相互作用	263
第一节 蛋白质分子相互作用概述	263
一、亚单位的聚合与解离	263
二、分子杂交	263
三、分子聚合	263
四、分子识别	266
五、自装配	266
六、多酶复合物	266
七、非酶蛋白改变寡聚酶的专一性	267
八、双功能寡聚酶	267
第二节 肌肉收缩的分子机理	268
一、肌原纤维的结构	268
二、粗丝结构	270
三、细丝结构	271
四、肌肉收缩的分子机理	272

第三节 血液凝固的分子机理	273
一、凝血因子	273
二、血液凝固的分子机理	273
第四节 抗体与抗原、补体的相互作用	280
一、IgG 和 IgM 的结构	281
二、抗原与抗体的相互作用	286
三、补体的激活	286
思考题	288
参考文献	288
第十二章 酶的结构与活性	290
第一节 酶催化活性的结构基础	290
一、活性部位	290
二、催化部位与底物结合部位	292
三、活性部位的研究方法	297
四、别构部位	303
五、酶的专一性与诱导契合理论	304
六、酶原激活	310
七、同工酶	312
第二节 酶的催化机制	313
一、过渡态与活化能	313
二、微观可逆性	315
三、降低活化自由能的几个因素	315
四、酶催化反应机制的实例	321
习题	328
参考文献	328
第十三章 酶催化反应动力学	330
第一节 酶催化反应初速的测定	330
一、反应速度	330
二、酶对催化反应速度的影响	331
三、初速的测定	332
第二节 底物浓度对催化反应速度的影响	334
一、中心复合物的存在	334
二、单底物-单产物系统(S ⇌ P 系统)	335
三、双底物双产物反应	350
第三节 酶浓度与催化反应速度	360
一、酶浓度与反应初速的关系	360
二、两个实际问题	364
第四节 抑制剂和活化剂对催化反应速度的影响	366
一、竞争性抑制	367

二、非竞争性抑制剂	369
三、反竞争性抑制	371
四、线性混合型抑制	372
五、酶催化反应的活化剂	375
第五节 pH 对酶催化反应速度的影响	377
一、pH 对酶稳定性的影响	377
二、pH 与催化反应速度	379
第六节 温度对酶催化反应速度的影响	384
一、酶的热稳定性与最适温度	384
二、酶催化反应的温度系数 Q_{10}	384
第七节 变构酶(别构酶)与协同性	386
一、催化反应速度与底物浓度的双曲线及 S 形曲线	386
二、简化的变构酶的速度方程——Hill 方程	388
三、M.W.C. 模型	390
四、Koshland 序变模型(KNF 理论)	394
习题	395

参考文献	399
第十四章 辅酶	400
一、与转移氢(电子)有关的辅酶(氧化还原反应的辅酶)	400
二、与其他基团(除氢而外)转移有关的辅酶	405
参考文献	413
附录一、蛋白质的存在与分类	414
附录二、酶的命名和分类	417
附录三、固体硫酸铵添加量与浓度(饱和度)的关系	420
附录四、离子交换树脂	421
附录五、Whatman 离子交换纤维素的有关数据	422
附录六、DNP 氨基酸纸层析几种常用试剂	423
附录七、分离 DNS 氨基酸用的溶剂系统	424

第一章 绪 言

组成生物体的成分很复杂,有许多的有机分子和无机离子,也有各种各样的生物大分子。如多糖类的纤维素、淀粉,蛋白质和核酸。这些大分子、小分子在生物体内都担负着不同的任务,但是蛋白质和核酸的作用最重要,是和生命直接相关的两类物质。

一、蛋白质在生物体内的重要作用

生命最基本的特性是能够进行新陈代谢和自我复制。活的有机体从环境中得到物质和能量,用以本身的繁殖,并能发生传给后代的永久变化。就这一生命的重要过程来说,脱氧核糖核酸当然是第一位的。它是基因的载体。但是蛋白质也是极重要的,没有各种蛋白质的作用,DNA的复制,信息的转录,遗传密码的翻译都无从谈起。众所周知,DNA大分子是由糖、磷酸基团交替组成的长链,碱基连在糖环上,是两条互绕的双螺旋。DNA的复制首先是两股链分开,然后以每股单链作为模板,依碱基配对原理形成新链,两股链精确地复制出四种碱基的特定顺序,产生了两个与原来全同的双螺旋。因遗传信息贮存于DNA碱基顺序之中,因此,每一世代必然保持这个顺序。DNA分子并不直接支配蛋白质的生物合成,DNA分子的遗传信息要转录到信使RNA分子上,信使RNA成为蛋白质合成的直接模板。每一种氨基酸都分别结合于转移RNA分子上,一个转移RNA只能结合一个特定的氨基酸,此转移RNA携带氨基酸在核糖体上进行蛋白质的生物合成。可以说,上述过程不管是那一步都离不开蛋白质的作用。就以DNA链复制来说,并不是只要有了各种核苷酸等基本材料,DNA就能正确地复制。为了合成出一种具有生物活性的DNA,人们花费了十多年的时间才发现了DNA聚合酶的作用。就目前所知,DNA复制过程是极其复杂的,DNA是由一个多酶的复合体,有时称之为“复制装置”来复制的。DNA聚合酶是其中的一个组份,它是以DNA碱基顺序为指令催化聚合的酶系。最近对“复制装置”的另一成分也有所了解,一般称这种组份为“螺旋-去稳定蛋白”,有时也叫作HD-蛋白质。是一种分子量较小的蛋白质。这种蛋白质紧密地、协同地、特异地结合到单链上,大大降低了细胞内DNA螺旋解链的热力学值。除了这两类蛋白质而外,还有其他一系列蛋白质与DNA聚合酶和螺旋-去稳定蛋白共同构成“复制装置”。虽然,目前对这些成分知道得并不详细,但已取得了很大进展。现已有可能利用原核的酶系统在离体条件下重现DNA复制的大多数反应,充分揭示了DNA的复制是一种依赖于多种蛋白质作用的复杂过程。不仅DNA复制过程如此,遗传信息的转录也是由RNA聚合酶来催化的。这个过程要有高度的准确性,酶系统必需保证正确地读出碱基顺序,以及为选择转录的适当地点作准备等。核糖体是个翻译的核心,这是一个含有RNA和蛋白质的颗粒,由两个亚单位组成,大的亚单位比小的大一倍左右。较小的亚单位结合着信息组分,较大的亚单位结合着正在合成的蛋白质链和正在进入的氨基酸转移RNA。新近的研究证明,核糖体内各种蛋白质具有结合信息、翻译起始、转位、肽链延长、终止及释放等多种机能。

生物体内的蛋白质的种类极其繁多,分布极其广泛,所担负的任务也是多种多样的。除了上述过程涉及蛋白质而外,众所周知,构成生物体新陈代谢的几乎全部的化学反应都是在活性蛋白质——酶的催化下进行的。现在,已知的酶没有一个不是蛋白质的。此外,高等动物的免疫反应,也主要是通过蛋白质来完成的。运动时的肌肉收缩,运输氧和营养物质的载体以及结缔、皮肤、毛发等也都是靠蛋白质实现的。最近的分子生物学研究表明,在细胞膜的通透性、高等动物的记忆活动等多方面,蛋白质都起着重要作用。基于上述,有人把核酸称为“遗传大分子”,而把蛋白质称为“功能大分子”,我们认为这种叫法还是比较确切的。

二、生物化学与分子生物学

正如大家所熟知的那样,生物化学是研究存在于生物体内的化合物及其化学过程的科学。主要以组成生物体的组份为对象,研究其性质,相互关系和新陈代谢的规律等方面。生物体内的成分虽然很多,但蛋白质的重要性很早就被认识到,是生物化学的重点研究对象。尤其是认识到所有的酶都是蛋白质之后,蛋白质的重要性就更是不言而喻了。在生物化学发展过程中,核酸的研究并不算晚,是于1872年从白血球和精细胞中离析得到,但其重要性一直未得到应有的重视,就是在遗传方面也认为蛋白质是主要的,而核酸不可能负有这样的任务。直到本世纪五十年代,才认识到DNA是一个非常重要的大分子,有见识的科学家都敏感地意识到,DNA是生命科学的最重要的对象。

在生物化学发展的同时,遗传学也沿着自主的道路发展起来,并逐渐与生物化学联系起来,开始从生物化学反应的角度分析基因的机能。进入五十年代之后,接受了DNA是遗传物质的概念,此概念与当时已经得到承认的蛋白质具有特定的氨基酸顺序的概念相结合,自然就产生了DNA分子中某一片段的核苷酸顺序对应某一蛋白质的氨基酸顺序(共线性原理)这样一个命题。这样,遗传学也就进入到一个新的阶段——分子遗传学。相关科学之间,尤其是生物化学,微生物学和遗传学在五十年代初期的会合,使人们坚信DNA分子结构必然是蛋白质合成的模板。这样一个认识上的飞跃,产生了一门新的边缘科学——分子生物学。因此,分子生物学是以蛋白质和核酸的结构与功能及其相互关系为中心,在分子水平研究生命过程的一门科学。特别是研究细胞组份的物理化学性质和变化,以及这些变化与生命现象的联系。分子遗传、神经传导、视觉、膜传导等都是分子生物学的重要课题。

三、新技术的采用促进了生命科学的发展

今日的生物科学已经从描述性的科学发展成一门精确的和定量的科学了。现在可以用 2×10^{-6} 毫克的核酸样品进行定量分析,快速反应技术可以测定 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ 秒的动力学反应过程,电子显微镜的分辨率可达 2 \AA 。这些成就的取得是与各学科人员在边缘科学中的会合以及不断地采用新技术新仪器分不开的。

生物化学和分子生物学本来就是边缘科学,当然,从事这些学科研究的人员除了生物学领域的人员而外,化学家,物理学家以及其他方面人员也都纷纷从事近代生物科学的研究。比如,对蛋白质螺旋构象作出卓越贡献的里努斯·鲍林(L. Pauling)是大家都熟知的理论化学家,但他

把生命科学中的蛋白质和核酸作为自己的研究对象,并通过自己的工作取得了巨大的成就。法兰西斯·克里克(F. Crick)本是一位年青的物理学家,后来从事蛋白质方面的研究,同时又非常注意 DNA 大分子,并和另一位青年生物化学家詹姆士·D·沃森(J. D. Watson)合作,利用X-射线衍射分析所得到的结果,发现了 DNA 分子的双螺旋结构。另外,从事蛋白质和核酸化学合成的人,大多数是非常熟悉有机化学合成的专业人员。没有这些人员的工作,人工合成生物大分子是很难想象的。显然,科学分类的本身只是便于人们对科学领域的理解,有利于人们展望科学发展的前景,它不是限制人们工作范围的壁垒,一个有见识的科学研究人员绝不会把自己的科研课题局限在传统的范围之内。如果结晶学家只研究小分子晶体的话,当然 X-射线晶体学的知识也就不会及时地用于分析蛋白质和核酸了。事实并非如此,各方面的科学工作者在生物化学、分子生物学等领域内的协同工作促成了生命科学的高速发展。

如果回顾一下生物化学和分子生物学近二、三十年取得的成就,就会发现新技术的引入和仪器设备的完备是非常重要的。蛋白质一级结构的解决是与蛋白质和肽的分离和纯化技术的进步分不开的。正是由于在一级结构研究之中使用了电泳技术,超离心,各种层析分离以及工具酶等各种技术,桑格(F. Sanger)才能在 1956 年完成胰岛素一级结构的测定工作。近年来,蛋白质的分离技术不断的进步,如气相色谱,各种离子交换剂用于分离提纯、亲和层析、分子筛以及用超离心进行梯度离心等,人们用于纯化蛋白质的手段越来越多,而且越来越精巧了。X-射线衍射技术对解决大分子的构象发挥了极大的作用,如 1953 年克里克(F. Crick)等人发现 DNA 的双螺旋结构,1958 年至 1960 年彼鲁茨(M. Perutz)和肯德鲁(J. Kendrew)又弄清了肌红蛋白和血红蛋白的单晶结构。此后又以 X-射线衍射技术得到了一系列酶的构象,大大加深了人们对催化机制的了解。近些年来,核磁共振、激光拉曼光谱也用于大分子构象的研究之中,而且取得了部分成果。此外电子显微镜的应用,快速反应技术等都在推动着生物化学和分子生物学及相关领域的发展。

四、蛋白质的应用与现实生活

科学工作者一方面注视与揭开生命奥秘有关的一些大课题,另一方面也无时无刻不在考虑现实生活,把现有的科学成果应用于人类社会,以改善人们的生活,增加生产,减少和根治疾病等实用方面。单就蛋白质而言,其应用范围也是很广泛的,与人民生活息息相关。其中大部分是涉及活性蛋白酶的应用。首先在临床化学分析上,不仅包括生物体化学成分的分析,也包括了各种酶的活力测定作为临床诊断的指标,如乳酸脱氢酶同工酶的检定作为心肌梗塞诊断的指标,转氨酶(GPT)作为肝病变的指标等。除了检查血液中成分与疾病的关系外,目前对尿的分析也很受重视。其次,许多蛋白制剂是安全有效的药品。比如蛋白水解酶复剂作为消化药物广泛使用。最近把种种蛋白水解酶作为口服药也收到了较好的疗效,不仅可以减轻炎症性浮肿、肿胀、血肿,而且有消瘦和促进浓汁排泄的作用。胰岛素,人胎盘血丙种球蛋白,细胞色素 c,胰酶抑制剂等也都是有效的药物。近些年来尿激酶的应用很受人重视,尿激酶是目前治疗各种血栓性疾病的最好药物。此药尚属新药,其使用方法和应用范围正在成熟和扩大之中。第三,酶法分析也用于食品分析上,其对象主要是辅酶和有机酸,有些酶法分析很灵敏,如 L-乳酸, DL-柠檬酸可测定

范围分别为 $0.2-10 \mu\text{g/ml}$, $2-50 \mu\text{g/ml}$. D 异柠檬酸为 $0.02-1.0 \mu\text{g/ml}$ 等。食品分析中还包括农药毒物分析,利用毒物可以非竞争性地抑制某些酶的活性,求出毒物在食品中的浓度。例如有机磷杀虫剂抑制胆碱酯酶(牛红血球),从而降低水解乙酰胆碱的能力。如果小麦受了 DDT 的污染,可用牛红血球碳酸酐酶测定,可检查出 1 克中含有 10 微克的毒物。第四,在一些工业生产上也常常利用酶制剂,如生丝的处理,天然生丝是互相粘着在一起的,为了使生丝分开,就要破坏粘着天然生丝的“天然胶水”,以肥皂和苏打水洗煮生丝,生丝的结构受到破坏,如果以酶制剂处理生丝,对生丝无害并可大大提高丝线的质量。我国是世界上盛产蚕丝的国家,不仅有家蚕丝,还有榨蚕丝,因此,有关生丝的处理和加工是非常有意义的工作。同样,制革工业也采用了酶法制革新工艺。还有许多方面可利用酶制剂,如生物高分子分解为低分子或单体,化学基团的引入或去除,异构化,光学异构体的分离以及一些合成反应等。第五,在日常生活中所使用的合成洗涤剂若以蛋白水解酶为添料,可以去除牛乳、蛋白、血液等不易去除的污物等。总之,蛋白质的知识以及蛋白制品的利用已经成为某些生产和人们生活的组成部分,而且随着科学的发展,应用范围还会有更大的扩展。因此,从事生物化学和分子生物学研究的人,既要注意大的基本理论课题,又要注意实际而有价值的应用课题,既要放眼未来,又要注意当前迫切需要解决的实际问题。

第二章 蛋白质的组成^[1-4]

早在 1838 年就已经确定,大多数蛋白质含 50—55%的碳,6—7%的氢,20—23%的氧,12—19%的氮,0.2—3%的硫,还发现某些蛋白质含有磷(3%),有的还含有微量金属。各种蛋白质的含氮量很接近,其平均值为 16%。因此,只要测出生物样品中的氮含量,就可推算出蛋白质的大约含量。到十九世纪末,已经确切知道了,氨基酸是蛋白质的基本结构单位,而且大多数蛋白质含有二十种不同的氨基酸。根据目前我们对蛋白质化学和蛋白质合成的了解,可以把蛋白质的成分分成两大类。第一类是以肽键形式存在于蛋白质中的氨基酸。这类包括二十种现在认为有确定的遗传密码的氨基酸以及由特殊反应产生的氨基酸,这种特殊反应是在前体氨基酸加入肽链后发生的。但这类不包括生物合成时仅短暂存在于多肽中的氨基酸,如 N-乙酰甲硫氨酸。蛋白质的第二类成分是非氨基酸物质,它们与蛋白质的结合可能是共价结合,也可能通过强的非共价力结合。含这类物质的蛋白质叫结合蛋白质(其分类见本章第二节)。水解后仅得到氨基酸的蛋白质叫简单蛋白质。因为简单蛋白质全由氨基酸组成,而结合蛋白质的主要部分也是由氨基酸组成的,所以,我们要了解蛋白质的结构、性质和生物功能,必须对氨基酸有一概括性的了解。不但要知道氨基酸的一般物理、化学性质,还要知道氨基酸的立体结构原则。

第一节 氨基酸

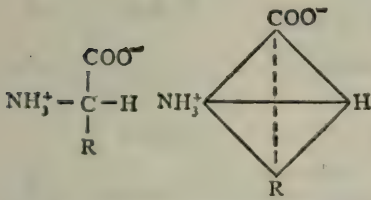


图 2-1 α -氨基酸结构示意图

组成蛋白质基本结构的二十种氨基酸及其确定的遗传密码列于表 2-1 中。除脯氨酸外,所有的氨基酸均有

一通式 $(\text{NH}_2-\text{CH}-\text{COOH})$ 和如图 2-1 所示的空间构型。其中, R 代表侧链基团,不同的氨基酸, R 基团不同。

表 2-1 中的二十种氨基酸是按其侧链基团的物理性质、特别是根据与水的相互作用分类的。这样的分类对我们以后研究蛋白质的三维空间结构是有用的。由此表可发现一个明显的特点,有些氨基酸的侧链,相对来说,不溶于水(如 Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Try),有些氨基酸在生命自然条件下总可以电离,因而是强亲水性的(如 Asp、Glu、Lys、Arg)。组氨酸由于在 pH 7 时能变成质子化的形式,因而很接近于后一类。所有其它的氨基酸处于这两个极端之间。如果按带电荷情况,又可分为:① 不带电荷的,如 Ser、Thr、CysH、Tyr、Asn、Gln, ② 在中性溶液中带负电荷的如 Asp、Glu,叫酸性氨基酸,③ 在中性溶液中带正电荷的,如 His、Arg、Lys,叫碱性氨基酸。

丝氨酸和苏氨酸带有脂肪族羟基侧链,其侧链羟基能和适当的给体和受体基团形成氢键,如和亚氨基的氮原子或蛋白质主链的羰基氧形成氢键;谷氨酸和门冬氨酸的侧链都有第二个羧基基团,在 pH 4 以上处于解离状态;门冬酰胺和谷氨酰胺,既是 H^+ 的给体,又是 H^+ 的受体,这种特

表 2-1 基本氨基酸分类表

分 类	名 称	三字母代号	单字母代号	遗传密码 ^a	结 构 式
脂 肪 族 类	甘氨酸	Gly	G	GG(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	丙氨酸	Ala	A	GC(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	缬氨酸	Val	V	GU(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{COOH} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$
	亮氨酸	Leu	L	CU(N), UUA,UUG	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \diagup \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{COOH} \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
	异亮氨酸	Ile	I	AUU AUC AUA	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{CH}_3 \\ \quad \diagup \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \diagdown \\ \text{COOH} \quad \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$
羟 基 类	丝氨酸	Ser	S	UC(N) AGU AGC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	苏氨酸	Thr	T	AC(N)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
酸 性 氨 基 酸	门冬氨酸	Asp	D	GAU GAC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	谷氨酸	Glu	E	EAA GAG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
碱 性 氨 基 酸	组氨酸	His	H	CAU CAC	$\begin{array}{c} \quad \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{HN} \quad \text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$

续表

分 类	名 称	三字母代号	单字母代号	遗传密码 ^a	结 构 式
碱性氨基酸	赖氨酸	Lys	K	AAA AAG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	精氨酸	Arg	R	CG(N) AGA AGG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH}_2 \\ \text{NH} \end{array} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
酰胺类	门冬酰胺	Asn	N	AAU AAC	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	谷氨酰胺	Gln	Q	CAA CAG	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
含硫类	半胱氨酸	Cys	C	UGU UGC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{SH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	蛋氨酸	Met	M	AUG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
芳香族类	苯丙氨酸	Phe	F	UUU UUC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	酪氨酸	Tyr	Y	UAU UAC	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
	色氨酸	Try	W	UGG	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \\ \text{H} \end{array} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$
亚氨基酸	脯氨酸	Pro	P	CC(N)	$\begin{array}{c} \text{NH} \quad \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H}_2\text{C} \quad \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \quad \quad \text{COOH} \end{array}$

a. 现在确定的遗传密码排列, 指的是信使核糖核酸的核苷酸顺序, 其中, A是腺苷酸, C是胞苷酸, G是鸟苷酸, U是尿苷酸, N是上述四种核苷酸中的一种。

性与蛋白质的结构和功能有重要联系；赖氨酸和精氨酸带有碱性的侧链基团，此基团在 pH 9 以下处于正电状态。这两个碱性氨基酸和带两个羧基的氨基酸，基本上决定了蛋白质所带的电荷。组氨酸的咪唑基往往能和 Fe^{2+} 和其它金属离子形成配位化合物；三个带芳环侧链的氨基酸中的苯丙氨酸是非极性的，而酪氨酸和色氨酸的侧链具有形成氢键的能力。色氨酸的结构比其它氨基酸复杂，也比较特殊，但它具有什么特殊作用还有待继续研究。半胱氨酸的侧链为 $-CH_2-SH$ ，此巯基既不易解离，也不参与形成氢键，但它的反应活性很高，二个巯基氧化后形成二硫桥；蛋氨酸的硫原子有时参与形成配位键，此外未发现有什么特殊功能。有些氨基酸的侧链基团可与某些化学试剂反应，这将在“氨基酸的反应”一节中详加介绍，此外，还可参阅“蛋白质的化学修饰”一章中的“蛋白质侧链的修饰”一节。

蛋白质中的第二类氨基酸，包括遗传密码尚未确定的那些氨基酸，其中大多数显然是由前体氨基酸通过特殊反应形成的，这种特殊反应是在多肽的生物合成中间或合成之后发生的。这类氨基酸的结构列于表 2-2 中。

表 2-2 蛋白质中某些被修饰了的氨基酸的结构(均属前述二十种氨基酸的衍生物)

L-胱氨酸	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \quad \quad \text{COO}^- \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ - \text{C} - \text{H} \quad \text{NH}_3^+ - \text{C} - \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 \end{array}$
L-羟脯氨酸 (Hyp)	
L-羟赖氨酸 (Hyl)	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \quad \text{NH}_3^+ \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{COO}^- \end{array}$
L-甲状腺素 (T ₄)	

胱氨酸是这些衍生氨基酸中最重要的一种。它是由氧化同一肽链或不同肽链上的二个半胱氨酸的巯基形成的，把二个半胱氨酸连成胱氨酸后就形成一个二硫桥。这对维持蛋白质的结构具有重要作用。羟脯氨酸和羟赖氨酸仅存在于骨胶原和弹性硬蛋白中。甲状腺素存在于甲状腺球蛋白中。丝氨酸和苏氨酸通过其羟基的磷酸化作用能衍生出磷丝氨酸和磷苏氨酸。在纤维蛋白原中，还发现有 O-磺化酪氨酸。现在还知道几种酶(如，大肠杆菌谷酰胺合成酶)含有腺甙化了的氨基酸。

一、氨基酸的构型

实际上，一个分子并不是写在纸面上的一些原子的平面组合，而是在三维空间中有一定的排布方式。同一组成的分子，其原子或基团的几何排布可以不同。一般称这种结构上的差异为立

体异构。在生物化学中,立体异构这个概念很重要,这一方面是由于天然存在的生物碱和氨基酸等都有其特异的立体构型,另一方面,蛋白质、酶等生物大分子的反应特异性,若不是建立在立体化学的基础上,很多问题很难得到确切的回答。

前已述及,除脯氨酸外(它实际是一个亚氨基酸),所有的氨基酸均由一个碳原子(即 α -碳原子)和四个取代基构成:即羧基、氨基、氢原子和一个R基团,不同的氨基酸R基团不同。如果 α -碳原子的四个取代基各不相同,那么该原子就叫做不对称碳原子。天然存在的二十种氨基酸,除甘氨酸外(它的R基团是H),都有一个不对称碳原子,即 α -碳原子。这四个不同的取代基有二种不同的排布形式,结果形成彼此成镜象的结构。这是因为碳原子的 sp^3 -轨道具有四面体结构,因此,四个取代基可以有二种方式排布在这个碳原子的周围。当然还可以有一些其它的排布方式,但都与这二种排布形式中的一种等效,因为只要简单地转动,就可以互相代替。我们可以把彼此成镜象的两个结构分别称为D-构型和L-构型。因此,每种氨基酸都可能有D-构型和L-构型之分。图2-2即表示丙氨酸的立体异构体。

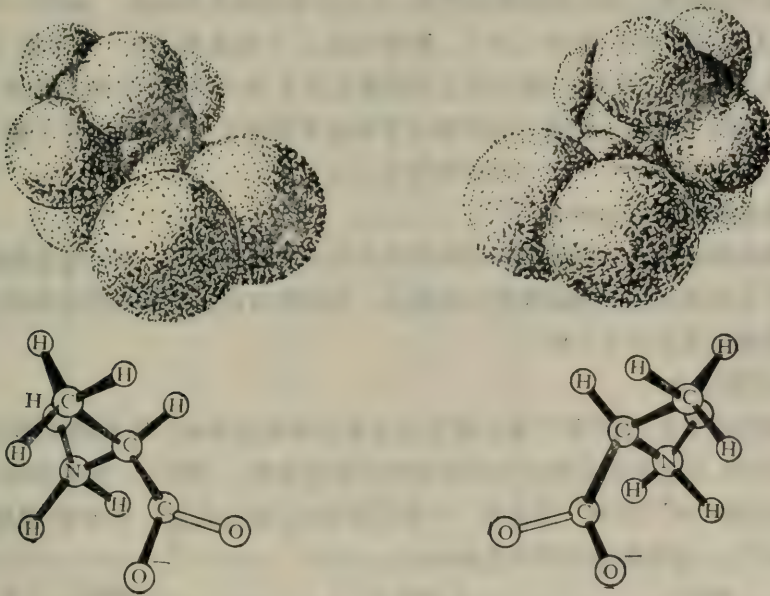
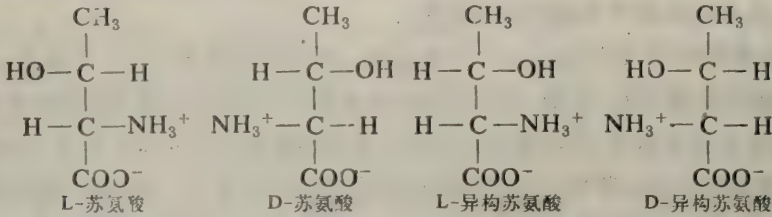


图 2-2 丙氨酸的立体异构体

在比较温和的条件下,水解蛋白质所得到的所有氨基酸都具有旋光性。这是由于 α -碳原子上的四个取代基的不对称性引起的。D-型氨基酸和L-型氨基酸的区别在于,它们能使平面偏振光向相反的方向转动,但它们的熔点、溶解度和其它物理性质相同。这种彼此成镜象的化合物(即D-型氨基酸和L-型氨基酸)称为对映结构体。等量混合D-和L-型物质,所得到的混合物称为外消旋混合物或DL型物质。它没有旋光性。虽然自然界也有D-氨基酸,但蛋白质中的所有氨基酸都是L-构型。

如果有多于1个不对称碳原子的话,则可能存在 2^n 个不同的构型,其中 n 是不对称碳原子

的数目。苏氨酸、异亮氨酸、羟脯氨酸、羟赖氨酸都有二个不对称碳原子和四个可能的构型。苏氨酸的四个构型图示如下：



其中，只有L-苏氨酸存在于蛋白质中。自然界也存在D-氨基酸，是由植物、微生物合成的。细菌产生的几种抗菌素，如青霉素里的青霉胺就含有D-氨基酸。另一个有意义的异构体是内消旋胱氨酸。它是由二硫键将二个镜像异构体连在一起形成的。分子中有补偿的不对称中心，因此没有净旋光性，因为分子的一半很精确地为另一半所补偿。

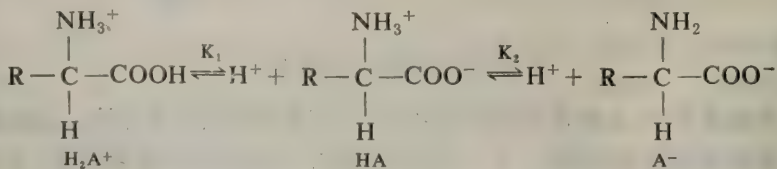
利用X-光结构分析、测定了各种氨基酸的晶体结构。结果证明，氨基酸分子有严格的键长与键角。虽然各种氨基酸之间的情况略有差异，但其基本结构有共同性。如图2-2所示，羧基的二个碳—氧键，大体是等同的，约为1.26 Å，羧基的碳，二个氧基本上在一个平面上。羧基碳与α-碳之间的键长平均为1.53 Å，α-碳与氮之间的键长为1.50 Å左右，α-碳和氮原子基本上处于羧基平面上。α-碳和R基团上的碳之间的键几乎和此平面垂直。α-碳的四个键是正四面体构型，角度为109°，羧基的O=C—O之间的夹角为125°。

二、氨基酸的酸碱性质与pK值^[1,2]

研究氨基酸的酸碱性质对理解蛋白质的性质有特别重要的意义。因为氨基酸的分离、鉴定及定量分析的方法都是以它的酸碱性质为根据的，而这些方法又是测定蛋白质的氨基酸组成和蛋白质的氨基酸顺序所必不可少的。

1、氨基酸的等电点

氨基酸一般能溶于水，但不溶于象乙醚这类非极性有机溶剂中。氨基酸的熔点较高，一般在200°C以上。这说明，在它们的结构中具有高电荷的极性基团。实际上，所有的氨基酸都含有酸性的羧基，能电离成COO⁻和H⁺，还含有一个碱性的氨基(或亚氨基)，它能接受质子，形成四级铵盐(如R—NH₃⁺)。这种情况可用下式表示：



因此，氨基酸是一个两性电解质，它在溶液中的带电情况，随溶液的pH值而变化。改变溶液的pH值，可以使一个氨基酸带正电，也可以使其带负电或不带电。如果氨基酸不带净电荷，那么，它在电泳系统中，就不会发生向正极或负极移动的现象。在这种状态下，溶液的pH值称为该氨基酸的等电点，以pI表示。氨基酸不同，其等电点也不同。也就是说，等电点是氨基酸的一个特征值。

对单氨基单羧基的氨基酸而言,在等电点时,两个离子的正负电荷相互中和,呈电中性,即呈 HA 形式,称此为偶离子。如果往溶液中加入酸(如 HCl),以降低 pH 值,则偶离子变成一个带正电荷的阳离子(H₂A⁺)。反之,如果往等电溶液中加入碱(如 NaOH),则偶离子变成带负电的阴离子(A⁻)。

氨基酸的羧基、氨基以及其它可解离基团,都有一个特征的 pK 值。按惯例,pK 的编号是从最酸的基团的解离开始,分别记为 pK₁'、pK₂'…。所有常见的氨基酸的 pK 值都已经测定过了。如表 2-3 所示。由于每一氨基酸的酸性和碱性基团数目不同,以及每个基团的 pK 值的差别,使得不同氨基酸有不同的 pI 值。有的 pI 值是中性,有的是酸性,也有的是碱性。表 2-3 列出了常见氨基酸的 pI 值。从表 2-3 可以看出:

表 2-3 氨基酸的解离常数和等电点

氨基酸	pK ₁ α-COOH	pK ₂ α-NH ₃ ⁺	pK _R R-基团	pI
Ala	2.35	9.69		6.02
Arg	2.17	9.04	12.48	10.76
Asn	2.02	8.8		5.41
Asp	2.09	9.82	3.86	2.98
Cys	1.71	10.78	8.23	5.02
Glu	2.19	9.67	4.25	3.22
Gln	2.17	9.13		5.65
Gly	2.34	9.60		5.97
His	1.82	9.17	6.00	7.58
Leu	2.36	9.60		5.98
Lys	2.18	8.95	10.53	9.74
Met	2.28	9.21		5.75
Phe	1.83	9.13		5.48
Pro	1.99	10.60		6.30
Ser	2.21	9.15		5.68
Thr	2.63	10.43		6.53
Try	2.38	9.39		5.88
Tyr	2.20	9.11	10.07	5.65
Val	2.32	9.62		5.97

① 对单氨基单羧基的氨基酸而言,pI 值显然在 pK₁ 和 pK₂ 之间,其值为 pK₁' 和 pK₂' 的算术平均值,即 $pI = \frac{1}{2}(pK_1' + pK_2')$ 。这个关系式在大多数情况下是准确的。但必须指出:在带电分子的平衡中,也有一定量的不带电分子(NH₂-CHRCOOH),但它的量不大。为什么有上面的关系式呢?我们可以简单地说明如下:根据 pI 的定义,在等电点的那个 pH 下,偶离子(HA)占优势,任何少量的[H₂A⁺]的存在都将为等量的[A⁻]所平衡。这种关系可表示如下:

$$K_1 = \frac{[HA][H^+]}{[H_2A^+]}; \quad K_2 = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

$$\therefore [HA] = \frac{K_1[H_2A^+]}{[H^+]}; \quad [H^+] = \frac{K_2[HA]}{[A^-]}$$

将[HA]代入,则有:

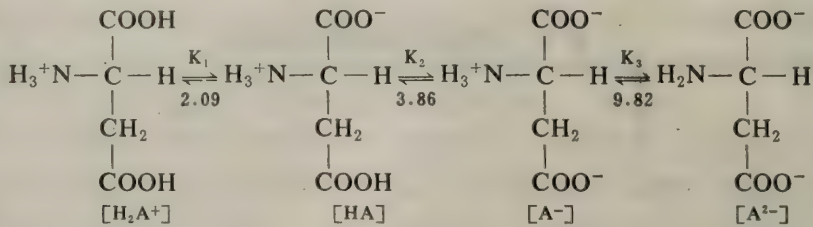
$$[H^+] = \frac{K_2 K_1 [H_2A^+]}{[A^-][H^+]} \text{ 或 } [H^+]^2 = \frac{K_2 K_1 [H_2A^+]}{[A^-]}$$

但在等电点处, $[H_2A^+] = [A^-]$

$$\therefore [H^+] = \sqrt{K_1 K_2}, \text{ 即 } pH = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

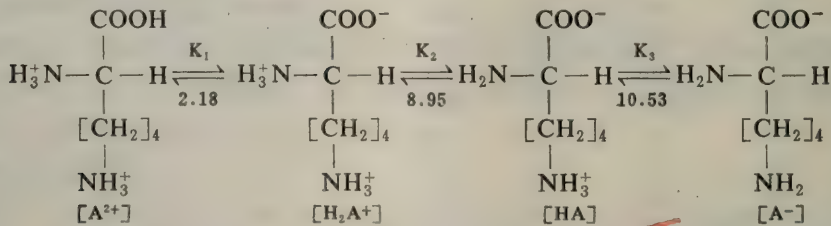
由上式可以看出,等电溶液的 pH 值与离子浓度无关。其值决定于偶离子两侧的 pK 值。

同样,对有三个可解离基团的氨基酸来说,只要写出它的电离式,然后取偶离子两边的 pK 值的平均值,即得其 pI 值。如,对天冬氨酸可表示为:



$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2}(2.09 + 3.86) = 2.98$$

对赖氨酸而言,我们有:



$$\therefore pI = \frac{1}{2}(pK_2 + pK_3) = \frac{1}{2}(8.95 + 10.53) = 9.74$$

② 单氨基单羧基氨基酸的羧基,其酸性比脂肪族酸(如醋酸, $pK = 4.76$)强,这可能是由于羧基旁边有一带正电的氨基,加强了羧基的解离。

③ 单氨基单羧基氨基酸的 α -氨基比相应的脂肪族胺具有较强的碱性(或较弱的碱性)。

④ 所有单氨基单羧基氨基酸具有几乎相同的 pK_1 和 pK_2 。

⑤ 任何一种单氨基单羧基氨基酸,在生理条件下($pH 6-8$)没有明显的缓冲容量。因为这些氨基酸,只有在接近其 pK 值时(即 $pH 1.3-3.3$, $pH 8.6-10.6$)才有缓冲容量。只有组氨酸在 $pH 6-8$ 有较大的缓冲容量。蛋白质溶液也是一个缓冲溶液,在生理条件下,蛋白质的缓冲容量主要是依靠 α -氨基和组氨酸的咪唑基。但 α -氨基仅存在于肽链的 N -末端,其数量太少,因此,缓冲系统主要依靠组氨酸咪唑基的解离。

⑥ 虽然天冬氨酸的 β -羧基和谷氨酸的 γ -羧基在 $pH 7$ 能完全电离,但这两个基团的

pK 值比 α -羧基的 pK 高许多,与醋酸的 pK 值很接近。

⑦ 半胱氨酸的巯基和酪氨酸的羟基,具有弱酸性。在 pH 7 时,半胱氨酸的巯基大约电离 8%,酪氨酸的羟基大约电离 0.01%。

⑧ 赖氨酸的 ϵ -氨基和精氨酸的胍基具有强碱性。它们只能在高 pH 下,才能给出质子。在 pH 7 时,这两个氨基酸带正电荷。

2、氨基酸的滴定

氨基酸的每一种功能基团(如氨基、羧基、咪唑基)不是能被酸所滴定,就是能被碱所滴定,其滴定曲线是典型的弱酸和弱碱的滴定曲线。图 2-3 是甘氨酸的滴定曲线。

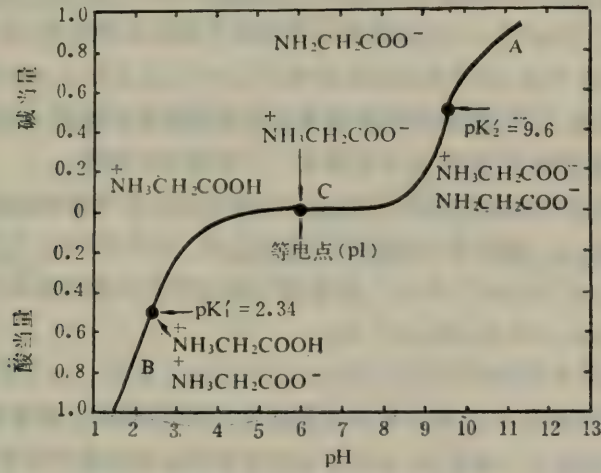


图 2-3 甘氨酸的滴定曲线

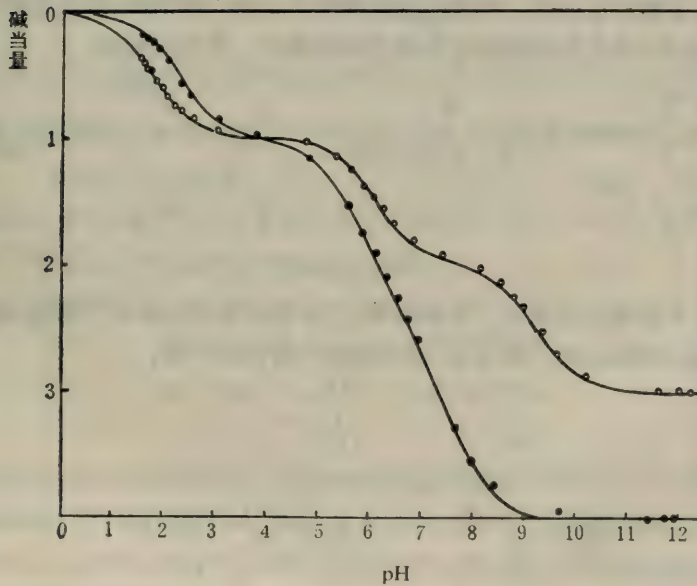


图 2-4 组氨酸(以圆圈示之)及其二肽(以黑点示之)的滴定曲线

在这个曲线中,等电点位于曲线的C点。pI=5.97,此时溶液中只有偶离子 $\text{NH}_3^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ 。从C点出发,加入1当量的HCl,则羧基解离全部被抑制,形成阳离子 $\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}$,即曲线中的B点。若加入1当量的NaOH,则 NH_3^+ 全部被滴定,形成阴离子 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$,即曲线中的A点。如果从C点开始,滴加0.5个当量的HCl,此时溶液中有一半偶离子和一半阳离子,即 $[\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COOH}] = [\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-]$ 。按照解离方程式的定义,此点的pH值等于pK值。因为这是羧基的解离,所以以 pK_1 表示。从实验曲线上可以看到, $\text{pK}_1 = 2.34$ 。同样,从C点开始,加入0.5当量的NaOH,则 NH_3^+ 基团被滴定一半,形成阴离子,同时溶液中还有等量的偶离子,即 $[\text{NH}_3^+\text{CH}_2\text{COO}^-] = [\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-]$,此点即为 NH_3^+ 基团的pK值,以 pK_2 表示。从曲线上可以看到 $\text{pK}_2 = 9.6$ 。在酸碱滴定过程中,甘氨酸的阳离子、阴离子和偶离子之间的比例,随pH值的变化而变化。在pH 1—6间是阳离子和偶离子间的比例关系;在pH 6—11是阴离子和偶离子间的比例关系。

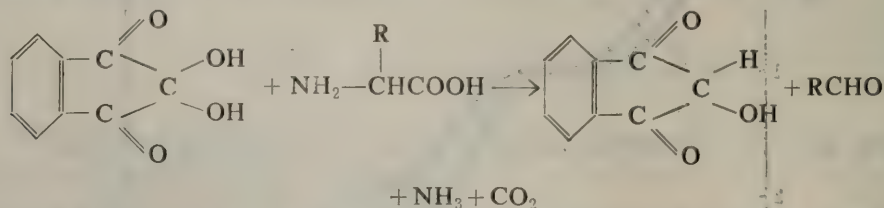
其它氨基酸(如组氨酸、天冬氨酸等)的滴定曲线和甘氨酸基本相同。不同的是,组氨酸和天冬氨酸都是含有三个功能团的氨基酸,比甘氨酸多一个可滴定的基团。

多肽链中的氨基酸,由于功能团之间的相互作用,使得它的各可解离基团的pK值多少有些变化。从图2-4组氨酸及其二肽的滴定曲线即可看出这点。组氨酸的三个可解离基团的pK值分别是 $\text{pK}_1 = 1.77$; $\text{pK}_2 = 6.10$; $\text{pK}_3 = 9.18$ 。组氨酸二肽的四个可解离基团的pK值分别为: $\text{pK}_1 = 2.25$; $\text{pK}_2 = 5.60$; $\text{pK}_3 = 6.80$; $\text{pK}_4 = 7.80$ 。

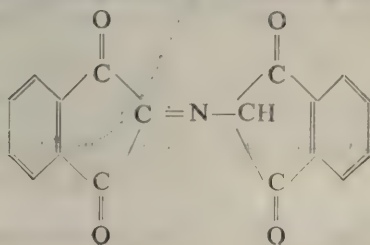
三、氨基酸的反应^[3-5]

氨基酸能和许多试剂作用,产生特异性的显色反应。在纸层析中,常常用这些反应来识别和鉴定一些氨基酸。下面所谈的一些反应,有的在结构测定和肽的合成中常常应用。

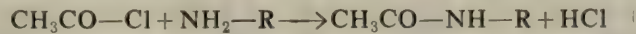
1. 氨基酸与茚三酮的反应,在生化中是特别重要的,因为它能用来定量测定氨基酸。在纸层析中,用它来检测氨基酸也很方便。如果把氨基酸和茚三酮一起煮沸,氨基酸即被显色。除脯氨酸和羟脯氨酸显黄色外,其它氨基酸都显深浅不同的紫色。其反应如下:



反应中产生的 CO_2 ,可用测压法测定。作为特例,只要测定反应生成的甲醛量,就可得知甘氨酸的量。反应生成的氨,继续与茚三酮反应,则得到深兰紫色的产物:

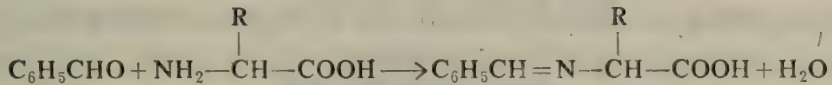


2、氨基酸的 α -氨基很易与各种酰化剂,如乙酰氯、苯酰氯、苯甲氧羰酰氯等反应。一级胺与乙酰氯的反应如下:

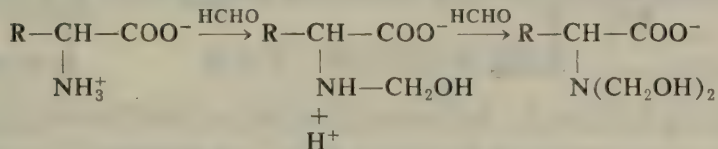


还有几个重要的氨基试剂,如苯异硫氰,2,4-二硝基氟苯、1-二甲氨基萘-5-磺酰氯 (dansyl-Cl) 等,在测定蛋白质的一级结构上很有用,将在第四章中讨论。

3、氨基酸的氨基可与各种芳香醛(如苯甲醛)反应,形成希夫碱式的缩合产物:

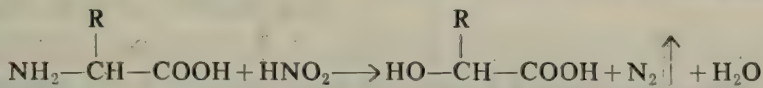


赖氨酸的 ϵ -氨基也能发生这类反应。据认为,骨胶原肽链的交联,就是由于这类氨基与脂肪醛结合的结果。氨基酸的氨基还可与甲醛反应生成羟甲基化合物:



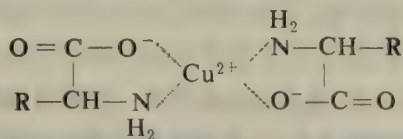
由于氨基酸分子在溶液中是以偶离子形式存在的,所以不能用酸碱滴定其含量。用甲醛与氨基结合,使氨基酸不再可能成为偶离子,因而可以用碱溶液来滴定,这叫做甲醛滴定法,可用于测定氨基氮。

4、氨基酸具有典型的一级胺反应,其中包括亚硝酸对 α -氨基的作用:

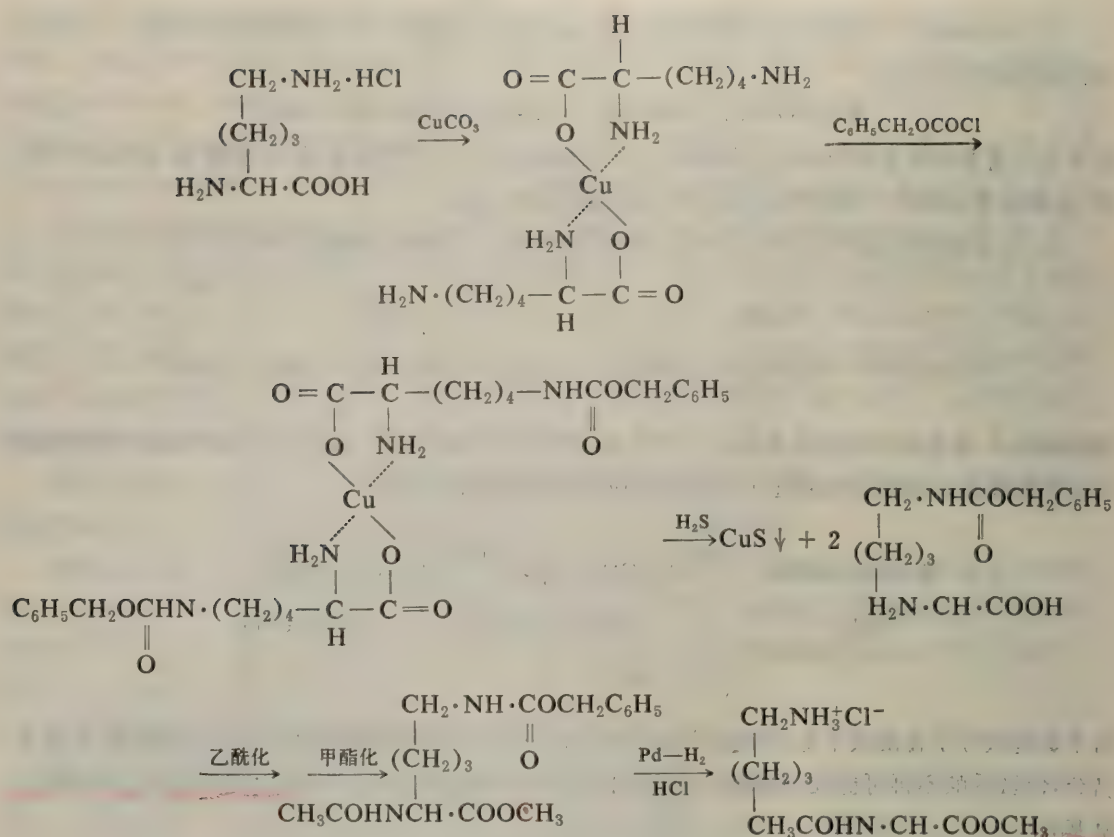


此反应可用来修饰蛋白质中的氨基,以研究这些基团在结构和功能关系上的作用,也可用于测定自由氨基氮。

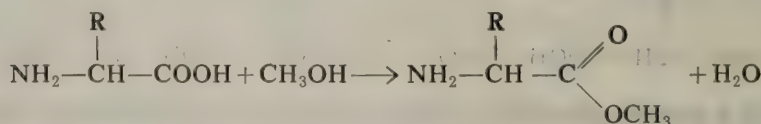
5、氨基酸和肽在适当 pH 下,可与重金属离子,如 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 等形成络合物,如氨基酸能与 Cu^{2+} 形成如下形式的络合物:



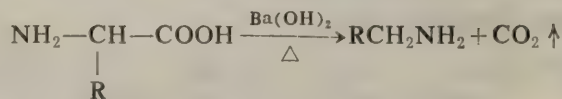
氨基酸的这个性质在有些情况下很有用。例如,在合成尿激酶的底物, N^α -乙酰赖氨酸甲脂 (ALME) 时,就是利用这个性质先保护 α - NH_2 、使二个赖氨酸分子通过 α - NH_2 和 α - COOH 与 Cu^{2+} 形成络合物,然后酰化 ϵ - NH_2 、再通 H_2S 破坏这个络合物,释放出 α - NH_2 ,这时就可以进行 α - NH_2 的乙酰化了。其合成过程大致如下:



6、所有氨基酸在酸性条件下,可用醇来酯化;



7、当氨基酸与氢氧化钡混合加热时,即脱去羧基,产生一种伯胺;

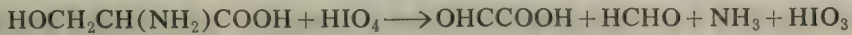


除了上述一般的氨基酸反应外,某些氨基酸还有一些特殊的反应,用这些反应来鉴定它们有时也很方便。其中颜色反应在层析方法中,对于检测个别氨基酸(无论是游离的,还是呈肽链形式的)是很有价值的。

Ehrlich 吡啶染色能使色氨酸和含色氨酸的肽清楚地层析图谱中显现出来。如果用对-二甲氨基苯甲醛,在酸性介质中,于室温处理色氨酸,则几分钟之后,就可以看到明显的灰色。酪氨酸能与 1-亚硝基-2-萘酚试剂形成红色络合物,这是鉴定酪氨酸和含酪氨酸的肽的有效方法。

咪唑化合物(如组氨酸及其肽)可用 Pauly 反应来鉴定,即用对氨基苯磺酸,在碱性硝酸盐溶液中处理后,组氨酸及其多肽呈桔红色。坂口反应(Sakaguchi)用来分析游离精氨酸及其多肽,即用 1-萘酚和次溴酸钠处理后,精氨酸及其它单取代胍显深红色。检出半胱氨酸和其它含巯基的化合物,是用它与硝普盐(亚硝酰铁氰化钠)的反应。半胱氨酸显红色。此法只对半胱氨酸的巯基有效,它的衍生物,如 S-苄基半胱氨酸就不能起显色反应。甘氨酸可用邻苯二醛的乙醇溶液显色。甘氨酸显墨绿色。脯氨酸有酸性吲哚酮试剂显色,脯氨酸显兰色。关于这些显色反应的细节可参考文献[7]。

有些 α -氨基酸的特异反应也可用来分析、定量测定氨基酸。如,丝氨酸、苏氨酸和羟赖氨酸,在相邻的碳原子上有羟基和氨基,可用高碘酸盐氧化裂解。对丝氨酸而言,可用下式表示。



由丝氨酸和羟赖氨酸产生的甲醛(苏氨酸产生乙醛)或其它产物(如氨)可以定量测定。谷氨酰胺和天冬酰胺的酰胺氮,可以通过分析酰胺基水解后释放出的氨来测定。定氮的普通方法是康威(Conway)微量扩散法。关于氨基酸混合物的分离、鉴定及定量测定留待第四章介绍。

第二节 蛋白质的其它组分

前已述及,蛋白质分简单蛋白质和结合蛋白质两大类。简单蛋白质就是仅仅由氨基酸组成的蛋白质,它水解后,只能得到氨基酸。而结合蛋白质是由氨基酸和非氨基酸两部分组成的。下面我们就略述一下结合蛋白质的非氨基酸部分,也就是蛋白质的其它组分。为什么会有结合蛋白质呢?人们发现,生物体中的大分子常常需要与非蛋白质部分联系在一起,才能发挥一定的生物学功能作用。这种联系有的是以共价键的形式、有的是以非共价键的形式。它们往往是作为一个整体从生物材料中被分离出来。因此,叫它们为结合蛋白质。结合蛋白质的非蛋白质部分通常是糖类、脂类、核酸和各种辅助因素等。

含糖类的结合蛋白质叫糖蛋白。它是由低聚糖通过共价键与蛋白质连接而成的复合蛋白^[8]。糖类通常是通过邻位配糖键与丝氨酸和苏氨酸结合,或者通过葡基胺结构把糖的还原端和天冬酰胺(有时是谷酰胺)连接起来。连接到蛋白质上的糖是一个或几个小的片断,其分子量不过是 520—3,500 左右。其中的糖可能是氨基葡萄糖、半乳糖胺、半乳糖、甘露糖、岩藻糖和唾液酸。糖蛋白中糖的含量也有很大变化,有的是百分之几(如纤维蛋白原)、有的含糖 50%以上(如粘液分泌物的糖蛋白部分)。所以,糖含量高的糖蛋白叫粘蛋白。它具有不寻常的溶解度和流体动力学特性。粘蛋白的主要功能是润滑和清洁作用。但糖在其它糖蛋白中的功能作用,有些尚不清楚。有的蛋白质还与几个带有高电荷的多糖(如硫酸软骨素、肝素和透明质酸)结合在一起。它们的结合,既有共价键,也有非共价键。

在几个重要的体系中,发现蛋白质与脂类结合在一起,我们叫它脂蛋白。其中处于细胞膜中的脂蛋白,很难研究,因为只有极端变性的条件下,才能分离出无脂蛋白质。高等动物血液中的脂蛋白,研究得比较多。人血液中的脂蛋白,可分为三组:高密度脂蛋白、低密度脂蛋白和乳糜微粒(chylomicra)。这些大分子在人体各组织中的脂的传递上有重要的功能。脂蛋白的脂主要是通过非共价相互作用与蛋白质相连接,而且脂可大可小,取决于生理条件下存在的脂

的类型和多少^[9]。因此,这些脂蛋白的大小、分子量和密度是相当不均一的。

有几类重要的生物大分子,其蛋白质与核酸(既有 RNA,也有 DNA)紧密相连。我们叫它为核蛋白。它们的连接在本质上是非共价结合的。一类重要的核蛋白是核糖体。它是蛋白质合成的场所,能控制正在生长中的肽链。这个含核糖核酸的大分子,含有几类肽链,其结构和功能都已经详细地研究过^[10]。还有一类小的碱性蛋白(有时也可能是其它蛋白)与细胞中的 DNA 基因组结合。这类蛋白质在结构和控制功能上起重要作用^[11]。另一类重要的核蛋白是病毒。复杂的病毒还含有脂类和糖类。现在认为,病毒蛋白有几个功能作用^[12]。病毒的蛋白质部分通常在核酸外部,因此能防止核酸酶的消化,起保护作用。病毒蛋白的其它功能,在某些病毒系统中也是明显的,包括宿主阶段的专一性和细胞的通透性等功能。

不少蛋白质还需要小分子量的辅助因子来完成其生物功能。这些辅助因子常与蛋白质紧密相连,分离时常与蛋白质一起被分离出来。它们的连结,既有共价结合,也有非共价结合。例如,肌红蛋白、血红蛋白及细胞色素 c 中就含有血红素这样的辅基;氧化还原酶类、转移酶类等都含有各种不同的辅酶和辅助因子。关于这类蛋白质的例子,以后还会经常遇到,这里就不多说了。

习 题

1. 蛋白质由哪些元素组成?测定蛋白质的含量以哪个元素为标准?怎样计算?
2. 氨基酸分哪几类?有什么性质?氨基酸为什么会有不同的构型?
3. 什么是氨基酸的 pK 值,什么是氨基酸的 pI 值,二者的区别在哪里?
4. 由表 2-3 中氨基酸的 pK 值,计算下列氨基酸的 pI 值:甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸和组氨酸。
5. 根据表 2-3 中的氨基酸 pK 值,指出下列氨基酸:甘氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、组氨酸,在下列情况下(① pH 1.0、② pH 2.1、③ pH 6.0、④ pH 10)、总的电荷情况是 0? - 还是 +?
6. 有甘氨酸、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、精氨酸、丝氨酸的混合物,现在用电泳在 pH 6 下分离它们。请回答下列问题:
 - ① 哪个氨基酸移向正极? ② 哪个氨基酸移向负极? ③ 哪个氨基酸不移动?
7. 向完全质子化的 500 ml 0.01 M 组氨酸溶液中,加入多少克 NaOH,才能得到 pH 7 的缓冲溶液?
8. 氨基酸有亚硝酸反应,为什么脯氨酸没有这个反应?这个反应在蛋白质分析上有何用途?氨基酸还有哪些反应?
9. 有一 400 ml、pH 8 的 L-丙氨酸溶液。向此溶液加入过量的甲醛。为使此溶液的 pH 再回到 pH 8,则需用 250 ml 0.2 M NaOH 进行反滴定,问原来溶液中含有多少克 L-丙氨酸?

参 考 文 献

1. Cohn, E. J., et al., "Proteins, Amino Acids and Peptides as Iron and Dipolar Ions" 1965
2. Edsall, J. T., et al., "Biophysical Chemistry" Vol. 1, 1958
3. A. Meister, "Biochemistry of the Amino Acids", 2nd ed. Vol. 1, 1965
4. J. P. Greenstein, et al., "Chemistry of the Amino Acids" Vol. 3, 1961
5. S. Blackburn, "Amino Acid Determination", 1968
6. C. H. W. Hirs, ed., "Methods in Enzymology" Vol. 25, 1972

7. J. L. Bailey, "Techniques in Protein Chemistry" 2nd ed., 1967
8. A. Gottschalk, et al., "The Proteins" 2nd ed., Vol. 4. 1966
9. A. V. Nichols, Adv. Biol. Med. Phys., 11, 109 (1967)
10. C. G. Kurland, Science 169, 1171 (1970)
11. T. Jacob, et al., J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
12. H. Fraenkel-Conrat, ed., "Molecular Basis of Virology", 1968

第三章 蛋白质的分离、提纯与纯度标准^[1-10]

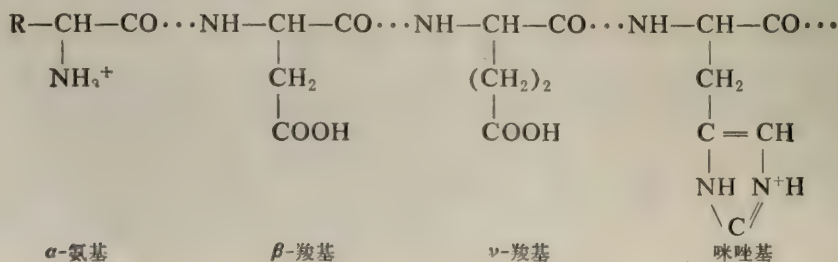
生物体内含有很多不同的蛋白质，其中绝大多数蛋白质是与其它大分子和各种各样的小分子一起处于混合体系中。因此，要研究某种蛋白质的结构和功能，头一项工作就是从复杂的大分子体系中分离出这种蛋白质。分离结果是否达到要求，这就要进行分析鉴定。有关纯度鉴定的方法，在本章第七节中再谈。蛋白质至少要纯化到什么程度才能符合要求，这就要看研究工作是什么类型。例如，精确的化学分析、确定蛋白质的氨基酸组成和蛋白质的氨基酸排列顺序等，就需要很纯的制剂；很多物理参数（如沉降常数和扩散常数）的测定也需要高纯度的样品。但用生物学分析法来测定这些物理参数时，则可以使用不纯的混合物。用沉降平衡法测定分子量分布，则需要高纯度的化学均一的蛋白质制剂。用 X-射线对蛋白质进行立体结构分析，则需要将蛋白质纯化成适当大小的单晶。其它形式的物理方法（如，沉降速度法）则容许使用蛋白质的混合物，只要这混合物的组分数目不是很多就行。

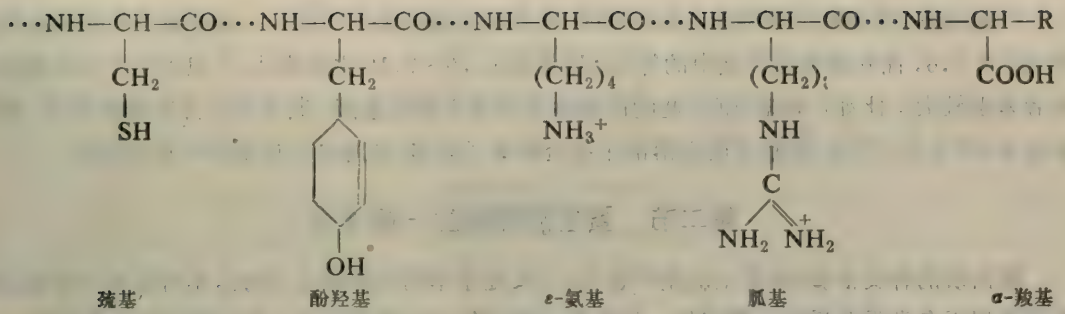
分离、提纯蛋白质的主要依据是蛋白质的性质各异，尤其是蛋白质在酸碱性质、电学性质上的差异。因此，在进入蛋白质分离和提纯之前，简单说明蛋白质等电点和等离子点的概念。

第一节 蛋白质的酸碱性质

在第二章中讲过了氨基酸，氨基酸是一个两性电解质，具有酸碱基团，可用酸碱滴定得到 S 形的滴定曲线。在滴定曲线上可以看到，在不同的 pH 环境中分子可以带正电荷，负电荷或零净电荷。同样，蛋白质是一个多聚氨基酸，在多肽链上有许多不同的酸性和碱性基团。因此，酸碱性质也是蛋白质的基本性质之一。蛋白质和氨基酸相比是个复杂的分子，同一分子上的可解离基团的类型多，数量也大。各种基团或是质子的给体，或是质子的受体，这些基团在不同的 pH 值下可以分别被滴定。所得到的滴定曲线也是 S 形曲线。不过这个曲线比氨基酸的 S 形曲线复杂得多，其中包括了好多方面的内容。从蛋白质的滴定曲线上不仅可以得到基团的种类和数量等基本情况，而且也可以通过各种不同条件下滴定曲线的变化，了解蛋白质的变性，构象等多方面的知识。这是研究蛋白质的一个有用的方法。

一般来讲，蛋白质每 3 个到 4 个氨基酸残基就有一个可滴定的基团。因此，分子量 100,000 以下的蛋白质，可有 20—250 个可滴定的基团。这些可滴定的基团是：





上述基团中,羧基(α 、 β 、 γ -COOH)大部分在 pH 3—5 被滴定,而氨基、胍基等在 pH 10—12 范围内被滴定。各种基团的 pK 值和相应的游离氨基酸比较有所不同,这主要是由于相邻的各基团之间的相互作用和蛋白质分子构象所造成的内部环境影响的结果。

上一章已经谈过,氨基酸在等电 pH 值时,净电荷为零。同样蛋白质分子上的正负电荷相等时(净电荷为零时)也称为蛋白质的等电点。在滴定曲线上可以清楚地看到,随着 pH 值的变化,基团的解离情况也发生变化,在某一 pH 值时,净电荷为零。处于等电 pH 的蛋白质,在外加电场下不发生移动。因此,在不同的 pH 值作电泳可以决定蛋白质的等电点。然而,处于等电 pH 的蛋白质,其分子上的正负电荷并不是完全由蛋白质本身正电基团和负电基团所贡献,蛋白质不仅同 H^+ 结合,而且也同溶液中的其他离子结合,尤其是和缓冲液中的阴离子结合。这样,由于结合缓冲液中的阴离子多于阳离子,就增加了蛋白质的负电荷,直接影响了等电 pH 值。结合的阴离子愈多,等电 pH 愈向低值移动。因此,等电点并不是一个恒定值,它依赖于所用的缓冲液及其浓度。

除了常用的等电点外,在滴定曲线上还用到等离子点或等离子 pH 值。等离子 pH 是除盐的纯蛋白质水溶液的 pH。这样,蛋白质的带电状态完全由 H^+ 的解离和结合来决定的,排除了其他离子对蛋白质带电状态的干扰。因此,等离子点是特殊的等电点。蛋白质溶液通过离子交换混合床之后,或长时间的以无离子水透析都可以得到等离子蛋白溶液。测定此溶液的 pH 值称为等离子 pH 值。但在无中性盐存在时,许多蛋白质是不溶的,所以,直接测定等离子点比较困难,往往采取间接测定法,即测定不同盐浓度下的等电点,然后外推至零浓度,得等离子 pH 值。

实际上,处于等离子 pH 值的蛋白质,也并非都是净电荷为零的。一般来讲,等离子 pH 值都落在 pH 3~9 范围内,其中只有 pH=7 时,等离子蛋白的净电荷才真正是零。在 pH=7 的两边都多少带有净电荷。其净电荷可从下式计算:

$$\bar{Z} = (K_w' / C_{\text{H}^+} - C_{\text{H}^+}) / C_p$$

其中 K_w' 是水的离子积,在 25°C 为 10^{-14} , C_{H^+} 是氢离子的克分子浓度。 C_p 是蛋白质的克分子浓度。从公式可知,在等离子点蛋白质所带的电荷 \bar{Z} 与 C_{H^+} (pH)、蛋白质浓度有关。一般来讲,等离子 pH 在 5~9 之间,而且蛋白质浓度在 10^{-4} 克分子时, \bar{Z} 值往往是很小的,接近于零。因此,一般认为等离子点时净电荷为零。比如: β -乳球蛋白,在 25°C 等离子 pH 为 5.39,蛋白质浓度 $2.8 \times 10^{-4} M$,按公式计算, $\bar{Z} = 0.015$,这么小的数值可以忽略不计。

一般说来,等离子点和等电点虽然不同,但数值差别不大。比如:一氧化碳血红蛋白的等离子 pH 为 7.6,而在磷酸缓冲液中的等电 pH 值在 6.70~7.16 之间变化。但也有个别的蛋白质两者差别较大。比如:烯醇化酶,此酶的碱性基团多于酸性基团,其等离子点在碱性范围,而等电点为 pH 5.1。可见,烯醇化酶在溶液中结合阴离子较多,使等电点向低 pH 方向转移。

第二节 蛋白质提纯的一般方法

蛋白质的种类很多,性质上的差异也很大,又处于不同的体系中,因此,不可能有一个固定的程序适用于各类蛋白质的分离工作。但多数分离工作中的关键部分、基本手段还是共同的。分离蛋白质的基本原料不外乎是细胞内含物和外分泌物。如果要分离的蛋白质是一种有活性的蛋白质——酶的话,在分离前要进行生物学试验,也就是以测定酶活力为起点。首先要测定原始粗材料总的酶活力,而且要在分离的每一步测定所得制剂的比活力。一般来说,分离、提纯的目的是,增加提纯步骤中每一步的比活力,尽量减少总活力的损失。

分离的第一步是细胞的破碎(原料是细胞外分泌物时,无须此步),从细胞内释放出内含物,然后对内含物(或组织匀浆液)进行适当稀释,以便于活力测定和下一步的提纯。

提纯的第二步,常常是用离心法将细胞的亚细胞颗粒(如核、线粒体、微粒体或核糖体等)与溶液分开。如果已经得到了具有某种活力的酶溶液(可能是原始抽提液或经离心沉降后的上清液),我们就可以采用几种溶解度分级法、进行粗分级。常用的是硫酸法和等电点沉淀法。其优点是,简单,而且适用于大量制备,既能除去大量杂质,又有利于蛋白质溶液的浓缩,使后来的操作更方便些。

样品经粗分级后,下一步就是细分级,也就是样品的进一步纯化。这里包括各种层析方法:如离子交换层析(DEAE-纤维素、CM-纤维素)、分子筛层析(Sephadex、Bio-gel)、还有吸附层析(羟基磷灰石),都是常用的方法。有时也用抗原抗体法、亲和层析法。若是小规模制备,则层析之后,接着,可以使用制备区带电泳、等电聚焦等方法进一步纯化(见第四节)。如有可能,还可以进行蛋白质的结晶,以便得到高纯度的天然蛋白质样品。上述过程可用图 3-1 表示如下:

在蛋白质纯化过程中,有几个问题必须时刻注意到。首先,提纯过程中始终要控制 pH 值,尽量避免由于过酸或过碱而引起蛋白质可解离基团发生变化,从而导致蛋白质构象的不可逆变化。缓冲液要有合适的 pK 值,又要对蛋白质无害。提纯植物和菌类中的蛋白质,需要较大的缓冲容量,因此,要注意缓冲液的浓度。还要注意溶液环境是否合适,会不会产生副反应等。含巯基的蛋白质(其中的巯基未结合成二硫键时)特别容易被氧化,因此,要维持一个还原环境。可以加入含有巯基的还原剂,而且要使整个体系保持无氧状态。但在有些情况下,加入的巯基化合物可能会抑制蛋白质的活力。

提纯过程中,通常要保持低温,因为细胞内有蛋白水解酶存在,这种酶在组织匀化以后是活化的,能降解要分离的蛋白质。因此,必须保持低温、降低降解酶的作用。但要注意,有时低温能使某些酶的四级结构遭到破坏。通常蛋白质在 0°C 最稳定,但丙酮酸羧化酶对冷敏感,25°C 时稳定。有些酶需 -20°C 或 -70°C 稳定活力。

蛋白质纯化过程中一个最大的问题是,在整个纯化过程中,蛋白质或多或少地总是要经受与

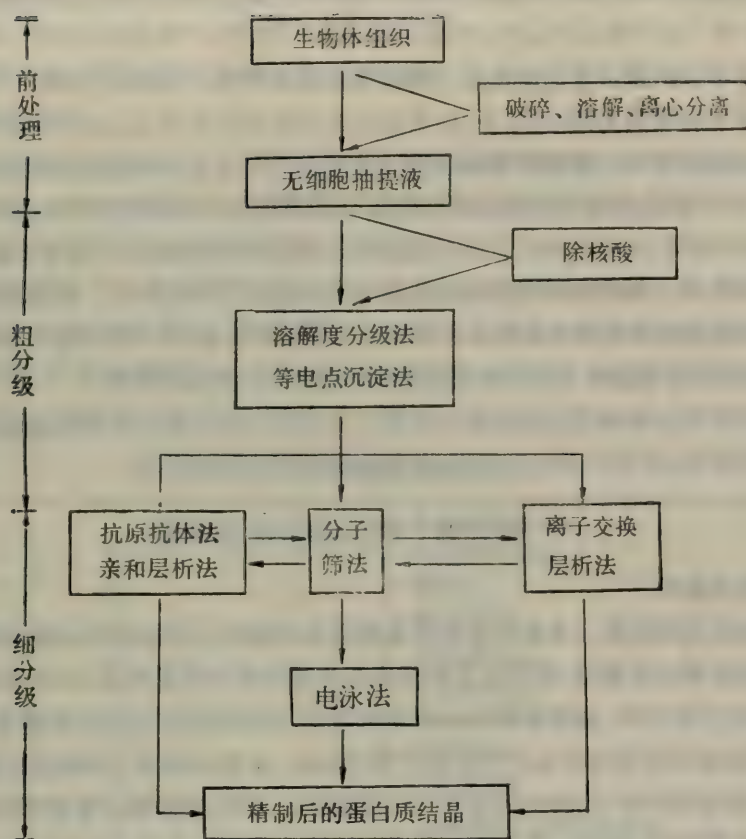


图 3-1 蛋白质分离提纯的一般程序

生理状态极不相同的溶液环境的有害影响。这一点对其功能在活细胞内受高度控制的蛋白质来说,是非常值得注意的。相反,有些蛋白质,如分泌蛋白质,却能忍受较大的环境变化,而不改变其结构和功能。为了减少很多蛋白质在稀的水溶液中的自发变性,可以向蛋白质溶液中加入小分子量物质(如蔗糖和甘油等)或加入其它已经纯化的蛋白质(如牛血清白蛋白、明胶等),这样,就使溶液中蛋白质的总浓度维持在较高的水平上。这是仿造细胞内环境的一个方法,可以减少水的有害作用。有时甚至加入二甲基亚砷、二甲基甲酰胺,加入的浓度需要试验,一般在1—10% (V/V)。少数蛋白质须在高离子强度的极性介质中保持活性,可加入 KCl、NaCl、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等来维持极性环境。

此外,还有一些常用的有效办法可以减少蛋白质变性,如有些二价离子(Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等)的存在有助于蛋白质或蛋白络合物的稳定性;提纯酶时,可以加入专一性的底物;有时候需要使用络合剂(如乙二胺四乙酸盐)来除去不需要的离子,特别是那些由水源带来的有害金属离子。这些方法可视不同情况加以采用。

要注意的另一个因素是,在提纯过程中,即使很小心,蛋白质也会经受结构上的变化。因此,提纯后的蛋白质,即使其活力基本上得以保留,它的构象也可能不同于天然构象或完整功能的构

象。在这种情况下,于生物体外测得的蛋白质的性质,未必能准确地反映这些大分子在活体内的性状^[11]。

含多个亚单位的蛋白质的解离是一种特殊类型的变性。提纯蛋白质时,当所测得的活力是仅由一种亚单位表现出来的时候,那么,其它的亚单位可能会因为注意不到而丢失。有的蛋白质在体内具有多功能形式,有的特殊的生物活性是由二个以上不同遗传基因决定的蛋白质一起显示的。因此,由一个已经纯化的蛋白质的性质去推断它在体内的完整的功能时,要特别小心。在这方面,于提纯期间,分析总的活力是有助益的。在提纯的早期阶段,由于干扰物质的除去,总活力可能会有所提高。如果拿最高总活力作基准,在提纯工作结束时,希望能回收最高总活力的50%。实际所能达到的收率往往只是5—20%。在有些情况下,特别是在有大量原料可供利用的情况下,我们可以专心致力于获得高比活的样品,而不必顾虑收率。

上述讨论可作为提纯蛋白质的基本准则。下边我们将对蛋白质提纯过程中所用的最重要的方法作一简要评论,在所引用的文献中,已有比较详细的实验步骤。

第三节 材料的选择与处理

一、材料的选择^[12]

分离精制蛋白质的第一个重要事情是选择适当的原料。蛋白质的来源无非是动物、植物和微生物。选择原料的原则是,原料所含有的要分离蛋白质的含量要高,而且原料还要容易得到。当然,由于研究目的不同,有时原料的量会受到限制,有时只能以特定的物质作为原料。应当注意的是,蛋白质含量在种属间有意想不到的差别,例如,人和牛的同一种物质的含量常常相差十倍之多。因此,选定材料时,先要对含量做一广泛调查。另外,蛋白质含量在不同的个体中,也有明显的不同。由于性别、年龄、季节、饲养条件及培养条件的不同,也会有量和质发生变化的情况。因此,要得到重复性好的结果,还要注意对材料的管理。

研究哺乳动物的蛋白质时,屠场上牛、羊、猪和马的组织、器官,实验动物,人的血、尿和尸体解剖材料是最普通的来源。选择动物材料时要注意,动物除了有共同的蛋白质和酶外,还有每个物种所固有的生物化学特征。现在已经知道,具有完全相同功能的蛋白质,由于物种不同,其氨基酸排列顺序可能不同。因此,选择动物时,非常重要的是,不仅要知道是否容易得到,而且要认识这些动物本身所具有的生理特征。还要注意,要尽可能地在接近正常状态下取出组织和器官,死后的变化要限制在最小限度内。所以,取出的组织和器官,要迅速处理,充分脱血后,立即使用或在冷库里冻结保存(-10—50°C)。

植物材料常局限于研究叶、果实和橡浆的蛋白质。用植物为原料提取蛋白质时与以其它生物有机体作为实验材料时,基本上没有什么不同,只是在一般的植物细胞里:① 含有大量的纤维素,很强韧;② 细胞膜破坏后,在提纯阶段,酚系物质氧化后变成暗棕色、与其它东西混在一起,很难除去;③ 细胞里有较大的液泡,里面含有许多不需要的代谢产物,细胞破碎后,这些东西就要改变提取所用的缓冲液的pH值;④ 由于植物品种和生长发育状况不同,其中所含蛋白质的量变化相当大;⑤ 植物材料和季节有关,要时时注意这方面的问题。另外,植物的种子、胚和花粉等在机能形态上也有不同,各器官、组织所含的蛋白质成分也不大相同。

微生物材料,无论是野生型菌株还是变异菌株,均被广泛使用。因为微生物的生长易受培养条件的变化所影响,因此以微生物为原料提取酶和蛋白质时,可以充分利用这一特性。选择适当的条件,常可得到含有数百倍到数千倍特定蛋白质的菌体。

二、细胞破碎的方法

大多数蛋白质存在于细胞内,结合于细胞器上,所以必须先将细胞破碎。要根据不同情况,采用不同的破碎方法。对动物组织可采用磨碎法、丙酮干粉法和超声波处理法等^[12]。对植物组织可用石英砂和适当的提取液混合磨碎,即能达到目的。

微生物细胞的破碎是个具有典型意义的问题。微生物细胞壁,据目前所知,它是由巨大的口袋形的高分子物质所构成,非常强韧。因此,要使细胞破坏,就必须使细胞壁结构中的共价键断裂。根据机理的不同,可将破碎的方法大致分为三大类,每一类还有一些作用近似的方法(见表3-1)^[13]。

表 3-1 微生物细胞的碎裂方法

I. 化学法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 碱或去垢剂破碎法 2. 有机溶剂提取法 3. 酶解法 4. 冰冻复融法
II. 物理法	<ol style="list-style-type: none"> 5. 热处理碎裂法 6. 渗透压碎裂法 7. 减压法(排除压力法) 8. 晶态转化法 9. 声波震荡法
III. 机械法	<ol style="list-style-type: none"> 10. 与磨料颗粒一起搅动的方法 11. 研磨法 12. 压挤法

化学碎裂法、冰冻复融法和酶解法的使用有较大的局限性,主要用来制备低分子化合物或稳定的高分子化合物。渗透压碎裂法、减压法和晶态转化法的破碎效率,一般说来,是不高的。所以,只有一些机械的方法比较常用。特别是当我们需要细胞材料中的酶来催化某些生化反应的时候,就常常要借助机械的方法。

各种不同的细胞材料对声波震荡法和压挤法的敏感程度大致平行。处于迅速生长期间的细胞比静止期的细胞更容易为物理的和机械的方法碎裂。声波震荡法对细胞壁的“溶蚀”作用特别强,这就会给后来的分离造成困难。用压挤法制备的细胞壁部分常比以搅动法制得的胞壁制品含有较多的胞膜酶。如果要在机械的方法当中进行选择的话,可以说,搅动法宜于用来制备细胞壁,而压挤法则宜于用来制备酶制剂。就一般的破碎目的来说,理想的方法应以恰好将细胞壁打开为度。为此目的,破碎力量有时需要作用于整个细胞,有时则需要某一时刻集中地作用于某一个位置上。

应当注意的是,细胞破碎这一步有可能影响蛋白质的物理性质,尤其是影响蛋白质的聚合状态。

细胞破碎的程度可用显微镜直接观察。主要是看细胞破碎的数目，而不是看释放出的蛋白质或酶的量。也可用分度管(graded tube)检查^[6]。将破碎细胞的悬浮液装于分度管中，离心3分钟，未碎的整细胞首先沉降，在它上面是细胞碎片，再上面是细胞质组分。每一层的相对含量即表示细胞的破碎程度。

现以棕色固氮菌为例，说明应用于细胞破碎的方法。在研究固氮酶结构与功能的实验中，常以棕色固氮菌为原料来提取固氮酶。固氮酶属胞膜酶，因此，用压挤法破碎细胞最为有利。通常用 French 压榨机进行破碎。其原理是让细胞在高压下通过一小孔，从而将细胞挤碎。它的最大压力可达 16,000 磅/英寸²。因为这种方法使用的压力比较大，机器要求的技术条件比较高，因此，我国目前尚少使用。现在我们常用的方法是超声波破碎法，即将细胞悬浮在适当的缓冲液中，然后用超声波发生器，以 18 千赫的频率、0.4 千瓦的功率超声破碎，一般也能得到满意的结果。还有用细胞自溶法，即将细胞干燥，然后以一定比例放于适当的缓冲液中，于 30°C，震荡 1 小时，最终所得的无细胞抽提液的蛋白质浓度可达 25—30 毫克/毫升。

三、抽提

生物材料中的蛋白质有些以可溶性的形式存在于体液（如血浆、消化液等）中，可以不必经过提取，直接进行分离。蛋白质中的角蛋白、胶原、丝蛋白等不溶性的蛋白质类，只需要用适当的溶剂洗去可溶性的伴随物，如脂类、糖类以及其它可溶性的蛋白质类，最后剩下的就是不溶性的蛋白质类。这里要说的是一般的蛋白质和球蛋白的抽提。这些蛋白质一般含在细胞内。要提取它们，先要将细胞壁打碎，然后再用适当溶剂（如水、稀盐溶液、缓冲液等）将蛋白质溶解出来，再用离心法除去不溶物，便得到粗抽提液。水适用于白蛋白类蛋白质的抽提。如果抽提物的 pH 用适当的缓冲液控制的话，其稳定性和溶解度都能增加。球蛋白类蛋白质能溶于稀盐溶液中，0.1 N NaCl 是典型的稀盐溶液。脂蛋白用稀的去垢剂溶液（如十二烷基硫酸钠）、白地黄皂甙(digitonin)或胆盐溶液，或有机溶剂来抽提。其它不溶于水的蛋白质通常用稀碱溶液抽提，但这样处理可能会部分改变蛋白质的结构。提取植物材料中的蛋白质时，要特别注意提取液的 pH 值，因为前已述及，植物细胞里有比较巨大的液泡，在细胞破碎以后，液泡里的物质能改变提取所用的缓冲液的 pH 值。因此，操作中可加入适量的碱。也有用稀碱一次提取的。为了防止酚系物质引起的着色，提取时可加入 5 mM 的抗坏血酸等。另一有效的办法是，把植物组织制成丙酮干粉后，再用适当的缓冲液抽提。

抽提的原则是“少量多次”，即对于等量的用于抽提的溶液，分多次抽提，比一次抽提好得多。这一点从下面的公式可以清楚地看出^[4]，

$$X_n = X_0 \left[\frac{KW}{KW + L} \right]^n \quad (3-1)$$

其中， W = 被抽提材料的体积， L = 每次抽提所用的抽提溶剂的体积； K = 所要的溶质在固相和液相中的分配系数； X_0 = 原先结合在固相中的所要提取的溶质的重量； X_n = 抽提 n 次以后仍保留在固相中的溶质。对于 10 公斤或大约 10 升固体，用 20 升缓冲液，分二次抽提，如果 $K = 0.1$ ，则有，

$$\frac{X_2}{X_0} = \left[\frac{(0.1)(10)}{(0.1)(10) + 10} \right]^2 = 0.0084$$

如果抽提一次,即 $n=1, L=20$ 升,则有,

$$\frac{X_1}{X_0} = \left[\frac{(0.1)(10)}{(0.1)(10) + 20} \right]^1 = 0.0476$$

这个计算充分地说明,若用同样量的溶剂抽提,则分批进行抽提,比一次抽提的效果更佳。

细胞组织状态被破坏以后,总是要把蛋白水解酶释放到溶液中,使蛋白质降解,从而导致天然蛋白质质量的减少。加入二异丙基氟磷酸 (DFP) 可以抑制或减慢自溶作用;加入碘乙酸可以抑制那些其活性中心需要有巯基的蛋白水解酶的活性。因为这些物质可与水解酶类活性部位发生不可逆相互作用,从而抑制了蛋白水解酶的作用。加入苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) 也能消除蛋白水解酶的活力,但不是全部,而且使用时要注意,因为会有副反应。还可以通过选择 pH、温度或有机溶剂,使这些条件适合于想要提取的那个蛋白质的抽提,而不利于蛋白水解酶,从而减少细胞自溶作用。

第四节 蛋白质的初步提纯

一、蛋白质性质上差异的利用^[6,17,20,21]

蛋白质提取液中,除包含所需要的蛋白质(或酶)外,还含有其它的蛋白质、多糖、脂类和核酸等杂质。要作进一步提纯,可先除去一些杂质。这就要根据具体情况,利用蛋白质性质上的差异来进行。目前常用的方法有:

1. 核酸沉淀剂法

从微生物中提取蛋白质时,其中常含有较多的核酸。因为核酸与蛋白质结合成一个大的聚合物,因而就不能根据蛋白质的性质来分离它们。所以,必须先除掉核酸。除核酸可用核酸沉淀剂,如氯化锰^[15]、硫酸鱼精蛋白^[16]、或链霉素^[22]等,必要时也可用核糖核酸酶除去核酸。也有人用脱氧核糖核酸酶与抽提液一起培养 30—60 分钟(4°C),这样就能把 DNA 降解成足够小的碎片,因此不能影响以后的提纯^[22]。

2. 蛋白质沉淀剂法

利用醋酸铅,利凡诺(7-乙氧基-2,5-二氧基吡啶)、丹宁酸、离子型表面活性剂等蛋白质沉淀剂,也可以除去一些杂蛋白。这些试剂还可以除去一些粘多糖类的物质。例如,在制备大豆的 β -淀粉酶时,加入 25% 的醋酸铅,可以除去大量的杂蛋白。因这类蛋白质沉淀剂也常常使所需要的酶(或蛋白质)缓慢变性而失活,所以在用这类试剂后,应当迅速进行盐析,使样品与这类试剂脱离接触。

3. 调 pH 值或加热沉淀法

利用蛋白质酸碱变性性质的差异也可以除去杂蛋白。例如,将根霉粗酶在 pH 2.6, 4°C 条件下,保存 10 天,则其中 α -淀粉酶的活力全部丧失,而所要制备的糖化淀粉酶的活力仍可保存 85%;利用蛋白质热变性的温度系数的差异,可以在一定的 pH 下,将蛋白提取液加热到一定的温度,使杂蛋白质变性沉淀。例如,将黑曲霉的粗酶液的 pH 调节到 3.4,在 40°C 保持 150 分钟,

则其中的淀粉酶活力丧失 90%，而所要制备的脂肪酶的活力仍保持在 80% 以上，脂肪酶的比活力提高三倍。因为酶和底物或竞争性抑制剂结合后，稳定性显著增加，因此，利用这一性质，可向抽提液中加入所要酶的底物，然后用比较激烈的方法（如加热等）处理，可以除去抽提液中的大量杂蛋白。例如，D-氨基酸氧化酶，当加入竞争性抑制剂（邻-甲基苯甲酸）时，其稳定性大大增加，可用加热法除去杂蛋白，得到很好的提纯效果^[18]。

4. 选择性变性法

利用各种蛋白质稳定性的不同，可以用选择性变性法来除去杂蛋白。例如，象胰蛋白酶、细胞色素 c 等少数特别稳定的酶，甚至可以用 2.5% 三氯醋酸处理，这时其它杂蛋白都变性而沉淀，而胰蛋白酶和细胞色素 c，则仍留在溶液中。

5. 蛋白质表面变性法

利用蛋白质表面变性性质的差异，也可以除去杂蛋白。例如，在制备过氧化氢酶时，加入氯仿和乙醇进行振荡，可以除去杂蛋白^[19]。

二、沉淀技术

如果除杂质进行到一定程度时，就可进行蛋白质的粗分级。而某些材料不需除杂质，直接就可进行蛋白质的粗分级。分级粗样品的一个常用的方法是溶解度分级法，即选择性沉淀。下面简述与此有关的一些方法。

1. 电荷密度的控制

蛋白质所带电荷与溶液的 pH 值密切相关。蛋白质的带电情况还与其等电点有关，pH 值在等电点以上，蛋白质带负电，在等电点以下，则带正电。带电的蛋白质分子比中性分子溶解度高。对大多数蛋白质来说，它的溶解度在等电点附近的 pH 值下，达到最小值，因为此时分子间静电排斥力最小。利用这一性质，我们改变溶液的 pH 值，就能使某些蛋白质沉淀。一种情况是，所要的蛋白质可能沉淀，而与仍留在溶液中的杂蛋白质分开，或者相反，所要的蛋白质留在溶液中，而不要的蛋白质沉淀，然后离心弃去。因等电 pH 值是蛋白质的特征性质，因此，仅仅控制 pH 值，也是选择性沉淀的一个有用方法。但必须注意，此法比较难于掌握，因为它所使用的条件比较激烈，其应用也是有限的。对于某一特定的蛋白质，pH 可在什么区间变化、pH 变化的速度可以快到什么程度、这些条件必须经过实验确定。蛋白质中的盐类，对等电点沉淀有一定的影响，这种影响由于蛋白质的不同而有所差异，但一般影响不算大。如酪蛋白溶液在无盐时，pH 为 4.8 时，其溶解度最小；当离子强度为 0.1 时，pH 值移到 4.06，溶解度才最小，向酸性方向有微小的移动。

溶剂的极性也影响溶解度。当加入易与水相混合的有机溶剂时，蛋白质的溶解度降低。主要原因是有机溶剂改变了溶液的介电常数。由于蛋白质间静电作用反比于介质的介电常数，因此，当向蛋白质溶液中加入有机溶剂时，则使其介电常数降低，因而增强了蛋白质分子间的静电作用力，减弱了蛋白质和溶剂分子间的相互作用，导致蛋白质发生聚集而沉淀。另一个因素是脱水作用。由于有机溶剂也必须溶解在溶液中，因此，它与水作用，则与蛋白质作用的水就减少了，从而使蛋白质脱水而沉淀。

应用此法时必须考虑以下四个问题：① 沉淀蛋白质时介质的离子强度；② 用什么样的有机

溶剂；③ 蛋白质沉淀时的温度；④ 沉淀的具体办法。在低离子强度下，增加有机溶剂的量、会大大降低蛋白质的溶解度；适当增加离子强度，会引起蛋白质溶解度的增加。虽然降低离子强度能降低蛋白质溶解度，但也可能影响蛋白质的稳定性。对由许多亚单位组成的蛋白质来说更是如此。当然，对某一特定蛋白质的影响必须用实验来确定。

常用的有机溶剂有乙醇、甲醇和丙酮。二氧六环、四氢呋喃也能很好地溶于水，但它们常被过氧化物污染，而过氧化物对大多数蛋白质都是有害的，所以，很少使用。

沉淀时的温度是应用此法时必须考虑的一个重要因素。当有机溶剂存在时，蛋白质的溶解度随温度的降低而显著降低。因此，低温时(0°C 以下)沉淀某个蛋白质所需的有机溶剂量就较少，这样就减轻了有机溶剂对蛋白质的变性作用。虽然关于温度因素作用的道理尚难说清，但一般的规律是，有机溶剂沉淀蛋白质时的温度越低，得到的活性蛋白质越多。

关于用有机溶剂沉淀蛋白质的具体办法这里就不说了。操作中的关键问题是，丙酮与蛋白质接触的时间要尽可能的短，以防蛋白质变性。当然，如果所要蛋白质对有机溶剂的变性作用有很强耐力时(如蓖麻子过氧化氢酶)，则不必顾虑这一点。这时可用类似于盐分级的办法，用有机溶剂进行分级。

2. 控制水合^[22]

蛋白质在水中的溶解度取决于蛋白质分子上离子基团周围的水分子的数目，即取决于蛋白质的水合程度。因此，控制水合程度，也就是控制蛋白质的溶解度。控制的方法，最常用的是加入无机盐。常用的无机盐是硫酸铵。虽然，其它的盐类，原则上，也都能用作沉淀剂，但这些盐类没有硫酸铵用的广泛。因为硫酸铵在水中最稳定，溶解度大，在 25°C ，能得到 4.1M 的浓度(温度不同，稍有差别)；它是最温和的试剂，提纯时，即使硫酸铵的浓度很高，也不会引起蛋白质生物活性的丧失。当溶液中硫酸铵的浓度从零增加时，一开始，蛋白质的溶解度有所增加(这叫“盐溶”现象)，但很快这个盐溶现象就结束了。当盐浓度继续增加到某一点时，蛋白质开始变得不溶而沉淀下来，这就是“盐析”效应。由于各种蛋白质的表面极性基团和带电数目的不同，并且在蛋白质表面上的分布也不同，这就产生了盐析顺序上的先后差异。利用硫酸铵沉淀法分级蛋白质就是根据这个道理。盐溶和盐析主要决定于溶液的离子强度^[23]。通常之所以用硫酸铵作沉淀剂，就因为它溶解度高、容易达到较高的离子强度。但也有人认为，盐是脱水剂，盐析过程是蛋白质的脱水过程^[22]。由于硫酸铵的溶解，则大量水结合到硫酸铵分子上。因此，随着硫酸铵分子数目的增加、与蛋白质相互作用的水量就少了。当达到某一点时，将不会有足够的水使蛋白质维持在溶液中，因而蛋白质就沉淀出来。

此法的实际运用是这样的，先用少量样品作试验，以确定沉淀某个蛋白质所需要的硫酸铵浓度。将少量样品冷却到 $0^{\circ}-5^{\circ}\text{C}$ ，然后搅拌下加入固体硫酸铵粉末，直到可以看见蛋白质沉淀产生。离心除去蛋白质沉淀。分析上清液，以确定所要蛋白质的浓度。如果它仍在溶液中，则弃掉沉淀，然后加入更多的硫酸铵于上清液中，直到产生蛋白质沉淀时为止。然后，如此重复这个过程，直到所需要的蛋白质沉淀为止。再加少量硫酸铵，以使这个蛋白质沉淀完全，仍保留在溶液中的其它物质弃掉。图 3-2 表示一个典型的例子。这是所要提取的蛋白质在溶液中的浓度对硫酸铵浓度作图。此例中，当硫酸铵浓度达到 40% 饱和度时，此蛋白质仍保留在溶液中；但在 50% 饱和度时，则

开始部分沉淀;60%饱和度时,则大部分沉淀;70%饱和度时,则仅有少量蛋白质仍留在溶液中。用这个实验数据,画一沉淀曲线,以找出蛋白质开始沉淀的那一点。在此情况下,大约是45%。

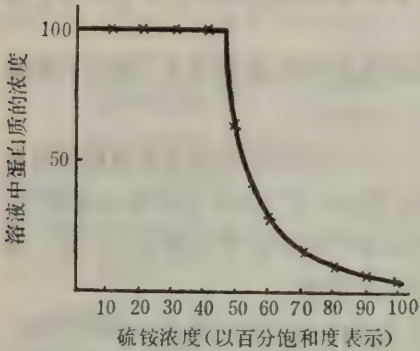


图 3-2 硫酸铵沉淀蛋白质图,实验点用×表示

然后可以用大量不纯样品进行分离,算出要达到40%饱和度,需要加多少固体硫酸铵。加入此量硫酸铵,待完全溶解后,离心除去不要的蛋白质。上清液再加入更多的硫酸铵,以达到70%饱和度,再离心,这次的固体沉淀则含有大量所要提取的蛋白质。当然在45—70%饱和度间沉淀的其它蛋白质也可能含在沉淀中。如果不考虑收率的话,饱和度区间也可以取得窄一些,如45—60%,这样能排除一些杂蛋白,使纯度高一点。

实际操作时,有几点要特别注意:

① 对要提纯的蛋白质,必须有一个特异的分析方法,以找到沉淀它的盐浓度范围。对酶来说,则用酶活力分析法,但对其它蛋白质则必须考虑这个问题。即使是酶也要在分析前除去硫酸铵或稀释,因为高浓度的硫酸铵,一般来说,不利于酶活力的测定。

② 加入无机盐的速度很重要。对很多蛋白质来说,必须逐步加入,即少量加入,待其溶解后再加。另一方面,如果脱水太慢,则另外一些蛋白质又可能变性。因此,对某一特定的蛋白质,加盐的最适速度,必须用实验来测定。盐加入后,要慢慢搅拌10—60分钟,以达到完全的平衡,然后,离心收集。

③ 蛋白质开始沉淀那点的硫酸铵浓度与溶液中那个蛋白质的起始浓度有关。例如,如果有人做图3-2的实验,用的蛋白溶液仅有50个任意单位,而不是如图所示的100个单位,那么直到溶液的硫酸铵浓度达到52%饱和度时(而不是45%饱和度),该蛋白才开始沉淀。使蛋白质开始沉淀的硫酸铵浓度还决定于与该蛋白质一起存在于溶液中的其它蛋白质。所以,由于这一点,有时(特别是在提纯后期,想要硫酸铵使其再沉淀,以进一步纯化时)会产生混乱。

④ 关于硫酸铵浓度的表示法。通常是用硫酸铵的饱和溶液(25°C时为4.1M)的百分数来表示,而不是盐的实际的克分子数。这是由于当固体硫酸铵加入到水溶液中时,会出现相当大的非线性体积变化,因此,计算克分子浓度就相当麻烦。为了克服这个困难,有人经过小心测量,确定了使1升纯水提高到不同浓度所必须加入的硫酸铵量,而且还确定了从某一浓度的一升溶液提高到另一浓度所必须加入的硫酸铵量。这些有价值的实验数据,以饱和浓度百分数的形式列于表附录三,而且至今仍以这种形式使用。表中溶液的温度是25°C。虽然,由于在0°—5°C下操作,会有所差别,但这个差别很小,常可忽略。对于大体积的粗制备物,常以固体的形式加入硫酸铵。但加入固体硫酸铵常使溶液起泡沫。一般说来,这不是个问题,但某些易于表面变性的酶会被泡沫所变性。在这种情况下,加饱和硫酸铵溶液较好,尽管这样做会使体积变大。沉淀小体积纯化的或部分纯化的蛋白质,可采用以滴的形式加入饱和硫酸铵溶液。这是一种更为温和的脱水方法,因为蛋白质脱水的速度可以控制。遗憾的是,此法对大体积溶液不适用,因为饱和硫酸铵液的加入会使样品体积大增。如,当达到50%饱和度时,样品体积增加一倍。如果使用硫酸铵的饱和溶液,则加入的量可

用下式计算：

$$V = V_0 \frac{C_2 - C_1}{100 - C_2} \quad (3-2)$$

其中， V_0 ——蛋白质溶液的初始体积

C_2 ——所要达到的盐饱和度

C_1 ——原来的盐饱和度

⑤ 由于硫酸是个弱酸，其铵离子的 pK 值为 9.25，所以，它的饱和溶液的 pH 值低于 7。如果所要的蛋白质易于酸变性，则应在适当的缓冲液中进行沉淀。

⑥ 由于浓硫酸溶液的密度，在 20°C 时是 1.24，而被沉淀出来的蛋白质的密度一般不会比此值大许多。对大多数蛋白质来说，其密度大约是 1.37。因此，蛋白质从悬浮液中沉降出来的速度极慢，必须用强力离心来促进这个过程。通常用 $19,000 \times g$ 以上的离心力。但是，如果加入太多的甘油或其它高密度物质来稳定样品的话，那么，即使使用强力离心也要出麻烦：一般离心时，管底出现致密的丸状物，上清液很易倾出。如果溶液密度太高，则形成的是松散的易移动的沉淀，几乎不可能倾析出去。这时唯一的补救办法是降低溶液的密度，因为长时间的高速离心不起作用。

⑦ 硫酸分级的改良方法——反抽提法也很有用。我们以大肠杆菌 RNA 聚合酶为例。此蛋白一般在 42—50% 饱和度之间沉淀。一般的作法是先用 42% 饱和度沉淀杂质，然后用 42—50% 饱和度沉淀此酶。现在，我们不这样做，而是先用 0—33% 饱和度沉淀杂质，离心弃去，然后用 33—50% 饱和度沉淀此酶。为了反抽提，将此酶沉淀重新悬浮于 42% 饱和度的硫酸溶液中，这时，某些杂质溶解，但聚合酶仍是沉淀，经过适当的平衡后，离心收集沉淀。此法的原理是，先沉淀较多量的蛋白质，然后用适当选择的硫酸溶液抽提沉淀。用反抽提法也能完成完整的硫酸分级。先将饱和度调到 60—70%，然后用硫酸浓度递减的溶液抽提沉淀。但在多数情况下使用阶段沉淀，然后反抽提比较合理。反抽提法的优点在于，蛋白质可以很容易地从溶液中析出，这个析出过程并没有什么特异性，但从沉淀的形式溶解下来却比较特异，因此，所得到的分级组分比用一般分级法所得到的要纯一些。

硫酸分级法有二个主要优点：一是在这一步能除去 75% 以上的杂质。从提纯的倍数看，这个提纯程度(四倍)是相当可观的。二是经过这一步，蛋白质溶液能被大大地浓缩。这一点很重要，因为较小体积为以后使用高分辨率的方法提供了方便。浓缩的程度决定于用来溶解蛋白质沉淀的溶液的多少。

3. 选择性沉淀^[20,21]

利凡诺、丹宁酸、离子型表面活性剂、鱼精蛋白和硫酸链霉素等蛋白质沉淀剂是多价阳离子物质，能束缚在阴离子化合物上，从而中和掉它们所带的大部分电荷，因此，能和蛋白质形成复合物沉淀下来，再用适当的方法使复合物溶解，除去沉淀剂，即可使酶得到纯化。

常用的离子型表面活性剂有十二烷基硫酸钠(SDS)、氯化苄叉烷基二甲胺等。近年来有人用杂多酸(磷-、砷-、硅-或硼-的钨酸、钼酸或钒酸)作为蛋白质沉淀剂^[24]。如，将枯草杆菌的培养液，浓缩到含 6% 固形物，用稀盐酸调节到 pH 4.5，添加磷酸钨，使其浓度达到 0.5% (重量/体

积)。搅拌后,在室温放置 5 分钟,就可将蛋白酶沉淀出来。

4. 水溶性非离子型聚合物沉淀法^[6]

这是近年新发展起来的一种方法。常用的聚合物是聚乙二醇 (PEG)、右旋糖酐硫酸钠等。水溶性非离子型聚合物沉淀蛋白质的原理,还不太清楚,大致有如下几种解释: ① 聚合物与蛋白质形成共沉淀; ② 聚合物使蛋白质在聚合物与水之间发生分配; ③ 聚合物与蛋白质分子间发生反应,形成一种复合物。此法的特异性受很多因素影响,主要的有:pH 值、离子强度、溶液中的蛋白质浓度,以及所使用的 PEG 的分子量等。分子量为 2,000—6,000 的 PEG 适宜作沉淀蛋白质之用。很多人使用 PEG 6000 获得了成功。最近有报告称,用低分子量的 PEG 4000 也能得到很好的特异性沉淀分离,其结果可与凝胶层析法所得之结果相比拟^[25]。

三、透析和浓缩^[6]

经硫酸铵沉淀的蛋白质,在作进一步提纯以前,常要除盐,即降低离子强度。除盐的方法有透析法,即将要透析的蛋白质溶液放于具有半透膜性质的玻璃纸袋中,然后将此袋放于水中或适当的低离子强度的缓冲液中,则无机盐类和小分子的代谢产物,如 ATP、辅酶等,由于扩散作用而通过半透膜被除去,大分子蛋白质则仍留在袋中。为了缩短达到平衡的时间,要不停地搅拌缓冲液。每次平衡的时间一般须 5 小时或更多的时间。如离子强度仍未达到要求,可另换新的缓冲液,继续透析,直至达到要求。此法虽然比较温和,但很多蛋白质,在透析过程中还是不稳定。这是因为买来的透析袋常被重金属、蛋白水解酶、核酸酶等污染。所以,使用前,必须进行处理。处理的办法是:将透析袋放于 0.5 M EDTA 溶液中煮半小时,弃去溶液,换上水,再煮八次。经这样处理后的透析袋只能用干净的镊子(无蛋白水解酶和核酸酶)和医用橡皮手套来拿,不能用手拿,因为手指常带有蛋白水解酶。

另一个除盐的办法是用分子筛层析。常用 Sephadex G-25 柱层析法:先用起始缓冲液平衡,然后加样品。加样量不能超过床体积(即凝胶在柱中所占的体积)的 20%。再用起始缓冲液洗脱。蛋白质在一个空体积(相当于总床体积的 1/3)流出,盐在一个总床体积后流出。少量样品可很快通过柱。大量样品还是以增加柱的直径为好,而不是增加其长度,这样能缩短层析时间。

最近又有一种新的除盐方法,叫“纤维过滤透析法”(fiber filter dialysis)。关于此法的原理,我们在下边讨论蛋白质浓缩法以后,就会很清楚了。

蛋白质提纯过程中,为了操作方便,要减少样品的体积;在实验室中操作的一些方法,如凝胶过滤层析法,也要求较小体积的样品溶液。因此,必须建立浓缩蛋白质溶液的方法。前面已经提到,硫酸分级法是浓缩蛋白质的一种方法。在不希望使用盐沉淀或用盐沉淀法对样品有害时,则采用冻干法、真空干燥法等。此法的缺点是,蛋白质和无机盐一起被浓缩。还有人用葡聚糖凝胶来浓缩:向一升左右的酶液中,加入固体的葡聚糖凝胶 G-25,搅拌 30 分钟,葡聚糖吸水膨胀,然后吸滤,样品全部留在滤液中。如此重复数次,可在短时间内将酶液浓缩到 100 毫升。前后加入的葡聚糖凝胶的总量,以占酶液重量的 1/5 为宜。因为固体葡聚糖凝胶只吸收水分,不能除盐,因此和冻干法具有同样的缺点。为了克服这一缺点,产生了一系列只浓缩大分子的方法。现简述如下:

1. 用火棉胶袋浓缩

火棉胶薄膜一般可通过分子量为一万的物质,将其制成特殊形状的小袋,蛋白质溶液放入其中,然后将此袋置于吸滤瓶内,轻轻减压,水分及无机盐等小分子则流向膜外,蛋白质即被浓缩。

2. 用聚乙二醇浓缩

将待浓缩的蛋白质溶液放入透析袋内。此透析袋(一般呈圆管形)的直径要小,因为这可增加有效表面积与蛋白液体积之比,提高浓缩效率。透析袋封闭后,用冷的粉末状聚乙二醇(PEG 6000)涂于透析袋上,置于 4°C 下。干的粉末 PEG 吸收水分和盐类,大分子溶液即被浓缩。聚乙二醇吸水的速度很快。100 毫升的蛋白液,在极短的时间内就能浓缩到几毫升。如聚乙二醇已变湿成块,但还未浓缩到所需的体积,则可将成块的聚乙二醇除去,继续涂上新的,直至达到所需要的体积。PEG 已成批生产,可供利用,也不必事先干燥,因为加热会使它成为不能用的腊状物。此法方便,而且对大多数不稳定的蛋白质也可以用。

3. 用超滤膜浓缩

近年国外已生产各种不同型号的超滤膜,可以用来浓缩分子量不同的(500—300,000)物质。现将其部分列于表 3-2 中。由于每种膜都有一定的分子量截止值,即比比值更大的分子不

表 3-2 Diaflo 超滤膜的分子量截止值

膜 名 称	分子量截止值	孔的大约平均直径(Å)
XM-300	300,000	140
XM-100	100,000	55
XM-50	50,000	30
PM-30	30,000	22
UM-20	20,000	18
PM-10	10,000	15
UM-2	1,000	12
UM-05	500	10

能透过此膜,所以,超滤法不仅有浓缩的作用,而且还有除盐、分级、纯化的作用,但分辨力远不及分子筛层析法。此法操作方便、迅速、温和、处理的量可大可小(从 2—3 毫升到几百升),是生化实验室必须建立的一个实验方法。用此法浓缩蛋白质的装置叫超滤器。它是一个密闭的装置,器底装有超滤膜,膜上面是待浓缩的溶液,在溶液表面上再加一定的压力(通常是 3—5 kg/cm²),此时,压力迫使小分子透过膜,从超滤器里流出来。这种超滤形式叫封闭式(dead-end system),只适用于稀溶液,最终浓度不超过 1.0%。因为浓度大时,阻留在膜表面的大分子,不能返回溶液,致使膜表面的大分子浓度高于溶液中的浓度,这种现象叫做极化。由于极化现象的产生,膜的孔隙被大分子堵住,因而影响流速。为了克服这一困难,又发展了以下三种超滤装置:

① 搅拌式(stirred system)

这种装置和封闭式相似,只是在膜表面上装有一搅拌子,以防止产生极化作用,保持超滤流量。搅拌子必须紧靠着膜表面,但又不能和膜接触。这种超滤器最常用、一般能得到满意的

结果。对大多数膜来说，最后的超滤流量减少近 50%。超滤的速度主要取决于膜的交换面积。

② 湍流式(turbulent flow system)

与膜表面平行有一相当宽的管道，管道中流过高速流动的液体，以此提供湍流，减少极化界面。这是一种大型装置，需要大容量的泵，适于工业生产。

③ 细管层流式(thin-channel laminar flow system)

待浓缩的溶液在细管中高速循环，通过膜表面时就产生一种高速层流，因而当溶质浓度相当高时，也能维持超滤速度。膜上的液体的流速通常是 10—100 英尺/秒，超滤的膜压力由外部气体提供。此法的优点是，处理的溶液量大，可达几百升；对多数不稳定的酶也可以应用此法，此法的超滤速度是搅拌式的二倍到三倍(当溶液浓度较稀时)或六倍(当溶液浓度较高时)。分级的效率也有所提高。高速循环有一个缺点，就是不稳定的酶可能变性，因此，有人采用低速(2—3 英尺/分)、低压(20 磅/英寸²)循环。

应用超滤法要注意几个因素：选择膜时要注意它的流量，要尽量没有吸附作用；使用的超滤系统应能避免极化，而达到最大流量，而且还要尽量减少变性作用。

用上面的超滤膜制成空心的纤维管，将很多根这样的管拢成一束，管的两端与低离子强度的缓冲液相连，使缓冲液不断地在管中流动。然后将纤维管浸入待透析的蛋白质溶液中。当缓冲液流过纤维管时，则小分子很易通过膜而扩散，大分子则不能。这就是前面提到的新的透析法——纤维过滤透析法。此法原理与普通透析法完全一样，只是由于膜做成了纤维管，其透析的有效表面积大增，因而使透析时间从通常的 5 小时缩短到半小时。此法也可用于浓缩蛋白质溶液，这么用的纤维管腔是空的。

第五节 蛋白质的进一步提纯

待提纯的样品经粗分级后，还是很纯的，还要做进一步的提纯，就是细分级。细分级有几种方法，其中最常用的是层析法，有时也用到电泳法和超离心法。层析法是蛋白质分离提纯中最方便有效的方法之一。层析法可分为几种。分离中究竟选择哪一种，取决于被分离的物质。下面我们就层析方法加以扼要的叙述。然后也要略述电泳法和超离心法。

一、层析方法的一般原理

所有的层析系统通常都由两相组成，一个是静相，一个是动相，这两相互不相溶。物质在层析系统中的分离就决定于该物质在这两相中的分配情况，一般用“分配系数”来表示。对于具体的物质，在一定的温度下，在一定的层析系统(假定由溶剂 I 和 II 组成)中，它的分配系统是恒定的，可用下式来表示：

$$\frac{\text{物质在溶剂 I 中的浓度}}{\text{物质在溶剂 II 中的浓度}} = \text{常数}$$

物质分配这个概念不仅仅是指物质在两个溶剂相间的分配。物质可以在任何两相间发生分配，如，固相-液相，或气相-液相。如果物质在某系统中(如硅酸-苯)的分配系数是 0.5，这就是说，该物质在苯里的浓度是在硅酸里的二倍。分配系数这个概念是层析的基础。为方便起见，我们

可以把分配系数理解为物质在动相和静相间的浓度比。

“有效分配系数”是物质在一相中的总量(不是浓度)与它在另一相中的总量之比,换句话说,有效分配系数是分配系数与在此系统中存在的二相的体积之比值的乘积,以 B 表示。例如,某物质在溶剂 I 和溶剂 II 之间的分配系数是 1, 如果该物质在 10 cm^3 的溶剂 I 和 1 cm^3 的溶剂 II 间达到平衡的话,那么,它在这二相中的浓度相等,但它在溶剂 I 中的总量却是它在溶剂 II 中的 10 倍。

层析系统中的静相可以是固相、液相或固-液混合相;动相可以是液相或气相,充满在静相的空隙中,并能流过静相。层析相的选择要使混合物的组份在二相中的分配系数不同。这样,在建立下述平衡后,就可以分离它们。

- ① 固体吸附剂的静相和液体的动相间的吸附平衡(吸附层析);
- ② 液体或半液体的静相和液体动相间的平衡分布(逆流分配和纸层析);
- ③ 液体静相和气体动相间的平衡分布(气-液层析);
- ④ 离子交换树脂的静相和电解质的动相间的离子交换平衡(离子交换层析);
- ⑤ 多孔物质或分子筛的内外表面上的液相间的平衡(分子筛层析);
- ⑥ 大分子对小分子的结合平衡,这种结合是由于大分子对小分子的生物特异性——即亲和力而引起的(亲和层析)。

以玻璃层析柱为例,可以很容易理解层析分离所依据的道理。假定层析柱由固体颗粒状的静相填充物填充 5 厘米高,其间充满液体动相,并且每厘米柱长的体积为 1 cm^3 , 见图 3-3。如果在柱顶加入 1 cm^3 溶剂,其中含 32 mg 样品,同时,相等体积的溶剂从柱底流出,此时,样品处在柱中 A 的位置。如果样品有效分配系数是 1, 那它在固相、液相间等量分配,如图中 1, 即溶剂中含 16 mg 样品,16 mg 样品保留在填充物上。再加 1 cm^3 溶剂时,处于 A 位置的体积就移到 B 位置,并且带走溶剂中的 16 mg 样品,剩下的 16 mg 样品仍留在 A 处,如图中之 2。在 A 处的样品又这样重新分配,它的 8 mg 进入溶剂,剩下的 8 mg 仍留在固相;在 B 处的样品同样要在两相间等量分配,即溶剂中含 8 mg 样品,固相中保留 8 mg 样品。再加 1 cm^3 溶剂,则柱顶含 8 mg 样品的溶剂被洗到 B 段中,留 8 mg 样品在 A 段的填充物上。原来在 B 段中的溶剂被挤到 C 段中,并带走 8 mg 样品,留下 8 mg 样品在 B 段填充物上,所以, B 段中现在含有 16 mg 样品,其中一半来自 A 段洗下来的,一半是前一次平衡后的量中保留下来的,如图中之 3。再继续加入二次新的溶剂(每次 1 cm^3)后,样品在柱中的分配情形如图中之 4、5 所示。

显然,加样后,加入 4 次溶剂,样品即分布在全柱,而且最高浓度部分在柱的中央。如果样品有效分配系数 B 小于 1, 则在每次平衡后,有 50% 以上的样品留在固相中,样品从柱中流下较慢。虽然经过 5 次平衡后,有相当量的样品在柱底出现,但其浓度高峰将在柱中央以上。同样,如果 B 大于 1, 大部分样品将在溶剂相中,它从柱中流下较快,浓度高峰将在柱中央以下。显然,如果 $B=0$, 也就是说,溶剂相中没有样品,则样品留在柱顶不动。如果 B 为无限大,即填充物不保留样品,则 5 次平衡后,全部样品将流到柱底。

平衡的次数越多,则样品在柱中某部分的浓度越高,即溶质带越集中。图 3-4 表明, B 为 1 的物质的洗脱图谱与平衡次数 n 之间的依赖关系。从图中可以看出,当 n 极大时,柱中带变得非

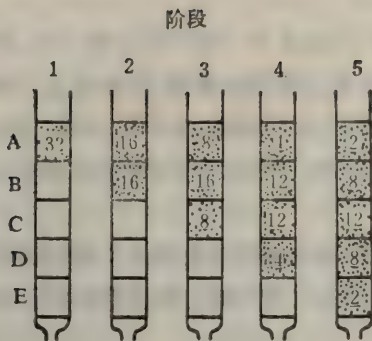


图 3-3 层析柱分离物质示意图

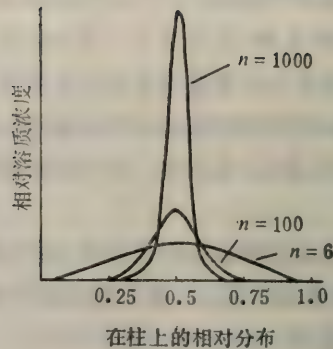


图 3-4 洗脱图谱与理论板数 n 的依赖关系

常集中。因此,溶质的分配性质基本上由两个因素决定:分配系数和平衡次数。溶质通过柱的速度决定于它的有效分配系数,但所形成的峰的形状(即溶质带的集中度)则取决于进行平衡的次数。在层析柱中所发生的平衡次数叫做柱的理论板数。“理论板”这一术语是用来表示蒸馏柱的有效性的,在层析柱中用它表示柱中发生的相间有效平衡的次数。柱的有效性越高、理论板的数目越大。

当柱的理论板的数目大时,溶质的性质遵守某些简单的规则,这些规则的推导请参见文献[26]。

先讲一个所谓全柱的性质。全柱就是从加入样品的一点到与样品同时加入的溶剂所达到的最远一点间的一段柱子。如前所述,在一个全柱中,溶质带的位置决定于有效分配系数 B , B 与溶质带间的实际关系如下式所示:

$$P/L = B/B + 1 = R_f \quad (3-3)$$

这里, L 是全柱的长度, P 是溶质带尖峰距加入溶质之点(柱顶)的距离。可见, P/L , 也就是 R_f , 表示溶质在柱内移动的速度。当 B 大于 1 很多时, P/L 接近于 1, 就是说溶质带与溶剂前沿的移动几乎同样快。相反,当 B 小于 1 很多时, P/L 也小于 1 很多,此时,与溶剂前沿相比,溶质移动较慢。当 $B=1$ 时, $P/L=0.5$, 溶质带将在柱的中央,如图 3-3、图 3-4 所示。应指出的是, P/L 或 R_f , 即柱中带的相对位置与全柱柱长无关,只决定于 B 值。

从图 3-4 中可见,在一个全柱中增加平衡次数,并不改变带的相对位置,只能增加分离的明显程度,即带的鲜明度增加了。带的鲜明度既取决于 n 值(理论板的数目),也和有效分配系数 B 有关。鲜明度越大,分离效果越好,因此,很自然会使人想到柱的分辨力问题。层析柱分开两个化合物的能力决定于这两个化合物的 B 值之比和柱中理论板的数目。高分辨力是指分开分配系数相差很小百分数的化合物的能力,但这样表示有一个缺点,就是百分数相差很小,但却表示很高的分辨力。因此,分辨力的更恰当的定义应当是,为了达到很好的分离目的所需要的有效分配系数百分数差的倒数。当相对分辨力这样定义时,可用下式表示(见文献[26]):

$$\text{相对分辨力} = \frac{\sqrt{Bn}}{B+1} = \frac{\sqrt{nP(L-P)}}{L} = \sqrt{nR_f(1-R_f)} \quad (3-4)$$

这个式子表示,对于一定的 B 值,层析柱的分辨力与此柱所含理论板的数目的平方根成正比。如果其它的变数不变,柱长增加,则分辨力也增加。对于一定的层析柱,分辨力在柱顶为零,此处 $P=0$;在柱底也是零,此处 $P=L$,而在柱中央时,分辨力最大。

对于流动层析柱,由于溶剂不断加入,因此平衡不断进行,一般可达上千次,它的分辨力可用下式表示:

$$\text{相对分辨力} = \sqrt{\frac{n'}{B+1}} = \sqrt{\frac{n'(V-v)}{V}} \quad (3-5)$$

n' 为流动层析柱的板数; v 为在任何时间在柱中存在的动相的体积; V 是将某一溶质带尖峰洗到洗脱液中所必须的动相的体积,一般称为保留体积。可以看出,流动层析柱的分辨力随洗脱体积增加而增加,但很快达到最高值。对于一定的管柱,此最高分辨力是当此管柱用作全柱时所能达到的分辨力的两倍。因此,有一定柱长的流动的层析柱比相应的全柱分离效果好,因为这时低 B 值的化合物,其平衡的次数远远超过管柱中板的数目。

理论板数是层析系统的重要参数。对于全柱可用下式来测定:

$$n = \frac{8 P(L-P)}{W^2} \quad (3-6)$$

此处, n 是板数, W 是溶质带的宽度,在峰的总高度的 36.8% 处测量。

对于流动层析柱,用下式测定:

$$n' = \frac{8 V(V-v)}{(W')^2} \quad (3-7)$$

n' 是板数, W' 是溶质带的宽度,也是在峰总高度的 36.8% 处测量。

二、分配层析

1. 纸上层析法

纸上层析图谱是一个完全的层析柱,因为被分离的化合物在分离过程的终了仍然在柱上。在层析纸条上,从加上样品的点到溶剂前沿构成了一个完全的层析柱。此法的原理是化合物在两个液相间发生分配作用。因层析纸具有从饱和蒸汽压中吸收极性溶剂(如水),或者由纸的纤维素从移动的溶剂前沿中优先吸收极性组分(如水)的性质。可以把极性溶剂(水)看作静相,当非水溶剂(动相)通过毛细管作用沿纸移动(这叫展层)时,纸上物质的分子就按照它们的分配系数在两相间进行分配。物质在动相里的溶解度越高,它在纸上随溶剂移动地越远,反之亦然。

常用的动相是与水相混合的溶剂(例如,丙酮、丁醇)。初看起来,在此条件下不能有分离作用,因为只有一相(通常只有在两个互不相溶的相间才能进行分离),但仔细考查一下层析纸就会清楚,纸的纤维素和水形成一种络合物。这种络合物好象浓缩了的多聚糖水溶液。这种溶液任何时候也不能和大量有机溶剂混合,其中包括能与水混合的有机溶剂。

纸上化合物沿溶剂运动方向走的距离与溶剂前沿走的距离之比就定义为那个化合物在一定的温度,一定的溶剂系统等条件下的 R_f 值。在一定的实验条件下,对于一定的化合物, R_f 值是恒定的,它决定于分配系数。

纸上层析的进行既可上行,也可下行,见图 3-5。无论在何种情况下,均须把溶剂放在层析

缸底部,这样,溶剂的蒸气就能使其中的空气饱和。在层析开始之前也要将纸放入缸中,进行充分平衡。上行法简单,因此常用。但纸的长度受限制,通常在50厘米左右。在展层过程中上升的速度降低。使用下行法时,纸带的长度不受限制,流速也相当稳定,比上行法快得多。

纸层析也可以双向进行。将混合物点在方形纸的一角,并用溶剂展层,然后干燥,再用不同溶剂以与第一向展层方向成直角的方向展层。适当地选择溶剂常常可以使复杂的混合物得到完全的分。例如从蛋白水解物中分出氨基酸,如图3-6所示。

表3-3中列举了一些溶剂系统,这是用纸上分配层析法分离一些生物物质常用的。

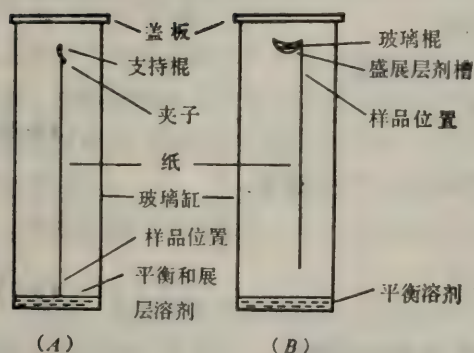


图 3-5 纸上上行层析(A)和下行层析(B)

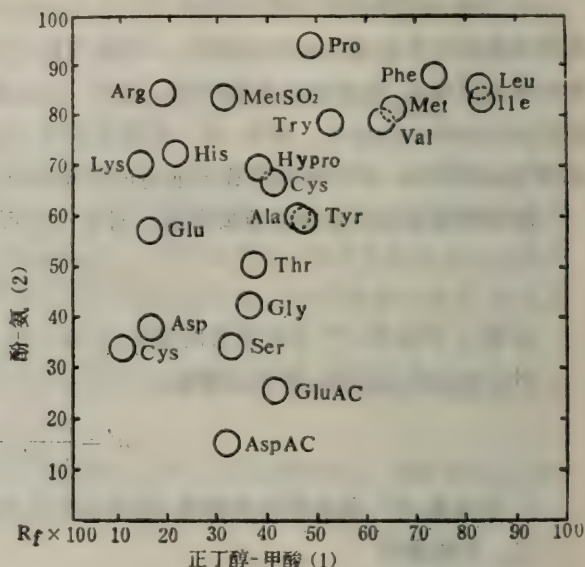


图 3-6 溶菌酶水解液的双向纸层析

表 3-3 层析常用的溶剂系统

化 合 物	溶 剂 系 统(V/V)
氨基酸	正丁醇/醋酸/水(40:10:50) 正丁醇/吡啶/水(33:33:33) 甲醇/吡啶/水(25:12:63)
单 糖 和 二 糖	正丁醇/吡啶/水(50:28:22)
叶绿素和类胡萝卜素	氯仿/石油醚(30:70)

通常,纸层析中的静相是水相,动相是有机溶剂。但某些化合物的分离以有机溶剂作静相,水为动相更好些。这种方法叫反相纸层析。可以让纸发生化学反应,引入疏水基团到纸纤维的羟基上,或者涂一层疏水物质,如硅酮,然后按常规方法进行层析。此法对某些非极性化合物有很高的分辨力。

为了确定化合物在层析谱中的位置,可用紫外光观察层析图谱或用特殊的试剂喷洒在纸上,显色后确定位置。在用纸层析能产生完全分离的情况下,可将需要的部分剪下来,然后用适当的溶剂洗脱下来。但以此法制备的样品的数量极其有限。

使用纸上层析法时,有几点要注意:

① 由于层析是一个完全的层析柱,所以在层析谱的中心可得到最好的分离,因此,选择溶剂系统时,要注意 R_f 值的调节。

② 控制纸上静相液体的量,避免使用水饱和的系统,否则纸吸收水的数量不易控制,重复性很差。最好一开始就用一不饱和系统。设计纸上层析手续时,也必须考虑在平衡条件下纸所吸收的水量。

③ 还要注意纸的种类的选择。有各种不同类型的纸:慢速的、中等速度的和快速的。纸的干纤维吸水的程度也不同,通常在 115—195% 之间。单向层析要避免沿纸纹方向层析,因为此方向比与它成直角的方向走的快。一般来说,粗纹纸比细纹纸分离效果差,薄纸比厚纸更容易超载。

最后,应当指出,纸层析只适用于氨基酸、小肽、单糖、二糖、叶绿素等的分离和鉴定,不适用于分子量大的蛋白质的分离,用分配层析法分离大分子的例子也是很有限制的。纸层析有时可用于少量物质的制备。

2. 柱上层析法

这种层析法通常用纤维素作载体。静相通常是水。为使分离成功,载体应含有一定量的水。水合载体与相应的互不混溶的溶剂混合成悬浮液,将此悬浮液按常规方法装柱。样品溶在有机溶剂中,上到柱顶,进行层析。有效分配系数不同的物质,在柱中以不同的速度移动,因此流出柱的顺序有先有后,从而达到分离。应当指出,在柱上进行分配层析时,吸附作用也在起作用。

三、逆流分配

此法的根据是物质在两个互不混溶的液相间的分配。与一般的分配层析不同的地方是,任何一相也没有固定在吸附剂或纸上,但其原理却和普通的分配层析一样,即物质在两个互不混溶的相间的分配系数不同。逆流分配的相是溶剂、缓冲液、盐和各種络合剂的混合物。

两个互不相溶的液体放在试管中,然后加入样品,样品就在两相间发生分配。达到平衡后,将上相移到另一试管中,其中含有同样体积的新鲜下相,那么转移过来的部分样品在这管中又再次进行分配。向含有下相的第一个试管中加入新的上相,这里也会发生样品的再分配。如此上相和下相连续混合几次,每一次重新混合后都发生物质的再分配。在实验室中,为了进行这种分离,使用一种特制的逆流分配仪。它是由许多特制的小管连接在一起的,样品转移的次数可在很大范围内变动(30—1000次)。由于小管间的特殊连接,只要简单地转动,就可以使一管中的上相转移到另一管中。

物质在这种情况下的分配系数用下式表示:

$$\frac{\text{溶解在上相中物质的浓度}}{\text{溶解在下相中物质的浓度}}$$

如果分配系数为 1,那么 50% 的物质处在上相,50% 的物质在下相(如果两相体积相等的话)。

从图 3-7 中可以清楚地看出，逆流分配是如何进行的。长方形的 A、B 分别代表装上相和下相的试管。假定物质的分配系数为 1，两相的体积相等，那么在第 I 行中，物质在两相间平衡以后，

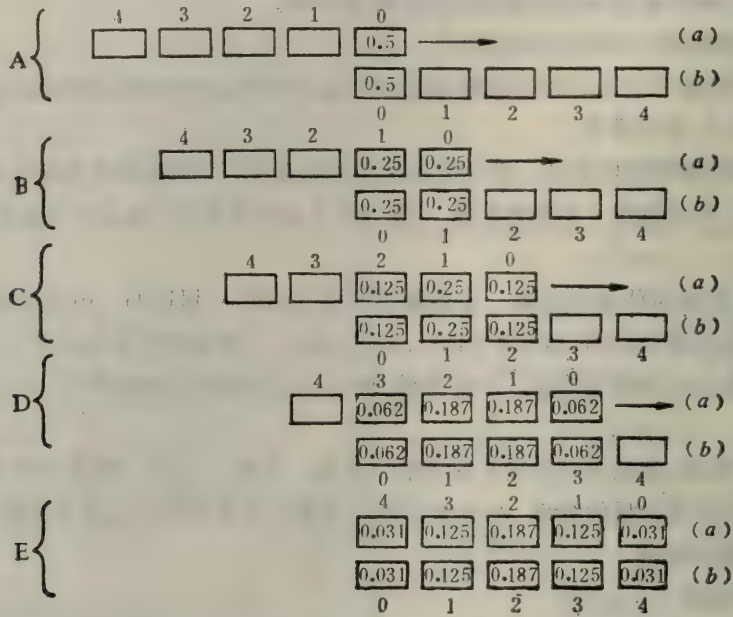


图 3-7 逆流分配法工作原理示意图

就等量分配在其中。现在把上相 0A 移到新鲜下相 1B 中，而下相 0B 移到新鲜上相 1A 中，则样品的分配情况如第 II 行所示。下一次转移，即 0A 移到 2B，1A 移到 1B，0B 移到 2A，这时样品的分配情况如图中之第 III 行所示。在逆流分配中，这个过程要重复多次。如果如此转移 8 次，然后定量分析每管中的溶解样品在两相中的重量，以便确定样品在上相和下相中的总含量，结果得到了如图 3-8 所示的分配情况。

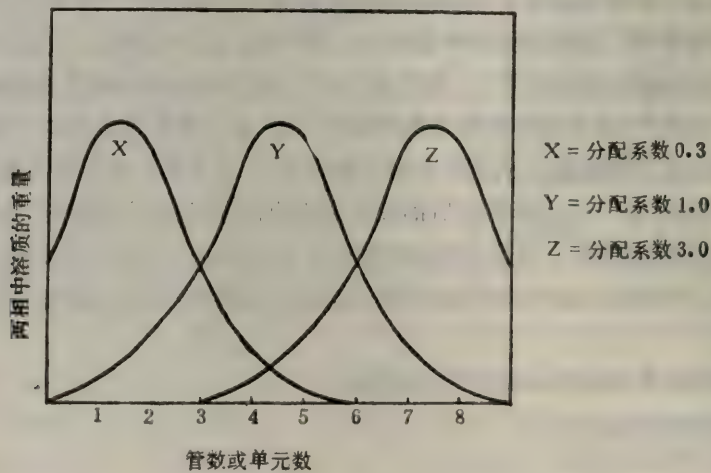


图 3-8 分配系数不同的物质的逆流分配图谱。I 的分配系数为 0.3、II 为 1.0、III 为 3.0

从图中可以看出,所有管中均有样品,但在第4管中,它的浓度最大。如果样品在上相里有较大的溶解度(即分配系数大于1),则样品向右边的管中集中(即向上相集中)。若分配系数小于1,则样品向左边的管中(即下相中)集中。从图3-8中可见,经过8次转移,分配系数为0.3和3.0的两种物质基本上可以得到分离。

逆流分配法广泛应用于分离各种类型的核酸、特别是用于分离某些类型的RNA和激素。分离氨基酸和肽也可应用此法,但只限于制备性质的分离。

四、吸附层析

1. 方法的原理

从广义上讲,吸附剂是在其表面上具有“保留”一定物质的能力的固体。如果吸附剂表面有很多小孔的话,这种保留的能力就很强。应该说,吸附层析作用的本质并不是很清楚的。有人认为,吸附层析非常类似于离子交换层析,只是装到柱里的吸附剂,既带正基团,又带负基团,因此蛋白质与吸附剂间的作用比离子交换层析要复杂得多。但总的看,这些作用力不外乎是离子吸引、疏水作用、范德华引力作用和氢键作用等。应当指出,吸附剂对物质的吸附可以是特异性的,也就是说,吸附剂能从混合物中有选择地吸附一种成分。各种物质对吸附剂吸附程度的不同,以及物质在相应的溶剂中溶解度的差异,这些就构成了吸附层析法分离物质的基础。而这些性质基本上是由物质的分子结构决定的。

2. 柱上层析法

吸附层析柱是用吸附剂填充的玻璃管。待分离的混合物上柱后,可用一定的溶剂(或溶剂混合物)洗脱。多数情况是用增加溶剂极性的办法进行梯度洗脱,用部分收集器收集分级物,然后进行分析。吸附牢固的组分要用极性更强的溶剂洗脱。

柱装得好与坏,对分离效果影响极大。常用的吸附剂有硅胶、氧化铝、磷酸钙、活性白土等。常用于蛋白质柱层析的最重要的吸附剂是微晶形的磷酸钙,也叫羟基磷灰石,可用标准方法在实验室制备^[27,28]。羟基磷灰石带有净的正电荷,它对蛋白质的吸附主要依靠蛋白质分子表面上的负电基团。这些负电基团同羟基磷灰石分子表面的钙离子相互作用,其结合的强度与净电荷的数目有关,也与其分布有关。因而具有多个羧基的多肽和羟基磷灰石有很强的亲和力。高碱性的多肽和蛋白质也能和羟基磷灰石牢固结合。

羟基磷灰石在pH 5.5—10范围内是稳定的,最适宜用于蛋白质的柱层析,层析手续与常规方法相同。可用浓度梯度进行洗脱。多数蛋白质用较低的磷酸盐缓冲液就能洗脱下来。尽管它的吸附容量较低(1 mg/g湿吸附剂),但有时仍能得到有价值的分离。不能用离子交换或凝胶过滤法分开的蛋白质,用此法分离有时可得到好的效果。Hjerten用羟基磷灰石层析分离人全血清蛋白质就是一个很好的例子^[28]。有意义的是,各组分洗下来的顺序与用离子交换法和电泳法不一致。

吸附剂的选择要依据具体情况而定。选择吸附剂时要注意:有些吸附剂在分离过程中对一定的化合物有破坏作用;有些吸附剂在保存的时候吸收空气里的水,有可能改变它的吸附性质。这时,为了除去水,使吸附剂活化,可在110°C加热一段时间。相反,有的吸附剂由于有水存在,反而更有效。这是由于水参与了吸附过程,或者物质在不同的相中发生了分配。

吸附层析不仅适用于蛋白质、酶、还能适用于核酸²⁹、病毒^{L30}。

3. 薄层层析法(TLC)

此法与纸层析很类似,原理与柱层析很相似,就是说,薄层层析也是吸附层析(虽然在柱层析中分配过程也在起作用)。吸附剂通常涂在玻板上。与柱层析不同,用在TLC中的吸附剂含有助缚剂,如硫酸钙,它能促进吸附剂固定在玻板上。先将吸附剂调成粥状悬浮液,然后从板的一端均匀地涂到另一端,干燥除水后,即有一层吸附剂留在板上。作分析用的板可涂0.25 mm厚吸附剂,制备用的板要涂5 mm厚吸附剂。层析操作法与纸层析法相同,一般只采用上行法,也可用双向层析法。影响分辨力的因素也与纸层析一致。吸附剂颗粒的大小、均匀程度和纸的纤维粗细一样影响分辨力。

用一般的吸附剂常不能分离复杂的混合物。为了分离某些混合物可采用薄层银化法,即制板时,将AgNO₃加入吸附剂悬浮液中,随着板的干燥,吸附剂浸透AgNO₃。此法主要用来分离脂类化合物。

在这种分离中,TLC主要是靠吸附作用分离物质的。但也有这样的吸附剂(如纤维素粉),它同时具有吸附性和分配物质的能力。用特殊制备的吸附剂,可以使这个过程完全转变成分配分离,即和纸层析一样。为了提高分离效率,制板时常采用不同的缓冲液饱和和吸附剂。表3-4列出某些用于分离一定类型化合物的溶剂系统。

表 3-4 用于 TLC 中的某些溶剂系统

化 合 物	吸 附 剂	溶 剂 系 统 (V/V)
氨 基 酸	硅 胶 G	96%乙醇/水(70/30) 正丁醇/醋酸/水(80/20/20)
单糖和二糖	硅藻土G (醋酸钠) 硅藻土G (磷酸钠, pH5)	醋酸乙酯/1-丙醇(65/35) 正丁醇/丙酮/磷酸缓冲液, pH5 (40/50/10)
中 性 脂 类	硅 胶 G	石油醚/乙醚/丙酮 (90/10/1)
磷 脂	硅 胶 G	氯仿/甲醇/水(65/25/4)
胆 甾 醇 脂	硅 胶 G	四氯乙烷/氯仿(95/5)
类 胡 萝 卜 素	硅 藻 土 G	石油醚/1-丙醇 (99/1)

薄层层析法与纸层析比较有如下优点: ① 层析系统均匀而且薄(100—1000 μ), 能适应极小量物质的分离,比纸层析的灵敏度高10—100倍,因为薄层层析每厘米所含有的表现板数常比纸层析多。② 许多介质都可做层析支持物,包括无机物质,如硅胶、矾土、氧化铝及有机物质,粉末纤维素、聚酰胺等,这就增加了层析方法的适应性。在用无机物的情况下,层析后,可使用化学反应来鉴定那些不用化学反应很难鉴定的化合物。如,用浓硫酸喷洒在板上,然后高温碳化,则可在硅胶板上定出任一有机化合物的位置。③ 薄层层析法可以很容易地改成柱层析法,而且展

层的速度比纸层析快得多,可以节省时间。用挥发性溶剂作动相,能使层析分离时间缩短到半小时,即使不用挥发性溶剂,分离时间也不超过 90 分钟。

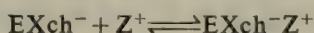
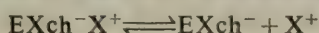
薄层层析法的缺点是,制板比较困难,层析后从板上取下分离物也比纸层析难一点。由于薄层层析不能采用下行法,所以层析谱的实际长度受到严重限制。显然,薄层层析和纸层析都是很有用的方法。在一定的情况下,选择哪一种方法决定于很多因素。现在,在市场上可以买到各种类型的层析板,这些不同种类的吸附剂有的涂在玻璃上,有的涂在塑料、铝、或其它支持物上。有了这些板,使用薄层层析法就更方便了。

五、离子交换层析^[31]

1. 方法的基本原理

离子交换层析是一种常用的分离方法。最常用的是使用各种类型的离子交换剂的柱层析法。离子交换剂是通过化学反应将带电基团引入到惰性支持物上形成的。如果带电基团带负电,则能结合阳离子,称为阳离子交换剂;如果带电基团呈正电,则能结合阴离子,称为阴离子交换剂。静电结合在离子交换剂上的离子叫做平衡离子。此法的主要价值在于可以找到适当的条件,使一些化合物静电结合到交换剂上,而使另一些化合物不能结合到交换剂上。生物化学所遇到的大部分化合物都是离子型的,能溶于水,因此,可用此法分离、提纯这些化合物。

离子交换过程可能有五个步骤:① 离子向交换剂颗粒表面扩散。在均一的溶液中,这个过程进行很快。② 离子在交换剂颗粒内部向它的带电部分扩散。扩散的速度取决于交换剂的交联度和溶液的浓度。这一步是整个离子交换过程中限制速度的一步。③ 离子在交换剂的带电部分进行交换。这一步能瞬间发生且呈平衡关系。如果是阳离子交换剂,则有如下平衡:



EXch^- 是阳离子交换剂, X^+ 、 Z^+ 是阳离子。对于阴离子交换剂也有类似的交换过程。被交换离子的电荷密度越大,它与交换剂的结合越牢固,其它的离子越难于替换它。④ 被交换的离子通过交换剂扩散到交换剂表面。⑤ 用洗脱液脱附,被交换的离子扩散到周围的溶液中。

第③步中的离子交换平衡受缓冲液的 pH 和离子强度的影响。适当地改变 pH、离子强度,结合上去的离子可以被重新置换出来。刚才已经说过, Z^+ 与 EXch^- 结合的强度取决于 Z^+ 所带的电荷量。电荷越多,洗脱它们所需之 X^+ 的浓度越高。当用改变 pH 的方法来洗脱它们时,这种结合的强度就取决于结合离子 (Z^+) 的 pK 值。离子的 pK 值越高,则洗脱它们的洗脱液的 pH 值越高。由于各种离子所带电荷的多少不同,它们对交换剂的亲和力就有差异,因此由柱上洗下来的顺序就有先有后,从而达到分离的目的。

迄今,我们只考虑一种形式的带电情况,对于氨基酸、蛋白质也是同样的道理,因为它们的分子既带正电基团,也带负电基团,所以阴、阳离子交换剂均能结合它们。如果提高 pH,这些分子带负电;降低 pH,则带正电;在其等电点处,分子含相等数目的正、负电荷。这个性质对蛋白质的提纯有很大好处。例如,可以将蛋白质混合物的 pH 调到某一点,在此 pH 下,所要的那个蛋白质的行为表现得和阳离子一样,这时,如果混合物在阳离子交换剂上层析,则很多阴离子蛋白质就可除去。此后,提高 pH,将所要蛋白质变成它的阴离子形式,再在阴离子交换剂上层析,这样又

可除去好多阳离子成分。应当指出,即使混合物的 pH 不能改变,连续在阴、阳离子交换剂上层析,也能得到很大程度的提纯。

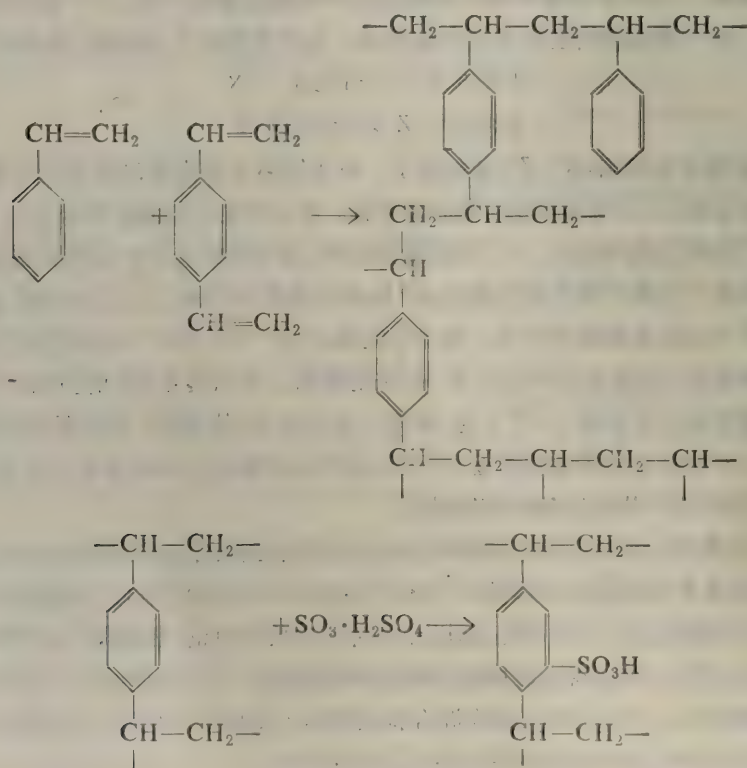
2. 离子交换剂的基本类型

在生物大分子的层析中所用的离子交换剂主要有四种类型:带有离子基团的交联度很高的球状合成树脂(离子交换树脂);带有离子基团的纤维素粉(离子交换纤维素);带有离子基团的球形交联多糖(交联葡聚糖离子交换剂);最后一种是涂有离子物质的粉状材料(涂有甲基化的血清白蛋白或组蛋白的硅藻土或硅胶),这是一种特殊类型的离子交换剂,主要用来分离核酸^[32],这里略去不谈。前三种离子交换剂的物理和化学性质列于表 3-5 和 3-6、附录四、五中。

(一) 离子交换树脂

羧酸型树脂(微粒形的 Amberlite IRC 50)是甲基丙烯酸与二乙烯苯交联而成的聚合物。它们主要以钠盐型、铵盐型使用,有时也以钡盐或钙盐型使用。Amberlite IRC 50 交联度很高,只能在颗粒表面吸附蛋白质,因此,它结合离子型大分子的容量低(每克干重树脂仅能结合几毫克蛋白质),但它的缓冲容量大,微小的 pH 变化不能影响它对大分子的吸附。由于这个优点,有时蛋白质样品在上柱前可以不必对起始缓冲液透析。属于这类的还有 Bio-Rex 70, Zeocarb 226。这是一种弱酸型的离子交换树脂,主要用来层析分离蛋白质^[33]。

磺酸型树脂(Dowex 50)是苯乙烯和不同比例的二乙烯苯交联,然后磺化而成的球状聚合物,如下式所示:



交联度常用 X-1、X-2、X-4···等符号来表示。数字表示二乙烯苯的百分含量。由于交联度的增加 树脂的通透性降低,但树脂的交换容量提高了,即单位重量树脂结合离子的量增加了。同时树脂的选择性也提高了。交联度的增加使离子平衡的时间增加,因为通过树脂的扩散速度降低了。选择合适的交联度通常是在高交联度和低交联度之间来一个折衷,作为起点常用 8% 的交联度。属于此类的树脂还有: Zeocarb 225, Amberlite IR 120, Bio-Rad AG 50。这是一种强酸型的树脂,通常以钠盐形式使用^[34]。这种树脂不适用于蛋白质的层析,但用它们来分离肽却能得到很好的结果。

带有季胺离子的树脂 (Dowex 1) 是由交联的聚苯乙烯与氯甲醚反应,然后氯基与季胺反应而制成的。其中的一 $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ 基团,除了在很碱的 pH 值以外都能离子化,因此,这是一种强碱性的离子交换树脂。属于此类的还有 Dowex 2、Bio-Rad AG 1 和 AG 2。这类树脂在大多数情况下是以醋酸盐的形式使用的^[35],并用层析的起始缓冲液平衡。这类树脂在肽的分离上很有价值。

离子交换树脂上的带电基团都是通过化学反应引入到支持物上的。这些带电基团的酸性或碱性的强度以及单位体积树脂里所含带电基团的数目就决定了离子交换树脂的束缚种类和束缚强度。例如,引入强酸性基团,如磺酸,则产生的树脂具有高的电荷密度,它能强烈地束缚阳离子;若引入弱酸性或弱碱性基团,则产生的树脂的电荷情况就取决于溶液环境的 pH 值。一般是根据束缚的强度去选择合适类型的功能基团和单位体积树脂的电荷数目(电荷密度)。如果有一种离子,对 pH 和离子强度的变化不敏感,那就可以使用高电荷密度的强酸型或强碱型树脂;如果所要的那个离子对这些变化敏感的话,则要用较弱的低电荷密度的树脂,这样,这些离子就可用温和得多 pH 和离子强度条件来洗脱。如果已经看到一定离子与树脂间的束缚是不可逆的,那就要改用低电荷密度的弱酸或弱碱性树脂。这种现象在分离具有高电荷密度的大分子时常有。因此,在大多数情况下,对大分子要避免使用聚苯乙烯树脂。

树脂颗粒的大小与流速、平衡时间、交换容量有关。颗粒越小,交换容量越大,达到平衡的时间越长,流速越低。通常 100—200 目的颗粒适合于大多数的分析上的应用。对于大量的低分辨率的分离可用更大些的颗粒。

离子交换树脂在蛋白质、核酸上虽然也有应用,但因为它有如下缺点,所以,在蛋白质、核酸的分离上较少应用。这些缺点是:① 由于交联树脂孔很小,大分子不能进入内部,只能在树脂表面吸附,所以交换容量小;② 树脂的离子交换基团排列很密,对蛋白质吸附太牢,一经结合上去就很难洗脱下来,用剧烈条件洗脱又容易引起蛋白质变性;③ 树脂的疏水性强,溶胀性差,蛋白质与树脂间的疏水相互作用也容易引起蛋白质变性。但这些缺点被离子交换纤维素的制成所克服。

(二) 离子交换纤维素

离子交换纤维素是采用纤维素作为支持介质的。这种纤维素是从棉花、软木和硬木中分离出来的。离子交换纤维素广泛应用于大分子的分离,是由于它具有松散的亲水性网络,有较大的表面积,大分子可以自由通过。因此,对于蛋白质来说,它具有很大的吸附容量^[36],较好的通透性。同时由于组成纤维素的糖残基的羟基被取代的百分比较低,因此,产生的离子交换纤维素的

电荷密度比 Dowex 低得多,所以洗脱条件温和,回收率高。可以说,离子交换纤维素的出现,对酶和其它蛋白质的层析提纯是个重大改进。

离子交换纤维素有两种类型:阳离子交换纤维素和阴离子交换纤维素。关于这些交换剂的结构式和某些性质列于表 3-5 中。目前经常使用的有以下几种:DEAE-纤维素是中等强的阴离子交换剂;ECTEOLA 是很弱的弱碱型离子交换剂;CM-纤维素是弱酸型的;P-纤维素和 SE-纤维素是强酸型的。离子交换纤维素的大多数离子基团都能有效地吸附离子化的大分子。和离子交换树脂相比,单位重量的离子交换纤维素具有较少的离子基团(0.3—1.0 毫克当量/每克干重),因此,盐浓度的微小变化会直接影响它对大分子的吸附容量。

表 3-5 离子交换纤维素

分 类	名 称	简 写	总容量(毫克当量/克)	在下列溶液中的 pK 值			
				水	0.01 M NaCl	0.5 M NaCl	
阳离子交换剂	强酸型	磷酸纤维素	P-纤维素	2 × 0.6—0.9	—	2.7, 7.4	—, 6.2
		磺甲基纤维素	SM-纤维素	0.40	—	—	2.5
		磺乙基纤维素	SE-纤维素	0.42	—	—	2.2
	弱酸型	羧甲基纤维素	CM-纤维素	0.4—0.7	3.8—4.2	—	3.6
阴离子交换纤维素	弱碱型	二乙氨基乙基纤维素	DEAE-纤维素	0.7—0.9	6.5—8.5	—	9.1—9.2
		氨基乙基纤维素	AE-纤维素				
		ECTEOLA-纤维素	ECTEOLA-纤维素	0.4			
		对氨基苯甲基纤维素	PAB-纤维素	0.2—0.5			
	强碱型	三乙氨基乙基纤维素	TEAE-纤维素	0.8	季碱		
		三甲氨基乙基纤维素	TMAE-纤维素	0.3	季碱		
		胍乙基纤维素	GE-纤维素	0.2—0.5	5.8—6.0	—	7.4—7.6

离子交换纤维素按其纤维的长短又可分为两类。长纤维的离子交换纤维素,适用于制备层析;短纤维的适用于分析层析。最近有一种新型的离子交换纤维素,叫做微球型纤维,已经开始使用。它不同于老式的纤维状的离子交换纤维素。它的纤维素经过处理,除去了纤维素的无定形部分,只剩下大小比较均一的微晶形部分。这部分经过化学交联,可以防止过度膨胀,并产生稠密的棒形颗粒,这种颗粒能提高柱的容量和电荷密度。因此,这种交换剂所具有的实际效应与 Dowex 增加交联度的效应一样。

在实际使用中,究竟使用哪种离子交换纤维素,要根据具体情况。例如,如果样品不稳定,为了减少样品与纤维素的接触时间,要用分辨率较低的纤维状离子交换纤维素,因为它的流速较高。这时就必须放弃微球形离子交换纤维素的高分辨率。

(三) 离子交换凝胶

这类交换剂的生产与离子交换纤维素的生产类似,只是支持介质——纤维素被葡聚糖或聚

丙烯酰胺的小颗粒所代替。已生产的类型有：DEAE Sephadex、CM Sephadex 和 SE Sephadex。与离子交换纤维素相比，这种交换剂是高度交联的葡聚糖。每克干重具有相当多的带电基团。总容量比常用的离子交换纤维素高 3—4 倍。由于容量高，所以必须以盐的形式保存它们。球形的交联葡聚糖比纤维状的离子交换纤维素更易使柱装得均匀。Sephadex 离子交换剂在使用前要先变成游离碱型(阴离子交换剂)或游离酸型(阳离子交换剂)，然后立即转变成适当的盐型，最后用层析的起始缓冲液平衡。关于此类交换剂的物理、化学性质列于表 3-6 中。这些交换剂的优点是，它们既能根据分子的电荷多少进行分离，又能根据分子的大小(分子筛作用)进行分离。应当指出，对分子量大于 200,000 的蛋白质来说，这类交换剂的分子筛作用就不起什么作用了。

表 3-6 交联葡聚糖离子交换剂的有关数据

商品名称	活性基团	型式	交换容量 (当量/克)	固定血红蛋白的容量 (克/克)
DEAE-Sephadex (弱碱型)	A-25 A-50	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	Cl^-	3—4 0.5
QAE-Sephadex (强碱型)	A-25 A-50	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \\ -\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH}_2 \end{array}$	Cl^-	3—3.4 0.3 6
CM-Sephadex (弱酸型)	C-25 C-50	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$	Na^+	4—5 0.4—0.7 4.7—7.0
SE-Sephadex (强酸型)	C-25 C-50	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$	Na^+	2—2.6 0.2—0.7 2.4—3.0

3. 离子交换柱层析的程序

(一) 离子交换剂的选择

在叙述离子交换剂的类型时，已经粗略地谈到了这个问题，这里再补充说明几点。选择离子交换剂要考虑被分离物质带有什么样的电荷、分子的大小、物理化学性质，它所处的环境等因素，然后，根据这些性质去选择合适的交换剂。如果对被分离物质的性质不甚了解，那就要通过预备实验来完成交换剂的选择。对于阳离子交换树脂，应用较广的是磺酸型。它在酸、碱、中性溶液中均可使用，绝大多数小的离子均可交换，但大分子离子不能交换。含有苯酚的磺酸型树脂不宜在碱性溶液中使用。对于阴离子交换树脂也是强碱型应用广泛。在酸性溶液中，强碱型与弱碱型均可使用，碱性溶液中则只有强碱型树脂适用。

对于离子交换纤维素的选择，最实际的办法是用两种常用的离子交换剂分别进行试验。通常用 1 毫升的小柱，在低盐浓度下(0.05 M)用 DEAE-纤维素(pH 8)或用 CM-纤维素(pH 6)进行试验。大多数蛋白质可被二者中的一个吸附，或二者均吸附。如果都不吸附，可再降低盐浓度至几乎近于零。如能吸附，则可用那种交换剂进行层析分离。理想的情况是，能吸附，但吸得不太牢，便于下一步洗脱。对于吸得太牢，不易洗脱的物质，可改用交换当量较小的交换剂，如，ECTEOLA-纤维素，它是一种具有弱解离基的交换剂。相应的弱解离的阳离子交换纤维素现在

还没有,可用CM-纤维素在极低pH下进行层析。这样就降低了CM-基的解离度,从而降低其交换当量。若需要在极低或极高pH下进行层析时,在pH 3.0以下可用p-纤维素或SE-纤维素;在pH 10以上时,可用GE-纤维素。

确定了层析所用的交换剂的类型以后,还要对交换剂的粒子大小进行选择。粒子大小主要影响分辨力和流速。粗粒子装柱不紧密,单位体积的交换容量小,而且间隙大,容易引起区带分散,所以分辨力低,但流速较快。细粒子分辨力高、交换容量大,但缺点是流速慢。要求高分辨力时,则采用细粒子;要求高速度,或阶段洗脱时,区带宽一些也没有多大妨害时,可用粗粒子。另外,装柱的规模也有关系,粗粒子不适于装太小的柱(直径1厘米以下),细粒子适于装小柱,直径1毫米的柱也可以。

(二) 离子交换剂的准备

准备就是将交换剂变成适于分离各类离子的形式。离子交换剂的准备应当包括以下四步:

- ① 除去交换剂中的杂质。这是由于制作时提纯不够,即使提得很纯,在贮存时也会有少量分解。
- ② 交换剂的溶胀。通过这一步使交换剂的带电基团更多地暴露在溶液中。
- ③ 除去交换剂中的很小的细粒,否则将影响流速。
- ④ 离子交换剂的平衡离子转变成所需要的形式,即改型。对于凝胶型的交换剂只需要后二步,其它类型的交换剂必须经过所有这四步处理。

一般的交换剂常含有水不溶性的杂质,即使交换剂的纯度较高(如DE-52),在贮存时也要经受氧化降解,所以,使用前要充分洗涤。洗的目的主要是除去杂质。对于聚苯乙烯型或苯酚型的树脂可用水、盐酸、碱、乙醇洗,最后用高浓度的平衡离子洗。一般的步骤是:干树脂用水浸泡2小时,除去水,再用无离子水洗至澄清,去水后在4倍量的2N HCl中洗4小时。除去酸,用水洗至中性,去水后,再加4倍量的2N NaOH洗4小时。除去碱,用水洗至中性。必要时用乙醇洗。

纤维素是单糖的多聚物,其羟基被带电基团所取代。干燥时,由于没有水分子,分子内的羟基结合在一起,结果形成浓密堆积的糖聚合物,许多功能基团被埋起来。当将纤维素悬浮于水中时,这些少量的氢键被破坏。完全膨胀需要用更强的条件处理,即悬浮于强酸或强碱溶液中,通常是0.5N的HCl和NaOH。操作步骤与树脂的洗涤相同。对阳离子交换纤维素则先用0.5N NaOH洗,然后用0.5N HCl洗;对阴离子交换纤维素则先用HCl洗后,用NaOH洗。每次洗涤后,要用大量水洗至中性。有时这个过程要重复几次。要除去牢固吸附在交换剂上的杂质,这一步是必须的。

除去交换剂中细粒的办法是将交换剂悬浮于大体积的水中,待90—95%的颗粒沉降后,倾去沉降慢的部分,否则柱的流速要慢,分辨力也差。

最后是用适当的平衡离子平衡,也就是交换剂的改型。所谓改型,也就是使交换剂带上所希望的离子。通常是让大体积、高浓度的平衡离子溶液通过交换剂。如,希望阳离子交换剂带上 Na^+ ,则用NaOH溶液处理它;如希望阴离子交换剂带上 Cl^- ,则用HCl溶液处理它。改型后,过量的部分用水或稀缓冲液洗脱除去,也有用层析的起始缓冲液平衡,除去过量部分。经过这样处理的交换剂就可以使用了。

还有一个重要的层析条件需要考虑,即层析时的pH。维持层析介质的pH,通常是用缓冲液

来实现的。对于缓冲液的选择总要考虑如下四个因素：① 对阴离子交换剂应当用阳离子缓冲液，对阳离子交换剂应用阴离子缓冲液。如果缓冲液的离子电荷与离子交换剂所带电荷相反，那它就参加离子交换过程，并降低离子交换剂的缓冲容量，引起 pH 变化。② 选用的 pH 值决定于被分离物质的等电点、稳定性和溶解度，也要根据交换剂解离基团的 pK 值。用阴离子交换剂要在低于其 pK 值的范围内层析；用阳离子交换剂要在高于其 pK 值的范围内层析。总之，缓冲系统的 pH 值要这样来选择：在这个 pH 值，要分离的离子所带的电荷种类与离子交换剂的平衡离子所带电荷种类相同。对于等电点在层析的 pH 范围内的蛋白质，这个考虑特别重要。③ 缓冲液离子的 pK 值要在所要用的 pH 值附近 (± 0.7 之间)，这样才能有较高的缓冲能力，否则，缓冲容量低，pH 可能改变，出现 pH 交错界面，产生假峰。④ 缓冲系统的选择应不影响被分离物的活性、溶解度，不干扰其分析。被分离物需要制成不含盐的干样品时，以用挥发性缓冲液为宜。

(三) 柱层析

要得到好的层析效果，必须考虑以下五方面的问题：层析柱的高度与体积；上样量的大小；所采用的洗脱梯度的形状和洗脱液量的多少；洗脱速度；分级物收集量的多少。

① 层析柱

所用交换剂的体积，也就是装在柱中的交换剂的体积（一般叫柱床体积），至少要比束缚所有样品所需要的还要大 2—5 倍。柱的形状一般以直径与高度之比为 1:15 为宜，也有采用 1:10—1:30 的，总之，柱形应根据层析条件和需要而定。当洗脱过程中梯度的变化比较剧烈时（如阶段梯度洗脱），则不能用过长的柱，否则区带扩散较宽，降低分辨力。区带变宽的程度与柱形状有关，细长柱的分辨力显著低于直径与高度之比较高的柱。分辨力降低的原因是，洗脱过程中存在着梯度的急剧变化。当平衡离子的浓度高得足以置换吸附离子的时候，此离子就从柱上下来，而且它的移动速度与溶液移动速度相同，因为这时这些离子在溶液中是自由的。如果从吸附点到收集点须走很长距离，那么每一个吸附物质都有扩散的机会，因此形成的峰带就宽，特别是在分离静电荷很不同的物质时更是这样。因此，如果必须增加离子交换剂的体积的话，应增加柱的直径。

但也有另外一种情况：增加柱长能增加分辨力。这时是用连续梯度洗脱，而不是用急剧增加的梯度洗脱。在这种情况下，洗脱液盐浓度应这样选择：洗脱液盐离子束缚柱上的程度与要分离的物质同等。这样，当所要蛋白质在柱上被移动时，它们就有很好的机会重新束缚于离子交换剂上。样品重新束缚的机会如何取决于束缚的强度。如果稍微不同的样品重新束缚于离子交换剂上的次数增加，那么它们之间的微小差别就可以在柱上表现出来。因此，增加柱长，由于被分离物重新束缚在交换剂上的次数增加，因而分辨力也增加。不过这时要注意，流速也不能过快。

处理好的交换剂在装入层析柱时，装的好坏对层析效果影响很大。对装柱的要求是，交换剂在柱中分布的要均匀，严防有节和气泡产生。注意沉积表面要平。一般用重力沉降法装柱，必要时用加压法装柱。详细操作请参见文献[37]。

② 上柱样品的准备与量的大小

样品应与起始缓冲液具有相同的 pH 和离子强度。可用透析、凝胶过滤或稀释法处理。前两

种方法,前面已经介绍过。稀释法是将样品溶液调到所需要的 pH 值,然后加水稀释至与起始缓冲液具有相同的电导度。这个方法对于洗脱液的前一部分的分辨力要求不高时,可以使用。加样的体积一般关系不大,但上柱前样品应离心除去不溶物,否则容易将柱堵住。用缓冲容量大的离子交换剂(如羧酸型)进行的层析,有时可以免去这一步。

上样量的大小取决于实验目的、样品中所要物质的浓度以及它对交换剂的亲和力。当所要物质在样品中含量很低,但对交换剂亲和力很大,这时为了浓缩富集,可以将几倍于柱床体积的样品通过柱,直到该成分饱和为止。然后将它从柱上洗下来。当要求高分辨力时,加样时紧密吸附的区带不应超过柱床体积的 10%。有色蛋白质可以看到,无色蛋白质则要根据其吸附容量来计算。一般可用蛋白质:纤维素=1:10 的比例作初步试验。阶段梯度洗脱时,加样量可以相当大,因为这时解吸和再吸附的过程是不重要的。但是紧密吸附的区带也不应超过柱床体积的一半。

加样的方法是,排除床表面的缓冲液,用移液管加样时,其尖端接触柱内壁并在离床表面数毫米处,随加随沿柱内壁转动一周,然后迅速移至中心,使样品尽快分布于全表面,然后打开出口,继续加样,待样品全部进入床内后,以少量起始缓冲液(0.5—1 毫升)冲洗内壁数次,再加足缓冲液,开始洗脱。加样时要注意不要把床表面破坏,否则,层析区带会不整齐。如有破坏,可搅起数毫米交换剂,使其自然沉降平正为止。

③ 洗脱梯度的形状和洗脱液量的多少

从离子交换剂上洗脱不同的离子是离子交换层析中需要控制的重要因素。洗脱液体积(相对于柱床体积而言)的大小和洗脱梯度的形状(盐浓度的变化能力)对柱的分辨力影响极大。洗脱可以用恒定组成的起始缓冲液来完成(简单洗脱),也可以用改变 pH 或盐浓度、或二者均改变的洗脱液来完成。pH 和盐浓度的改变又分为连续改变(梯度洗脱)和不连续改变(阶段洗脱)。获得浓度梯度有如下几种形式:

A、简单混合装置

图 3-9 是洗脱液浓度按指数增加的装置^[38]。容器 1 和 2 中的浓度分别为 N_1 和 N_2 ,容器 2 下装有磁力搅拌器,2 中含有浓度较低的缓冲液(即 $N_1 > N_2$),并且具有恒定的体积 V_2 。 X 为通过柱的洗脱液体积。此时洗脱液的浓度为 N ,由下式计算:

$$N = N_1 - (N_1 - N_2)e^{-\frac{X}{V_2}} \quad (3-8)$$

由图中可见,这是一种凸形梯度洗脱。由上式可见,洗脱至某一点时的洗脱液的浓度(N)只与 N_1 、 N_2 、 V_2 、 X 有关,而与贮槽 1 中缓冲液的体积(V_1)无关。

图 3-10 是浓度线性梯度的混合装置^[39]。 N_1 、 N_2 分别为容器 1 和 2 中缓冲液的浓度,而且 $N_1 > N_2$,两瓶在底部相连。 X 为通过柱的洗脱液体积。当从柱中流出的体积为 X 时,此时洗脱液的浓度为:

$$N = \left(\frac{N_1 - N_2}{V} \right) X + N_2 \quad (3-9)$$

V 为梯度的总体积,即开始洗脱时容器 1 和 2 中的洗脱液体积之和($V_1 + V_2$)。在此种情况下, $V_2 = V_1$,即两容器的直径相同,容器中的液面等高。

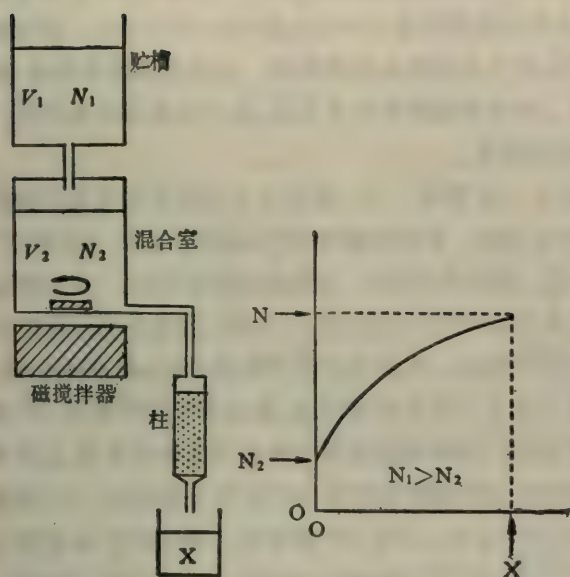


图 3-9 指数浓度梯度洗脱的简单混合装置

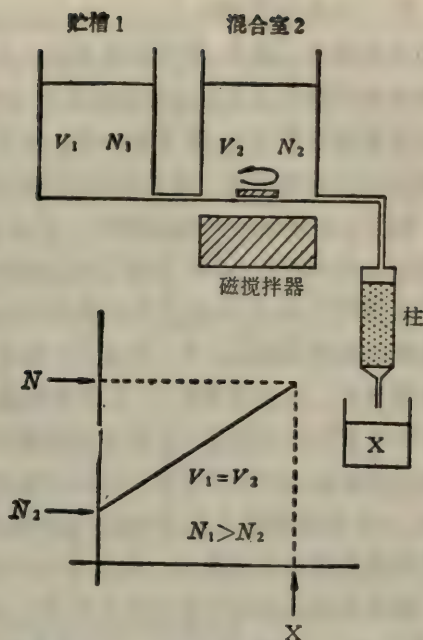


图 3-10 用于线性浓度梯度洗脱的装置

若改变两个容器的直径,即改变 V_1 和 V_2 的比值 ($K = V_1/V_2$), 则可得到如图 3-11 的洗脱梯度增加曲线。这时,浓度可由下边的通式计算。

$$N = N_1 - \frac{N_1 - N_2}{V_2^K} \left[V_2 - \frac{X}{K+1} \right]^K \quad (3-10)$$

当 $K > 1$ 时,则为凹形梯度; $K < 1$ 时,则为凸形梯度, $K = 1$ 时,则为线性梯度。

B、复杂浓度梯度的混合装置

为了得到更复杂的浓度梯度曲线, Peterson 及其同事描述了一个特殊的梯度混合装置^[40]。他们使用锥形瓶,使梯度在开始时增长缓慢,然后迅速增加。这种梯度能使微弱吸附的蛋白质成功地洗脱下来,然后使强吸附的蛋白质洗下来,同时能减少拖尾现象。Peterson 等人还设计了一个叫做“Varigrad”的梯度混合装置,能很容易地调到所需要的浓度梯度或 pH 梯度^[41]。

阶段洗脱在大量制备时用的最多。这种洗脱方式只有在对所分离的离子在给定的离子交换剂上的行为了解得很清楚的情况下才能使用。它是相继用较大的浓度洗脱。通常先用线性梯度进行试验。根据线性梯度的结果,再选择合适的阶段洗脱浓度。至于选择什么样的梯度形状、完全取决于具体的应用,不可能一概而论。

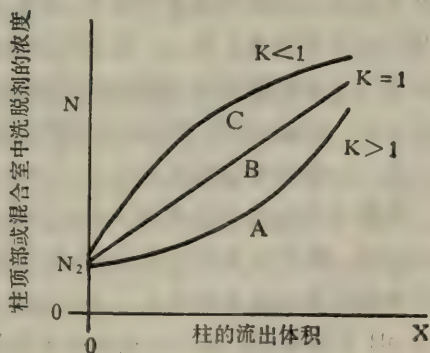


图 3-11 梯度洗脱的浓度曲线

除了梯度形状以外,还可以改变洗脱液的体积(相对于柱床体积而言)。实际上,这是改变梯度的有效斜率。通常,增加洗脱液的总体积(也就是降低梯度的斜率),能使分辨力提高。降低梯度斜率的不利的地方是会使洗脱区带加宽,所以洗下来的样品浓度较稀。如果增加梯度斜率,则能使洗脱峰显著变尖,洗下来的样品浓度较浓。增加梯度斜率的方法是,减少洗脱液的总体积,或者保持总体积不变,增加浓盐溶液贮器中的盐浓度。

梯度的组成是有严格限制的,基本上分以下三种情况: A. 增加离子强度的梯度通常由简单的盐(如 NaCl、KCl)溶解在稀的缓冲液中组成的。任何时候不能用弱酸弱碱盐,因为它们能产生缓冲作用,从而改变梯度进行时的 pH 值。当非用不可时,则考虑用挥发性盐。所有挥发性盐都是弱酸弱碱盐。B. 改变 pH 梯度通常是用混合两个不同 pH 和(或)容量的缓冲液的办法来完成的。在这类梯度中,缓冲液的选择是很严格的。不仅要对缓冲液成分的 pH 特别注意,而且要注意它们在所用 pH 范围内的缓冲容量。如果不考虑这些因素,那么实际所得到的 pH 就可能与预计的 pH 大不相同。与离子强度梯度不同(这种梯度对所有的离子交换剂来说总是增加的),pH 梯度既可从低值增加,也可从高值降低。pH 梯度增加常用于阳离子交换剂,pH 梯度降低常用于阴离子交换剂,而且常与浓度梯度同时使用。获得 pH 梯度要比得到浓度梯度难一些,因为滴定曲线的形状在很大程度上决定于洗脱液中所含的酸或碱的性质。有时洗脱体积与 pH 变化可以呈线性关系^[42]。pH 梯度的实际所能容许的 pH 范围决定于 pH 对所分离的离子的作用。C. 分离蛋白质时,有时为了稳定蛋白质,加入一些非离子化合物,如甘油、蔗糖、聚乙烯醇、乙二醇、巯基乙醇等。如果这些材料包括在梯度中,则在使用前,层析柱要用它们充分平衡。用低浓度的酶的底物来稳定酶时,也要这样做。

④ 柱的洗脱

选定了合适的洗脱液及其梯度形状后,柱洗脱的主要问题就是流速了。洗脱速度与所用交换剂的种类关系极大。选择柱的流速要注意两件事:第一,离子吸附到离子交换剂上的速度比它们从交换剂上脱附的速度慢得多,因此,加样时,样品上到离子交换剂上的速度应当比洗脱它们所用的速度慢得多。第二,流速与实验测定的最适流速偏离越大,柱的分辨力降低得越多。如果流速大于脱附的速度,那么每种物质的洗脱峰就要被其它物质所污染;如果流速太慢,则洗脱峰会扩散。因此,流速太快或太慢都会降低柱的分辨力。合适的流速只有通过实验来确定。

⑤ 分级物收集量的多少

洗脱下来的样品常用部分收集器收集在试管中。一般总体积在 500—2000 ml 时,每管收集 5—10 ml。降低每管收集的量,不能增加柱的分辨力,但却能充分表达出整个柱的分辨力。测定每管的蛋白质浓度和酶活力(或其它生物活力)。为了检查层析效果,并确定各峰的位置,最好测定 pH 和电导度。然后根据测得的数据做一层析图谱。图 3-12 是猪肾亮氨酸氨基肽酶在 DEAE-纤维素上的层析图谱^[43]。柱规格 0.9×25 cm,洗脱液 0.005 M Tris-HCl 缓冲液、pH 8.0,含 0.005 M MgCl₂,采用线性梯度 0—0.3 M NaCl 洗脱。

4. 其它形式的离子交换法

除了离子交换柱层析以外,还有离子交换纸层析。此法可以成功地分离不同的化合物。用化学修饰法修饰纤维素可以很容易得到这种纸。离子交换纸的类型有: DEAE-纤维素纸(中强

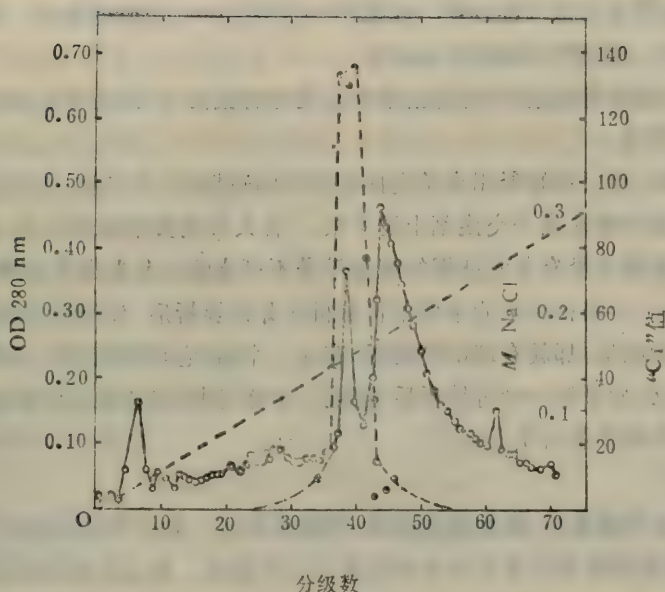


图 3-12 猪肾亮氨酸氨基转酶在阴离子交换剂 DEAE-纤维素上的层析图谱

碱型)；CM-纤维素纸(弱酸型)；AE-纤维素纸(弱碱型)。用离子交换树脂(45%重量)浸渍的纸也有出售，如 SA-2 (强酸型)、SB-2 (强碱型)。有些离子交换材料还可用于薄层层析，如：衍生的纤维素和 SE-Sephadex 等。

还有一种有用的使用形式是分批处理法。当要处理的样品体积很大时，上柱分离则相当费时间。这时可以采用分批处理法。将过量的交换剂悬浮于样品溶液中，搅拌下平衡 20—40 分钟，能束缚在交换剂上的物质则被束缚；不能束缚的，用布氏漏斗过滤除去。留下的滤瓶再悬浮于高离子强度的缓冲液中，再过滤。用此法可将束缚的物质分成 4—6 个粗级分。例如：用如下的盐浓度洗脱：0.01—0.08 M，0.08—0.16 M，0.16—0.24 M，0.24—0.32 M 和 0.32—0.40 M。如果所需要的物质在 0.24—0.32 M 之间释放出来，那么洗脱的步骤就可以改成二步：第一步是用 0.01—0.20 M，第二步是用 0.20—0.35 M。此法的价值在于，根据样品的电荷，可以非常迅速地将样品粗略地分级，因此，不与交换剂作用的物质很快被除去。如果所要的物质不束缚于交换剂上，此法也很有用，因为所有吸附于交换剂上的物质（通常约为可溶解物质的 50%）可被除去。这种情况叫做负吸附，即从溶液中分离出的不是所要的物质，而是尽可能地除去很多其它的杂质。此法的第二个优点是，即使是大量的样品溶液，用此法进行处理所需的时间也很短。这是此法的最大价值之所在。

但是有两个问题必须事先考虑到，一是必须加入足够量的交换剂。可以事先做小规模实验，以确定用何种类型的交换剂，在何种条件下(交换剂的量、离子强度、pH 等)能得到最好的结果。然后再进行大规模操作。二是要考虑样品溶液的离子强度。通常在粗浆液中的缓冲液浓度在 0.05—0.2 M。如果溶液中的盐浓度大于 0.05 M，那么此法的应用就要受到严重损害。因此，事前用电导法测定溶液的离子强度是十分重要的，以保证加入树脂前的合适的条件。制备粗匀

浆液时,要尽量使用较低的缓冲液浓度。如果不可能的话,可以适当稀释。当然,如果所要物质能紧密束缚于树脂上,那这些考虑就没有必要。

还要注意,当用磷酸纤维素时,样品溶液中要避免有镁离子,因为它能破坏交换剂的容量,使交换剂不起正常的作用。

最后,补充说明一点。在解释用离子交换法得到的数据时,要谨慎。可能有这样的情况:用二个不同盐浓度将某个酶从离子交换剂上洗下来。有人可能会错误地认为,这是催化同一反应的两个酶。但这种解释在没有其它证据的情况下是不可靠的。如果出现这种情况,要做的第一件事是,将分开的每一个峰在原来的条件下再层析。如果层析后,分开的两个活力峰的任何一个都能产生带两个峰的图形,那就有理由怀疑,只存在一个酶,它可能在层析条件下被修饰,所以产生第二个形式。相反,如果每一峰再层析后,仍是一个峰,则有必要做进一步的分析工作,以证实确有完成同一反应的两个蛋白质的存在。

六、凝胶过滤

凝胶过滤也叫分子筛层析、凝胶渗透色谱、排阻层析等。它主要是利用具有网状结构的凝胶的分子筛作用,根据被分离物的分子大小不同来进行分离的。此法之所以得到广泛的应用,是因为有如下的优点:① 分离条件温和,因此,不稳定的分子也能用此法分离。② 样品回收率高,几乎可达 100%。③ 实验的重复性高。④ 完成操作的时间相对来说比较短,所需要的设备简便、经济。

1. 方法的原理

凝胶层析的支持物是多孔的凝胶。当不同分子流经凝胶层析柱时,每个分子不仅是向下移动,而且还在做无定向的扩散运动。分子直径比凝胶孔径大的分子不能进入凝胶颗粒的微孔里,只能经过凝胶颗粒之间的孔隙,这样的分子是随溶剂一起移动的,因而最先流出柱外;而分子直径比凝胶孔径小的分子,则能够自由进入凝胶颗粒的微孔之中,即进入凝胶相内。当分子在凝胶

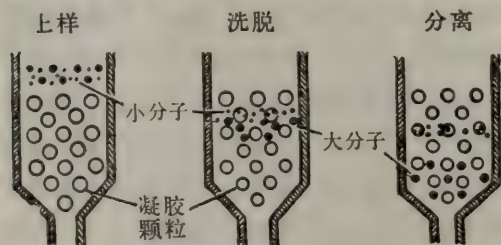


图 3-13 凝胶色谱原理示意图

相的时候,它就不能和洗脱液一样向前移动,因为没有大的液流通过凝胶颗粒的孔隙。这样,小分子向下移动的速度必然要落后于大分子。这种情况如图 3-13 所示。因此,我们可以把凝胶颗粒看成是固定相,它能阻滞溶质的移动。对不同的物质,阻滞的程度不一样,因而在柱中移动的速度也就不同。洗脱液可以看成是流动相。分子在柱中移动的速度(即分子被凝胶颗粒阻滞的程度)决定于该分子在固定相和流动相间的分配常数 K_d ,因此,分配常数是凝胶层析中的一个特征常数,可用它来表示某一种分子在指定的凝胶层析柱内的洗脱行为。 K_d 的定义是:

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i} \quad (3-11)$$

式中, V_e 为某种物质从柱内完全洗脱出来时洗脱液的体积; V_0 为凝胶颗粒之间的空隙的总容积,也叫外水体积或空体积; V_i 为凝胶颗粒内部的孔隙的总容积,也叫内水体积。 K_d 是溶质

分子大小的一个函数,与凝胶床的几何形状无关。如果是大的溶质,而且完全被排阻于凝胶颗粒的微孔之外的话,则该种溶质最先流出柱外,此时 $K_d=0$;如果溶质足够小,能完全进入凝胶颗粒内部的微孔中,则该种溶质最后流出柱外,此时 $K_d=1$ 。由于对某一种凝胶,孔径是有不同的,因此对于中等大小的溶质,凝胶颗粒内部的有些微孔是有效的,有些微孔则是无效的。因而 K_d 值在 0 和 1 之间变化。显然,不同溶质流出柱的顺序与它们的 K_d 值由小到大的顺序是一致的。 K_d 值小的最先流出, K_d 值大的后来流出。

一般来讲,没有必要对凝胶柱做综合性的数学分析,因此,这里只介绍一些简单有用的关系式。这些关系式是描述溶质在一定凝胶柱上的层析行为的。

凝胶床的总体积(一般称为柱的床体积) V_t ,是由凝胶颗粒的间隙的总体积(V_0),凝胶颗粒基质所占的体积(V_r)和凝胶颗粒内部微孔的总体积(V_i)构成的。其中 V_i+V_r 即是层析柱固定相的总体积,用 V_s 表示。因此有:

$$V_t = V_0 + (V_i + V_r) = V_0 + V_s \quad (3-12)$$

某一种溶质的洗脱体积 V_e 取决于外水体积 V_0 、分配系数 K_d ,也取决于内水体积 V_i 。根据分配系数的定义[见方程(11)]:

$$V_e = K_d \cdot V_i + V_0 \quad (3-13)$$

若已知某一溶质的 K_d ,可用上式算出它的洗脱体积 V_e 。实际上, V_e 也可用溶质峰渐上升边半高点处的洗脱体积来测量。这样做比用峰顶测量更可靠,因为峰高的位置是移动的,它决定于样品体积。

阻滞溶质的程度是用如下三种形式描述的:① 分配系数 K_d (这在前边已经讲过了);② 相对洗脱体积, $V_{re} = V_e/V_0$;③ 阻滞系数 R , $R = (V_e/V_0)^{-1} = V_0/V_e$,它是 V_{re} 的倒数。

正常情况下, K_d 值应在 0—1 之间,但有时 K_d 值会大于 1,这可能是由于层析过程中不仅有分子筛作用,还有吸附和离子交换等作用。

凝胶过滤法的分辨力是凝胶层析中的另一个重要的特征常数。从数学概念上考虑,分离分辨力可以表示为:

$$\rho = \frac{2(V_2 - V_1)}{W_1 + W_2} \quad (3-14)$$

V_1, V_2 , 是两种物质的洗脱体积,可以从加样品开始到洗脱峰的最高点为止的洗脱体积计算。 W_1, W_2 , 分别为两个物质的洗脱峰在基线上每一峰的两个夹角之间的宽度。两个物质要完全分离, ρ 必须大于或等于 1。影响分辨力的因素很多,如凝胶粒度,上样量,流速、温度、凝胶类型及层析柱的形状等,将在下边介绍。

2. 凝胶层析的介质

对凝胶层析支持物的要求是,第一要有惰性,即床物质与溶质不发生任何作用;第二,离子基团含量要低,即所带电荷要尽可能低;第三,凝胶颗粒的孔度和大小要均一;第四,凝胶颗粒和孔度大小的选择范围要宽,能适应各种不同大小的分子的分离;第五,机械强度要高。现在有五种介质在不同程度上满足这些要求。第一种是交联葡聚糖(Sephadex)。它是由一定平均分子量的

葡聚糖和甘油基以醚桥($\text{—O—CH}_2\text{—CH—CH}_2\text{—O—}$)形式相互交联而成的一种立体网状结构。

交联度的大小,可通过控制交联剂[一般为环氧氯丙烷($\text{Cl—CH}_2\text{—CH—CH}_2$)]和葡聚糖的配
比以及反应条件来掌握。关于它的技术数据列于表 3-7 中。不同规格的 Sephadex 用数字标明。
如: Sephadex G-50、G-75 等,它指的是凝胶得水值(即凝胶完全溶胀后所吸收水的量)的 10 倍。
如: Sephadex G-75,它的得水值即为 7.5。凝胶的交联度越小,网状结构越疏松,吸水值越大。
因此,吸水值实际上是表示交联度的大小。

表 3-7 交联葡聚糖的物理性质

型号	筛孔	颗粒直径* (μ)	分级范围 (M. W.)	得水值 (毫升/克干胶)	床体积 (毫升/克干胶)
Sephadex G-10		40—120	< 700	1.0 \pm 0.1	2—3
Sephadex G-15		40—120	< 1500	1.5 \pm 0.2	2.5—3.5
Sephadex G-25 (E)	粗 中 细 超细	100—300 50—150 20—80 10—40	1,000—5,000	2.5 \pm 0.2	4—6
Sephadex G-50	粗 中 细 超细	100—300 50—150 20—80 10—40	1,500—30,000	5.0 \pm 0.3	9—11
Sephadex G-75	超细	40—120 10—40	3,000—70,000	7.5 \pm 0.5	12—15
Sephadex G-100	超细	40—120 10—40	4,000—150,000	10 \pm 1.0	15—20
Sephadex G-150	超细	40—120 10—40	5,000—400,000	15 \pm 1.5	20—30
Sephadex G-200	超细	40—120 10—40	5,000—800,000	20 \pm 2.0	30—40

* 颗粒直径是干颗粒的直径。

第二种是聚丙烯酰胺凝胶,商品名为生物凝胶(Bio-Gel P)。它完全是一种合成凝胶。聚丙烯酰胺的组成单位是丙烯酰胺。把它加热,使乙烯基聚合,则形成线性多聚物。再经过次甲基双丙烯酰胺共聚,就得到交联的聚丙烯酰胺。再经过适当的加工即成生物凝胶-P。只要控制单体量(丙烯酰胺量)和交联剂(次甲基双丙烯酰胺)的比例,即能得到不同型号和不同层析特性的生物凝胶-P。生物凝胶的有关数据列于表 3-8 中。不同规格的生物凝胶用数字标明,如 Bio-Gel P-2、P-4 等,它表示的是该种凝胶排阻极限的千分之一。例如:Bio-Gel P-4,它的排阻极限是 4000 道尔顿。所谓排阻极限就是不能穿过凝胶内微孔的最小分子的分子量。大孔径的交联葡聚糖和生物凝胶能用来分离分子量到 300,000 的溶质,但由于它们缺乏机械强度,很难应用。由于它们柔软,在层析柱中易被压缩,因此影响流速,甚至造成封柱的现象。为了克服这个缺点,又研制出具有较大孔径而流速又好的琼脂糖凝胶和琼脂糖-丙烯酰胺凝胶。

表 3-8 聚丙烯酰胺凝胶的物理性质

型 号	筛 孔	颗粒直径 (μ)	分 级 范 围 (M. W.)	吸 水 值 (毫升/克干胶)	床 体 积 (毫升/克干胶)
Bio-Gel P-2	50—100 100—200 200—400 400	150—300 75—150 40—75 40	200—2,000	1.5	3
Bio-Gel P-4	同上	同上	500—4,000	2.4	4.8
Bio-Gel P-6	同上	同上	1,000—6,000	3.7	7.4
Bio-Gel P-10	同上	同上	1,500—20,000	4.5	9
Bio-Gel P-30	50—100 100—200 400	150—300 75—150 40	25,000—40,000	5.7	11.4
Bio-Gel P-60	同上	同上	30,000—60,000	7.2	14.4
Bio-Gel P-100	同上	同上	50,000—100,000	7.5	15
Bio-Gel P-150	同上	同上	50,000—150,000	9.2	18.4
Bio-Gel P-200	同上	同上	80,000—300,000	14.7	29.4
Bio-Gel P-300			60,000—400,000	18.0	36

早期的琼脂糖凝胶性能不好,因为它是从部分纯化的琼脂制来的。琼脂由不带电的琼脂糖和带负电荷的琼脂胶组成。如果不除去琼脂胶,它就会严重影响琼脂糖凝胶的层析性质。现在已经把这两个组分分开了。琼脂糖的颗粒不是共价聚合而成,而是由氢键结合在一起的,但这种凝胶能抵抗破坏氢键的试剂,如脲、盐酸胍等,因此有较高保持其形状的能力。虽然琼脂糖凝胶在颗粒结构上与交联葡聚糖凝胶不同,但各种溶质在这种凝胶中的分配系数仍然是溶质分子大小的函数。关于琼脂糖的物理性质请参见表 3-9。

使琼脂糖和丙烯酰胺结合的凝胶也有出售。据说得到的分辨力较高,流速也很好,但毕竟使用时间不长,尚不能作最后结论。

凝胶过滤层析的最后一类介质是受控微孔玻璃球。这种玻璃球制得很小,而且具有很多孔。它和前述的几种凝胶一样,同样具有分子筛作用。但玻璃球的表面能吸附很多蛋白质。有人将甘油残基共价结合到玻璃上来解决这个问题,但未完全除去吸附作用。用六甲基二硅氮烷处理玻璃球要好些^[44]。这种微孔玻璃球的排阻极限一般从 3,000 到 9,000,000。已经证明,在这些颗粒的层析柱中,溶质的行为与凝胶中的相似。但是,这些颗粒具有凝胶所没有的一些优点,如:① 除了氟化氢和强碱以外,它们对所有的化学物质都是稳定的。② 它们有较窄的排阻极限,因此,能得到较好的分辨力和较高的产率。③ 不需要膨胀,而且柱的制备比较容易。④ 不会被压缩,因此,往往可以使用较高的流速。⑤ 它们很容易进行清洗和消毒。

除了孔度大小以外,颗粒大小也影响所得到的分辨力。凝胶过滤介质的颗粒越小,分辨力越高。这是因为支持物表面积增加,从而提供了更多的机会让溶质分子扩散到具有阻滞作用的支持物上。同时,因为介质颗粒小,所以流速相对就低,当然分辨力也就有所提高。用于分析目的的介质颗粒通常在 100—200 目也就足够了。为了分离得更好,介质颗粒的大小可降至 200—400

表 3-9 琼脂糖凝胶的物理性质

凝 胶 类 型	筛孔(目)	颗粒直径* (μ)	分 级 范 围 (M. W. $\times 10^6$)	琼脂糖浓度(%)
Sepharosc 4 B		40—190	0.3—3	4
Sepharosc 2 B		60—250	2—25	2
Bio-Gel A-0.5m	50—100 100—200 200—400	150—300 75—150 40—75	小于0.01—0.5	10
Bio-Gel A-1.5m	同上	同上	小于0.01—1.5	8
Bio-Gel A-5m	同上	同上	0.01—5	6
Bio-Gel A-15m	同上	同上	0.04—15	4
Bio-Gel A-50m	50—100 100—200	150—300 75—150	0.1—50	2
Bio-Gel A-150m	同上	同上	1—大于150	1

* 颗粒直径是湿颗粒的直径。

目。相反,对于制备目的的分选,或分批处理法来说,介质颗粒的大小可增至 50—100 目。

3. 凝胶过滤介质的准备

葡聚糖和聚丙烯酰胺凝胶是以干品出售的,所以使用前必须溶胀。可以将它们浸在洗脱液中,慢慢搅拌。洗脱液应具有较低的离子强度($\mu=0.08$)。这是因为大多数凝胶含有少量羧基。如果洗脱液的离子强度低于 0.08,少量羧基不能被屏蔽,凝胶颗粒就具有离子交换性质,从而改变溶质的分配系数值。溶胀时不能用电磁搅拌,因为这样会使颗粒损坏,产生大量粉末,因而影响流速。溶胀可在室温,也可在沸水浴中。表 3-10 列出了各种凝胶完全膨胀所需的时间。

琼脂糖凝胶是以浓悬浮液的形式出售的,因此,不须溶胀。玻璃球凝胶也无须用前溶胀。琼脂糖凝胶的正常操作温度是 0—30°C,高于 36°C 时,这种凝胶就要软化解体,冰冻会引起凝胶结构不可逆的瓦解和排阻极限的改变。这是它与葡聚糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶不同的地方。溶胀时,由于搅拌可能会产生很细的颗粒,必须将其除去,因为它们会严重降低柱的流速。可以将凝胶悬浮在 2—4 倍体积的洗脱液中,再将悬浮液倒入玻璃量筒中。当 90—95% 的凝胶沉降以后,尽快吸出余下的悬浮液凝胶。这种办法与除去离子交换树脂细粒的办法不一样,不能用倾去法,因为倾去法会使凝胶重新悬浮起来。这步常要重复两次,直到凝胶颗粒能迅速沉降为止。

最后,必须除去可能存在的空气泡,否则层析时赶出的气泡会使柱床表面提高,破坏柱床的均一性。可将溶胀后的凝胶颗粒置于真空中,抽空。通常,好的水泵即能提供足够的真空度,也可用一般的真空泵。除气过程中,如果缓慢摇动瓶,使其中的凝胶产生旋涡,则会加快除气过程。因为空气,特别是二氧化碳很容易在凝胶中积累,所以装柱前必须除气。

4. 层析柱的准备

凝胶层析的成功在很大程度上决定于柱装的好坏。设计合适的层析柱有如下几点考虑:死体积(凝胶支持板到柱出口间的空间)要小;用细管连接流出液的形式要灵活、方便;凝胶床的支持板(常用尼龙筛板)不能被堵塞;还要有保护床面的一些措施。

表 3-10 各种凝胶介质的溶胀时间

凝 胶	最 少 溶 胀 时 间	
	22°C	100°C
Sephadex		
G-10	3	1
G-15	3	1
G-25	3	1
G-50	3	1
Sephadex		
G-75	24	3
G-100	72	5
G-200	72	5
G-150	72	5
Bio-Gel		
P-2	4	2
P-4	4	2
P-6	4	2
P-10	4	2
Bio-Gel		
P-100	24	5
P-150	24	5
Bio-Gel		
P-200	48	5
P-300	48	5

细玻璃球或用加热法处理的玻璃筛板不能用作凝胶床的支持板，因为它们能吸附很多蛋白质。

根据具体情况，选择凝胶类型和柱的大小。用来从大分子(M. W. >20,000)中分离小分子，如无机盐或代谢中间物(M. W. <1,500)时，柱床体积应是上样体积的4—10倍，柱高/柱直径应为5:1—15:1。这类柱叫除盐柱。一般使用很小孔径的凝胶，其排阻极限在25,000以下。相反，用来分离大分子时，柱床体积应为上样体积的25—100倍，柱高与柱直径之比应为20:1—100:1。

直径小(小于1厘米)的柱，在湿润的玻璃柱壁上有“壁效应”，即降低靠近柱壁的溶剂的流动。这个效应是由于壁和沿壁流动的分子间的摩擦力引起的，能严重降低柱的分辨力。用二甲基二氯硅烷处理柱壁可以克服这个困难^[46]。但这样处理所带来的弊病是可能降低柱的流速。

选好了凝胶类型和柱规格以后，下一步就是将处理好的凝胶装柱。小孔凝胶和大孔凝胶的装柱稍有不同，但开始阶段却相同。量出需要量的凝胶悬浮在足够的洗脱液中，形成一种稀的糊状物，它的体积大约是所需床体积的2倍。装柱前后使此糊状物达到层析分离时的温度。因为在柱床形成以后或在层析期间温度的改变会使凝胶床发生严重的不规则变化，这是由于凝胶床热胀冷缩不均一引起的。层析柱要装得垂直。将一半床体积的洗脱液加到柱中，检查是否

漏,然后赶出死空间中的气泡。除气泡很简单,只要让洗脱液快速流出柱,同时轻叩柱底部分即成。剩下的洗脱液留在柱中,以防气泡再次进入死体积。然后,就可以将糊状物沿着玻璃棒缓慢倒入柱中。要小心,不要产生气泡。如果在柱顶装一引伸管,则可以将要加的悬浮液立即全部加入,这样能保证柱装得均匀。在这步以后,大、小孔凝胶的操作步骤就不同了。小孔凝胶很硬,在柱出口关闭的情况下,先让凝胶颗粒沉降5—10分钟,然后,打开柱出口,让过量洗脱液流出。在装柱时,容许洗脱液流出柱的作法有一个缺点,就是,这时会产生严重的对流。对流的结果将在靠近柱壁的部分沉降重的粗颗粒,在柱中心沉降细颗粒。这样柱的流速就不能均一,因此分辨力差。当凝胶床达到事先测定好的高度时,则可将过量的凝胶从柱中吸出。如果凝胶量不够,则必须在凝胶未全部沉降前再加些凝胶。如果在床体已经确定了的情况下再加凝胶的话,则会出现可见带,产生不良的洗脱图谱。如果必须再加凝胶的话,可在加前将床面搅起3—4厘米。装好的柱用2—3个床体积的洗脱液洗脱,以使柱床稳定,这时柱床可能会有少量的收缩。

装大孔凝胶时,必须考虑这些软的大孔胶的可压缩性。在层析和装柱的过程中,大孔胶所承

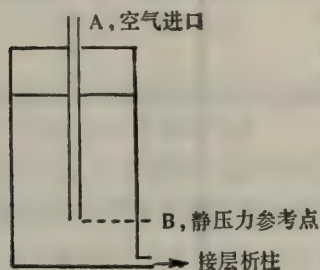


图 3-14 带马氏管的贮液器

受的壓力不能超过某一规定值,超过这值时,凝胶将被压缩,因而严重影响流速。这些规定的压力值叫做静压力,通常称为操作压。操作压是用柱系统溶液的顶部和底部的水平面间的垂直差来表示的。它不是柱溶液长度的函数,而是进口和出口水平面间的垂直差的函数。鉴别这种柱的顶部和底部水平面的简单方法是找到柱溶液直接与大气接触的两点。提高洗脱液的水平面,降低柱出口的水平面,可提高操作压,反之,则降低。为了避免层析时随着洗脱液的流出,柱的操作压也降低的现象,可采用带马氏管的贮液器。此容器的底部有一管与柱顶相连,

另一管从密封的塞顶延伸到溶液中,如图 3-14 所示。

当溶液从瓶中流出时,则在瓶中液面上部产生部分真空。由于液面上部的压力降低,容器中的液面也降至一较低点,溶液的进一步流出,则引起空气以气泡的形式进入容器,管 A 底部的压力等于大气压,所以操作压从管 A 的底部量,与瓶中溶液的高度无关,因此,层析过程中,操作压是恒定的。此外,用蠕动泵也能产生均一的、可控制的操作压。表 3-14 列出了各种凝胶所能容许的最大操作压。

装大孔凝胶时应关闭柱出口,先让柱里的凝胶沉降5—10分钟,然后打开出口,并将出口管提高到一定的高度,使形成的操作压比表 3-11 中规定的值稍低。随着床的沉降,逐渐提高操作压到表中规定的最终值。

如果使用上行层析装置,则可以减轻对软的大孔凝胶的压缩。这时,样品和洗脱液进入柱的底部,而不是从柱顶部进入。这种柱装有可调节的塞子、有时叫流动应接板。调节应接板的位置,就能调节层析柱的体积。使用这种柱应注意两点:一是必须在柱床稳定以后才能放上上部流动应接板;二是样品和洗脱液必须具有同样的密度,否则样品将留在柱底。减轻对凝胶的压缩是由于洗脱液流动的方向和重力作用的方向相反。向上流动的洗脱液是以向上的方向压缩柱

床,而重力却施加相反的影响。为了确保这些力的平衡,每次使用前,应当用大量洗脱液洗柱,使其充分平衡。

在稳定柱床和层析期间可以无人看管。但这时应采取安全措施,防止柱流干。图 3-15 示出两种形式的安全装置。这种装置起虹吸管的作用。当贮槽里的溶液水平面达到柱出口水平面时(图中的虚线),则虹吸作用停止,洗脱液停止流动。

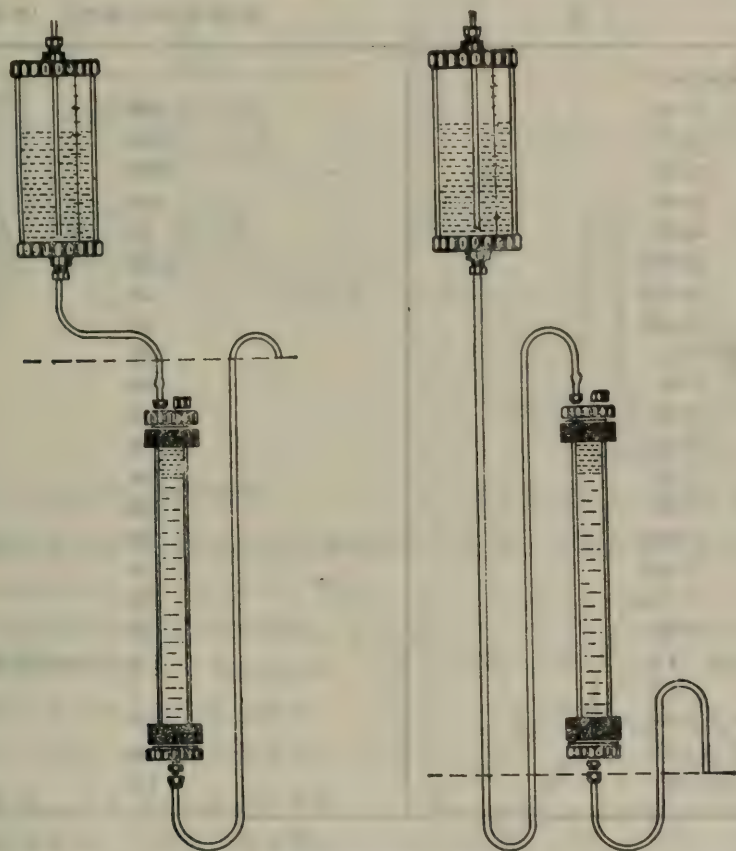


图 3-15 凝胶层析柱的安全装置

5. 外水体积的测定

新装好的柱,在使用以前要检查它的均一性。如有需要(如用凝胶过滤法测定分子量时),还要测定柱的外水体积。这可用高分子量的有色物质(其分子量在排阻极限以上)上柱来完成。兰葡聚糖(M. W. = 2×10^6)符合这个要求。层析时要注意兰葡聚糖在柱中移动的情形,同时收集从柱上将兰葡聚糖洗下来的洗脱液,此洗脱液的量就是外水体积。如果柱装得好,兰葡聚糖在柱中以均一的带移动,而且得到的洗脱图谱也是对称的。如果阻力不均一,则兰葡聚糖的区带就歪斜,这样的柱必须重装,然后再试。

6. 上样和层析

对于凝胶层析的样品必须考虑如下三个因素:上样量、样品的粘度和离子强度。上样量

也就是上柱样品的体积。这在很大程度上取决于样品的性质和分离的性质。对于除盐，上样体积应是床体积的 10—25%；对于分离大分子，则是 1—5% 比较合适。上样体积再小，如降至柱床体积的 1% 以下，也不能显著提高分辨力。上样体积的上限在很大程度上决定于样品各组分的分配系数的差别。如果混合物的各组分需要很不同量的洗脱液将它们从柱中洗出，那么上样体

表 3-11 各种凝胶介质所能容许的最大操作压

凝 胶	建议采用的最大操作压 (厘米水柱)
Sephadex	
G-10	100
G-15	100
G-25	100
G-50	100
G-75	50
G-100	35
G-150	15
G-200	10
Bio-Gel P-2	100
P-4	100
P-6	100
P-10	100
P-30	100
P-60	100
P-100	60
P-150	30
P-200	20
P-300	15
Sepharose 2 B	1 (每厘米高凝胶)
4 B	1
Bio-Gel A-0.5m	100
A-1.5m	100
A-5m	100

积可以增加。习惯上，衡量两个物质的分离效果是根据各自的洗脱体积之间的差别，这种差别用分离体积来表示。图 3-16 指出了样品量与分离体积的关系。通常样品体积必须小于分离体积才能得到较好的分离效果，否则就会出现如图 3-16 中间的洗脱曲线。图 3-16 的上面显示了样品量太少时所得到的分离曲线；而最下面的是为得到完全分离所能允许的最大样品体积。

样品的第二个重要性质是粘度。如图 3-17 所示，样品粘度过高时，则会产生宽的歪斜的洗脱图谱。这种现象是由于溶质“相对粘度”的影响造成的。“相对粘度”是溶质对洗脱液的粘度。样品和洗脱液的粘度相同时，所得峰形从而对称。加入葡聚糖使样品粘度增加，洗脱峰就出现不规则。所以，凝胶层析时，必须严格控制样品的粘度。一般相对粘度不能大于 1.5—2.0。图 3-17 之(1)、(2)、(3)为样品的相对粘度分别是 11.8、4.2、1.0 时的洗脱图谱。通常每毫升 70 毫克蛋白质溶液的相对粘度约等于 2.0，因此，实际上，样品和洗脱液的粘度通常不会差过 2 倍。

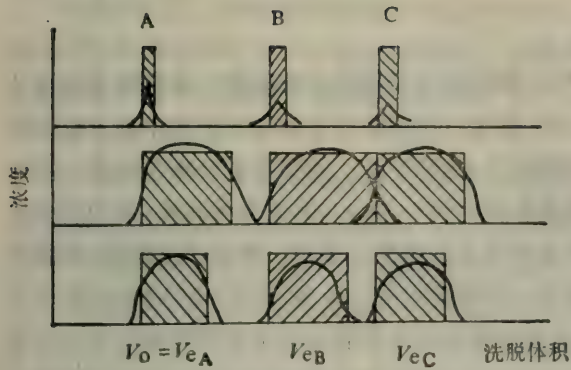


图 3-16 上样量对洗脱图谱的影响

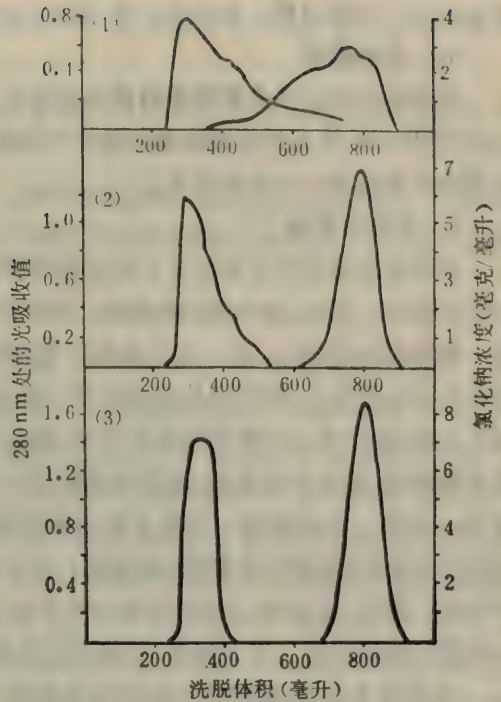


图 3-17 样品粘度对洗脱图谱的影响

正如对洗脱液的要求那样，样品的离子强度应大于 0.08，以屏蔽在凝胶介质中可能存在的离子基团。通常用 0.2—1.0M 的 KCl 或 NaCl 将样品和洗脱液调至适当的离子强度。

凝胶层析在很大程度上取决于混合物中的分子扩散到凝胶支持物上的机会。机会越多，所得之分辨力越高。因此，洗脱液的流速对柱的分辨力有很大影响。图 3-18 示出尿苷酸的洗脱图谱。当流速增加时，洗脱峰显著变宽。显然，当两种以上的成分进行层析时，洗脱峰宽度增加将严重影响分辨力。

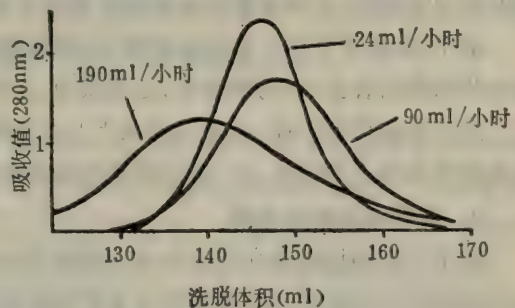


图 3-18 流速对尿苷酸在 Sephadex G-25 上层析图谱的影响。柱规格：2 × 65 cm

7. 凝胶的再生

因为凝胶本身不与溶质发生任何作用，所以每进行一次分离无须再生处理就可以进行下一次的分离。一般的层析床可反复使用数十次。如果注意防止微生物污染的话，同一凝胶可用数年不改变其层析特性。但实际操作时常有一定的污染物污染凝胶或层析床表面，必须做适当的处理。如果只是床表面污染的话，可除去污染凝胶，加入一些新处理的凝胶，并重新进行平衡。如果整个柱受污染，则可用 0.5N NaOH 和 0.5N NaCl 的混合液进行处理。聚丙烯酰胺凝胶和琼脂糖凝胶由于迂酸、碱不稳定，常用盐溶液处理。虽然凝胶层析有很多优点，但它也有局限性，如 pH 要在 6—8 之间；样品粘度也有一定限制；分离能力仅限于分子大小等。尽管如此，凝胶层

析法仍有广泛的应用：如分析分离、脱盐、大分子溶液的浓缩、大分子物质的分子量测定等。

七、亲和层析

前述的几种方法是利用蛋白质的溶解度、电荷、分子大小或吸附性质的差异来完成提纯的。1967年 Werle 等人开始用胰蛋白酶的不溶酶提纯胰蛋白酶抑制剂^[46]。以后逐渐发展成为一种新型的分离技术——亲和层析。

1. 方法的原理

亲和层析是利用生物大分子的生物学特异性，即生物分子间所具有的专一性亲和力而设计的层析技术。例如，酶和酶的抑制剂，抗原和抗体，酶蛋白和辅酶等生物大分子和小分子配体间有一种特殊的亲和力，在一定的条件下它们能紧密结合成复合物。如果将复合物中的某一方固定在不溶性载体上，则可以从溶液中专一性地分离和提纯另一方。与其它方法相比，亲和层析从理论上讲，能产生一个绝对的纯化作用，因此，可达到很高的纯度。采用一般方法提纯酶、抑制剂等生物制剂，操作十分复杂；而采用亲和层析，只需一步就能提纯 100 倍，甚至 1000 倍，产率可高达 70—95%。此法的另一个优点是分离快速。当要分离的大分子混合物中含有能破坏大分子结构的污染物时（如蛋白水解酶、核酸酶），用亲和层析可以迅速地将要分离的大分子从污染物中分离出来。因此，此法对分离含量极少又不稳定的活性物质极为有效。此法的关键是要有一个被分离蛋白质的配体。有了配体，还要以共价键（有时也以非共价形式）连接到支持物（如琼脂糖）上。然后将支持物-配体络合物以适当的缓冲液装在柱中。当蛋白质混合物上到此柱顶部时，大多数蛋白质径直通过，但能与配体相互作用的蛋白质则被阻留或被固定在柱上。洗柱，除去不需要的蛋白质以后，再用适当方法将吸附在柱上的酶洗下来。因此，这方法需要预先详细地了解酶的动力学特点，这样才能小心地设计最佳实验条件。

迄今，此法主要用于蛋白质的纯化，但从原理上说，也同样能适用于抗原和抗体，维生素、激素和药物的结合蛋白，药物受体，运载蛋白，多核蛋白体复合物，多酶复合物和阻遏物的纯化。

进行亲和层析以前，必须考虑如下几个问题：① 所用支持物的类型；② 配体的类型和将它连接到支持物上的方法；③ 用于吸附的条件和将大分子从柱上洗下来的条件。

2. 层析支持物的选择

对于亲和层析的介质的要求与凝胶层析的介质类似：① 非特异性吸附作用要低，与其它大分子的作用很微弱；② 必须具有很好的液体流动性；③ 在较宽的 pH、离子强度和变性剂浓度范围内具有化学和机械稳定性；④ 必须具有合适的、丰富的化学基团，配体可以共价地和它结合，并在联接的条件下必须是稳定的；⑤ 必须具有非常有效的多孔性。头三个性质不说自明。后两个性质需要做些解释。以后我们将谈到，对一定的大分子，其与配体结合的强度是配体浓度的函数。当大分子和配体间的亲和力较低时，为了提高它们结合的强度，就必须增加配体的数目。因此，支持物上必须有丰富的化学基团供配体结合；而大分子还必须容易地接近这些部位。因此，支持物必须有高度的多孔性。但是，当大分子和配体有很强亲和力时，多孔性就不是决定的因素了。此时，支持物表面上的有限数目的部位已足够结合全部大分子；当结合的样品分子太大，不能穿透大多数有孔支持物时，支持物的多孔性也就不那么重要了。

在亲和层析中非常有用的三种介质是：琼脂糖、聚丙烯酰胺凝胶和受控多孔玻璃球。这三

者之中,琼脂糖最常使用,因为它具有上面提到的那些特点。琼脂糖的主要缺点是,当用变性剂溶液洗脱时,它易于收缩。

聚丙烯酰胺含有大量的羧酰胺基,因此,能制备高度取代的支持物,可惜它缺乏多孔性,取代之后,孔度进一步降低。

将来受控微孔玻璃球可能是很有前途的介质。这种介质在凝胶层析中已经提到过。它是将硼硅酸盐玻璃加热到 700—800°C 制成的。在此温度下硼酸盐相和硅酸盐相分离,冷却后,硼酸盐相溶解在酸中,同时留下多孔的硅玻璃。

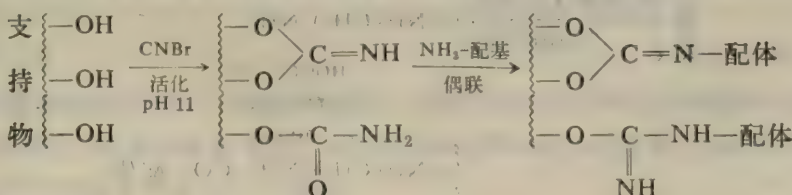
3. 配体的选择

选择配体要根据对纯化的大分子的特性的全面认识。可作配体的有:酶底物的类似物、效应物、酶的辅助因子。在有些情况下,也可以是酶的底物。当用酶的底物时,必须选择一定的条件不让酶起催化作用。可以通过取出酶所需要的金属离子,改变 pH 或低温等办法来实现这一目的。选择好的配体有两个标准:一是在蛋白质和配体间必须有强的亲和力。解离常数在 5 mM 以上的不是好的配体。相反,亲和力太高也是有害的。因为这时解离蛋白质-配体复合物所需要的条件就要较强烈,因而有可能使蛋白质变性。例如,用抗生物素蛋白作配体纯化含生物素的羧化酶。生物素-抗生物素蛋白复合物的解离常数为 $10^{-15} M$,它需要 6 M 盐酸胍,在 pH 1.5 进行解离。这样的条件可能要使大多数(如果不是全部的话)羧化酶变性。选择配体的第二个标准是,它必须具有一种适当的化学基团,这种基团不参与配体与大分子的特异结合,但可以用来联接配体和支持物,而且这种联接不应当影响配体和大分子结合的亲和力。但是当配体-大分子的亲和力很大时,也可以通过配体与支持物的结合来降低这个亲和力。所以重要的是不溶性的配体和所要蛋白质间的有效亲和力。这个亲和力可以通过预备实验来确定。将配体用类似于固相化的方式修饰,然后测定配体-蛋白质复合物在溶液中的表现解离常数 K_i 。

4. 配体和支持物的结合

配体结合到不溶性聚合物上的方法,目前已有 20 多种,但大都可以归结为载体结合法,物理吸附法,交联法和包埋法四类。结合的一般步骤是:① 活化支持物上的功能基团;② 将配体联接到这些活化基团上。用来发生交联的化学反应必须足够温和,不致使配体和支持物遭到破坏。交联后,要彻底清洗支持物,以除去剩下的未交联的配体。并且要测定交联的配体的量。

最常使用的支持物是 Sepharose 4 B。把支持物与溴化氢在 pH 11 进行处理,则能使支持物活化。这时,溴化氢与支持物上的羟基反应,形成氨基甲酸酯基团。此外,若有邻位羟基存在,则形成亚氨碳酸基团。加入溴化氢的量决定于支持物的量。如果希望取代的程度高,则加入溴化氰的量也要提高。经过取代后的支持物最后用常规的有机合成操作法和配体结合,这配体必须含有一种适合反应的基团,通常是氨基或羟基。上述过程可用下式表示^[47]。



在交联这步,首先要注意加入配体的浓度。通常,在交联反应混合物中的配体浓度应是最终产物所希望有的浓度的 20—30 倍。这样,溴化氰的浓度也必须提高到约 200 mg/ml 凝胶。如果在最终产物里希望有较少的配体,那么一开始加入的溴化氰也要相应地减少。其次,要考虑偶联反应的 pH。pH 在 9.5—10 时,活化的琼脂糖很不稳定。由于非质子化的配体氨基参加偶联反应,所以,降低 pH 也就减少了能反应的配体浓度,当然,结合到琼脂糖上的配体的量也就减少了。当蛋白质结合到不溶性的支持介质上时,总是希望它们结合的共价键尽可能少,这样,被束缚的分子才能有较大的灵活性,以便减小对其功能的干扰。要做到这点的最好办法是,让偶联反应在低 pH 下(如 pH 6.5—7.0)进行。

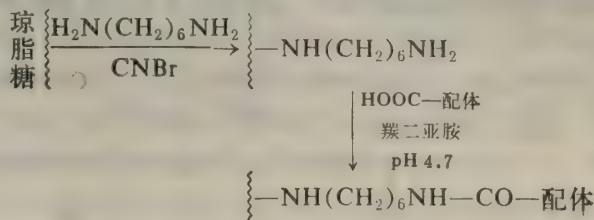
5. 吸附剂的衍生物

在叙述配体的选择时,已经提到,配体和支持物的联接不应当影响配体和大分子结合的亲和力。事实上,如果把配体直接结合在支持物上,往往由于支持物的空间障碍,大分子不能接近配体。如果在支持物和配体间加接一个“空间臂”,使配体远离支持物,而能进入溶液,与酶作用,这样就消除了来自支持物的干扰。表 3-12 所列的数据就证明了这一点。从表中可见,空间臂越长,吸附容量越大。

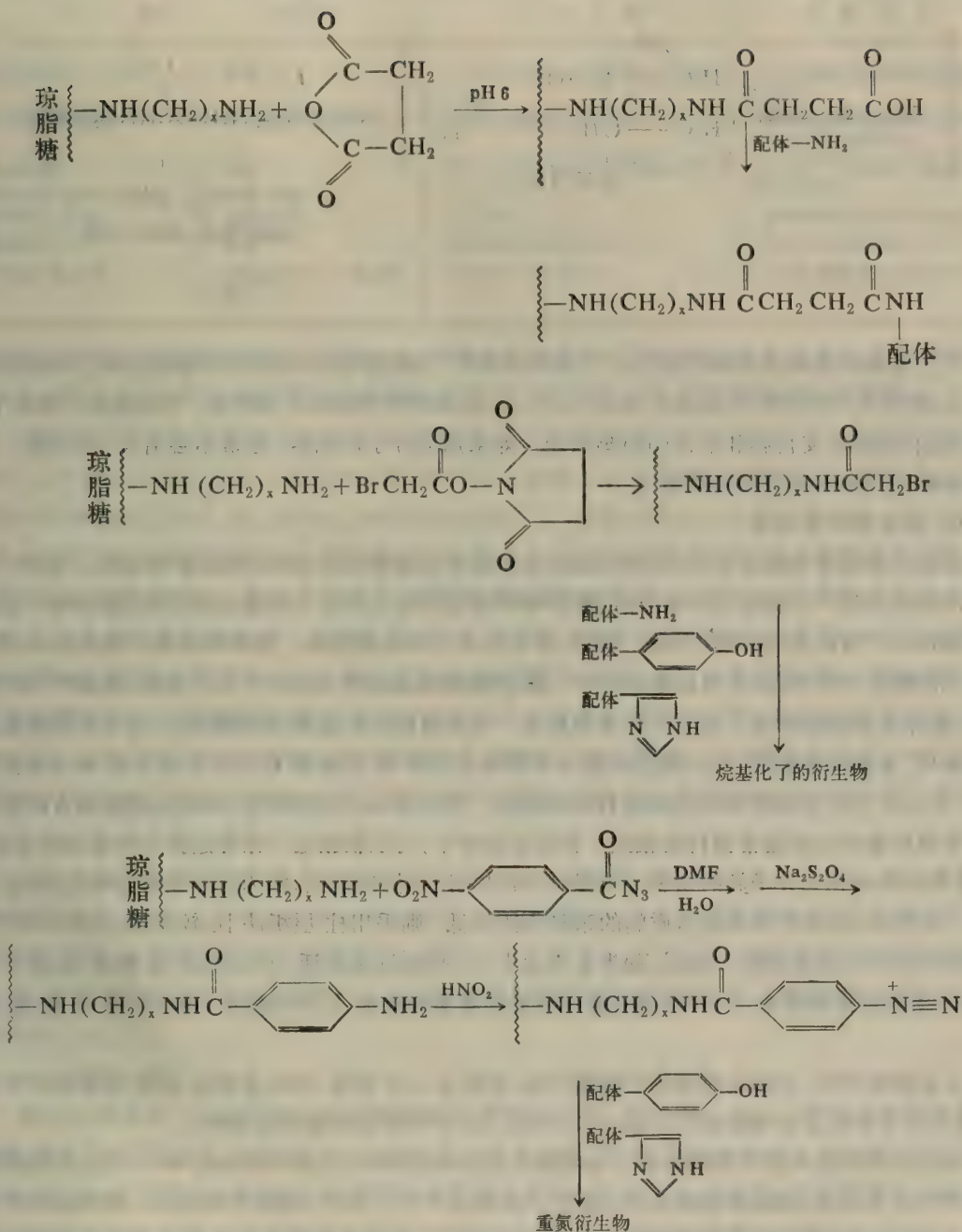
表 3-12 葡萄球菌核酸酶的特异亲和层析吸附剂

吸 附 剂 衍 生 物	吸 附 容 量
A $\left\{ \text{---NH---} \langle \text{苯环} \rangle \text{---PO}_4^{--} \text{---T---PO}_4^{--} \right\}$	2
B $\left\{ \text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCH}_2\text{---NH---} \langle \text{苯环} \rangle \text{---PO}_4^{--} \text{---T---PO}_4^{--} \right\}$	8
C $\left\{ \text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{CCH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\parallel} \text{CNH---} \langle \text{苯环} \rangle \text{---PO}_4^{--} \text{---T---PO}_4^{--} \right\}$	10

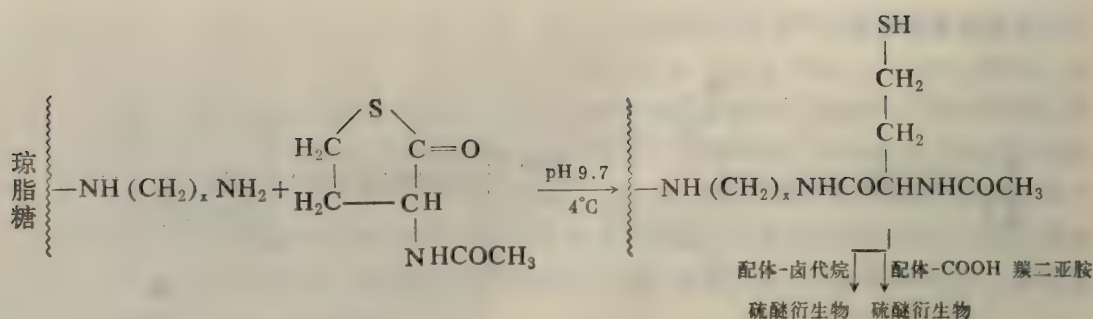
通常的连接空间臂的方法是将琼脂糖 ω -氨基烷基化,也就是用溴化氰活化法将适当长度的氨化物共价结合到琼脂糖上。有两种氨化物可用于此目的。一是六甲基二胺 $[\text{NH}_2\text{---}(\text{CH}_2)_6\text{---NH}_2]$,二是 3,3'-二氨基二丙基胺 $[\text{NH}_2\text{---}(\text{CH}_2)_3\text{---NH---}(\text{CH}_2)_3\text{---NH}_2]$ 。加接这两种臂后所得到的琼脂糖衍生物相当稳定。这种衍生物的最大优点是能使下一步的配体连接更容易。例如,氨基琼脂糖的氨基与配体的羧基就很容易形成酰胺键



常用的其它类型有^[48]：



以重氮键连接的配体有一个重要的特点：当固相配体在 pH 9，经保险粉还原，则很易使重氮键断裂，释放出偶联着的配体，因此，可以精确测定其中配体的含量。也能在温和条件下从支持物上释放出完整的蛋白质-配体复合物。



以上是最常用的几种取代类型。目前带有各种“空间臂”的一系列琼脂糖衍生物已有商品供应。必须指出，“空间臂”不是越长越好，太长了，亲和和吸附的效率反而降低，可能是由于链长了，容易弯曲，反而使支持物和配体的距离缩短。如果用大分子作配体，通常不必引入“空间臂”，可直接偶联在经活化的琼脂糖凝胶上。

6. 层析条件的选择

在蛋白质混合物通过亲和层析柱以前，柱中配体的浓度是已知的，而且是恒定的。这时，大分子的浓度为零。当样品进入柱中时，配体和所要蛋白质之间发生随机碰撞，形成复合物：蛋白质 + 配体 \rightleftharpoons 蛋白质-配体复合物。同时，形成的复合物也能解离。随着样品的不断加入会使已经存在的酶量不断增加，并且保留在柱中。酶浓度的增加会使上面的方程式右移，从而有利于蛋白质-配体复合物的形成。这样在柱中就形成一个明显的比较紧密的吸附带。这个过程就是亲和层析的“逐渐保留特性”^[49]。样品在柱中吸附时的这种特性能解释为什么相对亲和力很低的 ($K_i = 1 \times 10^{-3} M$) 系统仍能成功地进行亲和层析。也正是由于这种特性，从柱上洗脱络合的蛋白质所需要的条件远比通常预料的剧烈。在实际操作中，可以根据这个原理选择具体使用的方法。如，当看到配体和大分子间的亲和力很强时，可以采用分批处理法，因为这时吸附效率高，有能力处理大量样品；如果配体和蛋白质间的亲和力比较低，则采用柱层析法比较合理，这时可以充分利用它的自行保留特性。相反，如果亲和力太大，吸附过紧的话，可以把层析物重新悬浮于 10—20 倍的过量溶液中，这样就能有效地降低游离酶的浓度，以利于配体-蛋白质复合物的解离。

在亲和吸附时，亲和柱所用的平衡缓冲液，其组分、pH 和离子强度都应选择亲和双方作用强，最有利于形成复合物的条件。表 3-13 列出了用于吸附各种材料的条件。

这里还要考虑样品溶液的浓度。如果蛋白质的浓度很高 ($> 20-30 \text{ mg/ml}$)，那么蛋白质就容易聚合成聚合体，因而降低蛋白质与配体间的相互作用。另外，在亲和层析前，将样品初步纯化还是有好处的，特别是在大量制备时更应当这样做。因为初步纯化后能减少要处理的蛋白质量，从而节省亲和层析的时间。当然，如果亲和力很强，也可以直接进行亲和分离。

前边已经谈到，洗脱束缚的大分子所需要的条件通常要比束缚它们强烈的多。这一点从表 3-13 中的数据也可以看出。洗脱束缚的蛋白质的方法基本上有两种：第一是用含有较高亲和力

表 3-13 蛋白质在亲和层析柱上的吸附和洗脱条件

酶	固相化配体	吸附条件	洗脱条件
腺苷脱氨酶	腺苷	0.1M KCl 和 0.1M 磷酸盐, pH 7.0	2mM 疏基嘌呤核苷(底物类似物)
天冬氨酸转氨酶	吡哆醛-5'-磷酸	5mM 磷酸盐, pH 5.5	100mM 磷酸盐, pH 5.5 或 1mg/ml 吡哆醛磷酸
碳酸酐酶	磺胺	0.01M 三羟甲基氨基甲烷, pH 8.0	0—10 ⁻⁴ M 梯度的乙酰唑胺(酶抑制剂)
黄嘌呤氧化酶	别嘌呤醇	0.1M Na ₂ S ₂ O ₄	氧饱和的 1mM 水杨酸盐
凝固因子	肝素	0.05 M Tris, pH 7.5	0.1—0.4 M NaCl
半乳糖-阻遏物	对氨基苯基- α -巯基半乳糖苷	0.05M KCl, pH 7.5	0.1M 硼酸盐, pH 10.5

的能与配体竞争的物质的洗脱液洗脱。这种方法通常要用大量的洗脱液,而且增加竞争剂的浓度也没有助益。因为洗脱决定于复合物的解离速度。非常稳定的复合物的解离半寿期是 5—15 分钟。半寿期在这个数量级上的复合物,要洗脱掉 95%,则可能需要 1 小时以上。增加竞争剂的浓度,虽不能改变洗脱所需大分子的时间,但可防止解离了的复合物再重新结合。如果大分子对配体结合的亲和力很高,那么即使在最佳的洗脱条件下,洗脱过程也可能是很缓慢的。洗脱液里一般含有游离的底物或抑制剂。在室温或高于室温的条件下洗脱,并间歇地中断洗脱液的流动,可得到最好的洗脱结果。第二种方法是,剧烈改变复合物的环境,以使大分子-配体复合物解离。为此,往往是改变洗脱液的 pH、离子强度、温度。这种改变应不使蛋白质失去活性。一般使用稀酸(如醋酸)或弱碱(如 NH₄OH)。如果这样改变还不能解决问题,则可向洗脱液中加入水溶性的配体(即未固相化的同种配体物质)。这时又一次利用了生物特有的专一性,即只洗脱与配体有亲和力的蛋白质,因而能提高纯度。使用剧烈条件洗脱时,要注意测定蛋白质是否变性。可用催化活性和调节活性的测定来检查,也可以用少量样品重新上柱,看它与配体的结合能力是否遭到破坏。

上面讲的是只有一种大分子与配体结合成复合物,但实际情况并不总是这样。如以天冬氨酸作为配体的亲和柱,能够亲和结合下列物质:天冬酰胺酶、天冬氨酸脱羧酶、天冬氨酸酶^[50]。这时应当用较不剧烈的条件顺序洗脱络合的蛋白质。还有一种已经成功使用的方法是利用离子强度梯度或竞争剂梯度进行洗脱^[51]。此法是用 NADH 作为竞争剂洗脱,以凹形梯度洗脱各种不同形式的 LDH。

八、超离心法^[52]

离心技术是分子生物学和生物化学研究中不可缺少的一门技术。这是一种利用物质的沉降系数、质量、浮力因子等方面的差别,用强离心力使其分离、浓缩、提纯的技术。离心技术既可以是制备性的,也可以是分析性的;处理样品的量可大可小,小至 0.2 ml 以下,大至数千升;应用的范围也相当广泛,目前可用此技术分离各种亚细胞物质,如:线粒体、微粒体、染色体、溶酶体、肿瘤病毒等;各种与蛋白质合成有关的酶系,各种信使核糖核酸和转移核糖核酸以及脱氧核糖核酸,因此,为遗传工程学和酶学的发展提供了条件;用来产生离心力的离心机也是各种各样,从简单的低速、高容量的制备离心机到用于精细分析的超离心机应有尽有。虽然离心机的种类繁多,

但原理却是一样的。由于在蛋白质的分离提纯中,制备性的离心经常遇到,所以重点介绍这个技术。然后顺便提一下分析性离心,它们在方法学上有很多类似的地方。

1. 方法的原理

超离心是根据物质在离心场中的行为不同来分离物质的。任何物体,当它以稳定的角速度做圆周运动时,都要经受一个向外的离心力 F 。离心力的大小决定于转头的角速度 ω (以弧度/秒表示)和物质颗粒离旋转轴的距离 r (以厘米计),如下式:

$$F = \omega^2 r$$

F 常用地心引力来表示,这时它指的是相对离心力 RCF 。 RCF 常以重力常数 g (980 厘米/秒²)的倍数来表示,所以有:

$$RCF = \frac{\omega^2 r}{980}$$

为了使用方便,必须用离心机的转速(即转数/分)来表示这个关系。用下式可以将转数/分转换成弧度:

$$\omega = \frac{\pi(\text{转数/分})}{30}$$

因此,

$$\begin{aligned} RCF &= \frac{[\pi(\text{转数/分})]^2 (r)}{30^2 \cdot 980} \\ &= (1.119 \times 10^{-5})(\text{转数/分})^2 \cdot r \end{aligned} \quad (3-15)$$

这样,只要知道离心机的转数/分,以及离心管中某物质颗粒到离心机转轴中心的垂直距离 r ,就能知道这个颗粒所经受的离心力。

在离心力的作用下,物质颗粒以一定的速度向离心管底移动,这个移动的速度可由下式表示:

$$v = \frac{dr}{dt} = \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{f} \omega^2 r \quad (3-16)$$

其中, r 是离心转轴中心到沉降颗粒或分子的垂直距离(厘米), ϕ 是颗粒的体积(厘米³), ρ_p 是颗粒的密度(克/厘米³), ρ_m 是溶剂密度(克/厘米³), f 是摩擦系数(克/秒), v 是颗粒在与转轴垂直方向上的沉降速度,也叫辐射速度(厘米/秒)。(16)式的一个更普通的形式是用颗粒的“沉降系数” S 来表示的。所谓沉降系数,也就是在单位力场(F)中颗粒沉降的速度,即,

$$S = \frac{\text{沉降速度}}{\text{单位离心力}} = \frac{dr}{dt} \cdot \frac{1}{\omega^2 r}$$

或

$$S = \phi \frac{\rho_p - \rho_m}{f} \quad (3-17)$$

S 的单位是秒。因为很多重要生物分子的沉降系数大于 10^{-13} 秒,所以把 10^{-13} 秒定义为一

个 Svedberg 单位, 记为 S 。核糖体亚单位的沉降系数是 18×10^{-13} 秒, 通常就记作 $18 S$ 。

方程(17)中分子的摩擦系数 f , 决定于分子的大小、形状以及介质(分子在其中沉降)的粘度。对于半径为 r_p 的球形分子来说, 摩擦系数可由下式计算:

$$f = 6\pi\eta r_p \quad (3-18)$$

此处, η 是介质的粘度, 以泊来表示(克/厘米·秒)。 r_p 是分子或颗粒的半径(厘米)。因此, 可以看出, 一个球形颗粒的沉降速度不但取决于所提供的离心力, 也取决于颗粒的大小、形状和密度以及悬浮介质的粘度。

为标准化起见, 常常将颗粒在某一条件下测得的沉降系数值对此颗粒在 20°C 的水里所测得的值进行修正。利用方程式(17), 经过简单的数学处理得到:

$$S_{20 \cdot w} = S_{t \cdot m} \frac{\eta_{t \cdot m} (\rho_p - \rho_{20 \cdot w})}{\eta_{20 \cdot w} (\rho_p - \rho_{t \cdot m})} \quad (3-19)$$

这里, $S_{t \cdot m}$ 是颗粒在介质 m 中, 温度为 t 时所测得的沉降系数; 也就是未经校正的沉降系数, $\eta_{t \cdot m}$ 是介质在离心温度下的粘度; $\eta_{20 \cdot w}$ 是 20°C 水的粘度; ρ_p 是溶液中颗粒或分子的密度; $\rho_{t \cdot m}$ 是介质在离心温度下的密度; $\rho_{20 \cdot w}$ 是水在 20°C 时的密度; $S_{20 \cdot w}$ 是颗粒在 20°C 水中的沉降系数, 即经过校正后的沉降系数值。

假定在 t_0-t_i 的一段时间内, 颗粒由 r_0 移动到 r_i , 则积分(6)式得:

$$S \int_{t_0}^{t_i} dt = \frac{1}{\omega^2} \int_{r_0}^{r_i} \frac{dr}{r}$$

$$S(t_i - t_0) = \frac{1}{\omega^2} (\ln r_i - \ln r_0)$$

即,
$$S = \frac{\ln r_i - \ln r_0}{\omega^2 (t_i - t_0)} \quad (3-20)$$

这里, $t_i - t_0$ 是颗粒从 r_0 移动到 r_i 所需要的时间。如果颗粒或分子的沉降系数是已知的, 由式(20)就可以计算沉降一种粒子(从 r_0-r_i)所需要的时间:

$$t_i - t_0 = \frac{1}{S} \frac{(\ln r_i - \ln r_0)}{\omega^2} \quad (3-21)$$

如果 r_i 和 r_0 的值等于离心管的管底和管顶到离心机旋转轴中心的垂直距离值, 那么 $T = t_i - t_0$ 就是颗粒完全沉降所需要的时间。这个值通常叫做澄清时间。

将方程(17)代入方程(21)中, 得:

$$T = \frac{9}{2} \frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_p - \rho_m)} \ln \frac{r_i}{r_0} \quad (3-22)$$

由式(22)可以看出, 在某一转速时, 沉降一组均匀的球形颗粒所需要的时间与它们半径的平方以及它们的密度和悬浮介质的密度之差成反比, 与介质的粘度成正比。因此, 很明显, 一个大体上是球形颗粒的非均一的混合物可以用离心的方法, 根据它们的密度和大小来分离, 也就是根据它们在一个固定的离心场中完全沉降所需的时间不同, 或者根据它们在一个固定的离心场中经过一个预定的时间以后沉降的程度不同来分离。这就是用离心法进行分离的基础。

2. 制备性离心

用超离心技术分离纯化生物大分子及亚细胞物质时常采用两类方法: 沉降速度法和沉降平

衡法。在制备离心中,颗粒在均匀溶液中的移动常被机械振动、温度坡差和对流所扰动。因此,利用密度梯度来消除或减轻这种现象。密度梯度是由在离心管中能迅速扩散的物质,如蔗糖、甘油、氯化铯等形成的,管中溶液的密度由管底到管顶逐渐降低,形成一个平滑的梯度。沉降速度法主要是根据各种被分离物沉降系数的不同来分离物质的,它所用的密度梯度范围小,即梯度中的最大密度小于沉降样品的最小密度。此法适用于分离密度相近,但大小不同的物质。制备性沉降速度法的离心特点是短时间,低速度,使样品不完全沉降。相反,沉降平衡法是根据欲分离物的密度的不同来进行分离的。它所用的密度梯度范围大,即梯度的最大密度大于沉降样品的最大密度。此法适用于分离大小相近,但密度不同的物质。沉降平衡法的离心特点是高速长时间离心,以使样品完全沉降在平衡位置。

(一) 沉降速度法

① 差速离心法(differential centrifugation)

此法的特点是逐步增加离心力。每一步的离心力要选择到能使一种特殊类型的物质在预定的离心时间内沉降,从而得到一个沉淀。然后分离出沉淀。逐步增加离心力,进一步离心上清液,使中等颗粒沉降,最后是大小和密度最小的颗粒沉降。必须注意,每次得到的沉淀,必须经过几次洗涤后,反复悬浮和离心,才能得到比较纯的部分。差速离心最常用于从组织匀浆液中分离细胞器。但用此法分离得到的组分决不是均一的。用密度梯度法可以得到更好的分离。

② 速度-区带离心法(rate-zonal centrifugation)

此法有时也叫沉降系数-区带离心法。它是将样品放在一个连续的液体密度梯度上。注意,此密度梯度的最大密度值应小于沉降样品的最小密度值。这时的密度梯度只是为了防止形成的区带由于对流而引起的混合。然后,进行离心,直至达到所需要的分离,即各种颗粒在梯度中形成了不连续的区带。但应注意,在重的组分到达管底之前要停止离心。或者所用的密度梯度包括了所要研究的颗粒的密度范围,这时要离心到颗粒完全沉降之前,但又足以使各种欲分离物在梯度中形成明显区带为止。这时,所需要的部分没有达到它的等密度位置。这种方法已用于分离 RNA-DNA 混合物,核蛋白体亚单位和其它细胞成分的分离。用此法分离密度相同、大小(即分子量)不同的物质相当成功。如果两个蛋白质的密度相同,但分子量相差 3 倍,那么用此法可以很容易将它们分离。相反,对于亚细胞器,如,线粒体、溶酶体、过氧化物酶体(它们具有很不同的密度,但大小类似),用此法则不能得到明显的分离。这时就要采用沉降平衡法。

(二) 沉降平衡法

① 等密度离心法(Isopycnic centrifugation)

此法可用密度梯度或不用密度梯度来进行。不用密度梯度时,先用差速离心法除去较重的颗粒,然后把含有所需颗粒的样品悬浮在一个与被分离部分具有相等密度的介质中,再离心,直至所需要的物质沉降为止。密度低于所需物质的颗粒则漂浮在上面。

另一种情况是,人为地在离心管中造成一个连续的密度梯度,然后将样品放到这个连续密度梯度的顶部。注意,这个密度梯度包括了所要研究的颗粒的密度范围。然后进行离心,样品则在离心管中沿梯度运动,直到样品密度和梯度中的密度相等时为止。这时样品不会继续沉降,而是排列成带状。因为这时它漂浮在密度大于它的液面上。因此,这个技术有时也叫做等密度区带

离心, 它所使用的密度梯度范围较大。梯度密度的最大值必须比密度最大的样品还要大。为了使样品的所有组分都能达到它们的平衡密度, 需要连续长时间的高速离心。此法适用于分离沉降系数很接近, 但密度不同的物质。因为大多数蛋白质几乎具有相同的密度, 因此分离蛋白质一般不采用此法。但此法可用于分离核酸, 亚细胞的细胞器, 如线粒体、乙醛酸循环体, 溶酶体等。

② 平衡等密度离心法(equilibrium isodensity centrifugation)

此法是利用一种能在离心场内自行形成密度梯度, 并在一定时间内保持此梯度相对稳定的物质——氯化铯作为欲分离物的密度平衡溶液。样品和氯化铯的浓溶液均匀地混合, 离心, 则氯化铯浓溶液自行产生一个密度梯度。然后样品分子在梯度中进行分配。由于离心力的作用把样品分子赶到一定的区域内, 在这个区域中, 溶液的密度等于样品本身的漂浮密度。此法最常用于分析分离中, 也用于分离和分析人血浆脂蛋白。Meselson 等曾用此法来说明大肠杆菌 DNA 的复制机制^[53]。

总之, 沉降速度法是一种动力学的方法, 关键在于选择适合于各分离物的离心力; 而沉降平衡法则是一种测定颗粒漂浮密度的静力学方法, 关键在于选择合适的密度梯度溶液。由于目前对核酸、蛋白质等生物大分子的研究越来越深入到物质结构间的细微差别上, 因此, 沉降平衡法已成为超离心技术中广泛使用的方法。

3. 梯度的制备和取出

离心技术中, 密度梯度有两种: 连续的和 not 连续的。不连续的或者分层的密度梯度是把密度逐渐降低的溶液一层一层地放到离心管中。要分离的样品可以直接以一个很窄的带放到这个不连续梯度的顶层, 即密度最低的一层, 然后离心。这个梯度的优点是容许增加梯度的容量, 而且人为地使分离了的颗粒的分布更加集中。

连续密度梯度是通过一种特殊的称为梯度形成器的装置来制成的。这个装置与离子交换层析中所使用的梯度混合装置十分类似, 产生不同的梯度形状(如线性、凸、凹形)的原理也相同。

要想用密度梯度离心法成功地分离特定的分子和亚细胞细胞器, 必须注意用来确定梯度的材料、离子强度、粘度、渗透性质以及梯度的斜率、pH、稳定剂等问题。

用来确定梯度的最常用材料是蔗糖。它便宜、纯度高, 其溶液密度可达 1.28 克/厘米³。甘油与蔗糖有类似的性质, 但它的使用密度只能在 1.15 克/厘米³ 以下。这两个化合物的缺点是: 当它的密度大于 1.10—1.15 克/厘米³ 时, 就变得很粘, 而且即使在浓度很低的情况下, 其渗透效应也很强。这两个缺点促使人们去寻找新的化合物, 它们应当具有类似的密度范围, 而且是惰性的和非离子化的, 还要有较低的粘度和渗透效应。现在, 有五种材料可以满足这些要求。它们是, Renografin、Urografin、Ludox、Ficoll 和 Metrizamide。目前, 后三种经常使用。Ludox 是杜邦公司生产的胶态二氧化硅的商品名称。用 40% Ludox 溶液与多聚糖(如葡聚糖)结合制成的密度梯度, 可用来分离各种类型的整细胞, 如红、白血球。Ficoll 也是商品名, 它是由蔗糖和表氯醇聚合起来的高分子量聚合物。Metrizamide 是新产品, 潜力很大, 因为它能很容易地产生高达 1.45 克/厘米³ 的密度。它的梯度的形成可用梯度混合器来完成, 也可以通过离心它的均一溶液来完成。

虽然上述化合物形成的梯度适用于分离蛋白质和整细胞, 但不适于用来分离核酸, 以及主要

由核酸构成的病毒等。于是又用氯化铯来制备密度梯度。它的最高密度可达 1.70 克/厘米³[64]。离心氯化铯和要分离样品的均一溶液，由于铯离子的质量大，因此，在离心管中就自动形成一个密度梯度。除了能得到高密度以外，氯化铯梯度还有一个额外的优点：当 DNA 分子在这个梯度中沉降时，在各种 DNA 的漂浮密度和它们的鸟苷加胞嘧啶的量之间几乎呈线性关系[65]。但是，用硫酸铯代替氯化铯，则没有这种关系。硫酸铯也有它的优点：它形成的梯度范围可以是氯化铯的二倍，因此，可用于漂浮密度很不相同的 DNA 的分离和沉降 RNA 分子。用铯盐产生密度梯度的实际问题是，它们很贵，而且容易被吸放紫外光的物质污染。有一种方法可以将纯度较差的铯盐提纯到光谱纯[66]。

还要注意密度梯度的组成对最后结果的影响。例如，有两种物质 A、B，当它们在梯度 C 中时，A 的密度比 B 大；当它们在梯度 D 中时，则反过来，B 的密度比 A 大。有时，在梯度中加入少量无机盐就能改变欲分离物的密度。这种改变有时是有害的，如，两个本来密度不同的物质，经过这种改变后，两个的密度相同了，因此不能达到分离的目的[67]；有时又是有利的，如，两个本来很难分开的物质，经过适当的处理改变了它们的密度，因此，能明显地将它们分离开[68]。

在完成离心和分离了各个组分之后，为了把已分离物质的各条带分开，必须取出梯度溶液。从离心管中取出梯度溶液有好多种方法。常用的是取代法。另一种常用的方法是，在离心管底部用针穿一小孔，然后，管中的梯度溶液借重力或蠕动泵的作用，从管流到部分收集器中。

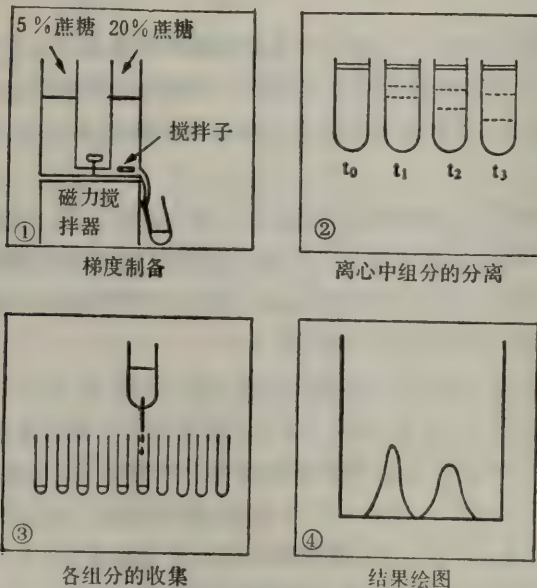


图 3-19 线性密度梯度离心的实际过程

(二) 高速离心机

这种离心机的速度在每分钟 20,000—25,000 转。适用于大体积的制备性应用，通常装有冷冻设备，用来冷却转子室。这类离心机分二种：一种是较简单的高容量连续流动的离心机，由快速电动机带动，转子是长管形的，其主要应用是从大量培养液中(5—500 升)收集酵母和细菌。当培养液从旋转的转子底口进入、并向转子上口移动时，微生物即沉降在转子壁上，而澄清的培养

液借重力或蠕动泵的作用，从管流到部分收集器中。

梯度溶液分部收集在各个试管之后，就要对它们进行分析，如用紫外吸收、放射性标记、酶活力测定等，以找出所需要部分的分布情况。最后根据所得结果作图。图 3-19 说明了线性梯度的制备以及在速度区带离心中的应用。

4. 各种离心机及其应用

(一) 桌式临床离心机

这种离心机最简单、经济、常用于收集能快速沉降的少量物质，如红血球、粗沉淀物和酵母细胞。最大转速在每分钟 3,000 转以下。

液则从上口流出。如果培养液是冷的,则无须冷冻。

第二类高速离心机容量较低。大多用于一般的生化实验室中。转子温度要保持在 $0^{\circ}-4^{\circ}\text{C}$ 。速度控制要比临床式的离心机精密得多。装有大小不同的离心管和转头,以适应不同的制备量。这种离心机常用来收集微生物、细胞碎片、细胞、大细胞器、硫酸沉淀和免疫沉淀等,但它不能产生足够的离心力来沉降病毒、小细胞器(如核糖体)或单个分子。

(三) 超速离心机

这类离心机主要由四个基本部分组成,① 动力和速度控制,② 温度控制,③ 真空系统,④ 转子。它的离心力可达 $500,000 \times g$ 以上,每分钟75,000转。这种离心机的出现开创了一个完全崭新的研究领域。它能分级只有用电子显微镜才能看见的亚细胞细胞器,这样,就能对它的酶成分进行分析。它甚至能分辨只在N原子上不同(一种含 ^{15}N ,一种含 ^{14}N)的两类DNA分子。这种离心机还用于生物大分子的纯度鉴定、分子量测定、构象变化的检测等。

九、电泳法

电泳技术已经成为鉴定生物大分子并分析它们的纯度的基本工具。此法的根据是,很多在生物学上有重要意义的分子、如氨基酸、多肽、蛋白质和核酸,都具有可电离的基团,在溶液中能够形成带电荷的离子,因而,它们在电场的作用下就会发生移动。由于各种分子所带净电荷的多少不同,因而,它们在电场中移动的速度也就不同,这就是电泳的基本道理。早期的电泳方法是在蔗糖溶液中进行的。但是,由于操作麻烦,所需仪器昂贵,严重地限制了它的使用。用淀粉凝胶代替蔗糖作支持介质和抗对流介质后,电泳在生物学上的应用增加了。但只是在应用了聚丙烯酰胺凝胶作电泳支持物后,才使电泳法得到了今天这样的普及。在下边的讨论中,我们以蛋白质为例来说明电泳的原理,但这些原理也同样适用于其它带电分子。

一、基本原理

在讲离子交换层析时,已经谈到,由于蛋白质含有酸性和碱性氨基酸,所以它带有电荷。但在电泳里,只有离子的净电荷才是有意义的。如果把一个净电荷为 q 的离子置于电场中,则分子就要受到一个力(F)。这个力的大小决定于分子所带的电荷和电场强度。用数学式表示如下:

$$F = \frac{E}{d} q$$

其中, E 为两个电极间的电势差; d 是两个电极间的距离。 E/d 就是通常所指的场强。如果是在真空中,带电分子的移动会很快,最后撞到电极上。但是在溶液里,就不会是这样,因为电场对分子的拉力被运动分子和溶液之间产生的阻力或摩擦力平衡。根据Stoke方程,这种阻力的大小取决于分子的大小和形状以及分子所通过的介质的粘度:

$$F = 6 \pi r \eta v$$

这里, F 是对球形分子的阻力; r 是球形分子的半径; η 是溶液的粘度; v 是分子运动的速度。在溶液中,电场所产生的加速力被阻力平衡,因此有:

$$\frac{E}{d} q = 6 \pi r \eta v$$

因此,

$$v = \frac{E q}{d 6 \pi r \eta} \quad (3-23)$$

由式(23)可以看出,分子在电场里运动的速度与场强和分子的电荷成正比,但与分子的大小和溶液粘度成反比。由于相同电荷和相同大小的分子,在一定时间内会移向电场内的同一位置,所以蛋白质混合物进行电泳时,每一种蛋白质就会在电场内的某一位置形成紧密移动的区域。上述讨论是以电泳在蔗糖溶液中进行为基础的。当电泳在聚丙烯酰胺凝胶中进行时,分子移动的速度要受凝胶本身结构的极大影响。

分子在电场中移动的速度常用电泳迁移率来表示,即带电颗粒在单位电场强度下的泳动速度:

$$M = \frac{v}{E/d} = \frac{L/t}{E/d} = \frac{dL}{Et} \quad (3-24)$$

式中, M 为迁移率; L 为颗粒泳动的距离; t 为通电时间。在一定条件下,对于一定的分子, M 是一定的。因此,它是描述物质在电泳中行为的特征参数。

影响迁移率的因素概括起来有如下几种:

1. 样品

关于分子所带电荷和分子大小对迁移率的影响,从式(23)中可以清楚地看出。但是大小相同,形状不同的分子,如纤维状蛋白质和球状蛋白质,因为摩擦力作用不同,而有不同的迁移率。

2. 电场

由于在两个电极之间,溶液中的电流完全由缓冲液和样品离子来传导,因此,迁移率与两极间的电位差成正比。因此,迁移率与支持介质的类型和大小以及缓冲液的离子强度有关。

3. 缓冲液

缓冲液是用来稳定支持介质的pH的。但它也影响化合物的迁移率。一般最适的离子强度在0.05—0.1克分子浓度之间。

缓冲液的pH能决定带电颗粒(如蛋白质等)的解离程度和它所带净电荷的多少。对于象氨基酸、蛋白质这样的两性电解质来说,pH值离等电点越远,则颗粒所带净电荷越多,泳动的速度也越快,反之越慢。当缓冲液的pH值等于某蛋白质的等电点时,则它在电场中不动。因此,要分离某一蛋白质混合物,应当选择一种能扩大各种蛋白质所带电荷量差异的pH值,以利于各种蛋白质的分离。

4. 支持介质

在用支持介质的电泳技术中,虽然使用了比较惰性的材料作为支持介质,但它的结构性质仍对迁移率有很大影响。

象吸附层析一样,有的支持介质对样品有滞留作用,因而造成拖尾现象,不能形成一条很清晰的带,因而降低分辨力。吸附作用还能降低总的迁移率。纸的吸附作用最大。但如果使用醋酸纤维素就可以消除这种现象。

有的支持介质(如纸和淀粉胶)具有电渗作用,即电泳缓冲液相对于固体支持介质的相对移动。例如,在纸电泳中,由于纸上纤维素带负电荷,因感应作用而使与纸相接触的水溶液带正电荷,因此带正电荷的液体就带着溶解的物质移向阴极,从而加速了阳离子的前进,阻滞了阴离子的移动。这种作用在一般的实验中可以忽略不计,但如果要测定样品的等电点,就必须考虑这种

作用。一般通过测定一种中性分子(如葡聚糖)的迁移程度来确定电渗作用的大小。醋酸纤维素和聚丙烯酰胺凝胶的电渗作用比纸和淀粉低。

有的支持介质具有分子筛作用,如凝胶电泳。凝胶的分子筛性质有助于大小上有所不同的大的离子化合物的分离。琼脂、淀粉和聚丙烯酰胺凝胶的分子筛原理是,随着凝胶中交联度的增加,孔径减小,大分子移动的阻力逐渐增加。若使用 Sephadex 型的凝胶,情况则正好相反,它的特性是对小分子迁移的阻碍作用要比大分子来得大。

二、电泳的类型及其应用

电泳基本上可以分为两大类:不用支持物的电泳技术和用支持物的电泳技术。从使用型式上又可分为水平式,垂直式、板形、柱形电泳、双向电泳、连续纸电泳、电泳-层析相结合的技术等。

不用支持物的电泳是一种自由界面电泳。它包括 Tiselias 式微量电泳,显微电泳,等电聚焦(密度梯度)技术,等速电泳技术等。用支持物的电泳技术中,按支持物的类型又分为:纸上电泳、醋酸纤维薄膜电泳、薄层电泳、非凝胶性支持物区带电泳(支持介质有:淀粉、纤维素粉、合成树脂粉末等)和凝胶支持介质区带电泳(支持介质有:淀粉胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶和琼脂凝胶等)。低压纸电泳已广泛地用在氨基酸、多肽、蛋白质、核苷酸以及带电碳水化合物衍生物的分离上。但小分子在纸上进行低压电泳时,会产生明显的扩散。为了克服这个缺点,一般采用高压电泳,因为这时分离所需的时间短,分子扩散较小。高纯度的醋酸纤维素对样品吸附作用比纸小,因此分辨力较好,而且它染色的本底较浅、能更好地显示各种成分。醋酸纤维素电泳在临床上已广泛用于分离血清蛋白(包括糖蛋白和脂蛋白)和血红蛋白,并且也用于免疫电泳。薄层电泳对于分离氨基酸和核苷酸一类小分子特别有用,因为它分离迅速、分辨力高,而且由于它可用于双向分离,所以可以用于蛋白质和核酸水解物的指纹图谱分析。

密度梯度等电聚焦和等速电泳在分析上具有较高的分辨力。而且能分离较大量的物质,分离后还能回收这些物质。这些技术已成功地用于多肽、蛋白质、核苷酸的分离。

凝胶电泳的最大优点是它的支持介质——聚丙烯酰胺一类的凝胶的孔径可以选择,因而适用于带有相同电荷,但大小和形状不同的分子的分离,这样,就大大扩大了这种技术的使用范围。淀粉和琼脂凝胶的孔径不象聚丙烯酰胺那样能被控制,但这些凝胶在分离高分子化合物的混合物上是很有用的。凝胶电泳非常适合于核酸和蛋白质混合物的分离,但也能分离蛋白水解物^[59]。凝胶等电聚焦特别适用于蛋白质的微量分析。凝胶电泳的另一个优点是,设备简单、操作简便,经济实用,一般的实验室均能建立这种技术,因而得到了空前的普及。因此,下面将重点介绍这种技术。

三、聚丙烯酰胺凝胶电泳

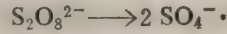
1. 区带聚丙烯酰胺凝胶电泳

① 凝胶孔径的选择

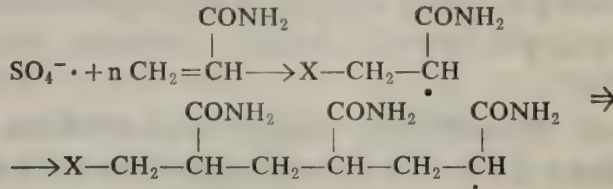
要使电泳获得好的结果,必须把样品分子放在稳定的介质中,即上面所说的支持介质。这是因为这种支持介质能减弱或者消除电泳过程中出现的对流现象,而且介质本身不与样品反应,也不以任何束缚样品的方式阻滞样品的移动。聚丙烯酰胺凝胶就是这样的化学惰性物质。它是由

下列物质合成的：丙烯酰胺, N,N'-次甲基双丙烯酰胺、四甲基乙二胺（常略写作 TEMED）、和过硫酸铵。

过硫酸铵溶于水时, 能形成自由基:



如果这些自由基与丙烯酰胺接触的话, 就发生反应, 而且这些自由基就保存在丙烯酰胺分子内。这个“活化”了的丙烯酰胺分子再以同样的方式连续与其它丙烯酰胺分子反应, 结果就形成一个长链聚合物。



这些长链聚合物溶液, 虽然很粘, 但还不能形成凝胶, 因为这些长链彼此间能够滑动。要形

成凝胶还需要进行交联。交联剂就是 N,N'-次甲基双丙烯酰胺 ($CH_2 = CH - \overset{O}{\parallel} C - NH - CH_2 - NH - \overset{O}{\parallel} C - CH = CH_2$)。它可以看作是二个丙烯酰胺分子通过次甲基将它们无活性端偶联在一起所形成的化合物。如图 3-20 所示, 这样聚合后就得到网状丙烯酰胺链。网中孔径的大小由二个因素决定:

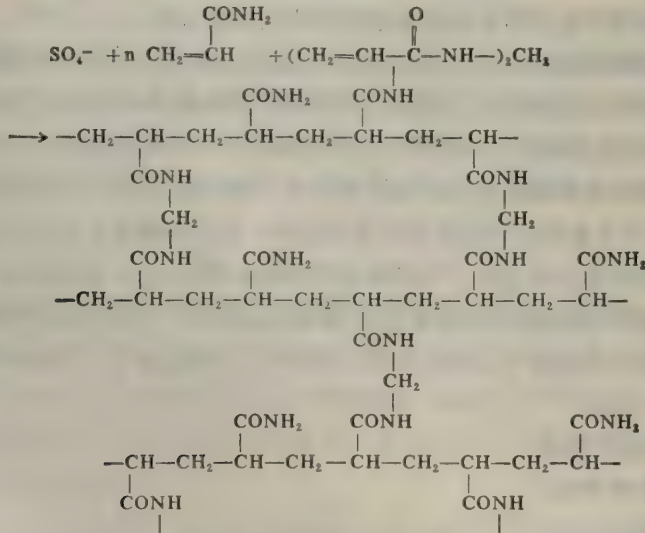


图 3-20 丙烯酰胺的交联反应。

a. 单位体积的反应介质中所用丙烯酰胺的量; b. 交联度。有人测定了总浓度为 6.5—20% 的丙烯酰胺凝胶液在六种不同比例的双丙烯酰胺 (Bis) 存在时聚合后的孔径大小^[60], 其结

果整理在表 3-14 中。

表 3-14 双丙烯酰胺浓度对平均孔径的影响

丙烯酰胺总浓度(%) (Acr + Bis)	$R_{0.5}(\text{Å})$ (半径)			
	1%	5%	15%	25%
	(Bis 的浓度)			
6.5	24	19	28	—
8.0	23	16	24	36
10.0	19	14	20	30
12.0	17	9	—	—
15.0	14	7	—	—

由表 3-14 可见,孔径的大小在很大程度上取决于丙烯酰胺(Acr)和双丙烯酰胺(Bis)二者的总浓度 T 。 T 值越大,孔径相应变小,机械强度增加。当 T 值不变时, Bis 浓度在 5% 时孔径最小。一般不用改变 Bis 浓度的办法来控制凝胶孔径(通常将它固定在丙烯酰胺总浓度 T 的 5%),而是通过改变 T 值来控制孔径大小。图 3-21 表示不同浓度的丙烯酰胺(W/V)所对应的孔径的近似值。必须强调说明,由于孔的形成是随机的,所以孔的大小是不均一的。所谓孔径实际上指的是一种分布。有的孔径大,有的孔径小。所以图 3-21 中的孔径值没有多大意义。它只是粗略地表示,平均孔径是丙烯酰胺含量的函数。TEMED 和 β -二甲基氨丙腈常作为形成凝胶的催化剂,因为它们能以自由基的形式存在。它们的使用浓度通常是 0.4%。

丙烯酰胺还可用核黄素聚合。在氧和紫外光存在下,核黄素受光分解,产生自由基。这些自由基与过硫酸铵产生的自由基起同样的作用。通常普通的荧光灯可作为紫外光源,只要靠近反应混合物放置就成。

合成聚丙烯酰胺凝胶时还要考虑缓冲系统的性质。缓冲液一是用来维持容器内和聚丙烯酰胺凝胶内的 pH 恒定,二是用作在电场中传导电流的电解质。要使缓冲液很好地执行这些作用,必

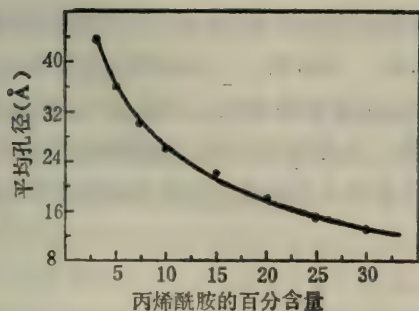


图 3-21 凝胶浓度(重量百分数/总凝胶体积)对平均孔径的影响

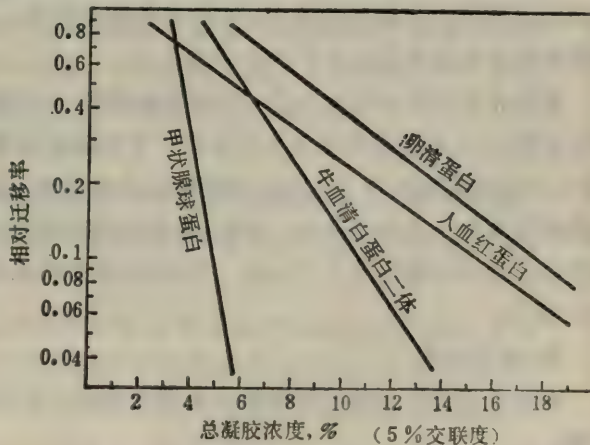


图 3-22 各种蛋白质的电泳迁移率与总凝胶浓度之间的关系

须注意三个条件：第一，所选择的缓冲液必须不与要分离的大分子相互作用，因为这种相互作用能改变大分子在电场中的移动速度（如果这种相互作用是增加或中和大分子所带电荷的话）。另外，这种相互作用还能使两个不同的样品在同一位置出现。Cann 曾发现，纯的白蛋白在含硼酸盐缓冲液中走电泳时，出现了两个蛋白质带^[61]。他将其中的一个蛋白质带回收后，再第二次走电泳，结果又出现了二个带，因此，他得出结论说，多条带的产生是由于硼酸盐和白蛋白的某些分子相互作用的结果。第二，电泳所用的 pH 必须能使要分离的大分子带电荷，但不能使它变性。对于蛋白质，pH 的最大限度通常是 4.5—9.0。但根据所研究分子的具体情况，这个范围可大可小。最后，必须考虑缓冲液的离子强度和浓度。如果丙烯酰胺凝胶中的电解质浓度太低，那么大分子所载的电荷量就过多，这样它们就不能形成一个尖锐的带，而是一个扩散的区带，因而大大降低分辨力。相反，如果凝胶中的电解质浓度过高，那么电场中的电流强度增加、电压降低，结果大分子移动速度变慢，而且还要产生大量的热，产生的热还有可能使要分离的蛋白质变性。

凝胶的特性是具有分子筛作用。很明显，大分子进入凝胶的程度既取决于分子的大小，也取决于分子所通过的凝胶的平均孔径。如果凝胶的大部分孔的直径小于蛋白质分子的直径，那么无论蛋白质的电荷或电场强度如何，蛋白质分子不能进入凝胶。正是由于这个分子筛作用，才使凝胶电泳获得了相当高的分辨力。如图 3-22 所示，随着凝胶总浓度的增加，蛋白质的相对迁移率的对数线性地下降。Rodbard 等人^[62]用一套数学关系式来描述凝胶浓度对大分子的电泳迁移率的影响。

$$\lg M = \lg M_0 - K_R T \quad (3-25)$$

其中， M 是电泳迁移率； M_0 是蛋白质分子在蔗糖溶液中的自由迁移率； T 是凝胶的总浓度； K_R 是阻滞常数或图 3-22 中直线的斜率。阻滞系数与大分子的半径有关：

$$K_R = C(R+r) \quad (3-26)$$

其中， C 是常数， R 是大分子的几何半径； r 是凝胶纤维的半径，而且假定它比大分子长得多。由于丙烯酰胺凝胶孔的形成是随机的，因此，这些关系式当然是用统计学的方法导出的。作者在收集了大量的数据之后指出，如果进行的实验足够多，在大分子的分子量和它在丙烯酰胺凝胶内的迁移率之间就可以确立一个定量的相互关系。尽管这样，在没有变性剂存在时仍不用丙烯酰胺凝胶电泳测定大分子的分子量。

凝胶孔径在凝胶电泳中是一个重要的参数。要想得到好的分离效果，选择一定孔径的凝胶是很关键的。但遗憾的是至今还没有一个普遍的规律可循。当分析一个未知样品时，常先用 7.5% 的标准凝胶或用 4—10% 的凝胶浓度来试测，选出适宜的凝胶浓度。实践证明，当凝胶孔径是蛋白质分子平均半径的一半时，常能得到较好的结果。这是因为在电泳时凝胶孔扩大了，足以使比孔径大的蛋白质分子通过。实用中，常按样品分子量的大小来选择适宜的凝胶孔径，如表 3-15 所示。

② 电泳过程

电泳所需要的设备只有两件：a 直流电源；b 缓冲液贮槽系统。图 3-23 是电泳过程的示意图。

贮槽系统由上、下两个缓冲液贮槽组成，凝胶在它们之间，电流只由聚丙烯酰胺凝胶接通。

表 3-15 不同分子量范围的蛋白质和核酸在凝胶电泳中所选用的凝胶浓度

	分子量范围	适用的凝胶浓度(%)
蛋 白 质	$<10^4$	20—30
	$1-4 \times 10^4$	15—20
	$4 \times 10^4-1 \times 10^5$	10—15
	$1-5 \times 10^5$	5—10
	$>5 \times 10^5$	2—5
核 酸	$<10^4$	15—20
	10^4-10^5	5—10
	$10^5-2 \times 10^5$	2—2.6

每一贮槽装有一铂金电极。贮槽上装绝缘盖以防触电。

大分子样品(如蛋白质)是以高密度溶液的形式置于凝胶顶部的。这种高密度溶液通常用甘油作成,目的是防止样品与上槽缓冲液混合。电泳常用的 pH 是 9,这时,大多数蛋白质带负电,因此,阳极放在下贮槽中。接通电源,蛋白质开始向阳极移动。在样品中,通常还放有示踪染料(如溴酚兰),作为电泳参照物。这个有颜色的物质比任何大分子都走得快。因此,电泳过程可以继续到示踪染料到达管底时为止。这时,可以确信,所有的大分子仍在凝胶内。如果大分子走得很慢,那就要通过试验确定合适的电泳时间。图 3-23 表明了电流从阴极流向阳极时所发生的电极反应。这基本上是一个电解水的过程,在阴极产生氢,在阳极产生氧。但是要注意,每产生一克分子的氢,仅产生 1/2 克分子的氧。根据这个特性可以很容易检查电极的极性:阳极产生的气泡总是阴极所生气泡的一半。由于有电极反应,所以需要有一个高容量的缓冲液系统。由电极反应可以清楚看出,每克分子的电子流过电泳系统时,在阴极和阳极分别产生一克分子的氢氧根离子和质子。

有的样品的电泳分离需要很长的时间,这时,必须用泵将下槽缓冲液再打到上槽中,以避免消耗缓冲容量,避免 pH 改变。但这样做必须十分小心。一定要维持两个贮槽的缓冲液界面是恒定的,而且经由循环泵的两个贮槽间不能形成完整的回路。一般是用蠕动泵将下槽缓冲液打到上槽,进入上槽的缓冲液是一滴一滴进入的,不能成流,否则就要短路。上槽中还要装一溢流管。当上槽缓冲液的体积增加时,它就会通过溢流管一滴一滴地流回下槽。

2. 圆盘凝胶电泳

圆盘电泳(disc electrophoresis)是上边讲过的区带聚丙烯酰胺凝胶电泳的一种改进形式。它的特点是使用两种凝胶系统,而且凝胶中所用的缓冲系统以及两缓冲液贮槽中所用的缓冲系统各不相同。两种凝胶系统表示在图 3-24 中。

下部的分离胶所用的丙烯酰胺量与类似的区带电泳相同(根据不同情况用 5—10%)。大分子就是在分离胶中依次被分离的。在这个凝胶中所用的缓冲液通常是胺,如 Tris,可用盐酸将其调到适当的 pH 值(如 8.7)。分离胶聚合后,再在它的上面聚合第二层薄的(1.0 cm)堆积凝胶。制这层胶所用的丙烯酰胺量要比制分离胶时所用的少得多,一般是 2—3%。用在这层胶中的缓冲液也是胺(Tris),但它的 pH 值要比分离胶低 2 个 pH 单位(pH 6.5)。用在蛋白质样品中的缓

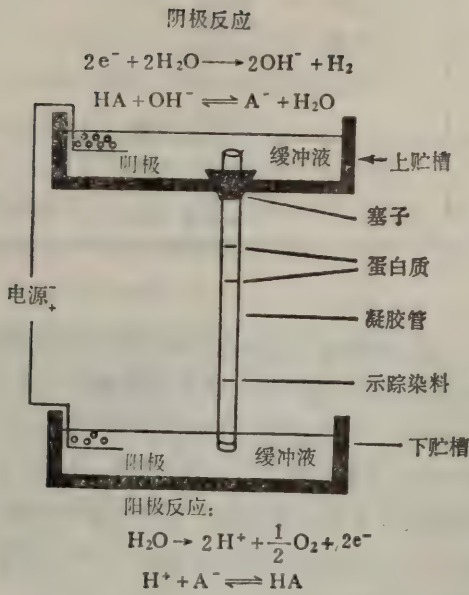


图 3-23 表明电极反应的电泳仪示意图

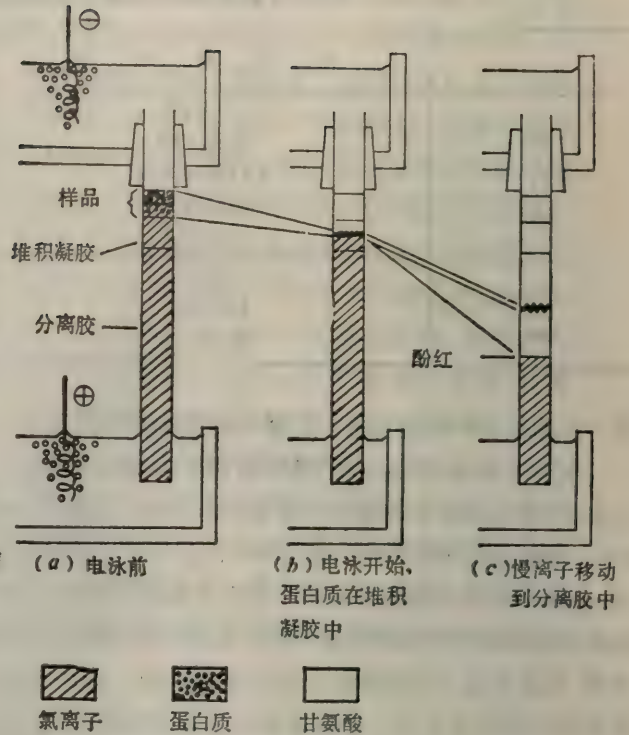
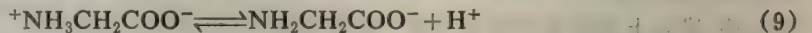


图 3-24 两种凝胶系统和各种离子在电泳过程中的运动示意图

缓冲液与堆积凝胶中所用的相同。下贮槽所用的缓冲液的组成和 pH 与分离胶的相同, 但可以把它稍微稀释。上贮槽所用的缓冲液也是胶, 但要用弱酸把它的 pH 调到相同于或稍高于分离胶所用的 pH, 这个弱酸的 pK 值应与所要调到的 pH 值相同。通常用甘氨酸来调节。

此法的原理可以通过通电后各种物质(离子)的电泳行为来理解。上槽缓冲液中的甘氨酸既可以静电荷为零的两性离子存在, 也可以带负电的甘氨酸离子而存在:



通电时, 氯化物、蛋白质、溴酚兰和甘氨酸的阴离子都开始向阳极移动。当甘氨酸离子进入样品缓冲液和堆积凝胶时, 就遇到了低 pH 环境, 因而使(9)式的平衡向偶离子的方向移动, 而偶离子在电场中是不动的。甘氨酸偶离子停止向样品和堆积凝胶移动就造成了移动离子的短缺, 因而使电流减弱。但是, 通过整个电泳系统的电流必须维持恒定, 因此, 在快离子和慢离子之间的区域的电压增加, 结果在氯离子和甘氨酸离子间产生一个很高的局部电压梯度。在这个条件下, 离子的相对迁移率是: 甘氨酸离子 < 蛋白质离子 < 溴酚兰离子 < 氯离子。在这个强的局部电场中, 所有的阴离子蛋白质都移动迅速。堆积凝胶是大孔胶, 因而不阻碍蛋白质的前进。如果哪一个蛋白质超过快速离子, 那它的移动会慢下来, 因为凡有氯离子的地方, 并不缺少离子, 因此没有高的电位梯度。这样, 当蛋白质快速移动到含氯离子的区域时会马上慢下来。蛋白质在氯离子前沿的后边快速移动, 当它达到前沿时移动速度又慢下来, 这种情况就导致蛋白质样品在甘氨酸离

子和氯离子之间聚集或浓缩成一个密集的圆盘。当蛋白质圆盘进入分离胶时,由于凝胶孔度变小,因此移动变慢。这就容许小的甘氨酸离子赶上蛋白质。甘氨酸离子通过堆积凝胶和分离胶的交界面后,又充满电荷,因此就不再有短缺离子的现象。这样,从这点开始,通过凝胶的电场强度就是恒定的了,而且蛋白质的分离过程也就与区带电泳完全一样了。圆盘电泳的优点是,蛋白质样品以一个很窄的区带进入分离胶,分离所得到的蛋白质带也很窄,因此大大提高了分辨力。但是,圆盘电泳的缓冲系统、各种胶的 pH 条件的选择要受到限制。幸好,前人在实践中已经建立了一些效果较好的缓冲液系统,它们的 pH 范围在 3.5—9.5 之间^[63-66]。

3. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

方程(4)、(7)、(8)说明蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率是它所带净电荷和它的大小的函数。但可能有这样的情况:两个分子量不同的蛋白质以相同的速度向阳极移动。这可能是由于蛋白质分子大小的差别被它们所带净电荷的差别所补偿。为了克服这个问题,Shapiro 等人试图在十二烷基硫酸钠(SDS)存在下来分离蛋白质混合物^[67]。他们的初步工作结果促使 Weber 等人^[68]测定了大约 40 种蛋白质在 SDS 存在时的电泳迁移率。他们发现,这些蛋白质的电泳迁移率与它们的分子量的对数呈线性关系。

SDS 是阴离子去污剂,它能与蛋白质的疏水部分相结合,并能把大多数蛋白质拆成组成它们的亚单位形式。由于 SDS 的结合使变性的无规盘绕的多肽链获得大量负电荷。这大量负电荷基本上屏蔽了没有 SDS 时正常存在的任何一种电荷。SDS 凝胶电泳法成功的确切原因尚不清楚,但它已被广泛地用在纯蛋白质的亚单位组成和分子量测定中。用此法测定分子量时,至少要有 3—4 种标准蛋白质,而且它们的分子量要分布在未知蛋白质的两侧。圆盘凝胶电泳也可以在 SDS 存在下使用^[69,70]。Laemmli 提出了一个广泛用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的缓冲液系统^[71]。

Hedrick 和 Smith^[64,72]描述了另一种测定分子量的方法。他们的方法是以测量蛋白质进入聚丙烯酰胺凝胶的程度为基础的。所用的聚丙烯酰胺凝胶含有不同的丙烯酰胺总量,所以具有不同的孔径。虽然此法比上面提到的 SDS 法麻烦,但它的优点是所测得的分子量是天然蛋白质的分子量,可以得到未解离的蛋白质。此法还可用来判别蛋白质(如乳酸脱氢酶)的电荷异构体。

4. 凝胶等电聚焦

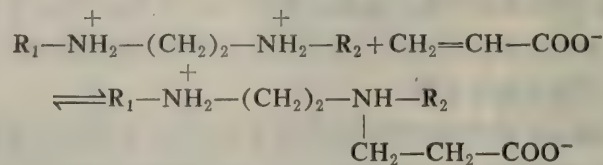
此法是利用一种两性电解质载体沿分离凝胶柱在电场中确立一个 pH 梯度。蛋白质样品在电场作用下,则向它们的等电点相应的 pH 区带移动。就是说,以载体两性电解质作为隔离离子,把样品分隔在相应的 pH 区域中。因为蛋白质在其等电点 pH 下净电荷为零,所以在电场中停止移动。当蛋白质处于高于其等电点或低于其等电点的 pH 时,电场都会对它施加一种使它移回等电点 pH 处的力,因此,蛋白质就聚焦于与它的等电点对应的区域,形成一个紧密的带。由于各种蛋白质的等电点不同,所以它们就被集中和分离在不同区带中,从而达到分离的目的。在这种电泳过程中往往采用抗对流的介质,如蔗糖密度梯度或聚丙烯酰胺。也有用其它方法抗对流的。用凝胶作抗对流介质的等电聚焦,就是凝胶等电聚焦^[73]。这种电泳虽然也用聚丙烯酰胺作支持介质,但其原理却与盘状电泳完全不同,凝胶等电聚焦并不利用凝胶的分子筛作用。

等电聚焦的关键问题是:① 用载体两性电解质形成 pH 梯度;② 稳定集中的分离了的蛋

白质区带；③ 分离了的蛋白质的鉴定以及 pH 的测量。

选用适宜的载体两性电解质是形成 pH 梯度的关键。载体两性电解质必须具备如下条件：① 它的化学组成应不同于被分离物，不干扰被分离物的鉴定，如用紫外吸收测定蛋白质浓度时，它不应当有紫外吸收；② 它的分子量要小，这样便于与被分离的高分子物质分开（用透析法或凝胶过滤法）；③ 要具有化学惰性，不与被分离物反应，也不能使被分离物变性；④ 在等电点处必须有足够的缓冲能力，因为当样品进入载体两性电解质构成的相应 pH 区域时；会影响这区域的 pH 值；⑤ 在等电点处必须有足够高的电导，以使一定的电流通过，而且各不同 pI 值的载体要有相同的电导系数，使整个体系的电导均匀。如果局部电导过小，就会产生极大的电位降，因而其它部分的电压就会太小，以致不能保持梯度，破坏聚焦过程。

载体两性电解质通常是用具有几个 pI 值很相近的多乙烯多胺（如五乙烯六胺），在 70°C 水中中和不饱和酸（如丙烯酸）进行加成反应制得的。产生的是脂肪族多胺基多羧基类的混合物：



R₁ 和 R₂ 代表 H 或带有氨基的脂肪基，调节胺和酸的比例，可以加上一个或多个羧基。反应产物是许多异构物和同系物的混合物，分子量都在 300—1000 之间，其 pK 值各个相异却又互相接近，pH 范围在 2.5—11 之间，因此适合作载体两性电解质。它在电场作用下，从阳极到阴极能形成一个 pH 值（2.5—11）逐渐上升的平滑的连续的 pH 梯度。如果保持电场作用和有抗对流介质防止混合时，这个 pH 梯度是相当稳定的。

抗对流介质一般采用蔗糖密度梯度或聚丙烯酰胺凝胶。用蔗糖密度梯度效果较好，但所用仪器比较复杂，此法适用于制备性的分离。用凝胶作抗对流介质也能得到很好的分辨力，而且电泳时间短，操作简便，还能做薄层电聚焦和双向电泳。此法适用于少量样品的分析鉴定，不适于制备分离。

从原理上看，等电聚焦是一个完善的较好的分离方法。它分辨力高，可分离等电点相差 0.01—0.02 pH 单位的蛋白质，而且电聚焦能抵消扩散作用，使区带越走越窄；而且样品可以充满整个柱（管），无须以一个窄带加入，很稀的样品也可以进行分离；此法还可以直接测出蛋白质的等电点，精确度可达 0.01 pH 单位。此法的缺点是，它要求用无盐溶液，而在无盐溶液中有的蛋白质可能会沉淀。另外，在等电点发生沉淀和变性的蛋白质也不宜用此法分离。在大量分离样品时，由于较大的蛋白质在其等电点处聚成一个窄带，如果聚焦的蛋白质量超过它的溶解度，该蛋白质就要沉淀，这样它就不能继续聚焦，因而破坏了分离过程。在某种程度上，这个缺点可以通过在水平柱中聚焦来克服。如图 3-25 所示，在柱的下部装有波纹状的收集器，用来收集沉淀的蛋白质（如果它很易沉淀的话）。这样，即使蛋白质沉淀了，也不会影响聚焦过程。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳的操作形式

1. 平板凝胶电泳

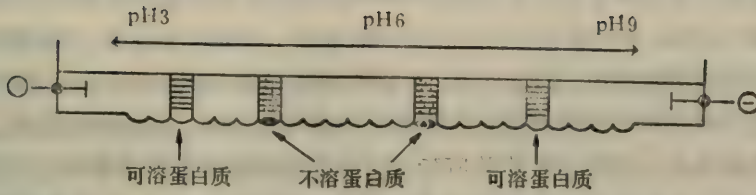


图 3-25 水平式等电聚焦仪

这种形式的电泳是,在两个玻璃板间,将丙烯酰胺聚合成方形的薄片^[69,70]。聚合前在板的一端放一梳形模具,聚合后,取下模具,就留下上样用的小孔。上面谈到的凝胶电泳均可采用这种形式进行。采用这种技术可以很容易比较同时进行电泳的许多样品,因为所有样品都是在同一凝胶中,电泳条件对所有样品都是一样的。

2. 双向凝胶电泳

O'Farrell曾报告用双向电泳法将一个含五千种以上的蛋白质混合物分成它的单个组分^[74]。这种强有力的技术是先将混合物在一个直径1毫米的玻管凝胶中进行等电聚焦,聚焦后,将凝胶小心地从毛细管中取出,然后放到平板凝胶的顶部,再让样品在平板凝胶中走 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。因此,此法是先按照蛋白质的等电点的不同进行分离,然后又按照蛋白质分子量的不同进行分离。由于蛋白质的分子量和等电点之间并没有什么必然的联系,因此,在两个方向上利用这些参数就有可能获得很高的分辨力。

3. 琼脂糖-丙烯酰胺凝胶

使用复合凝胶是电泳技术最近的一个新进展。这种凝胶是由丙烯酰胺和琼脂糖构成的。它是应分离很高分子量(20万以上)核酸的需要而研制的。孔径足够大的聚丙烯酰胺凝胶所含丙烯酰胺的量要小于或等于2.5%,但这时的聚丙烯酰胺凝胶几乎是液体状态,因此,不能使用。Peacock和Dingman^[75,76]发现,当把琼脂糖加到聚丙烯酰胺凝胶中时,能增加聚丙烯酰胺凝胶的机械强度。琼脂糖是中性的线性多糖。琼脂糖-丙烯酰胺凝胶是这样制备的:将琼脂糖溶解在沸水中(最终浓度为0.5%),然后让它冷却到40°C,在这个温度下,加入形成聚丙烯酰胺所需要的各组分。然后将混合物转移到适当的模具中,如管或平板。注意,模具要事先预热到40°C。进一步冷却时,凝胶就会象琼脂那样凝固。如果丙烯酰胺的浓度为0.5%,则这时所得到的凝胶孔径大,机械强度高。但必须确保丙烯酰胺聚合后,琼脂糖才能凝固。如果琼脂糖先凝固,所得到的凝胶表面不平正,分离效果也就不会好。用电泳法分离分子量高达 10^6 道尔顿的RNA分子、 3.5×10^6 道尔顿的DNA分子,琼脂糖-丙烯酰胺凝胶是特别有用的。RNA和DNA的分子量也常在聚丙烯酰胺凝胶中测定[75—78]。对于RNA来说,可用99%的甲酰胺代替水来制备凝胶,以防止RNA分子的聚合作用。

五、用凝胶电泳法分离的大分子的检测

电泳技术的广泛应用需要研制一些方法用来检测在聚丙烯酰胺凝胶上分离的大分子。这里总结几个方法。

1. 考马斯亮兰染色法

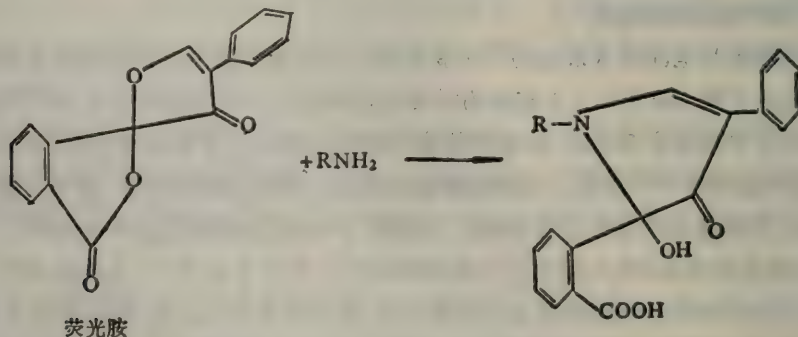
最常采用的蛋白质染料是考马斯兰(Coomassie blue)。由于这种染料的灵敏度很高(特别是在 SDS 存在时),所以,它已取代了广泛应用的氨基黑。用此法染色前,需将蛋白质用至少 10 个体积的磺基水杨酸固定过夜。固定后,用 0.25% 的考马斯兰水溶液染色。染色的时间取决于所用凝胶的浓度。5% 和 10% 的凝胶分别需要 2 小时和 4 小时。染色时间过长,则蛋白带之间的背景颜色就很难退去。过量的染料用 37°C 的 7% 醋酸溶液反复洗涤除去。

这种染料的另一种用法是,蛋白质的染色和固定同时进行。将 1.25 克考马斯兰溶解在 454 毫升 50% 甲醇和 46 毫升冰醋酸的混合液中,用前用华特曼滤纸过滤。将凝胶浸在上述制备好的溶液中,经 2—10 小时,即能达到固定和染色的目的。脱色液由冰醋酸、甲醇和水组成。用此液反复洗涤凝胶即可脱色。这种浸泡脱色法的优点是,能把着色微弱的区带保存下来,缺点是费时,本底不能完全除尽。

也可以用电泳法使凝胶脱色。这时可将凝胶重新放入管中,用较浓的缓冲液进行第二次电泳。也可将凝胶平行置于缓冲液中,然后在与凝胶纵轴垂直的方向上进行电泳,这样可以缩短脱色时间。电泳脱色的优点是:① 脱色速度快;② 能降低蛋白质带间的本底染色程度。但缺点是会去掉着色微弱的区带。脱色后凝胶保存在 7% 醋酸中。

2. 荧光染色技术

由于用考马斯兰检测蛋白质相当费时间,因此需要研制快速灵敏的方法。现在已有两种方法满足这个要求。第一个,也是最灵敏的方法—荧光胺(fluorescamine)法^[79,80]。荧光胺是不发荧光的分子,能特异性地与一级胺反应,得到荧光加成产物;



如果使用含 SDS 的凝胶,则既可在蛋白质分离后染色,也可在电泳前染色。虽然所观察到的荧光强度与一级胺的浓度有直接关系,但还不能用作蛋白质的定量分析,因为各种蛋白质所含赖氨酸的量不同,而且荧光强度随时间不断减弱。在走 SDS 电泳前,如果荧光胺与含大量赖氨酸的低分子量蛋白质反应的话,那么共价结合到蛋白质上的荧光胺会改变蛋白质的分子量。因此,在这种情况下,分子量的测定就要产生误差。

第二个荧光方法,虽然不太灵敏(检出极限 20 μg),但用起来挺方便。苯胺基萘磺酸镁在水中不发荧光,但当它溶解在有机溶剂中或结合到蛋白质的疏水表面部位时,则会发出强烈的荧光。此法^[81]要使蛋白质表面变性,方法是將凝胶置于 3 N HCl 中 2—5 分钟。然后将凝胶放入染色缓冲液中。它也可以在没有酸变性的情况下完成。因此在凝胶上显现出来的蛋白质带可以

活性的形式回收。不过这时染色的灵敏度要低 10—20 倍。

3. 特异酶的检测

此法常使酶催化的反应直接或间接地与化学反应偶联,而这个化学反应能产生颜色很深的不可溶性的产物,这个产物就指示了该酶在凝胶上的位置。由于四唑盐的合成和利用,可用这种方法分析的酶的种类大大增加了^[82]。

4. 其它的染色方法

除了上面说的以外,还有一些其它的染色方法。例如用 alcian blue 染糖蛋白^[83],用 ethidium bromide 染 DNA^[84],用次甲基蓝^[76]和焦宁^[77]染 RNA。最新的一种染料叫作全染料(Stains-all),因为它能使大多数大分子染色。这种染料是阳离子羰花青(cationic carbocyanine)。它能将 RNA 染成蓝紫色;DNA 染成蓝色;蛋白质染成红色;酸性粘多糖染成从蓝到紫的各种斑;磷蛋白染成蓝色^[85]。目前主要用它来染 RNA。

5. 定量检出大分子的方法

染色技术的主要缺点是不能用它们来定量。这个困难可用放射性标记所要研究的分子的办法来克服。利用放射化学和电泳相结合的技术,不仅可以定量测定大分子,而且能大大促进关于大分子合成和控制途径的研究。电泳分离后,可用放射自显影法来检测大分子^[86]。此法经济、特别适用于在平板凝胶上作定性比较。用于定量有些困难,而且精确度较低。

为了精确地定量测定凝胶,必须将凝胶分成许多小块,然后用闪烁分光计测定每块的放射性。可用简单的切片机^[87]和自动凝胶分割器^[88]将凝胶分割成很薄的片。

用微量光密度计也可以对凝胶进行扫描定量测定。这种光度计是特制的,它的光束很窄($<50\ \mu\text{m}$ 宽),灵敏度高。现在有不染色,直接用紫外光扫描测定的光度计,也有染色后扫描的光度计。可用 280 nm 扫描蛋白质;用 265 nm 扫描核酸,从扫描图的峰面积,可作相对量的比较。从峰面积和消光系数可求出带中蛋白质或核酸的量。扫描染色后的凝胶时,不同染料所用波长不同,考马斯兰染色的,用 550 nm;氨基黑的,用 620 nm;固绿的,用 625 nm。

十、蛋白质的结晶

在蛋白质提纯过程中,当蛋白质达到一定纯度时,就可以进行蛋白质的结晶。现在蛋白质的结晶被认为是使样品达到均一状态的必须的提纯步骤。但是结晶样品不一定是纯的。有时蛋白质或酶的第一次结晶纯度低于 50%。其中可能含有其它杂质。当重结晶时,若比活力有所增加,则要反复结晶几次,直至比活力提高到一个最大的恒定值。所以,重结晶法实际上是提纯后期的一个部分分级法。

常用的结晶方法有:盐析法、有机溶剂法、复合结晶法、平衡透析法、气相扩散法、pH 诱导法、温度诱导法等。对于不同的蛋白质或酶,其结晶条件各不相同,必须在实验中摸索,而不能制定一个总的结晶规则。

平衡透析法^[89]和气相扩散法^[90]是近年发展起来的。平衡透析法的最大优点是,在蛋白质沉淀以前,它的浓度是恒定的。如果蛋白质以不定形的形式沉淀,则可以很容易地改变外部溶液的条件,使沉淀溶解,然后再在一个新的条件下进行结晶。用此法可获得大量酶的结晶。气相扩散法主要用于微量样品的结晶,如,tRNA,通常只有很少的材料可供利用。此法当然也适用于

蛋白质的结晶,特别是在材料的量受到限制的情况下。

现在,对蛋白质结晶的兴趣主要在于制备适合于X-射线衍射研究、中子衍射研究的样品。适用于这种研究的最小晶体,其线性大小至少要在0.2 mm以上。要让晶体长成这样的大小,必须寻找适宜的条件。这些条件无非是控制溶解度的各种因素、温度、pH、离子强度、平衡离子,如缓冲液组成的性质,以及其它配体,如辅酶、抑制剂和其它重金属的存在等。现简述如下:

1. 纯度

样品纯度越高,结晶越容易,混杂蛋白的存在有时是影响单晶长大的主要障碍,甚至影响微晶形成。但多大纯度才能出结晶,没有统一的标准,通常不应低于50%。

2. 浓度

结晶母液通常应保持尽可能高的蛋白质浓度。浓度越高,结晶机会越大。这是因为蛋白质分子的扩散速度慢,相互碰撞聚合的机会增多。在稀溶液中不易形成晶核。对多数蛋白质或酶来说,浓度在5—30 mg/ml为好。但在过饱和状态下结晶,杂质含量多,而且晶形也不好。

3. 温度

温度可在0—40℃之间选择。一般是在低温下进行。低温不仅使蛋白质的溶解度低,而且不易使蛋白质变性。

4. 结晶时间

结晶时间视各种蛋白质或酶的具体情况而定。从浓盐溶液中结晶,形成结晶中心的时间短(几小时),但结晶生长较慢(需数周,数月)。但也有例外,牛肝过氧化氢酶从盐溶液中形成大的单晶只须12—24小时。结晶大小与结晶时间、结晶条件有关,大晶体通常是在生长较慢的情况下得到的。

5. pH值

调节pH可以使结晶长到最适大小,也可以改变晶形。但要注意酶的稳定性。结晶溶液的pH值一般应选择在被结晶蛋白质的等电点附近,这样有利于结晶的析出。

6. 金属离子

金属离子能引起或有助于蛋白质结晶过程。有些金属离子(特别是二价的)有促进结晶长大的作用。如,在硫酸铵溶液中的铁蛋白,加入少量镉离子后能形成菱形结晶。

7. 其它

有的蛋白质或酶不易结晶,如糜蛋白酶。但若加入微量的糜蛋白酶结晶,常可导致大量结晶的出现。有时用玻棒轻轻摩擦器壁也能促进结晶的形成。需要晶种才能形成结晶的蛋白质,一般结晶收率都不高。

第六节 纯化步骤的顺序编排

概括起来说,蛋白质的分离提纯基本上可分为五个阶段。首先要建立一个适当的方便灵敏的分析方法,这样才能估价每一步的提纯程度。关于这一点,将在下一节中讨论。第二,要选择一个最好的含有所要蛋白质的材料来源。第三是将所要蛋白质从原料中抽提出来。第四是在提纯的每一步中都应注意使所要蛋白质稳定,不变性。第五是建立一系列分离和浓缩的办法,最终

使所要蛋白质的纯度达到预定的要求。这些问题在前面已经讨论过了。现在的问题是,前述的种种分离方法,究竟在什么时候,什么条件下使用比较合适?这就涉及到纯化步骤的顺序编排问题。应当说,在这方面并没有什么死规定,对于一个指定的酶,要紧的是要进行试验,直到找到合适的顺序和条件。但从实际的角度出发,仍有一些一般的考虑。沉淀法可用于处理大体积,同时还有浓缩蛋白质的作用,因此常用于早期提纯。柱层析法可处理的体积通常要受到限制,但这种限制不象电泳法那么严格。因此,这种方法常常用在提纯步骤的中间。电泳法则用在提纯步骤的后期,因为这时杂质少,要处理的体积也小。亲和层析如果能用的话,可以期望从粗抽提液中一次提纯,但这种理想的情况,文献中还少见。实际上,在应用亲和层析以前常要进行预备提纯。结晶法一般用在提纯的最后一步。离心法最常用于早期提纯,如制备无细胞抽提液等,也用于提纯步骤的中间。

第七节 提纯过程中的定量

前已述及,在着手提纯蛋白质以前,首先要建立一个分析方法。如果要提纯的蛋白质是酶,则在提纯的每一步必须测定酶的比活力,即单位重量的酶制剂所具有的活力,可随时知道每一步的提纯效果。选择分析方法有四个标准:第一,方法的特异性要强,即所测到的酶活力只是所要分离酶的活力,其它的物质对酶活力没有贡献,也不干扰测定酶活力的反应。第二,方法的灵敏度要高,尤其在提纯的早期阶段,酶的比活力一般很低,因此方法必须灵敏。由于方法灵敏,则测活力所耗去的酶量减少,因而可提高最终收率。第三,方法的准确度要高。这取决于所用方法的化学基础。第四,方法的使用要方便,快速。对于不稳定的蛋白质来说,这一点很重要。

除了测定酶活力以外,还要测定蛋白质(或酶)的含量,这样才能算得比活力。蛋白质的含量可根据其物理、化学性质来进行测定。最常用的是紫外光吸收法。此法简便易行,灵敏度较高,可检出 $10-20\mu\text{g/ml}$ 的蛋白质,而且还适用于连续自动分析。但需要有仪器设备。此外福林法和微量双缩脲法也是测定蛋白质含量的常用方法,这两种方法所需要的仪器、设备比较简单,但操作烦琐。所有这些方法的使用都离不开分光光度计,因为这些方法都是利用物质特有的吸收光谱来鉴定物质性质及含量的。所以我们在介绍这些方法之前,先要讲讲分光光度法的原理。

一、分光光度测定法的原理

分光光度测定法是生物化学中最有价值的测定方法之一。通过测定紫外,可见或红外的特征吸收光谱可以鉴定未知化合物;通过测量在某一波长的光吸收可以测定溶液中未知化合物的浓度。酶催化的反应常常需要用分光光度法进行追踪,也就是通过测量产物的产生和底物的消失来追踪。当一定光源所产生的辐射光通过含有某种物质的溶液时,此物质能选择性地吸收某特定波长的电磁波的辐射能,从而得到该物质所特有的吸收光谱。利用物质的吸收光谱来鉴别物质的性质及其含量的仪器就是分光光度计。它是用来测定一定波长的光透过样品溶液后的光量的。其主要部件包括:①光源,②平行光镜或聚焦装置,它能产生平行光束,③单色光镜(如棱镜或光栅),它能将一束混合光波分解为各个单一波长光,④狭缝,用它来选择所需要波长的光,⑤装样品的比色杯,⑥光电池(或光电倍增管),⑦检流计,用来记录光电池的输出电流。

透过溶液的入射光的强度决定于样品溶液的厚度即光路长度(l),吸光物质在溶液中的浓度

(c), 以及吸光物质的化学性质。光吸收遵循的是指数定律, 而不是线性定律。浓度光路长度和光吸收之间的关系可用数学式表达如下:

$$-\frac{dI}{I} \propto cdl \quad \text{和} \quad -\frac{dI}{I} \propto ldc$$

或,
$$\frac{dI}{I} = -kcdl \quad \text{和} \quad \frac{dI}{I} = kldc$$

其中 $-dI$ 是浓度恒定时, 光路长度的微小增加(dl)所引起的透射光强度的减少, 或者, 当光路长度恒定时, 浓度的微小增加(dc)所引起的透射光强度的减少。

$\frac{dI}{I}$ 是被吸收的入射光的百分数。

k 是比例常数, 不同的化合物有不同的 k 值。

上述微分关系可在任一两个光路长度(如 $0-l$)或任一两个浓度(如 $0-c$)之间积分:

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -kc \int_0^l dl, \quad \int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -kl \int_0^c dc$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -kcl, \quad \ln \frac{I}{I_0} = -klc,$$

或者,
$$2.3 \lg \frac{I_0}{I} = kcl, \quad 2.3 \lg \frac{I_0}{I} = klc$$

$$\lg \frac{I_0}{I} = \frac{k}{2.3} cl, \quad \lg \frac{I_0}{I} = \frac{k}{2.3} lc.$$

$$\lg \frac{I_0}{I} = acl, \quad \lg \frac{I_0}{I} = alc$$

这里 a 是某物质的“吸收指数”, 或“消光系数”, “吸收系数”。如果浓度用克分子浓度表示的话, a 就成为“克分子消光系数” a_m , 如果浓度用克/升来表示, a 就成为“比吸收系数” a_s ; 显然,

$a_m = a_s \times MW$; 如果浓度用%(W/V)来表示, 那么消光系数则用 $a\%$ 来表示。在生化计算中大多采用克分子消光系数, 而且样品的厚度(即光路长度 l) 常是 1 厘米, 所以 a_m 的单位是 $M^{-1} \times C^{-1}$ 。吸收系数随波长变化而变化。因此, a_{m340} 指的是在 340 nm 处的克分子消光系数。

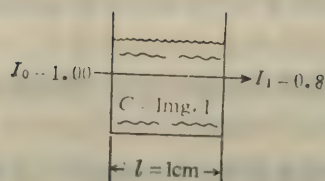
$\lg \frac{I_0}{I}$ 这一项叫做“吸收”, 用 A 或光密度(O. D.)来表示。因此,

$$A = a_m cl$$

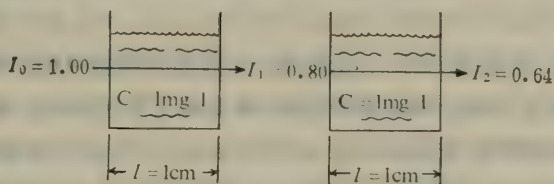
这就是著名的 Lambert-Beer 定律, 只要测定光密度(或吸收)就可以算出溶质在溶液中的浓度。浓度为 1 M 的某种物质, 在一定波长下, 于 1 厘米宽的比色杯中的吸收在数值上等于 a_m 。注意, A 是浓度的线性函数。

Lambert-Beer 定律的指数性质可以表示如下,

假定一束光通过 1 厘米厚的比色杯(其中含有 1 mg/l 浓度的吸光物质)时, 能透过 80% 的入射光(有 20% 的入射光被吸收)。



现在,在第一杯的后面放一同样的杯,透过两个杯后的光强度会是多少呢?前面已经说了,光吸收遵循的不是线性关系,而是指数关系,因此, I_2 不是0.6。光程中的每一厘米不是吸收恒量的光,而是每一厘米吸收20%的入射光。但第二个杯的入射光是 $I_1(0.8)$,因此,第二杯吸收20%的0.8,即0.16。透过的光量是0.8的80%即为原来入射光的64%。



同样的道理 如果并排放三个1厘米厚的杯子,则每一个都吸收它的入射光的20%,透过80%的入射光。因此透过第三个杯子后的 $I_3 = 0.64 \times 0.8 = 0.512$ 。

固定吸收物质的浓度 c ,改变杯子的厚度、如2厘米、3厘米,或杯子的厚度固定,增加吸收物质的浓度,如2 mg/l, 3 mg/l,则得到同样的结果。如下表所示:

透过光的强度 (以%表示)	0.80	0.64	0.512
测定条件	$l = 1\text{cm}$ $c = 1\text{mg/l}$	$l = 1\text{cm}$ $c = 2\text{mg/l}$	$l = 1\text{cm}$ $c = 3\text{mg/l}$
	$c = 1\text{mg/l}$ $l = 1\text{cm}$	$c = 1\text{mg/l}$ $l = 2\text{cm}$	$c = 1\text{mg/l}$ $l = 3\text{cm}$

据此,可以把一般原理概括为如下三点:

1. 如果浓度为 c 的溶液,透过它的光强度为 I (以百分数表示)的话,则浓度为 $2c$ 的溶液,透过它的光强度为 I^2 ; $3c$ 溶液,则透过它的光强度为 I^3 ; nc 溶液,则透过它的光强度为 I^n 。
2. 同样,如果光程(l)增加 n 倍,则透射率为 I^n 。
3. 溶液的吸收是溶质浓度的线性函数,双倍的浓度则产生双倍的吸收,三倍的浓度则产生三倍的吸收等等。

在实际操作中,所有的光吸收测量都应以“空白”溶液为参照物。这是因为,当一束光通过装有溶质溶液的比色杯时,透射光强度减弱的原因,部分是由于溶液表面反射或散射光,部分是由于溶质本身吸收光。由于我们测定的目的是研究物质吸收光的情况,其它则是干扰因素,必须设法除去。用“空白”作参照物,则能消去反射,散射等干扰因素造成的入射光的损失量。所谓“空

白”溶液,就是除了要测量的溶质以外,含有所有其它分析成分的溶液。

二、蛋白质浓度的测定

有几种分光光度法可用于测定蛋白质溶液的浓度。现分述如下:

1. 双缩脲法

双缩脲法是第一个用比色法测定蛋白质浓度的方法^[91],至今仍广泛采用。在需要快速,但不很准确的测定中,最常用此法。硫酸不干扰显色,这对蛋白质提纯的早期阶段是非常有利的。双缩脲法的原理是 Cu^{2+} 与蛋白质的肽键,以及酪氨酸残基络合,形成紫红色络合物,此物在 540nm 波长处有最大吸收。双缩脲法常用于 0.5~10 mg/ml 蛋白质溶液的测定。干扰物有硫酸,以及具有肽性质的缓冲液,如 Tris、Good 缓冲液等。可用沉淀法除去干扰物,即用等体积 10% 冷的三氯醋酸沉淀蛋白质,然后弃去上清液,再用已知体积的 1 N NaOH 溶解蛋白质。

2. Lowry 法

此法是双缩脲法的进一步发展^[92,93]。它的第一步就是双缩脲反应,即 Cu^{++} 与蛋白质在碱性溶液中形成络合物,然后这个络合物还原磷钼酸-磷钨酸试剂(即福林-酚试剂),结果得到深蓝色物。此法比双缩脲法灵敏得多,适合于测定 20~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质溶液。但也很费时间。其干扰物质与双缩脲法相同,而且受它们的影响更大。硫酸和许多其它物质的存在会使结果产生严重偏差。另外要注意的是,加入福林试剂时要特别小心,这个试剂只在酸性 pH 环境中才稳定,但上边提到的还原反应只有在 pH 10 时才发生。因此,福林试剂加入到碱性的 Cu^{2+} -蛋白质溶液中时,必须立刻搅拌,以使磷钼酸-磷钨酸试剂在没被破坏以前能有效地被 Cu^{2+} -蛋白质络合物所还原。

3. 紫外吸收法

大多数蛋白质在 280 nm 波长处有特征的最大吸收,这是由于蛋白质中有酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸存在的缘故。因此,利用这个特异性吸收,可以计算蛋白质的含量。如果没有干扰物质的话,在 280 nm 的吸收可用来测定 0.1~0.5 mg/ml 的蛋白质溶液。部分纯化的蛋白质常含有核酸,核酸在 260 nm 波长处有最大吸收。有核酸时,所测得的蛋白质浓度必须作适当校正,一般按下式粗略计算:

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg}/\text{ml}) = 1.55 A_{280}^{1\text{cm}} - 0.76 A_{260}^{1\text{cm}}$$

$A_{280}^{1\text{cm}}$ 是蛋白质溶液在 280 nm 波长处(光程 1 厘米)测得的光密度值。 $A_{260}^{1\text{cm}}$ 是蛋白质溶液在 260 nm 波长(光程 1 厘米)处所测得的光密度值。

此方程是从烯醇酶(在酵母核酸存在时)得出来的。因此,对其它蛋白质和其它核酸不一定适用。由于各种蛋白质所含芳香族氨基酸的量不同,因此,浓度为 0.1% 的各种蛋白质在 280 nm 处的消光系数($a_{280}^{0.1\%}$)在 0.5~2.5 之间变化。

所有的蛋白质在 230 nm 以下都有强吸收,例如,牛血清白蛋白的 $a^{0.1\%}$ 在 225 和 215 nm 处分别为 5.0 和 11.7,而在 280 nm 处则为 0.58。在 230 nm 以下的强吸收是由于肽键的存在。因此,此值对所有的蛋白质都是一样的。从在 215 和 225 nm 处的吸收差可以测定浓度为 10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白质。标准曲线由 ΔA 对蛋白质浓度作图而得到。蛋白质浓度可以近似地由下式得到:

蛋白质浓度($\mu\text{g/ml}$) = $144(A_{215\text{nm}} - A_{225\text{nm}})$ 吸收差是用来减少溶液中非蛋白质成分产生的误差。但是,蛋白质之间的分子量差异比较大,也就是肽键数目不同,因此,在比较几个蛋白质含量时,必须作适当校正。高浓度的缓冲液干扰测定,某些无机化合物也可能干扰测定。如不能用 0.1 N NaOH 溶解蛋白质,用 5 mM NaOH 溶解蛋白质则没有问题。由于蛋白质的吸收高峰常因 pH 改变而改变,所以在制作标准曲线时,必须与样品条件一致。

第八节 纯度标准

测定蛋白质样品的纯度远非易事。因为要受到很多限制。鉴定小分子纯度的一般标准不适用于蛋白质。蛋白质结晶在很多情况下可以达到纯化,但结晶本身并不是纯度的充分标准,因为蛋白质易于形成混合结晶物,而且以相同的方法反复结晶仍保留有混合物。从蛋白质制剂中检测出少量污染蛋白质是很困难的,因为污染蛋白质的量可能低于很多分析方法的检测极限。也可能有这样的情况:当用一个方法测定蛋白质纯度时,可能有二个或更多的蛋白质,其表现行为类似。这种类似的表现行为可能会产生本来是混合物的样品也被认为是均一的错误结论。因此,只用一种方法作为纯度试验的标准是很不可靠的,必须选择多种试验纯度的方法。只有当样品通过了所有的试验,才能确定这个样品是纯的。事实上,还没有一个真正的检验纯度的方法,只有检测样品不纯的或非均一性的方法。这些方法只能提供其它物质不存在的证据。纯度最终取决于所用方法的类型和分辨力。用低分辨力方法证明是纯的样品,改用高分辨力方法时就可能证明它是不纯的。而且每一种方法只能描述样品在某一方面的性质。例如,用高分辨力的 SDS 电泳法进行测定,得到一条均一带,这只能说明样品在分子量方面是均一的;如果用酶分析法检测污染物,分辨力还能进一步提高,但污染物必须有特异的酶反应性质。因此,最好的纯度标准是:建立多种分析方法,从不同的角度去测定蛋白质样品的均一性。下面介绍几种试验纯度的方法。

1. 层析性质的考查

当用线性梯度离子交换法或分子筛法层析试验样品时,如果制剂是纯的,它就应当显示出恒定的比活力。这一点,只要测定各个部分的比活力就可知道。如果所有的部分的比活力都相同,则可认为该样品在层析性质上是均一的。

2. 电泳法

样品在凝胶电泳上显现出一个带,也是纯度的一个指标。但这时只能说明,样品在荷质比(电荷/质量)方面是均一的。如果在不同的 pH 值下进行凝胶电泳,都得一条带,那结果就更加可靠。SDS-电泳法也很有价值,但它只适用于蛋白质含有相同亚基的情况。

等电聚焦法也可用于试验纯度,此法的基础仅仅是根据等电点的不同来进行分辨的。细胞中含有一万到五万种蛋白质,它们的等电点基本上分布在 pH 4~10 之间,因此,显然会有重迭现象,因为如果蛋白质均匀分布的话,每个 pH 单位要有 7000 个蛋白质,而实际上分布并不均匀,主要集中在 pH 4~8。

3. 免疫化学法

免疫技术也是一个鉴定纯度的有用方法。很多蛋白质和某些多糖、脂类都有抗原性,也就是

在给适当动物注射这种物质时,刺激特异性抗体的形成。注射均一性的物质,只形成一种特异性抗体,然而注射几种具有抗原性物质时,则产生几种抗体。只要杂质是抗原性物质,这种检查蛋白质制剂均一性的方法都有相同的灵敏度。但杂质若没有抗原性,则此法就不灵。

免疫法的形式有:免疫扩散,免疫电泳,双向免疫电泳扩散,放射免疫分析等。特别是放射免疫分析法,发展迅速,应用广泛,几乎普及于生物体内各种微量成分的测定,灵敏度很高。但缺点是需要一定的设备,操作人员需经特殊技术训练,长期使用,操作人员的保健与可造成公害的废弃物的处理均存在问题。为了克服这个缺点,近年有人尝试以无害标记物取代放射性同位素。在这方面成绩显著的是酶标记免疫分析法,简称酶免疫分析法(EIA)^[95]。

4. 蛋白质化学结构分析法

随着蛋白质分析技术的进步,末端基的测定方法等也逐渐用于酶纯度的鉴定。对于一个纯蛋白质来说,通过N-末端的定量分析可以发现,每克分子蛋白质应当有整数克分子的N-末端氨基酸,少量其它末端基的存在,常常表示存在着杂质。如果只是定性的测定N-末端,那么,此法就只适用于仅有一个肽链的蛋白质。

对样品进行总的氨基酸分析也是检验纯度的一个方法。对一个纯蛋白质而言,应当发现所有的氨基酸都成整数比,如果含有辅因子的话,辅因子也应计算在内。若有精确、灵敏、快速的氨基酸定量分析仪可供利用的话,此法常被用来鉴定蛋白质的纯度。

最终的纯度标准,当然是唯一的氨基酸顺序,但很少用它来鉴定纯度。

5. 其它方法

① 分光光度法:

纯蛋白质的 A_{280}/A_{260} 应为 1.75。此法可用来检查有无核酸存在。

② 酶活力法

对酶来说,酶活力可作为一个很好的纯度试验指标。因为随着杂质的除去,比活增加,当样品不能进一步纯化时,比活达到一恒定的最大值。此外,污染蛋白质生物活力的消失也是一个间接的纯度评价标准。如果蛋白质含有容易测到的金属,或结合紧密的辅助因子,那么,其含量在纯化过程中将增加。当样品达到均一状态时,其含量也就恒定了。

③ 利用蛋白质的特殊功能特性(如,起激素,酶,氧载体等)进行纯度检验,具有很高的灵敏度,因为很少量的这类物质,可以通过其生理作用,催化性能等而被检测出来。有时能检出浓度低到几千分之一或百万分之一的杂质。所以此法的灵敏度比许多物理或化学法要高得多。

④ 超速离心沉降法

此法常用于蛋白质分子量的测定,也可用于蛋白质纯度的鉴定。在离心管中如果出现明显的分界线,或者分部取出离心管中的样品,管号对样品浓度作图后,组份的分布是对称的,则表明样品是均一的。此法的优点时间短,用量少,缺点是灵敏度较差,微量杂质难以检出。

总而言之,如果对样品纯度的要求越高,则用来检验纯度的方法应当越多,而且对所得到的数据的解释越应当小心谨慎。

习 题

1. 蛋白质分离提纯的一般步骤是什么? 提纯过程中需要注意哪些问题?
2. 层析法、超离心法、电泳法的基本原理是什么? 适用的范围是什么? 实际操作中有哪些问题值得特别注意?
3. 有哪些方法可用于蛋白质纯度的鉴定, 其局限性是什么?
4. 在 pH 3.0 的柠檬酸缓冲液中含有天冬氨酸(pI=2.98)、甘氨酸(pI=5.97)、苏氨酸(pI=6.53)、亮氨酸(pI=5.98) 和赖氨酸(pI=9.74)。将此溶液上到 Dowex-50 阳离子交换柱上(此柱用同样的缓冲液平衡)。然后用适当的缓冲液洗脱, 并分部收集。问这五种氨基酸从柱上洗脱下来的顺序如何?
5. 甘氨酸、亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸在 pH 4.70 时的相对电泳迁移率是多少?
6. 一个超速离心机正以每分钟 58,000 转的速度旋转。(a) 计算每秒的 ω (以弧度表示), (b) 计算离旋转轴中心 6.2 厘米处所受到的离心力, (c) 这个离心力相当于多少 g 值?
7. 有一浓度为 2 克/升的吸光物质, 放于 1 厘米厚的比色杯中比色测定, 透射率为 75% (在给定的波长下)。计算浓度为(a) 4 克/升, (b) 1 克/升, (c) 6 克/升, (d) 5.4 克/升的溶液的透射率。(e) 如果该化合物的分子量为 250, 求 a_m 值。
8. 浓度为 $10^{-5}M$ 的 ATP 溶液, 在 260 nm 处的透射率为 0.702, 比色杯为 1 厘米厚。计算: (a) 用 3 厘米厚的比色杯时的透射率, (b) 1 厘米和 3 厘米厚的比色杯中溶液的吸收, (c) 1 厘米厚的杯中的 $5 \times 10^{-5}M$ ATP 的吸收和透射率。
9. 有一蛋白质溶液, 体积为 0.3 ml, 现在用 0.9 ml 水将其稀释。取稀释后的溶液 0.5 ml, 向其中加入 4.5 ml 双缩脲试剂, 显色后, 在 1 厘米厚的比色杯中, 于 540 nm 处测得吸收值为 0.18。向标准溶液(0.5 ml, 含 4mg/ml 蛋白质)加 4.5 ml 双缩脲试剂, 在同样条件下测得吸收值为 0.12。计算未稀释的未知蛋白质溶液的浓度。
10. 有一纯的含铜酶, 在 1 厘米厚的比色杯中测量时, 它的 $a_{280}^{0.1\%}$ 为 1.5。这个酶溶液每毫升含有 10.56 μg 的铜。将此溶液稀释 50 倍, 此时它的 A_{280nm} 为 0.375。计算此酶的最低分子量。铜的原子量为 95.94。

参 考 文 献

1. H. Neurath, Ed., The Proteins, 2nd ed., Vol. 3 Academic Press P. 2, 1965
2. R. A. Keckwick, Ed., Brit. Med. Bull., 22, 103 (1966)
3. P. Alexander, et al., Eds., A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry Including Polypeptides, Pergamon Press, 1966
4. C. H. W. Hirs, Ed., Vol. 11 of Methods in Enzymology Academic Press, 1967; C. H. W. Hirs, et al., Eds., Parts B and C, Vol. S. 25 and, 26 of Methods in Enzymology, Academic Press, 1972
5. J. L. Bailey, Techniques of Protein Chemistry 2nd ed., American Elsevier, 1967
6. W. B. Jakoby, Ed., Vol. 22 of Methods in Enzymology, Academic Press, 1971
7. E. Heftman, Ed., Chromatography, 2nd ed., Reinhold, 1967
8. C. J. O. R. Morris, et al., Separation Methods in Biochemistry, Pitman Publishing, 1963
9. E. Lederer, et al., Chromatography, 2nd ed., Elsevier, 1957
10. T. S. Work, et al., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1, North-Holland Publishing Co., 1969
11. R. H. Haschemeyer, et al., Proteins—A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, A Wiley-Interscience Publication, 34, 1973
12. 日本生化学会編“生化学実験講座”第 1 卷タンパク質の化学 I, 34, 1974
13. L. Edebo, Fermentation Advances, 249, (1969)
14. M. A. Joslyn, Methods in Food Analysis, 50, 1950
15. S. Korkeas, et al., J. Biol. Chem., 193, 721 (1951)

16. T. C. Chou, et al., *J. Biol. Chem.*, 196, 89 (1952)
17. 辻阪好夫, *科学と工業*, 42, 285 (1968)
18. 邹承鲁, *生物化学进展*, 上海科学技术出版社, 24—26 (1965)
19. D. Herbert, et al., *J. Biol. Chem.*, 43, 139 (1948)
20. M. Dixon, et al., *Enzymes*, 2nd ed., 27, 1964
21. S. P. Colowick, *Methods in Enzymology*, Vol. 1., 3—146, 1955
22. T. G. Cooper, *The Tools of Biochemistry*, A Wiley-Interscience Publication, 370, 1977
23. M. Dixon, et al., *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 16, 197, 1961
24. M. Sternberg, *U. S. Pat.*, 3, 655, 513 (1972)
25. W. Honing, et al., *Anal. Biochem.*, 72, 502 (1976)
26. W. W. Umbreit, et al., *Monometric & Biochemical Techniques*, 5nd ed, 325—329, 1972
27. A. Tiselius, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 132 (1956)
28. S. Hjerten, *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 216 (1959)
29. G. Bernardi, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 6, 54 (1961)
30. H. K. Miller, et al., *J. Immunol.*, 75, 155 (1955)
31. T. S. Work, et al., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.2, Part II, 1970
32. J. D. Mandell, et al., *Anal. Biochem.*, 1,66 (1960)
33. S. Paleus, et al., *Acta, Chem. Scand.*, 4, 1024 (1950)
34. S. Moore, et al., *Adv. Protein. Chem.*, 11, 191 (1956)
35. W. A. Schroeder, et al., *Anal. Chem.*, 34, 1570 (1962)
36. H. A. Sober, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 1771 (1954)
37. T. S. Work, et al., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 2, 297, 1970
38. A. Cherkin, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 1244 (1953)
39. C. W. Parr, *Proc. Biochem. Soc.*, 324th meeting XXVII, 56 (1954)
40. H. A. Sober, et al., *Federation Proc.*, 17, 1116 (1958)
41. E. A. Peterson, et al., *J. Chromatog.*, 5, 330 (1961)
42. B. F. Horton, *J. Chromatog.*, 27, 63 (1967)
43. J. E. Folk, et al *Biochem. Biophys. Acta*, 36, 256 (1959)
44. A. R. Cooper, et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, 13, 1487 (1969)
45. E. C. Horning, et al., *Methods Biochem. Anal.* 11, 69 (1963)
46. K. Hochstrasser, et al., *Z. Physiol. Chem.*, 348, 1337 (1967)
47. J. Porath, *Nature*, 218, 834 (1968)
48. P. Cuatrecasas, *J. Biol. Chem.*, 245, 3059 (1970)
49. P. Cuatrecasas, *Advances in Enzymology*, Vol. 36, 29, 1972
50. W. B. Jakoby, et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 34, 405, 1974
51. P. Brodelius, et al., *FEBS Lett*, 35, 223 (1973)
52. T. J. Bowen, *An Introduction to Ultracentrifugation*, 1970
53. M. Meselson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 44, 671 (1958)
54. M. Meselson, et al., *ibid.* 43, 581 (1957)
55. W. Szybalski, *Methods in Enzymology*, Vol. 12 B 330 1968
56. T. G. Cooper, *The Tools of Biochemistry*, 342, 1977
57. H. Beaufay, et al., *Biochem. J.*, 92, 1814 (1964)
58. Wattiaux, et al., *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 71 140 (1963)
59. D. G. Deutsch, *Anal. Biochem.*, 71 (1), 300 (1976)
60. J. C. Fawcett, et al., *Separation Science*, 1, 9 (1966)
61. J. R. Cann, *Biochemistry*, 5, 1108 (1966)
62. D. Rodbard, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 65, 970 (1970)
63. W. B. Jakoby, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 565, 1971
64. J. L. Hedrick, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 155 (1968)

65. D. Rodbard, et al., *Anal. Biochem.*, 40, 95 (1971)
66. B. Paterson, et al., *Biochemistry*, 9, 4094 (1970)
67. A. L. Shapiro, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, 28, 815 (1967)
68. K. Weber, et al., *J. Biol. Chem.*, 244, 4406 (1969)
69. W. F. Studier, *J. Mol. Biol.*, 79, 237 (1973)
70. G. F. L. Ames, *J. Biol. Chem.*, 249, 634 (1974)
71. U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970)
72. T. D. Kempe, et al., *J. Biol. Chem.*, 249, 4625 (1974)
73. C. W. Wrigley, *Sci. Tools*, 15, 17 (1968)
74. P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, 250, 4007 (1975)
75. A. C. Peacock, et al., *Biochemistry*, 7, 688 (1968)
76. A. E. Dahlberg, et al., *J. Mol. Biol.*, 41, 139 (1969)
77. E. G. Richard, et al., *Anal. Biochem.*, 40, 43 (1971)
78. A. S. Lee, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 71, 2882 (1974)
79. S. Udenfriend, et al., *Science*, 178, 871 (1972)
80. W. L. Ragland, et al., *Anal. Biochem.*, 59, 24 (1974)
81. S. Udenfriend, et al., *Anal. Biochem.*, 30, 391 (1969)
82. W. B. Jakoby, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 578—604, 1971
83. A. H. Wardi, et al., *Anal. Biochem.*, 49, 607 (1972)
84. K. Timmis, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 74, 4556 (1974)
85. M. R. Green, et al., *Anal. Biochem.*, 56, 43 (1973)
86. G. Fairbanks, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, 29, 393 (1965)
87. H. S. Anker, *FEBS Lett.* 7, 293 (1970)
88. Summers, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 54, 505 (1965)
89. W. B. Jakoby, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 22 266, 1971
90. W. B. Jakoby, Ed., *Methods in Enzymology*, Vol. 22, 253, 1971
91. A. G. Gornall, et al., *J. Biol. Chem.*, 177, 751 (1949)
92. O. H. Lowry, et al., *ibid.* 193, 265 (1951)
93. S. P. Colowick, et al., Eds., *Methods in Enzymology*, Vol. 3, 447—454, 1957
94. S. Ochoa, et al., *J. Biol. Chem.*, 193, 691 (1951)
95. International Symposium on Immunoenzymatic Techniques: *Immunoenzymatic Techniques*, Vol. 1, North-Holland, 1976

第四章 蛋白质分子量的测定

用前章所叙述的方法确定了蛋白质的均一性后,为了进一步开展一级结构的研究工作,首先要测定蛋白质分子的分子量,在研究过程中,还要测定亚单位和寡聚体的分子量以及各种裂解碎片的分子量。

从化学观点来看,分子量是组成蛋白质分子各原子的原子量总和。但是,对大分子的蛋白质来讲,若不知道分子量也无法得知每个分子的元素组成情况。由于这个原因,人们很早就对测定分子量工作非常重视。先后用于测定蛋白质分子量的方法有:渗透压、粘度、光散射、超离心(沉降速度、沉降平衡)、凝胶层析、柱层析、薄板层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法。近年来,电子显微镜以及激光小角散射仪等也都用于研究蛋白质的分子量。其中用得最多的是:超离心沉降速度、超离心沉降平衡、凝胶过滤柱层析及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法。这些方法都是根据蛋白质分子的物理化学性质来测定分子量,测得的分子量可称为物理分子量。与物理分子量相对应的是化学分子量,化学分子量是从化学分析得到的结果来计算出最小分子量。比如,用氨基酸定量分析结果可以计算出一些蛋白质的最小分子量。另外,根据某些蛋白质所含有的特殊基团或化学元素组成亦可计算最小分子量。例如,如果某基团(或元素)的分子量(或原子量)为 A ,分析该成分在蛋白质中所占百分比为 a 。则最小分子量 M 可从下式计算

$$\frac{A}{M} \times 100 = a$$

因此 $M = 100 A / a$

但是,无论用那种办法确定分子量都要求样品均一,否则测得结果是不可靠的。

第一节 分子量的平均值

在测定大分子分子量时,有以下两种情况:一是样品中所有大分子具有相同分子量(纯样品),另一种是样品中分子种类范围较宽(不均一样品)。后一种情况,在合成高聚物中常常如此,这时就要考虑分子量的平均值。常用的有数均分子量和重均分子量。另外还有 Z 平均及 $Z+1$ 平均分子量等。

用化学分析、渗透压等方法测得的分子量是数均分子量 M_n 。它表示是总质量 m 对总克分子数 n 的比值,即 m/n 。

$$\text{数均分子量 } M_n = \frac{\sum m}{\sum n} = \frac{\sum W_i}{\sum (W_i / M_i)}$$

这种平均分子量表明,测定结果是由分子数引起的效应。就拿渗透压法来讲,如果两种样品分子数相同,其一分子量大,而另一种分子量较小,在这种情况下两个样品所产生的渗透压是相同的(虽然两个样品重量不同)。这说明渗透压大小取决于样品中分子数。因此,渗透压法测得的是数均分子量。如果,同一样品含有大小不同的分子,该样品的渗透压取决于各种大小不同分

子分子数的总和。如果样品中有分子量为 $M_1, M_2, M_3, \dots, M_i$; 克分子数为 $n_1, n_2, n_3, \dots, n_i$ 。该样品的数均分子量为:

$$M_n = \frac{n_1 M_1 + n_2 M_2 + \dots + n_i M_i}{n_1 + n_2 + \dots + n_i}$$

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum W_i}{\sum (W_i / M_i)} \quad (4-1)$$

这里 W_i 为样品中某一种分子的总重量。

从实验中直接测定得到的是 M_n 。公式中 n_1, n_2, \dots 和 M_1, M_2, \dots , 都不能单独测定出来。因此, 方程(4-1)只是表示用这一类方法测得的分子量的平均方式, 描述出这种分子量的特点。

用沉降平衡、光散射等方法测得的分子量是重均分子量 M_w 。分子量不均一的样品, 重均分子量大于数均分子量。这是由于在这种测定方法中, 分子量较大者较分子量较小者产生较大的效应。若以 m_1, m_2, \dots, m_i 表示每一成分的总质量; M_1, M_2, \dots, M_i 表示每一成分的分子量。重均分子量可以用下式表示:

$$M_w = \frac{m_1 M_1 + m_2 M_2 + \dots + m_i M_i}{m_1 + m_2 + \dots + m_i}$$

因为

$$m = nM$$

所以

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum W_i M_i}{\sum W_i} \quad (4-2)$$

此外, 在沉降平衡法中也有用 z 平均和 $z+1$ 平均分子量^[1]。

$$M_z = \sum W_i M_i^2 / \sum W_i M_i \quad (4-3)$$

$$M_{z+1} = \sum W_i M_i^3 / \sum W_i M_i^2 \quad (4-4)$$

对于分子量均一样品, $M_n = M_w = M_z = M_{z+1}$ 。对于分子量不均一样品 $M_n < M_w < M_z < M_{z+1}$ 。它们的差值越大反映了样品的均一性越差, 差值越小, 均一程度越好。

至于用凝胶层析, 聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法测定分子量, 一般是按某一固定分子量成分的某一特性, 如: 洗脱体积, 迁移率等来确定分子量的。因此, 一般不存在各种不同分子量的平均问题。样品如为混合物, 可以将每一组分的分子量分别测定出来。

第二节 最小二乘法的应用

在用渗透压, 凝胶层析, 聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法测定分子量时, 最后数据处理都涉及到一个方程和一个标准线的问题。由于实验所得各点很不易完全在一条直线上。因此, 如何准确确定方程的常数(标准线的斜率和截距)是很重要的。

凝胶柱层析用 $\lg M = A - B \left(\frac{V_c}{V_0} \right)$

凝胶薄板层析用 $\lg M = A - B \left(\frac{1}{R_f} \right)$

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳用 $\lg M = A - BR_f$

渗透压测定分子量用 $\frac{\pi}{C} = \frac{RT}{M} + KC$.

总之,两个线性方程:

$$\text{即} \quad y = A - Bx \quad (4-5)$$

$$y = A + Bx \quad (4-6)$$

考虑方程(4-5),如果某一点正在线上,

则 $y - (A - Bx) = 0$. 若不在线上 $y - (A - Bx) = \varepsilon$, ε 表示该点的偏差。

若要求得一个 A, B 值使总偏差最小, 设总偏差为 $\sum \varepsilon_i$. $\sum_{i=1}^n \varepsilon_i = \varepsilon_1 + \varepsilon_2 + \dots + \varepsilon_n$. 为避免偏

差的代数和互相抵消, 采用它们的平方和,

$$\text{即: } \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2 + \dots + \varepsilon_n^2$$

$$\sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n [y_i - (A - Bx_i)]^2$$

按求极值方法:

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial A} = -2(y_1 + Ax_1 - B)x_1 - 2(y_2 + Ax_2 - B)x_2 - 2(y_i + Ax_i - B)x_i \quad (1)$$

$$\frac{\partial \varepsilon}{\partial B} = -2(y_1 + Ax_1 - B) - 2(y_2 + Ax_2 - B) - 2(y_i + Ax_i - B) \quad (2)$$

$$\text{由(1): } \frac{\partial \varepsilon}{\partial A} = -2(x_1y_1 + x_2y_2 + \dots + x_iy_i) - 2A(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_i^2) + 2B(x_1 + x_2 + \dots + x_i) \quad (3)$$

$$\text{由(2): } \frac{\partial \varepsilon}{\partial B} = -2(y_1 + y_2 + \dots + y_i) - 2A(x_1 + x_2 + \dots + x_i) + 2nB \quad (4)$$

$$\text{若 } \frac{\partial \varepsilon}{\partial A} = 0 \quad \frac{\partial \varepsilon}{\partial B} = 0$$

由③和④得方程组:

$$\begin{cases} -A \sum_{i=1}^n x_i^2 + B \sum_{i=1}^n x_i = \sum_{i=1}^n x_i y_i & (5) \end{cases}$$

$$\begin{cases} -A \sum_{i=1}^n x_i^2 + nB = \sum_{i=1}^n y_i & (6) \end{cases}$$

解此方程组得到:

$$A = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i y_i \sum_{i=1}^n x_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \quad (4-7)$$

$$B = \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i - n \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2} \quad (4-8)$$

在式(4-7)和(4-8)中,对已知标准样品来讲, x 和 y 分别为实验值和已知值。 n 是实验的点数。这样用这两个方程,由已知样品的数据,可以求出标准线的两个常数 A 、 B 值。对未知样品来讲,只要测定出 x 值,利用 A 、 B 值即可以计算出 y 值。

同理,方程(4-6)亦可照此办法求出 A 、 B 值。

这样,从实验测得的数据计算该实验方法所用方程的常数,再用这个常数计算出未知样品的分子量。所得结果比作图法精确,并且很方便。

第三节 超离心沉降速度法

在第二章已经谈过制备性超离心。分析性超离心与制备性不同。它主要是为了研究生物大分子的沉降特征和结构,而不是为了实际收集一些特殊的部分。因此,它使用了特殊设计的转头和检测系统,以便连续地监测物质在一个离心力场中的沉降过程。

分析性超离心测定分子量的两种方法是:沉降速度和沉降平衡法。本节介绍沉降速度法。

在沉降速度实验中,若转速达到50,000至60,000转/分钟时,在离心池中均匀分布在溶剂中的蛋白质分子将以一定速度移向离心池的底部。在如此高速的离心力场中,反向扩散可以忽略。在离心池顶部由于溶质分子的离去,只剩下溶剂。离心池下部为浓度均一的蛋白质溶液部分称为“坪区”(图4-1)。在上层溶剂与下层“坪区”之间有一个窄的过渡区带。在这个区带内,沉降物质的浓度随区带向池底部移动而增加,这个区带称为界面。不同分子量物质混合物能够形成几个界面。均一的蛋白质溶液只形成一个界面。分子量越大的物质,界面移动越快。沉降速度法就是利用光学方法来测定这个界面的移动速度。正如第三章所述,物质的分子量不同,沉降系数不同。物质的沉降系数与该物质分子的大小、形状和密度以及介质的密度和粘度等因素有关。

如果溶质分子的密度比溶剂的密度小,离心时溶质分子上浮,沉降系数则为负值。

在高速离心沉降过程中,溶质分子离开旋转轴中心而移动,设距离为 x 。若转子角速度为 ω ,则离心加速度为 $\omega^2 x$ 。作用于溶质分子上的离心力应是 $\omega^2 x$ 与其有效质量的乘积。有效质量是它的实际质量减去它所排开介质的质量。如果 M 为溶质的分子量, \bar{v} 为溶质分子的微分比容(等于溶质分子密度的倒数), ρ 为介质的密度,作用于一克分子溶质上的总离心力为:

$$\phi = M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 x \quad (4-9)$$

溶质分子在沉降过程中,受到介质对它的摩擦阻力为:

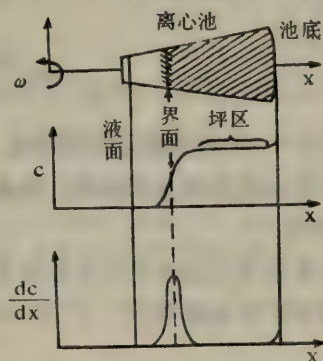


图4-1 在沉降过程中扇形孔离心池内溶质浓度的分布^[2]
c: 浓度; x: 距离; ω : 角速度

$$F = f \frac{dx}{dt} \quad (4-10)$$

f 为溶质的克分子摩擦系数, $\frac{dx}{dt}$ 为沉降速度。随着溶质分子沉降速度的增加,介质的粘滞阻力也同时增加。经过很短的加速过程以后,溶质分子所受到的离心力即为反方向的摩擦阻力所平衡。

$$\text{即: } f \frac{dx}{dt} = M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2 x \quad (4-11)$$

此时溶质分子便以恒速沉降。在单位离心力场中,溶质分子的沉降速度为:

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} \quad (4-12)$$

沉降系数 S 的量纲为秒。将(4-11)式代入(4-12)式得到:

$$S = M(1 - \bar{v}\rho) / f \quad (4-13)$$

假定上式中溶质分子在溶液中沉降时,所受到的溶剂分子的阻力与该溶质分子在同一溶液中扩散时所受到的溶剂阻力相同。

$$\text{则: } f = \frac{RT}{D} \quad (4-14)$$

D 为扩散系数; T 为绝对温度; R 为气体常数(等于 8.314×10^7 尔格/克分子浓度)

将(4-14)式代入(4-13)式,得到 Svedberg 公式:

$$M = \frac{SRT}{D(1 - \bar{v}\rho)} \quad (4-15)$$

式(4-15)中,扩散系数 D 可以测定。 \bar{v} 可以测定,亦可以由组成它的氨基酸的微分比容计算。(表 4-1) S 和 D 对浓度有依赖性。因此,应该使用无限稀释时的外推值。在这种情况下, ρ 也就是溶剂的密度。

沉降速度法虽然需要参数较多,但它操作时间短,而且可以用来鉴定大分子物质的纯度,所以得到了广泛的应用。

表 4-1 氨基酸残基微分比容

氨基酸	微分比容 \bar{v}	氨基酸	微分比容 \bar{v}
甘氨酸	0.64	半胱氨酸	0.61
丙氨酸	0.74	色氨酸	0.74
丝氨酸	0.63	酪氨酸	0.71
苏氨酸	0.70	组氨酸	0.67
缬氨酸	0.86	精氨酸	0.70
亮、异亮氨酸	0.90	赖氨酸	0.82
脯氨酸	0.76	天冬氨酸	0.60
甲硫氨酸	0.75	谷氨酸	0.66
苯丙氨酸	0.77	谷氨酰胺	0.67

第四节 沉降平衡法

沉降平衡法测定分子量是在低速离心下进行。在低速（7,000—8,000 转/分）的离心条件下，沉降分子向离心池底部移动的速度很小。另一方面，由于溶质分子在沉降时产生了浓度梯度，因而引起了与沉降相反方向的扩散。两个相反方向移动的溶质分子的量，在一定时间内达到平衡状态，（图 4-2）。

在理想的平衡条件下，测得在沉降平衡时溶质浓度的分布，即可以直接计算分子量，并不需要扩散系数。这点与沉降速度法不同。但是，二者都需要溶质分子的微分比容数据

在沉降平衡中，达到沉降平衡时不是形成“坪区”和界面等，而是样品浓度在离心池中从上到下逐渐增大。（图 4-2）。

达到沉降平衡有下列关系式

$$M = \frac{2RT \ln(c_2/c_1)}{(1 - \bar{v}\rho)\omega^2(x_2^2 - x_1^2)} \quad (4-16)$$

c_1, c_2 为距转轴中心距离为 x_1 和 x_2 处的大分子物质的浓度。 ρ, \bar{v}, ω 含义与沉降速度法相同。测定出 c_1, c_2 和 x_1, x_2 即可进行分子量计算。但是，准确测定 c_1, c_2 是比较困难的，必需在仪器正常运转情况下进行，运转一停止平衡即被破坏。这个测定是通过特殊光学系统来进行的，可以在运转情况下测出所需要的数据。

表 4-2 列出部分沉降平衡法测定的结果。

表 4-2 一些沉降平衡法测定的结果^[4]

物 质	由化学方法所得分子量	由沉降平衡法所得分子量
蔗 糖	342.3	341.5
核糖核酸酶	13,683	13,740
溶 菌 酶	14,305	14,500
胰凝乳蛋白酶原 A	25,767	25,670
30-S 大肠杆菌核糖体	—	900,000

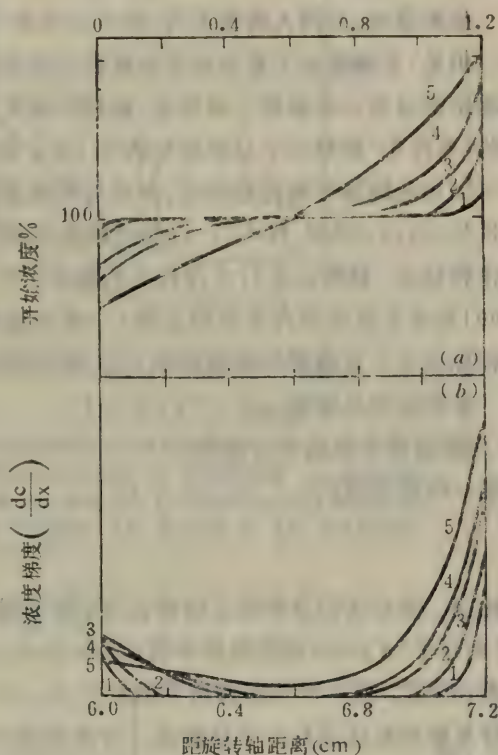


图 4-2 超离心沉降平衡实验时蛋白质浓度(c)和浓度梯度(dc/dx)曲线图^[3]。曲线 1 至 5 是不同时间的曲线。曲线 5 表示达到平衡时的曲线

第五节 凝胶色谱法(凝胶层析法)测定分子量^[4,5]

一 凝胶柱层析测定分子量

柱层析一般使用多聚葡糖凝胶,凝胶在强度上要符合要求,粒度要均匀。根据欲测物质分子量的大小选择好合适孔径的凝胶。将选择好的凝胶在洗脱液中充分溶胀后,抽空脱气,然后装柱。

柱的规格,不同人所用不同,也不必强求一致。一般柱直径与长度之比在 1:25 至 1:50 都可以。但是,对测定分子量来说保证凝胶柱床的内水体积大于 100 毫升是必要的,这样可以减少体积测定的误差。正如第三章所述,装柱时凝胶浓度不宜过大,要防止凝胶结块。柱要装得均匀。柱的“死体积”最好小于总床体积的 0.1%。装好后的柱应是均匀,无节痕,胶面很平整。这样,就可以用洗脱液平衡洗脱柱床,办法与分离层析时相同。洗脱液一般用缓冲液,并含有一定量的无机盐(如:0.05 M NaCl),以防止凝胶对样品的吸附现象产生。用洗脱液充分平衡后的柱子,床体积稳定,就可以进行各种样品的测定工作。先测出柱床的外水体积 V_0 (一般用蓝葡聚糖 2000)和外水体积与内水体积之和(一般用铬酸钾),进而求出内水体积 V_i 。接着可以进行测定各种标准分子量物质的洗脱体积 V_e 。标准蛋白列入表 4-3 中。

$$V_i = V_0 + V_i + V_g$$

V_g 为凝胶固体物质所占体积。

对某一纯物质来讲 $V_e = V_0 + K_d V_i$

$$K_d = \frac{V_e - V_0}{V_i}$$

因此, K_d 值在实验条件固定的情况下,对不同分子量物质来说都有自己的固定值。对全排阻物质(大分子) $K_d = 0$; 对全阻滞物质(小分子) $K_d = 1$ 。在该凝胶有效分离范围内的所有物质的 K_d 值为: $0 < K_d < 1$ 。对某些物质来说也有 $K_d > 1$ 的情况,这是由于凝胶对样品的吸附作用所造成,此时不能用此法进行分子量测定。对球形蛋白质分子来说, K_d 值与分子量对数呈线性关系。 V_e 与分子量对数也呈线性关系。(图 4-3)。可以用这个标准线来求出未知物的分子量。

表 4-3 标准蛋白及其分子量

标准蛋白	分子量	标准蛋白	分子量
细胞色素 c	11,700	过氧化氢酶(单体)	60000
核糖核酸酶	13700	牛血清白蛋白(单体)	68000
肌红蛋白	17200	乳酸脱氢酶	{ 130000 36000
胰凝乳蛋白酶原	25700	β -淀粉酶	215000
胰蛋白酶	23300	过氧化氢酶	240000
羧肽酶 A	34600	黄嘌呤氧化酶	275000
胃蛋白酶	35000	脲酶	483000
卵清白蛋白	45000	甲状腺球蛋白	630000

Andrews^[6]根据他的实验结果,提出了一个经验公式:

$$\frac{1}{R} = \frac{V_e}{V_0} = A - B \log M \quad (4-17)$$

(R 为外水体积与洗脱体积之比)

由(4-17)式可得:

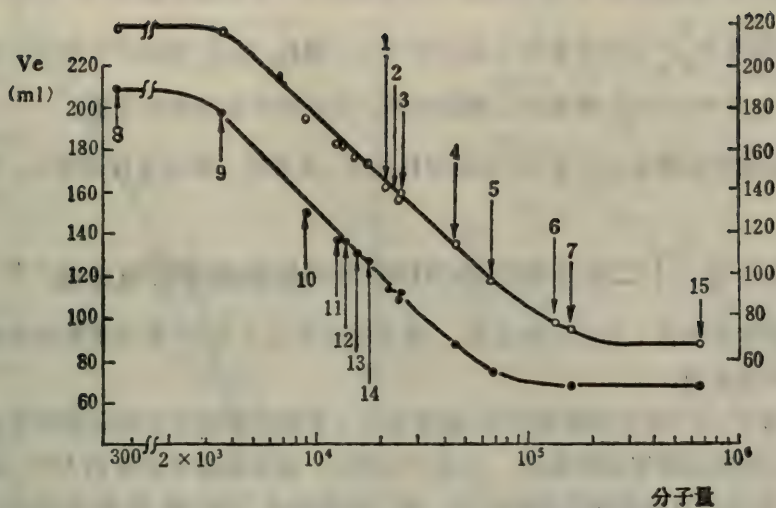


图 4-3 多聚葡聚糖凝胶柱层析洗脱体积对分子量对数作图^[6]

1. 大豆胰酶抑制剂 2. 细胞色素c二聚体 3. 胰凝乳蛋白酶原 4. 卵清白蛋白 5. 血清白蛋白 6. 血清白蛋白二聚体 7. γ -球蛋白 8. 蔗糖 9. 葡萄糖 10. Pseudomonas 细胞色素c-551 11. 细胞色素c 12. 核糖核酸酶 13. α -乳清蛋白 14. 肌红蛋白 15. 甲状腺球蛋白

$$\log M = \frac{A}{B} - \frac{1}{B} \frac{V_e}{V_0} \quad (4-18)$$

(4-18)式中, $\frac{A}{B}$ 和 $\frac{1}{B}$ 均为常数,所以:

$$\log M = a - b \frac{V_e}{V_0} \quad (4-19)$$

由(4-19)式可知,只要测得 V_0 和几种标准样品的 V_e ,用最小二乘法可以求出 a 、 b 二常数。得到常数以后,只要测得未知样品的 V_e ,即可以计算出未知样品的分子量。

用凝胶层析法测定分子量,准确度受分子形状等影响。分子形状为线形或者易与凝胶发生作用的物质(如溶菌酶),不能用该方法测定。

二 凝胶薄板层析测定分子量

凝胶薄板层析装置类似其它薄层层析。只是在制版、展层、点样、检出等方面有所不同。^[7]

全排阻的大分子物质(参考样),在板上迁移速度最快,迁移距离用 d_0 表示。标准样品迁移距离用 d_i 表示。用 R_f 值表示不同分子量标准物质在板上的迁移率。(图4-4)。

$$R_f = \frac{d_i}{d_0}$$

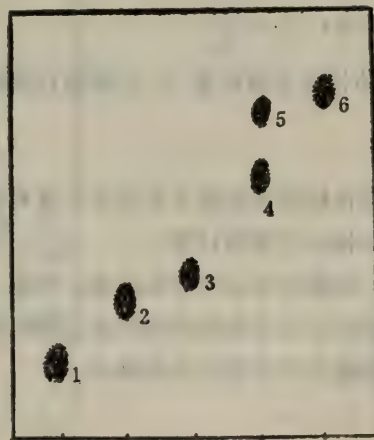


图 4-4 多聚葡聚糖凝胶-G 100 薄板层析图

1. 铬酸钠 2. 细胞色素c 3. 肌红蛋白 4. 牛血清白蛋白单体 5. 牛血清白蛋白二聚体 6. 蓝葡聚糖 2000

在薄板层析中, 迁移距离 d_s 和柱层析中洗脱体积 V_r 成反比关系。因此, 对同一种凝胶来说 $\frac{1}{R_f}$ 与分子量的关系和 $\frac{V_r}{V_0}$ 与分子量的关系是相同的。因此, 用 $\frac{1}{R_f}$ 对 $\lg M$ 作图可以求得分子量。

使用公式 $\lg M = a - b \frac{1}{R_f}$ 用最小二乘法计算, 可以较好的求得分子量。

用凝胶薄板层析法测定分子量, 优点是用样品少, 速度快。缺点是误差较大, 作得好误差可以小于 10%。

第六节 十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[8,9]

电泳方法基本原理第三章已经叙述过。本节主要谈关于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳在测定蛋白质分子量中的应用。

在 SDS 溶液中, 于 100°C 加热蛋白质(通常加入一定量的巯基化合物以还原所有二硫键), 这样把所有肽链之间的连接完全解离开。在这个过程中, 多肽链结合大量的 SDS, 从而带上强的负电荷, 产生了恒定的负电荷对质量的比率。将上述样品在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳时, SDS-多肽复合物的迁移率在一般情况下取决于分子量的大小。由于这个原因, 产生了分子量和电泳迁移率的经验关系。即: 分子量的对数与相对迁移率成一定比例关系。使用已知分子量的标准物作标准线或用算法确定标准线的常数, 即可求出未知样品的分子量。(图 4-5)。

显然, 这种方法测定的是亚单位肽链的分子量。

实验结果处理如下:

$$\text{迁移率: } R = \frac{d_s}{d_0}$$

d_s 为样品迁移距离, d_0 为前沿迁移距离(小分子染料)。

$$\lg M = a - bR = a - b \frac{d_s}{d_0}$$

从几种标准样品的 R 值和分子量对数, 用最小二乘法能较准确的求得 a, b 二常数。从而可进行未知物分子量的计算。

此测定方法主要优点是: 快速, 用样品量少, 并可同时测定几个样品。缺点是误差较大。误差来源主要是由前沿和样品迁移距离的测量而引起。这些又和电泳操作技术有着直接联系, 对实验操作要求还是比较高的。

习 题

1. 说明平均分子量、数均分子量、重均分子量的含义。以渗透压法测得的大分子分子量为什么是数均分子量?
2. 牛血清白蛋白水溶液在温度为 25°C 时, $S_{25,0}^0 = 5.01 \times 10^{-13}$; $D_{25,0} = 6.97 \times 10^{-7}$ 厘米²/秒; $v_{25} = 0.734$ 厘米³/克, 试求它的分子量(M_{SD})?
3. 在用 Sephadex G-200 进行凝胶柱层析时, 标准样品洗脱体积分别为:

	分子量	洗脱体积
牛血清白蛋白	68,000	134.8 ml

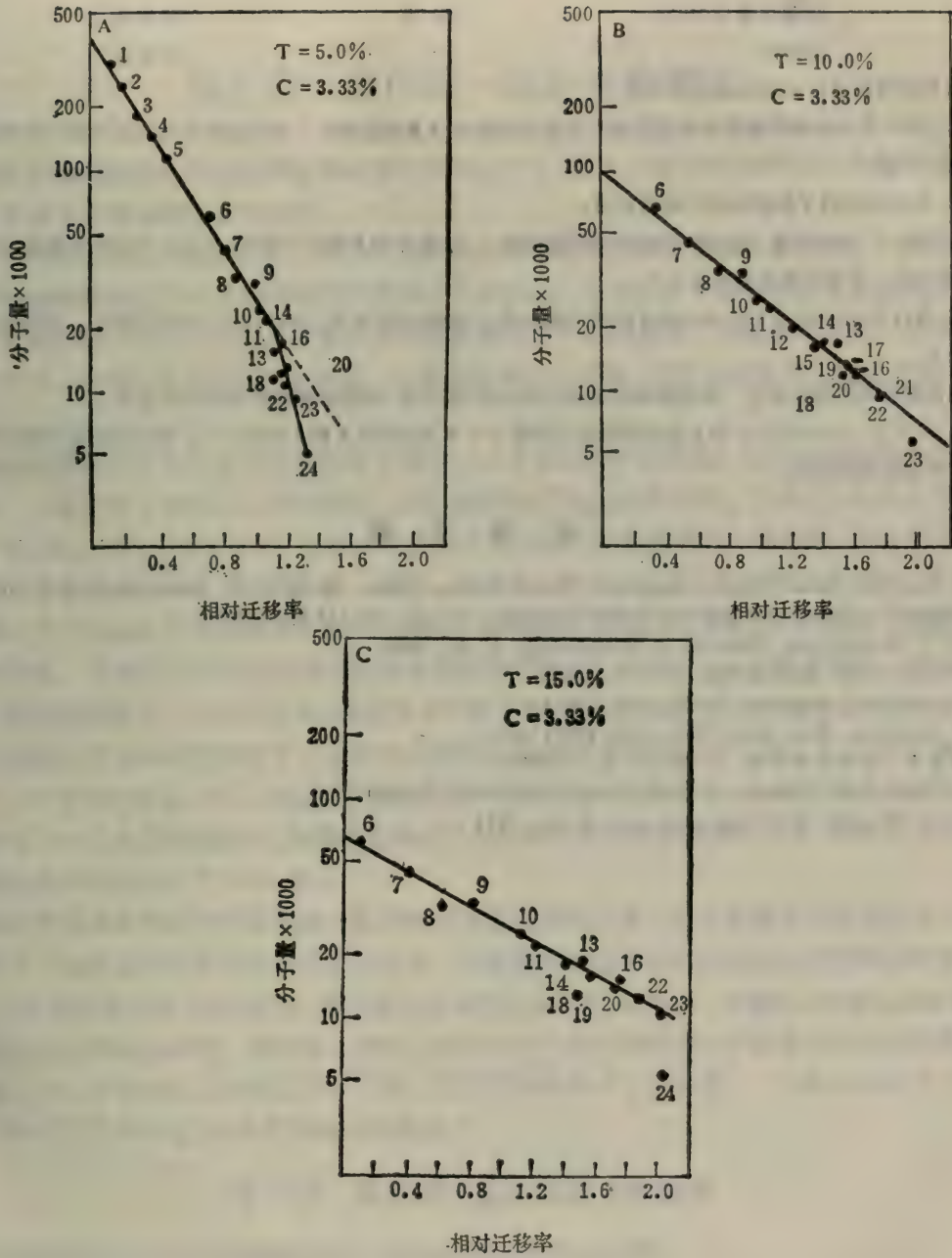


图 4-5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分子量对数与相对迁移率作图^[10]。A. 5%凝胶 B. 10%凝胶 C. 15%凝胶。胶中含有 0.1% SDS

胰凝乳蛋白酶	25,000	170.9 ml
肌红蛋白	17,200	182.6 ml
细胞色素 c	11,700	188.2 ml

蓝葡聚糖 G 2000	200 万	79.5 ml
未知样	?	150.9 ml

试用计算法求出未知样品的分子量。

4. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳是根据什么原理进行分子量测定的？一般圆盘电泳为什么不能只根据迁移率来确定分子量？

5. 给出具有以下性质的两个纯蛋白质：

a. 蛋白 1: 分子量为 100,000 的近似球形蛋白质。由两个亚单位分子量为 40,000 和两个亚单位分子量为 10,000 组成。该蛋白的等电点是 6.0。

b. 蛋白 2: 分子量为 100,000 的近似球形蛋白质。由分子量为 25,000 的单一亚单位组成。该蛋白的等电点是 6.0。

试预测这两种蛋白质在一般圆盘电泳凝胶系统中和在 SDS-凝胶电泳系统中的电泳结果。

6. 公式 $y = a + bx$ 中, x 和 y 是测得数值, 试用 n 个 x 和 y 求得 a 和 b 值的公式, 说明在你进行的工作中那些地方可以用到此公式。

参 考 文 献

1. E. Ken, M. Van, Protein Sequence Determination, Edited by Saul, B. Needleman, P. 6, 1975
2. 刘培楠等, 仪器分析及其在分子生物学中的应用, 第三册, 第 140 页, 1978
3. H. C. Schachman, Methods in Enzymology 4, 32, 1957
4. H. Determan, Experientia, 18, 430 (1962)
5. P. Andrews, Biochem. J., 91, 222 (1964)
6. P. Andrews, Brit. Med. Bull., 22, 109 (1966)
7. 林永齐, 吉林大学学报, 4, 第 147 页, (1979)
8. K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969)
9. H. R. Maurer, Disc Electrophoresis P. 16, 1971

第五章 蛋白质一级结构的测定

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接起来的生物大分子,所谓一级结构(也称为化学结构),指的是蛋白质分子中氨基酸的排列次序。

在生物化学以及相关领域中,不少问题都面临着需要知道蛋白质的一级结构。一级结构的测定对酶活性部位以及高级结构的研究提供了化学基础。此外,对研究生物进化也提供了不可缺少的重要材料。因此,蛋白质一级结构的研究引起了广泛的重视。可以说只有把一级结构研究清楚之后,生物化学工作者才能站到一个优越的地位去洞察、研究生命过程中的许多复杂问题。

生物化学家为了解决这个问题历尽了苦心。二十世纪四十年代初,对蛋白质的结构还知道的很少。当时主要是研究蛋白质的提纯、分离、物理化学及生物学性质。但是,已经有人开始进行这个艰苦的工作。1955年 F. Sanger^[1] 等人首先解决了牛胰岛素的一级结构,胰岛素是由五十一个氨基酸组成的小分子量蛋白质。虽然,目前 F. Sanger 方法已经成为经典方法,很少采用,但是, F. Sanger 所创立的方法奠定了测定一级结构的基础。也增强了人们研究一级结构的信心和兴趣。后来经过方法的改进和提高又很快测定出 RNA 酶的 124 个氨基酸等一些蛋白质的氨基酸的排列顺序。近三十年来,测定技术不断革新,成果不断出现,到目前为止,已经有近千种蛋白质的一级结构研究清楚了。其中较大的蛋白质,如骨胶原组分亚单位之一 1052 个氨基酸残基^[2], β -半乳糖苷酶 1021 个氨基酸残基^[3]等。研究速度也大为加快,如固氮酶铁蛋白每个亚单位含有 273 个氨基酸残基^[4],从确定它的分子量到研究清楚氨基酸排列次序,只用了一年多时间。测定水平远远超过了 1956 年。

能取得迅速进展的主要原因是一系列新技术新方法的出现。其中最重要的是蛋白质、肽的层析技术、电泳技术的发展和新仪器的出现。这些新技术使得我们有可能迅速得到高纯度的蛋白质,并且能够很好地分离、提纯、鉴定蛋白质降解后的大肽和小肽。精确度、速度也越来越高,并能适应微量样品的研究。近年来,液相法多肽顺序分析仪和固相法多肽顺序分析仪更使得顺序研究工作向着自动化方向迈进了一大步。发展迅速的另一个原因是,一级结构的研究工作已经不局限于几个实验室,而是广泛地开展起来了。

第一节 蛋白质一级结构研究的程序

在开展蛋白质一级结构研究之前,首先要知道以下几个问题:

① 蛋白质制剂是纯的吗?

如果蛋白质含有一定量杂蛋白时,一级结构研究结果将是没有意义的。蛋白质顺序研究的工作量很大,因此,开展此项工作之前,对于顺序研究的蛋白质的纯度要求是严格的。一般,要求纯度必须达到 97% 以上。但是,由于纯度的检定方法的局限,有时也可能引起麻烦。例如,在电泳中有的样品出现了两条区带,看来是不纯的,但后来证明这个不纯是假象。许多蛋白质由于

谷氨酰胺或天冬酰胺的侧链易脱落酰胺基而变为羧基，这样在电泳时就显出两条以上的区带。实际上，该样品是可以用来测定氨基酸排列次序的。由于这个原因，纯度的确定应该使用几种指标。

② 活性蛋白质(未变性蛋白质)的分子量多大?

这个数据对于研究蛋白质肽链组成是很重要的。但是，对分子量的要求一般不十分严格。误差小于 10% 即可以。这个数据用第四章所叙述的物理化学方法都可以达到。

③ 活性蛋白质含有多少个肽链? 它们多大? 是相同的吗? 如果不同又如何分离?

知道活性蛋白质的分子量以后,如经过亚单位拆离的程序以后,分子量发生了改变,说明该活性蛋白质可能是由多条肽链构成。下一步就需要确定这些肽链的种类和大小。有两种情况,一种是几条肽链通过非共价键结合组成了蛋白质分子。这种情况一般可以使用蛋白质变性剂即将链与链之间的连接拆开,然后进行分离。另一种情况是两条或几条肽链通过硫硫键连接成活性蛋白质分子。这种情况,就需要事先用化学方法处理(氧化或还原)将硫硫键拆开,然后进行肽链的分离。如果肽链是相同的,就不需要分离手续。

硫硫键在蛋白质分子中是有固定位置的。确定硫硫键在肽链中的位置的工作,亦属于一级结构的工作内容。

经过这个手续之后,就可以进行肽链中氨基酸排列顺序的研究工作。主要有如下一些工作:

- ① 蛋白质或肽的氨基酸定量组成测定。
- ② 肽链的端基测定,包括 N-末端和 C-末端。
- ③ 蛋白质分子中特殊基团的测定。
- ④ 蛋白质亚单位的拆离,肽链的专一性裂解,肽链及肽片断的分离。
- ⑤ 肽的氨基酸排列次序的测定。
- ⑥ 从已知顺序的肽段,复现肽链(蛋白质)的一级结构。
- ⑦ 蛋白质分子中二硫桥及酰胺基位置的确定。

以上这些工作都完成以后,就可以写出所研究的蛋白质的一级结构。

第二节 蛋白质和肽的氨基酸组成的测定

在测定蛋白质和肽的氨基酸排列顺序之前,首先要知道该蛋白质或肽的氨基酸组成。为了测定氨基酸的定性定量组成,首先要把蛋白质或肽水解成游离氨基酸,然后进行测定。

一 蛋白质的水解

酸水解是最常用的方法。一般使用重蒸 5.7 N 盐酸(恒沸点盐酸),在密封的水解管中,于 105°—110°C 进行水解。水解时间一般在 20 小时到 72 小时之间,作几个水解时间,看氨基酸的回收率。在水解过程中色氨酸全部被破坏。谷氨酰胺、天冬酰胺变为谷氨酸和天冬氨酸。胱氨酸变成半胱氨酸。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸也有某种程度的破坏。对这些氨基酸的破坏率,需要用不同水解时间测定这些氨基酸的含量,然后外推到水解时间为 0 时,算得的氨基酸含量,即代表了真正数值。

色氨酸用特殊方法进行测定。

将蛋白质或肽用过甲酸氧化，这时半胱氨酸氧化成半胱磺酸，甲硫氨酸氧化成甲硫磺酸亚砷，再将蛋白质或肽进行水解，测定两种氨基酸氧化后的产物，结果比较可靠。

由于酶水解不能将蛋白质彻底水解成为游离的氨基酸。因此，一般作氨基酸分析时不用酶水解法。

二 氨基酸的定性分析

氨基酸的定性分析一般采用纸层析、高压纸电泳等方法就能够很好地解决问题。也有用硅胶薄板层析等技术。

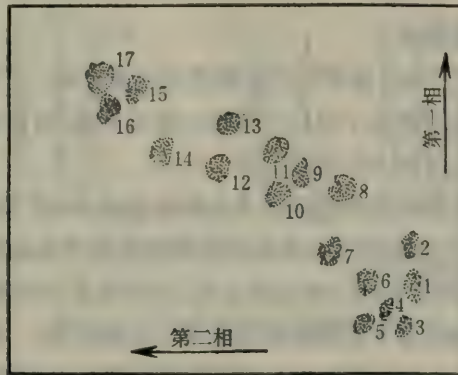


图 5-1 氨基酸的双相纸层析图谱
第一相,正丁醇:88% 甲酸:水=15:3:2
第二相,正丁醇:12% 氨水=13:3



图 5-2 氨基酸的一相纸层析,一相高压纸电泳图谱

用纸层析方法,一般采用双相纸层析。用两种不同溶剂系统(一般,一种是酸性溶剂,一种是碱性溶剂)在同一张纸上,以两个不同方向进行展层,即可以将水解液中大部分氨基酸很好地分开。将纸层析得到的各未知氨基酸斑点的 R_f 值与各种已知标准氨基酸的 R_f 值相对照,就可以基本上确定氨基酸的种类。也可以将斑点从纸上洗下来,用茚三酮显色与已知氨基酸标准线比较进行粗略定量。(图 5-1)

吡啶酮对不同氨基酸能显出不同颜色,用它对层析后的滤纸进行显色,可以根据颜色来区别 R_f 值相近的氨基酸。

如果选用一相用纸层析,第二相用高压电泳进行氨基酸分离,也会得到很好的效果。(图 5-2)

三 氨基酸的柱层析定量测定

构成蛋白质的氨基酸有二十种,要将它们分别作出定量分析,在四十年代是非常困难的工作。自从 Moore 等人^[5,6]成功地建立了用离子交换柱层析分离、分析氨基酸的方法以后,氨基酸定量分析工作的困难局面发生了根本的变化。

离子交换法分离分析氨基酸的基本原理在于各种氨基酸的 pK 值都有一些差异。在一定的 pH 和离子强度条件下,从离子交换树脂上将这些氨基酸洗脱下来的难易就有所不同。因此,可以控制条件将它们逐个分开,然后用茚三酮溶液显色,进行定量比色测定。

离子交换树脂一般使用细粒聚苯乙烯磺酸型阳离子交换树脂。将树脂均匀装成 150×0.9 厘米和 15×0.9 厘米两根柱子。 150 厘米长柱用于分离酸性和中性氨基酸。 15 厘米短柱用于分离碱性氨基酸。长柱操作是:当样品上柱以后,先用 $pH 3.25, 0.2 N$ 柠檬酸钠缓冲液洗脱。当脯氨酸被洗下来以后,立即换成 $pH 4.25, 0.2 N$ 柠檬酸钠缓冲液洗脱,一直到苯丙氨酸洗下来为止。短柱操作是当样品上柱以后,直接用 $pH 5.28, 0.35 N$ 柠檬酸钠缓冲液洗脱。酸性、中性氨基酸首先被集中洗下来以后,氨和碱性氨基酸的峰就逐次被洗下来(图 5-3)。长柱和短柱的层析温度都是 $50^\circ C$ 。氨基酸的定量测定法是用茚三酮溶液显色,然后进行比色测定。

自从出现离子交换柱层析定量分析氨基酸以后,近三十年来,该技术有了突飞猛进的发展。目前在快速、微量、自动化等方面已达到了很高水平。时间上已从数天缩短到几十分钟,样品量从十几毫克减少到少于微克也可以进行测定。现在,氨基酸分析仪已经有二十多种型号投入生产。

但是,大多数氨基酸分析仪仍采用离子交换柱层析进行氨基酸分离,使用茚三酮显色液显色检出。少数也有使用荧光指示剂,用荧光检出器检出。也有使用高效液相色谱对氨基酸进行分析。

图 5-4 是一种氨基酸分析仪的示意图。样品加入层析柱之后,缓冲液借助于微量泵以恒定流速定量地压入恒温的层析柱中,使样品中的各种氨基酸分离。分离后的氨基酸按先后顺序流入混合室,与另一微量泵压入的茚三酮显色液混合。混合液流入在 $100^\circ C$ 水浴中加热的蛇形管中加热显色。显色后的溶液再流入具有波长 $570 m\mu$ 及 $440 m\mu$ 的自动比色测定仪中进行比色测定,同时自动记录。从记录的峰面积可以计算出样品中各种氨基酸的含量。现在有的仪器能够自动运算给出结果。

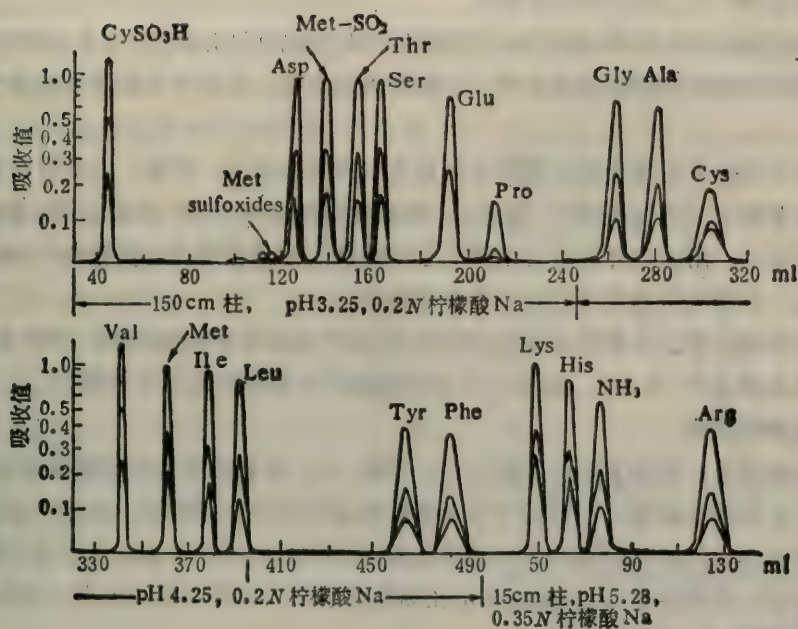


图 5-3 氨基酸的离子交换柱层析图谱

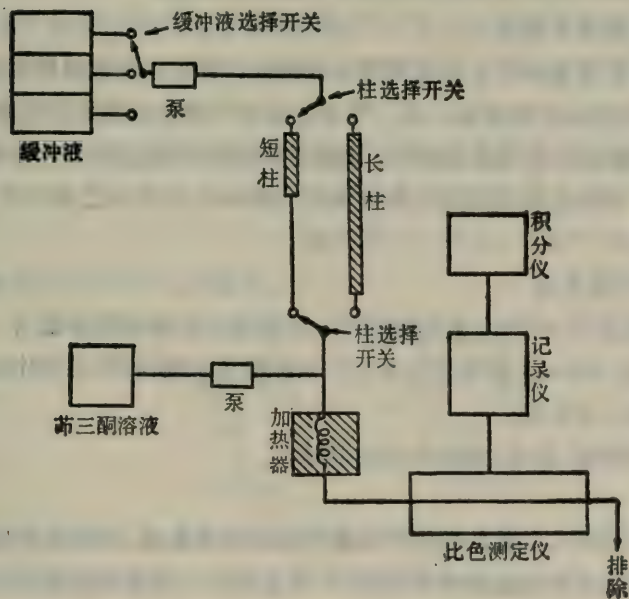


图 5-4 一种氨基酸分析仪示意图^[7]

第三节 蛋白质中特殊基团的测定

在蛋白质一级结构研究过程中,一些基团由于水解等各种原因而被破坏。这些基团如:色氨酸的吲哚基,半胱氨酸的巯基,胱氨酸的二硫键,天冬酰胺、谷氨酰胺和C末端酰胺的酰氨基等。

这些基团的确定对一级结构的研究很重要。

虽然水解时酪氨酸的酚基,苏氨酸、丝氨酸的羟基等也都部分破坏,但是,可根据不同水解时间基团的破坏率外推至水解时间为0时,计算准确的含量。因此本节就不再介绍它们的测定方法。

残基的表示方法可用每个蛋白质分子含有几个残基来表示。但是,有时蛋白质的分子量没有经过测定或者测定的不够准确时,通常以“残基数/100克蛋白质”或者以“氨基酸的克数/100克蛋白质”来表示。用这两种方法表示排除了不精确的分子量造成的模糊和不知道分子量而无法比较的情况。不同人按需要可以进行换算和比较。

如果用固体蛋白样品的重量来进行计算时,必须考虑样品中的盐(灰分)和水分的含量。氮的百分含量一般必须高于13.5%。如果低于此限度就必须除去非蛋白质物质。

一、色氨酸的测定

色氨酸是组成蛋白质的重要氨基酸之一。但是,在一些蛋白质的氨基酸组成的分析数据中经常缺少这个氨基酸的数据。这是由于酸水解时色氨酸几乎全部破坏。测定色氨酸的含量,可使用其它水解方法,如碱水解或酶水解,这些水解不破坏色氨酸。水解液可以用标准的氨基酸柱层析法进行分析。在短柱中,色氨酸的峰位在赖氨酸之前。这种方法的缺点一是比较麻烦,二是水解的也不够完全。

下面介绍两种用显色法直接测定蛋白质中色氨酸的技术。

1. 对-二甲基氨基苯甲醛法

色氨酸的吲哚核在强酸条件下与醛反应生成带色产物可用到色氨酸的鉴定上。在这个反应中,含有色氨酸的蛋白质碱水解液加入对二甲基氨基苯甲醛的浓硫酸溶液中(10%),再加入亚硝酸钠溶液,经一定时间之后,生成蓝的颜色。该颜色的深浅和色氨酸的含量成直线关系。因此,可以进行定量测定。该带色物质的最大吸收值为590 nm。该方法已被广泛使用,并得到了可靠结果。

2. 三价铁(Fe^{3+})显色法

含有色氨酸的样品(2~40 μg 色氨酸即可),与铁离子的醋酸溶液混合,并加入浓硫酸,振荡之后呈玫瑰红颜色,在545 m μ 波长比色测定。用标准色氨酸,按同法制作标准线。反应混合物中的含水量对显色有一定影响。

该方法测定手续简便、快速,线性关系也很好。

二、巯基测定

巯基在蛋白质的结构与功能的研究中比其它基团更为重要,因此更引起人们的注意。一方面是由于有很多化学方法可以修饰该基团,另一方面是由于巯基在酶催化上起着突出的作用。测定巯基有很多方法,还不能说那一方法最好。由于pH、缓冲液、巯基与试剂反应能力以及蛋白质分子的变性程度等因素的影响,必须比较不同方法的分析结果之后才能得出正确的结论。

主要方法有:形成硫醇盐法、烷基化法、比色法等。

1. 形成硫醇盐法: 重金属与巯基反应生成硫醇盐衍生物。

蛋白质-SH + Me^+ \longrightarrow 蛋白质-S Me^+ + H^+ ; 这些金属离子主要有: 银、汞、铜、镉、锌、铅等。

最主要的有银盐、汞盐和有机汞衍生物(RHgX)。

一般,采用不同量的金属离子滴定巯基,并用电位测定法测定过量的试剂。

对氯汞苯甲酸法是常用的方法之一。对氯汞苯甲酸(PCMB)与巯基反应,形成巯基的对氯汞苯甲酸衍生物。它在有效的光谱范围内吸收值增加,如图 5-5 所示:

PCMB 的最大吸收波长在 233 nm,克分子消光值为 1.69×10^4 。与巯基形成硫醇盐以后,增加到 2.2×10^4 。在 233 nm 处的这个差值比在 250 至 255 nm 处的差值小。因此,常用 250 nm 波长进行测定。这个差值与参与反应的试剂量有直接关系。测定时用光谱滴定法,用含巯基化合物去滴定固定量的汞试剂,直至吸收差值不再增加为止。而不是去测定过量的汞试剂。这样根据汞试剂的量可以计算出巯基数量。但是,由于测定是在蛋白质的吸收范围内进行的,因此必须作蛋白质含量对吸收影响的校正。

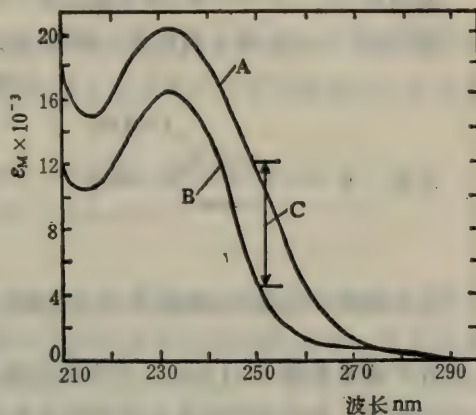
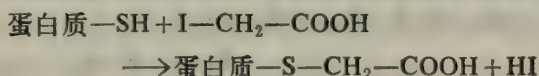


图 5-5 对氯汞苯甲酸及其与半胱氨酸形成硫醇盐的吸收光谱。0.05 M 磷酸盐, pH7.0。A. 半胱氨酸硫醇盐, B. 对氯汞苯甲酸盐, pH 7.0 C. 164% 增值, 250 nm, $\Delta \epsilon_M = 7.6 \times 10^3$

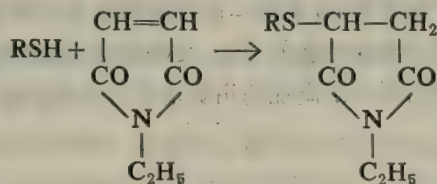
2. 烷基化方法

烷基化试剂(碘代乙酸及盐和溴代乙酸及其盐等)广泛应用于带有巯基酶的化学修饰的研究中。在研究蛋白质结构时,用于保护拆链时生成的巯基,使巯基不能重新氧化为二硫桥。该反应也能有效的应用于巯基的测定。

烷基化试剂可以分为两类,一是带卤素的试剂,它与巯基反应放出氢卤酸:



二是带活性的双键物质,巯基加成在双键上:



第一类最有用的试剂是碘乙酰胺和碘乙酸。巯基与活性卤素化合物反应是双分子亲核取代反应。亲核试剂是高活性硫醇盐离子。然而,氨基、酚基和咪唑基也可能和该试剂反应,但是,只有巯基的烷基化是很迅速的。其它反应可用防止试剂浓度过高和减弱烷基化条件等办法使其减小到最少。

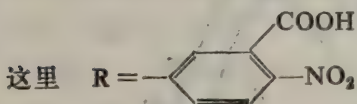
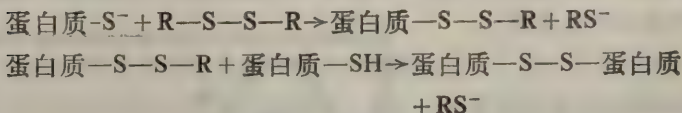
将碘乙酰化的蛋白质进行水解。然后,用离子交换色层分析法测定 S-羧甲基化半胱氨酸的含量,就可以推算出巯基的数目。

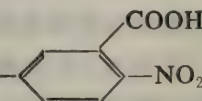
也可以直接测定反应生成的氢卤酸的数目来计算巯基的含量。

3. 比色法

这类方法是根据试剂与巯基反应后生成带色物质来进行测定的。

① 使用 5,5'-二巯基双-2-硝基苯甲酸测定巯基。反应如下：



反应最后产生的 4-硝基-3-羧基硫酚(结构式为 HS-) 在 412 nm 波长处的

的克分子消光系数 $\epsilon = 13600$ 。用半胱氨酸作为标准样品。标准样品和未知样品都于 412 nm 波长进行测定。用已知物的克分子消光系数来计算未知物巯基的含量。

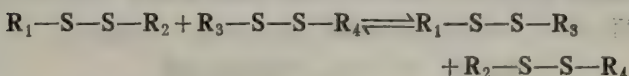
② 萘醌与巯基化合物,如: 巯基乙酸、乙硫醇和谷胱甘肽等有当量加成关系。加成物在 420 nm 左右有一吸收峰。标准物和未知物在相同条件下进行测定。光密度增值与巯基浓度的关系在一定浓度范围内符合比尔定律。

该方法可用于测定有过量巯基乙酸存在时的蛋白质中的巯基含量。

三、二硫键的测定

1. 二硫键的主要反应

① 交换反应: 在一个分子中存在几个二硫键时可以发生交换反应。反应如下:

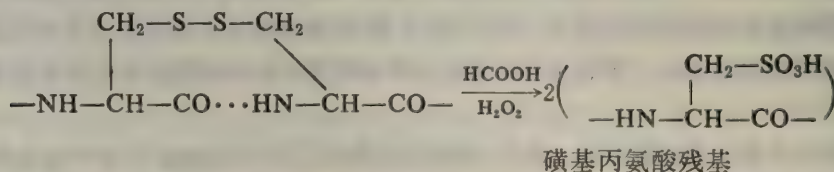


该交换反应对研究工作可能造成如下困难: 不能正确确定二硫桥在蛋白质中的分布; 裂解时使得欲研究的含二硫桥的肽段产率降低; 分离带二硫桥的纯肽也比较困难。

二硫桥的交换反应能被离子化的巯基所催化。交换程度也随 pH 值向碱性范围提高而增大。因此用 pH 值低于 7, 并且将蛋白质中游离巯基用烷基化方法保护起来, 可以将交换反应减至最小或者全部消除。

② 氧化反应

二硫键可以用过甲酸氧化成磺基。反应如下:



在蛋白质结构研究中常常利用此反应。如在氨基酸分析, 肽链的氧化拆离等方面。

③ 还原反应: 二硫键也可以还原成巯基。巯基可用烷基化方法封闭起来。这个反应也很

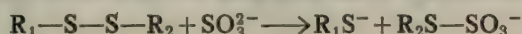
重要。常用于肽链的拆离, 巯基的测定及蛋白质的化学修饰等工作中。

常用的还原剂如: 二硫苏糖醇(DTT), 巯基乙醇, 巯基乙酸等。封闭巯基常用碘代乙酸或碘代乙酰胺。

2. 二硫键的测定方法

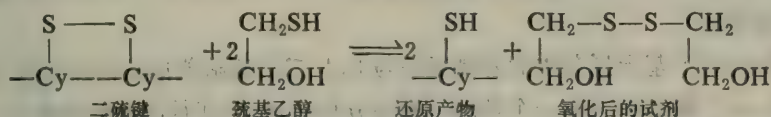
一般采用将二硫键还原成巯基的办法。还原后, 测定还原蛋白质的总巯基数。在还原之前先测得该蛋白质的游离巯基数。可用还原后蛋白质的巯基数与还原前蛋白质的巯基数的差值来计算二硫桥的数目。

当二硫键与亚硫酸钠作用时, 破坏一个硫硫键, 产生一个巯基。反应如下:



此反应生成的巯基数目即等于二硫键的破坏数。

另外, 用高浓度巯基乙醇在 pH 8 至 9 时于室温 1 小时, 二硫键即定量还原成为巯基。蛋白质必须预先用 8 M 脲素或 6 M 盐酸胍变性, 使蛋白质分子变为无规则松散构象, 这样二硫键能充分与试剂接触, 反应完全。反应如下:



此反应是可逆的。因此, 需用高浓度的巯基乙醇(0.1 至 0.5 M)才能使反应完全。测定生成的巯基数就可以计算出二硫桥的数目。

四、氨基和酰胺基的测定

在蛋白质分子中除了 N-末端是游离氨基以外, 只有赖氨酸含侧链氨基。因此, 对蛋白质水解液进行氨基酸分析以后, 测定出赖氨酸的含量就可以很容易的计算出侧链氨基的数目。而酰胺基是不能用这种方法得到的。因为酰胺基在蛋白质水解时转化成游离 NH_4^+ 。通常用氨基酸分析仪不能对这种 NH_4^+ 进行准确测定, 主要是因为其它氨基酸在水解时, 部分分解也放出氨, 使得测定结果偏高。因此, 必须用其它方法另行测定。

1. 氨基测定法

氨基测定最常用的方法是 Van-Slyke 法。此法在第二章已谈过了, 该方法很方便, 但用样品量较大, 不适于微量分析。

使用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS) 鉴定蛋白质和肽中游离氨基, 方法比较灵敏。该试剂在温和条件下与 $-\text{NH}_2$ 定量反应, 产生相应的三硝基苯衍生物。与组氨酸的咪唑基, 精氨酸的胍基等没有反应。氨基的三硝基苯衍生物可用分光光度法定量测定。

2. 酰氨基的测定

测定酰胺, 首先要将酰胺水解成氨, 然后进行测定。水解条件比较温和。可用浓盐酸 37°C 水解 10 天或用 2 N 盐酸 100°C 水解 2 小时。在这些条件下, 酰氨基全部以氨的形式释放出来。随后依水解时间加长氨含量缓慢的线性增加, 这是由于其它氨基酸的分解所造成的。在这种情况下, 为精确起见, 可测定不同水解时间放出的氨量, 然后作图, 将水解时间和氨含量的直线外推至时间为 0 时, 可准确地计算出酰胺的含量, 排除了其它氨基酸分解所引起的误差。

氮量的测定大多数采用修改的 Conway 微量扩散技术直接进行^[8]。将水解液与过量氢氧化钠溶液混合,氨扩散至稀酸溶液中,将含氨的稀酸溶液用茚三酮法显色,比色测定。用钠氏试剂显色也可以。也有用氨基酸分析仪对这种氨进行测定的。

测定酰胺时一定要防止游离氨的污染。样品中的游离氨可以在测定酰胺之前通过多聚葡萄糖凝胶柱脱氨。

第四节 蛋白质和肽的末端测定

肽链末端包括氨基末端,称为N端;羧基末端,称为C端。在写一级结构时,习惯把N端写在左边,C端写在右边。

一、N末端的测定

测定肽链N末端残基的方法主要有:二硝基氟苯法(FDNB),二甲基氨基萘磺酰氯法(DN-S-Cl),苯异硫氰酸酯法(PTH)-Edman法。另外还有氰化物羧氨基化法和氨肽酶法等。本节主要介绍前两种方法。Edman法将在第七节详细叙述。

1. 二硝基氟苯法

1945年F.Sanger^[9]基于蛋白质的游离氨基与2,4-二硝基氟苯反应的特点提出了N端氨基酸的鉴定方法。2,4-二硝基氟苯是一个理想的端基分析试剂,它在很温和的条件下(室温,pH8),就能与蛋白质的氨基反应,生成二硝基氟苯衍生物(DNP蛋白质)。反应如下:

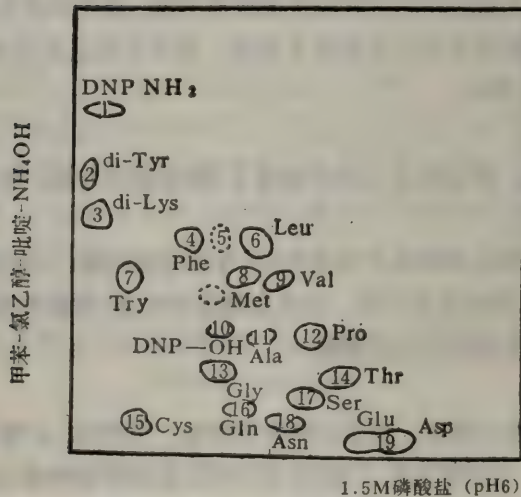
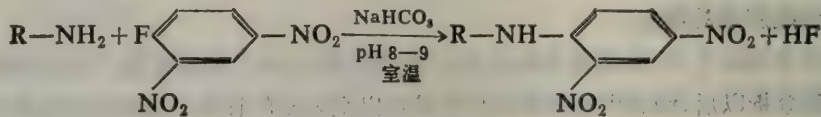


图 5-6 DNP-氨基酸双相纸层析图谱

DNP蛋白质在6N盐酸,105°C,16小时的条件下进行完全水解时,DNP氨基酸被水解下来,并可用乙酰将其从水溶液中抽提出来。(除DNP精氨酸等以外)。N端DNP氨基酸可以用纸层析,薄板层析与标准DNP氨基酸对照进行鉴定。黄色的DNP氨基酸斑点可以用1%的NaHCO₃溶液洗脱下来进行定量比色测定,波长用360nm。在水解过程中,DNP氨基酸的破坏率列表5-1中。

2,4-二硝基氟苯也能与蛋白质中除α-氨基以外的少数其他基团反应。生成物有O-DNP酪氨酸(无色),im-DNP组氨酸(无色)和e-DNP赖氨酸(黄色,醚不溶)。但是,这些并不影响N端氨基酸的分析。

表 5-1 酸水解时 DNP 氨基酸的近似破坏率

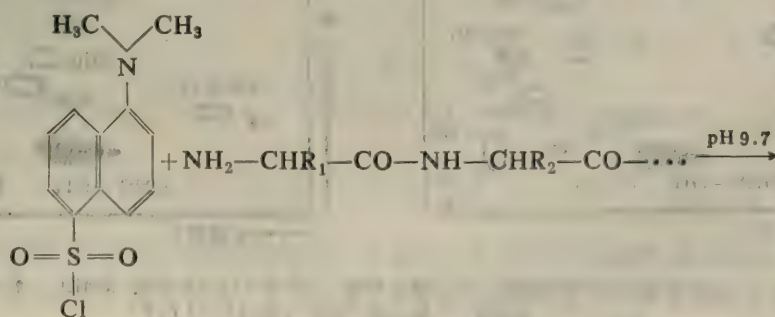
DNP 氨基酸	5.7N 盐 酸 水 解		12N 盐 酸 水 解 .105°C, 16小时 未变化的量%
	水 解 时 间	未 变 化 的 量 %	
DNP 丙氨酸	12	80	75
DNP 精氨酸	12	90	75
DNP 天冬氨酸	24	60	75
双DNP 胱氨酸	12	25	0
DNP 谷氨酸	12	75	75
DNP 甘氨酸	8	40	50
DNP 异亮氨酸	12	80	75
DNP 亮氨酸	12	80	75
双DNP 赖氨酸	8	95	75
<i>ε</i> -DNP 赖氨酸	12	95	75
DNP 甲硫氨酸	12	75	75
DNP 苯丙氨酸	12	70	50
DNP 脯氨酸	2	10	50
DNP 丝氨酸	12	90	75
DNP 苏氨酸	24	90	75
DNP 色氨酸	12	90	0
双DNP 酪氨酸	12	75	50
DNP 缬氨酸	12	80	75

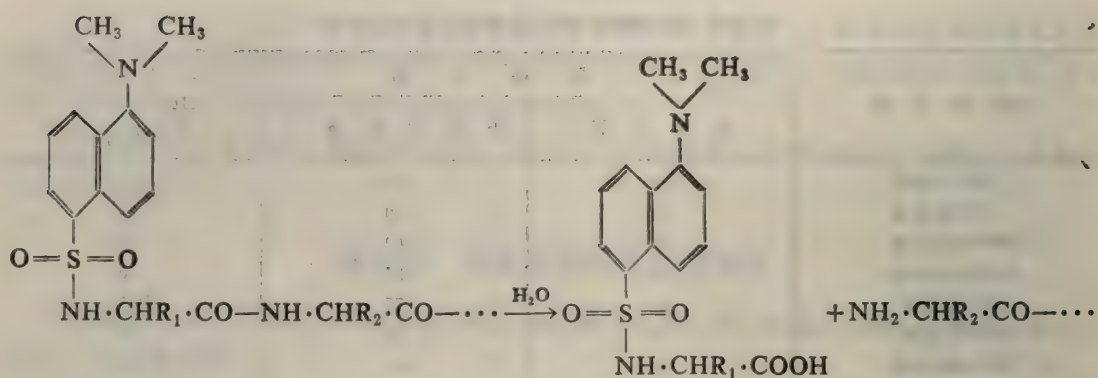
2. Dansyl-氯法

Hartley 等^[10]1956 年报告了 Dansyl-氯与氨基酸、肽或蛋白质的氨基反应产生黄色的荧光。由此产生了测定 N 端的新方法，称 DNS 法。

DNS 法测定 N 端原理与 DNP 法有相似之处。但 DNS 法近年来更为广泛的使用，大量代替了 DNP 法。该方法主要优点是 Dansyl-氯在相当温和的条件下就能与蛋白质和肽链的 N 端氨基反应。反应形成的衍生物除个别的以外都很耐酸水解。DNS 氨基酸在紫外光 (254 nm, 365 nm) 激发下产生黄色荧光，可以进行荧光测定。该方法灵敏度比 DNP 法高 100 倍。如用聚酰胺薄膜层析，每一种 DNS 氨基酸只需 0.05 nm。另外，DNS 氨基酸很适于电泳和层析分离，分辨率和准确度都很高。操作亦比较简单。

反应原理如下：

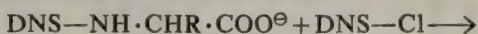




该反应的最适条件为：pH9.5—10.5(0.2M NaHCO₃)，于丙酮—水混合物中(1:1)，37°C—小时即能很好完成。样品量为0.1至1毫微克分子即可。

在上述反应过程中，酪氨酸的酚基，赖氨酸的ε-氨基等也和 Dansyl-氯反应，生成相应的衍生物。但是这些物质不影响N端 DNS 氨基酸的测定。

当在反应混合物中有过量试剂存在时，产生 DNS—NH₂，反应可能如下：



试剂本身被水和氢氧根离子水解也能生成 DNS—OH。DNS—OH 和 DNS—NH₂ 可用 DEAE-多聚葡糖凝胶柱除去。

反应后得到的 DNS 肽可以不必除去 DNS—OH。将样品干燥后，用恒沸点盐酸水解，真空干燥，吡啶溶解样品，然后可将溶液点在聚酰胺薄膜上进行层析(图 5-7)。也可以使用硅胶薄层层析或高压纸电泳来进行。

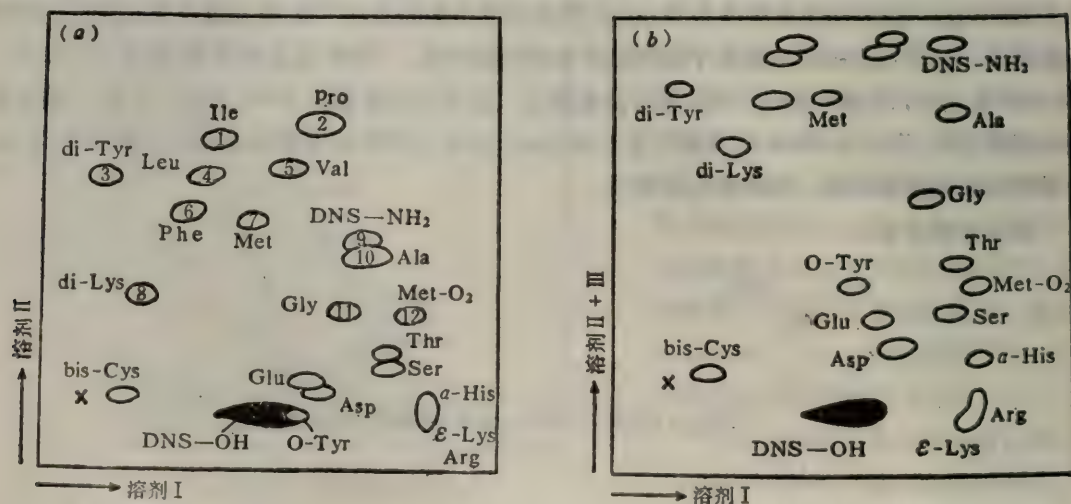
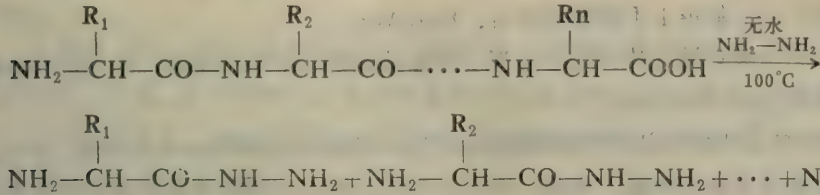


图 5-7 DNS 氨基酸在聚酰胺薄膜上双相层析图谱^[11]。溶剂 I：1.5% 甲酸，溶剂 II：苯—醋酸 (9:1 V/V)，溶剂 III：乙酸乙酯—醋酸—甲醇 (20:1:1 V/V)

二、C末端的测定

测定肽链C末端方法主要有：胍解法，还原C端成醇的方法和羧肽酶水解法等。

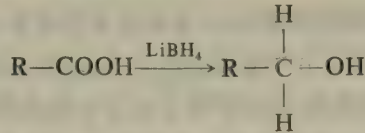
1. 胍解法：当蛋白质与无水胍在100°C反应5至10小时以后，除C端氨基酸以外，所有氨基酸都变为相应氨基酸的胍基。C端氨基酸则以游离氨基酸放出。反应如下：



氨基酸的胍基可与苯甲醛作用变成水不溶的二苯基衍生物。可以用DNP法和DNS法定性或定量测定留在上清液中的C端氨基酸。也可以用层析法鉴定氨基酸。比较好的方法是使用DNP法。反应生成了DNP-C端氨基酸和氨基酸胍基的二DNP衍生物。DNP氨基酸可用碳酸氢盐溶液将其从乙酸乙酯中抽提出来，用层析鉴定。胍解法不能用来鉴定C端半胱氨酸和胱氨酸，因为这两种氨基酸在胍解时分解。必须对其进行氧化或烷基化处理后，再进行胍解测定。

胍与天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺作用产物比较复杂。

2. 还原成氨基醇法：肽链游离羧基可以用硼氢化锂还原成醇：

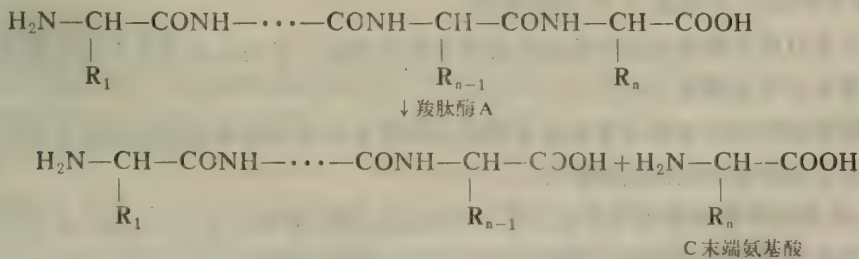


还原后的多肽用酸水解，然后抽提氨基醇，用纸层析或硅胶柱层析分离、鉴定。但是，由于肽链还原断裂也可能产生多余的氨基醇使该方法复杂化。因此，比较少用。

3. 羧肽酶法(羧肽酶A和B)

羧肽酶法是C端氨基酸测定的主要方法。羧肽酶A水解蛋白质或多肽时，是从C端氨基酸开始的。每一次裂解下一个C端氨基酸残基。切下第一个氨基酸以后，还可以继续切下第二个，第三个氨基酸。^[12]

反应如下：



但是，应用羧肽酶A时有一定的局限性。它基本上不能切下甘氨酸，碱性氨基酸。也不能切下脯氨酸或与脯氨酸相连的氨基酸。尽管如此，羧肽酶A仍然是一个很有用的工具酶。它是按顺

序地从C端释放出一个或n个氨基酸残基。从而推断了蛋白质的C末端或C端的几个氨基酸的排列顺序。

羧肽酶A能迅速释放的C端氨基酸有：Tyr、Phe、Try、Leu、Ile、Met、Thr、Gln、His、Ala、Val。较缓慢的释放的C端氨基酸有：Asn、Ser、Lys。很缓慢释放的C端氨基酸有：Gly、Asp、Glu、 CySO_3H 、S-羧甲基化Cys。基本上不能释放的有：Pro、Arg。

羧肽酶B也是一个水解C端的特异酶，它专一的释放碱性的C端氨基酸。它可以作为羧肽酶A的补充。主要水解C端Arg、Lys。

从原理上讲，用这些工具酶可以同时精确地分析出每一种氨基酸释放的相对速度，应当能够解决任何肽链的氨基酸排列次序问题。但是，由于这些工具酶对不同的侧链基团有极不相同的亲合性，比如甘氨酸、脯氨酸和其它几种氨基酸的释放速度很慢或根本切不下来；而亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸等的释放速度又相当快，几乎分不清那个先下来，好象同时发生的一样。这样一来，测定蛋白质和肽的氨基酸顺序并不能以直线方式顺利进行。另外，如果蛋白质不是由一条肽链组成，而是多条肽链的话，用该方法测定C端，对结果的解释就比较困难，因为有时搞不清楚几个氨基酸是从一条肽链上下来的还是从几条肽链上下来的。

定量测定C端的另一个比较好的方法是重氢标记法。

第五节 蛋白质中肽链的拆离和分离提纯

如果蛋白质分子是由几个亚单位组成的，首先要将不同亚单位之间的连接拆开，并进行分离提纯。提纯后的亚单位肽链一般来说分子量亦比较大，目前尚无法直接进行顺序测定，尚需要将大的肽链切成肽段，并将肽段进行提纯，然后才能正式开始顺序研究工作。

一、温和条件拆离亚单位

亚单位之间的联接，多数是以非共价键联接起来的。如：氢键、疏水键、静电引力等。这些键是比较弱的。在温和的条件下可以解离。

1. pH的改变

这是最简便，并且在很多情况下是可行的方法。对蛋白质来讲，解离的临界pH范围大约在pH 3至4(羧基滴定范围)和9至10(赖氨酸——酪氨酸滴定范围)。当滴定蛋白溶液的pH值低于3或者高于10时可能就会引起亚单位的解离。早期醛缩酶的研究就是一个实例。

2. 强变性剂(8 M脲素、6 M盐酸胍等)

大部分蛋白质在脲素或盐酸胍的浓溶液中发生变性。后来认识到这个变性作用有时是由于蛋白质解离为亚单位所致。

使用这种变性剂主要缺点是高浓度变性剂使很多后来的化学和物理研究复杂化。除去变性剂又常常发生重新缔合或无规则聚合。

但是，使用盐酸胍或脲素与还原剂结合(如巯基乙醇)拆离亚单位，拆离以后可以使用凝胶渗透色谱法测定亚单位的分子量。用超速离心平衡法可以更精确地测定在这种条件下的分子量，但是存在一个难题是在这种条件下影响了微分比容的精确测定。

二、二硫键的拆开

如果蛋白质中两条肽链是通过二硫键联接,就需要较强的条件将二硫键切断,拆开肽链。正如前述,切断二硫键主要采用氧化法和还原法。氧化法的优点是切断二硫键以后,肽链不能重新形成二硫键,便于肽链分离。缺点是在氧化过程中,甲硫氨酸侧链被氧化成为亚砷,色氨酸侧链被破坏。另外,氧化产物不能重新还原成为巯基和二硫键。由于存在这些缺点,在拆链时多用还原法。

还原法,即将二硫键还原成巯基,从而切断二硫键。该方法缺点是还原以后的二硫键还可能重新形成。但是,这个问题可以用羧甲基化封闭巯基的办法来解决。常用碘代乙酸(或碘代乙酰胺)进行羧甲基化。根据情况也有使用特殊巯基保护剂或加大巯基化合物浓度的办法来解决巯基重新形成二硫键的问题。

三、肽链的鉴定及分离

用前述方法将蛋白质分子中不同的肽链拆离以后,第一步要作的就是肽链种类的确定。如有不同种类肽链,需设法将它们分离提纯。

肽链种类的确定,一般采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法, N 末端分析法等。这两种方法前面已叙述过。

在作 SDS 电泳时,为防止巯基重新缩合成二硫键,电泳系统中常加入巯基乙醇等巯基化合物。利用末端测定结果也可估计肽链的种类。

肽链分离通常采用离子交换层析(羧甲基纤维素, DEAE 纤维素等),吸附层析(磷酸钙凝胶柱),凝胶层析(多聚葡萄糖等),等电聚焦等方法。这些方法都可以在解离剂存在的条件下进行。

棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白是个多亚基的蛋白质。^[13]将结晶钼铁蛋白以还原法拆开二硫键并羧甲基化。羧甲基化钼铁蛋白在 100 mM 醋酸 (pH 2.9)/8 M 脲素中,于聚丙烯酰胺凝胶上电泳产生了两条区带。经光电扫描,证实两个肽链是等量的。将该样品在 7 M 脲素中于 CM-纤维素柱上分离。洗脱用含 7 M 脲素的醋酸钠缓冲液进行, pH 分别为 pH 4.0、4.6、5.1。用 280 m μ 波长进行检测。两种肽链峰位分别在 pH 4.0 和 pH 5.1 中,得到了很好的分离。再将提纯后的肽链于含脲素的聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳鉴定。证实得到了两种均一的亚单位。这个工作是亚单位拆开和分离的很好实例。

第六节 肽链的部分裂解及肽片段的分离

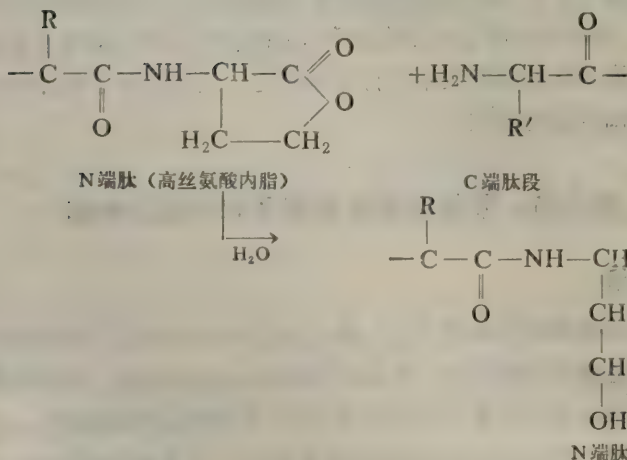
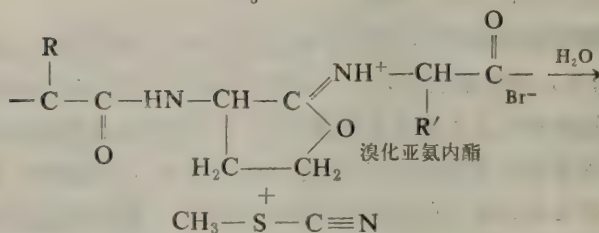
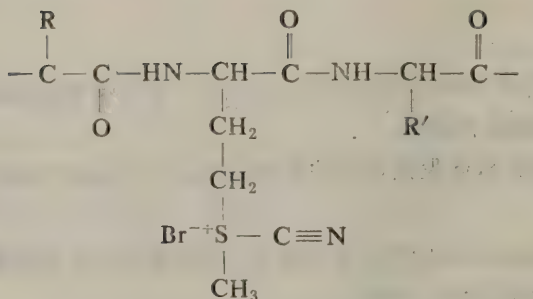
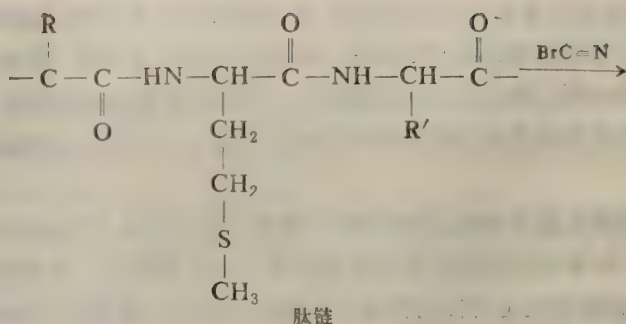
一、肽链的部分裂解

用前节所叙述的方法得到纯的肽链之后,就可以进行肽链的氨基酸排列次序研究。

顺序研究的第一步是部分裂解肽链,将长的肽链切成短的肽段。要求肽链裂解的选择性要强,裂解点少,反应产率高。方法基本上有两大类,即化学裂解法和酶解法。

化学裂解法包括:专一性化学试剂裂解(如溴化氰等),酸水解和碱水解。

1. 溴化氰 (CNBr) 裂解: 该方法是化学裂解方法中最好的方法^[14,15,16]。它与蛋白质中的甲硫氨酸侧链的硫醚基起反应,生成溴化亚氨内脂。此产物与水进一步反应,将肽键断裂。N 端一侧肽段的 C 端成为高丝氨酸内脂, C 端一侧肽段的 N 端不改变。其反应如下:



这一方法的优点是产率高(可达到 85%),专一性强,切点少。

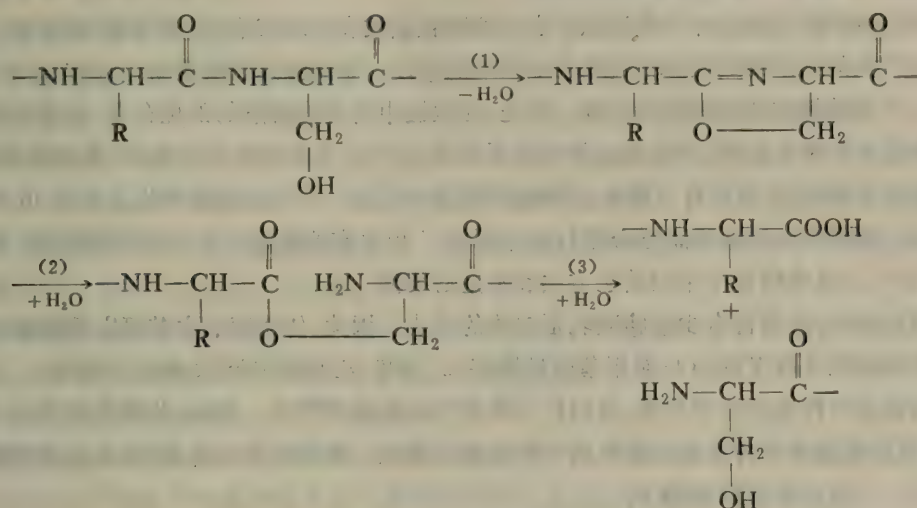
在酸性条件下,溴化氰与巯基反应,但不切断肽键。如巯基事先进行羧甲基化,可以防止此反应发生。

甲硫氨酸侧链如果被氧化成砷或亚砷，上述裂解反应就不能进行。此法是用得最多的方法。

2. 部分酸水解

F. Sanger 早期研究胰岛素的一级结构时使用了稀酸部分水解的方法。当时一般认为酸水解没有什么专一性。所以，酶的专一水解被应用以后，酸水解法就被人们所忽视。后来发现部分酸水解还是有一定的专一性。

酸部分水解一般分稀酸和浓酸两种条件。在稀酸的条件下，天冬氨酸后面的肽键容易断裂。如：Asp-Pro 键在 pH 2.5 时水解相当完全。在浓酸条件下，含羟基的侧链残基右侧肽键容易断裂。反应步骤可以表示如下：



在酸溶液中，二肽的水解也和氨基酸侧链有关系。侧链增加会降低水解率，如(表 5-2)。

表 5-2 在酸溶液中二肽的水解*

二肽	水解相对速度 (Gly-Gly=1)
Gly-Ala	0.62
Ala-Gly	0.62
Gly-Leu	0.40
Gly-Tyr	0.35
Gly-Val	0.31
Leu-Gly	0.23
Leu-Leu	0.48
Leu-Tyr	0.41
Val-Gly	0.15

* 在含等体积的 10% HCl 和冰醋酸溶液中于 37° 水解进行的动力学研究。

酸水解虽然有一定的规律性，但其专一性仍不如其它方法

3. 酶法裂解

用溴化氰裂解法可以得到一套裂解的肽段。但是,用不同方法得到第二套肽段,在进行重叠肽时是非常必要的。另外,在溴化氰裂解中(一次裂解),通常得到较大的肽段(50个氨基酸以上),这样的大肽段不易直接测定氨基酸排列次序,经常需要二次,三次裂解,在这种情况下一般用酶法进行。

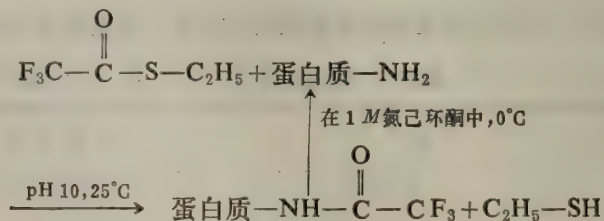
蛋白水解酶对肽键的水解率很高。同时,不同的蛋白水解酶对不同氨基酸形成的肽键水解的专一性也不同。因此,酶法被广泛采用。

在进行酶解之前,一般都要将所研究的蛋白质变性。如用前面所述的变性剂或过甲酸氧化等。变性之后的肽链更容易被酶裂解。很多事实证明,天然的蛋白质和此蛋白质变性之后,用同一种酶裂解,肽链被切断的部位是不同的。

胰蛋白酶切断肽键的专一性最强。它只切断赖氨酸和精氨酸右侧(羧基端)的肽键。因此,裂解之后产生的是以赖氨酸和精氨酸为C末端的肽段。肽链经过胰酶裂解之后应该得到 $n+1$ 个肽段。 n 是赖氨酸和精氨酸的总数。但是,在肽链中若有抗裂解的部位存在,或者裂解产生了游离的赖氨酸和精氨酸时,产生的肽数目就要小于 $n+1$ 。在典型的蛋白质中,赖氨酸加精氨酸约占氨基酸总数的10%左右。因此,用胰酶消化蛋白以后,产生肽段的平均长度为10个左右氨基酸残基。这样大小的肽段正适合进行顺序研究。但也有的样品产生大的不溶肽段,常称为抗胰酶的“核”,在这种情况下采用其它方法裂解是必要的。

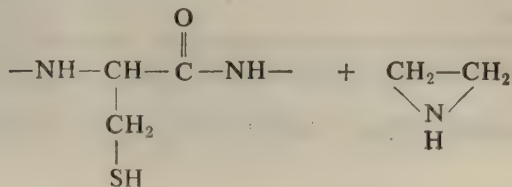
胰蛋白酶中,经常含有少量胰凝乳蛋白酶的活力。因此,使用胰酶之前可以用胰凝乳蛋白酶的专一性抑制剂 TPCK[L-(1-对甲苯磺酰胺基-2-苯基)乙基氯甲酮]处理以后再行。

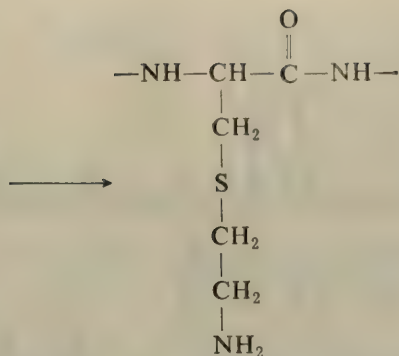
将肽链进行特定的化学修饰,可以扩大胰蛋白酶的使用范围。例如,将赖氨酸的 ϵ -氨基修饰以后,可以用胰酶专一性地水解肽链中精氨酸的部位。修饰的方法有多种,如氨基甲酰化、三氟乙酰化。三氟乙酰化反应如下:



要求结合上去的基团有专一性,如对蛋白质的 ϵ -氨基和 α -氨基应有所不同。为使原基团得以恢复,也要求在温和条件下能够除去此封闭基团。

如果肽链中精氨酸和赖氨酸的数量太少,还可以设法将巯基转化成为S-氨乙基,这样可以增加胰蛋白酶的水解点。S-氨乙基化反应如下:





胰凝乳蛋白酶的专一性虽然较宽,但是,它对具有疏水侧链基团的氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、亮氨酸等)右侧的肽键水解速度要比其它肽键快得多。因此,如果条件控制得好,水解的片段也不会太多。对于一些碱性蛋白质来讲,因为含有赖氨酸和精氨酸的数量多,用胰酶水解得到肽段太多,这种情况下,用胰凝乳蛋白酶水解可以得到适度大小的肽段。

有时由于邻近氨基酸残基的影响,一些非芳香侧链的氨基酸部位也可能水解得快,这就造成有时无法预测水解的部位和生成的肽段大小。另一个问题是胰凝乳蛋白酶中有少量胰酶,这种情况下通常采用 1 mM P-氨基苯脒处理。

胃蛋白酶也是非常有用的酶之一。用合成肽进行研究,确定胃酶可以水解苯丙氨酸、酪氨酸、谷氨酸、半胱氨酸和胱氨酸残基两侧的肽键。反应最适 pH 在酸性范围。由于其专一性很宽,对制备小片段肽是很有用的。

除上述老的水解酶类而外,还有些其它的蛋白酶可用。不久前才在国际市场上出售的 *Staphylococcus aureus* 裂解谷氨酸残基的蛋白酶素可用于二次或三次裂解。

二、肽链部分裂解后肽片的分离

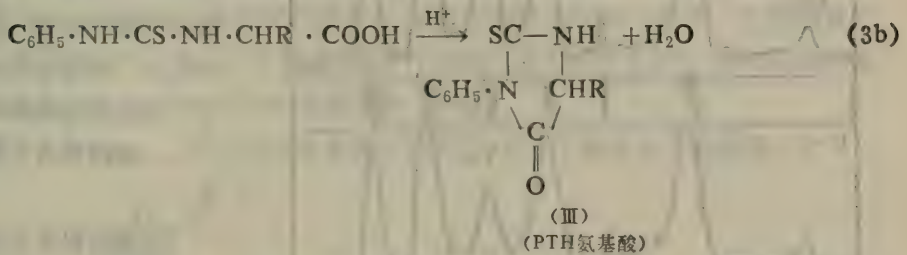
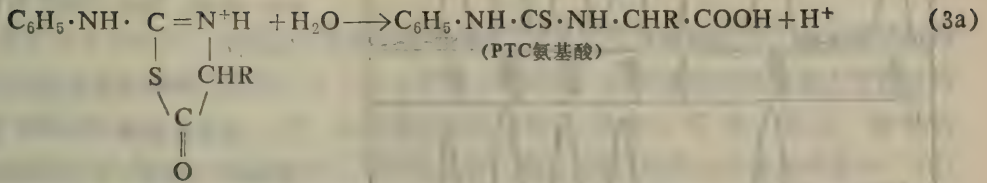
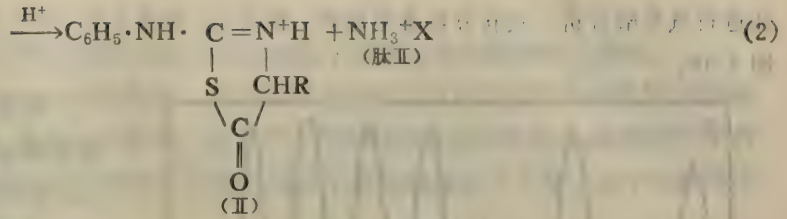
肽链裂解得到肽片的分离提纯工作,全凭实际经验和不断改变方法来解决。这个工作是一级结构研究中最麻烦的工作之一。

一般来讲,可将混合肽通过适当孔径的凝胶柱,按分子量大小进行粗分离。凝胶的型号可参考表 3-7、3-8。经过凝胶柱以后,得到了不同分子量的肽段级分,同时也脱去了样品中的无机盐。对于肽段分子量差异较大的混合物,该方法更有效。

被分离得到的肽段组分,往往需要进行下一步提纯。一般采用离子交换柱层析法。较大的肽段一般用离子交换纤维素或离子交换葡聚糖凝胶。较小的肽片断多用离子交换树脂(如: Dowex 50、Dowex 1 等)。洗脱方式一般用 pH 或盐浓度梯度洗脱法。图 5-8 是用离子交换层析分离肽段的图谱。

肽段的分子量一般较小,脱盐是很困难的。因此,洗脱时一般采用挥发性缓冲液。

用上述方法有时还不能得到纯的肽段,尚需用高压纸电泳、纸层析和薄板层析等方法进一步提纯。这些方法分离效果很好,只是得量很少。特别是一相用纸层析,一相用高压纸电泳的方法,不仅可以用来分离肽段和鉴定肽段的纯度。而且可以从水解得到的肽段混合物的层析-电泳图谱(指纹图)来研究蛋白质结构的差异(图 5-9)。



反应(1)肽的 α -氨基与苯异硫氰生成肽的苯氨基硫酰衍生物(I)。这个反应叫做偶联反应。反应(2)是在最接近被 PTC 取代的氨基酸处的肽键断裂。这个反应在强酸介质中进行,生成 2-苯胺基-5-噻唑啉酮衍生物(II)。与此同时,肽 I 从 N 端去掉了一个氨基酸生成肽 II。肽 II 的 N 端仍是自由的,可以进一步与苯异硫氰反应进行第二步降解。这样就可以从 N 端开始逐次降解下去,进行顺序测定。根据每步生成的 PTH 氨基酸的种类,可以确定氨基酸的排列顺序。该方法也称为 Edman 降解。

在整个反应中,反应(2)生成的 2-苯胺基-5-噻唑啉酮衍生物中的 R 基团取决于肽 I 的 N 端氨基酸。原则上可以用这个反应产物来测定该氨基酸,但是该产物不稳定,能转化成 3-苯基-2-乙内硫酰脲(PTH 氨基酸)。这个转化在酸溶液介质中进行。实际上包括两个反应:一是 α -苯胺基-5-噻唑啉酮衍生物水解生成 PTC 氨基酸(3a);二是 PTC 氨基酸环化生成相应的 PTH 氨基酸(3b)。第一个反应比第二个快得多,实际上可以作为一个反应处理。生成的 PTH 氨基酸是非常稳定的化合物。只有当侧链 R 的 β -碳上有羟基或巯基的时候,才表现出一些不稳定性,出现了 β -消除反应。

反应生成的 PTH 氨基酸可用乙酸乙酯抽提。PTH 精氨酸、PTH 组氨酸、PTH 半胱氨酸留在水相。PTH 氨基酸可用纸层析、薄层层析、气液色谱、高压液相色谱^[10]等方法进行测定。

标准 PTH 氨基酸和降解生成的 PTH 氨基酸都要避光保存,否则会分解。它在紫外光下有强的吸收。吸收峰在 268 nm 左右。

使用经典 Edman 方法在顺利的情况下,可以确定 10 个或更多的氨基酸排列顺序。一般情况下,在每一反应阶段之后鉴定 PTH 氨基酸。但也有时用减去法,即每一反应阶段之后,将未反应的肽水解并进行氨基酸组成全分析,看氨基酸减少的情况。可用氨基酸自动分析仪或纸电

泳进行氨基酸分析。长肽分析多采用第一种方法，对于小肽，后一方法更快速，也比较准确。见图 5-10。

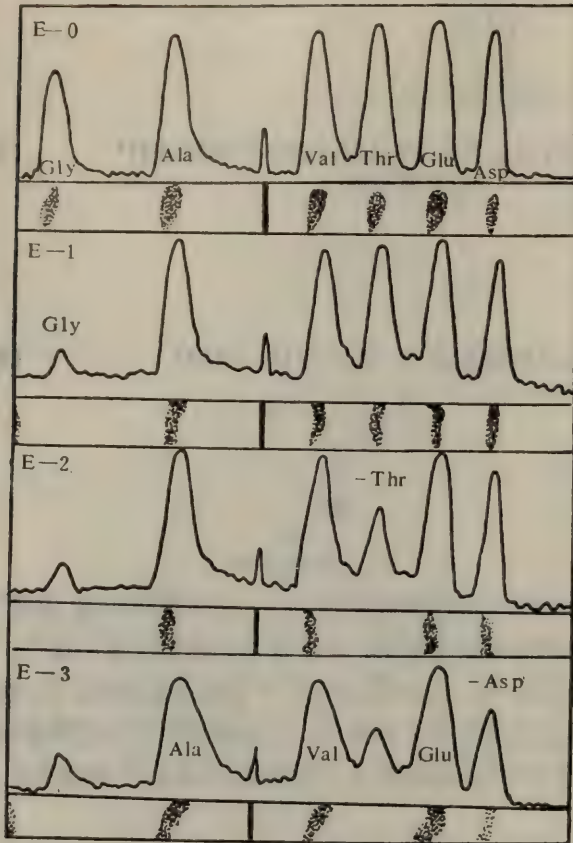


图 5-10 减除分析法用于Edman降解，从溶菌酶分离出的六肽Gly-Thr-Asp-Val-Glu-Ala，原始肽以E-0表示，降解三次为E-1、E-2、E-3。高压纸电泳分离。光密度计扫描测定

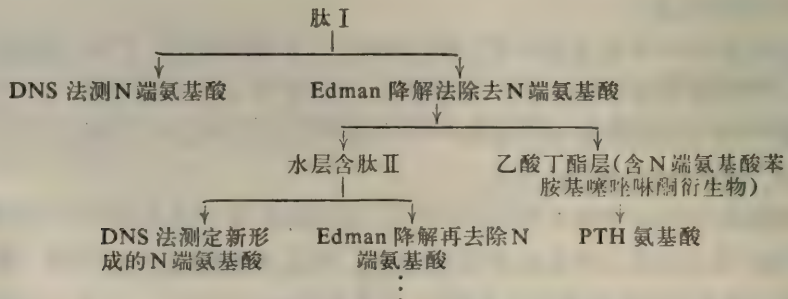
现在固相降解法也比较成功^[20]。将肽通过羧基固定在不溶性支持物上。试剂按顺序通过固相而完成Edman降解。按此方法已设计出了顺序分析仪。

二、DNS-Cl-Edman 方法

该方法原理和DNS法、Edman法相同。但是，将这两种方法结合起来进行顺序研究，更显示出两种方法的优点。将测定的灵敏度进一步提高了。样品用量减少到原方法的十分之一。一毫微克分子的肽即可进行测定。

其测定程序大体如下：将微量样品真空干燥，用水溶解之后取出少量样品，用DNS法测N端氨基酸，确定N端第一个氨基酸；向前述留下的溶液中加入苯异硫氰，在一定的条件下反应之后，干燥，再溶于水中。然后用乙酸正丁酯两次抽提形成的N端氨基酸的苯胺基噻唑啉酮衍生物。这样，脱除了N端第一个氨基酸，第二个氨基酸变为N末端。将上述抽提后的水层真空干燥，重溶于水，再以DNS

法测定N端第二个氨基酸。剩下的溶液再按Edman法将此N端脱除，如此反复测定即可定出从N端起的氨基酸排列顺序。可用下图表示该过程。



三、蛋白质顺序测定仪

顺序测定仪的出现，加速了顺序测定工作，同时减轻了研究人员的繁琐手工劳动。

顺序仪的基本原理就是 Edman 法的原理。仪器的操作关键是反应的溶液和抽提的溶剂涂在旋转的圆柱形玻璃杯内壁上，成为一个薄层。由于大的表面积和稳定的离心力，涂层适合于用另一个互不相溶的溶剂薄膜复盖上进行抽提。同时又适合于离心和减压下干燥。这个办法简化了降解时的许多操作。

图 5-11 是顺序仪示意图。反应贮器是圆筒玻璃杯 A，它被电机 B 带动旋转。由于杯子不断旋转，因此，进入杯中溶液或溶剂迅速在杯子壁上形成一层薄膜。试剂或溶剂通过输入管路 R 进入杯底。抽提溶剂不断上升到杯子上部。在那里将抽提液取出，经流出管路 S 流出。流出的 PTH 氨基酸抽提液用收集器分部收集，然后用气相色谱仪测定。反应杯密封在钟形夹套中，可以抽真空。反应室温度 50°C。试剂和溶剂装在贮器 C 中，通过阀门组 D 与杯子相连。贮器用氮气筒维持恒定的低压。贮器和容器之间压力差恒定，按时打开阀门进入溶剂或试剂，进入的体积是一定的。这样就可以连续不断地实现 Edman 降解的每一步骤。

氨基酸顺序仪对于小肽（如：二肽，三肽）或者很大的肽（50 以上）测定有一定困难。

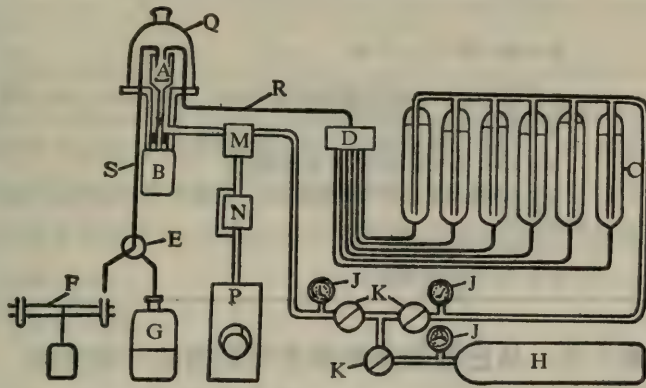


图 5-11 顺序仪示意图

A 旋转杯、B 电动机、C 试剂(或溶剂)贮器、D 阀门组、E 出口活塞、F 部分收集器、G 废液贮器、H 氮气筒、J 压力表、K 压力调节器

四、酶解法测定顺序

在蛋白水解酶中有一类酶能从端基逐个地将氨基酸按顺序切下来。有的酶从 N 端开始（氨肽酶），有的酶从 C 端开始（羧肽酶）。从理论上说，用这两种酶都可以进行顺序测定。但是，实际进行起来却有很多问题。

1. 氨肽酶：氨肽酶是从 N 端降解肽的酶，有许多种。最常用的是亮氨酸氨肽酶 (LAP)。亮氨酸氨肽酶并不是只水解以亮氨酸为 N 端的专一性酶，它普遍水解 N 末端肽键。不过它对各种氨基酸的水解速度不同。N 末端为极性氨基酸时，水解速度慢。N 端第二个氨基酸是脯氨酸时，它不能水解。以芳香族氨基酸为 N 末端时，水解速度仍不算快，而以非极性的侧链基团较大的氨基酸（如亮氨酸）为 N 末端时水解速度最快。由于氨肽酶从肽链中释放出第一个氨基酸以后，不

等到全部肽键都释放完第一个氨基酸,第二个氨基酸也跟着释放出来,这就给鉴定带来麻烦。为了确定氨基酸的释放顺序,需要把释放出的氨基酸的量对时间作图,从图中可以看到各种氨基酸的释放速度,从而推测它们的排列次序。当然,有时也有例外情况,如第二个氨基酸有时与第一个氨基酸释放速度相同就难以解释了。表 5-3 列出几种氨基酶的性质。

2. 羧肽酶:羧肽酶是从 C 端降解肽的酶。用化学方法从 C 端进行顺序研究比较困难。因此羧肽酶的应用比氨基酶多,也显得重要。

常用的羧肽酶有三类,即 A、B、C。其中以羧肽酶 A 最为常用。但是,用它也只能确定 4 至 5 个氨基酸排列次序。其性质列入表 5-7 中。

表 5-3 各种端肽酶及它们的专一性

氨基酶	酶的专一性 A—B	酶来源
亮氨酸氨基酶 LAP HLP 氨基酶 M 亮氨酸氨基酶	A=Ala 最快, A=非极性残基也很快, B=Pro 时 A 不释放。 除一般氨基酸外,也能水解 Pro 及碱性氨基酸。 A:Leu>Phe>Val>Ala A 是极性残基时反应低。	猪 肾 人 肝 猪 肾 眼球水晶体
羧肽酶	酶的专一性 A—B	酶来源
羧肽酶 A	B 是芳香族或长链脂肪族残基时反应快。B 是 Gly, Asn 及酸性氨基酸反应慢。最适 pH 是 5.5。 B 是 Pro, OH-Pro, Lys, Arg 时不作用。	胰
羧肽酶 B(CPB)	B 是 Lys, Arg 时反快,其余氨基酸慢。	胰
羧肽酶 C(CPC)	B 是各种氨基酸包括 Pro 都能作用。但 OH-Pro 不作用。对二肽不作用。	植 物
羧肽酶 Y (CPY)	专一性广,包括 Pro。 A 是 Gly 时水解减慢。	酵 母

第八节 从已知顺序肽段复现肽链的一级结构

前面谈到,为了研究氨基酸排列顺序,将肽链切成肽段。再研究各肽段的氨基酸排列次序。弄清各肽段的氨基酸排列顺序后,就可以从这些小肽段重新构成大肽或蛋白质的一级结构。

但是,实际做起来并不容易。如果长肽链只切成两段,测出两段的顺序,并知道原肽链的 N 末端和 C 末端,就很容易将长肽链的氨基酸顺序确定下来。如果肽链切成三段,只要切口处的氨基酸与原肽链的端基氨基酸不同,也很容易确定原肽链的氨基酸排列次序。如果切点很多,必然会有很多切点处的氨基酸与原肽链的端基氨基酸相同。这样,就必须用两套或几套切肽链的方法。得到两套或几套肽段的氨基酸排列顺序。最后用“重迭肽”的办法确定整个长肽链的氨基酸排列次序。

一、N-端基肽段的确定

以溶菌酶为例说明如何确定 N 端基肽段。Fraenkel-conrat 指出,用还原或烷基化方法不能明显改变天然溶菌酶的分子量。说明天然溶菌酶只存在一个简单多肽链。Schroeder 和 Jolles 用 DNFB 法指出溶菌酶含有一个 N 端基氨基酸。根据用 6 N HCl 部分酸水解的 DNP 溶菌酶,分

离出 DNP 四肽,该四肽的氨基酸排列顺序是 Lys-Val-Phe-Gly。可以确定它是 N 端肽段。Canfield 用胰酶水解溶菌酶以后分离出 18 个肽段。快速胰酶水解得到一个肽的顺序为 Lys-Val-Phe-Gly-Arg。当慢速水解时产生一个肽的顺序为 Val-Phe-Gly-Arg 的肽段,同时有游离赖氨酸产生。综合溶菌酶的这些实验结果,可以确定溶菌酶的 N 端基肽的结构为 H₂N-Lys-Val-Phe-Gly-Arg。

二、C-端基肽段的确定

在蛋白质的 C 端基和 C 端肽研究中,常常使用羧肽酶 A 或 B 分析法。

变性的细胞色素 c 用羧肽酶 A 处理 2、18、40 小时,释放出不同量的各种氨基酸(表 5-4 所示)。

表 5-4 羧肽酶 A 处理粗糙链孢霉细胞色素 c 后残基的释放情况

氨基酸	每克分子细胞色素 c 释放出的微克分子数		
	2 小时	18 小时	40 小时
丙氨酸	0.07	0.37	0.48
苏氨酸	0.04	0.15	0.13
谷氨酸	0.01	0.07	0.07
甲硫氨酸	0.02	0.14	0.16
异亮氨酸	0.01	0.08	0.10
苯丙氨酸	0.00	0.04	0.04

从结果可以清楚看出丙氨酸是该蛋白质的 C 端氨基酸。同时,从其余数据可以预料到从 C 端开始的其余氨基酸的排列次序可能是 The Glu、Met、Ile、Phe。

从促肾上腺皮质激素的研究中,用羧肽酶 A 处理时,氨基酸释放速度曲线如图 5-12。从图中可以确定 C 端肽片顺序为:

——Leu-Glu-Phe-COOH

三、重迭肽

前面叙述了关于 N 端和 C 端肽段的确定问题。那么如何确定中间各肽段的顺序呢?一般的办法是利用两种或几种裂解法得到所谓“重迭肽”,即得到两套或几套不同的肽段。最理想的情况是“重迭肽”的中间部分是另两个肽的 C 末端或 N 末端氨基酸。在“重迭肽”的两侧还有足够多的氨基酸,以免出现模糊的结果。用前述裂解法,如溴化氰裂解,胰酶裂解等,可以得到重迭肽,然后测定“重迭肽”的氨基酸排列次序及 N 末端和 C 末端氨基酸组成。再将“重迭肽”经过排列分析,就能把各肽段连接起来,得到肽链完整的一级结构。

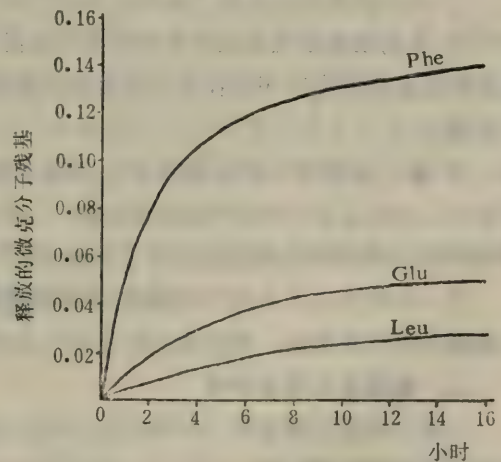


图 5-12 羧肽酶 A 作用于 α -促肾上腺皮质激素,氨基酸的释放速度,以 DNP 衍生物测定

下面是示意性地说明。如果用一种裂解方法得到的肽段是：

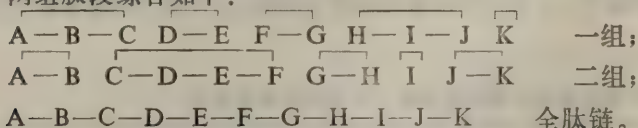
A—B—C、D—E、F—G、H—I—J、K 五个肽段，其中 A、B…J、K 表示氨基酸残基种类。

用第二种方法裂解得到肽段是：

A—B、C—D—E—F、G—H、I、J—K。

显然，一组肽 A—B—C 与二组的 A—B 和 C—D—E—F 重叠。F—G 在 C—D—E—F 和 G—H 肽段的中间。肽段 H—I—J 与 G—H 和 J—K 重叠。二组中的碎片 I 由一组中的 H—I—J 肽段可以确定其位置。K 为 C 末端。

两组肽段综合如下：



这只是为说明方法而假定的情况。第十节中介绍的铁蛋白一级结构测定，是个很好的实例。

第九节 蛋白质分子中二硫桥及酰胺基位置的确定

肽链的氨基酸排列次序测定完成以后，如果该蛋白质分子含有二硫桥和酰胺基时，下一步工作就是确定二硫桥和酰胺基在肽链中的位置。

一、二硫桥位置的确定

确定肽链中半胱氨酸残基是如何搭配成链内或链间二硫桥，需作如下工作：

- ① 确定还原或氧化拆开二硫桥以后的多肽链的氨基酸排列顺序。
- ② 将带有完整二硫桥的蛋白质分子用胰蛋白酶降解。
- ③ 分离含有二硫桥的肽。
- ④ 将分离得到的含有二硫桥的肽进行氧化或还原，切断二硫键。
- ⑤ 分离切断二硫键以后生成的两个肽段，并确定这两个肽段的氨基酸排列次序。将这两个肽段的氨基酸排列次序与在第一步得到的肽链的全部氨基酸排列顺序比较，就可以确定二硫桥的位置。

⑥ 若二硫桥在一条肽链内存在，而且在该肽链内还存在另一个半胱氨酸残基(—SH)时，在未拆开二硫桥之前，可将半胱氨酸残基(—SH)用碘代乙酰胺封闭，而—S—S—不参与此反应。这样可以确定哪两个半胱氨酸形成了二硫桥。

若一条肽链内含有两个二硫桥，用胰酶裂解又得不到含有一个二硫桥的肽段时，可以进一步用胰凝乳蛋白酶裂解。确定它们的位置与前述方法相同。

二、酰胺基位置的确定

在蛋白质基因测定时，如果确定在该蛋白质中含有酰胺基，那末在一级结构研究中就要确定酰胺基的确切位置。

多肽链中的侧链羧基和 C 端羧基有可能以—COOH 形式存在，也可能以—CONH₂ 形式存在。一般来讲， $-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{NH}_2 \end{array}$ 中的一 NH₂ 很容易被分解产生游离 NH₃ 和—COOH。因此，用酸进

行部分水解得不到含有酰胺基的肽段。用蛋白水解酶水解可以得到含有酰胺基的肽段。将这些肽段分离以后，测定其酰氨数量和可能形成酰胺的侧链基团 $(-C \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix} O)$ 的数量(不包括C端)。如果二者数量相等，就可以确定酰氨基位置。如果酰胺基少于一 COO^- 基，就说明有的 $-COO^-$ 基在分子中是以 $-COOH$ 形式存在的。这样仍不能确定酰胺基的位置。再进一步裂解进行确定。

第十节 蛋白质一级结构测定的实例

一、胰岛素一级结构的测定

① 胰岛素的分子量：胰岛素在水溶液中，用渗透压和超离心测得分子量为47,000~84,000。用X-射线测定为36,000。有人认为，这是由于12,000分子量的分子聚合所致。Harfenist用了部分DNP化和逆流分溶法求出分子量为6,000。这个数据和根据胰岛素所含的51个氨基酸计算出来的5,734很符合。两个51个氨基酸的亚单位通过一个锌原子连成102个氨基酸的分子量为12,000的胰岛素分子。

② 氨基酸组成：

Harfenist等使用柱层析法确定胰岛素的氨基酸组成为：Gly 4、Leu 6、Ser 3、Phe 3、Arg 1、Ala 3、His 2、Lys 1、Asp 3、Glu 7、Val 5、Pro 1、Ile 1、Tyr 4、Thr 1、CysH 6。共51个氨基酸。另外，每分子有6个酰胺。

③ 末端分析：

DNP-胰岛素水解得DNP-Gly和DNP-Phe。说明胰岛素分子中有两条肽链，它们的N末端分别为甘氨酸和苯丙氨酸。

④ 氧化拆链：

胰岛素分子中胱氨酸的含量高，推测两条肽链可能是由 $-S-S-$ 桥键连接。用过甲酸氧化能拆成两条肽链证实了这个问题。A链为酸性的，以甘氨酸为N末端。A链不含碱性氨基酸，也无Thr、Pro和Phe。从测得硫含量计算得到其分子量为2,900，每分子有4个半胱磺酸。B链以苯丙氨酸为N末端，所有碱性氨基酸全在这条链中，只有两个半胱磺酸，它的分子量为3,800。

用羧肽酶作用于B链，先放出的氨基酸是丙氨酸，可知B链的C末端为丙氨酸。用羧肽酶作用于A链，得到的C末端为天冬酰胺。总结起来两条链的末端为：

A链 Gly—Asn

B链 Phe—Ala

⑤ 氨基酸的排列次序

F. Sanger等人将分离出来的A链、B链分别进行研究。主要用DNP标记法。用酸部分水解，酶部分水解得到小肽，然后决定A、B链中的氨基酸排列顺序。

在水解过程中，较困难的是B链中存在极性较差的基团(Phe、Leu、Tyr)常常密集在一起，产生许多特别难以分离的非极性肽。其次A和B链中Ser、Thr等具有羟基的氨基酸形成的肽键欠

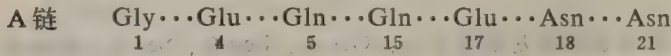
稳定,易破坏,所以需要用酶水解法。在水解过程中,使用酶水解得到较长的肽以后,再进行部分酸水解。然后再确定每个小肽的结构较为合适。

确定A链中氨基酸的排列次序比B链困难。在B链中的 Asp、Ser、Arg 等在整个链中只出现一次,容易解释实验结果。但在A链中半胱磺酸(CySO₃H)、Glu、Leu 出现多次,故需要更多的较长肽才能排列出整条A链的氨基酸顺序。

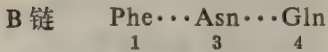
⑥ 酰胺基的数目及其位置的确定

在A链中,有4克分子谷氨酸和2克分子天冬氨酸。而酰胺总数是4个克分子,游离羧基(-COOH)是2克分子。那么4克分子酰胺基到底在那些氨基酸上呢?也就是说6个分子中有4个分子是Gln或Asn,有两个分子是Glu或Asp。如何识别四个酰胺基的确切位置呢?为了弄清这个问题,研究了用胃蛋白酶,胰凝乳蛋白酶部分水解的小肽,推定了有两个天冬酰胺,两个谷氨酰胺和两个谷氨酸。下一步还要弄明白四个谷氨酸中,那两个是谷氨酰胺。

用酶(胃酶、胰凝乳酶和木瓜蛋白酶)部分水解A链,切断第4和第5之间的键、15和17之间的键,分离短肽。然后用酸水解分离出来的短肽,测定酰胺量,从而确定了酰胺基在第5位和第15位的谷氨酸上。分布如下:



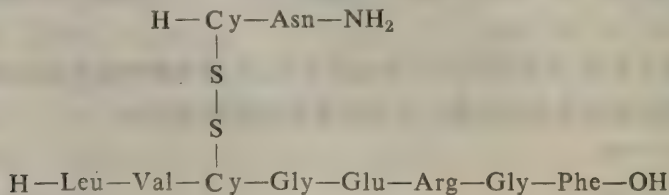
B链有2克分子酰胺,用同样的方法推定了酰胺的位置。



⑦ 二硫桥(-S-S-)的位置

胰岛素分子中的三对二硫桥的位置是用未经氧化的胰岛素分子,经部分水解法确定的。① 在不使-S-S-键切断的条件下进行部分水解。② 分离水解生成的胱氨酸肽。③ 用过甲酸氧化胱氨酸肽使其变为半胱磺酸肽(氧化切断-S-S-键)。④ 分离半胱磺酸肽,确定半胱磺酸肽的结构,从而知道二硫桥在胰岛素分子中的位置。

从胰凝乳蛋白酶水解产物中得到:



用过甲酸氧化此胱氨酸肽,变成两个半胱磺酸肽,再确定两条链的氨基酸排列顺序,由此决定了A链的20和B链的19位构成了二硫桥。

其他两对二硫桥存在于不能被胰凝乳蛋白酶水解的大肽内,需用酸部分水解,然后分离,得到一系列半胱氨酸肽,然后确定它们的位置。

通过上述测定,最后得到胰岛素的整个一级结构如下:

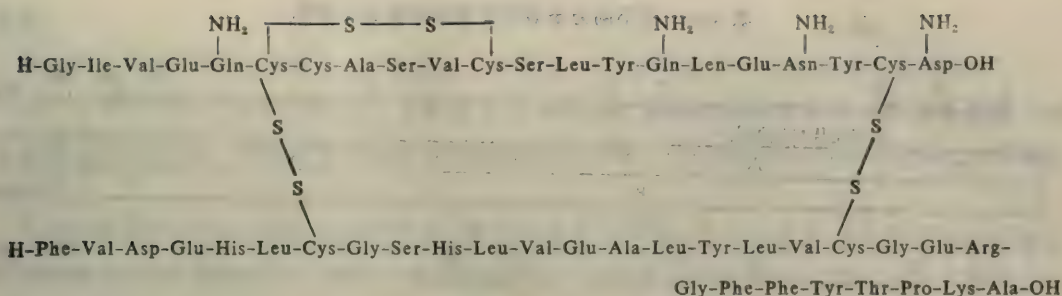


图 5-13 胰岛素的一级结构

二、巴氏梭菌固氮酶组分——铁蛋白的氨基酸排列顺序。

固氮酶是固氮微生物将分子氮还原成氨的酶。棕色固氮菌、巴氏梭菌等固氮菌中都含有这种酶类。该酶由两种蛋白组成——铁蛋白和钼铁蛋白。两种蛋白都已经分离提纯，功能研究也逐渐清楚了。下面只介绍铁蛋白的一级结构的研究工作^[23,24]。

铁蛋白的分子量为 55,000 左右。是一个具有相同的两个亚单位的二聚体。每分子含有 4 个非血红素铁和 4 个酸不稳定硫($S^=$)原子。以 Fe_4S_4 原子簇形式存在于铁蛋白的分子中。每个分子含有 12 个可滴定的半胱氨酸残基^[22]。

① 铁蛋白的羧甲基化：先用 5% 三氯醋酸除掉分子中的铁和酸不稳定硫原子。得到白色的脱铁铁蛋白。因为铁蛋白含有两个相同的亚单位，所以不需进行亚单位的分离，直接用巯基乙醇还原，然后用碘代乙酸进行羧甲基化，得到羧甲基化铁蛋白。

② 羧甲基化铁蛋白的胰酶水解，肽段的分离纯化及顺序研究。

用胰酶水解羧甲基化铁蛋白。水解产物在多聚葡糖凝胶 G-50 柱上进行分级。分离出 T-I、T-II、T-III、T-IV、T-V、T-VI 六个部分。

用阳离子交换柱层析法和纸层析法对上述六个峰进行进一步的分离提纯工作，共得到 25 个纯的肽段。

对这些肽段进行氨基酸分析。这些肽段的氨基酸残基总合为 273 个氨基酸。

③ 肽段的顺序确定：顺序测定工作采用手工 Edman 降解法、顺序仪自动分析法、羧肽酶法等进行测定。测定过程中生成的 PTH 氨基酸用气液色谱、薄层层析法和将 PTH 氨基酸衍生物用 6N 盐酸水解，进行氨基酸分析等办法进行。

C 端测定采用羧肽酶 A、B 和胍解的方法进行。

25 个肽段共 273 个氨基酸残基，确定下来 242 个氨基酸残基的排列次序，占 88.6%。

④ 用溴化氰裂解羧甲基化铁蛋白。用多聚葡糖 G-50 柱层析分级。用纸层析和离子交换柱层析进一步提纯，得到 10 个溴化氰肽段。这 10 个肽段的氨基酸总数也为 273。然后将这些肽段进行顺序测定。测定方法和测定胰酶肽段顺序时所用方法相同。

⑤ 将三个大的溴化氰肽段 (B_3 、 B_7 、 B_8) 分别再用胰酶裂解，用离子交换柱层析分离，共得到 27 个胰酶肽段。并测定它们的氨基酸排列次序。

⑥ 直接用顺序仪测定羧甲基化铁蛋白从 N 端起的顺序，可得到从 N 端起 41 个氨基酸的排

表 5-5 用不同方法裂解固氮酶铁蛋白的情况

1	2	3	9	10	14	15	28	29	30	31
H ₂ N-Met	-Arg	-Gln	-Lys	-Gly	-Lys	-Ser	-Met	-Gly	-Lys	-Thr
顺序仅从N端测定										
	T ₁	↑	T ₂	↑	T ₃	↑	T ₄			↑
			B ₁					↑		B ₂
33	34	40	41	45	46	54	55	61	62	
-Met	-Val	-Lys	-Ala	-Arg	-Leu	-Lys	-Ser	-Arg	-Glu	
	T ₅	↑	T ₆	↑	T ₇	↑	T ₈			
↑		B ₃								
↑	B ₃ T ₁	↑	B ₃ T ₂	↑	B ₃ T ₃	↑	B ₃ T ₅	↑		
74	75	81	82	97	98	105	106			
-Lys	-Glu	-Arg	-Cys	-Arg	-Gly	-Met	-Leu			
	↑	T ₉	↑	T ₁₀	↑	T ₁₁				
			B ₃				↑		B ₄	
B ₃ T ₆	↑	B ₃ T ₇	↑	B ₃ T ₈	↑	B ₃ T ₉	↑			
134	135	137	138	140	141	152	153	154		
-Met	-Pro	-Arg	-Glu	-Lys	-Ala	-Met	-Met	-Ala		
		↑	T ₁₂	↑	T ₁₃					
↑		B ₅					↑	B ₅	↑	B ₇
										↑
										B ₇ T ₁
163	164	167	168	170	171	175	176			
-Lys	-Gly	-Lys	-Tyr	-Lys	-Ser	-Arg	-Leu			
	↑	T ₁₄	↑	T ₁₅	↑	T ₁₆	↑	T ₁₇		
			B ₇							
↑	B ₇ T ₂	↑	B ₇ T ₃	↑	B ₇ T ₄	↑	B ₇ T ₅			
184	185	186	198	199	210	211	213	214		
-Arg	-Lys	-Val	-Lys	-Glu	-Arg	-Ser	-Met	-Val		
	↑	T ₁₈	↑	T ₁₉	↑	T ₂₀				
			B ₇				↑	B ₈		
↑	B ₇ T ₇	↑	B ₇ T ₈	↑	B ₇ T ₉	↑	B ₇ T ₁₀	↑	B ₈ T ₁	
216	217	221	222	238	239	242	243	244		
-Lys	-Ala	-Lys	-Gln	-Arg	-Glu	-Arg	-Lys	-Val		
	↑	T ₂₁	↑	T ₂₂	↑	T ₂₃	↑	T ₂₄		
			B ₈							
↑	B ₈ T ₂	↑	B ₈ T ₃	↑	B ₈ T ₄	↑	B ₈ T ₆	↑		
260	261	266	267	271	272	273				
-Arg	-Leu	-Met	-Gln	-Met	-Asp	-Leu	-COOH			
	↑	T ₂₅								
			↑	B ₉	↑	B ₁₀				
B ₈ T ₇	↑	B ₈ T ₈	↑							胍解

注: T: 胰酶裂解, B: 溴化氰裂解, BT: 先溴化氰后胰酶裂解

列次序。

将上述已知顺序的肽段重迭,可得到整个铁蛋白一个亚单位 273 个氨基酸的排列顺序。

表 5-5 列出不同方法的裂解点。可以清楚看到溴化氰和胰酶裂解的特点。溴化氰裂解点是甲硫氨酸后面的肽键。胰酶裂解精氨酸和赖氨酸羧基肽键。同时也表现出两种方法结合裂解的优越性。

固氮酶铁蛋白的氨基酸排列次序测定,概括起来有如下特点: ①基本上只采用两种裂解方法,专一性好,切下肽段整齐,两种方法相互配合; ②肽段分离提纯的比较好,能将裂解出来的肽段全部提纯,进行结构测定,这样就不需要寻找更多的裂解方法; ③顺序测定能很好的将手工操作(Edman 降解)与用顺序仪自动分析结合起来使用。

第十一节 蛋白质一级结构研究展望

自从 F.Sanger 创立一级结构测定方法以来,近些年来,在方法学上主要是力图在自动化和微量方面取得进展。由于与蛋白质有关的各方面的研究都要求尽快地知道蛋白质的一级结构,所以测定的自动化是首要任务。1967 年 Edman 降解法液相自动分析装置的问世是一级结构研究的巨大进步。此后为了弥补液相法的缺欠,又发展了固相自动分析装置。现在,二者并用对解决大肽的氨基酸顺序的能力大大提高了。鉴定每个氨基酸残基所需的时间,包括 PTH 氨基酸的鉴定在内也只需二小时左右。可以预料不久可能达到一小时测定一个氨基酸残基的水平。应该认识到,在实际工作中对测定的微量化的要求比对自动化的要求更迫切。比如测定磷酸化酶的 841 个氨基酸残基需 40—50 克样品。这样大量的样品对大家正在热烈讨论的某些膜蛋白、激素、受体、补体来讲是很难筹集的,一般只能得到微量,因此急切地需要实现更高水平的分析。比如分子量为 50,000 的蛋白质,全部结构分析用 50 毫克样品或更进一步用 5 毫克样品能完成全部分析是当前努力的方向。

另外,X-射线结构分析用于一级结构研究之中也颇有趣味。若能得到优质的蛋白质结晶,达到 2 Å 分辨率是不十分困难的。2 Å 的分辨率可以鉴定肽链 75% 的氨基酸残基。看来,对能进行 X 光结构分析的蛋白质不一定都需要以化学方法进行整个结构的测定,相当一部分数据可以来自 X-光结构分析。但由于并非所有蛋白质都能得到好的结晶,所以 X-光结构分析法在一级结构分析中能发挥多大作用还不好预料。

GC-MS 法(气相色谱-质谱法)的发展很引人注目。GC-MS 法主要使用酸分解,使多肽部分分解,然后把小肽变成挥发性诱导体,用 GC-MS 法分析后,与计算机连接得出小肽的排列顺序。目前 40 个残基的肽已用 GC-MS 法测定了。另外,对于用 Edman 降解法难于处理的 N 末端闭环肽也有效,此法将来必定会被广泛应用。

第十二节 蛋白质的一级结构与生物进化

生物体内存在着各种各样的蛋白质,每种蛋白质都有着特定的一级结构和空间结构,并完成它在生物体内特定的功能。所谓结构与功能的关系,一般并不单指一级结构与功能的关系,还包括了立体结构的效果。一条长的肽链,若不是在三度空间中有一定的排布,按一定的方式折叠和

卷曲的话,很难理解蛋白酶的催化特异性及其作用原理。因此,不打算在这一节中谈一级结构与功能的关系,结构与功能的关系留待第八章以后叙述。此处仅就一级结构与进化略加介绍。

研究生物进化的经典方法是依靠分类、形态。对微生物来讲,主要依靠生理。对于古老的进化过程,依靠古生物的化石。这些化石是地球上的生物死亡、灭种多少万年、亿年的生物痕迹,就是根据它们的形态和现在的种类相比较,看出生物是怎样从简单到复杂,怎样从原核到真核,从单细胞到多细胞;真菌、动物、植物又是怎样演化的等等。但这种研究方法有一个很大的困难,找到简单的生物化石很不容易,微生物的化石就更不易找到。找出来以后在形态上进行鉴别和分类也是一个难题,当然要进行生理上的分类更没什么办法。因此,生物进化较近期的知道得清楚些,而远期的就比较模糊,更远的就说不清了。由于近代分子生物学的飞速发展,人们能够从分子水平认识许多生命现象,这对生物学的各个领域都有很大促进,各个学科也都从不同的角度和分子生物学接触。生物进化的研究就是其中一例。比较研究各种不同来源的蛋白质一级结构对生物进化的研究有很大帮助。目前已经对50几种不同来源的细胞色素c进行了化学结构的测定,其中包括脊椎动物、某些无脊椎动物、酵母和较高等的植物等。这50几种细胞色素c虽然其来源不同,但具有同样的生物功能:第一,所有细胞色素c都与哺乳动物或酵母的细胞色素氧化酶发生当量反应。虽然一般不把细胞色素c列为酶类,但它也具有酶的专一性特征。它是细胞色素氧化酶的专一性还原酶。第二,所有这些细胞色素c的氧化还原电位都是+250 mV左右。第三,对所有这些不同种属的细胞色素c、其氧化态和还原态的吸收峰相同。从这三点来看,在长期的进化过程中,细胞色素c的功能和构象并没有发生重大的变化,不管是高等的哺乳动物的细胞色素c,还是低等微生物的细胞色素c其结构和功能基本类同。如果从一级结构氨基酸排列顺序上加以

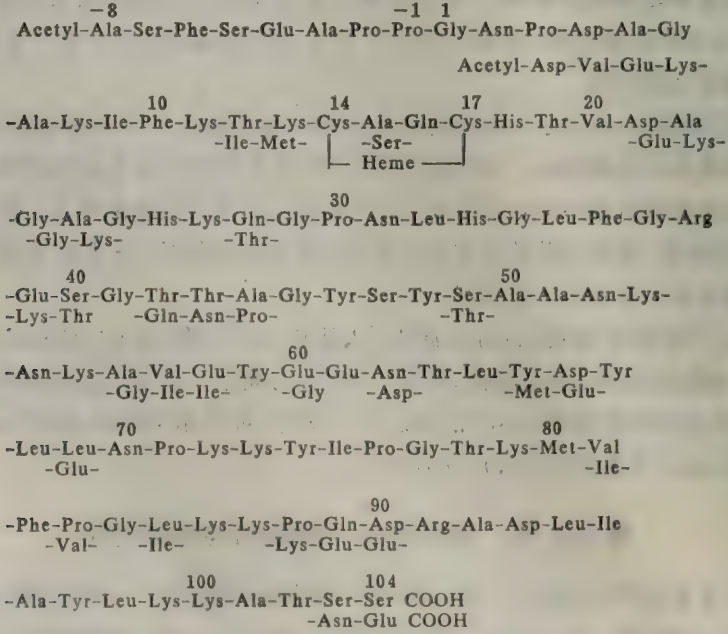


图 5-14 小麦细胞色素c(胚乳)的氨基酸顺序(上)和人心细胞色素c(下)的不同之处。脊椎动物细胞色素c没有-1到-8一段。

说明就更清楚了。图 5-14 比较了人心细胞色素 c 和小麦胚乳的细胞色素 c 的氨基酸排列顺序。虽然一个来源于人,另一个是植物,但两者的一级结构有 69 个位置相同。如果更多地比较各种不同来源的细胞色素 c,也同样发现不仅功能相同,而且氨基酸顺序也大部分相同。这说明细胞色素 c 有一个共同的祖先。在比较各种不同来源的细胞色素 c 时还应注意结构上的两个特点:第一、血红素以共价键和第 14 号和第 17 号的半胱氨酸残基相连,这一点对所有种属的有机体都一样。第二、细胞色素 c 的 N 末端是乙酰化的。脊椎动物的细胞色素 c 是 103 或 104 个氨基酸残基,而无脊椎动物、酵母、高等植物等都有一段额外的 N 端肽段。这种链长的缩短是生物进化的一个结果。这种情况也普遍适用于其他类蛋白质。看来,这额外的一段肽对细胞色素 c 的功能没有什么影响,因此在生物进化过程中去掉了。

如果把各种不同来源的细胞色素 c 同人的细胞色素 c 相比较时,可以清楚地说明进化过程。种属和人越接近,在一级结构上相差也越少。如表 5-6 所示。

从表 5-6 可见,人和黑猩猩的细胞色素 c 氨基酸顺序完全一致,而和猴差了一个氨基酸,其他哺乳动物与人的差别就越来越远了,牛、猪和羊与人差了 10 个,而小麦和人差了 35 个,酵母差 44 个。这清楚地说明了生物进化从低等到高等的基本规律。

表 5-6 与人细胞色素 c 相比较所差的氨基酸残基数目

种 类	数 目	种 类	数 目
黑猩猩	0	响尾蛇	14
恒河猴	1	海龟	15
兔	9	金枪鱼	21
袋鼠	10	狗鱼	23
鲸鱼	10	小蝇	25
牛、猪、羊	10	蛾	31
狗	11	小麦	35
驴	11	粗糙链孢霉	43
马	12	酵母	44
鸡、火鸡	13		

习 题

1. 氨基酸定量分析中,为什么不用紫外分光光度计直接测定,而要用茚三酮显色?色氨酸的含量为什么要用特殊的方法?
2. Folin 试剂显色,茚三酮显色,双缩脲反应本质上有什么不同?各有什么特点?
3. 氨基和酰胺基有什么不同?测定方法又有什么差别?
4. 什么是巯基?巯基有什么性质?巯基和二硫桥有什么关系?
5. N-末端测定采用那种方法最好?为什么?
6. 拆开肽链和切断肽键在本质上有什么不同?主要使用些什么方法?
7. 肽链分离的主要方法是什么?都根据什么原理?
8. Edman 降解法的基本原理,反应的主要步骤和条件是什么?
9. DNS 法和 Edman 法是怎样结合起来用于顺序测定的?有什么优点?

10. 水解肽A时,发现其含有等量的 Arg,Val,Tyr,Glu,Lys,Ala 和Gly 七种氨基酸。

a. 用胰酶水解肽A时,得到如下物质:Arg, Ala—Lys 和含有 Glu,Gly,Tyr,Val 的肽B。用胰凝乳蛋白酶水解肽B,产生两个二肽:Val—Tyr 和 Glu—Gly。

b. 肽A用羧肽酶短时间处理产生游离 Gly 是第一个可鉴定的氨基酸。

c. 肽A用FDNB法分析N端氨基酸产生出 DNP—Ala。

问:该肽A的氨基酸排列次序是怎样的?

参 考 文 献

1. F. Sanger, E. O. P. Thompson, *Biochem. J.*, **53**, 366 (1955)
2. P. P. Fietzek, K. Kühn, *International Review of Connective Tissue Research* (ed. D. A. Hall, D. S. Jackson), **7**, 1, Academic Press, New York—San Francisco—London 1976
3. A. V. Fowler, I. Zabin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 1507 (1977)
4. M. Taraka, M. Haniu, K. T. Yasunobu, L. E. Mortenson, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7093 (1977)
5. A. T. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **178**, 53, 79 (1949)
6. A. T. Moore, W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **211**, 893, 907 (1954)
7. P. E. Hare, *Protein Sequence Determination* Edited by Saul B. Needleman, **220**, 1975
8. E. J. Conway, *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, 4th ed., p. 90, London 1957
9. F. Sanger, *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945)
10. B. S. Hartley, V. Massey, *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 58 (1956)
11. K. Narita, H. Matsuo, T. Nakajima, *Protein Sequence Determination* Edited by Saul B. Needleman, P. 52, 1975
12. R. P. Ambler, *Methods in Enzymology*, Vol XXV (eds. C. H. W. Hirs, S. N. Timashef) **143**, 262, 1972
13. R. H. Swisher, M. L. Landt, F. J. Reithel, *Biochem. J.*, **163**, 427 (1977)
14. E. Gross, B. Witkop, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1510 (1961)
15. A. B. Edmundson, *Nature*, **198**, 354 (1963)
16. J. Heller, E. L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3165 (1966)
17. P. Edman, *Nature*, **177**, 667 (1956)
18. P. Edman, *Acta. Chem. Scand.*, **10**, 761 (1956)
19. E. Jacques et al., *J. Chromotogr.*, **155**, 436 (1978)
20. G. R. Stark, "Recent developments in Chemical modification and Sequential Degradation of Protein" *Adv. Protein Chem.*, **24**, 261, 1970
21. P. Edman, G. Begg, *J. Europ. J. Biochim.*, **1**, 80 (1967)
22. W. G. Zumft, L. E. Mortenson, *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 1—52 (1975)
23. M. Taraka, M. Haniu, K. T. Yasunobu, L. E. Mortenson, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7081 (1977)
24. M. Taraka, M. Haniu, K. T. Yasunobu, L. E. Mortenson, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7089(1977)

第六章 蛋白质的化学合成

最早实践人工合成肽类物质的是 E. Fischer^[1]。早在本世纪初,他就想从氨基酸出发以有机合成的方式合成生理活性物质。但是当时所使用的氨基保护基团是乙酰基,苯甲酰基等,在去除这些保护基团的同时,肽链本身也发生断裂。因此,要想顺利地合成多肽,必须首先解决合适的保护基团问题。1932年 M. Bergman 和 L. Zerva^[2]首先使用了苯甲氧羰基($C_6H_5-CH_2-O-CO-$, Z)保护氨基,此基团可在温和条件下除去。利用这个保护基团合成了许多合成底物,这对阐明蛋白水解酶,如胰酶、胰凝乳蛋白酶等的特异性起了决定性作用。因此,可以说 Z 基团的出现代表了肽的合成化学的第一个发展时期。

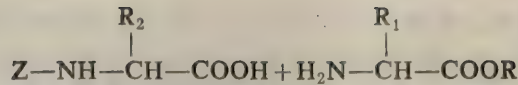
五十年代初期^[3], Th. Wieland 等人先后报导了羧基的活化方法:活化酯法和混合酸酐法,使肽的合成化学进入了一个大发展时期。1953年 du Vigneau 合成了催产素^[4]。1963年 R. Schwyzner 合成了 ACTH。在 1965 年中国科学家在世界上首先合成了牛胰岛素^{[5][6]}。从结晶形状、活力以及其他各项指标来看,确证合成的是天然牛胰岛素,从而使得肽的合成化学发展到又一个新的阶段。美国和西德的两个研究组也在此后不久发表了牛和羊的胰岛素合成结果^[7,8]。在这段时期内,合成的多肽激素达百余种,在保护基团的使用上,形成肽键的方法上都积累了不少经验。上述合成结果都是在有机溶剂中所进行的均相反应,因此叫作液相合成法。目前可以说,液相合成法在合成分子量不太大的多肽时,是比较成功的,但是当人们试图合成更大的蛋白质时,虽然也可以合成到底,但产物既不能表现全部活力,也不能结晶,因此都不能算作最后完成合成工作。我们把这一段看成第二个发展时期。

另外,六十年代初期蛋白质生物合成机制已经基本清楚,反应是在溶液相和固相之间进行的。可能是在这个科学成果的启发下, R. B. Merrifield 在 1962 年建立了固相合成的新方法^[9]。此法简单、快速。使人们看到了以简便的方法合成大的蛋白质的可能性。固相合成法曾一度吸引了人们极大的注意,也出现了不少固相合成多肽和蛋白质方面的报导,如牛胰岛素, 124 肽的核糖核酸酶^[10]等结果。其中小肽的合成是很成功的,但对大的蛋白酶的合成由于无法保证其纯度,都未能达到天然物质的全活力,如牛胰核糖核酸酶只达天然活力的 7.8%。在固相合成法发展的同时,液相法也一直试图突破一百肽以上的大关,虽然困难很大,最近也取得了很好的结果。日本矢岛治明等人报导了 124 个氨基酸组成的牛胰核糖核酸酶液相合成结果^[10],活力指标以及其他指标都达到天然 RNA 酶水平。基于上述,我们把试图合成大的蛋白质以及建立快速简便的合成方法看成是肽的合成化学第三阶段的特征。

第一节 液相合成法的基本原理

合成多肽的原理并不复杂,大体上可以分为三个步骤:

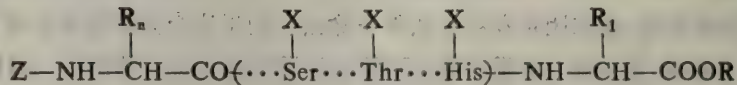
- ① 氨基和羧基以及侧链基团的保护;



② 羧基的活化和形成酰胺键缩合反应:



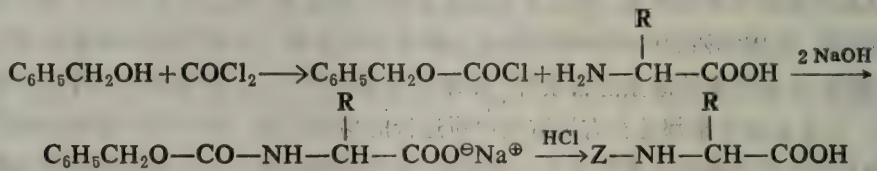
重复上面反应:



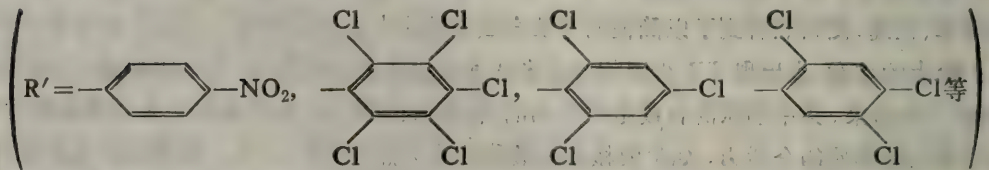
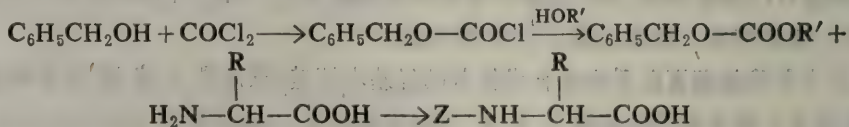
③ 脱除保护基团得到最终产物多肽。

一、基团的保护

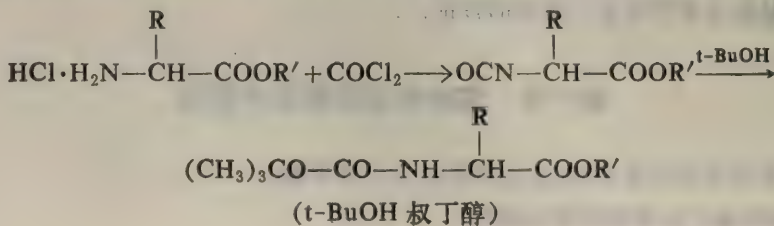
为了缩合反应能定向进行,羧基活化的氨基酸 N^α-氨基要进行保护。最常使用的是叔丁氧羰基(BOC)和苯甲氧羰基(Z)。Z 基团的使用方式如下:



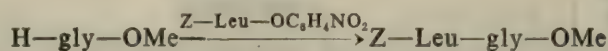
或者:



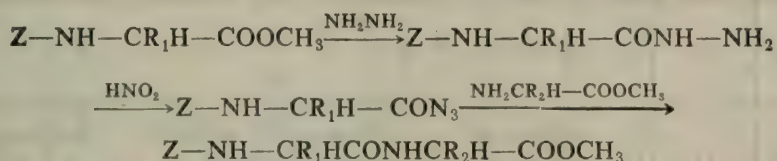
Z 基可以用 H₂/Pd, Na—液 NH₃, HBr/HAc 法除去。叔丁氧羰基 (Boc) 在液相合成中也广泛使用。由于 Boc 与 Z 对酸的稳定性不同,可以选择性的除去。比如:在室温以三氟乙酸(TFA)处理30—60分钟,可以除去 Boc,而 Z 基团基本上不发生变化。



另一常用的方法是活化酯法。带有 N^α 保护基的氨基酸对硝基芳香族酯，能与另一氨基酸的氨基缩合成肽：



② 片段缩合法。由小肽合成大肽时常常采用叠氮法，一般说来，叠氮法有较好的光学纯度（不消旋）



由小肽接成大肽时，为了保证光学纯度，尽量利用 Gly、pro 分段，充分利用这两个氨基酸的 C-末端接肽。在片段缩合法中也常常使用活化酯法和酸酐法，在反应时往往采取一些办法抑制消旋的发生。

三、胰岛素的液相合成

为了制定胰岛素的合成方案，首先要研究胰岛素的拆合问题，也就是用化学方法将天然胰岛素拆分成 A 链和 B 链，打开二硫桥，然后用适当的办法使 A 和 B 链的二硫桥重新接合起来，还原为与天然胰岛素活力相同的分子。

① 天然牛胰岛素 A 和 B 链拆开后的重合成及合成方案的确立。由于二硫桥拆开以后，重新氧化就可能产生很多种异构体，如表 6-1 所示，单单 A₁B₁ 结合方式就有 12 种异构体，形成正确的胰岛素分子结构的可能性在 5% 以下，而且不仅仅是 A₁B₁ 结合，按道理，A 链和 B 链可以采取 A_nB_m 形式，其中 n 和 m 可等于零或任何正整数。这样，异构体的数目就很多了，其中正确的胰岛素结构的比例就非常微小了。如果天然胰岛素拆开以后，重新氧化的结果真是如此的话，就不能先合成 A 链和 B 链，然后再把两个链氧化结合的道路，需要“I”字形接肽，或其他定位连接巯基的办法。但哪种方式都不如分别合成 A 链和 B 链，然后氧化接上二硫桥方式简单。所以研究胰岛素拆合工作是一个非常关键性的工作。它与确定合成路线有关。

我国科学工作者在 1959 年中初步解决了这个问题。以后经过几次拆合条件的改进，活力可达天然胰岛素的 50% 左右。此重氧化产物经抽提之后溶于少量含乙酸锌和丙酮的柠檬酸水溶液中，经一定处理后，在 0℃ 下结晶，其晶体形状为正立方体，与天然胰岛素晶体形状相同。其他方面的鉴定也确证重新氧化后的产物就是正常的牛胰岛素。有了这样的基础研究之后，采用 A 链和 B 链分别合成的方案才有了保证。

② A 链和 B 链合成简况

我国从 1959 年和 1960 年分别开始进行羊和牛胰岛素 A 链肽段的合成工作。在 A 链合成之后与天然 B 链组合，得到了半合成的粗产品。经过纯化获得了结晶，其结晶形状及用小白鼠惊厥法测定的生物活力，均与天然的结晶牛胰岛素相同。A 链合成采取下列途径，先分别得到 N-端九肽酰肼和羧端十二肽，然后把十二肽 N-端保护基脱除，与九肽以迭氮法缩合成带保护基的 A 链。如图 6-1 所示。

表 6-1 二硫键氧化接合的可能性

结合	异构体数	二硫键连接方式
A ₁	3	
B ₁	1	
A ₁ B ₁	12	
A ₂	48	
B ₂	2	
AnBm	∞	

有关 B 链肽段的合成从 1961 年起就陆续报导, 1964 年发表了胰岛素 B 链衍生物的合成结果。将此物以 Na-液 NH₃ 处理, 并转变为磺酸衍生物, 经过改进后, 化学合成的三十肽 S-磺酸衍生物与天然 A 链 S-磺酸衍生物组合后表现出 5—10% 胰岛素活力, 经过抽提后, 比活力大大提高, 在锌离子的存在下, 于丙酮的柠檬酸缓冲液中获得结晶, 其晶体形状, 活力水平以及电泳图谱均与天然胰岛素一致。B 链的合成采用 8+22 的途径。如图 6-2 所示。为了避免大肽连接时发生消旋, 特意在 B₆、B₂₀、B₂₈ 的甘氨酸处分段, 合成了以甘氨酸为羧端的肽段, B₁₋₈、B₁₇₋₂₀、B₁₇₋₂₈、B₂₁₋₂₈。在不得不用其他氨基酸为末端时, 便充分用迭氮法, 或以活化酯法从 N-端递增的阶梯伸长法以保证光学纯度。

③ 胰岛素的全合成。在合成 A 链和 B 链的基础上, 于 1964 年得到了具有生物活力的全合成产物。又经几次改进, 终于在 1965 年 9 月得到了化学合成的结晶牛胰岛素, 实现了人类百年来的宿愿。牛胰岛素全合成步骤如图 6-3 所示。人工合成的带保护基的二十一肽和三十肽的衍生物分别以 Na-液 NH₃ 处理后, 以四硫酸钠和亚硫酸钠进行 S-磺酸化, 经过初步提纯后得到二十一肽和三十肽的 SSO₃⁻ 衍生物, 按 1.2:1.0 分子比混合, 以当量的巯基乙酸还原, 然后在空气中氧化, 其产物用小白鼠惊厥法则定活力, 是天然胰岛素的 1.2—2.5%, 此粗产品经酸性仲丁醇提纯两次, 可使全合成产物提高到 50% 的纯度。用这个产物在含锌离子丙酮的柠檬酸缓冲液中结晶, 其结晶与天然胰岛素一致, 经小白鼠惊厥法和兔血糖法测活力, 并经电泳, 层析性质以及免疫学性质多方面鉴定, 都证明与天然物无异。

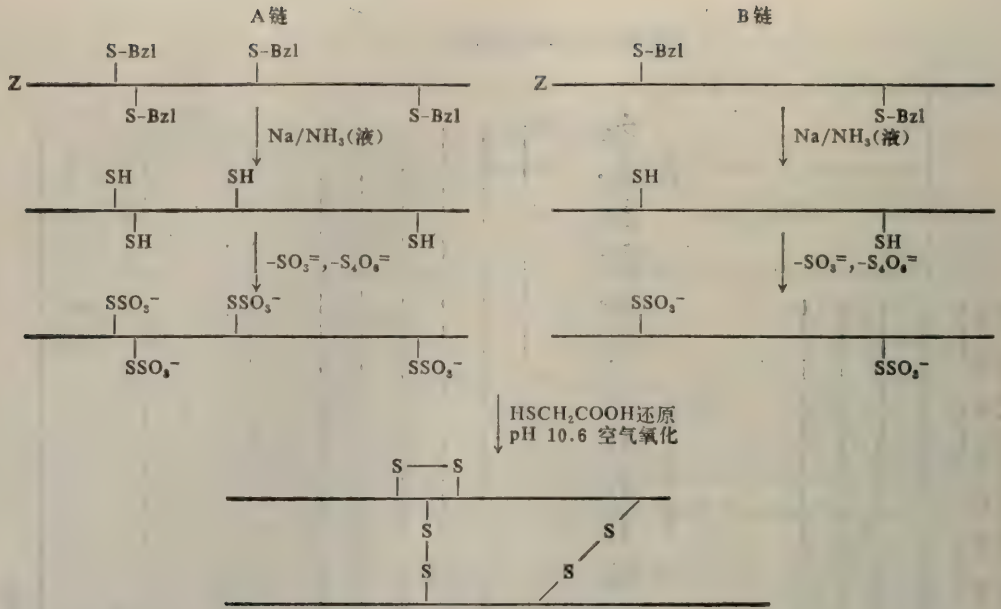


图 6-3 合成的 A 链和 B 链组合形成胰岛素

四、RNA 酶的液相合成

在 1969 年已有两个研究组报导了具有部分活力的 RNA 酶的合成。1971 年 Gutte 和 Merrifield 以自动固相合成法得到了具有 78% 活力的 RNA 酶, 还有其他人作了 S-蛋白的合成以及与天然 S-肽结合方面的工作, 但一直未得到具有天然活力的 RNA 酶。1979 年日本矢岛治明等人报导了以液相合成法得到天然活力的 RNA 酶的研究成果。合成是以通常的方式进行。以甲基磺酸($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) 作为去保护基团试剂, 因此在合成的最后一步是带有如下保护基团的氨基酸衍生物: Arg(MBS) (甲氧基苯磺酰基, 即 $-\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$); Lys(Z); Cys(MBzl); Glu(O-Bzl)。首先合成三十肽片段, 并得到纯品, 然后以迭氮法合成 RNA 酶完整结构。脱除了保护基团之后的多肽以 2-巯基乙醇在 pH 8.6 还原, 然后空气氧化形成四对二硫桥。得到 RNA 酶粗品。此粗品在葡聚糖凝胶 G-75 分离后, 具有 9—12% 的活力 (对酵母 RNA)。然后以亲和层析分离, 活力达 74—82%, 再以 CM-纤维素离子交换层析, 得到了天然活力的化学合成 RNA 酶。在 pH 4.3 以圆盘电泳鉴定和氨基酸分析结果都与天然酶吻合。

第二节 固相合成法的基本原理

固相合成法是 1962 年美国学者 Merrifield 创立的。这是以不溶性高聚物为载体, 尽可能以统一的自动化的方法在短时间内合成肽的一种方法。在 Merrifield 的方法中, 把要合成的肽的 C-端氨基酸的 N-端加以保护(BOC-氨基酸), 其羧基通过酯键连于固相载体(交联的聚苯乙烯-二乙烯苯)上, 然后脱除保护基, 顺次向 N-端方向每次缩合一个 N-端保护(BOC)C-端活化的氨基酸。在反应中使用过剩的 BOC-氨基酸和其他试剂以求增加产率。因为挂于固相载体的肽是不溶的, 可以用简单的洗涤方式除去过剩的试剂, 而且不需要溶解中间体, 所以也就没有选择溶剂、精

制中间物等麻烦问题了。从固相合成的程序本身来看, 只要把 C-末端肽挂在固相载体上, 然后向 N-端方向一个个顺序装配, 最后从固体上断下合成的多肽, 溶解, 提纯之后就可以得到所需要的产品。但此法也存在着一个很难以解决的问题, 这就是合成的纯度问题。如果把每接上一个氨基酸叫作一个“循环”的话, 每一“循环”都要经过几个手续: 脱除保护基, 中和(脱质子), 形成肽键缩合反应, 洗涤和过滤。当然, 主要是两步, 一是脱 N 端保护基, 二是缩合反应。若合成百肽的话, 需几百步手续, 这就要求每一步产率特别高。但是, 即使每一步收率为 99.9% 的话, 也还有 0.1% 的付产物。由于保护基的部分脱落, 树脂和肽之间共价键的部分断裂等多种原因, 导致肽的流失和分枝肽和 2 种错误结构的“缺欠型”分子的出现, 反应百步以后, 就积累了大量的结构类似的缺欠型分子。这些分子与具有正确结构的肽的分离是极端困难的事情。因此, 固相合成法虽然比液相法简单, 快速, 但在纯度上不如液相法。合成 15—20 肽还是相当不错的, 再大的话, 就很难得到纯品了。固相合成法的原理如图 6-4 所示。

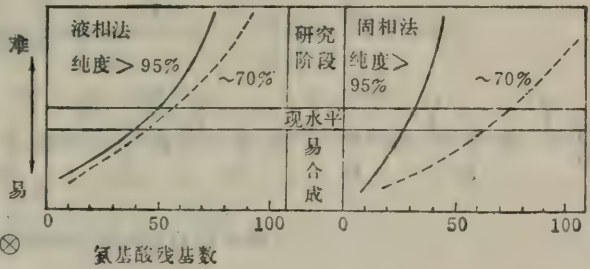
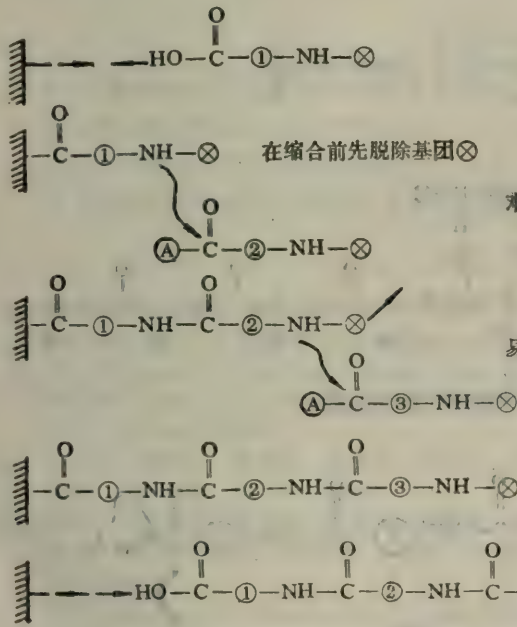


图 6-4 Merrifield 固相合成法原理

图 6-5 液相法和固相法合成肽难易的比较

此外, 该法还存在着一个与固相载体有关的问题。载体是三度交联的高聚物, 树脂的批号一变, 其结果不易重复。在合成小肽时这个问题还不小, 稍稍大一些的肽的合成常常发生两次合成结果不能重复的现象。从上可见, 固相合成法一方面有着非常诱人的优点, 但也存在着纯度不高的棘手问题。如果把纯度降低的话, 比如 70%, 则以固相合成法合成的肽链比液相法容易得多, 如果要求合成产品具有天然物一样活力时, 目前还是液相法水平高, 可以稳定在 50 肽。固相法则只能是 20 肽左右。两种方法的比较可参考图 6-5。

目前, 使用得最广泛的方法还是 N-端递增方式, 即将 N^α 端以 BOC 保护, 其羧端以共价键形式连于固相载体上, 连接方式视固相载体的活化基团而定。如果树脂的活化基团是羟基, 则以

酯键相连。BOC 氨基酸连到载体上后,以盐酸或其他系统脱去 BOC,再以三乙胺为中和剂,游离出氨基,再与另一个 BOC 保护的氨基酸以 DCC 法或活化酯法活化羧基,在有机溶剂中进行非均相缩合反应,依此类推,形成大肽。由于大肽反应步骤太多,影响产率,针对这个问题有时采用片段缩合法,以减少在固相上的缩合次数,如图 6-6 所示。这对改善大肽的合成纯度很有好处。

1963 年 R. L. Letsinger 和 M. J. Kornet^[11] 提出了一个与上述不同的合成路线,即从 C

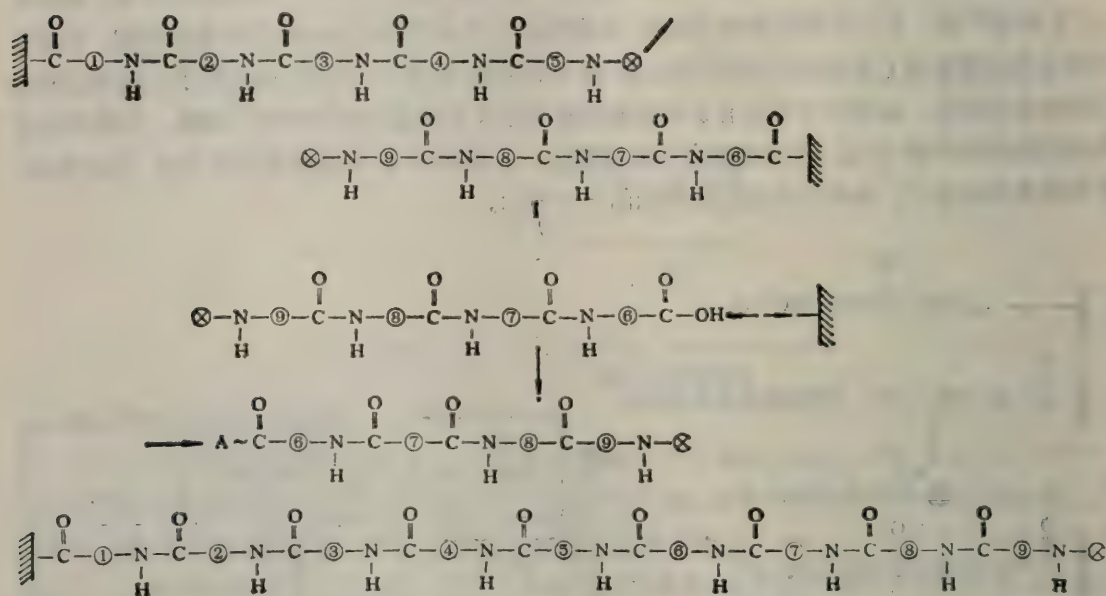


图 6-6 以片段缩合法从 N 端伸长肽的固相合成法

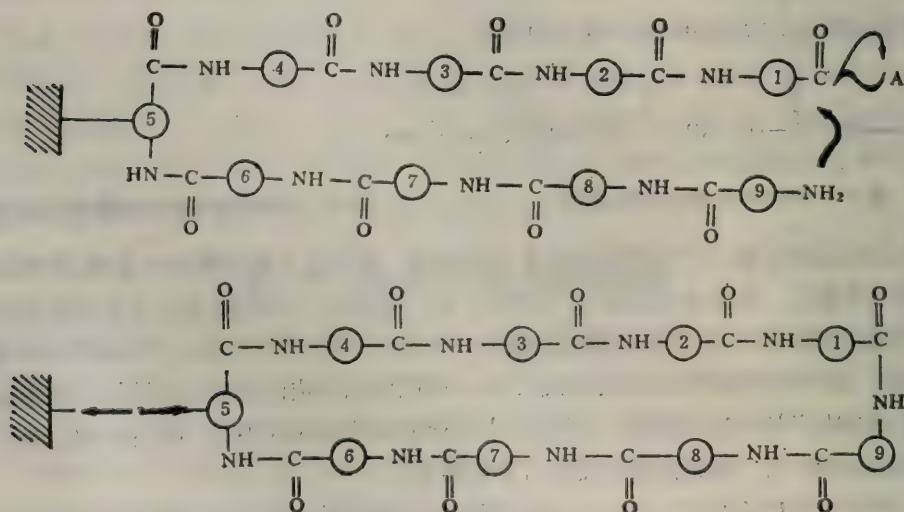


图 6-7 双向合成法在固相载体上的环化

端递增方式。把氨基酸的N端以其价键连于固相载体上，并活化其羧基与下一个氨基酸的氨基缩合。为了减少消旋常常使用消旋抑制添加物。

第三种合成方式是把侧链功能团连于固相载体的办法^[12,13,14,15]。这种办法既可以双向伸长肽链，同时又有利于肽的环化，尤其有利于二硫桥的连接。如图6-7所示。

1972年J. D. Glass, R. Walter和J. L. Schwartz采用二硝基苯基为桥把组氨酸的咪唑基连于固相载体，此法既可以双向合成，同时又可在温和条件下从载体上裂下肽段。

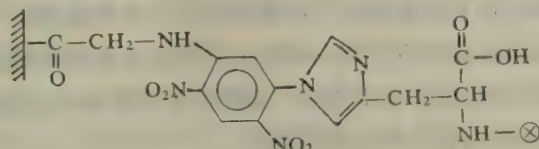


图 6-8 组氨酸咪唑基与修饰后的固相载体相连

习 题

1. 以胰岛素为例说明液相合成法的基本原理。
2. 试述肽的固相合成法的基本原理。
3. 比较液相和固相合成法的优缺点。
4. 试述蛋白质的化学合成的理论意义和实际价值。

参 考 文 献

1. E. Fischer, Chem. Ber., 39, 530 (1906)
2. M. Bergmann, L. Zervas, Chem. Ber., 65 1192 (1932)
3. Th. Wieland, H. Bernhard, Liebigs Ann. Ges., 65 1192 (1932)
4. V. Du Vigneaud, C. Ressler, J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, J. Amer. Chem. Soc., 76, 3115 (1954)
5. 钮经义, 龚嶽亭, 黄惟德, 葛麟俊, 陈常庆, 陈远聪, 杜雨苍, 蒋荣庆, 邹承鲁, 胡世全, 朱尚权, 汪克臻, 中国科学, 14 (9) (1965)
6. 龚嶽亭, 杜雨苍, 黄惟德, 陈常庆, 葛麟俊, 胡世全, 蒋荣庆, 朱尚权, 钮经义, 徐杰诚, 张伟君, 陈玲玲, 李鸿绪, 汪猷, 陆德培, 季爱雪, 李崇熙, 施溥涛, 叶蕴华, 汤卡罗, 邢其毅, 中国科学, 15 (4) (1966)
7. P. G. Katsoyannis, Science, 154 (3756), 1509—1514 (1966)
8. H. Zahn, O. Brinkhoff und J. Meienhofer; E. F. Pfeiffer und Ditschuneit; Ch. Gloxhuber, Z. Naturforsch., 20 B (7), 666—670 (1965)
9. R. B. Merrifield, Fed. Proc., Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 21, 412 (1962)
10. H. A. Yajima, Joint Symposium on Nucleic Acids & Proteins Abstract, Shanghai (1979)
11. R. L. Letsinger, M. J. Kornet, J. Amer. Chem. Soc., 85, 3045 (1963)
12. C. L. Krumdieck, C. M. Baugh, Biochem., 8, 1568 (1969)
13. J. Meienhofer, P. M. Jacobs, H. A. Godwin, J. H. Rosenberg, Org. Chem., 35 4137 (1970)
14. L. Y. Sklyarov, J. V. Shashkova, J. Gen. Chem., USSR 39, 2714 (1969)
15. J. Meienhofer, A. Trzeciak, Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. 68, 1006 (1971)
16. J. D. Glass, J. L. Schwartz, R. Walter, Amer. Chem. Soc., 94, 6209 (1972)

第七章 蛋白质的化学修饰

从广义上说,凡涉及共价或部分共价键的形成或破坏的转变都可看作是蛋白质的化学修饰。因此,化学修饰的内容也应当包括质子转移、氢同位素交换、金属螯合、酶-底物结合以及氢键合等。但本章不涉及这些内容,只涉及通常考虑的较窄的化学修饰领域——选择性化学修饰,它是指在较温和的条件下,以可控制的方式使一种蛋白质同某些化学试剂起特异反应,以引起单个氨基酸残基或其功能基发生共价的化学改变。选择性化学修饰的优点在于,单个修饰的实验条件远较多个修饰易于控制,实验结果也较易解释。

选择性化学修饰的关键问题是,设计和筛选出某些使单独一类氨基酸残基或其功能基发生有效修饰的特异性试剂,即选择性化学修饰剂(也叫基团选择性试剂)。现在已发展了许多根据颜色、荧光或放射性对肽类进行追踪的有效试剂,对酶的催化部位或结合部位特异性很高的试剂也相继出现。这些精巧而选择性很强的试剂能引起蛋白质分子中最少数、甚至单个基团的修饰,因而使选择性化学修饰的应用范围日益扩大。

必须指出,对化学修饰结果的解释是不易的,必须注意以下几点复杂性:一是对一定类型的功能基很少有绝对特异的修饰剂。化学修饰以后,蛋白质的结构总要有或大或小的改变。能对氨基酸和小肽进行定量测定的试剂不一定适用于蛋白质,就是说,被同一种试剂修饰的氨基酸残基,会因其存在状态不同而出现反应差异;二是设计能对酶的催化部位、底物结合部位起作用的修饰剂常常是非常困难的,有时是不可能的。能修饰同类氨基酸的试剂,其本身的反应性也有不同。修饰的结果要受不同类型实验的影响;三是在了解修饰剂与酶失活的关系上,除应注意其活性部位残基的直接修饰外,还必须考虑修饰过程中引起的酶蛋白位阻的间接影响,分析是否有同酶活性无关的残基起非特异性反应等等。

下面,我们要重点叙述化学修饰的原理,方法及应用,简要介绍一些应用最广泛的试剂及有关这方面的进展^[1,2]。

第一节 化学修饰的原理

一、影响蛋白质功能基反应性的各因素

用X-射线衍射分析蛋白质所得到的数据清楚地证明,多数非极性侧链(疏水侧链)位于非常致密的分子基体的中心,而多数极性带电侧链(亲水侧链)位于基体的表面和裂隙之中。小分子试剂必须通过裂隙,缓慢扩散才能与分子内部的残基相互作用。蛋白质分子的内部和某些裂隙的极性较小,类似于烃类。分子表面在外形上也不规则,各原子的极性和电荷也各异,因此,表面极性是很不相同的。蛋白质的功能基所处的环境强烈地影响着它的物理和化学性质。蛋白质分子的表面特点也影响化学试剂的接近,位于不同表面微环境的两个相同残基,对一个试剂可能表现出很不相同的反应性。因此,应当详细考察局部微环境对功能基和试剂的影响。由于功能基的反应性是通过它的亲核性来测量的,而亲核性又常常(但不总是)与它的酸、碱性有关,因此,

应当强调 pK 值和影响 pK 值的因素。

1、微环境的极性

微环境的极性是决定电离状态的決定因素之一。醋酸的 pK 值(4.76)在 80% 乙醇中增至 6.87; 在 100% 乙醇中增至 10.32。与此相反,降低极性对 NH_3^+ 的电离影响很小。一般地说,极性对通过电荷分离而解离的基团(如, $-\text{COOH} \rightleftharpoons -\text{COO}^- + \text{H}^+$) 的影响比通过电荷扩散而解离的基团(如, $\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$) 要大。

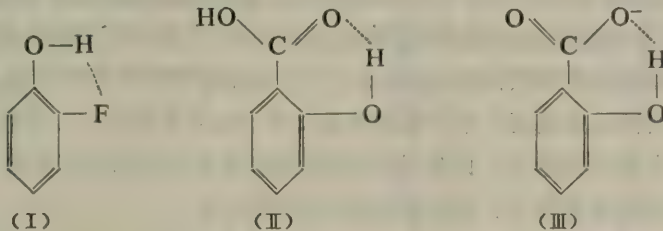
卵清溶菌酶中第 35 号谷氨酸的 γ -COOH 在 25° 时的 pK_a 为 5.9, 而溶菌酶与三-N-乙酰葡萄糖胺复合物中的第 35 号谷氨酸的 γ -COOH 的 pK_a 则约为 6.4。pK_a 的提高可能是由于这个残基的微环境极性降低之故。从整体来看,局部极性的改变对色氨酸、蛋氨酸和胱氨酸反应性的影响最小; 对氨基和组氨酸反应性的影响较大; 对酪氨酸、半胱氨酸和羧基的反应性影响最大。极性对整个反应速度的影响与有关反应的类型关系极大。

2、氢键合效应

天然蛋白质或它的离子通过氢键维持稳定性,也是使 pK 值发生改变的一个因素。例如, 2-氟酚(I)的 pK 值比预计值高 0.7 pH 单位。由于 2-溴酚的 pK 值是正常的,所以此效应不是由于空间原因,而是由于氟形成氢键的能力很强。相反,水杨酸的羧基(II)比预计的 pK 值小 1 个 pH 单位。这是因为(III)中的负电氧原子能形成很强的氢键,这个氢键加强了羧基离子的稳定性。但这个氢键却使酚基难以电离,因而将酚基的正常 pK 10 改变到 pK 13。因此,在蛋白质的酚基-羧基相互作用中,羧基的 pK 值应比正常值低,而酚基的 pK 值高于正常值。

3、静电效应

用高分辨力的核磁共振谱对组氨酸残基的电离行为进行的研究表明,不同蛋白质中的组氨酸残基的 pK 值是不同的,最大可相差 2.5 个 pH 单位。模型化合物的数据指出,这些变化可能



是由于带电基团相互影响所致^[3]。 α -NH₂ 的正常 pK 值是 7.8, 但胰肽酶 E 中的 N-末端缬氨酸的 α -氨基的 pK 却为 9.7, 从 X-射线衍射结果知道,这个残基是与天然酶结构中的第 194 号天冬氨酸进行静电相互作用的。这些例子说明,静电效应是影响功能基反应性的重要因素之一。

4、位阻效应

处于蛋白质表面的功能基,一般说来,比较容易与修饰剂反应。但是烷基在空间上紧密靠近功能基,使修饰剂不能与功能基接触,这时就要出现位阻效应。

对枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的 X-射线衍射研究指出,它的所有的 10 个酪氨酸残基均在蛋白

质分子的表面,而且苯酚的羟基几乎在所有的情况下都没有形成氢键。但是,如果对它进行彻底硝化和碘化后,10个酪氨酸只有8个被修饰。若没有X-射线衍射研究的结果,很可能解释为至少有两个酪氨酸被包埋在分子内部,但实际情况并不是这样。这种情况很可能是空间障碍引起的。

5、基体效应

引入基体效应只是为了使它与前面说的表面位阻效应区别开来。事实上,分子内的基团有两类:一类是深埋于分子中心内部,不能与任何大小的修饰剂作用;一类是虽在分子内部,但可与小分子(不是大分子)修饰剂作用,叫做内部被位阻的基团。修饰剂也可能由于位阻不能进入分子内部,从而不能与深埋于分子中心或深的裂隙中的功能基作用。

前已述及,分子的表面基团通常比它的内部基团较易与修饰剂作用,但也有例外,如,马心亚铁细胞色素C中的四个酪氨酸残基,有2个位于分子表面,而另外2个在分子内部并已氢键合。用四硝基甲烷处理这个蛋白质,则只能使内部的2个酪氨酸硝化。这说明,对四硝基甲烷来说,包埋的残基比暴露的残基反应性更强。象这类例子,文献中还有许多。仅仅从天然蛋白质结构的静态模型观点看,上述例子是反常的,但从蛋白质结构的可变性观点看,则又是可以理解的。这类问题随着观察方法的进步会越来越清楚。

6、其它效应

还有几种因素也能改变蛋白质功能基的反应性,如,电荷转移、共价键形成、金属螯合、旋转自由度等。但是由于可供利用的资料有限,所以不作叙述。

Hartley及其同事发展了一个竞争标记法来测定蛋白质分子中个别基团的反应性^[4],并用此法测定了猪胰弹性蛋白酶的氨基的反应性。此法的基础是用痕量放射性试剂,标记蛋白质分子中不同的功能基。标记的量由它的 pK_a 和微环境决定。所用试剂的量对蛋白质的量来说是很小的,所以平均每个蛋白质分子将只有一个部位被标记,这就使结果的解释更容易些。此法的大致步骤是,用有限量的放射性试剂处理蛋白质和内部标准物(在弹性蛋白酶的例子中用的标准物是苯丙氨酸),然后用酶解法降解蛋白质,再将每一个含标记基团的肽分离出来,由它们的比放射性测定其相对于标准物的反应速度。整个过程要在几个pH下重复进行。结果就可以计算每一功能基的 pK_a 和每一部位的反应性。此外,还有用醋酸酐竞争标记法测定电离常数和 α -胰凝乳蛋白酶的3个氨基末端的反应性^[5]。此法虽麻烦,但应用广泛。

二、有关蛋白质功能基反应性的几个问题

上述影响功能基反应性的各因素实际上可归纳为两个方面,其一是微环境的极性、基团之间的氢键以及静电作用等因素对功能基的 pK 值的影响。其二是基团和基体的空间障碍。功能基的反应性往往通过其亲核性衡量,但并不是用亲核性就可以解释一切,功能基的反应性比较复杂。下面就pH对亲核性的影响、功能基亲核性的顺序以及超反应性加以简要说明。

1、pH值对反应性的影响

用大过量氯乙酰胺修饰溴苯酚,其反应速度随pH增加而增加。用测得的速度常数对pH作图,所得图形与普通苯酚的滴定曲线相同,速度曲线的中点的pH对应于苯酚的 pK 值,这可能说明,溴苯酚中的苯酚基是唯一的最有反应性的亲核剂,可用方程(1)概括这种情况。

$$K_{\text{观察}} = K_N \alpha = K_N \left(\frac{K_i}{K_i + H^+} \right) \quad (7-1)$$

其中, K_N 是依赖 pH 的速度常数, α 是在任一 pH 值下存在的苯酚离子的分数, K_i 是苯酚的电离常数。

如果用同样的方法研究一系列间位和对位取代的苯酚, 则 $\log K_N$ 对 pK_a 作图, 得一直线(图 1, 直线 A), 表示苯酚离子的亲核性(用 $\log K_N$ 来测量)是与它们的酸碱性(以 pK 测量)成正比的。因此, 苯酚的 pK_a 值越高, 它的阴离子的反应性越高。

对于含 pK_a 8 苯酚基和 pK_a 10 苯酚基的蛋白质而言, 从图 1 的线 A 分别可得到 $K_N = 10 M^{-1} \text{分}^{-1}$ 和 $100 M^{-1} \text{分}^{-1}$ 。根据 K_N 值, 再由方程(1), 求出 $K_{\text{观察}}$ 。这两种基因 $K_{\text{观察}}$ 的比值是 pH 的函数, 如图 2 之曲线 A 所示。由图可见, 其 $K_{\text{观察}}$ 的比值在低 pH 下是 0.1, 在高 pH 下是 10。因此, 选择性烷化 pK_a 8 苯酚, 最好在等于或低于它的 pK_a 值的 pH 下进行; 而选择性烷化 pK_a 10 苯酚的 pH 值至少要比它的 pK_a 值高 1 个 pH 单位。

如果用碘乙酰胺烷化同一套苯酚, 则 K_N 与 pK_a 的关系如图 1 的直线 B 所示。直线的斜率比 A 高, 说明碘乙酰胺对苯酚离子的亲核性敏感度高。 K_N 值越大, 反应性越强。 $K_{\text{观察}}$ 的比值与 pH 的关系如图 2 之曲线 B 所示。虽然烷化所用的 pH 值与用氯乙酰胺烷化时相同, 但选择性烷化较酸的苯酚(即 pK_a 8 苯酚)的机会降低 4 倍, 因此, 使用反应性差的试剂能得到较大的选择性。

2、蛋白质功能基的亲核性

质子形式的氨基酸, 其所有的功能基都是亲核的。由于杂原子的性质及空间环境的显著

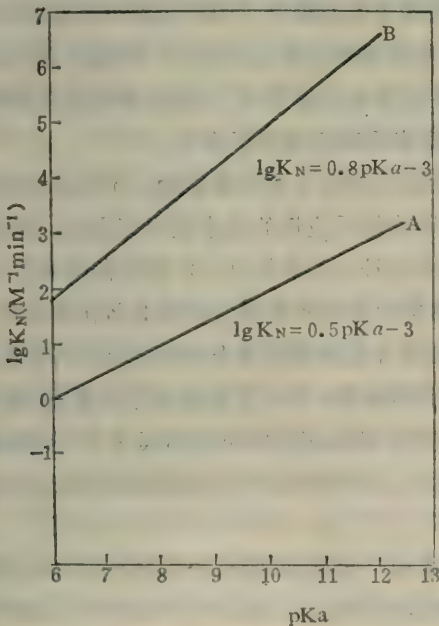


图 7-1 用氯乙酰胺(A)和碘乙酰胺(B)烷化取代苯酚的 $\log K_N$ 对 pK_a 图

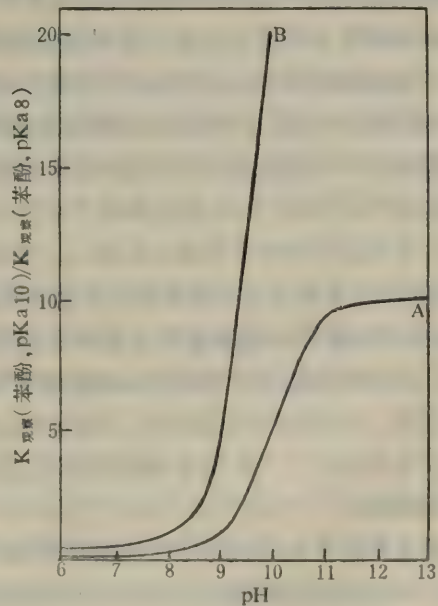


图 7-2 烷化 pK_a 10 苯酚和 pK_a 8 苯酚的速度比。(A) 是用氯乙酰胺, (B) 是用碘乙酰胺

差异,还不能找出亲核反应性与 pK 值的相互关系,只能编出一个定性的反应顺序表,如表 1。表里的顺序未考虑蛋白质环境的任何特殊效应,这些效应很易使它的反应顺序发生变化。修饰剂性质不同以及反应机理不同,也能影响功能基的反应顺序。如氨基甲酰化反应(7-2),是一个少见的修饰反应。它修饰 α -氨基的选择性超过了 ϵ -氨基。虽然 ϵ -氨基通常有较高的亲核性,但这个反应的机理包括质子从氮转移到氰酸盐离子,因 α -氨基具有低 pK 值,容易转移质子。显然,这个因素对修饰反应的影响超过了亲核性对反应的影响。



表 7-1 修饰反应中反应性的近似顺序^a

烷 基 化	酰 基 化	芳 基 化	光 氧 化
蛋 氨 酸 半胱氨酸 咪 唑 基 胺 苯 酚 羧 基	—— 半胱氨酸 苯 酚 咪 唑 胺 羧 基	—— 半胱氨酸 胺 苯 酚 咪 唑 羧 基	蛋 氨 酸 半胱氨酸 引 噪 咪 唑 苯 酚 ——

a: 基团是以递减顺序列入的。

3、超反应性

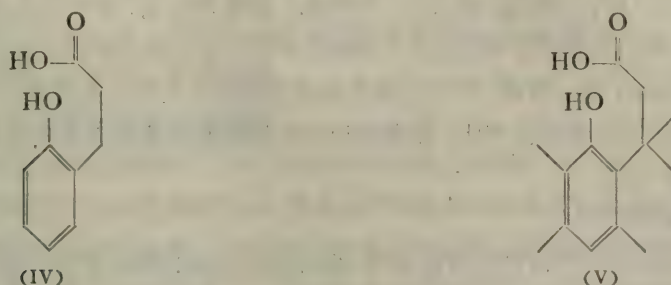
超反应性指的是蛋白质的某个侧链与个别试剂能发生非常迅速的反应。多数蛋白质的功能基与简单氨基酸中的同样基团相比,反应性要差。但是每个蛋白质分子中至少有一个基团,对一定的试剂能显示出超反应性。酶的催化活性基团通常对修饰剂是有反应性的,但酶的超反应基团不一定是酶活性部位中的基团,可能与酶的功能或构象没有明显联系。例如,木瓜蛋白酶中的 19 个酪氨酸中只有 1 个能与二异丙基氟磷酸盐反应、修饰后酶活力并不改变。

简单分子中功能基的反应性(或亲核性)是由重要原子的电子密度决定的。不能认为,蛋白质中的超反应基团,仅仅是由加强了亲核性造成的。影响超反应性的因素是很复杂的,其中包括:① 改变蛋白质功能基的 pK_a 值;② 蛋白质功能基具有较大的亲核性;③ 通过静电相互作用吸引试剂,并使其有适当的取向;④ 试剂与靠近修饰部位的蛋白质区域之间的立体化学适应性;⑤ 试剂的束缚等。超反应性可能由上述的一个因素或几个因素的结合作用而产生。例如,用 2,4-二硝基氟苯选择性芳基化人碳酸酐酶 B 的第 204 号组氨酸,看来主要是由于该基团的 pK_a 值非常低。带电试剂与蛋白质之间的静电相互作用是产生超反应性的决定因素之一,有很多例子可以证明这点。一般来说,酶活性部位上的极性是低的,这特别有助于加强在活性部位上的静电相互作用。

蛋白质的空间结构和试剂的空间结构之间的相互影响,也能加强修饰反应速度和反应的特异性。如对核糖核酸酶 A 第 119 号组氨酸和第 12 号组氨酸的烷化,使用不同的试剂,这两个残基的反应速度也不同,适当地选择试剂,可以选择性地修饰 119 号组氨酸。

加快修饰反应速度的一个重要原因是限制了构象的总数(即限制旋转自由度)。这种限制可

能是由于上述提到的几类相互作用引起的。比较酚酸(IV和V)的酯化速度最能说明这个问题。引入几个甲基,特别是在同一碳原子上有2个甲基取代(V),则限制了基团的自由旋转,因而使



(V)的 K_N 提高 10^8 倍以上。

能说明由于试剂的束缚而产生超反应性的例子是亲和标记(见第四节)。

三、修饰剂反应性的决定因素

蛋白质的构象和表面特性对氨基酸侧链的反应性有影响。同样,它们也可能对接近功能基的修饰剂产生有利或不利的影晌。弄清楚这种影响,对设计类似的底物和亲和标记物是很有价值的。

1、选择吸附

化学修饰以前,修饰剂是根据各自的特点选择性地吸附在低极性区或高极性区的。有时可以根据对速度的饱和效应检测出蛋白质-修饰剂复合物的形成。正象酶-底物复合物那样,蛋白质-修饰剂复合物形成后,修饰过程的速度加强了。这种速度的加强部分是由于选择性吸附的结果。曾经考察过几个反应的饱和和动力学,如,D-氨基酸氧化酶的巯基与一系列N-烷基马来酰亚胺的反应表明,巯基的N-辛基化的速度比N-乙基化的速度增加15倍。这说明巯基处在非极性环境中。饱和动力学的研究指出,修饰剂先与蛋白质的巯基疏水键合,然后烷基化。利用饱和效应也可以证明,在修饰以前,二硝基氟苯与牛血清白蛋白疏水键合。看来,这种现象可能是普遍存在的。

2、静电相互作用

带电的修饰剂能被选择性地吸引到蛋白质表面带相反电荷的部位。静电相互作用可使修饰剂向多功能部位中的一个残基定位,或向双功能基的一侧定位。碘乙酸和碘乙酰胺烷基化的速度和烷基化的部位的差异就是由静电影响造成的。例如,究竟是烷基化N-1上的咪唑,还是烷基化N-3上的咪唑,这要由静电相互作用来决定。

3、位阻因素

蛋白质表面的位阻因素、或者底物、辅因子、抑制剂所产生的位阻因素都可以阻止修饰剂与功能基的正常反应。此外,修饰的结果也能提供有关蛋白质表面的有用信息。用四个碳的 α -溴代酸可使核糖核酸酶的第12号组氨酸烷基化,而且反应进行得很快;而用 α -溴代戊酸作修饰剂,则很难进行反应;用 α -溴代己酸作修饰剂,则不能发生烷基化反应。由四碳酸到六碳酸,亲水键含量减少得很少,所以,这个效应说明,在修饰以前,蛋白质束缚 α -溴代酸的部位是有一定大

小的。如果修饰剂的大小超过这个部位的大小,则不能发生修饰反应。

4、催化因素

修饰部位附近的其它功能基,如果起一般的酸、碱催化作用,也能影响修饰反应。不同的修饰剂,其反应速度和反应部位有明显差异。例如,对硝基苯乙酸盐和苯乙酸盐对胰凝乳蛋白酶活性丝氨酸的乙酰化属于同一机理,但苯乙酸盐的反应性差,在较大的程度上与酶的酸碱催化有关。相反,氟磷酸盐与氯磷酸盐相比,氟磷酸盐对丝氨酸酶有非常高的反应性,这可能与一般酸碱催化除去氟原子有关。

5、局部环境的极性

许多有机反应的速度与溶剂的极性有关,而有些反应则与极性无关。溶剂效应是很复杂的,但可以概括出几条规律,列于表 2。

表 7-2 溶剂极性对反应速度的影响

反 应 类 型	降低极性对速度的影响
(1) $RSR + ICH_2CONH_2 \rightarrow [R_2S^+CH_2CONH_2]I^-$	适当降低或大大降低
(2) $RSR + H_2O_2 \rightarrow R_2SO + H_2O$	没有影响
(3) $RS^- + ICH_2CONH_2 \rightarrow RSCH_2CONH_2 + I^-$	没有影响
(4) $RNH_3^+ + OCN^- \rightarrow RNHCONH_2$	适当增加或大大增加

疏水环境能阻止产物中电荷分离的反应(1),并能加速电荷中和的反应(4);对于反应类型(2)(没有电荷分离)和反应类型(3)(电荷只是从一个离子转移到另一个离子),则介质的极性是不重要的。

第二节 化学修饰的方法学

如果对与催化活性、底物结合或构象维持有关的功能基一无所知,那就只有通过反复试验去了解。在这样探索性的研究中,对修饰剂类型的选择并没有什么一般的指导原则,只有反复试验才能对修饰剂的选择有所认识。但是,在实验中必须注意以下几个问题:① 蛋白质经极端 pH 处理后,或经氧化、还原修饰后,要进行总的氨基酸分析,特别要分析那些难分析的氨基酸(如色氨酸、蛋氨酸)。要检查有否因为未知的肽键裂解而出现新的氨基末端。如果认为氨基酸层析图谱中的一个峰仅代表一个正常的氨基酸,那就可能会得到错误的结果,因为被修饰了的氨基酸或氧化降解产物有时会在非常靠近正常氨基酸的位置出现,或者与正常氨基酸位置重叠在一起。② 因为修饰剂对模型化合物或蛋白质的选择性不一定适用于另外一些蛋白质,所以,对每一个残基,总希望弄清楚它是被修饰了,还是没被修饰。原始修饰以后,还可能发生共价改变。如酰基转移、巯基转移、卤素转移及二硫交换过程可能自发地或在纯化、降解过程中发生,有些修饰产物在反应条件下不稳定,用普通的技术检测不出,必须使用特殊的分析方法(见本节二 3)。③ 注意,不能忽略缓冲液成分或修饰付产物对修饰部位和修饰程度及对酶活力的影响。不应当仅对一种底物进行活力试验,因为有很多这样的例子:对大分子底物,活力有改变,但对简单底物则

没有改变;对一种类型的大分子有改变,但对另一种大分子,则没有改变;对一种类型的简单底物有改变,但对另一类简单底物,则没有改变。④天然酶活力的最适 pH 与修饰后酶活力的最适 pH 可能有显著差别。同样,天然酶与修饰酶对金属的需要,在程度和性质上也有不同。酶活力的改变可能是由于米氏常数的改变或最大反应速度的改变引起的,或者由于二者均改变引起的,因此,应当作适当的测量,以区分这两种现象。

一、蛋白质修饰试剂和修饰条件的选择

实验目的不同,对选择性的要求也不同。例如,对氨基的修饰就可以分以下几种情况:修饰所有的氨基,而不修饰其它的基团;仅修饰 α -氨基;修饰暴露的或反应性高的氨基以及修饰具有催化活性的氨基。修饰的程度和部位一般可用三种方法来控制:选择适当的试剂和反应条件;选择蛋白质的构象;选择有重要功能的基团。后两种方法在研究蛋白质的结构和功能中有非常重要的作用,这里不能细说。只就第一种方法略述如下。

1、试剂的选择

选择试剂的可能性不仅要受可供利用的试剂的数目和反应机理类型限制,而且由于蛋白质的所有功能基在一个相当窄的反应性范围内都是亲核的,所以试剂的选择比较困难。使用在溶解度、pK、电荷、大小、反应性、立体化学或反应机理上不同的修饰剂,有时会得到精细的选择性。

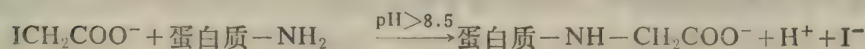
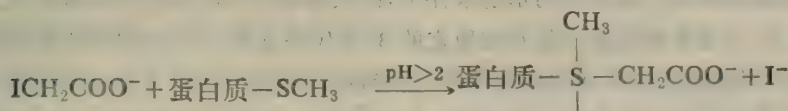
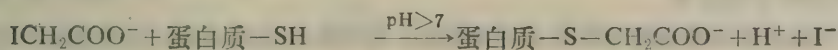
选择蛋白质修饰剂要考虑如下一些问题:修饰反应要完成到什么程度;对个别氨基酸残基是否专一;在反应条件下,修饰反应有没有限度;修饰后蛋白质的构象是否基本保持不变;是否需要分离修饰后的衍生物;反应是否需要可逆;是否要有一个快速、方便的分析方法等。在决定选择某一修饰方法之前,对上述问题必须有一个权衡的考虑。

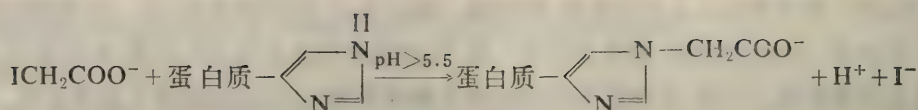
对于可逆修饰,理想的修饰剂是选择性高、在温和的反应条件下也能进行修饰反应、被修饰的功能基在温和条件下也能再生。

用于修饰酶活性部位氨基酸残基的试剂应具备以下一些特性:选择性地与一个氨基酸残基反应;反应在酶蛋白不变性的条件下进行;标记的残基在肽中稳定,很易通过降解分离出来,进行鉴定;反应的程度能用简单的技术测定。当然,不是单独一种试剂就能满足所有这些条件。一种试剂可能在某一方面比其它试剂优越,而在另一方面则较差。因此,必须根据实验目的和特定的样品,来决定使用什么样的试剂。

2、反应条件的选择

适当选择 pH,可得到选择性。例如,在不同的 pH 下,碘乙酸可修饰不同的蛋白质侧链:





很多亲核反应可通过控制 pH 而得到很高的选择性,但亲电试剂对 pH 控制常常是不敏感的。

缓冲液可改变蛋白质的构象或封闭反应部位也影响修饰反应,如磷酸盐是某些酶的竞争性抑制剂,因而该离子的结合可能封闭修饰部位。碳酸酐酶的酯酶活力能被氯离子抑制,也可能是由于这种效应所致。

反应介质也能改变试剂的反应性和性质。在有机溶剂介质中,硼氢化钠的反应性降低。在脲溶液中,N-溴代琥珀酰亚胺能转变成N-溴代脲,这是一个更温和,更有专一性的试剂。最后,还要注意,许多试剂仅在有限的 pH 范围内是稳定的,有反应性的。

反应在低温下完成,缓慢加入试剂,使用非常有限量的试剂,虽然许多基团也部分修饰,但仍可有效地改变反应性,控制修饰程度。

二、修饰程度和修饰部位的测定

1、分析方法

测定修饰基团和测定修饰程度的实验方法在文献^[6,7]中已有详细讨论。这里只能简述概况。还没有一个完满的分析方法。用光谱法追踪检查是最简单、最有用的方法,而且用此法还能很容易地计算修饰的速度。此法要求修饰后的衍生物具有独特的光谱或它的光谱与修饰剂的不同,但能符合这个条件的试剂为数不多。

最常使用的是间接分析法,其中有的要用蛋白质降解法,有的可以不用。被修饰了的残基经分离纯化后,可通过它含有的同位素标记量来测定反应程度。也可以通过有色修饰剂的光谱强度、顺磁共振谱、荧光标记量、修饰剂的可逆去除等来测定反应程度。在大多数情况下,对修饰部位的鉴定,需要蛋白质的总降解和氨基酸分析。当然,测定一个被修饰氨基酸的出现,要比测定多个相同氨基酸中有一个消失更准确。理想的情况是,被修饰的氨基酸在水解条件下是稳定的,而且在氨基酸层析图谱中有一个独特的位置。使用蛋白水解酶降解,一般可避免不稳定问题。但有些修饰了的残基,即使在酶解条件下也不稳定,或者其它残基阻碍蛋白水解酶对临近肽键的进攻。这时常进行残基部位的第二次修饰,以产生另外一种更稳定的修饰。由第二次修饰的结果,可以得到第一次修饰的程度。例如,已经酰化了的蛋白质,再经二硝基苯酰化,然后酸水解,测定 DNP-氨基酸和回收氨基酸的数目,再与总数进行比较,则能知道修饰的程度。

2、修饰残基的不稳定性

很多修饰了的残基对酸水解和以后的化学处理、甚至对分离提纯都是不稳定的。盐酸是肽键的有效水解剂,也是还原剂。在正常的水解条件下,碘代酪氨酸可以重新变成酪氨酸。作为还原剂的盐酸能产生氢,氢能使酪氨酸变成对酸稳定的 3-氯代酪氨酸。蛋白质中的碘代酪氨酸相当不稳定,除了对光和氧敏感以外,在层析过程中,或者在弱酸性介质中,有碘离子存在时,能发生脱碘化作用。

在氨基酸分析仪的分析图谱中,有些修饰了的氨基酸或它们的降解产物能在明显的位置上出现,很易鉴别;但也有一些被部分降解,产生许多峰,因而掩盖了正常氨基酸的峰。另一方面,

光氧化组氨酸,经酸水解后,产生许多未知的产物,但这些未知物峰的位置与正常氨基酸的峰位重叠。

3、没有被发现的修饰

咪唑基、巯基、羧基、甚至苯酚的酰化反应之所以检测不出,是因为它们的产物在反应条件下不稳定,或在以后的纯化等操作步骤中被水解。这种暂时性的修饰看起来是无害的,但由于它们对构象的影响无疑会改变其它功能基的反应性和可接近性。C-末端残基的羧基能与一定强度的酰化剂作用,暂时形成混合酸酐,结果使羧肽酶不能除去C-末端残基。非末端羧基(特别是天冬氨酸的末端羧基)也能产生环化亚酰胺和 β -天冬氨酸肽键。

有些修饰反应不能检测出来,只是由于它们在蛋白质化学中并不占优势地位。如,汞盐常用于修饰蛋白质中的巯基,但它也能裂解二硫桥。

色氨酸能形成各种各样的络合物,并能进行加成反应。由于这种修饰并不产生显著的光谱变化,或者由于色氨酸的光谱常被酪氨酸所掩盖,所以,从光谱上可能也看不到它们。

第三节 蛋白质侧链的修饰

蛋白质侧链上的功能基主要有:氨基、羧基、巯基、咪唑基、酚基、吲哚基、胍基、甲巯基等。修饰上述每一种功能基都有好多试剂可供利用,这里不能详细、全面地介绍,只能介绍其中的几个重要试剂。表3列举了一些用来修饰蛋白质中氨基酸侧链的最常用试剂。

1、修饰氨基试剂

这之中包括二硝基氟苯、苯酯基氯、醋酸酐、琥珀酸酐等。六十年代初,曾用下列试剂对氨基进行可逆修饰,如二硫化碳、三氟乙酸乙硫酯、乙亚胺甲酯等。

用顺丁烯二酸酐能可逆修饰氨基,而且有一个重要的优点,即所形成的衍生物在碱性、中性溶液中很稳定,但在酸性中不稳定。

应当说明,顺丁烯二酸酐对氨基并不是绝对特异的,酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基也能与之反应。巯基能在该试剂的双键上加成,形成稳定的衍生物。但酪氨酸衍生物在碱性pH下自动水解,丝氨酸、酪氨酸衍生物在弱碱性pH下,能被羟胺水解。因此,对于没有巯基的蛋白质,选择适当的条件,可以使顺丁烯二酸酐对氨基是专一性的。

在支-顺式-3,6-内氧六氢酞酐中没有活化的双键,所以消除了与巯基反应的可能性^[8]。酞酐是很有用的可逆修饰剂。修饰后,再生的条件也很温和,用顺丁烯二酸酐处理的蛋白质,再生后能恢复活力和结构。

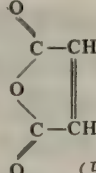
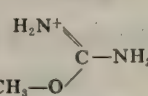
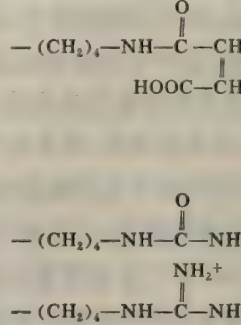
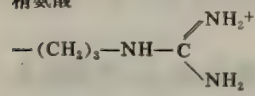
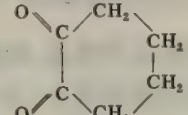
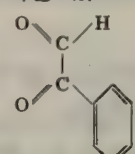
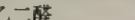
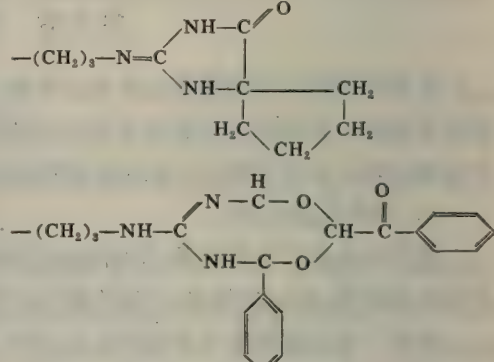
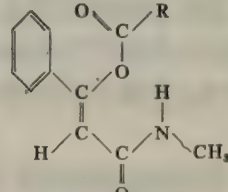
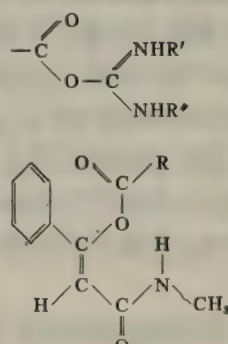
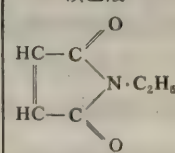
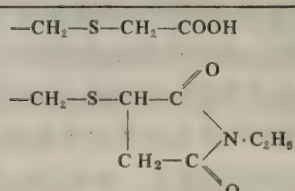
在研究各种侧链在蛋白质结构和功能中的作用时,曾用各种试剂对氨基进行修饰。结果发现,制备中性的、带正电的和带负电的氨基衍生物是很容易的。通过还原烷基化反应,可以有控制地增加取代基的量,而保持正电荷不变^[9]。

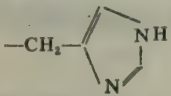
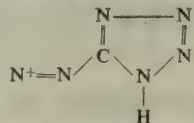
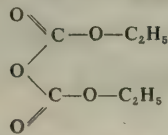
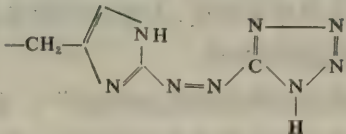
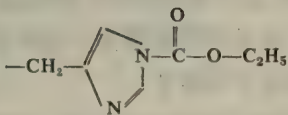
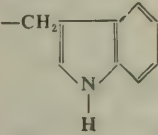
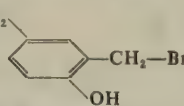
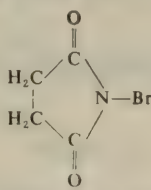
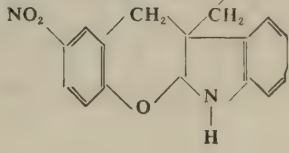
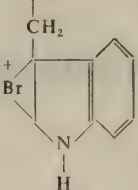
用氰酸盐时,只要控制一定的反应条件,则仅修饰 α -氨基和 ϵ -氨基^[10]。

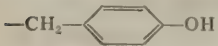
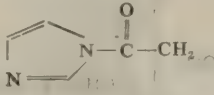


用O-甲基异脲修饰溶菌酶的主要优点是,该试剂与 ϵ -氨基的反应速度显著快于 α -氨基,结果赖氨酸残基转变成高精氨酸。修饰后的溶菌酶仍保持全部酶活力,并很容易结晶^[11]。

2、修饰蛋白质的精氨酸侧链基团

表 7-3 蛋白质中氨基酸侧链的化学修饰

氨基酸侧链	所用试剂	修饰后的侧链
赖氨酸 $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ (和 N-末端 $\alpha\text{-NH}_2$)	(1) 酸酐:  (马来酐) (2) 氰酸盐, NCO^- (3) O-甲基异脲 	
精氨酸 	二羧基化合物  1,2-环己二酮  苯乙二醛 	
羧基 $-\text{COOH}$	(1) $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}''$ 碳化二亚胺 (2) 异噁唑盐 (N-甲基-5-苯基异噁唑氟硼酸盐) 	
半胱氨酸 $-\text{CH}_2\text{SH}$	(1) 烷化剂 $\text{I}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 碘乙酸 	

氨基酸侧链	所用试剂	修饰后的侧链
	<p>N 乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM)</p> <p>(2) 重金属衍生物 $\text{Cl}-\text{Hg}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}^-$ 对-氯汞苯甲酸 (PCMB)</p> <p>(3) Ellman's 试剂 $\text{COOH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{COOH}$ 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)</p>	$-\text{CH}_2-\text{S}-\text{Hg}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}^-$ $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2-\text{COOH}$
<p>组氨酸</p> 	<p>(1) 重氮离子:  重氮-1-氢-四唑 (DHT)</p> <p>(2)  焦碳酸二乙酯 (乙氧基甲酸酐)</p>	 
<p>蛋氨酸</p> $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$	<p>(1) 氧化: H_2O_2</p> <p>(2) α-卤酸和酰胺</p>	$-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ \downarrow O \oplus $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ \downarrow $\text{X}-\text{CO}$
<p>色氨酸</p> 	<p>(1) Koshland 试剂  2-羟基-5-硝基苄基溴 (HNB)</p> <p>(2)  N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS)</p>	  (此物在一定的条件下可发生重排)

氨基酸侧链	所用试剂	修饰后的侧链
酪氨酸 	(1) N-乙酰咪唑:  (2) 四硝基甲烷 (TNM) $C(NO_2)_4$	 

精氨酸与醛和与 1,2-或 1,3-二羰基化合物反应。醛的加成物不稳定;与二羰基化合物缩合后,则生成稳定的杂环。

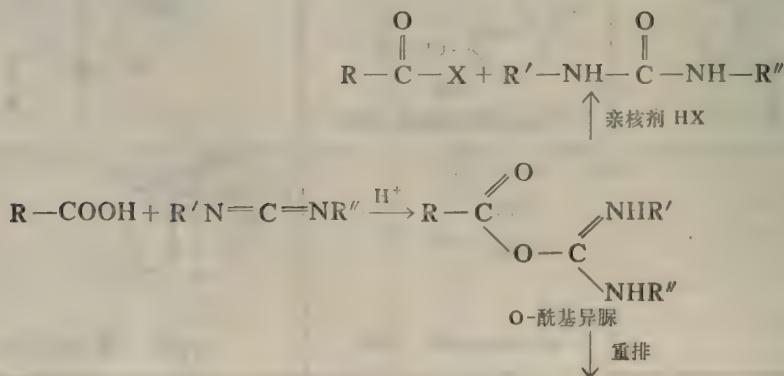
在硼酸钠缓冲液中 (pH 8-9, 25°—40°C), 1,2-环己二酮可对精氨酸及其残基进行选择性的修饰。在这样温和的条件下, 可得到唯一的缩合产物^[12]。产物在反应条件下和酸性溶液中均稳定。精氨酸也很容易再生, 只要在羟胺缓冲液中放置即可。此反应曾成功地用在氨基酸顺序分析、结构与功能的研究中。

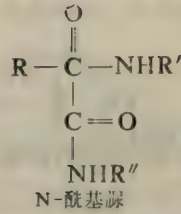
乙二醛能可逆修饰精氨酸残基^[13]。修饰后的产物可用 O-苯二胺分解、再生出自由精氨酸残基。此试剂在某些方面不同于环己二酮, 二者可以互相补充。

苯乙二醛与精氨酸残基形成的衍生物, 在酸性溶液中是稳定的, 但在中性、碱性 pH 下, 精氨酸能慢慢再生^[14]。乙二醛和苯乙二醛均能与氨基反应。要消除与氨基的反应, 可先用顺丁烯二酸酐处理蛋白质, 然后再用醛修饰。这时就只修饰精氨酸了。

3、修饰蛋白质中的羧基

最早用来修饰羧基的试剂是乙醇-盐酸, 它能使羧基酯化。由于重氮甲烷能使氨基和酚羟基烷基化, 因此不能用它来修饰羧基。但有人用比重氮甲烷反应性差的乙酰胺衍生物来特异性地修饰羧基^[15]。水溶性碳化二亚胺也可以选择性地修饰羧基^[15], 为了使羧基与赖氨酸残基的交联减到最小, 反应要在 pH 4.5 下完成。Hoare 等人利用这一反应得到了稳定的酰胺衍生物。在高浓度的亲核剂存在下, 他们用水溶性碳化二亚胺来完成反应, 反应过程如下式所示^[16]。水和





加入的其它亲核剂与分子间重排(O-酰基异脲→N-酰基脲)竞争。水的进攻产生羧基,而其它亲核剂的进攻产生羧基的酰基亲核衍生物。在 pH 4.75, 高浓度亲核剂和过量碳化二亚胺存在下, 酰基亲核衍生物的形成, 基本上是定量的^[17]。上述方法已用来定量测定蛋白质中羧基的含量以及鉴定天然蛋白质中未反应的羧基^[17]。用异噁唑盐修饰羧基是一个类似于碳化二亚胺-亲核剂反应的方法^[18]。

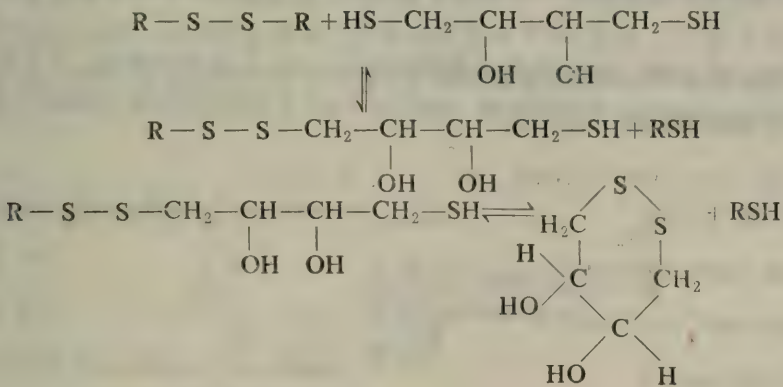
4、二硫键和巯基的修饰

在许多蛋白质中, 二硫键还原后, 仍能部分或全部保留活性; 巯基在许多具有不同功能的酶中充当催化基团; 巯基似乎存在于多亚基蛋白质的亚基之间的区域, 并具有稳定、聚合作用。

(1) 二硫键可以用各种方法断裂, 这在第五章里已经接触过了。这里, 略加补充, 并加以综合。

① 还原法

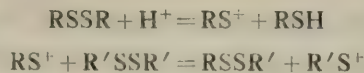
可以用硫醇、硼氢化钠、硫代磷酸盐还原二硫键。现在最常采用的还原剂是二硫苏糖醇(DTT)^[19]。DTT 是很有效的还原剂, 在 pH 7, 25°C, DTT 还原二硫键反应的平衡常数是 β-巯基乙醇的 10⁴ 倍。还原过程在低浓度的 DTT 溶液中即能完成, 反应过程如下:



二硫键的完全还原, 需要分子的完全展开。

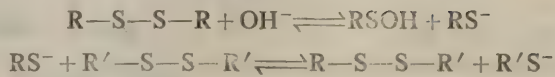
② 二硫交换法

二硫交换反应($\text{RSSR} + \text{R}'\text{SSR}' = 2 \text{RSSR}'$)能在强酸(如 10 N HCl)中进行。其反应机理是,



加入巯基离子会抑制交换反应。巯基离子(RS^-)所催化的二硫交换反应是在中性和碱性溶液中

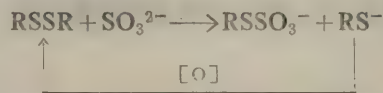
进行的。由于平衡的缘故,这些反应也是碱催化的。



在含有几个二硫键的蛋白质中,测定其中半个胱氨酸的配对工作,由于有二硫交换反应而变得复杂了。

③ 氧化亚硫酸分解法

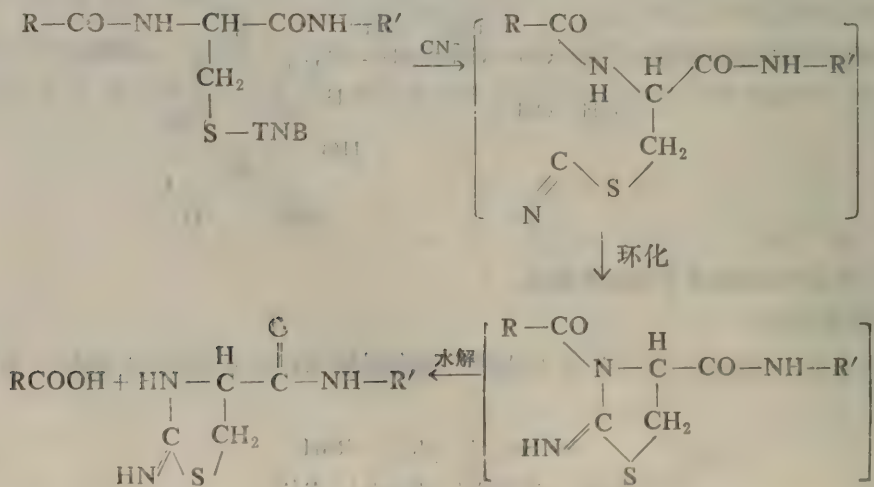
在氧化剂,如 Cu^{2+} 、亚碘酰基苯甲酸存在下,于碱性溶液中,通过亚硫酸分解作用,可以使二硫键完全转变成 S-磺基衍生物,如下式:



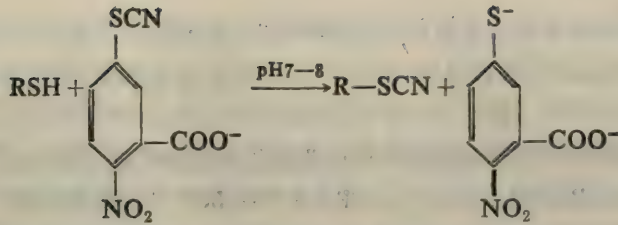
反应条件很激烈,可能有氧化副反应。Chan 提出一个较温和的亚硫酸分解法^[20]。在 pH 7.0—8.5, 有氧情况下,用含有催化量的半胱氨酸和 β -巯基乙胺的 8 M 脲处理蛋白质,则二硫键可转化成 S-磺化衍生物。蛋白质的 S-磺化衍生物在中性和酸性 pH 下是稳定的,而且易溶于水。S-磺化修饰的基团很容易通过加入过量的硫醇而除掉。醛缩酶完全磺化后没有活力,用硫醇还原后,活力完全恢复。

④ 用氰化物裂解

氰化物裂解肽中的二硫键,产生硫代氨基丙氨酰衍生物,此产物又能环化成 3-酰基-2-亚胺噻唑烷,其中的 N-酰基键能被水解。Vanaman 根据这个反应提出一个在半胱氨酸处特异裂解蛋白质的有意义的方法^[21]。先用 DTT 将蛋白质中的二硫键全部还原;再让还原的蛋白质与过量 DTNB 反应;反应所得到的硫代硝基苯甲酸(TNB)衍生物再与过量氰化物作用(于 pH 7),结果得到在半胱氨酸处的裂解肽,如下式:



在二硫键存在下,2-硝基-5-硫氨基苯甲酸可使巯基直接氰酰化,但并不裂解二硫键^[22]。



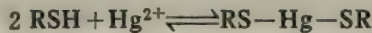
文献^[22]介绍了利用硫氰基衍生物选择性地裂解蛋白质中半胱氨酸残基的氨基肽键的方法。这个特异性的化学裂解法,在氨基酸顺序分析中与溴化氰裂解蛋氨酸残基的肽键法同样重要。S-氰基半胱氨酸衍生物是小的、不带电分子。在研究巯基对蛋白质的结构和功能的作用中,必定要用到它。

⑤ 二硫键裂解的其它方法

除了上面说的反应之外,二硫键还能被过甲酸氧化成半胱氨酸。这个反应常用来制备蛋白质衍生物和测定蛋白质中半个胱氨酸和半胱氨酸的含量^[23]。三丁基亚磷酸盐也可用作二硫键的还原剂。

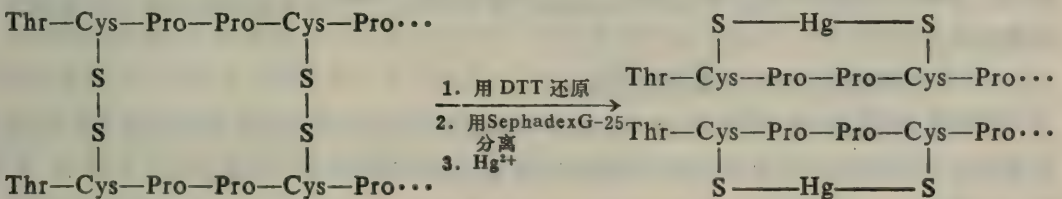
⑥ S—Hg—S 衍生物的生成

Steinberg 利用 Hg^{2+} 对巯基的高度特异性,提出一个精巧的修饰二硫键的方法^[24]。 Hg^{2+} 与过量硫醇的反应,如下所示:



平衡非常偏向于右边。S—Hg—S 键是线性的,大约比 S—S 键长 3 Å。这个修饰提供了一个在特定部位引入重金属原子的方法,还可以用这个修饰来考察加长二硫键对蛋白质生物活力和构象的影响。

在还原几个二硫键的情况下,加入 Hg^{2+} 可能发生重新配对。例如,当人的骨髓瘤蛋白 Fc 碎片的二个临近链间桥被还原,然后与 Hg^{2+} 反应时,则重新形成的是链内桥 S—Hg—S, 如下所示:



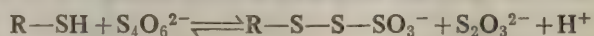
(2) 巯基通常是最活泼的蛋白质侧链,很容易与酰化剂、芳基化剂和烷基化剂反应,还能与芳基亚磺酰卤化物形成混合二硫化物。

最早用来修饰巯基的试剂是对汞苯甲酸 (PMB) 及其更易溶于水的类似物对汞苯甲磺酸 (PMBS)。

α -卤酸和酰胺,在弱碱性 pH 下,对巯基有高度选择性,在氨基酸顺序分析中广泛用来制备蛋白质衍生物。同时用这类试剂的烷化反应还可以考察酶的活性部位上的巯基的环境和反应性。

自旋标记、荧光标记和放射性取代,常常要利用巯基的高度反应性。硫醇和二硫化物的交换反应对于这些标记来说是特别有用的,如与二(二甲基氨基萘磺酰)胱氨酸的交换,能引进荧光标记^[25]。

连四硫酸盐能选择性地与巯基反应,形成亚磺酰硫代硫酸盐,如下式:



加入硫醇很容易使巯基再生。这种温和的修饰能防止自动水解和在蛋白质提纯期间的蛋白酶水解。将链球菌蛋白酶活性部位上的巯基转变成亚磺酰硫代硫酸盐后,就可以使这个酶活性部位上的组氨酸烷基化,然后再使巯基再生。在解释修饰结果时,必须小心谨慎。例如,用碘乙酸、PMB、N-乙基顺丁烯二酰亚胺和DTNB修饰棕色固氮菌异柠檬酸脱氢酶的最活泼的巯基,结果使此酶的活力几乎完全丧失。但是,将钝化的酶的单硫代硝基苯甲酸衍生物转变成硫氰基衍生物,则酶活力可恢复30—50%。而且NAD⁺和异柠檬酸对天然酶和它的单硫氰基衍生物的*K_m*值是相同的^[26],所以最活泼的巯基显然不是这个酶的催化活性所必须的。

5、组氨酸残基的修饰

目前还没有特异性的修饰剂。修饰组氨酸的试剂有:重氮-1-氢-四唑(DHT)^[27]、乙氧基甲酸酐(也叫焦碳酸二乙酯)^[28]、2,4-二硝基氟苯、 α -卤酸、碘、N-溴代琥珀酰亚胺和溴代丙酮等。

6、蛋氨酸残基侧链的修饰

用碘乙酰胺烷化蛋氨酸残基,能形成正电铯盐。将此肽置于沸水浴中,则可选择性地裂解肽中的羧酰胺基甲基-蛋氨酸键,此反应类似于溴化氰裂解肽键的反应^[29]。在碱性pH下,铯盐与巯基乙醇作用,可再生出硫醚。此外还可用H₂O₂和卤代烷使蛋氨酸残基氧化和烷化。过甲酸除了能氧化半个胱氨酸和色氨酸外,还能把蛋氨酸转变成砜。

7、色氨酸残基侧链的修饰

N-溴代琥珀酰亚胺在温和条件下氧化色氨酸。酪、组、半胱氨酸也同时被氧化。这反应可用于分光光度法测定蛋白质中色氨酸的含量,并能在色氨酸和酪氨酸残基处选择性化学裂解肽键^[30]。使用2-羟基-5-硝基苄基溴要在强酸介质中进行,产物是复杂的混合物。主要副反应是巯基的烷化^[31]。

8、蛋白质中酪氨酸残基侧链的修饰

修饰酚环可以得到具有不同最大吸收和不同消光系数的发色基团。酚羟基的pK_a对环的取代也敏感。因此,通常用分光光度法检查酪氨酸的修饰,但常常检不出副反应。如用N-乙酰咪唑修饰酪氨酸时,其产物在278 nm处的光吸收显著减弱;在262 nm处的光吸收增强。

修饰酪氨酸的常用方法是碘化法和硝化法。蛋白质的碘化是很有意义的修饰,因为有二个放射性同位素、I¹²⁵、I¹³¹可供利用。在弱碱性pH下,蛋白质碘化的主要产物是单碘和二碘衍生物^[32]。但也可能发生组氨酸碘化、半胱氨酸和蛋氨酸侧链氧化。还要注意不寻常的氧化反应可能发生,如,溶菌酶中的色氨酸残基容易氧化。因此,引进较温和的碘化法看来是很有意义的。

用四硝基甲烷(TNM)修饰酪氨酸有不少优点。修饰产物3-硝基酪氨酸的pK_a大约是7。硝基苯酚离子在可见光谱区有强烈吸收,因而可以很容易测定硝化程度和修饰残基pK_a的剧烈变化对结构和功能的影响。3-硝基酪氨酸残基有旋光性,此外它的吸收光谱对环境的极性也很

敏感,所以,可以用它作为“报告”基团。3-硝基酪氨酸在酸水解条件下相当稳定,而且能用氨基酸分析定量。

TNM 在研究酪氨酸的修饰中虽有上述优点,但也有一些问题。TNM 能促进蛋白质中分子内和分子间的交联。除了交联以外, TNM 还能氧化半胱氨酸和蛋氨酸残基^[33]。除了这些限制以外,分级和鉴定蛋白质衍生物的技术必须非常有效。在这方面促黄体激素硝化产物的分离就是一个很好的例子^[34]。

第四节 亲和标记

亲和标记是一种特殊的化学修饰方法。它是利用酶和底物的亲和性,使用与酶底物类似的修饰剂,对酶活性部位上的氨基酸残基进行共价标记。因此,此法对研究酶的结构与功能具有重要意义,这一点将在第十二章讨论。这里只简述亲和标记的一般情况。

设计亲和标记要满足二个条件:第一,亲和试剂应当对活性部位专一性地结合;第二,亲和试剂必须含有能与某些氨基酸残基起反应的化学基团。在适宜的条件下,反应只能在活性部位上及其附近的氨基酸残基上进行。蛋白质的正常的配位体、底物和抑制剂的结构,可作为设计亲和试剂(特异部位试剂)的参考。亲和试剂有时也叫导向活性部位的试剂。关于亲和标记的历史和基本原理在文献^[35-37]中已有详细讨论。

亲和试剂作为底物类似物有如下标准:第一,反应速度对试剂浓度的依赖关系应当表明结合部位是饱和的;第二,对正常的配位体来说,参加反应的试剂的量应与结合部位的数目成化学计量关系;第三,正常配位体的存在应减弱与底物类似物的反应速度。

对于一个特定的酶,设计亲和标记只是一个有机化学中的问题。查阅文献就可以知道,大多数成功的亲和标记研究都是用 α -卤代乙酰化合物(或 α -卤代酸)、 α -卤代酮进行的。这类化合物有一个有利条件,即它们能与蛋白质分子的每一个亲核侧链反应。例如, α -卤代酸、卤代酰胺和带有卤代乙酰基的底物类似物可与各种酶活性部位中的 ϵ -氨基、羧基、咪唑基、巯基、苯酚的和脂肪族的羟基反应。标记的特异性主要是由于试剂与蛋白质形成的复合物大大增加了结合部位上试剂的浓度,因此,当溶液中试剂的浓度低时,也能看到在结合部位上的特异反应。选择性取代的速度将决定于试剂与结合部位互补的程度,决定于试剂对结合部位上的亲核物的倾向性。因此,底物类似物往往会使反应速度大大加强。例如, α -N-甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲基酮(TLCK)与 clostripain 活性部位上的巯基的反应速度,在同样条件下,比它与半胱氨酸的巯基的反应速度快 10^8 倍。

应当指出,亲和标记并不总是产生单一部位的修饰。溴代丙酮酸盐能酯化一种醛缩酶活性部位上的羧基,也能烷化它的巯基^[38],形成的酯和硫醇盐的比例取决于盐浓度。在 $1 M NaCl$ 溶液中,有利于硫醇盐生成。这是由于此酶有二个不同的构象,这二个构象随盐浓度而成比例地改变。因为溴代丙酮酸盐对这二种构象中活性部位上亲核物的倾向性不同,因此,产生不同的共价产物。

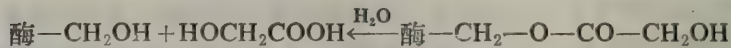
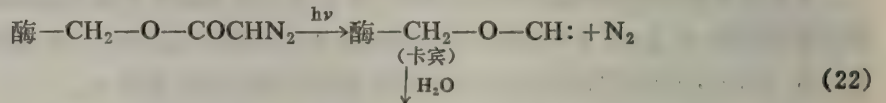
亲和标记的另一种有用的形式是使用具有潜在反应基团的底物类似物。这类化合物叫做“Kcat 抑制剂”,因为它们作用的机理是通过目标酶将其转变成有反应性的修饰剂^[39]。例如,大

肠杆菌 β -羟癸基硫酸酯还原酶可被底物类似物 $\Delta^3,4$ -癸基 N-乙酰半胱胺不可逆抑制。此酶能将没有反应性的炔属底物类似物转变成有高度反应性的共轭丙二烯，此物能使酶活性部位上的组氨酸烷基化。

显然，Kcat 抑制剂比一般的底物类似物要特异得多，因为它的潜在反应基因是在它到达目标酶的活性部位上，才开始起作用。文献中^[89]详细讨论了 Kcat 抑制剂，强调指出了它在治疗上的价值。

第五节 光化学标记

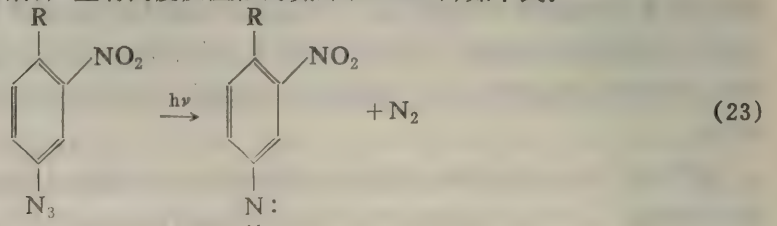
光化学标记是亲和标记的一个很重要的变体，因此，有时也叫光亲和标记。此法是 Westheimer 及其同事于 1962 年提出的^[40]。它是将重氮基引入到试剂中，这个试剂能共价或非共价地结合在酶的活性部位上。因此，重氮基也就被带到紧靠活性部位的残基上。重氮基在温和的 pH、温度条件下，经光照射 ($\lambda > 315 \text{ nm}$) 变成有反应性的卡宾 (carbene)，卡宾再与周围的基团反应，甚至能插入到 C—H 键。这样就有可能标记脂肪族残基。卡宾的能量很高，反应迅速，而且在它插入到附近的氨基酸残基或溶剂以前，蛋白质的构象不大可能发生改变。此法在研究胰凝乳蛋白酶和胰酶的活性部位时，得到有用的结果。 α -胰凝乳蛋白酶与 C^{14} -标记的对硝基苯重氮乙酸盐反应，得到钝化的单重氮乙酰胰凝乳蛋白酶^[41]。由产物光分解产生的卡宾主要 (约 55%) 进入水中，形成乙醇酸，同时再生出相应量的活性酶，其途径如下所示：



但是，有 20—25% 的放射性进入到蛋白质中。形成的产物包括：O-羧甲基丝氨酸、1-羧甲基组氨酸和 O-羧甲基酪氨酸。头二个产物是胰凝乳蛋白酶活性部位上的丝氨酸、组氨酸残基的衍生物。Hexter 令人信服地证明了，通过分子间反应，在胰凝乳蛋白酶二体内形成 O-羧甲基酪氨酸^[42]，因此，光化学标记能提供有关齐聚体蛋白质中分子内和分子间相互关系方面的信息。

重氮酰基衍生物有一些缺点。脂肪族重氮化合物需要有临近羧基或其它拉电子基团来稳定它。光分解这样的化合物导致 wolff 重排，形成乙烯酮。光分解产生的卡宾大部分转变成这个产物。当附近没有好的亲核剂时，乙烯酮迅速与水反应。脂肪族重氮化合物在水溶液中的稳定性也有限。

Fleet 等人引入带芳香基的叠氮化合物作为光化学标记试剂^[43]。这些化合物在黑暗中是稳定的，但用 $\lambda > 400 \text{ nm}$ 光照射后，产生有高度反应性的氮烯 (nitrene)，如下式：



在芳香氮烯中,分子内重排无关紧要。象卡宾一样,氮烯也能插入到C—H键中。文献中^[43]介绍了用芳香氮烯作为反应基亲和标记抗体的研究情况。

用芳香酮作为光亲和标记试剂看来有很多优点^[44]。用 $\lambda > 320$ nm的光照射,很容易产生三重态的芳香酮,这种酮不溶于水,不能发生重排或分子内反应。

可以相信,光化学标记会有越来越多的用途。在放射性标记膜上的特殊大分子和其它细胞器方面,光化学标记似乎是很有价值的。

第六节 敏化光氧化

当光敏剂(即对光敏感的物质,如结晶紫、甲烯兰、磷酸吡哆醛等)与蛋白质共存时,若用可见光照射,则光敏剂能产生亲电子的单态氧,去氧化蛋白质的氨基酸侧链,这就是蛋白质的敏化光氧化过程。对此过程目前有二种看法。一种认为,敏化光氧化并不决定于光敏剂与蛋白质间的特异性络合;另一种认为,正是由于光敏剂与蛋白质形成特异性的共价(或非共价)络合物,才使蛋白质的敏化光氧化具有部位特异性和立体特异性。

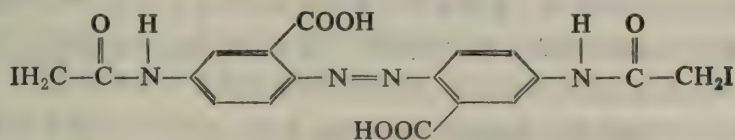
敏化光氧化法已经引入二十多年了^[45],但多年来很少得到应用。可是,最近对各种光敏剂选择性的研究,特别是对反应条件的研究,取得了可喜的进展。

光敏化氧化氨基酸的主要机理看来是,能量从三重态敏化剂转移到基态三重氧,从而产生单态,亲电子的单态氧可能进攻富有电子的半胱氨酸、蛋氨酸、组氨酸、色氨酸、酪氨酸侧链^[46]。在低pH下,质子化的组氨酸、酪氨酸残基在光氧化期间是稳定的。小心控制反应条件、适当选择敏化剂,可以选择性地修饰半胱氨酸、蛋氨酸或色氨酸。迄今,研究过的蛋白质的数目有限。据报告,光敏化氧化能显示出很强的侧链特异性,而且没有副反应^[47]。

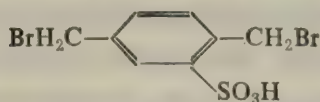
第七节 双功能试剂

近年来,设计了一些对称的“双头”试剂,可以在相隔较近的两个氨基酸残基之间搭桥,形成多肽链内的交联,而不引起蛋白质构象的重大改变,这种试剂称为双功能试剂。文献中^[48]简要介绍了双功能试剂的类型、反应条件、特异性等。双功能试剂主要有以下几类:

烷基卤化物类:

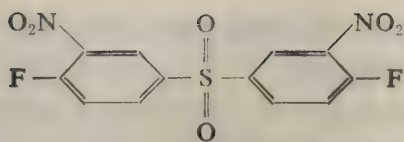


2,2'-二羧基-4,4'-二碘乙酰基偶氮苯

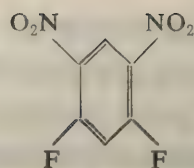


α, α' -二溴对二甲苯磺酸

芳香族卤化物类:

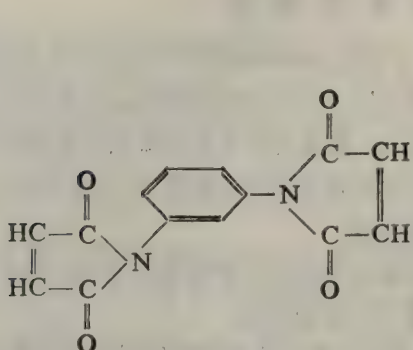


P, P'-二氟-m, m'-二硝基二苯磺

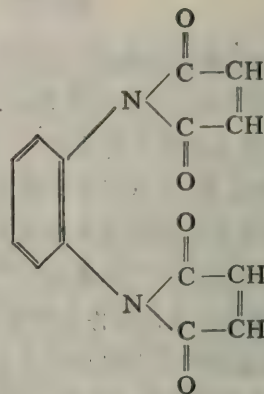


1,5-二氟-2,4-二硝基苯

顺丁烯二酰脲亚胺类：

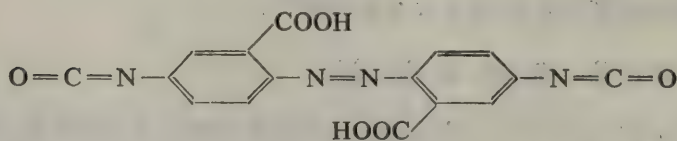


N,N'-(1,3-次苯基)二顺丁烯二酰脲亚胺

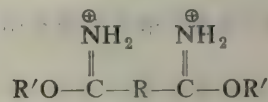


N,N'-(1,2-次苯基)二顺丁烯二酰脲亚胺

双功能的异氰酸盐



2,2'-二羧基-4,4'-偶氮苯基二异氰酸



双功能的亚酰胺酯的一般结构

R = -CH₂-，丙二亚胺酸二甲酯
R = -(CH₂)₄-，己二亚胺酸二甲酯
R = -(CH₂)₆-，辛二亚胺酸二甲酯

蛋白质与双功能试剂的反应，直接有助于通过接近效应来研究蛋白质的折叠。当蛋白质浓度很大时，双功能试剂也能形成分子间的交联键，使蛋白质对变性趋于稳定。在病毒、核微粒、抗原-抗体系统等多相而复杂的生物体系中，双功能试剂的应用很有发展前途。

双功能试剂可用来测定蛋白质亚基的量。例如，用辛二亚胺酸二甲酯与齐聚体蛋白作用，使在同一亚基内和多个亚基的赖氨酸残基之间形成交联，再进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，即可测定齐聚体蛋白的分子量和亚基数目，以阐明亚基的组合情况(如是单体、二体还是三体等)^[49]。

提高交联反应特异性的方法很多。为此，常常要小心控制 pH。设计双功能试剂要利用蛋白质上活泼的反应基。例如，二溴丙酮能与木瓜酶、无花果蛋白酶活性部位上的巯基非常迅速和特异性地反应，然后与临近的组氨酸残基形成一个分子内的交联键。使用基团特异性高的试剂常能得到选择性交联。

第八节 化学修饰的某些应用

化学修饰的应用,在前面的各节中已经涉及到了。下面再作一简单概括。

一、蛋白质的结构与功能

化学修饰在这方面的应用最多,研究得也比较细。在核磁共振出现以前,研究蛋白质的结构与功能的关系主要靠化学修饰,特别是蛋白质的可逆化学修饰,在这方面能提供大量的信息。

在第三节中已经谈到,修饰蛋白质的氨基的过程中,可以向蛋白质引入正电荷或负电荷。通过蛋白质的羧基同水溶性碳二亚胺反应,也可以向蛋白质中引进一个正电荷。这样就改变了蛋白质的表面电荷。由此而产生的静电效应常引起分子膨胀,这有利于蛋白质和水的相互作用,甚至可造成蛋白质分子之间的接触点断裂。因此,不需加入脲或胍,一些齐聚体蛋白质即选择性地被解离成可溶性亚基。它们在水中很少发生聚集,并保持其生物活性,从而大大便利了这些蛋白质分子量的精确测定^[60]。

在氨基酸顺序分析中,也常用到化学修饰。由于胰酶对精氨酸和赖氨酸具有高度特异性,故常用此酶水解蛋白质,以制备肽碎片,这就提出了如何防止精氨酸和赖氨酸相互干扰的问题。为此可利用选择性化学修饰剂修饰精氨酸或赖氨酸,使水解局限在其中一个残基的肽键上。

化学修饰也可用于免疫化学。最初用来证明抗非生物性的半抗原(如二硝基苯基)的抗体可以在体内产生。抗原和抗体的结合取决于同一类型的非共价相互作用。化学修饰抗体后,再测定它与抗原相互作用的能力是否有改变,就能知道与束缚有关的功能基的类型。

关于双功能试剂在研究蛋白质的结构与功能中的应用已在第七节中谈过了。

文献中^[61]介绍了一些用来影响蛋白质的功能性质的化学修饰。

二、酶

现在,选择性化学修饰已日益广泛地用于酶类活性部位的组成及其催化作用机理的研究,如对胰凝乳蛋白酶等活性部位的研究。与此有关的部分将在第十二章叙述。

三、激素

有人用四硝基甲烷修饰酪氨酸残基的反应,比较了促黄体生成素(LH)和促甲状腺素(TSH)的 α 和 β -亚基的多肽链组成,并证明 LH- α 链的第 41 位酪氨酸残基参与了 α 和 β -亚基之间的相互作用^[62]。据报导,以乙脒($\text{CH}_3-\text{C} \begin{matrix} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$)与甲状旁腺激素(PTH)所含氨基起反应,在

10 个氨基中共有 8 个被乙脒化。再对引入的乙脒基进行氟化,可制成 PTH 的有效示踪剂^[63]。

此外,在血浆代用品的研究中也用到了化学修饰。用选择性化学修饰法可以消除牛血清白蛋白的抗原“决定簇”。如,经甲基化等操作处理后,天然牛血清白蛋白的大部分抗原决定簇被破坏^[64]。但能否采用动物血,经加工以代替人血输入人体,尚有不少问题有待解决。

人静脉注射用的生物学药品也要求没有抗原性。例如,天冬酰胺酶是治疗白血病的有效药物,但它往往带有抗原性,若不除去,再度使用可能引起免疫休克。因此,有人用聚乙二醇修饰此酶的二个氨基,结果,虽然酶活力丧失较多(只保留 15%),但完全消除了抗原性^[65]。

习 题

1. 什么是蛋白质的化学修饰? 什么是蛋白质的选择性化学修饰?
2. 化学修饰的基本原理包括那些内容? 影响蛋白质功能基反应性的因素有哪些? 影响修饰剂反应性的因素有哪些?
3. 解释化学修饰的结果要注意哪些问题? 考虑哪些因素才能认为一个蛋白质修饰结果是完整的、有意义的?
4. 如何选择蛋白质修饰剂? 控制修饰程度和修饰部位的方法有哪些? 怎样才能得到特异性高的选择修饰?
5. 蛋白质有哪些侧链可被化学修饰? 用来修饰的主要试剂是什么? 有何优缺点?
6. 裂解二硫键的方法有哪些? 有何用途?
7. 什么是亲和标记? 它有何价值? 设计亲和标记要满足什么条件?
8. 什么是光化学标记和敏化光氧化?
9. 双功能试剂在蛋白质研究中有何作用?
10. 化学修饰在生物学中有何应用?

参 考 文 献

1. A. N. Glazer, In "Proteins" Vol. II. 3rd, ed. by H. Neurath and R. L. Hill P. 2—88, 1976
2. L. A. Cohen. In "Enzymes". Vol. 1. 3rd, ed. by P. D. Boyer. P 147—211, 1970
3. J. L. Markley, Accounts Chem. Res., 8, 70 (1975)
4. H. Kaplan, et al., Biochem. J., 124, 289 (1971)
5. H. Kaplan, J. Mol. Biol., 72, 153 (1972)
6. G. E. Means, et al., "Chemical Modification of Proteins" Benjamin, New York, 1970
7. C. H. W. Hirs, Ed., "Methods in Enzymology", Vol. 11, 1967
8. J. Riley, et al., Biochem. J., 118, 733 (1970)
9. G. E. Means, et al., Biochemistry, 7, 2192 (1968)
10. G. R. Stark, "Methods in Enzymology" Vol. 11, P 590, 1967
11. W. F. Benisek, et al., J. Biol. Chem., 243, 4267 (1968)
12. L. Patthy, et al., Ibid., 250, 557 (1975)
13. J. D. Glass, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 527 (1978)
14. K. Takahashi, J. Biol. Chem., 243, 6171 (1968)
15. J. P. Riehm, et al., Biochemistry, 5, 99 (1966)
16. D. G. Hoare, et al., J. Biol. Chem., 242, 2447 (1967)
17. K. L. Carraway, et al., "Methods in Enzymology" Vol. 25, P. 616 (C. H. W. Hirs et al., Eds.) 1972
18. P. Bodlaender, et al., Biochemistry, 8, 4941 (1969)
19. W. W. Cleland, Ibid., 3, 480 (1964)
20. W. W. C. Chan, Ibid., 7, 4247 (1968)
21. T. C. Vanaman, et al., J. Biol. Chem., 245, 3565 (1970)
22. Y. Degani, et al., Biochemistry, 13, 1 (1974)
23. S. Moore, J. Biol. Chem., 238, 235 (1963)
24. L. Z. Steinberg, et al., "Conformation of Biopolymers" (G. N. Ramachandran ed.) Vol. 1, P. 215, 1967
25. L. Stryer, "Ciba Foundation Symposium on Molecular Properties of Drug Receptors" (R. Porter, et al., eds) P. 133, 1970

26. A. E. Chung, et al., *Biochemistry*, 10, 2872 (1971)
27. H. Horinishi, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 86, 477 (1964)
28. A. Mühlrad, et al., *Ibid.*, 181, 184 (1969)
29. J. Tang, et al., *Biochem. J.*, 118, 611 (1970)
30. T. F. Spande, et al., *Advan. Protein Chem.*, 24, 97 (1970)
31. T. M. Radhakrishnan, et al., *FEBS. Lett.*, 7, 72 (1970)
32. A. N. Glazer, et al., *Biochem. J.*, 90, 92 (1964)
33. J. F. Riordan, et al., *Accounts Chem. Res.*, 4, 353 (1971)
34. K. W. Cheng, et al., *J. Biol. Chem.*, 247, 7163 (1972)
35. S. J. Singer, *Advan. Protein Chem.*, 22, 1 (1967)
36. E. Shaw, *Physiol. Rev.*, 50, 244 (1970)
37. R. B. Baker, "Design of Active-Site Directed Irreversible Enzyme Inhibitors" Wiley, New York, 1967
38. H. P. Meloche, *Biochemistry*, 9, 5050 (1970)
39. R. R. Rando, *Science*, 185 320 (1974)
40. A. Singh, et al., *J. Biol. Chem.*, 237, PC 3006 (1962)
41. J. Shafer, et al., *Ibid.*, 241, 421 (1966)
42. C. S. Hexter, et al., *Ibid.*, 246, 3928 (1971)
43. H. Chaimovich, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 4088 (1968)
44. R. E. Galardy, et al., *Nature (London), New Biol.*, 242, 126 (1973)
45. L. Weil, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 90 (1951)
46. W. J. Jr. Ray., "Methods in Enzymology" Vol. 11, P. 490, 1967
47. E. Scoffone, et al., *Biochem. Soc. Symp.*, 31, 163 (1970)
48. F. Wold, "Methods in Enzymology" Vol. 25, P. 623, 1972
49. G. E. Davies, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 66, 651 (1970)
50. A. N. Glazer., *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 101 (1970)
51. K. D. Schwenke., *Nahrung*, 22 (1), 101 (1978)
52. K-W. Cheng, et al., *J. Biol. Chem.*, 247, 7163 (1972)
53. J. E. Zull, et al., *Ibid.*, 250, 1668 (1975)
54. V. Schirmacher, et al., *J. Immunol*, 113, 1635 (1974)
55. 芦原义弘ら, *化学の領域* 33, 44 (1979)

第八章 蛋白质分子构象

第一节 引言^(6,13,17)

蛋白质分子,没有严格的定义,一般地说,它是具有完整生物功能的蛋白质的最小单位。蛋白质分子具有一条或多条肽链。肽链既不是直线,也不是任意的线团,而是在三维空间上有特定的走向与排布。

蛋白质分子的构象又叫空间结构、高级结构、立体结构、三维构象,等等,指的是:蛋白质分子中所有原子在三度空间中的排布。

蛋白质的分子结构可以分成一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。

关于蛋白质二、三级结构的定义,有不同意见,这里作下列定义:

所谓二级结构,就是指:多肽链主链骨架中的若干肽段,各自沿着某个轴盘旋或折迭,并以氢键维系,从而形成有规则的构象,如 α -螺旋、 β -折迭和 β -转角等。二级结构不涉及氨基酸残基的侧链构象。

所谓三级结构,就是指:一条多肽链在二级结构的基础上,由于其顺序上相隔较远的氨基酸残基侧链的相互作用,而进行范围广泛的盘旋和折迭,从而产生特定的很不规则的球状构象。换句话说,三级结构指的是:一条多肽链中所有原子的空间排布。三级结构不涉及一条多肽链上的原子与另一条多肽链的关系。必须指出,该定义仅适用于球状蛋白。

有关四级结构的定义将在第五节叙述。

有些蛋白质分子仅有一、二、三级结构,而没有四级结构,如肌红蛋白、细胞色素c、溶菌酶、核糖核酸酶、羧肽酶A,等等;另外一些蛋白质分子,不但有一、二、三级结构,而且还有四级结构,如血红蛋白、固氮酶、乳酸脱氢酶、天冬氨酸转氨甲酰酶,等等。

在描写蛋白质分子空间结构方面,过去常用构象与构型这两个容易混淆的概念,现在,大家认为,这两个概念,应有所区别,确定用构象一词。

“构型”指的是,在一个化合物分子中,原子的空间排列,这种排列的改变,会涉及到共价键的生成与破坏,但与氢键无关,如氨基酸的D-和L-型是构型。

“构象”指的是,多肽链中的一切原子,由于单键的旋转而产生不同的空间排布;这种空间排布的变化,仅涉及到氢键等次级键的生成与断裂,但不涉及共价键的生成与断裂。

蛋白质的功能,不仅与蛋白质的一级结构有关,而且还与蛋白质的空间结构有关。如果我们只了解蛋白质的一级结构,而不了解蛋白质的空间结构,那末,我们就不可能全面彻底地阐明蛋白质结构与功能的相互关系。例如:Ser-195、His-57、Asp-102是胰凝乳蛋白酶分子的活性部位。如果我们不了解胰凝乳蛋白酶分子的空间结构,那末,我们就无法理解在多肽链的氨基酸顺序上相距很远的这三个氨基酸残基为什么能够在一起共同催化底物反应。但是,在弄清了此酶的空间结构之后,我们就会知道:这三个氨基酸残基,虽然在肽链的氨基酸顺序上相距很远,但

是,由于肽链的盘旋、折迭,使它们紧密接近,形成了一个凹形的夹攻底物的活性部位。由此可见,没有一定的空间结构,这三个氨基酸残基是不可能在一起共同催化底物反应的。因此,为了要弄清蛋白质结构与功能的相互关系,我们不仅要测定蛋白质的一级结构,而且更要测定它的空间结构。

由于空间结构对于生物功能的重要性,因此,早在本世纪三十年代,就有人研究蛋白质空间结构。从本世纪三十年代起,直到现在,蛋白质空间结构的研究,已经有将近五十年的历史了。它经历了两个发展时期。这两个发展时期,大致上可以以1960年为分界线。在1960年以前,研究的对象主要是结构较简单的各种纤维蛋白,研究的主要途径是:建立模型,以解释纤维蛋白的X-射线衍射图。1951年Pauling和Corey根据他们在氨基酸和小肽方面进行X-射线结构分析所获得的键长、键角数据,提出了蛋白质立体化学原理和 α -螺旋模型,从而为蛋白质空间结构的研究,奠定了理论基础,为研究蛋白质空间结构的历史征途,树立了第一个里程碑。1960年,Kendrew及其同事,由于实验技术的重大突破,第一次以 2\AA 分辨力的X-射线结构分析法,揭示了肌红蛋白的二、三级结构,第一次证实了 α -螺旋的存在,从而为蛋白质空间结构的研究,开辟了一条新途径,为研究蛋白质空间结构的历史征途树立了第二个里程碑。从此以后,研究的主要对象是结构复杂的结晶球蛋白,研究的主要途径是:制备合适的蛋白质单晶,同时,制备引入重金属原子的同晶型蛋白质单晶,记录与分析这两种样品的X-射线衍射图,确定相位,绘出电子密度图,参考一级结构,最后确定蛋白质空间结构。

1965年,Phillips等人,第一次以 2\AA 分辨力,揭示了溶菌酶分子的空间结构,发现酶分子表面有一个很深的裂隙(活性部位),从而为研究蛋白质空间结构的历史征途,树立了第三个里程碑。

到目前为止,运用X-射线结构分析法,已对50多种蛋白质空间结构,作出不同程度的揭示,研究的最高水平,是 1.4\AA 分辨力的肌红蛋白的测定结果。近年来,中子衍射法在研究结晶球蛋白的空间结构方面,已初露头角,比X-射线结构分析法有更多的优越性,正受到人们极大的重视。相信在不久的将来,蛋白质空间结构及其与功能相互关系的研究,将会取得更大的成就。

第二节 维持蛋白质分子构象的化学键^(1,4,6,16,21)

蛋白质分子的二、三、四级结构离开了化学键是不可能存在的。现已知道,维持蛋白质分子构象的有下列化学键:氢键;疏水键;范德华引力;离子键;二硫键;配位键,如图8-1所示。

一、氢键

氢键这一名词,有两种不同的含意。第一种,指 $X-H\cdots Y$ 的整个结构。氢键的键长,就是指,从X到Y之间的距离。第二种,专指 $H\cdots Y$ 之间的结合力。氢键的键能,就是指,打开 $H\cdots Y$ 的结合所需要的能量。

生成氢键必须具备两个条件:

① 必须有氢的供体($X-H$),这X原子必须是电负性较大、半径较小的原子,如:N, O, F, Cl。

② 必须有氢的受体(Y),这Y原子必须是电负性较大、半径较小、含独对电子的原子,如:N, O, F, Cl。

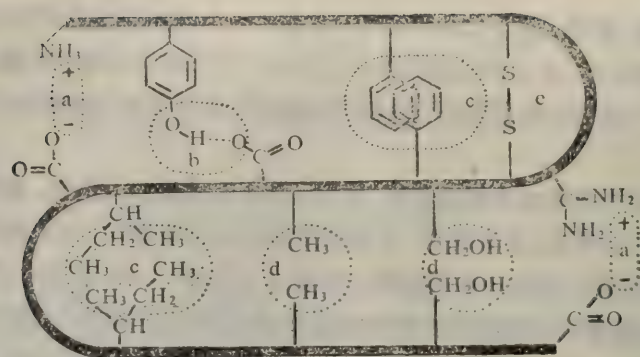
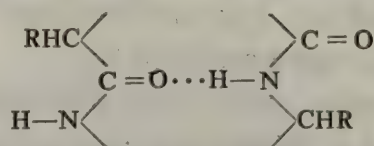


图 8-1 维持蛋白质分子构象的各种化学键
(a) 离子键;(b) 氢键;(c) 疏水键;(d) 范德华引力;(e) 二硫键。

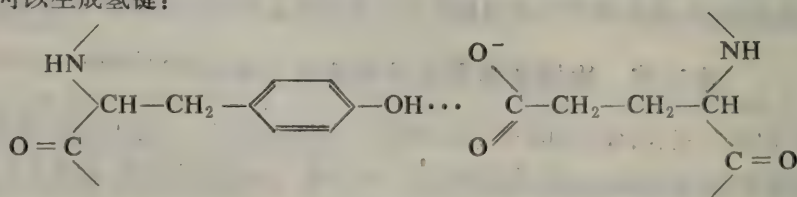
与电负性较大的 X 原子共价结合的 H 原子, 由于其本身带正电荷, 没有内层电子, 半径较小, 不被其它原子排斥, 因而, 能与另一个电负性较大、半径较小的 Y 原子的独对电子, 互相吸引, 生成氢键, 即 $X-H \cdots Y$ 。

在二条多肽链之间, 或一条多肽链的不同部位之间, 主链骨架上的羰基氧原子与亚氨基氢原子生成氢键:

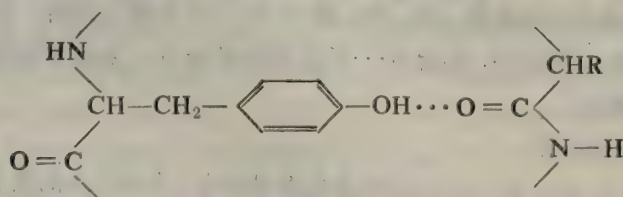


N, H, O, C 在一条直线上, 氢键的键能大约为 8 千卡/克分子, 氢键长度为 $2.79 \pm 0.12 \text{ \AA}$ 。这种氢键, 对于维持蛋白质二级结构, 保持蛋白质的稳定性, 起着极其重要的作用。

在蛋白质的某些侧链之间, 如酪氨酸残基的 -OH 基与谷氨酸残基或天冬氨酸残基的 -COOH 基, 可以生成氢键:

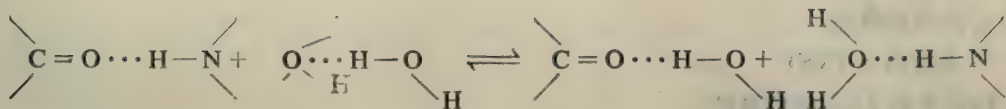


某些侧链与主链骨架之间, 如 Tyr 的 OH 基与主链骨架的 C=O 基, 可以生成氢键:



侧链之间及侧链与主链骨架之间的氢键, 虽然数量不多, 但对维持蛋白质三、四级结构, 亦有一定的作用。

在水溶液中, 极性水分子能与蛋白质分子中的氢供体或氢受体生成氢键:



上述平衡趋向左方,即蛋白质分子在水中仍然是稳定的,但是,其氢键的能量已相应地降低了。

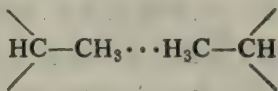
二、疏水键

疏水键就是指,两个非极性基团(疏水基团)为了避开水相而群集在一起的作用力,如图 8-1c 所示。

在蛋白质分子中,含有非极性侧链(疏水侧链)的氨基酸残基有:

Leu、Ile、Phe、Val、Try、Ala、Pro。

两个非极性侧链之间可以生成疏水键,如:



非极性侧链与主链骨架的 α -CH 基也可以生成疏水键。

在蛋白质分子的多肽链中,上述氨基酸残基的疏水侧链,有一种自然的趋势,即避开水相,互相粘附,藏于蛋白质分子的内部。很显然,疏水键对于维持蛋白质分子的三、四级结构,一定起着主要的作用。

三、范德华引力

范德华引力又叫范德华键。其实质也是静电引力。它有三种表现形式:

- ① 极性基团(如 Ser 的 -OH 基)之间,偶极与偶极的相互吸引(取向力);
- ② 极性基团的偶极与非极性基团的诱导偶极之间的相互吸引(诱导力);
- ③ 非极性基团瞬时偶极之间的相互吸引(色散力)。

其共同的特点是:引力与距离的六次方成反比。

总的趋势是:互相吸引,但不相碰。因为当上述二基团靠得很近时,电子云之间的斥力就增大,使二者不能相碰。范德华引力的键长为 3—5 Å,键能为 1—3 千卡/克分子。它对维持蛋白质的三、四级结构,亦有一定的贡献。

值得指出的是:实际上,氢键就是一种特殊的范德华引力。

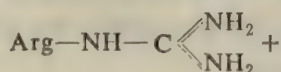
四、离子键

离子键又叫盐键,或盐桥。离子键是由于正负离子之间的静电吸引所形成的化学键,如图 8-1a 所示。

在蛋白质分子中,往往有带正电荷的基团和带负电荷的基团。其中,带正电荷的基团有:

N-末端的 α -NH₃⁺

肽链中的 Lys- ϵ -NH₃⁺



带负电荷的基团有:

C-末端的 $\alpha\text{-COO}^-$

肽链中的 $\text{Asp-}\beta\text{-COO}^-$

$\text{Glu-}\gamma\text{-COO}^-$

在蛋白质的空间结构与环境都适宜的情况下,上述正负离子可以生成离子键,如图 8-1 a 所示。

高浓度的盐,过高或过低的 pH 值,可以破坏蛋白质构象中的离子键。如果溶液的 pH 比羧基的 pK 值低 1—2 pH 单位,或者比氨基的 pH 值高 1—2 pH 单位,那末,这些基团就不能生成离子键。这是强酸强碱使蛋白质变性的原因。

五、配位键

所谓配位键,就是指:在两个原子之间,由于单方面提供共用电子对,所形成的共价键。

不少蛋白质分子含有金属离子。如:铁氧还蛋白、固氮酶铁蛋白及细胞色素 C,含有铁离子,胰岛素含有锌离子,等等。金属离子与蛋白质的连接,往往是配位键。在一些金属蛋白质分子中,金属离子通过配位键参与维持蛋白质的三、四级结构。当用螯合剂从蛋白质中除去金属离子时,则蛋白质分子便解离成亚单位,或者是三级结构遭到局部破坏,以致活力丧失。

六、二硫键

二硫键($-\text{S}-\text{S}-$)又叫二硫桥或硫硫桥。二硫键就是指,两个硫原子之间的化学键。其键能很大(大约 30—100 千卡/克分子),是很强的化学键。它可以把不同的肽链、或同一条肽链的不同部分连接起来,对稳定蛋白质的构象起重要作用。在某些蛋白质中,二硫键一旦破坏,则蛋白质的生物活力即丧失。二硫键的数目增多,则蛋白质分子抗拒外界因素的能力也加强,即蛋白质分子的稳定性也增加。在生物体中,具有保护功能的毛、发、鳞、甲、角、爪中的角蛋白,含二硫键最多,因此,角蛋白对外界的一般物理化学因素都非常稳定。

维持蛋白质分子二、三、四级结构的化学键,主要是次级键,如:氢键、疏水键和范德华引力。这些次级键单独存在时,的确是比较弱的键,但是,各种次级键加在一起时,就产生了一种足以维持蛋白质空间结构的强大作用力。在一些蛋白质分子中,离子键、二硫键或配位键也参与维持蛋白质空间结构。

第三节 X-射线结构分析的基本原理(1,8,17,19)

X-射线是波长很短的电磁波,约 0.1—100 Å。结构分析用的是单色 X-射线,其波长在 1 Å 数量级,相当于分子中原子之间的距离。用于结构分析的仪器是 X-射线仪。该仪器主要由 X-射线管、滤波器、高压系统、真空系统和照相机所组成。高压系统为 X-射线管提供所需要的电压(30—50 KV);真空系统使 X-射线管维持一定的真空度(10^{-4} — 10^{-5} mmHg 柱)。由 X-射线管产生的各种波长的 X-射线,经过滤波器(如镍片等)得到一定波长的单色 X-射线。单色 X-射线通过晶体,产生衍射线,用照相机记录下来,得到衍射图(图 8-2 所示的一些斑点与线条),然后,通过对衍射图中衍射斑点的位置与强度的测定与计算,并参照化学分析的结果,就可以确定晶体结构。这就是 X-射线结构分析方法(X-光衍射法)。

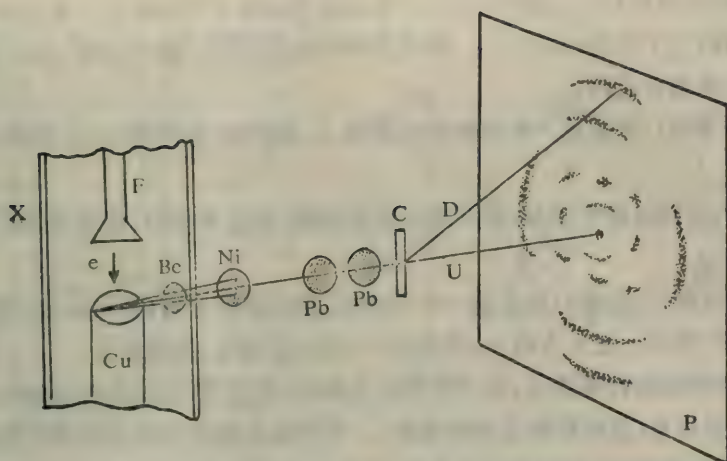


图 8-2 X-射线衍射示意图

X: X-射线管(其中 F: 白热灯丝,产生电子(e);Cu: 阳极靶,产生 X-射线);Bc: 窗口;
Ni: 镍片,获得单色 X-射线;Pb: 平行光系统,获得一束细而平行的 X-射线;C: 纤维样品;U: 未衍射的光束;D: 衍射光束;P: 照相底片上的衍射图。

X-射线结构分析是研究物质结构的一种非常重要的方法。它在研究蛋白质分子的空间结构及其与功能的相互关系方面,也发挥了巨大的作用。由于这一方法的应用,蛋白质分子的空间结构及其与功能的相互关系的研究,取得了一些重大的突破。

X-射线结构分析是一种非常复杂的实验技术。本节仅就 X-射线结构分析的基本原理,作一简单介绍。详细情况请看有关参考书。

一、晶体结构的基本知识

日常所见的许多晶体,如:氯化钠、金刚石等,外形都是非常有规则的。外形的规则性是内部结构的反映。

晶体通常是由离子、原子或分子构成的。例如:食盐晶体是由 Na^+ 与 Cl^- 构成的,叫离子晶体;金刚石是由 C 原子构成的晶体,叫原子晶体; CO_2 在低温时的结晶,是由 CO_2 分子构成的,叫分子晶体。

不论是那一类晶体,组成晶体的微粒(离子、原子或分子)在空间的三个方向上,都是周期性地排列的。因此,我们可以把晶体的内部结构,看成是一个空间格子(空间点阵),如图 8-3 所示。

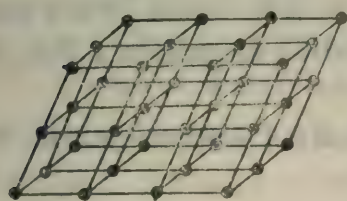


图 8-3 空间格子
•表示结点



图 8-4 直线点阵

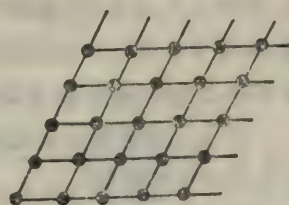


图 8-5 平面点阵

把晶体物质中的微粒(离子、原子或分子)看成是空间格子中的结点。在空间格子中,任何相同的结点,在空间的三个方向(a, b, c)上,都是周期性地排列的。换句话说,结点在空间的三个方向上,分别是等距离地分布的。

直线点阵(原子列),即是在一条无限长的直线上,周期性(等距离)地分布着结点,如图 8-4 所示。周期为 a 。

可以把晶体的空间结构看成是,由一组为数无限的、相互平行的、情况相同的直线点阵所组成的。

平面点阵(平面格子,晶面),就是在一个平面上,结点在两个方向(a, b)上,周期性(等距离)地排列着,如图 8-5 所示。在 a 方向上,周期是 a ;在 b 方向上,周期是 b 。

可以把晶体的空间结构看成是,由一组为数无限的、相互平行的、情况相同的平面点阵所组成的。 (hkl) 是晶面符号(晶面指数或密勒指数)。它表示晶面在空间点阵中的取向。

对于晶体结构的理解,也可以把它看成是,由无数相同的平行六面体单位迭加而成的,如图

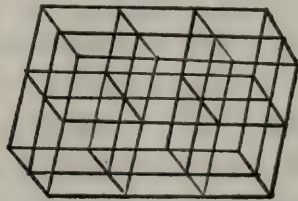


图 8-6 平行六面体结构

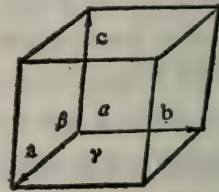


图 8-7 晶胞

8-6 所示。这种平行六面体单位叫晶胞。对于一个晶胞,可以用六个参数(a, b, c 及 α, β, γ)来描写,如图 8-7 所示。知道了一个晶胞的结构,就等于知道了整个晶体的空间结构。

有三点说明:

第一,对于一定的空间格子,划分成晶胞的方式,可以有多种,如图 8-8 所示。从图 8-8 可以看出,这个空间格子,可以看成是由许多方格子组成的,可以看成是由许多长方格子组成的,也可以看成是由许多斜方格子组成的。一般的原则是,使划分的晶胞体积尽量小,对称性尽量高。所谓体积小,就是使 a, b, c 愈短愈好。所谓对称性高,就是尽量划成方格子。因为方格子对称性高。不能划成方格子的,再划成长方格子。长方格子对称性次之。如果也不能划成长方格子,那就只好划成斜方格子了。

第二,真正的晶体结构,不仅在格子(晶胞)的顶点上有结点,而且在格子的体心(晶胞的中心,叫体心)、面心(晶胞每一平面的中心)或其它部位也可能有结点,这样,就形成了所谓复杂晶胞,如图 8-9 所示。复杂晶胞中的体心、面心或其它部位的结点,同样具有三维周期性。因此,晶胞实际上可以看成是,由几套空间格子相互安插而成的。

第三、空间格子是无限的,但晶体不可能是无限的。实际上,晶体中总难免有一些杂质,有时会有位错和缺陷。

二、X-射线结构分析的基本原理

X-射线结构分析的主要根据是衍射线的方向和强度,即衍射图上斑点的位置与黑度。根据

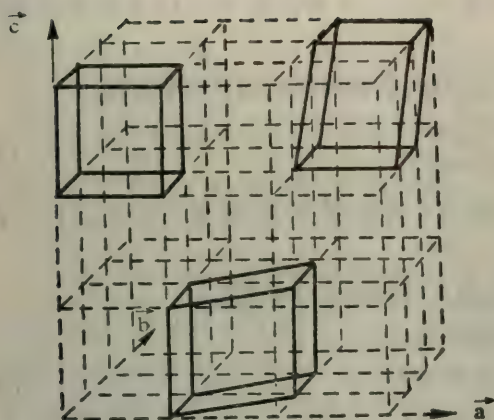
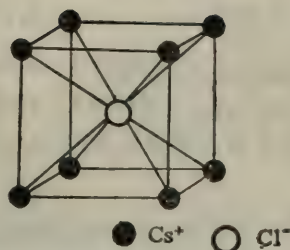
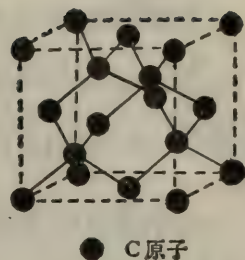


图 8-8 划分成晶胞的方法



氯化铯



金刚石

图 8-9 复杂晶胞

衍射线的方向,可以确定晶胞的大小和形状;根据衍射线的强度,可以确定晶胞中的原子排布。现在,我们来定性地讨论一下,为什么衍射线方向决定于晶胞大小,而衍射线的强度决定于晶胞中的原子排布。

1. 衍射线的方向与晶胞大小的关系

① 劳埃方程

假设有一周期为 a 的原子列,一束平行的单色 X-射线与原子列成 α_0 角射来,衍射线与原子列成 α 角,如图 8-10 所示。要使得在 α 角方向上产生衍射,则经过相邻两原子的波程差 ($AD-BC$) 必须等于波长 (λ) 的整数倍,否则,即无衍射产生。用公式表示:

$$AD - BC = h\lambda$$

$$a(\cos\alpha - \cos\alpha_0) = h\lambda \quad (1)$$

$$h = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$$

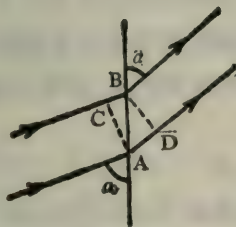


图 8-10 原子列对 X-射线的衍射

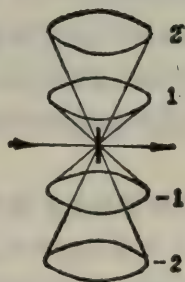


图 8-11 入射角为 90° 时各级衍射线的分布

实际上,产生的衍射线不止一条,衍射线是分布在以原子列为轴,以 2α 为顶角的圆锥面上(图 8-11)。若照相底片与入射线垂直放置,则底片记录的衍射图是双曲线。在底片上,层线间隔接近正比于 $\cos\alpha$,即正比于 $\frac{1}{a}$ 。若 α_0, λ, h 固定,则衍射角大小(即衍射线方向)决定于原子列

的周期 a 。 a 愈大, 则 $\cos\alpha$ 值愈小, 即 α 角愈大。如果 $\lambda, \alpha_0, \alpha, h$ 都已知, 则可以求出原子列的周期 a 。

根据同样的道理, 要 X-射线对一个平面点阵产生衍射, 就必须同时满足两个方程:

$$\begin{cases} a(\cos\alpha - \cos\alpha_0) = h\lambda \\ b(\cos\beta - \cos\beta_0) = k\lambda \end{cases} \quad (2)$$

b 是另一方向的周期, β_0, β 是入射线及衍射线方向与 b 方向所成的角度, $k=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ 。

同理, 要使 X-射线对一个空间点阵产生衍射, 就必须同时满足三个方程:

$$\begin{cases} a(\cos\alpha - \cos\alpha_0) = h\lambda \\ b(\cos\beta - \cos\beta_0) = k\lambda \\ c(\cos\gamma - \cos\gamma_0) = l\lambda \end{cases} \quad (3)$$

c 为晶体在 C 方向上的周期, γ_0, γ 是入射线及衍射线方向与 C 方向所成的角度, $l=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$ 。

这就是决定衍射线方向的劳埃方程。从方程可以看出, 如果入射线方向和波长已知或固定, 根据衍射图定出 α, β, γ , 就可以求出晶胞的三个参数 a, b, c 。

② 布拉格方程

晶体对 X-射线的衍射, 也可以看成是, X-射线对一组平行晶面的反射线, 相互加强的结果。

假设有一组平行的晶面, 晶面上只有一种结点, 晶面间距为 d , 一束平行的单色 X-射线与晶面成 θ 角射来, 反射线与晶面成 θ 角(图 8-12)。要使得在反射线方向上产生衍射, 则来自相邻两个晶面的波程差($BD + DC$)必须等于波长(λ)的整数倍。

$$\begin{aligned} BD + DC &= d\sin\theta + d\sin\theta = n\lambda \\ 2d\sin\theta &= n\lambda \end{aligned} \quad (4)$$

n 是反射的级次, $n=1, 2, 3, \dots$ 。只有在满足布拉格方程的反射线方向上, 才能产生衍射。因此, 晶体对 X-射线的衍射, 也可以看成是一种选择性的反射。

从方程(4)可以看出, 如果 λ, n 固定, 则衍射线方向(即衍射角 θ)决定于晶面间距(d)。如果 λ 固定, θ 可以从照片上测得, 再设法知道, 这是那一组晶面产生的衍射, 就可以求出晶胞大小。

2. 衍射线的强度与晶胞中原子排布的关系。

前面讨论的是一种简单的情况, 即假设晶体仅由一种原子组成。但真正的晶体, 是由几套空间格子相互穿插而成的。现在, 我们来讨论一下, 由两套空间格子组成的晶体所产生的衍射强度, 如图 8-13:

有黑结点的晶面, 其衍射线的方向必须满足于公式:

$$2d_1\sin\theta_1 = n\lambda$$

有白结点的晶面, 其衍射线的方向必须满足于公式:

$$2d_2\sin\theta_2 = n\lambda$$

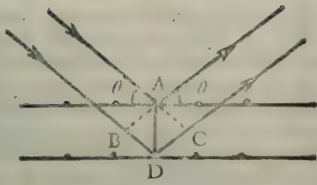


图 8-12 晶面对X-射线衍射的示意图

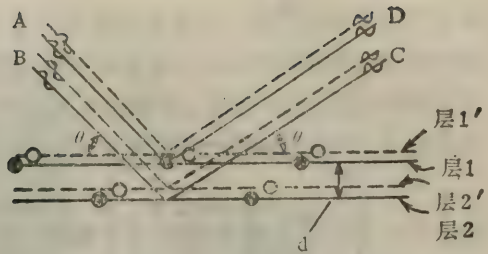


图 8-13 两套晶面产生的衍射强度

因为这两种晶面的 d 相等 ($d_1 = d_2$), 所以衍射角 $\theta_1 = \theta_2$ 。因此, 衍射线的方向是不随晶胞中原子的排布而改变的, 它只决定于晶胞的大小。但是, 在衍射角 θ 方向上, 衍射线的强度却与晶胞中原子的排布有关。因为这两组晶面的相对位置不同, 使得它们的衍射线的相位有差别, 从而产生加强或减弱现象。所以, 影响衍射线强度的是晶胞中原子的排布。这里我们讨论的是两种结点 (即两种离子、原子或分子) 的情况, 更复杂的情况可以此类推。

实际上, 对 X-射线的衍射, 是由原子中的电子引起的。整个原子在某一方向上的衍射线强度, 就是原子中的所有电子在这一方向衍射的总和。晶胞是由许多原子组成的, 因此, 晶胞在某一方向的衍射强度, 实际上就是所有原子的散射在这一方向上迭加的结果。

三、单晶回转法基本原理

不同的样品要求用不同的分析方法。根据样品的不同情况, 可以采用单晶回转法、粉末法和纤维法。这里仅介绍单晶回转法。

单晶回转法又叫旋转晶体法, 是目前测定蛋白质分子空间结构的主要手段。它要求蛋白质样品是足够大 (约 1 mm 长) 的单晶。如果能将均一蛋白质制剂制成足够大的单晶, 就可以用此法测定其空间结构。

将单晶样品绕晶轴转动 (如绕 c 轴转动), 用一束平行的单色 X-射线照射单晶样品, 照相底片放在以回转轴为中心的圆柱面上, 拍摄衍射图 (图 8-14)。所得衍射图叫回转图。在衍射图上, 有许多平行而等距离的层线, 层线上分布着许多衍射斑点 (图 8-15)。

由于晶体回转, 其中任一晶面与入射 X-射线所成的角, 总有机会满足布拉格方程, 因而, 在相应的方向有衍射线, 在照片上得到衍射斑点。此衍射斑点应满足劳埃方程:

$$C(\cos \gamma - \cos \gamma_0) = l \lambda$$

而且, 衍射线应分布在图 8-11 所示的圆锥面上。圆锥面与底片相切成圆周, 打开底片, 则是一条一条的水平线。这说明衍射斑点分布在一条条的层线上。

利用回转图确定晶胞参数 a, b, c 甚为方便。例如: 单晶样品绕 C 轴旋转, 入射 X-射线垂直于 C 轴, 则 $\gamma_0 = 90^\circ$ 。如图 8-14 所示, 第 l 层线与 O 层线的垂直距离为 Y_l , 底片所在圆柱面的半径为 R , 则

$$\cos \gamma = \frac{Y_l}{\sqrt{R^2 + Y_l^2}}$$

$$\therefore \cos \gamma_0 = 0$$

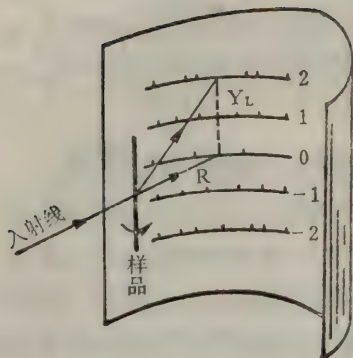


图 8-14 单晶回转法示意图

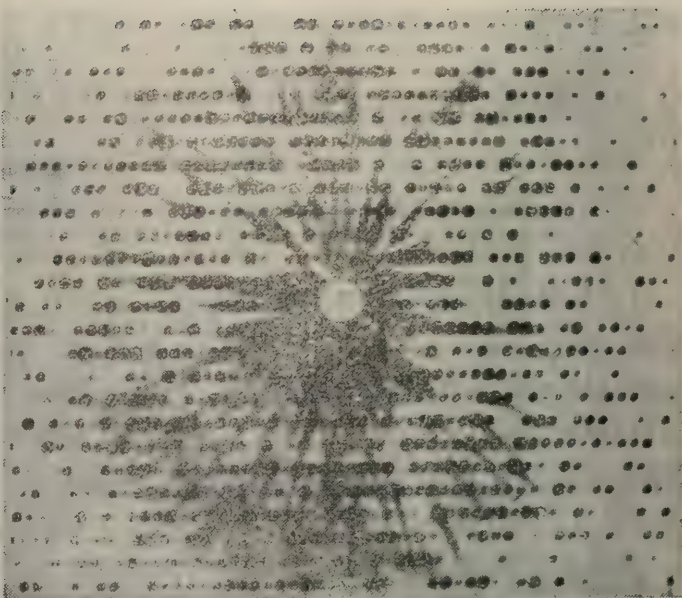


图 8-15 肌红蛋白 X-射线衍射图

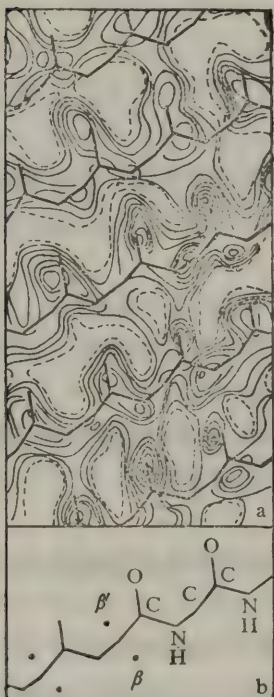


图 8-16 肌红蛋白分子中部分肽链的电子密度图

∴ c 轴的周期为

$$c = \frac{l\lambda}{\cos \gamma - \cos \gamma_0} = l\lambda \sqrt{\frac{R_2^2}{Y_l^2} + 1} \quad (5)$$

在式(5)中, λ 已知, R 为相机半径, 亦已知, 对应于第 l 层线的垂直距离 Y_l 可以从衍射图上测出, 因而, 很容易求得 c 值。如果将单晶样品绕 a 轴或 b 轴旋转, 则可以求出 a, b 值。

根据衍射斑点的黑度如何确定晶胞中的原子排布? 这是一个十分复杂的问题。本节不可能解决这个问题, 仅简述如下:

晶胞中的电子密度分布按下列方程计算:

$$\rho(X, Y, Z) = \frac{1}{V} \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} |F(hkl)| \cos 2\pi [hx + ky + lz - \alpha(hkl)]$$

V : 晶胞体积; $F(hkl)$: 结构因子; $\alpha(hkl)$: 相角。

V 和 $F(hkl)$ 分别由衍射图上衍射斑点的位置和黑度测得。 $\alpha(hkl)$ 只有用间接的方法才能确定。利用同晶置换法可以确定相角。所谓同晶置换法, 就是: 把重原子 (强散射体) 引入结晶

蛋白质分子中,要求重原子既不改变蛋白质分子构象,又不改变结晶形式,从而制得同晶型重原子衍生物。然后,从该衍生物的衍射图推算出重原子在晶胞中的位置,从而求出相角。如果知道了晶胞中的电子密度分布,就可以画出电子密度图。根据电子密度图,并参考蛋白质一级结构,就可以确定蛋白质分子构象。图 8-16 是 2 Å 分辨力的肌红蛋白分子中一部分肽链的电子密度分布以及由此推测的肽链构象。

所谓分辨力,就是指:能分清两个质点的最小距离。所谓 2 Å 分辨力,就是对相距 2 Å 的两个质点能够加以区分。分辨力的大小决定于各种因素。它标志着蛋白质空间结构的研究水平。目前,研究蛋白质空间结构的最高水平是 1.4 Å 分辨力。在此水平上,参考蛋白质一级结构知识,从衍射图上几乎可以认出除氢原子而外的所有原子。

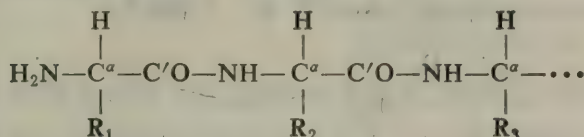
现在,用单晶回转法已经弄清了许多球蛋白分子的空间结构,如:肌红蛋白、血红蛋白、细胞色素 c、溶菌酶、羧肽酶 A、胰凝乳蛋白酶、胰岛素,等等。

第四节 蛋白质分子的二、三级结构

一、蛋白质的立体结构原理^(1,5,13,16,17,21)

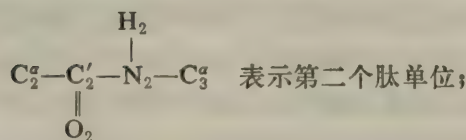
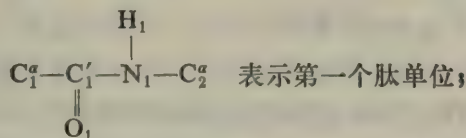
1. α-碳原子的二面角

蛋白质多肽链的基本结构是:



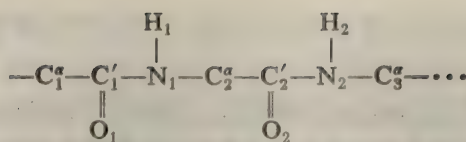
在此结构中,

$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}^\alpha}-\text{C}'\text{O}-\text{NH}-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}^\alpha}-\text{C}'\text{O}-\text{NH}-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}^\alpha}-\dots$ 是主链骨架;而 $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \dots$ 是侧链基团; $-\text{C}^\alpha-\text{C}'\text{O}-\text{NH}-\text{C}^\alpha-$ (或 $-\text{C}^\alpha-\text{C}'\text{O}-\text{NH}-$) 是主链骨架的重复单位,叫肽单位。多肽链就是由许多肽单位在 α-碳原子(C^α)上互相连接而成的。我们以



依此类推,一直到第 n 个肽单位。

上述许多肽单位互相连接起来,就构成了多肽链的主链骨架:



Pauling 和 Corey 根据各种氨基酸、肽类以及其它有关化合物的 X-射线结构分析数据, 提出了下列立体化学原则:

1. 肽键具有部分双键性质, 不能自由旋转;
2. 肽单位是刚性平面结构;
3. 在肽单位上, C=O 与 N-H 或二个 C^α 呈反式排布。

在肽单位中, 肽键 $\left(\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C}'\text{---N} \\ || \\ \text{O} \end{array} \right)$ 的键长是 1.32 Å, 比 C—N 单键 (键长 1.47 Å) 短些, 比 C=N 双键 (键长 1.27 Å) 长些 (图 8-17)。由此可见, 肽键具有部分双键的性质, 不能自由旋转。

每一个肽单位都是刚性的平面结构。这就是说, 肽单位上的六个原子都是位于同一个平面上的。

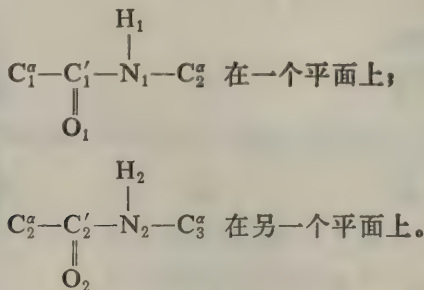


图 8-18 a 表示: C₂^α 在两个肽平面的交线上。C₂^α 上的两个键 (N₁—C₂^α 与 C₂^α—C₂[']) 都是单键, 可以绕键轴自由旋转。其中, N₁—C₂^α 单键的旋转角度, 用 φ 表示; C₂^α—C₂['] 单键的旋转角度, 用 ψ 表示。这两个旋转角度叫二面角。两个肽平面通过 α-碳原子连接起来; 一对二面角 (φ; ψ) 决定了相邻两个肽单位的相对位置。

二面角 (φ 与 ψ) 可以在 0°—±180° 范围内变动。当 C₂^α—C₂['] 与 N₁—H₁ 呈反式位置时, 则 φ = 0°; 当 C₂^α—N₁ 与 C₂[']=O₂ 呈反式位置时, 则 ψ = 0°。从 α-碳原子看, 单键 (C₂^α—C₂['] 或 C₂^α—N₁) 沿顺时针方向旋转的角度, 用“+”表示; 沿反时针方向旋转的角度, 用“-”表示。

如果 C₂^α 原子上的两个单键 (C₂^α—N₁ 与 C₂^α—C₂[']) 都沿着顺时针方向旋转 180° (即: φ = 180°; ψ = 180°), 那么, 这两个相邻的肽单位便呈现充分伸展的肽链构象 (图 8-18 a)。如果 C₂^α 原子上的两个单键 (C₂^α—N₁ 与 C₂^α—C₂[']) 没有旋转 (即: φ = 0°; ψ = 0°), 那么, 这两个相邻的肽单位便呈现图 8-18 b 所示的肽链构象。在此构象中, 一个肽单位的 C₁'=O₁ 基 O₁ 原子与另一个肽单位的 N₂—H₂ 基 H₂ 原子, 其距离小于范德华半径, 斥力很大, 因而此构象不能存在。

实验表明: 多肽链中所有的肽单位, 基本上都具有相同的键长与键角 (图 8-17); 每一个 α-碳原子都是正四面体构型。因此, 多肽链主链骨架的构象, 是由每个 α-碳原子的成对二面角 (φ; ψ)

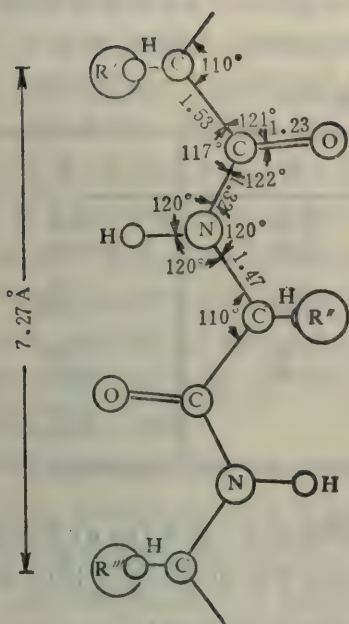


图 8-17 充分伸展的肽链构象

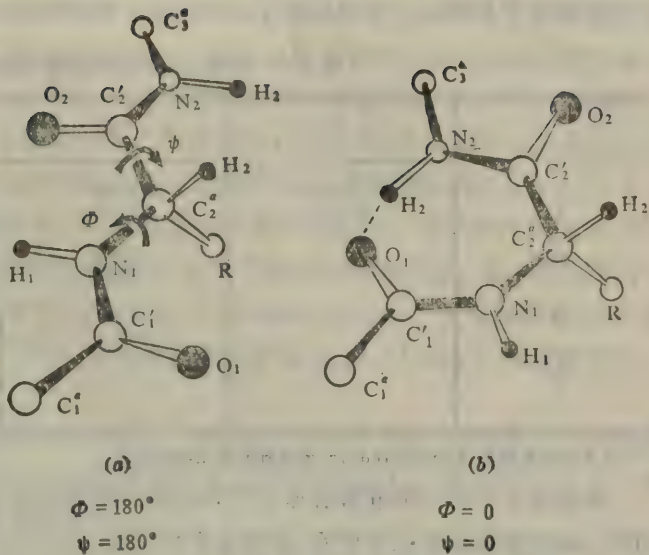


图 8-18 由二面角决定的多肽链的构象

(a) $\phi = \psi = 180^\circ$ 的肽链构象

(b) $\phi = \psi = 0^\circ$ 的肽链构象

所决定的。在多肽链中,任何 α -碳原子的二面角(ϕ 或者 ψ),如果发生变化,则多肽链主链骨架的构象必然发生相应的变化。如果所有的 $C_i^\alpha (i=1,2,3,\dots,n)$ 的二面角,分别都相等,则多肽链主链骨架一般是螺旋式的构象。如果所有 C_i^α 的二面角 ϕ 与 ψ 分别都等于 $+180^\circ$ (或 -180°),则多肽链主链骨架是充分伸展的肽链构象(图 8-17)。

在每个肽单位上, $N-H$ 与 $C=O$ 或者 C^α 与 C^α 可以有两种排布方式:



反式构型

顺式构型

实际上,除含有脯氨酸残基的肽单位而外,多肽链中绝大多数的肽单位,其 $N-H$ 与 $C=O$ 都是反式排布的。这就意味着,反式排布的能量比顺式排布的能量低。用核磁共振研究 N -甲基乙酰胺的构型指出,顺式构型比反式构型的能量高 2 千卡/克分子。

2. 非键合原子之间的最小接触距离

虽然 C^α 原子的两个单键($C^\alpha-N$ 与 $C^\alpha-C$)可以在 $0^\circ-360^\circ$ 范围内自由旋转,但不是任意二面角($\phi; \psi$)所决定的肽链构象都是立体化学所能允许的。换句话说,若干二面角($\phi; \psi$)所决定的肽链构象,是立体化学所不能允许的,在天然蛋白质分子中是不存在的。这主要决定于下列原则:

在相邻两个肽单位的构象中,非键合原子之间的接近有无障碍,即能量是否达到最低。

Ramachandran 等人对这一复杂的问题作了近似的处理。他们把原子看成是简单的硬球，根据范德华半径确定了非键合原子之间的最小接触距离(标准接触距离)，如表 8-1 所示

表 8-1 非键合原子之间的最小接触距离 (Å)

	C	O	N	H
C	3.20 (3.00)	2.80 (2.70)	2.90 (2.80)	2.40 (2.20)
O		2.70 (2.60)	2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
N			2.70 (2.60)	2.40 (2.20)
H				2.00 (1.90)

括弧内的数据是 Ramachandran 所得到的最小接触距离。

根据表 8-1 所示的非键合原子之间的最小接触距离，确定那些成对二面角 (ϕ ; ψ) 所决定的相邻二肽单位的构象是允许的，那些是不允许的，用二面角 ϕ 对 ψ 作出 $\phi\psi$ 图(图 8-19)。此图

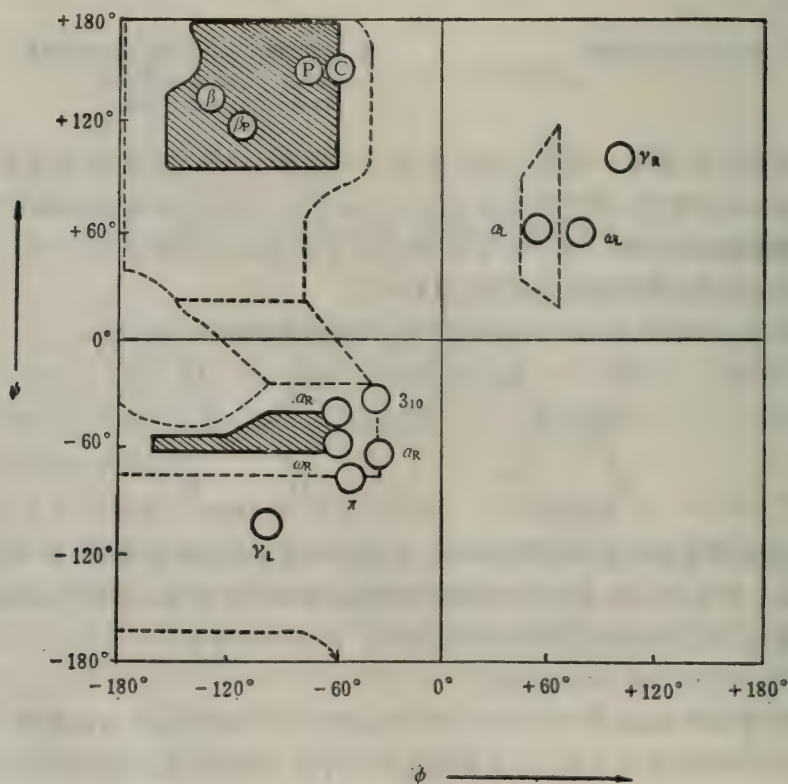


图 8-19 典型构象图

典型的构象有: P=聚脯氨酸螺旋; C=胶原螺旋; β =反平行 β -折迭; β_p =平行 β -折迭; α_R 和 α_L =右手 α -螺旋和左手 α -螺旋; ω_R 和 ω_L =右手 ω -螺旋和左手 ω -螺旋; γ_R 和 γ_L =右手 γ -螺旋和左手 γ -螺旋; 3_{10} = 3_{10} -螺旋; π = π -螺旋(4.4_{10} -螺旋)

又叫典型构象图或 Ramachandran 图。实线封闭的区域是允许区。在该区域中,任何二面角(ϕ 与 ψ)所决定的肽链构象,都是立体化学所完全允许的。因为在此肽链构象中,非键合原子之间的距离不小于标准接触距离,二者之间没有斥力,构象的能量最低,所以,此肽链构象最稳定。平行 β -折迭、反平行 β -折迭、右手 α -螺旋、胶原螺旋和右手 ω -螺旋都位于允许区。虚线以外的区域是不允许区。在该区域中,任何二面角(ϕ 与 ψ)所决定的肽链构象,都是立体化学所不允许的。因为在此肽链构象中,非键合原子之间的距离小于极限值(比标准接触距离小 $0.1-0.2 \text{ \AA}$),二者之间产生很大的斥力,构象的能量很高,所以,此肽链构象很不稳定。虚线封闭的区域是临界限制区(部分允许区)。在该区域中,任何二面角(ϕ 与 ψ)所决定的肽链构象,是立体化学可以允许的,但不够稳定。因为在此肽链构象中,非键合原子之间的距离,小于标准接触距离,大于极限值,以致于二者之间产生一定的斥力,所以,此肽链构象不够稳定。 3_{10} -螺旋、 π -螺旋和左手 α -螺旋位于这一区域。

氨基酸残基的侧链对典型构象图有很大的影响。若肽链由 L-Gly 构成,则允许区占构象图的 61%;若肽链由 L-Ala 构成,则允许区占构象图的 23%;若是 Val 或 Ile,则允许区更小。图 8-19 构象图是根据肽链中的 Ala 甲基侧链而作成的。

从目前的肌红蛋白、溶菌酶、胰岛素的构象来看,其大多数的成对二面角(ϕ ; ψ)数值,都是位于允许区和部分允许区的。这说明构象图基本上还是可靠的。

总而言之,在肽链中,所有的肽单位都是刚性平面结构, $C'=O$ 与 $N-H$ 对 $C'-N$ 键呈反式排布,肽键是部分双键,不能自由旋转, C^α 原子的两个单键($C^\alpha-N$; $C^\alpha-C'$)可以旋转,从而使肽链产生不同的构象,即二面角(ϕ ; ψ)决定肽链的构象。肽链构象是否稳定,就在于其非键合原子之间的距离是否符合标准接触距离。这些就是蛋白质立体化学的基本原则。

3. α -螺旋构象的由来

(一) 螺旋构象

蛋白质的多肽链一般含有 100—150 个氨基酸残基。因此,多肽链中含有许多肽单位。按照上述立体化学原则,所有肽单位的 C^α 原子,其成对二面角(ϕ 和 ψ)的规律性决定了多肽链构象的规律性。如果一系列 $C^\alpha(i=1,2,3,\dots,n)$ 原子的成对二面角(ϕ 和 ψ)都分别取同样的数值时,则多肽链的构象,一般是螺旋构象。所谓螺旋构象,就是指,多肽链主链骨架围绕螺旋中心轴一圈一圈地上升,而形成的螺旋式的构象。如果每一圈所包含的氨基酸残基数是整数(比如 3 个残基),那么,这种螺旋就叫整数螺旋。如果每圈的氨基酸残基数是非整数(比如 3.6 个残基),那么,这种螺旋就是非整数螺旋。由于主链骨架旋转方向有左手(左旋)和右手(右旋)之分,因此,螺旋可分为左手(左旋)螺旋和右手(右旋)螺旋。

对螺旋构象而言,除了要考虑多肽链主链骨架的空间排布而外,还要考虑非键合原子之间的最小接触距离。也就是说,多肽链所采取的螺旋构象必须满足非键合原子间的最小接触距离(表 8-1)。当非键合原子间的距离小于这种最小接触距离时,就产生范德华斥力,因而,螺旋构象就不稳定。此外,还要考虑主链骨架上的 $C=O$ 基氧原子与 $N-H$ 基氢原子所生成的氢键。在氢

键 $\left(\begin{array}{c} \diagup \\ C=O \cdots H-N \\ \diagdown \end{array} \right)$ 中,当 H 原子位于两个电负性原子(O与N)之间的连线上时,能量最低;

同时,形成氢键的原子间的距离,也要符合最小接触距离。氢键 $O-H \cdots O$ 的合适值接近 2.6 \AA ; 而氢键 $N-H \cdots O$ 的合适值接近 2.8 \AA 。

在螺旋构象中,主链骨架的 $C=O$ 基氧原子与 $N-H$ 基氢原子生成氢键。螺旋构象就是靠氢键来维持的。若破坏氢键,则螺旋构象变成伸展的多肽链。

按照氢键形成方式的不同,可以把螺旋分成两大类。一类是 α -系螺旋;另一类是 γ -系螺旋。在 α -系螺旋构象中,每一个氢键所封闭的环是:

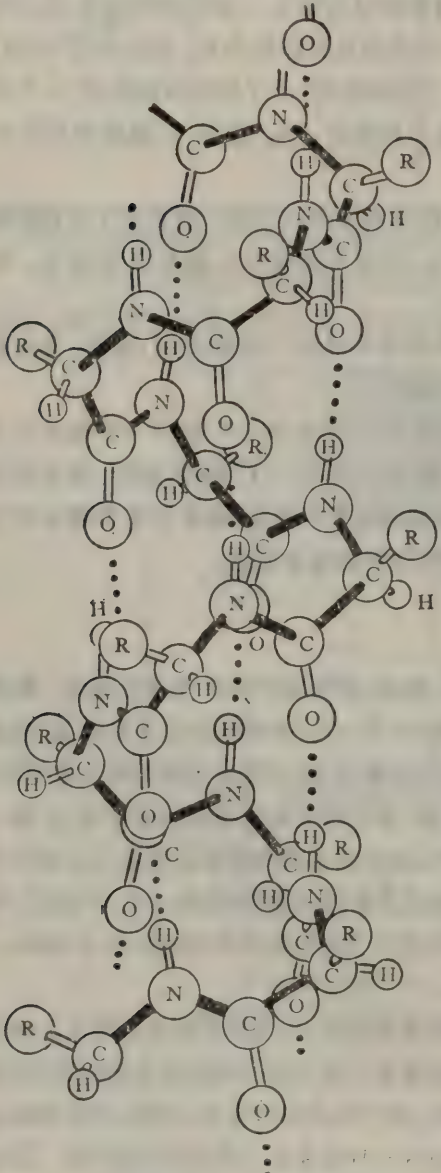
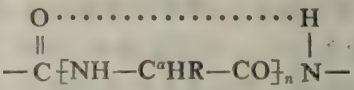
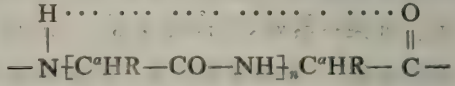


图 8-20 右手 α -螺旋



封闭环本身的原子数是 $(3n+4)$ 。 $n=1, 2, 3, 4, \dots$ 。
 n 表示,在主链骨架上,每个肽单位的 $N-H$ 基氢原子与其前的第几个肽单位的 $C=O$ 基氧原子生成氢键,例如: $n=3$,就是指,在主链骨架上,每个肽单位的 $N-H$ 基氢原子与其前的第三个肽单位的 $C=O$ 基氧原子生成氢键。在这种情况下,氢键所封闭的环本身的原子数是 $3 \times 3 + 4 = 13$ 。其余的以此类推。因此, α -系螺旋有许多不同的螺旋构象,如: 2.2_7 -螺旋 ($n=1$)、 3.1_0 -螺旋 ($n=2$)、 3.6_{13} -螺旋 ($n=3$)、 4.4_{16} -螺旋 ($n=4$),等等。这些螺旋可以用 S_n 来表示。 S 表示每一圈所包含的氨基酸残基数; N 表示氢键所封闭的环本身的原子数。如 3.1_0 -螺旋, $S=3$, 表示每一圈包含 3 个氨基酸残基, $N=10$, 表示氢键所封闭的环由 10 个原子组成。其余类推。

在 γ -系螺旋构象中,每一个氢键所封闭的环是:



封闭环本身的原子数是 $3n+5$, $n=1, 2, 3, 4, \dots$ 。
 n 表示主链骨架上的每一个残基的 $N-H$ 基氢原子与其后的第 n 个残基的 $C=O$ 基氧原子生成氢键。例如: 5.1_{17} -螺旋 (γ -螺旋), $n=4$,就是在主链骨架上,每一个 $N-H$ 基氢原子与其后的第四个残基的 $C=O$ 基氧原子生成氢键;氢键所封闭的环本身的原子数为 $3 \times 4 + 5 = 17$ 。

(二) α -螺旋构象

3.6_{13} -螺旋就是非整数的 α -螺旋。它有下列特征:多肽链主链骨架围绕螺旋中心轴一圈一圈螺旋式地上升。每隔 3.6 个氨基酸残基上升一

圈。每上升一圈相当于向上平移 5.4 Å。螺旋上升时，每个氨基酸残基沿螺旋中心轴旋转 100°，向上平移 1.5 Å。每一个 ϕ 角等于 -57°，每一个 ψ 角等于 -47°。

相邻的螺圈之间形成链内氢键，即一个肽单位的 N—H 基氢原子与其前的第三个肽单位的 C=O 基氧原子生成氢键。氢键的取向与螺旋中心轴几乎平行。氢键所封闭的环包含 13 个原子(图 8-20)。 α -螺旋构象允许所有的肽键都能参与链内氢键的形成，因此， α -螺旋构象是相当稳定的。 α -螺旋构象仅靠氢键维持。若破坏氢键，则 α -螺旋构象便遭到破坏，而变成伸展的多肽链。

与 C^α 原子相连的 R 侧链位于 α -螺旋的外侧。R 侧链对 α -螺旋的形成和稳定性有较大的影响。如果在多肽链上连续存在带极性基团的氨基酸残基(如: Asp、Glu、Lys 等)，则 α -螺旋构象就不稳定；然而，如果这些氨基酸残基分散存在时，就不影响 α -螺旋构象的稳定性。Pro 残基，由于其 N 原子位于刚性的吡咯环中，其 C^α -N 单键不能旋转，因而不可能得到形成 α -螺旋所需要的 ϕ 角，加上 Pro 残基本身没有 N—H 基，其侧链又阻止其 C=O 基接近主链骨架的 N—H 基，因而不可能生成维持 α -螺旋构象所需要的氢键。由于上述原因，Pro 残基是 α -螺旋构象的最大破坏者。在多肽链上，那里有 Pro 残基存在，那里就不可能形成 α -螺旋构象，但 N-末端螺旋区除外(后面将会谈到)。Gly 残基由于没有侧链，其 ϕ 与 ψ 可以任意取值，从而，使形成 α -螺旋所需要的二面角的机率很小，因此，它也是 α -螺旋的最大破坏者。Asn 与 Tyr 残基也是 α -螺旋的破坏者，但不及前二者。

胶原分子含有大量的 Pro 或羟脯氨酸残基(占 1/4)以及大量的 Gly 残基(占 1/3)，因而，胶原分子中不可能存在 α -螺旋构象。丝心蛋白含有 50% 的 Gly 残基，Ser 残基的含量亦甚高，在其氨基酸顺序中，多为 Gly-Ser，因而丝心蛋白中也不可能存在 α -螺旋构象。

(三) α -螺旋最稳定

α -螺旋构象完全符合下列立体化学原则：

第一，在 α -螺旋中，所有的肽单位都是刚性的平面结构，且所有的 C^α 原子的键角均为正四面体(110°)；

第二，在 α -螺旋中，非键合原子间的接触比较紧密，但不小于最小接触距离；

第三，氢键中的 H 原子位于 C=O...H—N 的直线上，氢键键长为 2.86 Å。因此， α -螺旋构象最稳定。与 α -螺旋构象相比， α -系的其它螺旋以及 γ -系螺旋，其稳定性较差，例如： α -系的 2.2₇、3₁₀、4.4₁₆ 等都不能完全符合立体化学原则，因此，其稳定性较差。

总之，从理论上讲，虽然有各种各样的螺旋构象，但并不是所有的螺旋构象都能完全符合立体化学原则的。能完全符合立体化学原则的螺旋构象，只有 α -螺旋，更确切地说，是右手 α -螺旋。

(四) 右手 α -螺旋比左手 α -螺旋稳定

根据主链骨架旋转方向的不同，把 α -螺旋分成左手(左旋) α -螺旋和右手(右旋) α -螺旋。如果仅看主链骨架的空间排布，左手 α -螺旋和右手 α -螺旋只是镜象关系，似乎这种差别没有什么重要意义；但是，如果考虑到 C^α 原子的 L 构型时，两者就不同了。不论是左手 α -螺旋，还是右手 α -螺旋，它们都是由 L-氨基酸残基组成的。由于侧链的第一个 C 原子 (C^β) 是位于 C^α 的 L-

构型中的,因而,在左手 α -螺旋中, C^{β} 原子过分接近主链骨架的 $C=O$ 基氧原子,以致于构象不舒适,能量较高,而右手 α -螺旋没有这种缺点,完全符合立体化学原则。因此,右手 α -螺旋最易形成、最稳定,存在于绝大多数蛋白质分子之中。到目前为止,仅在嗜热菌蛋白酶中发现左手 α -螺旋。

(五) 典型 α -螺旋与非典型 α -螺旋

上述右手 α -螺旋是典型的 α -螺旋(叫 αI)。在蛋白质晶体结构中还发现一种非典型 α -螺旋(叫 αII);它与前者的区别,就在于,形成氢键的 N 、 H 、 O 三原子不在同一条直线上,且距直线甚远。虽然,从能量上看,与前者相差不大,但要形成第二圈螺旋就不可能了。

对各种蛋白质的旋光研究表明,不同的蛋白质分子有不同的螺旋度,如表 8-2 所示。

表 8-2 在 pH~7 溶液中, 各种蛋白质分子中的螺旋结构含量

蛋 白 质 种 类	螺 旋 度*
原肌球蛋白	80—100%
肌红蛋白 血红蛋白	60—80%
肌球蛋白、胰凝乳蛋白酶 胰岛素	45—60%
溶菌酶 固氮酶 卵清蛋白 血纤蛋白原	30—45%
胃蛋白酶 羧肽酶 A 组蛋白	20—30%
核糖核酸酶	10—20%
酪蛋白 肌动蛋白 γ -球蛋白	0—10%

* 螺旋度: 以螺旋形式存在的多肽链的总长度在蛋白质多肽链中的百分率。此螺旋度表示右旋螺旋的含量,更确切地说,它表示右旋螺旋超过左旋螺旋的数量。

由表 8-2 可知,各种蛋白质的确含有右手螺旋结构,其含量因蛋白质而异。有的蛋白质含右手螺旋很多,如:原肌球蛋白分子几乎含有 100% 的右手螺旋;有的蛋白质分子含右手螺旋很少,如: γ -球蛋白、肌动蛋白几乎不含右手螺旋。X-射线结构分析表明,在肌红蛋白、血红蛋白、溶菌酶等所所有的螺旋结构中,右手 α -螺旋的确占绝对优势,而其它螺旋形式(3_{10} -螺旋、 4.4_{16} -螺旋)只有少量的存在。

4. β -折迭

β -折迭又叫 β -折迭层状结构、 β -结构,等等。在此结构中,若干条肽链或一条肽链的若干肽段平行排列,相邻主链骨架之间靠氢键维系。为了在主链骨架之间形成最多的氢键,避免相邻侧链间的空间障碍,锯齿状的主链骨架必须作一定的折迭($\phi = -139^\circ$, $\psi = +135^\circ$),以形成一个

折迭的片层。与 C^α 原子相连的侧链(R)交替地位于片层的上方和下方。它们均与片层相垂直(图 8-21)。

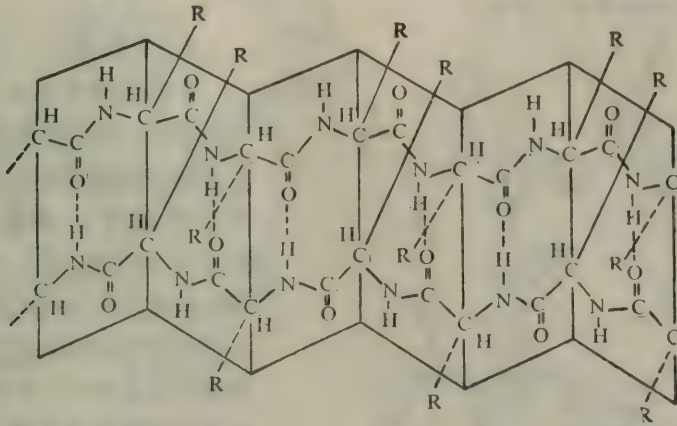


图 8-21 反平行 β -折迭

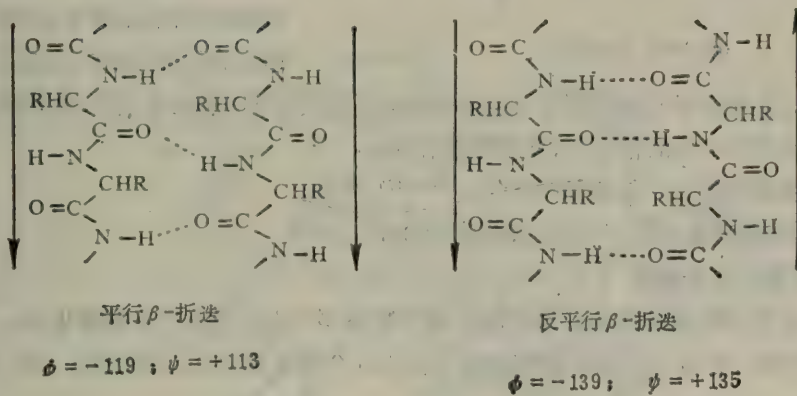


图 8-22 两种类型的 β -折迭

β -折迭有两种类型：一种是平行式，即所有肽链的N-末端都在同一端；另一种是反平行式，即所有肽链的N-末端，按正反方向交替排列着，如图 8-22 所示。从能量上看，反平行 β -折迭更为稳定。此外，在蛋白质中还发现，平行与反平行互相交替的 β -折迭形式，以及只有一段充分伸展的锯齿形肽链。

β -折迭大量存在于丝心蛋白和 β -角蛋白之中。在一些球蛋白分子中，如溶菌酶、羧肽酶 A、胰岛素等，也有少量的 β -折迭存在。

5. 无规则卷曲

在多肽链主链骨架中，与螺旋构象和 β -折迭不同的构象，通常称为无规则卷曲（无规构象、无规线团、自由折迭、自由回转）。无规则卷曲就是指，没有规则的那部分肽链构象。

在螺旋构象或 β -折迭中，所有氨基酸残基的成对二面角(ϕ, ψ)，都存在于典型构象图(图 8-19)的固定点上。然而，在无规则卷曲中，不同氨基酸残基的成对二面角，存在于典型构象图的

不同点上,因此,可以产生许多不同的构象。一般球蛋白分子,除含有螺旋构象和 β -折迭面外,往往含有大量的无规则卷曲,倾向于产生球状构象。这种球状构象有高度的特异性,与生物活性密切相关,对外界的理化因子极为敏感。

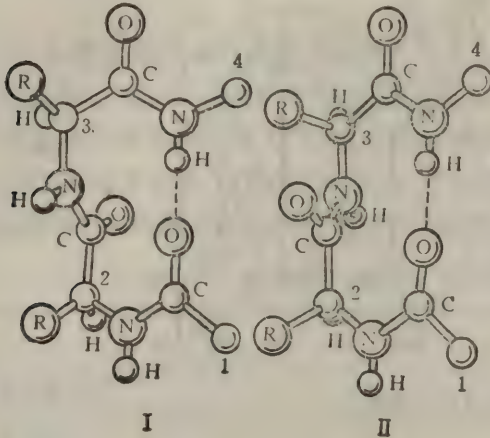


图 8-23 β -转角

肽平面的 C=O 基氧原子与相邻两个残基的侧链,呈反式位置;而在 II 型中,它们是在同一侧。只有在第三个残基为 Gly 的情况下,II 型才能存在。

6. β -转角

β -转角是近年来从无规则卷曲中发现的。在蛋白质分子中,肽链经常出现 180° 的回折。此回折部分就是 β -转角(又叫 β -回转、 β -弯曲、发夹结构、U 形转折,等)。它是由四个连续的氨基酸残基构成的。在此构象中,主链骨架本身以大约 180° 返回折迭,第一个残基的 C=O 基与第四个残基的 N-H 基形成氢键, C $^\alpha_i$ 与 C $^\alpha_{i+3}$ 之间的距离小于 7 Å。 β -转角有 I 型和 II 型两种形式,如图 8-23 所示。这两种形式的区别,就在于:在 I 型中,中间

二、球蛋白分子的二、三级结构^(1-4,6,7,9-12,17)

1. 对几种结晶球蛋白分子二、三级结构的分析

(一) 肌红蛋白分子构象

肌红蛋白存在于肌肉细胞中。它能够运输和贮藏 O₂, 为生物氧化直接提供 O₂。肌红蛋白的分子量是 17000。它有一个血红素和一条包含 153 个氨基酸残基的多肽链。其一级结构如图 8-28 所示。

英国 Kendrenw 研究小组用 X-射线结构分析法,阐明了抹香鲸肌红蛋白的空间结构。其研究分为三个阶段:

第一阶段,在 6 Å 分辨力的水平上看到了肌红蛋白分子的三级结构,如图 8-24 所示。

一根大约 300 Å 长的“腊肠”,以相当大的角度,分两层盘曲成 43 Å × 35 Å × 23 Å 的扁圆盘。“腊肠”的盘曲是不对称的。血红素位于扁圆盘的空穴中。

第二阶段,在 2 Å 分辨力的水平上看到了肌红蛋白分子的二级结构,如图 8-26 所示。在多肽链中,75—80% 是 α -螺旋构象,其余的是无规则卷曲。整个肽链有长短不一的八个螺旋区,即 A、B、C、D、E、F、G、H,如图 8-25 所示。 α -螺旋的各种参数与 Pauling 提出的 α -螺旋模型十分一致,从而证明了 α -螺旋模型的正确性。

由于 α -螺旋不能突然拐弯,因而,在肽链的拐弯处 (AB、CD、EF、FG、GH),不可能形成 α -螺旋,只能形成无规则卷曲。Pro、Ile、Ser 出现在拐弯处。

在多肽链中,侧链之间的相互作用,使得多肽链折迭、盘曲或内有袋形空穴的三级结构。所

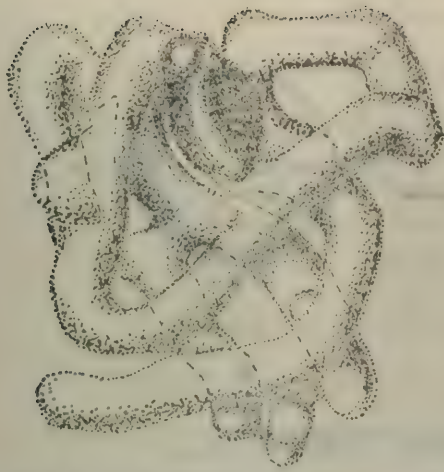


图 8-24 6 Å分辨力的抹香鲸肌红蛋白三级结构

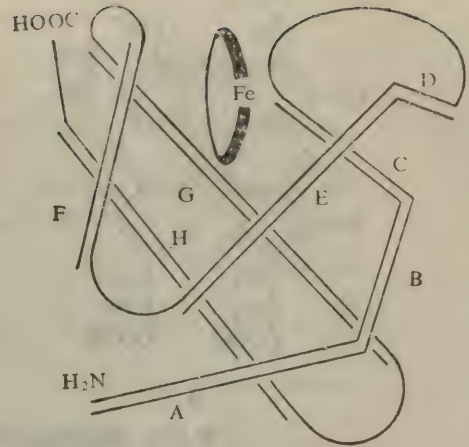


图 8-25 肌红蛋白的多肽链走向(双线表示 α -螺旋区段)

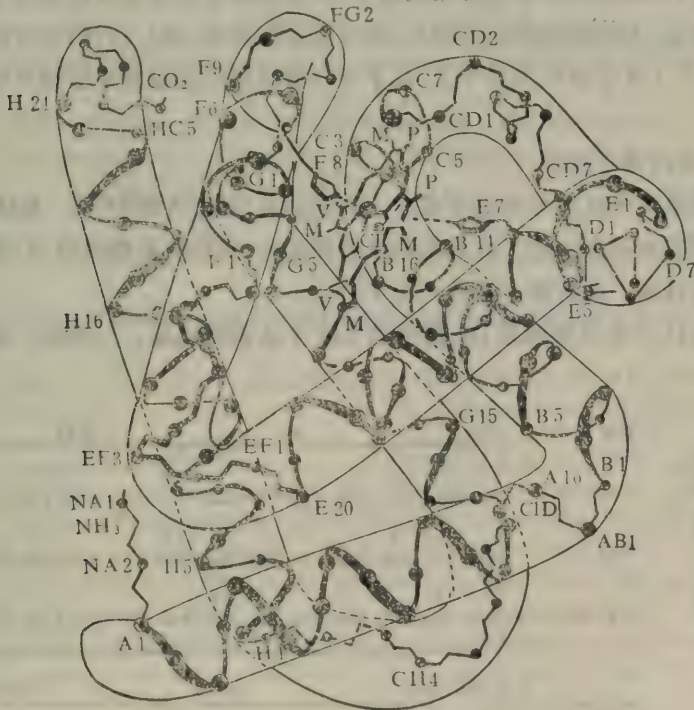


图 8-26 肌红蛋白分子的空间结构

有的疏水侧链位于分子内的空穴周围,绝大部分亲水侧链分布在分子的表面上。

血红素位于疏水的空穴中。血红素中的 Fe^{2+} ,除与血红素本身的四个吡咯环的 N 原子配位而外,还与 F 螺旋区中 F 8 His 咪唑基相配位,其第六个位置,可以与 O_2 可逆地结合(图 8-27)。

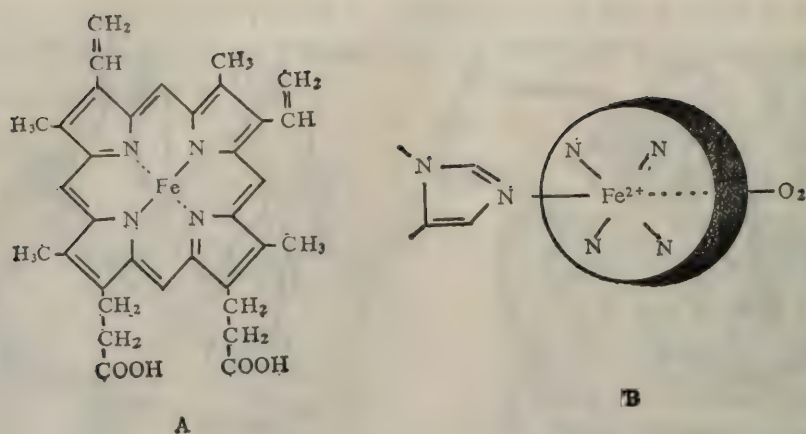


图 8-27 血红素结构(A)和血红素 Fe^{2+} 的配位关系(B)

虽然绝大多数 α -螺旋的各种参数都非常接近 Pauling 的 α -螺旋模型,但是,也有某些 α -螺旋不是很标准的。比如图 8-26 的 A 和 E 段,就不是直的 α -螺旋; C 和 G 部分,由于侧链与主链骨架之间的相互作用,使得某些氢键遭到破坏;有些肽单位的平面与螺轴不平行,而稍有倾斜,等等。值得注意的是,无规则卷曲的大部分,也是落在构象图(图8-19)的允许区内。

第三阶段,在 1.4 Å 分辨率水平上,几乎可以看出肌红蛋白分子中除 H 原子而外的全部原子的空间位置。

(二) 血红蛋白分子构象

血红蛋白是血液中红血球的主要成分。其功能是运输 O_2 和 CO_2 。血红蛋白的分子量是 64000,比肌红蛋白分子大四倍。它是由两条相同的 α -链和两条相同的 β -链组成的。每一条肽链都含有一个血红素。血红素中含有一个 Fe^{2+} 。

α -链含有 141 个氨基酸残基; β -链含有 146 个氨基酸残基。二者的一级结构如图 8-28 所示。

	NA 1	A 1	A 5	A 10
肌红蛋白 (抹香鲸)			5	10
α -链 (人)	Val-Leu	Ser-Glu-Gly-Glu-Try-Gln-Leu-Val-Leu-His-Val-Try-Ala	5	10
β -链 (人)	Val-His-Leu	Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly	5	10

	A 16	AB1	B 1	B 5	B 10
			20	25	30
	Lys-Val-Glu	-Ala	Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Asp-Ile-Leu-Ile	20	25
	Lys-Val-Gly	-Ala	His-Ala-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu	20	25
	Lys-Val-Asn		-Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly	20	25

B16	C1	C5	C7	CD1
35 Arg-Leu-Phe-Lys-Ser		40 His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu--Lys		45 Phe-Asp-Arg
35 Arg Met-Phe-Leu Ser		40 Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr		45 Phe-Pro-His
30 Arg-Leu-Leu-Val-Val				Phe-Glu-Ser

CD5	CD9	D1	D5	D7	E1
50 Phe-Lys-His-Lcu-Lys			55 Thr-Glu-Ala Glu Met-Lys-Ala		60 Ser-Glu-Asp
50 Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly					Ser-Ala-Gln
			55 Thr-Pro-Asp-Ala-Val-Met-Gly		Asn-Pro-Lys-

E5	E10	E15
65 Leu-Lys-Lys His-Gly-Val-Thr-Val-Leu-Thr-Ala-Leu-Gly-Ala-Ile-	70	75
	60 Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-	
	65 Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Ala-The-Ser-Asp-Gly-	

E20	EF1	EF5	EF8	F1	F5
	80 Lys-Lys Gly-His-His-Glu-Ala-Glu		85		90 Leu-Lys-Pro-Leu-Ala-
	75 His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala				Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-
	80 His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly-Thr				Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-

F9	FG1	FG5	G1	G5
	95 Thr-Lys-His-Lys-Ile		100	105 Pro-Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu
85 Asp-Leu-His-Ala-	90 His-Lys-Leu-Arg-Val		95	Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys
90 Glu-Leu-His-Cys-	95 Asp-Lys-Leu-His-Val		100	Asp-Pro-Glu-Asn-The-Arg

G10	G15	G19	GH1
	110 Phe-Ile-Ser-Glu-Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Arg-	115	120 His-Pro-
100 Leu-Leu-Ser-His-Cys	105 Leu-Leu-Val-Thr-Lcu-Ala-Ala-His-	110	Leu-Pro-
105 Leu-Leu-Gly-Asn-Val	110 Leu-Val-Cys-Val-Leu-Ala-His-His-	115	Phe-Gly-

	GH 6	H 1	H 5	H 10
Gly-Asn-Phe-Gly		125 Ala-Asp-Ala-Gln-Gly	130 Ala-Met-Asn-Lys-Ala	135 Leu
115 Ala-Glu-Phe-Thr		120 Pro-Ala-Val-His	125 Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe	Leu
120 Lys-Glu-Phe-Thr		125 Pro-Pro-Val-Gln-Ala	130 Ala-Tyr-Gln-Lys-Val-Val	
	H 15	H 20	H 24	HC 1
Glu-Leu-Phe-Arg-Lys-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Try-Lys-Glu	140	145		150 Leu-Gly-
130 Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser	135		— — — —	140 Lys-Tyr-
135 Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His	140		— —	145 Lys-Tyr-
	HC 5			
	Tyr-Gln-Gly			
	Arg — —			
	His — —			

图 8-28 抹香鲸肌红蛋白和人血红蛋白中 α -和 β -链的一级结构
方框内表示螺旋区段；氨基酸残基上面的数字表示氨基酸残基顺序；字母与数字表示氨基酸残基在三级结构中的位置；“—”表示在三级结构的特殊位置缺少氨基酸残基。

从图 8-28 可以看出，肌红蛋白与血红蛋白的 α -和 β -链，尽管在一级结构上有较大差异，但是，它们的二、三级结构却非常相似。即：三者的肽链走向基本上相同；螺旋与非螺旋结构亦基本上类似。因此，如果不仔细分析，就会把肌红蛋白的三级结构误认为是血红蛋白的 α -链或 β -链的三级结构。但是，如果以肌红蛋白为标准，对三者的二、三级结构加以比较，就会发现，三者之

表 8-3 血红蛋白的 α -链(α)和 β -链(β)与肌红蛋白(M)之间的相同与不同

肽链区段	α	β	M
A	=M	=M	α -螺旋
AB	A16-B1 不同	少 2 个残基	非螺旋
B	=M	=M	α -螺旋
BC	=M	=M	非螺旋
C	3.0 ₁₀ 螺旋	3.0 ₁₀ 螺旋	α -螺旋
CD	所有都不同	CD5-7 不同	无规则卷曲
D	不存在	=M	α -螺旋
E	无规则卷曲	E 18-20 是无规则卷曲	α -螺旋
EF	EF 2-5 不同于 M ($\alpha=\beta$)		无规则卷曲
F	=M	=M	α -螺旋
FG	=M	=M	无规则卷曲
G	G1-3 与 M 不同，是 3.0 ₁₀ 螺旋		α -螺旋
GH	=M	GH 1-2 不同于 M	无规则卷曲
H	含 20 个残基		含 24 个残基
HC	含 3 个残基		含 5 残基
残基数	141	146	153

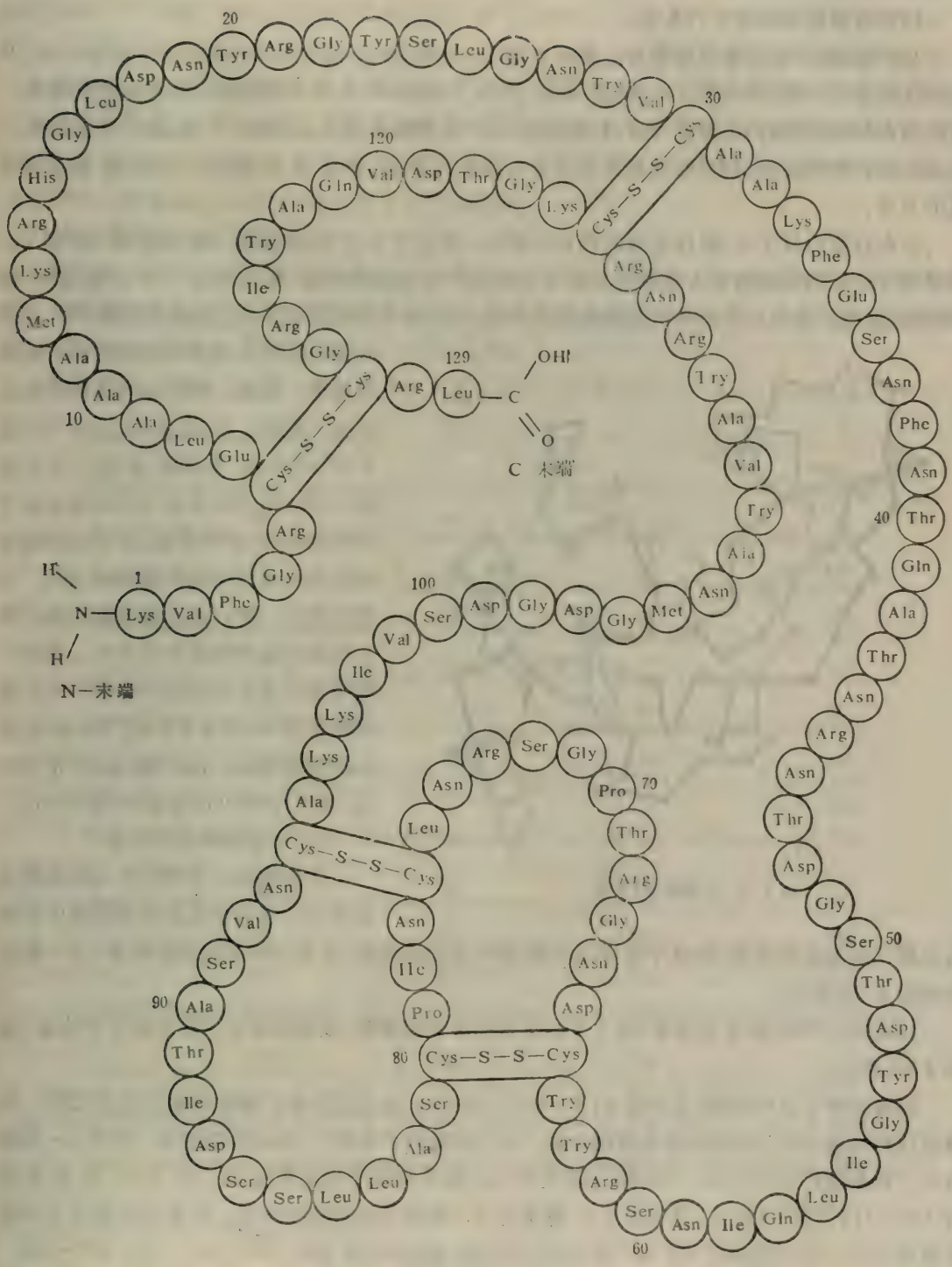


图 8-29 卵清溶菌酶一级结构

间是有若干差异的,如表 8-3 所示。

值得特别提出的有下列几点:

在 C 螺旋区,肌红蛋白有稍为扭曲的 α -螺旋,但 α -和 β -链有 3.0_{10} 螺旋;肌红蛋白 A、E、H 螺旋区的最后一圈,倾向于 3.0_{10} 螺旋,而在 α -和 β -链的 A、E、G、H 螺旋中,亦有类似的情况;肌红蛋白和血红蛋白 α -与 β -链的 F 螺旋区,其 C 末端敞开成 4.4_{16} 螺旋(π -螺旋)。由此可见,在血红蛋白和肌红蛋白中,的确存在着大量的右手 α -螺旋,但是, 3.0_{10} 螺旋和 4.4_{16} 螺旋也有少量的存在。

在血红蛋白分子中,极性氨基酸残基的侧链一般位于分子表面,但是,偶尔也有 Ser 和 Thr 残基位于分子内部的情况。在这种情况下, Ser 和 Thr 残基的羟基,往往与同一个 α -螺旋的羧基,形成氢键。大部分非极性氨基酸残基的侧链,位于分子内部或亚单位之间的裂隙表面。非极

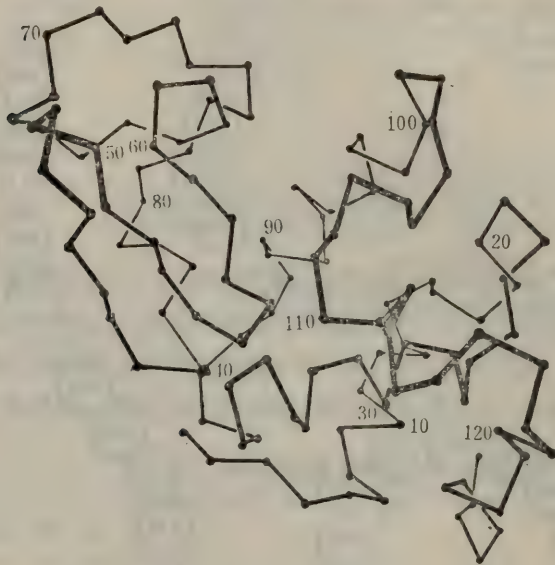


图 8-30 溶菌酶分子构象

性侧链伸到水环境中去的情况是极其罕见的。但是,偶尔也有这样的情况发生,例如: β -链的 F9 (93) Cys 或 E 27 (68) Leu, 其侧链伸出了分子表面。Gly 和 Ala 残基可以分布在分子的任何地方(分子表面、分子内部疏水核以及亚单位之间的裂隙表面)。与肌红蛋白一样,血红素埋藏在血红蛋白的每条肽链的疏水空穴中。其 Fe^{2+} 除与血红素本身的四个吡咯环的 N 原子配位而外,还与 F8 (92) His 咪唑基以配位键相连。 Fe^{2+} 的第六个空位,可以与 O_2 可逆地结合(图 8-27)。

(三) 溶菌酶分子构象

溶菌酶存在于卵白和人的粘膜分泌物中。它能催化细菌细胞壁中多糖

的水解,因而能够杀菌。其分子量是 14600,由一条肽链构成,含有 129 个氨基酸残基,其一级结构如图 8-29 所示。

1965 年,Phillips 及其同事,用 2 \AA 分辨力的 X 光衍射法,成功地确定了溶菌酶分子构象,如图 8-30 所示。

溶菌酶分子状如椭球,大小为 $45 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA} \times 30 \text{ \AA}$ 。溶菌酶的分子构象不同于肌红蛋白,其螺旋结构只占 25%,大部分是无规则卷曲。在溶菌酶分子构象中,有六个螺旋区。其中, α -螺旋存在于残基顺序 5—15、24—34、88—96 之中; 3_{10} -螺旋存在于残基顺序 80—85 之中;在残基顺序 108—114、119—125 上,还有处于 α -螺旋与 3_{10} -螺旋之间的中间类型。 β -转角分布在下列残基顺序之中: 17—20、20—23、36—39、54—57、60—63、74—77、98—101、104—107、115—118、124—127。肌红蛋白没有 β -折迭,但是,溶菌酶分子在 41—54 残基顺序上,却有一个反平行 β -

折迭。值得特别注意的是,在溶菌酶分子的表面上,有一个深陷的“凹槽”,其大小恰好能容纳多糖底物的六个单糖。这是溶菌酶的活性部位。四个二硫桥存在于 Cys-6 与 Cys-127、Cys-30 与 Cys-115、Cys-64 与 Cys-80、Cys-76 与 Cys-94 之中。这些二硫桥对保持溶菌酶分子构象,起了一定的作用。要对溶菌酶划分分子内区和分子外区,是很困难的。但是,一般地说,避开溶剂的区域是非极性的,即是非极性基团群集的地方;而带电荷的极性基团和不带电的极性基团,除个别(Ser 和 Gln 各一个)而外,都是位于分子的表面。非极性基团并不是全部位于分子内部的,也有个别的非极性基团(如四个 Try)位于分子的表面。

(四) 羧肽酶 A 分子构象

羧肽酶 A(CPA)是一种含 Zn 的酶。它催化多肽链 C-末端肽键的水解,并能逐步降解肽链。从胰腺产生出来的不是有活性的羧肽酶 A,而是无活性的羧肽酶 A 原。此酶原经过胰酶激活,产生四种羧肽酶 A: CPA_α、CPA_β、CPA_γ、CPA_δ。

羧肽酶 A_α(CPA_α)是由一条包含 307 个氨基酸残基的多肽链和一个 Zn 原子组成的。其分

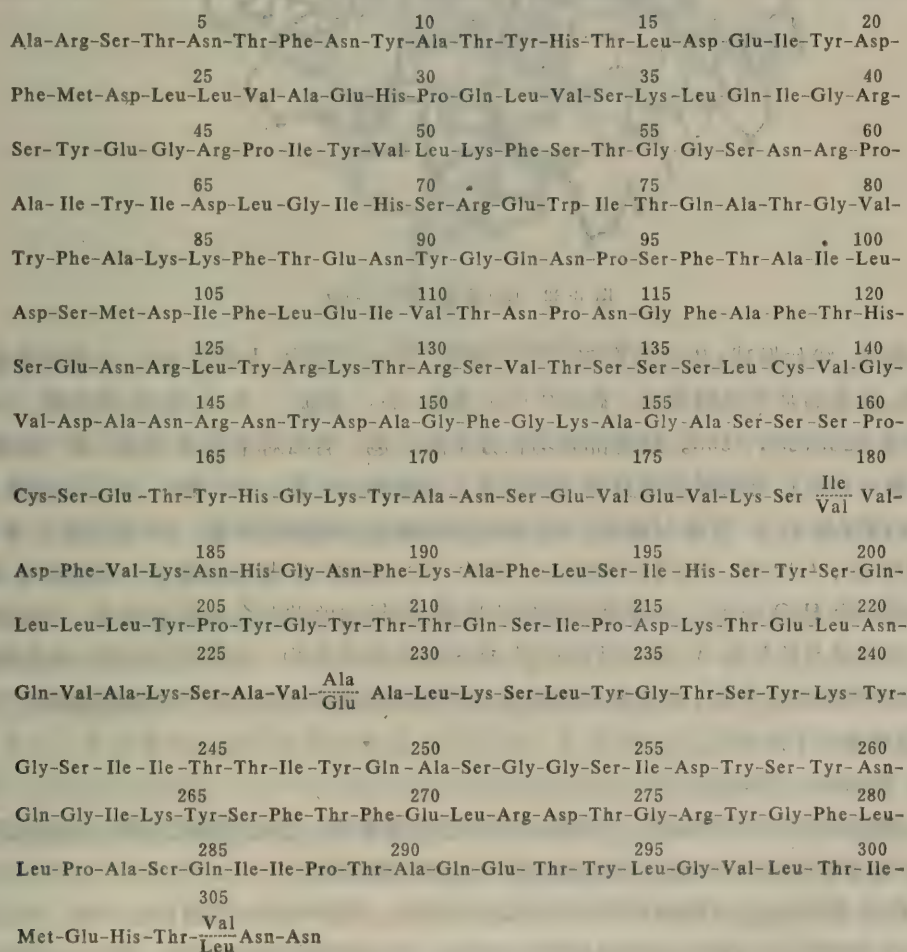


图 8-31 牛羧肽酶 A_α 的一级结构
二硫键存在于残基 138 与 161 之间

子量为 34600。其一级结构如图 8-31 所示：

1967 年, Lipscomb 等人, 以 2\AA 分辨率, 揭示了羧肽酶 A_a (CPA_a) 的分子构象, 如图 8-32 所示。

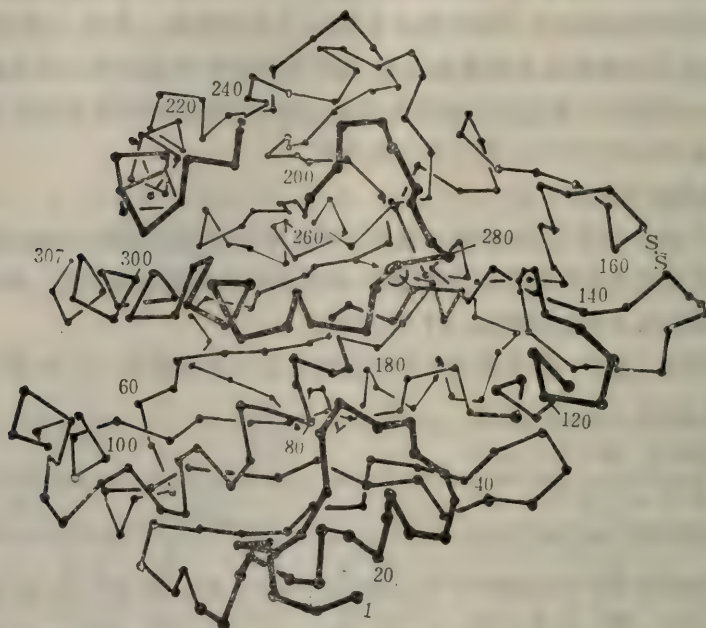


图 8-32 羧肽酶 A_a 的分子构象

羧肽酶 A_a 状如椭球, 其大小为 $50 \times 42 \times 38\text{\AA}$ 。在多肽链中, 大约有 38% 的螺旋构象, 17% 的 β -折迭, 其余的是无规则卷曲。螺旋中的大多数, 是 α -螺旋。其主要的部分是: 14—29, 72—88, 215—233, 288—305。这些部分均在分子的一边。有四对平行 β -折迭, 其二面角 (ϕ, ψ) 为 -119° 和 $+113^\circ$; 有三对反平行 β -折迭, 其二面角 (ϕ, ψ) 为 -139° 和 $+135^\circ$ 。这些 β -折迭穿过分子的中心。在 β -折迭与螺旋之间, 有由疏水侧链构成的疏水核。Zn 原子位于 β -折迭的附近, 与 His 69、Glu 72、His 196 相配位。其中, His 196 是 β -折迭的成分。此外, 与 Zn 原子配位的还有一个 H_2O 分子。一个袋形的空穴顺着 β -折迭的并列的肽链安放, 并与 Zn 原子联系。此空穴就是羧肽酶 A_a 的活性部位区, 能容纳此酶的底物。值得注意的是, 在底物进入之前, 此空穴是充满水分子的, 但在底物逐出水分子而进入空穴之后, 由于底物引起酶分子的构象变化, 则空穴变成了疏水区。

(五) 胰岛素分子构象

胰岛素是由哺乳动物胰腺的 β -细胞分泌的蛋白质激素。它在碳水化合物、氨基酸和脂肪的代谢中, 起重要的调节作用。注射胰岛素, 可以治疗糖尿病。

天然胰岛素的结晶, 首先由阿贝尔于 1926 年获得。英国牛津大学霍奇金等人, 从三十年代起, 就一直在研究三方二锌晶体的胰岛素空间结构。美国哥伦比亚大学劳 (B.W. Low) 等人, 对无锌胰岛素的正交晶体结构, 也进行了多年的研究。但是, 由于制备合适的同晶型重金属衍生物很

不容易，致使胰岛素空间结构迟迟得不到圆满的解决。牛津小组于1969年，报道了 2.8\AA 分辨力的X-射线结构分析结果。我国虽然从1967年才开始研究，但于1971年就得到了 2.5\AA 的研究结果，1973年，又报道了 1.8\AA 的研究结果。

通过X-射线结构分析得知，胰岛素以二聚体形式存在。图8-33是我国测出的胰岛素空间结构。对胰岛素空间结构加以剖析，可以得出下列结果：

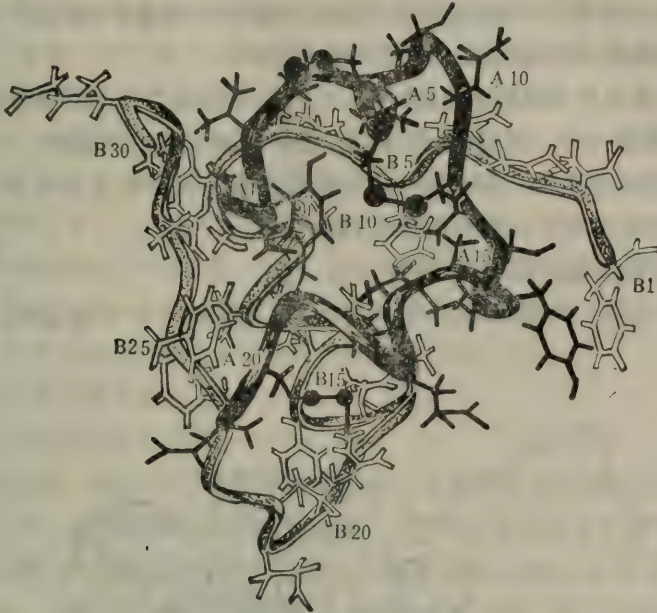


图 8-33 我国测出的胰岛素的空间结构

(一) B链与A链

B链有30个氨基酸残基。B1—B6是伸展的折迭肽链。B8是Gly，肽链在此发生大转折，然后进入螺旋构象。B9—B19是右手螺旋，其中两圈是标准的 α -螺旋，B20—B23肽链呈现U形转弯。B23—B27为一段伸展的肽链结构。在整个B链中，B9—B19螺旋构成肽链的基本骨架，是使这条长链稳定的基本因素之一。

A链有21个氨基酸残基，其中只有A12—A15是一个非标准的右手螺旋，其它为不同伸展程度的肽链构象。

(二) 胰岛素的分子内部，由非极性侧链充满，形成一个疏水核。参与形成疏水核的残基有：A16、B11、B15的Leu，B2的Phe以及A2的Ile。B18的Val、A13Leu和B14Ala也部分地参与了疏水核的形成。这一疏水核，对稳定胰岛素分子的构象起重要的作用。

(三) 全部的极性侧链，分布在胰岛素的分子表面上。分子表面有两个极性区域。第一极性区域包括：B5His、B9Ser、B10His、B13Gln；第二极性区域包括：A8Thr、A12Ser、A4、A15、A17的Gln、A14、A19的Tyr、B3Asn以及B链的N-末端 NH_2 基。B22Arg与A21末端羧基形成离子键。极性侧链的这种分布，使得胰岛素的分子表面不均一，给特殊的生理功能，造成必要的条件。

(四) 在二聚体中,两个B链的B 24—B 27 形成了一个反平行 β 折迭结构。在此结构中,四对氢键是形成二聚体的一个重要的作用力。

2. 球蛋白分子二、三级结构的一般特征

通过对上述几种球蛋白分子以及其它球蛋白分子的二、三级结构的具体分析,可以看出,球蛋白分子的二、三级结构有下列一般特征:

(一) 在球蛋白分子中,一条肽链往往是通过一部分 α -螺旋、一部分 β -折迭、一部分 β -转角和一部分无规则卷曲,而形成紧密的球状构象(图 8-34)。

不同的球蛋白分子有不同的螺旋度(表 8 2)。一个球蛋白分子可以含有各种螺旋构象,如右手 α -螺旋、 3_{10} -螺旋、 4_{10} -螺旋,等等,但是,右手 α -螺旋占绝对优势。

在两条肽链之间,或者是一条肽链的不同肽段之间,有时存在着平行 β -折迭或反平行 β -折迭。但 β -折迭的含量则因蛋白质的不同而不同。

在 180° 的肽链转折处往往有 β -转角。

在螺旋与螺旋之间、 β -折迭与 β -折迭之间,或者螺旋与 β -折迭之间,往往是无规则卷曲(图 8-34)。

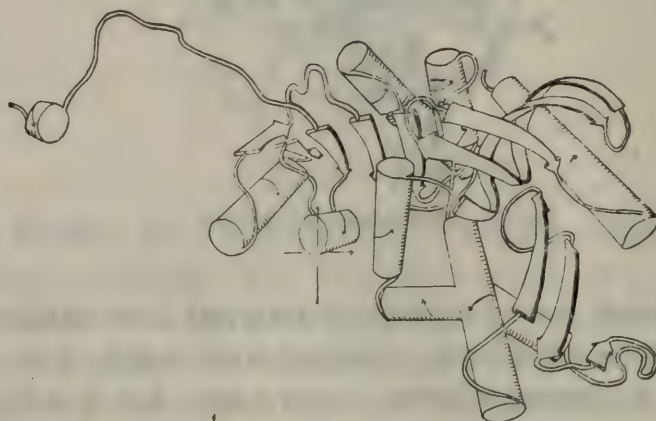


图 8-34 乳酸脱氢酶亚单位的二、三级结构
圆桶: 螺旋构象; 同方向箭头: 平行 β -折迭; 反方向箭头: 反平行 β -折迭

(二) 在球蛋白分子中,大多数非极性侧链总是埋藏在分子的内部,形成疏水核;而大多数极性侧链总是暴露在分子的表面上,形成一些亲水区。极性基团的种类、数目与排布决定了蛋白质的功能。

有不少较大的蛋白质分子,含有几个区域,每个区域都是紧密的球状构象,如:木瓜蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、苹果酸脱氢酶和乳酸脱氢酶等,含有两个区域;IgG 分子含有十二个区域。这些区域的划分,往往是与功能相联系的。

(三) 在球蛋白分子的表面,往往有一个内陷的空穴(裂隙、凹槽、袋)。此空穴往往是疏水区,能够容纳一个或二个小分子配体,或大分子配体的一部分。对酶分子而言,此空穴正好容纳

一个或二个小分子底物,或大分子底物的一部分,此即酶分子的活性部位。对肌红蛋白、血红蛋白和细胞色素c而言,此空穴正好容纳一个血红素分子。

3. 维持蛋白质分子构象的力

蛋白质多肽链为什么能够形成二级结构和三级结构?为什么大多数蛋白质分子总是采取内含疏水核外包亲水壳的球状或椭球状的紧密构象?这是十分复杂的问题。它不仅涉及到侧链之间的相互作用,而且还涉及到侧链与溶剂(如溶解多肽链的水)的相互作用,此外,还涉及到侧链与溶剂环境(如pH、温度、离子强度、溶质)的相互作用。总而言之,决定蛋白质分子二、三级结构的因素有内因和外因两方面。内因是产生二、三级结构的根据,外因是产生二、三级结构的条件。所谓内因,这里就是指:由一级结构所决定的各种侧链之间的各种相互作用。我们知道,蛋白质多肽链一般是由20种氨基酸残基按照一定的顺序构成的。这些氨基酸残基除Gly而外,都有自己特殊的侧链(R)。侧链共分四种类型:非极性侧链、极性不带电荷的侧链、极性带正电荷的侧链、极性带负电荷的侧链。因此,蛋白质中的氨基酸残基也分为四种类型:

(一) 非极性氨基酸残基——Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Try, Pro, Met, Cys;

(二) 极性不带电荷的氨基酸残基——Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln;

(三) 极性带正电荷的氨基酸残基——Lys, Arg, His;

(四) 极性带负电荷的氨基酸残基——Glu, Asp。

这些残基的侧链按照一定的顺序存在于多肽链上。它们不是彼此孤立的、不是互不相干的,总是在不断地相互作用。其作用方式是多种多样的,一般有疏水的相互作用(疏水键)、静电相互作用(离子键)、氢键和范德华引力。有时,还有二硫键、配位键。这些相互作用的方式与侧链的种类有关。例如:非极性侧链之间可以发生疏水的相互作用;带正电的极性侧链与带负电的极性侧链可以发生静电吸引;带相同电荷的极性侧链可以发生静电排斥;Thr, Ser, Tyr的—OH基可以与Glu, Asp的侧链基团(—COOH)形成氢键;不带电的极性侧链之间,或不带电的极性侧链与非极性侧链之间,或非极性侧链之间,可以产生范德华引力;两个Cys的—SH基可以产生二硫桥,等等。

侧链之间的相互作用在很大程度上决定了一条多肽链所采取的二、三级结构。这一论点从下列几例可以得到证明。

(一) 人工合成的多肽,如聚L-Lys和聚L-Glu,在水溶液中能够以自由折迭或 α -螺旋的形式存在。在酸性溶液中,当每个Lys的侧链氨基带有正电荷时,则聚L-Lys形成自由折迭形式。这是因为带有正电荷的侧链氨基,相互排斥,从而阻止了 α -螺旋的生成。在碱性溶液中,当Lys的侧链氨基不带电荷时,它就生成 α -螺旋。另一方面,聚L-Glu在酸性溶液中,当其侧链羧基不带电荷时,生成 α -螺旋;而在碱性溶液中,当其侧链羧基带负电荷时,生成自由折迭形式。因为带负电的侧链羧基相互排斥,从而,阻止了 α -螺旋的生成。这一实验表明,侧链的相互作用对 α -螺旋的生成有很大的影响;水环境(如pH)的变化影响侧链基团的电荷,从而影响侧链的相互作用。

(二) 油与水是不能互溶的。一滴油,如果位于水中,必然是球状油滴。因为油中的脂肪分子含有“憎恶”水分子的非极性碳氢链,这些脂肪分子只有以球状的形式聚集一起,才能最大限度

地避免与水接触。在大多数的蛋白质中,非极性残基的含量往往高达 30—50%。如果一条多肽链构成长而直的 α -螺旋,那么,众多的非极性侧链将使 α -螺旋在水中难以生存。因此,在蛋白质分子中,长螺旋本身倾向于返回折迭,两个 α -螺旋倾向于聚集,以减少分子表面的疏水面积,如图 8-35 所示。为了使 α -螺旋上的非极性侧链尽可能地藏在分子内部,螺旋区的残基顺序使大多数疏水侧链位于螺旋的同一侧。例如:在胰岛素 B 链上,两个二硫桥之间的肽段(11 个残基)是一个 α -螺旋。这个螺旋把大多数非极性侧链带到螺旋的同一边(图 8-36)。可以设想,这一边必然指向胰岛素分子的内部。如果按照图 8-36 的方式,对肌红蛋白和血红蛋白的螺旋区的

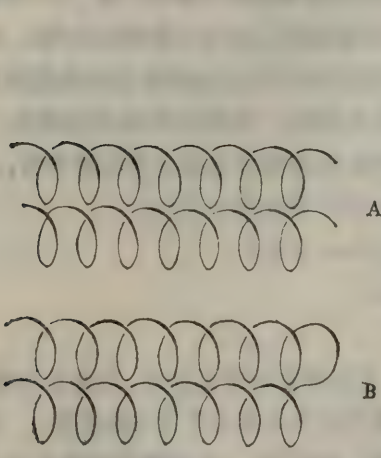


图 8-35 由于侧链相互作用的结果,二个 α -螺旋发生聚集(A);一个 α -螺旋本身返回折迭(B)

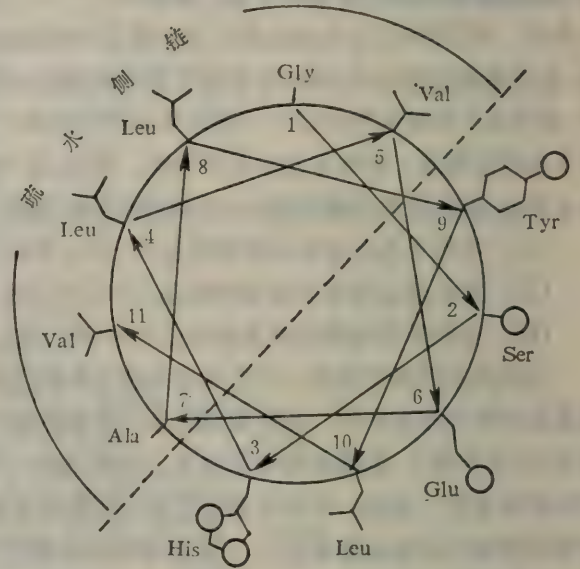


图 8-36 以胰岛素 B 链上两个二硫桥之间的肽段(形成三圈 α -螺旋)画出的“螺旋轮”

残基顺序作图,那么,也可以发现,较大的非极性侧链,主要位于“螺旋轮”的同一侧。如果按类似的方式,对其非螺旋区的残基顺序作图,则没有发现这种情况。无疑的,这些非极性侧链所群集的螺旋一侧,一定位于分子内部。

总之,位于多肽链各部分的许多非极性侧链,为了避开水相,总是千方百计地聚集在一起,从而在蛋白质分子内部形成一个疏水核。由于非极性侧链之间的疏水作用,从而使多肽链盘旋折迭,形成一个紧密的球状或椭球状的三级结构。由此可见,非极性侧链间的疏水作用,对形成和维持水溶液中的蛋白质的三级结构,可能起主要的作用。

(三) 荷电的侧链基团,亲水性很强,主要分布于蛋白质分子表面。如果带正电荷的侧链基团与带负电荷的侧链基团在分子表面相迁,二者便发生静电吸引,从而使多肽链形成紧密的构象。如果将溶液 pH 调节到蛋白质等电点的酸性或碱性一边,则蛋白质分子的净电荷增加。在酸性溶液中,蛋白质的 COO^- 基团的负电荷被中和,结果正电荷增加;在碱性溶液中,碱性基团的正电荷被中和,结果负电荷增加。由于蛋白质分子的净电荷增加而产生的静电斥力,是使蛋白

质构象发生松散的主要原因。因此,荷电侧链基团之间的静电引力与斥力,在某种程度上,是决定蛋白质三级结构的另一个因素。

(四) 在某些蛋白质中,两条肽链或一条肽链的不同部位,其侧链基团—SH,可以生成二硫桥。此二硫桥对维持蛋白质的三级结构,也有一定的作用。

(五) 在多肽链主链骨架上,—C=O基与—NH基可以生成氢键。这些氢键对于 α -螺旋、 β -折迭和 β -转角的维持,起了重大的作用。没有氢键,就没有二级结构。Tyr的—OH基不仅可以与主链骨架上—C=O基生成氢键,而且,也可以与Glu或Asp的侧链—COOH基生成氢键。这些氢键对维持蛋白质三级结构亦起一定的作用。

4. 一级结构与二、三级结构的关系

为什么每一种蛋白质都有自己特定的构象呢?最可能的回答是,一级结构决定空间结构。这一论点可以得到下列重要实验的有力证明:

在8M脲素存在下,用巯基乙醇处理天然核糖核酸酶,其二硫桥全部断裂,肽链松散,活性全部丧失。但是,当用透析法除去脲素和巯基乙醇之后,则核糖核酸酶的活力几乎全部恢复,而且,复原后的产物,其物理化学性质与天然核糖核酸酶的物理化学性质完全相同。这说明松散的肽链又完全恢复了核糖核酸酶的天然构象。或然率计算表明,在随机重组的情况下,

当八个巯基形成四个二硫键时,应有105种不同的方式,但是,在复原过程中,走向随机的核糖核酸酶肽链,却只选择了其中的一种方式(即与核糖核酸酶分子天然构象所采取的方式完全相同),如图8-37所示。这说明,核糖核酸酶分子的一级结构决定着核糖核酸酶分子特定的天然构象。

蛋白质分子的一级结构与二级结构有什么关系?如何从一级结构推测二级结构?最近十多年来,人们一直在探讨这些问题。虽然还没有完全解决,但是,已经取得了一定的进展。探讨上述问题可以采用各种方法,经验参数法就是其中之一。因该法对已知的实验结果进行了总结,并揭示了某些规律,又因该法处理简单,易为一般人所理解,所以,以此法为例说明结构预测工作。但不意味着此法是目前最好的方法。探讨一级结构与二级结构的关系需确定:多肽链上哪些肽段是螺旋构象,哪些肽段是 β -折迭,哪些肽段是 β -转角,以及哪些肽段是无规则卷曲。现在,Chou和Fasman用经验参数法,对一级结构与空间结构都已知的29种蛋白质,进行了统计分析,初步总结了一级结构与二级结构之间的对应规律。但根据这些规律预测(已知一级结构的)未知物的二级结构尚需时间的考验。

Chou和Fasman对29种蛋白质中的每一种氨基酸残基在 α -螺旋、 β -折迭和 β -转角中的分布,进行了统计学的处理,得到了表8-4所示的20种氨基酸残基的构象参数。 P_α 、 P_β 和 P_i 分

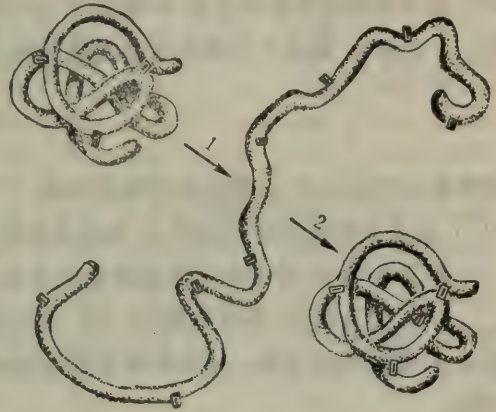


图 8-37 核糖核酸酶分子构象的松散与恢复
1. 构象松散; 2. 构象恢复

别代表 α -螺旋、 β -折迭和 β 转角的构象参数。以 α 螺旋构象参数为例，来说明构象参数的意义：

$$P_j = \frac{n_j}{\sum n_j} \quad (8-1)$$

P_j 表示某种氨基酸残基在蛋白质中出现的频率； n_j 表示某种氨基酸残基数； $\sum n_j$ 表示所有氨基酸残基的总数。

$$P_{j,\alpha} = \frac{n_{j,\alpha}}{\sum n_{j,\alpha}} \quad (8-2)$$

$P_{j,\alpha}$ 表示某种氨基酸残基在 α -螺旋中出现的频率； $n_{j,\alpha}$ 表示 α -螺旋中的某种氨基酸残基数； $\sum n_{j,\alpha}$ 表示 α -螺旋中的所有氨基酸残基的总数。

$$P_\alpha = \frac{P_{j,\alpha}}{P_j} \quad (8-3)$$

某种氨基酸残基在 α -螺旋中出现的频率 ($P_{j,\alpha}$) 除以某种氨基酸残基在蛋白质中出现的频率 (P_j)，就是某种氨基酸残基的 α -螺旋构象参数 P_α 。

β -折迭和 β -转角的构象参数依此类推。

对 α -螺旋而言，构象参数 (P_α) 大，这说明形成 α -螺旋的能力强；相反的，构象参数小，说明形成 α -螺旋的能力弱。按照构象参数值的大小，即形成 α -螺旋的能力大小，把 20 种残基分成六组：

- (一) Glu, Met, Ala, Leu 形成 α -螺旋的能力最强，以 H_α 表示；
- (二) Lys, Phe, Gln, Try, Ile, Val 形成 α -螺旋的能力中等，以 h_α 表示；
- (三) Asp, His 形成 α -螺旋的能力很弱，以 I_α 表示；
- (四) Cys, Ser, Thr, Arg 是 α -螺旋的中立者，以 i_α 表示；
- (五) Asn, Tyr 是 α -螺旋的破坏者，以 b_α 表示；
- (六) Gly, Pro 是 α -螺旋的最强的破坏者，以 B_α 表示。

根据表 8-4 所示的各种残基的 α -螺旋构象参数 (P_α)，如何从一级结构预测 α -螺旋构象？

Chou 和 Fasman 将 α 螺旋划分为中央螺旋(内螺旋)、N-末端螺旋和 C-末端螺旋三部分。N-末端螺旋和 C-末端螺旋分别只包含三个残基。与 N-末端螺旋相邻的三个连续的非螺旋残基是 N-末端非螺旋区；与 C-末端螺旋相邻的三个连续的非螺旋残基是 C-末端非螺旋区。N-末端螺旋与 N-末端非螺旋区以及 C-末端螺旋与 C-末端非螺旋区，统称为螺旋疆界，如图 8-38 所示。由该图可以看出残基构象参数 $\langle P_\alpha \rangle$ 的分布规律。在中央螺旋的核心，残基的构象参数值最大。从中央螺旋核心分别向 N-末端螺旋和 C-末端螺旋两个方向延伸，其残基的构象参数值是逐步减小的。因此，得出一个总的趋势：最强的螺旋生成者——Glu, Met, Ala, Leu，往往占据中央螺旋的核心；最强的螺旋破坏者——Gly, Pro, Tyr, Asn，常常出现在 N-末端螺旋区和 C-末端非螺旋区。

在多肽链的一级结构与螺旋构象之间存在着下列关系：

- (一) 在多肽链的六个连续的残基中，如果有四个残基是强螺旋生成者 (H_α) 或螺旋生成者

表 8-1 在 29 种蛋白中 20 种残基在 α -螺旋、 β -折迭和 β -转角中的构象参数*

P_α		P_β		P_i		f_i		f_{i+1}		f_{i+2}		f_{i+3}	
Glu 1.51	} H_α	Val 1.70	} H_β	Asn 1.56	Asn 0.161	Pro 0.111	Asn 0.191	Try 0.167					
Met 1.45		Ile 1.60		Gly 1.56	Cys 0.149	Ser 0.159	Gly 0.190	Gly 0.152					
Ala 1.42		Tyr 1.47		Pro 1.52	Asp 0.147	Lys 0.115	Asp 0.179	Cys 0.128					
Leu 1.21	} h_α	Phe 1.38	} h_β	Asp 1.46	His 0.140	Asp 0.119	Ser 0.125	Tyr 0.125					
Lys 1.16		Try 1.37		Ser 1.43	Ser 0.120	Thr 0.123	Cys 0.117	Ser 0.106					
Phe 1.13		Leu 1.30		Cys 1.19	Pro 0.142	Arg 0.125	Tyr 0.114	Gln 0.038					
Gln 1.11	} i_α	Cys 1.19	} i_β	Tyr 1.11	Gly 0.102	Gln 0.098	Arg 0.099	Lys 0.095					
Try 1.08		Thr 1.19		Lys 1.01	Thr 0.086	Gly 0.085	His 0.093	Asn 0.091					
Ile 1.08		Gln 1.10		Gln 0.98	Tyr 0.082	Asn 0.043	Glu 0.077	Arg 0.085					
Val 1.06	} b_α	Met 1.05	} b_β	Thr 0.96	Try 0.077	Met 0.082	Lys 0.072	Asp 0.081					
Asp 1.01		Arg 0.93		Try 0.96	Gln 0.074	Ala 0.076	Thr 0.065	Thr 0.079					
His 1.00		Asn 0.89		Arg 0.95	Arg 0.070	Tyr 0.065	Phe 0.065	Leu 0.070					
Arg 0.98	} a_α	His 0.87	} a_β	His 0.95	Met 0.068	Glu 0.060	Try 0.061	Pro 0.068					
Thr 0.83		Ala 0.83		Glu 0.74	Val 0.062	Cys 0.053	Gln 0.037	Phe 0.065					
Ser 0.77		Ser 0.75		Ala 0.66	Leu 0.061	Val 0.048	Leu 0.036	Glu 0.064					
Cys 0.70	} b_α	Gly 0.75	} b_β	Met 0.60	Ala 0.050	His 0.047	Ala 0.035	Ala 0.058					
Tyr 0.69		Lys 0.74		Phe 0.60	Phe 0.059	Phe 0.041	Pro 0.034	Ile 0.056					
Asn 0.67		Pro 0.55		Leu 0.59	Glu 0.056	Ile 0.034	Val 0.028	Met 0.055					
Pro 0.57	} B_α	Asp 0.54	} B_β	Val 0.50	Lys 0.055	Leu 0.025	Met 0.014	His 0.054					
Gly 0.57		Glu 0.37		Ile 0.47	Ile 0.043	Try 0.013	Ile 0.013	Val 0.053					

* P_α, P_β, P_i 分别是 α -螺旋、 β -折迭和 β -转角的构象参数; $f_i, f_{i+1}, f_{i+2}, f_{i+3}$ 分别是 β -转角中四个位置的弯曲频率; H_α, H_β : 产生 α -螺旋、 β -折迭的能力最强; h_α, h_β : 产生 α -螺旋、 β -折迭的能力中等; I_α : 产生 α -螺旋的能力最弱; B_α, B_β : 破坏 α -螺旋、 β -折迭的能力最强; b_α, b_β : 破坏 α -螺旋、 β -折迭的能力中等; i_α, i_β : 对 α -螺旋、 β -折迭是中立者。

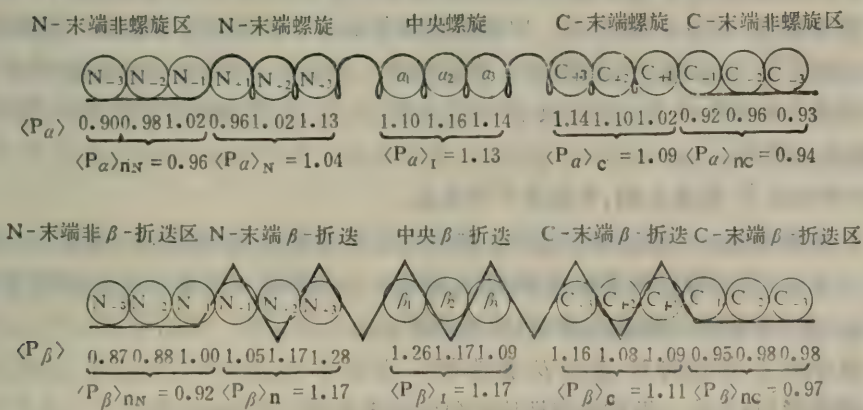


图 8-38 在 15 种蛋白质中,螺旋疆界和中央螺旋的构象参数(P_α)的比较以及 β -折迭疆界和中央 β -折迭的构象参数(P_β)的比较
 $\langle P_\alpha \rangle_{nN}, \langle P_\alpha \rangle_N, \langle P_\alpha \rangle_I, \langle P_\alpha \rangle_C, \langle P_\alpha \rangle_{nC}$ 分别是 N-末端非螺旋区、N-末端螺旋、中央螺旋、C-末端螺旋、C-末端非螺旋区的平均 P_α 值。每个区包含三个残基。 $\langle P_\beta \rangle_{nN}, \langle P_\beta \rangle_n, \langle P_\beta \rangle_I, \langle P_\beta \rangle_C, \langle P_\beta \rangle_{nC}$ 分别是 N-末端非 β -折迭区、N-末端 β -折迭、中央 β -折迭、C-末端 β -折迭、C-末端非 β -折迭区的平均 P_β 值。每个区包含三个残基

(h_a),那么,这一肽段可以生成中央螺旋的核心。弱螺旋生成残基(I_a)可以作为 $0.5 h_a$ 计入。如果此肽段中含有 $1/3$ 或更多个螺旋破坏者(B_a 或 b_a),那么,此肽段便不可能生成螺旋。

(二) 从中央螺旋核心向 N-末端螺旋和 C-末端螺旋两个方向延伸,直到具有 $\langle P_a \rangle < 1.00$ 的四肽破坏者($b_4, b_{3i}, b_{2i_2}, b_{i_3i_4}, b_{ih_2}, b_{i_2h}, b_{2h_2}, b_{3h}, b_{2ih}$)为止。有时,在四肽破坏者中,也包含 I, B 或 H 。邻近的 β -折迭也中止螺旋区。

(三) Pro 不能存在于中央螺旋区或 C-末端螺旋区。

(四) Pro 和带负电荷的 Asp⁽⁻⁾、Glu⁽⁻⁾“喜欢”加入 N-末端螺旋区;带正电荷的 His⁽⁺⁾、Lys⁽⁺⁾、Arg⁽⁺⁾“喜欢”加入 C-末端螺旋区。

总之,对于含有六个或更多个残基的任何肽段而言,如果此肽段是螺旋构象,那么,它必然满足下列三个条件:

(一) $\langle P_a \rangle \geq 1.03$

(二) $\langle P_a \rangle > \langle P_\beta \rangle$

(三) 符合上述四种关系

在螺旋结构中,残基置换是否对螺旋结构产生严重影响,决定于残基的构象参数 $\langle P_a \rangle$ 。例如:Glu、Ala 和 Leu 的构象参数都较大,是强螺旋生成者。实验表明,Ala 或 Leu 可以置换 Glu,不会影响螺旋结构。又如:Leu 与 Pro 的构象参数相差很大。前者是强螺旋生成者;后者是强螺旋破坏者。实验表明,Pro 不能置换 Glu,否则,螺旋结构就会遭到破坏。

现在,让我们来谈一谈一级结构与 β -折迭的关系。

Chou 和 Fasman 把 β -折迭划分为中央 β -折迭、N-末端 β -折迭和 C-末端 β -折迭三部分。其中,N-末端 β -折迭和 C-末端 β -折迭分别只包含三个残基。与 N-末端 β -折迭相邻的三个连续的残基是 N-末端非 β -折迭区;与 C-末端 β -折迭相邻的三个连续的残基是 C-末端非 β -折迭区。N-末端非 β -折迭区和 N-末端 β -折迭以及 C-末端非 β -折迭区和 C-末端 β -折迭统称为 β -折迭疆界,如图 8-38 所示。由该图可以看出: β -折迭的三个部分,其残基构象参数 $\langle P_\beta \rangle$ 均大于或等于 1.05;在 N-末端和 C-末端的非 β -折迭区,其残基构象参数 $\langle P_\beta \rangle$ 小于 1.05;产生 β -折迭能力最强的残基占据中央 β -折迭的核心;在 β -折迭的三个部分中,强 β -折迭形成残基的分布是分散的。

在一级结构与 β -折迭之间,存在着下列关系:

(一) 在多肽链的五个连续的残基中,如果有三个残基是最强的或一般的 β -折迭形成者(H_β 或 h_β),那么,这个肽段将能生成 β -折迭的核心。如果有 $1/3$ 或更多个 β -折迭破坏者(B_β 或 b_β),那么,这个肽段就不可能生成 β -折迭的核心。

(二) 从中央 β -折迭向 N-末端 β -折迭和 C-末端 β -折迭两个方向延伸,直到 $\langle P_\beta \rangle < 1.00$ 的 β -四肽破坏者(与上述一级结构与螺旋构象的关系中的(二)相同)为止。

(三) Glu⁽⁻⁾ 很少存在于 β -折迭中;Pro 很少存在于中央 β -折迭区。

(四) 荷电的残基很少存在于 β -折迭中;Try 常常出现在 N-末端 β -折迭区,但很少存在于 C-末端 β -折迭区。

总之,在多肽链中,由五个或更多个残基所构成的肽段,如果要形成 β -折迭,就必须满足下

列条件:

(一) $\langle P_\beta \rangle \geq 1.05$

(二) $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$

(三) 符合上述一级结构与 β -折迭四种关系。

在多肽链的某一肽段既含有螺旋生成残基又含有 β -折迭生成残基的情况下,如何判断此肽段是螺旋结构还是 β -折迭?在这种情况下,就需要比较 $\langle P_\alpha \rangle$ 与 $\langle P_\beta \rangle$ 的大小。若 $\langle P_\alpha \rangle > \langle P_\beta \rangle$,则重迭区是螺旋结构;若 $\langle P_\beta \rangle > \langle P_\alpha \rangle$,则重迭区是 β -折迭。

关于一级结构与 β -转角的关系,通过对29种蛋白的408个 β -转角的分析,得到下列一些初步规律:

(一) Pro 往往在第二位,不在第三位;Try 在第四位,不在第二位;Cys 和 His 在第一位,不在第二位。

(二) 在全部的四个位置上,强 β 转角生成者是:Asn、Gly、Pro、Asp、Ser。

(三) 最大的疏水残基(Val、Ile 和 Leu)往往恰好存在于 β -转角之外的区域。

(四) 与 β -转角相邻的反平行 β -折迭,或者 α - α 和 α - β 相互作用,可以使 β -转角得到稳定。

在一条多肽链上,任一四肽,如果要形成 β -转角,就必须满足下列条件:

(一) $P_i > 0.75 \times 10^{-4} (P_i = f_i \times f_{i+1} \times f_{i+2} \times f_{i+3})$,

(二) $\langle P_i \rangle > 1.00$ [$\langle P_i \rangle$ 是 β -转角发生的平均机率],

(三) $\langle P_\alpha \rangle < \langle P_i \rangle < \langle P_\beta \rangle$ 。

同一种氨基酸残基,在 α -螺旋、 β -转角或 β -折迭中,往往表现相反的作用。例如:Asn、Gly、Pro 是 β -转角的强生成者,可是,对 α -螺旋的形成,却是最大的破坏者。Ile、Val、Leu 是 β -转角的最大破坏者,可是,对 β -折迭,却是强大的生成者,同时,也是 α -螺旋的生成者。在 α -螺旋、 β -折迭的四肽破坏者当中,包含着 β -转角的强生成者。

关于一级结构与三级结构的关系,现在,虽然还没有完全弄清,但已取得了一些进展。一级结构的变化可以导致三级结构的变化:

(一) 当 β -转角的残基,由于被其它残基置换,而引起 β -转角的破坏时,则三级结构随之变化。

(二) 构成二硫桥的两个Cys,如有一方被Tyr置换,则二硫桥不能形成,三级结构可能有变化。形成侧链氢键的Glu与Tyr,如Glu被Val取代,则侧链氢键不能形成,三级结构可能有变化。如果把反平行 β -折迭的一方肽段变成 α -螺旋,则 β -折迭的破坏可能导致三级结构的变化。

(三) 把多肽链中的亲水残基换成疏水残基,如Glu \rightarrow Val, Glu \rightarrow Ala, 这种置换,即使不影响二级结构,也要严重影响三级结构。

不同酶之间,或者不同的非酶蛋白之间,其一级结构的差异,导致空间结构的差异,导致分子表面上基团的种类、数目及其精确排布的差异,从而导致功能的差异。

但是,有愈来愈多的例子表明,明显不同的氨基酸顺序,产生基本上相同的三级结构,例如:

不同来源的细胞色素c便是这样。为什么不同的一级结构却能产生基本上相同的三级结构呢？这个谜现在还没有揭开，尚待深入研究。

在我们考虑蛋白质分子空间结构的时候，千万不要忘记环境因子的影响。相同的蛋白质分子，由于配体的束缚，溶液pH的变化，或者金属原子（如细胞色素c中的Fe）价态的变化，可以导致其三级结构的变化。因此，蛋白质分子呈现什么样的三级结构，一级结构固然有决定性的作用，但是，环境因子也有较大的影响。

第五节 蛋白质分子的四级结构^(1,3-6,20)

一、基本概念

有些球蛋白分子，含有二条或更多条多肽链，这些多肽链彼此以非共价键相联，每一条多肽链都有自己的三级结构。此多肽链就是该蛋白质分子的亚单位（亚基）。因此，从结构上看，亚单位就是蛋白质分子的最小共价单位。亚单位，一般是由一条多肽链组成的，但有的亚单位，也可以由几条多肽链构成，这些多肽链以二硫桥相连。由亚单位聚合而成的蛋白质分子，叫寡聚蛋白。

所谓四级结构，就是指：各个亚单位在寡聚蛋白中的空间排布及亚单位之间的相互作用。这里不考虑亚单位本身的构象。由相同亚单位构成的四级结构，叫均一四级结构；由不同亚单位构成的四级结构，叫非均一四级结构。

近年来，有人把亚单位看成是寡聚蛋白的一个功能单位。例如：天冬氨酸转氨甲酰酶分子有六条催化肽链和六条调节肽链。每三个催化肽链构成有催化活性的催化三聚体；每二条调节肽链构成有调节功能的调节二聚体。从结构上看，这催化肽链和调节肽链就是天冬氨酸转氨甲酰酶分子的亚单位；但从功能上看，催化三聚体和调节二聚体才是此酶分子的亚单位。

除亚单位而外，在文献中还能见到原体（protomer）和单体（monomer）。

单体的含意较广，在不同的情况下，有不同的含意：1. 指寡聚蛋白分子中的各个多肽链。此时，单体即亚单位；2. 指蛋白质聚合体中的重复单位，此时，蛋白质分子本身即单体；3. 指由一条肽链组成的蛋白质分子，或没有四级结构的蛋白质分子。

原体是指，寡聚蛋白中的单个多肽链，此时，原体就是亚单位或单体。

二、亚单位之间的结合力

现已查明，溶菌酶、核糖核酸酶、胰蛋白酶、肌红蛋白，等等，都是单体蛋白。在正常条件下，它们不能聚合，没有四级结构。但是，血红蛋白、天冬氨酸转氨甲酰酶，等等，总是形成四级结构。现已发现，形成寡聚体的倾向与蛋白质中疏水氨基酸残基的含量有关。这些蛋白质含有大约30%以上的疏水氨基酸残基。看来，它们不可能将这些残基全部包藏在由一条肽链折迭所形成的核心里，过剩的一些疏水氨基酸残基不得不暴露到与水接触的亚单位表面上。亚单位表面上的疏水侧链，为了避开水相，只有迫使亚单位聚合，以实现把剩余的疏水侧链包藏在亚单位之间。因此，维持四级结构的主要力，看来是疏水键。但是，疏水键并不是维持四级结构的唯一的力。氢键、范德华引力也一定参与维持四级结构，但是，它们可能仅仅起次要的作用。此外，在个别的情况下，离子键、二硫键等也参与维持四级结构。

三、四级结构

在研究蛋白质四级结构中,人们必须回答下列两个问题:

第一,在一种蛋白质分子中,有多少亚单位?这些亚单位是否相同?

第二,亚单位是如何排布的?

1. 亚单位的种类与数目

首先,用超离心法或凝胶过滤法测定天然寡聚体的分子量,然后用 SDS-凝胶电泳法测定亚单位的分子量。这样,便可以确定寡聚体中亚单位的数目。如果亚单位分子量的区别较大,后者还能揭示亚单位的种类。

对于大肠杆菌 β -半乳糖苷酶,经超离心法测定,其分子量为 540000;经 SDS-凝胶电泳法测定,其分子量为 135000。这些实验结果表明,天然蛋白质分子是四聚体,这个四聚体是由分子量相同的四个亚单位所构成的。如果用分析超离心机代替 SDS-凝胶电泳法,在亚单位解离剂(如 SDS、脲或胍)的存在下,测定 β -半乳糖苷酶亚单位的分子量,其结果与 SDS-凝胶电泳法测得的结果完全相同。这说明该酶亚单位的分子量的确是 135,000。但是,这两种方法都不能确定这四个亚单位是否相同。

在 pH 7.0 稀磷酸缓冲液中,用超离心法测定,天冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)的分子量为 3.1×10^5 。当在对氯汞苯甲酸的存在下重新测定时,便发现了分子量不同的两种蛋白成分。其中,一种成分有酶活力,分子量为 1.03×10^5 ;另一种成分没有酶活力,分子量大约为 3×10^4 。后来,加 8M 氯化胍,用超离心机再研究分离的两种成分。人们发现:活性成分实际上是由分子量相同(3.4×10^4)的三个催化肽链所组成的三聚体(即催化亚单位);而无活性成分是由分子量相同(1.7×10^4)的二个调节肽链所组成的二聚体(即调节亚单位)。因此,该酶分子是由二个催化亚单位和三个调节亚单位所组成的。

对寡聚体中 N-末端氨基酸残基的种类与数目的准确测定,亦可以为蛋白质中多肽链的数目及其是否相同,提供信息。在多肽链的 N-末端残基相同但其分子量没有区别的情况下,要确认多肽链是否真正相同,有时是十分困难的。在这种情况下,蛋白质的指纹图可以作出回答。蛋白质经过蛋白水解酶水解之后,进行双向纸层析或双向高压纸电泳,以分离肽混合物,从而得到了肽的图谱,如图 8-39 所示。这就是指纹图谱。

胰酶仅裂解多肽链上的 Lys 和 Arg 的肽键。因此,通常用胰酶来制作指纹图。根据蛋白质的氨基酸定量组成的知识,可以计算出已知分子量(M)的天然蛋白质分子的 Lys 和 Arg 的残基数。假设这个数目是 N,每分子只有一条多肽链,则胰酶将使蛋白质分子裂解成 N + 1 个不同的

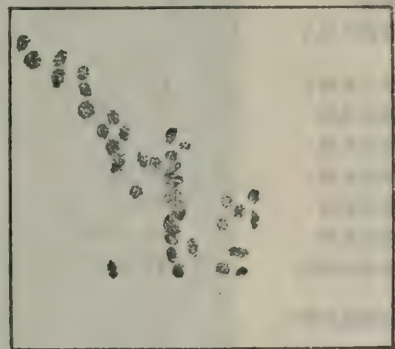


图 8-39 猪肌肉甘油醛-磷酸脱氢酶经过甲酸氧化、胰酶消化的肽图谱
消化液首先在 pH 6.5(横轴方向)高压纸电泳,
然后在 pH 3.5(纵轴方向)高压纸电泳。

肽段。如果每分子有两条相同的肽链,则每一条肽链的分子量就是 $\frac{N}{2}$,每条链只有 $N/2$ 个Lys和Arg的肽键。因此,预期的肽段数目将是 $\left(\frac{N}{2}+1\right)$ 。如果指纹图上的斑点数目与此预期的数目相符,就可以断定这两条肽链是相同的;如果指纹图上的斑点数目与此预期的数目 $\left(\frac{N}{2}+1\right)$ 不相符,而与 $(N+2)$ 的数目相符,就可以断定这两条肽链是不同的。因为两条不同的肽链经胰酶充分水解之后,必然产生 $N+2$ 个肽段数目。

寡聚体中的亚单位是否相同,最终还得靠一级结构确定。如果用各种技术能证明仅为一种多肽链,顺序研究又给予明确的一级结构,那末,人们就能很有把握地断定,所有的肽链都是相同的。换句话说,所有的亚单位都是相同的。

使用上述各种方法,已经发现(据1974年统计),650多种蛋白质具有四级结构,其中,500多

表 8-5 蛋白质分子中亚单位的种类与数目

蛋白质种类	来源	分子量	亚单位	
			数目	分子量
血红蛋白	哺乳动物血	64250	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 15130 β : 15870
烟草斑纹病毒	感染的叶片	39400000	2130*	17530
伴刀豆球蛋白A	Jack beans	55000	2*	27000
乳球蛋白	牛	36750	2*	18375
肠毒素	Cholera vibrios	84000	6*	14000
血浆铜兰蛋白	血浆	125000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 16000 β : 53000
神经生长因子	鼠	26520	2*	13260
乳糖阻遏物	大肠杆菌	150000	4*	39000
过氧化氢酶	牛肝	240000	4*	60000
乙醇脱氢酶	酵母	141000	4*	35000
虫萤光素酶	Renilla	34000	3*	12000
苹果脱氢酶	Neurospora	54000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	13500
天冬氨酸激酶	多粘芽孢杆菌	116000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 17000 β : 43000
亮氨酸氨肽酶	眼晶状体	330000	6*	58000
	猪肾	255000	4*	63500
谷酰胺合成酶	猪脑	370000	8*	46000
	猪肾	370000	4*	90000
磷酸果糖激酶	酵母	770000	6*	130000
固氮酶钼铁蛋白	巴氏梭菌	220000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 50700 β : 59500
固氮酶铁蛋白	同上	55000	2*	27500
天冬氨酸转氨甲酰酶	大肠杆菌	310000	12 (C_6R_6)	C-链: 34000 R-链: 17000
乳酸脱氢酶	心	150000	4*	35000
色氨酸合成酶	大肠杆菌	149000	4 ($\alpha_2\beta_2$)	α : 29500 β : 45000

*: 表示亚基相同

种是酶。表 8-5 列举了一部分蛋白质分子的亚单位种类与数目。

蛋白质分子的亚单位数目,有二、四、六、八、十二、2130 等。大多数蛋白质分子的亚单位数是偶数,个别的是奇数,如:虫萤光素酶分子含三个亚单位。蛋白质分子的亚单位种类,一般是一种或两种。

2. 亚单位的空间排布

在蛋白质分子中,亚单位是如何排布的?应用 X-射线结构分析和电子显微镜,可以看到亚单位的排布。其中,X-射线结构分析法是研究亚单位排布的最强有力的工具。

(一) 血红蛋白分子四级结构

血红蛋白分子是四聚体,包含两个相同的 α -亚单位(α -肽链)和两个相同的 β -亚单位(β -肽链)。5.5 Å 分辨力的 X-射线结构分析揭示:不论是 α -亚单位还是 β -亚单位,其三级结构都与肌红蛋白的三级结构基本上相同,为球状结构。相同的亚单位分别配对,四个亚单位按四面体方式排布。亚单位之间凹凸相补,形成一个四面体,长、宽、高分别为 64 Å、55 Å 和 50 Å,如图 8-40 所示。

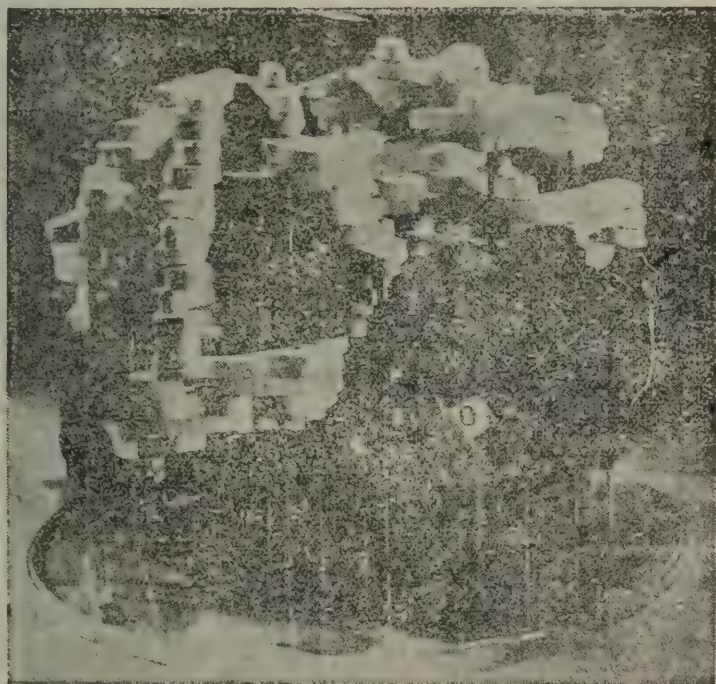


图 8-40 血红蛋白分子四级结构

(二) 天冬氨酸转氨甲酰酶分子四级结构

天冬氨酸转氨甲酰酶催化氨甲酰磷酸的氨甲酰基向天冬氨酸转移的反应。此酶受 CTP 反馈抑制。

天冬氨酸转氨甲酰酶分子含有两个相同的催化亚单位,三个相同的调节亚单位和六个 Zn 原子。其分子量为 31000。催化亚单位有催化活性,分子量为 10300。它含有三个相同的分子量

为 34000 的催化肽链。调节亚单位没有催化活性,但能结合 CTP,分子量为 34000。它含有两个相同的分子量 17000 的调节肽链。因此,天冬氨酸转氨甲酰酶分子实际上含有六条催化肽链(C-链)和六条调节肽链(R-链),是十二聚体。在天冬氨酸转氨甲酰酶分子中,这六个催化肽链和六个调节肽链是如何排布的?现在,X-射线结构分析法、电子显微镜法以及其它物理化学方法为此提供了一些重要的信息。根据这些信息,人们纷纷提出了有关此酶四级结构的各种模型。这里仅介绍其中的两个模型。

1972年,Schachman等人提出一种模型,如图8-41所示:三个扁圆形的催化肽链接等边三角形方式,互相结合,构成催化三聚体,即催化亚单位。两个催化三聚体上下对应,互相接近。两个圆柱形的调节肽链互相结合,构成了“V”形的调节二聚体,即调节亚单位。三个调节二聚体之间不直接结合。它们位于两个上下迭加的催化三聚体的周围。二聚体的一个调节肽链与下面的催化三聚体的一个催化肽链结合,另一个调节肽链则与上面的催化三聚体的一个催化肽链结合。与二聚体的两个调节肽链分别结合的两个催化肽链处于对角线上。

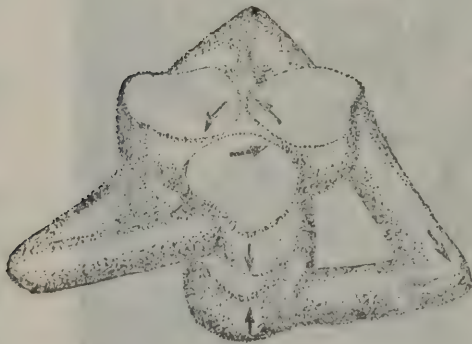


图 8-41 天冬氨酸转氨甲酰酶分子四级结构模型

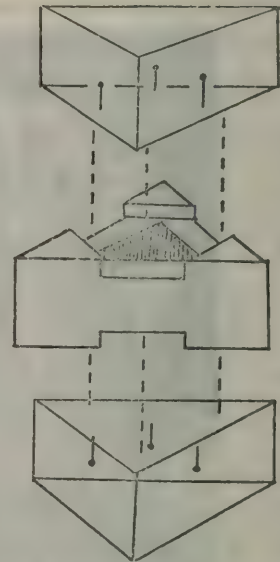


图 8-42 天冬氨酸转氨甲酰酶分子四级结构模型

后来,有人提出另一种模型,如图8-42所示。该模型分顶部、底部和中央区三层。顶部与底部的三角形单位表示两个催化三聚体。每个三聚体中的三个黑点表示活性部位-SH基的位置。这两个催化三聚体可能不直接相联,由中央区隔开。

分子中央区是一个中心有空腔的三角柱。它表示三个调节亚基的排布。就每一个调节亚基而言,其主要部分位于这一区的尖端,次要部分沿边彼此结合。

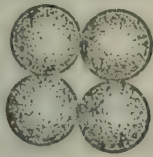
这两个模型的主要分歧是:

(1) 前者认为两个催化三聚体直接接近;后者认为两个催化三聚体不直接接近,为三个调节二聚体所分开。

(2) 前者认为三个调节二聚体不直接结合;后者认为三个调节二聚体互相结合。两个催化三聚体是否直接接近?三个调节二聚体是否互相结合?现在正在研究之中。

(三) 固氮酶二组分的四级结构⁽²⁰⁾

固氮酶能催化 N_2 还原成 NH_3 , 是一种多功能的氧化还原酶。它是由钼铁蛋白和铁蛋白所构成的复合物。钼铁蛋白分子是由两个相同的 α -亚单位和两个相同的 β -亚单位所组成的四聚体,其分子量为 220000。 α -亚单位和 β -亚单位的分子量分别为 50700 和 59500。铁蛋白分子量为 55000,它包含两个相同的亚单位。用电子显微镜观察均一的钼铁蛋白制剂,发现钼铁蛋白的每个亚单位都是球状的,其大小为 $\sim 40-45 \text{ \AA}$,四个亚单位按正方形排布,如图 8-43 a 所示。在电镜下,可以看到铁蛋白分子的四级结构。两个直径为 $35 \pm 5 \text{ \AA}$ 的球状亚单位成对地结合起来,如图 8-43 b 所示。



a



b

图 8-43 固氮酶二组分的四级结构

a: 钼铁蛋白分子
b: 铁蛋白分子

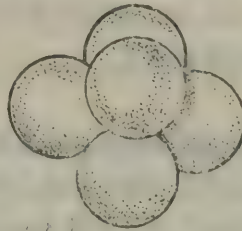


图 8-44 谷氨酸脱氢酶分子四级结构

(四) 谷氨酸脱氢酶

谷氨酸脱氢酶分子是分子量为 313000 的六聚体。这个六聚体含有六个相同的亚单位。这六个亚单位是如何排布的?根据电镜研究结果,有人提出图 8-44 所示的模型。

第六节 纤维状蛋白的构象^(1,3,6,8,13,16)

在生物体内,除球蛋白而外,还存在一类纤维状蛋白。这一类蛋白一般具有下列四个特性:不溶于水;在一定限度内伸长之后还可以恢复;不被一般的蛋白水解酶所水解;具有不同于球蛋白的特殊的氨基酸组成。根据 X-光衍射图的不同,或者肽链构象的不同,人们把纤维状蛋白类分成三个组,即: α -角蛋白组(α -螺旋型)、丝心蛋白组(折迭片层型)和胶原组(三股螺旋型)。这些纤维状蛋白在动物的体内和体表起支架和保护作用,故又称之为结构蛋白。角蛋白、丝心蛋白和胶原是这三个组的最重要的代表。

一、 α -角蛋白组

α -角蛋白组包括: α -角蛋白、肌球蛋白、表皮和纤维蛋白原,称为 K-M-E-F 组。这一组蛋白的共同特点是:它们都具有 α -螺旋结构,故又称之为 α -螺旋型。

α -角蛋白存在于动物的毛、发、爪、蹄、羽毛、甲壳和指甲之中。羊毛纤维是典型的角蛋白。其氨基酸组成中,疏水氨基酸和半胱氨酸(11%)的含量较高。这种蛋白已经用 X-光衍射法彻底研究过,发现其基本的结构单位是右手 α -螺旋。三个右手 α -螺旋互相缠绕,形成一个直径 20 \AA 的绳状的左手超螺旋(三股螺旋)。这种左手超螺旋又叫原纤维(protofibril)。在原纤维中,螺旋

之间通过许多二硫桥交联。九个原纤维集合在另外两个原纤维的周围，产生了一个直径 80 Å、电镜下可见的微纤维(microfibril)。几百个微纤维结合成直径 2000 Å 的巨纤维(macrofibril)。许多巨纤维平行束缚，生成无生命的细胞。这些细胞平行堆积，生成羊毛纤维。羊毛纤维的重要特性是：它们能够被拉长，并具有弹性。羊毛纤维的拉长，是由于氢键的破坏而导致 α -螺旋变成平行 β -折迭片层的结果，其弹性起因于二硫桥在螺旋之间的交联。

二、丝心蛋白组

丝心蛋白存在于蚕丝之中。Gly、Ala、Ser 的含量特别多、占 87%。其一级结构亦非常特殊：含有 (Gly—Ser—Gly—Ala—Gly—Ala)_n 的重复顺序。X-射线结构分析揭示：丝心蛋白具有反平行 β -折迭片层。由于缺少半胱氨酸残基， β -折迭片层之间，不是用二硫桥交联的，而是用范德华引力联系的。因此，丝心蛋白有很大的柔软性。由于丝心蛋白结构是 β -折迭片层，所以，它不可能象羊毛纤维那样被拉长。

三、胶原组

胶原广泛地存在于各种动物体中，占机体总蛋白的 25—30%，是皮肤、软骨、动脉管壁以及结缔组织的成分。胶原的氨基酸组成极为异常：Gly(33%)、Pro(12%) 和 Hypro(9%) 的含量特别高。胶原的基本结构是由分子量 360,000 的原胶原蛋白(tropocollagen)分子所组成的。原胶原蛋白分子是直径 14 Å、长 2800 Å 的棒状物。它是由三条多肽链组成的。每一条多肽链含有

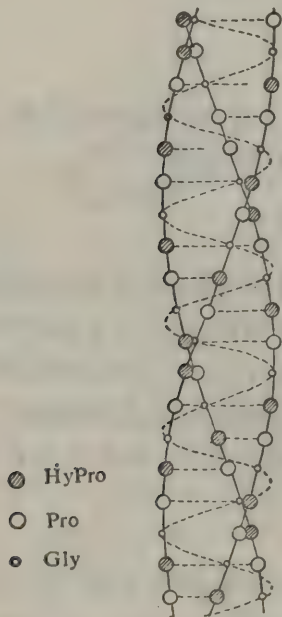


图 8-45 胶原结构中的三股螺旋

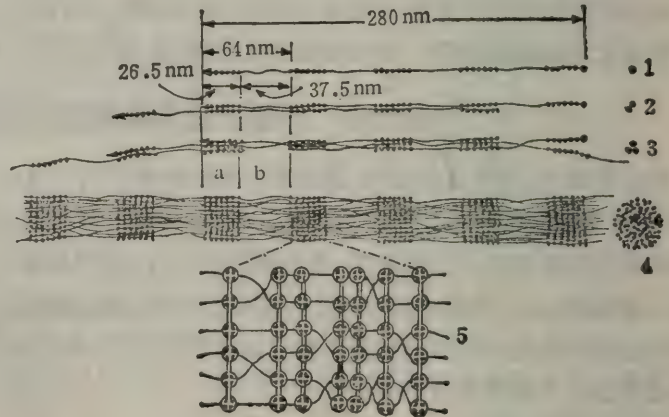


图 8-46 原胶原蛋白分子聚合成胶原纤维

•：表示用重金属盐染色后，重金属原子与原胶原蛋白分子中的特殊化学基团结合的地方

大约 1000 个氨基酸残基，分子量大约 120000。这种多肽链不可能形成 α -螺旋。因为肽链中 Pro、Hypro 的含量太高；pro 和 Hypro 是 α -螺旋的破坏者。每条多肽链略微向左扭成左手螺旋，

- (1) 直线点阵;(2) 平面点阵;(3) 空间点阵;(4) 结点;(5) 晶胞;(6) 分辨力;(7) 同晶置换。
15. 为什么衍射线的方向决定于晶胞大小? 为什么衍射线的强度决定于晶胞中原子的排布?
16. 什么是单晶回转法? 它对样品的要求是什么? 能解决什么问题?

参 考 文 献

1. G. H. Haggis, Introduction to Molecular Biology, William Clowes & Sons, Limited London, Beccles and Colchester, 1974
2. S. Blackburn, Enzyme Structure and Function, Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1976
3. H-D Jakubke, et al., Amino Acids, Peptides and Proteins, An Introduction, The Macmillan Press Ltd., London and Basingstoke, 1977
4. W. Ferdinand, The Enzyme Molecule, John Wiley & Sons, London. New York. Sydney. Toronto, 1976
5. R. Jaenicke, et al., Protein-Protein Interactions, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, 1972
6. R. H. Haschemeyer, et al., Protein, A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, John Wiley & Sons, Inc. 1973
7. C. B. Anfinsen, et al., Current Topics in Biochemistry Academic Press, Inc., New York and London, 1973
8. 北京医学院生物物理教研组, 生物物理学, 人民卫生出版社, 1961
9. P. Y. Chou, et al., Ann. Rev. Biochemistry, 47, 251 (1978)
10. P. Y. Chou, et al., Biochemistry, 13, 211 (1974)
11. 今堀和友, 等, 生体机能高分子, 1977
12. 北京胰岛素结构研究组, 中国科学, 6, 591 (1974)
13. F. Haurowitz, The Chemistry and Function of Proteins Academic Press Inc., 1963
14. A. Light, Proteins Structure and Function, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, 1974
15. E. E. Conn, et al., Outlines of Biochemistry, 1976
16. R. F. Steiner, The Chemical Foundations of Molecular Biology, D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey Toronto New York London. 1965
17. T. L. Blundell, et al., Protein Crystallography, Academic Press, New York. London, San Francisco. 1976
18. 浜口浩三, 蛋白质机能の分子论, 学会出版センター, 1976
19. K. E. 范霍尔德, 物理生物化学, 科学出版社, 郁贤章译, 1978
20. Л. А. Сырцова, ид., Молекулярная Биология, 5 (5) 726, 1971
21. D. E. Metzler, Biochemistry, Academic Press, New York San Francisco London, 1977

第九章 溶液中蛋白质分子构象的研究方法 及蛋白质变性

蛋白质分子采取什么样的构象,主要决定于蛋白质一级结构,即主要决定于多肽链中侧链之间的相互作用,其次,决定于侧链与水分子之间的相互作用。蛋白质分子构象还明显地依赖于蛋白质的溶剂环境,例如:pH、温度或离子强度的微小变化,可以使蛋白质分子构象发生很大的变化。若溶质能与侧链相互作用,或者影响水的结构,那么,向水加入溶质,就可以影响蛋白质分子的构象。

在有机体中,蛋白质分子不是孤立的。它们生活在水溶液中或生物膜上,与各种各样的大大小小的分子、离子发生相互作用。蛋白质分子构象不是静止的。各种化学因子(如pH、离子强度、水、底物、激活剂、抑制剂等)和物理因子(如温度、紫外线、电离辐射、超声波等)都在促使蛋白质分子构象发生变化。在正常的条件下,蛋白质分子构象有正常的变化规律,从而呈现生物活性;在异常的条件,蛋白质分子构象有异常的变化规律,从而导致生物活性的丧失。蛋白质分子构象在正常和异常条件下的变化规律,现在还没有被人们所完全认识,需要深入研究。

第一节 溶液中蛋白质分子构象的研究方法

蛋白质分子呈现生物功能,大多数是在水溶液中或界面上进行的,而且,其构象在不断地变化之中。这种变化过程,往往是几个大分子相互作用的结果。

研究蛋白质分子在溶液中的构象变化,对阐明蛋白质结构与功能的关系,特别是酶催化机理,具有重要的意义。因此,需要有一些实验方法来测定溶液中的蛋白质分子构象及其变化过程。

X-射线结构分析法,虽然可以准确地测定晶态蛋白质分子的构象,但是,不能测定溶液中的蛋白质分子构象及其变化的全过程,更不能描绘相互作用的几个大分子的构象变化过程。

五十年代建立起来的旋光色散、重氢交换和紫外差示光谱等方法,经过改进,现在已成为实验室的常规技术。它们为溶液中的蛋白质分子二级结构,提供了一些信息。

近十多年来,核磁共振、激光拉曼光谱、中子衍射以及荧光光谱等一系列的新技术,在探测溶液中蛋白质分子的构象变化及其与功能的关系中,已经显示了巨大的潜力。但是,用这些新技术,目前还不可能弄清水溶液中蛋白质分子的整个构象。

一、紫外吸收法

溶液中的蛋白质分子能够吸收一定波长范围的紫外线,产生紫外吸收光谱。这种吸收光谱可以用紫外分光光度计测定。蛋白质分子为什么能够吸收紫外线呢?主要是由于Try、Tyr、Phe的吸收;其次,是由于His和CysH的吸收;此外,还由于肽基团的吸收。其中,值得特别注意的是Try、Tyr和Phe。这三种氨基酸由于其发色团不同而有不同的紫外吸收光谱,如图9-1

所示。

Try 和 Tyr 在 280 nm 附近有一个吸收峰；Phe 在 257 nm 有一个吸收峰。大多数蛋白质在 280 nm 附近有一个吸收峰。这个吸收峰主要是由于 Try 和 Tyr 残基的吸收。

发色团的吸收光谱，受下列三种因素的影响：

1. pH 的影响

溶剂的 pH 决定可电离的发色团的电离状态。例如：Tyr 在 pH 6 和 pH 13 的两个溶液中，有不同的紫外吸收光谱，如图 9-2 所示。在 pH 13，由于 Tyr 的酚基 OH 发生电离而带负电荷，使最大吸收峰的波长 (λ_{max}) 和克分子吸收系数 (克分子消光系数, ϵ) 增大。

2. 溶剂或邻近分子的极性影响

极性溶剂和非极性溶剂对极性发色团的吸收光谱有不同的影响。例如：Tyr 在极性溶剂中的 λ_{max} 小于在非极性溶剂中的 λ_{max} 。

3. 邻近发色团的相对取向，常常

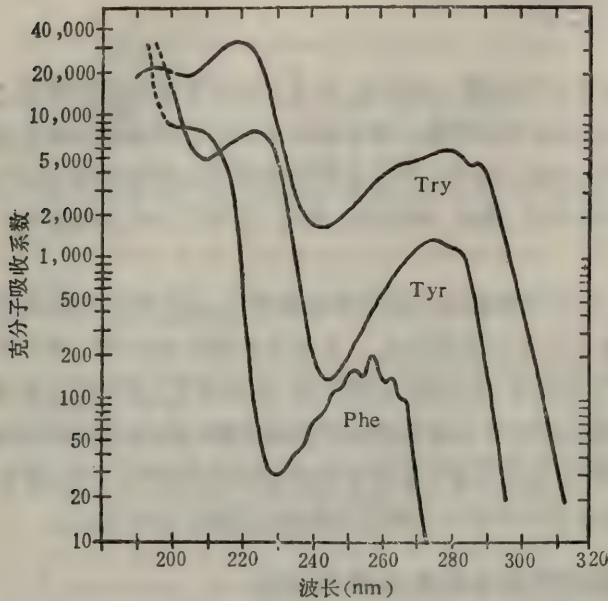


图 9-1 在 pH6 溶液中, Try, Tyr 和 Phe 的紫外吸收光谱

对 λ_{max} 和 ϵ 有很大影响。

根据已知结构的蛋白质的紫外吸收光谱研究，人们已经总结出下列经验规律：

1. 如果 Try、Tyr、Phe 和 His 从极性环境移入非极性环境中，则 λ_{max} 和 ϵ 增加。根据这一规律，可以对下列现象作出推测：

(一) 在极性溶剂中，如果蛋白质中氨基酸残基的 λ_{max} 和 ϵ 大于自由存在的同一种氨基酸的 λ_{max} 和 ϵ ，那么，这种氨基酸残基一定位于蛋白质分子的内部，并被非极性氨基酸残基所包围。

(二) 如果蛋白质吸收光谱对溶剂的极性变化很敏感，那么，产生 λ_{max} 和 ϵ 变化的氨基酸残基一定位于蛋白质分子的表面。

2. 氨基酸侧链基团(如：Tyr 的 -OH 基、CysH 的 -SH 基和 His 的咪唑基)由于溶剂 pH 的变化而带电荷时，则 λ_{max} 和 ϵ 往往是增加的。根据这一规律，可以对下列现象作出推测：

(一) 如果蛋白质溶液以酸碱滴定时，看不到发色团的光谱变化，那么，此发色团一定埋藏在

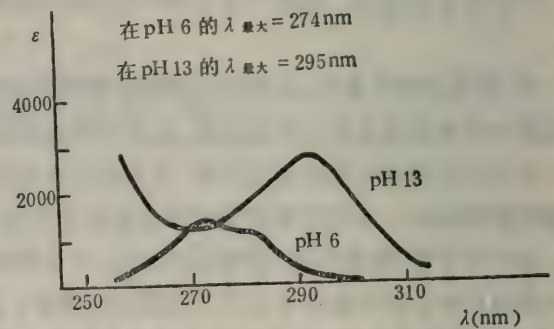


图 9-2 Tyr 在 pH 6 和 pH 13 的吸收光谱

蛋白质分子的非极性区内。

(二) 如果由 pH 引起的光谱变化表明, 蛋白质中可电离的氨基酸残基侧链基团, 与溶液中自由存在的同一种氨基酸侧链基团, 具有接近的 pK 值, 那么, 此氨基酸残基位于蛋白质分子的表面。

(三) 如果由 pH 引起的光谱变化指明了一个十分不同的 pK 值, 那么, 此氨基酸残基可能位于强极性环境(如: Tyr 被 $-COOH$ 基包围)中。

现在, 应用紫外吸收法可以探讨下列问题:

1. 芳香族氨基酸残基是位于蛋白质分子的表面, 还是内部? 是处于极性环境, 还是非极性环境? 数量多少?

2. 在物理和化学因素的影响下, 蛋白质二、三级结构有无变化? 变化的过程如何? 这可以通过下列两条途径来进行:

(一) 用差分分光光度法, 在 280 nm 波长附近, 测定蛋白质中芳香族残基(Tyr, Try)的光吸收变化($\Delta\epsilon$), 以检测和追踪蛋白质分子中的 α -螺旋与无规则卷曲的转化。

(二) 用差分分光光度法, 在 190—220 nm 波长, 测定蛋白质中肽基团的光吸收变化, 以检测和追踪 α -螺旋与无规则卷曲的转化。蛋白质除 280 nm 吸收峰而外, 还有一个重要的吸收区。这个吸收区是在波长 190 nm 附近。它是由于肽基团的吸收而产生的。这个吸收区受肽链构象的影响。例如: 聚 L-Lys 在这个吸收区的吸收光谱, 随它的构象变化 (α -螺旋、 β -折迭和无规则卷曲)而变化, 如图 9-3 所示。

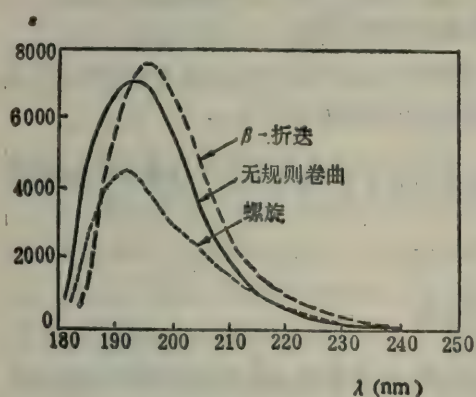


图 9-3 聚-L-Lys 在水溶液中的紫外吸收光谱

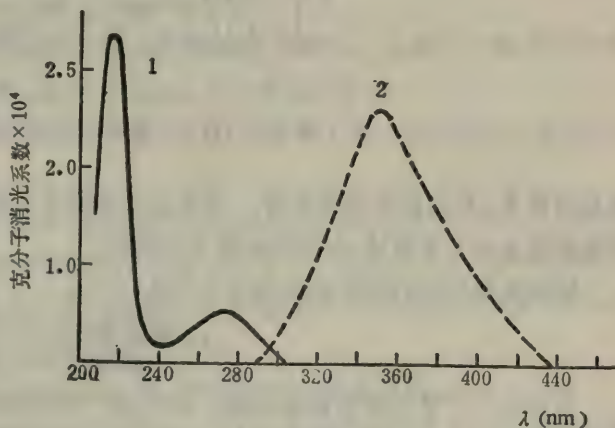


图 9-4 色氨酸的吸收光谱与荧光光谱
1. 吸收光谱; 2. 荧光光谱

由此可见, 当肽链骨架由无规则卷曲变成 α -螺旋时, 吸收明显下降。因此, 可以通过测定波长在 190 nm 附近的光吸收变化, 来追踪蛋白质分子中 α -螺旋与无规则卷曲的转化过程。

二、荧光光谱法

有些分子吸收一定波长的入射光, 经过 10^{-9} — 10^{-8} 秒, 能发射较长波长的光, 这种光就是荧光。能产生荧光的物质, 叫荧光物质。荧光物质分子在吸收不同波长的入射光之后, 能发射不同

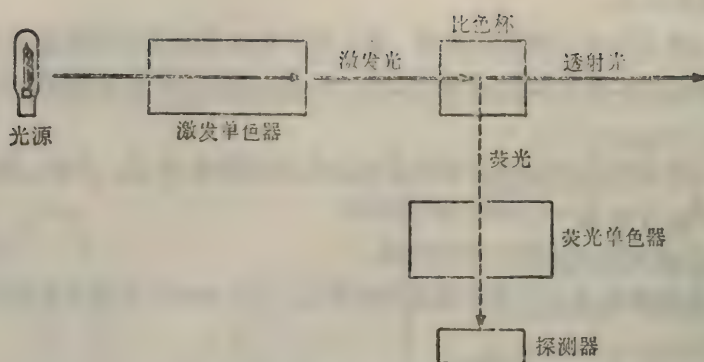


图 9-5 荧光分光光度计结构示意图

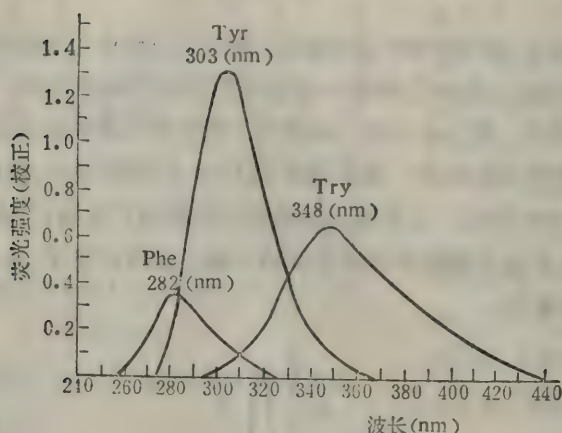


图 9-6 Try、Tyr 和 Phe 在中性水溶液中的荧光光谱

波长的荧光，从而产生荧光光谱。荧光波长总是比入射光的波长长(图 9-4)。测定荧光光谱的仪器是荧光分光光度计，其结构如图 9-5 所示。

描写荧光产生机率的参数是量子产量(Q)。

$$Q = \frac{\text{被发射的荧光光子数}}{\text{被吸收的光子数}}$$

决定量子产量大小的因素很多。其中，有一些是内因子，即分子本身的结构；有一些是环境因子。影响量子产量的环境因子有：温度、pH、溶剂的极性、熄灭剂，等等。

由于荧光物质分子与溶剂分子或其它溶质分子的相互作用，而引起荧光强度降低的现象，叫荧光熄灭。引起荧光熄灭的物质，叫熄灭剂，如：卤素离子、重金属离子、硝基化合物、O₂，等等。熄灭剂与荧光物质分子的作用是有选择性的。

荧光光谱法是研究水溶液中蛋白质分子构象的一种新工具。利用该法研究蛋白质在水溶液中的构象，有两条途径：一条是测定蛋白质分子的自身荧光；另一条是，向蛋白质分子的特殊部位，引入荧光探测剂[如：1-苯胺基-8-磺基萘(ANS)；1-二甲基氨基-萘-5-磺酸盐(DNS)及其衍生物——1-二甲基氨基-萘-5-磺酰氯(DNS-Cl)，等等]，然后测定荧光探测剂的荧光。

在蛋白质分子中,能发射荧光的氨基酸残基,只有 Try、Tyr 和 Phe。个别蛋白质分子含有黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。此 FAD 亦能发射荧光。

Try、Tyr 和 Phe 由于共发色团(侧链基团)不同,而有不同的荧光光谱(图 9-6)。其最大荧光强度的波长(λ_{\max})分别是 348、303 和 282 nm。Phe 的荧光量子产量很低,而 Tyr 的荧光,往往由于被熄灭,而变得很弱。因此,通常,利用 Try 的荧光来研究蛋白质分子的构象。当 Tyr 是电离的,或者在氨基、羧基或 Try 的附近时,其荧光几乎全部被熄灭;然而,在特殊的情况下(即用 280 nm 波长的光激发),能够测出其荧光。

通过对已知结构的模型化合物的荧光光谱研究,得出下列经验性规律:

1. 除非蛋白质含有其它的荧光成分,否则,蛋白质的所有荧光都是来自 Try、Tyr 和 Phe 的。
2. 当溶剂的极性降低时,则 Try 荧光光谱的 λ_{\max} 向较短波长移动,而 λ_{\max} 的荧光强度增加。

(一) 当蛋白质位于极性溶剂中时,如果 λ_{\max} 向较短波长移动,那么, Try 一定位于蛋白质分子内部的非极性区域。

(二) 当蛋白质位于非极性溶剂时,如果 λ_{\max} 向较短波长移动,那么, Try 残基或者位于蛋白质分子的表面,或者由于溶剂诱导构象变化而把 Try 残基带到蛋白质分子的表面。

3. 如果有荧光熄灭剂(如: I^- 、 Cs^+ 、硝酸盐)能熄灭 Try 或 Tyr 残基的荧光,那么,此残基一定位于蛋白质分子的表面。如果荧光熄灭剂不能熄灭 Try 或 Tyr 残基的荧光,则有下列三种可能的理由:

(一) 残基可能位于熄灭剂进不去的蛋白质分子内部,因而不被熄灭;

(二) 残基可能位于熄灭剂进不去的裂隙中,因而不被熄灭;

(三) 残基可能位于能排斥熄灭剂的荷电区,因而不被熄灭。例如: 如果 Try 残基位于负电区,则带负电的碘离子就不能进入负电区,因而不能熄灭 Try 残基的荧光。

4. 如果一种物质不能影响自由氨基酸的量子产量,但是,却影响了蛋白质的荧光。那么,此物质一定使蛋白质分子发生了构象变化。

5. Try 或 Tyr 残基,如果位于极性环境中,其量子产量随温度增加而下降,但在非极性环境中,则变化不大。因此,当量子产量不随温度增加而下降时,说明 Try 残基所在的区域是非极性区。当蛋白质位于极性溶剂(如水)时,量子产量对温度的依赖性表明,蛋白质肽链是伸展的,许多 Try 残基暴露到极性溶剂中。

6. 如果 Try 和 Tyr 残基的 α -羧基是质子化的,则二残基的量子产量下降。

7. Try 残基的荧光被邻近的质子化的酸性基团熄灭。因此,如果通过记录 Try 残基的荧光而测出的 pK 值,与已知电离基团(如 His 残基的咪唑基或 Cys 残基的 -SH 基)的 pK 值相同,那么,此基团一定非常接近 Try 残基。这一规律只能应用于 pH 变化不导致构象变化的情况。

8. 如果小分子与 Try 残基相距很近,并且,前者的吸收光谱与后者的荧光光谱重叠,那么,此小分子便能使 Try 残基的荧光熄灭。由此推论: 如果与蛋白质分子相结合的小分子能熄灭 Try 残基的荧光,那么, Try 残基一定位于或接近于结合部位。

根据上述经验性规律,应用荧光光谱法,可以作下列研究:

蛋白质分子的构象变化;

酶活性部位的结构;

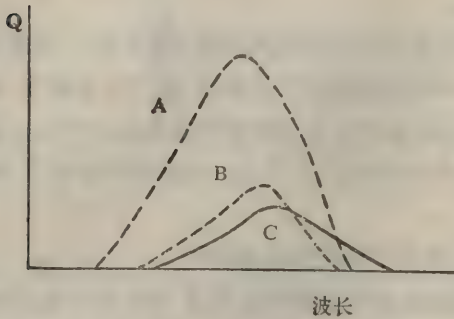


图 9-7 假想的酶在溶液中的荧光光谱
A: 未加辅因子; B: 加入辅因子; C: 自由 Try 在水中的荧光光谱

Try 和 Tyr 残基的微环境;

蛋白质变性,等等。

现举例说明,如何运用上述经验性规律,推测蛋白质分子的构象变化。

与自由的 Try 相比,如果酶分子的 Try 残基有较大的荧光强度、较短的 λ_{max} (图 9-7),那么,这些 Try 残基一定位于非极性环境(规律 2)。当加入辅因子时,则 Try 残基的荧光强度下降,而 λ_{max} 变得较长,那么,酶分子的构象一定发生了变化(规律 4),从而使 Try 残基接触极性溶剂(如水),或者接近荷电基团。在结合

辅因子之前或之后,加入 I^- 或 Cs^+ , 则酶分子的荧光光谱不受影响,推测 Try 残基不可能位于酶分子的表面,而可能移入蛋白质内部的强极性区(规律 3)。

已知酶分子有五个 Try 残基,其量子产量比自由 Try 的量子产量高。这说明有一些 Try 残基位于酶分子的非极性区(规律 2)。对酶蛋白从 $20^\circ C$ 加热到 $55^\circ C$,其量子产量下降 35%。这说明二个 Try 残基($0.35 \times 5 = 2$)位于酶分子的表面(规律 5)。若加入高浓度的 I^- ,则 30% 的荧光受到熄灭。再一次证明,二个 Try 残基位于酶分子表面。若加入底物,则量子产量不变。这说明: Try 残基可能不在底物结合部位上;或者在此部位上,但底物分子为该残基创造了极性环境。当底物分子与酶分子相结合时, I^- 仅仅熄灭 15% 的荧光。由此推测,当结合底物时,酶分子表面的 Try 残基,有一半($0.15/0.30 = 1/2$)没有暴露到溶剂中,即有一个 Try 残基($1/2 \times 2 = 1$)位于活性部位。

如果滴定酶,则 18% 的荧光受到熄灭。与此熄灭相关的 pK 值就是 His 残基的 pK 值。由此推测,一个 His 残基位于一个 Try 残基的附近(规律 7)。如果先结合底物,后滴定酶,则量子产量不变。这表明在底物存在下,此 His 残基不被滴定。因而推测,活性部位含有一个 His 残基和一个 Try 残基,底物分子直接与该 His 残基相结合。

后一例是,假设所有的 Try 残基都有相同的量子产量。这一假设是否正确,尚待验证。

除了利用蛋白质分子的自身荧光而外,有时,需要引入荧光探针剂,以测定蛋白质分子中的疏水微区、二基团之间的距离,以及酶与底物结合过程中的蛋白质构象变化,等等。

ANS、DNS 和 TNS 等荧光探针剂在水中时,其荧光强度很小,然而,在非极性溶剂中时,其荧光强度大增,而荧光峰向较短波长移动。许多蛋白质分子可以与这些探针剂结合。根据结合以后荧光特征有何变化,可以测定蛋白质分子中是否存在疏水微区。例如:酶与带荧光标记的底物或竞争性抑制剂结合以后,如果其荧光强度大增,荧光峰移向短波,由此可以推测,酶活性部位处于疏水微区。

向蛋白质分子中的两个不同的侧链基团,分别接上两个不同的荧光生色基团。一个基团受光激发,将激发能转移到第二个基团上,则第二个基团便发射荧光。利用激发能转移的效率与二

基因之间的距离有关的规律,可以测定蛋白质分子中二个基团之间的距离。

向蛋白质分子引入荧光探测剂,运用荧光偏振法可以测定:蛋白质分子的聚合与解离;抗原与抗体的反应机制,不同蛋白质分子的相互作用,等等。

三、旋光色散和圆二色性

光是电磁波,由振动的电场(E)与磁场(H)所组成,能用互相垂直的电场矢量 E 与磁场矢量 H 来表示。同时,这两种矢量均与光传播的方向垂直,如图9-8所示。这就是所谓平面偏振光,即仅在固定的方向上有振动的光。电场矢量的平面是平面偏振光的偏振面。

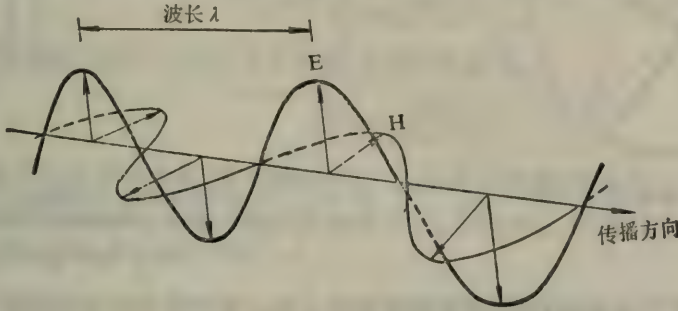


图 9-8 平面偏振光

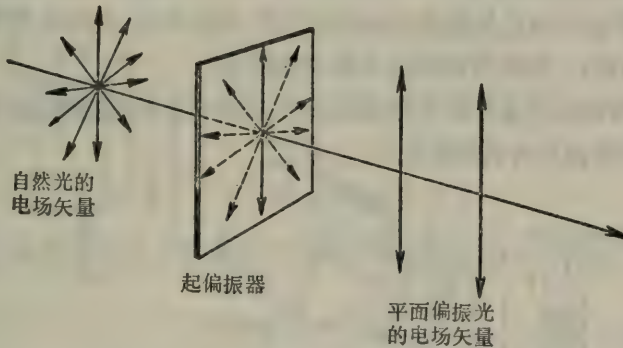


图 9-9 平面偏振光的产生

由光源产生的光是自然光。自然光是由各种平面偏振光混合而成的,没有固定的振动方向。它通过一个起偏振器(尼科尔棱镜)之后,产生一种平面偏振光,如图9-9所示。

由两个传播方向相同,但位相差 90° 、电场矢量互相垂直的平面偏振光相加而成的光,其电场矢量的尖端沿螺旋线前进,朝光传播方向上看,此电场矢量就好象在作圆周运动。这种偏振光,就叫圆偏振光,如图9-10所示。朝光源看,电场矢量按顺时针方向旋转的圆偏振光,叫右圆偏振光(R);按逆时针旋转的,叫左圆偏振光(L)。振幅相同的左、右圆偏振光相加时,产生平面偏振光,如图9-11A所示。振幅不等的左、右圆偏振光相加时,产生椭圆偏振光。其电场矢量的尖端沿椭圆路线旋转。如图9-11B所示。描写椭圆偏振光的参数是椭圆度(θ)

$$\theta = \tan^{-1} \frac{b}{a}$$

当一束光通过物质时，传播波的电场矢量(E)与该物质的原子中的电子相互作用。这种相互作用产生两种效应：一种是降低光的传播速度；另一种是减小电场矢量的振幅。前者叫折射，用折射率(n)表示，后者叫吸收，用克分子吸收系数(ϵ)表示。 n 和 ϵ 决定于光的波长、分子的电子结构和几何形状。

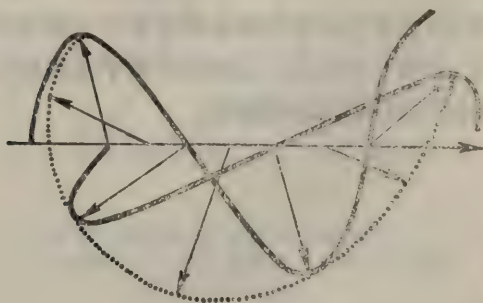


图 9-10 圆偏振光的产生

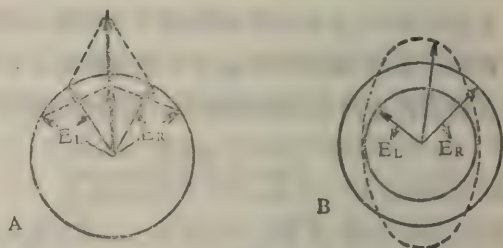


图 9-11 A: 振幅相同的左、右圆偏振光产生平面偏振光; B: 振幅不等的左、右圆偏振光产生椭圆偏振光。椭圆的长轴和短轴分别是 a 和 b

平面偏振光可以看作是左、右圆偏振光的混合光。当一束平面偏振光通过旋光物质时，由于该物质对左、右圆偏振光的折射率不同，因而，透射出来的平面偏振光，其偏振面发生了旋转。这种现象叫旋光。能使平面偏振光的偏振面旋转的特性，叫旋光性(光活性)。具有旋光性的物质，叫旋光物质(光活性物质)。偏振面旋转的角度，叫旋光度。

当任意波长的平面偏振光通过旋光物质溶液时，其偏振面旋转的角度(α_λ)决定于物质的性质、溶液的距离(d)、以及旋光物质的浓度(c)。

$$\alpha_\lambda = [\alpha_\lambda]dc$$

其中， c 为克/毫升， d 为分米， $[\alpha_\lambda]$ 为旋光率(比旋、比旋光度)，其单位是度/ $\frac{\text{克}}{\text{毫升}} \cdot \text{分米}$ 。

$$[\alpha_\lambda] = \frac{\alpha_\lambda}{dc} \quad (9-1)$$

一束平面偏振光通过 1 分米厚、1 克旋光溶质/ml 的溶液时，其偏振面旋转的度数，叫旋光率。朝光源看时，偏振面按顺时针方向旋转的，叫右旋，以“+”号表示；偏振面按逆时针方向旋转的，叫左旋，以“-”号表示。因此，旋光率的“+”或“-”，分别表示右旋或左旋。对同一种溶液而言，其旋光率的数值与偏振光的波长、溶剂的性质和溶液的温度有关。使用时，须指明波长、温度和溶剂。

如果旋光物质是高分子聚合物，为了比较高分子之间的旋光率，常用平均残基旋光 $[m]$ ：

$$[m]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda M_0}{100 dc} \quad (9-2)$$

M_0 是残基的平均分子量，即高分子聚合物的分子量被分子的残基数去除。

对溶液折射率 n 进行校正，得有效残基旋光 $[m']_\lambda$ ：

$$[m']_\lambda = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} [\alpha_\lambda] \quad (9-3)$$

旋光率随平面偏振光的波长不同而变化的光学现象,叫旋光色散。以旋光率($[\alpha]$ 或 $[m']$ 、 $[m]$)为纵坐标、波长(λ)为横坐标所作出的曲线图,叫旋光色散曲线(旋光色散光谱或 ORD)。

旋光物质对左、右圆偏振光有不同的吸收,从而使二者产生椭圆偏振光。其吸收之差为:

$$\varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta\varepsilon \quad (9-4)$$

ε_L 和 ε_R 分别是旋光物质对左、右圆偏振光的消光系数。这消光系数之差 ($\Delta\varepsilon$) 就叫圆二色性 (CD)。若 $\varepsilon_L - \varepsilon_R > 0$, 则为正圆二色性; 若 $\varepsilon_L - \varepsilon_R < 0$, 则为负圆二色性。可以用椭圆度 θ 、克分子椭圆度 $[\theta]_\lambda$ 、平均残基椭圆度 $[\theta]_\lambda$ 来表示圆二色性的大小。

$$\theta = 3300 \Delta\varepsilon \quad (9-5)$$

$\Delta\varepsilon$ 的单位是升/厘米·克分子, θ 的单位是度·厘米²/克分子。

$$[\theta]_\lambda = \frac{M\theta_\lambda}{10dc} \quad (9-6)$$

M 是分子量或平均残基分子量, θ_λ 是椭圆度, d 是溶液的距离(厘米), c 是浓度(克/毫升)。

以克分子椭圆度或消光系数之差为纵坐标, 波长为横坐标, 所作出的曲线图, 叫圆二色性曲线(或圆二色性光谱、CD 光谱)。

测定旋光物质的旋光色散光谱的仪器是旋光色散仪(分光偏振计)。其结构示意图如图9-12所示。

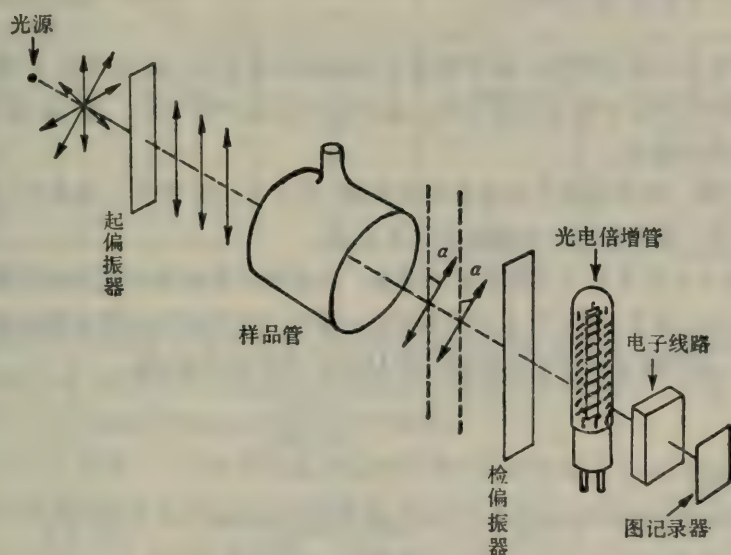


图 9-12 旋光色散仪结构示意图

由光源产生的自然光,经单色器的作用,变成平行的单色光。此单色光经起偏振器的作用,变成平面偏振光。此光经过样品管时,由于溶液中旋光物质的作用,使偏振光的偏振面旋转一定角度。用检偏振器测定偏振面的旋转角度(α)。最后,经过光电倍增管转化为光电流,在图记录器上显示出来。

改变所用单色光,依次测定旋光率,就可以测得旋光色散曲线(图9-14)。目前,有自动描绘式分光偏振计,能直接显示旋光色散曲线。

为了测定 CD,原则上需要两个光源。一个产生左圆偏振光;另一个产生右圆偏振光。每一个都装配单色器,以选择波长。然而,商品圆二色性仪(CD 仪),利用一个简单的技巧,从一个光源产生左、右圆偏振光。即:由光源产生的自然光,经单色器的作用,变成平行的单色光。此单色光经过线性起偏振器的作用,变成平面偏振光。此平面偏振光经过一个所谓电光调制器(晶体)的作用,从而,产生左、右圆偏振光。左、右圆偏振光通过样品池,由于旋光物质的不同吸收,产生椭圆偏振光。最后,由接收、测量、记录装置显示 CD 光谱。图 9-13 是 CD 仪的结构示意图。

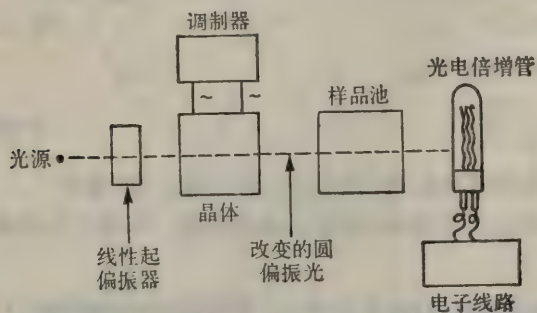


图 9-13 圆二色性仪

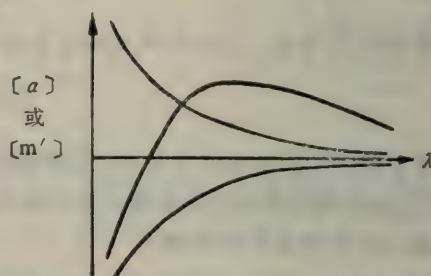


图 9-14 旋光色散曲线

旋光物质为什么有旋光性呢?旋光物质之所以具有旋光性,就在于其中的生色团有不对称性。几乎所有的生物分子都具有旋光性,蛋白质则是其中的一员。蛋白质为什么有旋光性呢?主要有下列两点理由:

1. 构成蛋白质一级结构的大多数氨基酸残基,都含有不对称的 α 碳原子,故伸展的肽链有旋光性。实验揭示,它使偏振光的偏振面发生左旋。
2. 蛋白质分子往往含有不对称的右手螺旋。此螺旋构象使偏振光的偏振面右旋。

在 700—500 $m\mu$ 波长,即可见光与近紫外区,多肽与蛋白质的旋光率随波长的变化而变化,如图 9-14 所示。这些曲线有的可以用简单的 Drude 方程来表示,即:

$$[m'] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} \quad (9-7)$$

式中 a_0 与 λ_0 为常数。

也有的不能用简单的 Drude 方程来表示,但能满足复杂的 Moffitt 方程,即:

$$[m'] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} + \dots \quad (9-8)$$

a_0 、 b_0 和 λ_0 均为常数。实验证明,当多肽或蛋白质是无规则卷曲构象时,其旋光色散曲线属于(9-7)式的类型;当多肽或蛋白质是螺旋构象时,其旋光色散曲线须用(9-8)式来表示。

在(9-8)式中, $a_0 = a_0^R + a_0^H$, a_0^R 和 a_0^H 分别代表无规则卷曲和螺旋构象对第一项的贡献。与(9-7)式比较可知, b_0 一项全系螺旋构象对旋光率的贡献。 $b_0 = 0$,则为无规则卷曲构象。根据理论分析, b_0 之值为负,表示右手螺旋; b_0 值为正,表示左手螺旋。 b_0 数值的大小为螺旋含量多少的量度。此外, λ_0 与 a_0^H 亦与构象有关。

利用旋光色散法研究溶液中多肽和蛋白质分子的构象, 第一步, 需要测定旋光色散曲线, 第二步, 根据 Moffitt 方程加以分析。

通过对聚-L-赖氨酸、聚-L-谷氨酸、L-赖-L-谷共聚物等多肽的旋光色散的研究, 发现它们在不能与主链骨架的 CO 基或 NH 基生成氢键的溶剂(如: 氯仿、二噁烷)中, 以螺旋构象存在; 在形成氢键能力较强的溶剂(二氯醋酸、胍)中, 则以无规则卷曲存在。

为了确定 Moffitt 方程中的常数, 用 $[m'] \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2}$ 对 $\frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ 作图, 用试验的方法选择适当的 λ_0 , 使所得图线为直线, 则在纵坐标轴上的截距为 a_0 , 直线的斜率为 b_0 。对于上述几种多肽, λ_0 为 212 m μ ; 当多肽含 100% 的右手螺旋时, $b_0 = -630$ 。因此, 以 $-b_0/630$ 表示多肽或蛋白质中的右手螺旋含量。用 Moffitt 方程法可以估计蛋白质分子中右手螺旋的百分含量。如表 9-1 所示。需要指出是, Moffitt 方程法并不是估计蛋白质中螺旋含量的唯一方法, 还有其它的各种方法。例如, 根据在 190, 207 或 222 m μ 波长上圆二色性带的强度, 也可以估计螺旋的百分数。表 9-1 列举了用各种方法计算的结果。

表 9-1 用各种方法计算的各种蛋白质的螺旋含量

	% 螺旋				
	b_0	a_0	$[m']_{233}$	$[\theta']_{222}$	X-射线*
原肌球蛋白	90	90	60	60—70	70
肌红蛋白	70—80				
牛血清白蛋白	45	60		50	
胰岛素	40	60		30	
溶菌酶	30	40		35	35
核糖核酸酶	15	15		少	15

* 得自 X-射线衍射研究。

应该强调指出, 由于影响旋光性的因素, 不仅有肽链的构象, 而且还有侧链的性质、肽链的长度, 以及其它未知的因素, 故蛋白质的构象与旋光性的关系是十分复杂的。因而, 对蛋白质中螺旋含量的上述估计, 必须持分析的态度。

当聚-L-Lys 以 α -螺旋、 β -折迭和无规则卷曲三种不同的构象存在时, 则呈现不同的 ORD 光谱(图 9-15)和 CD 光谱(图 9-16)。这说明聚-L-Lys 的 ORD 光谱和 CD 光谱对其构象的变化, 是非常敏感的。蛋白质也有类似的现象。因此, 可以用 ORD 和 CD 法来测定溶液中蛋白质分子的构象变化。

ORD 和 CD 法常用来研究蛋白质变性。蛋白质在变性时, 往往发生 α -螺旋和 β -折迭的减少或丧失、无规则卷曲的增加。这种构象上的变化, 必然导致 ORD 和 CD 光谱的变化。因此, 通过一定波长下的旋光率或椭圆度对变性条件(如 pH、温度、变性剂浓度, 等)的关系图, 可以追踪蛋白质的变性程度, 即构象变化大小(图 9-20)。

底物、辅酶或抑制剂与酶分子作用时, 会导致酶分子的构象变化, 从而引起 ORD 和 CD 光谱的变化。利用 CD 法, 可以测定被酶束缚的分子数、束缚常数, 可以从相同的几个氨基酸残基中

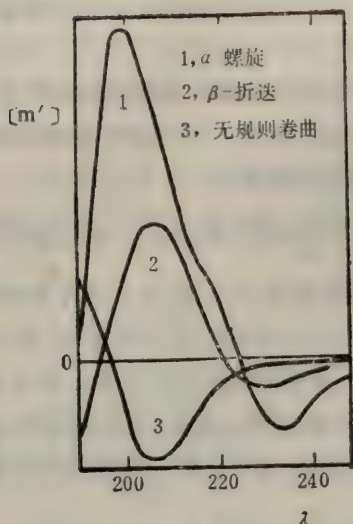


图 9-15 聚-L-Lys 的 ORD 光谱
1. α -螺旋; 2. β -折迭; 3. 无规则卷曲

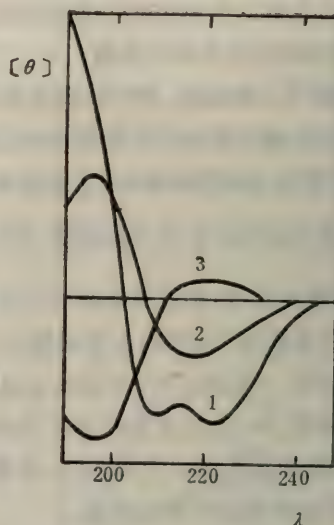


图 9-16 聚-L-Lys 的 CD 光谱
1. α -螺旋; 2. β -折迭; 3. 无规则卷曲

认定那一个残基属于活性部位。

CD 光谱比 ORD 光谱能提供较多的结构信息,故近年来常用 CD 法,而较少用 ORD 法。从 CD 光谱得到的信息,如能与其它物理方法(如: 荧光光谱法、核磁共振法,等)互相补充,则对溶液中大分子的构象能作出更合理的描绘。

四、几种新技术的简单介绍

核磁共振、激光拉曼光谱和中子衍射,就其原理和设备来说,都是非常复杂的,这里仅作简单介绍。读者如需深入了解,请看有关专著。

1. 核磁共振

原子核在外加磁场中,具有等距离的核磁能级共 $(2I + 1)$ 个 (I 代表原子核的自旋量子数,其数值与原子核中的质子数和中子数有关)。相邻二能级之间的能量之差都是 ΔW 。如果有量子能量 $(h\nu)$ 等于 ΔW 的电磁波通过时,则原子核便吸收电磁波的能量 $(h\nu)$,由低能级跃迁到相邻的高能级上。这种吸收,叫共振吸收,即核磁共振。

原子核所受到的外磁场,不仅是外加的磁场,而且还有原子的电子壳层及邻近的其它原子核所产生的磁场。

由于原子核在分子中的不同位置上,受到电子壳层的磁屏蔽不同,因而,在不同的 ν 共振,即吸收谱线位置发生移动,这种移动,叫化学位移。根据化学位移,可以确定原子在分子中的排布,确定分子中存在的功能基。

基团间核自旋磁矩的相互作用,导致谱线分裂,这种作用,叫自旋偶合。根据自旋偶合所产生的谱线精细结构,可以了解分子中基团之间的彼此关系,从而确定其相对排列位置,肯定分子空间结构。

对分子结构进行核磁共振测定的仪器,是核磁共振波谱仪。一般而言,此仪器可分为四个部

分：射频振荡器、磁场系统、探测系统、记录装置，如图 9-17 所示。

(一) 射频振荡器：它产生射频电磁波。一般将样品放在射频振荡器的电感应线圈中。

(二) 磁场系统：包括磁铁、磁铁电源和稳定装置等部分。它产生均匀的强磁场。

(三) 探测系统：当磁场强度与射频电磁波频率配合好而满足样品的核磁跃迁频率时，则射频电磁波的能量被样品吸收一部分，因而，使射频电磁波的强度减弱。利用探测系统可以测出这微小的变化，经过检波、放大，就可以记录下来。

(四) 记录装置：经过放大后的信号，可以用示波器观察，也可以用其它自动记录设备描成曲线，从而得到样品的核磁共振谱

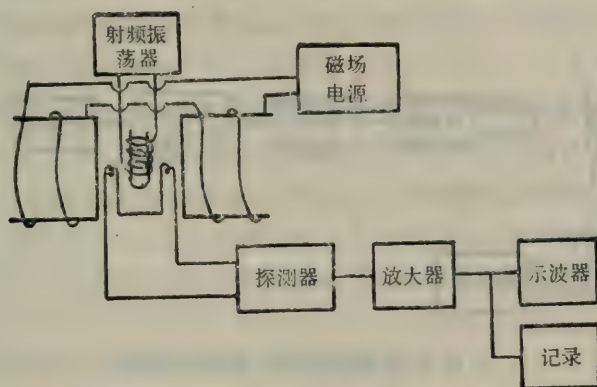


图 9-17 核磁共振波谱仪结构示意图

核磁共振波谱仪的种类较多。用来研究生物高分子结构与功能的是，超导体、强磁场、高分辨率的核磁共振波谱仪。

核磁共振在生物高分子中的应用，有下列优点：

- (1) 不破坏生物高分子的结构；
- (2) 能在液体状态下测定生物高分子的空间结构；
- (3) 能研究生物高分子构象的动力学；
- (4) 能获得多种参数，为分析生物高分子结构提供多种信息；
- (5) 仪器的基型配加附件，可以多核多用。

核磁共振与电子计算机技术相结合，应用于分子生物学，将对该学科的发展，产生深远的影响。

目前，核磁共振法在分子生物学上的应用，还处于幼年时期，正在不断地发展与完善。就蛋白质而言，现在，它可以为蛋白质构象提供下列信息：

- (1) 可以测定蛋白质分子中的螺旋含量；
- (2) 可以记录蛋白质分子中螺旋与无规则卷曲之间的转化过程；
- (3) 可以观察小分子或金属离子与蛋白质特定区域的结合；
- (4) 可以测定蛋白质特定区域的构象；
- (5) 可以测定电子传递蛋白分子中的顺磁性活性部位。

2. 激光拉曼光谱

拉曼光谱是一种散射光谱,是分子的振动、转动光谱。1928年,它为印度物理学家拉曼(Raman)发现。60年代,由于引入了激光光源,使拉曼光谱焕发了青春。以激光作入射单色光,照射样品,由于样品分子对入射光的散射作用而产生的散射光谱,就是激光拉曼光谱。产生与记录激光拉曼光谱的仪器,是激光拉曼分光光度计。其基本结构分为三个部分(图9-18):

- (1) 光源部分: 产生激光的激光器;
- (2) 光学部分: 减光板、透镜、单色器和放样品的样品池;
- (3) 检测部分: 探测器、探测器电子部分、记录器。

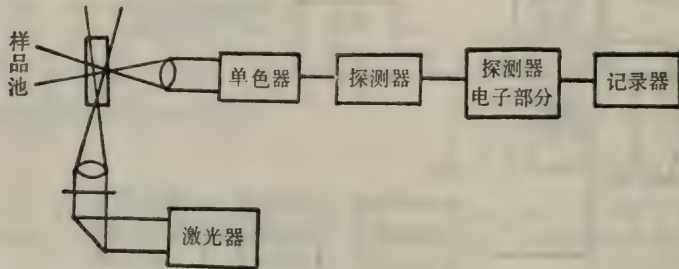


图 9-18 激光拉曼分光光度计示意图

目前,在生物大分子和生物超分子体系的构象研究中,特别是溶液中生物大分子空间结构与功能相互关系的动态研究中,激光拉曼光谱已成为很有发展前途的一门新技术。

激光拉曼光谱能显示蛋白质分子中肽基团 ($\begin{matrix} \text{O} & \text{H} \\ \parallel & | \\ -\text{C} & -\text{N}- \end{matrix}$) 的特征性振动谱带、主链骨架的振动谱带和侧链基团的振动谱带。肽基团的振动光谱对主链骨架的盘曲方式是敏感的。因此,肽基团的振动光谱应能测定蛋白质分子的构象及其变化。目前,应用激光拉曼光谱法已经能够对蛋白质分子中的三种构象(α -螺旋、 β -折迭和无规则卷曲)作出精确的测定;但是,要对整个蛋白质分子构象作出明确的测定,对方法本身还需要作进一步的研究。

3. 中子衍射

中子是静止质量 $m=1.6748 \times 10^{-24}\text{g}$ 、自旋 $=\frac{1}{2}$ 、磁矩 $=-1.913\mu_N=1.042 \times 10^{-3}\mu_B$ (μ_N 和 μ_B 分别是核磁子和波尔磁子)、不带电荷的微观粒子。中子束具有波动和微粒的两重性,其德布罗意波长为:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mE}} \quad E = kT$$

式中, h , k 分别为普朗克常数和玻耳兹曼常数, m 是中子的静止质量, E 是中子的能量, T 是绝对温度。由上式可知,中子束的波长与温度有关。处于一定温度范围的低能中子束,与 X-射线一样,能为晶体所衍射,因而,也可以用来研究晶体的空间结构、分子间距等。

中子衍射(中子散射)是低能中子与原子核之间的相互作用。当一束波长为 λ_0 的单色中子通过样品时,则中子为样品分子中的原子核所散射,其能量与动量都发生了显著的变化。通过测量散射强度与散射角度、能量变化的关系,就可以得到许多有关大分子的形态、构象以及分子运动等信息。

产生中子的中子源是原子反应堆。用于结构研究的中子束波长在0.5—10 Å的范围内。

小角中子衍射法用于生物高分子构象及亚细胞器结构的测定,虽然才有十年左右的历史,但是,它已显示了巨大的威力。与X-光衍射法相比,小角中子衍射法具有下列优点:

(1) 低能中子与物质的作用很弱,因而,对样品几乎没有破坏性。这在生物研究中是很重要的,如某些易受X-射线破坏的蛋白质晶体样品,往往不能在同一个样品上多次收集不同的X-光衍射数据,而低能中子则容易做到这一点。

(2) X-光衍射法不能测定生物大分子中的H原子位置,而小角中子衍射法,不仅能测定X-光衍射法所能确定的生物大分子构象,而且还能测定生物大分子中的H原子位置。

(3) X-光衍射法只能研究晶态生物大分子的构象,不能研究生物大分子在溶液中的构象;只能研究静态构象,不能研究动态构象;只能研究一个生物大分子的构象,不能研究许多相同或不同的生物大分子之间的空间排布以及相互作用时的构象变化。而小角中子衍射法则能够做到这一点。

目前,利用小角中子衍射法正在作下列几方面的研究:

- (1) 蛋白质分子在晶态和溶液中的构象;
- (2) 生物高分子的构象变化,如酶的变构效应等;
- (3) 蛋白质与核酸相互作用时的构象变化;
- (4) 亚细胞器的结构,如病毒、核蛋白体、生物膜和染色体中各个大分子的空间排布等。

在上述研究中,有的已经取得了重大成果,如:弄清了肌红蛋白分子中几乎每一个氢键和其它氢原子的位置;发现免疫球蛋白在晶体中和溶液中的构象是有变化的,等等。

第二节 蛋白质的变性

一、蛋白质变性的基本概念

鸡蛋白能够全溶于水,但是,经过煮沸之后,就凝固了,不再溶于水了。这是众所周知的蛋白质变性现象。能够引起蛋白质变性的因素是很多的。这些因素可以分成两种类型。一类是化学因素。它包括:酸、碱;有机溶剂(如乙醇、乙醚、丙酮等);重金属盐类;脲、胍;表面活性剂(如SDS等),等等。另一类是物理因素。它包括:热、紫外线、超声波、高压、表面力、剧烈的振荡、搅拌、研磨,等等。在上述任何一种因素的作用下,蛋白质都可能发生变性。变性有下列这样或那样的种种表现:

(1) 物理性质的改变:旋光值改变;特性粘度增加;紫外吸收光谱和红外吸收光谱变化;出现流动双折射;失去结晶能力;溶解度下降,有的甚至于凝集、沉淀,等等。

(2) 化学性质的改变:(a) 蛋白质在变性之前,不易被蛋白水解酶水解,但变性之后,水解速度就加快了,水解部位亦大大增加了,即消化率提高;(b) 在变性之前,埋藏在蛋白质分子内部的

某些基团,不能与某些试剂反应,但变性之后,由于其暴露到蛋白质分子的表面上,从而变得可以反应了。例如:能与二硝基氟苯反应的 Lys 的 ϵ -NH₂基,在天然 β -乳球蛋白中,只有12个,但在变性之后,就有31个。Cys 的-SH基、Tyr 的-OH基和His 的咪唑基,等也有类似的现象。

(3) 生物性能的改变:(a) 抗原性改变;(b) 生物功能丧失,如:酶失去活性,激素失去生理调节作用,抗体失去与抗原结合的能力。

蛋白质的上述变化,称为变性作用。变性了的蛋白质,就称为变性蛋白;没有变性的蛋白质,就是天然蛋白。所谓天然蛋白质,严格地说,就是指这样的蛋白质,即:在体内条件下,它具有呈现全部生物功能所需要的精确的构象。但是,关于蛋白质结构与功能的研究,一般是在体外进行的,需要从体内分离提纯蛋白质,因而,把具有高活力水平的离体蛋白质,也叫做“天然”蛋白质。假定这种蛋白质的构象,完全类似于体内天然蛋白质的构象。一般地说,“天然”这一术语主要指后者。因为体内蛋白质的真正的天然特征,往往是无法检测的。

什么是蛋白质变性?关于蛋白质变性的定义,从本世纪三十年代起,直到现在,一直是有争论的。

现在,一般认为,凡是能引起蛋白质天然构象的变化,而不涉及肽键断裂的任何过程,都叫变性。但是,有些作者,把能引起蛋白质构象变化的二硫键断裂和某些基团的化学修饰,也归为变性。前者仅涉及次级键的变化,变性的范围较窄,后者是比较广义的。为了把变性概念说得更明确、更全面一些,我们认为,变性就是指:由于变性因素的作用,使天然蛋白质分子的二、三或二、三、四级结构发生异常变化,从而,导致生物功能的丧失以及物理、化学性质的异常变化。变性可以涉及次级键、二硫键的变化,但不涉及肽键断裂。

从构象上看,变性蛋白与天然蛋白的差别有大小之别。最小者可以仅差一个次级键,或一个侧链基团的取向;差别最大者,除一级结构相同而外,几乎所有原子的空间位置都与天然蛋白的不同。变性所涉及的蛋白质的构象变化,范围很广。它可以是很小的构象变化,以致于用目前的实验手段几乎无法测出;它也可以是较大的构象变化,用物理、化学方法可以测定。当然,这种可测定的构象变化,还有程度上的不同。

应该注意到,某些情况,虽然有适度的构象变化,但实际上并不影响或很少影响生物活性。

变性可以分为可逆变性和不可逆变性。除去变性因素,蛋白质构象可以恢复原状的,叫可逆变性;除去变性因素,蛋白质构象不能恢复原状的,叫不可逆变性。

蛋白质结构与功能相互关系的研究以及酶动力学研究,需要天然的蛋白质制剂。但是,蛋白质在分离、提纯、贮藏的过程中,容易发生部分变性。这就需要蛋白质制剂进行鉴定,看它有没有变性,变性到什么程度。鉴定蛋白质变性的方法是很多的,概括起来,有下列几种:

1. 测定蛋白质的比活性。用几种方法提纯蛋白质,若得到相同而恒定的比活性,就可以认为,此蛋白质制剂是天然蛋白。比活性测定可以用来追踪纯化蛋白的变性过程。

2. 以天然蛋白作对照,测定蛋白质物理性质的变化。例如:以旋光法和圆二色性法测定蛋白质的旋光率和椭圆度的变化;以紫外差分光谱法测定蛋白质消光系数的变化;以粘度法测定蛋白质溶液的特性粘度变化;以电泳法测定蛋白质的电泳迁移率变化,等等。

3. 测定蛋白质化学性质的变化,例如:某些侧链基团的反应性是否增加;被蛋白水解酶的水解速度是否增加。

4. 用免疫法测定蛋白质的抗原性是否改变,抗体能否与抗原结合。

5. 观察蛋白质的溶解度是否下降,等等。

总之,检查蛋白质变性的方法,虽然不少,但是,其中任何一种方法,都不能单独地确定蛋白质构象的变化类型和变性程度,当然,也无法证明一种蛋白的两个制剂,是否具有同样的构象。

因此,检查蛋白质的变性情况,往往采用多种方法,最后,综合其结果,才能得到确切的结论。

研究蛋白质变性,大约有五十多年的历史,直到今天,仍然是一个重要的研究课题。为什么人们对蛋白质变性有这么大的兴趣呢?有下列几个原因:

首先,大多数从事蛋白质和酶研究的人,希望通过变性研究,认识并掌握变性条件,防止变性,以得到天然蛋白制剂。

第二,有些研究工作,需要利用变性条件。例如:不同肽链的拆离,电荷异构体(由于对残基侧链的化学修饰,而产生的不同净电荷的肽链)的分离,亚单位分子量的测定,某种残基的化学反应,都要在实验研究之前,先通过变性,把蛋白质拆成亚单位,或者,把天然蛋白质变成无规构象的多肽链。

第三,利用变性过程,研究维持蛋白质二、三级结构的作用力,研究各种作用力在决定活性部位上的作用。为了这种研究,常常采用人工合成的氨基酸聚合物,或者由几种氨基酸合成的共聚物,作为蛋白质的模型化合物。这种模型化合物,结构单元只是一种或几种氨基酸,二、三级结构比较单一,因而,能较好地观察到从 α -螺旋转变成无规卷曲的变性过程。蛋白质虽然也包含 α -螺旋片段,但整个构象复杂,在变性过程中,不仅 α -螺旋发生变化,其它类型的构象也发生变化,因而,不利于观察到某一类型的变化。

蛋白质变性的研究,已经经历了三个发展阶段。第一阶段,以吴宪的变性理论(1931年)为代表,主要是变性现象的观察。第二阶段,主要是研究变性与蛋白质分子形状的关系。第三阶段,从六十年代起,由于X-光衍射技术的发展,蛋白质变性的研究,由分子形状进入分子构象变化的研究。

二、各种变性因素对蛋白质构象的影响

1. 温度对蛋白质构象的影响

蛋白质在50—60°C的溶液中,经过一定的时间,往往发生变性。由于加热而产生的蛋白质变性,叫热变性。热变性有可逆与不可逆之分;但是,多数是不可逆的。不可逆热变性往往发生沉淀和凝集现象。在某些蛋白中,热变性促使了二硫键的断裂或二硫键之间的交换反应,特别是在碱性条件下,更是如此。但是,一般来说,热变性仅仅涉及非共价键的变化。例如:不含Cys的蛋白质(如肌红蛋白),在热变性时,没有二硫键的变化,但是,也产生沉淀和凝集。这种蛋白质的热变性,在低pH下,是可逆的,但在pH 6以上时,是不可逆的。虽然,对产生凝集的分子构象,还不清楚,但是,看来,热变性所形成的聚集体具有较高的位能壁垒,反应逆转很困难,逆向反应速度太慢,以致于观察不到。

研究可逆热变性是特别重要的。因为它可以提供热力学知识。可逆热变性的蛋白质构象,

虽然也是相当无序的,但是,还保留了某些紧密结构的区域。RNA 酶的可逆热变性就是一个典型的例子。该酶的热变性研究被限制在低 pH 范围(1.13—3.15)内。在此范围内变性,二硫键不发生变化,变性蛋白很容易恢复到天然状态。用紫外差示光谱法测定变性蛋白的消光系数变化($\Delta\epsilon$),发现:在相同的 pH 下, RNA 酶消光系数的变化,随着温度的升高而增大,在相同的温度(如 35°C)下,随着 pH 值的减小而增大,如图 9-19 所示。上述图形,不论用紫外差示光谱法测定,还是用旋光或特性粘度法测定,都是相同的。在此条件下,变性的蛋白质,随着变性因素的排除,还能够恢复到有活性的天然构象。从蛋白质消光系数的变化随温度升高而增大的现象,可以推测,由于热的作用,蛋白质分子由紧密有序的构象,变成了松散无规则的构象,但不是完全的无规则构象,它还保留了一部分有序的结构区域。因而,变性是可逆的。

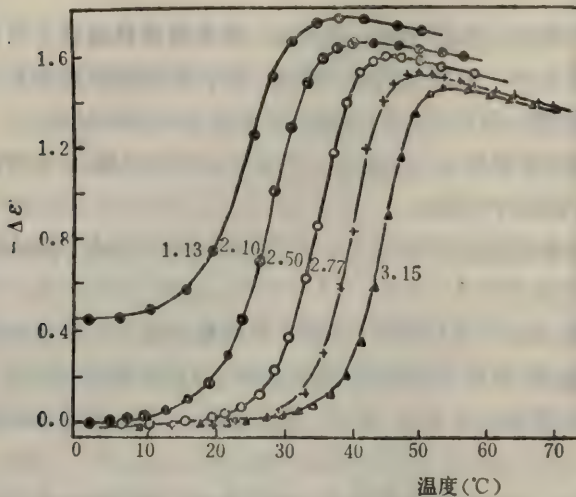


图 9-19 RNA 酶在低 pH 范围(1.13—3.15)内的可逆热变性曲线。 $\Delta\epsilon$ 是相对天然蛋白的消光系数变化

通过由其它变性剂(pH、脲等)所引起的可逆热变性对温度的依赖性的研究,发现许多蛋白质有一个最大稳定温度。此温度处于大多数有机体本身所允许的温度范围(5—40°C)内。例如:有些蛋白质的最大稳定温度是 18°C。虽然,目前对这一现象还不能很好地解释,但是,这一发现,在生理上还是有意义的。

在低温下,一些酶被钝化。其中,有些酶的冷钝化是不可逆的,例如:固氮酶的铁蛋白,在 0—1°C 下放置 15 小时,就丧失了固氮活性,在重新加热时,不可能恢复固氮活性;但是,大多数酶的冷钝化是可逆的,例如:丙酮酸羧化酶在 0°C 放置一小时后,立即测定活性,几乎完全丧失活性,然后,保温 30 分钟,活性几乎完全恢复。多亚单位的蛋白质发生这类变化,并不少见,比我们所能想象的还要更普遍些。烟草斑纹病毒(TMV)外壳亚单位的聚合,随温度下降而降低。由此推测,冷钝化可能与酶的活性寡聚体解离成无活性的亚单位有关。

2. pH 对蛋白质构象的影响

大多数蛋白质,仅在 pH 4—10 的范围内,是稳定的,超过这个范围,就发生变性。溶菌酶和 RNA 酶对酸十分稳定,只有当 pH < 2 时,才发生变性。酸、碱为什么能引起蛋白质变性呢?为什么不同的蛋白质对酸、碱的敏感性不同呢?因为蛋白质是多聚离子(polyion),因而,在肽链的不同部分之间,存在着静电的相互作用(或者是相互吸引,或者是相互排斥)。静电排斥可以使蛋白质的稳定性下降,导致构象变化。这可以从下列蛋白质的模拟实验得到证明。例如:聚-L-Lys 在 pH > 11 的水溶液中,其侧链基团(ϵ -NH₂ 基)不带正电荷,因而,呈现 α -螺旋构象;但是,在 pH < 11 的水溶液中,其侧链基团带正电荷,由于同性电荷相斥,使聚-L-Lys 由 α -螺旋构象

变成了无规则卷曲。同理，聚-L-Glu 在 $\text{pH} < 3$ 的水溶液中，其侧链基团 (γ -COOH 基) 不带负电荷，呈现 α -螺旋构象；但在 $\text{pH} > 3$ 的水溶液中，其侧链基团带负电荷，由于同性电荷相斥，使聚-L-Glu 由 α -螺旋构象变成了无规则卷曲。

对蛋白质而言，在 pH 低于等电点时，产生净的正电荷；在 pH 高于等电点时，产生净的负电荷。由于同性电荷相斥，因而使蛋白质的构象发生了变化。由此可见，酸、碱变性是通过静电作用来实现的。其静电作用的大小，依赖于介质的介电常数、溶剂和配对离子氛的屏蔽程度。这样看来，是否蛋白质在等电点时，静电作用就最适当、构象就最稳定呢？这倒不完全如此。蛋白质对酸、碱的稳定性，主要决定于其分子表面的电荷分布。

在许多情况下，酸、碱变性是与埋藏在蛋白质分子内部的基团的不稳定性有关的。当 pH 超过该基团的 pK 值几个单位时，此基团就转移到蛋白质的分子表面上。例如：血红蛋白在低 pH 下的构象变化，是与原先以不带电荷的形式埋藏在分子内部的组氨酸残基的暴露有关的。

pH 变性所引起的蛋白质的构象变化，有大小之分。有的是很小的变化，有的则几乎变成无规则构象，有的无序和有序两部分同时并存。

3. 有机溶剂对蛋白质构象的影响

对蛋白质来讲，一般地把非水溶剂分成两大类：强质子性溶剂和弱质子性溶剂。强质子性溶剂主要是有机酸(如甲酸、乙酸、二氯乙酸，等)和有机碱(如氨等)。其 1 M 在水中的 pH 值，低于 6(有机酸)或高于 8(氨)。弱质子溶剂主要是一些醇(如：甲醇、乙醇、甘油，等)和酰胺(如：N-甲基乙酰胺、甲酰胺，等)。其 1 M 在水中的 pH ，在 6—8 之间。研究有机溶剂对蛋白质构象的影响，是很重要的。因为大多数蛋白质的天然环境，并不是单纯的盐水溶液，而是含有许多有机物质(如糖类、脂类，等)的复杂环境。

有机溶剂可以使蛋白质发生变性。有机溶剂为什么能使蛋白质变性？它是怎样使蛋白质变性的？

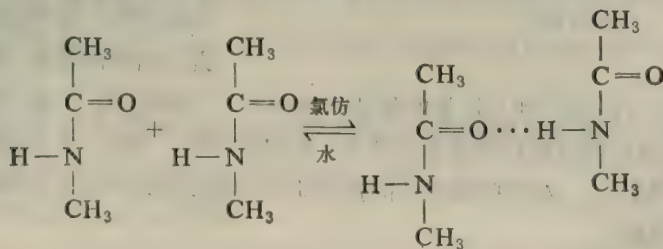
一般认为，有机溶剂可以影响静电力、氢键和疏水键，从而导致蛋白质的构象变化。

(一) 静电力

有机溶剂可以影响蛋白质分子中的静电力。这种影响是通过下列途径来实现的：a. 不同于水的有机溶剂介电常数；b. 有机溶剂对配对离子氛的影响；c. 有机溶剂影响蛋白质分子与溶剂或其它溶质分子的结合。一般地说，随着溶剂极性和介电常数的减小，蛋白质分子中的静电斥力会增大，多肽链会高度伸展。

(二) 氢键

在能与蛋白质生成强氢键的溶剂中，不利于蛋白质分子内的氢键生成；但是，在不能与蛋白



质生成强氢键的溶剂中,有利于蛋白质分子内的氢键生成。N-甲基乙酰胺在氢键生成能力较小的氯仿中,可以通过氢键而聚合,但在氢键生成能力较大的水中,则几乎不能聚合(除非N-甲基乙酰胺的浓度很高)。聚-L-Met在氯仿中,以 α -螺旋的形式存在,加入三氟醋酸之后,则变成无规则卷曲。这说明,三氟醋酸由于其氢键生成能力较强,而破坏了聚-L-Met的 α -螺旋中的氢键,结果, α -螺旋转化成无规则卷曲。

(三) 疏水键

在天然蛋白质中,疏水键是疏水侧链为了避开水相而群集在一起的一种相互作用。使蛋白质稳定的疏水键,可以由于溶剂极性的减小而削弱。为了比较在有机溶剂和水中的蛋白质构象,往往通过控制pH、离子强度和介电常数,来最大限度地减小静电斥力的影响。在这种环境里,由非极性有机溶剂所诱导的蛋白质构象的崩溃,很可能是由于它们对疏水键的破坏。然而,还存在着另一种因素,这种因素有利于形成蛋白质分子内的氢键。在纯的和混合的有机溶剂中,用合成的多肽已经做了广泛的构象研究。这些聚合物的 α -螺旋形式,在纯的溶剂中(例如:聚- γ -苄基-L-谷氨酸在 α -氯萘中,聚-L-谷氨酸在N-甲基乙酰胺中),是意外的稳定,100°C加热,也没有表现明显的构象变化。对这种现象,迄今还没有令人满意的解释。在几个系统中,还观察到另一种异常现象,例如:聚- γ -苄基-谷氨酸在二氯化乙烯和二氯醋酸的混合溶剂中,当温度较低时,以无规则卷曲的构象存在,温度升高时,则转变成 α -螺旋构象,如图9-20所示。需要有更多的理论和实验知识,才能对溶于有机溶剂或混合有机溶剂中的蛋白质和多聚氨基酸所产生的复杂的非共价相互作用,作出充分的描写和定量的估计。这种研究是相当重要的。因为类似的相互作用在结合蛋白和结构复合物(如生物膜)中可能起重要的生理作用。

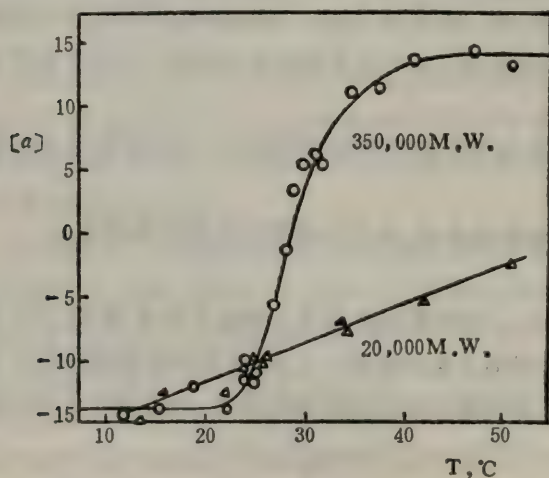


图 9-20 温度对聚- γ -苄基-L-谷氨酸〔在二氯化乙烯与二氯醋酸(20:80)的混合溶剂中〕的无规则卷曲与 α -螺旋相互转化的影响

4. 脲和盐酸胍对蛋白质构象的影响

4. 脲和盐酸胍对蛋白质构象的影响

脲和盐酸胍是常用的变性剂。在高浓度(8 M 脲或 5 M 盐酸胍)时,许多蛋白质分子都是以高度伸展的构象存在于溶液中的;蛋白质寡聚体则解离成亚单位;另外一些蛋白质,则发生凝集和沉淀。凝集和沉淀现象,常常是由于脲、胍使蛋白质肽链伸展而暴露出内部的巯基,巯基之间生成二硫

桥的缘故。这种反应可以通过加入过量的巯基试剂(例如:巯基乙醇、二硫丁四醇),或者通过还原并继之以烷基化,或者通过氧化成磺基衍生物,而加以抑制。然而,并不是所有的沉淀和凝集都是由于二硫桥而产生的。在某些脲变性的蛋白质中,能够形成很稳定的链间的非共价键,从而使蛋白质凝集或沉淀。

关于脲、胍以及其它类似的变性剂(如: 甲酰胺、二甲基甲酰胺、二乙基甲酰胺,等)对蛋白质的作用机制,一直是一个研究课题,并且存在着争论。这些化合物的结构(特别是脲和胍)表明,它们在和蛋白质生成氢键时,既可以作质子的供体,又可以作质子的受体。因此,许多年来,人们一直认为,脲、胍与蛋白质生成氢键的能力比水强,它们是通过破坏分子内氢键,而使蛋白质变性的。但是,实验表明,N-甲基乙酰胺或脲在水中,溶质与溶质之间几乎完全不产生氢键。这就否定了在这些化合物中有强大的氢键生成能力。然而,另一方面,如果以烷基取代脲或胍的氢原子,就降低了与模型化合物的酰胺基团相互作用的能力。这样看来,与氮原子结合的氢原子(形成氢键的能力)在这些物质的变性作用中,似乎起重要的作用。总之,脲、胍是否通过破坏分子内氢键而使蛋白质分子变性,现在尚未定论。

现在,人们认为,脲、胍以及类似的化合物,其变性作用主要是破坏蛋白质分子内部的疏水键,从而,促使疏水基的暴露。一般地说,含有高浓度的这类化合物的水溶液,可以作为非极性物质的溶剂。

虽然,这类变性剂的作用机制尚未弄清,但是,它们在研究蛋白质结构中,特别是阐明蛋白质聚合体中亚单位的数目与大小,是十分有用的。用流体动力学或光散射法,能够在这些多组分的系统中,测定可靠的分子量。然而,在使用这种变性剂时必须注意确定变性的完成程度。有时,甚至使用最高浓度(8—10 M)的脲溶液,也仅仅产生部分变性;还必须改变其它条件,才能使蛋白质分子完全无序化。另一方面,在高浓度的盐酸胍溶液中,所有的非复合和非交联的蛋白质都能达到无规构象。与此相关的几种盐类是比盐酸胍更强的变性剂。这些变性剂包括胍基-胍盐类和胍同负离子(负离子本身也是促进变性的物质)结合的盐类(例如: 硫氰酸胍)。

图 9-21 表示 β -乳球蛋白的脲变性曲线。在一定的条件下(温度 25°C、pH 2.77、离子强度 0.15),8 M 脲能使 β -乳球蛋白完全变性。

脲和胍变性也常常用于了解未知结构的蛋白质分子内部的基团情况,例如: 测定埋藏在分子内部的 Tyr 数目以及估计可交换的氢原子数目,等等。

5. 盐对蛋白质构象稳定性的影响

在蛋白质的分离、提纯及结构与功能的研究中,广泛地使用了各种盐。比如: 用稀盐溶液溶

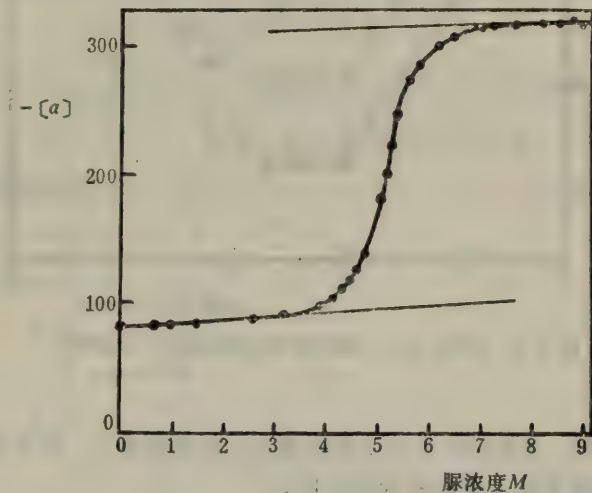


图 9-21 β -乳球蛋白的脲变性曲线
实验条件: 25°C, pH 2.77, 离子强度 0.15; 在 365 nm 波长测定旋光率 $-\alpha$; 在 $-\alpha = -310^\circ$ 时的平线相当于蛋白质的完全伸展的构象

解蛋白质；在浓盐溶液中盐析蛋白质；在一定条件下（pH 值和离子强度）测定酶活力，等等。因此，盐对蛋白质构象的影响，是生物化学工作者非常关心的一个问题。

不同的盐对蛋白质的构象有不同的影响。例如：对 RNA 酶构象的稳定性，有些盐（如： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ）有提高的作用；有些盐（如： CaCl_2 、 KSCN ）有降低的作用；有些盐（如： NaCl 、 KCl ）实际上没有作用。如图 9-22 所示。

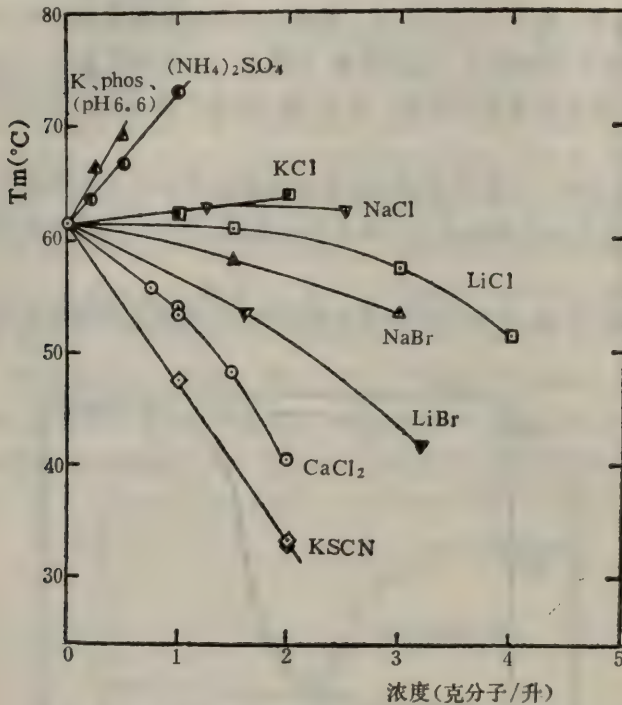


图 9-22 各种盐对 RNA 酶热变性的解链温度 (T_m) 的影响

所有的溶液都含有：5 mg RNA 酶/ml, 0.15 M KCl, 0.013 M 二甲胂酸钠 (sodium cacodylate)。溶液的 pH=7.0。解链温度 (T_m) 是指，蛋白质构象变化一半所需要的温度。

由大量的实验总结出一条基本规律：某些离子（如 SO_4^{2-} ）能够提高蛋白质构象的稳定性，同时，也能够使蛋白质的溶解度下降，换句话说，就是也能够盐析蛋白质；某些离子（如 Ca^{2+} 、 SCN^- ）能够降低蛋白质构象的稳定性（使蛋白质变性），同时，也能够提高蛋白质的溶解度，即有盐溶作用。这一规律反映在表 9-2 之中。表中各种离子的排列顺序，是按照各种离子对蛋白质盐析或盐溶能力的大小而排列的。在表的左方，表示这些离子对蛋白质有盐析作用，同时，又能提高蛋白质构象的稳定性。愈向左，盐析能力愈强，对构象稳定性的提高愈大。在表的右方，表示这些离子对蛋白质有盐溶作用，同时，也能够降低蛋白质构象的稳定性。

这一经验性的规律在各项研究中得到了广泛的应用。例如：用盐析法分离提纯蛋白质，同时又保护了蛋白质的生物活性；在适当的条件下，用 CaCl_2 或 KSCN 拆开亚基，而不改变肽链的三级结构。

为什么有些离子能提高蛋白质构象的稳定性？为什么有些离子能降低蛋白质构象的稳定性？为什么有些离子对蛋白质构象的稳定性没有影响？对于这些问题，现在还没有解决。关于离子与蛋白质相互作用的机制，仅仅有两种考虑：一种是，离子对蛋白质分子内部的极性基团的直接作用；另一种是离子改变溶剂的结构，以影响水分子与蛋白质极性侧链基团的相互作用，从而间接地影响蛋白质构象的稳定性。

6. 表面活性剂对蛋白质构象的影响

长链的脂肪酸（如月桂酸）或相应的表面活性剂 [如十二烷基硫酸钠 (SDS)] 很容易与蛋白质

表 9-2 各种离子对蛋白质构象稳定性影响的相对大小

	螺旋 ←天然构象 盐析	无规卷曲 变性状态→ 盐溶
胶原-明胶	$SO_4^{2-} < CH_3COO^- < Cl^- < Br^- < NO_3^- < ClO_4^- < I^- < CNS^-$ $(CH_3)_4N^+ < NH_4^+ < Rb^+, K^+, Na^+, Cs^+ < Li^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+} < Ba^{2+}$ $(CH_3)_4N^+ < (C_2H_5)_4N^+ < (C_3H_7)_4N^+ < (C_4H_9)_4N^+$	
RNA酶	$SO_4^{2-} < CH_3COO^- < Cl^- < Br^- < ClO_4^- < CNS^-$ $(CH_3)_4N^+, NH_4^+, K^+, Na^+ < Li^+ < Ca^{2+}$ $(CH_3)_4N^+ < (C_2H_5)_4N^+ < (C_3H_7)_4N^+ < (C_4H_9)_4N^+$	

反应,常常引起蛋白质解离成亚基或单个肽链的变性。与脲、盐酸胍不同,这类物质不需要高浓度,在很低的浓度下,就能和蛋白质高度地结合。

SDS 与蛋白质的相互作用有很多用途,特别是用于凝胶电泳中估计亚基分子量和亚基计量关系。各种蛋白质与 SDS 结合的比例很相似,而且结合的比例是溶液中自由 SDS 的浓度的函数。图 9-23 是各种蛋白质结合 SDS 的典型结果。由图可见,有一低一高两个平阶,分别相当于每克蛋白质结合 0.4 克和 1.4 克 SDS。

根据 SDS-蛋白质复合物(每克蛋白束缚 1.4 克 SDS)的物理研究,提出了一个 SDS-蛋白质复合物模型。这个模型是一个直径恒定、长度相当于肽链长度的细棒。其大小相当于沿螺旋长度插入 SDS 分子的类螺旋构象。低水平 SDS 的束缚,一般不引起蛋白质构象明显变化。有几种蛋白质在低浓度的 SDS 存在下,还能够抗拒其它变性剂的变性作用。在 SDS 与蛋白质结合的最初阶段,SDS 的脂肪族侧链可能与蛋白质内部区域的非极性基团相互作用,而留在蛋白质分子表面的带电部分可能与溶剂作用。虽然非

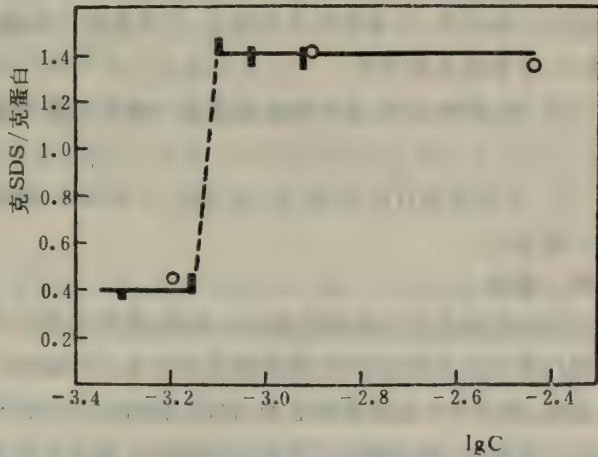


图 9-23 各种蛋白质与 SDS 结合的比例是溶液中自由 SDS 平衡浓度的对数的函数

极性相互作用在 SDS-蛋白质复合物的稳定中起重要作用,但是,不论侧链的极性如何,沿着整个肽链几乎都能牢固地结合 SDS,因此,SDS 与蛋白质的相互作用的机制,是很复杂的,有待于进一步研究。

表面活性剂在蛋白质分子上的大量的束缚,大大增加了复合物的溶解性能。因为 SDS 是带负电荷的分子,所以,SDS 在蛋白质分子上的大量束缚,使 SDS-蛋白质复合物的分子表面带有大量的负电荷,由于同性电荷相斥,从而阻止了复合物之间的聚集。

十六烷基三甲基氨溴化物(cetyl trimethyl ammonium bromide)是带正电荷的;异辛烷基

苯氧基多乙氧基-乙醇(isooctoylphenoxypolyethoxy ethanol,又叫 Triton X-100)是中性的。这两种表面活性剂也用来解离蛋白质,或者,用来从生物膜或其它结构组分中把蛋白质溶解下来。中性的表面活性剂也经常用来对病毒进行温和破碎。

三、变性产物的构象

蛋白质经变性因素作用之后,其构象发生了什么变化?

吴宪早在1931年就已经提出:蛋白质变性之后,其肽链就由原来紧密有序的构象变成了松散无序的构象。此后,很长一段时间,人们对变性的认识,基本上停留在这个水平上。五十年代末,有人发现,氯乙醇之类的有机溶剂,对蛋白质构象的影响,与有机溶剂的浓度有密切关系。有机溶剂浓度低时,变性蛋白呈现易聚集的伸展构象;当浓度提高时,又逐渐变成 α -螺旋,有时,其螺旋含量可以超过天然状态。这一实验结果说明:变性蛋白质的构象也可以是紧密构象。近年来,又进一步观察到, α -淀粉酶、L-门冬酰胺酶等,经过阳离子或阴离子表面活性剂变性之后,其螺旋含量增加。这就进一步证实了上述论点。Reynold等人对许多SDS变性的蛋白质,作了旋光研究,认为:SDS的疏水基与蛋白质的侧链疏水基共同形成疏水区,螺旋即处于这种疏水区。增加螺旋度的变性,叫重构造(reconstructive)变性。

1968年,Tantord把变性产物的构象概括成三类:

(一) 盐酸胍变性的蛋白质,呈无规则卷曲构象。若打开二硫键,则变成线状无规则卷曲。浓脲变性亦属此类,但变性程度不完全,尤其是有二硫键的蛋白质更是如此。溶菌酶只有在酸性pH值下,才能发生脲变性。

(二) 热、酸碱变性,其产物往往保存一部分紧密构象。添加胍,可以破坏这一部分的紧密构象。

(三) 高浓度的有机溶剂(如:氯乙醇、三氧六环、脂肪族醇,等)变性,其产物的螺旋度增加,不存在疏水区。

四、复性

变性的蛋白质能不能恢复原来的构象,重新呈现全部的生物活性?

蛋白质分子的变性部分,恢复到天然构象,这叫复性。复性一般可以分成三种类型。一种是全部复性,甚至变性到无规则卷曲,也能全部恢复天然构象。另一种是部分复性,能够恢复原来构象的主要部分,但还保留了异常的结构区。还有一种也是部分复性,但得到的是几种产物的混合物。其中,有些产物与天然蛋白基本上相同,另一些产物则具有明显不同的性质。当存在多条折迭途径时,这种情况便能发生,从而导致多种产物。这些产物被中止成不同的亚稳态构象。因为活化能的壁垒很高,这些产物向天然构象转化的速度很慢,或者根本不可能转化成天然构象。

下面介绍变性蛋白复性的几个典型事例:

1. RNA 酶复性

DNA 酶分子只有一条多肽链,包含四个二硫桥。在温和碱性条件下,由于 β -巯基乙醇和8M脲的作用,RNA酶发生了变性。四个二硫桥断裂了,多肽链变成无规则卷曲,酶活力丧失。如果透析除去脲,并在 O_2 存在下,让二硫桥重新生成,则酶活力几乎全部恢复,复性蛋白的晶体与天然蛋白的晶体具有相同的X-光衍射图谱。这说明,变性蛋白的构象已经完全恢复到天然蛋

白的构象。

2. 醛缩酶复性

醛缩酶分子包含四条大小相似的多肽链,没有二硫桥,分子量为 160000。在 4 M 脲或 pH 2 的作用下,四条链被拆开来,肽链似呈无规则卷曲,酶活力丧失。如果对适当的缓冲液透析,则活力恢复 70%。复性对条件的要求是严格的。在蛋白质浓度高(5 mg/ml)的情况下,当 pH 从 2 迅速变成 5.3 时,则产生几种无活性的聚集体(各种中止状态),但是,在蛋白质浓度低的情况下,就不产生这样的聚集体,而是快速重组。

活性大部分恢复,而没有全部恢复,这一结果说明,对于具有四级结构的蛋白质而言,三、四级结构遭到破坏之后,在适当的条件下,虽然蛋白质的其它区域不能恢复到天然构象,但是,活性部位可以正确地重新形成。

3. 氨甲酰基磷酸合成酶复性

在硫氰酸钾作用下,大肠杆菌氨甲酰基磷酸合成酶分子解离成大小不同的两个亚单位,活性丧失。将大小亚单位分离开来,并除去变性剂。如果以 NH_3 作为酰胺供体,则大亚单位具有催化氨甲酰基磷酸合成的充分活性。此合成反应,象天然酶的活性一样,亦受鸟氨酸和次黄嘌呤核苷单磷酸的变构调节。然而,单独的大亚单位却不能利用正常的酰胺供体——谷酰胺,来合成氨甲酰基磷酸。据发现,小亚单位能束缚谷酰胺,有低水平的谷酰胺酶活力。大小亚单位重组,能恢复天然的四级结构和所有的酶性质。

二、三或三、四级结构遭到破坏的变性蛋白为什么能够复性?

一般认为,只要满足所需的环境条件,蛋白质的一级结构能够决定其二、三、四级结构。天然蛋白的二、三、四级结构,虽然遭到不同程度的破坏,但是,一级结构仍然保持不变,因此,除去变性剂之后,在适当的环境条件下,可以复性。

五、抗变性手段

对蛋白质变性要从两方面看,它有利的一面,也有不利的一面。在不少场合,可以利用变性为人类服务。例如:在提纯蛋白质时,可以用加热法除去对热特别敏感的杂蛋白,以纯化蛋白质制剂;在食品工业上,通过变性,使大豆蛋白由球状结构变成纤维状结构,以制造“人造肉”;在医疗和食品部门,有不少器具或制品,需要利用变性来消毒杀菌等等。但是,在大多数场合,变性给人们带来损失,需要加以克服。例如:医用生物制品(疫苗、酶制剂、其它蛋白质制剂)的制备与保存,人工心肺机内循环的血液,以及日常实验室和工业上用的酶制剂,都需要防止变性。因此,蛋白质的稳定性问题一直是一个急待解决的问题。

影响蛋白质的稳定性的因素很多,但是,基本上可以分成两个方面:

1. 内源性稳定因素,即蛋白质的共价结构以及由共价结构所决定的空间结构;
2. 外源性稳定因素,包括非共价结合的辅基以及环境的物理、化学条件(如:温度、压力、溶液中其它溶质,等等)。

外源性稳定因素发挥功能是与内源性稳定因素相关的,并受其制约。一般来讲,从外源性稳定因素着手防止变性,是比较简单的。例如:添加蛋白质(包括明胶)、树胶、底物、抑制剂、辅基、必需的金属离子以及某些盐类,在适当的缓冲液中,可以增加蛋白质的稳定性。但是,有些酶在

表 8-3 有机溶剂对猪心苹果酸脱氢酶活性的影响*

	有机溶剂浓度 (V/V)%				
	0	10	30	50	70
	酶活性 %				
甲 醇	50	63	59	66	20
乙 醇	50	72	87	79	62
丙 酮	50	77	99	101	—
甘 油	50	57	96	94	109

* 25°C保持 30 分钟。

底物存在下,反而降低了热稳定性。很多实验指出,多元酶及糖类可增进蛋白质的稳定性。最有趣的是某些变性剂(丙酮或乙醇)有时在表观上竟能稳定脱氢酶,如表 8-3 所示。相反的,糖和甘油对某些酶的活性却起抑制作用。对于这些错综复杂的现象,现在,人们还不能够正确解释,有待于进一步研究。

思 考 题

1. 解释下列名词:

荧光;荧光物质;荧光光谱;荧光熄灭;熄灭剂;荧光量子产量;平面偏振光;圆偏振光;椭圆偏振光;旋光;旋光性;旋光物质;旋光度;旋光率;椭圆度;左旋;右旋;旋光色散;圆二色性;圆二色性光谱;旋光色散光谱;核磁共振;自旋偶合;化学位移;激光拉曼光谱;中子衍射。

2. X-射线结构分析法在研究蛋白质分子构象方面有哪些优点与缺点?

3. 与X-射线结构分析法相比,中子衍射法有哪些优越性?核磁共振法有哪些优越性?

4. 蛋白质的紫外吸收光谱与蛋白质分子结构有何关系?

5. 蛋白质的荧光光谱与蛋白质构象有何关系?

6. 蛋白质的圆二色性光谱和旋光色散光谱与蛋白质的构象有何关系?

7. 目前,核磁共振法、激光拉曼光谱、中子衍射法、圆二色性与旋光色散光谱、荧光光谱以及紫外吸收光谱可以为蛋白质分子构象提供哪些信息?

8. 什么是蛋白质变性?引起蛋白质变性的因素有哪些?

9. 蛋白质变性有哪些表现?鉴定蛋白质变性的方法有哪些?

10. 天然蛋白与变性蛋白有何不同?

11. 解释下列名词:

天然蛋白;重构造变性;复性;可逆变性;不可逆变性。

12. 酸、碱、脲、胍、SDS 以及有机溶剂对蛋白质的变性机理如何?

13. 蛋白质的热变性与冷钝化的机理如何?

14. 由不同变性剂所引起的蛋白质构象变化有何不同?

15. 复性有哪些类型?

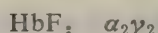
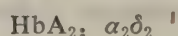
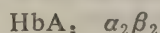
参 考 文 献

1. R. H. Haschemeyer, et al., *Proteins, A Guide to study by Physical and Chemical Methods*, John Wiley & Sons, Inc., 1973
2. D. Freifelder, *Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology*, W. H. Freeman and Company, 1976
3. K. E. 范霍尔德, 物理生物化学, 科学出版社 (郁贤章译), 1978
4. 北京医学院生物物理教研组, 生物物理学, 人民卫生出版社, 1961
5. 陈国珍, 荧光分析法, 科学出版社, 1975
6. M. Joly, *A Physico-Chemical Approach to the Denaturation of Proteins*, Academic Press, London, New York, 1965
7. 蔡惠罗, 生物化学与生物物理进展, 21, (3), 35, 1978
8. 郭志鲲, 生物化学与生物物理进展, 4, 16 (1974)
9. D. W. Jones, *Introduction to The Spectroscopy of Biological Polymere*, Academic Press, London New York San Francisco, 1976
10. 浜口浩三, 蛋白质机能の分子论, 学会出版センター, 1976

第十章 蛋白质分子构象与功能的关系

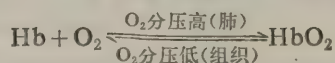
第一节 血红蛋白分子构象与功能的关系^(1-9,13-15)

人的血液含有许多红细胞,红细胞里含有两种血红蛋白。一种是 HbA,占血红蛋白总量的 96% 以上;另一种是 HbA₂,占血红蛋白总量的 1.5—4%。在人胎儿的红细胞中,含有另外一种血红蛋白,叫 HbF。这三种血红蛋白分子的亚单位组成如下:



由此可见,这三种血红蛋白分子都具有共同的 α -亚单位;所不同的是 β -、 δ -和 γ -亚单位。 β -、 δ -和 γ -亚单位的一级结构虽然有一定的差异,但是,它们的二、三级结构却十分相似。这三种血红蛋白分子都是 O₂ 和 CO₂ 的运载工具。

血红蛋白分子既能够与 O₂ 迅速结合,也能够与 O₂ 迅速解离。其结合与解离主要决定于血液中 O₂ 分压的高低。当血液流经肺部时,由于 O₂ 从肺泡进入血液,使血液里的 O₂ 分压增高,这时,大部分血红蛋白分子(Hb)便与 O₂ 迅速结合成氧合血红蛋白(HbO₂);当血液流经组织时,由于 O₂ 从血液进入组织,使血液里的 O₂ 分压降低,这时,一部分氧合血红蛋白分子(1/4—1/3)便解离成脱氧血红蛋白(Hb)与 O₂。上述过程可以用下式表示:



其平衡常数为

$$K = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{Hb}][\text{O}_2]}$$

与 O₂ 结合的血红蛋白(HbO₂),叫氧合血红蛋白;没有与 O₂ 结合的血红蛋白(Hb),叫脱氧血红蛋白。O₂ 在血红蛋白分子中的结合部位是血红素中的 Fe²⁺(图 8-29)。在 HbO₂ 中,血红素的 Fe²⁺,其配位键是六,即有六个配位体与之配位。其中,四个配位体是卟啉环中的四个 N 原子,第五个是 F 8 His 的咪唑基,第六个是 O₂。因此,每个亚单位结合一个 O₂,每个血红蛋白分子共结合四个 O₂。

血红蛋白分子与 O₂ 结合的前后,其血红素中 Fe²⁺ 的价态不改变。如果从 Fe²⁺ 变成 Fe³⁺,那么,这种血红蛋白便是氧化血红蛋白(又叫高铁血红蛋白),以 HbM 表示。氧化血红蛋白失去载 O₂ 的能力。

H⁺、CO₂ 以及 2,3-二磷酸甘油酸(DPG)可以与脱氧血红蛋白分子结合,从而降低其对 O₂ 的亲合力。

脱氧血红蛋白分子对 O₂ 的亲合力低于其单独的 α -或 β -亚单位对 O₂ 的亲合力,亦低于肌

蛋白分子对 O₂ 的亲合力。

与 O₂ 首先结合的是脱氧血红蛋白分子中的 α-亚单位,而不是 β-亚单位。

一、血红蛋白的变构作用与 O₂ 的运输

血液的 O₂ 饱和度是指,血液中氧合血红蛋白的数量对血红蛋白总量的百分比。

$$\text{O}_2 \text{ 饱和度} = \frac{\text{HbO}_2}{\text{HbO}_2 + \text{Hb}} \times 100\%$$

图 10-1 是血液中氧合血红蛋白的氧解离曲线。由该图可知,血红蛋白的氧饱和度随着 O₂ 分压的升高而增加,但不成直线关系,而是呈 S 形曲线。

氧合血红蛋白的氧解离曲线的 S 形特征,具有重要的生理意义。S 形曲线的上部较为平坦, O₂ 分压从 100 毫米汞柱降至 80 毫米汞柱时, O₂ 饱和度仅下降 0.02 (从 0.95 降至 0.93)。因此,当血液流经 O₂ 分压较高的肺部时,即使 O₂ 分压有相当大的改变,血液的 O₂ 饱和度也无多大改变,仍然能够保证较多的脱氧血红蛋白分子与 O₂ 结合。但是,在 S 形曲线的中段,坡度较大, O₂ 分压从 40 毫米汞柱降至 20 毫米汞柱时, O₂ 饱和度可以从 0.6 降至 0.3, 这样,便保证了血液在流经 O₂ 分压较低的组织时,即使 O₂ 分压有较小的变化,氧合血红蛋白分子的解离却有明显的增加,从而释放更多的 O₂, 供组织需要。

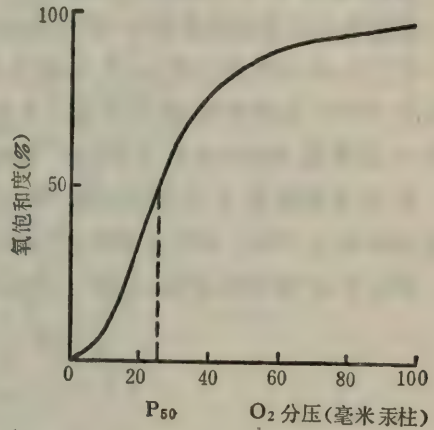


图 10-1 血液中氧合血红蛋白的氧解离曲线

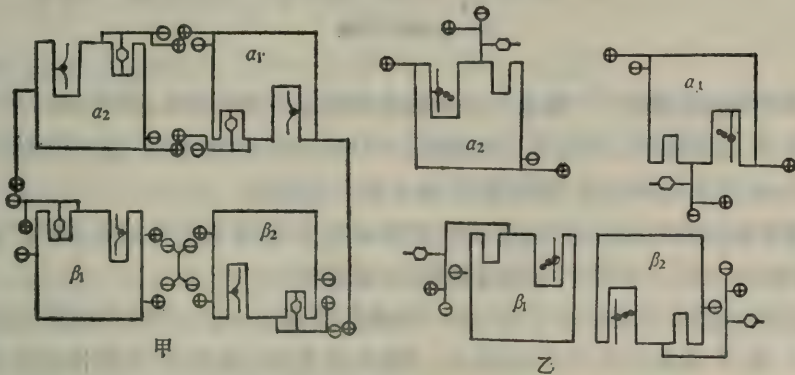


图 10-2 脱氧血红蛋白(甲)与氧合血红蛋白(乙)中各亚单位的构象及其基团之间的关系示意图

⊕, ⊖ 表示电荷基团; —⊕—⊖— 表示盐桥; —表示 DPG; —●— 表示脱氧的血红素; ●— 表示氧合的血红素; —表示 Tyr 的侧链。

氧合血红蛋白的氧解离曲线为什么呈 S 形? 这是因为: 血红蛋白分子对 O₂ 的结合是协同的, 即一个亚单位对 O₂ 的结合促进了其它亚单位对 O₂ 的结合。这种协同作用是通过血红蛋白

分子中 α -与 β -亚单位之间的相互作用来实现的。当一个 α -亚单位与 O_2 结合时,其构象发生改变;通过亚单位之间的相互作用,这种构象变化可以引起其余亚单位的构象发生变化,从而提高其余亚单位对 O_2 的亲和力。这就是所谓变构效应。变构效应是生物用来调节生物高分子功能(尤其是酶催化功能)的极其普遍的方式。

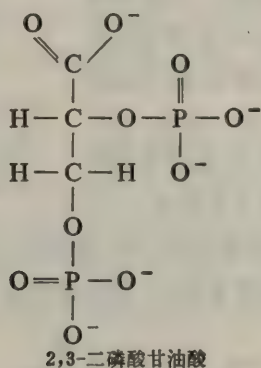
现在,通过 X-光衍射法已大致上弄清了氧合前后血红蛋白分子的构象变化⁽¹³⁾。

在脱氧血红蛋白四聚体中,四个亚单位通过下列盐桥互相结合(图 10-2):

在二个 α -亚单位之间,一个 α -亚单位 N-末端 Val 的 $-NH_3^+$ 基与另一个 α -亚单位 C-末端 Arg 的 $-COO^-$ 基相互吸引,共生成二个盐桥;一个 α -亚单位 C-末端 Arg 的荷正电的胍基与另一个 α -亚单位 Asp 126 的 $\beta-COO^-$ 基相互吸引,共生成二个盐桥。

在 α -亚单位与 β -亚单位之间,每一个 β -亚单位 C-末端 His 的 $-COO^-$ 基与每一个 α -亚单位 Lys 40 的 $\epsilon-NH_3^+$ 基相互吸引,共生成二个盐桥。

在二个 β -亚单位之间,夹着一分子 DPG。DPG 分子的结构式如下图所示:



由此可见,DPG 分子中的一个羧基和二磷酸根都是带负电荷的。DPG 分子中的三个带负电的基团与每个 β -亚单位的三个带正电的基团[NAI(1)Val 的 $\alpha-NH_3^+$ 基、EF 6(82)Lys 的 $\epsilon-NH_3^+$ 基、H 21 (143)His 的咪唑基]相互吸引,共生成六个盐桥。

除了上述亚单位之间的盐桥而外,在每个 β -亚单位中,亦各有一个盐桥,即 C-末端 His 的咪唑基与 FGI(94)Asp 的 $\beta-COO^-$ 基相互吸引,生成盐桥。

由于上述盐桥的作用,使脱氧血红蛋白分子的构象受到了约束,从而导致其对 O_2 的亲和力低于其单独的 α -或 β -亚单位对 O_2 的亲和力。DPG 分子插入两个 β -亚单位之间,使脱氧血红蛋白分子的四级结构更加稳定,从而进一步降低了脱氧血红蛋白分子对 O_2 的亲和力。

血红素位于每个亚单位的由 E 和 F 螺旋所构成的空穴中。在血红素平面的两侧各有一个 His。F 8 His 距血红素平面较近,以配位键与 Fe 原子相连;E 7 His 距血红素平面较远,如图 10-3 所示。

在脱氧血红蛋白分子中,血红素中 Fe^{2+} 的配位数是五。此时,Fe 原子的直径太大,以致于不能落入卟啉环的中央空穴中,而与血红素平面保持 0.75 Å 的距离。在 α -亚单位中,由于 O_2 结合部位没有空间障碍,因此, α -亚单位能够首先与 O_2 结合,但在 β -亚单位中,由于 E 11 Val

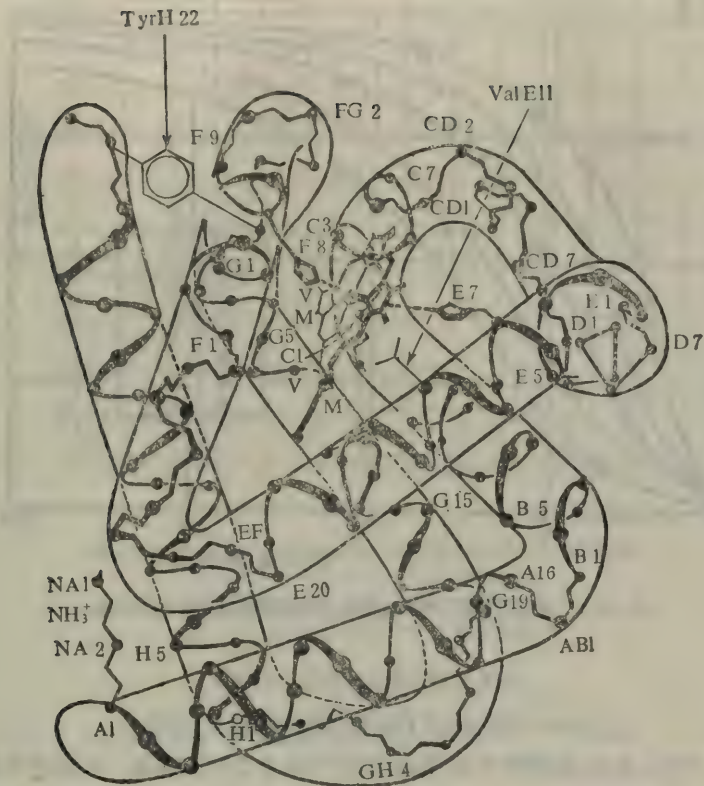


图 10-3 脱氧血红蛋白 β -亚单位的三级结构, α -亚单位的三级结构与其极其相似

侧链对 O_2 结合部位的空间障碍,使 β -亚单位不能首先与 O_2 结合。

当一或二个 α -亚单位与 O_2 结合时,由于 O_2 的结合,使 Fe 原子的直径缩小,向血红素平面移动 0.75 \AA ,从而全部落入卟啉环的中央空穴中。Fe 原子的位移,导致 HC 2 Tyr 包围圈 (由 F 和 H 螺旋所构成的空穴) 的收缩,从而使 HC 2 Tyr 突围而出。HC 2 Tyr 的移动,拉断了约束脱氧血红蛋白分子构象的某些盐桥,并挤出了 DPG 分子,使血红蛋白分子的四级结构发生很大变化。盐桥的断裂,使 β -亚单位的构象发生了一定的变化,从而排除了 E 11 Val 侧链对 O_2 结合部位的空间障碍,使 β -亚单位也能够与 O_2 结合。

与脱氧血红蛋白分子构象相比,氧合血红蛋白分子构象有下列变化:

- (1) Fe 原子有六个配位体,半径缩小,移入卟啉环的中央空穴;
- (2) HC 2 Tyr 已从包围圈突围而出,能自由旋转;
- (3) 亚单位之间所有的盐桥都断裂了;
- (4) 两个 β -亚单位之间的距离缩短了,DPG 分子被挤出来了。

二、DPG 对血红蛋白氧亲和力的影响

DPG 是红细胞中糖酵解支路的代谢产物。它能够降低脱氧血红蛋白分子对 O_2 的亲合力,使氧合血红蛋白的氧解离曲线右移,如图 10-4 所示。

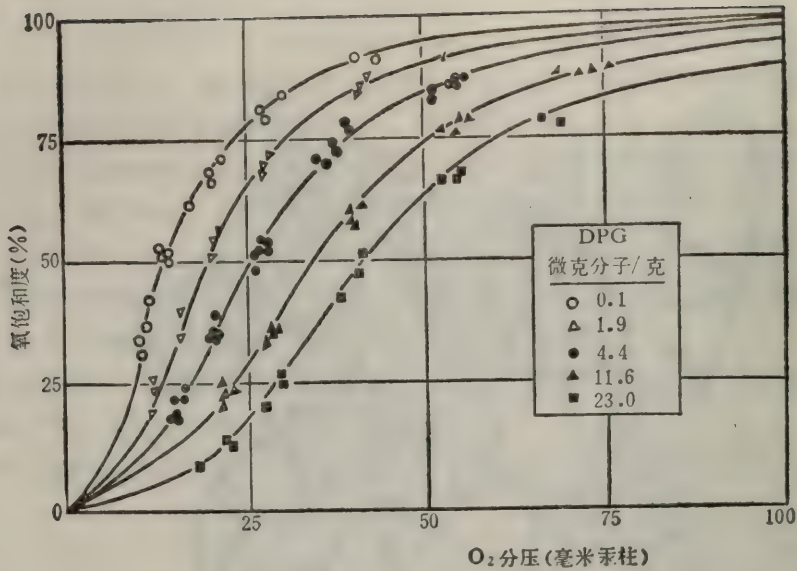
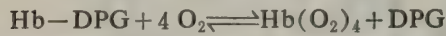
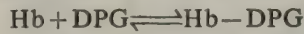


图 10-4 细胞中 DPG 浓度对氧合血红蛋白氧解离曲线的影响



由上述反应式可知,脱氧血红蛋白分子可以与一分子 DPG 结合,但是它不能同时又与四个氧分子结合。

在脱氧血红蛋白分子中,二 β -亚单位之间的空穴较大,可以容纳一分子 DPG,因此,DPG 能与脱氧血红蛋白分子结合。与 DPG 的结合使脱氧血红蛋白分子的四级结构更加稳定,从而降低了其对 O_2 的亲合力。但是,结合了 O_2 的血红蛋白分子 $[\text{Hb(O}_2)_4]$ 就不能与 DPG 结合了。因为与 O_2 的结合使血红蛋白分子的构象改变,二 β -亚单位之间的空穴缩小,结果容纳不下 DPG。

DPG 降低脱氧血红蛋白分子对 O_2 的亲合力有下列意义:

当血液流过 O_2 分压较低的组织时,红细胞中 DPG 能明显地增加 O_2 的释放,以满足组织对 O_2 的需要。DPG 的浓度越大,则 O_2 的释放量越多。红细胞中 DPG 浓度的变化是调节血红蛋白分子对 O_2 亲和力的重要因素。在空气稀薄的高山上的人,或者换气困难的肺气肿病人,其红细胞中的 DPG 代偿性增加,使为数不多的氧合血红蛋白分子尽量释放 O_2 ,以满足组织对 O_2 的需要。

三、 H^+ 浓度、 CO_2 分压对血红蛋白氧亲和力的影响

H^+ 浓度和 CO_2 分压的增高,能够降低血红蛋白分子对 O_2 的亲合力,促使氧合血红蛋白的氧解离曲线右移,如图 10-5 所示。

在肌肉中,高浓度的 H^+ 和 CO_2 促使氧合血红蛋白分子释放 O_2 ;在肺中,高浓度的 O_2 促使脱氧血红蛋白分子释放 H^+ 和 CO_2 。

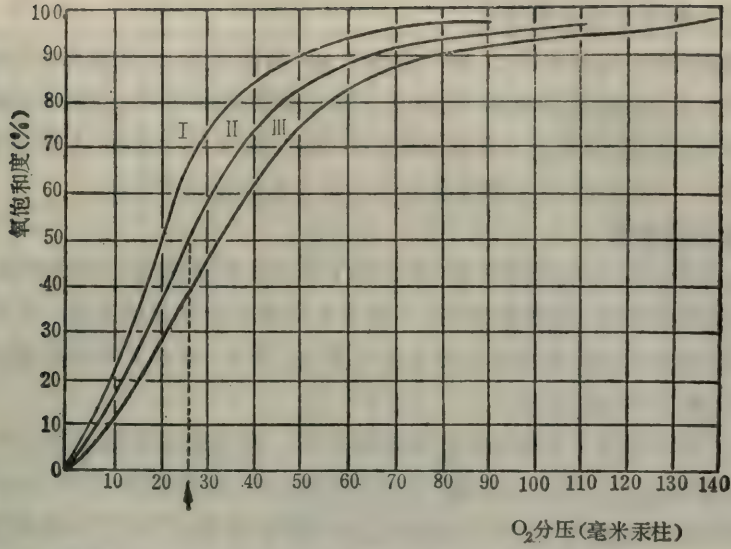
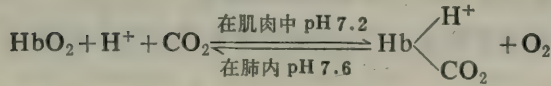
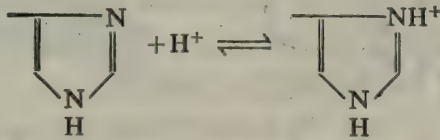
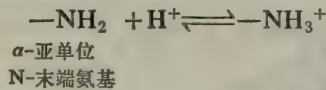


图 10-5 pH 和 CO₂ 分压对氧合血红蛋白氧解离曲线的影响
 I: pH 7.6 (CO₂ 分压=25.5 毫米汞柱)
 II: pH 7.4 (CO₂ 分压=39.7 毫米汞柱)
 III: pH 7.2 (CO₂ 分压=61.3 毫米汞柱)



上述现象是波尔首先发现的,故叫波尔效应。

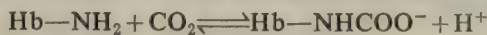
H⁺ 在脱氧血红蛋白分子中的结合部位是:α-亚单位的 N-末端—NH₂ 基;α-亚单位 His 122 的咪唑基;β-亚单位 His 146 的咪唑基。



α-亚单位 His 122
和 β-亚单位 His 146
的咪唑基

H⁺ 与脱氧血红蛋白分子的结合,能够改变脱氧血红蛋白分子的构象,从而降低脱氧血红蛋白分子对 O₂ 的亲合力。

CO₂ 在脱氧血红蛋白分子中的结合部位是每个亚单位的 N-末端氨基。



脱氧血红蛋白分子中四个亚单位的 N-末端氨基都能与 CO₂ 结合,生成氨基甲酸血红蛋白,并释放 H⁺。

波尔效应有下列重要的生理意义：

当血液流经组织时，与血液相比，由于组织的 pH 较低、CO₂ 分压较高，因而有利于氧合血红蛋白分子释放 O₂，使组织能比单纯的 O₂ 分压下降时获得更多的 O₂，同时，O₂ 的释放又促进脱氧血红蛋白分子与 H⁺、CO₂ 的结合。当血液流经肺部时，由于肺泡的 O₂ 分压较高，促使脱氧血红蛋白分子释放 H⁺ 和 CO₂。CO₂ 的呼出有利于氧合血红蛋白的生成。

四、血红蛋白分子病

由于 DNA 分子上结构基因的突变，而合成了失去正常功能的异常蛋白质，从而产生先天性的疾病，这种病就叫分子病（遗传性疾病）。由于血红蛋白结构基因上的一个或多个氨基酸遗传密码发生突变，而合成了这样或那样的异常血红蛋白，其中，有些异常血红蛋白可以产生临床疾病，即分子病。今举二例加以说明：

1. 在非洲人中流行着一种镰刀形红细胞贫血病。患者的红细胞呈镰刀状，容易发生溶血，严重的可以引起患者死亡。其发病机理，现在已大致查明：在患者的 DNA 分子中，血红蛋白 β-链结构基因上的第六个遗传密码 CTT（谷氨酸遗传密码）转变成 CAT（缬氨酸遗传密码），结果合成了一种异常血红蛋白 HbS。从一级结构上看，HbS 与正常血红蛋白 HbA 的差别，仅是 β-链第六位氨基酸残基不同。前者是缬氨酸残基；而后者是谷氨酸残基。从空间结构上看，β-链第六位的残基置换发生在血红蛋白分子的表面上。这种结构上的变化，虽然不影响单个 HbS 分子的载 O₂ 功能，但是，在红细胞中 HbS 的浓度很高的情况下，却促进了 HbS 分子之间的相互作用，使 HbS 分子一个接一个地线性凝集，产生溶解度较低的线性凝集物，从而导致红细胞变成镰刀状和易于破裂。

2. 与血红素有接触的残基都位于血红素空穴的周围，如图 10-6 所示。当该图所示的部位

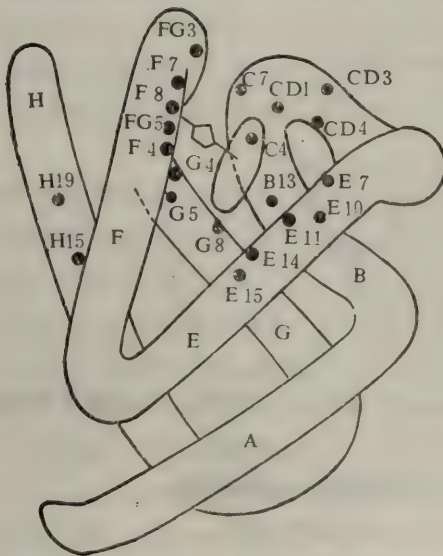


图 10-6 血红蛋白 β-链中与血红素有接触的残基分布示意图(α-链基本上与此相同)

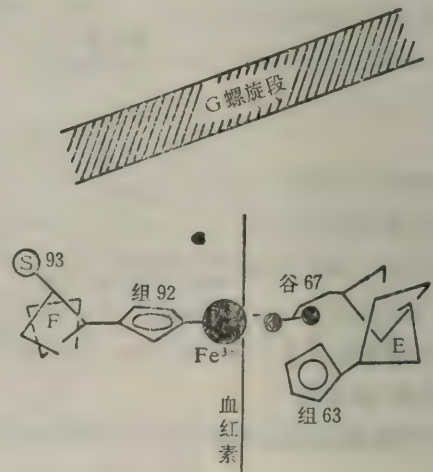


图 10-7 HbM Milwaukee β-链血红素区结构简图

表 10-1 与血红素有接触的残基发生置换所形成的异常血红蛋白

血红蛋白名称	异常链	顺序号	螺旋号	氨基酸改变	异常性质	改变对结构的影响
Torino	α	43	CD1	Phe→Val	于50°C不稳定	置换使血红素与Phe失去接触,在血红素空穴的表面留下缺口,Val与Phe 46(CD4)的距离缩短,这会破坏CD段的构象。
M. Boston	α	58	E7	His→Tyr	不易还原, α -链不能与O ₂ 结合。	可能是Tyr的酚基形成负离子而与Fe ³⁺ 结合,从而使高铁处于安定状态。
M. Iwate	α	87	F8	His→Tyr		除具有M Boston所有的影响而外,此时,血红素移向E螺旋区,X光衍射研究表明,M Iwate的构象类似正常的脱氧血红蛋白。
Bibba	α	136	H19	Leu→Pro	50°C时不稳定,pH8.6电泳时,可与HbA分开	置换使Leu与血红素失去接触,使H螺旋段136—138残基失去螺旋结构, α -链正常功能受到抑制。
Hammersmith	β	42	CD1	Phe→Ser	50°时不稳定,易氧化,从而失去血红素,低O ₂ 亲和力。	置换使血红素与Phe失去接触,于血红素空穴表面留下缺口,亲水性OH的存在使空穴易受水的影响。
M. Sskatoon	β	63	E7	His→Tyr	似M Boston	
Zürich	β	63	E7	His→Arg	能与O ₂ 可逆结合,但更易氧化并沉淀,Bohr效应正常,与CO ₂ 结合的动力学与HbA大不相同。	血红素空穴不能容纳Arg的侧链,它必须伸向表面,在Fe原子配位体部位留下一个大空穴。
M. Milwaukee	β	67	E11	Val→Glu		Glu的COO ⁻ 基与Fe ³⁺ 生成盐桥,将E7His的侧链挤出血红素空穴。
Sydney	β	67	E11	Val→Ala	50°C时不稳定,易氧化,加热时失去血红素。	破坏了血红素与Val的接触,使血红素处于松弛状态。
Santa Ana	β	88	F4	Leu→Pro	β -链上没有血红素	Pro出现于F螺旋段N-末端,可能未改变主链构象,使血红素与Leu失去接触,这样,就在其近侧打开一个缺口,使水能够进入。
M. Hyde Park	β	92	F8	His→Tyr	难还原, β -链不能与O ₂ 结合,不稳定。	见M Iwate

发生残基置换时,则产生表 10-1 所示的各种异常血红蛋白。这些异常血红蛋白几乎全部能产生临床疾病。引起先天性青紫的几种 M 型血红蛋白(HbM)全部在这个范围内。M 型血红蛋白的结构变异是比较有规律的。它们绝大多数都是由酪氨酸残基取代了近连(F8)组氨酸残基或远连(E7)组氨酸残基。可能是,由于酪氨酸残基的酚基所形成的负离子与Fe³⁺结合,使异常血红蛋白中异常链的血红素固定在高铁(Fe³⁺)状态,从而失去结合O₂的能力,造成先天性青紫。HbM Milwaukee的情况略有不同。它是 β -链的Val 67(E11)为一带负电的Glu所取代。虽然这一突变并没有涉及到近连或远连His,但是,由于Glu与 β -链His 63(E7)相距四个氨基酸残基,这在 α -螺旋上大致相当于转一圈,因此,二者所指的方向相同。这样一来,Glu的一COO⁻基就能与血红素中的Fe³⁺形成盐桥,并将远连His挤出血红素空穴(图 10-7)。由于上述结构上的变化,使HbM Milwaukee失去结合O₂的能力,造成先天性青紫。

第二节 细胞色素 c 分子构象与功能的关系^(10-12,14,15)

从酵母到人类,氧化食物分子都需要细胞色素 c。细胞色素 c 与线粒体膜紧密相连,是呼吸链中的一种电子传递体。在生物氧化过程中,来自食物分子的电子,在到达细胞色素系统之后,按下列顺序传递:

细胞色素 b → 细胞色素 c₁ → 细胞色素 c → 细胞色素 a → 细胞色素 a₃ → O₂

b 和 c₁ 以细胞色素还原酶复合体存在; a 和 a₃ 作为一种细胞色素氧化酶。还原酶把电子传给细胞色素 c, 氧化酶从细胞色素 c 接受电子。

从酵母到人类,尽管其细胞色素 c 的一级结构有较大的差异,但是,它们都具有相同的生物功能——在细胞色素还原酶与细胞色素氧化酶之间传递电子。最近,对马心、金枪鱼心,等细胞色素 c 的空间结构进行了测定,发现它们的空间结构是十分相似的。

今以马心细胞色素 c 为例,说明细胞色素 c 的空间结构(图 10-8):

在细胞色素 c 分子的中央,有一个扁平的血红素分子。一条多肽链恰好包围着血红素辅基。1—47 号残基居于血红素的一边; 48—91 号残基居于血红素的另一边; 92—104 号残基又折回,形成罩着血红素顶端的一条带子。整个肽链有四个螺旋段: 1—11 号残基; 89—101 号残基; 50—53 号残基; 63—70 号残基。其中, 1—11 号残基, 89—101 号残基是 α -螺旋。

血红素与蛋白质肽链通过下列方式相连:

肽链中的 Cys 14 和 Cys 17 的巯基 S 分别与血红素的两个乙烯基以硫醚键相连; 在血红素 Fe 原子的一边, His 18 的咪唑基 N 以配位键与 Fe 原子相连; 在血红素 Fe 原子的另一边, Met 80 的甲基 S 以配位键与 Fe 原子相连; Tyr 48 和 Try 59 以氢键与血红素的一个丙酸基相连。

血红素埋藏在疏水的空穴中,只有一边向外暴露。

大多数疏水氨基酸残基埋藏在分子的内部,其中,有不少分布在血红素空穴的周围。大多数亲水氨基酸残基分布在分子的表面。在分子表面的左侧与右侧各有一个由 Lys 残基组成的正电区。这二个正电区被一个负电区所隔开。

由 55—75 号残基构成了一个环状左槽。此槽被强疏水残基的侧链所填充。其中,有三个芳香族残基: Try 59, Tyr 67, Tyr 74。八个带正电荷的 Lys 残基位于左槽的周围。据推测,左槽可能与细胞色素还原酶结合,其芳香族残基可能参与电子传递。

右槽由 1—11 和 89—101 α -螺旋以及 12—20 肽段所构成。槽内有两个芳香族残基: Phe 10 和 Tyr 97(也可能是 Phe)。与左槽一样,槽内亦被疏水残基的侧链所填充。八个带正电荷的 Lys 残基位于右槽的周围。据推测,右槽和正铁血红素空穴可能与细胞色素氧化酶结合,其芳香族残基可能参与电子传递。

从细胞色素 c 空间结构看,几个重要的氨基酸部位恰恰都是被 35 个恒定氨基酸中的成员所占据。例如:与血红素直接相连的 Cys 14、Cys 17、His 18、Tyr 48、Try 59 和 Met 80 都是恒定氨基酸;处于肽链拐弯处的 Pro(30 号、71 号、76 号)和 Gly(29 号、34 号、45 号、77 号、84 号)也是恒定氨基酸。

从酵母到人,其细胞色素 c 中 35 个氨基酸位置为什么保持恒定? 为什么所有的细胞色素 c

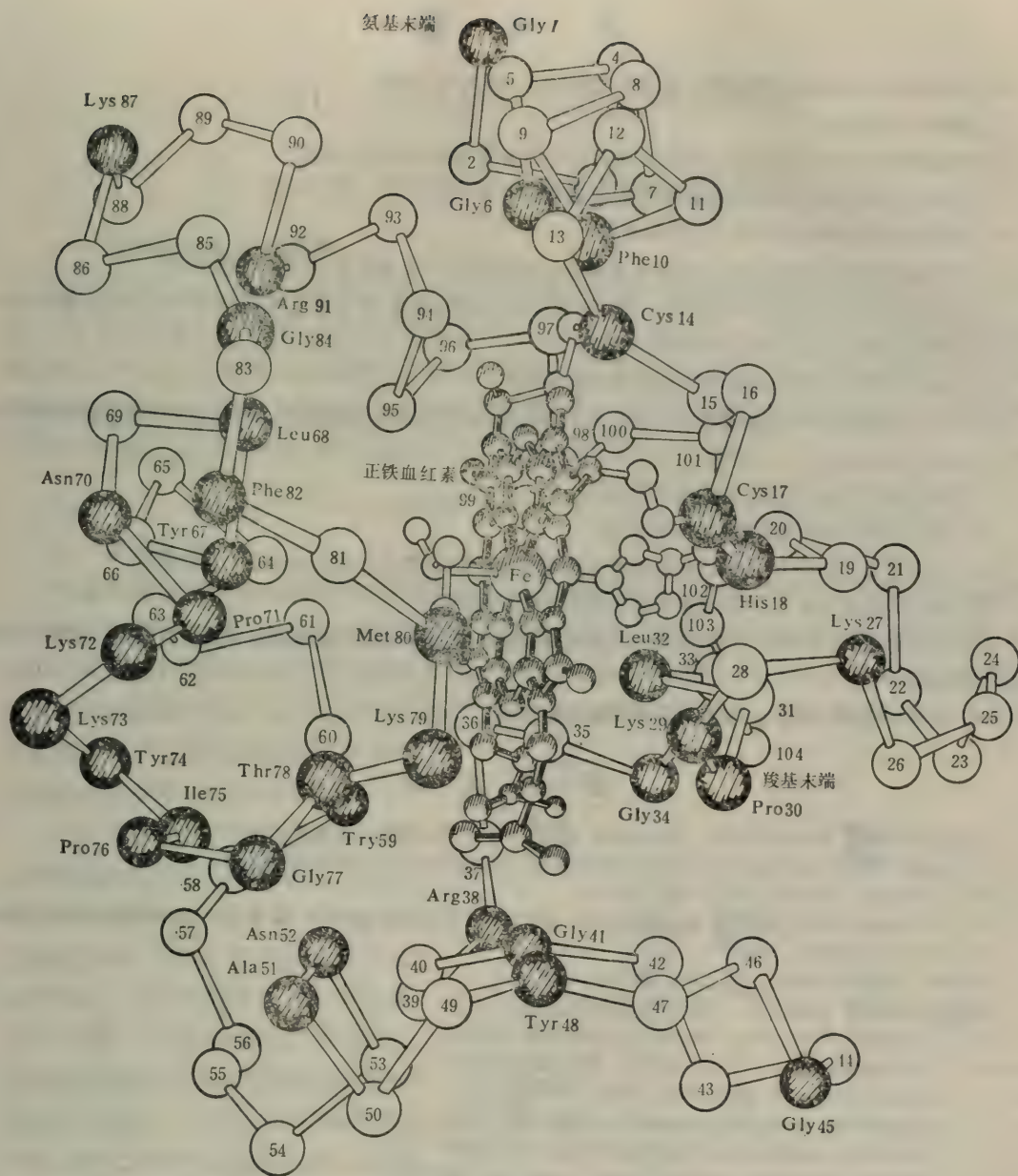


图 10-8 细胞色素 c 分子空间结构

● 恒定氨基酸

都具有相同的功能？这说明，处于这 35 个氨基酸位置的残基，是细胞色素 c 的生物功能所不可缺少的。其中，有的可能参与维持分子构象；有的可能参与电子传递；有的可能参与“识别”与结合细胞色素还原酶与氧化酶。

思 考 题

1. 正常人的血红蛋白有哪几种? 其亚单位组成有何相同与不同?
2. 解释下列名词:
脱氧血红蛋白; 氧合血红蛋白; 氧化血红蛋白; 变构效应; 波尔效应; 分子病。
3. 氧合血红蛋白的S形解离曲线有何生理意义?
4. 以血红蛋白为例, 说明什么是变构效应?
5. 脱氧血红蛋白对O₂的亲合力为什么比该蛋白的单独的 α -亚单位或 β -亚单位低得多?
6. 在脱氧血红蛋白分子中, 为什么 α -亚单位对O₂的亲合力高于 β -亚单位对O₂的亲合力? α -亚单位与O₂结合之后, 为什么能够提高 β -亚单位对O₂的亲合力?
7. 脱氧血红蛋白与氧合血红蛋白的构象有何不同?
8. H⁺、CO₂以及DPG在脱氧血红蛋白分子中的结合部位是什么? 三者对脱氧血红蛋白的氧亲合力有何影响? 在生理上有何意义?
9. 举例说明异常血红蛋白有哪几种类型?
10. 镰刀形红细胞贫血病的发病机理如何?
11. 在血红蛋白分子中, 与血红素有接触的残基若发生置换, 将会产生什么后果? 为什么?
12. 在细胞色素c分子中, 血红素与多肽链的连接情况如何?
13. 在细胞色素c构象中, 几个重要的氨基酸残基部位与35个恒定氨基酸残基位置有何关系? 这种关系说明了什么问题?
14. 在细胞色素c构象中, 左槽与右槽可能有何功能?

参 考 文 献

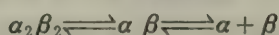
1. D. E. Metzler, *Biochemistry*, Academic Press, New York San Francisco London, 1977
2. L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company San Francisco, 1975
3. M. F. Perutz, *Nature*, 228, 726 (1970)
4. G. H. Haggis, *Introduction to Molecular Biology*, William Clowes & Sons, Limited London, Beckles and Colchester, 1974
5. 秦文斌, *生物科学动态*, 第二期, 第六页, 1978
6. 北京医学院等, *生物化学*, 人民卫生出版社, 1978
7. M. F. Perutz, *Proc. Roy. Soc. (B)*, 173, 113 (1969)
8. J. V. Kilmartin, et al. *Physiol. Rev.* 53, 836 (1973)
9. J. Baldwin, et al., *J. Mol. Biol.* 129, 175 (1979)
10. R. E. Dickerson, *Scientific American*, 226, 58 (1972)
11. F. R. Salemme, *Ann. Rev. Biochem.* 46, 299 (1977)
12. E. T. Adman, *Biochim. Biophys. Acta*, 549, 107 (1979)
13. M. F. Perutz, et al., *Nature (London)*, 219, 29 (1968)
14. D. R. Willians, et al., *An Introduction to Bioinorganic Chemistry*, Charles C Thomas. Publisher, Springfield. Illinois, U. S. A. 1976
15. El-Ichiro Ochiai, *Bioinorganic Chemistry An Introduction*, Allyn and Bacon, Inc. Boston. London. Sydney. Toronto, 1977

第十一章 蛋白质分子相互作用

第一节 蛋白质分子相互作用概述^(1,4,12-14)

一、亚单位的聚合与解离

有些球蛋白分子是由二个或二个以上的相同或不同的亚单位所构成的聚合物。在一定的条件下,这种聚合物可以解离而成单个的亚单位,但在另一种条件下,这些亚单位又能重新聚合成聚合物。例如:巴氏梭菌固氮酶钼铁蛋白分子是由二个相同的 α 亚单位和二个相同的 β 亚单位所构成的四聚体。在较低的蛋白浓度或 pH、离子强度下,这种四聚体可以解离成 α 和 β 亚单位,但在较高的蛋白浓度或 pH、离子强度下,又能够重新聚合成四聚体。



二、分子杂交

在某些具有四级结构的蛋白质分子之间,一种蛋白质分子的亚单位可以与另一种蛋白质分子的亚单位聚合,产生有活性的杂交分子。这就是所谓分子杂交。例如:心肌乳酸脱氢酶分子是由四个相同的 H 亚单位所组成的四聚体 (H_4), 骨骼肌乳酸脱氢酶分子是由四个相同的 M 亚单位所组成的四聚体 (M_4)。这两种酶分子的亚单位结构虽然不同,但是,它们能够按照不同的比例互相聚合,产生有乳酸脱氢酶活性的不同的杂交分子,如图 11-1 所示。

不论来源如何,所有的固氮酶复合物都是由钼铁蛋白和铁蛋白二种组分组成的,能够在常温常压下催化 N_2 还原成 NH_3 。来自不同固氮微生物的固氮酶,虽然都能催化同一种固氮反应,但是,它们的结构不完全相同。现有的实验表明,棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白分子,能够分别与肺炎克氏杆菌、多粘芽孢杆菌、红螺菌等固氮酶

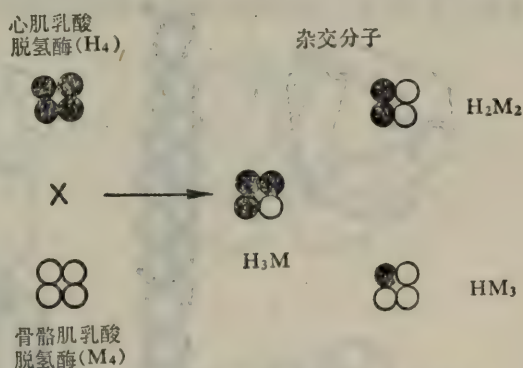
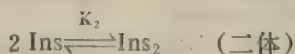


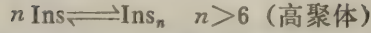
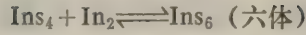
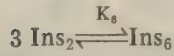
图 11-1 不同乳酸脱氢酶的分子杂交示意图
●: H 亚单位; ○: M 亚单位; ×: 杂交

铁蛋白分子聚合,产生有固氮活性的杂交固氮酶复合物;同样,棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白分子,能够分别与上述固氮菌的固氮酶钼铁蛋白分子聚合,产生有固氮活性的杂交固氮酶复合物。

三、分子聚合

不少蛋白质分子,不论其是否由亚单位组成,都能聚合而成聚合物。例如:胰岛素单体 (Ins) 在溶液中能够发生下列聚合反应:





上述聚合反应与胰岛素的浓度密切相关。浓度越大，则高聚体的数量越多。由单体形成二体的主要结合力有：

(1) 疏水键

在胰岛素单体的表面上，由B链上 Val-12、Tyr-16、Phe-24、Phe-25 和 Tyr-26 的疏水侧链形成了一个疏水面。然后，由两个单体的疏水面结合成一个疏水核(疏水键)。

(2) 氢键

在胰岛素单体中，B链的C-末端肽段是伸展的构象。在两个胰岛素单体的B链C-末端肽段之间，一方的Phe-24的N-H和C=O基分别与另一方的Tyr-26的C=O和N-H基形成二个氢键；一方的Tyr-26的N-H和C=O基分别与另一方的Phe-24的C=O和N-H基形成二个氢键。结果形成了一个反平行的β-折迭构象。

蛋白质亚单位或分子的聚合有各种方式，产生不同形状的聚合体，如：环状、螺旋状、线状、球

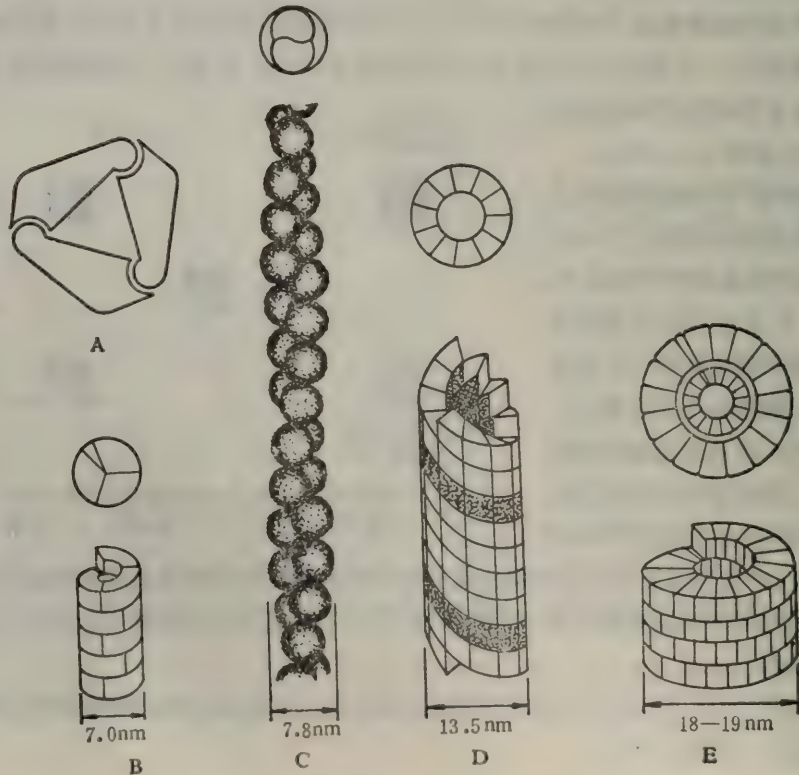


图 11-2 不同形状的蛋白质聚合体

状等。

1. 环状聚合物

有二聚体、三聚体、四聚体、五聚体,等等。聚合物呈环状,有环对称性。例如:图 11-2 A 中的环状三聚体有一个三重轴,每个亚单位旋转 $360^\circ/3$,可以与下一个亚单位重复。

2. 螺旋聚合物

聚合物呈螺旋状,有各种形式。例如:大肠杆菌菌毛是单股的非整数螺旋,每圈含 $3\frac{1}{8}$ 个亚单位,亚单位分子量为 17000,螺距 2.3 nm,孔径 2.0~2.5 nm (图 11-2 B);烟草花叶病毒壳体蛋白也是单股的非整数螺旋,每圈含 16.3 个亚单位,亚单位分子量 17500,螺距 2.5 nm,螺旋长度 300 nm,约由 2200 个亚单位组成(图 11-2 E);细菌鞭毛(图 11-2 D)是五股的整数螺旋,每圈含 11 个亚单位,亚单位分子量 40000,螺距 2.5 nm,孔径 6 nm;肌肉的 F 型肌动蛋白是双股螺旋,每圈含 13 个单体,螺距 70 nm,单体呈球状(图 11-2 C)。

3. 线状聚合物

聚合物呈线状,例如棒状的血纤维蛋白分子按照末端对末端的方式直线聚合,生成细长的聚合物。

4. 球状聚合物

聚合物是空心的球体。小球病毒的蛋白壳体是空心的球体,在电镜下可以看出,它是由许多相同的结构单位(叫壳微体)聚合而成的。这壳微体是否就是亚单位,尚未肯定。图 11-3 是芜菁黄花叶病毒(TYMV)壳体的结构模型。

分子或亚单位之间的聚合不是任意的,其聚合部位必须能相嵌互补。有时,为了满足相嵌互

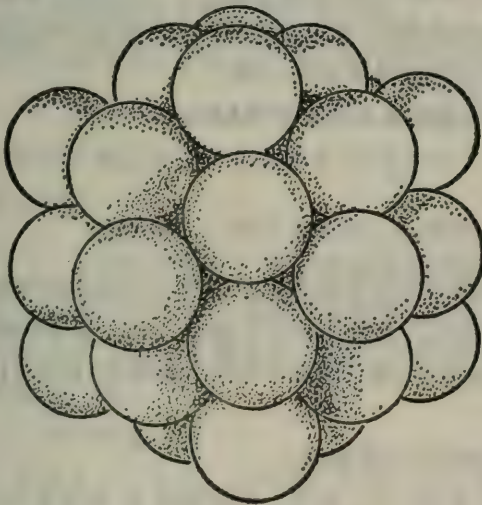


图 11-3 TYMV 壳体的结构模型
病毒壳体含有 32 个相同的球状壳微体,每个壳微体的直径是 7~9 毫微米。

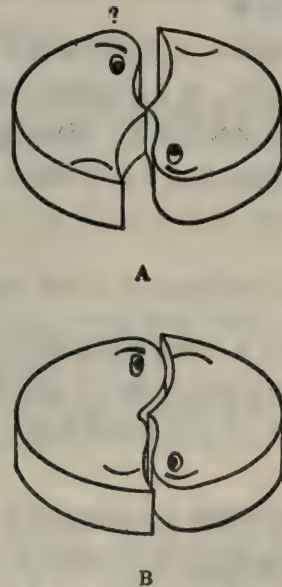


图 11-4 分子之间的相嵌互补示意图
A: 由于在分子的中心不能相嵌互补,结果二分子不能聚合成二聚体; B: 一分子少许改变构象,结果能与另一个分子相嵌互补,生成二聚体。

补,还要引起某种程度的构象变化,如图 11-4 所示。

到目前为止,已知有些蛋白质分子的聚合是与生物功能有关的。例如:肌动蛋白分子的聚合与肌肉收缩有关;血纤维蛋白分子的聚合与血液凝固有关;在胰岛中以六聚体形式存在的胰岛素,可能是为了防止蛋白质水解酶对它的水解作用;乙酰辅酶 A 羧化酶的纤维状聚合体一旦解离成单体(分子量为 410000,由几个亚单位组成),就丧失了酶活性。

四、分子识别

在不同的生物大分子之间,普遍存在着一种专一性结合现象。例如:某抗体只能与诱导该抗体产生的那种抗原相结合;胰岛素与胰岛素受体(一种糖蛋白)专一结合;凝血酶与血纤维蛋白原专一结合,等等。生物大分子之间的这种专一性结合,就是所谓分子识别。分子识别是通过两种蛋白质分子各自的结合部位来实现的。要实现分子识别,就必须具备下列两个条件:

- (1) 在两种蛋白质分子的结合部位之间,其结合部位的微区构象要能够相嵌互补;
- (2) 两个结合部位各有化学基团,能使两种蛋白质分子结合起来。

当这两个条件都具备时,两种蛋白质分子便能专一结合。

五、自装配

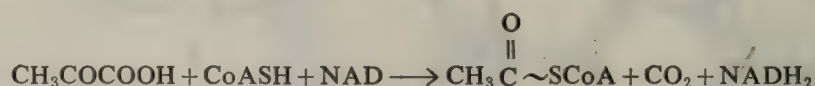
近年来,一些实验表明,烟草花叶病毒和某些细胞器(如:核蛋白体、线粒体、细菌鞭毛)在拆散成蛋白质、核酸等组分之后,在特定的条件下,又能自动装配成具有原有功能的烟草花叶病毒和细胞器碎片。这就是所谓自装配。

自装配的实质就是生物大分子的相互作用,是一种特殊的聚合现象。被拆散的各种生物大分子之所以又能重新装配起来,其物质基础,就是生物大分子之间的分子识别。

六、多酶复合物

在一个代谢途径中,有许多彼此偶联并按照一定顺序进行的化学反应。不同的化学反应是由不同的酶所催化的。为了使这些反应能够更有效的偶联,催化这些反应的许多酶,可以按照一定的排布方式构成多酶复合物。丙酮酸脱氢酶复合物就是其中的一例。

丙酮酸氧化脱羧,生成 1 分子 CO_2 、1 分子乙酰辅酶 A 和 1 分子 NADH_2 。



这个总反应包含了彼此偶联并按照一定顺序进行的三个化学反应。第一个反应是丙酮酸脱羧,由丙酮酸脱羧酶催化;与第一个反应相偶联的第二个反应是转移乙酰基,由二氢硫辛酸乙酰转移酶催化;与第二个反应相偶联的第三个反应是脱氢,由二氢硫辛酸脱氢酶催化,如图 11-5 所示。

在机体中,这三种酶是以丙酮酸脱氢酶复合物的形式存在的。

大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物的分子量大约为 400 万。其中:丙酮酸脱氢酶含有 24 个亚单位,每二个亚单位构成一个二聚体(分子量为 192000),共 12 个二聚体;二氢硫辛酸乙酰转移酶亦含有 24 个亚单位,亚单位的分子量为 70000;二氢硫辛酸脱氢酶含有 12 个亚单位,每二个亚单位构成一个二聚体(分子量为 112000),共六个二聚体。在多酶复合物中,这三种酶分子是

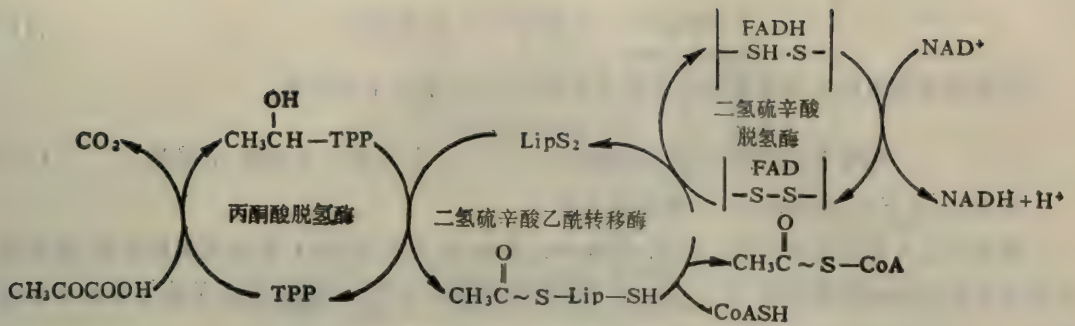


图 11-5 丙酮酸氧化脱羧反应

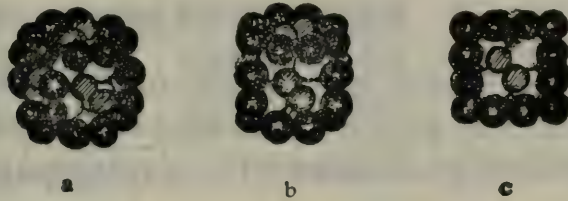


图 11-6 丙酮酸脱氢酶复合物模型

如何排布的？根据电镜研究结果，有人提出图 11-6 所示的模型。

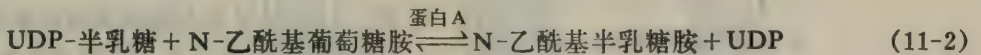
由该图可知，二氢硫辛酸乙酰转移酶的 24 个亚单位聚合而成立方体，作为复合物的核心；丙酮酸脱氢酶的十二个二聚体分布在立方体的每个边缘上；而二氢硫辛酸脱氢酶的六个二聚体位于立方体的每个平面上。该模型还有待于进一步检验与修正。

七、非酶蛋白改变寡聚酶的专一性

乳糖合成酶是由蛋白 A 和蛋白 B 两种组分构成的复合物，可以催化乳糖合成反应：



该酶易分离成蛋白 A 和蛋白 B，二者单独均不能催化上述反应(1)，然而，蛋白 A 可以催化下列反应：

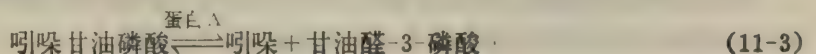


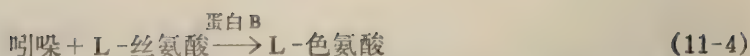
在蛋白 B 的作用之下，蛋白 A 不能催化反应(2)，但能催化反应(1)。

蛋白 B 是一种 α -乳清蛋白，本身无催化功能，但是，当它与蛋白 A 相结合时，可以改变蛋白 A 的底物专一性。

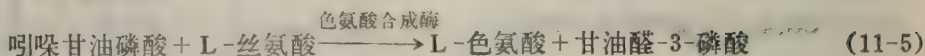
八、双功能寡聚酶

色氨酸合成酶是由二分子蛋白 A 和一分子蛋白 B 所构成的。蛋白 A 的分子量为 29500，含有一个 α -亚单位；蛋白 B 的分子量为 90000，含有二个 β -亚单位。蛋白 A 和蛋白 B 有不同的催化功能，可以分别催化下列反应：





当蛋白A和蛋白B结合而成色氨酸合成酶时,可以催化下列反应:



反应(5)是反应(3)和反应(4)偶联的总反应。

通过蛋白A和蛋白B的相互作用,不仅可以使反应(3)与反应(4)紧密地偶联起来,而且还可以使每个蛋白的酶活性提高30—100倍,有趣的是中间产物——吲哚,并不从酶复合物中释放出来。

第二节 肌肉收缩的分子机理^(1,4,6,7)

肌肉是动物机体执行各种机械运动(例如:四肢运动、心脏跳动、肠胃蠕动,等等)的重要组织,是一种效力极高的能量转换器,能直接将化学能转变成机械能。肌肉运动的基本方式是收缩与舒张交替进行。肌肉收缩所需要的能量来源是ATP。近年来,有关肌肉收缩的分子机理已初步阐明。

一、肌原纤维的结构

肌肉是由许多肌细胞组成的。肌细胞中含有肌纤维(图11-7)。肌纤维是由许多肌原纤维组成的。肌原纤维是骨骼肌收缩的基本结构单位。

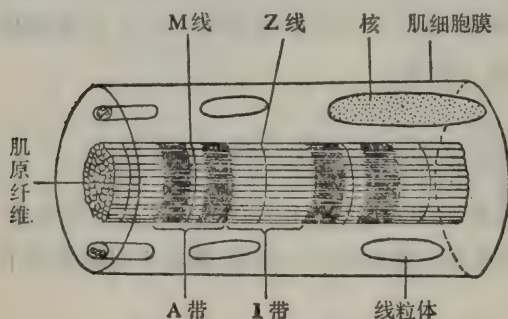


图 11-7 肌细胞模式图

在光学显微镜下,可以看见,每根肌原纤维由几百条较宽的暗带(叫A带)和较窄的明带(叫I带)交替组成。每段I带都被一薄的Z盘(Z线)所平分;而在A带的中央也有一薄的中膜,称之为M线。M线的两边还有狭窄的明带,称之为H区。两条Z线之间的区段,叫肌节。肌节是基本的收缩单位。哺乳动物的肌节,静息时,其长度为2—3微米,最大收缩时,可缩短到1.5微米。Z盘与肌细胞膜相连,可以将许多肌原纤维固定在一起,并保持各条肌原纤维中

的明带与明带并列、暗带与暗带并列,从而形成明暗交替的横纹。

肌原纤维是由粗丝与细丝组成的。粗丝的直径约120—160 Å,长约1.5微米;细丝的直径约80 Å,长约1.0微米。在A带的H区,只有粗丝,粗丝按照六角形排布。在I带,只有细丝,细丝亦按照六角形排布。在H区以外的A带,既有粗丝又有细丝,粗丝与细丝相间排列,形成有规则的双层六角形。由此可见,在肌节中,粗丝横贯整个暗带,而细丝则由Z线起,经过I带,进入A带的一部分(图11-8)。

粗丝与细丝均由蛋白质组成,但所含蛋白质的结构不同,故具有不同的折光性质。粗丝具有双折射现象,故显示暗带;细丝没有双折射现象,故显示明带。

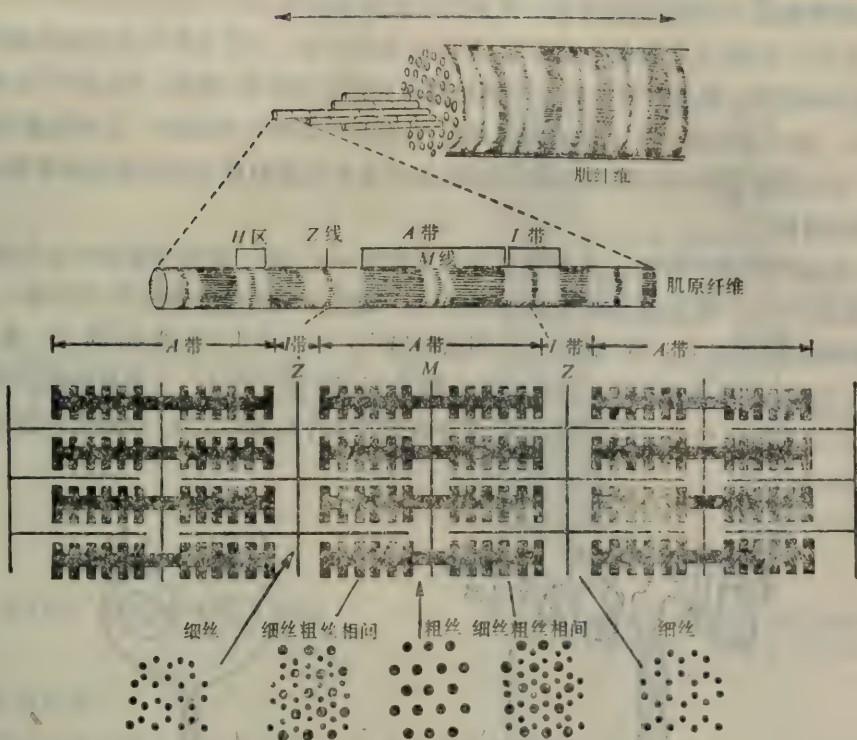


图 11-8 肌原纤维结构示意图

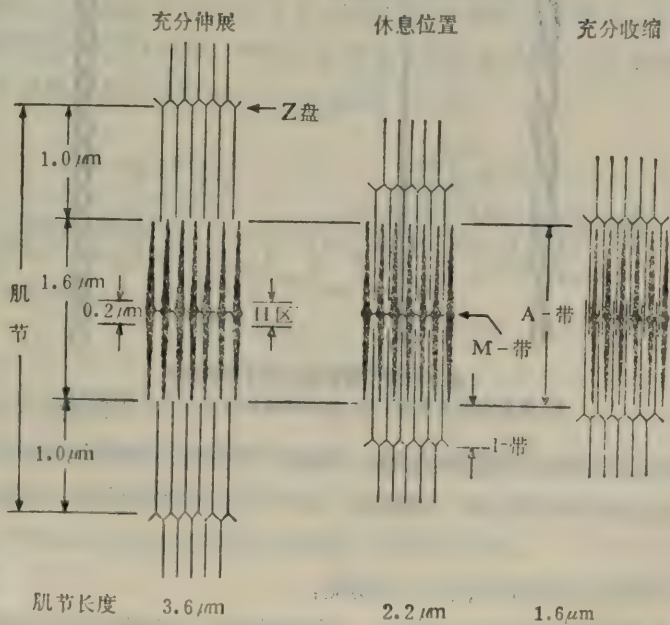


图 11-9 肌肉收缩时肌节的变化及粗丝与细丝的相对位置

肌肉在极度收缩时,其肌节长度比一般休息时的长度缩短 20—25%,而被动拉长时,则为休息状态的 120%。但是,无论收缩还是拉长,A 带的长度不变,只是 I 带和 H 区的长度发生变化。这就是说,肌肉收缩时,肌原纤维的粗丝和细丝的长度都没有改变,但是,它们作了相对滑动,如图 11-9 所示。粗丝和细丝为什么能相对滑动? 它们是怎样相对滑动的? 这些问题现在还没有完全弄清。要知道粗丝与细丝相对滑动的秘密,必须首先弄清粗丝与细丝的结构及其相互关系。

二、粗丝结构

粗丝主要由肌球蛋白组成。肌球蛋白的分子量约 480,000,有两个椭圆形的头部和一条细长的尾部(图 11-10)。整个分子的长度约 1600 Å。该分子由两条重链(又叫 H 链,分子量约 200,000)和四条轻链(又叫 L 链)组成。在四条轻链中,有二条 L_2 链是相同的,其分子量为 18000;而 L_1 链和 L_3 链是不同的,其分子量分别为 16000 和 25000。二条重链的大部分构成双股 α -螺旋,作为肌球蛋白分子的尾部,其余部分分别与 L_1 、 L_2 和 L_2 、 L_3 构成肌球蛋白分子的两个头部(图 11-10)。

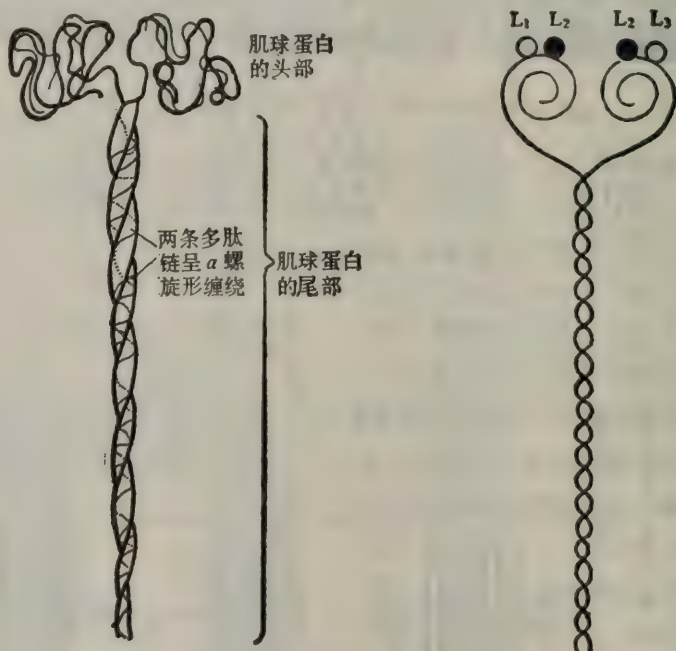


图 11-10 肌球蛋白分子结构简图
左:表示头部与尾部 右:表示四条轻链与二条重链的关系

肌球蛋白分子是怎样聚合而成粗丝的? 现在一般认为,肌球蛋白分子是尾部对尾部地反向排列的,然后,边对边地平行聚合成一束粗丝。分子的头部朝向两端,并露出粗丝的表面(图 11-11)。

肌球蛋白分子的每个头部有下列二种功能:

(1) 有一个肌动蛋白结合部位,可以与一个肌动蛋白分子结合成肌动球蛋白,其结合力可能是静电引力和氢键(图 11-12)。

(2) 有一个 ATP 酶活性部位, 可以结合 ATP, 并催化 ATP 水解反应。水解反应所释放的能量用于肌肉收缩。

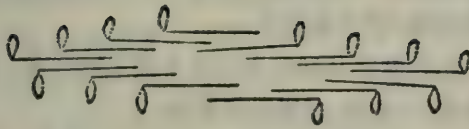


图 11-11 肌球蛋白分子聚合示意图

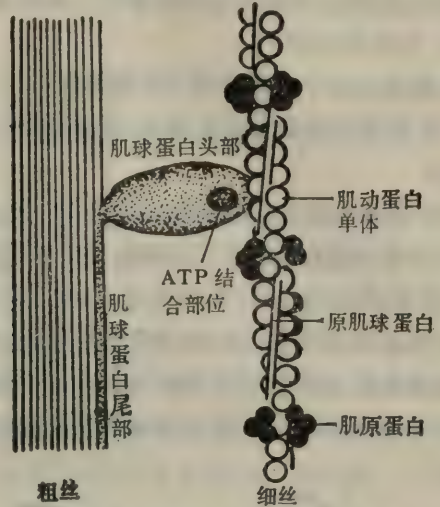


图 11-12 肌球蛋白与肌动蛋白结合示意图
(为了看得清楚, 特意夸大了肌球蛋白头部)

三、细丝结构

组成细丝的蛋白质主要有肌动蛋白、原肌球蛋白和肌原蛋白。其含量之比约为 7:1:1。

1. 肌动蛋白

肌动蛋白是细丝的主要成分。其分子量为 42000, 由一条多肽链组成, 是球状分子。肌动蛋白有球型(G型)和纤维型(F型)两种。球型为分子量 42000 的单体, 在生理条件下, 可以聚合而成纤维型多聚体。此多聚体是双股螺旋(11-2c 和图 11-13)。

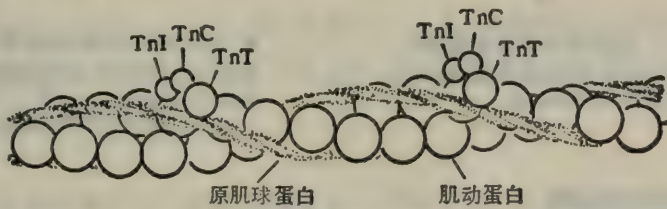


图 11-13 细丝结构

肌动蛋白有下列二种功能:

- (1) 在球型单体的表面, 有肌球蛋白结合部位, 可以与肌球蛋白分子的头部结合而成肌动球蛋白;
- (2) 纤维型肌动蛋白可以提高肌球蛋白头部的 ATP 酶活性。

2. 原肌球蛋白

原肌球蛋白是由两条多肽链构成的双螺旋分子, 分子量为 70, 000, 分子呈棒状, 直径约 20 Å, 长度约 490 Å, 相当于七个球型肌动蛋白单体的长度。原肌球蛋白分子头尾相连, 排列成

串,藏在纤维型肌动蛋白双股螺旋的沟中(图 11-13)。它们在沟中可以移动位置,但仅与两条纤维型肌动蛋白中的一条相接触。每分子原肌球蛋白可以遮蔽七个球型肌动蛋白单体的肌球蛋白结合部位,以阻止肌球蛋白与肌动蛋白的结合。因此,在肌肉收缩中,它是一个重要的调节蛋白。

3. 肌原蛋白(Tn)

肌原蛋白分子包含下列三种亚单位:

(1) 原肌球蛋白结合亚单位(肌原蛋白-T,或 Tn-T),其分子量为 37000,可与原肌球蛋白分子结合;

(2) 抑制亚单位(肌原蛋白-I,或 Tn-I),其分子量为 24000,可以与肌动蛋白结合,以阻止肌动蛋白与肌球蛋白相互作用,同时,还能抑制肌球蛋白的 ATP 酶活性;

(3) 钙结合亚单位(肌原蛋白-C,或 Tn-C),其分子量为 18000,由 158 个氨基酸组成,其中 Glu 和 Asp 残基约占 1/3,因而负电性较强,可以与 Ca^{2+} 结合,是钙受体蛋白。

由此可见,每分子肌原蛋白有两个不同的结合部位。其中,一个部位与一分子原肌球蛋白结合;另一个部位与一分子肌动蛋白单体结合(图 11-14 A)。它也是肌肉收缩的调节蛋白。

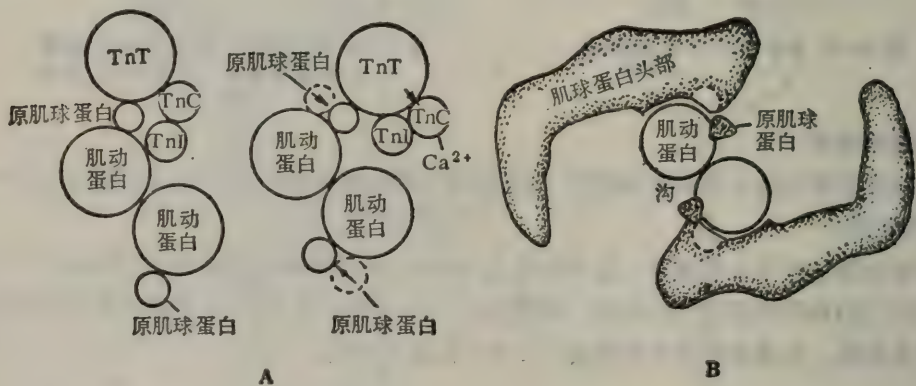
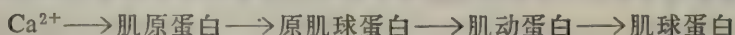


图 11-14 A. 从细丝横切面看肌动蛋白、肌原蛋白三个亚单位与原肌球蛋白之间的排布及 Ca^{2+} 的作用

B. 原肌球蛋白对于肌球蛋白头部与肌动蛋白结合的作用。虚线圆圈表示肌肉松弛时原肌球蛋白的位置;三角形虚线表示肌肉收缩时原肌球蛋白的位置。

四、肌肉收缩的分子机理

实验表明,没有肌球蛋白和肌动蛋白,就没有肌肉收缩。因此,肌球蛋白和肌动蛋白及其相互作用是肌肉收缩的核心。原肌球蛋白和肌原蛋白本身并不参与肌肉收缩,但是它们参与了对肌肉收缩的调节。 Ca^{2+} 也是肌肉收缩的生理调节者。它是通过下列途径控制肌肉收缩的:



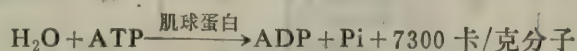
在较高的 Ca 离子浓度下, Ca^{2+} 能够与肌原蛋白的钙离子结合亚单位相结合,引起其构象变化。这种构象变化经过原肌球蛋白传递到肌动蛋白,使肌动蛋白与肌球蛋白结合,从而引起 ATP 水解和肌肉收缩。

当肌细胞处于静止(舒张)状态时,其胞液内的 Ca^{2+} 浓度较低($<10^{-7}M$),TnC 不与 Ca^{2+} 结

合,则 TnC 与 TnI、TnT 的结合比较松散。此时, TnT 与原肌球蛋白紧密结合,使原肌球蛋白遮盖了肌动蛋白与肌球蛋白的结合部位,从而阻止了肌动蛋白与肌球蛋白的结合;同时, TnI 与肌动蛋白紧密结合,从而阻止肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用,并抑制肌球蛋白的 ATP 酶活性。因此,肌肉处于舒张状态。

由此可见,要使肌肉收缩,就必须解除肌原蛋白和原肌球蛋白对肌动球蛋白形成的抑制作用,同时,还要大大提高肌球蛋白的 ATP 酶活性。要实现这两个条件,就必须增加肌细胞胞液内的 Ca^{2+} 浓度。

当胞液内的 Ca^{2+} 浓度增加到 $10^{-7} \sim 10^{-5} M$ 时, Ca^{2+} 便与 TnC 结合。结合后, TnC 的构象发生变化,从而增强了 TnC 与 TnI、TnT 之间的结合力,使三者紧密结合,结果削弱了 Tn-I 与肌动蛋白的结合力,使肌动蛋白与 Tn-I 脱离接触,而变成启动状态(图 11-14A 右)。一个肌动蛋白单体一旦被启动之后,与它连接的原肌球蛋白使其余六个肌动蛋白单体都变成启动状态。与此同时, TnT 使原肌球蛋白移位到肌动蛋白双股螺旋沟的深处,从而排除了肌动蛋白与肌球蛋白相结合的障碍,于是,肌动蛋白便与肌球蛋白的头部相结合,产生具有横桥的肌动球蛋白(图 11-12,图 11-14 B)。在肌动球蛋白中,肌动蛋白使肌球蛋白的 ATP 酶活性大大提高。于是,肌球蛋白催化 ATP 水解反应。



ATP 水解所释放的能量迫使横桥改变角度,于是,细丝沿粗丝滑行。也就是说,肌肉发生收缩。

当胞液内 Ca^{2+} 浓度降低 ($< 10^{-7} M$) 时, Ca^{2+} 与 Tn-C 分离, Tn-I 又与肌动蛋白结合,从而使肌动蛋白恢复静止状态,同时,原肌球蛋白亦恢复原来的位置,从而使肌动蛋白与肌球蛋白不能结合,肌肉即转为舒张状态。

第三节 血液凝固的分子机理^(2,7)

血液在人与动物的正常的心血管中是不凝固的。但是,当血管损伤而血液与创伤组织接触时,或者抽出的血液接触玻璃器皿时,血液即迅速凝固。血凝块封闭伤口,以阻止继续出血。这是人与动物自我保护的一种机能。

一、凝血因子

血液凝固是由许多因素参加的化学连锁反应。其结果是,使溶胶状态的血纤维蛋白原变成了凝胶状态的血纤维蛋白。参加血液凝固的这些因素,统称为凝血因子。一个世纪前,人们就已经知道,血液中含有凝血酶原和血纤维蛋白原。以后,随着蛋白质分离提纯技术的发展,新的凝血因子不断被发现,不同的研究者常常给同一个凝血因子以不同的名称,造成不必要的混乱。1959 年,国际命名委员会根据凝血因子发现的先后次序,统一用罗马数字命名,以避免人为的混乱。现将各种凝血因子列于表 11-1 中。

二、血液凝固的分子机理

血液凝固有两条不同的途径。一条是内源性途径;另一条是外源性途径。这两条途径现在已大体上弄清楚了,如图 11-15 所示。

表 11-1 凝血因子的命名及其部分特性

凝血因子	同 义 名	合成场所	分子 量	肽链种类与 数 目	含糖量 %	血浆浓度 (mg/100 ml)	衍生物	功 能
I	血纤维蛋白原	肝	340,000 (人, 牛)	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	4—5	200—400	血纤维蛋白	形成凝胶
II	凝血酶原	肝	720,000(人) 680,000(牛)	1	8.2 (人)	10—15	凝血酶	蛋白酶
III	组织因子, 组织凝血激酶	各种组织	330,000(牛) 220,000					辅因子
IV	Ca ²⁺							辅因子
V ^①	前加速素	肝	29万—40万		11—18	5—10		辅因子
VII	血清凝血酶原转变加速素 (SPCA)	肝	63,000(人)	1	9.1	0.4—0.7	VII.	蛋白酶
VIII	抗血友病因子	肝为主	110万(人, 牛)	6(相似)	6(人)9(牛)	15—20		辅因子
IX	抗血友病因子 B	肝	57,000(人) 55,400(牛)	1	20.3	3—5	IX.	蛋白酶
X	Stuart 因子	肝	55,000(人, 牛)	2(不同)	10	5—10	X.	蛋白酶
XI	血浆凝血酶激酶原	肝?	16万(人, 牛)	2	12	0.5—0.9	XI.	蛋白酶
XII	接触因子	网状内皮 系统?	9万(人) 89,000(牛)	1	15	0.1—0.5	XII.	蛋白酶
XIII	血纤维蛋白稳定因子 激肽释放酶原 ^②	肝? 血小板?	32万(血浆) 107,000(人) 90,000(牛)	$\alpha_2\beta_2$	5	1—2	XIII.	形成桥键
	高分子量激肽原 ^②	肝	76,000	1	12.6	1—2	激肽释放酶	蛋白酶

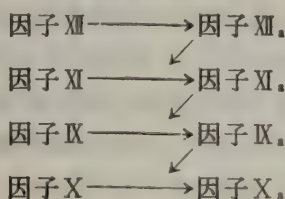
① 因子VI为因子V的衍生物, 属同一因子。② 发现较晚, 尚未用罗马数字统一命名。

内源性途径与外源性途径之间的区别, 就在于, 对因子X激活的途径不同:

(一) 内源性途径:

当心血管内膜受损(如: 动脉粥样硬化、心内膜炎、血栓性静脉炎等), 或血液抽出体外而接触异物(如: 玻璃、陶土、棉纱, 等)表面时, 血液凝固便按照内源性途径进行。导致因子X激活的途径是:

- (1) 表面(高分子量激肽原、玻璃等)
- (2) 激肽释放酶
- (3) 因子 XII.
- (4) 血纤维蛋白溶酶



由此可见, 参加内源性凝血途径的, 只是血浆的各种凝血因子。

(二) 外源性途径:

当机体组织受损而释放组织因子时, 血液凝固便按照外源性途径进行。导致因子X激活的途径是:

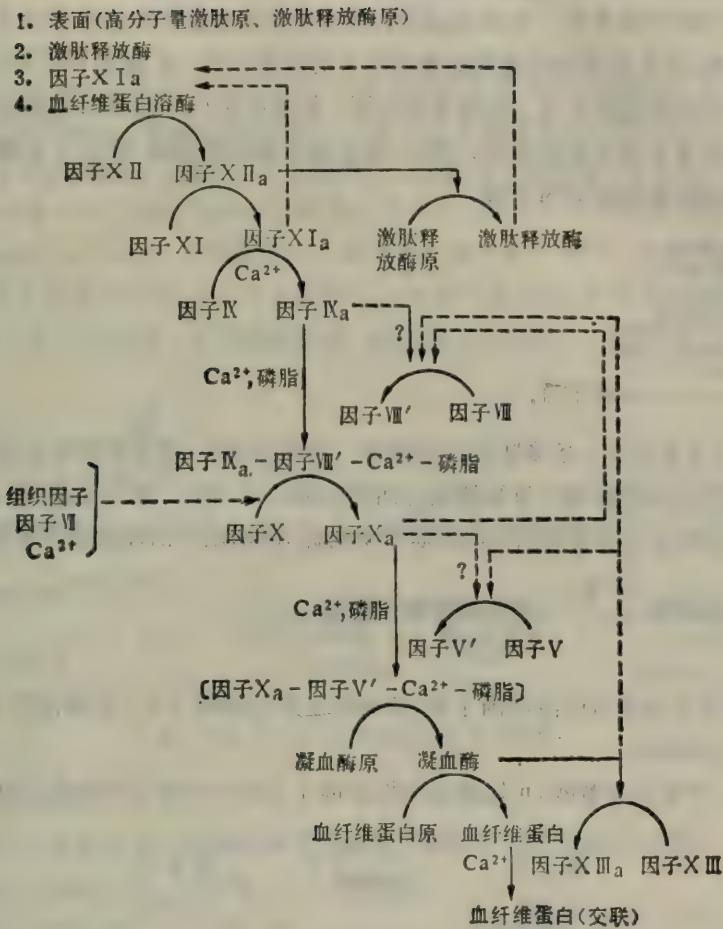
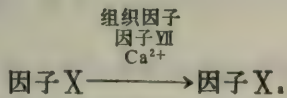


图 11-15 在哺乳动物血浆中血液凝固的推测性机理

〔注〕 因子V'即因子V。



由此可见,参加外源性凝血途径的,不仅有血浆的凝血因子,而且还有组织因子。

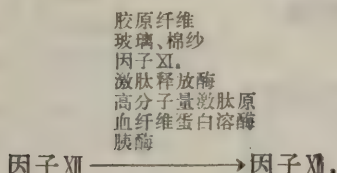
内源性途径与外源性途径的共同点是,从因子X_a到不溶的血纤维蛋白多聚体,二者具有完全相同的反应步骤。

根据内源性凝血过程各反应的特点,把内源性凝血过程分为三个阶段。这就是:接触活化阶段;磷脂胶粒反应阶段;凝胶生成阶段。

1. 接触活化阶段

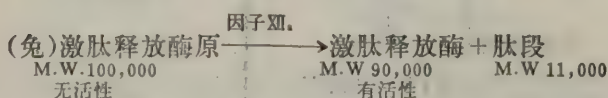
(一) 因子 XII 的激活

内源性凝血的触发,是从因子 XII 的激活开始的。实验证明,玻璃、棉纱、陶土,等表面带负电荷的物质都可以激活因子 XII。如果将这些物质表面的负电荷中和或转变成正电荷,则其激活作用丧失。在体内,由于血管内皮损伤而暴露出来的胶原纤维,是富含 Glu 和 Asp 的带负电荷的蛋白质。它也可以激活因子 XII。体内实验表明,如果把其 Glu 和 Asp 的侧链羧基酯化,则胶原纤维对因子 XII 基本上没有激活作用。此外,因子 XI、激肽释放酶、高分子量激肽原、血纤维蛋白溶酶、胰酶等,也能激活因子 XII。



人、牛、的因子 XII 是具有一条多肽链的糖蛋白。在激活前后,没有发现其分子量的变化。上述各种因子是如何将无活性的因子 XII 激活成有活性的因子 XII_a 的? 这个问题现在尚未解决。

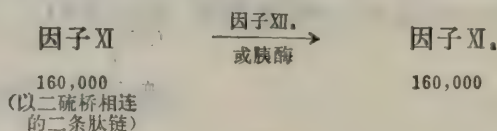
有活性的因子 XII_a, 可以将无活性的激肽释放酶原, 激活成有活性的激肽释放酶。



激肽释放酶反过来也可以激活因子 XII, 从而产生大量的因子 XII_a。其激活能力大于胶原纤维。

(二) 因子 XI 的激活

因子 XII_a 是一种蛋白水解酶, 可以将无活性的因子 XI 激活成有活性的因子 XI_a。



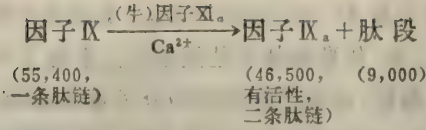
经巯基乙醇还原后, 作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 因子 XI 的分子量为 160,000, 但是, 因子 XI_a 被分离成分子量为 80,000、50,000 和 30,000 的三种肽段。由此可见, 因子 XII_a 对因子 XI 进行了肽键裂解, 但是, 裂解的肽链部位, 现在尚未弄清。

2. 磷脂胶粒反应阶段

因子 XI_a 生成以后, 直到凝血酶生成为止, 这一系列的反应均在血小板磷脂胶粒表面上进行。故称此阶段为磷脂胶粒反应阶段。血小板磷脂胶粒, 实际上乃是血小板膜上的脂蛋白。当血小板发生粘着、聚集后, 其脂蛋白颗粒便成为这一凝血阶段的反应场所。由于大量的因子 IX、VIII、X、V、II 集中于磷脂胶粒表面, 故反应速度大大提高。

(一) 因子 IX 的激活

因子 XI_a 是一种蛋白水解酶, 在 Ca²⁺ 存在下, 能将无活性的因子 IX 激活成有活性的因子 IX_a。



据 1974 年 Fujikawa 等人揭示,因子 XI_a 对因子 IX 的激活,分两步进行。第一步,从因子 IX 肽链的 N-末端区段裂解一个肽链(Arg-Ala),产生一个无活性中间产物。此中间产物的分子量与因子 IX 的分子量相同,但是,它不再是一条肽链了,而是由一条轻链(分子量 16,600)和一条重链(分子量 38,800)借一个二硫桥连接而成的蛋白质分子。第二步,从中间产物重链的 N-末端区段,再裂解一个肽键(Arg-Val),从而释放出一条肽段(分子量 9,000);得到有活性的因子 IX_a。因子 IX_a 是一种分子量为 46,500 的蛋白水解酶。它含有一条轻链(分子量 16,600)和一条重链(分子量 27,000)。此二链仍以一个二硫桥连接,如图 11-16 所示。

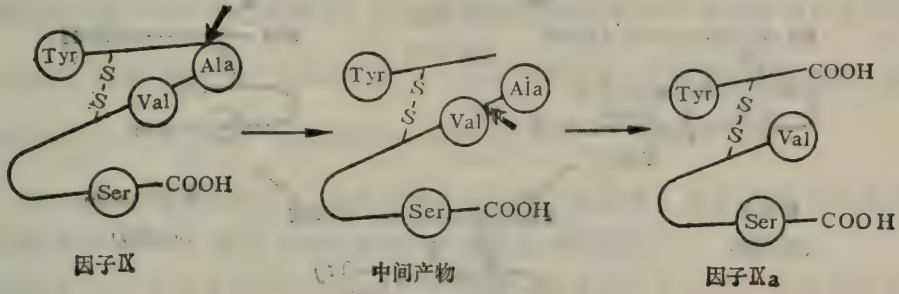


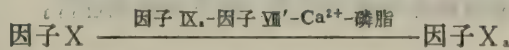
图 11-16 牛因子 XI_a 激活牛因子 IX 的机理

(二) 因子 X 的激活

把无活性的因子 X 激活成有活性的因子 X_a, 有下列四个不同的激活系统:

- (i) 内源性途径的因子 IX_a、因子 VIII、Ca²⁺ 与磷脂;
- (ii) 外源性途径的组织因子与因子 VII;
- (iii) 胰蛋白酶;
- (iv) Russell's 蝮蛇毒液中的 RVV-X(一种蛋白酶)。

实验表明,因子 IX_a 与因子 VIII'、Ca²⁺ 和磷脂可以生成复合物——因子 IX_a-因子 VIII'-Ca²⁺-磷脂。此复合物催化因子 X 的激活反应。



需要指出的是:因子 VIII 是不能参加上述激活反应的,必须激活成因子 VIII' 之后,才能参加。因子 VIII 的激活反应可以由因子 IX_a 或因子 X_a 或凝血酶催化。其激活机理现在尚未弄清。

关于因子 X 的激活机理,现在已初步弄清。无论采用何种激活系统激活因子 X,反应均按两步进行,所得产物相同。

因子 X 是分子量为 55,100 的糖蛋白。它有一条重链和一条轻链。二链通过一个二硫桥相连。反应的第一步,裂解部位是因子 X 重链上 Arg 51 与 Ile 52 之间的肽键,释放出分子量 9,490

的激活肽,得到了有活性的分子量 45,300 的因子 X_{aa}。此活性产物仍含有以二硫桥相连的一条重链和一条轻链。反应的第二步,其裂解部位是因子 X_{aa} 重链上 Arg 290 与 Gly 291 之间的肽键,释放出分子量 2,700 的降解肽,得到了有活性的分子量 42,600 的因子 X_{aβ}(X_a)。此产物的活性与因子 X_{aa} 的活性相同,但是,其分子量减小了 2,700。可见降解肽与活性无关。如果第一步反应,裂解部位不是 X 重链的 Arg 51-Ile 52 肽键,而是重链的 Arg 290-Gly 291 肽键,则中间产物——因子 X_β(分子量 52,400)没有活性。此产物经第二步裂解(裂解部位是因子 X_β 重链的 Arg 51-Ile 52 肽键),也得到有活性的因子 X_{aβ},如图 11-17 所示。

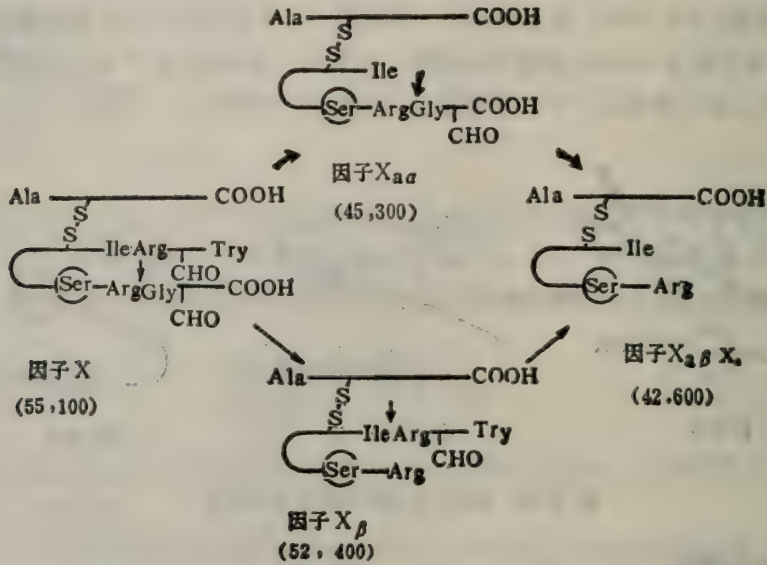


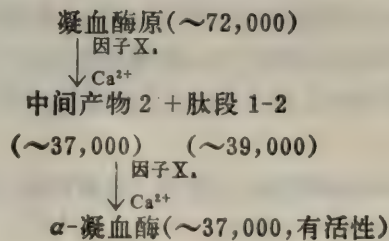
图 11-17 牛因子 X 的激活机理

(三) 凝血酶原的激活

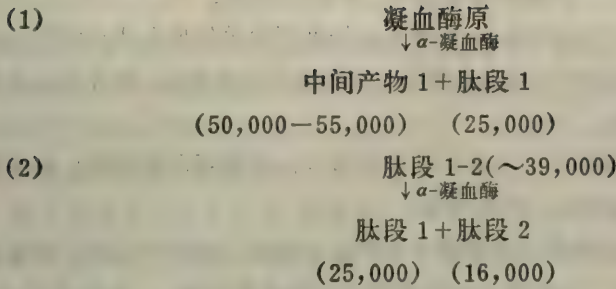
因子 X_a 是一种蛋白水解酶,可催化凝血酶原转化成凝血酶。此反应的速度,可以由于因子 V_a 与 Ca²⁺、磷脂的共同存在,而提高 1600 倍。实验表明,因子 X_a 能够与因子 V_a、Ca²⁺、磷脂生成复合物——[因子 X_a-因子 V_a-Ca²⁺-磷脂]。此复合物叫凝血酶原酶。它能比因子 V_a 更有效地催化凝血酶原的激活反应。

在因子 X_a 的催化下,凝血酶原的激活反应,按下列路线进行:

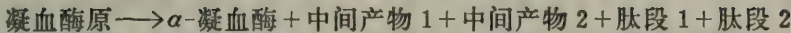
A. 开始的路线:



B. 后来的路线:



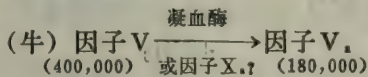
总反应:



现在,凝血酶原的激活机理已得到部分阐明。凝血酶原分子含有一条肽链,12个二硫桥,82个氨基酸残基。其一级结构已经确定。因子X₁对凝血酶原激活时,其裂解部位是Arg-Thr_{274 275}和Arg-Ile_{323 324}的肽键,从而,除去了一个肽段(Ala—Arg)_{1 274},得到了一个有活性的凝血酶。此酶分子含有一条轻链(Thr—Arg)_{275 323}和一条重链(Ile—Ser)_{324 582}。

因子V₁为什么能大大提高因子X₁对凝血酶原的激活反应速度?这个问题现在还没有解决。现有的实验表明,因子V₁能阻止抗凝血酶III对因子X₁的钝化。

血浆中的因子V₁只有经过凝血酶或因子X₁的修饰而变成因子V₁之后,才能参与因子X₁对凝血酶原的激活作用。



3. 凝胶生成阶段

生成的凝血酶脱离磷脂胶粒,催化血纤维蛋白原转化成血纤维蛋白。

血纤维蛋白原是由三对不同的多肽链借二硫桥连接而成的纤维状蛋白质。这三对多肽链分别称为 α 、 β 、 γ 链(图11-18)。 α 、 β 、 γ 链的分子量分别为63,500、56,000、47,000。因而,血纤维蛋白原($\alpha_2\beta_2\gamma_2$)的分子量为340,000。

在凝血酶的作用下,首先,从血纤维蛋白原 α 链的N-末端区段,切下小分子酸性多肽(A肽),然后,从 β 链的N-末端区段,切下小分子酸性多肽(B肽)。裂解的部位是Arg-Gly肽键。

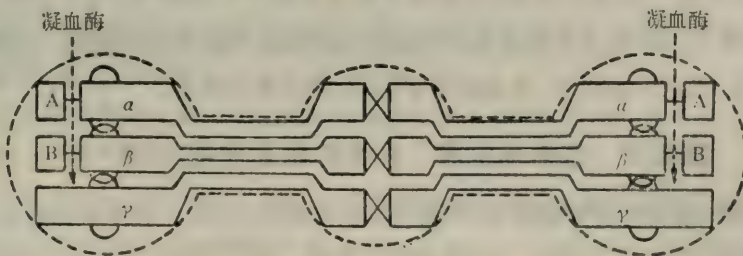
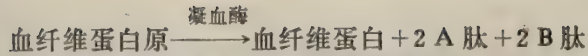


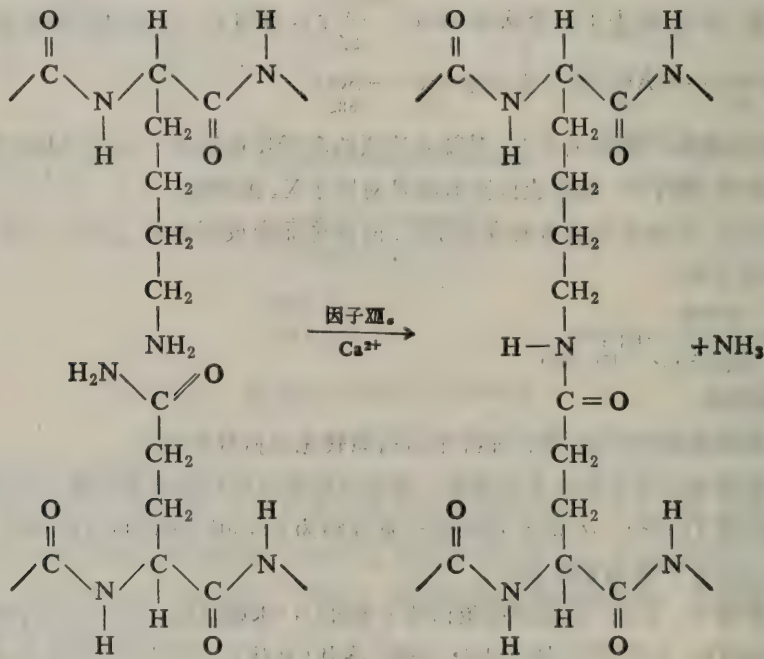
图 11-18 血纤维蛋白原的分子模型



酸性多肽的释放,使血纤维蛋白的负电性减小,有利于血纤维蛋白单体聚合成纤维蛋白多聚体。血纤维蛋白单体,不仅以末端对末端的方式直线聚合,生成细长的多聚体,而且还以边对边的方式侧面聚合,使细长的多聚体加宽。

血纤维蛋白单体借氢键、疏水键、范德华引力聚合而成可溶性血纤维蛋白多聚体。此多聚体可溶于稀酸、6 M 脲,易被血纤维蛋白溶酶(纤溶酶)水解。

因子Ⅻ在催化可溶性血纤维蛋白多聚体转化成脲不溶性血纤维蛋白多聚体方面,起重要作用。因子Ⅻ本身无催化活性。它在因子Ⅹ_a或凝血酶的催化下转变成因子Ⅻ_a。在因子Ⅻ_a的催化下,可溶性血纤维蛋白多聚体中的单体之间发生了交联,从而转化成脲不溶性血纤维蛋白多聚体。目前已知,交联键发生在γ-与γ-链、α-与α-链之间的谷氨酰胺残基和赖氨酸残基之间。即赖氨酸残基的ε-氨基与谷氨酰胺残基的γ-酰胺基之间生成了酰胺键。



由许多脲不溶性血纤维蛋白多聚体所形成的血纤维蛋白细丝交织成网, 包罗红细胞、白细胞、血小板和血浆,形成了血凝块,从而封闭了伤口,阻止继续出血。

第四节 抗体与抗原、补体的相互作用(2,3,6,-11)

当异种蛋白质(称为外源物或异物)注射到人或动物的体内时,机体的免疫系统(如浆细胞)便产生相应的球蛋白,并与之结合,以消除异物的毒害。此反应称为免疫反应;此异物便是抗原;此球蛋白便是抗体。实际上能刺激机体免疫系统产生特异性免疫反应的物质,不仅有蛋白质,还

有核酸、多糖、病毒、细菌等异物。不过,具有良好抗原性的物质,大多是蛋白质,但并非所有的蛋白质都具有抗原性,如白明胶就没有抗原性。抗体是由于抗原刺激机体免疫系统所产生的具有免疫特性的球蛋白,故又称为免疫球蛋白,简称Ig。抗体与抗原的结合,不是任意的,而是有选择性的。抗体只能与刺激机体免疫系统产生该抗体的抗原相结合,而生成抗原-抗体复合物(又称为免疫复合物)。抗原-抗体复合物的本身并不构成对入侵抗原的杀伤。抗体只是“识别并逮捕”抗原,“杀伤”抗原的则是补体。

从人血浆蛋白的电泳图谱来看,绝大多数的抗体出现在 γ -球蛋白区带,少数的抗体出现在 β -球蛋白区带。 γ -球蛋白部分几乎全是抗体。据估计,一个人的血浆中可能含有千百种抗体。所有的抗体都有共同的结构单位——四链单位,如图11-19所示。

在四链单位中,有两条相同的重链(又叫H链,分子量50,000~70,000,大约由450多个氨基酸残基

所组成),两条相同的轻链(又叫L链,分子量22,000~23,000,由210~230个氨基酸残基所组成)。重链与重链以及重链与轻链之间均以二硫桥相连。不论是重链还是轻链,都可以分成两个区域(图11-19):

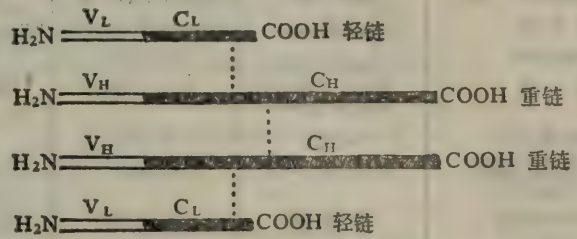


图 11-19 抗体四链单位示意图

V_L: 轻链的变区; V_H: 重链的变区; C_L: 轻链的恒区; C_H: 重链的恒区; ...: 链间二硫桥

从多肽链的N-末端算起,占轻链的 $\frac{1}{2}$ 或重链的 $\frac{1}{4}$ 部分,叫做变区(V区)。在同类抗体的不同分子的变区当中,其氨基酸排列顺序的变动较大。从多肽链的C-末端算起,占轻链的 $\frac{1}{2}$ 或重链的 $\frac{3}{4}$ 部分,叫做恒区(C区)。在同类抗体的不同分子的恒区当中,其氨基酸排列顺序的变动很小。

根据重链恒区抗原性的不同(即氨基酸排列顺序的不同),可以将重链分成五大类: γ 、 α 、 μ 、 δ 、 ϵ 。根据重链的不同,将抗体分成IgG、IgA、IgM、IgD、IgE五大类。在同类抗体重链的恒区中,又因为氨基酸排列顺序的较小变动,而使恒区内的一定肽段有不同的抗原性。故重链还可以进一步分为亚类。 γ -链可以分成 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 四个亚类;与其相应的IgG可以分成IgG 1、IgG 2、IgG 3、IgG 4四个亚类。 α -链有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 两个亚类,与其相应的IgA也有IgA 1和IgA 2两个亚类。 μ -链有 $\mu 1$ 和 $\mu 2$ 两个亚类,与其相应的IgM也有IgM 1和IgM 2两个亚类。对IgD和IgE的亚类数字,目前还不清楚。

根据轻链恒区抗原性的不同,可以将轻链分成 κ 和 λ 两型;与其对应的每一类抗体可分成 κ 型和 λ 型两大型,如表11-2所示。

五类抗体有不同的生物学活性。IgG、IgM和IgA有抗感染(细菌、病毒和毒素)的作用;IgE与变态反应有关;IgD的功能尚在研究当中。

一、IgG和IgM的结构

表 11-2 人免疫球蛋白的物化和生物学特性

性 质	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
分子量	150,000	(160,000) _n	950,000	175,000	190,000
沉降常数(S ₂₀)	6.6S	7S, 9S, 11S, 14S	19S	7S	8S
重链种类	γ	α	μ	δ	ϵ
轻链种类	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ	κ 或 λ
常见的分子形式	单 体	单体、二聚体,等	五聚体	单 体	单 体
分子式	$\kappa_2\gamma_2$ 或 $\lambda_2\gamma_2$	$(\kappa_2\alpha_2)_n$ 或 $(\lambda_2\alpha_2)_n$	$(\kappa_2\mu_2)_5$ 或 $(\lambda_2\mu_2)_5$	$\kappa_2\delta_2$ 或 $\lambda_2\delta_2$	$\kappa_2\epsilon_2$ 或 $\lambda_2\epsilon_2$
重链亚类	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4$	α_1, α_2	μ_1, μ_2	—	—
亚 类	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,	IgA1, IgG2	IgM1, IgM2	—	—
糖含量(%)	2~3	7~11	9~12	9~11	12
正常血清浓度 (mg/ml)	9, 3, 1, 0.5	3, 0.5	1.5	0.03	0.0003
病变蛋白血	骨髓瘤	骨髓瘤	巨球蛋白血	骨髓瘤	骨髓瘤
与补体结合	IgG1, IgG2, IgG3	—	大多数的 IgM2	?	—
激活补体第二通路	IgG4	IgA1, IgA2	—	?	IgE
抗体价	2	2	5 或 10	?	?
血清学性质	沉淀; 毒素中和	沉淀; 病毒中和	凝集; 血球凝集; 溶血; 病毒中和	病毒中和	未测定
受束缚的细胞	巨噬细胞	—	—	?	肥大细胞
通过胎盘	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

由于抗体是所有蛋白质中最不均一的一类蛋白质,故分离提纯非常困难。不少抗体至今尚未得到均一制剂,以致于一级结构与空间结构不能测定。IgG 已得到提纯,其一级结构与空间结构已经基本弄清。

1. IgG 的结构

IgG 占人血清抗体总量的 70~80%,是最重要的一类抗体。其分子量为 150,000,有两条相同的重链和两条相同的轻链。H 链含有 446 个氨基酸残基,分子量为 50,000,有四个功能区(同源区、环形区)。每个功能区都有一个由二硫桥封闭的环。整个 H 链分为变区(V 区)和恒区(C 区)。其变区:氨基酸残基的顺序有变化;大约含有 110 个氨基酸残基,占 $\frac{1}{4}$ H 链;有一个功能区(V_H)。其恒区:氨基酸残基的顺序基本上不变;占 $\frac{3}{4}$ H 链;可以分成三个功能区(C γ 1、C γ 2、C γ 3),其中,C γ 2 区能结合补体与糖成分。两条 H 链之间有两个二硫桥连接。L 链含有 214 个氨基酸残基,分子量 24,000,有两个功能区。整个 L 链也分成变区(V 区)和恒区(C 区)。其变区:氨基酸残基的顺序有变化;大约含有 110 个氨基酸残基,占 $\frac{1}{2}$ L 链;有一个功能区(V_L区)。其恒区:氨基酸残基的顺序基本上不变;占 $\frac{1}{2}$ L 链;有一个功能区(C_L)。

L 链的 C-末端区段与 H 链的 C 区有二硫桥相连。H 链的 V 区(V_H)与 L 链的 V 区(V_L)互相结合,构成半个 IgG 分子的 V 区。此 V 区含有抗原结合部位,可以与一个抗原分子结合。每个 IgG

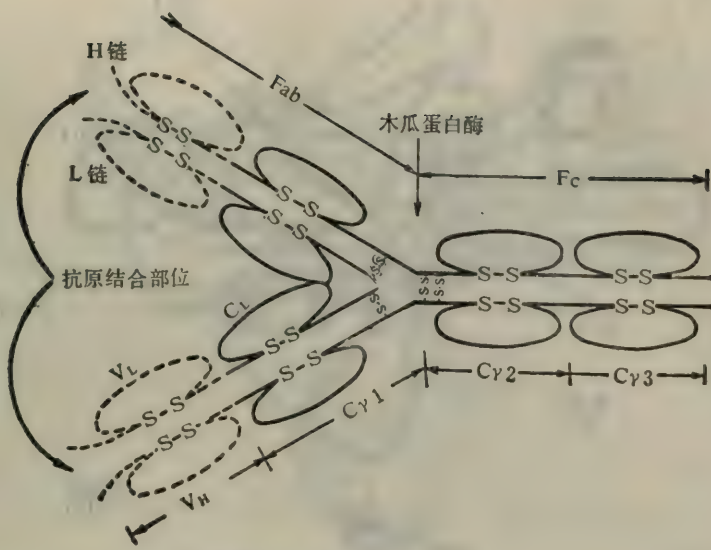


图 11-20 人 IgG 的线状多肽链结构

分子有两个同样的抗原结合部位,可以结合两个相同的抗原分子(双价),如图 11-20 所示。

木瓜蛋白酶能够将 IgG“切”成三段。其中,相同的两段含有全部的 L 链和 H 链的 V_H 与 $C_{\gamma 1}$, 能够与抗原分子结合,故称之为抗原结合片段,用 Fab 表示; 另一个片段与 Fab 不同,具有激活补体等生物学活性,易于结晶,故称之为可结晶片段,用 Fc 表示,如图 11-20 所示。

最近,用 X-光衍射法已经阐明了 IgG 分子的空间结构,其所有的功能区都有十分相似的空间结构,如图 11-21 所示。

对任何一个功能区而言,肽链折迭,形成七个大体上线性的肽段,依次为 $f_x 1, f_x 2, f_y 1, f_x 3, f_x 4, f_y 2, f_y 3$ 。由 $f_x 1, f_x 2, f_x 3$ 和 $f_x 4$ 四条肽段构成了一个反平行的 β -折迭片层。此 β -折迭片层叫四链层(平面 X)。由 $f_y 1, f_y 2$ 和 $f_y 3$ 三条肽段构成了另一个反平行的 β -折迭片层。此 β -折迭片层叫三链层(平面 Y)。四链层与三链层大体上是平行的,并以一个二硫桥相连。疏水侧链分布在二硫桥的两边,充满夹层空间。 β -折迭片层以外的肽段是 $b 1, b 2, b 3, b 4, b 5, b 6$ 。它们形成 β -转角、螺旋和其它构象。 V 功能区和 C 功能区的不同点表现在上述六个肽段的某些部位,特别是 V 功能区的 $b 3$ 肽段有一个额外的环 (E) (见图 11-21 中的黑线)。

各个功能区在结构上的相互关系如图 11-22 所示。

V_L 与 V_H 通过平面 Y 互相结合,在一端的表面上,产生了一个大小为 $15 \times 6 \times 6 \text{ \AA}$ 的裂隙。此裂隙分别由 H 链 V 区和 L 链 V 区中的三个高变区 (H 链的 31—37, 51—68, 101—110; L 链的 29—34, 50—56, 91—97) 所构成(即由 $b 2, E$ 和 $b 6$ 三肽段中的特定部位所构成的),是抗原结合部位。抗体对不同抗原的选择性,就是由上述高变区中的氨基酸顺序所决定的。

C_L 与 $C_{\gamma 1}$ 通过平面 X 互相结合。 $C_{\gamma 3}$ 与 $C_{\gamma 3}$ 的结合也是如此。 $C_{\gamma 2}$ 与 $C_{\gamma 2}$ 并不彼此结合,但是,每一个 $C_{\gamma 2}$ 与 $C_{\gamma 3}$ 纵向结合,结果,Fc 有一个对称的双折迭旋转轴。这种纵向结合非

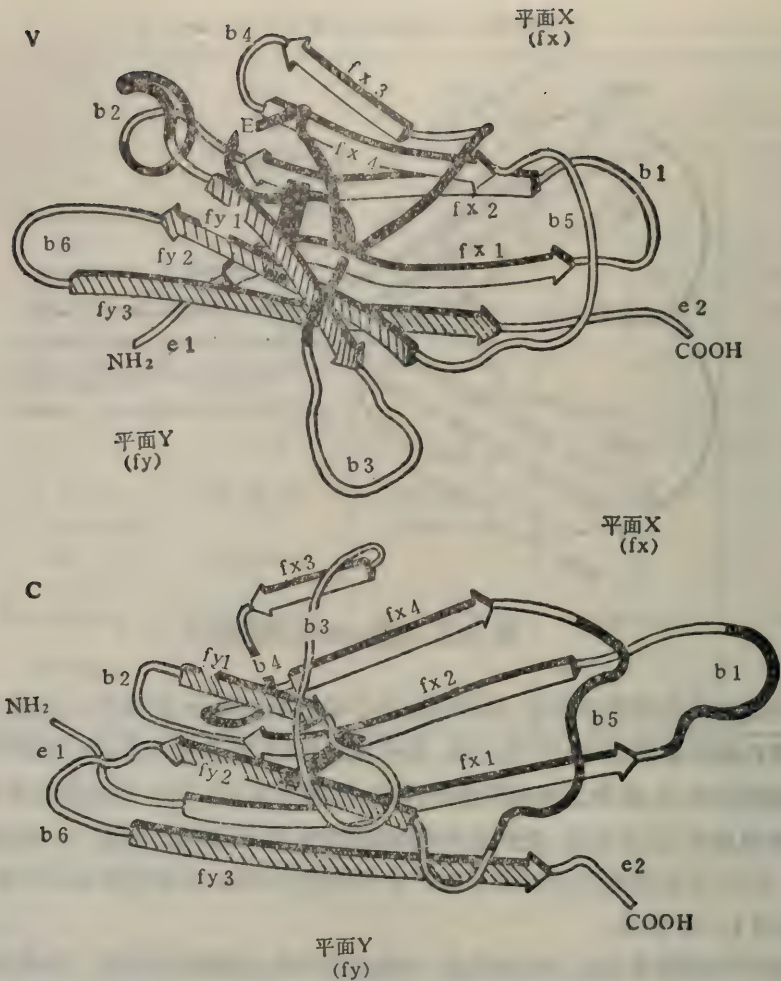


图 11-21 IgG 分子中 V 功能区 and C 功能区的构象——表示 V 功能区与 C 功能区的结构差异

常类似于 Fab 晶体中 V_H 与 $C\gamma 1$ 之间的结合，主要包括 V_H 和 $G\gamma 2$ 底部的 b1、b5 以及 $C\gamma 1$ 和 $C\gamma 3$ 顶部的 b2、b6。

2. IgM 的结构

人 IgM 是血浆中另一类重要的抗体分子，分子量为 950,000，称为巨球蛋白。它是由五个 IgM 单体和一条 J 链组成的环形五聚体。其中，单体与单体之间以二硫桥相连，如图 11-23 所示。

与 IgG 的四链结构一样，在 IgM 五聚体中，每个单体均由一对重链 (μ 链) 和一对轻链构成，肽链之间均由二硫桥相连，每条肽链均分成变区和恒区，每个变区均含一个功能区 (V_L 或 V_H)，每条轻链的恒区均含一个功能区 (C_L)，每一对变区 (V_L 与 V_H) 都有一个抗原结合部位，可以结合一个抗原分子。所不同的是：每条重链恒区的功能区数目，不是三个，而是四个 ($C\mu 1$ 、 $C\mu 2$ 、 $C\mu 3$ 、 $C\mu 4$)；补体的结合部位主要位于 $C\mu'3$ 功能区；一条 J 链可能通过一对 μ 链的 C-末端半胱氨酸

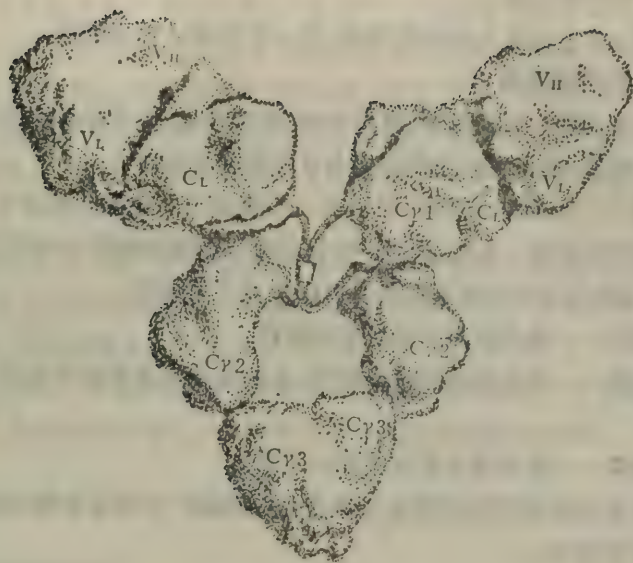


图 11-22 人 IgG1 模型

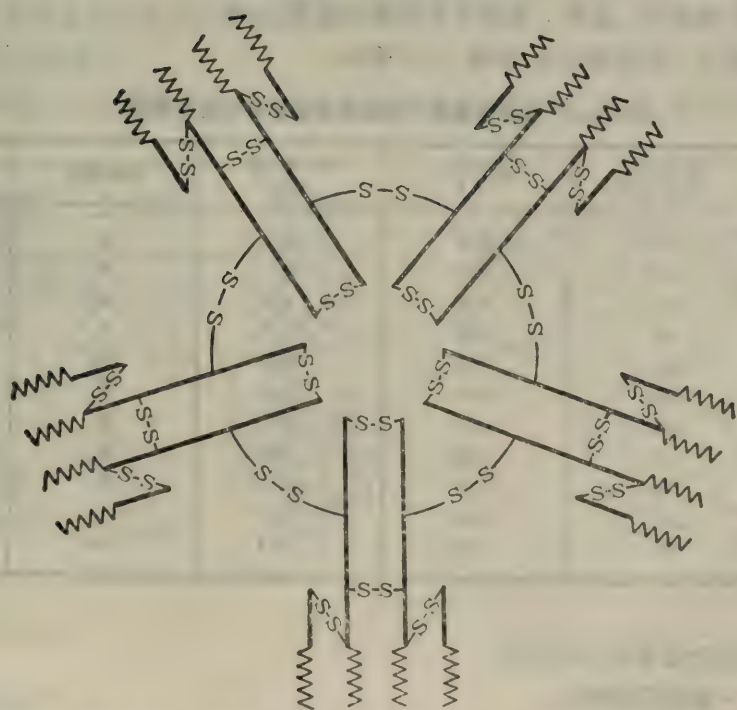


图 11-23 人 IgM 分子结构示意图

的-SH基S与IgM五聚体相连。

人IgM重链(μ 链)含有576个氨基酸残基,其一级结构已得到阐明。

二、抗原与抗体的相互作用

IgG具有多种功能,例如:结合抗原、激活补体、穿过胎盘、促进吞噬细胞对颗粒抗原(如细菌等)的吞噬作用等等;但是,最主要的功能还是与抗原选择性地结合。

一个IgG分子有二个抗原结合部位,可以与二个抗原分子选择性地结合。抗体的这种选择性(特异性)不需要全部的变区,只是与变区中(氨基酸排列顺序变化频率很高)的高变区有关。在IgG的高变区中,与抗原结合的氨基酸残基可以分成三种类型:

- (1) 接触氨基酸群——参与抗原结合的最初阶段;
- (2) 调制氨基酸群——与抗原更完全的结合,是决定抗体选择性的最重要的一群,关系到与抗原结合的强弱;
- (3) 补偿氨基酸群——保持整个抗体结构的平衡。

抗原分子决定簇与IgG分子的裂隙互补结合,生成抗原-抗体复合物,其结合力可能是氢键、盐键、疏水键或范德华引力。

三、补体的激活

抗体杀伤带抗原的细胞一般是通过补体来完成的。补体是正常血浆中存在的一组蛋白酶系。其主要作用是杀伤带抗原的细胞,但是,补体只有经过抗体激活、并形成攻膜复合体之后,才能有效地杀伤带抗原的细胞。现在知道,激活补体有二条途径:一条是补体激活第一通路(经典通路);另一条是补体激活第二通路。这里仅介绍第一通路。

第一通路包括十一种补体成分,如表11-3所示。

表 11-3 补体激活第一通路各补体成分的生化特征

蛋白质	血清浓度 (微克/毫升)	沉降系数 (S)	分子量 $\times 10^4$	电泳部位	肽链数目
C _{1q}	180	11.1	40	γ_2	18
C _{1r}	—	7.5	18	β	2
C _{1s}	20	4.5	8.6	α_2	1
C ₂	25	4.5	11.7	β_1	—
C ₃	1600	9.5	18	β_2	2
C ₄	640	10.0	20.6	β_1	3
C ₅	80	8.7	18	β_1	2
C ₆	75	5.5	9.5	β_2	1
C ₇	55	6.0	11	β_2	1
C ₈	80	8.0	16.3	γ_1	3
C ₉	230	4.5	7.9	α	—

补体激活可以分为下列三个阶段:

第一阶段——激活识别单位

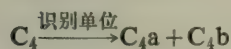
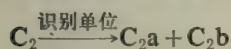
现已知道,在IgG分子的C γ 2功能区有一个补体结合部位;在补体第一通路的十一种补体

成分中,只有 C_{1q} 可以直接与 IgG 结合。但是,在 IgG 与抗原分子结合之前,IgG 分子的 C_{1r} 2 功能区并不能与补体(C_{1q})结合,只有在抗体与抗原结合而成抗原-抗体复合物之后,IgG 分子才能与 C_{1q} 结合。有人推测,在抗体与抗原结合之前,IgG 分子呈“T”形, Fab 可能遮盖了补体结合部位,使补体不能与抗体结合;在抗体与抗原结合之后,由于抗原分子对抗体分子的诱导作用,使抗体分子的构象发生变化,呈“Y”形,结果排除了 Fab 对补体结合部位的遮盖,因而抗体可以与补体结合。

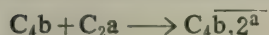
在 Ca^{2+} 的作用下, C_{1q} 、 C_{1r} 与 C_{1s} 三种补体成分结合而成三聚体(C_1)。此三聚体既无酶活性,又不能与细胞膜上的抗原结合。位于细胞膜某一部位的抗原,首先与特异性的抗体结合,使抗体的构象发生变化,从而暴露出补体结合部位。这时,每两个 IgG 分子(或一分子 IgM)可以与 C_1 三聚体中的 C_{1q} 结合,并使其发生构象变化。此构象变化促进 C_{1r} 变构,使其变成有活性的蛋白水解酶(C_{1r})。此活性酶水解 C_{1s} , 使其变成有活性的蛋白水解酶 (C_{1s})。如此完成了第一阶段,得到了有活性的识别单位——抗原·Ig· C_{1q} $\begin{matrix} \leftarrow r \\ \leftarrow s \end{matrix}$ 如图 11-24 所示。

第二阶段——形成激活单位

在识别单位的催化下, C_2 被水解成 C_{2a} 和 C_{2b} ;而 C_4 被水解成 C_{4a} 和 C_{4b} 。



C_{2a} 与 C_{4b} 结合成有活性的二聚体($C_{4b,2a}$)。



此二聚体中的 C_{4b} 与细胞膜的另一部位(C_{4b} 的受点)相结合。然后,在 $C_{4b,2a}$ 的催化下, C_3

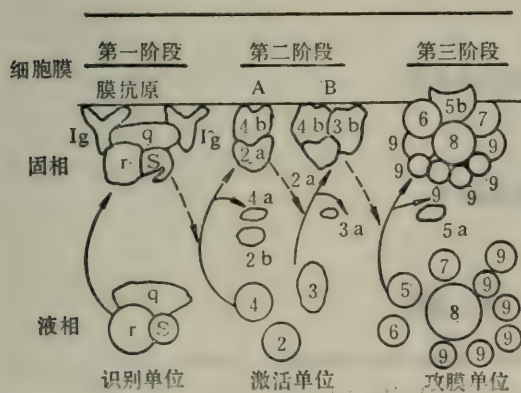


图 11-24 补体激活第一通路示意图

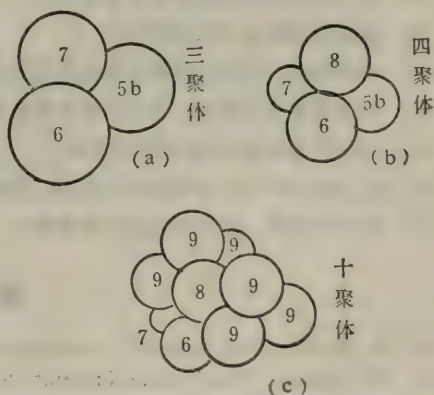
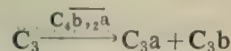
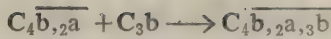


图 11-25 攻膜复合体的形成过程示意图

被水解成 C_{3a} 和 C_{3b}



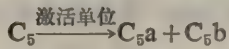
C_{3b} 又与 $C_{4b,2a}$ 结合而成激活单位 ($C_{4b,2a,3b}$)。



如此完成了第二阶段,得到了激活单位($C_4\overline{b_{,2a,3b}}$),如图 11-24 所示。

第三阶段——形成攻膜复合体

在激活单位的催化下, C_5 被水解成 C_5a 和 C_5b 。



C_5b 与 C_6 、 C_7 结合成 $C_5\overline{b_{,6,7}}$ 三聚体(图 11-25 a)。此三聚体与细胞膜的另一个部位结合,然后,再与 C_8 结合成具有四面体结构的 $C_5\overline{b_{,6,7,8}}$ 四聚体(图 11-25 b)。最后,以四聚体中的 C_5 为中心,结合两个 C_9 三聚体,形成了一个十聚体(图 11-25 c)。此十聚体含有 C_5b 、 C_6 、 C_7 、 C_8 各一个分子, C_9 六个分子,叫做攻膜复合体,简称为 $C_5\overline{b-9}$ 。攻膜复合体可以破坏细胞膜,杀伤带抗原的细胞,如细菌等。

习 题

1. 胰岛素由单体形成二体的结合力有哪些?
2. 线性聚合的特点是什么?
3. 分子聚合与生物功能有何关系?
4. 分子或亚单位之间的聚合必须具备哪些条件?
5. 分子识别的实质是什么? 要二分子相互识别,必须具备哪些条件?
6. 解释下列名词:

分子杂交; 分子识别; 自装配; 线性聚合; 抗原; 抗体; 补体。

7. 肌原纤维的结构如何?
8. 粗丝与细丝的结构如何?
9. 肌肉收缩的分子机理如何?
10. 参与血液凝固的凝血因子有哪些?
11. 血液凝固的分子机理如何?
12. 内源性凝血途径与外源性凝血途径的区别与共同点在哪里?
13. 抗体有那几种类型? 它们是根据什么分类的?
14. IgG 和 IgM 的结构有哪些特征?
15. 在 IgG 分子中, 各功能区在结构上的相互关系如何?
16. 抗体与抗原、补体的相互作用如何?

参 考 文 献

1. D. E. Metzler, Biochemistry, Academic Press, New York San Francisco London, 1977
2. F. W. Putnam, The Plasma Proteins, Structure, Function and Genetic Control III. 1977
3. R. Markham, et al., Structure-Function Relationships of Proteins, North-Holland Publishing Company-Amsterdam, New York Oxford, 1976
4. G. H. Haggis, Introduction to Molecular Biology, William Clowes & Sons, Limited London, Bectles and Colchester, 1974
5. R. F. Steiner, The Chemical Foundations of Molecular Biology, D. Van Nostrand Company Inc. Princeton, New Jersey Toronto New York London, 1965
6. L. Stryer, Biochemistry, W. H. Freeman and Compomy San Francisco, 1975

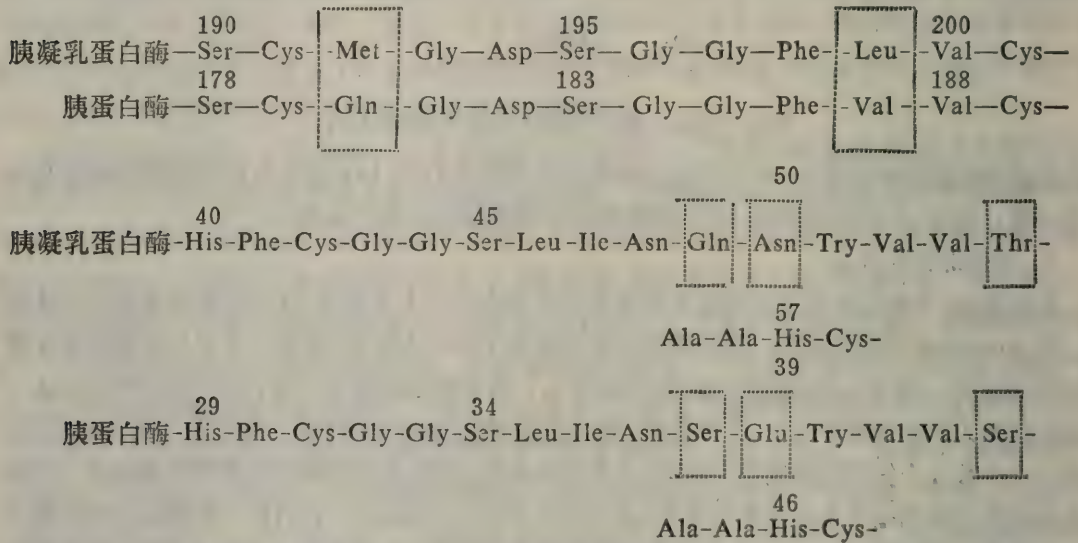
7. 北京医学院等, 生物化学, 人民卫生出版社, 1978
8. 谢彦博, 生物化学与生物物理进展, 第三期, 第二十四页, 1978
9. 陈懿康, 生物科学动态, 第四期, 第三十页, 1979
10. M. W. 斯图尔德, 免疫化学, 科学出版社 (中译本) 1979
11. 上海第一医学院等, 医用生物化学 (上册), 人民卫生出版社, 1979
12. R. H. Burris, in: Recent Developments in Nitrogen Fixation (W. Newton et al. Ed.), PP. 487. Academic Press, London. New York. San Francisco, 1977
13. R. Jaenick et al., Protein-Protein Interactions, Springer-Verlage Berlin. Heidelberg. New York, 1972
14. E. E. Conn, et al., Outlines of Biochemistry, John Wiley & Sons Inc. New York London Sydney Toronto, 1976

合部位)这一术语。当然,底物是配体中的一种。

每一酶蛋白分子有几个活性部位呢?这个问题还很难确切地说明。但从目前结构状况比较清楚的酶来看,可以说,一条肽链的单功能酶只有一个活性部位。如果每个酶分子可以结合几个底物分子,这种酶可能是由几个亚单位组成的寡聚体。当然,上述说法并不排除酶分子上还有其他配体结合部位,比如别位酶的别构部位,这是结合不同于底物的特殊配体的部位。

二、催化部位与底物结合部位

催化部位和底物结合部位都是活性部位的组成部分,但两者的功能有所不同。为了说明这个问题,我们简单地比较一下胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶在催化上的同异。两者在结构上很相似,首先以 DFP 作用于胰凝乳蛋白酶,该酶的 Ser-195 侧链羟基被烷基磷酸化,同时完全丧失活性,DFP 同样也与胰蛋白酶的 Ser-183 作用,并丧失活性;胰凝乳蛋白酶 His-57 侧链基团经化学修饰后酶完全失活,胰蛋白酶 His-46 侧链经化学修饰之后也完全失活。这说明两者在活性部位组成上至少有两个基团是相同的。还可以进一步比较包括组氨酸和丝氨酸在内的一段肽链的一级结构,如下所示:



二酶在活性丝、组附近的一级结构极相似,局部不同的氨基酸(以虚线方框标出)也都是相似取代,如 Leu-199 与 Val-187; Thr-54 与 Ser-43 等。此外,胰凝乳蛋白酶的 His-57—Ser-195 相隔 138 个氨基酸残基,而胰酶 His-46—Ser-183 相隔 137 个氨基酸残基。除了结构相似而外,两者都具有催化水解肽键的功能。这是两个酶相似的一面。两者不同之处在于底物的特异性不同,胰凝乳蛋白酶主要切断由酪氨酸等带有芳香族侧链基团的氨基酸羧基形成的肽键,而胰酶专一断开由带有碱性侧链基团的精、赖氨酸所形成的肽键。由此可见,活性部位必然包括了两个方面。其一是催化部位,二酶类同;其二是底物结合部位,二酶不同,即特异性不同。

1. 催化部位

催化部位是在催化反应中直接参与电子授受关系的部位。经多种方法研究,胰凝乳蛋白酶的催化部位已经明确了。首先从 DFP 化学修饰法得知, Ser-195 是直接参与催化作用的基团。

又从动力学研究得知,有一个pK 值在6—8 之间的解离基团与催化反应有关。从pK 值上推测是His 的咪唑基。以TPCK(1-氯-3-甲苯磺酰氨基-4-苯-丁酮-2) 化学修饰法更进一步证实了动力学的推断。在中性条件下,一分子TPCK 和一分子胰凝乳蛋白酶反应,酶完全失活。修饰的残基是His-57 的咪唑基。而且被DFP 修饰了的酶不和TPCK 反应。反之,经TPCK 作用失活后的酶也不再与DFP 反应。由此可见,胰凝乳蛋白酶至少有两个催化基团。从X-光结构分析结果来看,Ser-195 与His-57 在空间位置上很接近,而且接近His-57 咪唑基氮原子处还有一个Asp-102。这三个残基的侧链基团构成一个电荷接力系统。如图12-1 所示:

Ser-195、His-57、Asp-102 三者相距几十个残基,但由于肽链的盘转和折叠而使得它们形成一个系统,在催化底物反应中,直接参与电子的授受。

一般来讲,没有辅酶的酶蛋白的催化部位,仅涉及其几个特定的氨基酸残基侧链基团。有辅酶的酶,辅酶直接参与电子授受。当然与辅酶结合的酶蛋白的特定氨基酸残基也是缺少不得的。另外有些酶含有某种金属,有些金属与催化反应直接相关,这类酶往往是通过酶蛋白的特定氨基酸侧链与金属离子的相互作用,与底物之间进行电子授受。总之,不管是那种情况,酶的催化部位总是要涉及几个特定的氨基酸残基的侧链基团。

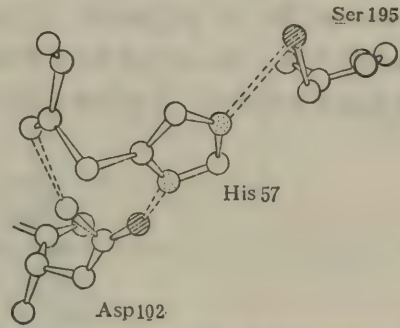


图 12-1 胰凝乳蛋白酶电荷接力系统的构象

2. 底物结合部位

酶只有催化部位是不够的。如果只有催化部位的话,胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶应该具有同样的催化特征,只要是肽键,不管其两端是什么氨基酸残基都应该同样水解。但实际上并不如此,每个酶都有自己独特的专一性。只有与酶的活性部位结构相适应的底物分子才能被酶结合(适应是多方面的,如大小、形状、电荷等)。应该说,专一性主要是由底物结合部位决定的,但有的催化基团也参与底物的结合。

以溶菌酶为例说明底物结合部位。溶菌酶催化细菌细胞壁中多糖成分的水解,如图12-2 所示:

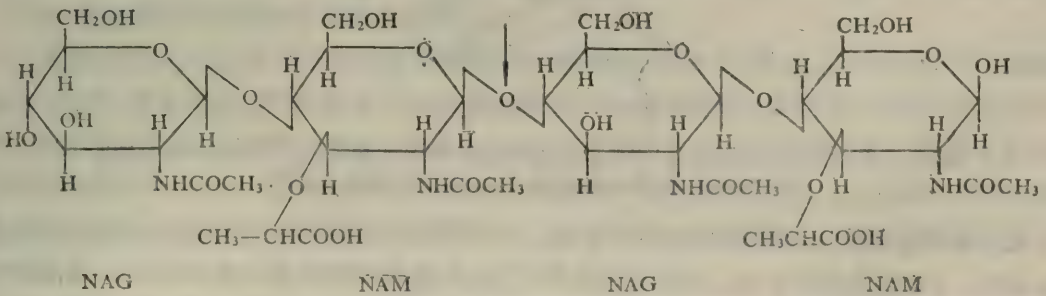


图 12-2 溶菌酶底物结构

细菌细胞壁多糖是 N-乙酰氨基葡萄糖 (NAG) 和 N-乙酰精质酸 (NAM) 组成。NAG 和 NAM 通过 β -1,4 糖苷键连接, 交替排列。溶菌酶切断 NAM 的 1 位和 NAG 4 位之间的 β 糖苷键, 如图 12-2 箭头所示。溶菌酶也能水解仅由 NAG β -1,4 连接而成的缩合物。因此, 溶菌酶底物的基本条件是: ① 多糖类, 基本骨架是 D-葡萄糖; ② 各环 2 位的一 OH 换成胺基, 即成葡萄糖胺; ③ N-乙酰化; ④ 糖苷键结合方式为 β -1,4 型。溶菌酶能够识别具有上述特征的底物分子。如图 12-3 所示。该图是 NAG 六聚体与酶的活性部位呈结合状态。分别以 A、B、C、D、E、F 表示六个糖环位置。首先看 C 环, 乙酰基的 CO 与 Asn-59 的 NH 有氢键连系, 这是酶对条件③的识别; C 环 2 位的 NH 同 Ala-107 的 CO 结合成氢键, 这是对条件②的识别; C 环 6 位、3 位的 OH 分别与 Try-62、Try-63 呈氢键结合, 这是对条件①的识别。B 环 6 位的 OH 和 Asp-101 形成氢键, 这是满足 β -1,4 键的必要条件; A 环的 3 位 OH 也同 Asp 101 结合成氢键, 表明 A 和 B 二环逆向, 这是条件④的识别。其他各环与酶结合情况如表 12-1 所示。

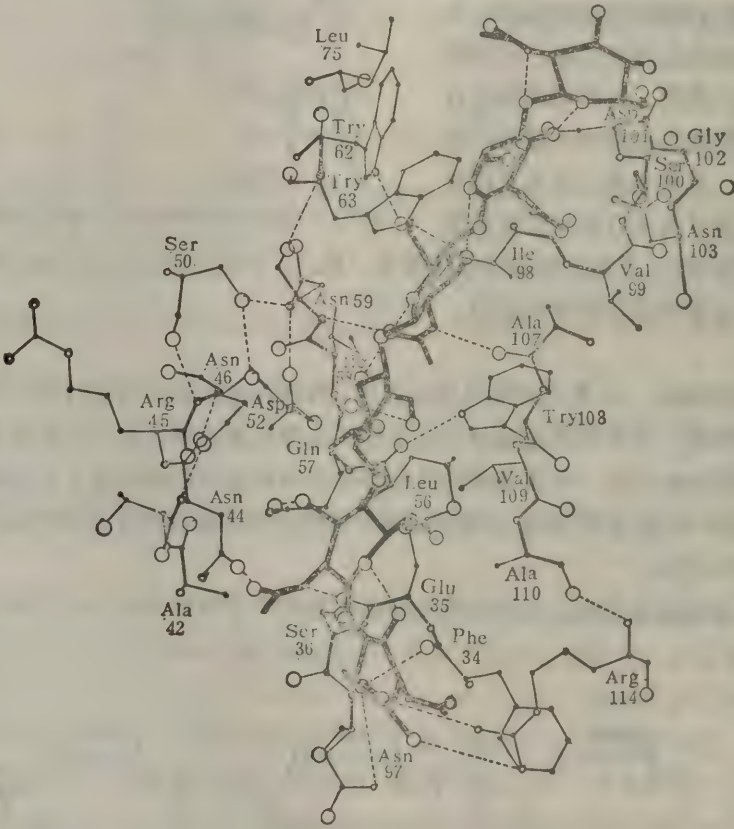


图 12-3 溶菌酶与(NAG)结合。上半部三个糖残基按 (NAG) 结合方式, 下半部三个糖残基以搭模型法作出。图中酶的各原子的位置是天然构象的位置

从上述可见, 酶与底物的特异结合是多点结合, 需要几个或更多的氨基酸残基参加 (可能是侧链基团, 也可能是主链骨架), 而且要求这些残基在三维空间中正确排布。如果正确的位置受到干扰或破坏的话, 不仅失去识别底物和非底物的能力, 连底物-酶复合物也不能形成, 当然, 随

表 12-1 多聚己糖与溶菌酶之间的原子接触

部 位	极 性 接 触	Van der Waals 接触 < 4Å	对 $-\Delta F$ 结合的贡献(千卡/克分子)	
A	NH-Asp 101	7	1.8—1.9	2.3
B	O(6)-Asp 101	11	3.5—3.9	2.8
C	O(6)-Try 62	30	5.6	4.7
	O(3)-Try 63			
	NH CO 107			
	CO NH 59			
D	O(6)-CO 57	35	-2.9	-6
	O(1)-Glu 35			
E	O(3)-Gln 57	45	4	0.9
	NH-CO 35			
	CO-Asn 44			
F	O(6)-CO 34	13	1.5—2	5.0
	O(6)-Asn 37			
	O(5)-Arg 114			
	O(1)-Arg 114			

之而来的是活力降低,乃至全部失活。

羧肽酶A与合成底物甘氨酸-酪氨酸之间的结合如图 12-4 所示。有四个作用点,头三点与形成酶-底物复合物有关。第一点是底物羧基末端侧链插入酶的“口袋”,置换出几个水分子。“口袋”的大小足以容纳色氨酸侧链。“口袋”的内部没有特殊的结合基团,可能是些不带电的基团参与作用;第二点是底物末端羧基与 Arg-145 带正电的胍基相互作用;第三点,被裂解的肽键羰基氧原子与 Zn^{++} 配位;第四点仅适用于二肽, Glu-270 通过水分子与 Gly-Tyr 的 α -氨基结合。如果底物长于二肽,底物 N-末端与 Glu-270 之间不能结合,但 Glu-270 很接近于被水解的肽键的羰基,如图 12-5 所示。第二个肽键的 NH 与 Tyr-248 羟基形成氢键,底物在第 3、4 位置上的芳香族侧链基团 R 与酶的 Tyr-198、Phe-279 相互作用。第三个肽键的羰基(或许第四个)与 Arg-71 接近稳定结合状态。由此可见,羧基肽酶A的活性部位由包括一个疏水口袋在内的 Zn^{++} 、His-69、His-196、Glu-72、Arg-145、Tyr-248、Glu-270、Tyr-198、Phe-279、Arg-71 等基团构成,这些基团决定了结合部位的特异性。酶的底物必须以正确的方式与活性部位结合,以便底物敏感键有正确的定位(Gly-Tyr 二肽的肽键羰基与 Zn^{++} 结合),这样,才能顺利地为酶水解。

3. 催化部位与底物结合部位的关系

虽然从功能上可以把活性部位分成催化部位和底物结合部位,但是,这两个部位并不是各自独立存在的,而是相互关联的整体。比如,胰凝乳蛋白酶的电荷接力系统 Ser-195、His-57、Asp-102 能否充分发挥催化效率,在很大程度上,取决于底物结合的位置是否合适。也就是说,底物结合部位的作用,不单单是固定底物,而且要使底物处于被催化的最优位置。因此,酶的催化部位与底物结合部位之间的相对位置是很重要的。换句话说,构成底物结合部位的氨基酸残基的空间位置,不但要适合于结合底物,也要适合于催化底物反应。

就上述意义而言,所谓底物特异性(某化合物是某酶的特异性底物)这一说法,不仅取决于能

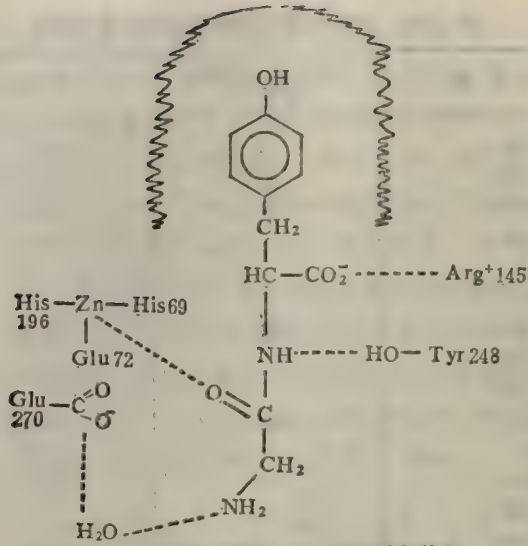


图 12-4 甘氨酸-酪氨酸二肽与羧肽酶的结合

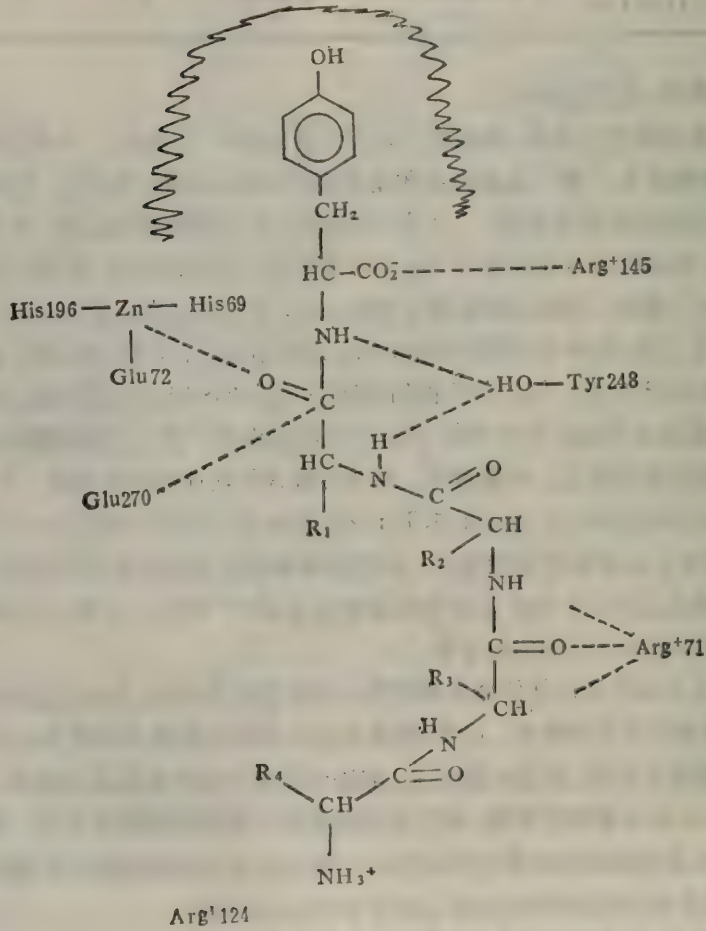


图 12-5 大于甘-酪二肽的底物与羧肽酶 A 的结合

否牢靠地与活性部位相结合,而且也要看能否顺利地得到产物。例如,胰凝乳蛋白酶作用于与底物有同样结构的 D-氨基酸化合物,其 K_m 值与底物大体相同,但 D-氨基酸化合物不能被胰凝乳蛋白酶水解。这是由于在胰凝乳蛋白酶活性部位中,其催化部位与底物结合部位的相对位置只适合于 L-氨基酸形成的多肽, D-型氨基酸化合物的羧基碳与 Ser-195 相距较远,催化部位不能发挥作用。因此,底物的特异性,不仅取决于底物结合部位,而且还取决于活性部位的整体。

三、活性部位的研究方法

确定活性部位的方法近年来有很大发展。常常使用的方法有化学修饰法、X-光晶体衍射法、反应动力学方法等。其中最令人信服的结果,当然是来自 X-光晶体衍射法。可是,单单靠此法是不够的,往往一个问题的解决,是靠多种方法多方证明之后才能确定下来的。下面就其中几种重要的方法简要地加以介绍。

1. 化学修饰法

酶分子中可以被修饰的基团很多,正如第七章所述,凡是可解离的,或带有极性的侧链基团,如羟基、巯基、咪唑基、氨基、羧基等都是修饰的对象。用于化学修饰的试剂也不少,但常用的并取得显著效果的并不多。尽管如此,多年来积累了不少有用的资料,化学修饰法一直广泛地用于酶活性部位的研究之中。

如何证明所用的修饰试剂恰恰结合到活性部位的某基团上,而不是结合到活性部位以外的某基团上了呢?一般来讲,活性部位的修饰与酶活力的丧失有着计量关系。但这个问题很复杂,还有许多因素值得分析和考虑。比如,标记化合物结合的不是活性部位某基团,而是活性部位边缘某基团,由于空间障碍也导致酶失活。这种情况往往使人作出错误的判断,误认为修饰的基团是活性部位的某基团。在化学修饰研究中,也常常使用酶失活的特异性保护法,此法以竞争性抑制剂保护酶活性,因抑制剂结合的部位是活性部位,所以在竞争性抑制剂存在下,共价标记法使酶失活的程度远远低于无抑制剂存在时的情况。但这也不是绝对的,也有可能活性部位以外的某基团的表现与活性部位中的部分基团相似,当有保护性抑制剂时,这些基团不易与标记化合物反应,无抑制剂时,很易与之结合,而且由于空间障碍或分子构象的变化导致活力丧失,这时也会错断这个基团的作用。还有一个问题值得说明,以化学修饰法研究酶的底物结合部位比研究催化部位更困难。这是因为酶的催化部位的基团种类和数目都比较少,而且往往是些富于反应性的基团,标记与计量失活关系比较明显。比如,每个胰凝乳蛋白酶分子只要结合一个 DFP 分子就完全失活。然而,属于底物结合部位的基团大多是反应性很低的非极性基团,如果以弱的化学反应修饰,则实验难以收效,如果以强烈的条件修饰,则又易发生几个同种氨基酸侧链基团一起被修饰的结果。另外,底物结合部位基团的修饰与酶活力的变化关系也比较微妙,如果把底物结合部位想象成一个槽穴的话,其中某个基团被修饰以后,可能导致结合底物能力降低,酶部分失活,也可能改变了结合底物的特异性等多方面的变化。

总之,多年来以化学修饰法研究酶的活性部位得到了不少有用的结果,但有些结果并不很理想。往往工作做了不少,却很难下确切的结论。

(1) 使用非特异性试剂对特殊基团的标记

某些酶的活性部位中含有活性部位以外没有的氨基酸残基时,则可以充分利用这种特殊情

况,使用一般非特异性试剂(即不能区分活性部位内和外基团的试剂)进行修饰。比如,木瓜蛋白酶分子中有七个半胱氨酸残基,其中的六个形成三对二硫桥,只有一个残基以自由硫氢基形式存在于活性部位。这种情况就可以用任何一种硫氢基试剂来标记,如用碘乙酸修饰,在此反应中所用的碘乙酸既不是拟底物,又对木瓜蛋白酶活性部位无任何特殊亲和力,但由于情况特殊,仍然得到了硫氢基的修饰与活力丧失相平行的结果。

使用这类试剂时要注意,它们经常可与不止一类氨基酸残基侧链反应,如碘乙酸可使核糖核酸酶失活,原以为是活性部位有一半胱氨酸硫氢基,但后来证明是一组氨酸咪唑基被烷基化。

此外,还发现一种现象,即活性部位内部的某一残基对某一非特异性试剂的反应性比活性部位以外的同类残基要高或低。这可能是活性部位内的微环境所致。酶蛋白变性后,这种现象就消失了。属于反应性增高的情况,活性部位的某基团比其余部位的同类基团更易被标记,如一磷酸甘油醛脱氢酶的活性部位的丝氨酸能优先被¹⁴C-碘乙酸标记,牛胰核糖核酸酶活性部位的组氨酸能优先被碘乙酸标记,其赖氨酸-41的ε-NH₂可优先被氟二硝基苯标记。有的酶则与此相反,虽然有某一特殊基团位于活性部位中,但由于它处于隐蔽状态,缺乏反应性,用通常的试剂难以修饰。要充分利用活性部位中某一基团具有特别高的反应性的有利条件进行化学修饰。胰凝乳蛋白酶中的Ser-195的羟基氧原子具有特别高的亲核性,所以,不管是DFP抑制,还是乙酰化都发生在同一位置。不仅胰凝乳蛋白酶如此,与它相关的一系列酶都有类似的表现。它们不仅与DFP反应性相似,而且活性丝氨酸周围的氨基酸排列顺序也很相似,如表12-2所示。

表 12-2 某些酶活性部位丝氨酸肽的氨基酸顺序

酶	活性丝氨酸肽段氨基酸顺序
牛胰凝乳蛋白酶	-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val-Cys-Lys-
牛胰蛋白酶	-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Val-Val-Cys-
牛凝血酶	-Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Phe-
猪弹性蛋白酶	-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-
丁酰胆碱酯酶	-Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly
乙酰胆碱酯酶	-Gln-Ser-Ala
枯草杆菌蛋白酶	-Asn-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-
霉菌蛋白酶	-Thr-Ser-Met-Ala-

正如前述,木瓜蛋白酶之中有一个-SH基是催化部位活性基团,另外,通过动力学实验证实,还有一个很重要的催化基团——组氨酸咪唑基^[3]。Husain和Lowe^[4]利用1,3-二溴丙酮和木瓜蛋白酶作用,在pH 5.6,1克当量的试剂完全抑制了木瓜蛋白酶活力。以Sephadex G-75提纯被抑制的酶,然后进行氨基酸分析,发现少掉一个组氨酸。Husain和Lowe^[5]还用了1,3-二溴(2-C¹⁴)丙酮测定组氨酸残基位置,结果证明,1,3-二溴丙酮连接了Cys-25和His-59两残基。通过此实验,不仅知道了催化基团组氨酸的位置,而且也知道了催化基团半胱氨酸-25和His-59之间的距离在5 Å以内。这个结论通过X·光衍射分析法又进一步得到了肯定,如图12-6所示。

(2) 差示标记法

这类方法是非特异性试剂标记法的一个发展,此法基于保护效应,不要求被标记的活性部位

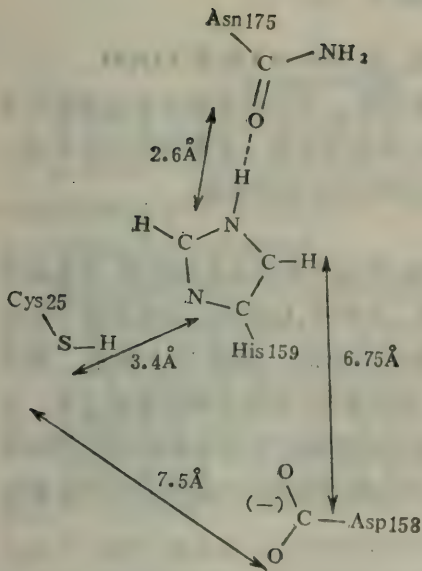


图 12-6 木瓜蛋白酶活性部位 Cys-25 和 His-159 周围的情况

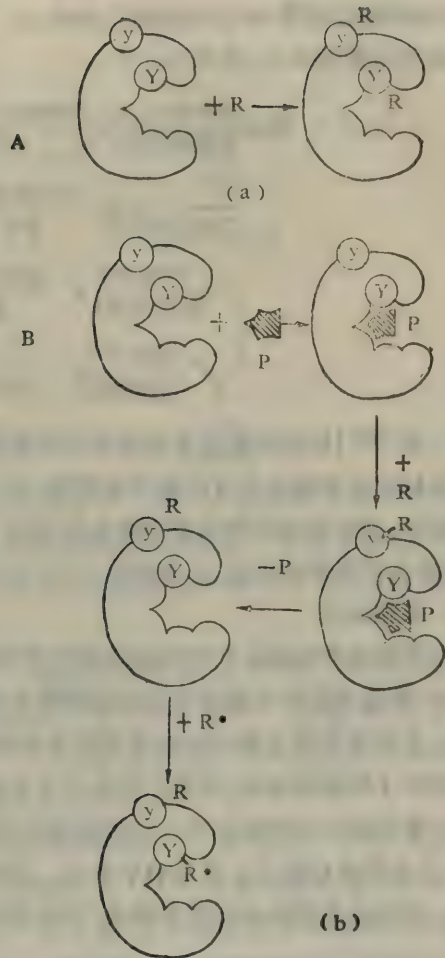


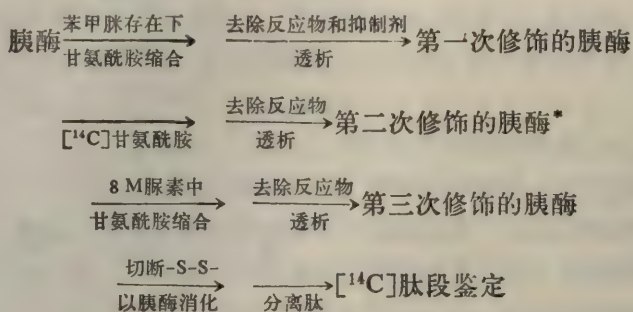
图 12-7 差示标记法图解

的基团有特殊灵敏的反应性。差示标记法的一种形式如图 12-7 所示。

图 12-7 中 y 和 Y 是酶中的同一类基团，只是 Y 位于活性部位中，是要标记的基团， P 是竞争性抑制剂， R 为非特异性试剂， R^* 为同位素标记的同种试剂。如图所示，先向酶溶液中加入过量的竞争性抑制剂 P ， P 与活性部位结合，好象是 Y 基团的保护剂。这时加入非特异性试剂 R ，所有的 y 均与 R 发生反应。待 P 透析除去后，再加入同位素标记试剂 R^* ，此时 R^* 只有和 Y 结合。检定同位素标记的位置，便可帮助确定活性部位基团。

胰酶和胰凝乳蛋白酶同是胰脏中的水解酶类，两个酶在一级结构上有 40% 以上是相同的，但由于两者水解肽键的特异性不同，人们一直认为胰酶活性部位中必有酸性基团存在。另外，还知道 ψ 胰酶^[6](Lys-176 和 Asp-177 之间肽键断裂形成的) 失去水解碱性氨基酸残基羧基所形成的肽键的专一性，而保留了一般酯酶活性。估计 Asp-177 的 β -COOH 可能与结合底物有关。Fyl 等人^[7,8] 的实验证明了上述推测。使用苯甲脒 ($C_6H_5C(:NH)NH_2$) 作为 β -胰酶的

竞争性抑制剂,以差示标记法证明了 Asp-177 是结合底物的一个基团。以碳二亚胺为缩合剂,使甘氨酸胺与羧基缩合,其反应如下:



第二次 ^{14}C 标记的羧基是结合部位的羧基,经分离鉴定,是 Asp-177 的 $\beta\text{-COOH}$ 。

差示标记法使用起来有时也不太理想,主要是保护效果问题。有时保护剂不能完全阻止 R 与 Y 的反应;同时也可能因保护剂的存在影响了酶分子构象,致使反应第一步 R 不能与所有的 y 结合,而在去掉保护剂以后,还有部分 y 可与 R* 反应。此法随后又有不少改进。

(3) 亲和标记

上述两种共价标记法在活性部位研究中得到了一些结果,但由于方法本身的弱点,不是应用范围太小,就是不能令人满意地把标记局限在活性部位之内。近年来,以亲和标记法取得了较好的结果。主要是利用了酶与底物特异结合这种性质而设计标记试剂的。如图 12-8 所示。图中 \textcircled{x} 是试剂分子的活泼基团, \textcircled{y} 和 \textcircled{Y} 是酶分子上可与 \textcircled{x} 发生反应的基团, \textcircled{Y} 位于活性部位之中。反应的第一步是酶与试剂发生专一和可逆地结合。此时,试剂在活性部位的局部浓度远较活性部位外高, \textcircled{x} 与 \textcircled{Y} 反应比与 \textcircled{y} 反应有利得多。因此,这个方法不要求活性部位的基团有特别灵敏的反应性。有时也把亲和标记试剂称为“活性部位指示剂”。

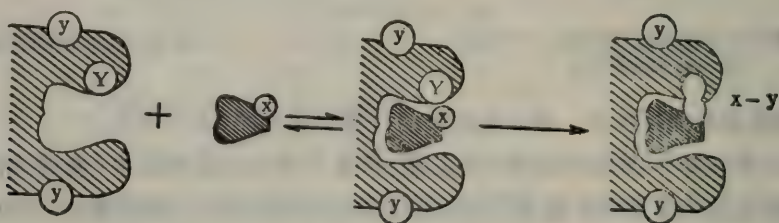
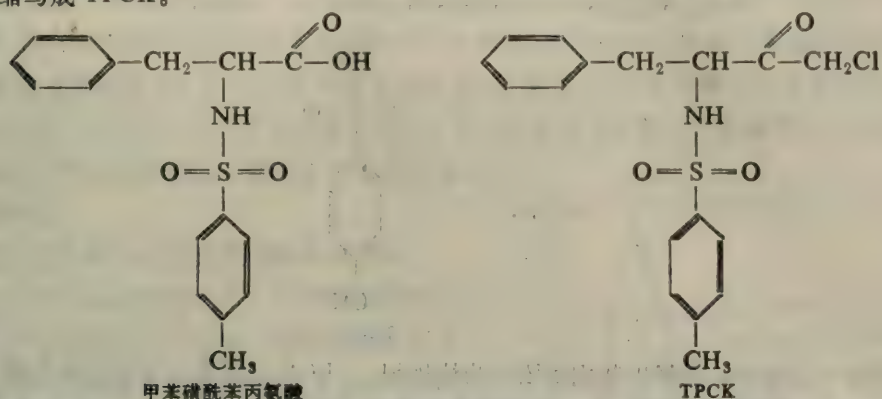


图 12-8 亲和标记法图解

亲和标记试剂用于胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶活性部位的标记,是两个非常成功的例子。它们说明了亲和标记法用来研究活性部位是一个强而有力的方法。原来认为 DFP 是酯酶类或具有酯酶活性的蛋白酶类最专一的抑制剂,现在看来,亲和试剂的优越性已超过了 DFP。因为它们能把胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶区分开,而 DFP 对二者都是同样抑制的。

胰凝乳蛋白酶选择地水解芳香族氨基酸羧基所形成的肽键或酯键,甲苯磺酰-L-苯丙氨酸胺或乙酯是该酶的很好的底物,所以在设计亲和试剂时用甲苯磺酰-L-苯丙氨酸为基本结构,然

后将羧基换成氯甲基酮。这是一个活泼的烷化剂。此试剂全称为 1-氯-3-甲苯磺酰胺基-4-苯-丁酮-2, 缩写成 TPCK。

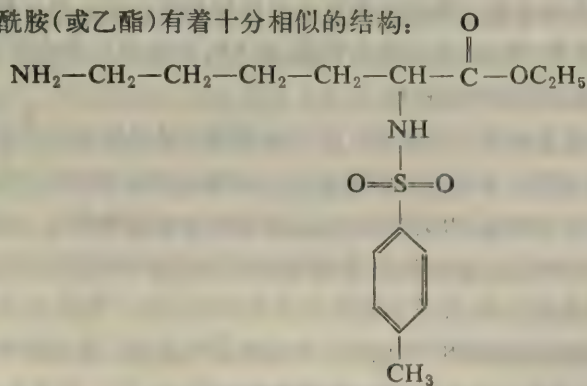


将 TPCK 与胰凝乳蛋白酶保温, 二者定量与共价结合^[9]。在 8 M 脲素中二者不发生反应, TPCK 也不能与胰凝乳蛋白酶原以及 DFP 抑制了的胰凝乳蛋白酶结合。由此可见, 必须是天然构象的活性酶才能与此试剂结合。当然, TPCK 抑制了的酶也不能再与 DFP 反应, 这也说明烷化作用确实发生在活性部位上。

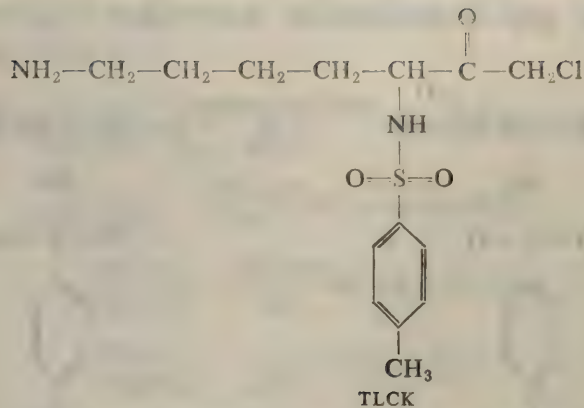
胰凝乳蛋白酶分子中有两个组氨酸残基, 位于一级结构的第 40 与 57 位。TPCK 烷化后的酶经水解, 分析其氨基酸组成, 发现只出现一个组氨酸, 可见 TPCK 与另一组氨酸结合了。用 ¹⁴C-TPCK 与酶作用, 然后以胃蛋白酶水解, 发现 ¹⁴C 存在于含有 His-57 的肽段中。此外, 尚有一些其他证据, 证明 TPCK 与 His-57 结合, 结合发生在咪唑环 N³ 上^[10,11,12]。

TPCK 并不是一个组氨酸修饰试剂, 它不易单独与组氨酸本身发生反应。另外, 其分子中的氯原子, 比起其他烷化剂中的卤原子, 也不算是很活泼的, 但 TPCK 能使胰凝乳蛋白酶分子中组氨酸 57 烷化, 而其他一些烷化剂却不能, 所以就这一点来看, 试剂本身不具有特殊的活泼性, 只能认为, 在胰凝乳蛋白酶-TPCK 复合物中, 组氨酸-57 刚好处于与试剂的活泼基团氯甲基酮十分接近的位置, 因此易于发生烷化反应。

胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶有不同的底物专一性, 不能与 TPCK 反应, 但能与自己的亲和试剂-氯-3-甲苯磺酰胺基-7-氨基庚酮-2 (TLCK) 所抑制^[13]。TLCK 与胰蛋白酶的一个合适的底物——甲苯磺酰赖氨酸酰胺(或乙酯)有着十分相似的结构:



甲苯磺酰赖氨酸乙酯



TLCK 试剂分子上也有一个氯甲基酮基团作为烷化剂。TLCK 以等克分子比与酶反应，酶完全失活。但在竞争性抑制剂苯甲脒，或 8 M 脲变性的情况下都不与酶反应。TLCK 也不影响胰凝乳蛋白酶的活力。进一步证实 TLCK 结合在 His-46 的咪唑基上^[14]。

2. 动力学分析法

动力学方法是研究酶活性部位的常用方法之一，以动力学方法得到了不少有关酶活性部位的材料。比如 Gutfreund^[15]研究了 pH 值对胰酶催化活力的影响，在 25°C，以苯甲酰-L-精氨酸乙酯为底物，发现一个 pK 值为 6.25 的解离基团与催化反应有关。这意味着组氨酸的咪唑基在酶解中起着重要作用。酶蛋白是带有许多解离基团的两性电解质。pH 改变必然要影响解离基团的解离状态。处于活性部位的基团，其解离状态的改变会直接关系到酶的催化活性。因此，通过 pH~酶催化活力关系的研究，可能得到与催化直接相关的某些基团的 pK 值，进而推断此基团的本质。

为了达到上述目的，首先要取得反应速度参数，特别是 V/K_m 对 pH 的依存性数据。通过作图法可以得到催化反应必须基团的 pK 值(未结合底物的游离态酶的 pK_e)。蛋白质中的各类解离基团的 pK 值，由于基团分布的影响，往往同一基团呈现不同值，但就一般情况而言，每一种基团大体上有一个 pK 范围，因此，通过分析比较，基本上可以从 pK_e 估计基团的种类。由于各类基团之间 pK 值不是截然分开的，有一定程度的交叉，常常采用辅助办法帮助鉴定基团。其一是改变反应温度作 pH 依存性实验，算出解离热 ΔH 协助判断基团。另一种办法是适当地加入有机溶剂，改变溶液的电导率，作 pH 依存关系实验，从 pK_e 的变化协助推定基团种类^[16]。

3. 光谱法在活性部位研究中的作用

最常用的是紫外吸收光谱和荧光光谱。圆二色光谱也越来越多地用于这方面的研究中。使用这些方法的依据是蛋白质分子中含有生色基团，也可以用化学修饰法人为的引入生色基团。当酶和底物结合时，位于底物结合部位的生色基团必然发生某种变化。根据这种变化可以推断生色基团本身。通过化学修饰法引入生色团，能够查明生色团周围的环境，从而推断底物结合部位的情况。下面仅以溶菌酶为例，简单地说明上述方法的应用。如图 12-9 所示，Lehrer 等人^[17]作了溶菌酶以及酶同底物(或抑制剂)形成的复合物的荧光光谱。溶菌酶的荧光光谱几乎完全依赖于色氨酸残基，其量子产量为 6.5%，比一般蛋白质低很多(20% 或更多)，这意味着色氨酸的

荧光由于分子内的相互作用而消光。但酶和底物或抑制剂结合后,与结合的分子大小相应,荧光强度增大,而且光谱稍稍向短波方向移动。对这种实验结果的解释是这样:在酶分子没与底物结合时,分子内某基团与色氨酸残基相互作用产生消光,但结合后,屏蔽了某基团与色氨酸的作用,导致荧光光谱的变化。进一步研究消光变化与 pH 的关系时,证明参与结合底物的色氨酸不只一个,有 Try-62,63,108,而参与消光的基团,是 pK 值为 3.5 和 6.5 的羧基。这样,通过荧光光谱的研究,得知溶菌酶活性部位中有几个色氨酸和二羧基。

4. X-光衍射分析法研究活性部位结构

上述几种方法虽然很有用,但所得的结果还是比较零碎和间接的。近年来,将酶与底物、底物类似物或专一性抑制剂反应,形成复合物并作 X-光衍射研究,对酶的活性部位的构象以及酶与底物的接触,酶的催化机理有了进一步的认识。从已研究过的酶来看,用化学修饰法和 X-光衍射法所得的结果基本一致。比如,通过化学修饰法和其他方法得知胰凝乳蛋白酶的 His-57 和 Ser-195 与催化活性密切相关,以 X-光衍射法又进一步证实了这一点,His-57 和 Ser-195 确实折叠在一起,它们之间有氢键联系,处于分子表面为水所接近。此外,还发现 Asp-102 在 His-57 下面,它们之间也形成氢键,三者构成氢键系统。

大多数酶的活性部位都是以多种方法确定的。但也有的主要以 X-光衍射法确定的,如以 X-光衍射法确定了溶菌酶与底物分子结合的空间位置,从立体图上显然可见催化裂解糖苷键的基团只能是 Glu-35 和 Asp-52,并在此基础上提出了催化反应机制。表 12-3 列举了几种酶的部分研究结果。

四、别构部位

酶分子体现其活力是以完整结构为基础的。某些酶除活性部位而外,还有别构部位(Allosteric site)。这是 1963 年 Monod 等人提出来的^[18]。别构部位不同于活性部位,是独立于活性部位之外的另一酶部位。活性部位的功能是结合配体(底物)并催化转化配体,而别构部位虽然也是一个结合配体的部位,但结合的不是底物,而是别构配体。这种配体叫作效应剂。效应剂在结构上与底物毫无共同之处,效应剂结合到别构部位上引起酶分子构象上的变化,从而导致活性部位构象的改变,这种改变可能增进催化能力,也可能降低催化能力。别构部位结合配体和活性部位结合底物不同,配体本身并不受到任何化学变化,只是间接地影响酶活力。增强活力者叫正效应剂,反之,称为负效应剂。

前文已经介绍过天冬转氨甲酰胺酶。此酶催化天冬氨酸和氨甲酰磷酸缩合成氨甲酰天冬酰胺和磷酸。这是合成嘧啶的第一步,代谢途径的最后产物是胞嘧啶核苷酸三磷酸(CTP),CTP 是反

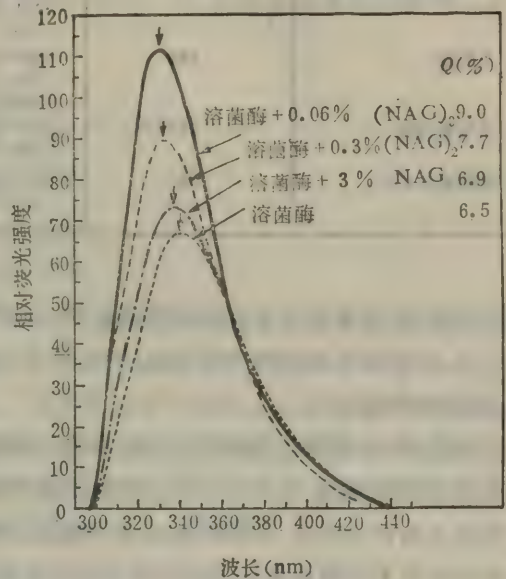


图 12-9 溶菌酶和溶菌酶复合物的荧光光谱

表 12-3 几种酶的催化基团

酶	氨基酸残基总数	催化基团及研究方法	金属离子及其他因素	X-光衍射水平
牛胰核糖核酸酶	124	His-12 (IAA) His-119 (IAA)	无	2Å
溶菌酶(鸡卵白)	129	Glu-35 (X-光衍射) Asp-52 (X-光衍射)	无	2Å
牛胰凝乳蛋白酶A	245	His-57 (TPCK) Ser-195 (DFP) Asp-102 (X-光衍射)	无	2Å
牛胰酶	238	His-46 (TLCK) Ser-183 (DFP) Asp-90 (X-光衍射)	无	2Å
木瓜蛋白酶	212	Cys-25 (IAA) His-159 (二溴丙酮)	无	2.8Å
羧肽酶A(牛)	307	Glu-270 (X-光衍射) Tyr-248 (X-光衍射)	Zn	2Å

IAA: 碘乙酸

馈抑制剂,是天冬转氨甲酰酶的负效应剂。CTP 在结构上与天冬转氨甲酰酶的底物和产物无相似之处,但它能和酶的调节亚单位结合,首先引起调节亚单位构象的变化,然后,传导到催化亚基,从而钝化酶活力。

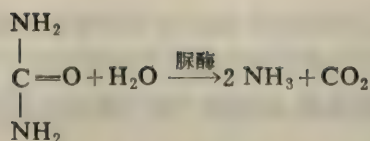
当然,并不是所有的酶都有别构部位。有的酶可能只有活性部位,而无别构部位;有的酶除具有活性部位而外,还具有不同于活性部位的配体结合部位,但该部位不影响活力;还有的酶有一种以上的别构部位,该酶的活力为一些效应剂所调节。另外,也并非所有酶的别构部位与活性部位分处于不同的亚单位上,天冬转氨甲酰酶仅是一类极端的情况。但是不论是处于同一亚单位,还是不同亚单位上,别构部位和活性部位不是重叠的,而是分立于酶的两个区域。

五、酶的专一性与诱导契合理论

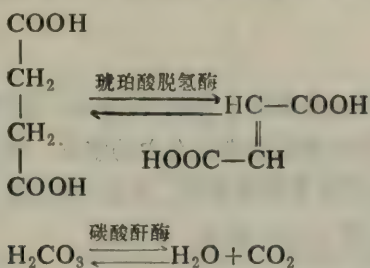
酶的专一性也称特异性。这是酶与非生物催化剂的最重要区别之一。比如,蛋白质、脂肪、淀粉都可以为酸所催化,但催化效率不高。就酶来说,情况就完全不同了,这几种物质分别由蛋白水解酶、脂肪酶和淀粉酶催化。因此,酶的专一性也就是指,一种酶只能催化某一种或某一类物质。酶的专一性是生命活动所必须的。在复杂的酶体系中,若酶没有专一性,则生命物质在体内有规律的新陈代谢就无法进行,当然,生命也就无法存在了。研究酶作用的专一性,可以了解酶催化反应的范围和性质,可以更全面地阐明酶在代谢过程中的功能,并有助于对酶作用机制的了解。

1. 专一性的类型

不同酶专一性不同,有些专一性很高,有些酶则较低。大致可以分为三类,第一类是反应专一性,即某酶只催化某一类反应。例如,醇脱氢酶催化伯醇氧化为醛的反应;转氨酶催化氨基酸和酮酸之间的转氨反应等。第二类是底物专一性,这是指对某一特定底物或某一对特定底物的催化。某些酶的底物专一性比较宽,如转氨酶类,蛋白水解酶类,肽酶类等。有的酶的底物专一性很强,比如脲酶,只能催化脲水解成氨和二氧化碳,而对脲的氯或甲基取代物均不能作用($H_2NC-NHCl, H_2NCONHCH_3$)。

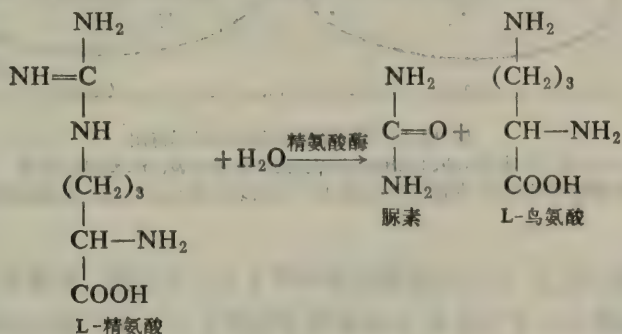


又如琥珀酸脱氢酶仅催化琥珀酸脱氢变成延胡索酸(反丁烯二酸),而对琥珀酸的同系物:丙二酸,戊二酸不但不能作用,反而受其抑制。碳酸酐酶只催化碳酸水解或合成,不能作用于其他物质。第三类是立体专一性。酶和底物作用时,不仅表现化学专一性,往往也表现出立体专一性。

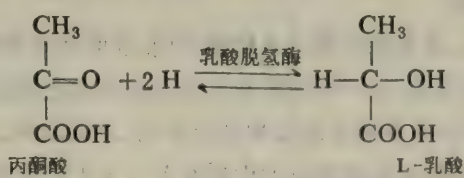


酶的立体专一性是相当普遍的现象。可以说,几乎所有已知的酶均具有立体专一性,不过作用速度有很大差别。立体专一性可分为DL-立体异构专一性和几何异构专一性。

① DL-立体异构专一性。旋光物质有D-和L-型两种旋光异构体之分。凡是只能催化D型和L型两个对映体中的一个,而不能催化另一个的特异性,称为酶的DL-立体专一性。这是绝对立体专一性。例如: D-氨基酸氧化酶只能催化D-氨基酸氧化脱氨,而L-氨基酸氧化酶只催化L-氨基酸氧化脱氨。精氨酸酶只水解L-精氨酸,不能水解D-精氨酸:

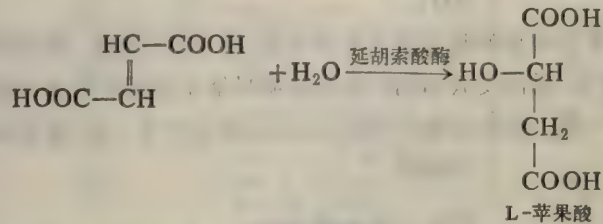


底物分子没有不对称碳原子,而酶促反应产物含有不对称碳原子时,该底物受酶催化后,往往只得到一种旋光异构体。如丙酮酸受乳酸脱氢酶催化还原时,只产生L-乳酸:



有些酶能作用于D型和L型两个对映体,但作用速度有大小之别,这种性质称为相对立体专一性。

② 几何异构专一性(顺反式立体特异性)。含有双键的物质有顺、反两种异构体。有些酶对于顺反异构体,只能作用其中之一,称这种性质为几何异构专一性。例如,延胡索酸酶只催化延胡索酸(反丁烯二酸)加水变成苹果酸,而对顺丁烯二酸不但不作用,反而受其抑制;



酶的特异性也是以酶的结构为基础的。显然“反应专一性”取决于活性部位中催化基团;“底物特异性”取决于活性部位,包括底物结合部位在内的整体。酶的立体特异性说明酶和底物的结合至少得有三个点,否则就不能产生立体特异性。比如,为了区分配体A和其镜像体A',酶的X、Y、Z三个基团与底物结合时,如图12-10所示;

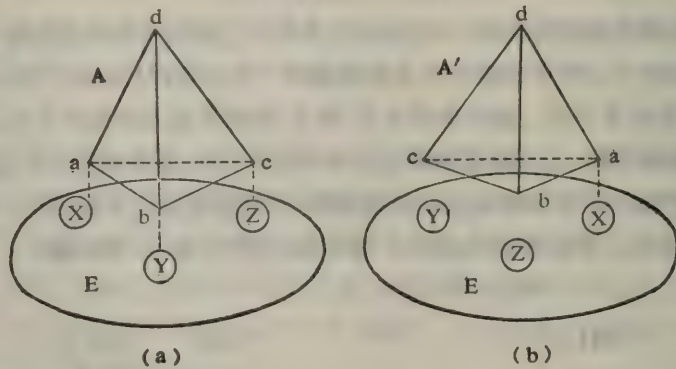


图 12-10 结合底物立体特异性示意图

(a) 配体分子A的三个基团a、b、c与酶结合部位的三个基团⊗、⊙、⊚相互作用 (b) 配体A'是A的镜像对映体,酶的结合部位(非镜像体)转动180°以使⊗对准a,但b和c都不能和相应的⊙⊚结合。

当配体A与酶结合时,⊗、⊙、⊚三个基团分别对准a、b、c三基团。如果酶与A'结合时,把⊗对准a,则⊙、⊚和相应的b、c合不起来,也就是酶不能结合A'。如果酶和底物是二点结合,显然无法区分A和A'对映体。实际上,酶的活性部位确实不是一点、二点、而是由一些基团组成的多点部位,底物和酶的结合是在一定范围内的空间区域。

2. 蛋白水解酶的专一性

酶的专一性各有其特点,这里仅以蛋白水解酶为例,说明其工作情况。蛋白水解酶的种类很多,专一性各不相同,曾一度认为,专一性表现在对不同大小的底物分子水解能力不同,所以把酶区分为蛋白酶和肽酶。后来以大量的合成底物进行研究,才认识到,决定的因素不是底物分子的大小,而是与被水解的键邻接的氨基酸侧链的性质有关。人工合成底物时,可根据需要设计其组成成分,可以是不同氨基酸组成的肽、酯或酰胺,或带有不同保护基的各种各样的合成底物,从中找出一些规律,如表12-4,12-5,12-6分别列出最常用的蛋白水解酶与部分底物的作用情况。

表 12-4 胰蛋白酶对合成底物的作用

底 物	作 用
赖氨酸乙酯	++++
苯甲酰甘氨酸赖氨酸	++++
苯甲酰精氨酸	++
苯甲酰赖氨酸	++
甘氨酸赖氨酸	+
酪氨酸酪氨酸赖氨酸酪氨酸酪氨酸	+
赖氨酸	±
苯甲酰(苯氧羰基)精氨酸	-
苯甲酰(苯氧羰基)赖氨酸	-
酪氨酸赖氨酸酪氨酸	-

表 12-5 胰凝乳蛋白酶对合成底物的作用

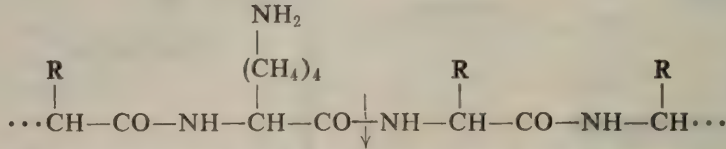
底 物	作 用
苯甲酰酪氨酸乙酯	+++++
苯甲酰(硝基)酪氨酸乙酯	+++++
苯甲酰苯丙氨酸甲酯	++++
乙酰苯丙氨酸	+
苯丙氨酸	±
苯氧羰基酪氨酸甘氨酸	-
苯氧羰基谷氨酸酪氨酸	-
苯氧羰基谷氨酸苯丙氨酸	-

表 12-6 胃蛋白酶与合成底物的作用

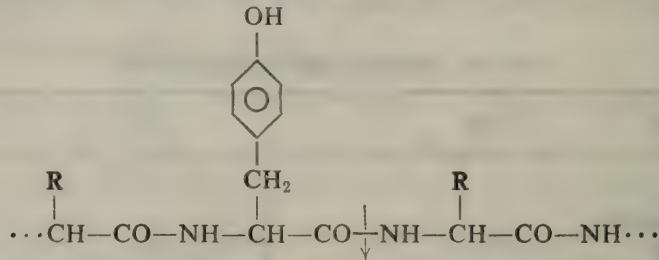
底 物	作 用
乙酰苯丙氨酸苯丙氨酸	+++++
苯氧羰基酪氨酸苯丙氨酸	+++++
苯氧羰基半胱氨酸酪氨酸	++++
苯氧羰基谷氨酸酪氨酸	++++
半胱氨酸酪氨酸	++
苯氧羰基苯丙氨酸酪氨酸	+
酪氨酸半胱氨酸	+
谷氨酸酪氨酸	±
苯氧羰基(乙酰)酪氨酸苯丙氨酸	-
苯氧羰基谷氨酸(碘)酪氨酸	-
苯氧羰基谷氨酸酪氨酸	-

[注] “+” 愈多，作用愈快
 “±” 作用很慢
 “-” 无作用

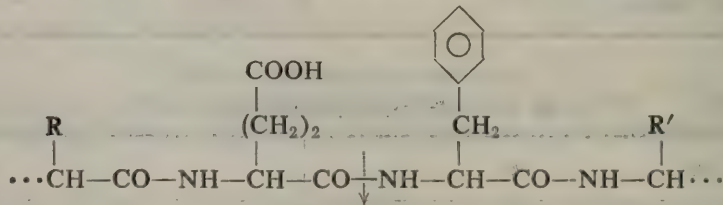
胰蛋白酶水解的键必须是碱性氨基酸(Arg、Lys)的羧基形成的肽键、酯键或酰胺键。此碱性氨基酸的侧链碱基被取代,酶便完全不作用,但 α NH_2 被取代却有利于酶的作用。另外,被水解键的邻近若有酸性侧链则不利于水解。胰蛋白酶虽然是蛋白水解酶,但其水解酯键的速度远比肽键为快。



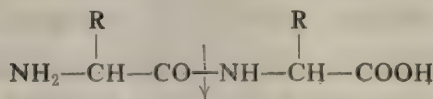
胰凝乳蛋白酶与胰蛋白酶类似,能水解肽键、酯键、酰胺键。水解酯键的速度大于肽键。要求被水解的键有芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸)的羧基参与,其邻近不能有自由羧基存在。芳香族氨基酸的 α - NH_2 被酰化,增强酶的作用速度。



胃蛋白酶只作用于肽键而不能作用于酯键和酰胺键。要求被水解的肽键是芳香族氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸)的氨基和酸性氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸)、蛋氨酸的羧基形成的肽键,酸性氨基酸的侧链羧基必须是未取代的。另外,邻近氨基酸上不能有自由氨基。



上列所述各酶专一性不是很严格的,不能满足上述条件的底物被水解时速度减慢,减慢的程度也很不相同。羧肽酶作用于多肽时要求肽键之后有自由羧基,邻近若有自由氨基便抑制酶的作用。氨肽酶与之相反,需要在被水解肽键的一侧有自由的 α -氨基,酶活性受邻近的自由羧基抑制。羧肽酶和氨肽酶各不止一种。每种对C-末端或N-末端氨基酸的性质都有特殊的要求。这二种酶都不能水解二肽。二肽酶只作用于二肽,要求相邻的两个氨基酸上的 α - NH_2 和 α - CO-OH 同时存在。二肽酶有多种,不同的二肽酶对底物成分有不同的要求。



3. 锁钥学说与诱导契合理论

Fischer^[19]早在 1894 年就提出了锁钥学说,也有人把此学说称为模板学说。锁钥学说认为,酶与底物之间在结构上有严格的互补关系,如果底物分子在结构上有微小的改变,就不能契入酶分子中,因而不能被酶作用。如图 12-11 所示:

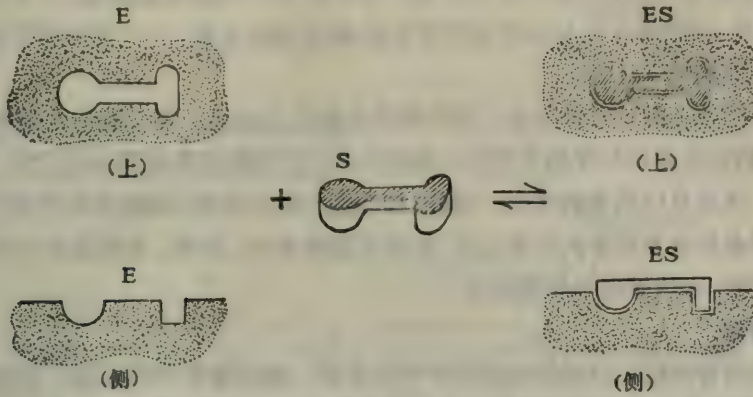


图 12-11 酶作用的锁钥学说示意图

锁钥学说在结构上的严格要求实际上意味着酶分子结构在形状上是固定的,而且是硬的。如果酶分子构象发生微小的变化,自然就破坏了和底物的契合关系。但是,越来越多的事实说明,锁钥学说虽然有合理的内核,但与许多实验事实不符。因而在 1958 年 Koshland^[20]提出了诱导契合理论。Koshland 保留了底物和酶之间的互补概念,但认为酶分子本身不是固定不变的硬东西,酶分子活性部位的氨基酸侧链的排布是具有一定柔性的,酶分子与底物的契合是动态的契合,底物分子可诱导酶分子构象发生一定的变化,以利于两者的契合和催化反应。更具体一点说,当酶接近专一性底物时,底物诱导酶活性部位构象发生变化,使得催化部位各基团正确排布,使催化基团位于底物敏感键附近正确的位置,二者互相契合,形成酶-底物复合物。Koshland 以各种模型说明诱导契合学说^[2,20,21]。图 12-12 是上述理论的简单说明。

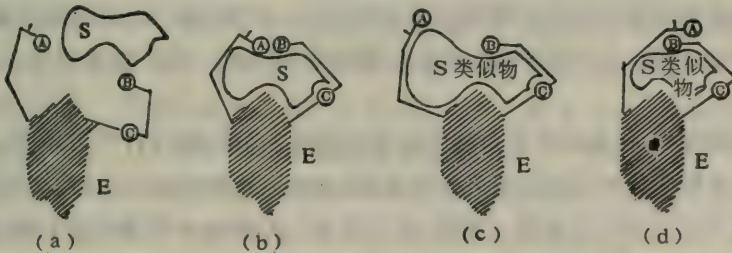


图 12-12 Koshland 诱导契合理论 (a)底物接近活性部位(b)底物结合诱导催化基团 A 和 B 正确排布(c)和(d)底物类似物(竞争性抑制剂)与酶的结合,与基团 C 相适应,但催化基团排布不当。

从图 13-12 可见,只有底物才能诱导催化基团 A、B 正确地排布以便进行催化反应,而底物类似物不论大小如何,尽管也能与结合基团 C 契合,但由于 A、B 方位不正确而不能发生反应。

“诱导契合说”不仅能解释锁钥学说不能解释的实验事实,而且近年来,应用各种物理化学方

法,如: X-光衍射分析、旋光色散、圆二色性、核磁共振、差示光谱等,确实证明了酶与底物结合时酶的构象发生变化。以 X-光衍射法看到了溶菌酶、羧肽酶 A、弹性蛋白酶、乳酸脱氢酶等在与底物以及底物类似物结合时,活性部位的构象发生轻微的变化。比如,溶菌酶与(NAG)₃结合时,糖残基 C 环上的 O-6、O-3 原子与 Try-62、Try-63 的吡咯 N 形成氢键, Try-62 吡咯环移动大约 0.75 Å。另外,羧肽酶 A 在与合成底物甘氨酸-酪氨酸结合时, Tyr-248 酚羟基移动了 12 Å,相当于酶分子直径的 1/4。

底物分子与酶结合时,诱导酶分子活性部位构象发生变化,这一事实并不难理解。我们知道,天然蛋白质的构象是各种作用力协调一致的结果,如果环境发生微小的变化,就可能引起构象的局部变化。这是早已熟知的事实。同样,如果酶与配体结合,必然引起作用力的变化,活性部位中有些基团必然改变原来的结合方式,转而和配体结合,这样,在活性部位内部引起了新的作用力之间的平衡,必然导致构象的变化。

六、酶原激活

一些酶在胞内合成时,以无活性的前体形式存在。酶的前体叫作酶原。在研究酶的结构与活性方面,酶原激活是一个很好的课题。比如胰凝乳蛋白酶原、胰蛋白酶原都是在胰细胞内合成的,然后输送到胞外消化系统中。可以想象,如果蛋白水解酶在胞内一合成出来就有活性的话,对胞内的其他蛋白质成份是个威胁。因此,就这一点来讲,酶原——酶的激活是有机体调控酶活性的一种办法。

在酶原激活过程中,酶原分子结构发生了什么样的变化呢?这方面的工作一直吸引着人们极大的注意。下面以胰凝乳蛋白酶原为例,说明激活的大致过程。胰凝乳蛋白酶原在少量胰酶作用下,激活成有活性的胰凝乳蛋白酶。这是个很复杂的过程,涉及一系列结构上的变化,通过对该酶原激活的研究,大致可以弄清两个问题:一是激活过程中酶原一级结构上的变化;二是从构象的变化上看活性部位。

由于胰酶的用量不同,胰凝乳蛋白酶原的激活分为快激活和慢激活二种。慢激活基本上是一个自我催化过程。Jacobsen^[22]首先描述了快速激活过程,而后 Bettelheim^[23]等人又进行了详细的研究。激活是从胰酶水解 Arg-15 和 Ile-16 之间的肽键开始,首先生成活性的 π 型胰凝乳蛋白酶,此后,在自我催化作用下水解第二个肽键(Leu-13 和 Ser-14 之间的肽键)生成 δ -型酶和一个二肽 Ser-Arg,最后,经自我催化,变成 α -胰凝乳蛋白酶,并产生第二个二肽 Thr-Asn。如图 12-13 所示:

胰凝乳蛋白酶原在 δ -胰凝乳蛋白酶的作用下裂解三个肽键(Tyr¹⁴⁶-Thr¹⁴⁷、Asn¹⁴⁸-Ala¹⁴⁹ 和 Leu¹³-Ser¹⁴),其水解产物叫作新胰凝乳蛋白酶原(neochymotrypsinogen)。新胰凝乳蛋白酶原由胰酶裂解 Arg¹⁵-Ile¹⁶ 肽键之后激活。因此,有人认为,大部分 α -胰凝乳蛋白酶并非 δ -胰凝乳蛋白酶自我水解的产物,而是来源于新胰凝乳蛋白酶原^[24]。

由酶原开始到产生 α -胰凝乳蛋白酶,虽然尚有若干细节有待研究,但就酶原激活中所涉及的一级结构的变化,已大致清楚了。146—147,148—149 肽键断裂并不产生活力,13—14 肽键断裂也不产生活力,只有 Arg¹⁵-Ile¹⁶ 肽键断裂才使酶原激活,显然,产生 NH₂-Ile 是活力起动的关键。但是单从一级结构变化本身还不能回答“酶原为什么经过这样的变化就变成活性形式”这

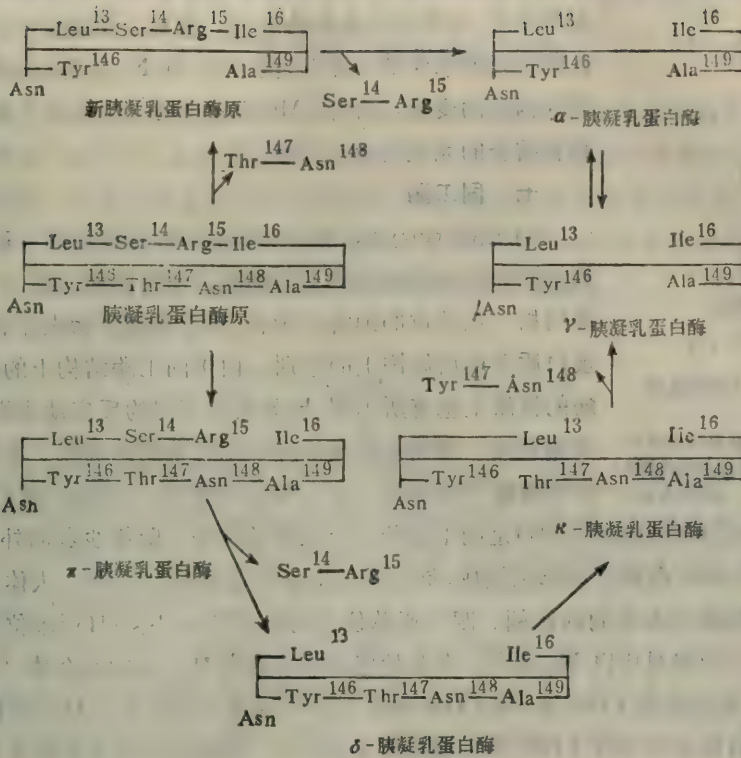


图 12-13 胰凝乳蛋白酶原激活图示

样一个更加深入的问题。如果从酶原激活过程中构象的变化观察活性部位，似乎对这个问题的理解就更加深入了。

X-光衍射分析结果证明，胰凝乳蛋白酶原与胰凝乳蛋白酶的三级结构很相似^[26]，主链的走向和肽链的折叠方式没什么变化。2.5 Å 分辨率证明，活性部位中的电荷接力系统的三个基团 Ser-195、His-57、Asp-102 的空间排布也相似，只有 His-57 的咪唑平面稍有偏转。看来，酶原和酶不仅整个分子构象类似，而且活性部位局部结构也类似。显然，酶原活力的发动仅与活性部位局部细节的变化有关。关键区域是与 Ile-16 有关的局部。由于 Arg¹⁵-Ile¹⁶ 肽键断开，产生了 Ile¹⁶ 为 N-末端的 B 链，Ile-16-Val-17 围绕主链旋转 180°，重新定位，并与分子内部的 Asp-194 形成离子对。Asp-194 在酶原中与 His-40 的 N³ 形成氢键，在激活过程中，Asp-194 改变了位置，指向 Ile-16，而 His-40 的 N³ 与 Gly-193 的羰基氧形成氢键。此外，Arg-145 的胍基在酶原中与分子内部的 Asp-194 的 -COOH 很接近，两者之间有静电作用力。激活后 Arg-145 离开原位，伸展到溶剂中。Met-192 在酶原活化中从隐蔽位置转到分子表面。总之，酶原激活在分子结构上有如下变化：① Arg-15-Ile-16 肽键水解，产生游离的 -COO⁻ 和 NH₃⁺ 基团；② 游离的 NH₃⁺ 基团进入分子内部同隐蔽的 Asp-194 相互作用；③ 16-17 侧链疏水基团被隐蔽起来；④ 分子内部的 Asp-194 离开 His-40，而 His-40 与 Gly-193 形成氢键；⑤ 带正电荷的 Arg-

145 离开分子表面进入溶剂; ⑥ 分子内部的 Met-192 转到分子表面; ⑦ 214—217 片段的位置

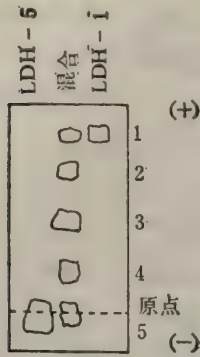


图 12-14 LDH 同工酶的电泳分离。

同工酶分离是在淀粉凝胶电泳上进行的, 左边是纯 LDH-5, 右边是纯 LDH-1, 中间样品是 LDH 1—5 的混合物。

有所变化, 可能与结合底物有关。看来, 在酶原分子中, 特异性结合底物的槽穴仅部分存在, 由于 Ile-16 N-末端的出现, 引起一系列的构象的变化, 特别是 Met-192 的转动, 形成了能与特异性底物相结合的完整的疏水口袋。

七、同工酶

同工酶(isozymes 或 isoenzymes)是催化同一反应, 或者说, 具有同样特异性而结构不同的酶。结构不同包括一级结构或高级结构, 亚单位的纯合与杂合, 等位基因产物或非等位基因产物, 蛋白质合成后修饰上的差别。由于同工酶结构上的差异反映在酶的性质上也有所不同, 比如具有不同的反应动力学常数, 不同的代谢调控, 因而在代谢反应中起着不同的功能。在国内以往的文章中多称“同功酶”, 这一叫法不妥^[26], 还是叫“同工酶”更确切。

动物器官中的乳酸脱氢酶(LDH)是同工酶的一个很好的例子。除极少数例外, L-乳酸脱氢酶分子量接近 140,000, 由四个亚单位组成, 每个亚单位分子量接近 35,000。人体有五种乳酸脱氢酶同工酶, 不同的组织有不同的比例。四个亚单位有两种类型, 分别叫 H 亚单位和 M 亚单位。心肌中以 H₄ 为主, 骨骼肌中以 M₄ 为主, 在其他组织中存在着 H、M 的杂合体 (H₃M, H₂M₂, HM₃)。在五种不同形式的 LDH 中, H₄LDH 叫作 LDH-1 (或 LDH-A), M₄LDH 叫作 LDH-5 (或 LDH-B), 杂合体分别叫作 LDH-2、LDH-3、LDH-4。两种类型亚单位在许多方面有所差别, 但最重要的差别是氨基酸组成和螺旋结构以及 K_m 等动力学性质不同。因氨基酸组成不同, 则带电荷情况不同, 所以可用电泳法把不同类型的 LDH 分开。电泳图谱如图 12—14 所示:

两种类型亚单位的米氏常数显著不同。骨骼肌 LDH 的对应底物丙酮酸的 K_m 值高, 因此, 当丙酮酸浓度增加时, 酶反应速度增大。而心肌 LDH 对丙酮酸底物的 K_m 值低, 丙酮酸浓度增大时, 酶很快饱和, 反应速度不能随着底物浓度的增加而增大, 而且在高丙酮酸浓度时活力被抑制。如表 12-7 所示:

表 12-7 人 LDH 对各种不同底物的 K_m 值

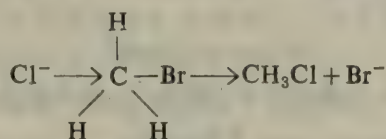
底物	H-LDH ($\times 10^{-4}M$)	M-LDH ($\times 10^{-4}$)
丙酮酸	1.2	4.6
α -丁酮酸	17	63
α -酮戊酸	54	101
L-乳酸	41	143
L- α -羟基丁酸	44	48

基于上述, 肌肉中 LDH-5 多, 而心、脑中 LDH-1 多。肌肉中可能产生大量的乳酸, 心、脑则相反, 在高浓度丙酮酸条件下, 丙酮酸不能转变为乳酸, 被迫进入 TCA 循环, 氧化提供能量。说

明不同器官存在的同工酶与各器官的代谢环境相适应,起着不同的生理功能。

第二节 酶的催化机制

上一节中大致说明了酶在结构上的特点。酶的结构是行使催化功能的基础。但是,还没有回答酶是怎样结合底物,又怎样进行催化,哪些因素促成酶具有异乎寻常的高催化效率等,这样一些根本性问题。这类问题也可以说是酶的催化机制问题,也就是要说明酶反应的各个步骤,其中主要是说明化学键的裂解和新键形成的机理。比如甲基溴与氯离子的简单取代反应,生成甲基氯和溴离子,这个反应被认为是 Cl^- 攻击甲基的碳,同时置换出 Br^- ,



了解酶的催化机制显然是人们长期以来梦寐以求的问题。近年来,这方面有了一定的进展,对影响酶催化效率的因素有了一个轮廓性的了解,认识到了一些规律,但还有很多问题需要解决,还有很多规律性的东西没有掌握。显然,彻底阐明酶的催化机制是酶学研究的长期任务。

一、过渡态与活化能

还以上述 Cl^- 与 CH_3Br 的取代反应为例。 Cl^- 对甲基碳原子的攻击过程中,在某一时刻,由于 $\text{C}-\text{Br}$ 键的拉长,部分破坏,而新键 $\text{C}-\text{Cl}$ 部分生成,处于这种状态的化合物不是一个普通化合物,而是对底物和产物两方面来讲,在能量上都是不稳定的化合物。这个不稳定的中间结构,叫作过渡态。如图 12-15 (a) 所示:

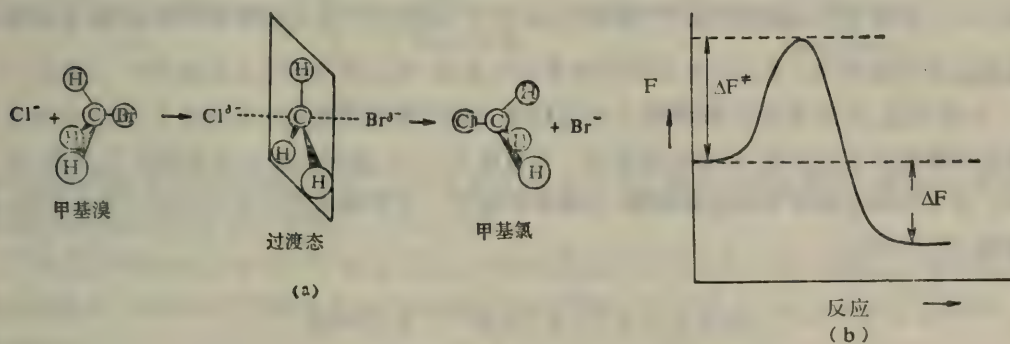
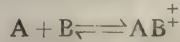


图 12-15 氯离子与甲基溴的取代反应(a) 过渡态的形成(b) 从反应物到产物自由能对反应过程作图

此时,与中心碳原子成键已不是正四面体, $\text{C}-\text{H}$ 键在一平面上, $\text{Cl}^{\delta-}$ 与 $\text{Br}^{\delta-}$ 和碳原子间的部分键与平面呈直角。图 12-15(b) 是表示过渡态的作图。纵坐标是自由能 F , 横坐标是反应坐标。反应坐标通常并不指定严格的物理意义, 但是代表了从反应物到产物的反应进程。 ΔF 是底物和产物之间 F 值之差, 是该反应全部自由能的变化。 ΔF^\ddagger 是过渡态和底物之间 F 之差, 叫作活化自由能, 代表了反应的能量壁垒。也就是说, 底物(或称为反应物)转变到产物之前必须具备

某一最小能量，以便通过过渡态。该“最小能量”就是活化自由能。

如果我们考虑A和B两分子的反应，以 AB^+ 代表过渡态，则：



以 K^+ 表示平衡常数，则：

$$K^+ = \frac{[AB^+]}{[A][B]}$$

从A、B形成 AB^+ 的活化自由能：

$$\Delta F^+ = -RT \ln K^+ \quad (12-1)$$

反应速度取决于单位时间内进入过渡态的分子数目 $^{27)}$ ，可表示为：

$$v = \frac{RT}{Nh} [AB^+] \quad (12-2)$$

R和T表示气体常数和绝对温度，N为阿佛加德罗常数，h是普郎克常数。又因：

$$[AB^+] = K^+ [A][B]$$

则：

$$v = \frac{RT}{Nh} K^+ [A][B] = k [A][B] \quad (12-3)$$

k是二级反应速度常数，显然：

$$k = \frac{RT}{Nh} K^+ \quad (12-4)$$

方程式(12-4)意味着反应速度大者(k值大)是由于 K^+ 值大， K^+ 值大意味着在给定的反应物浓度下过渡态分子浓度大。从式(12-4)可以计算 K^+ ，从而，可以算出活化自由能 ΔF^+ （按式12-1计算）。由此可见，反应速度快者，活化自由能较小。生物体系在极温和的条件下，以自身特有的生物催化剂降低活化自由能，增加反应速度。在常温25°C下，酶催化反应是非催化反应的 $10^6 \sim 10^{15}$ 倍。为了加深对酶催化反应的理解，下面我们比较一下酶催化和非催化反应。双分子A、B反应如图12-16所示：

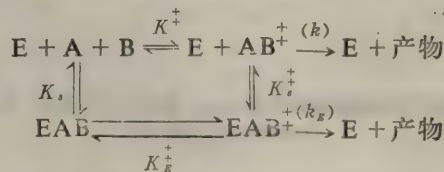


图 12-16

图中上面的路线是通过 AB^+ 过渡态的非催化反应。下面的路线是酶催化反应，先形成酶-底物复合物EAB，通过 EAB^+ 过渡态，以新的表现速度常数 k_E 反应。形成 EAB^+ 可以按 $E + A + B \rightarrow EAB \rightarrow EAB^+$ 路线，也可以从 $E + A + B \rightarrow E + AB^+ \rightarrow EAB^+$ 得到。 K_s 是 $E + A + B$ 形成

EAB 酶-底物复合物的平衡常数, K_s^+ 是 EAB 形成 EAB^+ 的平衡常数。因 AB^+ 是不稳定瞬间存在的物质, 所以 K_s^+ 是 AB^+ 结合到酶上形成 EAB^+ 的理论平衡常数。从图 12-16 可以得到下式:

$$K_s, K_E^+ \rightleftharpoons K_s^+, K_E^+ \quad (12-5)$$

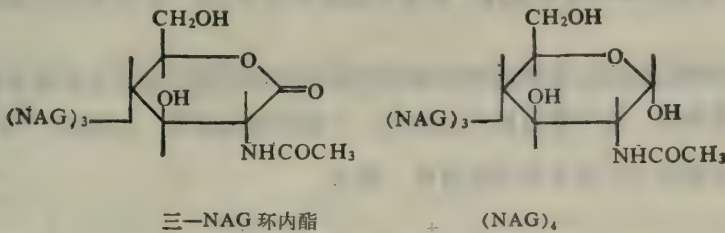
$$\because k_E \gg k, \text{ 则: } K_E^+ \gg K_s^+$$

从(12-5)可知:

$$K_s^+ \gg K_s \quad (12-6)$$

$K_s^+ \gg K_s$ 说明酶结合“过渡态”比结合底物 A、B 强得多。这个结论很重要, 使我们对酶的专一性有了进一步的认识。显然, 酶对底物和产物都有某种程度的专一性, 但酶对过渡态的专一性最强。按照这种理论合成了一些酶的“过渡态类似物”。这种物质应该是结构上类似于酶催化反应中的过渡态, 然而是一个稳定的化合物, 这种物质应该很牢固地结合到酶分子上, 应该是酶的最好的抑制剂(因而也叫作过渡态抑制剂)。

溶菌酶的底物是 N-乙酰-葡萄糖胺 NAG 和 N-乙酰粘质酸 NAM 交替组成的聚合物。从实验观察得知, 在过渡态时, 底物的一个残基被迫从椅式构象变为不稳定的半椅式构象, 反应就发生在这个形变的残基上。按“过渡态”的要求, 合成了 NAG 四聚体的衍生物, 最后一个残基以环内酯代替六碳环:



稳定的环内酯是半椅式构象, 符合“过渡态类似物”的条件。事实上也发现三-NAG-一环内酯化合物和溶菌酶的亲合力比 $(NAG)_4$ 大 3600 倍。

从上述可知, 酶分子是一个在结构上与所催化的反应的活性复合物(过渡态)互补的分子。酶对活性复合物的吸引导致能量的降低, 因而降低了反应的活化能, 增加了反应速度^[28]。参看图 12-17。

二、微观可逆性

微观可逆性是一个重要的统计力学原理: 任一化学反应的逆向反应机制必定是正向反应机制的逆转。按此原理, 如果知道了某反应机制, 其逆反应机制也就清楚了。另外, 也可以这样说, 酶所催化的正向和逆向反应必然发生在酶的另一活性部位上。微观可逆性原理在研究酶的催化机制时很有用, 往往能够检验所提出的机制是否正确。

三、降低活化自由能的几个因素

1. 邻近(Proximity)和定向(Orientation)

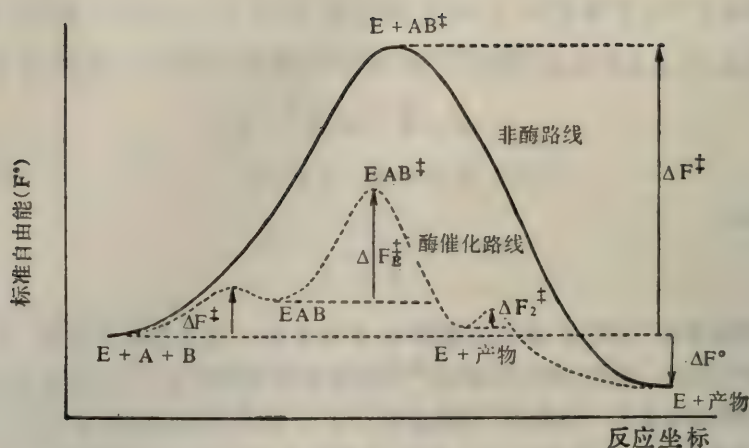


图 12-17 双分子反应活化图(A + B → 产物)。非催化和酶催化反应活化能的比较。ΔF[‡]: 非催化反应; ΔF^{‡‡}: 酶催化反应活化能之差。

“邻近”效应系指A和B两个底物分子结合在酶分子活性部位上,其反应基团互相靠近,从而降低了进入过渡态所需要的能量,这种效应称为邻近效应。邻近效应对有机催化和酶的催化反应都有影响的因素。显然,邻近效应大大增加了反应物的有效浓度。正如大家所熟知的那样,化学反应速度与反应物的浓度成正比。如果在反应体系中,某一区域增加反应物浓度,其反应速度也相应提高。

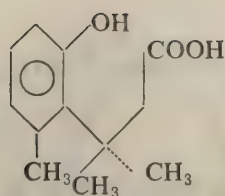
酶催化反应的邻近效应,使得活性部位的底物的有效浓度远远大于溶液中的浓度,底物浓度大,当然反应速度加快。这个效应也可以从另一个角度加以说明:在溶液中,A和B两分子进入过渡态AB[‡],此过程的ΔS[‡]是个较大的负值。因为:

$$\Delta F^{\ddagger} = \Delta H^{\ddagger} - T\Delta S^{\ddagger}$$

所以该过程的ΔF[‡]亦较大。但对酶催化反应来讲,由于“邻近”效应,酶的活性部位先结合A、B两分子,反应物在反应之前已大大失去活动的自由度,使得进入过渡态的ΔS[‡]负值大幅度下降。因此,与溶液中A、B两分子反应的ΔF[‡]相比,ΔF[‡]大大降低,从而加快反应速度。

“定向”和“邻近”紧密相关地影响着酶催化反应效果。A、B两分子为进入过渡态,其两个反应基团的分子轨道要交叉,并有极强的方向性,稍稍脱离基团之间的正确方向,就要付出多余的能量,才能进入过渡态。反应物结合在专一的活性部位上,给分子轨道交叉提供了良好的条件,这是溶液中由于分子碰撞而进入过渡态所远远比不了的。对酶催化反应来讲,“邻近”和“定向”虽然是两个概念,但实际上是共同产生催化效果的。显然,酶的“邻近”“定向”效应对双分子反应的效果大于单分子的效果。

另外,从使分子间的反应转为分子内的反应可加大反应速度的角度来看,可以加深对“邻近”“定向”效应的理解。比如硫酸酯的催化水解,以咪唑基为催化剂:



总之,“邻近”与“定向”效应加大催化反应效果是很明显的,但在定量上究竟能使反应速度提高多大倍数还有待于进一步研究。

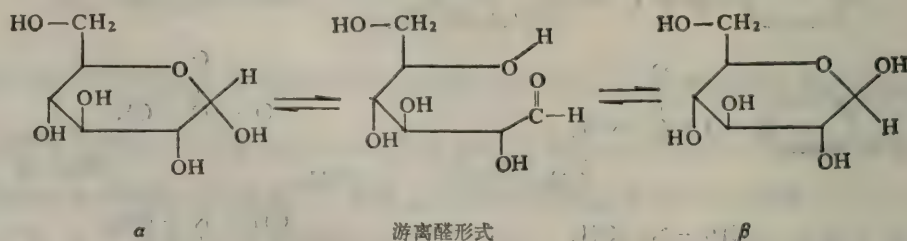
2. 底物形变(strain, distortion)

过渡态是分子的不稳定态,其中某些化学键是处于伸展或形变之中。反应物要达到过渡态的化学键状态要付出能量。酶活性部位与底物的结合,使得底物的某些敏感键发生形变,从而使底物分子接近于过渡态,这也是影响酶催化效率的重要因素之一。底物形变可能是发生在底物与酶结合时,为很好地契合,底物的构象有了小的变化,也可能是由于底物诱导酶蛋白改变构象之后随之而来的一个结果。总之,酶活性部位的某些基团或离子,使底物敏感键的某些基团的电子云发生改变,或者说,使底物发生构象的改变,从而形成互相契合的酶底物复合物。羧基肽酶A和溶菌酶的X-光衍射分析为底物形变提供了实验证据。

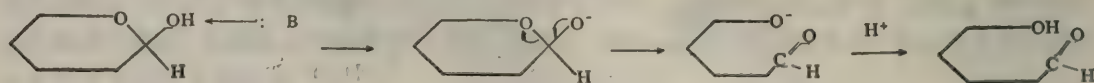
3. 一般酸碱催化与质子转移通路

许多酶所催化的化学反应往往也能为碱、酸或碱和酸催化(当然酶催化的化学反应效率比后者高得多)。比如葡萄糖的变旋,即 α -葡萄糖转变为 β 形式的反应,变旋酶是此反应的生物催化剂,同时,此反应也能为无机的碱和酸来催化。显然,一些酶的催化必与酸碱催化有某种关系。也就是说,酶蛋白的活性部位中有各种不同的酸碱基团,这些基团必然参与催化反应。

(1) 一般碱酸催化。碱酸催化在有机化学中是一种普遍和有效的催化方式。比如:葡萄糖变旋反应是通过游离醛形式:

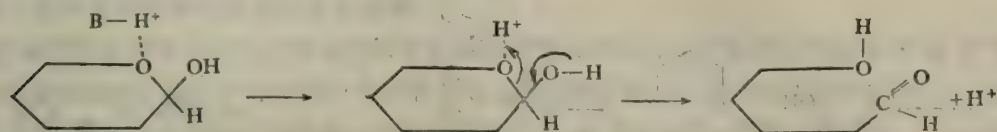


碱催化变旋,如 OH^- 离子直接攻击羟基的质子,除去一个质子后形成阴离子,此阴离子异构化形成开环的阴离子,然后从 H_3O^+ 提供一个质子给阴离子,如下式:



上式碱催化可能是 OH^- 离子本身,也可为其他弱碱——质子受体所催化(以B表示,共轭酸为HB)。但有些反应,其催化反应速度仅与 OH^- 离子有关,正比于 OH^- 离子的浓度,其他弱碱B不

能影响催化反应速度,这种催化叫作特殊碱催化。葡萄糖变旋反应既能以 OH^- 和 H_2O 催化,也能为一般碱(质子受体)和一般酸(质子给体)所催化,称这种催化为一般酸碱催化。酸催化葡萄糖变旋反应(包括特殊酸催化和一般酸催化)是糖环的氧原子从酸得到一个质子,如下式:



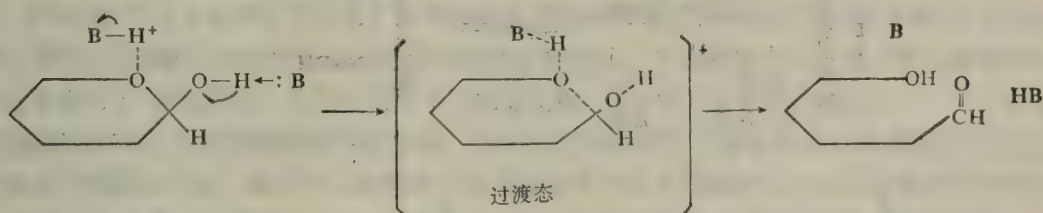
显然,在酸碱催化反应中,特殊酸碱催化起的作用有限,而一般酸碱催化起重要作用。酶蛋白活性部位中的一般酸碱基团主要有咪唑基、羧基、巯基和氨基,如表 12-8 所示。其中组氨酸的咪唑基最活泼,是最有效的催化基团。

表 12-8 酶蛋白中的一般酸碱基团

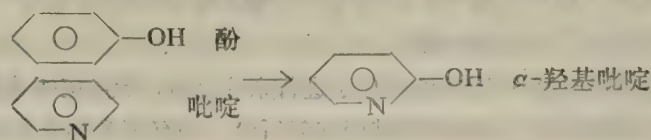
质 子 供 体 (HB)	质 子 受 体 (B)
$-\text{COOH}$	$-\text{COO}^-$
$-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}_2$
$-\text{SH}$	$-\text{S}^-$

(2) 酸碱共催化与质子转移通路

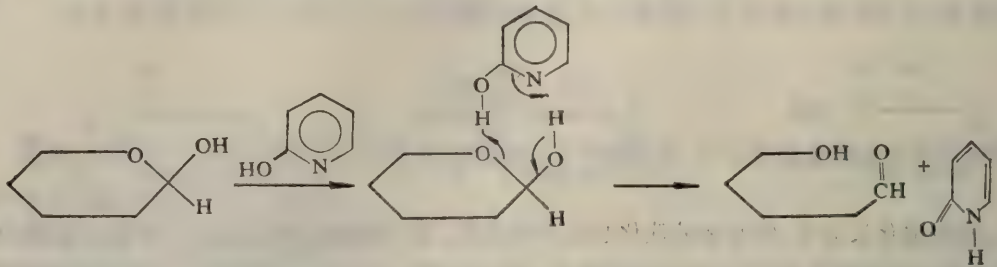
四甲基葡萄糖在苯中以吡啶(碱)或以酚(酸)单独催化变旋反应速度很慢,但把吡啶和酚混合物作为催化剂,变旋速度加快,因此 Swain 和 Brown^[29]提出了酸和碱一起参与催化的机制,即酸碱共催化。



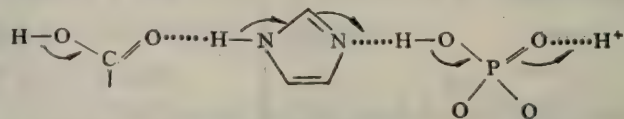
如果把酚和吡啶的特点都集中到一个分子上,即合成 α -羟基吡啶,它的催化效率比单独酚,或单独吡啶碱催化更有效,这是两个催化基团集中到一个分子上有利于质子的传递。



在苯中 0.1 M 四甲基葡萄糖以 0.001 M α -羟基吡啶为催化剂, 其反应速度比以 0.001 M 吡啶加上 0.001 M 酚混合催化速度快 7000 倍。催化机制可能如下式:



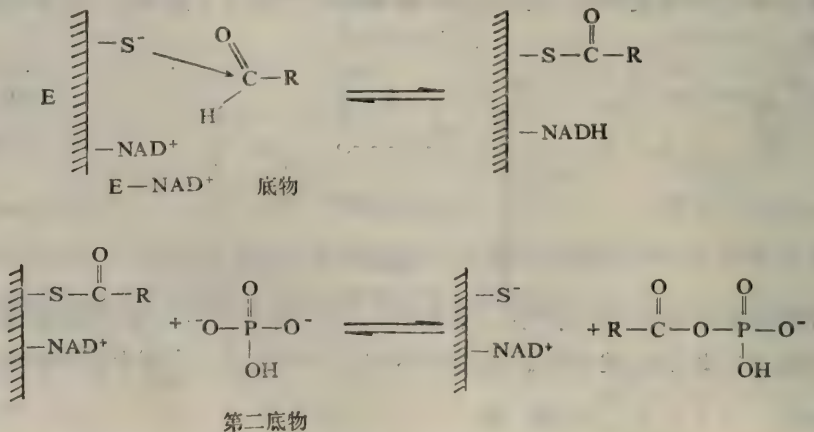
该反应的催化剂 α -羟基吡啶变成吡啶酮, 二者为互变体, 处于相互平衡中。因此, 该反应催化剂的高效率不仅是碱酸基团相互靠近, 而且催化剂反复循环于互变体之间, 给质子转移形成通路。因此, 也有人把这种催化叫互变催化 (tautomeric catalysis)。在酶-底物复合物中, 沿着氢键进行质子传递可能是某些酶催化反应的一个重要特征^[30]。比如羧基、咪唑基和磷酸之间的氢键构成质子传递通路(电子从左向右流动)如下:



可以想象, 在酶蛋白活性部位内部由几个基团构成质子传递通路会大大提高催化效率。

4. 亲核与亲电催化反应

亲核催化是指, 具有一个非共用电子对的基团或原子, 攻击缺少电子具有部分正电性的原子, 并利用非共用电子对形成共价键的催化反应。亲核反应形成一个不稳定的中间物, 因此这种催化反应也叫作共价催化。所用的试剂叫作亲核试剂。比如, 磷酸甘油醛脱氢酶 (GPD) 的催化机制(中间省略 $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ 一步):



带负电的巯基负离子 $-\text{S}^-$ 对醛 RCHO 的碳原子进行亲核攻击, 形成硫酯共价键, NAD^+ 形成 NADH , 随后与第二个底物反应, 酶的催化基团恢复原状。以丝氨酸为催化基团的蛋白水解酶,

含-SH基的木瓜蛋白酶,以硫胺素为辅酶的丙酮酸脱羧酶都是亲核催化的很好的例子。

亲电催化是由亲电试剂(具有接受电子对的原子)引起的催化反应,是亲核催化反应的逆过程。

5. 微环境对酶催化反应速度的影响

已知某些反应在低介电常数的介质中的反应速度比在高介电常数的水中的反应速度快得多。这可能是由于在低介电环境中有利于电荷之间的相互作用,而极性的水对电荷往往有屏蔽作用。估计酶在其活性部位内造成一个疏水的微环境,有利于中间物的生成和稳定。另外,酶造成局部的特殊环境影响活性部位本身的催化基团的解离状态。比如,溶菌酶的两个催化基团,谷氨酸-35和天冬氨酸-52,在酶作用最适条件下, Glu-35基本上处于不解离状态,而 Asp-52处于解离状态。这是由于 Glu-35所处的微环境是非极性,在它周围非极性侧链基团较多,因此氢离子和羧基结合较牢,而 Asp-52处于极性环境中,在较低的 pH 值就解离了。这样,由于局部的微环境的差别,使这个酶可以用两个相同的基团进行酸碱催化反应。又如,乙酰醋酸脱羧酶的活性部位有一个赖氨酸。在蛋白质碱性基团中,赖氨酸的 ϵ -氨基是比较强的基团,其 pK 值在 9 左右。而位于乙酰醋酸脱羧酶活性部位的赖氨酸的 ϵ -氨基其 pK 值只有 6 左右,相差三个 pH 单位。估计微环境这一因素是某些酶提高催化反应速度的因素之一,但这方面的研究还很肤浅,知道的东西并不多。

上述各因素都是降低酶催化反应活化自由能的重要因素,但不是在同一酶中各种因素都同时发挥作用。可能各种酶都有自己独特的催化特点,可以分别受一种或几种因素的影响。

四、酶催化反应机制的实例

1. 溶菌酶

早在 1922 年, Fleming^[31] 在鼻粘液中发现一种具有溶解细菌的能力的酶,定名为溶菌酶。这是自然界中分布很广的一种酶。随后 Roberts 改进了提纯方法^[32],同时, Wolff^[33,34] 从鸡蛋清中得到了溶菌酶。1963 年 Jolles^[35]以及 Canfield^[36,37]测定了一级结构,如图 8-31 所示。

Phillips^[38,39,40,41] 等人在 1965 年以 X-光衍射法阐明了溶菌酶的三维结构,如图 8-32 所示。溶菌酶是第一个完全以晶体结构分析的结果而提出合理催化机制的酶。

Phillips 于 2 Å 分辨水平测定了溶菌酶的全部空间结构,发现酶分子表面(中部)有一深的裂隙。随后,又观察了某些竞争性抑制剂对酶的抑制作用。在此基础之上研究了酶与抑制剂结合的复合物的 X-光衍射图。他们使用了不同的氨基糖,其中研究得最细的是由三个 NAG 组成的三糖,即(NAG)₃与溶菌酶形成的复合物。分析比较纯酶和这个复合物的电子密度图,发现这个三糖位于裂隙的上部,通过六条氢键和一些非极性的作用力与酶结合,其还原端指向裂隙的底部,如图 12-18 所示。三糖的结合,使得酶分子的构象略有改变,裂隙部分好像稍稍合拢。

在研究三糖-酶复合物结构的基础上,提出了这样一个问题:溶菌酶是怎样催化糖苷键水解的?为此提出了一个酶-底物复合物的模型,见图 12-3。因在三糖(NAG)₃与酶复合物中,(NAG)₃并不被水解,故可以认为,酶的真正催化部位并没有参加到三糖的结合中。考虑到裂隙的下半部是空的,这个空间也可放入三个糖残基,因而推论:一个六糖-酶复合物可能类似于底物-酶复合物。根据空间结构方面的计算,形成这样的复合物是完全可能的。图 12-3 表示:酶分

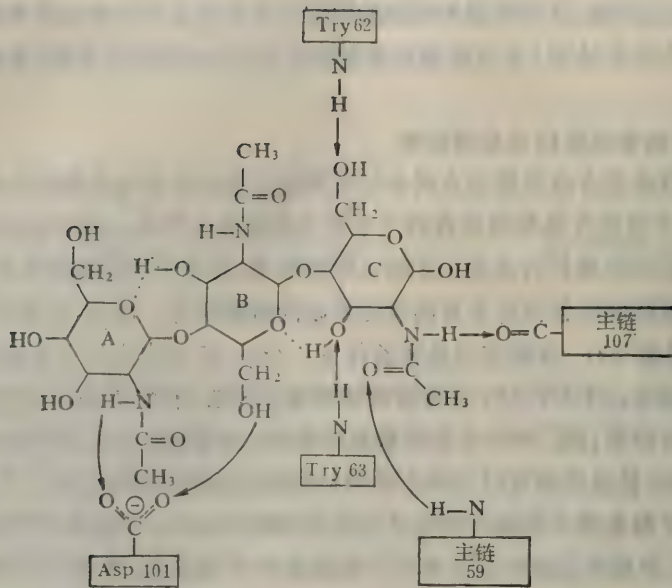


图 12-18 (NAG)₃和溶菌酶之间的氢键

子刚好能容纳一个六糖分子，A、B、C、D、E、F表示六个糖残基的位置，只是第四个糖残基D环因空间的原因，必须偏离正常的椅形，而处于一个能量较高的构象。

在这样一个模型的基础上，需要判断，在六糖的五个糖苷键中哪一个键被水解。正如前述，在细菌细胞壁的多糖分子中，NAG和NAM交替排列，溶菌酶催化水解的是NAM的C₁与NAG的C₄之间的β-糖苷键。因此，首先要确定，在这个模型的六糖中，哪几个糖残基是NAM。NAM的C₃上比NAG多一个乙酰基，因C环周围的空间容纳不下乙酰基侧链，所以，可以很明确地作出结论，残基C不可能是NAM。由此推测，B、D、F便是NAM。酶催化水解的糖苷键是B—C键还是D—E键？从(NAG)₃与酶生成的复合物来看，B—C键是不被作用的。因此，酶催化水解的只能是D和E之间的糖苷键了。有人用不同数目的NAG组成的寡糖作底物，测定被溶菌酶水解的相对速度，其结果支持了上述推论。如表12-9。

从表中可见，从四聚体至五聚体增加一个糖单位，水解速度增加500倍，而从三糖至四糖，或五糖

表 12-9 溶菌酶对不同 N-乙酰氨基葡萄糖寡糖水解速度的比较

底物 (浓度 10 ⁻⁵ M)	相对速度
二聚体	0.003
三聚体	1
四聚体	8
五聚体	4,000
六聚体	30,000

至六糖,速度增加均不到十倍。这也说明D-E糖苷键是最容易被酶作用的。

进一步的问题是,酶怎样催化D-E糖苷键水解?已知这个键断裂在C₁和氧原子之间,而不是C₄和氧原子之间。分析D-E键周围的酶结构环境,最活泼的基团显然是天冬氨酸-52和谷氨酸-35,Asp-52上一个氧原子距离D糖环之C₁及环上氧原子只有3 Å,Glu-35上一个氧原子距离糖苷键氧原子也只有3 Å。天冬氨酸-52处于极性微环境,在较酸性的溶液中也呈解离状态,而带有一负电荷,相反,谷氨酸-35处于非极性微环境中,不易解离。基于上述推测,溶菌酶破坏细菌细胞壁的过程如图12-19所示。

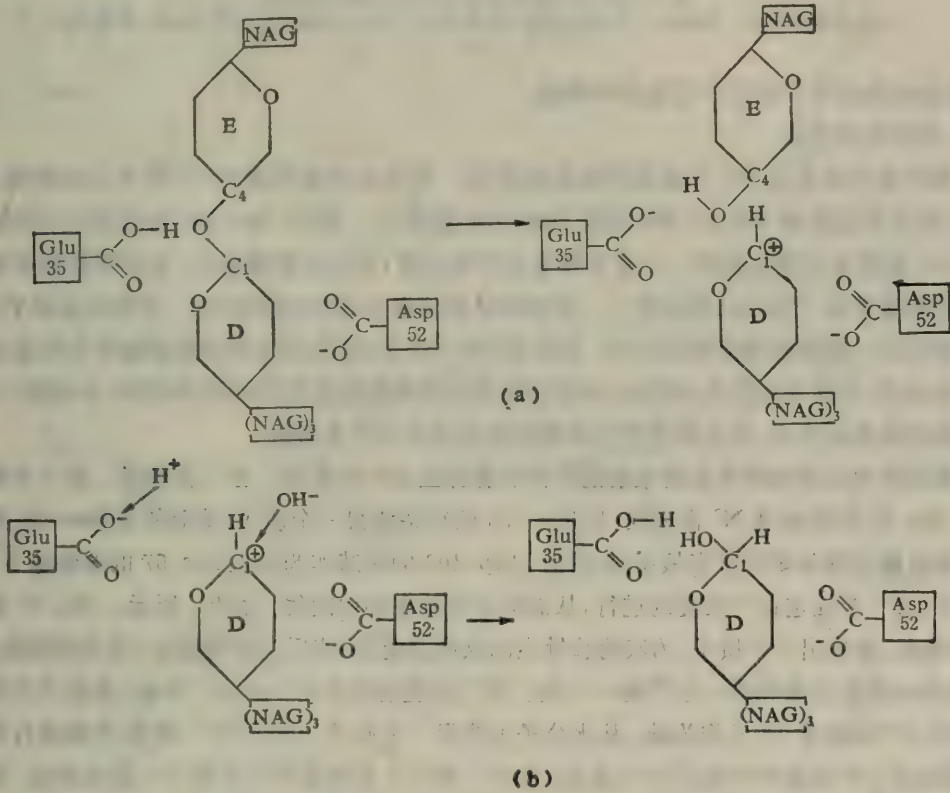


图 12-19 推测性溶菌酶催化机制 (a) 第一步形成正碳离子(b) 完成催化反应, OH⁻ 离子加到正碳离子上, H⁺ 加到 Glu-35 的侧链上。

首先,溶菌酶分子接触细胞壁,与六个暴露于外的氨基糖残基结合。这时,D糖环的构象发生变化。然后,谷氨酸-35作为质子的给体转移一个质子给糖苷键氧原子,使得氧原子与D糖环C₁间的键断开,C₁带正电荷成为正碳离子。由于天冬氨酸-52的负电荷的影响,而稳定了正碳离子,最后,来自环境水中的OH⁻离子与它结合。这时,反应完成,溶菌酶离去,而细胞壁打开一个缺口。由上述假设的机制中可知,主要有三个因素影响催化效率:①一般酸催化,Glu-35以酸的形式给出质子,使底物的糖苷键断开;②Asp-52带负电荷的羧基和D环上带正电的C₁静电作用稳定正碳离子中间物;③D环形变(图12-20),这种构象的变化显然促进了正碳离子的形成。C₁、C₂、C₅和环氧平面使得正电荷分配在C₁和环氧原子之间。因此可以说,在结合底物

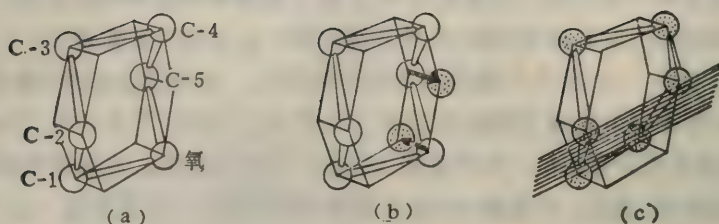


图 12-20 溶菌酶底物D环变成半椅式的形变图
(a) 正常椅式(b) 与酶结合, C₅和环氧原子的移动(c) 半椅式构象 C₁、C₂、C₅、O 在一平面上。

时,酶迫使底物采取了接近于过渡态的构象。

2. 胰凝乳蛋白酶

胰凝乳蛋白酶是由 241 个氨基酸残基组成的。通过化学修饰和 X-光衍射法的研究,已经确定,其催化部位是由 His-57、Ser-195、Asp-102 组成的。其中, Ser-195 与底物分子的酰基结合, His-57 是重要的催化基团。三者有特定的空间位置,彼此以氢键联系,从而形成电荷接力系统。这些问题在第一节中已经谈过了。但该酶是如何催化底物水解的呢? 在催化反应中,组氨酸的咪唑基起一般碱酸催化剂的作用,先促进 Ser-195 的羟基氧对底物敏感键中的羰基碳原子进行亲核攻击,从而形成酰化中间物,再促进酰化中间物的酰基转移到酰基受体(水或醇)上。由于碱酸催化和亲核反应,使水解速度比非催化速度增大几个数量级。

胰凝乳蛋白水解酶催化底物水解的具体步骤如图 12-21 所示。分二步进行。第一步酰化作用:(a) His-57 的咪唑基 N³ 作为碱,从 Ser-195 的羟基获得一个质子,从而使得 Ser-195 的羟基氧与底物肽键的羰基碳进行亲核反应;同时, Asp-102 的羧基作为碱从 His-57 的咪唑基 N¹ 得到一个质子,进一步促进这个反应的进行,从而形成过渡态的中间体,如(b) 所示。 His-57 的咪唑基 N³ 作为酸,释放出一个质子,为底物肽键上的氮所接受,促使反应继续进行,从而得到酰化酶,即酶-底物中间复合物和第一个产物——胺。第二步脱酰化作用:由(d) 开始,水分子代替胺的位置, His-57 咪唑基 N³ 又作为碱,从水分子上获得一个质子,促进 OH⁻ 对酰化酶进行亲核反应,从而形成一个过渡的中间体(e),最后,由(e) 到(f) 得到最终的产物——游离的酸,酶分子本身重现。

在活性部位中具有由 Asp-His-Ser 组成的氢键系统的酶,除胰凝乳蛋白酶外,还有胰蛋白酶、弹性蛋白酶以及枯草杆菌蛋白酶等,所以它们可能有很类似的催化机制。

3. 羧基肽酶 A

羧基肽酶 A 是由 307 个氨基酸组成的单一多肽链,含有一个锌离子。其活性部位的状况如第一节所述。羧基肽酶 A 最易水解底物分子中 C-末端具有芳香或大的脂肪族侧链的肽键。

Lipscomb 等人^[36,37,38,39]于 1967 年以 2Å 分辨率阐明了羧基肽酶 A 的三维结构,发现在分子中紧密地结合着一个 Zn 离子,对酶的催化起着重要的作用。这个锌离子位于接近分子表面的沟槽中,它以配位键与成四面体排列的两个组氨酸(His-69, His-196),一个谷氨酸(Glu-72)和一个水分子相连,如图 12-22 所示。靠近 Zn 离子有一个大的非极性口袋,可容纳底物 C-

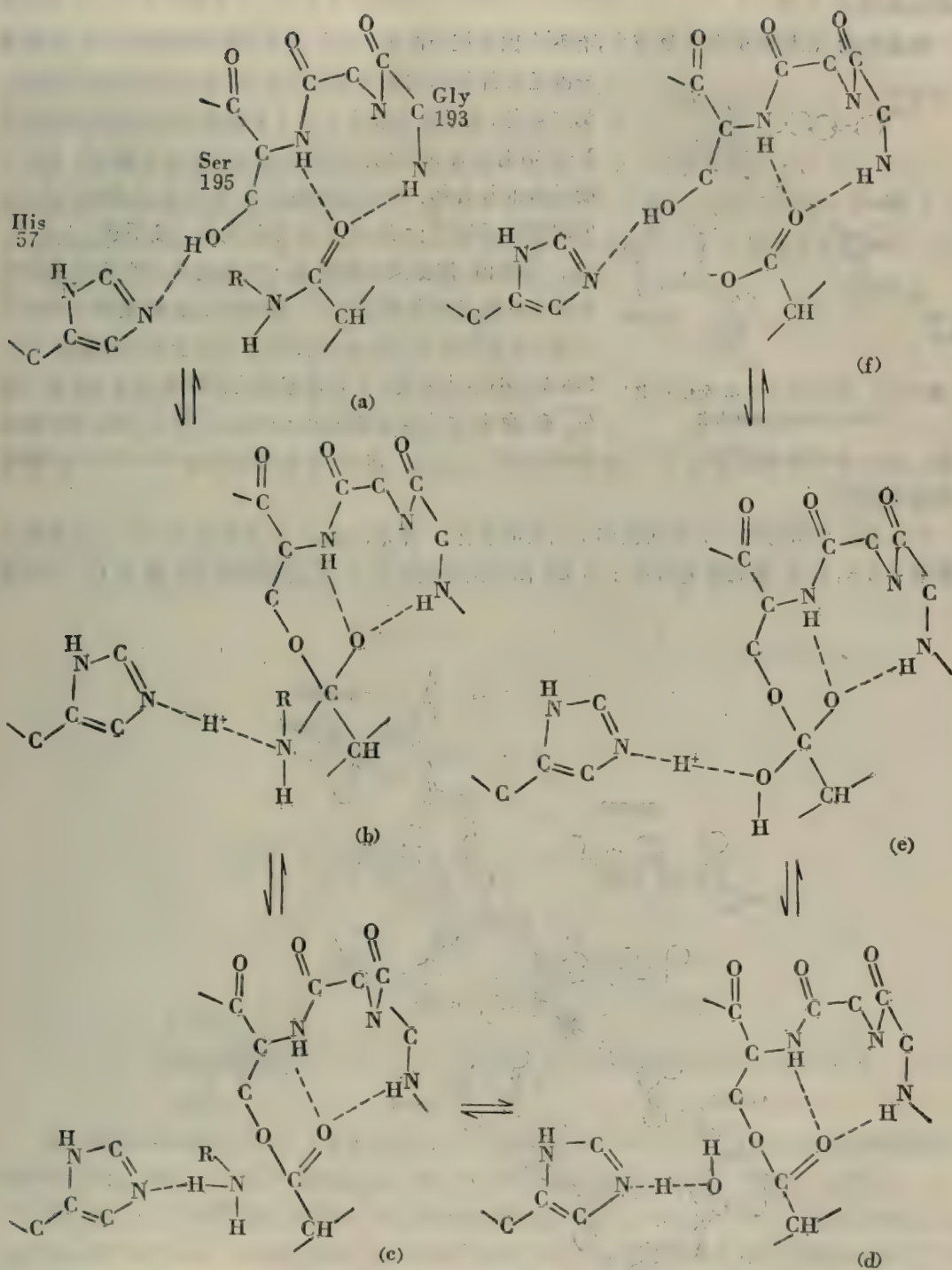


图 12-21 胰凝乳蛋白酶催化水解反应机制。底物氧原子和 Ser-195、Gly-193 酰胺基团之间的相互作用呈现在各步中，但并不意味着都是氢键。

末端的侧链。

目前认为,在该酶的催化反应中,有两个因素值得注意。第一点是,酶与底物结合时,底物诱导酶活性部位的构象发生巨大变化,形成正确的催化部位。第二点是,电子张力效应。为了弄清这个酶的催化机制,用X-光衍射法首先研究了与酶缓慢作用的甘氨酸-酪氨酸与酶结合的复合物,并与游离酶的X-光衍射图谱进行比较,发现酶和Gly-Tyr的结合分五步进行(参看图12-4,12-5)。甘氨酸-酪氨酸末端羧基上的负电荷与酶活性部位中Arg-145的正电荷相互吸引;底物酪氨酸侧链伸入非极性口袋;底物中待作用的敏感肽键的NH上的H与酶中Tyr-248的OH生成氢键;底物敏感键上的羰基氧与Zn离子配位;底物末端的氨基通过介入的水分子与Glu-270形成氢键。这一步在形成正常的ES复合物时可能并不发生,这种结合可能是使Gly-Tyr水解速度缓慢的原因。

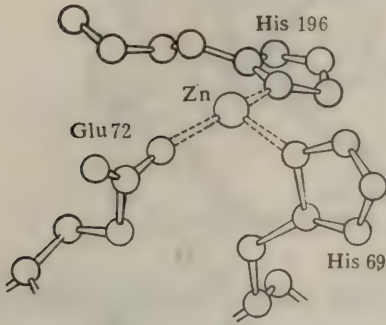


图 12-22 羧基肽酶A中Zn配位图,其中水分子配位未画出来

这一步在形成正常的ES复合物时可能并不发生,这种结合可能是使Gly-Tyr水解速度缓慢的原因。

Gly-Tyr与酶的结合引起活性部位构象的变化。首先,Arg-145的胍基和Glu-270的羧基都移动了2 Å,其次,底物羰基置换了与Zn离子结合的水分子,自己结合到Zn离子上。当底物

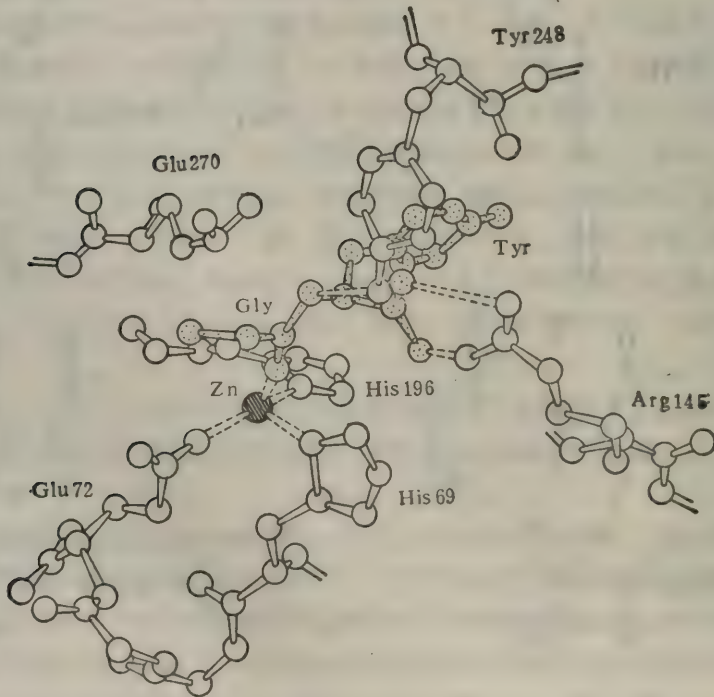


图 12-23 Gly-Tyr与羧基肽酶A活性部位结合的三维结构图。黑色表示Gly-Tyr底物

酪氨酸残基结合到酶上时,至少从非极性口袋里排出另外四个水分子。Tyr-248 的酚羟基移动了 12 Å。这种构象的变化是从 Arg-145 结合底物末端羧基开始的。应该说,这是酶对底物的识别过程。不仅如此,由于上述变化,使 Tyr 的酚羟基从酶的表面移到底物肽键近旁,结果封闭了活性部位的通道,活性部位从充满水的状态转变为疏水区。参看 12-23 图。

进一步的问题是,酶怎样水解底物。Lipscomb 根据 X-光衍射结果提出如下过程: Glu-270 直接攻击底物的敏感肽键的羰基碳原子,而 Tyr-248 向这个肽键的—NH—提供一个质子,结果,肽键断开,生成一个产物——胺。Glu-270 的羧基作为亲核基团与底物羰基共价结合,形成酐。最后,水分子使酐水解,生成另一个产物——酸,如图 12-24 所示。

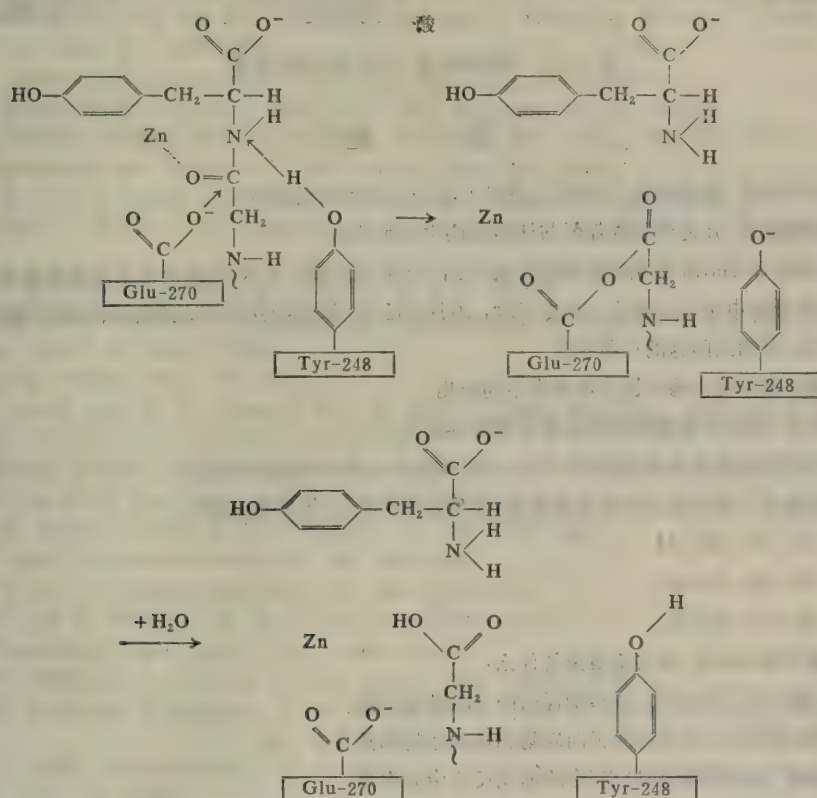


图 12-24 羧基肽酶 A 可能的催化机制之一。Glu-270 直接攻击敏感键羰基碳原子, Tyr-248 给该肽键 NH 基团一个质子

另一可能的机制是, Glu-270 激活水分子, 释放出 OH⁻ 离子, OH⁻ 直接攻击敏感肽键羰基, 同时 Tyr-248 提供一个质子, 肽键直接水解, 不经过形成酐的中间步骤, 如图 12-25 所示:

Zn 离子在上述两种催化机制中均起到使敏感肽键产生电子张力的作用。酶与底物靠近后, 由于 Zn 离子的作用, 使敏感肽键的诱导偶极矩增大, 使 C=O 进一步极化而更易于亲核试剂攻击。Zn 离子周围的非极性环境加大了对敏感肽键的诱导。带负电的 Glu-270 的“邻近”, 也加强了对羰基的偶极诱导。这样, Zn 离子在底物中所造成的电子张力, 大大促进了底物的水解过程。

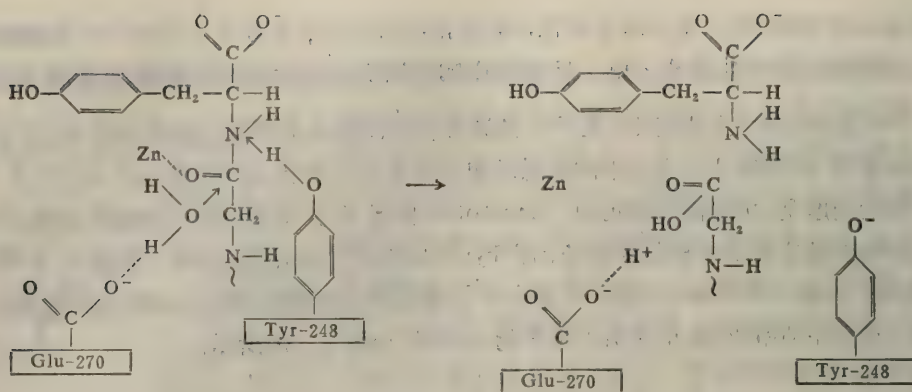


图 12-25 羧肽酶A另一个可能的催化机制

习 题

- 什么是活性部位,催化部位,底物结合部位?它们之间的关系如何?
- 什么是别构部位,并说明别构部位与活性部位之间的关系。
- 1956年 Hill 和 Smith 使用亮氨酸氨肽酶作用于木瓜蛋白酶,从N-端顺次切下游离的氨基酸,发现在消化液中游离氨基酸为酶中残基总数的三分之二时,仍具有活力,因而把具有活力的酶片段称为“活力碎片”。就这个问题调查文献,说明此问题的目前状况。
- 举例说明亲和标记在酶活性部位研究中的作用。
- 举例说明 X-光衍射分析在活性部位研究中的作用。
- 以酶活性部位结构为基础,说明反应专一性:底物专一性和立体专一性。
- 预测溶菌酶对下列寡糖分子的水解速度(G代表 NAG, M代表 NAM)。

 - M—M—M—M—M—M
 - G—M—G—M—G—M
 - M—G—M—G—M—G。

- 什么是诱导契合理论,其实验根据是什么?
- 说明同工酶“同工”的含义,并举例说明同工酶功能不同。
- 为什么酶对其催化的反应的正向底物和逆向底物都具有专一性?
- 说明“邻近”“定向”“底物形变”在酶催化反应中的作用。
- 说明“一般碱催化”、“亲核反应”在酶催化中的作用。假如合成(NAG)时, D 和 E 糖残基之间的糖苷键氧原子以 ^{18}O 标记,溶菌酶水解后, ^{18}O 位于哪个产物中?

参 考 文 献

- J. A. Cohen, R. A. Oosterbaan, H. S. Jansz and F. Behrens, *J. Cell Comp. Physiol.*, 54, Suppl 1, 231 (1959)
- D. E. Koshland, Jr., *Science*, 142, 1533 (1963)
- E. L. Smith and M. J. Parker, *J. Biol. Chem.*, 233, 1387 (1958)
- S. S. Husain and G. Lowe, *Biochem. J.*, 108, 855 (1968)
- S. S. Husain and G. Lowe, *Biochem. J.*, 108, 861 (1968)

6. R. L. Smith and E. Shaw, *J. Biol. Chem.*, 244, 4704 (1969)
7. A. W. Ely and T. Inagami, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 149 (1970)
8. A. W. Eyl, Jr. and T. Inagami, *J. Biol. Chem.*, 246, 738 (1971)
9. G. Schoellmann and E. Shaw, *Biochemistry*, 2, 252 (1963)
10. E. B. Ong, E. Shaw, and G. Schoellmann, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 1271 (1964)
11. E. B. Ong, E. Shaw, and G. Schoellmann, *J. Biol. Chem.*, 240, 694 (1965)
12. B. Meloun and D. Pospisilova, *Biochim. Biophys. Acta*, 92, 152 (1964)
13. E. Shaw, M. Mares-Guia, and W. Cohen, *Biochemistry*, 4, 2219 (1965)
14. E. Shaw and S. Springhorn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 391 (1967)
15. H. Gutfreund, *Trans. Farad. Soc.*, 51, 441 (1955)
16. K. Hiromi, K. Takahashi, Z. Hamanzu and S. Ono, *J. Biochem.*, 59, 469 (1966)
17. S. S. Lehrer and G. D. Fasman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 133 (1966)
18. J. Monod, J. Wyman and J-P. Changeux, *Journal of Molecular Biology*, 12, 88 (1965)
19. E. Fischer, *Ber.*, 27, 2985 (1894)
20. D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, 44, 98 (1958)
21. D. E. Koshland, Jr. and K. E. Neet, *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 359 (1968)
22. C. F. Jacobsen, *Compt. Rend. Trav. Lab., Carlsberg, Ser. Chim.*, 25, 325 (1947)
23. F. R. Bettelheim and Neurath, *J. Biol. Chem.*, 212, 241 (1955)
24. H. T. Wright, J. Kraut, and P. E. Wilcox, *J. Mol. Biol.*, 37, 363 (1968)
25. S. J. Freer, J. Kraut, J. D. Robertus, H. T. Wright, and Ng. H. Xuong, *Biochemistry*, 9, 1997 (1970)
26. 周光宇, *生物化学与生物物理进展*, 第3期, 第80页 (1979)
27. H. Eyring, R. Lumry and J. D. Spikes, *The Mechanism of Enzyme Action* (W. D. McElroy and B. Glass. Eds.), P. 123, (1954)
28. L. Pauling, *Nature*, 161, 707 (1948)
29. C. G. Swain and J. F. Brown, Jr., *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2534-2537 and 2538-2543 (1952)
30. J. H. Wang, *Science*, 161, 328 (1968)
31. A. Fleming, *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 93, 306 (1922)
32. E. A. H. Roberts, *Quart. J. Exp. Physiol.*, 27, 89 (1937-8)
33. L. K. Woltz, *Z. Immunitaetstorsch.*, 50, 88 (1927)
34. L. K. Woltz, *Z. Immunitaetstorsch.*, 54, 188 (1927-8)
35. J. Jolles and P. Jolles, *C. R. Acad. Sci.*, 253, 2773 (1961)
36. R. E. Cantfield, *J. Biol. Chem.*, 238, 2698 (1963)
37. R. E. Cantfield and A. K. Liu, *J. Biol. Chem.*, 240, 1997 (1965)
38. C. C. F. Blake, R. H. Fenn, A. C. T. North, D. C. Phillips, and R. J. Poljak *Nature*, 196, 1173 (1962)
39. C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, *Nature*, 206, 757 (1965)
40. C. C. F. Blake, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 167, 365 (1967)
41. C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, and V. R. Sarma, *Proc. Roy. Soc., Ser. B.*, 167, 378 (1967)

第十三章 酶催化反应动力学

酶的动力学这一章主要是讨论影响酶催化反应速度的各种因素,当然最重要的因素是酶浓度、配体浓度(底物,产物,抑制剂和激活剂)、pH、离子强度和温度。如果对这些因素作了详细的分析,有可能弄清酶催化反应的本质。例如,通过变化底物和产物浓度,有可能导出该反应的动力学机制,即底物与酶结合的顺序和产物脱离酶的顺序;通过变化 pH 和温度对动力学常数的影响可以增进对活性部位重要基团的了解;可以得到一些动力学常数,而且通过这些常数可以推知胞内底物和产物的浓度和反应的方向等。

由于酶分子是一个大分子催化剂,催化反应的体系又很复杂,因此酶催化反应动力学是个很复杂的课题。在这里仅着重讨论酶催化反应动力学中的几个基本问题,并限于比较简单的体系。如果对某方面有特殊需要的话,请参看有关的专著。

附带指出一点,酶催化反应动力学是以化学动力学为基础,因此它遵守化学反应动力学的一般规律,但酶催化反应又有其自身的特点,又服从于特有的规律。

第一节 酶催化反应初速的测定

一、反应速度

研究反应动力学,当然要测定反应速度。反应速度是以反应物(底物 S) 的消耗速度或者以产物(P) 的形成速度表示。例如:一种底物一种产物的简单体系 $S \rightleftharpoons P$ 反应,随着反应的进行,底物 S 逐渐消耗,产物 P 随反应时间的延长而增加, S 和 P 随时间变化的曲线如图 13-1 所示:

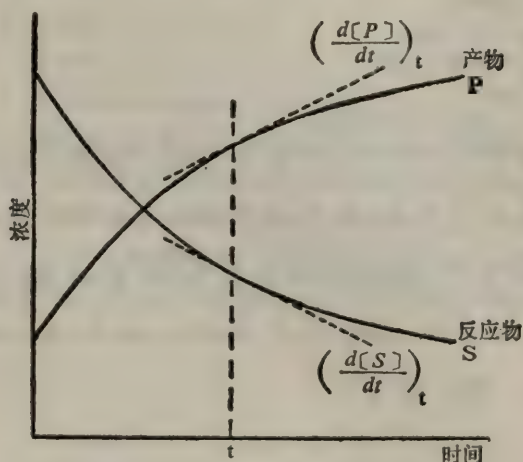


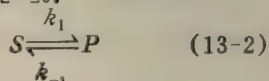
图 13-1 简单 $S \rightleftharpoons P$ 非催化反应, S 消耗和 P 生成随时间变化曲线。虚线是时间 t 两曲线的斜率,即时间 t 的瞬时速度。

示:

设时间 t 的速度以 v 表示:

$$v = -\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_t = \left(\frac{d[P]}{dt}\right)_t \quad (13-1)$$

(13-1)式中的 $[S]$ 和 $[P]$ 分别是时间 t 时的底物浓度和产物的浓度,底物消耗速度以负号表示。因为底物消耗完全用于转变产物,而产物的形成也只有来源于底物,所以两种速度数值相等,符号相反。如果反应开始时没有产物 P 存在,其反应初速度正比于底物的初始浓度 $[S]_0$;



$$v^+ = -\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_0 = k_1[S]_0 \quad (13-3)$$

k_1 是正向反应速度常数, k_{-1} 是逆向反应速度常数。方程式(13-2)中, 只有 P 而无 S 时, 其反应初速同样可以表示为:

$$v^- = k_{-1}[P] \quad (13-4)$$

如果考虑在反应系统中同时存在着一定浓度的 $[S]$ 和 $[P]$ 时, 净反应速度为:

$$v = k_1[S] - k_{-1}[P] \quad (13-5)$$

实验上可以在一系列的 $[S]$ 、 $[P]$ 下得到 v 的实验值, 即在 $[S]_1$ 、 $[P]_1$ 时, 测得 v_1 ; $[S]_2$ 、 $[P]_2$ 时测得 v_2 ; $[S]_n$ 、 $[P]_n$ 测得 v_n , 代入方程式(13-5)可以求得 k_1 和 k_{-1} 。当然若已知 k_1 和 k_{-1} , 测定 $[S]$ 和 $[P]$ 也可以推知反应速度。

当反应达平衡时, 其净反应速度为零。平衡常数以 $K_{e,q}$ 表示。

$$\begin{aligned} \because K_{e,q} &= \frac{[P]_{e,q}}{[S]_{e,q}} \\ \text{又 } v_{e,q} &= k_1[S]_{e,q} - k_{-1}[P]_{e,q} = 0 \\ k_1[S]_{e,q} &= k_{-1}[P]_{e,q} \\ K_{e,q} &= \frac{[P]_{e,q}}{[S]_{e,q}} = \frac{k_1}{k_{-1}} \end{aligned} \quad (13-6)$$

方程式(13-6)表示了平衡常数 $K_{e,q}$ 和速度常数 k_1 、 k_{-1} 的关系。

上面仅考虑了一个反应物一个产物的简单反应, 如果是双底物反应, 其速度表达方式也与前述一样:



在时间 t 时产生 X 克分子的产物, 则:

$$\begin{aligned} v_t &= \left(\frac{dx}{dt} \right)_t = k[A][B] \\ &= k(A_0 - X)(B_0 - X) \end{aligned} \quad (13-7)$$

(13-7)式中, k 为正向反应速度常数, $[A]$ 、 $[B]$ 分别为 t 时两底物的浓度。

二、酶对催化反应速度的影响

一个反应有没有酶参与催化, 其反应速度规律大不相同。以蔗糖水解反应为例, 以酸为催化剂时, 其反应速度正比于酸浓度, 并与底物浓度也成正比, 这是很早就知道的事实。但以蔗糖酶催化蔗糖水解时, 其情况就大不一样了, 早在 1903 年 Henri 就研究了此水解反应^[1]。反应速度与酶浓度, 底物浓度关系如图 13-2 所示:

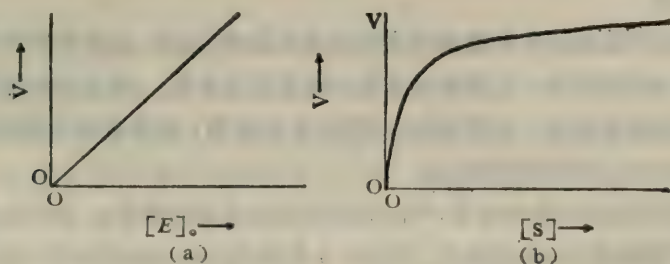
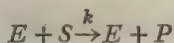


图 13-2 酶浓度 $[E]$ 和底物浓度 $[S]$ 对酶催化反应速度的影响

从图 13-2 可知,蔗糖酶催化蔗糖水解时,其反应速度与酶浓度成正比,在这一点上与酸催化时一致,但与底物浓度的关系呈典型的矩形双曲线关系,与酸催化的正比关系大不相同。在低底物浓度时与底物浓度大体上成正比,但在高浓度时,反应速度逐渐逼近一个极限值。因此可以预料到酶催化反应与酸催化反应机理不同。假定两种催化反应机理相同,则二者都可以下式表示:

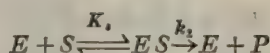


这是单纯的双分子反应,即酶分子和底物分子相互碰撞,底物转化为产物。其反应速度可以表示为:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[E]_0[S]$$

也就是说反应速度既与酶浓度成正比,也与底物浓度成正比。这个结果符合于以酸为催化剂的情况,但与酶催化反应速度的双曲线规律不完全相符,所以这种机制不能表示酶所催化的反应。

如果我们假定底物 S 和酶先形成中心复合物 ES ,再由 ES 转变为产物,此机制可表示如下:



假定 E 和 S 生成 ES 反应很快, ES 分解为 E 和 P 是限定整个反应速度的一步,后一步较前步慢得多,不会干扰前步的迅速平衡,平衡常数为 K_s 。这样,反应速度与底物浓度的关系可表示如下:

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_s + [S]} \quad (13-8)$$

(13-8)式一方面表明了 v 与 $[E]_0$ 成正比,而且也表明了 v 与 $[S]$ 的双曲线关系;当 $[S]$ 很小, $K_s \gg [S]$ 时:

$$v = \frac{k_2[E]_0}{K_s} [S]$$

仅反应速度与 $[S]$ 成正比,又 $[S] \gg K_s$ 时:

$$v = k_2[E]_0 \equiv V_m$$

V_m 是最大反应速度,是反应速度的极限值,显然这是典型双曲线关系。

从上述可知,酶催化反应不仅效率高,而且反应机理与一般催化不同,有自己独特的规律。

三、初速的测定

酶催化反应动力学要弄清各种因素对反应速度的影响,这样,必不可少的要在一定的条件下(底物浓度,酶浓度,pH 值以及一定的溶液条件)测定反应速度。通过这些数据的处理可以得到酶催化反应动力学的许多结果。如果实验作得好,数据准确,则会得到正确的结果,但是如果得到的数据不准确,往往导致错误的结论。

通常,稳态动力学处理的是初速度,即时间为零时的速度极限值。为什么使用初速呢?简言之,初速所涉及的干扰因素少,易于处理。图 13-3 是按式(13-8)的积分形式画出的 $P \sim t$ 曲线,点线是 $P \sim t$ 曲线的切线,其斜率为初速度。

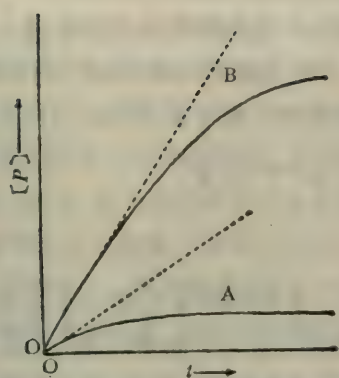


图 13-3 酶催化反应 $P \sim t$ 曲线

A: $[S]_0 = \frac{K_s}{2}$; B: $[S]_0 = 4K_s$ (点线表示初速度)

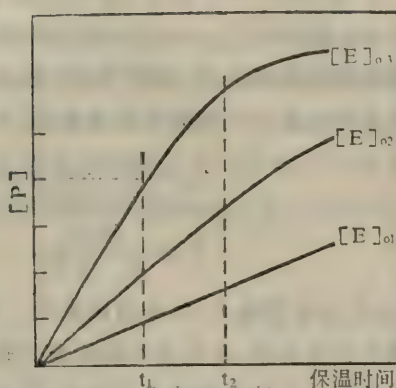


图 13-4 产物积累时间曲线与酶浓度的关系

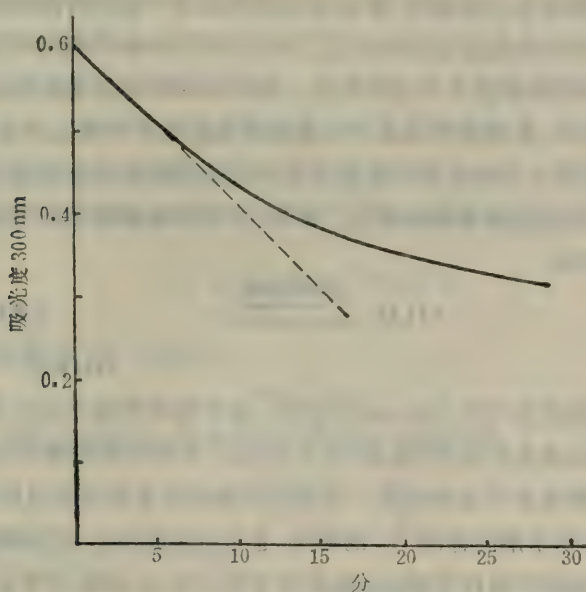


图 13-5 自动分光光度计记录的延胡索酸酶催化反应图形^[3]

从图 13-3 可见,反应速度只在最初的一段时间内保持恒定,随着时间的延长,反应速度逐渐降低。反应速度下降的原因很多,最主要的是底物浓度的降低,产物浓度的增加,从而加速了逆反应的进行,以及酶在反应条件下部分失活等。但是如果我们测定反应初速度,就可以避开这些令人为难的因素。在反应初期,产物 P 的影响可以忽略,酶在极短的反应过程中也不会发生变性失活。相应于初速的底物浓度也叫做底物的初始浓度。

虽然初速是指反应时间为零时的极限速度,但实际上总是要使反应进行足够短的一段时间,在此足够短的一段时间内,使反应进行到恰当的程度。一般来讲,这个恰当程度就是指底物消耗

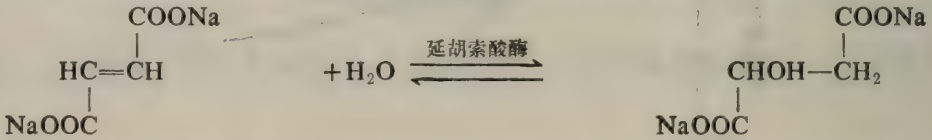
不超过 5%，此时的 $P \sim t$ 曲线几乎呈直线关系，可以精确地得到初速数据。图 13-3 中的曲线 B，因初始底物浓度高 ($[S]_0 = 4 K_s$)，较初始底物浓度低的曲线 A 容易精确地求得初速。通常，反应中所用的酶浓度都很小，所谓“催化”数量， $10^{-12} M \sim 10^{-7} M$ ，而底物一般为 $10^{-6} M \sim 10^{-2} M$ 。如果固定底物浓度 $[S]$ ，使用不同浓度的 $[E]_0$ ，从式 (13-8) 可知 v 正比于 $[E]_0$ ：

$$v = \frac{[S]k_2[E]_0}{K_s + [S]} = \frac{[S]k_2}{K_s + [S]}[E]_0 = k'[E]_0$$

$$k' = \frac{[S]k_2}{K_s + [S]}$$

$[E]_0$ 越大反应速度越大，底物消耗越快。从图 13-4 可见，反应时间至 t_1 时， $[E]_{01} \sim [E]_{03}$ 的 $P \sim t$ 都呈直线关系，在更高的酶浓度时脱离了直线，如果延长反应时间到 t_2 ，仅 $[E]_{01}$ 和 $[E]_{02}$ 两种酶浓度 $P \sim t$ 呈直线关系， $[E]_{03}$ 以上的用量都脱离了直线范围。因此，为了正确地得到初速，要充分考虑反应进行的程度，即产物积累量（底物消耗）与时间 t 的关系。要使反应进行到恰当的%，以便能精确地得到初速。这项工作必须首先作好。

实验上如何精确地测定反应初速呢？最普通的办法是在一定的时间间隔取出一部分反应液，以适当的办法立即停止取出来的反应液的反应，然后以恰当分析法测定产物的生成量（或底物的消耗量）。以这种方法测得的数据是不连续的点。最好采用能连续观察反应过程的办法，常用的有吸收光谱，荧光和旋光法。采用这些办法的先决条件是底物和产物之间在吸收光谱或旋光值上有明显的变化。在分光光度计的比色槽内直接反应并记录其吸收光谱的变化，从而得到伴随底物消耗或产物生成的吸收光谱连续变化的曲线。例如：延胡索酸酶催化下列反应^[2]：



此反应的底物延胡索酸在近紫外区 300 nm 有吸收，而产物苹果酸在此区没有吸收，利用此吸收光谱的差别可以连续地记录反应过程（如图 13-5 所示）。如果底物是糖类（如淀粉酶的底物），底物和产物之间不产生吸收光谱方面的变化，但可以利用旋光度的变化追踪反应过程。此外，酯酶、蛋白水解酶等催化底物水解时伴随 H^+ 的释放，也可以追踪 pH，连续测定反应动力学数据。所有这些数据都是在较短的时间内完成的，数据变化并不很大，因此不管采用那种办法都要求仪器灵敏而准确。比如在测定吸光度时，要能测准到 $\Delta OD \sim 0.01$ ，旋光计要测准 0.01° 以下的旋光变化。

因反应速度是以浓度的变化速度为度量的，所以速度的单位以克分子/升/秒表示，或 M/S ，缩写成 MS^{-1} 。

第二节 底物浓度对催化反应速度的影响

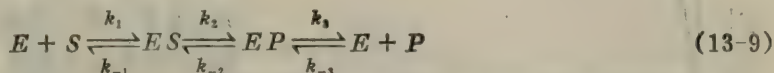
一 中心复合物的存在 (Central Complex)

从上一节讨论中知道，酶催化蔗糖水解反应速度与底物浓度呈矩形双曲线关系，以 $E + S \rightleftharpoons P + E$ 机制不能说明此催化过程。但是，若假定酶分子与底物先形成中心复合物“ ES ”，即

$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons P + E$ 机制,就能很好地说明 $v \sim S$ 曲线关系,从而估计,酶在催化反应中可能形成中心复合物。为了确证这个事实,还需要利用动力学以外的其他办法提供更直接的证据。1898年 Fischer 发现了酶的立体特异性。从这一点出发,很自然想到,酶分子只有具备特定的构象才能特异地结合底物分子,酶才会有特异性的作用。在 1943 年前后^[5~8],Chancl 等人在研究过氧化物酶和过氧化氢酶反应时,从实验上证实了酶催化反应时酶分子与底物分子确实形成中心复合物。此外,由于近些年来对黄素酶类的研究已经拿到酶和底物的中心复合物的结晶,从而“ES”复合物的存在被真正地确立下来了。

二 单底物——单产物系统($S \rightleftharpoons P$ 系统)

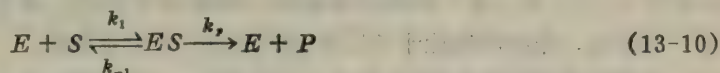
这是最简单的系统,反应过程可表示如下:



ES 和 EP 是中心复合物。为简化起见,可假定只存在一种形式的中心复合物“ES”。可以用两种方法推导速度方程:迅速平衡法和稳态法。

1. 迅速平衡法(Henri, Michaelis 和 Menten^[9])

以迅速平衡法处理上述反应有两点假定:①、 $ES \rightarrow E + P$ 是反应最慢一步,是整个反应的限速一步。速度常数为 k_p 。逆反应可以忽略不计。如果只考虑初速,没有产物积累,忽略逆反应是可以的。②、酶和底物结合成中心复合物“ES”过程和 $ES \rightarrow E + P$ 过程相比是快过程,迅速达成平衡。也就是说 ES 复合物的分解不干扰平衡过程。这样,该反应可以表示成:



某一时刻的瞬时速度依赖于 ES 的浓度:

$$v = k_p [ES] \quad (13-11)$$

k_p 也称为速度常数。按第②点假定,迅速平衡过程应有下列关系:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (13-12)$$

K_s 是 ES 的分解常数。从(13-12)可得到:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_s} \quad (13-13)$$

设总的酶浓度为 $[E]_0$, 反应开始以后,酶分子以两种形式存在,即游离态 E 和结合态 ES:

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (13-14)$$

将(13-13)式代入(13-11)和(13-14)得到:

$$v = k_p \frac{[E][S]}{K_s}$$

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_s}$$

两式相除得:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p \frac{[E][S]}{K_s}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s}} = \frac{k_p \frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

方程式两边同乘以 $1/k_p$;

$$\frac{v}{k_p[E]_0} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

$$\because v = k_p[ES] \quad \therefore k_p[E]_0 = V_m$$

V_m 是最大反应速度, 即所有酶 $[E]_0$ 都转变成 $[ES]$ 时的反应速度。

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} = \frac{[S]}{K_s + [S]}$$

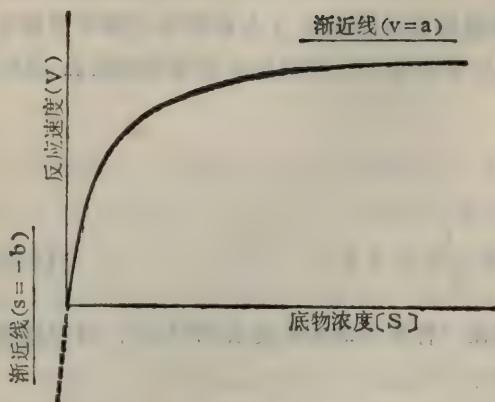
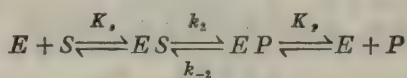


图 13-6 底物浓度与反应速度的关系

$$v = \frac{V_m[S]}{K_s + [S]} \quad (13-15)$$

这就是 Henri-Michaelis-Menten 方程, 简称米氏方程。它表达了反应初速度与底物浓度的关系。如果作 $v \sim [S]$ 图, 是一条矩形双曲线。如图 13-6 所示。要充分注意, 只有反应时间足够短, 确保 v 是初速, 底物消耗低于 5% 时, 式(13-15)才是正确的。

为了熟悉迅速平衡法, 再处理一个稍复杂一点的问题, 比如 D-葡萄糖异构酶催化 b-葡萄糖转化为 D-果糖的反应。此反应可用 (13-9) 式表示:



$[ES]$ 和 $[EP]$ 分别是底物和酶分子、产物和酶分子结合形成的中心复合物, 按迅速平衡法假定 $E + S \rightleftharpoons ES$ 和 $E + P \rightleftharpoons EP$ 两过程迅速达成平衡, 其分解常数分别为 K_s 和 K_p 。反应中最慢的一步是 $ES \rightleftharpoons EP$ 的转变。正向反应速度常数为 k_2 , 逆向反应速度常数为 k_{-2} , 以迅速平衡法推导速度方程式如下:

$$\because \text{正向反应速度 } v^+ = k_2[ES]$$

$$\text{逆向反应速度 } v^- = k_{-2}[EP]$$

$$\therefore \text{正向反应净速度为 } v_f = k_2[ES] - k_{-2}[EP] \quad (13-16)$$

$$\text{逆向反应净速度为 } v_r = k_{-2}[EP] - k_2[ES] \quad (13-17)$$

当然, $v_f = -v_r$ 。基于迅速平衡法假定, 下式成立:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}; \quad [ES] = \frac{[E][S]}{K_s}$$

$$K_p = \frac{[E][P]}{[EP]}, \quad [EP] = \frac{[E][P]}{K_p}$$

在反应中酶以三种形式存在, 即 E , ES 和 EP ;

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EP] \quad (13-18)$$

把 $[ES]$ 和 $[EP]$ 代入(13-16)和(13-18)式得:

$$v_f = -v_r = k_2 \frac{[E][S]}{K_s} - k_{-2} \frac{[E][P]}{K_p}$$

$$[E]_0 = [E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][P]}{K_p}$$

两式相除得:

$$\frac{v_f}{[E]_0} = \frac{k_2 \frac{[E][S]}{K_s} - k_{-2} \frac{[E][P]}{K_p}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_s} + \frac{[E][P]}{K_p}}$$

$$= \frac{k_2 \frac{[S]}{K_s} - k_{-2} \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[P]}{K_p}}$$

方程式两边同乘以 $[E]_0$:

$$v_f = -v_r = \frac{k_2 [E]_0 [S] - k_{-2} [E]_0 [P]}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[P]}{K_p}} \quad (13-19)$$

注意, 方程式(13-19)中的 S 和 P 的浓度未加限制, 因此, 任意的 $[S]$ 和 $[P]$, (13-19)式都应当成立。当 $[P]=0$, 逆向反应未发生时, 正向净速度 v_f 以 v_f^0 表示:

$$v_f^0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{K_s + [S]}$$

(13-19)式还原为(13-15)式。令 $V_{m_f} = k_2 [E]_0$, 则:

$$v_f^0 = \frac{V_{m_f} [S]}{K_s + [S]}$$

同样, 如果 $[S]=0$ 时, 并令 $V_{m_r} = k_{-2} [E]_0$, 则:

$$v_r^0 = \frac{V_{m_r} [P]}{K_p + [P]}$$

所以:

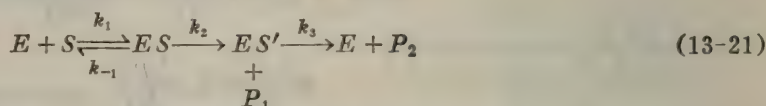
$$v_f = -v_r = \frac{V_{m_f} \frac{[S]}{K_s} - V_{m_r} \frac{[P]}{K_p}}{1 + \frac{[S]}{K_s} + \frac{[P]}{K_p}}$$

分子分母同乘以 K_s, K_p 得:

$$v_f = -v_r = \frac{V_{m_f} K_p [S] - V_{m_r} K_s [P]}{K_s \cdot K_p + K_p [S] + K_s [P]} \quad (13-20)$$

式(13-20)虽然较(13-15)式复杂,但两者都是由分子和分母组成的分式,只不过(13-15)式中,分子是一项,分母为二项,而(13-20)式分子为二项,分母为三项。仔细观察之后不难看出,分子的项数与中心复合物存在的形式有关,分母的项数与酶存在的形式有关。(13-15)式表示中心复合物只能 ES 一种,而酶存在的形式为二种: E 和 ES 。(13-20)式表示中心复合物有二种形式 ES 和 EP ,相应的酶存在形式也多了一种,即 E, ES, EP 三种。

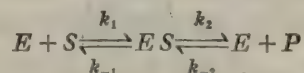
迅速平衡法有二点假定,但这些假定并不能适用于所有酶的催化反应。迅速平衡法要列出足够数目的方程,如果酶的存在形式是三种,就要有三个方程联列,除了酶本身的分布方程而外 ($[E]_0 = [E] + [ES] + [EP]$), 还需两个方程,这两个方程得由二个迅速平衡式来确立。有的反应就无法作到这一点,比如以胰凝乳蛋白酶为代表的各种酯酶和蛋白水解酶,其反应过程可以表示成(13-21)式:



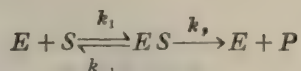
ES' 是乙酰化酶。酶以三种形式存在, E, ES 和 ES' 。要列出三个方程,除 $[E]_0 = [E] + [ES] + [ES']$ 而外,还需二个迅速平衡式,但(13-21)中只有一个。因此,迅速平衡法对这类反应就无能为力了。除此而外,如果 ES 复合物分解的速度也是足够快的话,再假定底物和酶之间迅速建立平衡,也就不实际了。这样,一个更为有力的方法——稳态法就越来越被广泛地应用起来了。

2. 稳态法

如果式(13-10)中 ES 复合物分解为 E 和 P 的速度和 ES 分解为 $E + S$ 的速度相比也是足够快的话,则 ES 和 E, S 之间就不能认为处于平衡状态了,也就是说,不可能有平衡水平的 ES 积累。让我们考虑把酶加入底物 S 溶液中最初的很短时间内的变化,设总酶浓度为 $[E]_0$, 底物的初始浓度为 $[S]_0$, 酶浓度是很小的“催化量”,即 $[S] \gg [E]$, 这样,酶和底物的反应可表示成下式:



为了简化起见,考虑反应最初的很短时间内,由于产物 P 积累很少,逆反应可以不计,上式可以简化表示为:



底物消耗速度为 $k_1[E][S]$, 底物的消耗用于形成 ES , ES 一经形成,就会按 $k_{-1}[ES]$ 的速度解离为 $E + S$, 同时 ES 按 $k_2[ES]$ 形成产物。因此,一方面 S 和 E 反应形成 ES , 另一方面中心复合物 ES 又以两种方式消耗, ES 的净形成速度为:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

$$= k_1([E]_0 - [ES])([S]_0 - [ES]) - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (13-22)$$

在 $[ES]$ 为零时, ES 的消耗速度 $(k_{-1} + k_2)[ES]$ 项为零,随着反应的进行 ES 逐渐积累,如图13-7 a所示。 ES 积累增加, ES 形成速度降低,分解速度加快,从式(13-22)可以看到这一点, ES 积累越多 $([E]_0 - [ES])$ 越小, ES 的形成速度 $\frac{d[ES]}{dt}$ 下降。这样,反应进行到某一时刻,必然达到由 E 和 S 形成 ES 的速度和 ES 按两个方向分解的速度($ES \rightarrow E + S$; $ES \rightarrow E + P$)相等,也就是 ES 的净形成速度为零($\frac{d[ES]}{dt} = 0$)。此时 ES 的浓度等于一个常数值,这种

状态称为“稳态”或“恒态”。体系达到稳态后,底物 S 的消耗速度等于常数,产物形成的速度也为常数值,且两者相等,如图13-7 b各曲线及其间的关系。

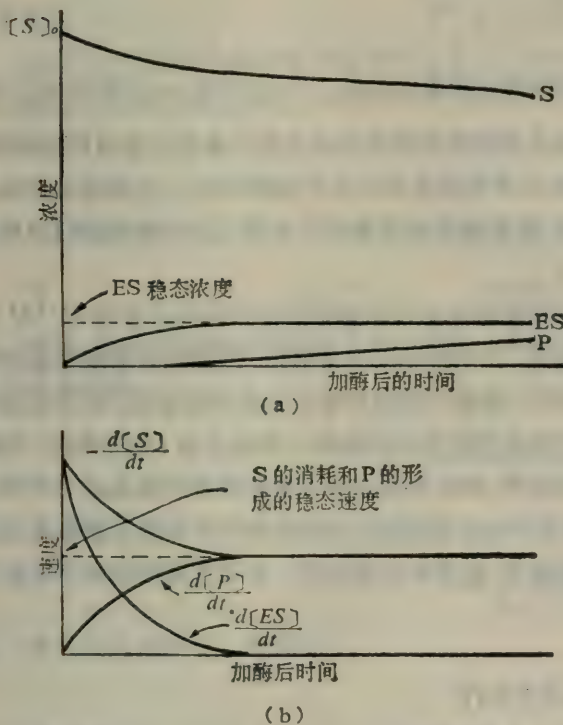


图 13-7 (a) E 加入 S 溶液后(无 P)几毫秒内的各种浓度变化 (b) E 加入底物 S 溶液后(无 P)在头几毫秒过程中速度的变化。

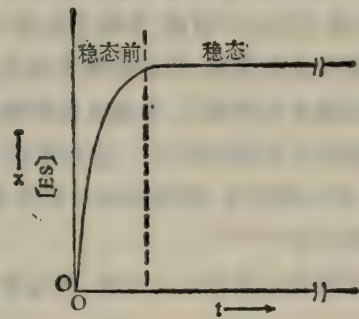


图 13-8 稳态和稳态前示意图

在这里值得注意,稳态法不象迅速平衡法那样有一系列的假定。但在这里为了处理问题方便,暂且以 $E + S \xrightarrow{k_1} ES \xrightarrow{k_2} E + P$ 代替了 $ES \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} E + S \xrightarrow{k_2} E + P$ 。也就是没有考虑产物的积累,以及由此而来的逆反应 $E + P \rightarrow ES$ 对速度方程的影响。如果考虑这个问题的话,不仅要加上由 E 和 P 形成 ES 项,而且游离态 $[S]$ 也要相应改变,应把 $([S]_0 - [ES])$ 改为 $([S]_0 - [ES] - [P])$ 。上述简化实际上暗示了稳态形成的时间很短,稳态在产物 P 有一定积累之前达到。

让我们再回过头来看一下式(13-22),仔细观察一下中心复合物 ES 的积累过程。以 x 代表 $[ES]$,式(13-22)可以写成:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k_1([E]_0 - x)[S] - k_{-1}x - k_p x \\ &= k_1[E]_0[S] - (k_{-1} + k_p + k_1[S])x \\ \because [S] &= [S]_0 - [ES] \quad ([S]_0 \gg [ES]) \end{aligned}$$

可以把 $[S]$ 看作常数,所以:

$$\frac{dx}{dt} = a - kx \quad (13-23)$$

对(13-23)式积分, ($t=0, x=0$) 则得:

$$x = \frac{a}{k}(1 - e^{-kt}) \quad (13-24)$$

图 13-8 即是按式(13-24)画出的 $x([ES])$ 随时间而积累的曲线。当 $t \gg \frac{1}{k}$ 时, x 达常数值 $\frac{a}{k}$, 称为稳态, 稳态之前的状态称为稳态前。达到稳态所需的时间 t 有多长呢? 最近以快速反应技术, 如温度阶差法等^[10, 11, 12]对几种酶进行了测定, 这个时间大体上在几毫秒以内。也就是说把酶加入反应体系之后, 在几毫秒的瞬间就达到稳态, 因此我们通常测定的初速(以分为时间单位)是稳态速度。

在此顺便说明一下稳态前(或非稳态)。在稳态动力学中通常所使用的酶浓度是 $10^{-6}M$ 或更低些, 底物浓度和酶浓度比较起来是大过量的, 反应时间以分为单位, 所测定的速度是稳态速度, 是整个反应的速度(取决于最慢一步的速度), 观察不到酶本身在反应中的变化, 以及反应中各中间阶段的情况, 因而依稳态动力学所推定的反应机制是间接的。而稳态前(或非稳态)能够反映出酶本身的变化, 能够直接探知反应中间过程, 因此稳态前动力学能够得到稳态动力学弄不清楚的反应机制的细节。稳态前动力学所使用的酶浓度较高, $10^{-6} - 10^{-4}M$ 以上, 而且反应迅速, 一般在秒以下, 需要快速反应技术, 如停流技术, 温度阶差方法等。关于这方面的知识请参看有关的文献^[10-14]。

按稳态法推导米氏方程, 其过程如下:

$$v = k_p[ES]$$

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_p[ES]}{[E] + [ES]}$$

$$ES \text{ 的形成速度} = k_1[E][S]$$

$$ES \text{ 的分解速度} = k_{-1}[ES] + k_p[ES] = (k_{-1} + k_p)[ES]$$

稳态时, $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ 即:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_p)[ES]$$

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_p}$$

定义: $\frac{k_{-1} + k_p}{k_1} = K_m$ (K_m 称为米氏常数)

$$\therefore [ES] = \frac{[S]}{K_m} [E]$$

将 $[ES]$ 代入 $\frac{v}{[E]}$ 方程中:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_m}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

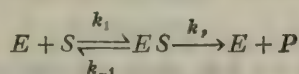
$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (13-25)$$

式(13-25)是以稳态法得到的米氏方程,在推导过程中虽然在反应步骤上有部分简化,但如果以稳态法处理非简化形式 $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$, 其结果是一样的,只不过 K_m 值更复杂些,包括了反应中所有各步骤的速度常数。

K_m 是一个动力学常数,它表达了实际的稳态浓度(而不是平衡浓度)之间的关系。从米氏方程可以直接看出 K_m 值等于达到最大反应速度一半时的底物浓度:

当 $[S] = K_m, \quad v = \frac{K_m}{K_m + K_m} V_m = \frac{1}{2} V_m$

综上所述,我们用两种方程推导了米氏方程。下面就这两个方程加以简要的比较,设催化反应以米氏机制进行:



① 两种方法都得到同样的动力学方程式:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

② 最大反应速度 V_m 两者同为:

$$V_m = k_p [E]$$

③ 两者不同之处在于 K_m 。迅速平衡法 $K_m = K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$, 是中心复合物的解离常数,而稳态法

$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1}$ 。如果 $k_p \ll k_{-1}$ (迅速平衡法的假定), 则: $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$ 。因此可以认为以迅速平衡法得到的速度方程是稳态方程的特殊情况。因以稳态法推导速度方程式时,没有什么假定,所以其表达式适用范围更广。

④ 从道理上来看,稳态法是严密的,但如果反应机构比较复杂的话,推导起来比较烦琐,结果表达式比较复杂,同实验结果难于对应起来。迅速平衡法虽然假定多,其结果有一定的局限性,只有假定正确结果才正确,但此法易于掌握,得到的方程式比较简单。近些年来,由于快速反应方法的发展,证实了酶和底物(也包括抑制剂)所形成的中心复合物,其形成和解离速度确实非常

快,迅速平衡法在很多场合是正确的。因此,这两种方法不能偏废一方,按照具体情况经常可以交替使用。

3. 酶催化反应速度与底物浓度的关系和 K_m 值意义的延伸

米氏方程圆满地说明了酶催化反应速度和底物浓度的关系。反应初速对底物浓度作图是一条双曲线,如果 $[S]$ 外推到 $[S]_{\infty}$, 则 v 达到极限值。这条双曲线的曲率是固定的,与 K_m 和 V_m 无关,因此,对服从米氏方程的所有酶来讲,其曲线上某两个特定点所对应的底物浓度比值是一个常数。比如曲线上相应于 $70\% V_m$ 和 $10\% V_m$ 两点所对应的底物浓度之比总是 21, $90\% V_m$ 与 $10\% V_m$ 两点对应的底物浓度之比总是 81 等。相应于 $70\% V_m$ 的点,即 $v=0.7 V_m$, 则,

$$0.7 = \frac{[S]_{0.7}}{K_m + [S]_{0.7}}$$

$$[S]_{0.7} = \frac{7}{3} K_m$$

相应于 $10\% V_m$ 点,即 $v=0.1 V_m$, 则:

$$0.1 = \frac{[S]_{0.1}}{K_m + [S]_{0.1}}$$

$$[S]_{0.1} = \frac{K_m}{9}$$

$$\therefore \frac{[S]_{0.7}}{[S]_{0.1}} = 21$$

K_m 值是一个非常重要的动力学常数,前面虽然已经指出了 K_m 的直观含义,为了更好地应用它,尚需进一步加以引伸。

首先, K_m 对某一特定酶来讲是一个常数,就这一点,我们可以比较来源于同一器官不同组织,或者同一组织的不同发育期的具有同样作用的酶,判断这些酶是完全相同的酶或是催化同一反应的不同种酶;如果已知 K_m , 可以调整实验条件,使 $[S] \gg K_m$, 得到 V_m 。知道了 V_m 值就可以求出参加反应的总酶浓度 ($V_m = k_p [E]_0$, $[E]_0 = V_m / k_p$); 通过 K_m 值的测定可鉴定酶的各种底物,哪种底物是“天然底物”, K_m 最低, V_m / K_m 比值最高者是对酶亲和力最大的底物,一般称为天然底物;知道了 K_m 值可以大致认识到细胞内底物的浓度。一般来讲,细胞内的底物浓度不会 $\ll K_m$, 如果底物浓度很低,虽然酶对底物浓度的变化很敏感,可是反应速度太小,酶的催化潜力不能发挥出来。当然,胞内的底物浓度也不会 $\gg K_m$, 因为 v 怎么也不会大于 V_m , $[S] = K_m$ 和 $[S] = 1000 K_m$, 其反应速度只差一倍,过多的底物是没用的。在很高的底物浓度时,反应速度对 $[S]$ 的变化不敏感,不利于生理活动;最后一点是酶不仅与底物结合,而且也与其他配体结合,如抑制剂,激活剂等。酶结合配体后, K_m 值发生变化是酶活性调节的一种方式。因此,如果发现某种酶在体外测定的 K_m 和体内差别较大,所谓非“生理性”地高于体内 K_m 值。可以预料,体内很可能存在天然激活剂,降低了 K_m 值。同时测定各种不同物质对 K_m 值的影响,可以识别生理上有重要意义的抑制剂。

4. Haldane 关系式^[16]

对于反应 $S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} P$, 如(13-6)式所示:

$$K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

如果考虑反应: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$, 此反应由二段组成: $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES$ 和 $ES \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} E + P$,

则:

$$K_{eq} = K_1 K_2 = \frac{k_1}{k_{-1}} \cdot \frac{k_2}{k_{-2}}$$

我们希望以动力学常数 K_m 和 V_m 表示 K_{eq} 。以 K_{m_s} 代表酶对底物 S 的米氏常数, 对产物 (另一底物) 的米氏常数以 K_{m_p} 代表, V_{m_f} 和 V_{m_r} 分别表示正向和逆向的最大反应速度。

$$K_{m_s} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}; \quad K_{m_p} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-2}}$$

$$V_{m_f} = k_2[E]_0; \quad V_{m_r} = k_{-1}[E]_0$$

则:

$$\begin{aligned} \frac{V_{m_f}/K_{m_s}}{V_{m_r}/K_{m_p}} &= \frac{k_1 k_2 [E]_0 (k_2 + k_{-1})}{k_{-2} k_{-1} [E]_0 (k_2 + k_{-1})} \\ &= \frac{k_1 k_2}{k_{-1} k_{-2}} = K_1 K_2 = K_{eq} \end{aligned}$$

$$\therefore \frac{V_{m_f} \cdot K_{m_p}}{V_{m_r} \cdot K_{m_s}} = K_{eq} \quad (13-26)$$

式(13-26)表示了动力学常数 K_m 、 V_m 和平衡常数 K_{eq} 之间的关系。这种关系在实验中得到了证实。例如: 对于延胡索酸酶 $V_{m_{延}}$ 与 $V_{m_{草}}$ 之比为: $10.9 \times 10^4 / 7.9 \times 10^4$, 而 $K_{m_{延}}$ 和 $K_{m_{草}}$ 分别为 2.6 微克分子和 8.3 微克分子, 按式(13-26)计算:

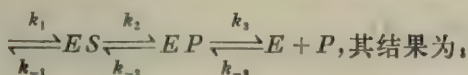
$$K_{eq} = \frac{10.9 \times 10^4 \times 8.3}{7.9 \times 10^4 \times 2.6} = 4.4$$

此计算值与实验值一致^[16]。

5. 产物对酶催化反应速度的影响

如果考虑细胞内的酶催化反应, 虽然产物不断地为另外的酶所利用, 但 S 和 P 总是同时存在的。因此考虑产物对反应速度的影响更符合实际情况。

在前文中实际上已经以迅速平衡法处理了产物对催化反应速度的影响。对反应式: $E + S$



$$V_f = \frac{V_{m_f} \cdot K_p [S] - V_{m_r} \cdot K_s [P]}{K_s K_p + K_p [S] + K_s [P]}$$

对上式略加变换, 以 K_s 除以分子、分母:

$$v_f = \frac{V_{m_f}[S] - V_{m_r} \frac{K_s}{K_p} [P]}{K_s + [S] + \frac{K_s}{K_p} [P]}$$

$$= \frac{V_{m_f} \left([S] - \frac{V_{m_r}}{V_{m_f}} \frac{K_s}{K_p} [P] \right)}{K_s \left(1 + \frac{[P]}{K_p} \right) + [S]}$$

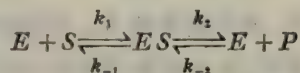
此处 $K_s = K_{m_s}$, $K_p = K_{m_p}$

$$\therefore K_{eq} = \frac{V_{m_f} K_{m_p}}{V_{m_r} K_{m_s}}$$

$$\therefore v_f = \frac{V_{m_f} \left([S] - \frac{[P]}{K_{eq}} \right)}{K_{m_s} \left(1 + \frac{[P]}{K_{m_p}} \right) + [S]} \quad (13-27)$$

式(13-27)在形式上与(13-15)式一致。只是分子中 $\left([S] - \frac{[P]}{K_{eq}} \right)$ 代替了 $[S]$, 分母中以 K_{m_s} $\left(1 + \frac{[P]}{K_{m_p}} \right)$ 代替了 K_m 。也就是说产物 P 对反应速度的影响相当于底物 S 的竞争性抑制剂对反应速度的影响。

上述是以迅速平衡法处理得到的结果。如果以稳态法处理也得到同样的结果。其过程如下,为简化起见考虑下列反应:



$$\frac{d[ES]}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] - ([E]_0 - [ES])(k_1[S] + k_{-2}[P])$$

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_1[S] + k_{-2}[P])([E]_0 - [ES]) - [k_{-1} + k_2][ES]$$

$$\therefore \frac{d[E]}{dt} = 0; \frac{d[ES]}{dt} = 0$$

$$\therefore [ES] = \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]}$$

$$\text{又: } v_f = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}([E]_0 - [ES])[P]$$

$$= (k_2 + k_{-2}[P])[ES] - k_{-2}[E]_0[P]$$

将 $[ES]$ 代入:

$$v_f = \frac{d[P]}{dt} = \frac{(k_2 + k_{-2}[P])(k_1[S] + k_{-2}[P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1[S] + k_{-2}[P]} - k_{-2}[E]_0[P]$$

$$= \frac{(k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P])[E]_0}{k_{-1} + k_2 + k_1 [S] + k_{-2} [P]}$$

分子分母同乘以 $\frac{k_{-1}+k_2}{k_1 k_{-2}}$

$$v_t = \frac{[k_2(k_{-1}+k_2)[S]/k_{-2} - k_{-1}(k_{-1}+k_2)[P]/k_1][E]_0}{\frac{(k_{-1}+k_2)^2}{k_1 k_{-2}} + \frac{(k_{-1}+k_2)[S]}{k_{-2}} + \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}[P]}$$

$$\therefore K_{m_s} = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}, \quad K_{m_p} = \frac{k_{-1}+k_2}{k_{-2}}$$

$$V'_{m_f} = k_2[E]_0, \quad V_{m_r} = k_{-1}[E]_0$$

$$\therefore U_t = \frac{V_{m_f} \cdot K_{m_p}[S] - V_{m_r} \cdot K_{m_s}[P]}{K_{m_s} \cdot K_{m_p} + K_{m_p}[S] + K_{m_s}[P]}$$

此结果与迅速平衡法所得到的(13-20)式完全一致。如果已知[S]和[P]，从此方程可以直接得到在S和P同时存在的情况下的反应速度。如果固定产物P的浓度，改变底物浓度作U~S曲线图，显然不再是双曲线，因为在分子中多了一项常数项。只要有产物存在，由于产物的抑制作用，总是使得酶的催化反应动力学变得复杂化，也正是由于这个原因，在实验上测定K_m，V_m时，总是避开产物的影响，测定反应的初速度。

6. 反应级数

如果有一个反应： $xA + yB \rightarrow P$ ，以产物的形成速度表示反应速度，则：

$$\frac{dP}{dt} = k[A]^a[B]^b$$

k：速度常数、[A]和[B]分别是反应物A和B的浓度、a和b分别是浓度[A]和[B]的幂次。该反应对反应物A是a级反应，对B是b级反应，整个反应的级数为(a+b)级。反应级数可以是整数：0、1、2……，也可以是非整数。反应级数是实验值，只表示反应速度与反应物浓度的幂次关系。而反应分子数是指最慢一步反应中，参加反应的最低分子数目。如单分子反应，双分子反应。显然反应分子数必须是整数。反应分子数是对反应机制而言的，不能从简单的实验中得到

① 零级反应

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k$$

即反应速度与反应物浓度无关。积分上式：

$$[S]_0 - [S]_t = [P]_t = kt \quad (13-28)$$

[S]₀是初始浓度，[S]_t是时间t的底物浓度，[P]_t是时间t的产物浓度。式(13-28)表示了零级反应底物的消耗或产物的形成与时间t成直线关系。如图13-9所示：

当[S] ≫ K_m时，米氏方程(3-15)：

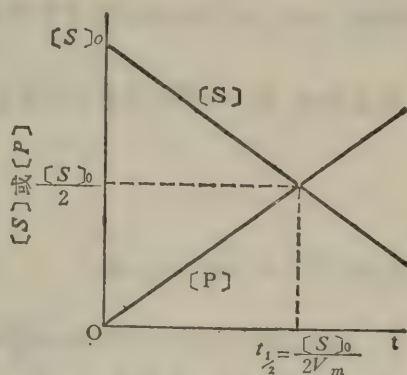


图 13-9 零级反应产物[P]和底物[S]与反应时间的关系

$$U = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{V_m [S]}{[S]} = V_m$$

一般来讲,当 $[S] > 100 K_m$ 时 ($U = \frac{100}{101} V_m$), 近似地认为达到 V_m , $U \sim S$ 双曲线在这一段属于零级反应。图 13-9 $[S]$ 和 $[P]$ 两线交于一点, 此点的纵坐标为 $\frac{[S]_0}{2}$, 相应的横坐标 $t_{1/2}$ 叫半寿期, 即一半底物转化为产物所需的时间:

$$\begin{aligned} [S]_0 - [S]_t &= kt = V_m t \\ \frac{[S]_0}{2} &= V_m t_{1/2} \\ t_{1/2} &= \frac{[S]_0}{2V_m} \end{aligned} \quad (13-29)$$

② 一级反应

一级反应速度与底物浓度成正比: $-\frac{d[S]}{dt} = k[S]$ 。当 $[S] \ll K_m$ 时, 米氏方程分母中的 $[S]$ 可以忽略, 则:

$$\begin{aligned} U &= \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m}{K_m} [S] = k[S] \\ &\left(k = \frac{V_m}{K_m} \right) \end{aligned}$$

一般来讲, 米氏方程的双曲线 $[S] < 0.01 K_m$ 一段是一级反应。积分 $d[S]/dt$ 得:

$$\ln [S] = -kt + c$$

c : 积分常数, 当 $t = 0$ 时, $[S] = [S]_0$, 则 $c = \ln [S]_0$ 。

$$\ln \frac{[S]}{[S]_0} = -kt$$

$$[S] = [S]_0 e^{-kt} \quad (13-30)$$

把(13-30)代入 $U = k[S]$, 则:

$$U = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] = k[S]_0 e^{-kt} = A e^{-kt} \quad (13-31)$$

$$(A = k[S]_0)$$

式(13-30)和式(13-31)呈现了一级反应的底物浓度和反应速度随时间变化的规律。如图 13-10 所示:

又因:

$$\ln \frac{[S]}{[S]_0} = -kt$$

$$2.31 \lg \frac{[S]}{[S]_0} = -kt$$

$$\lg [S] = -\frac{k}{2.3} t + \lg [S]_0 \quad (13-32)$$

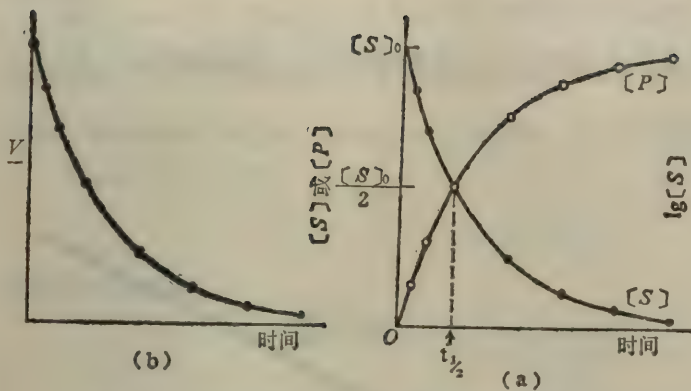


图 13-10 一级反应速度曲线(a)产物[P]形成和底物[S]消耗与t关系曲线(b)v~t曲线

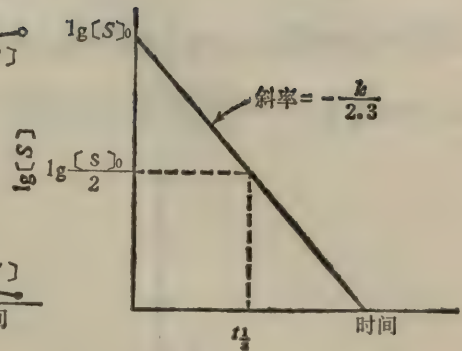


图 13-11 一级反应 $\lg[S] \sim t$ 作图

按式(13-32), $\lg[S] \sim t$ 作图是条直线, 斜率为 $-\frac{k}{2.3}$, 纵轴截距为 $\lg[S]_0$, 如图 13-11 所示:

$$\text{当 } t = t_{1/2} \text{ 时, } \frac{[S]_0}{[S]} = \frac{1}{0.5} = 2$$

$$\begin{aligned} 2.31 \lg \frac{[S]_0}{[S]} &= kt \\ t_{1/2} &= \frac{2.31 \lg 2}{k} = \frac{0.693}{k} \end{aligned} \quad (13-33)$$

一级反应的半寿期等于常数 $\left(\frac{0.693}{k}\right)$, 这是一级反应的另一特点。此外, 因,

$$-\frac{d[S]}{dt} = k[S]$$

则:

$$\frac{-d[S]/[S]}{dt} = k$$

这意味着一级反应速度常数近似等于 dt 时间内(小的时间增量)转化为产物的底物分数。换言之, 不论起始底物浓度如何, 在同样的时间间隔底物转化为产物的分数恒定。

7. 动力学数据的处理

实验上我们可以测定不同底物浓度的反应初速, 按此数据可以画出 $U \sim [S]$ 矩形双曲线图。但是从图上不能直接准确地求出 V_m 和 K_m 。在曲线的延长线上确定 V_m , 然后再于纵轴上找出 $V_m/2$ 处, 在横轴上相应地可以定出 K_m 值, 但这只是粗略的作法, 最好按下面的几种作法处理动力学数据, 求得 V_m 和 K_m 。

① Lineweaver-Burk 倒数作图法

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

颠倒分子和分母,

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (13-34)$$

从式(13-34)可见, $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图是一条直线, 斜率为 $\frac{K_m}{V_m}$, 纵轴截距为 $\frac{1}{V_m}$, 横轴截距为 $-\frac{1}{K_m}$ ($\because 1/v=0, \frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_m}$)。

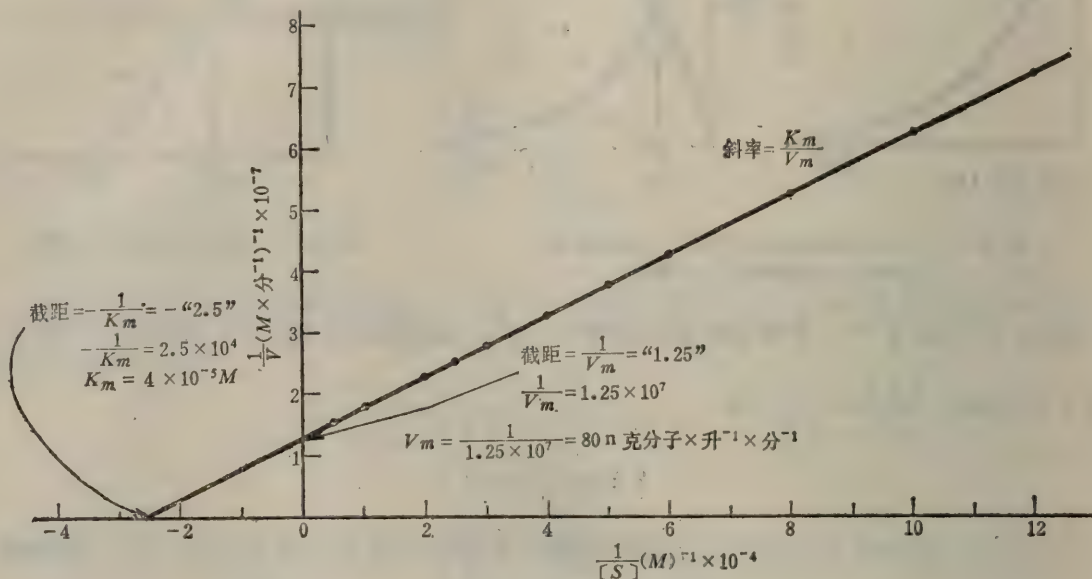


图 13-12 Lineweaver-Burk 倒数作图法

以 Lineweaver-Burk 作图法可以满意地求得 K_m 和 V_m , 此法被广泛地采用。但 Lineweaver-Burk 法也有其弱点, 因横轴是 $\frac{1}{[S]}$, 如果实验时 $[S]$ 值等距, 则 $\frac{1}{[S]}$ 轴上的点子就不等距, 在低值处点子过密, 高值处点子过稀。高值点子是低底物浓度的速度数据, 误差较大, 点子稀容易引起更大的误差。为了克服这个问题, 在实验时选择底物浓度时要注意, 一般选在 K_m 值左右, 且底物浓度之间有适当的间距, 如表 13-1 所示:

表 13-1 Lineweaver-Burk 作图 $[S]$ 的选择

$S (10^{-5} M)$	$\frac{1}{S} (10^5 M^{-1})$	$S (10^{-5} M)$	$\frac{1}{S} (10^5 M^{-1})$
0.833	1.2	4.00	0.25
1.00	1.0	5.00	0.20
1.25	0.8	6.00	0.170
1.67	0.6	8.00	0.125
2.00	0.5	10.00	0.10
2.50	0.4	20.00	0.05
3.00	0.33		
3.30	0.30		

② 其他直线作图法

除 Lineweaver-Burk 法以外,还有几个方法在某些情况下使用可能更方便。如: Hanes-Woolf 法: $\frac{S}{v} \sim S$ 作图,横轴 S 点分布均匀;还有 Woolf-Angustinsson-Hofstee 作图法, $v \sim v/S$; Eadie-Scatchard 作图法, $v/S \sim v$, v 不取倒数。此二法更适合于 v 测定误差较大的实验。

Hanes-Woolf 作图:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$$

等式两边取倒数:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]}$$

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} [S] \quad (13-35)$$

$\frac{[S]}{v} \sim [S]$ 作图,斜率为 $\frac{1}{V_m}$, 纵轴截距 $\frac{K_m}{V_m}$ 。当 $\frac{[S]}{v} = 0$ 时, $[S] = -K_m$, 所以横轴截距为 $-K_m$ 。

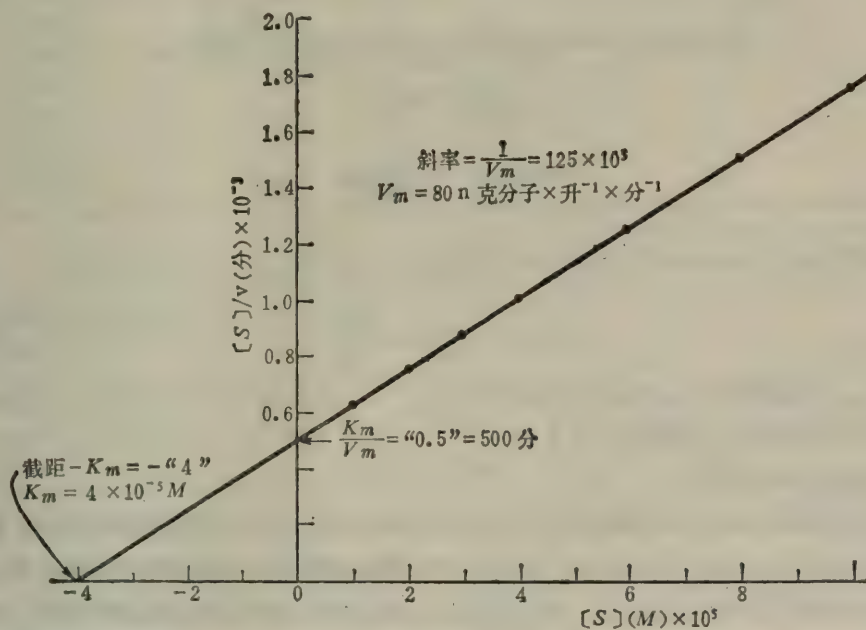


图 13-13 Hanes-Woolf $\frac{[S]}{v} \sim [S]$ 作图

Woolf-Angustinsson-Hofstee $v \sim \frac{v}{[S]}$ 作图法:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_m}{\frac{K_m}{[S]} + 1}$$

$$v = -K_m \frac{v}{[S]} + V_m \quad (13-36)$$

$v \sim \frac{v}{[S]}$ 作图, 斜率为 $-K_m$, 在纵轴上截距为 V_m , 因 $v=0$ 时 $\frac{v}{[S]} = \frac{V_m}{K_m}$, 横轴截距为 V_m/K_m 。

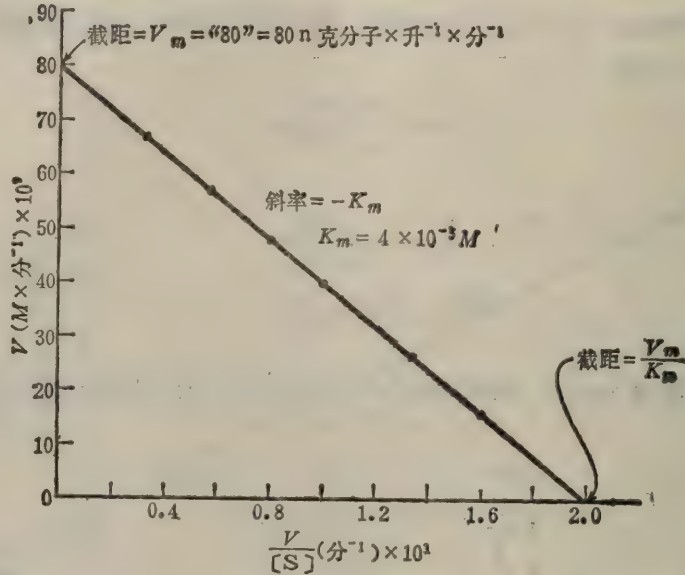


图 13-14 $v \sim \frac{v}{[S]}$ 作图

此外还有 Eadie-Scatchard 的 $\frac{v}{[S]} \sim v$ 作图法:

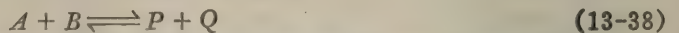
$$\frac{v}{[S]} = -\frac{1}{K_m} v + \frac{V_m}{K_m} \quad (13-37)$$

斜率为 $-1/K_m$, 纵轴截距 V_m/K_m , 横轴截距为 V_m 。

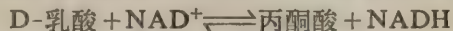
上述几种作图法及特点列于表 13-2 中。

三、双底物双产物反应

米氏方程是以单底物系统为根据推导出来的动力学方程。以米氏方程处理蛋白水解酶类所催化的水解反应, 其结果是令人满意的。但对大多数其他酶类来讲, 反应中大多都涉及两种底物, 有些酶反应涉及两种以上的底物。对这些反应来说, 原则上米氏方程还是有效的, 但由于体系较单底物复杂, 米氏方程就不完全适用了。下面就双底物双产物反应进行简单地讨论。一般可表示为:



乳酸脱氢酶催化 D-乳酸脱氢生成酮酸的反应, 是一个很好的实例。



NAD^+ 相当于 (13-38) 式中的底物 A, 乳酸相当于底物 B。表 13-3 显示了反应初速度与 A、B 两种底物浓度的关系。表中 A_0 (NAD^+) 固定在几种不同的浓度, 改变 B_0 (乳酸) 浓度测定反应的初

表 13-2 四种作图法特征的比较

作图方式	斜率	纵轴截距	横轴截距
$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$	K_m/V_m	$1/V_m$	$-1/K_m$
$[S]/v \sim [S]$	$1/V_m$	K_m/V_m	$-K_m$
$v \sim v/[S]$	$-K_m$	V_m	V_m/K_m
$v/[S] \sim v$	$-1/K_m$	V_m/K_m	V_m

表 13-3 乳酸脱氢酶催化反应速度与两底物浓度的关系

$[A]_0$ $M \times 10^5$	$v_0 \text{ 分}^{-1} \times 10^3$			
	3.85	6.32	11.3	63.2
1.68	0.508	0.788	1.27	3.23
2.52	0.715	1.10	1.75	4.35
4.17	1.08	1.61	2.56	5.89
8.34	1.70	2.50	3.85	8.35
17.20	2.44	3.57	5.26	10.0
55.50	3.45	5.00	7.15	12.5

速度, v_0 。以每分钟每克分子酶转化乳酸为丙酮酸的克分子数表示 (pH 6.80, 29°C)^[17]。

按表 13-3 数据可作图 13-15:

从图 13-15 可见, 在某一 $[A]_0$ 浓度下, 比如: $1.68 \times 10^{-5} M$ 所得到的 V_m 和 K_m 值并不是真正的 V_m 和底物 B 的 K_m 值, V_m 和 K_m 与底物 $[A]_0$ 有关。只有在两个底物都呈饱和浓度时 V_m 才是真正的最大反应速度, 只有 $[A]_0$ 呈饱和浓度时的 K_{mB} 才是真正的 K_{mB} (达到最大反应速度一半时的底物 B 的浓度)。 K_{mB}^{app} 和 V_m 与 $[A]_0$ 的关系列于下表中。

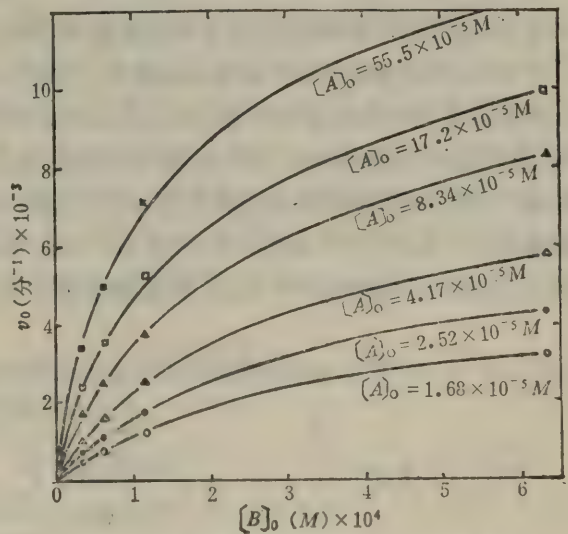


图 13-15 双底物反应底物浓度对反应初速的影响

从上述反应可见, 双底物反应与单底物反应不完全相同, 单底物反应系统的动力学规律不能代替双底物反应的规律。Cleland 系统地整理了这种反应, 而且对各种不同情况以稳态法推导了动力学方程^[18~22]。下面就 (13-38) 式所表示的反应的几种主要机制进行简单叙述。各种反应机

表 13-4 在双底物反应中, 底物 A₀ 浓度对 K_{mB}^{app} 和 V_m 的影响

$[A]_0$ (M) × 10 ⁵	K_{mB}^{app} (M) × 10 ⁵	V_m (分 ⁻¹) × 10 ⁻⁴
1.68	3.73	0.544
2.52	3.26	0.688
4.17	2.72	0.862
8.34	2.06	1.08
17.20	1.56	1.23
55.50	1.16	1.36
$[A]_0 \gg K_m$	0.855	1.43

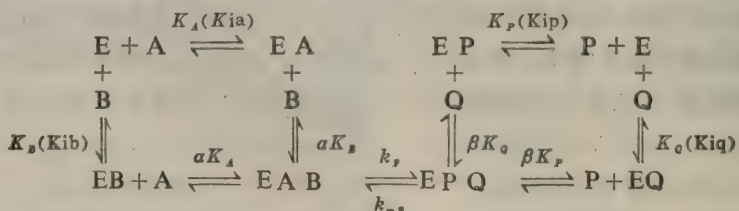
制的命名首先考虑反应物和产物的数目, 如: Uni Bi, Bi Bi, Ter Ter 等。Uni Bi 是一种底物生成二种产物的意思, Bi Bi 是二种底物二种产物。不可逆反应作为可逆反应的一部分一併处理。底物按正向反应结合到酶上的顺序可排成 A, B, ……; 产物(逆反应的底物) 按从酶分子离开的顺序排成 P, Q, ……。

此外, 因双底物以及多底物酶催化反应动力学机制比较复杂, 以稳态法推导其动力学表达式是一件很麻烦而且也是一件不易作好的工作, King 和 Altman 为此提出了一个速度方程图式法^[23~25], 随后 Wong 和 Hanes 又把此法加以规则化^[26]。图式法是一个很简便而又可靠的方法, 目前被广泛地使用着。为了对此法有个初步的了解, 在推导动力学方程时概要地介绍此法的应用。

1. 几种反应机制

① 随机三元复合物机制(迅速平衡随机 Bi Bi)。

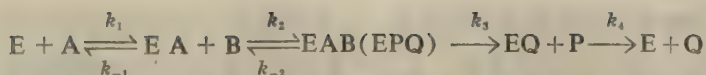
A、B 二底物与酶结合的顺序是随机的, 产物 P、Q 脱离酶的顺序也是随机的。游离酶 E 与底物 A 结合成复合物 EA, 解离常数为 K_A (Cleland 写作 K_{ia}), 底物 B 与游离酶 E 结合成 EB 复合物, 解离常数为 K_B (Cleland, K_{ib})。由于 B 的结合改变了 A 与酶结合的亲和力, 所以 A 与 EB 结合形成三元复合物 EAB 时解离常数为 αK_A , 当然 B 与 EA 结合形成三元复合物 EAB 时, 其解离常数应为 αK_B ($\because K_B \cdot \alpha K_A = K_A \cdot \alpha K_B$)。 αK_A 即在饱和浓度 B 时 A 底物的 K_m 值, 也可以写作 K_{mA} , 同理 αK_B 也可写作 K_{mB} 。此机制表示如下:



也可以用图 13-16 表示:

② 有序三元复合物机制(有序 Bi Bi)

反应顺序可表示如下:



底物 A 结合在先, B 结合在后。也就是说只有酶与 A 结合之后才有利于和底物 B 结合。这种机制也可简单表示成下图:

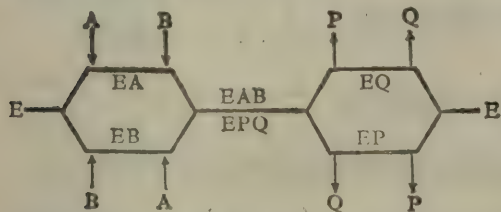


图 13-16 随机三元复合物机制

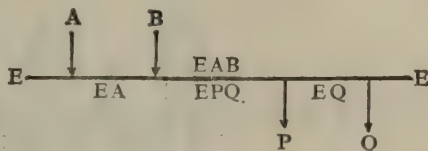


图 13-17 有序三元复合物机制。复合物 EAB 只能从 EA 形成

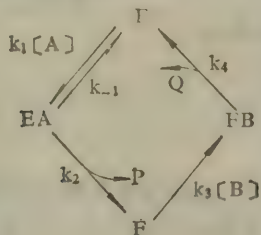
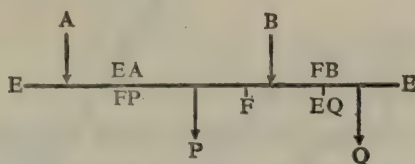


图 13-18 乒乓 Bi Bi 机制

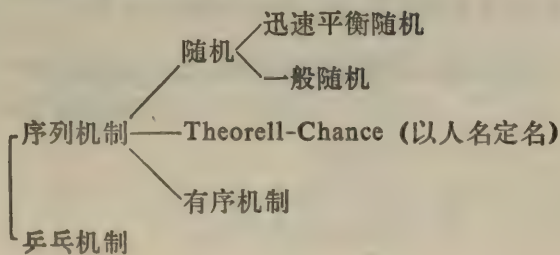


③ 乒乓机制(乒乓 Bi Bi)

此反应机制中不形成三元复合物 EAB。酶与底物的复合物为 EA(FP)和 FB(EQ);

上面几个图中,水平直线代表酶的状态,箭头代表正向反应的底物结合和产物脱离的方向。E 和 F 代表酶的稳定形式。乒乓机制中的 E 和 F,若是氧化还原酶类的话,相当于氧化型和还原型。凡在反应过程中,比较稳定的酶中间物形式,可以和底物发生双分子反应,而不能发生自身解离反应的酶形式称为稳定态酶中间物形式。其中包括自由酶。还有一个概念值得注意,即“中心复合物”和“非中心复合物”,凡活性部位完全与底物结合,不能再与其他配体结合的酶-底物复合物称为“中心复合物”;当然,活性部位未被底物完全覆盖的酶-底物复合物称为“非中心复合物”。两者都属于非稳定态酶中间物,可以自身单分子解离,或异构化(如 $EAB \rightleftharpoons EPQ$) 之后单分子解离成产物。

上述三种机制中除乒乓 Bi Bi 而外,另两种都是全部底物和酶结合之后才生成产物,这类机制也叫作序列机制(Sequential),因此把各机制分类如下:



V_m^{app} 和 K_m^{app} 是在固定[B]时的表现 V_m 和表现 K_m 值。当[B]是饱和浓度时, $K_B/[B]$ 和 $\alpha K_B/[B] \approx 0$,所以式(13-40)成为:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A]}{\alpha K_A + [A]}$$

此时得到的是真正的 V_m 和 $K_{m,A}$ 。

为了求得 V_m, K_A, K_B 和 $K_{m,A}$ 把式(13-40)变成倒数方程:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[A]} \left(\frac{\alpha K_A}{V_m} + \frac{\alpha K_A K_B}{V_m [B]} \right) + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]} \right) \quad (13-42)$$

$1/v \sim 1/[A]$ 作图,斜率为 $\frac{\alpha K_A}{V_m} + \frac{\alpha K_A K_B}{V_m [B]}$,纵轴截距为 $1/V_m \left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]} \right)$,横轴截距为 $-\left(1 + \frac{\alpha K_B}{[B]} \right) / \alpha K_A \left(1 + \frac{K_B}{[B]} \right)$ 。见图 13-20 和 13-21。

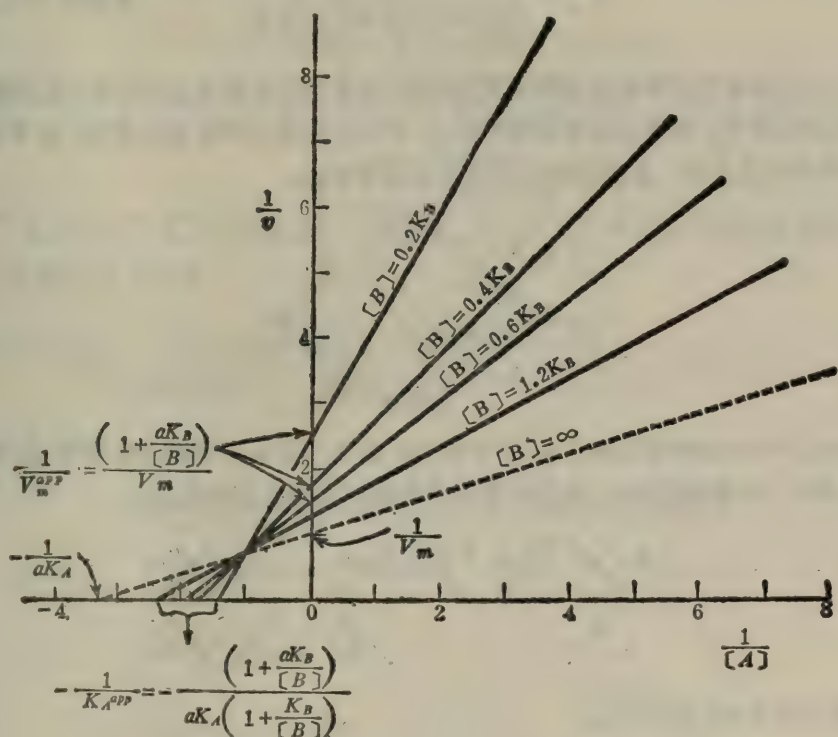


图 13-20 迅速平衡机制($\alpha=0.3$)在不同的固定[B]浓度下, $1/v \sim 1/[A]$ 作图

② 有序机制 Bi Bi

如果三元复合物 EAB 转变为 EPQ 是速度限制步骤, 则 E、A、EA、B 和 EAB 处于平衡态。以迅速平衡法可以得到下列方程式:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A][B]}{K_A K_B + [A] + \frac{[A][B]}{K_A K_B}} \quad (13-43)$$

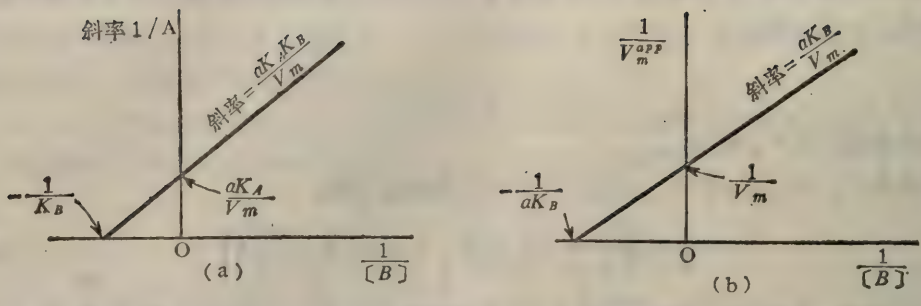
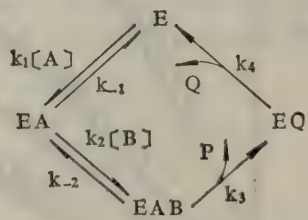


图 13-21 图 13-20 中斜率 $1/[A]$ 对 $1/[B]$ 作图(a); $1/v_{app}$ 对 $1/[B]$ 作图(b)

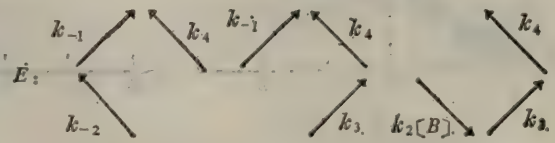
或：

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A]}{\frac{K_A K_B}{[B]} + \left(1 + \frac{K_B}{[B]}\right)[A]} \quad (13-44)$$

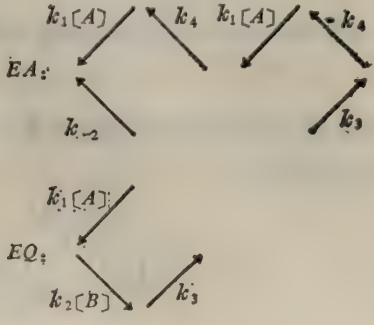
式(13-44)与迅速平衡随机机制在形式上一致,倒数方程作图形式也一致。但如果考虑 EAB 转变为 EPQ 的速度和分解反应速度同样快的话,则应以稳态法求得速度方程。以 King-Altman 方法很容易得到稳态方程。首先把反应机制写成循环形式:

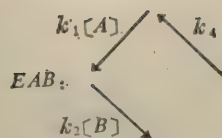


在此循环中有三个酶-底物复合物 EA、EAB 和 EQ,因而在此反应中酶以四种形式存在,即 E、EA、EAB 和 EQ。按循环图所示,分别写出每一种酶形式的反应步骤,如:



同样对 EA、EQ 和 EAB 可以写成:





酶浓度[E]、[EA]、[EAB]、[EQ]分别正比于反应步骤项数之和:

$$[E] \propto k_{-1}k_{-2}k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_2k_3k_4[B]$$

$$[EA] \propto k_1k_{-2}k_4[A] + k_1k_3k_4[A]$$

$$[EAB] \propto k_1k_2k_4[A][B]$$

$$[EQ] \propto k_1k_2k_3[A][B]$$

每项乘积的速度常数的数目比循环中酶存在形式数少“1”，因循环中酶以四种形式存在，所以每项为三个速度常数乘积。

$$\therefore [E]_0 = [E] + [EA] + [EAB] + [EQ]$$

$$\frac{[EAB]}{[E]_0} = \frac{k_1k_2k_4[A][B]}{k_4(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3[B]) + k_1k_4(k_{-2} + k_3)[A] + k_1k_2(k_3 + k_4)[A][B]}$$

$$\therefore v = k_3[EAB]$$

$$\therefore v = \frac{k_1k_2k_3k_4[A][B][E]_0}{k_4(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3[B]) + k_1k_4(k_{-2} + k_3)[A] + k_1k_2(k_3 + k_4)[A][B]}$$

以 $k_1k_2(k_3 + k_4)$ 除以分子分母:

$$v = \frac{\{k_3k_4/(k_3 + k_4)\}[E]_0[A][B]}{\frac{k_4(k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3)}{k_1k_2(k_3 + k_4)} + \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)}[A] + \frac{k_3k_4}{k_1(k_3 + k_4)}[B] + [A][B]} \quad (13-45)$$

式(13-45)可以写成:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A][B]}{K_{ia}K_{mB} + K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (13-46)$$

$$V_m = \{k_3k_4/(k_3 + k_4)\}[E]_0$$

$$K_{mB} = \frac{k_4(k_{-2} + k_3)}{k_2(k_3 + k_4)}$$

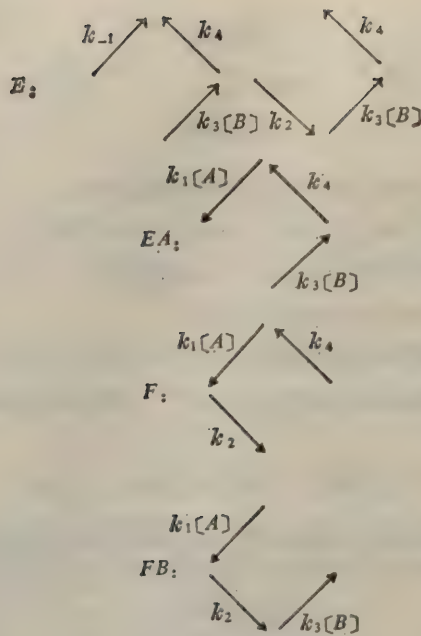
$$V_{mA} = \frac{k_3k_4}{k_1(k_3 + k_4)}$$

$$K_{ia} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

比较(13-44)式和(13-46)式可知，在双底物反应中，迅速平衡法和稳态法所得到的最后方程并不一样。

③ 乒乓机制

Cleland 把这个机制叫乒乓 Bi Bi。如果不考虑 P、Q 的逆反应，如图 13-18 所示，以 King-Altman 法很容易得到速度方程:



E, EA, F, FB 的浓度可以表示如下:

$$[E] \propto k_{-1}k_3k_4[B] + k_2k_3k_4[B]$$

$$[EA] \propto k_1k_3k_4[A][B]$$

$$[F] \propto k_1k_2k_4[A]$$

$$[FB] \propto k_1k_2k_3[A][B]$$

这样:

$$\begin{aligned}
 [FB] &= \frac{k_1k_2k_3[E]_0[A][B]}{k_1k_2k_4[A] + k_3k_4(k_{-1} + k_2)[B] + k_1k_3(k_2 + k_4)[A][B]} \\
 v &= \frac{k_1k_2k_3k_4[E]_0[A][B]}{k_1k_2k_4[A] + k_3k_4(k_{-1} + k_2)[B] + k_1k_3(k_2 + k_4)[A][B]} \\
 &= \frac{\frac{k_2k_4}{k_2 + k_4}[E]_0[A][B]}{\frac{k_2k_4}{k_3(k_2 + k_4)}[A] + \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_4)}[B] + [A][B]} \quad (13-47)
 \end{aligned}$$

式(13-47)可写成:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (13-48)$$

$$V_m = \frac{k_2k_4}{k_2 + k_4}[E]$$

$$K_{mB} = \frac{k_2k_4}{k_3(k_2 + k_4)}$$

$$K_{mA} = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_4)}$$

若固定[B]变化A的浓度可写成:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[A]}{K_{mA} + \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right)[A]} \quad (13-49)$$

倒数方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right) + \frac{K_{mA}}{V_m} \frac{1}{[A]} \quad (13-50)$$

$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[A]}$ 作图斜率为 $\frac{K_{mA}}{V_m}$, 纵轴截距为 $\frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right)$, 横轴截距为 $-\frac{(1 + K_{mB})}{K_{mA}}$ 。如图 13-22 所示:

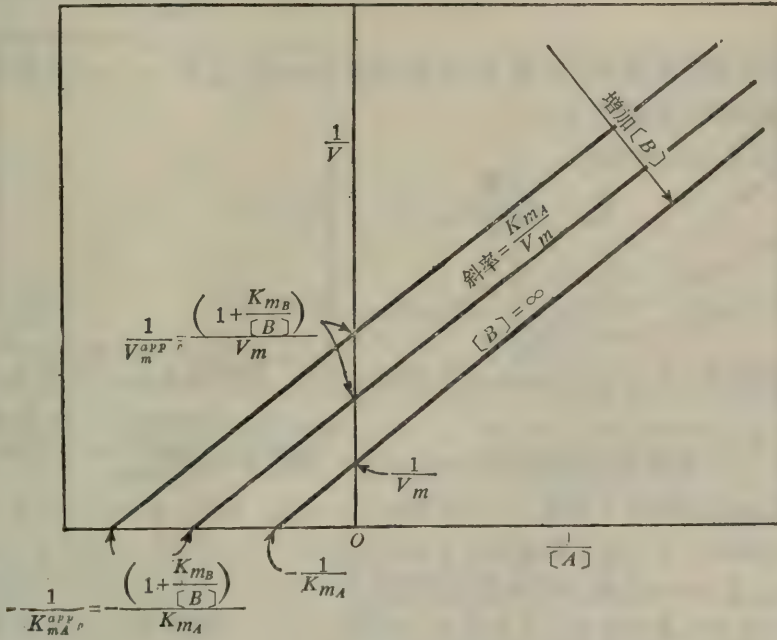


图 13-22 乒乓 Bi Bi 机制反应的 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图

纵轴截距对 $1/[B]$ 作图如 13-23;

3. 反应机制的鉴别

在实验上可测定不同底物浓度(A或B)下的反应初速,区分乒乓机制和序列机制。速度方程倒数作图中 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[A]}$ (或 $1/[B]$) 作图,乒乓机制是一些平行线,而迅速平衡随机和有序机制的各直线交于纵轴左侧的一点。但此法不能区别开迅速平衡随机和有序机制,两机制的倒数方程作图没有区别。

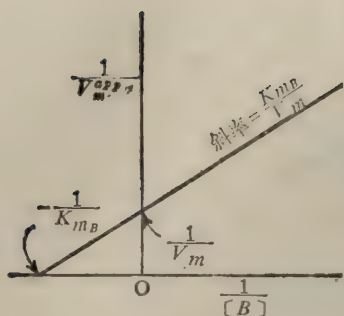


图 13-23 图 13-22 纵轴截距对 $1/[B]$ 作图

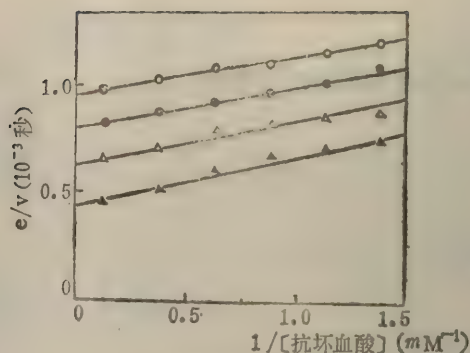
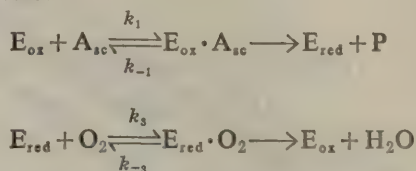


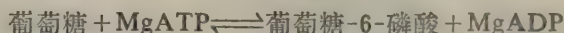
图 13-24 抗坏血酸氧化酶催化反应的 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图^[27]
 $[O_2] = 0.15 \text{ mM} (\circ), 0.2 \text{ mM} (\bullet), 0.3 \text{ mM} (\triangle), 0.5 \text{ mM} (\blacktriangle)$

抗坏血酸氧化酶的反应属于乒乓 Bi Bi 机制, 可以用初速法鉴别。 $e/v \sim 1/[抗坏血酸]$ 作图如 13-24 所示 (e 是酶的总浓度 $[E]_0$)。

因此, 这个机制可按乒乓机制写成:



此处 A_{sc} 是抗坏血酸, E_{ox} 、 E_{red} 分别为酶的氧化型和还原型。己糖激酶催化反应机制与上述不同:



以初速倒数对底物浓度作图得不到图 13-24 那样的平行直线, 因此, 上述催化反应不是乒乓机制。究竟是哪种机制呢? 是迅速平衡随机还是有序机制呢? 以初速倒数作图法不能解决这个问题。因双底物反应, 缺少一个底物, 整个反应就不能进行, 所以可用二缺一的办法研究两个底物与酶结合的顺序。如果催化反应是随机机制, 不管往酶液中先加入哪种底物, 都会和酶结合。酶与底物是否结合, 可用平衡渗析法或吸收光谱法(某些情况可用)探知。如果所研究的反应是有序机制, 可能先加入 A 发生结合, 先加入 B 就不发生结合或反之。当然, 如果是乒乓机制, 加入底物 A 不仅产生复合物, 而且也有产物生成。关于机制的鉴别, 上述方法虽然可以采用, 但用途有限, 更常用的方法是“产物抑制”、“端点抑制”等办法。可参看有关文献^[18, 19, 20, 27]。

第三节 酶浓度与催化反应速度

一、酶浓度与反应初速的关系

在酶制剂的生产中, 以及医务部门的化验工作中, 都经常测定酶活力, 定量酶浓度。当然在科研实践中专门研究酶也好, 或者是研究其他生物大分子课题也好, 一般来讲, 都要接触到酶, 都

要建立测定酶活力的方法,以便随时知道溶液中酶的含量。定量酶浓度的理论基础就是反应初速与酶浓度之间的正比关系。

定量某酶制剂中酶的浓度,除了极个别的酶依据其特殊的吸收光谱特征可以直接定量而外,绝大多数的酶都无法直接确定浓度。即使是有特殊性质可利用的话,由于在分离提纯过程中可能产生部分变性,或由于其他原因,可能造成部分活性的钝化。而且无活力的酶和活性酶除活力不同而外,其他方面差别极小,在分离纯化时往往分不开。因此,利用除测活力而外的性质定量酶浓度有时也是不可靠的。这样,定量酶浓度最好还是在酶发挥活力的催化反应中定量。

按米氏方程可知反应初速与酶浓度成正比:

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} = \frac{k_p[S]}{K_m + [S]}[E]_0$$

如果初始底物浓度固定,则 $k_p[S]/K_m + [S]$ 是常数,则 $v = k'[E]_0$ ($k' = k_p[S]/K_m + [S]$)。 $v \sim [E]_0$ 作图呈图 13-25 所示的直线:

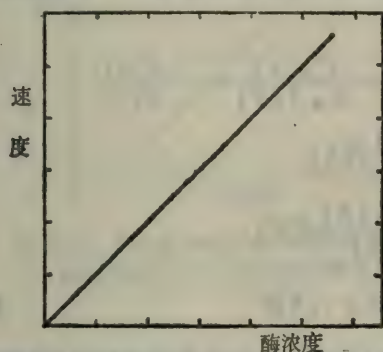


图 13-25 反应速度与酶浓度的关系(底物浓度、pH、温度和缓冲液恒定)底物浓度 $\gg K_m$

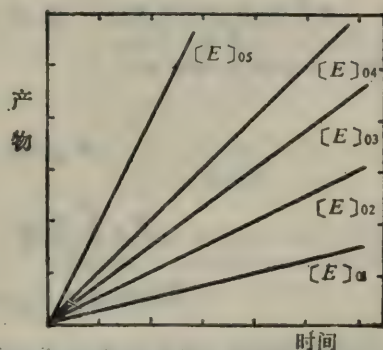


图 13-26 当 $[S]_0 \geq 100 K_m$, 在不同的酶浓度下,产物形成的数量与时间的关系。
 $[E]_{05}:[E]_{04}:[E]_{03}:[E]_{02}:[E]_{01} = 8:4:3:2:1$
 8:4:3:2:1

在实验中必须确保所测定的是初速,即底物消耗的百分比很低,此时 $p \sim t$ 呈直线关系,如图 13-26 所示。否则,由于底物的消耗,反应速度变慢,或者由于产物的积累逆反应明显地影响正向反应速度,使得 $p \sim t$ 作图逐渐地偏离直线。因此正如第一节所述,测定酶浓度首先要确定 $p \sim t$ 的直线范围。在酶催化反应中如果其他条件选择好之后,决定 $p \sim t$ 关系的主要因素是底物浓度,酶浓度和反应时间。一般采用高底物浓度 $[S] \geq 100 K_m$ (零级反应)测定反应初速定量酶浓度。如果采用低底物浓度 $[S] \leq 0.01 K_m$, 该反应服从一级反应速度规律:

$$2.3 \lg \frac{[S]_0}{[S]} = k t = \frac{V_m}{K_m} t = \frac{k_p}{K_m} [E]_0 t$$

$2.3 \lg \frac{[S]_0}{[S]} \sim t$ 作图呈直线。如图 13-27 所示。直线的斜率等于 $k'[E]_0$ ($k' = \frac{k_p}{K_m}$)。斜率 $\sim [E]_0$, 作图呈直线。在实验中,最好以连续测定法监测反应过程,至少要使反应进行 10~25% 左右。这种方法适用于 K_m 很大的酶(如, $10^{-2} M \sim 1 M$), 或底物溶解度很低的情况。如果使用接

辅助因子 FAD 需要在反应中维持循环使用,即 FADH_2 氧化成 FAD, 如果氧分子进入溶液中的速度不够快,限制了 FADH_2 返回 FAD 的速度,从而影响整个反应速度,则 $\frac{d[P]}{dt} \sim [E]_0$ 。作图在高酶浓度时偏离直线。第二,如果反应系统中有不可逆抑制剂存在时,对反应有明显的影响。比如溶液(水)或底物中有重金属离子存在时(Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 等),因酶分子要和抑制剂结合,因此 $\frac{d[P]}{dt}$ 对 $[E]_0$ 作图,在低浓度 $[E]_0$ 时不呈现活力,但 $[E]_0$ 增大到一定值后,反应正常进行,只不过 $\frac{d[P]}{dt} \sim [E]_0$ 直线不通过原点。如图 13-28 所示:

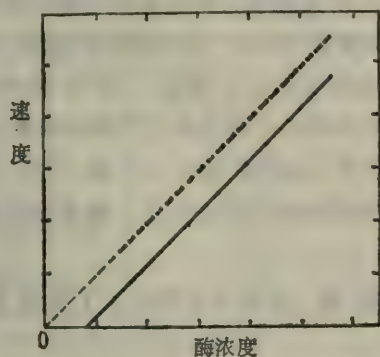


图 13-28 酶浓度-速度的关系(有不可逆抑制剂存在)点线和实线分别为理想和实测直线

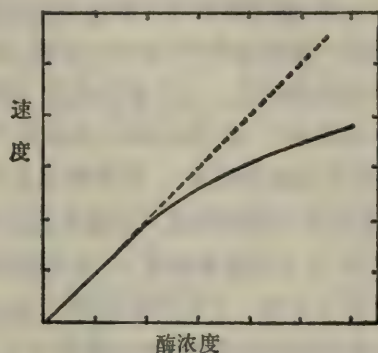
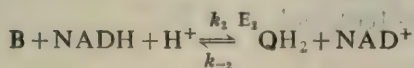
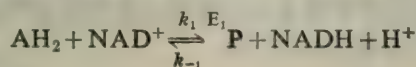


图 13-29 酶浓度-速度关系(竞争性抑制剂存在于酶剂中)。点线和实线分别为理想和实测结果($[E]$ 不饱和)。

第三种情况是酶制剂本身含有抑制剂,如竞争性、非竞争性或反竞争性抑制剂等情况。酶浓度增加,抑制剂浓度也增加, $v \sim [E]$ 。作图情况如图 13-29。

如果是竞争性抑制剂,当增加底物浓度使酶分子充分饱和时,可以克服竞争性抑制剂的影响,但非竞争性抑制与底物浓度无关,若是反竞争性抑制剂的话,增加底物浓度反而增加了抑制效果。除了上述三种情况而外还有些因素值得注意,如两个酶系统有一个共同的辅酶:



在此反应中,底物 AH_2 氧化成 P,而 B 还原为 QH_2 , E_1 和 E_2 有一个共同的辅酶 NADH。如果测定 $\frac{d[P]}{dt} \sim [E]_0$,则反应“1”受反应“2”的制约(因“2”返回供应“1”所需 NAD^+),所以在高浓度 $[E]_0$ 时呈现图 13-30 所示的偏离情况。另外,蛋白水解酶、核酸酶、淀粉酶等作用于天然大分子底物的情况比较复杂。由于底物是大分子,比如 α -淀粉酶水解直链淀粉时产生中间大小的片

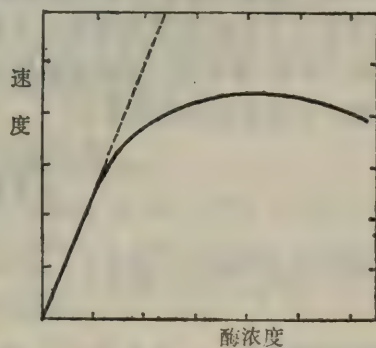


图 13-30 酶浓度-反应速度的关系(两种酶有共同的辅酶)。点线为理想情况,实线为实测结果(E_1 被监测)。

断,此中间物还继续不断地水解,直到水解成麦芽糖为止。中间大小不同的片断对酶的相对亲和力不同,水解速度也就不同。再比如蛋白水解酶水解蛋白质分子时,有的键敏感些,有的键敏感性差一些,因此所观察到的结果是一个平均结果。

总之,酶浓度与催化反应速度之间的关系是比较复杂的,但只要正确地测定初速,就可以利用 $v \sim [E]$ 。作图的直线关系确定酶浓度。在反应中如果出现各种干扰的话,就要充分分析可能出现的情况,排除干扰。

二、两个实际问题

1. 酶的单位 and 定量

正如上述,测定酶的绝对数量是办不到的。因此,一般把酶置于催化反应中测定反应初速,也就是把在一定的条件下(如 pH、温度、缓冲液种类和浓度等)经过一定时间所引起的一定反应的酶量作为酶的单位。为了避免混乱,国际生物化学协会酶委员会^[28]建议了酶单位的标准形式:1 个酶单位(1 U)是在特定的条件下,1 分钟内催化形成 1 个微克分子产物的酶量(或转化 1 个微克分子底物的酶量)。所谓特定条件一般指最适条件,如温度 25°C,30° 或 40°C,最适 pH 值,底物浓度采用饱和浓度。每毫克蛋白所含的酶活力单位叫作该酶的比活。随着酶的提纯,总活力要损失,而比活逐渐提高,一直达到纯酶稳定比活。

最近有人使用一个大的酶单位:“katal”,一个“katal”是一秒钟催化转化 1 个克分子底物的酶量。如果把国际单位和 katal 换算一下:

$$1 \text{ katal} = 6 \times 10^7 \text{ U}$$

$$1 \text{ U} = 16.67 \text{ n katal}$$

下面举两个简单的例子说明酶的定量问题:

例 1: 某酶粗品经 DEAE-纤维素柱层析之后,每毫升含 2 毫克蛋白,取此酶制剂 0.1 μl ,在总体积为 0.5 ml 的反应系统中水解合成底物,反应 2 分钟后产生 20 n 克分子产物(在最适 pH、离子强度、温度等),计算此酶制剂的浓度和比活。

解: 首先解决反应速度 v :

$$\begin{aligned} v &= \frac{20 \text{ n 克分子} / 2 \text{ 分}}{0.5 \text{ 毫升}} = 20 \text{ n 克分子} \cdot \text{毫升}^{-1} \cdot \text{分}^{-1} \\ &= 20 \times 10^{-3} \mu \text{ 克分子} \cdot \text{毫升}^{-1} \cdot \text{分}^{-1} \end{aligned}$$

所以每毫升的反应液为 $2 \times 10^{-2} \text{ U} / \text{毫升}$ 。因反应系统为 0.5 毫升,参加反应的总酶量为:

$$2 \times 10^{-2} \text{ U} / \text{毫升} \times 0.5 \text{ 毫升} = 10^{-2} \text{ U}$$

即原酶制剂中 0.1 μl 含有 10^{-2} U ,原酶浓度为:

$$10^{-2} \text{ U} / 10^{-4} \text{ ml} = 100 \text{ U} / \text{ml}$$

比活为:

$$\text{S.A.} = \frac{100 \text{ U} / \text{ml}}{2 \text{ mg} / \text{ml}} = 50 \text{ U} / \text{mg}$$

例 2: 酶在分离提纯过程中,每一步都有所损失,所以总的收率一步比一步低,但比活一步高于一步。一个好的分离提纯办法要尽量作到收率好比活高二项要求。如果某一程序其提纯倍

数很高,而收率很低,一般来讲,此法也是不可取的。见下面尿激酶制备的收率和比活情况(表13-5和13-6)。

表 13-5 尿激酶粗制步骤情况^[28]

步 骤	蛋 白 质			酶				
	体 积 (吨)	浓 度 mg/ml	总 数 mg	浓 度 u/mg.pr.	比 活 u/mg.pr.	总活力 u (万)	收 率 %	提纯倍数
人 尿	10	0.3	3×10^6	5	16.6	5000	100	1
硫酸沉淀粗品溶解液	0.02	1.5	3×10^4	1500	1000	3000	60	~60

表 13-6 尿激酶提纯的技术指标^[29]

步 骤	项 目	总 活 *CTA 单位 (万)	收 率 %	比 活 CTA 单位/mg.pr	提 纯 倍 数
原 料		5000	100	16	1
粗 品		~3000	~60	~1000	60
DEAE-纤维素层析		~1500	~30	~5000	~310
724 树脂层析		~1350	~27	40,000~50,000	2,500~3,100

注* CTA 单位为尿激酶的国际单位

从两表可见,最后一步 724 树脂层析比活提高近十倍,收率 85~90% (分步),是较好的一步,而 DEAE-纤维素层析收率较差。

2. 什么叫转换值(turnover number)

转换值也叫分子活力或克分子活力。其定义为 1 克分子酶在最适条件下 1 分钟所转化的底物克分子数。对多亚基酶其转换值也定义为 1 克分子活性亚基(或催化中心)在最适条件下 1 分钟所转化的底物克分子数。这也叫作“催化中心活力”。转换值的单位为分⁻¹。

$$k_p = \frac{V_m}{[E]_0} = \frac{\mu \text{ 克分子毫升}^{-1} \text{分}^{-1}}{\mu \text{ 克分子毫升}^{-1}} = \text{分}^{-1}$$

转换值 k_p 的数值大约是 $50 \sim 10^6 \text{分}^{-1}$ 。碳酸酐酶的转换值最高,达 $36 \times 10^6 \text{分}^{-1}$ 。 k_p 的倒数是一个“催化循环”所需时间,碳酸酐酶的 $1/k_p = 0.028 \times 10^{-6} \text{分}$ 即 $1.7 \mu \text{秒}$ 。又如:某酶的分子量为 54000,1 微克纯酶样品在最适条件下,1 分钟转化 $0.4 \mu \text{克分子底物}$,其转换值和一个“催化循环”分别为:

$$1 \text{ 微克} = \frac{10^{-6} \text{ 克}}{5.4 \times 10^4 \text{ 克/克分子}} = 1.9 \times 10^{-11} \text{ 克分子}$$

$$k_p = \frac{V_m}{[E]_0} = \frac{0.4 \times 10^{-6} \text{ 克分子/分}}{1.9 \times 10^{-11} \text{ 克分子}} = 2.1 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}$$

$1/k_p$ (催化循环):

$$\frac{1}{2.1 \times 10^4 \text{ 分}^{-1}} = 4.76 \times 10^{-6} \text{ 分}$$

第四节 抑制剂和活化剂对催化反应速度的影响

凡降低酶催化反应速度的物质都被称为抑制剂。酶的抑制剂是多种多样的，有的是小分子物质，如重金属离子 Ag^{++} 、 Hg^{++} 以及一氧化碳、氰氢酸等。也有结构复杂的大分子物质，如抑制胰酶活性的胰酶抑制剂，以及在凝血，溶血系统中的各种大分子抑制剂等都是天然的蛋白分子。实际上，在自然条件下，酶的抑制作用是体内的一种必不可少的调节作用。

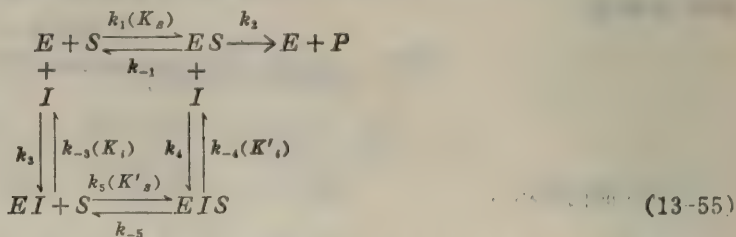
我们要充分注意到，在日常生活中许多酶的抑制剂以药物、防腐剂、毒物、毒素等形式出现。如磺胺药物——对氨基苯磺酰胺能抑制细菌体内叶酸的生物合成，因而对治疗细菌性疾病很有效。许多农药实际上也是酶的抑制剂，如敌百虫、1059、1605 等有机磷化物，能有效地杀死许多种类的害虫，主要是由于它们抑制了体内的脂酶，特别是抑制了胆碱脂酶和乙酰胆碱脂酶。另外，一氧化碳和氰化物是人所共知的毒物，动物之所以中毒，其原因在于它们作为抑制剂抑制了呼吸链中细胞色素氧化酶。



对氨基苯磺酰胺

酶的抑制剂一方面与我们的实际生活有着重要关系，同时，也是了解酶活性部位以及酶催化反应机制等基础理论问题的重要工具。由此可见，研究酶的抑制剂及其作用，在实际应用和理论研究方面都有着重要意义。

如果一种抑制剂只抑制个别的酶，则称之为特异性抑制剂。当然，如果某抑制剂可抑制许多种酶，则称之为非特异性抑制剂。但这二种称呼并不严格。如果以透析法或加入其他物质的方法能消除某些抑制剂的作用，酶的活性能得以恢复，则称这类抑制剂为可逆性抑制剂，反之，抑制剂与酶共价结合，或者使得酶的结构有了不可逆的改变，则称之为不可逆抑制剂。可逆抑制剂基本上分为四种类型：即竞争性、非竞争性、反竞争性和线性混合抑制。实际反应中所遇到的抑制反应，其机制往往不是这样单一，尤其涉及到有第二个复合物存在或多于一个底物的反应中，情况往往比较复杂。但是简单的抑制类型是基础，对基本类型有了一定理解后，复杂情况也不难理解。下面就上述四种类型分别予以简述。如果我们考虑反应： $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$ ，当加入抑制剂（以符号 I 表示）时，可用下列图示表示其作用：

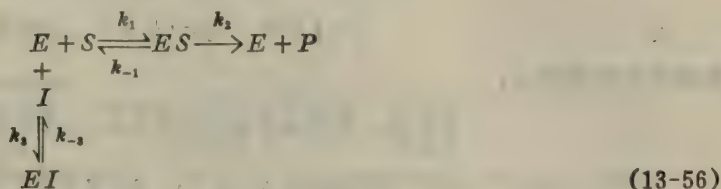


式(13-55)假定酶只有一个“独立”的活性部位，三元复合物 EIS 是无活性的。因此只有 $ES \xrightarrow{k_2}$

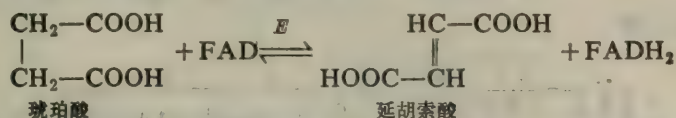
$E + P$ 一环生成产物 P

一、竞争性抑制

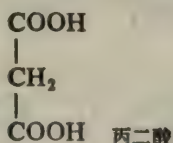
一个酶分子结合底物就不能结合抑制剂,结合抑制剂就不能结合底物,两者和酶的结合是互相排斥的。这种情况往往是抑制剂和底物争夺同一结合位置。除此因素而外,还有些因素可以造成两者和酶的结合互相排斥的原因。比如,两者的结合位置虽然不同,但由于空间障碍使得抑制剂和底物不能同时结合到酶分子上。还有些抑制剂(效应剂或调节剂)虽然和酶结合的位置不是底物结合的位置,可是由于抑制剂的结合引起了酶构象的变化,干扰了底物和酶的结合。竞争性抑制可用下式表示:



竞争性抑制剂往往是底物的衍生物或非代谢性类似物、反应的产物,也可能是该酶的另外一种底物。最经典的例子是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制作用:



丙二酸是琥珀酸的类似物,它和酶活性部位结合,从而抑制了底物和酶的结合。但丙二酸只是和酶结合,不能产生氧化还原反应。



己糖激酶催化葡萄糖和 MgATP 反应生成葡萄糖-6-磷酸。果糖和甘露糖是其竞争性抑制剂,同时也是己糖激酶的另外底物,果糖和甘露糖在己糖激酶的催化下也能转化为产物,己糖-6-磷酸。

以稳态法处理竞争性抑制剂可以得到如下结果,酶以三种形式存在:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] \quad (a)$$

EI 是酶和抑制剂结合的复合物。反应速度 v 为:

$$v = k_2[ES] \quad (b)$$

b/a 得:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI]} \quad (c)$$

按稳态假定,

$$\frac{d[E]}{dt} = (k_2 + k_{-1})[ES] + k_{-3}[EI] - (k_1[S] + k_3[I])[E] = 0 \quad (a)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_2 + k_{-1})[ES] = 0 \quad (b)$$

从(a)得出

$$\frac{[EI]}{[ES]} = \frac{[E]}{ES} \left(\frac{k_1[S] + k_3[I]}{k_{-3}} \right) - \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-3}} \quad (c)$$

从(b)得出

$$\frac{[E]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1[S]}$$

∴

$$[E]k_1[S] = (k_2 + k_{-1})[ES] \quad (d)$$

整理(e)并把(d)代入,

$$\begin{aligned} \frac{[EI]}{[ES]} &= \frac{k_1[S][E] + k_3[E][I]}{k_{-3}[ES]} - \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-3}} \\ &= \frac{[ES](k_2 + k_{-1})}{k_{-3}[ES]} + \frac{k_3[E][I]}{k_{-3}[ES]} - \frac{k_2 + k_{-1}}{k_{-3}} \\ &= \frac{[E]k_3[I]}{[ES]k_{-3}} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1[S]} \cdot \frac{k_3[I]}{k_{-3}} \quad (e) \end{aligned}$$

将(d)、(e)结果代入(c)式得:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI]} = \frac{k_2}{\frac{[E]}{[ES]} + 1 + \frac{[EI]}{[ES]}}$$

$$= \frac{k_2}{1 + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1[S]} + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1[S]} \cdot \frac{k_3[I]}{k_{-3}}}$$

$$= \frac{k_2}{1 + \left(\frac{k_2 + k_{-1}}{k_1[S]} \right) \left(1 + \frac{k_3[I]}{k_{-3}} \right)}$$

∴

$$k_2[E]_0 = V_m; \quad \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m; \quad \frac{k_{-3}}{k_3} = K_i$$

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} = \frac{V_m[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]}$$

$$= \frac{V_m[S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (13-57)$$

式(13-57)中, V_m 为没有抑制剂存在时的最大反应速度, K_m 是 EI 复合物的解离常数, K_i 愈小表示抑制剂的抑制强度愈大。式(13-57)在形式上与没加抑制剂的米氏方程类同, 只不过 V_m 值增大了, 乘以一个因子 $\left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$ 。 K_m 值增大的程度与 $[I]$ 和 K_i 值有关。抑制剂的浓度越大,

EI 的解离常数越小, 抑制作用越强(即 $K_m^{app} > K_m$)。同样浓度的抑制剂而 K_i 值较大, 其抑制作用较前述小。另外, 从公式中可见, 最大反应速度 V_m 值不变, 这意味着当加大底物浓度时, 同样可以达到全部酶饱和和成 ES 复合物。竞争性抑制剂对反应的影响如图 13-31 所示:

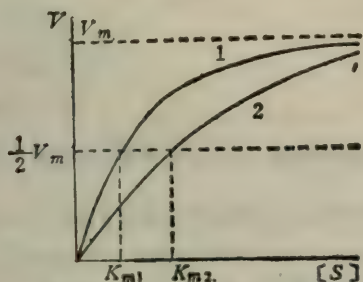


图 13-31 竞争性抑制剂对酶动力学的影响。曲线 1 为没有抑制剂; 曲线 2 是在竞争性抑制剂存在时的 $v \sim s$ 曲线

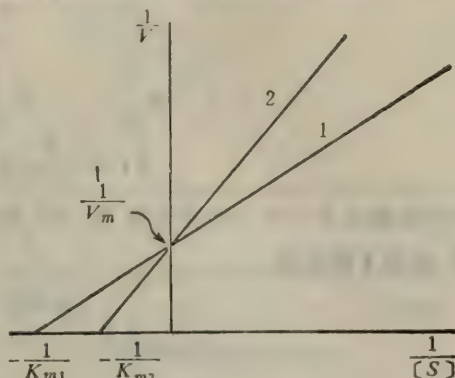


图 13-32 竞争性抑制剂对酶动力学的影响—倒数作图 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 。曲线 1: 没有抑制剂; 线 2: 竞争性抑制剂存在时

从式(13-57)得到下列倒数方程, 并作图如下:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (13-58)$$

从图(13-32)显然可见, 纵轴截距不变而斜率增大。当 $\frac{1}{v} = 0$ 时, 在横轴上的截距为 $-\frac{1}{K_m^{app}} =$

$$-\frac{1}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)}$$

从斜率和截距(横轴)可以计算出抑制常数 K_i 。

以 Dixon 作图法可以更方便的求得 K_i 。从式(13-58)直接可以得到:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m K_i [S]} [I] + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right) \quad (13-59)$$

从图(13-33)可知, 线 1 和线 2 (底物浓度分别为 $[S]_1$ 和 $[S]_2$) 交于一点, 此点在横轴上的坐标为 K_i 。

$$\frac{K_m}{V_m K_i [S]_1} [I] + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_m}{[S]_1} \right) =$$

$$\frac{K_m}{V_m K_i [S]_2} [I] + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_m}{[S]_2} \right)$$

整理后得:

$$[I] = -K_i$$

二、非竞争性抑制剂

如果酶分子与底物的结合不影响抑制剂的结

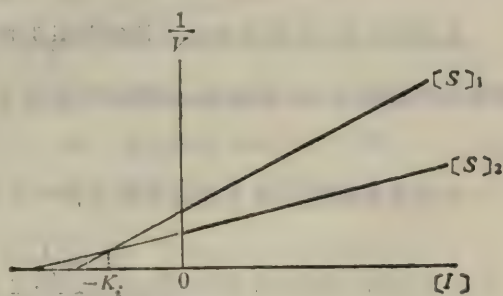
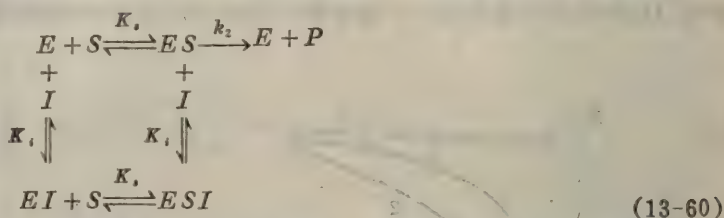


图 13-33 竞争性抑制的 Dixon 作图。底物浓度分别为 $[S]_1$ 和 $[S]_2$ 的两个独立实验中 $\frac{1}{v} \sim [I]$ 的作图

合,反之,抑制剂与酶的结合也不影响底物与酶的结合。也就是说,酶与底物、抑制剂可逆地无规、独立地结合成无活性的三元复合物。其动力学模型可表示成:



设 ES 分解为 $E + P$ 一步不干扰 E, ES, EI, ESI 间的平衡;以迅速平衡法处理 (13-60) 反应模型,得到下列结果:

$$v = k_2[ES] \quad (a)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (b)$$

$$\textcircled{a}/\textcircled{b}, \quad \frac{v}{[E]_0} = \frac{k_2[ES]}{[E] + [ES] + [EI] + [ESI]} \quad (c)$$

$$\begin{aligned}
 \text{又:} \quad K_s &= \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{[EI][S]}{[ESI]} \\
 K_i &= \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad (d)
 \end{aligned}$$

将①代入③中得:

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{V_m[S]}{K_s\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)[S]} \\
 &= \frac{V_m[S]}{(K_m + [S])\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \\
 &= \frac{V_m^{app}[S]}{K_m + [S]} \quad (13-61) \\
 &\quad (K_s = K_m)
 \end{aligned}$$

从式(13-61)可见非竞争性抑制剂只影响最大反应速度 V_m , 而 K_m 值保持不变。所使用的抑制剂剂量越大, K_i 值越小, 则抑制因子 $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ 越大, 对反应的抑制程度越大 (参看图 13-34)。

非竞争性抑制速度方程的倒数方程可写成下式:

$$\frac{1}{v} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_m} K_m \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_m} \quad (13-62)$$

$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图, 纵轴截距为 $\frac{1 + [I]/K_i}{V_m}$, 斜率为 $\frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{V_m} K_m$ 。当 $\frac{1}{v} = 0$ 时, 直线的横轴截距

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{V_m[S]}{K_s + \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)[S]} \\
 &= \frac{V_m / \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)[S]}{K_s / \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right) + [S]} \\
 &= \frac{V_m^{app}[S]}{K_m^{app} + [S]}
 \end{aligned} \tag{13-65}$$

$$\left(V_m^{app} = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)}; K_m^{app} = K_s / \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right) \right)$$

V_m 和 K_m 都相应降低同样一个倍数 $\left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)$ 。其倒数方程为(13-66)式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right) \tag{13-66}$$

$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图斜率为 K_m/V_m ，纵轴截距为 $\frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K'_i}\right)$ 。当抑制剂浓度加大时，直线斜率不变而截距增加，所以呈现一系列平行直线

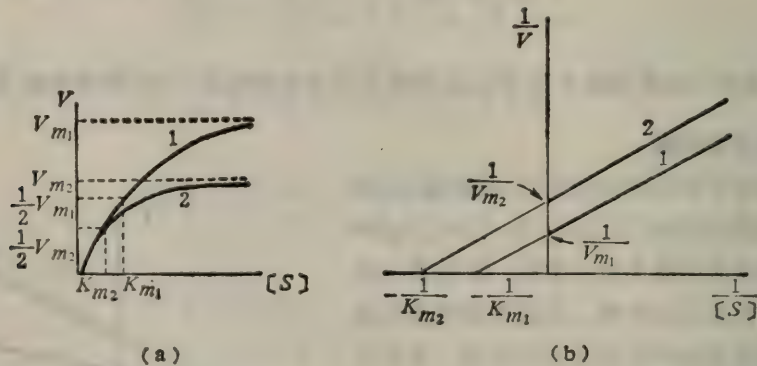


图 13-37 反竞争性抑制剂对酶反应动力学的影响

(a): $v \sim [S]$ 作图 (b) $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图。线 1、2 分别为无抑制剂和有抑制剂存在时的作图。

反竞争性抑制的 Dixon 作图如下:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m K'_i} [I] + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \tag{13-67}$$

纵轴截距为 $\frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)$ ，其中含有 $[S]$ ，因此在不同底物浓度时截距不等，而斜率不变，是一系列平行线，如图 13-38。

四、线性混合型抑制

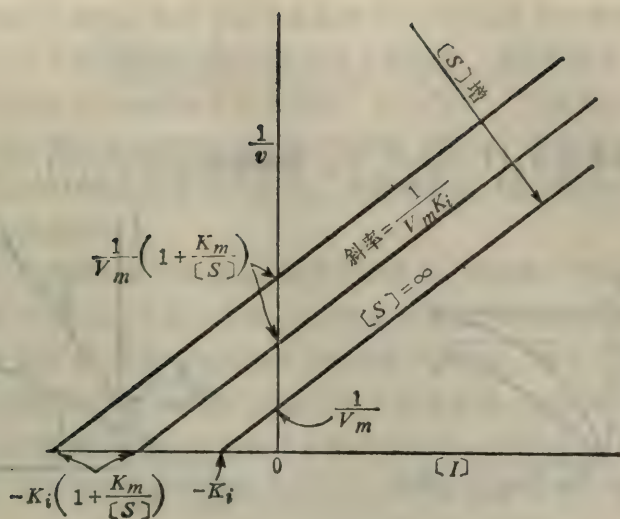
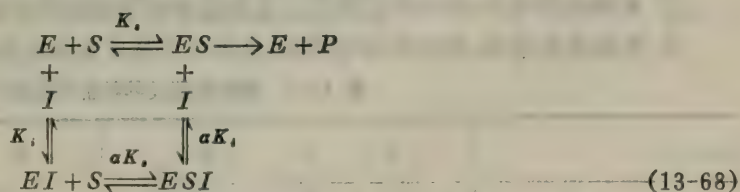


图 13-38 反竞争性抑制的 Dixon 作图

(13-55)抑制反应模型中,如果 $K_i = K'_i$ ($K_s = K'_s$),是纯非竞争性抑制类型; $K'_i = \infty$,是纯竞争性抑制类型; $K_i = \infty$,是纯反竞争性抑制; 如果 $K_i \neq K'_i$ ($K_s \neq K'_s$) 且为有限值时是混合型抑制,令 $K'_i = \alpha K_i$,因 $K_s \cdot K'_i = K_i K'_s$,所以 $K'_i = \alpha K_i$ 。混合型抑制可表示如下:



(13-67)式中的 αK_s 、 αK_i 分别是三元复合物 ESI 的底物和抑制剂解离常数。也就是说由于抑制剂和酶分子的结合改变了底物的解离常数 ($K_s \rightarrow \alpha K_s$), 由于底物和酶分子的结合改变了抑制剂从复合物上解离的解离常数 ($K_i \rightarrow \alpha K_i$)。

以迅速平衡法可以很容易地得到如下速度方程:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) [S]} \quad (13-69)$$

从式(13-69)显而易见,当 $\alpha = 1$,是纯非竞争性抑制; 当 $\alpha > 1$,底物浓度 $[S]$ 增加时抑制程度降低,此种类型的抑制具有某些竞争性抑制的特征,在这里叫作非竞争-竞争型混合抑制; 当 $\alpha < 1$, $[S]$ 增大抑制程度增大,具有某些反竞争性抑制的特征,因此叫作非竞争-反竞争型混合抑制。

(13-69)式经变换可得到倒数方程(13-70)式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right)}{V_m} \quad (13-70)$$

$\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图直线斜率为 $K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) / V_m$, 纵轴截距为 $\left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) / V_m$ 。如图 13-39 所示:

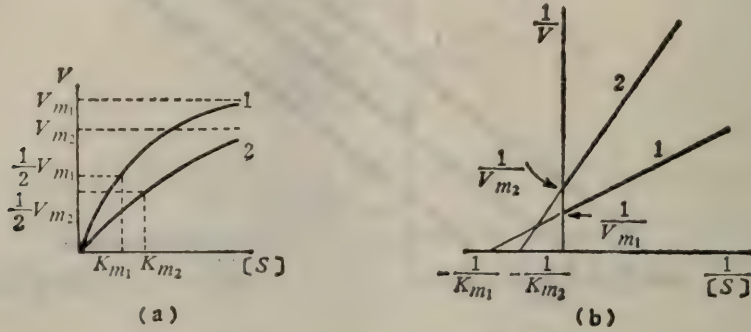


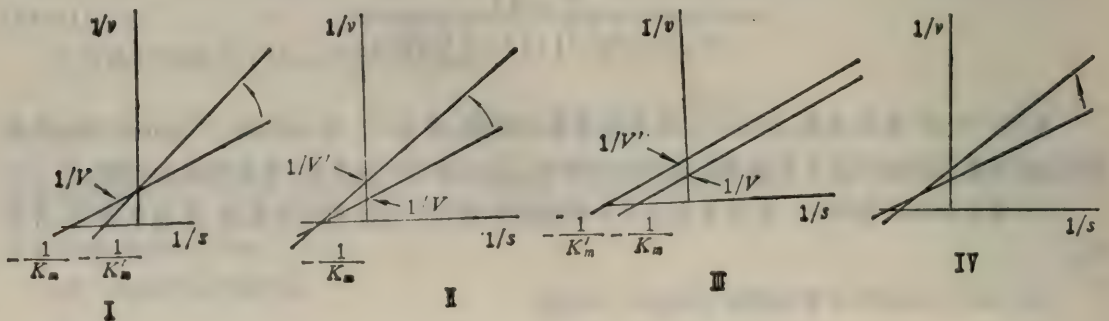
图 13-39 混合型抑制剂对酶反应动力学的影响 (a) $v \sim [S]$ 作图 (b) $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[S]}$ 作图, 线 1、2 分别为无和有抑制剂存在时的作图

上述四种抑制类型在实验上是很容易区分的。抑制程度与底物浓度的关系显然不同,

- ① 底物浓度的改变对抑制程度没有影响, 这是纯非竞争性抑制的特征。
- ② 底物浓度增加, 抑制程度降低。这是竞争性抑制剂的特征。
- ③ 底物浓度增加, 抑制程度也增加, 这种特征是反竞争性抑制的标志。

表 13-7 抑制类型及其特征的比较

	I	II	III	IV
名称	竞争性	非竞争性	反竞争性	混合型
斜率	增大	增大	不变	增大
纵轴截距	不变	增大	增大	增大
横轴截距	减小	不变	增大	减小或增大
与无抑制剂倒数作图的交点	交纵轴上一点	交横轴延长线上一点	平行无交点	在第二象限内或第三象限内一点



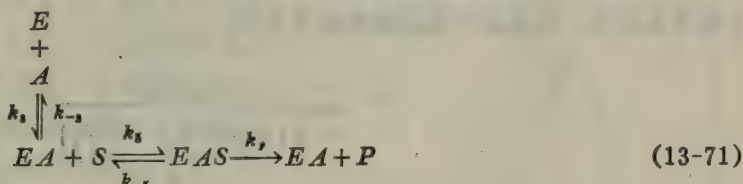
分析实验数据确立抑制类型最常用而且也是最有力的方法是 Lineweaver-Burk 作图法, 各种抑制类型的特征一目了然, 因此把这种作图叫作一级作图。一级作图的斜率或截距对 $[I]$ 作图叫作二级作图。二级斜率作图的斜率可表示成: $K_m/V_m K_i$, 二级截距作图的斜率表示成 $1/\alpha K_i V_m$, 因 K_m, V_m 可从不加抑制剂的实验中得到, 所以从二级作图中可以很容易地计算出 K_i 和 αK_i 。此外, Dixon 作图法也常用于求 K_i 。为便于掌握一级作图的特征列表如上:

五、酶催化反应的活化剂

有些物质的作用与抑制剂的作用相反, 起着活化作用, 加强酶作用的效果。在某些情况下, 只有在活化剂的存在下, 酶催化反应才能进行, 或者说只有在活化剂的存在下催化反应速度才能测得出来。在酶催化反应中, 能够起活化剂作用的物质很多, 如: 某些无机离子, 某些有机分子以及大分子等都可能是酶的活化剂。活化剂的活化作用主要是: 由于活化剂与游离酶相结合形成活性酶复合物; 活化剂与底物相结合形成复合的活性底物; 或者和 $E、ES$ 都能结合形成三元复合物等多种情况。因活化作用和抑制作用类同, 在此不多叙述, 仅就二种类型的活化作用简述如下。

1. 活化剂 A 与酶形成 EA 活性复合物。

活化动力学模型与抑制动力学模型采取一致的符号, 可表示如下:



以稳态法处理可得到如下反应速度方程式:

$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)} \quad (13-72)$$

$V_m = k_p[E]_0, K_m = \frac{k_2 + k_{-5}}{k_5}, K_A = \frac{k_{-3}}{k_3}$ (活化常数)。显而易见, 此类型的活化剂只影响反应的 K_m 值, 并不影响 V_m 。若和抑制剂的类型相比, 应属于竞争性活化。式(13-72)的倒数方程可表示如下:

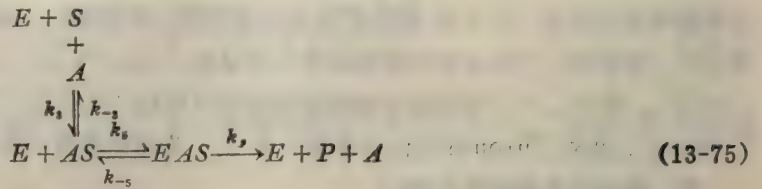
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right) \frac{1}{[S]} \quad (13-73)$$

从上可见: ① $[A]$ 加大, 斜率降低, 反应速度 v 增大; ② $[A]$ 降低, 斜率增大, 反应速度 v 降低; ③ $[A]=0, v=0$ 。另外, 当 $[S] \rightarrow \infty$ (在 A 存在的前提下) 时, $v = V_m$ 。若固定 $[S]$, 以 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[A]}$ 作图可求出 K_A :

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m [S]} \right) + \frac{K_m K_A}{V_m [S]} \frac{1}{[A]} \quad (13-74)$$

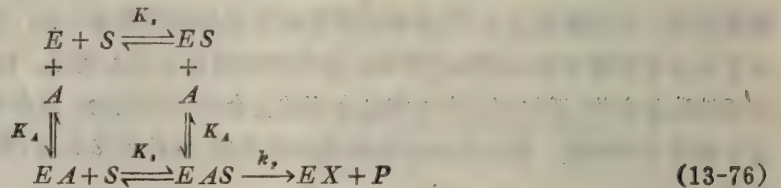
在 $[S]_1$ 和 $[S]_2$ 不同底物浓度下所得到的 $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[A]}$ 两直线相交于一点: $\frac{1}{[A]} = -\frac{1}{K_A}$ 。

如果活化剂 A 与底物结合, 其模型可表示如下:



速度方程式(13-75)与(13-72)完全相同, 也属竞争性活化中的一种情况。

2. 活化剂与游离酶、酶-底物复合物结合。



活化剂和酶结合不影响底物与酶结合, 同样底物结合也不影响活化剂与酶的结合。活化剂的作用只对酶的活性有影响, 也就是说, 未结合活化剂的 ES 复合物是无活性的, 只有 EAS 三元复合物才有活性。以迅速平衡法得到如下方程:

$$\begin{aligned}
 v &= \frac{k_p[E]_0}{\left(1 + \frac{K_s}{[S]}\right)\left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)} \\
 &= \frac{V_m / \left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}{\left(1 + \frac{K_s}{[S]}\right)} \quad (13-77)
 \end{aligned}$$

显然此种类型的活化剂只影响 V_m 而不影响 K_m , 属于非竞争性活化作用。其倒数方程式(13-78)如下:

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_A}{[A]}}{V_m} + \frac{\left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)K_s}{V_m} \frac{1}{[S]} \quad (13-78)$$

直线的斜率为 $(1 + K_A/[A])K_s/V_m$, 纵轴截距为 $(1 + \frac{K_A}{[A]})/V_m$ 。横轴截距为 $-\frac{1}{K_s} \left(\frac{1}{v} = 0\right)$, $\frac{1}{[S]} = -\frac{1}{K_s}$ 。若已知活化剂 $[A]$ 的浓度和 V_m 就可以计算出 K_A 。

以 Dixon 作图法也可以得到 K_A 。当 $[S]$ 为常数时, $\frac{1}{v} \sim \frac{1}{[A]}$ 作图是直线, 而且 $[S]_1$ 和 $[S]_2$ 两直线交于一点: $\frac{1}{[A]} = -\frac{1}{K_A}$ 。

$$\frac{\left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}{V_m} \left(1 + \frac{K_s}{[S]_1}\right) = \frac{\left(1 + \frac{K_A}{[A]}\right)}{V_m} \left(1 + \frac{K_s}{[S]_2}\right)$$

$$\frac{1 + K_A/[A]}{V_m} \left(\frac{K_s}{[S]_1} - \frac{K_s}{[S]_2} \right) = 0$$

$$\frac{K_s}{[S]_1} - \frac{K_s}{[S]_2} \neq 0$$

$$1 + \frac{K_A}{[A]} = 0 \quad \frac{1}{A} = -\frac{1}{K_A}$$

第五节 pH 对酶催化反应速度的影响

影响酶催化反应速度的因素除前述的各种浓度因素(底物浓度、酶浓度、抑制剂浓度)而外,溶液酸碱度的变化也对反应速度有很大影响。研究酶催化反应速度与 pH 值的关系能够更进一步地了解酶活性部位中的重要基团以及这些基团在催化反应中的作用,进而增进对反应机制的了解。但是 pH 值对酶催化反应的影响是一个很复杂的课题,在这里只能作简单的介绍。

酶催化反应速度随着 pH 值的变化,多数情况下都呈左右对称的钟形,如图 13-40 所示。一般把反应速度最大时的 pH 值叫作“最适 pH”,但是一定要注意“最适 pH”值受很多因素的限制,在作酶催化反应与 pH 关系的实验中总是在一系列的实验条件下完成的,比如:底物的种类、底物的浓度、温度、反应时间、缓冲液种类和浓度等。只有这些因素都确定下来之后,才能得到 pH 值与反应速度 v 的关系曲线。因而“最适 pH”值直接受这些实验参数的限制。如果这些参数发生了变化,“最适 pH 值”也发生变化。比如:牛肠粘膜碱性磷酸酶催化磷酸苯酯水解,在底物浓度为 $2.5 \times 10^{-5} M$ 时,“最适 pH”为 8.3,而 $[S] = 2.5 \times 10^{-2} M$ 时,最适 pH 增至 pH 10。如图 13-41 所示。因此在使用最适 pH 值时需要给以严格限定,在解释有关结果时要慎重。

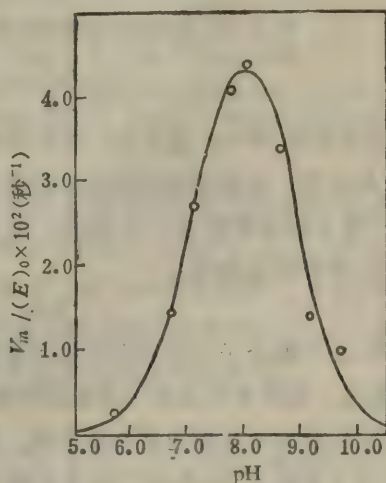


图 13-40 pH 对酶催化反应速度的影响: α -乳球蛋白水解 N-乙酰色氨酸酰胺 $V_m \sim \text{pH}^{[30]}$ 。

一、pH 对酶稳定性的影响

在解释酶催化反应速度 \sim pH 的钟形曲线时,首先就会想到 pH 值对酶催化活性部位的影响。一般来讲,活性部位的重要基团一是结合底物,二是催化底物转化为产物。一般,这些基团是带电的氨基酸侧链基团,这些基团在结合底物和转化底物为产物时,必须处于某一特定的解离状态, pH 的变化可以直接影响基团的解离状态,从而影响反应速度。但是,这个问题很复杂,还有许多因素要考虑在内。首先是 pH 的变化对酶蛋白分子稳定性的影响。一般,酶分子在强酸强碱中都发生不可逆的变性。但各种酶变性 pH 互不相同,如胃蛋白酶,在中性 pH 7 时很快就失去活性,而在 pH 1.5,反而相当稳定。碱性磷酸酶(乳)在 pH 7—9 很稳定, pH 9.5 以上迅速钝化。

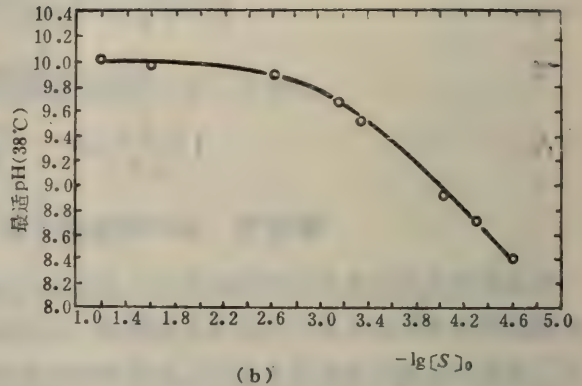
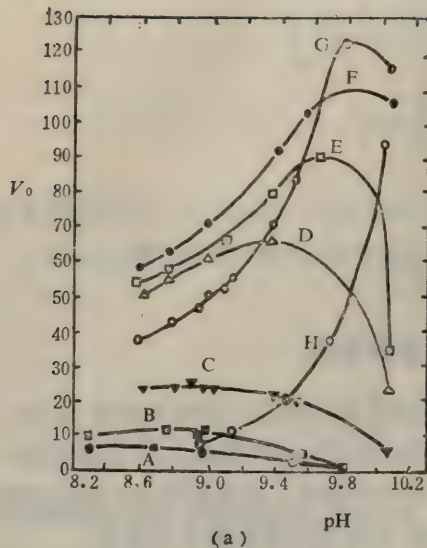
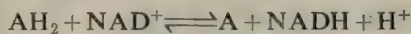


图 13-41 实验条件(底物浓度)对牛肠粘膜碱性磷酸酶最适 pH 的影响。(a) 磷酸苯酯底物浓度分别为: A: 2.5×10^{-8} ; B: 5×10^{-5} ; C: 1×10^{-4} ; D: 5×10^{-4} ; E: 7.5×10^{-4} ; F: 2.5×10^{-3} ; G: 2.5×10^{-2} ; H: 7.5×10^{-2} 。(b): (a) 中最适 pH 值数据对 $\lg[S]_0$ 作图

因此在研究 $\text{pH} \sim v$ 关系时, 首先要排除酸碱变性这一因素。其次要考虑底物分子解离状态与 pH 的关系。底物的解离状态直接关系到与酶分子的结合和产物的形成, 如果忽略了这一因素, 也不能正确地解释 $\text{pH} \sim v$ 曲线。还要考虑到有些酶催化反应本身就需要氢离子或放出氢离子, 比如, 许多脱氢酶类:



另外, 由于酶分子表面还有许多可解离基团, 这些基团对 pH 值很敏感, 其解离状态也随 pH 变化而变化。这些变化虽然不直接影响催化反应, 但是否也应考虑到这种变化会使分子构象发生某种变化, 从而对反应速度有所影响。从上述可知, 为什么在某 pH 时达速度最大值, 而在其他 pH 值(高于或低于“最适 pH”)时速度降低, 这个问题所涉及的因素很多, 无疑, 活性部位的变化是重要因素之一, 但不能单纯归结于活性部位内解离状态变化。为了把 $\text{pH} \sim v$ 曲线与活性状态直接联系起来, 就需要以各种办法排除其他因素的干扰。首先要排除酸碱不稳定性问题, 要事先作酶的 pH 稳定性实验。第二, 底物的解离状态要在无酶的情况下单独研究。即使这样, 自己认为已经考虑了各种可能的因素, 在解释实验结果时也要小心, 因为还可能有些因素未考虑在内。下面我们就酶的 pH 稳定性问题稍加叙述。

酶的 pH 稳定性问题也与很多因素有关, 比如胰酶, 保温条件不同 pH 稳定性曲线差别很大, 如图 13-42, 在 30°C 保温 24 小时之后其 pH 稳定性如 A 线所示, pH 2.5 时最稳定, 而在 pH 1 和 8 活力基本丧失; 若在 0°C 保温 15 分钟, 则一直到 pH 10 活力不变^[31]。一般来讲, 影响酶 \sim pH 稳定性的因素, 首先是酶本身的浓度和纯度。低浓度时往往不稳定, 高浓度时较稳定; 酶纯度越高稳定性越差(但纯度低时, 有时可能有其他不稳定因素存在, 酶也不一定稳定); 其次是底物浓

度和辅因子浓度;还有温度因素,在 0°C所作的稳定性曲线不能推论到其他温度;离子强度,缓冲溶液种类,有无保护剂以及保护剂的浓度等(如常用的丙三醇, —SH 化合物)都对稳定性有所影响。

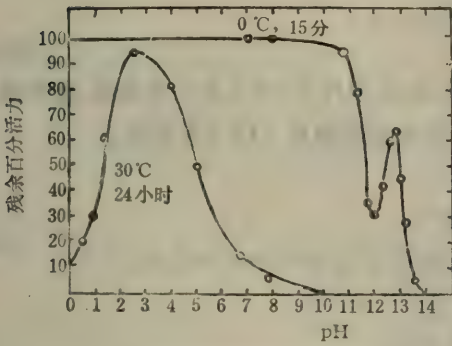


图 13-42 胰酶在二种保温条件下的 pH 稳定性

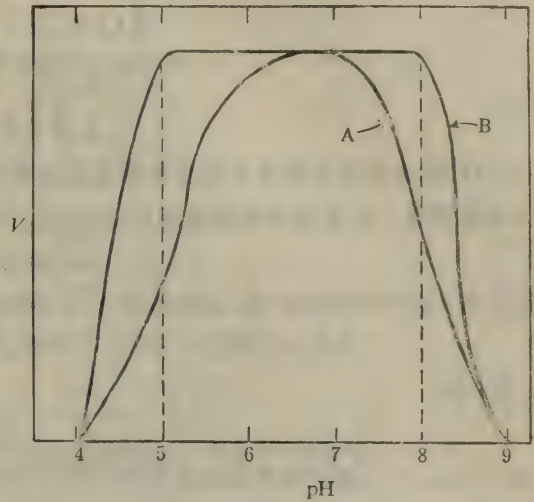


图 13-43 pH 对酶活力和稳定性的影响。曲线 A: $v \sim \text{pH}$ 作图; 曲线 B: 在指定的 pH 保温后在 pH 6.8 测定 v 。

研究酶的 pH 稳定性时,实验中采用的保温时间至少要相当于活力测定时所需的时间,然后,调回到“最适 pH”测定残余活力。图 13-43 B 线表明:此酶在 pH 5—8 不失活,而在 pH 4.0 以下,8.0 以上发生变性,活力降低。这样,对 $v \sim \text{pH}$ 曲线 A 就有了较为明确的解释:在 pH 6.8~5 和 6.8~8 反应速度降低可以认为是 pH 变化改变了活性部位重要基团的解离状态。在 pH 4.0 以下, pH 8.0 以上,速度降低是由于变性所致,或是这两种因素都包括在内的作用。

二、pH 与催化反应速度

假定酶活性部位有二个可解离基团(如:一个羧基,一个氨基)这两个基团的解离状态随 pH 变化而变化。以 X 和 Y 分别代表羧基和氨基基团。当 pH 在酸性范围时, X、Y 都带有质子,呈 XH, YH 型,即酶以 EH_2 状态存在。当 pH 增高(氢离子浓度降低)时, XH 解离为 X, 酶呈 EH 态; pH 再增高 YH 解离为 Y, 酶呈 E 状态,如图 13-44 所示:

pH 不仅影响游离态(未结合底物)酶的解离状态,对酶-底物复合物的解离也产生同样的作

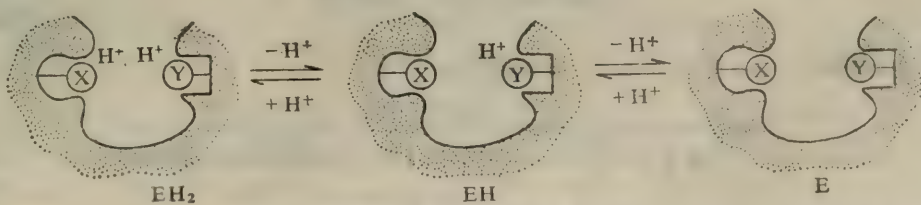
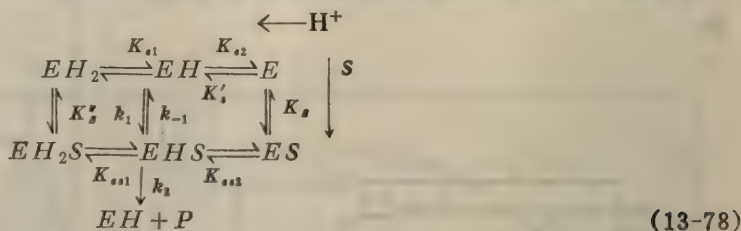


图 13-44 酶活性部位基团解离状态示意图

用。EH₂、EH、E 与 S 结合 成 EH₂S、EHS、ES 三种形式。其解离方式及它们之间的关系可表示如下：



设(13-78)式中所表示的各可逆过程都迅速达成平衡，而且 EHS → E + P 一步是限速步骤，以 k₂ 为速度常数。以迅速平衡法处理(13-78)式，产物 P 的生成速度 v 以下式表示：

$$v = k_2[\text{EHS}] \quad (a)$$

反应式中存在六种形式的酶，总酶浓度[E]₀可表示如下：

$$[\text{E}]_0 = [\text{E}] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2] + [\text{ES}] + [\text{EHS}] + [\text{EH}_2\text{S}] \quad (b)$$

①/②：

$$\frac{v}{[\text{E}]_0} = \frac{k_2[\text{EHS}]}{[\text{E}] + [\text{EH}] + [\text{EH}_2] + [\text{ES}] + [\text{EHS}] + [\text{EH}_2\text{S}]} \quad (c)$$

$$\left. \begin{array}{l}
 \text{又：} \frac{[\text{EH}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2]} = K_{e1}; \quad \frac{[\text{E}][\text{H}^+]}{[\text{EH}]} = K_{e2} \\
 \frac{[\text{EHS}][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2\text{S}]} = K_{e\cdot 1}; \quad \frac{[\text{ES}][\text{H}^+]}{[\text{EHS}]} = K_{e\cdot 2} \\
 \frac{[\text{EH}][\text{S}]}{[\text{EHS}]} = K'_s
 \end{array} \right\} \quad (d)$$

从①可得到：

$$\left. \begin{array}{l}
 [\text{E}] = \frac{K_{e2}K'_s}{[\text{H}^+][\text{S}]}[\text{EHS}] \\
 [\text{EH}] = \frac{K'_s}{[\text{S}]}[\text{EHS}] \\
 [\text{EH}_2] = \frac{K'_s[\text{H}^+]}{K_{e1}[\text{S}]}[\text{EHS}] \\
 [\text{ES}] = \frac{K_{e\cdot 2}}{[\text{H}^+]}[\text{EHS}] \\
 [\text{EH}_2\text{S}] = \frac{[\text{H}^+]}{K_{e\cdot 1}}[\text{EHS}]
 \end{array} \right\} \quad (e)$$

将①代入②得：

$$v = \frac{k_2[\text{E}]_0[\text{S}]}{K'_s \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[\text{H}^+]} \right) + [\text{S}] \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_{e\cdot 1}} + \frac{K_{e\cdot 2}}{[\text{H}^+]} \right)} \quad (13-79)$$

上式看起来很复杂，实际上和米氏方程是一样的。可整理成下式：

$$v = \frac{\left\{ k_2[E]_0 / \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right) \right\} \cdot [S]}{K'_s \cdot \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right) / \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right) + [S]}$$

$$= \frac{V_m^{H^+}[S]}{K_m^{H^+} + [S]}$$

$$K_m^{H^+} = K'_s \frac{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right)}{\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \right)} \quad (13-80)$$

$$V_m^{H^+} = k_2[E]_0 \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]}} \quad (13-81)$$

从而:

$$\frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}} = \frac{k_2[E]_0}{K'_s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]}} \quad (13-82)$$

式(13-82)中,只含有 K_{e1} 和 K_{e2} , 游离状态 E 的两个解离基团的解离常数; 式(13-81)中,只含有与底物相结合的酶的二解离基的解离常数 K_{e1} 和 K_{e2} 。采用对数作图法可以分别求出 K_{e1} , K_{e2} , K_{e1} 和 K_{e2} 。式(13-82)在酸性范围内,括号中 pH 依赖项 $[H^+]/K_{e1}$ 占主导, $V_m^{H^+}/K_m^{H^+}$ 反比于 $[H^+]$;

当 $[H^+] \gg K_{e1} (\gg K_{e2})$

则, $\frac{[H^+]}{K_{e1}} \gg 1 \gg \frac{K_{e2}}{[H^+]}$

$$\therefore \frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}} \approx \frac{k_2[E]_0}{K'_s} \cdot \frac{1}{[H^+]/K_{e1}} \approx \frac{k_2[E]_0 K_{e1}}{K'_s} \frac{1}{[H^+]}$$

取对数: $\lg\left(\frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}}\right) = \text{常数} + \text{pH}$

在低 pH 值时, $\lg\left(\frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}}\right)$ 对 pH 作图斜率为正值 1, 见图 13-45 左侧。

当 $K_{e1} \gg [H^+] \gg K_{e2}$, 处于中间 pH 区域时, 括号 pH 依赖项 $\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]}\right) \approx 1$, 则式(13-82)变成:

$$\frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}} \approx \frac{k_2[E]_0}{K'_s}$$

$\lg V_m^{H^+}/K_m^{H^+} \sim \text{pH}$ 作图斜率为零, 如图 13-45 中间部分。

当 $H^+ \ll K_{e2}$ (当然 $\ll K_{e1}$) 时, 式(13-82)成为:

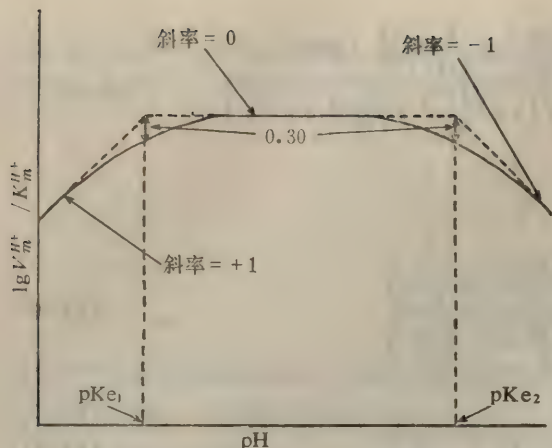


图 13-45 $\lg V_m^{H+} / K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图

$$\frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} \approx \frac{k_2[E]_0}{K'_s K_{e2}} [H^+]$$

取对数： $\lg \frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} = \text{常数} - \text{pH}$

$\lg \frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} \sim \text{pH}$ 作图斜率为负 1, 见图 13-45 右

侧图形。

斜率为正 1 与斜率为零的两条线交于一点, 在交点处下列等式成立:

$$\frac{k_2[E]_0 K_{e1}}{K'_s} \cdot \frac{1}{[H^+]} = \frac{k_2[E]_0}{K'_s}$$

所以, $[H^+] = K_{e1}$, $\text{pH} = \text{p}K_{e1}$ 。同理, 斜率为零与斜率为负 1 两线交于另一点, 在此点 $[H^+] = K_{e2}$, $\text{pH} = \text{p}K_{e2}$ 。

实际上按式(13-82)作图, $\lg V_m^{H+} / K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图斜率并不是 1, 0, -1 那样突然变化的, 而是呈图 13-45 实线所表示的圆滑曲线, 在酸性 pH 侧的 V_m^{H+} / K_m^{H+} 值为:

$$\frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} = \frac{k_2[E]_0}{K'_s} \cdot \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}}}$$

当 $[H^+] = K_{e1}$ 时:

$$\frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} = \frac{k_2[E]_0}{K'_s} \cdot \frac{1}{2}$$

$$\lg \frac{V_m^{H+}}{K_m^{H+}} = \lg \frac{k_2[E]_0}{K'_s} - \lg 2 = \lg \frac{k_2[E]_0}{K'_s} - 0.30$$

即在 $[H^+] = K_{e1}$ 时, 曲线低于交点 0.30, 见图 13-45 所示。同样 $\lg V_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图可以求得 K_{e1} 和 K_{e2} 如图 13-46。

酸性区域: $\lg V_m^{H+} = \text{常数} + \text{pH}$

中间区域 $1 + \frac{[H^+]}{K_{e1}} + \frac{K_{e2}}{[H^+]} \approx 1$ 时, $\lg V_m^{H+} = \lg V_m$

碱性区域 $\lg V_m^{H+} = \text{常数} - \text{pH}$ 。

式(13-80)是 K_m^{H+} 与 pH 的关系式, 其中包含了 K_{e1} 、 K_{e2} 、 K_{e1} 和 K_{e2} 四个解离常数。按道理单独作 $-\lg K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 图就应该能确定下四个解离常数, 但由于解离常数间的重叠(如: $K_{e1} = K_{e1}$)往往收不到予想的效果。Dixon 建议^[32]以 $-\lg K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图作为参考, 同时作三个图确定各个解离常数, 如图 13-47 所示。 $-\lg K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图, 斜率随 pH 增高而降低, 相当于游离态酶的解离($EH_2 \rightarrow EH \rightarrow E$), 而 pH 增高, 斜率增大, 相当于酶的复合物解离。 $-\lg K_m^{H+} \sim \text{pH}$ 作图等于 $\lg V_m^{H+} / K_m^{H+}$ 和 $\lg V_m^{H+}$ 之差:

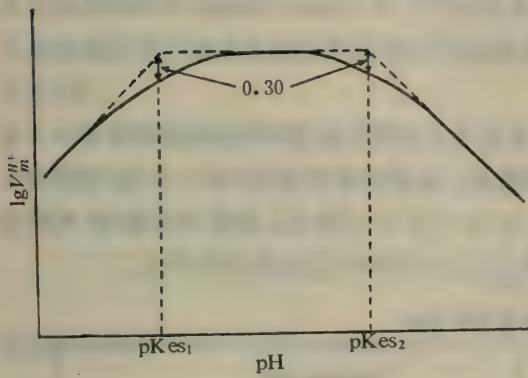


图 13-46 $\lg V_m^{H^+} \sim \text{pH}$ 作图

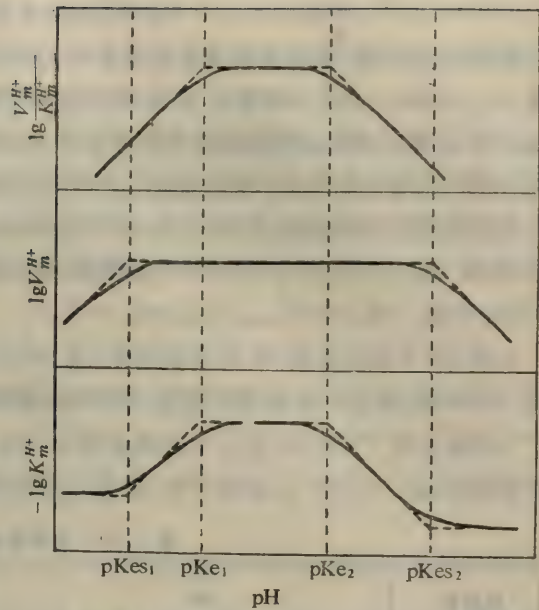


图 13-47 $\lg V_m^{H^+}/K_m^{H^+}, \lg V_m^{H^+}, \lg K_m^{H^+} \sim \text{pH}$ 作图

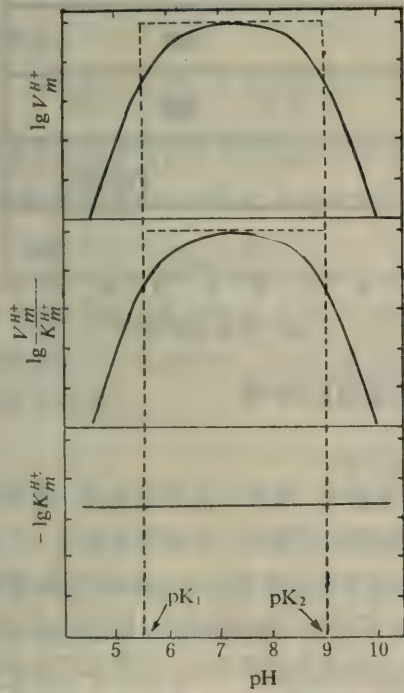


图 13-48 $\lg V_m^{H^+}, \lg \frac{V_m^{H^+}}{K_m^{H^+}}, \text{pK}_m^{H^+} \sim \text{pH}$ 图

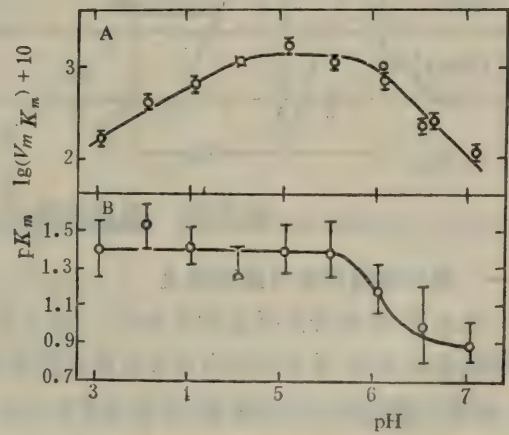


图 13-49 溶菌酶水解 NAG-Glu- ϕ NO₂ 反应的 Dixon 图

$$-lg K_m^{H^+} = lg V_m^{H^+} / K_m^{H^+} - lg V_m^{H^+}$$

游离酶与酶复合物的解离常数不等时(即 $pK_{e1} \neq pK_{e,1}$, $pK_{e2} \neq pK_{e,2}$), 如图 13-47 所示。如果 $pK_{e1} = pK_{e,1}$, $pK_{e2} = pK_{e,2}$, 则 $pK_m^{H^+} \sim pH$ 作图呈斜率为零的直线, 平行于横轴, 如图 13-48 所示。 $K_e = K_{e,}$ 意味着解离基团的解离状态不影响底物和酶结合, 换句话说, 也就是此解离基团的作用与结合底物无关, 可能是催化底物转化为产物的基团。

溶菌酶催化合成底物 NAG-Glu- ϕ NO₂ 的水解反应^[33], 其 Dixon 作图如 13-49 所示。从图上可知: $pK_{e1} \approx 4$, $pK_{e2} \approx 5.6-5.8$, 因此, 该水解反应至少涉及两个必需基团。而且从 $pK_m \sim pH$ 作图可知: $pK_{e2} \approx pK_{e,2}$, $pK_{e,2} \approx 6.1-6.3$ 。

从表 13-8 结合基团 pK 值和解离热(从 pK~温度关系中可以求得)可以初步估计前一个基团是-COOH, 而后一个基团可能是-COOH 或咪唑基。从其他研究方法(如: X-射线衍射分析^[44], 核磁共振^[45])得知, 这二个基团分别是 Asp-52 和 Glu-35 的羧基。而且可以推断 Asp-52 处于解离状态(-COO⁻), 后者 Glu-35 处于非解离状态(-COOH)是酶的活性形式。

表 13-8 各种解离基团的特性

解离基	pk	解离热(ΔH)
-COOH	2-12	0-12
-OH	10-12	6-12
-SH	10-12	6-12
>NH ⁺	6-8	6-12
-NH ₃ ⁺	6-12	8-14
-(NH ₂) ₂ ⁺	10-12	12-14

第六节 温度对酶催化反应速度的影响

一、酶的热稳定性与最适温度

一般来讲, 温度升高反应速度加快, 一般的化学反应是这样, 酶催化反应也如此。温度增高反应物的能量增加, 单位时间内有效碰撞次数增加, 因而反应速度加快。但对酶来讲有一个温度界限, 在某一点之后再增高温度, 反应速度突然迅速降低, 直到完全丧失活力。也就是说, 酶催化反应速度随着温度的升高达到一个最大值, 往往把这个温度叫作“最适温度”。酶催化反应的这种现象很容易理解, 酶是一个大分子物质, 蛋白质肽链具有特定的空间排布, 若吸收了过多的能量, 则维持蛋白质空间结构的次级键解体, 导致热变性, 随着变性的明显化, 反应速度自然降低。对大多数酶来讲, 在 30°C 以下反应速度随温度的升高而加速, 再升高温度变性加速, 温度越高变

性速度越快,大多数酶在 $50^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 变性速度极快,当然催化活力也相应丧失。见图 13-50。

所谓“最适温度”并不是酶催化反应的特征值,它与实验时所取的条件有关,比如:作用时间的长短,底物浓度、酶浓度以及反应的 pH 条件等都对“最适温度”有影响。

虽然大多数酶的热稳定温度在 $30^{\circ}\sim 40^{\circ}$ 左右,但也有的酶比较耐热。核糖核酸酶、胰酶、溶菌酶等属于抗热性比较强的酶。当然,某些生活于温泉中的菌类,其体内的酶是非常耐热的。值得注意的是酶对温度的敏感性与一系列条件有关,比如: pH、离子强度、有无底物和保护剂存在;高浓度酶液一般比低浓度酶液耐热;高纯度的酶不如低纯度的酶耐热(低纯度酶中有不稳定因素除外)等。

二、酶催化反应的温度系数 Q_{10}

Arrhenius(阿伦尼斯)方程表达了反应速度常数 k 和反应活化能 E_a 之间的关系。酶催化反应符合 Arrhenius 方程式:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

取对数,

$$\lg k = -\frac{E_a}{2.3R} \frac{1}{T} + \lg A \quad (13-83)$$

A , 频率因子,对具体反应来讲是常数; R , 气体常数; T : 绝对温度; E_a : 活化能。因简单的迅速平衡系统 $V_m = k_p[E]$, $V_m/[E] = k_p$, 所以 $\lg V_m \sim \frac{1}{T}$ 作图可得 E_a 。Arrhenius 方程的积分形式为:

$$\lg \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right) \quad (13-84)$$

反应速度的温度效应常常以温度系数 Q_{10} 表示。

Q_{10} 是温度升高 10°C 时,反应速度增加的因数,

$$Q_{10} = \frac{k_2}{k_1}$$

k_2 为 T_2 时的反应速度常数; k_1 为 T_1 时的反应速度常数,而 $T_2 - T_1 = 10^{\circ}\text{C}$ 。这样,从 Q_{10} 可以求出反应的活化能,

$$\begin{aligned} \lg Q_{10} &= \frac{E_a}{2.3R} \left(\frac{10}{T_2 T_1} \right) \\ E_a &= \frac{2.3RT_2 T_1 \lg Q_{10}}{10} \quad (13-85) \end{aligned}$$

从上式可见,活化能与温度系数成正比,活化能大,温度系数也大,即反应速度对温度的敏感性大。酶催化反应的温度系数一般在 $1.4\sim 2.0$ 之间,比无机催化反应的温度系数小。 Q_{10} 和反应速度之间不是线性关系,其关系可表示成:

$$\Delta \lg v = \frac{\Delta T}{10^{\circ}} \lg Q_{10} \quad (13-86)$$

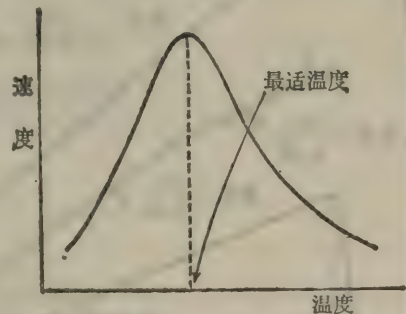


图 13-50 酶催化反应速度与温度的关系示意图

按式(13-86)计算得到表 13-9。从表中可见,温度系数 Q_{10} 虽然只是 2 和 3 之差,可是在 50°C 时的相对速度(以 0°C 为 1)分别为 32 和 243。所以温度对反应速度的影响是极重要的。

表 13-9 不同 Q_{10} 值时的相对速度

温 度 $^{\circ}\text{C}$	不同 Q_{10} 值的相对速度			
	2	2.5	3	4
0	1	1	1	1
10	2	2.5	3	4
20	4	6.25	9	16
30	8	15.6	27	64
50	32	97.7	243	1020
70	128	610	2190	16400
100	1020	9540	59000	1050000

还有一个问题值得说明,活化能 E_a 可以从 $\lg V_m \sim \frac{1}{T}$ 作图中得到,但比 E_a 只是一个表观活化能,或叫作平均活化能。如果在不同的温度,限速步骤发生了变化, $\lg V_m \sim \frac{1}{T}$ 作图本身就是

非线性的。在某些情况下,在某温度时,斜率可能有明显的变化,这表示限速步骤发生了变化。往往把这个温度叫转换温度。见图 13-51。

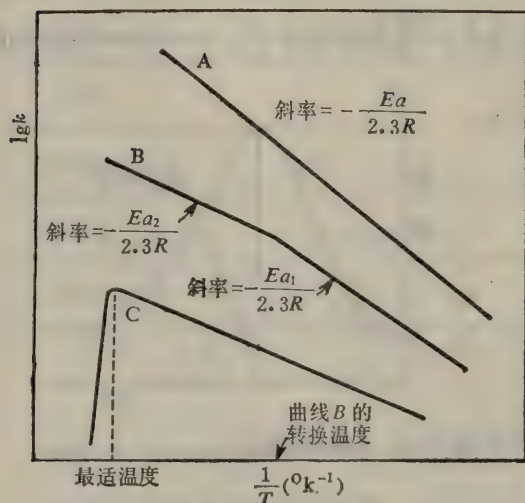


图 13-51 按式(13-83) $\lg k \sim \frac{1}{T}$ 作图

A: 斜率不变 B: 在某温度斜率有明显的变化 C: 在某温度发生酶蛋白的热变性(与图 13-50 同)

第七节 变构酶(别构酶)与协同性

在前几章中我们所接触的酶大多数是一个分子一个活性部位,如核糖核酸酶、溶菌酶等。但也有不少酶分子是由几个亚单位组成,其中每个亚单位都像是一个酶分子一样有一个活性部位。因此在酶分子内部亚单位之间就可能存在着相互作用问题。一般把具有多个亚单位而又呈现相互作用的酶叫变构酶(或别构酶)。当然,也并非所有多亚单位酶都是变构酶,有些酶的各亚单位之间是独立的,不呈现相互作用,其表现和单体酶是一样的。变构酶是生物体内酶活性调节的一种重要形式。

要形式。

一、催化反应速度与底物浓度的双曲线及 S 形曲线

在本章前一部分已经比较详细地阐述了催化反应速度与底物浓度的双曲线关系,即:

$$\begin{aligned}
 \therefore v &= V_m \cdot \frac{\frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}}{1 + 2 \cdot \frac{[S]}{K_s} + \frac{[S]^2}{K_s^2}} \\
 &= V_m \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^2} \\
 &= \frac{V_m \frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}} = \frac{V_m [S]}{K_s + [S]} \quad \text{⑥}
 \end{aligned}$$

一般有多个独立活性部位的酶其动力学方程可表示成下式：

$$v = V_m \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^n} \quad (13-87)$$

(13-87)式仍然可以简化成 $v = \frac{V_m [S]}{K_s + [S]}$ 。

从上述可见,无论一个酶有多少个亚单位,只要各个亚单位是独立的,其催化反应速度与浓度之间的关系就符合双曲线规律。

变构酶因亚单位间的相互作用,一个亚单位活性部位结合了底物,使其余尚未结合底物的部位对结合底物的亲和力有所变化,如果使亲和力增加,这种作用叫“协同”作用,上述情况叫底物结合的“正协同”,反之则称为“负协同”。由于一部位结合底物而使其他底物结合部位对底物的亲和力增加也叫作“正同种作用”(Positive homotropic interaction),如果相互作用的配体不同,比如结合了效应剂(激活剂和底物;抑制剂和底物;抑制剂和激活剂之间)引起了其他活性部位的底物结合或催化反应速度的变化,把这种相互作用叫“异种作用”(heterotropic interaction)。异种作用也有正作用和负作用之分。不管是同种还是异种作用都是通过酶蛋白分子构象变化实现的。酶蛋白大分子由于某位点结合了配体,产生了局部构象变化,此变化从一个亚单位传到另一亚单位,从而产生协同作用。其动力学与米氏动力学不同,反应速度与底物浓度的关系呈S形曲线,如图13-52所示。有一点值得注意,并非所有S形曲线都是变构酶所致,还有一些机制也产生S形曲线,如:酶中含有与底物结合的不纯物;双底物的随机三元复合物机制等。但一般来讲,因酶变构调节是一种非常重要的现象,S形曲线与变构动力学就牢牢地联系在一起了。

二、简化的变构酶的速度方程——Hill方程

血红蛋白氧合曲线是S形曲线,这是早就知道的事实。Hill在研究上述问题时,提出血红蛋白是低聚蛋白分子,而且当第一个底物分子结合到一个亚单位上时,增加了第二个亚单位对氧的亲和力,依此类推。也就是以现在所说的正协同效应来解释血红蛋白的氧合过程。设结合第一个氧分子时 HbO_2 的解离常数为 K_s ,第二个为 $a \cdot K_s$,依此分别为 $abK_s, abcK_s, \dots$ 因亲和性递

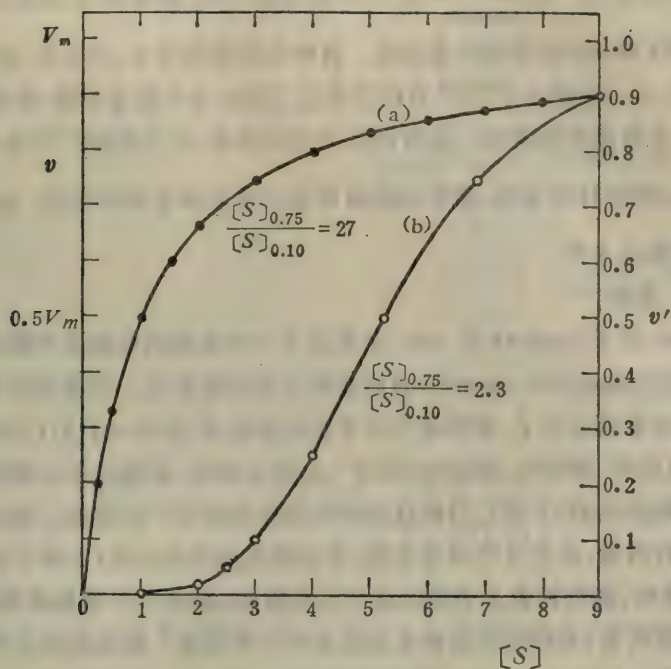


图 13-52 两种不同酶速度曲线的比较。(在 $[S]=9$ 时 v 相同)

A 线为双曲线, B 线是 S 形曲线。

增, $a, b, c < 1$ 。而且 Hill 认为血红蛋白与氧结合的中间状态: $\text{HbO}_2, \text{Hb}(\text{O}_2)_2$ 等的浓度可以忽略, 只考虑结合 n 个 O_2 分子的情况: $\text{Hb} + n \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Hb}(\text{O}_2)_n$ 。并以上述假定为起点得到 Hill 方程, 如下式:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{[S]^n}{K' + [S]^n} \quad (13-88)$$

式(13-88) $v \sim [S]$ 当然是 S 形曲线。其中 n 是每分子酶结合的底物分子数; K' 是常数(解离常数与相互作用因子 a, b, c 的乘积)等于 $K'_0(a^{n-1}b^{n-2}c^{n-3} \dots z^1)$ 。从式(13-88)可见, 当 $n=1$ 时, $K'=K_m$, 还原为米氏方程。当 $n > 1$ (至少是二聚体), K' 不等于达到 $\frac{1}{2}V_m$ 时的底物浓度, 从(13-88)式可以得到:

$$\begin{aligned} \text{当 } v=0.5V_m, \text{ 则 } 0.5K' + 0.5[S]_{0.5}^n &= [S]_{0.5}^n \\ \therefore K' &= [S]_{0.5}^n, [S]_{0.5} = \sqrt[n]{K'} \end{aligned}$$

把方程(13-88)式重排可以得到更有用的形式:

$$\frac{[S]^n(V_m - v)}{v} = K'$$

取对数:
$$\lg \frac{v}{V_m - v} = n \lg [S] - \lg K' \quad (13-89)$$

如果 Hill 假定是正确的话, $\lg \frac{v}{V_m - v} \sim \lg [S]$ 作图应是直线, 斜率为 n , 截距为 $-\lg K'$ 。但实际上, 血红蛋白氧合按 (13-89) 式作图不是直线, 斜率的最大值为 $2.5 \sim 3.0$, 小于实际结合部位总数 (四个亚单位, $n=4$)。这是由于 Hill 方程只考虑了结合 n 个氧分子酶-底物复合物, 而忽略了小于 n 个氧分子复合物存在的情况。虽然 Hill 方程不完备, 但还是被广泛地使用着, Hill 作图的最大斜率以 h 表示, 叫作 Hill 系数, 常常以此数值标志反应体系的协同性, $\lg \frac{V}{V_m - v} \sim \lg [S]$ 作图常用于证明协同酶动力学。

三、M. W. C. 模型^[36]

Monod, Wyman 和 Changeux 在 1965 年提出了一个比较简单的变构模型, 称为 M. W. C. 模型, 也叫同构模型 (Concerted model), 可以解释许多实验事实。其模型的要点如下: 具有变构性质的蛋白质是低聚蛋白分子; 低聚蛋白分子由原体组成 (protomer), 以对称方式排列; 原体对任何给定的配体 (底物、抑制剂、激活剂) 仅有一个结合部位; 低聚分子以两种构象存在, 分别称为松弛型 (即 R 型) 和紧密型 (T 型)。当然这两种构象的差别在于原体的三级结构。在低聚分子中所有原体只能取同种构象, 或者 R 型或者 T 型, 不存在构象的杂合体 (R 和 T 的杂合)。如图 13-53 所示: 在没有配体时, 两种构象分子在溶液中呈平衡态, 如果一个原体改变了构象, 分子中其余的原体也随之改变构象; 对给定的配体优先结合于一种构象, 配体的结合导致平衡转移, 向结合配体构象方面转移。比如 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ (注角“0”表示未结合配体), 平衡中 R_0 结合了一个配体成 R_1 , 引起平衡向左转移, 产生新的 R 构象分子, 因每个低聚分子中至少有二个以上的原体, 虽然 R 构象结合配体用去了一个结合部位, 但产生对该配体具有高亲和性的空部位多个。这样, 在低配体浓度时低聚蛋白分子结合配体的曲线是 S 形曲线。图 13-54 是一个四聚体的同构模型。以 T 型代表对配体 S (底物) 低亲和力的构象, R 代表对配体 S 高亲和力的构象。 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 的平衡常数以 L 表示:

$$L = \frac{[T]_0}{[R]_0}$$

R_0, T_0 表示未结合配体, R_1, T_1 表示结合一个配体, R_4, T_4 表示结合四个配体。R 与配体 S 结合的微观解离常数以 K_S^R 表示, 不管是结合一个还是 n 个配体, K_S^R 不变。同样 T 与配体 S 结合以 K_S^T 表示微观解离常数。 K_S^R 与 K_S^T 的比值以 C 表示:

$$\frac{K_S^R}{K_S^T} = C$$

如果 L 值大, 即溶液中主要以 T_0 构象存在, R_0 构象很少。又 C 很小, $K_S^R \ll K_S^T$, 表示配体优先选择 R 构象结合。加入少量配体 S, R_0 变成 R_1 , 由于 R_0 的消耗, 平衡偏向 R 一方, 某些 T 型构象分子转化为 R 型。这样, 在溶液中, 与配体 S 有高亲和力的结合部位大增, 配体结合曲线呈 S 形。以简单的数学处理可以得到 S 形曲线的定量表达式。我们以二聚体为例, 配体结合情况如图 13-55。

以 Y_0 代表在任意底物浓度 S 时的饱和分数:

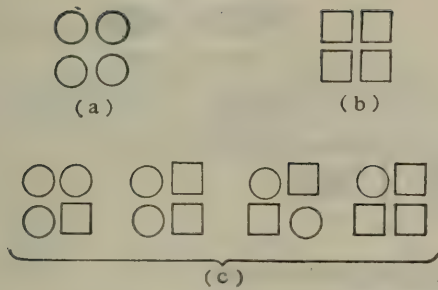


图 13-53 M.W.C. 模型的对称性图示。
(a) R型 (b) T型 (c) 杂合体(不存在)

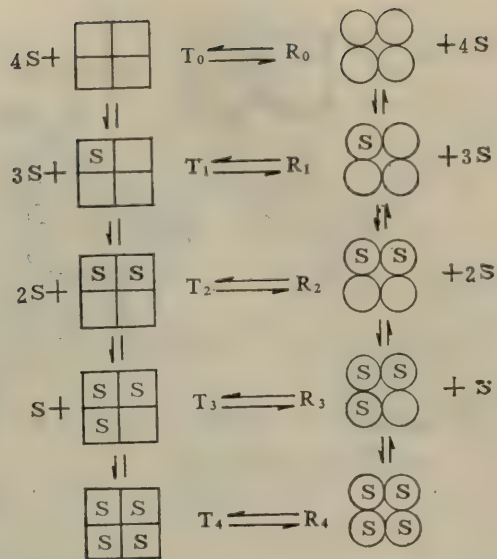


图 13-54 M. W. C. 模型。T 代表对配体 S 低亲和力和力构象，R 代表高亲和力和力构象。

$$Y_s = \frac{\text{被 S 占据的部位数}}{\text{总部位数}} = \frac{v}{V_m}$$

$$Y_s = \frac{[RS] + [SR] + 2[RS_2] + [TS] + [ST] + 2[TS_2]}{\alpha\{[R_0] + [RS] + [SR] + [RS_2] + [T_0] + [TS] + [ST] + [TS_2]\}} \quad \text{①}$$

$$\left. \begin{aligned} \therefore R_0 + S &\xrightleftharpoons{K_S^R} RS & [RS] &= \frac{[R_0][S]}{K_S^R} \\ R_0 + S &\xrightleftharpoons{K_S^R} SR & [SR] &= \frac{[R_0][S]}{K_S^R} \\ R_0 + 2S &\xrightleftharpoons{(K_S^R)^2} RS_2 & [RS_2] &= \frac{R_0[S]^2}{(K_S^R)^2} \end{aligned} \right\} \quad \text{②}$$

$$\begin{aligned} \text{又:} \quad [T]_0 &= L[R]_0 \quad K_S^T = \frac{K_S^R}{C} \\ \left. \begin{aligned} T_0 + S &\xrightleftharpoons{K_S^T} TS & [TS] &= \frac{[T_0][S]}{K_S^T} = \frac{L[R_0]C[S]}{K_S^R} \\ T_0 + S &\xrightleftharpoons{K_S^T} ST & [ST] &= \frac{L[R_0]C[S]}{K_S^R} \\ T_0 + 2S &\xrightleftharpoons{K_S^{T^2}} TS_2 & [TS_2] &= \frac{L[R_0]C^2[S]^2}{K_S^{R^2}} \end{aligned} \right\} \quad \text{③} \end{aligned}$$

将②③代入①

$$\frac{v}{V_m} = Y_s = \frac{[R_0] \frac{[S]}{K_S^R} + [R_0] \frac{[S]}{K_S^R} + 2[R_0] \frac{[S]^2}{K_S^{R^2}} + \frac{L[R_0]C[S]}{K_S^R} + \frac{L[R_0]C[S]}{K_S^R} +}{2 \left\{ \left([R_0] + \frac{[R_0][S]}{K_S^R} + \frac{[R_0][S]}{K_S^R} + \frac{[R_0][S]^2}{K_S^{R^2}} \right) + \left(L[R_0] + \frac{L[R_0]C[S]}{K_S^R} + \right. \right.}$$

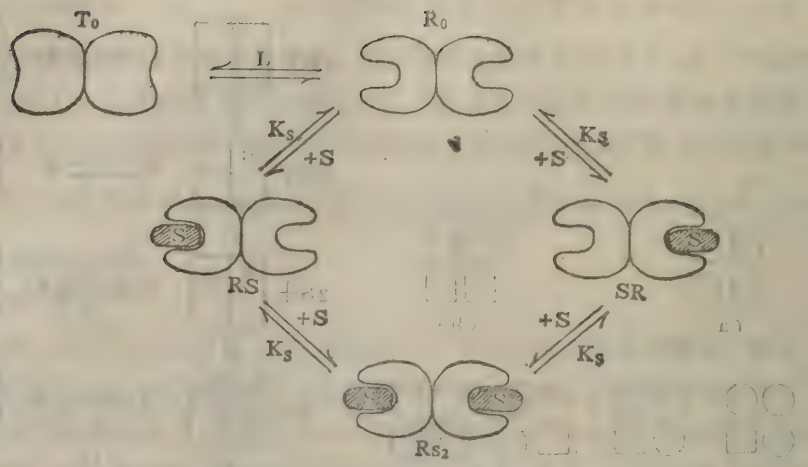


图 13-55 M. W. C. 模型二聚体结合配体 S 示意图

$$\begin{aligned}
 & + 2 \frac{L[R_0]C^2[S]^2}{K_S^{R^2}} \\
 & \left. + \frac{L[R_0]CS}{K_S^R} + \frac{L[R_0]C^2[S]^2}{K_S^{R^2}} \right\} \\
 & = \frac{\frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right) + LC \frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right)^2 + L \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)^2}
 \end{aligned}$$

如果是四聚体同样可以得到类似的方程式：

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right)^3 + LC \frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)^3}{\left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right)^4 + L \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)^4}$$

如果是 n 聚体，

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right)^{n-1} + LC \frac{[S]}{K_S^R} \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right)^n + L \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)^n} \quad (13-90)$$

下面就方程式(13-90)简单讨论一下：

当 $n=1$ 时，即每个酶分子只有一个原体（一个结合部位），应该服从米氏方程双曲线型规律：

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_S^R} + LC \frac{[S]}{K_S^R}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_S^R} \right) + L \left(1 + \frac{C[S]}{K_S^R} \right)} = \frac{\frac{S}{K_S^R}}{1 + LC + \frac{[S]}{K_S^R}}$$

$$= \frac{[S]}{\text{常数} + [S]}$$

当 $n > 2$ 时, $\frac{v}{V_m} \sim \frac{[S]}{K_s^R}$ 作图如图 13-56 所示:

L 大 C 小或相反 C 大 L 小时, 曲线是 S 形。对给定的 L 、 C , n 越大, S 形越明显。

当 $C = 1$, 则 $K_s^R = K_s^T$, 即底物对“ R ”和“ T ”构象同等对待, 当然应该服从双曲线规律:

$$\frac{v}{V_m} = \frac{\frac{[S]}{K_s^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^{n-1} + L \frac{[S]}{K_s^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^n + L \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^n}$$

$$= \frac{\frac{[S]}{K_s^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^{n-1} (1+L)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^n (1+L)} = \frac{[S]}{K_s^R + [S]}$$

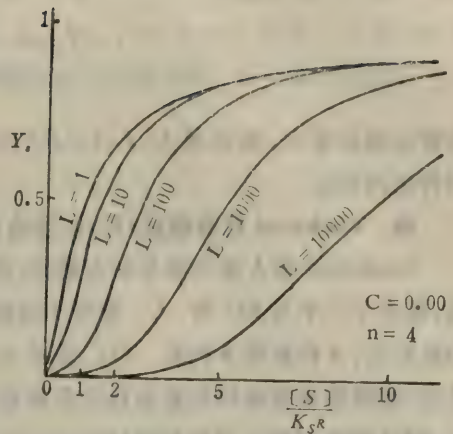


图 13-56 服从 M. W. C. 模型的酶, 在不同的 L 值时的 $Y_s \sim \frac{[S]}{K_s^R}$ 作图

M. W. C. 模型处理异种效应也是说得通的。如果配体 A 只与 R 构象结合 ($R_0 \rightleftharpoons T_0$ 平衡偏向 T_0), 也就是配体与底物优先结合的对象一致时, 在低底物浓度时 A 的存在为底物提供大量的 R 构象, 从而增加了 Y_s 值, 称这种效应剂为该酶的正效应剂。设 R_0 与 A 结合的平衡常数为 K_A , 当 $C \approx 0$ 时:

$$Y_s = \frac{\frac{[S]}{K_s^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^{n-1}}{\frac{L}{(1+\gamma)^n} + \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^n} \quad (13-91)$$

$$\left(\gamma = \frac{[A]}{K_A}\right)$$

当 $[A] \gg K_A$ 时, $\frac{L}{(1+\gamma)^n} \approx 0$, 则 (13-91) 式成为:

$$Y_s = \frac{\frac{[S]}{K_s^R} \left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_s^R}\right)^n} = \frac{[S]}{K_s^R + [S]}$$

$Y_s \sim [S]$ 作图显然是双曲线。

如果效应剂 I 只与 T 构象结合, 即与 $R_0 \rightleftharpoons T_0$ 平衡中占主导的 T 构象结合, 由于平衡进一步向右偏移, 导致与底物结合的“ R ”构象浓度降低, 称效应剂 I 为负效应剂。设 K_I 为“ T ”与负效应剂结合的平衡常数, 令 $\beta = \frac{[I]}{K_I}$, 则:

$$Y_s = \frac{\frac{[S]}{K_s} \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^{n-1}}{L(1+\beta)^n + \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)^n} \quad (13-92)$$

负效应剂浓度大,则 β 值大, $L(1+\beta)^n > L$, 具有提高同构转变常数 L 的效应, 增强底物结合的同种协同效应。

四、Koshland 序变模型(KNF 理论)^[37]

Koshland 等人基于诱导契合理论, 即酶与底物结合时, 酶活性部位构象发生变化这样的观点, 提出了一个与 M. W. C. 模型不同的模型。这个模型的要点如下: 低聚体酶的原体以两种构象存在: A 构象和 B 构象。以 \circ 表示 A, \square 表示 B。两种构象可以同时存在于低聚体中, 也就是说, 低聚体中原体的构象允许杂合体存在。随着配体的结合, 原体的构象逐次地发生变化。因此, 把这种模型称为序变模型(Sequential model)。如图 13-57。

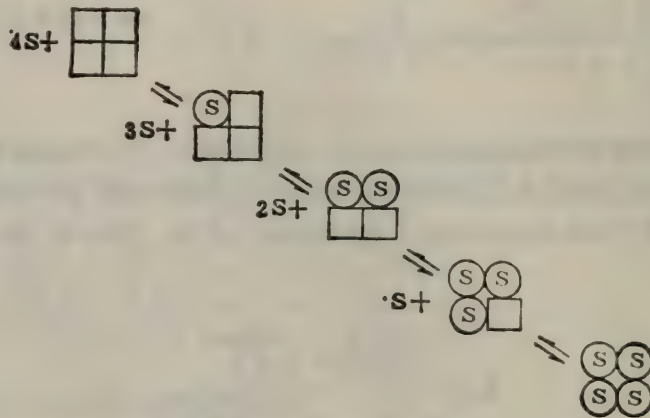
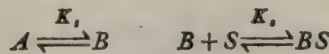
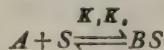


图 13-57 序变模型示意图

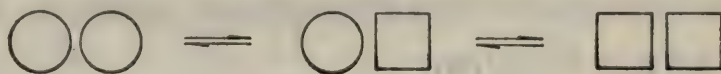
A 转变为 B 的平衡常数为 K_1 , 只有 B 结合配体, 其平衡常数为 K_2 。在最简单的序变模型中, 可以忽略未结合配体的 B 构象的浓度。这样, $[AS]$ 和 $[B]$ 都可以忽略不计, 存在的只是 $[A]$ 和 $[BS]$ 。



等于:



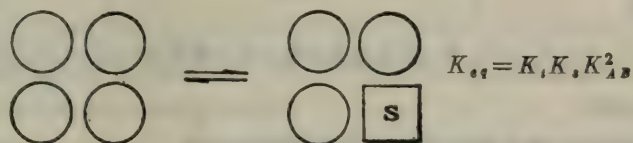
由于一个原体构象的变化, 使得相邻的原体的构象的稳定性发生变化, 即由于相邻原体之间的“相互作用”的变化, 影响与配体进一步结合的亲和力。因原体的构象或 A 或 B, 因此其间的相互作用可分为 A-A、A-B、B-B 三种, 相应的平衡常数以 K_{AA} 、 K_{AB} 、 K_{BB} 表示。以二聚体为



例,以 $K_{AA}=1$ 为参考点,当 $K_{BB}/K_{AB} > K_{AB}/K_{AA} > 1$ 时,随着结合配体数的增加,配体结合的亲和力增大,反应呈正协同效应。反之, $1 > K_{AB}/K_{AA} > K_{BB}/K_{AB}$ 时,呈现负协同。此外,低聚体中原体的排布的几何形状也要考虑在内,如:四聚体若是正四面体排列,每个原体和其余三个都有“相互作用”存在,如:



如果是正方形,“相互作用”仅发生在相邻的转角间,



Koshland 序变模型对异种效应也进行了按排^[38,39],分为三个类型,即竞争性结合、独立结合和序列结合。对各种异种效应的解释还是比较圆满的。

总之,序变模型是比 M. W. C. 模型更为复杂的模型,所涉及的参数是三个: $(K, K_s), K_{AB}, K_{BB}$, 而 M. W. C. 模型中只有 L, C 二个。因而在解释协同作用时,序变模型比 M. W. C. 模型更为机变。比如: M. W. C. 模型对正协同性解释得自如,但对负协同无能为力。Koshland 模型不仅能解释正协同,也能解释负协同,究竟哪个模型正确,或哪个模型哪点正确,还有待更多变构酶的结构和功能的研究的进展

习 题

1. 研究酶催化反应动力学的方法和目的是什么?
2. 蔗糖酶催化蔗糖水解反应速度与蔗糖浓度的关系列于下表中^[4],按数据画出 $v \sim S$ 图,并说明此曲线的特点。

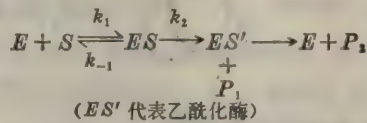
[S] M	相 对 速 度
0.1370	22.0
0.0995	20.5
0.0676	19.0
0.0262	12.5
0.0136	9.0
0.0100	7.0
0.0079	6.0

3. 什么是反应初速? 如何测定反应初速?
4. 以 Michaelis-Menten 方程推导过程为例,说明迅速平衡法和稳态法的要点。并说明

$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$ 的意义和适用范围。

5. 某酶的 K_m 值为 $2.4 \times 10^{-4} M$, 在下述底物浓度下催化反应: ① $2 \times 10^{-7} M$; ② $6.3 \times 10^{-6} M$; ③ $10^{-4} M$; ④ $2 \times 10^{-3} M$; ⑤ $0.05 M$ 。底物为 $0.05 M$ 时的反应速度等于 $128 n$ 克分子 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$ 。计算各种不同底物浓度时的反应初速度。如果酶量加倍, 初速如何?

6. 以胰凝乳蛋白酶为代表的酯酶和蛋白水解酶按下列方式反应:



以稳态法推导速度方程式。

7. 说明 K_m 值的意义。当 $[S] = K_m$ 时, 反应速度为最大反应速度的一半 $\left(\frac{V_m}{2}\right)$, 当 $[S] = 2K_m$ 时, 反应速度等于最大反应速度, 对吗?

8. 试分析反应初速与底物浓度关系的矩形双曲线各段的反应级数。

9. $S \xrightleftharpoons{E} P$ 反应的平衡常数为 2×10^3 , $K_m = 2.5 \times 10^{-5} M$, $V_m = 4.2 \mu$ 克分子 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$ 。问: ① 正向反应的一级反应速度常数? ② 逆向反应一级反应速度常数? ③ $V_m / K_m = ?$

10. 某酶催化 $S \rightleftharpoons P$ 反应, $V_m = 22 \mu$ 克分子 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$, $V_m' = 14 \mu$ 克分子 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$ 。如果 $[S] = 2K_m$, $[P] = 7K_m$, ① 反应方向如何? ② 速度如何?

11. 某酶 K_m 为 $2.6 \times 10^{-3} M$, 初始底物浓度为 $0.3 M$, 反应速度为 5.9×10^{-5} 克分子 \times 升 $^{-1}$ \times 分 $^{-1}$ 。如果初始底物浓度为 $2 \times 10^{-3} M$, 问: ① 5 分钟产物浓度如何? ② 10 分钟产物浓度如何?

12. 某酶的初始底物浓度为 $10^{-6} M$, $K_m = 2 \times 10^{-3} M$, 1 分钟转化 2% 的底物为产物。问: ① 3 分钟底物转化为产物的%? ② 如果初始底物浓度为 $10^{-4} M$ 时, 3 分钟转化底物为产物的%? ③ $V_m = ?$ ④ 达到 V_m 所需的底物浓度? ⑤ 在达 V_m 时的底物浓度下, 3 分钟转化底物为产物的%?

13. 某酶的 $K_m = 3 \times 10^{-4} M$, 反应初始浓度为 $10^{-6} M$ 。反应 1 分钟消耗 5.0% 的底物。问: ① 该反应的级数? ② 反应 5 分钟底物消耗的%? ③ 如果起始底物浓度为 $8 \times 10^{-7} M$, 反应 5 分钟底物消耗%? ④ $V_m = ?$ ⑤ 初始底物浓度为 $8 \times 10^{-7} M$ 时, $t_{1/2} = ?$ ⑥ 底物初始浓度为 $10^{-6} M$ 时, 转化 75% 底物所需时间如何?

14. 说明什么是双底物反应的“真正” V_m 和 K_m 。实验上如何求得 V_m 、 K_{m_A} 、 K_{m_B} ?

15. 酶催化双底物反应: $A + B \rightarrow$ 产物, 底物 B 为饱和浓度, 改变底物 A 的浓度和底物 A 饱和, 改变 B 的浓度, 得到如下数据:

A 底物 (μM)	12.5, 15, 20, 25, 40, 60,
v (任意单位)	1.68, 1.89, 2.27, 2.60, 3.22, 3.77,
B 底物 (μM)	12.5, 15, 20, 25, 40, 60,
v (任意单位)	2.25, 2.50, 2.90, 3.23, 3.77, 4.17,

计算 K_{m_A} 、 K_{m_B} 和 V_m 。

16. 胚胎肝组织含有一种催化 $S \rightarrow P$ 的酶, 成年人肝脏也具有 $S \rightarrow P$ 催化活力, 其反应动力学数据如下:

问: E_1 和 E_2 是否是一种酶, 为什么?

[S]M	初速 μ 克分子 \times 毫克蛋白 ⁻¹ \times 分 ⁻¹	
	成年人肝提取物 E_1	胚胎肝组织提取物 E_2
1.67×10^{-5}	1.05	5.00
2.5×10^{-5}	1.54	6.66
3.33×10^{-5}	1.98	8.00
5.0×10^{-5}	2.86	10.00
7.0×10^{-5}	3.78	11.67
1.0×10^{-4}	5.00	13.33
1.5×10^{-4}	6.67	15.00
1.67×10^{-4}	7.15	15.40
2.0×10^{-4}	8.00	16.0
3.0×10^{-4}	10.00	17.1

17. 解释下列实验现象：① 反应时间加倍，形成产物量加倍；② 底物量加倍，单位时间形成产物量不增加；③ 酶浓度加倍，单位时间形成产物量增加 60%。

18. 某酶制剂比活为 42 $v/mg. pr.$ ，每毫升含有 12 mg 蛋白酶制剂。取 5 μl 制剂于 1 ml 反应混合物中反应，计算反应初速，并说明此酶制剂在使用之前是否需要稀释？

19. Escherichia Coli 的无细胞抽提液磷酸化酶的比活为 0.0033 单位/毫克蛋白，浓度为 0.08 单位/毫升。取 50 毫升此酶溶液以硫酸沉淀法分级，取 30—50% 饱和度的沉淀，溶解于 10 ml 溶液中并透析，透析后体积为 2 ml，每 ml 含 30 mg 蛋白。取 20 μl 初步纯化的溶液在标准的实验条件下进行磷酸化酶催化反应，初速为 5.9 n 克分子/分。计算酶的收率和纯化倍数。

20. 某纯酶比活为 120 单位/ $mg. pr.$ ，分子量为 360,000，计算转换值？一个催化循环所需时间？

21. 在总体积为 1 ml 的己糖激酶催化反应系统中，在 25 分钟转化底物 95%。葡萄糖的初始浓度为 $8 \times 10^{-3} M$ ，($K_m = 4.7 \times 10^{-4} M$)，求反应中的酶单位数。如果反应混合物中酶浓度为 1.0 单位/ml，转化同样数量的葡萄糖需多长时间？

22. 以迅速平衡法推导竞争性抑制速度方程，以稳态法推导非竞争性抑制速度方程。

23. 非竞争性抑制使得最大反应速度 (V_m) 降低，是否意味着 $ES \rightarrow E + P$ 反应速度常数 k 降低？为什么？

24. 在不同的底物浓度下测定反应速度，得到下列数据：

[S] μM	12.5	15.0	20.0	25.0	40.0	60.0
无抑制剂 v (任意单位)	1.68	1.89	2.27	2.60	3.22	3.77
抑制剂浓度 2.5 mM	1.04	1.20	1.50	1.75	2.35	2.54

① 作图计算 $K_m, V_m = ?$

② 抑制类型？

25. 表中所列数据是某酶在不同底物浓度下测定的催化反应速度和两种抑制剂 A、B 对反应速度的影响 (抑制剂浓度 10 mM)：

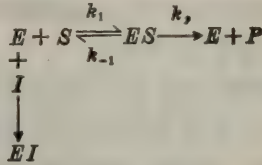
求：① $K_m = ?$ ② A、B 抑制类型？

v (任意单位) \ [S] mM	0.25	0.30	0.50	1.00	2.00
无抑制	44	50	65	82	97
A (10 mM)	29	33	46	67	83
B (10 mM)	24	27	36	50	60

26. 由于抑制剂的存在酶催化反应速度发生了变化,一般以 $i = \frac{v_0 - v_i}{v_0}$ 表示抑制分数,以 $i\%$ 表示抑制百分数,试写出竞争性、非竞争性、反竞争、混合型抑制的 i 和 $i\%$ 。当 $[S] = K_m [I] = K_i$ 时,计算竞争性抑制的 i 和 $i\%$ 。

27. 某微生物含有水解 6-磷酸-葡萄糖的酶,以产物葡萄糖的形成速度计算反应速度。该酶在无细胞抽提液中,动力学常数 $K_m = 6.7 \times 10^{-4} M$, $V_m = 300 n$ 克分子 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$ 。6-磷酸半乳糖是竞争性抑制剂,在 $10^{-5} M$ 6-磷酸半乳糖和 $2 \times 10^{-5} M$ 6-磷酸葡萄糖时, $v = 1.5 n$ 克分子 \times 升 $^{-1} \times$ 分 $^{-1}$, 计算 6-磷酸-半乳糖的 K_i 。

28. 二异丙基氟磷酸盐同以丝氨酸为活性部位的水解酶类不可逆结合:



说明此种抑制的 K_m 和 V_m 变化与竞争性抑制有何共同和不同?

29. 说明“最适 pH”的意义,“最适 pH 是否是酶的特征值? 为什么? 那些因素影响酶的“最适 pH”?

30. 如何判断“最适 pH”两侧活力降低的原因? 什么情况是 pH 对酶稳定性的影响,什么情况是 pH 对活性部位重要基团解离状态的影响?

31. 某酶的活性部位含有单一的可解离基团,此基团负电形式是活性形式, pK 值 5.0。底物是带正电的化合物,而且在所使用的 pH 范围内完全解离。① 写出 pH 影响酶催化反应的反应模型; ② 推导速度方程; ③ 画出 $v \sim pH$ 图 ($[S^+] \gg K_m^{app}$ 和 $[S^+] \ll K_m^{app}$ 两种情况)。

32. 某酶催化反应 $V_m \sim pH$, 得到如下数据 ($T = 25^\circ C$),

pH	8.0	7.6	7.3	7.0	6.7	6.4	6.0	5.5	5.0	4.6
V_m (任意单位)	1.0	2.5	5.0	9.4	14.9	20.9	28.2	35.5	39.8	40.0

① 画图说明活性基团 $pK_{a,1} = ?$

② 在 $35^\circ C$ 时 $pK_{a,1} = 6.2$, 此基团是什么? 为什么?

33. 什么叫酶催化反应的“最适温度”和“转换温度”?

34. 酶催化反应的温度系数 Q_{10} 是如何定义的? 其意义如何?

35. 某酶在不同温度下测定的反应速度如下:

$T/^\circ C$	20	28	35	42	50	53
V_m (相对)	1.0	1.88	3.13	5.15	4.22	2.12

① 作图计算 E_a ; ② 解释 $40^\circ C$ 以后出现的现象。

36. 酶催化反应速度随温度而变化,其数据如下:

$T/^\circ C$	2	5	10	15	20	25	30	35
--------------	---	---	----	----	----	----	----	----

V_m (相对) 1.0 1.49 2.86 5.47 9.97 14.16 18.18 24.05

作 $V_m \sim \frac{1}{T}$ 图并解释图形。

37. 什么叫协同作用? 试以 M. W. C. 模型和 Koshland 模型解释底物结合的正协同效应。

38. 说明 Hill 系数的意义并作下列计算: 某酶的反应速度与底物浓度的关系服从 S 曲线动力学规律, 实验得知: $[S]_{0.9}/[S]_{0.1} = 6.5$, 求 $h = ?$ ($[S]_{0.9}$ 即 $v = 0.9V_m$ 时的底物浓度, $[S]_{0.1}$ 是 $v = 0.1V_m$ 时的底物浓度)。

39. 某酶服从 S 曲线动力学, $h = 2.6$, 计算 $[S]_{0.9}/[S]_{0.1} = ?$

参 考 文 献

1. V. Henri, Lois g n rales de l'action des diastases (Paris, 1903)
2. V. Massey, Methods in Enzymology, I, 729 (1955)
3. V. Massey, Biochemical Journal, 53, 67 (1953)
4. R. Kuhn, Z. Physiol. Chem., 125, 28, (1923)
5. D. Keilin and T. Mann, Proc. Roy. Soc. B, 122, 119 (1937)
6. K. G. Stern, J. Biol. Chem. 114, 473 (1939)
7. B. Chance, J. Biol. Chem. 151, 553 (1943)
8. B. Chance, Science 109, 204 (1949)
9. L. Michaelis and M. L. Menten, Biochem. Z. 49, 333 (1913)
10. 廣海啓太郎, 化学増刊 29, (新しい生物物理化学研究法(下)), 153(1967)
11. 廣海啓太郎, 生物物理化学研究法 II, 今堀和友, 野田春彦, 坪井正道编, 朝仓书店, P. 191, 1969.
12. G. G. Hammes and P. R. Schimmel: The Enzymes, Third Edition, P. D. Boyer, Vol. II. P. 67, Academic Press, New York, 1970
13. 中村隆雄, 化学と生物, 5, 677 (1967); 蛋白质、核酸、酵素临时増刊, 13, NO.5, 141 (1968); 生体膜实验技术, 大西劲编, 南江堂, P. 72 (1967)
14. 中村隆雄, 酵素的反応機構, 殿村雄治, 山崎勇夫, 中村隆雄编, 朝倉書店, P. 160 1971
15. J. B. S. Haldane, Enzymes, Longmans, 1930
16. C. Frieden & R. A. Alberty, J. Biol. Chem., 212, 859 (1955)
17. M. T. Hakala, A. J. Glaid and G. W. Schwert, J. Biol. Chem., 221, 191 (1956)
18. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67, 104 (1963)
19. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67, 173 (1963)
20. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67, 188 (1963)
21. W. W. Cleland, Ann. Rev. Biochem., 36, 77 (1967)
22. W. W. Cleland, in The Enzymes, 3rd ed., (P. D. Boyer, H. Lardy and K. Myrback, eds.), Vol. 2, Academic Press, P., 1 1970
23. E. L. King and C. Altman, J. Phys. Chem., 60, 1375 (1956)
24. H. J. Fromm, Biochem. biophys. Res. Commun., 40, 692 (1970)
25. N. Seshagiri, J. Theor. Biol., 34, 469 (1972)
26. J. T. Wong and C. S. Hanes Can. J. Biochem. and Physiol., 40, 763 (1962)
27. K. Dalziel, Acta Chem. Scand., 11, 1706 (1957)
28. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. 1961
29. 吉林大学尿激酶组, 吉林大学学报, 2, 119 (1979)
30. M. L. Bender, G. E. Clement, F. J. K zdy and H. A. Heck, J. Am. Chem. Soc., 86, 3680 (1964)
31. J. H. Northrop, M. Kunitz and R. M. Herriott, Crystalline Enzymes, Columbia Univ. Press, New York, P. 12, 1948
32. M. Dixon, Biochem. J., 55, 161 (1953)
33. T. Rand-Meir, F. W. Dahlquist and M. A. Raftery, Biochemistry, 8, 4206 (1969)
34. C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips and V. R. Sarma, Proc. Roy. Soc. (London), B 167, 378 (1967)
35. F. W. Dahlquist and M. A. Raftery, Biochemistry, 7, 3277, (1968)
36. J. Monod, J. Wyman and J-P. Changeux, J. Mol. Biol., 12, 88 (1965)
37. D. E. Koshland, Jr., G. N methy and D. Filmer, Biochemistry, 5, 365, (1966)
38. M. E. Kirtley and D. E. Koshland, Jr., J. Biol. Chem., 242, 4192(1967)
39. J. E. Haber and D. E. Koshland, Jr., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 58 2087 (1967)

第十四章 辅 酶

有些酶是单纯蛋白质,即除蛋白质而外不含其他成分。比如水解酶类的胃蛋白酶、胰蛋白酶、核糖核酸酶、脲酶等,都是单纯蛋白质。另外,还有些酶是由蛋白质和非蛋白质两部分组成。氧化还原酶类和转移酶类中的许多酶除含有蛋白质部分而外还有其他成分。蛋白质部分叫作酶蛋白,非蛋白质部分叫作辅酶(在这里把辅酶作广义的理解)。有时,还把与酶蛋白结合的成分分为辅酶(狭义)和辅基。凡与酶蛋白结合十分牢固而不易分离的非蛋白部分叫辅基,例如细胞色素氧化酶的铁卟啉,透析法不能把蛋白部分和铁卟啉分开,往往把这类成分叫作辅基。如果与酶蛋白结合不牢,极易分离,在反应溶液中与酶蛋白处于可逆的解离平衡状态,把这类辅酶叫作辅酶(狭义)。如 NAD^+ 、 NADP^+ 等都被称作辅酶。实际上,辅酶和辅基之别并不表示在催化作用上有什么本质的差别。

一种酶蛋白通常只能与一种辅酶结合而起催化作用。例如,乙醇脱氢酶的蛋白质只与 NAD 结合,6-磷酸葡萄糖脱氢酶的酶蛋白只与 NADP 结合。但是,一种辅酶往往能与多种酶蛋白相结合,对不同的底物起特异性催化作用。在结合酶中,酶蛋白的种类很多,而辅酶为数甚少。酶蛋白和辅酶是体现酶活力的不可缺少的两部分。比如,对活性的酵母羧化酶透析,则酶蛋白与辅酶(焦磷酸硫胺素)分离,辅酶进入透析液,这时,两部分都不呈现活力,若把两者合二为一,酶活力又恢复,只有二者结合起来构成全酶才具有活力。一般认为,辅酶直接与底物分子作用,催化底物反应,而且对酶蛋白的稳定性起保护作用。高分子量的酶蛋白部分提供特异性催化条件。

除辅酶、辅基而外,在文献中还常常出现辅助因子(Cofactor)这一术语,这是指尚未能以全酶形式分离出来的辅酶而言,在其作为辅酶的本质未阐明以前的一种称呼。

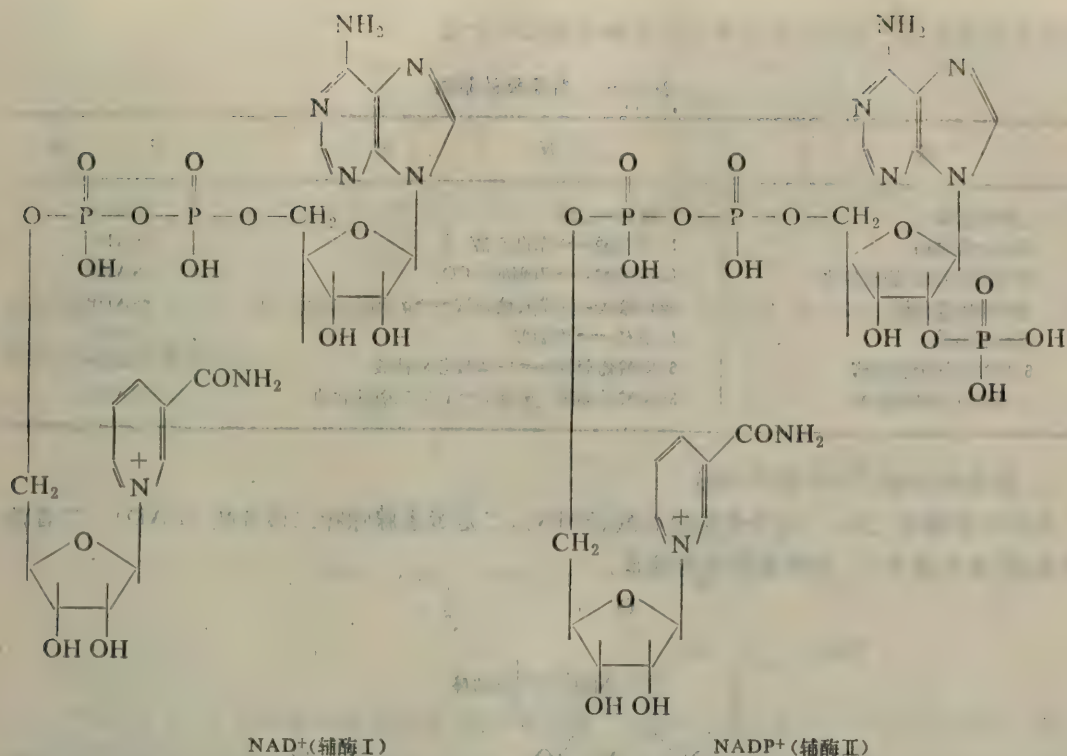
现在所知道的辅酶,从其作用上来看,可分为两类,其一是与转移氢(电子)有关的辅酶,其二是转移除氢而外的特定基团的辅酶。

一、与转移氢(电子)有关的辅酶(氧化还原反应的辅酶)。

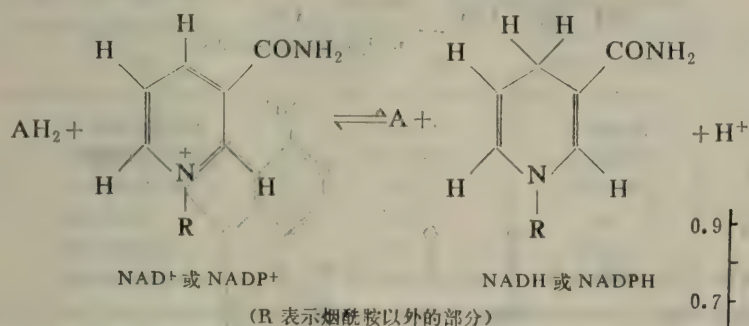
这类辅酶的作用是传递氢(或电子)。形成呼吸链的酶类的辅酶都属于此类。

1. 烟酰胺核苷酸

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)二者均为脱氢酶的辅酶,如表14-1所示。 NAD 和 NADP 均为烟酰胺核苷酸与腺嘌呤核苷酸所组成的二核苷酸,二者的区别是后者在 NAD 分子中连接于腺嘌呤的D-核糖2'位-OH基与一个分子磷酸形成酯,其结构如下:



NAD^+ 和 NADP^+ 在生物氧化过程中具有传递氢的作用，烟酰胺是 NAD^+ 和 NADP^+ 作用的核心，其机制如下：



在氧化还原反应中，氧化型的 NAD^+ 或 NADP^+ 接受1个质子和2个电子还原为 NADH 和 NADPH ，并伴随紫外吸收光谱的变化，如图14-1所示。氧化型只在260 nm有吸收峰（嘌呤和吡啶环形成的吸收峰），还原型在340 nm增加一个吸收峰（吡啶环还原成醌式结构）。在脱氢酶催化反应中，单位时间内在340 nm光吸收的增加

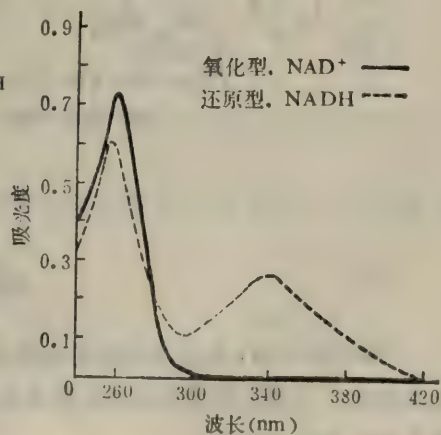


图 14-1 NAD^+ 和 NADH 的吸收光谱

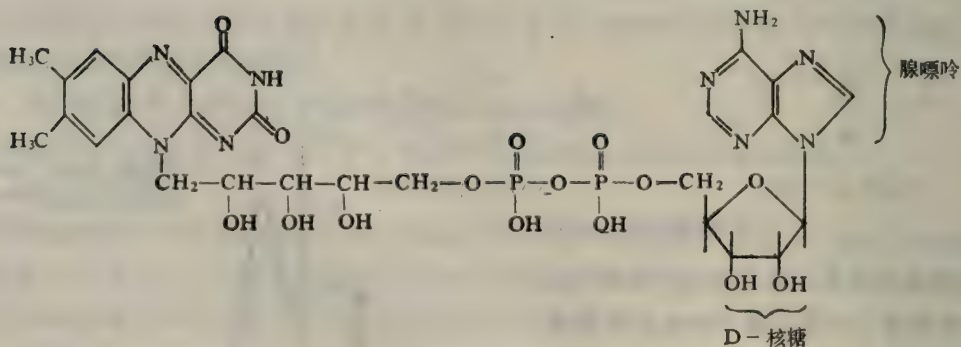
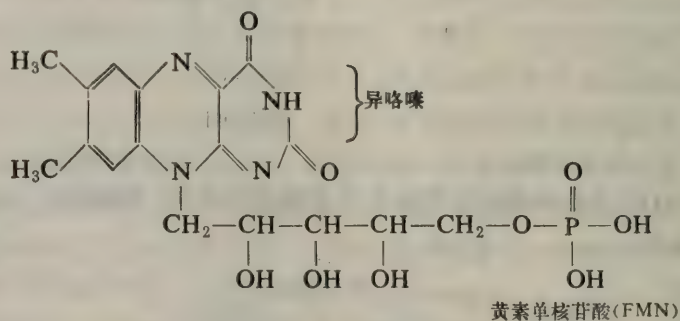
与该酶浓度成正比，可用此关系测定脱氢酶或辅酶的含量。

表 14-1 脱氢酶的辅酶

酶	反 应	辅 酶
乙醇脱氢酶	乙醇 \rightleftharpoons 乙醛	NAD ⁺
苹果酸脱氢酶	L-苹果酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸	NAD ⁺
苹果酸脱氢酶(脱羧酸化)	L-苹果酸 \rightleftharpoons 丙酮酸 + CO ₂	NADP ⁺
异柠檬酸脱氢酶	异柠檬酸 \rightleftharpoons 草酰琥珀酸 \rightleftharpoons α -酮戊二酸 + CO ₂	NADP ⁺
乳酸脱氢酶	L-乳酸 \rightleftharpoons 丙酮酸	NAD ⁺
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	6-磷酸葡萄糖 \rightleftharpoons 6-磷酸葡萄糖酸	NADP ⁺
3-磷酸甘油醛脱氢酶	3-磷酸甘油醛 + 磷酸 \rightleftharpoons 1,3-二磷酸甘油	NAD ⁺

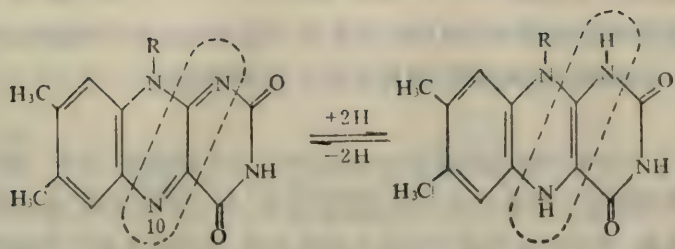
2. 黄素核苷酸(FMN 和 FAD)

黄素核苷酸有二种，一是黄素单核苷酸(FMN)，二是黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。二者都含有黄素(维生素 B₂)，是黄素酶类的辅基。



FMN 和 FAD 均有不同程度的黄色，呈现黄色荧光。在还原作用中，其荧光消失，氧化后荧光又恢复。二者与酶蛋白结合后荧光也消失。FMN 的最大吸收带在 445 nm，FAD 的最大吸收带在 260, 375, 450 nm。

异咯嗪环是脱氢反应的核心。氧化型黄素核苷酸在 N₁ 和 N₁₀ 加上 2 个氢原子转化为还原



型 FMN 和 FAD，从作用物或还原型 NADH 和 NADPH 接受氢，然后将氢传递给氧原子或其他受氢体(细胞色素)；



D-氨基酸氧化酶的反应

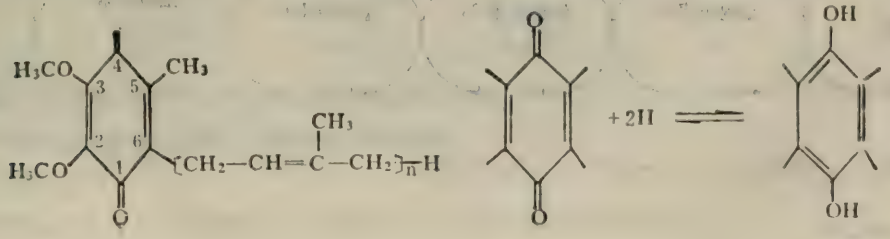
FMN 和 FAD 与酶蛋白结合很牢，属于辅基类。加热处理后，蛋白部分与辅基分开，蛋白质变性，反应是不可逆的。若以酸处理(冷)时，反应是可逆的，可以把辅基和蛋白部分分开。表 14-2 是黄素酶类催化反应的实例。

表 14-2 黄素酶类催化反应实例

酶	辅基	底物(电子供体)	产物	电子受体
D-氨基酸氧化酶	FAD	D-氨基酸	α -酮酸, NH_3	O_2
L-氨基酸氧化酶	FMN, FAD	L-氨基酸	α -酮酸, NH_3	O_2
NADH 脱氢酶	FAD	NADH	NAD^+	(CoQ)
醛氧化酶	FAD	醛	羧酸	O_2
琥珀酸脱氢酶	FAD	琥珀酸	延胡索酸	(CoQ)
黄嘌呤氧化酶	FAD	黄嘌呤	尿酸	O_2

3. 辅酶 Q(泛醌 Ubiquinone)

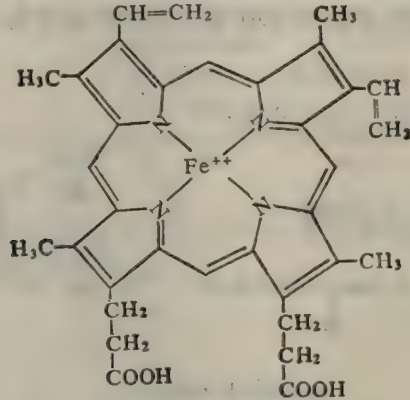
这个辅酶是苯醌的一种衍生物，分布很广，从动物组织到微生物都有所发现。其结构如下：



其中 $n=6-10$ ，而微生物则为 $6\sim 9$ 。来源于动物组织线粒体的泛醌，其 n 值为 10。动物组织线粒体的泛醌，在呼吸链中，是从 $FADH_2$ 接受氢，然后把电子转移给细胞色素 b 酶的辅酶。在酶传递氢的过程中，辅酶 Q_{10} 先被还原，然后再氧化，依次重复。

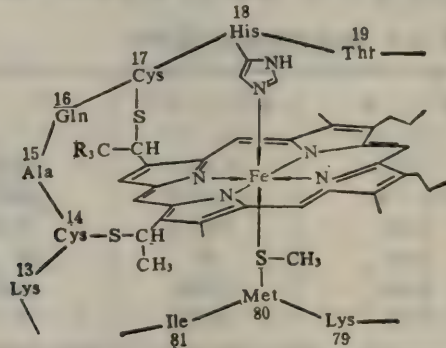
4. 铁卟啉

铁卟啉是铁离子与卟啉环组成的络合物，也常叫作血红素辅酶。它是一些氧化酶和细胞色素的辅酶，其中也有些与酶蛋白共价结合以辅基形式存在，如过氧化氢酶，细胞色素 C 等均含有这种辅基。血红素有几种，不同的血红素中卟啉环侧链不同，如细胞色素 C 的辅基可写作如下形式：

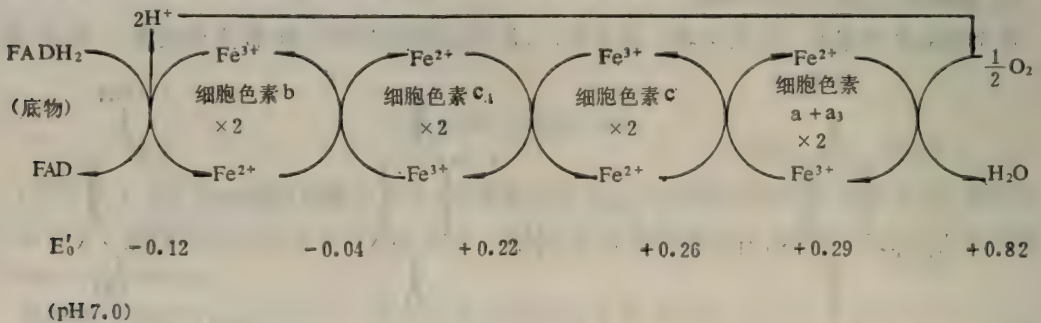


铁卟啉(还原型)

细胞色素 C 的蛋白部分与铁卟啉的结合，是通过两个半胱氨酸的硫氢基加到两个乙烯基的双键上，形成牢固的硫醚键。铁原子以配位键与肽链的 His-18 和 Met-80 相连：

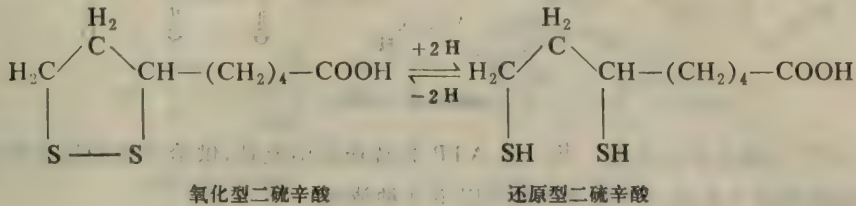


细胞色素的铁卟啉的功能在于传递电子。其作用方式如下：

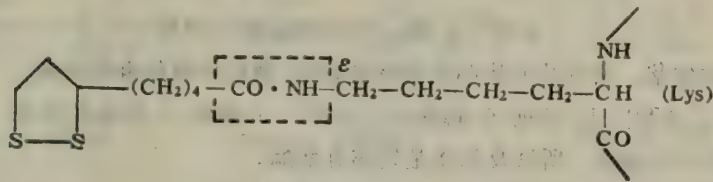


5. 二硫辛酸

二硫辛酸最初是从酵母中分离出来的。在1953年从牛肝中提取并得到结晶。它是丙酮酸脱氢酶复合体中二硫辛酰转乙酰基酶的辅基。它的氧化型和还原型如下：

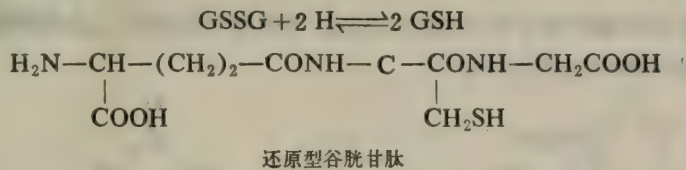


这个辅基的—COOH基与酶蛋白的赖氨酸的ε-NH₂基通过酰胺键而连接起来。

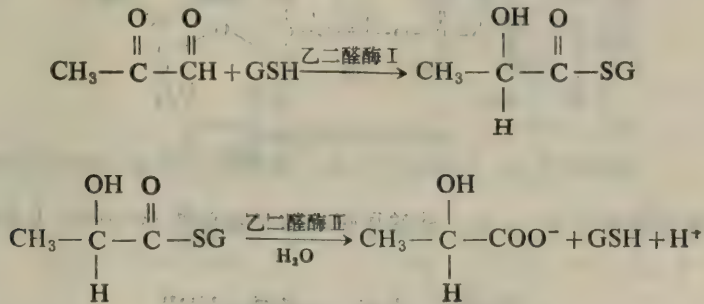


6. 谷胱甘肽

谷胱甘肽是生物中广泛存在的三肽：γ-L-谷氨酰-L-半胱氨酰-甘氨酸。以GSH表示还原型，以GSSG表示氧化型：



还原型谷胱甘肽是乙二醛酶的辅基，参与甲基乙二醛转化为L-乳酸的反应：

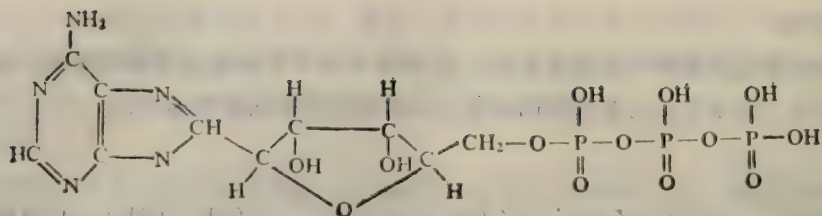


在乙二醛酶 I 催化反应中，谷胱甘肽是乙酰基的受体。

二、与其他基团(除氢而外)转移有关的辅酶

1. 三磷酸腺苷

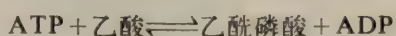
三磷酸腺苷是由一个腺嘌呤，一个核糖和三个分子磷酸残基组成的：



三磷酸腺苷(ATP)

一般来讲,ATP 与两类反应有关。其一为 ATP 分解释放出能量,供给另外的反应使用,其二为 ATP 分子转移到适当受体上。这之中又有以下几种情况:

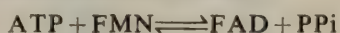
1) 磷酸基的转移。在这类反应中所涉及的酶叫作转磷酸酶(磷酸激酶),在代谢中有着重要意义。



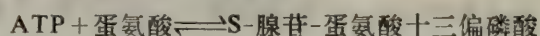
2) 转移焦磷酸基。所涉及的酶叫焦磷酸转移酶(磷酸核糖焦磷酸激酶)。



3) 转移腺苷-5'-磷酸。所涉及的酶是转核苷酸酶。

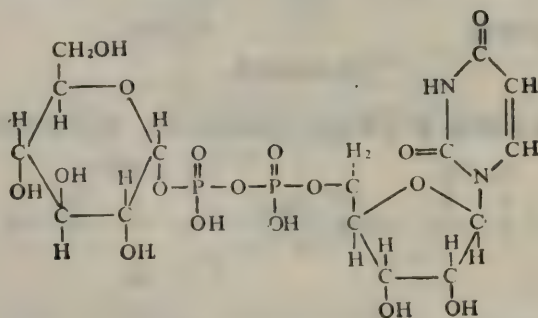


4) 转移腺苷形成 S-腺苷蛋氨酸(活性蛋氨酸)。

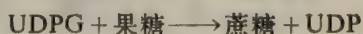


2. 尿嘧啶核苷酸辅酶

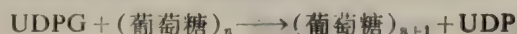
所有尿嘧啶核苷酸辅酶都有着共同的结构式,不同的只是连接于末端磷酸上的糖。二磷酸尿嘧啶核苷葡萄糖(UDPG)其结构如下:



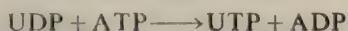
在蔗糖 UDP-转糖基酶的作用下,从二磷酸尿嘧啶核苷葡萄糖(UDPG)及果糖合成蔗糖(转糖基):



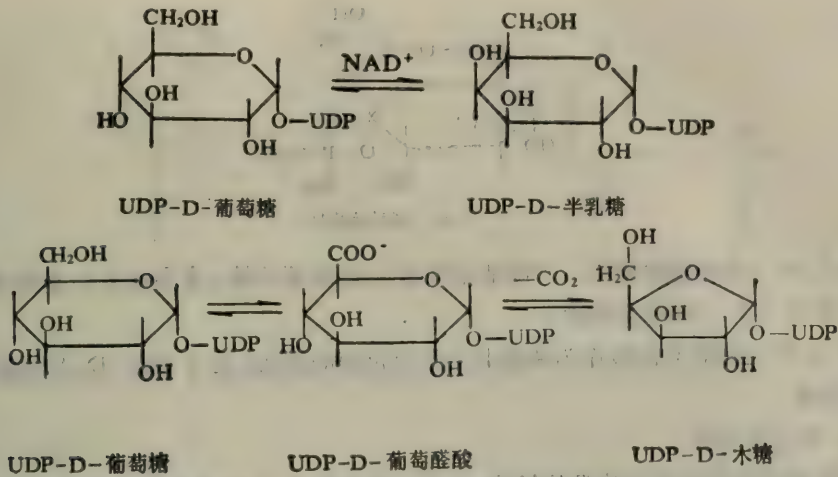
涉及糖基转移的另一类反应是动物糖原链的增长:



此反应中的酶叫作糖原合成酶。UDP 通过下列反应再生:



尿嘧啶核苷酸辅酶的第二种类型反应是糖的化学转化反应。典型的反应是UDP-葡萄糖转化为UDP-半乳糖和UDP-D-葡萄糖氧化成UDP-D-葡萄糖醛酸，然后脱羧成UDP-D-木糖。

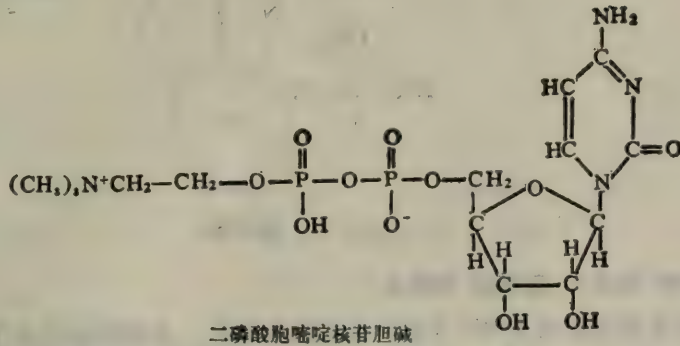


3. 胞嘧啶核苷酸辅酶

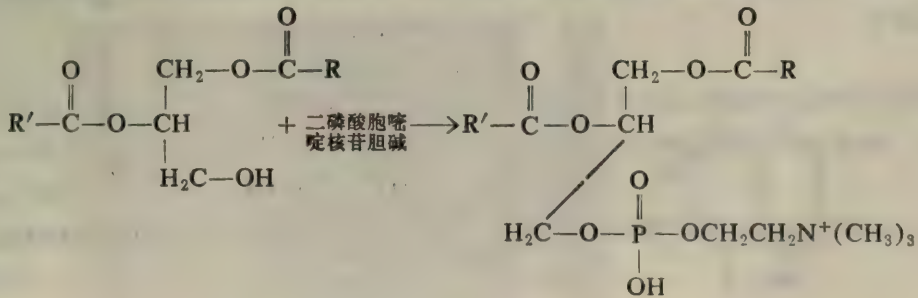
在卵磷脂生物合成过程中，第一步是合成胞嘧啶核苷酸辅酶：



该辅酶结构式可写成下式：

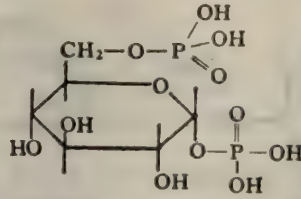


反应第二步是，辅酶的磷酸胆碱部分转移到1,2-二甘油酯上，形成卵磷脂：



4. 糖磷酸

1,6-二磷酸葡萄糖是磷酸葡萄糖变位酶的辅酶,其结构可写成:



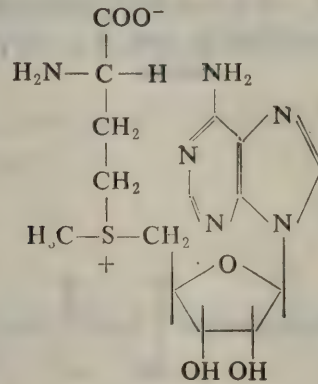
1,6-二磷酸葡萄糖

在反应中 1,6-二磷酸葡萄糖把一个磷酸基转给 1-磷酸葡萄糖,本身变为 6-磷酸葡萄糖(产物),同时产生新的 1,6-二磷酸葡萄糖。

另外,2,3-二磷酸甘油酸作为磷酸甘油酸变位酶的辅酶,使 2-磷酸-D-甘油酸转化为 3-磷酸-D-甘油酸。

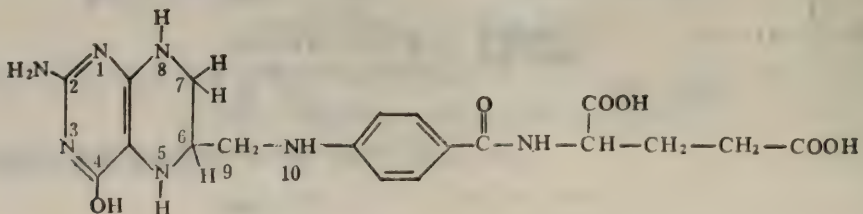
5. S-腺苷蛋氨酸

S-腺苷蛋氨酸是转甲基酶类的辅酶,也叫作活性甲基,在形成肌酸和胆碱的反应中涉及蛋氨酸甲基基团的转移。

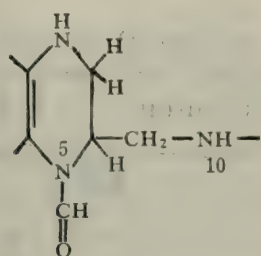


6. 四氢叶酸(辅酶 F, 简写成 THFA)

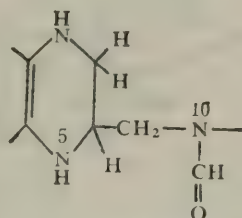
四氢叶酸在某些氨基酸及嘌呤代谢中起着重要作用。在某些酶系中 THFA 可以作为羟甲基(-CH₂OH)、甲基(-CH₃)、氮甲基(-CH₂NH₂)、甲醛基(-HCHO) 的传递体而起作用。其结构式如下:



四氢叶酸在 5 位和 10 位结合单碳原子基团, 如转移甲酰基, 在第 5 位或第 10 位, 结合 $-CHO$, 生成甲酰基四氢叶酸:

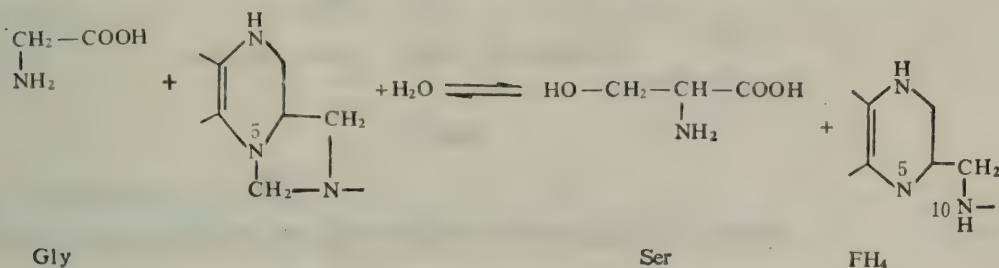


5-甲酰基 FH_4

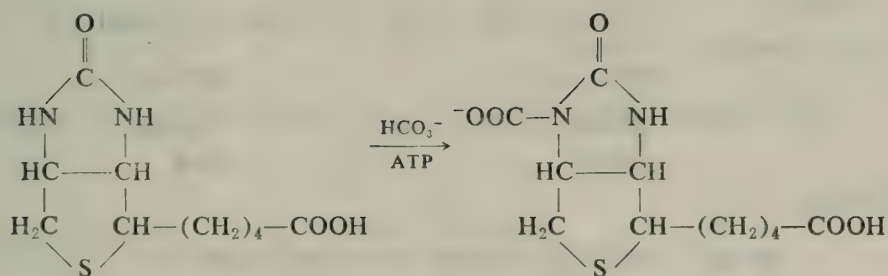


10-甲酰基 FH_4

丝氨酸缩醛酶以 FH_4 为辅酶催化甘氨酸生成丝氨酸, 其反应如下:



7. 生物素

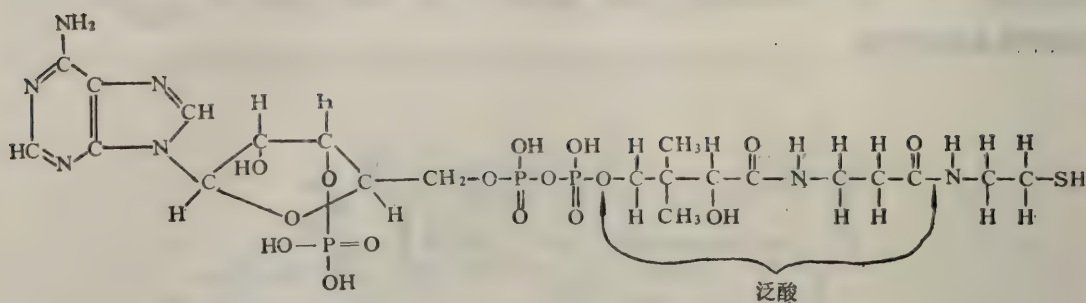


生物素

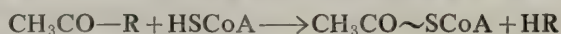
生物素侧链的羧基和酶蛋白的一个赖氨酸的 ϵ -氨基共价结合, 因此生物素属于辅基类。生物素与 CO_2 结合成活性中间物生物素 $\sim CO_2$, 在羧化反应中有重要作用。

8. 辅酶 A (CoA)

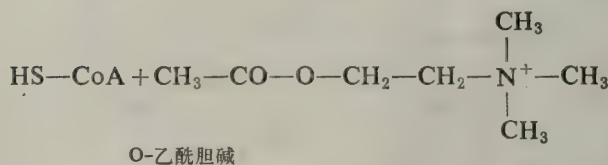
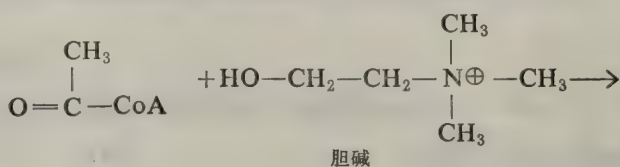
辅酶 A 是乙酰化酶及其它转酰酶的辅酶, 含有泛酸 (一种 B 族维生素)。它是一个带有三个磷酸基和一个巯基的核苷酸。



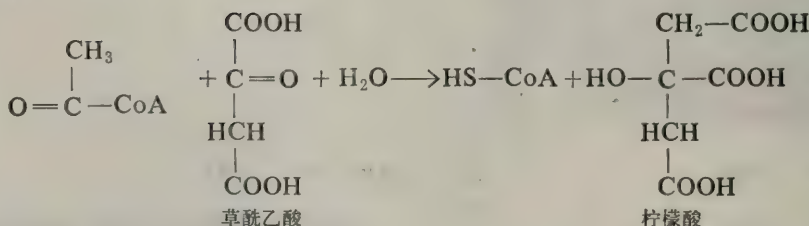
在酶系中,通过辅酶 A(HSCoA) 传递酰基的所有反应都涉及 $\text{CoAS} \sim \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{R}$ 形式:



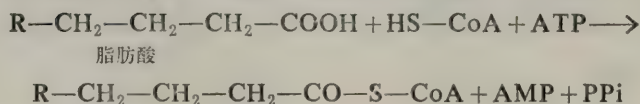
胆碱转乙酰基酶通过乙酰辅酶 A 完成下列反应:



柠檬酸合成酶:

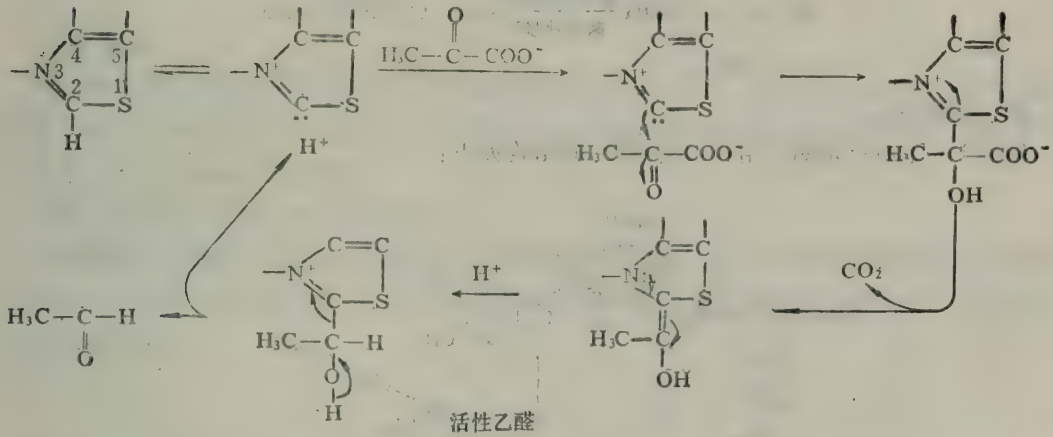
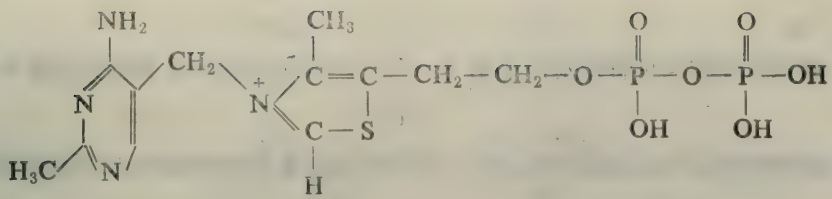


乙酰-CoA 合成酶:



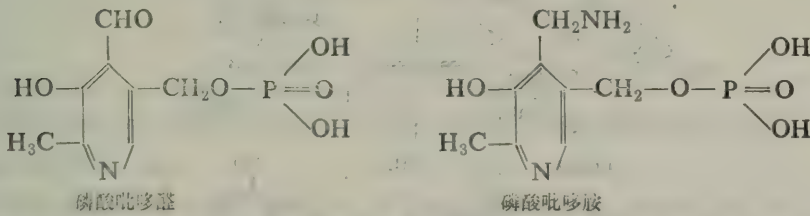
9. 焦磷酸硫胺素(TPP 辅脱羧酶)

TPP 是脱羧酶的辅酶,含有硫胺素。TPP 在下列三种反应中充当辅酶: ① α -酮酸的非氧化脱羧反应; ② α -酮酸的氧化脱羧反应; ③ α -乙酮醇的生成和转移反应。焦磷酸硫胺素在三类反应中的作用是类似的,所有这些反应的头一步都是 α -酮基化合物加到焦磷酸硫胺素噻唑环的第 2 号碳原子上。焦磷酸硫胺素的结构可以写成下式:

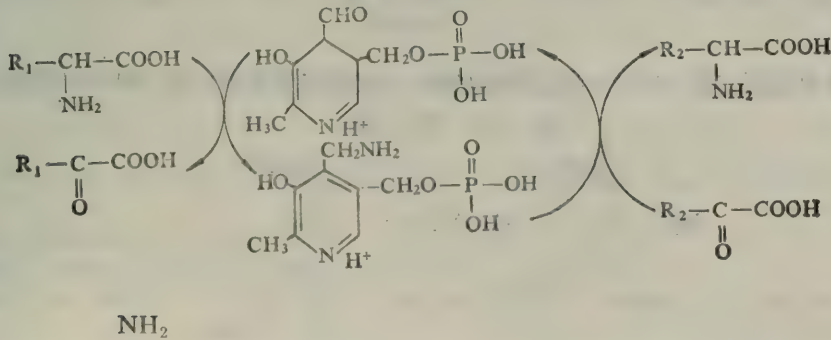


10. 磷酸吡哆醛及磷酸吡哆胺

这是许多转氨酶和氨基酸脱羧酶的辅酶，对蛋白质代谢具有十分重要的意义，其结构式如下，



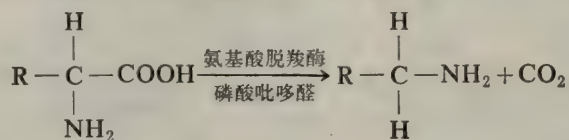
在转氨基过程中，磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺作为转氨酶的辅酶，促进转氨作用：



转氨酶催化 $R_1-CH(NH_2)-COOH$ 脱下 α 碳原子上的一 NH_2 ，转氨酶的辅酶磷酸吡哆醛接受氨基，变

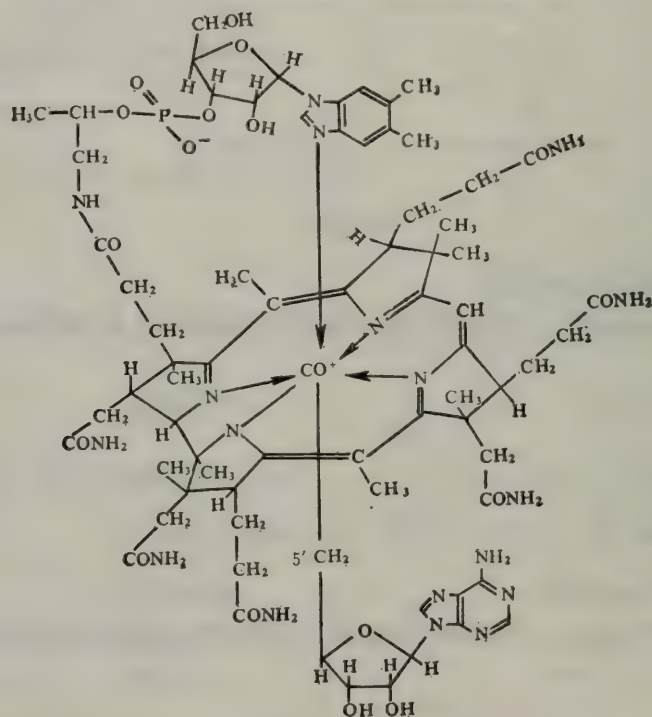
成磷酸吡哆胺，磷酸吡哆胺又可将氨基传递给 $R_2-C-COOH$ ，成为一个新的氨基酸 $R_2-CH-NH_2$ —
 $\begin{array}{c} NH_2 \\ | \\ R_2-CH- \\ || \\ O \end{array}$

COOH。此外，磷酸吡哆醛在氨基酸脱羧过程中，作为氨基酸脱羧酶的辅酶，使氨基酸脱羧成胺：

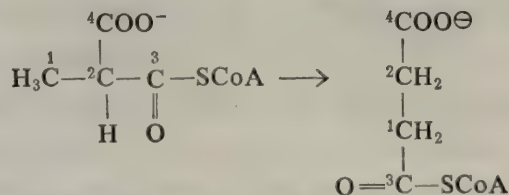


11. 辅酶 B₁₂

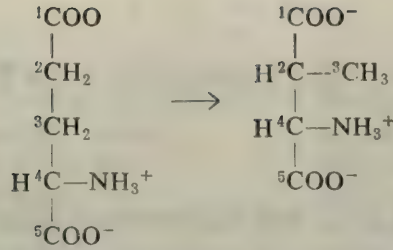
辅酶 B₁₂ 是所有辅酶中结构最复杂者，其结构如下：



辅酶 B₁₂ 是甲基丙二酰—SCoA 变位酶的辅酶，此酶催化甲基丙二酰—SCoA 转化为琥珀酰—SCoA，



此外，在谷氨酸变位酶反应中转化谷氨酸为 β-甲基天冬氨酸：

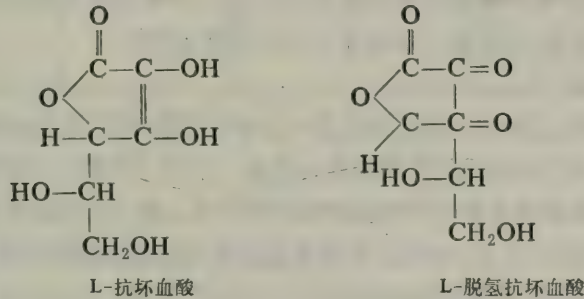


(三) 金属

许多酶的催化作用需要金属参与,这些金属被称为活化因子。金属和酶的关系比较复杂,有的金属直接关系到酶活性,比如羧肽酶A中的锌;也有的金属主要是维持主体结构,与酶活性有间接关系,如酯(肪)酶中的金属钙。

(四) 抗坏血酸(维生素C)辅助因子

抗坏血酸是一种强还原剂,它能迅速地还原许多染料,甚至将中性的硝酸银还原成金属银。当然也能为一般氧化剂所氧化。这个水溶性的维生素很容易氧化成脱氢抗坏血酸,二者构成一个氧化还原体系。



这个氧化还原体系与细胞内许多氧化还原反应有关,但作为辅酶的实质尚不很清楚。

五、维生素与酶的关系

从上述可知维生素与酶之间有密切的关系。大多数B族维生素是构成酶的辅基或辅酶的主要成分。例如: NAD, NADP 都含有维生素PP, 黄素酶类含有维生素B₂, 转氨酶的辅酶含维生素B₆, 辅羧化酶含维生素B₁。也就是说,它们参与了酶的组成,在酶的催化反应中起决定性作

参 考 文 献

1. J. R. Whitaker, Principles of enzymology for the food sciences, Marcel dekker, INC., New York, 1972
2. 鲁宝重, 酶学概论, 科学出版社, 1964
3. 船津勝編, 酵素, 講談社サイエンティフィック, 1976
4. 奥田九一郎, 小倉良平, 滝口久, 竹尾和, 村松正实, 生化学, 东京南江堂, 京都, 1976

附录一、蛋白质的存在与分类

一、蛋白质的存在

蛋白质是生物体最重要的物质之一。从最简单的病毒到最复杂的人体，都含有蛋白质。所有的鞭毛与纤毛全部是由蛋白质所构成的。蛋白质是细胞膜或细胞壁的重要成分，也是线粒体和质体的主要成分。细胞质和液泡更是蛋白质的存在部位。在细胞核中，核蛋白是构成染色体的基本物质。总之，在细胞的各种部位中，含有各种各样的蛋白质。病毒与噬菌体的外壳是由蛋白质所组成的。在动物的血液、淋巴液、乳与卵中，蛋白质的浓度是非常大的。在表皮结构(如：毛、发、羽毛、蹄、爪，等)、内分泌物(如：胰岛素、甲状腺素，等)、外分泌物(如：消化液、脑脊髓液、眼球与关节的滑液)以及生殖系统所分泌的一系列的物质中，都含有大量的各种各样的蛋白质。蚕丝与蛛网是一种特殊的蛋白质。植物种子中的蛋白质浓度很高，特别是内胚乳中，更是如此。蛋白质也存在于植物的循环液(细胞液)中。在叶状体或叶中，大部分蛋白质处于不溶状态。

总之，从最简单的病毒到最复杂的人体，那里有生命，那里就有蛋白质。蛋白质广泛地存在于生物体的各种不同部位，行使着生命过程中的各种重要机能。

二、蛋白质的分类

蛋白质的种类繁多，要对每一种蛋白质有一个全面系统的认识，就必须有一个较好的分类方法。这种分类方法应该以蛋白质的化学结构为依据。但是，目前大多数蛋白质的化学结构尚未阐明，因此，还不能够按照蛋白质化学结构的不同来分类。由于大多数蛋白质的化学组成和物理化学性质已弄清，因此，现在一般是，根据蛋白质的化学组成和物理化学性质的差异，来分类的。

按照化学组成的不同，可以将蛋白质分为简单蛋白(单纯蛋白)和复合蛋白(结合蛋白)两大类。简单蛋白仅由多肽链所组成；复合蛋白除含有多肽链而外，还含有非蛋白部分，如：核酸、脂肪、糖、色素和金属离子，等等。这部分称为辅基。

按照理化性质，特别是溶解度、热凝性质、盐析等的差别，可以将简单蛋白分为清蛋白(白蛋白)、球蛋白、组蛋白、精蛋白、醇溶蛋白、硬蛋白、谷蛋白七类，如表 12-1 所示。

按照辅基的不同，可以将复合蛋白分为核蛋白、糖蛋白、脂蛋白、磷蛋白、色蛋白和金属蛋白六类，如表 12-2 所示。

需要指出的是，由于分析方法的改进，许多过去认为是简单蛋白的，也被发现，含有微量的非蛋白质物质，因此，简单蛋白与复合蛋白的分类只是相对的。

1. 清蛋白类

这类蛋白可溶于水和稀中性盐溶液，在饱和硫酸铵溶液中发生沉淀，热或其它变性试剂可使清蛋白变性并凝集。清蛋白的分布很广泛，例如：在血液、淋巴、肌肉、蛋、乳以及植物种子中，特别是豆类和谷类种子中，都含有大量的清蛋白。

清蛋白类中的大多数已经制成结晶。研究的比较详细的清蛋白有：卵清蛋白、 α -乳清蛋白、

表 12-1 简单蛋白质分类

分 类	举 例	溶 解 度
清蛋白类	血清清蛋白, 乳清蛋白	溶于水 and 中性盐溶液, 不溶于饱和硫酸铵溶液
球蛋白类	血清球蛋白, 溶菌酶	不溶于水, 溶于稀中性盐溶液, 不溶于半饱和硫酸铵溶液
组蛋白类	胸腺组蛋白	溶于水, 稀酸, 稀碱, 不溶于稀氨水
精蛋白类	鱼精蛋白	溶于水, 稀酸, 稀碱, 不溶于稀氨水, 含 87% 的 Arg
醇溶蛋白类	醇溶玉米蛋白, 醇溶谷蛋白	不溶于水, 中性盐溶液, 溶于 70~80% 乙醇
谷蛋白类	米谷蛋白, 麦谷蛋白	不溶于水, 中性盐及乙醇溶液, 溶于稀酸, 稀碱
硬蛋白类	角蛋白, 弹性蛋白, 胶原	不溶于所有的溶剂

表 12-2 复合蛋白质分类

分 类	辅 基	举 例
核蛋白类	核 酸	病毒核蛋白, 染色体蛋白
糖蛋白类	糖 类	免疫球蛋白, 粘蛋白
脂蛋白类	各种脂类	低密度脂蛋白, 高密度脂蛋白
磷蛋白类	磷 酸	酪蛋白, 卵黄磷蛋白
色蛋白类	色 素	血红蛋白, 肌红蛋白, 黄素蛋白
金属蛋白类	金属离子	固氮酶, 铁氧还蛋白, 铜兰蛋白

血清清蛋白等。

2. 球蛋白类

不溶于水, 但是加少量的盐、酸或碱, 则可溶解, 在 50% 饱和度的硫酸铵溶液中, 则可以析出。热或其它变性剂可以使球蛋白变性并凝集。

球蛋白是一大类重要的蛋白质, 广泛地分布于动物和植物体中, 例如: 血液、淋巴、肌肉、蛋、乳以及眼睛的晶状体中, 所有的细胞液中, 植物的种子中, 都含有大量的球蛋白。

目前, 不少球蛋白已制成结晶。有许多球蛋白已经作了详细研究, 例如: 肌红蛋白、溶菌酶、 β -乳球蛋白、免疫球蛋白、血纤维蛋白原、鸡蛋蛋白的卵球蛋白以及血浆、淋巴中的其它球蛋白, 等。

3. 组蛋白类

组蛋白溶于水、稀酸、稀碱, 但不溶于稀氨水中, 也不溶于氯化铵、氯化钠或硫酸镁的饱和溶液中。组蛋白含有较多的碱性氨基酸残基, 故呈碱性。

大多数组蛋白存在于体细胞核中, 在蛋白质生物合成中起重要的作用。现在研究较多的有, 红血球、淋巴球、胸腺和肝的组蛋白等。

4. 精蛋白类

这类蛋白存在于成熟的精细胞中, 是天然蛋白质中最简单的一类, 分子量 5000 左右, 氨基酸的种类较少, 碱性氨基酸的含量较多, 特别是精氨酸含量最高, 等电点在 pH 10-12, 因此, 与组蛋白一样, 也是碱性蛋白。这类蛋白质很容易与其它蛋白质形成蛋白-精蛋白复合物, 更容易与核酸形成核酸-精蛋白复合物。这一特性往往用于蛋白质的分离提纯。研究较多的是鱼精蛋白。

5. 醇溶蛋白类

醇溶蛋白的特点是：含有大量的谷氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺以及极其少量的精氨酸；容易溶解于低脂肪族醇类之中，特别是乙醇。这类蛋白仅仅存在于禾本科植物的种子之中。比较熟知的有，小麦醇溶蛋白和玉米醇溶蛋白等。

6. 硬蛋白类

这类蛋白质主要存在于动物组织的中层和外层细胞组织中，例如：皮肤、头发、角、蹄、指甲（爪）、羽毛、龟甲、软骨、韧带、腱，等部位。硬蛋白类可以细分为角蛋白、胶原和丝心蛋白。其共同的特点是：不溶于所有的一般溶剂中；不被大多数蛋白水解酶所水解。

7. 磷蛋白类

磷蛋白主要存在于乳、蛋之中。目前，已知的磷蛋白数目不多。研究较多的是酪蛋白和卵黄磷蛋白。磷蛋白的特点是：内含的磷酸与丝氨酸、苏氨酸的—OH基结合成酯，并具有自由解离的酸性基团，故磷蛋白是一种强酸性蛋白。磷蛋白可溶于盐溶液中。

8. 糖蛋白类

糖蛋白类是以糖类为辅基的复合蛋白，广泛存在于生物体之中。无论是种类和数量，糖蛋白都是非常复杂的一类蛋白质。这类蛋白质易溶于水、盐溶液中，能够被盐析或酸、乙醇所沉淀。

9. 核蛋白类

核蛋白是由核酸与精蛋白、组蛋白或其它蛋白所组成的复合蛋白。它存在于所有的细胞之中。就一个细胞而言，无论是细胞质还是细胞核，都含有核蛋白。核蛋白是染色体的主要成分。病毒和噬菌体的全部或大部分，是由核蛋白所构成的。

10. 脂蛋白类

脂蛋白类是由蛋白质与脂类相结合而成的复合蛋白。它们存在于血清、蛋黄、某些组织的抽提液和某些细胞的线粒体、叶绿体，以及细胞和病毒之中。脂蛋白溶于水、盐溶液（如10% NaCl）中，但稀释时又沉淀出来。在7—20%的甲醇或乙醇中，脂蛋白容易失去其脂类辅基，但一般的有机溶剂并无此种作用。

附录二、酶的命名和分类

酶的命名和分类是一个很不容易作得好的工作，人们经过了长期考虑和研究之后才达到今天这样的分类水平。酶的命名和分类是与酶学发展过程密切相关的，人们从仅知道少数几种酶的时候起就开始了命名和分类，随着酶学的发展，新发现的酶和经过仔细研究的酶，种类越来越多，由于没有一个统一的命名和分类原则，酶的命名往往取决于发现者本人对此酶的称呼。这样，必然会造成混乱，比如：一酶多名或多酶一名的现象，也有的酶的叫法相当模糊不清，比如：黄色酶，中间酶等。因此非常有必要规定一个命名和分类原则，以便大家共同沿用。按道理，从酶的结构和催化反应类型确立命名和分类原则是合理的。但是，酶是大分子物质，结构相当复杂，不仅要考虑化学结构，也要考虑立体结构；不仅要考虑蛋白质本身，还要考虑酶的辅助成分；不仅要考虑蛋白质整体，也要考虑活性部位的局部结构，因此很难象有机分子那样按结构明确命名和分类。但酶所催化的反应是酶最特异的性质，因此目前的命名和分类原则就是以酶催化反应本身为依据的。

为了酶的命名和分类，国际生化联合会(I.U.B)在1955年就酶的命名和分类问题设置了国际委员会，并在1961年提出了报告书，在报告书中一方面对酶进行了系统的命名和分类，同时把当时承认的酶作成了酶表。在1965年进行了小的改动并增添了一些新酶，1972年又进行了较大的修改又追加了新酶，并建议各国生化科学工作者按照这个方案进行命名和分类。

一、酶的命名

1. 系统命名法：一般，酶的命名由两部分组成，即：“底物加反应类型的”方式命名，例如：醇脱氢酶催化下述反应：



底物是醇和 NAD^+ ，反应类型是氧化还原，因此其系统命名为：醇： NAD^+ 氧化还原酶。这里有一个问题值得注意，反应是可逆的，反应有正反两方向，按哪个方向命名呢？这就要有规定，在上述反应中，凡涉及 NAD^+ ， NADH 的反应都以 NAD^+ 为受体的反应命名，其他反应也有类似的规定。

2. 通用名：系统命名法所表现的内容很明确，既知道参加反应的底物，又知道催化反应的类型，但酶的名称相当复杂而不便通常使用，而一般习惯名比较简单，也较为人们所熟知，所以酶学委员会对每一个酶同时推荐一个通用的习惯名称，括在〔 〕号内。如：醇： NAD^+ 氧化还原酶〔醇脱氢酶〕。

二、酶的分类

国际生化协会酶委员会按酶催化的整体反应把酶分成六大类。每一种酶在这个分类系统中的地位是以四个数字组成的编号来表示的。数字之间用句点隔开，每一个酶都有其特有的编号。编号中的第一个数字指明这个酶属于六大类中的哪一类。“1”代表氧化还原酶类；“2”代表转移酶类等。编号中的第二个数字指出这个酶属于哪一个亚类。在氧化还原酶类中，这个数字表明

底物中发生氧化的基团,即电子的给体,如“1”表示醇基,“2”表示醛基或酮基等。编号中第三个数字指出这个酶属于哪一个次亚类。在氧化还原酶类中,表明氢或电子受体,如“1”是 NAD^+ 或 NADP^+ ,“2”是细胞色素,“3”分子氧等。编号中的第四个数字是酶委员会决定的在酶表上的登记号数。其六类如下:

六类:

1. 氧化还原酶(Oxidoreductase)

催化底物 *A* 和 *B* 间氧化还原的酶类。脱氢酶,氧化酶,过氧化氢酶都属于这一类。

2. 转移酶(Transterase)

催化基团转移反应(除H而外的基团),如甲基,氨基等。

3. 水解酶(Hydrolase)

4. 裂合酶(Lyase)

催化水解而外的消除反应,导致形成双键的酶类。

5. 异构酶(Isomerase)

6. 合成酶(Ligase)

催化与三磷酸腺苷(或某些类似的焦磷酸化合物)分解偶联,并由两种物质合成一种物质的反应。

亚类和次亚类:

1.1, CH-OH 作为电子给体的酶。

1.1.1, NAD^+ 或 NADP^+ 作为电子受体的酶。

1.1.2, 细胞色素作为电子受体的酶。

1.1.3, O_2 作为电子受体的酶。

1.1.99, 其他物质作为电子受体的酶。

1.2, 醛或酮基(>C=O)作为电子给体的酶。

1.2.1, 以 NAD^+ 或 NADP^+ 为受体。

1.2.2, 以细胞色素为受体。

1.2.3, 以氧为受体。

1.2.7, 以铁-硫蛋白为受体。

1.2.99, 以其他受体。

1.3, CH-CH 基团为给体的酶。

2.1, 转移一碳基团。

2.1.1, 转移甲基酶。

3.1, 作用于酯键。

3.1.1, 羧酸酯水解酶。

3.1.4, 磷酸二酯水解酶。

3.4, 作用于肽键。

3.4.13, 二肽水解酶。

4.1, 碳-碳裂合酶。

4.2, 碳-氧裂合酶。

4.99, 其他裂合酶。

5.1, 变旋酶和差向异构酶。

5.1.1, 作用于氨基酸及衍生物。

6.1, 形成C—O键。

6.5, 形成磷酸酯键。

具体举例:

1.1.1.1, 氧化还原酶类, 电子给体为

CH—OH, 电子受体为 NAD^+ , 排号为 1。即乙醇脱氢酶。

这种系统分类法与命名原则相当严格, 一种酶只可能有一个名称和编号, 并能明确地表示底物和催化反应的特性。

附录三、固体硫铵添加量与浓度(%饱和度)的关系

		硫铵的最终浓度 (%饱和度)																
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
硫铵的起始浓度 (%饱和度)		向 1 升溶液中加入的固体硫铵克数																
	0	56	114	114	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
	25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
	30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
	33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
	35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
	40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
	45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
	50										33	66	101	137	176	214	302	392
	55											33	67	103	141	179	264	353
	60												34	69	105	143	227	314
	65													34	70	107	190	275
	70														35	72	153	237
	75															36	115	198
80																77	157	
90																	79	

附录四、离子交换树脂

分 类	商 品 名 称	活 性 基 团	支 持 物 类 型	总容量 (毫克当量/克干重)	
阳 离 子 交 换 树 脂	弱 酸 型	-COOH	聚甲基丙烯酸	9-10	
		-COOH	聚甲基丙烯酸	8.5	
		-COOH	聚甲基丙烯酸		
	强 酸 型	Dowex 50	-C ₆ H ₄ SO ₃ H	聚苯乙烯	5.1-5.4
		Zeo-Carb 225	-C ₆ H ₄ SO ₃ H	聚苯乙烯	4.5-5.0
		Amberlite IR 120	-C ₆ H ₄ SO ₃ H	聚苯乙烯	4.0
		Bio-Rad AG 50	-C ₆ H ₄ SO ₃ H	聚苯乙烯	
		Amberlite IR 45	-N(C ₃ H ₇) ₂	聚苯乙烯	1.8
		De Acidte E	-OH, 核氨酸	酚 醛	9.0
		Bio-Rad AG 3	+ -RNHR ₂	聚苯乙烯	
阴 离 子 交 换 树 脂	弱 碱 型	-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	聚苯乙烯	3.5-3.6	
		-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ + C ₂ H ₄ OH	聚苯乙烯	2.5	
	强 碱 型	-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	聚苯乙烯	4	
		-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	聚苯乙烯	3	
		-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	聚苯乙烯		
		-C ₆ H ₄ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	聚苯乙烯		

附录五、Whatman 离子交换纤维素的有关数据

商品名称	物理结构	交换当量 (毫克当量/克)	蛋白质容量(mg/g)	柱体积 (毫升/克干重)
DEAE-纤维素				
DE-22	纤维状	1.0±0.1	450	7.7
DE-23	短纤维	1.0±0.1	450	9.1
DE-32	微球形(干粉)	1.0±0.1	660	6.3
DE-52	微球形(湿粉)	1.0±0.1	660	6.3
CM-纤维素				
CM-22	纤维状	0.6±0.06	150	7.7
CM-23	短纤维	0.6±0.06	150	9.1
CM-32	微球形(干)	1.0±0.1	400	6.8
CM-52	微球形(湿粉)	1.0±0.1	400	6.8
P-纤维素				
P-11	纤维状	2×3.7	—	—
AE-纤维素				
AE-11	纤维状	1.0	—	—
ECTEOLA-纤维素				
ET-11	纤维状	0.5	—	—

5-5-5
 5-5-5
 5-5-5
 5-5-5
 5-5-5
 5-5-5

附录六、DNP 氨基酸纸层析几种常用试剂

溶 剂	组 成	注
甲苯-吡啶-2-氯乙醇-0.8N NH ₄ OH 用 NH ₄ OH 饱和的正丁醇	50:18:30:30 用 0.1% NH ₄ OH 饱和正丁醇。 用高浓度 NH ₄ OH 如 2 N, 对 R _f 值没有明显影响。	使用有机相, 现用现配。 使用有机相, 现用现配。
用 pH 6-邻苯二甲酸盐饱和叔戊醇	叔戊醇与过量的 pH 6 邻苯二甲酸盐缓冲液振荡。后者用 50 ml 0.1 M 邻苯二甲酸氢钾和 45.5 ml, 0.1 N NaOH 使至 100ml。	首先在缓冲液中浸纸在室温干燥。
1.5 M 磷酸盐缓冲液 2.5 M 磷酸盐缓冲液	138 克 (1 M) NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 和 71 克 (0.5 M) Na ₂ HPO ₄ 溶于 1 升水中。 229 克 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 和 118 克 Na ₂ HPO ₄ 溶于一升水中。	} 冬季在温暖房间进行层析 (20°C)。否则当层析时在溶剂中会出现结晶。

收到期 2007.9.7
 来源 赠阅
 书价 1.95
 单据号 附录七
 开票日期

中科院植物所图书馆

 S0050323

附录七、分离 DNS 氨基酸用的溶剂系统

用途	溶剂系统	配方
聚酰胺薄膜层析 ^[65]	1. 甲酸 2. 苯-醋酸 3. 乙酸乙酯-醋酸-甲醇 4. Na ₃ PO ₄ 的乙醇水溶液	1.5% 9:1 V/V 20:1:1 V/V 0.05 M Na ₃ PO ₄ 于25%乙醇水溶液中
薄板层析	氯仿-乙醇-醋酸 n-丁醇-吡啶-醋酸-水 苯-吡啶-醋酸 氯仿-氯苯-醋酸	38:4:3 30:20:6:24 16:4:1 70:30:3

书号 13012·0625
定价 1.95 元