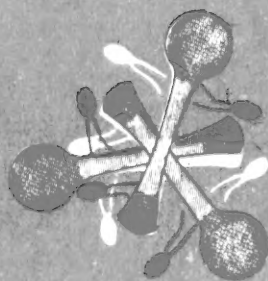


细胞分子生物学

上册

(美) B. 艾伯茨 D. 布雷 J. 刘易斯 著
M. 雷夫 K. 罗伯茨 J. D. 沃森



科学出版社

Digitized by the Internet Archive
in 2011 with funding from
Institute of Botany, CAS and Internet Archive

<http://www.archive.org/details/xibaofenzishengw01baib>



1950

58.159
161

58.157
774

细胞分子生物学

上册

[美] B. 艾伯茨 D. 布雷 J. 刘易斯 著
M. 雷夫 K. 罗伯茨 J.D. 沃森

赵寿元 等 译

王亚辉 等 校



科学出版社

1990

中科院植物所图书馆



S0013736

内 容 简 介

本书是近年来细胞生物学方面的一本巨著,也是一本很好的入门指南。内容概括了1981年前所有细胞生物学和分子生物学领域中的主要成就,以现代生物学的观点介绍了细胞生物学的主要方面,并以较多的篇幅讨论了发生生物学、组织学、免疫生物学和神经生物学。全书分三部分,共十九章,取材严谨,概念清楚,并附有大量精美插图。可供细胞生物学、分子生物学研究和教学工作者,特别是研究生和高年级学生参考,也适于大学低年级学生及自学者阅读。

译本分上下两册出版,上册包括两部分,十三章。

Bruce Alberts·Dennis Bray·Julian Lewis
Marin Raff·Keith Roberts·James D. Watson
MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL
Garland Publishing, Inc., 1983

细胞分子生物学

上 册

[美] B. 艾伯茨 D. 布雷 J. 刘易斯 著
M. 雷夫 K. 罗伯茨 J. D. 沃森

赵寿元等译

王亚辉等校

责任编辑 姜梦兰

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1990年2月第一版 开本:787×1092 1/16
1990年2月第一次印刷 印张:49 1/2 插页:3
印数:0001—1300 字数:1152000

ISBN 7-03-000833-2/Q·130

定价:51.40元

前 言

科学知识的增长是一个悖理。当资料积累到令人眼花缭乱的惊人数量时，杂乱无章的事实和难解的奥秘却能得到合理的解释，从浑沌迷乱中会呈现出简明条理。一门学科的基本原理渐趋清晰。当今的细胞生物学就是这种情况。在分子水平进行分析的新技术，正揭示出活细胞的惊人的精美和经济，以及细胞功能活动原理的令人满意的统一性。本书将讨论这些原理。本书不是一本百科全书，而是一本入门指南。大家都认为细胞生物学仍有广袤的未知领域，很多事实仍有待阐明。但这些尚未解决的问题却是动人心弦的，我们打算提出这些问题，以激励读者参加到揭开奥秘的事业中来。因此，我们不是简单地提出未知领域中互不连贯的事实，而是经常大胆地提出一些假说供读者去思考，并希望加以评论。

《细胞分子生物学》主要讨论真核细胞而不是细菌，书名本身反映了在分子水平上洞察事物的头等重要性。本书的第一部分和第二部分正是从这种观点来分析细胞和概述细胞生物学课程的传统材料。但是分子生物学本身讲得不够充分。构成多细胞动植物的真核细胞是高度社会化的机体，它们的生存依靠合作和分工。想要了解这些细胞怎样发挥功能，必须研究细胞在多细胞集体中的情况，以及单个细胞内部的活动。这是两个截然不同的层次上的研究，但都相互决定着彼此的研究重点和方向。所以我们在本书第三部分讨论了多细胞动植物中细胞的行为。因此，与别的细胞生物学教科书相比，本书以更多的篇幅去讨论发育生物学、组织学、免疫生物学和神经生物学。虽然基础细胞生物学课程对这些材料可以只作为选读教材或补充读物而一笔带过，但这些材料却代表了我们对细胞的了解的主要内容，而且对决定继续攻读生物学或医学的人们来说特别有用。本书广博的内容正是表达了我们的信心，即细胞生物学应是现代生物学教学的中心。

本书主要供初次选修细胞生物学课程的大学生、研究生和医学院学生们阅读。虽然我们假定大部分读者至少已读过生物学引论这类课程，但我们还是力图把本书写成甚至使一个生物学的门外汉从头学起也能跟得上。另一方面，我们也希望对从事研究工作的科学家在浩瀚无垠的知识领域中寻觅前进指南时也有所裨益。为此，我们开列的文献目录远远超过一般大学生的需要，同时还力求挑选在大多数图书馆里都能借到的资料。

本书是部巨著，酝酿准备的时间之长，三倍于母象怀胎的时间，五倍于母鲸怀胎的时间。许多人共襄此事。每一章都经初稿作者和审稿修订者的反复推敲，所以每一章都是许多人的共同作品。此外，有几位未参加写作的局外的专家提供了书面材料，本书作者们对此作了加工润色，以期保持全书的统一风格。本书各章均请专家审阅，他们的评论和改正意见是非常宝贵的。对每一章做出贡献的人们的全部名单附后，谨向他们致谢。Paul R. Burton(堪萨斯大学)，Douglas Chandler(阿利桑那州立大学)，Ursula Goodenough(华盛顿大学)，Robert E. Pollack(哥伦比亚大学)，Robert E. Savage(斯瓦思摩尔学院)和 Charles F. Yocum(密歇根大学)审阅了全部或一部分书稿，提出了许多有益的意见。大学生们也阅读了书稿，有助于我们鉴别哪些章节晦涩难懂。

Miranda Robertson 收集和分析了许多位学生和局外专家们所提的意见和建议。她要求每一页都应该是清晰易懂和前后呼应,凡不符要求的都推倒重写;她对大学生们容易读懂的本书的问世起了很大作用。Lydia Malim 给十五章和十六章画了很多幅图,许多科学家惠赠了照片,他们的名字写在刊出照片的插图中。感谢我们的家庭、同事和学生对我们几年来的苛求和照顾不周持宽容态度,我们谨向他们致歉。最后,我们特别要感谢编辑和出版者。Tony Adams 在更明确地体现本书的内容上起了很大作用,Roth Adams 以使作者感到惭恧的和霭态度和高效率组织了本书的撰写。Gavin Borden 出版了本书,他的慷慨和殷勤使撰写工作进行得很愉快,对我们也颇有教益。

欢迎读者们提出建议和指正。来信请寄:

Gavin Borden, Garland Publishing, Inc.,
136 Madison Avenue, New York NY 10016
转交我们收。

【赵寿元译 王亚辉校】

序 言

目前大家对低估细胞的复杂性过于心安理得了。我们已了解绝大多数生物体的细胞，致使我们在很大程度上已不再去穷究细胞的底蕴。当我们刚学习初步的科学原理时，马上就被告知所有生物都是由细胞构成的，细胞来自已经存在的细胞的生长和分裂，细胞或是单个存在成为单细胞生物，或是成为极复杂的生物体的组成部分，这些生物体有几十亿个相互作用且高度特化的单位。细胞在大小、形状和功能上的多样性，使之得以循着如此迥异的方向去进化。

只按细胞的不同名称和独特性质来分类是很少引人入胜的。但当我们第一次用简易的中学显微镜去观察生活在池塘水滴中的单细胞生物如变形虫或草履虫时，教科书中枯燥乏味的事实就有了新的意义。那时，细胞是一个令人惊异的、活生生的运动着的生物体，人们很自然地会想知道它是由什么样的分子所构成，它怎能如此有规律地生长和分裂以产生更多的同类。可是在 20 世纪 50 年代以前，这个问题似乎超越了科学家力所能及的范围。那时除了用愈来愈好的显微镜去发现愈来愈多的细胞结构、集中于描述性的形态学研究外，别无其他选择。我们常给细胞的结构取一些富有想像力的名称，例如动质或线粒体，却不了解为什么在那个地方会有这些结构以及它们是如何发挥功能的。毫不奇怪，许多人发觉这种研究方法难如人意，因而从研究细胞本身转向揭示作为其基础的日益经得起逻辑分析的化学反应。

这批从“生物学家转来的生物化学家”立刻发现细胞怎样利用食物分子中的能量去构建新的生物学分子，进而发现细胞如何能生长和分裂而不违背热力学的名言：所有的化学反应必定趋向最大限度地生成热和无序。这一重大成就极大地鼓舞了越来越多的科学家，他们认为细胞的本质全在于细胞的分子结构和分子降解或生成的酶反应路线。可是仍不能确定基因在这幅化学图景中所处的位置，特别是在把构成一个典型的蛋白质分子的几百个氨基酸正确地连接起来时基因是否直接起作用。直到 20 世纪 40 年代，在概念上还全然不清楚这是怎么发生的，而且也没有人料到在 1953 年到 1966 年间竟会以无比迅速的步伐研究出遗传信息的性质和传递。于是由于如此清楚地确定了 DNA 的主宰作用，诱使人们认为了解了核酸也就了解了生命状态的本质，而且认为已战胜了生物学所面临的最大的挑战。

这种看法我们不能苟同。ATP 和 DNA 之间的相互联系途径不管有多么奇妙，也不可能产生出活细胞。哪怕是一个最简单的细胞，也是一个比通常所能想像得到的远为复杂的客体，比任何一台迄今设计出的计算机控制的智能机远为精巧。简单的观察就能强有力地指出这一点。我们不一定非得透过细胞的外表来观察，就能认识到使细胞能以如此合理的方式进行活动的生物学结构必定是无比微妙而灵活的。

例如，随同成纤维细胞的移动，细胞的形状发生极复杂的变化。这些结缔组织细胞是帮助粘合多细胞机体组织的细胞外基质的主要制造者。动物体内，成纤维细胞必定时刻准备移入新形成组织的地点。成纤维细胞从动物体内取出后在体外培养，就能用显微镜进行

分析；缩时电影分析已广泛地记录了随同它们从一处到另一处的移动而出现的形态上的变化。

分离出来而营养良好的单个成纤维细胞因而被发现是不知休息的、显然是不知满足的细胞，它们无法安静地呆着，而是内在注定要移动的细胞。成纤维细胞及其所有后代会不断地移动和生长，直到塑料培养皿的底面铺满了一层紧挨着的细胞。运动中的成纤维细胞很像伸展着伪足的变形虫，我们早在初中科学课上就观察到这种情况，但它们各自运动的细节则并不相同。

成纤维细胞的移动是由快速而实际上是狂乱地伸出丝状延伸物(微突)和层状突起(层足)所发动的。每一个突起物都能牢固地附着在它前面的培养皿表面上。这样的附着导致细胞的细胞质及其被包围的细胞核朝前流动。被推动前进的突起物远远多于牢固附着的突起物。那些不能附着的突起物则像“皱褶”一样被上层的细胞表面扫向后面，最后被送到细胞的后部。因此，有大量可供附着的点，但只牢固地结合在最合适的位置上。

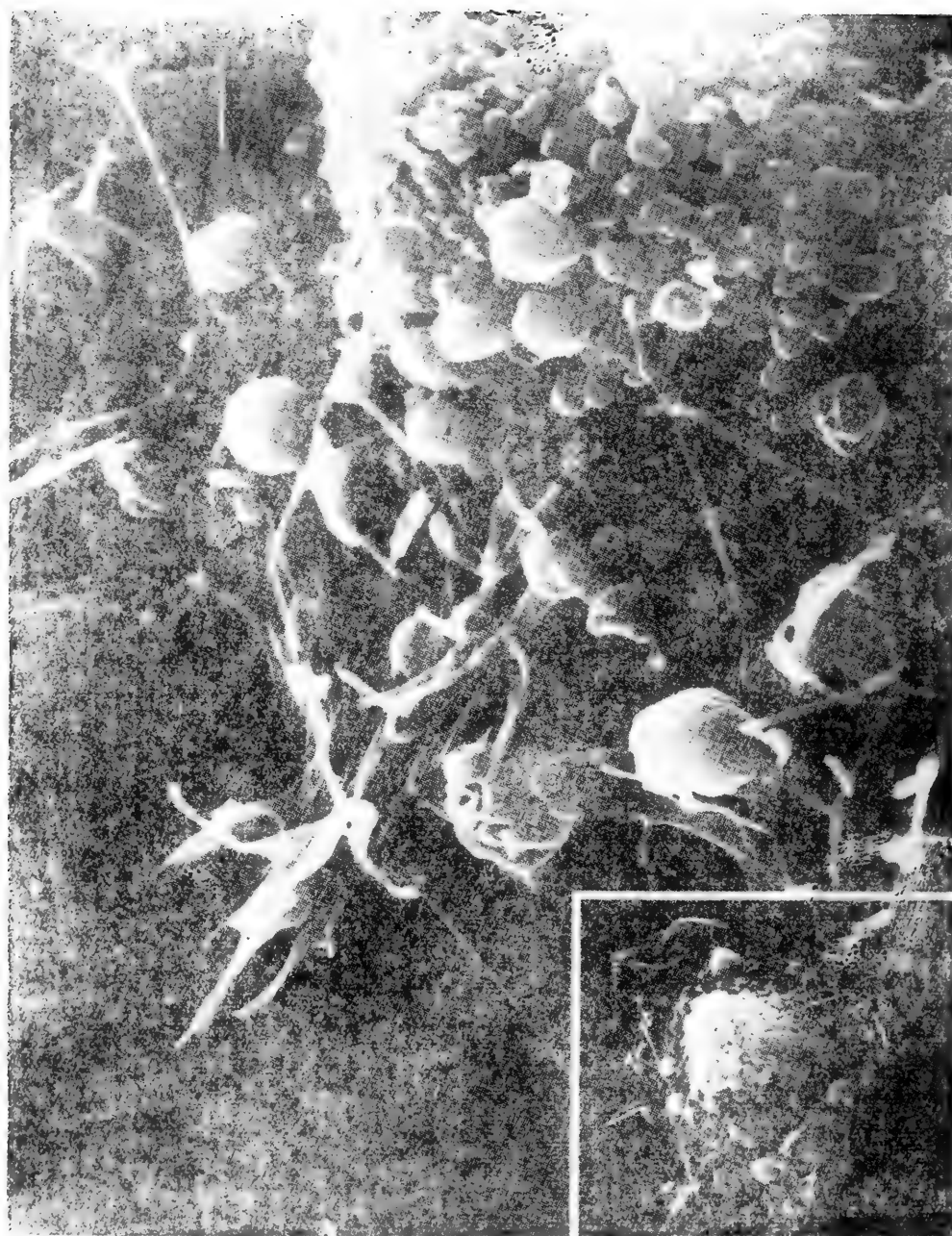
成纤维细胞长期持续的单独移动的能力并非所有细胞的共性。例如，肠壁或皮肤中的单个上皮细胞在体外培养时，它们没有移动的趋向。因此，特定类型细胞的运动行为好像是注定的，而且实际上如同所有其他重要的细胞事件一样，很难说是机遇决定的。结果是在多细胞生物体内，一个细胞最后所处的精确位置是由无数个调控得很好的生化步骤所规定的，这些生化步骤有效地使细胞只能按特定的构型与别的细胞和谐协调地结合，而别无其他选择。

想要了解这些合乎逻辑的步骤是如何逐渐展开的，我们显然必须探究在细胞表面掩盖下所发生的一切。令人欣慰的是我们现在已拥有尖端的显微镜术、生物化学和遗传工程等方法，使我们实际上有同等成功的机会去研究细胞的几乎所有的复杂情况。我们已经发现看似无定形的细胞质物质内，含有由特定的纤维状蛋白聚集成成的交织图型。这些由更小的亚基蛋白质分子构成的丝状结构，被装配成精细的骨架和指导细胞运动的分子机器。

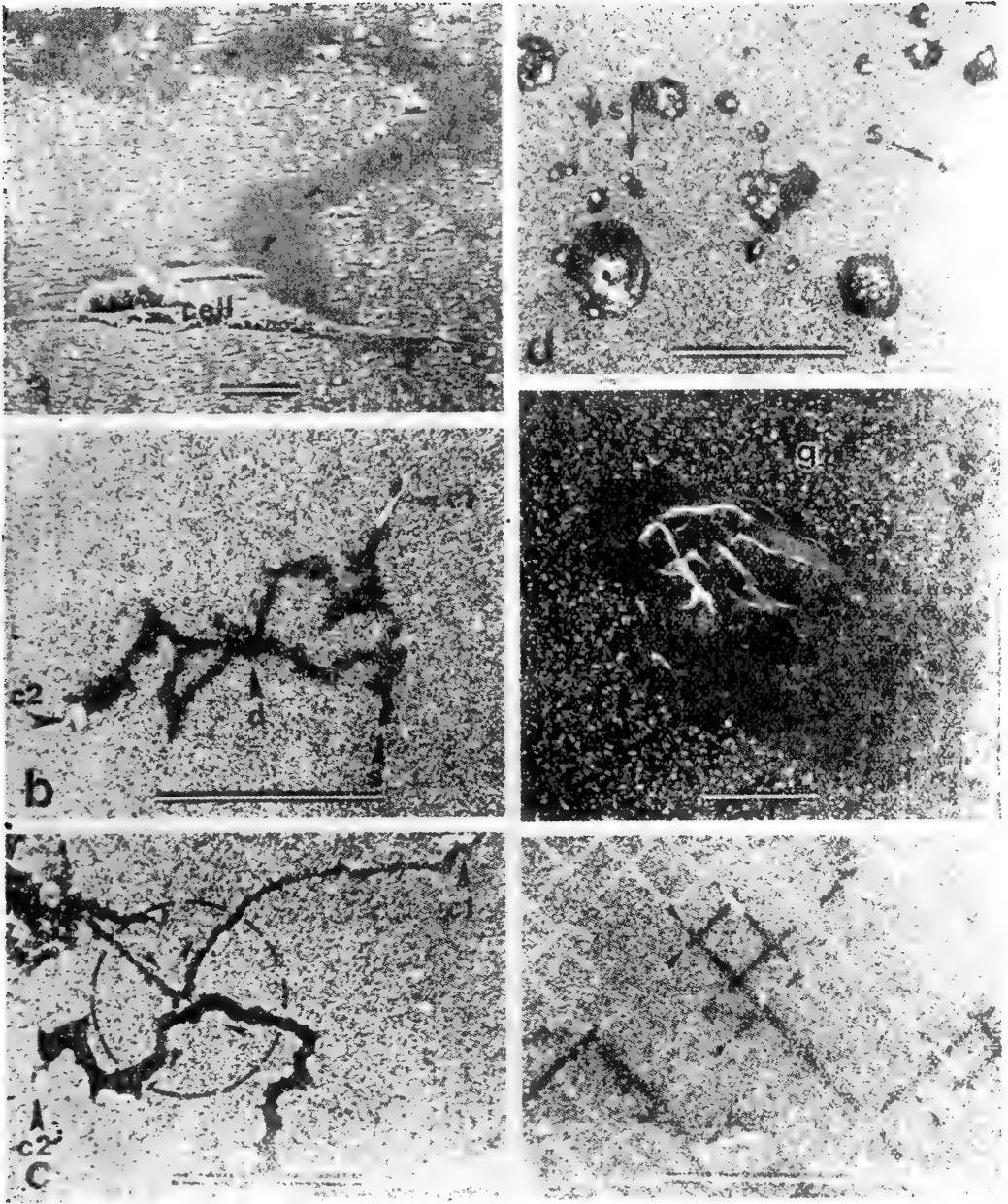
本书将逐步深入地谈到如何通过复杂分子之间特定的相互作用，来构建和维持各种各样的细胞结构成分。我们还将粗略地勾划出这些细胞结构成分如何使细胞得以生长和分裂，如何使细胞的结构出现我们称之为细胞运动和分化的那种变态，正是这种变态使细胞参与了多细胞生物体的构建。我们也希望能表达出笼罩在至今我们还不知该如何着手的许多问题上的神秘之谜，表达出由于当前细胞生物学取得巨大成就而带来的欢欣鼓舞的心情，最后的但并非无关紧要的是希望表达出细胞的美，这是逻辑的美，也是视觉的美。



相差显微镜下观察到的小鼠成纤维细胞(3T3 细胞)的运动行为。(左图)当细胞平铺在表面上时,朝外伸出针状微突和片状层足以寻找合适的附着位置。层足间歇地朝后卷缩(“皱褶”),然后再伸出。(中图)成纤维细胞平展后,以层足为前导采取一种有极性的形状,开始沿着培养皿表面匍伏爬行。在这四张连续的显微照片中,我们可看到行进方向来了个突然改变。(右图)在进行有丝分裂时,一个平展的细胞在形成有丝分裂纺锤体之前收缩集拢;两个子细胞在分离后又重新采取平展的位置。每一组连续拍摄的显微照片是按自上至下的次序排列。(Guenter Albrecht-Buchler 赠)

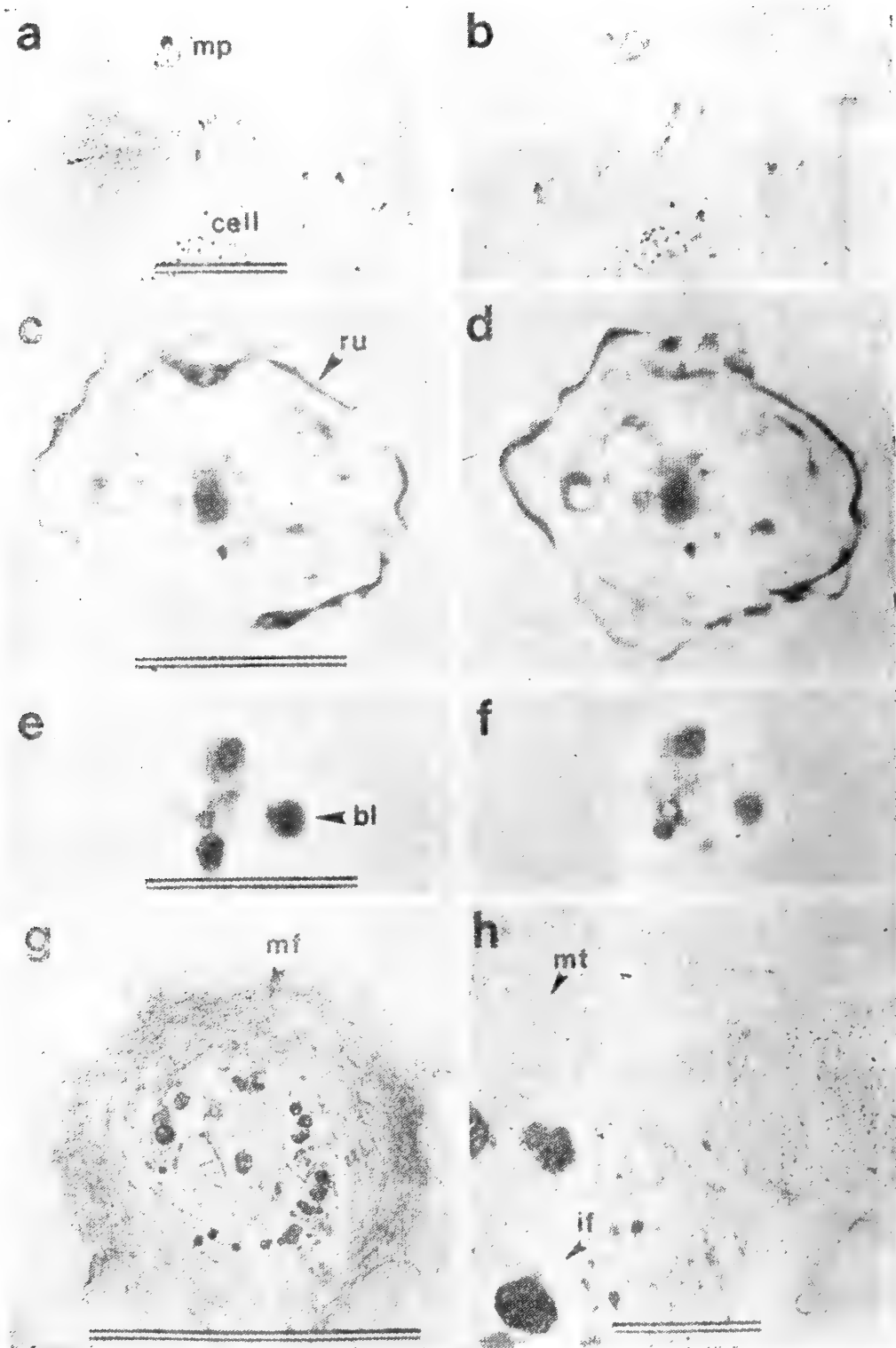


小鼠成纤维细胞在平展过程中一部分表面的扫描电镜照片。在皱褶周缘朝外伸出微突和层足，同时从位于中央的细胞核的上方伸出大量半球状突起(“小泡”)。方框内是整个细胞的低倍照片，细胞直径约为 $25\ \mu\text{m}$ 。(Guenter Albercht-Buchler 赠)



当细胞在涂有一层极细的金粒的表面上移动时，可看出细胞迁移的路线。伸展的微突和层足捡起稀疏的金粒，往后带到细胞体上，从而在该处吞入细胞(吞噬作用)。这样，使细胞经过的地方变得很干净。在暗视野照明下，移动的径迹呈黑色，而充满金粒的细胞闪闪发光。(Guenter Albercht-Buchler 赠;从 *J. Natl. Cancer Inst. Monograph* 60,1982 复制)

(a) 径迹的扫描电镜照片，图示底层上有许多极细的金粒、细胞，以及留在细胞(箭头所示)后面的没有金粒的径迹。线段表示 $20\ \mu\text{m}$ 。(b) 母本 3T3 小鼠细胞的分支径迹的暗视野显微镜照片，该细胞从“s”处出发，在“d”处分成二条相似的径迹，这是姐妹细胞“c1”和“c2”的径迹。线段表示 $500\ \mu\text{m}$ 。(c) 两个 3T3 小鼠细胞(c1 和 c2)间的碰撞。在圆圈里两个细胞彼此弹开，像是碰撞的弹子球。线段表示 $500\ \mu\text{m}$ 。(d, e) 暗视野光学显微镜照片(d)和扫描电镜照片(e)示迁移中的 PTK1(麟)细胞群(g)、(d)中的“s”指的是很少移动的单细胞。线段表示 $500\ \mu\text{m}$ (d)和 $50\ \mu\text{m}$ (e)。(f)在有指引线(白线)的方格盘上被引导的 3T3 细胞的径迹(发亮的白色结构)。细胞沿着这些线条，但在交叉处探索可任意选择的方向，这就是在径迹的交叉点上倾斜的小“刺”(箭头指的是几个小“刺”)。线段表示 $500\ \mu\text{m}$ 。



细胞接触了细胞骨架破坏剂——细胞松弛素 B 后，常产生极小的能自主移动的细胞碎片(微质体, microplast)。它们虽然没有细胞核却能平展,生成皱褶和泡,表明它们具有有结构的、有功能的细胞骨架成分。(Guenter Albrecht-Buchler 赠;复制自 *J. Natl. Cancer Inst. Monograph* 60, 1982)

(a,b) 在平展的人体细胞(cell)边缘附近的一个皱褶的微质体(mp), 比较两者之大小。线段表示 $20\ \mu\text{m}$ 。两张照片拍摄时间相隔 35 秒钟, 表示它们的运动。(c,d) 相隔 15 秒钟拍摄的有皱褶的微质体的两张照片。其中的一个皱褶用“ru”指明。线段表示 $10\ \mu\text{m}$ 。(e,f) 有泡的微质体的相隔 10 秒钟拍摄的两张照片。其中一个泡用“bl”指明。线段表示 $10\ \mu\text{m}$ 。(g,h) 与微质体所处表面相平行的微质体切片的电镜照片。可看到周缘含肌动蛋白的微丝(mf)、微管(mt)和中等纤维(if)。线段表示 $10\ \mu\text{m}$ (g) 和 $1\ \mu\text{m}$ (h)。

致 读 者

虽然本书各章均可单独成篇，但仍按其逻辑顺序分为三个部分。第一部分的前三章讨论了基本原理和基础生物化学，既可作为未学过生化的人们的入门，也可作为已学过生化的人们的复习课程。第一部分的结尾第四章，讨论了研究细胞的主要实验方法的原理。这一章对于理解以后各章并不是必要的，但读者会发现它很有参考价值。

第二部分是细胞生物学的核心，主要讨论绝大多数真核细胞共有的属性。这一部分从第五章开始。第五章讨论遗传的基本的分子机制，即 DNA 的复制和维持，以及它的线性顺序翻译成蛋白质中氨基酸的线性顺序。但染色体结构的细节以及有关真核细胞基因表达的调控细节等，留在第八章（“细胞核”）中讨论。第六章和第七章专致于细胞的各种膜系统，以及与膜相关的功能。第九章讨论供给细胞以能量的线粒体和叶绿体。第十章则讨论细胞骨架和细胞运动，第十一章是讨论细胞生长和分裂的机制。第二部分最后两章讨论细胞相互作用的途径：第十二章讨论细胞间的粘附和细胞外基质，第十三章则讨论细胞间的化学信号。

第三部分是追踪细胞在构建多细胞生物体中的行为，从精、卵形成，通过受精、胚胎发育（第十四和第十五章）到成熟动物分化组织的生成（第十六章）。第十七和十八章分别详细地讨论了免疫系统和神经系统的细胞，这不仅因为这些细胞为细胞集合体能够完成最复杂、最奇妙的任务提供了实例，而且因为对细胞行为的了解很多来自对这些系统所作的研究。最后，第十九章讨论了植物细胞的极有魅力的特性。

细胞生物学的进展在很大程度上取决于实验方法的进展。第四章里有几张表列出了重大发展的资料及有关科学家的名字。本书的宗旨是在别处不再指名道姓地提到科学家，但在每章后面的参考文献目录中，通常可以查到重要发现的作者姓名。这些文献包括第一次报道重大发现的原始论文。许多标题上的角注数字是文献目录中引用次序的号码，循此可方便地查阅专题。

【赵寿元译 王亚辉校】



目 录

前言
序言
致读者

I 细胞概述

第一章 细胞进化	(3)
从分子到第一个细胞.....	(3)
从原核生物到真核生物.....	(11)
从单细胞到多细胞生物.....	(28)
第二章 小分子、能量和生物合成	(42)
细胞的化学组分.....	(42)
生物的有序和能量.....	(57)
食物与细胞能量的获得.....	(67)
生物合成与有序的产生.....	(74)
分解代谢和生物合成的相互协作.....	(82)
第三章 大分子：结构、形状和信息	(91)
分子的识别过程.....	(91)
核酸.....	(98)
蛋白质结构.....	(109)
蛋白质的功能.....	(130)
第四章 如何研究细胞	(143)
显微镜检术.....	(143)
细胞培养.....	(160)
细胞及其成分的分级分离.....	(164)
用放射性同位素和抗体示踪细胞的分子.....	(176)
重组 DNA 技术.....	(181)

II 细胞的分子结构

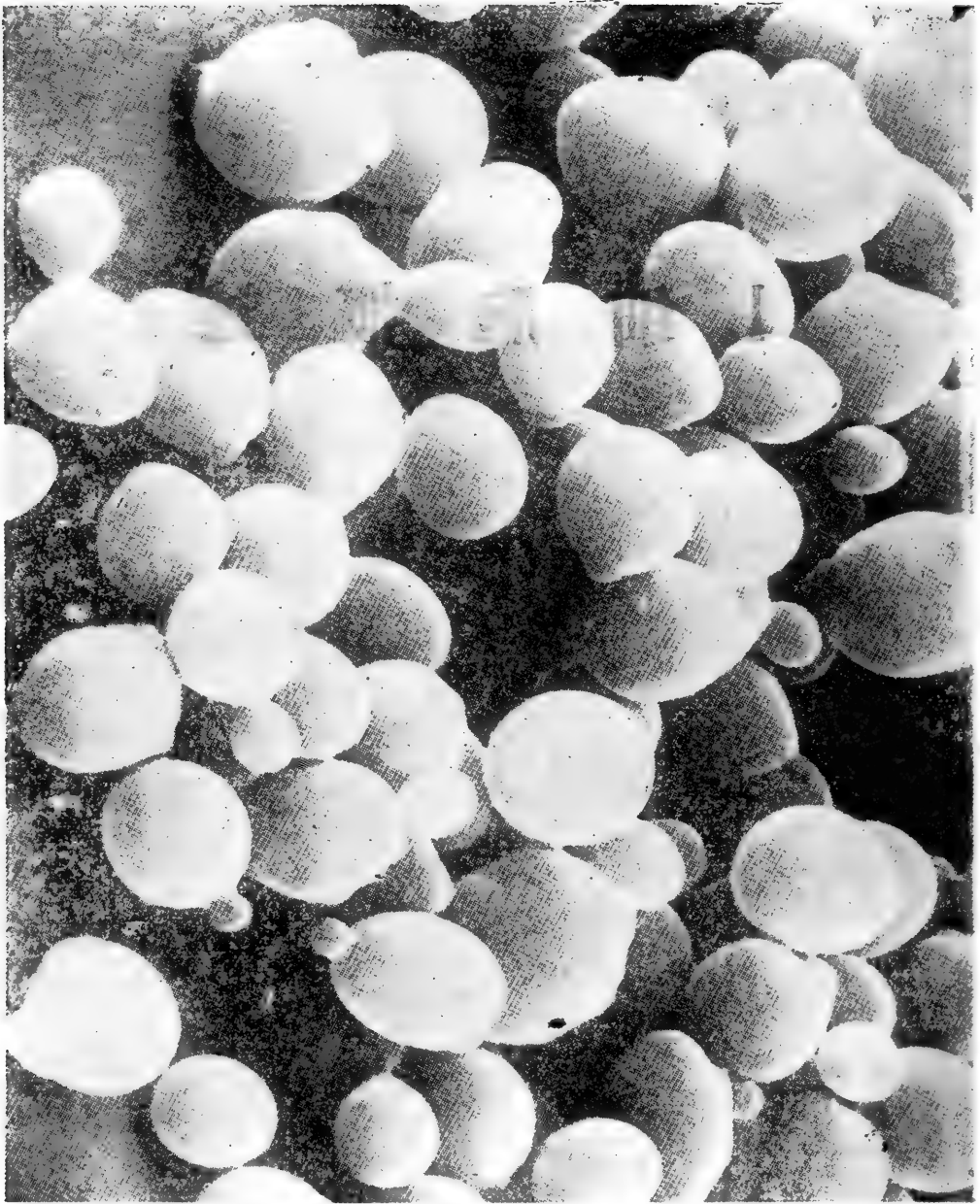
第五章 基本的遗传机理	(193)
蛋白质合成.....	(193)
DNA 修复机理.....	(206)
DNA 复制机理.....	(215)
病毒.....	(227)
遗传重组机理.....	(235)

第六章 质膜	(247)
脂双层.....	(247)
膜蛋白.....	(256)
膜的碳水化合物.....	(275)
小分子的跨膜转运.....	(277)
大分子和颗粒物质的跨膜转运: 内吞和外排.....	(292)
第七章 细胞内膜及生物大分子合成	(307)
高等细胞结构的区室化.....	(307)
胞液.....	(312)
内质网.....	(322)
高尔基器.....	(340)
溶酶体与过氧化物酶体.....	(352)
双膜细胞器: 细胞核、线粒体及叶绿体.....	(361)
第八章 细胞核	(365)
DNA 组成染色体的过程.....	(366)
RNA 合成及其加工.....	(388)
核被膜.....	(411)
控制基因表达的基本因素.....	(419)
基因调节机制与细胞“记忆”.....	(440)
DNA 序列的组织与进化.....	(452)
第九章 能量的转化: 线粒体和叶绿体	(463)
线粒体.....	(464)
呼吸链.....	(480)
叶绿体.....	(491)
电子传递链的演化.....	(504)
线粒体和叶绿体的生物发生.....	(508)
第十章 细胞骨架	(526)
肌肉收缩.....	(526)
纤毛运动.....	(540)
作为动态装配物的微管和肌动蛋白丝的一般特征.....	(549)
微管组织中心和微管相关蛋白.....	(558)
非肌肉细胞中的肌动蛋白丝和结合肌动蛋白的蛋白质.....	(562)
中等纤维.....	(575)
细胞骨架的组织结构.....	(579)
第十一章 细胞生长和分裂	(591)
细胞分裂的控制.....	(591)
肿瘤病毒作为研究细胞周期控制的工具.....	(601)
S 期中的事件.....	(609)
细胞周期的逻辑性.....	(620)

细胞分裂.....	(627)
第十二章 细胞间的粘连和细胞外基质.....	(650)
细胞间识别和细胞粘连.....	(650)
细胞连接.....	(659)
细胞外基质.....	(670)
第十三章 细胞之间的化学信号发放.....	(693)
三种不同的化学信号发放策略: 局部的化学介导因子、激素和神经递质.....	(694)
细胞内受体所介导的信号发放: 甾体激素的作用机制.....	(704)
细胞表面受体介导的信号发放: 作为第二信使的 cAMP 和钙离子.....	(708)
作为第二信使的 cAMP 和钙离子的作用方式.....	(718)
靶细胞的适应.....	(728)
参考文献.....	(738)



I 细胞概述



生长中的酵母细胞的扫描电镜照片。这些单细胞真核生物增殖时芽出小的子细胞。
(Ira Herskowitz 和 Eric Schabatach 赠)

第一章 细胞进化

所有生物都由细胞构成,细胞是以膜为界的小室,充满着浓的化学溶液。最简单的生命形式是单个细胞,以一分为二的方式增殖。诸如人那样的高等生物像座细胞城,一群群细胞行使着各种特定的功能,通过错综复杂的通讯系统相互联系。从某种意义上讲,细胞介于分子和人之间。我们研究细胞的目的,一方面要搞清楚它们怎样由分子构成,另一方面要搞清楚它们怎样通力合作构成像人那样复杂的生物体。

大家都相信,所有的生物体以及构成生物体的所有细胞都是通过进化从一个共同的祖先细胞传下来的。进化包括两个基本过程:(1)遗传信息发生随机变异,从一个个体传至其后裔;(2)遗传信息的选择,以助遗传信息载体的生存和增殖。进化是生物学的中心法则,有助于我们弄懂生物界中令人迷惑的变异。

本章与全书一样,讨论从分子到多细胞生物体的进程。它讨论细胞的进化,细胞首先作为由更小的部分构成的生命单位,然后作为更大结构的构成单位。通过进化的讨论,初步介绍细胞组分和细胞活性,详细内容在以后各章按大体相同的顺序进行讨论。我们从地球上第一个细胞的起源开始,讨论某些类型大分子的特性如何使遗传信息得以传递和表达,如何使进化得以发生。包在膜内的这些分子为自我复制的细胞提供必需品。然后讨论从小的类菌细胞到当今更大、更复杂的动植物细胞的进化过程中发生的主要变迁。最后,提出独立生存的单个细胞可能形成大的多细胞生物体的途径,这些单个细胞在形成像脑那样复杂器官时如何变成特化的和通力协作的细胞。

探讨进化显然有各种危险:我们知识中的大片空白只能靠猜测来弥补,而猜测在许多细节上很可能是错误的。但是,从化石以及从当今生物体和分子的比较研究使我们有足够的证据对生命进化的主要阶段作出明智的猜测。

从分子到第一个细胞¹

在生命出现前的条件下可形成简单的生物分子

对地球形成的最初十亿年内地球上的情况,目前仍有争论。地球表面最初是否处于熔融状态?大气是否含氨或甲烷?然而,看来大家都认为地球到处有火山喷发、闪电和暴雨。即便有游离氧那也是微乎其微,根本没有臭氧层吸收来自太阳的强烈的紫外线辐射。

简单的有机分子(即含碳分子)可能就是在这样的条件下产生的。最可靠的证据来自实验室的实验。如果诸如 CO_2 、 CH_4 、 NH_3 和 H_2 的混合气体与水一起加热,由放电或紫外线辐射提供能量,则它们便起反应,形成小的有机分子——通常种类甚少,但每类数量颇大(图 1-1)。在这些产物中,有若干种化合物如氢化氰($\text{H}-\text{C}\equiv\text{N}$)和甲醛

$\left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagdown \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}\right)$, 易在水溶液内进行进一步反应(图 1-2)。最重要的是产生了细胞内发现

的四大类小有机分子——氨基酸、核苷酸、糖和脂肪酸。

尽管这些实验还不能精确地重演地球上的早期条件，但却简单明了地阐明有机分子的形成是轻而易举的。当然，演化中的地球远远胜过任何实验者；地球很大，能产生各种各样条件。最主要的是它历史悠久——已有几亿年。在这样的环境中，当代细胞内发现的许多简单有机分子，看来当时很可能曾在某个时刻和某个地点高浓度地积累着。

多核苷酸能指导自身合成

诸如氨基酸和核苷酸那样的简单有机分子能结合形成大的多聚体。一个氨基酸能与另一个氨基酸连接，形成一个肽键，而两个核苷酸能通过磷酸二酯键相连。这些反应重复进行，分别形成多肽和多核苷酸等线性多聚体。在现在的生物体中，通常把多肽(称为蛋白质)和多核苷酸(核糖核酸 [RNA] 及脱氧核糖核酸 [DNA] 两种形式)看作最重要的组成。20 种氨基酸构成蛋白质的共同的构造单位，RNA 和 DNA 分子则各由 4 种核苷酸构成。生物合成为什么选的是这些单体而不是化学上相似的其它单体，对此人们只能猜测。

最早的多聚体可能有几种形成方法——例如，加热干的有机化合物，或高浓度无机多磷酸盐的催化。试管中的相似反应的产物是长度不等和顺序随机的多聚体，在什么位置上加上氨基酸或核苷酸主要靠机会(图 1-3)。然而，多聚体一旦形成便影响其它多聚体的形成。尤其是充当聚合反应模板的多核苷酸能确定新多核苷酸中核苷酸的顺序。例如，由

一种核苷酸组成的多聚体(多尿苷酸，即 poly U) 能充当模板，去合成另一种核苷酸组成的第二种多聚体(多腺苷酸，即 poly A)。这种模板作用取决于一种多聚体优先与另一种多聚体结合。只要使制造 poly A 所需的亚基排列在 poly U 的表面，poly U 便启动 poly A 的形成(图 1-4)。

互补核苷酸之间的专一配对，很可能在生命起源中起关键作用。例如，像 RNA 那样的多核苷酸是由 4 种核苷酸包含碱基尿嘧啶(U)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)和鸟嘧啶(G)构成的链。因为碱基 A 与 U 之间和碱基 G 与 C 之间互补配对，所以在有利于聚合的条件下，当 RNA 溶液内加进活化的核苷酸混合物时，便产生新的 RNA 分子，其中核苷酸连接的顺序同原来的 RNA 核苷酸顺序互补。也就是说，新分子很像原来分子的模压制品，原来分子中的每一个 A 与拷贝分子中每一个 U 相对应，等等。原来 RNA 链的核苷酸顺序所包含的信息基本上保存在新形成的互补链中。第二轮拷贝以互补链为模板，恢复原来的顺序(图 1-5)。

这类互补模板机制十分简单，并在生物系统的信息传递过程中起主导作用。每个细胞所含的遗传信息编码在它的多核苷酸分子的核苷酸顺序之中，这种信息依靠互补的碱基配对作用而代代相传。

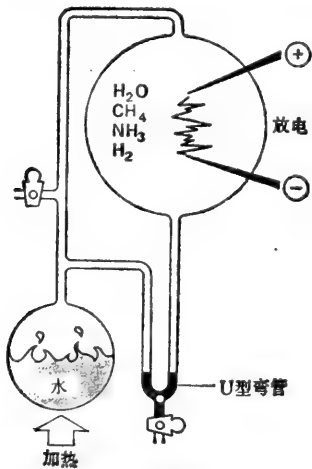


图 1-1 模拟原始地球条件的典型实验。给盛在含 CH₄、NH₃ 和 H₂ 的密闭容器内的水加热，并在汽化的混合物中放电。有机化合物累积在 U 型弯管内。

在试管里快速形成多核苷酸需要有特定的蛋白质催化剂，即酶，在“生命出现前的汤”里没有酶。但无机物形式或金属离子形式的效率较差的催化剂却早就存在；总之，催化剂只不过是加速只要时间充裕总能发生的那些反应。因为在地球出现生命以前的条件下，时间和化学反应的核苷酸前体的供应都很充裕，所以很可能逐渐建立了多核苷酸的慢复制系统。

自我复制分子经受自然选择

在有利的条件下，核苷酸丰富的汤里的多核苷酸分子能进行增殖，每一份原来的多核苷酸分子作为新拷贝的亲本。但在拷贝过程中特别是在原始条件下，不可避免地会发生许多差错。原始多核苷酸的不完善的新拷贝也就传下来了。于是，原始多核苷酸分子中的核苷酸顺序不断改变，直到它一度代表的信息完全丧失为止(图1-6)。

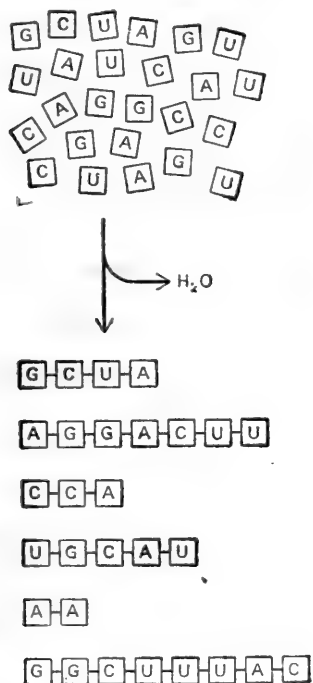


图1-3 4种核苷酸(图中用字母A、U、G和C代表)可自发地进行脱水聚合。产物是长度和顺序都是随机的多核苷酸混合物。

通过复制过程传递；它有一种独特的折叠结构，决定它如何发挥功能和应答外界条件。这两个特性——一个是信息方面的，一个是结构方面的——是发生进化所需的两个基本要

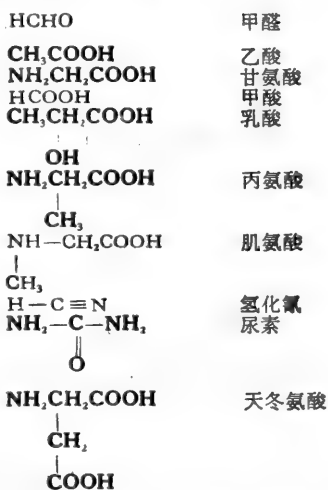


图1-2 图1-1所示实验可能发现的一些化合物。黑体表示的化合物是当今活细胞的重要组分。

但是，多核苷酸不仅是以抽象的方式携带信息的一串符号。它们具有影响它们行为的化学个性。核苷酸的特定顺序赋予整个分子以一系列特性，特别是在溶液里如何折叠。如同多核苷酸中的核苷酸能同环境中的游离核苷酸配对形成新的多聚体一样，它们也能同多聚体本身内部的互补核苷酸残基配对。多核苷酸链一部分顺序 GGGG 能与同一分子另一区的 CCCC 顺序牢固结合。由此产生各种各样的三维折叠，整个分子所取的独特形状完全取决于它的核苷酸顺序(图1-7)。

多核苷酸三维折叠结构既影响其稳定性，又影响其复制的能力，所以复制混合物中各种形状的多核苷酸并不是都能复制的。有的太长，有的折叠得太紧，不能作为有效的模板。另一些在一般条件下可能不稳定。事实上，实验室研究表明，RNA分子的复制经受了一种方式的自然选择，各种不同的有利顺序最后能否占优势，完全取决于当时所处的条件。

所以，像RNA分子那样的多核苷酸有两个重要特性：它携带信息，编码在核苷酸顺序之中，

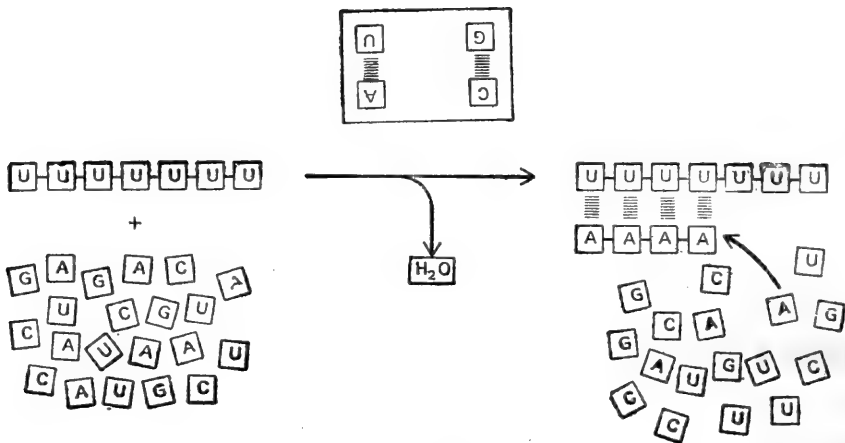


图 1-4 核苷酸对之间(C 和 G, A 和 U)通过相当弱的化学键而优先结合(上图)。这种配对作用使一个多核苷酸充当合成另一个多核苷酸的模板。

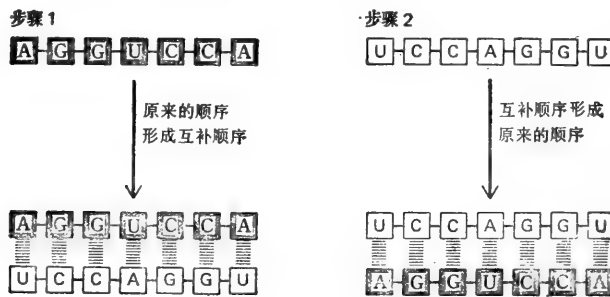


图 1-5 多核苷酸顺序的复制(图示 RNA 分子)。步骤 1, 原来的 RNA 分子充当模板, 形成互补顺序的 RNA 分子。步骤 2, 这一互补的 RNA 分子本身充当模板, 形成原来顺序的 RNA 分子。因为每一模板分子能产生许多互补链拷贝, 所以这些反应结果使原来的顺序“增殖”。

素。RNA 分子的核苷酸顺序类似于生物体的遗传信息, 即基因型。折叠的三维结构类似于表现型——遗传信息表达, 它是自然选择作用的对象。

信息从多核苷酸流往多肽

所以人们提出, 大约 35 亿至 40 亿年前, 在地球的某些地方, 多核苷酸的自体复制系统开始了进化过程。不同核苷酸顺序的多聚体竞争可用的前体物质以构成自己的拷贝, 如同现在的生物竞争一样; 胜败取决于制造拷贝的准确性和速度, 也取决于这些拷贝的稳定性。

然而, 尽管多核苷酸的结构很适宜于信息的贮存和复制, 但是这些分子不够多样化, 不足以为活细胞提供结构和功能的所有构建单位。另一方面, 多肽由许多种不同的氨基酸组成, 它们的多种多样的三维形式常带有许多个反应部位, 使它们非常适宜于执行各种各样的结构和化学的任务, 详细内容在第三章讨论。甚至通过生命出现前的合成机构所产生的随机的氨基酸多聚体, 可能已有催化特性, 有些多聚体能加强 RNA 分子的复制。

所以,有几类多肽对复制系统极为有用,特别是它们如能被剪裁。有助于指导特定的多肽在它们的环境中合成的多核苷酸,在进化的生存斗争中可能已取得巨大优势(图 1-8)。

但是,多核苷酸如何发挥这样的控制作用呢?编码在它们顺序中的信息如何确定不同类型的多聚体的顺序呢?在当今的生物体内,RNA 指导多肽的合成——蛋白质合成,但这是需要十分精致的生化机构的过程。一种 RNA 分子携带着特定多肽的遗传信息,而一套别的 RNA 分子与氨基酸结合;这两种 RNA 分子相互形成互补碱基对,使信息 RNA 分子中的核苷酸顺序能指导特定的氨基酸整合进延伸的多肽链中。新蛋白质的装配发生在核糖体的表面,核糖体是一些复杂的颗粒,由几个大 RNA 分子和 50 多种不同的蛋白质组成。虽然难题逐个地被解开,但进化过程中如何产生这么复杂的机制,至今仍然是个谜。最有魅力的证据来源之一是遗传“词典”,或遗传密码,核苷酸三联体通过遗传密码转译成氨基酸。因为所有生物体内的密码基本相同,它必然在进化的很早阶段就已固定,它可能含有能获得原始转译的一种方法的痕迹。

不管进化的最初步骤是怎么样的,只要 RNA 分子一旦能指导蛋白质合成,它们就有潜力安排一个规模庞大的化学工具车间。现在原则上已能合成催化各种化学反应的酶,包括催化越来越多的蛋白质和 RNA 分子的合成。一旦核酸的进化发展到它们所确定的酶能帮助制造它们自身时,复杂系统的增殖将大大地加速。在当今某些细菌病毒的生活周期中,就可看到这种自动催化过程的潜在的爆发性:病毒进入细菌后,指导蛋白质合成,蛋白质选择性地催化病毒复制,以致在短时间内病毒便占据整个细胞(图 1-9 和 1-10)。

膜确定了第一个细胞

核酸控制蛋白质合成,无疑是导致第一个细胞形成的关键事件之一。另一个关键事件必定是外膜的建立。某种 RNA 控制下合成的蛋白质除非仍留在 RNA 附近,否则不一定有利于这种 RNA 的增殖;而且只要这些蛋白质在复制 RNA 分子群体间自由扩散,它们同样有益于可能存在的任何参加竞争的 RNA。如果出现一种 RNA 变种能制造更好的酶,在 RNA 变种与其他 RNA 的竞争中,这种新酶并不能选择性地只对 RNA 变种的生存作出贡献。直到某种形式的区室进化到能包含 RNA 分子制造的蛋白质,从而使这些蛋白质主要限于 RNA 自用,才能开始按照 RNA 所产生的蛋白质的性质来

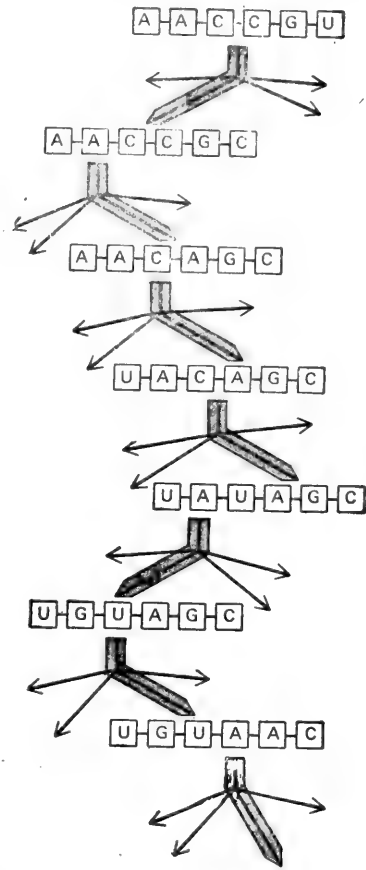


图 16 复制差错能使 RNA 分子的顺序发生变化。图中用粗箭头示踪一个“谱系”,表明 RNA 顺序 AACCGU 如何通过一系列拷贝差错逐步改变成 UGCAAC。同时还产生许多其他顺序,如多个箭头所示。

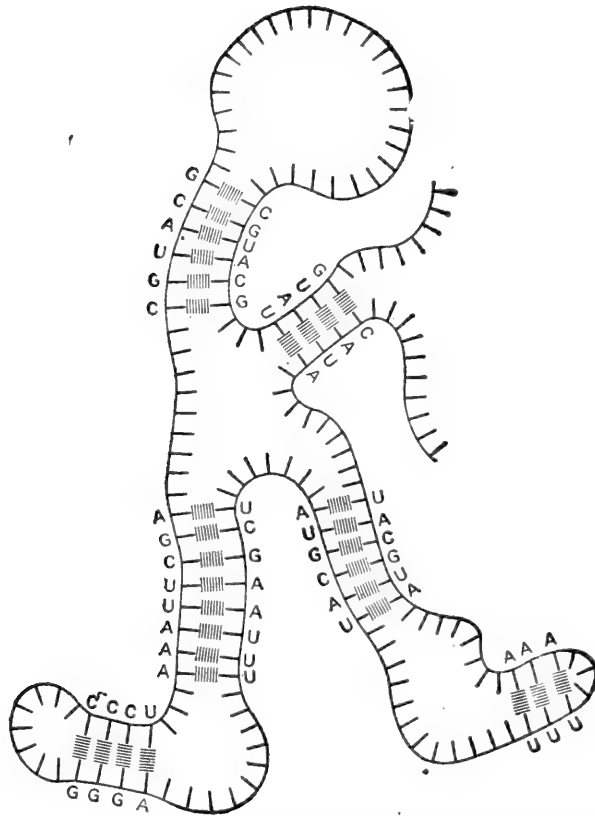


图 1-7 同一条多核苷酸(RNA)链的不同区域间的核苷酸配对,使分子取不同形状。

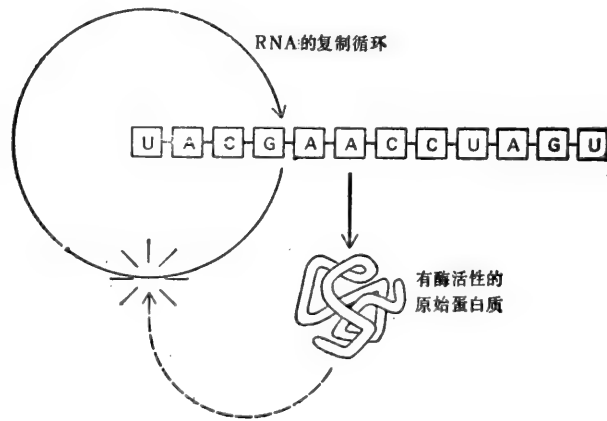


图 1-8 蛋白质能充当有效的化学反应催化剂,如形成核苷酸或使核苷酸聚合成 RNA。所以,能指导适当的蛋白质合成的 RNA 分子能加速其自身的复制,如图所示。

选择 RNA 分子(图 1-11)。

现在的细胞都包着一层质膜,质膜由磷酸酯和蛋白质组成。在电镜下观察,质膜像约

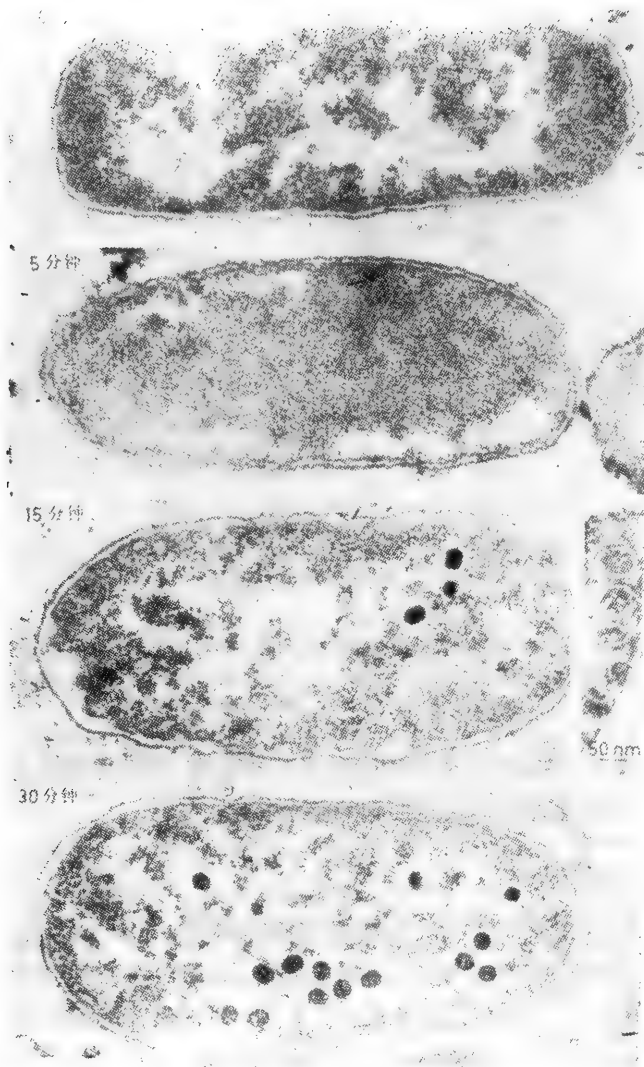


图 1-9 显示病毒在细菌内生长的一系列电镜照片。当病毒吸附在细菌外表面(也可见图 1-10)和把 DNA 注入细菌细胞时,感染便开始了。5 分钟内病毒已指导一套特定的蛋白质合成,有些蛋白质使寄主细菌的 DNA 降解,有些蛋白质则催化病毒 DNA 复制。感染 15 分钟后细胞内所见的致密颗粒是未成熟的病毒颗粒,病毒 DNA 装进了球状的蛋白质外壳(外壳先在别处制成,如插图所示)。在感染 30 分钟的样品中可见病毒颗粒继续在成熟,积累在细胞内。(E. Kellenberger 赠)

7nm 厚的纸层,由于磷酸酯分子尾对尾地包装,所以看上去明显地呈三层。在试管内只要简单地把磷酸酯和水混合在一起,就能制造出人造膜,外观极像天然膜。在适当的条件下,这种人造膜包成密闭的囊,直径在 1—10 μm 之间。虽然这些囊是惰性的,像肥皂泡一样,但不难想像由于包装着一群与众不同的分子,它们就能形成空间隔离的功能单位。

有人假设在生命出现前的汤里,磷酸酯分子自发地装配成这种膜结构,包装着自我复制的 RNA 和蛋白质分子的混合物时,形成了第一个细胞。。一旦 RNA 密封在闭合膜

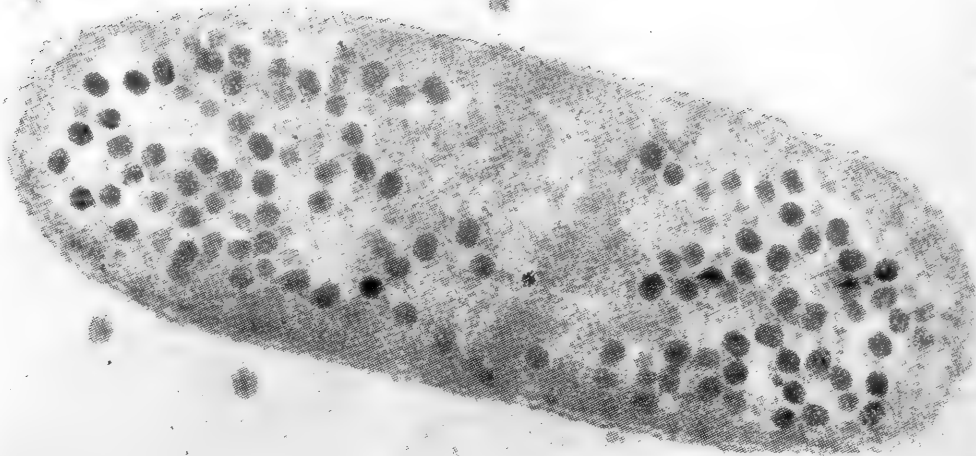


图 1-10 病毒颗粒感染了一个多小时后的细菌细胞的高倍电镜照片。感染周期几乎已完成，细菌行将崩裂，向周围释放几百个新的感染性病毒。这张电镜照片和图 1-9 那张电镜照片所示的病毒都是噬菌体 T4。(E. Kellenberger 赠)

内，它们就能开始进化；进化不止是根据它们自己的结构，而且按照它们所制造的蛋白质：RNA 分子的核苷酸顺序现在能表达细胞的整个特性。

支原体是最简单的活细胞

上述的进化历程当然是猜测的：还没有可追溯到第一个细胞起源的化石记录。但根据当今的生物体和实验结果确能令人信服地证明，这样地进化的主要特征是正确的。生命出现前的小分子合成、RNA 的自我复制、RNA 顺序转译成氨基酸顺序和脂质分子装配成以膜为界的间隔——全部发生在 35 至 40 亿年前，以产生第一个细胞。

将这种猜测的第一个细胞和现在最简单的细胞即支原体作一番比较是大有裨益的。支原体是小的类菌生物体，通常过着寄生生活，与动植物细胞密切相关(图 1-12)。有些支原体直径约 $0.3\mu\text{m}$ ，含足够的核酸，指导合成约 750 种蛋白质，这可能是细胞存活所需蛋白质的最低数目。

我们所描述的第一个细胞和支原体（或任何一种现在的细胞）之间的一个重要差别是，后者的遗传信息贮存在 DNA 内，而不是在 RNA 内。现在的细胞内可找到这两类多核苷酸，但它们以通力协作的方式发挥功能，各自进化到执行特定的任务。化学上的小小差别使两种分子有不同的功能。DNA 作为遗传信息的永久贮存库，它不同于 RNA，主要以双链方式存在，由一对互补的多核苷酸分子组成。以这种方式贮存的遗传信息不仅比较稳定，而且双链排列允许修复机制发挥作用：一条完整无损的链充当模板，校正或修复对应的损伤链。DNA 又经互补碱基配对原理指导合成特定的 RNA 分子，然而现在是在类型稍有不同的核苷酸之间配对。所产生的单链 RNA 分子然后执行其他两个

基本功能：指导蛋白质合成，在某些情况下，像蛋白质那样具有结构的作用。

支原体细胞除了有各种类型的核苷酸外，还含有许多酶和结构蛋白，有的在细胞内，有的则埋在膜内；这些分子集在一起合成周围环境所不供应的必需小分子，重新分配驱动生物合成反应以及维持细胞内适当的化学条件所需的能量。后一种代谢功能的进化将在下一节中讨论。

小结

地球上的活细胞很可能是约 35 亿年前分子自发聚合而成的。根据我们对当今生物体以及它们所含分子的知识，第一个细胞出现之前，至少先经历三个阶段：(1) 必须通过互补碱基配对反应形成能指导自身合成的 RNA 多聚体；(2) 必须有 RNA 分子指导合成蛋白质的机制；(3) 必须装配成脂质膜以密闭 RNA 和蛋白质分子的自我复制混合物。在稍晚一些的进化过程中，DNA 取代 RNA 成为遗传物质。

从原核生物到真核生物²

人们认为，现在地球上的所有生物都起源于几十亿年前诞生的一个原始细胞。这个细胞的增殖能力胜过它的竞争者，在细胞分裂和进化过程中处领先地位，最终使大地披上了绿装，改变了大气的成分，并使地球成为理智生命之家。所有生物体之间的出身太相像了，以致无法用其他方法解释。这条进化之路上的一个重要的里程碑约出现在 15 亿年前，那时有一个飞跃，从内部结构相当简单的小细胞，即从包括各种细菌的所谓原核生物飞跃为更大、更复杂的真核细胞，如高等动植物的细胞。

原核细胞结构简单但有各种生化特性

细菌是大多数自然环境中能找到的最简单的生物体。它们是球状或棒状的细胞，通常长几微米(图 1-13)。它们往往具有坚韧的保护外壳，称为细胞壁，细胞壁下有一层质膜包着一团细胞质，内含 DNA、RNA、蛋白质和小分子。在电镜下可看到这种细胞内部出现多少呈均一的基质(见图 1-9 的第一张照片)。

细菌很小，且能迅速通过简单的一分为二的二分裂进行复制。当食物充裕时，“最适者生存”通常意味着分裂得最快的得以生存。在最佳条件下，一个原核细胞每 20 分钟分裂一次，所以不到 11 小时就产生 40 亿个细胞(接近地球上现有的总人数)。迅速分裂的

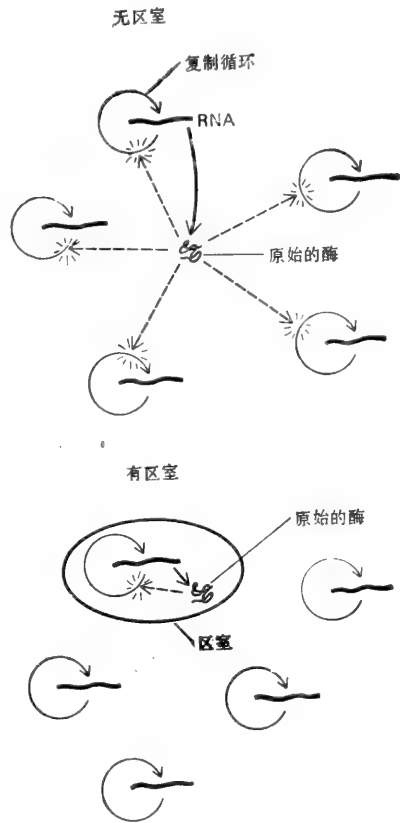


图 1-11 细胞似的区室所占进化优势的示意图。在能合成蛋白质的自我复制 RNA 分子的混合群体中(图 1-8 所示)，任何能产生更有用的蛋白质的改进型 RNA 必然与其竞争者共享这种蛋白质。然而，如果 RNA 盛在区室如脂膜内，则它制造的任何蛋白质只限于它自己使用；所以 RNA 可根据它所制造的更好的蛋白质而被选择出来。



图 1-12 生长在植物细胞内的支原体柠檬螺原体 (*Spiroplasma citrii*)。(J. Burgess 赠)

能力使细菌群体很快适应环境的变化。例如,在实验室条件下,在培养皿里生长的细菌群体通过自发突变和自然选择,在几星期内就会进化到能利用新型糖分子作为碳源。

在自然界中,细菌生活在各种生态小生境中,它们的基本的生化成分也会有相应的增减,我们能识别两类亲缘很远的菌:真细菌类是生活在土壤、水和活体中的常见类型;原始细菌类则可在沼泽、深洋、海水和热的酸性温泉等不良环境中找到(图 1-14)。

有些菌能利用任何有机分子为食物,包括糖、氨基酸、脂肪、碳水化合物、多肽和多糖。有些菌甚至能从 CO_2 得到碳原子和从 N_2 得到氮原子。尽管细菌相当简单,其在地球上生存的时间却比任何生物都长,仍是数量最多的一种细胞。

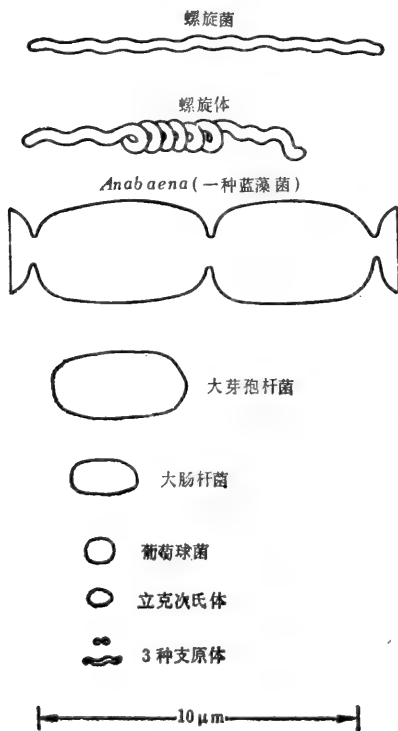


图 1-13 按比例画的一些原核细胞

代谢反应进化

生长在含有葡萄糖作为单一碳源的盐溶液中的细菌,必须进行大量的化学反应。细菌不仅必须从葡萄糖得到生命过程中所需的化学能,而且必须利用葡萄糖的碳原子合成细胞所需的各种有机分子。这些反应经几百种酶催化,呈“链式”反应,一个反应的产物是下一个反应的底物;这样的酶链称为代谢途径,将在下章讨论。

当地球上刚开始出现生命时,很可能几乎不需要这样的代谢反应。细胞能靠环

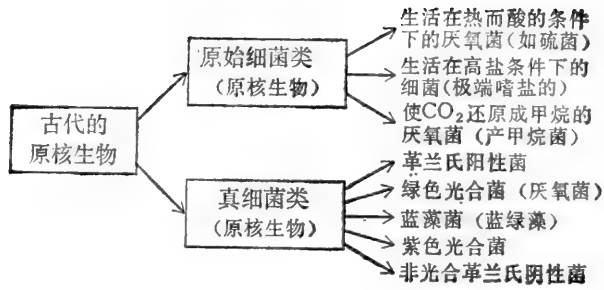


图 1-14 当今细菌之间的家谱关系 (箭头示可能的进化路线)。真核细胞的起源在后文中讨论。

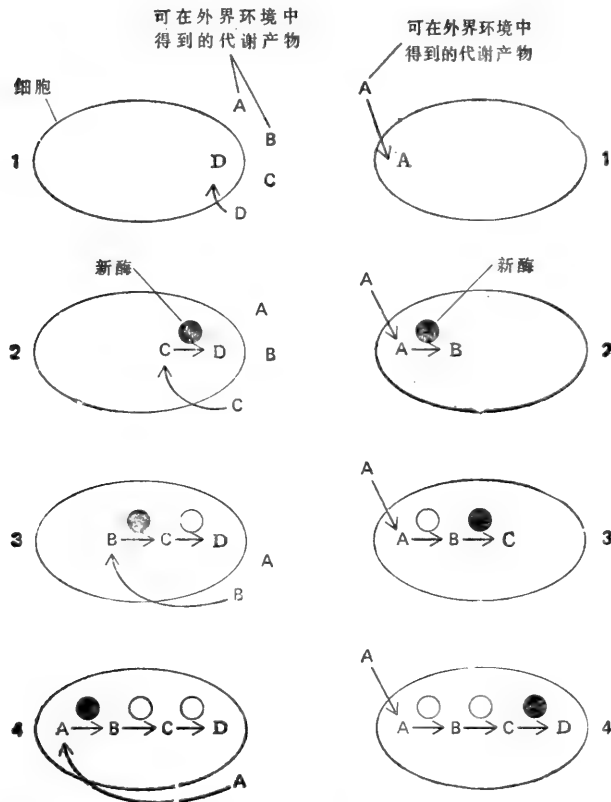


图 1-15 代谢途径进化的两种可能路线的示意图。生命出现前合成产生的有关物质(A、B、C、D)供应给左图的细胞。其中之一物质D是代谢上有用的物质。当细胞耗尽D的供应时,通过新酶的进化获得选择优势,这种新酶能从密切相关的物质C产生D。通过一系列相似的步骤,重要的基本代谢途径可能发生进化。右图,细菌获得大量代谢有用的化合物A。在进化过程中出现一种酶,这种酶偶尔获得使物质A转化成物质B的能力。然后细胞内发生了其他变化,使细胞能利用这种新物质。一系列酶的相继出现构成了很长的反应链。

境中的分子存活和生长,这些分子是“生命出现前的汤”的遗物。当这些自然资源逐渐耗尽时,则已产生了酶、能制造更多有机分子的生物体便占巨大的选择优势。这样,细胞具有的

酶的补足物就逐渐增加,产生了当今生物体的代谢途径。图 1-15 表明进化过程中可能产生代谢途径的两条路线。

如果代谢反应的进化是把新的酶反应相继累加在已有的酶反应上,则最古老的反应就像树干中最老的年轮,最靠近“代谢树”的中心,合成最重要的基本构件。糖磷酸的转变肯定占据代谢中的这一位置,一系列酵解反应在所有转变中起很主要作用。葡萄糖在无氧条件下通过酵解而降解(即无氧酵解)。最古老的代谢途径不得不是无氧的,因为在原

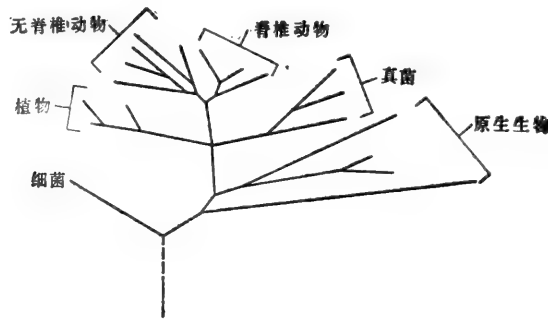


图 1-16 从生物体的细胞色素 c(呼吸系统的蛋白质)的氨基酸顺序推断生物体之间的进化关系。该树的每一末端分枝代表不同的种,连接任意两个种之间的分枝总长度与种间细胞色素 c 的不同氨基酸的数目成正比。这种方法所得的进化树很像根据解剖结构和化石记录得到的进化树。(引自 M. O. Dayhoff and R. M. Schwartz *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 361: 92—104, 1981)

始的地球大气中没有氧。实际上每个细胞内都发生酵解,酵解驱动腺苷三磷酸即 ATP 的形成,所有细胞都用 ATP 作为化学能的能源。

以糖磷酸反应为中心连接着几百种其他的化学反应。其中有些反应负责合成小分子,许多小分子又被用于进一步的反应,制造生物体专一的大得多聚体。另一些反应把作为食物摄入的复杂分子降解为较简单的化学单位。这些代谢反应的最突出的特性之一是,它们发生在所有各种生物体内。差异肯定存在:在细菌、酵母和绿色植物内以不同方法制造赖氨酸,而高等动物则完全不制造赖氨酸;许多专一的代谢产物只限于某些属或种才能制造;但广义上看,绝大多数反应和催化这些反应的大多数酶存在于细菌到人的所有生物体内;为此可以相信,在产生所有这些生物体的原始古老细胞内,早就存在这些反应。

催化基础代谢反应的酶虽然继续发挥相同的基本功能,但在生物体进化成各种类型时,已经历了逐步的变化。为此,不同现存物种的同一种酶的氨基酸顺序为种间进化关系提供了极有价值的指标(图 1-16)。由此所得的证据完全可与化石记录之类的其他来源的证据相媲美。活细胞 DNA 中的核苷酸顺序甚至隐藏着更丰富的信息源。近年来发展起来的分析方法可大量测定 DNA 顺序,进行种间比较;可以预见, DNA 顺序分析将以前所未有的准确性追溯进化过程。

蓝藻菌能固定 CO_2 和 N_2

如果最早的代谢步骤进化到填补早期生命出现前所合成的有机分子供应缺档时,则

当这些化合物耗尽时又会发生什么情况呢?一种强大的选择优势将属于能利用大气中碳、氮原子(取 CO_2 和 N_2 形式)的生物体。但是,碳、氮原子虽然充裕易得, CO_2 和 N_2 也还是很稳定的。所以,除了需要大量复杂的化学反应外,还需大量能量,使它们转化成不稳定的形式,即转化成有机分子,如单糖。

以 CO_2 为例,进化到获得这种转化的机制是光合作用,在光合作用中,从太阳捕获的辐射能驱动 CO_2 转变成有机化合物。阳光与色素分子叶绿素相互作用,使电子激发至较高能态。当电子落回低能态时,它所释放的能量驱动由蛋白质分子促进和指导的化学反应。

最早的光驱动反应之一很可能是形成高能化合物 ATP 的核苷酸磷酸化,另一个光驱动反应产生“还原力”。大气的 CO_2 和 N_2 中的碳氮原子处于氧化和惰性状态。要使它们比较活泼,使它们参加生物合成反应,一个方法是使它们还原,即给它们大量电子。在还原过程中,叶绿体使电子脱离弱电子供体,转移至强电子供体,叶绿体参与的这一反应需要光;然后,强电子供体使 CO_2 和 N_2 还原。比较各种当今细菌中的光合作用机制后提出,电子的最初来源之一是 H_2S ,从 H_2S 所得的原始废物是硫元素。后来出现了虽然难度较大,但效应较高的从 H_2O 中得到电子的过程,于是 O_2 开始作为废物累积在地球的大气中。

蓝藻菌(又称蓝绿藻)是当今使磷和氮转化成有机分子从而进入生物圈的主要途径。它们包括那些现在存在的最自给自足的生物体,它们能使 CO_2 和 N_2 “固定”成有机分子,从一级近似考虑,它们能生活在只有水和空气的环境中;它们这样生活的机制很可能保持十亿多年稳定不变。

细菌能使食物进行有氧氧化

当前许多人只关心人类活动对环境造成的后果。但在过去,其他生物体已给地球环境造成巨大的变化(然而变化是极其缓慢的)。地球大气成分的变化最为明显,随着光合作用的出现,大气已从实际上没有氧分子的混合物变成含氧 21% 的化合物。

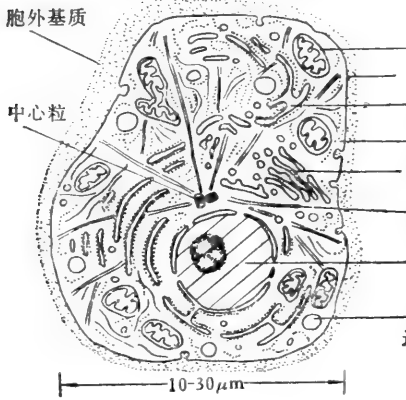
因为氧是极活泼的化学元素,它能与大多数细胞质组分发生反应,所以它对许多早期生物体很可能是有毒的,正如它对现在的厌氧菌是有毒的一样。然而,这种活性也提供了一种化学能源,毫不奇怪,它已被生物体在进化过程中开发利用了。生物体由于利用了氧,便能更完全地氧化它们所吸收的分子。例如,在有氧情况下,葡萄糖完全分解成 CO_2 和 H_2O ,但在无氧条件下,只能分解成无氧酵解的最终产物乳酸或乙醇。因此,从每克葡萄糖可得到更多的能量。食物分子有氧氧化——通常称为呼吸——释放的能量用于驱动 ATP 的合成,这个过程很像营光合作用的生物体用太阳能产生 ATP。在这两个过程中,有一系列电子转移反应,在有膜区室内外产生一个 H^+ 梯度;然后 H^+ 梯度用于驱动 ATP 的合成。当前,包括大多数原核生物在内的极大多数生物体都利用呼吸作用。

真核生物含有几种不同的细胞器

当大气中累积氧分子时,依然存在的、最初出现的生命类型厌氧生物会怎样呢?在含氧丰富的世界上,它们因不能利用氧而处于劣势。有些厌氧菌无疑已经绝灭。有些厌氧菌发展了呼吸能力,或找到了无氧的小环境,它们在此小环境中继续度着无氧的生活。然

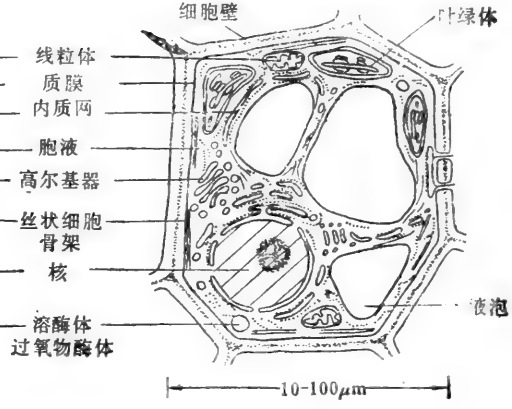
动物细胞

普通动物细胞的超薄切片



植物细胞

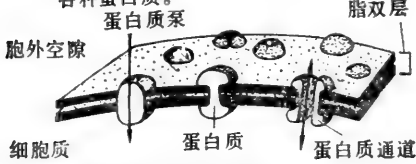
普通高等植物细胞的超薄切片



细胞的膜系统

质膜

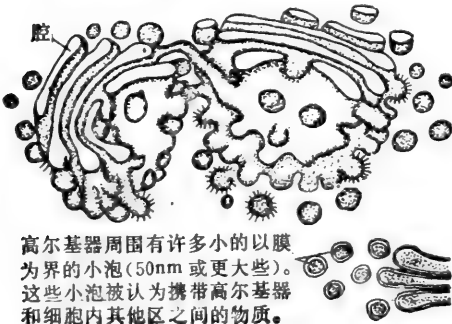
细胞的外界面是质膜，为连续的脂质分子层，厚约 4—5 nm，其中埋着各种蛋白质。



有些蛋白质作为泵和通道，使特定的分子进出细胞。

高尔基器

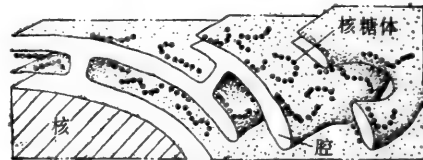
以膜为界的平盘堆叠系统，涉及修饰、分类和包装大分子，分泌或释放到其他细胞器。



内质网

膜的平片层、盘和管伸展在整个真核细胞的细胞质内，围成一个大的细胞内空隙。内质网膜结构上与核被外膜连续，而在脂质和膜蛋白的合成和运输中特化。

粗糙内质网一般呈现为平片层，密布在外表面，含有从事蛋白质合成的核糖体。



光滑内质网通常为多管的和缺少附着的核糖体。主要功能是脂质代谢。



溶酶体

以膜为界的小泡，内含与细胞内消化有关的水解酶。



0.2-0.5 μm

过氧化物酶体

以膜为界的小泡，内含产生和破坏过氧化氢的氧化酶。

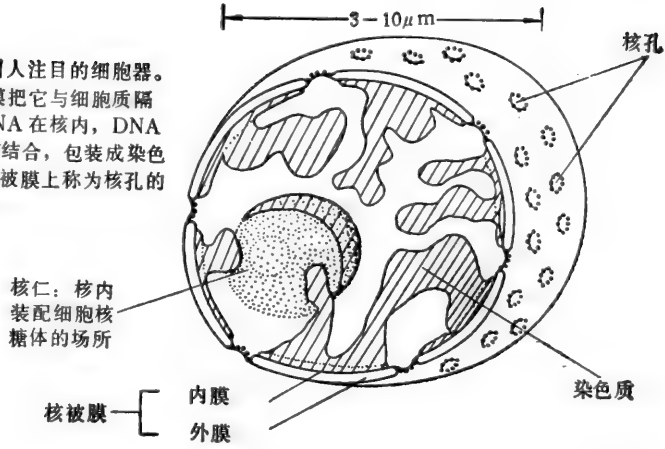


0.2-0.5 μm

组合图 A 真核细胞: 它

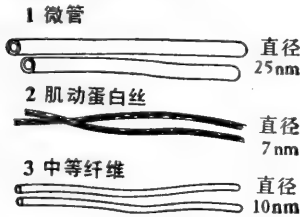
细胞核

核是细胞内最引人注目的细胞器。双层膜组成的核被膜把它与细胞质隔开。所有的染色体DNA在核内，DNA与同等质量的组蛋白结合，包装成染色质。核内物质通过核被膜上称为核孔的开口与细胞质沟通。



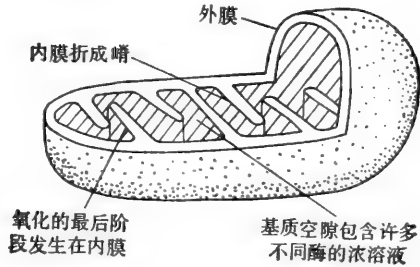
细胞骨架

在胞液中，蛋白质丝排列成网络，使细胞有一定形状，并构成细胞运动的基础。在动物细胞内，含细胞中心粒对的核附近区域常组成细胞骨架。三种主要的细胞骨架纤维是：



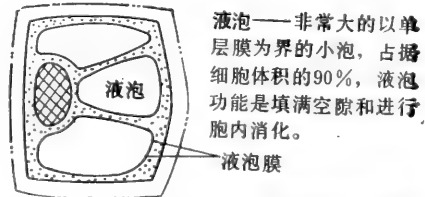
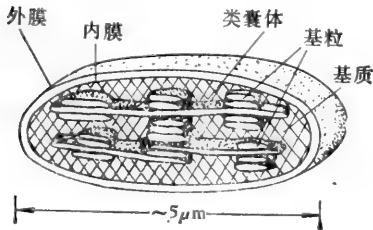
线粒体

线粒体大小与细菌相仿，是所有真核细胞的动力工厂，利用氧与食物分子结合时释放的能量制造ATP。

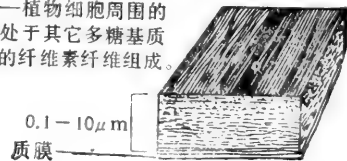


特殊的植物细胞细胞器

叶绿体——这些含叶绿素的质体是在所有高等植物内发现的以双层膜为界的细胞器。精致的内膜系统包含光合作用器。



液泡——非常大的以单层膜为界的小泡，占据细胞体积的90%，液泡功能是填满空隙和进行胞内消化。



们的主要细胞器一览图。



图 1-17 核含有真核细胞的大部分 DNA。这张照片为电镜下观察到的哺乳动物细胞的超薄切片。
(Daniel S. Friend 赠)

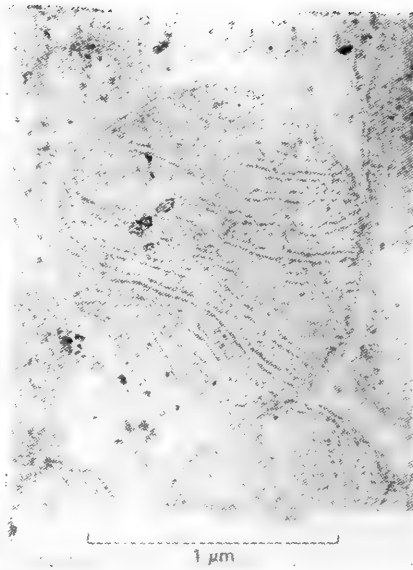


图 1-18 在所有真核细胞中，线粒体使营养物质氧化降解。从这张电镜照片中可见，它们具有光滑的外膜和高度卷绕的内膜。(Daniel S. Friend 赠)



图 1-19 苔藓细胞叶绿体的电镜照片，显示内膜的伸展系统。膜的扁平囊内含叶绿素，排列成堆，即基粒(g)。这种叶绿体还含有大的淀粉积聚物(s)。(J. Burges 赠)

而，第三类厌氧菌似乎发现了更巧妙的对未来意义更为深远的生存策略：它们与好氧型细胞密切结合，共生在一起。这就是当今真核型细胞起源的最合乎情理的解释（组合图 A），本书主要讨论真核细胞。

根据定义，与原核细胞对比真核细胞有一个核(核的希腊字为“caryon”，核内含有

细胞的大部分 DNA, DNA 密封在双层膜内(图 1-17)。因而, DNA 在区室内与细胞其余物质即细胞质分开, 大多数的细胞代谢反应发生在细胞质内。而且在细胞质内许多不同的细胞器可被识别, 其中两个突出的是线粒体和叶绿体(图 1-18 和 1-19)。两者各自密封在自己的双层膜内, 它们的膜不同于核周围的膜。线粒体几乎是真核细胞的共同特征, 而叶绿体只存在于有光合作用能力的真核细胞内, 也就是说, 只能存在于植物内, 在动物或真菌都没有发现。这两种细胞器都被认为起源于共生。

真核细胞的氧化代谢依靠线粒体

线粒体与自由生活的原核生物很相似: 例如, 它们的大小和形状往往类似于细菌, 含 DNA, 以一分为二的方式增殖。破碎真核细胞并分离它们的组分可以证明, 线粒体负责呼吸, 而且在真核细胞内的其他地方不发生呼吸作用。无线粒体的动物细胞和真菌细胞是厌氧生物体, 它们的能量来自效率不高和自古就有的酵解过程。现在有许多细菌能呼吸, 它们赖以呼吸的机制明显地类似于线粒体的。

所以, 真核细胞看来很可能就是原始厌氧生物的后裔, 厌氧生物通过吞入好氧菌而在氧气充足的世界生存。与其说它们消化了细菌, 不如说它们养育了细菌并保持共生, 目的在于能使细菌消耗大气中的氧以产生能量, 正像我们饲养乳牛, 它们吃的是草产的是奶。当然, 我们还不能完全证明这就是过去所发生的事情, 但是有某些现存微生物为上述进化顺序提供了证据: 例如, 一种罕见的真核生物——池沼多核变形虫 (*Pelomyxa palustris*) 没有线粒体, 却同好氧菌建立了永久的共生关系。

叶绿体可能是原核藻的后裔

叶绿体进行光合作用的方式, 很像原核的蓝藻菌, 以附着在叶绿体膜上的叶绿素吸收阳光。有些叶绿体的结构极像蓝藻菌, 它们的大小和带有叶绿素的膜堆叠的方式都相似(图 1-19)。此外, 叶绿体经分裂而增殖, 含 DNA。所有这些足以提出叶绿体是从在真核细胞内安家的蓝藻菌进化而来, 叶绿体执行光合作用以报答寄主为它们提供了居住和营养的环境。营光合作用的细胞与其他类型的细胞共生, 实际上是一种普遍现象, 可考察到在许多现在的真核细胞中含有真正的蓝藻菌(图 1-20)。

图 1-21 表明, 真核生物按共生理论的进化起源。但必须强调, 线粒体和叶绿体与如今的好氧菌和蓝藻菌除了相似外, 还有重大的差别。例如, 它们的 DNA 含量极少, 构成它们的分子大部分是在真核细胞的其他地方合成后再输入细胞器。假定它们确实起源于共生菌, 则它们已经历了很大的进化变化, 已完全依赖于它们的寄主。

某个原始厌氧细胞获得线粒体是否为真核生物发生的关键步骤, 它是否把厌氧细胞的其他特性一起带进真核生物而进化? 我们缺乏证据回答这个问题: 现存的真核细胞不仅都含有线粒体, 而且还有许多有别于原核细胞的其他特性(表 1-1)。这些功能合在一起使真核细胞拥有种种不同的能力, 所以不可能说哪种能力最先进化。

真核细胞含有各种排列的内膜

真核细胞的体积比原核细胞大得多, 通常要大一千多倍, 它们所含的细胞物质的量大多数也成比例地增加; 例如, 人体细胞所含的 DNA 为典型细菌 DNA 的 800 倍。体积

大也带来一些问题，因为发生在细胞内部的生物合成反应的原材料必须通过覆盖在细胞表面的质膜进出，又因为膜也是许多重要反应的场所，所以增加细胞体积就得增加细胞表面。结构按简单的比例增加，体积就要按长度的立方增加，表面积按长度的平方增加，这



图 1-20 现代的蓝藻菌的一个近亲，以永久共生关系生活在另一细胞内(这两生物体合称为 *Cyanophore paradoxa*)。蓝藻菌正在经历分裂。(D. Pickett-Heaps 赠)

是几何学的事实。所以，如果大的真核细胞要像原核细胞那样保持很高的表面积与体积之比，则它的膜必须卷曲、折叠和其他方式的精心安排，以增加它的表面积。

这可能部分地解释了内膜的一个基本特性，即内膜结构复杂而多样。膜围住核、线粒体和(植物细胞内)叶绿体。它们形成迷宫般的区室，称为内质网(图 1-22)，那里除了合成细胞向外输出的物质外，还合成细胞膜的脂肪和蛋白质。它们还形成一堆堆扁平的囊，构成高尔基器(图 1-23)，各种有机分子的合成和运输都与高尔基器相关。膜围住溶酶

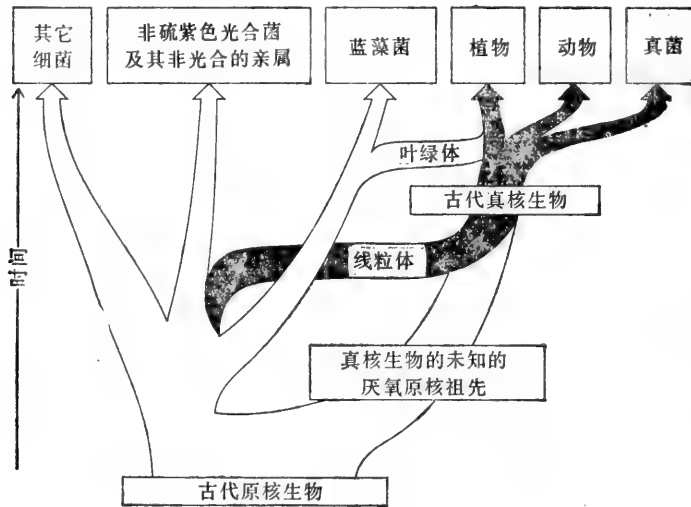


图 1-21 真核生物的假设的起源：好氧的原核生物与厌氧的原核生物共生。

体，溶酶体内贮存胞内消化所需的酶，免遭细胞本身的蛋白质和核酸的侵袭。同样，膜围住过氧化物酶体，那里产生和降解有害活性的过氧化氢。它们还形成小泡，在植物中形成大的充满液体的空泡。所有这些以膜为界的结构相当于细胞质内的明显的区室。在典型的动物细胞内，这些区室几乎占据全部细胞体积的一半。细胞质还有一个间隔通常称为胞液，它包括以膜为界的细胞器之外的所有一切物质。

我们列举的所有的有膜结构都在细胞的内部。那么，它们怎样才有助于解决我们一

表 1-1 原核生物和真核生物的比较

	原核类	真核类
生物体	细菌和蓝藻菌	原生物、真菌、植物和动物
细胞大小	长度一般为 1—10 μm	长度一般为 10—100 μm
代谢	厌氧或好氧	好氧
细胞器	极少或是没有	核、线粒体、叶绿体、内质网等
DNA	细胞质中环状 DNA	很长的 DNA, 含有许多非编码区; 组织成染色体, 以核被为界
RNA 和蛋白质	在同一区室内合成 RNA 和蛋白质	核内合成和加工 RNA, 细胞质内合成蛋白质
细胞质	无细胞骨架、细胞质流, 内吞作用, 外排作用	细胞骨架由蛋白纤丝组成; 细胞质流; 内吞作用和外排作用
细胞分裂	通过二分裂	通过有丝分裂(或减数分裂)
细胞组织	主要为单细胞	主要为多细胞, 有细胞分化

开始所提出的问题和向细胞提供与其大的体积相适应的表面积呢? 这个问题的回答取决于以膜为界的间隔与细胞外部的交换。这种交换得自真核细胞独特的内吞和外排过程。在内吞过程中, 外表膜部分内陷并缢断, 形成以膜为界的细胞质小泡, 内含外界物质或吸附在细胞表面的物质。外排作用是其逆过程, 细胞内以膜为界的小泡与质膜融合, 将它们的内含物释放至外界介质。因此, 在细胞深处围住区室的膜能增加细胞与外界交换物质的有效表面积。

以后几章中我们将会看到, 真核细胞中的各种膜和以膜为界的区室已变得高度专一, 有些用作分泌, 有些用作吸收, 有些用于特定的生物合成过程等。

真核细胞有细胞骨架

细胞越大, 其内部结构越复杂和越专一, 这些结构对保持它们的适当位置和控制它们的运动的要求也就越高。所有真核细胞都有内部骨架, 即细胞骨架, 它使细胞有一定形状, 能运动, 能安放细胞器并使之能从细胞的一部分转移至另一部分。细胞骨架由蛋白质丝网络组成, 其中最重要的两种是肌动蛋白丝和微管(图 1-24)。这两种蛋白质丝必定来自进化的初期, 因为在所有的真核细胞内发现它们几乎是一成不变的。这两种蛋白质丝关系到细胞运动的产生; 例如, 在纤毛和鞭毛中, 肌动蛋白丝参与肌肉的收缩, 而微管是主要的结构因子和力量产生因子; 纤毛和鞭毛是某些细胞表面伸出的长形突起, 它们像鞭子那样鞭打, 起着推进器的作用。

肌动蛋白丝和微管对于真核细胞细胞质内的内部运动也是必不可少的。因此, 有丝分裂纺锤体那种形式的微管, 是真核细胞分裂时使 DNA 均等地分给两个子细胞的机构的重要部分。所以, 无微管的真核细胞便不能增殖。在这一个以及其他例子中, 如靠自由扩散则运动不是太慢, 就是太乱, 对细胞分裂没有用处。事实上, 有人曾经提出, 真核细胞里的细胞器多半直接或间接地吸附于细胞骨架, 它们只能通过需能的转移过程沿着细胞骨架的轨道移动。

原生动物的最复杂的细胞

原生物最能阐明真核单细胞所能获得的复杂性。这些原生物是自由生活的单细胞

胞的真核生物，有着各种不同的形状和行为：它们可以营光合作用或捕食为生，可以是活

动的也可以是固着的。它们的形态往往是很复杂的，含有诸如感觉刚毛、光感受器、鞭毛、足状附肢、口器、螫刺、肌状收缩束等结构。虽然它们是单细胞的，但却像许许多多细胞生物体那样复杂而多能。称为原生动物或“最早的动物”的原生生物尤其是如此。

栉毛虫 (*Didinium*) 是捕食性原生动物。体呈球状，直径约 $150\mu\text{m}$ ，围着两个纤毛环；前端扁平，有一个隆起物，很像鼻子(图 1-25)。栉毛虫凭借纤毛同步拍打而在水中高速游动。栉毛虫的捕食对象通常是另一种原生动物草履虫，当遇到适当的捕食对象时，从鼻区释放大量使敌麻痹的小刺。栉毛虫吸附和吞噬草履虫时成空心球状，以便吞食与它本身一样大小的其它细胞，这种复杂的行为——游动、使敌麻痹和捕食——大多数是由质膜下的细胞骨架结构产生的。例如，平行的微管束实际上是在这种细胞皮质内，形成每条纤毛的芯，使纤毛能拍打。

但是，原生动物尽管很奇特，并不代表真核细胞进化的顶峰。出现的更大的事情是，不是把各种复杂性集中于一个细胞，而是各类不同细胞之间的分工。多细胞生物进化的过程中，来自同一祖先的细胞相互分化，有的细胞高度发展这一特性，有的细胞高度发展另一特性，形成了一项大协作事业的专业分工。

基因能开能关

高等动植物体内各种特化的细胞类型是大不相同的(组合图 B)。这似乎令人迷惑不解，因为多细胞生物体内所有的细胞都密切相关，都是刚刚从同一个前体细胞——受精卵传下来的。共同的谱系意味着有相似的基因；那么怎样会产生差别的呢？在少数情况下，细胞特化涉及遗传物质的丧失：一个极端的例子是哺乳动物的红细胞，在分化过程中丧失了整个细胞核。⁽¹⁾但大多数动植物的细胞，几乎都保留着受精卵所含的全部遗传

图 1-22 哺乳动物细胞超薄切片的电镜照片，显示内质网的光滑区和粗糙区。(George Palade 赠)

信息。特化不取决于基因的丧失或获得，而取决于基因表达的变化。

即使是细菌也不是一直在制造它们所有各种类型的蛋白质，但它们能按照外界条件

调整合成水平。例如,有些菌株只在要利用乳糖时才制造专门为乳糖代谢所需的蛋白质。有些细菌在条件不利时,抑制大多数正常的代谢过程,形成孢子,孢子有硬而不可渗透的外壁和成分改变的细胞质。

真核细胞有了更复杂的控制基因表达的机制,这些机制影响整个相互作用的基因产物系统。一组组基因被激活或抑制,以应答内外两种信号。膜的成分、细胞骨架、分泌产物,甚至代谢——所有这些和其他特性必定随细胞分化而协调地变化。例如同一动物体内,专司收缩的骨骼肌细胞与分泌硬性骨基质的成骨细胞是协调的(组合图 B,第24页)。细胞特性如此巨大的转化反映了基因表达的稳定变化。在真核细胞中,引起如此变化的控制已进化到原核细胞无法与之比拟的程度。

真核细胞所含的 DNA 远多于确定蛋白质所需的量

真核细胞含有大量 DNA; 我们已经讲到过,人体细胞的 DNA 含量几乎是典型细

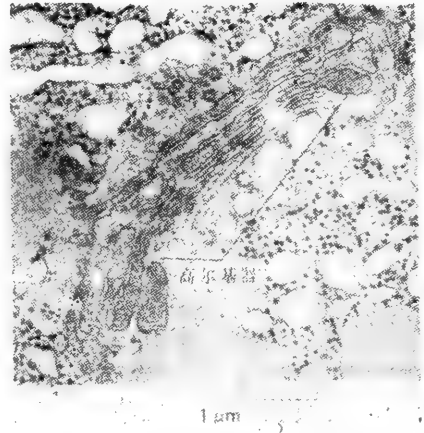


图 1-23 哺乳动物细胞超薄切片的电镜照片,显示高尔基器,高尔基器由膜的扁平囊组成,排列成多层(也可见组合图 A)。高尔基器参预分泌到细胞外的物质的合成和包装,并参预将新合成的蛋白质引入正确的细胞区室。(Daniel S. Friend 赠)

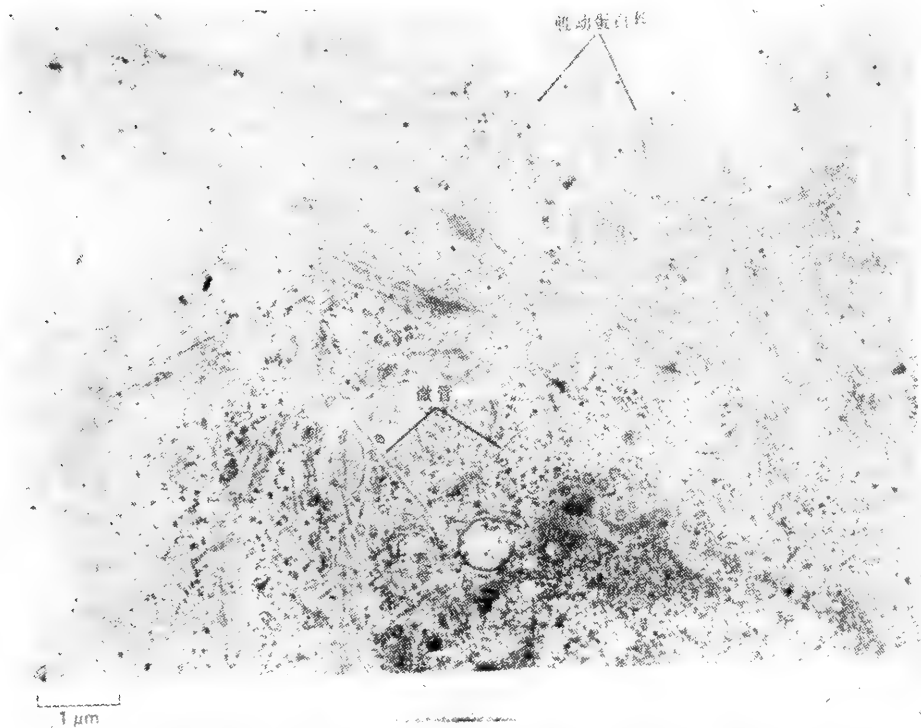


图 1-24 在这张动物细胞的电镜照片中可看到细胞骨架的两个主要组分: 微管和肌动蛋白丝。(引自 B. S. Spooner, *Bioscience* 25: 440—451, 1975. 照片经版权所有美国生物科学研究所同意复制)

细胞类型

人体内有200多种不同类型的细胞。这些细胞装配成不同类型的组织，如

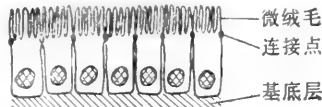
上皮
结缔组织
肌肉
神经组织

大多数组织含有各种类型细胞的混合物

上皮

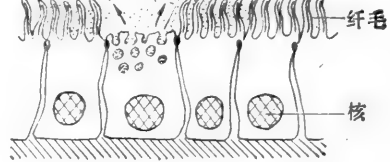
上皮细胞形成固定的细胞层，称为上皮，它们排列在身体的内外表面。有许多特化类型的上皮。

吸附细胞有许多发状微绒毛，从自由表面向外突出，以增加吸附面积。



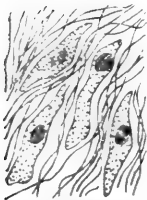
相邻的上皮细胞通过连接点结合在一起，连接点增强片层机械强度，使小分子不能通过。片层置于基层层上。

有纤毛的细胞——其自由表面上的纤毛同步拍打，使上皮层上的物质（如粘液）运动。
分泌细胞——大多数上皮层有一些细胞将物质分泌在表面。



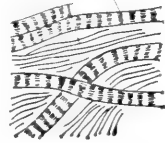
结缔组织

体内器官和组织之间的空隙充满结缔组织，结缔组织主要由埋入多糖凝胶内的坚韧蛋白纤维网组成。胞外基质主要由成纤维细胞分泌。



在疏松结缔组织中的成纤维细胞

两种主要类型的胞外蛋白纤维：胶原蛋白和弹性蛋白

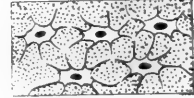


骨由成骨细胞构成。成骨细胞分泌胞外基质，后来磷酸钙晶体沉积在基质内。

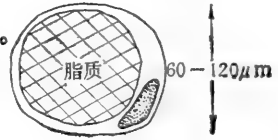
沉积在胞外基质中的钙盐



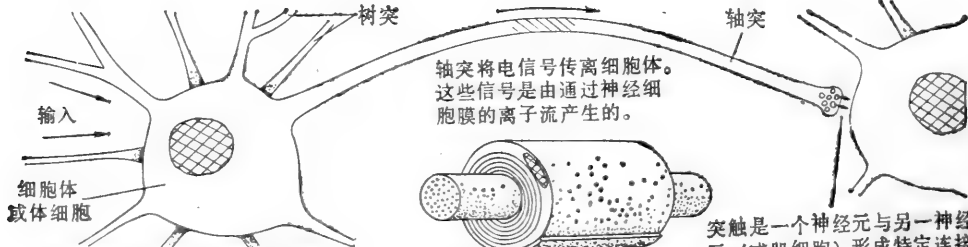
由细胞突起连接在一起的成骨细胞 胞外基质



脂肪细胞是体内最大细胞之一。它们负责生产和贮存脂肪。大的脂肪滴将核和细胞质挤到边缘。

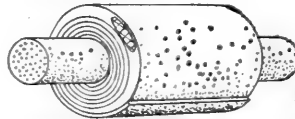


神经组织



神经细胞或神经元，专门用于通讯。例如，脑和脊髓由支持胶质细胞之间的神经元组成。

轴突将电信号传离细胞体。这些信号是由通过神经细胞膜的离子流产生的。

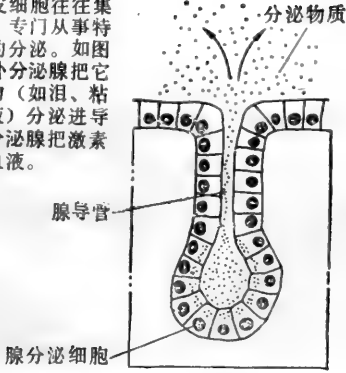


称为施旺氏细胞或寡树突细胞的特化细胞围绕轴突，形成多层膜鞘。

突触是一个神经元与另一神经元（或肌细胞）形成特定连接的场所。在突触处，信号从一个神经元传至另一神经元（或从神经元传至肌细胞）。

组合图 B 脊椎动物的

分泌上皮细胞往往集合成腺，专门从事特定物质的分泌。如图所示，外分泌腺把它们的产物（如泪、粘液和胃液）分泌进导管。内分泌腺把激素分泌进血液。



血液

红细胞（或红血细胞）是很小的细胞，无核或内膜，充满着结合氧的蛋白质，即血红蛋白。



1cm³ 血液含有 50 亿个红细胞



它们正常的形状是双凹的盘

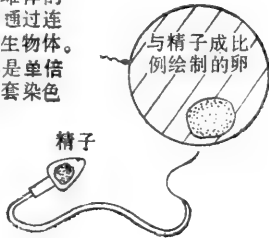
白血细胞（白细胞）——每一千个红细胞就有一个白血细胞。虽然它们循环运行，但它们能通过血管壁，在周围组织内发挥作用。有几种白血细胞，包括巨噬细胞和嗜中性细胞，它们运动至感染处，在那里吞噬细菌和碎屑。



淋巴细胞——负责免疫应答，如产生抗体和排斥组织移植

生殖细胞

雄体的精子与雌体的卵融合，然后通过连续分裂形成新生物体。精子和卵子都是单倍体，即只带一套染色体。

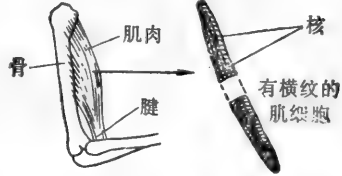


一些不同类型的细胞

肌肉

肌细胞通过收缩产生机械力。在脊椎动物中有三种主要类型：

骨骼肌——通过它的强而快速的收缩使关节运动。每根肌肉是一束肌纤维，每条肌纤维是许多多核细胞。



平滑肌——存在于消化道、膀胱、动脉和静脉中，它由细长细胞（没有条纹）组成，每一细胞有一个核。

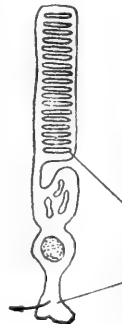
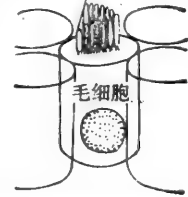


心肌——特性介于骨骼肌和平滑肌之间，它使心脏跳动。相邻细胞靠电传导的连接点连接，连接点使细胞同步收缩。

感觉细胞

在脊椎动物体内最复杂的细胞之一是察觉外界刺激的细胞。内耳的毛细胞是声音的主要检测器。修饰的上皮细胞的表面携带特殊的微绒毛（静纤毛）。应答声振动的微绒毛的运动使电信号通至大脑。

静纤毛很硬，因为它们被用肌动蛋白丝捆扎



眼睛视网膜中的视杆细胞是专门应答光的神经细胞。光敏区含有许多有膜的囊，光敏色素视紫红质埋在囊膜内。光造成的电信号传至其它神经细胞。

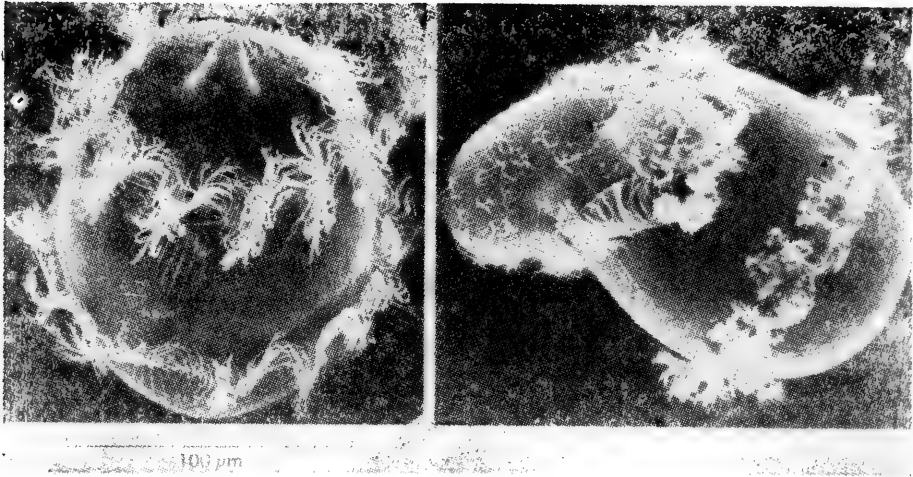


图 1 25 图示一种原生动动物吞食另一种原生动物的扫描电镜照片。原生动动物是单细胞动物，呈现各种各样的形状和行为。栉毛虫(左)是有纤毛的原生动动物，有两轮运动的纤毛环，前端有一个鼻状的隆起物，用于捕捉捕食对象。右图显示栉毛虫正在吞食另一种原生动动物草履虫。(D. Barlon 赠)

菌的一千倍。但是，似乎只有一小部分 DNA——或许是人体细胞中的 1%——携带确定实际制造的蛋白质的信息。那么，为什么还要有其余的 99% 的 DNA 呢？一个假设是，大多数 DNA 只增加核的物理体积而已。另一假设是，它多半是寄生的——成年累月地在细胞内积累了各种 DNA 顺序，利用细胞机构进行增殖，而没有多大好处。其实有人证明，许多种 DNA 包含转座因子的顺序，转座因子能在 DNA 内从一个位置不时“跳”至另一位置，甚至在新部位插入它们自身的拷贝。因此，转座因子能像慢性感染那样增生，占遗传物质的很大部分。

但进化是带有偶然性的。尽管 DNA 开始时不编码蛋白质，现在却有一些重要功能。其中一部分 DNA 起结构作用，使一部分遗传物质以特定方式浓缩或“包装”起来，这在下一节讨论，同时，有些 DNA 起调节作用，帮助开启或关闭指导蛋白质合成的基因，因而对真核细胞中复杂的基因表达调控起重要作用。

真核细胞内以复杂方式包装遗传物质

真核细胞里的 DNA 很长，纠缠和断裂的危险性极大。或许正因为如此，真核细胞独有的组蛋白已进化到与 DNA 结合在一起，将 DNA 裹成结实而易操纵的染色体（图 1-26）。染色体紧密包装是真核生物细胞分裂的准备工作的主要部分（图 1-27）。所有真核生物（有一个不太重要的例外）都有组蛋白与它们的 DNA 结合，组蛋白在进化过程中十分保守：豌豆的几个组蛋白的氨基酸顺序几乎与牛的组蛋白的氨基酸顺序完全相同这一事实反映了这些蛋白质的重要作用。

真核细胞中除了组蛋白外还有许多其他蛋白质与 DNA 结合。由于 DNA 与其他分子结合的机会不同，有些结合 DNA 的蛋白质使基因表达的类型随细胞类型的不同而改变。例如，因为结实包在 DNA 中的基因不会表达，所以通过改变 DNA 的包装可

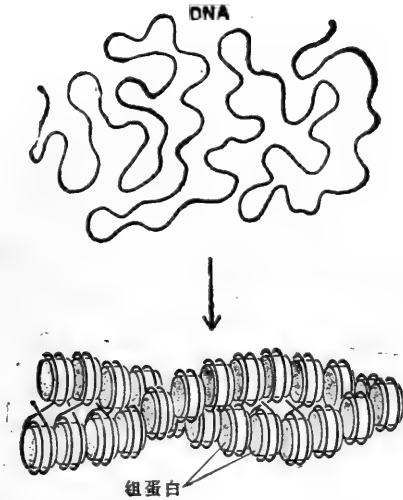


图 1-26 染色体中称为组蛋白的带正电的蛋白质如何介导 DNA 折叠的示意图

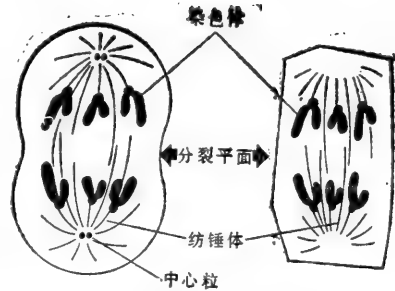


图 1-27 真核细胞有丝分裂的示意图。左图示动物细胞，右图示植物细胞。核膜已破，已复制的 DNA 浓缩成两整套染色体。有丝分裂纺锤体将每套染色体各分至两个新形成的细胞中，纺锤体主要由微管组成。

控制基因的表达。

真核细胞中包住细胞核的膜保护与 DNA 有关的脆弱的控制机构，使其免遭快速运动和发生在细胞质内的许多化学变化的损害。它们还使基因表达的两个主要步骤分开：(1) DNA 顺序拷贝成 RNA 顺序 (DNA 转录) 和 (2) 再用这些 RNA 顺序指导特定蛋白质的合成 (RNA 转译)。在原核细胞内，没有区室化——RNA 顺序转录后就开始转译成蛋白质，甚至完成 RNA 顺序转录前就开始转译。然而，在真核细胞内 (除了线粒体和叶绿体，它们在这方面以及其他各方面都很像细菌)，从基因至蛋白质途中的两个步骤严格分开：转录发生在核内，转译发生在细胞质内。RNA 在用于指导蛋白质合成之前，必先离开核。当它在核内时，经受精细复杂的加工，DNA 分子的有些部分被丢弃，有些部分则被修饰。

正因为有这些复杂性，真核细胞的遗传物质才比细菌有更多的调控机会。

小结

如今的活细胞分为原核细胞 (细菌及其近亲) 和真核细胞。原核细胞被认为最酷似最早的古细胞。虽然它们的结构相当简单，但生化特性却多种多样：例如，细菌内发现的主要代谢途径，包括三个主要的产能过程：酵解、呼吸和光合作用。真核细胞比原核细胞大而复杂，含有较多的 DNA，DNA 与能用精细复杂的方法处理它的其他组分相结合。真核细胞的 DNA 装在以膜为界的核内，细胞质内则含有许多别的以膜为界的细胞器。这些细胞器包括使食物分子进行末端氧化的线粒体和使植物细胞内发生光合作用的叶绿体。种种迹象提示，线粒体和叶绿体是早期原核细胞的后裔，它们为较大的古细胞的内共生体。真核细胞还有一个独特的特性，即含蛋白纤维的细胞骨架，蛋白质纤丝帮助组织细胞质，并提供运动机构。

从单细胞到多细胞生物³

单细胞生物如细菌和原生动物是如此成功地适应各种不同的环境,以致构成了地球上生物总量的一半以上。它们不同于高等动物,许多单细胞生物能从少数简单的营养物质合成它们所需的所有物质,有些原核生物每小时不止分裂一次。那么,什么是导致多细胞生物进化的选择优势呢?

简单的回答是,多细胞生物体能开发利用单细胞不能很好利用的资源。例如,多细胞结构使树长得外形高大;根扎在土中,一套细胞从土中摄取水分和养料;叶片在空中,另一套细胞有效地获取太阳辐射能。树干中的特殊细胞形成通道,在根和叶之间传送水分和营养。此外还有另一套特殊的细胞形成一层树皮,阻止水分蒸发,提供保护性的内环境。总的说来,树并不直接与单细胞生物竞争生态小环境;它已找到一种全然不同的生存和传代的方法。

当地球上出现不同的动植物时,它们改变环境,在其中发生进一步的进化。生存在丛林中所需的本领不同于生存在广阔海洋中所需的本领。运动、感觉、通讯、社会组织等的革新都使真核生物能以前所未有的更复杂的方式进行竞争、增殖和生存。

单细胞能聚合成群体

多细胞生物进化的早期很可能是单细胞生物聚合成群体。形成群体最简单的方法是每次细胞分裂后仍聚在一起。甚至有些原核细胞也表现出这种原始形式的群居行为。例如,粘菌生活在土壤中,以不溶的有机分子为食物,它们通过分泌降解酶来分解有机分子。它们聚在一起形成松散的群体,群体中每个细胞分泌的消化酶汇集在一起,提高了取食的效率。这些细胞其实代表了最复杂的原核生物,因为当食物供应耗尽时,细胞便紧紧地聚集成多细胞的子实体,在其中细菌分化成孢子,孢子 in 极恶劣条件下也能存活。当条件好转时,子实体中的孢子又开始生长,产生一群新细菌。

绿藻(不要与原核生物“蓝绿藻”或蓝藻菌混淆)是真核生物,以单细胞、群体或多细胞形式存在(图 1-28)。不同种的绿藻可按其复杂程度排列次序,以阐明高等动植物进化中可能出现的渐进类型。单细胞绿藻如衣藻类似于有鞭毛的原生动物,只不过前者有叶绿体可营光合作用。在亲缘很近的属中,一群群有鞭毛的细胞通过细胞自身分泌的基质分子群生在一起。最简单的种[盘藻属(*Gonium*)的种]具有由 4、8、16 或 32 个细胞构成的凹盘形式。它们的鞭毛独立地拍打,但因它们的取向都一致,所以它们能推动群体在水中运动。每个细胞都相同,都能分裂产生全新的群体。在其他属中发现较大的群体,最独特的是团藻属(*Volvox*),其中某些种是由多达 50 000 多个细胞结合成的空心球。在团藻中,形成群体的单个细胞通过细的胞质桥连接起来,所以它们的鞭毛协调地拍打推进整个群体,就像一个滚动的球(图 1-28)。在团藻内,细胞之间有分工,少数细胞专司生殖,作为新群体的前身。其余细胞相互依存,不能独立地生活,如果群体解体,生物体便死亡。

高等生物的细胞是特化的和协同合作的

团藻在某些方面更像多细胞生物,而不像简单的群体。当它在水中旋转时,所有的鞭

毛同步拍打,群体在结构和功能上是有极性的,能朝着远方的光源游去。生殖细胞通常局限在群体的一端,它们在那里分裂,形成新的小群体,小群体最初藏在亲体球内。因此,团藻以原始的方式表现了所有多细胞生物共有的两个基本特性:它的细胞特化了,同时这些细胞又协同合作。由此细胞联合成一个协调的整体,强于它的任何一个组成部分。

有组织的细胞分化形式甚至出现在某些原核生物中。例如,多种蓝藻菌在细胞分裂后仍聚在一起,形成长达一米的纤维状链。沿着纤维每隔一定距离,一个个细胞有不同的特性,变得能将大气中的氮整合进有机分子。这样少数几个特化细胞为其相邻的细胞固氮,并与它们共享产物。但真核细胞似有更好的组织分工;它们不是原核生物,而是构成所有更复杂的多细胞生物的生命单位。

多细胞结构依靠细胞间的内聚力

为了形成多细胞生物,细胞必须以某种方式结合,真核生物已有行使这一功能的若干种不同的方法。如上述的团藻在细胞分裂时细胞并不完全分开,通过胞质桥连在一起。在高等植物中,细胞不仅通过胞质桥(胞间连丝)仍连在一起,而且束缚在以纤维素为壁的硬质蜂窝状小室内,这种纤维素是细胞本身分泌的(细胞壁)。

大多数动物的细胞没有硬壁,胞质桥也是不常有的。细胞通过相当松散的胞外大有机分子网(称为胞外基质)和质膜间的粘连力结合在一起。例如,通常认为海绵是当今最原始的多细胞动物,它的体壁典型地由五种特化细胞的粘合层所组成;这些细胞形成水管系统和孔,使水通过,细胞通过它们过滤和摄取食物。海绵通过细胞增生而无限地生长,它们的大小和结构不是固定的。它们没有神经系统协调它们各部分的活动,它们被描述为“细胞的松散联邦”——与构成高等动物的有更严格纪律的细胞社会恰成对照。不过,海绵远非是杂乱无章的结构。如果强迫海绵通过细筛,使单个细胞机械地相互分开,细胞往往又会自发地装配成完整的海绵,最初聚集成一大块,最后终排列成粘合的多细胞层。这样的细胞层称为上皮。

上皮层细胞包住屏蔽的内环境

将动物细胞编织成多细胞组织的所有方法中,最重要的也许是上皮的排列。上皮层对复杂的多细胞生物的进化,就像细胞膜对复杂的单细胞的进化一样有着重要的意义。

另一类简单的动物——腔肠动物能很好地说明上皮层的重要性。它们在进化的阶梯

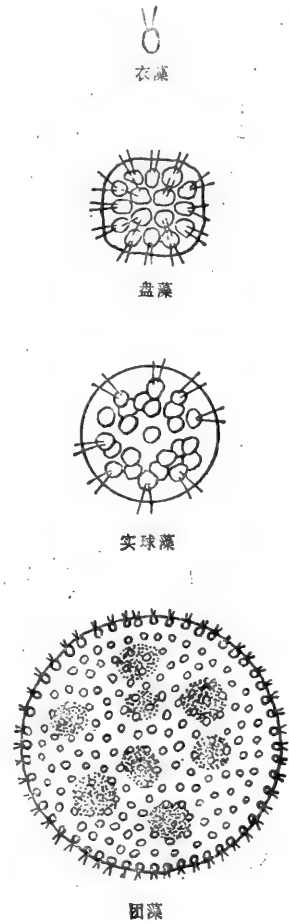


图 1.2: 绿藻中 4 个亲缘相近的属, 图示从单细胞至群体的和多细胞的组织。

上比海绵高一级,因为它们具有极为简单的神经系统;在具有神经系统的动物中,它们很可能是最原始的。这类动物包括海葵、水母、珊瑚虫以及小的淡水生物水螅(*Hydra*)。腔肠动物由两层上皮构成,外层是外胚层,内层是内胚层。内胚层围住一个腔,称为体腔,食物在其中消化(图 1-29)。细胞结合在一起,使表皮层不仅有机机械强度,而且能作为分子通行的屏障;因此,它们可以防止食物逃走,有可能建立食物消化的专一化学条件。内胚层细胞中有些细胞将消化酶分泌到体腔里去,有些细胞则吸收和进一步消化这些酶释放的营养分子。通过形成紧密粘合的上皮层,防止所有这些分子不致散到体外,内胚层细胞为它们自身在体腔内创造了一个适合其消化任务的环境。同时,面对外部的内胚层细胞也特化以适应外界环境。例如,在外胚层细胞内有着一种内容一枚卷曲毒刺的细胞,毒刺射中水螅捕食的小动物时,能使小动物麻痹。

外胚层和内胚层之间的夹层是另一个既与体腔隔开也与外界隔开的层次。神经细胞主要位于这一狭窄的空间内,紧靠外胚层的内表面。动物能通过外胚层和内胚层里的

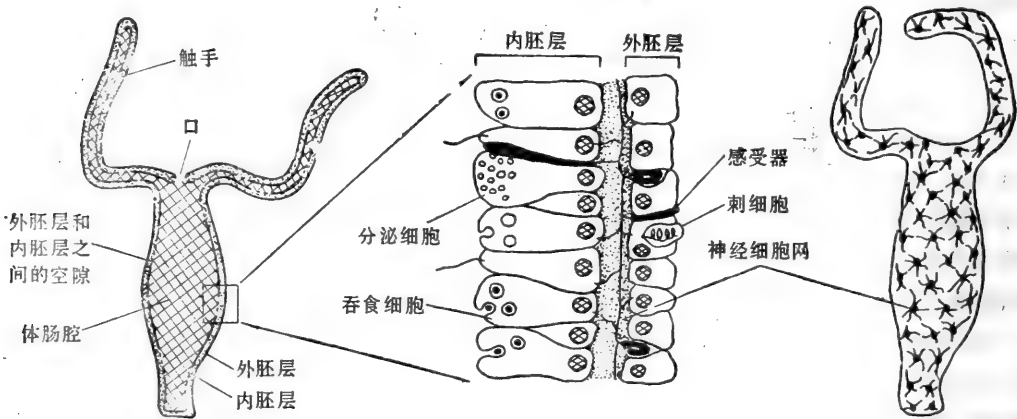


图 1 2) 水螅的纵剖面示意图。外层细胞(外胚层)主要起保护作用,内层细胞(内胚层)主要从事消化作用。两层之间的夹层是把两层联系起来的神经细胞网。(请注意,右图所示的神经细胞不是按比例绘制的,画得大了一些)

肌状细胞的收缩改变形状和运动。神经细胞传送电信号,以控制和协调这些收缩(图 1-30 和 1-31)。后面我们会看到,神经细胞周围介质中简单的无机离子的浓度,对神经细胞的功能起关键作用。大多数神经细胞——包括人的神经细胞——设计得只有浸在离子成分类似于海水的溶液里时才能发挥作用。这可能反映了最早的神经细胞进化的条件。大多数腔肠动物仍生活在海洋中,但不是全部。特别是水螅生活在淡水中。水螅之所以能开拓新的栖息地,只是因为它的神经细胞处在被上皮细胞层密闭从而与外部隔离的空间,上皮细胞层保持着神经细胞功能所需的内部环境。

细胞间通讯控制着多细胞生物的空间型式

水螅细胞不仅是机械地结合在一起,而且通过密封内外环境的接口相互联系;它们还沿着体长方向相互通讯。如果水螅的一端被切除,剩下的细胞就通过调整它们的特性和重新排列而对被切除部分的缺失作出反应,从而再生出完整的动物。信号显然从生物体

的一部分传到另一部分,控制着体型的发育,一端长触手和口,另一端长足。此外,这些信号与神经系统是没有关系的。如用秋水仙素处理发育的水螅以阻止神经细胞的形成,则水螅便不能运动、捕食或喂养自己。然而,它的消化系统仍能发挥正常功能,所以只要有

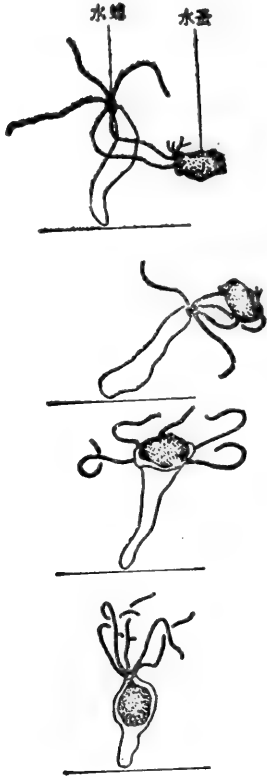


图 1-30 水螅能作许多很复杂的活动。图示它的触手捕捉小水蚤,将它塞进体肠腔内进行消化。

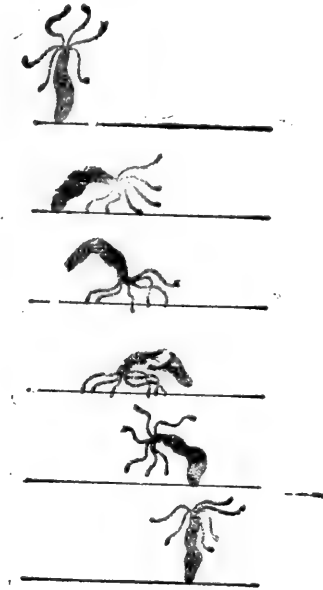


图 1-31 水螅能游动,基部滑动,或如图所示,通过翻筋斗而移动。

人耐心地把它通常捕食的动物塞进它的口中,它就能存活。这样强迫喂养的动物的体型保持不变,失去的部分会再生,如同具有完整的神经系统的动物一样。

更复杂的高等动物从类似于腔肠动物的低级祖先进化而来,高等动物的复杂性应归因于更好地利用在水螅结构上反映出来的同一种细胞协同作用的基本原理。上皮层细胞排列在体内的内外表面上,创造了隐蔽的区室,控制了分化细胞在其中行使专一功能的内环境。特化细胞相互作用和通讯,建立了支配每个细胞的特性的信号。使细胞能按其在全局中所处的地位来确定其特性。然而,为了表明怎样才能产生出像人那样大小、复杂和精密的多细胞生物,就得更详细地考虑发育中的一系列事件。

细胞记忆使复杂型式得以发展

每一种多细胞生物的细胞几乎都是通过单细胞前体细胞反复分裂产生的;这些细胞

构成了克隆。当增殖继续发生,克隆不断长大时,正如我们所知的有些细胞开始分化,采取不同的结构、不同的化学特性、不同的功能,应答相邻细胞来的信息。显然,真核细胞及其后代通常坚持处于各种特化的状态,即使在最初指导它们分化的影响消失之后亦是如此——换言之,这些细胞有记忆。因此,它们最终的特性不是简单地取决于它们的最终环境,而是取决于发育过程中它们所经受的整个一系列影响。因此,当身体成长和成熟时,成熟体型的越来越精细的结构变成专一的,产生出复杂性逐渐增加的生物体,它的最终形态表达了长期发育的历史。

基本发育程序在进化中有保守的趋势

动物结构也是其进化历史的产物,进化历史像发育一样,奉献了一部从简单到复杂的渐进编年史。那么在进化和发育这两种前景之间究竟有什么联系呢?

进化过程中,在最简单的多细胞生物体中进化的许多发育方法被保存下来,作为构建它们更复杂的后代的基本原理。例如,我们已提到细胞组织成上皮。还值得注意的是,从水螅到人,几乎整个动物界都发现相同的基本的特化细胞类型,如神经细胞。而且动物早期发育阶段往往十分相似,尽管它们的成体形状看来大不相同,例如,只有专家的眼睛才能区分幼龄的鸡胚和人胚。

这些观察是不难理解的。试考虑进化过程中出现新的解剖特性——比如伸长的鸟喙——的过程。随机出现的突变改变蛋白质的氨基酸顺序,从而改变蛋白质的生物活性。这种变化的蛋白质偶尔会影响负责形成鸟喙的细胞,这些细胞形成一只较长的鸟喙。但是,突变还必须与生物体其余部分的发育协调一致:只有那时它才能通过自然选择而传宗接代。如果在形成长喙过程中,丢掉了舌头或耳朵不发育,则长喙的形成也没有选择优势。如果突变影响的事件发生在发育的早期,而不是发生在末期,才有可能出现这种巨大变化。胚胎的早期细胞就像是纸牌搭成的房子底部的纸牌——大量细胞取决于胚胎的早期细胞,它们的特性哪怕是微小的变化也可能酿成灾难。基本的步骤已“冻结”在发育过程中,正像遗传密码或蛋白质合成机制已包含在细胞的基本生化组构中。相反,发育末期产生的细胞变化的自由度较大。也许正因为这一原因,不同种的胚胎在它们的早期常彼此类同,当它们发育时,有时似乎又重演进化步骤。

真核生物具有复杂的生殖机构

多细胞生物内,必定有些细胞作为新一代的前身。在高等动植物中,这些细胞高度特化,称为生殖细胞。物种依靠它们传代,强有力的选择压力调整生物体的整体结构,给生殖细胞以最有利的生存机会。其它细胞可能死亡,但只要生殖细胞存活,就会繁殖同种的新生物体。从这一意义上看,多细胞生物最基本的特性是生殖细胞与其它细胞之间的区别,也就是生殖细胞与体细胞之间的区别。

并非所有的多细胞生物都依靠明显分化的生殖细胞繁殖。许多简单的动物,包括海绵和腔肠动物,通过芽生部分躯体来进行繁殖,许多植物也是如此。然而,有性繁殖必须有生殖细胞。这个过程我们太熟悉了,也就认为是理所当然的,但它决不是直截了当的繁殖方法,它比无性繁殖复杂得多,需要多种多样的资源。同种而不同性的两个个体通常产生特性完全不同的生殖细胞——一个个体产生卵,另一个个体产生精子。卵细胞与精细胞

融合,形成合子——发育成新生物体的单个前身细胞,它的基因代表了双亲基因的部分随机的重新组合。真核生物虽然也能以其他方式繁殖,但几乎所有的真核类,不管是单细胞的还是多细胞的都能进行有性繁殖。真核细胞已进化出复杂的性机构;生命围绕着它周而复始。强烈的选择压力必定有利于有性繁殖的进化,使之优于以一般细胞分裂为基础的较简单的生殖方式。虽然很难肯定地说,这些选择压力究竟是什么,但至少有利性繁殖为操纵和重组一个种的基因带来了新的可能性。因此,有性繁殖对新组合中新基因的进化,以及对产生当今动植物的无穷无尽的形态和功能中起关键作用。

脊椎动物的细胞有 200 多种特化模式

在高等动物细胞中间发现的特化类型之多是任何原核生物所无法比拟的。在脊椎动物中,清楚可辨的细胞类型就有 200 多种,这些细胞很多是名称虽然相同,却有许多更细微的差异。组合图 B (第 24 页) 只画了其中一小部分。从这些特化的行为可见,在一个生物体内的真核细胞有着惊人的多种功能。组合图 A (第 16 页) 所示每一个特性和每一个细胞器的原型,在这一或另一细胞中已十分明显地发展到非同寻常的程度。我们现在对真核细胞总的特性的了解,很多是依赖于对这些特化细胞的研究,某种研究显示所有细胞在某种程度都有关系的特别有利的特性。随便举一个例子来看,神经-肌连接点正好是三种细胞汇合的地方,这三种细胞是:肌肉细胞、神经细胞和许旺氏细胞。多种细胞各有不同的作用(图 1-32)。

1. 肌肉细胞专司收缩。它的细胞质与有组织地排列的蛋白质丝(包括许多肌动蛋白丝)堆积在一起。蛋白质丝之间还插进许多线粒体以供应 ATP,作为收缩器的燃料。

2. 神经细胞刺激肌肉收缩,把兴奋信号从大脑或脊髓传至肌肉。所以神经细胞极长:含核的主体离开与肌肉连接处达一米以上。结果细胞骨架得到很好的发育,维持细胞的特定形状和有效地把物质从细胞的一端传送到另一端。然而,神经细胞最主要的专一性是它的质膜,质膜含有充当离子泵和离子通道的蛋白质,能引起相当于电流的离子运动。鉴于所有的细胞在质膜内都有这种泵和通道,所以神经细胞能利用它们在几分之一秒的时间内把电脉冲从细胞的一端传至另一端,传达动作的信号。

3. 最后,许旺氏细胞是大量产生质膜的专家,它们把质膜包在神经细胞蛋白质伸长部分的外面,盘绕的质膜层像一卷纸带形成髓鞘,作为绝缘体。

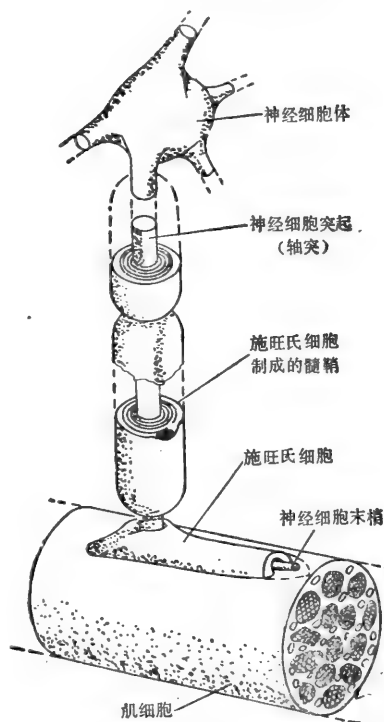


图 1-32 在神经-肌连接点神经细胞以及与其相连的施旺氏细胞连接着肌细胞的示意图

免疫系统细胞专司化学识别

在高等动物的已进化的所有细胞系统中，有两个系统以不同方式突出地表明细胞的错综复杂程度已达到登峰造极的地步：一个是脊椎动物的免疫系统，另一个是神经系统。这两个系统的性能——脊椎动物免疫系统的化学识别能力，神经细胞系统的知觉和控制能力，都远远胜过任何人工装置的性能。每一系统由大量不同的细胞组成，每一系统的功能取决于不同细胞之间的作用。

多细胞动物内部保护性的和营养丰富环境接待外来生物体像对动物自身细胞那样融洽。因此，这类动物需有一种保卫自己对抗入侵生物体的系统——尤其是防止病毒和细菌的侵入。免疫系统的主要任务是消灭任何这种外来的可能侵入体内的微生物。

许多真核细胞有能力吞食和消化来自它们周围环境的物质颗粒。当颗粒相当大时，这过程称为吞噬作用。在高等动物的分化细胞中，有一些专职的吞噬细胞，如巨噬细胞，它们专长于这种活动，能吞下和消灭细菌和其他外来细胞，然而有一个困难：吞噬细胞袭击入侵者固然是好事，但如袭击它自己的亲属和同事就变成了灾难。所以，免疫系统面临着辨别动物自身细胞和外来细胞的问题，也就是辨别自我和非我的问题。

为此，脊椎动物已进化出一类专一的辨别细胞，即淋巴细胞。淋巴细胞本身没有吞噬作用，但它们的通力合作告知吞噬细胞对哪些东西要进行袭击。特别是某些淋巴细胞（B淋巴细胞）制造特殊的蛋白质分子即抗体，抗体选择性地与入侵生物体表面或它们产生的毒性分子上特定排列的原子相结合。为了在新的入侵者身上打上外来者的标记，必须产生新的抗体；因为可能入侵者种类繁多，基本上不可预测，所以B淋巴细胞必须要能制造出无穷无尽的不同种类的抗体。另一方面，系统必须不产生与动物自身细胞和分子相结合的抗体。

编码抗体分子特定结合部位的DNA的随机变化，产生了多种多样的抗体。因此，通过一种特殊的突变，产生几百万种遗传上不同的淋巴细胞，每一种淋巴细胞增生，形成克隆，其成员都产生相同的独特的抗体。在这些许多可能形成的克隆中，那些制造与它们自身分子反应的抗体遭到破坏和受到抑制（机制仍不很清楚），而那些制造对抗外来分子的抗体的克隆被选择出来、存活和繁殖。因此，独特的动物免疫系统的起源就像进化过程，是依靠随机变异和选择的策略。

神经细胞使动物能迅速适应变化着的外界

脊椎动物的免疫系统单独列为一类。低等动物显然没有淋巴细胞帮助它们抵抗入侵的微生物。另一方面，几乎所有的多细胞动物中都有神经系统，以满足更基本的要求——迅速地对外部事件作出适当反应。

进化作用于好多世代，以期根据生物生活的环境产生生物体最佳的结构。不过，在大多数生态小环境中，有些变化发生得太快，进化性适应一时跟不上。所以，最成功的生物是具有另一类适应能力的生物，当环境变化时，它不需要遗传突变也能产生最佳的反应。如果环境变化的顺序是完全能预料的，如昼夜或冬夏的交替，则生物能根据适当的时刻表遗传地编排自动变化。因此，光合原生生物 *Gonyaulax*（属涡鞭毛虫类）显示24小时节律的光合作用活性，即使细胞在连续几星期的光照条件下，24小时节律继续保持

不变。许多其他的生物也有这种生物钟,但它们的机制仍是个谜。

然而,大多数的环境变化不是那么可预测的。例如肠道菌的食物的性质和数量的变动是不规则的,任何能调整其代谢以适应这些变化的细菌比不能调整的菌占优势。因此,这些生物已进化到有能力感知它们环境中营养物的浓度和有能力调整代谢酶的合成速率。特殊的胞内控制分子(如 cAMP)用来耦合环境的刺激与适当的应答。

在多细胞生物中,使知觉与反应相偶联的信号一般必须在细胞间传递。因此,代谢调节常以一组细胞释放的激素为媒介,通过组织使另一组细胞产生反应。但激素长途传递要花费时间,而且还会向四面八方扩散。如果一个化学信号要快速发送,就必须在它的靶附近释放;这样也使它的作用有局部性。但如果化学信号在其靶附近释放,它怎能使知觉与身体远端的反应相偶联呢?神经细胞提供了答案。在一端,正是它本身感觉到化学或物理的刺激;在另一端,它能释放化学信号即神经递质以作用于其他细胞。一端的刺激触发产生电兴奋,电兴奋迅速传至另一端,到达另一端后马上又触发释放神经递质。这种迅速传送信号的装置使多细胞动物能迅速对周围变化的世界作出反应。它还能使多细胞动物身体各个部分的动作协调一致。

发育中的神经细胞必须装配成神经系统

人的一个神经细胞并不全然不同于蠕虫的一个神经细胞。人神经系统的优越性在于它有无数个细胞,最重要的是它们连接在一起,发送、综合和解释感觉输入,协调复杂的动作型式。同样地,计算机的容量不在于一个个开关或记忆元件的性能有多好,而在于有多少个记忆元件以及它们连接成系统的方法。就计算机而论,外界的力量——制造商——把元件装配成适当的构型。就身体的其余部分而论,如果没有神经系统,也就没有外界的制造者:细胞必须自行装配成功能系统,服从它们 DNA 中携带的指令,并根据外部世界调整最终产物。为了了解神经系统进化的细胞基础,我们必须注意神经细胞赖以发展其极端复杂的形状和形成精确有序的连接型式的机制。

神经细胞开始也像其他细胞一样,小而坚实。然后,神经细胞体向它必须连接的靶伸出很长的突起(图1-33)。这种突起是轴突或树突,轴突将信号传离细胞体,

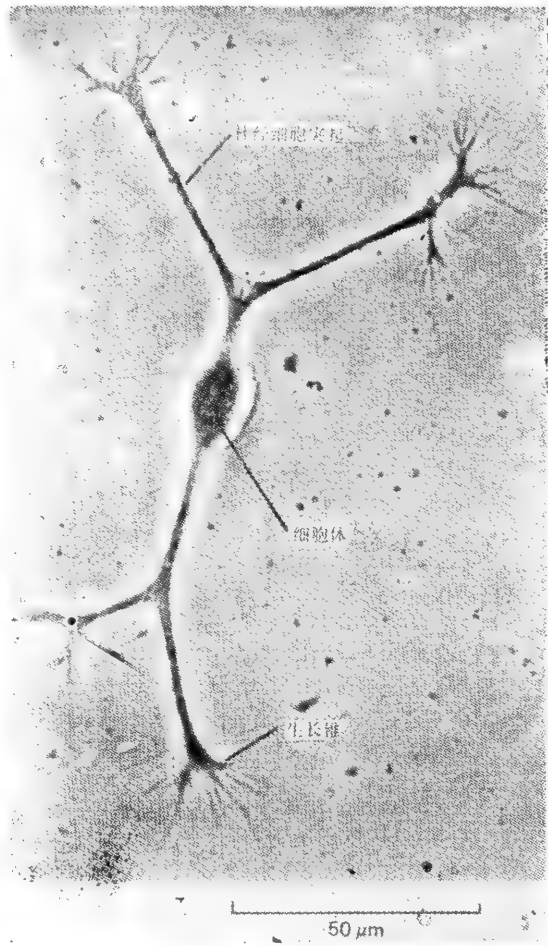


图1-33 从鸡胚胎分离出来放入含营养液的组织培养皿中培养的神经细胞的光学显微镜照片。细胞正开始长出伸长的突起,(Zoltan Gabor 赠)

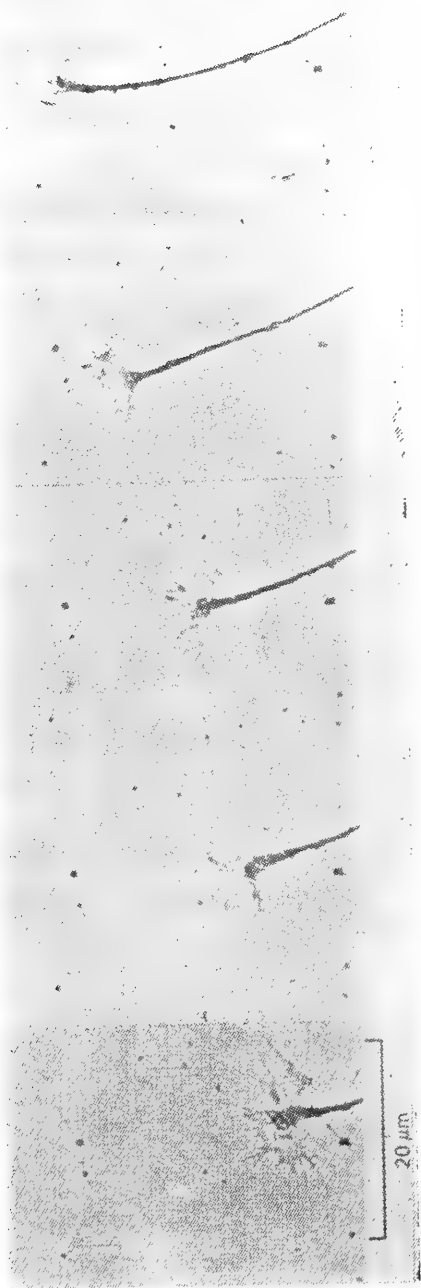


图 1-34 像上一张照片那样,沿着组织培养皿表面伸展的神经细胞突起的顶端。每隔 5 分钟拍摄一张照片,显示神经细胞突起在伸长,生长锥也迅速改变形状。神经细胞的其余部分在照片下方没有摄入;在现在的放大倍数下,细胞体离顶端 20 至 30 cm。(Stephen Clark 赠)

树突把信号传至细胞体,它们都靠生长锥构成(图1-34)。这种细胞器像其他的细胞器一样,代表了真核细胞共有的专司运动的装置。然而,生长锥不是把整个神经细胞向前拉,而是留在细胞体的背后,拉出伸长的轴突或树突。生长锥似乎通过组织向前爬,就像系在皮带上的狗,沿着通向其猎物之途径嗅路寻找。在有些情况下,生长锥似乎只靠物理方法引导,通过预建的通道或沿着胞外基质内的特定小径前进。然而,复杂的神经系统的进化在很大程度上取决于化学标记的发展,特定的神经细胞靠化学标记在大量的靶中识别出它的靶。

神经细胞的连接决定行为的型式

通过刚刚讨论过的那些机制构成异常复杂的神经系统。以蝇的视觉系统为例(图1-35、1-36、1-37),整个结构体现了遗传专一性,甚至即使在没有光的条件也会生成。而且,神经连接的型式限定了行为的型式。用不着教,也不需要经验,雄蝇会同雌蝇交配,蜘蛛会织网,鸟会迁往南方。所有这些活动都由物种的 DNA 所规定, DNA 控制着一个个细胞的行为,这些细胞在胚胎期构成了神经系统,在成年期参与神经系统发挥功能。

但并不是所有的行为都由遗传所决定。动物的 DNA 固然重要,过去的经验也很重要。哺乳动物发育期间如丧失感觉能改变大脑的显微结构,而且几乎所有的成年动物——从腔肠动物到人——都有一定程度的学习能力。学习被定义为经验的产物,也因此是神经细胞电活动的结果,必定涉及神经连接中持久变化的产物。除此而外,我们对学习机制几乎一无所知。或许这就是神经生物学中未解决的主要问题。

使我们能够读、写和讲本国语言的大脑连接是教育的结果,大脑连接代表一种

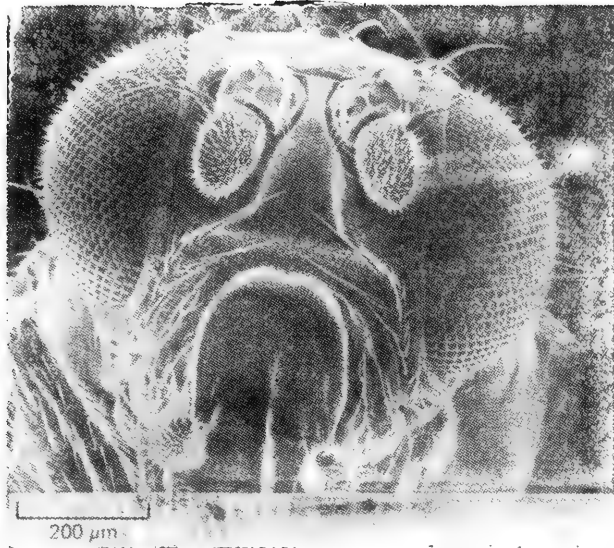


图 1-35 扫描电镜下看到的果蝇头部。位于头部两侧的是两个大的复眼,每一个复眼由许多小眼组成。每一个小眼有一个独立的晶状体,把光聚焦在其基部的一组光敏接受细胞上(见图 1-36)。(Rudi Turner 和 Anthony Mahowald 赠)

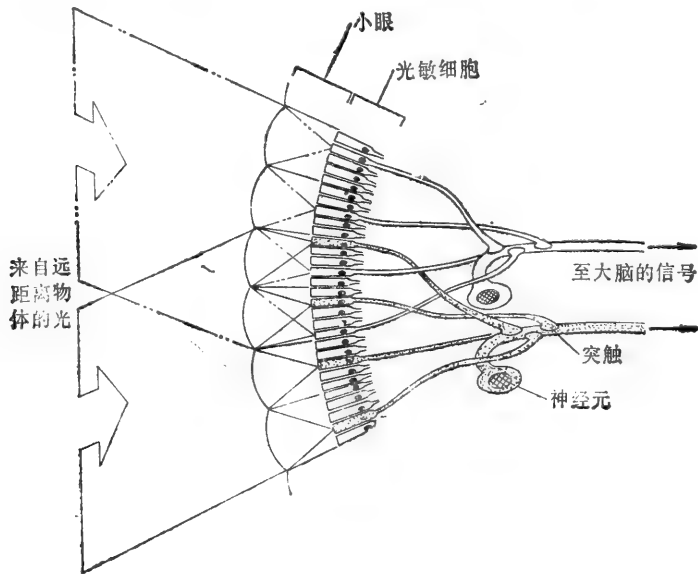


图 1-36 在垂直切面上所见的蝇眼外层中的神经元连接的示意图。光进入复眼的每一个小眼(见图 1-35),聚焦在其基部的 8 个光敏接受细胞之一上(此图只绘出 5 个光敏接受细胞)。来自远距离光源的光线由于因复眼的曲率,只聚焦在不同小眼的一个不同的光敏接受细胞上。然而,光接受细胞的交织的短轴突把正在“看”同一点的光接受细胞与通向昆虫大脑的同一束神经轴突相连接。在每一个果蝇眼中有一千多束这样的轴突束,每一轴突束在发育过程中准确地与一组光接受细胞相连。

非遗传的继承。学习和交往能使人类世代适应环境,而低等生物只有经过遗传进化才能做到这一点。但我们能看到,即使是我们的文化和社会所赖以存在的这些高级能力,也是依赖于细胞行为的细微变化——依赖于神经细胞由于电活动的结果持久调节它们之

间相互连接的法则。

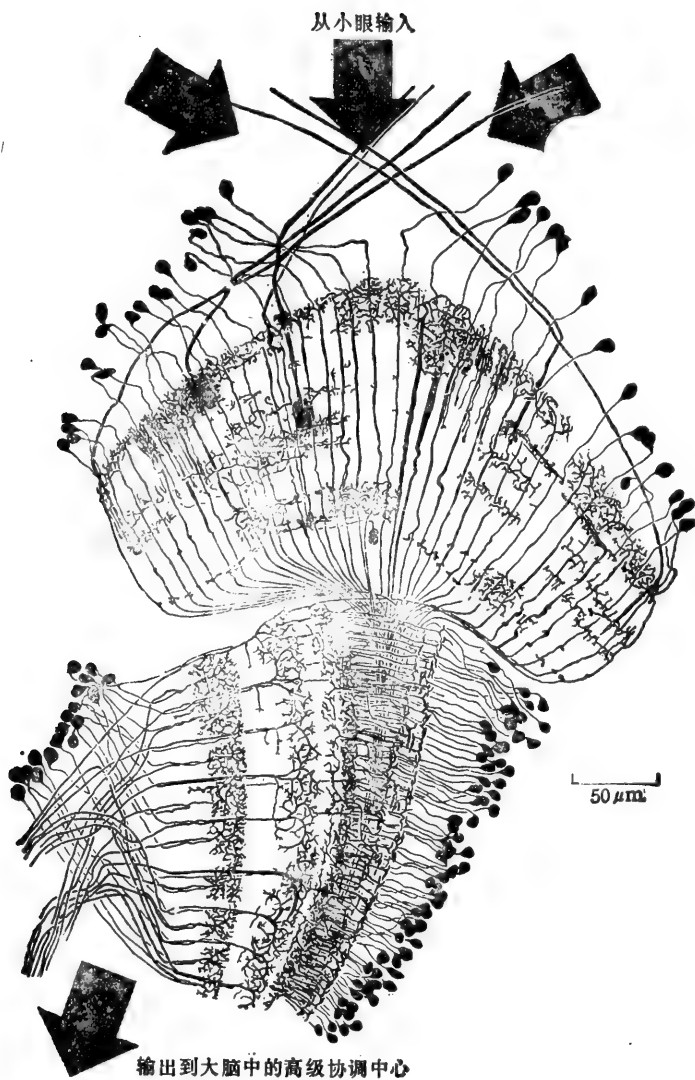


图 1-37 蝇脑的一部分，图示对小眼输入进行加工的一部分神经细胞网络(见图 1-36)。(重绘自 N. Strausfeld, Atlas of an Insect Brain, New Yorks: Springer, 1976)

当然，只研究分离出来的生物分子不可能了解一个细胞，只研究一个细胞更不可能了解社会或多细胞生物。但如果不了解细胞，就决不可能彻底了解生物体。同样，不了解组成分子，也不能适当地了解细胞。因此，分子必定是下章讨论活细胞的起点。

小结

大的多细胞生物的进化，依赖于真核细胞以不同方式表达其遗传信息的能力，以及互

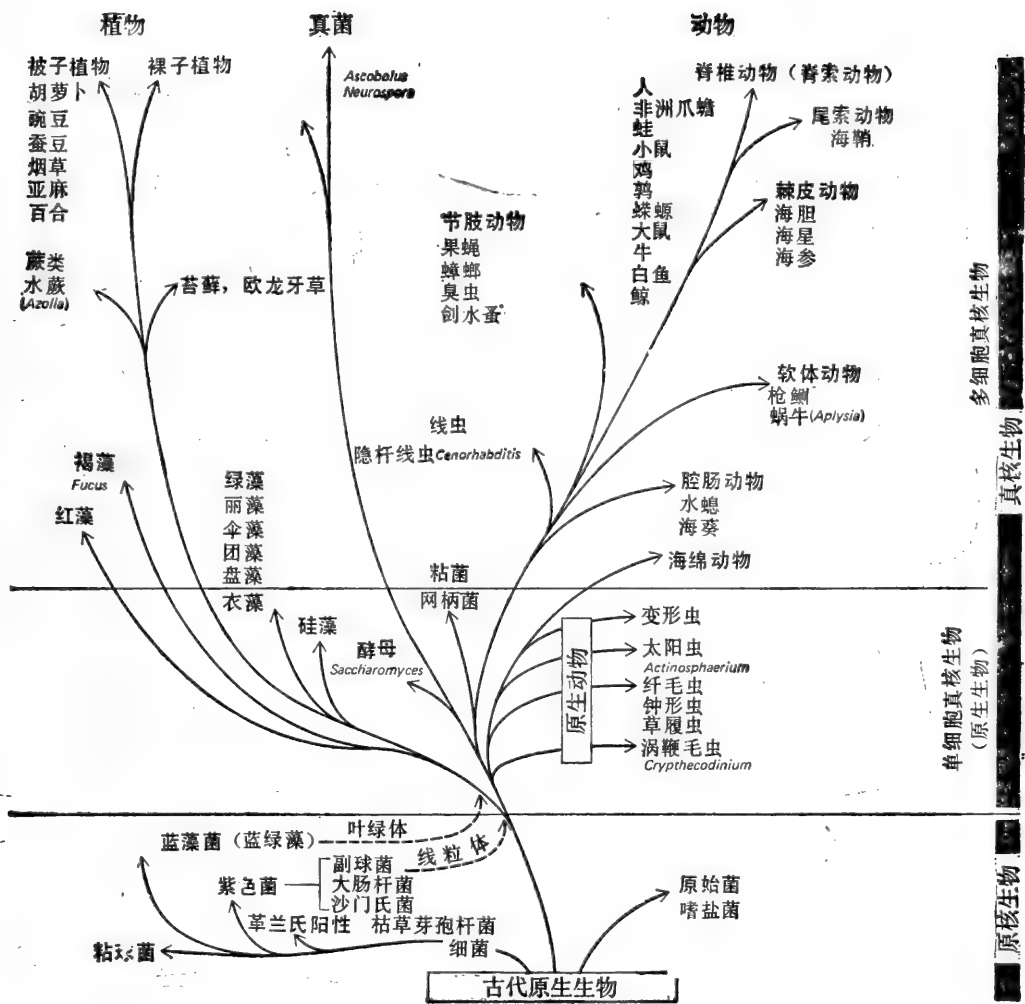


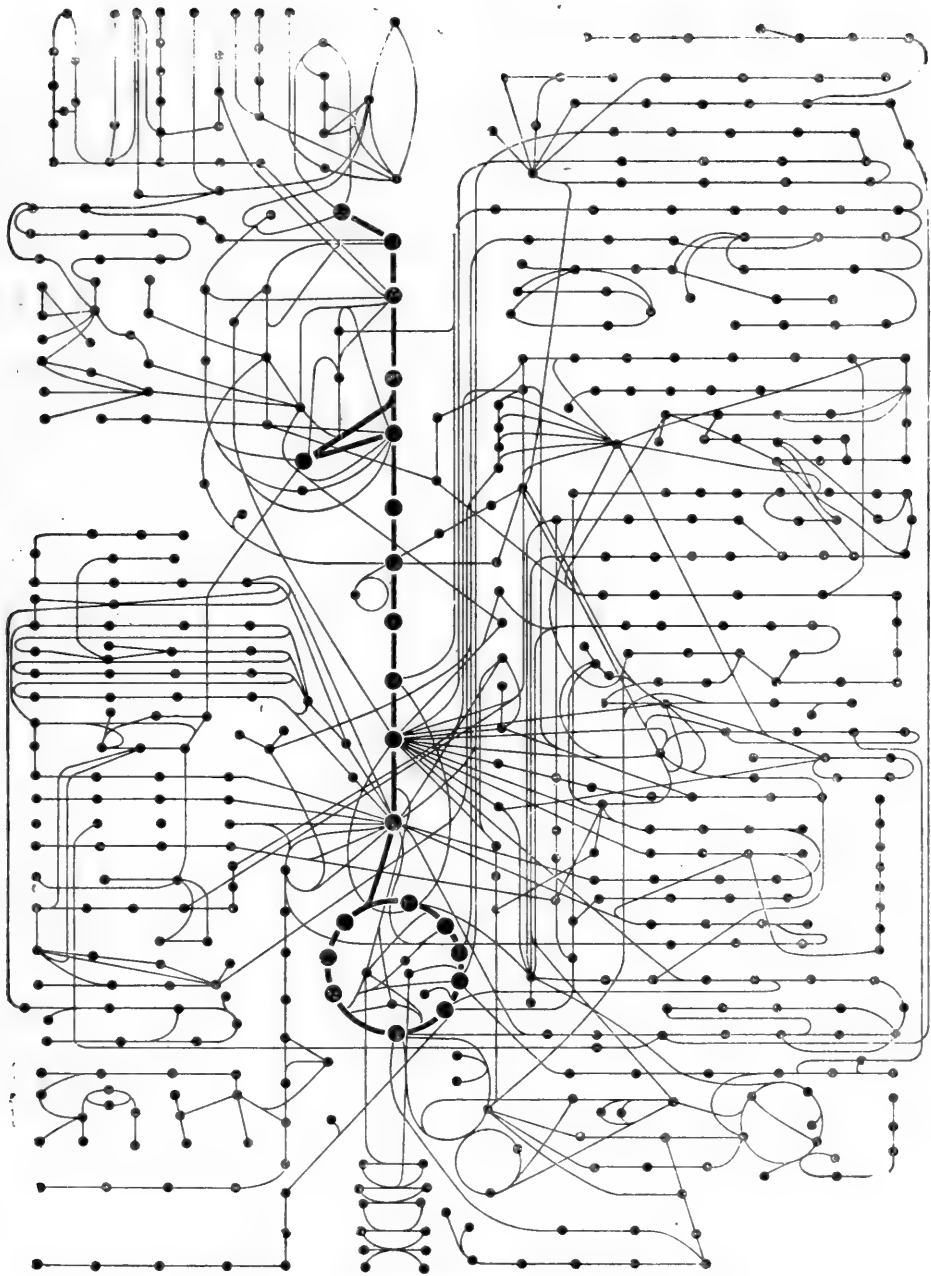
图 1-38 本书提到的一些生物之间的进化关系。树枝表示共同血统的路线（不同于图 1-16 所示的树），但长短不表示所经历的时间。（同样请注意，图的垂直轴只表示生物的主要类别，不表示时间）

相配合像一个生物体那样发挥功能。最早发展形成的细胞之一很可能是上皮细胞。上皮细胞连接成层，把动物的内外空间隔开。除上皮细胞外，最初分化的细胞类型包括神经细胞、肌细胞和结缔组织细胞，所有这些细胞在当今最简单的动物内都能找到。

高等动物的进化中(图1-38),运用同样的基本发展策略,产生越来越多的特化细胞和越来越高级的协作。在高等动物中有两个系统以不同方式体现多细胞结构中的最复杂的方面:一个是脊椎动物的免疫系统,免疫系统细胞有可能产生几百万种不同的蛋白质抗体;另一个是神经系统。在低等动物中,神经细胞间的连接型式多半是在遗传上完全被

定的，行为型式因遗传突变而进化。包括人在内的高等动物中，动物越高等神经系统的性能和结构越易改变(学习)，这是神经细胞能对环境影响引起的电活动作出反应而改变它们连接的结果。

【王顺德译 赵寿元校】



导致小分子与细胞发生相互转变的化学反应的迷津

第二章 小分子、能量和生物合成

“我要告诉您，我无需肾，也无需动物——不论是人还是狗，也能制备尿素。”这句话由年轻的德国化学家 Wöhler 写于 150 年之前，它标志着认为活体中存在特殊的生命力，这种力可产生活体的与众不同的特性和产物这样的信念的结束。但是，Wöhler 时代的新发现却已成为今日的普通常识，即活体是由化学物质所构成的。在现代的生命观中，活力论或任何其他的超越化学和物理学定律的理论已无立足之地。但这不等于说，生物学中已无奥秘；在以后几章中将可以看到，生物学中仍然存在许多未知的领域。不过我们一开始还是应该着重讨论已知的大量事实。

现在，我们已拥有关于细胞的基本分子——不只是少数分子，而是几乎所有的分子——的详尽知识。在许多例子中，我们已知它们的精确的化学结构，以及它们如何被精确地制造和分解。我们大体上已知，化学能如何驱动细胞的生物合成反应，热力学原理如何在细胞中起作用以创造分子的有序，以及细胞内源源不断地发生的无数的化学变化如何得到控制和协调。

在本章和下一章中，我们将概述活细胞的化学特性。本章讨论有关小分子的过程：细胞赖以合成其基本的化学成分和赖以获得其能量的机制。第三章讨论细胞大分子，它们是小分子的多聚体，它们的特性决定生物过程的专一性和生物信息的传递。

细胞的化学组分

细胞化学以碳化合物为基础¹

活细胞是由一组局限性的元素所组成，其中六种元素（C、H、N、O、P、S）构成其重量的 99% 以上。这一成分明显不同于地壳的成分，因而成为活细胞具有特种化学类型的证据（图 2-1）。这种特殊的化学是怎样的呢？它如何进化的呢？

活细胞最丰富的物质完全不特殊，因为它覆盖了地球表面的三分之二。水占细胞重量的 70% 左右，大多数细胞内的反应发生在水溶液环境中。地球上的生命起源于海洋，原始环境的条件在活体的化学上打上了烙印。所有的生物都是围绕着水的独特的性质而设计的，例如：水的极性和氢键，水的高熔点和沸点，以及水的大的表面张力（组合图 C，第 44 页）。

如果我们不考虑水，则一个细胞的绝大多数分子都是碳化合物，它们成为有机化学讨论的主题。因为碳能形成大分子，所以在地球上所有元素中，碳是最突出的元素；唯有硅各方面与碳相近，但也难以比拟。碳原子因其体积小且外壳层上有 4 个电子，而能与其他原子形成 4 个强共价键。最重要的是，它能与其他碳原子连接成链和环，因而产生大而复杂的分子，其大小无明显的上限。细胞中其他含量丰富的原子也是小而能构成非常强的共价键的原子（组合图 D，第 46 页）。

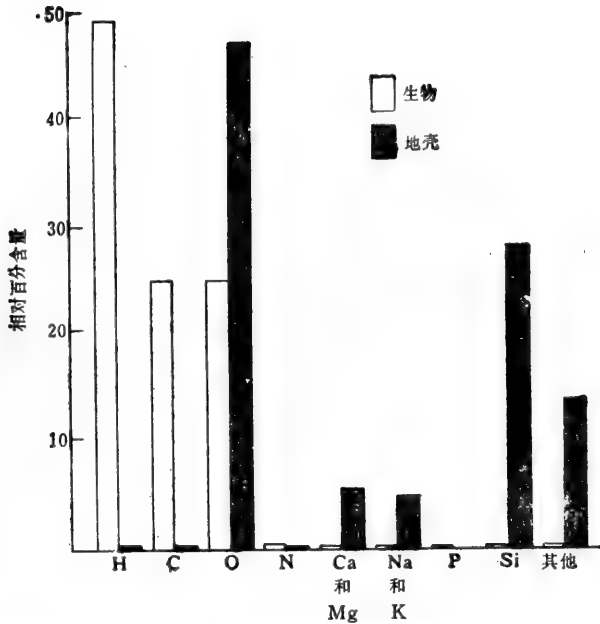


图 2-1 地壳(无生命界)中发现的化学元素相对丰度与活体软组织内发现的化学元素相对丰度的比较。相对丰度以其占原子总数的百分比表示。

根据碳与其他元素之间共价结合的简单规律，原则上允许形成像天文数字那么多的化合物。细胞内不同碳化合物的数目是很大的，但是这仅是理论上可能的一小部分。在某些例子中，我们能指出为什么这一化合物或那一化合物能执行某一生物功能的真正原因；但看来实际“入选者”只不过是许多合乎情理的选择对象之一，其所以入选往往是带有偶然性的(图 2-2)。一旦选定之后，某些化学结构和反应方式在进化过程中便可连同变化一起保持下去。显然，新类型的化合物的发展是不甚必要或不太有用的。

细胞利用四种基本类型的小分子

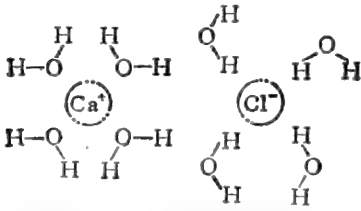
原子的某些简单的组合例如甲基 ($-\text{CH}_3$)、羟基 ($-\text{OH}$)、羧基 ($-\text{COOH}$) 和氨基 ($-\text{NH}_2$)，可在生物分子内反复出现。每一种如此的基团都具有独特的化学和物理特性，影响着基团所在分子的行为。主要类型的基团以及它们的一些明显的特性归纳在组合图 D 中 (第 46 页)。

细胞的所谓小有机分子是碳化合物，其分子量从 100 至 1000，含有多至 30 个左右的碳原子。通常发现这种分子游离在细胞质溶液内，它们在细胞质里形成用以构成大分子的中间产物库，它们也是将来自食物的能量转化成可用形式的化学反应中的基本中间产物(见下文)。

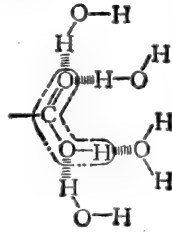
细胞内(粗略估计)有近千种小分子，但是其中有许多在化学结构上是相互有关的。所有的生物分子都是从简单的小分子合成，又可分解成相同的简单的小分子，而且合成和分解都是通过范围有限和服从一定规律的一系列化学变化而发生的。因此，细胞内的化合物可分成为数不多的几个族。细胞内的大分子由小分子装配而成，所以分别属于相同的类别；细胞内的大分子将在本书第三章论述。

亲水的和疏水的分子

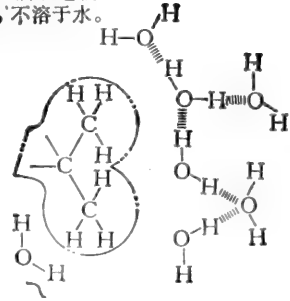
水分子因极性而聚集在离子和其它极性分子周围



所以参与水的氢键结构的物质是亲水的，相对地易溶于水。

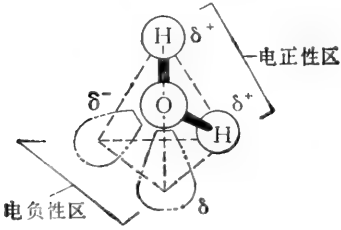


非极性分子中断水的氢键结构，所以它们是疏水的，不溶于水。



水

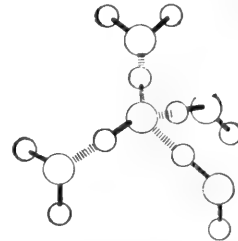
虽然水分子整个呈中性（有同数的电子和质子），但电子是不对称地分布，使分子呈极性。



氧核把电子部分地拉离氢核，使这些核带有少量净正电。弱的负电区出现在想象的四面体的另外两角上的氧原子附近。

冰结构

在氢键点阵中水分子暂时连接在一起。甚至在37℃，15%的水分子短暂地与4个其余水分子连接，称为“不定聚集”。

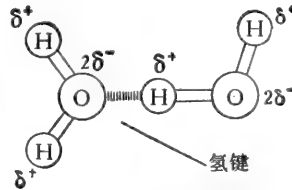


水的粘性决定其许多反常的特性，如高表面张力、高比热和高蒸发热。

氢键

因为水分子是极化的，所以两个相邻的水分子能形成键，称为氢键。氢键的强度只有共价键强度的1/20左右。

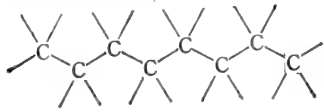
当3个原子位于一直线时氢键最强



组合图 C 水的化学特性及

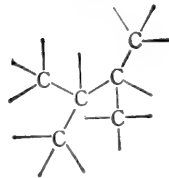
碳骨架

细胞中碳的独特作用来自它能与其它碳原子形成强共价键。因此，碳原子能连接成链。



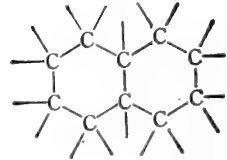
[也可写成]

或分枝树



[也可写成]

或环



[也可写成]

共价键

生物分子中的原子通常经共价键相连(形成共享的电子对)。每一原子能形成固定数目的共价键,呈一定的空间排列。

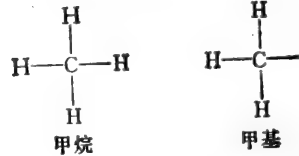


双键存在并有不同的空间排列

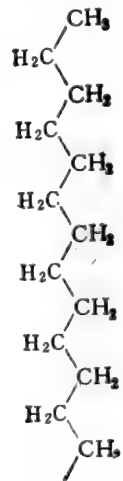


烃

碳和氢在一起构成稳定的化合物,称为烃。烃是非极性的,不形成氢键,一般不溶于水。

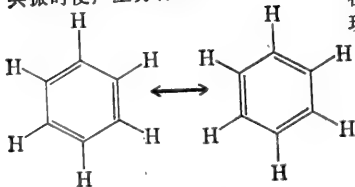


部分脂肪酸链:



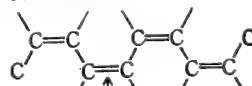
共振与芳香族

当整个环状化合物发生共振时便产生芳香环

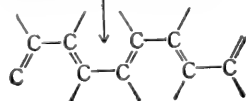


[常写成]

碳链可包含双键。如果双键是在隔一的碳原子间,则成键电子在分子内移动,通过称为共振的现象使结构稳定。



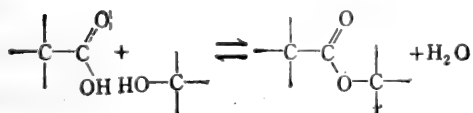
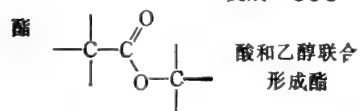
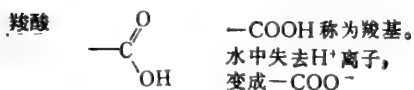
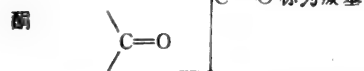
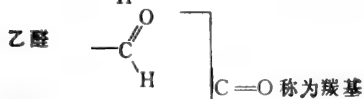
实际情况是在这两种结构之间



组合图 D 生物分子中

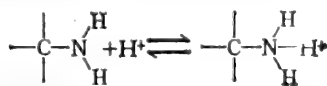
C-O 化合物

许多生物化合物含结合氧的碳，例如：



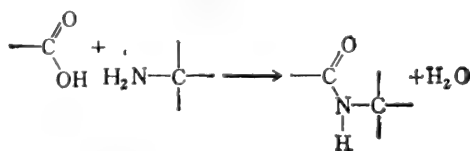
C-N 化合物

胺和酰胺是含氮碳连接的化合物的两个重要例子。水中的胺与H⁺离子结合成带正电。



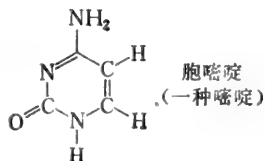
所以它们是碱性的

酸和胺结合成酰胺。它们比酯稳定。它们不同于胺，在水中不带电。一个例子是肽键。



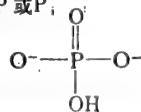
氮也出现在几种环化合物中：

嘌呤和嘧啶

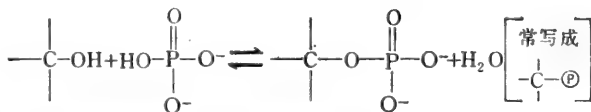


磷酸基

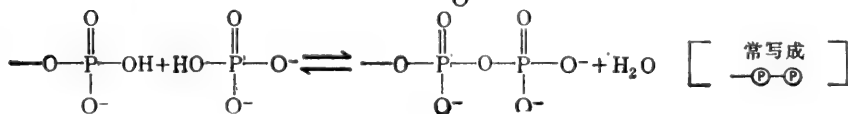
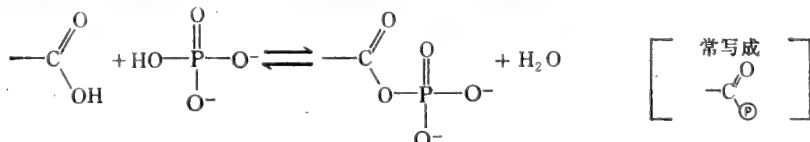
无机磷酸基是从磷酸H₃PO₄形成的稳定离子。它常被写成P或P_i



磷酸基和游离的羟基之间能形成磷酸酯



磷酸基和羧基结合，或是两个或两个以上的磷酸基相结合，形成酸酐



当非常利于酸酐水解时这些反应很容易倒过来

大致说来,细胞含有四类小有机分子:单糖、脂肪酸、氨基酸和核苷酸。每一类含有许多具有共同的化学性质的不同成员。虽然有些细胞的化合物不属于这四类,但这四类包括小分子以及由这些小分子构成的大分子,合在一起占细胞质量的极大部分(表 2-1)。

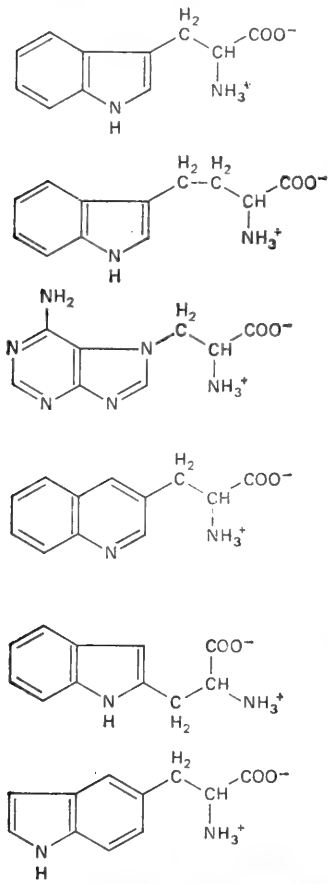


图 2-2 活体只合成理论上它们能制造的有机分子的一小部分。图示的 6 个氨基酸中,细胞只制造顶上的一个(色氨酸)。

糖是细胞的营养分子

最简单类型的糖即单糖是通式为 $(CH_2O)_n$ 的化合物,其中 n 为正整数,从 3 至 7。例如,葡萄糖的分子式为 $C_6H_{12}O_6$ (图 2-3)。所有的糖含有羟基以及醛基 $\left(\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{O} \end{array}\right)$ 或酮基 $\left(\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagdown \\ \text{C}=\end{array}\right)$ 。

一个糖的羟基可与另一个糖的醛基或酮基结合,脱水形成二糖(组合图 E, 第 52 页)。更多的单糖以相同的方式加成,使低聚糖(三糖、四糖等等)的长度越来越长,一直长到拥有几千个单糖单位(残基)的非常大的多糖。因为每一个单糖有几个自由的羟基,它们能与另一单糖(或一些其他化合物)相连,所以,可能有的多糖结构的数量很大。即使由两个葡萄糖残基组成的简单的二糖也能有 11 种变体(图 2-4),而 3 个不同的己糖($C_6H_{12}O_6$)可连在一起,构成几千种不同的三糖。为此,很难测定任何特定多糖的结构;根据现有的方法,测定 6 个连接糖的排列(例如糖蛋白中的糖)所花费的时间,比测定含有好几千个核苷酸的 DNA 分子的核苷酸序列的时间还要长。

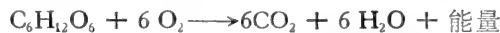
葡萄糖是许多细胞的主要营养化合物。一系列氧化反应使这种己糖变成较小的糖衍

表 2-1 细菌细胞的近似的化学组成

	占细胞器重量的百分比(%)	每种类型分子正数目		占细胞器重量的百分比	每种类型分子数目
水	70	1	核苷酸及其前体	0.4	200
无机离子	1	20	脂质及其前体	2	50
糖及其前体	3	200	其他小分子	0.2	~200
氨基酸及其前体	0.4	100	大分子(蛋白质、核酸和多糖)	22	~500

引自 S. E. Luria, S. J. Gould and S. Singer, A View of Life. Menlo Park, Ca: Benjamin-Cummings, 1981.

生物,最终变成 CO_2 和 H_2O 。净结果可写成



在葡萄糖分解过程中,生物合成反应中必不可少的能量和“还原力”,主要以分别称为 ATP 和 NADH 的两种关键性的分子的形式被利用和贮存。

由葡萄糖组成重复结构的简单多糖在动物细胞内主要是糖原，在植物细胞内主要是淀粉，它们被用于贮存能量，以备不时之需。但是糖的功用并非完全局限于产能和贮能。例如，重要的胞外结构物质(如纤维素)是由简单的多糖组成的。又如小而复杂的无重复糖分子序列常共价地与糖蛋白中的蛋白质以及糖脂中的脂相连接。这些糖蛋白和糖脂的短低聚糖链中可能存在的巨大变化，被认为可在细胞内和细胞间的奇妙的识别过程中起作用。

脂肪酸是细胞膜的组分

十六烷酸(图 2-5)那样的脂肪酸有两个明显不同的区域：长碳氢链，它是疏水的(不溶于水)，无化学活性；羧基团，在溶液中电离，非常亲水(溶于水)，易形成酯和胺。事实上细胞内几乎所有的脂肪酸分子都通过它们的羧基团与其他分子共价相连。细胞内发现的许多不同的脂肪酸在碳氢链的长度以及它们所含的碳-碳双键的数目和位置等方面存在不同的化学特性(组合图 F)。

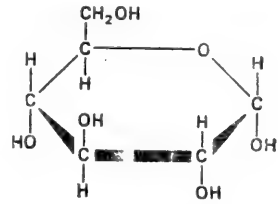


图 2-5 简单的己糖即单糖葡萄糖的结构

脂肪酸是有价值的营养源，因为它们能分解产生ATP，根据重量比计算，其ATP能量相当于葡萄糖能量的两倍。

它们以甘油三酯分子小滴的形式贮存在许多细胞的细胞质内，甘油三酯分子由3条脂肪酸链组成，每条链接一个甘油分子(组合图 F)。有需要时，脂肪酸链能从甘油三酯中释放出来，分解成二碳单元。这些二碳单元在称为乙酰辅酶A的分子内表现为乙酰基团，它们在各种产能反应中进一步降解，关于产能反应将在下面讨论。

但是，脂肪酸的最重要的功能是构成细胞膜。包裹着所有的细胞和围住它们内部细胞器的那些薄而不可透的片层主要由磷脂组成，磷脂是小分子，类似于甘油三酯，因为它们都是由脂肪酸和甘油构成的。然而，在磷脂中，甘油连接两个而不是三个脂肪酸链。甘油的其余部位由磷酸基团占据，磷酸基团又与另一个小的亲水化合物例如乙醇胺、胆碱或丝氨酸相连。

每一个磷脂分子都有一个由两条脂肪酸链组成的疏水的尾，以及一个磷酸基团所在的亲水的极性头基团。因此，磷脂分子实际上是去垢剂，从它们的特性看来，这是很明显的。小量的磷脂会在水面上铺开，形成单层磷脂分子；在此薄膜中，尾区紧紧地聚集在一起，朝向空气，而头部基团则与水接触(组合图 F)。两片如此的膜可尾尾相联，构成磷脂夹层，即脂双层，它是所有细胞膜的结构基础。

氨基酸是蛋白质的亚基

常见的氨基酸在化学上是各不相同的，但是它们都含一个羧基团和一个氨基，两者都与一个碳原子相连(图 2-6)。它们用作蛋白质合成的亚基；蛋白质是长的线性的氨基酸多聚体，这些氨基酸通过一个氨基酸的羧基团与下一个氨基酸的氨基之间的肽键而首尾相连(图 2-7)。蛋白质有20种常见的氨基酸，各有一个不同的侧链与 α 碳原子相连(图 2-8和组合图 G)。同样的20种氨基酸在所有的蛋白质包括细菌、植物和动物制造的蛋白质内反复出现。虽然正好选上这20种氨基酸或许是进化偶然性的一个实例，但是它

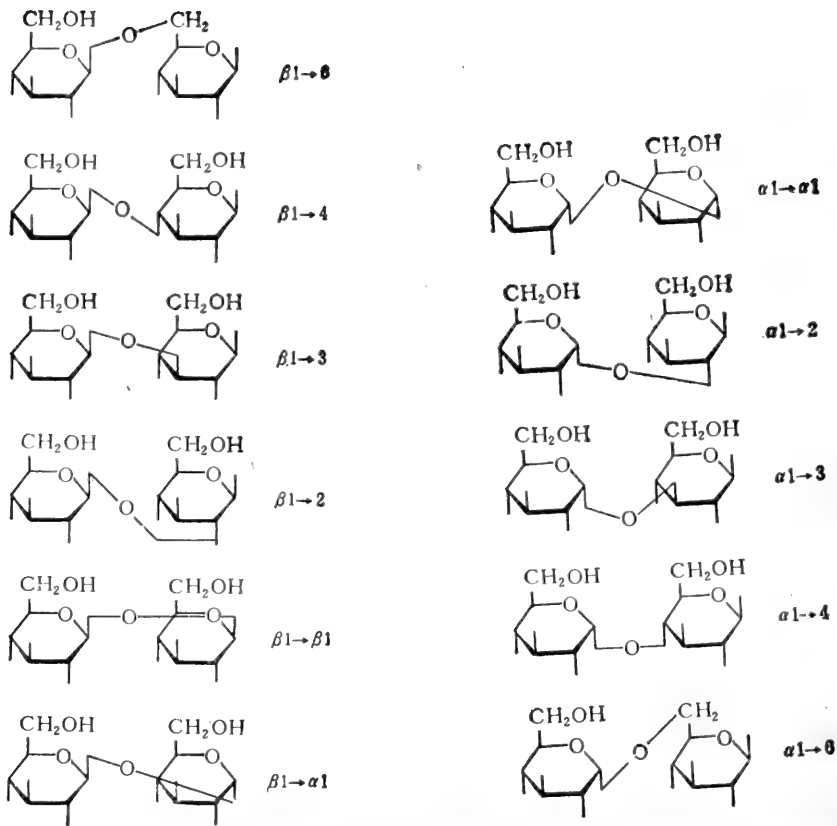


图 2-4 由两个 D-葡萄糖单位组成的 11 个二糖。虽然这些二糖仅在两个葡萄糖单位之间键连的类型有所不同，但是它们化学特性各异。因为与蛋白质和脂结合的低聚糖可能有 6 种或 6 种以上的糖，它们通过如图所示的键，连成线性的或分枝的排列，所以可能存在的不同类型低聚糖的数目是极大的。

们提供的化学多能性却是极其重要的。我们将会看到，总的看来氨基酸侧链的特性决定了它们所组成的蛋白质的特性，构成了蛋白质的全部各种各样的复杂功能的基础。

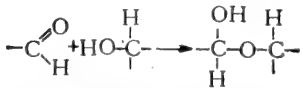
核苷酸是 DNA 和 RNA 的亚基

在核苷酸中，几种含氮的环状化合物之一（常称为碱基，因为它们能与 H^+ 结合）与也携带磷酸基团的五碳糖（核糖或脱氧核糖）相连。在核苷酸中发现的含氮环之间有很强的族类相似性。胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）和尿嘧啶（U）称为嘧啶化合物。因为它们都是六元嘧啶环的简单的衍生物；鸟嘌呤（G）和腺嘌呤（A）是嘌呤化合物，有另一个五元环与六元环融合在一起（组合图 H）。

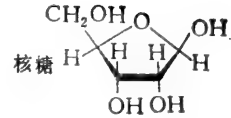
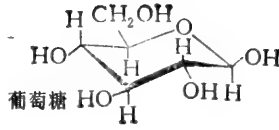
核苷酸可充当化学能的载体。尤其是腺嘌呤的三磷酸酯 ATP（图 2-9）可参与细胞内成百个反应之间的能量传递。它的两个活性的易水解的末端磷酸基团在食物氧化期间被迫形成共价键，一个或两个“高能”磷酸基团水解释放的能量能在别处用于驱动能力上不利的生物合成过程。其他核苷酸衍生物用作传送特定化学基团的载体，如将氢原子或糖残基从一个分子传送至另一个分子。环腺苷酸（cAMP）是含腺嘌呤环状磷酸衍生物，

环形

糖的醛基或酮基能与羟基反应

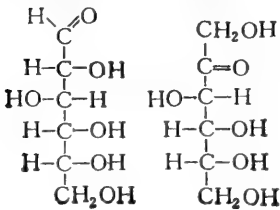


对较大的糖 ($n > 4$) 来说, 这反应能发生在同一分子内, 形成五或六元环。



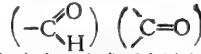
己糖

$n = 6$ 两种普通的己糖是
葡萄糖 果糖

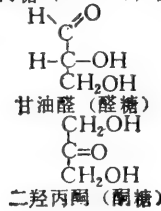


单糖

单糖是
醛糖或酮糖

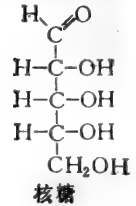


它们也有两个或两个以上羟基。它们的通式是 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 。最简单的是丙糖 ($n = 3$)，例如



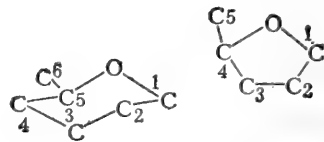
戊糖

$n = 5$
普通的戊糖是



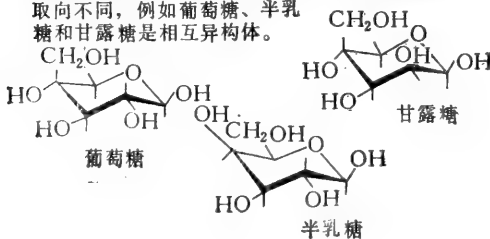
编号系统

糖的碳原子是从最靠近醛基或酮基的一端开始编号的



立体异构体

单糖有许多异构体, 其区别仅在于它们羟基的取向不同, 例如葡萄糖、半乳糖和甘露糖是相互异构体。



D型和L型

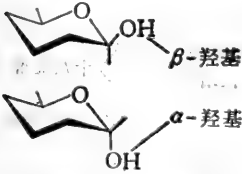
是互为镜像的两种异构体, 有相同的化学特性, 取相同的名称, 而加前缀D或L以示区别。



组合图 E 细胞内一

α连接和β连接

醛或酮的碳上的羟基能迅速地从一个位置转移到另一个位置。这两个位置称为α位和β位

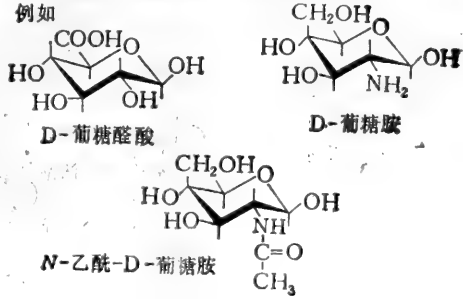


一旦一个糖与另一个糖连接时，α型或β型便冻结了。

糖衍生物

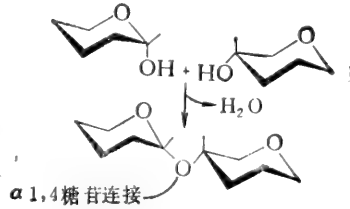
简单单糖的羟基能被其它基团替代。

例如



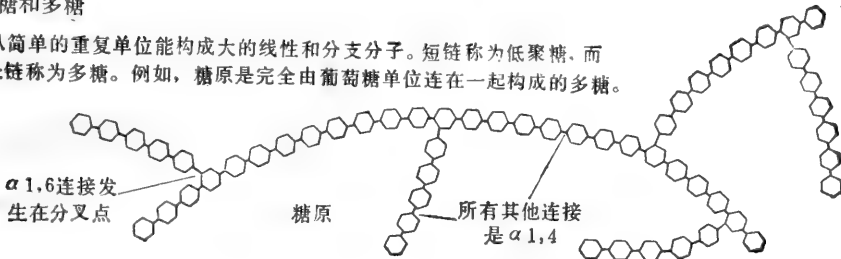
二糖

两个糖能互相反应，形成糖苷连接。三个普通的二糖是麦芽糖（葡萄糖α1,4葡萄糖）、乳糖（半乳糖β1,4葡萄糖）和蔗糖（葡萄糖α1,2果糖）。



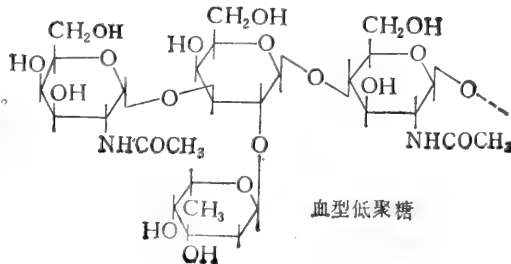
低聚糖和多糖

从简单的重复单位能构成大的线性和分支分子。短链称为低聚糖，而长链称为多糖。例如，糖原是完全由葡萄糖单位连在一起构成的多糖。



复杂的低聚糖

在许多情况下糖顺序是非重复的。可能有许多不同的分子。如此复杂的低聚糖通常与蛋白质或脂质连接。

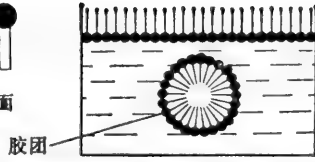


些常见的糖的类型

脂聚体

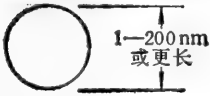
脂肪酸有亲水头和疏水尾

在水中它们能形成表面膜或形成小胶团

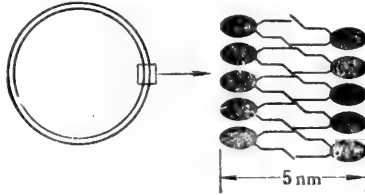


它们的衍生物能形成较大的聚集体，靠疏水力聚在一起。

在细胞质内甘油三酯形成大的圆球形脂肪滴

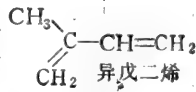


磷脂和糖脂形成自密闭的脂双层，它们是所有细胞膜的基础。



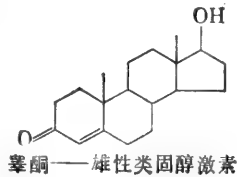
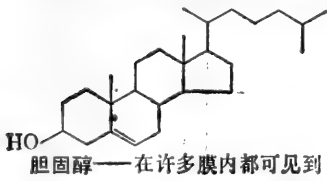
其他脂质

脂质是可溶于有机溶剂中的化合物。其它两种普通类型的脂质是类固醇和多聚类异戊二烯。两者都从异戊二烯单位构成。



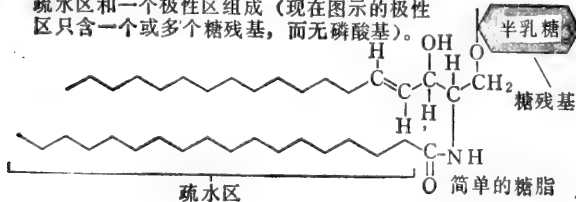
类固醇

类固醇具有普通的多环结构



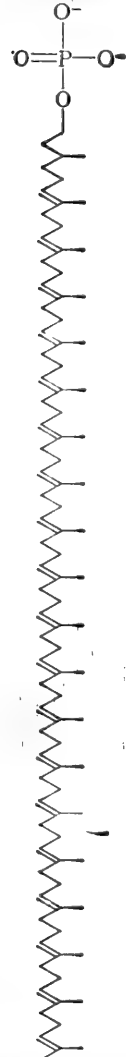
糖脂

这些化合物类似磷脂，由含两条长碳氢尾的疏水区和一个极性区组成（现在图示的极性区只含一个或多个糖残基，而无磷酸基）。



多聚类异戊二烯

异戊二烯的长链多聚体



磷酸多萜醇——在与膜有关的糖蛋白和某些多糖的合成中用于载运激活的糖

酸的类型以及它们所形成的结构

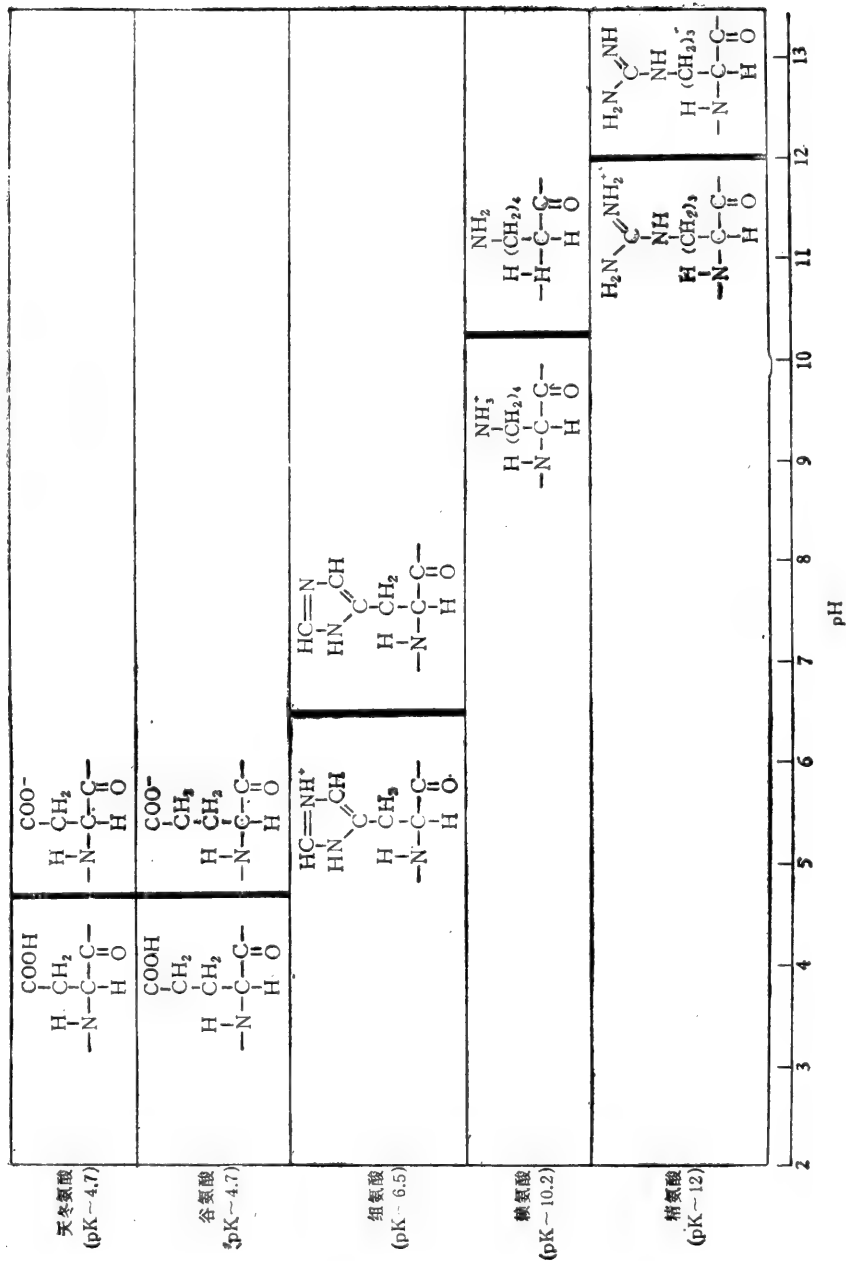


图 2-8 氨基酸侧链上的电荷取决于 pH。羧基在水溶液内易失 H⁺，形成带负电的离子，英语中用后缀“-ate”表示，如天冬氨酸或谷氨酸。胺的情况差不多，它在水溶液内吸收 H⁺，形成带正电的离子(英语中没有特别的名称)。这些反应迅速而可逆，带电和不带电这两种形式的量取决于溶液的 pH。pH 高时，羧酸倾向于带电，胺不带电；pH 低时，情况相反，羧酸不带电而胺带电。羧酸或胺线基正正好各带一半电时的 pH 称为氨基酸的 pK。

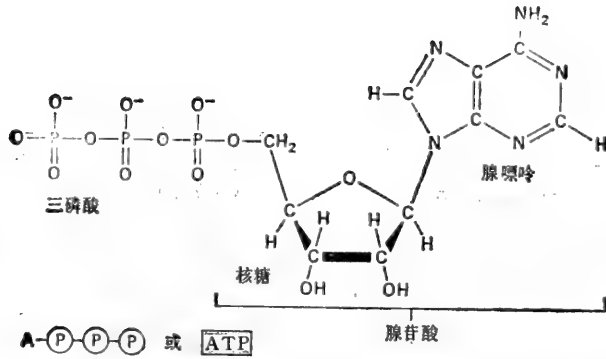


图 2-9 腺苷三磷酸(ATP)的化学结构;图中还显示这一化合物的两种通用的缩写。

生物的有序和能量

细胞必须服从物理学和化学的定律。力学的法则以及一种形式的能转换成另一种形式的能的法则既适用于蒸汽机,也适用于细胞。然而,必须承认,细胞有使人迷惑的特性,乍一看,细胞似乎可归入特殊的种类。众所周知,事物任其自然发展最终就会变成无序,例如大楼的倒塌、尸体的腐烂,等等。这种总趋势表达在热力学第二定律中便是:在任何孤立系统内,无序的程度只能增加。

令人不解的是,活体在各级水平上都是高度有序的。在蝴蝶翅膀或章鱼眼睛那样的大结构中,在线粒体或纤毛那样的亚细胞结构中,在构成这些结构的分子形状和排列中,都有十分明显的秩序。每一个蛋白质分子或核酸分子从环境中觅取大量的原子,它们聚集在一起,终于从高度无组织状态形成精确的结构。大分子总是由较小分子制成,因为当活细胞生长时,可从混乱中创造出秩序。甚至未分裂的细胞为了生存也需要经常保持有序或修复过程,因为细胞的所有的有组织的结构都要蒙受自发性事故和副反应。这在热力学上怎么可能呢?我们将会明白,回答这一问题的根据是细胞总是经常不断地向其环境释放能量,所以,就热力学意义上讲,细胞不是孤立的系统。

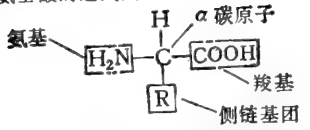
细胞释放的热能使生物的有序成为可能

就热力学而论,可把细胞及其周围的环境看作是一个密闭的箱子,这一箱子置于代表宇宙其余部分的均匀的物质海洋之中(图 2-11)。细胞为了生长和自立,必须不断地在箱内创造秩序。然而我们刚讨论过;热力学第二定律认为,在整个系统中(即箱子加海洋),有序量始终是减少的。所以,箱子内有序性的增加必须由宇宙其余部分无序性更大的增加才得以补偿。虽然箱子与海洋之间不能交换分子,却能交换热,热与有序之间存在定量的关系。热是分子随机骚动形式的能,所以它代表最无序形式的能。如果细胞向周围释放热,则它提高了周围分子运动的强度——从而增加分子运动的随机性,即增加无序。

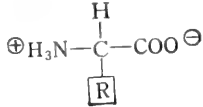
19 世纪末才第一次认识到热与有序之间的定量关系,它使我们原则上能计算一个细胞为了补偿在细胞内创造一定量的有序(如从氨基酸装配成蛋白质)究竟得释放多少热量(千卡),即此过程最终使宇宙的总无序增加了多少。考虑一定量的热能从热物体传至

氨基酸

氨基酸的通式是

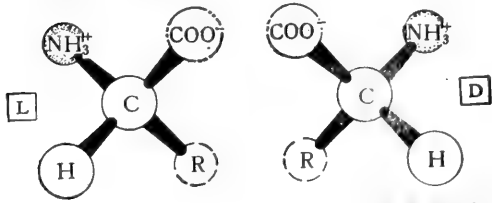


R 通常代表20种不同的侧链之一。在pH 7时氨基和羧基都电离。



旋光异构体

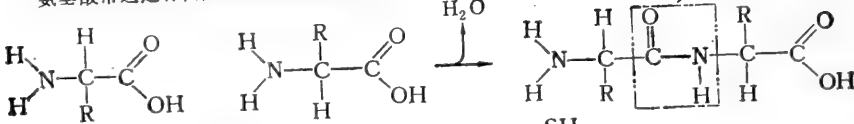
α碳原子是不对称的，允许存在两个镜像（或立体）异构体D和L。



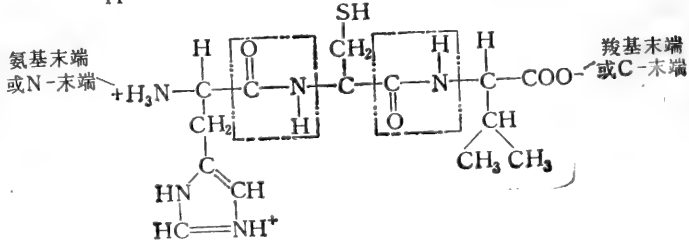
蛋白质完全由L氨基酸组成

肽键

氨基酸常通过称为肽键的酰胺键连接在一起



蛋白质是通过肽键连接起来的长氨基酸多聚体，总是把N-末端写在左边。



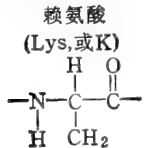
氨基酸族

常见的氨基酸按它们的侧链归类为：

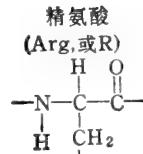
- 酸性
- 碱性
- 不带电的极性
- 非极性

这20种氨基酸缩写成3个字母或1个字母，因此，丙氨酸 = Ala = A

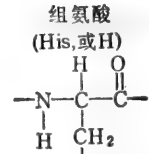
碱性侧链



这一基团碱性很强，因为共振使它的正电荷稳定

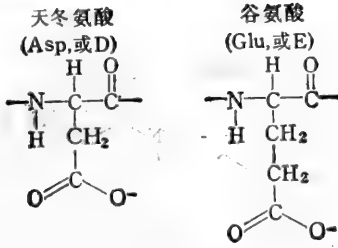


这些氮对H⁺有比较弱的亲和力，在中性pH下仅部分带正电。

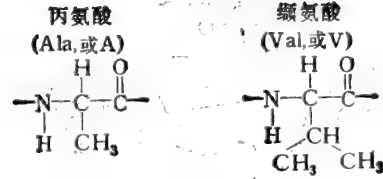


组合图 G 与蛋白质

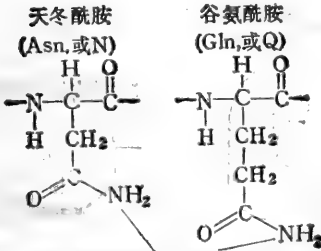
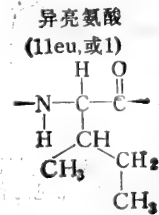
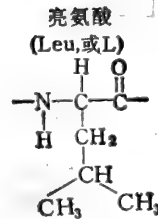
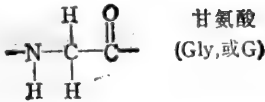
酸性侧链



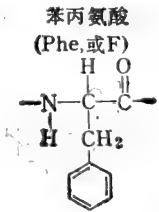
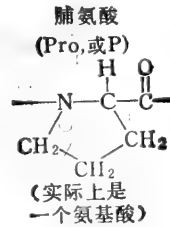
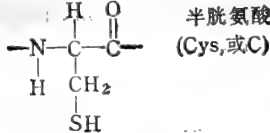
非极性侧链



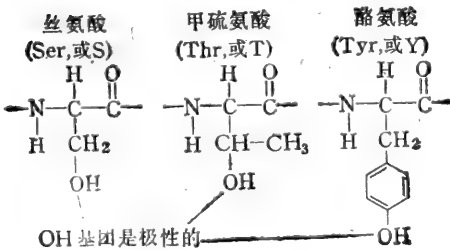
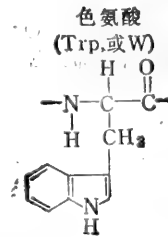
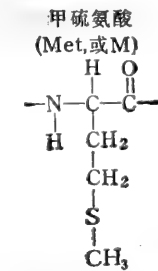
不带电的极性侧链



虽然酰胺 N 在中性 pH 下不带电，但它是有极性的。



配对的半胱氨酸允许在蛋白质内形成二硫键



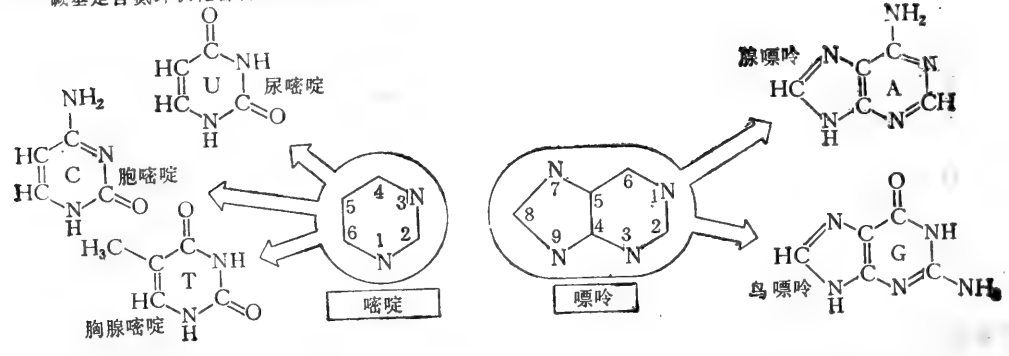
OH 基团是极性的

蛋白质中的非极性侧链倾向于集聚在分子的内侧

合成有关的20种氨基酸

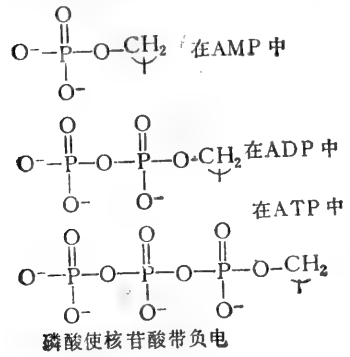
碱基

碱基是含氮环状化合物，嘌呤或嘧啶。



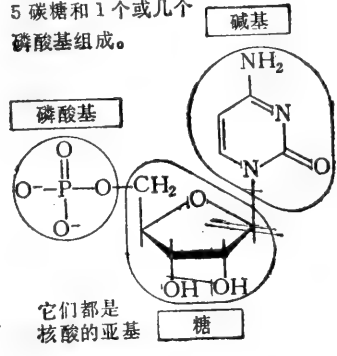
磷酸

磷酸通常与核糖或脱氧核糖的C5羟基相连。常见的有一、二和三磷酸。

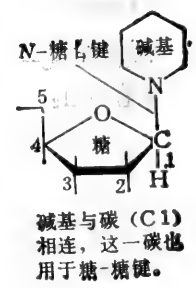


核苷酸

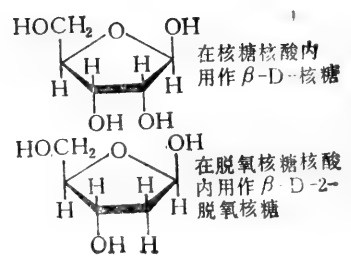
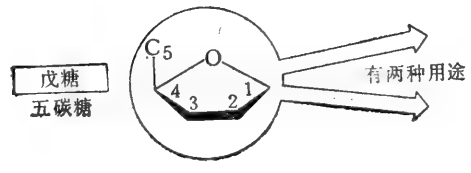
核苷酸由含氮碱基、5 碳糖和 1 个或几个磷酸基组成。



碱基-糖键连



糖



组合图 H 在细胞内见

命名法

名称会混淆，缩写则反而清楚。

碱基 + 糖 = 核苷
碱基 + 糖 + 磷酸 = 核苷酸

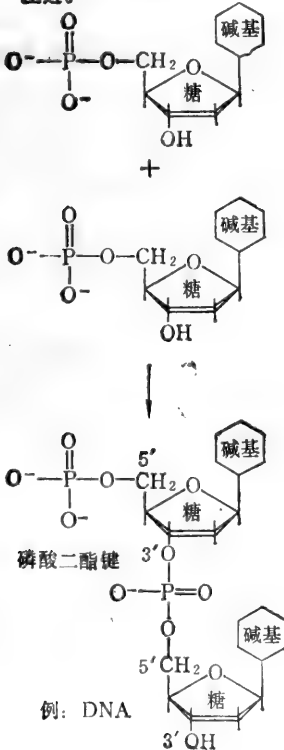
碱基	核苷	缩写
腺嘌呤	腺苷	A
鸟嘌呤	鸟苷	G
胞嘧啶	胞苷	C
尿嘧啶	尿苷	U
胸腺嘧啶	胸苷	T

核苷酸缩写为 3 个大写字母。

AMP = 腺苷一磷酸
dAMP = 脱氧腺苷一磷酸
UDP = 尿苷二磷酸
ATP = 腺苷三磷酸
等等

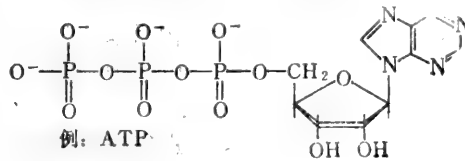
核酸

核苷酸通过一种磷酸二酯键连接成核酸。
核酸链中的核苷酸线性序列通常缩写成一个字母的密码，即 A-G-C-T-T-A
—C-A，链的 5' 末端写在左边。

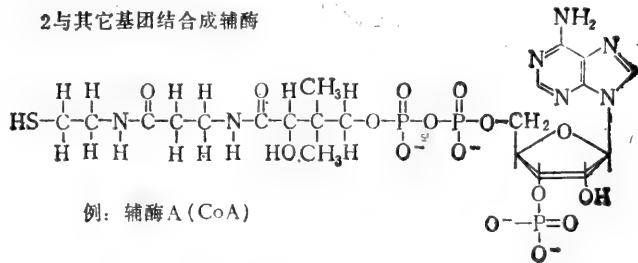


核苷酸有许多其他功能

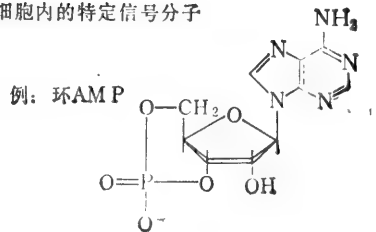
1. 在它们的易水解的磷酸键上携带化学能 NH_2



2. 与其它基团结合成辅酶



3. 用作细胞内的特定信号分子



到的主要核苷酸类型及其衍生物一览

冷物体时所引起的分子运动的变化，可以推导出这一关系。虽然这些详细的定量关系与我们现在的讨论无关，但是务请注意，产热的化学反应必然在分子水平上与产生有序事件本身密切相关。这些相关的反应称为偶合反应，下文将对偶合反应予以说明。

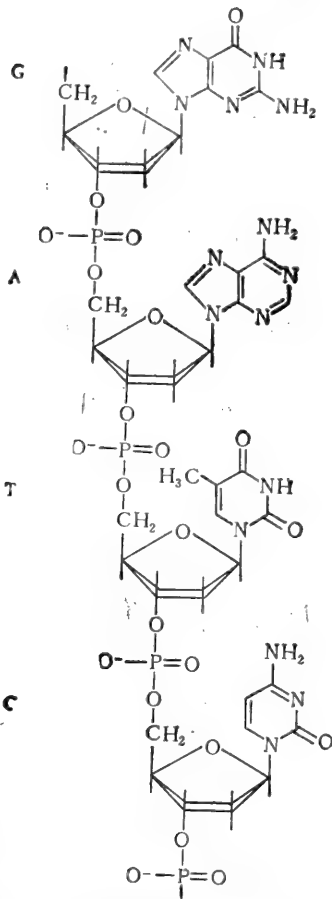


图 2-10 一小段脱氧核糖核酸或 DNA。DNA 及其密切相关的 RNA 是细胞的核酸。

光合作用反应将在第九章详细讨论。大体上说来，它们可区分为两个不同的阶段。在第一个阶段(光反应)中，可见光辐射激发色素分子中的电子，这电子在返回至低能态时，提供了合成 ATP 和 NADPH 分子所需的能量。在第二个阶段(暗反应)，ATP 和 NADPH 被用于驱动一系列“碳固定”反应，利用空气中的 CO₂ 形成糖分子(图 2-12)。

迄今为止，就绿色植物而论，光合作用的最终结果可概括于以下的反应式：



这是糖的氧化分解的逆反应。然而，这一简单的反应式却隐藏着复杂的暗反应的本质，后者包含许多连锁的反应步骤。而且，当最初固定的 CO₂ 形成糖，以后的代谢反应就立即把这些糖转化成植物细胞必不可少的其他小分子和大分子。

化学能通过植物到动物

动物和其他不进行光合作用的生物不能从阳光直接获得能量，所以不得不依靠摄食植物所取得的“间接的”能量来维持生存。植物细胞制造的有机分子为摄食植物的生物体提供结构成分和燃料。所有的各种类型的植物分子包括糖、蛋白质、多糖、脂质和许多其

图 2-11 高度示意地阐明，这些偶合反应怎样释放热能，使环境无序，从而补偿它们在细胞内造成的有序性的增加。因为放热才使这些反应成为可能，所以可以认为放热驱动产生有序的过程。

化学反应中能量不生不灭。由于细胞源源不断地丧失热量，驱动生物有序的产生，所以也需要源源不断地将能量输入细胞。这一种能必定不是热能。对植物来说，能量最初得自太阳的电磁辐射；而对动物来说，能量则来自贮存在它们吃进的有机分子的共价键。不管怎样，因为这些有机营养物质本身是由光合生物例如绿色植物产生的，所以太阳乃是这两种类型生物体的最终能源。

进行光合作用的生物利用阳光合成有机化合物

太阳能通过进行光合作用的生物体即植物或细菌的光合作用而进入生命世界(生物圈)。在光合作用过程中，电磁能转换成化学键能。但与此同时，部分太阳光能转换成热能，正是向环境释放的热增加了宇宙的无序，这才驱动了光合作用过程。

它分子都能为此目的服务。

植物和动物之间的交往不完全是单向的。植物、动物和微生物在地球上共存了那么长时间,以致许多植物、动物和微生物已成为其他植物、动物和微生物环境的不可缺少的一部分。光合作用释放出来的氧被几乎所有生物的有机分子的氧化所消耗。今日通过绿叶的光合作用“固定”到大型有机分子中去的一些 CO_2 分子则是昨天动物通过呼吸作用而释放到大气中去的。因此,碳的利用是个循环的过程,它涉及整个生物圈,越过生物个体之间的界限(图 2-13)。同样,通过一系列相似的循环原则上有可能追查氮、磷和硫原子从一个生物分子到另一个生物分子的踪迹。

细胞通过生物分子氧化获得能量

细胞中的碳、氢原子不是处于它们最稳定的形式。由于地球大气含有大量氧,碳的能力学上最稳定形式为 CO_2 , 氢的能力学上最稳定形式为 H_2O 。所以细胞能从葡萄糖或蛋白质分子获得能量,只要允许它们的碳、氢原子与氧结合,相应地产生 CO_2 和 H_2O 。然而细胞并不是像燃烧那样,通过一个步骤就使分子氧化。它使待氧化分子通过许多反应,而只有极少数反应涉及直接加氧。我们必须对氧化过程有一个清晰的概念,才能追查这些反应并了解这些反应的动力。

就上述的意义而论,氧化作用不只是意味着加上氧原子,它更普遍地适用于电子从一个原子转移至另一个原子的任何反应。这种意义的氧化作用是指电子的减除,而还原作用即氧化作用的逆过程,则是指电子的增加。因此,如果 Fe^{2+} 失去一个电子变成 Fe^{3+} , 则被 Fe^{2+} 氧化了; 如果氯原子得到一个电子变成 Cl^- , 则氯原子被还原了。

电子仅在共价键连接的原子之间部分转移时,也使用同样的术语。例如,当碳原子与氧、氯或硫这些电负性原子共价结合时,它放弃的电子比它共享的电子来得多,即获得部分正电荷,所以说它被氧化了。相反, $\text{C}-\text{H}$ 键内的碳原子相对地有较多的电子,所以说它被还原了(图 2-14)。

在细胞内,营养物氧化把有机分子中的 C 和 H 原子(它们在那里相对地有较多的电子,处于还原状态)转化成 CO_2 和 H_2O , C 和 H 原子在 CO_2 和 H_2O 中放弃了电子,所以是高度氧化了。电子从碳和氢移至氧,使所有的原子都获得较稳定的状态,因而能力学上是有利的。通过一系列中间反应,电子逐步地发生转移,在大多数情况下,这一系列反

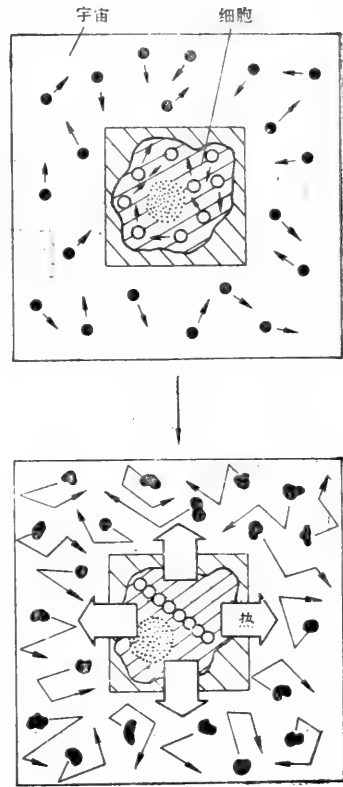


图 2-11 为了对活细胞进行简单的热力学分析,有必要考虑密封在箱子内的细胞及其周围环境,这箱子可与宇宙的其余部分交换热,但不交换分子。在上面这张图中,细胞和宇宙其余部分的分子都绘成相对无序状态。在下面一张图中,细胞已通过使其内含分子有序化的反应而放热。宇宙其余部分中分子的随机运动包括键变形的增加所造成的无序,足以补偿细胞内秩序的增加,这正是热力学定律对自发过程的要求。因此,细胞向其周围环境放热可使细胞内部变成高度有序,而与此同时,整个宇宙则变成更为无序。

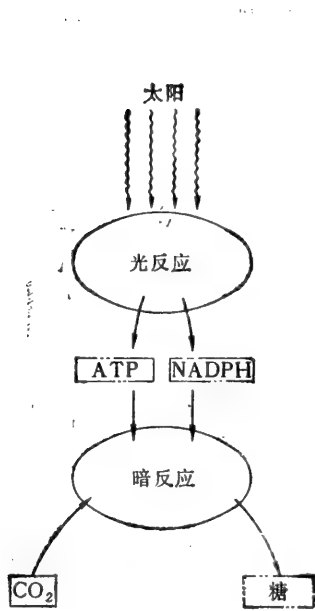


图 2-12 绿色植物光合作用的两个阶段

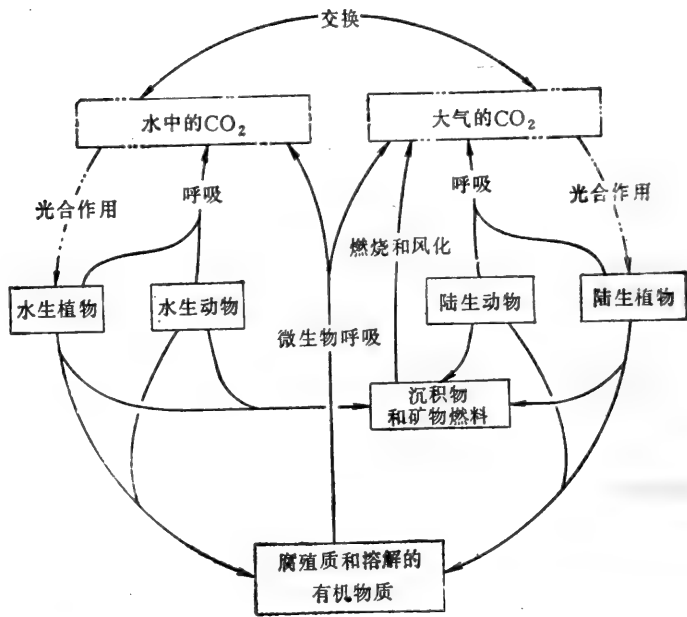


图 2-13 碳循环。一个个碳原子通过植物、细菌和海藻的光合作用活动而整合入生物的有机分子。碳原子通过循环途径进入动物、微生物和土壤与海洋中的有机物质中。当有机分子被细胞氧化或被人作为矿物燃料燃烧时， CO_2 便又贮存在大气内。

应涉及氢原子组分在分子间的转移。

有机分子在一系列酶促反应中分解

虽然碳的能力学最有利形式为 CO_2 ，氢的能力学最有利形式为 H_2O ，但是活有机体并不烟消云散，同样理由，您手上的书也不会突然起火燃烧：两者都存在于亚稳态的能槽之中(图 2-15)，它们需要有活化能，才能转化成较稳定的构型。就书而论，点着的火柴能提供活化能。对活细胞来说，可以不甚剧烈的和破坏性较小的方式获得同样的结局。高度专一的蛋白质催化剂(即酶)通过降低结合分子所能进行的特定反应的活化能而与生物分子结合。酶通过选择性地降低某一途径的激活能，来确定采取可供选择的几个反应途径中哪一个途径(图 2-16)。各种细胞分子就是以这种方式定向通过特定的反应途径的。

活有机体的成就多半归之于细胞能制造大量特异的酶。各种酶都是蛋白质，有独特的三维构象，可形成一个活性部位，把一组特定的其他分子(底物)结合在它的表面。酶以这样的方式与其底物结合，以致可加速底物所能进行的许多化学反应中的一个特定反应，典型情况下速率可增加 10^6 多倍。没有一种其它类型的催化剂可以与酶的专一性和效率相提并论。

氧化反应释放的部分能量与 ATP 的形成偶合

细胞之所以能从葡萄糖的“燃烧”获得有用的能，完全是因为细胞以极其复杂的和有

控制的方式使葡萄糖燃烧。通过酶指导的反应途径，产生生物有序的合成或合成代谢的

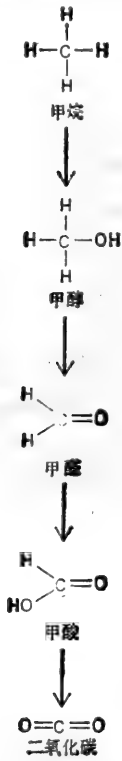


图 2-14 甲烷的碳原子通过逐步失去氢原子而转化成二氧化碳的碳原子。每转化一步，便有电子从碳原子上丢失，使碳原子转化至能力学上较稳定的状态（即碳的氧化程度变得更高）。

化学反应与提供能量的降解或分解代谢反应紧密偶合。图 2-17 的力学模拟可说明偶合反应和非偶合的分解代谢反应之间的主要差别，图中用岩石从悬崖上落下代表能力学有利的化学反应。落下的岩石的动能通常以它们击地时产生的热的形式完全浪费掉(组合图 A)。但是，经过精心设计，部分动能可用于推动叶轮，从而拎起一桶水(组合图 B)。在分图 B 中，因为岩石只有推动叶轮后才能到达地面，所以我

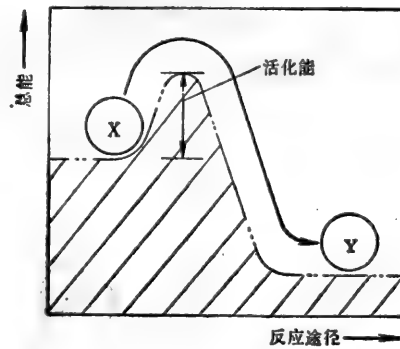


图 2-15 阐明活化能原理的示意图。化合物 X，通过被转化为化合物 Y 而获得较低和较有利的能态。然而，除非 X 能获得足以进行反应的活化能，这种转化就不会发生。

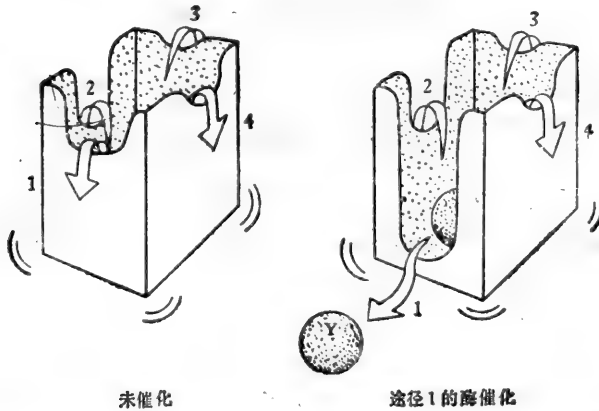


图 2-16 阐明酶如何指导分子采取何种需要的反应途径的“跳选箱”模型。在此模型中，球代表潜在的酶底物，它由于施碰水分子的不断轰击而跳上跳下。箱子的四壁代表能力学上有利的 4 种不同化学反应的活化阻碍。在左边的箱子中，一个反应也没有发生，因为从碰撞所得的能量不足以克服任一能量阻碍。在右边的箱子中，酶催化作用只降低 1 号反应的活化能，因而允许利用所得的能量进行这一反应。

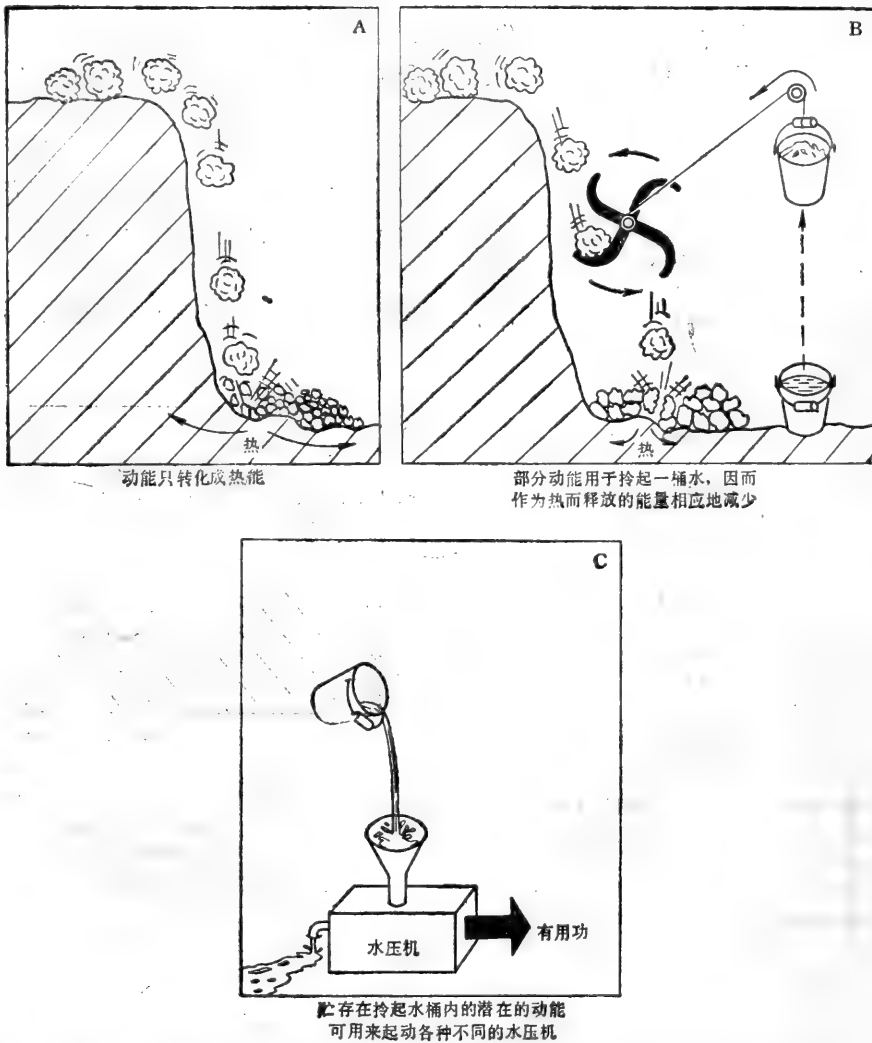


图 2-17 阐明偶合化学反应的力学模型的示意图。A 所示的自发反应可用来模拟葡萄糖直接氧化成 CO_2 和 H_2O 。只产生热。B, 上述反应与另一个反应偶合; 第二个反应可用来模拟 ATP 的合成。B 中产生的适用性更广的能可用来驱动其他的细胞过程, 如 C 所示。

们说, 岩石下落的自发反应已经与拎起一桶水的非自发反应直接偶合。应当指出。在分图 B 中, 因为部分能量现在用来做功, 所以岩石击地的速度小于分图 A 中的岩石击地的速度, 所以, 以热的形式浪费掉的能量也相应地较少。

在细胞内, 酶起着我们的模拟中的叶轮的作用, 使食物的自发燃烧与产生核苷三磷酸 ATP 的反应偶合。正如图 2-17 中贮存在拎起一桶水的能量可分出一部分去起动各种不同的水压机(组合图 C), ATP 可用作方便而又多功能的能库或能量的通货, 以驱动细胞所需的许多不同的化学反应。

ATP 水解产生细胞的有序

ATP 因不甚稳定而充当化学能载体。在细胞质内的条件下, ATP 很容易经水解而

释放无机磷酸 (P_i), 并释放出大量的可用能。因此, 在这种水解反应中断裂的键有时称为高能键, 虽然就共价键本身而论并没有什么特殊。ATP 水解释放的能也能驱动其他反应, 只要这些反应能以某种方式与 ATP 水解过程偶合。

ATP 水解驱动的多种反应包括参与生物分子的合成的反应, 参与分子越过细胞膜的主动运输的反应, 以及参与力和运动产生的反应。这三种过程在建立生物有序中都起着重大的作用。生物合成反应中形成的大分子携带信息, 催化特定的反应, 在细胞内和胞外空间中装配成高度有序的结构。膜围成的泵可维持细胞内部的特殊组成, 允许信号在细胞内和细胞间传递。最后, 力和运动的产生不仅使细胞的细胞质内含物成为有组织的, 而且使细胞本身游移活动, 装配成有结构的组织。

小结

活细胞是高度有序的, 为了生长和存活, 必须在它们内部建立秩序。这在热力学上之所以可能, 完全是因为源源不断地输入能量, 部分能量以热的形式从细胞向它们的环境释放。能量归根结蒂来自太阳的电磁辐射, 后者促使像绿色植物那样的进行光合作用的生物内形成有机分子。动物在偶合于 ATP 的一系列酶催化反应中, 通过吸收和氧化这些有机分子而获得能量。ATP 是所有细胞共同的能量通货, 它的水解与其他一些反应偶合, 而驱动建立秩序的各种能力学不利过程。

食物与细胞能量的获得^{2,5}

食物分子分三步分解而产生 ATP

蛋白质、脂质和多糖构成了我们所吃食物的主要成分, 它们必须先分解成小分子, 我们的细胞才能够利用它们。这些分子的酶促分解或分解代谢可分三个阶段进行(图 2-18)。我们首先简单地概述这三个阶段, 然后较详细地讨论其中的两个阶段。

在第一阶段中, 大型多聚分子分解成它们的单体亚基——蛋白质分解成氨基酸, 多糖分解成糖, 脂肪分解成脂肪酸和甘油。这些初步的过程称为消化, 通过分泌出来的酶的作用而主要发生在细胞外。在第二阶段中, 最终的小分子进入细胞, 在细胞质内进一步降解。糖的大多数的碳和氢原子转化成丙酮酸, 然后进入线粒体, 丙酮酸在线粒体内转化成乙酰辅酶 A 的乙酰基(图 2-19)。乙酰辅酶 A 像 ATP 一样, 是个化学性质活泼的化合物, 水解时释放出大量的能量。脂肪酸的氧化也产生大量的乙酰辅酶 A。

分解代谢的最后阶段, 即第三阶段, 乙酰辅酶 A 的乙酰基完全降解成 CO_2 和 H_2O 。大多数 ATP 就是在这最后阶段中产生的。通过一系列偶合的化学反应, 理论上从糖类和脂肪氧化成 H_2O 和 CO_2 所得的一半以上的能量投入于驱动能力学不利反应 $P_i + ADP \rightarrow ATP$ 。因为其余部分的氧化能被细胞作为热释放出去, 所以这样产生的 ATP 在宇宙中创造了净无序, 而符合热力学第二定律。

通过 ATP 的产生, 最初得自糖类和脂肪氧化的能量重新分布成便于包装和易于释放的化学能形式。在典型的细胞内, 整个胞内空间的溶液内约有 10^9 个 ATP 分子, 在那里, ATP 返回到 ADP 和磷酸基的能力学有利的水解, 给各种能力学不利反应提供驱动这些反应的能量。

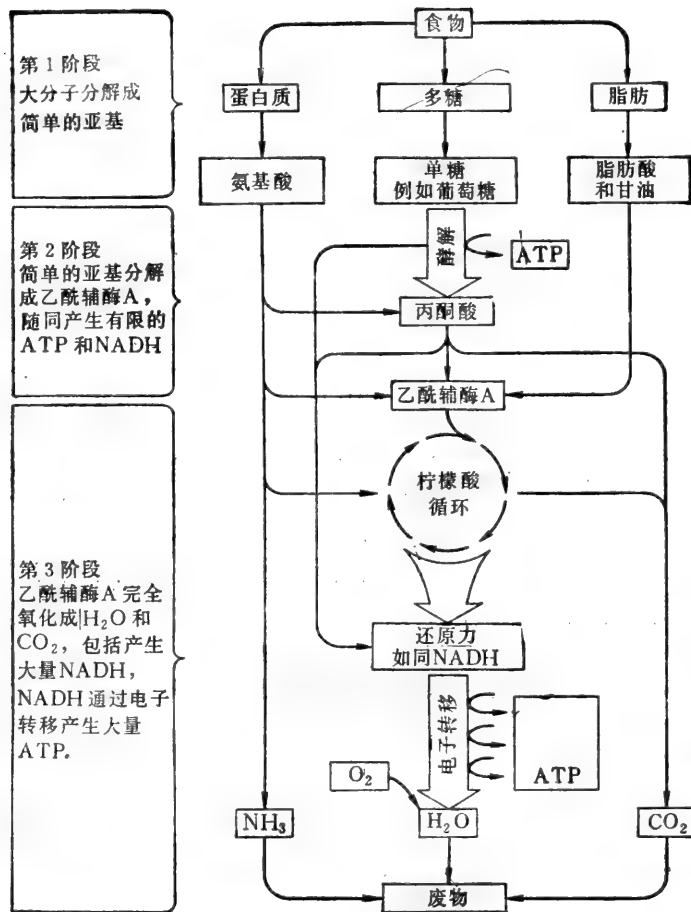


图 2-18 导致食物变成废物的分解代谢的三个阶段的简单图解。这一系列反应产生 ATP; 接着 ATP 被用于推动生物合成反应和细胞内其他需能的过程。

甚至无氧时酵解也能产生 ATP

分解代谢第二阶段的最重要部分是一系列称为酵解的反应——葡萄糖的溶胞(分解)作用。在酵解过程中,有六个碳原子的葡萄糖分子转化成各有三个碳原子的两个丙酮酸分子,这一转化需要依次发生 9 个酶促反应,而涉及一系列含磷酸基团的中间产物(图 2-20)。从逻辑上看来,这种依次发生的反应可分成三部分:(1)在反应 1 至 4 中,葡萄糖转化成三碳醛即甘油醛-3-磷酸,这一转化需要投入 ATP 形式的能量;(2)在反应 5 和 6 中,甘油醛-3-磷酸的醛基氧化成羧酸,由此反应所得的能量与 ATP 中产生的新的高能磷酸键偶合;(3)在反应 7、8 和 9 中,回收第一反应程序中最初投入的 ATP。

在酵解完成后,ATP 收支情况表明净收入为两个 ATP 分子(每一个葡萄糖分子),这是在反应 5 和 6 中产生的。所以,这两步是酵解的关键。因为在这一程序中唯有这两步反应才从无机磷酸基产生高能磷酸键,所以这两个反应可充分说明细胞内的反应偶合在一起以收获氧化作用释放出的能量的方法(图 2-21)。在酵解的反应 5 中,氢(氢化物

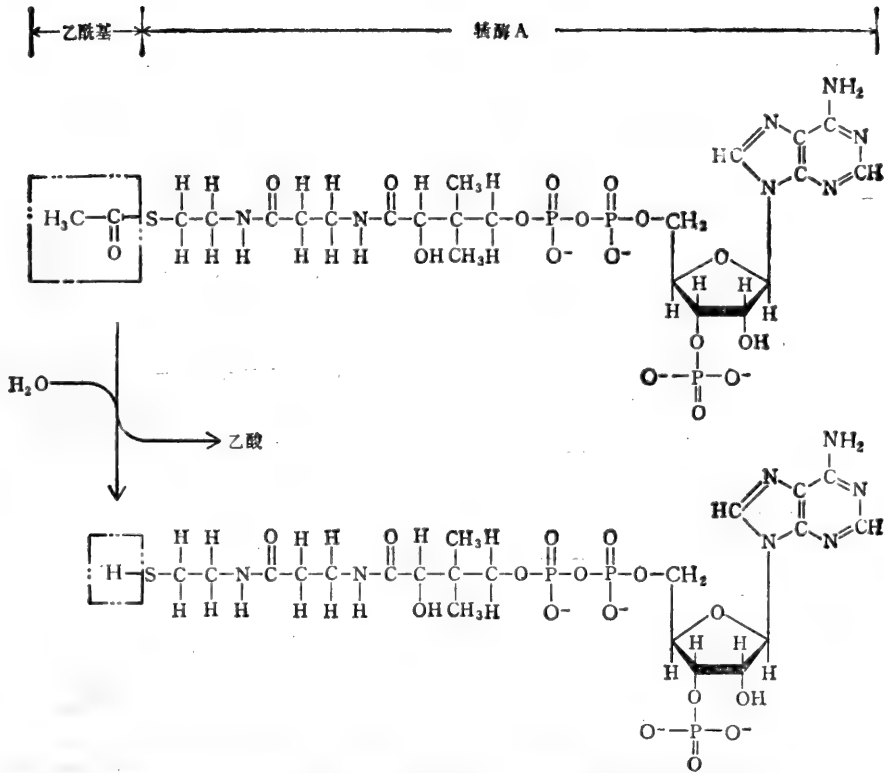


图 2-19 关键性的代谢中间产物乙酰辅酶 A 的结构。在分解代谢第二阶段(见图 2-18)产生的乙酰基与辅酶 A (CoA) 共价结合。

的离子：一个质子加两个电子）离开甘油醛-3-磷酸的醛基，而转移至载体分子 NAD^+ (图 2-22)。同时，如图 2-21 所示，从溶液中所得的磷酸离子通过高度活泼的键与新产生的羧基结合。在酵解的反应 6 中，这一活泼的磷酸基转移至 ADP，形成 ATP，留下自由的羧基。所以，这两个反应的总结果是，糖醛氧化成羧酸，无机磷酸转化成 ATP 上的高能键， NAD^+ 分子还原成 NADH 。这对出色的偶合反应很可能是最早出现在进化细胞中的代谢步骤之一。它们除了形成葡萄糖代谢的中心外，在光合作用期间，它们还被光激活反应产生的 NADPH 和 ATP 逆向驱动，所以它们在光合作用的固碳过程中起着关键性的作用。

对大多数动物细胞来说，酵解仅是分解代谢第三阶段的前奏。因为丙酮酸形成后很快就进入线粒体，完全氧化成 CO_2 和 H_2O 。然而，就厌氧生物体(不利用氧分子的生物体)，以及无氧条件下也能发挥功能作用的像骨骼肌那样的组织而论，酵解可成为细胞 ATP 的主要来源。在这些例子中，丙酮酸在线粒体内并不降解，而是待在胞液内，根据生物体的类型不同，或是转化成乙醇加 CO_2 (如在酵母中)，或是转化成乳酸(如在肌肉中)而排泄出去。在这些称为发酵的无氧产能反应中，为了用光酵解反应 5 中产生的还原力，丙酮酸需进一步反应，以产生继续酵解所需的 NAD^+ 。

氧化分解代谢产生更大量的可利用能

通过酵解反应从葡萄糖无氧产生 ATP 的效率颇低。无氧酵解的最终产物仍含大量

进一步氧化就能释放的化学能。只有在分子氧由于蓝藻菌光合作用的结果而积累在地球的大气中之后，氧化微生物和真核细胞的线粒体中才有可能出现氧化分解代谢（细胞呼

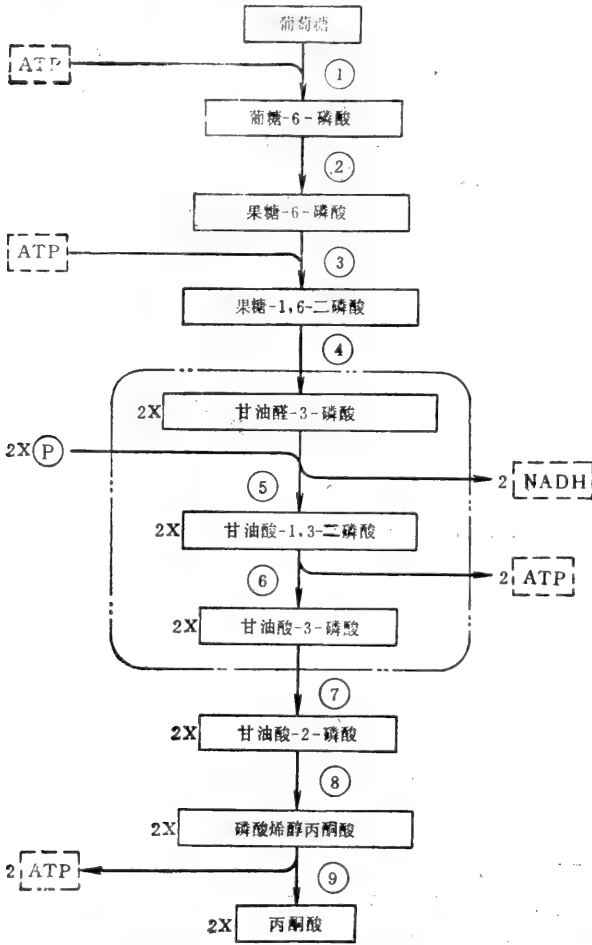


图2 20 酵解的中间产物。每一个编号的反应由不同的酶催化。在步骤4，六碳糖分裂成两个三碳糖，以致在这一步骤之后的各个步骤中分子数目加倍。反应5和6是负责ATP和NADH分子净合成的反应。(见正文)

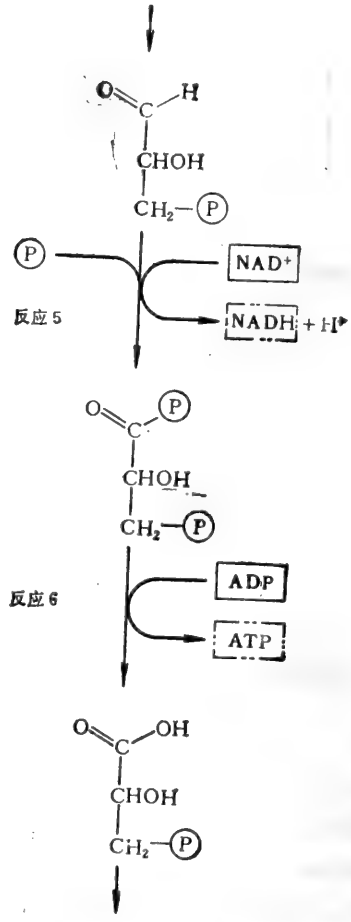


图2 21 酵解反应5和6：醛氧化成羧酸与ATP和NADH的形成偶合。(见图2-20)

吸)的进化。早期，无氧分解代谢过程主宰着地球上的生命。分解代谢过程外加了需氧的阶段(图2-18的第三阶段)，这就给细胞提供了从食物分子摄取能量的更加有效得多的方法。这个第三阶段以柠檬酸循环(也称三羧酸循环或克雷伯氏循环)为起点，以氧化磷酸化告终，两者都发生在好氧菌和真核细胞的线粒体内。

代谢作用受柠檬酸循环的控制

柠檬酸循环的主要功能是氧化以乙酰辅酶A分子形式进入循环的乙酰基。因为乙酰基不直接氧化，而只是与循环一周之末再生的较大分子草酰乙酸共价加成，所以这些反应才形成循环。如图2-23所示，循环以乙酰辅酶A与草酰乙酸之间反应生成称为柠檬酸的

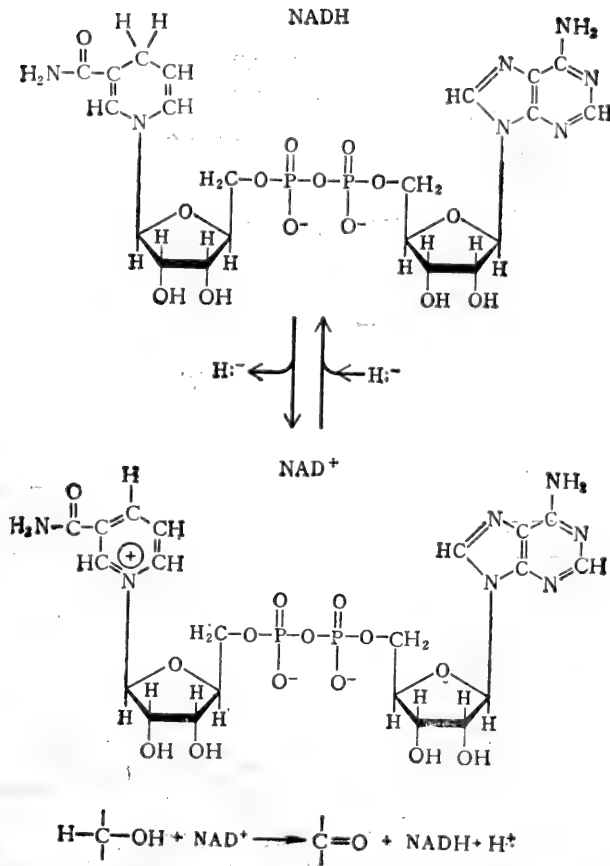


图 2-22 分解代谢反应中氢的最重要的载体 NADH 和 NAD^+ 的结构。 NAD^+ 分子中称为烟酰胺环的部分能接受多带一个电子的氢原子(氢离子 H^-)形成 NADH 。在这一还原形式中,烟酰胺环有还原稳定性,它不再因共振而稳定。因此,外加的氢离子易转移至其他分子。
 在乙醇那样的底物分子的生物氧化过程中(见图的下半部分),底物失去两个氢原子。其中一个氢原子作为氢离子加在 NAD^+ 上,产生 NADH ,另一个氢原子作为质子 (H^+) 释放到溶液里去(见图 9-16)。

三羧酸分子开始。此后发生一系列反应,在这些反应中,柠檬酸的6个碳原子中两个碳原子氧化成 CO_2 ,形成另一个草酰乙酸分子,使循环重复。(因为每一次循环新加进去的两个碳进入柠檬酸分子的部位不同于氧化成 CO_2 时碳在柠檬酸中的位置,所以只有在经过几次循环之后,它们本身才得以氧化。)尔后,这些反应产生的 CO_2 从线粒体扩散出去并脱离细胞。

在柠檬酸循环过程中,以几种不同方式捕获柠檬酸中 $\text{C}-\text{H}$ 和 $\text{C}-\text{C}$ 键氧化时释放的能量。在循环的一个步骤(琥珀酰辅酶 A 至琥珀酸),通过类似于以上讨论的酵解机制产生高能磷酸键。(虽然这一反应产生 GTP , 而不是 ATP , 但是所有的核苷三磷酸从能力学上衡量是等价的,因为存在着诸如 $\text{ADP} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{GDP}$ 那样的交换反应。)所有其余捕获的氧化能量都投入将载氢分子转化成它们的还原形式中;每循环一周,有三个 NAD^+ 分子转化成 NADH , 一个黄素腺嘌呤核苷酸 (FAD) 转化成 FADH_2 。

从进入柠檬酸循环的乙酰基制造 CO_2 , 所需的外加的氧原子不是由氧分子提供,而是由水提供的。每一次循环分解三个水分子,用它们的氧原子制造 CO_2 。它们中有些氢原

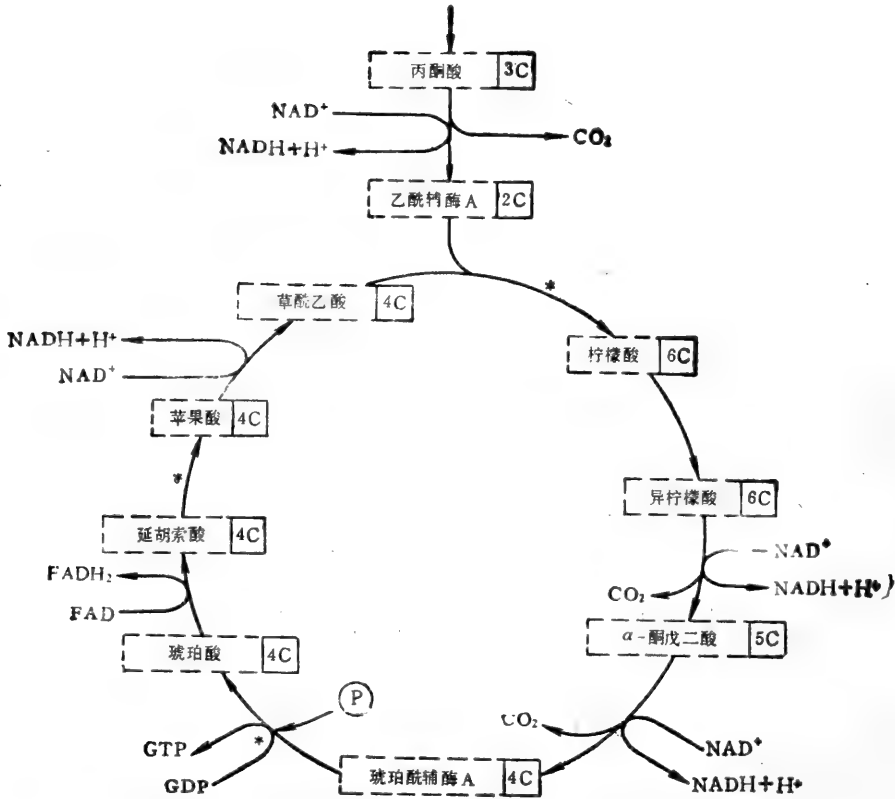


图 2-23 柠檬酸循环。在线粒体和好氧菌中，由丙酮酸产生的乙酰基进一步氧化。乙酰基的碳原子转化成 CO_2 ，而氢原子则转移至载体分子 NAD^+ 和 FAD 。外加的氧和氢原子在标以星号(*)的步骤中以水的形式进入循环(详见图 9-12)。

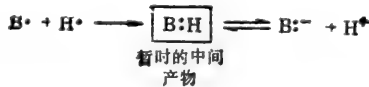


图 2 24 分子间电子的转移相当于氢原子的转移。在这一例子中，由于加上氢原子而使分子 B 还原；但是，如果 B-H 是酸性分子，则氢原子易在溶液内分解，而给出质子(即 H^+ 离子)。还原作用的基本要领是电子的转移，转移的电子保持在 B 中。

子进入底物分子，能量升高，(与乙酰基的氢原子一起)移至 NADH 那样的载体分子。在线粒体的另一场所，由这些激活的氢原子携带的能量为产生 ATP 的反应所利用；后者的氧化磷酸化(在下文详细讨论)才需从大气中摄取氧。

所以，线粒体既是细胞的动力室，又是食物分子的碳氢原子最终氧化的场所。所有的分解代谢过程，不管是以糖、脂肪还是蛋白质为起始，最终都向线粒体集中。除了丙酮酸外，脂肪酸和一些氨基酸也从胞液进入线粒体，它们在线粒体内转化成乙酰辅酶 A 或柠檬酸循环的其他中间产物之一。

线粒体除了可以产生许多种生物合成所需要的 ATP 之外，还通过产生重要的含碳中间物，如草酰乙酸和 α -酮戊二酸，而起着生物合成反应起始点的作用。这些物质从线粒体返至胞液，它们在胞液内用作为合成必需分子如氨基酸的前体。

电子向氧转移而驱动 ATP 形成'

氧化磷酸化是分解代谢的最后一步，大部分代谢能量是在这一步释放的。在这一过程中，NADH 和 FADH₂ 分子把它们从食物分子氧化获得的电子转移给分子氧 O₂。这一反应形式上相当于氢在空气中燃烧形成水，释放出大量的化学能。一部分能量用于制造 ATP，其余以热的形式释放。

虽然 NADH 和 FADH₂ 氧化的整个化学过程涉及氢向氧转移，但是完整的氢原子并不直接转移。重要的是从氢原子获得电子。这是因为氢原子易于分解成电子和质子 (H⁺)，这电子此后能单独转移到只接受电子的分子，而质子仍留在水溶液中(图 2-24)。由于同样的理由，如果电子单独授于对氢有强亲和力的分子，则通过从溶液中回收质子，氢原子可自动地重新构成。在氧化磷酸化过程中，来自 NADH 和 FADH₂ 的电子传过一连串载体分子，但是完整的氢原子存在与否取决于载体的特性。

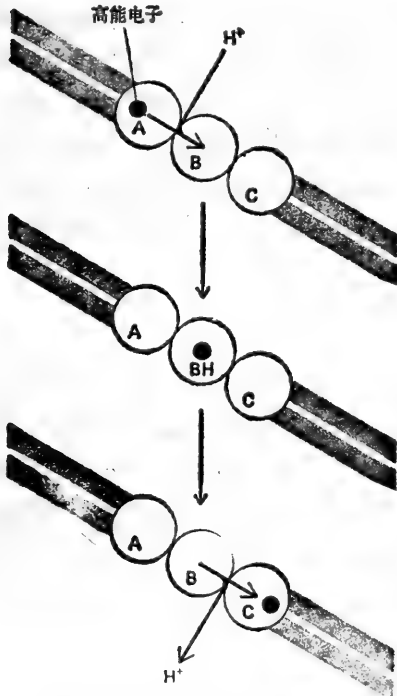


图 2-25 通过电子转移反应而产生跨膜 H⁺梯度的示意图。高能电子(例如得自代谢物的氧化)按次序通过载体 A、B 和 C 至低能态。在这张图中，载体 B 在膜中排列使得它在电子通过时可以从一侧摄取 H⁺，从另一侧释放 H⁺。最终的 H⁺梯度代表一种贮能的形式，线粒体中的其它膜蛋白利用这种能量促使 ATP 形成(见图 9-34)。

电子沿电子转移链的一系列转移发生在线粒体的内膜上，所有的载体分子都埋在内膜之中。电子每转移一步，便降至低能态一次，直到最后它们转移至已扩散到线粒体中去的氧分子。氧分子对电子有最强的亲和力，因此束缚在氧上的电子处于最低的能态。这些电子降至低能态时释放出来的能量以尚未完全了解的方式将质子从线粒体内室泵出(图 2-25)，因而产生跨线粒体内膜的电化学质子梯度。

必需氨基酸	
苏氨酸	
甲硫氨酸	
赖氨酸	
缬氨酸	
亮氨酸	
异亮氨酸	
组氨酸	
苯丙氨酸	
色氨酸	

图 2-26 9 种必需氨基酸，人细胞不能合成它们，所以必须由食物提供。

反过来，这一梯度又促使质子回流，通过膜中的酶复合物，将磷酸基加在 ADP 上，在线粒体内产生 ATP。新制造的 ATP 从线粒体转移到细胞的其它地方，进一步起动各种代谢反应。

电子传递链的特性和 ATP 合成的机制将在第九章详细讨论。

氨基酸和核苷酸是氮循环的一部分

到现在为止所讨论的代谢变化只限于 4 种元素——碳、氢、氧、磷。我们还没有讨论氮和硫的代谢。这两种元素是蛋白质和核酸的重要组分；蛋白质和核酸则是细胞的两种最重要的大分子，大约占细胞干重的三分之二。氮和硫原子通过一系列可逆的循环，在化合物之间以及生物体与环境之间转移。

虽然地球大气中分子氮含量丰富，但是它的化学性质不活泼。只有少数现存物种能将分子氮结合进有机分子，这一过程称为固氮作用。固氮发生在某些微生物中，也通过闪电之类的某些地球物理过程发生。总的说来，固氮对于生物圈是必不可少的，没有它，地球上的生命也就不复存在。然而，当今生物中只有一小部分氮化合物代表固氮的新鲜产物。大多数有机的氮已循环了一段时间，从一个活有机体传递到另一个活有机体。因此，固氮反应可以说对整个氮的供应起着“补充”作用。例如，脊椎动物实际上已摄入食物中蛋白质和核酸中所有的氮。在体内，这些大分子分解成氨基酸和核苷酸，然后用它们构成其他分子。

生物合成中未利用的氨基酸能氧化产生代谢能。它们的大多数碳、氢原子最终形成 CO_2 或 H_2O ，而它们的氮穿梭般不停地通过各种形式，最终成为尿素，排出体外。各种氨基酸被作了不同的加工，并且有一整列的酶反应被用于它们的分解代谢。相反，另一个不同系列的反应可允许柠檬酸循环的中间产物用于合成若干氨基酸。蛋白质中的 20 种氨基酸有一半左右是脊椎动物能制造的，其余的氨基酸必须靠食物提供，为此，后者被称为必需氨基酸(图 2-26)。其他生物通常可通过长而耗能的途径来制造这些氨基酸，而这些途径在脊椎动物的进化过程中已经丧失。

小结

动物细胞被认为分三个阶段从食物获得能量。在第一阶段中，蛋白质、多糖和脂肪经胞外反应分解成小分子。在第二阶段中，这些小分子在细胞内降解，产生乙酰辅酶 A 和有限量的 ATP 及 NADH。这些是唯一能在无氧条件下产能的反应。在第三阶段中，乙酰辅酶 A 分子在线粒体内降解，产生 CO_2 和氢原子，氢原子与 NADH 那样的载体分子相连。氢原子的电子通过复杂的载体链，最终导致氧分子还原成水。氢离子 (H^+) 受这些电子转移步骤中释放出的能量驱动，从线粒体中输出。跨线粒体内膜的最终电化学质子梯度，被用于驱动大多数细胞 ATP 的合成。

生物合成与有序的产生

细胞内任一瞬间都发生着成千上万的不同的化学反应。这些反应联接成链，一个反应的产物成为下一个反应的底物。原则上一个化合物可转变为另一个化合物。无论如何，像大城市路上的汽车通行一样，细胞内的许多代谢途径有可能或是“向内的”，或是“向外的”。如前所述，向内的路线由分解代谢反应组成，它们可以把食物分子转化成糖和糖磷酸。向外的路线由生物合成反应组成，以酵解的中间物和柠檬酸循环(以及它们有关的化合物)开始，产生较大和较复杂的细胞分子。

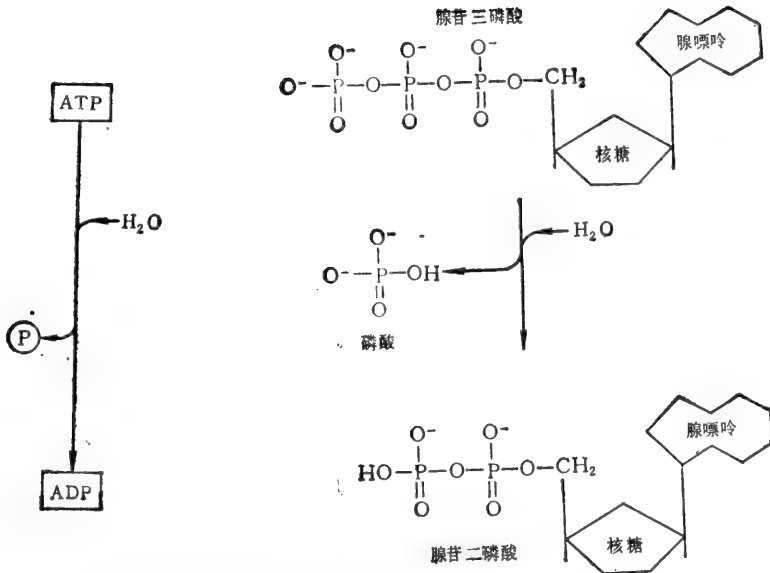


图 2-27 在 ATP 水解过程中,可切下末端磷酸基,从而根据细胞内条件产生每摩尔 11 至 13 千卡的可用能。

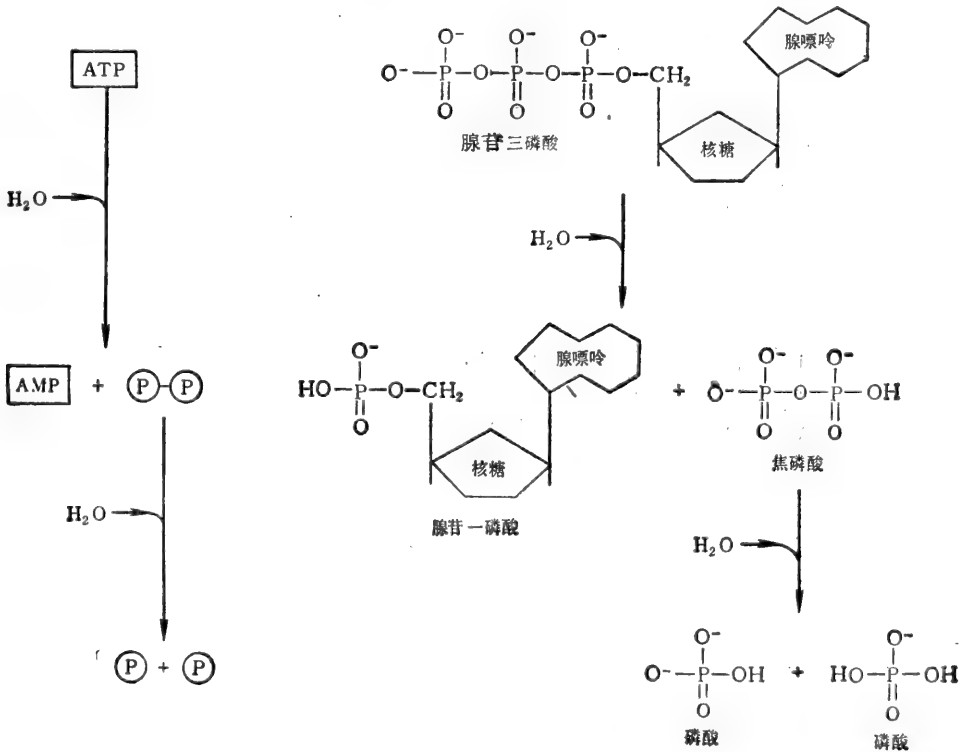


图 2-28 ATP 水解的另一条路线,首先形成焦磷酸,然后焦磷酸再水解。这条路线产生的有用能约为图2-27反应的一倍。在此图和上一张图中显示,得自水的H原子与水解后的磷酸基相连。然而,在细胞质的 pH 下,实际上大多数磷酸基分解,形成游离的氢离子 H^+ 。

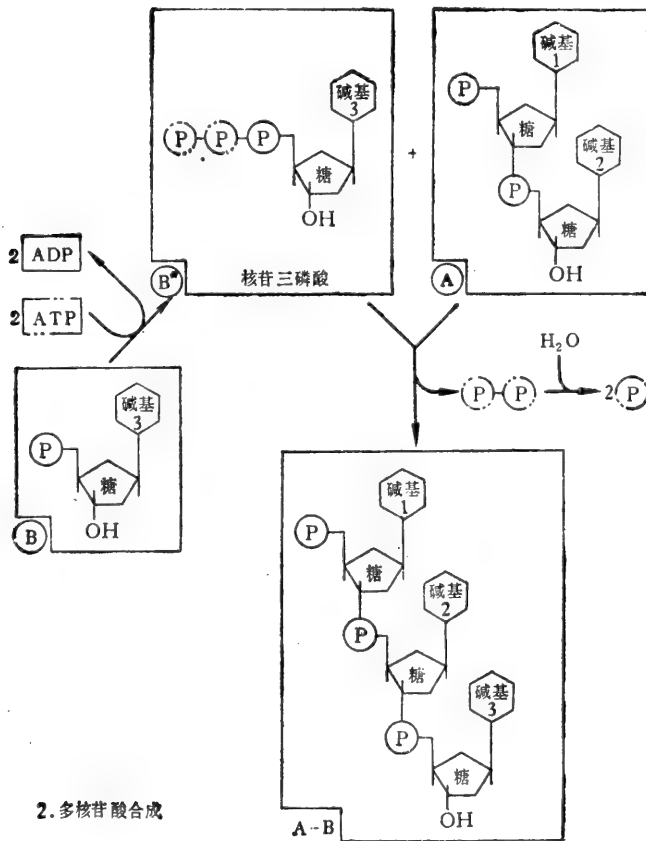
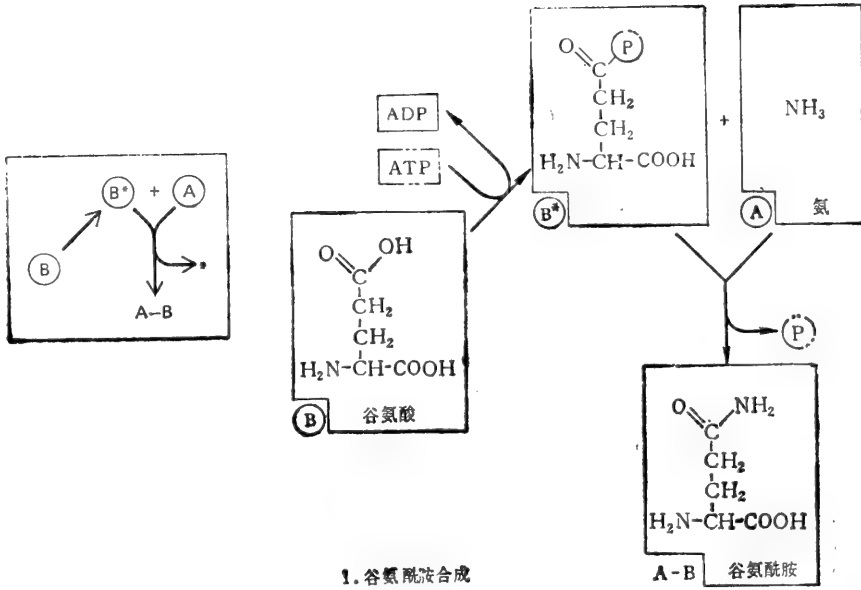


图 2-29 典型的 $A + B \rightarrow A-B$ 脱水反应的例子。此图适用于所有各种情况；通常核苷酸水解可将化合物 B 激活为 B^* ，以驱动原本不利的反应。在以下所示两例之一中，从谷氨酸和氨合成谷氨酰胺，需水解一个磷酸键。在另一例中，每加一个核苷酸到 DNA 或 RNA 中去，就得水解两个磷酸键(多核苷酸合成)。

生物合成的能量来自 ATP 的水解

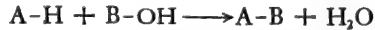
ATP 分子的水解直接或间接地推动整个细胞内本来不利的反应,包括所有的生物合成反应。在这反应中释放的大量能量有几个来源,包括游离形式磷酸基(缩写成 P_i 或 \textcircled{P}) 的高度稳定性,以及 ATP 分子内两个相邻磷酸基之间不利的电荷排斥的释放(图 2-27)。在另一条 ATP 水解途径中,两 $\textcircled{P}-\textcircled{P}$ 键水解,释放约两倍的能量;在此情况下,ATP 水解成 AMP (腺苷一磷酸) 和 $\textcircled{P}-\textcircled{P}$ (焦磷酸),释放的 $\textcircled{P}-\textcircled{P}$ 再水解成游离的磷酸基(图 2-28)。

到现在为止,我们很不严格地使用术语“能量”;决定一个反应发生与否实际上是自由能的变化。如我们先前所说,以热的形式释放的能量,通过提高分子运动的剧烈性和使分子发生变形,产生无序;根据热力学第二定律,唯有结果净增加宇宙无序的那些反应才能自发地发生。反应期间所发生的自由能的变化用 ΔG 表示, ΔG 定义为反应发生时宇宙中所产生的无序量的直接量纲。释放大量自由能的反应是那些有很大负 ΔG 和产生大量无序的反应。虽然这些反应的发生速率取决于其它因子,如获得特定的酶(见下文),但是它们有很强的发生趋势。相反, ΔG 为正值的反应在宇宙中产生净有序,不能自发地发生。这些能力学上不利的反应只有在与负 ΔG 很大的另一个反应偶合,使整个过程的 ΔG 为负时才会发生。

生物合成反应常常直接与 ATP 水解偶合

酶虽然可加速能力学上有利反应,却不能迫使能力学不利反应发生。用水来比拟,酶本身不能使水流上山。但是,细胞为了生长和分裂,它们必须这样做:它们必须从小而简单的分子建造成大而复杂的分子。我们已经知道,要做到这一点一般得通过酶,酶使化学能(最初得自太阳)的释放与完成能力学不利的反应偶合。让我们较详细地讨论如何获得这种偶合。

试想像一个典型的生物合成反应,两个单体 A 和 B 在脱水(也称缩合)反应中连接在一起,从中释放出水:



(为了方便起见,我们把 A-H 和 B-OH 写成 \textcircled{A} 和 \textcircled{B})。水分解共价连接的化合物 A-B 的逆反应(称为水解)几乎总是能力学上有利的反应。例如,蛋白质、核酸和多糖水解成它们亚基的情况就是如此。

细胞从 \textcircled{A} 和 \textcircled{B} 制造 A-B 的总的策略与细胞从燃烧葡萄糖制造 ATP 的策略相同:多步骤途径使能力学不利地合成理想的化合物与甚至能力学上较有利的反应偶合(见图 2-17)。在许多情况下,所利用的能力学上有利的反应是 ATP 分子的水解。

在从 \textcircled{A} 和 \textcircled{B} 制造 A-B 的偶合途径中,来自 ATP 水解的能量首先把 \textcircled{B} 转换成高能的中间化合物,后者接着直接与 \textcircled{A} 反应,产生 A-B。最简单的机制涉及磷酸基从 ATP 转移至 \textcircled{B} ,形成 $\textcircled{B}-OPO_3^{2-}$ (即 $\textcircled{B}-\textcircled{P}$),在此情况下,反应途径只包括两步:

1. $\textcircled{B} + ATP \longrightarrow \textcircled{B}-\textcircled{P} + ADP$
2. $\textcircled{A} + \textcircled{B}-\textcircled{P} \longrightarrow A-B + \textcircled{P}$

因为中间物 $\textcircled{B}-\textcircled{P}$ 形成后又分解(可能很快,但仍结合在酶分子的表面)。整个发生的反

应是



请注意,第一个反应因与第二个反应直接偶合而被迫发生。

偶合反应的结果取决于自由能的总变化

对于大多数的反应过程可作数量上的预测。根据现已收集到的大量热力学数据,已可计算细胞中大多数重要的代谢反应的自由能变化。因此,途径中全部自由能的变化就是各分步中能量变化的总和。

假定有两个反应



反应中的 ΔG 值分别为每摩尔 +1 和 -9 千卡,而且这两个反应能偶合在一起,则偶合反应的 ΔG 将为每摩尔 -8 千卡(让我们回想一下,一摩尔物质有 6×10^{23} 个分子)。这说明,即使是一个不是自发地发生的具有正 ΔG 的反应,也能被另一个反应所驱动。然而,这要求后一反应具有足够大的负 ΔG ,并要求存在使两个反应能偶合在一起的机制。

ATP 水解成 ADP 和无机磷酸的 ΔG 取决于所有反应物的浓度(见第 480 页),但在细胞内的正常条件下,它是处在每摩尔 -11 至 -13 千卡之间。原则上,这一水解反应能用来驱动 ΔG 为每摩尔 +10 千卡的不利反应,只要可得到适当的反应途径。然而,对许多生物合成反应,例如核酸合成和蛋白质合成前的氨基酸激活,即使每摩尔 -13 千卡也是不够的。在种种情况下,ATP 水解的途径改变成最初产生 AMP 和 P-P (焦磷酸)(见图 2-28)。然后焦磷酸本身在第二步中水解,又可得到每摩尔 -13 千卡。许多生物合成途径实际上是不可逆的,这完全是因为逆反应所需的焦磷酸很快就转移了(图 2-29)。

辅酶参与特定的化学基团的转移

我们刚才已了解到,ATP 通过与另一个分子反应,形成高活性的磷酸化的中间产物,驱动生物合成反应。因为新的磷酸键易折断,释放自由能,所以第二个分子可容易地与其他分子相连。这一普遍的原理并不限于 ATP 协调的反应:其他各种化学上不稳定的键连也有这样的表现。例如,特定的载体分子可参与乙酰基或甲基那样的化学基团的转移(表 2-2)。同一种载体分子往往参加许多需要其基团的不同生物合成反应。

表 2-2 参与基团转移反应的一些辅酶

辅酶	转移的基团	辅酶	转移的基团
ATP	磷酸基	生物素	羧基
NADH, NADPH	氢加电子(氢离子)	S-腺苷甲硫氨酸	甲基
辅酶 A	乙酰基	UDP-葡萄糖	葡萄糖

辅酶是小分子,与一些酶结合,是酶活性所必需分子。表中每一个辅酶是小化学基团的载体分子,它参加各种反应,基团在这些反应中转移至另一分子。有些辅酶与它们的酶共价连接;有些辅酶则与酶结合得不甚紧密。

葡萄糖分解过程中产生的乙酰辅酶 A 是这种载体分子的一个例子。它携带一个乙酰

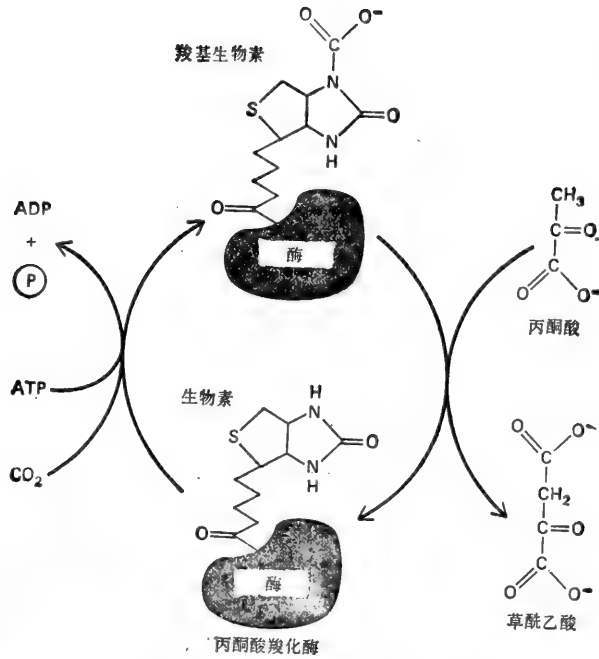


图 2-30 辅酶生物素转移羧基。生物素充当羧基 ($-\text{COO}^-$) 的载体分子。在图示的反应顺序中，生物素与丙酮酸羧化酶共价结合。来自磷酸氢离子 (HCO_3^-) 的活化的羧基，在需要从 ATP 分子水解输入能量的反应中与生物素偶合。此后，这一羧基转移到丙酮酸的甲基，形成草酰乙酸。

基，这个乙酰基通过活性的硫酯键而与 CoA 相连(见图 2-19)。这一乙酰基易转移至另一个分子，如延伸的脂肪酸分子。另一个重要的例子是生物素：它在许多生物合成反应中携带羧基(图 2-30)。像乙酰辅酶 A、生物素和 ATP 那样的分子称为辅酶，因为它们牢牢地结合在酶的表面，是酶活性所必不可少的分子。有许多小分子称为维生素，在饮食中所需的量极微，可在体内转化成辅酶。

生物合成需要还原力

我们已了解，细胞内可连续不断地发生氧化和还原的反应。一方面食物分子中的化学能通过作为燃烧的一种形式的氧化过程释放出来；另一方面，为了制造生物分子，细胞特别需要进行一系列需要有化学能输入的还原反应。利用在 ATP 合成中起同样作用的偶合反应原理，化学能投入 NADH 中的氢与烟酰胺环之间高能键的合成。然后，这一高能键为原本不利的酶反应提供能量，把氢（作为氢离子）转移至另一分子。所以说 NADH 和 NADPH（很易由 NADH 转化而成）携带“还原力”。

为了搞清楚这一过程实际上是如何进行的，现仅考虑一个生物合成步骤：脂类分子胆固醇合成中的最后一个反应。在这反应中，为了还原碳-碳双键，两个氢原子加在多核类固醇环上(图 2-31)。正如大多数的生物合成反应一样，这一反应所需的两个氢原子由来自 NADPH 的一个氢离子，以及来自溶液的一个质子 (H^+) 提供 ($\text{H}^- + \text{H}^+ = 2\text{H}\cdot$)。正如 NADH 一样，从 NADPH 转移的氢离子是烟酰胺环的一部分，而且容易丢失，因为环失去它就能转变为比较稳定的芳香状态(见图 2-22)。所以 NADH 和 NADPH 都能将这一氢离子保持在高能键中，而在获得适当的酶催化时，这一氢离子能从 NADH

或 NADPH 转移到另一分子。

NADH 和 NADPH 之间化学特性的差异是微不足道的：NADPH 在远离活性区的

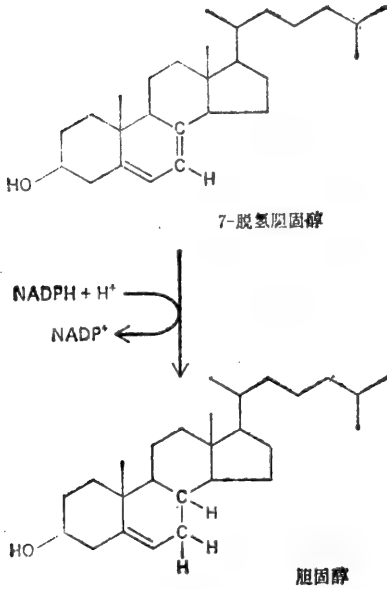


图 2-31 产生胆固醇的生物合成途径之一的最后一步。通过来自载体分子 NADPH 的氢离子和来自溶液的质子(H^+),实现 $C=C$ 键的还原。

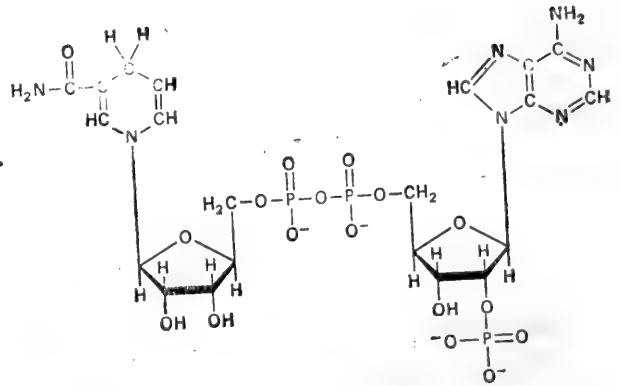


图 2-32 NADPH 的结构, 这种结构不同于 NADH(图2-22) 之处仅在于多了一个磷酸基, 而使得它可以被某些酶(通常是参与生物合成的酶)选择性地识别。

分子部分多一个磷酸基(图2-32)。就反应本身来说,这一磷酸基并不重要,但是它有助于把 NADPH 作为辅酶而结合在一定的酶上。一般而论, NADH 与催化分解代谢反应的酶起作用,而 NADPH 则与催化生物合成反应的酶起作用。这味意味着,改变 NADH 和 NADPH 浓度可分别调节分解代谢途径和生物合成途径。

反复进行脱水反应而合成生物多聚体

细胞合成的主要大分子是多核苷酸 (DNA 和 RNA)、多糖和蛋白质。它们的结构层出不穷,包括已知的最复杂分子。虽然如此,它们可以通过有限几种化学反应而从少数小分子(称为单体或亚基)合成。

单体加成为蛋白质、多核苷酸和多糖的情况示于图 2-33。虽然各种多聚体的合成反应涉及不同种类的共价键和不同的酶及辅助因子,但基本上是很相似的。在各种情况下,亚基的加成都是通过脱水反应,即从反应物中去除水分子而发生的。

如同前面讨论的比较普遍的例子(第 77 页),这些多聚体的形成需要输入化学能,而这种化学能是通过把生物合成反应偶合于核苷三磷酸的能力学上有利的水解作用的标准策略而最终获得的。总之,至少要有一个有关的核苷三磷酸裂解,产生焦磷酸,焦磷酸再水解,对这一反应外加一个驱动力(图 2-28)。

聚合反应中的活化的中间产物的取向有两种:或是引起头端聚合,或是引起尾端聚

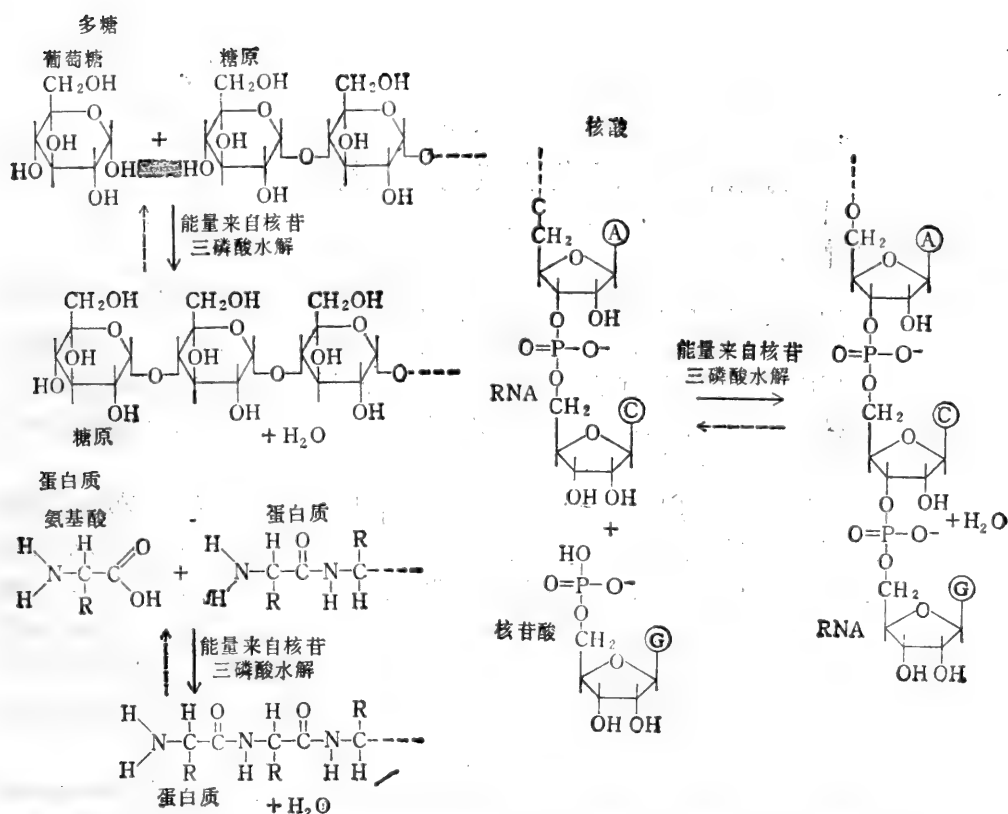


图 2-33 合成三种生物大聚合体的多聚反应的示意图。虽然各种反应涉及一些不同的酶和其它中间产物,它们仍然是相似的。在每一种情况下,合成都涉及失水(脱水),消耗高能的核苷三磷酸,以及产生无机焦磷酸。只要简单地加上水(水解)就要发生逆反应,使所有三种大聚合体都分解。

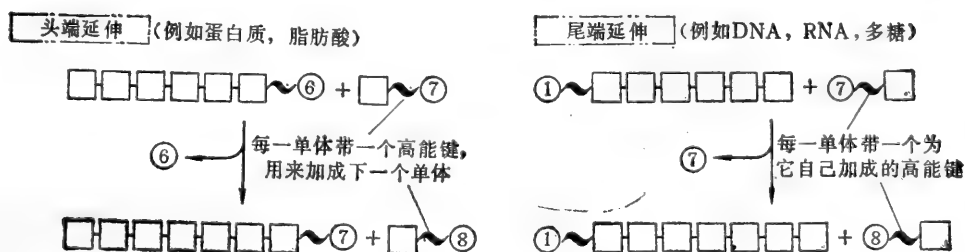


图 2-34 多聚合体的头端延伸和尾端延伸的比较。

合。在头端聚合中,延伸的多聚合体的末端带活化键,所以每加上一个单体,活化键就必定再生一次。在这样的情况下,每一个单体要带一个活化基团,用来与一连串单体中的下一个单体反应(图 2-34)。在尾端聚合中,每一单体所带的活化键为它自己的加成所用。多核苷酸和某些简单多糖的合成发生尾端聚合,而蛋白质的合成则发生头端聚合。

小结

ATP 水解通常通过形成活泼的磷酸化中间产物与大分子的生物合成那样的能力学

不利的反应偶合。称为辅酶的其他活性载体分子在生物合成过程中转移其他化学基团：例如，NADPH 使质子加两个电子(氢离子)形式的氢转移，而乙酰辅酶 A 使乙酰基转移。通过重复的脱水反应从小的活化的前体分子装配成诸如蛋白质和核酸那样的多聚体分子。

分解代谢和生物合成的相互协作

代谢是有组织和受调节的

图 2-35 显示了细胞内众多的酶代谢途径的线路。如果把细胞看作化学机器，从这幅图不难看出细胞的设计是多么的巧妙。所有这些反应都发生在直径不到 0.1 mm 的细胞内，而且在这幅图中还有许多酶没有显示(尤其是那些结合于细胞骨架和细胞膜的酶)。不仅如此，每一反应都需要不同的酶，这些酶本身又是整个一系列的信息传递和蛋白质合成反应的产物。

整个系统很复杂，看起来像是代谢的迷宫。任取一个小分子例如丝氨酸为例，有 6 种以上的酶能以不同的方式使其发生化学变化：它能与 AMP 相连(腺苷酸化)，以准备合成蛋白质；或降解为甘氨酸，转化成丙酮酸，以备氧化；它也能被乙酰辅酶 A 乙酰化，或是被转移到脂肪酸，以制备磷脂酰丝氨酸。所有这些不同的代谢途径都为同一丝氨酸分子而竞争，与此同时，对成千上万的其它小分子的类似的竞争也在进行。人们可以想像；整个系统需要保持很精细的平衡，任何微小的紊乱，如暂时改变饮食，都会引起祸害。

事实上，细胞是惊人地稳定。在饥饿或疾病期间，它能沉着地适应变化并继续发挥功能作用。很多种突变都能取消特定的反应途径，但是，只要某些起码的要求得到满足，细胞仍可继续存活。细胞之所以能做到这一点，是因为在细胞里有一个精密的调控网络可以调节各种化学反应。一些较高水平的调控将在后几章内讨论。现在只讨论一些最简单的机制，它们可以调节小分子通过细胞内的各种代谢途径的通量。

代谢途径是由酶活性的变化来调节

细胞内各种小分子的浓度可通过称为反馈调节的过程的缓冲作用来应付大的变化。这种类型的调节机制可以暂时提高或降低关键性酶的活性的办法，对代谢物通过特定代谢途径的通量进行微调。例如，一个反应系列的第一个酶通常受此途径的最终产物抑制；因此，如果最终产物大量积累，便自动抑制前体进一步进入反应途径(图 2-36)。途径往往分道或交叉，在那里通常受不同的最终产物多点控制。图 2-37 阐明这些反馈控制过程的复杂性，它显示了在一组相关的氨基酸途径中观察到的酶调节型式。

反馈调节极快，它可能既涉及可逆酶激活剂又涉及抑制剂。对细胞内的这种类型调控的分子基础已有了充分的了解，但是因为这方面的解释需要一些蛋白质结构的知识，所以推迟到第三章再讨论。

能量输入能使分解代谢反应逆转

通过对少数几个酶的调节也能导致影响整个细胞代谢的大幅度变化。例如，特殊型

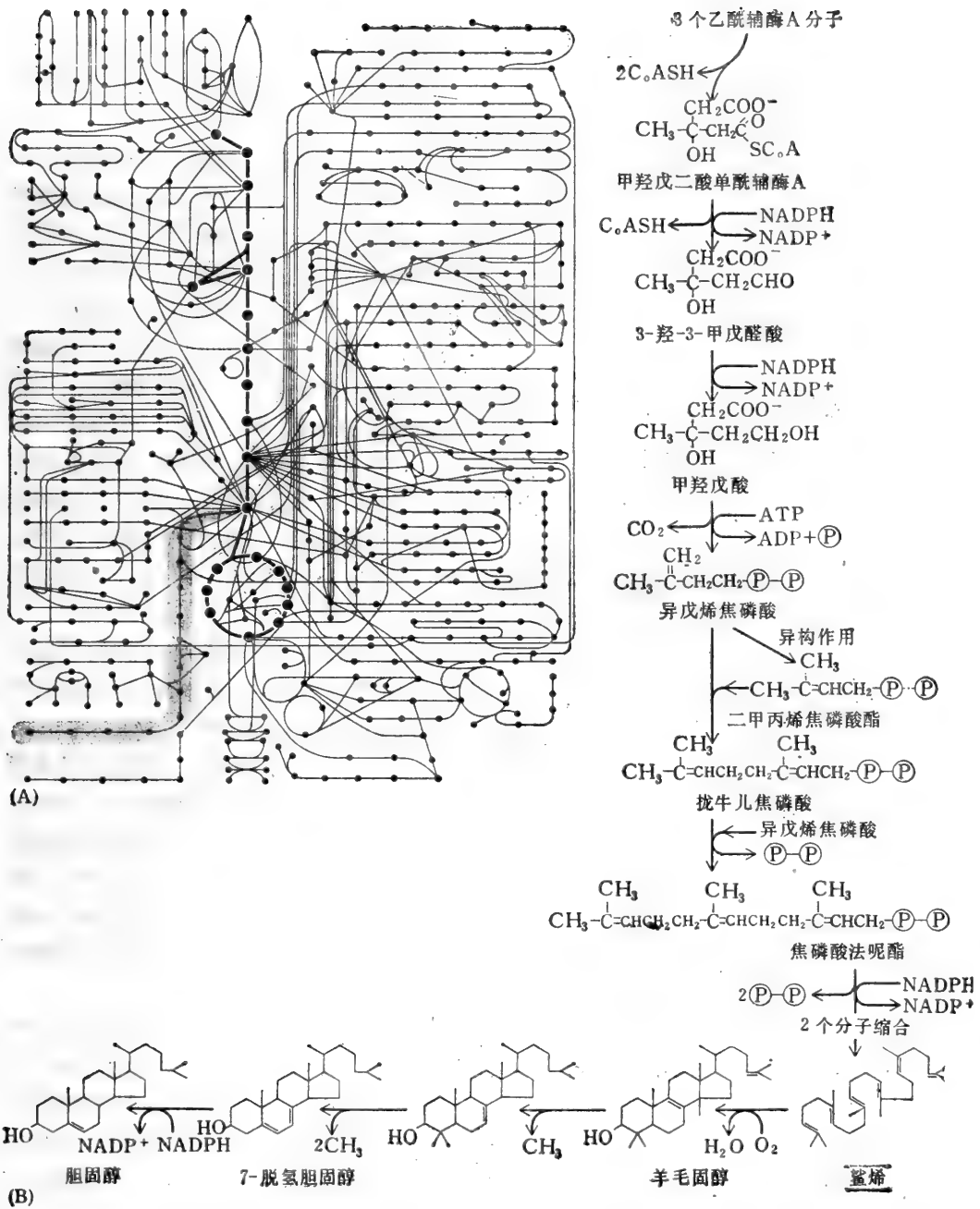


图 2-35 发生在细胞内的一些化学反应。(A)从酵解途径和柠檬酸循环(示以黑色粗线)辐射延伸出500个左右的普通代谢反应。典型的哺乳类细胞合成10 000多种蛋白质,大部分是酶。在这代谢迷津中覆上黑色阴影的命定的一段途径中,从乙酰辅酶A合成胆固醇。这段途径的具体细节放大后显示在迷津的右侧和下侧(B)。

式的反馈调节能使细胞从葡萄糖降解转向葡萄糖的生物合成即葡糖异生。这种逆途径的

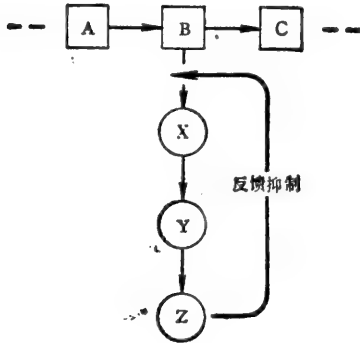


图 2-36 一个生物合成途径的反馈抑制。最终产物 Z 可抑制第一个酶（这个酶是 Z 合成所独有的），从而调节它自己在细胞内的浓度。

需要在激烈运动期间尤其显得迫切，这时肌肉收缩所需的葡萄糖是由肝细胞产生的；饥饿期间也是如此，这时为了存活必须从脂肪酸和氨基酸形成葡萄糖。

酵解期间，葡萄糖正常分解成丙酮酸是由 9 个不同的酶依次催化。大多数酶催化的反应是容易逆转的，但是有 3 个反应步骤（图 2-20 序列中的步骤 1、3 和 9）实际上是不可逆的。事实上，在这些正常驱动葡萄糖分解的反应中出现大的负自由能的变化。对于以相反方向进行的、从丙酮酸制造葡萄糖的反应来说，这三个反应都必须通过旁路。从丙酮酸制造葡萄糖必须有三个替代的酶催旁路反应，这些反应通过化学能的输入而沿着上行方向驱动（图 2-38）。因此，每当一个葡萄糖分子降解成两个丙酮酸分子时可产生两个 ATP 分

子，而葡糖异生期间的逆转反应则需要水解 4 个 ATP 分子和两个 GTP 分子。这相当于每合成一个葡萄糖分子，总共水解 6 个 ATP 分子。

图 2-38 中的旁路反应必定受到严密控制，所以仅当需要能量时葡萄糖才分解，仅当细胞营养供应充足时葡萄糖才合成。如果前进和逆转的反应都允许无限制地进行，则它们将穿梭般地在无效的循环中向前向后代谢，而无目的地消耗大量 ATP。

用一个例子就可以说明这些控制机制的精密。酵解步骤 3 是葡萄糖形成期间必须旁路的反应之一。通常这一步骤涉及果糖-6-磷酸上加一个来自 ATP 的磷酸基团，并被果糖磷酸激酶所催化。这一特定的酶被 AMP 和 ADP 所激活，被 ATP、柠檬酸和脂肪酸所抑制。换言之，当能量供应不足，AMP 和 ADP 积累时，这种酶便被激活，当能量供应（以 ATP 形式）或脂肪酸和柠檬酸（来自氨基酸）那样的食物供应充足时便被抑制。催化导致葡萄糖形成的逆转（旁路）反应的酶是果糖二磷酸酶。这种酶是由同样的反馈控制分子反方向调节的，所以它是在磷酸果糖激酶不起作用时才起作用的。

请注意，磷酸果糖激酶是被 ADP 激活的，而 ADP 则是磷酸果糖激酶催化反应的产物（ $\text{ATP} + \text{果糖-6-磷酸} \rightarrow \text{ADP} + \text{果糖-1,6-二磷酸}$ ）；磷酸果糖激酶又是被 ATP 所抑制的，ATP 是它的底物之一。因此，这种酶接受复杂的正反馈控制。在某些情况下，这种反馈控制可引起明显的酶活性振荡，并导致各种酵解中间物浓度的相应振荡（图 2-39）。虽然目前还不知道这些特定振荡的生理意义，但是它们可以说明少数几种酶如何能产生生物振荡器。理论上，这种振荡可提供一个内在的钟，使细胞能够“计时”，例如按照固定的时间间隔来行使某些功能。

酶可被共价变化所激活和抑制¹⁰

刚刚讨论过的这些反馈控制可使反应序列的速率，由于代谢中不时出现的波动而得到连续的和自动的调节。当要求活性持续变化时间较长，超过几分钟或几小时时，细胞对

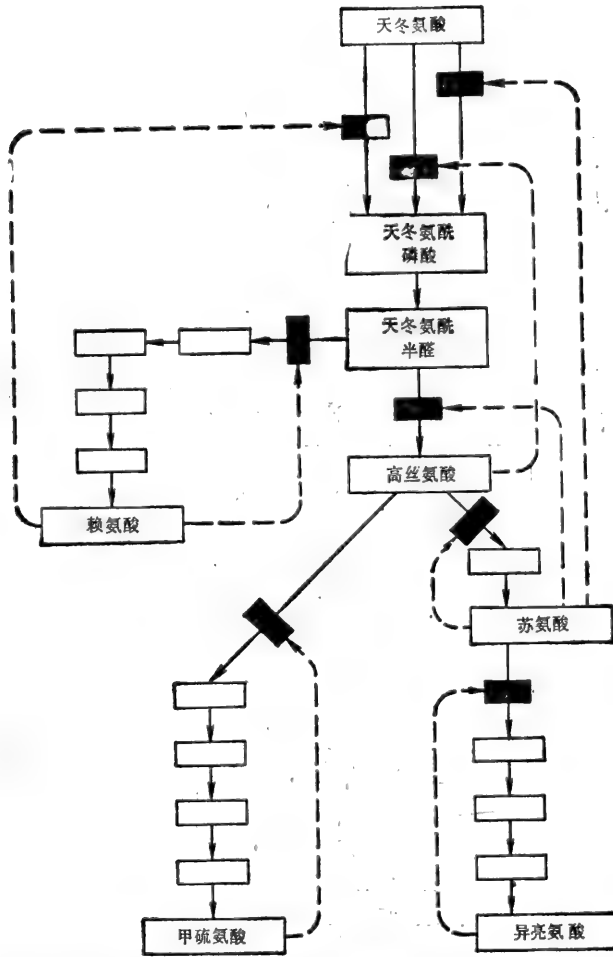


图 2-37 细菌中赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和异亮氨酸合成中的反馈抑制。虚线箭头指示产物“反馈”抑制酶的位置。请注意，3 个不同的酶（称为同工酶）催化初反应，各为不同的产物所抑制。

酶有不同的调节方法。这些方法涉及酶的可逆的共价变化，这种变化常常但并非总是通过在酶中特定的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上加一个磷酸基来完成。磷酸基来自 ATP，蛋白质激酶催化其转移。

我们在下一章将讨论磷酸化作用如何改变酶的形状，以此提高或抑制酶的活性。另一种酶称为磷蛋白磷酸酶，可除去磷酸基，逆转磷酸化作用。酶的共价变化又给代谢控制增加了一种手段，因为它使特定的反应途径可被与代谢中间物本身无关的信号例如激素所调节。

反应不仅在细胞内而且在有机体内分室进行¹¹

一个细胞的所有的代谢反应并非个个都发生在同一个亚细胞区室内。因为细胞的不同部位有不同的酶，所以化学组分不仅在化学上而且在物理上都有其流动的通道。

当催化连续反应的两个酶形成酶复合物时，便出现最简单的空间隔离形式，第一个酶的产物不必通过细胞质扩散，就可以与第二个酶相遇。第一个反应一结束，第二个反应就

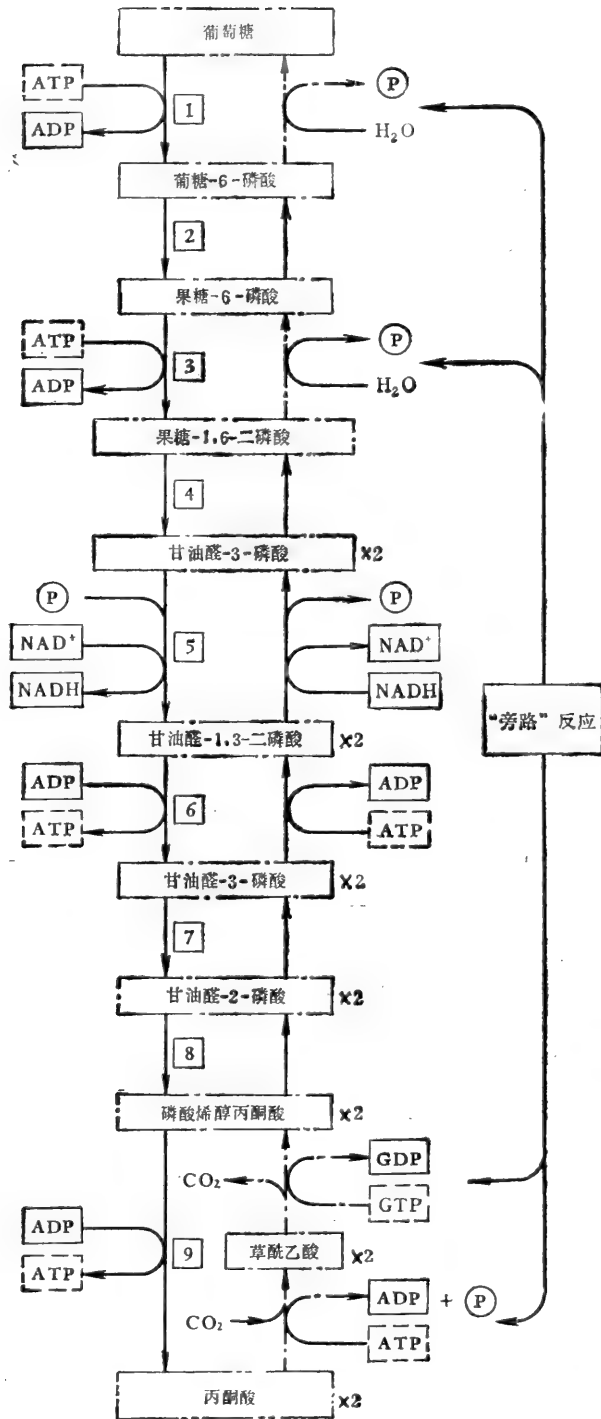


图 2-38 葡糖异化期间产生葡萄糖的反应与降解葡萄糖的反应的比较。降解(酵解)反应是能力学上有利的(自由能变化小于零),而合成反应需输入能量。为了合成葡萄糖,需要不同的“旁路酶”,使酵解反应 1、3 和 9 通过旁路。反应物的总通量取决于在这些关键性步骤中起作用的反馈控制机制。

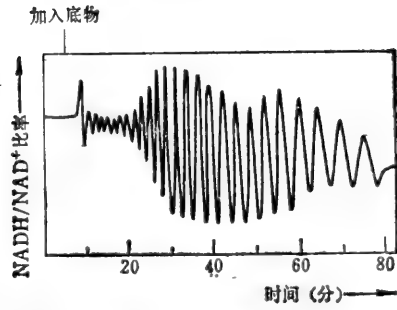


图 2-39 含酵解所需的酶和辅助因子的提取物中突然加进葡萄糖,可使 NADH 那样的中间物的浓度产生大幅度的周期性波动。这些代谢振荡部分起因于酵解酶即磷酸果糖激酶的正反馈控制。

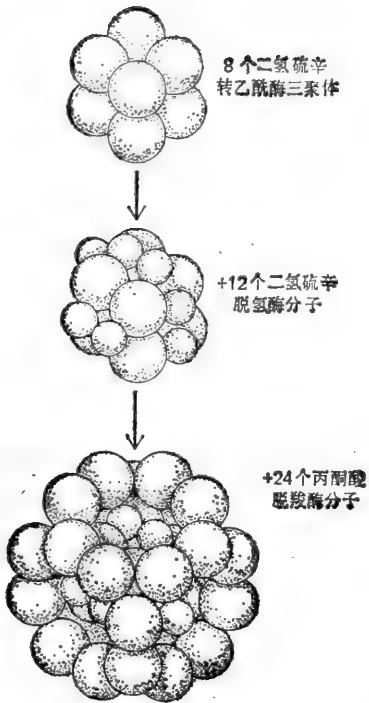


图 2-40 大的多酶复合物的一个例子——丙酮酸脱氢酶的结构。在此,反应中间产物直接从一个酶传至另一个酶。这一酶复合物催化丙酮酸转化成乙酰辅酶A。

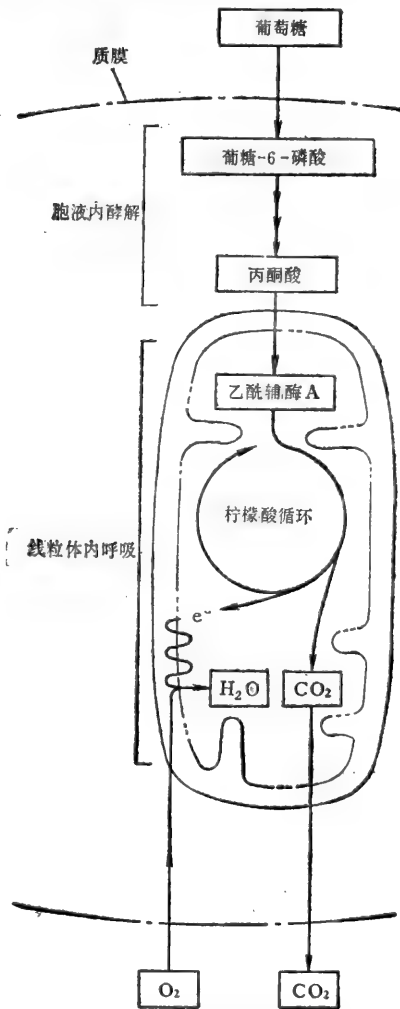


图 2-41 真核细胞内葡萄糖分解各步骤的分离。酵解发生在胞液内,而柠檬酸循环和氧化磷酸化反应则仅发生在线粒体内。

接着开始。有些大的酶聚合体执行整个一系列的反应而不错过与底物接触。例如，丙酮酸转化成乙酰辅酶A通过三个化学步骤进行，所有这三步反应都发生在同一个大的酶复合物上(图2-40)，而且在脂肪酸合成中，一种酶的集合体甚至可催化更长的反应序列。无怪乎一些最大的酶复合物与蛋白质和 DNA 那样的大分子的合成有关。

细胞内的下一水平的空间隔离是把功能上相关的酶限制在同一膜内或膜围成的细胞器液态区室内。葡萄糖的氧化代谢就是一个很好的例子(图2-41)。酵解后，丙酮酸从胞液充分地被摄入线粒体内区室，后者包含与柠檬酸循环有关的所有的酶和代谢物。而且，线粒体内膜本身包含可催化此后的氧化磷酸化反应的所有的酶，包括与电子从 NADH 转移至 O_2 ，以及与 ATP 合成有关的酶。因此可以把整个线粒体看作是一个小型的生产 ATP 的工厂。同样，其他细胞器，如细胞核、高尔基器、溶酶体都可被看作特化的室，其中有功能上相关的酶局限在那里，执行着专门的任务。从某种意义上讲，活细胞像一座现代化的城市，有很多专门的机构集中在市内不同的地区，这些地区通过各种交通路线而取得普遍的相互联系。

多细胞有机体的空间组织超越单个的细胞。机体的不同组织有一套套不同的酶，以不同的方式对生物整体的生存作出贡献。除了激素或抗体那样的特殊产物有所不同外，同一生物体内各种类型细胞之间“共同的”代谢途径也有显著的差异。虽然实际上所有细胞都包含参与酵解、柠檬酸循环、脂质合成和分解，以及氨基酸代谢的酶，但是不同组织中的这些过程的水平则有待于微调，以应答生物体的需要。神经细胞可能是机体内最任性

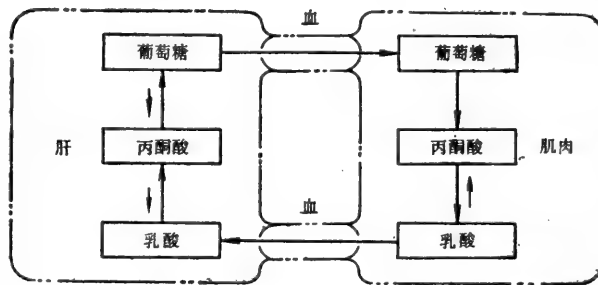


图 2-42 肝细胞和肌细胞之间代谢协作的示意图。积极收缩的肌细胞的主要燃料是葡萄糖，大量的葡萄糖由肝细胞供应。肌肉内葡萄糖无氧分解的最终产物乳酸在肝细胞内反过来转化成葡萄糖。

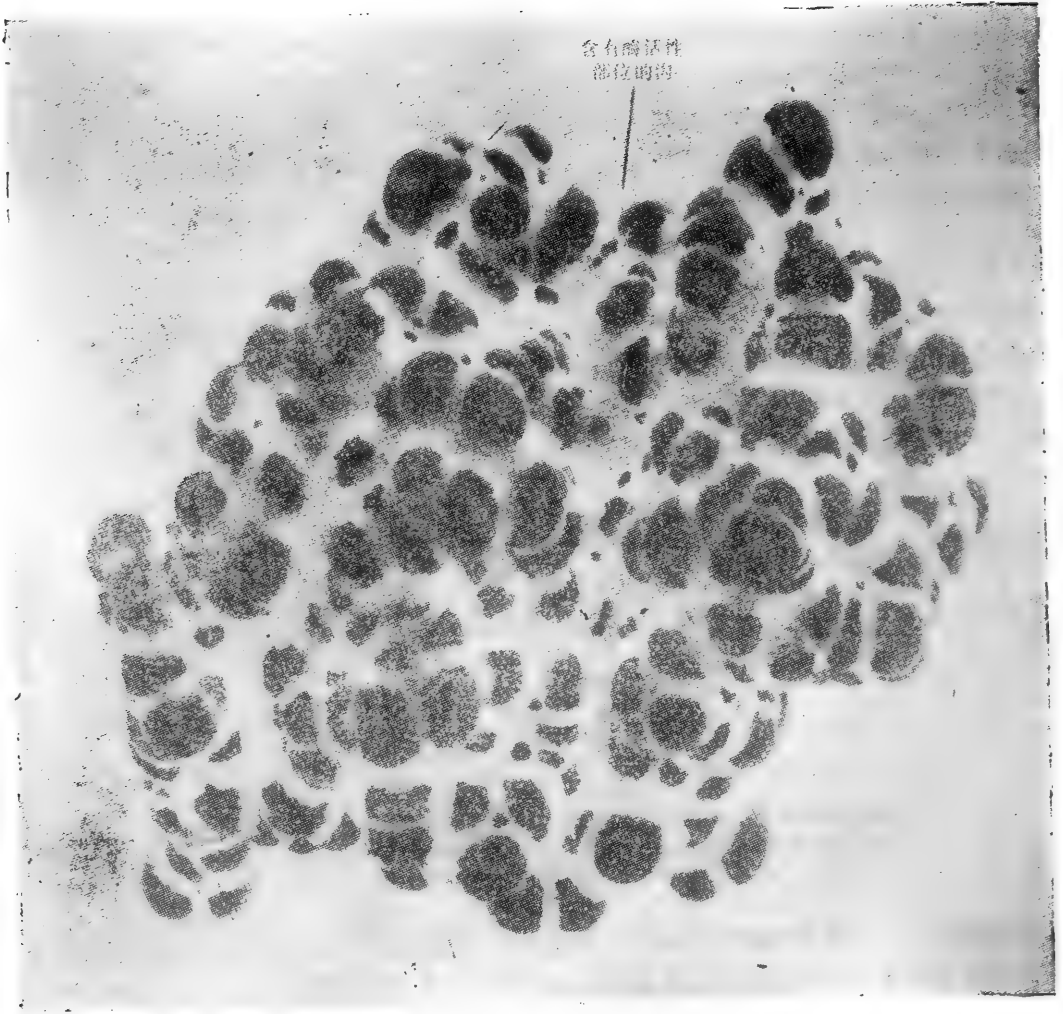
的细胞，它们简直不贮存糖原或脂肪酸，而几乎完全依靠血流供应葡萄糖。肝细胞把葡萄糖供应给积极收缩的肌细胞，并使肌细胞产生的乳酸通过再循环而重新成为葡萄糖(图2-42)。所有各种类型的细胞都具有它们自己的独特代谢特性，它们不仅在运动、紧张和饥饿时，而且在正常状态下，都进行着广泛的协作。

小结

细胞内同步进行的成千上万种不同的化学反应是相互密切协作的。多种调控机制在细胞内千变万化的条件下调节着关键性酶的活性。一种很普遍的调节形式是快速的可逆反馈抑制，它通过代谢途径的终产物而作用于该途径的第一个酶。较长时期持续形式的调节是一种酶被另一种酶作了化学修饰，这种修饰往往是通过磷酸化作用。各种调节

机制联合起来就能在细胞的代谢中产生大的长期持续的变化。并非所有的细胞反应个个都发生在同一种细胞区室内，内膜的空间隔离使得细胞器可以执行它们各自的专门的生化任务。

【王顺德译 汪开治校】



• 计算机绘制的包含 129 个氨基酸的小蛋白质卵清溶菌酶表面的模型。(Michael Connolly 赠)

第三章 大分子:结构、形状和信息

细胞的主要大分子——蛋白质、核酸和多糖——是从上一章所讨论的小分子,如氨基酸、核苷酸和糖的多聚体等合成的。它们的复杂而又精确限定的结构使它们拥有独特的特性,使它们能执行细胞所有最独特的功能。大分子负责装配细胞组分,催化化学变化,产生运动,以及负责遗传——这是最基本的。这些极重要的功能的事实根据是生物大分子携带信息。写到蛋白质或 DNA 分子结构中去的是生物信息,它在与其他大分子作用过程中被“读出”。这种信息的贮存、转移和使用的原理是本章的主要内容。

分子的识别过程¹

除水外,细胞的大部分均由大分子构成(表 3-1)。在典型情况下,它们的分子量约在 10 000 和 1 000 000 之间,大小介于第二章讨论的细胞的有机分子与核糖体和病毒等较大的生物活性单位之间(图 3-1)。

正如第二章中所描述的那样,大分子是从小分子量的亚基装配而成,小分子的亚基——相加形成长长的链状多聚体(见图 2-33)。通常只有一类亚基形成各种链的结构:氨基酸与氨基酸相连形成蛋白质;核苷酸与核苷酸相连形成核酸;糖与糖相连形成多糖。因为亚基的精确顺序是大分子功能的关键,所以它的生物合成需要有一种机制来准确地确定多聚体链上的每一位置由哪一个亚基占有。

大分子携带的信息依靠非共价的弱键来表达

大分子链通过共价键保持在一起,共价键很强,足以使大分子内的亚基顺序长期保存。但是,这个序列所携带的信息是通过许多弱的非共价键来表达的。这些弱键在同一大分子的不同部位之间和不同大分子之间形成。所以,它们既确定大分子链的三维结构,又确定这些结构如何相互作用。

在生物分子中遇到的非共价键通常分为三类,即:离子键、氢键和范德瓦耳斯引力。另一种重要的弱力是由水的三维结构产生的,它可迫使疏水基聚在一起,从而把疏水基对水分子氢键网络的破坏作用减到最小。从水溶液产生的这种排斥力可形成键,它们有时

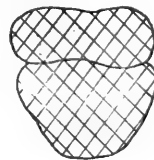
糖、氨基酸和核苷酸 ~ 0.5-1 nm.



球蛋白 ~ 2-10 nm



核糖体 ~ 30 nm



细菌细胞 ~ 1000 nm

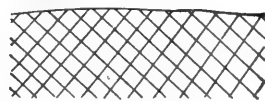


图 3-1 蛋白质分子大小与其他细胞组分的比较

表 3-1 典型的细菌和典型的哺乳动物细胞的近似的化学组成

组分	细胞总重量的百分比		组分	细胞总重量的百分比	
	大肠杆菌	哺乳动物细胞		大肠杆菌	哺乳动物细胞
H ₂ O	70	70	磷脂	2	3
无机离子(Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ 等)	1	1	其他脂质	—	2
各种小代谢物	3	3	多糖	2	2
蛋白质	15	18	细胞总体积	2 × 10 ⁻¹² cm ³	4 × 10 ⁻⁹ cm ³
RNA	6	1.1	相对细胞体积	1	2 000
DNA	1	0.25			

蛋白质、多糖、DNA 和 RNA 都是大分子。脂质虽然也具有大分子的某些特性，但一般不算大分子；例如，大多数脂质是由较小分子合成的线性多聚体(乙酰辅酶A上的乙酰基)，并自我装配成较大的结构(膜)。

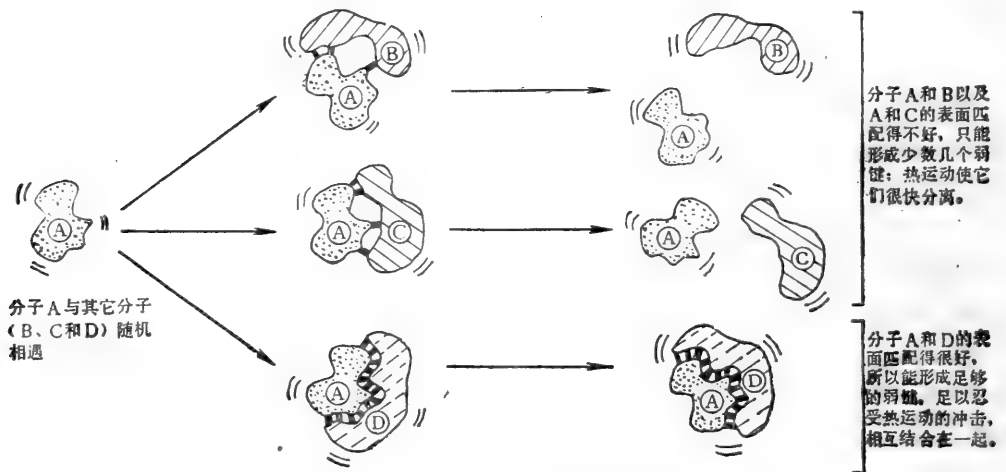


图 3-2 阐明弱键如何调节大分子之间的识别过程的示意图

称为第四种非共价弱键，一般称为疏水键。第 94 页的组合图 I 将分别讨论和解释这四种类型的弱键。

表 3-2 共价和非共价化学键

键的类型	长度(nm)	强度(kcal/mol)	
		在真空中	在水中
共价键	0.15	90	90
离子键	0.25	80	1
氢键	0.30	4	1
范德瓦耳斯引力	0.20	1	1

键的强度可用折断键所需要的能来测量(这里用每摩尔的千卡数或 kcal/mol 来表示)。(一千卡是指 1 000 克水的温度提高 1°C 所需要的能量。另一种广泛使用的单位是千焦，相当于 0.24 kcal。)各种键的强度因有关原子及其所处的真实环境的不同，而有很大的差异，所以上述的数值仅仅是供参考的约略数字。应当指出，细胞中的水环境可极大地减弱非水分子之间的离子键和氢键两者(组合图 I)。

在水溶液环境中,非共价键比共价键约弱 100 倍(表 3-2),只比 37°C 时热碰撞的平均能量稍强。所以,同共价键不一样,一个非共价键确实是太弱了,以致不能忍受热运动的冲击;热运动可将分子冲开,要使两个分子表面保持在一起,需要有大量的非共价键。由于仅当两个分子表面相互精确地组配时才能形成大量的这种键(图 3-2),这就说明生物识别,例如发生在酶及其底物之间那种识别的专一性。

同样,弱的非共价力可确定同一分子的不同区域如何组配在一起。原则上,像蛋白质那样的可曲性长链可以多种不同的方式折叠起来,在每种折叠方式中,这种链都可建立不同的弱相互作用组。然而,实际上细胞的大多数蛋白质只有一种稳定的折叠方式:在进化过程中已选择出氨基酸亚基的顺序,使原子的一种三维排列(或构象)能形成多种弱相互作用。

扩散是分子识别的第一步

两个分子在相互识别从而表达它们表面的信息之前,它们必须相互紧密接触。这由热运动来完成,热运动使分子从它们的出发点向外移动,即扩散。当液体中的分子相互迅速地碰撞和反弹时,一个分子先是朝一个方向运动,然后又朝另一个方向运动,它的轨迹构成了“随机漫步”(图 3-3)。这种分子移动的平均距离与时间的平方根成正比,也就是说,如一个分子平均 1 秒钟移动 1 μm ,则移动 2 μm 需 4 秒钟,移动 3 μm 需 9 秒钟,依此类推。所以,扩散是分子移动有限距离的有效方法。

将荧光染料和其他标记分子注射于细胞的实验表明,小分子通过细胞质扩散的速率似乎与在水内扩散一样快。ATP 那样大小的分子只需约 0.2 秒就可以扩散平均 10 μm 的距离——相当于小动物细胞的直径。然而,大分子的移动要慢得多。它们不仅确实具有固有的较慢的扩散速率,而且它们的运动由于与细胞质内位置固定的许多其他大分子的频率的碰撞而遭受阻碍(图 3-4)。

热运动不仅使分子聚集而且使它们分离

两个大分子之间或者一个大分子和一个小分子之间的相遇可通过简单的扩散而随机地发生。一次相遇可能立即形成复合物(在这种情况下形成的速率被说成是扩散限制的速率),或者复合物形成的速率较慢,在相互作用的表面能组配之前,一个或两个分子的结构再作一些调整。在无论哪种情况下,一旦两个相互作用的分子靠得足够近时,它们相互之间就形成众多的弱键,这些键一直保存到随机的热运动又使分子解离为止。

通常,复合体中分子的结合越强,它们解离的速率便越慢。在一种极端的情况下,成键的能量与热运动的能量相比可忽略不计时,两个分子解离便与它们结合一样快。在另一种极端情况下,键的能量很高,致使解离难得出现。两个分子之间键合的精确程度是识别过程专一性的有用的指数。

为了搞清楚如何测量结合强度,试考虑分子 A 与分子 B 的结合反应。这一反应一直

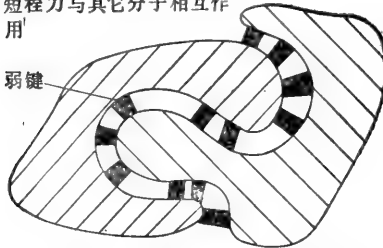


图 3-3 随机漫步。溶液中的分子由于在与其他分子碰撞过程中受到连续的冲击,所以随机地运动。这种运动使分子在很短的时间内扩散到整个细胞。

弱化学键

有机分子可通过非共价的短程力与其它分子相互作用

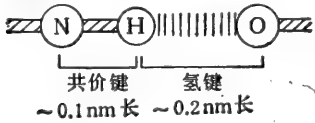
弱键



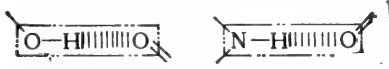
弱化学键强度典型时小于共价键强度的1/20。仅当同时形成许多弱键时它们才很强，足以产生紧密结合。

氢键

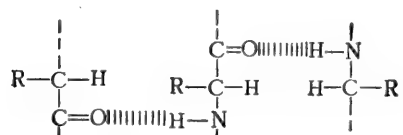
两个非氢原子（都呈电负性，如N和O）之间共享一个氢原子，产生氢键



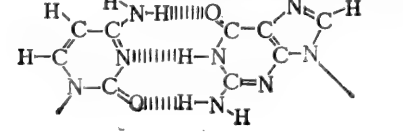
当三个原子在一直线上时氢键最强：



大分子中的例子：
氢键使两条多肽链结合在一起

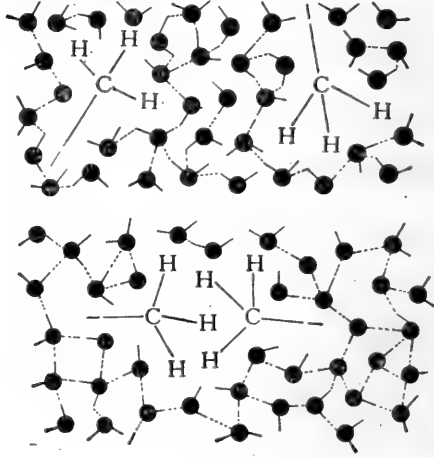


DNA 或 RNA 中氢键使两个碱基G和C结合



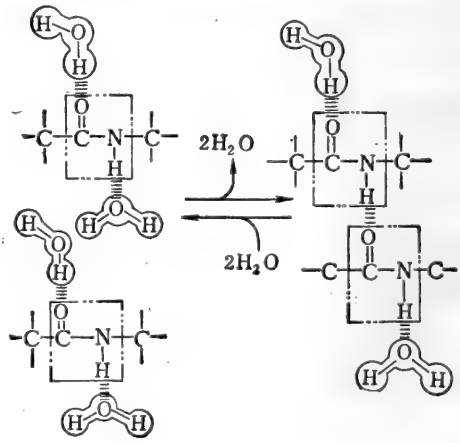
疏水相互作用

为了使疏水基团对氢键连的水网络的破坏作用减到最小，水迫使疏水基团聚在一起。以这种方式聚在一起疏水基团常说成是通过“疏水键”而聚在一起的。



水中的氢键

因为两个可溶分子之间任何新的氢键的形成都可导致原存的水分子之间氢键的断裂，所以说氢键是相当弱的。



组合图 I 把大分子结合

离子键

离子相互作用发生在完全带电基团(离子键)或部分带电基团之间



两个电荷 δ^+ 和 δ^- 之间的吸引力为

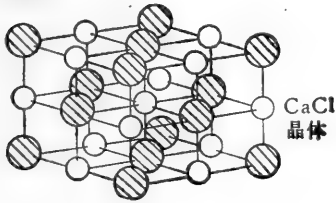
$$力 = \frac{\delta^+ \delta^-}{r^2 D} \text{ (库仑定律)}$$

其中D=介电常数

(真空D=1; 水D=80)

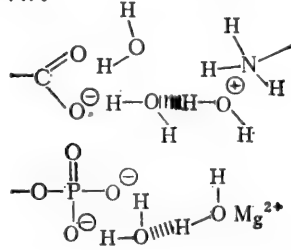
r=分开的距离

无水时离子力很强。它们与矿物如大理石和玛瑙的强度有关。

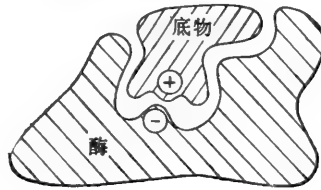


水中的离子键

带电基团受它们与水分子的相互作用的屏蔽,所以水溶液中离子键是很弱的(强度大概与氢键相同)。

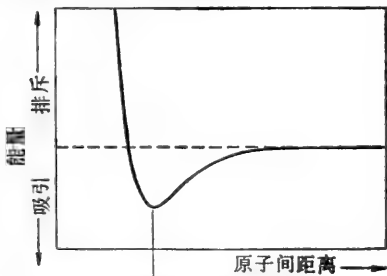


但是在生物系统中离子键是很重要的;与带正电底物结合的酶常常在适当的地方有带负电的氨基酸侧链。



范德瓦耳斯力

任何两个原子距离非常近时,由于它们的电荷起伏而显示出弱的键连相互作用。这个力称为范德瓦耳斯引力。

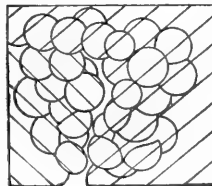


在这一点范德瓦耳斯力最佳

各种原子都具有最佳范德瓦耳斯力的半径

H	C	N	O
1.2 Å (0.12 nm)	2.0 Å (0.2 nm)	1.5 Å (0.15 nm)	1.4 Å (0.14 nm)

虽然单独的范德瓦耳斯引力是很弱的,但是当两个大分子表面非常紧密相连时,范德瓦耳斯引力就变成很重要了。



在一起的主要类型非共价弱键一览

进行到它到达平衡点为止；在平衡点时，复合物 AB 的解离量和生成量相等。平衡点时 A、B 的浓度和复合物 AB 的浓度可用来确定反应的平衡常数 (K)，解释见图 3-5。这一常数有时称为亲和常数，通常用来测量两个分子之间的结合强度；结合越强，亲和常数便越大。

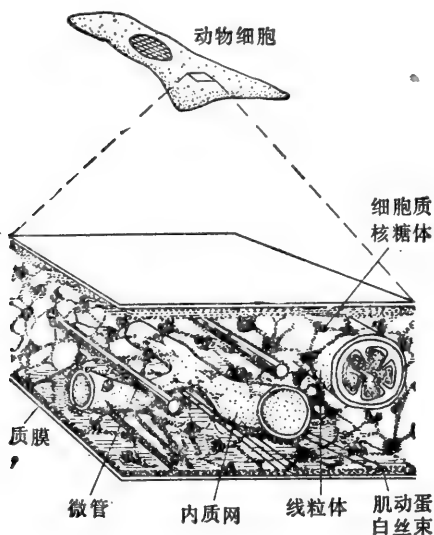


图3-4 一小块动物细胞的示意图。展现高密度的蛋白纤维以及细胞内包含的膜围成的细胞器。大分子的扩散因其与细胞质内许多其他大分子相互作用而受阻，而小分子扩散则几乎像在水中一样快。图示的细胞因贴近表面而展平。

两个分子相互结合反应的平衡常数直接与结合的标准自由能变化(ΔG°)相关， ΔG° 由表 3-3 所示的方程式计算，这一方程也能用来计算对应于一系列 K 值的 ΔG° 值。生物系统中简单的结合性相互作用的亲和常数常处在 10^3 — 10^{10} 升每摩尔的范围之内，它代表结合能在 4—14 千卡每摩尔范围内。

举一个更复杂的相互作用的例子，试考虑有丝分裂，在从中期至末期的 30 分钟左右时间内，每条染色体可能都继续不断地与它的纺锤丝相连。如果一条染色体成功地分进准确的子细胞，即在每 1 000 次有丝分裂中失败少于 1 次，这条染色体必须连接其纺锤体至少要有 $30 \text{ 分钟} \times 1 000 \text{ 次有丝分裂} = 3 \times 10^4$ 分钟。因为失败是一种随机过程，为了

使人细胞全部 46 条染色体在 1 000 次有丝分裂中不出现 1 次分离差错，它们与纺锤体连接的时间必须延长 46 倍，即 1.4×10^6 分钟。这就算出了染色体解离速率的最大许可值。而且，我们能从染色体的扩散速率确定解离的最大速率，这就有可能计算出亲和常数 K 的最小值(如图 3-5 所讨论的那样)。所得之值(至少 10^{16} 升每摩尔)代表至少—23 千卡每摩尔的自由能变化。这种变化平均由 23 个氢键产生。

分子识别过程决不可能完美无缺

分子在溶液内扩散的快速运动不是它们所具有的唯一能量形式。在正常温度下，所有的原子，包括构成细胞的原子，还具有振动、旋转和电子分布等形式的能量。这种能量主要通过分子碰撞而随机地分布于不同的原子。所以，虽然大多数原子的能量水平接近平均值，一小部分原子仍将具有极低或极高的能量。假定已知温度和两状态之间的能差，就有可能计算分子存在两种能态之一的机率。两能态的能差越大，高能态的机率例如染色体脱离纺锤丝，相对于低能态的机率而言就变得越小。无论如何，只有在这种能差成为无穷大时，高能态相对于低能态的机率才成为零(表 3-3)。

因为分子间的相互作用存在着随机的因素，所以分子间的作用决不可能绝对可靠。结果，细胞连续不断地发生差错。甚至能力学不利的反应偶尔也会发生；例如，通过共价键相互连接的两个原子最终将分离。同样，酶对其底物的专一性决不可能是绝对的，因为区别

表 3-3 自由能之差和平衡常数之间的关系

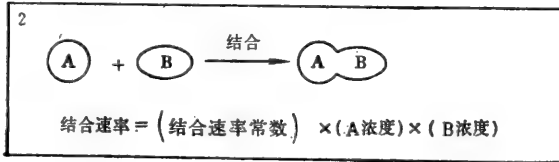
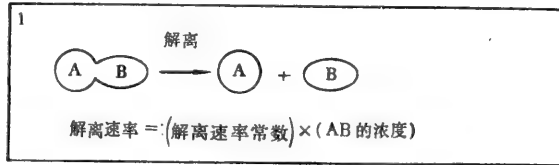
$\frac{[AB]}{[A][B]} = K$	AB的自由能减A + B的自由能(kcal/mol)	$\frac{[AB]}{[A][B]} = K$	AB的自由能减A + B的自由能(kcal/mol)
10^3	-7.1	1	0
10^4	-5.7	10^{-1}	1.4
10^5	-4.3	10^{-2}	2.8
10^6	-2.8	10^{-3}	4.3
10	-1.4	10^{-4}	5.7
		10^{-5}	7.1

如果 $A + B \rightleftharpoons AB$ 反应能达到平衡,则 A、B 和 AB 的相对量取决于它们之间自由能差 ΔG° 。表中之值是在 37°C 下计算出来的,计算的方程式为

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{[AB]}{[A][B]}$$

或 $\frac{[AB]}{[A][B]} = e^{-\Delta G^\circ/RT} = e^{-G^\circ/(1.673)}$

其中 ΔG° 是以 kcal/mol 为单位,代表标准条件下(所有组分的浓度为 1.0 摩尔每升)的自由能之差。



平衡时: 结合速率 = 解离速率

$$(\text{结合速率常数}) \times (\text{A 浓度}) \times (\text{B 浓度}) = (\text{解离速率常数}) \times (\text{AB 浓度})$$

$$\frac{(\text{AB 浓度})}{(\text{A 浓度}) \times (\text{B 浓度})} = \frac{\text{结合速率常数}}{\text{解离速率常数}} = \text{平衡常数 } K$$

$$\frac{[AB]}{[A][B]} = K$$

图 3-5 平衡原理。分子 A 和 B 与二聚体 AB 之间的平衡。由于(1)和(2)的两个相反反应之间的平衡而得以维持。结合反应和解离反应的速率常数之比等于反应的平衡常数 K。因为分子 A 和 B 必须碰撞才能反应,所以,在反应(2)中,合成速率是与各浓度之积成正比的。结果, $[A] \times [B]$ 之积出现在 K 的最终表达式中。

在图示的数学式中, K 是指亲和常数,其值越大, A 和 B 之间结合就越强。这种形式的平衡常数也称结合常数(单位为升/摩尔)。平衡常数也能另行定义为此处所示常数的倒数,称为解离常数(单位为摩尔/升)。

一种分子与另一种分子的识别决不可能是完美无缺的。只有在细胞进化出使两个选择对

象的能差成为无限大的机制时,才能完全避免差错。因为细胞只能支配有限的能量,所以它们被迫容忍一定水平的失败,并用特殊的修复反应校正它们的许多差错。

另一方面,差错总是难免的。要不是在制造 DNA 过程中发生偶尔的差错,进化也就不可能发生,这一点将在下面讨论。

小结

大分子的信息包含在确定其表面的三维外形的亚基顺序之中。这些外形又通过非共价的弱键决定一个分子与另一分子之间的识别,或同一分子的不同部位之间的识别。分子相互识别的过程是,首先通过随机扩散而相遇,然后再结合,结合强度可用平衡常数来表达。因为使识别确实无误的唯一方法是使结合能保持无穷大,所以活细胞常常出差错;特殊的修复过程校正需要校正的差错。

核 酸²

基因由DNA 构成

已经知道,只要人们播种谷物或饲养动物,每一颗种子或每一个受精卵就必定都包含着生物发育的潜在的计划或设计。当今,遗传学这门学科是在假定存在不可见的、含有信息的因子这一前提下成长起来的;这些因子称为基因,基因分布在每一次细胞分裂所产生的两个子细胞之中。细胞在任何一次分裂之前,必须给它的基因制造出复本,以便给它的每一个子细胞都提供一套完整的基因。精细胞和卵细胞中的基因携带遗传信息,代代相传。

虽然生物特性的遗传似乎很神秘,但从逻辑推理,它必然涉及服从物理学和化学定律的原子组配;换言之,基因必须由分子组成。最初,这些分子的性质是难以想像的。细胞内存贮何种分子才能指导发育中的生物的活动,以及准确而又几乎无限制的复制呢?

到了19世纪末,生物学家已认识到,当细胞开始分裂时在核内变得可见的染色体是遗传信息的载体。但是,这些染色体中的脱氧核糖核酸(DNA)是构成基因的物质的证据,却是在晚得多的时候才从有关细菌的研究中获得的。1944年,有人证明,若把一个细菌株的纯化的DNA加到稍有不同的另一细菌株中,第一种菌株所特有的遗传特性便授于另一个菌株。这一发现令人惊奇;实际上直到50年代初才为人们普遍接受,在此之前一般只相信蛋白质才有足够复杂的构象用来负载贮存在基因中的信息。今天,由DNA携带遗传信息并把它贮存在其核苷酸长链中这一概念已经成为现代生物学思想中的基本概念,以致人们有时难以设想这个概念居然曾经填补了知识上的空白。

DNA 分子由两条通过碱基对结合在一起的互补长链组成³

如果考虑到DNA在化学上的简单性,就能理解遗传学家何以难以承认DNA为基因的物质原因。DNA链是一条不分支的多聚体,仅由4种不同的亚基组成。这4种亚基是分别含有碱基腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T)的脱氧核糖核苷酸。核苷酸通过共价的磷酸二酯键连接在一起,磷酸二酯键使一个脱氧核糖基团的5'碳与下一个脱氧核糖的3'碳相连(组合图H)。4种碱基连接在重复的糖-磷酸链

上,就像4个不同种类的珠子挂在一条项链上一样(图3-6)。

核苷酸长链如何能编码生物体甚至细胞的指令呢?这些信息怎么能拷贝出来从一代细胞传给下一代细胞呢?答案在于DNA分子的三维结构。

早在50年代初,根据拉成纤维的DNA样品的X射线衍射分析提出, DNA分子是由两条链组成的螺旋多聚体。DNA的螺旋结构是不足为奇的,因为多聚体中各相邻亚基取向若有规则,便往往形成螺旋。但是,关键在于DNA为双链这一事实。沿着这一事实所提供的基本线索,1953年作出了一个DNA模型,这模型符合于所观察到的X射线衍射图,从而解决了DNA的结构问题。

这模型的一个很重要的特点是DNA分子的全部碱基均处于双螺旋的内侧,糖磷酸则处在外侧(图3-6和3-7)。由此一条链上的碱基必定非常靠近另一条链上的碱基。事实上,碱基是匹配得如此密切,以致要求一条链上的每一个碱基通过非共价键与另一条链上的互补碱基专一地配对。该模型预示,为了使两条链很好地匹配在一起,这种互补碱基配对必定涉及一个大的嘌呤碱基(A或G,各有双环)与一个较小的嘧啶碱基(T或C,各有单环)之间的配对。这个模型的建构还揭示,G与C或A与T之间所能形成的有效氢键数比任何其他组合的氢键数都要多,在DNA双螺旋中,A与T之间以及G与C之间的互补碱基配对为不同物种DNA制备的早期生化分析提供了解释。这些分析已经证明,虽然DNA的核苷酸组成变化很大(例如,不同类型细菌的DNA中A残基从13%变化到36%),但一般规律是,在数量上 $G = C, A = T$ 。

DNA 结构为遗传提供了解释

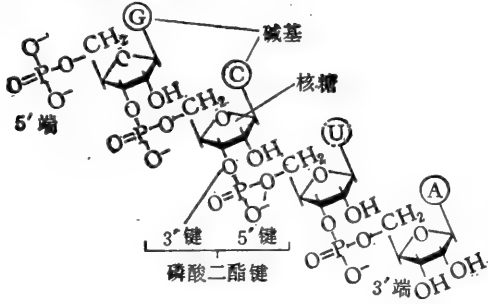
基因携带的生物信息的形式必须可以精确地拷贝和传给所有的后代细胞。DNA双螺旋结构的发现其意义是巨大的,因为根据这一结构立即提示了完成这种关键性信息传递过程的普遍机制。因为每一条链都包含着精确地与其对应链的核苷酸序列互补的核苷酸序列,所以这两条链实际上都带有相同的遗传信息。如果我们把这两条链称为A和A',则链A可用作制造新链A'的模子或模板,A'链也可以相同的方式制造新链A。由于链A与链A'的分离,每一条链都成为产生新互补配偶链的模板。遗传信息也就通过这样的过程而被复制出来。

虽然,DNA依靠它的核苷酸的线性序列携带信息,这是碱基配对机制的直接结果。可以把每一种核苷酸即A、C、T和G看作简单的4字母表中的字母,利用这些字母可以把生物信息以线性“自动收报机纸带”形式书写出来。不同物种的动物因为它们的细胞里相应的DNA分子携带不同的核苷酸序列亦即携带不同的生物信息,所以它们是各不相同的。

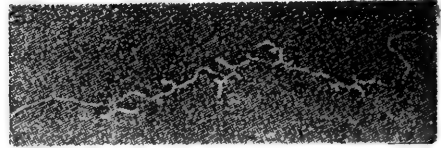
因为n个核苷酸长的DNA链中不同的可能序列的数目为 4^n ,所以即使用并不过分长的DNA,能够产生的生物变种的数目也是很大的。典型的动物细胞含有一米长的DNA(3×10^3 核苷酸)。微小的细菌病毒的遗传物质写成4字母的线性顺序可占据书本的整整一页(图3-8);一个动物细胞内携带的遗传信息如果也这样写则可写成整整一本500 000多页的书!

虽然基因复制的原理既别致又简单,细胞内进行这种复制的实际机理却是复杂的,涉及多种不同种类的蛋白质。基本反应如图3-9所示,在这一反应中,称为DNA多聚酶

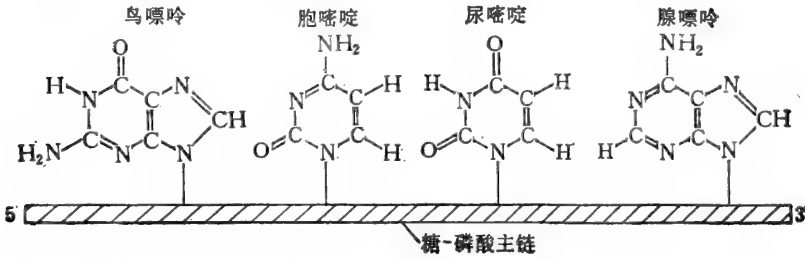
RNA 的糖-磷酸主链



RNA 的电镜照片



RNA 的 4 种碱基



RNA 单链

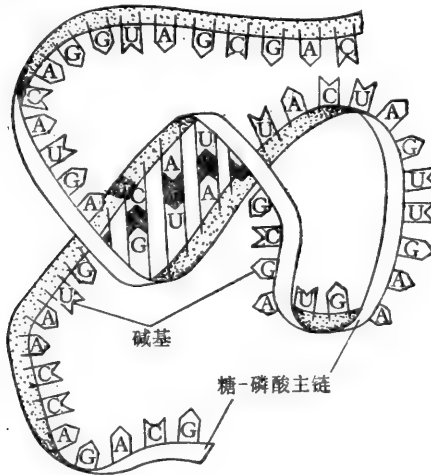
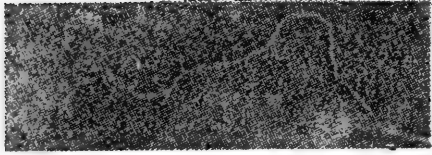
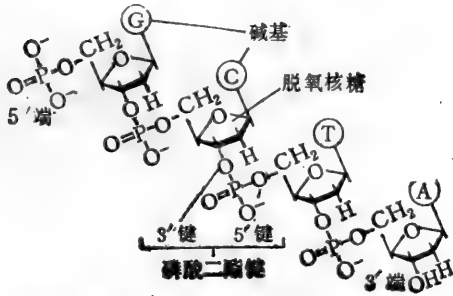
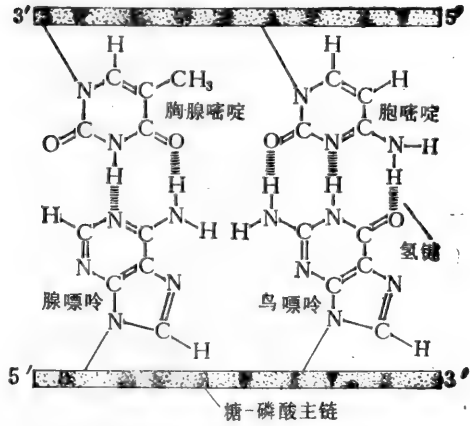


图 3-6 DNA 和 RNA 的结构。DNA 和 RNA 都是核苷酸的线性多聚体 (见组合图 H)，DNA 在两个方面不同于 RNA：(1)糖-磷酸主链包含脱氧核糖而不是核糖；(2)DNA 包含胸腺嘧啶(T)而不是尿嘧啶(U)。G 与 C 之间以及 A 与 T (RNA 中为 A 与 U) 之间的特定的氢键产生互补性碱基配对。在 DNA 分子中，核苷酸顺序互补的两条反向平行的链配对成右旋双螺旋，每

DNA 的糖-磷酸主链

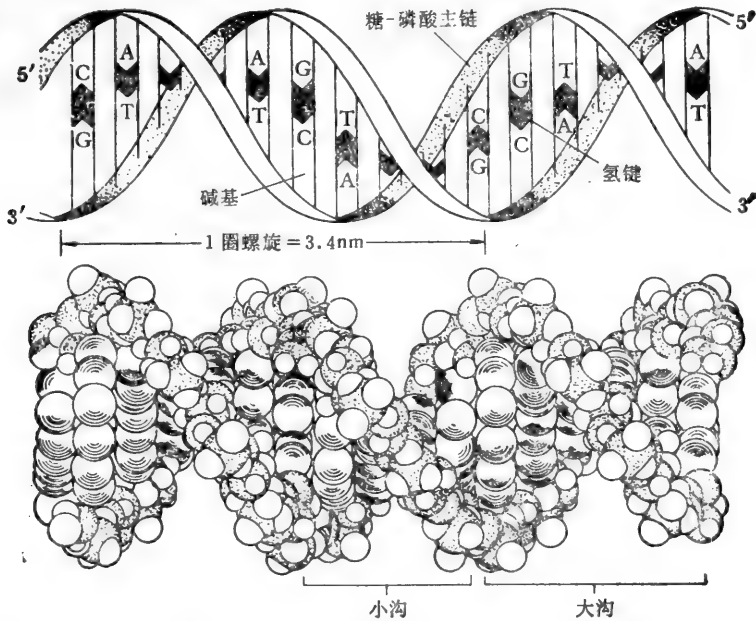


DNA 碱基对的 4 种碱基



DNA 的电镜照片

DNA 双螺旋



一圈螺旋约由 10 个碱基对形成。RNA 是单链,但它包含可以随机配对过程形成的短的互补碱基配对局部区域。RNA 中这些双螺旋区的构象显示于图3-7。(电镜照片由 Meiliie Wong [DNA] 和 Peter Wellauer [RNA] 赠)

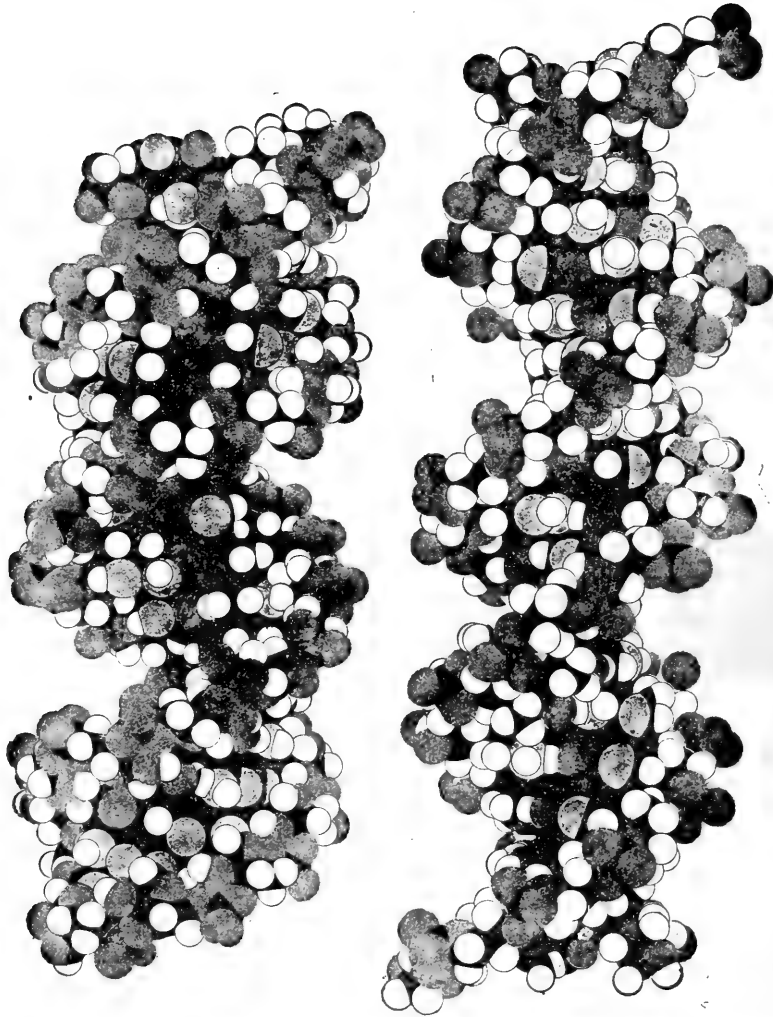


图 3-7 DNA 双螺旋(右)和双链 RNA 螺旋的一个区域(左)的空间结构模型。这两种结构都是从两条反向平行的核酸链形成,并且通过互补碱基配对而结合在一起的;它们在螺距和碱基对取向上稍有不同。图示的 DNA 螺旋称为 B 型螺旋, RNA 螺旋称为 A 型螺旋;虽然这些结构分别是 DNA 和 RNA 的最稳定的双螺旋形式,但不是唯一可能的形式(见 374 页)。(根据 Sung-Hou Kim 所赠照片重绘)

的酶催化脱氧核糖核苷酸加在 DNA 链的 3' 末端。加在链上的每一个核苷酸实际上是脱氧核糖核苷三磷酸;从这激活的核苷酸释放焦磷酸及其后的水解可为 DNA 复制反应提供能量,并使反应完全不可逆。

DNA 螺旋的复制从其两条互补的 DNA 链的局部分离开始。然后每条链充当模板,通过连续加成脱氧核糖核苷三磷酸形成新的 DNA 分子(图 3-10)。每一个步骤中加入的核苷酸都被选用,选用的过程要求它形成与亲代模板链中的下一个核苷酸配对的互补碱基对,从而产生与模板链顺序互补的 DNA 子链。遗传信息就这样被全盘复制出来。也就是说,最终形成了两条完整的 DNA 双螺旋,每一条双螺旋在核苷酸顺序上与充当模

GAGTTTATCGCTCCATGACGCASAGTTAACACTTCGGATATTTCTGATGAGTCGAA
 AAATTATCTTGATAAAGCAGGAATTACTACTGCTTGTITACGAATTAATCGAAGTGGAC
 TGCTGGCGGAAAATGAGAAAATTCGACCTATCCTTGCGCAGCTCGAGAAAGCTTACTTT
 CGGACCTTTCGCCATCACTAACGATCTGTCAAAAACGACCGTTGGATGAGGAGAAG
 TGGCTTAATATGCTTGGCAGCTTCGTCAGGACTGGTTAGATATGAGTCACATTTGTT
 CATGGTAGAGATTCTCTTGTGACATTTAAAGAGCGTGGATTACTACTTGAATCCGAT
 ECTGTTCACCCCTAATAGGTAAGAAATCATGAGTCAAGTACTGACAAATCCGTACGTT
 TCCAGACCGCTTTGGCCCTCTATTAGGCTCATTGAGGCTCTGCGCTTTTGGATTAAAGC
 AAGATGATTTTCGATTTTTCGACGAGTAACAAGATTTGGATTGCTACTGACCCGCTCGT
 CTCGTCGCTGCGTTGAGGCTGCGTTATGAGTACGCTGGACTTTGTTGGATACCCCTCGCT
 TTCTGCTCTGTTGAGTTTATTGCTGCCCTATTGCTTATTATGTTTCATCCCGTCAACA
 TTCAAACGGCTGTCTCATCATGGAAGCGCTGAATTTACGGAAAACATTATTAATGCCG
 TCGAGCTCCGGTTAAAGCCGCTGAATTTGCTGCGCTTACCTTGGCTGACCGCCAGGAA
 ACACGACGTTCTTACTGACGCAAGAAAACGTTGCGCTCAAAAATTAAGTGGCGAAGGAG
 TGATGTAATGCTAAAGGTA AAAAACGTTCTGGCGCTCCCCCTGGTCGTCGCCAGCCGTT
 GCGAGGTAATAAGGCAAGCGTAAAGGCGCTGCTCTTGGTATGTAAGGTTGCAACAATT
 TTAATTGCGAGGGCTTCGGCCCTTACTTGGAGTAATAATATGCTAATTAATCAAACTGG
 CCGCAGCGTATGCCCATGACCTTTCCCATCTGGCTTCTGCTGGTTCAGATTGGTTCG
 TCTTATTACCATTTCAACTACTCCGGTTATCGCTGCGCAGCTCTCGAGATGGACCGCT
 TGGCGCTCCCGCTCTTCTCCATTGCGCTGCGGCTTGGCTATTGACTCTACTGATAGAC
 TTTTACTTTTTATGCTCCCTCATCGTACGTTTATGGTGAACAGTGGATTAAGTTCATGAA
 GGATGGTAAATGCGCACTCTCTCCGACTGTTAACACTACTGGTTATAATGACCAATGC
 CGCTTTTCTTGGCAGGATTAACCTGATACCAATAAAATCCCTAAGCATTTGTTTACGG
 TTATTGAAATCTATAACAATTTTAAAGCGCGTGGATGCTGACCGTACCGCCAGGCG
 TAACCTAATGAGCTTAATCAAGATGATGCTCGTTATGGTTCCGTTGCTGCCATCTCAA
 AAACATTTGGACTGCTCCGCTTCTCTGAGACTGAGCTTCTCGCCAAATGACGACTTCA
 TACCACATCTATTGACATTAAGGCTGCAAGCTGCTTATGCTAATTTGCATACTGACCA
 AGAACGCTGATTACTTCATGACGCGTTACCATGATGTTATTCTTCAATTTGGAGGTA
 AAAACCTCTTATGACGCTGACAACCGCTCTTACTTGTGATGCGCTTAATCTCGGGCAT
 CTGCTATGATGTTGATGGAACGCAACCGCTGTTAGGCCAGATTTTCTGGTCTGTTCA
 CAACGACCTATAACACTCTGTCGCCGCTTTCTTGTCTGAGCATGGCCTATGTTACTCT
 TGGCCTGTCTGTTTTCCGCTTACTGCGACTAAAGAGATTGATGCTTAAAGCTTAAAG
 TGCTTTGACTTATACCGATATTGCTGGCGACCTGTTTTGATGGAACCTGCGCCGCG
 TGAATTTCTATGAAGGATGTTTTCCGTTCTGGTATTGCTTAAGAAGTTTAAAGATTG
 TGAGGTCAGTGGTATCGTTATGCGCCTTGGTATGTTCTCTGCTTACTACCTTCTG
 ACGCTTCCCATTCATTACGGAACCGCTTCTGGTATTGCAAGAACCGTACTTATTTCB
 CCACCATGATTATGACCAAGTGTTCAGCTCCGTTGAGTTGTCAGTGAATATGACAGT
 TAAATTTAATGTCACCGTTTTATCGCAATCTGCCBACCACTCGGATTCGAATGACTTC
 GTGATAAAGGATGAGTGTGAGGTTAATACCGCAAGCGGTA AAAATTTTAAATTTTGGC
 GCTGAGGGTTGACCAAGCGAAGCGCGGTAGTTTTCTGCTTAGGAGTTAATCATGTTTT
 CAGACTTTTATTCTCGCCATAATCAAACTTTTTTCTGATAAGCTGGTCTCACTCTT
 GTTACTCCAGCTTCTTCGGCACCTGTTTTACAGACACCTAAAGCTACATCTCAACGTTA
 TATTTGATAGTTGACGGTAAATGCTGGTAAATGGTGGTTTTCTTCAATGATTCAGAT
 GATACATCTGCAACCGCTTAATCAGTGTGTTCTGTTGGTGTGATATTGCTTTGAT
 CCGGACCTAAATTTTTGCTGTTTTGGTTCGCTTGGAGTCTTCTCGGTTCCGACTACC
 CTCGCGACTGCTTATGATGTTTATCCTTGAATGGTCCCATGATGGTGGTTATTAACC
 GTCAGGACTGTGTGACTATTGACGCTCTTCCCGTACGCCGGCAATAACGTTTTATGT
 GGTTCATGTTTGGTCTAACTTACCCTACTAAATGCCCGGGATTGGTTTCCGCTGAAT
 CAGGTTATAAGAGATATTATTGCTCCAGCCACTTAAGTGAAGGTTAATTTGTTGGTG
 CTATTGCTGGCGGTTATGCTTCTGCTTCTGCTGGTGGCGCCATGCTAAATGTTTGGAG
 GCGGTCAAAAAGCCGCTCCGGTGGCATTCAAGGTGATGTGCTTGTACCGATAACAATA
 CTGTAGGCATGGGTGATGCTGGTATTAAATCTGCCATTCAAGGCTCTAATGTTCCTAAC
 CTGATGAGGCCCGCCCTAGTTTTGTTTTGTTGCTGCTATGGCTAAAGCTGGTAAGGACTT
 TGAAGTACGTTGCAAGCTGGCACTTCTGCCGTTCTGATAAGTTGCTGATTTGGTTG
 SACTTGTGGCAAGCTCTCCGCTGATAAAGGAAAGGATACTCGTATATCTTCTGCTG
 CATTTCTGAGCTTAAATGCTTGGGAGCGTCTGGTCTGATGCTTCTCTGCTGATATGG
 TTGACGCGGATTTGAGAATCAAAAAGAGCTTACTAAATGCAACTGGCAATCAGAAAG
 AGATTTGCCAGATGCAAAAATGAGACTCAAAAAGAGATTGCTGGCATTCAAGTCCGCGACT
 CACGCCAGATACGAAAGACCGGATATGACAAAAATGAGATGCTTGGCTATCAACAGCA
 AGGAGTCTACTGCTCGCGTTCGCTCTATTATGAAAAACCAATCTTCCAAGCAACAG
 AGGTTTCCGAGATTATGCGCCAAATGCTTACTCAAGCTCAAAAGCGGTGGTCAAGTATTA
 CCAATGACCAAAATCAAGAAATGACTCGCAAGGTTAGTGTGAGGTTGACTTATGTTATC
 AGCAACGCAAGATCAGCGGATGGCTCTTCTCATATTGGCGCTACTGCAAAAGGATAT
 CTAATGCTGTCAC1GATGCTGCTTCTGGTGGTATTTTTCATGGATTTGATAAAG
 CTGTTGCCGATACTTGAACAATTTCTGGAAGACGGTAAGCTGATGGTATTGGCTCTA
 ATTTGCTAGGAATAACCGTCAGGATTGACACCCCTCCCAATGATGTTTTCAATGCTC
 CAAATCTTGGAGGCTTTTTATGTTTCTGTTCTTATACCCTTCTGAATGCTCAGCTGAT
 ATTTTACTTTGAGCGTATCGAGGCTCTTAAACCTGCTATTGAGGCTTGTGGCATTCTCA
 CTCTTCTCAATCCCAATGCTTGGCTTCCATAAGCAGATGGATAACCGCATCAAGCTCT
 TGAAGAGATTTCTGCTTTTCTGATGACGCGGCTTGGATTGATAATGGTGTATGATG
 TTAGCGCCATAAGGCTGCTTCTGACGTTCTGATGAGTTGATCTGTTACTGAGAAAT
 TAATGGATGAATGCGCATACTGCAATGCTGCCCAACTTGAATTAATACACTA
 TAGACACCCGCCCCGAAAGGGACGAAAATGGTTTTAGAGAACGAGAGCGGTTACGC
 AGTTTTGCCCAAGCTGGCTGCTGAACCCCTCTTAAGGATATTCGCGATGAGTATAAT
 ACCCAAAAAGAAAGTATTAAAGATGAGTGTCAAGATTGCTGGAGGCCCTCCACTATGA
 AATCGCTAGAGGCTTTSCTATTGACGCTTTGATGATGCAATGCGACAGGCTCATGCT
 ATGGTTGGTTTTATCGTTTTTGCACCTCTCAGGTTGGCTGACGACCGATTGAGGGGTTTT
 ATGATAATCCCAATGCTTTGCGTGACTATTTTCTGATATTGGTCTGATGTTTTGCTG
 CCGAGGGTCCCAAGSCTAATGATCAGACGCGGACTGCTATCAGTATTTTGGTGGCTG
 AGTATGGTACAGCTAATGGCCGCTTCTATTTCATGCGGTTGCACTTTATGCGGACACTT
 CTACAGGTACGCTTGAACCTAATTTTGGTCTGCGGTACGCAATCGCCGCGAGTTAAATA
 GCTTGCAAAATACGCTGGCCTTATGGTTACAGTATGCCCATCGAGTTCTACACGCGAG
 ACGCTTTTTACGTTCTGGTTGGTTGGTGGCTGTTGATGCTAAATGTTGAGCCGCTTAAAG
 CTACAGGTTATAGGCTGTTGGTTTTCTATGTCGCTAAATACGTTAAACAAGACTG
 TGGACCTTGTGCTAAAGGCTAGGAGCTAAAGAAATGGAACAACCTCACTAAAAACCAAG
 TGTGCTACTTCCCAAGAGGCTGTTCAAGAAATCAGAAATGAGCCGCAACTTCGGGATGA
 TGGTCAAAATGACAAATCTGTCACGCGAGTGTCTAAATCAACTTACCAAGCTGGGTACG
 ACAGCGACCGGTTCAACAGATATGAAAGCAGAACGCAAAAAGAGAGATGAGATTGAGCG
 TGGAAAAGTTACTGTAGCCGACGTTTTGGCGGCGAACCTGTGACGCAAAATCTGCTCA
 AATTTATGCCGCTCGATAAAAATGATTGGCGTATCCAACCTGCA

图 3-8 简单的细菌病毒 ϕ X174 的全部遗传信息包含在一条 DNA 链中, 图示这条链的核苷酸序列(应该从左到右, 一行一行地连续往下读, 就像读普通的教科书那样)。

板的亲代 DNA 螺旋完全相同。因为每一条原始的链在过程之末以成为不同的子分子而告终,所以我们说 DNA 复制机制是“半保留的”(图 3-11)。

DNA 复制中的差错造成突变³

DNA 复制给人印象最深刻的特点是它的准确性,这种准确性是由形成一台“复制机”的蛋白质的复合体所提供的。这台机器起三方面的作用:(1)它依靠与模板链进行碱基配对而选择正确的核苷酸;(2)它通过催化共价键的形成把每一个新的核苷酸连接在正在生长链的末端;(3)它提供了校正机制,消除取位不当的核苷酸。复制机的精确度是很高的,在一个 DNA 分子中,碱基序列的复制,在加入的 10^9 个核苷酸中,所发生的差错不到一次。

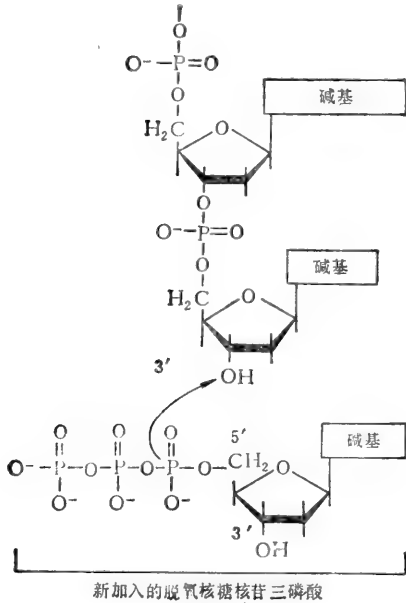


图3-9 脱氧核糖核苷酸加在 DNA 链3'末端是合成新 DNA 的基本反应

然而,复制机极少漏掉或多加几个碱基,或者在原来应该放 C 的地方放了 T,或以 A 代替 G。DNA 序列中的任何这类差错构成了遗传错误,称为突变。这种差错所造成的结果有两个。首先,错误会在全部未来的世代中复制出来,因为“坏的”DNA 序列同好的 DNA 序列一样都被忠实地复制。其次,错误可按

突变在细胞中发生的部位而对细胞产生重大的影响。

40 年代初,遗传学家已经确凿地证明,称为基因的遗传单位规定了一个个蛋白质的结构。所以,基因的 DNA 序列的变化所引起的突变有可能使一个关键性的蛋白质失活,从而导致细胞死亡。在这种情况下,变化了的 DNA 序列就丧失了。另一方面,突变可以发生在非基本区域而不起作用,这称为同义突变。碱基配对的错误在极罕见情况下会导致基因的改善。它可改变蛋白质,使其变成“更好的”酶,或提供更有利的结构。在这些罕见的情况中,带有突变的生物体将有优势,因而在大多数群体中突变基因最终可通过自然选择而替代原来的基因。

基因的核苷酸顺序确定蛋白质的氨基酸顺序⁴

DNA 所包含的信息并不立即影响细胞。只有当它用来指导蛋白质的合成时,它才能确定细胞的化学特性和物理特性。

大约就在生物物理学家用 X 射线衍射法分析 DNA 的三维结构的同时,生物化学家正在深入研究蛋白质的化学结构。当时已知蛋白质是通过相继的肽键连接在一起的氨基酸链,但是还没有肯定各种类型的蛋白质包含着独特的氨基酸顺序。只有到了 50 年代初,才发现了这一点,这时测出了小型蛋白质胰岛素的序列,并证明它含有一连串的定位

苷酸序列组成，但有两个小小的化学差异：(1) RNA 的糖-磷酸主链包含核糖，而不是脱氧核糖；(2) 碱基胸腺嘧啶 (T) 被非常近似的碱基尿嘧啶 (U) 所替代 (见图3-6)。

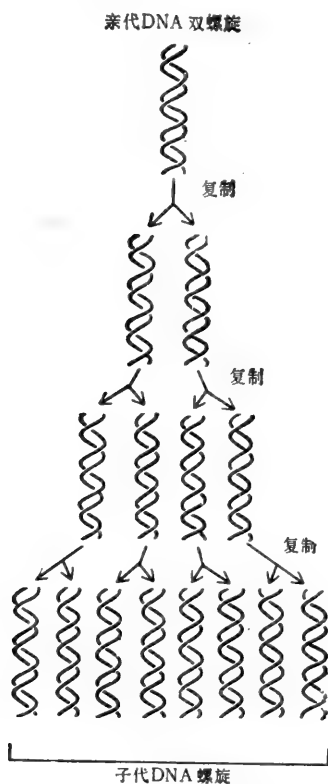


图3-11 DNA 的半保留复制。在每轮复制中，DNA 两条链各用作为模板，形成新合成的互补DNA链。所以一条条链通过许多细胞世代仍保持它们的完整性。

RNA 既保持拷贝它的 DNA 序列的所有信息，也保持 DNA 的碱基配对的特性——因为 U 与 A 配对的方式和 T 与 A 配对的方式相同 (图3-6)。RNA 分子通过称为 DNA 转录的过程合成，DNA 转录在很多方面类似于 DNA 复制。DNA 的两条链之一充当模板，检验每一个新来的核糖核苷酸的配对能力。当一个核糖核苷酸达到与 DNA 模板良好的匹配时，它便作为一个共价连接单位而整合入延伸的 RNA 链。

DNA 转录有几个重要方面不同于 DNA 复制。一个方面是，一条链退火成 DNA 时，RNA 产物并不保留。一旦完成 RNA 复制，原始的 DNA 螺旋重新形成，并释放出 RNA 分子。因而 RNA 分子是单链的。此外，RNA 与 DNA 相比较短，因为它们是从 DNA 的有限区域拷贝出来的——这足以制造一个或几个蛋白质。从 DNA 特定区域制造的 RNA 的量可以控制，一些基因可用来制造大量的 RNA，而另一些基因却一点也不转录。大致上说来，基因表达之所以能控制，那是因为存在着基因

调节蛋白，这些蛋白质确定 DNA 的哪几段被复制。

在每一细胞世代，同一 DNA 片段可制造出几千个 RNA 转录本。在真核细胞内，有许多这种 RNA 分子在离开细胞核到细胞质内充当指导蛋白质合成的信使 RNA (即 mRNA) 之前，发生了大量的化学变化。因为每一个 mRNA 分子能转译出好几千个多肽链拷贝，所以 DNA 的一个小区域内所包含的信息可指导大量特定的蛋白质的合成。以丝心蛋白为例，它是丝的主要组分，在每一个丝腺细胞内，单个丝心蛋白基因可制造出 mRNA 10^4 个拷贝，每个 mRNA 指导 10^3 个丝心蛋白分子的合成，在为期 4 天的周期内，每一个细胞总共可生产出 10^9 个丝心蛋白分子。

mRNA 中的核苷酸序列被三个一组地“解读”和转译成氨基酸⁸

60 年代初破译了所谓的遗传密码，即基因的多核苷酸序列转译成蛋白质的氨基酸序列的规则。充当中间体的 mRNA 分子中的核苷酸序列被证明是三个一组地挨着次序解读的。核苷酸的每一个三联体称为密码子，可以确定一个氨基酸，原则上每一个 RNA 序列都能按三种不同移码译读中的任何一种来转译，究竟按哪一种读码法来转译，取决于

分子上移码译读过程开始的确切位置(图3-13)。总之,在这些移码译读中,只有一种会产生有功能的蛋白质。因为除了 RNA 信使的起始和结束处外没有标点符号,所以移码译读决定在转译过程的起始,并在此后保持下去。

因为 RNA 是 4 种不同核苷酸的线性多聚体,所以有 $4^3 = 64$ 个可能的密码子三联体(请记住,三联体中的核苷酸顺序很重要)。通常在蛋白质内只发现 20 种不同的氨基酸,所以,大多数氨基酸必定由几个密码子确定;也就是说,遗传密码是简并的。密码示于图3-14,它是很保守的,细菌、植物和人类等各种生物密码都相同。

tRNA 使氨基酸与核苷酸组匹配

mRNA 密码子不能用酶识别底物的方法直接识别它们所确定的氨基酸。转译使用既识别氨基酸又识别核苷酸碱基组的“连接物”分子。这些连接物由一套小 RNA 分子组成,称为转移 RNA (或 tRNA),每个 tRNA 长度只有 70 至 90 个核苷酸。

每个 tRNA 分子都有一个折叠的三维构象,这种三维构象由那种把 DNA 螺旋的两条链结合在一起的非共价相互作用所保持。正如前面指出的那样, DNA 螺旋是由许多互补碱基对的结合力所形成的。在 tRNA 那样的多核苷酸单链中,有同样类型的碱基配对相互作用发生在同一条链上的一些核苷酸残基之间。这就使 tRNA 分子以独特的方式折叠起来,折叠方式对连接体行使功能来说是重要的。tRNA 分子的 4 个短的片段含有像图 3-7 中那样的双螺旋结构。但是特别重要的是在分子的两端各有三个不配对的核苷酸残基:一端的顺序可变的三联体形成反密码子,能与 mRNA 分子中一个互补的三联体碱基配对,而分子的游离 3' 端的三联体 (CCA 顺序) 则能以共价方式与特定的氨基酸相连(图3-15)。

其他类型的 RNA 分子,包括形成核糖体结构核心的核糖体 RNA (rRNA) 分子和 mRNA (见下文),虽然它们比 tRNA 大得多,且不是折叠得那么紧,但有实验证据表明,它们也含有具有

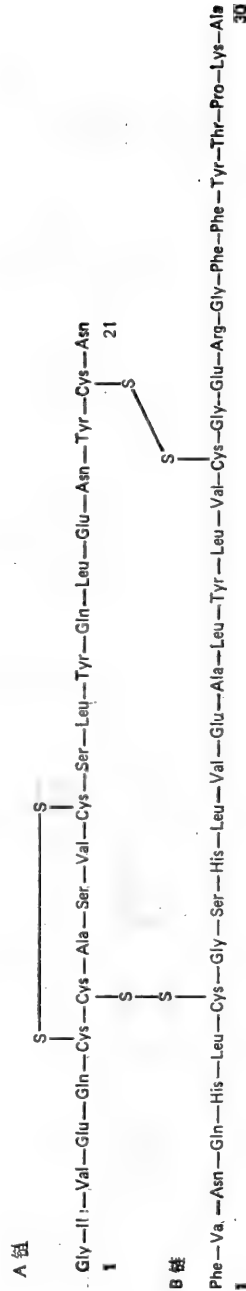


图 3-12 牛胰岛素的氨基酸序列。胰岛素由两条多肽链组成,每条链有专一的由遗传决定的氨基酸序列。用来规定氨基酸的三字母符号列于组合图 G;图中的 -S-S- 键是半胱氨酸残基之间的二硫键。

独特的三维构象的区域。

核糖体从一端至另一端读出 RNA 信息¹⁰

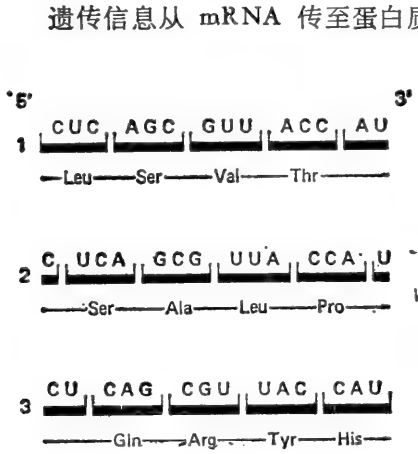


图 3-13 蛋白质合成中三种可能的移码译读。RNA 中的核苷酸序列三个一组地顺序从 5' 端读至 3' 端，从而转译成氨基酸。所以同一个 RNA 序列可依赖于“移码译读”而确定 3 种完全不同的氨基酸序列。

遗传信息从 mRNA 传至蛋白质的密码子识别过程依赖于那种把遗传信息从 DNA 传至 DNA 以及从 DNA 传至 RNA 的相同的碱基对的相互作用(图 3-16)。但是,使 tRNA 分子在 mRNA 上排列成序的机制是复杂的,这需要有核糖体,核糖体是由约一百种不同的蛋白质与几个结构 RNA 分子(rRNA)结合而成的复合体。每一个核糖体仿佛是一台大的生化机,tRNA 分子在生化机上自行就位,以致读出编码在 mRNA 中的遗传信息。核糖体首先结合在 mRNA 分子的特定部位上,确定一种移码译读,并确定蛋白质的氨基末端。然后,当核糖体沿着 mRNA 分子移动时,每移动一次翻译一个密码子,利用 tRNA 分子把氨基酸加至延伸的多肽链末端(图 3-17)。当核糖体到达信使的端部后,它与新制造的蛋白质羧基末端一起从 mRNA 分子的 3' 端释放进细胞质。核糖体结构的详情和蛋白质合成的机制在第五章讨论。

的机制在第五章讨论。

核糖体操作效率很高: 一个细菌核糖体可在一秒钟内把 20 个氨基酸加在伸延的多

第一位 (5' 端)	第二位				第三位 (3' 端)
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr 终止 终止	Cys Cys 终止 Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

图 3-14 遗传密码。RNA 中的三核苷酸组(密码子)在蛋白质合成过程中按所示的规则转译成氨基酸。例如,密码子 GUG 和 GAG 分别转译成缬氨酸和谷氨酸。请注意,第二个核苷酸为 U 或 C 的那些密码子有可能确定较疏水的氨基酸(与组合图 G 比较)。

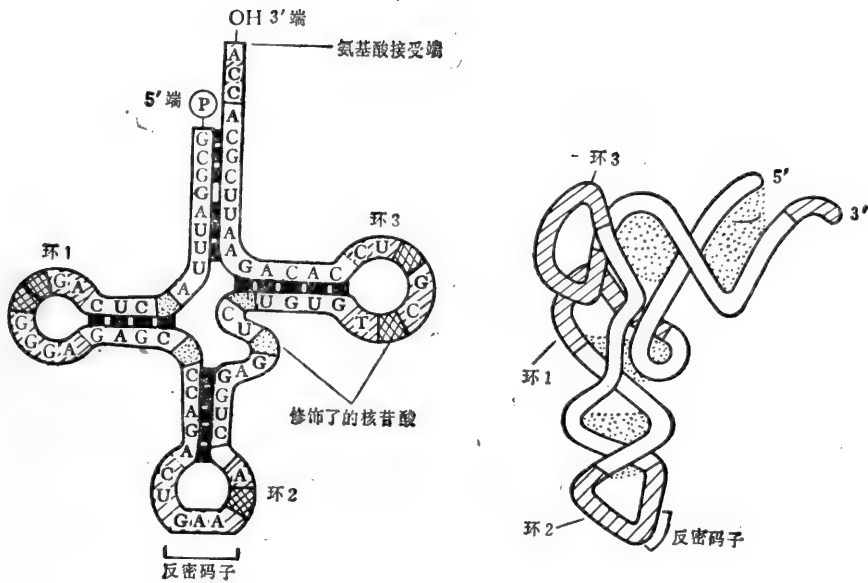


图 3-15 酵母的苯丙氨酸 tRNA。左图中，核苷酸的排列显示了形成 tRNA 分子中的内螺旋区域的碱基配对。右面是根据 X 射线衍射分析绘制的分子实际形状的示意图。密点区表示碱基对把两条链保持在一起的地方。

肽链上；人体一秒钟内制造约 5×10^{11} 个血红蛋白拷贝，血红蛋白含有由 574 个氨基酸组成的特异序列。

小结

DNA 中的线性核苷酸序列携带着遗传信息。每一个 DNA 分子含有两条互补的核苷酸链，它们通过 G—C 和 A—T 碱基对的氢键而相互匹配。DNA 复制是复制遗传信息，它是通过一条新的互补链聚合于每一条老链上而实现的。

遗传信息的表达涉及 DNA 中的线性核苷酸序列转译成为蛋白质中共线性氨基酸序列。DNA 的一个有限的片段先拷贝成 mRNA 的互补链，然后通过称为核糖体的大型复合物的催化反应把后者转译成为蛋白质。用于蛋白质合成的氨基酸与一族小的 tRNA 分子相连，每个 tRNA 通过互补的碱基配对相互作用识别 mRNA 中的三个一组的核苷酸。mRNA 中的核苷酸序列按照通用的遗传密码三个一组地从一端读到另一端。

蛋白质结构¹¹

蛋白质构成细胞的大部分，占细胞干重的一半以上(表 3-1)。蛋白质确定细胞的形状和结构，也充当分子识别和催化的工具。虽然 DNA 确实贮存制造细胞所需的信息，但这属于“学术”方式，DNA 本身几乎不直接影响细胞过程。例如，血红蛋白基因不能运载氧；而这却是它所确定的蛋白质的特性。用计算机术语来说，核酸代表“软件”——细胞从其亲代接受的指令。蛋白质构成“硬件”——执行寄存在存储器内的程序的物理仪

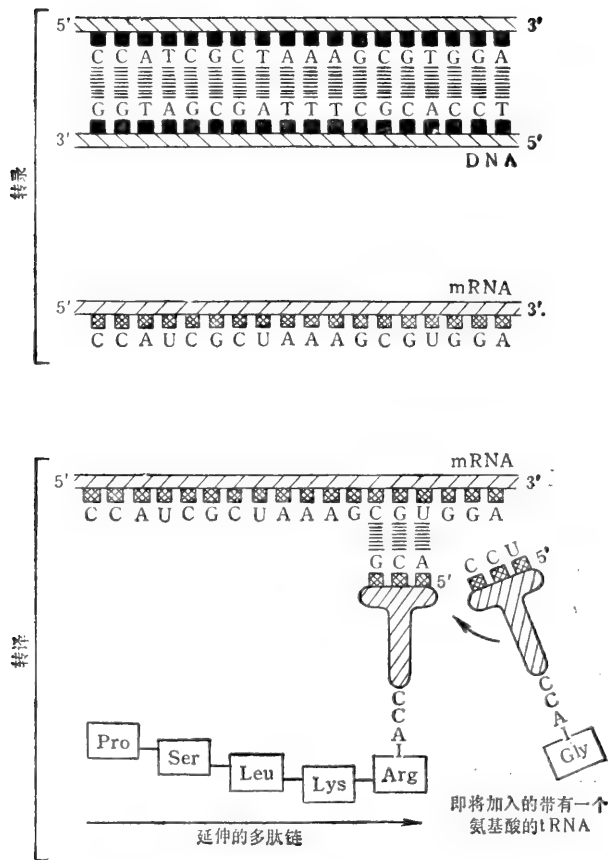


图 3-16 蛋白质合成中的信息流。信使 RNA 中的核苷酸形成 DNA 一条链的一个片段的互补拷贝。然后它们每次三个与特定 tRNA 分子反密码子区域中的三核苷酸的互补组匹配。在 tRNA 分子另一端,一个氨基酸保持在高能键上,当发生匹配时,这一个氨基酸便加至延伸的蛋白质链末端。mRNA 核苷酸序列转译成氨基酸序列依赖于 mRNA 的密码子和适合的 tRNA 相应的反密码子之间互补碱基配对。所以,转译过程中信息转运的分子基础与 DNA 复制和转录中的分子基础极为相似。

器。

核酸和蛋白质的这些不同的功能反映在构成它们的亚基的化学性质之中。DNA 和 RNA 由一系列核苷酸组成,所有的核苷酸在化学上彼此都十分相似,它们装配成大分子,不管它们的排列顺序有何不同,都具有十分相似的化学性质。相反,蛋白质由 20 种具有不同的化学性质的差别很大的氨基酸所组成(见组合图 G)。这种多样性使不同的蛋白质具有各种各样的化学特性。

氨基酸序列确定蛋白质分子的形状¹³

在长长的多肽链中的许多键允许它们所连接的原子自由旋转,从而使蛋白质的主链十分柔顺。因此,任何蛋白质分子原则上可呈现许许多多各不相同的形状或构象。然而,在生物学条件下,大多数多肽链只折叠成一种构象。这是因为不同氨基酸侧链相互之间,以及与水之间形成各种弱的非共价键(见组合图 I)。多肽链上可产生一种巨大的力,而赋

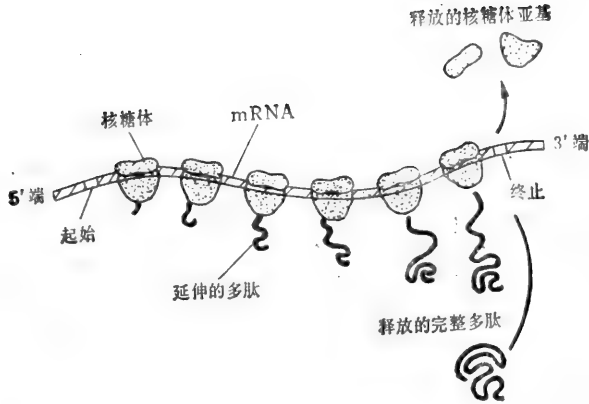


图 3-17 蛋白质在核糖体上合成的示意图。核糖体先与 mRNA 分子 5' 端附近的起始信号相连，然后向 3' 端方向移动，当它们向前移动时便合成蛋白质。一个 mRNA 往往同时有若干个核糖体在它上面移动；整个集合称为多核糖体。

予蛋白质的特定构象以异常的稳定，这种力的产生取决于存在哪些侧链以及这些侧链在主链上的位置。

大多数蛋白质均可自发地折叠成准确的形状。例如，可以使蛋白质展开，即使其变性，从而产生失去原来的构象的柔顺的多肽链。然而，如果变性处理很温和，它通常可逆转，展开的多肽链可自发地重新折叠成它们的原来的构象。这种行为证实，所有的确定构象的信息必定包含在氨基酸序列本身。

控制多肽折叠的最重要因素之一是多肽的极性和非极性侧链的分布。当蛋白质正在合成时，它们许多疏水的侧链有可能被推挤在分子内部，使它们避免与水环境接触（正像油滴机械地在水面上散开后的聚结那样）。同时，所有的极性侧链有可能使它们自己排列在蛋白质分子外侧附近，它们在那里可与水以及其他极性基团相互作用（图 3-18）。因为肽键本身极性很强，它们有可能通过彼此之间的相互作用，以及与极性侧链之间的相互作用而形成氢键（图 3-19）；几乎所有的埋在蛋白质内的极性残基都以这样的方式配对。因此，氢键不仅对于折叠的蛋白质分子中多肽链的不同区域约束在一起起着主要的作用，而且对于蛋白质表面观察到的许多结合性相互作用都是极其重要的。

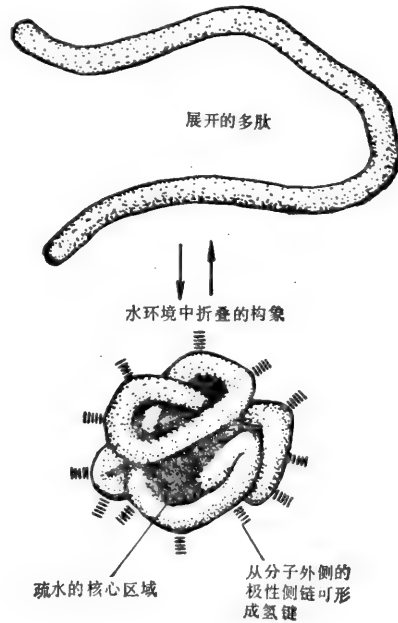


图 3-18 蛋白质折叠成球状构象的示意图。极性氨基酸侧链有可能暴露在蛋白质外侧；非极性氨基酸侧链埋在内部，形成避水的疏水核心。

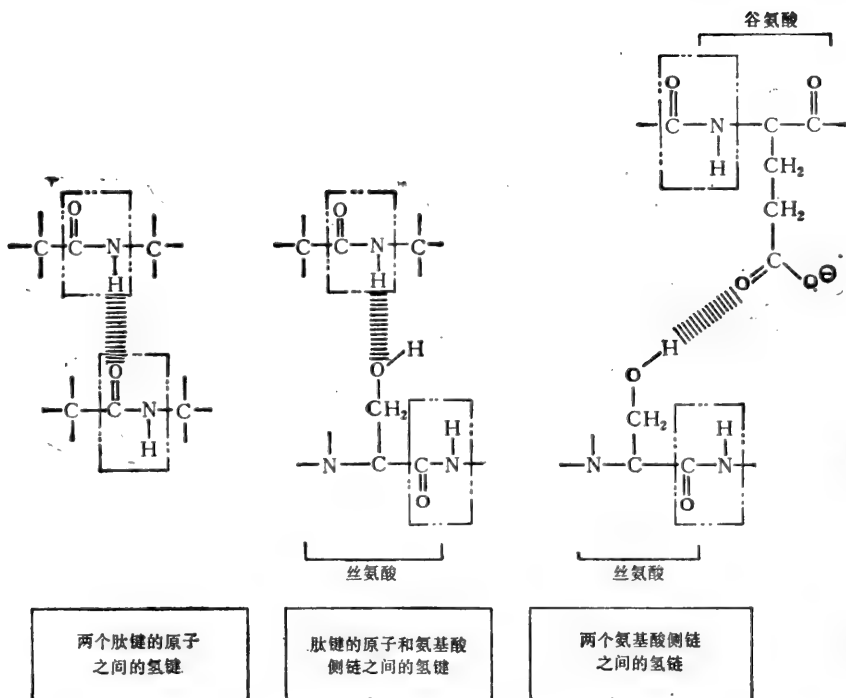


图 3-19 蛋白质的氨基酸之间形成的一些氢键(用短线表示)。

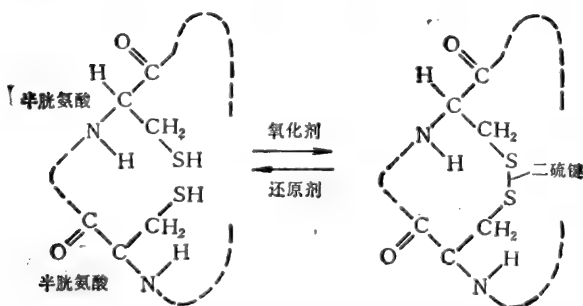


图 3-20 蛋白质中相邻半胱氨酸侧链之间形成共价的二硫键

一旦分泌的或细胞表面的蛋白质处在细胞质之外，它们就常常形成额外的共价链内键。例如，在折叠的多肽链内相邻的半胱氨酸—SH 基团之间可形成二硫键(也称 S—S 桥)(图 3-20)，使胞外蛋白质的三维结构保持稳定，虽然分子的特定折叠并不需要这种键。留在细胞液中的蛋白质分子极少形成这样的 S—S 桥，因为细胞内—SH 还原剂谷胱甘肽的浓度很高，使大多数这样的键断裂。

所有的一个个的氨基酸相互作用的最终结果是使大多数蛋白质分子自发地折叠成独特的构象，通常折叠得很紧，呈球状，但有时也呈细长纤维状。其内核由丛集的疏水侧链组成，像晶体那样紧密地排列在一起，而极性较强的侧链则形成非常复杂的和不规则的

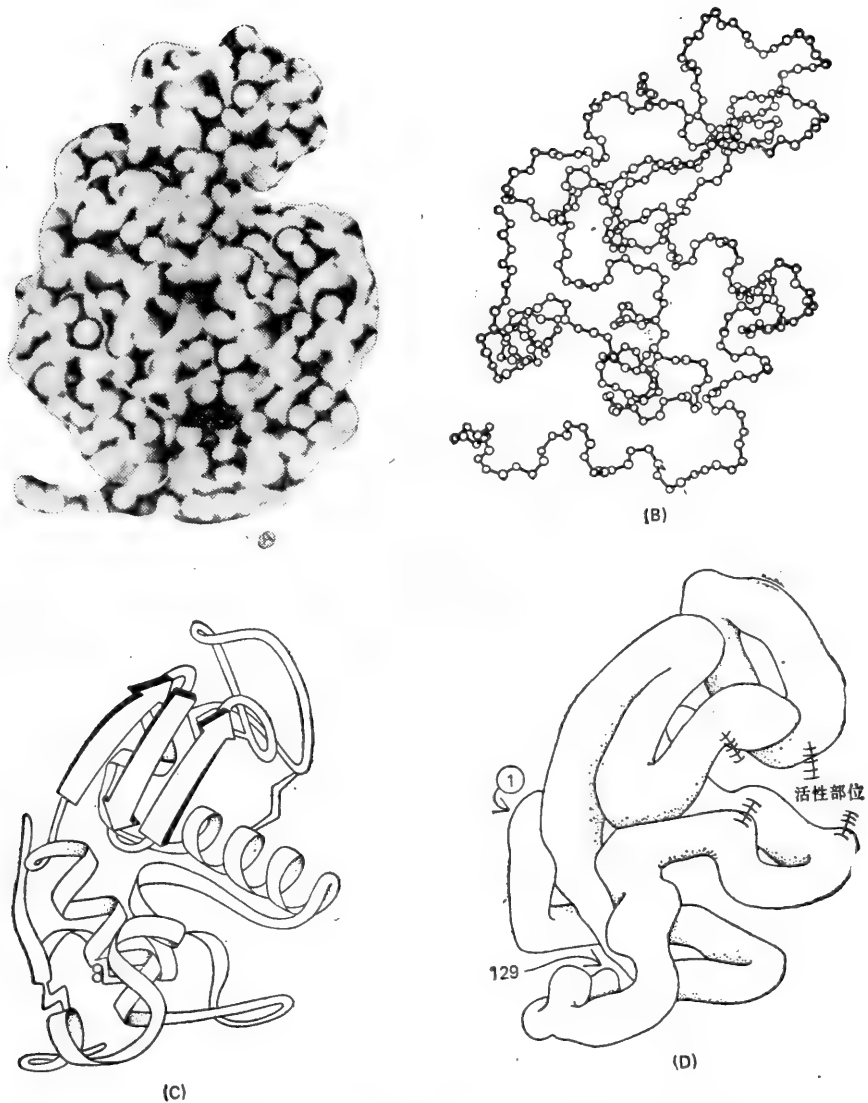


图 3-21 卵清溶菌酶三维构象的 4 种常用的模型。(A)空间结构模型,显示所有原子的半径。(B)主链金属丝模型,由沿着多肽主链相邻原子的连线组成。(C)“带状模型”,显示所有的有规则氢键相互作用区,表现为螺旋(α 螺旋)或一组组箭头(β 片层)。(D)“香肠模型”,显示多肽链的行径,但略去了所有的细节。应该指出,所有的球蛋白核心都是紧密地排列着原子的。因此,由模型 B、C 和 D 产生的结构空缺的印象是不正确的。(A 和 B, Richard J. Feldmann 赠; C, Jane Richardson 赠)

外表面。在这错综复杂表面上,不同原子的取位和化学性质使得每一个蛋白质与其它大分子表面和小分子的结合都是专一的(见下文)。从化学观点看来,蛋白质是已知的最复杂的分子。

在不同的蛋白质链中反复出现共同的折叠型式¹³

虽然蛋白质链的折叠所需要的全部信息都包含在其氨基酸序列内,但是我们至今尚

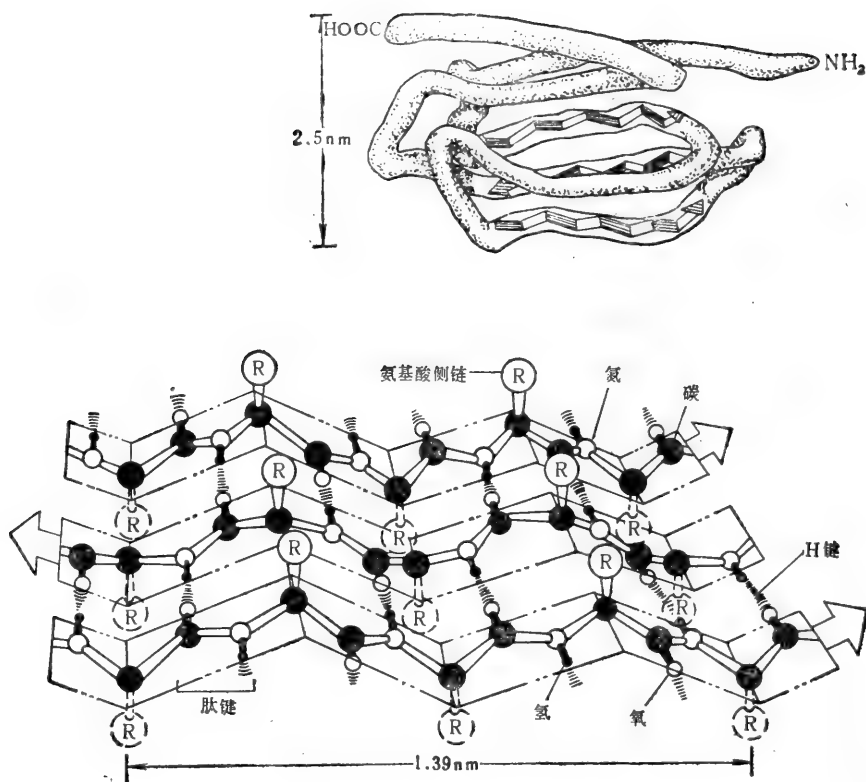


图 3-22 β 片层是球蛋白的一部分形成的共同的结构。上图示免疫球蛋白分子的一个由 115 个氨基酸组成的区，方框内标出一个片层结构区。下图详尽地显示了完整的反向平行的 β 片层。请注意，每个肽键都通过氢键与相邻的肽键结合。球蛋白的实际片层结构通常没有图示的 β 片层那么有规则，许多片层稍扭曲。

未搞清楚如何“解读”这种信息，以期预测已知序列的蛋白质的详细的三维结构。因此，只得通过对蛋白质晶体所作的精细的 X 射线衍射分析，才能确定折叠的构象。迄今为止，用这项技术已完整地分析了 200 多种蛋白质。每一种蛋白质都有特异的构象，它们很不规则，要用整整一章的篇幅才能充分描述三维构型的细节。

蛋白质的完整结构可用空间结构模型或金属丝型模型表示。图 3-21 A 和 B 就是用这些模型显示和解释溶菌酶结构的。但鉴于这两种模型中所见的大量细节往往使多肽主链的途径看不清楚，所以蛋白质构象最好用图 3-21C 和 D 这两种比较示意的模型来表示。图中所有的侧链和实际的原子都略而不绘，以便容易追踪主链的主径。

当比较不同蛋白质分子的三维结构时，可以明显看出，虽然每种蛋白质的总的构象是独特的，但是在这些大分子部分结构中，几种折叠型式会重复地出现。有两种型式特别普遍，因为它们是肽键本身之间有规则的氢键形成相互作用的结果，而与侧链相互作用的独特型式无关。这两种型式都是 1951 年根据丝和发的不同的 X 射线衍射图，从模型构造研究正确地预测出来的。这两种已发现的有规则的折叠型式现在称为 β 片层和 α 螺旋：前者见于丝中的丝心蛋白，后者见于皮肤及其附物例如毛发、指甲和羽毛中的 α 角蛋白。

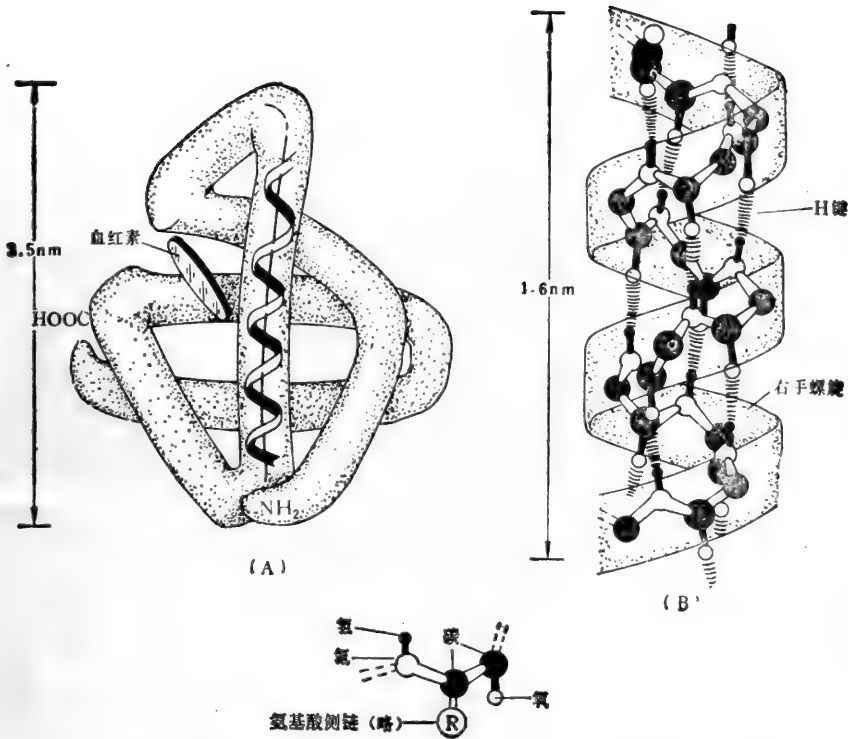


图 3-23 α 螺旋与 β 片层一样,通常由球蛋白的一部分形成。(A)显示载氧分子肌红蛋白(153个氨基酸长),黑色勾出一个 α 螺旋区的轮廓。(B)示一个完整的 α 螺旋的细节。像 β 片层那样,每一个肽键都通过氢键与相邻肽键相连。为了清楚起见,每一个氨基酸的侧链都略而不绘(见下图);这些侧链沿螺旋外侧径向突出。

β 片层结构构成了大多数(虽然不是全部)球蛋白核心的大部分区域。图 3-22 举例显示了抗体分子的一部分,在这个例子中,当伸展的多肽链自身来来回回地折叠时,便形成反向平行的 β 片层,同时链的各段走向都与其相邻段的走向相反。这就形成了一种由相邻多肽链中肽键之间的氢键约束在一起的很牢固的结构,因而反向平行的 β 片层常常形成球蛋白结构的骨架。密切相关的平行的 β 片层常常在两侧覆加 α 螺旋,形成层状结构,这个单位也可用作骨架,围绕着这种骨架可以形成许多球蛋白。

一条多肽链可以有规则地自我盘绕,构成刚性的圆柱体。在这个圆柱体中,每一个肽键可通过氢键有规则地与链中其他肽键结合,从而产生 α 螺旋。很多球蛋白都包含由这些 α 螺旋组成的短区域(图 3-23),而 α 螺旋的长杆区则见于例如可增强皮肤及其附物强度的细胞内 α 角蛋白纤维。图 3-24 显示有和没有侧链的 α 螺旋和 β 片层的空间结构模型。

多种多样的蛋白质结构

由于氨基酸侧链的多样性,蛋白质所能形成的结构类型是很多的。一个极端的例子是见于细胞外空隙的胶原族分子。在胶原中,有三条独立的多肽链,每条链都富含脯氨酸,并且每隔两个残基出现甘氨酸。这些多肽链相互缠绕,产生有规则的三股螺旋。这些

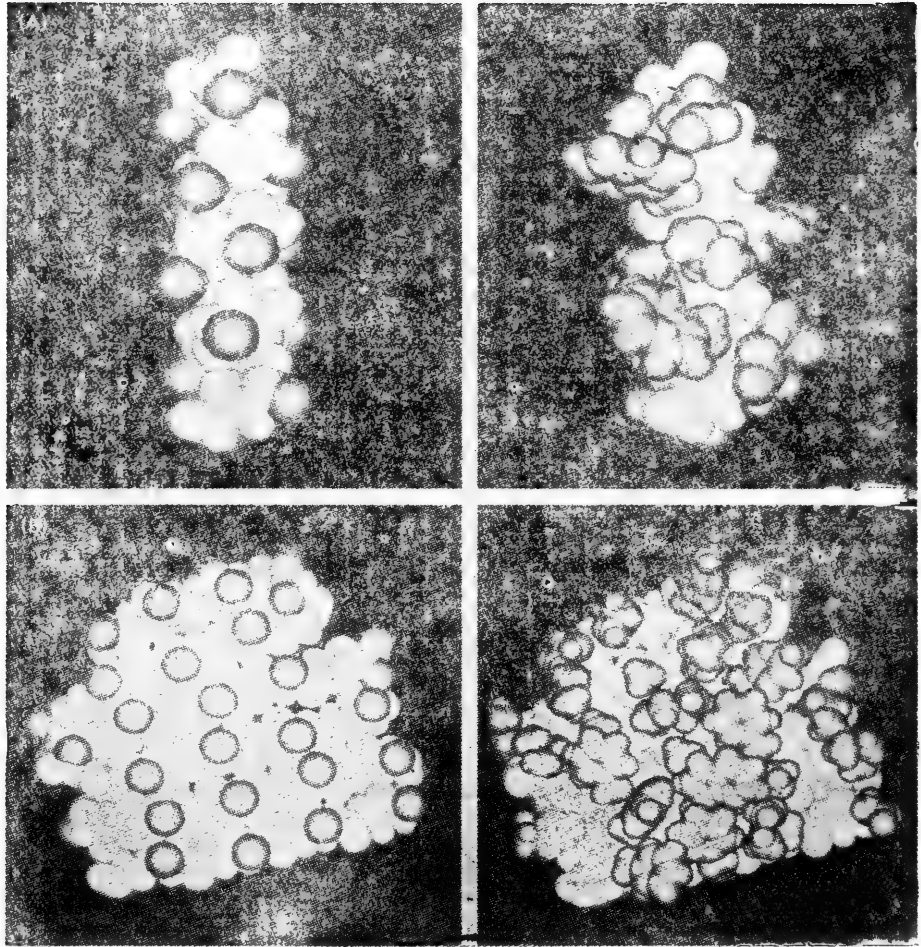


图 3-24 α 螺旋和 β 片层的空间结构模型，右图有氨基酸侧链，左图无氨基酸侧链。(A) α 螺旋(肌红蛋白结构的一部分)。(B) β 片层区(伴刀豆球蛋白 A 结构的一部分)。(Richard J. Feldmann 赠)

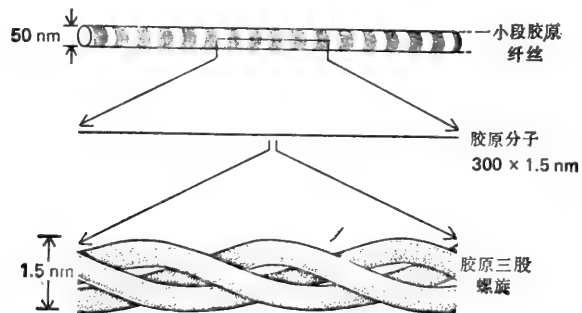


图 3-25 胶原是三条伸展的平行排列的蛋白质链形成的三股螺旋。许多杆状胶原分子交联在一起，形成坚韧的不能伸展的胶原原纤维和纤维。

胶原分子进一步有规则地排列在一起，产生腱那样的结缔组织。腱中相邻胶原分子通过相邻赖氨酸残基之间的共价交联而结合在一起，产生抗张强度很强的纤维(图 3-25)。

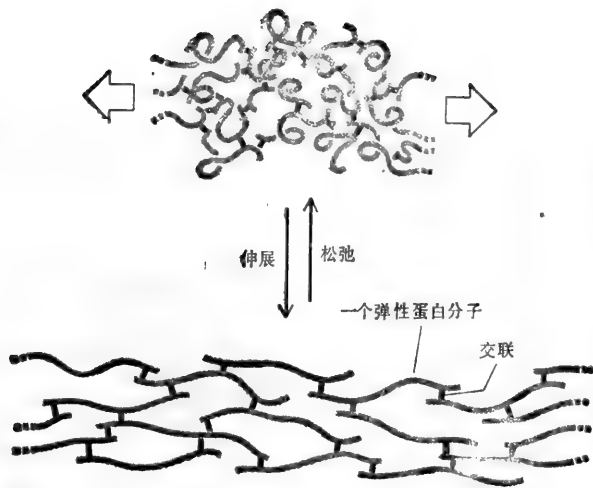


图 3-26 弹性蛋白由可塑性多肽组成，后者交联在一起，形成橡皮状的基质。当基质伸展时，每一个分子就解开螺旋形成伸展的构象。弹性蛋白和胶原蛋白由于氨基酸序列极不相同，所以它们的物理性质区别极为明显。

另一极端的例子是细胞外的弹性蛋白，弹性蛋白中相对不定型的多肽链共价地交联在一起，产生像橡皮那样的弹性物质。如图 3-26 所示，弹性蛋白之所以具有弹性是由于各个蛋白质分子一旦受到拉力就能可逆地把螺旋解开。弹性蛋白像胶原一样可分泌到细胞外空隙，在那里它使像动脉和肺这样的组织得以无损伤地变形和伸展(见第十二章)。

同样的基本化学结构即氨基酸链能够形成那么多不同的结构：高效的橡皮状物质(弹性蛋白)，坚如钢的丝索(胶原)，具有酶功能的球蛋白上各种各样的催化表面，确实令人惊奇。图 3-27 显示和比较了 300 个氨基酸长的多肽链在理论上所能呈现的各种不同的形状。我们已经强调指出，实际呈现的构象完全取决于氨基酸序列。

蛋白质呈现不同水平的结构组织

虽然即使是一个小蛋白质其折叠方式也是极多的，但发生折叠的方式看来有一定的逻辑性。在第一级折叠水平，邻近的一段段多肽链内氢键的相互作用产生 α 螺旋和 β 片层，它们构成了蛋白质的二级结构。此外， α 螺旋和 β 片层的一些组合本身特别稳定，并常存在于多种不同的蛋白质中。这些“结构铸件”常形成更高级水平结构的基础，这一级水平的结构称为蛋白质区。蛋白质区是当小的球蛋白单位，由一段多肽链组成，包含 150 个或数量更少的氨基酸。它们似乎是构成球蛋白的标准单位(见下文)。若干不同的蛋白质通常通过相对自由的一段段多肽链而连接在一起，形成球蛋白。最后，各个球蛋白本身常装配成较大的蛋白质聚合体。

因此，一个大型蛋白质结构可分成几个不同的结构水平，低水平依次构成高水平(图 3-28)。这些组构水平相当于阶梯，新合成的蛋白质沿着它逐级上升地折叠成为其天赋的结构。

许多可能的多肽链只有相当少数几个结构有效

因为 20 种氨基酸化学上各不相同，同时每一种氨基酸原则上可存在于蛋白质链的任

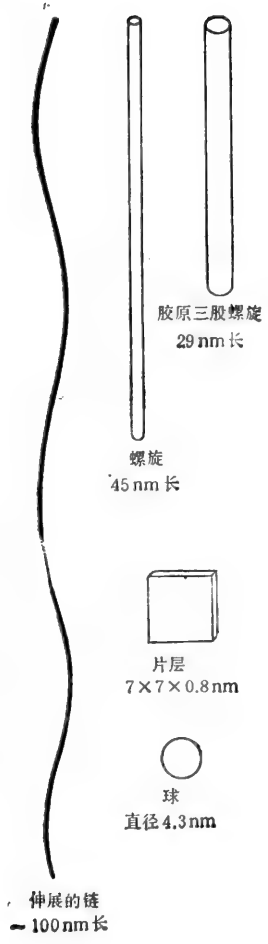


图 3-27 含有 300 个氨基酸的蛋白质分子所可能有的大小和形状。结构的形成由氨基酸序列确定。(引自 D.E.Metzler, *Biochemistry*. New York: Academic Press, 1977)

何位置,所以 4 个氨基酸长有 $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160\,000$ 种不同的可能的多肽链,即 n 个氨基酸长有 20^n 个不同可能的多肽链。对于约 300 个氨基酸长的典型的蛋白质,可给出 10^{390} 多种不同的蛋白质。

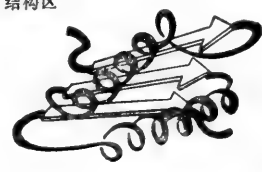
然而,我们知道,只有极少部分可能的蛋白质可形成有用的三维构象。绝大多数的蛋白质预期具有多种不同的构象,它们的能量大致相等,而各有不同的化学特性。因为这种

氨基酸顺序
—谷—天冬—缬—丝—赖—甘—脯—

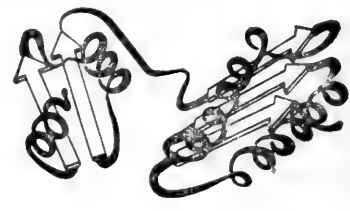
1. 二级结构



2. 结构区



3. 蛋白质



4. 蛋白质聚合

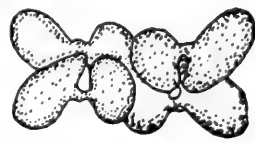


图 3-28 蛋白质结构水平。蛋白质的三维结构可用 4 种不同的折叠水平来描述,每一级水平由前一级水平构成,呈等级形式。按照交替命名法,氨基酸序列本身称为一级结构,第一级折叠水平称为二级结构,第二和第三级折叠水平的组合称为三级结构,第四级折叠水平称为蛋白质的四级结构。

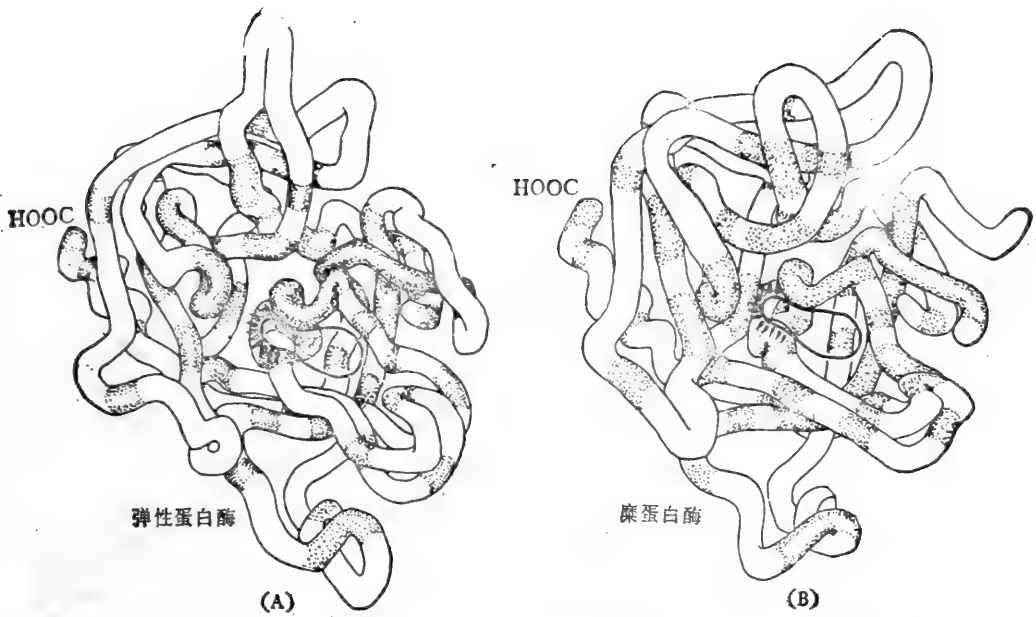


图 3-29 弹性蛋白酶(A)和糜蛋白酶(B)的三维构象的比较。在这两个进化相关的蛋白酶中,只有细点部分的多肽链残基的相应的氨基酸是相同的。但是,它们的构象是极相似的。图中圈出活性部位;这两个蛋白酶都含有一个活化的丝氨酸残基。(见图 3-46)

不稳定性是与维持细胞存活所需的高度有序有矛盾的,所以这样的蛋白质在进化过程中已被自然选择所淘汰。

现存的蛋白质由于具有独特的折叠性能而显示出令人惊奇的错综复杂的结构和化学特性。不仅是氨基酸顺序可使一种构象极其稳定,而且这种构象还具有准确的形状和化学特性,以完成细胞内的催化或结构功能。蛋白质的构成是很精确的,一个氨基酸中只要有少数几个原子发生改变就可以破坏其结构,造成巨大的影响。但是我们应该记住,它们是漫长的进化历程中的少数幸存者,大多数有比较随机的构象的蛋白质,不太有用,因而已被自然选择所淘汰。

新蛋白质常因老蛋白质的微小变化而进化¹⁴

细胞具有可使基因在进化过程中复制和修饰的遗传机制(见 455 页)。因此,一旦进化出具有独特的三维构象和有效的表面特性的蛋白质序列,它的基本结构便能整合入许多其他的蛋白质。在现存的生物体中,功能相近的不同蛋白质常有相似的氨基酸序列。人们相信,这些种类的蛋白质是从一个祖先基因进化而来的,这一基因在进化过程中复制产生其它的基因,突变逐渐积累在这些基因中,从而产生具有新功能的蛋白质。

众所周知的例子是一族蛋白质切割(蛋白水解)酶,称为丝氨酸蛋白酶。这一族酶包括消化酶例如糜蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶,以及许多其他的蛋白酶例如控制血液凝结过程的凝血酶。如果比较一下其中的任意两个酶,就可发现它们的氨基酸序列中约 40% 的位置被同样的氨基酸占据。根据 X 射线结晶学检测,它们的三维构象的相似性甚至更明显: 在这些几百个氨基酸长的多肽链中,扭曲和转折的细节大多数是相同的(图

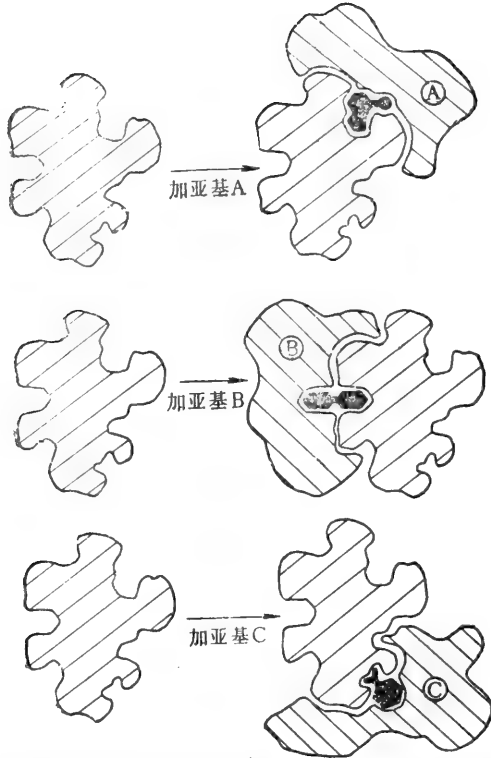


图 3-30 蛋白质区的组合。毗邻的分开蛋白质表面在进化过程中能产生称为配体的小分子的新结合部位的一般原理的示意图。



图 3-31 含有两个分开的折叠区的一个蛋白质的示意图。如图所示，配体的结合部位常处在这样的区之间。

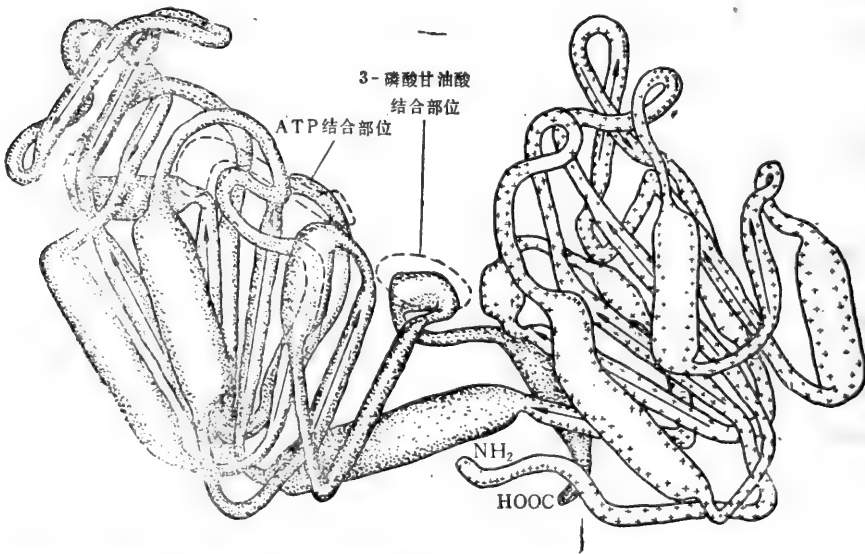


图 3-32 由两个区组成的蛋白质的结构。在这个香肠式模型中， α 螺旋区用粗的圆柱体表示，而 β 片层区则用箭头指示。图示的酶是磷酸甘油酸激酶(416个氨基酸长)，圈出两个底物可能的结合部位。当两个底物结合时，两个区相互靠拢。这样的移动形成活性部位。(引自 R. D. Banks et al., *Nature* 279: 773—777, 1979. 由 H. C. Watson 改绘)

3-29)。

但是,各种丝氨酸蛋白酶有十分不同的功能。氨基酸的某些变化使这些酶有不同的表现,这些变化很可能是在进化过程中选择出来的,因为它们导致底物专一性和调节特性的变化,使这些酶今天有不同的功能特性。另一些氨基酸的变化可能是“中性”的,它们之所以能保存下来,只因为它们并没有改变酶的基本结构和功能。因为突变是随机的过程,所以必然也存在有害的变化,它们改变了这些酶的三维结构,足以使它们的功能失效。具有这些变化的蛋白质已经消失,因为制造它们的个体想必因处于劣势而被自然选择淘汰。

因此,细胞含有整套的结构上相关的多肽链,它们一方面有共同的祖先,一方面又有不同的功能,这一点是完全不足为奇的。

新蛋白质常通过不同多肽区的组合而进化¹⁵

一旦细胞内已构成若干稳定的蛋白质表面,则通过它们之间的非共价相互作用把两个或几个单独的蛋白质连在一起,就可以产生不同结合特性的新表面。在图 3-30 所举的示意的例子中,一个蛋白质的不同部位与三个其他蛋白质结合,可以产生三个不同的结合位点。在细胞中,球蛋白的这种通过复合而形成较大的、有功能的蛋白聚合体是常见的;虽然典型的多肽链分子量为 40 000 至 50 000 (约 300 至 400 个氨基酸),并且几乎没有比这一大小大两倍以上多肽链,但许多蛋白质聚合体分子量却有一百多万。

另一个从现存链制造新蛋白质的有关而又不同的方法是把相应的 DNA 序列连接起来,从而导致形成一条较大的多肽链。新蛋白质的多肽链的不同部分可独立地折叠成不同的球蛋白区。根据这一事实可识别出用上述方法产生的蛋白质。很多蛋白质都具有这样的“多区”结构,同时从以上讨论过的进化方面来考虑,可以预见,与另一分子的重要的结合部位常常处在不同区的并列的地方(图 3-31)。图 3-32 显示了一个特定的多区蛋白质的结构。

细胞通过连接原存的氨基酸序列而把氨基酸序列聚集在一起的进化策略(图 3-30 和 3-31),显然要比通过随机的 DNA 突变而从头衍生新的蛋白质序列的方案有效得多。随机突变产生的大多数多肽肯定缺乏独特的构象,所以几乎没有什么用处。相反,已建立的蛋白质区或片段连接在一起至少可产生一个独特的表面的新组合。事实上,真核细胞的基因组构成的方法似乎有利于 DNA 序列通过偶然的重排而产生新的基因,新的基因编码蛋白质区的新的组合(见第八章)。

蛋白质亚基在细胞内能自我装配成大的结构¹⁶

在细胞内,能使几个蛋白质区联合成结合部位的原理在产生大得多的结构中同样也起作用。像酶复合体、核糖体、蛋白质丝、病毒和膜那样的超分子结构不是由一个巨大的共价连接的分子构成;相反,它们由预先形成的大分子亚基聚合体非共价地装配而成。

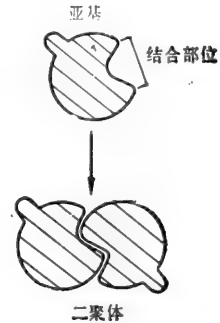


图3-33 从一种类型的蛋白质亚基形成二聚体的示意图。自身识别的结合部位将产生对称的二聚体。

利用小亚基建造大结构有几个好处：(1) 从一种或几种重复小亚基建造大结构减少所需的遗传信息量；(2) 亚基通过能量颇低的多键而联合，使得组装和拆卸都容易控制；(3) 亚基装配使结构合成的差错减到最小，因为装配过程中有校正机制起作用，排除了畸形的亚基。

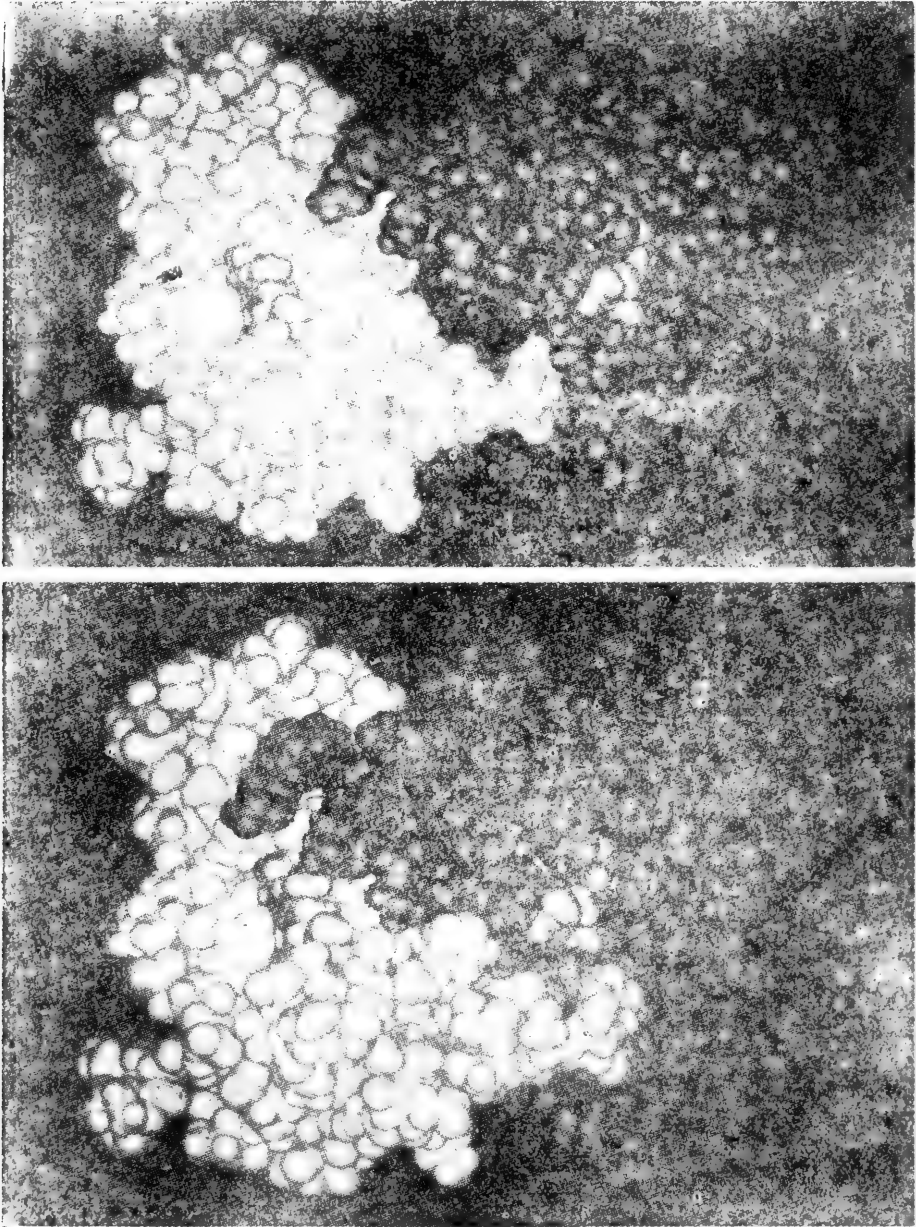


图3-34 两个相同的蛋白质单体形成二聚体的空间结构模型。图示的蛋白质是细胞色素c。
(Richard J. Feldmann 赠)

单一类型的蛋白质亚基能彼此相互作用形成几何形状规则的聚合体¹⁷

如果蛋白质有一个结合部位与它自己表面的一个区域互补，它便自发地装配成聚合结构。在最简单的可能情况下，结合部位可自身识别，形成对称的二聚体。许多酶和其他蛋白质形成这种二聚体，后者在大型聚合结构的形成中常充当亚基(图 3-33 和 3-34)。

如果蛋白质的结合部位与不包括结合部位的自身表面区域互补，则将形成一条亚基链。由于两个结合部位的某些取向，这条链很快自身相连而终止，形成一个由 2、3、4 或更多亚基组成的闭合环(图 3-35)。较普遍的情况是，产生无限延伸的亚基多聚体，而且如果每一亚基以相同的方式与其相邻的亚基结合，则多聚体中的亚基将排列成螺旋(图 3-35)。所以，螺旋是由非常简单的结构构成的。

细胞内常见的螺旋结构的例子是肌动蛋白丝，它有两条相互缠绕的螺旋丝，由一种称为肌动蛋白的球蛋白亚基形成。因为每一个亚基除了与其同一链上的相邻亚基作用外，还与相对链上的亚基相互作用，所以两条链增加了装配的稳定性和强度。机械强度特别重要的分子通常由丝状而不是球状亚基构成，因为丝状亚基构成的分子使蛋白质-蛋白质接触的区域更广(图 3-36)。

蛋白质亚基也可能装配成扁平的片层，亚基在其中排列成六角点阵。特化的膜转运蛋白有时可在双脂层内以这种方式排列，例如脊椎动物细胞之间的间隙连接。各个亚基的几何结构稍加改变，六角片层就能转变成管(图 3-37)；这种圆柱状的管子与某些长形

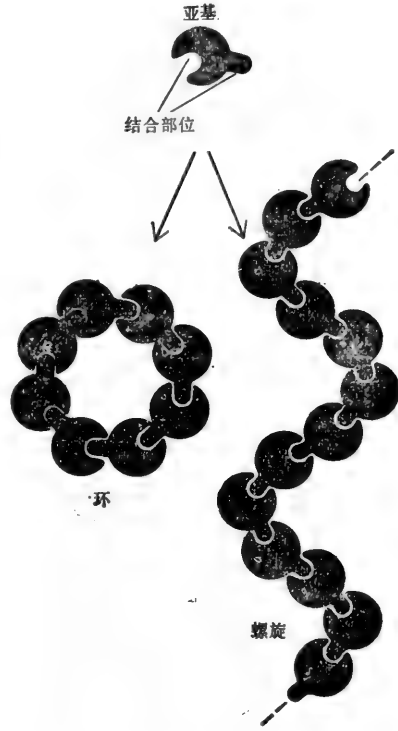


图3-35 一种蛋白质亚基以图示的方式重复地自身相互作用，从而形成环或螺旋。

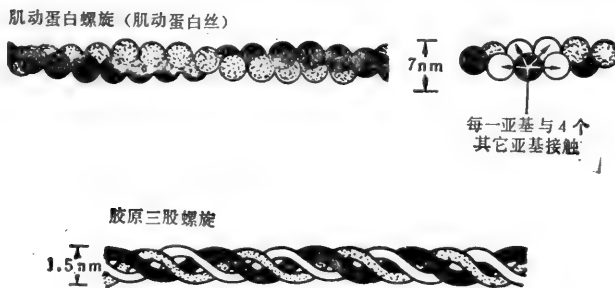


图 3-36 细胞形成的两种简单的蛋白质螺旋。肌动蛋白螺旋包含双链球蛋白亚基，每一亚基与 4 个其它亚基接触。胶原螺旋由三条伸展的蛋白链组成，它们长距离地相互盘绕，形成很强的杆状结构。(请注意，这两个图解中的比例尺度不同)

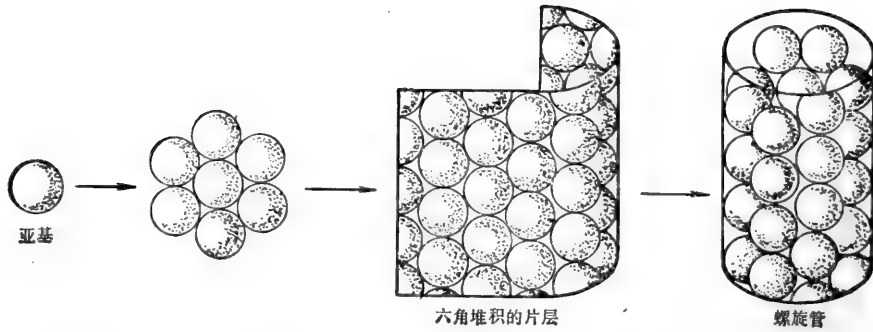


图 3-37 六角堆积的亚基可形成扁平的片层或管

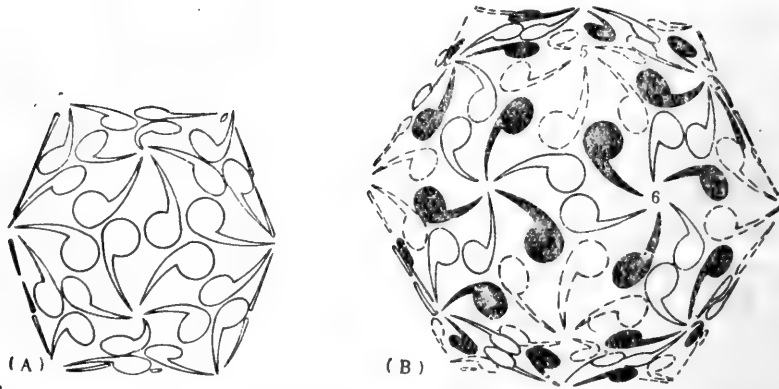


图 3-38 在某些病毒中，大量相同的蛋白质亚基堆积在一起，产生球状外壳，包裹着核酸分子即 RNA 或 DNA。由于几何原因，用完全对称的方法堆积，相同的亚基不得越过 60 [此种排列显示于(A)]，这就限制了蛋白质外壳所能携带的核酸数量。然而，如果亚基的位置不完全对称，则可有较大数目的亚基构成较大的外壳。(B)图所示的外壳由 180 个相同的亚基构成，每一亚基处于三种不同的“准对称”堆积排列之一的状态。在该图中可见，一个亚基排列成五聚体(以虚线表示)，而其余两个黑色和浅色亚基改排成六聚体。为了制造这样的外壳，蛋白质亚基必须具备足够的可塑性，以适应三种稍不同的堆积排列，如图中三种亚基所示。(根据 Arthur J. Olson 提供的照片绘制)

病毒蛋白质衣壳的形成相关。

闭合结构诸如环、管或球的形成可使结构更加稳定，因为它增加了在蛋白质亚基之间形成的键的总数。很多具有中空的球状结构的简单病毒的蛋白质外壳充分地体现这一原理。这些衣壳常常由几百个相同的蛋白质亚基构成，它们包裹着和保护着内部的病毒核酸(图 3-38 和 3-39)。这种外壳中的蛋白质必定具有适应性特别强的结构，因为它必须作多种不同的接触并改变其排列，以输出核酸和启动病毒增殖。

自我装配的聚合物可包括不同的蛋白质亚基和核酸¹⁸

许多大型的细胞结构是由不同的蛋白质混合物构成的。在某些例子，如病毒和核糖体中，RNA 或 DNA 也可能形成结构的一部分。就像上述较简单的结构一样，装配很多复杂聚合体的信息则是包含在大分子亚基本身结构之中的。这可由下列事实予以证

实,即在适当的条件下,离体的亚基可在试管内自发地装配成最终的结构。

第一个显示有组分自我装配能力的大分子聚合体是烟草花叶病毒。此病毒为一长杆状体,蛋白质的圆柱体围绕其中螺旋状RNA核心而排列(图3-40和3-41)。如果分离的RNA和蛋白质亚基在溶液内混合在一起,它们便可以重新结合而形成具有充分活性的病毒颗粒。这种装配过程无比复杂,涉及形成蛋白质双环,起着加入延伸病毒外壳的中间产物的作用。

另一个能从组分部分重新装配的复杂大分子聚合体是细菌核糖体。这些核糖体由约55种不同蛋白质分子和3种不同的rRNA分子组成。如果在适当条件下在试管内将58个独立的组分进行温育,它们便自发地重新形成原来的结构(图3-42)。最重要的是:这些重新构成的核糖体能够进行蛋白



图 3-39 番茄丛矮病毒的电镜照片。该病毒的外壳是根据图 3-38(B)的准对等堆积为案构成的。它由一个单一类型的分子量为 41000 的蛋白质的 180 个拷贝组成。(Robley Williams 赠)

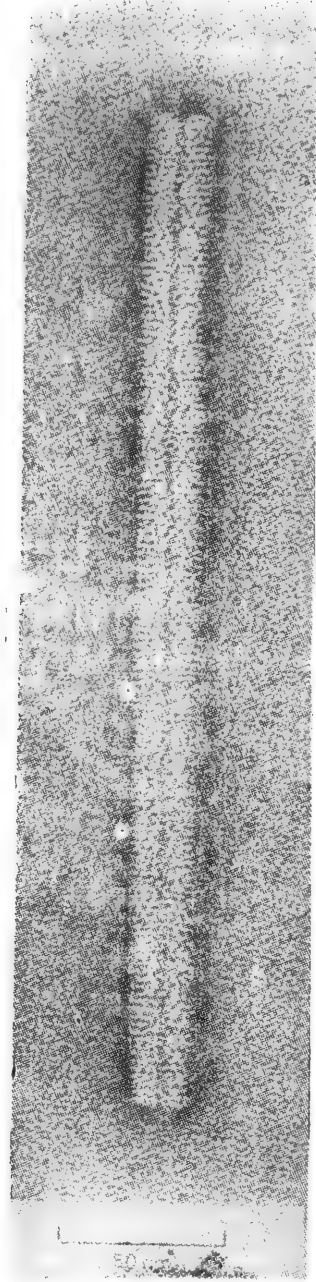


图 3-40 烟草花叶病毒(TMV)的电镜照片。该病毒由一长RNA分子和一个圆柱状蛋白质外壳组成,蛋白质外壳则由相同的蛋白质亚基紧密螺旋排列而成,RNA包裹在蛋白质外壳之中。只要在试管内混合纯化的RNA和外壳蛋白质,使它们自我装配,就能制得外形正常的全侵染性的病毒颗粒。(Robley Williams赠)

质的合成。如所预测,核糖体的重新装配遵循特定的途径:某些蛋白质先与RNA结合;

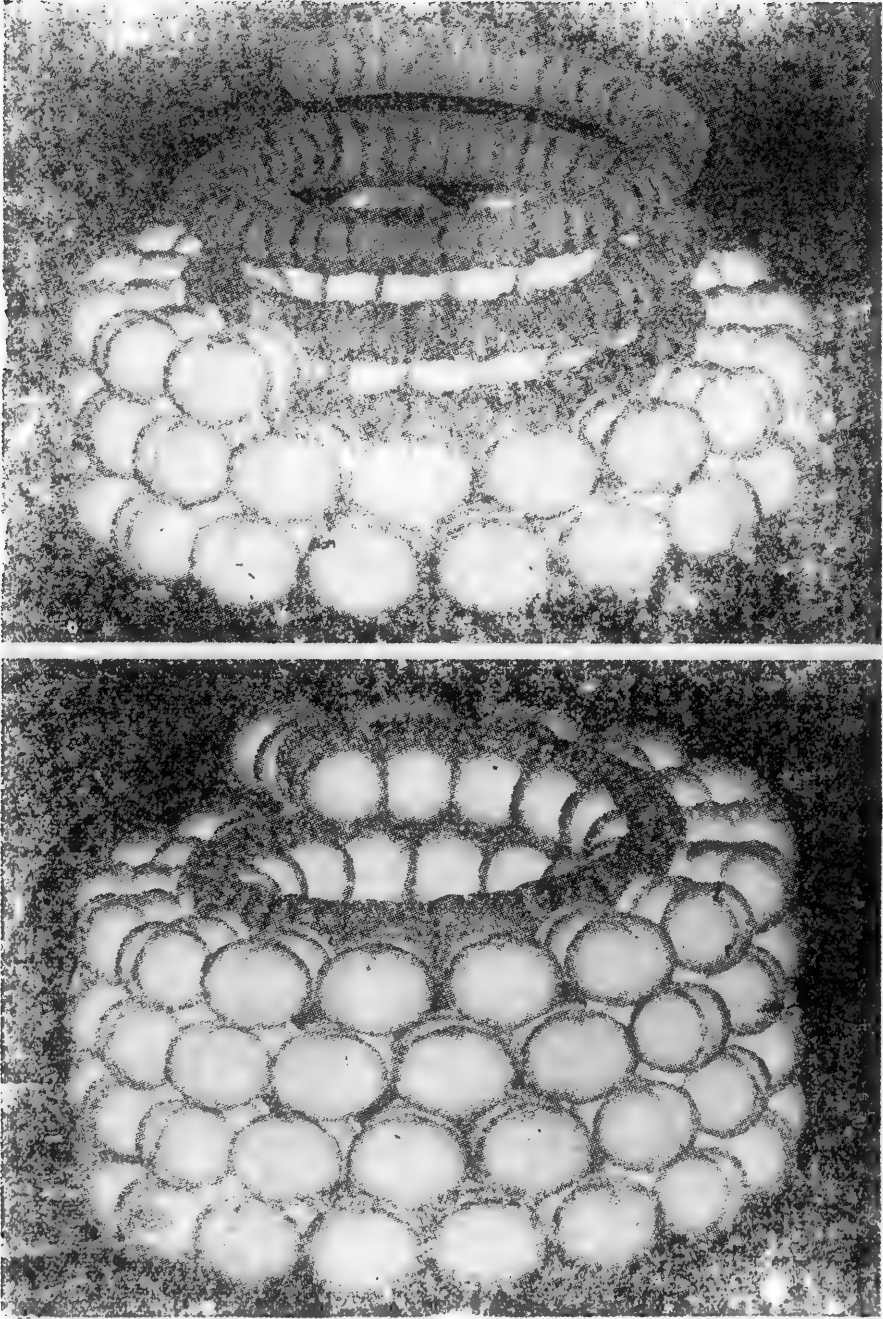


图 3-41 显示自我装配的两个阶段的烟草花叶病毒模型。外壳蛋白质分子与单链 RNA 分子(深色)结合,形成螺旋复合物。(Richard J. Feldmann 赠)

然后这一复合物被其他蛋白质所识别,如此等等,直到构成最终的结构。

目前还不清楚,某些比较复杂的自我装配过程是怎样被调节的。例如,细胞内的许多结构似乎有精确限定的长度,比它们的组分大分子长好几倍。这个长度是如何确定的还是个谜。但是根据游标卡尺原理假设的一个机制可显示于图 3-43。图中两个杆状分

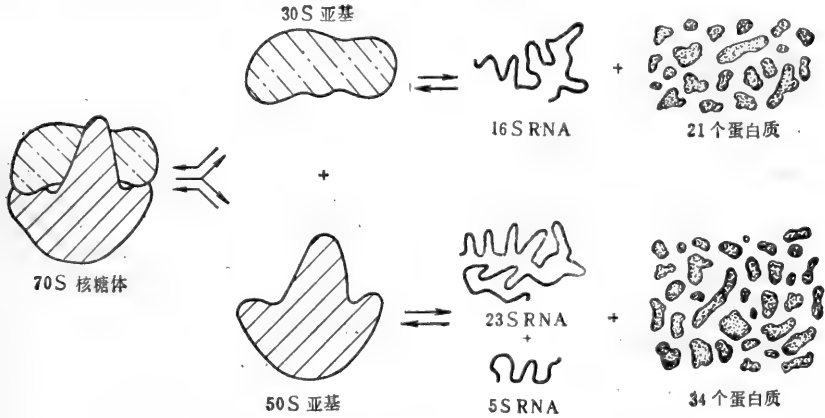


图 3-42 细菌核糖体的自我装配。如果在适当条件下温育 55 种不同蛋白质和 3 种不同的 RNA 分子,则它们可以重新装配成有功能的核糖体。

子形成参差不齐的复合物。因为分子有稍不相同的长度,所以只有到了某一点,它们的末端才对齐。在这一点便停止进一步延伸。

自我装配是有限制的¹⁹

人们不禁要问:通过非共价键结合在一起的所有的细胞结构是否都能自我装配?线

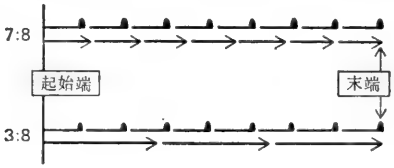


图 3-43 理论上如何用游标卡尺原理能确定蛋白质聚合体的长度。图中箭头分子和杆状分子形成参差不齐的复合物,复合物一直延伸到它们的末端完全对齐为止。在上例中,正好在 7 个箭头分子和 8 个杆状分子相互作用之后到达这一点;在下一例中,3 个箭头分子和 8 个杆状分子相互作用后到达这一点。

粒体、纤毛、肌原纤维,甚至整个细胞是否都能从它们的组分大分子溶液自发地形成?答案是否定的,因为对大而复杂的结构来说,装配的部分信息是由特殊的酶,以及只起模具或模板作用而在最终装配成的结构中并不出现的其他细胞蛋白质所提供的。甚至有些小结构也缺乏一些它们自己的装配所需的配件。例如,在一个小细菌病毒形成过程中,由一种蛋白质亚基组成的头结构是在另一种蛋白质组成的临时结构上装配起来的。因为这另一种蛋白质在最终的病毒颗粒中并不出现,所以头结构一旦拆开就不能自发地重新装配。其他已知的例子是,蛋白酶的切割在装配过程中是一个基本的和不可逆的步骤。对于某

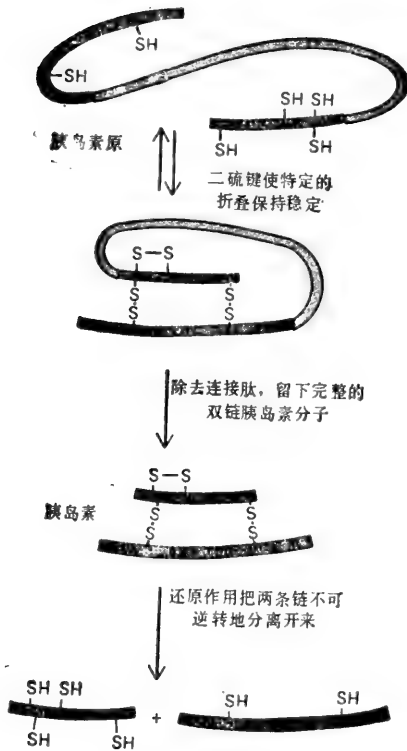


图 3-44 因为多肽激素胰岛素合成时是一种大型蛋白质(胰岛素原),后者在它折叠成特定的形状后被蛋白酶所裂解,所以这种激素在它的二硫键还原后就不能自发地重新形成它的原来的构象。部分去除胰岛素原的多肽链可使分子自动地重新装配所需的信息遭受不可恢复的丧失。

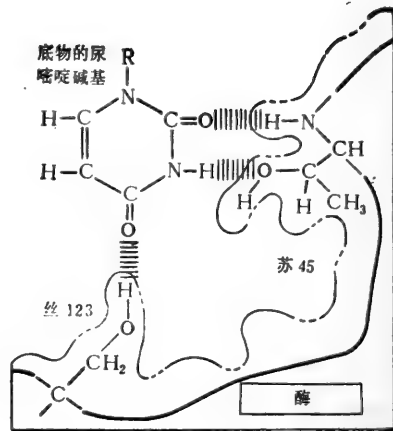


图 3-45 蛋白质与其配体之间的氢键连接。根据酶-底物复合物的X射线晶体学分析的测定,这里显示的相互作用可说明核糖核酸酶如何与其RNA底物的一部分结合在一起。

些细菌病毒外壳,甚至对于某些简单的蛋白质聚合体,包括结构蛋白胶原蛋白和激素胰岛素的装配情况确实如此(图 3-44)。从这些相对简单的例子可见,像线粒体或纤毛那样复杂的结构的装配,似乎很可能除了涉及降解酶催化的不可逆的加工步骤外,还涉及其他细胞组分授予的时空指令。

至于某些复杂的细胞器,贮存在结构内的信息本身可能需要制造新的拷贝。因此,一个细胞器例如线粒体或高尔基复合体的大分子组分,在细胞成长时通常通过与细胞器膜的特定识别有关的过程,而装配成相应的原存的结构(第七章)。如果一个细胞分解成它的组分大分子,则有可能不可复得地丧失基本信息,因为这些细胞器的组分不可能自行重新装配。所以,在这种意义上说,认为制造细胞所需要的全部信息都包含在它的DNA中,那是不正确的。

小结

一个蛋白质分子的三维构象是由其氨基酸序列来确定的。多肽链不同部分之间的非共价作用使特定的折叠结构保持稳定。带疏水侧链的氨基酸倾向于集聚在分子的内部,

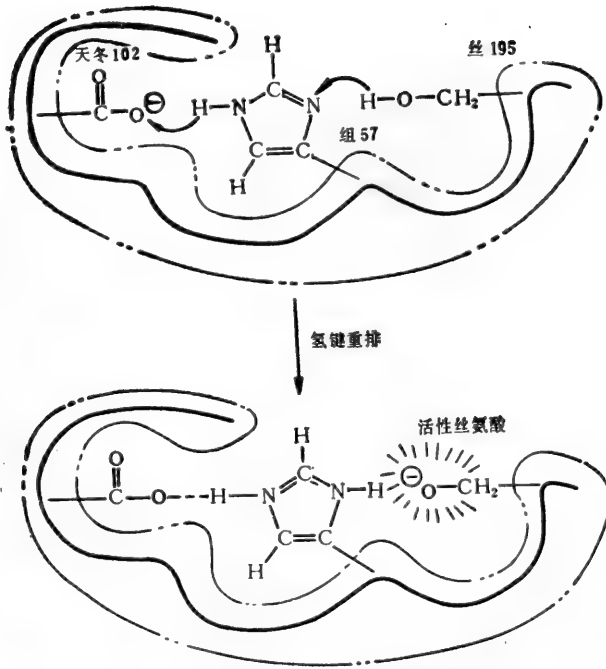


图 3-46 酶活性部位上异常活泼的氨基酸。图示的例子是在糜蛋白酶和弹性蛋白酶那样的酶中
发现的“继电器系统”。这两个酶与底物结合时可使它们活性部位上的丝氨酸活化（见图 3-29）。然
后这个丝氨酸与酶底物形成暂时的共价键，催化肽键水解，如图 3-49 所示。

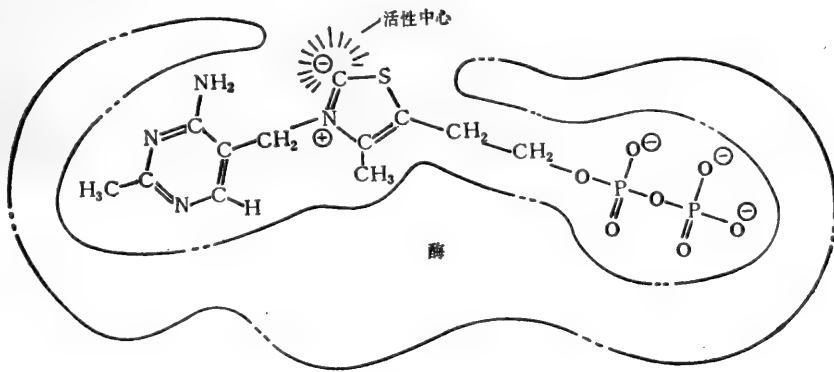


图 3-47 图示的硫胺素焦磷酸(TPP)那样的辅酶是小分子,它们与酶的表面结合,使它催化特定
的反应。TPP 的活性集中在其“酸性”碳原子上,后者易与底物分子的碳原子交换它的氢原子。
TPP 分子的其它区域有可能充当“把柄”,使酶在准确的位置把握住辅酶。

肽主链之间局部的氢键作用形成 α 螺旋和 β 片层。小的球蛋白区域称为区,它们是构成许多蛋白质的标准组件;它们通过一段段短的多肽链连接在一起,构成球蛋白。

那种使蛋白质折叠相同的力使蛋白质聚集成聚合结构。自己表面有结合部位的蛋白质能装配成二聚体或较大的低聚体、闭合环、球壳或螺旋多聚体。许多不同蛋白质的混合

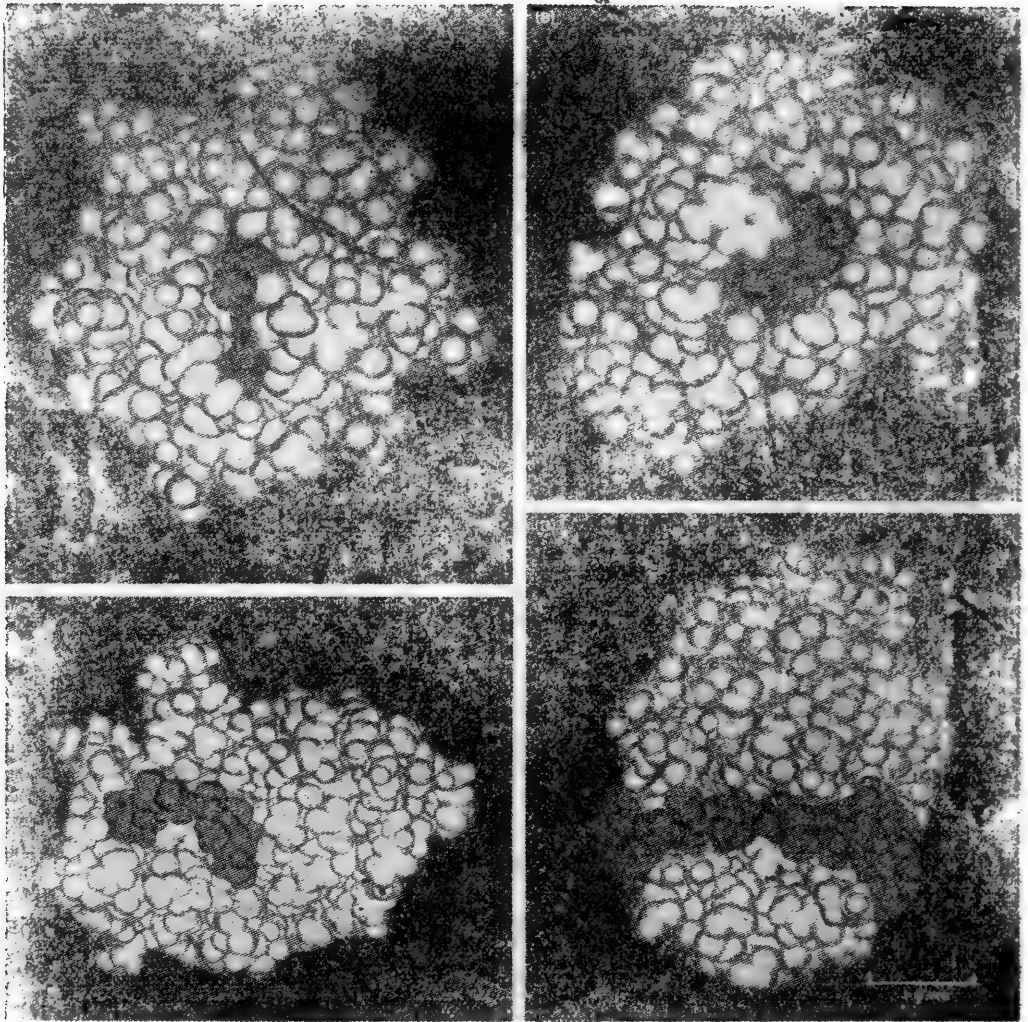


图 3-48 计算机产生的 4 个不同的酶与辅酶或底物结合的空间结构模型。在每一种情况中，结合的配体示以深色：(A)结合血红素的细胞色素 c；(B)结合黄素单核苷酸的黄素氧还蛋白；(C)结合二核苷酸的核糖核酸酶；以及(D)结合低聚糖的卵清溶菌酶。(Richard J. Feldmann 赠)

物,也包括结构核酸,可在试管内自发地装配成大的复杂结构。然而,在许多装配过程中,可出现不可逆的步骤,所以,如果细胞内的结构分解成它们的组分,就不是所有的结构都能自发地重新装配了。

蛋白质的功能²⁰

蛋白质分子的化学特性几乎完全取决于暴露在其表面的残基,它们能与其他分子形

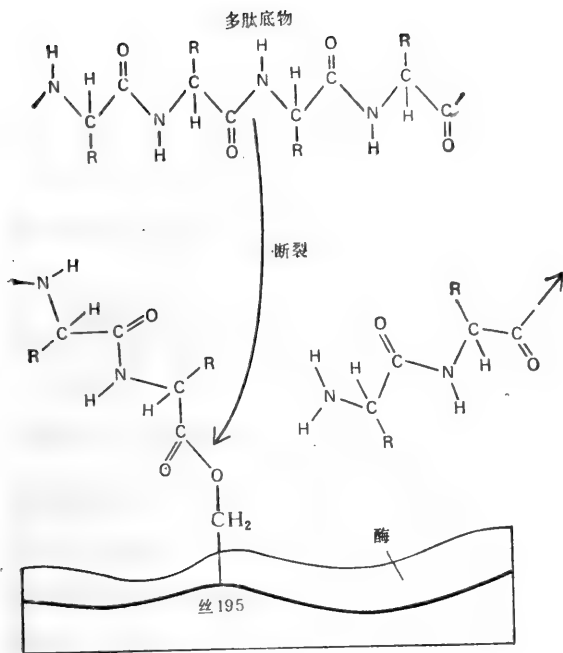


图3-49 酶有时与其底物形成瞬时的共价键。在图示的例子中,当主链断裂时,多肽链中的羧基与蛋白酶的活化的丝氨酸残基形成共价键(见图3-46)。当多肽链的非结合部分扩散开时,发生第二步反应(未显示),在此反应中,水分子水解了新形成的共价键,从而释放出与酶表面结合的多肽部分,并在丝氨酸的195号部位恢复一个氢原子。

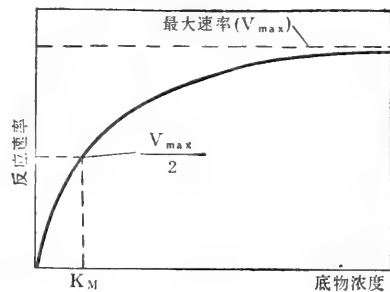


图3-50 酶反应速率(V)随底物浓度而变。浓度增加时反应速率也增加,直至达到最大值(V_{max})。此时,所有的酶分子都与底物结合,反应速率被酶表面催化处理的速率所限制。对大多数的酶来说,反应速率达到最大值一半时的底物浓度(K_M)是底物结合牢固度的度量,大 K_M 值代表弱结合,反之亦然。

成不同类型的非共价弱键。蛋白质分子与另一种分子(称为配体)有效地相互作用需要在它们之间同时形成一些弱键。所以,唯有能与蛋白质紧紧地结合的配体才是与蛋白质表面精确匹配的配体。

蛋白质与配体结合的区域称为结合部位,通常取空穴的形式,由氨基酸在蛋白质表面特定排列而成。这些氨基酸往往属于多肽链上分得很开的部分(图3-45),它们只代表全部氨基酸的一小部分。蛋白质分子的其余部分可用于把多肽链维持在准确的位置,以及为调节提供额外的结合部位;蛋白质里面的部分仅仅在给分子表面提供适当的形状和强度方面,才常常是重要的。

蛋白质的构象确定蛋白质的化学性质

蛋白质上相邻表面残基常相互作用从而改变选定的氨基酸侧链的化学活性。这些相互作用分成几种类型。

第一种类型是,多肽链的相邻部分有可能相互作用,从而限制水分子进入蛋白质表面的其他部位。因为水分子有形成氢键的趋势,所以它们将与配体竞争蛋白质表面的选定的侧链。如果排除水分子,则大大增强蛋白质与其配体之间氢键(以及离子相互作用)的

紧密度。初看起来,从蛋白质表面排像除水那样小的分子,而不影响配体本身进入的机制简直是难以想像的。然而,因为水分子有很强的形成氢键的趋势,所以它们可以存在于大的氢键网络之中(组合图 1,第 94 页),而且个别分子要想脱离这一网络进入蛋白质表面的间隙,往往是能力学上不利的。

第二种类型是,相邻的极性氨基酸侧链的集聚改变了它们的化学活性。例如,通过蛋白质折叠的方式能迫使一些带负电的侧链聚集在一起,以对抗它们相互排斥。当发生这样的情况时,便大大增强每一侧链对带正电的离子的亲和性。选定的氨基酸侧链还通过氢键而相互作用,从而使通常不活泼的侧链(如图 3-46 所示的丝氨酸上的 $-\text{CH}_2\text{OH}$)变得很活泼,以致它们能参与形成或分裂选定的共价键的反应。

所以,每一个蛋白质分子表面有独特的化学活性,这种化学活性不仅取决于暴露出来的氨基酸侧链,而且取决于它们的精确的相互取向。为此,即使是同一种蛋白质分子的两个稍不相同的构象,它们的化学性质也可能大相径庭。

当侧链活性不足以完成其面临的任務时,蛋白质常求助于选定的非多肽分子,而结合于它们的表面。这些酶体在酶促反应中充当辅酶,它们与蛋白质结合得很牢,使它们实际上成为蛋白质本身的一部分。例如,在血红蛋白和细胞色素中的含铁的血色素,与转移醛基有关的酶中的硫胺素焦磷酸,以及与转移羧基有关的酶中的生物素。当辅酶与蛋白质表面结合时,各种辅酶以其所能提供的独特的化学活性而被选择。辅酶除了其活性中心外,还有其他残基使其与寄主蛋白结合(图 3-47)。辅酶往往是很复杂的有机分子,它们与蛋白质结合时的确切的化学性质没有完全了解。图 3-48(A)和(B)显示两个酶与它们辅酶结合的空间结构模型。

结合底物是酶催化的第一步²¹

蛋白质最重要的功能之一是充当酶,催化特定的化学反应。这样情况下的配体便是底物分子,底物与酶结合是化学反应必不可少的前奏[图 3-48(C)和(D)]。酶使化学反应获得极高的速率,远远超过任何人工催化剂所能发挥的作用。这样的高效率归因于几个因素。首先,酶可提高催化部位的底物分子的局部浓度,使适当的原子持正确的取向,以便进行下一步反应。但是,最重要的是,有些结合能直接帮助催化:底物分子形成反应的最终产物之前,经过一系列几何结构和电子分布的中间形式的变化。当分子与酶表面结合时,这些中间形式的自由能,尤其最不稳定的跃迁态的中间形式的自由能大大地降低。通常,酶对不稳定的跃迁态底物的亲和性比对稳定态底物的亲和性强得多。酶利用从这种结合相互作用取得的能量,帮助它们的底物到达特定的跃迁态,从而大大加速一个特定的反应。

有些酶与一个或几个底物共价地相互作用,使底物与氨基酸(如丝氨酸、半胱氨酸、组氨酸或赖氨酸)相连,或与辅酶分子(如磷酸吡哆酸)相连。这样的酶反应往往分阶段进行:一个底物先进入结合部位,成为共价结合,然后再与酶表面的另一个底物反应(图 3-49)。

因为酶作用方式的关系,在一定时间内,一个酶能处理的底物的数量是有限的。如果底物的浓度增加,则形成产物的速率也就可提高到最大值(图 3-50)。此时,酶分子与底物的结合饱和,因而反应的速率仅取决于底物分子的处理速率。这一速率用周转率来表

示,许多酶的周转率数为每秒钟约 1 000 个底物分子。

常常用来表征酶特性的另一个动力学参数是 K_M ,它是使反应速率到达最大速率一半时的底物浓度(图 3-50)。低 K_M 值意味着酶在低浓度底物时到达最大催化速率,通常表示酶与其底物结合得很牢。

酶加速反应速率而不改变平衡

不管酶变得何等的复杂,它都不能使它催化的化学反应在能力学上有所得失。像已讨论过的简单的结合相互作用一样,任何一个既定的化学反应都有一个平衡点,在这一点上,正反应和逆反应的通量是相等的;所以最终不出现进一步的变化(见图 3-5)。如果酶使正反应即 $A + B \rightarrow AB$ 的速率增大 10^8 倍,它必然也使逆反应即 $AB \rightarrow A + B$ 的速率增大 10^8 倍。正向与逆向反应速率之比仅取决于 A, B 和 AB 的浓度。底物分子 A 和 B 的强酶结合与产物分子 AB 的弱酶结合的任何组合都不能改变这一基本的化学事实。不管反应是否受酶催化,平衡点始终严格保持不动。

许多酶通过与 ATP 水解耦合使反应优先向一个方向前进²²

活细胞代表一个不平衡的化学系统:在代谢途径中,每一个酶的产物通常用作另一个酶的底物,且很快被消耗掉。更重要的是,如在前面第二章讨论的那样,根据酶催化途径,许多反应可通过与 ATP 水解成 ADP 和无机磷酸基耦合而被起动。为了使此成为可能,ATP 库本身要维持在远离平衡点水平上,ATP 与其水解产物之比要高(见第九章)。因此,这个 ATP 库起了“蓄电池”的作用,使能量和原子源源不绝地流过细胞,沿着酶确定的途径前进。对活系统来说,向化学平衡靠近象征着衰老和死亡。

多酶复合物有助于提高细胞代谢的速率²³

酶加速代谢反应的效率以及它们在细胞内的组构都是维持生命的关键。实际上,细胞必须与不可避免的趋向化学平衡的衰老过程赛跑。如果重要反应的向前速率不比逆向速率大,细胞会立即死亡。从一个典型的哺乳动物细胞每一二分钟就周转掉(即完全降解和置换)其整个 ATP 库的事实,可以了解到细胞代谢的速率。对每一个细胞来说,这种周转象征着每秒钟大约利用 10^7 个 ATP 分子(对人体来说,每分钟约消耗一克 ATP)。

细胞反应速率之所以那么快,那是因为酶催化剂的效率高。许多重要的酶效率已很高,以致进一步提高其效率均属徒劳,因为在它们催化的反应中限制速率的步骤就是酶与其底物碰撞的步骤;也就是说,反应速率是受扩散限制的。

如果反应受扩散限制,则反应速率将取决于酶及其底物两者的浓度。因此,对一系列很快发生的反应来说,每一种代谢中间物以及有关的酶的浓度都必须很高。如果细胞进行大量不同的反应,则所能达到的反应物的浓度就受到限制。事实上,大多数代谢物出现的浓度为微摩尔(10^{-6} mol/L)数量级,而大多数酶浓度比一微摩尔低得多。所以,怎么可能维持很快的代谢速率呢?

答案在于细胞组分的组构。参与反应顺序的各种酶聚集在一起形成大的多酶复合体,也能不增加底物浓度而提高反应速率。用这样的方法,酶 A 的产物可直接传到酶 B,并且接二连三直至传到最终产物,即使细胞内底物浓度很低,也不需限制扩散的速率。这种酶

复合物是很普遍的，图 2-40 显示丙酮酸脱氢酶复合体的结构。大的多酶复合体也参与 RNA、DNA 和蛋白质合成，虽然它们的结构特性尚未充分了解。

另有两种机制与细胞内膜有关，已进化到可克服细胞内的动力学问题。

细胞内膜提高受扩散限制的反应的速率²⁴

真核细胞的广泛的细胞内膜至少用两种不同的方法提高反应的速率，否则反应速率将受到扩散速率的限制。第一，膜能把底物以及所有作用于底物的酶隔离到同一个膜局限的室内，例如线粒体内或细胞核内。假定各种这样的室占典型细胞总体积的 10%，则在这些细胞器内反应物的浓度可以是无室间隔的同样细胞内浓度的 10 倍(图 3-51)。当各种类型的细胞器室的总体积相对于细胞总体积而减少时，则它的扩散限制反应速率的加速便可相应地增加。

第二，膜可能将反应物的扩散局限于膜本身的二维空间，所以酶与其底物的相互碰撞机会要比它们在三维空间内的扩散多得多。虽然在膜内分子扩散的速率比在溶液内慢 100 倍，但是，如果典型真核细胞内的两种反应物先与内质网那样的内膜结合，那么它们碰在一起的速率就要快得多(图 3-52)。就参与脂分子合成的酶和底物而论，所指出的膜的捕获过程似乎肯定起作用，使底物直接溶解在双脂层内；而且它可能还可以加速多种也利用膜结合酶的其他反应。

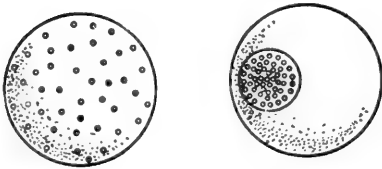


图3-51 膜限制的区室。真核细胞中，由于相互作用分子限制在一个亚细胞区室内，使作用分子的浓度大大增加。

蛋白质分子能可逆地改变它们的形状²⁵

因为细胞生命力学通常需要稳定的分子结构，所以进化压力压制多肽随机地从一种构型变成另一种构型的能力。然而，选择压力并不是完全消除这种能力，而是把它限制在高度特异的方式，致使许多(若不是大多数)蛋白质分子有可能在几种不同而相关的稳定构型之间发生可逆的转变。具有这种特性的蛋白质称为变构蛋白。例如，这种蛋白质能在其内部形成几组可供选择的能量大致相等的氢键，每组不同的氢键需要改变不同折叠的多肽链之间的空间关系。只有某些独特的分子构型能力学上是有利的，任何中间构象都是不稳定的。图3-53示意地说明形成不同构型的原因；介于 A 构型与 B 构型之间的中间构象是不稳定的，因为它不能形成两组有利氢键的任何一组。

每一个独特构象的变构蛋白都有稍不相同的表面，因而与其他分子相互作用的能力也就不同。两个构象中往往只有一个构象对特定的配体有强亲和力；在这种情况下，配体的存在与否决定着蛋白质所取的构象(图 3-54)。当有两个不同的配体各对同一蛋白质的不同表面专一时，一种分子的浓度便常可改变蛋白质对另一种分子的亲和力。这种变构变化对于许多生物过程调节都是重要的。

变构蛋白参与代谢调节

变构蛋白是控制通过代谢途径流量的反馈调节所必不可少的(第 82 页)。例如，在代谢途径初始时起作用的酶几乎总是变构蛋白，它作为两种不同的构象而存在。一种是

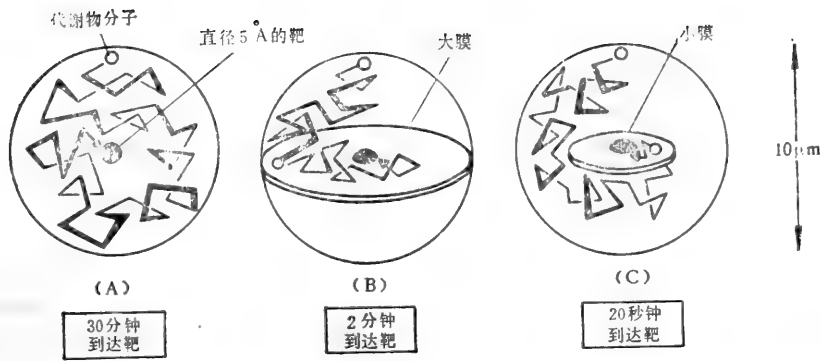


图3-52 膜加速碰撞。当膜把三维扩散转变为二维扩散时加快了反应速率。图示一系列理论计算的结果。(A)无膜扩散时,平均一个分子在 $10\mu\text{m}$ 直径的球内找到任何一个“靶”所需时间为30分钟。(B)若靶固定在膜上,扩散时间便大大减少。此时,平均一个分子击中一个大膜约需费1秒钟,接着在膜内找到靶的平均扩散时间为2分钟。(C)现在内膜面积减少了10倍,平均一个分子找到膜需要10秒钟,但在膜内通过扩散击中靶要比(B)快10倍。因此,在小膜内碰撞过程的效率最高,与(A)中情况相比,效率提高了近100倍。

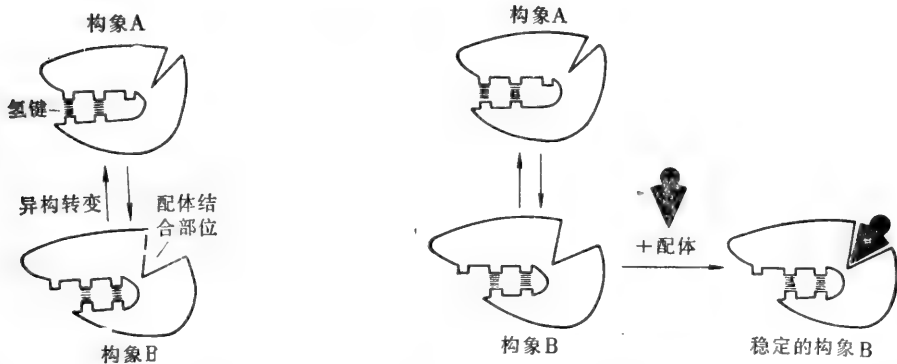


图3-53 变构蛋白的两种不同构象。构象A和B各含两个氢键,所以,它们比任何中间构象都稳定。

图3-54 蛋白质构象因结合配体而稳定。一种配体若仅与一变构蛋白的一种构象牢固地结合,可使其改变构象而与配体取得最佳的结合。

活性构象,在其活性部位与底物结合,并在代谢途径中催化底物变成下一个反应的物质。另一种是无活性构象,在蛋白质表面的不同的地方(调节部位)与同一途径的最终产物紧密地结合。当最终产物积累时,该酶便变成失活的构象,原因是产物与调节部位的结合可使这种构象稳定(见图3-54)。在其他情况下,酶与细胞缺乏途径产物时所积累的配体结合时发生的变构转换可激活代谢途径中的酶。在这些调节方式中,细胞仅当需要产物时才制造一定的产物,并自动维持所有代谢物的相对恒定的浓度。

变构蛋白对于细胞发送信号极为重要²⁹

我们曾经提到,当反馈调节有关的变构蛋白至少有两个结合部位,一个是酶底物的结合部位,一个或几个是调节配体的结合部位。这些部位占据蛋白质表面的不同区域,识别完全不同的小分子或离子。但是,我们刚刚了解到的,配体与一个部位的结合可通过改变

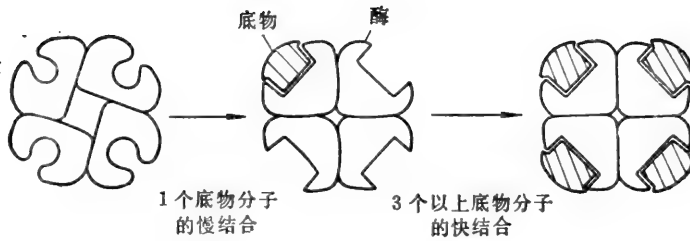


图 3-55 一种底物分子与一种酶的协作性结合。在变构亚基的聚合物中，一个亚基的构象往往影响其相邻亚基的构象。因此，一个底物分子与一个酶的结合可能影响其他底物分子与该酶结合的亲和力。

蛋白质的构象而影响另一个部位。这一事实引出了非常有力的总的细胞组构原理，因为这意味着，细胞内的任何一种酶反应或代谢过程都可被任何其他一种酶反应或代谢过程所调节，而不管后者有什么样的化学性质。例如肌细胞内糖原的产生和分解可通过变构

酶而与 Ca^{2+} 的浓度联系在一起，因为当 Ca^{2+} 的浓度变化时，变构酶可改变它们的活性。

变构蛋白常常表现为相同亚基的聚合体，这时它们是特别有效的信号发送装置。因此，一个亚基的构象能影响相邻亚基的构象，产生类似放大的效果。例如，与蛋白质亚基上的一个部位结合的底物分子（或其它配体）可使其他亚基的构象稳定，使其他底物分子更易与酶结合（图3-55）。当底物浓度提高时，这种行为可使酶活性出现特征性的 S 形提高

（图3-56）。变构蛋白的这种作用颇像一个开关，它用最短的时间在两种状态之间转换（见图 13-38）。

蛋白质可推拉成不同的形状¹⁾

细胞内所有定向运动取决于蛋白质产生的力。但是怎样才能控制蛋白质分子的运动呢？在回答这一问题之前，我们必须先讨论细胞调节变构蛋白构象的一些方法。试考虑一个变构蛋白，它能取两种不同的构型，即低能型 C（无活性）和高能型 C^* （有活性），能量相差约 4.3 千卡¹⁾每摩尔（相当于蛋白质表面形成 4 个氢键的能量）。假使能差是这些，构象 C 将在能量上有利 1 000 倍（见表 3-3），因而蛋白质几乎总是取无活性的构象。然而，有两种不同的方式迫使蛋白质取活性构象。

在某种意义上，蛋白质与小分子量的配体结合，能被“拉”成活性 C^* 构象。假使这一配体只与 C^* 结合，则这一构象的能量将被选择性地减少，而不影响 C 的能量（图 3-57）。因为配体相对较弱地与蛋白质结合（它的能量大多数用在拉长蛋白质的形状，以便接纳配

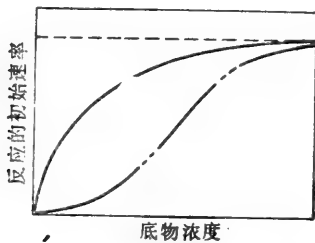


图 3-56 显示图 3-55 的变构酶的活性随底物浓度而改变。底物分子的“协作”结合产生特征性 S 形反应曲线，与非变构酶的简单的饱和动力学（弧形）形成对照（见图 3-50）。

1) 1卡=4.1868焦耳。

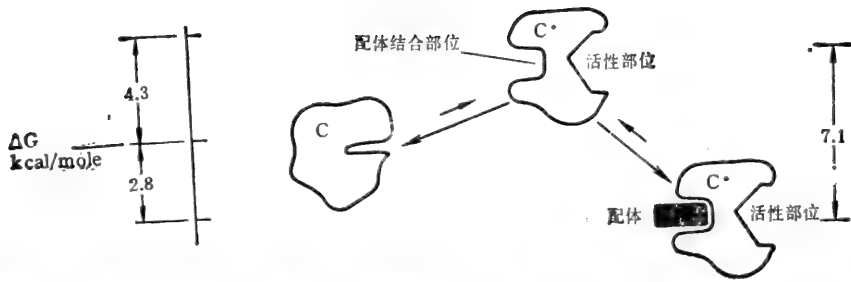


图 3-57 这张示意图描绘配体与变构蛋白的活性构象结合, ΔG 为 -7.1 千卡/摩尔(相当于亲和常数为 10^7 升/摩尔)。因此, 配体的结合把酶从其正常能量有利的无活性构象 C “拉”至其活性构象 C^* 。在此例中, 在无配体时无活性构象与活性构象之比为 $1000:1$, 而在存在配体时则为 $100:1$ (见表 3-3)。

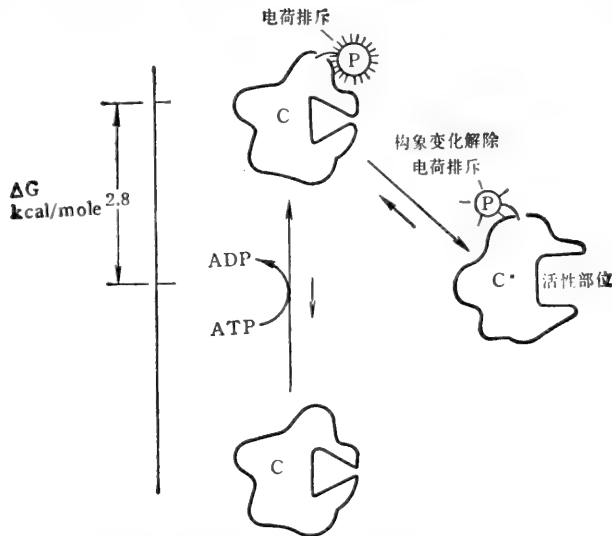


图 3-58 ATP 使许多蛋白质磷酸化。在这张图中, 设想变异构蛋白的无活性构象的磷酸化作用可产生不利的电荷排斥; 而变成活性构象 C^* , 则可解除一部分电荷排斥。因此, 磷酸化作用把酶“推”成活性构象。然而, 请注意, 这不是磷酸化作用的唯一的作用方式。在研究得最详细的糖原磷酸酶的例子中, 磷酸化作用反而产生电荷吸引, 它通过使蛋白质分离的两部分结合在一起而引起构象变化。

体), 所以很易分离, 蛋白质的这种构象变化是完全可逆的。

另一种方法是利用化学能的输入来把构象 C “推”成活性型 C^* , 这种转化就更不可逆了。这一共同的机制涉及磷酸基从 ATP 转移至蛋白质的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基, 形成共价键。假定这样产生的电荷排斥不利于构型 C。如果在活性 C^* 型中的这种排斥降低, 则有可能发生从 C 至 C^* 的转变(图 3-58)。在真核细胞内可普遍观察到控制性蛋白质磷酸化可以活化或抑制特定蛋白质的功能; 事实上, 哺乳动物细胞内制造的所有不同的蛋白质中约有 $1/10$ 含有共价结合的磷酸基。

有时可以观察到, 在体外把 ADP 加进这样的一个磷酸化蛋白中, 便能制造 ATP。这种情况的发生, 直接证实 ATP 水解释放的大量能量已经在初始磷酸化期间被贮存在应

变的蛋白质构象之中。但是，细胞内蛋白质构象的这种能量驱动的变化是怎样产生运动从而做有用功的呢？

蛋白质构象中能量驱动的变化可以做有用功²⁶

假定蛋白质需要沿着细丝例如微管或 DNA 分子“走动”。图 3-59 显示异构蛋白如何通过取不同的构型而可能做到这一点。由于驱动这些构象有规则地变化不要花什么力气，所以形状的变化是完全可逆的，蛋白质随机地沿着细丝或纤维来回徘徊。

因为定向的蛋白质运动做净功，所以热力学定律要求，它必须消耗来自某些其他来源的自由能（否则就能用它来制造永动机）。所以，不管我们怎样使图 3-59 的模型变化，例如加入有利于某些构象的配体，若不加入能源就不能使图示的蛋白质分子跑动。

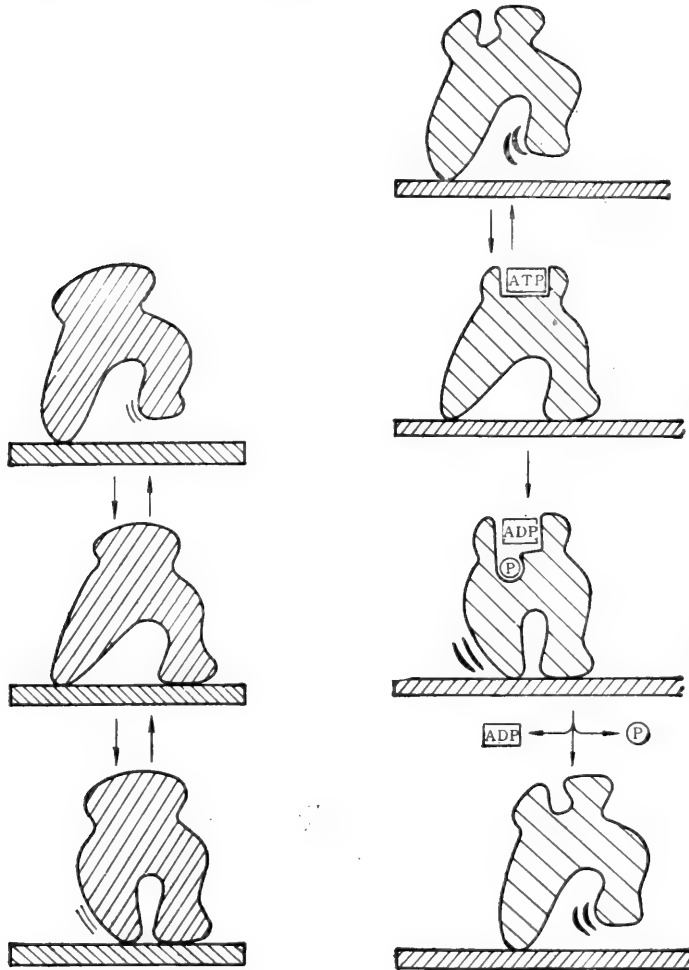


图 3-59 变构的“走动”蛋白质的示意图。虽然蛋白质的三种不同构象允许它在与纤维保持结合时，仍可随机地前后来回徘徊，但它始终不能朝一个方向移动。

图 3-60 一个“走动的”蛋白质。在这个蛋白质中，结合的 ATP 分子的水解驱动三种不同的构象作有序的转变。其中的一个转变与 ATP 的水解偶合，使循环基本上不可逆。结果，蛋白质始终沿着纤维向右移动。

现在所需要的是使一系列蛋白质构象发生单向变化的方法。例如，只要使其中任何一个步骤变成不可逆的，整个循环就只能朝着一个方向前进。做到这一点的一个方法是通过刚才讨论过的机制，即通过磷酸化-脱磷酸循环来驱动蛋白质分子的变构变化。然而，不涉及蛋白质磷酸化的 ATP 水解也可能驱动蛋白质的异构变化。例如，图 3-60 所示的修改的周期性走动图解中，ATP 结合把蛋白质从构象 1 “拉”成构象 2；然后，结合的 ATP

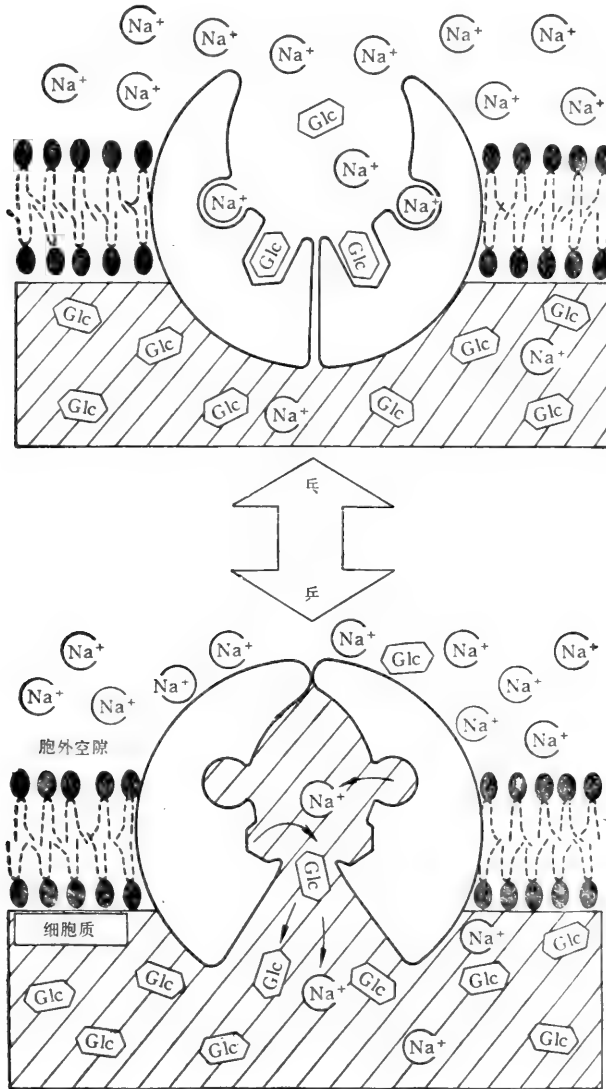


图 3-61 Na^+ 梯度驱动葡萄糖泵原理的示意图。泵在两种不同状态“ E_1 ”和“ E_2 ”之间随机振荡。在“ E_1 ”态时，蛋白质向胞外空间开放；在“ E_2 ”态时，它向细胞质开放。当 Na^+ 在两种状态下同等紧密地与蛋白质结合时， Na^+ 的结合便诱使蛋白质发生异构转变，以致大大提高其对葡萄糖的亲水性。因为 Na^+ 浓度在胞外空间比在细胞质内高，所以在“ E_1 ”态时，葡萄糖更有可能与泵结合；因而 Na^+ 和葡萄糖(Glc)进入细胞(通过 $\text{E}_1 \rightarrow \text{E}_2$ 转变)比它们离开细胞(通过 $\text{E}_2 \rightarrow \text{E}_1$ 转变)经常得多。结果，这系统把葡萄糖和 Na^+ 都带进了细胞。

水解,产生结合的 ADP 和 P_i ,把构象 2 推成构象 3;最后,结合的 ADP 和 P_i 的释放,驱动蛋白质再返回至构象 1。

因为 $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 1$ 的转变是由 ATP 水解的能量驱动的,所以这一系列转变在生理条件下是完全不可逆的(也就是说,ADP 与 P_i 通过 $1 \rightarrow 3 \rightarrow 2 \rightarrow 1$ 的途径而重新组合成 ATP 的可能性是极低的)。这意味着,整个循环只朝着一个方向前进,因而在这一示意的例子中,蛋白质分子连续不断地向右移动。以这种方式产生定向运动的蛋白质例子包括重要的肌蛋白,即肌球蛋白和 DNA 螺旋酶(在 DNA 复制中起着重要作用的蛋白质)。

大量不同的蛋白质机器运用相似的机制产生连贯的运动。所有这些蛋白质在它们水解 ATP 期间都有能力经受周期性的形态变化;有些蛋白质在此过程中暂时磷酸化,而有些蛋白质则不然。

ATP 驱动的和膜结合的变构蛋白可充当泵²⁷

异构蛋白除了产生机械力外,不能利用 ATP 水解的能量做其它形式的功,如把特定的离子抽进或抽出细胞。例如,存在于所有的动物细胞的质膜中的称为 Na^+-K^+ ATP 酶的变构蛋白在由 ATP 协调的磷酸化驱动的构象变化的每一周期内可以把 $3Na^+$ 抽出细胞和把 $2K^+$ 抽进细胞。ATP 驱动泵消耗大多数细胞的全部能量需求的 30% 以上,这一事实反映了 ATP 驱动泵的重要性。大量抽进抽出 K^+ 和 Na^+ 使细胞内的 Na^+ 浓度比细胞外的低, K^+ 浓度比细胞外的高,从而使质膜的两侧产生了两种相反的离子梯度。如我们现在就要讨论的,贮存在这些和其他离子梯度中的能量可进一步被用于驱动各种其他的膜结合变构蛋白的构象变化,使它们为细胞做有用功。

蛋白质分子可利用离子梯度做有用功²⁷

虽然 ATP 和其他的核苷三磷酸是极重要的,但是它们不是唯一容易获得的作有用功的能源。另一种重要的能源存在于各种细胞膜两侧的离子梯度之中,它们贮存和释放能量的方式类似于水坝两侧的水压差。例如, Na^+-K^+ ATP 酶产生的质膜两侧的大的 Na^+ 梯度,可用于驱动其他质膜结合蛋白质泵,把葡萄糖或氨基酸抽进细胞。

至今还不知道这种离子驱动力的蛋白质泵的工作细节(它们似乎无疑是复合物)。但是图 3-61 这幅简图说明,质膜结合蛋白构象的变化有可能被 Na^+ 梯度所驱动,使蛋白质把葡萄糖抽进细胞。

ATP 水解驱动力的膜结合变构泵也能逆向工作,运用离子梯度中的能量来合成 ATP。事实上,我们将在第九章中了解到,正是通过这样的机制,在线粒体内膜两侧 H^+ (质子)梯度中得到的能量可被用于合成动物界所利用的大多数 ATP。

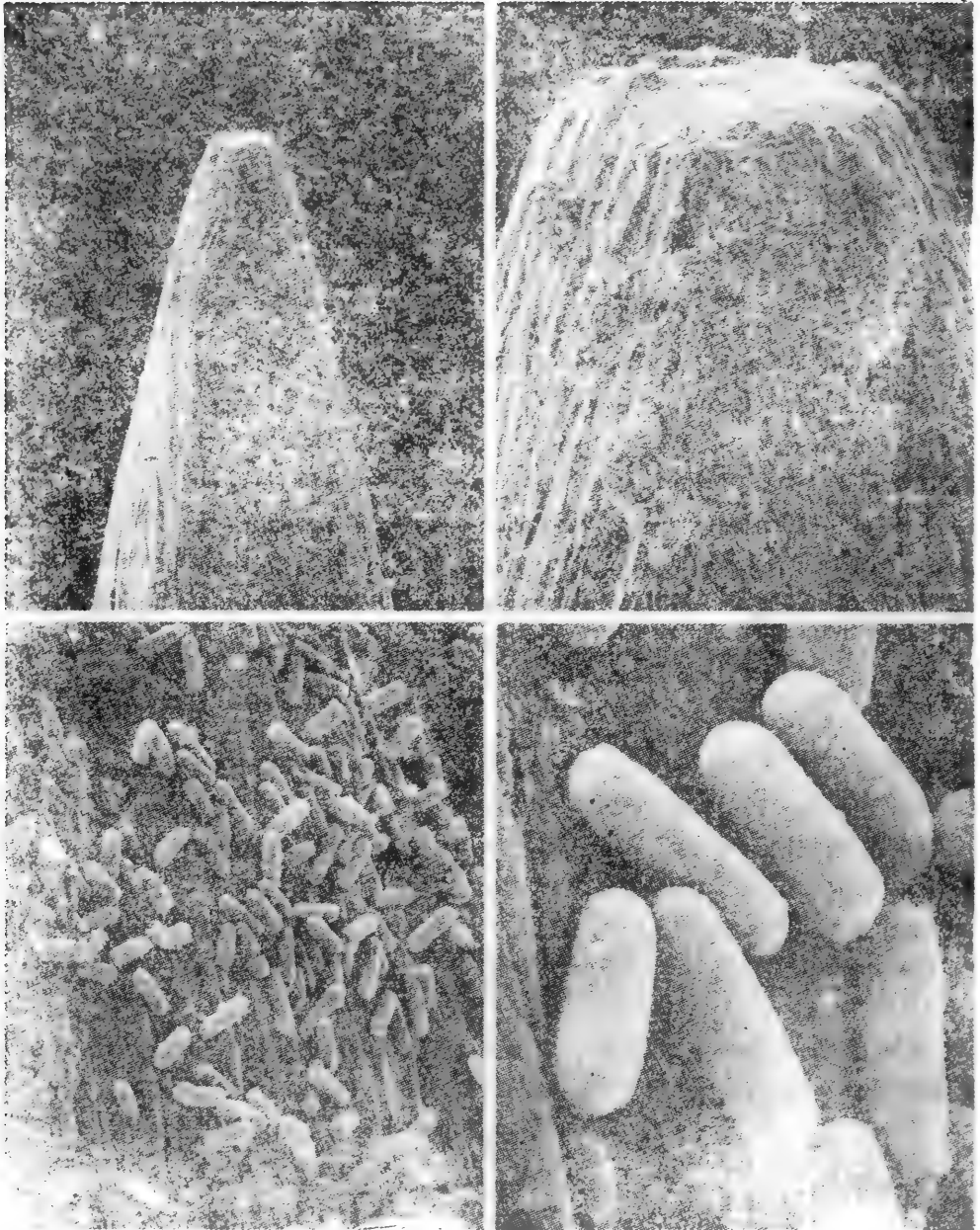
小结

蛋白质的生物功能取决于其表面的详细的化学特性。结合部位形成表面空穴,有精确位置的氨基酸链通过蛋白质折叠而聚集在空穴内。酶催化所结合底物分子的化学变化,它们常常运用小而紧密结合的辅酶分子扩展它们的反应范围。酶反应的速率常被扩散所限制,当酶和底物都局限在同一细胞区室内时,酶反应的速率便提高了。

当配体与变构蛋白的表面结合时,变构蛋白便可逆地改变它们的形状。一个配体产

生的变化可影响另一个配体的结合,从而提供了一种调节各种细胞过程的机制。这种蛋白质外形的变化常可通过消耗化学能而被单方向地驱动。例如,蛋白质可通过变构变化与ATP水解的偶合而做有用功——诸如产生一种机械力或把离子抽过膜。

【王顺德译 汪开治校】



对细菌大小的感性认识。这几张逐级放大的扫描电镜照片示普通针尖上的细菌细胞。
(Tony Brain 和科学杂志照片资料库赠)

第四章 如何研究细胞

细胞小而复杂,以致难以观察它们的结构,难以揭示它们的分子组成,并且更难发现细胞内各种成分如何发挥其功能。已经发展了大量各种各样的技术对细胞加以研究,而这些技术的有效性和局限性大体上决定了我们对细胞所持有的现代概念。细胞生物学中的大多数进展——包括近年来最令人振奋的进展,都是由于新方法的引进才获得的。因此要了解细胞生物学,就必须了解某些与之有关的实验技术。

本章我们将简要地论述现代细胞生物学最重要的研究方法,并阐明这些方法的原理和构成这些原理的基础。这些方法有很多将在后面的几章里提到,届时我们还要作更详细的讨论。

显微镜检术¹

一个典型的动物细胞的直径为 $10-20\ \mu\text{m}$,或者说比肉眼可见的最小微粒还要小 $4/5$ 。因此,直到 19 世纪初叶应用精良的光学显微镜才发现动植物组织是单个细胞的集合体。1835 年 Schleiden 和 Schwann 据以提出“细胞学说”的这一发现标志着细胞生物学的正式诞生。

动物细胞不仅很小,而且它们还是无色和透明的;因此,只有在 19 世纪末叶发展出能提供充分反差而使细胞可见的各种染色方法,才可能发现细胞的精细结构和较大的内部细胞器。终于,在 19 世纪 40 年代初,由于电子显微镜以及细胞保存和染色的综合技术的发展,细胞内部结构的高度复杂性才被揭示出来。

图 4-1 比较了现代光学显微镜和电子显微镜的分辨范围。在这些显微镜下,细胞的外形及其内含物,取决于光和电子的特性以及细胞对不同染色和制备过程的反应性。这些问题要在以后的几节里讨论。

光学显微镜可分辨间距为 $0.2\mu\text{m}$ 的细节²

一般来说,一定波长的射线不能用来探测比它自己波长小得多的结构细节。这是所有显微镜的主要局限性。因此光学显微镜分辨的最大极限决定于光的波长。根据光的颜色不同波长的范围大约是从 $0.4\mu\text{m}$ 到 $0.7\mu\text{m}$ 。在实际应用中,大小为 $500\ \text{nm}(0.5\mu\text{m})$ 的细菌和线粒体就是在光学显微镜下能清晰看到的最小物体了,比这更小物体的细节由于光衍射作用而不能分辨。要了解其原因,我们就必须查明一束光波通过显微镜的透镜时发生了什么现象。

光衍射是由于以微小差别的光路通过一个光学系统的波间的干涉而引起的。如果两列波恰好同相,波峰对波峰,波谷对波谷,它们就会互相增强而使亮度增加。相反,如果两列波异相,它们就会相互干涉,以致相互抵消(图4-2)。光与物体间的相互作用会改变光波

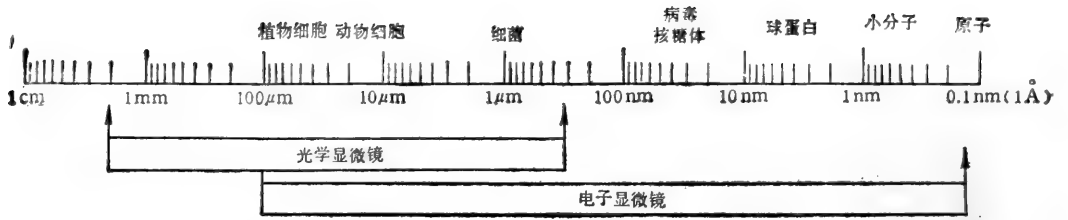


图 4-1 画在对数标尺上的细胞和它们的成分的大小，同时标出光学显微镜和电子显微镜的应用范围。下列长度单位通常用于显微镜检术：

$$\mu\text{m}(\text{微米})=10^{-6}\text{m} \quad \text{nm}(\text{毫微米})=10^{-9}\text{m} \quad \text{Å}(\text{埃})=10^{-10}\text{m}$$

间相的关系，并且会产生这种干涉作用。例如，用相同波长的光照射的一条直边的影像被高倍地放大便是一组平行线，而一个圆点就好像一组同心圆(图4-3)。同样道理，通过显微镜

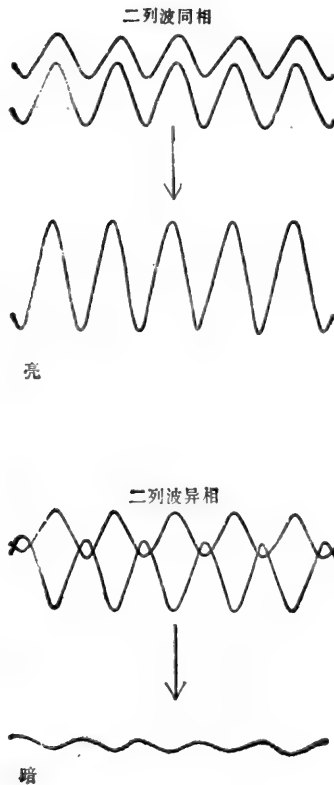


图 4-2 光波间的干涉。当二列光波同相叠加时所形成波的振幅增大，亮度增加。二列异相的光波相互抵消，所产生波的振幅和亮度减小。

看到的单个点就像一个模糊的圆盘。这样两个紧靠在一起的物体小点的图像就会相互重叠，合并成一个图像。透镜的改善并未能克服光的波相所造成的局限性。因此，就可见光而言，能清楚地看到两个物体的极限分辨能力，也就是所谓分辨极限，为 $0.2\mu\text{m}$ 。这是 19 世纪末叶显微镜制造者所能达到的极限，现代工厂制造的显微镜也不过如此。尽管有可能按需要将图像放大，例如，将图像投影到屏幕上，但也决不可能在光学显微镜下看清比 $0.2\mu\text{m}$ 更细微的物体。



图 4-3 当光通过放在光源和观察者之间的一个固体物的边缘时所观察到的被高度放大的干涉效应

衍射对细胞的研究并非总是起阻碍作用的，相反，以后我们将会看到由衍射引起的干涉是怎样被用来在显微镜下对活细胞进行研究，怎样用于发现生物结构中有规律的周期

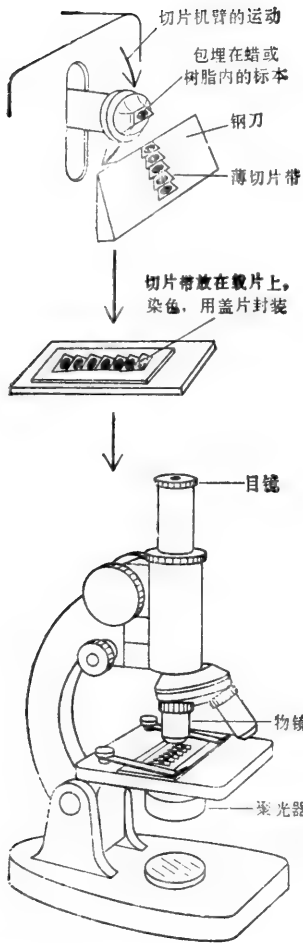


图4-4 示意图表示一块包埋的组织如何用切片机制片,以备在光学显微镜下观察。

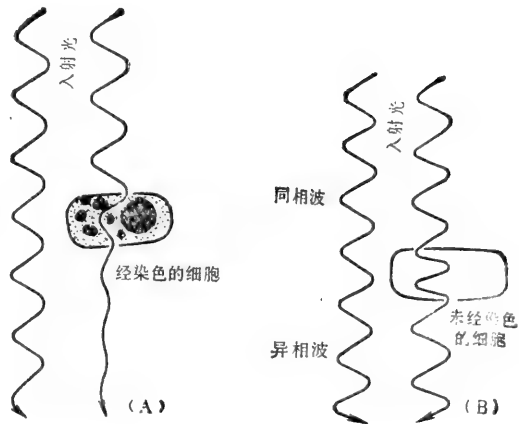


图 4-5 细胞 (A) 的着色部分使得透过它的特定波长光波的振幅降低。因此可以直接观察到细胞的有色图像。透过未染色的活细胞 (B) 的光, 振幅不发生显著的改变, 因此很多细节不能直接地被看到。但是发生在光线相上的变化在相差和分光干涉显微镜下就可用来产生出一个反差显著的像。

性特征。但是首先我们要讨论增大细胞能见度的化学染色法的应用。

细胞的不同成分可被选择地染色^{1,3}

大多数细胞(重量的 70% 是水)中只有很少的内含物是不透光的。因此大多数未经处理的细胞在普通光学显微镜下几乎是看不见的。使细胞成为可见的一种方法是用选择性的有机染料把细胞染色。

19 世纪初叶对纺织品染料的需求迎来了有机化学的兴盛时期。有些染料被发现可用于生物组织的染色, 并出乎意料地还经常表现出对细胞的一些特殊部位——核或膜——的染色具有选择性, 使得细胞的内部结构被看得清楚得多了。今天已有丰富多样的有机染料被应用, 其富有色彩的名称诸如孔雀绿 (Malachite green)、苏丹黑 (Sudan black) 和考马斯蓝 (Coomassie blue), 其中每一种染料对特殊的亚细胞成分都具有某些特异的

亲和力。例如苏木精(hematoxylin)染料对带负电性的分子具有亲和力,因此能显示出细胞内 DNA 和 RNA 的分布状况。但是有许多染料的特异性的化学基础还未搞清。

最近,已使用了比有机染料更特异的染色剂。例如,将酶与底物分子接触,那么就会

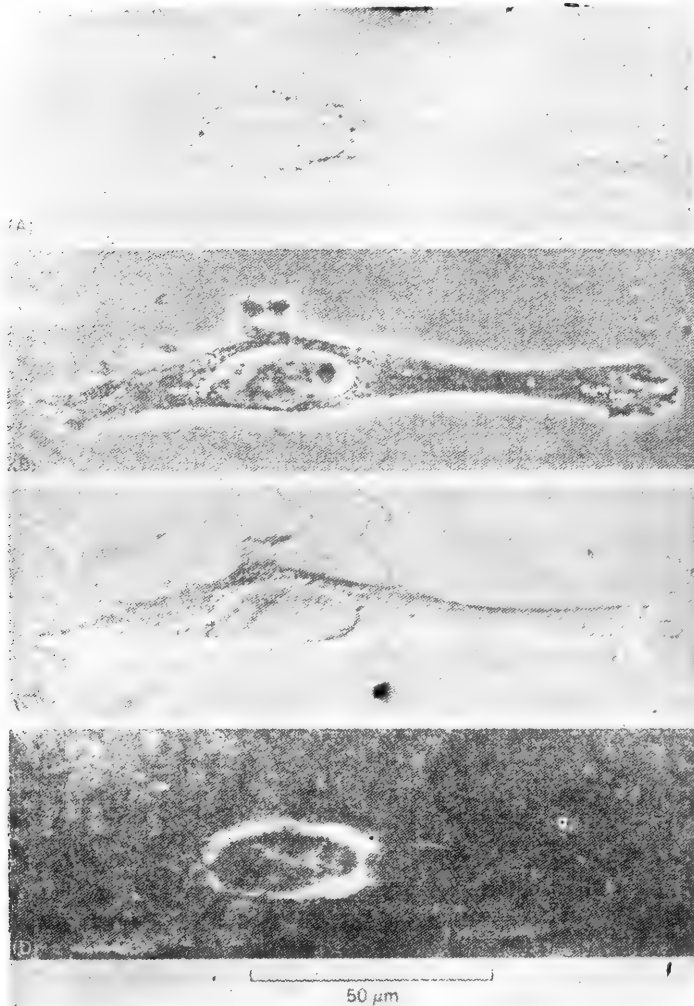


图 4-6 用四种不同类型的光学显微镜看到的在组织培养中的成纤维细胞。(A)像是光线直接透过细胞即明视野显微镜技术得到的。其他的几个像是由书中所讨论的几种技术分别得到的,(B)相差显微镜检术,(C) Nomarski 分光-干涉-相差显微镜检术,(D)暗视野显微镜检术。大多数的现代化显微镜都只要调换光学部件就能得到这四种像。

在底物与某一特殊酶反应处产生一个定位的可见产物,借此可以对细胞内的一些酶定位。针对一些特殊大分子的抗体可用来与这种酶共价偶联,或与荧光染料结合,然后用于标出细胞内这种大分子的分布。

用于显微镜观察的组织通常经过固定和切片

大多数的生物组织在染色前必须先固定。固定使得染料可以透入细胞,使得细胞中的大分子交联而变得稳定,并固着在一定的位置上。某些早期的固定方法是将材料短期

浸入酸或是像甲醇那样的有机溶剂中。但现在的固定方法往往是将细胞放置在活性的醛类内，特别是甲醛和戊二醛内。后二者会与蛋白质的自由氨基形成共价键，因此将邻近的分子联在一起。

固定和染色并不是显微镜检者所使用的唯一制片步骤。大部分组织都太厚了，以致于它们的细胞不能被高分辨地直接观察。因此，这些组织首先要切成薄片(切片)，然后将每一切片放在载玻片的表面。切片是由一种操作起来像切肉机那样的称为切片机的机器切出来的。适用于光学显微镜观察的切片的标准厚度为 $1-10\ \mu\text{m}$ ，这是用锋利的金属刀切成的(图 4-4)。

组织一般太软，不能直接切成薄片，因此在固定之后往往将组织包埋在液态的石蜡或塑性树脂内，使之渗入并包围住整块组织。包埋介质以后硬化(通过冷却或聚合)成一个固体小块，这样就可用于切片机切片了。

显然存在这样一种严重的危险，即作任何固定的处理都可能使细胞的结构变形。采用另一种制片方法可以减少这种危险性，就是不需固定或包埋的快速冷冻法。冷冻的组织可以直接用一种特殊的，装置在冷室的切片机(称为冰冻切片机，cryostat)切片。尽管以这种方法制出的冷冻切片具有保持组织更接近原来形状的优点，但是制作起来困难，而且冰晶体的存在会使许多形态上的细节结构丢失。

活细胞可以在相差或分光-干涉-相差显微镜下观察²

在固定或染色的过程中，使细胞的一些成分丧失或变形的可能性一直使显微镜检者感到困扰。利用多种技术观察细胞可以获得可靠的保证：假如用这些不同的技术都得到同样的图像，那么这个图像多半是代表了细胞的真正结构，而不是人为产物。

确定存在于活细胞内的一个结构的最可靠的方法就是在这些细胞活着时用显微镜观察，而不作预先的固定或染色。这就需要设计一些能利用细胞的衍射特性的特殊光学系统。当光线透过一个活细胞时，光波的相发生变化：光线透过细胞的一个相对较厚或较致密的部分(例如核)，会被延阻，结果该光线相对于透过邻接的较薄的细胞质区域的光线来说，相位发生了改变。相差显微镜和分光干涉显微镜都是利用两列光波重合时所产生的干涉效应的。使用这种显微镜，一个活细胞的许多细节才能清楚地观察到(图 4-5和图 4-6)。

利用由不同细胞成分发出的散射光是观察未染色细胞细节结构的一个较简单的方法。在暗视野显微镜下，照明的光线是从旁边进入的，因此只有散射光能进入显微镜的透镜。这样细胞就成了衬在黑暗背景上的一个被照明的物体。同样的安排能用来探测标本中的荧光。关于荧光显微镜技术的应用，我们将在以后讨论。同一细胞用四种不同的光学显微镜得到的像如图 4-6 所示。

这几种显微镜的最大优点之一就是它们能观察细胞的活动，研究参与诸如有丝分裂和细胞迁移过程中的运动。因为许多细胞运动之慢使得在实际时间上看不出来，所以用缩时电影(显微电影摄影术)或电视录像就很有帮助。这样，时间间隔很短的连续图像被记录下来，当影片或电视录像带以正常速度放映时，这些情节就似乎被大大加快了。这种方法可以确定细胞及其细胞器运动的精确方式和速率。

光学显微镜检术发展史上的里程碑列于表 4-1。

表 4-1 光学显微镜发展史上的一些重要发现

1611	Kepler 提出制作复式显微镜的一个方法。
1655	Hooke 用复式显微镜描述软木切片上的小孔,并将它们称为“细胞”。
1674	Leenwenhoek 报道了原生动物的发现。9年以后他首次发现了细菌。
1833	Brown 发表了他对兰花的显微镜观察,清楚地描述了细胞核。
1835	Schleiden 和 Schwann 提出了细胞学说,指出有核细胞是动物和植物结构与功能的单位。
1857	Kolliker 描述了肌肉细胞中的线粒体。
1876	Abbe 分析了衍射对显微镜成像的作用,并提供了如何制作显微镜的最佳设计。
1879	Flemming 十分清楚地描述了动物细胞中染色体在有丝分裂中的行为。
1881	Retzius 描述了许多动物组织,其详细程度至今还没有任何其他的光学显微镜专家能超过他。在以后20年中,Retzius, Cajal 和其他组织学家发明了染色法并奠定了显微解剖学的基础。
1882	Koch 用苯胺染料对微生物染色,鉴定了引起肺结核和霍乱的细菌。在以后的20年里,其他的细菌学家,如 Klebs 和巴斯德(Pasteur)利用显微镜观察经染色后的材料,鉴定了许多其他疾病的病原体。
1886	Zeiss 按艾伯的设计制作了一系列的透镜,使得显微镜学家能在可见光的理论极限上分辨细胞的结构。
1898	高尔基(Golgi)用硝酸银染色细胞,首次发现和描述了高尔基器。
1924	Lacassagne 和他的同事们首次发明了生物标本中的放射性钋定位的放射自显影方法。
1930	Lebedeff 设计和制造了第一台干涉显微镜。1932年 Zernike 发明了相差显微镜。这两项发展使得未染色的活细胞首次被详细观察。
1941	Coons 用抗体结合荧光染料检测细胞抗原。
1952	Nomarski 设计了光学显微镜的分光干涉相差系统,并取得专利,该系统现仍以他的名字命名。

电子显微镜分辨细胞的精细结构¹⁴

用电子代替光可降低由可见光造成的分辨极限,这是因为电子的波长要短得多。电子运动得越快,电子的波长就越短:以十万伏特加速的电子显微镜其电子波长为 0.004

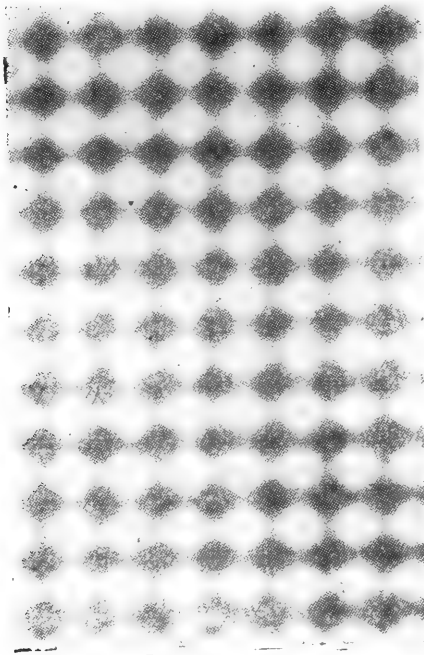


图4-7 金箔的电镜照片。亮点显示的是单个金原子。邻接金原子间的距离大约为 0.2nm(2Å)。(Graham Hills赠)

nm。在理论上这样的电子显微镜的分辨率应为 0.002 nm;但是由于电子透镜的像差要比玻璃透镜的像差大得多,现代电子显微镜的实际分辨能力最好的也不过是 0.1 nm(1Å)(图 4-7),并且由于标本制备方面的问题,反差和辐射的损坏使得电子显微镜对生物标本的分辨率被限制在大约 2 nm(20Å)。不过这已经比光学显微镜的分辨率高出 100 倍了。

透射电子显微镜(TEM)在整体设计上和光学显微镜没什么大的不同,只是比光镜更大些,而且是倒置的(图4-8)。照明源是一根电极丝,或者说阴极,装在 2m 高的一个筒形圆柱体的顶端,发射出电子。如果要形成线性的电子束,首先要将筒内的空气抽出,造成真空。从电极丝发射的电子由邻近的阳极加速,通过一个微孔形成电子束穿过圆筒。磁线圈装在圆筒的间隙使电子束聚焦,就像在光学

显微镜里玻璃透镜将光线聚焦一样。标本通过一个气闸 (air lock) 送入真空,然后放置在聚焦的电子束下。按照物质局部的密度,有些电子穿过标本时被散射,其余的电子就聚焦在照相底片上或磷光屏幕上成像,其方式与光学显微镜的成像相类似。由于散射的电子从像中失去了,标本的致密部分表现为电子流减少的区域。

用于电子显微镜的生物标本需作特殊制备^{4,5}

电子显微镜开始用于研究生物材料时,发现了许多以往未曾想像到的细胞结构。但是为了研究生物标本,电子显微镜专家还必须发展新的包埋、切片和组织染色方法。

标本的制备发生过各种问题。既然组织放置于高度真空中,那么标本在制备的某一

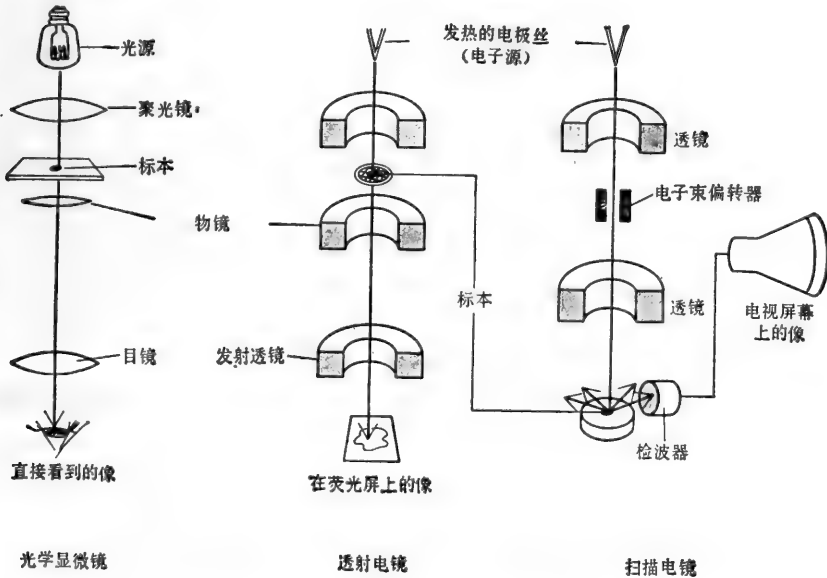


图 4-8 示意图表示光学显微镜、透射电镜和扫描电镜的主要特征,强调这些显微镜在整体设计上的相似点。两种电镜要求标本放在真空内。

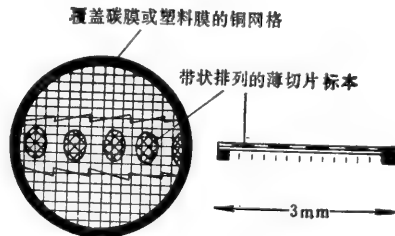
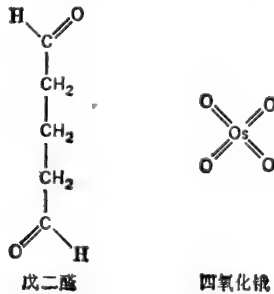


图 4-10 在透射电镜中,铜网用来托住薄片标本的示意图。

图 4-9 戊二醛和四氧化锇是电镜标本的常用固定剂。戊二醛的二个活性醛基能与各种不同类型的分子交联在一起,形成共价键,并置换出黑体表示的氢原子。四氧化锇的四个氧可被许多有机化合物还原,并形成交联复合物。这对于细胞膜特别有效,因为它可与存在于脂肪酸中的 C=C 双键反应。

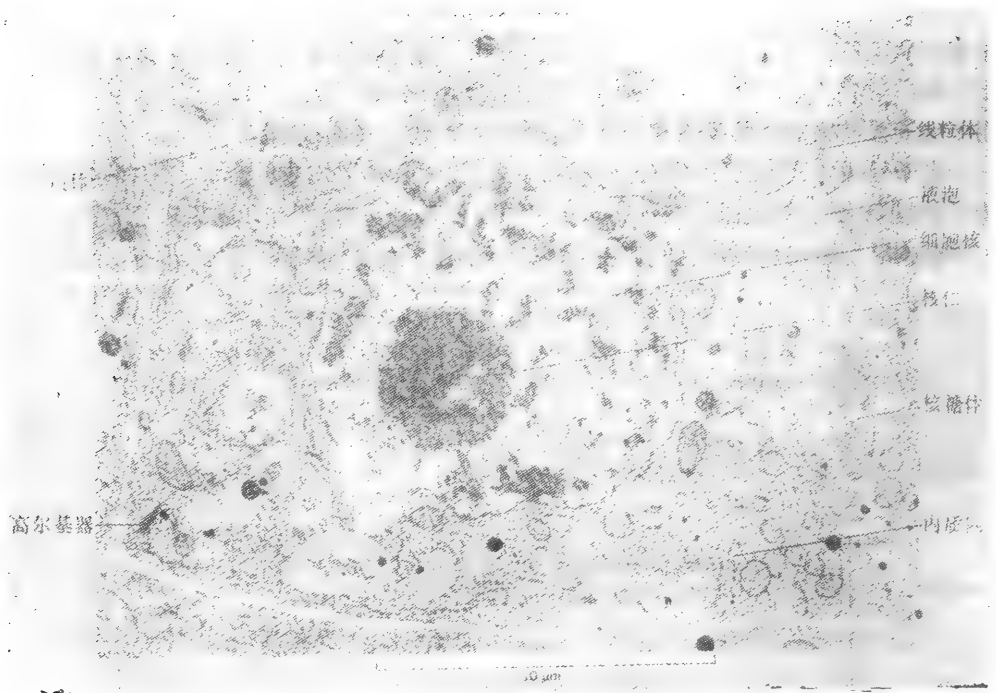


图 4-11 草根尖细胞的切片。很容易看到细胞壁、核、液泡、线粒体、内质网、高尔基器和核糖体。
(Brian Gunning 赠)

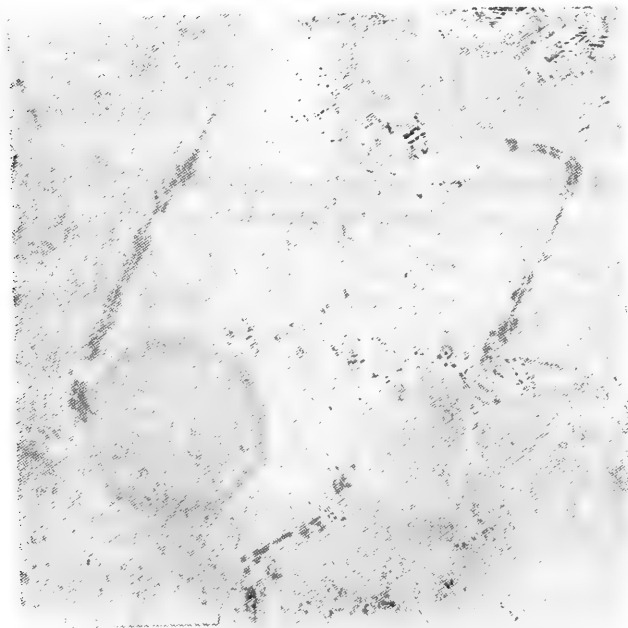


图 4-12 细胞的电镜照片表示在高尔基器内一个特殊酶（硫胺焦磷酸酶）的定位。细胞薄片与底物温育，酶与底物反应处形成一电子密集的沉淀物。(Daniel Friend 赠)

阶段必须加以干燥。为了避免因干燥而引起的变形，湿的组织一般用双功能的交联剂戊二醛(它能与邻近的蛋白质分子共价偶联)和钨酸(它能结合和稳定脂双层膜及组织蛋白)的混合物固定(图 4-9)。

因为电子的穿透力有限，所以组织必须制成 50 至 100 nm 厚的切片(大约一个细胞厚度的 1/200)。为了切出这样的薄片，组织必须先用单体树脂浸透，再聚合成塑胶的固体块，在特制的切片机上用锐利的玻璃或钻石刀切片，然后放在一个圆形的小金属网格上(图 4-10)。

电子显微镜中的反差取决于标本中原子序数的序数：原子序数越高，散射的电子就越多，反差也就越大。生物分子是由序数很低的原子组成的(主要是碳、氧和氢)。为了使它们看得见，生物材料的薄切片就要放入重金属盐内染色，例如放入铀和铅的盐内。按照被这些盐浸透的程度，不同的细胞成分会表现出不同程度的反差。例如脂质倾向于染得黑一点，这样就显示出细胞膜所在的部位(图 4-11)。

有时候，特殊的大分子可以在细胞的切片内作特殊标记。例如，将切片在底物内培养，酶与底物的反应会造成一个局部的电子密集的沉淀物的沉积，这样就可以对一些酶定

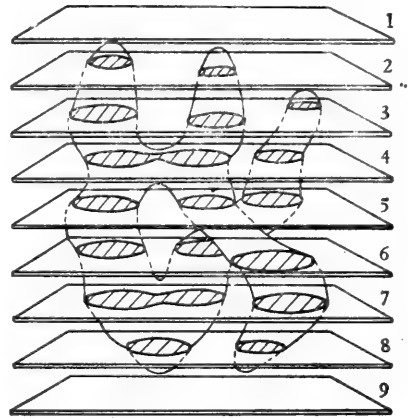


图4-13 示意图表明单张的薄切片有时怎样给人以错误的印象。在这个例子中，大多数通过含有一个分叉线粒体的细胞的切片将表现出含有两个或三个分离的线粒体。而且切片 4 至 7 可以解释为一个线粒体正处于分裂过程中。但从连续的切片可以重建真实的三维形状。

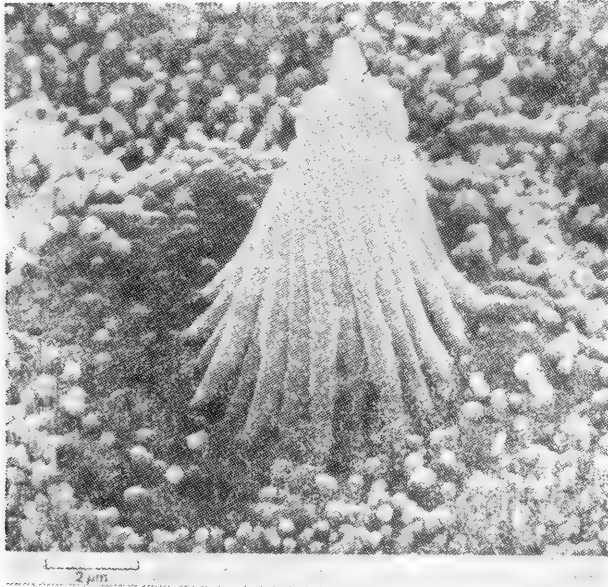


图 4-14 从内耳毛细胞表面伸出的呈风琴管样排列的静纤毛的扫描电镜照片 (R. Jacobs 和 A. J. Hudspeth 赠)

位(图 4-12)。也可将抗体结合到这些酶上,或者结合到电子密集分子上(例如含铁的铁蛋白),即可用于定位抗体所识别的大分子物。

三维像可通过电子显微镜技术获得⁶

薄切片实际上是组织的二维切片,不能表达细胞成分的三维排列。尽管在原则上可以从成百上千张的连续切片重组成立体图形,但这是一个乏味而冗长的制作过程(图 4-13)。

幸好,还有更直接的方法可得到三维像。用扫描电镜(SEM)来观察标本就是方法之一。在扫描电镜中,电子束从标本的表面被反射,而不是像透射电子显微镜那样透过标本。观察的标本经固定,干燥后镀上一薄层在真空中蒸发的重金属——该过程被称为投影(shadowing)。在 SEM(它一般比透射电子显微镜小,装备更简单一些)中标本被聚焦的电子束扫描:当电子束击中标本时,会从金属表面产生二次级电子,二次级电子被检测,并在电视屏幕上转换成像。由于散射的电子数量取决于电子束与表面的相对角度,图像就会出现亮点和黑影,这就形成了标本的三维形状(图 4-14)。

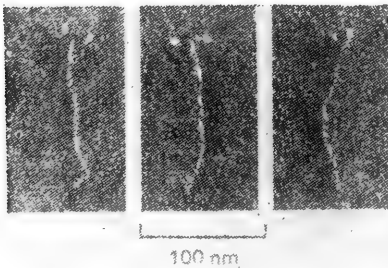


图4-15 用铂投影的单个肌球蛋白分子的电镜照片,肌球蛋白是肌肉收缩装置的主要成分。(Arthur Elliot 赠)

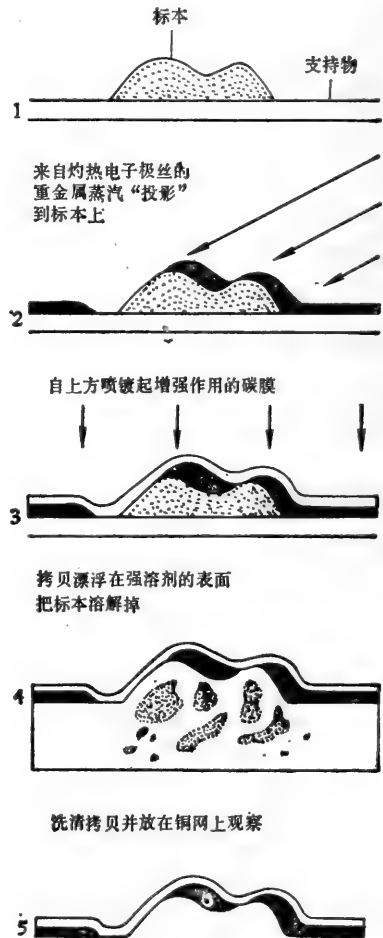


图4-16 示意图表示一个标本表面的金属投影拷贝是怎样制备的。注意,金属的厚度反映了原来标本的表面轮廓。

大多数型号的 SEM 能达到的分辨率不是很高的(大约 10nm,有效放大倍数为 2 万倍):因此该技术主要用于观察大小在完整的单个细胞与小生物之间的材料。

在一定限度内使标本在电子束中倾斜并从两个不同角度摄影,从常规的薄切片能取得三维像。当最后得到的一对显微摄影底片通过立体镜观察时,标本就形成了三维图像。以这种方法所能观察到的标本的深度,取决于电子的穿透力,也就是电子的能量。因此建

造了高压电子显微镜,以一百万伏特,而非十万伏使电子加速高压电镜可观察厚达1微米的切片。

冰冻断裂和冰冻蚀刻电子显微镜检术提供了新的细胞图像⁷

在干燥的标本上蒸发上一层重金属(如铂)的薄膜(即所谓投影),不仅可用于扫描电镜,而且也可用于透射电镜观察某些标本。有些标本非常薄或非常小,在投影之后,电子束能直接穿透过去;单个的分子,病毒和细胞壁就是例子(图4-15)。但是其他的标本太厚了;因此投影之后,一定要把有机物质溶解出来,这样就只剩下该标本表面的薄金属拷贝了。拷贝再用碳膜增强,这样标本就可以放在网格上在电镜下观察了。因为金属从一个角度喷镀在标本上,有些地方的金属膜就会比另一些地方的厚一些(图4-16)。结果产生投影效应,得到了一个三维的像。

另一种拷贝方法是特别有用的。其方法之一是冰冻断裂电子显微镜检术,它是唯一能看到细胞膜内部的方法。细胞加防冻剂在液氮(-196℃)中冷冻,以免冰晶形成引起变形,然后冻块用刀锋切开。断裂面经常通过脂双层膜的疏水中间层,因此将细胞膜的内部

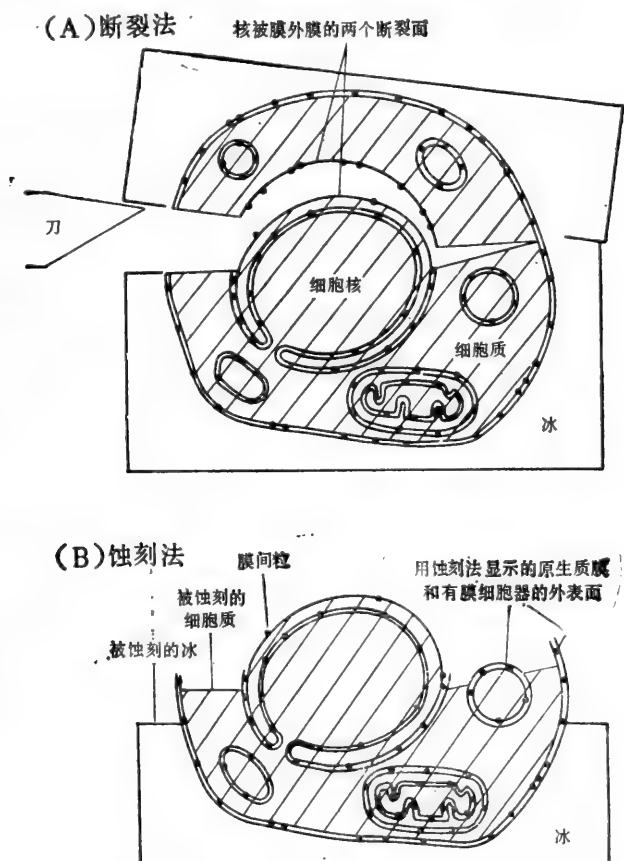


图4-17 在电镜冰冻断裂法(A)中,冰冻的标本用刀剖开。如图示断裂面常会通过脂双层膜的中间。在冰冻蚀刻法(B)中,标本首先如(A)剖开,然后在真空中使水升华的方法降低冰面,这样就暴露出了细胞的一部分外表面。随后就制备冰冻表面的拷贝(如图4-16所描述),置于透射电镜下观察。

暴露出来(图 4-17)。形成的断裂面用铂投影,有机物质溶解掉,拷贝漂浮出来,放在电镜下观察。这样拷贝上发现有小颗粒散布着(称为膜间粒),据推测它们主要是由被横切的脂双层膜的蛋白质大分子组成的(图4-18)。这一技术首次证明在细胞相互接触处的许多

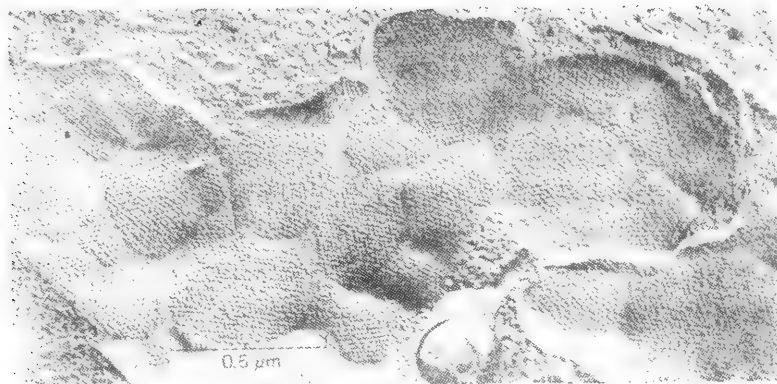


图 4-18 大鼠膀胱的一个上皮细胞质膜的冰冻断裂电镜照片。断裂面通过脂双层膜的中间,暴露出被认为是大的脂蛋白的膜间粒的规则排列。尽管在所有的质膜里都能看到膜内颗粒,但很少像这些细胞里这样密集。(N. J. Severs 赠)

胞间连接是由特化的膜蛋白有组织的排列构成的。

相似的冰冻蚀刻电子显微镜检术有可能观察细胞的外表面和它们的膜的外表面(而不是膜的内表面)。在这个技术中,细胞再次在液氮温度中冷冻,然后冻块用刀锋切开,随后在真空中提高温度使冰升华,这样细胞周围的冰面下降(细胞内下降的程度要小一些),该过程称为冷冻干燥(图4-17)。细胞用蚀刻法暴露出来的部分再如常规的电镜冰冻断裂法那样做成铂拷贝。

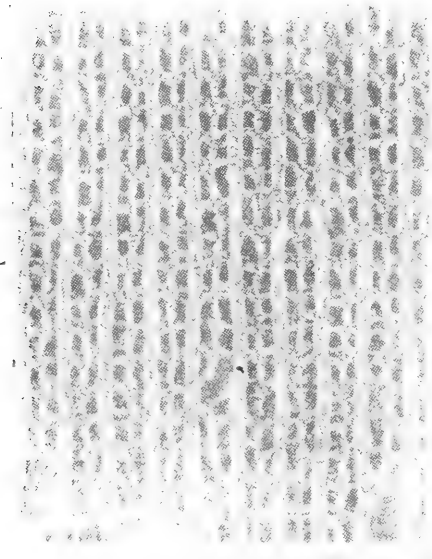


图4-19 昆虫肌肉里蛋白质丝的规则排列。为了得到这个像,肌肉细胞要在液氮中迅速冷冻,断裂通过细胞质,进行深度蚀刻,然后制成金属拷贝,高倍放大后观察。(Roger Cook 和 John Henser 赠)

在冰冻蚀刻法中不需要用防冻剂,因为防冻剂是不挥发的,当冰升华时就会留在标本的背面。因此冰晶的形成一直大大限制了该方法的分辨率。现在用标本极迅速地冷冻(冷冻速率大于 $20^{\circ}\text{C}/\text{msec}$)来改进该方法,从而阻止了大冰晶的形成。这种快速冷冻是将细胞标本一下子投在用 -269°C 的液氮冷冻的铜块上达到的。假如冷冻的细胞以后再加以彻底的冷冻干燥,那么就会取得特别明显的效果。这种深度蚀刻法揭示了细胞内部的结构。例如,它可以将肌肉细胞的各种蛋白质丝成为硬化的浮雕,使它们的结构看得格外清楚(图 4-19)。

电镜能分辨单个大分子

在理想条件下,现代电镜能分辨间距在 $1-2 \text{ \AA}$ 的结构。虽则在实用上镜检生物标

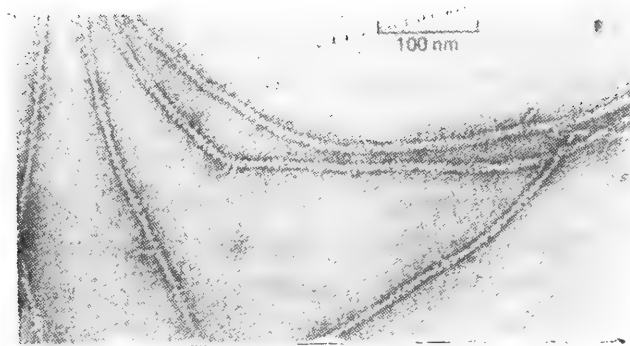


图 4-20 肌动蛋白丝负染色法的电镜照片。可见到每根丝的直径约 6 nm, 近看, 可见每一条肌动蛋白丝是由两条螺旋状肌动球蛋白链组成。(Roger Craig 赠)

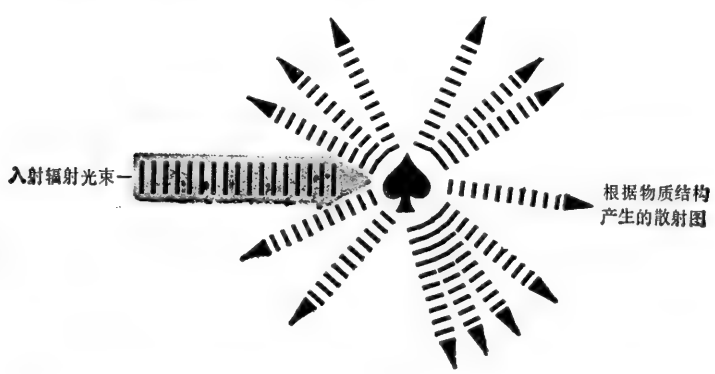


图 4-21 由直径与辐射波长相似的单个物体产生的散射。辐射落到物体上以不同的方向和不同的强度产生散射。某一方向散射光束的强度取决于从一个物体的某一部分产生的散射和另一部分产生的散射发生干涉的方式。图中在各种可能方向的散射强度用从物体发出的箭头的密度表示。

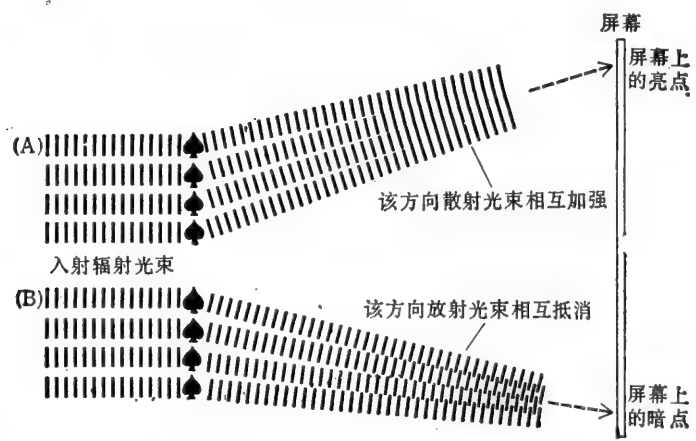


图 4-22 晶体辐射的散射。当许多相同的物体以晶格排列时, 每一物体产生的散射均与另一物体产生的散射发生干涉。只有在一定方向(根据物体在排列中的空间隔)散射光束相互加强, 在排列的衍射图谱上产生亮点。某个亮点的强度取决于排列中每一个物体如图 4-21 作单独观察时在这个方向散射的强度。

本很少能达到这样的分辨率,不过,在观察分离出的大分子(DNA 或大的蛋白质)时,就非常接近这一分辨率,这是常规的很有价值的观察法。为了造成必要的反差,要把分离出的大分子吸附到一个碳包被的网格上并用重金属(如铂、钨或金)作投影(见图 4-15)。

用负染色法可以把大分子观察得更详尽。这种方法是将大分子放到有碳膜的网格上沥干,再用高浓度的重金属盐(如醋酸铀)溶液洗涤。当样品干燥后,除了大分子所在处,整个网格就覆盖上了一层很薄的重金属膜。由于大分子比周围重金属覆盖处更易让电子通过,这样就产生了一个反的,或者说负的像。负染色法特别适用于观察大分子的聚合体,如病毒、核糖体、均一的纤维或重复亚基的平面薄片(图 4-20)。

晶状排列的分子的微细结构可以从衍射图来推测

即使是经过染色加工的单个分子只能产生一个微弱的,模糊不清的像。想通过延长观察的时间或者增强照明光束来获得更佳信息的努力是注定要失败的,因为这会使被观察的物体损坏和分解。为了发现分子结构的细节,必须将来自许多分子的信息综合起来以消除单个像的随机误差。这对于以规则晶状排列的物质是可能的,这类物质中大量的

分子是同向的,并且规则地排布在空间位置上。为获得所需信息的标准技术依赖于衍射。

首先考虑将单个物体(例如单个分子)放入任何一种射线之中,其波长小于该物体的大小。物体会使一部分辐射光发生散射。经散射后的辐射光可以认为由一组重叠的波组成,每列波都是由物体的一个不同的部位发出的。当这些波重叠时,它们就发生干涉,产生出一个辐射的分布,即为衍射图谱。衍射图谱可用放在离物体一定距离的屏幕上描记下来,并可根据物体从不同方向发生的衍射量来记述(图4-21)。物质的结构决定了衍射图谱的式样。反过来,在理论上从一个给定的衍射图谱的完整描述就能推测产生

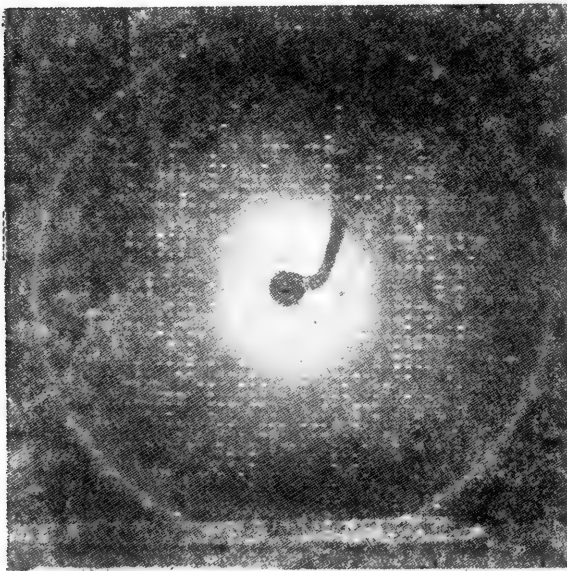


图 4-23 蛋白质晶体的部分 X 射线衍射图谱。这一特殊的晶体有助于确定蛋白水解酶(胰蛋白酶)的原子结构。(Robert stroud 赠)

该图谱的物质的结构。实际上,单分子的衍射图谱太弱太不稳定而不能用于此种目的。

现在假定有许多相同的物体按晶格排列,并且又用辐射光束照明(图 4-22)。每一物体产生的散射均与另一物体产生的散射发生干涉。根据物体排列的间隔,仅在某些方向各散射光束增强,在衍射图谱上产生一个亮点。因此晶体排列的完整衍射图谱将由许多不同强度的分离的亮点组成(图 4-23)。

衍射图谱中各个亮点的相对强度取决于排列中各物体的散射特性。事实上,某个亮点的强度与从一个代表它的单独物体在同一方向产生散射的平均强度是成比例的。因此

在衍射图谱中光点的位置取决于晶格排列中物体的安排方式，而光点的强度则给出了一个表示单个物体内部结构的信息。而且这信息既精确又丰富，因为它是从大量相同的信息来源加以综合而成的。实际上，根据晶体排列衍射图谱的完整描记常可推测由之组成的各物体的结构，正如我们将看到的那样。

根据衍射重建图像的技术能从电镜照片取得额外的信息⁸

原则上从一个衍射图谱为重建一个图像，可以用任何一种辐射光进行，只要它的波长适合于对该物体的观察。图 4-24 表示如何用该方法从一张晶体排列分子的显然模糊的电镜照片来推出分子结构较详细的信息。电镜照片(不是分子排列本身)被放入激光束的通路上，从光学衍射图谱可以重建呈晶体排列的代表单个分子的像。除此之外，我们可以更方便地不用光束而改用计算机对来自电镜照片的衍射图谱作计算。然后，由计算机处理

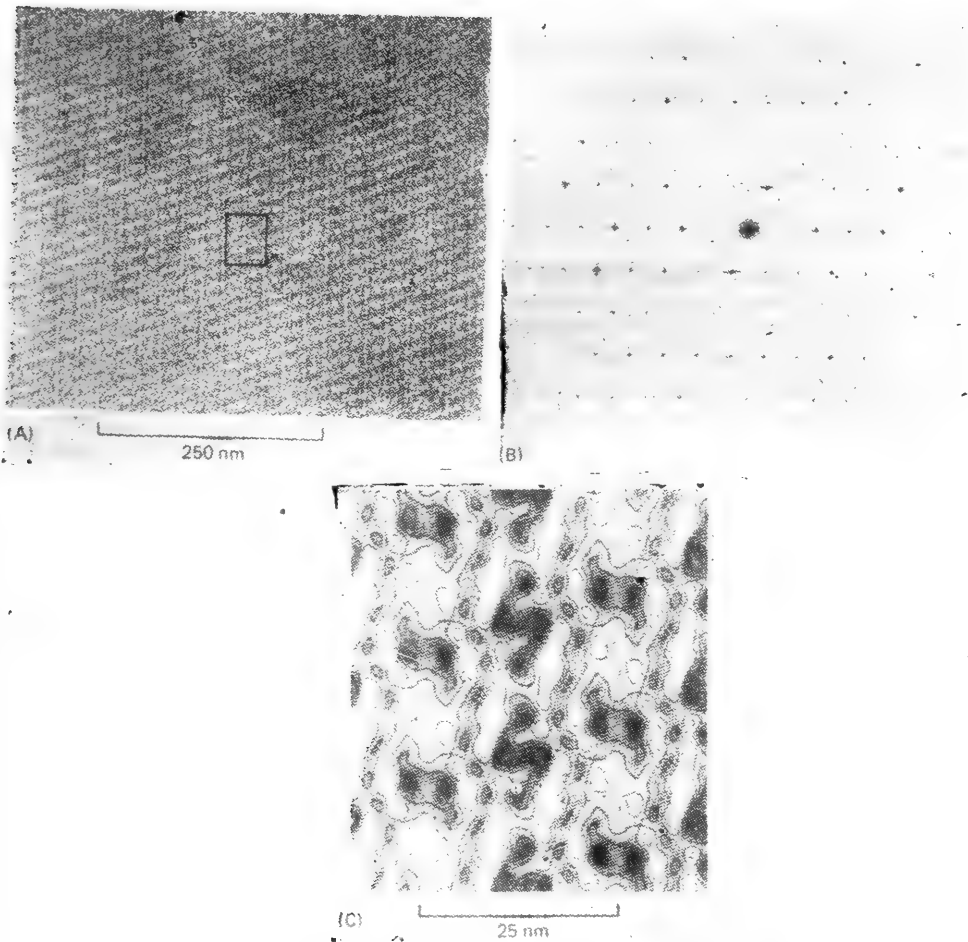


图 4-24 衍射用于对二维空间排列的分子的电镜照片作平均加工。(A)一种小藻类的细胞壁内高度有序排列的糖蛋白分子的原始电镜照片。暗区代表染料，亮区代表糖蛋白分子。这个像经计算后的衍射图谱如(B)所示，由衍射图谱决定的这个像的一个小区的重建像如(C)所示。分子形状的细节在重建像里看得很清楚(该像中现以暗区代表糖蛋白分子)，但在原始照片里难以分辨出来。(Graham Hills 和 Peter Shaw 赠)

衍射图谱重建像。

这种重建像的技术均化了来自排列中所有分子的信息，因此能显示原来照片中在各个分子像中被随机“噪声”所掩盖而不清楚细节。这种方法对于在（二维平面上）形成晶体排列的分子，如一些膜蛋白，特别有价值。在顺利的情况下，根据电镜观察重建的像对一个蛋白质分子形状的分辨率可以达到大约 $0.7 \text{ nm}(7\text{\AA})$ 。但这仍不能满足对分子结构作完整描述的要求，因为分子中的原子相隔的距离仅 0.1 或 0.2 nm 。

电子显微镜技术发展史上的一些里程碑概述于表4-2。

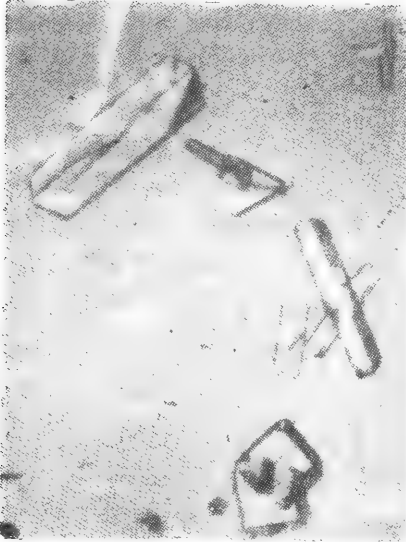


图4-25 在光学显微镜下见到的糖原磷酸化酶的晶体。(Robert Fletterick 赠)

X射线衍射显示分子中原子的三维空间排列

衍射在分析分子结构上最重要的应用是使用X射线。X射线衍射甚至比最熟练的电镜技术所能达到的分辨率还好。用波长约为 0.1 nm 的X射线从一个晶体产生的衍射图谱可以推断组成

该晶体的分子中单个原子的排列。X射线与可见光或电子束不一样，它不能透过一个标

表 4-2 电镜发展中的重大事件及其在细胞生物学上的应用

1897	J. J. Thomson 宣布存在负电荷粒子,后来称为电子。
1924	de Broglie 提出运动的电子具有波像性。
1926	Busch 证明用圆筒状的磁透镜可以使电子束聚焦,奠定了电子光学的基础。
1931	Ruska 和他的同事创造了第一台透射电镜。
1935	Knoll 证明扫描电镜的可行性,三年后 Von Ardenne 建造了一台锥形的装置。
1939	Siemens 最早推出批量生产的透射电镜。
1944	Williams 和 Wyckoff 介绍了金属投影技术。
1945	Porter, Claude 和 Fullam 用电镜观察了在组织培养中经钨酸固定和染色的细胞。
1948	Pease 和 Baker 可靠地制备了生物材料的薄片($0.1-0.2\mu\text{m}$ 厚)。
1952	Palade, Porter 和 Sjöstrand 发展了固定和薄片技术,使许多细胞内的结构第一次被看到。H.E. 赫胥黎(H. E. Huxley)是第一个应用这些技术证明骨骼肌含有重叠排列的蛋白质丝,支持了肌肉收缩的“滑动丝”假说。
1953	Porter 和 Blum 发明了第一台被广泛应用的超薄切片机,该机汇集了 Claude 和 Sjöstrand 所介绍的许多特点。
1956	Glauert 和他的助手证明环氧树脂 Araldite 是电镜使用的高效包埋剂。五年后,Luft 介绍了另外一种包埋树脂 Epon。
1957	Roberson 描述了细胞膜的三层结构,这是首次在电镜下被观察到。
1957	最早由 Steere 发展起来的冰冻断裂技术经 Moore 和 Mühlenthaler 加以完善。后来(1966)Branton 证明冰冻断裂法可用来观察膜的内部结构。
1959	Brenner 和 Horne 发展了四年前由 Hall 发明的负染技术,使之成为观察病毒、细菌和蛋白质丝的常规技术。
1963	Sabatini Bensch 和 Barrnet 介绍了电镜使用的固定剂戊二醛(随后是钨酸)。
1965	剑桥仪器厂生产了第一台商品扫描电镜。
1968	de Rosier 和 Klug 描述了从电镜照片重现三维结构的技术。
1979	Heuser, Reese 和他们的同事在高速冷冻基础上发展了高分辨率深度蚀刻技术。

本后聚焦形成通常类型的像,但是它的衍射图谱却很容易被记录在照相底片上。而且X射线比电子有更大的穿透力,这样所用的标本就可以厚得多。由于含水的生物材料可以用X射线衍射观察,这就避免了因电镜制片必需的制备过程所引起的变形。

用于高分辨率的研究需要大的、高度有序的晶体。穿透晶体的X射线主要被标本中的电子散射。因此带电子多的大原子散射的X射线比小原子的多,所以C、N、O和P原子就比H原子更易探测到。同样的道理,任何金属原子,例如血红蛋白中的铁原子,造成一个X射线散射的强点。从衍射图谱倒转过来制作成样品分子中原子的三维排列是一件很复杂的事。像蛋白质这样大的和不规则分子所产生的X射线的衍射图谱的解释直到1960年才完成(表4-3)。甚至在今天,这也仍是一个重大的任务,它涉及到好几个月的数据自动收集和好几小时的大型计算机处理。而通常合适的蛋白质大晶体的产生是一个更慢的步骤(图4-25)。为了获得足够的衍射信息,需要有几套晶体,其中有些要用重金属原子插入到特殊的点上来修饰。蛋白质晶体的生成是一项经验性的技巧,对任何一种分子取得成功都可能花费好几年的功夫。

表4-3 X射线晶体学发展史上的里程碑及其在生物分子上的应用

1864	Hoppe-Seyler 结晶和命名了血红蛋白。
1895	Röntgen 观察到一种新的穿透辐射,他称之为X射线,这是阴极射线(电子)击中金属靶产生的。
1912	Von Laue 用X射线透过硫化锌晶体得到了第一张X射线衍射图谱。W. L. Bragg 和 W. H. Bragg 提出X射线衍射图谱与产生该图谱的晶体中原子排列间的明确关系。
1926	Sumner 从刀豆的抽提物中得到脲酶结晶,并证明该蛋白质结晶有催化活性。
1931	Pauling 发表了他的第一篇关于“化学键特性”的论文,详细说明了共价键联结的规律。
1934	Bernal 和 Crowfoot 发表了第一张胃蛋白酶晶体的详尽的X射线衍射图谱。
1935	Patterson 发明了从X射线的数据确定原子间间隔的分析方法。
1941	Astbury 取得了第一张DNA的X射线衍射图谱。
1951	Pauling 和 Corey 提出L-氨基酸链的 α -螺旋构型和 β 折叠的结构,这两种结构以后在很多种蛋白质中被发现。
1953	Watson 和 Crick 根据 Franklin 和 Wilkins 的X射线衍射图谱提出了DNA的双螺旋结构模式。
1954	Perutz 和他的同事发展出用重原子方法去解决蛋白晶体图描记术中的相位问题。
1960	Kendrew 首次以0.2 nm的分辨率描述了一种蛋白质(抹香鲸的肌红蛋白)的细微结构,Perutz 提出了更大的血红蛋白的低分辨率的结构。
1966	Phillips 描述了溶菌酶的结构。这是首次对酶结构作详细分析。
1976	Kim, Rich 和 Klug 及其同事们利用X射线衍射,描述了tRNA三维结构的细节。
1977-1978	Holmes 和 Klug 确定了烟草花叶病毒(TMV)的结构, Harrison 和 Rossman 确定了两个小的球形病毒的结构。

尽管有这些困难,X射线衍射还是一项广泛应用的技术,因为它是确定大多数分子中原子详细排列情况的唯一方法。例如,一个有良好结晶的蛋白质的结构可以推算到分辨率为0.3nm至0.4nm,显示出多肽链的主要层次,但其他的细节就很少知道。用优质晶体,再加上辛勤地工作,可以获得0.15nm的分辨率,显示出蛋白质中几乎所有的非氢原子的方位。

小结

多种显微镜技术均适用于研究细胞。活细胞可以用相差、干涉或暗视野光学显微镜来观察,而固定后的死细胞可以用各种染料或者用与细胞中的特殊成分结合的更专一的

试剂来染色。透射电镜可以更高的分辨率观察细胞,并显示出细胞器、膜和蛋白丝的排列。电子密度标记试剂可以用来对细胞内或细胞表面的特殊大分子定位。应用电镜冰冻断裂法可以看到细胞膜的内部,而扫描电镜能显示细胞表面的立体外形。

单个大分子的形状用一种重金属投影法或者用负染法勾画出来后可以透射电镜下观察到。但是一个分子的每个原子要精确定位只有将这个分子装配成大晶体才行。在这种情况下,X射线束能穿透一个晶体,构成晶体分子的原子的三维排列。可以从X射线衍射图谱推断。

细胞培养¹⁰

在合适的条件下,多种动植物细胞在组织培养皿中能存活、繁殖,甚至表现有分化特性。因此可以确定加入或去除一些特殊的分子(如激素或生长因子)对细胞行为的影响,并可得到纯的细胞群体用于生化分析或研究不同类型细胞间的相互作用。对培养细胞的实验常被称为离体的(in vitro,实际上是在玻璃器皿中)的实验。生物化学家使用该术语有不同的含义,指的是活细胞外部发生的生化反应。离体实验极有利于研究在培养皿严格限制的条件下的细胞的复杂行为,同时其观察结果必须迟早与在活体的自然环境中的细胞行为核实。

细胞能在培养皿中生长¹¹

组织培养始于1907年为解决神经生物学中一个争论而设计的实验。被检验的假说称为“神经元学说”,认为每根神经纤维都是从单个神经细胞生长出来的,而不是许多细胞融合的产物。为了验证这个论点,几小片脊索被放到温暖潮湿的盒子中的凝固的血浆上,并定期在显微镜下观察。一天或数天后,可以见到单个神经细胞伸出长而细的突起进入血浆凝块。由此确认了神经元学说,并且奠定了细胞培养革新的基础。

1907年最早的实验包括组织小碎片(或称外植体)的培养。现在更普遍的是培养从组织分离出来的细胞悬浮液。这种分离的细胞培养(图4-26)具有极大的优点,能使实验者从组织中混合存在的各类细胞中纯化出单一类型的细胞,因而能在游离状态下观察它们。

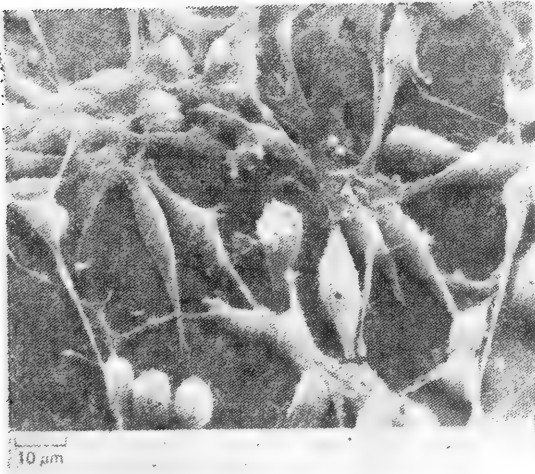


图4-26 在组织培养中生长的大鼠成纤维细胞扫描电镜照片(Guntor Albrecht-Buehler 赠)

与细菌不同,大多数组织的细胞不适应在悬浮液中生长,需要在固体表面上才能生长和分裂。这种机械支持物原来是用血浆凝块,现在往往被塑料的组织培养皿表面所取代。但是细胞对其要求有所不同,有些细胞不能生长和分化,除非培养皿涂上一层细胞外基质成分,例如胶原。

直接从一个有机体组织制备培养称

为原代培养。在大多数情况下,原代培养中的细胞可以从培养皿中取出,用于形成大量的继代培养;可以用这种方法几个星期或几个月地重复传代。这样的细胞经常表现出原有组织的分化特性:成纤维细胞依旧分泌胶原;来自胚胎骨骼肌的细胞融合成肌肉纤维,并在培养皿中自发地收缩;神经细胞伸出轴突,可被电兴奋,并与其他神经细胞形成突触;上皮细胞形成具有完整上皮的许多特性的伸展层。因为这些现象发生于组织培养,所以它们易于用在完整组织所不能使用的方法加以研究。

化学成分明确的培养基可以鉴别特殊的生长因子¹²

直到70年代初,组织培养还类似科学和魔法的混合体。虽然血浆凝块已代之以塑料培养皿和含有明确规定混合的盐、氨基酸和维生素的液体培养基,但是,大多数的培养基还含有一定比例的成分还不大明确的生物物质,例如马血清、胎牛血清或者鸡胚的粗抽提物。当前,大多数常规的组织培养仍使用这种培养基(表4-4),但为了确定一个特定类型细胞的生长和分化的特殊要求,这种培养基就不适用了。

表 4-4 适用于培养哺乳动物细胞的典型培养基组成

氨基酸	维生素	盐类	其他
精氨酸	生物素	NaCl	葡萄糖
胱氨酸	胆碱	KCl	青霉素
谷氨酰胺	叶酸	NaH ₂ PO ₄	链霉素
组氨酸	尼克酰胺	NaHCO ₃	酚红
异亮氨酸	泛酸	CaCl ₂	全血清
亮氨酸	维生素B ₆	MgCl ₂	
赖氨酸	硫氨酸		
甲硫氨酸	维生素B ₁₂		
苯丙氨酸			
苏氨酸			
色氨酸			
酪氨酸			
缬氨酸			

葡萄糖用 5—10 mmol/L 浓度,氨基酸除一两个例外全用 L 型的,浓度为 0.1 或 0.2 mmol/L; 维生素浓度低于毫摩尔的 100 倍,即约为 1 μm。通常将马或小牛血清,加至总体积的 10%。青霉素和链霉素是抗生素,加入后抑制细菌的生长。酚红是 pH 指示染料,它的颜色作为一个监察,用来保证 pH 大约在 7.4。

培养物通常生长在一种备有细胞可附着的表面的容器内。容器置于 37℃, 5%CO₂, 95% 空气的培养箱中。

维持不同类型细胞生长的各种化学成分明确的培养基的开发工作由此兴起。这些培养基经常含有许多细胞在培养中生存和繁殖所需要的各种蛋白质生长因子中的一种或几种:例如某些神经细胞在培养中需要微量的神经生长因子(NGF)使其分化和存活。就像在完整动物中一样。还发现一些在特殊类型的细胞发育和生存中起重要作用的其他因子,而应用化学成分明确的培养基去寻找新的因子就容易多了。

真核细胞的细胞系是纯系细胞的一个方便来源

大多数脊椎动物细胞在组织培养中经过一定次数的分裂就会死亡:例如,人的皮肤细胞在死亡前只能分裂 50—100 次。这种有限的寿命反映了该细胞来源的动物的寿限。例如,来自患有会引起早衰和死亡疾病的人的细胞在组织培养中的寿命就更短。但是偶尔变

异的细胞实际上会在培养中永远存活。这样的细胞可以无限增殖成为一个细胞系（表4-5）。细胞附在固体表面时，它们通常生长得最好，当它们在培养皿的表面形成连续的，或者汇合的细胞层时，一般就停止生长。

表 4-5 一些常用的细胞系

细胞系	细胞种类和来源	细胞系	细胞种类和来源
3T3	成纤维细胞(小鼠)	L6	成肌细胞(大鼠)
BHK21	成纤维细胞(叙利亚田鼠)	PC12	嗜铬细胞(大鼠)
HeLa	上皮细胞(人)	SP2	浆细胞(小鼠)
PTK1	上皮细胞(小袋鼠)		

这些细胞系有很多是来自肿瘤的，它们都能在组织培养中无限地增殖，并至少表现出某些来源细胞的分化特性。BHK21 细胞, HeLa 细胞和 SP2 细胞能在悬浮状态生长, 其他细胞在固体培养基上才能扩增

在培养中无限制地分裂的变异细胞通常与癌细胞有明显区别，后者无论在体内还是在体外都无限制地分裂。癌细胞与其他的细胞系不一样，常常不需要附在表面，它们在培养皿中增殖所达到的密度大大超过正常细胞。用诱发肿瘤的病毒或化学试剂转化的正常细胞可实验性地诱导出相似的特性。如将形成的癌性转化细胞系注射到动物体内会引起肿瘤。经转化和未经转化的细胞系在细胞研究中作为大量同型细胞的来源都非常有用，特别是由于这些细胞能在 -70°C 不定期地贮存，并在冻融后仍能产生活细胞。

细胞系的均一性可用克隆化进一步提高。克隆是来源于单个祖先细胞的细胞群。细胞克隆最重要的用途之一是分离在特殊基因上有缺陷的突变细胞系：研究在一种特异蛋白质上有缺陷的细胞，常可揭示许多有关该蛋白质在正常细胞中的功能。

细胞能融合在一起形成杂种细胞¹⁴

有可能将一个细胞与另一个细胞融合，形成一个有两个分离核的，称为异核体的组合细胞。通常用某些灭活的病毒或者聚乙二醇处理细胞的悬浮液即可使细胞融合，以上两种处理都会改变细胞的质膜，使细胞有相互融合的趋势。异核体提供了一种方法去混合两个分离细胞的成分——原生质膜、细胞质和核，以便研究它们的相互作用。例如，利用

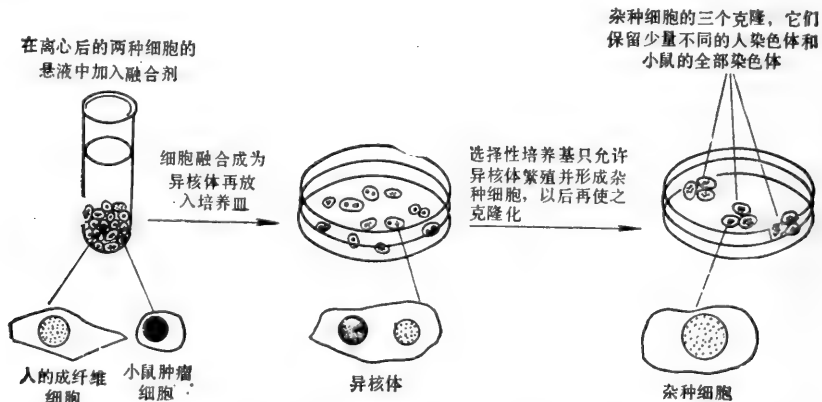


图 4-27 示意图表示人的细胞和小鼠的细胞怎样融合产生异核体(每一异核体有两个或多个核)，最后形成杂种细胞(有一个融合的核)。这种特殊的杂种细胞对于在人的特定的染色体上作基因图是很有用的，因为人的大多数染色体很快随机地丢失了，留下的克隆仅保留一条或几条染色体。其他种类细胞融合形成的杂种细胞常保留它们染色体的大部分。

融合法将小鸡红细胞的惰性核接触一个正在生长的组织培养细胞的细胞质，该核被再激活而产生 RNA，最终能复制出它的 DNA。膜蛋白能在质膜内水平方向移动的第一个直接证据是来自小鼠细胞和人细胞融合的实验：小鼠细胞和人细胞表面的蛋白质开始限于在异核体原生质膜自己的那一半，但很快就扩展并混合到整个细胞的表面。

最后异核体进行有丝分裂，产生一个杂种细胞，其中分离的核的核膜破裂，所有的染色体汇合入一个大核(图4-27)。这样的杂种细胞可以克隆化，形成杂种细胞系。由于它们不稳定和易丢失染色体，因此对绘制人类染色体的基因图谱特别有用。融合小鼠和人的细胞是绘制基因图的常用方法。由于未知的原因，这些杂种细胞随机地丢失人的染色体，这样就产生了多种不同的小鼠-人的杂种细胞系，每一系中仅包含一条或数条人的染色体。对许多这样的细胞系作分析就有可能确定人的特定染色体的特定生化功能。例如，唯有含人的第一号染色体的杂种细胞合成人的尿苷磷酸激酶，这就表明编码这个酶的基因位于第一号染色体上。

组织培养发展史上的一些重要发现列于表4-6。

表 4-6 组织培养发展史上的里程碑

1885	Roux 证明鸡胚细胞可以在动物体外的盐溶液中生存。
1907	Harrison 在淋巴凝块上培养两栖类的脊髓，证明了轴突是由单个神经细胞延伸产生的。
1910	Rous 用小鸡肿瘤细胞的过滤抽提液诱发一个肿瘤，后来证明其中含有 RNA 病毒(Rous 肉瘤病毒)。
1913	Carrel 证明只要细胞在无菌条件下定期地得到营养就可以在培养中长期地生长。
1948	Earle 和他的同事们分离了 L 细胞系的单个细胞，并表明这些细胞在组织培养中形成了细胞克隆。
1952	Gey 和他的同事从人的宫颈癌建立了一个可连续传代的细胞系，以后成为著名的 HeLa 细胞系。
1954	Levi-Montalcini 和他的助手们证明神经生长因子(NGF)刺激组织培养中轴突的生长。
1955	Eagle 首次对组织培养中的细胞的基本营养要求作了系统研究，并发现动物细胞能在补充一小部分血清蛋白的小分子的成分明确的混合物内增殖。
1956	Puck 和他的助手以改变生长要求的办法，从 HeLa 细胞的培养中选出突变体。
1958	Temin 和 Rubin 发展了定量检测纯化的 Rous 肉瘤病毒感染小鸡细胞的方法。在随后的10年里，Stocker, Dulbecco, Green 和其他的病毒学家建立了该病毒的和和其他类型病毒的转化特征。
1961	Hayflick 和 Moorhead 证明培养的人成纤维细胞经一定次数的分裂后死亡。
1964	Littlefield 介绍 HAT 培养基用于体细胞杂种细胞的选择性生长。同时结合细胞融合技术，这使得体细胞遗传学成为可行。
	Kato 和 Takeuchi 从组织培养中的单个胡萝卜根细胞培育出一株完整的植物。
1965	Ham 介绍一种成分明确的无血清培养基，它能维持某些哺乳动物细胞的生长。
	Harris 和 Watkins 用病毒诱导人和小鼠细胞融合，产生了第一批哺乳类细胞的异核体。
1968	Augusti-Tocco 和 Sato 使得小鼠神经细胞肿瘤(成神经细胞瘤)适应于组织培养，并分离出一些能被电兴奋和伸出神经突起的克隆。当时还分离出许多已分化的其他细胞系，其中包括骨骼肌和肝细胞系。
1975	Kohler 和 Milstein 培养出第一个分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。
1976	Sato 和他的助手发表了最早的一系列论文来证明不同的细胞株在无血清培养基中的生长需要不同的激素和生长因子的混合物。

小结

假如给予适当营养物的培养基，很多动物和植物的细胞在培养瓶中能生存，通常还能增殖；不同种类的细胞要求不同的营养物质，其中包括一种或数种特殊的蛋白质生长因子。尽管大多数的动物细胞经过一定次数的分裂会死亡，但是在培养中会自发地产生极少数变异细胞，它们可以作为细胞系而无限期地生存下去。来自一个原始祖先细胞的克

隆可以从细胞系获得,这使我们有可能把有单一蛋白质缺陷的突变细胞分离出来。两种不同种类的细胞融合可产生异核体(有两个核的细胞),异核体最终形成杂种细胞(有一个融合的核)。这种细胞可用于研究两种不同细胞成分间的相互作用,并提供一种将基因定位在特定染色体上的简便方法。

细胞及其成分的分级分离¹⁴

当我们能够用显微镜检术确定在细胞和组织中的大分子集合物和细胞器的布局,而且甚至用特殊的染色方法对特殊的大分子定位时,对一个细胞详细的分子水平上的了解还需要作生化分析。这种分析一般需要裂解细胞,因此破坏了细胞解剖学上的精巧结构。为了在分析中保留尽可能多的有关这些分子原来位置的信息,生物学家发展了一种技术,有控制地裂解组织和细胞,这样,不同的细胞成分在生化分析前能被分离开来。

细胞可以从组织中分离出来,并可按不同类型分开¹⁵

很多类型的已分化细胞是不容易建成培养细胞系的。无论如何,用于大规模生化分析的细胞还是直接从动物或植物的组织中分离出来更为经济和快速。不利的是高等动植物的所有组织都包含各种类型混合的细胞,它们必须在分析前分离开。通过破坏连接细胞的细胞外基质和胞间连接物,先将组织制备成单细胞悬浮液。要得到最好的活的分离细胞通常是取自胎儿或新生儿的组织。方法是将这种组织用蛋白酶(如胰蛋白酶和胶原酶)和与 Ca^{2+} 结合或螯合的试剂(如乙二胺四乙酸,即 EDTA) 处理,然后用温和的机械破碎法将它们分离成单个细胞。

有一些方法被用来从混合的细胞悬浮液中分离不同类型的细胞。其一就是利用细胞物理特性的差别。例如用沉降或离心可以将大的细胞与小的细胞,重的细胞和轻的细胞分离开来;这些技术我们在讨论细胞器和大分子分离时还要阐述,它们原来就是为此目的而发展起来的。另一个方法是依据有些细胞能牢固地粘在玻璃和塑料上,因而能将它们与附着力差的那些细胞分离开来。

后一技术的一个重要改进是依赖于抗体的特异结合特性。仅与组织中一种细胞的表面特异性结合的抗体能与各种基质——如胶原、多糖珠或塑料——偶联形成一个亲和表面,只有被抗体识别的细胞才能附着上去。用温和的振摇方法或用酶(如胶原酶)分解可被消化的基质(如胶原),即可回收已结合的细胞。

最完美的细胞分离技术是用与荧光染料偶联的抗体标记分离特异性细胞,然后在电子荧光激活细胞分类器中将标记的细胞和未标记的细胞分开,以单列在细流中运行的单个细胞通过激光束作荧光检测。震动的喷嘴使顺流而下形成的微滴多数或含一个细胞或不含细胞。这些只含有一个细胞的小液滴在形成的片刻,自动地被带上正电或负电,这取决于微滴是否含有荧光细胞;然后在一个强电场中使它们转向进入一个适当的容器中。偶尔大群细胞(从光散射增加可探测到)是不带电荷的,于是被扔进废物贮器(图4-28)。这种机器能在1 000个细胞中将需要的一个细胞选出,它每秒钟能把5 000个细胞分门别类。

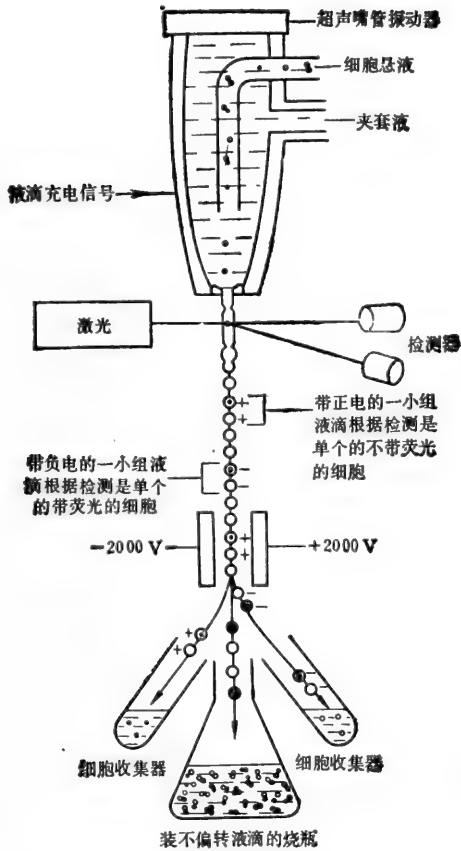


图4-28 荧光活化细胞分类器的示意图。当一个细胞通过激光束时,对细胞作荧光监测。小液滴里含的单个细胞根据它们是否有荧光而得到正的或负的电荷。小液滴然后经过一个电场,根据它们带的电荷偏斜进入收集管。注意,必须将细胞的浓度调节到大多数的小液滴不含细胞,大部分的液滴和所有大集群细胞一起流入废液贮器。

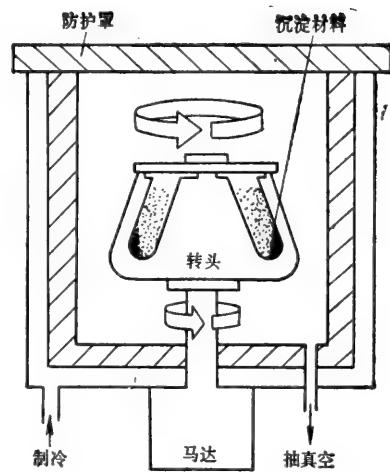


图 4-29 制备超离心机的示意图。样品放在插入金属转头中一圈圆柱型孔的管内。转头高速运转产生巨大的离心力,使样品中的颗粒沉降。真空可以减少摩擦,因此避免了转头发热,并使制冷系统将样品保持在 4℃。

用超离心可以分离细胞器和大分子¹⁶

一个纯的细胞群体可以用各种方法来破碎:渗透性冲击、超声振荡、迫使细胞通过一个小孔,或者把它们磨碎。这些方法将许多细胞的膜成分(包括质膜、内质网膜和高尔基器的膜)裂成碎片,这些碎片马上又会再拼合成一个封闭的小泡。假如按这些破碎细胞的方法小心操作,是能得到完整的核、线粒体、溶酶体和过氧化酶体等细胞器的。这样细胞群就变成含有膜包围颗粒的浓稠悬浮液的可溶性抽提物,每个颗粒都有不同的大小、电荷和密度。假如仔细地选择匀浆液(这要求对每个细胞器作广泛的试验以确定是否适合),那么不同的颗粒就可以保持它们在完整细胞中原来细胞器的生化特性。

直到本世纪 40 年代初期制备超离心机商品化之后,才有可能分离混合物中的各种成分,在制备超离心机中破碎细胞的抽提物被高速旋转(图4-29)。大的成分如核和未破

碎的细胞,在相对较低的速度下很快地沉降下来,在离心管的底部形成一个小团块;在稍高一点的速度下线粒体的小团块沉降下来;在更高的速度下,离心更长的时间,先可以收集到封闭的小泡,然后是核糖体(图4-30)。所有这些部分都是不纯的,但再次悬浮这些小团块,重复离心若干次就能去掉很多杂质。

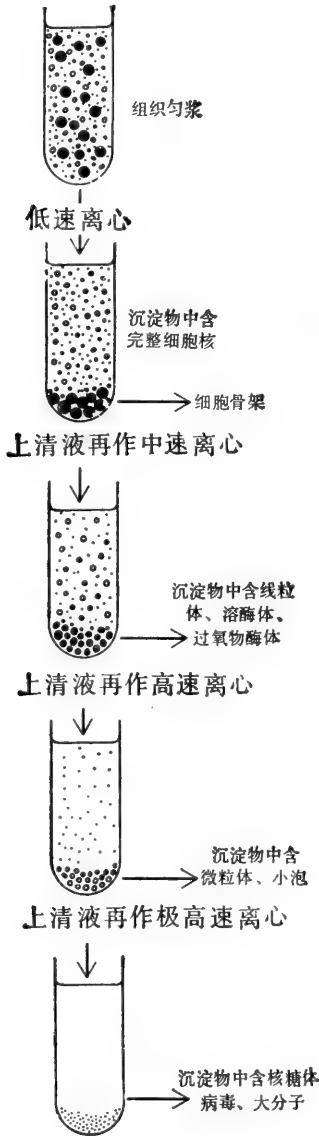


图4-30 示意图表示怎样将细胞的抽提物反复以逐步加快的速度离心来分级分离它们的成分。一般亚细胞成分越小,使它们沉降所需要的速度越大。图中各步离心代表的速度是:

- 低速: $1\,000 \times g$ 10 分钟
- 中速: $20\,000 \times g$ 20 分钟
- 高速: $80\,000 \times g$ 1 小时
- 极高速: $150\,000 \times g$ 3 小时

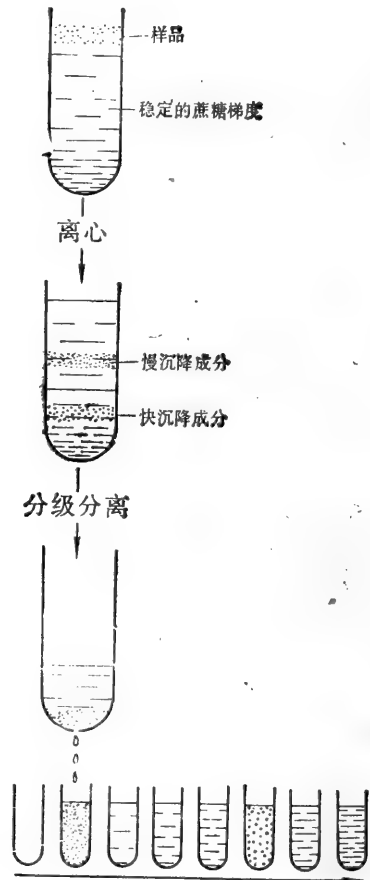


图4-31 当亚细胞成分铺放在含蔗糖的溶液上时,在离心时根据它们的大小作不同速度的沉降。为了稳定沉降带,防止对流混和,离心管内装连续梯度的蔗糖溶液,其浓度朝离心管底部方向递增(典型的值从5%到20%浓度的蔗糖)。离心以后不同的成分可以逐一个地收集,最简单的是将塑料离心管穿孔,如图示从底部收集液滴。

将细胞匀浆在离心管中的盐溶液顶上铺成一条狭带再超速离心，可取得更好的分离效果。为了使沉降成分稳定，防止对流引起混合，样品狭带下的盐溶液含有密度逐步增加的(密度梯度)极易溶解的惰性物质，例如蔗糖。在这些条件下，不同的部分以不同的速率沉降，形成一条条清晰的带，各区带可分别收集之(图4-31)。每一成分沉降的速率取决于它们的大小和形状，通常是用沉降系数即 s 值来表示的(表4-7)。目前超速离心机的旋转速度可以达到 80 000r/min，产生的离心力达到重力的 500 000 倍。在这样大的离心力下，即使较小的大分子，如 tRNA 分子，单个酶分子也会根据它们的大小彼此分离开来。

超速离心机也可用于按细胞成分的浮力密度而不是根据它的大小将它们分离。在这种情况下，样品是通过含有高浓度的蔗糖或氯化铯垂直梯度溶液沉降下来的。细胞成分顺梯度向下沉降到一个与它自己的密度相等的位置，并在这个位置漂浮着不再向下沉降。这个方法是如此灵敏，它可以将含较重同位素(如 ^{13}C 或 ^{15}N) 的大分子和正常的未标记的大分子分离开来。事实上氯化铯方法是 1957 年为了分离在含 ^{15}N 核苷酸前体中培养的细菌群体产生的标记和未标记的 DNA 而发展起来的。这个经典实验提供了 DNA 半保留复制的直接证据。

表 4-7 某些代表性的沉降系数

颗粒或分子	沉降系数	颗粒或分子	沉降系数
溶酶体	9400S	核糖体 RNA 分子	28S
烟草花叶病毒	198S	tRNA 分子	4S
核糖体	80S	血红蛋白分子	4.5S

沉降系数(S)在秒单位中是从 $\frac{dx/dt}{\omega^2 x}$ 求出的,式中 x 是旋转中心距离(以厘米表示), dx/dt 是沉降速度(以厘米/秒表示), ω 是离心机转头的角旋速度(以弧度/秒表示)。因为这种系数是十分小的数值,所以通常以飘浮单位(svedberg unit)S表示,即 $1\text{ S} = 1 \times 10^{-13}\text{ s}$ 。

复杂的细胞加工过程的分子细节只有通过细胞成分进行分级分离的研究才能确定¹⁷

作为分离细胞器和其他大的亚细胞成分的主要方法之一的超速离心法在确定细胞不同成分的功能上也起着极为重要的作用。例如,可用于纯化来自线粒体和叶绿体的部分,达到对这些细胞器在能量相互转换上主要功能的理解。同样,从内质网和高尔基器形成的封闭小泡也能被相互分开,用以作为完整细胞器的小型译本——这可使得每一细胞器的许多功能被详细地分析。

分级分离的细胞抽提物,也称作无细胞系统,被广泛地用于研究细胞内发生的加工过程。只有用这种方式,才能将一个生物加工过程与细胞中发生的所有其他的复杂的副反应分离开来加以研究,并从而确定详细的分子机制。这种方法早期的一个成果是阐明了蛋白质合成的机制。起始点是能将 RNA 分子翻译成蛋白质的细胞的粗抽提物。这种粗抽提物一步一步地分级分离,依次产生核糖体、tRNA 和各种酶,它们在一起组成了合成蛋白质的机器。一旦个别纯的成分可用来分别地加入或不加入,那么这些成分在加工过程中所起的确切的作用就可以弄清楚。后来,同一系统被用来破译遗传密码,即利用已知顺序的合成的多聚核糖核酸作为信使 RNA (mRNA) 被翻译而做到的。今天各种体外的翻译系统结合各种 DNA 克隆技术,用来确定提纯的 mRNA 的制备物所编码的蛋

白质(见 185 页和表4-13)。在分级分离的细胞抽提物制备中应用的一些方法其发展的里程碑列于表4-8。

表 4-8 超速离心机和无细胞抽提物制备发展中的重大事件

1897	Buchner 证明酵母的无细胞抽提物可以将糖发酵,生成二氧化碳和酒精,奠定了酶学的基础。
1926	Svedberg 发展出第一台分析超速离心机,并用其估计血红蛋白的分子量约为 68000。
1935	Pickels 和 Beams 介绍了作为制备器具而设计的离心机的一些新特点。
1938	Behrens 用差速离心从肝细胞中分离核和细胞质,在本世纪40年代和50年代的早期由 Claude、Brachet、Hogeboom 和其他人进一步发展了用于细胞器分级分离的技术。
1949	Szent-Györgyi 证明从骨骼肌细胞中分离的肌原纤维在加入 ATP 时发生收缩。1955年,Hotman-Berling 发展出了一个相似的使纤毛摆动的无细胞系统。
1951	Brakke 用蔗糖溶液中的密度梯度离心提纯了一种植物病毒。
1953	de Duve 用离心法分离了溶酶体,以后又分离了过氧化物酶体。
1954	Zamecnik 和他的同事发展出第一个无细胞系统进行蛋白质合成。随后10年经过积极的研究活动搞清了遗传密码。
1957	Meselson、Stahl 和 Yinograd 发展了在氯化铯溶液中的密度梯度离心来分离核酸。

细胞生物学发展的一个主要目的是发展能完成十分复杂的加工过程(如有丝分裂的纺锤体上染色体的分离)的无细胞系统。但是最终无细胞系统的分析还要依赖于该系统的每个蛋白质成分的完全分离。在下一节里将要讨论这是怎样获得的。

利用层析分离蛋白质

蛋白质分级分离通常最有用的方法之一是层析,这一技术原来是为分级分离低分子量的组分(如糖和氨基酸)而发展起来的。用于分离小分子的最普通的一种层析是分配层析。这种技术最方便的形式是将一滴样品点在一张吸收纸上(在纸层析中)或一张塑料膜上,或点样在覆盖一薄层非活性的吸收剂物质(如醋酸纤维或硅胶)的玻璃上(薄层层析)。然后让一个混合溶剂(如水和酒精),从纸的一头渗透。当溶剂移动横越薄膜时,带走了样品中溶于该溶剂的分子。溶剂是经选择的,使得其中的一种溶剂对吸收剂物质的吸附比另一种溶剂强。因此最容易溶解在吸收溶剂中的那些分子相对地移动迟缓,而在另一溶剂中最容易溶解的分子移动较快。层析干燥后染色(图4-32),即可检测出不同分子的位置。多种方式的纸层析和薄层层析依然广泛地用于分析许多不同的小分子物。

蛋白质分级分离中用得最多的是柱层析。混合的蛋白质溶液通过含有多孔固体基质的柱,不同的蛋白质由于它们与基质的相互作用而被不同程度地滞留。这样,不同的蛋白质从柱的底部流出时就能被分别收集(图4-33)。已经发展出很多种基质能将蛋白质分离而不改变其天然结构。这些基质根据蛋白质的电荷、大小或者它们对基质上特殊化学基团的结合能力,对不同的蛋白质加以区别。

用于上述目的的不同类型的基质已经商品化(图4-34)。离子交换柱充填着带正电或负电小珠,因此蛋白质按其表面电荷的排布被分级分离。疏水柱填满了疏水侧链伸出的小珠,这样,疏水区暴露的蛋白质就被滞留了。凝胶过滤柱填满了多孔性的小珠,它是根据蛋白质的大小将它们分离:当过柱时,分子小得足以进入小孔的蛋白质渗入连续的凝胶珠内,而分子大的留在凝胶珠之间,因此能更快地通过柱,最早流出。凝胶过滤层析除提供了一种分离分子的方法外,还是一个方便的测定分子大小的方法。

一种特殊的蛋白质通常不能过一次柱层析就可从混合物中分离出来。因为每一次过柱一般只能使混合物中该蛋白质的比例增加不超过20倍。由于大多数蛋白质少于细胞总蛋白质的1/1000,所以,通常需要依次用不同类型的柱将它们纯化(图4-35)。一个更为有效的方法称为亲和层析,该方法利用发生在蛋白质表面有重要生物学意义的结合的相互作用。例如,假使一种酶的底物与一个惰性基质(如多糖珠)

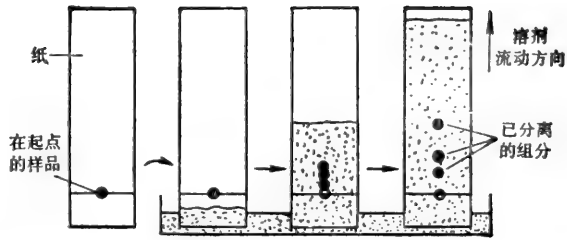


图4-32 用纸层析分离小分子。样品加到起点并干燥以后,含有两种混合溶剂的溶液因毛细管作用缓慢地流过纸。样品中的不同成分根据它们在更容易被纸吸附的那种溶剂里的相对溶解度在纸上作不同速度的移动。

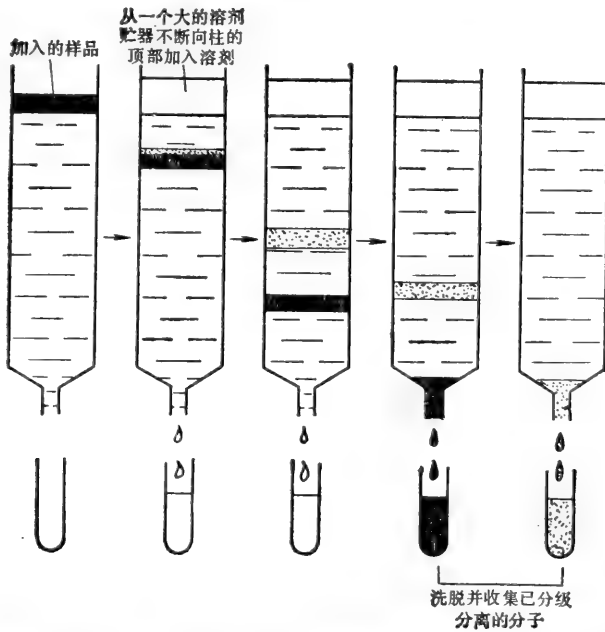


图4-33 用柱层析法分离分子。样品加入用玻璃或塑料制成的含有浸在溶剂中的可透性固体基质圆柱的顶部。然后大量的溶剂被压入,慢慢地透过柱,当溶剂从底部流出时分别收集在试管中。样品中的各种成分以不同速度通过柱,因此被分级分离。

共价偶联,那么被基质截留下来的酶仅含有极少的其他蛋白质。用相似的方法,特异抗体能与基质偶联,该基质可用来纯化抗体所能识别的分子。由于这种亲和柱的严格专一性,有时过一次柱就能达到1000—10000倍的纯化。

蛋白质的大小和亚单位的组成可以用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定¹⁸

由于蛋白质表面有带正电荷或负电荷的氨基酸基团,所以蛋白质往往带有净正电荷或净负电荷。假如对一个含蛋白质分子的溶液加上一个电场,那么蛋白质就会按照它的净电荷、大小和形状以一定速度移动。这一技术(称为电泳)用来分离游离在水溶液中或

含在固体多孔性基质(如淀粉)溶液中的蛋白质混合物。

在本世纪60年代中期,这个方法的一个改良——称为 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳——发展起来了。在对蛋白质常规分析作革命性改进的方法中,蛋白质在其中迁移的惰性基质由聚丙烯酰胺高度交联的凝胶组成的。凝胶一般是在临用前由单体聚合制备的,它的孔径能够调节,因此能够小到足以滞留我们想要分析的蛋白质的迁移。

蛋白质本身也并不处于简单的水溶液状态,而是在一种含很强的,带负电的去垢剂,十二烷基磺酸钠(SDS)的溶液中(图4-36)。因为这种去垢剂和蛋白质分子的疏水区结合,使蛋白质展开成伸展的多肽链,单个蛋白质分子失去了它与其他蛋白质或者脂质分子的联系,并自由地溶解在去垢剂的溶液中。此外通常还加入巯基乙醇之类的还原剂,使存在于蛋白质中的任何 S—S 键断裂,这样就能分析以多亚单位分子组成的多肽。

当被 SDS 溶解的蛋白质混合物通过一块聚丙烯酰胺平板电泳时发生了什么呢?由于这些蛋白质与许多带负电荷的去垢剂分子结合,所以当加上电压时,每个蛋白质都向正极迁移。但是,小的蛋白质比大的蛋白质通过凝胶筛网的孔要容易得多,结果从一个复杂的混合物产生了一系列按分子量大小依次排列的分离的蛋白质区带(图4-37)。存在于混合物中的主要蛋白质用考马斯蓝之类的染料对凝胶染色很容易显示出来,而次要的蛋白质可用银染法在凝胶上检出(该方法可检出一区带中少至 10ng 的蛋白质)。一个特殊的蛋白质可以用放射性同位素或荧光染料偶联的抗体加以标记,使之在这种凝胶上被鉴定;当在凝胶上被分离的蛋白质被转送(用印迹法)到硝酸纤维纸上后,通常就使用上述方法。这在以后鉴定核酸中我们将叙述。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法比先前任何一种蛋白质分析方法更为有效,这主要是由于它能分离任何蛋白质,不论蛋白质在水溶液中固有的溶解度如何。膜蛋白、细胞骨架的蛋白质成分和大分子聚合物的部分蛋白质,都能被离解成分离状态。由于该方法是严格按照它们的大小分离多肽的,所以该方法也能使我们了解任何蛋白质复合体的分子量和亚单位组成(图4-37)。

聚丙烯酰胺凝胶双向电泳可以在单层凝胶上分析 1 000 个以上的蛋白质¹⁹

紧靠的蛋白质带或峰容易重叠,因此任何单向分离的方法,如 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳或层析法只能分辨相对少数目的蛋白质(一般少于 50 个)。一种新的,称为双向电泳的分析蛋白质的方法是 1975 年发展起来的。将两种不同分离方法的特点结合起来,双向电泳能以双向蛋白质图谱的形式分辨 1 000 个以上不同的蛋白质。

第一步将样品溶解于小体积的含有非离子去垢剂、变性剂(尿素)和巯基乙醇的溶液中。该溶液将所有的多肽链溶解、变性和解聚而不改变它们原来的电荷。多肽链被一种称为等电聚焦的方法分级分离,这是根据这样的事实,即一个蛋白质分子的净电荷随周围溶液的 pH 而变化。对每一种蛋白质都有一个特定的 pH,称为等电点,在该处蛋白质无净电荷,因此在电场里不移动。在等电聚焦中,蛋白质在一支聚丙烯酰胺凝胶的细管中电泳,其中 pH 的梯度是用特种缓冲液的混合物设置起来的。每一种蛋白质都移动到与它的等电点相应的位置并停留在那儿(图4-38)。这是双向凝胶电泳中的第一向。

在第二步,含有分离蛋白质的凝胶被放入 SDS 中浸泡,这些蛋白质通过一块 SDS 聚丙烯酰胺凝胶平板电泳,按大小作进一步的分级分离。这时每个多肽链就根据它们的

分子量移动到凝胶上一个分离的点上了。这就是双向电泳的第二向。留下的未被分离的仅是那些大小相同和等电点相同的蛋白质，这种情况较罕见。每种多肽链存在的痕迹量可用不同的染色方法检测，假如蛋白质样品用放射性同位素标记的，则可用放射自显影来检测。单层双向凝胶上能辨认的多肽链可达 2000 个，足以检测一个细菌里的大多数蛋白质(图4-39)。这种方法的分辨力是如此之高，以致两个几乎相同的、仅差一个带电氨基酸的蛋白质也可被区分开。

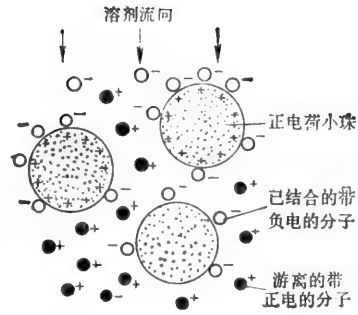
层析和电泳发展史上的一些里程碑列于表 4-9。

蛋白质选择性地裂解可生成一组特殊的多肽片段²⁰

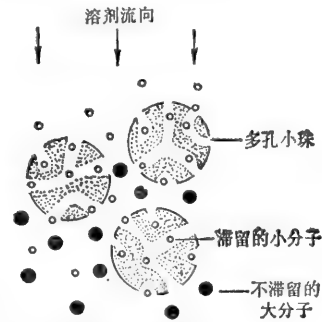
虽然分子量和等电点是蛋白质的特性，然而最终肯定地鉴定蛋白质还有赖于确定它的氨基酸顺序。这个过程的第一步包括将蛋白质裂解成较小的片段，仅此裂解过程就可提供大量有关蛋白质的有用信息。蛋白水解酶类以及化学试剂均适用于在特定的氨基酸残基之间裂解蛋白质(表4-10)。例如胰蛋白酶的切口在赖氨酸或者精氨酸残基的羧基端，而化合物溴化氰切在与甲硫氨酸残基邻近的肽键上。因为这些酶和化学制剂在相对较少的蛋白质部位上裂解蛋白质，就会产生相当大的肽。假如这些肽的混合物接着用层析和电泳方法分离，其所产生的图形，或者说肽图是判定产生这些肽的蛋白质的方法，即有时称为蛋白质的“指纹图谱”(图4-40)。

蛋白质指纹图谱是在 1956 年发展起来的，作为比较正常血红蛋白与镰状细胞贫血症病人血红蛋白突变型的一种方法。由发现一个单肽的差别，最后归因于一个氨基酸的改变，这是突变可以改变蛋白质中单个氨基酸的第一个证明。

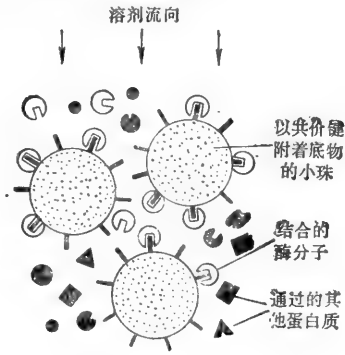
蛋白质指纹图谱的一个改进通常是与 SDS 凝胶电泳结合起来应用。从 SDS 凝胶



(A) 离子交换层析



(B) 凝胶过滤层析



(C) 亲和层析

图4-34 一些不同类型层析基质的示意图。在离子交换层析(A)中，不溶性基质带离子电荷，能滞留带相反电荷的分子。通常用于分离蛋白质的这类基质有带正电的二乙氨基乙基纤维素(DEAE-纤维素)和带负电的羧甲基纤维素(CM-纤维素)及磷酸纤维素。要分离的分子和离子交换基质结合的牢度取决于离子强度和洗脱液的pH，因此，pH可作系统性的变化(如图4-35)以获得有效的分离。在凝胶过滤层析(B)中，基质是惰性的，但是多孔的。小得足以进入基质的分子要通过较大容积的溶剂，因此通过柱时移动得较慢。商业上已提供广范围孔径的交联多糖小珠(葡聚糖和琼脂糖)适用于分子量从 500 到超过 5×10^6 的各类分子的分级分离。亲和层析(C)利用与特异配体(如抗体分子或酶的底物)共价连接的不溶性基质来结合特异的蛋白质。通过这样的亲和层析柱一次往往可获得高度的纯化。

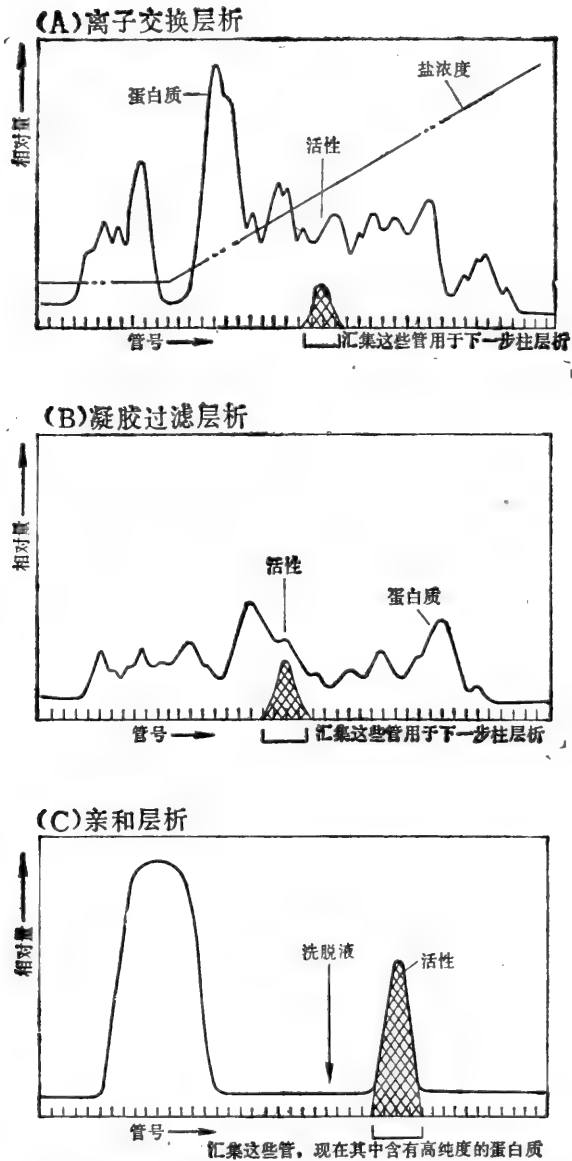


图 4-35 三种不同的层析步骤依次用于纯化一个蛋白质所得到的典型性结果。在这个例子中首先将全部细胞抽提物透过充填离子交换树脂的柱进行分级分离(A)。洗柱, 结合的蛋白质被加入到柱顶浓度逐步增加的盐溶液洗脱。与离子交换树脂亲和力最低的蛋白质直接通过柱, 从底部首先流出被收集。滞留的蛋白质根据它们与树脂的亲合力依次洗脱——与树脂越是结合得紧密的蛋白质需要越高浓度的盐溶液来洗脱它们。所需蛋白质洗脱成一个狭的峰, 可用它的酶活性检测到。有活性的这部分被汇集起来, 用于第二步凝胶过滤层析(B)。还未纯化的蛋白质的管号仍用它的酶活性来确定, 汇集活性部分并在含有被固定的酶的底物的亲和柱(C)上被纯化为均质。

切下的某种蛋白质与木瓜蛋白酶之类的蛋白酶混合。假如小心地控制蛋白酶的量和消化的时间, 就会产生一组大的、不完全裂解的多肽片段。当在第二次 SDS 凝胶上分析时, 此混合物即产生一组单一而清晰的区带, 这样通常就足以确定用不同方法分离的两种蛋

表 4-9 层析和电泳发展史上的里程碑及其在生物分子上的应用

1833	法拉第(Faraday)描述了与离子溶液导电有关的基本法则。
1850	Runge 利用对纸的不同吸附分离了无机化合物,他是后来层析分离的先行者。
1906	Tswett 将植物叶子的石油抽提物通过粉状白瓷柱,从而发明了柱层析。
1933	Tiselus 介绍了在溶液中分离蛋白质的电泳方法。
1942	Martin 和 Syngde 发展了分配层析,导致了两年后纸层析的出现。
1946	Stein 和 Moore 第一次确定了一种蛋白质的氨基酸组成,他们最初用淀粉柱层析,以后又发展出了离子交换树脂柱层析。
1955	Smithies 用淀粉做成的凝胶通过电泳分离血清蛋白质。
	Sanger 完成了牛胰岛素氨基酸顺序的分析,这是第一个被作顺序分析的蛋白质。
1956	Ingram 制作了第一个蛋白质的指纹图谱,证明镰状细胞的血红蛋白与正常的血红蛋白间的差别在于一个氨基酸的改变。
1959	Raymond 介绍了聚丙烯酰胺凝胶电泳,这种凝胶用于电泳分离蛋白质要优于淀粉凝胶;又改进了缓冲系统,使几年后 Ornstein 和 Davis 得以发展出有高分辨率的电泳分离。
1966	Maizel 介绍用十二烷基磺酸钠改进了蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳。
1975	O' Farrell 装置了一个双向电泳凝胶系统用于蛋白质混合物的分析,在该方法中,把 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和按等电点分离法结合起来了。

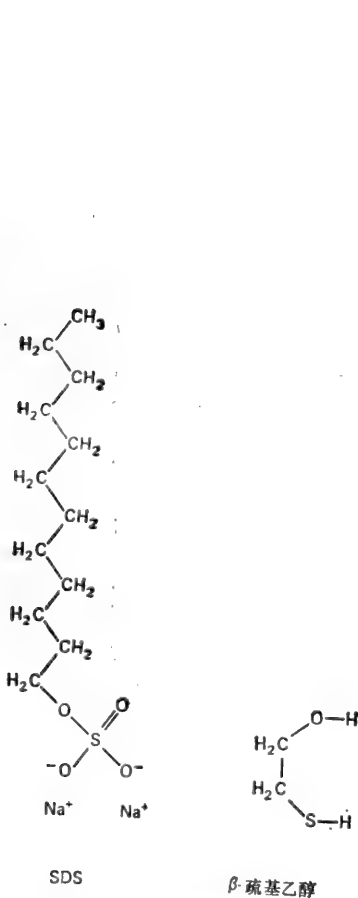


图 4-36 去垢剂十二烷基磺酸钠(SDS)(在本图中是离子形式)和还原剂 β-巯基乙醇是在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中用于溶解蛋白质的两种化学试剂。

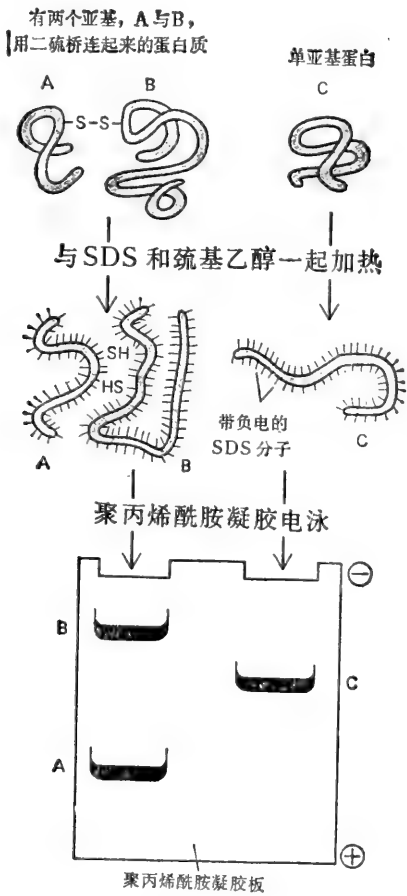


图 4-37 图示 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。这是一种蛋白质分离的有效方法。每个多肽链与带有负电的十二烷基磺酸钠(SDS)形成复合物,因此迁移时作为负电荷的 SDS-蛋白质复合物通过聚丙烯酰胺多孔的凝胶。由于在这种条件下,多肽越小迁移的速度就越大,所以这种技术可用来测定多肽链近似的分子量和蛋白质亚单位的组成。

表 4-10 裂解蛋白质肽键的一些常用试剂

	氨基酸1	氨基酸2
酶		
胰蛋白酶	赖氨酸或精氨酸	任何一种氨基酸
胰凝乳蛋白酶	苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸	任何一种氨基酸
V8 蛋白酶	谷氨酸	任何一种氨基酸
化合物		
溴化氢	甲硫氨酸	任何一种氨基酸
2-巯基-5-噻唑羧苯甲酸盐	任何一种氨基酸	半胱氨酸

试剂对裂解键每边的氨基酸都是特异的。裂解后,氨基酸 1 的羧基被释放出来,这种氨基酸按照通常的写法位于裂解肽键的左边(见组合图 G)。

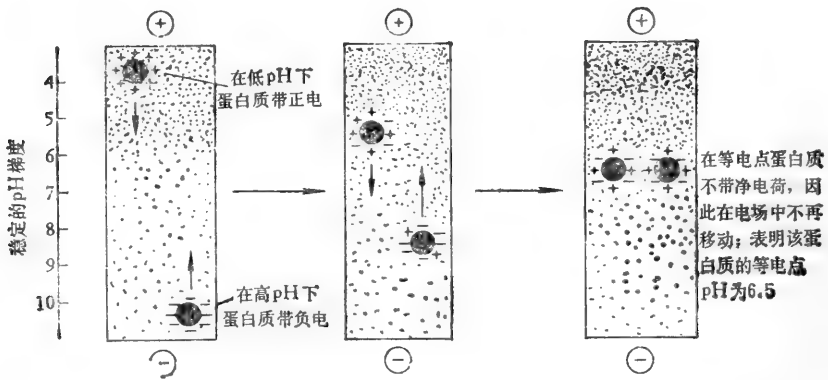


图 4-38 利用等电聚焦分离蛋白质分子。在低 pH(高 H^+ 浓度), 蛋白质的羧基基团倾向于不带电($-COOH$), 氨基基团完全带电(例如 $-NH_3^+$), 使大多数蛋白质带一净正电荷。在高 pH, 羧基基团带负电($-COO^-$), 碱性基团倾向于不带电(例如 $-NH_2$), 使大多数蛋白质带一个净负电荷(见图 2-8)。蛋白质在它的等电点 pH 不带电。因此当一个含有固定的 pH 梯度的管子放入一个强电场时, 管中存在的每一种蛋白质将发生迁移, 直到在它的等电 pH 形成一明显的区带。(如图所示)

白质是否一样。

短的氨基酸顺序可以用自动分析仪分析²¹

一旦蛋白质被裂解成较小的肽, 下一步分析的必然步骤就是确定每个分离出来的肽片段的氨基酸顺序。这是最初在 1967 年设计的通过一系列重复的化学反应完成的。首先, 将这个肽放入一个仅与这个肽氨基末端的自由氨基基团反应的化学药品中。然后将这个化学药品放到弱酸中进一步激活, 这样就专一地切开了连接氨基终端的氨基酸与肽链的肽键, 释放的氨基酸用层析方法鉴定。余下的多肽少了一个氨基酸, 然后再进行同样的反应顺序, 直到肽中的每一个氨基酸都被确定为止。

这些反应的重复性使它们可以自动化地进行, 一种称为氨基酸顺序分析仪的仪器已

经商品化生产,用于肽片段氨基酸顺序的自动测定。最后一步是排列各种肽片段在完整多肽链上的顺序。这是通过比较用不同蛋白酶裂解同一蛋白质得到的数套不同的重叠肽片段的顺序得到的。

最近蛋白质顺序测定技术的改进大大增加了它的速度和灵敏度。这部分是由于缩小了顺序分析仪的结构,部分是由于用于氨基酸分析的快速、高分辨型柱层析的改进。在这种称为 HPLC (高性能液相色谱)的层析仪中,待测溶液通过一个细长的填满小珠的柱。



图 4-39 大肠杆菌细胞里的所有蛋白质用聚丙烯酰胺凝胶双向电泳分级分离。每一个点代表一个不同的多肽链。蛋白质首先根据它们的等电点用等电聚焦法从左到右分离开。这些蛋白质再进一步根据它们多肽的分子量,用电泳法在 SDS 存在的情况下自上而下分级分离。注意,不同蛋白质是以十分不相同的量存在的。(Patrick O' Farrell 赠)

在高压下迫使溶液通过这个柱,这样在几分钟内,而不是在数小时之内,就完成了层析分离,而且分辨率也提高了。由于这些改进,氨基酸分析的灵敏度比原来的方法提高了数千

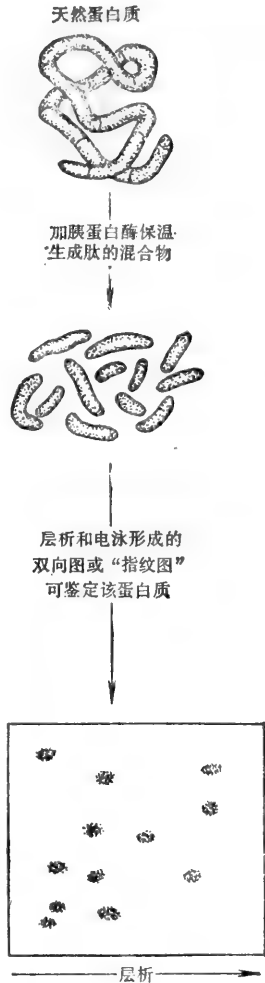


图 4-40 蛋白质的肽图或指纹图谱的产生。在这种情况下蛋白质用胰蛋白酶消化,产生许多小的多肽片段的混合物,然后用电泳和分配层析法作双向分级分离。所得到的斑点图谱就是被分析蛋白质的鉴定依据。

倍。现在有可能测定只有几微克蛋白肽的氨基末端几十个氨基酸的顺序,这些量仅来自一块 SDS 聚丙烯酰胺凝胶的一条带。

尽管有这些改进,并且测定过程已经半自动化,对一个蛋白质的整个氨基酸顺序的测定仍是一项艰巨的任务,随着多肽链的长度增加,其困难也增加。有 100 个氨基酸残基的蛋白质,顺序分析常需经过艰苦工作,但是有时被测定的肽片段是难溶性的,那就不能用常规的方法了。因此,如我们以后要讲到的,大多数蛋白质的顺序确定是用克隆该蛋白质基因,然后用更有效和更快的 DNA 顺序测定方法参照遗传密码来翻译氨基酸的顺序。

小结

来自胎儿和新生儿组织的分离细胞常用作各种类型细胞纯化的起始材料。这种纯化了的细胞,即同源的培养细胞系,可用破碎细胞法作生化分析,并用超速离心法将其组分分级分离。在很多情况下,分级分离细胞的抽提物作为有功能的无细胞系统用于分析复杂的细胞加工过程,如蛋白质合成和 DNA 的复制。

存在于可溶性细胞抽提物中数量相对较多的蛋白质可以容易地用柱层析纯化。由于不同种类柱的基质的的发展,使得有生物活性的蛋白质可以根据它们的分子量、电荷特性或者对其他分子的亲和性而被分离。在一个典型的纯化过程中,样品依次通过几个这样的柱,从一个柱得到的富集组分再过下一个柱。一旦蛋白质纯化至均质,它的氨基酸顺序就可以被测定。该蛋白质首先裂解成一组较小的肽,然后它们的氨基酸顺序用灵敏的自动化程序测定。

甚至非常少量的蛋白质的分子量和亚单位组成也可用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。在双向凝胶电泳中,用第一向等电聚焦电泳,随后用第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质分离成分开的点。这些电泳分离法甚至能用于正常情况下不溶解的蛋白质。

用放射性同位素和抗体示踪细胞的分子

一个分子的几乎所有的特性——物理的、化学的或生物的——原则上都可用来作为检测它的一个方法。在细胞生物学的研究中,经常或者根据分子的光学特性——不论纯的或与染料结合的物质,或者根据它们的生物学活性加以检测。在这一节里我们认为有两种检测法特别有用:即放射性同位素及抗体示踪法。每种方法能检测复杂混合物中的特殊分子。两种方法都极其灵敏,在最佳条件下能检出少于 1000 个分子的样品。

能以极高的灵敏度检测放射性原子²²

大多数天然的元素是略有差异的同位素的混合物,它们在原子核的重量上虽相互不同,但是由于有相同的外层电子,所以有相同的化学性质。放射性同位素的核是不稳定的,并通过随机的衰变产生不同的原子。在衰变过程中,放出含能的粒子(如电子),或者辐射(如 γ 射线)。

表 4-11 在生物学研究中一些常用的放射性同位素

同位素	半衰期	同位素	半衰期
^{32}P	14天	^{14}C	5570年
^{131}I	8.1天	^{45}Ca	164天
^{35}S	87天	^3H	12.3年

同位素按它们发出的 β 辐射(电子)的能量递减次序排列。 ^{131}I 也发射 γ 射线。半衰期是指一个同位素的50%原子衰变所需要的时间。

虽然天然的放射性同位素很少(由于它们的不稳定性),但在核反应中,其他的原子被高能粒子轰击,可以大量地产生放射性原子(表 4-11),因此很容易得到以放射性同位素标记的生物中常见的元素。同位素的辐射可以用很多不同的方法探测。利用电子(β 粒子)在一种气体里的电离作用,可用盖革计数器对它测定,或者利用它们在闪烁液中产生的闪光可在闪烁计数器内测定。用这些方法可以测定生物标本中特殊同位素的量。我们也可以通过同位素对胶片乳剂内的银粒子的作用使之成为可见的斑点对该同位素定位。这些测定方法是极其灵敏的,在适当条件下,几乎每一次衰变——也就是每个衰变的放射性原子——都能被探测到。

放射性同位素用来追踪细胞和有机体内的分子^{22,23}

放射性在生物学中最早的应用是追踪光合作用时碳的化学途径。单细胞的绿藻在含有放射性标记的 CO_2 ($^{14}\text{CO}_2$)的大气中生存,在它们暴露于阳光后的不同时间内用纸层析分离它们的可溶性成分。含有来自 CO_2 的 ^{14}C 小分子用放在干燥后的纸层析图上的照相底片来测定。这样就可鉴定从 CO_2 生成糖的光合作用途径中大多数主要的成分。

放射性分子可以用来跟踪细胞中几乎所有的活动过程。在一个典型的实验中,一个放射性的前体被加入到细胞中,这样放射性的分子就与原来存在的未标记的分子混在一起了,因为它们仅是在原子核的重量上有差别,所以这两种分子都受到细胞同样的处理。放射性分子在位置或化学型式上的变化可以作为时间的函数来示踪。这种实验的分辨率常因脉冲追踪标记记录法的使用而提高,在这种技术里,放射性物质(脉冲)只是极短暂地加入,然后洗掉并换上无放射性的分子(追踪)。经过不同的时间后,取得样品,于是在每个时间点上的放射性物质的位置和化学结构就能测定出来(图 4-41)。

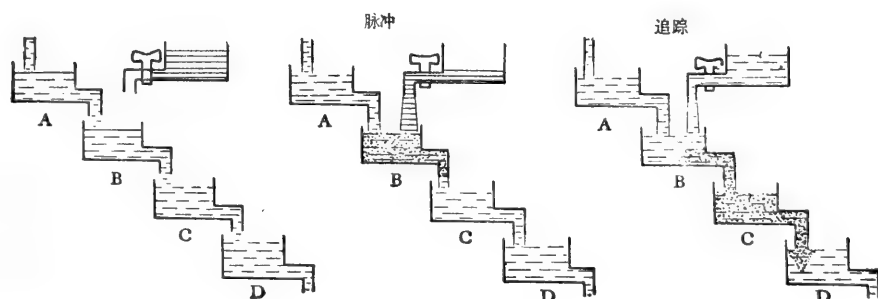


图4-41 示意图画出一个典型的用放射性同位素的脉冲追踪实验。A、B、C、D 标出的小室代表细胞中不同的区室(用放射自显影或细胞分级分离的实验测定),也代表不同的化学化合物(用纸层析或其他的化学方法测定)。

利用这些方法甚至可以追踪如软骨和骨的蛋白质这样稳定、无反应性的分子的命运。事实上，放射性示踪物的使用，证明了在活细胞中几乎所有的分子都不断地被降解和取代。没有放射性同位素，这样慢的转换就不可能被测出来。

今天，几乎所有放射性形式的普通小分子都可以从市场上得到，而实际上任何生物分子，不管它怎样复杂，都能用放射性标记。化合物通常是将放射性原子掺入在它们结构上的特殊位置制备成的，使得同一分子不同部分各自的命运可以被跟踪（图 4-42）。

放射性在细胞生物学上应用的一个重要方面，是通过放射自显影定位完整细胞或组织切片中有放射活性的化合物。这一方法是将活细胞短期地暴露于特异的放射性化合物的“脉冲”之中，并在固定和为了光学或电子显微镜检所作的处理以前，与放射性化合物一起温育不同的时间。然后，在每一制备样品之上涂一薄层的感光乳胶。样品在暗处存放数天以后——在此期间放射性同位素发生衰变——乳胶即可显影。每个细胞中有放射性的部位，是根据暗黑的银颗粒来确定的。譬如，将细胞与放射性的 DNA 前体 (^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷)一起温育，可发现 DNA 是在细胞核内合成的并保留在核内。与上述不

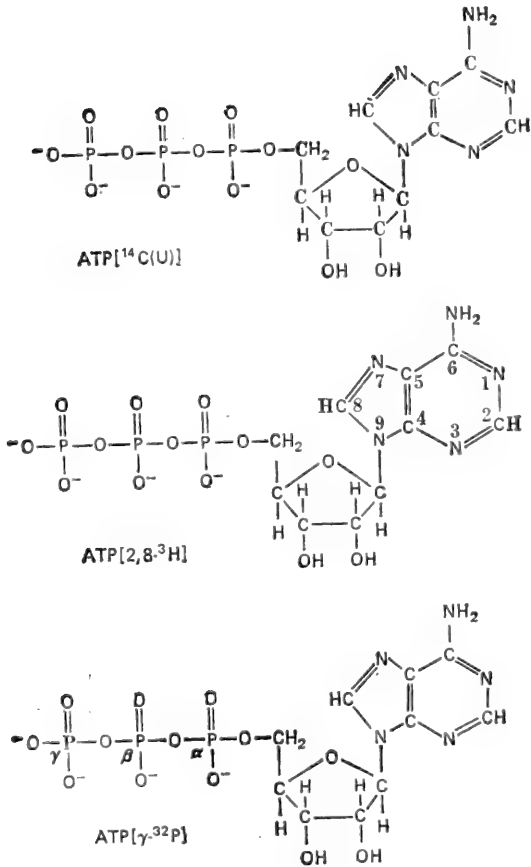


图 4-42 市场上提供的 ATP 的三种放射性形式，放射性原子以黑体表示。用于区别放射性原子的位置和种类的命名法也于图中标出。

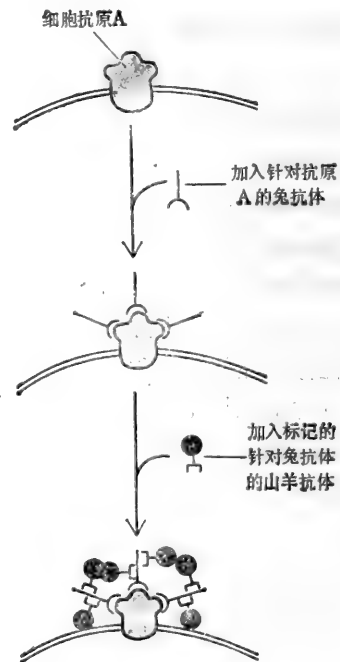


图 4-43 表示抗体如何用来给为显微镜检术而制备的标本中的特殊分子定位的示意图。图示中的改变(称为间接免疫细胞化学)特别灵敏，因为结合到抗原上的每一个抗体本身被识别第一种抗体的许多第二种抗体所识别。第二种抗体与标记分子共价相连，因此能在显微镜下被探测到。标记分子包括荧光素或者碱性萘香红(若丹明)(用于荧光显微镜检术)和铁蛋白(用于电子显微镜检术)。

同的是,以放射性 RNA 的前体 (^3H -尿嘧啶核苷)标记的细胞,可揭示 RNA 最初在细胞核内合成,但后来很快地聚集在细胞质内。

抗体可用于探测和分离特殊的分子²⁴

抗体是脊椎动物防御感染而产生的蛋白质。它们在蛋白质中的特殊性是因为它们有几百万种不同的结构,每一抗体都有一个不同的特异地识别诱导它们产生的分子(抗原)的结合部位。抗体对抗原的严格的特异性,使它们成为细胞生物学家有力的工具(图 4-43)。用荧光染料标记后的抗体,在通过荧光显微镜检术对细胞中特异的分子定位时有极大的价值(图 4-44);如果它们偶联着电子密度大的分子(如铁蛋白),则在电子显微镜中可高分辨率地对细胞抗原定位。抗体作为生化工具,常被用来对经聚丙烯酰胺凝胶电泳分级分离后的特殊蛋白质作鉴定。而且抗体能偶联到非活性的基质上制备成亲和柱,该柱既可用于纯化来自细胞粗抽提物的特异大分子,或者,抗原如在细胞表面,也可用于从异质性的细胞群中检出活细胞的特异类型。通常,抗体是由给动物(如兔或山羊)注射若干次抗原样品后产生的,然后收集富含抗体的血清。这种抗血清包含抗体的异质性混合物,每种都是由一个不同的抗体分泌细胞(一个 B 淋巴细胞)产生的。不同的抗体识别抗原分子的不同部位,以及在抗原制备中的杂质。抗血清对特殊抗原的特异性,有时候可以用去除会结合其他分子的不需要的抗体分子而提高;例如,针对蛋白质 X 产生的抗血清能够通过 Y 和 Z 抗原的亲和柱,以去除任何杂有抗 Y 和抗 Z 的抗体。不过,这种抗血清的异质性仍然限制了它们的可利用性。

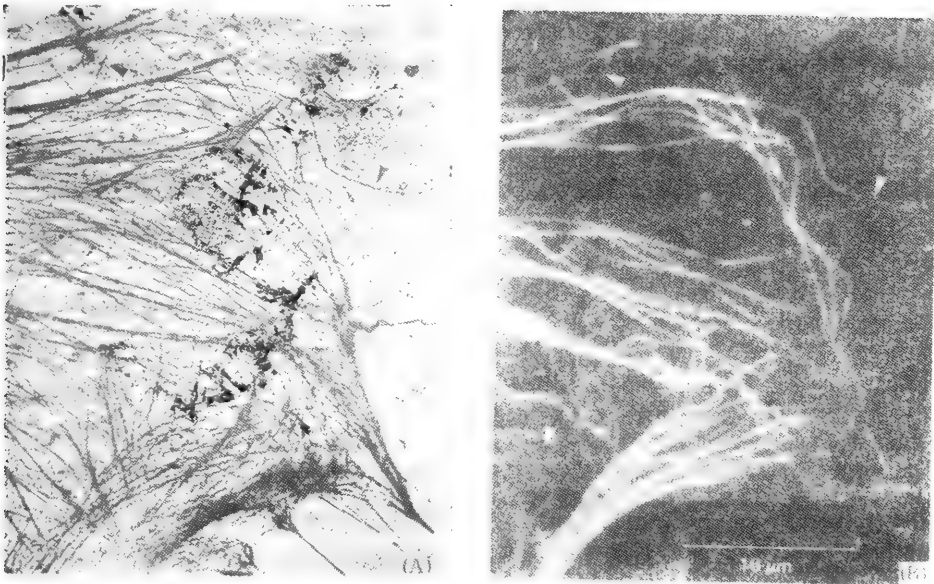


图 4-44 (A)培养的上皮细胞外周部分的电镜照片。显示微管和其他微丝的分布。(B)用间接免疫细胞化学方法对同一区域的微管蛋白(微管的蛋白亚基)的荧光抗体染色。箭头指出每个微管在两幅图中都容易被认出。(引自 M. Osborn, R. Webster and K. Weber, *J. Cell Biol.* 77: R27—R34, 1978, 洛克菲勒大学出版社同意复制)

杂交瘤细胞系提供了单克隆抗体的一个永久性来源²³

1967年新技术的发展克服了抗血清异质性的问题，这种技术革新了抗体作为细胞生物学工具的应用。该技术包括单个产生

抗体的B淋巴细胞的克隆化，这样就能大量得到均一型的抗体。由于B淋巴细胞在培养中的寿命通常是有限的，可将来自免疫小鼠单个的产生抗体的B淋巴细胞与来自无限繁殖的B淋巴细胞肿瘤的细胞融合。从形成的异质性的杂种细胞的混合细胞中我们可以选择出那些既有能力产生特种抗体又能在细胞培养中无限繁殖的杂种细胞。这些杂交瘤被扩增成细胞克隆，每个克隆可成为一种单克隆抗体的永久和稳定的来源(图4-45)。

因为单克隆抗体是一个B淋巴细胞的产物，它们是由一群相同的抗体分子组成的，每个分子都有相同的抗原结合部位。例如，这个结合部位将识别一个蛋白质上五个或六个氨基酸侧链的特殊基团的限定构象，或识别多糖中相似数目的糖残基。由于单克隆抗体均一的特异性，它们比常规的抗血清有大得多的优点，后者通常包含着能识别甚至在一个小的大分子上各种不同抗原部位的抗体。

但是杂交瘤技术最重要的优点是能制备出针对未提纯的分子的单克隆抗体，即使这种分子在一个复杂的混合物中含量很少。这个优点来自这样的事实，即产生特殊抗体的各杂交瘤细胞克隆能够从产生各种不同抗体的大量的、不同的杂种细胞混合物中筛选出来。因此在

原则上单克隆抗体能够针对细胞中的任何蛋白质制备出来。每一单克隆抗体能作为一个特殊的探针，既可以细胞学方法定位蛋白质，又可纯化蛋白质，以便研究它的结构和功能。据估计存在于典型哺乳动物细胞中10000种左右的蛋白质，其中已被分离的不到5%，这就很难想像细胞生物学这个领域会不受到单克隆抗体革命的影响。

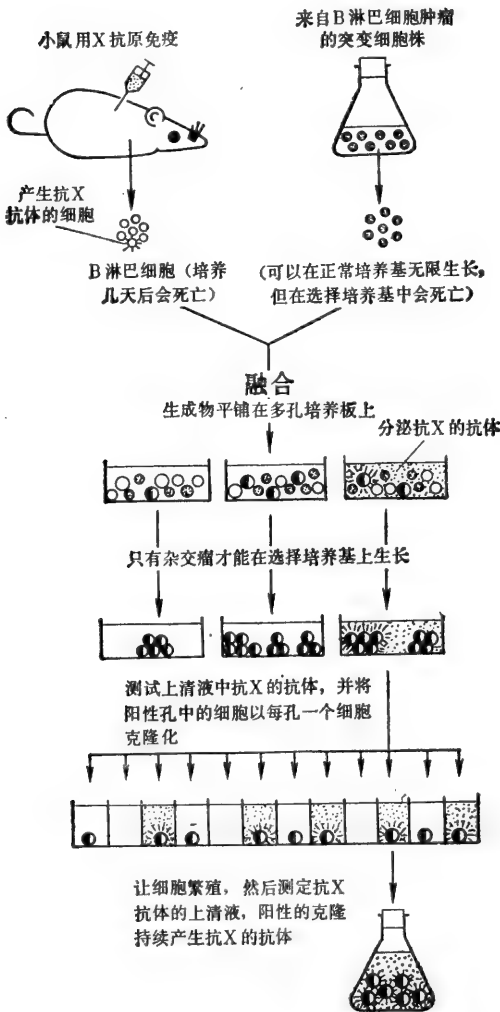


图4-45 示意图表明如何制备针对一个特殊抗原X产生均一性的单克隆抗体的杂种细胞(或杂交瘤)。选择性生长的培养基内含有抑制剂(氨基嘌呤)，它能阻断核苷酸生物合成的通路。因此细胞就必须通过旁路来合成核酸，而与正常B淋巴细胞融合的突变细胞的这个旁路是有缺陷的。因而，原来两种融合的细胞都不能单独生长，只有杂种细胞才能生存。

抗体和其他大分子可以被注入到活细胞中²⁶

抗体分子常用于使与它们结合的分子失活。例如将神经生长因子的抗体注入到新生的小鼠中,阻碍了某些类群的神经细胞的发育。同样,与特定类型的细胞表面分子起反应的抗体能够用来从混合的群体中清除这些细胞。

外面加入的抗体不能接触到活细胞内的蛋白质,因为大分子不能渗入原生质膜。但是由于原生质膜是自我封闭的(seef-sealing),我们有可能用细玻璃针将抗体和其他大分子引入真核细胞的细胞质中。例如,抗肌球蛋白的抗体注入海胆卵,可阻止卵细胞分裂成两个细胞,虽然细胞核分裂正常。这一观察表明肌球蛋白在有丝分裂期使原生质分裂的收缩过程中起决定性作用,但提示了在有丝分裂的纺锤体形成中并不需要肌球蛋白的参与。单克隆抗体的高度特异性以及易被制备成浓缩状态,对于上述应用方式特别适宜。

微注射正被越来越多地应用于不仅将抗体,而且也将其他的大分子,甚至细胞器导入到哺乳动物的细胞中;一个熟练的实验者在组织培养皿中在一小时就能注射几百个细胞。另一种方法是可以利用脂质小泡或红细胞空壳(“血影细胞”)将特殊的大分子同时导入大量的哺乳动物细胞中去。这种小泡或血影细胞先装满要导入细胞的物质,然后使之与活细胞的质膜融合,这样它们的内含物就递交给了靶细胞的细胞质。在合适的条件下,细胞群体中 50% 以上的细胞能以这种供应方式获得分子。

小结

细胞中的任何分子能以一个或多个的放射性原子掺入加以标记。这些不稳定的原子蜕变时放出辐射,因而可示踪该分子。放射性同位素在细胞生物学中多方面的应用包括对代谢途径的分析和用放射自显影定位细胞中单个大分子。

抗体也是对特异性生物分子检测和定位的多用途的灵敏工具。脊椎动物制造几百万个不同的抗体分子,每个抗体都有一个能识别某个分子特殊区的结合部位。杂交瘤技术使我们取得有单一特异性的单克隆抗体的数量实际上是无限的。在原则上,可以制备针对任何细胞大分子的单克隆抗体,并可以用来定位和纯化这种分子,至少在有些情况下还可用来分析它的功能。

重组 DNA 技术²⁷

本世纪 70 年代早期, DNA 对生物学家来说是最难加以分析的细胞成分。由于 DNA 极长和化学上的单调性,遗传物质的核苷酸顺序只能用间接的方法测定,如通过蛋白质和 RNA 的顺序分析或遗传分析。今天这种情况完全改变了。DNA 从细胞中最难分析的大分子变成最容易分析的大分子。现在已有可能切取 DNA 特殊的区段,获得几乎是无限数量的该区段的拷贝,并且以一天几百个核苷酸的速度来测定它们的顺序。

新的重组 DNA 技术提供了有力的新方法了解真核生物基因调控表达的复杂机制,它大大地减少了传统的测定一个蛋白质氨基酸顺序的方法的使用。相同方法的潜心

研究为蛋白质激素和疫苗大规模经济地生产提供了广阔的商品化生产的前景，虽然现时这还是很费力和昂贵的。

重组 DNA 技术是各种技术综合组成的，有些是新的，有些是从其他领域，如微生物遗传学移植过来的（表 4-12）。最重要的技术是（1）用限制性核酸酶专一地切开 DNA；

表 4-12 重组 DNA 技术发展的主要阶段

1869	Miescher 第一次分离了 DNA。
1944	Avery 提供了在细菌的转化中携带遗传信息的是 DNA，而不是蛋白质的证据。
1953	Watson 和 Crick 在 Franklin 和 Wilkins X 射线衍射研究结果的基础上提出了 DNA 结构的双螺旋模式。
1961	Marmur 和 Doty 发现了 DNA 的复性作用，确定了核酸杂交反应的专一性和可行性。
1962	Arber 提出了第一个证据，证明 DNA 限制酶的存在，导致以后对该类酶的提纯，并由 Nathans 和 H. Smith 应用于 DNA 序列分析。
1966	Nireberg, Ochoa 和 Khorana 阐明了遗传密码。
1967	Gellert 发现了 DNA 连接酶，该酶将 DNA 的片段连在一起。
1972—1973	Boyer, Cohen, Beig 的实验室和他们在旧金山的斯坦福大学、加州大学的同事们发展了 DNA 克隆化技术。
1975—1979	Sanger, Barrell, Maxam 和 Gilbert 发展了快速 DNA 序列分析方法。

（2）核酸杂交，即利用它们与互补核酸顺序的结合能力使有可能极准确极灵敏地鉴定出

DNA 或 RNA 的特殊序列；（3）DNA 克隆化，只要一个特殊的 DNA 片段被整合进一个快速复制的遗传成分（质粒或病毒），它就能在细菌或酵母细胞中扩增；（4）克隆化 DNA 片段中核苷酸的 DNA 顺序分析。

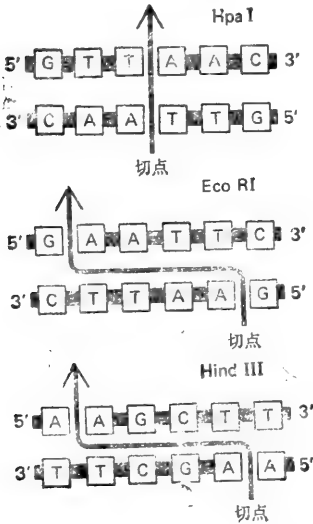


图 4-46 被三个常用的限制性核酸酶识别的 DNA 核苷酸序列。如图例所示，这些序列通常长度是六个碱基对和“回文”形的——即二股链的核苷酸序列在被识别的区段都是相同的。DNA 的二股链在识别序列上或其邻近被切开，切口经常是交错的，造成一个粘性末端——以 Eco RI 和 Hind III 为例。限制性内切酶是从各种细菌中得到的：Hpa I 来自副流感嗜血杆菌 (*Hemophilus sparsa influenzae*)，Eco RI 来自大肠杆菌，Hind III 来自流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae*)。

限制性核酸酶在专一的核苷酸序列上水解 DNA 分子²⁵

很多细菌产生称为限制性核酸酶的一类酶，用以降解侵入的外源 DNA 分子以保护自身。每种内切酶识别 DNA 中四个到六个核苷酸的序列。在细菌本身基因组内相应的核苷酸序列是由腺嘌呤 (A) 或胞嘧啶 (C) 残基上的甲基化掩饰起来的，但是任何侵入细胞的外源 DNA 立即被这种核酸酶识别出来，它的两股 DNA 螺旋链都被切断(图4-46)。从不同种的细菌中已提纯了限制性核酸酶，现在有商品供应的核酸酶在 100 种以上，其中大多数能识别不同的核苷酸序列。

一个特殊的限制性核酸酶可将任意长度的 DNA 双螺旋切成一系列称为“限制性片段”的片段。通过比较用不同限制性核酸酶综合处理后从一个特殊遗传区段产生的 DNA 片段的大小，可

以构建成一个限制图，用以表明每一个限制切点和它邻近切点有关的位置。因为这样的图反映了在这个区段里所选择的核苷酸序列的排列，因此，对两个或更多相关基因作这种图的比较，就可以粗略地估计它们之间的同源性。例如，人、猩猩和黑猩猩自从它们在进化中分离以来的大约 500 万年到 1 000 万里，它们在染色体上为血红蛋白链编码的整个区段的限制图，也可以认为是核苷酸序列，大致没有改变（图 4-47）。

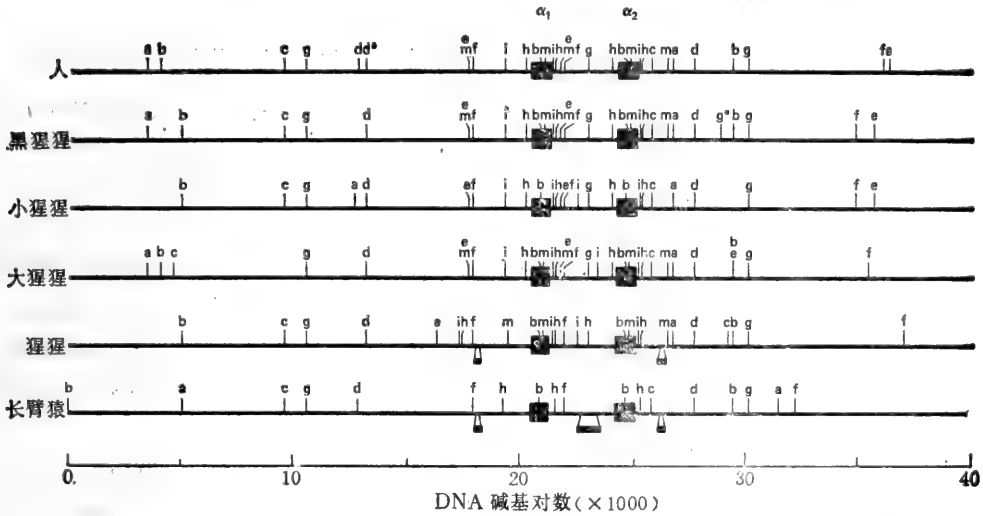


图 4-47 人和各种灵长类的为血红蛋白编码的一簇基因的 DNA 限制图。每个图中的二个方块表示相当于 α -珠蛋白基因的 DNA 位置。每个字母代表一个不同的限制性核酸酶的切点。每个切点的位置是比较了用不同限制性核酸酶单独地和共同地处理的 DNA 所产生的 DNA 片段的大小而确定的。(Elizabeth Zimmer 和 Alan Wilson 赠)

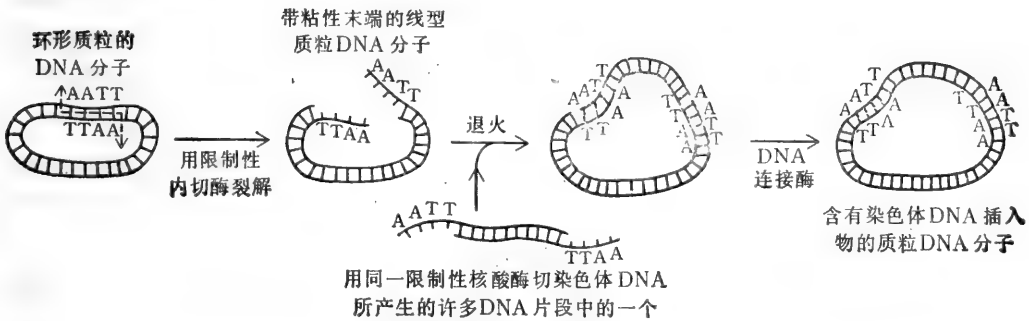


图 4-48 很多种限制性核酸酶产生的粘性末端(见图 4-46)使两个 DNA 片段通过互补的核苷酸碱基对的相互作用连在一起。以这种方式接起来的 DNA 片段能在 DNA 连接酶催化的反应中共价连接。在本例中形成了一个含有染色体 DNA 插入的杂交质粒 DNA 分子。

许多限制性核酸酶产生交错的切口，这样在两片上就会留下短的单股末端。这称为“粘性末端”，因为它们能与同一酶切成的任何末端形成互补碱基对。一个环形的 DNA 分子用这种限制性核酸酶切成的单切口，通过它粘性末端的“退火”（碱基配对）将有助于再形成一个环。用限制性酶产生的粘性末端在 DNA 重组技术中一直是很重要的，因为

它们能将任何两个 DNA 片段连接起来，只要这些片段是用同一种限制性核酸酶产生的，并因此具有互补的粘性末端。一旦两端用互补的碱基配对连接起来，它们就可以被称为“DNA 连接酶”的酶愈合，即在 DNA 每股链的相反端之间形成共价的磷酸键(图 4-48)。限制性酶和 DNA 连接酶的结合使用有可能将任何 DNA 的片段移植到自我复制的成分中去。

选定的 DNA 序列可以用克隆化大量产生²⁹

可以将任何来源的 DNA 片段插入到质粒或者细菌的病毒(噬菌体)的 DNA 中

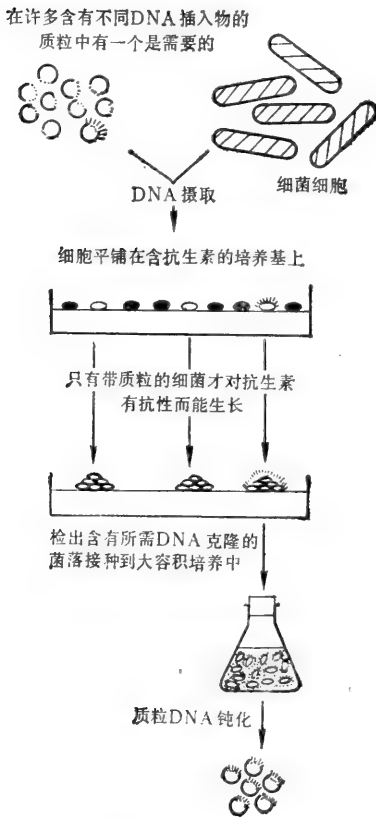


图 4-49 利用在细菌中 DNA 的克隆技术将一个特殊的 DNA 序列纯化和扩增。在酵母细胞中 DNA 片段的克隆过程与之相似。

去，然后让噬菌体和质粒在细菌(或者酵母)中生长而将 DNA 扩增至数百万倍以上，这一过程称为 DNA 克隆化。质粒是环形的双链 DNA 小分子，自然发生于细菌和酵母中，在寄主细胞增殖时，它们也作为一个独立的单位复制。尽管它们通常只作为寄主细胞总 DNA 的一小部分，它们却带有重要的基因，例如对抗菌素有抗性的基因。这些基因和相对较小的质粒 DNA 均被用于 DNA 重组技术中。

由于质粒 DNA 小得多，所以很容易将它与寄主细胞的 DNA 分离，并加以纯化。用作克隆化载体的提纯的质粒 DNA 先用限制性核酸酶切一次，然后与要克隆化的 DNA 片段退火相连。由此产生的杂交质粒 DNA 分子再转导到经加工后暂时允许大分子透过的细菌中去。经过处理的细胞只有一部分接受质粒。这些细胞可根据质粒赋予的抗生素抗性加以筛选，因为只有这些细胞能在抗生素存在的情况下生长。当这些细菌分裂时，质粒也复制，产生大量的导入的 DNA 片段的拷贝(图 4-49)。在增殖的最后阶段，这种质粒的 DNA 分子被提纯，导入的 DNA 片段用同一限制性内切酶作第二次处理切开(图4-50)。

克隆化的 DNA 经常是用一个特殊的限制性内切酶切开一个细胞的整个基因组得到的。以这种方式会得到大量的 DNA 片段，例如从一个哺乳

动物的基因组总会得到 10^5 到 10^7 个片段。因此克隆化过程可能产生数百万个不同的细菌或酵母的菌落，每个菌落内的质粒携带不同的基因组 DNA 插入序列。必须将含有需要的基因组 DNA 区段的质粒的少数菌落选出，并让它们增殖形成一个大的细胞群，或者称为克隆。筛选所需的菌落往往是克隆过程中最困难的任务。常规用于鉴定含有一个特异的被克隆化的 DNA 片段的菌落的技术要用到与被克隆化的 DNA 互补的放射性核酸探针。我们现在将要讨论这样的探针是怎样制备的。

特殊的 mRNA 分子的拷贝可以被克隆化^{30,31}

上文描述的克隆技术有时可称为“鸟枪法”，因为整个基因组 DNA 被切成大量的，

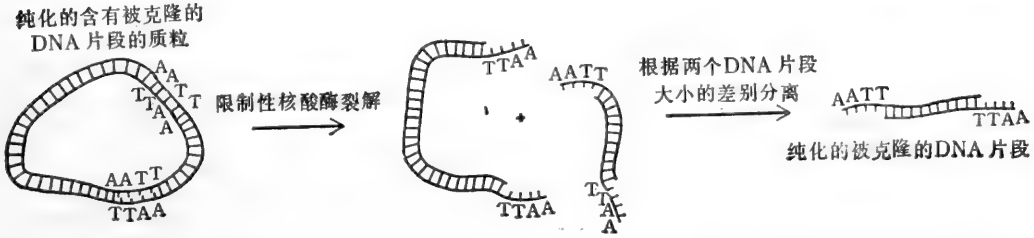


图 4-50 从一个包含重组 DNA 分子的质粒回收被克隆的 DNA 片段。用原来克隆切出 DNA 片段(见图 4-48)相同的限制性核酸酶从质粒里再将该片段切出来。

随机地携带基因的片段。结果，有的包含一部分基因，很多片段却只含有不编码的 DNA，即根本没有基因。另一种策略是从只选择那些转录为 RNA 的 DNA 序列入手开始克隆化过程。做法是从细胞中抽出 mRNA (或者提纯的 mRNA 的亚组分)然后将其中每个 RNA 分子做成 DNA 拷贝(称为 cDNA 分子)。这通过反转录酶有可能做到，因为反转录酶以 RNA 为模板，催化相反的过程，合成互补 DNA，而不是催化 DNA 转录成 RNA。用反转录酶合成的单链 cDNA 可以用 DNA 聚合酶转变为双链的 cDNA 分子，再插入到质粒中做成克隆(图 4-51)。

质粒可以用这样的方法构建，即使得被克隆的 cDNA 在细胞内指导由 cDNA 编码的特殊蛋白质大量合成。用这种“遗传工程”的方法，细菌或酵母能被诱导大量制造有用的蛋白质如人的胰岛素，生长激素和干扰素。

另外，cDNA 还可被用来鉴定由“鸟枪法”产生的含有少数基因的克隆。这个方法是用放射性核苷酸前体做成单链 cDNA。由此做成的放射性标记的 DNA 能以下述方法与互补的基因组克隆杂交。因为 cDNA 是从 mRNA 做成的，所以它与编码蛋白质的基因组 DNA 相当，并且它与克隆里的 DNA 杂交就表明该克隆包含着编码 mRNA 分子基因的一部分。

克隆化的 DNA 片段可立即作序列分析³²

当前，已有可能简单而快速地测定被克隆的 DNA 片段的序列。这些方法之一的原理在图 4-52 和图 4-53 中示明。这种新技术业已导致了 100 多个哺乳动物全部基因的 DNA 序列的确定，其中包括为胰岛素、血红蛋白、干扰素和细胞色素 C 编码的基因。目前测定一个蛋白质氨基酸序列最容易最准确的方法是对编码它的基因作序列分析，然后用遗传密码作词典，从核苷酸序列反推出蛋白质的序列。尽管在原则上有 6 种不同的读码，从它可以将任何 DNA 的序列读成蛋白质(每一链上有三种读码)，通常认为只是那种不经常出现终止密码的序列才是准确的序列。DNA 顺序的信息量是这样地大 ($>10^6$ 核苷酸)，以致必须用计算机来贮存和分析。

核酸杂交反应提供了测定特殊核苷酸序列的一个灵敏方法³³

当 DNA 水溶液加热到 100°C 或者置于非常高的 pH (≥ 13) 时，通常将双螺旋的二

股链连在一起的互补碱基对断开,双螺旋立即解开成二股单链。这个被称为 DNA 变性过程,很多年来被认为是不可逆的。但是在 1961 年发现,假如互补的 DNA 单链在 65°C 保存较长时间很容易重新形成双螺旋(该过程称为 DNA 复性或杂交)。两股单链的核

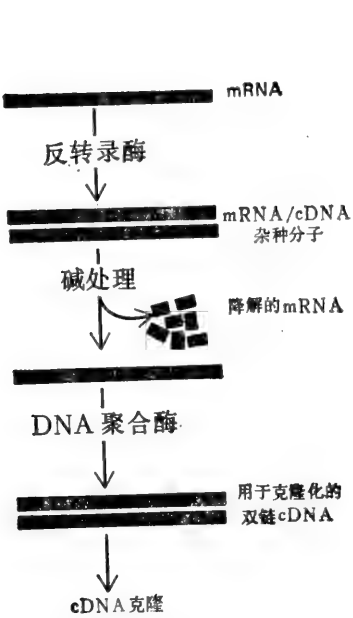


图 4-51 一个 mRNA 分子的 DNA 拷贝(cDNA)是由反转录酶产生的,该酶是一种病毒的酶,它以单链 RNA 为模板合成一条互补的 DNA 链,因此形成 DNA/RNA 杂交螺旋链。用碱处理 DNA/RNA 杂交螺旋链,可选择性地将 RNA 链降解成核苷酸。余下的单链 cDNA 被 DNA 聚合酶复制成双螺旋的 cDNA。

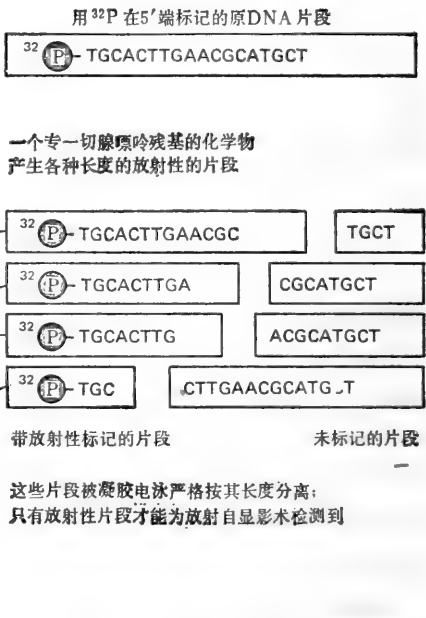


图 4-52 在一定类型的核苷酸上随机裂解一条 DNA 链而产生的一组 DNA 片段。每次裂解都是通过温和的化学处理,从链上切除一个核苷酸,而让绝大多数这类被切除过的核苷酸链保持完整。只有左边 5' 末端的 [³²P] 磷酸基团有放射性。

酸 (DNA:DNA, RNA:RNA 或 RNA:DNA) 只要它们有互补的核苷酸序列,它们之间就会发生类似的杂交反应。

由于双螺旋形成的速率受到两股互补核酸链发生碰撞的速率所限制,带有特殊核苷酸顺序的 DNA 分子的浓度能通过所用的 DNA 制备物与互补序列的有放射性标记的克隆化 DNA 探针杂交的速率来量度。这是一个如此严格的试验,以致在每个细胞中一个分子浓度存在的互补 DNA 序列也能被检出(图 4-54)。从这样的测定中,可以判断一个细胞的 DNA 中有多少克隆化探针中的 DNA 序列的拷贝。大多数的序列在每个单倍体基因组内只出现一个或几个拷贝,而另有一些却存在着几十万个拷贝,即所谓重复 DNA 序列。

另外,杂交的研究还能用从细胞里分离出来的 RNA,判定被克隆的 DNA 序列是否是那些转录成 RNA 的序列之一。假如是的,则可确定细胞又能制成多少 RNA 拷贝,这些拷贝又由哪种细胞、哪种组织形成。更精确的方法鉴定了与细胞的 RNA 分子杂交的克隆化探针的精确区段,因此确定了 RNA 转录的起始点和终点(图 4-55)在 RNA

转录后加工过程中从 RNA 转录本中被切除出去的区段（即内含子序列）也是用这种方法确定的。

克隆化的 DNA 放射性探针广泛地用于定位从凝胶分级分离的 DNA 限制性片段混合物中的特殊核苷酸序列。利用扩散或者电泳将所有分级分离的 DNA 片段转送到一张硝酸纤维纸上，制成凝胶的一个复本，这个过程称为印迹（blotting）。与放射性 DNA 探针杂交的片段的位置可以用放射自显影辨认出来（图 4-56）。在相似的方法中，硝酸纤维纸的复本可以用生长在琼脂表面细菌的密集菌落制成，这样纸上与特殊放射性探针发生的杂交可用来辨认少数几个带有新克隆化的特殊 DNA 片段的细胞。

原位杂交用于染色体和细胞的特殊核酸序列的定位²¹

核酸，不亚于其他大分子，在细胞和组织中也占据了精确的位置，当把这些分子用匀

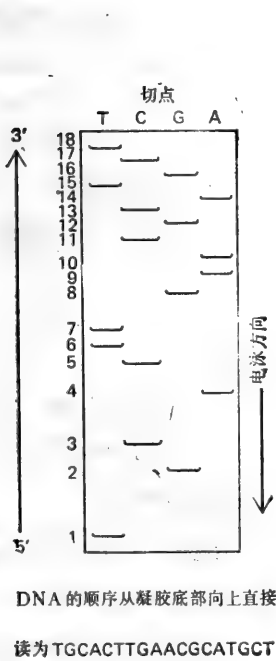


图 4-53 示意图表明一种 DNA 序列分析方法。在图 4-52 中描述过的过程同时在相同 DNA 的四个单独的样品中进行，第一个样品用化学制剂专一地在 T 上裂解 DNA，第二个断裂在 C 上，第三个断裂在 G 上，第四个断裂在 A 上。形成的片段在同一块凝胶的平行道上走电泳，从得到的图谱可以读出 DNA 的序列。最靠近该序列 5' 端的核苷酸由胶上横看为水平 1 处（在胶的底部）和在哪一条道上显带（T）来决定。以同法再确定水平 2、水平 3……的核苷酸，就得以读出 DNA 的序列。这个方法在本处被理想化了。实际上化学处理的专一性比表示的要差。

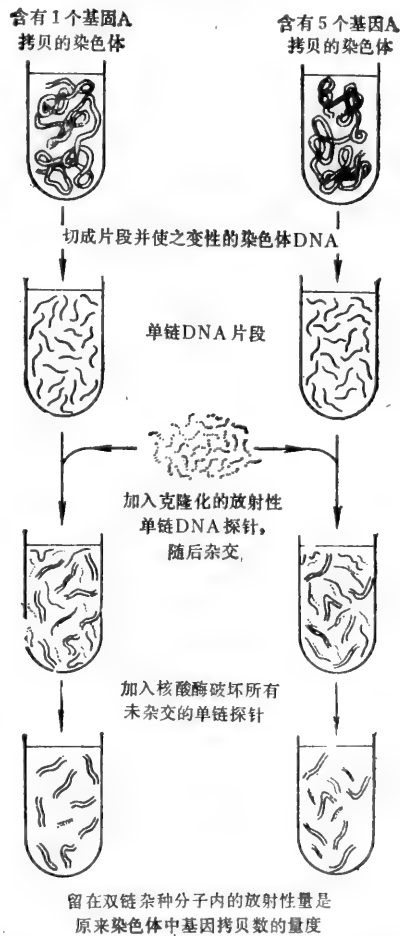


图 4-54 用 DNA 杂交方法测定一个特殊基因在 DNA 样品中的拷贝数。在这类实验中使用的放射性单链 DNA 片段通常称为 DNA 探针；该处染色体的 DNA 未加放射性标记。

浆法从细胞中抽提出来时，许多重要的信息丢失了。由于这个原因，发展了技术，其中核

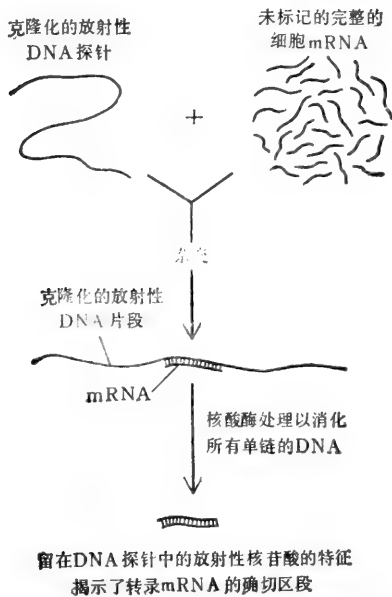


图4-55 核酸杂交用于确定克隆化的 DNA 片段转录出 mRNA 的区段。用这种方法发现了真核基因中存在着
间隔序列(内含子)。

苷酸探针像标记的抗体示踪法那样，用来对染色体上或特殊种类细胞里的特殊核苷酸序列在原处定位。早期的原位杂交法，将强放射性核酸探针与短暂地放入高 pH 以破坏 DNA 的碱基配对的压片及固定了的染色体杂交。经反复洗涤后，染色体上与放射性探针结合的区段可以用放射自显影显示出来(图 4-57)。最近，用荧光染料标记核酸探针的特殊方法的发展提高了这一技术的空间分辨率。

类似的原位杂交法已用于探测在特别大的灯刷染色体上有正在生长的特殊的 RNA 转录物的存在，此法由于染色体未置于高 pH 中，因此染色体的 DNA 保持双链，不能与探针结合。同样的方法还可用于固定的组织切片，来判定在复杂的组织中哪一些细胞含有与特殊 DNA 探针互补的细胞质 RNA 分子。

重组 DNA 技术甚至能够研究一个细胞中的微量蛋白质^{31,35}

直到最近，能被研究的蛋白质还只是那些在细胞中含量相对较多的蛋白质。从几百克的细胞群开始，含量为细胞总蛋白质 1% 左右的一个主要蛋白质可以用一系列简单的层

表 4-13 利用重组 DNA 技术对细胞中一个微量蛋白作大量纯化的步骤

1. 利用一系列传统的层析方法对细胞的抽提物作分级分离，直到所需要的蛋白被充分富集。经过一个有高度分离能力的凝胶电泳后，从凝胶上将该蛋白质切出来，得到 1μg 纯的这种蛋白质。
2. 在微量序列分析仪上分析这个变性的蛋白质，确定它的氨基端前 30 个氨基酸的序列。
3. 用遗传密码预测与上述氨基酸序列相对应的 mRNA 的核苷酸序列。用快速的化学方法合成一套短的 DNA 片段，长度为 15—20 个核苷酸，其中的一个将与该 mRNA 序列的一部分形成互补的碱基对(这里将会有一些疑问，因为几个不同的密码子为同一个氨基酸编码)。
4. 将这些短的 DNA 片段与总的细胞 mRNA 杂交，并用它们来指导反转录酶作用于带互补序列的 mRNA 分子。反转录酶以这些互补的 mRNA 分子为拷贝，产生长的 cDNA 分子(图 4-51)。
5. 用克隆技术(图 4-49 和图 4-50)生产大量的 DNA，这种 DNA 分别含有这些 cDNA 分子中的每一种序列。
6. 从每一个 cDNA 克隆制备的 DNA 与细胞的总 mRNA 杂交，从而选出并纯化那些分别与每个克隆化 cDNA 序列互补的 mRNA 分子。
7. 用无细胞蛋白质合成法把每个得到的 mRNA 制备物译成蛋白质，以便确定哪一个 mRNA 为所需的蛋白质编码。
8. 对相应的 cDNA 作序列分析(图 4-53)，并用遗传密码确定该蛋白质全部的氨基酸序列和为该蛋白质编码的序列的起始点和终点在何处。
9. 将克隆化的 cDNA 序列插入到一个含有插入了转录和翻译起始信号的特殊设计的 DNA 载体质粒中去。用含有这个新质粒克隆的细菌或酵母细胞为原材料，大量分离(100 mg 或更多)这种纯蛋白质。

析和电泳方法提纯,得到大约 0.1 g (100 mg) 的纯蛋白。这样一个蛋白质的量足够用于常规的氨基酸序列分析,对它的生物学和酶学活性(假如有的话)作详细分析,并用以诱导产生抗该蛋白质的抗体,然后用抗体在细胞内定位这种蛋白质。此外,如有适合的晶体生成,这个蛋白质的三维结构还能用 X 射线衍射的晶体图谱加以分析。用这种方法业已测定了许多含量高的蛋白质的结构和功能,其中包括血红蛋白,胰蛋白酶,免疫球蛋白和溶菌酶。

真核细胞中成千上万种不同蛋白质中的绝大多数,包括很多起重要作用的蛋白质,仅以很少的量存在。其中大部分蛋白质要想得到几微克以上的纯物质,即便不是不可能,也是极端困难的。然而,在原则上重组 DNA 技术使得在细胞中的几乎所有的蛋白质,包括微量的蛋白质,能被用来作同样的结构上和功能上的研究,这在以前仅有少数几个蛋白质才有可能做到。使这项工作成为可能的几个步骤归纳于表 4-13。

突变的基因现在可以加以矫正³⁶

设想有人从一个细胞的抽提物中分离出一个新蛋白质并用上述“鸟枪法”技术将它的

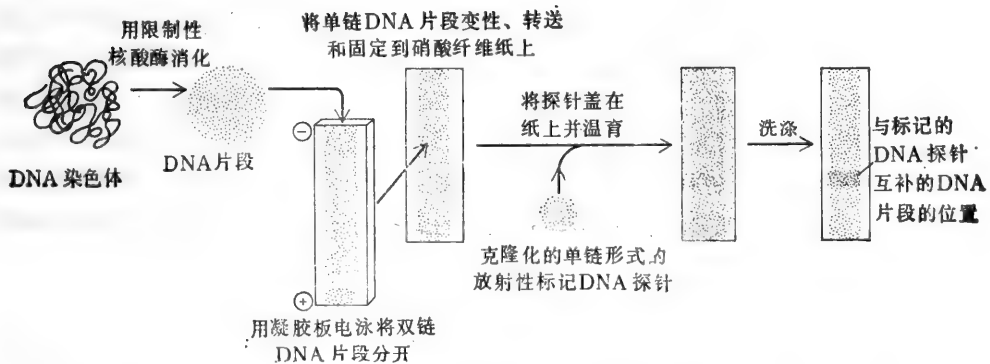


图 4-56 一个 DNA 样品被限制性核酸酶切开以后再用电泳把它们分离,存在的许多不同 DNA 片段用印迹法被转送到硝酸纤维纸上,然后在退火条件下使其与放射性 DNA 探针接触一段时间。纸经过反复洗涤,这样只有与探针杂交的那些 DNA 片段能保留放射性标记,并在纸片的放射自显影照片上显出带来。

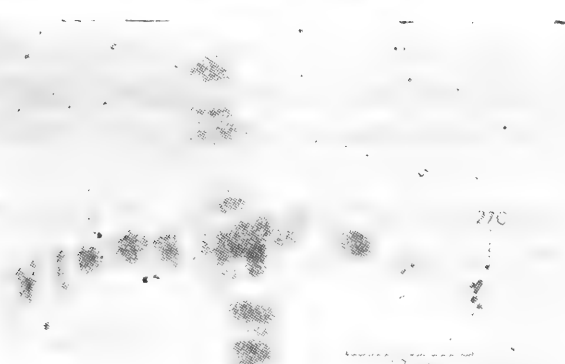


图 4-57 用一个放射性克隆化 DNA 探针与果蝇多线染色体原位杂交对果蝇的一个基因定位。在放射自显影相片中测到的一簇染黑的银粒如图所示,位于染色体图的 27 C 位置。图中显示存在于每条幼虫的唾腺细胞中的四条巨大染色体中的二条的一部分。(Steven Henikoff 赠)

基因克隆化。他怎么能发现该蛋白质在细胞里所起的作用呢？这个问题是惊人的困难，因为无论蛋白质的三维结构还是它的基因的全部序列都不能识别这个蛋白质的功能。并且很多蛋白质，如细胞中的结构成分或者大的多酶复合体部分的蛋白质，当它们与功能单位的其他成分分离时就没有明显活性了。

一个已经讨论过的方法是用特异性抗体使特殊蛋白失活。当上述方法与微量注射技术结合时，便得到了一个测定蛋白质功能的有效探针。但是有些在蛋白质上的抗原点，即使将抗体分子注射到细胞质中也到达不了。况且，许多抗体与蛋白质分子结合并不能使它们失活。

遗传学方法为这个问题提供了一个完满的解决。缺少一个特殊蛋白质的突变型，或者更有用的是能合成该蛋白质的一种温度敏感型复本的突变型，当温度略有上升（或下降）时，这个蛋白质就失活，这就能很快地揭示这个正常蛋白质分子的功能。虽然这个方法已广泛地应用（例如阐明了细菌的主要代谢途径），但主要还是限于在快速复制的有机体——如细菌、酵母、线虫和果蝇中应用，因为从这些有机体中能很快地分离出大量的突变型，然后筛选出所需要的特殊缺陷型。

原则上通过制造细胞外的特殊“突变”，这种遗传方法应用面就更广了。用最近发展的方法，一个分离的克隆化基因的拷贝能用生化方法稍加改变，然后放回到细胞中去，那么该细胞就合成这种改变了的蛋白质。在细菌和酵母细胞中，这个突变基因将与正常基因重组，通常完全可能选出一个正常基因单拷贝被突变基因所取代的细胞。用这种方法，携带一个突变型的特殊蛋白质的细胞可以被矫正，同时，缺乏正常基因的细胞的表型也由此被确定。虽然用相似的方法尚不能将一个克隆化的突变基因插回到哺乳动物的细胞中去以取代正常的基因，但是随着重组 DNA 技术的突飞猛进，假如不久成为可能的话，将不会令人惊奇。

小结

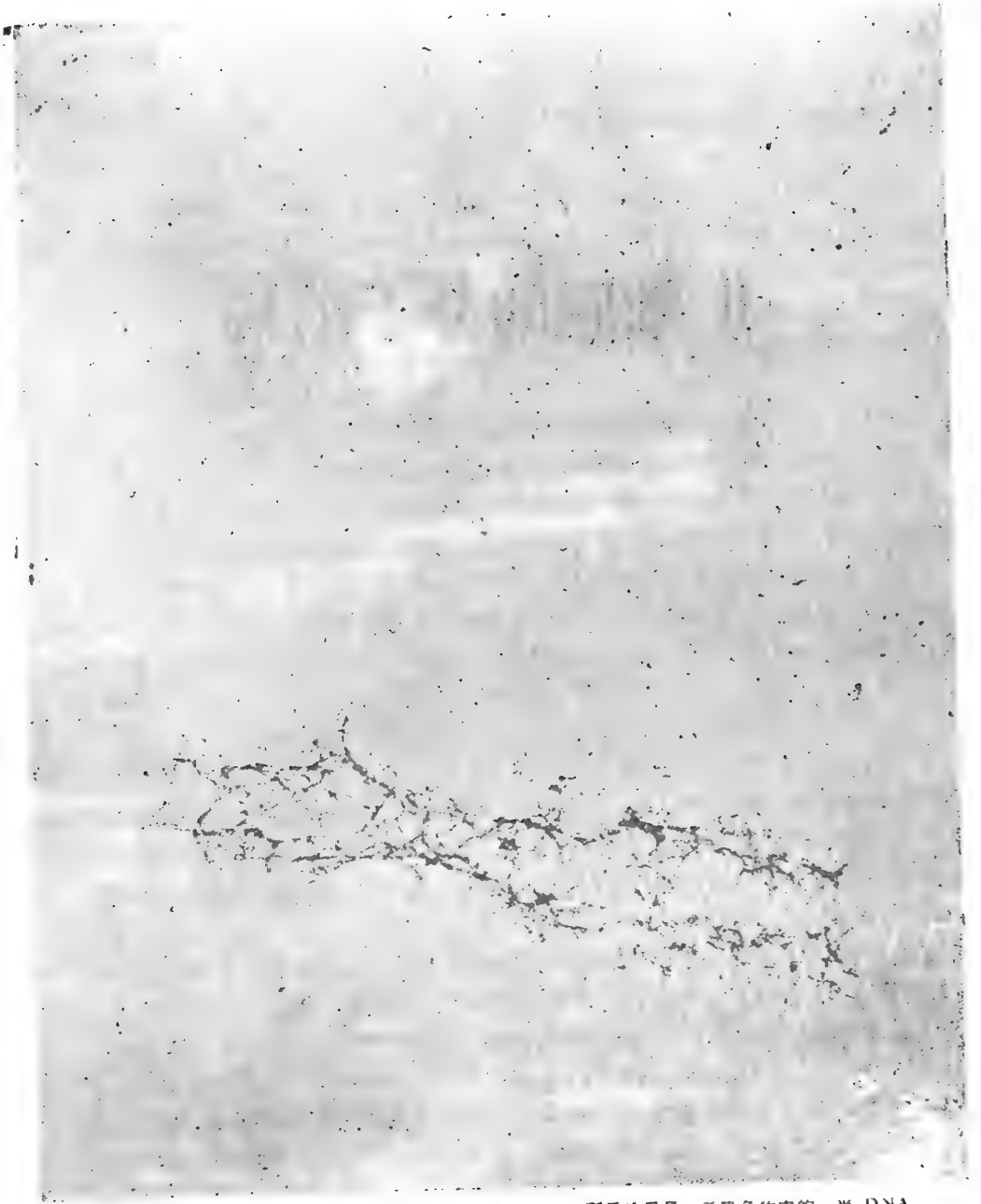
重组 DNA 技术革命性地改变了对细胞的研究。细胞 DNA 的任何区段可用限制性核酸酶切出来，并借 DNA 克隆最终将其无限量的生产出来，然后以一天几百个核苷酸的速度作序列分析。其结果是确定了真核生物基因组的许多基因和非编码区段的序列。

利用核酸杂交技术可测定、分离与克隆化 DNA 分子相应的 mRNA，并在无细胞系统中翻译成蛋白质。进而，在原则上可以从蛋白质回溯到为它编码的基因：利用蛋白质中一小段氨基酸序列合成特异的 DNA 探针，它能与 mRNA 和编码该蛋白质的 DNA 杂交。

重组 DNA 技术的实用效果是影响深远的。细菌或酵母能被工程化地用于无限量地制造哺乳动物的蛋白质。并使得分析该蛋白质的结构和功能，或将这种蛋白质作为医用疫苗或药物成为可能。

【蒋成山 译 查士隽 校】

II 细胞的分子结构



从单条破裂的人体染色体溢出的 DNA 的电镜照片,图中所示的只是一条染色体中的一半 DNA。
(James Paulson and Ulrich Laemmli 赠)

第五章 基本的遗传机理

细胞在浑沌无序的宇宙中保持高度有序的能力来源于遗传信息；通过蛋白质合成、DNA 修复、DNA 复制和遗传重组等四个基本的遗传过程，遗传信息得以表达、保持、复制和不断完善。产生并保存细胞的蛋白质和核酸的这些过程都是一维的：在每一个过程中，核苷酸线性序列中的信息被用来产生或改变另一条线性氨基酸链（一个蛋白质分子）。其他一些细胞过程大都涉及包含在蛋白质分子三维表面中的信息表达，相比之下遗传事件在概念上要简单得多。较之其他大多数细胞事件，我们对遗传机理的了解更为详尽，其原因也许就在于此。

我们将首先详细讨论已在第三章作过介绍的蛋白质合成的一些机理。然后，描述通过 DNA 修复以保持 DNA 序列完整性，以及通过 DNA 复制来增殖 DNA 的机理。由此引向病毒作为自我复制的遗传实体的讨论，病毒寄生于细胞的遗传机构，以 DNA 分子或 RNA 分子作为遗传信息的主要贮存所。本章以遗传重组机理的讨论作为结束。通过重组，DNA 序列重新分配组合，这是物种适应于环境变化的十分重要的过程。

蛋白质合成

DNA 密码译成蛋白质

蛋白质一般占细胞总干重的一半以上，蛋白质合成对细胞的存在、生长和发育都至关重要，虽然通常认为蛋白质合成是从 DNA 拷贝成信使 RNA(mRNA) 开始，但还需要另外许多准备步骤：20 种常见氨基酸中的每一种必须同专一的转运 RNA(tRNA) 相结合，核糖体的亚单位必须预先装好辅助分子。在蛋白质合成过程中，所有这些组分都被带到了细胞质里的核糖体复合物中。在这里一个 mRNA 分子一步步地通过核糖体，于是它的核苷酸序列被转译成对应的氨基酸序列，由此形成不同的蛋白质链。

RNA 聚合酶把 DNA 拷贝成 RNA

通过 RNA 聚合酶的催化，合成了 DNA 的一段核苷酸序列的 RNA 拷贝。这个过程称为 DNA 转录，这是信息从 DNA 传递到蛋白质的关键过程。在原核生物中只有一种 RNA 聚合酶参与所有 RNA 的合成，所以原核生物的 RNA 聚合酶研究得最清楚。

RNA 聚合酶在同称为启动子的专一的 DNA 序列结合后发动了转录过程，启动子发出 RNA 合成应在哪里开始的信号。在同启动子结合后，RNA 聚合酶就把 DNA 螺旋解开大约一圈，露出一段短的单链 DNA，以它作为模板，与进入的核糖核苷酸作互补的碱基配对。然后把两个进入的三磷酸核糖核苷酸单体结合在一起，开始形成一条 RNA 链。RNA 聚合酶分子沿着 DNA 模板链移动，一次加上一个核苷酸，RNA 链就从 5'

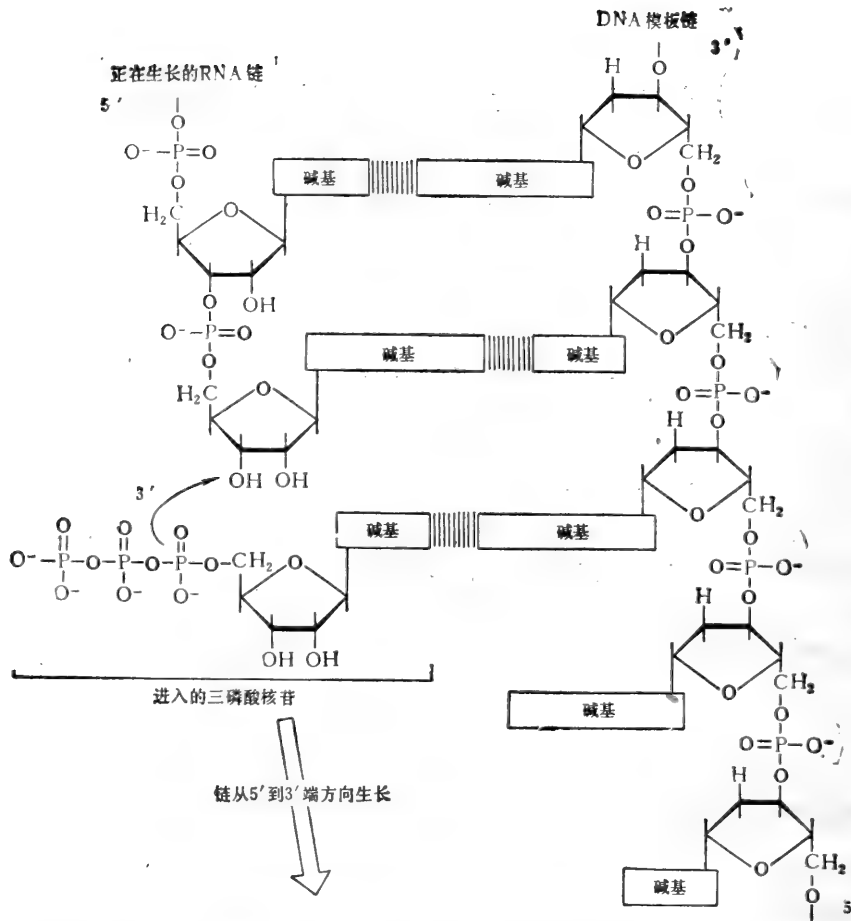


图 5-1 由 RNA 聚合酶所催化的反应。在每一步骤中,根据 DNA 模板链上外露的碱基选择能与之配对的三磷酸核苷;接着它以单磷酸核苷的形式加在生长的 RNA 链 3' 端羟基上(黑箭头)。因此,新的 RNA 链由 5' 到 3' 端方向生长,并与 DNA 模板链的序列互补。

端向 3' 端逐渐伸长(图 5-1), RNA 聚合酶不断地增添核苷酸,一直到它遇上 DNA 中的第二个特异的核苷酸序列——终止信号——为止,在这里,聚合酶将 DNA 模板和新合成的 RNA 链都释放出来。酶移动时,形成了一小段 RNA-DNA 双螺旋,但不如 DNA-DNA 双螺旋稳定,所以马上置换其中的 RNA 而重新建立起 DNA-DNA 双螺旋。结果,每一条完成的 RNA 链从 DNA 模板上释放出来成为单链的 RNA 分子(图 5-2)。

原则上, DNA 的任何一段都可以拷贝成两个不同的 mRNA 分子——两条 DNA 链中的每一条都可以拷贝出一个 mRNA 分子。事实上,被拷贝的只是一条 DNA 链,至于哪一段被拷贝则根据它两旁的基因而定。启动子 DNA 序列(起始信号)是指出那条链要被拷贝的“路标”。启动子使 RNA 聚合酶朝一个方向通过一个给定的遗传区段,这就自动地确定了两条链中的哪一条将解读(图 5-3)。

作为大肠杆菌 RNA 聚合酶启动子的 DNA 序列已研究得很清楚了。它们的共同特征是聚合酶识别两段长为 6 个核苷酸的序列,在两段序列之间有一段约 25 个核苷酸的非

识别 DNA (图 5-4)。如图 5-4 中所描述的, 对这种多聚酶发出终止信号的 DNA 序列也有共同的特征。真核生物细胞有三种不同的 RNA 聚合酶; 基本上类似于细菌的聚合酶, 但它们起始信号和终止信号是不同的, 并且特征不是很明显(见第八章)。

上面所说的只是大体轮廓, 省略了许多细节, 在许多情况下, 在产生 mRNA 分子之前一定还有许多复杂步骤。例如, 基因调节蛋白有助于决定哪一段 DNA 被 RNA 聚合酶所转录, 从而在决定细胞制造哪些蛋白质中起重要作用。此外, 在原核生物中 mRNA 分子虽然是直接由 DNA 转录所产生, 但在高等真核细胞中, 大多数 RNA 转录本先要经过 RNA 加工过程大大改变后, 才离开细胞核而进入细胞质成为 mRNA。产生 mRNA 时的所有这些特殊问题, 我们将在第八章谈到细胞核时作详细讨论。现在, 我们假定细胞已产生了有功能的 mRNA 分子, 看它们是怎样指导蛋白质合成的。

蛋白质合成天生就是极复杂的事

构成蛋白质合成基础的分子过程极其复杂。虽然我们已能描述其中许多过程, 但这些过程并没有使我们从理性上懂得 DNA 转录、DNA 修复以及 DNA 复制的意义。例如, 我们现在知道参与蛋白质合成的 RNA 分子有三种 (mRNA、tRNA 和 rRNA) 而不是一种, 但我们并没有完全了解为什么非如此不可。因此, 蛋白质合成的细节大部分是作为事实而被认识到的, 丝毫没有一种清晰的概念结构。

真正了解了蛋白质合成的机理后将有助于阐明生命出现的早期事件。这里的关键必定是 RNA 链化学与多肽合成之间的关系。多肽中氨基酸的排列次序怎么会由 RNA 链中的核苷酸序列所决定的? 迄今我们还不知道 RNA 有这些化学性质能使它同氨基酸优先结合, 不仅能提供能量去形成肽键, 而且能指定哪些氨基酸连接在一起。在弄清这些问题之前, 我们必须设法进一步阐明当今发生的蛋白质合成的细节, 希望能由此揭示出原始生命的情况。

tRNA (转运 RNA) 分子是蛋白质合成中的重要角色, 氨基酸在聚合成多肽之前先与 tRNA 分子相连接(图 5-5)。氨基酸的羧基端与 tRNA 相连接而被活化成高能形式,

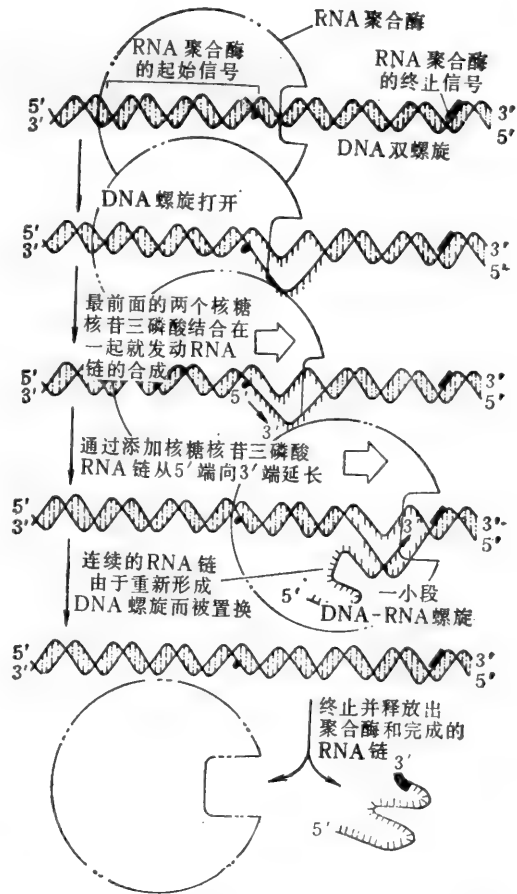


图 5-2 图示 RNA 聚合酶从 DNA 上称为启动子的特定的起始信号处开始其合成, 并在特定的终止信号处结束其合成, 聚合酶和完成的 RNA 链都从终止信号处释放出来。37°C 下, 聚合速度平均约为每秒 30 个核苷酸。所以一条有 5000 个核苷酸的 RNA 链约需 3 分钟就可以合成。图中的 RNA 聚合酶和 DNA 螺旋大致是按比例画的。

从而自发形成肽键生成多肽。因为游离氨基酸不可能直接加到生长着的多肽链上，所以这些活化过程是蛋白质合成所必需的。自发产生的只是肽键因加水而水解的逆过程。

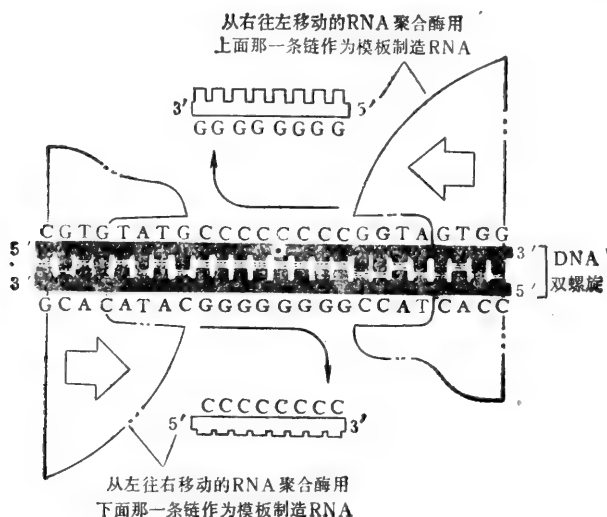


图 5-3 因作为模板用的 DNA 链一定是从其 3' 端横移至 5' 端(见图 5-1)，所以 RNA 聚合酶移动的方向决定了两条 DNA 链中哪一条将作为合成 RNA 的模板。聚合酶移动的方向则由在它启动处的启动子序列的取向所决定。DNA 双螺旋的任何一段的两条链中，一股只有一条链被转录。转录产生的每个 RNA 分子的极性和核苷酸序列，除了 U 取代 T 外，同作为模板与之配对的那条 DNA 链完全相同。

蛋白质合成时决定氨基酸加在哪里的是 tRNA 分子而不是与 tRNA 分子相连接的氨基酸。这是由一个巧妙的实验证明的。先用化学方法把与 tRNA 连接的氨基酸变成另一种氨基酸(半胱氨酸变成丙氨酸)，如果让这些杂种 tRNA 分子在无细胞系统中指导蛋白质合成，则蛋白质链中凡使用这种 tRNA 的地方都插入了错误的氨基酸(图 5-6)。因此，成功地解码一部分取决于把每个活化氨基连接到与其对应的 tRNA 分子上去的机理的准确性。

mRNA 的密码子与每个 tRNA 分子的反密码子之间配对的准确性，对 mRNA 的成功解码同样地重要(见图 5-9)。只有 mRNA 和 tRNA 分子结合在核糖体上合适的位置上，才能有效地形成这些碱基对。遗憾的是，我们还得在若干年后才能深入地了解这些核糖体介导的结合的相互作用。正如第 201 页所示，核糖体是非常复杂的分子聚合物，近期内不太可能在分子水平上正确地确定它们的结构。

专一的酶使每个氨基酸与其相应的 tRNA 分子偶联¹

每个 tRNA 分子怎样识别其相应的氨基酸？回答是一组氨酰 tRNA 合成酶把每个氨基酸与其相应的 tRNA 分子连接起来。不同的氨基酸有不同的合成酶：一种合成酶使甘氨酸与 tRNA^{Gly} 相连接，另一种合成酶使丙氨酸与 tRNA^{Ala} 相连接，依此类推，如图 5-7 所示，连接反应分两步进行，结果形成氨酰 tRNA 分子(图 5-8)。

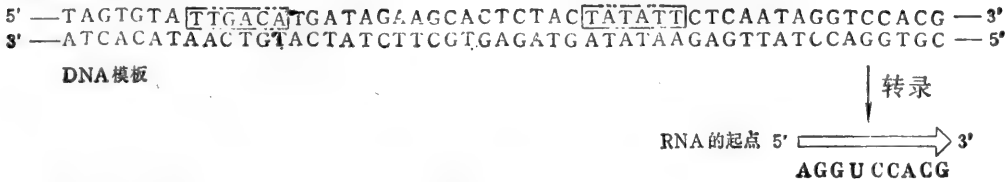
tRNA 分子是把核酸序列的信息转换成蛋白质序列信息的最终“接头”。但是氨酰 tRNA 合成酶构成了对解码过程同样重要的第二组专一接头。因此，遗传密码是两组连接的接头翻译的，每组接头都以高度专一性与另一组接头的分子表面相匹配。它们的结

合通过 mRNA 分子中三个核苷酸一组的特定序列——氨基酸的密码子——来鉴别每个氨基酸(图 5-9)。

氨基酸被加到生长着的多肽链的羧基端上

蛋白质合成的基本反应是在生长着的多肽链末端的羧基与氨基酸的游离氨基之间形成肽键。因此,蛋白质链是从其氨基端向羧基端逐步合成的。在整个过程中,多肽链生长

(A) 起始信号



(B) 终止信号

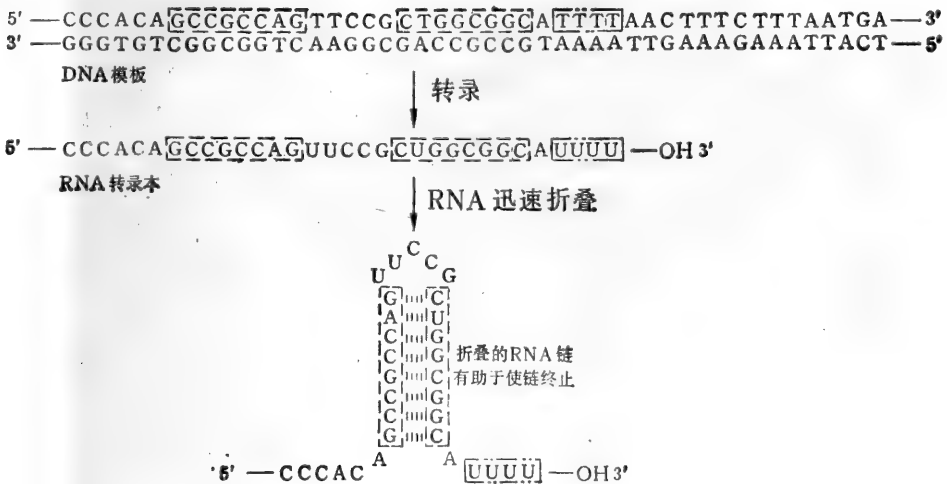


图 5-4 大肠杆菌的 RNA 聚合酶合成 RNA 时的起始信号和终止信号。

(A)聚合酶在启动子序列处起始。一般认为,在 RNA 链(点线框内)起点之前的大约第 35 个到第 10 个核苷酸之间的两段序列是启动子。图示两段 6 核苷酸序列中的每一段都只能出现很少改变,才不致使启动子的活性消失。一般认为,图示的其余的 DNA 序列不重要。

(B)当聚合酶在模板上合成了一串 U 残基并紧接着自身互补的核苷酸序列时,聚合酶就停止作用了。所以,DNA 序列的适当组合构成了终止信号。如图所示,在新合成的 RNA 链中,自身互补的序列(虚线框内)将迅速形成发夹螺旋。业已证明许多种不同的自身互补序列都有这种功能,因此,构成终止信号这一部分所需的看来不是这种核苷酸序列,而是这种发夹螺旋。

中的羧基端由于与 tRNA 分子共价连接肽基-tRNA 分子而保持着活化状态。这种共价键在每一周期中发生断裂,但由于新氨基酸带来相同的键而立刻得到替换(图 5-10)。因此,蛋白质合成时加上去的每个氨基酸都带有活化能,这种活化能用于加上下一个氨基酸而不是为它自己加上去的(这是图 2-34 中描述的“顶端生长”的一个例子)。

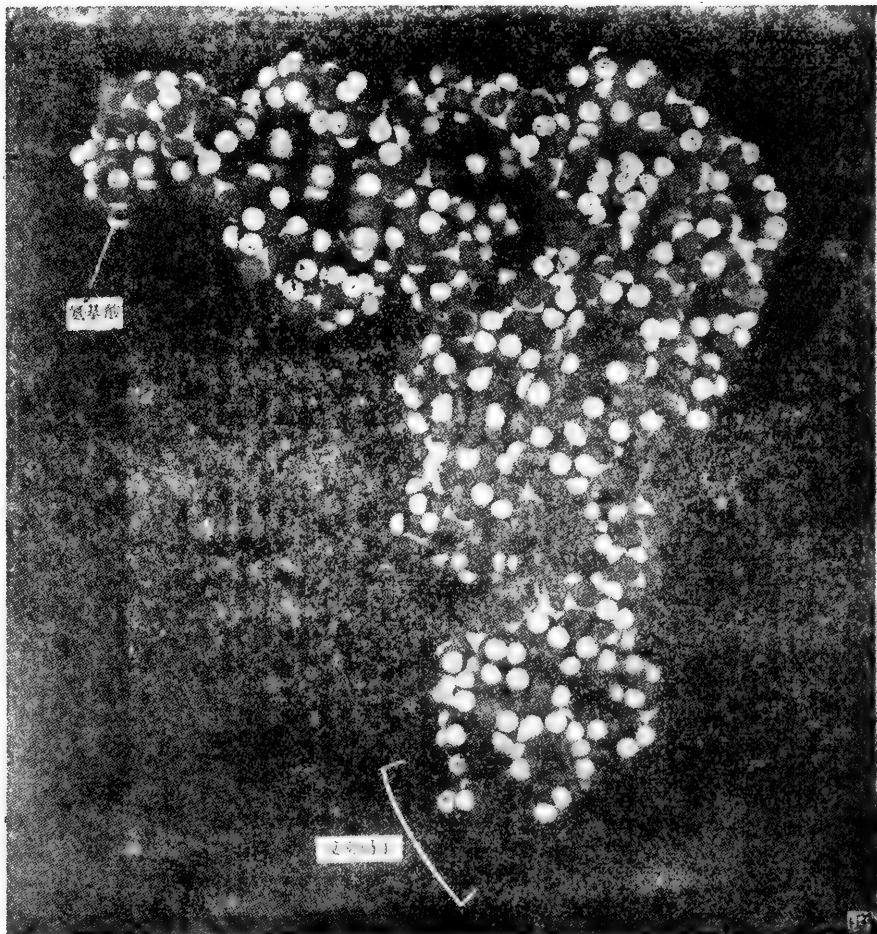
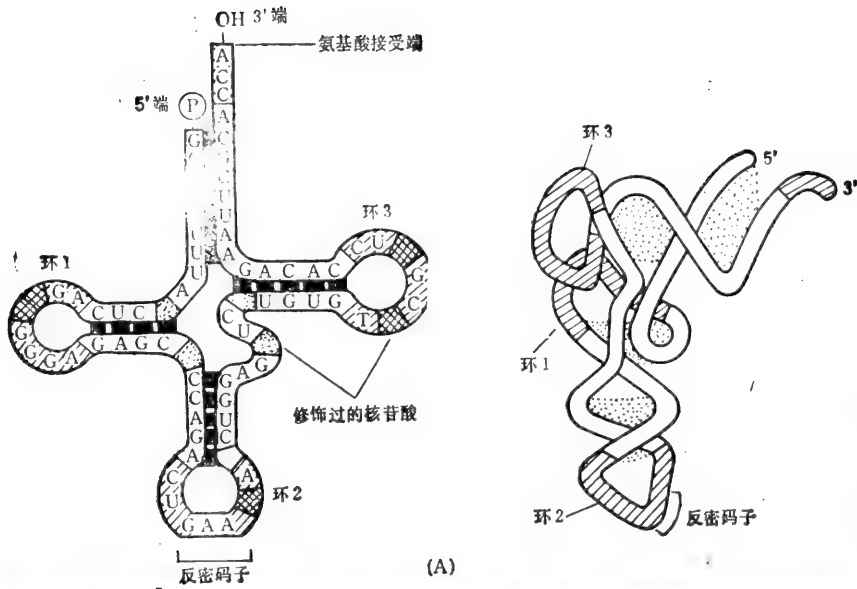


图 5-5 典型的 tRNA 分子的结构

(A)结构的轮廓。左面的图解是分子中的碱基配对区。右面是X射线衍射测定的三维构象总体图。(B)为(A)图所示结构的实体模型。tRNA分子有20多种,每一种氨基酸至少有一种tRNA分子。虽然它们的核苷酸序列不同,但折叠方式相似。在所有情况下,氨基酸都连接在tRNA分子3'端CCA序列中的A残基上。与苯丙氨酸连接的tRNA分子称为tRNA^{phe}。(照片由Sung-Hou Kim 赠)

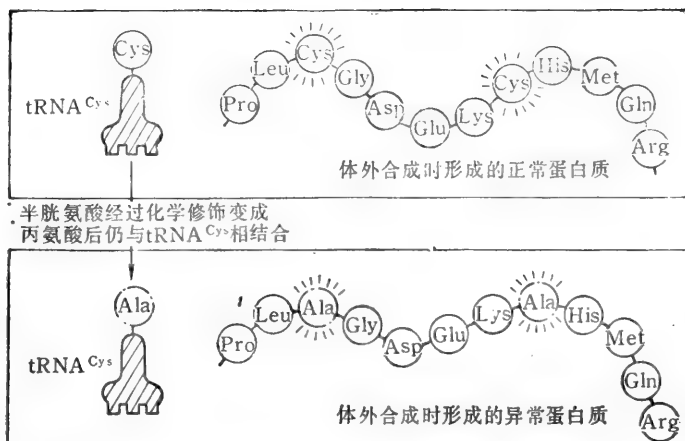


图 5-6 证明在蛋白质合成时“识别”加上每个氨基酸的位置的只是 tRNA，而不是与其相连接的氨基酸的实验。

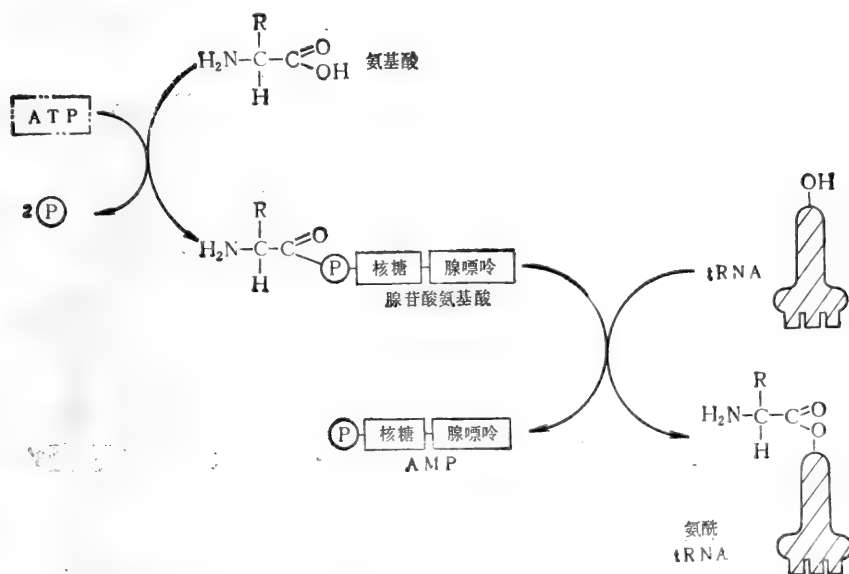


图 5-7 氨基酸被氨酰 tRNA 合成酶激活后用于蛋白质合成的两个阶段。图示利用 ATP 水解释放的能量使每个氨基酸以高能键与其 tRNA 分子相连。这个氨基酸首先将其羧基直接与 AMP 结合形成腺苷酸氨基酸而被激活，同 AMP 结合通常是一个不利的反应，它由提供 AMP 的 ATP 分子的水解所驱动。AMP 与氨基酸上的羧基相连接不必离开合成酶，就转移到 tRNA 分子 3' 端糖的羟基上。这种转移使得氨基酸通过活化的酯键与 tRNA 相连，最后形成氨酰 tRNA 分子。

每个加上去的氨基酸由它连接的 tRNA 分子同 mRNA 链之间的互补碱基配对相互作用而选出

在转译过程中，转译机构沿着 mRNA 分子从 5' 端向 3' 端移动，每次读出 mRNA 序列的三个核苷酸。每个氨基酸由 mRNA 分子中的核苷酸三联体(密码子)所确定。密码子同 tRNA 分子反密码子端的三个互补核苷酸序列相配对。细胞中有许多种 tRNA 分

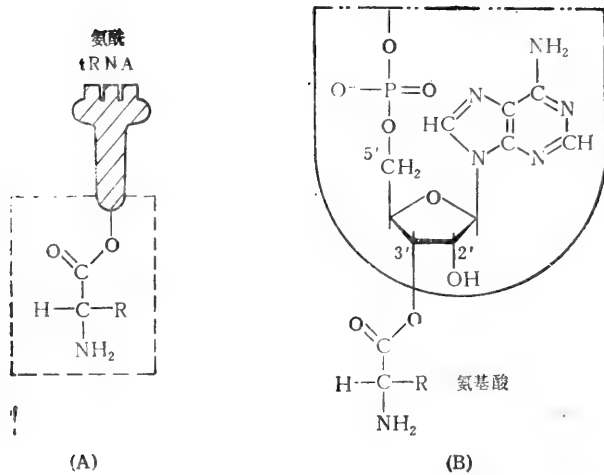


图5-8 氨酰 tRNA 键的结构。氨基酸的羧基端与核糖形成一个酯键(在核糖的 2'氧或 3'氧上)。(A)结构示意图,(B)相当于(A)方框区的真正结构。

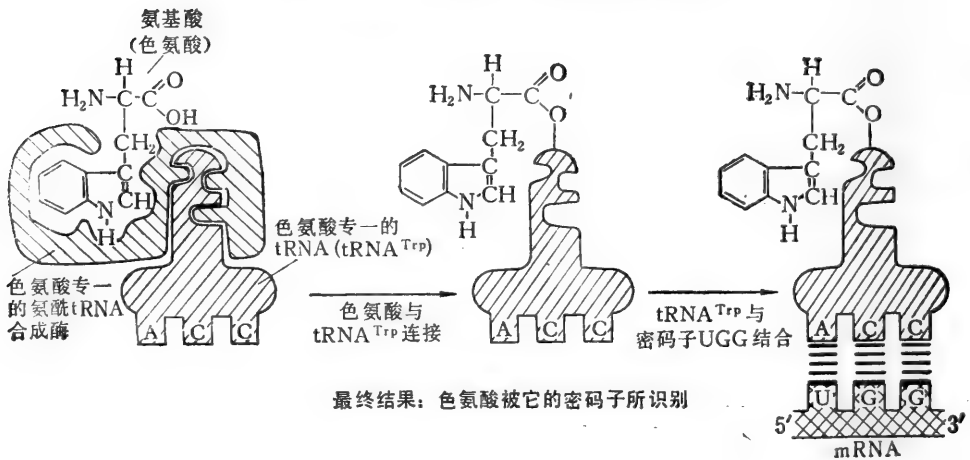


图5-9 遗传密码通过两个连接的“接头”而被转译的示意图。一个接头是氨酰 tRNA 合成酶,它使一个特定氨基酸与其相应的 tRNA 相偶联;另一个接头是 tRNA 分子,它接着同 mRNA 上的相应核苷酸序列相结合。

子,因为能与每个密码子进行碱基配对的只是其中的一种,所以是密码子决定了加到生长中的多肽链末端上去的特定的氨基酸残基(图 5-11)。

三个核苷酸可以组成 64 种序列(4×4×4),大多数 mRNA 分子有这些序列。64 个密码子中有 3 个不编码氨基酸,用来终止多肽链;它们是终止密码子。剩下的 61 个密码子只给 20 种氨基酸编码,所以,大多数氨基酸的密码子不止一个。因此,我们说遗传密码是简并的(图 5-12)。

遗传密码的简并性意味着或是(1)一种 tRNA 分子可以同一种以上的密码子进行碱基配对,或是(2)每种氨基酸有不止一种 tRNA。事实上,两者都是正确的。有些氨基酸有不止一种 tRNA 分子。此外,有些 tRNA 分子的结构只需同密码子前面两个核苷酸

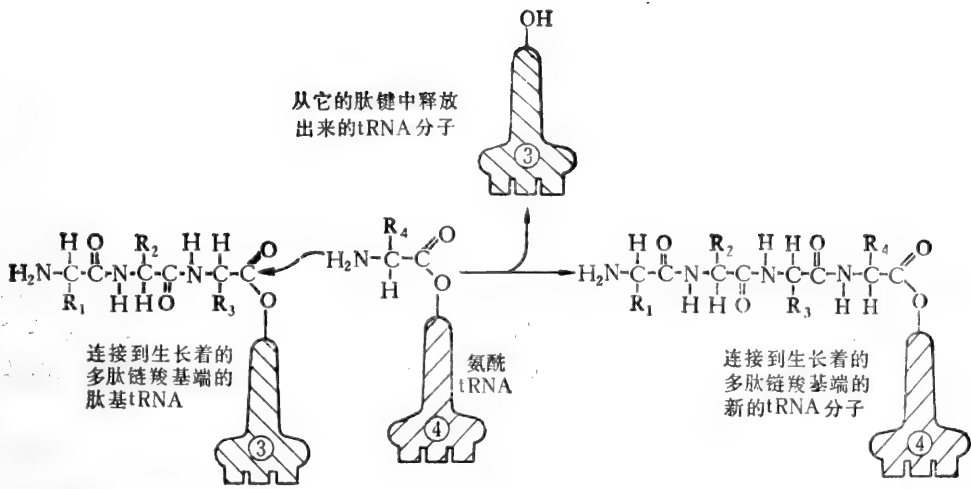


图 5-10 多肽链通过在其羧基末端上逐个加上氨基酸而延长。因为生长着的羧基端已被 tRNA 分子的共价结合所激活,所以每个肽链的形成在能量上是有利的。激活生长端的肽基-tRNA 键是在每个周期中加上新的 tRNA 分子时再生的。

正确地碱基配对,第三个核苷酸容许错误配对(或者变动)。

为了调节核酸的生物活性,一条完整的核苷酸链中的核苷酸如同蛋白质中的氨基酸可被共价地改变。尤其在 tRNA 分子群体中有许多种被改变的核苷酸,每一种都是在 tRNA 合成后通过共价修饰而生成的;图 5-13 举了几个例子。有些稀有核苷酸影响构象和反密码子的碱基配对,从而使 tRNA 分子容易识别合适的 mRNA 密码子。另一种转录后修饰在 tRNA 分子中也是常见的,tRNA 最初是较长的 RNA 转录物的一部分,先在那里切下来,然后通过一种酶把 CCA 三个碱基加到 3' 端而成为完整的 tRNA。原核生物和真核生物都出现这种 tRNA 的加工反应。mRNA 前体的全面加工则只发生在真核生物(见第八章)。

在核糖体催化蛋白质合成

我们刚描述的蛋白质合成反应需要有一个复杂的催化机构来引导,例如,多肽链的生长端必须与 mRNA 分子对准,才能保证 mRNA 中每一个相继的密码子啮合一个 tRNA 分子。这意味着多肽链的生长端每加上一个氨基酸后,沿着 mRNA 移动必须正好是三个核苷酸。由蛋白质和 RNA 分子组成的很大的多酶复合体——核糖体,使得蛋白质合成时的这些事件成为可能。

真核生物和原核生物的核糖体的结构和功能都非常相似。每个核糖体由一大一小两个亚单位组成。RNA 约占真核生物核糖体的重量的一半:一个核糖体 RNA(rRNA)分子和大约 33 种核糖体蛋白组成小的亚单位,3 种 rRNA 分子和 40 多种核糖体蛋白构成大的亚单位。原核生物核糖体略小一些,所含组分也少些(图 5-14),这两类核糖体都有一条沟可容纳一条生长着的多肽链,另有一条沟可容纳一个 mRNA 分子。这些沟的长度分别相当于约 30 个氨基酸和 35 个 RNA 核苷酸。

核糖体沿着 mRNA 链逐渐移动^{6,7}

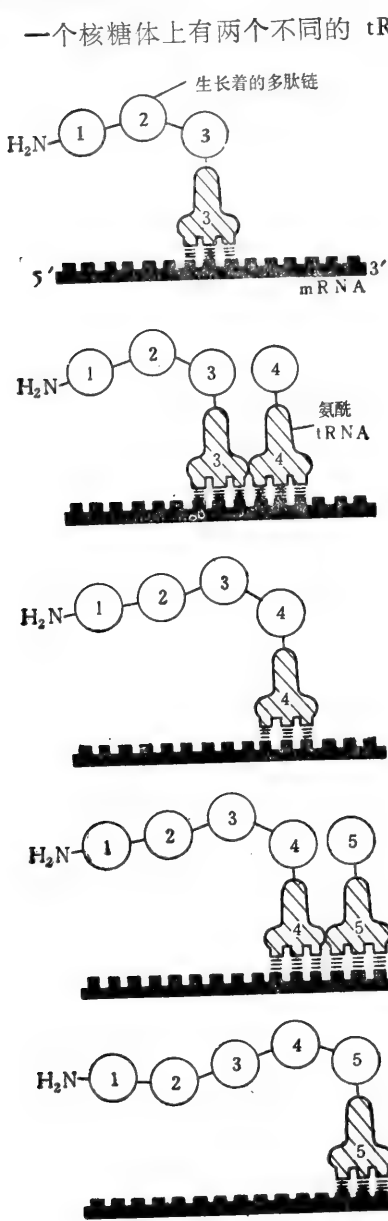


图 5-11 加到多肽链生长端上的每个氨基酸，是由该氨基酸所连接的 tRNA 分子上的反密码子同 mRNA 链上的下一个密码子之间互补的碱基配对所选定。

一个核糖体上有两个不同的 tRNA 分子结合部位：一个部位上结合通常与多肽链生长端连接的 tRNA 分子，称为肽基-tRNA 结合部位，或 P 位；另一个部位则结合进入的载有氨基酸的 tRNA 分子，称为氨酰 tRNA 结合部位，或 A 位。tRNA 分子不管结合在哪个部位上，它的反密码子核苷酸必须同 mRNA 的互补密码子形成碱基配对，这样才能在部位上结合住。A 位和 P 位如此靠近，以致结合在每一部位上 tRNA 分子能同邻接的 mRNA 分子中的密码子形成碱基配对(图5-15)。

多肽链在核糖体上的延伸过程可看成是包含三个独立步骤的循环(图5-16)。第一步，核糖体上的 A 位空着，隔壁的 P 位被占着，于是一个氨酰 tRNA 分子与 A 位上露出来的 mRNA 的三个核苷酸形成碱基配对，结合在核糖体的 A 位上。第二步，多肽链羧基端与 P 位上的 tRNA 分子脱开，通过肽键同 A 位上 tRNA 分子相连的氨基酸相连接。这个反应由紧密结合在核糖体上的肽基转移酶所催化。第三步，随着核糖体沿着 mRNA 分子精确地向前移动三个核苷酸，A 位上新的肽基-tRNA 移到 P 位上。这一步需要能量，通过所结合的 GTP 分子的水解使一种核糖体蛋白发生一系列构象变化，从而驱动这一步反应(见 139 页)。作为第三步移位过程的一部分，第二步中在 P 位产生的游离 tRNA 分子从核糖体上释放后又重新进入细胞质 tRNA 库。所以，第三步结束时，A 位又空出来接纳与下一个氨基酸连在一起的一个新的 tRNA 分子，这样，循环又重新开始了。因为在最适条件下一个细菌每进行一次循环只需要 1/20 秒，所以，20 秒钟左右就可以合成平均大小为 400 个氨基酸的一个蛋白质。

在大多数细胞中，蛋白质合成所消耗的能量多于其他任何生物合成过程。每形成一个新的肽键共需 4 个高能磷酸键断裂。每一个 tRNA 分子

装载一个氨基酸需要用去其中的两个高能磷酸键(图 5-7)。而两个用来驱动合成期间发生在核糖体上的两个循环反应，一个用于第一步中氨酰 tRNA 的结合，另一个用于第三步中核糖体移位。

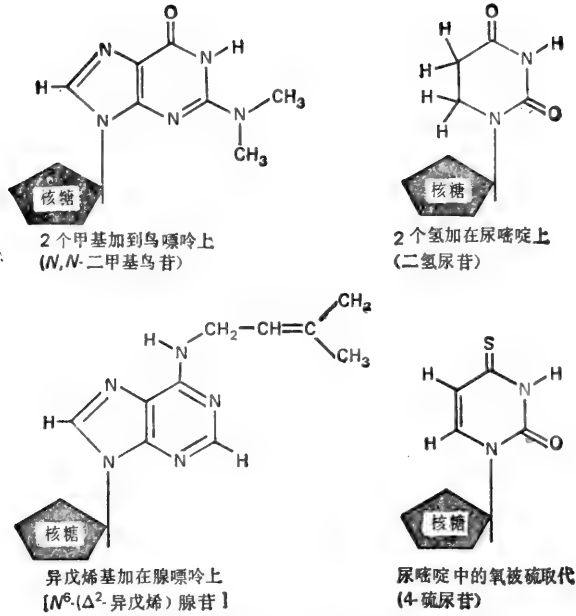


图 5-13 tRNA 分子中发现的几种稀有碱基,它们都是正常核苷酸掺入多核苷酸链后通过共价修饰产生的。在大多数 tRNA 分子中,约10%的核苷酸是这样修饰的。(见图 5-5 A)

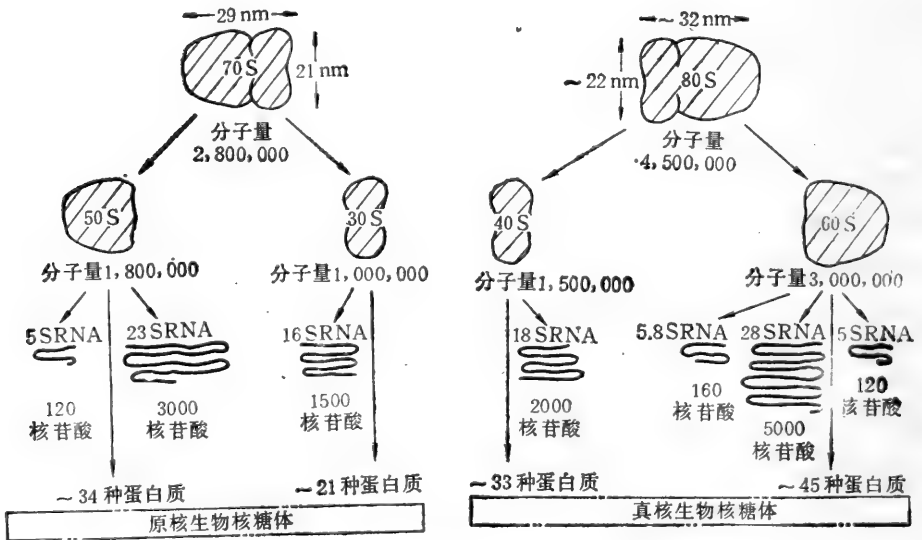


图 5-14 原核生物核糖体和真核生物核糖体的结构的比较。尽管结构有差别,但功能十分相似。

多数不用作起始密码子,在其他章节已阐明了,哪一个 AUG 被识别为起译密码子取决于 mRNA 核苷酸序列的其他部分。

起始过程结束时,与核糖体的小亚单位结合的所有起始因子都被卸下来,让核糖体的大亚单位与小亚单位结合在一起。这样就形成了一个具有完整功能的核糖体。起始子



图 5-15 核糖体上 3 个主要的 RNA 结合部位示意图。左边是空着的核糖体，右边是有负载的核糖体。

tRNA 分子竖立着结合在核糖体的 P 位。通过把第二个氨酰 tRNA 分子结合在核糖体的 A 位上而直接开始蛋白质链的合成(图 5-18)。以后就如前面所描述的那样进行蛋白质合成延伸期的几个步骤(见图 5-16 中的第 2 步)。

因为起始子 tRNA 分子总是携带甲硫氨酸，在原核生物中是甲硫氨酸的氨基-甲酰衍生物。因此，新合成的蛋白质的氨基端都有一个甲硫氨酸。甲硫氨酸对蛋白质的功能并不重要，所以发生在它掺入后不久常因许多种蛋白质氨基端少数残基有限的蛋白质水解而被除去。

真核生物蛋白质合成的总速率受起始因子控制¹⁰

第十一章将讨论到多细胞生物的细胞只在合适的环境中才增殖。虽然细胞的信号刺激细胞生长和分裂的机理还不知道，但是它们的主要作用之一必定是增加蛋白质合成的总速率，决定这种速率的是什么？直接在组织中进行研究非常困难。但在组织培养中的细胞缺乏必需氨基酸、葡萄糖或者血清时，它们的多肽链起始速率显著受到抑制，可以证明这是蛋白质合成起始因子 IF-2 失活的结果，此外，已知至少在一种细胞未成熟的红细胞中 IF-2 活性的降低是通过它的三个蛋白质亚单位之一的磷酸化来控制的，这提示真核细胞的蛋白质合成速率部分地受专一性蛋白质激酶所控制，激酶处于活性形式时抑制蛋白质合成的起始。可以推测，当细胞在合适的环境中时可通过使蛋白质激酶失活而引起细胞增殖。

蛋白质合成许多所需的起始因子虽然在真核生物和原核生物中完成相同的基本功能，但在真核生物中远比原核生物中多而复杂。许多额外成分可能是调节蛋白，它们通过控制蛋白质合成在多细胞真核生物中协调细胞生长。

原核生物蛋白质合成的许多抑制物是有用的抗生素¹¹

现代医学所用的最有效的抗生素，很多都在于抑制细菌蛋白质的合成。这些药物很多是利用原核生物核糖体和真核生物核糖体结构和功能的差异。抗生素的这种选择性常使人体能经受相当高浓度的抗生素而不出现过分的毒性。因为不同的抗生素同细菌核糖体不同的蛋白质亚复合体相结合。所以，常抑制合成过程中的不同步骤。表 5-1 列举了

最常用的这类药物及其专一效应。该表还列举了另一些常用的蛋白质合成抑制剂，其中有些作用于真核生物细胞。因为它们可阻断从 DNA 到蛋白质过程中的特定步骤，所以表中所列化合物已广泛用于生化和细胞生物学研究。

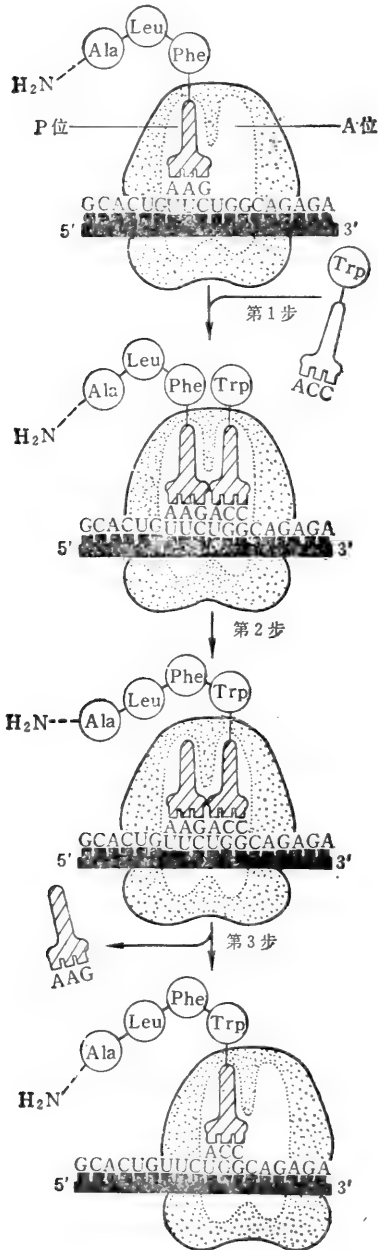


图5-16 核糖体上蛋白质合成的延伸期。图示蛋白质链合成期间一次又一次重复的三步循环。第一步，氨酰 tRNA 分子与核糖体上的 A 位结合；第二步，形成一个新的肽键；第三步，核糖体沿着 mRNA 链走过三个核苷酸的一段距离，核糖体“复原”，循环又可以重复。

小结

在能够合成蛋白质之前，必定先通过 DNA 转录过程产生相应的 mRNA 分子，再输送到细胞质中。然后，各种机构开始起作用。从核糖体的小亚单位同 mRNA 分子相结合而开始，一个特定的起始子 tRNA 分子把核糖体的小亚单位装在 mRNA 上专用的起始密码子上。加上核糖体的大亚单位以构成完整的核糖体，接着是蛋白质合成的延伸期。通过由三个相继步骤组成的一个循环，每一个氨基酸被加到生长着的多肽的羧基末端上，这三个步骤是：氨酰 tRNA 结合，接着形成肽键，然后是核糖体移位。核糖体沿着 mRNA 分子自 5' 端向 3' 端从一个密码子到下一个密码子行进着，直至遇到三个终止密码子中的一个。然后一个释放因子同终止密码子结合，转译终止，合成的多肽链从核糖体上释放出来。

氨酰 tRNA 作为解码装置，使 mRNA 中特定的三个核糖核苷酸组成的序列转译成新合成蛋白质的某一特定的氨基酸。20 种氨基酸中的每一种通过分两步的识别过程适合于一个密码子：第一步是特定的氨酰 tRNA 合成酶识别氨基酸，把氨基酸连接在专一的 tRNA 分子上；第二步是 tRNA 分子中的反密码子识别 mRNA 链中由三个核苷酸组成的特定序列。每一种氨基酸至少有一种专一的氨酰 tRNA 合成酶和一种专一的 tRNA。

DNA 修复机理¹²

就一个物种来说遗传的变化也许有利于它的长期生存，但是在它的短期存活期间却是

绝对准确地保持其遗传记录。适当地保持遗传物质的稳定，不仅要求每一细胞世代有

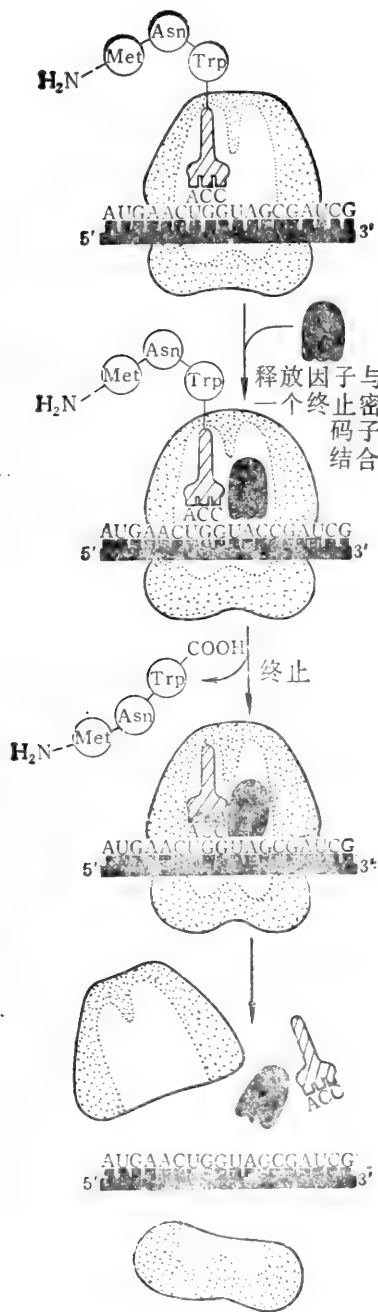


图 5-17 蛋白质合成的最后一个时期。释放因子与一个终止密码子结合使转译停止：合成的多肽释放出来，核糖体解离成为两个单独的亚单位。

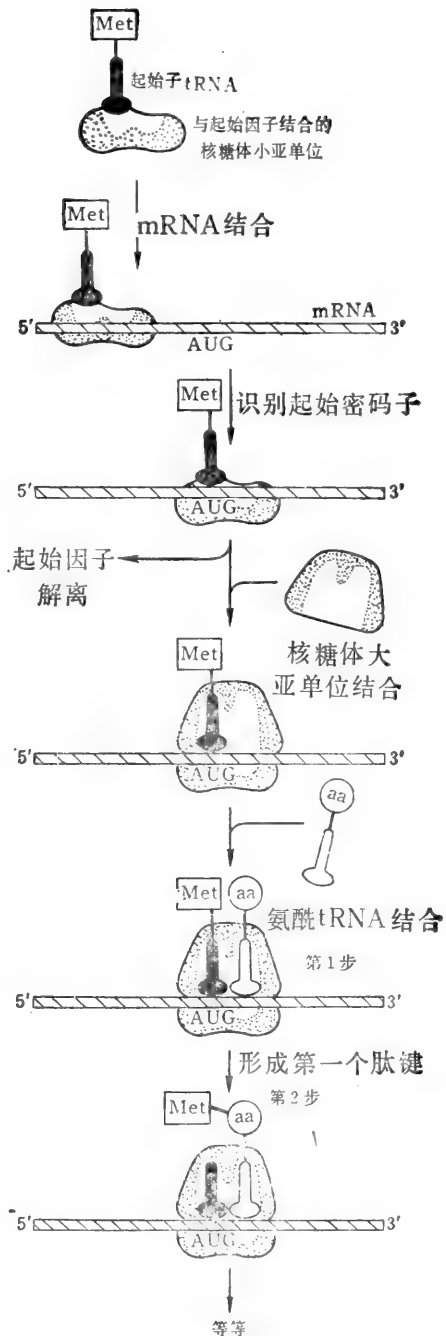


图 5-18 蛋白质合成的起始期。图示真核生物中发生的事件，而细菌中发生的过程非常相似。第 1 步和第 2 步是指图 5-16 中所示延伸反应中的步骤。

表 5-1 蛋白质或 RNA 合成的抑制剂

抑制剂	专一效应
只作用于原核生物*	
四环素	阻止氨酰 tRNA 结合在核糖体的 A 位上
链霉素	阻止从起始复合物到链延伸的核糖体的转变
氯霉素	阻断肽基转移酶在核糖体上反应(图5-16)中的第二步
红霉素	阻断在核糖体上的移位反应(图5-16)中的第三步
利福霉素	通过与 RNA 聚合酶结合而阻断 RNA 链的起始(阻止 RNA 合成)
作用于原核生物和真核生物	
嘌呤霉素	通过它加到生长着的多肽链末端使新生多肽链提前释放
放线菌素 D	与 DNA 结合从而阻断 RNA 聚合酶的移动(阻止 RNA 合成)
只作用于真核生物	
放线菌酮	阻止肽基转移酶在核糖体上的反应(图 5-16 中的第二步)
α -鹅膏蕈碱	通过优先与 RNA 聚合酶 II 结合而阻断 mRNA 合成

*真核生物线粒体(和叶绿体)的核糖体对抑制剂的敏感性常同原核生物的核糖体相似。

极其精确地拷贝 DNA 序列的机理,而且还需要一种修复 DNA 中自然发生的偶然损伤的机理。在探讨这些复制与修复机理之前,我们先要简短地讨论 DNA 序列是怎样从一代到下一代不走样地保持下去的。

以极高的保真性维护DNA序列¹⁵

对 DNA 序列的变化速率(突变率)只能间接地加以估计。一种办法是比较几个不同物种的同一种蛋白质的氨基酸序列:先根据化石记载,估计算出一对物种在多少年前是从一个共同祖先那里趋异分化,然后,与不同的氨基酸所占百分数作比较。由此我们可以算出蛋白质的 1% 氨基酸中发生稳定变化所需的平均年数。因为一般说,每一个这样的变化反映了编码该蛋白质的基因 DNA 序列中的一个改变,所以可用这个数值来估算基因中发生一次稳定突变所需的平均年数。

因为有些突变有损于蛋白质的功能,因而在选择压力下从群体中消失,所以总是低估了实际突变率。但有一族已研究过的蛋白质几乎不存在这个问题。这些蛋白质是血纤维蛋白肽:它们是凝血过程中血纤维蛋白原被激活形成血纤维蛋白时丢掉的长为 20 个残基的片段。因为血纤维蛋白肽没有直接的功能,所以它们的氨基酸几乎都可改变。对血纤维蛋白肽的分析(图 5-19)表明,平均长度为 400 个氨基酸组成的蛋白质大约每 20 万年有一个氨基酸随机发生改变。最近, DNA 序列分析技术有可能测定几种哺乳动物基因组的同源非编码区中 DNA 序列的相似性。得到的突变率估计值与研究血纤维蛋白肽得到的数值非常一致。

直接测出的自发突变率与进化估计值相符合¹⁶

观察生长着的细胞基因组的自发变化可以较直接地估计 DNA 序列复制的差错率。估计在非常大的动物群体(例如果蝇或小鼠群体)中新突变型出现的频率,或普查体外培养的细胞中某些酶的变化都可以做到这一点。虽然估计的只是近似值,但用上述两种方法得到的数据都同 10^9 对碱基复制时约有一个碱基对发生改变的差错率相符。在哺乳动

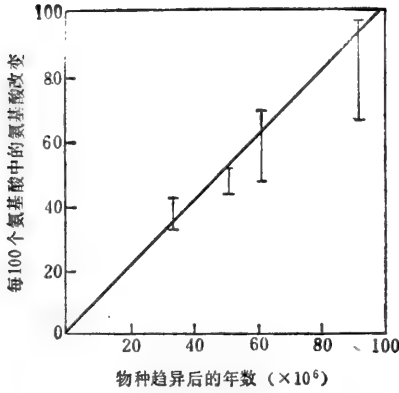


图 5-19 在进化过程中血红蛋白肽的氨基酸改变速率

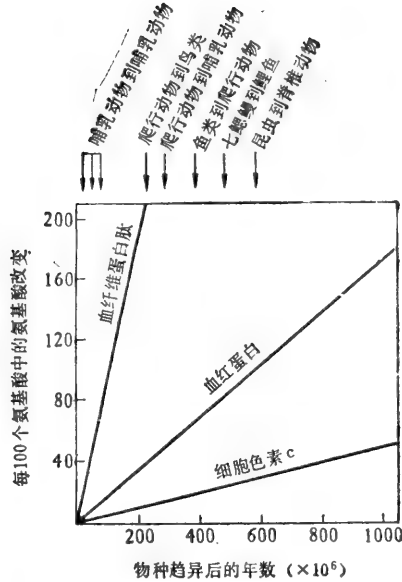


图 5-20 血红蛋白和细胞色素 c 中的氨基酸变化速率与血纤维蛋白肽的氨基酸变化速率的比较。进化过程中, 血红蛋白和细胞色素 c 变化得比血纤维蛋白肽要慢得多。

表 5-2 观察到的不同蛋白质在进化期间氨基酸序列的变化速率

蛋白质	单位进化时间(百万年)
血纤维蛋白肽	1.2
血红蛋白	6.1
细胞色素 C	2.1
组蛋白 H4	600

“单位进化时间”的定义是该蛋白质在其所含的每 100 个氨基酸中出现一个可接受的氨基酸改变所需的平均时间。

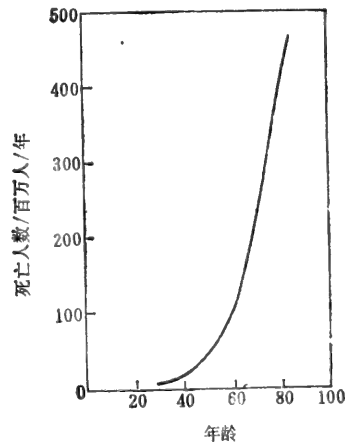


图 5-21 美国大肠癌的死亡率与年龄的关系。指数上升表明,产生这种癌细胞需要有几个独立的遗传事件。

物中,这个数值相当于每一细胞世代每一单倍体基因组大约有三个改变。给一个平均大小的蛋白质编码的基因有约 10^3 碱基对,这基因约需 10^6 细胞世代才积累一个突变。如果我们假定一个生殖系(从亲代的卵到子代的卵)平均每年约五个细胞世代,则这一数值与一个平均大小的基因每 20 万年发生一次突变这样一个进化突变率估计值是一致的。

蛋白质的突变大多数是有害的,被自然选择所淘汰

两种生物的某一蛋白质中氨基酸差异的数目同这两种生物趋异后的时间作图,可得一条相当直的线。这就是说,趋异后的时间越长,差异的数目越多。为方便起见,直线的

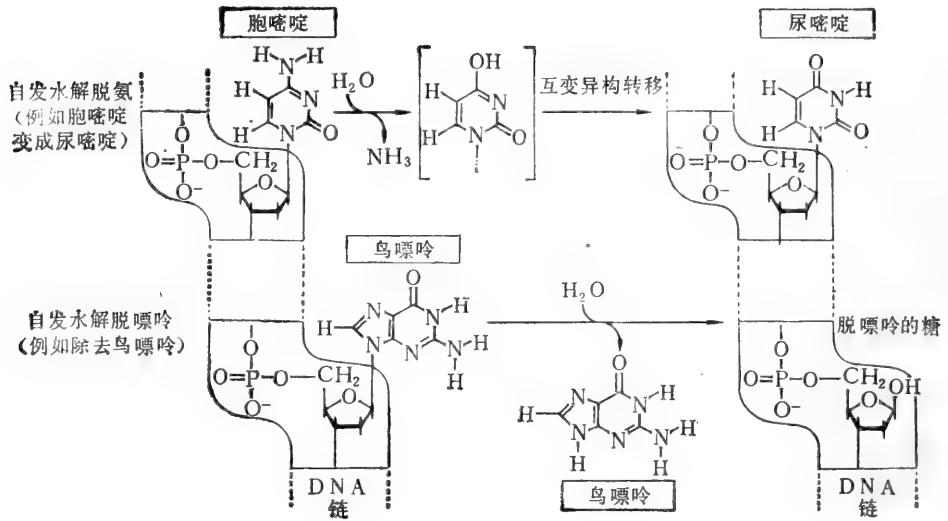


图 5-22 两个常常自发产生的化学反应: 脱氨作用和脱嘌呤作用, 会造成细胞中 DNA 的严重损伤。每种反应各举一个特殊的例子。

斜率可用该蛋白质的单位进化时间 (100 个氨基酸残基序列中出现一个氨基酸变化所需的平均时间) 来表示。对具有不同的而且特征性的进化速率的不同蛋白质就是这样表示 (图 5-20)。既然所有碱基对有相同的随机突变率, 因此根据这些数据可以说氨基酸序列中的变化对有些蛋白质功能的影响者大于对另一些蛋白质功能的影响。从表 5-2 我们可以估计出, 在血红蛋白中, 每 5 个随机的氨基酸改变约有 4 个是有害的; 在细胞色素 c 中, 每 18 个氨基酸改变约有 17 个是有害的; 在组蛋白 H4 中, 实际上所有的氨基酸改变都是有害的。可以假定带有这些有害突变的个体由于自然选择而从群体中被淘汰。

就我们所知观察到的低突变率为生命所必需¹⁵

淘汰蛋白质的突变型的证据包含着一个原理, 即没有一个物种经得起在性细胞中高速率地积累突变。但体细胞也必须避免发生遗传变化。例如, 体细胞中的核苷酸的改变可导致癌那样的失去控制的细胞。东西半球癌造成了 20% 左右的过早死亡。这些死亡大半起因于体细胞中积累了 DNA 序列的变化, 证据如下。

1. 已表明, 大多数癌来自一个异常的前身细胞所形成的细胞克隆。
2. 人体致癌物大多能提高细菌的突变频率。
3. 着色性干皮病这种人体遗传病与一类 DNA 修复酶的缺失有关, 患者生皮肤癌的比例特别高, 这是日光中紫外线对 DNA 的损伤效应所造成的。

4. 癌的发病率在老年人中急剧增加。统计分析表明,对有些癌来说,在发展成一个癌细胞之前,在细胞系中必定积累了三到六个独立的随机事件,每次事件可能就是某种突变(图 5-21)。

后面我们将讨论,为什么认为观察到的突变率把任何生物的种系中能够编码的必需蛋白质数目限制在 30 000 种左右(见 386 页)。根据同样的论据,突变率高 10 倍将把生物能编码的必需蛋白质限制在 3 000 种左右。在这种情况下,在果蝇发现之前进化也就停止了。

因此,从有 30 000 种蛋白质的物种能一直存在下去(性细胞稳定性)以及防止由于体细胞突变而产生癌(体细胞稳定性)这两方面来看,真核生物需要由 DNA 序列所维持的高度的保真性。

低突变率意味着有亲缘关系的生物一定是由基本相同的蛋白质所组成¹⁾

作为不同于大类人猿的一个属,人类只有几百万年的历史。所以自人类起源以来,每

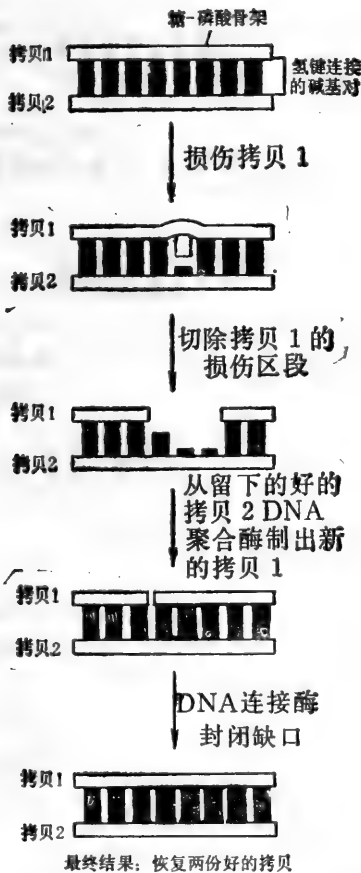


图 5-23 DNA 修复的两个基本反应示意图。修复反应包括两个步骤: DNA 聚合酶填补切除后留下的空隙,然后 DNA 连接酶封住修补过的链中留下的缺口。缺口封闭包括断裂的磷酸二酯键的重新形成。

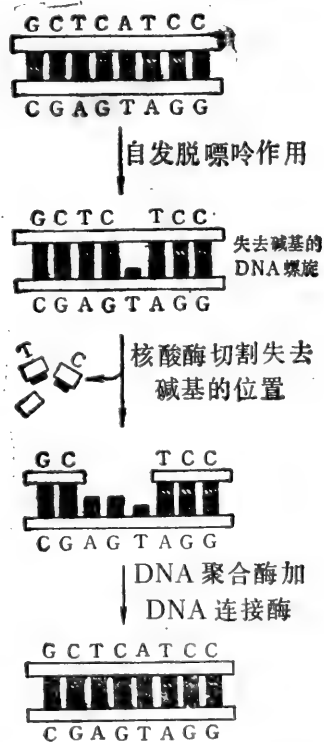


图 5-24 最常见的 DNA 自发损伤——脱嘌呤位置的修复。切除步骤包括识别失去碱基的位置: 先在那里切开磷酸二酯键,然后,修复核酸酶,再切除附近的几个核苷酸。以后的步骤如图 5-23 所示。

个基因积累核苷酸变化的机会相当少，而且其中大多数已为自然选择所淘汰。我们的许多遗传性一定是在智人 (*Homo sapiens*) 出现之前很久，在哺乳动物进化期间 (开始于 3×10^8 年前) 或更早的时候形成的。因此，鲸和人这样不同的哺乳动物的蛋白质还是十分相似是不足为怪的。进化变化使哺乳动物在出现明显变异，但对构成我们的物质所引起的变化却又少得出乎意料。

不正确的自发 DNA 损伤如果保留下来，则将迅速改变 DNA 序列¹⁶

1945 年，物理学家 Erwin Schroedinger 指出，不管基因的化学性质如何 (那时还不知

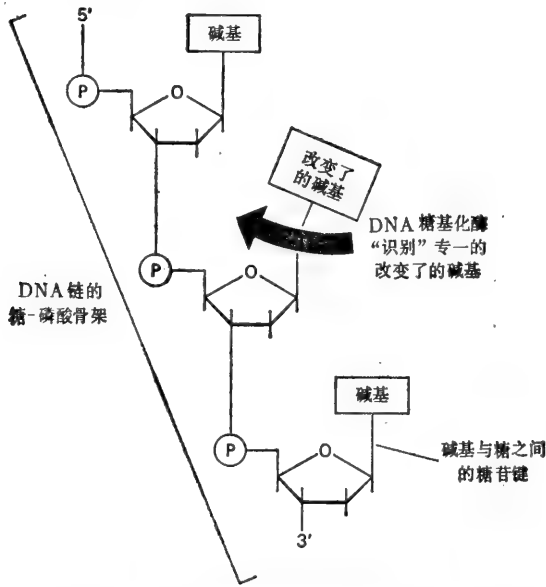


图 5-25 所有 DNA 糖基化酶所催化的反应。DNA 糖基化酶有许多种，各识别一种改变了的碱基。

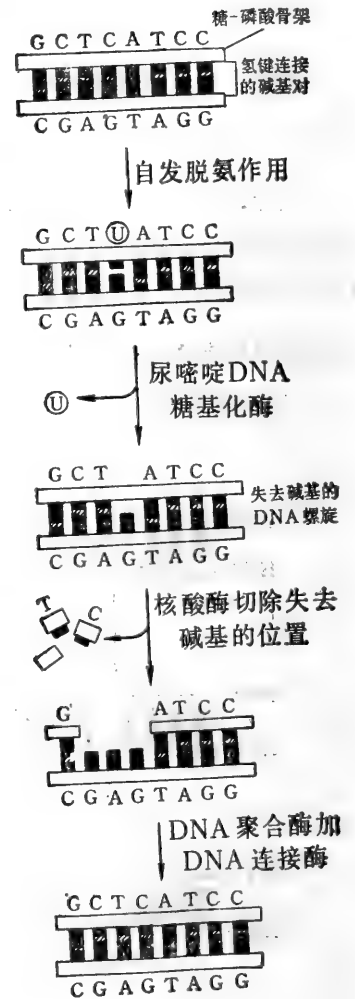


图 5-26 尿嘧啶 DNA 糖基化酶参与的修复途径，这种酶使 DNA 中偶然脱氨的胞嘧啶得到恢复。

道)，它一定是极小的，由几个原子所组成。否则核里装不下产生一个生物所需的为数极多的基因。另一方面，正由于基因这样小，所以预期它可经受与溶剂分子随机热碰撞引起自发反应所造成的明显改变。这就提出了一个严重的二难推理，因为遗传学资料表明基因是很稳定的物质，基因极少发生自发变化。

Schroedinger 的二难推理是真实的。基因中的分子确实经受了热振动引起的重大变化。例如，现在我们知道，由于连接碱基与脱氧核糖的 N-糖基键受热破坏(脱嘌呤作用)，所以每个人体细胞的 DNA 每天要失去 5 000 个嘌呤碱(腺嘌呤和鸟嘌呤)。同样，DNA 中的胞嘧啶自发脱氨生成尿嘧啶的速率估计为每天每个基因组 100 个 (图 5-22)。能够

改变 DNA 碱基配对能力的代谢产物以及日光中的紫外线都能使 DNA 碱基发生变化，紫外线能够促使 DNA 中两个相邻的胸腺嘧啶碱基共价结合(形成胸腺嘧啶二聚体)。这些还只是我们 DNA 中自发产生的许多变化中的几种。可以预期大多数变化会导致 DNA 复制后产生的子 DNA 中一个或几个碱基对的缺失，或导致碱基对的替换(例如，由于 U 与 T 极为相似，所以能与 A 形成互补碱基对，因此 C 每次脱氨变成 U，最后会使 C-G 碱基对变成 T-A 碱基对,(见 100 页)。正如我们已经看到的这些变化对生物会有灾难性的后果。

基因的稳定性的归因于 DNA 修复¹⁷

尽管在人体细胞 DNA 中每天由于热能而发生成千上万次随机变化，但一年内每个细胞 DNA 序列中至多只积累几个稳定的改变。解释是 DNA 修复过程以很高的效率消除了这些损伤。各种修复机制全有赖于存在遗传信息的两个拷贝。DNA 双螺旋的每条链是一份拷贝。如图 5-23 的图解说明，一组酶识别并除去受损伤链中发生变化的部分，然后，由另一种酶即 DNA 聚合酶通过互补的碱基配对复制出贮存在“好”链中的信息，使切去部分恢复原样。最后，由 DNA 连接酶封住 DNA 螺旋中留下的缺口修复成一条完整的 DNA 链。

脱嘌呤是最常见的 DNA 损伤。根据图 5-24 中的简略表示来看，这类损伤的修复效率极高。首先，一种修复核酸酶识别丢失碱基的位置，在改变的位置上切开 DNA 的磷酸二酯骨架。然后在原切点两旁进一步切割除去附近的核苷酸(包括损伤的核苷酸)之后，就如图 5-23 所示，恢复了没有损伤的 DNA 序列。

另外一条非常重要的修复途径涉及一组 DNA 糖基化酶 (DNA glycosylase)，每一种酶识别 DNA 中改变的一种碱基，催化这种碱基水解而从脱氧核糖上除去(图 5-25)。一般认为这种酶至少有 20 种，其中包括除去脱氨的胞嘧啶、脱氨的腺嘌呤、不同类型的烷化碱基、带有开环的碱基及碳-碳双链偶然变成碳-碳单链的碱基的那些酶。

图 5-26 表示除去脱氨胞嘧啶的过程作为在所有情况下起作用的普遍机制的例子。首先由尿嘧啶 DNA 糖基化酶除去损伤的碱基。然后第二种酶识别脱去碱基的糖(就是图 5-24 所示的识别脱嘌呤的 DNA 所在位置的酶)，在 DNA 那一点上切开磷酸二酯骨架。当另一种酶把和在损伤碱基同一条链上的旁边的核苷酸切去后，DNA 聚合酶催化 DNA 修复合成。结果，由于偶然脱氨而产生的尿嘧啶又恢复为胞嘧啶(图 5-26)。

两种不同方法已直接证明除去偶然脱氨的 DNA 碱基的重要性。第一，缺少尿嘧啶 DNA 糖基化酶的突变型细菌中，通常情况下 C-G 变为 T-A 碱基对的很低的自发突变率提高了 20 倍左右。第二个例子是在 DNA 序列的特定点上，有些胞嘧啶碱基常会甲

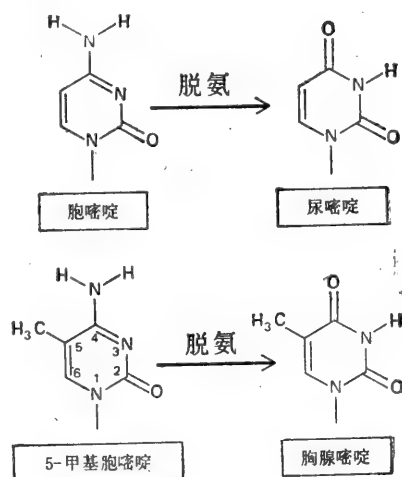


图 5-27 DNA 中甲基化胞嘧啶残基脱氨产生胸腺嘧啶而不产生尿嘧啶，尿嘧啶 DNA 糖基化酶不能识别和除去胸腺嘧啶。

基化产生5-甲基胞嘧啶。细菌和高等生物细胞中都出现这种情况。在研究某个细菌基因时发现，这种甲基化作用会提高甲基化位置上的突变机率。这个结果可归因于5-甲基胞嘧啶自发脱氨产生了 DNA 的正常成分胸腺嘧啶残基，而不是尿嘧啶残基。细胞的尿嘧啶-DNA 糖基化酶不能识别这些特殊的胞嘧啶脱氨作用，结果不能得到修复(图 5-27)。

由于不同的 DNA 糖基化酶识别 DNA 中各种不同类型的碱基损伤，所以大多数异常碱基很快被切除，形成了一个失去碱基的位置。然后，每一个这样的位置被恢复脱嘌呤碱基的同一个有效的修复系统所修复。

细胞还有另一条多步骤切除途径，几乎能够除去引起很大损伤的任何一种 DNA 损伤。这些“大损伤”包括 DNA 碱基与有致癌能力的大的烃类(例如，苯并芘和日光产生的胸腺嘧啶二聚体)共价反应所造成的损伤。在这些情况下，需要有一个大的多酶复合体来识别 DNA 双螺旋中的大损伤而不是某个碱基的改变。第一步是切开损伤旁边的磷酸二酯骨架。第二步是切除损伤，在原处重新合成 DNA (见图 5-23)。

细胞对 DNA 修复酶作了大量投资，反映了这些修复过程对生命的重要性。例如，

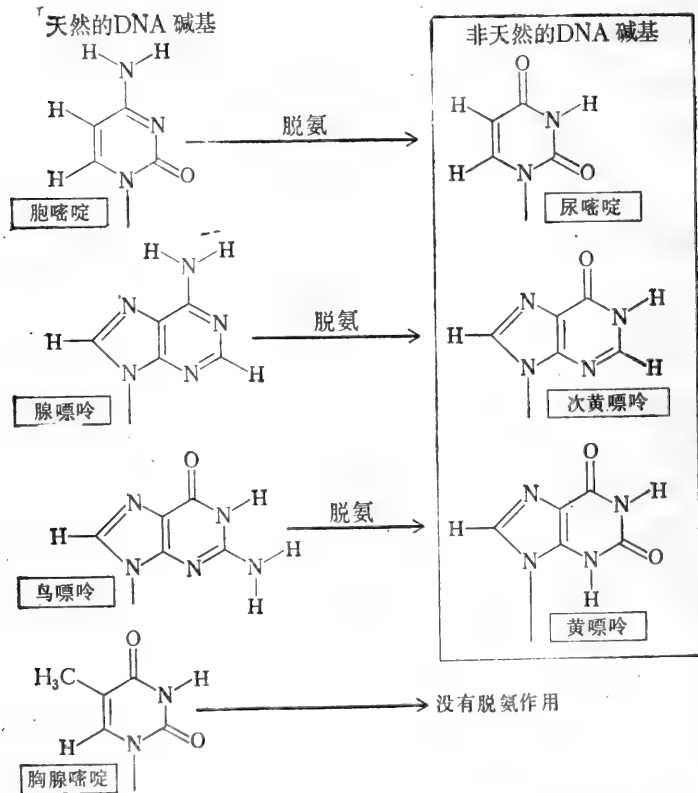


图 5-23 图示 DNA 碱基的所有自发脱氨产物，当它们出现在 DNA 时都因为是非天然碱基而可以被识别。

对着色性干皮病患者所作的遗传学分析表明，单是切除“大损伤”就至少要有 5 种酶。对酵母所作的更全面的遗传学分析表明 DNA 修复酶至少有 50 多种，每种酶始终在监控着每个细胞中的 DNA。

DNA 双螺旋的结构和化学性质使它容易得到修复

如果 DNA 的第四种核苷酸是尿嘧啶,而不是胸腺嘧啶(它就是 5-甲基尿嘧啶),则我们上面所说的去除脱氨胞嘧啶的机理(图 5-26)就不会起作用。胞嘧啶自发脱氨生成尿嘧啶,所以识别并切除这些偶发损伤的修复酶也会切除这种 DNA 中的正常的尿嘧啶(图 5-28)。同样次黄嘌呤是能与胞嘧啶专一配对的最简单的嘌呤碱,配对时形成两个氢键。但是次黄嘌呤是腺嘌呤的直接脱氨产物(图 5-28)。次黄嘌呤上添加第二个氨基以产生鸟嘌呤,由此演变成有三个氢键的 G-C 对。因此,腺嘌呤和鸟嘌呤这两种嘌呤碱就不能通过自发脱氨而相互转变。于是, DNA 中每一个可能的脱氨事件产生一种非天然碱基,能被一种特殊的 DNA 糖基化酶识别并除去(图 5-28)。

因此碱基的化学性质保证脱氨作用可被检出。但精确的修复——以及对 Schrodinger 二难推理的基本答案——有赖于双螺旋的两条链各自有遗传信息拷贝。只有二份拷贝在同一个碱基对上同时受到损伤,细胞才会没有一个完好的拷贝作为 DNA 修复的模板,但很少会出现这种情况。

遗传信息也能贮存在单链 DNA 中,一些很小的病毒是单链基因组。但这样的 DNA 不能进行修复,所以这些病毒的突变率很高。只有基因组极小的生物才能将它们的遗传信息编码在不是 DNA 双螺旋的结构中。

小结

在整个进化期间从非必需蛋白质和 DNA 序列的变化速率,可以估算出高等真核生物中 DNA 序列借以维持的保真性。这种保真性如此之高,以致 3×10^9 碱基对的哺乳动物基因组平均每年影响到生殖系的只有 15 个碱基对的变化。但是,不可避免的化学衰变过程使这样大小的基因组每天有成千上万个 DNA 核苷酸受到损伤。只是由于有各种各样的 DNA 修复酶在不断地监测着 DNA,并除去损伤的核苷酸,遗传信息才能稳定地贮存在 DNA 序列之中。

DNA 修复过程有赖于 DNA 双螺旋的每一条链各贮存着遗传信息的一份拷贝。所以一条链上的偶然损伤可被修复酶切除,根据未损伤链中的信息重新合成一条完好的链。

DNA 复制机理¹⁸

生物除了由 DNA 修复来保持 DNA 序列的完整性外,还必须在再次细胞分裂之前准确地复制自身的 DNA。DNA 复制时,聚合速率在细菌中约为每秒 500 个核苷酸,在哺乳动物中约为每秒 50 个核苷酸。显然,复制酶必须既准确又迅速。速度和准确是借助几种不同蛋白质组成的多酶复合物来达到的,多酶复合物指导复制过程并构成一台精细的“复制机器”。

碱基配对是 DNA 复制和 DNA 修复的基础¹⁹

DNA 复制的定义是 DNA 核苷酸序列(或 DNA 的某一段)通过互补的碱基配对

(A 与 T 或 U 配对, G 与 C 配对)复制成为互补的核酸 (DNA 或 RNA) 序列的过程。这个过程要求 DNA 中的每个核苷酸能被尚未聚合的互补的核苷酸所识别,要求 DNA 螺旋的两条链分开,至少是暂时分开,让每个碱基上的氢键供体基因和氢键受体基因暴露出来进行碱基配对。然后,进入的相应核苷酸单体 (A、G、C 和 T) 在酶催化的聚合作用下呈直线排成一条新的核酸链。1956 年,发现了第一个核苷酸聚合酶,定名为 DNA 聚合酶。已证明这种酶的底物是脱氧核苷三磷酸,它们按图 5-29 中所示的分步机理聚合在单链 DNA 模板上。我们已经看到,这种酶是如何在 DNA 修复时发生作用的(图 5-23)。

DNA 复制时,每一条老的 DNA 链作为形成新链的模板。所以很长的 DNA 序列据说是“半保留地”复制。一个分裂细胞的两个子细胞都继承一条新的 DNA 双螺旋,其中含一条老链和一条新链(见图 3-11)。

本世纪 60 年代初期用短脉冲 [³H] 胸苷标记正在复制的整条染色体,放射自显影分析结果发现了沿着亲体 DNA 螺旋移动的局部复制区。由于它具有 Y 形结构,所以称这种活性区段为 DNA 复制叉。在每一个这样的区段中,合成着 DNA 的两条新的子螺旋。

DNA 复制叉是不对称的²⁰

本世纪 60 年代出现的最简单的 DNA 复制机理为,两条新链都是随着复制叉从 DNA 分子的一端向另一端移动时,在复制叉处一个一个地加上核苷酸而不断生长的。但因为 DNA 螺旋中的两条 DNA 链是反向平行的,所以,这种机理就要求一条子链从 5' 端向 3' 端生长,另一条子链则从 3' 端向 5' 端生长(图 5-30)。这样一种复制叉就要求有两种 DNA 聚合酶。一种聚合酶按图 5-29 中所示,从 5' 端向 3' 端聚合,在图中进入的每一个脱氧核苷三磷酸单体都带有为添加它自身所需要的三磷酸活化作用。另一种 DNA 聚合酶从 3' 端向 5' 端移动,需通过所谓的“顶端生长”方式起作用,此时生长中的 DNA 链末端常有为相继核苷酸添加时所需的三磷酸活化作用。尽管生物化学研究发现在其他地方确有多种“顶端生长”聚合过程,但实际上没有这种从 3' 端到 5' 端的 DNA 聚合酶(见图 2-34)。

那末,3' 端向 5' 端的 DNA 合成是怎么进行的呢?本世纪 60 年代后期放射性标记 DNA 前体的实验首次回答 3 个问题。如果将高放射性的 [³H] 胸苷加到分裂着的细胞中几秒钟,只有在复制叉后面刚复制的 DNA 上标记。这种选择标记法揭示,在细菌的生长叉处临时有一些长为 1 000 到 2 000 个核苷酸的片段(由于历史的原因,通常都称这些片段为冈崎片段;在真核生物中,它们只长 100 到 200 个核苷酸)。此后不久,证明这些片段只从链的 5' 端向链的 3' 端合成,而且在合成后由 DNA 修复期间封住 DNA 螺旋中缺口的同一种 DNA 连接酶连接起来形成 DNA 长链(图 5-23)。

现在知道,复制叉具有如图 5-31 所示的那种不对称结构。连续合成的 DNA 子链称为前导链 (leading strand),它的合成先于不连续合成的那条子链,不连续合成的子链叫做后随链 (lagging strand)。虽然从总体上说后随链是从 3' 端向 5' 端合成,但实际上每个片段还是从 5' 端向 3' 端合成,所以这条链的合成是延迟了。因为叉的滞后一侧上的 DNA 是通过不连续的,“背后缝合”(backstitching)机理合成的,所以叉上只需从

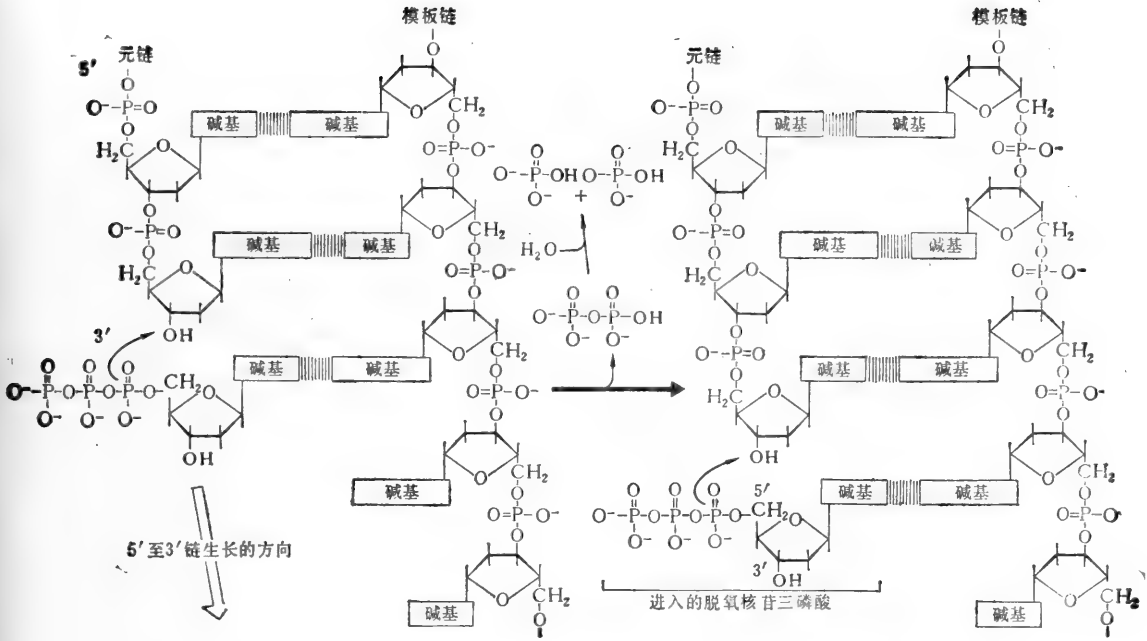


图 5-29 DNA 聚合酶催化的反应中的两个连续步骤。反应由添加每个核苷酸时所释放的焦磷酸的水解来驱动(见 77 页)。如图所示,通过与露出来的一条模板链上的核苷酸碱基配对,每次从核苷酸中选出一个核苷酸,然后按弯箭头所示的酶催化反应共价结合。结果是新的 DNA 链从 5'端向 3'端生长。除模板链外,反应还需要一段现成的多核苷酸链,新的核苷酸链就加在它的 3' OH 端上;这段链叫做 DNA 聚合酶的引物。

5' 端向 3' 端这种类型的 DNA 聚合酶。

DNA 复制的高保真性需要一种“校对”机理²¹

DNA 复制时复本的保真性如此之高,以致每复制 10^9 个碱基对大约只出现一个差错,这是保持 3×10^9 个 DNA 碱基对的哺乳动物基因组时所要求的。但是,可能的互补碱基对不只是标准的互补碱基对。预料在正常 DNA 中会临时出现四种 DNA 碱基的罕见的互变异构形式,约占 $1/10^4$ 或 $1/10^5$ 。这些形成了错配。例如,罕见的 C 的互变异构形成与 A 配对,而不是与 G 配对,所以就造成突变(图 5-32)。因此, DNA 复制的高保真性取决于“校对”机理。

“校对”过程在很大程度上有赖于 DNA 聚合酶的一些特殊性质。与 RNA 聚合酶不同, DNA 聚合酶不是靠把两个核苷三磷酸连接起来开始合成新的多核苷酸链。它们绝对要求在碱基已配对的多核苷酸链的 3'-OH 端上添加核苷酸(见图 5-29)。这条预先存在的、要加上另外核苷酸的链叫做引物。测试各种合成的 DNA 分子能否用作 DNA 聚合酶的模板时发现,只有在碱基已配对的 3'-OH 端上有引物链的 DNA 分子能直接复制(图 5-33)。DNA 分子 3'-OH 末端如是错误配对的(碱基没有配对),就不能用作模板。当碰上这类错配的 DNA 时,已知用于复制的 DNA 聚合酶利用其内在的 3'-5' 外

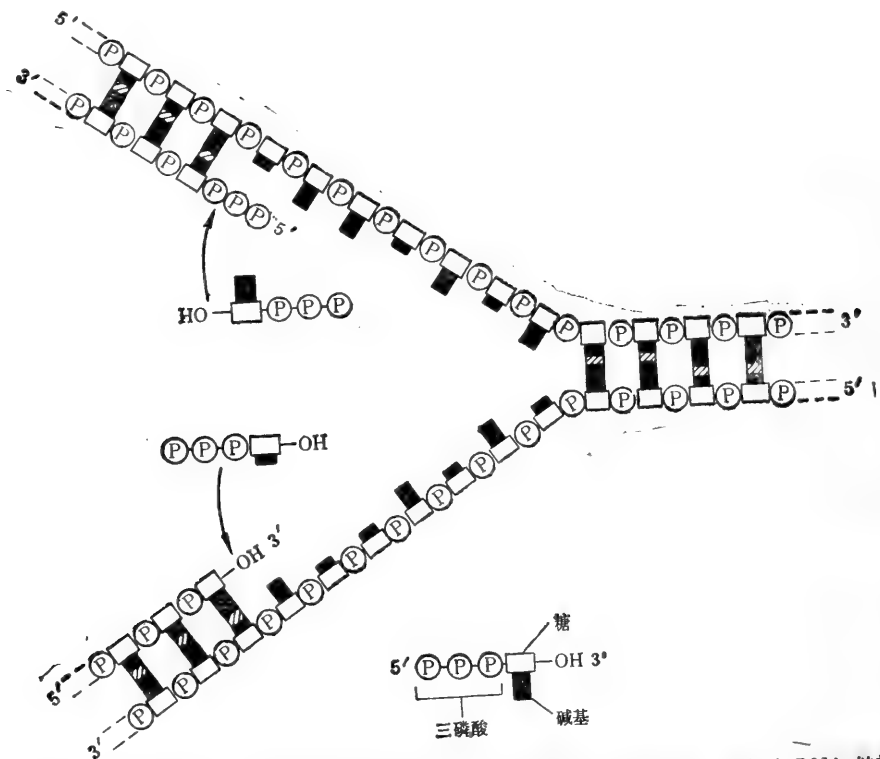


图 5-30 图示直觉上认为的最简单(不正确)的 DNA 复制机理。如图所示, 两条子 DNA 链都连续生长, 需要从 5' 端向 3' 端和从 3' 端向 5' 端的核苷酸聚合作用。

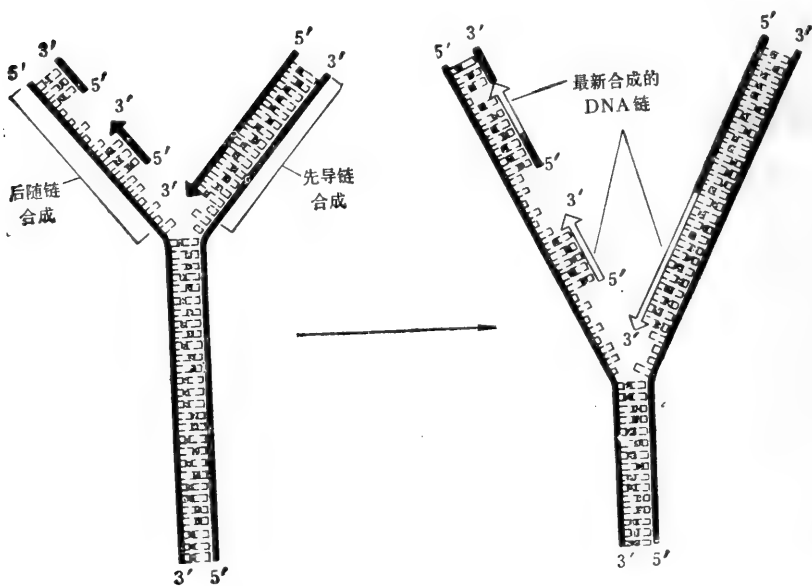


图 5-31 一个真实的复制叉结构。两条 DNA 子链都从 5' 端向 3' 端合成, 这就要求后随链上合成的 DNA 是由一系列小片 DNA 连接而成。

由此可见, DNA 聚合酶起着“自我校正”的作用,当 DNA 聚合酶沿着 DNA 移动时会切除它自己在聚合时的差错。这样的校对被认为是如图 5-34 所示,切除罕见的互变异构碱基的配对。

现已清楚, DNA 聚合酶的一个重要优点是在没有引物时,它不能将两个脱氧核苷三磷酸连接在一起去发动合成新的多核苷酸链。正是需要有一个碱基完全配对的末端,使 DNA 聚合酶具有自我校正的特性。要使这样一种酶在完全没有引物的情况下成功地区别碱基配对的和未配对的生长中的 3'-OH 端,从而去发动合成显然是不可能的。相反,参与基因转录的 RNA 聚合酶不需要自我校正,因为在制造 RNA 转录物时可以允许有较高的差错率。RNA 聚合酶能在没有引物的情况下开始合成新的多核苷酸链。而且在 RNA 合成以及将 mRNA 序列转译成蛋白质序列的独立过程中差错频率约为 1×10^{-4} 。

DNA 从 5' 端向 3' 端复制本来就是很准确的

两条子链如果都是连续合成的(如图 5-30 所示),则需要有第二种 DNA 聚合酶去添加脱氧核苷三磷酸使链从 3' 端向 5' 生长,但并没有发现这种酶,上一节的论证也对此提出了一种解释。如果有这样一种 3'→5' 的聚合酶(带有活化的三磷酸的是生长的 5' 链而不是进入的单核苷酸),那末聚合时出现的差错就不能单靠水解来切除了,因为这样形成的裸露的 5'-链端会马上终止 DNA 合成。因此,校正刚添加在 DNA 链 3' 端上的错误配对碱基,比校正刚添加在 DNA 链 5' 端上的错误配对碱基要容易得多。因此乍看之下,图 5-31 所示的 DNA 复制机理则比图 5-30 所示的不正确机理更为复杂和更难控制,但它只涉及 DNA 从 5' 端向 3' 端合成使这种真实机理更为准确。

在后随链上合成小段引物分子需要一种特别的核苷酸聚合酶

复制叉一旦形成,就不断为前导链上的 DNA 聚合酶提供碱基配对的链端,由此合成新链。可是,在叉的后随一侧的 DNA 聚合酶只需 4 秒钟就可合成每个 DNA 短片段,而后必须在模板链上更前的位置上开始合成全新的片段(图 5-31)。发动合成每一个这样的 DNA 片段需要有碱基配对的引物,而产生这种引物又需要有一种特殊的机理。这种机理涉及 RNA 引物酶的聚合酶,这种酶利用核糖核苷三磷酸合成长约 10 个核苷酸的小段 RNA 引物(图 5-35)。在后随链上每隔一段合成这些引物,再通过 DNA 聚合酶的作用而延长,这样就开始形成每一个冈崎片段(见图 5-31)。这种 DNA 聚合酶分子继续伸长,直至碰到连接在前面 DNA 片段 5' 端上的 RNA 引物为止。一条连续的 DNA 链的生成,先是把在后随链上合成的许多片段连接起来,一个特殊的 DNA 修复系统迅速切除老的 RNA 引物,并用 DNA 取代之。然后, DNA 连接酶把新 DNA 片段的 3' 端与前一个 DNA 片段的 5' 端连接起来而完成了这一过程(图 5-36)。

为什么宁愿用可切除的 RNA 引物,而不用看似更经济的不切除的 DNA 引物?自我校正的聚合酶不能从无到有地发动链的合成的论据也意味着相反的含意:一种能发动从无到有地合成链的酶就不能有效地进行自我校正。因此,任何引发冈崎片段合成的酶必然会制出较不准确的复本(至少在 10^5 中有一次差错)。即使留在最终产物中的这种复本的数量,少到只占整个基因组的 5% (例如,每个有 200 个核苷酸的 DNA 片段中有 10

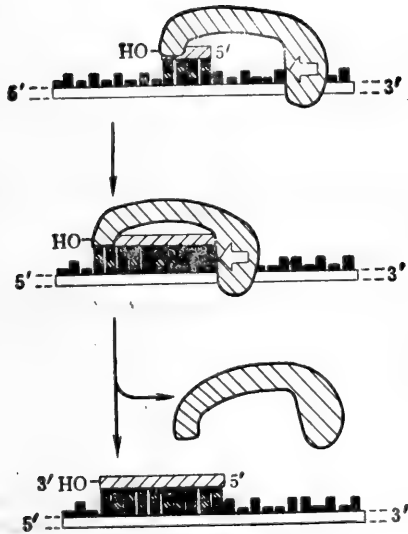


图 5-35 RNA 引物酶催化反应的示意图。该酶在后随链上合成短的 RNA 引物。与 DNA 聚合酶不同,这种酶可以通过将两个核苷三磷酸结合在一起的方式发动新的多核苷酸链合成。如图所示, RNA 引物酶在合成一小段多核苷酸链后就停止工作,这样, DNA 聚合酶就可以在这个引物的 3' 端上加核苷酸了。

个核苷酸),结果也会大大增加总的突变率。由此看来,认为用 RNA 引发而不用 DNA 引发是一种进化,它必然带来强大优势的看法是有道理的,因为引物中的核糖核苷酸会自动地给这些序列做上要切除的“坏拷贝”的标志。

特异蛋白质帮助解开复制叉前面的 DNA 双螺旋²⁴

为了让进入的脱氧核苷三磷酸能同亲本模板链进行碱基配对,复制叉前面的 DNA 双螺旋必须迅速解开。可是在正常情况下, DNA 双螺旋非常稳定,碱基配对结合牢固,以致要在试管中将两条链分开需要接近沸水的温度 (90°C) 才行。因此,大多数 DNA 聚合酶都只能在已成为单链的模板链上复制 DNA 分子。需要有另一些蛋白质去帮助解开双螺旋,从而为 DNA 聚合酶提供合适的露出碱基的 DNA 模板去进行复制,这些蛋白质有两种:

1. 螺旋松解蛋白——也叫单链 DNA 结合 (SSB) 蛋白 [single strand DNA-binding (SSB) proteins]。这些蛋白质通过协作方式与 DNA 的单链结合(图8-7)。然后在单链 DNA 上排成一行。展开它的骨架并让 DNA 碱基暴露出来以便进行碱基配对,虽然螺

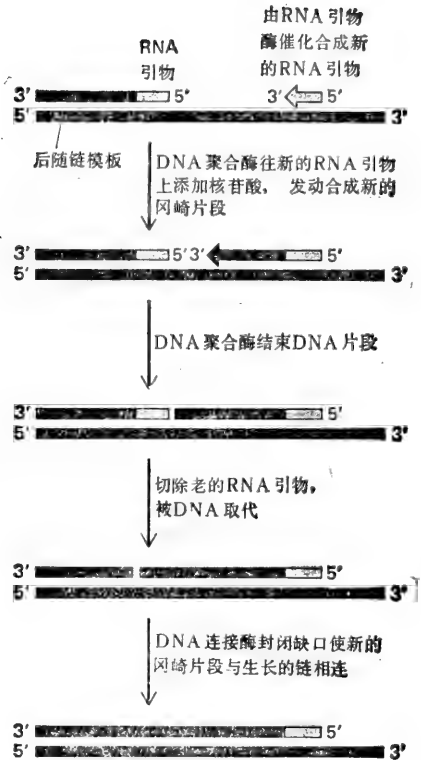


图 5-36 后随链上每个 DNA 片段合成的步骤。真核生物中,在后随链上每隔约 200 个核苷酸合成一个 RNA 引物,每个 RNA 引物长 10 个核苷酸。RNA 引物酶的起始信号的特性还未弄清楚,但如同特异的模板核苷酸序列有关,则必定是非常短的一段序列。

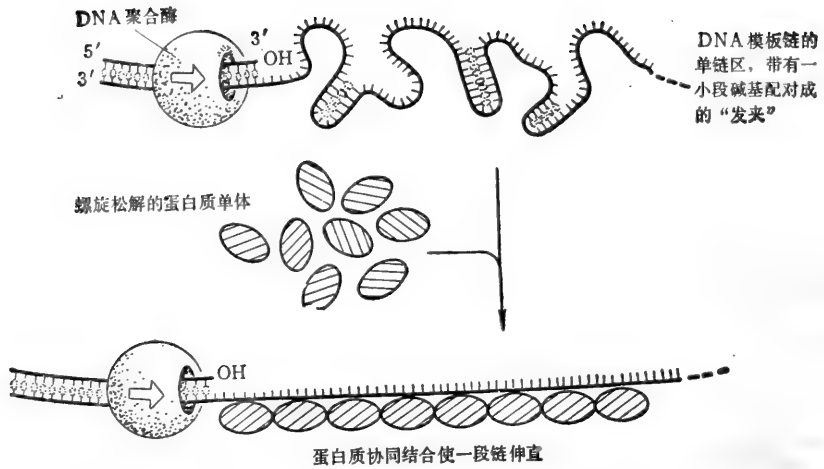


图 5-37 螺旋松解蛋白对单链 DNA 结构的影响的图解。这些蛋白质通过图示的协作方式与 DNA 结合后,在 DNA 上排成长串,使 DNA 模板链伸直,便于 DNA 聚合过程的进行。裸露单链 DNA 中的“发夹”是由小段互补核苷酸序列偶尔匹配形成的。

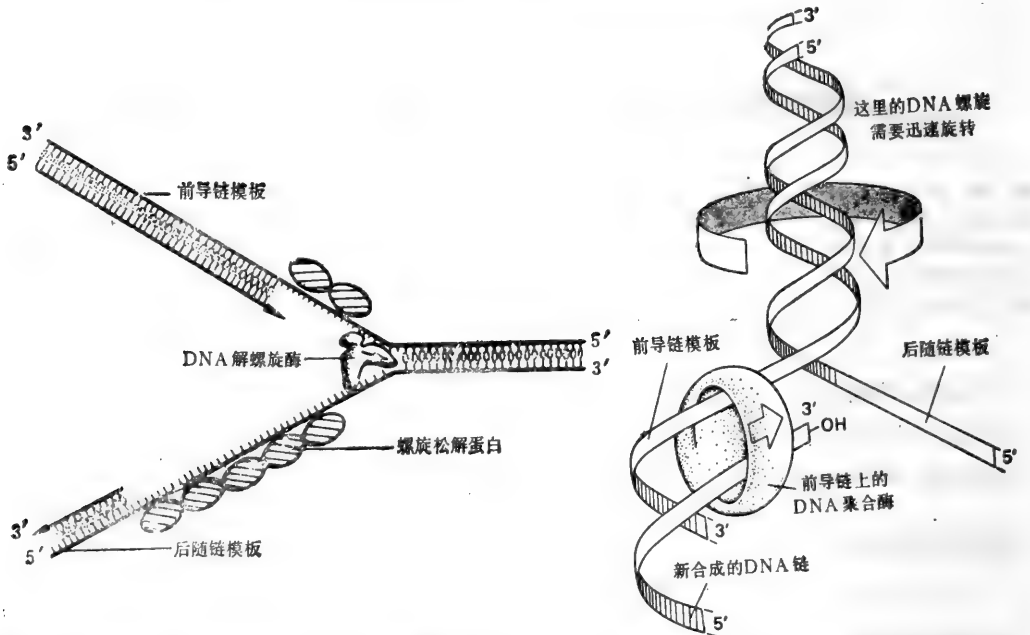


图 5-38 一般认为,复制叉前面的 DNA 螺旋通过 DNA 解螺旋酶与螺旋松解蛋白的联合作用以很快的速度解开。

图 5-39 图示DNA复制时产生的“螺旋问题”,复制叉以每秒 500 个核苷酸的速度移动,亲本 DNA 螺旋必须每秒钟旋转 50 圈。

螺旋松解蛋白不直接与双螺旋形式的 DNA 结合,但它们可以通过与单链 DNA 结合,使 DNA 双螺旋变得很不稳定,从而有利于解开螺旋的过程。此外,它们的存在还可以解开在 DNA 中已成为单链的区段内部所形成的弱的发夹状螺旋。DNA 聚合酶分子在后随链上的真正模板是由于有蛋白质结合而被拉直了的一段单链 DNA (图 5-37)。一般认为,螺旋松解蛋白在细胞中以这种方式覆盖了单链 DNA 的大部分区段,因而在 DNA

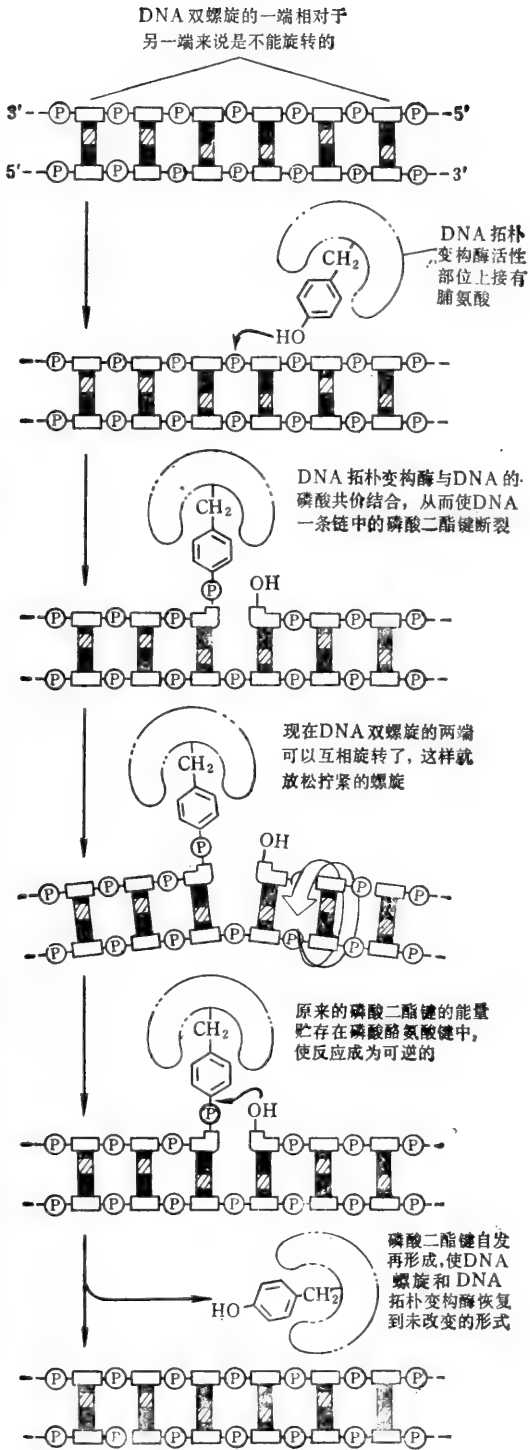


图 5-40 DNA 拓扑异构酶催化的可逆的缺口形成反应示意图。表明这些酶与 DNA 形成暂时的共价键,产生一个磷酸酪氨酸残基。图示的酶为 I 型 DNA 拓扑异构酶。

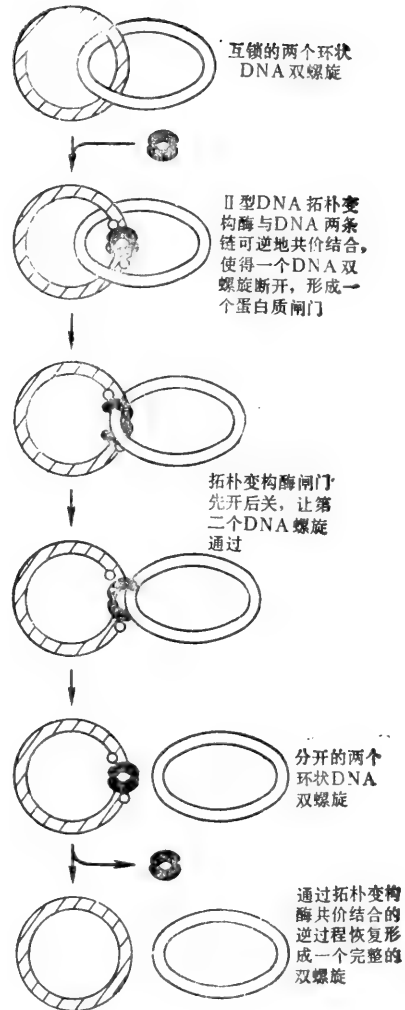


图 5-41 II 型DNA 拓扑异构酶催化DNA 螺旋通过反应的实例。原核生物和真核生物都有这些酶,也许具有多种功能。

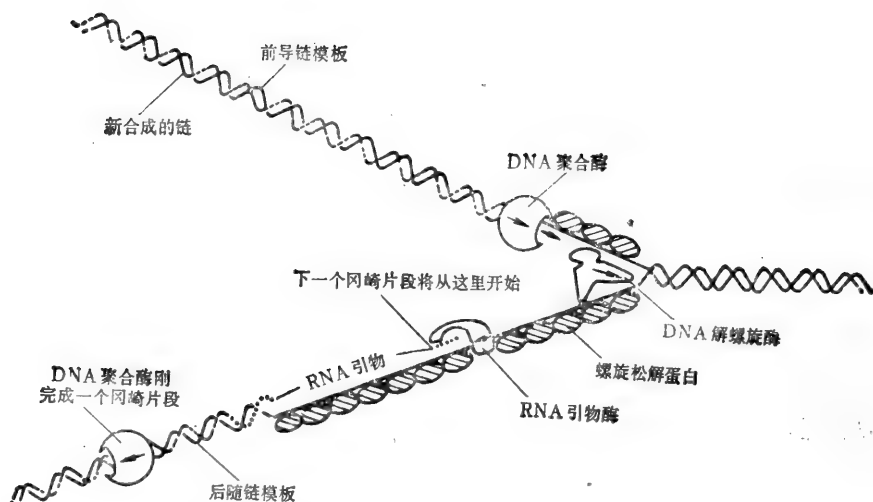


图 5-42 在 DNA 复制叉上工作的几种主要蛋白质一览

修复和遗传重组中也起重要作用。

2. 复制蛋白 (replication protein) 是由 ATP 驱动, 在 DNA 上行走的机器。如在肌肉中那样, ATP 的水解可改变蛋白质的形状, 使之能做机械功。图 3-60 说明一个假设的 DNA 结合蛋白质如何利用 ATP 沿着 DNA 走动。事实上已经证明, 这些蛋白质是 DNA 解螺旋酶参与解开 DNA 复制区上的 DNA 螺旋。图 5-38 表示 DNA 复制时, 螺旋松解蛋白如何同由 ATP 驱动的 DNA 解螺旋酶合作解开 DNA 螺旋。

防止 DNA 缠绕的其他专一性蛋白质²³

由于不准确地把 DNA 画成一部平面的“梯子”, 所以迄今我们忽略了“螺旋问题”。实际上, 复制叉上每复制 10 个碱基, 亲本双螺旋就必须绕着它的轴转一圈(图 5-39)。所以复制叉移动时, 叉前的染色体在正常情况下必须迅速旋转, 对长的染色体来说, 这是需要输入大量能量。据认为, 一类叫做 DNA 拓扑变构酶 (topoisomerases) 的蛋白质通过在螺旋中形成一个“转体”, 就可解决这个问题以及 DNA 转录时所产生的类似问题。

DNA 拓扑变构酶可看成是“可逆的核酸酶”, 它先是切断 DNA 链, 然后把自身共价结合在断端上, 拓扑变构酶造成的暂时“缺口”使缺口两侧的 DNA 螺旋绕着缺口对面的磷酸二酯键旋转, 从而放松拧紧了螺旋(图 5-40)。因为共价结合的蛋白质-DNA 键是高能量键, 它保留着已断的磷酸二酯键的能量, 所以形成缺口的反应是可逆的, 蛋白质一旦离去, 缺口就闭合, 因此, 重新封闭很迅速且不需要另外输入能量。

这种机理全然不同于 DNA 修复过程中 DNA 连接酶重新封闭事前存在的缺口的机理(图 5-23 和 5-36)。与拓扑变构酶不同, DNA 连接酶必需利用 ATP 分子生成高能磷酸键, 在活化缺口处裸露的 5' 端方能将缺口两端的 DNA 连接起来。

DNA 拓扑变构酶有各种类型。按上述方式作用的叫做 I 型 DNA 拓扑变构酶, 因为它们在 DNA 双螺旋中产生一个可逆的单链断裂(图 5-40)。最近已鉴别出 II 型 DNA 拓扑变构酶。这些酶与 DNA 的两条键共价结合, 在 DNA 螺旋中造成暂时的双键, 使第二个 DNA 双螺旋通过断裂处, 然后干净利落地重新封闭断口。所以, 这类酶在解开环

状 DNA 分子或分开两个互锁的 DNA 环时是很有效的(图 5-41)。

为解决 DNA 复制时所产生的各种 DNA 缠绕问题,使每条染色体复制时形成的 DNA 两条长子螺旋全部分开,II 型 DNA 拓扑变构酶可能起重要作用。任何一个想不用剪刀而解开一团乱麻似的钓鱼线的人,最容易体会到这种酶解决这个问题时的用途。

真核生物与原核生物的 DNA 复制基本相似²⁴

图 5-42 总结了 DNA 复制的主要步骤。在复制叉上有两个相同的 DNA 聚合酶分子在工作,一个在前导链上,另一个在后随链上。当前导链上的 DNA 聚合酶分子与螺旋松解蛋白及 DNA 解螺旋酶一齐工作时,DNA 螺旋就解开。虽然前导链上的 DNA 聚

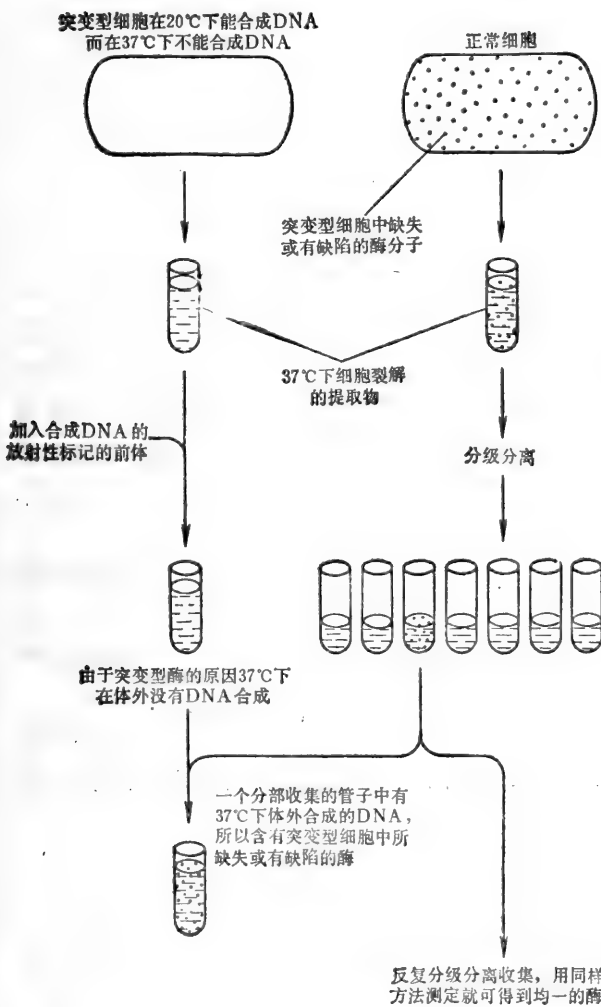


图 5-43 利用 DNA 复制有缺陷的细菌和噬菌体突变型,原核生物 DNA 复制时必需的但功能未知的酶。这种“体外互补分析”略作修改,可用来对分离突变型的其他许多过程作生化研究。

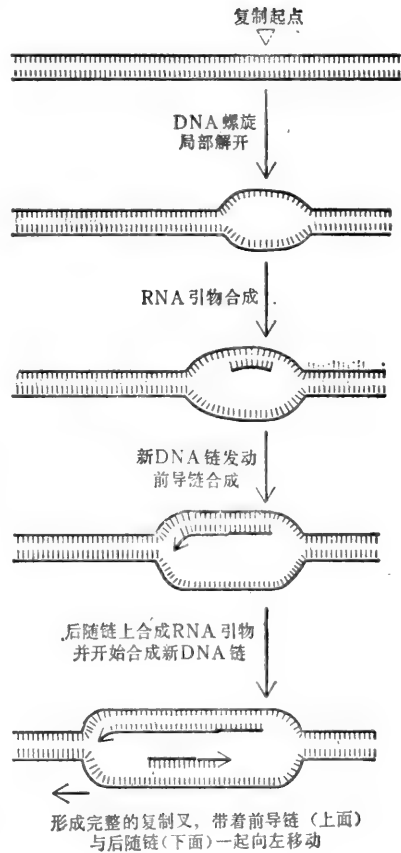


图 5-44 设想在复制起点开始形成复制叉过程的简图。还不了解起始过程的细节。

合酶分子能连续行进,后随链上的 DNA 聚合酶分子则必须相隔一段才重新起动,因此,这条链上合成的 DNA 是一连串短片段(冈崎片段)。当 DNA 聚合酶把脱氧核苷酸添加在后随链模板上由 RNA 引物酶制造的短 RNA 引物上时,就开始合成冈崎片段;当 DNA 连接酶使 3' 端与前面一个片段的 5' 端连接时合成就结束。

图 5-42 中的资料多半得自本世纪 70 年代后期,那个时候已有能作离体 DNA 复制的细菌和噬菌体的多酶系统。各种基因的突变型从而促进了这些系统的发展。

主要由于难以获得所需的突变型,所以有关真核生物 DNA 复制的酶学细节至今还不清楚。然而,复制的基本情况包括复制叉的几何图形以及 RNA 引物的利用等,原核生物和真核生物看来似乎是一样的。主要区别是,真核 DNA 被复制裸露的不是 DNA 而是染色质,在染色质中 DNA 与组蛋白紧密结合。如第八章中所述组蛋白构成盘状复合体,真核 DNA 绕在它们上面形成一有规则的结构,叫做核小体。在 DNA 上每隔 200 个碱基对有一个核小体,这就解释了后随链上新的 DNA 片段开始间隔,在真核生物中的(相隔 100—200 个核苷酸)是细菌中的(间隔 1 000—2 000 个核苷酸) 1/10。此外,如果核小体的作用是暂时阻止聚合酶行进,那末染色质的存在就可解释为什么真核生物复制叉的移动速度只有细菌复制叉的 1/10,如果存在的是裸露 DNA 就难以解释了。

复制叉在复制起点上形成²⁵

在从细菌到哺乳动物的各种各样生物中,复制叉似乎起源于一种叫做复制泡 (replication bubble) 的结构,在这里亲本 DNA 螺旋的两条链已相当分开,并作为合成两条互补子链短片段的模板(图 5-44 下方)。原则上,DNA 螺旋局部区段中的碱基对被叉起始蛋白 (fork-initiation protein) 拆开露出一条单链 DNA,使 RNA 引发酶能在上面合成 RNA 引物。那末,复制叉就这样开始了(图 5-44)。但这种复制叉的起始过程在细胞提取液中特别难以重复,所以,对参加这过程的特殊的酶以及完成这个过程的确切方式都不知道。

业已证明:细菌以及真核细胞中生长的几种病毒的复制泡,是在复制起点那种特殊 DNA 序列处形成的。这些序列长约 300 个核苷酸,在好几种情况下证明,它们含有与特异蛋白相结合的区段,这些特异蛋白是复制叉起始过程所必需的。一般认为,在真核生物基因组中存在着类似的具有蛋白质结合部位的复制起点,只是尚缺乏确凿的证据。

真核细胞中复制叉的起始与生长的一般方式,将在第十一章中结合细胞周期中 DNA 合成期的描述作详细讨论。因为形成复制叉的确切机理可能同控制动物细胞生长的过程密切相关,所以阐明这一机理特别重要。

小结

DNA 复制的惊人的忠实性,部分由于在 DNA 双螺旋的两条从 5' 端向 3' 端的链上发生核苷酸聚合作用,这使能把有自我校正功能的 DNA 聚合酶用于所有的合成。因为 DNA 螺旋的两条链是反向平行的,所以 5' 端向 3' 端的 DNA 合成只能在一条链上连续进行。在后随链上通过“反面缝合”过程合成小段 DNA。因为自我校正的 DNA 聚合酶不能起始一条新链,所以后随链上的这些 DNA 片段是由小段 RNA 引物分子所引发,接着这些小段 RNA 引物被切除而被 DNA 所代替。

DNA 复制需要多种蛋白质的合作,其中有,(1)DNA 聚合酶和 RNA 引物酶,以催化核苷三磷酸聚合;(2)DNA 解螺旋酶和螺旋松解蛋白,以帮助解开 DNA 螺旋进行复制;(3)DNA 连接酶和一种降解 RNA 引物的酶,使后随链上不连续合成的 DNA 片段连接在一起;(4)RNA 拓朴异构酶,以帮助解决螺旋缠绕问题;(5)目前还未弄清其特性的起始蛋白,它帮助在复制起点上形成新的复制叉。

病 毒

本章至此已讨论了 DNA 转录和蛋白质合成的基本过程,已阐明了遗传信息怎样通过 DNA 修复和复制而世代相传的。现在我们将叙述病毒怎样利用细胞的一般遗传机理,重点讨论病毒独有的一些 DNA 复制机理。

病毒是可移动的基因²⁶

病毒最初被描述为只能在细胞中繁殖的致病因子。由于它们的超微大小可以通过使是最小的细菌也通不过的超微滤器。在电子显微镜出现之前,虽然已有人推测病毒可能是获得从一个细胞进入另一个细胞的能力的裸露基因,但它们的性质还是模糊不清的。20 世纪 30 年代,利用超速离心机有可能把病毒从宿主细胞的组分中分离出来。到了 20 世纪 40 年代初,开始提出所有病毒都含核酸的概念。这进一步使人们推测,病毒与遗传物质执行着同样的功能。这种想法为细菌病毒(噬菌体)的研究所证实。1952 年,有人证明进入细菌宿主细胞的只是噬菌体 DNA,而不是噬菌体蛋白,噬菌体 DNA 发动了复制,结果每一个被感染的细胞中产生了几百个子噬菌体。

因此,应把病毒看作为是遗传因子,外面包着一层保护性外壳,可从一个细胞进入另一个细胞。病毒繁殖本身对于它所在的细胞来说往往是致死的。被感染的细胞有了许多病毒以后就裂解。由此又给了病毒进入邻近细胞的机会。许多病毒感染的临床表现都反映了病毒裂解细胞的特性。

病毒外壳的结构,所含核酸的类型,病毒进入细胞的方式,进入细胞后在细胞中复制的机理,各种病毒都不一样。图 5-45 和 5-46 说明了病毒结构上的差异。

病毒的遗传成分是 DNA 或 RNA²⁷

所有 DNA 病毒外面的病毒特异蛋白质分子,都由病毒 DNA 编码。起初认为,病毒 DNA 分子实际上是编码一种蛋白质的单个基因。但现在已弄清楚病毒核酸分子,即使是已知的最小病毒的核酸分子都带有几种蛋白质的信息。较大的病毒基因组,例如, T4 噬菌体的基因组,编码几百种蛋白质。所以,病毒的核酸成分可看成是微小染色体。

在有些病毒,如烟草花叶病毒(TMV)中发现的 RNA 开始时不太清楚其重要意义。当 RNA 存在时 DNA 就不存在,所以最合理的推测是 RNA 一定是这种病毒的遗传成分。但在本世纪 50 年代初,这种推测是公然违抗 RNA 的唯一作用在于把 DNA 的遗传信息转移给蛋白质的信条。到 1956 年,非但能从 TMV 中得到 RNA 纯制剂,而且还证明在没有任何 TMV 蛋白存在的情况下具有感染能力。不久又发现其他许多病毒——例如,脊髓灰质炎病毒、流感病毒和麻疹病毒——都含 RNA, RNA 携带遗传信息

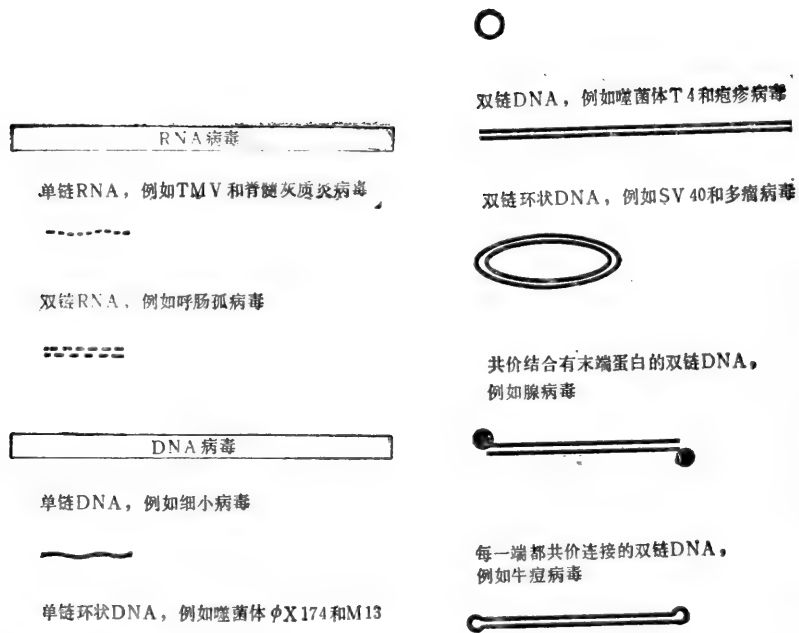


图5-45 几种病毒基因组的示意图(不按比例)。最大的病毒含有几百个基因和一个双链DNA基因组。因为DNA链末端最后几个核苷酸复制困难,所以其中有些DNA分子上可能有特殊的端(以及环的形式)。

的能力在今天已是无可争辩的了。

病毒外壳可以是蛋白质衣壳也可以是膜包被

起先认为病毒外壳只是由蛋白质分子所构成,也许只是由一种主要蛋白质分子所构成。一般认为,病毒感染是从病毒染色体与其蛋白质外壳分离时开始,随之染色体自我复制而形成许多个相同的拷贝,并以病毒编码的RNA链作为信使合成病毒专一的外壳蛋白。然后,就在子病毒的染色体周围自发装配病毒的外壳蛋白,从而形成许多个子病毒(图5-47)。

现在我们认识到,这些最初的看法尽管总的说是正确的。但从病毒可通过极其多样的途径来完成其生活史这一点来看,都是过于简单化了。首先,大多数病毒的蛋白质外壳(或衣壳)所含的多肽链不止一种,它们往往排列成好几层。其次,在许多病毒中,蛋白质衣壳外面还包着一层膜,这层膜含脂质和蛋白质,结构与所有细胞的质膜相似。这些被膜病毒的脂质成分虽然同宿主细胞的质膜一样,但蛋白质是病毒特异的。许多被膜病毒将它们最外层的膜装配在宿主细胞的质膜中,子病毒就像芽似的掏掉(图5-48)。这种出芽过程可使病毒颗粒不破坏质膜就离开细胞,因而不会杀死细胞,第七章中将对此作较详细的讨论。

病毒染色体通常编码一种或多种参与病毒核酸复制的酶²⁸

病毒染色体通常不仅编码病毒外壳蛋白,而且还编码复制病毒核酸所需的酶。例如,

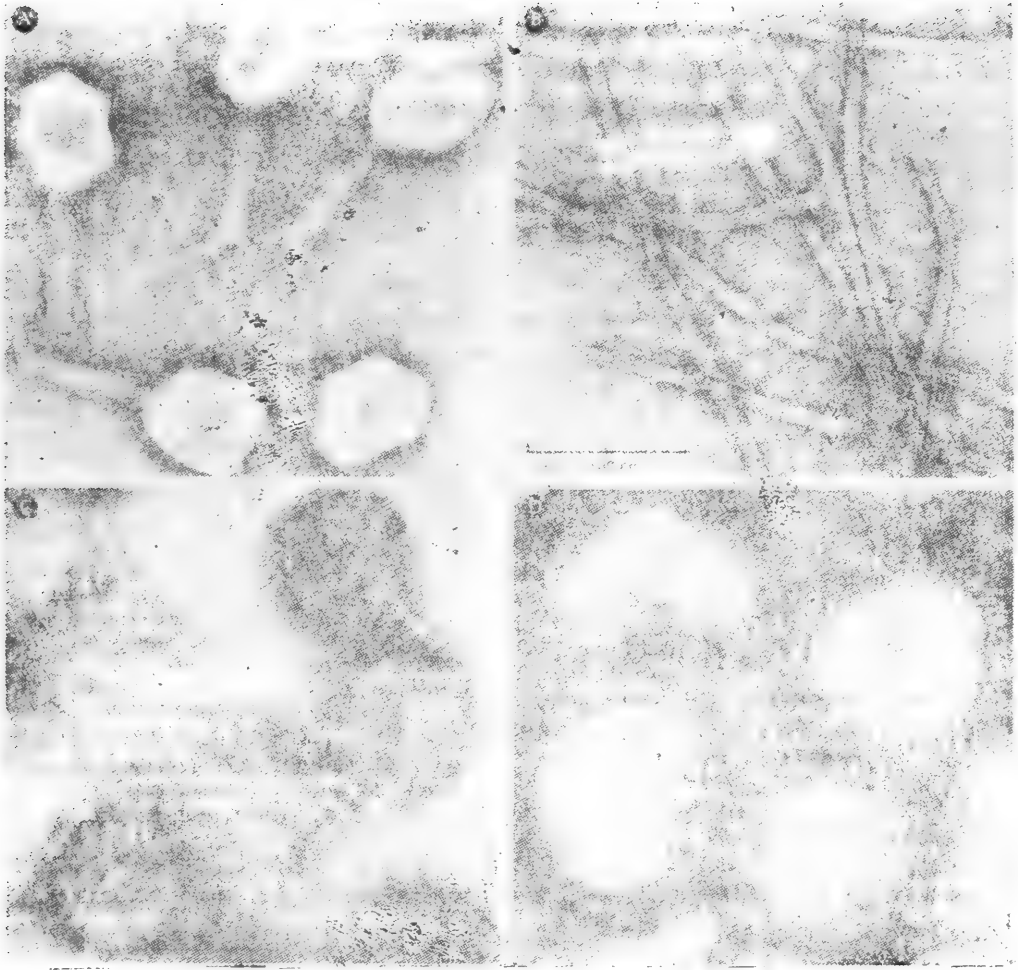


图 5-46 负染病毒颗粒的电子显微镜照片[放大倍数相同：比例见(B)所示]。(A)T4 噬菌体，一种感染大肠杆菌的含 DNA 的大病毒。贮放在噬菌体头部的 DNA 通过圆柱形的尾巴注入细菌 (James Paulson 赠)。(B)马铃薯 X 病毒，一种含 RNA 基因组的丝状植物病毒 (Craham Hills 赠)。(C)腺病毒，一种能够感染人体细胞的含 DNA 的病毒。蛋白质衣壳构成这种病毒的外表面 (Mei Lie Wong 赠)。(D)流感病毒，一种含 DNA 的动物大病毒，它的蛋白质衣壳外面还包着一层膜。(R. C. Williams 和 H. W. Fisher 赠)

较大的 T4 噬菌体 DNA 至少编码 30 种酶，以保证优先于宿主 DNA 有选择地迅速复制 T4 染色体 (图 5-49)。这些蛋白质连续催化 T4 DNA 复制并选择性地 将 5-羟甲基胞嘧啶掺入 T4 DNA 中代替胞嘧啶。T4 基因组编码的其他蛋白质还有选择性地降解大肠杆菌 DNA 的核酸酶。另一些则改变宿主细菌的 RNA 聚合酶分子，使在不同的感染时期转录不同的噬菌体基因组。

较小的 DNA 病毒，例如猴病毒 SV40 和小噬菌体 ϕ X174 所带遗传信息很少，更多地依靠宿主细胞的酶来合成病毒蛋白质和 DNA。但即使是这些病毒也还是要编码几种酶，以便有选择地发动它们自身的 DNA 合成，因为病毒如要顺利繁殖必须制服细胞的控制信号，否则就会阻止病毒 DNA 在每一个细胞周期中增殖几次。

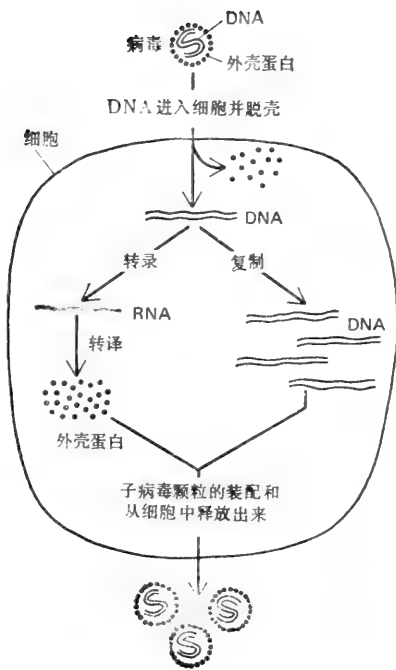


图 5-47 所有病毒中最简单的生活史。图中假设的病毒由编码单个病毒衣壳蛋白的双链DNA小 η 子组成。已知没有一种病毒比这更简单。

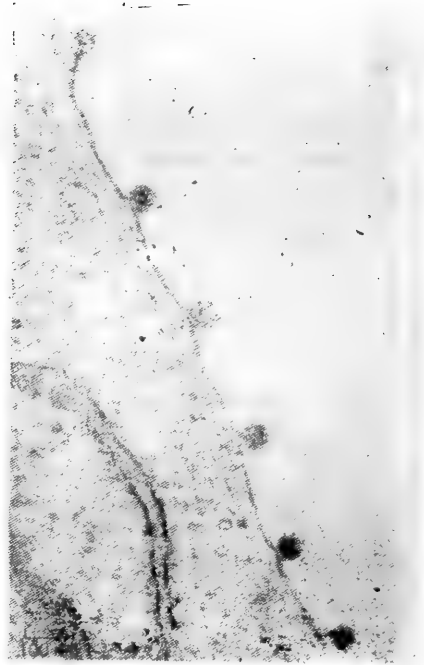


图5-48 一个动物细胞的超薄切片电子显微镜照片,从细胞上一个被膜病毒(Semliki 森林病毒)的几个拷贝正在出芽。(M. Olsen 和 G. Griffiths 赠)

各种形式的病毒基因组¹⁰

发现 DNA 双螺旋时合乎逻辑地认为 DNA 只有这种形式: 如果一条多核苷酸链偶然受到损伤, 它的互补链能够把断片聚在一起直到损伤修复为止。但对病毒染色体不必有这种担心, 特别是它们比较短只有几个核苷酸——同含几百万个核苷酸的细胞基因相比它们遭到损伤的机会很小。此外, 病毒的一个生活周期产生几百个子 DNA 分子, 因此少数几个受到损伤实际是无足轻重的。于是回想起本世纪五十年代和六十年代期间发现许多 DNA 小病毒含有单链 DNA 就不足为奇了。有一段时期人们曾推测, 这些病毒可能以一种根本不同的方式来复制 DNA, 但现在知道它们先产生一种双链的复制中间物, 并认为所有 DNA 复制都要生成互补链的。

第一个详细研究过的病毒染色体是简单的线状 DNA 双螺旋, 但病毒染色体也可以是环状 DNA 双螺旋(SV40 和多瘤病毒)、环状单股 DNA 链 (M13 和 ϕ X174 噬菌体), 或线状单股 DNA 链(细小病毒)。最近还发现更复杂的线状双螺旋。在某些噬菌体和腺病毒类型的动物病毒中, 蛋白质分子是同它们 DNA 链的 5' 端共价连接的, 而来自很大的痘病毒的 DNA 具有反向平行的两条链, 每一端通过磷酸二酯键共价连接(图 5-45)。这些形式的 DNA 都需要有独特的酶反应来完成自我复制。

病毒染色体能整合在宿主染色体中¹⁰

起初总认为病毒染色体进入细胞后最希望得到的结果是立即增殖, 这是生成大量子

病毒的前奏。但是,许多病毒可以潜伏状态存在,这时宿主细胞中有病毒基因组但没有活性,而且不产生后代。直至 20 世纪 50 年代才弄清楚病毒潜伏的分子基础,那时发现许多表面上看没有被感染的细菌,在接触紫外线后被诱导产生子噬菌体。以后的实验证明,这些溶原性细菌的染色体中带有完整的病毒染色体,这些整合病毒的染色体叫做原病毒。

能够整合到细菌染色体中去的噬菌体称为溶原性噬菌体。最熟知的例子是 λ 噬菌体。 λ 感染合适的大肠杆菌宿主细胞时,通常产生几百个子 λ 颗粒,而且在细菌细胞溶解时释放出来,这是裂解感染。在极难得的情况下感染的线状 DNA 分子环化,并通过位置专一的重组事件整合到宿主大肠杆菌的环状染色体中。成功地整合后就产生带有 λ 原病毒染色体的溶原性细菌。它在受到环境伤害(例如,接触紫外线或电离辐射)之前一直正常地增殖。这些伤害发出信号使整合的原病毒离开宿主染色体开始进入正常的病毒复制周期。这样,整合的原病毒在其宿主受到损伤时不但不会死亡,反而有机会逃入附近未受损伤的大肠杆菌细胞中(图 5-50)。

RNA 病毒也通过形成互补链复制^{26,31}

RNA 病毒增殖时也涉及互补链的形成。R17 噬菌体和脊髓灰质炎病毒等许多研究得很清楚的病毒的染色体都是单链,但也有双螺旋 RNA 的病毒染色体,例如,逆转录病毒,它们感染酵母和哺乳动物等各种生物。在所有情况下, RNA 复制都由病毒 RNA 染色体编码的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(复制酶)所催化。这些酶常掺入子病毒颗粒,所以在病毒感染时,它们可立即用来开始复制病毒 RNA。象流感病毒或水疱性口炎病毒等这些所谓的负链病毒,总是把复制酶包入子病毒颗粒。就这些病毒来说,感染链不编码任何蛋白质。只有它的互补链带着有用的遗传信息,其中包括给病毒复制酶和它的外壳蛋白编码的序列。因此如无所需的复制酶,感染链就不起作用。

病毒 RNA 的合成总是开始于 RNA 模板的 3' 端(新病毒 RNA 分子的 5' 端),从 5' 端向 3' 端进行直至模板的 5' 端。病毒 RNA 的合成没有校正差错的机理,但只要 RNA 染色体比较短,这就不是一个严重缺陷。所有 RNA 病毒的基因组都小于 DNA 大病毒,这是它们的复制机理比较原始的必然结果。

图 5-51 描绘出病毒复制其基因组的一些途径。

病毒遗传因子能使细胞癌变³²

DNA 病毒能在其中裂解增殖的细胞称受纳细胞。病毒不能在其中复制的是非受纳

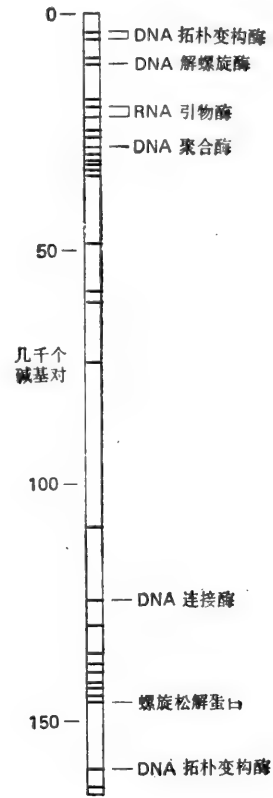


图 5-49 T4 噬菌体 DNA 复制的酶。T4 噬菌体基因组由 160 000 多个碱基对组成,编码 150 多种蛋白质,其中包括参与 DNA 复制的蛋白质。其余的蛋白质包括许多参与噬菌体头尾装配的蛋白质(见图 5-48 A)。

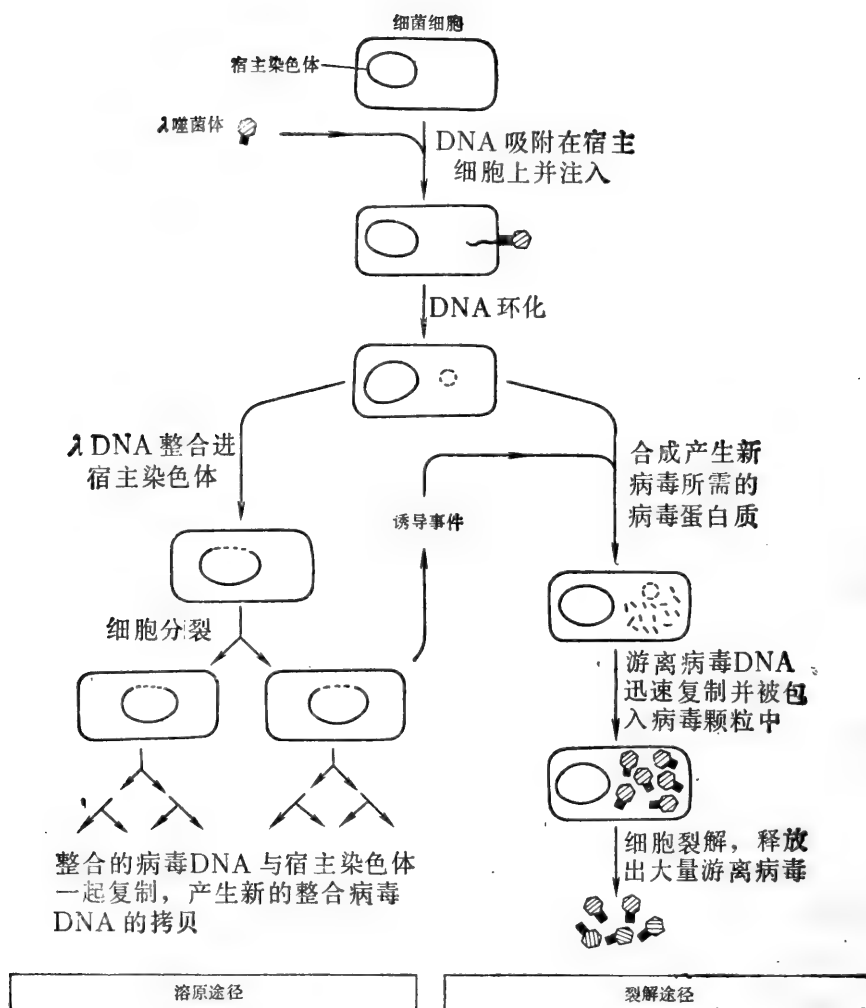


图 5-50 λ 噬菌体的生活史。 λ 基因组约含 50 000 个碱基对，编码约 50 种蛋白质。它的双链 DNA 可以线状或环状存在。如图所示这种噬菌体可通过裂解途径或溶原途径增殖。在以溶原状态生长时，对细胞 DNA 的损伤会把整合的病毒 DNA(原病毒)从宿主染色体上切下来，从而转向裂解生长。DNA 的进入和从染色体上切下是位置专一的遗传重组事件，由 λ 整合酶蛋白催化。

细胞。在少数情况下，DNA 病毒将非受纳细胞转化成为癌细胞。肿瘤转化时，一个或几个病毒基因整合进宿主细胞的基因组，在那里合成通常只有病毒增殖时制造的蛋白质。虽然我们还未确切了解病毒产物使细胞癌变的原因，但在有些情况下肯定有蛋白酶的参与；这方面的情况将在第十一章讨论肿瘤病毒遗传学时作较详细的阐述。

最初令人费解的是 RNA 肿瘤病毒，病毒感染同时导致细胞表面非致死地释放子病毒产物和感染细胞发生永久性变化，使之变成癌细胞。直至观察到 DNA 合成抑制剂可阻断病毒增殖和癌的转变才弄清楚 RNA 病毒感染如何导致永久的遗传变化。这暗示着 DNA 合成是 RNA 肿瘤病毒增殖的必要条件，1970 年发现了逆转录酶证明该假设

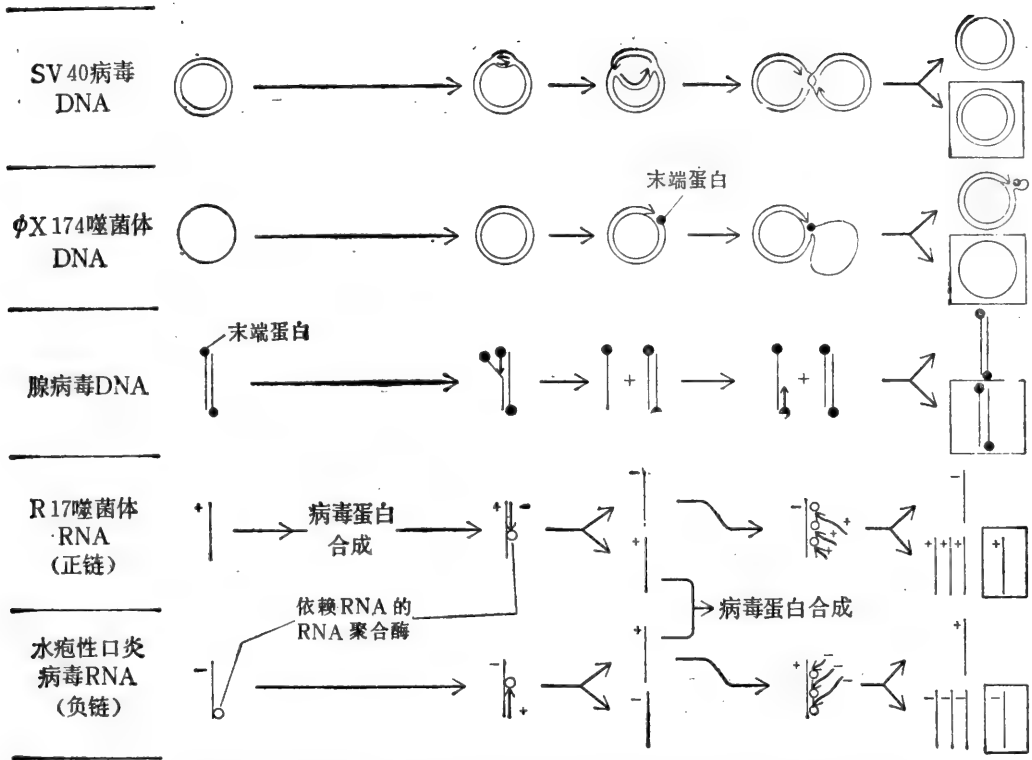


图 5-51 各种病毒复制其基因组时所用的不同对策。在图中标有黑点的地方，末端蛋白共价结合在 DNA 链的末端；这些蛋白质在其各自的复制过程中起着重要作用。请注意正链和负链 RNA 病毒之间的主要差别是，后者在制造病毒蛋白前必先合成 RNA 正链。为此，负链病毒的衣壳中必须有一种或多种病毒聚合酶分子，因为它的宿主细胞中没有类似的酶。

是正确的，感染的 RNA 链通过这种酶的作用转录出与它互补的 DNA。因此，称 RNA 肿瘤病毒为逆转录病毒，其中包括众所周知的第一个肿瘤病毒——Rous 肉瘤病毒。图 5-52 简单表明了逆转录病毒的生活周期。

病毒是如何进化的？

即使是最大的病毒也大量依赖宿主细胞来进行生物合成；例如，已知的病毒中没有一个是自己制造核糖体，或自己产生所需的 ATP。所以很明显，细胞的进化一定在病毒之前。最初的病毒的前体也就是核酸小片段，这种小片段发展了不依赖宿主细胞染色体而独立增殖的能力。RNA 病毒的前体也许类似于在植物细胞中发现的类病毒 (viroid)；这些小的 RNA 环——只有 300 到 400 个核苷酸——因为它们不编码任何蛋白质，所以是完全依靠植物细胞的酶来复制的。类病毒只以裸露的 RNA 分子存在，没有衣壳，所以只有当供体和受体细胞受到损伤时才在植物之间传播（其他病毒是靠衣壳而进入完整细胞的）。DNA 病毒可能是从一般细胞染色体偶然产生的环状小分子进化来的，在自然选择的压力下，这些独立复制的因子不管是 RNA 还是 DNA，料想可从宿主细胞获得

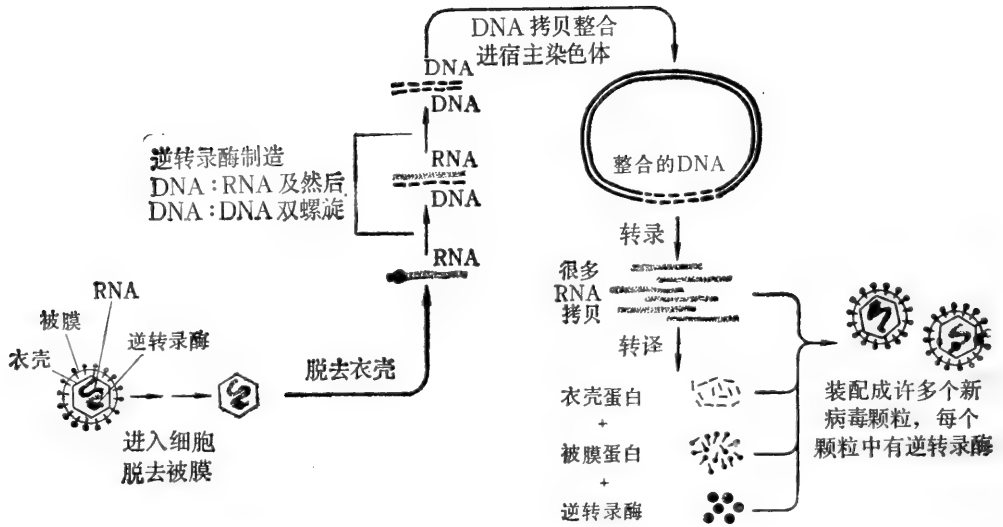


图 5-52 逆转录病毒生活史。逆转录酶是一种 DNA 聚合酶,它首先制出病毒 RNA 分子的原始 DNA 拷贝,然后再合成第二条 DNA 链,生成 RNA 基因组的双链 DNA 拷贝。由未知的宿主酶催化,这种 DNA 双螺旋整合进宿主染色体,这是合成新病毒 RNA 分子所必需的。

能促进它们自身增殖的核苷酸序列,其中包括给蛋白质编码的序列。由此就产生了类似于第四章讨论过的 DNA 小质粒那样的 RNA 或者 DNA 分子。质粒象类病毒也没有衣壳,因此不能象病毒那样地在细胞间传播。

质粒获得编码衣壳的基因之时,也称就是第一个病毒出现之日。但衣壳能包的核酸数量有限,所以它的大小限制了病毒能含有的基因数目。迫使病毒充分利用其有限的基因组,以致有些小病毒(象 ϕ X174)就出现了重叠基因,利用编码一种蛋白质的一部分核苷酸序列(读码相同或不同)来编码第二种蛋白质。另一些病毒则进化成为有较大的衣壳,因此可获得有用的新基因,其中一部分是通过与其它病毒重组而获得,一部分是从宿主细胞处获得。

病毒具有通过物种屏障转移 DNA 的独特能力,因此几乎可以肯定病毒在其他生物的进化过程中起重要作用。它经常与宿主染色体发生重组,获得宿主染色体的随机片段,并将它们带到不同的细胞或生物中。此外,病毒 DNA 的整合拷贝(原病毒)成为大多数生物基因组的永久部分。虽然这种 DNA 常会改变,以致不能形成完整的病毒,但由于它们仍能编码蛋白质,所以其中有些对细胞还是有用的。病毒可与不同生物的基因库混合而进化。

从一个完全不同的角度来看,病毒在细胞生物学中也很重要。因为它们比较简单,所以对它们的繁殖所作的研究进展非常迅速,并已阐明了细胞中许多基本的分子机理。对于我们接下来讨论的遗传重组机理尤其是如此。

小结

病毒是感染颗粒,由包在蛋白质衣壳内的 DNA 或 RNA 分子(病毒基因组)所组成。病毒只能在宿主细胞中增殖,通过打乱宿主细胞的遗传机理来繁殖自身。不同的病毒基因组结构及其复制方式也不相同。病毒感染的常见结果是被感染的细胞裂解,释放出

病毒颗粒。有些病毒却能整合进宿主染色体，病毒基因在那里与宿主细胞的基因一起复制。因为病毒有时可把宿主 DNA 序列从一个物种带到另一个物种，所以有可能在进化过程中使不同的基因库不时混合。

遗传重组机理³³

前面几节我们讨论了细胞中的 DNA 序列世世代代保持很少改变的机理，并叙述了病毒如何利用这些机理的变化以复制其自身的基因组。现在我们将详细叙述可导致核苷酸序列重排的机理：它们总起来叫做遗传重组，是一组发生在 DNA 螺旋两个独立区段之间的遗传交换反应，这些反应既有关系而又不相同。

遗传重组事件可分成两类——一般重组和专一位点重组。一般重组时，遗传交换发生在同源 DNA 序列之间，最常见的是发生在同一条染色体的两份拷贝之间。减数分裂过程中同源染色体区段的交换是熟知的一个例子，这一事件发生在卵和精子发育早期紧密联合的染色体之间（第十四章）。重组可增加交配群体的染色体上基因组合的多样性，从而增加在变化着的环境中存活的机会（第十四章）。虽然减数分裂只限于真核生物，但由于这样的基因混合的优势极大，以致在原核生物中也出现交配和一般重组引起的基因更新分配。

位点专一重组不同于一般重组，它不要求 DNA 的同源性，而是在两个参加重组的 DNA 螺旋的一条链或两条链上专一的短核苷酸序列处发生交换。所以，位点专一重组会改变基因组中核苷酸序列的排列。这些变化有时好像是有计划、有组织的，就象一个整合的细菌病毒从细菌染色体上切下来时那种情况。但在另一些情况下，这些变化又是毫无规律可言，就象转位成分进入基因组时那样。

目前还不可能阐明高等真核生物中遗传重组的生物化学。就像 DNA 复制一样，我们所知道的有关这些过程的分子细节多半来自比较容易研究的一些生物系统，例如大肠杆菌和它的病毒。

一般重组过程由同源 DNA 螺旋的互补链间的碱基配对相互作用所指导

一般重组涉及 DNA 链互换的中间产物，这还有待进一步研究。此外，重组的确切途径不同生物可能是不同的。但对交配的细菌、病毒以及真菌所作的详细遗传学分析表明，一般重组的主要结果总是相同的。

1. 这个过程最终结果是，两个同源的 DNA 双螺旋断开，两个断端同相对的两个断端重新愈合再形成两个完整的双螺旋，每个双螺旋中含有原来两个 DNA 分子的一部分（图 5-53）。

2. 交换部位（即图 5-53 中彩色螺旋与黑色螺旋的接合处）可发生在参加重组的染色体的同源核苷酸序列中的任何地方。

3. 一个螺旋的一条链与另一个螺旋的一条链在交换部位上进行碱基配对，在两个不同的 DNA 螺旋之间形成交错连接（staggered joint）（图 5-54）。这些交错连接可长达几千个碱基对，后面将阐明它们是怎么形成的。

4. 在交换的地方核苷酸序列不改变；断裂和重新愈合过程如此准确，以致没有一个核

苷酸缺失、获得或改变。

一般重组途径用来保证只在 DNA 螺旋中 DNA 序列同源程度大的两个区段间发生交换反应。交换处形成的交错连接保证了这一点，因为它要求原来两个螺旋的链之间有相当长的碱基配对区。但交错连接是怎么形成的，将配对的两个同源 DNA 螺旋又是如何识别它们的同源序列的？正如我们将明白的，同源区先通过碱基配对直接地互相识别。然后来自两个 DNA 螺旋的互补链之间形成的碱基对指导一般重组过程，所以它只发生在长段 DNA 序列配对区段之间，而不改变染色体的结构。

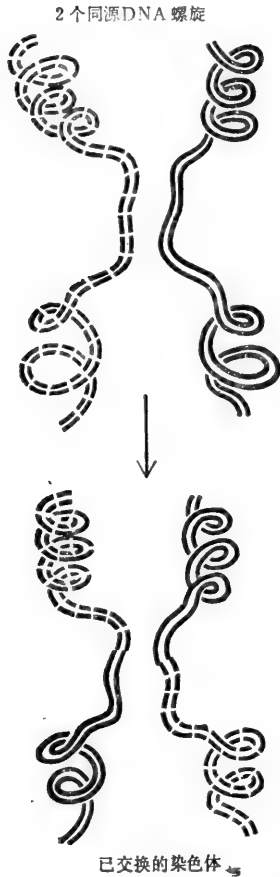


图 5-53 两个同源 DNA 双螺旋断裂和重新愈合，产生两条交换过的染色体。

一般重组是在 DNA 双螺旋一条链上的缺口处开始^{34,35}

DNA 双螺旋的两条链不仅互相通过碱基配对，而且彼此绕成螺旋。因此，两个同源的 DNA 双螺旋之间不会发生有效的碱基配对作用，除非其中一个双螺旋的一条链中先有一个缺口，使那条链自由了才能发生所需的解螺旋和重新螺旋的事件。同理，两个 DNA 双螺旋链间的发生相互交换至少要有两个缺口，每个 DNA 双螺旋的一条链上各有一个。最后，如要产生图 5-53 中所示的那种断裂和重新愈合，显然四条链都必需断裂，只有这样每一条断链才能与另一条对应的断链重新愈合。这些形成缺口的事件是如何完成和协同，以保证只在两个 DNA 螺旋共有一长段配对 DNA 序列时才产生缺口的？

观察各种生物后得到的一条线索是，只要在 DNA 螺旋的一条链上产生一个缺口，就足以引起一般重组事件。所以，已知能在 DNA 链中引起这类缺口的因素如 γ 或 X 射线辐射，都能引发遗传重组。例如，在脊椎动物细胞中，这些使 DNA 产生缺口的因素诱发处于有丝分裂细胞周期 S 期和 G₂ 期的每条染色体的两条姊妹染色单体之间发生交换(图 5-55)。因为这种姊妹染色单体交换发生在相同染色体的相同拷贝之间，它们并没有使不同的基因组重新分配；所以，用遗传方法是检查不出的。但用一种特殊的染色法还是可以将两条姊妹染色单体彼此区别开来，所以，根据在有丝分裂中期看到的“染色深浅的染色体”(harlequin chromosome) 可以容易地检出交换(图 5-56)。

在真核生物减数分裂期间和细菌中发生类似的重组事件时，很可能有一种酶在开始配对的分散(而不是随机的)的位置上造成缺口。图 5-57 表示在 DNA 双螺旋的两个互补区段之间，由这样一个缺口引起的最早的碱基配对作用的一般方式。虽然详细情况还不清楚，但研究了一些有关的蛋白质后，证明在一般重组途径中有这样的步骤。现在就讨论

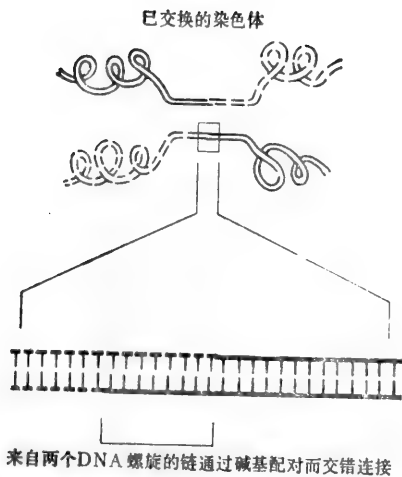


图5-51 两条染色体在发生交换的地方通过交错连接而愈合。这样的连接常长达几千个碱基对。

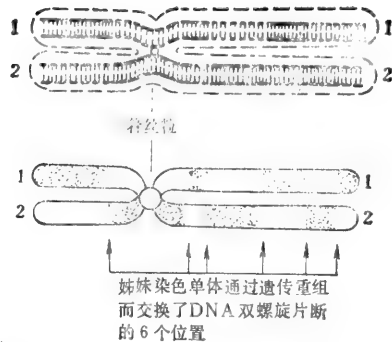


图5-55 姊妹染色单体间交换(光学显微镜下看到的)与DNA双螺旋中交换事件的关系。图示在中期时出现的一个浓缩的真核生物染色体。下面一条表示已染色的;上面是解释它的结构。一般认为,每条染色单体由一个很长的DNA双螺旋所组成(详细讨论见第八章)。染色单体1和染色单体2是姊妹,是在同一细胞中由同一亲体DNA螺旋复制产生的(见第十一章)。最初合成的染色单体1用分开的DNA螺旋表示,染色单体2由边缘为黑粗线的螺旋表示。用一种特殊染色方法标记每个DNA子螺旋中的染色质,可检出所示的交换(见图5-56)。请注意每条染色单体上的深浅色交替的图案。

图5-56 中期染色体中看到的姊妹染色单体交换。左图的染色体来自对照细胞,只有少数染色单体经过交换。右图的染色体来自经过处理以诱发DNA产生缺口的细胞,每条染色单体都经过许多次染色体交换。请注意每条姊妹染色单体上交替染色图案(也请看图5-55)。(Judy Bodycote和Sheldon Wolff赠)

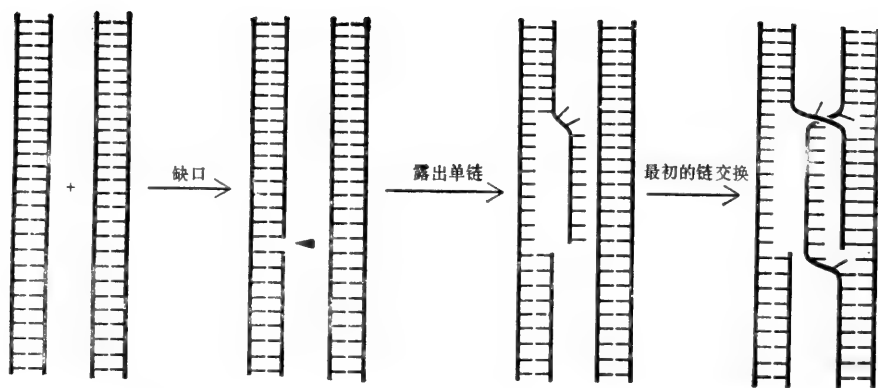


图 5-57 正在经历一般重组的两个同源 DNA 双螺旋之间开始出现链交换的示意图。一条 DNA 链上产生一个缺口,使这条链自由了,然后这条链侵入第二个螺旋中形成一小段配对区。只有核苷酸序列互补的两个 DNA 分子能按这种方式进行碱基配对,从而开始一般重组事件。

这一点。

特殊蛋白质使 DNA 单链同 DNA 双螺旋的同源区配对*

有关遗传重组过程的酶学知识,多半来自对在一般重组途径中有缺陷的大肠杆菌突变型所作的研究。研究这些突变型细菌已鉴别出发生这些事件所必需的特殊蛋白质。一种蛋白质就是大肠杆菌 SSB 蛋白,它是同一种螺旋松解蛋白,对大肠杆菌 DNA 复制也不可少。通过以协同形成簇的方式同细胞中所有 DNA 单链的糖-磷酸骨架紧密结合,这些小蛋白质(19 000 道尔顿)伸展而破坏链的构象,使它们的碱基暴露出来(图 5-58)。处于伸展构象的 DNA 单链很容易同核苷三磷酸形成互补碱基对(DNA 复制时),或与另一条 DNA 单链互补形成互补碱基对,如在重组时发生的。

碱基配对相互作用对一般重组可在试管中模拟来说极为重要,模拟是通过已分离成单链的 DNA 复性来进行的。当两条配对的 DNA 单链上的互补核苷酸序列由于随机碰撞并排靠在一起时就发生 DNA 复性,把在它们之间形成的小段双螺旋集结起来。螺旋集结的步骤相当缓慢,随之是极快的“拉链”步骤,此时双螺旋生长使碱基配对作用达到最大程度(图 5-59)。当大肠杆菌的螺旋松解蛋白(SSB 蛋白)与这些 DNA 链结合并使它们的构象伸展时,就加快螺旋集结的速率,从而在生理条件下可使链重接的总速率增加一千多倍。但这种被催化的配对反应发生在两条 DNA 单链之间,所以不足以说明遗传重组开始时的配对事件,因为这发生在双螺旋之间。已知在大肠杆菌中至少还涉及另一种蛋白质即 Rec A 蛋白。

Rec A 蛋白是以在 1965 年鉴别出在染色体配对中起主要作用的基因命名的,经过生物化学家的长期探索,终于在 1976 年纯化了这个重要而又捉摸不透的基因产物,证明它是 38 000 道尔顿的蛋白质,有几种令人感兴趣的酶活力。象螺旋松解蛋白一样,Rec A 蛋白也牢固地结合在 DNA 单链上,它能帮助一条有缺口的链离开 DNA 双螺旋(如图 5-57 中所要求的那样)。它同时也能同 DNA 双螺旋相结合,使单链同双螺旋结合在一起(图 5-60 A)。Rec A 蛋白还是一种依赖于 DNA 的 ATP 酶,另有一个与 ATP 结合和水解 ATP 的部位。所以它能驱动蛋白质的一系列构象变化,使图 5-60A 中所

示的三链复合物转变为图 5-60B 中所示三链复合物。最后的这个反应是关键的反应，因为它使单链和双螺旋之间发生直接的碱基配对，一般认为重组的一些主要事件就是通过这种作用开始的。虽然这个关键反应的详细情况目前还不清楚，但根据一个模型，Rec A 蛋白利用 ATP 水解释放出的能量帮助一条单链沿着一个双螺旋移动，这有助于寻找碱基配对开始时所需的核苷酸序列同源区。

离体研究证明，大肠杆菌的螺旋松解蛋白 (SSB 蛋白) 与 Rec A 蛋白合作，就容易发生反应。这可能就是大肠杆菌如缺少其中的一种蛋白质时，遗传重组将大大减少的原因。

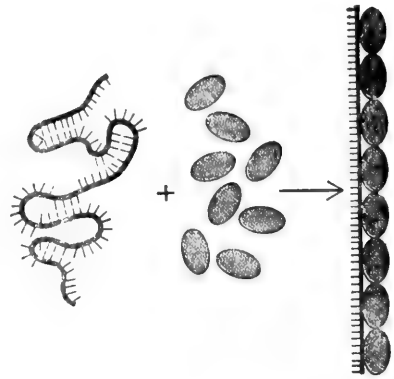


图 5 53 结合螺旋松解蛋白，为 DNA 单链碱基配对相互作用作好准备。蛋白质单体协助它们旁边的单体结合上去，然后在 DNA 链上排成长簇。DNA 复制时起作用的同一种螺旋松解蛋白看来也在遗传重组时发生作用。

遗传重组通常与交叉链的交换有关³⁷

一般认为，遗传重组中缓慢而困难的步骤是在两个双螺旋之间开始建立单链互换(图5-57)。因为在这种最初的交换后，两个相互作用的螺旋中的同源 DNA 序列就靠拢对交了。配对区迅速扩大，两个螺旋之间很快建立起链的进一步交换。在这些事件发生期间切除了有限的几个核苷酸，常发生 DNA 的局部重新合成，这与 DNA 修复中的一些事件很相像。但由于有多种可能性，所以在不同生物中，甚至在同一细胞的不同事件中，在这个阶段以后会出现不同的途径。在大多数途径中，参加重组的 DNA 螺旋都形成一种中间结构——交叉链的互换 (cross-strand exchange)。图 5-61 是形成这种结构的最简单方式。

在交叉链互换时，最初配对的两个同源 DNA 螺旋现在通过四条链中两条的互换而连接一起，这两条互换的链各来自一个螺旋。保持这种结构不需破坏碱基配对，这种结构有几个令人感兴趣而重要的特点：(1) 两个同源 DNA 螺旋之间的交换点——两条链交叉的地方——可以通过分叉移动 (branch migration) 的自发过程沿着螺旋迅速地前后移动 (图 5-62)。这种分叉移动可大大增加来自不同 DNA 螺旋的相互作用链之间的碱基配对区，这可能是已重组的链之间配对区相当长的原因(见图 5-54)。(2) 交叉链互换含有两条交换链和两条非交换链。经过图 5-63 中所示的一系列旋转运动，这种结构可以异构化。异构化改变了两对链的位置，结果原来两条非交换链变成交换链，反之亦然。

为了重新产生两个分开的 DNA 螺旋从而终止配对过程，必须切去两条交叉链。如果在交叉链互换异构化之前切去它们，那末，两个原来的 DNA 螺旋几乎没有改变地相互分离，只有很短一段单链 DNA 发生交换 (图 5-63)。但如在异构化过程中切去两条交叉链，每个原来的 DNA 螺旋中都有一段通过交叉点同另一个螺旋的段连接；换言之，两个 DNA 螺旋都发生交换(图 5-63)。

图 5-64 表明这一过程的实际情况，有丝分裂细胞中的两条姊妹染色单体，或减数分裂细胞中的两条同源的姊妹染色单体之间，都可能发生这种情况 (第十四章)。虽然图 5-64 和 5-63 中所示的关键性的互换异构化会以某种速度自我产生，但它可能也是酶驱动的，或由细胞通过其它方式调节的。有些类型的调节很可能在减数分裂期间起作用，因为

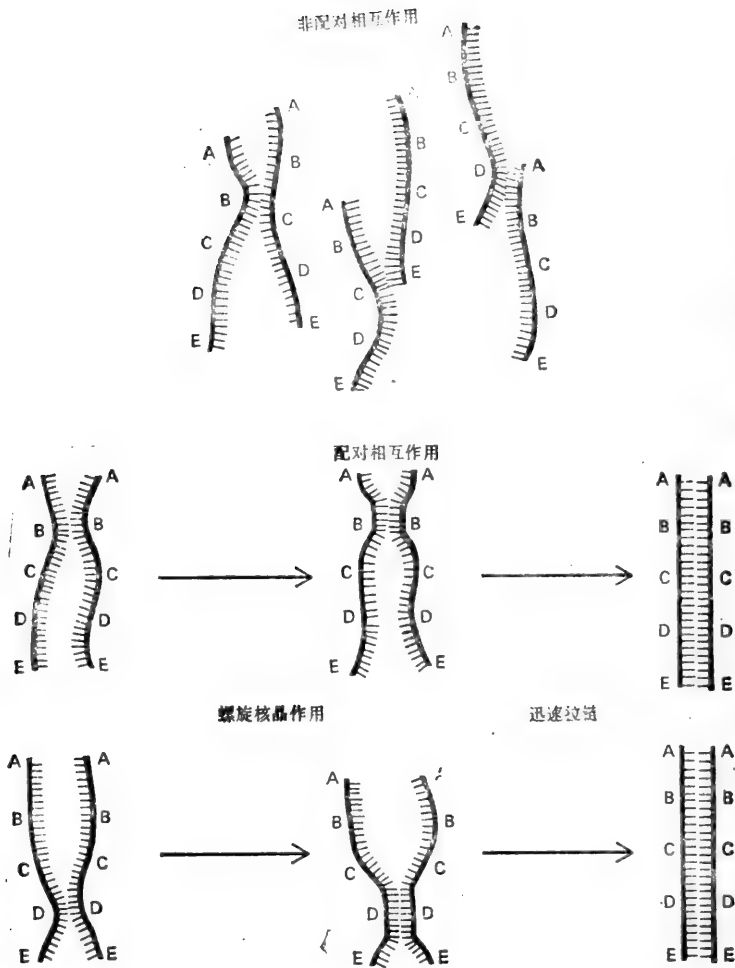


图 5-59 DNA 体外复性时, 由已分开的链重新形成 DNA 双螺旋。螺旋的重新形成有赖于两条互补链的随机碰撞。虽然这种碰撞多半没有结果, 如左图所示; 但少数碰撞会导致形成已有互补碱基对的短区段(螺旋核晶作用)。然后, 迅速形成拉链就完成了每一个螺旋。通过这种尝试和错误的过程, 一条 DNA 链可在几百万条不配对的 DNA 链中找到它的互补链。互补链的尝试和错误的试配识别似乎是所有一般重组事件的开始。

那时配对的两个 DNA 双螺旋必定形成联会丝复合物的精细结构(第十四章)。

一般重组有助于 DNA 修复过程³⁹

有些射线或化学物理在 DNA 螺旋两条链的同一部位上同时引起损伤的机率相当大。此时不可能靠上述任何一种 DNA 修复机制来修复这种损伤。研究细菌得到了充分的证据表明, 虽有靠其他方法不能修复的严重的 DNA 损伤, 在遗传重组事件过程中出现的一些特殊的 DNA 修复过程却可以排除这种损伤。尽管还不知道这种修复途径, 但有一点是清楚的, 即在关键的配对过程中, 遗传信息的四份拷贝 (四条 DNA 链) 是暂时地聚集

在一起(图 5-63)。原则上这有可能在姊妹染色单体之间进行修复,即使一个 DNA 螺旋的两条 DNA 链在同一碱基附近受到损伤。前面讨论过的姊妹染色单体交换(图 5-55 和 5-56)可能起作用,尽管它们发生在体细胞中,而且重新分配的只是相同基因。

专一部位重组酶将特定的 DNA 序列在基因组中搬进搬出³⁹

另一种遗传重组的作用范围比刚才描述的一般重组系统狭窄得多。这里,整个重组过程——包括使两个 DNA 螺旋连在一起的最初的识别步骤——是由一种重组酶指导的,两个重组分子之间不一定有碱基配对(即使在确实发生碱基配对的系统中,形成了只有几个碱基对的交错连接)。因为重组酶识别重组 DNA 分子中一条链或两条链上的特异核苷酸序列,而且就是在这些序列上发生重组的,所以这种重组叫做专一部位重组。

有一个系统能使一种细菌病毒—— λ 噬菌体——在大肠杆菌染色体中跑进跑出,这是所发现的第一个这样的系统。负责这个反应的酶是 λ 整合酶,它由一个病毒基因编码。纯化的酶进行图 5-65 所示的反应。这种整合酶识别两段非同源的 DNA 序列,一段在环状的噬菌体 DNA 双螺旋上,一段在细菌染色体上。进行重组反应时,噬菌体 DNA 双螺旋的两条链暂时断裂,然后与细菌 DNA 双螺旋中同样断裂的链的末端重新愈合。重组酶使细菌和噬菌体染色体上的专一部位紧靠在一起,然后开始所需的 DNA 切割和重新连接等反应。这一过程中的各个步骤进行得如此之快,以致在正常情况下不可能检出推测可能存在的 DNA 过渡形式。

如图 5-66 所示, λ 噬菌体也可以颠倒实现一种专一部位重组机制,它可使噬菌体从其附着位置上下来以便在细菌细胞中迅速增殖。一般认为,发育中的 B 淋巴细胞也出现同样的反应,在这种细胞中通过特定 DNA 序列的缺失,使免疫球蛋白基因重排(第十七章)。有人认为,它还引起沙门氏菌的控制外壳的基因的倒位。

原核生物和真核生物的染色体中都发现一组移动的遗传因子,它们能以类似于 λ 噬菌体的方式在宿主基因组中跑进跑出。其中有些跟 λ 一样也是病毒,能以颗粒形式从一个细胞跑到另一个细胞,这些病毒的 DNA (或者 RNA) 基因组外面有一外壳保护,使它们能从细胞中出来和重新进入细胞。但是,许多能移动的遗传成分并不形成病毒颗粒,不能离开细胞。结果,这些 DNA 序列只能在一个细胞及其子代的染色体上移动,所以它们被称为转位成分。像许多病毒一样,转位成分可借助专一识别其 DNA 的专一位点重组系统而移动,即使当它们整合在宿主基因组中时候也是如此。

虽然对病毒和转位成分插入基因组的方式还未完全了解,但有一点是清楚的,那就是不同的移动成分有不同的机制。不同于 λ 噬菌体识别染色体的专一“附着部位”,许多因子在染色体上的插入位置多少是随机选择的。虽然有些移动成分的整合可能与整合酶有关,这种酶与 λ 噬菌体的酶相似,但从细菌研究已经知道,有些转位成分是通过更复杂的

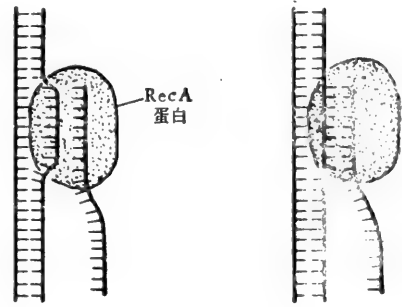


图 5-60 通过 RecA 蛋白在一条 DNA 单链和一个双螺旋之间形成的两种复合体。将 DNA 分子与 RecA 蛋白一起在体外保温时,非碱基配对复合体的形成要先于碱基配对复合体的形成。

专一位置重组过程而移动的。对于这些成分来说，整合事件伴随着转位成分 DNA 序列的复制，使这种 DNA 序列不必离开染色体上原来的位装就可插入染色体上新的位置(图5-67)。

一般认为，整合形成的病毒和转位遗传成分散布在所有细胞的整个基因组中，但这个转位成分的特性只是在细菌、酵母、玉米、以及果蝇中研究得比较清楚。转位成分有多种类型，每一种被未知信号偶然激活而进入其基因组，或从其基因组中出来，这一过程是由各种专一位点酶复合体所催化，但它们的特性目前还了解得很少。因为这种移动本来就是极其难得发生的(例如，对于许多细菌转位成分来说，每 10^5 细胞世代中只有一次)，所以常常难以判断这些 DNA 序列的存在。它们有时被看成是寄生物，在每个细胞中常有多份拷贝。

在典型的情况下，转位遗传成分的 DNA 序列(其长度范围在几百个碱基对到几万个碱基对)两端是相同的核苷酸序列。据推测专一部位重组酶就是通过识别这两端起作用的，从而将这两端之间的 DNA 序列在染色体中移进移出。

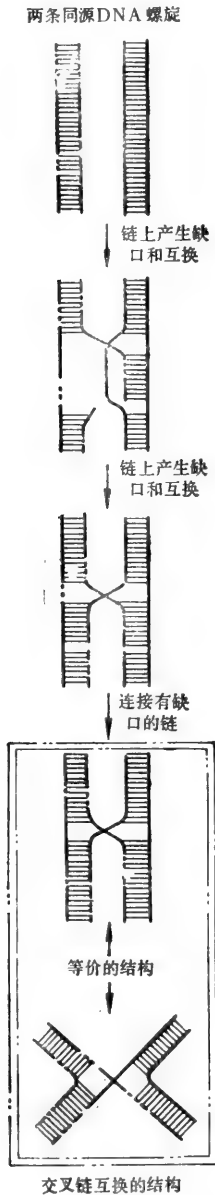


图5-61 交叉链互换的形成。由图 5-27 所示的结构变成交叉链互换可通过许多可能的途径，但图中只画出一条途径。

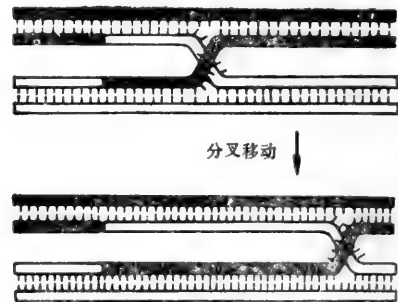


图5-62 在交叉链互换时迅速发生分叉移动，由此增加了来自不同 DNA 双螺旋的链之间的碱基配对数。

除了本身移来移去之外，转位成分偶尔还可使宿主基因组的邻近 DNA 序列移动或者重排。例如，它们经常造成邻近核苷酸序列的缺失，或带着它们一起转移到另一个位置上。所以，由转位成分引起的染色体 DNA 序列的排列比以前所了解的更不稳定，基因组中许多进化上的重要变化，很可能是由它们引起的。

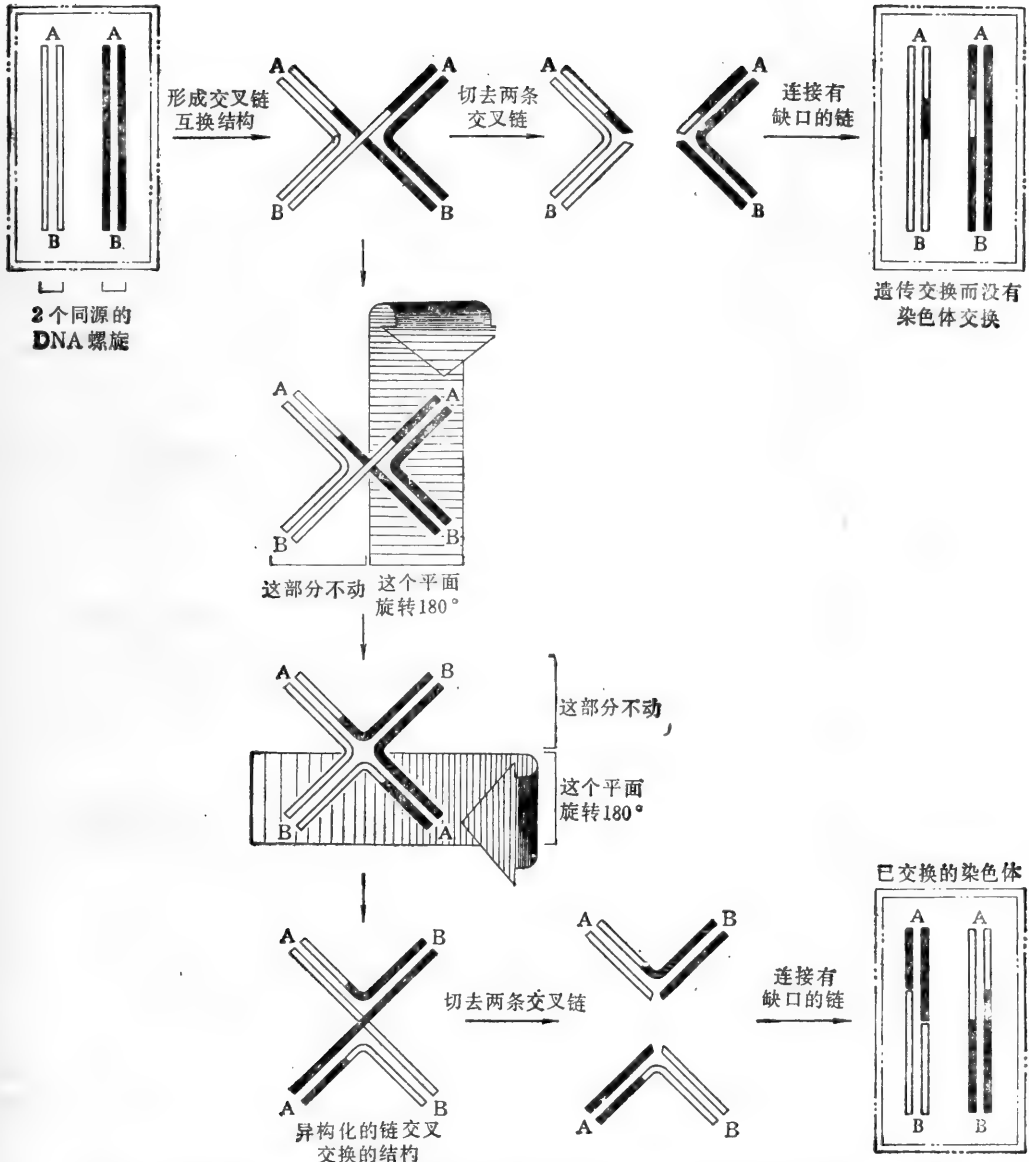


图 5-63 交叉链互换的变构化。如不变构化,切去两条交叉链后就终止互换,这时两条染色体没有交换(图的上方)。发生了变构化,切去两条交换链后形成交换的两条染色体(图的下半部分)。

小结

遗传重组机理使大段大段的DNA 双螺旋能从一条染色体移动到另一条。进化出现的反应途径使两个 DNA 螺旋由于断裂和重新愈合所造成的破坏减到最小程度,这样就很容易恢复为两条完整的染色体。重组事件分为两大类。在一般重组时,开始的一些反应有赖于两个 DNA 双螺旋的将重组的链之间广泛地碱基配对。因此,这些事件只发生在两个同源的 DNA 分子之间;虽然它们涉及染色体之间基因的交换,但在正常情况下,

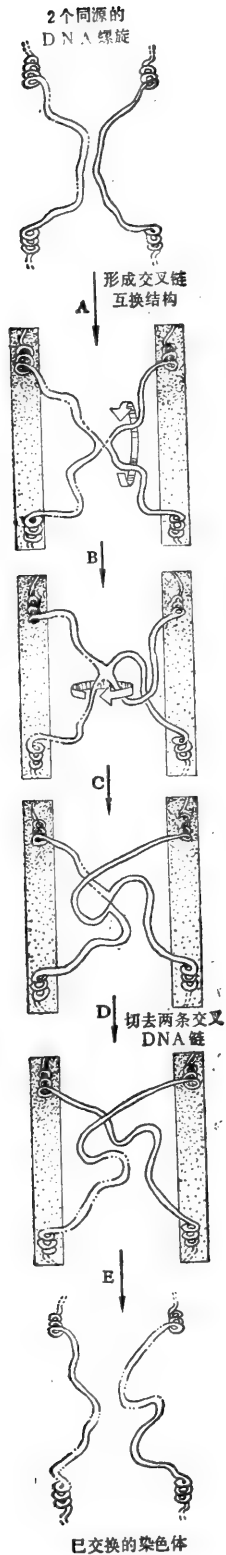


图 5-64 两条同源染色体间发生一次遗传重组事件的图解。发生如图 5-63 所述的交叉链互换的变构化。

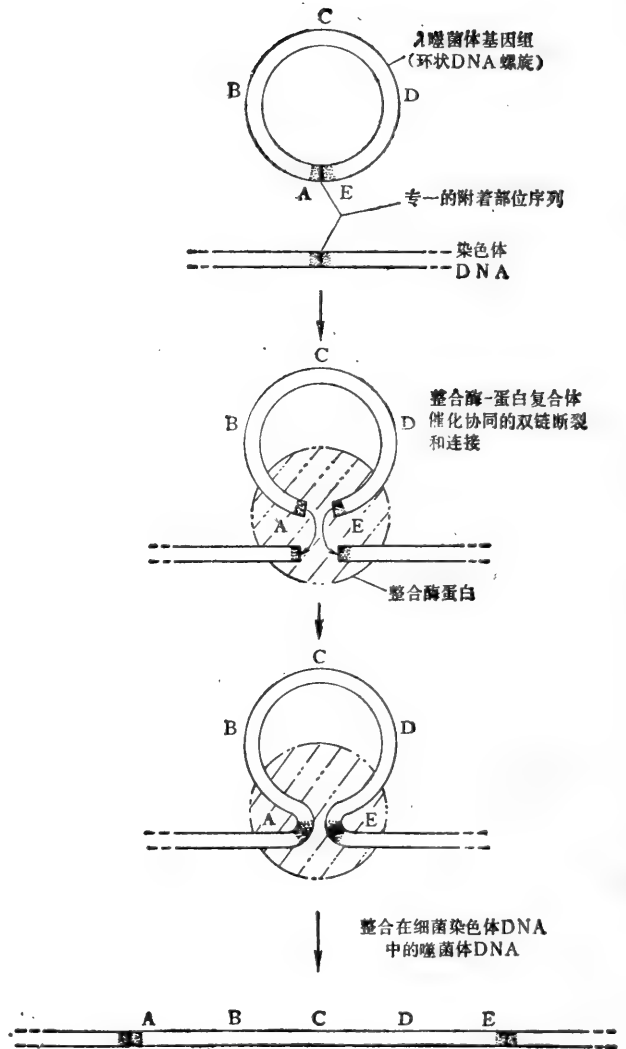


图 5-65 λ噬菌体 DNA 插入大肠杆菌宿主染色体中的专一位点重组事件。图中用细点小方块表示的 DNA 序列是整合酶识别的专一部位。

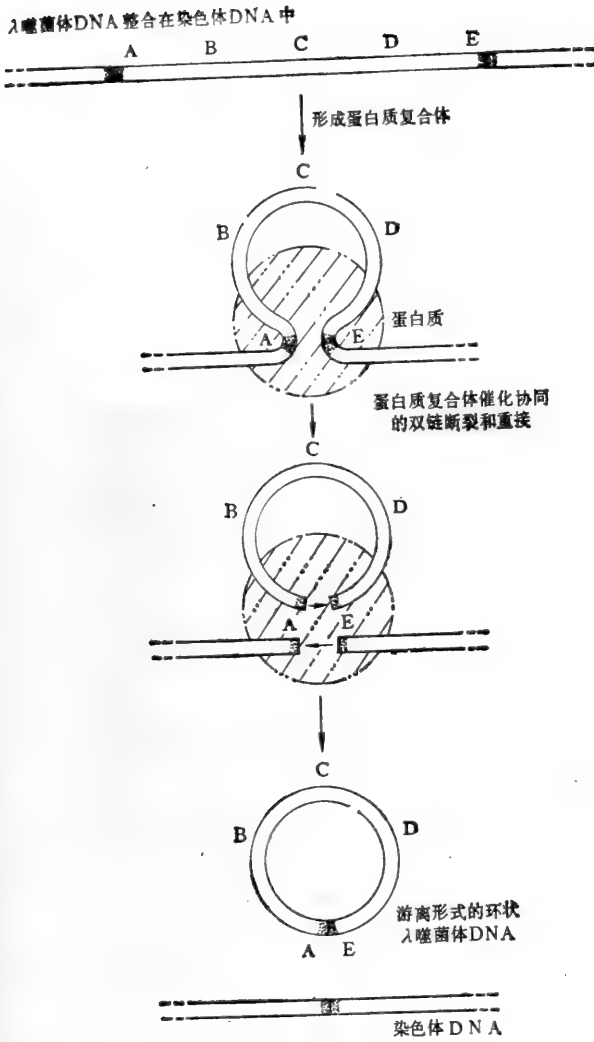


图 5-66 通过图 5-65 中所示的反应的逆反应，λ噬菌体从宿主染色体上下来。这一反应由整合酶和第二种噬菌体蛋白的复合体所催化。第二种蛋白质的活性受到调节，以控制出入染色体(见图 5-50)。

它们并不改变一条染色体中的整个基因序列。相反，在专一部位重组事件中，配对反应是靠识别将重组的两段 DNA 序列来进行的，这种识别由蛋白质介导。因此，这第二类重组事件通常会改变染色体中核苷酸序列的相对排列。

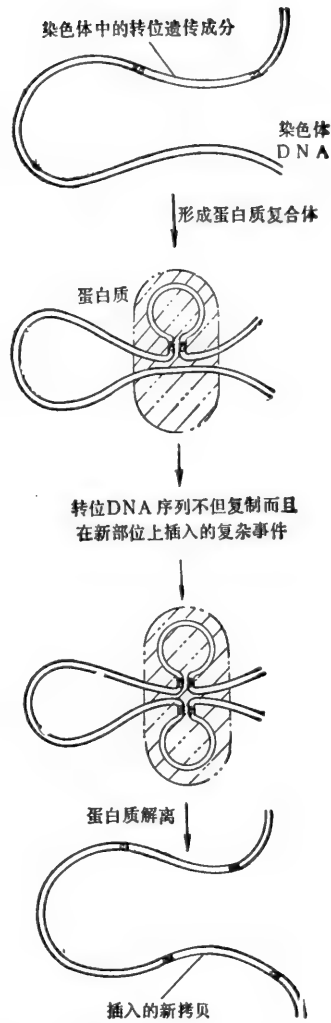
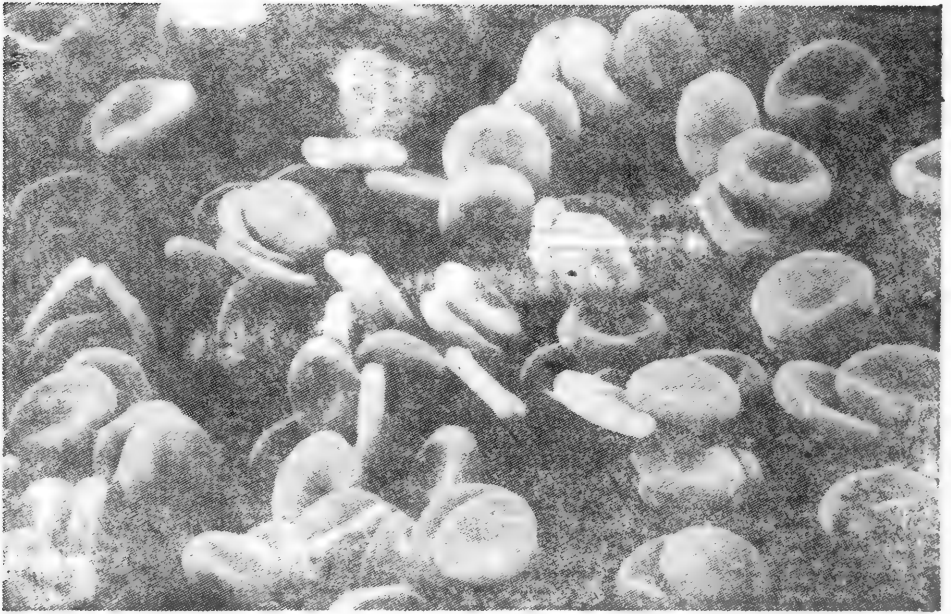


图 5-67 转位遗传成分在一条染色体上移动，就这里所示的这种因子来说，毋需在其原来位置上移位也可以发生移动。用细点小方块表示两段相同的 DNA 序列，它们常位于这些转位成分两端。

[邱信芳译 赵寿元校]



人类红细胞的扫描电镜照片。由于质膜是这种细胞中唯一的一种膜,因此较易研究,对它的结构的认识要比对其他真核细胞膜清楚得多。(Bernadette Chailley 赠)

第六章 质 膜

在原始生命的产生过程中，质膜的形成是关键的一步。因为没有质膜，细胞形式的生命就不能存在。围在每个细胞外的质膜规定了细胞的范围并使细胞内的物质与外界环境之间保持着必要的差别。但质膜不仅仅是一个被动性的屏障，它还是一个有高度选择性的过滤器，维持质膜两侧不同的离子浓度，允许营养物进入细胞和废物离开细胞。

所有生物膜，包括质膜以及真核细胞的各种内膜，都具有一个共同的结构：它们都是由脂质与蛋白质的分子以非共价键的形式联结成的集体。如图 6-1 所示，脂质分子组成连续的脂双层，厚度为 4—5nm。这种脂双层是膜的基本结构，大多数水溶性分子是不易透过这层屏障的。蛋白质分子则“溶解”于脂双层中，执行膜的各种功能：某些蛋白质分子负责转运特定的物质进出细胞；某些则是酶分子，催化各种与膜有关的反应；而另一些则在细胞骨架与细胞外的基质之间起着结构联系作用，或者作为细胞的受体，接受与变换来自细胞环境的化学信号。

所有的细胞膜都是动态的液体结构：大部分脂质与蛋白质分子都能在膜平面上快速移动。此外，膜还是一种非对称的结构：在膜两侧面上的脂质与蛋白质的组成是不一样的，从而反映了膜两侧的功能也是不一样的。

尽管在不同类型的膜中，脂质与蛋白质的成分可以有很大的不同，但是本章所讨论的关于膜结构与功能的基本概念同样适用于质膜和细胞的各种内膜。在讨论了生物膜的主要成分——脂质、蛋白质与碳水化合物——的结构与组成后，我们将讨论细胞转运小分子物质进出膜的机理以及输送大分子物质与大颗粒通过质膜的另外一些完全不同的机理。

脂 双 层¹

生物膜中脂质分子是组成双层的这一点首先由 1925 年完成的一次实验证明。用丙酮提取红细胞膜上的脂质，使之浮于水面。利用一个可移动的栅栏来缩小这些脂质所占有的面积，直至形成一个单分子的薄膜（单层）。这个单层薄膜最后所占有的面积，约为原来红细胞表面面积的一倍。由于红细胞中唯一的膜就是质膜，实验的结论是：此质膜中的脂质分子必定是一个连续排列的脂层。这个结论是对的，但后来得知，它所根据的两个假设都是错误的，但两者恰好相互补偿，结论却变对了。一方面，丙酮并不能提取所有的脂质。另一方面，红细胞的表面积是根据它的干制备物计算的，这个数字远远低于在湿制品中所观察到的实际面积。但从这个实验中所引出的结论却对于细胞生物学产生了深远的影响；远在它被实际证实之前，脂双层已经被大家采纳作为大多数膜结构模型中的一个组成部分了。

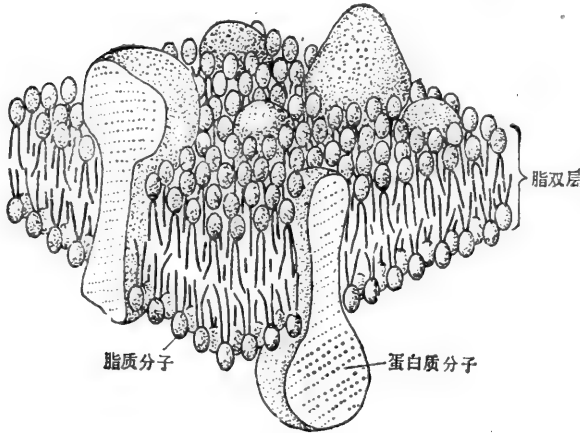
对于高度有序的生物膜的 X 射线衍射研究证实，这些生物膜的大部分脂质分子是以

双层形式排列的。所有的生物膜都是脂双层的证据来自以下的事实：即在冰冻状态下，可用力学的方法使一切生物膜从中间裂开（在两个脂单层之间），此现象可在冰冻断裂电镜检查中观察到。

为什么所有的膜结构都是以脂双层的形式构成的呢？一个理由是：这些脂质分子具有特殊的性能，即使在细胞外，它们也可以自己集聚成双层结构。

膜脂是亲水脂分子，能自动形成脂双层⁴

脂质分子不溶于水，但很容易溶解于有机溶剂中。在大多数动物细胞质膜的组成成分中，脂质约占 50%。一块大小为



1 $\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ 的脂双层，大约有 5×10^6 个脂质分子，或者说一个小的动物细胞的质脂中约含有 10^9 脂质分子。细胞膜的三种主要脂质是磷脂（含量最丰富）、胆固醇和糖脂。它们都是亲水脂分子，换句话说，它们有一个亲水（或极性）的末端和一个疏水（非极性）的末端。举例来说，图 6-2 中所示的一个典型的磷脂分子，它有一个极性的头部和两个疏水的碳氢尾部。尾部的长短不一（通常在 14—24 个碳原子之间）。

图 6-1 部分细胞膜（约 10 nm^2 ）的三维结构示意图

其中一个尾部常常含有一个或多个顺式双键（不饱和）；而另一尾部则不含双键（饱和）。如图 6-2 所示，尾部的双键部位造成一个弯曲。尾部长度以及饱和状态的不同很为重要，因为它们影响到膜的流动性（见下文）。

当亲水脂分子被水环境包围时，它们就集聚起来，掩蔽它们的疏水末端而让亲水的头部与水接触。有两种方法可以做到此点：形成球状的胶团，把尾部包在里面；或者形成双层，把疏水的尾部夹在亲水头部的中间。图 6-3 示这两种可能性。

绝大部分的磷脂与糖脂能在水环境中自动形成双分子层结构。因此，生物膜中的脂质部分的形成是一个自我装配的过程。此外，此种脂双层有自相聚合形成封闭性腔室的倾向，借此可以避免留下游离的边缘，否则疏水末端将与水接触。同理，这种脂双层受到破损时也会自动再度封闭。

脂双层除了有这种能自我装配与自我封闭的特点外，还具备了作为细胞膜理想结构的另外一些特点。其中最重要的一点是它的流动性。我们将会看到，此点对于细胞的许多功能来说是至关重要的。

脂双层是一个二维的流体³

说来奇怪，直到本世纪 70 年代早期，科学家才开始认识到脂质的单个分子能在脂双层中自由扩散。最初的证据来自对人工合成的脂双层的研究。在实验研究中有两种类型脂双层非常有用：（1）一种脂双层形成球状小泡，称为脂质体，其直径从 25nm 到 1 μm

体相同：生物膜的脂质成分是一种双维的流体，其组成的分子能迅速移动，但大都局限于它们所处的单分子层内。

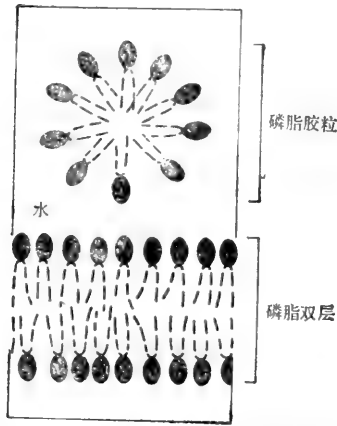


图 6-3 磷脂胶粒与磷脂双层横断面的示意图。在水中磷脂分子能自发地形成此类结构。

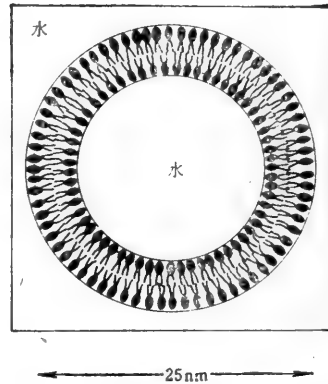


图 6-4 小球状脂质体的横断面。实验研究中常用脂质体作为模型膜材料。

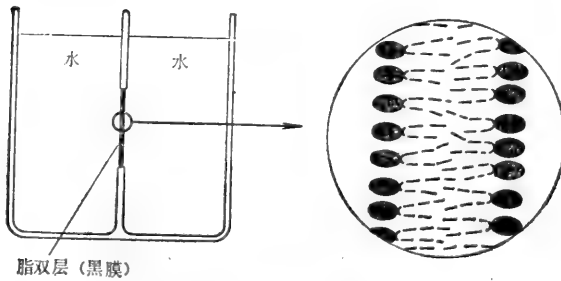


图 6-5 称为黑膜的人工脂双层横切面示意图。它形成于水箱隔板的穿孔上。黑膜可用于测定人工膜的渗透特性。

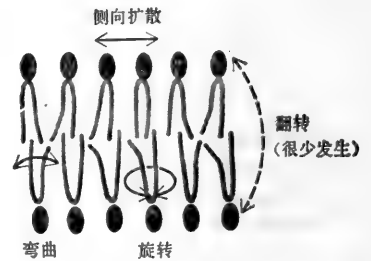


图 6-6 在脂双层中磷脂分子的几种可能的运动类型。

脂双层的流动性取决于它的组成

用单一类型磷脂所构建的人工脂双层可在一个特定的凝固点上由液态转变成刚性的晶体(或凝胶)。此种物态转变称为相变(phase-transition)。而如果磷脂分子的碳氢链较短或者有双键的话,则膜的凝固点也较低(即,难以凝结)。链愈短,则尾端碳氢链愈不易发生相互作用;而顺式-双键在碳氢链上产生弯曲,则使链之间的集聚更为困难(图 6-7)。

人工脂双层可由不同种类的磷脂组成,它们具有不同的饱和度(因而具有不同的相变点),此时可发生相分离现象(phase separation):其中同类型的磷脂分子在到达它们各自共有的凝固点时分别集集成不同的胶团。由于在生物膜中饱和与不饱和的脂肪酸链常存在于同一个脂质分子中(即一条链是饱和的,另一条链是不饱和的),因此它们不能以这种方式分离。

膜流动性的另一个决定因素是胆固醇。真核细胞的质膜含有比较多的胆固醇,其分子数与磷脂分子相比可达到 1:1。胆固醇除了具有调节流动性的作用外,还被认为能提

高脂双层的力学稳定性。在脂双层中胆固醇分子的羟基靠近磷脂分子头部的极性基团，其平板状甾环与磷脂分子内紧靠头部极性基团的那段碳氢链相互作用并使它大致固定，剩下该链的其余部分可以弯曲(图6-8)。在绝大多数真核细胞质膜在所具有的胆固醇含量范围内，它还能防止碳氢链聚合和结晶。这样，胆固醇就可抑制由温度诱发的相变，从而防止了流动性在低温下突然大幅度降低的可能性。

利用一些不能合成胆固醇的动物细胞突变株作实验，也提示了胆固醇在维护膜的力学稳定性方面的重要作用。实验显示，除非在培养基中加入胆固醇，否则这些细胞很快自溶。加入的胆固醇被整合到质膜中，使脂双层趋向稳定，并使细胞得以存活。

质膜具有流动性这一点必然具有重要生物学意义，因为细菌、酵母和其他一些变温生物的温度随外界温度的变化而上下波动，它们就必须不时改变其质膜脂肪酸的成分以维持相对恒定的流动性。究竟哪些主要的膜活动最依赖于脂双层的流动状态，这还有待进一步阐明。但我们已知，当脂

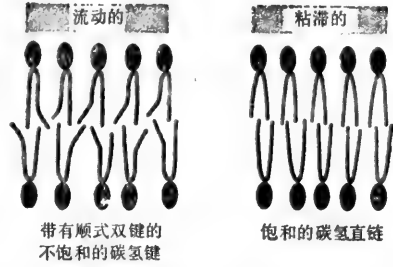


图6-7 不饱和碳氢链中的双键使碳氢链不易集在一起，从而增加磷脂双层的流动性。

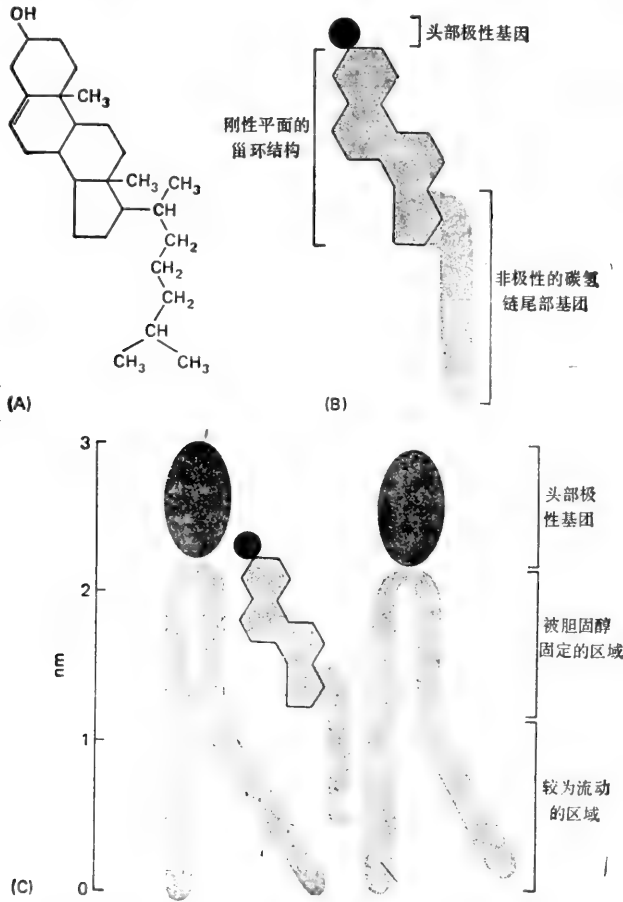


图6-8 (A)胆固醇的结构式,(B)示意图,(C)在单层:内两个磷脂分子间的相互作用。

双层的粘度超过阈值时,某些转运过程会停止,膜上酶的活性会消失。

脂双层是膜蛋白的溶剂⁵

表 6-1 对各种不同生物膜的脂质组成作了比较。真核细胞质膜与细菌质膜不同的是,细菌质膜通常仅由一种主要类型的磷脂所组成,而且不含胆固醇,但绝大部分真核细胞的质膜不仅含有大量的胆固醇,而且还有多种磷脂。举例来说,人红细胞质膜含有四种磷脂——磷脂酰胆碱、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺。图 6-9 表示了这些分子的结构式;注意只有磷脂酰丝氨酸带有净负电荷,而其他三种分子在生理性 pH 时呈电中性。

表 6-1 各种不同细胞膜脂质组成的近似值

脂质	占总脂质的重量百分比					
	肝细胞质膜	红细胞质膜	髓鞘	线粒体内膜与外膜	内质网	大肠杆菌
胆固醇	17	23	22	3	6	0
磷脂酰乙醇胺	7	18	15	35	17	70
磷脂酰丝氨酸	4	7	9	2	5	微量
磷脂酰胆碱	24	17	10	39	40	0
鞘磷脂	19	18	8	0	5	0
糖脂	7	3	28	微量	微量	0
其他	22	13	8	21	27	30

人们可能会问,为什么真核细胞的质膜含有如此多种的磷脂,并且它的头部基团在大小、形状与所带电荷等方面都不同。在寻找这个答案时,可以这样设想:即膜脂是膜蛋白的二维溶剂,正如同在水环境中水是蛋白质的三维溶剂一样。可能某些膜蛋白只能在具有特定的磷脂头部基团时才能发挥其功能,正如同在水溶液中许多酶需要有特定的离子才有活性一样。下列发现与这个观点是一致的:在把功能性的膜蛋白插入到人工的脂双层中的某些实验中,这些蛋白质似乎需要某些特定的磷脂才能充分发挥其功能。

质膜的脂双层是不对称的⁶

在已经作过分析的质膜中,脂双层的两半的脂质成分具有明显差异。在人红细胞中,绝大多数末端为胆碱基团的脂质分子都位于脂双层的外层,而绝大部分末端为氨基酸基团的磷脂都位于内层(图 6-10)。前者要比后者更为饱和,因此头部基团的不对称分布也必然伴有尾部碳氢基团的不对称。此外,带有负电荷的磷脂酰丝氨酸位于内层。其结果是两个单层间有着明显的电荷差。

由于脂质分子在两个单层间翻转的几率很小,所以这种不对称可能是在内质网上合

成脂双层时便形成了,通过酶再把特定脂质分子从一个单层转移到另一个单层(336页),这种脂质不对称必定有其功能。例如,它可能有助于保持膜蛋白在脂双层中的正确方位;我们将看到,所有的膜蛋白与膜的联系也是高度不对称的,这点对于它们的功能发挥是至关重要的。

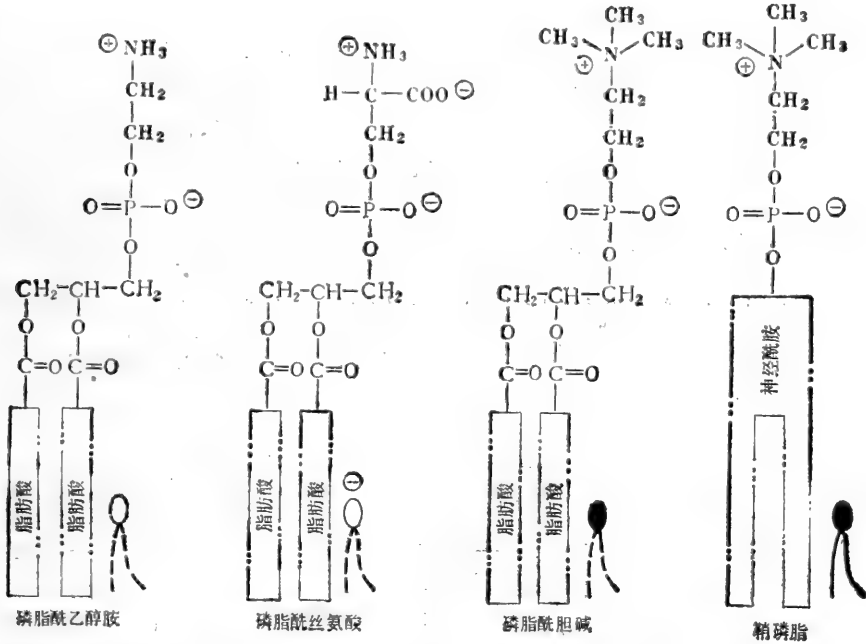


图 6-9 人红细胞膜主要磷脂的结构式和符号。注意:不同的头部基团用不同的符号表示。神经酰胺的结构式见图 6-11。

在动物细胞的质膜上,分布最不对称的脂质分子是糖脂,这是一类含有低聚糖的脂质。这些令人感兴趣的分子仅存在于脂双层的外层,而它们的糖基暴露在细胞表面上

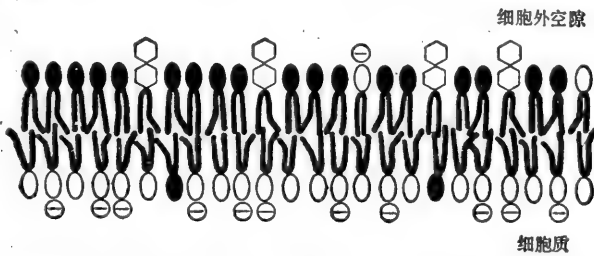


图 6-10 人红细胞脂双层中磷脂与糖脂不对称分布的示意图。磷脂的符号同图 6-9。糖脂的头部基团以六角形符号表示。胆固醇未画出。

(图 6-10)。组成糖脂分子头部的低聚糖是很复杂的;这一点再加上它们在细胞表面上所处的关键位置,提示这些低聚糖可能在细胞间通讯上起一定的作用。不过此作用尚待证实。

糖脂位于所有质膜的表面,但它的功能尚不清楚⁷

所有的动物细胞质膜可能都有糖脂,大约占外部单分子层中脂质分子的 5%。糖脂

的含量因动物种类不同而异,甚至同一动物的各组织中含量亦可不一。在细菌或植物中,几乎所有的糖脂均由甘油衍生而来,而在动物细胞中糖脂几乎全来自鞘氨醇,一种长的氨醇(图 6-11)。动物细胞的糖脂,称为鞘糖脂,其基本结构类似于来自甘油的磷脂,具有一个极性的头部基团和两条疏水的碳氢链(但一条来自鞘氨醇,另一条是脂肪酸链)。但是所有的糖脂分子均有其特点,即头部的极性基团都是由一个或多个糖残基所组成。

不论是真核细胞或原核细胞,质膜中最常见的糖脂都包括中性糖脂,其头部的极性基团由 1—15 种以上的中性糖所组成。某些中性糖仅见于某些哺乳类动物,而且常常仅存在于这些动物的某些组织中。一个突出的例子是半乳糖脑苷脂,这是最简单的糖脂之一,它的头部极性基团只包括一个半乳糖(图 6-11)。半乳糖脑苷脂是髓鞘中的主要糖脂,髓鞘是能使神经绝缘的多层膜。髓鞘实际上也就是包绕在神经纤维外面的多层质膜,是由一种特化的成髓鞘细胞(myelinating cell)形成的(见第十八章)。这些细胞的特点是在其质膜上有大量的半乳糖脑苷脂,几乎占外单分子层的 40%。由于它在其他膜上的量很

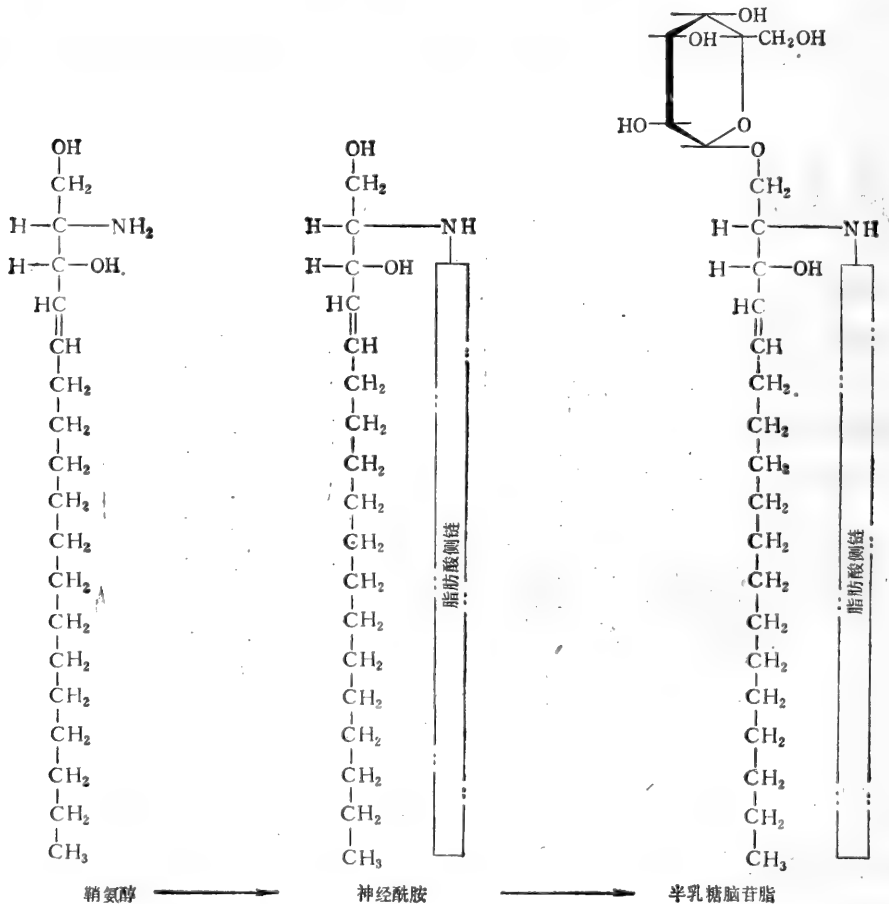


图 6-11 简单的鞘糖脂(半乳糖脑苷脂)的最后合成步骤

少,因此它可能在鞘膜包绕过程中起着重要作用,这个包绕过程是髓鞘形成所特有的步骤。

最复杂的糖脂是神经节苷脂,它含有一个或多个唾液酸残基(亦称 N-乙酰神经氨酸

或 NANA),这些残基使苷脂带净负电荷(图 6-12)。神经节苷脂在神经元的质膜中最为丰富,占总脂质的 6%,不过在大多数细胞类型中都可找到神经节苷脂,只是含量较少。到目前为止,得到鉴定的已有 30 余种不同的神经节苷脂。图 6-13 列举了某些常见的类型,同时也介绍了命名的方法。

关于糖脂的功能可能有哪些,目前只有一些线索。举例来说,神经节苷脂 G_{M1} (图6-13)是一种细胞表面受体,霍乱毒素与之结合可导致严重腹泻;霍乱毒素仅与细胞表面有 G_{M1} 的细胞相结合,包括肠道的上皮细胞。虽然不能说与细菌毒素结合是神经节苷脂的正常功能,但这种现象提示此苷脂可能是接受细胞间正常信号的受体。目前已有愈来愈多的糖脂能用特定的抗体加以鉴别,所以已有可能用这些抗体来查明这些奇妙分子的功能。原则上,人们可将抗体结合到细胞表面上的一种糖脂分子上,再测试特定细胞功能是受抑制还是被促进。

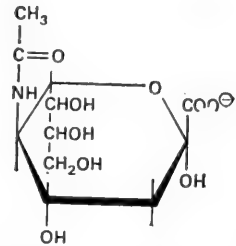


图 6-12 唾液酸(N-乙酰神经氨酸,或 NANA)的结构。

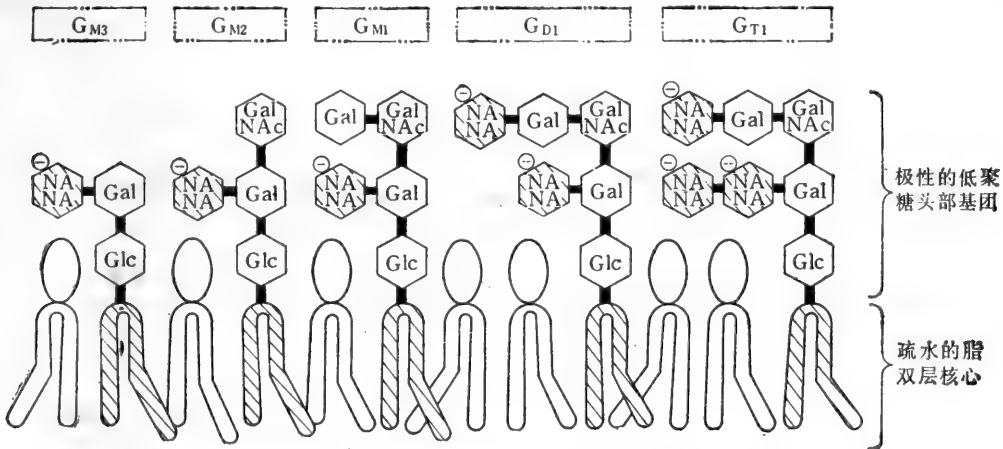


图 6-13 一些有代表性的神经节苷脂及其标准名称。在 G_{M1} 、 G_{M2} 、 G_{M3} 、 G_{D1} 和 G_{T1} 中,字母 M、D 和 T 代表唾液酸残基的数目(分别是 1、2 与 3),而用 5 减去电中性的糖残基数目即可得出字母后面的数字。NANA = N-乙酰神经氨酸(唾液酸); Gal = 半乳糖; Glc = 葡萄糖; GalNAc = N-乙酰氨基半乳糖胺。半乳糖、葡萄糖和 N-乙酰氨基半乳糖胺都是电中性,而唾液酸则携带负电荷(图 6-12)。

小结

所有生物膜都是由连续的脂双层所组成,各种膜蛋白即嵌在其中。脂双层是流动的,脂质分子能在各自的单分子层内迅速地移动。但是脂质分子很少能自发地从一个单分子层翻转到另一单分子层中去。膜脂分子是亲水脂分子,在水中,绝大部分都能自发地形成脂双层。因此,细胞的脂双层能自我装配,如有破损亦能自动闭合。在质膜的脂双层中有三种主要的脂质分子:磷脂、胆固醇与糖脂。内单分子层与外单分子层的脂质成分不同。此外,一个真核细胞中不同的膜各具不同的脂质成分。

膜 蛋 白

虽然生物膜的基本结构是由脂双层所决定的，但它的特定功能却主要是由蛋白质来完成的。因此膜上的蛋白质的类型和数量就反映了膜的功能：在主要对神经纤维起绝缘作用的髓鞘中，膜蛋白成分不足 25%，而在负责转换能量的膜中(例如线粒体和叶绿体的内膜)，大约 75% 是蛋白质；一般的质膜则介于两者之间，大约 50% 是蛋白质。当然，脂质分子与蛋白质分子相比，体积小得多，因此膜上的脂质分子总是远多于蛋白质分子。举例来说，在一个含 50% 蛋白质的膜中，大概每有 1 个蛋白质分子就有 50 个脂质分子。

许多膜蛋白分子是借助与脂质分子间的疏水性相互作用而保持在脂双层中的^a

直到前不久，科学家还错误地认为，膜蛋白在脂双层的两侧表面上各形成一个平展的单层。现在人们知道，许多膜蛋白是直接插入到脂双层内(图 6-14)。与脂质分子一样，这些膜蛋白通常也是中极两性分子：它们的疏水部分与脂双层内部脂质分子的疏水部分相互作用，而亲水部分通常暴露在膜的一侧或两侧(更常见)，与水环境相接触。某些膜蛋白的疏水性可由于与一个或多个脂肪链的共价结合而增强，这些链帮助蛋白质固定在脂双层内。

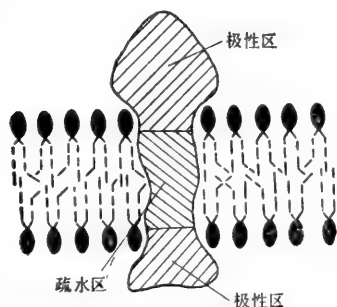


图 6-14 中极两性的膜蛋白的图解。这些膜蛋白分子是借助与脂质分子的烃链间的疏水性相互作用而保持在脂双层中的。

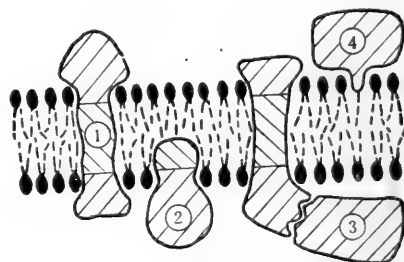


图 6-15 膜蛋白与脂双层连结的四种可能方式的示意图。虽然已知一些蛋白质是穿越脂双层的(1)，而另一些则通过与其他膜蛋白的非共价结合而保持在脂双层上(3)，但始终未能明确证实是否有些膜蛋白其多肽链只部分进入脂双层(2)。最近有证据表明，某些膜蛋白上有一条或多条共价结合的脂肪酸链，这些链能帮助把蛋白质固定在单层上；这些膜蛋白大多的是跨膜蛋白，但少数则可能不是(4)。

由膜上去除蛋白质的难易度相差很大，有些膜蛋白仅用温和的方法(例如用盐溶液提取)就能释出，而另一些则需用去垢剂或有机溶剂破坏了整个脂双层后才能提取。这两种极端的类型通常分别称为外周蛋白及整合蛋白。但是这种根据操作方法所作的分类不能错误地理解为就代表了这些蛋白质与脂双层之间联系的分子结构，这一方面通常我们并不清楚。许多蛋白质穿过脂双层暴露在膜两侧的水环境中，这些蛋白质称为跨膜蛋白。另一些蛋白质则仅在脂双层的一侧与水接触；其中一些借助与跨膜蛋白的非共价联系而固定在膜上，而另一些蛋白质则因其上有共价结合的脂肪酸链，借助这些链而得以固定在一侧单层中(图 6-15)。

因为大部分水分被排除在脂双层之外，所以人们认为膜中的多肽链主要排列成 α 螺旋或 β 折叠的形式。水被排除意味着膜上多肽链的极性基团本来可以与水形成氢键，而现在则趋向于在这些极性基团彼此之间形成氢键。而当多肽链以 α 螺旋或 β 折叠层的形式穿过脂双层时，肽键间形成的氢键最多。同样理由，可能肽链在通过脂双层之后才会改变方向，因为链的弯曲会丧失正常的氢键之间的相互作用。因此，仅仅穿过脂双层一部分的膜蛋白是极少的。

一般说来，要溶解跨膜蛋白(和其他一些与膜紧密结合的蛋白质)，必须使用能破坏疏水作用并瓦解脂双层的试剂才行。对膜生物学家最有用的试剂是去垢剂，这是一些亲水脂分子，具有在水中能形成胶团的发展趋势(图6-16)。当去垢剂和膜混合后，它的疏水端就和膜蛋白外膜面的疏水区结合，从而取代了脂质分子。由于去垢剂的另一端是极性的，这样，就会

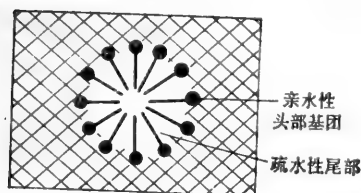


图6-16 水中去垢剂胶粒的横断面。我们说去垢剂是亲水脂性的，是因为它具有极性端和非极性端两者。

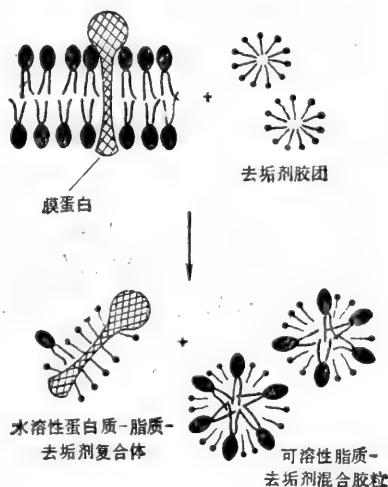


图6-17 用去垢剂溶解膜蛋白。去垢剂破坏脂双层，把蛋白质溶于溶液中，形成蛋白质-脂质-去垢剂复合体。膜上的磷脂也被去垢剂溶解。

把膜蛋白以去垢剂-蛋白复合物的形式带到溶液中(虽然一些结合牢固的脂质分子仍然结合在膜蛋白上；见图6-17)。去垢剂的极性端可以是带电的(离子)，如十二烷基硫酸钠(SDS)；也可以是不带电的，如“去利通”(triton)去垢剂。这两种用得最多的去垢剂的结构见图6-18。

当除去去垢剂后，原来溶解的膜蛋白在水溶液中又变得极难溶了，从而形成含有多种物质的混合物从溶液中析出(图6-19)。因此，膜蛋白要比水溶性蛋白难提纯，难以研究。还有一个麻烦：强去垢剂(特别是离子型的)往往与膜蛋白天然结构内部的“疏水核心”结合，从而将膜蛋白展开(见图3-18)；这样溶解下来的蛋白质由于丧失了正常的三维结构，因而也没有活性，无法用于功能性的研究。已展开了的蛋白质称为变性蛋白。然而，在最有利的情况下，可以用低浓度的温和去垢剂保持膜蛋白的可溶性，并在活性状态(即或不是完全正常的状态)下加以研究。

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳给膜蛋白的研究带来了革命

去垢剂溶解技术用于研究各种膜的主要蛋白质已取得巨大成果。此法的一般过程

是：首先，把膜放在1%的强去垢剂 SDS 溶液(它可以破坏所有蛋白质-蛋白质、蛋白质-脂质的非共价结合，并使蛋白质完全展开)中加热到 100°C，再把它铺在含 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶的上面，最后在强电场中电泳几小时。由于离子型 SDS 结合在蛋白质上的量大约和多肽链的量相等，因而，去垢剂的负电荷大大超过了蛋白质本身的电荷。这样，蛋白质分子在电场中的迁移率就主要由它的分子量决定：分子量越大，受到凝胶上聚丙烯酰胺分子的复杂网络的阻滞作用也越大，从而移动也越慢。当用能与蛋白质结合的染料(如考马斯蓝)染色后，在凝胶上就可以看出主要的膜蛋白分别形成的带(见图 4-37)。

最近，双向凝胶电泳技术也用于膜蛋白的研究；到目前为止，用这种技术已从一种质膜中区分出 50 多种膜蛋白。由于微量的蛋白质是很难检测的，所以毫无疑问，在一个典型的质膜上必然还会存在许多其他蛋白质。

用红细胞空壳可以研究膜蛋白的胞质面

比起其他任何真核细胞膜来，我们对人类红细胞质膜了解得最多。这有许多原因：(1)可以取得大量的红细胞(如从血库中)，比较不易夹杂其他类型细胞；(2)因为质膜是红细胞唯一的膜，因而分离时也不会夹杂细胞内膜，而这个问题是制备其他类型细胞质膜的一个严重问题；(3)制备红细胞膜，或称“空壳”很容易，只要把红细胞置于低渗溶液中

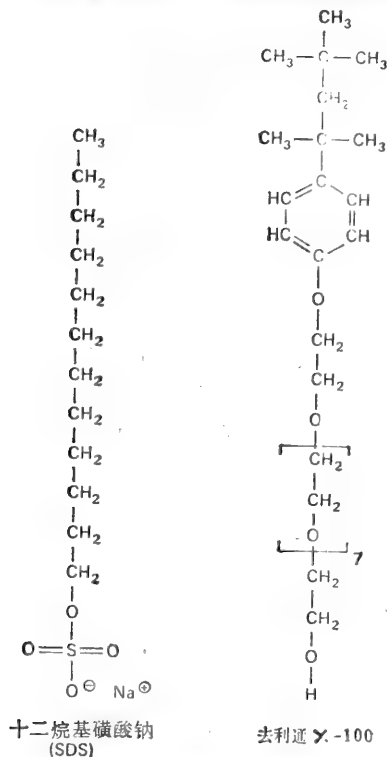


图 6-18 常用的两种去垢剂的结构：十二烷基磺酸钠(SDS)是阴离子型去垢剂；“去利通”X-100是非离子型去垢剂。

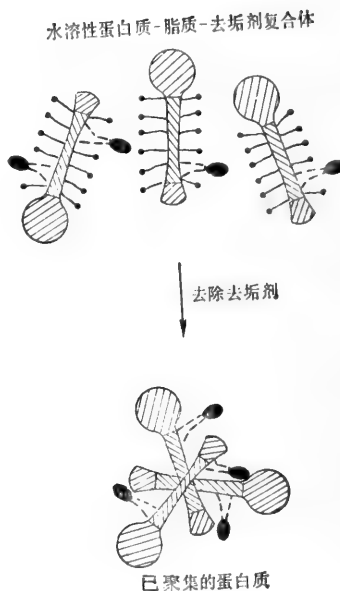


图 6-19 当从去垢剂溶解的膜蛋白中去除去垢剂后，相对裸露的蛋白质分子(上面只结合有少数脂质分子)趋向于聚集在一起以埋藏它们的疏水区，从而形成较大的团粒由溶液中析出。

就可以了。因为溶液的盐浓度比细胞内低,水就渗入细胞,使细胞肿胀、破裂(裂解),从而释出血红蛋白(这是唯一的一种主要的非膜蛋白);(4)我们既可以研究破损的空壳(在此情况下,试剂可以和膜的内外两个表面作用),也可以待其重新闭合,这时,试剂只能和膜的外表面起作用。此外,用红细胞空壳还可制成内侧面外翻的小泡(图6-21),因而,可以分别研究细胞膜的外侧面和内侧面(胞质面)。正是应用这种闭合的和未闭合的血影细胞才第一次证实了某些膜蛋白完全贯穿脂双分子层,以及证实了脂双分子层是不对称的。

膜蛋白位于哪一侧,可以用两种方法测定。其一是用不能穿过膜的共价标记试剂(例如,放射性或荧光标记的试剂),它只能和暴露面的特定基团共价结合(见后)。然后把膜溶解,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离膜蛋白,再借放射自显影术探测放射性或者在紫外线照射下观察荧光均可寻找到标记的蛋白质。运用这样的向量标记法,可以确定某一特定的蛋白质(在凝胶上是一条带)在膜上的方位。如果一个膜蛋白同时在外侧面(如标记完整细胞或闭合的血影细胞)和内侧面(细胞质)面(如标记内面外翻小泡)上得到标记,那就必定是一个跨膜蛋白。另一种方法是用不能透过膜的蛋白分解酶与膜蛋白的内侧面与外侧面相接触:如果一个膜蛋白在两个侧面均有一部分被消化,那么它必定是一个跨膜蛋白。

用单向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析人红细胞质膜大致可分出15条主要的区带,分子量在15 000到250 000之间。其中三种蛋白质——血影蛋白、血型糖蛋白和带 III 蛋白(band III)——占膜蛋白总量的60%(以重量计)以上(图6-22)。这三种蛋白质在膜中的排列方法是各不相同的。因而,我们可以以它们为例来说明目前已知的膜蛋白和膜联系的三种基本方式。

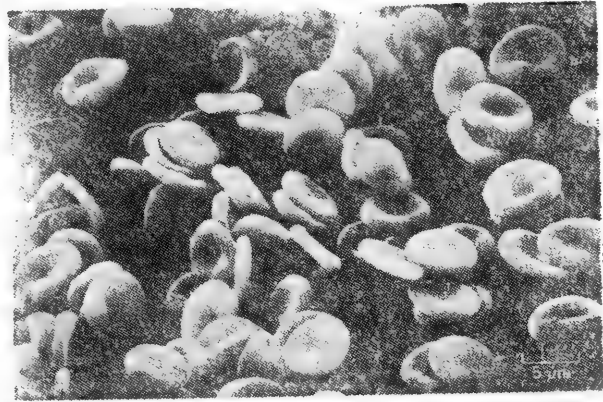


图6-20 人红细胞的扫描电镜照片。它呈双凹圆盘状,无核。(Bernadette Chailley 赠)

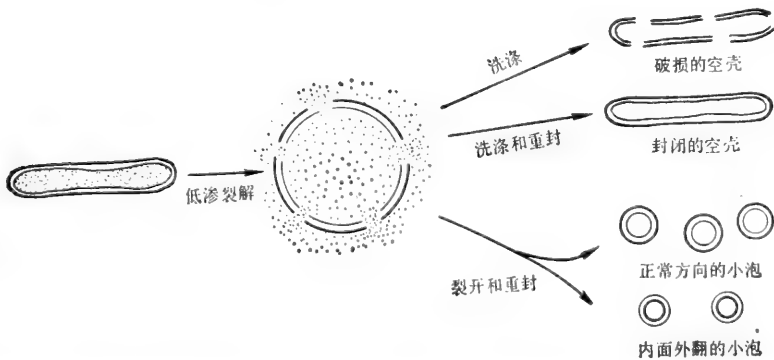


图6-21 红细胞膜材料的制备过程: 闭合的与未闭合的血影细胞、正常方向的小泡和内面外翻小泡。小泡膜的方向由裂解过程中的离子条件所决定。

血影蛋白疏松地结合在红细胞膜的胞质面¹⁰

人类红细胞质膜上的大多数蛋白质分子仅仅暴露在内表面(胞质面)上与水环境接触,这其中大部分在离子浓度很低的溶液中就可以从膜上解脱出来。其中含量最多的就是血影蛋白,它是一种长纤维状的分子,约占膜蛋白总量的30%,每个细胞约有 3×10^5 个分子(图6-23)。血影蛋白由两条非常大的肽链(分别为220 000和240 000道尔顿)组成,在膜的胞质面排成网格状(图6-24)。有证据表明肌动蛋白以及至少还有另一种蛋白质也参与网格的形成。人们认为网格有助于维持红细胞的双凹圆盘形状,而当红细胞通过狭窄的毛细血管时又允许其变形。血影蛋白通过一种被称为锚蛋白的蛋白间接地与带III蛋白分子胞质端相互作用(见下),这便大大限制了带III蛋白在膜平面的扩散。

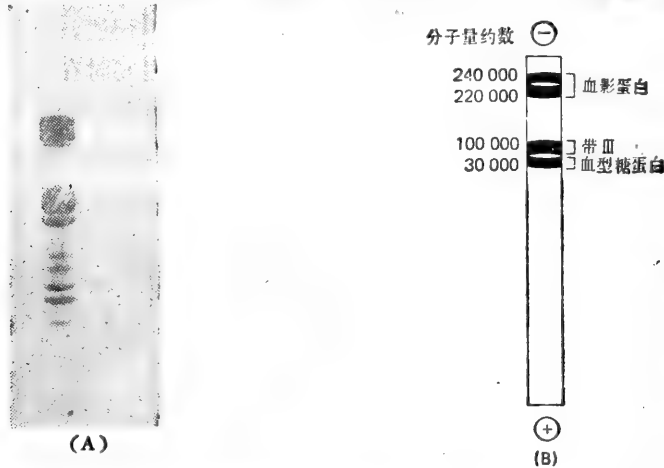


图6-22 (A)图表示 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示的人红细胞膜蛋白的类型(考马斯蓝染色);(B)图表示凝胶上三条主要膜蛋白带的位置。凝胶上的其他带,含量较低的蛋白质,在此图中已略去。血型糖蛋白上大量的糖基减慢了它的迁移速度,因而和分子量大的带III蛋白分子跑得一样慢。(Vincent Marchesi 赠)

由于以上原因,血影蛋白可以看作是红细胞细胞骨架的一个组分,而不是细胞质膜的组分。目前对血影蛋白的兴趣主要在于,希望从血影蛋白中能了解有核细胞的其他纤维状蛋白是怎样与质膜相互作用的(虽然血影蛋白本身似乎只见于红细胞,但在其他细胞中最近也发现了类似的蛋白质)。我们以后还将看到,细胞内的纤维状蛋白似乎能控制有核细胞的某些质膜蛋白的分布和移动。

血型糖蛋白以单根 α 螺旋的形式穿过红细胞的脂双层¹¹

血型糖蛋白是暴露在人类红细胞膜外侧的两种主要蛋白质之一。它是第一个完全确定了氨基酸顺序的膜蛋白,也是真核细胞质膜蛋白中了解得最多的蛋白质。血型糖蛋白是跨膜的糖蛋白,有131个氨基酸,大部分在膜的外侧,这也是它亲水氨基端所在的部位。在蛋白质的这个部位结合了所有的碳水化合物——约100个糖残基分别位于16个低聚糖侧链上——这部分约占分子总量的60%。实际上,全部细胞表面碳水化合物中的绝大部分(包括90%以上的唾液酸,因此也就包括细胞表面上的大部分负电荷)都在血型糖蛋白上。血型糖蛋白的亲水羧基端与胞质接触,而约20个氨基酸残基那么长的一段疏水片段则以 α 螺旋的形式穿过非极性的脂双分子层(图6-25)。

和血影蛋白一样，血型糖蛋白也只见于红细胞中。尽管每个红细胞有 6×10^5 个以上的血型糖蛋白分子，但它们的功​​能还是不清楚的。事实上，某些人，其红细胞膜上缺乏这种蛋白质，但表现却完全健康。

人类红细胞膜的带 III 蛋白是一种转运蛋白¹¹

与血型糖蛋白不同，带 III 蛋白在血细胞的专职功能方面起着重要的作用。之所以把这种蛋白质称为带 III 是根据 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后它与其他膜蛋白所处的相对位置。像血型糖蛋白一样，带 III 也是跨膜蛋白，但它穿过膜时折叠程度更高或者呈球形的构象，而它的多肽链可能来回穿过脂双分子层多次（图 6-26）。它的分子量约为 100 000（大约 800 个氨基酸），它含有的少量碳水化合物暴露于外表面。这个蛋白质好像是二聚体，每个细胞约含 5×10^5 个二聚体。

红细胞的主要功能是把 O_2 从肺带到各组织，又把组织中的 CO_2 带回到肺。有足够的证据表明，带 III 有助于这种交换作用。当红细胞通过肺部时，通过 HCO_3^- 与 Cl^- 的交换，排出 CO_2 。此种离子交换的发生需要通过膜上的一个特殊的阴离子通道。用特异

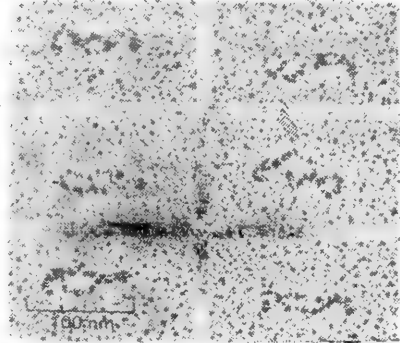


图 6-23 铂投影的血影蛋白分子电镜照片。每个分子由两条末端相连的多肽链组成。（D. M. Shotton 赠引自 D. M. Shotton, B. E. Burke, and D. Branton, *J. Mol. Biol.* **131**:303--329, 1979. Copyright by Academic Press Inc. [London] Ltd.）

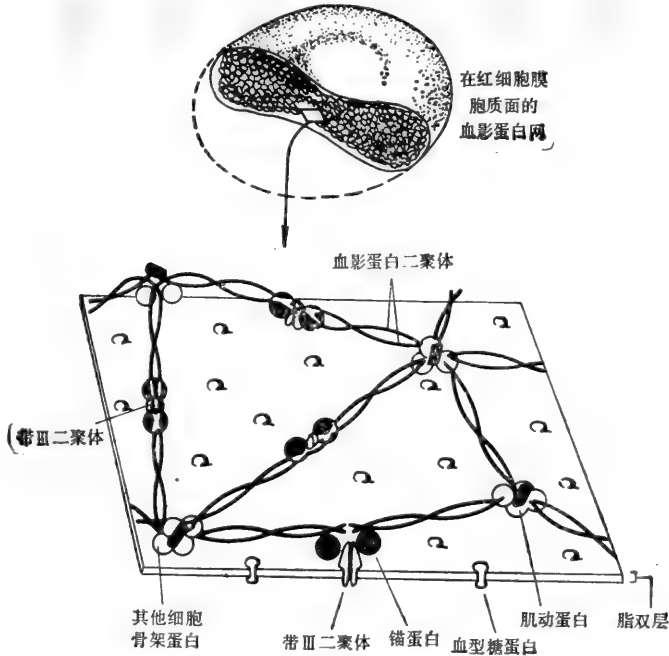


图 6-24 血影蛋白分子在人类红细胞膜内表面(胞质面)的可能排列格局。两条血影蛋白多肽链平行排列成线状，互相缠绕形成易弯曲的二聚体(见图 6-23)。血影蛋白二聚体的头部互相连接形成四聚体，并通过短的肌动蛋白纤维及其他蛋白质联在一起，在膜的胞质面形成网络。血影蛋白分子还通过另一种称为锚蛋白的间接地和带 III 蛋白相互作用。

性抑制剂结合通道蛋白可以阻断这个通道。通过修饰抑制剂使被结合的蛋白带上放射性，已能断定红细胞膜阴离子通道蛋白即为带 III 蛋白。

一般说来，不难理解像带 III 那样大部分埋在脂双层中的跨膜蛋白是怎样介导极性分子被动地通过非极性脂双层的。例如，带 III（或其二聚体）可以形成一个其大小和电

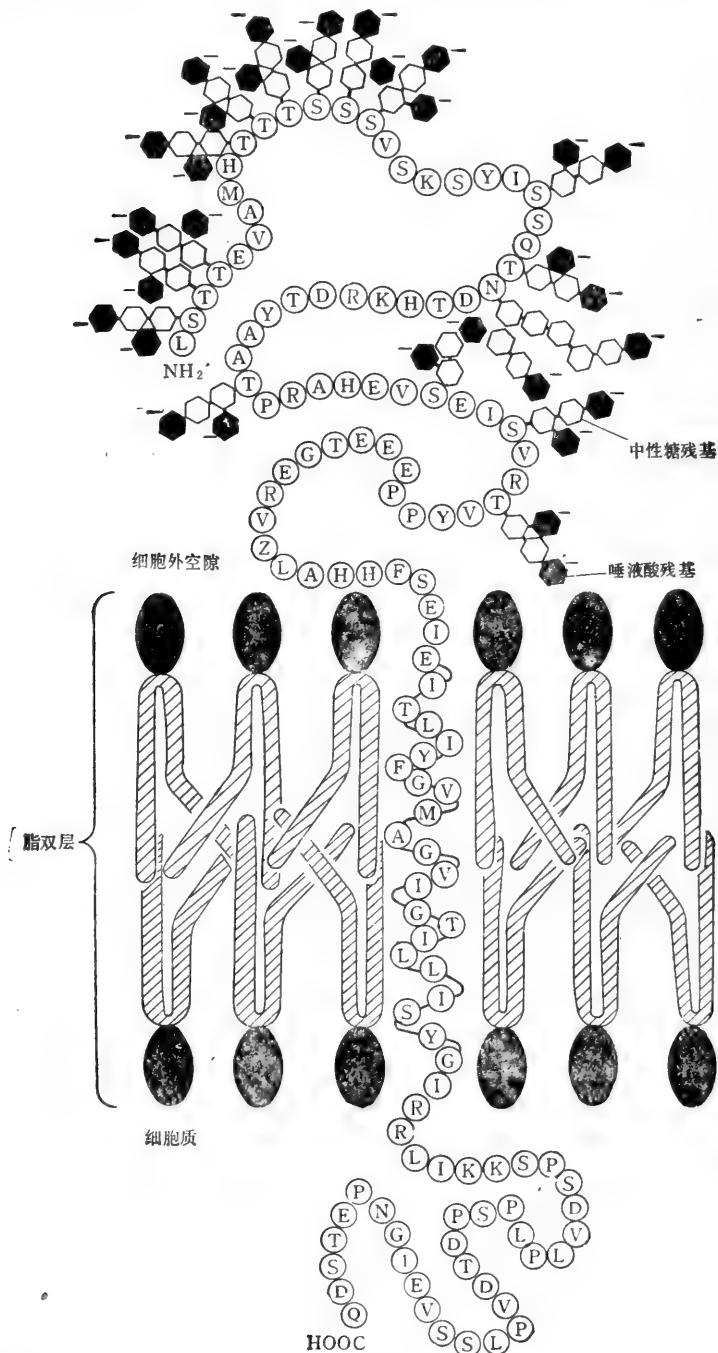


图 6-25 人类红细胞膜上的血型糖蛋白的示意图。单个字母表示氨基酸残基的种类，全称 详见 58—59 页。

荷都合适的亲水性通道让 HCO_3^- 和 Cl^- 沿各自的浓度梯度通过脂双层。但是，对于血型糖蛋白这样单纯以 α 螺旋的形式贯穿膜的分子，就无法想像它靠本身性质能介导这种形式的转运。因此，有足够的理由认为，就其与脂双层的联系方式来说，直接参与主动或被动运输极性分子穿过膜的蛋白质更像带 III 而不像血型糖蛋白。当然要搞清这些蛋白质到底是怎样工作，需要了解它们在脂双层中的确切三维结构。可是到目前为止还不知道带 III 蛋白的三维结构。唯一已被了解这些细节的膜转运蛋白是一种叫细菌视紫红质的蛋白质，它存在于某些细菌的质膜上，是一种受光激活的质子 (H^+) 泵。由于它可能与高等生物的膜转运蛋白有关，这里我们暂时离开原题，来简单地讨论一下这个细菌膜蛋白的结构和功能。

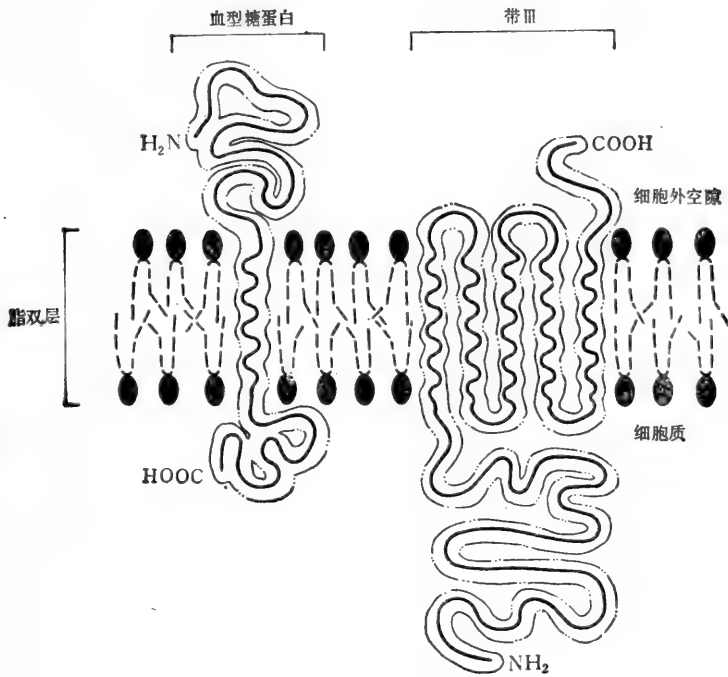


图 6-26 带 III 蛋白在人类红细胞膜上的可能排列方式；图中画出血型糖蛋白作为对照。虽然还未确切地了解带 III 蛋白在膜中是怎样排列的，但有证据表明，它几次穿过脂双层。注意：血型糖蛋白的氨基端在细胞外侧，而带 III 蛋白的氨基端被认为是在细胞内。

细菌视紫红质是一个质子泵；它在穿越脂双层时反复盘成 7 条 α 螺旋¹³

盐生盐杆菌 (*Halobacterium halobium*) 细菌的“紫膜”是细菌质膜中一种特化的斑片 (图 6-27)。它只含有一种蛋白质分子，即细菌视紫红质，由 248 个氨基酸所组成。每个分子含有一个能吸收光的辅基即发色团 (称为视黄醛)，后者与脊椎动物视网膜杆细胞的视紫红质中的发色团相同 (见第十八章)。视黄醛与蛋白质的赖氨酸侧链共价连接；当受到一个光子激活时，激发态的发色团引起蛋白质构象的变化，其结果是导致两个 H^+ 从细胞内转移到细胞外。这种转移建立了跨越质膜的 H^+ 和电压梯度，这个梯度又带动 ATP 的产生。

由于视紫红质分子排列成平面晶格(很像一个二维的晶体),因而能利用低强度电子显微镜及复杂的小角度电子衍射分析的技术重建其三维结构并确定它在膜上的取向,分辨率达到 0.7nm。后一种方法类似于用 X 射线衍射法分析可溶性蛋白的三维晶体 [虽然曾用 X 射线衍射的方法研究过一种病毒的膜糖蛋白(见图 7-30),但至目前为止还未曾制备出一个合适的细胞膜蛋白的三维晶体]。正如图 6-28 所示,每个细菌视紫红质分子



图 6 27 盐生盐杆菌的示意图。示斑状紫膜,其中含有细菌视紫红质分子。

折叠成 7 条紧靠在一起的 α 螺旋(每个 α 螺旋含有约 30 个氨基酸),并以与膜几乎垂直的角度穿越脂双层。由于最近的研究提示这些 α 螺旋之间并未形成一个大的水通道,所以很可能质子是沿着由 α 螺旋的侧链所建立的接力系统传递过去的,不过有关在分子水平上的细节仍不清楚。因为只有质子(以及电子)能够以这种方式通过,细菌视紫红质不大可能为其他离子的跨膜运输提供一个普遍性的模型。

输提供一个普遍性的模型。

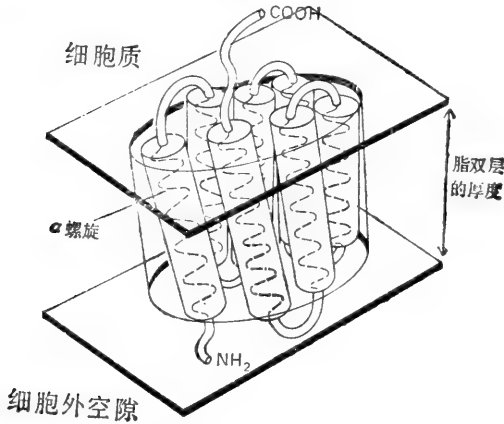


图 6 23 细菌视紫红质分子的结构及其与脂双层的关系。多肽链穿过脂双层时盘旋成 7 个 α 螺旋。

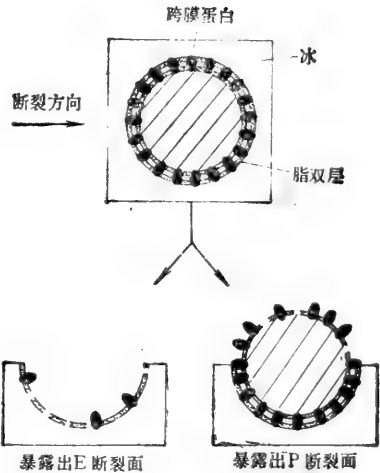


图 6 29 冰冻断裂电子显微镜技术提供了脂双层胞质面(称为 P 面)的内部疏水区和外侧面(称为 E 面)疏水区的图像。经过图示的断裂过程后,用铂和碳投影暴露的断裂面,并消化除去有机物,这样得到的铂复制物再用电镜观察。

用冰冻断裂电子显微镜技术能观察膜转运蛋白"

冰冻断裂电子显微镜技术是唯一可用来观察膜内疏水区的方法。该法的程序是先将细胞用液氮(-196°C)冻成冰块,再使之断裂。断裂平面往往通过一切生物膜脂双层结构的中间疏水区,将双层结构分裂成两个单层。然后用铂和碳投影暴露的断裂面,消化除掉有机物质,这样得到的铂复制物便可用电镜观察。如图 6-29 所示,用这种技术可暴露和复制两个不同的断裂面:一面代表脂双层靠细胞质(或原生质)半边的内部疏水区(称为 p 面),另一面则代表脂双层靠外半边的内部疏水区(称为 E 面)。

用这种方法制备的人类红细胞膜在它的 P 和 E 两个断面上都散布着小的突起,称为膜内颗粒。颗粒的大小比较均匀(直径为 7.5nm),随机分布,P 面上的颗粒比 E 面上更为

密集(图 6-30)。由于在无蛋白质的人工脂双层里一般说来没有膜内颗粒,当它们断裂时,表面显得很平滑,因此生物膜中的这些颗粒可能主要是由蛋白质所组成的。在冰冻断裂电子显微镜检术中如果多肽能作为颗粒而显现的话,那末多肽本身、或者作为一个较大的团粒体的一部分都必须横穿质膜,而且它在双层膜内的体积还必须大得足以“形成投影”。虽然还不确切知道人类红细胞膜中的膜内颗粒是由哪些蛋白质组成的,但它们的主要成分可能是带 III 蛋白,因为带 III 二聚体的数量(大约每个细胞 500 000 个)和所观察到的颗粒的数量很相近。而且在用纯化的带 III 蛋白分子人工重建脂双层再进行冰冻断裂时,可以观察到典型的直径为 7.5nm 的膜内颗粒。



图 6-30 人类红细胞的冰冻断裂电镜照片。值得注意的是,在原生质(P)面上的膜内颗粒的密度比外侧(E)面上的要高。(L. Engstrom 和 D. Branton 赠)

在冰冻断裂时,跨膜蛋白会发生什么变化呢?当脂双层被分裂成两个单层时,这种蛋白质的或是靠里侧的一半或是靠外侧的一半必须从与之相连的冰冻单层中拉出来。另一种可能是多肽链(如果共价键断裂的话)会在它穿过双层的地点断裂(在这种情况下,这种蛋白质不会显现为膜内颗粒)。既然带 III 蛋白分子显现为膜内颗粒,因此它们在冰冻断裂时似乎并未断裂。估计它们仍然是完整的,因为它们的大部分是位于脂双层的内部。此外,带 III 蛋白分子由靠细胞质那侧的表面伸展出来的多肽链要比从脂双层外表面延伸出来的要多得多,因此在冰冻断裂时它们被保留在冰冻双层里面半边的机会比起留在外面半边的机会要多,这就可以解释为什么膜内颗粒在红细胞膜的里层(p 层)密度较高的原因。另一方面,像血型糖蛋白那样的蛋白,在冰冻断裂过程中或者被折断或者它的小羧基端尾部从冰冻的里层被拉出来。在这两种情况下,可能在量上都不足以被显现出来成为膜内颗粒(图 6-31)。

最近已能用一些业已分离出的转运蛋白(包括带 III),在合成的双层膜中,重建有功能的膜运输系统。迄今为止,各种被研究过的转运蛋白都能在冰冻断裂电子显微镜中表现为一种颗粒。既然大部分转运蛋白在双层膜中都有足够的量能在双层膜的磷脂背景中被分辨出来,因此大多数膜内颗粒很可能代表了具有某种运输功能的蛋白质。

有核细胞质膜的某些蛋白质可以用向量标记试剂加以研究¹

与红细胞不同,有核细胞具有各种各样的细胞内膜,包括核、内质网、高尔基器、线粒体、溶酶体和各种液泡的膜。通常质膜的面积还不到细胞总膜面积的 10%。正是由于这

种原因,只有先将这种质膜与细胞内膜分开才能对它们进行直接研究。但分离通常是很困难的,几乎所有的质膜制备物都是不纯的。另一种方法是使用前文已讨论过的那种不能透过膜的向量标记试剂。这种试剂能标记并识别仅暴露在细胞表面的那些蛋白质。用这

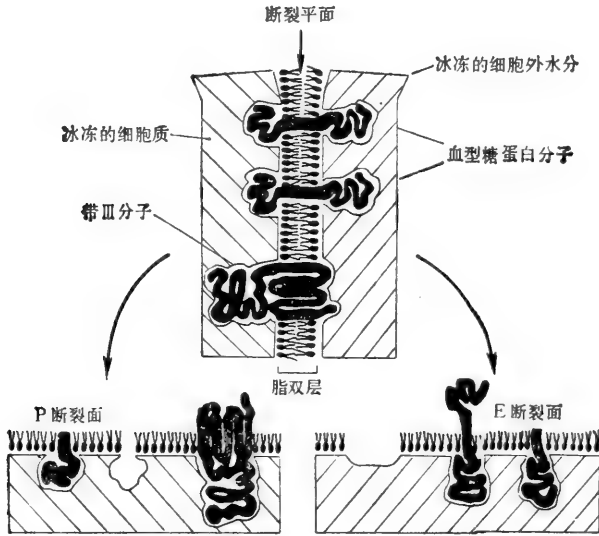


图 6-31 图示人红细胞膜中的血型糖蛋白和带 III 分子在冰冻断裂时可能发生的变化。带 III 分子通常留在内层(P)断裂面上,并且其量大,能被显示为膜内颗粒。而血型糖蛋白分子则可能被折断或留在外(E)断面上,在上述的两种情况下都不能被显示为膜内颗粒。

种方法,大多数质膜蛋白质均能标记,而溶解在细胞质中或与细胞内膜相结合的蛋白质则不能标记。在定向标记法中普通使用的一种试剂是乳过氧化物酶,它在有过氧化氢 (H_2O_2) 和放射性碘化物 ($^{125}I^-$) 存在时,使碘化物氧化为一种反应能力更强的与酶结合的形式。这种活化的试剂能够碘化其他蛋白质中的酪氨酸和组氨酸残基。但是由于这种碘的活性形式未从乳过氧化物酶中释放出来,而大的酶分子本身并不能穿透膜,因此当用于完整细胞时,只有暴露在细胞表面上的蛋白质才能被碘化,也即被标记(图 6-32)。这种方法的缺点是只能鉴别出全部质膜蛋白质中的一个亚群,即只是暴露在双层外带有酪氨酸或组氨酸残基的蛋白质。若要选择性地标记有核细胞质膜的靠细胞质的那个表面,则非常困难。目前解决这个问题的方法是将分离的质膜制备成无漏孔的、内面外翻的液泡。然而制备物的纯度仍然是一个有待解决的问题。

通过向量标记研究,已清楚地知道,与人红细胞相比,一个典型的有核细胞的质膜上有更多的各种蛋白质。例如通过乳过氧化物酶催化的碘化作用,在一个典型的培养的有核细胞的外膜上能检测出 50 种以上各不相同的蛋白质。迄今为止对膜上的大多数蛋白质的配置状况或功能,所知不多。但是最近已经知道,许多膜蛋白质在膜平面方向上是能够移动的,对此我们将在下面进行讨论。

当两个细胞融合时,其质膜蛋白迅速混合在一起¹¹

证明膜蛋白在质膜平面上可以移动的直接证据来自 1972 年的一个很精巧的实验。该实验是用小鼠细胞与人细胞融合的人工杂种细胞进行的(异核体,见 163 页)。这些细胞在培

培养基中能存活的事实,证明融合的质膜在其结构和功能上仍然是完整的。因此,人们可以提出这样的问题:究竟两种不同的质膜区仍然是分开的还是这两组分子(特别是膜蛋白)已混合在一起了呢?用两组抗体进行的实验生动地回答了这个问题,一组抗体只与人细胞上的蛋白质结合,另一组抗体则只与小鼠细胞上的蛋白质结合。用红色荧光染料若丹明标记显示人类蛋白质的抗体,在绿色荧光染料荧光素标记显示小鼠蛋白质的抗体。在大多数异核体细胞中,人和鼠的蛋白质最初是限制在各自的一半中,形成绚丽的荧光图形。但在一小时之内,两组蛋白质已扩展到整个表面并且混合在一起,表明了它们在组合的膜平面上能迅速地扩散(图 6-33)。

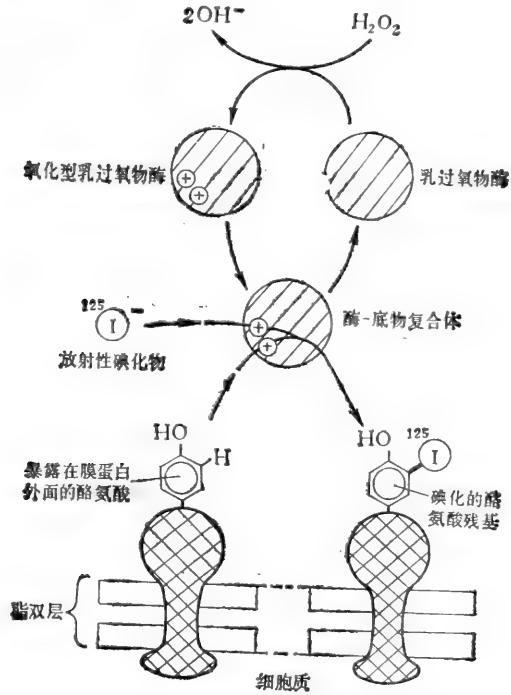


图 6-32 用乳过氧化物酶催化的碘化作用选择性地标记位于质膜外面的蛋白质。如图所示,所有涉及碘的反应都局限于酶的表面上。酶的活性部位有一个铁原子,能在待碘化的酪氨酸中产生一个自由基。

脂双层的流动结构使膜蛋白能迅速地扩散,并使膜蛋白之间能相互作用。它提供了一种简单的方法,使膜的组分能从在它们合成后最初插入到膜上的位置扩布到细胞的其他区域。它允许膜互相融合而不失去膜对通透性的控制,并且确保膜分子在细胞分裂时均等地分配给子代细胞。如果膜不具有流动性,则很难想像细胞如何能存活、生长和繁殖。

膜蛋白可被抗体交联而簇聚成斑片¹⁷

当荧光抗体和暴露在细胞表面上特定的质膜蛋白结合时,它们可诱导这些蛋白聚集,成斑片,像在淋巴细胞(负责免疫反应的特殊类型白细胞,见第十七章)就是如此。由于抗体分子是双价的,即它们有两个抗原(能与抗体结合的蛋白质或其他物质)结合部位,所以它们能与可溶性抗原产生交联,形成大的抗体-抗原复合物,并从溶液中析出。由抗

体结合而诱导发生的抗原在细胞表面上的簇聚就类似于这种沉淀反应,但在这种情况下,它是在二维膜平面上发生的。为了使抗体与膜蛋白交联形成大的复合物,这些蛋白质必须在脂双层中自由地侧向运动,这意味着膜必定是流动的。

在还没有认识到膜是流动的之前,标记抗体就已广泛地被用于查看淋巴细胞表面上的蛋白质了,但是观察到的成簇分布现象曾被误认为这就是膜蛋白的通常分布方式。利用单价的抗体片断可以证明簇聚现象实际上是抗体结合的直接后果。用木瓜蛋白酶消化抗体所得到的单价抗体片断仅有一个抗体结合部位,因此它们不能交联邻近的膜蛋白。用荧光染料标记这些单价抗体分子发现,虽然它们仍能与淋巴细胞表面上的蛋白质分子结合,但它们的分布是弥散的;不能形成由双价抗体分子诱生的簇聚物(图 6-34)。

现已证明,迄今所研究过的所有有核细胞的多种不同膜蛋白(以及糖脂)都具有这种由抗体诱导的膜分子簇聚现象。不仅用抗体诱导成斑,而且也能用一类与抗体完全不

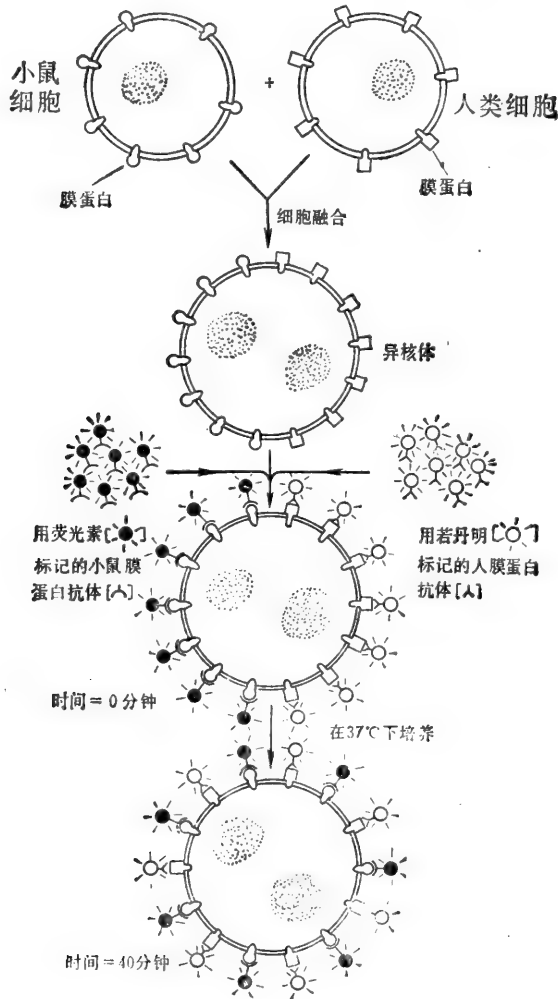


图 6 33 表示图证明在鼠-人杂种细胞上质膜蛋白互相混合的实验。最初,鼠和人的蛋白质仅局限在新形成的异核体质膜中各自的半边,但随着时间的推移,它们交混在一起。

同的称为外源凝集素的蛋白质来诱导。这些蛋白质,通常是从植物中分离出来的,具有两个或多个结合部位,能与细胞表面的糖蛋白和糖脂上的特定的碳水化合物残基相结合;因此,外源凝集素和抗体一样,能与具有对应的碳水化合物残基的分子交联。

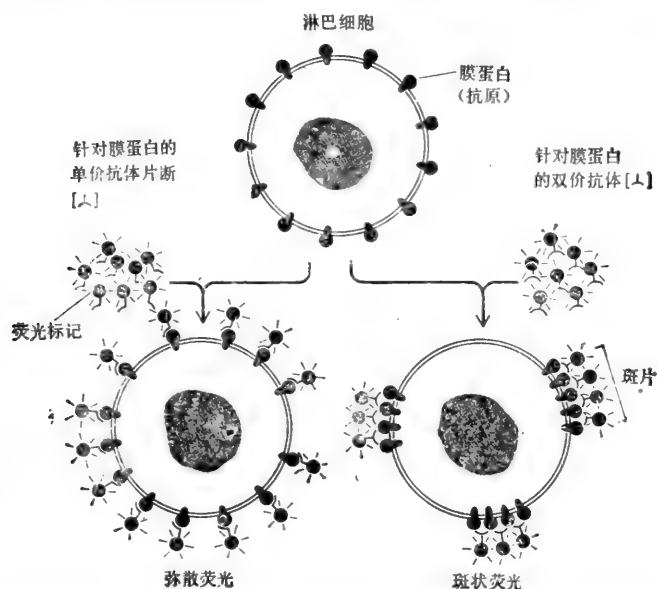


图 6-34 表示在淋巴细胞表面由抗体诱发的抗原成斑(簇聚)现象。单价抗体弥散地分布在淋巴细胞的表面,而双价抗体则交联抗原,并将抗原簇聚成斑片。

利用抗体或外源凝集素(这些结合性分子总称为配体)与铁蛋白偶联后能在分子水平上观察到膜蛋白的分布情况。因为铁蛋白的电子密度大,因此能用电子显微镜观察到单个分子。用单价配体或通过化学方法“固定”细胞膜使膜蛋白不能移动,可阻止配体诱导的簇聚现象发生。此时,如用与铁蛋白偶联的配体探测膜上的大分子时,则可发现悬浮在液体中的单个细胞,其质膜上的大分子是弥散地分布的[图 6-35(A)]。另一方面,在未经固定的膜上用与铁蛋白偶联的多价配体进行探测时,被标记的分子又重新簇聚成斑片[图 6-35(B)]。

交联的膜蛋白在“加帽”过程中主动地转移到细胞的一极¹⁸

在淋巴细胞表面上用多价配体诱导形成的斑片能迅速地集中在淋巴细胞的一端上,形成一个“帽盖”(图 6-36 和图 6-37)。加帽过程需几分钟,帽盖几乎总是位于淋巴细胞的尾端(尾端是指淋巴细胞在一个表面上移动时的后部)(图 6-36)。但是,很清楚,加帽过程并不要求细胞非运动不可,因为即使淋巴细胞保持在悬浮液中而不能与表面相互作用时,加帽过程仍然发生。与成斑过程相同的是,帽盖形成只有用交联的配体时才能观察到。但不同的是,成斑是被动现象,加帽是一个主动的过程,它需要能量(ATP)和完整的肌动蛋白纤丝。

加帽的机理还未搞清楚。但在进行加帽过程的淋巴细胞,其外表形状往往与一个在表面上移动的淋巴细胞相似。此外,能沿着表面移动的大多数真核细胞,当它们的表面分子与多价配体交联后都能形成帽盖,但不能游动的细胞则不能形成帽盖。这些观察表明

加帽的机制和细胞运动的机理是相同的。如果认为支撑表面使膜蛋白交联在一起的方式与多价配体的作用方式是相同的话，那么甚至还可以把细胞运动看作为加帽过程的副产品。按照这种观点，当细胞把支撑表面推向它的尾部时，实际上是细胞本身向前移动了。从另一个角度也可以用运动的观念来解释加帽的现象。当可溶性交联配体与在悬浮液中的细胞膜结合时，细胞作出了反应，仿佛它正在与一个固体表面互相作用：于是细胞开启了它的运动机构，随后形成帽盖。从这个角度看问题，加帽现象为研究细胞运动提供了一种方便的方法。

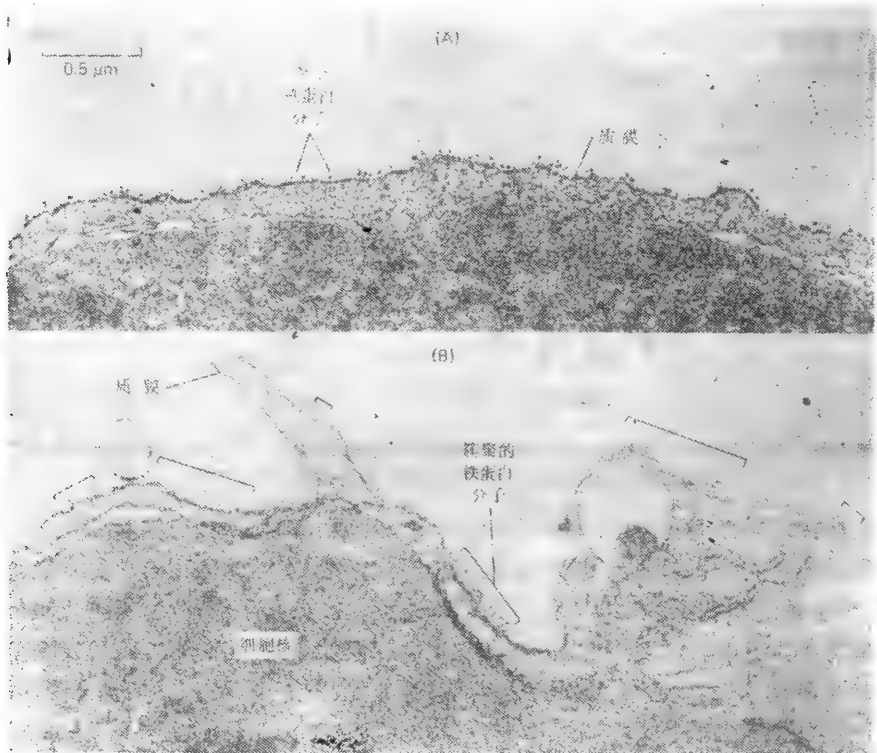


图 6-35 电子显微照片显示： A. 在淋巴细胞表面与铁蛋白偶联的单价抗体分子的弥散分布； B. 与铁蛋白偶联的双价抗体分子的簇聚现象，每个黑点表示一个铁蛋白分子。(Durward Lawson 赠)

已与抗体或其他配体交联的膜分子往往被细胞摄入内部，这个过程称为配体诱导的内吞作用。虽然在淋巴细胞中大多数这类内吞作用一般仅在帽盖完成之后才能发生（图 6-36），但它在很大程度上取决于与配体结合的特异性细胞表面分子。在某些情况下，配体和与之结合的分子不是被内吞而是从细胞表面脱落下来。在 298 页将详细讨论配体诱导的内吞作用[也称为受体介导内吞作用或吸附内吞作用(adsorptive endocytosis)]。

在细胞的“加帽”问题上两种互相抵触的观点：流动假说和牵引假说¹⁹

已有两种假说用来解释加帽过程。一种假说认为，细胞在尾端通过内吞作用逐步地摄入质膜，以小泡的形式将它们运过细胞质再重新插入前部的质膜中（外排作用，exocytosis，见 294 页），由此产生的膜的连续流动使斑片迅速地转移至细胞的后部。按照这种假说，在质膜中各个蛋白质分子扩散的速度是相当迅速，因此尽管膜在流动，它们仍

然保持近乎随机的分布。然而，当膜蛋白质被交联而形成大的团粒体时，它们的扩散减慢，因此膜流动能将它们转移到细胞的一个极上(图 6-38)。小泡的定向运输需要肌动蛋白纤丝和 ATP，从而驱动了膜的流动。也有人提出一种类似的假说用来解释成纤维细胞的运动。

加帽过程的另一种假说认为，经配体交联而簇聚的膜蛋白与细胞质内肌动蛋白纤丝收缩系统互相作用，于是被这些纤丝牵引到细胞的尾部(图 6-39)。这个假说所遇到的困难是，实际上任何一种蛋白质(甚至糖脂)都能被适当的多价配体交联成帽盖。看来，这种假说要求一定的条件，即在膜下的肌动蛋白纤丝能以某种方式识别簇聚的膜分子，而不管它们是什么分子就与它们结合。但这种识别能力是难以想象的。不过如果有一类特殊的膜蛋白能与肌动蛋白纤丝互相作用，而其他膜蛋白(或糖脂)在簇聚时能结合或捕获这些特殊的蛋白质分子，那么这种识别也有可能发生。

虽然业已证实肌动蛋白和肌球蛋白在斑片区及帽区有积聚现象，并已被引用来支持牵引假说，但仍然没有明确的实验证据允许我们在流动和牵引两种假说之间作一抉择。但不管最后的答案是什么，对加帽现象的兴趣已经促使人们将注意力集中到某些质膜蛋白与细胞骨架之间的互相作用上。其他的一些实验也已经证明，质膜并不是一个独立的细胞器，它在结构和功能上都与复杂的细胞骨架有联系(见第十章)。

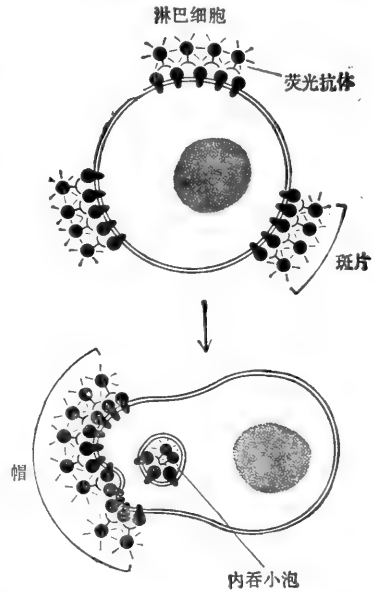


图 6-36 加帽的示意图。抗体诱导的斑片迅速地转移到淋巴细胞的尾部，并在那里形成“帽盖”。以后这些抗体(以及与之结合的蛋白质)往往又被摄入内吞小泡，而淋巴细胞也呈现运动的形状。

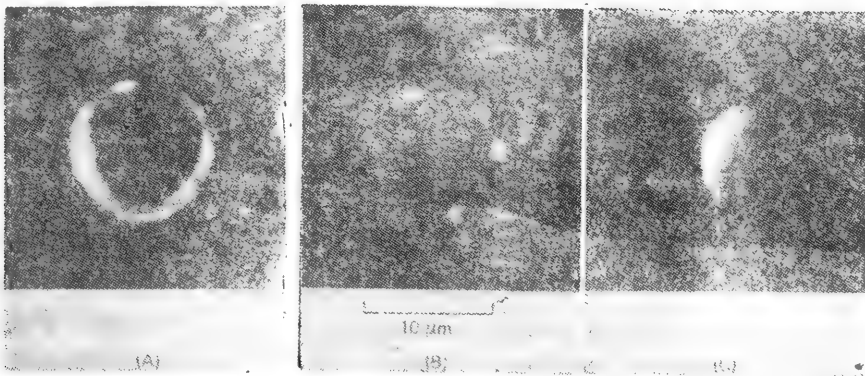


图 6-37 免疫荧光显微照片，显示荧光抗体在淋巴细胞上的扩散，成斑和加帽等几种分布情况。
A 图中为单价抗体，其染色是弥散性的；而双价抗体在 B 图中--开始即簇聚成斑片，然后在 C 图中形成帽盖。(Stefanello de Pefris 赠)

抗体诱导的膜蛋白的重新分布能用来判断两个多肽在质膜上是否互相关联

膜生物化学的一个重要目标是确定在特定的膜上的不同分子之间的确切关系。例如，可以提出这样的问题：两个不同的膜多肽 A 和 B 是否互相连结。回答此问题的一个方法是

分别使用针对两种不同多肽的标记抗体,用抗A抗体集聚A分子成为斑片和帽盖,然后再用抗B的单价抗体片段来观察B分子发生什么变化(图6-40)。如果B随A移动就可假定它们在膜上是连接的。但如果B在原位不动,那么这两个多肽显然是不连接的。用不同的

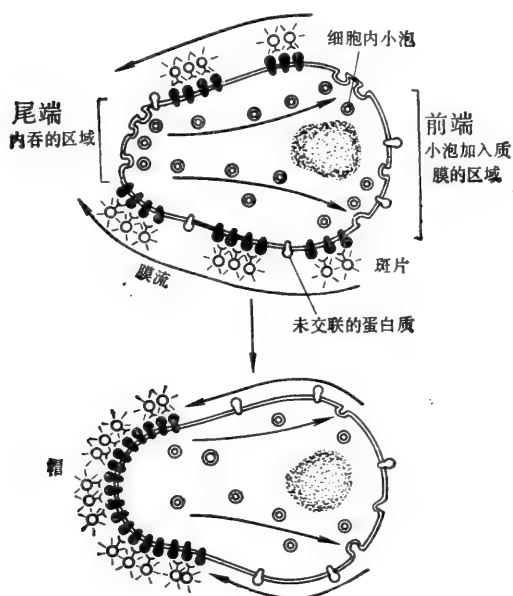


图6-38 加帽现象的膜流动的假说。膜泡在淋巴细胞的尾部被摄入,然后被转运穿过细胞质,最后重新插入膜的前部。它在细胞表面造成膜的流动,将大片交联的蛋白质转移到细胞的尾部。即使内吞作用发生在整个细胞表面(某些类型的细胞似乎就是如此),但只要在一个局部区域有膜重新插入,膜的流动就会出现。

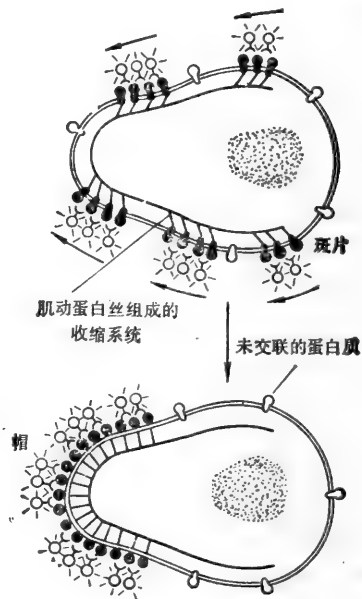


图6-39 加帽现象的牵引假说。在细胞表面蛋白质交联形成斑片后,它们能直接或间接地与细胞内肌动蛋白丝收缩系统相互作用,纤丝把斑片牵到淋巴细胞的尾部。

荧光染料(如荧光素和若丹明)偶联,则可同时观察两种抗体。用这种方法研究过的大多数蛋白质(主要是淋巴细胞质膜上的蛋白质)都能单独加帽。这意味着大多数膜蛋白没有稳定的、长距离的相互联系。

膜蛋白的侧向扩散速率是能定量测定的²⁰

和膜脂一样,膜蛋白也能围绕与脂双层平面相垂直的轴旋转(旋转扩散)和在膜中作横向移动(侧向扩散),但它们不能在脂双层中跨层移动(翻转)。通过对多种不同膜的各种不同蛋白质分子的侧向扩散速率作测定,发现数值变动范围是相当大的,扩散系数在 $5 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ 和 $10^{-12} \text{cm}^2/\text{s}$ 之间(作为比较,可追忆膜内磷脂分子的扩散系数,约为 $10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$)。也许最精确的测量是在脊椎动物视杆细胞的盘膜里对单个视紫红质分子进行的。所用的方法是,先用强烈的高度聚焦的光束使位于杆状细胞一边的视紫红质分子中的发色团(视黄醛)迅速漂白,然后测量已漂白的分子扩散到未漂白的一边所需要的时间(图6-41)。利用这种技术测得视紫红质的扩散率大约是 $5 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ 。最近采用一种类似的方法来研究活细胞质膜中特定蛋白质分子的扩散速率。这种方法是利用激光束照射细胞表面的一块小面积,使与细胞表面分子结合的荧光抗体被漂白,然后测定相

邻的未漂白分子扩散到漂白区所需要的时间。发现使用这种方法测得的各种不同的质膜蛋白的扩散速率要比视紫红质分子的扩散速率慢 10—1 000 倍。对此，一种可能的解释是

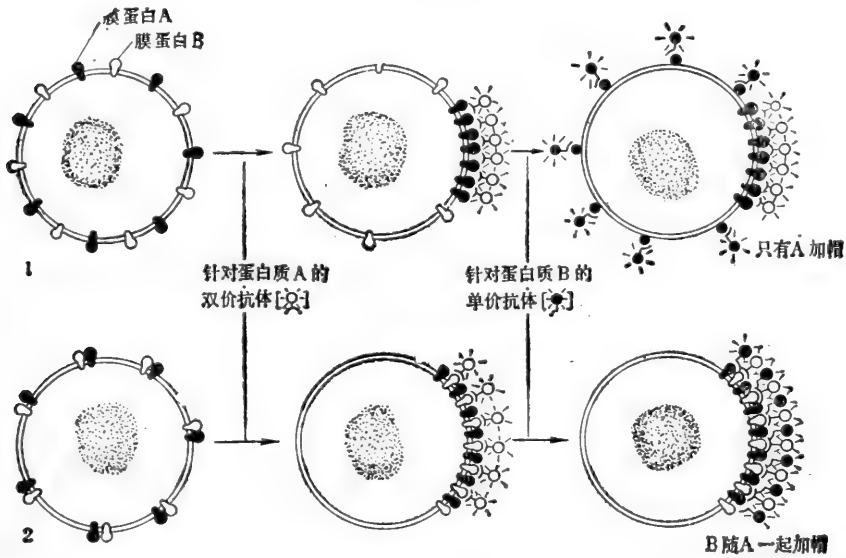


图 6-40 测定两种膜蛋白 A 和 B 是否相联的方法。如果 A 和 B 不相联，则当抗 A 抗体使 A 聚成“帽盖”时，B 仍然保持散在分布(1)。如果 A 和 B 是相联的(2)，则 B 随 A 一同聚成“帽盖”。注意要用单价抗体片断检测 B 的分布，以避免抗体直接诱导 B 的簇聚。

某些蛋白质因与膜上或邻近膜的其他大分子互相作用而降低了扩散速率。另一种可能是，高强度的激光束可能会破坏细胞膜，从而引起扩散速率的大幅度降低。

细胞有限制它们的某些膜蛋白侧向流动的方法

认识到生物膜是一种二维流体，是在理解膜结构和功能方面的一个重要进展，但是如把生物膜描绘成一个脂质的海洋任蛋白质在其中自由飘浮，则又把问题过于简单化了。已知有许多膜蛋白在横向移动能力方面是受到限制的。例如，在覆盖各种腔体的上皮细胞中，质膜的某些酶和转运蛋白只限于细胞的上表面，而另一些酶和转运蛋白则局限于基底面及侧面。造成这种限制的原因是由于一种特殊类型的细胞连接形成一个限制屏障（这种连接又称为紧密连接，见图 6-42）。然而，这些蛋白质分子中的大部分则很可能在各自的限制区内自由扩散。但是在细胞连接处的运动却受到更加严格限制，因为用来构成细胞连接的膜蛋白一般是不能在两个对接膜上横向移动的。

在理论上有几种能控制膜蛋白侧向流动的方法。图 6-43 中表示出三种方法。一种方式可以用盐生盐杆菌的紫膜作为范例。在这种紫膜中，细菌视紫红质分子集聚成大的二维晶体，在此晶体中蛋白质分子间的相对关系是固定的。大的聚合体扩散得极慢，实际上是不动的[图 6-43(A)]。第二种情况，膜蛋白的移动能力受限是因为它们与细胞外结构发生相互作用，例如两个互相作用的细胞质膜上的特异蛋白质集聚形成一个特殊细胞连接[图 6-43(B)]。最后一种情况，如前所述，膜蛋白分子的运动和分布也可能因与细胞质中的蛋白质集聚体（如肌动蛋白丝）相互作用而受控制[图 6-43(C)]，正如血影蛋白牵住

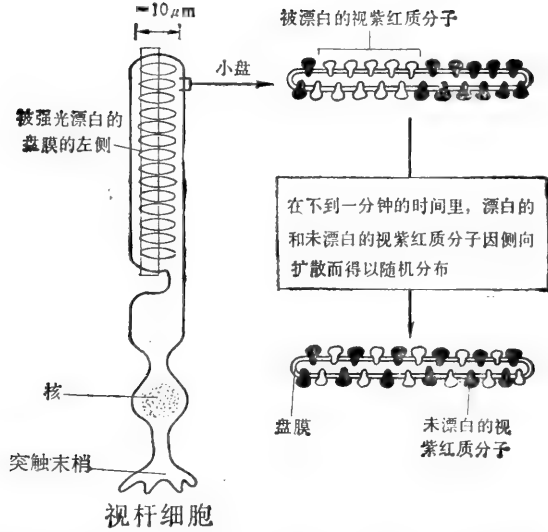


图 6-41 测定视网膜视杆细胞盘膜中视紫红质分子的侧向扩散速率。使细胞一侧的视紫红质分子漂白，并测定它们扩散到未漂白区的速率。

红细胞质膜中的某些蛋白质一样(图 6-24)。在分子水平上，有核细胞中的细胞质成分与膜蛋白之间互相作用的细节，现在还不清楚，但这是一个非常活跃的研究领域。

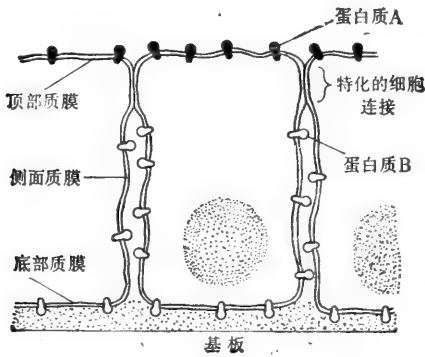


图 6-42 上皮细胞的示意图显示各种不同的膜蛋白可以被限制在膜的一个特定的区域内。蛋白质A(在膜的顶部)和B(在膜的基底部和侧部)可以在它们各自的膜区内作侧向扩散。但是它们不能进入其他膜区，因为一种特殊的细胞连接(又称为紧密连接)阻止了它们。

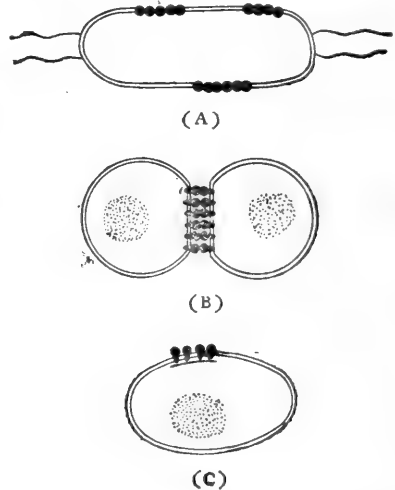


图6-43 限制质膜蛋白侧向移动的三种方式。它们能集聚成大的聚合体(A)(例如在盐生盐杆菌紫膜中的细菌视紫红质分子)。它们与细胞外的蛋白质(B)，或与细胞内的蛋白质(C)互相作用而受到牵制。

小结

综上所述，脂双层决定了生物膜的基本结构，而蛋白质担负着膜的大部分功能，例如作为特异性受体、酶或转运体(transporter)。大多数膜蛋白具有疏水表面，这使它们不

溶于水溶液。它们能以多种方式和脂双层结合：许多蛋白质穿过双层，或者是以单个 α 螺旋的形式穿过，或者是反复折叠，因而多肽几度跨过双层。属于后一种的大多数可能是转运蛋白，它们在脂双层的平面里具有足够大的体积可以在冰冻断裂电子显微镜检时显现为膜内颗粒。其他一些膜蛋白则并不穿过双层，而只是在膜的这一边或那一边接触水环境。这些蛋白质也许通过与本身共价连接的脂肪酸链，或者通过与横穿膜的蛋白质的非共价的相互作用而与膜结合。

和双层里的脂质分子一样，许多膜蛋白能在膜的平面里扩散。膜蛋白可通过多价配体如抗体或外源凝集素而相互交联成簇，这就是这种移动能力的一种表证；在某些细胞里，这些簇被转移到细胞的一端形成一个“帽盖”。然而细胞可以限制一些质膜蛋白的侧向移动，其办法是借位于质膜的外侧面或胞质面的大分子牵住这些膜蛋白。

膜的碳水化合物

所有真核细胞的表面都有碳水化合物，大部分是借低聚糖侧链与膜蛋白(糖蛋白)共价结合，少部分是与脂质(糖脂)共价结合，一般认为大多数暴露在细胞表面的质膜蛋白分子带有糖残基，而在大多数质膜的外单分子层里，脂质分子中携带碳水化合物的分子还不到十分之一。另外，单个糖蛋白能有许多个低聚糖侧链，而每个糖脂分子则只有一个低聚糖侧链。总之，在质膜中碳水化合物按重量计算占总量的2%至10%。

生物膜的糖类只见于质膜的非胞质面²¹

正如我们所看到的，生物膜明显地不对称：外单分子层和内单分子层中的脂质是不一样的(至少质膜是如此)，暴露在这两层表面的多肽也总是极不相同的。糖类的分布则更加不对称，因为内膜与质膜的糖脂和糖蛋白的低聚糖侧链仅位于非胞质侧的表面：在质膜上，糖残基都暴露在细胞外，而在内膜这些残基都是面向膜室内腔。

细胞衣或称多糖被，这两个词常被用来描述大多数真核细胞表面上富含糖类的周缘区。该区可用各种不同的染料，例如钌红(ruthenium red)来显示(图6-44)。这些糖类包括与质膜相连的糖蛋白和糖脂的低聚糖侧链，不过它也常包括先被分泌出来，以后又被吸附在细胞表面的糖蛋白和蛋白多糖(图6-45)。(蛋白多糖是由很多的多糖链连接到一个蛋白核心组成的见，678页)。在这些被吸附的大分子中，有些是细胞外基质的成分，因此要明确哪里算是质膜结束处，哪里算是细胞外基质起始处，这主要是一个语意学的问题。虽然细胞表面有着高浓度的糖类必定会对质膜的很多功能有着重要的影响，但其影响的性质仍然不明。

细胞表面的糖类很可能对细胞间相互作用有重要作用，但一直难以证明这一点²²

自然界中发现的单糖类超过100多种，但在膜糖蛋白和膜糖脂中只有9种，其中主要的是半乳糖、甘露糖、岩藻糖、半乳糖胺、葡糖胺、葡萄糖和唾液酸。唾液酸的残基常见于糖类侧链的末端，真核细胞表面上特征性的净负电荷主要由它造成。糖蛋白和糖脂的低聚糖侧链可以是很复杂的。虽然它们包含的糖残基常常不到15个，但侧链常具分支，其中的糖通过各种不同的键连接在一起。从理论上说，仅仅三个糖残基就可以连在一起形

成1000多种不同的三糖。目前要测定膜蛋白和膜脂上的这些复杂的低聚糖侧链的顺序，在技术上仍存在很多困难，因此在大多数情况下，它们的详细结构还不清楚。

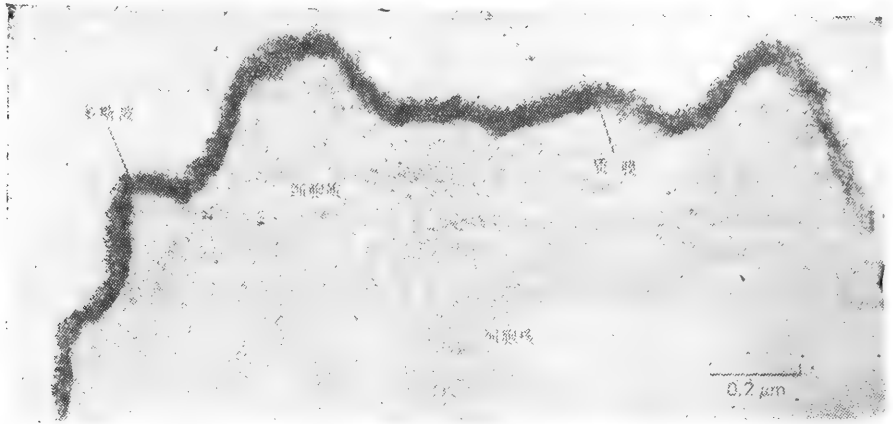


图6-44 电子显微图淋巴细胞表面，由钨红染色显示出细胞衣（多糖被）。
(A. M. Glauert 和 G. M. W. Cook 赠)

膜糖脂和膜糖蛋白中低聚糖侧链的功能还不清楚。有可能，位于某些跨膜糖蛋白上的低聚糖侧链有助于蛋白质在细胞膜上的固定及定位，以防止其滑入细胞质或在脂双分子层中翻转。这种糖类对于稳定糖蛋白的折叠结构可能有一定作用。另外，它可能协助引导膜糖蛋白定位在细胞内或细胞上的适当部位上，正如位于溶酶体酶上的一些特殊的糖链能引导那些可溶性糖蛋白到达溶酶体上一样但是这些不可能是膜糖蛋白糖类仅有的功能，因为如果用一种能抑制多种膜糖蛋白糖基化的抗生素[衣霉素 (tunicamycin)]来处

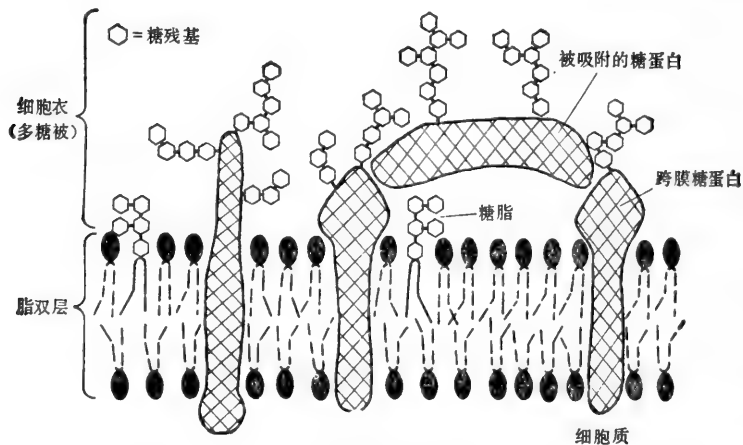


图6-45 细胞衣(多糖被)的图解，它是由膜糖脂及膜糖蛋白的低聚糖侧链以及被吸附的糖蛋白和蛋白聚糖所组成。图中被吸附的蛋白聚糖未表示出来。注意所有的糖类都在细胞膜的外面。

理细胞的话，部分这样得出的没有糖的蛋白质照样能正常地嵌入质膜，而且看来位置正常，也相当稳定。此外，定向、固定、稳定和寻的等功能并不能归之于糖脂分子中的糖类，也不能用此来解释糖蛋白中某些糖链的复杂性。

质膜糖蛋白与糖脂上某些低聚糖结构的复杂性以及它们在细胞表面上所处的位置提

示,它们在极为复杂的细胞间识别过程中可能具有重要作用。有些细胞具有能与特定的低聚糖相结合的表面蛋白;理论上,这种外源凝集素能识别其他细胞表面的低聚糖。从而在细胞的交互作用中起引导作用。虽然有证据表明在植物中有这种交互作用,而且尽管有越来越多的间接证据说明在动物中细胞表面的糖类也具有此种作用,但却很难加以证实。

小结

在所有真核细胞的质膜中,暴露在细胞表面的大多数蛋白质以及外脂单层中的脂质分子具有共价结合的低聚糖链。这些糖链可以是很复杂的,在大多数情况下,其确切的顺序还不清楚。虽然这些糖类的功能还有待进一步搞清,但至少有一部分糖链可能在细胞间的识别过程中起作用。

小分子的跨膜转运

由于脂双层内部是疏水性的,因此对绝大多数极性分子来讲,脂双层是一个高度不通透的屏障,从而防止了细胞内大部分水溶性成分的外溢。但也正是由于这个原因,细胞不得不发展出一种特殊的方式来使极性分子通过细胞膜。例如,细胞必须摄取必需的营养物质,并排出代谢废物。它们也需要调节细胞内离子的浓度,这意味着要转运特定的离子进出细胞。转运小分子物质通过脂双层是依靠一组特化的跨膜蛋白来完成的。每一种跨膜蛋白负责转运一种特定的分子或一组密切相关的分子。细胞还发展了一种转运大分子(如蛋白质),甚至大的颗粒通过质膜的方法。但其机制与小分子转运的机制迥然不同,这将在后面章节中予以讨论。

在本节中我们将看到,生物膜对单个离子的选择通透性,造成了细胞内与细胞外液间离子组成的巨大区别(表 6-2)。这可使细胞膜以离子梯度的形式贮存势能。这种跨膜离

表 6-2 一个典型哺乳动物细胞的内外离子浓度

成分	细胞内浓度 (mmol/L)	细胞外浓度 (mmol/L)	成分	细胞内浓度 (mmol/L)	细胞外浓度 (mmol/L)
阳离子			Ca ²⁺	1-2 ($\leq 10^{-7}$ mol/L 是游离的)	2.5-5
Na ⁺	5-15	145	H ⁺	4×10^{-8} ($10^{-7.4}$ mol/L 即 pH7.4)	4×10^{-8} ($10^{-7.4}$ mol/L 即 pH7.4)
K ⁺	140	5	阴离子		
Mg ²⁺	30	1-2	Cl ⁻	4	110

* 由于细胞的正负电荷应该相等(也就是电中性),因而细胞内阴离子的大量短缺反映了绝大部分细胞成分是带阴电荷的(HCO₃⁻、PO₄³⁻、蛋白质、核酸,以及带有磷酸盐和羧基的代谢物等)。

子梯度可以用来制造 ATP,驱动各种转运过程,以及传送各种电讯号。在讨论这些特异性转运蛋白以及由其中一些转运蛋白所造成的离子梯度之前,应先了解一下无蛋白质的脂双层的通透特性。

无蛋白质的脂双层对离子是不通透的,但对水却可自由通透²⁾

如果给予足够时间,那末实际上任何分子都会沿着它的浓度梯度穿过一个无蛋白质

的脂双层扩散过去。但是分子通过无蛋白质脂双层的扩散速率则差异很大，主要取决于分子的大小和它在油内的相对溶解度。一般说来，分子越小，以及在油中的溶解度越大（即疏水性或非极性的程度愈大），则它扩散通过脂双层的速率越快。小的非极性分子很容易在脂双层中溶解，从而能很快通过脂双层。不带电荷的极性分子如果足够小的话，也能很快通过脂双层。例如，CO₂（44道尔顿）、乙醇（46道尔顿）和尿素（60道尔顿）能很快通过；甘油（92道尔顿）不太容易通过；而葡萄糖（180道尔顿）几乎不能通过（图6-46）。重要的是，水（18道尔顿）虽然相对不溶于油，却能很快地通过脂双层。这种快速的扩散率部分是由于水分子很小而且不带电荷；另外，人们认为水分子的偶极结构容许它能异常快的通过脂双层含有脂质头部基团的部位。

对比之下，脂双层对所有带电荷的分子（离子）不管这分子是多么小，都是高度不通透的：这些分子所带的电荷以及高度的水合状态阻止它们进入脂双层的烃相。所以人工脂双层对水的通透性比对甚至很小的离子，如 Na⁺ 或 K⁺ 还要大 10⁹ 倍（图6-47）。

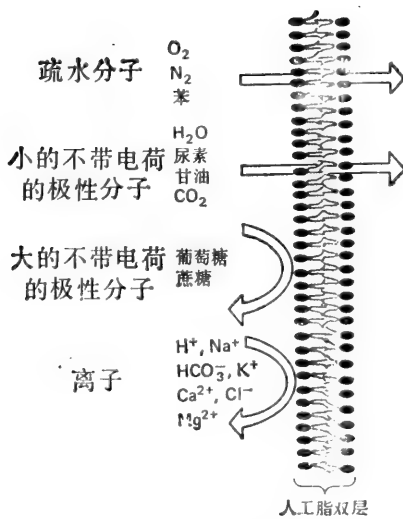


图6 46 人工脂双层对不同种类分子的相对通透性

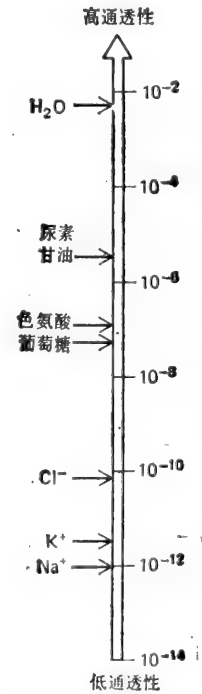


图6 47 各种分子通过人工脂双层的通透系数 (cm/sec)

膜结合的转运蛋白能转运特异的小分子通过细胞膜²⁴

与人工脂双层一样，细胞膜能容许水和非极性分子借单纯物理扩散作用透过来。但是细胞膜也可让各种极性分子，如离子、糖、氨基酸、核苷酸及很多细胞代谢产物通过，而这些极性分子只能极缓慢地通过人工脂双层。现已知道另有特定的膜蛋白负责转运这些溶质通过细胞膜。这些蛋白质称为膜转运蛋白，它们具有多种形式，并存在于各种类型的生物膜中。每种不同的蛋白质转运一种类型的化合物（如离子、糖或氨基酸），而且通常仅仅是这类中的一种特定的分子类型。曾发现单基因突变使细菌失去转运某些特定的糖类

通过质膜的能力,这首次表明转运蛋白的这种特异性。在某些因遗传性疾病影响肾脏与肠道中某些特定溶质转运的患者中,也发现了类似的突变。

有些转运蛋白只能将一种溶质从细胞膜的一侧转运到另一侧,这些蛋白质称为单转运(uniport)。另一些称为共转运(cotransport)系统的功能,具体地说,就是一种溶质的转运依赖于同时或先后另外一种溶质的转运。这两种可以是同方向的(同向转运)或者是反方向的(反向转运)(图6-48)。例如,糖类进入许多细菌是通过氢离子与糖分子的同向内流而发生的。而真核细胞质膜上钠钾泵(见下面)则起着对向转运的作用,把钠泵出细胞而让钾进入细胞内。

许多膜转运蛋白是通过所谓的被动运输过程使一些特定的溶质透过脂双层,如果被转运的分子不带电荷,则膜两侧的浓度差(浓度梯度)便决定了这个被动运输的方向。然而,如果溶质带有净电荷,那么跨膜的浓度梯度和总电梯度(即膜电位)共同决定它们的运输。这两种梯度一起构成了电化学梯度(electrochemical gradient)。事实上,所有的质膜都具有跨膜电位(电压梯度),细胞内侧较外侧为负。这种电位使正电荷离子容易进入细胞而阻碍负电荷离子的进入。

有些介导被动运输的转运蛋白形成水通道。容许体积和电荷的大小都适当的溶质以单纯扩散方式通过脂双层;这些蛋白质称为通道蛋白(channel protein)。其他的被称为载体蛋白(或载体,或转运体),它们能与特定的分子相结合后被转运过细胞膜,这个过程叫做易化扩散(facilitated diffusion)

有些载体蛋白的功能与泵类似,能主动携带特定的溶质逆它们的电化学梯度而运动,这种过程称为主动运输。与能自发产生的被动运输不同,主动运输必须与一种代谢能源紧密偶联(图6-49)。大多数情况下,可能是载体蛋白促使ATP水解放能,或者是发生与 Na^+ 或 H^+ 的共转运,而后两种离子是顺着它们各自的电化学梯度运动的。

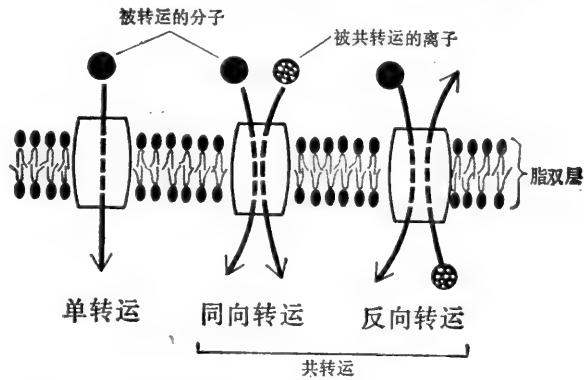


图6-48 转运蛋白的单转运、同向转运和反向转运作用。

转运蛋白形成一个通过脂双层的连续的蛋白质通道²⁵

我们发现所有经过仔细研究并已确定它们在膜上的位置的膜转运蛋白都是穿过脂双层的,或者至少它们本身是穿过脂双层的一个大结构中的一部分,而且,它们在脂双层中的体积也很大,因此可以在冰冻断裂电子显微镜下显现为膜内颗粒。由于转运蛋白形成一条连续的蛋白质通道穿越细胞膜,因此所转运的特定溶质毋需直接接触脂双层内部的疏水区。

对于转运蛋白的详细结构和功能的认识,进展很缓慢。这主要由于很难以将它们分离为溶解的状态。虽然已有好几百种可溶蛋白的氨基酸顺序都已经全部确定,但仅仅是在最近才搞清了第一个跨膜转运蛋白(细菌视紫红质)的全部氨基酸顺序。此外也没有一种转运蛋白能得到适宜于作X射线衍射结构分析的结晶。尽管如此,现在已有可能对一

些转运蛋白进行纯化,在条件顺利的情况下,已能将它们插入人工脂双层中,重建它们的转运功能。先前提到的细菌视紫红质是一个特殊的例子,因为它在盐生盐杆菌属细菌的

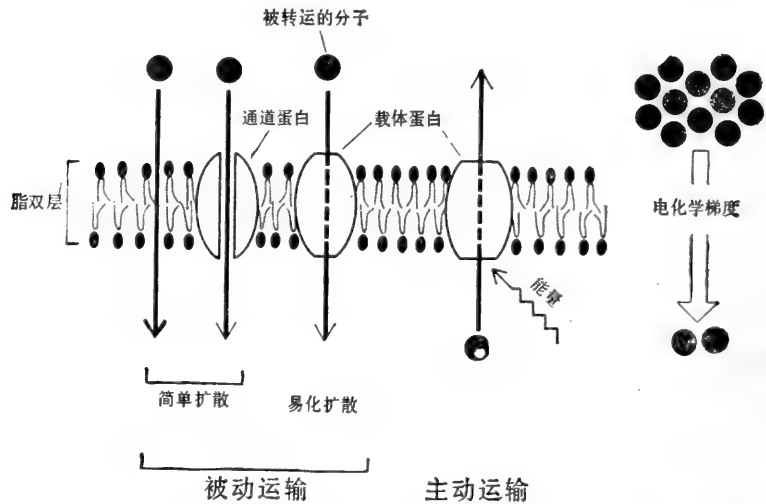


图 6-49 顺电 化学梯度的被动运输和逆电 化学梯度进行的主动运输。被动运输既可通过单 纯扩 散,又可通过易化扩散而自发产生。主动运输则需要代谢能的输入。虽然不带电荷的小分子能直 接通过脂双层,但是带电荷的分子(包括所有小离子)只有经过通道蛋白或载体蛋白才能表现明 显的运送速率。

紫膜里呈现二维晶体结构(在膜中它起着被光激活的 H^+ 泵的作用),因此我们能在原位 便测定它的三维结构而无需分离它或使之结晶。

载体蛋白的作用类似与膜结合在一起的酶²⁴

一个载体蛋白能特异地结合和运载一个溶质分子通过脂双层,这过程很像酶——底 物的反应过程,而有关的载体的作用亦类似特化的与膜结合在一起的酶。每类载体蛋白 都具有一个与溶质(底物)结合的特定结合部位。当载体蛋白饱和时(亦即所有的结合部 位都已被占满了)转运速率最大。这时的速率称为 V_{max} ,每种载体蛋白均有其特有的 数值。此外,每个载体蛋白对它的溶质来说,都具有一个特征性的结合常数, K_M ,这相当于 当转运率达到其最大值的一半时的溶质浓度(图6-50)。载体蛋白与溶质的结合可特异地 被竞争性抑制剂所阻断(抑制剂竞争相同的结合部位,它可以被载体蛋白转运,也可以不 被载体蛋白转运),也可被非竞争性抑制剂所阻断(抑制剂可以在其他部位上结合,但能特 异地改变载体蛋白的结构)。但它与酶-底物反应间的相似性是有限的,因为载体蛋白对 被转运的溶质并无共价修饰作用。

尽管载体蛋白在分子水平上是如何作用的细节还不清楚,但这过程不可能是通过蛋 白质在脂双层中来回移动成翻转完成的。更为可能的是,载体蛋白横跨膜层,当溶质被跨 膜转运时,它们只发生可逆的构象改变。图 6-51 是易化扩散中这种转运过程的一个可能 模型。

在这类模型中仅需作一些很小的改变即可使载体蛋白与一种能源,例如 ATP 水解 或一种离子梯度偶联起来(图6-54),因而能起到泵的作用将溶质逆电 化学梯度转运过去。

载体蛋白运用 ATP 水解的能量来转运离子的一个重要的例子是钠钾泵，它对动物细胞之能形成跨膜电位起了决定性作用。

跨质膜的膜电位是由 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵维持的²⁶

膜电位的离子基础最初是在对枪乌贼巨神经轴突的研究中确立的。这种神经轴突很粗(直径约 1mm)，很容易插入一个细管，因而可用固定成分的盐溶液取代其细胞质。这样就可以控制质膜两侧的离子浓度，从而证明：

(1)膜电位主要是由 K^+ 浓度梯度决定；(2)静止时质膜对 K^+ 的通透性比对 Na^+ 或其他的阳离子的通透性为大，而 K^+ 浓度梯度和各种离子通透性间的差别则又是由质膜本身的特定转运蛋白的性质所决定的。

有两种转运蛋白对膜电位的产生和维持是至关重要的(图6-52)。第一种是 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵，它把 Na^+ 泵出细胞，把 K^+ 摄入细胞，因而，细胞内 K^+ 浓度比细胞外大，而 Na^+ 浓度正好相反。另一种是 K^+ 渗漏通道(leak channel)，它容许 K^+ 顺其陡峭的浓度梯度渗漏到细胞外。由于 K^+ 的净流出，相对于细胞外来说，细胞内就带有负电。由此产生的膜电位又阻止 K^+ 通过渗漏通道外漏。当膜电位达 -75mV 时，由浓度梯度造成的 K^+ 外漏的趋势就和电势梯度(膜电位)造成的 K^+ 内流的趋势完全平衡。在这个平衡点上， K^+ 的电化学梯度消失。因而，就没有 K^+ 的净移动：进入轴突和渗出轴突的 K^+ 数目相等。

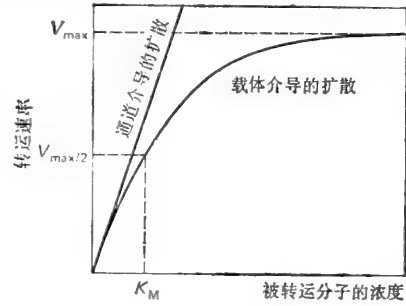


图6-50 蛋白质通道介导的扩散与载体蛋白介导的扩散：前者的扩散率总是与溶质的浓度成正比，而后者的扩散率在载体蛋白饱和时，达到最大值 (V_{max})。当转运达到其最大值一半时，这时的溶质浓度就假定与此载体的溶质结合常数(K_M)相等。

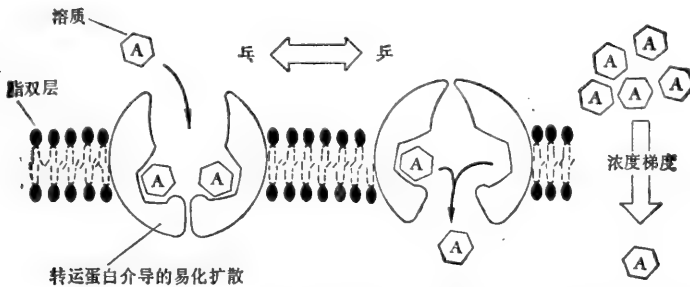


图6-51 图解载体蛋白的构象变化如何介导极性溶质A的易化扩散。载体蛋白有两种不同的构象：“乒”态时，A的结合部位暴露在双层外侧；“乓”态时，同一部位位于双层内侧。虽然这一过程是完全可逆的，但当双层外的A的浓度较高时，在载体蛋白“乒”态结合的A就更多。这样，就有A顺浓度梯度的向内流动。

因为 K^+ 渗漏通道对 Na^+ 也有低度的通透性，部分 Na^+ 就顺着电化学梯度漏入细胞内。这部分 Na^+ 的净流入使细胞内电性朝正的方向变化，从而降低了膜电位，这又引起 K^+ 进一步外渗。如果没有 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵把 Na^+ 泵出细胞和把 K^+ 摄入细胞以维持膜两侧浓度梯度的话，这种流动最终将导致膜两侧的 Na^+ 、 K^+ 浓度平衡而使膜电位消失。

在不同于枪乌贼神经元的其他细胞中,尽管膜对某些离子的通透性可以有所不同,但膜电位的产生也遵从同样的机理(由于种属和细胞类型的不同,它们的膜电位可以在-20

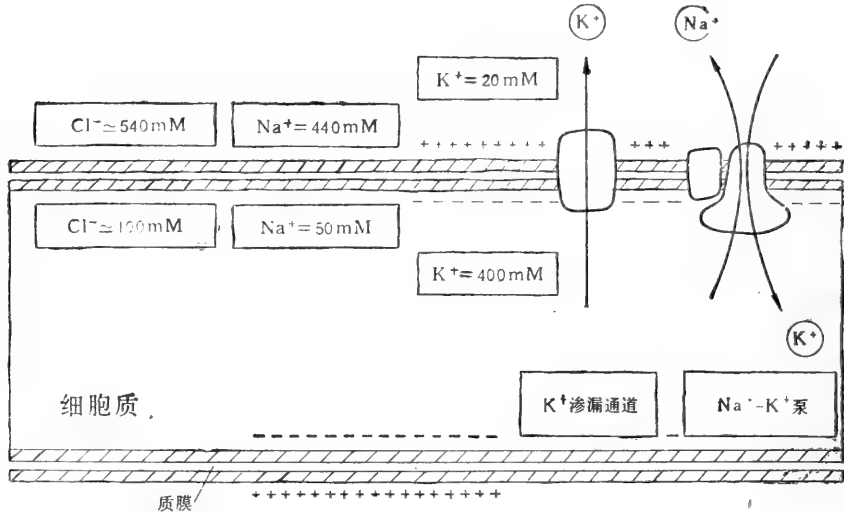


图 6-52 枪乌贼巨轴突膜电位的起因: Na^+ - K^+ 泵产生相反方向的 K^+ 和 Na^+ 浓度梯度。 K^+ 渗漏通道使膜对 K^+ 的通透性比对 Na^+ 或其他阳离子的通透性为大。因而, K^+ 顺其浓度梯度漏出细胞外。结果, 相对于外侧(细胞外空隙), 内侧(细胞质)就带负电。除 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 外, 还有其他阳离子和阴离子存在, 它们的含量使得除靠近质膜两侧表面外, 阳离子总浓度和阴离子总浓度恰相平衡。

mV 到 -200mV 之间)。例如, 许多质膜对 Cl^- 是通透的, 因而 Cl^- 对膜电位的产生也起了重要作用。

质膜上普遍存在的 Na^+ - K^+ 泵是一种 ATP 酶²⁷

几乎所有动物细胞质膜都含有 Na^+ - K^+ 泵。它的作用是对向转运, 主动地逆浓度梯度把 Na^+ 泵出细胞外, 把 K^+ 摄入细胞内(对于 Na^+ 来说, 还逆着电梯度)。由 Na^+ - K^+ 泵维持的 Na^+ - K^+ 浓度梯度不仅能产生和维持膜电位, 而且还控制细胞容积和驱动糖及氨基酸的主动运输(见后)。因此, 动物细胞中三分之一以上的能源都被 Na^+ - K^+ 泵所消耗, 这也就毫不足怪了。在有电活动的神经细胞中, 每次去极化后都需重建膜电位, 消耗的能量高达细胞总能量需求的 70%。

在对 Na^+ - K^+ 泵的认识上的一个主要进展是 1957 年发现了一种酶, 它能催化 ATP 水解为 ADP 和磷酸, 但需要 Na^+ 、 K^+ 才能充分发挥其活力。一个把 Na^+ - K^+ ATP 酶和 Na^+ - K^+ 泵联系起来的重要线索, 是人们观察到一种已知的 Na^+ - K^+ 泵的抑制剂乌本苷也可抑制 Na^+ - K^+ ATP 酶。但是 ATP 的水解提供能量来驱动 Na^+ - K^+ 泵的最主要证据是来自对红细胞空壳的研究。在研究中, 可以改变膜任何一侧的离子浓度、ATP 和药物, 因而可以观察这些改变对离子转运和 ATP 水解的效应。实验中发现: (1) Na^+ 、 K^+ 转运是和 ATP 水解紧紧偶联在一起的, 缺一方面另一方面就不能发生; (2) 仅当 Na^+ 和 ATP 存在于细胞空壳内, 而 K^+ 存在于细胞空壳外时才能发生离子转运和 ATP 水解; (3) 乌本苷必需存在于细胞外侧才起抑制作用。在外侧, 它和 K^+ 竞争结合部位; (4) 每个 ATP 分子的水解(一个 ATP 酶分子每秒钟可水解 100 个 ATP 分

子)泵出 3 个 Na^+ , 摄入 2 个 K^+ (图 6-53)。

虽然以上实验提供了令人信服的证据说明 ATP 为泵动 Na^+ 、 K^+ 通过质膜提供能量, 但它并不能解释 ATP 水解时是如何和离子转运偶联在一起。人们发现 ATP 的末端磷酸基团在 Na^+ 存在的条件下转移到 ATP 酶的天冬氨酸残基上, 这一事实也为此提供了部分解释。这个磷酸基团随后又在 K^+ 存在的条件下被水解, 正是这最后的一步可以被乌本苷所抑制。依赖 Na^+ 的磷酸化过程可能改变了 ATP 酶的构象, 其结果就是把 Na^+ 转运出细胞外。而依赖 K^+ 的去磷酸化过程则导致 K^+ 的摄入并使 ATP 酶回复到原来的构象 (图 6-54)。实际上, 红细胞空壳上的 Na^+ - K^+ 泵是可以逆转的: 如果 Na^+ - K^+ 浓度梯度升高到 Na^+ - K^+ 泵不能对付的程度时, 这些离子就顺着浓度梯度流动, 在细胞空壳内由 ADP 和磷酸合成 ATP。这也提示, 磷酸化的 ATP 酶具有处于高张力下的构象, 它松弛并放出能量(和磷酸), 或者把 K^+ 泵入空壳, 或者(当 Na^+ 、 K^+ 浓度梯度极大时)合成 ATP。

目前, Na^+ - K^+ ATP 酶已经提纯, 发现它由一个跨膜的催化亚基(约 100 000 道尔

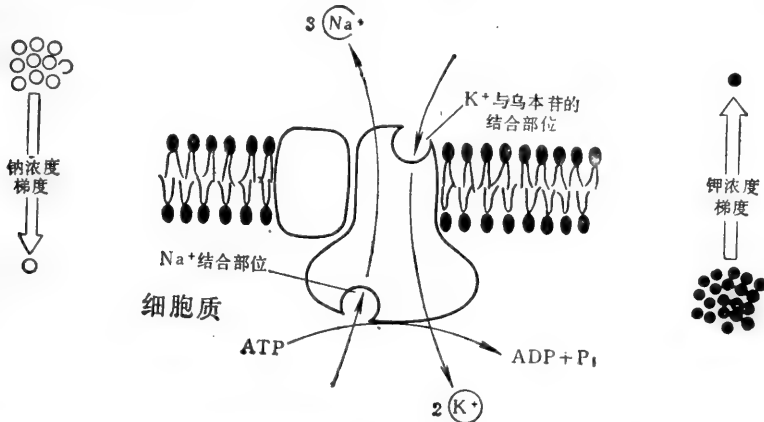


图 6-53 Na^+ - K^+ ATP 酶逆浓度梯度主动摄入 K^+ 、泵出 Na^+ 的示意图。每个 ATP 分子水解时, 排出三个 Na^+ , 摄入两个 K^+ 。注意乌本苷和 K^+ 竞争 ATP 酶外侧的同一部位。虽然 Na^+ - K^+ ATP 酶在这里画成二聚体, 膜中可能存在的至少是个四聚体, 由两个大亚基和两个小亚基所组成。

顿)和一个与催化亚基相联的糖蛋白(约 45 000 道尔顿)组成。前者的胞质面有 Na^+ 及 ATP 的结合部位, 外侧面有 K^+ 及乌本苷的结合部位, 它可逆地磷酸化和去磷酸化。糖蛋白的功能不清楚。用下述方法, 可以用提纯的 ATP 酶重建为有功能的 Na^+ - K^+ 泵: 把 ATP 酶溶解在去垢剂中纯化, 然后和适当的磷脂混合; 把去垢剂用透析法去除后, 就可形成膜小泡, 这些小泡在 Mg^{2+} 和 ATP 存在的条件下, 可以向相反的方向泵动 Na^+ 和 K^+ (图 6-55)。

Na^+ - K^+ ATP 酶可通过调节细胞内溶质的浓度来调节细胞容积²⁸

由于 Na^+ - K^+ ATP 酶每摄入 2 个 K^+ 要泵出 3 个 Na^+ , 因而它是“生电的”(electrogenic); 即具有在质膜两侧建立膜电位的趋势, 使细胞内比起细胞外呈电负性。这样, Na^+ - K^+ ATP 酶对膜电位的产生有少许(20%)直接作用。然而, 正如我们已经知道的那样, 大部分(80%)膜电位是由 Na^+ - K^+ ATP 酶维持的 Na^+ 、 K^+ 浓度梯度

加上膜对 K^+ 的通透性比对 Na^+ 或其他阳离子为大这两方面来维持的。

Na^+-K^+ ATP 酶也协助调节细胞容积。这是因为它可以控制细胞内容质的浓度,从而可改变渗透压使细胞膨胀或皱缩。在细胞内的大分子可对质膜产生渗透压的作用。此

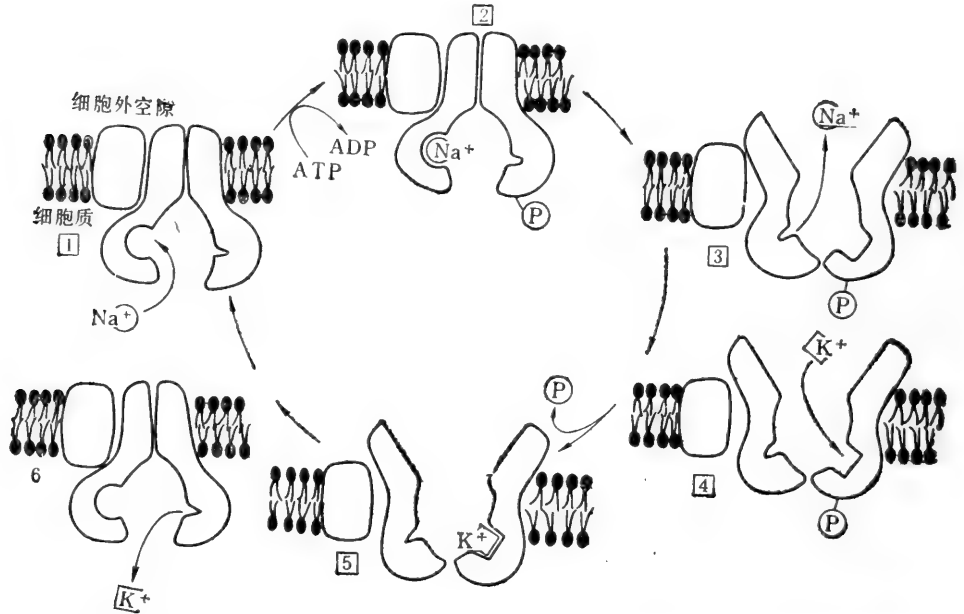


图 6-54 Na^+-K^+ ATP 酶的简化模型 Na^+ 的结合在 ATP 酶的胞质面上(1)以及后者的磷酸化(2)导致 ATP 酶的构象变化,因而把 Na^+ 运过膜释放在外侧(3)。然后 K^+ 的结合在外表面(4)及随后的去磷酸化(5)又使酶恢复原有构象而把 K^+ 运过膜, 释放在胞质中(6)。这些变化和图 6-51 所示的“乒乓”变换相似。所不同的是这些变化过程中有酶的磷酸化和去磷酸化, 它使图示的转变顺序进行而使酶能有效地工作。

外,这些大分子多数是带电的,它必然伴有带相反电荷的离子比如 Na^+ 的存在,这更增加了渗透压作用。作用在质膜内表面的渗透压被细胞外液的溶质分子(主要是 Na^+ 和 Cl^-) 造成的渗透压所平衡。然而, Na^+ 、 Cl^- 有顺浓度梯度进入细胞的倾向,可能破坏平衡并引起细胞肿胀。 Na^+-K^+ ATP 酶恰好解决了这一问题: 它把渗入的 Na^+ 离子直接泵出细胞,同时通过维持细胞内的电负性来抗衡 Cl^- 的浓度梯度的作用,阻止了 Cl^- 离子内渗。

Na^+-K^+ ATP 酶在控制细胞容积中起了重要作用。这一点是通过以下观察得到证实的: 如果用抑制 Na^+-K^+ ATP 酶的乌本苷处理动物细胞,细胞就会肿胀,有时还可能胀破。当然,细胞还可利用其他方式解决渗透压问题: 植物细胞和细菌质膜外有一层较硬的细胞壁可防止细胞被胀破;变形虫则把由渗透压引起的多余水分收集在收缩泡里,再定期排放到细胞外去。但是,对大多数多细胞动物的细胞来说, Na^+-K^+ ATP 酶是至关重要的。图 6-56 表示有细胞壁的细胞和无细胞壁的细胞对高渗液和低渗液的反应。

某些 Ca^{2+} 泵也是与膜结合的 ATP 酶²⁹

在真核细胞的胞质中 Ca^{2+} 浓度维持在很低 ($\leq 10^{-7}mol/L$) 的水平上,而细胞外

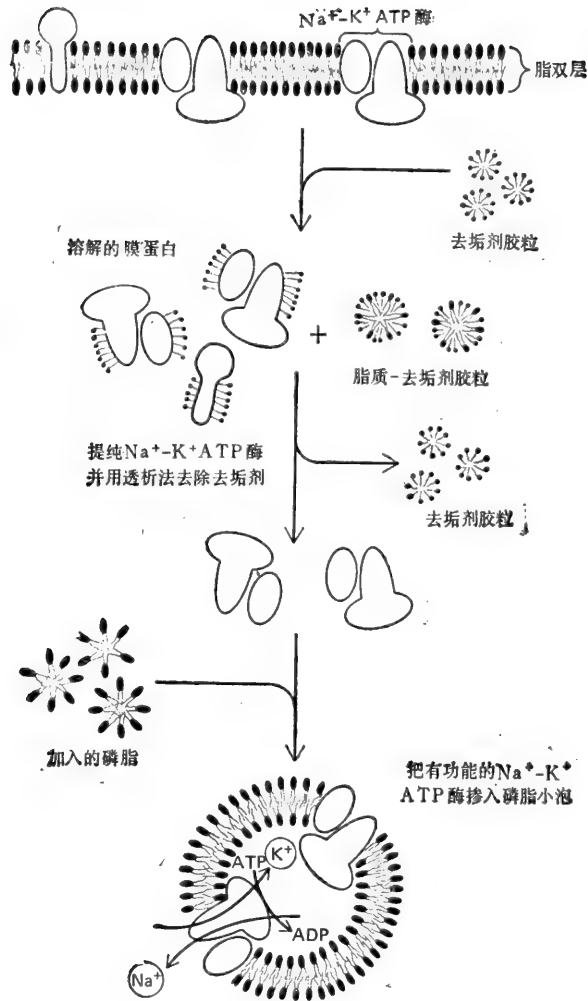


图 6-55 溶解、提纯和重建在磷脂小泡上有功能的 Na^+-K^+ ATP 酶分子。重建是在高浓度的 Na^+ 和 ATP 的条件下进行的。因而这些分子在小泡内部达到足够的浓度,使 ATP 酶能发挥泵的作用。

Ca^{2+} 浓度却高得多(约 10^{-3}mol/L)。接受细胞外信号时, Ca^{2+} 顺着它显著的浓度梯度流入细胞;而这种流动是把细胞外信号穿过质膜传入细胞内的一种重要方式。 Ca^{2+} 的浓度梯度部分是由质膜上的 Ca^{2+} 泵所维持的, Ca^{2+} 泵可以把 Ca^{2+} 主动地泵出细胞外。虽然目前已经知道一部分 Ca^{2+} 泵也是 ATP 酶,但它一直未被分离提纯,同时对它的结构和功能也了解得不多。

对肌细胞肌质网上类似的膜结合 Ca^{2+} 泵则知道得要多一些。肌质网在肌细胞内形成精细的管状网络,并是细胞内储存 Ca^{2+} 的场所。 Ca^{2+} 泵的作用是把 Ca^{2+} 从细胞质泵入肌质网中(当神经冲动使肌细胞去极时, Ca^{2+} 从肌质网释放到胞质中,刺激肌肉收缩)。像 Na^+-K^+ 泵一样, Ca^{2+} 泵也是 ATP 酶,在它的泵周期中,也有磷酸化和去磷酸化现象。每个酶分子在它的胞质面上每秒钟可水解 10 个 ATP 分子,而在每个 ATP 分子水解时,把两个 Ca^{2+} 泵入肌质网。由于 Ca^{2+} ATP 酶是肌质网上唯一的主要蛋白

质(约占总蛋白质的 90% 左右),它比较容易提纯。它是一条包含 1 000 个氨基酸残基的多肽链;如把它掺入磷脂泡(像上述处理 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP 酶一样),当这种 ATP 酶水解 ATP 时就可泵入 Ca^{2+} 。

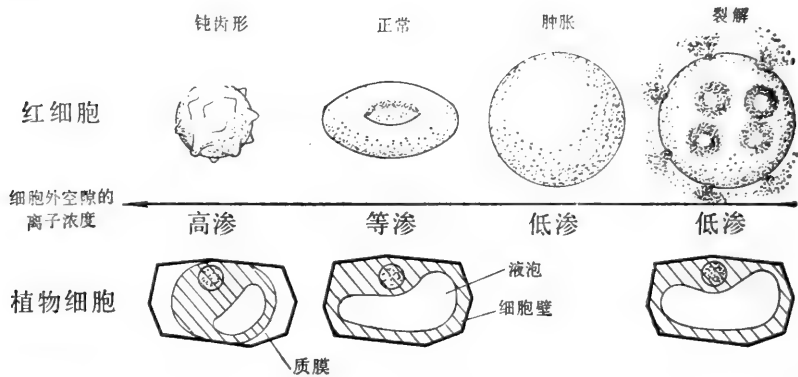


图 6-56 人红细胞和植物细胞对细胞外液渗透压改变的反应。红细胞在低渗液中膨胀直至裂解,而植物细胞则由于细胞壁的保护而不会发生类似现象。两种细胞都在高渗液中皱缩,植物细胞膜还从细胞壁上缩离。

合成 ATP 的膜结合酶是反向工作的转运 ATP 酶³⁰

在厌氧菌的质膜、真核细胞的线粒体和叶绿体内膜上,都发现了和上述的转运 ATP 酶相类似的酶。但它们在正常部位的正常作用正好相反:它们不是由 ATP 水解而驱动离子转运(如 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP 酶和 Ca^{2+} ATP 酶),而是膜两侧的 H^+ 浓度梯度驱动由 ADP 和磷酸合成 ATP。因此,这些酶被称为 ATP 合成酶。 H^+ 浓度梯度是由氧化磷酸化(在细菌和线粒体中)或光合作用(在叶绿体中)形成的;在盐生盐杆菌中,则由光激活的 H^+ 泵(细菌视紫红质)形成。在所有以上的这些例子中,酶都可以朝任一方向工

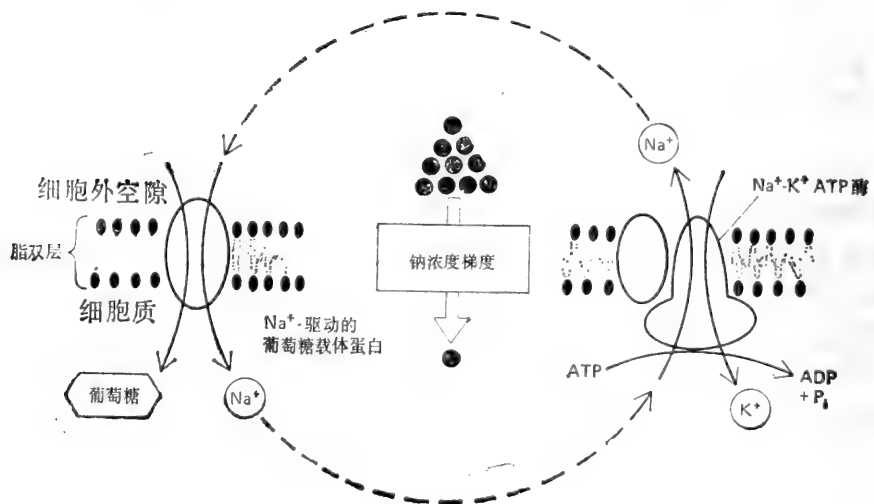


图 6-57 葡萄糖同向转运的示意图,表明葡萄糖的主动运输怎样被 Na^+ 浓度梯度所驱动,而此浓度梯度则由 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP 酶产生和维持。

作，这主要依赖于所给的条件：它既可以水解 ATP 并泵动 H^+ 通过膜，也可以当 H^+ 以相反方向流过酶的时候合成 ATP。这些酶将在第九章详细讨论。

主动运输可以由离子梯度驱动⁴

很多主动运输系统是用贮存在离子梯度中的能量来驱动，而不是直接由 ATP 水解而驱动的。所有这样的系统都属于共转运系统——有些是同向转运，有的是反向转运。动物细胞的共转运离子通常是 Na^+ 。例如，动物细胞能主动摄入某些糖和氨基酸就是由 Na^+ 的跨膜梯度供能的。肠细胞和肾细胞主动吸收葡萄糖也是由一个同向转运系统完成的。即葡萄糖和 Na^+ 结合在葡萄糖载体蛋白的不同部位上； Na^+ 顺电化学梯度流入细胞，因而，在某种意义上说，把葡萄糖也“拉进了”细胞。 Na^+ 浓度梯度越大，葡萄糖进入的速率越快。相反，如果细胞外液的 Na^+ 浓度明显降低，葡萄糖转运也就停止。和葡萄糖同时进入细胞的 Na^+ 由 Na^+-K^+ ATP 酶泵出，以维持 Na^+ 梯度，故 Na^+-K^+ ATP 酶也间接地参与驱动葡萄糖的转运（图 6-57）。图 3-61 的假设模型（可能过于简单）表示这个同向转运系统是怎样工作的。

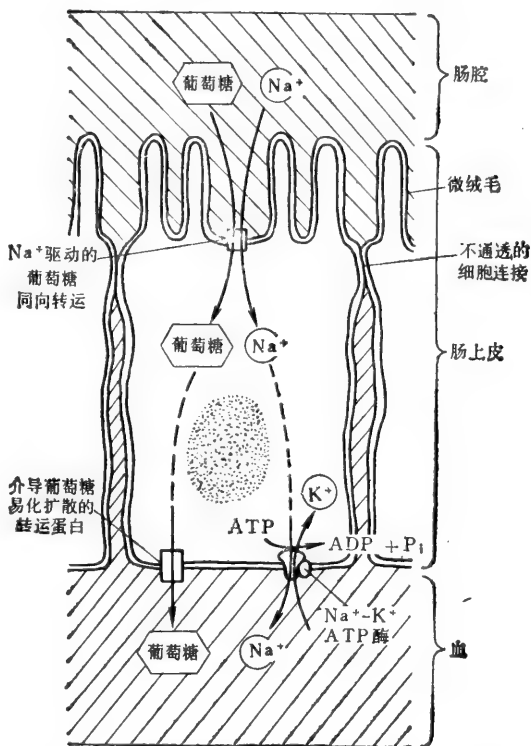


图6-58 肠上皮细胞转运蛋白的不对称分布造成葡萄糖从肠腔到血液的跨细胞转运。 Na^+ 驱动的葡萄糖同向转运系统把葡萄糖经细胞顶面膜泵入细胞内，然后由存在于细胞侧面和底面膜上一个不同的葡萄糖载体蛋白的介导，把葡萄糖以易化扩散的形式顺浓度梯度排出细胞。驱动葡萄糖同向转运的 Na^+ 梯度由底面和侧面质膜上的 Na^+-K^+ ATP 酶维持，这个酶使内部的 Na^+ 保持在低浓度的水平。

许多动物细胞质膜上至少有 5 种不同的氨基酸载体蛋白（每种载体对应一组密切相关的氨基酸），它们和 Na^+ 组成同向转运系统。 Na^+ 也可驱动反向转运系统。例如，当海胆卵受精时，细胞内 pH 值大幅度升高，激活卵内蛋白质和 DNA 的合成；pH 的这个变化是由 Na^+ 内流驱动 H^+ 外流造成的。

在许多细胞中，与 Na^+ 偶联的载体蛋白把代谢物（如糖和氨基酸）带进细胞。然而，在某些上皮细胞，比如那些参与从肠腔中吸收营养物质的细胞，转运蛋白在质膜上的分布是不对称的，从而有助于吸收物质的跨细胞转运（transcellular transport）。像图 6-58 所示那样，与 Na^+ 偶联的同向转运系统存在于上皮细胞顶面的质膜上（吸收面），把营养物质转运进细胞。而细胞的底面和侧面质膜上则有不依赖 Na^+ 的转运蛋白，它让营养物质顺浓度梯度离开细胞。这些细胞质膜两侧的 Na^+ 浓度梯度则由底面和侧面膜上的 Na^+-K^+ ATP 酶维持。肾和肠上皮细胞也采用类似的机制把水从一个细胞外空隙泵到另一细胞外空隙。

在许多上皮细胞中,质膜面积由于形成数以千计的微绒毛而大量增加。微绒毛是顶面上很细的指状突起(图6-58),它可使细胞总吸收面积增加 25 倍之多,因而也大大提高了细胞的转运能力。

在细菌中大部分由离子梯度驱动的主动运输系统是用 H^+ 而不用 Na^+ 作为共转运离子。例如,把绝大部分糖和氨基酸摄入细菌中是由质膜两侧的 H^+ 离子梯度驱动的。乳糖载体蛋白(透性酶或称M蛋白)是研究得最透彻的一种蛋白质。它是一个单一的跨膜蛋白(30 000 道尔顿),起着与 H^+ 同向转运一样的功能;转运进细胞一个乳糖分子需要一个质子的协同转移。

细菌的主动转运可以通过“基团转移”来完成,还可能通过水溶性结合蛋白的介导^{24,25}

迄今为止,我们已经知道主动转运可由光(如细菌视紫红质)、ATP 水解或者离子梯度来驱动。从理论上讲,还可以有第四种方法,那就是以某种方式去改变分子使其不能从它进入细胞的同一通道逸出,从而“抓住”了这个分子。事实上,某些细菌用的是这样一种称作基团转移的机制。例如,在某些细菌中,糖类的主动运进质膜涉及到糖的主动磷酸化。由于它被离子化而不能再漏出,其结果是糖的磷酸化物聚积在细胞内。此外,通过把转运进来的糖磷酸化,细胞内未磷酸化的糖的浓度一直维持很低,因而糖的浓度梯度不断地推动糖分子进入细胞。研究得最多的系统是细菌,它的磷酸化机制很复杂,至少包括四个膜蛋白,并且用的是

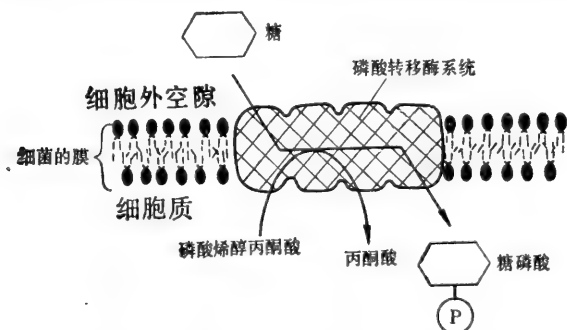


图6-59 细菌通过基团转移方式主动运输。细菌膜蛋白中的特殊磷酸转移系统在糖经过膜时把糖磷酸化。磷酸根供体是磷酸烯醇丙酮酸,而不是 ATP。

磷酸烯醇丙酮酸(而不用 ATP)作为高能磷酸根的供体(图6-59)。

在细菌中,很多糖和氨基酸的主动运输系统包括一组特殊的水溶性蛋白质。它们存在于质膜和细胞壁之间的空隙——质周空隙(periplasmic space)。这些蛋白质有具有结合溶质分子的特殊结合部位,因此称为质周结合蛋白(periplasmic binding protein)。虽然它们的全部氨基酸顺序甚至三维结构都已确定,但是它们到底怎样发挥作用还不清楚。总之,除结合蛋白外,至少还有一种蛋白质是转运所需要的,可能是每种结合蛋白把与它结合的溶质传给一特定的跨膜转运蛋白,但这还有待于证实。

起转运作用的结合蛋白似乎还在趋化性中起受体的作用。趋化性是一个很重要的过程,它使细菌朝特定营养物质浓度增高的方向运动。在趋化过程中,很多不同的结合蛋白会聚集在那些较少的把信号传到细胞内部的膜蛋白上。这样做是有意义的,因为在转运过程中许多结合蛋白共用少量跨膜蛋白是符合节约原则的。

某些跨膜蛋白通道是“受控”的,仅瞬时开放²⁶

我们知道,在被动运输中有两类膜转运蛋白起作用:(1) 具有膜结合酶特性的载体蛋白;(2) 可以让体积和电荷合适的溶质分子以简单扩散形式通过的疏水性跨膜通道蛋白。

与载体调节的转运的不同处是,经被动通道转运蛋白质是不会饱和而没有 V_{max} , 它的速率可以比易化扩散时快得多(见图 6-50)。

一些转运蛋白形成的通道是持续开放的, 而另一些则只是瞬时开放的。后者可称为是“受控”的。某些“受控”通道仅当细胞外的配体与细胞表面的特定受体结合时才开放, 这样的通道称为配体调控通道 (ligand gated channels)。另一些仅在膜电位变化时才开放, 因而称电压调控通道 (voltage gated channels) (图 6-60)。还有一些是当细胞内特定离子浓度变化时开放, 例如, 胞液中游离 Ca^{2+} 浓度增加时, 某些 K^+ 通道才开放。

大多数情况下, 受控通道有自动关闭的机制。它能迅速关闭, 即使当起初引起通道开放的刺激还继续起作用时亦是如此。考虑一下神经肌肉接头, 在那里沿神经传来的冲动刺激肌肉收缩, 这一看来很简单的反应至少包含着四种不同“受控”通道的顺次开放和关闭, 而这一切发生在不到一秒钟的时间内(图 6-61)。

1. 当神经冲动到达神经终板时, 就启动了这个过程; 膜电位的下降(去极化)使这个终板上质膜的 Ca^{2+} 电压调控通道瞬时开放。因为细胞外 Ca^{2+} 浓度总比细胞内游离 Ca^{2+} 浓度高 1000 倍以上, 因而 Ca^{2+} 就会涌进终板内。刺激终板分泌神经递质——乙酰胆碱。

2. 释放的乙酰胆碱结合在对侧肌细胞质膜的乙酰胆碱受体上。这些受体是配体调控阳离子通道, 可让 Na^+ 、 K^+ 通过。当该通道和乙酰胆碱结合后, 它能瞬时开放。由于细胞外的 Na^+ 比细胞内高得多, 而 K^+ 则相反, 所以当通道开放时(约为 1 ms), 就有 Na^+ 的净流入和 K^+ 的净流出。因 Na^+ 的跨膜电化学梯度较大, 由乙酰胆碱激活的通道所流入的 Na^+ 就大大超过流出的 K^+ , 因而肌细胞膜产生局部去极化。

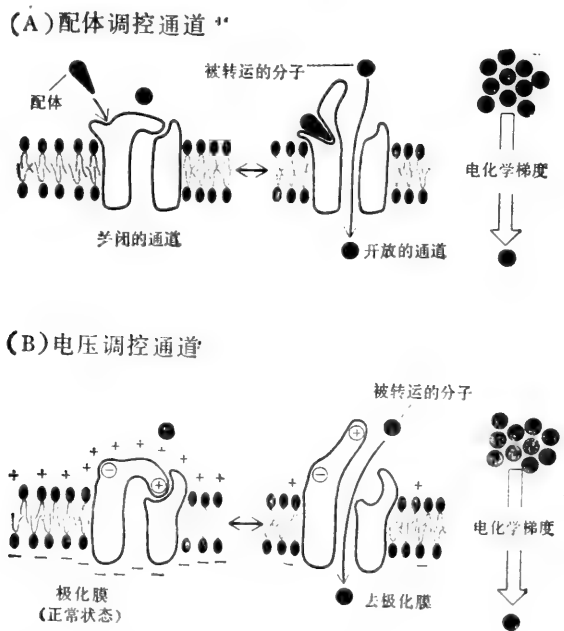


图 6-60 两类受控离子通道的示意图。通道只有当蛋白质处于“开放”构型时才容许离子顺电化学梯度流动。(A)所示的通道是配体调控通道, 当细胞外配体与它结合时(或结合到与它相联的膜蛋白上)它才开放。而(B)所示的通道是电压调控通道, 当膜去极化时才开放。

3. 同一肌细胞膜上还含有其他主要让 Na^+ 通过的蛋白质通道。当肌细胞膜发生去极化时,这些 Na^+ 的电压调控通道可短暂开放,让 Na^+ 涌进细胞使细胞膜进一步去极化。而这个去极化又使更多的 Na^+ 电压调控通道开放,其结果形成一个去极化波(称为动作电位)扩散到整个肌细胞膜。

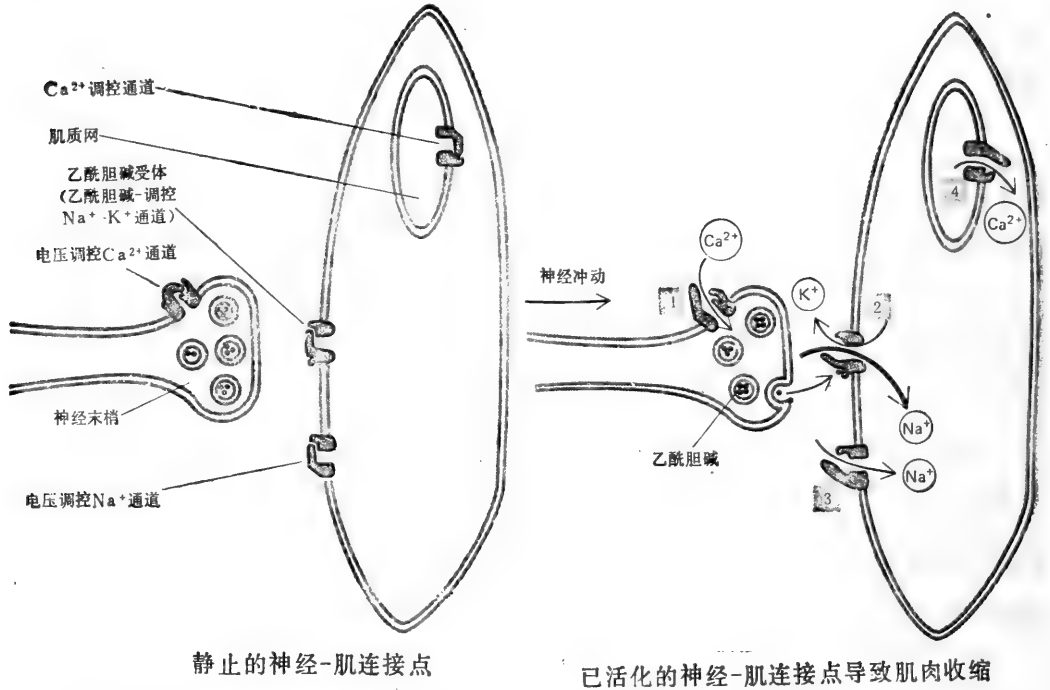


图 6-61 神经肌肉接头的示意图。表明由神经冲动引起肌肉收缩过程中有关的几种受控通道。数字表示不同受控通道的开放顺序。

4. 由于这个动作电位,又引起肌质网膜上的 Ca^{2+} 通道瞬时开放,使 Ca^{2+} 逸入胞质中。正是由于细胞内 Ca^{2+} 浓度的突然增加就引起细胞内肌原纤维的收缩。

因为细胞内 Na^+ 或/和 Ca^{2+} 电压调控通道可以产生动作电位,它们就被认为有“电活性”的。但是,配体调控通道并不是只局限在电活性细胞中,它可能存在于许多真核细胞质膜上,其功能是把细胞外信号传入细胞内。

离子通道的不对称分布可产生离子流使细胞具有极性³³

虽然大多数细胞具有明确的极性,一端的形态和功能与另一端有差别,但这些细胞如何会“知道”哪里是前面,哪里是后面,至今仍完全是个谜。有证据表明,质膜上离子通道的不均匀分布可产生细胞内的离子流而有助于细胞极性的建立。例如,在普通褐色海藻墨角藻 (*Fucus*) 的卵中存在着可测得到的从顶极流向底极的电流。这个电流的产生与维持可能是由于在顶极有 Ca^{2+} 的被动流入以及在其他部分有 Ca^{2+} 的主动排出。此点反映了在质膜上可能有 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} 泵的不对称分布(图 6-62)。这个电流流过卵,通过电泳作用,使细胞内高度带电的物质移动。有证据表明,这电流使细胞质定向从而影响以后的胚胎发育。尽管一个典型的体细胞比卵细胞小得多,但如因膜转运蛋白分布不对称而引起细胞内局部的离子流动促使某些体细胞带有极性,那也就不足为怪了。

离子载体可增加人工合成膜和生物膜对离子的通透性^{23,24}

离子载体是一些疏水性的小分子，溶解于脂双层中增加脂双层对离子的通透性。绝大多数离子载体是由微生物合成的(可能是一种用于削弱其竞争对手的生物武器)，其中一些已用作抗生素。它广泛用于研究人工膜、细胞器，最近还用来研究完整的细胞，用以增加膜对某些特定离子的通透性。离子载体有两类——活动离子载体(mobile ion carriers)和通道构成者(channel formers)(图6-63)。它们都可以把需转运的离子的电荷屏蔽起来，从而使离子可以通过脂双层的疏水性内部。由于它们不和能源偶联，所以它仅能让离子顺着电化学梯度流动。

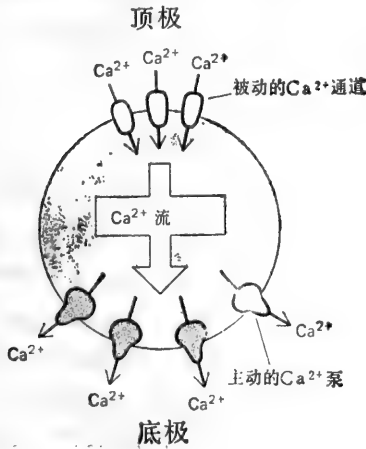


图6-62 表明墨角藻卵质膜上转运蛋白的不对称分布产生细胞内电流的示意图。有人认为电流有助于使卵细胞极化，因而影响以后的胚胎发育。

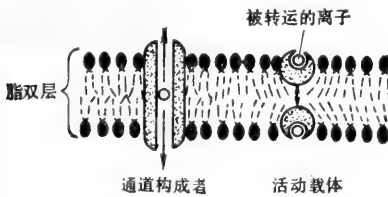
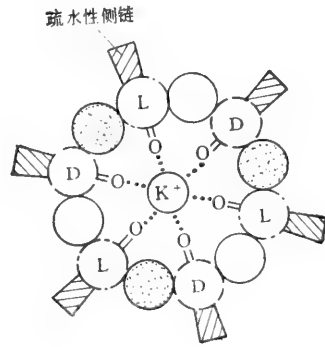


图6-63 活动离子载体和构成通道的离子载体的示意图。两种载体都仅仅在顺电化学梯度时才产生净的离子流。



- D-羟基异戊酯
- L-乳糖
- D
- L

图6-64 缬氨霉素环状结构，中央有6个氧原子与K⁺结合。

缬氨霉素是活动离子载体的一个例子。它是一个环状的多聚体，可增加膜对K⁺的通透性。环状分子外部是疏水的(由缬氨酸侧链组成)，它和脂双层的碳氢化合物核心接触，而极性的内部则恰好可容纳一个K⁺(图6-64)。缬氨霉素顺着电化学梯度转运K⁺，其方法是在膜的一侧结合K⁺，以扩散的形式穿过膜，在膜的另一侧释放K⁺。由于它在两个方向上来回穿梭，所以仅当向某侧移动的载体结合的钾离子比另一侧多时，才会有净的转运。

离子载体A23187是活动离子载体的另一个例子。但它转运的是两价阳离子如Ca²⁺和Mg²⁺。在平常所见的低浓度时，这种离子载体是一种离子交换运输工具，每把一个两

价阳离子带入细胞内,都同时带出两个 H^+ 。因而和缬氨霉素不同,它不使膜去极化。当活细胞和 A23187 接触时, Ca^{2+} 顺着显著的电化学梯度涌进胞液。因此在细胞生物学中这种离子载体广泛用于增加胞液内游离 Ca^{2+} 的浓度。

如果膜的温度低于它的凝固点,活动离子载体就不能扩散通过脂双层,转运也随之停止。这种对温度的依赖性可用于鉴别离子载体是不是活动载体。因为和活动载体相反,构成通道的离子载体即使在脂双层已经凝固时还能继续正常地转运。

短杆菌肽 A 是一种构成通道的离子载体。它是一条由 15 个氨基酸组成的线状多肽,所有氨基酸都具疏水性侧链。推想在脂双层中两个这样的分子靠在一起形成跨膜通道,选择性地只让单价阳离子顺着电化学梯度流动。这些二聚体是不稳定的,不断地形成和解离。因而,一个通道的平均开放时间只有一秒钟左右。在存在较大电化学梯度的情况下,短杆菌肽 A 的每个开放通道每秒钟可以转运 2×10^7 个阳离子。这个数目相当于相同时间内单个活动载体可能转运的离子数目的一千倍。

小结

脂双层对大多数极性分子来说是高度不通透的。为了能把这些分子运入或运出细胞,质膜含有许多特殊的转运蛋白。每种蛋白都把一种特殊的溶质运过质膜。这些转运蛋白形成穿过脂双层的连续蛋白通道。许多转运蛋白的作用与酶相类似,即它们具有与被转运的分子结合的特定结合部位。这些蛋白质称为载体蛋白。某些载体蛋白仅使被结合的溶质分子以易化扩散的形式穿过双分子层。另一些则通过 ATP 水解或者离子结合等形式引起一系列的构象变化,从而可以像泵一样逆着电化学梯度主动运输结合溶质分子。在所有动物细胞质膜上存在的一个十分重要的泵是 Na^+-K^+ ATP 酶。它利用 ATP 水解的能量主动地把 Na^+ 泵出细胞,而把 K^+ 摄入细胞。

另一类转运蛋白则在脂双层中形成一个开放通道,以简单扩散的形式让分子物质顺着电化学梯度流动。比起通道蛋白来,这些被动通道所允许跨膜流动的量要大得多。一些通道是持续开放的,另一些则是受控的,其瞬时的开闭取决于细胞外信号配体、膜电位变化或者细胞内的离子浓度。

大分子和颗粒物质的跨膜转运: 内吞和外排

虽然转运蛋白可以介导许多极性小分子通过细胞膜,但它们却不能转运大分子,比如蛋白质、多聚核苷酸和多糖等。然而,大多数细胞都能排出或摄入某些特定的大分子,使其能跨越质膜。有的细胞甚至可以吞入大颗粒。细胞完成这种功能的机制是与介导小分子溶质和离子转运的机制完全不同的。它涉及到膜结合小泡的依次形成和融合。例如,为了把胰岛素分泌出来,产生胰岛素的细胞把胰岛素分装在细胞内小泡中,然后,小泡与质膜融合,向细胞外腔开放,把胰岛素释放到细胞外。这个融合过程称外排(图 6-65)。在所有的真核细胞中,还有其他小泡也通过同样的过程把新的质膜组分从高尔基器带到质膜上。

细胞通过相似的机制摄入大分子和颗粒物质,不过顺序相反。要摄入的物质逐渐被小部分质膜包裹,然后内陷,收缩并与质膜分离形成一个包含摄入物的小泡(图 6-65)。这

这个过程称内吞。由于小泡的大小不同可把内吞分为两种类型：胞饮，它通过较小的小泡把液体和(或)溶质摄入细胞；吞噬，它通过较大的小泡(通常称液泡)把大颗粒如微生物和细胞碎片摄入细胞。大多数细胞主要通过胞饮把液体和溶质不断地摄入细胞内，只有少数特殊的吞噬细胞把大颗粒物质吞进去。由于这个原因对多数细胞来说，胞饮和吞噬这两个术语可以互换地使用。

内吞和外排的一个重要特征是分泌或摄入的大分子物质是包在小泡内的，它一般不和细胞内其他大分子或细胞器混合。通过目前尚不清楚的机理，每个小泡仅与特定的膜结构融合，这样就保证了细胞内外大分子的有秩序的运送。一个新合成的大分子在细胞

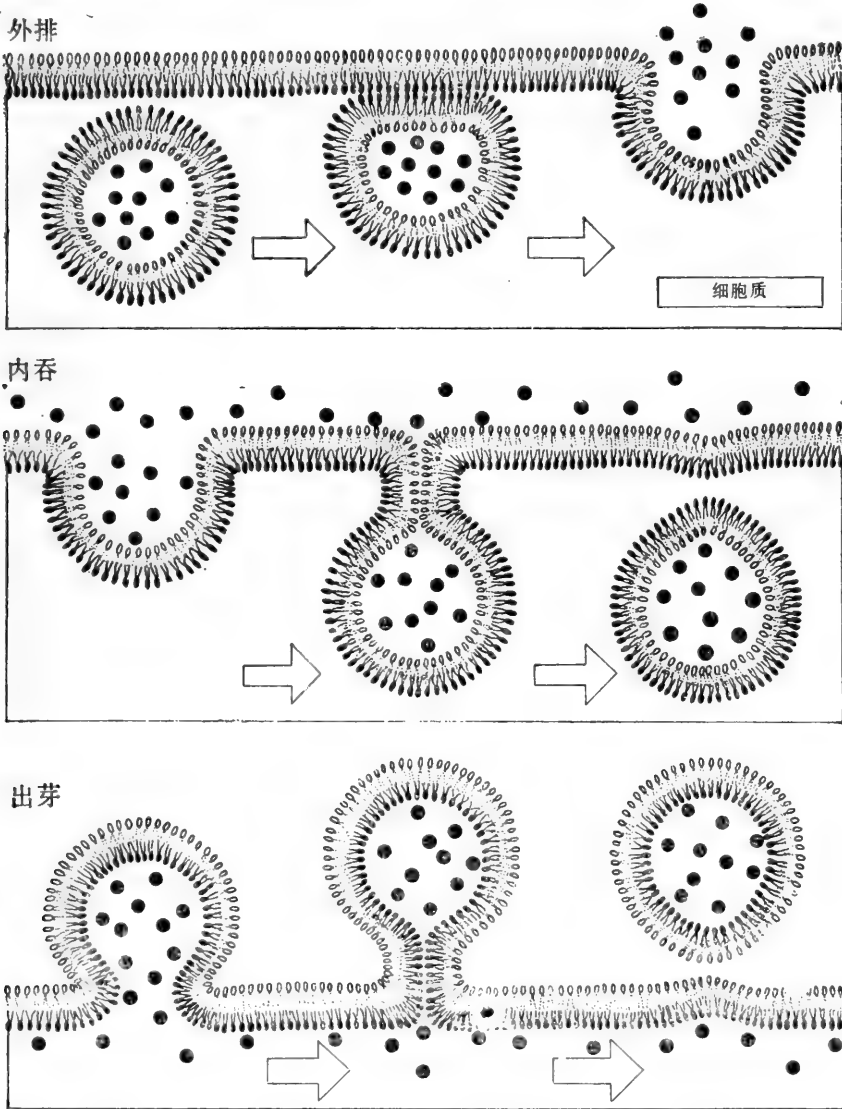


图 6-65 三种融合过程(内吞、外排和出芽)中双层的粘附和接合。内吞、外排在本章中讨论。出芽是形成胞内转运小泡的一个步骤,则在第七章讨论。注意,由于双层粘附这一步的不同,内吞和外排并非单纯的互为相反的过程。外排时,两个质膜的胞质面单层互相粘附,而内吞时,两个质膜的非胞质面单层互相粘附。推想这种差别使内吞和外排能得到分别的调节。

内不同区室间的转运与这个过程很相似；在内质网和高尔基复合体上的芽生小泡(图 6-65)可以移动并与细胞内其他内膜相融合。虽然现在已经清楚,小泡的快速和大规模的形 成和融合是所有真核细胞的一个基本特性,但是驱动和引导这些小泡沿着特定的路线 运输的分子机理还有待于探索。

细胞外排是通过胞内小泡与质膜融合的方式进行的³⁵

大多数细胞都能向外分泌大分子物质(常常也可分泌较小的分子)。在真核细胞中, 分泌几乎都是靠外排。某些分泌的大分子依附在细胞表面,成为细胞衣的一部分,还有一 些掺入到细胞外基质中,再有一些则扩散到间质液和(或)血液中作为其他细胞的营养或 者信号。

像第七章描述的那样,分泌的蛋白质是由粗面内质网(ER)上的核糖体合成的。合 成的蛋白质进入粗面内质网管腔并被粗糙内质网形成的转运小泡携带转运到高尔基复合 体上。在那里,这些蛋白质被修饰、浓缩和分类,最后装入小泡中,小泡与高尔基器分离, 最终与质膜融合(图 6-66)。相反,分泌的小分子则是主动地转运至预先已形成好的分泌 小泡内,而这一过程通常是靠离子梯度所驱动。此外小分子常常与小泡内特定的大分子 结合。这样,它能以高浓度储存而不产生过高的渗透梯度。

某些物质是不断地由产生该物质的细胞分泌出来,而另外一些物质则储存在分泌小 泡中,仅当细胞被外界信号触发时才分泌。促使分泌的信号一般是化学信号,例如激素,

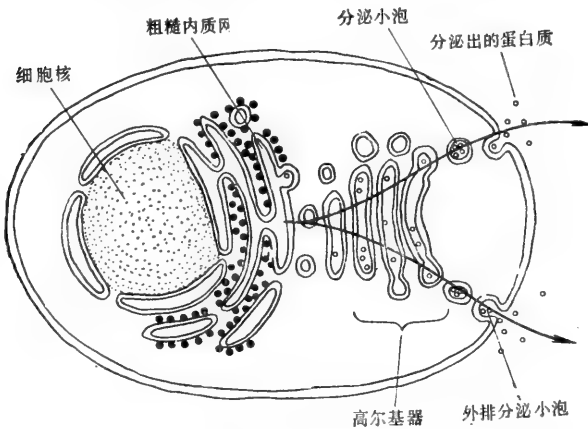


图 6 66 分泌出的蛋白质所经历的道路

它可以与细胞表面的受体相结合。受体的激活常常可引起胞 液中游离 Ca^{2+} 浓度瞬时增加,从而启动了外排的过程,使分 泌小泡与质膜融合,把它的内容物释放到细胞外。分泌小泡 的膜则掺入质膜中(图 6-65)。以后又可以通过内吞作用特 异性地回收,可能再被整合到新的分泌小泡中。临时加在质 膜上的小泡膜的量可以很大:在 胰腺腺泡细胞中,当细胞受到 刺激而分泌时,大约有 $900 \mu m^2$ 的小泡膜插入顶质膜上(而顶质膜的面积只有 $30 \mu m^2$)。

触发的外排现象是质膜和胞质的一种局部反应³⁶

触发的外排现象很可能是 Ca^{2+} 局部地作用在分泌细胞上从而引起部分胞质及其上 的质膜所起的局部反应。这个结论是由用肥大细胞所做的实验提示的。当特殊配体与肥 大细胞的表面受体相结合时,就触发肥大细胞分泌组胺。正是由于肥大细胞所分泌的组 胺才引起许多过敏反应中令人不舒服的症状,如发痒和打喷嚏。把肥大细胞放在含可溶 性刺激物的培养基中培养时,整个细胞表面都表现外排现象(图 6-67)。然而,如果将刺 激性配体吸附在固体小珠上,使它仅能和肥大细胞表面的局部区域接触,结果是肥大细胞

仅在与小珠接触的区域才有外排现象(图 6-68)。显然,当肥大细胞被触发时,并不是整个细胞都发生反应。受体的激活 Ca^{2+} 的内流,以及随后发生的外排现象,都局限在细胞受刺激的特定区域。这就证明了质膜的一个重要特性:个别部分可以不依赖于其他部分独立地起作用。

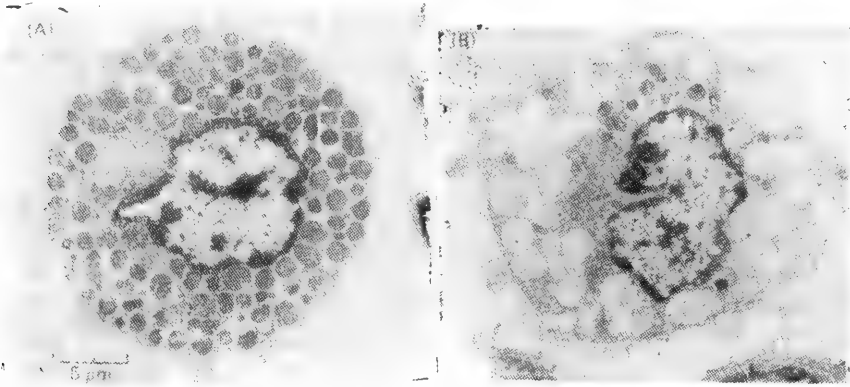


图 6-67 大鼠肥大细胞的外排现象的电子显微照片。(A)表示未受刺激的细胞;(B)表示细胞被细胞外可溶性配体激活正在分泌其内储的组胺。含组胺的小泡颜色较深,已释出组胺后的小泡颜色变淡。仍留在释放后小泡内的物质是一种大分子网络,正常情况下与储存的组胺相结合。一旦一个分泌小泡与质膜融合,它还可与细胞内一定数目的其他小泡融合。这样,肥大细胞的许多小泡可以通过与其他开放的小泡相连,间接地通向外界。其结果是,在(B)图中,细胞含有几个由许多小泡膜融合成的大腔,这些膜已与质膜连成一片。所有这些腔都与细胞外相通。然而,在细胞的某一个切面上,这种现象并不总是能看得出来。(引自 D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts, and M. Raif, *J. Exp. Med.* 142:391—402, 1975)

胞液中局部 Ca^{2+} 浓度的增高怎样会引起邻近的分泌小泡与质膜融合的呢? 因为用完全由带负电极性头部基团的磷脂所构建的脂质体可以在高浓度 Ca^{2+} ($\geq 10^{-4}$ mol/L) 介导下融合, 所以有人推论说 Ca^{2+} 本身就可以介导细胞膜的融合。然而, 在一切研究过的例子中, 都发现除 Ca^{2+} 的流入, 外排还需要 ATP。此外, 细胞内的 Ca^{2+} 浓度也不可能高到足以直接介导融合。不管是什么机制, 很可能这一过程还包括 Ca^{2+} 结合蛋白, 例如调钙蛋白(当它与 Ca^{2+} 结合后可发生显著的构象变化)。

膜融合过程包括脂双层的粘附和随后的接合³⁵

由于具有双层结构, 细胞膜横断面的电镜照片看起来像一个夹心面包, 两条平行的致密线中夹有一条明亮的空隙。当两层膜融合时, 首先它们互相紧密贴合(双层粘附), 产生一个包含 5 层的图像, 中间的致密带是由两个单层粘附在一起形成的(图 6-69)。在外排过程的电镜照片中, 这种 5 层图像只是偶然见到, 可能是由于这一过程是暂时的缘故。在融合过程中, 粘附层很快重新组合(双层接合)形成连续的膜, 使分泌小泡向细胞外空隙开放(图 6-65)。双层粘附和双层接合(它们共同组成膜融合过程)是细胞膜的一个基本的现象, 不仅发生在外排与内吞过程中, 还发生在细胞分裂和细胞融合时(图 6-70)。

内吞作用在大多数细胞中是持续进行的³⁷

几乎所有真核生物的细胞都持续不断地以内吞(胞饮)小泡的形式一点一点地摄入其

质膜。这种连续发生的(而不是诱导产生的)过程常称为固有 (constitutive) 过程。细胞外液(以及溶解在其中的一切物质)被裹在小泡中并摄入。如果将一种示踪剂 (例如从辣根中分离出来的辣根过氧化物酶)引入细胞外液中,那么这种液相内吞作用可以被观察甚至被定量。用四氧化钼固定的方法可以使辣根过氧化物酶与其底物的反应产物具有较高的电子密度。因此,如果细胞先在过氧化物酶中温育,然后冲洗,用戊二醛固定,并使之接触底物,然后用四氧化钼再次固定,那么在电镜下可很容易地看到内吞小泡内的反应产物 (图 6-71)。摄入的过氧化物酶的量与它在细胞外液中的浓度平行,且随着时间的推移而增加。

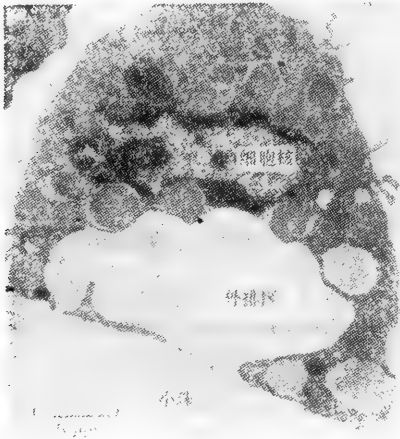


图6-68 肥大细胞的电子显微照片,它被固体小珠上的刺激物激活而分泌组胺。外排现象仅发生在与小珠接触的区域。(引自 D. Lawson, C. Fewtrell, and M. Raff, *J. Cell Biol.* 79:394—400, 1978)

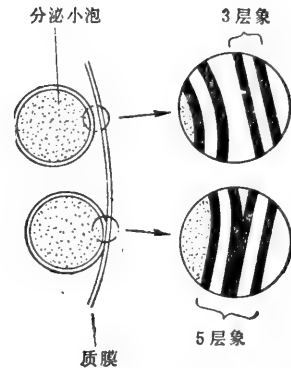


图6-69 示意图表明,当分泌小泡的双层粘附到质膜上但尚未接合之前,用电镜观察到的5层象。

固有内吞作用 (constitutive endocytosis) 的速率因细胞种类不同而异,但是这种速率是相当惊人的。例如,一个巨噬细胞每小时摄取量可达到它本身容量的 25 %。这意味着,它每分钟摄取其质膜的 3 %,或约半小时内摄取了 100 % 的质膜。成纤维细胞的内吞的速度不到巨噬细胞的三分之一,但一些变形虫摄取其质膜的速率则比巨噬细胞还要快。因为一个细胞的表面积和体积在这过程中仍保持不变,显然此时细胞必然通过外排作用持续不断地又把膜加到细胞表面上,其速率和内吞膜的一样快。鉴于速率如此之快,又无证据可以证明质膜有类似的降解速率,因此可以断定,被内吞的膜脂和蛋白质必定是反复循环并还给质膜,而不是被降解。关于质膜如何再循环,此点还不清楚;至于何种质膜成分被内摄从而参加这种大规模的再循环过程也尚未确切地知道。质膜的广泛再循环是“膜流”假设的一个基本要点,这个学说的提出是为了解释加帽现象和细胞运动。

大多数内吞小泡最后都和溶酶体融合^{37,38}

内吞小泡呈现各种形状和大小(直径通常在 50—400nm 之间),并常常通过互相融合及(或)与细胞内其他小泡融合而增大。在大多数细胞内,绝大部分内吞小泡(用上述过氧化物酶的方法看到的)最后和称为初级溶酶体的小泡融合而形成次级溶酶体,这是细胞内消化的专门场所(图 6-72)。由于溶酶体内含多种降解(水解)酶,所以当内吞小泡与初级溶酶体融合后,泡内的大多数大分子物质迅速被分解;小的分解产物如氨基酸、糖和核苷酸

等透过溶酶体膜被转运到胞质液中,在那里他们能被细胞利用。另一方面,大部分内吞小泡的膜成分不被降解;它们通过一些迄今未明的机理(可能是通过出芽过程)被回收,并(直接或间接地经高尔基器)送还到质膜上去(图 6-72)。

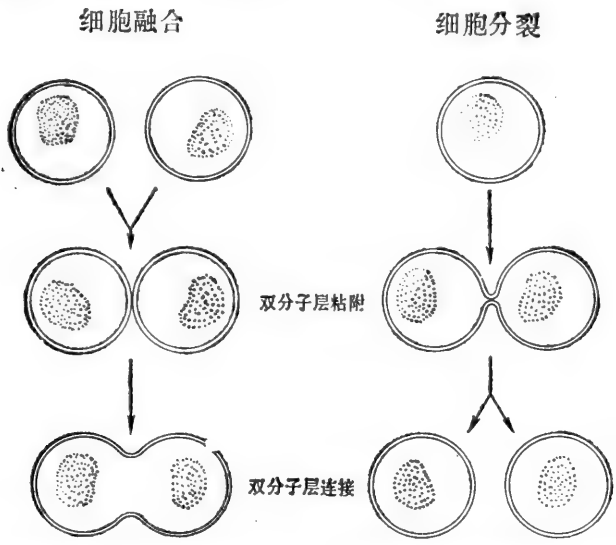


图 6-70 细胞分裂和细胞融合过程中的膜融合(包括双层的粘附和接合)。天然的细胞融合见于受精时的精、卵结合过程以及多核的骨骼肌细胞形成过程。

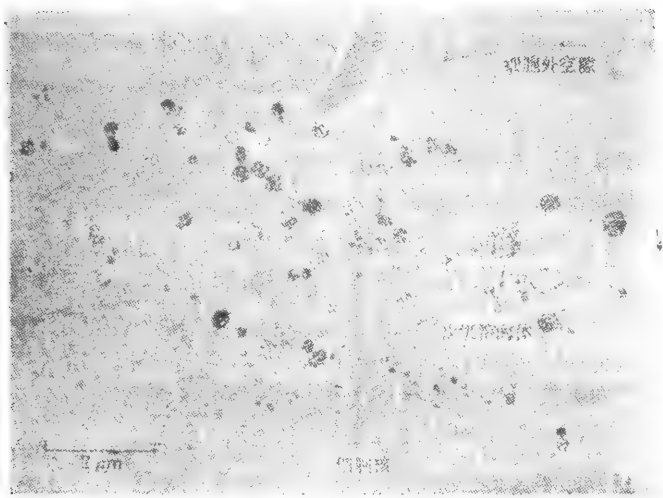


图 6-71 人工培养的成纤维细胞中的内吞小泡。细胞先在含有过氧化物酶的溶液中温育了 30 分钟。细胞经固定并与过氧化物酶的底物接触后,因其反应产物的电子密度较大,故可使内吞小泡中的过氧化物酶得以被鉴别。(Ralph M. Steinman 赠)

然而,并不是所有内吞小泡都与溶酶体融合。在某些细胞中,一些特化的内吞小泡穿越细胞质并通过外排作用将其内容物释放到细胞的其他表面上。这些小泡绕过溶酶体将物质从细胞的一个表面往返运输到细胞的另一表面。这种横越细胞的转运方法是小血管内皮细胞采用的方法之一,它们把物质从血流中转送到细胞外液中去。在脊椎动物的内皮细胞,这一过程是由直径为 70nm 的小泡所介导的,这些小泡有时彼此互相融合并与细胞表面融合,形成一种横越细胞的衬膜的通道。

许多内吞小泡都有衣覆盖³⁹

大多数真核细胞都含有一种特殊类型的小泡,这种小泡直径在 50—250nm 之间,常规电子显微镜下显示在其胞质表面有毛状结构覆盖(图 6-73)。其中某些有衣小泡据认为是参与细胞内细胞器之间的泡性转运,而另一些则是通过质膜有衣区的内陷继之与膜分离而持续不断产生的:这些有衣区称为有衣小凹(coated pit)(图 6-73 和图 6-74),约占培养成的成纤维细胞表面积 2%。在形成的数秒钟内,内吞有衣小泡失去其外衣,然后和细胞内的其他小泡融合。最后,大多数小泡将其内容物转送到初级溶酶体中去。

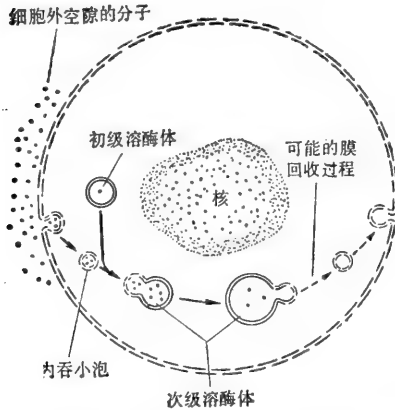


图6-72 内吞小泡与初级溶酶体融合形成次级溶酶体的过程。虽然在这里并未画出,但人们认为大多数内吞小泡先与细胞质内其他小泡融合后才与溶酶体融合。图的右侧显示从次级溶酶体选择性地回收内吞小泡的膜,再直接送回到质膜上去,不过这仅仅是可能的回收途径之一(图 6-77 还显示另一种途径)。

有衣小泡现已分离出,人们发现泡膜含有一些主要蛋白质。其特征搞得最清楚的是一种称之为笼蛋白(clathrin)的蛋白质。它是一种高度保守的纤维状蛋白质(180 000 道尔顿),它和另一较小的多肽(约 35 000 道尔顿)一起在有衣小泡表面形成一种特征性的多面体覆盖物。这种覆盖物的基本单位是一种类似有三个分支的蛋白质复合体[三支架体(triskelion)],由三个笼蛋白多肽和三个较小的多肽组成。三支架体在有衣小泡表面上排列成由六边形和五边形组成的篮状网络(图 6-75)。在适合的条件下,分离出的三支架体能自动地重新组合成典型的多面体篮状物(即使没有小泡)。据认为,与有衣小泡膜相连的其他蛋白质则负责把笼蛋白外衣结合到小泡上,以及将质膜受体集聚在有衣小凹与有衣小泡中(参看下一节)。

在一些细胞内(但不是全部),这种有衣小凹常常见于胞质肌动蛋白丝束之上[这种丝束亦称为张力纤维(stress fiber)]。这种关系表明质膜上的有衣区能与细胞骨架相互作用,它使我们联想起以前在图 6-39 所示加帽过程的模型中假设的相互作用。

有衣小凹和有衣小泡为某些特定大分子的受体介导内吞作用提供了专门的通道^{39,40}

在大多数动物细胞中,有衣小凹和有衣小泡为摄取细胞外液中特定大分子提供专门的通道,这一过程称为受体介导内吞作用(或吸附内吞作用)。和细胞表面特定受体相结合的大分子经过有衣小凹进入细胞,其速率比溶于细胞外液中的物质通过液相内吞作用进入细胞要快得多。因而,受体介导内吞作用是一种选择性的浓缩机制,能使细胞摄入大量特定的配体而不需相应地摄入大量的细胞外液。

已经知道,有一个重要的过程是通过受体介导内吞作用而完成的,这就是动物细胞对胆固醇的摄取。胆固醇的摄取为细胞提供了质膜合成所必需的大部分胆固醇。如果这种摄取被阻断,胆固醇就会在血中积聚,并可导致在血管壁形成动脉粥样硬化斑块。大部分在血中循环的胆固醇是和蛋白质结合成复合物,这种复合物称为低密度脂蛋白,或 LDL。这些大的球形颗粒直径为 22nm,每个颗粒含有一个核心由约 1 500 个胆固醇与长链脂

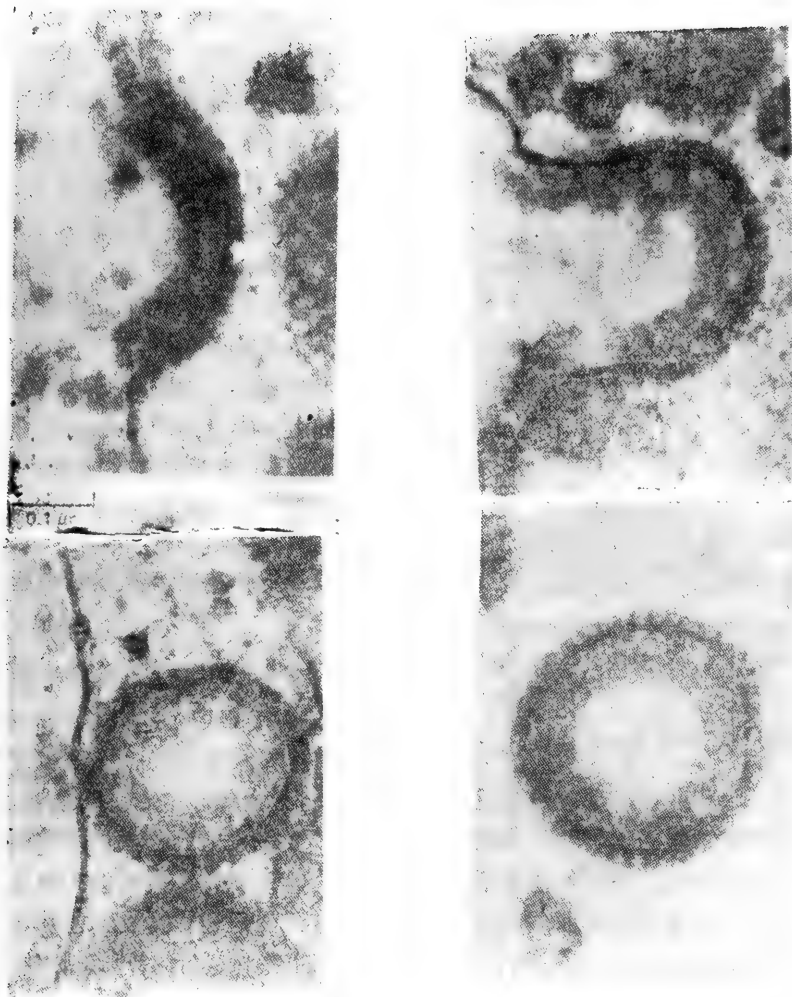


图 6-73 表示人们推想的由有衣小凹到有衣小泡的一系列形成过程的电子显微照片。图中所示为一个母鸡的大卵母细胞在形成卵黄的过程中，有衣小凹和有衣小泡摄入脂蛋白颗粒的情景。这里的小凹和小泡要比在正常细胞内所看到的大许多倍。(M. M. Perry 和 A. B. Gilbert 引自 *J. Cell Sci.* 39:257—272, 1979)

肪酸合成的酯组成；胆固醇酯的核心之外包绕着一个脂双分子层，此脂双层仅含有单一一种类的蛋白质(图 6-76)。

当动物细胞需要用胆固醇合成膜时，它就制造 LDL 受体蛋白，并将这些受体蛋白插入到细胞的质膜上去。其中大部分受体蛋白均自发地和有衣小凹连在一起。那些不与有衣小凹相连的，也因与 LDL 结合而引导移向有衣小凹。由于有衣小凹不断地脱离形成有衣小泡，所有与 LDL 受体结合的 LDL 颗粒都很快地被摄入细胞。有衣小泡很快地失去覆盖物，与其他小泡融合形成较大的泡，称为内含体；这些内含体又与初级溶酶体融合形成次级溶酶体。这样，在与细胞表面受体结合的 10—15 分钟内，LDL 被运送到溶酶体内，在溶酶体内，胆固醇酯被水解成游离胆固醇，可供细胞合成新膜之用。如果细胞内游离胆固醇积聚过多，细胞就停止自己合成胆固醇，并且停止合成 LDL 的受体蛋白，因此自制的和摄入的胆固醇均减少(图 6-77)。

在某些患者这条途径由于制造 LDL 受体蛋白的基因有缺陷而受阻,因此,他们的细胞不能从血中摄取 LDL。其结果是这些患者血中胆固醇浓度很高,从而容易引起过早地发生动脉粥样硬化,其中大多数人在早年死于冠心病。这种异常既可能由于丧失 LDL 受体与 LDL 结合的部分,也可能是由于缺少 LDL 受体与有衣小凹结合的部位。在后

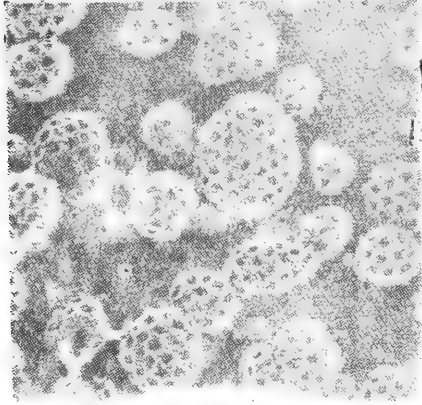


图6-74 电子显微照片显示在培养成纤维细胞质膜内表面有无数有衣小凹和有衣小泡。这些细胞先在液氮中经迅速冰冻、断裂、深度腐蚀,以暴露质膜的胞质面。(根据 JHeuser, *J. Cell Biol.* 84: 560—583, 1980 复制)

一情况下, LDL 受体蛋白的数目正常,但它们却不能集中到质膜的被膜区(图6-78)。虽然 LDL 能与这些突变型细胞的表面结合,但它们却不能进入细胞内。这直接证明了有衣小凹在胆固醇的受体介导内吞作用中的重要性。

像内吞小泡膜的其他能再循环的成分一样,进入细胞内的大多数 LDL 受体蛋白并未在溶酶体内被破坏;它们迅速地返回到质膜上去,和有衣小凹结合,并再次进入细胞内(图 6-77)。

许多细胞表面受体只有在与配体结合后才与有衣小凹结合⁴⁰

许多通过有衣小凹进入细胞的细胞表面受体在配体与它们结合之前并不自动地和有衣小凹结合。例如胰岛素的受体蛋白是弥散地分布在成纤维细胞表面的。在胰岛素与受体结合后,胰岛素-受体复合体和有衣小凹结合,并进入细胞内。也有可能是,胰岛素与受体蛋白结合后改变了受体蛋白的构象,使它能被有衣小凹的蛋白质成分所识别。在这种情形下,进入细胞内的许多胰岛素受体和胰岛素一起在溶酶体内被降解,因此细胞表面的胰岛素受体的浓度降低。通过这种称为受体向下调节(receptor down regulation)的过程,细胞外液中的激素浓度能调节其靶细胞表面的受体浓度。

并非所有的内吞作用都涉及到有衣小凹:内吞小泡也可从质膜的无衣区形成。然而,目前还不能断定有多少比例的液相内吞作用是由平滑小泡引导的,多少比例是受有衣小泡引导的。

一些大分子能直接穿过细胞膜⁴¹

虽然大多数大分子是通过内吞和外排进出细胞膜的,但还存在大分子直接穿过细胞膜的特例。在细菌中,存在着专门的通道能使 DNA 分子穿过细胞壁和质膜以利遗传交换:例如,在遗传转化过程中,某种细菌的遗传结构因它们与纯化的 DNA 分子接触而发生改变。在真核细胞中,正在合成中的分泌蛋白质可直接穿过粗糙内质网膜而转移。此外,一些细菌蛋白的毒素能穿过动物细胞膜,在胞液内发挥作用。在以上的这些例子中,大分子似乎在透过细胞膜时并未形成小泡,但其机理不明。

特化的吞噬细胞摄取与其表面特定受体相结合的颗粒^{37,42}

在原生动物中,吞噬作用是取食的一种方式:大颗粒摄入到吞噬泡,再与溶酶体融

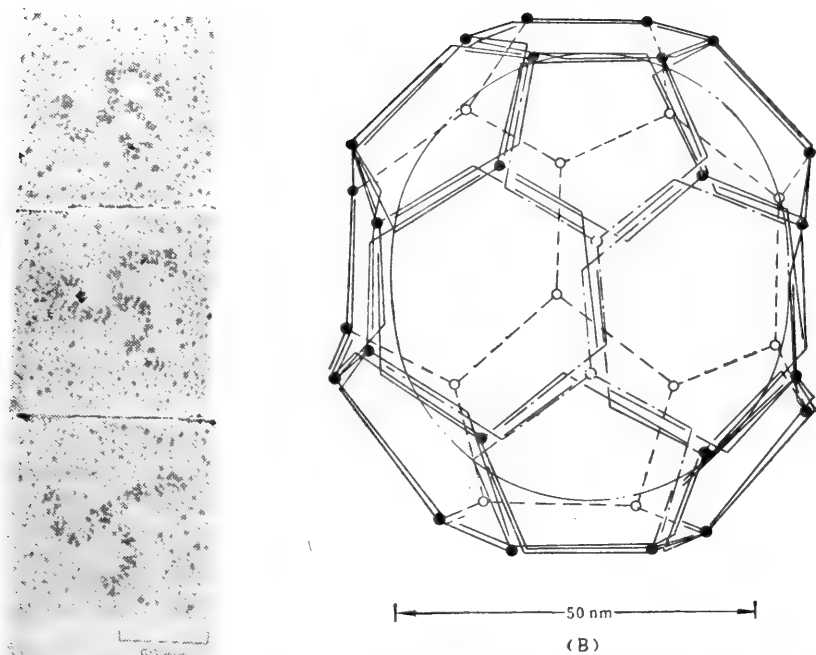


图 6-75 有衣小泡的笼蛋白外衣的结构。(A) 用铂投影的笼蛋白三支架体的电镜照片。人们认为,每一个三支架体是由 3 条笼蛋白多肽链和 3 个较小的多肽链组成的。(B) 有衣小泡胞质面上三支架体的可能排列方式。36 个三支架体组成了一个由 12 个五边形和 8 个六边形组成的网状结构。图中用点线标出两个三支架体。其他大小形状不同的被膜小泡被认为同样也是由 12 个五边形加上数量不等的六边形构成。三支架体的臂能弯曲,再加上互相重叠的排列方式,就增加了结构的力学强度与柔韧性。(A,引自 E. Ungewickell and D. Branton, *Nature* 239:420—422, 1981; B, 根据 R. A. Crowther and B. M. F. Pearse, *J. Cell Biol.* 91:790—797, 1981)

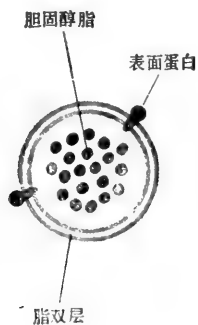


图 6-76 低密度脂蛋白(LDL)颗粒横断面的示意图。每一颗粒含两份重 250 000 道尔顿的蛋白质,它负责把 LDL 结合到细胞表面受体上。

合。随后,消化过程的产物进入胞液作为营养而被利用。多细胞生物中的大多数细胞不能有效地吞食大颗粒,只得将这一任务留给“专职的”吞噬细胞来完成。在哺乳动物中,有两种白细胞充当吞噬细胞:巨噬细胞(广泛分布在血液和组织中)和多形核白细胞(也称作多形嗜中性白细胞)。这两种细胞通过吞噬入侵的微生物来防御感染(图 6-79)。巨噬细胞对清除衰老的、被破坏的细胞以及细胞碎片也起重要作用。从数量上来考虑,后一作用显得重要得多:在每个人中,巨噬细胞每天要吞噬 10^{11} 个以上的衰老红细胞。和在

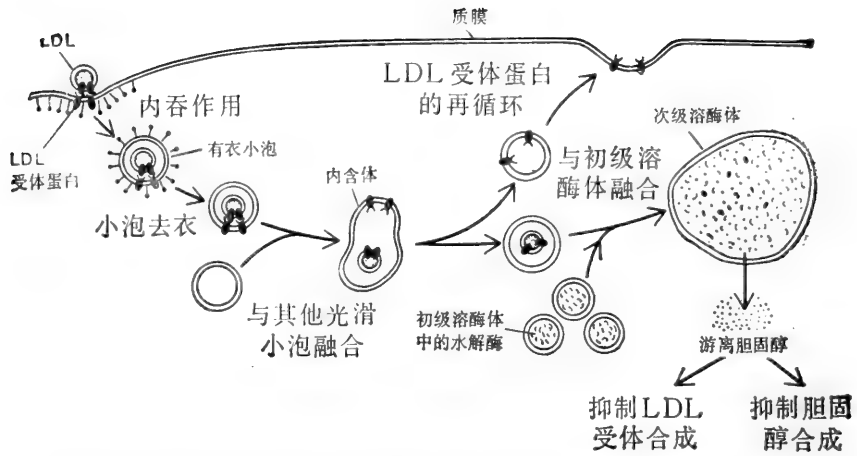


图 6-77 通过有衣小凹和有衣小泡的受体介导内吞作用调节细胞内的胆固醇水平。注意 LDL 在次级溶酶体内被破坏,但内含体上的 LDL 受体蛋白却被回收,并再循环到质膜上去。

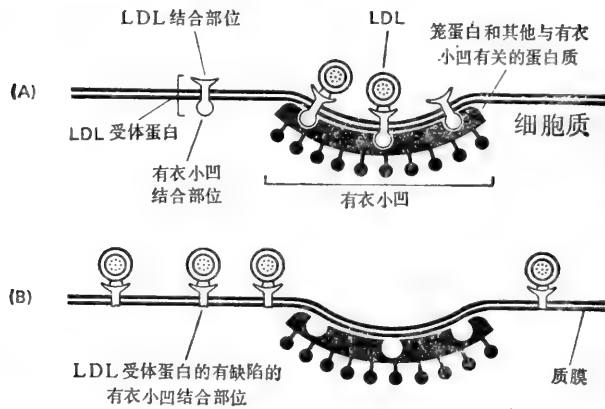


图 6-78 结合到一个正常细胞质膜的有衣小凹的 LDL 受体蛋白(A)。注意:即使无 LDL 结合时,一些 LDL 受体还是集中到有衣小凹内。(B)显示一个突变型细胞;LDL 受体蛋白是异常的,缺乏能使它们结合到有衣小凹上去的结合部位。这种细胞与 LDL 结合,但不能摄取 LDL。

原生动物的吞噬细胞中一样,吞噬细胞中的吞噬泡和初级溶酶体融合而形成次级溶酶体,被吞食的物质在次级溶酶体中被降解。无法消化的物质仍留在次级溶酶体内,形成残体。

为了被吞噬,各种颗粒必须首先和吞噬细胞表面结合。然而,并非所有结合的颗粒都被吞食,吞噬细胞有各种特殊的表面受体,这些受体在功能上和细胞的吞噬结构密切相关。我们了解得最清楚的受体是能识别抗体分子的受体。抗体保护我们抵抗感染微生物的主要方法之一是抗体与微生物表面结合形成一外衣,然后这外衣被巨噬细胞和多形核白细胞表面的特定受体所识别。被抗体所包裹的颗粒和这些受体相结合能诱导细胞伸出伪足,伪足吞进颗粒并融合成为吞噬泡(图 6-80)。

关于能介导吞噬作用的其他种类受体则知道得很少。虽已知吞噬细胞能识别和摄取衰老或被破坏的细胞和某些微生物,但在抗体未参加的情况下,吞噬细胞识别的是什么,则仍有待我们去探索发现。

吞噬作用是一种局部反应。它是通过一种“膜-拉链”的机理进行的⁴³

现在我们能适当处理红细胞，使它们与巨噬细胞的表面相结合但不被吞噬。如果让已同这种红细胞结合的巨噬细胞再去吞噬被抗体所包裹的细菌时，那么只有细菌被吞入；即使红细胞结合在紧靠活跃吞噬部位近旁也不会被吞噬。这表明，吞噬作用和外排作用一样，是仅限于质膜上一个区域及其下面的细胞质结构的局部反应。

如果巨噬细胞与已被抗体均匀覆盖的淋巴细胞接触，那么它就吞噬这一淋巴细胞。然而，如果抗体分子已因加帽过程而被局限到淋巴细胞的一端(见 270 页)，那么巨噬细胞的质膜就只扩展到淋巴细胞的帽区，而整个淋巴细胞不被吞食(图6-81)。因而很清楚，被抗体覆盖的靶细胞和巨噬细胞表面受体最初的相互作用还不足以触发摄入作用。这仅仅是引起了膜的一个逐渐扩大贴附范围的过程，如果要使靶细胞完全被吞噬泡

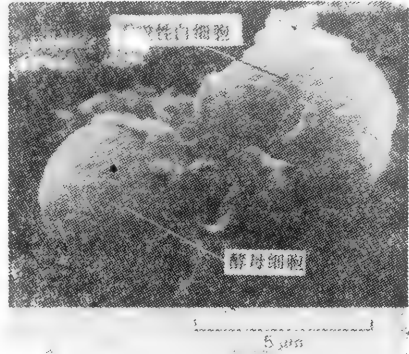


图 6-79 多形核白细胞正在吞噬一个酵母细胞的扫描电镜照片。(引自 J. Boyles and D. F. Bainton, *Cell*, 24: 905-914, 1981)

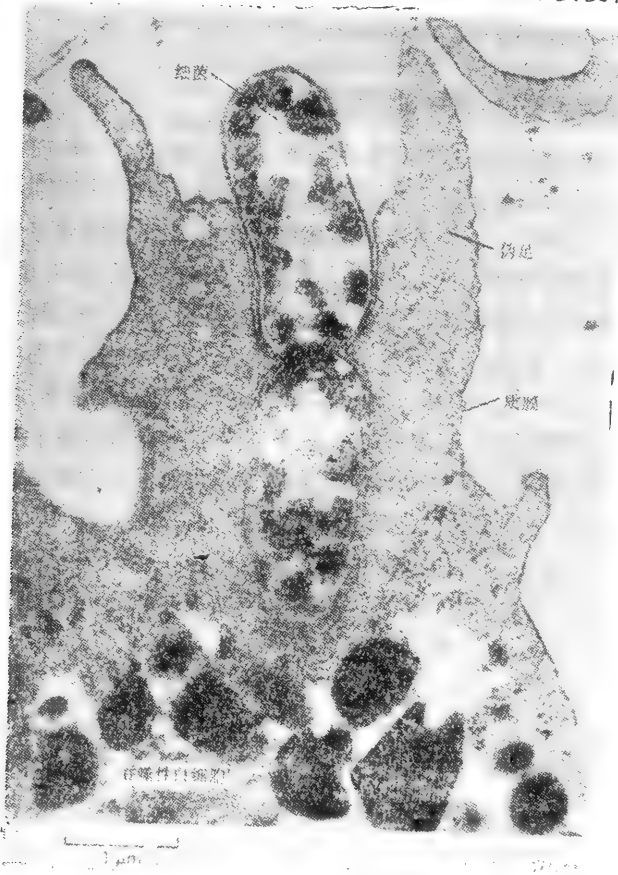


图 6 20 电镜照片示多形核白细胞正在吞噬一个细菌，这细菌正处在分裂过程中。(Dorothy F. Bainton 赠)

所围住的话,还需受体与抗体持续的接触。这启示,吞噬作用是按一种“膜-拉链”(membrane-zippering)机理进行的。

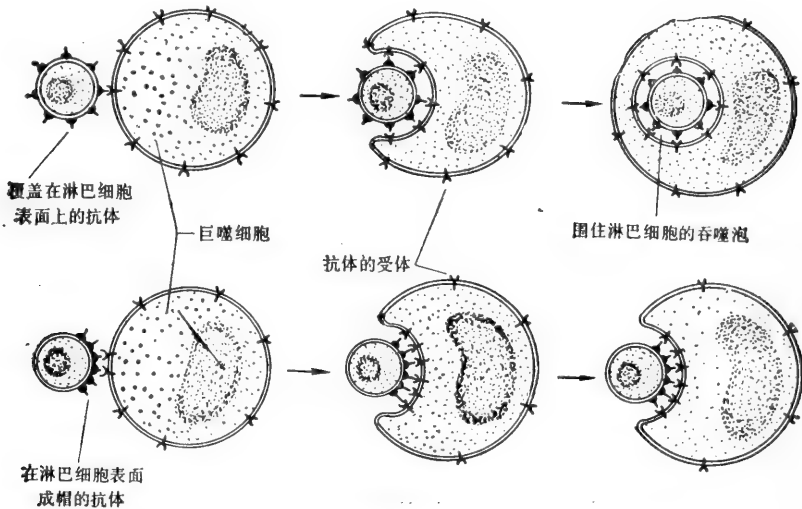


图 6-81 一个实验的示意图,表明吞噬作用是按“膜-拉链”的机理进行的。(见正文)

膜泡运输：它们是怎样被驱动、引导和调节的

小泡迅速地、持续不断地在真核细胞的各种膜性细胞器之间穿梭往来。质膜上的外排作用和内吞作用只不过是这种复杂的运输过程中最容易研究的特例。尽管这种小泡运输极为重要,但对于它的驱动、引导和调节的分子机理却知道得非常少。有一点是清楚的,那就是这些过程需要能量代谢,可能是以 ATP 水解的形式;但能量如何被利用,也还不知道。有证据表明,肌动蛋白和肌球蛋白(以及它们的某些辅助蛋白质)在吞噬作用中参与伪足的形成和运动,但这些蛋白质在液相及受体介导的内吞作用中、或在外排作用中、或在细胞内将小泡从一部分膜移到另一部分的过程中是否也起作用,则不清楚。

小泡如何会知道去哪儿?在小泡胞质表面上必定有一些分子会引导小泡到相对应的膜上去,但关于这些分子的性质和种类却不知道。泡性转运中持续发生的膜融合现象会引起大规模的膜混合,但细胞内的各种膜仍保持其特有的组成。这种组成的恒定不变,意味着如发生混合,同时也必然伴有特异性的回收过程。但这些特殊的膜成分如何被识别,以及(例如在小泡融合后)如何从内含体膜或质膜上回收这些特殊膜成分呢?这个问题将在下一章详细讨论。

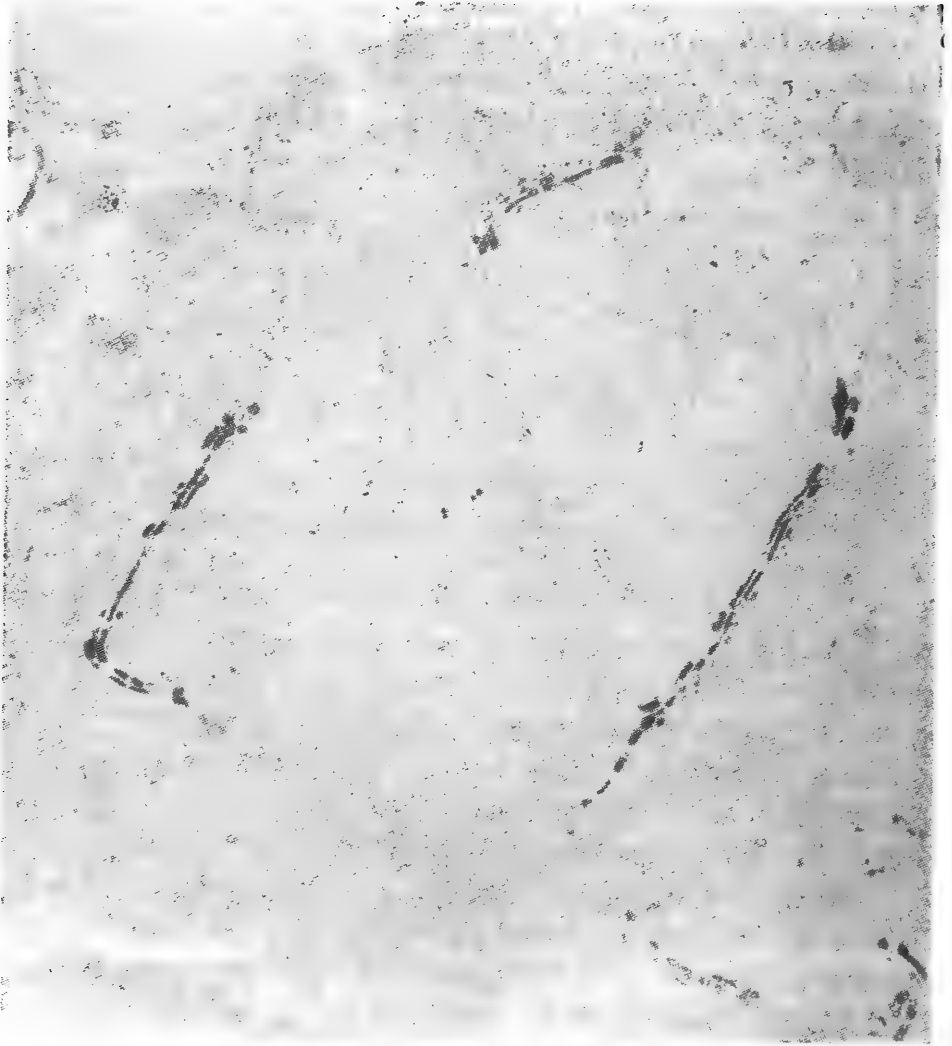
小结

大多数细胞分别通过外排作用和内吞作用分泌和摄取大分子。在外排作用中,当特殊的细胞内小泡和质膜融合时,其内容物就被释放到胞外。在内吞作用中,次序则相反:质膜的某一局部区域会内凹并收缩形成小的(胞饮的)或大的(吞噬的)小泡。大多数内吞小泡最终与初级溶酶体融合形成次级溶酶体,在那里,小泡中的大分子大多被消化,而小泡中的大部分膜成分则通过某种方式被回收并送还给质膜。外排作用和内吞作用都是质

膜及其下的细胞质的局部反应。

大多数动物细胞连续地一点一点地内摄其质膜并形成内吞小泡，它们能以这种方式摄取细胞外液及其中溶质——这一过程称之为液相内吞作用。一部分小泡由质膜的平滑部位形成，而另一些则由质膜的有衣区形成，这些有衣区称为有衣小凹。有衣小凹和有衣小泡为浓缩和摄取某些胞外大分子提供特殊的通道，这些大分子必须和有衣小凹内的特定的受体蛋白先结合——这一过程称为受体介导内吞作用。细胞外大颗粒，像细胞碎屑或来犯的微生物，主要是由“专职的”吞噬细胞内吞，这些细胞在其表面有各种专门的受体调节其吞噬作用。

【刘泽玺译 全如斌 校】



哺乳动物中部分细胞质的电镜照片，每个高尔基池垛的另一边的囊泡是用一种特异的酶染成暗色。(Daniel S. Friend 赠)

第七章 细胞内膜及生物大分子合成

细胞质占整个细胞质量的大部分。细胞质是一种极为复杂的大小分子混合体，其中70%的重量为水分，15%至20%为蛋白质。一个典型的动物细胞中大约含有100亿个(10^{10})蛋白质分子，分属一万个不同的类型。若在高倍光学显微镜下观察活细胞，细胞质呈现为一种相当无定形的、凝胶状的物质，其中有散在分布的颗粒迅速飘游浮动。但实际上细胞质的组织结构要比在光学显微镜下所见严密得多。在电子显微镜下，可以看到细胞质含有许多不同的细胞器，每一细胞器都具有一组特殊的蛋白质，来专门执行某种特殊功能。除细胞器外，其余的细胞质就叫胞液。胞液中穿插散布着致密的蛋白质丝的网状结构，总称细胞骨架(cytoskeleton)。许多种蛋白质直接或间接与细胞骨架结合。此外，因几乎所有蛋白质都对某些其他类蛋白质具有选择性的亲合力，所以数组蛋白质可结合在一起构成时隐时现的大型簇状物。但是在研究过程中细胞质的组织结构大部分被破坏，因此目前对细胞质的这种复杂结构的细节知道得很少。

然而，要了解细胞就必须了解细胞质，那么了解细胞质当如何着手？方法之一是将细胞质内各种蛋白质分离，分析每种蛋白质的详细结构及化学特性。另一种方法是将细胞质按内部不同的亚结构支解，然后单独研究各种结构的功能及化学特征。本章在探讨胞液、内质网、高尔基器、过氧化物酶体及溶酶体功能时，主要采用后面一种方法。两种与细胞能量转化有关的细胞器：线粒体及叶绿体将在第九章，细胞骨架将在第十章分别详细讨论。

高等细胞结构的区室化¹

大型真核细胞需有内膜

许多生命攸关的生化过程是在细胞膜内或膜表面进行的。举例来说，氧化磷酸化反应及光合作用均需在半透膜存在时进行，以便质子转运与ATP合成成对发生。此外，膜本身可作为新膜成分合成的结构支架。在原核生物中(如细菌)，所有上述作用(及其他许多作用)均在细胞膜上完成。一般而论，细胞膜是原核细胞中唯一的膜。

除具有细胞核外，真核细胞最显著的特征在于具有多种多样的包围细胞器及液泡的内膜。据认为，细胞内膜系统为大体积细胞所必需(134页)。一个典型的真核细胞，直线长度为典型细菌(如大肠杆菌)的10倍。所以，就相对体积而言，真核细胞外围膜面积要小得多。显然单靠细胞质膜无法提供足够表面积或容纳足够膜结合性酶分子，以维持膜承担的各种极重要功能。因而细胞内必需另含大量的附加膜结构。

细胞内膜将细胞分隔为特异性的区室

原则上，真核细胞可简单地通过质膜反复内陷(或外突)而增加细胞膜的表面积。但实际上，真核类细胞内膜与细胞质膜间，以及细胞内膜相互间在物理和化学性质上均有区

别。细胞内膜将细胞分隔成为具有不同功能的区室,每一区室由封闭的、选择性通透的膜构成边界。每一区室为一分离的亚细胞反应容器,具限制性能的膜在这一容器中保持并浓缩着一套独特的酶,从而赋予每一区室以特异性的功能。

复杂的真核细胞也只有几种主要细胞区室²

七种主要细胞区室为多数真核细胞所共有(图7-1)。细胞核是DNA及RNA的合成场所。围绕细胞核的细胞质由胞液及悬浮于其中的细胞器组成,细胞的多数中间代谢作用,包括在游离核糖体上的蛋白质合成,均在胞液中进行。内质网(ER)及其膜结合核糖体,合成新的整合膜蛋白及预定分泌的蛋白质,并为细胞其余部分合成新的膜脂质。高尔基器的作用与交通警相仿,指挥通过其中的大分子驰向正确的细胞内目的地,并常对大分子进行共价修饰(如对蛋白质分子的选择性切割和糖基化)。线粒体及(植物中的)叶绿体产生用于驱动耗能性生物合成反应的ATP之大部。溶酶体则含有种种消化酶,主要降解大分子及从细胞外摄取的颗粒。最后,过氧化物酶体(又称微体, microbodies)为含有参与种种氧化反应的酶类的小泡状物。一般每种由膜分隔的区室(细胞器)既具有一套在各类细胞中共有的性质,又具有在不同类型细胞间各异的活性。这些细胞器的总和占据细胞总体积的大部(表7-1)。其余具有更加特异性功能的细胞器(如贮存受激发后释放的酶或激素的小体),则只存在于某些高度特化的细胞中。

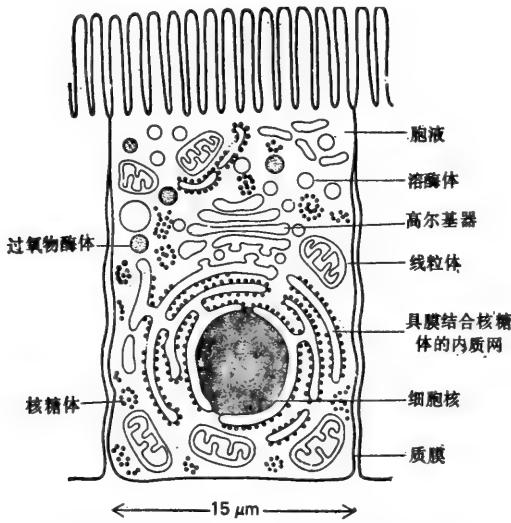


图7-1 典型动物细胞示意图。着重描绘主要的细胞区室。胞液、内质网、高尔基器、细胞核、线粒体、溶酶体及过氧化物酶体分别代表由至少一层选择性可透膜分隔于细胞其余部分的特殊区室。

合核糖体,合成新的整合膜蛋白及预定分泌的蛋白质,并为细胞其余部分合成新的膜脂质。高尔基器的作用与交通警相仿,指挥通过其中的大分子驰向正确的细胞内目的地,并常对大分子进行共价修饰(如对蛋白质分子的选择性切割和糖基化)。线粒体及(植物中的)叶绿体产生用于驱动耗能性生物合成反应的ATP之大部。溶酶体则含有种种消化酶,主要降解大分子及从细胞外摄取的颗粒。最后,过氧化物酶体(又称微体, microbodies)为含有参与种种氧化反应的酶类的小泡状物。一般每种由膜分隔的区室(细胞器)既具有一套在各类细胞中共有的性质,又具有在不同类型细胞间各异的活性。这些细胞器的总和占据细胞总体积的大部(表7-1)。其余具有

更加特异性功能的细胞器(如贮存受激发后释放的酶或激素的小体),则只存在于某些高度特化的细胞中。

表7-1 典型肝细胞内主要细胞区室所占相对体积

细胞区室	占细胞体积百分比	每一细胞所含个数*	细胞区室	占细胞体积百分比	每一细胞所含个数*
胞液	54	1	细胞核	6	1
线粒体	22	1700	过氧化物酶体	1	400
粗糙内质网池	9	1	溶酶体	1	300
光滑内质网加高尔基池	6				

* 一般认为各个粗糙及光滑内质网池互相连接形成单一大区室。相反,高尔基器在细胞中则由堆积的池组成许多分散的结构,这些结构间联系的紧密程度尚不清楚。

所有细胞器中细胞内膜的总量相当可观。如在表7-2中所分析的两种不同哺乳类动物细胞中,内质网的总表面积分别为细胞膜面积的25及12倍,就面积和质量而言,细胞质膜在绝大多数真核细胞中只占次要地位(图7-2)。

表 7-2 真核细胞中多数膜被用来构成细胞器

膜类型	占细胞膜总量百分比		膜类型	占细胞膜总量百分比	
	肝脏 肝细胞	胰 外分泌细胞		肝脏 肝细胞	胰 外分泌细胞
质膜	2	5	内膜	32	17
粗糙 ER 膜	35	50	细胞核		
光滑 ER 膜	16	<1	内膜	0.2	0.7
高尔基器膜	7	10	分泌泡膜	未测	3
线粒体			溶酶体膜	0.4	未测
外膜	7	4	过氧化物酶体膜	0.4	未测

这两种细胞体积差别相当大。因肝细胞平均体积为 $5\,000\mu\text{m}^3$ ，而外分泌细胞体积约为 $1\,000\mu\text{m}^3$ ，故两种细胞膜总面积分别估计为 $110\,000\mu\text{m}^2$ 及 $13\,000\mu\text{m}^2$ 。

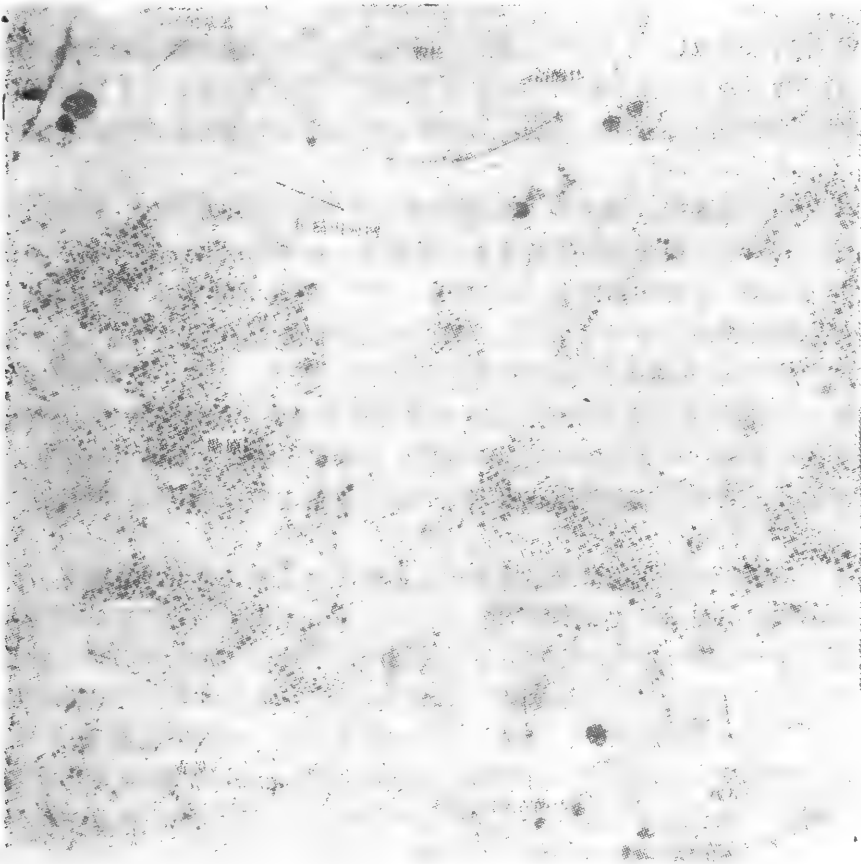


图 7 2 肝细胞局部横断面的电子显微照片，表明各主要细胞区室。(Daniel S. Friend 赠)

细胞区室使细胞能同时进行多种互不相容的化学反应

细胞区室的作用之一是防止竞争性酶反应之间相互干扰。例如，需要的蛋白质在胞液中合成，不需要的蛋白质在溶酶体中水解。脂肪酸在胞液中合成后，用于膜生物合成及

能量贮存,同时在线粒体中则作为能源裂解。另外,如在本章以后将详细讨论的,各种糖类在内质网中被加在蛋白质上,其后又在高尔基器中被除去或修饰。

过氧化物酶体为细胞分室化 (compartmentalization) 的重要性提供了极好的例证。过氧化物酶体为含有各种重要氧化酶的小泡(直径为 0.1 至 1 μm 。这类氧化反应的产物之一是具潜在致死性的氧化剂过氧化氢 (H_2O_2), 由如下类型的反应生成:



式中,R 为一种被氧化的有机小分子。由于过氧化物酶体内还含有能将 H_2O_2 裂解为 H_2O 及 O_2 的过氧化氢酶,所以这一过氧化物在其生成处即被摧毁,从而没有机会来危害胞液。

病毒揭示寄主区室内存在着高度有组织的通道³

许多动物病毒基因组中只含有能组成不超过 4 至 5 个基因的极有限的核酸。这些基因大多为成熟病毒颗粒(病毒体)的结构蛋白编码。这种病毒遗传容量是十分有限的,这就迫使它们不得不利用寄主细胞内有关通道以完成自身复制过程。在生活周期中,病毒一般遵循特定顺序经过细胞内各区室,从而揭示寄主细胞中重要合成反应是如何分室化的。

有些人利用具被膜的动物病毒,即基因组由脂双层膜包裹的病毒,已对细胞分室化进行了相当深入的探索。跟着具被膜病毒的生活周期,就如同周游细胞一样。以一种经详细研究过的 Semliki 森林病毒为例,该病毒是由含有 RNA 的核壳体 (nucleocapsid) 和一种与任何生物膜类似,由脂双层及蛋白质组成的外膜构成的(图 7-3)。基因组 RNA 包装在由规则排列的 20 面体蛋白质(C 蛋白)组成的衣壳中。衣壳由仅含 3 种蛋白质(称 E1、E2 及 E3) 的脂双层紧密围绕。这些所谓外膜蛋白是一种横跨脂双层的糖蛋白,并穿过核壳体的 C 蛋白,从下面连接膜及核壳体。外膜蛋白糖基化部分总是出现于脂双层的外围,在电子显微镜下可看到这些蛋白质的复合物构成病毒表面向外伸长的“穗”(图 7-3A)。

如图 7-4 所示,病毒感染始于病毒与寄主细胞质膜上的蛋白质受体结合。这一结合导致病毒颗粒被选择性地纳入质膜表面的有衣小凹 (coated pits),有衣小凹经内陷后在细胞内形成有衣小泡 (coated vesicles)。含有经内吞作用摄入的病毒颗粒的小泡迅速与具光滑表面被称为内含体 (endosome) 的中间小泡融合,内含体转而再与溶酶体融合。

据此,病毒以一种特殊途径,即有衣小凹—有衣小泡—溶酶体途径进入细胞。细胞一般通过此途径摄入结合于外膜的特殊蛋白质及小颗粒。不同的是病毒不被溶酶体消化。病毒能逃避被消化的命运是因为被膜蛋白具特异性质。在溶酶体酸性 pH 环境中,被膜蛋白可促使相邻脂双层融合。结果在病毒被纳入溶酶体后,病毒被膜就与溶酶体膜融合,使裸核壳体逸入胞液(图 7-4)。

在胞液中核壳体“脱去”脂质被膜,释放出的基因组 RNA 经寄主细胞核糖体翻译,产生一种以病毒基因编码的 RNA 聚合酶。RNA 聚合酶继而制造更多的 RNA 拷贝,其中有些作为信使 RNA,指导合成病毒的四种结构蛋白,即衣壳 C 蛋白及三种被膜蛋白: E1、E2 及 E3。

衣壳及被膜蛋白在细胞质中遵循不同途径分别在不同的区室内合成:被膜蛋白,与一

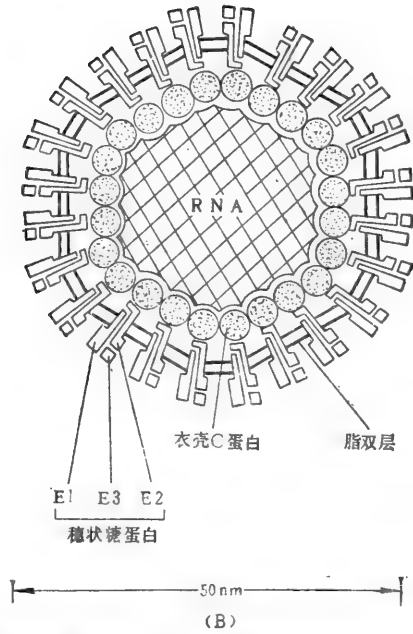
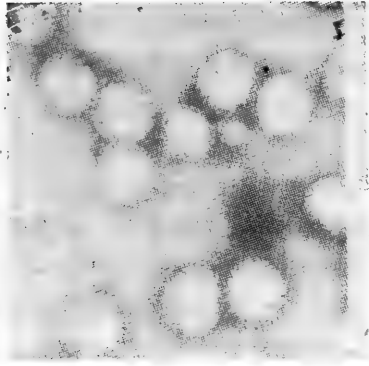


图 7-3 几个完整 Semliki 森林病毒颗粒结构的负染电子显微照片(A)及病毒横断面示意图(B)。每一病毒颗粒中约有 240 个衣壳 C 蛋白及 240 个糖蛋白穗状复合体的拷贝。病毒外被膜由嵌入脂双层的穗状糖蛋白构成。(电镜照片由 Kai Simons 赠)

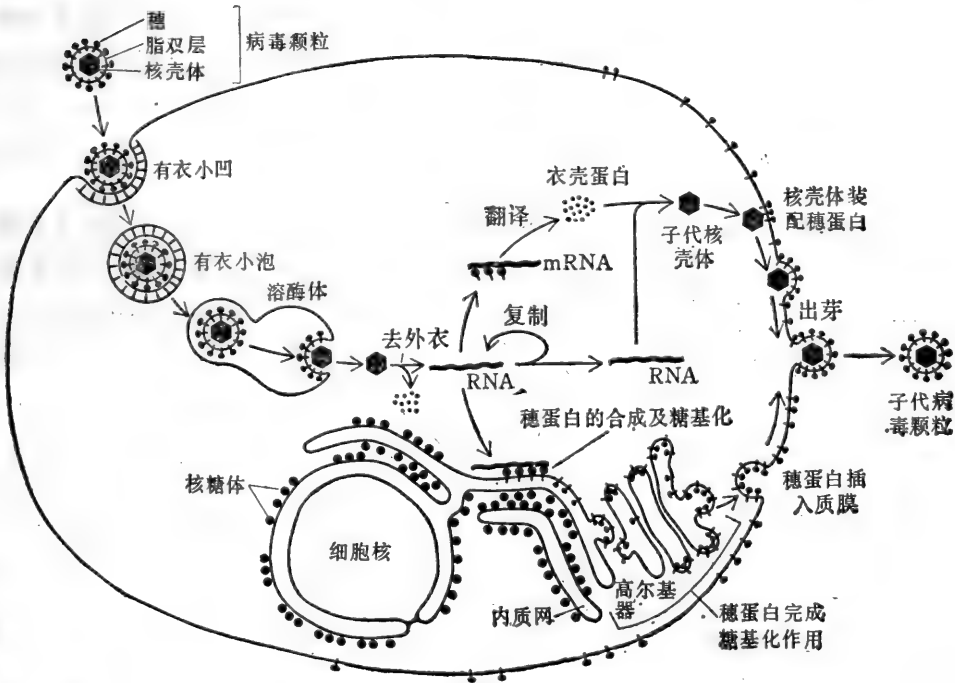


图 7-4 Semliki 森林病毒生活史示意图。病毒寄生寄主细胞进行它的所有生物化学合成。

般细胞膜糖蛋白相同,由附着于粗糙内质网的膜结合核糖体合成,而壳体蛋白则与一般胞液蛋白相似,由胞液中游离的核糖体合成。

新合成的衣壳蛋白分布于细胞的胞液中。在胞液中衣壳蛋白与新复制的基因组 RNA 结合,形成新病毒核壳体。相反,被膜蛋白则嵌入内质网膜,并在该处糖基化。在保持膜结合状态下,被膜蛋白先被转运至高尔基器(在此处被进一步糖基化),然后再被转运至质膜(图 7-4)。

病毒核壳体与被膜蛋白最终在细胞质膜处汇合。经核壳体与被膜蛋白的特殊反应的结果,核壳体被包入一部分质膜中,这部分质膜富含病毒编码的嵌在宿主细胞脂质中的被膜蛋白。然后,据目前还不甚了解的过程,核壳体芽生出细胞外,继而以带有完整被膜的方式,从细胞上缢缩脱离(图 7-4)。

不同病毒沿着不同通道穿越细胞

像 Semliki 森林病毒这种具被膜病毒可用来探索细胞本身的分室化。这类研究变化无穷,依所利用病毒而异,有些区室被病毒利用,其余则不被利用。如多数含 DNA 病毒不是在胞液,而是在细胞核中复制,并转录生成 RNA。另一些病毒则以直接与质膜融合的方式进入细胞,而不是通过溶酶体间接进入细胞。在特化的顶端质膜及侧底质膜有差别的特化细胞中,有些病毒只在顶端质膜处出芽,有些病毒只在侧底质膜出芽(图 7-5 及 7-6),而另一些则根本不在细胞质膜处,而在内质网膜、高尔基器膜或核膜内层处出芽。此时病毒或以分泌性外排作用,或以诱导细胞溶解的方式脱离细胞。

根据被膜病毒特异地从不同细胞膜出芽的事实,直接证明这些膜具有不同性质,也证明即使在同一种膜中可能存在各种不同区域。再者,这类现象表明膜融合事件可依病毒所含的特殊被膜蛋白而被引导发生于此种或他种膜。后面我们将看到相同类型的特异性靶是细胞内不同区室本身形成的关键。由此,研究具被膜病毒有助于揭示寄主细胞如何指导及组织生物合成反应的机制。

小结

真核细胞含有大量的细胞内膜,把几乎占一半体积的细胞器分隔形成独立的细胞区室。几乎所有细胞都具有六种主要细胞器:内质网、细胞核、高尔基器、线粒体、溶酶体及过氧化物酶体。植物细胞另外还含有叶绿体作为主要的细胞器,除细胞器外的细胞区室内均为胞液。当病毒感染真核细胞时,其生物合成依次在细胞区室内进行。因此,病毒生活周期可揭示细胞内生物合成反应通常是怎样按分室化方式进行的。

胞 液⁵

多数中间代谢过程在胞液中进行

所谓“中间代谢”指一整套的化学反应,通过这些反应细胞降解一些小分子(主要以 ATP 或质子梯度形式捕获其中大部分化学能),并合成另一些小分子作为细胞结构、功能及生长所需的大分子的前体。所有中间代谢都在细胞质中进行,其中多数发生于胞液。一般胞液约占细胞总体积的 55%(表 7-1),胞液中富含几千种催化酵解,葡糖异生及生物合成糖、脂肪酸、核苷酸及氨基酸等反应的酶。此外,胞液中尚含有种决定细胞形状,引起胞

质连贯性运动及形成有助于组织胞液内各类酶催化反应的总支架的细胞骨架蛋白（见第十章）。胞液重量中约 20% 为蛋白质，所以尽管在电子显微照片中显得相当无定形，胞液实际上为一种高度有组织的胶质实体，而不是一种简单的酶分子溶液。例如，通过细胞学研究已知直接包围高尔基器的胞液与紧密环绕细胞核的胞液不尽相同。然而，由于一旦细胞破裂后这类结构极难保存，目前对其形成的机制几乎一无所知。

几种主要化合物在转化为贮存形式的代谢途径中，可产生易在显微镜下观察到的产物。脂肪酸的贮存形式，即脂肪（甘油三酯）是最显而易见，同时也是最重要的例子。如图 7-7 所示，在许多细胞中这种不溶性甘油三酯在胞液中合并形成大型无水小滴（直径约为 $0.2\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ ）。为了贮存脂肪而特化了的脂肪细胞中，这类脂质小滴直径可达 $80\mu\text{m}$ ，实际上充满了整个胞液。

另一类主要可见的贮存分子是糖原，是葡萄糖的多聚体。糖原是碳水化合物的主要贮存形式，在许多细胞中糖原大型单分子（直径约为 $10-40\text{nm}$ ），在电子显微照片中呈粒状。合成及降解糖原所必需的酶结合于糖原颗粒表面（图 7-8）。

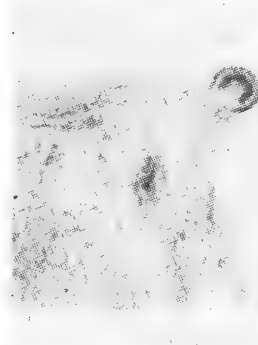


图 7-5 自质膜中出芽的具被膜病毒
(Daniel S. Friend 赠)

多种蛋白质在胞液中由核糖体合成⁶

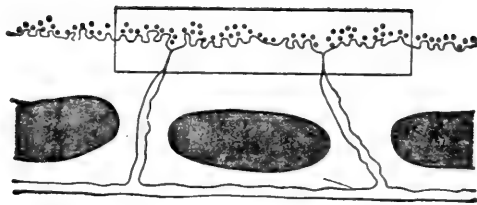
在胞液中合成的多种蛋白质之中有催化中间代谢化学反应的酶。每一蛋白质都通过信使 RNA (mRNA) 分子自核进入细胞质并附于被称为核糖体的大型核糖核蛋白颗粒这一过程来合成的。在此 mRNA 顺序被译成相应的氨基酸顺序。由于蛋白质合成机制的细节已在第五章中介绍，本章将只提及与真核细胞质结构有关的特性。

每一核糖体由大小亚单位组成。每当蛋白质合成后都作可逆性的分离，图 7-9 描绘细菌核糖体的一般大小及形状。真核类核糖体略大一些，但显然以与细菌核糖体相仿的方式构成，功能更是类似（见图 5-14）。

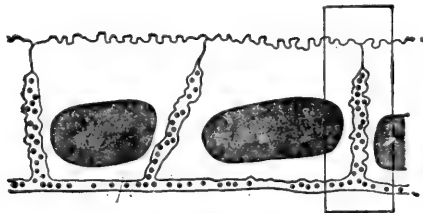
核糖体为最大直径约达 30nm 的复杂结构物，其中所含 RNA 重量略超过蛋白质。核糖体 RNA 分子 (rRNA) 组成核糖体的骨架，数十种蛋白质，每种在每一核糖体中仅含一份，自动装配在骨架上。rRNA 除在核糖体蛋白装配方面起重要作用外，还与转移 RNA (tRNA) 及 mRNA 的选择性区域形成特殊互补碱基对，作为核糖体-mRNA-tRNA 识别过程的关键部分。核糖体被恰当地比作一种大型蛋白质合成器，这种合成器不仅将蛋白质合成所需原料安排在恰当的空间位置上，还提供催化多肽链形成的全过程所需的酶。

多个核糖体与单个信使 RNA 分子结合形成多核糖体⁷

蛋白质合成可分三个不同阶段：起始、延伸及终止（第五章）。起始阶段需要两种不同信号，其一促使 mRNA 分子结合于核糖体，这种信号在真核及原核生物中不同（见 317 页所述）。另一信号为可被特殊起始 tRNA（结合甲硫氨酸）识别的起始密码子 AUG，起始 tRNA 必须与 AUG 密码子配对以启动合成每一新多肽链。在 GTP 水解所释能



流感病毒只从
顶端质膜出芽



水泡性口炎病毒只
从侧底质膜出芽

图 7-6 电子显微照片示一类具被膜病毒从组织培养的上皮细胞顶端质膜出芽，而另一类病毒则自相同细胞的侧底质膜出芽。这种上皮细胞从底面附着于培养皿的方式生长。(E. Rodriguez-Boulan 和 D. D. Sabatini 赠)

量的驱动下，核糖体按 5' 至 3' 方向沿 mRNA 移动，从而开始延伸阶段。延伸阶段的每一步，其反密码子与 mRNA 下一个密码子互补的特种氨酰 tRNA 分子和核糖体结合。与 tRNA 连接的氨基酸则被转移至延伸中多肽链的羧基末端。所以肽链合成总是由蛋白质的氨基末端向羧基末端延伸。终止阶段则是在遇到三种终止信号之一时发生，从而将已完成的产物从核糖体上释放。由于多肽链的折叠多在合成进程中发生，所以已合成的蛋白质一经释放通常即具活性。

氨基酸以每秒 20 个的速度被掺入多肽链，因此合成一个普通大小的蛋白质只需 20—60 s。然而即使在如此短暂的时间内，新核糖体在前一核糖体已翻译足够氨基酸顺序

以让出足够空间后,即跃上 RNA 分子的 5' 端,从而形成多次起始。因此,在正常生理条件下,处于活跃翻译状态的 mRNA 存在于多核糖核蛋白体或多核糖体中,多核糖体是由相隔 80 个核苷酸的数个核糖体沿着一条信使 RNA 分子组成(图 7-10 及 7-11)。多核糖体为几乎所有细胞的共性。细胞溶解后通过高速离心将多核糖体与胞液中单核糖体分离(图7-12)。鉴别这样分离出的多核糖体中存在有某种特殊的 mRNA 分子,即可作为相应编码顺序是在制备出多核糖体的这一细胞中被活跃翻译的最好证明。为鉴别某种 mRNA 的存在,可用自多核糖中分离出的 mRNA 混合物指导体外蛋白质合成,再将该混合物解码。也可利用核酸分子杂交技术检验这些 mRNA 与特异性的克隆 DNA 探针的顺序同源性。

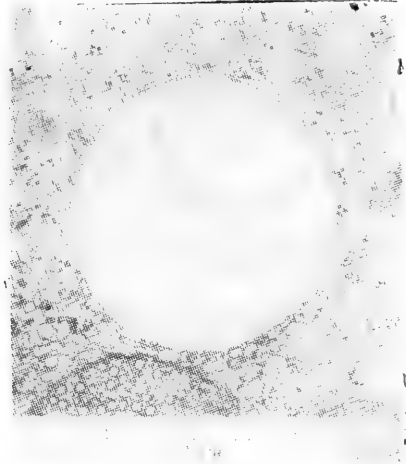


图7 7 脂肪的主要贮存形式含甘油三酯的脂质滴的电子显微照片。这些滴状物在细胞质内用作贮能库。(Daniel S. Friend赠)

蛋白质的合成可被特异性抑制剂阻抑

许多药物及毒素能专一性地影响蛋白质合成的各主要步骤,因此对搞清细胞内有关机制极为有用。这类研究中最常用的药物为氯霉素、放线菌酮及嘌呤霉素。前两种药物能可逆性地抑制肽基转移酶。肽基转移酶属核糖体酶,

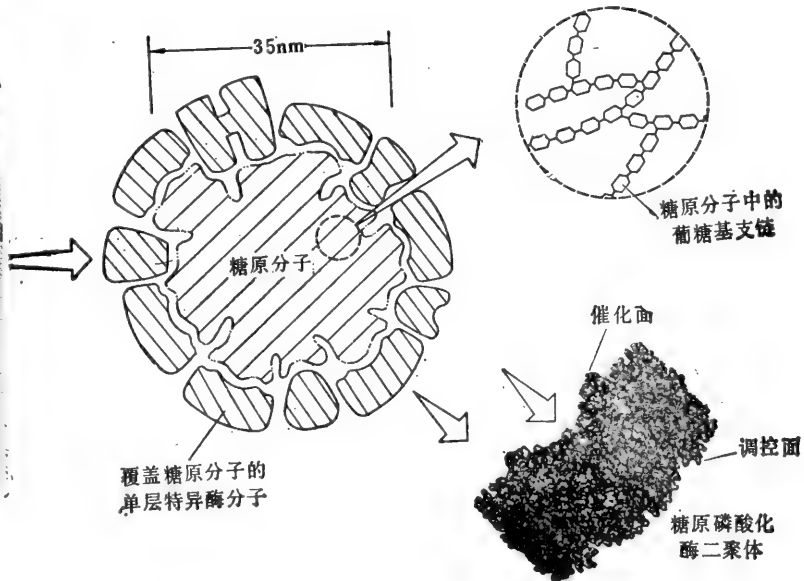
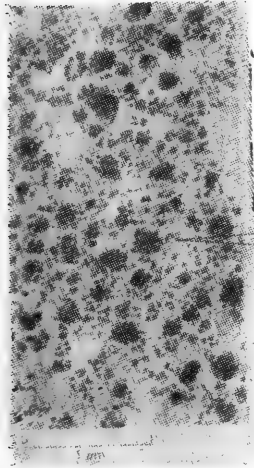


图 7-8 脊椎动物碳水化合物主要贮存形式糖原颗粒的电子显微照片及示意图。糖原的合成及降解由结合于颗粒表面的酶催化,其中包括合成性糖原合成酶及降解性糖原磷酸化酶。图中示磷酸化酶的三维结构。(Robert Flettevick 和 Daniel S. Friend 赠)

催化形成多肽键。但在真核细胞中氯霉素只抑制线粒体中(以及植物叶绿体中)核糖体上的蛋白质合成,而放线菌酮则只影响胞液核糖体。对这两种药物敏感性的差异可反映两类核糖体在结构上的不同,同时提供一种判断某种蛋白质是否在线粒体(或叶绿体)中合

成的有效方法。嘌呤霉素属一种与氨基酸连接的 tRNA 分子的结构类似物，当核糖体误认嘌呤霉素为真正的氨基酸，并将其共价连接于延伸中的多肽链羧基端时，即能过早地造成肽链终止及释放(表 5-1)。

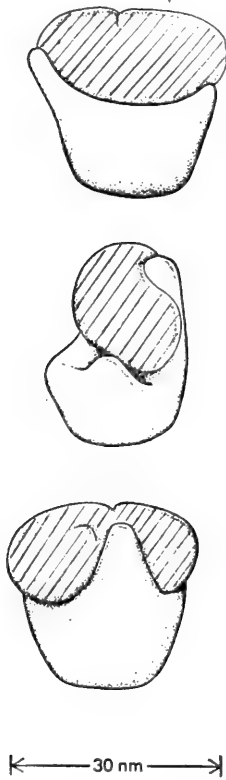


图7-9 细菌核糖体三维模型三面观，图中示配对的小亚单位(斜线部分)及大亚单位(密点部分)。在真核生物中，大亚单位含有一大二小rRNA分子及约45种蛋白质；小亚单位含有不同的大rRNA分子及约33种蛋白质。依沉降速度不同，大小亚单位一般分别称为“60S”及“40S”亚单位(完整核糖体沉降速度为80S)。

一个典型肝细胞内含有 10^7 核糖体，每一核糖体质量约为 4.5×10^6 道尔顿(其中rRNA及蛋白质约各半)。因此核糖体约占此类细胞干重的5%。蛋白质合成中较不活跃的细胞含较少核糖体。

某些蛋白质通过与制造这些蛋白质的信使 RNA 的结合来调节自身合成的速度⁹

在某种情况下，细胞内的蛋白质浓度必须精密调节，因这些蛋白质过量时对细菌有害。著名的例子是核糖体蛋白，若细胞内核糖体蛋白含量超过 rRNA 可结合量，这些蛋白质中有许多将不加区别地结合于各种 RNA 分子。细胞是如何保证核糖体中 80 种左右的蛋白质按 rRNA 合成的步骤形成等量蛋白质的呢？

这一课题已在细菌中进行了详细的研究。若把某种核糖体蛋白基因的多份拷贝插入大肠杆菌(利用质粒载体)，可观察到为这种蛋白质编码的信使 RNA 的量急骤增加，

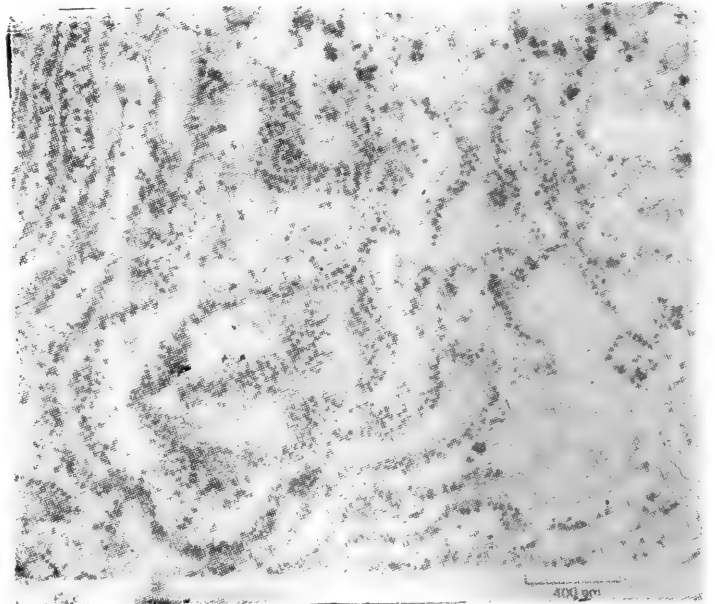


图7-10 正在进行蛋白质合成的典型多核糖体电子显微照片。细胞质中通常挤满了这种多核糖体，有些自由存在于胞液，有些与膜结合。(George Palade 赠)

但蛋白质本身合成速度只略为增高。进一步研究证明在许多情况下，若把游离核糖体蛋白加入体外蛋白质合成体系，可专一性地抑制为这种蛋白质编码的 mRNA 的翻译过程。这些引人注目的发现提示，细菌核糖体的合成是由一种反馈调节系统协调的。在这一调节系统中，过量的蛋白质结合在为之编码的 mRNA 5' 端附近的特殊碱基顺序或结构上，从而阻抑这种蛋白质自身的合成(图 7-13)。

尽管对此类翻译调节作用的例子目前所知甚少，但若在今后发现真核类中不具如图

7-13所示的此类调节机制,即具有协调最终装配成一定结构(如核糖体)的各种相互作用的蛋白质的合成,将令人十分惊讶。

真核生物每一信使 RNA 分子上只能合成一种多肽链⁹

真核及原核信使 RNA 在结构及功能上有所不同。真核 mRNA 分子(除在线粒体或叶绿体中合成者外)于转录后立即在核中被修饰(见 393 页)。结果,这些 RNA 分子在 5' 端通常具有由一个 7-甲基鸟苷残基连接于三磷酸组成的独特“帽子”结构,并在 3' 端具有一串约 200 个腺苷残基(“多聚A”)。多聚 A 在翻译过程中起何作用(如果有作用的话)目前尚不清楚。但 5' 帽

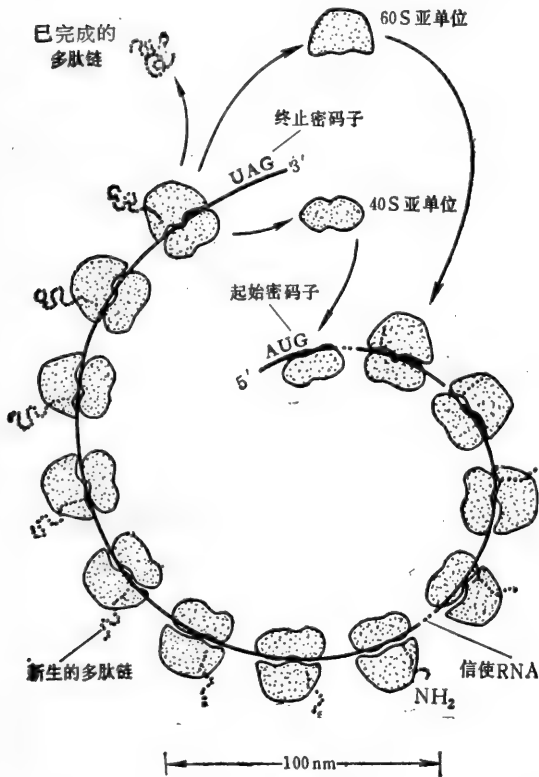


图7-11 多核糖体简图。蛋白质合成始于小亚单位与信使RNA 分子上适当部位结合。当多肽链完成后,大小亚单位均与 mRNA 分离。(见第五章)

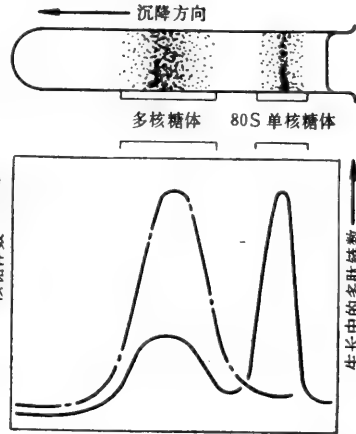


图7-12 通过离心沉降将多核糖体与单核糖体及其亚单位分离的示意图。此法基于大的分子聚合体比小的在强重力场中沉降较快的事实。一般在蔗糖梯度中进行沉降,以使溶液稳定,防止对流混合作用。

子为翻译的关键,可被核糖体专一地认作蛋白质合成的起始信号。在酵母菌中进行的巧妙遗传学实验揭示,蛋白质合成一般可起始于任何一个最接近5'帽子结构的 AUG 密码子,然后以对 mRNA 三联密码依次解码的方式进行,直至遇到终止密码子为止。RNA 链中其余为数众多的 AUG 密码子均不能作为起始点。因超越第一个终止密码子(指在终止密码子 3' 边)后信使 RNA 顺序不再被翻译,所以每一 mRNA 分子只能生成一种多肽。

就上述各点而论,原核 mRNA 与真核 mRNA 相当不同(图7-15)。细菌 mRNA 既无 3' 多聚A,又无 5' 帽子,而具有存在于同一 mRNA 分子多处的特殊起始顺序。这些起始顺序可与核糖体 rRNA 中特殊区域形成碱基对,从而在邻近 AUG 密码子处启动蛋白质合成。再者,虽然细菌核糖体可识别表示多肽结束的终止密码子,但这些核糖体却可

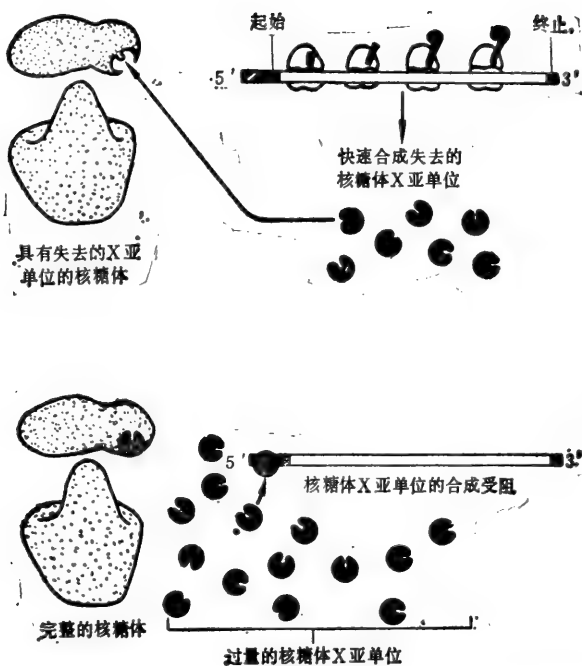


图 7-13 细菌中核糖体蛋白质合成的协调机制的详细示意图。这一协调机制为目前所知的少数几例特异的翻译机制之一。

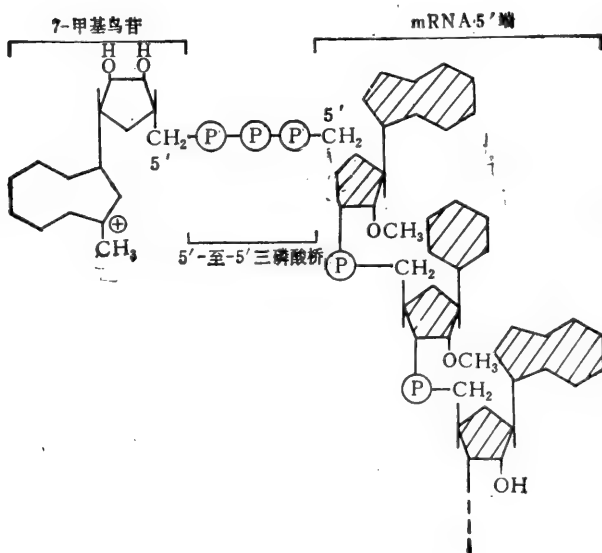


图 7-14 在真核信使 RNA 分子 5' 端发现的 5' 帽子结构。注意与具正电荷的 7-甲基鸟苷的不寻常连接方式以及核糖上 2' 羟基的甲基化(第二个核糖并非一定甲基化)。

滑过终止密码子而在下一个 AUG 处起始第二条多肽合成。结果,细菌信使 RNA 通常为多顺反子性 (polycistronic), 即可为由同一 mRNA 分子分别翻译的多种蛋白质编码。相反,所有真核 mRNA 均为单顺反子性 (monocistronic), 即每一信使 RNA 分子只能翻译一种多肽。

真核类常合成多蛋白¹⁰

尽管有上述 mRNA 多肽合成的限制,真核类同一信使 RNA 分子还是可能为多种相关酶活力 (related enzymatic activity) 编码。此时 mRNA 被译为一条大型多功能蛋白质,有些多蛋白被特殊酶切割,产生几种不同的酶,但另一些多蛋白则保持为一条完整的多功能多肽。

如图 7-16 所示,真核类一系列相关酶活力可连接于一条多聚蛋白,而在原核类中相

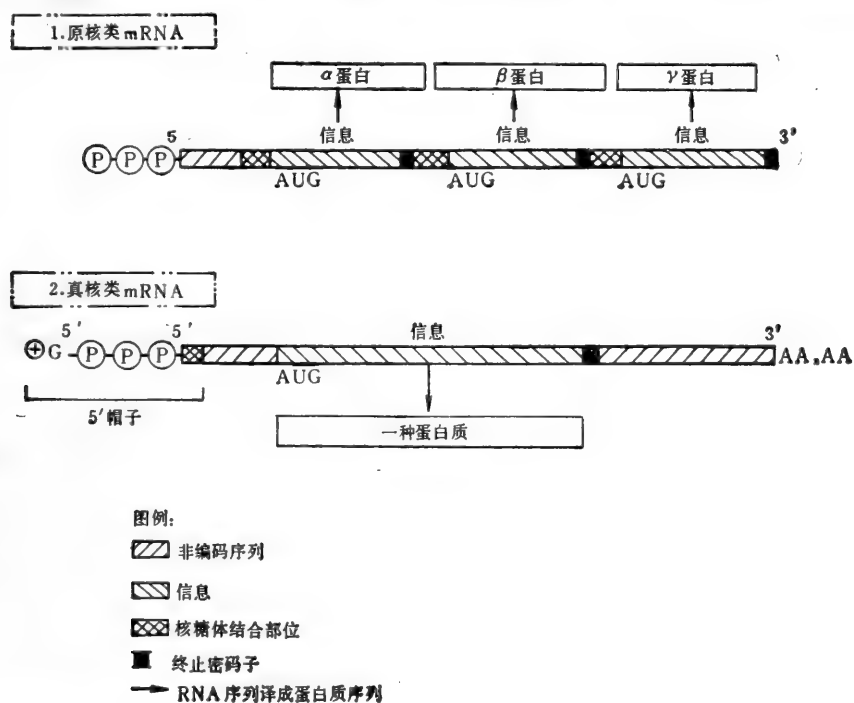


图 7-15 原核类及真核类信使 RNA 分子结构比较图。虽然两种 mRNA 分子均以 5' 端具有三磷酸基团的形式合成,真核类 RNA 分子却立即获得 5' 帽子结构。因这种帽子结构为起始核糖体的结合所需,所以核糖体在真核 mRNA 5' 端与 mRNA 结合并启动蛋白质合成。相反,原核类 mRNA 链内部可具有多个核糖体结合部位。

似酶活力往往参与分离的酶亚单位的非共价复合体。这一区别部分原因是真核细胞由于体积增加约一千倍后亚单位拼合增加困难,同时也可能由如图 7-15 所示的 mRNA 翻译机制的不同所致。

很多蛋白质在合成后进行共价修饰¹¹

若非大多数,至少有许多蛋白质自核糖体释放后尚要经受某种类型的共价修饰,目前已知的对氨基酸支链的修饰作用有 100 多种,通常属调节蛋白质生物活力的可逆性修饰

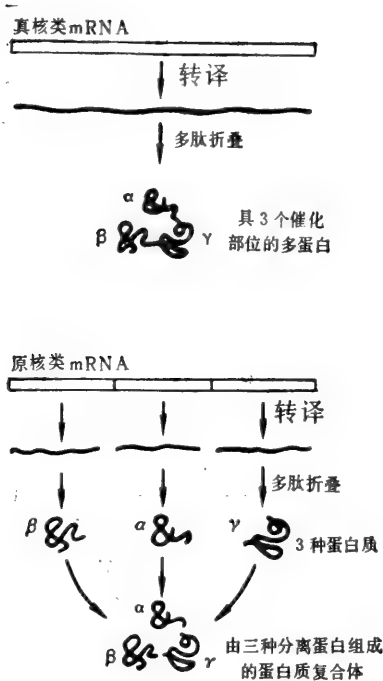


图7-16 据认为在真核类中较常见具有多种酶活力的蛋白质(多蛋白)。在细菌中,相似的酶可由译自单个的长 mRNA 分子的不同区域的分离蛋白链装配而成。

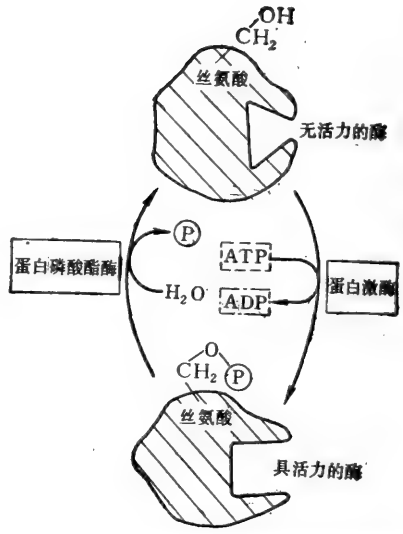


图7-17 蛋白激酶及蛋白磷酸酯酶催化蛋白质支链羟基磷酸化和脱磷酸化的两种相对作用的示意图。如图所示,磷酸化作用通常引起蛋白质构象的变构性变化,从而增高或降低酶活力。

(见721页)。最常见的例子为对蛋白质中丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸支链中经选择的自由羟基的磷酸化作用(图7-17)。依蛋白质而不同,磷酸化作用可提高或降低蛋白质的功能活性。被称为蛋白激酶的一类酶可按上述方式利用 ATP 催化蛋白质磷酸化。此类激酶本身的活力则被如 cAMP 或 Ca^{2+} 的浓度之类的细胞内关键性信号严格调节。蛋白质的磷酸化作用因胞液中存在大量磷酸酯酶而属可逆过程。当蛋白激酶作用停止,磷酸化酶的磷酸将被磷酸酯酶除去,从而使酶活力恢复到磷酸化之前的水平。酪氨酸支链腺苷酸化(在此作用中 ATP 的 AMP 部分被可逆地接上酪氨酸羟基团),以及谷氨酸支链的可逆性甲基化,则为另外的重要调节体系。

其余产生于胞液的蛋白质共价修饰是属于永久性修饰,这类修饰为蛋白质发挥活力所必需。例如,多种酶具有共价结合的辅酶(如生物素、硫辛酸及磷酸吡哆醛)。辅酶在酶反应机制中起重要作用。其余为数众多的不可逆修饰作用的确切功能尚不清楚。例如,许多胞液蛋白质的氨基端经乙酰化修饰(“被阻挡”),而有些经选择的赖氨酸氨基则可能被甲基化。

其他多种永久性共价修饰作用只发生于将离开胞液转运至细胞内别处或细胞外的蛋白质。如,内质网中分泌性胶原蛋白中约半数脯氨酸残基被羟基化,成为羟脯氨酸。此羟基化反应可增强胶原蛋白的三螺旋结构(见 672 页)。此类另一重要例子为向蛋白质中谷氨酸残基添加第二个羟基,以形成对 Ca^{2+} 具高度亲和力的二羟酸—— γ -羟基谷氨酸。这种结构被用来形成可被多种与血凝作用有关的 Ca^{2+} 结合蛋白所利用的 Ca^{2+} 结合部位。

此外多数分泌性糖蛋白的碳水化合物联结着天冬酰胺，或极少数联结着丝氨酸或苏氨酸的残基，膜蛋白则可具有共价相连的脂肪酸。上述修饰作用有的发生于内质网上，有些如下面将讨论的则发生于高尔基器上。

为数众多的蛋白质是特异的分泌细胞所分泌的，如一些内分泌细胞分泌多肽类激素，胰腺泡细胞分泌消化酶。许多这类蛋白质最初以大分子形式合成，然后被专门的蛋白酶切割成为具有活力的蛋白质。此类切割作用可发生于高尔基器，或发生在发育中的分泌泡，亦或发生在分泌之后。这取决于是那一种蛋白质。有些共价修饰作用被认为是具有调节性的。特别是许多分泌性酶（包括消化性蛋白酶）是以无活力的前体（称为酶原）的形式合成和分泌的。如果在细胞内合成有活力的酶，则对细胞有害。这些酶只有在细胞外经一种或多种特异的蛋白水解切割而被修饰后，才具有活力。

某些蛋白质在合成后不久即被降解¹⁴

细胞内蛋白质的浓度是由其合成与降解速度间的平衡所决定的，所以细胞内存在着恒定的蛋白质转换过程。蛋白质合成速度一般通过调节可供翻译的 mRNA 的量来控制。另外，细胞也可调节某种蛋白质被摧毁的速度来控制这种蛋白质的浓度。

蛋白质降解可能是一种随机过程，因在一定时间内，老的蛋白质分子并不比新的更易被降解。然而，由于一个细胞内不同蛋白质对降解过程的固有易感性不同，各种蛋白质以显著不同的速度转换。一个“典型”蛋白质分子平均在合成后约两天被降解，但就个别蛋白质而言，平均降解期可短至数分钟，长至数月，甚至数年。

多数蛋白质具有致密的结构，因而对蛋白水解作用，也就是对降解作用具有一定的抗性。蛋白质降解的重要作用之一为清除细胞内有缺陷的蛋白质。有缺损的蛋白质或从由于生物合成过程中的错误而造成的有缺陷的基因编码生成，或从原具正常功能的多肽自发变性而成。这些“异常”蛋白质的较松散的结构可能使它们较易受蛋白水解作用攻击。作为这一精密控制过程的一环，ATP 水解所释放的能量可能被用来在一种特殊多肽与降解的蛋白质之间形成共价键。这种特殊的多肽，由于在从细菌到人类各种极不同的生物中广泛存在而被称为泛素（ubiquitin），显然这标志着被它所结合的蛋白质将迅速降解。

许多在细胞内易被迅速降解的“正常”蛋白质都是一些在代谢途径中催化决定速度步骤的酶。合成这些关键性蛋白质的速度通常受环境的调节，以促使最有效地利用该代谢途径。只有当不断迅速降解时，这些酶的浓度才能受合成速度的变化所决定的新水平而被迅速调节。目前尚不清楚降解这些蛋白质的机制是否与降解有缺损的蛋白质的机制有所不同。并非所有在胞液中合成的蛋白质都留在胞液中。

正如在下节中将讨论的，有些参与翻译的核糖体与内质网结合形成膜结合核糖体。许多预定形成各种细胞器和细胞器膜的蛋白质，以及所有预定要分泌出去的蛋白质都由这类核糖体合成。

然而，一些由胞液中游离核糖体翻译的蛋白质也可离开胞液。如组蛋白及其他多种染色质蛋白，在胞液中一经合成后即迅速扩散穿越大型核膜孔，并与核内有关结构结合。叶绿体及线粒体中大部分蛋白质，以及过氧化物酶体中至少部分蛋白质，由胞液中游离核糖体合成后，再经运输穿越围绕上述各有关细胞器的膜。

小结

胞液包括除细胞器外的所有细胞空隙,在真核类中一般占整个细胞体积的50%至60%。多数中间代谢过程及细胞生长和生存所需的蛋白质的合成均在胞液中进行。细胞内某种蛋白质含量依其合成速度(主要由核中有关 mRNA 合成速度支配)及降解速度间的平衡而定。有些蛋白质在细胞内被不断迅速降解,其作用可能是使细胞能依调节信号而迅速改变这些蛋白质的浓度。蛋白质的可逆性共价修饰为细胞内调节特定蛋白质活性提供了一个重要机制。如许多细胞蛋白质的活性是由磷酸化和脱磷酸化循环所控制。

内 质 网¹³

所有细胞均含有内质网(endoplasmic reticulum, ER),一般内质网膜占细胞的整个膜成分一半以上(表7-2)。尽管内质网膜是高度卷曲的,但仍认为它是围绕一封闭囊的单一连续膜。这一被封闭的内部空间,称为ER腔或ER池,通常占有细胞总体积的百分之十以上(表7-1),ER腔由单一膜(ER膜)与胞液隔离,ER膜还起着这两个细胞区室间通讯媒介的作用。因ER膜与外层核膜是连续的,因此ER腔与核内空间也只是一层膜,即内层核膜所分隔。相反,ER腔与高尔基器区室相互间则由两层膜分隔,一般认为这两种细胞区室间的大分子交流需经运输小泡进行(图7-18)。

ER为细胞提供一种机制,用来分离属于胞液及不属于胞液的新合成的分子。此外,ER在合成用来建造其余细胞器的大分子方面起重要作用。预定要运输到高尔基器,质

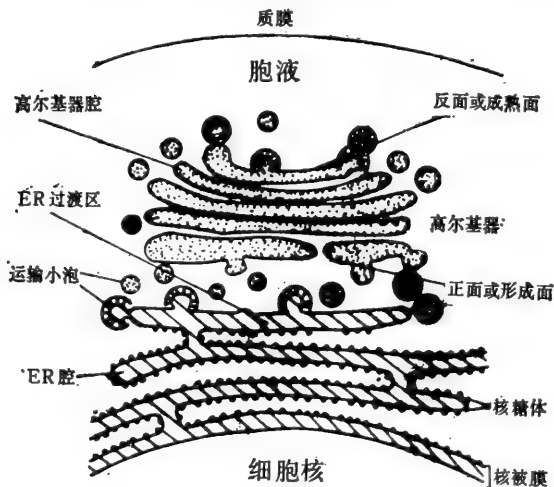


图7-18 ER腔与其他三种与之穿插的细胞区室分隔的示意图。注意ER腔与胞液及核只有一层膜分隔,而ER腔及高尔基器腔之间则由两层膜分隔。图中所示高尔基器的朝向为在分泌细胞中所见,在许多它类细胞中高尔基器的朝向相反,即高尔基器反面朝向细胞核。

膜及溶酶体,或细胞外的脂类、蛋白质及复杂的碳水化合物的合成都与ER有关。因此,了解ER的生物化学特性对了解其它许多细胞结构的起源是很重要的。最近用ER阐明生物合成途径方面所取得的进展,是由于无细胞系统的发展,在这种系统中有关的生化步骤可以在离体情况下进行研究。

附着的核糖体限于ER“粗糙”区域

在电子显微照片中可容易地区分存在于一些细胞内的两种具不同功能的ER区域:在膜的胞质面布满核糖体的粗糙ER,以及实质上属同一膜,但无任何核糖体附着的光滑ER。这两个区域在形态上很不相同:粗糙ER由被称为“池”(cisternae)的堆积状扁平小囊构成,而光滑ER则由纤细小管组成的网状结构(图7-19及7-20)。核被膜的外层膜上常布满核糖体并与粗糙ER相连。在ER的腔面从未发现核糖体这一事实,首先表明

ER 的生物合成功能(指蛋白质合成)是跨膜不对称分布的。

尽管粗糙 ER 存在于除精子外的全部有核细胞中,但在分泌蛋白质的特化细胞(如胰腺泡细胞及分泌抗体的浆细胞)或大量合成膜的细胞(如未成熟的卵细胞或视杆细胞)中特别丰富。此时细胞内多至半数的核糖体与 ER 结合。在分泌蛋白质的细胞,由核糖体分泌到 ER 腔的蛋白质常使 ER 腔明显膨胀(图 7-21 及图 7-22)。

光滑 ER 不参与蛋白质的合成。虽然在某些特化细胞中相当丰富(见下节),就绝大多数细胞(包括多数分泌性细胞)而论,光滑 ER 只不过是粗糙 ER 中不含核糖体的小段区域(图 7-23)。此类区域通常被称为过渡 ER(transitional ER, 而不称为光滑 ER),作为供细胞内运输的装载新合成的蛋白质及脂质的小泡出芽脱落的特异性区域(见下节)。

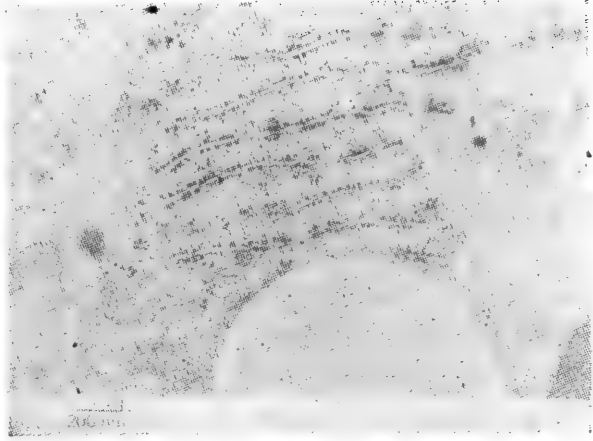


图 7-19 示粗糙及光滑 ER 的极不相同形态的电子显微照片。照片中所示为睾丸中产生类固醇激素,含丰富光滑 ER 的 Leydig 细胞。还可看到大圆球型脂质滴的一部分。(Daniel S. Friend 赠)

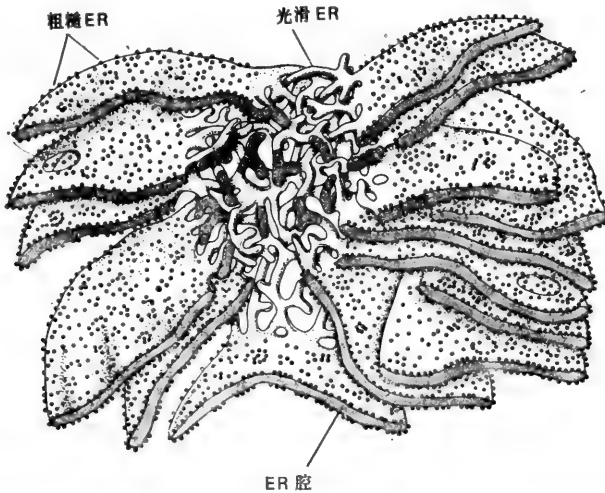


图 7-20 肝细胞中光滑及粗糙 ER 区域三维结构重建图。粗糙 ER 形成定向堆积的扁平池,每一池具有 20 nm 至 30 nm 宽的腔。与池连接的是光滑 ER 膜,光滑 ER 膜形成由直径为 30 nm 至 60 nm 小管组成的纤细网状结构。据信 ER 膜为一连续结构,包围单一腔。(仿照 R. V. Krstic, *Ultrastructure of the Mammalian Cell*. New York: Springer-Verlag, 1979)

某些特化细胞中富含光滑 ER¹⁴

有时在脂质代谢的特化细胞中光滑 ER 属主要细胞器。例如,肝脏中的主要细胞类型——肝细胞——是产生外运脂蛋白颗粒的主要场所。合成脂蛋白脂质部分的酶位于光滑 ER 膜上。肝细胞光滑 ER 还含有催化与药物及有害代谢产物解毒的一系列反应有

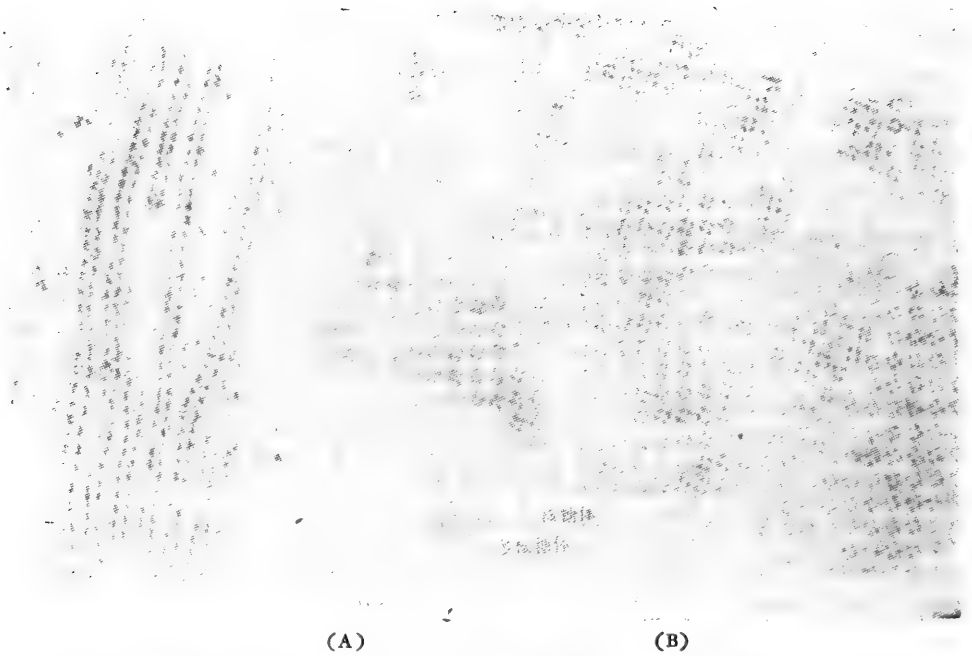


图 7 21 蜥蜴卵母细胞(未成熟卵细胞)中不寻常高度有序排列的核糖体覆盖大面积粗糙 ER 的电子显微照片。(A)堆积状粗糙 ER 小池垂直切面观。(B)表面观。(Nigel uniwin 赠)

关的酶。研究最详尽的一类解毒反应是由被称为细胞色素P450的酶催化的。这种蛋白质利用来自 NADPH 的高能电子借 ER 中特殊还原酶的传递,将羟基加至溶于脂双层中的任何一种具有潜在危害的非水溶性碳氢化合物上。然后,位于 ER 膜的其他酶向这些羟基添加带负电荷的水溶性分子(如硫酸盐或葡糖醛酸)。通过这一系列反应后,本来将被永久固着在细胞膜的非水溶性药物或代谢物可获得足够的水溶性,因而可离开细胞

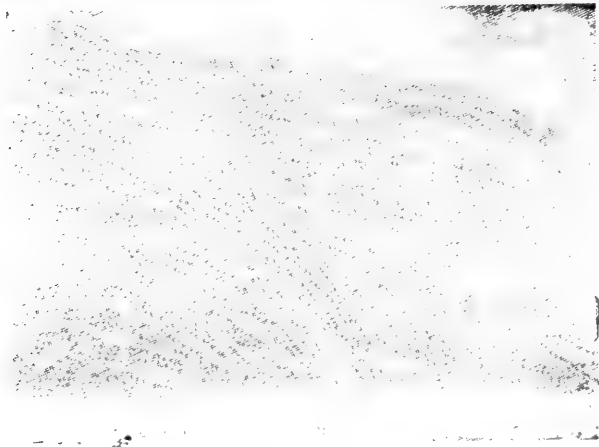


图7-22 胰腺泡细胞活跃的粗糙 ER 电子显微照片。在这个特化的分泌蛋白质的细胞中,ER 腔膨胀(与图 7-19 比较)。(Daniel S. Friend 赠)

并随尿液排出。因单靠粗糙 ER 不足以容纳这些和其他必要的酶,所以在正常情况下肝细胞膜主要由光滑 ER 组成(表 7-2)。

当某类化合物,如药物中的苯巴比妥,大量进入循环系统后,解毒酶在肝脏中异乎寻常地大量合成。此时光滑 ER 的表面积可在数天内加倍。药物清除后,过量光滑 ER 大约通过溶酶体的特异性处理(包括自体吞噬泡结构)去除,光滑 ER 可于 5 天内恢复正常。这些急剧变化的调控机制尚属未知。

其余类型的细胞也含有大量光滑 ER。如以胆固醇为原料合成甾族激素的细胞(如睾丸中的有关细胞)具有展开的光滑 ER,来容纳合成胆固醇并将其修饰,以形成甾族激素的酶(见图 7-19 所示之例)。肌肉细胞内含有被称为肌质网的特化而精致的光滑 ER,

可吸收胞液中的 Ca^{2+} 。泵入 Ca^{2+} 的 Ca^{2+} -ATP 酶 为这类光滑 ER 上存在的主要膜蛋白。从胞液中排除 Ca^{2+} 可使肌原纤维在每次肌肉收缩后得以松弛。

ER 的粗糙及光滑区域可用物理方法分离¹⁵

为研究 ER 的功能及生化特性,必须将 ER 膜与细胞其他成分分离。从直观来看,



图7-23 小鼠上皮细胞中的一段 ER 过渡区域,可见运输小泡在此出芽。亦见图 7-18。(Daniel S. Friend 赠)

这是一件艰巨的工作,因 ER 与细胞质内其他成分犬牙交错。幸运的是,当组织或细胞经匀浆化被破坏后,ER 破碎为许多较小(直径约 100 nm)且相对较易被纯化的封闭小泡,这些小泡称为微粒体。

来自粗糙 ER 的微粒体上布满核糖体,故称为粗糙微粒体。核糖体总是存在于此类微粒体的外表面,说明微粒体内部在生化学上相当于 ER 腔(图 7-24)。在匀浆中还可发现许多体积与粗糙微粒体相仿,但无核糖体附着的小泡。这类光滑微粒体部分来自 ER 的光滑区域。

部分来自质膜、高尔基器以及线粒体的泡状碎片(比例随组织而异)。所以,尽管粗糙微粒体等于 ER 粗糙区域,但光滑微粒体的来源却不易确定。由于肝细胞中光滑 ER 大量存在,所以肝匀浆中多数光滑微粒体来自光滑 ER。

因核糖体含有大量 RNA,使粗糙微粒体比光滑微粒体致密。所以,可在蔗糖密度梯度中将混合物沉降达到平衡,使粗糙及光滑微粒体得以分离(图 7-25)。若比较组织(如肝脏)中所分离出的粗糙及光滑微粒体的酶活力及多肽组成等特性,可发现这些特性尽管不完全相同,却相当类似。看来大部分 ER 膜成分,正如可预期在液体的连续的膜系统之间发生的一样,可在 ER 膜粗糙及光滑区域之间自由扩散。



图7-24 纯化的粗糙微粒体部分的薄片电子显微照片。微粒体表面附有核糖体的球状小泡。(George palade 赠)

ER 膜可以容易地在保持功能的情况下纯化,因而粗糙微粒体可做为研究由 ER 进行的多种不同过程的特别有用的制品。小泡在局部解剖学上以与粗糙 ER 相同的方式封闭,使其胞质面易受可在离体加入的成分的影响,对生物学家来说,粗糙微粒体代表仍具有蛋白质合成、糖基化及膜合成能力的内质网的一个小型可靠的翻版。

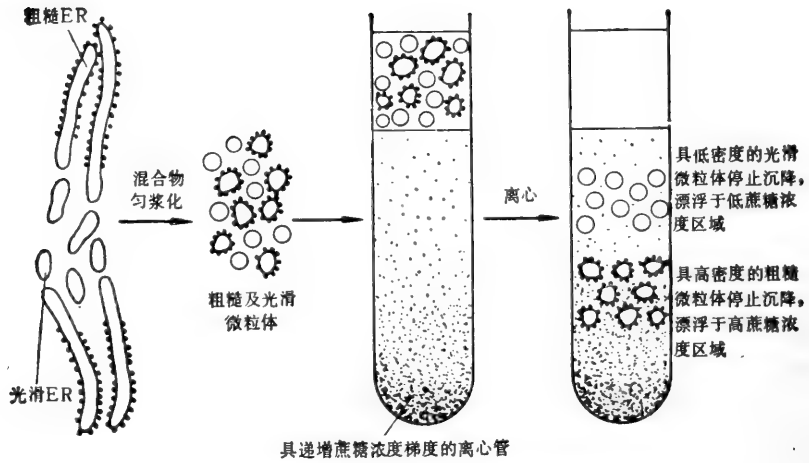


图 7-25 自 ER 中纯化粗糙及光滑微粒体的分离程序示意图

ER 粗糙区域含有负责结合核糖体的特异蛋白质¹⁶

因 ER 膜与所有的膜相同,属二维液相结构,若无特殊的约束,多数蛋白质及脂质将在粗糙及光滑区域之间自由均衡。然而,当比较分离的肝微粒体时,可发现某些成分只存在于粗糙 ER,而不存在于光滑 ER 的事实,说明必有某些特殊约束机制存在。特别是粗糙 ER 膜上大概含有非均衡分布的特殊蛋白质,既可结合核糖体,又使粗糙 ER 呈扁平状(图 7-20)。

粗糙 ER 上的核糖体部分地由延伸的肽链固着于 ER 膜,当多肽链在合成后,它们穿越 ER 膜(见以下所述)。然而,当用嘌呤霉素一类药物终止肽链合成时,核糖体依然牢固地附着于粗糙微粒体膜。若将微粒体悬浮于高浓度盐溶液中,则可将核糖体剥离。高浓度盐溶液的作用是破坏核糖体与粗糙微粒体特殊膜蛋白之间的相互作用。此外,核糖体可以和与之分离的粗糙微粒体膜重新联结。核糖体与膜上有限的部位以高亲和力迅速结合,使“剥光”的膜重新获得当初分离时所具有的核糖体数目。

核糖体上的结合部位位于大亚单位,大概附着于粗糙 ER 膜上两种特异的糖蛋白上。这两种蛋白称为核糖体结合蛋白(ribophorins),横跨 ER 膜,并只存在于 ER 粗糙区域。尚不清楚防止核糖体结合蛋白扩散至光滑 ER 膜的机制。核糖体结合蛋白可通过在脂双层膜形成大型二维结晶的方式而被分隔,或借双层膜两面的纤维蛋白系挂于适当的位置上,不管机制如何,这些都可能与粗糙 ER 的外形要比光滑 ER 扁平有关。

膜结合核糖体合成的蛋白质在翻译过程中穿越膜¹⁷

许多蛋白质在某一时期必须穿越细胞膜所设置的通透性屏障。此类例子极多,其中最明显的为蛋白质从细胞分泌出来(分泌蛋白)。在这例子中,核糖体结合于 ER 膜有助于解决使水溶性蛋白质穿越疏水性膜的问题:蛋白质在合成过程中,尚未折叠形成最终亲水性构象前,就如线一般穿过 ER 膜。一旦进入粗糙 ER 腔,预定分泌的蛋白质即通过高尔基器转运,然后被分泌到细胞外。所以,分泌蛋白一经合成,就永远与胞液隔离。

另一个类似的但更不可思议的问题是预定要横跨脂双层的膜蛋白提出的。通常,这类多肽链的大型亲水性部分以末端向上暴露于细胞内膜的腔侧面,或暴露于局部解剖学上相当于质膜外侧面的那一侧(图 7-26)。与分泌蛋白不同,膜蛋白一般仅少量合成,因而较难探索其合成方式。然而,有一种膜蛋白,即具被膜的水泡性口炎病毒(VSV)的G蛋白,可由细胞大量合成。当这种病毒感染细胞时,只有一种膜蛋白(G蛋白)被细胞合成,而在未被感染的细胞中则合成成千上万种不同的蛋白质。所以在经病毒感染的细胞中较易跟踪G蛋白的合成过程。与分泌蛋白相同的是,G蛋白多肽链的大部分在合成后即被运送穿越ER膜。但与分泌蛋白不同的是,G蛋白并不被释放进入ER腔,而由多肽链中一小段疏水性片段固定在脂双层上。因此G蛋白保持膜结合状态,而穿越ER膜的500个氨基酸则从包裹最终形成的病毒颗粒的脂双层中伸出,形成外部的“穗”。

翻译产物在合成过程中横穿ER膜的膜结合核糖体被说成是参与“定向施放”(vectorial discharge)。“定向施放”这一术语可强调这一过程的两个重要特征。首先,核糖体只存在于ER膜的胞液面,所以多肽链的穿越膜的运送必然具有“方向性”,即由胞液至腔(多肽以氨基端为首,按蛋白质合成方向穿越膜,所以这种运送亦带方向性)。第二,“施放”一词强调这一过程属一种主动需能过程。延伸的多肽穿越膜的机制尚不清楚,而且这一过程所需能的来源亦属未知,但目前已可利用无细胞系统对这类问题进行生化研究。涉及定向施放的可能是一种未知的转运蛋白。就象一种需要能量驱动的多肽泵那样。

支持定向施放的直接证据来自细菌实验¹⁸

定向施放的概念最早来自1966年进行的实验,实验表明,用嘌呤霉素使微粒体释放的多种新合成的多肽是被隔离在微粒体腔内的。直至1977年又进行了一系列令人非常信服的实验,如其他许多得出重要生物学发现的实验一样,这些实验也无例外地是在细菌中进行的。芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)之类的革兰氏阳性细菌分泌大量酶,因细菌中无ER,这些酶由结合于质膜的核糖体合成。在图7-27所示实验中曾发现,若将蛋白水解酶加入已被除去细胞壁의完整细菌细胞,则可选择性水解这些分泌性多肽链的一端,而多肽链的另一端,即正在细胞内被核糖体合成的一端,则不被水解,这表明生长中多肽链的一端必然暴露于细胞外表面。此外,几乎新合成多肽的所有部分都可被蛋白酶攻击,只剩下含50个氨基酸残基的未被消化片段。因当游离核糖体受轻度蛋白水解后,在核糖体内可剩下约含30个氨基酸残基的抗性片段,这些观察提示了在定向施放过程的任何瞬间每一多肽中只有约20个氨基酸残基留于膜内。这一长度的肽链仅够单程横跨脂双层。

虽经尝试,但此类试验在真核类粗糙微粒体中并不成功。主要问题是,在真核类中有关局部解剖结构正好相反,生长中的多肽被封闭在微粒体内,而目前尚无使外加蛋白酶只在微粒体内部起水解作用的方法。

膜结合核糖体来自被特殊信号顺序引至ER膜的游离核糖体¹⁹

尽管与粗糙ER膜结合的核糖体可有选择地合成预定进行定向施放的蛋白质,却并无证据表明这些核糖体本身与游离存在于细胞质中的有何不同。据目前观点,膜结合核糖体只不过是这些核糖体正在翻译多肽链而被特异地引入ER膜而已。

有关核糖体是如何被引至 ER 膜的主要发现来自对抗体（免疫球蛋白）合成的详尽研究。免疫球蛋白的轻链及重链是免疫系统浆细胞的主要分泌产物（第十七章）。当替免疫球蛋白轻链编码的 mRNA 在体外被游离核糖体翻译时，轻链被合成为含有通常不存在于分泌产物中的 20 个额外氨基酸残基的前体形式。这一额外“引导”肽位于免疫球蛋白前体的氨基端。但是在体外用附着于粗糙微粒体的核糖体合成的轻链则没有这种额外的氨基端肽。这一发现证实了早先的有关肽引导序列可作为将核糖体引向 ER 膜粗糙区域的信号之设想（图 7-28）。因此，某些可识别含有信号肽的蛋白质的受体必须专存在于 ER 膜的粗糙区域。

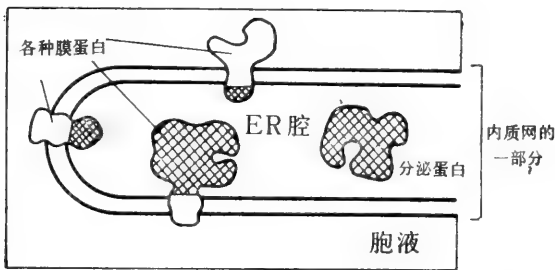


图7-26 四种不同蛋白质的示意图。着重描绘每种蛋白质在合成过程中已通过 ER 脂双层的部分。图示三种不同膜蛋白及一种分泌蛋白，网格区域代表每种蛋白质中已跨过双层的部分。

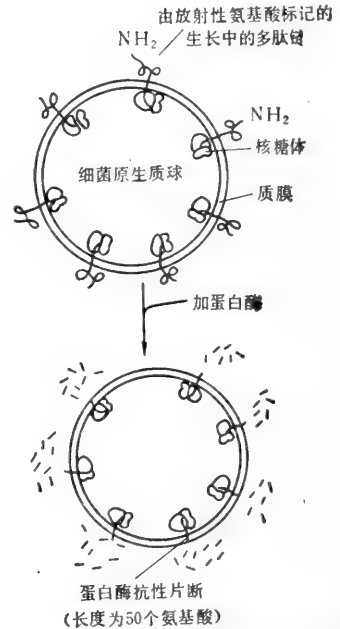


图7-27 细菌中定向运输略图。去除细胞壁后(形成原生质体),使细胞短暂摄取放射性氨基酸以标记与质膜结合的核糖体合成的多肽链。由于部分生长中多肽链已被运送穿越膜,因此可被蛋白酶消化。此图未按比例绘制,实际上核糖体直径只有细菌细胞直径的四十分之一。

这一观点被以后的发现有力地证实：当胰脏的主要分泌蛋白在体外被游离核糖体合成时，被翻译为在体内未发现的含有类似氨基端引导顺序的多肽前体（前分泌蛋白）。此后，对原核及真核类中数十种分泌性及膜组成蛋白的前体形式又有报道。在这些蛋白质前体中，尽管实际顺序有很大差别，但氨基端信号序列均含有大量疏水性氨基酸残基。目前已知这些信号序列实际上在多肽合成全部完成以前，就被只存在于粗糙微粒体上的特殊蛋白酶于粗糙 ER 的腔侧面切除。这种在合成后被切除的氨基端序列从未在胞液的蛋白质中发现过。

胞液中开始合成预定运往 ER 的蛋白质的核糖体必须被引向粗糙 ER 以进行定向施放。但是 ER 膜如何特异地识别这些核糖体呢？近来有证据表明，当核糖体合成特有的信号肽后，胞液中立即就有一种多亚单位蛋白与这些核糖体结合。这种被称为信号识别蛋白（signal recognition protein）的蛋白质，可在核糖体结合于粗糙 ER 膜前终止蛋白质的进一步合成。据猜测，由于这一蛋白质可同时识别新合成蛋白质的氨基端及粗糙 ER 膜上的有关受体，故可将核糖体结合于 ER。当定向施放过程开始后，核糖体上的蛋白质合成即得恢复。尽管 ER 膜上受体的性质不明，核糖体结合蛋白则可能参与稳定核糖体-ER 复合体。

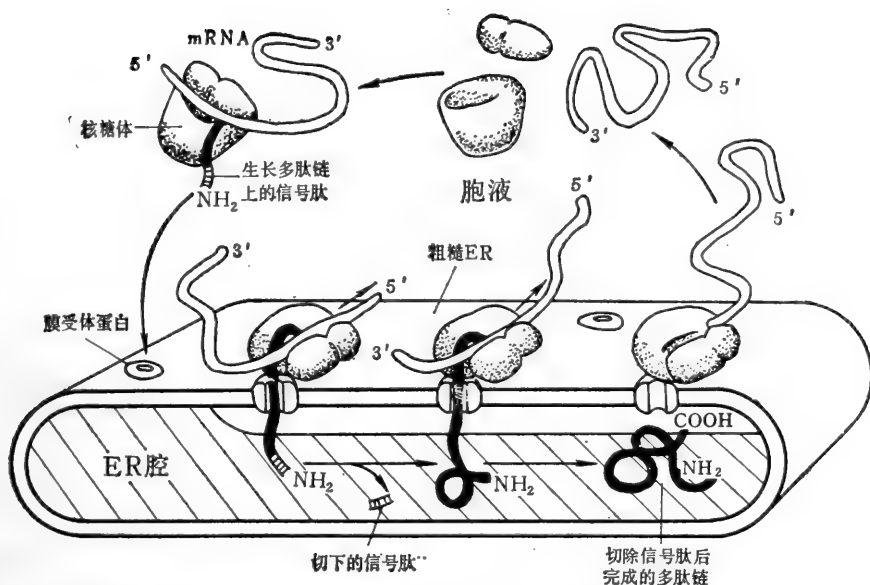


图 7-28 信号肽假说示意图。为简明起见,图中只示单个核糖体,而未示多核糖体。据认为图中描绘的胞液核糖体与粗糙 ER 结合需两种不同的相互作用:核糖体本身对 ER 上特殊膜蛋白(可能为核糖体结合蛋白,见 326 页)的亲合力,以及生长中多肽链氨基端信号肽与膜受体间的相互作用。然而,一旦蛋白质穿越膜的运送开始后,生长中多肽链本身即取代第二种作用而起协助固定核糖体的作用。

遗传学证据支持信号假说²⁰

在原核类中进行的遗传学分析可以两种不同方式来验证引导序列充当蛋白质定向释放信号的设想。(1)已分离出许多大肠杆菌膜蛋白突变型,在这些突变型中,有关膜蛋白不插入膜中,而留在细胞质内。可发现这些突变多数改变了蛋白质氨基端的引导序列。(2)在特别设计的大肠杆菌菌株中,为结合膜蛋白多肽链及胞液蛋白(cytosolic protein)多肽链编码的 DNA 片段被融合而产生新的杂种蛋白。若具相当长度的大肠杆菌膜蛋白氨基端与胞液蛋白羧基端的大部分融合后,可发现杂种蛋白嵌于膜内。看来只有氨基端部分是进入膜所必需的。

在大肠杆菌中利用杂种蛋白进行的实验揭示了有关信号序列的另一重要事实:尽管把生长中多肽引向膜需要这些序列,但有时单靠这些序列本身却难以完成这一使命。含有极短的膜蛋白氨基端的杂种蛋白,尽管包括完整的引导序列,却不能嵌入膜中。正常情况下,引导序列可能与多肽链临近区域作用,产生一种独特的氨基酸三维阵列。正是这种结构,而不是引导序列本身,为特有的膜嵌入过程所必需。

某些蛋白质是根据翻译后输入机理穿越膜,而不是以定向释放方式穿越膜²¹

有些蛋白质可在核糖体合成很久后再穿越某类膜。例如,线粒体及叶绿体中多数蛋白质由核基因编码(第九章)。这些蛋白质在胞液中合成并释放,然后再通过需能过程(翻译后输入)穿过有关细胞器膜。有趣的是,多数按此方式输入的蛋白质也含有在穿越线粒体或叶绿体膜后即被切除的氨基端引导序列。已知这类引导序列为提供经识别后可指引

蛋白质至正确位置的“信号”所必需。这两种细胞器的膜必然都含有辨认相应的氨基端信号的特异性受体。这些受体可能在功能上与一种由能驱动的泵连接，这种泵可驱使被识别的蛋白质穿越膜，并可能在此过程中将蛋白质分子暂时伸展(图 7-29)。

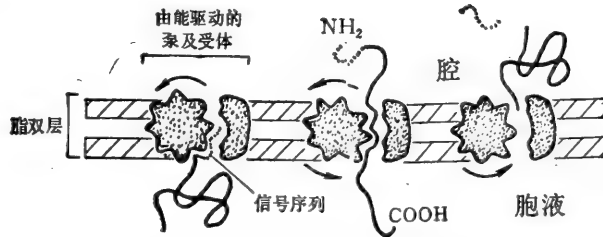


图 7-29 由能驱动的蛋白质泵示意图。当受体识别某些氨基端肽的特点后，泵即被活化，从而驱使整个蛋白质穿越膜。显然需要用类似的机制来解释观察到的将已合成蛋白质从胞液运送到线粒体及叶绿体的现象。

某些膜蛋白可按翻译后穿越方式进入或部分穿越 ER 膜。这类膜蛋白可能包括这样一些蛋白质：它们的大部分被埋于脂双层，而只将小部分暴露于膜的非细胞质的一侧。不难想像，这类疏水性蛋白为何在释入胞液后，或甚至在合成过程中，仅仅溶于脂双层。将蛋白质中相对较小的亲水部分运送穿越脂双层所需的能量可取自将疏水部分由水性环境移至疏水脂双层所产生的自由能。位于线粒体外膜的某些蛋白质似乎在胞液核糖体合成后以这种方式进入膜内。

即使只考虑上述少数几例，已可清楚地认识到，蛋白质中必然存在着多种不同类型的信号序列。有些信号将蛋白质引向 ER，其他则将蛋白质引向线粒体或叶绿体(植物细胞中)。有关的识别系统必然具有高度选择性，因为看来蛋白质是可相当可靠地被引至细胞内正确的位置上的。

在粗糙 ER 上合成的大多数蛋白质都是糖基化的²¹

糖基化作用是 ER 主要的生物合成功能之一。值得注意的是分泌前或运送到细胞内其余目的地前(如高尔基器、溶酶体或质膜)停留在 ER 腔的多数蛋白质都属于糖蛋白(图 7-30)。相反，胞液中的可溶性蛋白质则都未被糖基化。

了解糖基化过程的一个重要进展是发现了只有一种低聚糖(由 N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖及葡萄糖组成)在 ER 中被转移至蛋白质，并且这一低聚糖总是与蛋白质中天冬酰胺残基支链上的 NH₂ 基团连接(图 7-31)。成熟糖蛋白中所有与天冬酰胺连接的低聚糖结构的多样性均来自对这种唯一前体结构的大幅度修饰，这些修饰作用多发生于通过高尔基器的运行过程中(见 342 页)。这种与天冬酰胺连接的低聚糖(N-连接低聚糖)是目前糖蛋白中最普遍的一种糖基，除此之外，还常可发现低聚糖与丝氨酸、苏氨酸或羟赖氨酸残基侧链上的 OH 基团相连(O-连接低聚糖)。目前尚不清楚这种糖基化作用是在 ER 开始的或是只在高尔基器中发生，对其细节也了解得不多。

细胞内发生糖基化作用的位置可利用放射自显影术来判断。例如，若把甲状腺切片短暂地与 [³H] 甘露糖温育，可发现多数 ³H 掺入甲状腺细胞所合成的主要糖蛋白上，即与甲状腺球蛋白相连的低聚糖上。为判断这一反应在细胞内发生的地点，可将细胞用 [³H] 甘露糖短暂标记，然后按图 7-32 所示步骤加工，用于电子显微镜观察。将细胞薄

切片用照相乳剂薄层覆盖，这样切片中 ^3H 衰变的部位可由覆盖切片的感光薄膜上的银粒显示(图 7-33)。当在电子显微镜下观察时，可判断 ^3H 相对于已知细胞结构的位置。此类实验的结果极为明显： $[\text{}^3\text{H}]$ 甘露糖只掺入 ER 中(图 7-34)。

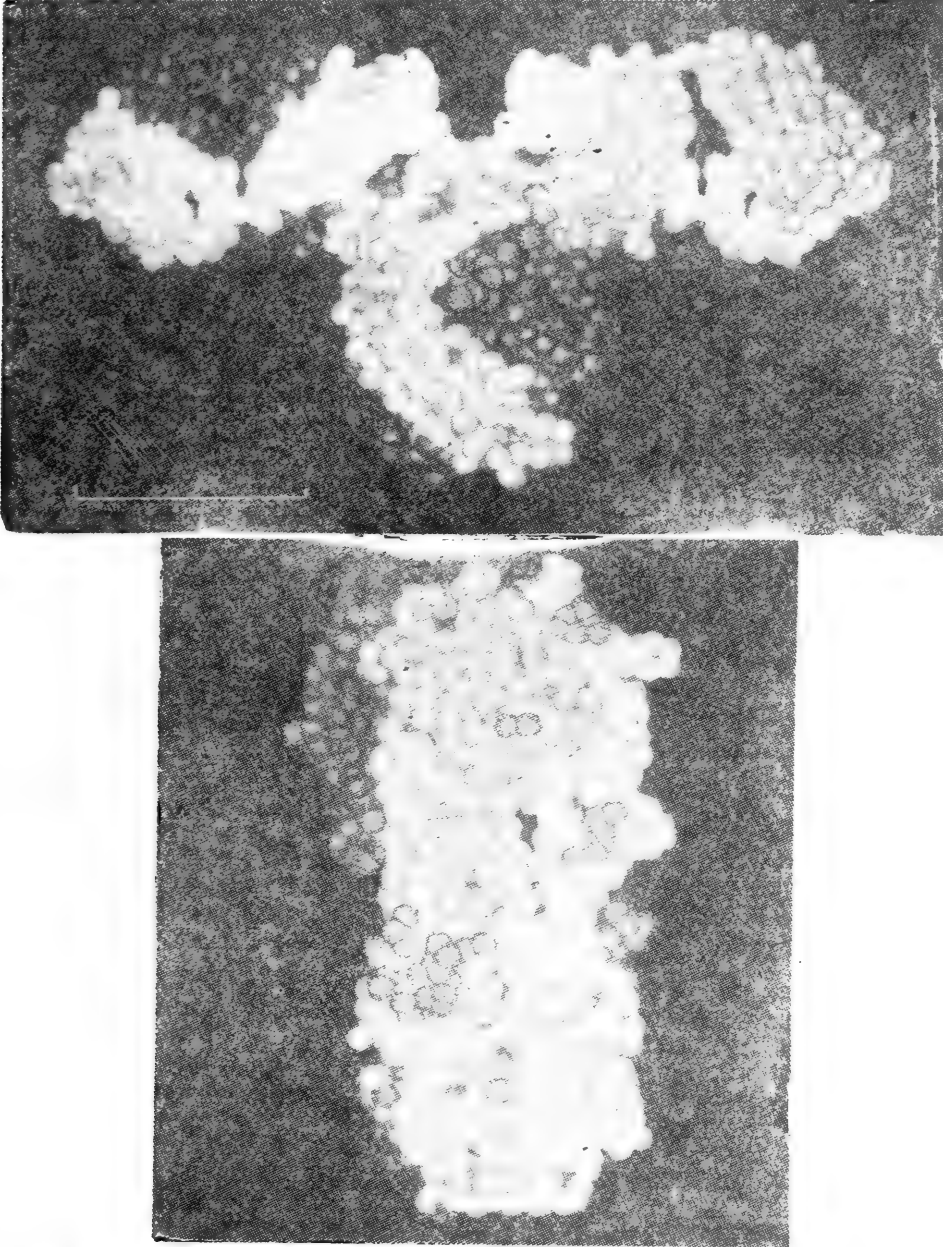


图 7-30 两种糖蛋白的三维结构，表明与之共价连接的低聚糖链(带密点的原子)的结构及位置。(A)免疫球蛋白(抗体)分子。(B)膜糖蛋白：流感病毒血凝素。糖蛋白或嵌入细胞膜，或分泌于细胞外，在重量上可含有少至 1%，多至 85% 的碳水化合物。某些富含碳水化合物的糖蛋白每一分子中可含数十至数百个低聚糖链。(照片由 Richard J. Feldmann 赠)

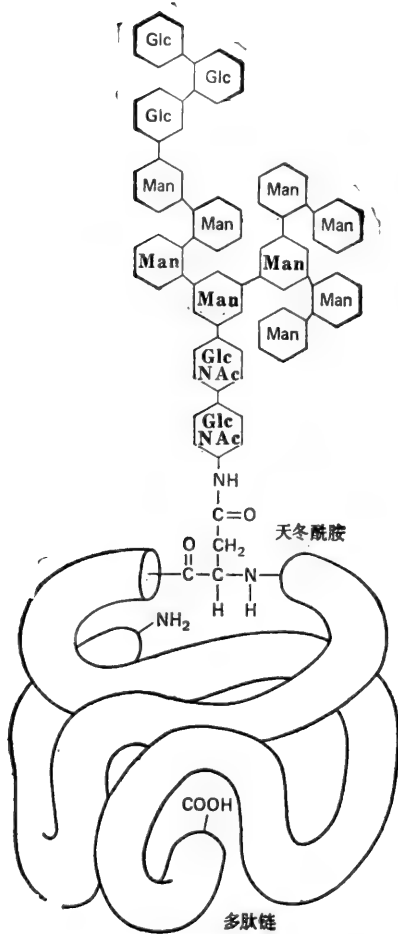


图7-31 于 ER 膜的腔侧面加入多种蛋白质并与天冬酰胺连接的低聚糖结构图。着色糖基组成低聚糖的“核心区域”。在许多糖蛋白中，只有位于核心区域的糖基才可逃避在高尔基器中进行的对低聚糖的大幅度修剪作用(见图 50)。

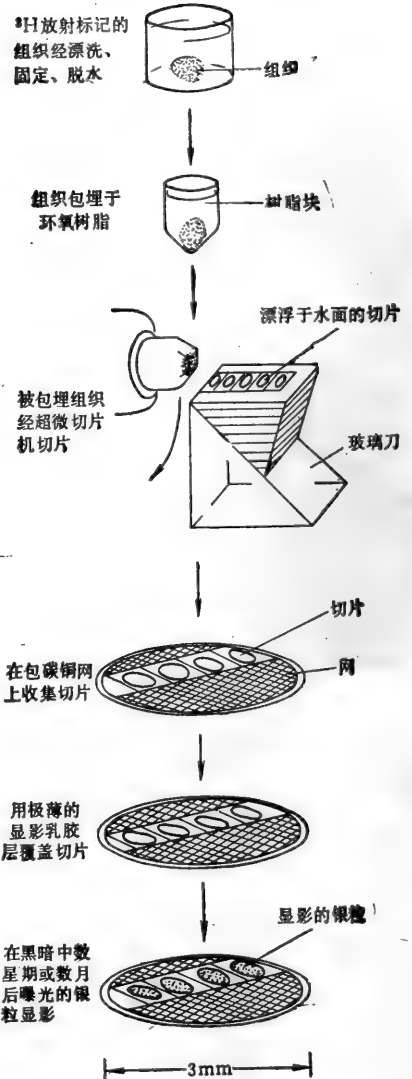


图7-32 将薄组织切片加工以使用电子显微放射自显影术定位放射性的示意图。包埋前将未掺入产物的所有放射性通过固定及漂洗步骤清除，而产物本身必须留在组织内，这些都是十分重要的。

低聚糖在 ER 的腔侧面加在合成中的多肽链上

据信低聚糖向天冬酰胺的转移实际上发生于 ER 膜的腔侧面。催化这一转移过程的酶属一种活性部位暴露于腔侧面的膜结合蛋白。这一事实可解释为何从未接触 ER 腔的胞液蛋白不被糖基化。如图 7-35 所示，低聚糖预先作为一个整体形式，然后在蛋白质上的靶天冬酰胺残基一露出 ER 膜腔侧面后，就立即以一步酶促反应的形式转移到这一残基上。这种转移方式提供与位于 Asn-X-ser 或 Asn-X-Thr (X 为任何氨基酸)顺序中的靶天冬酰胺 (Asn) 残基结合的最大机会。上述两种顺序结合在糖蛋白中出现的机

会比在非糖基化的细胞质蛋白中出现的机会要少得多。显然在糖蛋白进化过程中有不利于这些顺序出现的选择压力。许多部位上发生的糖基化作用无疑可干扰蛋白质分子的折叠。

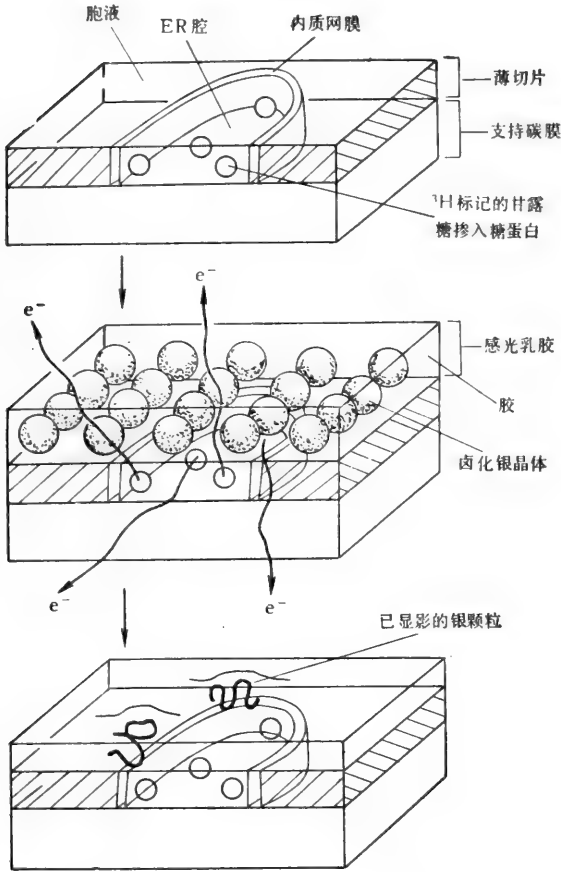


图7-33 放射自显影术的原理。图中银粒相对于电子显微放大像的位置指明³H甘露糖掺入糖蛋白的位置。因³H衰变而放射出的电子可在略偏离放射源处使银粒显影，故对放射性分子的定位与电子显微镜的分辨率相比不够准确。

叠。

若糖基化作用发生于胞质面，将给定向施放机制造成严重困难，因这时定向施放过程将不得不迁就臃肿庞大的低聚糖链。如有一个系统可使低聚糖及多肽在腔侧面相互结合前就以不同的机制分别转运穿越膜即可使问题简单化。

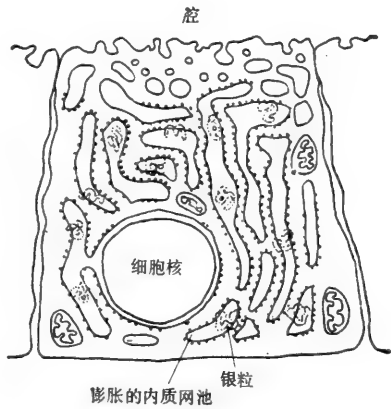


图7-34 甲状腺球蛋白在温育于³H甘露糖中的甲状腺细胞内合成的示意图。利用以上两图所示方法，可将银粒定位于粗糙ER，表明³H甘露糖在该处掺入甲状腺球蛋白。然而，本法的分辨率（约140 nm）不足以将产物在ER池空隙定位，但图中仍标出产物在ER池中的大约位置。

低聚糖借活化脂质供给多肽，并几乎立即被修饰²³

如图7-35中所示一系列反应要求即将转移至天冬酰胺残基的低聚糖在ER腔侧面以“活化”形式存在。活化则由低聚糖通过高能键与供体分子相连而实现。本世纪70年代初发现活化供体是一种特殊脂质分子长萜醇，这是这方面研究的一个主要进展。低聚糖通过焦磷酸键与脂质供体相连。

低聚糖在这种与膜结合的脂质分子上，以糖与糖连接的方式组成。各种糖先在胞液中形成核苷酸-糖中间物而被活化。然后这些中间物依次将其中的糖（直接或间接）供给脂质（图7-36）。长萜醇具高度疏水性，分子相当长，连其22个5碳单位，可较脂双层的厚度长三倍以上。由于长萜醇被牢固地嵌于膜中，与其相连的低聚糖也被牢牢地固定在将发生糖基化反应的ER的腔侧面。

在ER中蛋白质最初糖基化作用之后，接着就是最终大幅度重建（remodeling）低

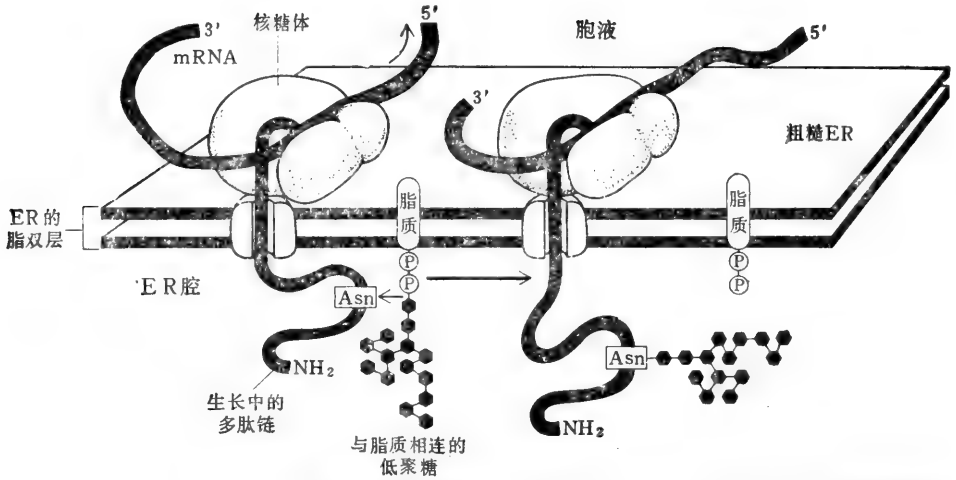


图 7-35 蛋白质在 ER 糖基化作用的示意图。一旦多肽链进入 ER 腔,即在其受体天冬酰胺残基上糖基化。如在图 7-31 中所示的低聚糖作为一个完整单位,通过与膜结合的糖基转移酶催化的反应被转移至天冬酰胺。

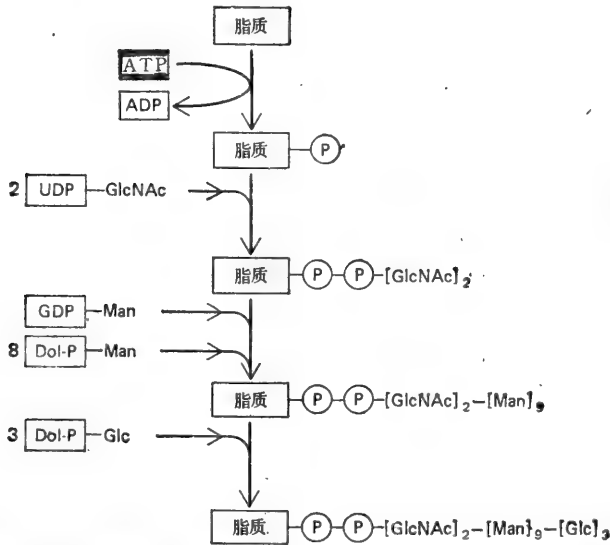


图 7-36 当图中所示的中间物嵌入膜后,即在 ER 膜上进行与脂质连接的低聚糖的合成。图中脂质指长蒽醇,与脂质相连的焦磷酸键可活化低聚糖,使其随后转移到蛋白质。

聚糖过程的第一步。三个葡萄糖残基从多数(但大概非所有)糖蛋白的低聚糖中除去。因这种低聚糖的“修剪”或“加工”过程还将在高尔基器中继续,我们将留在后面章节中继续讨论。

脂质在 ER 膜上合成

磷脂及胆固醇是组建所有脂双层的主要构件,它们都在 ER 膜上合成。实际上,除脂肪酸及两种线粒体磷脂外(见下节),所有细胞内制造的脂质都在 ER 膜上合成。所以,ER 的主要功能之一就是生产为制造新细胞膜所需的几乎所有脂质及蛋白质。

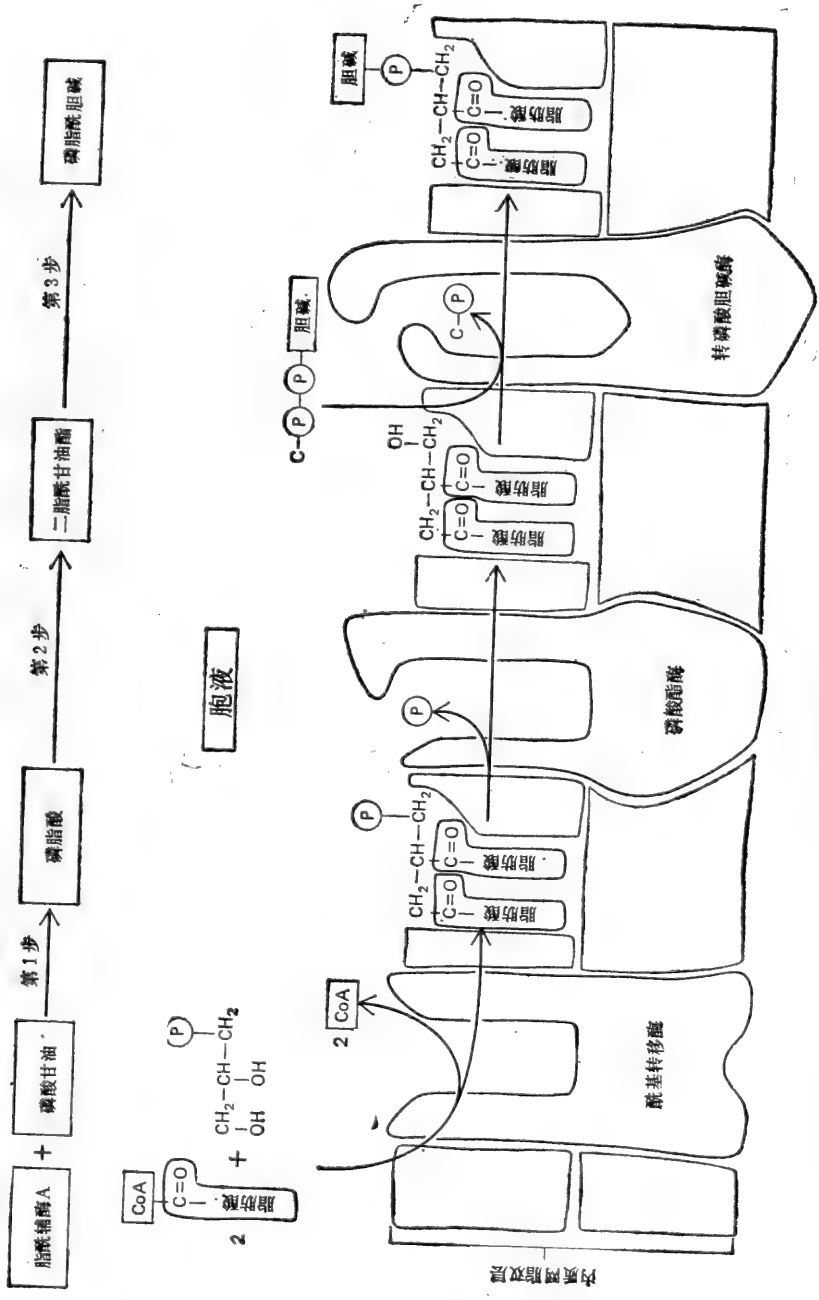


图7-37 在 ER 膜上合成磷脂酰胆碱。反应在脂双层胞液面由与膜结合的酶催化。脂质中间物在脂双层中酶与酶之间迅速扩散，脂双层只在第一步反应中扩增。在第一步反应中相对可溶的前体经反应后生成疏水性脂质分子。CDP-胆碱在图中简化为 C-②-①-胆碱。

装配脂质双层的所有基本原理可依据磷脂的生物合成过程描述。在 ER 合成的主要磷脂是磷脂酰胆碱(又称卵磷脂),卵磷脂可由两个脂肪酸,一个磷酸甘油及一个胆碱通过三步合成(图 7-37)。每一步反应都由酶催化,这种酶溶于 ER 脂双层,它的活性部位朝向胞液。第一步,酰基转移酶将胞液中的脂肪酸及磷酸甘油浓缩产生磷脂酸。这是一种非水溶性的化合物,一旦合成就可保留在脂双层内。脂双层中的磷脂酸可作为下一步酶反应的底物,以此类推。

根据膜装配的观点,图 7-37 所示途径中的最重要一环是发生于第一步反应的新合成脂质插入脂双层。随后各步修饰脂质顶端基团,从而修饰脂双层的化学性质,但并不导致膜的增长。

脂质的生物合成是非对称性的²⁴

脂质生物合成与脂双层的增长之间的实际联系最先是通过细菌实验阐明的。因为细菌没有细胞内膜,所以磷脂可以在质膜处合成。并且发现新合成的磷脂分子最初只存在于质膜脂双层的胞质面(单层)。

这一发现展现出一幅脂双层在细菌或真核细胞中如何增生的简明图。因磷脂合成中的几乎每一步反应均利用仅在胞液中存在的代谢物(即脂酰辅酶 A、磷酸甘油、CDP-胆碱),催化各步反应的酶的活性部位必然也朝向胞液。所以即使最初将早期产物“固定”于双层体内(发生于图 7-37 第一步反应),以后也要将新嵌入的脂质进行修饰,以形成其他脂质,所有这一切都发生在脂双层的同一边。

这种机制可以把任何脂双层变为单层。因为新脂质的嵌入,也就是使膜伸展,将只限于双层的胞液面。很明显,必然存在某种机制,使磷脂能迅速跨越 ER 双层而平衡分布,以便对面单层与胞液面单层平行伸展。在人工合成的脂双层中,脂质不按此方式“翻转”。但脂质确实可在数分钟内跨越 ER 或细菌膜而达到平衡,这一速度几乎为单靠自发的“翻转”所能达到速度的 100 000 倍。磷脂以这种速度从一个单层向另一单层运动的现象只能在进行脂质生物合成的膜中才能观察到。譬如,动物细胞质膜中就无这种现象。所以,在 ER (及细菌质膜)中必然存在一种引起脂质运动的机制。一个值得重视,但尚未被证实的想法是,脂质的平衡是由于只存在于这类膜的一种特异转移蛋白的催化(图 7-38)。

特异蛋白质将磷脂从 ER 转移到线粒体²⁵

线粒体合成磷脂的能力有限,因而在利用磷脂方面有特殊困难。就多数膜而言,如高尔基器膜、溶酶体膜及质膜,可同时获得小液泡形式的蛋白质及脂质(由 ER 合成)。但线粒体膜并不通过接受由他处合成的膜而增长。替代的方式是,在线粒体外合成的脂质及蛋白质,在以“可溶性”而不是以膜结合形式获得后,分别掺入线粒体膜。尽管某些蛋白质可由线粒体内部本身特有的核糖体合成(见 512 页),多数线粒体蛋白质是通过胞液中游离核糖体与合成的水溶性多肽前体的输入而获得的。同样,线粒体中两种带负电荷的脂质,磷脂酰甘油及心磷脂,也是在线粒体膜上合成的。其他脂质,如磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺,则必须从 ER (合成处)或其他已从 ER 获得脂质的细胞膜输入。脂质分子是如何转移到线粒体膜的呢?

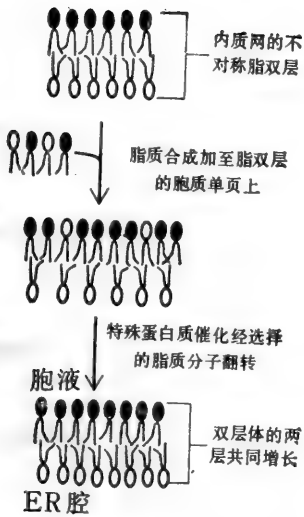


图7-38 脂质分子从 ER 双层的一层(页)向另一层翻转的示意图。因新合成的脂质分子只加至胞质页,某些特殊机制(可能涉及与膜结合的转移酶)必然将部分脂质分子转移至腔页,使膜以双层形式增生。至少在多数双层中两页各含有不同的脂质混合物。此类非对称双层可在转移酶优先识别某些脂质时生成。

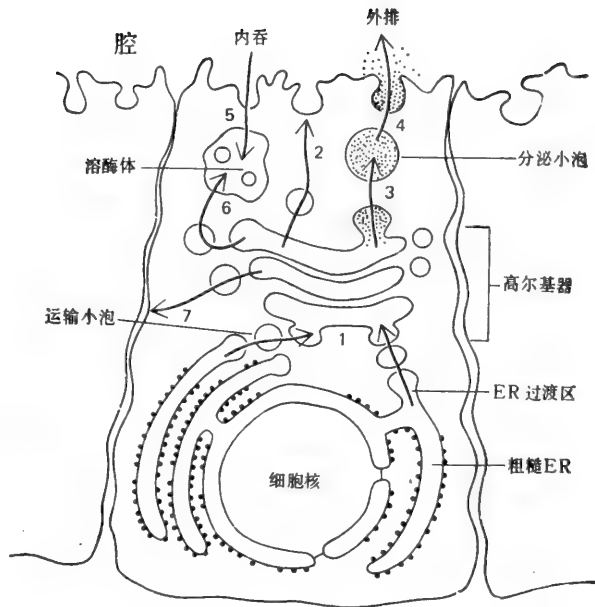


图7-39 运输小泡介导的由 ER 向各细胞内位置运送膜结合的和可溶性的物质的示意图。运输泡在 ER 过渡区出芽,并与高尔基器融合(1)。小泡自高尔基器再次出芽、融合将这些物质运向细胞内各处。图示总计 7 种不同的小泡运输途径。途径 2 及 7 分别向质膜顶膜及侧底膜提供不同的成套蛋白质。此外,由 ER 合成,对 ER 功能必需的物质被选择性地保留在原处。

这一难题似乎可依靠特殊的磷脂转移蛋白,即一种在膜间转移单个磷脂分子的水溶性蛋白来解决。每一转移蛋白只识别特殊类型的磷脂,并只与一个磷脂分子结合。膜双层体间的转运通过下列方式完成:蛋白质从一种膜中“提取”一个磷脂分子,将此脂质埋入结合部位。然后扩散而去,当遇到具适宜性质的另一种膜时,转移蛋白就将结合的磷脂送入新的脂双层。在许多离体情况下,转移蛋白在所有膜之间,以随机方式分送磷脂。即使是随机交换过程,也可导致磷脂从富含脂质的膜输向脂质贫乏的膜。这是因为脂质分子倾向于优先在对脂质具高度亲和性的膜中沉积,同时优先从对脂质具低亲和性的膜中移去。例如,单靠这一过程,磷脂酰胆碱及磷脂酰乙醇胺分子可从 ER(合成处)转向线粒体膜。转移蛋白能否以更特异性的方式将磷脂运至目标,目前尚不清楚。

内部细胞器的腔侧面在局部解剖学上相当于细胞的外部

由 ER 向其他部位运送的大分子被包裹在从 ER 过渡区域挤出的小运输泡内(图 7-39)。这些小泡被含有 ER 膜脂质及蛋白质的脂双层封闭,小泡内则含有来自 ER 腔的可溶性蛋白质。当此类小泡与特殊的靶膜(细胞器膜或质膜)融合后,泡膜组分即成为靶膜的一部分(图 7-40),同时泡内所含可溶性蛋白则被运送至靶的细胞器腔(当靶为质膜时,蛋白质被分泌到细胞外)。尽管生化过程尚不清楚,小泡出芽和融合的反复循环看来在从一种细胞器向另一种细胞器运输大分子方面起重要作用。参与此类细胞内运输的小

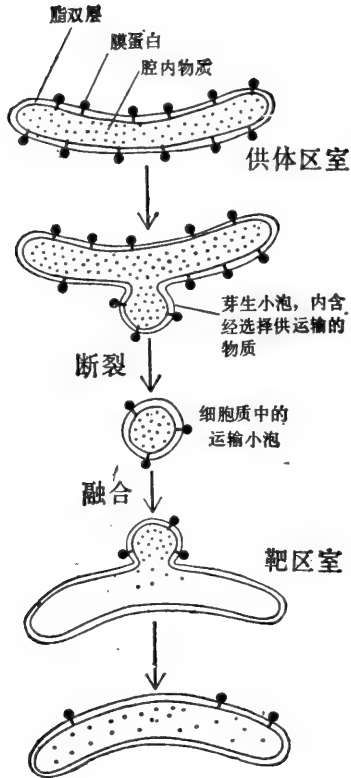


图7-40 示膜的面性在运输小泡介导的运输过程中被保存。注意供体区域膜蛋白及脂质原来的方向性在靶的区域膜中被保存,可溶性物质则在腔与腔之间运送。

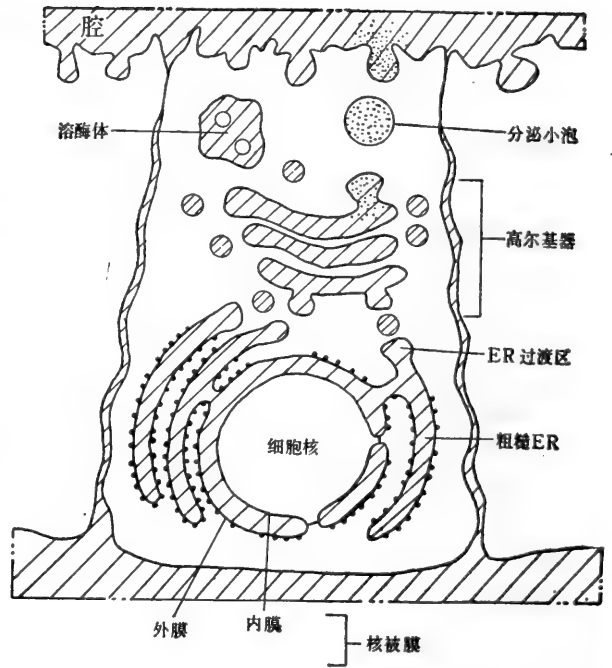


图7-41 具有局部解剖学上等价空间(斜线部分)的细胞的示意图。原则上,运输小泡的出芽和融合循环允许任何一种腔与腔之间或腔与细胞外部进行交流。

泡可能属于前所描述的有衣小泡。

如图7-40所示,小泡的出芽及融合过程必然保持膜的两面性。即任何ER的跨膜不对称性都在细胞内的运输并转交给靶膜的过程中被保存下来,这就使细胞生物学家简化了有关各种细胞器间相互关系的观念。因出芽及融合的反循环可使任何一种细胞器腔内的小物质运送到任何其他细胞器腔内或细胞外,所以,每一细胞器腔在局部解剖学上相当于细胞外部(图7-41)。这一重要事实也有助于了解在细胞内发生的各种内吞或外排作用。

通过ER持续伸展而增长的膜保证了跨膜不对称的扩展

ER实在可算是一座合成膜蛋白及膜脂质以输到细胞其余部分的制膜工厂。在这座工厂中糖蛋白生物合成的局部位置为糖蛋白在膜中非对称方向性的起源提供了直接解释。例如,碳水化合物只在ER的腔侧面被结合入蛋白质。因ER腔侧面在局部解剖学上与细胞外部相当,又因为所有质膜糖蛋白都在ER发生糖基化作用,质膜碳水化合物应只出现于质膜外侧面,事实也正是如此。在质膜的胞质面则不应发现碳水化合物。

膜蛋白多肽链不对称排列的原因也是不难了解的。蛋白质永远只从含有合成这些蛋白质的核糖体胞液面插入ER膜。因膜蛋白一经插入即不能反向跨越双层,某种多肽的

每一分子必然与这种多肽的其余各分子具有同样的不对称方向性。

利用局部解剖学的等价原则，能说明任何一种膜上的蛋白质的方向性与别种膜上的蛋白质的方向性有关。例如，任何通过前所述及的定向施放机制插入 ER 的跨膜蛋白(图 7-28)将在腔侧面具氨基端，胞液面具羧基端。基于图 7-42 所示局部解剖学的原因，这种蛋白质通过细胞内运输抵达质膜后，将使其氨基端朝外，羧基端朝内。事实上，这正是最常见的跨膜蛋白的定向方式。

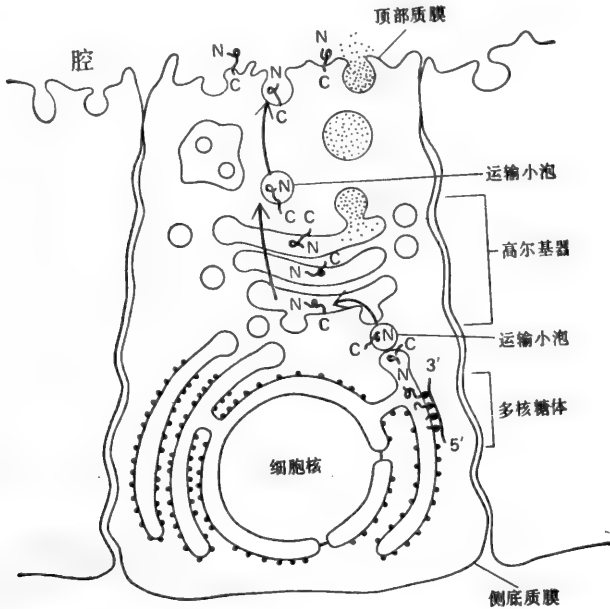


图 7-42 示跨膜蛋白对 ER 膜的插入具方向性，如何在这种蛋白质被运输到其他膜时仍被保留。

当组成膜的新大分子一个接一个地结合入原有的非对称 ER 膜时，由于迅速向两侧扩散，这些分子很快变得与原有组分无法区别。这样，通过封闭泡内唯一接受面(胞液面)的不断扩展而增生的 ER 膜，产生了可扩展到整个细胞的膜的不对称性。

小结

ER 可作为生产多数细胞器中蛋白质及脂质组分的工厂。ER 广阔的膜中含有许多生物合成酶，包括与几乎所有细胞脂质合成有关，以及与将一种特异的和天冬酰胺相连的低聚糖加到多数 ER 蛋白有关的酶。将要分泌或输送到其他数种细胞器的新合成的蛋白质必须先运送至 ER。对需运送蛋白质的选择过程通常由生长中多肽链氨基端存在的“信号序列”所指导。合成载有这种信号序列的多肽的胞液核糖体将与 ER 膜上的受体蛋白质结合。然后，全部或部分多肽被活跃地运送穿越 ER 膜进入 ER 腔。最后预定在 ER 腔内发挥作用的蛋白质、分泌蛋白及将转运到其他细胞器腔内的蛋白质完全进入 ER 腔。许多蛋白质并不释放进入 ER 腔，而将部分多肽链留于 ER 膜的胞液面。据认为跨膜蛋白中有一些继续留在 ER 膜，其余的则被选择输出，用于建造高尔基器、溶酶体、过氧化物酶体、质膜及内层核膜。ER 中蛋白质插入及糖基化过程的不对称性构成了 ER 膜蛋白及细胞器膜蛋白的极性。

高尔基器²⁶

高尔基器是由一群连着小泡的盘状池组成的

高尔基器通常位于近细胞核区域，在动物细胞中高尔基器常分布在代表细胞中心的一对中心粒附近。正常情况下高尔基器由许多组有膜包围、具光滑表面的小池组成。每组扁平盘状小池形成直径约 $1\mu\text{m}$ 、类似一叠盘子的结构，叫做高尔基垛，又叫高尔基体网 (dictyosome) (图 7-43 及 7-44)。典型的高尔基垛约含有 6 个小池，虽然在低等真核生物中此数字可高达 30 以上。

每一细胞内高尔基体的数目变化相当大，依细胞类型，可少至一个，多至数百个。在某些特化细胞中，高尔基器甚至可占细胞体积的相当大的一部分。可举小肠上皮上向肠腔分泌粘液的杯状细胞为例，粘液中糖蛋白的糖基化作用主要在高尔基器中进行。

有膜包围的大群小泡 (直径约 50nm) 常与高尔基体相连。这些小泡簇聚在高尔基器与 ER 相邻面，以及每一小池膨胀端部附近的高尔基体周围 (图 7-44)。某些“高尔基泡”中被一种多面体网格“包裹” (图 7-45)。可常见此类被包裹的小泡从高尔基池中出芽。许多合成大量分泌物的特化细胞，除含上

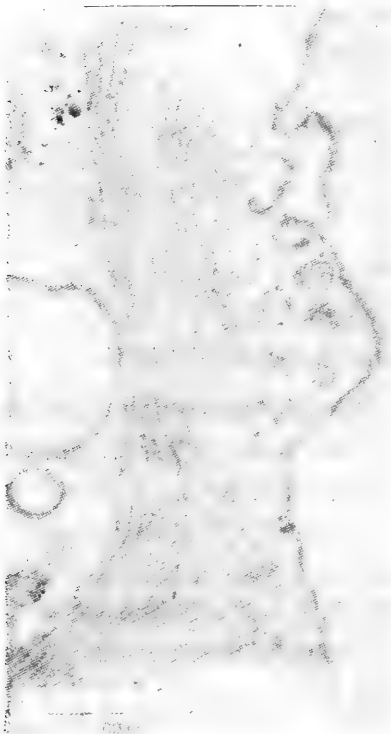


图7-43 植物细胞(衣藻*Chlamydomonas*)的高尔基器横断面电子显微照片。通常在植物细胞中高尔基器比在动物细胞中清楚，并与其他细胞内膜明显分离。(George palade 赠)

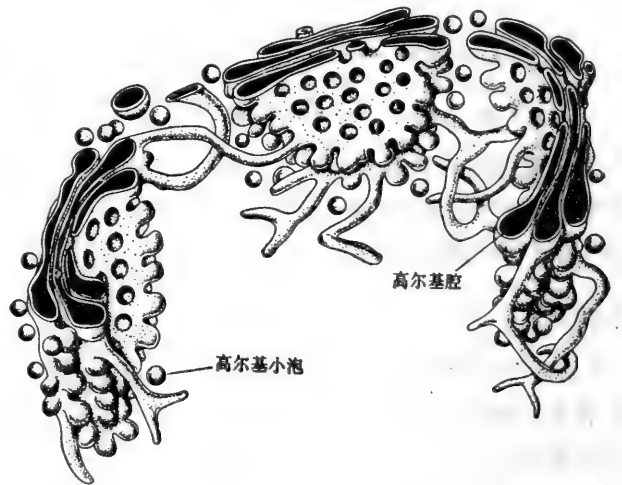


图7-44 根据电子显微照片绘制的动物细胞高尔基器三维结构图。注意扁平小池垛具有膨胀的端部，小泡似从此处出芽。(按照 R. V. Krsitić, Ultrastructure of the Mammalian Cell. New York: Springer-Verlag, 1979)

述小型高尔基泡外，还含有一种称为分泌颗粒或液泡的大型分泌泡 (直径约 1000nm) (图 7-46)。这些较一般大得多的泡位于高尔基器的最靠近质膜面，其中含有浓缩的细胞分泌物。

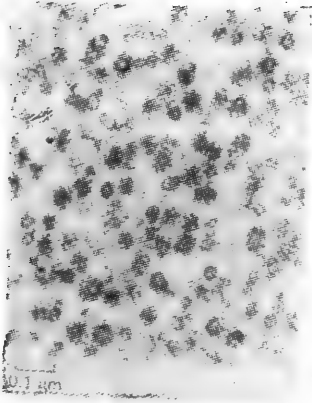


图7-45 自牛脑中分离纯化了的有衣运输小泡制备物的电子显微照片。据信这种小泡在各种细胞中往返穿梭于高尔基池。(引自 S. R. Pfeffer and R. B. Kelly, *J. cell Biol.* **91**: 385—395, 1981)

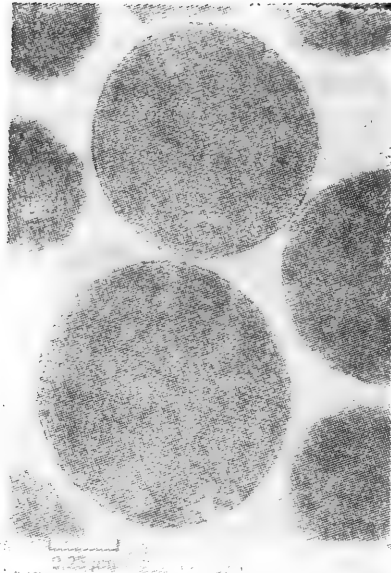


图7-46 纯化的大型分泌泡制备物的电子显微照片。这类泡只在特异性分泌的细胞中发现。(Daniel S. Friend 赠)

高尔基器在结构及生物化学上均有极性²⁷

高尔基器具有两个不同的面：正面或形成面，以及反面或成熟面。正面紧靠粗糙 ER 的光滑过渡区域(见 323 页)。在分泌细胞中反面是与质膜最接近的一面，在该处可发现大型分泌泡只与高尔基堆反面联系，正在形成中的分泌泡的膜往往是与最后一个(最靠反侧)高尔基池的反面连续的。相反，小型高尔基泡则较均匀地沿堆分布。一般认为蛋白质经正面自 ER 进入高尔基堆，再从反面离开，转运至多种目的地。然而，目前尚不清楚蛋白质穿越高尔基器的确实途径，也不了解蛋白质如何在高尔基堆中从一个小池向另一个小池运行。

高尔基器的两个面在生物化学上是不同的。例如，有时可测出高尔基膜的厚度堆两侧变化。靠正面的膜较薄(类似 ER 型)，靠反面的膜则较厚(类似质膜型)。当与电子显微镜结合，使用组织化学法在高尔基器中定位某种蛋白质时，曾获得更引人注意的结果。某些此类试验表明在高尔基堆内的膜结合酶活性(图 7-47)的分布有着明显的极性。一个特别引人入胜的生物化学发现是溶酶体酶，如酸性磷酸酯酶，在高尔基堆最靠反侧的池及其附近一些被包裹的泡中浓缩，这表明投向溶酶体的特殊小泡在此区域装配。

尽管浓缩分泌产物的大型分泌泡只与最靠反侧的高尔基池相联系，但是利用组织化学方法可发现所有成堆的小池中都含有分泌蛋白。

在生物化学方面对高尔基器尚不了解

高尔基器也许是细胞中大分子运输的主要调度机构。许多种类分子在成熟过程的某阶段(通常是在 ER 中合成后不久)需经过高尔基结构的某部分。这些分子包括分泌蛋白、

糖蛋白及蛋白聚糖(见 678 页),还包括糖脂、质膜糖蛋白、溶酶体蛋白,以及植物中的细胞壁物质。很清楚,当大分子通过时,高尔基器还对这些分子进行共价修饰。这些修饰作用通常为改变在 ER 中附着于蛋白质上的天冬酰胺连接的低聚糖;特异性蛋白水解;或对蛋白质中经选择的丝氨酸和苏氨酸糖基化;硫酸盐化,以及加脂肪酸。修饰作用包括的生物化学步骤有些已经知道,有些酶甚至已被纯化。然而,生化事件,分子运输方式(大分子通过此方式被拣选送往不同细胞区室),以及高尔基器特有的极性形态之间的确切关系,至今仍是一个正向当代生物化学家挑战的谜。

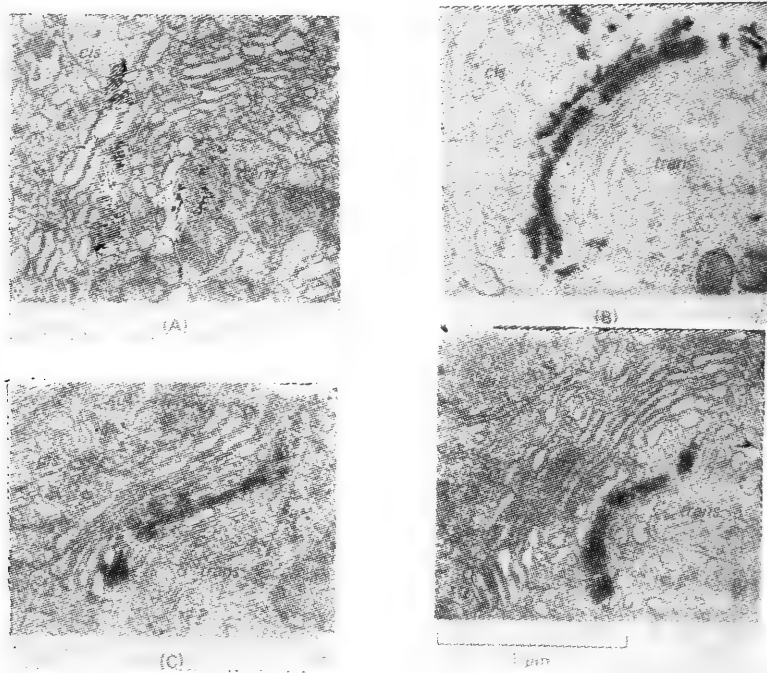


图 7-47 组织化学染色技术表明高尔基器具有生物化学极性。(A) 未经染色;(B) 钨优先在靠近正侧的小池被还原;(C) 硫酸素焦磷酸酶的定位;(D) 酸性磷酸酯酶定位在最靠反侧的小池。染色方法请见图7-57。(Daniel S. Friend 赠)

碳水化合物结构在高尔基器中被修饰^{28,29}

虽说不同的蛋白质可被极不相同地糖基化,一种多肽链中的每一条在成熟过程中的各个阶段通常都含有相同的低聚糖。事实上,某种新合成蛋白质的精确糖基化模式可利用来跟踪蛋白质通过细胞区室的途径。如 333 页所述,糖基化作用的第一步发生于 ER,此时主要只有一种低聚糖与蛋白质结合。多数附着于各种成熟蛋白质的低聚糖在结构上的差异,是由于在穿越高尔基器以后的修饰作用所造成的。

在成熟糖蛋白上可发现两大类与天冬酰胺相连的低聚糖:复合低聚糖及高甘露糖低聚糖(图 7-48)。有时上述两类低聚糖可(在不同部位)附着于同一多肽链。高甘露糖低聚糖只含甘露糖及 N-乙酰葡萄糖胺。复合低聚糖则除此之外,还含有数量不定的半乳糖及唾液酸残基,还可能含有岩藻糖。特别使人感兴趣的是唾液酸,因这是在糖蛋白中唯一有负电荷的糖残基。

区分复合低聚糖的“核心”及“末端”区有一定意义,因为这两个区域分别由在 ER 及

高尔基器中加入的糖基组成。内部的核心区与天冬酰胺相连,含有 2 个 N-乙酰葡萄糖胺及 3 个甘露糖残基。虽说低聚糖在数量上比原在 ER 中加进的少,所有核心区域的糖都是以原来与脂质相连的低聚糖形式加上去的。复合低聚糖末端区由数目不定的、与核心区甘露糖相连的 N-乙酰葡萄糖胺-半乳糖-唾液酸三糖单位组成。末端区经常被截短,只含双糖(N-乙酰葡萄糖胺-半乳糖),或甚至只含 N-乙酰葡萄糖胺。除此之外,岩藻糖残基通常可加入或不加入至连接天冬酰胺的核心区 N-乙酰葡萄糖胺残基上。所有上述糖基都不是以与脂质相连的低聚糖形式在 ER 加上的,而全部都在高尔基器中加入。

相反,成熟低聚糖中高甘露糖只含 2 个 N-乙酰葡萄糖胺及较多的、其数目与原先和脂质相连的低聚糖前体相近的甘露糖残基。成熟高甘露糖低聚糖中的所有糖残基都是在 ER 中作为与脂质相连的前体的一部分加入的。在高甘露糖低聚糖以及复合低聚糖中失去的甘露糖残基,都被高尔基器中的特异性甘露糖苷酶切除。

显然,使糖蛋白变为最终形式的修饰作用需要一系列特殊的甘露糖苷酶及糖基转移酶。若将肝或肾组织的匀浆差速离心,则可将高尔基膜以不寻常的低密度泡状物形式分离,这些经分离的高尔基膜中含有上述酶。事实上,通常用来判断高尔基器衍生泡状物的标记,就是半乳糖基转移酶的存在。

三类糖基转移酶按严格预定次序添加末端 3 个糖基(依 N-乙酰葡萄糖胺-半乳糖-唾液酸顺序)产生成熟复合低聚糖(图 7-49)。所有上述反应都在高尔基器腔侧面进行。至于作为糖基转移酶底物的糖核苷酸如何抵达高尔基器腔侧面,则尚不清楚。

这一多糖基转移酶系统阐明了低聚糖合成的最普遍原则:无论在何处合成的低聚糖,其中的糖都是按特定的顺序连接起来的,这是因为在这一系列反应中,每一步糖基化的产物是被下一个酶看作唯一的底物来识别的。相反,其余主要大分子(DNA、RNA 及蛋白质)的顺序则需利用同样的酶(一种或数种),反复采用一套重复步骤,从模板上拷贝下来。在合成复杂碳水化合物时,每一步需要一种不同的酶以提供适当程度的特异性,并催化具有复杂顺序的小型低聚糖,形成多种不同的共价连接。尽管在合成简单重复的糖顺序时,大型多聚体也遵循同样的总的方式,但此时却只需少数几种特异性的酶(如糖原或植物细胞壁多糖合成时)。

低聚糖修饰途径是精确程序化的²⁹

水疱性口炎病毒的成熟糖蛋白(G 蛋白)(327 页)含有在核心区具有 3 个甘露糖残基的复合低聚糖[图 7-48(A)]。所以,原有 9 个甘露糖残基中的 6 个已在高尔基器中切去。然而,当病毒感染某些在高尔基器中不能将第一个 N-乙酰葡萄糖胺加至“核心”区的酶的突变细胞时(图 7-50, 第 3 步),G 蛋白上的低聚糖则含有 5 个而不是 3 个甘露糖残基的核心。这表明切除最后 2 个甘露糖残基是依据预先向核心加第一个 N-乙酰葡萄糖胺而定的。随后进行的生物化学研究表明低聚糖的加工依图 7-50 中所示高度有序连续途径进行。只有当一个 N-乙酰葡萄糖胺先被转移至图中所示的特定甘露糖(黑体)后,有关的甘露糖苷酶才切除额外两个甘露糖。

这些重要发现提出了低聚糖的修饰途径遵循合成特异顺序糖类时所用的总原则,同时表明这一途径能多么精确。在被严密程序化的一系列切割中,某一步反应的产物只能作为这一体系中下一个酶的唯一底物(图 7-50)。

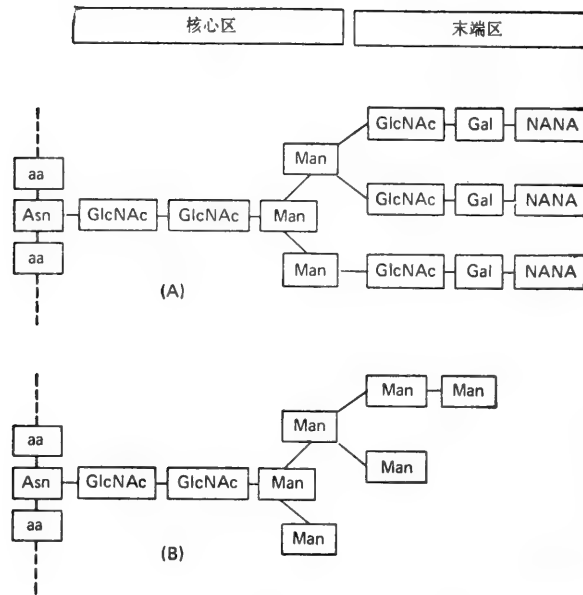


图 7-48 与天冬酰胺连接的两类主要低聚糖：“复合”低聚糖(A)及“高甘露糖”低聚糖(B)。图中所用缩写为：天冬酰胺,Asn;甘露糖,Man; N-乙酰葡萄糖胺, GlcNAc; N-乙酰神经氨酸(唾液酸),NANA;半乳糖,Gal;氨基酸,aa。

正确修饰程序是由低聚糖加工初期的不可逆“开关”确定的

对各种成熟的低聚糖结构多样性进行检查时发现：虽然所有结构的改变都是由于脂连接低聚糖的最初前体的改变，但获得这些不同结构所需的修饰途径却常常是独一无二的。没有一种修饰途径能产生所有的已知结构。究竟开关怎样才能确定糖蛋白沿哪一条加工程序进行呢？这种决定性的信息必然包含在与低聚糖相连的多肽中。因为不同的蛋白质都从同样的低聚糖开始，而都以不同的低聚糖结尾。目前这种修饰酶已纯化，正在加紧研究，相信很快就可搞清这一决定加工过程的细节。

高尔基器中碳水化合物的修饰作用可通过放射自显影法检出³⁰

将细胞与 [³H] 甘露糖短暂温育后，进行电子显微放射自显影检测，可证明 ER 是这种糖掺入糖蛋白的唯一场所(见 333 页)。类似的实验利用其他糖类也已进行过了。例如，与 [³H] N-乙酰葡萄糖胺短暂温育后导致 ER 及高尔基器的同时标记。因 N-乙酰葡萄糖胺既存在于复合低聚糖“核心”区，又存在于“末端”区，这种标记的结果是可以想像得到的(图 7-48)。但与 [³H] 半乳糖及 [³H] 唾液酸温育后，开始只能在覆盖高尔基器的区域发现感光银粒。事实上，这一实验结果第一次最有力地证明这些糖基只在高尔基器中被结合入低聚糖。

当细胞与 [³H] 甘露糖短暂温育(脉冲)后，将细胞继续在无放射性培养液中培养一段时间(追踪)，可观察到 ³H 标记的糖蛋白自 ER 迅速移动到高尔基区域，然后再转移到其他目的地，包括质膜各部分、溶酶体及细胞外部，表明由高尔基器调度的分子运输的复杂性。

运送所需时间,如系新合成蛋白质约需 10 分钟自 ER 运至高尔基器,再需 30 至 60 分钟通过高尔基器,输送到最终目的地。

预定分泌的蛋白质包装在与高尔基器相连的分泌小泡中,随后与质膜融合¹¹

所有细胞都具有高尔基器。这种重要的细胞器为多种蛋白质的后期合成步骤所需,通过这些后期步骤,ER 中最初生成的多肽链经共价修饰而“成熟”。我们将看到,高尔基器也为分离过程所需要,由于分离才可能使随后发生的这些蛋白质转运到细胞的特定位置上。除上述作用外,高度特异的分泌细胞利用高尔基器,在与高尔基器连接的分泌小泡中将某种或数种产物浓缩并大量贮存。无论何时细胞受特殊信号刺激后,这些小泡将

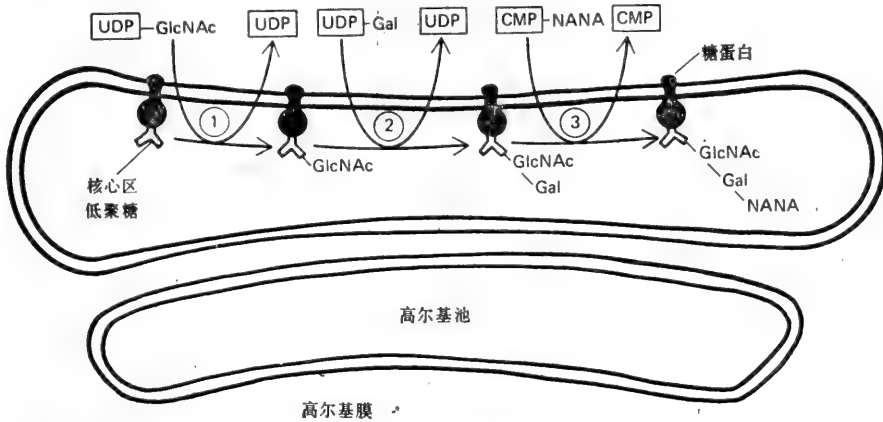


图 7-49 在高尔基器中按步加入糖基以形成复合低聚糖的示意图。三种不同糖基转移酶利用与核苷酸连接而活化的糖基作为底物依次进行作用。尚不清楚糖核苷酸如何从胞液运送至高尔基器的腔侧面。缩写式请见图 7-48。

泡内所贮物质迅速排至细胞外。尽管许多细胞并不具有这类分泌小泡,但通过对特异分泌细胞的研究,对高尔基器的功能有了一般性的了解。

有关分泌过程的知识大多来自对胰腺泡细胞的放射自显影研究。这种外分泌细胞被专门用来分泌各种消化酶及酶原(无活性的酶,随后经特殊的蛋白水解切割激活)。分泌的蛋白质包括胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、淀粉酶、脂肪酶、脱氧核糖核酸酶及核糖核酸酶。细胞内加工及包装这些蛋白质的途径提供了一个模型,可用来了解分泌及有关过程在生物学上的来龙去脉。

因胰腺泡细胞合成的大部分蛋白质预定是要分泌的,因此就有可能用放射自显影术结合电子显微镜检术来追踪分泌蛋白从合成至施放的途径(事实上,正是为进行此类研究才发展了这种将两者结合的技术)。经 ³H 氨基酸脉冲标记后,在无放射性的培养液中通过不同时间的追踪,发现新合成的具放射性的蛋白质自粗糙 ER 通过 ER 光滑过渡区进入高尔基器(图 7-51)。这段细胞内转运途径是需要能量的,当使用药物阻止 ATP 合成后,分泌蛋白就不再从 ER 向高尔基器移动。上述情况并不意外,因任何遵循一定方向的移动过程必然在其中某步或数步是依赖能量的。

随后,可发现 [³H] 蛋白质出现于浓缩泡中,浓缩泡为与高尔基体反面结合的大型未成熟分泌泡(图 7-52)。在某些类型的分泌细胞中,浓缩泡与高尔基体是不相同的,但在

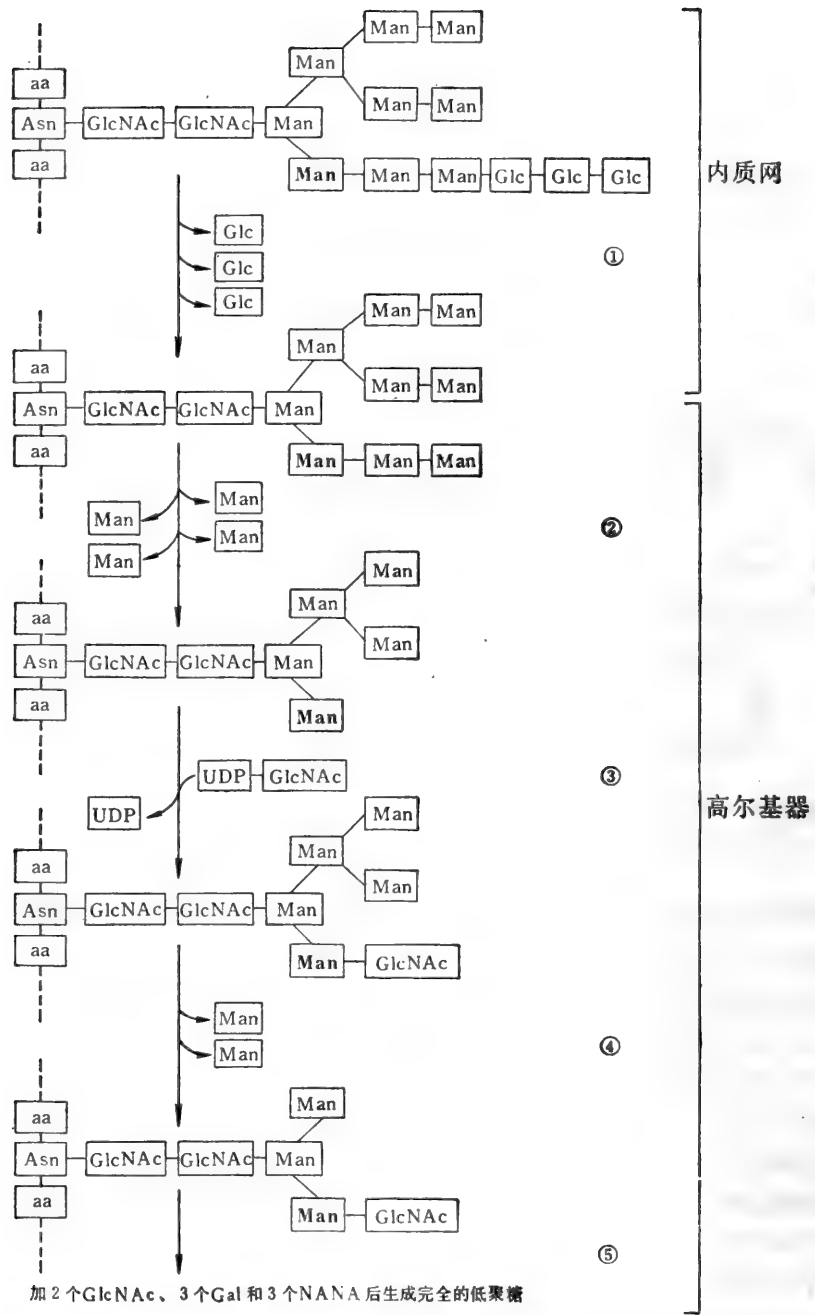


图 7-50 在 ER 及高尔基器中发生的低聚糖加工过程示意图。因为此过程高度有序，以致图中所示每步反应均依赖这一系列中的上一步反应。所以，在文中描述的突变细胞中，因催化第三步反应的酶缺失而使第 4、第 5 步反应被阻。图中第 5 步反应实际上代表上图所示的一系列连续反应。缩写式见图 7-48。

大多数细胞中浓缩泡实际上与最靠反侧的高尔基体膨胀端部相连续，据信由此端部形成浓缩泡。分泌蛋白以稀溶液形式进入浓缩泡，在此处经一定时间后蛋白质被浓缩（所以被

称为“浓缩泡”),产生成熟分泌泡(在胰腺中被称为酶原粒)。分泌泡因含高浓度物质而易在电子显微照片中识别(图 7-46 及 7-52)。分泌蛋白在浓缩泡中的浓缩过程不需能量。在胰腺泡细胞中,浓缩作用大概由带正电荷的胰分泌蛋白与带负电荷的蛋白多糖之间的相互作用实现。蛋白多糖是在高尔基器中硫酸化并与蛋白质相连的大型多糖。这一自发静电反应产生无渗透活性的沉淀物,导致水分自浓缩泡中被动外渗。在别种细胞中,类似的浓缩过程由其他方式推动。例如,在为胰岛素分泌作准备时,胰岛素的渗透性由于导致蛋白质结晶的金属复合物的形成而降低。

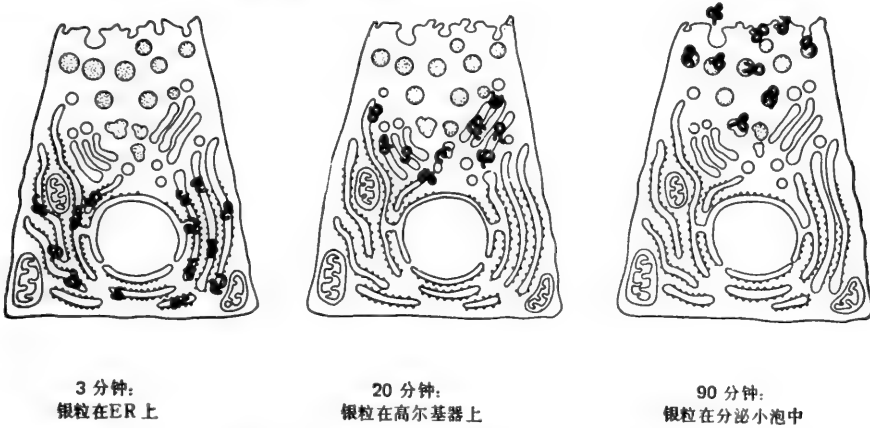


图 7-51 利用电子显微放射自显影技术(图7-32)研究先经 $[^3\text{H}]$ 氨基酸短暂脉冲标记,再于非放射性培养液中温育(“追踪”)不同时间的胰腺泡细胞实验结果的示意图。黑色点代表随时间推移而逐渐更接近细胞外部的显影银粒,表明新合成蛋白质分子的运输途径。这类细胞的不寻常之处在于其合成的蛋白质大部分从细胞分泌出去。

浓缩的分泌蛋白质贮存在位于细胞顶膜区域的高尔基器与分泌管腔之间的分泌泡中。分泌蛋白通过外排作用由细胞施放。在外排过程中分泌泡与质膜融合,将所含物释于外部(见 294 页)。外排是一种高度特异并被严格调控的过程。分泌泡只与质膜的顶膜部分融合,因而避免向细胞间空隙,或细胞内其余细胞器中进行无效甚至是危险的施放。此外,外排只对特异性信号才发生反应。胰腺泡细胞外排的刺激信号或是乙酰胆碱(神经递质),或是肠促胰酶肽(激素)。当需胰酶消化时,这些信号分子分别由神经或小肠细胞释出。

膜组分的再利用

当分泌泡与质膜融合后,不仅其中所含物质被细胞施放,分泌泡膜也成为质膜的一部分,这必然导致质膜表面积的增长。但在分泌过程中分泌细胞表面积只呈暂时性增加。显然膜成分必定以与由外排过程掺入时大致相同的速度从表面除去,或被回收后再利用(图 7-53)。除维持细胞各区室间膜量恒定分布外,回收再利用是一种经济的方法。所有运输小泡的膜(包括分泌小泡)是高度特化并具有泡形成及融合所需的特有多肽。将这些蛋白质在运输过程中回收再利用数次,显然要比只用一次即弃去要合理得多。

预期回收再利用会发生于细胞内的各条运输途径。最好将各种运输泡设想为一种可重复使用的往返运载系统,在往返循环的前半圈通过融合,向靶膜交“货”,然后通过再出芽(卸货)与原产生运输小泡的细胞器重新融合(见图 7-56)。由此而来的一个基本上尚

无答案的问题是：货物如何被不可逆地投递至目的地，而不是在被往返运载系统联系的两细胞器之间简单地平衡。有关答案将成为了解蛋白质在细胞内转运机制的关键。

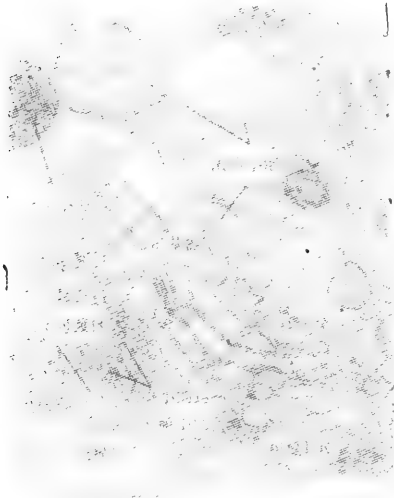


图7-52 胰腺泡细胞高尔基器的电子显微照片，示成熟过程各阶段的浓缩泡。（George palade 赠）

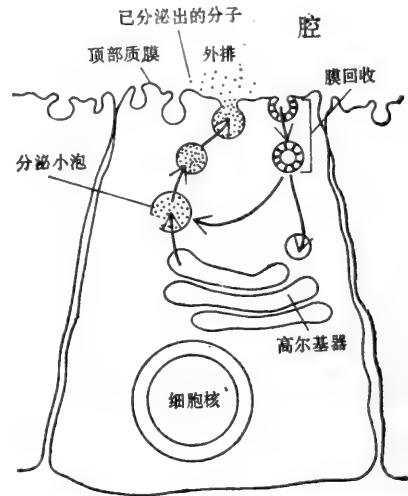


图7-53 假设的经顶膜分泌后膜成分再利用的分泌性上皮细胞示意图。有时膜的回收似乎由有衣小泡中介，但其中的精确机制尚不清楚。

膜融合及再利用可通过电子显微镜检术得到证实³²

在神经-肌连接点(图7-54)，可在电子显微镜下跟踪运输小泡往返运载系统的高度同步化的周期。在位于神经-肌连接点的神经轴突的突触区域(即神经末梢)，充满着数百个大小一致的(直径约50nm)小泡，每个小泡中含有神经递质乙酰胆碱。刺激神经后可引起同步突发的外排现象，小泡与神经末梢的质膜融合，因而从未梢施放乙酰胆碱，并启动了毗邻肌肉细胞的收缩。融合现象是因膜电位改变所诱导的神经末梢内局部性 Ca^{2+} 浓度升高而激发的。神经末梢在每次激发后外排速度可提高10 000倍以上，甚至还能保持这样的外排速度数毫秒之久。

由一次神经脉冲同步启动的神经突触的周期性变化，可在准备进行电子显微镜观察前通过极迅速地在液氮中将组织冻结而证实。部分有关实验结果如图7-55所示。在刺激后5毫秒内，神经末梢质膜中出现明显的豁口，每个豁口代表一个含神经递质的小泡与质膜的融合点。融合局限在位于两列直线排列的膜内颗粒附近的质膜中的特殊区域(称做“活化区”)。在随后的两毫秒内融合作用完成，外排口消失；可观察到小泡膜蛋白质组分已插入质膜，因突触泡膜内颗粒显著比最初出现在质膜中的大。在随后的数百毫秒内，这些大型颗粒自最初融合点越移越远，在电子显微镜下估计的这些大颗粒的扩散系数($2 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{s}$)表明小泡蛋白在脂双层中随机移动，自由与质膜成分混合。

下一步为从质膜中回收突触泡的特异蛋白组分(如大型膜内颗粒)。分泌后10秒钟内出现在神经末梢质膜上的有衣区域(或“小凹”)变得不计其数，同时大型膜内颗粒被收集其中。刺激后20秒内，有衣小凹由内吞作用从膜中挤出，形成了有衣小泡(图7-45)。这些泡内含有突触泡原有的蛋白质成分，而在数秒钟前，这些蛋白质还与其他质膜组分完

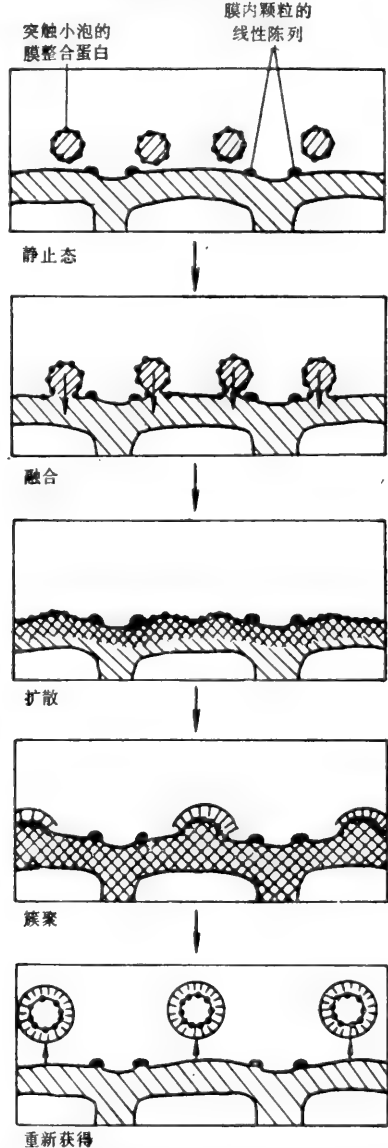
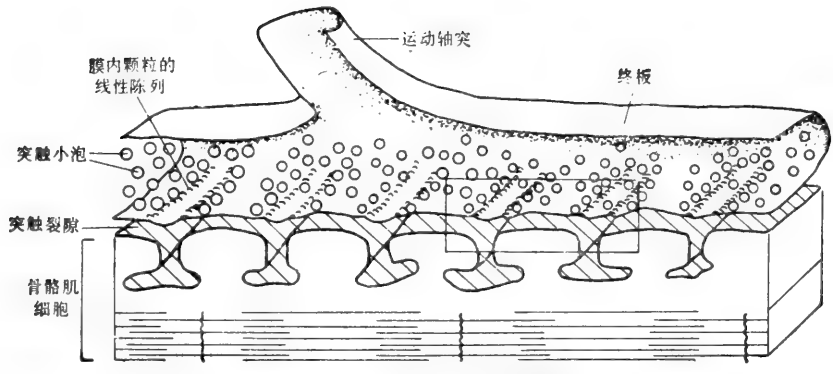


图7 5! 神经及骨骼肌细胞间的特异性突触——神经-肌连接点的三维结构图。上方为放大的横切面图，表明神经被激发后的事件。(亦见图 7-55)

全混杂一起。这一循环以包被的外衣脱离有衣小泡而结束。然后，有衣小泡中重新充满乙酰胆碱，形成具光滑表面的再生突触泡。上述安排可能与突触泡惊人的统一尺码有关，突触泡的大小由笼蛋白的窗格状的外衣容积决定。

上述回收途径可通过在密电子细胞外标记物(如铁蛋白)存在时刺激神经而获得进一步证据。这些标记物迅速出现于有衣小泡内，但最终则在突触泡中出现。

有衣小泡被认为在细胞内蛋白质拣选中起主要作用³³

有衣小泡除了介导多种内吞作用外，它似乎负责转运在 ER 及高尔基器间，以及高尔基器与质膜间的膜蛋白。不同种类的有衣小泡大概与这类泡的一系列不同功能有关。

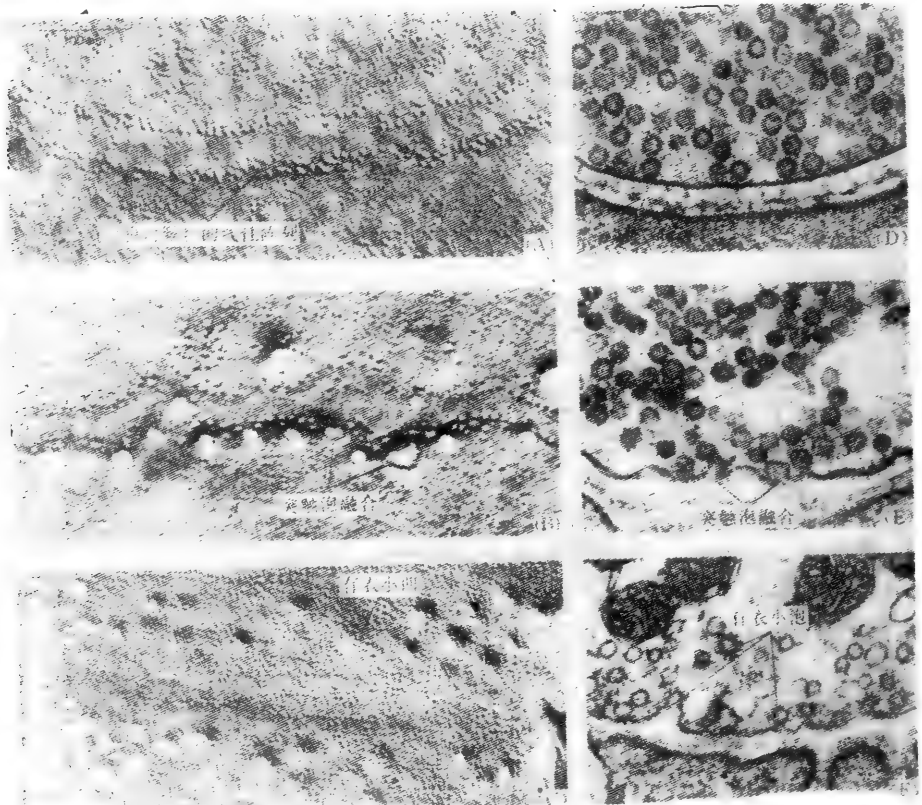


图 7-55 电子显微镜下观察到的受刺激后神经-肌连接点膜上的循环性变化。左边为突触前膜质面侧(“P面”)的冰冻断裂电子显微照片。(A,D)静止态;(B,E)突触泡在膜内颗粒的线状阵列附近融合;(C,F)通过有衣小凹和有衣小泡进行簇聚及回收突触泡。请与图 7-54 比较。(John Heuser 赠)

如前所详述(见298页),有衣小泡的明显特征是具有几乎标准的多面体“篮子”或“外衣”。外衣本身主要由一种结构蛋白,笼蛋白,以及在这种运输泡膜中与多种辅助蛋白联接的一种小多肽组成。辅助蛋白在细胞内转运事件中至少具有两种重要功能:第一,必须为与特殊“货物”分子有关的有衣小凹非胞液面(腔面)提供结合部位,从而确保这些分子被包装在有衣小泡内。第二,每一运输泡内物质可被准确投递至细胞内膜正确“地点”的事实,说明运输泡中必然存在着不同的亚群,每个亚群在表面具有被靶膜互补性“受体”

识别的特有辅助蛋白(“停靠标记”),图 7-56 描述了这种设想中的过程。

有衣小泡可看做小型拣选机器。有衣小泡的窗格状外衣看来是为带有一定货物负荷的小泡能从膜中出芽而设计的,这些小泡的选择作用则必然由于其他存在于有衣小泡膜的辅助蛋白一方面可抓住特殊货物蛋白,同时又排斥其他膜成分。事实上,由有衣小泡介导的运输可能是细胞实现分子拣选的主要方法。

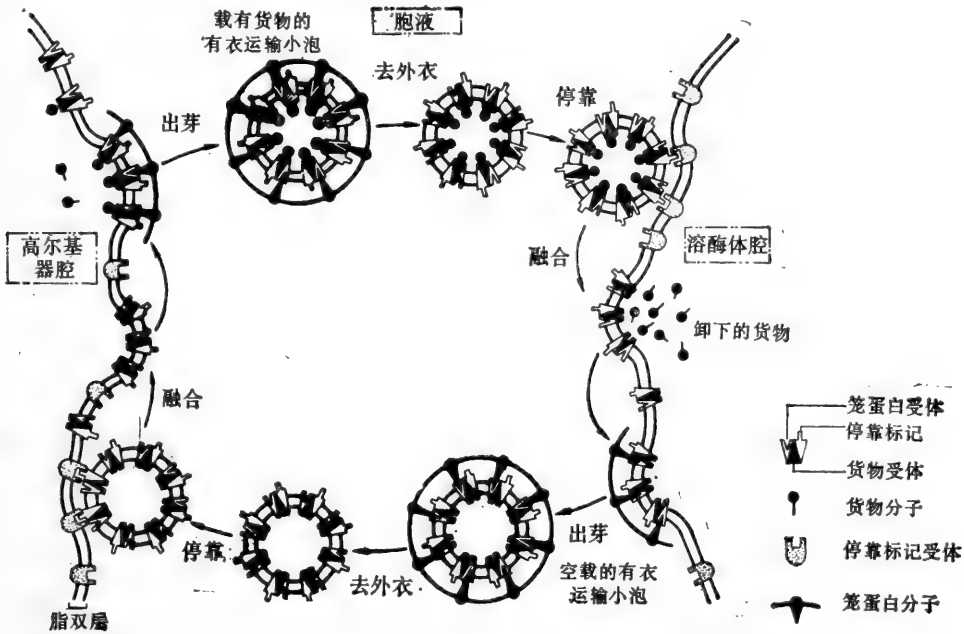


图 7-56 将有衣运输小泡引向特异性细胞内膜的一种可能机制的示意图(详见正文)。在此例中示将“货物”从高尔基器腔最终向溶酶体腔运输。

为什么要有高尔基器³⁴?

初看之下,似乎可省却高尔基器。细胞内所有拣选及包装程序为何不能在运送到高尔基器前,就在蛋白质的生成处由 ER 解决呢?如此的拣选过程肯定可以在 ER 水平发生,因 ER 中的许多膜结合蛋白(例如核糖体结合蛋白和参与脂质及低聚糖合成的酶)被有选择地保留而不外运。

考虑到新合成分子拣选的重要性,可对上述问题提供一般性答案。为维持细胞不同区室间的功能的(如酶功能的)差别,则要求对蛋白质的拣选以极低的差错率进行。如此低的差错率大概难以仅靠在 ER 中的一次拣选达到。因而这就表明,分布于 ER 及最终目的地间的高尔基器起着编辑者的作用,得以发生几个连续拣选步骤,从而降低总的差错率。

另外,值得注意的是在 ER 及高尔基器间进行的已知酶反应的颀颀特性。低聚糖在 ER 中合成,而这种低聚糖结构的大部分则在高尔基器中被降解。下面将讨论到,这些相互竞争的成对反应相当关键,因这些反应可在决定向细胞内哪个区室运送新合成的大分子时起重要作用。

小结

高尔基器是有极性的结构，由一群被小泡包围的盘状小池形成的具有方向性的垛组成。在高尔基垛正面附近，来自 ER 腔及膜的蛋白质，大概通过有衣小泡，被运送到高尔基腔内及膜中。一旦进入高尔基腔，蛋白质就以各种方式修饰，形成最终的成熟分子。特别是原先在 ER 中结合了蛋白质的与天冬酰胺相连的低聚糖链，通过切除或添加经选择的糖基而被大幅度修饰。这些不同的共价修饰过程各遵循一系列高度有序的酶促途径中的一条支路。途径的选择则由各条多肽链本身尚未被了解的特性决定。

蛋白质一般通过高尔基器中接近垛的最靠反侧的区域外运至多种细胞内或细胞外的目的地。将蛋白质准确拣选以进行选择性地外运是高尔基器的主要功能之一。据认为分类主要由围绕小池的有衣小泡介导，并依赖存在于高尔基膜可辨认运送蛋白质上特殊标记的受体组。

溶酶体与过氧化物酶体³⁵

溶酶体是细胞内消化的主要场所

1949 年，对肝匀浆中碳水化合物代谢的酶学研究中曾注意到酸性磷酸酯酶（用做对照的酶）分析中出现的某些无规律的变化。如在蒸馏水制备的提取物中，水解酶活性比在用渗透平衡的蔗糖溶液制备的提取物中要高。酶活性在放置一段时间的制备物中比在新鲜制备的要高。同时，放置一段时间的制备物中的酶活性不再与沉降颗粒有关。此后不久，对若干种其余水解酶也有类似报导。上述观察导致发现一种新的细胞器，称为溶酶体。溶酶体为一种含水解酶的膜质囊，用来控制细胞内大分子的消化。因渗透溶解及老化而引起的膜损伤，使酶在细胞提取物中按非沉淀形式释放。但通常溶酶体膜的通透性障碍足以防止酶逸入细胞。

现已知溶酶体中含有约 40 种酶。它们都是水解酶，包括蛋白酶、核酸酶、糖苷酶、脂肪酶、磷脂酶、磷酸酯酶及硫酸酯酶。所有上述酶都属酸性水解酶，在细胞器内 pH 维持在 5 为最佳活性状态。虽然溶酶体膜在正常情况下对这些酶无通透性，但这些酶需酸性环境才呈最佳活性的事实是在万一发生渗漏时可以保护胞质不受可能造成的损害。

与其他所有细胞器相似，溶酶体不仅含有独特的一套酶，还拥有独特的周围膜。如所预料，这种膜允许大分子的最终消化产物漏出，从而使产物能被细胞分泌或再次利用。此外，据信溶酶体膜内含有一种特殊转运蛋白，这种蛋白可利用 ATP 水解时释放的能量将 H^+ 泵入溶酶体腔，从而维持腔内 pH 为 5。膜内还应含有“停靠标记受体”蛋白，可将溶酶体标记，使之成为细胞内特殊运输泡融合的靶（图 7-56）。

某些小分子以无电荷形式穿越溶酶体膜，然后在溶酶体腔内酸性环境中捕获一个质子，而带有电荷。一旦带电荷后，此类分子就因具有较强亲水性而不易再通过溶酶体脂双层。所以，这些分子进入溶酶体的速度比离去速度快，结果在溶酶体内高度浓缩。此类物质中重要一例为抗疟疾药物氯奎，将氯奎加入完整细胞，可升高溶酶体内的 pH 值，因而在实验室中常被用作溶酶体功能的抑制剂。

组织化学染色表明溶酶体是异型性的细胞器*

在溶酶体首次经生物化学法描述后约十年，这种细胞器再次被电子显微细胞化学法所鉴别。由于溶酶体在形状及大小上的极端差异，常有必要采用由某种水解酶(如磷酸酯酶或硫酸酯酶)的反应产物形成的密电子沉淀来判断电子显微照片中某种细胞器是否是溶酶体(图 7-57)。根据这一指标，可发现溶酶体存在于所有真核细胞中。肝细胞溶酶体被研究得最彻底，肝溶酶体为直径约 $0.5 \mu\text{m}$ 的圆形泡，具有充满水解酶的密电子核心(水解酶在重量上占核心的 60% 以上)。

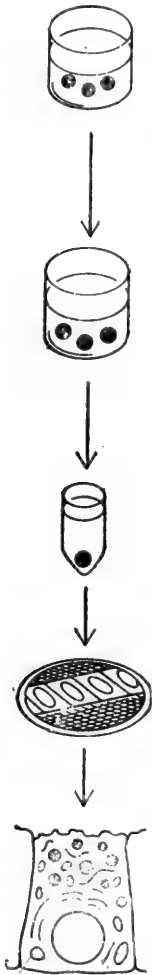


图7-57 电子显微照相中常用以显示溶酶体酶的标记酶——酸性磷酸酯酶位置的细胞化学方法简图

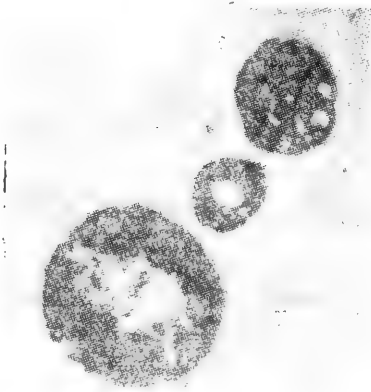
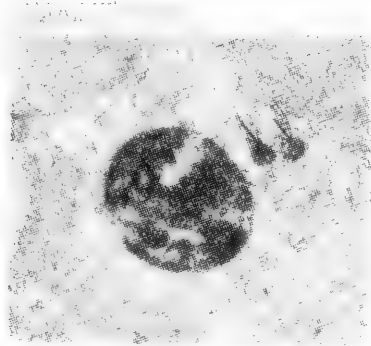


图7-58 通过染色将酸性磷酸酯酶定位的一个细胞的两张切片的电子显微照片。含致密沉淀的有膜包围的较大的细胞器是次级溶酶体，其形态多样性反映了这种溶酶体所含消化物质的量及质的不同。两个初级溶酶体在上图由箭头指出。(Doanill S. Friend 赠)

溶酶体形态上的异型性与所有其余细胞器所具有的相对较统一的超微结构不同。这一形态差异反映了由酸性水解酶中介的一系列广泛不同的消化作用。其中包括胞内、胞外组成要素的消化及转换，胚胎发生中预定的细胞死亡，对经吞噬摄入的微生物的消化，

甚至包括细胞营养(因溶酶体是从内吞摄入的血清脂蛋白中吸收胆固醇的主要场所,(见299页)。由上述理由,最好将溶酶体看做具有含大量水解酶这一共同特征的不同细胞器的集合体。一般可将溶酶体区分为两大类型:初级溶酶体,即新合成,尚未与底物接触进行消化的溶酶体;以及次级溶酶体,即含有底物及水解酶,具不同形态的膜质囊。次级溶酶体由初级溶酶体与多种有膜包被的底物多次融合产生(图7-59)。所以次级溶酶体的形态因由各种途径摄入及包装不同的底物而异:大溶酶体因吞噬作用形成,小溶酶体因内吞作用形成,等等。

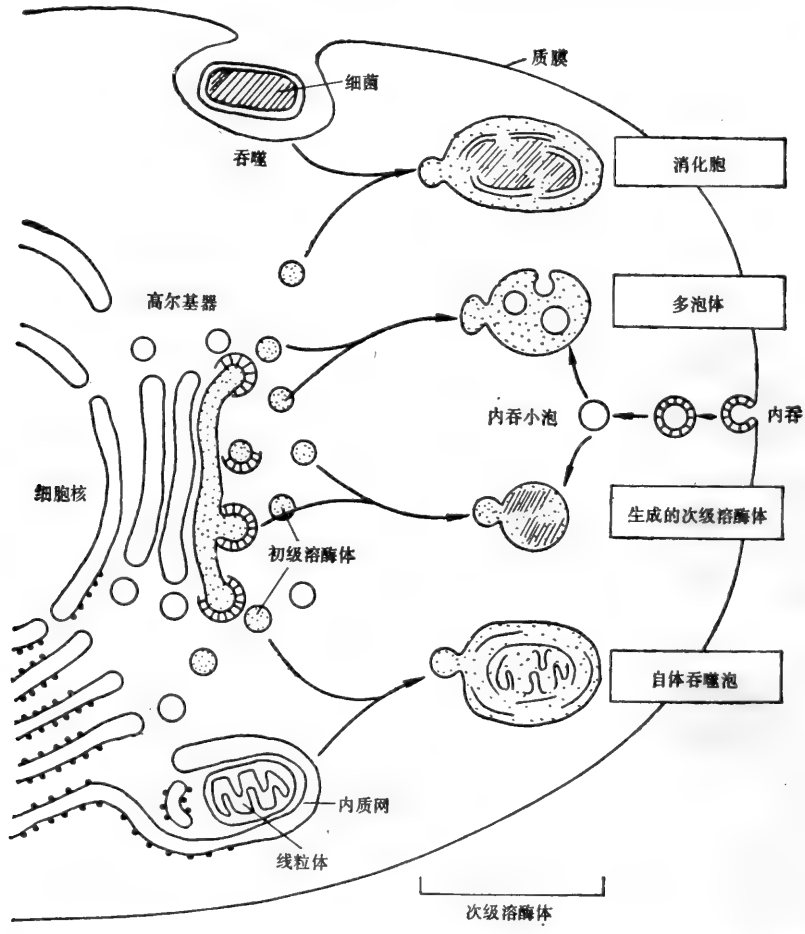


图 7-59 设想次级溶酶体由靶泡与一系列含新合成的水解酶的小型初级溶酶体融合而成的数种途径的示意图。形成过程的精确途径及其区别尚不清楚。

次级溶酶体由于形态多种多样,因而常有特别的名称。(1)大型消化泡,通过吞噬大型颗粒(如细菌)形成;(2)多泡体,为含有无数直径约 50 nm 的小泡的膜质囊;(3)自体吞噬泡,为含有(假定在消化中)细胞内膜或细胞器(如线粒体或分泌小泡)的溶酶体结构。此外尚有很多其它名称(图 7-59)。

为避免混乱,最好把注意力集中在初级溶酶体上。初级溶酶体是如何形成的?何种机制指导这些溶酶体与被包装的底物专一地融合?

初级溶酶体由高尔基器出芽形成²⁷

细胞学证据表明初级溶酶体从高尔基器中最靠反侧的池出芽形成。在此区域有无数直径约 50 nm, 含酸性水解酶活性, 与高尔基器联系的小泡(有衣而光滑)。当从高尔基器出芽被“当场捕获”时, 这些泡总是被笼蛋白包裹。根据最简单的看法, 初级溶酶体是由高尔基器中挤出的有衣小泡衍生而成, 出芽后笼蛋白外衣从泡上脱落。若此观点正确, 溶酶体生物形成的问题可简化为酸性水解酶如何专门在高尔基器某区域积聚, 并被装入有衣小泡。然而, 即使在高尔基器的最靠反侧的区域, 也只是一小部分有衣小泡或其他小泡含有明显水解酶活性。这反映了以下事实即有衣小泡参与细胞内大分子的多种不同途径的包装和运输。所以, 溶酶体酶必须在许多来自高尔基器的亚群中以某种方式找到正确的有衣小泡群。

有三条非直接证据提示溶酶体水解酶在 ER 合成, 然后在转运至高尔基器之前被移入 ER 腔。

1. 细胞化学染色法表明, 某些酸性水解酶活性既存在于 ER, 又存在于高尔基器组分中。

2. 溶酶体酶是依靠质膜和分泌蛋白质以定向施放的方式进入粗糙内质网时所用的同一氨基端引导肽(即信号序列)来启动合成的。

3. 所有溶酶体水解酶实际上都是糖蛋白, 含有必须在 ER 获得的低聚糖。

对溶酶体酶的低聚糖的组成进行更深入研究后提供了一个有关此类酶在细胞内如何被包装的重要线索。至今为止, 所纯化的溶酶体酶很少含有一个磷酸化甘露糖残基。基于以下将讨论的证据, 结论是已知高尔基膜上的受体可识别这种低聚糖上的特有部分, 这些受体负有将水解酶包装进变成初级溶酶体的有衣小泡的使命。

溶酶体酶缺陷患者的体外培养细胞中的溶酶体功能可通过在培养液中 加入缺失的酶而纠正²⁸

人类中有无数先天性溶酶体代谢异常者, 其中许多都伴有严重的临床症状。这些患者都是以缺失某种酸性水解酶的溶酶体为特征的。结果造成溶酶体内所缺失酶的底物以完整大分子或经部分消化后的残基形式大量积聚。依缺失酶的种类而异, 各种底物中的任何一种都可能积聚。这包括葡糖胺聚糖(从前称为粘多糖)、糖蛋白、糖原、脂质及糖脂。溶酶体中异常积聚物的出现是正常细胞功能需要溶酶体降解活性实际水平的直接证明。因充满异常积聚的物质而膨胀的溶酶体可干扰正常细胞功能, 从而造成该疾病的临床表现(图 7-60)。对这些遗传性疾病进行的生物化学研究, 已提供了一个范例, 即在分子水平上对医学难题的研究, 如何能有助于深入了解细胞生物学的基本问题的。

目前关于溶酶体生物发生的观点, 多数来自于最初为阐明一种称为粘多糖病的溶酶体疾病中所涉及某种分子缺陷的一系列卓越的实验。这种疾病使溶酶体大量积聚葡糖胺聚糖(粘多糖, 见 678 页)。粘多糖病之一为赫勒氏(Hurler)症, 病人具特有的骨骼变形。电子显微镜观察表明这种病人的多数细胞内含有充满葡糖胺聚糖的大型消化泡, 葡糖胺聚糖在正常情况下是细胞外基质的成分。赫勒氏症患者皮肤的成纤维细胞可在离体组织培养时生长, 并被证实带有与在体内时相同的溶酶体缺陷。然而, 当正常成纤维细胞与

赫勒氏症患者细胞共同生长时,异常细胞不再积聚葡糖胺聚糖。缺陷细胞的“纠正因素”可单独从正常细胞生长的培养液中纯化出来,从而被证明为 α -L-艾杜糖苷酸酶 (α -L-iduronidase),也就是缺陷细胞溶酶体中缺失的特殊水解酶。

因不同的溶酶体酶缺陷的酶系可采用类似方法用不同的酶纠正,显然多数溶酶体水解酶可被正常细胞少量释入培养液,这些酶则可再次被原来细胞或其他细胞摄入。尚不了解这些水解酶被释放的原因及方式。但已证明从培养液中摄取水解酶依赖于特殊的细胞表面蛋白,通过由受体中介的内吞作用发生。据推测,酶-受体复合体被内卷进入有衣小泡,这种泡最终与有缺陷的溶酶体融合,向溶酶体提供所需水解酶。如此,赫勒氏症患者成纤维细胞几乎可摄取一半量的外加的 α -L-艾杜糖苷酸酶,却很少吸收培养液中所含的大量液体。

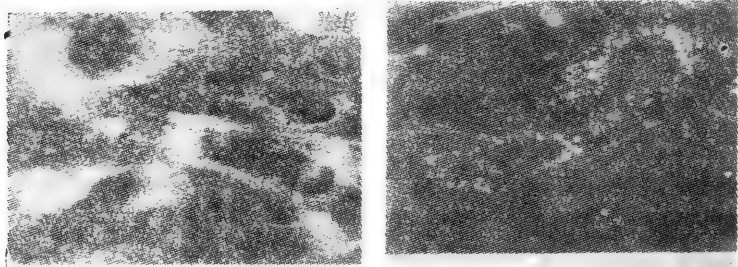


图 7-60 暗视野显微镜下看到的体外培养的活成纤维细胞的外观。溶酶体中致密胞质内含物显现为围绕黑色细胞核的白斑。(A)取自具溶酶体积聚病患者的细胞;(B)正常细胞。(George H. Thomas 赠,引自 H. A. Taylor et al., *Clin. Genet*,4:388-397, 1973)

只有含甘露糖-磷酸的低聚糖溶酶体水解酶才被摄入”

所有溶酶体水解酶必然有一种共同特征,使它们能高亲和性地结合于特异性细胞表面受体,并且随后可有效地进入细胞。这种“识别标记”的概念通过对另一种溶酶体异常,即 I 细胞症 (I-cell-disease) 的类似研究而加强。这种取自单基因突变纯合的病人的经培养成的纤维细胞,其溶酶体中几乎不含水解酶,但这些酶却以极高浓度在细胞外的液体中出现。一个关键性的发现是,由 I 细胞释放入培养液中的水解酶都不能被正常细胞上的受体识别,因此这些水解酶不被细胞摄入。例如,从 I 细胞症成纤维细胞培养液中提取的 α -L-艾杜糖苷酸酶不能纠正体外培养的赫勒氏症细胞,也不被细胞摄入,尽管这种酶本身却具有完全的水解酶活性。相反, I 细胞症成纤维细胞可结合、内吞,并保持正常细胞释放的水解酶。简单的解释是 I 细胞症中单一基因缺陷影响一种可把识别标记加给多种水解酶的酶。结果从 I 细胞中释放的水解酶不能被 I 细胞或正常细胞识别而摄入(图 7-61)。

把正常细胞及 I 细胞释放的水解酶比较后,发现被细胞表面受体识别的标记是一种含有甘露糖-6-磷酸的不寻常低聚糖。将正常水解酶用一种可切除末端磷酸基团的酶处理后,可使这些水解酶转变成被称为“弱摄入型”(low-uptake),其形式很难与 I 细胞释放的酶区别。此外,当将甘露糖-6-磷酸加入组织培养液后,该物质本身可与细胞表面受体结合,因而可作为对多种不同的正常溶酶体水解酶摄入过程的有力竞争性抑制剂。

细胞内水解酶可能借甘露糖-磷酸标记物引向初级溶酶体⁴⁰

当正常成纤维细胞在含有足够甘露糖-6-磷酸,以阻止从细胞外摄取水解酶的培养液中生长很多代以后,它们的溶酶体仍具有正常功能,并含有通常应含的各种水解酶。这一现象排除了在正常情况下,新合成溶酶体酶通过胞外“分泌-回收”途径进入新溶酶体的可能性。因此,I 细胞溶酶体中无水解酶的现象暗示了含甘露糖-磷酸的低聚糖可被存在于细胞内的特殊受体当作标记来识别的。事实上,目前已知高尔基器及 ER 膜上均含有与质膜上相同的甘露糖-磷酸受体。引导水解酶被特异地装入初级溶酶体的应是这种细胞内受体。当正确识别标记丢失后(如在 I 细胞症中),水解酶即不再被包装,而是穿越高尔基器,源源不断地分泌到细胞外。

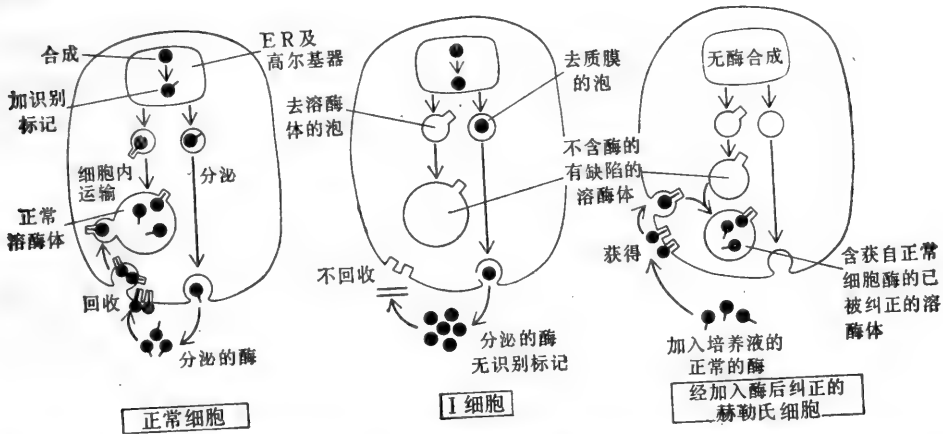


图 7-61 培养中的正常及突变细胞分泌及回收溶酶体水解酶过程示意图。位于三种细胞质膜上的特殊受体蛋白使它们能将加入培养液的水解酶摄入各自的溶酶体。赫勒氏细胞无合成 α -L-艾杜糖苷酸酶的能力,此缺陷可通过向培养液中添加这种酶(由正常细胞释放)而纠正。I 细胞可合成所有水解酶,但因为缺失为这些酶摄入细胞及在细胞内运送至溶酶体所需的标记而全被分泌。

饶有兴趣的是,实验业已证明水解酶一旦进入溶酶体内,即失去甘露糖-磷酸标记。失去标记可能有助于将酶稳定在溶酶体内,以防止在膜再利用过程中,被识别该标志的受体重新收回这些酶(见图 7-56)。

过氧化物酶体膜由光滑 ER 出芽形成⁴¹

过氧化物酶体是一种几乎存在于所有真核细胞中的细胞器。这种细胞器一般在密度梯度离心时与溶酶体同时沉降。直到 60 年代初,人们才普遍意识到过氧化物酶体以独立的细胞器形式存在。那时,采用生物化学与电子显微技术相结合的方法,鉴定了这种细胞器,它由一层膜包围,直径约为 $0.5 \mu\text{m}$,在肝细胞中至少是三种氧化酶;即 D-氨基酸氧化酶、尿酸氧化酶、过氧化氢酶的浓缩源。随后,由于对可占过氧化物酶体蛋白总量 40% 的过氧化氢酶的组织化学染色技术的发展,证明小型($0.15-0.2 \mu\text{m}$)过氧化物酶体(“微过氧化物酶体”)普遍存在于哺乳动物细胞中。大型过氧化物酶体则只限于相对少数几类细胞。有时,因过氧化物酶体中含有一个“晶体样”核心而在电子显微照片中相当醒目(图 7-62)。这种核心属一种含高度浓缩的过氧化物酶体的管状结构,但经常是不存在的。

与线粒体相同,过氧化物酶体是氧(O_2)利用的主要场所。实际上,有些学者认为过氧化物

酶体代表一种当氧进入大气后，在原始的前真核细胞中进行各种有氧代谢的古老细胞器的退化形式。根据这一观点，线粒体的形成使过氧化物酶体在很大程度上被细胞废去不用。许多原在过氧化物酶体中以不产生能量方法进行的同一反应，目前可在线粒体中通过氧化磷酸化作用与 ATP 同时生成。而继续在过氧化物酶体中进行的氧化反应，不管线粒体的存在与否仍将细胞是有用的。

与上述假说一致的是，新过氧化物酶体可能通过相对来说比较原始的机制形成的。据认为过氧化物酶体某些专有的膜整合蛋白在 ER 合成，并簇聚于 ER 膜形成前细胞器。然

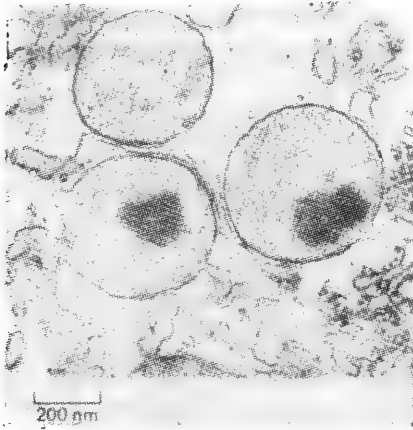


图7 62 肝细胞中3个过氧化物酶体的电子显微照片。常见一种结晶状密电子内含物及该细胞器与 ER 膜的密切联结。

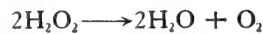
后，这种细胞器前体在光滑 ER 的某区域形成芽。包括过氧化氢酶及尿酸氧化酶在内的几种主要过氧化物酶体的酶在胞液中合成，并在形成中通过涉及过氧化物酶体膜的特殊识别过程转运到过氧化物酶体。因成熟过氧化物酶体常与光滑 ER 的细小袖套状突出物相连(图7-62)，据认为许多成熟过氧化物酶体仍附着于 ER，而不出芽离去，以形成自由细胞器。

过氧化物酶体利用氧进行分解代谢反应⁴²

过氧化物酶体含有细胞内大部分过氧化氢酶。此外，还含有一种或数种利用分子氧从特异底物中除去氢原子的酶，进行氧化反应：



过氧化氢酶则利用其他酶生成的 H_2O_2 ，通过 $H_2O_2 + R'H_2 \longrightarrow R' + 2H_2O$ 这类“过氧化”反应，来氧化各种包括酚、甲酸、甲醛及乙醇等一系列底物。除此之外， $R'H_2$ 在低浓度时，过氧化物酶将 H_2O_2 转变为 H_2O ：



后一反应有时被看做一种安全装置，可防止强氧化剂 H_2O_2 在无充分氢原子供体($R'H_2$) 供应时的危险积聚。对过氧化物酶体功能来说重要的是，这一细胞器的膜有特殊的通透性，可使无机离子及所有分子量不超过蔗糖的低分子量物质轻易通过。

据认为肝及肾细胞中的大型过氧化物酶体对各种分子的解毒具有重要意义。如，我们饮入的乙醇中几乎一半在此途径中被氧化成乙醛。正常情况下，过氧化物酶体至少耗去肝所吸收氧的百分之十。

除解毒反应外，过氧化物酶体还利用一种特殊 H_2O_2 生成酶，来催化脂肪酸裂解为乙酰辅酶 A。产生的乙酰辅酶 A 则可经过胞液转运到线粒体，加入柠檬酸循环，或供它处进行的生物合成反应使用。据估计四分之一至二分之一的脂肪酸在过氧化物酶体中降解，其余的则发生于线粒体。

过氧化物酶体中所含的酶随细胞类型而异⁴³

对过氧化物酶体代谢难以进行笼统描述，因这种细胞器的成分变化极大。同一生物中的不同细胞常含有一组相当不同的酶。更有甚者，在某些细胞中，过氧化物酶体的数目及内

含物依条件而变化。例如,在糖中生长的酵母菌细胞中含有极少过氧化物酶体,在含甲醇环境中生长的细胞则生成大量可氧化甲醇的特殊过氧化物酶体,而生长在脂肪酸中的细胞却含有无数促使脂肪酸裂解为乙酰辅酶A的过氧化物酶体。

对植物中的两种不同类型的过氧化物酶体已进行了透彻的研究。一类存在于叶片中。叶中的这种细胞器催化将 CO_2 固定于碳水化合物反应的副产品的氧化。这一过程被称为光呼吸,因在此过程中利用 O_2 而释放 CO_2 (见 496 页)。在萌发的种子内则存在一种类型极为不同的过氧化物酶体,这种过氧化物酶体将贮存在种子脂质中的脂肪酸转化为幼小植株物质生产中所需的糖。由于这一过程的完成需通过称之为乙醛酸循环的一系列反应,这

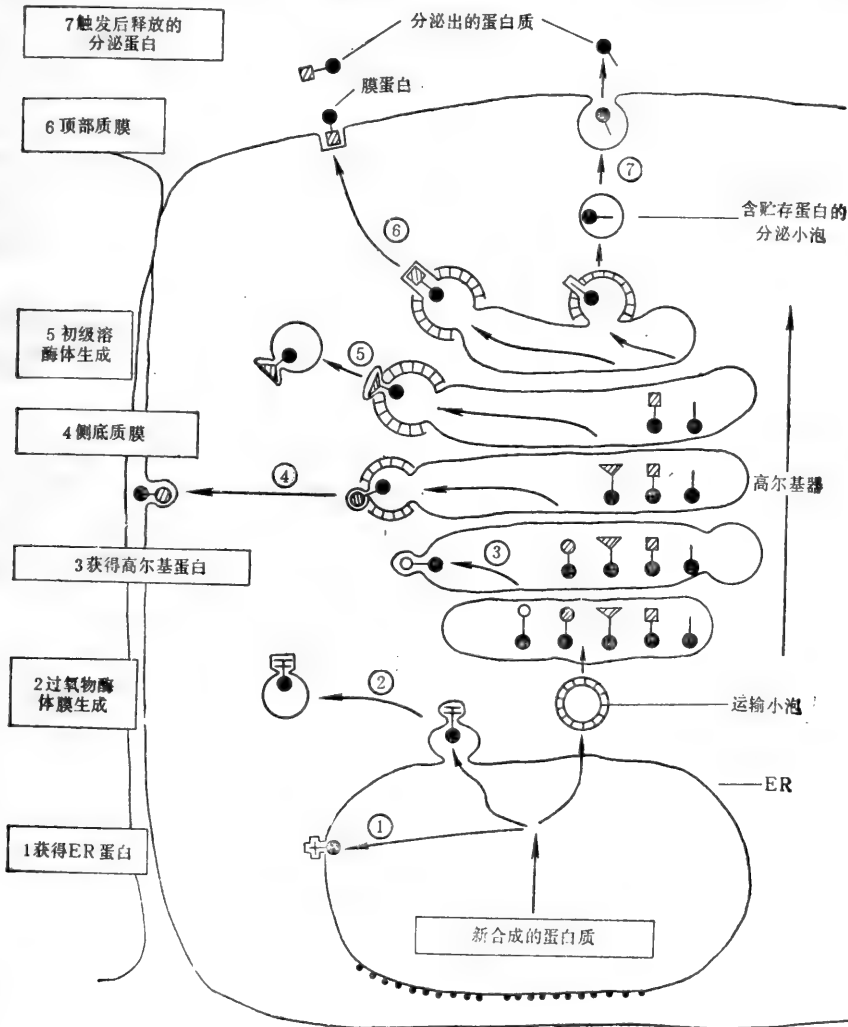


图 7-63 在 ER 中合成的蛋白质进行细胞内拣选的简图。蛋白质基于所含“地址标记”而被引向细胞内不同位置。但溶酶体的识别标记未知。利用抑制 N-连接糖基化作用的霉素(tunicamycin)进行的实验表明在许多情况下溶酶体识别标记中并不需要 N-连接的低聚糖。注意,据认为过氧化物酶体膜由 ER 直接出芽形成(见图 7-62),一旦形成后,这种膜可提供将胞液中合成的经选择的可溶性蛋白质泵入过氧化物酶体的重要系统。如此,过氧化物酶体以与线粒体大致类似的方式获得许多其中所含的蛋白质。

种过氧化物酶体又称为乙醛酸循环体(glyoxysomes)。在乙醛酸循环中,过氧化物酶体中的脂肪酸降解产生的2个乙酰辅酶A分子可用于合成琥珀酸,琥珀酸离开过氧化物酶体并转化为葡萄糖。由于乙醛酸循环不发生在动物细胞中,所以动物细胞没有将脂肪转化为碳水化合物化合物的能力。

类似溶酶体途径中所用的拣选机理可同样在其他细胞区室中起作用¹³

有关将酸性水解酶拣选到溶酶体的引人注目的实验观察提示,细胞内对多种蛋白质的拣选可能以大致相同的方式进行。当采用蛋白质或低聚糖结构中某种共同特征作为“地址标记”时,下列模式可用以确定蛋白质在恰当类型的有衣小泡中包装(图7-63)。

1. 新合成的蛋白质(及其他大分子)通过 ER 时,部分分子上的低聚糖被选择性地修饰。含有某些类型的低聚糖或其他标记的蛋白质被 ER 膜上受体保留,其余所有蛋白质则自动外运到高尔基器。

2. 许多被运到高尔基器的蛋白质被一系列低聚糖修饰酶辨认,这些酶以特有方式进一步改变蛋白质的碳水化合物化合物的侧链。某些经修饰的低聚糖侧链与位于高尔基膜上的特殊受体蛋白结合,因相关的一组蛋白质具有相同的低聚糖标记,这些蛋白质被相同受体捕获。同样,其余高尔基受体可识别并捕获经其他方式标记的蛋白质。

3. 有些类型的高尔基受体分子把捕获的蛋白质分子保留在高尔基器内。其余蛋白质则分散于高尔基膜中,并包装在特异类型的有衣小泡中,这些小泡是将受体及所携货物运到特定细胞区室的。

4. 所有未能在高尔基器中与特殊受体结合的大分子被运到细胞外。

在这种模式中,ER 或高尔基器中任何未被特殊受体捕获的大分子,不管是否因为意外,都将通过 ER 及高尔基器最终被运到质膜。因此,可溶性蛋白的分泌只需要一种由 ER 及高尔基器中正常拣选机理做出的“推开”(hands-off)决定。这就可用来解释为什么缺少低聚糖标记(如在 I 细胞症中)的溶酶体水解酶会分泌出来。

在发现高尔基器 80 余年后,这一重要细胞器中进行的拣选过程的有关分子细节正在开始展现。尽管图 7-63 所示过程只是一种理论上的推测,但也反映了目前实验中有关拣选机理的一般要点。一些依然存在的中心问题是:(1)需要确切了解地址标记的实质;(2)弄清这些标记在运输过程中如何被修饰而将蛋白质引到正确地点(如将酶引到 ER 或高尔基膜),或将蛋白质运到更远的位置;(3)要确定这一地址密码如何被介导转运的有衣小泡破译的。

小结

过氧化物酶体是特化来用分子氧进行氧化反应的细胞器。这种细胞器产生过氧化氢酶既可利用又可破坏的过氧化氢。

溶酶体是专门进行细胞内消化的细胞器,含有在 pH 值约等于 5 时(溶酶体内 pH 值)具最佳活性的特征而被称为酸性水解酶的多种多样水解酶。水解酶在 ER 中合成,经高尔基器加工,再从高尔基器被特异的有衣小泡运到溶酶体。

即使只缺乏一种溶酶体水解酶,也可能造成严重的遗传性疾病,这表明溶酶体消化作用对正常细胞功能的重要性。一种被称为 I 细胞症的疾病则因在溶酶体中缺失全部水解

酶而发生。对来自这些患者细胞的研究导致发现含甘露糖-磷酸的特殊低聚糖在正常情况下可作为地址标记附着于溶酶体水解酶,从而使这些蛋白质可被位于高尔基膜的受体蛋白分类。蛋白质表面的不同低聚糖及其他特征似乎可被用来作为地址标记,以进行细胞内的蛋白质分类。

双膜细胞器: 细胞核、线粒体及叶绿体

至此,有关细胞内运输机制的讨论尚未涉及将新合成蛋白质运送至细胞核、线粒体及(植物中)叶绿体的问题。所有上述细胞器都被两层分离的膜包围,据说这类膜构成细胞器的被膜。两层膜虽都含有脂双层,但蛋白质组成差别极大,这反映了功能上的差异。除此之外,由于存在两层同心膜因而在细胞器内产生了两个独立的空隙:外层及内层膜之间的膜际空隙及被内层膜包围的较大区室。在以下讨论中,我们将称这种最内层的区室为细胞器腔。通常称线粒体腔为基质空隙(matrix space),称叶绿体腔为间质(stroma)。细胞内的拣选机制不仅应将适当的新合成蛋白质投递到各个双膜细胞器,还必须将这些蛋白质引到四种亚细胞器区室之一:外膜、内膜、膜际空隙或腔。

这些双膜细胞器中的蛋白质多在细胞器外合成,然后穿越内外两层膜进入腔内,或只穿越外膜,抵达内膜上或膜际空隙中的最终位置上。据认为内外膜间的特化的粘附部位(adhesion sites)有利于这些分子的转运。

具有内外细胞膜的细菌可视为双膜细胞器的模型⁴⁴

基于细菌遗传学分析的威力及细菌是自由生长机体的事实,对大肠杆菌及沙门氏菌双膜系统的了解要比对真核细胞器的双膜了解得更深。如图 7-64 及 7-65 所示,大肠杆菌被膜是一种由内外两层脂质膜及夹在其中的一种使细胞坚硬的粘肽层构成的复杂结构。内外两层膜各含有不同的膜蛋白质,具有极不相同的功能。两层膜通过称之为粘附部位的不连续区域联系。虽可在大肠杆菌细胞的电子显微照片中观察到粘附部位,但这类结构更易于在各种细菌、病毒附着细菌外膜处观察到(图 7-66)。

若不考虑坚硬的中间层,细菌双膜可做为分析穿越真核双膜细胞器两层膜运输过程

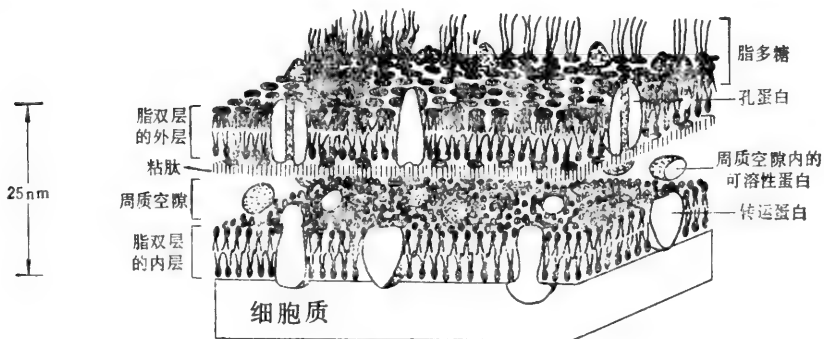


图 7 64 大肠杆菌外膜小块断面示意图。注意两层同心脂双层膜将细胞质与外界隔离。坚硬的粘肽层是极为多孔的,并与外层膜的一种小型蛋白质分子共价相连。图中黑线代表低聚糖链,它们是和外层膜的外面单层的特有脂多糖分子相连。为简明起见,只显示少数几条低聚糖链。

的极好模式。然而，蛋白质运输的方向却相反，在细菌中，腔内(细胞质)合成的某些蛋白质向外移动，而在真核细胞中，许多在外面(胞液)合成的蛋白质向内运入细胞器腔(图 7-67)。

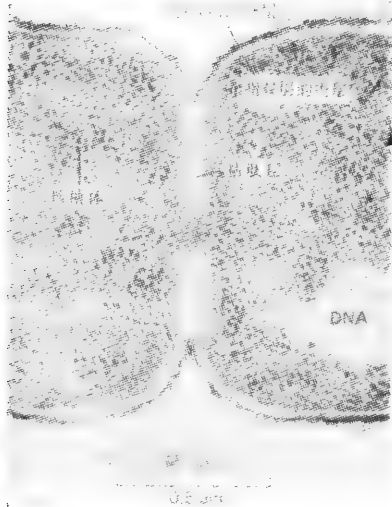


图7 65 分裂中的大肠杆菌横断面的电子显微照片。细胞正处于分裂过程中，双层膜及粘肽层的排列清晰可见。(引自 I. D. J. Burdett and R. G. E. Murray, *J. Bacteriol.* **119**:303—324, 1974)

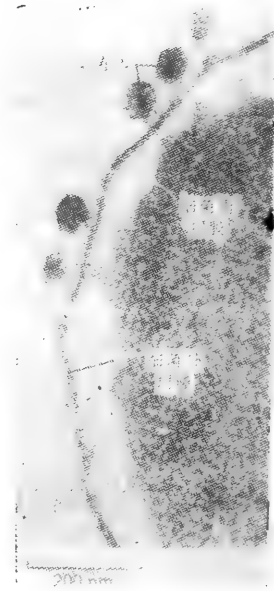


图7 66 附于大肠杆菌双层膜粘附部位的细菌病毒的电子显微照片。病毒可能在粘附部位处将它的 DNA 注入细胞内。(引自 M. Bayer, H. Thurow and M. H. Bayer, *Virology* **94**: 95—118, 1979)

膜蛋白可在粘附部位的内外双层膜之间移动^{20,45}

现在某些细菌外膜蛋白质已可进行诱导合成，然后再利用特异抗体探测出现在外膜上的蛋白质。此类研究已证明至少部分蛋白质首先在特殊膜的粘附部位或其附近进入外膜，这提示了这些部位在内外膜间大分子运输方面起重要作用。

我们已提及在大肠杆菌中“工程化地”由大肠杆菌膜蛋白氨基端及胞液蛋白羧基端构成杂种蛋白的巧妙实验(见 329 页)。当含有大肠杆菌外膜蛋白氨基端的杂种分子合成后，可发现某些分子主要只插入细菌内膜，而不插入细菌外膜。这就提示了预定分往大肠杆菌外膜的蛋白质首先被插入内膜，随后再将这些分子转入外膜时则需要第二信号。有些杂种分子中的第二信号是有缺陷的。

这些观察指出膜蛋白以独立的两步运输穿越真核双膜的可能性。根据这一观点，新合成的细胞器膜蛋白携有一个使它们能与适当外膜结合，然后插入其中的信号序列。在双层平面中扩散后，所有在外膜中的蛋白质最终将与粘附部位相遇。位于粘附部位的受体蛋白就能选择性地将携有特殊标记的膜蛋白运送到内膜(图 7-68)。这一转移过程可能是耗能的、单向的。因此，仍留在真核细胞器外膜的将只是那些无适当转移标记的蛋白质。目前，这类有关选择性膜际转移的模式只是一种常被借用的假说，因设想中的粘附部位受体至今尚未被验证。

双膜细胞器必须从胞液同时向腔内运输可溶性及膜结合蛋白，现在我们将讨论蛋白质如何连续穿越两层膜。

粘附部位在把水溶性分子转运到双膜细胞器腔时可能也起作用

图 7-68 所示的膜蛋白运输途径也可被脂质及其他溶于脂双层的疏水性小分子采用，但水溶性分子不能以此方式进入细胞器。小型水溶性分子一般被特异转运蛋白运送穿越单个的双层膜，而在双膜细胞器的外层膜上则存在着蛋白质孔使小型可溶性分子得进入膜际空间。第二组转运蛋白必存在于内膜，以使位于膜际空隙的分子进入腔内(图7-69)。因这两种转运蛋白不同,位于腔内及膜际空隙的分子也大不一样(见第九章)。

然而，像蛋白质这样的大的可溶性分子究竟如何被运到这些细胞器中的呢？虽说原则上可利用细胞质运输小泡，但这种方式可能使被运到细胞器腔内的分子仍留在泡中(图7-70,途径1)。而这正可能是运输小泡不能被高尔基器运到线粒体或叶绿体的原因。此外，有关线粒体的实验表明预定分往腔(基质)的蛋白质并不先进入膜际空隙(见 518 页)。原则上，大分子可从胞液通过完全在膜际空隙内进行的泡出芽和融合循环进入细胞腔(图 7-70,途径2)，然而，在细菌或细胞器的双膜间，从未发现这种小泡介导类型的运输过程。

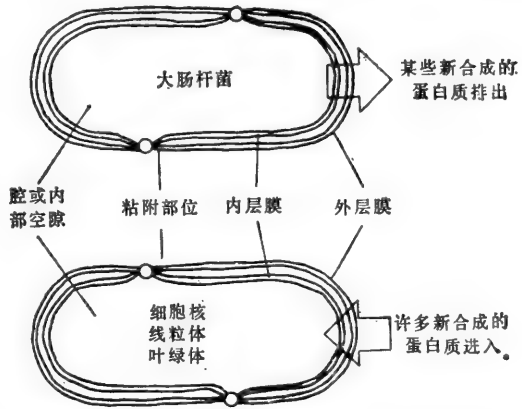


图7-67 大肠杆菌和某些真核生物的细胞器之间的相似性。内部空隙(称为腔)是被一外膜包围着的。外膜则由两层同心膜组成，其中每层都是包埋了膜蛋白的脂双层。蛋白质输入(并穿越)这两层膜的机理，细菌和真核生物可能相似。

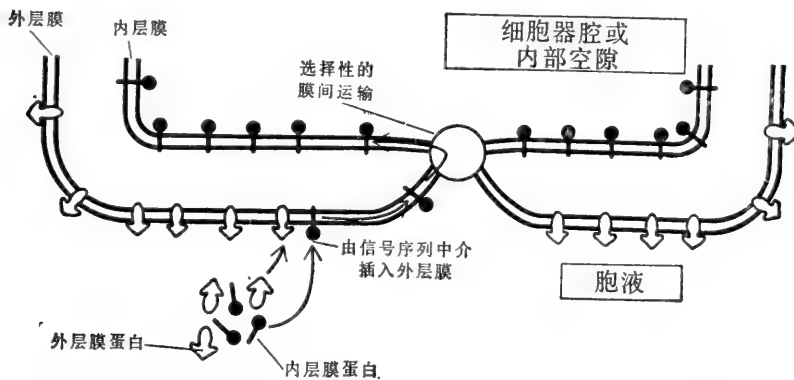


图 7-63 双膜细胞器中粘附部位可在内外双层间选择性运送脂质及膜蛋白的示意图

通过粘附部位上的横跨两层膜的特殊蛋白质通道，将可溶性分子送入双膜细胞器腔是一种最可能的机制。已知被称为核膜孔复合体 (Nuclear pore complexes) 的连接细胞核内外膜的独特结构可将蛋白质及核酸运出和运入细胞核(见 413 页)。更接近线粒体及叶绿体情况的是，大肠杆菌中细菌病毒与特殊粘附部位结合(图 7-66)，并将其 DNA 直

接通过这些结合部位注入细胞。虽然已在线粒体及叶绿体中观察到粘附部位，但至今这些部位尚无可作为选择性孔的直接证据。分离这些粘附部位进行生物化学分析始终极为困难。或许，与在大肠杆菌中的模式相同，线粒体及叶绿体上的粘附部位是不稳定的，它们不断分解，而且再在不同地方重新形成。

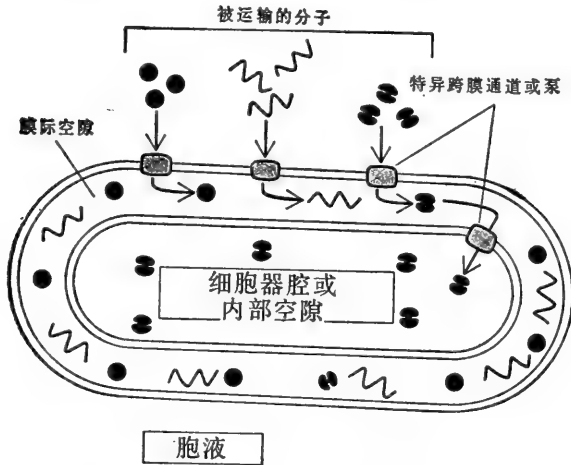


图7-69 水溶性分子被运入双膜细胞器的一种途径的示意图。这些细胞器在膜际空隙积聚可溶性分子，并选择性地将其部分运入腔内。凡具有相应转运蛋白的分子均可按这种方式运送。

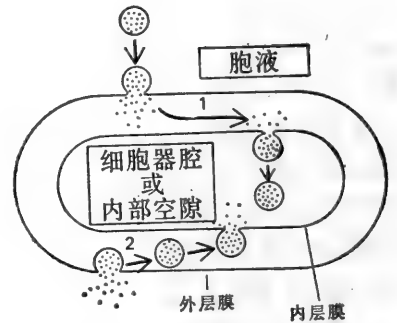


图7-70 来自胞液的运输小泡不能用来将水溶性分子运送至双膜细胞器腔的示意图。虽然分子可通过运输小泡被运至膜际空隙，然后在另一泡内进入腔(途径1)，但结果这些分子却不能释放进入腔内。然而，原则上水溶性分子可通过完全在膜际空隙进行的泡出芽和融合循环而直接从胞液送入腔内(或相反)(途径2)，但从未发现发生这类小泡运输方式。

小结

与 ER、高尔基器及溶酶体不同，细胞核、线粒体及叶绿体被两层分离的双层膜包围。虽然被运到腔内的分子可独立穿越每层膜，但连接这两层膜的特殊粘附部位似乎与这种运输有关。就线粒体及叶绿体而论，这种运输过程可能比核膜更特殊。在核膜，大型核膜孔复合体使大分子能迅速运出和运入核。

【秦世真译 查士隽校】

第八章 细胞核

细胞的 DNA 组分隔离在细胞核中,细胞核则以一双层膜为界,称为核被膜。核被膜是区别真核细胞与原核细胞的本质特征。核被膜将 DNA 复制和 RNA 合成这两个重要的遗传过程同细胞质中的核糖体分开,遗传信息是在核糖体上转译成蛋白质的。看来核被膜的最重要功能之一就是使 RNA 合成与蛋白质合成分开。否则,核膜的进化是难于理解的。原核生物与真核生物之间还有其他重大差别,但这些差别看来都是次要的。例如,原核生物的基因组通常要小得多,真核生物 DNA 则与特化蛋白——组蛋白——紧密复合在一起。组蛋白把 DNA “包装”起来并协助调节 DNA 的活性。但是细胞核的存在并不意味着基因组必然要大以及组蛋白必然存在。最大的细菌 DNA 组与最小的真核生物 DNA 组差不多一样大。而单细胞的甲藻是一类真核生物,它有核被膜,却没有组蛋白。

由此看来,即使对于 DNA 含量较少的小细胞来说,细胞核和细胞质两部分的分隔也是有好处的。但如果从分子遗传学的中心法则(DNA→RNA→蛋白质)对于所有的活细胞都适用的话,为什么应该如此呢?目前我们能得到的最好回答是:在真核细胞中,将 RNA 合成(转录)在时间上和空间上与蛋白质合成(转译)分开是具有重要意义的。在原核生物细胞中,转录和蛋白质合成是同时进行的,即当核糖体转译 RNA 分子的 5' 端时, RNA 分子的 3' 端还在合成中。因此在 RNA 转录本被转译成蛋白质之前是没有什么机会改变这个转录本的。相反,在真核生物中, RNA 转录本在被转译成蛋白质之前可以在细胞核中加以广泛的改变。这种改变称为 RNA 加工,它是真核生物中遗传信息传递过程的一个重要的中间步骤,之后才将加工好的 RNA 从细胞核中转运到细胞质中的核糖体上(图 8-1)。我们将会看到,至少有一种类型的 RNA 加工——称为 RNA 剪接——对于细胞功能是大有好处的。此外, RNA 剪接还使真核生物细胞能演化出具有间断结构的基因,这有利于新蛋白质的出现。所以要说明真核生物细胞存在细胞核的道理是不难的。

这一章所介绍的资料相当丰富。在开始两节中,我们叙述真核生物的 DNA 是怎么装配成为染色体,并概述 RNA 合成和加工所涉及到的基本机理。第三节叙述核被膜的结构。接着对控制真核生物基因表达的机理进行详尽的讨论。最后,本章的最后一节讨论真核生物基因组进化过程的本质。

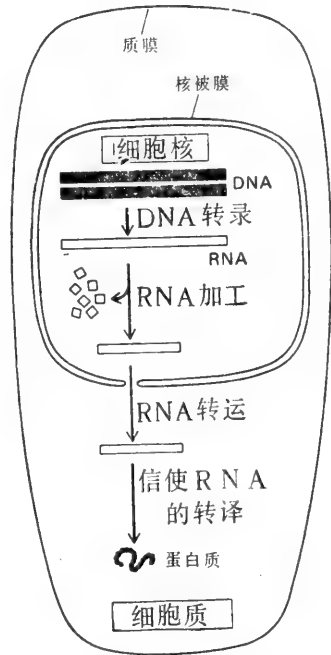


图8-1 在真核生物中扩大了蛋白质合成过程(“DNA→RNA→蛋白质”)的示意图。因为有核被膜,所以在转录与信使 RNA 转译为蛋白质这两个过程之间还插入了 RNA 加工和 RNA 转运两个步骤。

DNA 组成染色体的过程¹

在本世纪的最初四十年内,生物学家对 DNA 能在染色体中携带遗传信息的可能性往往不予考虑,部分是因为核酸被误认为只含有简单重复的四核苷酸序列(例如 AGCT AGCT AGCT……)。但是,现在我们知道, DNA 是一种非常长的、不分支的线性多聚体,它可以包含好几百万个核苷酸,这些核苷酸的排列顺序不规则但却非随机,而遗传信息正蕴藏在这个核苷酸的排列顺序中。这个线性的由四个字母组成的遗传密码是以三个核苷酸作为一个单词,它直截了当地解决了将大量遗传信息贮存于很小的空间内的问题。在 DNA 中,每 100 万“字母”(核苷酸)所占的直线距离只有 $3.4 \times 10^5 \text{ nm}$ (0.034 cm),所占总体积大约为 10^6 nm^3 (10^{-15} cm^3),因此,一个直径为 $20 \mu\text{m}$ 的典型人体细胞——其(单倍体) DNA 序列含有 3×10^9 个核苷酸——理论上讲它的全部遗传信息可以装在一个每边长 $1.5 \mu\text{m}$ ($1.5 \times 10^{-4} \text{ cm}$) 的立方体中。比较起来,一本包含 3×10^9 个字母的书大约要有 100 万页。

但是,尽管如此紧凑,现在看来在高等动植物中仍只有一小部分 DNA 用于编码蛋白质或编码必需的非转译 RNA,如转移 RNA 和核糖体 RNA。通常称这些区段为编码 DNA。虽然对不编码区段的 DNA 的功能尚未完全了解,但有些区段中无疑包含具有必要生物功能的序列,这包括决定每条染色体中 DNA 折叠模式的序列。

DNA 的折叠之所以在真核生物细胞中很重要,是有两方面的原因。第一,很长的 DNA 分子要有规律地包装在细胞核中就必须折叠起来。第二,基因组区段在某一种细胞中的正确折叠方式能决定该区段的基因活性。在下面各节中我们介绍真核生物所特有的蛋白质——组蛋白,它对于真核生物 DNA 的折叠起着很重要的作用。

组蛋白是已知最保守的蛋白质之一²

所有生物的 DNA 都是与各种不同的 DNA 结合蛋白紧密结合在一起的。这些蛋白质可以作为酶来介导像 RNA 合成这样的重要功能,还可以作为结构蛋白协助把细胞核中的 DNA 组织起来。习惯上把真核生物中的 DNA 结合蛋白分成两大类:组蛋白和非组蛋白染色体蛋白。后者是千百种具有各种不同功能的不同蛋白质的总称。而组蛋白是指一类定义明确的结构蛋白。与其他染色体蛋白相比较,组蛋白的数量非常之大(每个细胞中每种类型约有六千万份)。事实上,它们的总量与细胞 DNA 的总量大约相等。由于历史的原因,我们把有组蛋白与之结合的 DNA 称为染色质(一般认为所有真核细胞的核 DNA 都是如此)。

组蛋白是较小的蛋白质,内含高比例的带正电荷的氨基酸(赖氨酸和精氨酸);正电荷有助于组蛋白与 DNA 的紧密结合而与核苷酸顺序无关。组蛋白可能是一直保持与 DNA 结合在一起的,所以,有可能在多数有基因组参与的反应中起重要作用。

真核生物细胞中有五种组蛋白,分为两大类。第一类包括核小体组蛋白,这是一些负责把 DNA 折叠起来形成核小体的小蛋白质(有关情况将在下一节中详细讨论)。用组蛋白 H2A, H2B, H3 和 H4 来表示它们。这四种类型的组蛋白是所有已知蛋白质中最保守的:例如,豌豆和奶牛的组蛋白 H4 的氨基酸顺序中只有两个氨基酸的差异(图

8-2)。这种保守性表示,这些组蛋白的几乎全部氨基酸都和它们的重要功能有关。

第二类只有组蛋白 H1, 每个细胞中有好几种不同的但亲缘关系很近的变种。除了中心的核心区外, H1 组蛋白的氨基酸顺序在进化中的保守性要比核小体的其他四种类型小得多。

组蛋白与 DNA 的结合导致形成染色质的颗粒单位——核小体³

每条染色体中的 DNA 双螺旋要是伸展开来的话,平均会有 5 cm 左右长。组蛋白负责把这样长的 DNA 分子包装在直径只有几微米的细胞核中。包装有好几个层次。现在我们对染色质结构有了比较深入的了解,那是由于 1974 年发现了叫做核小体的基本包装单位。在经过处理已解开较高层次的包装之后拍摄下来的电镜照片中(图 8-3B),核小体使染色质呈现“串珠”外观。

用降解 DNA 的酶进行消化可以除去 DNA “链”上的核小体“珠”。(降解 DNA 和 RNA 的酶都叫核酸酶,而只降解 DNA 的酶则叫做脱氧核糖核酸酶或者 DNase)。常用于分离一个个核小体的酶是一种细菌酶——微球菌核酸酶。用这种酶短期消化后,只有核小体珠之间的 DNA 被降解。其余 DNA 受到与它结合的组蛋白的保护而免遭消化,这留存下来的是一个长 146 碱基对的双链 DNA 片段。核小体珠,这些 DNA-组蛋白复合物,在电镜照片中呈现为盘状颗粒,直径约为 11nm。每个核小体念珠中含有一组共 8 个组蛋白分子——四种高度保守性核小体组蛋白 H2A、H2B、H3、H4 各两个分子。这些组蛋白形成一个蛋白质核心,在它四周围绕着 DNA 片段(图 8-4)。

在未经消化的染色质中, DNA 在核小体之间连续成线。每个核小体珠与下一个核小体珠之间由一段联接 DNA 隔开,它的长度不一,约有 60 个碱基对左右。这种连接 DNA 加上核小体珠就构成了完整的核小体。所以,每一核小体含约 200 个碱基对的 DNA (图 8-4)。

一个平均大小的蛋白质约含 400 个氨基酸(分子量约为 50 000),所以,需要有 1200

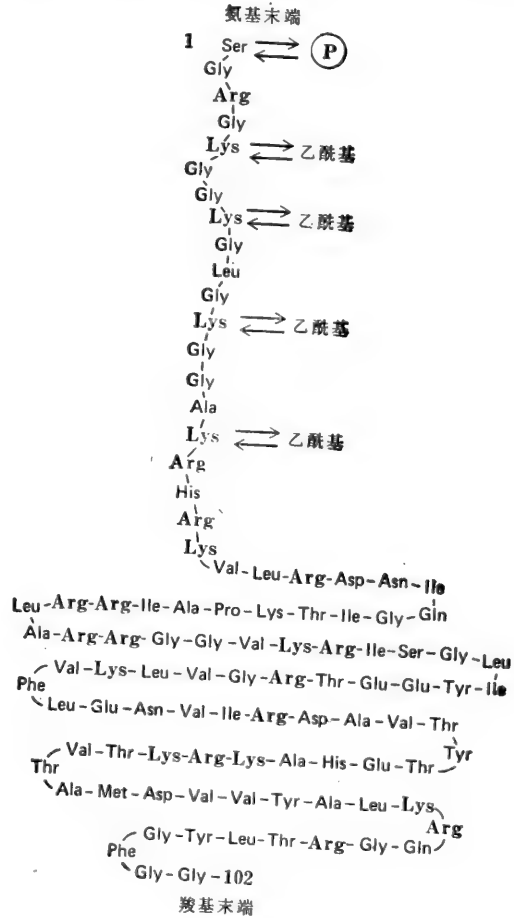


图 8-2 组蛋白 H4 (四种核小体组蛋白之一)的氨基酸顺序。为了突出起见,将带正电荷的氨基酸以黑体表示。图中还表明(其他三种核小体组蛋白也一样): 延伸的氨基末端“尾”可以通过个别赖氨酸的乙酰化和丝氨酸的磷酸化(见图 8-9 和 8-10)而在细胞中发生可逆的变化。图中画的是牛的 H4 的顺序,豌豆中的顺序是基本一样的,只不过有一个赖氨酸变成异亮氨酸和一个赖氨酸变成精氨酸。

个左右的碱基对来编码它。因为染色质中每 200 个碱基对构成一个核小体，所以 1 200 个碱基对的编码 DNA 与 6 个核小体相结合，而人类单倍体基因组为 3×10^9 个 DNA 碱基对，所以有 1.5×10^7 个核小体。

许多核小体装配在一起形成高度有序规则结构^{3,4}

在活细胞中，染色质必须保持一种高度紧凑的状态，所以，可能很少采用长串珠的方式。而是核小体彼此堆起来形成规则的阵列，其中的 DNA 高度浓缩。当在电镜网格上对细胞核作非常温和的溶解时可以看到，大部分染色质为直径约 30nm 的纤维(图 8-3A)；

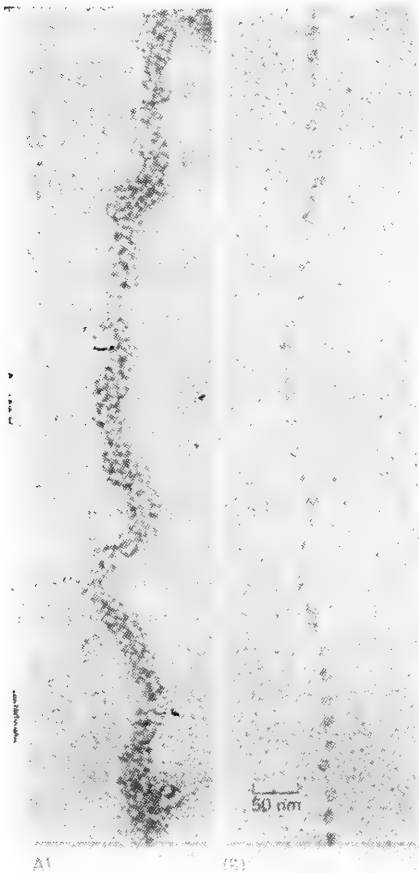


图 8-3 经去浓缩处理前后的染色质线电镜照片。(A)表示天然结构，常称为 30 nm 纤维。(B)表示染色质去浓缩后的串珠形状，放大倍数相同。这两种形式染色质的示意图见图 8-24。这些电镜照片是根据图 8-35 中所述的步骤加以修改而拍摄的。(A, Barbara Hamkalo 赠; B. Victoria Foe 赠)

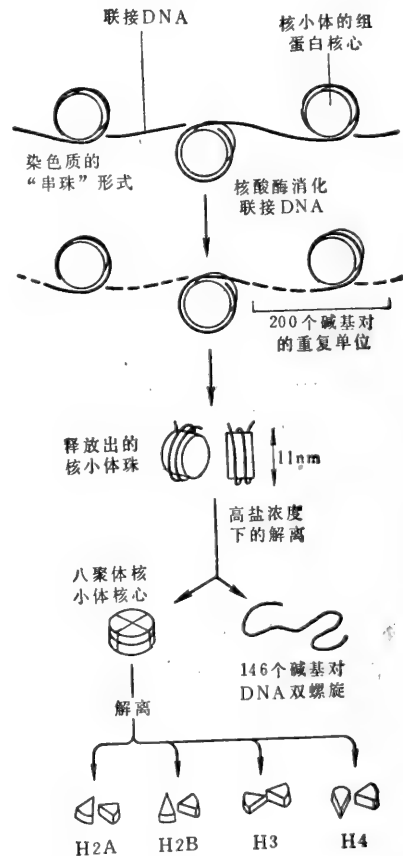


图 8-4 核小体珠结构的示意图。用微球菌核酸酶对联接 DNA 作局部消化后，将珠从染色质中释放出来。每个核小体珠中有一个八聚体组蛋白核心，在它四周围绕着一个 146 个碱基对的 DNA 双螺旋。这个蛋白质核心是由组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 各两个组成。这些组蛋白各含 102 到 135 个氨基酸。染色质以串珠状存在时，每个核小体珠与其相邻的珠通过一条裸露的联接 DNA “线”彼此连接。

这种染色质包装的基本形式通常就叫做 30nm 染色质纤维。

关于在这种 30nm 的基本染色质纤维中核小体的包装方式曾提出过两个不同的模型，如图 8-5 所示。按照这两个模型，一条含 5 cm DNA 的人染色体的染色质伸展开来时大

约 1.2mm 长,而以串珠状构像存在时则有 2 cm 左右长。

组蛋白 H1 帮助将核小体包装在一起⁵

看来,负责把核小体包装起来形成 30nm 纤维的是组蛋白 H1。每个 H1 分子有一个球状中心区,向两侧分别伸出一个氨基末端“臂”和一个羧基末端臂(图 8-6)。球状部分与每个核小体上的特殊部位相连,一般认为,伸出的臂不仅与相邻核小体的组蛋白核心接触,而且还在联接 DNA 通向核小体的地方将联接 DNA 盖起来。通过这种方式,组蛋白 H1 使核小体聚拢形成一种有规则的重复排列(图 8-6)。

组蛋白 H1 结合的一个重要特征没有在图 8-6 中表示出来,那就是,往往是 8 个或者更多个组蛋白 H1 分子成群地与 DNA 结合在一起。这种类型的相互作用叫做协同结合(cooperative binding),这是因为任何一个组蛋白 H1 分子与 DNA 结合时,总倾向于与已结合的组蛋白 H1 分子相靠近。与基因组结合的其他许多蛋白质也是以一种协同方式结合的,所有这些蛋白质结合时总是形成由许多分子组成的簇。这种协同结合的一般特征如图 8-7 所示。

我们将会看到,染色质似乎是包装成较大的单位,每个大

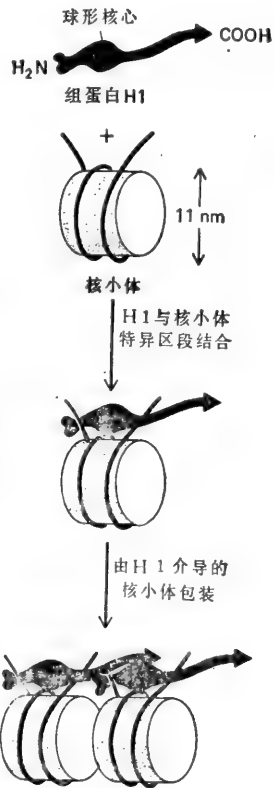


图 8-6 组蛋白 H1 帮助把相邻的核小体包装在一起的方式,组蛋白的确切结构及其氨基末端和羧基末端臂与核小体相互作用的正确部位,都还不知道。但 H1 的球形核心好象是按图中所画的那样与每个核小体相连。每一组蛋白 H1 分子约含 220 个氨基酸。

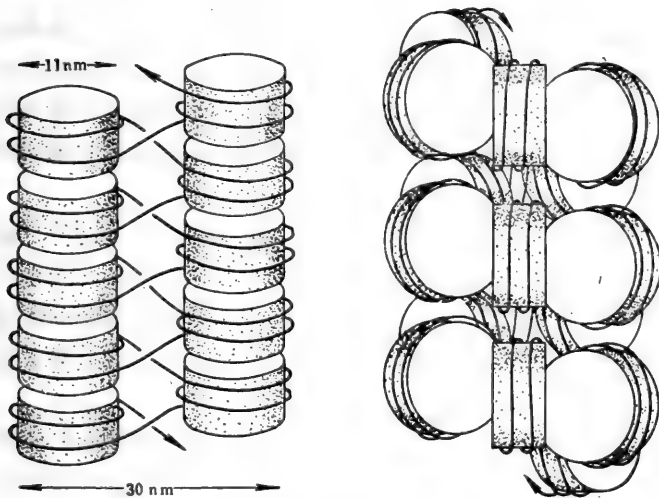


图 8-5 为说明串珠状核小体如何包装成 30nm 基本纤维而提出的两个不同模型。图 8-3A 电镜照片中所看到的这种染色质的真正结构现在还不清楚。甚至有可能在染色体的不同区段中采用不同类型的包装形式。

单位当它所含的基因有活性时可以通过去浓缩而改变其结构。如果染色质是通过组蛋白 H1 分子间的协同相互作用组织起来的话,那么,染色质的不同功能区就会像细小的结晶一样,而在基因活化期间当 H1 分子簇发生变化或者被移除时,每个功能区会突然伸展开(图 8-8)。

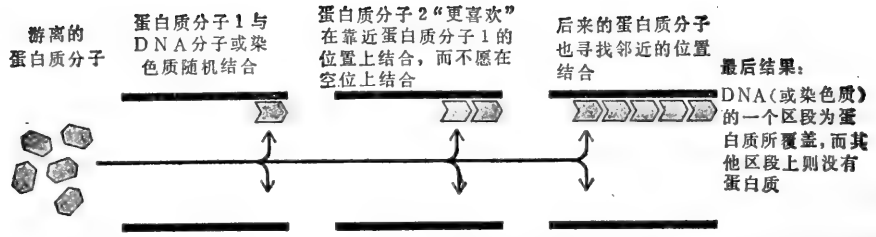


图 8-7 一般图解表明以协同结合方式与 DNA 或者与染色质中蛋白质结合的任何蛋白质为什么要成簇地结合, 图示与某一区段“全或无”式的结合。

并不是所有核小体都是通过同一方式包装起来的^{2,6}

在试管中纯化的组蛋白可与任何 DNA 分子形成核小体, 这包括正常情况下不与组蛋白结合的细菌 DNA。所以, 在染色质的电镜照片中看到, 核小体是 DNA 所有区段都有的特征这是不足为奇的。但是核小体并不像在这些照片中所显示的那样一致。事实上, DNA 的重要功能是靠基因组个别区段中染色质核小体结构的细微改变来调节的。虽然这些微小的然而在生物学上却是很重要的结构差异的分子基础, 有很多还是不知道的, 但是, 引起染色质结构异质性的原因有几个是可以肯定的。其中有些变化好像主要是发生在含有活性基因的染色质区段中。

核小体组蛋白的异质性 已经知道, 每种类型核小体组蛋白都可以发生一系列的共价修饰, 例如, 个别赖氨酸侧链会乙酰化(图 8-9), 两个别丝氨酸会磷酸化(图 8-10)。但是, 每种类型组蛋白中只有一部分经过这两种方式修饰(见图 8-2), 所以有些核小体含修饰过的组蛋白, 而另外一些则没有。因为这些修饰是发生在那些进化过程中特别保守的氨基酸上的, 所以非常可能在细胞中有重要功能。

有些组蛋白修饰反应在形成以后可以迅速发生逆反应。最为显著的是, 组蛋白乙酰基转移酶经常在赖氨酸上加上乙酰基, 然后组蛋白脱乙酰基酶再将乙酰基除去。因此, 乙酰基在组蛋白上的平均时间大约只有 10 分钟左右。这就是说, 一个细胞接受到合适的信号后, 能够迅速改变它的核小体的乙酰化型式。一般认为, 在有活性基因的染色质中, 组蛋白的乙酰化作用是加强的。

另外一种可逆的组蛋白修饰作用在细胞中将一种进化中非常保守的 74 个氨基酸组成的蛋白质共价结合于组蛋白 H2A 分子的大约 1/10 处, 这种蛋白质叫做泛素(图 8-11)。这些特殊的 μ H2A 分子好像只在有活性基因的间期染色质中才有。每次有丝分裂时, 染色体浓缩, 它就暂时消失。

核小体组蛋白的修饰作用并非全部都是可逆的。例如, 许多细胞合成一种或一种以上的“组蛋白变种”, 它们的氨基酸顺序与该组蛋白的大多数分子稍有差异。这些组蛋白变种的意义尚不知道。

组蛋白 H1 的异质性 虽然每个核小体大约有一个 H1 分子, 但并非所有 H1 分子都是一样的。在有些细胞中至少有 5 种不同的亚型, 它们都能够在个别的氨基酸侧链上磷酸化。这些不同类型的 H1 组蛋白与核小体结合可能即使染色质在功能上产生差异。

由于含量丰富的非组蛋白蛋白质与选中的核小体结合造成的异质性 大多数非组蛋白染色体蛋白质的含量都非常少。例如,有些已知的基因调节蛋白,每个细胞大约只有 10 000 个分子,或者每 3 000 个核小体大约只有一个拷贝。要想分离出足够量的这些稀有蛋白质来进行分析研究是很困难的。由于这个原因,迄今为止,只有对含量最丰富的非组蛋白蛋白质进行过详细的研究。这些蛋白质的量大到每 10 个核小体就有一个分子(每个细胞中超过一百万个),所以不可能它们中的多数都能识别特异 DNA 顺序。相反,它们可能只是影响染色质的较一般结构特征,例如基因转录所必需的结构特征。

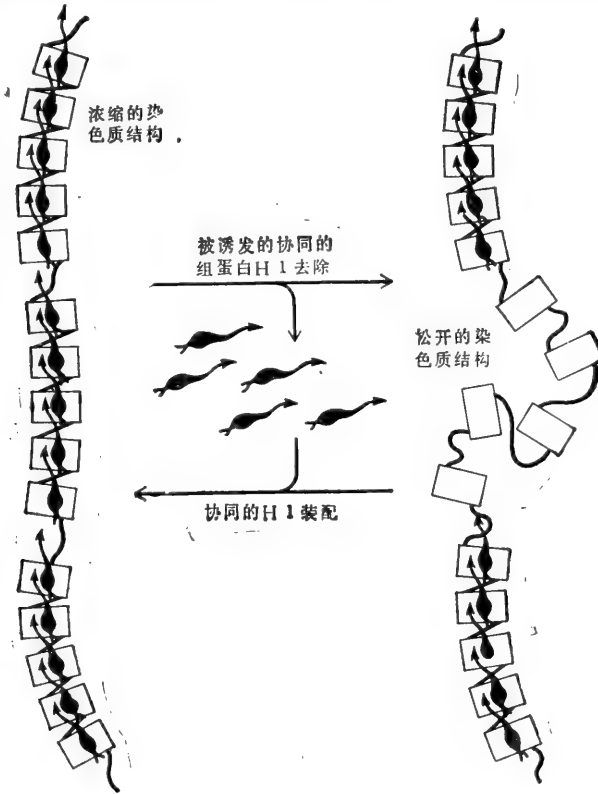


图 8-8 因为组蛋白 H1 使染色质的核小体协同包装,所以染色质的一个局部区域应该起结构单位的作用。本图描述了一个单位在接收到某一个外界来的调节信号时突然去浓缩的情况。一般认为,这样一种类型的染色质去浓缩过程是基因活化过程的基础。(见图 8-93)

含量丰富的非组蛋白蛋白质包括“高迁移率群”(high-mobility group),即 HMG 蛋白,之所以如此称呼是因为它们比较小,带电多,所以电泳时移动快。特别有意义的是两种亲缘关系很近的,叫做 HMG14 和 HMG17 的蛋白质,这两种蛋白质在所有哺乳类动物细胞中都有。像组蛋白乙酰化作用和与泛素结合组蛋白 H2A 分子一样,它们似乎也专门寻找那些含有活性基因的核小体,由其中一种的两个分子与每个核小体珠直接结合。

在 DNA 双螺旋上间隔地存在着与特殊 DNA 序列相结合的蛋白质

含量较少的非组蛋白蛋白质包括那些与染色体上特异 DNA 序列结合的蛋白质。这些

序列特异性蛋白质(sequence-specific protein)中有些负责控制对 DNA 序列的解读方式。

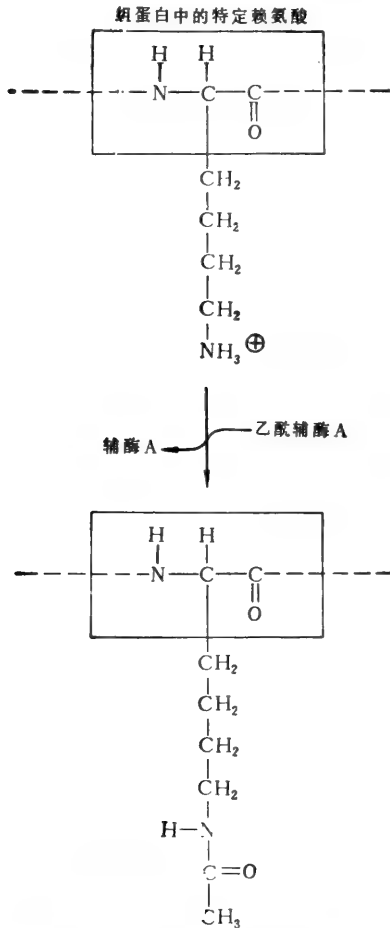


图 8-9 组蛋白中特定的赖氨酸通过可逆的乙酰化作用除去了一个正电荷。如前面表示组蛋白 H4 氨基酸顺序的图(图 8-2)中所示的那样,发生这种类型修饰的赖氨酸是位于四种核小体组蛋白的每一种的氨基末端的前面 30 个氨基酸中的。

这种控制最先是在细菌中证明的,当时发现,乳糖阻遏蛋白与 DNA 结合,抑制参与乳糖代谢的一系列基因合成 RNA。它起着一种基因调节蛋白的作用,只有在其正需要这些基因的蛋白质产物时,才将这种调节蛋白从 DNA 上除去(见 422 页)。乳糖阻遏蛋白与一段长 21 碱基对的特异

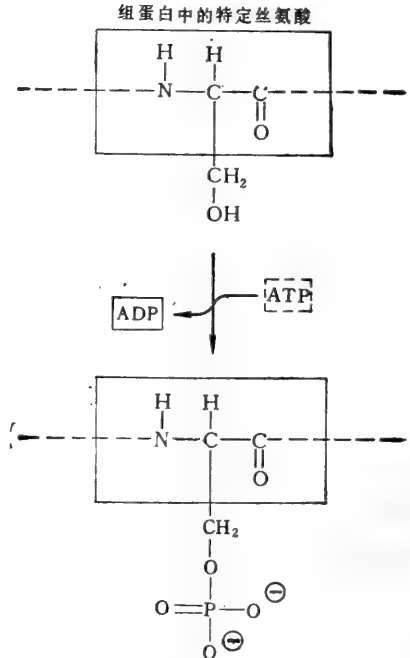


图 8-10 组蛋白中特定丝氨酸通过可逆的磷酸化作用加上负电荷。那些含有一个磷酸化氨基酸或一个乙酰化氨基酸的核小体与其他核小体会有差异。

NDA 序列紧密结合。还有其他几种通过与特异 DNA 序列结合来控制基因活性的细菌蛋白质也已经研究得很彻底。就象乳糖阻遏蛋白一样,这些蛋白质好像是从 DNA 的外面来识别某一段 DNA 序列,而且与 DNA 结合时也不破坏碱基的配对(图 8-12)。

最近,已经从真核细胞中分离出两种基因调节蛋白。其中一种叫做 T 抗原,是由猴病毒 SV40 编码的一种蛋白质。这种大蛋白质与病毒 DNA 上一段约为 36 个碱基对的特异序列结合,这一序列在 DNA 上靠近病毒 DNA 复制及 RNA 转录的开始处连续重复了三次(图 8-13)。像乳糖阻遏蛋白一样,T 抗原与 DNA 结合后就阻断了特异病毒基因的转录;同时,只有与它结合后病毒 DNA 才能在邻近部位开始复制。

真核生物中与特异 DNA 序列相结合的另一研究得较清楚的蛋白质就是所谓的 5S

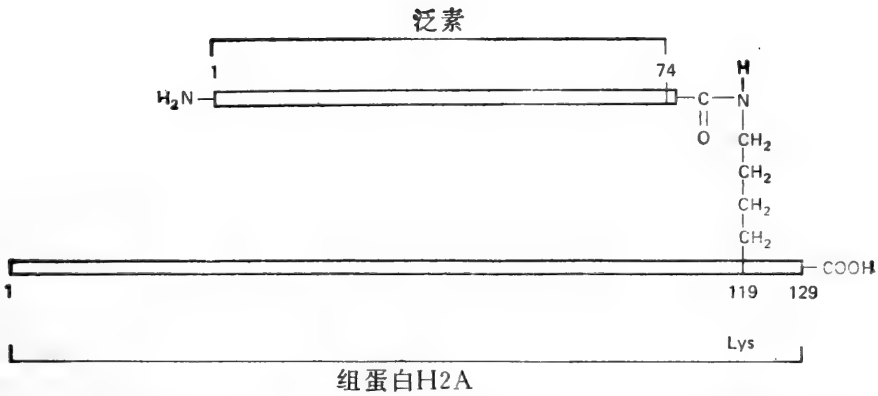


图 8-11 核小体中某组蛋白 H2A 分子与泛素共价结合,通过 H2A 的一个赖氨酸侧链与泛素的羧基末端结合。含有这种所谓 uH2A 组蛋白的核小体与其他核小体是不同的。

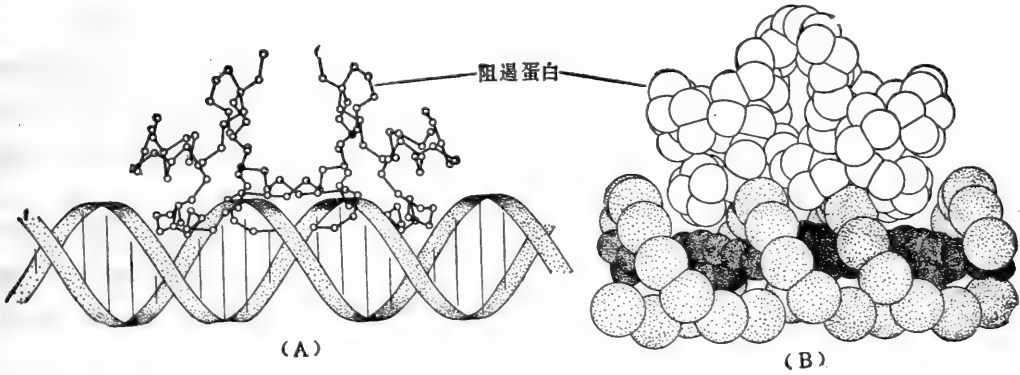


图 8-12 结合在 DNA 上的噬菌体基因调节蛋白的结构。图示的蛋白质分子是 λ 噬菌体 cro 蛋白的二聚体,它的三维结构已通过 X 射线衍射分析确定。cro 蛋白与 DNA 结合的部位已通过模型建造研究推断出来。(A),与 DNA 螺旋结合的网架模型。(B), (A) 中所示的 DNA-蛋白质复合体的实体模型。在这个模型中,蛋白质中每个氨基酸用球来表示,而带密点和黑色的球代表 DNA 骨架。(Brian W. Matthews 赠,根据 W. F. Anderson, D. H. Ohlendorf, Y. Takeda and B. W. Matthews, *Nature* 290:754-758,1981.重绘)

转录因子,有了它才能启动合成 5SRNA——一种小的核糖体 RNA。这个蛋白质以低聚物的形式与 5SRNA 基因中间附近的长约 35 个碱基对的序列相结合(见图 8-34)。

另外还有千百种识别不同特异 DNA 序列并帮助确定合成哪些 RNA 的蛋白质还有待于发现,上述这些 DNA 结合蛋白可认为是它们的原型。在多细胞生物中,在决定每种细胞类型制造哪些蛋白质时,有一组这样的调节蛋白被认为起着主要作用。除了调节转录以外,识别特异 DNA 序列的蛋白质无疑还参与其他遗传过程,例如,启动 DNA 的合成。将连续的 DNA 长分子折叠成具有不同功能的区域等,这些将在下面讨论。一段真核生物 DNA 在脱去其组蛋白后可能就像图 8-14 中表示的那样,特异的 DNA 结合蛋白间隔地分布在双螺旋上,通过这种方式来调节特异区段的基因活性。但是目前,有关真核生物中这些蛋白质的情况知道得非常少。

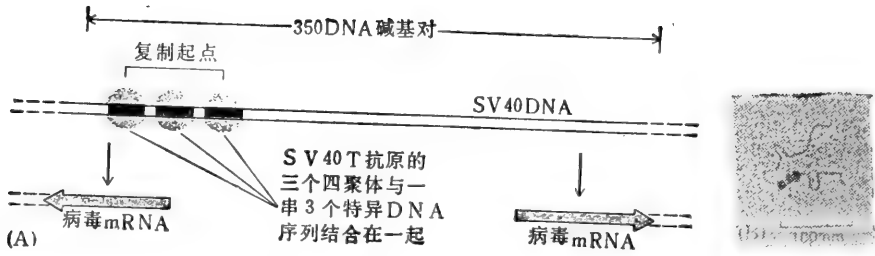


图 8-13 SV 40 的 T 抗原蛋白与病毒 DNA 一个特定区段的结合。(A)三段重复的 DNA 序列各长约 36 个碱基对,位于靠近病毒 DNA 复制及病毒 RNA 合成的起始处,这三个重复顺序与 T 抗原的三个四聚体分子相结合。(B)与纯 SV 40 DNA 结合的三个 T 抗原分子的电镜照片。虽然病毒 DNA 原为环形,但已用限制性核酸酶切割,所以图中是酶切后产生的线性 DNA 小片段。每个蛋白质球是重 400000 道尔顿的四聚体。(Richard Myers, Robert Tjian 和 Robley Williams 赠)

蛋白质可以通过与碱基对形成氢键和辨认螺旋的几何形状来识别特异 DNA 序列

DNA 结合蛋白是怎么识别特异 DNA 序列的呢? 虽然从原理上来说 DNA 螺旋可以采取几种不同的形式,然迄今所知最稳定的是 B-型 DNA 螺旋,它的结构如图 8-15A 所示。每个碱基对都有一部分露出在两条分开的沟中,宽的那条叫做大沟,窄的那条叫做小沟(图 8-15B)。在这些沟中,四种可能的碱基对排列中的每一种 (A-T, T-A, G-C 或 C-G), 由于它们突出的原子的排列不同而可以被专一地识别。所以我们认为,每个序列特异 DNA 结合蛋白上氨基酸侧链的排列,都是为了最大量地增加蛋白质与某一特异碱基对序列间的氢键结合。图 8-15B 表示一个氨基酸与一个碱基对间的一种可能相互作用。



图 8-14 与特异 DNA 序列结合的不同蛋白质间隔地分布在一段 DNA 螺旋上的示意图

但是这可能不是借以识别特异 DNA 顺序的唯一根据。根据对合成的小 DNA 的 X 射线衍射研究表明, DNA 螺旋的确切几何形状是可以随核苷酸顺序的差异而有不同。虽然多数 DNA 是处于图 8-15 A 所示的那种 B-型, 但由特殊序列组成的局部区段可以形成一种稍有不同的右手螺旋,称为 A-型 DNA (见图 3-7)。而且由嘌呤和嘧啶交替组成的序列如 GCGCGCGC, 可以形成一种十分不一样的左手双螺旋,称为 Z-DNA。可以预期,含有这种构像发生了改变的 DNA 螺旋的区段在染色体中是很少的,但因为它们可以为蛋白质专一地识别,所以一定具有重要的生物学功能。

具有更普遍意义的是,发现在 B 型 DNA 中碱基的确切倾斜度及碱基对之间的螺旋扭角取决于序列中彼此邻接的那些核苷酸。螺旋中这些小的变化将使原子(包括 DNA 的磷酸在内)从它们的理想位置上位移大约 $\pm 0.1\text{nm}$ (图 8-16)。可以预期,所有识别特异序列的 DNA 结合蛋白都能辨认出这些位移。

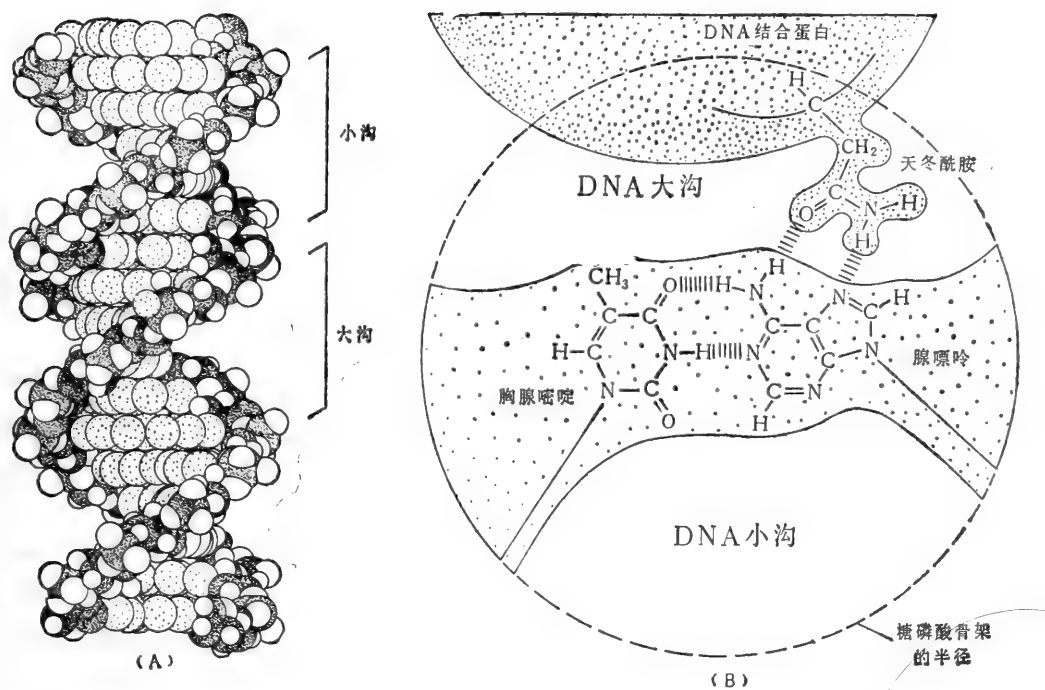


图 8-15 DNA 结合蛋白对 DNA 碱基对的识别作用。(A) B 型-DNA 双螺旋有大沟和小沟。碱基对的边缘伸到这些沟中,使 DNA 结合蛋白能够通过氢键相互作用从螺旋外面识别不同的 DNA 顺序。在 (B) 中提出了一个氨基酸与一个 A-T 碱基对之间在大沟中发生的一种相互作用,这是顺螺旋轴观察时所见。B-型 DNA 螺旋是右手螺旋。

组蛋白阻止其他 DNA 结合蛋白接近 DNA, 因而能够影响基因的调节⁸

虽然核小体中所有 DNA 都可以自由地与小分子相撞,但是,它与核小体珠的结合必然限制它与大分子的交互作用。这就是说,核小体能限制调节蛋白与它们所结合的特异 DNA 序列的接近。就某些调节蛋白来说,可能只有当 DNA 的局部区段完全没有核小体时才能结合。但其它基因调节蛋白大概只要特异 DNA 序列正好位于珠间比较容易接近的联接区中就可以与之结合。

因为核小体珠在核小体中的位置可以干预其他蛋白质与 DNA 的结合从而影响着基因表达和其他的过程,所以可以预期,在染色质的有些区段中核小体的定位应是非随机的,这样就暴露出其他蛋白质必须识别的 DNA 序列。由于核小体的间隔多少是固定的,所以 DNA 上一个核小体的确切位置也会影响到其邻近核小体的位置。因此,一个区段中的整个重复的核小体结构的位置必须定得正好,使某一特定 DNA 序列正好在没有核小体的位置上,或者是在一段联接 DNA 中。核小体的这种序列特异定位叫做核小体定相 (nucleosome phasing),图 8-17 中的这些核小体可以说是定相的。

事实上,我们将会看到,至少在有些情况下,核小体是非随机地定位在 DNA 上的,不仅可以观察到核小体定相,而且可以看到偶然的“空档”(没有核小体)。

核小体珠在染色质中的位置可以是非随机性的⁹

用微量的脱氧核糖核酸酶 (DNase I) 处理细胞核就可以检出没有核小体的 DNA

区段, 因为这种酶在低浓度时只消化游离 DNA, 但不消化与核小体连在一起的联接 DNA。经过这样处理的染色质优先在 DNA 顺序中相隔数千个碱基对的小段之间断开。这些对 DNase 超敏部位 (hypersensitive site) 揭示, 基本的 30nm 染色质纤维实际上更象一串大“染色质念珠”, 而不像一条连续的绳子样的纤维(图 8-18)。

关于对 DNase 超敏部位可能在基因调节中起着重要作用的证据来自用 SV40 病毒所做的实验, SV40 的 DNA 是组织成一种含有核小体的染色质结构。SV40 DNA 中含有一个无核小体的区段, 大约长 300 个碱基对, 容易被 DNase I 消化。这个裸露的区段的位置非常靠近病毒 DNA 复制和 RNA 合成开始的地方(图 8-13)。同样, 细胞染色质中对 DNase 超敏的区段很多正好位于一个活性基因的 5' 侧, 距 RNA 转录起始点不到 200 个碱基对。一般认为, 其中每一部位都是一个除去了核小体的区段, 为的是让调节分子和 (或) RNA 聚合酶分子能与之结合并启动新 RNA 链的合成。与这一观点相一致的是, 发现位于胰岛素基因 5' 侧的某个对 DNase I 高度敏感的部位只存在于制造胰岛素的细胞的染色质中, 而在不制造胰岛素的其它细胞的染色质中则不存在。这样的核苷酸超敏部位是怎样形成的, 目前尚不知道。

虽然有证据表明有核小体定相的现象存在, 但是, 对于核小体定相有什么作用还不清楚。存在的证据来自用微球菌核酸酶或是高剂量 DNase I 处理的细胞核的实验, 在这种情况下, 这种酶优先切断相邻核小体念珠之间的连接 DNA。这些

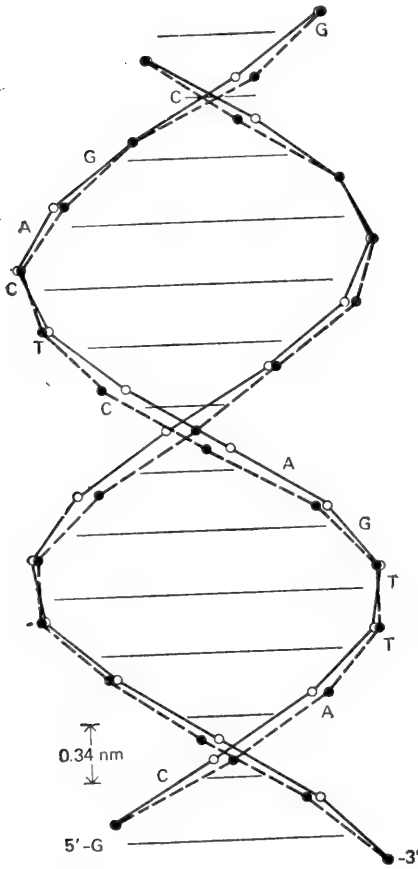


图 8-16 B-DNA 螺旋的磷酸二酯键骨架, 表示由于邻近碱基对之间的螺旋扭角的变化导致螺旋构象的变化。图中(虚线)表示 5'-GCATTG-ACTCAGCG-3' 这样一个核苷酸序列中磷酸盐的实际轨迹。作为比较, 还画出一个理想的正规 B 螺旋中的磷酸盐轨迹(黑线)。相邻碱基对的不同结合造成的扭角平均约为 34°, 范围在 28° 到 40° 之间。(Edward Trifonov 赠, 数据引自 W. Kabsch, C. Sander, and E. Trifonov, *Nucleic Acids Res.* 10:1097-1104, 1982)

实验证明, 核小体的位置至少在某些染色质区段中是与特异性 DNA 序列保持精确关系的。还不知道是什么原因使得核小体定位或定相得如此精确, 也不知道定相对染色质功能到底有什么作用。但是下述推测是很吸引人的, 即在不同类型的细胞中, 核小体在同一基因上是以不同的位相排列的, 因而决定基因能否表达。



图 8-17 表示定相的核小体与随机定位的核小体之间的差异。(A)当核小体在一段染色体中是定相时,在一切同一类型的细胞中,蛋白质都能接近相同的特异 DNA 序列加以识别。(B)在另一段染色体中,核小体的位置可以不同。



图 8-18 一段染色体,表示在规则的核小体结构之间穿插着短的区段DNA,其中的DNA非常容易被 DNase I 消化。这些区段中可能由于有特殊的非组蛋白染色体蛋白质与 DNA 相结合着,所以没有核小体。

每条染色体可能含有一条由一系列环状区域 (looped domains) 组成的非常长的 DNA 分子^{10,11}

一般认为,一个完整的真核生物染色体的已解开螺旋的 DNA 就是一条线性 DNA 分子。假定人单倍体基因组中的 23 条染色体都是这样,那末,每条染色体就是一条平均长度为 $3 \times 10^9 \div 23 = 1.3 \times 10^8$ 核苷酸的 DNA 分子。这相当于一平均约 5 cm 长的解开螺旋 DNA,而典型的细胞核直径大约为 $5 \mu\text{m}$ ($5 \times 10^{-4}\text{cm}$),这样,就产生了一个难于克服的包装问题。因为将 DNA 包装成 30nm 的染色质纤维只不过把 5 cm 减少到 1 mm 多一点,所以还必须进行几次更高层次的折叠。某些特殊的染色体,例如许多卵母细胞中的灯刷染色体和某些昆虫细胞中的多线染色体的外观最早提示了再高一层次折叠的可能性质。正如后面将要讨论到,这两种类型的染色体好像是由一连串环状区域组成。1972 年还证明大肠杆菌染色体——一个长约 1 mm,没有组蛋白的环状 DNA 分子

——也是折叠成为一连串类似的环。现在看来,这种形式的染色体组织可能是很普遍的。

曾有人提出,染色质中的环状区域是依靠 DNA 结合蛋白组成和保持的,估计 DNA 结合蛋白可能是通过识别特异性 DNA 序列而把两侧的 30 nm 纤维拴在一起,特异 DNA 序列就组成每个环的颈部(图 8-19)。根据间接估计,像果蝇和人这样不同的生物,环状区域的平均大小却差不多;虽然不同环的大小可以相差很多,但是,典型的环中的 DNA 长度在 20 000 到 80 000 个碱基对之间。这就是说,一条典型的人染色体可能有 $(1.3 \times 10^8) \div (5 \times 10^4) = 2\,600$ 个环状区域,而每个染色质环含有平均长度为 400 nm (0.4 μm) 的 30nm 纤维(图 8-20)。

不过即使采取图 8-20 中所画的那种环状区域形式,每条染色体中 5 cm 长的 DNA 分子仍然还有 100 μm 长,所以,必须要再进一步盘卷才能装进细胞核中。

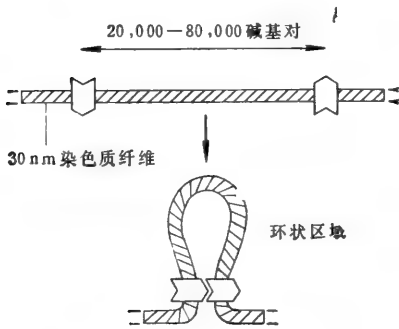


图 8-19 一段 30 nm 染色质纤维折叠成一个环状区域

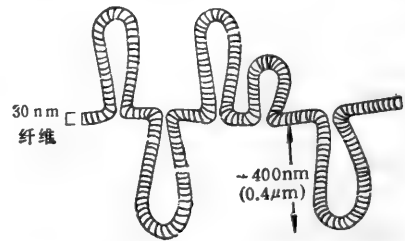


图 8-20 一段染色体折叠成一连串环状区域的示意图。每个区域大概包含 20000 到 80000 个碱基对的双螺旋 DNA, 缩卷成 30 nm 染色质纤维。

有丝分裂染色体上的带显示了一种更高的组织层次^{11,12}

灯刷染色体和多线染色体是间期染色体,只是因为具有特殊的性质,才能看得到,这些性质将在后面解释。间期时,大多数染色体因为伸展得太开并且太纤细,所以观察不到它们的环;只有在进行有丝分裂,它们盘卷起来形成更紧密的结构时,才能作结构方面的研究(图 8-21)。通过这种盘卷就可以把一条 5 cm 长的 DNA 卷缩到 5 μm 左右。与此同时,细胞中所有的组蛋白 H1 分子都在其五个不同的特异丝氨酸残基处磷酸化。因为组蛋白 H1 有把核小体包装在一起的功能(图 8-6),由此看来,它的磷酸化很可能是造成有丝分裂期间染色体浓缩的原因之一。

图 8-22 画出了一条典型的有丝分裂中期染色体。两个子 DNA 分子各自折叠形成一种由两部分组成的结构,它包括两条子染色单体由一种叫做着丝粒的结构连在一起。这些有丝分裂染色体外面通常覆盖着各种各样的分子,其中包括大量的核蛋白(见 410 页)。这层覆盖物一旦剥去,就可以在电镜照片上看到每条染色单体组成由中轴发出的染色质环(图 8-21 和 8-23)。这些显微镜照片有力地支持下述看法:所有染色体都是由一连串环状区域所构成的。对于每条染色单体中 DNA 的排列情况,看法还是不一,不过,为了说明怎样能使染色质有组织地折叠起来,我们在图 8-24 中将每条染色单体画成为绕成紧密螺旋状而且包装得紧紧的一连串环状区域。图 8-24 还表示了形成这样一种结构的各种不同折叠过程。

人类基因组由 23 对染色体组成(其中包括一对性染色体)。所以,每个二倍体细胞的染色体总共为 46 条。有丝分裂时这 46 条染色体的全部特征叫做人类核型。应用 1970 年以后研制出的细胞学方法可以将每条染色体一一明确地鉴定出来。其中有些方法要用一些只在与某些类型 DNA 序列相结合时才发出荧光的染料对有丝分裂染色体进行染色。虽然这些染料的专一性很低,好像是主要只能将富含 A-T 碱基对的 DNA 与富含 G-C 碱基对的 DNA 区分开来。但是,用它们可以得到每条有丝分裂染色体的精细带型,不仅非常清楚,而且可以重复(图 8-25)。如图 8-26 所示,因为每种类型染色体的带型都是独特的,所以对于每条染色体都可以进行鉴定和标号。

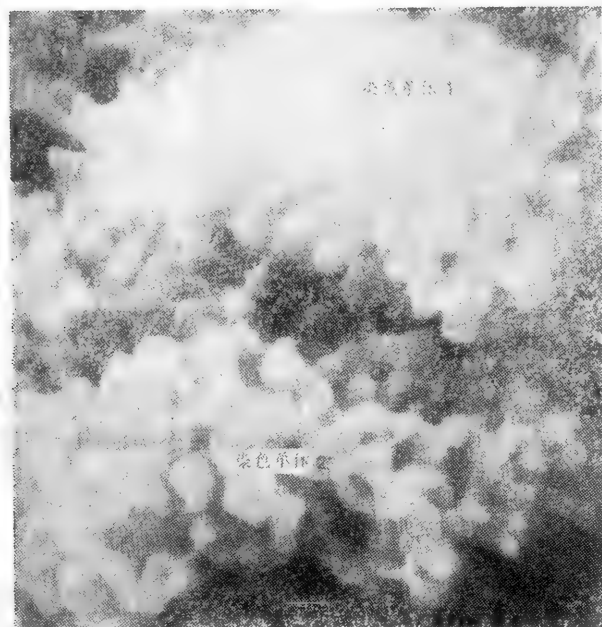


图 8-21 有丝分裂时形成的一条典型高度浓缩染色体的一小段的扫描电镜照片。每条染色体在有丝分裂前就复制了,所以它是由两条一样的、成对的染色单体所组成。(引自 M. P. Marsden and U. K. Laemmli, *Cell* 17: 849—858, 1979)



图 8-22 一条典型的有丝分裂中期染色体示意图。在细胞周期早期中通过 DNA 复制产生两个子 DNA 分子,这里的两个染色单体各含其一。

检查有丝分裂很早期的人体染色体(那时的染色体还没有中期那么浓缩)可以估计出,整个单倍体染色体组至少含 2 000 个由富含 A-T 碱基对 DNA 组成的不同的带。有丝分裂期间随着浓缩过程的进行,这些带渐渐合并为少数较宽的带(图 8-26)。

为什么有这些带存在完全是一个谜。即使图 8-26 中画得最细的带也有 30 几个环状区域,估计在这样长(100 万个碱基对以上,或者接近一个典型的细菌基因组)的 DNA 序列中,碱基对的平均组成应是随机的。推测真核生物基因组可能就是以这样区段为单位发生作用的。例如,一组相邻的,染色质结构类似的环状区域可能形成带(图 8-27),可能只有这样才能在间期时形成一个染色质的功能单位。

有大量染色体带的存在是从果蝇到人这样多种多样的物种中有丝分裂染色体的普遍特征。而且染色体的确切带型在长时期的进化过程中保持不变。例如,在黑猩猩、大猩猩及猩猩的染色体中可以清晰辨识出与人类每条染色体相当的部分,其带型几乎一样(只是发

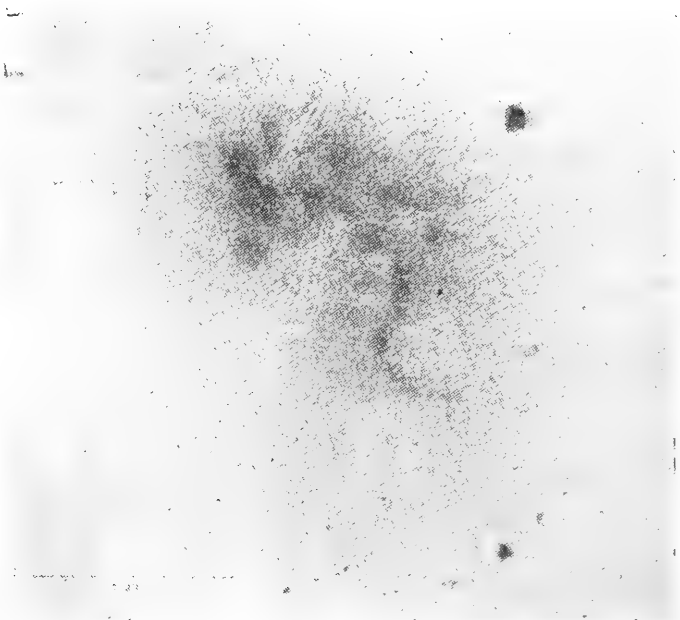


图 8-23 一条昆虫(长蜡)的有丝分裂染色体中的一条染色单体的电子显微照片,经过处理后,显示从染色单体中轴发出的染色质纤维环。(Victoria Foe 赠)

生过一次染色体融合,致使人染色体为 46 条而不是类人猿的 48 条)。这有力地表明,染色体大范围的空间组织对于正确的基因表达是重要的,带的存在反映组织单位的一种重要类型。

在多线染色体中可以看到间期基因¹³

虽然有丝分裂染色体的带型对我们有启发而且很吸引人,但是它并没有提供能阐明个别基因的组织或功能的详细情况,因为即使是可辨认的最狭的带也可能有 10 到 100 个基因长度。要想能够在个别基因的水平上检出染色质结构中的变化,就一定要检查在间期中伸展开来的染色体。在普通细胞中,因为间期染色质线太细,缠结太多,所以不可能进行观察。但是在有些昆虫细胞中,因为有一种叫做多线性的特殊现象,所以可以看到一种清楚的显带带型,每条带可能就相当于单个的基因。多线染色体是昆虫幼虫某些分泌细胞所特有的。这些细胞经历多次 DNA 合成周期而未发生细胞分裂,因而长得非常大。结果形成的巨型细胞所含的 DNA 组分多达正常情况的几千倍。当这些细胞所含的标准染色体数目增加时,就称它们为多倍体,而当所有的同源染色体依然保持并排在一起形成一条巨型染色体时,就称它们为多线染色体。有些大的昆虫细胞最后直接由多线转变成多倍体,这种现象证明,这两种不同的染色体状态是密切相关的。多线染色体的基本结构一定与正常染色体的相类似。

因为这些细胞的体积非常之大,并且因为一条条染色质线精确地并排在一起互相粘附而阻止了相互缠绕,所以在光学显微镜下很容易看到多线染色体。此外,在这些间期染色体中,每条染色质线中的一个环状区域是直线排列着的,而不是象通常那样彼此盘绕着。果蝇幼虫唾腺细胞四条染色体中的多线性现象是研究得最清楚的;在这些染色体中,

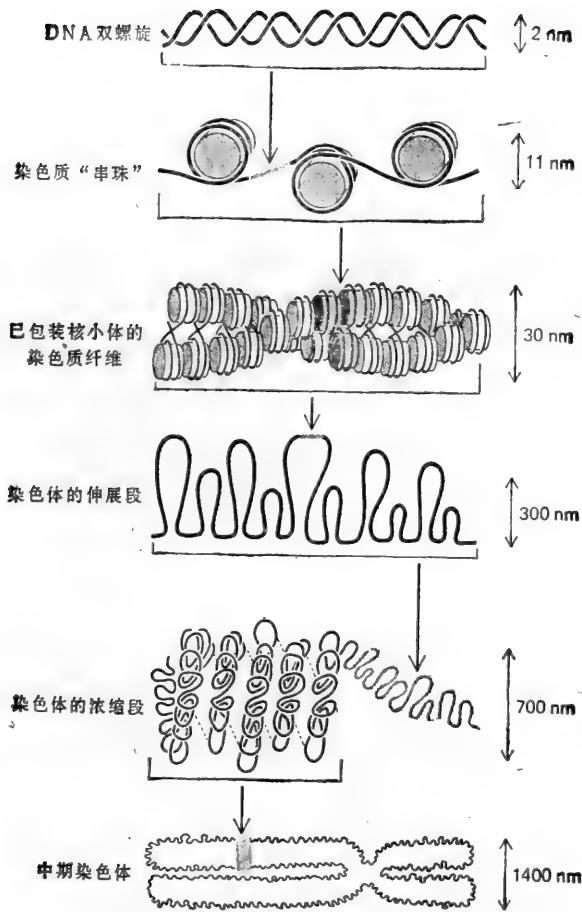


图 8-24 染色质包装的不同层次,最后造成高度浓缩的中期染色体的示意图。

DNA 已重复了 10 个周期而子代染色体并没有分离,结果是 $1\ 024 (=2^{10})$ 条同样的染色质线并排地排列在一起。

将多线染色体染色并在光学显微镜下观察时,可以看到暗带和明带(后者叫做间带)清楚地交替着。一般认为,每条带就是一组对齐排列的 1 024 个同源的环状区域(图 8-28)。在整个果蝇基因组中可以检出 5 000 条左右的带,估计每条带按单倍染色体计含有的 DNA 碱基对为 3 000—30 000(视带的大小而定)。因为这些带可以通过它们不同的厚度与间隔而加以识别(图 8-29 和 8-30),所以,可以给每条带编上一个号码而得到一幅多线染色体“图谱”。间带中的 DNA 量比较少,他们的结构与功能还不知道。

每个染色质环状区域可能相当于一个独立的功能单位¹⁴

可以观察到某些突变型果蝇染色体发生了一定的变化,通过分析这些变化已能把一个一个的基因定位于果蝇的多线染色体上,而且还可以证明,每条带就相当于一个独特的遗传区段。其他的遗传学研究表明,果蝇只制造 5 000 种左右的必需蛋白质,这个数字正好等于染色体带的数目。例如,黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)染色体上两个研究得

相当清楚的基因——Eeste 和白眼之间的区段，含有 14 条可辨别的带。经过紧张实验力求在这个区段中分离出尽可能多的突变型，但所分离出的几百个突变型只形成 18 个遗传上的独立群“（互补群）”，也即 18 个基因。同样，在另一段约含 50 条可见带的染色体上找出了大约 50 个基因。用这些技术不能确定某一基因是在一条带中，还是在间带中。但是在果蝇中，基因与染色质环状区域至少大致上是相符的，这启示，一般的环状区域中含有的 DNA 序列只编码一种必需蛋白质。

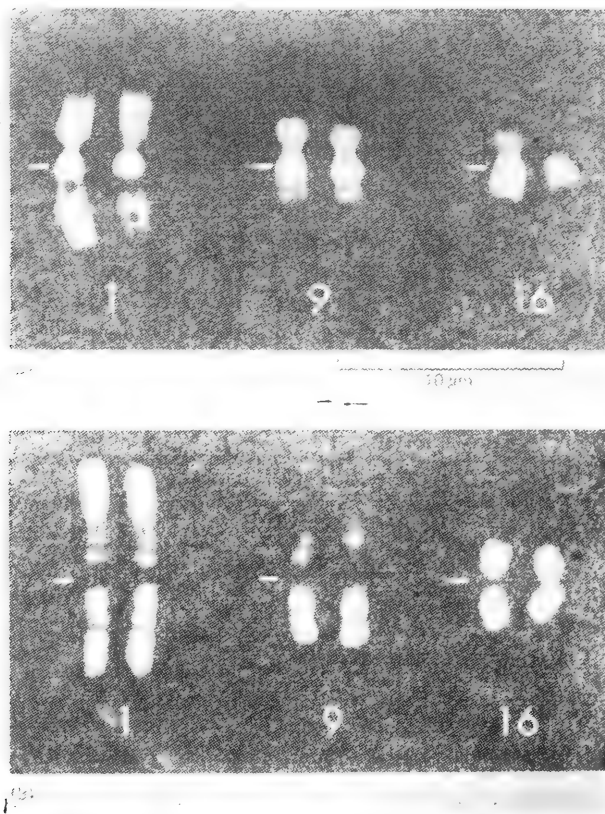


图 8-25 三对在进行有丝分裂的人体染色体的荧光显微照片。(A) 用 A-T 碱基对专一性染料 Hoescht 33258 染色，(B) 用 G-C 碱基对专一性染料吖啶酮素染色。短棒表示着丝粒的位置。注意：在 A 中亮的带在 B 中暗，而 B 中亮的在 A 中暗，所以它们彼此恰好是互补的。(引自 K. F. Jorgenson, J. H. van de Sande, and C. C. Lin, *Chromosoma* 68: 287—302, 1978)

果蝇多线染色体的每一条带都代表一个独立的功能单位，支持这个结论的还有下述现象：当基因开始合成 RNA 时，个别的带好像松开来了（见 434 页）。这些松开的带称为染色体胀泡（chromosome puff），它们按着特定的顺序出现和消失，这种情况反映了在果蝇发育的不同阶段中基因活化的规律型式（见图 8-97）。

但是，如果我们将果蝇的整个基因组分成 5 000 份，那么就会发现，每一个基因平均就有 20 000 个 DNA 碱基对，这比编码一个平均大小为 400 个氨基酸的蛋白质所需要的 1 200 个碱基对数要多得多。如我们将要看到的，大多数基因组中的 DNA 要比编码必需蛋白质所需要的多。其中有些可能是编码非必需蛋白质，有些是不编码的。某些不编码的 DNA 很可能在形成每个环状区域的组织时起着一种结构作用。

从果蝇多线染色体来推论，有理由认为像人这样一些高等真核生物细胞中染色质环

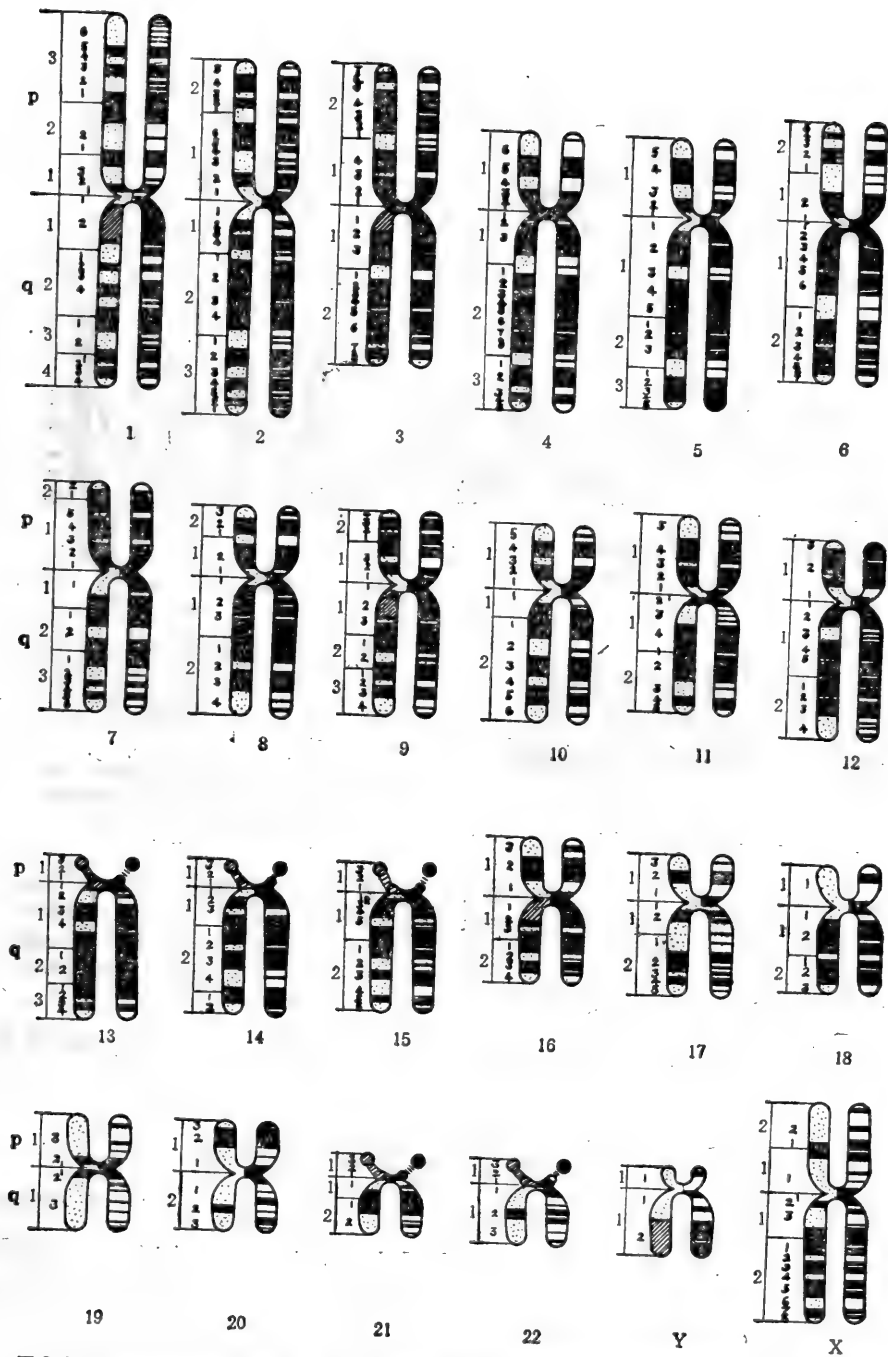


图 8-26 根据有丝分裂中期(每条左半边的染色体)和早前期(每条右半边的染色体)形象测定的人类核型中每条染色体带型的标准图。早前期染色体比中期染色体要细长得多,所以可以检出的带也要多得多。这里显带所用的染色试剂似乎对富含 A-T 的 DNA 序列具有特异性。注意:每种类型染色体只画出一条,实际上有丝分裂时每种类型的染色体有两条。(引自 J. J. Yunis, *Science* 191: 1268—1270, 1976)

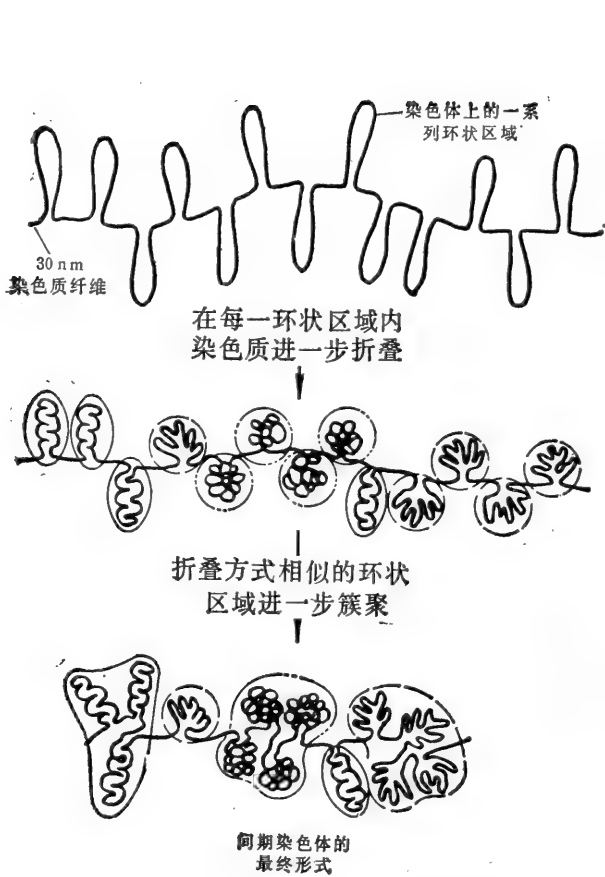


图8-27 图解相邻的环状区域是以类似方式包装在染色质中，它们成簇后就可以产生有丝分裂染色体上看得到的带。根据图示，可以假定这些带是存在于整个间期的一种重要组织单位，只不过它们只能在染色体为了进入有丝分裂而开始浓缩时清楚地看到。

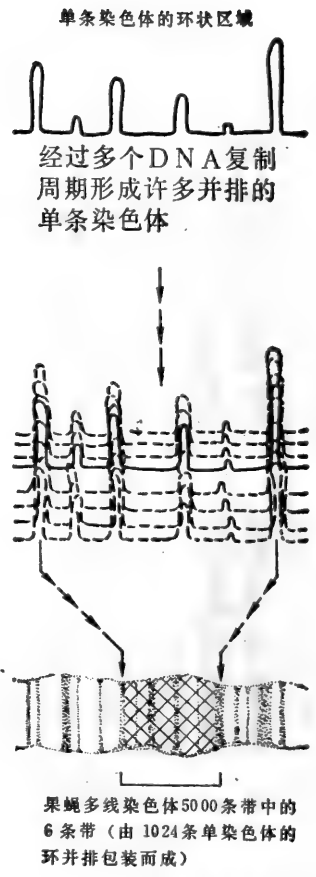


图8-23 假想示意图：同源的环状区域并排包装而形成多线染色体上可以看到的带。在每条带之内，好像是30 nm染色质纤维环紧紧地包装在一起形成比这里所示要浓密得多的结构。

状区域也是功能单位。此外，在这些生物中，每个环状区域可能只含一个基因。或者几个基因。

染色质的不同功能区所含的核小体似乎是以不同方式组织起来的¹⁵

在光学显微镜和电子显微镜下，多线染色体上一条一条的带都有其特有的形态（图8-30和8-31）。这表明，不同的带——相当于不同的环状区域——具有稍为不同的染色质结构。根据果蝇多线染色体的荧光抗体染色研究得到类似的结论：抗组蛋白抗体使带均一地染上色，而抗某些非组蛋白蛋白质的抗体则只染某些带，而不染另一些带（图8-32）。

染色质带之间存在结构差异的另外证据来自另一些实验：让分离出来的多线染色体接触高浓度的无机离子而使染色质发生去浓缩。有些带好象对高浓度的 K^+ 特别敏感，而另外一些带则对高浓度的 Mg^{2+} 特别敏感，等等。

这些类型的差异不可能只局限于昆虫，只不过是昆虫因其有多线染色体而容易用显



图 8-29 一个果蝇唾腺细胞中的全部多线染色体。为使这些染色体展开以利观察，这里是在显微载玻片上做的压片。注意有四对不同染色体。每条染色体与其同源染色体紧密配对，四对染色体在靠近它们的着丝粒的地方连在一起；这些着丝粒集合在一起形成一个大的“染色中心”。这里由于所用的压片方法使染色中心已分为两半。（根据 T. S. Painter, *J. Hered.* 25: 465-476, 1934. 修改）

显微镜观察罢了。不同哺乳动物基因染色质结构间的差异可以通过它们的 DNA 对某些核酸酶的敏感性的不同来检出，但是这种方法的分辨水平要差得多了。我们将会看到，哺乳动物基因的特殊染色质结构似乎对核基因在细胞中的表达能力有影响。

大多数染色体 DNA 不编码必需蛋白质¹⁶

根据好几方面的理由可以认为，高等生物基因组中的大部分 DNA 是不编码必需蛋白质的。远在可以利用重组 DNA 技术直接确定染色体 DNA 的核苷酸顺序之前，有好

几个显然是解释不通的现象。例如，不同生物单倍体基因组的 DNA 相对含量与生物的复杂性没有系统的关系。人体细胞所含的 DNA 量要比大肠杆菌这种细菌多 800 倍，但是有些两栖动物和植物所含的 DNA 则是人体细胞的 30 倍(图 8-33)。这一怪现象是不能用有些生物中每个基因有许多拷贝来解释的，因为从对许多生物的 DNA 复性的研究中可以清楚看到：在每个单倍体的 DNA 组中，多数 DNA 序列只有一个拷贝。有时在近缘物种之间也可以看到 DNA 含量有很大的差异，这一点生动地说明 DNA 含量与遗传复杂性没有相关性。最明显的例子就是两栖动物，它们的 DNA 含量在不同的物种之间可以相差 100 倍。

种群生物学家作过估计，高等生物的 DNA 到底有多少真正编码必需蛋白质的基因（或是参与调节这些基因）。推论过程大致如下：突变是一种偶然发生的过程，突变时，DNA 序列中个别核苷酸以一种很低但却稳定的速率发生变化。因为当这些突

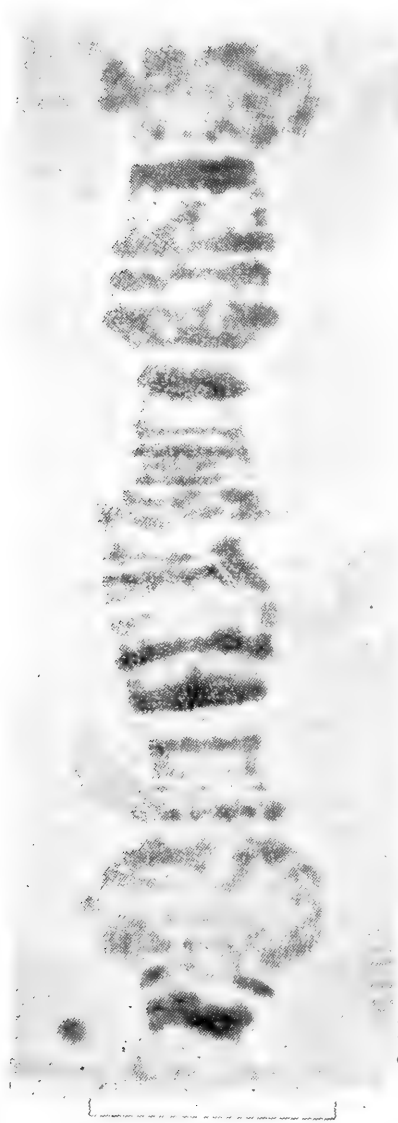


图 8-30 一段果蝇唾液腺多线染色体的光学显微镜照片。显示不同的染色体带有可辨别的特殊型式。这些带在间期染色体中就存在，是巨型多线染色体所特有的一种性质。注意不应与图 8-26 中所画的带相混淆，那些带要粗得多，是用特殊染色技术在正常有丝分裂染色体上染出的。(Joseph G. Gall 赠)



图 8-31 一小段果蝇多线染色体的超薄切片电镜照片。不同的染色体带有不同的样子，这表明它们所含的染色质是以各自特有的方式包装起来的。(Viecko Sorsa 赠)

变发生在一个必需的 DNA 序列中时，大多数突变对生物是有害的，所以能够稳定保持下来的必要基因的数目是有限的。根据观察的突变率估计，哺乳动物基因组中可以参与

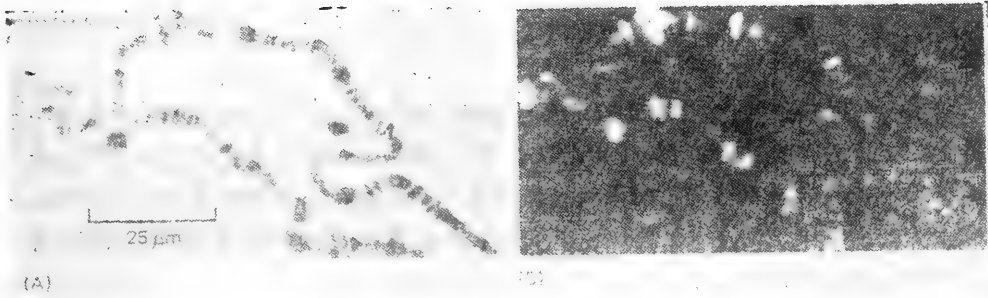


图 8-32 同一段多线染色体, (A) 是相差显微镜所见, (B) 则是用荧光标记抗某种非组蛋白染色体的单克隆抗体时所见。注意: 只有一小部分带纹因有这种非组蛋白存在而染上色, 一般认为, 只有在可能是“活性”的染色质区中才有这种情况。(引自 G. C. Howard, S. M. Abmayr, L. A. Shinefeld, V. L. Sato, and S. C. R. Elgin, *J. Cell Biol.* 88:219—225, 1981)

调节或者编码必需蛋白质的基因不能超过 1% 左右。

这些考虑的最重要的意义是, 尽管从原则上来说, 哺乳动物的基因组是大到足以编码近 300 万个一般大小的蛋白质 (3×10^9 核苷酸), 但是还没有生物可能容纳得了超过 30 000 个以上的必需蛋白质。果蝇大约有 5 000 个必要基因, 根据这一观点, 人是不可能比果蝇复杂 6 倍以上的。

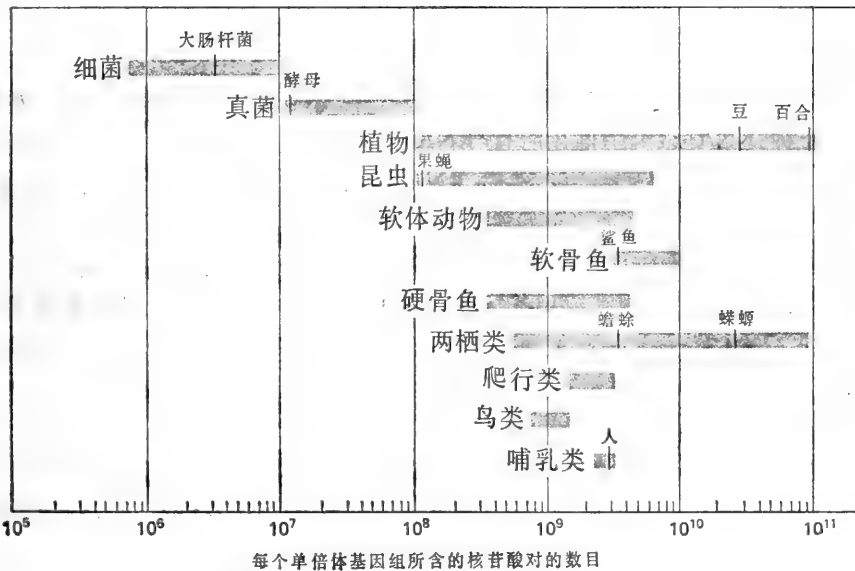


图 8-33 从最小的原核细胞、支原体, 直到某些植物和两栖动物的最大细胞, 单倍体基因组的 DNA 量可以相差 100 000 倍。注意: 人体基因组大小 (3×10^9 个核苷酸对) 要比其他一些生物小得多。

高等真核生物基因组中的其余 DNA 是干什么的? 我们已经指出, 其中有些可能纯粹是在染色质组织中起结构作用的。在本章后面的一些章节中, 我们将讨论有关不编码 DNA 的性质的最新证据, 以及关于它们的功能的其他一些假说。不论答案如何, 根据图 8-33 所列的数据可以清楚地看到, 一个高等真核生物细胞可以携带着大量额外 DNA 而没有很大的影响, 这表明, 在进化过程中并不存在选择压力来促使 DNA 含量减少到只含

有必需基因。

小结

哺乳动物基因组约含有 3×10^9 DNA 核苷酸,但是人们认为,这些 DNA 中只有一小部分是编码必需蛋白质的。虽然其余的 DNA 的功能还不知道,但是其中有些很可能参与形成真核染色体的高层次结构。大致上可以把染色体看成是一个组织成为一连串环状区域的相当长的 DNA 分子,尽管它含有好几万个碱基对,但每个环状区域可能只有一个(或几个)编码蛋白质的序列。

在真核生物中,几乎所有的 DNA 都与等量的组蛋白紧密结合形成一串小盘状 DNA-蛋白质颗粒,叫做核小体。核小体结构之间好象间隔着一小段一小段的“游离”DNA,这些 DNA 可能是结合调节蛋白的部位。其中有些蛋白质可能是帮助核小体定位或者是定相的,这样就可以使特异 DNA 序列暴露在邻近核小体之间而更易被接近。

通常,核小体包装在一起形成更为浓缩的结构。在这些结构中,核小体具有各种各样变型,并与不同的附加蛋白质相结合。DNA 和与之结合的所有蛋白质组成的整个复合物就叫做染色质。基因组不同区段折叠成染色质的方式可以稍有不同。看来,这些差异之中至少有一些是对于基因表达具有功能意义的。

RNA 合成及其加工¹⁷

RNA 合成首先出现于原核生物,他们的转录机器要比真核生物的简单。在原核生物中,只有一种 RNA 聚合酶催化所有 RNA 的合成。一种特殊的 DNA 序列(启动子)指明 RNA 合成要在哪里开始,然后 RNA 聚合酶就与启动子相结合,并沿着 DNA 模板链移动,从 5'端向 3'端的方向每次加上一个核苷酸使生长链延伸(见图 5-2)。当达到第二个序列即终止信号时,就与 DNA 分离并释放出新合成的 RNA 链。所以,每个 RNA 分子就是基因组中较短区段里的一段 DNA 单链的核苷酸序列的单链拷贝。

真核生物 DNA 转录的基本原理虽然与在原核生物中的一样,但是机构要复杂得多。首先,它们有三种不同的 RNA 聚合酶,每一种酶转录不同的基因。每种真核生物 RNA 聚合酶比细菌中的聚合酶要复杂得多:原核生物的酶由 5 条多肽链组成,而真核生物的酶包含 9 到 11 条多肽链。此外,纯的细菌 RNA 聚合酶在试管中就可以很好地发挥作用,只需要加上裸露 DNA 就可以进行转录了。而真核生物 RNA 聚合酶还需加上其他东西才能发挥作用。部分地是由于这一个原因,所以直到 1979 年能在体外分析真核生物转录机制的系统才可供利用。

在真核生物中由三种不同的 RNA 聚合酶来制造 RNA¹⁸

三种真核生物 RNA 聚合酶中,只有 RNA 聚合酶 II 是转译蛋白质基因的。其他两种是用来合成组成蛋白质合成机器部件的 RNA 的:聚合酶 I 制造大的核糖体 RNA,而聚合酶 III 制造各种非常小的但稳定的 RNA,其中包括 tRNA 和核糖体中较小的 5S RNA。

三种 RNA 聚合酶可以通过它们对 α -鹅膏蕈碱的敏感性来加以区别, α -鹅膏蕈碱是

从蕈中分离出来的一种毒素。RNA 聚合酶 I 不受 α -鹅膏蕈碱的抑制；RNA 聚合酶 II 对这种毒物十分敏感；而 RNA 聚合酶 III 对它中度敏感。这三种 RNA 聚合酶都与细菌聚合酶一样，分子量为 50 万左右。

人们可以想到，这三种酶分别识别 DNA 上的不同起始信号。聚合酶 I 和聚合酶 II 都识别转录起始部位上游的 DNA 序列。例如，聚合酶 II 的识别序列包括两段短的 DNA 序列，一段从 RNA 合成起始点上游大约 25 个核苷酸处开始，而另一个从上游再远大约 50 个核苷酸处开始。这种识别部位的安排方式与细菌 RNA 聚合酶的情况非常相像(见图 5-4)。相反，RNA 聚合酶 III 好像能识别特殊的基因调节蛋白。其中包括 5S 转录因子；这种蛋白质以一种低聚物的形式与 5S RNA 基因中部的一段序列结合，这种结合便促使 RNA 聚合酶 III 由大约 45 个核苷酸以外处开始合成 RNA (图 8-34)。从这幅图来看，RNA 聚合酶 III 分子会在 5S RNA 合成时与调节蛋白相碰，但事实上在聚合酶通过时，这种蛋白质好像依然结合着而并不妨碍转录。

“高等”真核生物细胞约包含 40 000 个 RNA 聚合酶 II 分子，40 000 个 RNA 聚合酶 I 分子和 20 000 个 RNA 聚合酶 III 分子。但是，所有 RNA 聚合酶的确切浓度是有变化的，视细胞生长速率而定。有关这三种真核生物 RNA 聚合酶的情况还有许多尚待进一步研究。到目前为止，只在有其他一些特性还不很清楚的蛋白质存在的情况下，才能够用这几种酶在体外来起动 RNA 的合成。所有真核生物，包括像酵母和人这样不同的真核生物，都需要有三种不同的 RNA 聚合酶才能转录的原因，还有待于揭示。

因为所有的信使 RNA 前体都是 RNA 聚合酶 II 转录的，所以一个细胞制造哪些种蛋白质也得由这种酶来决定。因而我们下面的讨论大部分将只集中在这种聚合酶所合成的 RNA 转录本的合成过程及其命运上。

RNA 聚合酶 II 转录某些 DNA 序列的次数要比转录另一些 DNA 序列多得多^{19,20}

要确定转录时的生化需要必须进行纯聚合酶的体外实验，但是从这些实验却得不到关于转录机构在细胞中行使功能时其结构和动态的清晰图像。相反，在细胞染色质的电镜照片中却能看到长段 DNA 和与之结合的 RNA 聚合酶“正在转录”的情况。

从一般的超薄切片电镜照片中只能看到颗粒状的染色质团块，这表示细胞核中还有相当多的亚结构(见图 8-61)，但很少显示出关于基因怎么转录的情况。如果设法弄破细胞核，使它的内含物流在电镜的铜网上，那么，看到的情况要详细得多(见图 8-35)。这时，在离已溶解的细胞核中心最远的地方，染色质非常之稀，以致可以看到一条一条的染色质线呈现前面图 8-3 中所示的那种串珠状外观(图 8-36)。

活跃地在进行转录的 RNA 聚合酶分子看上去是一个大的球形颗粒，后面拖着一条 RNA 分子的尾巴(图 8-37)。活性 RNA 聚合酶 II 分子的颗粒常常只是单个存在，附近没有类似的分子。这表明，多数基因只是偶尔才转录成 mRNA 前体；一个聚合酶转录完毕后，另一个才开始，不过偶尔也可以看到有许多聚合酶颗粒(以及 RNA 转录本)簇聚在一起。这些成簇的聚合酶颗粒只出现在少数以高频率转录的基因上(图 8-38)。上面的 RNA 分子的长度沿着转录的方向增长，结果形成一种特有的“圣诞树”的外观。这样的簇构成一个具体的转录单位，它有一个独特的 RNA 聚合酶 II 的起始部位和终止部位(图 8-39)。

详尽的生化研究业已证实并扩展了电镜检查得到的结果，得到三条主要结论。

1. 真核生物 RNA 聚合酶分子,象原核生物 RNA 聚合酶分子一样，是在染色体的特异位点上开始和终止转录的；

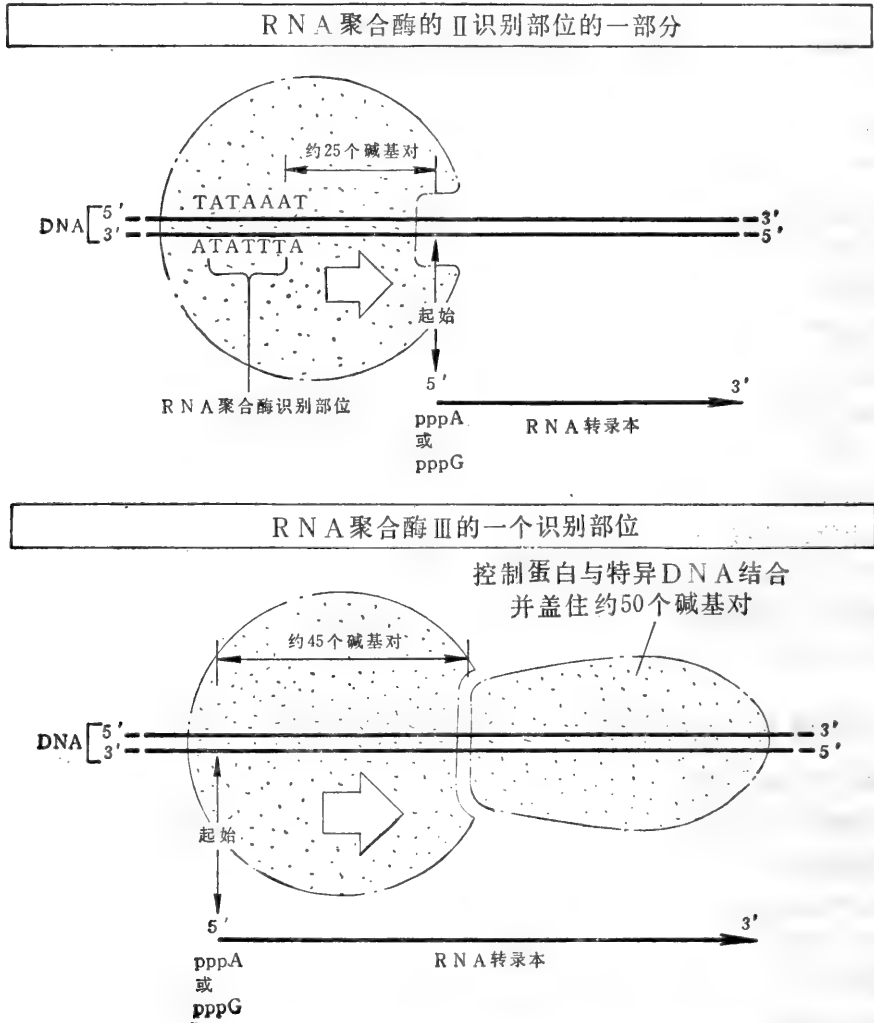


图 8-34 真核生物 RNA 聚合酶 II 和 III 所识别的不同类型起始点，像细菌 RNA 聚合酶和真核 RNA 聚合酶 I 一样，RNA 聚合酶 II 识别的特异 DNA 序列好像在 RNA 合成起点上游。但识别序列部分可延伸到距 RNA 链起点 150 个核苷酸的地方（这里表示的只是 RNA 聚合酶 II 的启动序列中的一小部分）。相反，RNA 聚合酶 III 却独特地识别一个基因调节蛋白（这里是 5S 转录因子），这种蛋白与聚合酶合成 RNA 起始点的下游的一个序列相结合。

2. RNA 聚合酶 II 在一个转录单位中产生的成品 RNA 分子的平均长度约为 8 000 个核苷酸，长到 10 000 到 20 000 个核苷酸的 RNA 分子也很常见。编码一个平均为 400 个氨基酸的蛋白质需要 1200 个核苷酸的 RNA，上述这些长度比 1200 个核苷酸要长得多，这反映了真核生物基因有特殊的结构，这将在后面详细讨论。但是目前应指出，一个转录单位不一定正好等于一个基因：有些 RNA 转录本可能没有功能，而另一

些转录本则生产不止一个基因的产物。

3. 不同 RNA 聚合酶 II 起始部位的作用效率极不相同, 因此有些基因的转录速率要比另一些高得多。电镜照片中观察到的转录型式与生化研究的结果相当一致, 生化研究的结果表明, 虽然有许多不同的信使 RNA 分子

积累在细胞中, 但其中大多数只存在少量拷贝(表 8-1)。

转录发生在包装于核小体中的 DNA 上²⁰

由四种核小体组蛋白(H2A、H2B、H3和H4)形成的复合物与 DNA 结合得如此牢固, 以致每个组蛋白八聚作(图 8-4)几乎不离开与之相结合的特殊 DNA 区段。现在已经清楚, 即使在 DNA 转录和 DNA 复制期间 DNA 仍然是包装在核小体上的。所以展开的染色质的电镜照片通常显示出, 在染色质的转录和不转录区段中到处都是核小体珠的规则图像(见图 8-37 和 8-38)。

真核生物 RNA 必须从 DNA- 组蛋白复合体上转录下来, 而不是像在原核类中的那样从裸露 DNA 上转录下来, 这一现象看来对真核生物基因

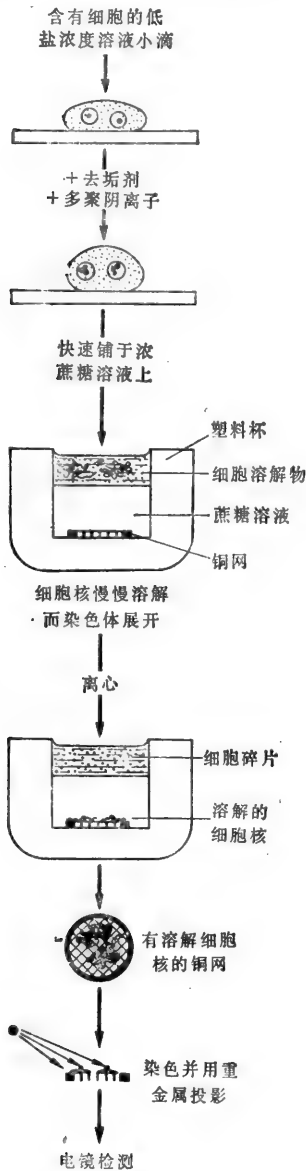


图 8-35 在使细胞核温和溶解、铺开, 并与细胞碎片分离后, 用电镜技术检查细胞核染色质的一种方法。

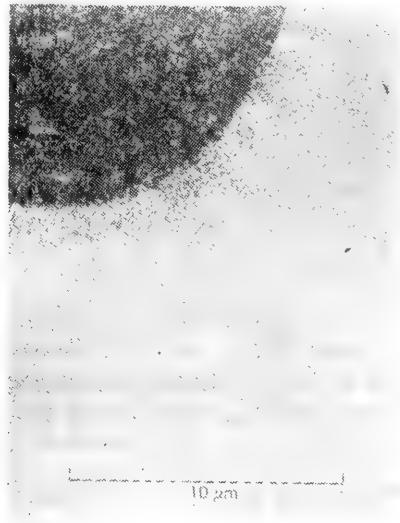


图 8-36 用图 8-35 中介绍的方法在电镜下看到的一个典型细胞核。可以看到缠结在一起的一大团染色质从溶解的细胞核中流出来; 只有在离这团缠结最远的边缘上的染色质才稀到足以能在高倍下进行有意义的观察。(Victoria Foe 赠)

的调节方式是有相当重要的意义的。即使染色质是以串珠状展开的形式存在, 也难于想像 RNA 聚合酶在转录包装在核小体上的 DNA 时, 核小体本身的构像却不发生任何暂时性的变化。DNA 以象 30 nm 纤维这种比较浓缩的染色质形式存在时, RNA 聚合

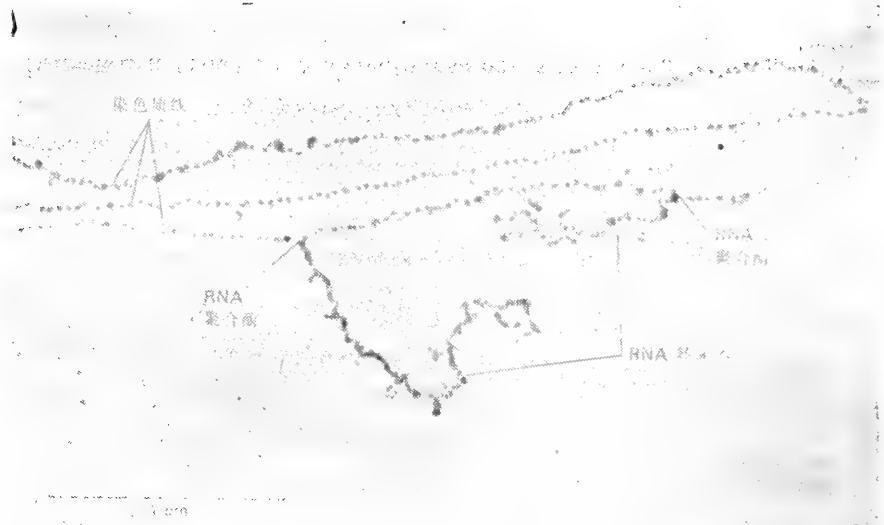


图 8-37 一段串珠状的染色质,可以看到有两个 RNA 聚合酶 II 分子正在进行转录。高等真核生物细胞核中的染色质大多数没有这种转录本,事实上,虽然每个细胞有 40 000 个左右的 RNA 聚合酶 II,但是,每 750 个核小体 (150 000 个 DNA 碱基对)大约才有一个 RNA 聚合酶分子。
(Victoria Foe 赠)



图 8-38 一段不常见的染色质,所含基因的转录频率极高,所以可以同时看到许多 RNA 聚合酶 II 分子以及它们正在生长的 RNA 转录本。(引自 V. E. Foe, L. E. Wilkinson, and C. D. Laird, *Cell* 9: 131—146, 1976)

酶能够转录它而对核小体的包装却没有较大的破坏,也是不可思议的(图 8-40)。

新产生的 RNA 都包装在核糖核蛋白颗粒中²¹

真核生物中新制造好的 RNA 与细菌中的不一样,它在电镜下有一种特殊的珠状外观(见图 8-37)。这些珠状物是 RNA-蛋白质复合物,很像核小体中的 DNA-蛋白质复合物,它们沿着 RNA 链形成,作用是使每个 RNA 转录本紧缩,以便包装起来。这样的核糖核蛋白包装有许多不同的种类,但有一种最常见。这种颗粒是一段短的 RNA 转录本,外面覆盖着几个分子量 30 000 到 40 000 的蛋白质。这种颗粒中的蛋白质是细

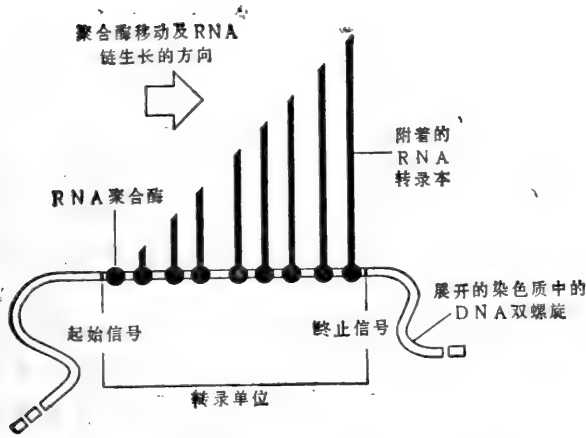


图 8-39 一个理想的转录单位，表示怎么用在电镜下看到的例子来确定 RNA 链生长的方向。

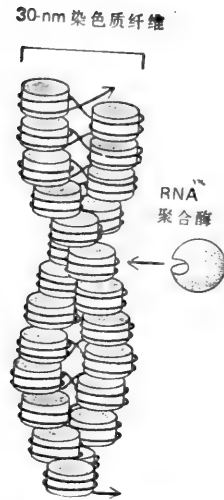


图 8-40 一个 RNA 聚合酶分子正在接近一条 30 nm 染色质纤维时的示意图。图是约略按比例画的。所示的核小体数目大致相当于一个平均大小的转录单位。不管采取什么方式，聚合酶必须设法进入 DNA，而不必将其从组蛋白内染色质八聚体上移开。要使它能够做到这一点，就需要染色质相当的松开。

胞核中最富有的蛋白质之一。

虽然在 RNA 转录本中看到的颗粒的间隔和大小是不同的，但是在同一个转录单位的相邻 RNA 分子中，图形往往是相似的。这表明，RNA 包装过程有相当高的特异性。正如 DNA 包装成染色质对于它的功能极为重要一样，一般认为，虽然到目前为止，对细

表 8-1 典型哺乳动物细胞中的 mRNA 分子

	每个细胞中每一 mRNA 分子的拷贝数	每一种类中不同 mRNA 序列的数目	每一种类中 mRNA 分子的总数
丰富种类	1 200	4	48 000
中等种类	300	500	150 000
稀有种类	15	11 000	165 000

这种将 mRNA 分成三类的分法有些武断。在某些细胞中可见到更连续的分布。然而，正常在每一细胞中能观察到的不同的 mRNA 种类总共有 10 000 到 20 000 种，绝大部分只有极少拷贝（每细胞 5—15 个分子）。通常细胞质中总 RNA 的 95% 到 97% 是 rRNA，而仅有 3% 到 5% 是 mRNA，这与每 mRNA 分子上约存在 10 个核糖体的比例相符。表中这种特殊的细胞类型在其细胞质中总共含约 360 000 个 mRNA 分子。

胞核蛋白质包装 RNA 的过程还不了解，但是认为它可以引导 RNA 初级转录本继续进行以后的 RNA 加工和转运等事件。这些情况我们将在下面叙述。

信使 RNA 前体的两端还要经过共价修饰²²

细胞核中由 RNA 聚合酶 II 转录的全部转录本叫做不均一核 RNA (hn RNA) 分子，这是因为过去用来将它们与其他 RNA 区分开的首要特征之一就是它们的大小不一。这些转录本中的许多是注定要离开细胞核而成为信使 RNA 分子的。但是在它们离开之前要经历一系列共价修饰过程，这关系到它们以后的功能，并使它们与其它 RNA 聚

合酶制造的转录本之间有明显的区别。

首先,在 RNA 分子 5' 端(转录时首先合成此段)加上特殊结构的帽子,以后要通过这个帽子与核糖体结合(见317页)。在 RNA 分子的其余部分还未转录完毕之前,加帽过程就开始了。然后 RNA 分子继续以大约每秒钟 30 个核苷酸的速率从 5' 向 3' 端生长,一直到它达到染色质的终止信号。然后就停止转录。其次,对于大多数注定要成为 mRNA 分子的转录本,要由另一种酶——多腺苷酸聚合酶——在 RNA 链 3' 端加上 100 到 200 个腺苷酸残基(写作 poly A),这样就构成了初级 RNA 转录本(图 8-41)。聚腺苷酸化(加 poly A)的部位是通过生长链的切割,或者由 RNA 聚合酶终止链的延长后产生的。虽然还不知道 poly A 尾巴的确切功能,但是看来有助于介导以后的 RNA 转录后加工和将成熟 mRNA 输出细胞核。

因为只有 RNA 聚合酶 II 的转录本有 5' 帽子和 3' poly A 尾巴,所以有人认为介导加帽和加尾(或两者)的酶一定与 RNA 聚合酶 II 发生相互作用而不与 RNA 聚合酶 I 和 III 相互作用。看来要用一种特殊方式在 mRNA 前体的两端加上标记是很重要的,这也可以用来解释为什么 mRNA 要由单独一种 RNA 聚合酶分子来合成。

即使聚合酶 II 的转录本占细胞合成的 RNA 的一半以上(表 8-2),我们将在下面看到,这些转录本是不稳定的和短命的。结果细胞核的 hnRNA 以及由它转化而来的细胞质 mRNA 在细胞的总 RNA 中只占一小部分(表 8-2)。生物化学家感到幸运的是,尽

表 8-2 一个典型的哺乳动物细胞中 RNA 含量的部分数据

	稳态含量(占细胞总RNA的百分比)	占总 RNA 合成的百分比		稳态含量(占细胞总RNA的百分比)	占总 RNA 合成的百分比
细胞核 rRNA 前体	4	39	细胞质 mRNA	3	1
细胞质 rRNA	71	/	稳定的小 RNA		
细胞核 hnRNA	7	58	(大部分为 tRNA)	15	3

这里所列数据来自对小鼠成纤维细胞的组织培养细胞(L 细胞)的分析,每个细胞含 26 μg RNA(5×10^{10} RNA 核苷酸)。其中约有 14% 是在细胞核中(所以细胞核中含的 DNA 约比 RNA 多一倍)。间期时,每分钟平均约有 200×10^6 个核苷酸聚合成 RNA。这大约为 S 期 DNA 合成的平均速率的 20 倍。注意,虽然合成的 RNA 大多数是 hnRNA,但是,这种 RNA 只有一小部分能够不被降解。结果,由 hnRNA 产生的 mRNA 只占细胞总 RNA 的一小部分。

管这些 RNA 分子相当少,但是它们 3' 端所特有的 poly A 尾巴却为纯化提供了方便。当细胞的总 RNA 通过一个装有与载体结合的 polydT 的层析柱时,残基 T 与 A 之间的互补碱基配对选择性地具有 poly A 尾巴的分子与柱结合在一起,然后再使结合的分子释放出来便可作进一步分析(图 8-42)。这种方法被广泛用来从核糖体 RNA 和转移 RNA 中分离出 mRNA 和 hnRNA,前两种在细胞中占绝大部分。

RNA 加工过程在 RNA 分子中间去除大段的核苷酸序列²²

证明 RNA 聚合酶 II 的转录本在细胞核中不稳定的第一个证据来自这样的一些研究,即在短时期内加 [³H] 尿嘧啶核苷酸使放射性掺入这些 hnRNA 分子,这样就可以在以后一段较长的时间内跟踪这些 hnRNA 分子的去向。由这些及后来一些其他实验得到以下两个值得注意的结果。

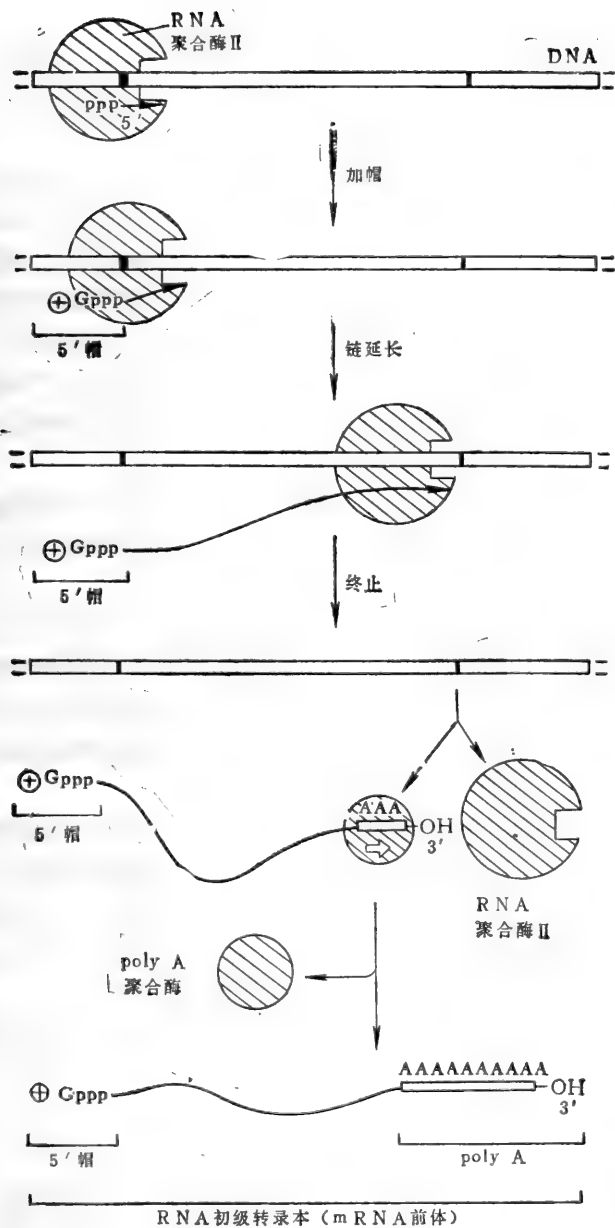


图8-41 RNA聚合酶II产生的RNA转录本要经共价修饰:在5'端加帽和在3'端加poly A尾。帽子上的正电荷(+)是通过碱基鸟嘌呤7位上氮甲基化而产生的,甲基化是在鸟嘌呤基转移后不久发生的(图中没有表示出来)。在图7-14中说明了帽子的详细结构。

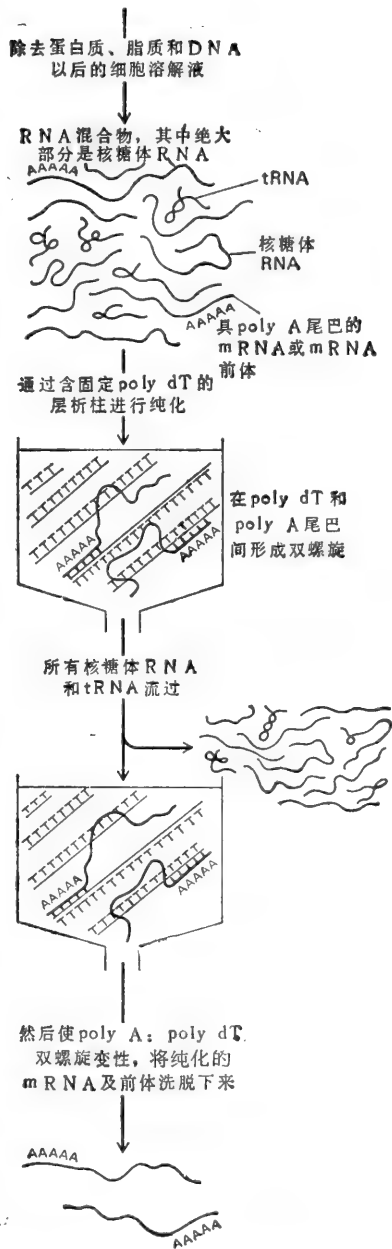


图8-42 mRNA分子及其前体的纯化。方法是将待测物通过一个层析柱,柱上共价结合有一种由T或U残基合成的多核苷酸; mRNA分子及其前体的3'端poly A与相应的poly dT或poly dU选择性地结合而被保留在柱上。图示结合在柱上的是多聚脱氧胸苷酸(poly dT)。

1. 新合成的 RNA 分子的长度迅速减短, 经过大约 30 分钟左右就可达到细胞质 mRNA 分子的大小。在所研究过的组织培养细胞中, 平均来说 RNA 初级转录本约含 6 000 个核苷酸, 而成熟的 mRNA 分子约含 1 500 个核苷酸。

2. 大约在 30 分钟以后, 放射性标记的 RNA 分子 (mRNA 分子) 开始离开细胞核。可是, 总的标记 RNA 中只有 5% 左右到达细胞质。其余的大约在一小时左右的时间内在细胞核中降解成小片段。

这些观察指出, 原核生物与高等真核生物之间在 DNA→RNA→蛋白质的途径中有着关键性的不同。在最进化出基本遗传机制的原核生物中, 每个 RNA 分子是由编码蛋白质氨基酸所必需的一连串核苷酸组成的, 近 RNA 分子 5' 端的核苷酸编码蛋白质的氨基末端, 近 3' 端的核苷酸编码蛋白质的羧基末端 (图 8-43 上面)。真核生物的转录本虽说也具有同样的极性 (近 RNA 分子 5' 端总是编码蛋白质氨基末端的氨基酸), 但它们经常间隔地含有长段不编码的 RNA 序列, 这些长段序列是从基因中称做间插序列或者内含子的区段中复制下来的。为了使转录本转变成能够编码完整蛋白质的信使 RNA 分子, 必须从每个 RNA 转录本上切除这些内含子序列 (图 8-43 下面)。

1977 年发现断裂基因 (interrupted gene) 是完全出乎意料的。因为内含子序列两边的编码 RNA 序列能在内含子序列切除后相互连接在一起 (图 8-44), 所以 RNA 加工反应叫做 RNA 剪接。

RNA 剪接看来是在 RNA 输出到细胞质之前在细胞核中发生的; 剪接范围可能非常广泛, 能使很长的细胞核 hnRNA 分子 (长达 50 000 个核苷酸) 变成短得多的细胞质 mRNA 分子 (通常为 500 到 3 000 个核苷酸)。由此看来, 真核生物核被膜的作用就是使新创造的 RNA 分子与细胞质核糖体暂时分开, 一直到 RNA 加工过程拣选出要转译成蛋白质的区段之后再接触。

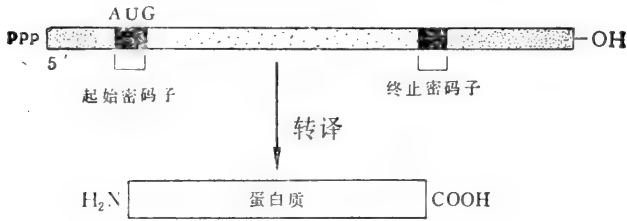
核酸杂交分析表明 (185 页), 大部分迅速降解的细胞核 RNA 序列与留存下来的 RNA 序列是不同的。内含子的移除有助于解释为什么在一个典型的哺乳动物细胞的总 DNA 序列中虽然有 7% 到 10% 转录成为细胞核 RNA, 但是细胞质 mRNA 却只占 DNA 序列的 1% 或 2% 左右。一般认为, 这种差额大部分是由于移除的内含子序列所造成的。

在讨论这样一种复杂的遗传系统是怎么出现的和为什么会出现在之前, 必须说明一下关于内含子序列及其移除过程机理方面的一些已知情况。

细胞核中的小核糖核蛋白颗粒可能帮助指导 RNA 加工^{22,23}

内含子的大小从 100 到 10 000 个核苷酸不等。它们与编码序列的明显不同之处在于内含子的大多数核苷酸序列常常可以通过实验加以改变, 而对基因功能不发生很大的影响。此外, 内含子似乎在进化过程中迅速积累突变, 这就使人们提出, 它们一点功能也没有而基本上是遗传的“废物”; 这种提法将在后面加以分析。但是, 在内含子的每一端有几个核苷酸是不能改变的, 否则就会破坏该基因的功能, 这几个核苷酸在所有顺序已知的内含子中几乎都是一样的。人们认为这些边缘序列就是 RNA 剪接的信号。目前我们只有一个关于它们是怎么起作用的重要线索: 已经证明, 这种保守的边缘序列与细胞核中富有的一种小型核内核糖核蛋白颗粒 (sn RNP) 中的一段 RNA 分子是互补的。这种颗

原核生物 RNA 转录本是直接转译的



许多真核生物 RNA 转录本转译前需要加工

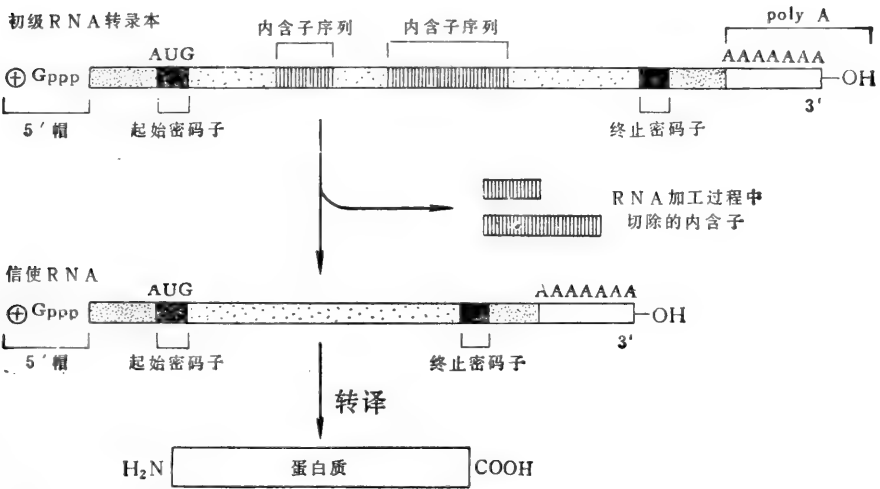


图 8-43 原核生物和真核生物 RNA 转录本的核苷酸序列的比较。只有真核生物转录本含有间隔序列(内含子),在 mRNA 转译成蛋白质之前,必须切去这些序列。

粒是在 RNA 转录本上形成的核糖核蛋白中的一种次要成分,它可能是通过与内含子序列的两端形成 RNA-RNA 双螺旋而使两端靠拢,从而促使 RNA 剪接的(图 8-45)。一般认为,这种结构的形成伴随着酶的切割和重新连接的反应,结果是除去了内含子顺序而编码顺序依然完好无损(图 8-44)。这些反应必须准确地进行,因为即使是一个核苷酸的差错也会因产生的 mRNA 分子中的读码移位而使它的信息变得无意义。

除了刚才讨论过的 sn RNP 颗粒外,还有其他好几种核糖核蛋白小颗粒。像那些人们认为在 RNA 剪接中起作用的颗粒(在每个细胞中有 10^6 个拷贝)一样,其他的这些颗粒也很丰富,而且其中许多都位于细胞核中。很可能是,其中一些核糖核蛋白颗粒协助引导特异 RNA 脱出细胞核(见 403 页),而另一些则指导其他类型 RNA 加工过程,其中包括在核仁中装配新核糖体等事件(见 405 页)。

所有这些核糖核蛋白颗粒在许多方面都与核糖体相像。虽然它们要小得多(每个约

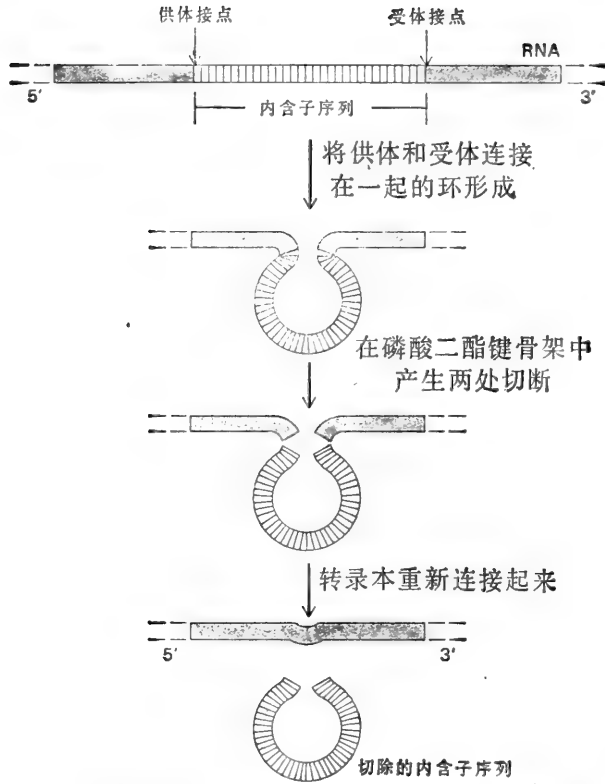


图 8-44 RNA 剪接反应图解。进行剪接时，从 RNA 转录本上切除内含子序列，结果使 mRNA 的编码序列连在一起。进行这种 RNA 加工反应时，必须切去一段 RNA，剩下的分子在配对的所谓“供体”和“受体”剪接点序列处重新连接起来。

为 250 000 道尔顿，而一个核糖体有 4 500 000 道尔顿)，但它们也含有许多多肽链与一个稳定的 RNA 分子复合在一起。一般认为，小型核糖核蛋白颗粒也像核糖体一样是通过 RNA-RNA 碱基配对的互补性来识别核酸顺序的，它们协助将催化各种复杂反应的蛋白质亚单位定位。

在一个 RNA 转录本上可以去除许多个内含子序列^{22,24}

假如内含子序列是按图 8-45 所示的那种方式去除的，那末在剪接过程中任何一个内含子 5' 端的序列(为方便起见叫做供体接点)都能和任何另外一个内含子 3' 端的序列(为方便起见叫做受体接点)连接在一起。将两个不同内含子的供体和受体部分组合在一起的实验证实了这种预测。所产生的杂种内含子序列可以被 RNA 剪接酶识别而被除去(图 8-46)。

鉴于内含子的所有供体接点和所有受体接点在 RNA 剪接时都起相同作用，人们感到很奇怪，迄今为止，曾克隆过并分析过的许多脊椎动物基因都含有多个内含子(在卵清蛋白中有 7 个，而举个极端的例子，在溶胶原蛋白的 α 链中有 50 多个)。如果供体接点和受体接点是随机配对进行剪接的话，那末内含子之间的有功能的 mRNA 序列就会丢失，这样会带来灾难性的后果。为了制造某一种蛋白质，RNA 剪接机构必须保证每个

供体接点通常只与在线性 RNA 顺序的下游 (5' 到 3') 方向上最接近的受体接点互相配对 (图 8-47)。至于接点的这种顺序配对是怎么实现的, 目前尚不知道, 不过一般认为, RNA 转录本中内含子序列的确切三维构象是重要的。但是我们现在会看到, 在有些情况下, 不存在这种从 5' 到 3' 方向的简单剪接方式。这些例外之所以重要是因为它们开始表明, 断裂基因对细胞可能有什么好处。

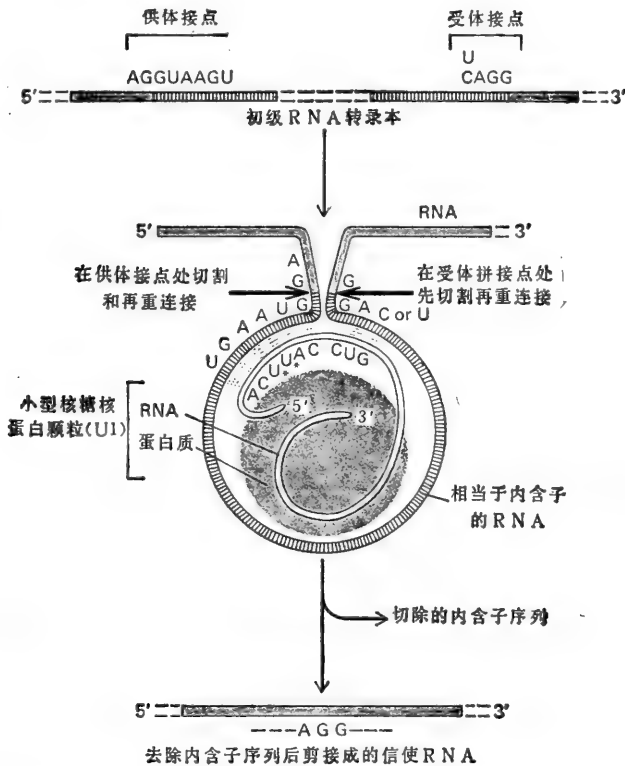


图 8-45 假定有一种特异的叫做 U1 的小型核内核糖核蛋白颗粒参加 RNA 剪接过程的示意图。这种颗粒有一小段结合 RNA 分子 (165 个核苷酸长), 其中部分序列是与 hnRNA 分子上内含子两边的核苷酸序列互补的。有人认为, 通过碱基互补配对, U1 RNA 就可以使供体和受体接点聚拢到一起, 以为图 8-44 所示的剪接反应作准备。

同样的 RNA 转录本可以经过不同方式加工产生编码好几种蛋白质的 mRNA²⁹

虽然大多数内含子序列看来是没有什么特异功能的, 但是有越来越多的证据表明, 因为有与它们联合的剪接机构的存在, 所以给细胞添加了额外的遗传可塑性。这种可塑性之所以可能是因为同一个 RNA 转录本可以通过不同方式的剪接产生几种不同的蛋白质。已经知道, 在分化过程中有些转录本的剪接方式是会发生变化的, 结果, 同样的 DNA 编码顺序在细胞发育过程中可以派上不同的用场。

RNA 剪接赋予的多样性最先是在腺病毒中发现的, 这是一种感染动物细胞的大病毒。它的基因组指导合成一些很长的 RNA 转录本, 每个 RNA 转录本含有编码许多种不同必需蛋白质的序列。不同的 RNA 加工途径从同一个 RNA 转录本制造出不同的 mRNA 分子, 结果就可以用同一个 5' 帽子序列来启动合成好几种不同的蛋白质。这样

一来却彻底违背了剪接信号的顺序配对规则。

第七章曾讲过,由 RNA 聚合酶 II 分子制造的每一个 RNA 转录本的 5' 端都有一个帽子核苷酸,这个帽子后来成为 mRNA 分子中启动合成蛋白质的信号。通常,即使 mRNA 分子中确是有多个起始和终止密码子,但从 5' 帽子起,第一个终止密码子下游的编码序列是不会被转译的,这是因为一到达终止密码子 mRNA 就会自动地脱离核糖体。因此,一个 RNA 转录本一旦加工成 mRNA 后,就只能编码一种蛋白质。另一方面,如果 RNA 加工机构把某些编码序列当作内含子看待而将它们除去,那末同一个细胞核转录本就能够产生几种不同的信使 RNA。这样 5' 帽子就可以剪接在几种不同编码序列的

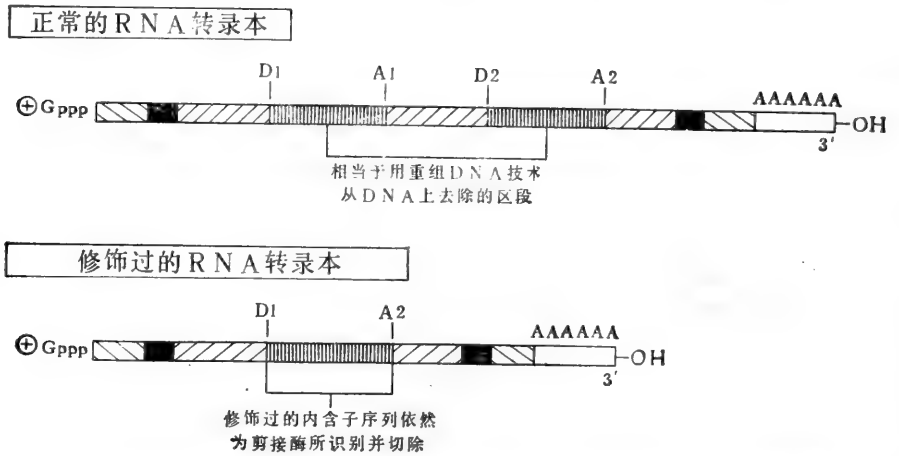


图 8-46 实验概图表明如果将两个不同内含子的供体接点(“A₁”)和受体接点(“D₂”)切除,则 D₁ 可以和 A₂ 在 RNA 转录本中联结起来。

前面,从而启动几种不同蛋白质的合成(图 4-48)。对同一 RNA 转录本的不同加工是怎么控制的还不知道。

病毒采用这种选择式的 RNA 加工的方针的好处可能就是节约:病毒为了把它们的基因包装在病毒颗粒中,就必须将基因组的大小缩减到最小。

一个 DNA 编码序列在不同的细胞发育阶段可以制造出不同的蛋白质²⁶

现在知道,至少有一类细胞的编码序列所产生的 RNA 转录本可以通过不止一种方式加工。不过,它并不是产生一种完全不同的蛋白质,而是通过初级 RNA 转录本在细胞发育过程中发生变化来改变剪接式样,产生同一种蛋白质的新变种。

这种变化就发生在淋巴细胞形成抗体分子的时候(见第十七章)。在淋巴细胞的生活史早期,抗体是结合在质膜上的。以后,同一抗体却分泌在外。分泌形式与膜结合形式大部分是一样的,只是在羧基末端有所不同,膜结合形式的羧基末端有一长串疏水氨基酸,抗体就是通过这些氨基酸固定在质膜上的,而分泌形式的羧基末端只有一串短得多的水溶性氨基酸。所以从膜结合形式的抗体转变为分泌形式的抗体要求 mRNA 3' 端有不同的核苷酸顺序来为蛋白质的不同羧基末端编码。

膜结合形式的蛋白质是通过将所有编码序列都转录到核 RNA 中形成一个长的初级转录本而产生出来的。编码膜结合蛋白的疏水羧基末端的核苷酸恰好位于受体接点的

下游,靠近这个长转录本末端的地方(图 8-49)。正常的 RNA 剪接过程将这些核苷酸与编码蛋白质其余部分的核苷酸接在一起。在这种连接过程中,编码分泌型分子的水溶性尾巴的核苷酸则被去除:转录本中最后的供体剪接信号刚好位于编码这些水溶性氨基酸的核苷酸之前,所以,这些核苷酸就被当成了内含子的一部分而被切除(图 8-49)。

相反,分泌形式的分子是从一个较短的初级转录本来的,这个转录本正好终止于长转录本中最后的受体接点之前,所以再远一些的编码膜结合形式分子中疏水羧基末端的核苷酸就被除去了。由于不再有受体接点能与邻近编码水溶性氨基酸的核苷酸旁边的供体接点结合,所以这一段核苷酸仍保留在最终的 mRNA 中而被转译(图 8-49)。

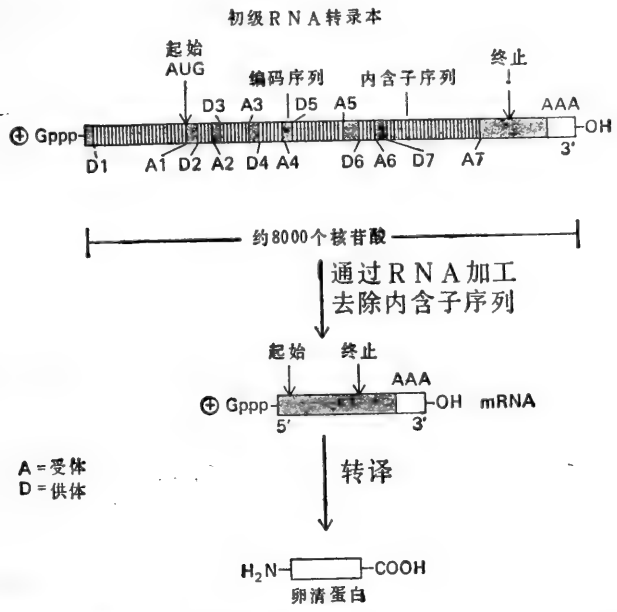
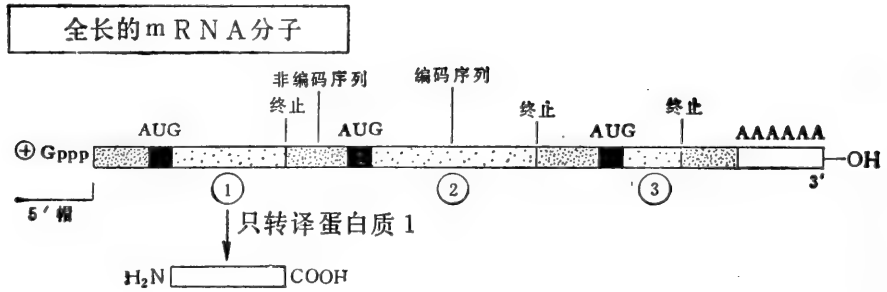


图 8-47 鸡卵清蛋白基因的初级 RNA 转录本,表示必须要有组织地除去 7 个内含子后才能得到有功能的 RNA 分子。与图 8-46 中一样,供体接点用“D”来表示,受体接点用“A”来表示。

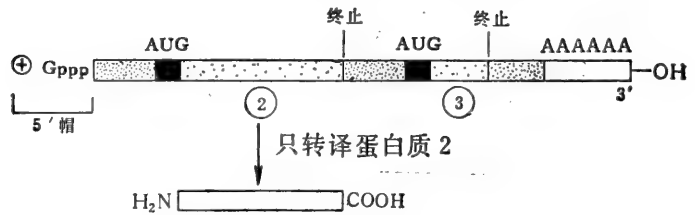
有两条途径可以产生编码分泌型分子的较短的转录本:提前停止转录,或者将长初级转录本断裂后再在新形成的 3' 端加上 poly A。病毒实验证明,通过在不同部位断裂和加 poly A 可以得到不同 3' 端的初级转录本。但是目前还不知道到底是怎么控制编码抗体的 RNA 转录本的长度才能产生上述切换过程。

什么是基因²⁷?

自从发现真核生物基因中有内含子以及它们的编码序列可以通过不止一种的方式拼在一起,对于基因的确切定义又产生了新的问题。本世纪 40 年代初期,根据对脉孢菌 (*Neurospora*) 的生化遗传学研究,最先从分子水平上给基因下了一个明确的定义。更早些时候,是从功能上给基因下的定义,认为它是基因组中的一个区段,减数分裂时作为一个分离单位,并产生像果蝇的红眼或白眼,或者豌豆的圆型种子或皱瘪型种子这样一些界线分明的表型性状。在对脉孢菌研究之后,人们了解到,大多数基因相当于基因组中的一个区段,它指导合成一种酶,这就导致产生了“一个基因,一条多肽链”的中心原则。已经



经 RNA 剪接把帽子移到编码序列 2 的 mRNA 分子片段



经 RNA 剪接把帽子移到编码序列 3 的 mRNA 分子片段

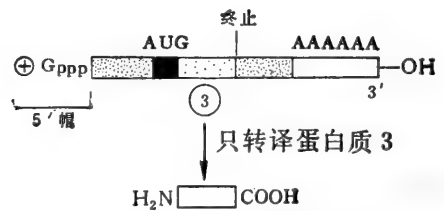


图 8-48 在有些病毒中,同一个 RNA 转录本可以通过几种不同的方式加工,然后输出到细胞质中去成为三种(或更多种)不同的 mRNA 分子,各编码一种不同的蛋白质。在每种情况下,只有最接近 5'帽子的编码序列转译成 mRNA 分子。

证明,这个假说给后来的研究工作带来极大的好处。于是,到了本世纪 60 年代,人们对基因表达的机理了解得更加清楚时,开始把基因定义为一段 DNA, 它的转录产物是编码一条多肽链的 mRNA (或者是一种像 tRNA 或 rRNA 那样的结构 RNA)。本世纪 70 年代末期发现的断裂基因也很容易纳入基因的最初定义, 只要我们专指由某一种 DNA 序列转录来的 RNA 编码某一条多肽链就行了。但是现在知道,有些 DNA 序列由于 RNA 剪接方式的不同,可以至少产生两种不同的 mRNA 分子,因此也至少可产生两种生物功能各异的不同蛋白质。那么,基因的定义到底怎么下呢?

目前看来,最好还是保留一个基因一条多肽链的定义。这就是说,在那些同一 DNA 序列对应一条以上的多肽链的情况下,可以认为在染色体上几个基因互相重叠。只有在我们更多地了解了大量高等真核生物基因的结构与功能的情况以后才能知道真核生物中这种重叠基因的出现频率有多大。

同时,内含子的存在对于另一些重要过程也是有意义的。

从细胞核输出 RNA 需要有分子信号²⁸

如果要防止新合成的 RNA 在加工之前就碰到核糖体,就必须要有—种选择性输出细胞核 RNA 的机制。而事实上,转录出的全部 RNA 中只有 5% 左右离开细胞核。虽然特异的输出信号还没有鉴定出来过,但是至少从有些情况看来,它们是在 RNA 剪接过程中产生的。现在已经能够选择性地除去真核生物基因中的某些内含子,再把这些修改过的基因插到培养细胞中让它们在核中转录。已经测验过好几种基因了,从这些基因中去除了不同数目的内含子。奇怪的是,发现 DNA 中至少要有一个内含子,否则它的转录本就只能留在核内。这启示这些 RNA 的输出需要与 RNA 剪接酶发生某种相互作用(图 8-50)。

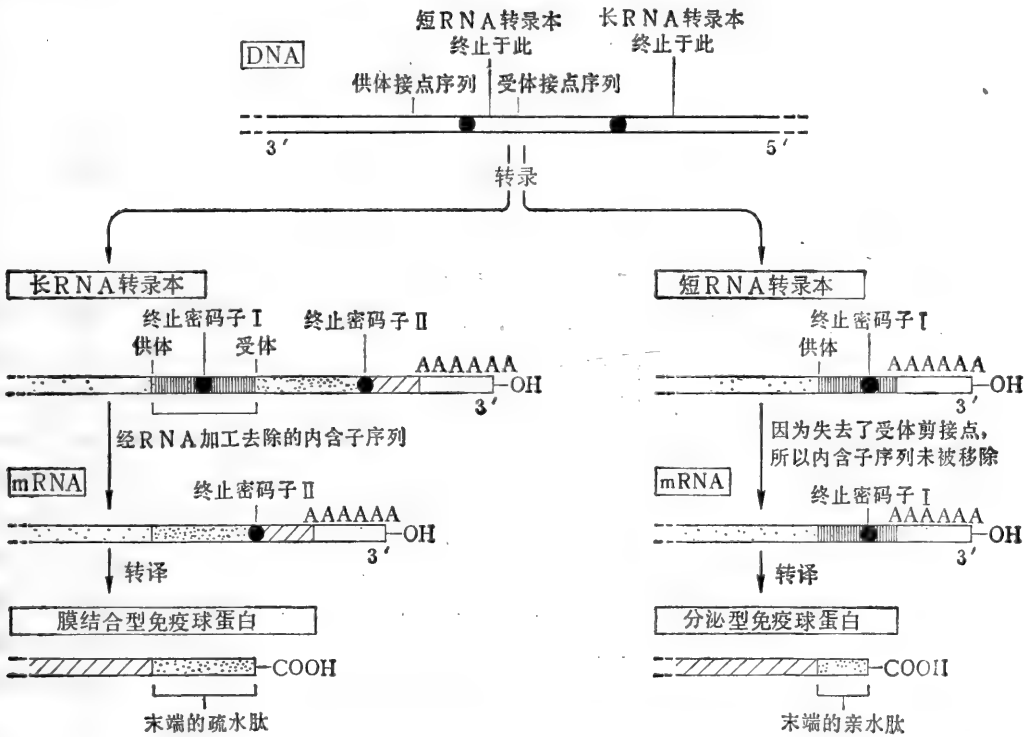


图 8-49 从同一 DNA 序列合成两种近缘蛋白质。在抗体基因制造的长初级 RNA 转录本的 3' 端附近有内含子序列,在 RNA 剪接过程中这个内含子序列被去除。这样就得到编码膜结合抗体分子(免疫球蛋白)的 mRNA 分子。相反在受到抗原刺激后,产生较短的初级 RNA 转录本,它没有所示的受体接点。所以长的转录本中被去除的内含子序列在短的转录本中却未被去除。因此由于原先定位于被切除内含子中的 mRNA 序列的转译而合成抗体分子的亲水羧基末端部分。结果就形成分泌抗体分子而不是膜结合抗体分子。

但是并不是所有的真核生物基因都有内含子,因此一定还可以通过其他方式产生 RNA 分子的输出信号。

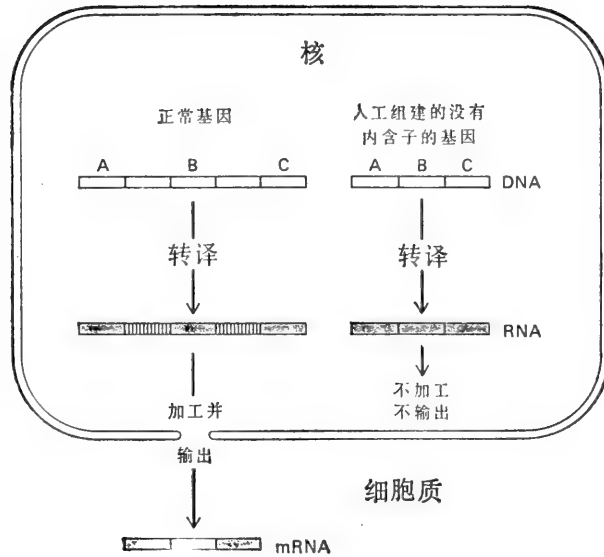


图 8-50 实验示意图：要将某些 mRNA 分子转运到细胞质中去，必须存在内含子再将其切除，而不存在内含子是不行的。

核糖体 RNA 和转移 RNA 是在串联排列的成套同样基因上制造的²⁹

到目前为止，我们讨论了基因转录和随后发生的 RNA 转录后加工的基本机理。现在我们把注意力集中到某些需要量特别大的特殊基因产物是怎么在细胞中合成的问题上。对于特化细胞中许多最丰富的蛋白质，其中包括红细胞的血红蛋白和肌肉细胞的肌红蛋白，合成它们的基因在每单倍体基因组中只有一个。这些蛋白质之所以含量这么高，是因为从基因上转录下来的许多 mRNA 分子中的每一个 mRNA 分子每分钟可以转录出多达 10 个蛋白质分子。这样，在正常情况下，每个细胞世代中每个 mRNA 分子可产生 10 000 多个蛋白质分子。但是，在一个正在生长的细胞中，要制造它的 1 000 万个核糖体，每一种核糖体 RNA 在每个细胞世代中都必须合成 1 000 万个拷贝，而由于 RNA 就是基因的最终产物，所以也不存在可以扩大生产的转译步骤。事实上，细胞是因为含有编码核糖体 RNA 基因 (rRNA 基因) 的许多拷贝才得以产生足够数量的核糖体 RNA 的。

人细胞中每单倍体基因组约有 200 个 rRNA 拷贝，一小簇一小簇地分布在五条不同的染色体上(见 407 页)，而非洲爪蟾细胞每单倍体基因组中约有 600 个 rRNA 基因拷贝，而且是聚成一簇存在于一条染色体上。不过，rRNA 基因的组织 and rRNA 合成的一般型式在所有真核生物中都是一样的。这种高度保守的 rRNA 基因的许多拷贝是串联排列在染色体上的，每个基因与邻近基因之间隔有不转录区段，称为间隔 DNA，这种间隔区段的长度及顺序各有不同。因为有这种重复排列以及它们的转录速率很高，所以在分散的染色质制片中可以很容易看到 rRNA 基因的串联排列(图 8-51)。RNA 聚合酶分子以及与它们相连的转录本非常密集(典型情况下每个基因有 100 个左右)，它们以与 DNA 垂直的方向向两侧伸展，使每个转录单位都呈现“圣诞树”的外观。正如前面指出的那样(图

8-39), 每一棵树的顶部就相当于 DNA 上开始转录的起点, 而 RNA 聚合酶分子及其转录本突然消失的地方就是 rRNA 基因的终点。

rRNA 基因由 RNA 聚合酶 I 转录, 而每个基因都产生同样的初级 RNA 转录本。在人类, 这种 RNA 转录本叫做 45S RNA, 约有 13 000 核苷酸长。每 45S RNA 在装配为核糖体颗粒离开细胞核之前被切而产生最后核糖体的 28S RNA (约 5 000 个核苷酸), 18S RNA (约 2 000 个核苷酸) 和 5.8S RNA (约 160 个核苷酸) 的一个拷贝 (见 204 页)。这三种不同的 rRNA 都来自同一个初级转录本, 这就保证了它们的数量是相等的。每个初级转录本的其余部分 (约 6 000 个核苷酸) 在核中被降解 (图 8-52)。一般认为, 这些多余的 RNA 序列在核糖体装配时起短暂的作用, 而核糖体的装配是在 45S RNA 合成时就开始了。

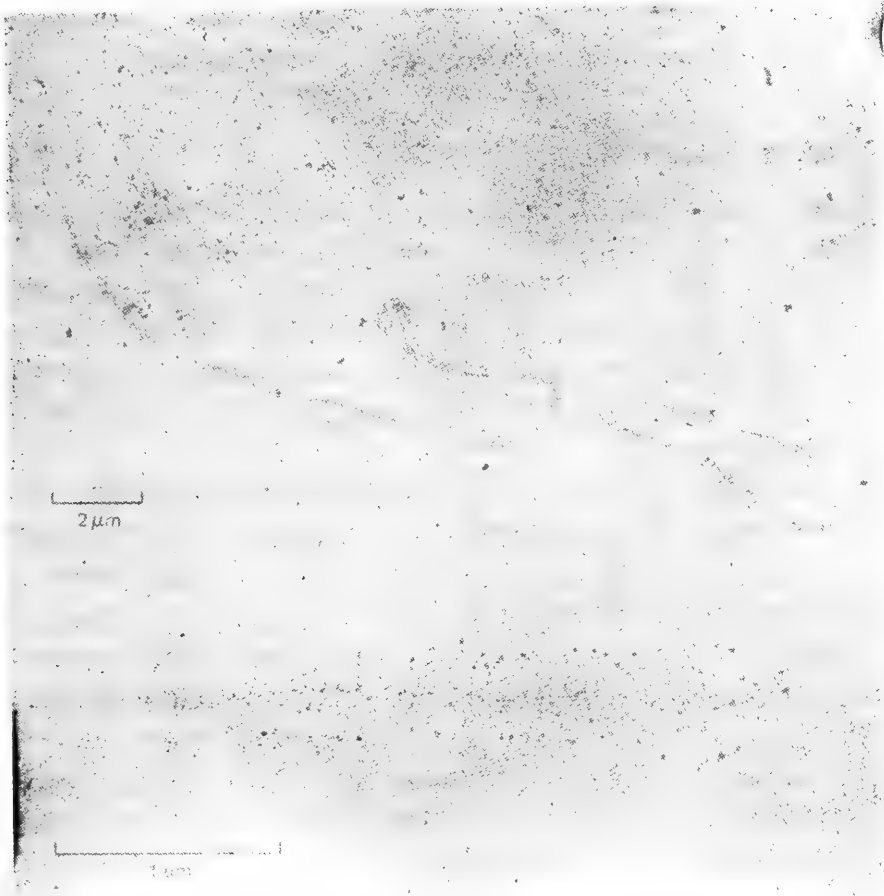


图 8-51 电镜下看到的 45S RNA 核糖体 RNA 前体在串列的 rRNA 基因上转录时的情况。在上面一幅放大倍数较低的图中, 注意转录基因与不转录基因的间隔区相间排列的型式。(引自 V. E. Foe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42: 723-740, 1978)

其他作串联排列而且有类似的不编码间隔区的基因有编码核糖体大亚单位的 5S rRNA 基因 (唯一单独转录的 rRNA), 以及编码各种不同 tRNA 的基因。这两类基因都是由 RNA 聚合酶 III 转录的。串联排列基因编码蛋白质的例子不多, 组蛋白基因是其中之一, 它们是由 RNA 聚合酶 II 转录的。

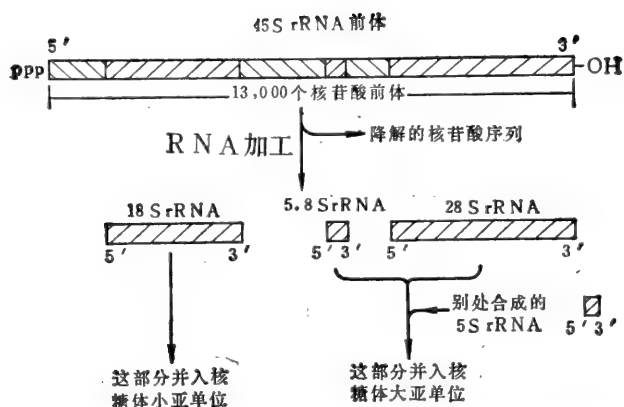


图 8-52 图解 45S rRNA 前体分子加工成三种不同核糖体 RNA。注意有近一半的核苷酸序列在核中被降解。

核仁是一台生产核糖体的机器³⁰

重复基因的不断转录保证了 rRNA 的充分供应。新合成的 rRNA 马上与核糖体蛋白质包装成核糖体。这种包装是在核内,在一种叫做核仁的大的弥散样结构中进行的。核仁中含大的 DNA 环,其上的 rRNA 基因由 RNA 聚合酶 I 以飞快的速率转录下来。这样一个 DNA 环叫做核仁组织区。在电镜照片中可以看到 rRNA 包装过程的开端:每棵“圣诞树”中每个核糖体 RNA 的 5' 尾巴包有一个富含蛋白质的颗粒(图 8-51)。这些颗粒在其它类型的 RNA 转录本中是不出现的,它们可能就反映了在核仁中发生的第一个蛋白质-RNA 相互作用。

利用放射性短期标记新合成的 RNA,可以追踪核仁的生物合成功能。进一步培养不同时间后,利用细胞分级分离方法把放射性核仁分离出来。这些实验证明,完整的 45S 转录本先装入一个大的复合体中,这个复合体含有从细胞质输入的许多不同的蛋白质,要知所有蛋白质都是在细胞质中合成的(图 8-53)。这些蛋白质中包括组成核糖体的 70 种不同多肽链的大部分,以及其它一些蛋白质和小的 RNA 分子。一般认为,这些分子是催化组建核糖体的,在核糖体亚单位以成品形式输出到细胞质中去时这些分子还留在核仁中。

45S rRNA 分子加工时,其核蛋白大颗粒失去部分 RNA 和蛋白质,然后分开形成核糖体的大亚单位和小亚单位的前体。在放射性脉冲标记 30 分钟之内,首先从核仁中出来进入细胞质的是含 18S rRNA 的成熟核糖体小亚单位。而含 28S, 5.8S 和 5S rRNA 的成熟核糖体大亚单位的装配需花更长的时间(大约 1 小时),所以核仁中所含的未完成的核糖体大亚单位要比小亚单位多。

只有当这些亚单位转移到细胞质中去时才发生核糖体成熟过程中最后一些步骤。这种推迟可防止有功能的核糖体接近细胞核中还没有加工好的 hnRNA 分子。

核仁具有一种高度有组织的结构³¹

根据现在所知道的有关核仁功能的知识可以了解它的一些结构的意义。正如在光学

显微镜下所看到的，在不进行有丝分裂的细胞核中最清楚的结构就是大的、球状的核仁。因此，早期的细胞学家们对核仁进行了非常仔细的研究，结果 1898 年的一篇综述就列出了大约 700 篇参考文献。到本世纪 40 年代，细胞学家们证明，核仁中含有高浓度的 RNA 和蛋白质。可是，到 60 年代才发现它的主要功能是合成核糖体 RNA 和装配核糖体。

有关核仁组织的某些细节可以在电镜中看到。与细胞质的细胞器不同，核仁没有膜将它维持在一起；相反，看上去好像是由未完成的核糖体前体彼此通过未知的方式特异地结合在一起的。在典型的电镜照片中，核仁里可以分出三个大致分隔的区域（图 8-54）：（1）浅染组分，含有来自染色体核仁组织者的 DNA；（2）颗粒组分，含有直径为 15nm 的颗粒，相当于最成熟的核糖体前体颗粒；（3）致密纤维组分，由许多细的 5nm 的核蛋白纤维组成，相当于 RNA 转录本。

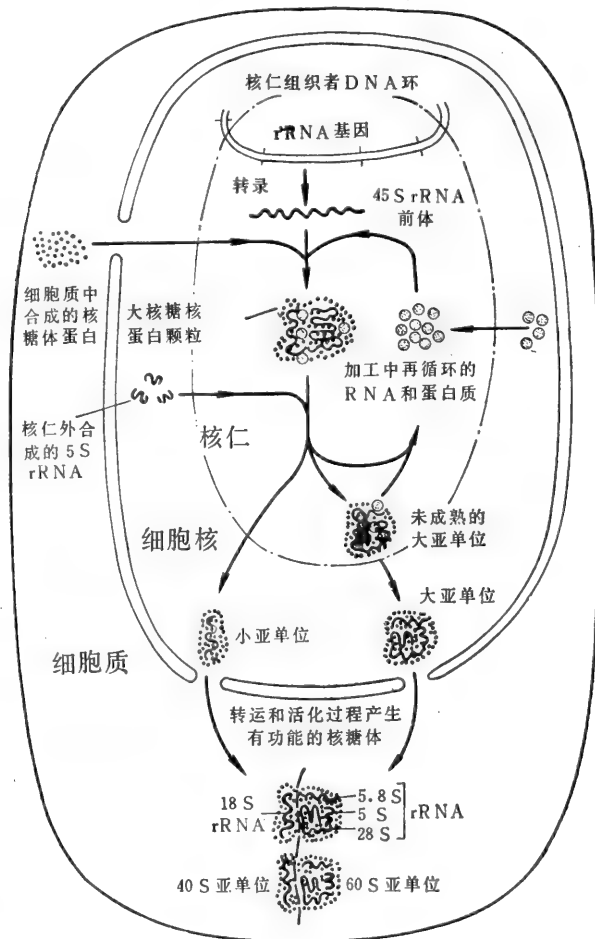


图 8-53 核糖体合成过程中核仁的功能的示意图。大的 45 S rRNA 转录本先装入一个核糖核蛋白大颗粒中，其中包含许多从细胞质输入的核糖体蛋白。当这种颗粒还留在核仁中时，它便有选择地丢弃了一些片段而加工成为未成熟的核糖体大亚单位和小亚单位。一般认为这两种亚单位只有在通过核膜孔转运到细胞质中去时才变成最终有功能的形式。

核仁的大小反映了它的活性,不同细胞的核仁大小可以相差很多,即使在同一种细胞中其大小亦有变化。例如,在一些休眠的植物细胞中,核仁很小,但是在制造特大量蛋白质的细胞中,核仁可占到整个核的体积的 25%。大小上的差异主要是由颗粒组分的收缩或扩展来决定的,这可能是在核糖体基因转录水平上控制的:分散染色质的电镜检查表明,活性核糖体基因所占比例的大小和每个基因的转录速率可以随环境的变化而不同。

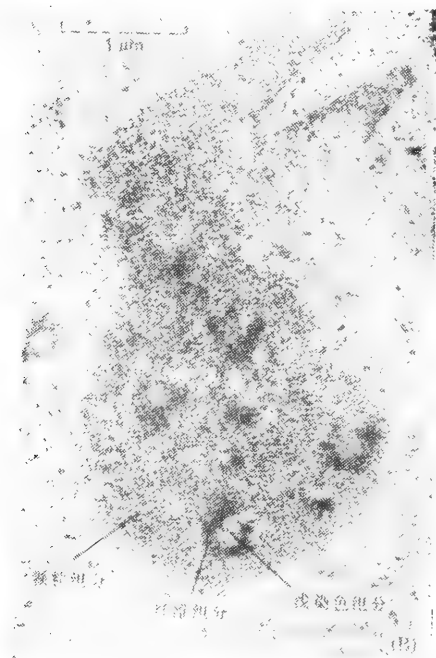
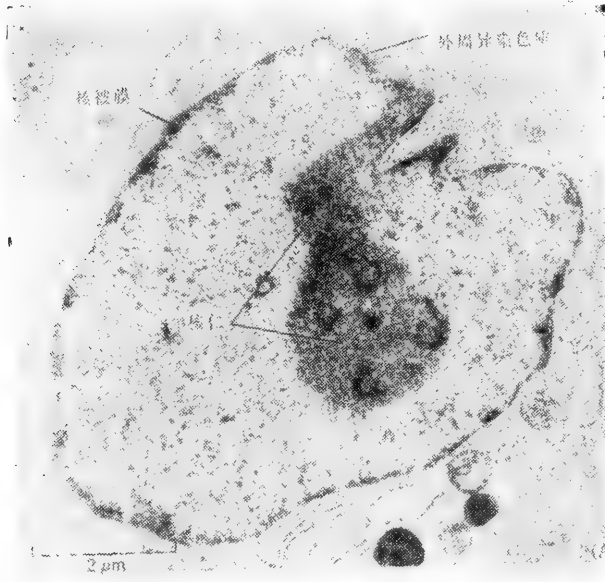


图 8-54 人类成纤维细胞核仁超薄切片的电镜照片,示三个不同区域。(A)核的整体图;(B)细节图。

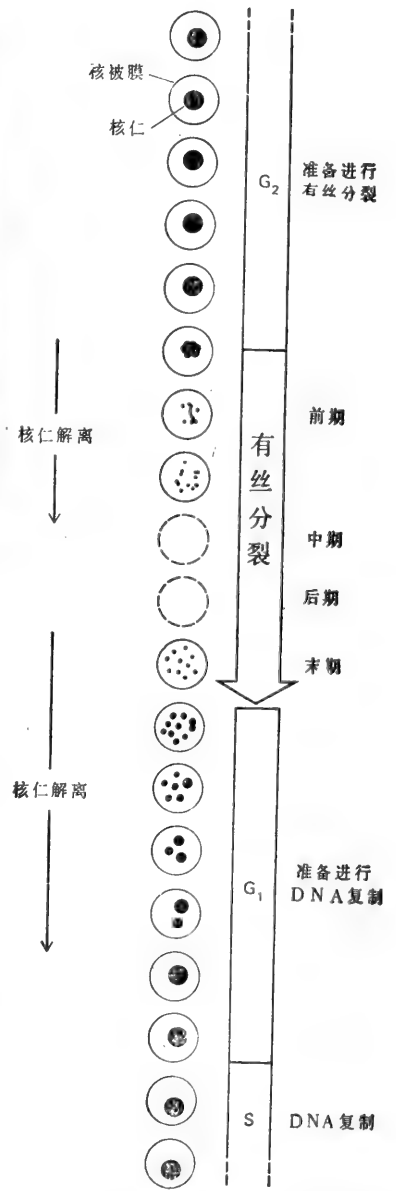


图 8-55 人细胞中核仁外在细胞周期中的变化。这幅图中只画出细胞核。

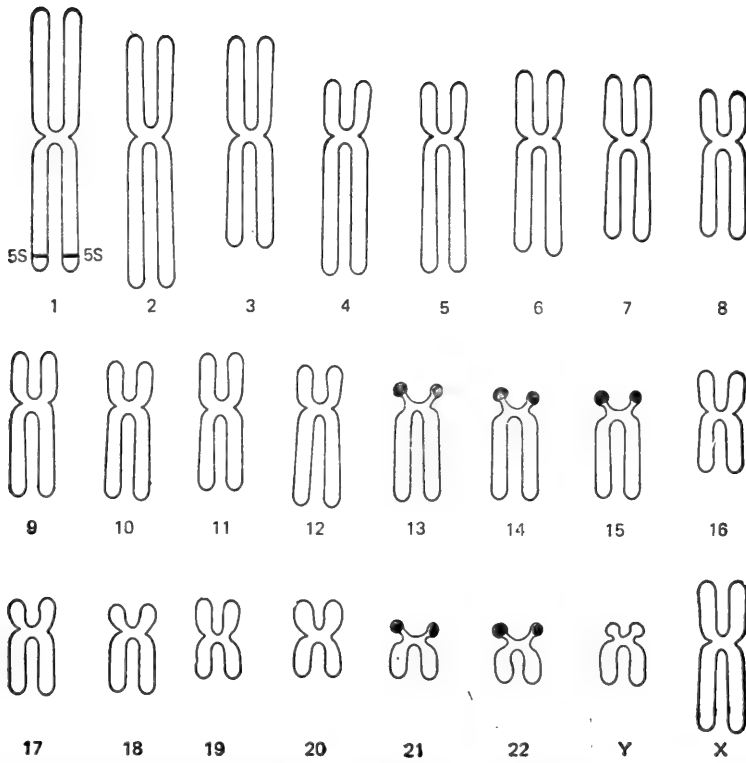


图 8-56 有丝分裂时看到的人体染色体组。表示核糖体 RNA 基因位于 13、14、15、21 和 22 号染色体上(核仁组织者区用黑色小点表示), 以及 5S rRNA 基因位于 1 号染色体上。这些位置是用有丝分裂染色体与放射性标记的相应 RNA 分子进行原位杂交而确定的。注意每种染色体只画出一条, 每条中含有两条配对的染色单体。实际上, 在进行有丝分裂的所有二倍体细胞中, 每条标上号码的染色体都有两个拷贝及两条 X 染色体(女性), 或一条 X 染色体及一条 Y 染色体(男性), 每个都是由一对相同的染色单体所组成(见图 8-22)。

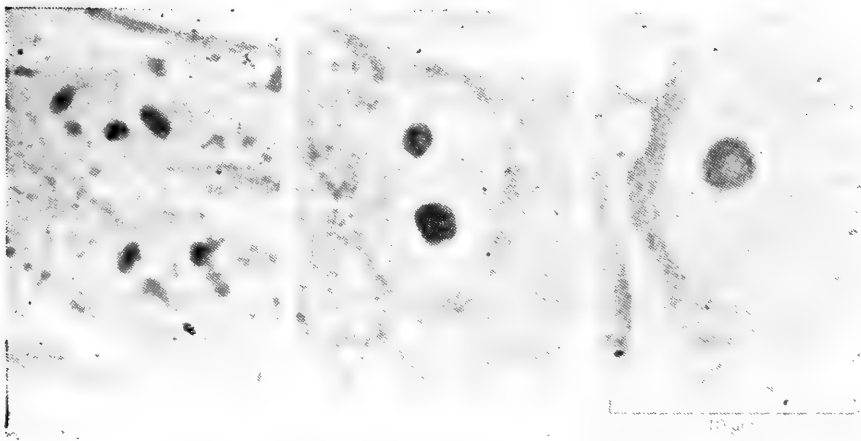


图 8-57 培养生长的人类成纤维细胞的光学显微照片, 示核仁融合的不同阶段。
(E. D. Jordan 和 McGovern 赠)

核仁是在每次有丝分裂后在特定染色体上重新装配起来的³¹

在细胞周期的不同时期，核仁的外貌有明显的变化（图 8-55）。细胞接近有丝分裂时，核仁先是缩小，然后消失，此时染色体浓缩，所有的 RNA 合成停止。一般情况下，在中期细胞中是没有核仁的。在有丝分裂结束（末期）时，核糖体 RNA 合成又重新开始，此时，在染色体核糖体 RNA 基因的地方又重新出现小的核仁。

在人类中，核糖体 RNA 基因位于图 8-56 中所示的 5 条不同染色体的顶端附近（也

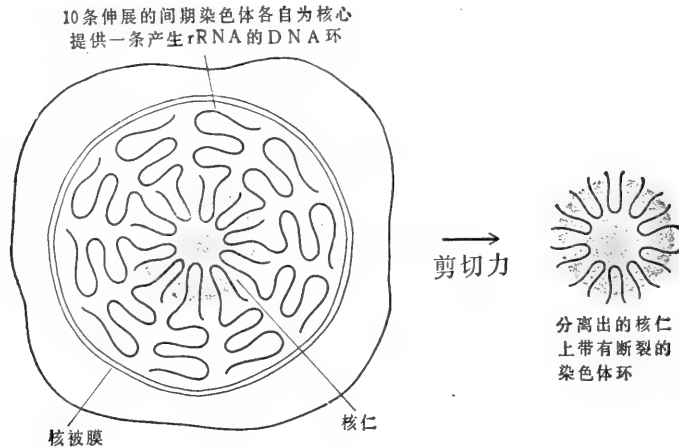


图 8-58 人细胞的高度示意图，表示一个核仁中含 rRNA 基因的染色质环是分别由 10 条不同的染色体提供的。提纯的核仁对于核仁功能的生化研究来说是非常有用的；如图所示，把染色质环从其染色体上扭断下来，就可以得到这种纯的核仁。

就是说，在 46 条染色体中的 10 条上有核糖体 RNA 基因)。相应地，有丝分裂后每一个人体细胞形成 10 个小核仁，但这个阶段难得看到，因为它们生长迅速，很快就融合成一个间期细胞所特有的大核仁（图 8-57）。因此，在一个还没有开始 DNA 合成之前的二倍体人细胞中，一个核仁就含有 10 个不连在一起的 DNA 环，分别由 10 条染色体中的一条所形成的。将核仁从细胞中分离出来的时候，这些 DNA 环就被扭断，从染色体中游离出来（图 8-58）。

有丝分裂过程中，解离的核仁中的 RNA 和蛋白质组分发生了什么变化？看来，至少有一些是分布在所有中期染色体的表面，然后被运载到两个子细胞核的每一个中去。在末期染色体浓缩时，这些“老的”核仁组分又协助再建新出现的核仁。

小结

大多数细胞 mRNA 是通过一个复杂的过程产生的，一开始在核中合成和转录后加工的是核不均一 RNA (hnRNA)，接着是选择性地将 RNA 转运到细胞质中去。hnRNA 初级转录本是由 RNA 聚合酶 II 分子制造的，在其 5 端加上一个特殊核苷酸（加帽），在 3' 端又接上一个多腺苷酸的尾巴。这些过程之后往往还要经过一次或多次的 RNA 剪接。剪接时，从 hnRNA 之中去除叫做间插序列（或内含子序列）的区段。通过这个过程，初级 RNA 转录本大部分在核中被去除并被降解。结果，虽然 hnRNA 的生产速率

一般占到细胞 RNA 合成的一半左右,它所生成的 mRNA 却只占一个细胞中稳态 RNA 的3%左右。

与编码蛋白质的大多数基因不同,编码由 RNA 聚合酶 I 和 III 所合成的结构RNA 的基因通常在基因组中有多份拷贝,而且往往串联排列成簇。RNA 聚合酶 III 分子制造 tRNA 和核糖体的 5S 小 RNA。含有较大 RNA 的大 RNA 前体分子是在细胞核内一个叫做核仁的特殊细胞器中由 RNA 聚合酶 I 分子催化合成的,核仁中有来自不同染色体核仁组织者区的 rRNA 基因 (rDNA),核仁是细胞所有核糖体的装配场所。

核 被 膜³³

细胞核外面包着双层膜³⁴

核被膜将细胞核内含物(核质)与细胞质分开。核被膜是由两个脂双层组成的双层膜,两层之间相隔 20 到 40nm,这个腔隙叫做核周腔(图 8-59 和 8-60)。在超薄切片的电镜照片中可以看到,外层核膜是与内质网(ER)相连续的,象粗糙内质网(RER)一样,外层核膜的外表面常常也布满了从事于蛋白质合成的核糖体(图 8-61)。由于 ER 腔与核周腔相通(图 8-60),所以可以把核周腔和外层核膜都看成是内质网的一块小的特化区域(见表 7-2)。

在称为核膜孔的局部区域,外膜与内层核膜连在一起。因此,整个膜表面在结构上是连续的(图 8-62),不过我们将会看到,内层和外层在功能上以及生物化学上都非常不一样。因为核被膜与 ER 相连续,所以核膜可以通过同 ER 膜直接进行物质交换而生长,

它还可以迅速扩大和缩小(图8-62)。这还有助于在有丝分裂过程中,伴随着核膜的崩解和重新形成,核膜面积的迅速变化。当一个以前静止的核开始迅速合成 RNA 或 DNA 的时候,

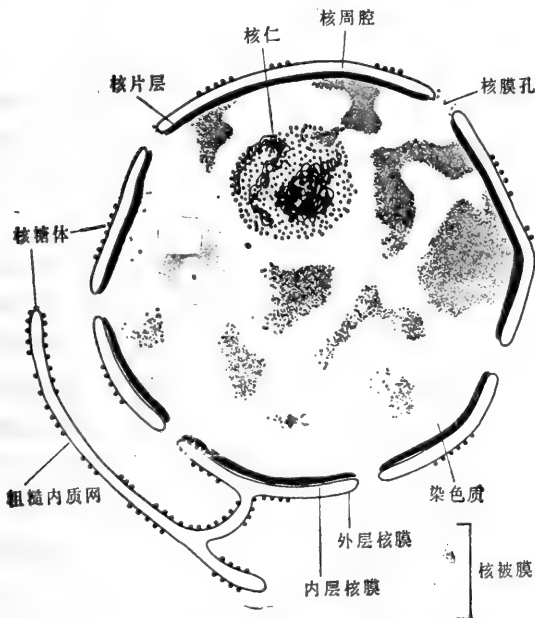


图8-59 一个典型细胞核的横切面图。核被膜是个双层膜,它的外层膜与内质网膜相连续。内层核膜和外层核膜的脂双层在核膜孔处融合在一起。

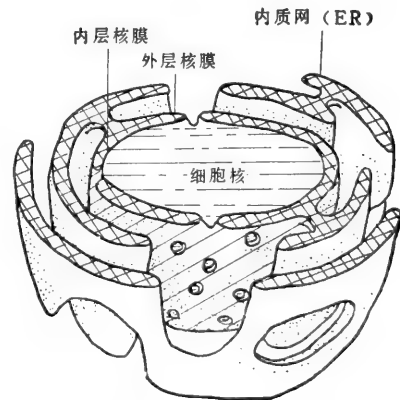


图8-60 说明内质网与核膜之间相互关系的三维图像

核膜面积也显著扩大。

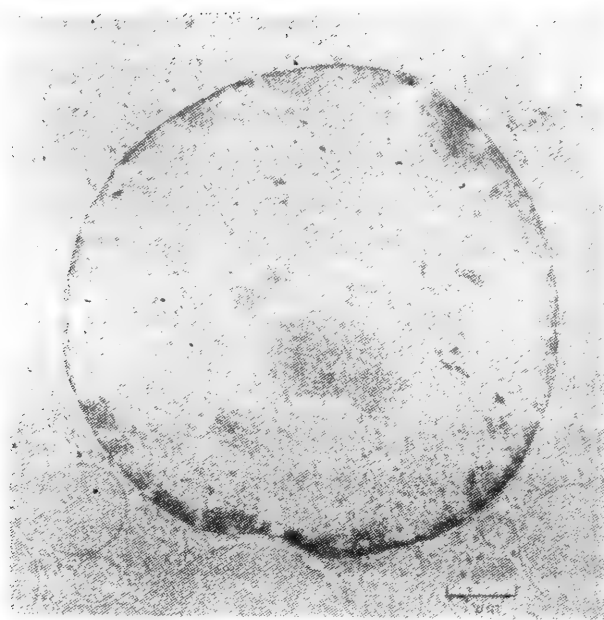


图 8-61 一个肾上腺皮质细胞核的超薄切片电镜照片,从照片上可以看到它的精细结构。因为大部分染色质处于伸展的间期状态,所以辨别不出各个染色体。

双层膜系统的一个好处就是内外两层核膜各自特化,分别与核质或细胞质中的组分发生相互作用。例如,一般认为,内膜中的特异蛋白质与构成它下面核片层(nuclear lamina)的一套蛋白质相互作用。

核片层帮助确定核的外形³⁵

核被膜在其内层膜的核质一侧有一个电子致密层(图 8-63)。这个纤维层(或叫做核片层)的厚度在不同的细胞中是不一样的,在有些细胞中用显微技术根本就看不到。然而,生物化学证据证明,几乎在所有的真核生物细胞中都存在有核片层,而人们认为,核片层在组织核被膜及其里面的染色质方面起着关键性作用。

核片层由一个纤维网所组成,分离出来的网是一层无膜的东西,内含一些特化蛋白,核膜上的孔就是由这些特化蛋白构成的(图 8-64)。在脊椎动物中,核片层主要是由三种比较大的多肽自发装配而成的,有人认为,这种较大的多肽是与埋在内膜脂双层中的特异蛋白质结合在一起的。一般认为,与核片层结合的其他组分是结合在染色质的特异部位上的,因此可引导染色质与核被膜的相互作用。图 8-65 中所示的细胞显微照片是用与核片层蛋白相结合的荧光标记抗体染色的。图 8-66 是核片层结构及其与染色质相互作用的示意图。

核片层多肽对于每次有丝分裂时核膜的消失和重新形成可能是有帮助的。在早中期,这些蛋白质大多数从核膜中释放出来,散布在细胞质中。一般认为,这种可逆的解离过程似乎是受这三种核片层蛋白的暂时磷酸化控制的,转而引起有丝分裂过程中所观察到的核被膜的崩解。

细胞核是通过核膜孔来运输的³⁶

由于已经概述过的原因(见361页),像核被膜那样的双层膜系统给分子运输带来特殊的困难。为了克服这些困难,所有真核生物(从酵母到人)的核被膜上都开有核膜孔,每个孔的四周包围着一种称为核膜孔复合体的大的盘状结构(内径约80nm)。在核被膜的

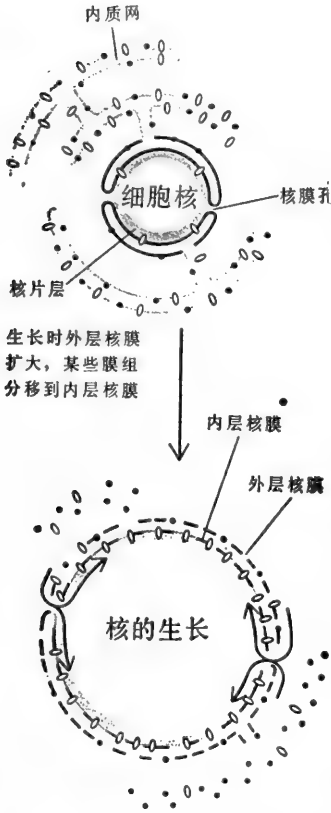


图8-62 在正常细胞周期的末期之后,或者静止细胞开始活跃地合成RNA或DNA的时候,核被膜迅速扩大的示意图。

内外两面,每个复合体四周是排列成八角形的8个蛋白质大颗粒(图8-67A和8-68)。在垂直于膜平面所作的切面中可以看到,核膜孔复合体的边缘跨过核周腔,把内外膜的脂双层连在一起,包绕在每个孔的边缘(图8-67)。这些内外层核膜连在一起的区域可能使溶解在膜中的脂溶性物质(脂类和膜蛋白)得以从合成这些物质的内质网膜流到内层核膜中去(图8-62)。

人们认为,在每个复合体中心所看到的孔是个通水的孔,它为水溶性分子在核质与胞质之间的进出提供主要通道。常常看到孔的中心塞有一个大的

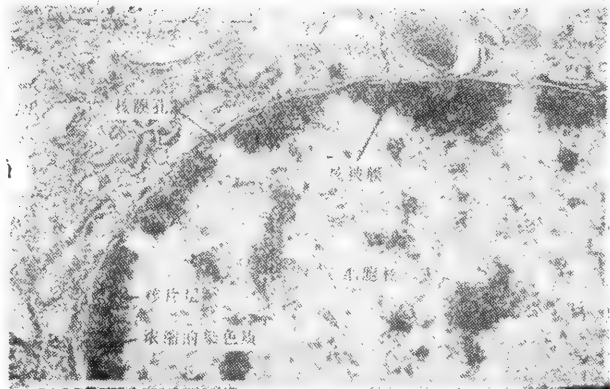


图8-63 一个典型哺乳动物细胞核的电镜照片,它有一个清晰的核片层,厚度约40nm。由于在许多细胞中片层都很薄,所以在这类电镜照片中看不到。
(Larry Gerace 赠)

中心颗粒,据认为是新合成的核糖体和其他粒子物质,正在运输通过孔中心时被拍摄下来的(图8-67)。虽然穿孔运输的直接证据还没有,但是已经有很多间接的证据支持这种看法。例如,注入细胞的小分子(5000道尔顿或更小)通过核被膜扩散得极快,简直可以认为它们是自由地透过核膜的。17000道尔顿的蛋白质在2分钟内就在细胞质与细胞核之间达到平衡,而44000道尔顿的蛋白质达到平衡要30分钟。注入细胞超过60000道尔顿的球形蛋白,则几乎就不能进入细胞核。对这些实验资料所作的定量分析表明,核被膜的表现相当于核膜孔复合体中有一根直径9nm,长15nm的充满水的圆柱形管道(图8-69),这种大小符合于在某些电镜照片中看到的小的、不规则的、开口的管子。

核被膜的作用是将核质与许多在细胞质中起作用的颗粒、细丝以及大分子隔开。例

如,成熟的细胞质核糖体由于太大而不能通过这个直径 9nm 的管子,这样就保证了所有蛋白质的合成都只能在细胞质中进行。

核膜孔或许能选择性地转运大颗粒³⁶

如果考虑到一个典型哺乳动物细胞的核被膜上有 3 000 到 4 000 个核膜孔复合体(每 μm^2 膜面积上约有 11 个孔,要是膜上的孔尽可能地挤紧,则每 μm^2 中孔的最高密度可达 60 个),那么就可以得到有关通过核膜孔输送的物质的量的概念。一个正在合成 DNA 的

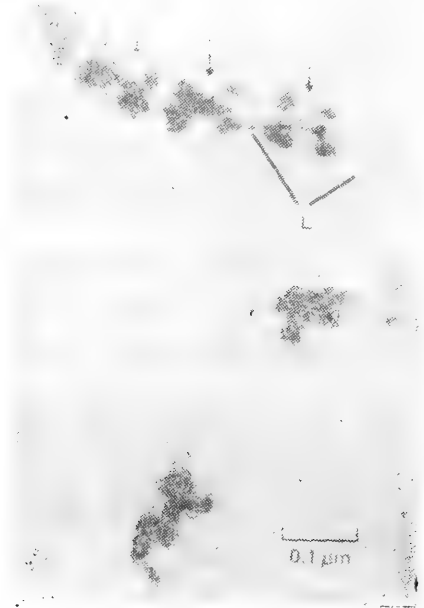


图8-61 分离出来的一段核片层(L),上有与之相连的核膜孔复合体(箭头)。(引自 N. Dwyer and G. Blobel, *J. Cell Biol.* 70: 581-591, 1976)

细胞要把新合成的 DNA 装到核小体中去,需要每 3 分钟从细胞质输入约 10^6 个组蛋白分子: 这就是说, 每个孔每分钟要输入 100 个左右的组蛋白分子。如果是迅速生长中的细胞, 那么在同一细胞中每个孔每分钟大约还同时要输出 3 个装配好的核糖体到细胞质中去。尽管如此, 那也只是总运输量中的一小部分。

细胞核输出新的核糖体亚单位尤其成问题。因为这些颗粒的直径太大(约有 15 nm)而不能通过 9nm 的通道。通常假设这些颗粒是专门由一个主动运输系统运输通过膜的, 在这种运输过程中, 颗粒形状还必须大大地改变。表示颗粒正在通过孔的电镜照片支持这种看法, 核膜孔复合体因核蛋白而着色很深这个事实也支持这种看法。有人认为, 信使 RNA 分子与特殊蛋白质复合形成核糖核蛋白颗粒后, 也是通过这种方式选择性地输出的。

对于大型大分子也存在类似的问题, 例如 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶, 尽管大小至少有 100 000 到 200 000 道尔顿, 但也必须输入细胞核。要是这些蛋白质能改变成杆状构象而不是球状构象, 那么就能钻过孔。或者, 它们可与孔缘上某种类型受体蛋白相互作用而通过孔, 这些蛋白质使通道变大而让它们通过去。

在某些但不是所有细胞的细胞质中, 有与核膜孔复合体类似的复合体堆积在一起, 叫做环形片层(图 8-70)。这些结构最常见于生殖细胞以及蛋白质合成活性高的细胞, 包括大多数肿瘤细胞。虽然它们可能是核被膜材料的额外贮备, 但细胞中存在这样的结构就使人们想到, 核膜孔复合体可能还有运输之外的第二种功能, 例如, 在 RNA 或者核糖体加工的一些步骤中起直接的作用。遗憾的是, 核膜孔复合体至今仍是细胞中还有待于进行现代生物化学研究的若干重要结构之一。

核片层的内表面协助将染色体组织起来³⁷

很可能, 核片层外表面协助将核膜孔固定在应有的位置上并使核被膜保持应有的形状, 而核片层的内表面则保持间期染色体的某些区段紧靠在内层核膜上。由于可以看到紧贴在内层核膜里面的染色质(特别浓缩的染色质, 在电镜下看得很清楚)不见于每个核

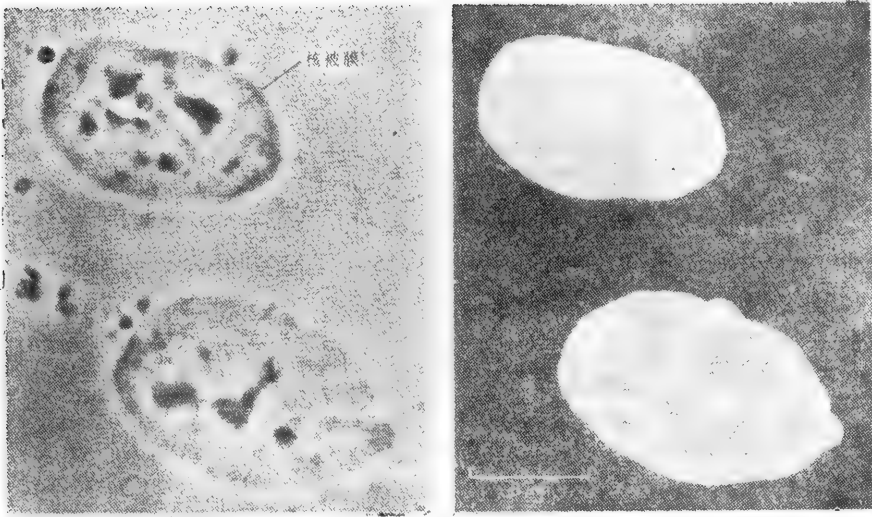


图 8-65 (左)组织培养生长的两个哺乳动物细胞的光学显微照片。(右)同一细胞的荧光显微镜照片,它们的核片层蛋白用免疫荧光法染色。在这些细胞中只能看到细胞核。(Frank, Mckeeon 和 Marc Kirschner 赠)

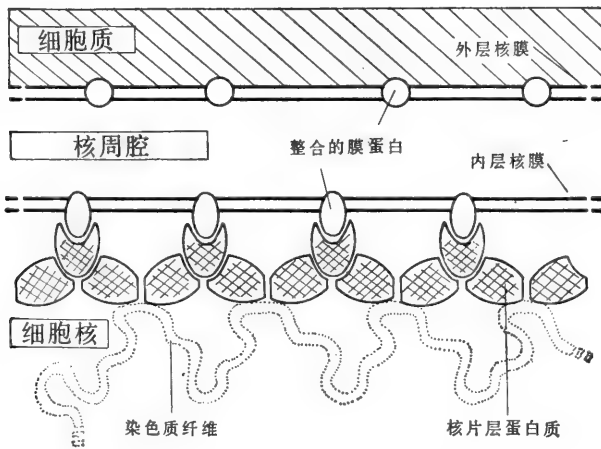


图 8-66 高度示意的核片层图,它是由核片层蛋白亚单位组成的纤维网,核片层蛋白既组成核被膜,又与染色质的特异部位相结合。在脊椎动物中,核片层的三个主要多肽的分子量为 60 000—70 000。

膜孔下面及其周围的相当一段距离内,所以上面所说的这两种不同的组织作用显然是互相协调的(图 8-63)。这里没有染色质,因而细胞质与核质之间的道路是敞开的,这也一定反映了孔四周区域中核片层的结合性质的某种改变。

迄今为止,讨论到核被膜时仿佛它是一种非常不规则的结构似的,在它的表面上散乱地分布着孔,而染色质片段也乱七八糟地附着在它的内表面上。但是认为一种重要的细胞内结构在空间上是无规则排列的想法,常常是错误的,细胞核也不例外。例如,在有些情况下会发现,核膜孔在核被膜中的排列是高度有组织的。图 8-71 表示在一个蕨类孢子的长形细胞核中所观察到的、平行排列着的核膜孔。在另一些细胞的核被膜上,或是见到

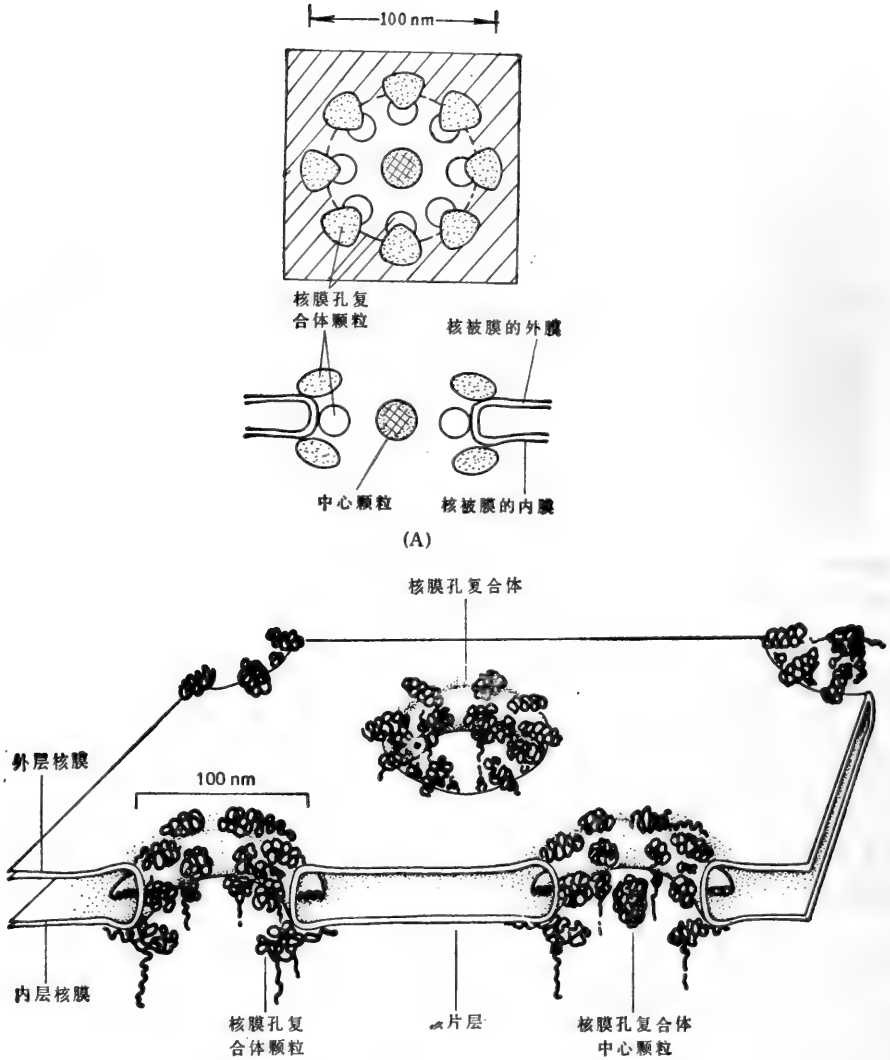


图 8-67 图解核被膜中核膜孔复合体的排列。(A)顶面观和中心垂直切面。“中心颗粒”在有些孔中可以看到,而在另一些孔中则看不到。虽然这些颗粒可能是孔的组成部分,但人们往往认为它们是正在运送过孔时被拍摄到的大复合体。(B)一小块核膜的三维图像。

簇聚成群的核膜孔,或是存在没有核膜孔的特殊区域,它们的方位与细胞本身有特别的关系(图 8-72)。这种排列可能反映了核片层中的某些相应的组织。

在某些细胞中,很容易在间期辨认出特殊染色体的特殊区域,这是因为它们不同寻常的浓缩状态或染色特性的关系。例如,在果蝇中,所有四条染色体的某一区段聚集形成一个染色中心,用 DNA 专一荧光染料染色时显得特别的亮。如果检查果蝇胚胎的细胞则会发现,每个细胞的染色中心都朝向外表面(图 8-73)。同样发现,果蝇幼虫多线细胞中的巨大间期染色体在相邻细胞的立体关系上也具有类似的方位和排列(图 8-74)。这些观察表明,至少在某些细胞核中,染色体的特殊区段是与核片层的特殊部位相结合的。通过这种方式,核被膜内表面就可以协助将内部的染色体组织起来。

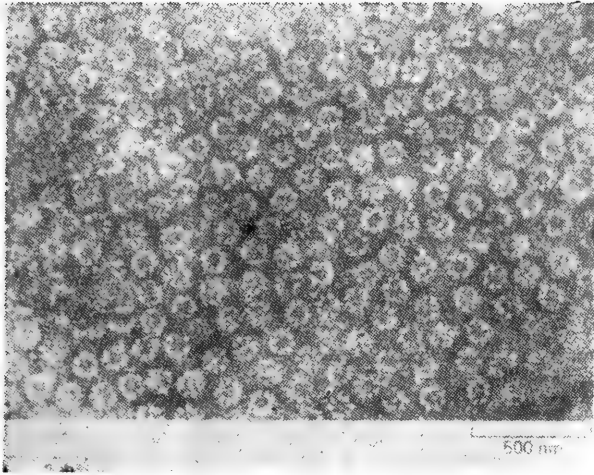


图8-68 核膜孔复合体负染制片的电镜照片。注意，每个孔四周有8个大颗粒组成的环，每个颗粒都比核糖体要大。
(A. C. Fabergé 赠)

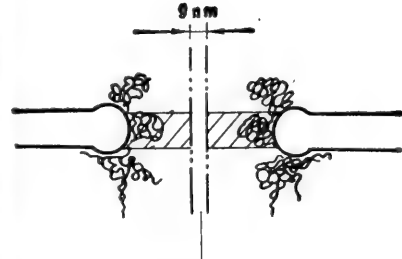


图8-69 一个核膜孔复合体断面的示意图。画在孔中的圆柱体是根据运输测定所估计的开放通道的相对大小。在有些电镜照片中可以看到孔内大部分为看不太清楚的线所填满，可能正是这些线使有效孔径缩小到图中9 nm管子那样大小。

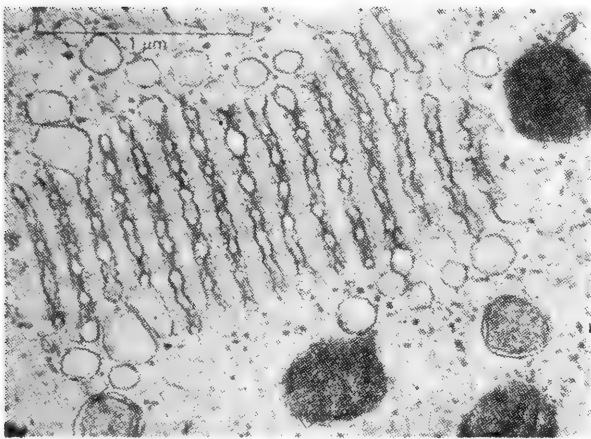


图8-70 在蛙成熟卵母细胞细胞质横切面中看到的环形片层。(Richard G. Kessel 赠,引自 *J. Ultrastruct. Res.*, Supplement 10, 1968)

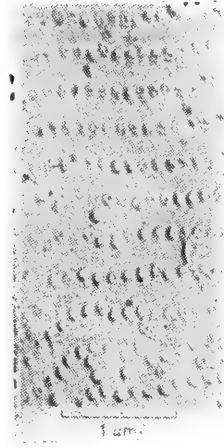


图8-71 一个蕨类孢子长形核膜的冰冻断裂电镜照片，示核膜孔复合体有规则地排成平行列。(Don H. Northcote 赠,引自 K. Roberts and D.H. Northcote, *Microsc. Acta* 71: 102—120, 1971)

小结

细胞核四周有一个由两层同心排列的膜组成的被膜。外层核膜与 ER 膜相连续，内、外层核膜之间的核周腔也与 ER 腔相通。细胞全部 RNA 分子和核糖体都是在细胞核中制造好后再输出到细胞质中去的，而在细胞核中发挥作用的蛋白质却全部是在细胞质中合成的，因而只能由外输入。一般认为，细胞核与细胞质之间的物质交换是通过核膜孔进行的，核膜孔是由内外层核膜连接起来形成的沟管。这些地方的核膜孔复合体是一种大的超分子结构，好象是由核片层将它组织起来并固定在应有的位置上的。核片层是一

层纤维蛋白网络,衬在内层核膜的里面,协助维持核的外形,并把染色体组织起来。



图8-72 在一个精子细胞核一端的成簇核膜孔的冰冻断裂电镜照片

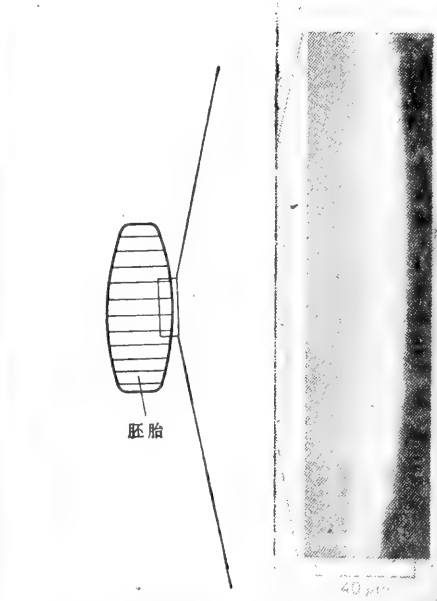


图8-73 细胞胚盘期的果蝇胚胎间期细胞的低倍光学显微照片。染色体经荧光染色。注意,染色最亮的区域(染色中心)都是朝胚胎外表面排列的,这个染色中心包含四个染色体(见图8-29)中每一个的特殊区段。(John Sedat 赠)

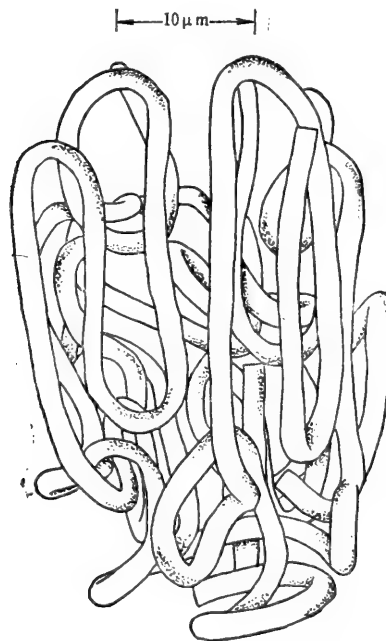


图8-74 果蝇唾腺细胞的大形多线染色体在细胞核中的折叠形状。形状复杂,但却可重现于每个细胞。为了发现图示的结构,需要对一个细胞中荧光着色的染色体的一系列光学切片进行非常复杂的分析。(根据 David Agard 和 John Sedat 提供的照片重绘)

控制基因表达的基本因素³⁸

高等真核生物的许多细胞在形态和功能上都有明显的差异(见 24 页)。因为高度特化的细胞往往合成大量的一种或几种蛋白质,所以,细胞分化很可能涉及到编码那些蛋白质的特殊 DNA 序列的扩增。另一方面,由于细胞分化几乎总是不可逆的,因此,有些生物学家推测,分化是选择性地失去某些 DNA 序列(或者基因)。但是,这两种想法都没有得到证实。看来,细胞分化决定于选择哪些 DNA 序列来编码蛋白质,而 DNA 序列本身并没有发生任何不可逆的变化;这极少有例外,有关例外我们将在以后详述。

多细胞生物的细胞都含有同样的 DNA³⁹

证明动物基因组恒定性的最好的证据来自将业已完全分化的蛙细胞核注射到去核蛙卵中去的实验,这些实验将在第十五章中叙述。注入的“供体”核能够指导“受体”卵产生正常的蝌蚪。蝌蚪含有各种各样的分化细胞,它们的 DNA 序列来自原先业已分化了的供体细胞核。所以供体 DNA 在其分化过程中显然没有丧失重要的 DNA。在利用各种植物进行的实验中也得到类似的结论。进行这类实验时,先将已分化的组织块放在合成培养基中培养,然后分离成单细胞。这些单个细胞常常能再生出一株完整的成体植株来(图8-75)。

进一步证明在脊椎动物的发育过程中没有大段的 DNA 丧失或者重排的证据来自对不同类型细胞有丝分裂中浓缩染色体的详细带型的比较研究(图8-25 和 8-26)。根据这个标准来看,人体中所有分化细胞的染色体组都是一样的。

利用重组 DNA 技术所做的更为灵敏的实验(见182 页)使我们能进一步排除掉通过不断的 DNA 扩增来进行分化的可能性。迄今为止最有力的证据表明,编码特殊分化细胞所特有的大量蛋白质的每个基因只有一个拷贝,即使在几乎专门用来合成这些蛋白质的细胞中也是如此。例如,鸡红细胞血红蛋白亚单位、蚕丝腺细胞的丝心蛋白,以及鸡输卵管腺细胞的卵清蛋白,都只有一个有功能的基因。此外,在所有的情况下,这些基因及其前后的核苷酸序列好象在所有已

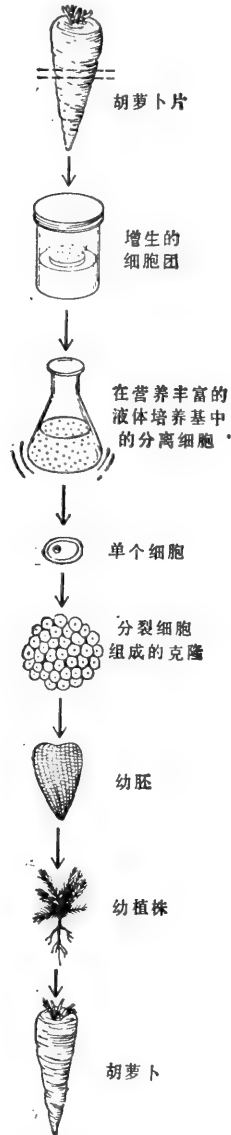


图8-75 能在许多种植物中进行的一种实验的图解。许多分化的植物细胞都保持“去分化”的能力,形成一个由子细胞组成的克隆,它们后来能够组织起来再生成完整的植株(见第十九章)。

经测验过的动物细胞中都是一样的，不管那些细胞是否制造这种蛋白质。类似的研究表明，在所有分化细胞中，编码蛋白质的其它 DNA 序列大部分也是一样的。

不同细胞类型合成不同的蛋白质组合¹⁰

多细胞生物中不同细胞类型是因为合成和积累不同的蛋白质组合，才变得彼此不一样的。但例如要产生像肌肉细胞和成纤维细胞这样不同的两种细胞，究竟需要多大的蛋白质的差异？虽然我们还不知道这一基本问题的答案，但是还是可以提出某些一般性的说法。

1. 因为有许多功能对所有的细胞来说都是一样的，所以一个生物中的任何两个细胞都有很多的共同的蛋白质。这里面包括一些含量丰富的蛋白质，例如细胞骨架的蛋白质、组蛋白和非组蛋白染色体蛋白、一些内质网和高尔基膜所必需的蛋白质、核片层蛋白、RNA 包装蛋白、核糖体蛋白，等等。含量丰富的蛋白质是比较容易鉴定的，其中有许多看来在不同类型细胞中都是一样的。参与重要代谢反应的多种不同酶在不同细胞类型中也是一样的。

2. 某些含量丰富蛋白质是高度特化的。其中有些蛋白质除非是在它们发挥作用的特化细胞中，否则即使用最灵敏的测定方法也不能检出。例如，虽然编码各种血红蛋白的 DNA 序列在所有哺乳类动物细胞中都存在，血红蛋白却只能在红细胞中检出。

3. 虽然每种类型特化细胞的独特形态和行为可能表明存在着许多细胞类型专一性蛋白质，但是，即使应用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳，也只有 2000 种左右含量最丰富的蛋白质（每细胞中的存在量有 50 000 以上拷贝）能够在不同细胞类型之间进行比较。不管比较的是组织培养生长的两个不同的细胞系（例如，肌肉细胞和神经细胞），还是幼鼠的两种不同组织的细胞（例如肝、肾，或者肺），用这种技术都得到类似的结果。绝大部分被检的蛋白质在检查的两种细胞类型中都有合成，而合成速率之差不到 5 倍。只有很少一部分蛋白质其合成速率在两种细胞类型中相差很大，或甚至是只存在于一种细胞类型中。

对不同 mRNA 序列的数目的研究表明，一个典型的高等真核生物细胞合成 10 000 到 20 000 种不同的蛋白质（表 8-1），但有许多种蛋白质由于太少，所以连用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳都不能检出。要是这些比较少的蛋白质也有像比较丰富的蛋白质那样的相似性与差异的模式，那末只需要相当少的蛋白质差异就一定足以在细胞行为上产生很大的差异。可是即使在这种情况下，高等真核生物的不同细胞类型尽管其染色体组看来是一样的，但还是制造出许多种不同的蛋白质。

不同类型细胞转录不同的基因组合¹¹

已知不同类型细胞之间的差异有赖于它们所制造的特殊蛋白质，那么，蛋白质合成是在什么水平上受控制的还有待于确定。从 DNA 到蛋白质的途径中的任何或所有步骤都有可能参与控制（图 8-76）。原则上讲，细胞类型之间的差异可以通过下面几种方式产生出来：（1）控制某一基因的转录方式或转录时间（转录控制）；（2）控制初始 RNA 转录本的加工方式（加工控制）；（3）决定哪些细胞核中竣工的 mRNA 要输出到细胞质中去（运输控制）；（4）决定哪些细胞质中的 mRNA 由核糖体进行转译（转译控制），或者

(5) 决定要将哪些细胞质中的 mRNA 分子稳定下来 (mRNA 降解控制)。虽然控制可以视蛋白质和细胞类型不同而在任何一个水平上进行,但是我们现在知道,非常重要的一部分控制过程是发生在这条途径中的第一步的,即初级 RNA 转录本合成的时候。

证明转录控制重要性的最令人信服的证据来自对肝中制造的 RNA 与脑中制造的 RNA 进行比较的实验。实验有赖于利用由肝 mRNA 制造的“cDNA”探针。首先,从肝和脑的细胞中分离出细胞核,将它们与高放射性的 RNA 前体(核苷三磷酸)一起保温,所以在这些细胞核中合成的 RNA 转录本是有放射性标记的。然后按图 8-77 和 8-78 中所述的方法对这些 RNA 分子进行测定。

这种测定方法是设计用来测验,脑细胞核中制造的 hnRNA 是否含有相当于肝细胞质中所有的,但在脑细胞质中没有的 mRNA 分子的核苷酸序列。肝细胞的 hnRNA 作为阳性对照,因为它必然含有这些序列。在这种检定方法的有限灵敏度范围之内,没能发现脑细胞 hnRNA 序列与所测定的 11 种不同的肝专一 mRNA 中的任何一种相对应。所以脑细胞中的细胞质中没有这些 mRNA 及它们所编码的蛋白质,主要是由于脑细胞核中相应基因没有转录。换言之,对于这些随机选来的肝专一 mRNA 来说,脑细胞与肝细胞之间的差异主要是通过

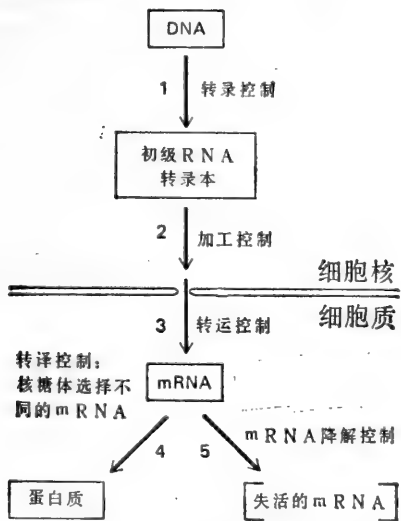


图 8-76 图解真核生物中能控制基因表达的 5 个不同水平。

转录控制来决定的。

上述实验中所用分析方法的灵敏度是有限的。如果脑细胞核中对肝专一性基因的转录降低 10 到 50 倍(视所用的特殊探针而定),那么就会漏检。在少数有利的情况下,已能更灵敏地检测在一种类型细胞中大量转录的 DNA 序列是否在另一种类型的细胞中也

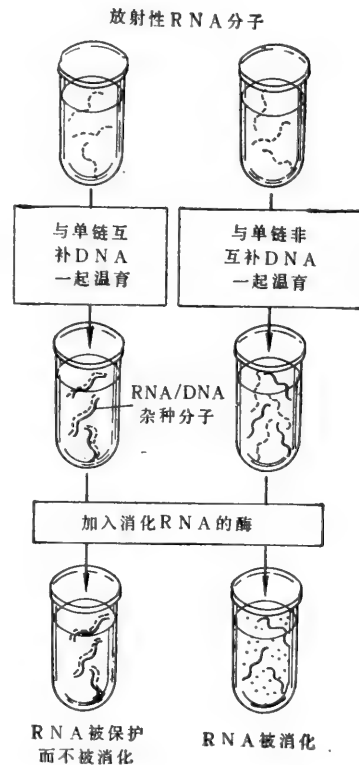


图 8-77 图解一种可用以检出有特异顺序的放射性 RNA 分子的通用方法。如果 RNA 分子能与作探针的特异单链 DNA 片段形成 RNA/DNA 杂交双螺旋的话,那么它们在酶处理后依然不被消化,因而可根据它们的放射性被检出。在正文述及的实验中,相当于各种不同基因的纯 DNA 片段是通过下法得到的: 先使 mRNA 混合物逆转录,再将产生的 cDNA 分子进行克隆。在每一实验中各用一种纯 DNA 片段作为探针(见图 8-78)。

转录。这类实验表明,两种类型细胞之间的基因转录速率可以相差到 100 万倍。

如果这些结果是普遍正确的话,那么表明,不表达的真核生物基因“漏过”转录控制的机会要比细菌中的不表达基因小得多(在细菌中,表达基因与不表达基因之间的转录速率的已知最大差异约为 1 000 倍)。这表明,在高等真核生物中,至少有些不表达基因的关闭机制不仅与关闭不需要的细菌基因时所用的机理不同,而且比它更为有效。

我们在讨论转录控制机制时首先来考虑一个对细菌和真核生物都适用的基因控制一般模型。在细菌中,基因调节蛋白与特异 DNA 序列相结合来开动或关闭基因转录。这些

基因阻遏蛋白和基因活化蛋白已充分弄清楚了,它们很可能提供重要的启示,协助我们了解真核生物中更为复杂的基因表达调控机制。

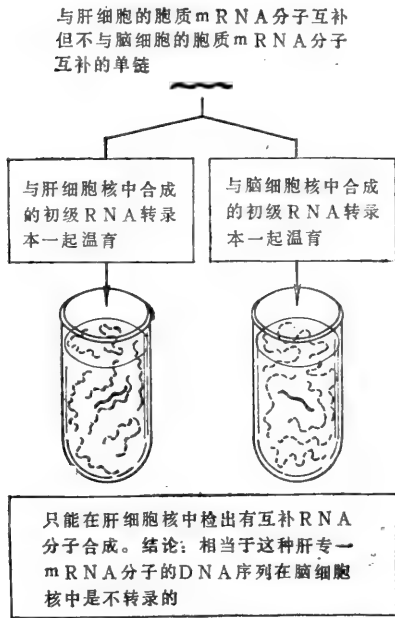


图8-78 图解表示在哺乳动物细胞中基因表达大多是受基因转录水平的控制的实验(亦见图8-77)

阻遏蛋白抑制细菌中特异基因的表达⁴²

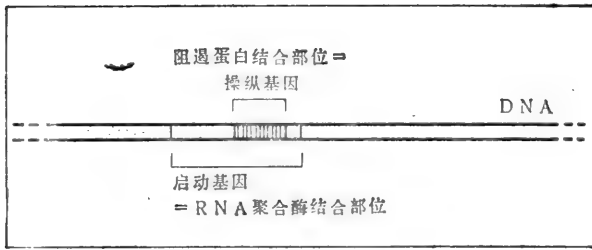
大肠杆菌染色体是一条约 3×10^6 碱基对的环状 DNA 分子。这 DNA 足以编码大约 2500 个不同蛋白质,不过在任一时间内只制造其中的一部分蛋白质。大肠杆菌是根据细胞内特殊代谢物的水平来调节许多基因表达的。

已经知道,原核生物中的基因调节几乎都是发生在转录水平上的。基因控制机制最早是在本世纪 50 年代和 60 年代通过研究大肠杆菌合成乳糖水解酶的实验而搞清的,大肠杆菌需要将乳糖这种双糖水解成葡萄糖和半乳糖这两种单糖。这些实验导致乳糖阻遏蛋白的最终提纯和鉴定;前面已经讨论过这种蛋白质与一特异的 DNA 序列结合的情况(371页)。这种蛋白质和一个 21 个碱基对的特异操纵基因 DNA 序列结合就使特异

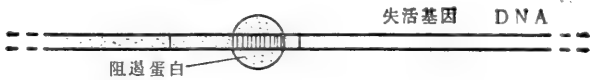
基因转录停止,这个操纵基因序列在大肠杆菌基因组中只有一个拷贝,而且与邻接的 RNA 聚合酶结合部位(启动基因部位)部分重叠。阻遏物与操纵基因结合时,妨碍了 RNA 聚合酶进入其结合部位,从而阻断邻近 DNA 区段的转录(图 8-79)。

乳糖阻遏蛋白本身又受一种小的糖分子的调节,这种小的糖分子叫做别乳糖(allo-lactase),是在细胞中存在乳糖的情况下产生的。当别乳糖达到足够高的浓度时,它就诱导阻遏蛋白分子发生一种变构构象变化,使后者从 DNA 上松开,而使转录得以进行:这时我们就说这个基因是“去阻遏”了。所以大肠杆菌细胞只是在有乳糖存在的情况下才制造乳糖降解所必需的酶(图 8-80)。

这种特异基因阻遏现象,在细菌中现已知道很多其他的例子。在所有的例子中,一种特异的信号发放配体(例如别乳糖)为不同的基因阻遏蛋白所识别,这种基因阻遏蛋白与 DNA 中的特异操纵基因序列有亲和力。这个配体一旦与阻遏蛋白结合就使阻遏蛋白与特异 DNA 序列的亲和力下降,结果,操纵基因邻近的转录单位就被开动。另一方面,特异的信号发放配体也同样可以用来使邻接的转录单位关闭。在这种情况下,配体与阻遏



如果有阻遏蛋白存在，则RNA聚合酶不能结合，结果就不转录



如果阻遏蛋白不存在，则RNA聚合酶结合，结果进行转录

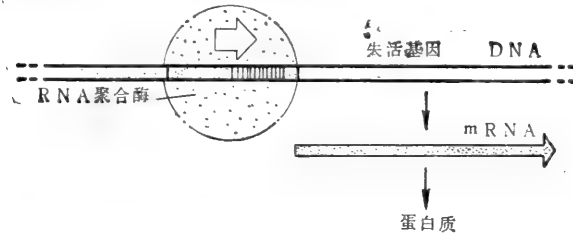


图 8-79 图解原核生物中特异基因阻遏蛋白控制基因转录的机理。阻遏蛋白和 RNA 聚合酶与 DNA 中不同的特异核苷酸序列紧密结合，这些序列分别作为操纵基因部位和启动基因部位。

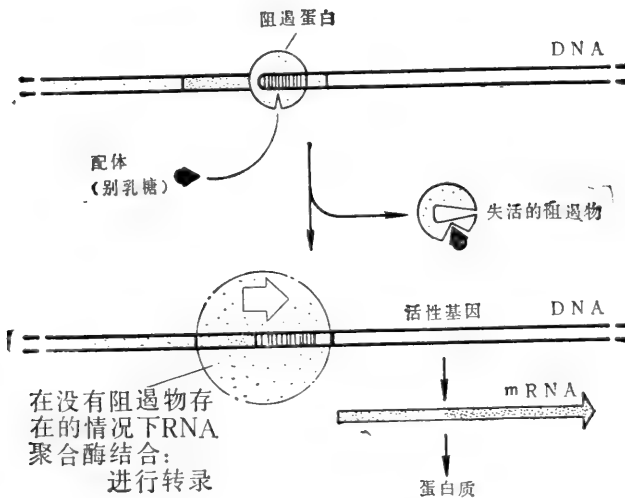
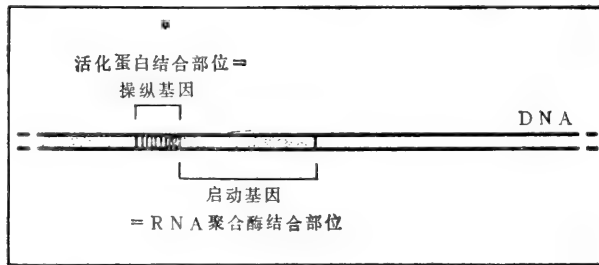


图 8-80 图解细菌中的基因去阻遏过程。一种特异的小分子(这里是别乳糖)作为配体与阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白由 DNA 上脱离，从而激活特异基因。在这个例子中，合成的单一 RNA 转录本编码参与乳糖代谢的三种不同蛋白质；因为编码这些蛋白质的基因是邻接的并受到协同的调节控制，所以说每个基因是同一个乳糖操纵子的组成部分。

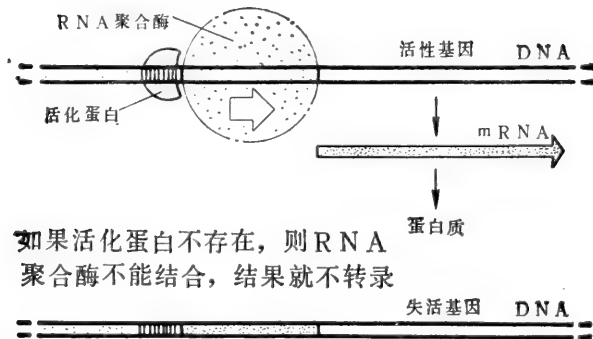
蛋白结合引起的变构变化是增加而不是降低阻遏蛋白与其特异 DNA 序列之间的亲和力,注意,在前一种情况下,增加配体浓度会开动特异基因的转录,而在第二种情况下,却抑制特异基因的转录。然而,因为没有调节蛋白时的转录总是要比有调节蛋白时的转录多得多,所以这两种机制原理上是一样的。因此,这种类型的基因调节叫做负调节。

在高等真核生物细胞中可能是基因活化蛋白起主要作用¹²

除了负调节以外,还有通过基因活化蛋白的调节(图 8-81)。在大肠杆菌中,有些 RNA 转录单位中的 RNA 聚合酶结合部位较弱,这种部位需要靠第二种蛋白质与邻接的特异 DNA 序列的结合才起作用。阻遏蛋白与 DNA 部位结合的方式使它堵住 RNA



如果活化蛋白存在,则 RNA 聚合酶结合,结果进行转录



如果活化蛋白不存在,则 RNA 聚合酶不能结合,结果就不转录

图 8-81 原核生物中特异基因活化蛋白控制基因转录机制的示意图。除非在附近的操纵基因部位上同时有基因活化蛋白存在,否则所示的启动基因部位 DNA 序列与 RNA 聚合酶的结合是非常弱的。应当将这种机制与基因阻遏机制相比较(见图 8-79)。

聚合酶结合部位,而基因活化蛋白结合部位的位置正好在聚合酶部位的边缘,而且活化蛋白是促进 RNA 聚合酶的结合。但是在其他所有方面,基因激活蛋白与阻遏蛋白都完全相似。像阻遏物一样,它们也常常与特异配体结合,这些配体通过增加或降低活化蛋白对 DNA 的亲和力而分别使基因开动或关闭。但是在这种情况下,因为有基因调节蛋白存在时的转录比没有基因调节蛋白时的转录多,所以这种类型的基因控制叫做正调节。在图 8-82 中总结和比较了正调节方式和负调节方式。

有些细菌基因调节蛋白可以与基因组中好几个不同的部位结合,结合在某个部位上时阻遏转录,而结合在另一个部位上时则启动转录。这些不同的作用是由于调节蛋白结合

部位与 RNA 聚合酶结合部位的间隔略有不同所致(图 8-83)。有间接证据表明,真核生物中的有些调节蛋白也可以在基因调节中起正调节因子或负调节因子的作用,视受控的特殊基因而定,但是在典型的高等真核生物细胞中,只有 7% 的 DNA 序列转录为 RNA。看来,由成千上万不同的阻遏蛋白来关闭其余 93% 的 DNA 上的特异转录是不大可能的。而常识却表明,高等真核生物细胞一定是利用某些普遍适用的设置来阻遏基因的表达,而用非常特异的基因调节蛋白作为基因活化因子,来启动特异基因的转录。

两种相互作用的基因调节蛋白, 互相阻遏对方的合成, 在细菌细胞中可以产生稳定的“记忆”⁴³

真核生物细胞对激素一类环境信号发生反应的方式与细菌对养料的反应方式差不多相同, 都是通过使特异基因可逆地活化或失活的方式 (见 705 页)。但是基因表达的总型式——也就是说, 在某一个特殊细胞中起作用的特定基因组合——是在该真核生物发育过程中逐步确定的, 而且一旦确定, 它似乎就不再受细胞外界环境中的任何变化的影响。这些基因表达的型式如此稳定地从一个细胞世代转到下一个细胞世代, 而且造成性状上的根本差异, 以致身体中许多细胞类型虽然基因组都一样, 它们的表现却好像它们是遗传上独立的物种一样。

这样一种稳定遗传的基因调节型式在细菌中却是例外, 而不是常例。但是, 有一个了解得特别清楚的重要例子将有助于阐明真核生物基因调节方面的一些问题。这是一种开

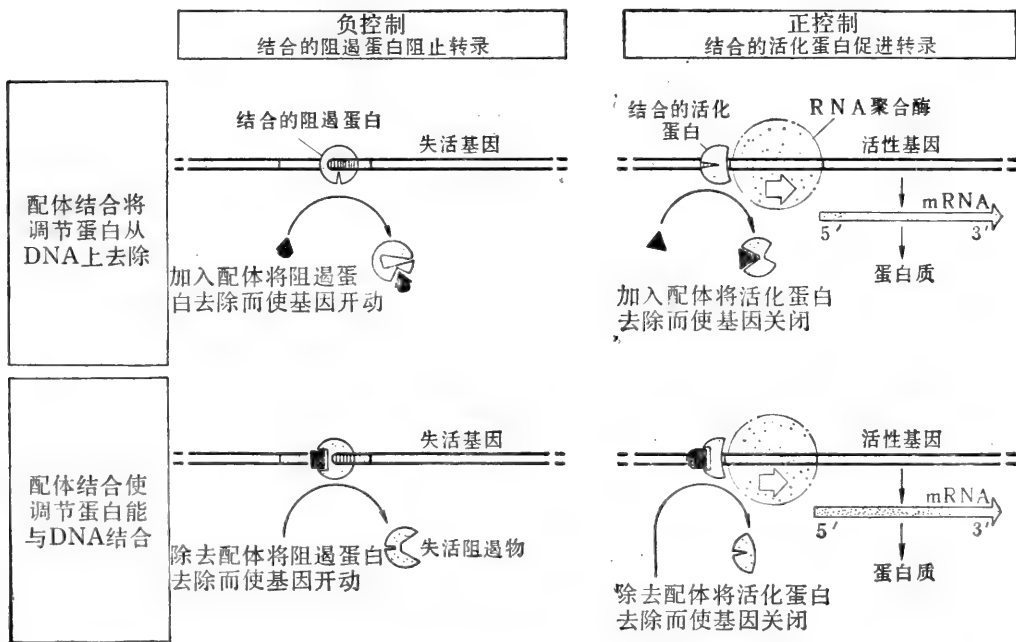


图 8-82 原核生物中特异基因调节蛋白控制基因转录的不同机制。注意, 加入诱导性配体可以通过去除 DNA 上的基因阻遏蛋白(左上图), 或者让基因活化蛋白与之结合(右上图), 而使基因启动。同样, 加入抑制性配体可以通过去除 DNA 上的基因活化蛋白(右上图), 或者让基因阻遏蛋白与之结合(左下图), 而使基因关闭。

关样的机制,它决定细菌病毒 λ 噬菌体是在大肠杆菌细胞质中繁殖而杀死其宿主呢,还是整合到宿主细胞 DNA 中随着细菌分裂而自动复制。病毒的这种生存方式的选择是受噬菌体的小基因组编码的蛋白质控制的,噬菌体总共有约 50 个基因。在这种状态中,噬菌体基因的转录一定非常不一样,例如,整合到宿主 DNA 的病毒必须避免产生负责病毒繁殖的病毒蛋白质,因为这对宿主细胞是致死的。一种转录型式或另一种转录型式一旦确定,那么就稳定地维持下去。结果,整合的 λ 噬菌体就能静静地隐藏在大肠杆菌宿主基因组中,经过成千上万次的细胞世代而不表现。

对于这个重要而复杂的 λ 基因调节系统的详细情况读者可以在其它地方查阅到,这里只需对它的几个一般性质强调一下就够了。这个系统的核心就是该病毒合成的两种调节蛋白: λ 阻遏蛋白和 cro 蛋白,这两种蛋白质都是在与另一个基因的操纵基因部位结合时阻止另一个蛋白质的合成。只有两种稳定状态:在状态 1(溶源状态)时, λ 阻遏蛋白占优势地位,这时只有 λ 阻遏物合成,而没有 cro 蛋白合成;在状态 2(裂解状态)时,cro 蛋白占优势地位,这时只有 cro 蛋白合成,而没有阻遏蛋白合成(图 8-84)。这两种蛋白质中的这一种或另一种占优势时又进一步控制另外一组基因,结果是,在稳定整合的噬菌体中大部分 DNA 是静止于状态 1,而在状态 2 时却大量转录、复制、装到新的噬菌体外壳中去,直到最后通过宿主细胞的裂解而释放出来。

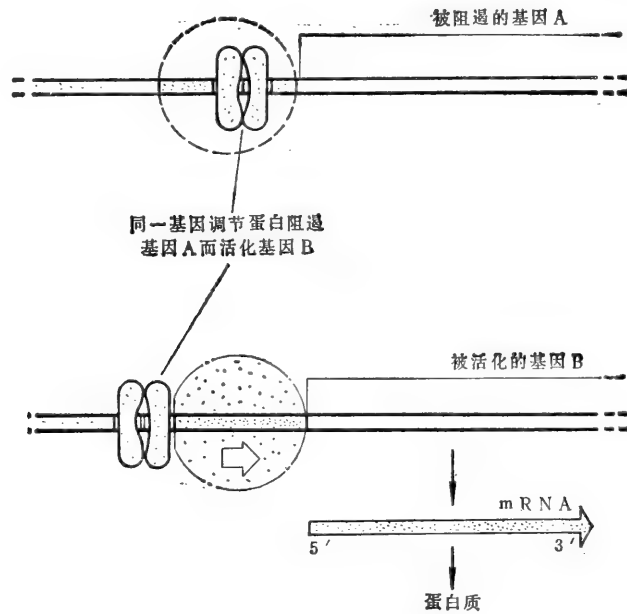


图 8-83 示意图表明单个基因调节蛋白与 DNA 结合可以阻遏基因 A 的转录而活化基因 B 的转录。细菌中有些基因调节蛋白就具有这样的双重功能。

入侵的 λ 噬菌体所采用的生长方式并不是随机决定的。例如,当宿主细菌生长得好时,病毒往往采取状态 1,让病毒 DNA 与宿主染色体一起迅速增殖。另一方面,当整合病毒处于有病的细胞中时,就从状态 1 转变成状态 2,以便在细菌细胞质中繁殖,并迅速地离去。

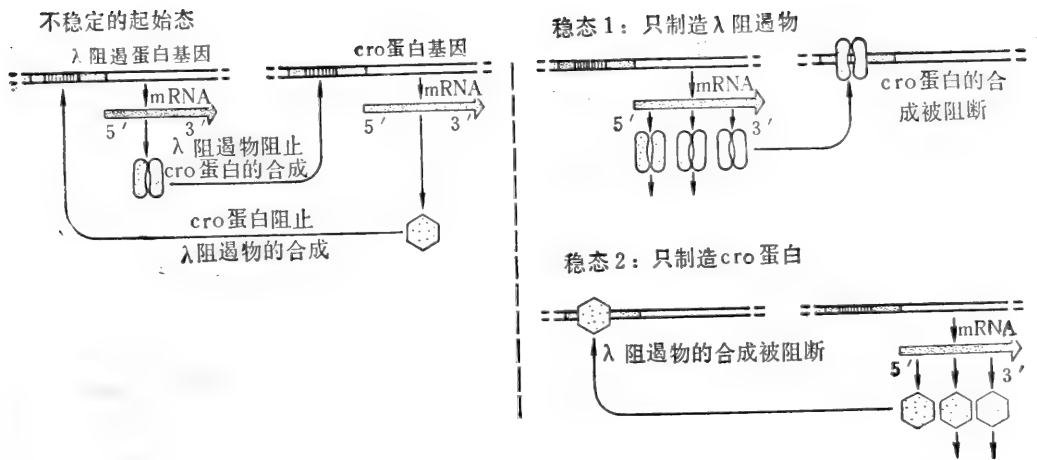


图 8-84 决定 λ 噬菌体在大肠杆菌宿主细胞中的生长方式的开关样调节系统的简化图。在状态 1 (溶源态) 时, 有大量的 λ 阻遏蛋白合成。这种基因调节蛋白关闭其他几种噬菌体蛋白的合成, 其中包括 *cro* 蛋白。因此, 病毒 DNA 整合到大肠杆菌染色体中, 随着细菌的生长而自动复制。在状态 2 (裂解态) 时, 有大量的 *cro* 蛋白合成。这种基因调节蛋白关闭 λ 阻遏物的合成。结果在大肠杆菌细胞中制造出多种噬菌体蛋白, 而病毒 DNA 得以自由复制, 最终形成许多噬菌体颗粒并杀死细胞。

在真核生物中可能是利用同时作用于许多基因的基因调节蛋白的不同组合而产生不同组织的

从 λ 噬菌体学到的重要知识是, 只要有几种基因调节蛋白通过相互影响彼此的合成和活性就可以得到一种非常复杂的行为模式。从可供真核生物利用的基因调节因子的数目来看, 基因调节的可能性是多得不可胜数的。

对于在复杂的多细胞真核生物发育过程中使大量基因按照次序开关的分子机理, 目前还几乎一无所知。但是, 对于有关的控制过程的性质, 还是可以从某些对胚胎发生过程有明显影响的基因突变推断出来。尤其是, 果蝇中有许多单基因突变会使身体的一个部分变成另一个部分, 这方面的情况将在第十五章中详细讨论。例如, 一种叫做触角足的突变会使正常情况下要生成一个触角的整个细胞群不形成触角而转为形成一条腿, 结果产生一个在其头上长出一条腿的果蝇 (第十五章)。造成这种全面转化的突变类型叫做同源异形突变型。我们假定这些突变基因所编码的蛋白质是主基因调节蛋白, 每种蛋白质都通过一种可能与 λ 阻遏物和 *cro* 蛋白相类似的控制方式来控制大量的其他基因, 只不过这种控制的规模更大一些 (图 8-85)。

果蝇中同源异形突变型的显著特征是, 通过干扰单基因产物的作用不是形成一团无定形的组织, 而是形成另外一种复杂的结构。这个现象启示, 果蝇中大量不同组织的组合是通过为数不多的主基因调节蛋白的不同组合而产生的, 还有些观察也支持这种看法 (见第十五章)。由于缺少一种基因调节蛋白 (辜酮受体蛋白) 使一个基因型为男性 (XY) 的人发育成几乎完全像女人这种现象 (707 页) 表明, 在哺乳动物中, 包括人在内, 情况可能也是如此。正如我们在下面马上就要讨论的, 这种组合式的基因调节方式可以使复杂生物通过为数较少的主基因调节蛋白的作用而得以发育生长。

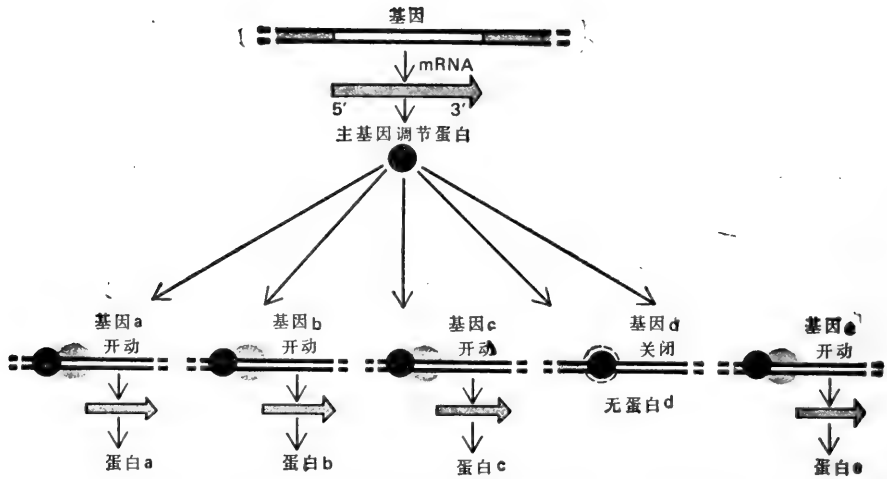


图 8-85 示意图说明, 如何“决定”一种能影响细胞中许多不同蛋白质产生的主基因调节蛋白是否产生。

原则上, 少数基因调节蛋白的不同组合可以有效地确定许多不同细胞类型”

在图 8-86 中说明了组合式基因调节方式的要点, 图中每个编码的因子代表由不同控制基因制造的一种调节蛋白。在这个纯属假设的图中, 一个初始细胞类型产生两种不同类型的细胞, 用 A 和 B 来表示, 它们仅仅在能否制造基因调节蛋白①这一点上有所不同。这种差异类似于 λ 噬菌体的两种状态, 后者取决于是否有 λ 阻遏蛋白的产生。其中每种细胞在随后的发育过程中, 先是在某些细胞中又产生基因调节蛋白②或③, 后来又产生基因调节蛋白④或⑤。最后, 由 5 种不同的调节蛋白产生了 8 种不同的细胞类型(由细胞 G 到细胞 N)。

在图 8-86 中所示的系统中再加(⑥和⑦)两个基因调节蛋白, 那么就可可在下一步产生 16 种细胞类型。如再经历 10 个这样的步骤, 原则上, 只要 25 种不同的调节蛋白就可以确定略多于 10 000 种的细胞类型。因此, 这种组合调节方式是非常有效的。此外, 它还可以解释果蝇的同源异形突变型。如果某次突变除去了一种基因调节蛋白, 而这种蛋白质在正常情况下是在发育早期出现的, 那么, 整个细胞群将被确定为另一类群。这时突变细胞所含的基因调节蛋白组可能正好与另一不同结构的细胞所含的一样, 因而相应产生了那一种结构。例如, 除去图 8-86 中的蛋白质①, 会使一个果蝇的触角变成一条腿。

启动一个基因需要从几种不同基因调节蛋白输入信息”

乍一看, 从刚才所讨论的组合式基因调节方式的图解似乎可以预测, 细胞 E 与细胞 B 的差异以及细胞 C 与细胞 A 的差异都是由于同一种蛋白质的有或无, 因为在这两对细胞中, 每对的差异就在于其子细胞中又加上调节蛋白②(见图 8-86)。但是即使在细菌系统中, 调节蛋白的作用也并不总是彼此独立无关的。在许多情况下, 要启动一个基因需要两种不同的调节蛋白的相互作用。已证明, 在高等真核生物中, 同一种基因活化蛋白(甾类激素受体蛋白)在不同细胞类型中启动不同蛋白质组合的合成。因此, 在发育中的细胞

里,由于诱导合成某一种基因调节蛋白而造成的基因表达的改变是不一样的,视该细胞过去的历史而定。

在图 8-87 和8-88中,说明了两种基因调节蛋白之间相互作用的许多可能方式中的两

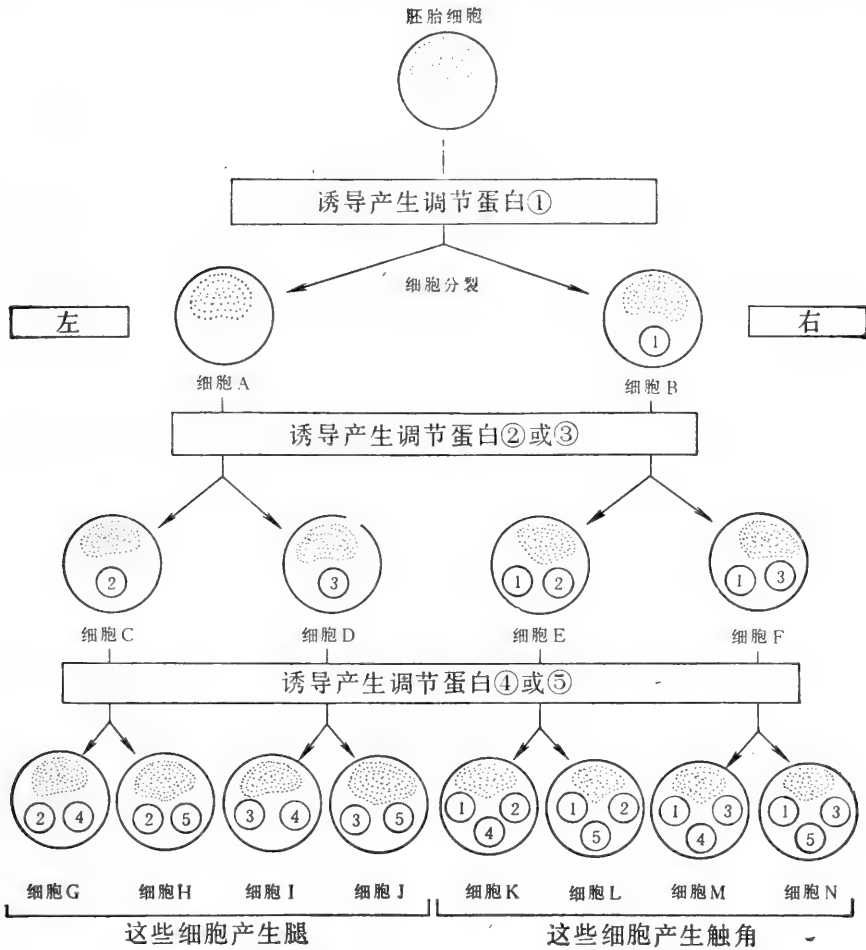


图 8-86 高度示意图说明胚胎中主基因调节蛋白的不同组合可产生许多不同细胞类型。在简化图中,每次细胞分裂后要“决策”制造一对不同主基因调节蛋白中的哪一种(编号的圆圈)。根据子细胞在胚胎场(embryonic field)中的相对位置,胚胎左边的子细胞(本页左边)总是诱导每对中的偶数蛋白质的合成,而胚胎右侧的子细胞总是诱导奇数蛋白质的合成。这种决策与λ噬菌体是制造λ阻遏物蛋白还是cro蛋白的决策类似(图8-84)。像λ噬菌体的决策一样,我们假定每种主基因调节蛋白的产生是自我维持的。所以,在扩大的克隆中的细胞所含的调节蛋白数量越来越多,而其中的每一种蛋白质都假定可控制一大群基因(见图8-85)。

种方式。这种类型的相互作用给基因调节机制带来极大的灵活性。

在细菌中, DNA 的超螺旋化有利于基因的转录⁴⁶

迄今为止,我们所关心的一直是基因阻遏蛋白和基因活化蛋白在细菌中是怎样发挥作用的,以及类似的蛋白质在真核生物中可能如何工作的问题。现在我们讨论另外一种完全不同的基因控制机制,已知这种机制在细菌细胞中是起作用的。这种调节机制利用

这样的事实：即位于启动基因部位的大约 10 个碱基对必须先分开，以便形成 RNA-DNA 碱基对，然后，RNA 聚合酶分子才能开始合成新的 RNA 链(见图 5-2)。要使这 10 个碱基对暴露出来，必须先解开一圈 DNA 螺旋，这就需要启动基因两侧的两个 DNA 螺旋区段相对旋转一圈(图 8-89 A)。

但是，已知细菌细胞中的 DNA 螺旋是折叠成一连环状 DNA 区域，所以每一个环中 DNA 螺旋的两端是相对固定而彼此不能相对旋转的。结果是，RNA 聚合酶分子每次开始合成新的 RNA 链的时候，就必须形成一圈 DNA 超螺旋，以补偿在 DNA 双螺旋中解开的 10 个碱基对(图 8-89 B)。由于 DNA 的超螺旋化使刚性的 DNA 螺旋弯曲，所以图 8-89 B 所示的过程在 DNA 中将产生张力使得它在能量学上处于比图 8-89 A 中的过程更不利的状态。因此，在没有补偿因子存在的条件下，发生在限制于环状区域内的 DNA 上的 RNA 合成要比发生在可以自由旋转的 DNA 上的为少。

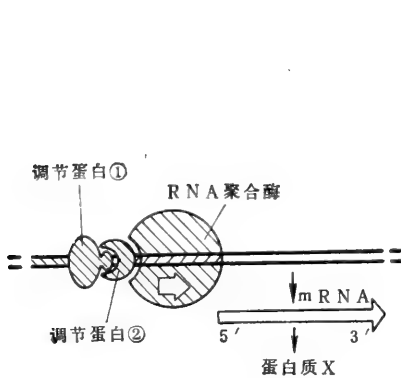


图8-87 图解示一种可能的机制,其中需要两种调节蛋白才能启动转录,最后合成蛋白 X。这里需要有蛋白质①与DNA 结合之后,蛋白质②才能结合。对于其它某些 DNA 序列,蛋白质①或者蛋白质②单独就能结合并启动转录。已知在原核生物中有这种类型的双重调节的明显例子。

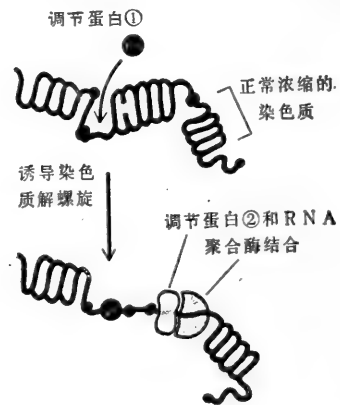


图8-88 图解与图 8-87 不同的另一种可能机制,也表示需要两种调节蛋白才能启动转录,以合成蛋白 X。这里需要有蛋白质①的结合使正常染色质结构去浓缩(或者以其他方式改变其结构)后蛋白质②才能结合。有证据说明,在真核生物中染色质结构的改变可以控制基因表达(见图 8-93)。

但是，细菌能够利用环状区域中没有自由旋转这一点来促进它们的 RNA 合成，而不是阻碍 RNA 的合成。一种叫做 DNA 促旋酶的细菌酶利用 ATP 水解的能量不断地将超螺旋泵送到 DNA 中，通过这种方式使每个环状区域保持在张力状态下。这些超螺旋是负超螺旋，它的旋转方向与 RNA 聚合酶结合时形成的正超螺旋相反。结果由 RNA 聚合酶造成的 DNA 区段局部解旋是除去 DNA 中的负螺旋，而不是加上正螺旋。因为超螺旋的张力在启动 RNA 合成时是减小了，所以这种合成在能量学上要比在没有超螺旋的 DNA 上进行 RNA 合成更为有利(图 8-90)。

假如在一段组成环状区域的 DNA 螺旋中有一缺口，那么就会在 DNA 中造成一次“转轴”，结果使得整个环中的超螺旋张力消失(见图 5-40)。由于要是没有这种超螺旋张力，细菌基因组上有许多启动基因序列就难以发挥功能，所以受损伤的环状区域内的 RNA 合成速率就会下降，只有等完全恢复成为一个完整的双螺旋时才能恢复。这种限制条件可能对细胞反而有好处，因为它往往可以使移动的 RNA 聚合酶分子不致妨碍其他

一些要在 DNA 上造成缺口的遗传过程,例如 DNA 修复、DNA 复制及遗传重组过程(见第五章)。

虽然细菌细胞中的大部分 DNA 通常都是保持在负超螺旋张力状态下,但是看来在真核生物细胞中,大多数 DNA 不是这种情况。不过,在特殊的环境下,例如,真核基

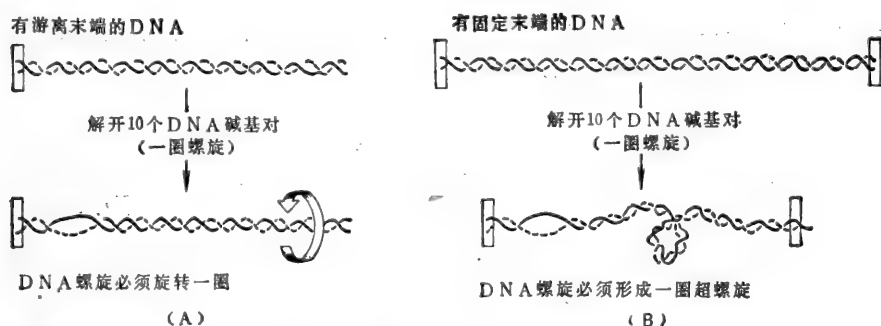


图 8-89 解开 DNA 螺旋开始转录时,沿着 DNA 螺旋传递的效应。(A)每解开 10 个碱基对, DNA 双螺旋要旋转一圈。(B)如果旋转不了,那么每解开 10 个碱基对就要在 DNA 双螺旋中形成一个 DNA 超螺旋。这里形成的超螺旋称为“正超螺旋”。

因活化,或者它的染色质结构发生改变的时候,染色质的个别环状区域有可能出现超螺旋张力(负的或正的)。我们将会看到,真核生物基因调节机制的深入研究还只是刚刚开始。

真核生物细胞中基因表达的调节包括一些在细菌中不曾发现过的控制类型

原则上,迄今为止所讨论过的全部基因调节机制在原核生物和真核生物中同样能很好地发挥作用。但是正如我们已经看到的,真核生物基因及染色体并不是和原核生物基因及染色体完全一样的。在真核生物中,组蛋白和 DNA 紧紧包装在一起形成染色质,而在形成 mRNA 时 RNA 要经历广泛的剪接,这两者是真核生物所独具的特点,对于调节具有特别重要的意义。

我们将先讨论紧密结合的染色体蛋白在真核生物基因表达调节中的作用。真核生物 DNA 是由组蛋白包装起来的,组蛋白一直与 DNA 分子结合在一起从不离开 DNA 分子,这就是说,真核生物 RNA 聚合酶必须对包装在核小体中的 DNA 进行转录。可是,大部分染色质纤维是高度浓缩的,因而大多数 DNA 是不能被接触到的(见图 8-40)。已有证据表明,某段染色质区域一定要先去浓缩,而后才能转录。这个条件似乎给真核生物中的基因活化过程增添了一个在细菌中不需要的额外步骤。

真核生物基因活化机制看来就是将整个基因中的染色质结构松开⁴⁷

一个证明活化基因中染色质发生选择性去浓缩的重要证据来自用胰 DNase I 处理分离的细胞核的实验,这种酶在高浓度时连核小体中的 DNA 都能降解。如果这种酶的浓度适中,并非所有的 DNA 都被消化,被降解的序列是 7% 左右或发生转录的那部分。而且在同一生物的不同细胞中,不同的 DNA 序列发生降解,其型式与细胞制造的 RNA 的不同模式是一致的。值得注意的是,即使在一个细胞世代中只转录了几次的基因,对

DNase I 也是敏感的,这表明,使这些区段变得非常易与酶接近的是染色质的特殊状态,而不是 RNA 转录过程本身(图 8-91)。

在电镜中通常是检测不出所谓活跃转录的核小体与不活跃的核小体之间的区别的。但是在某些昆虫的胚胎中却发现一个明显例外,那就是在活化的 rRNA 基因区段中有着看来并非珠状的染色质清楚地串连排列着(图 8-92)。因为这些基因依然包着组蛋白样蛋白质,所以有人提出,这是染色质中核小体已经被打开并形成伸展构象的区段。通常它在它核心周围包绕两圈的 DNA 已经解开,以便转录。

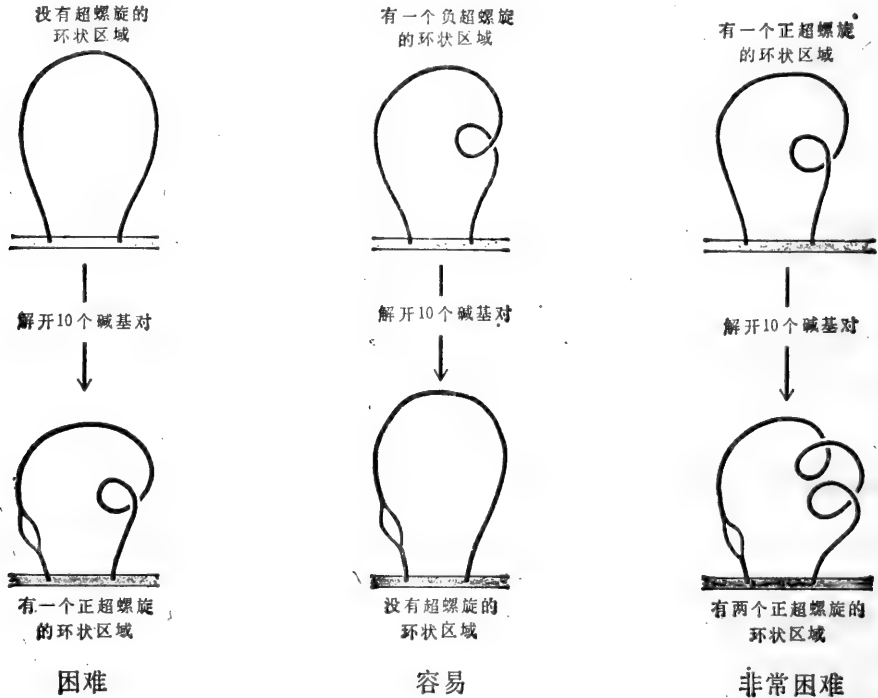


图 8-90 超螺旋张力对于在一个环状区域中打开螺旋的影响。细菌 DNA 中的环状区域是“负向超螺旋的”,这就使得 RNA 的合成的启动要比在没有超螺旋的染色体上的启动来得容易(见正文)。

活性染色质与非活性染色质之间结构差异的生化基础是什么?我们在前面论述核小体的章节中已经提到过这个问题。组蛋白 H1 与核小体结合帮助将它们包扎在一起,看来,组蛋白 H1 至少与某些活性染色质的结合不是那么紧密的,虽然四种核小体组蛋白的量还是与平常一样。第二个差异是,在活跃转录的核小体中,组蛋白好像特别高度乙酰化(370 页)。已经证明,在邻近核小体之间乙酰化程度的增加会降低它们在体外堆积在一起的倾向。所以,活性染色质对组蛋白 H1 亲和力的降低及其乙酰化作用的增加有助于使 30nm 染色质纤维转为珠状的构象。最后,活性基因的核小体选择性地与 HMG14 和 HMG17 这两种小而丰富的非组蛋白蛋白质结合(371 页),而且这些核小体似乎富含与泛素共价结合的组蛋白 H2A (见 370 页)。所有这些变化可能在活性基因染色质的解旋中起着重要作用。

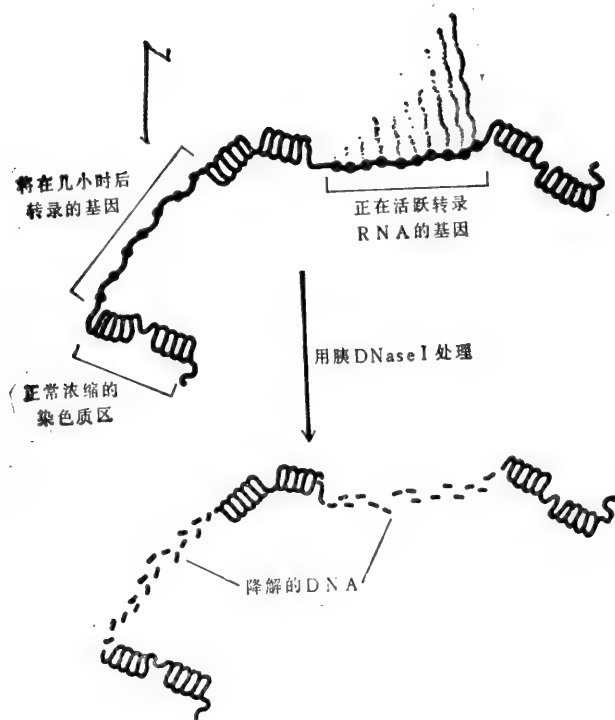


图 8-91 图解用胰 DNase I 对染色质进行温和消化, 这种酶选择性地降解正在活跃转录的以及具潜在活性的基因的 DNA。



图 8-92 昆虫胚胎的伸展开的染色质的电镜照片, 可以看到两个串联排列的 rRNA 基因的染色质结构的变化。在这些胚胎中, 好像在起始 rRNA 合成之前, 染色质由珠状变为非珠状。有人认为, 非珠状染色质是 DNA 已从核小体珠周围解旋下来准备转录的区段。(引自 V. E. Foe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:723—740, 1978)

真核生物基因活化可能是通过两个阶段进行的

在转录单位活化的细胞中, 转录单位中的所有核小体好像都变为活性形式。虽然我们对这个过程是怎么受到控制的还一无所知, 但是, 这里面一定涉及到一组与原核生物中的完全不同的特殊基因调节蛋白。这些蛋白质不仅必须识别染色质上的一个特殊部位(推测是一个 DNA 序列), 而且还要引起邻近染色质的结构变化, 这种结构改变的影响从识别部位开始平均至少要传到邻近的 40 个核小体去(8 000 个 DNA 碱基对), 或者是传遍整个染色质环状区域(见后)。然后, 已裸露的活性染色质区段中的特异基因的转录再由

目前已了解得比较清楚的类似于细菌的基因活化蛋白和阻遏蛋白的基因调节蛋白进行调节。所以,真核生物基因活化可能是通过两个阶段发生的;第一阶段,染色质结构发生改变使它去浓缩;第二阶段,在去浓缩染色质中的特定亚区中启动 DNA 转录(图 8-93)。

在多线染色体中环状染色质区域在转录时打开^{13,48}

在了解染色质结构之前很久,对果蝇幼虫唾液腺巨细胞多线染色体的研究就告诉我们,在基因转录的同时,DNA 的包装情况发生了很大的变化。我们已经介绍过这些染色体是如何由重复的染色体复制产生的 1024 条平行的染色单体组成的(见 381 页)。我们还讨论了一些证据,它们说明这些巨型染色体上的带在结构上相当于染色质环状区域,而在功能上则相当于一单个基因。现在我们将要讨论其因转录时个别带的生物化学和外貌特征又发生哪些变化。

蜕皮素,这种昆虫激素是控制果蝇多线染色体的基因活性的主要因子之一,它的量呈周期性地增加和减少,诱导转录那些编码昆虫幼虫每次蜕皮和化蛹所需要的蛋白质的各种基因。用 ³H 标记的放射性 RNA 前体尿苷短期标记细胞,再用放射自显影定位逐渐加长的 RNA 转录本,可以检出在任何时间中转录的区段(图 8-94 和 8-95)。这种分析表明,大多数有活性的染色体区段都发生去浓缩,并形成前面已简略提到过的明确的染色体胀泡。这些胀泡的超薄切片电镜检查表明(图 8-96),染色质 DNA 的浓缩程度要比 30 nm 染色质纤维中差得多。

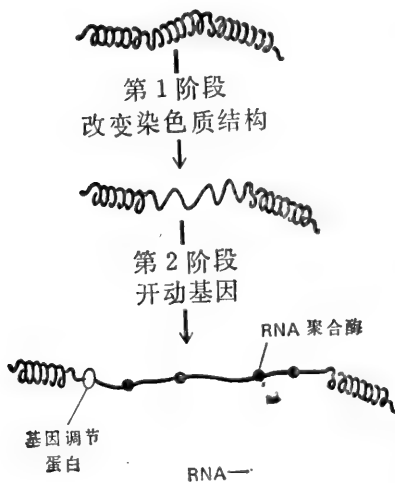


图 8-93 图解真核生物基因活化过程中两个阶段的一般性质。(A)在阶段1,改变染色质局部区段的结构准备转录。(B)在阶段2,基因调节蛋白与结构改变后的染色质上的特异部位结合,导致 RNA 合成。根据这个观点,原核生物中的转录只为真核生物基因调控过程的阶段 2 提供了一个模型。

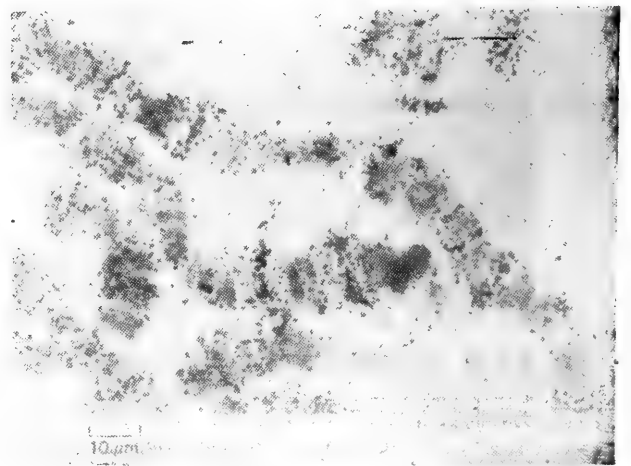


图 8-94 表示多线染色体上 [³H]尿苷掺入部位的位置的放射自显影照片。在染色质上伸展开来的区段(染色体胀泡)中可见粒子密度最高,表示这些就是 RNA 合成最活跃的场所。

随着生物通过不同的发育阶段,在转录单位相继发生活化和失活以及制造出不同的 mRNA 和蛋白质的时候,新的胀泡出现而老的胀泡消失(图 8-97)。在每个胀泡还相当

小,染色体带型还辨别得出的时候对胀泡进行观察,可见大多数胀泡都是由一条染色体带解旋而来(图 8-98)。一般认为,每条染色体带是由环状区域折叠起来形成的(图 8-28),因此这就表明,环状区域在转录时是作为一个单位而起作用的。

蜕皮素先与一种特异受体蛋白结合,再与染色质上特异部位结合,然后诱导 RNA 转录。染色体的免疫荧光染色证明,大多数可以被蜕皮素诱导形成胀泡的带至少有一种特异性非组蛋白是共有的。这种蛋白质可能协助染色质中的 DNA 折叠成蜕皮素受体蛋白可以识别的构象,因此是在图 8-93 中所示真核生物基因活化作用一般图解的第一阶段起作用的,如蜕皮激素受体蛋白本身则在第二阶段起作用。

胀泡形成可以具有“传染性”,这一有意义的现象与局部染色体去浓缩机制大有关系。这种传染性有赖于这样的事实,即存在于这些二倍体细胞中的两个同源的多线染色体通常是紧密配对的。有时两

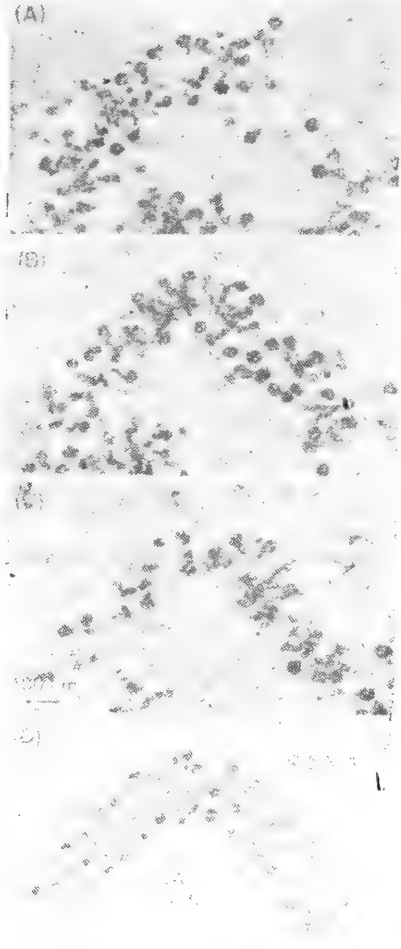


图8-95 大胀泡的放射自显影照片,标记同图 8-94,表示在有些情况下 RNA 合成只能在胀泡的部分区段中进行,而在胀泡中含有去浓缩染色质的其余部分看来未发生转录。(Jose Bonner 赠)

图 8-96 通过一个大染色体胀泡所作的连续超薄切片的电镜照片,表示一个突出的特长转录单位的构象。(C)中的短线为100nm,(D)为这个转录单位一部分的三维重建图,可以看到许多末端有球状突出的 RNA 转录本连在一条染色质纤维上。(引自 K. Andersson, B. Björkroth, and B. Daneholt, *Exp. Cell Res.* 130:313-326, 1980)

个同源染色体之一有一个缺陷基因,它对蜕皮激素没有反应,所以不能形成胀泡,而另一个同源染色体上的基因则是正常的。有些缺陷基因如与正常基因靠拢,则可被诱导形成胀泡(图8-99)。为了解释这些结果,有人提出每条带的结构就象一个小的晶体,一条带的染色质包装情况可以影响其同源带,其方式如同分子晶体指导形成更大晶体的情况。有可能由调节蛋白诱导发生的染色质结构局部变化会通过同样机制传播到整条染色体带。

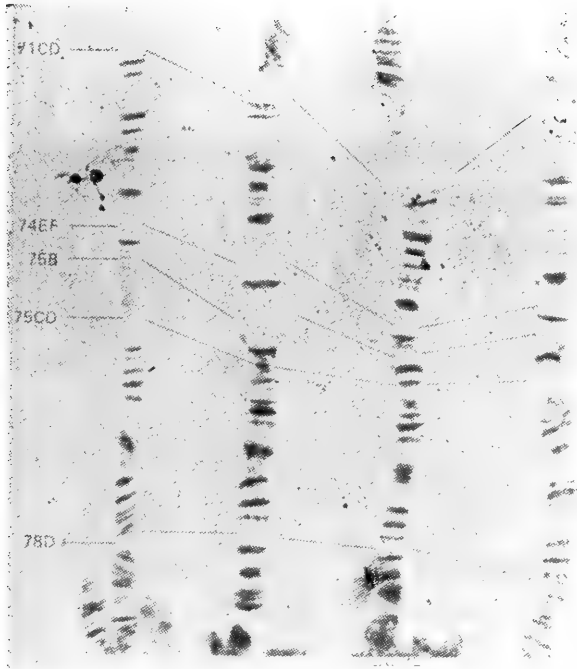


图8-97 时间系列照片,表示在黑腹果蝇多线染色体中胀泡出现和消失的情况。示出第3染色体左臂的一个区段,其上可见唾腺细胞中五个非常大的胀泡,在发育时期每个胀泡只活动很短时间(见横线)。这是22小时内发生的一系列变化,随着生物发育可以重复出现。(Michael Ashburner赠)

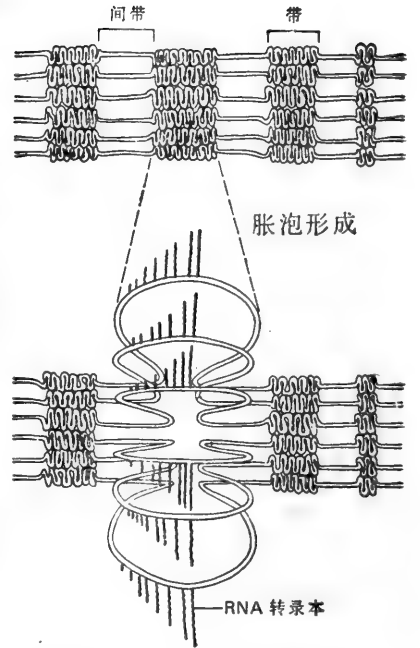


图8-98 多线染色体中胀泡形成过程的高度示意图

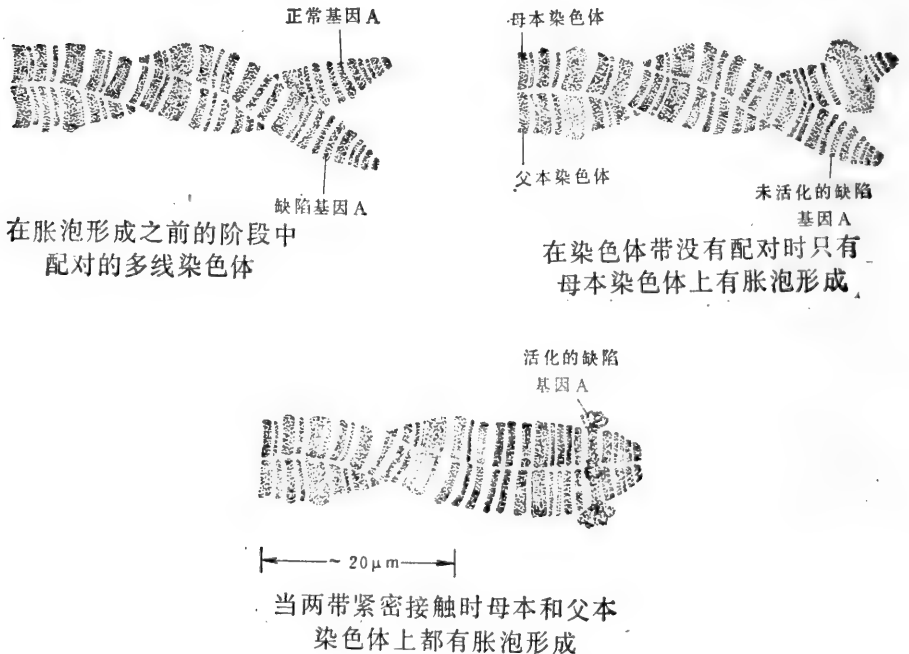


图8-99 果蝇多线染色体中看到的“感染性胀泡”现象

在伸展的环状区域中可以看到灯刷染色体的转录单位¹⁹

未成熟的卵或者卵母细胞是另一个可以看得非常清楚的活性染色体的材料。在卵母细胞分化的早期阶段,每条染色体复制,准备开始进行减数分裂。复制后的同源染色体配对形成一种总共含有四条染色单体组成的结构。这种结构可以持续几个月或者几年,此期间卵母细胞制造其最后发育成新个体时所必需的大量 mRNA 和其他物质(第十四章)。在这期间,减数分裂的配对染色体常常伸展开, RNA 合成非常活跃。这种活动伴随有长染色质侧环的伸展,侧环上包覆着由新转录的 RNA 组成的致密 RNA-蛋白质复合物。这些所谓的灯刷染色体虽然既非多线,也不是特别地浓缩,但在光学显微镜下却是可见的(图 8-100)。由于两栖动物的灯刷染色体特别大,所以自从它们在 19 世纪末被发现以来,研究得最为详细。灯刷染色体的组织结构见图 8-101。

转录活动的型式在侧环与侧环之间是不一样的。许多侧环是从一端到另一端连续转录的,因此,从一端向另一端逐渐增粗,侧环的细端含有最短的 RNA 转录本。其他一些侧环是不连续转录的,其中一个转录单位在开始转录,而另一个转录单位则结束转录,所以,在侧环的整个长度上是粗细不一的。而有些侧环中还有根本不转录的染色质区段(图 8-102)。染色质的大部分不在侧环中,而是浓缩于染色粒中;一般这种染色质是不转录的。

象多线染色体上的可发生胀泡的带一样,灯刷染色体侧环相当于去浓缩并在活跃转录的染色质折叠单位。核酸杂交实验证明,一定的侧环总是含同样的 DNA 序列,而且在卵母细胞生长过程中它们始终是同样地伸展着。

从某些方面来看,灯刷染色体上的转录活动型式并不代表一般体细胞的特征。第一,所有的侧环都在非常活跃地转录,有许多还形成非常长的转录本。其次,一般认为在正常细胞中不转录的高度重复 DNA 序列,却在有些灯刷侧环中发生转录(图 8-103)。最后,

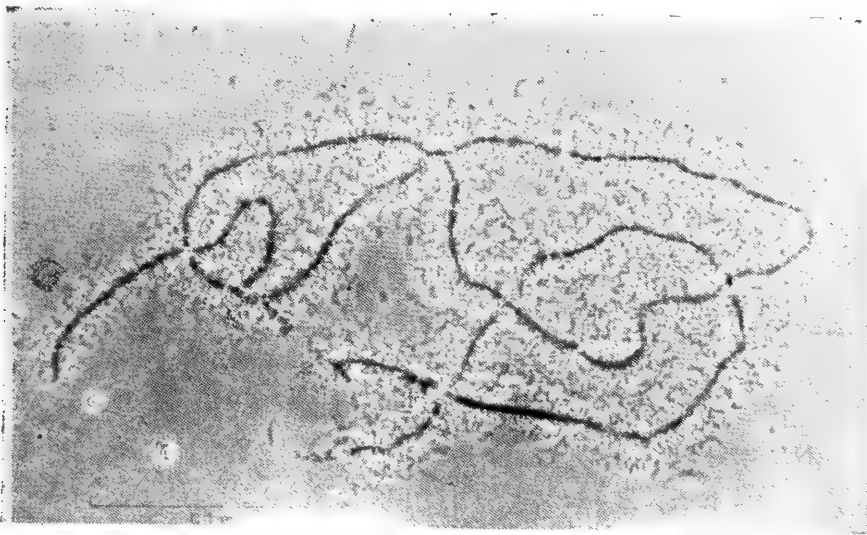


图 8-100 两栖类卵母细胞中见到的高度伸展的灯刷染色体的光学显微照片
(Joseph G.Gall 赠)

至少在非洲爪蟾中，由于为卵而贮藏的 mRNA 分子在灯刷染色体还没有达到最大和最活跃的时期之前就已制造好了，所以灯刷染色体的大多数庞大的转录活动似乎并未导致产生 mRNA。因此，大部分活动的功能还是难以理解的，而且这可能只是卵母细胞所特有的现象。然而即使这种转录活动型式是卵母细胞所特有的，但伴随着个别侧环的转录活动而出现的

选择性去浓缩现象却支持这样一种看法：即侧环染色质区域是所有染色体中的功能单位。

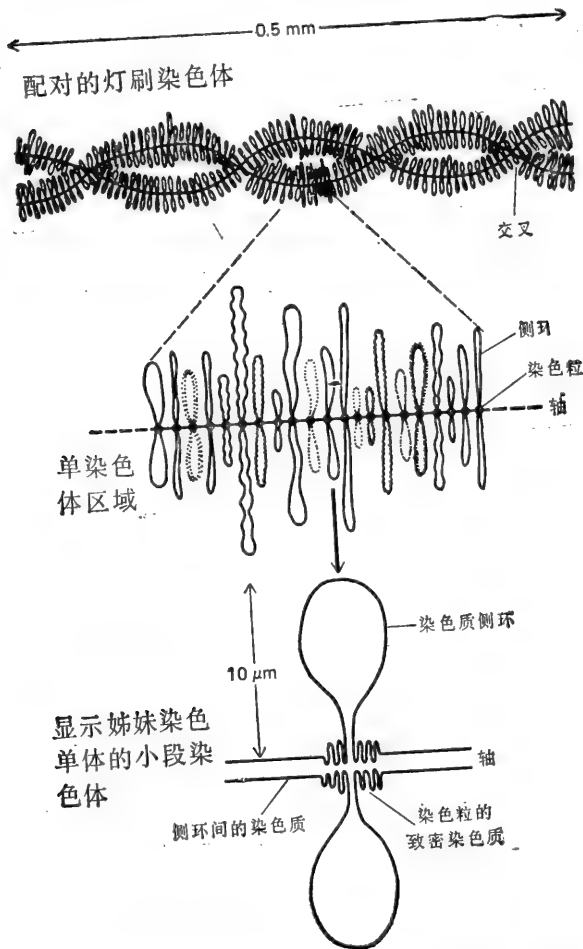


图8-101 灯刷染色体结构图。据估计，在许多两栖动物中，灯刷染色体组总共含有约 10 000 个不同的染色质侧环，其余 DNA 高度浓缩存在于染色粒中。注意，每个侧环相当于一个 DNA 序列，而每个侧环在一个细胞中有四个复本，这是因为上图所示结构由两条配对的同源染色体组成，而每条染色体又由紧密并排的两条姊妹染色单体所组成。这种四线结构是处于这个发育阶段的卵母细胞所特有的（减数分裂双线期见第十四章）。

5' 端附近的 RNA 剪接方式。

借改变 RNA 的加工方式来进行调节，这不会只限于对抗体合成的控制。已经证明在另外一些情况下，同一生物中两种不同类型细胞可以从同一基因制造出不同的初级 RNA 转录本。甚至在同一细胞中，从一定区段来的某些转录本的长度与其余转录本的不同，这是由于所形成的初级转录本有不同的 5' 端和 3' 端。在许多这类情况下可以预期，通过 RNA 剪接会产生改变了的 mRNA 分子，而它又编码出不同的蛋白质。

这些以及其他观察表明，在发育期间起作用的基因控制过程不仅决定了一定 DNA 序列的转录速率，而且还确定了初级转录本中 5' 帽子和 poly A 序列的位置。这些末端又影响随后的 RNA 加工，因此也就可以使合成的蛋白质结构发生变化。因而，有关

改变一个初级 RNA 转录本的两端可以改变它制造的蛋白质^{26,50}

考虑过真核生物染色质结构对基因活性的一些影响之后，我们现在转向讨论 RNA 剪接的重要意义，这也是真核生物所特有的。我们已经在前面讨论过，RNA 加工的改变可以介导由合成膜结合抗体分子转换为合成分泌抗体分子（图 8-49）。在那种情况下，抗体分子的羧基末端部分被一个完全不同的氨基酸序列所替代，这是因为在初级 RNA 转录本 3' 端加 poly A 的地方发生了改变而引起的 RNA 剪接方式的不同。蛋白质氨基末端原则上也可通过类似方式发生改变，即改变转录起始部位，导致改变在转录本的

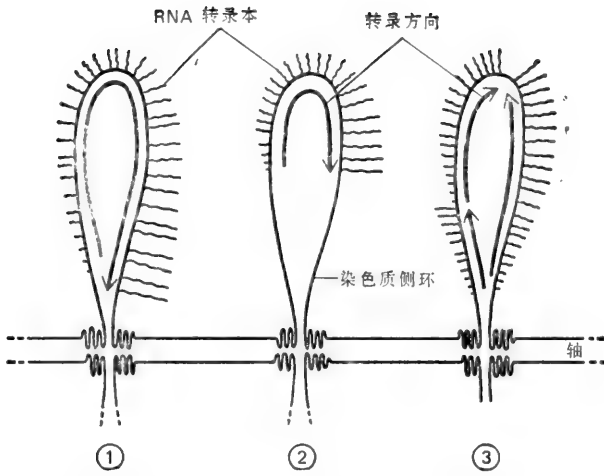


图 8-102 电子显微镜检术检出的灯刷侧环形态的几种类型

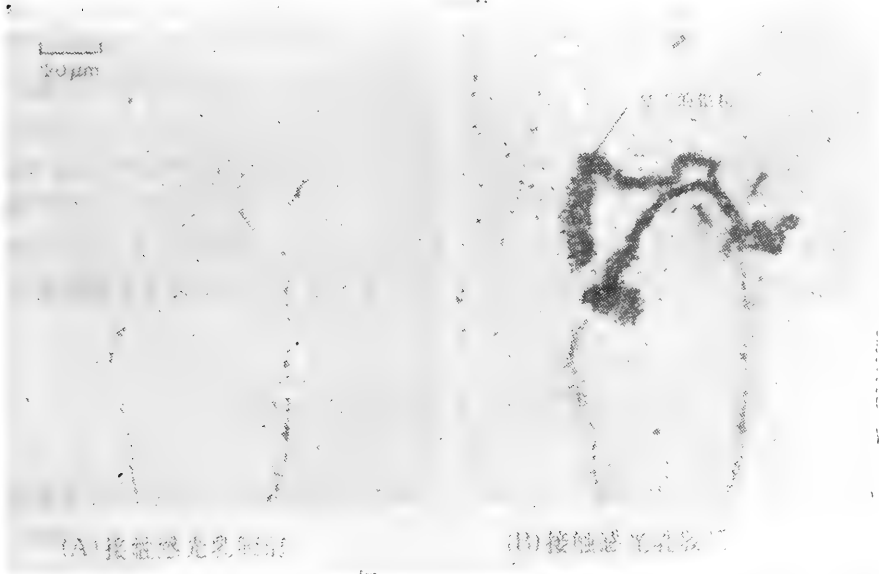


图 8-103 利用核酸杂交技术来证明两栖动物灯刷染色体上的特殊转录情况。制备对应于某一高度重复 DNA 序列的单链 DNA 探针,并标上放射性。在(A)中使染色体与这个探针结合,充分洗涤,然后进行放射自显影(B)。照片中显示放射性的伸展侧环正在合成非常长的 RNA 转录本,它上面含有几个成簇组蛋白基因的拷贝。这些长的 RNA 转录本能与 DNA 探针杂交的事实证明,探针中的重复 DNA 序列已转录到 RNA 中,但是在其他细胞中,这种序列只不过是组蛋白基因间的不转录间隔区。(引自 M. O. Diaz, G. Barsacchi-Pilone, K. A. Mahon, and J. Gall, *Cell* 24:649-659, 1981)

DNA 转录在哪里开始和在哪里结束的决策至少对基因区段的功能来说,是与它的转录速率一样重要的。

RNA 加工和输出的特异性变化也起重要控制作用吗？

初级 RNA 转录本的平均长度似乎至多比 RNA 剪接产生的成熟 mRNA 分子长 10 倍。但是，制造出的 hnRNA 的总量中只有 1/20 离开细胞核（见 393 页）。所以简单的计算表明，有相当一部分（或许一半）初级转录本在细胞核中就全部降解了，从未产生输出的 mRNA 分子。被丢弃的 RNA 可能就是那些其序列不能转入 mRNA 分子中的 RNA。而其中有些可能就是大量的储备 mRNA 分子，它们只在其他细胞类型中经过适当加工才成为 mRNA。在这种情况下，RNA 的直接加工和输出控制对于细胞发育来说是重要的。例如，不同类型的 RNA 剪接酶可以在不同类型的细胞中起作用，由同样的初级 RNA 转录本制造出不同的 mRNA。但是我们已经介绍过，测验肝细胞和脑细胞中这种控制的结果是负的（见 421 页），而且迄今为止，还不曾发现过明显的例证。

小结

特化的高等真核生物细胞由于它们制造不同的蛋白质而相互有异。作为这些差异基础的基因表达控制好象是在 DNA 转录水平上发生作用的。在原核生物中，基因调节蛋白与靠近 RNA 聚合酶起始部位的特异 DNA 序列结合并借此来阻遏或活化邻近基因的转录。据认为，在高等真核生物中，基因表达的控制是依靠为数不多的主基因调节蛋白。它们通过一种组合方式的相互作用来确定大量的不同细胞类型与组织类型。原则上讲，一套交互作用的原核细胞型的基因调节蛋白就可以导致不同的可自我维持的选择性基因活动型式，从而也就解释了真核生物细胞发育所特有的基因表达的克隆遗传。但是大多数真核生物基因调节蛋白的真正作用机理还不知道，而有些机理好像肯定要比原核生物中的复杂。尤其是，真核生物基因的染色质必须去浓缩后才能转录，一般认为，使染色质结构发生改变的基因调节蛋白是在另外一个重要水平上控制真核生物基因表达的基础。

基因调节机制与细胞“记忆”

在高等真核生物细胞中，某种基因调节型式一旦确定，就往往在以后的各个细胞世代期间都保持不变。换言之，基因在一个克隆内的所有子细胞中有“开则恒开和关则恒关”的强烈倾向。这种细胞“记忆”是不能单靠永久结合在 DNA 中控制部位上的基因调节组分来维持的，因为这样一种机制不能提供持续许多细胞世代的记忆。如果要使分化状态能永久地遗传下去，子细胞就必须能得到亲代细胞中存在的调节组分（或者调节组分组）的新拷贝。所以这种调节组分本身一定是在每个细胞世代中重新制造的。其一般规则是，“如果这个基因调节组分原来就有，那么就再合成一个相同的；如果原来没有，那末就不要合成”。换言之，控制基因调节的因子也必须同时以正反馈的方式来控制其本身的生产。正是这种正反馈环才赋予系统以记忆。

我们已经论述过 λ 噬菌体中的这样一种细胞记忆系统，它涉及到两种基因调节蛋白，这两种基因调节蛋白与 DNA 上操纵基因部位结合，并相互阻遏彼此的合成（见 426 页）。在这一节中，我们将概述其它几种基因调节系统，推测起来，这几个系统在高等真核生物

细胞中协助基因表达型式的稳定遗传。我们开始先回顾一下染色质结构在控制真核生物基因表达方面的作用。

间期染色质的高度浓缩部分含有特殊失活的基因

我们已经看到,染色质环可能代表一种功能单位,它们的转录活性需要某种类型的组蛋白和非组蛋白的协助,这些蛋白质帮助染色质去浓缩,从而使它的 DNA 可以与其他基因调节蛋白,或者与 RNA 聚合酶本身接触。镜检只能在灯刷染色体和多线染色体中在单个侧环的水平上检出染色质浓缩状态的差异。虽然在其他类型细胞的普通染色体中也可以看到这种差异,不过那只是在染色质的更广泛的区段上看出差异。根据在显微镜中的外观,可将高等真核生物中的染色质分为两大类:浓缩染色质或称异染色质,以及不那么浓缩的染色质或称常染色质。

因为异染色质在间期还是浓缩的,看上去仍保持染色质其余部分仅在有丝分裂时才表现的那种结构类型,所以它开始时是用光学显微镜鉴定出来的。后来发现,象有丝分裂

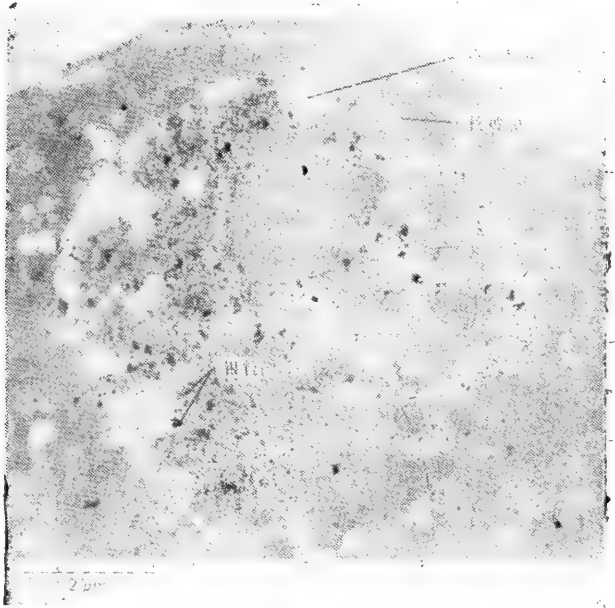


图 8-104 细胞核超薄切片的放射自显影图。细胞核取自曾用 $[^3\text{H}]$ 尿苷脉冲标记以标出 RNA 合成部位(银粒)的细胞。白色区域为异染色质区,它倾向于堆积在核被膜内表面。由于样品制备的特殊方法,含异染色质的区域已脱色。大部分 RNA 的合成发生在靠近这些异染色质的常染色质上。(Stan Fakan 赠)

染色质一样,异染色质无 DNA 转录活性:用放射性 RNA 前体与细胞一起培养,然后放射自显影,证明大量 RNA 是在广大的常染色质区中合成的,在异染色质中是没有标记的(图 8-104)。

异染色质中的 DNA 是在每个细胞周期 S 期的晚期才复制的(见 613 页)。这可能反映了它特别浓缩的状态,因为每个 DNA 复制叉附近的染色质线都需要局部去浓缩。异染色质与常染色质间差异的生化基础还不清楚。

异染色质可以分为两个亚类⁵¹

一般认为,在大多数细胞中,90%左右的染色质无转录活性(见394页)。虽然这些无活性染色质要比仅占7—10%的在有转录活性区段中的染色质具有更浓缩的构象,但其中只有一部分是包装在具有高度浓缩构象的异染色质中。所以异染色质是转录上无活性的染色质中的一个特殊类型,可以认为,它所含的基因在细胞及其所有子代中是永久关闭着的。某些染色体区段在一切细胞中都浓缩成异染色质,这些就叫做生物的结构异染色质。其它区段只在有些细胞中浓缩成异染色质,而在另一些细胞中则不浓缩,这些区段为细胞的功能性异染色质。

一般认为,结构异染色质的DNA在任何细胞中是从不转录的、是即使在高度浓缩的有丝分裂染色体中也可以与正常染色质相区别的唯一类型的染色质。在人染色体中,它位于每条有丝分裂染色体着丝粒的周围,用特殊染色方法可以看到它是一些染色深的带(图8-105)。在其他某些哺乳动物中,结构异染色质呈带状分散在整条染色体各处,在有些情况下甚至组成染色体的一整条臂。间期时,结构异染色质区可以聚集形成染色中心。在哺乳动物中,这种染色中心的数目和排列随细胞类型及发育阶段而异。

结构异染色质的大多数区段中含有比较简单的串联重复的DNA序列。由于历史上的原因,把这些高度重复的序列叫做卫星DNA(见452页)。虽然有些卫星DNA在减数分裂染色体配对时好象有一定作用,但是在其它方面,例如它们的功能以及它们在间期形成的浓缩染色质结构的功能都还不清楚。

功能性异染色质的意义比较明显。它几乎无疑地反映了不同细胞类型遗传活性方面的一些稳定差异。在不同的细胞中,功能性异染色质的总量相差很大,在胚胎细胞中好像非常少,而在高度特化的细胞中却有很多。这表明,随着细胞发育的进行,永久失活的基因越来越多,它们被包在一种浓缩形式的染色质中,不再能与基因活化蛋白接触。功能性异染色质中不含大量高度重复的DNA序列,在有丝分裂染色体中也无法用染色区分出来。所知道的关于功能性异染色质的情况大多来自对雌性哺乳动物细胞中一条X染色体的失活现象的研究。

一条失活的X染色体是可以遗传的⁵²

雌性哺乳动物的所有细胞都有两条X染色体,而雄性细胞有一条X染色体和一条Y染色体。可能因为双份的X染色体产物是致死的,所以雌性细胞发展了一种使每个细胞中两条X染色体有一条永久失活的机制。在小鼠中,这种失活发生在发育的第3天至第6天,那时每个细胞的两条X染色体中的这一条或者那一条随机地浓缩成为异染色质。在光学显微镜下看,间期时这条致密染色体位于靠近核膜的地方,成为一种叫做Barr氏小体的特殊结构。它在晚S期复制,它的大部分DNA在任何子细胞中都不转录。因为失活的X染色体是如实地遗传下去,所以每个雌体是一个由细胞克隆群所组成的嵌合体,在大致一半细胞中只有从父本遗传下来的X染色体(X_p)有活性,而在另一半细胞中只有从母本遗传下来的X染色体(X_m)有活性。一般在成年动物中,表达 X_p 的细胞和表达 X_m 的细胞是成簇分布的,这反映了这样一个事实,那就是在胚胎发育和生长期姐妹细胞往往保持近邻的关系。例如,在皮肤上可以检测出特别大片的含有来自早期胚胎同一

细胞的子代的皮肤(图 8-106)。

虽然还不知道 X 染色体的浓缩是如何发生的, 但已经知道浓缩有沿着染色体从一个区域扩散到另一个区域的倾向。用突变型动物所进行的研究证明了这一点, 该动物的一条 X 染色体与一条常染色体(非性染色体)的末端连接在一起了。在突变染色体中, 靠近失活 X 染色体的常染色体区往往也浓缩成为异染色质, 所以它们所含基因的失活也是可遗传的。这表明, X 染色体失活现象与染色质结晶过程相类似, 它也是从 X 染色体上某一核晶位点扩散开来的。这种特别紧凑的染色体结构一旦随机地在两条 X 染色体中的一条上形成, 它在该染色体以后复制时忠实地遗传下去(图 8-107)。

真核生物基因的关闭可能是通过一种全新的可遗传机制来实现的^{52,53}

一般的基因控制机理(例如, 像细菌中那种可扩散的基因调节蛋白的作用)是不能解释 X 失活现象的遗传, 因为活性 X 染

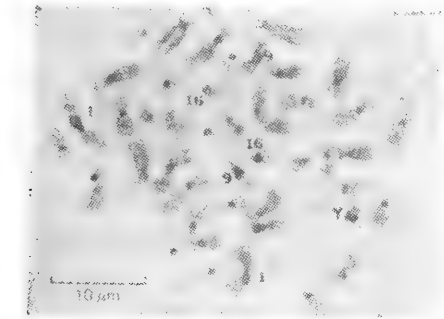


图 8-105 人中期染色体, 用特殊技术染色使结构异染色质变黑。数字和字母用来给特异染色体标号。

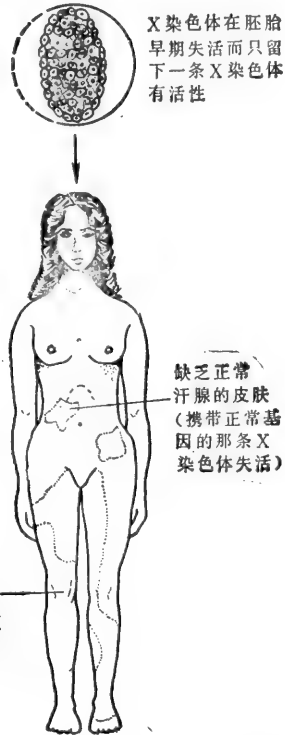


图 8-106 携有一条正常 X 染色体和一条突变 X 染色体的妇女的皮肤基因表达型式。在任一单个细胞, 只有正常或突变 X 染色体中的一条是有活性的。突变 X 染色体携有能引起一种称为无汗性外胚叶性发育异常的皮肤病的基因。其表征为汗腺的缺陷。这些有缺陷的皮肤是斑块状的, 表明起源于单一细胞克隆, 在这些细胞中带有正常基因的那条 X 染色体是失活的。这些克隆之所以如此, 是因为失活 X 染色体一旦发生失活之后就能在其所有的子细胞中如实地遗传下去(见图 8-107)。

色体和失活 X 染色体上同样的 DNA 序列在同一细胞核中所受的调节完全不同。一种可能性是, 失活 X 染色体的特殊染色质结构在 DNA 复制时靠着随亲代核小体带过来的结构信息直接从亲代 DNA 螺旋传到子代 DNA 螺旋(见 615 页上的讨论)。下面我们将会看到, 任何与染色质协同结合且不开 DNA 的染色体蛋白质都可能遗传, 并同样能很好地起这种作用。我们还将探讨真核生物中这种直接遗传的基因表达状态的其他几种可能的解释。

不管它的分子基础如何, 将个别基因组区段包装在异染色质中显然是一种细菌所不能利用的遗传调节机制。这类真核生物所独有的基因调节方式的主要特征是, 基因态的稳定记忆是贮存在直接遗传的染色质结构中, 而不是贮存于能在细胞核中到处扩散的自我调节的基因活化蛋白的稳定反馈环之中。使这些大片染色质失活的机理是否也在个别

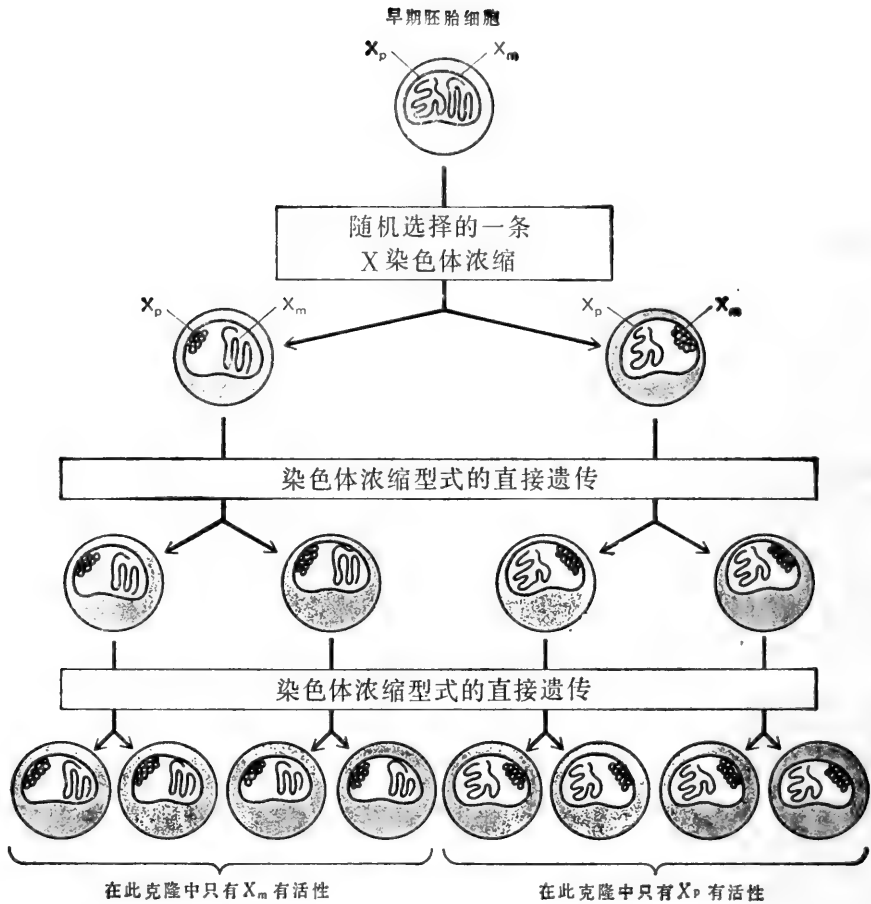


图 8-107 图解雌性哺乳类动物中浓缩的失活 X 染色体的克隆遗传

染色质环状区域的水平上发生作用,还不清楚。

原则上协同结合的基因调节蛋白簇是能直接遗传的

曾提出过好几种比较简单的基因调节机理来解释高等真核生物中基因调节的遗传型式,这些机理也能解释我们刚才讨论的无活性浓缩染色质的遗传。

其中一个解释系假设有一种基因调节蛋白,它存在多个拷贝,这些拷贝协同结合到染色质的特定部位上去(例见图 8-7)。如果这簇基因调节蛋白在 DNA 复制时仍然结合在 DNA 上,那末通过遗传每个 DNA 子螺旋会获得一部分。因为蛋白质结合是协同的,所以该簇中遗传下去的部分可以与另外的游离蛋白质单体结合,由此恢复到簇的原来大小。这样,基因的调节态就可以通过其染色体结合蛋白直接遗传下去(图 8-108)。原则上,这些直接遗传的蛋白簇能以稳定的方式使一个基因开或关。目前还没有证明这种基因调节机理的例子,由于要进行合适的实验性测试是困难的,所以这些图式还不能验证。

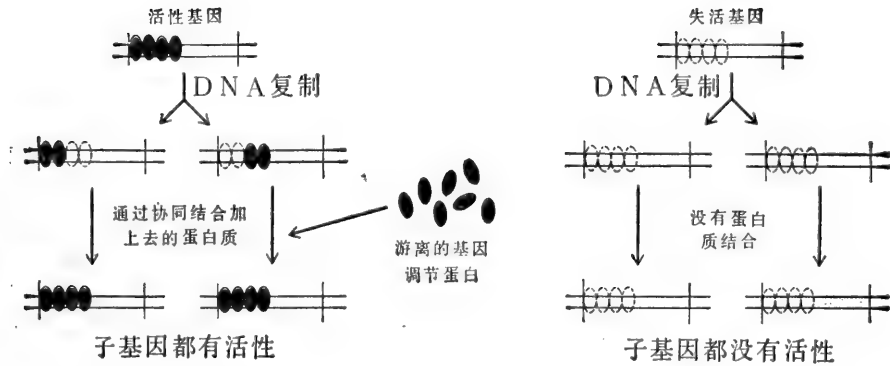


图 8-108 DNA 复制时基因表达态直接遗传的一般图解。按照这个假设的模型，协同结合的基因调节蛋白簇有一部分直接从亲本 DNA 螺旋传递到子 DNA 螺旋。每个遗传下去的簇使得每个子 DNA 螺旋与同样基因调节蛋白的另一些拷贝相结合。但因为这是一种协同的结合(见图 8-7)，所以从缺乏这种结合基因调节蛋白的同一个亲本 DNA 螺旋合成 DNA 将依然没有这种蛋白质。要是结合的基因调节蛋白是起关闭基因转录的作用，那末直接遗传的是无活性基因态，这就象正文中所讨论的 X 染色体失活的情况一样。这种类型的结合基因调节蛋白还有一种是开启基因转录的；在那种情况下，直接遗传下去的是活性基因态，正像这里所示的那样。

DNA 甲基化型式的直接遗传有助于调控某些哺乳动物基因⁵¹

在哺乳动物细胞中唯一已经有一些直接证据并能够解释细胞记忆的基因调节机理就是 DNA 甲基化。包括人在内的许多高等真核生物 DNA 中都含有少量的 5-甲基胞嘧啶，它们是 DNA 双螺旋中的胞嘧啶碱基通过甲基化形成的(图 8-109)。已知这种甲基化是自动遗传的，这是因为哺乳动物细胞中使 DNA 甲基化的酶有特殊性质的缘故。这种酶似乎存在两种限制条件：一个是，它主要只能使 CpG 序列中的 C 碱基甲基化；第二是，CpG 序列必须与已经甲基化的 CpG 序列进行碱基配对。因此，已有的 DNA 甲基化方式直接通过 DNA 复制遗传下去(图 8-110)，一段对于基因活化来说是重要的 DNA 或以甲基化形式、或以非甲基化形式通过重复的细胞分裂而稳定地保持下去。

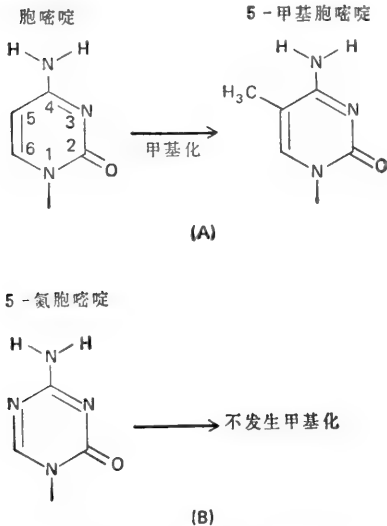
一般说，无活性基因 DNA 往往要比活性基因 DNA 的甲基化程度高。而且在好几种情况下已经证明，含甲基化 DNA 的无活性基因在基因活化之后，它的 DNA 就不甲基化了。但是，这些观察却不能排除这样的可能性，即 DNA 甲基化的减少是基因活化的原因，而不是其结果。证明甲基化改变起着主导作用的最好证据来自将含有 5-氮胞嘧啶这种碱基类似物(图 8-109)的核苷短期加到组织培养细胞中的实验。5-氮胞嘧啶是不能甲基化的，它掺入 DNA 后就会降低 DNA 甲基化的普遍水平。可以看到，如果细胞经过这种方式处理后，特定的无活性基因就活跃地转录起来，与此同时，还吸取非甲基化的胞嘧啶残基。因为在没有 5-氮胞嘧啶存在的情况下，活性基因态一般能维持很多细胞世代，由此看来，基因原来的甲基化极可能就是引起基因无活性的原因。

目前还不清楚，通过 DNA 甲基化控制基因这种方式有多么广泛。例如，还不知道它是否对雌性哺乳动物中存在的 X 染色体失活起作用，在有些已经研究得很清楚的例子中，当基因表达状态改变时并未伴有甲基化的预期改变。而且在果蝇这样复杂的多细胞

真核生物的 DNA 中好象根本没有甲基化胞嘧啶残基。所以 DNA 甲基化很可能只是高等真核生物细胞用以产生可遗传的基因调节型式的几种不同机制之一。

在特殊情况下局部 DNA 序列的可逆重排也可以使基因开启和关闭⁵⁵

在某些单细胞生物中，还存在一种更为彻底的机制可以产生可稳定遗传的基因调节型式。某些原核生物和低等真核生物的 DNA 可以重排而使特异基因活化或失活。由于



于 DNA 序列中的一切改变在以后的 DNA 复制过程中都将忠实地复制，所以这样一种由重排决定的基因态也遗传给它的所有子代。虽然这些重排可以稳定遗传若干世代，但它们是可逆的，而且可以在相当长的时期内重复重排，以致会产生交变的基因活性模式。

在沙门氏菌中存在这种类型的最简单的机制，在这些细菌中，一段 1000 个核苷酸的特殊 DNA 偶尔会倒位 (图 8-111)。可以说这段 DNA 是在 (+) 态和 (-) 态之间“翻转”。这种倒位对基因表达的影响是通过这 1000 个核苷酸中的启动子部位来实现的，这个部位当 DNA 处于 (+) 态时使细菌合成某一种类型的表面外壳，而当 DNA 处于 (-) 态时则合成另一种类型的表面外壳。由于翻转只是在罕见的情况下发生，所以整个细菌克隆只生出一种类型的表面外壳。这种叫做位相变化的现象之所以进化出来几乎肯定是由于它保护细菌免遭其宿主的免疫作用。如果宿主针对一

图 8-109 (A) DNA 双螺旋中的胞嘧啶碱基通过甲基化形成 5-甲基胞嘧啶。这一事件只发生在位于 CpG 序列中的某些胞嘧啶残基。(B) 合成的核苷酸 (5-氮 C) 如带有碱基 5-氮胞嘧啶则不能甲基化。而且如将小量的 5-氮胞嘧啶掺入 DNA 中时，它们就抑制正常的胞嘧啶残基甲基化。

种类型外壳制造抗体，那末，少数由于基因倒位而使其外壳发生改变的细菌将依然能存活下来并繁殖。

在有些酵母品系中有一种类似但更复杂，而且在某些方面也更有意义的机理。酵母是一种单细胞的真核生物，以单倍体状态或二倍体状态存在，二倍性是通过一种由两个单倍体细胞融合在一起的称为接合 (mating) 的过程而达到的。为了使两个单倍体细胞接合，这两个细胞的接合型必须是不同的。在普通酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中有两种接合型， α 和 a ，分别决定于占据在酵母染色体称为接合型座位的特定位置上的 α 基因还是 a 基因。因为接合型是遗传的，所以近缘的酵母彼此不会接合。但是单倍体酵母细胞定期转换它们的接合型。接合型的变化是由于接合型座位上 DNA 序列发生改变的结果。不过这种改变并不是一种简单的倒位，使 α 序列或者 a 序列得以表达，而是每一次 α 型细胞变化成为 a 型细胞时，接合座位上的 α 型基因被切除，代之以一个新合成的 a 型基因，这个基因是从基因组中其他地方的一个无活性的 a 型“主”基因复制出来的。因为这种改变涉及到从一个活性“槽”里除去一个基因，代之以另一个基因，所以这种机理就被称为盒带机理 (cassette mechanism)。

因为虽然接合型座位上原来的 α 型基因被除去，但在基因组中其他地方还有无活性

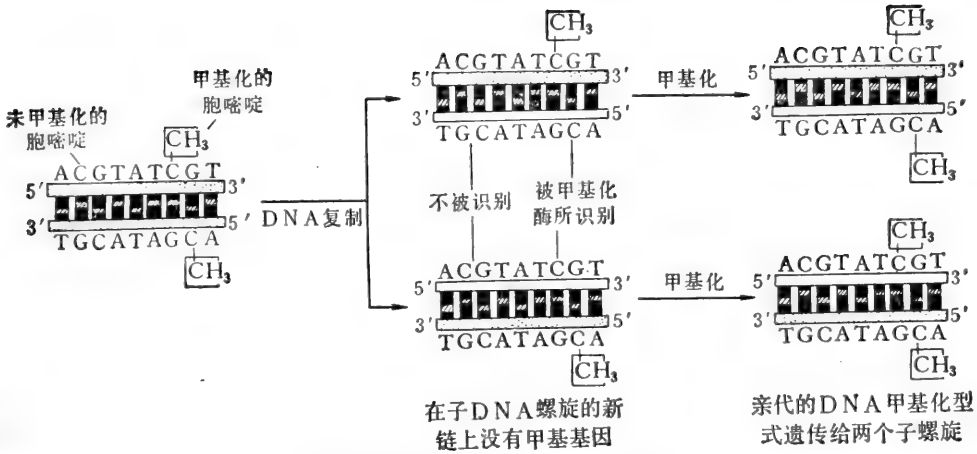


图 8-110 认为 DNA 甲基化型式如实遗传的假想图解。在真核生物 DNA 中, CpG 序列中的胞嘧啶碱基大部分是甲基化的(见图 8-109)。因为存在有受甲基引导的甲基化酶,所以一种 DNA 甲基化型式一旦确定下来,甲基化部位往往就如图示那样地遗传到子 DNA 中。这就是说,生物可以通过克隆遗传的方式,利用 DNA 甲基化型式来使特异基因开或关。有证据表明,哺乳动物细胞中有些基因是通过这种方式控制的,无活性基因 DNA 甲基化程度要比活性基因 DNA 为高。

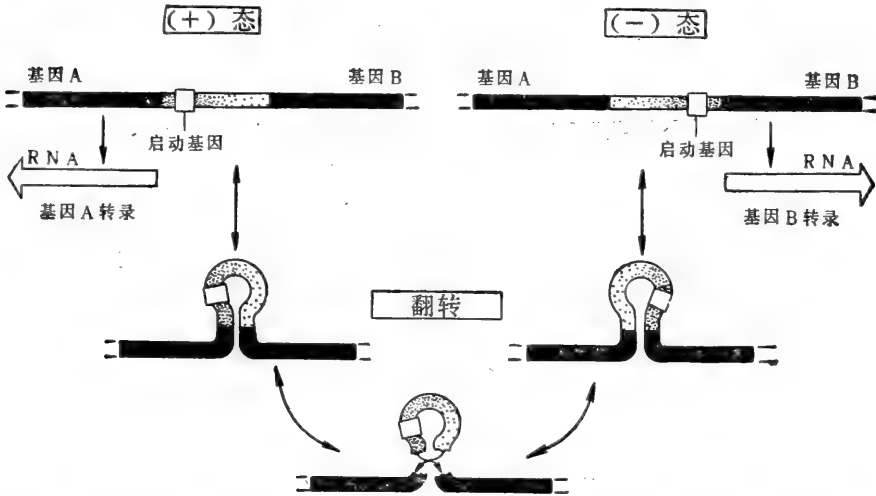


图 8-111 图解说明一次简单的“翻转”使一小段 DNA 倒位就可使细胞中的基因 A 或者基因 B 交替发生转录。造成翻转的部位特异重组机制已在它处叙述过。这种机制只偶尔被激活。所以图示的 (+) 态和 (-) 态往往在细胞的每个克隆中真实地遗传下去。沙门氏菌中的控制机制也属于这种类型,但要复杂一些。

的 α 型“主”基因,所以,这种变化是可逆的。偶尔会有一个 α 型基因的新拷贝产生,并重新插入而使基因组恢复到原来状态。由此看来,从 α 型主基因和 α 型主基因复制出来的拷贝起着用一次便可扔掉的 DNA 盒带的作用,它们每隔一段时间插入到接合型座位(其作用有如放音磁头),从而使酵母细胞在两种不同接合型之间变来变去(图 8-112)。

一般认为,含有接合型主基因的无活性部位与含有表达基因的活性部位之间的差异,

在于染色质的结构。看来，位于无活性部位的基因由于其 DNA 处在活性蛋白所进不去的染色质结构中，所以不转录。可是当移到接合型座位上时，虽然还是同样的 DNA 序列，但染色质却由于受附近染色体区扩展来的影响而采取了比较开放的构象。原则上，许多不同 DNA 序列中任何一种序列都可以通过这样一种盒带机理插入到某一个部位上，因而一个细胞就可以产生许多不同的可遗传的基因型式。

最近，有人发现了一种类似的机理，它可以使覆盖在锥虫表面的主要蛋白质产生许多变化。这些单细胞真核生物在人和家畜中引起诸如昏睡病这样严重的疾病。如同在沙门氏菌中的情况一样，这些表面变化可以使锥虫避开宿主的免疫防御。

实验证明从一个体细胞中的遗传信息可以再生出一个完整的生物(见 419 页)，这表明，高等真核生物细胞的分化不一定伴有 DNA 序列的不可逆变化。不过这类观察结果却启示了另一种可能性，即 DNA 序列的可逆变化——类似于在沙门氏菌、酵母及锥虫

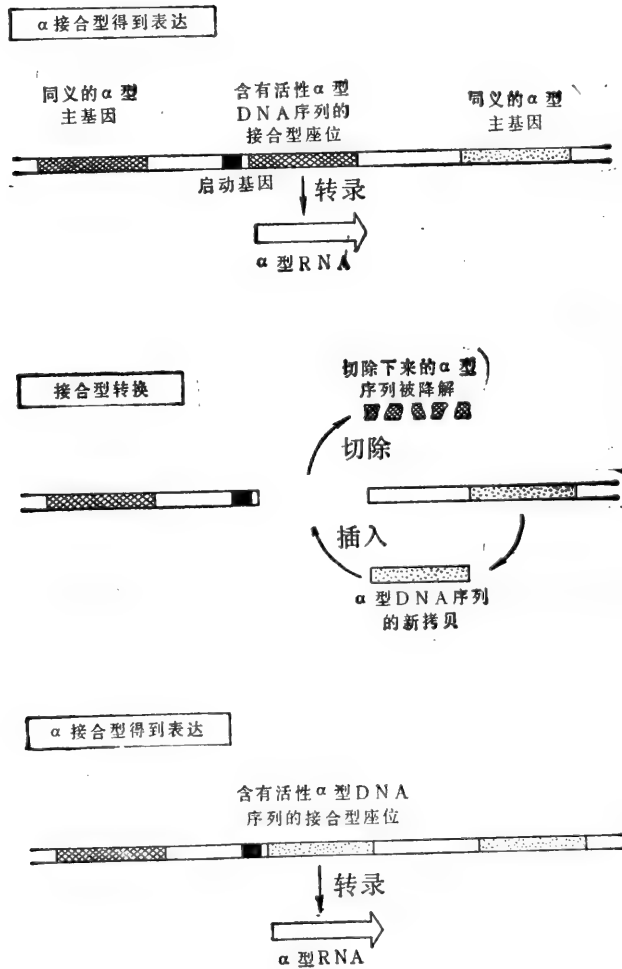


图 8-112 使酵母能在 α 型和 α 型这两种接合型之间换来换去的“盒带机理”的示意图。原则上，这样一种盒带机理也可以插入从两个以上不活动部位上复制出来的多个基因拷贝，从而产生各种各样的基因表达型式。如图 8-111 中的机理一样，涉及 DNA 重排这一事实表示，基因表达的改变可以直接遗传给子细胞。

中已经观察到的变化——是造成基因表达产生遗传变化的原因，而这些变化是正在发育的体细胞的特征。

在体细胞中染色体的个别部分可以缺失也可以扩增⁵⁶

虽然大多数生物的体细胞在发育和分化过程中似乎保留了它们的全部完整的 DNA，但却不存在什么先验的道理而非如此不可。原则上，只有生殖系细胞（卵和精子）必须含有完整的基因组。事实上，在少数例子中

DNA 确实发生广泛的变化。

在有些原始的真核生物，例如蛔虫这样的蠕虫和桡足类这样的小甲壳动物中就存在或许是最生动的例子了。它们在发育的很早时期，卵才不过分裂几次以后，所有分裂细胞，除一个以外，都去除了它们染色体中的特定异染色质部分，结果这些染色体的大小只有其原来大小的一半左右。消

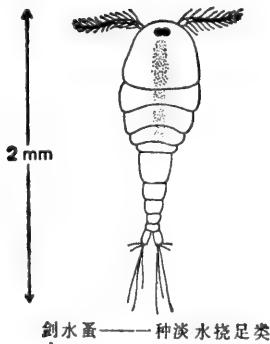
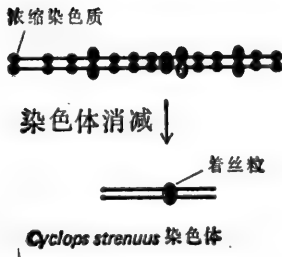
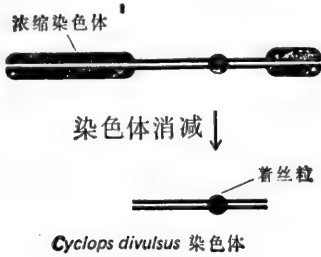


图8-113 染色体个别部分在两种不同桡足类中消减方式的比较。如图解中说明的那样，在这两种桡足类中，待消减的染色质先变得非常浓缩之后才被消减。

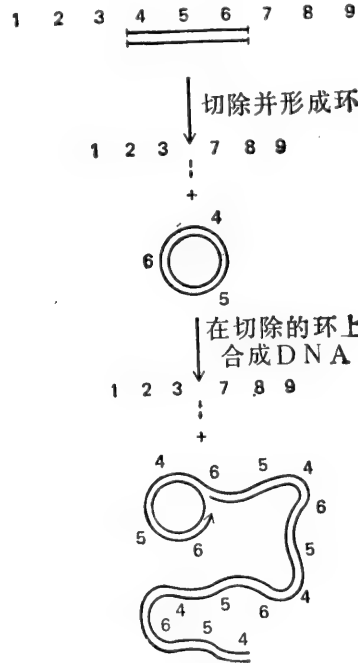


图8-114 图解rRNA基因在极早期的两栖动物卵母细胞中的扩增情况。DNA分子脱离染色体后就合成扩增的基因。

失的片段很快从细胞中排出。这样，体细胞谱系中全部 DNA 有一半左右就消失了，而下一代的全部生殖细胞都是由保留着完整染色体的那对子细胞产生的。估计从其细胞中丢失的 DNA 可能含有只为生殖细胞所必需的序列。

在分子水平上,特异染色体片段的丢失一定是由于在 DNA 序列的特异部位上切割 DAN 螺旋的结果。在有些生物中,只有染色体端部被切除。但在英勇剑水蚤 (*Cyclops strenuus*) 这种桡足类中,由于异染色质片段是散布在整条染色体上的,所以去除它们就需要多处切割,而且在每处切割之后都需要特异 DNA 的再连接,以使染色体恢复完整(图 8-113)。

在产生抗体分子的淋巴细胞这种特化的脊椎动物细胞中也发生类似的 DNA 重排,不过规模要小得多。在淋巴细胞的发育过程中,编码抗体分子的基因通过这样的重排产生多种多样不同的抗体蛋白。与在桡足类中的情况一样,只在特异 DNA 序列上进行切割,同时伴有 DNA 再连接的过程,而这些过程只安排在细胞发育的某些阶段进行(见第十七章)。不过在形成抗体的细胞中,丢失的染色体只占整个基因组中的一小部分。(不要把这种重排与 RNA 加工中的事件混淆起来,前者是发生在 DNA 水平上的,后者则引导在这些淋巴细胞中由膜结合抗体到分泌抗体之间的转变。)

相反地,在有些特化细胞中,特异基因是扩增的。这些细胞的基因组有一小段在一个细胞世代中就复制好几次,结果就产生某个特异 DNA 序列的多个附加拷贝。这见于两种类型的细胞,它们都必须相当快地制造出大量的单基因产物。一种是许多动物的正在发育的卵(卵母细胞),它必须制造并贮藏巨大数量的核糖体。例如,在极早期的非洲爪蟾卵母细胞中,rRNA 基因扩增 1 000 倍左右,它们产生许多游离的 rDNA 分子,这些分子聚集在一起形成 1 000 个左右的附加核仁(图 8-114)。在卵生长直至成熟大小的过程中,这些核仁中合成了大量的 rRNA,并装配了大量核糖体(见图 14-29)。

另一种有特异基因扩增的就是滤泡细胞,这种细胞合成和分泌形成昆虫卵坚硬外壳(即卵壳)的蛋白质。例如在果蝇中,在需要产生卵壳蛋白之前,编码这种蛋白质的 DNA 序列扩增约 30 倍(图 8-115)。

根据我们现阶段的了解,虽然体细胞中个别 DNA 序列可以缺失、改变、或者扩增,但是基因组的这种不可逆变化在高等动植物的发育过程中只是偶尔发生。

染色体的大规模重排通常是有害的⁵⁷

染色体数目与排列的重大变化往往会引起严重畸形这一点是毫不足怪的。人为了保持正常,每种常染色体必须有两份,而且必须只有两份。偶然只从上代得到一份常染色体的胚胎是不能活的,而活下来的有三份常染色体的个体(三体性)常常呈明显畸形:只有第 21 号染色体有三份的个体(患先天愚型,或称 Down 氏综合征),第 13 号染色体有三份的个体,或者第 18 号染色体有三份的个体能真正活下来。染色体的正确数目对于正常细胞的功能与发育来说显然是重要的。

通常在一个染色体之内或者在染色体之间的重排也会产生不能成活的胚胎,它在出生之前早就死去。但在人类中曾发现某些类型的染色体重排,其遗传物质的总数并没有影响,这些人在其他方面都完全正常。有 5 对单臂染色体(第 13、14、15、21 和 22 染色体),其中任何两个染色体的顶端都有可能发生融合,结果形成双臂染色体。所以发生这种染色体融合时正常个体中只有 45 条染色体,而不是 46 条染色体。此外,在正常个体中还可发现染色体易位,易位时两条不同染色体的片段互换,而并不丢失染色体物质(图 8-116)。这类变化的影响有多么小,这可在羌鹿(barking deer)中找到一个最明显的例子:羌鹿的

两个近缘种的遗传物质几乎完全一样,但却分别分布在 46 条小染色体或者 6 条大染色体上。但是在任何动物中观察到的特殊的染色体变化决不是对可能发生的全部变化的随机选择;看来只有某些排列才能产生正常的生物。

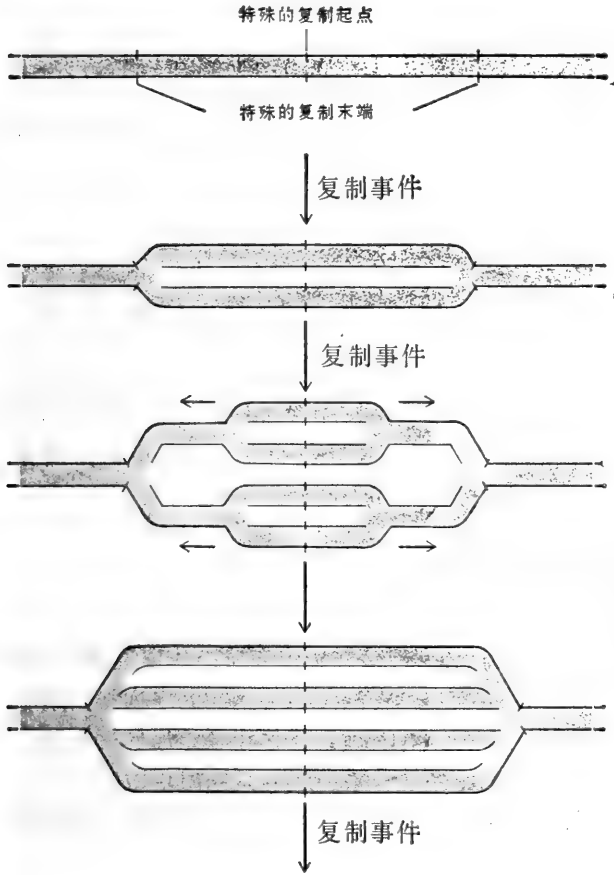


图8-115 图解想像的果蝇滤泡细胞中卵壳基因进行特异扩增时发生的过程的类型。如图所示,这里的扩增基因看去仍然是与染色体连在一起的。

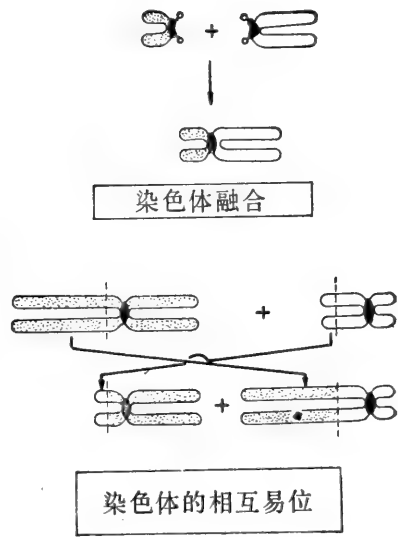


图8-116 图解通常在人类中发现的两类染色体重排。染色体融合时,两条染色体合而为一。染色体相互易位时,两条染色体互换部分形成两条重排的染色体。

刚才讨论的染色体重排是遗传的,而且存在于每个细胞中。但是在动物的一生中,在体细胞中也可以发生同一类型的重排,这些重排可以对细胞行为有巨大影响。几乎人的所有肿瘤细胞都有各种各样的染色体异常,包括易位、缺失及重复等。其中多数好像是随机的,但是在某些情况下,一种特异的染色体变化可以重复地在某一种类型的肿瘤中再现。例如,多数患某一类型白血病(慢性骨髓性白血病)的病人的癌细胞在第 22 号染色体与第 9 号染色体远端之间有个易位。同样地,多数患 Burkitt 氏淋巴瘤的病人的癌细胞中在第 8 号染色体与第 14 号染色体之间有一个特殊易位,等等。有人假定,这些可重复再现的染色体变化将一个编码某种调节蛋白的基因转移到了一个高度表达的基因的旁边,

由此制造出异常大量的调节蛋白。这种过量生产可能是由于被易位基因的染色结构发生变化而引起的。一般认为,这种变化使产生肿瘤的细胞能够逃脱正常生长控制。这些控制的性质以及逃脱这些控制的方法将在第十一章和第十六章中讨论。

染色体重排后除非是每条染色体末端含一条正常染色体的顶端,否则是不稳定的,并且带有一条断端染色体的细胞最终要死亡。染色体顶端叫做端粒,为保证位于那里的DNA双螺旋的末端圆满地完成每次DNA复制周期,端粒的结构必然要很特殊。最近用酵母细胞进行的实验表明,位于17条酵母染色体的每个顶端的端粒都含有一个近缘的约为3000个核苷酸长的DNA序列。对于为什么要在一条染色体的末端正常戴上这样长一段DNA序列的帽子还不了解。

小结

看来,高等真核生物中细胞“记忆”的某些机理是在染色体结构的水平上起作用的。尤其是把基因包装成异染色质好像有助于将失活状态遗传下去,雌性哺乳动物细胞的两条X染色体中一条失活的现象就生动地说明了这一点。原核生物类型的可扩散基因调节蛋白不能承担这种类型的可遗传的基因控制,因为单个细胞中一个基因的两个相同的拷贝受到不同的影响。可能的机制包括协同结合染色体蛋白在DNA复制过程中的直接遗传,DNA甲基化型式的直接遗传,以及局部重排的DNA序列的遗传。

DNA 序列的组织与进化⁵⁸

在现代生物的基因组中记载着大量的进化历史。一部分历史现在可以从用重组DNA技术确定的大量DNA序列中推断出来(见185页)。等到更多的基因的序列得到阐明时,或许就能很清楚地看到,编码特异蛋白质的DNA序列在几亿年来是如何进化的。不过现在,我们还必须以一种概括得多的方式来论述现存基因组与基因组借以进化所经过的过程之间的关系。通过研究现存生物DNA的行为,我们可以就有关的进化事件作一明智的推测。

遗传重组驱动进化的改变

如讨论有关DNA复制和DNA修复过程时所指出的那样(第五章),编码蛋白质的DNA核苷酸序列为什么必须准确地复制和保守是有明确的理由的。虽然已经了解得很详细的DNA序列大多数是非常稳定的(它们在每200000年中每1000碱基对约只有一个碱基对发生随机变化,第208页),但某些序列发生重排的频率却令人吃惊。其中许多是高度重复的序列,是通过遗传重组而重排的。虽然对这些重排的全部意义还不完全了解,但是其中有些对进化过程中产生多样性起着重要作用。在这一节中,我们将叙述某些重复DNA序列,以及它们所经历的变化。

大多数真核生物DNA的一大部分是由重复核苷酸序列组成的⁵⁹

在高等真核生物DNA中发现高度重复的核苷酸序列是令人十分吃惊的。它们最先是确定基因拷贝数的杂交技术发现的。测定步骤包括,先使基因组断裂成约1000

个核苷酸长的小段 DNA 双螺旋,然后再使这些片段变性形成单链 DNA。单链片段的混合物在使双螺旋构象稳定的条件下重新结合,结合速度取决于每个片段所能找到的互补链有多少。因为要重建起一个哺乳动物细胞的单倍体基因组,必须总共把约 600 万个,1000 个核苷酸长的不同 DNA 片段加在一起,所以反应多半是非常缓慢的。在二倍体细胞中任何只存在两个拷贝的基因必须与 6 百万非互补链随机碰撞后才能偶然碰上一个能匹配的配偶链。

一个典型哺乳动物细胞的 DNA 经过这样的分析之后,发现 70% 左右的 DNA 链重退火的速度慢得就象它们都是非重复 DNA 序列似的,全部结合需要好几天。但其余的 30% DNA 链大多数退火要快得多。这些链中含有在基因组中重复许多次的序列,所以它们与互补对象的相撞比较快。这些在大多数细菌中没有发现的高度重复 DNA 序列有两种类型——卫星 DNA 和散置重复 DNA。

时常发生的遗传重组事件可使串连重复的卫星 DNA 序列加长或缩短⁹

在刚才叙述过的那种实验中退火最迅速的 DNA 链通常含有由小段核苷酸顺序串连组成的重复序列(图 8-117)。这一类型的序列中的重复单位可以只有一个或两个核苷酸,但最为常见的是 170 到 250 个核苷酸长的重复单位。这些串连重复的 DNA 序列之所以叫做卫星 DNA,是因为,最早发现的这种类型的 DNA 有不寻常的核苷酸比率,使得我们有可能将这种 DNA 作为一种次要组分(或“随体”)与细胞的大部分 DNA 区别开来。卫星 DNA 序列好像是不转录的,而且是常常位于与染色体着丝粒区相联的异染色质中。

在有些哺乳动物中,一种类型的卫星 DNA 序列可占 DNA 的 10% 或者更多,甚至有可能占据整个染色体臂(每个细胞有几百万个重复长度的拷贝)。卫星 DNA 序列似乎在进化过程中变化得非常快,甚而还改变了它们在染色体上的位置。例如,人基因组中至少有三种主要的卫星 DNA 序列,在每个着丝粒处存在着由这三种卫星 DNA 序列形成的不同组合。比较任何人的两条同源有丝分裂染色体,常会发现,某些由父母亲遗传下来的卫星 DNA 序列的排列彼此存在着明显的差异。

此外,任何两个近缘物种的卫星 DNA 序列通常也有明显的差异。这与该基因组中



图 8-117 一个简单的卫星 DNA 序列,由许多一段段长为 7 个核苷酸的序列串连重复排列而成。这种特殊 DNA 序列是在果蝇中发现的。

其他地方 DNA 序列的高度保守性适成对比。卫星 DNA 迅速进化的一个原因是,它的重复性质促使大片大片的 DNA 在遗传重组过程中重复、缺失。这种重组大多数好像有些“乱伦”,就发生在两个新复制的 DNA 子螺旋之间(图 8-118)。还不知道,卫星 DNA 的这种遗传不稳定性是不是对生物进化有什么显著的影响。但是正如我们将会看到的,类似的——不过罕见得多的——重组事件使有遗传活性的 DNA 序列重复和缺失,这可能具有重要进化作用。

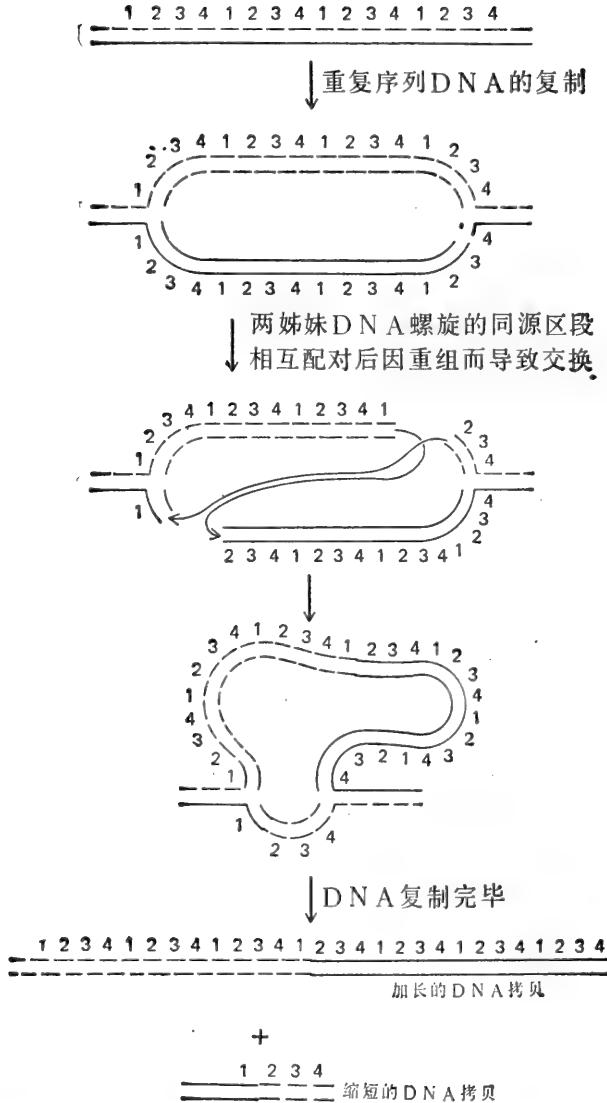


图 8-118 图解经常发生的遗传重组事件的类型。人们认为这种事件是使卫星 DNA 序列发生迅速变化的原因。由于序列的重复，所以依赖同源碱基对间的识别来进行的遗传交换有时便不能对等。

珠蛋白的进化告诉我们 DNA 的随机重复如何有助于生物的进化⁶⁰

一个氨基酸序列一旦进化成为一个有用而且按独特方式折叠起来的蛋白质区域之后，编码它的那个 DNA 序列就可能重复，而重复的拷贝稍加改变就可以制造出另外的稍有不同的蛋白质。这种看法来自于各种具有不同功能的蛋白质的氨基酸顺序及结构之间的正确无误的同源性。

正如我们强调过的，大多数突变是有害的。在单倍体生物中，一个必需基因必须重复

之后才能经受任何大的变化而不致危及生物的生存。相反，在二倍体生物中，每个基因总是带有第二个“额外”拷贝，所以可以经受突变而不一定致死。因而从理论上说，二倍性对生物是有好处的，这是因为二倍性使生物能够形成新蛋白质的速率大大增加。进化事件的预期顺序将在第十四章中讨论。

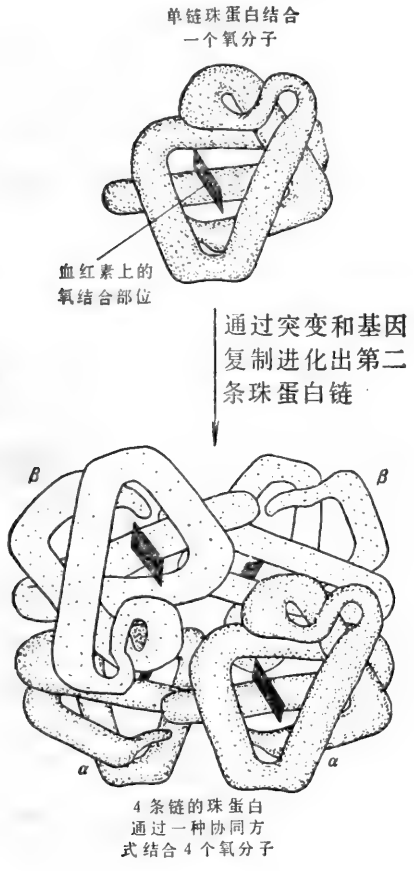


图8-119 1-链和4-链珠蛋白结构的比较。图中的4-链珠蛋白就是血红蛋白，它是由两条 α -珠蛋白链和两条 β -珠蛋白链组成的复合体。

比较在系统发生进程上不同水平的生物的不同分子形式，我们就可以重建红细胞蛋白血红蛋白事件的顺序。要让多细胞动物长大到它们不再能单纯依靠体表扩散来取得氧气的地步，就必须要有类似血红蛋白的分子；因此，在全部脊椎动物和许多无脊椎动物中都存在有类似的分子。最原始的携带氧气的分子是一种由一条大约含 150 个氨基酸的单链组成的珠蛋白。在许多海洋蠕虫、昆虫及原始鱼类中，氧气就是由这种珠蛋白来携带的。可是在高等脊椎动物中，血红蛋白分子是由两类珠蛋白

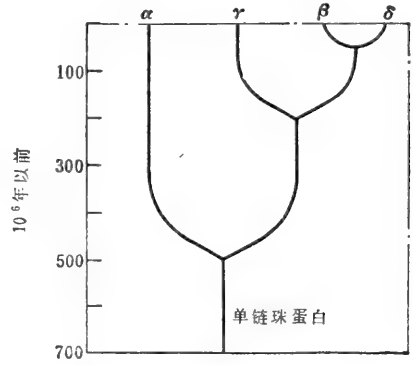


图8-120 推测人类不同珠蛋白链的起源的进化树。这方面的资料可以从各种不同物种的相应蛋白质或DNA序列的详细比较得到。

链所组成的。看来在 5 亿年前在高等鱼类的进化过程中，一定发生过一系列基因突变和重复。这些事件导致出现两种略有不同的珠蛋白基因，分别编码各个基因组中的 α 和 β 珠蛋白链。在现代高等脊椎动物中，血红蛋白分子是由四条链：两条 α 链和两条 β 链所组成的复合体(图 8-119)。这种结构比单链的珠蛋白有效得多，这是因为 $\alpha_2\beta_2$ 分子中有四个氧结合部位可以相互作用，因而在结合氧和释放氧的时候这种分子的构象发生一种协同的变构变化。这就使得它能将其结合氧的更大部分释放给组织。

往后，在哺乳动物进化期间，两个 β -链基因中的一个看来是又一次发生突变和重复，结果产生 γ 链，这种链是专门在胚胎(或胎儿)中合成的，生成的血红蛋白为 $\alpha_2\gamma_2$ 。这种胎儿血红蛋白对氧的亲合力比成人血红蛋白要高，因而对胎儿有好处。更后在灵长类进

化期间，进一步发生重复而产生 δ 珠蛋白基因，因而形成另外一种数量较少的血红蛋白 ($\alpha_2\delta_2$)，只见于成年的灵长类中(图 8-120)。有时在进化过程中还出现 ϵ 珠蛋白基因，结果形成胚胎类型的血红蛋白 ($\alpha_2\epsilon_2$)。

基因重复过程产生了血红蛋白链的多样性，而不同功能的多肽链来源于原先的 β 链，从编码不同功能的多肽链的基因的排列可以清楚地看到基因重复过程的最终结果。利用重组 DNA 技术对这些基因进行了详细的分析，结果表明，它们排列成一系列同源 DNA 序列，位于人的一条染色体的 50 000 个碱基对范围之内(图 8-121)。同样的分析还表明，这一区段中某些重复的珠蛋白 DNA 序列不相当于基因。这些序列称为假基因(pseudo-gene)，它们虽然与有功能的基因是明显同源的，但由于发生突变使它们不得表达。这样一些假基因的存在是不足为奇的，因为并非每次 DNA 重复都会导致产生新的有功能的基因。

只要仔细比较由蠕虫→鱼→哺乳动物→人这个漫长谱系中这些基因的 DNA 序列便可以在我们的染色体中辨认出我们进化历史的大量情况(也见图 4-47)。

重组事件通过连接编码区域也能形成新型蛋白链⁶¹

我们刚才已经看到，如何通过一

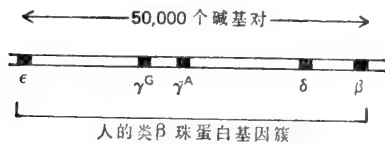


图8-121 人的类 β 珠蛋白基因成簇排列。一般认为所示基因之间的 DNA 是不编码蛋白质的。 α 基因位于一条不同染色体上的另一个基因簇中，估计这个基因是由于很早发生的重组事件而与 β 基因分开的。

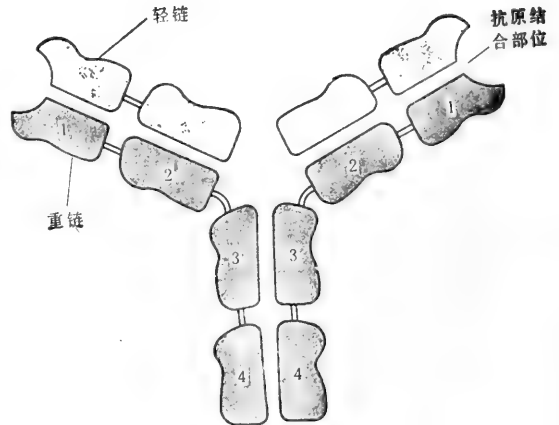


图8-122 免疫球蛋白分子示意图。这种分子是由四条链组成的复合体：两条重链分别由四个共价结合的区域(1—4)组成，而两条轻链各含两个这样的区域。所有这些蛋白质区域好像都是由一小段原始蛋白质序列的系列重复进化来的。

系列基因重复形成了几种由两类相互作用的多肽链组成的不同血红蛋白分子。类似的 DNA 重复也可导致新的单个基因的出现。由这样一些基因编码的蛋白质是能够识别的，因为它们是由重复的类似的蛋白质区域组成的，这些区域靠共价连接，而且是串联排列的。例如，免疫球蛋白(图 8-122)、清蛋白及胶原蛋白就是这样产生的。

要形成编码这种蛋白质的单基因必须经历多次重复，而当真核生物 DNA 中有间插序列(内含子)存在时，重复的积累可能要比没有间插序列时快得多。要是没有内含子，那末将只有少数部位可以在其上发生姊妹 DNA 分子之间的重组交换，从而通过重复形成有用的蛋白质区域。相反，要是在一个区域两边有长的内含子，则就可以提供许多不同的可能发生重组的部位(图 8-123)。因此，内含子能够大大增加有利的重复事件的发生机率。

通过一次偶然的重组事件可以把原先不在一起的两个编码两种不同蛋白质的不同区段的 DNA 序列连在一起,同样地,内含子通过增加这种偶然重组事件的发生率也有助于产生新的有用蛋白质。所以一般来说,真核生物编码序列中的内含子会增加新蛋白质出现的速率。

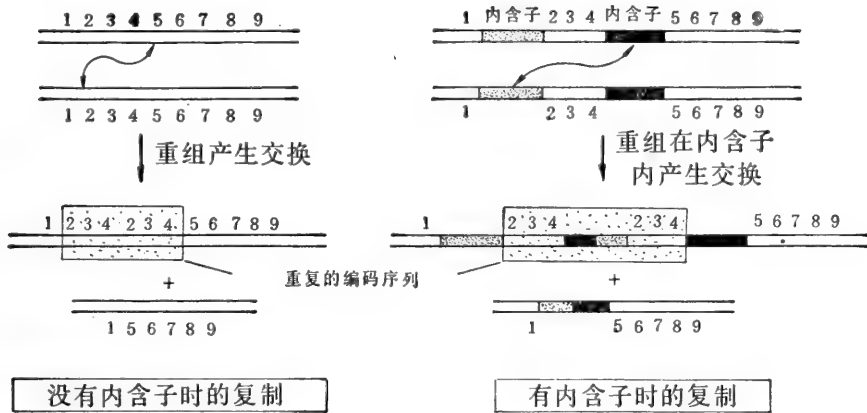


图 8-123 表示内含子的存在如何加速一种新蛋白质的偶然产生的示意图。这种新蛋白质中含有重复的蛋白质区域,图中用字母“2 3 4”来表示。注意,形成的新内含子可以与许多不同的内部序列发生作用(图 8-46)。这就是说,在许多部位上的重组都可以导致产生一种含有图中所示的重复的蛋白质。

短的散置重复序列在真核生物基因组中很常见⁶²

卫星 DNA 序列在多数哺乳动物中只占全部重复 DNA 的三分之一左右。其余的重复序列(占细胞总 DNA 的 20%左右)重新结合的速率比卫星 DNA 要慢,但比单拷贝序列要快。已知有几个必需基因(编码 rRNA、5S RNA、tRNA 及组蛋白的基因)在基因组中是重复的,它们在这种重复 DNA 中占一定比例。但是,这些已知序列占基因组的 1%都不到。像卫星 DNA 一样,这种重复 DNA 大多数也没有已知的功能。

在人和啮齿类中已发现有一大族散置重复 DNA 序列,它们在非卫星的重复 DNA 中占大部分。这一类有亲缘关系的 DNA 在好几个方面与卫星序列不同:

1. 这些序列不是在染色体的少数几个部位上串列重复,而是有千万个单独拷贝散置在整个基因组中,每个拷贝长约 300 个核苷酸。
2. 这些序列有很多能有效地转录为 RNA,可能表现为长 RNA 转录本的一部分,也可能作为单独的短的 RNA 分子。
3. 在哺乳动物进化期间,这些顺序在核苷酸序列上和位置上的变化比卫星 DNA 序列要慢得多。

我们可以为这些散置重复 DNA 序列推测出许多不同的功能来。例如,它们可能成为 DNA 复制的起点, RNA 加工的讯号, RNA 转录的调节序列,染色体的结构成分等。但至今,它们的功能,如果有的话,也还是未知。

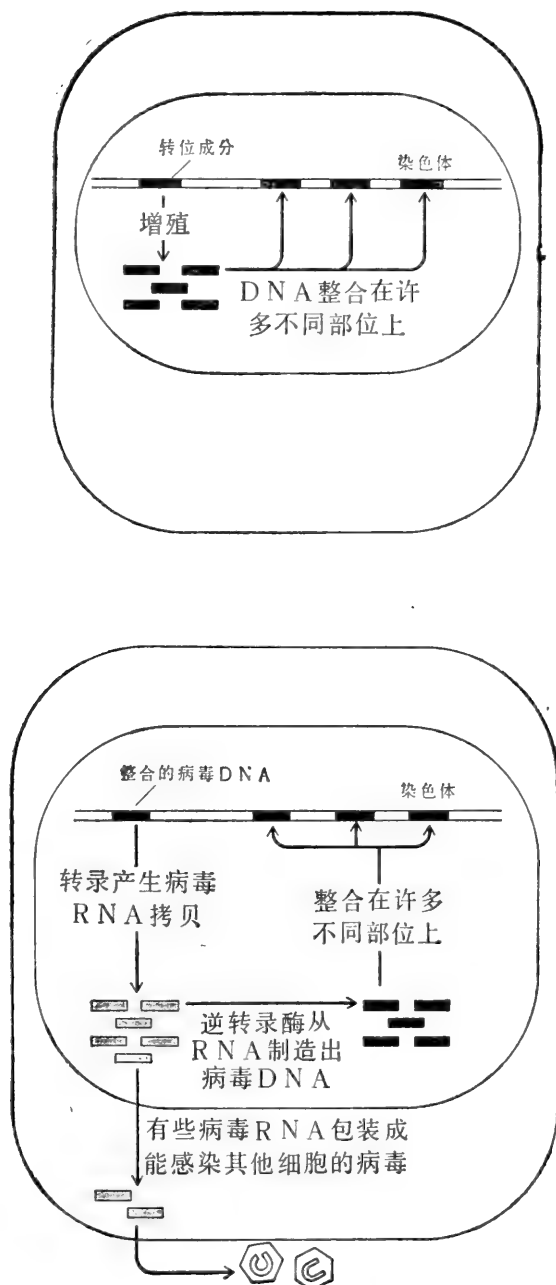


图 8-124 图解重复 DNA 序列可能起源于细胞中转位成分或病毒的增殖。与病毒 DNA 不同，转位成分 DNA 是不包到离开细胞的颗粒中去的。所以要是转位成分增殖的话，它只在一个细胞之内增殖。

基因组中有些重复 DNA 在顺序上相当于细胞的 mRNA 分子——没有编码该 mRNA 的基因中所有的内含子，而且有一条 poly-A “尾巴”。由此看来，病毒 RNA 以外的 RNA 序列也可以偶然通过逆转录和图示的病毒途径进入基因组中。

“自私” DNA 的概念⁶⁴

很可能,这些散置重复 DNA 序列一点功能也没有。尤其是,上文所述 10^5-10^6 个散置重复 DNA 序列的拷贝可能是在很久以前——人与啮齿类趋异之前——由一个原始序列进化来的,这个序列在一些早期哺乳动物基因组中象一种寄生虫那样繁殖传布。因而,这样一种原始 DNA 序列的表现就像一个病毒或者转位成分,病毒和转位成分都可以被看成是寄生在它们宿主细胞中的 DNA 序列。两者都是通过产生与其自己一样的拷贝而增殖,然后这些拷贝可以插入到宿主的 DNA 中,随着宿主染色体复制而被动地带走(图 8-124)。因此,曾有人提议,应把存在于今天生物基因组中的许多高度重复的 DNA 顺序看成是“自私的 DNA”,在进化过程中得以被选留下来只是因为它们能在高等生物基因组中重复和传布而对机体无伤。这类 DNA 序列在有性繁殖的物种中应传播得特别快,因为母体来的染色体可以被父体来的基因组中所携带的转位成分所“传染”,反之亦然。

于是,这种自私 DNA 也就成了大量过剩的不编码 DNA 中的一分子了,这些不编码 DNA 序列对细胞的生存并非必需。但是即使说散置的重复 DNA 序列的原始“功能”只是它们自己的生存,现在看来,它们与宿主细胞的关系好象已经变成了共生的关系。例如,为了使它们对宿主的有害影响降低到最小的程度(从而使它们自己的存活机会达到最大),有些转位成分可能进化出相当于 RNA 剪接时用的剪接点的末端 DNA 序列;这样,如果它们万一插入编码 DNA 序列,它们也会脱出而对原 mRNA 序列无伤。我们已经指出,高等真核生物的编码序列中插入许多内含子是如何在基因控制机理及新蛋白质进化这两个方面给这些生物创造出新的可能性。所以能产生新内含子的自私 DNA 序列对其宿主可能是有好处的。

基因组中的骤变可以增加生物多样性⁶⁴

在真核生物基因组中移居了这样多种多样的非必需 DNA 片段可能有许多原因。有证据表明,酵母细胞、昆虫、以及某些植物基因组中,某些这样的“客人”会不时被激活,使宿主细胞 DNA 发生复杂的变化,结果该生物的几个特性同时发生改变。此后,这些变化还可以遗传下去,于是经过接连几个循环的变化和自然选择,就可以产生一种新的适应于新环境生态位(environmental niche)的生物。

在亚麻植物中可找到这种变化的实例,这种植物能对多种异常条件(例如,土壤中的磷酸盐太多,或者氮太少)发生反应而产生变异的种子,由这些种子长成的子株在一些生长特性上与其亲株不一样。至少在有些情况下可产生几种植株类型,其中许多的性状可以遗传,即使土壤条件改变时也不再变化。有两种变化曾进行过详细研究:一种变化使得植株长得相当矮,但形态还是相似的(这种植株叫做 S 株);另一种变化使得植株长得稍微矮一点,但分枝多得多,而且种子蒴果无毛(这种植株叫做 L 株)(图 8-125)。

生化分析表明,在亲代植株突然变为 S 株或者 L 株时, DNA 发生了很大变化。虽然染色体形态没有可检出的变化,但是, L 株每个细胞中所含 DNA 要比亲株多 10%,这是因为有许多不同 DNA 序列进行差别扩增的结果。S 株每个细胞中所含 DNA 要比亲株少 6%,某些 DNA 序列发生选择性缺失现象。例如,核糖体 RNA 基因数目减半。

DNA 中发生许多不同的变化，但不知道其中的哪一些是引起亚麻形态发生稳定变化的原因。这些变化是怎么引起的也不清楚。但是在 30 多年前就已经在玉米中观察到一种类似的诱发的遗传变化，当时对玉米作过一流的遗传学和细胞学分析，结果指出是一种叫做控制因子的遗传单位的活性和位置都改变的缘故。现在认为，这些控制因子与在分子水平上研究过的细菌、果蝇及酵母中的转位成分(见 242 页)是相当的。果蝇中的情况可能与玉米中的情况最为相象。在果蝇某些品系的杂交中可以诱发某一类型转位成分大范围的移动，结果在子代中出

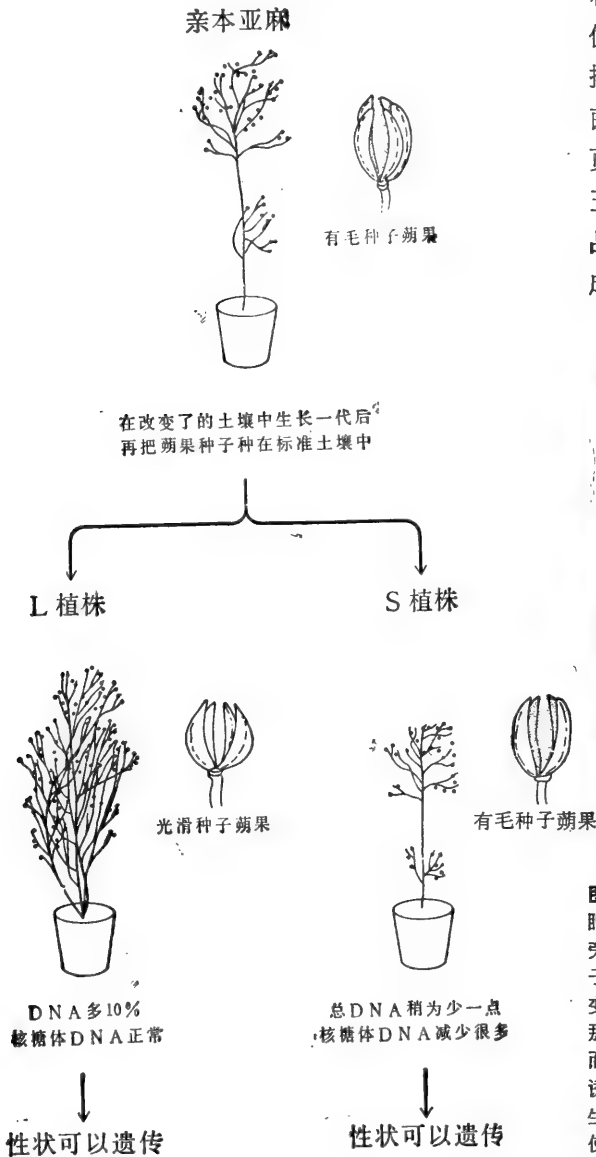


图8-125 图解亚麻中可能发生的一些骤变,说明见正文。

现高频率的突变型(这种现象叫做杂种不育)。而且如同早期在玉米中观察到的，转位成分插入果蝇染色体可以导致邻近基因表达型式发生明显的改变(图 8-126)。

这时出现的情况是，偶然的或剧烈环境压力改变了生物的内部环境，并激活某些未知组分，结果使类似转位成分的 DNA 序列在染色体中跑进跑出，有时造成邻近 DNA 序列的扩增、缺失、重排，或者表达型式的改变。通过这类骤变事件而引起的精确变化至少部分是由机会来决定的，而重要基因的表达的水平、时间及型式可在多方面发生稳定的

一种叫做控制因子的遗传单位的活性和位置都改变的缘故。现在认为，这些控制因子与在分子水平上研究过的细菌、果蝇及酵母中的转位成分(见 242 页)是相当的。果蝇中的情况可能与玉米中的情况最为相象。在果蝇某些品系的杂交中可以诱发某一类型转位成分大范围的移动，结果在子代中出

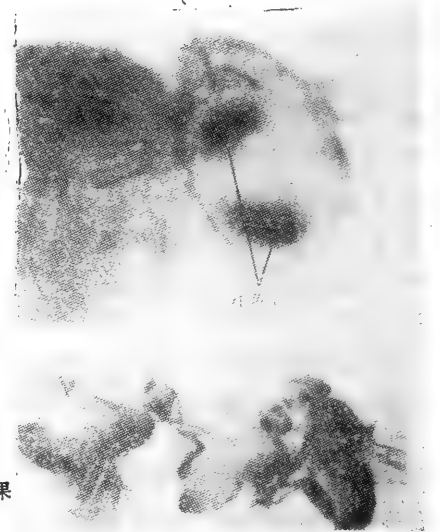


图8-126 表示成年果蝇眼睛由于转位成分造成眼睛颜色变化的照片，这种因子插在白眼基因的旁邻，白眼基因是产生果蝇红眼色素所必需的因子。因为转位成分引起局部 DNA 序列发生改变，所以改变了的白眼基因只在近眼睛背腹缘的那些细胞中有活性，结果产生的眼睛是淡黄色的，而沿着眼睛边缘有两块不在一起的深红斑。如果诱发那些控制个别眼细胞增生的基因在活性上发生类似的并具有一定空间模式的变化，那末，就会使眼睛的形状发生显著变化，这对于突变型生物有较大的适应意义。(Robert Levis 和 Gerald M. Rulin 赠)

改变。

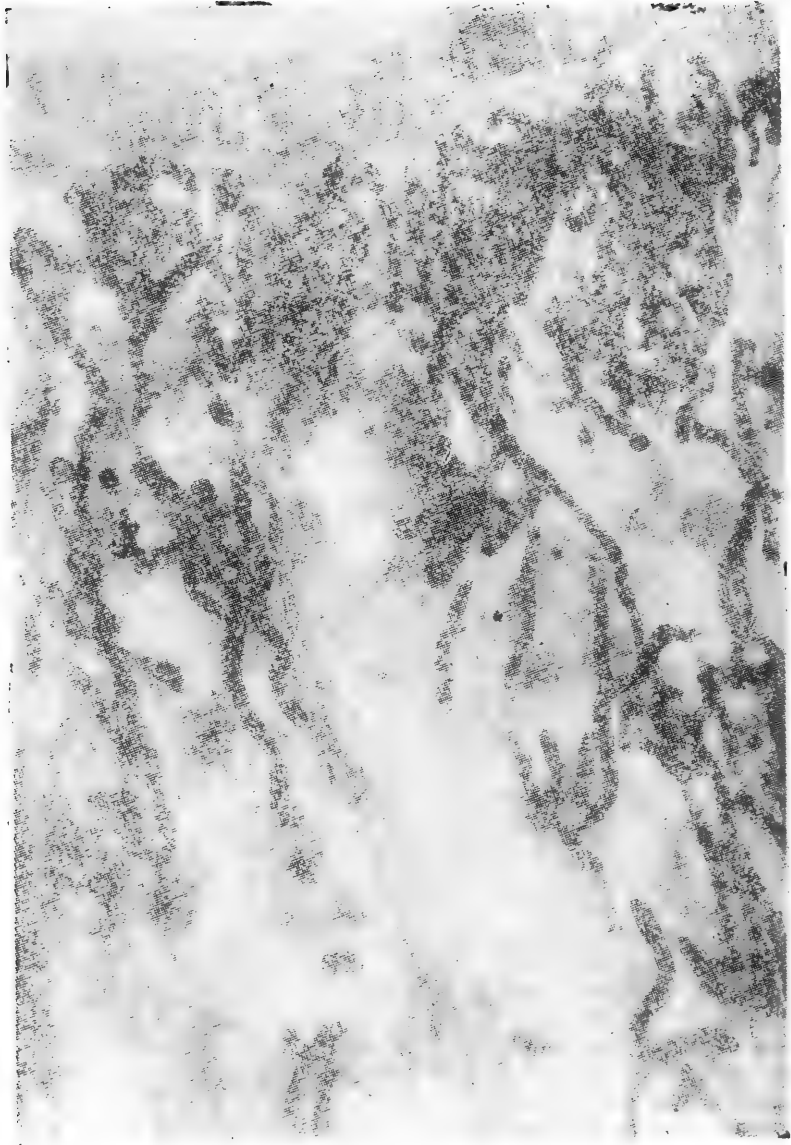
看来很可能，生物经受这种偶然发生的、激烈的 DNA 重排的能力有助于进化。如果是这样的话，可能部分正是由于这个原因，所以细胞携带这些寄生在它们的基因组中的重复 DNA 序列，在进化中取得如此之成功。

小结

可以证明，最复杂高级的生物来自具有适应能力最强的基因组的细胞。在许多真核生物基因组中 DNA 发生重排的频率令人吃惊；其中有些重排可能有助于真核生物产生更广的多样性。真核生物中的重复 DNA 序列在这些 DNA 重排中起着作用，这就可以解释大多数真核生物的基因组中为什么有这样多的重复 DNA 序列。

有些重复序列以单拷贝的形式散置在基因组中。而另一些则串联排列成“卫星 DNA”。后者进化得异常快，可能是通过非对称遗传重组(out of register genetic recombination)事件而产生的，在基因组中其他地方偶然发生的基因复制就是通过同样机制。一般认为，这种随机的基因复制事件有助于进化出新的蛋白质。

【薛京伦译 全如斌校】



在高压电镜下所见的蜗牛上皮细胞似蛇样的线粒体。(Pierre Favard 赠)

第九章 能量的转化:线粒体和叶绿体

细胞核不是真核细胞内唯一含有 DNA 的器官:存在于所有真核细胞中的线粒体和局限于植物的质体(最突出的是叶绿体)都含有它们自己的 DNA。这些 DNA 规定着其功能所必需的部分机构。虽然这些细胞器比细胞核小得多,但它们数量众多,因而在细胞内通常占据很大的容积。这两类细胞器把能量转变成可用以驱动细胞反应的各种形式。它们特殊的功能反映在其形态结构上含有大量的内膜,同细胞核有着非常明显的区别。这膜在这些“能量细胞器”的功能中起着两种决定性的作用,第一,电子传递过程所需的构架,转变氧化反应的能量为更有用的形式——特别是转变为 ATP。第二,在每个细胞器内形成一大的内部区室,其中集中了催化其他重要的细胞反应的各种特殊的酶。

如果没有线粒体,动物细胞将依赖于厌氧酵解,以产生它们所需的全部 ATP。但分解葡萄糖为丙酮酸的酵解作用,只能从糖的氧化释放出全部可利用的自由能的一小部分。在线粒体中,由于分子氧(O_2)的作用,糖(和脂肪酸)的代谢,最终氧化成 CO_2 和 H_2O , 所得到的能量可被有效地利用,每个葡萄糖分子产生约 36 个分子的 ATP,而单单酵解作用只产生 2 分子的 ATP。

叶绿体同线粒体一样,都是有效产生 ATP 的机器,虽然它们的能量来源完全不同。叶绿体依赖于太阳光,而不是糖或脂肪酸,因此可以预料到它们组织方式上的基本差别。但是事实上,线粒体和叶绿体两者均按相同的基本原理来构建,并且都以相同的方式合成 ATP。

经过二十多年来的艰苦研究,得出了引人注目的结果,现在已确实证明能量被利用于生物学目的的主要途径不仅在线粒体和叶绿体中是相同的,而且在细菌中也是相同的。这途径由一已知的叫做化学渗透作用(chemiosmosis)过程所控制。这过程开始于高能电子,它们或是受太阳光所激发,或捕获自富含电子的食物。这些电子沿着一条嵌于离子透不过的膜上的称为电子传递链的一系列蛋白质运行。在它们沿着这链传递的过程中,这些电子逐次地降落到较低的能量水平。由这些电子释放出来的能量被用来将质子从膜的一侧泵到另一侧。结果形成了跨膜的电化学质子梯度(electrochemical proton gradient),贮存在这梯度中的能量又转而为膜中的其他蛋白质所利用(图 9-1)。在线粒体和叶绿体中,大部分的能量是用于化学转变 ADP 和 P_i 为 ATP,而另一些能量则推动运输特殊的代谢物出入细胞器。在细菌中,这电化学梯度本身作为直接可利用的能量而贮存,同由它所产生的 ATP 同等重要。例如,这梯度不仅可驱动许多运输过程,而且也可由于质子的返流驱动细菌鞭毛快速地转动而细菌游动。

一般认为,真核生物转换能量的器官是直接由原核生物演化来的。在进化史的早期,原始真核细胞吞下原核生物,并和它们以共生关系发展。这将可解释为什么线粒体和叶绿体含有它们自己的 DNA。但是自第一个真核细胞出现以来的亿万年中,线粒体和叶绿体丢失了它们自己的许多基因组,从而变成牢固地依赖于在胞液中合成的、然后输入每

个细胞器中的、核基因组编码的蛋白质。反过来说,这些宿主细胞现在也依赖这些细胞器来供应 ATP, 以进行生物合成、离子与溶质的泵运和维持它们生存的运动等经常性工作。

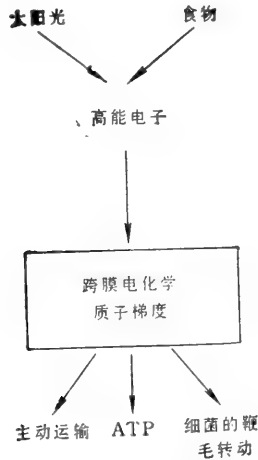


图9-1 作为普遍机制的化学渗透作用: 能量首先被利用以产生跨膜的电化质子梯度。这梯度作为通用的能量贮存, 在线粒体、叶绿体和细菌中可以各种不同方式来利用。

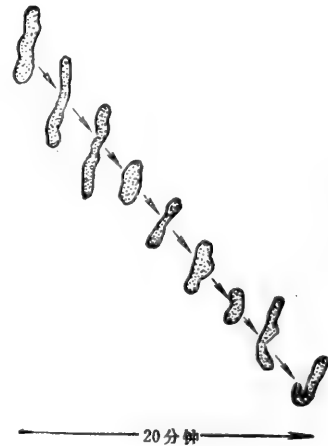


图9-2 活细胞中所看到的线粒体形态的迅速变化

线粒体¹

线粒体实际上占据了所有真核细胞细胞质中的很大部分。虽然它们的大小在光学显微镜下足以见到, 并在 19 世纪已经确证, 而阐明它们功能的真正进展一直到 1948 年在分离完整线粒体的操作程序被建立之后才开始。由于技术上的原因, 大多数生物化学研究是用从肝脏中提取出的纯化的线粒体进行的。每个肝细胞含有这细胞器 1 000—2 000 个, 占整个细胞体积大约五分之一。

线粒体通常被描绘为坚硬的长形圆柱体, 直径为 0.5—1 μm 。然而, 活细胞的显微缩时摄影图象表明它们是可移动的和有可塑性的, 与电子显微镜所看到的静止的图象不相符合(图9-2)。当它们在细胞质中运动, 线粒体常常表现与细胞骨架的微管联系在一起(图9-3)。从这种联系可以确定不同种类细胞中线粒体的独特方向性和分布。这样, 某些细胞的一些线粒体形成长的可运动的纤丝或链(图9-3); 而在其他种类细胞中, 它们固定在 ATP 耗量异常高的部位: 如在心肌中它们堆积在相邻的肌原纤维之间, 它们也牢牢地缠绕在精虫鞭毛的周围(图9-4)。

线粒体有外膜、内膜和两个内部区室²

线粒体被两层高度特化的膜所包围, 这膜对它的活动起着关键的作用。这两层脂双层膜的每一层含有一群独特的蛋白质集合体 (collection), 并且在一起包围和形成了两个独立的线粒体区室: 内部的基质空隙和一较狭的膜间空隙。如果把纯化的线粒体温和地破碎, 然后分级分离成各个组分(图9-5), 线粒体四个不同部分的生化组成就可能被测

定出来,某些结果在图 9-6 中说明。

这些和其他方面的研究已经证明外膜含有一种转运蛋白的许多拷贝,这蛋白质形成了穿越脂双层膜含水的大通道。这样,外膜像个网,所有 10 000 道尔顿或更小些的分子,包括小分子蛋白,都可以通过。这些分子能够进入到膜间空隙,但其中的大多数不能通过不可通透的内膜。这表明,就其所含的小分子而言,膜间空隙在化学上相当于胞液,而基质空隙的组成则是高度特异化的。

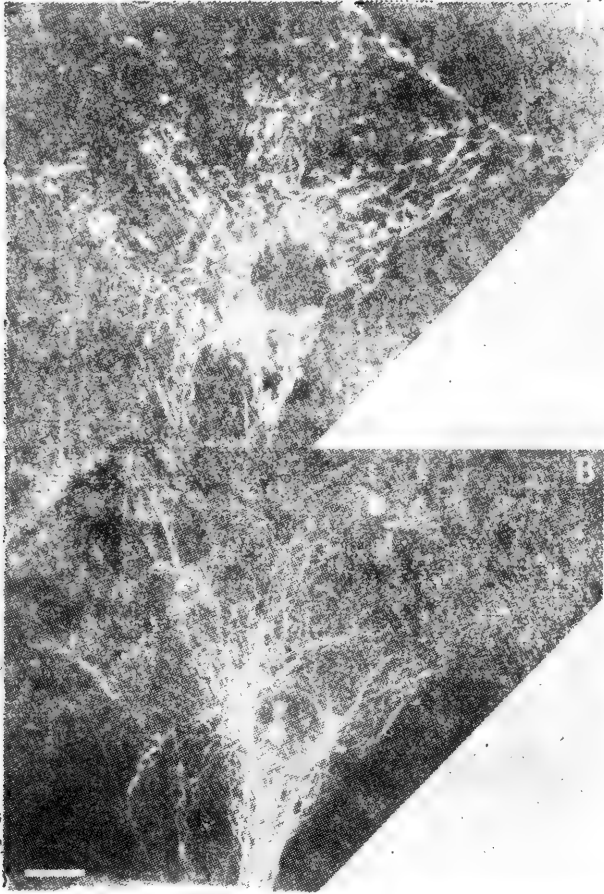


图 9-3 (A)长形的线粒体组成的链的光学显微镜照片,摄自一组织培养的活的哺乳动物大细胞。以荧光染料活体染色。所用的若丹明 123 染料对线粒体是专一的。
(B)在相同细胞上以荧光染料染色微管,显示线粒体沿着微管成行排列。标尺为 25 μm 。
(Lan Bo chen 赠)

我们在下面将详细地阐述线粒体的主要工作部位是其基质空隙和包围这些空隙的内膜。内膜的特异特征之一是异常高比例的心磷脂,这是一种磷脂,占膜脂含量 10% 以上,被认为是造成离子极不易渗透的原因。这膜还含有各种各样的转运蛋白,它们使内膜可选择性地透过某些小分子,这些小分子可被集中在基质空隙内的许多线粒体酶系所代谢。基质中包含代谢丙酮酸和脂肪酸而产生乙酰辅酶 A 的酶,以及在柠檬酸循环中氧化乙酰辅酶 A 的酶。这氧化作用的主要最终产物是 CO_2 (从细胞中释放出来)和 NADH 。 NADH 是沿呼吸链传递的电子的主要来源。这呼吸链在线粒体中称之为电子传递链。呼吸链的

多酶系嵌在线粒体的内膜上,它们是线粒体中进行氧化磷酸化整个过程所必需的,氧化磷酸化作用产生动物细胞大部分的 ATP。

内膜皱折成嵴³

内膜通常是高度卷曲的,在基质空隙内形成一列列折叠,叫做嵴 (cristae)。由于这些皱褶,使肝细胞线粒体内膜总面积几乎五倍于其外膜的面积,约构成细胞全部膜的三分之一(见表 7-2)。在心肌细胞的线粒体中,其嵴的数量较肝细胞线粒体的大两倍,这可能

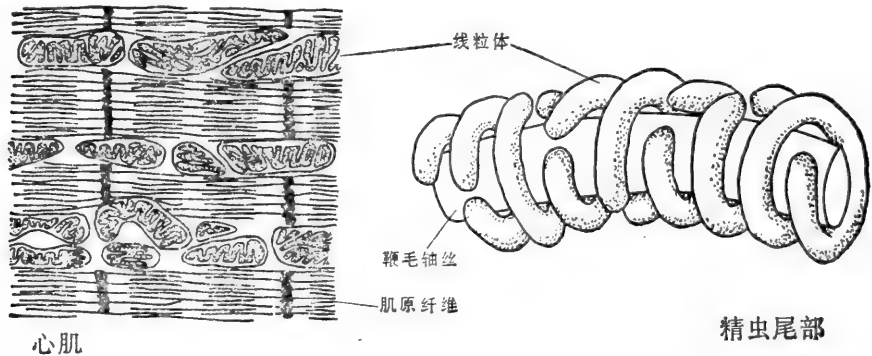


图 9-4 线粒体局部集中在靠近 ATP 高利用的特定部位的两个例子。关于所产生的 ATP 是怎样被水解而使肌肉(左)和真核细胞鞭毛(右)运动的讨论,请阅第十章。当精虫尾部鞭毛发育时,螺旋缠绕的微管暂时性地环绕着轴丝,这有助于线粒体集中于尾部。

反映心肌组织对 ATP 的更大需求。不同种类细胞线粒体的嵴也表现出显著的形态上差别,差别的意义不明(图9-7)。此外,线粒体通常含有特殊的酶,来为含有这种线粒体的特定的细胞服务。然而,在这一章里我们将不去注意这些差别,而集中注意于在所有线粒体中普遍存在的酶及其特性。在详细地阐述线粒体独特活性的特征——电子传递过程之前,我们将简要地描述产生呼吸链底物的代谢步骤。

当大量的乙酰辅酶A在基质空隙中由丙酮酸和脂肪酸产生时就开始了 线粒体的氧化作用⁴

如我们已提到的,线粒体中的氧化代谢主要是由胞液中酵解产生的脂肪酸和丙酮酸提供燃料。这些化合物有选择地从胞液中输入线粒体基质,在这里它们分解成乙酰辅酶A上的二碳乙酰基团(图9-8);这乙酰基团随后进入柠檬酸循环,将进一步降解。这过程以沿着呼吸链运送乙酰基衍生的高能电子而结束。

为了保证连续不断地提供氧化代谢以燃料,在动物细胞中脂肪酸和丙酮酸是以贮藏形式存在:脂肪贮存脂肪酸,糖原贮存葡萄糖,葡萄糖再分解为丙酮酸。脂肪在量上是极为重要的,部分地因为它们经氧化作用所释放出的能量较等量的水化形式糖原的氧化作用所释放的能量多五倍以上。一个普通成年人有足够的糖原,供给其约一天正常活动的需要,而足够的脂肪则可供其近一个月的需要。假若我们主要的燃料库是糖原而不是脂肪,那么人体的重量将平均增加约 60 磅。

人体脂肪大量贮藏⁵在脂肪组织里。其他细胞需要时,它就从脂肪组织释放到血液中。

在停止进食一段时间后就出现这种需要。正常情况下,即使经过一个夜晚,就迅速导致脂肪的代谢。所以在早晨,进入柠檬酸循环的多数乙酰辅酶A是由脂肪酸而不是由葡萄糖产生的,然而,进餐之后进入柠檬酸循环的大部分乙酰辅酶A则来源于食物中的葡萄糖,如有多余的葡萄糖,则用以补充消耗的糖原存储,或用以合成脂肪。(注意,糖类很容易转化成脂肪,而在动物细胞中脂肪则不能转化成糖类。)

一个脂肪分子是由三个脂肪酸分子所组成,这些脂肪酸以脂键联接着甘油。甘油三脂不带电荷,不溶于水,在胞液中聚结成滴状。一个大的脂肪滴几乎占据了脂肪细胞的整个体积,这大细胞是脂肪组织贮藏脂肪所特有的。在细胞内一般含有许多较小的脂肪滴,如心肌细胞,其能量供应是依赖于脂肪酸的分解。这些脂肪小滴通常与线粒体紧密联系(图9-9)。在所有细胞中,线粒体外膜和内膜上的酶对从脂肪分子产生的脂肪酸进入线粒体基质的运动起着媒介的作用。在基质中,每个脂肪酸分子被一系列反应循环所完全分解,循环的每一次周转同时在其羧基端整齐地切下了两个碳,产生一个乙酰辅酶A的分子(图9-10)。这乙酰辅酶A随后进入到柠檬酸循环中去,进一步被氧化。

六碳糖葡萄糖在胞液中首先被分解成两个分子的三碳丙酮酸,它们仍然保留着从葡萄糖氧化作用所能产生的总能量的大部分。这能量要在丙酮酸进入线粒体后的过程开始才能获取。在那里,丙酮酸遇上了比核糖体还大的酶复合体——丙酮酸脱氢酶。这复合体含有三种不同的催化酶、五种不同的辅酶和两种调节酶的许多拷贝——快速转化丙酮酸成乙酰辅酶A(图9-11)。这乙酰辅酶A与从脂肪酸所生成的乙酰辅酶A一起,进入柠檬酸循环。

柠檬酸循环氧化乙酰辅酶A上的乙酰基团,产生为呼吸链所用的 NADH 和 FADH₂

在19世纪,生物学家注意到,在没有空气的条件下细胞就产生乳酸(或乙醇),而在有空气时则生成CO₂和H₂O。为了证明需氧代谢途径,一切的努力最终都集中到丙酮酸的氧化,从而导致1937年柠檬酸循环(citric acid cycle),亦称三羧酸循环或克雷伯(Krebs)循环的发现。现在已经清楚,在大多数细胞中柠檬酸循环是占碳化合物全部氧化作用的

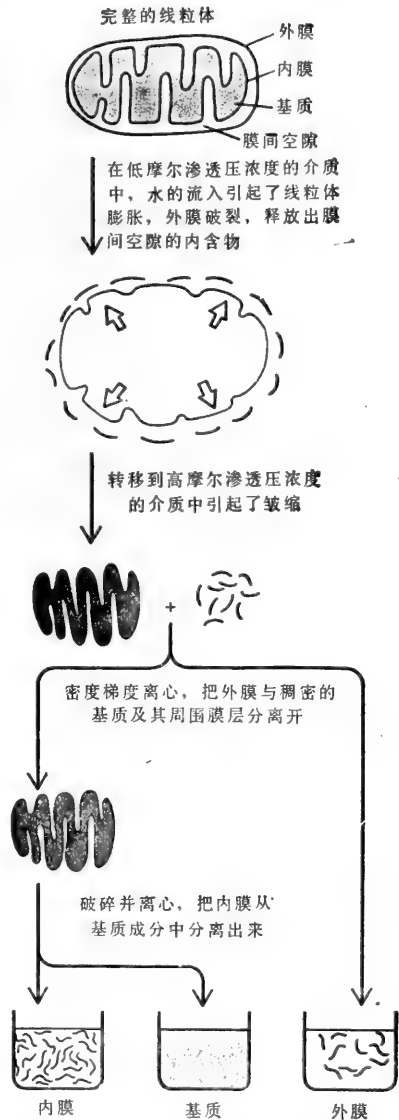


图9-5 分级分离纯化线粒体各组分的技术,使有可能研究线粒体的每个部位的不同蛋白质。这种方法表明,由于在低离子强度的介质中水流入线粒体,使基质空间大大膨胀。这种情况有利于在同一时间内大量制备线粒体。在膨胀时,内膜的嵴被展开,而外膜(没有皱褶),因膨胀而破碎,释放出只含有内膜及基质的结构。

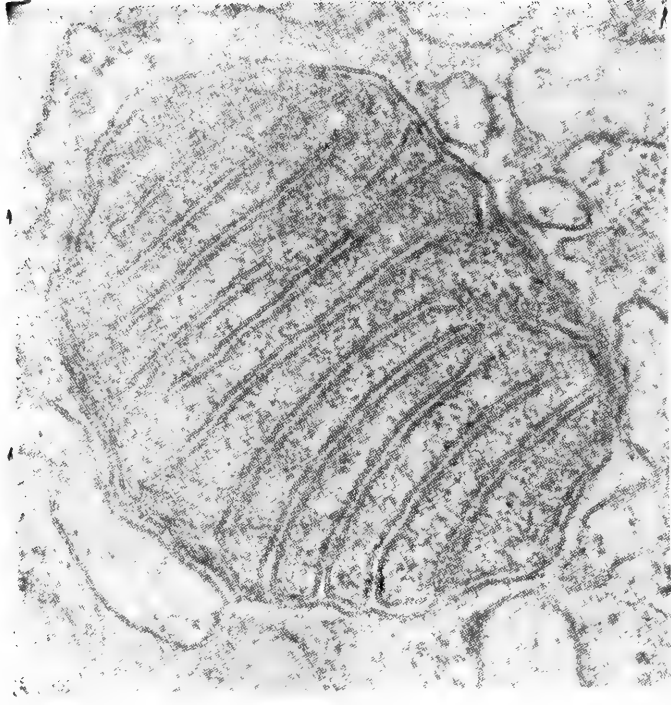
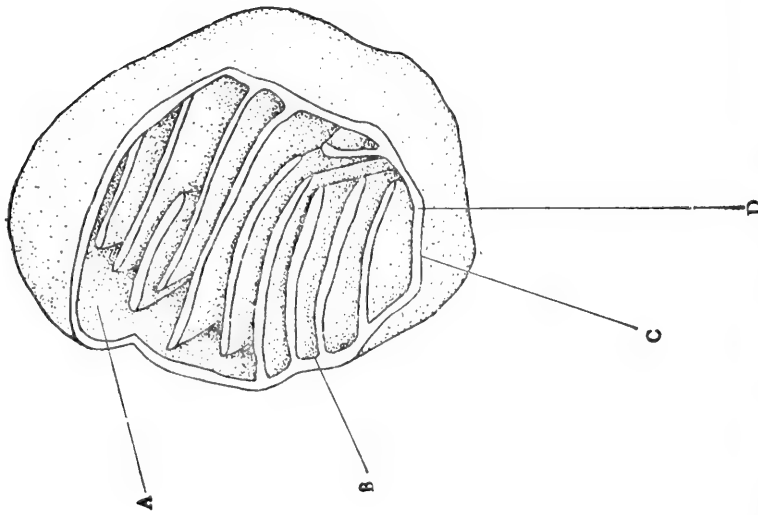


图9-6 线粒体的一般结构。在肝脏内，线粒体总蛋白质含量的67%分布在基质中，21%在内膜内，6%在外膜，膜间空隙含6%。如下面所述，这四个不同部位分别含有专一适合于其功能的不同蛋白质组。（显微照片由 Daniel S. Friend 赠）

A. 基质 基质含有数百种不同酶的高度皱缩的混合物，包括丙酮酸与脂肪酸氧化和柠檬酸循环环所需要的酶。它还含有几个相同拷贝的线粒体 DNA 基因组、特殊的线粒体核糖体、rRNA 和为线粒体基因表达所需要的各种酶。

B. 内膜 内膜折叠成许多嵴，这增大了它的总表面积。它含有三类主要蛋白质：(1)进行呼吸链氧化反应的蛋白质；(2)一种叫做 ATP 合成酶的酶复合体，在基质中制造 ATP；(3)特殊的转运蛋白，以调节代谢产物出入基质。因为驱动 ATP 合成酶的跨内膜的电化学梯度是由呼吸链所建立的，故而这膜对许多小的离子不可通透是很重要的。

C. 外膜 因为含有一大的通道形成蛋白，使外膜允许 10,000 道尔顿或更小的分子通过。在这膜上的其他蛋白质，包括那些转变脂质底物的酶，使脂质转换成在基质中最终可以被代谢的形式。

D. 膜间空隙 这空隙含有几种酶，这些酶利用从基质中流出的 ATP，使其他核苷酸磷酸化。

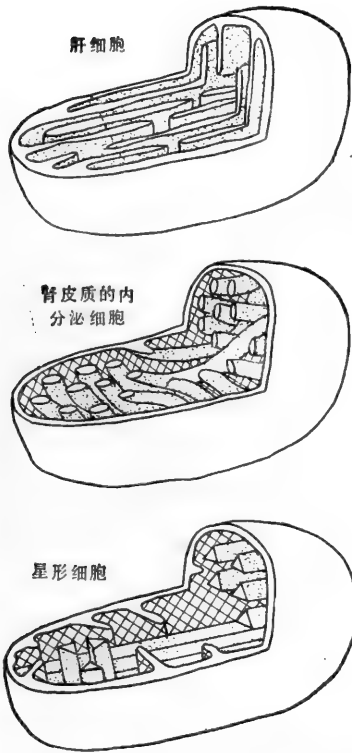


图9-7 在鼠的不同组织中发现的形态截然不同的线粒体。这些差异对线粒体功能的效应尚不知道。

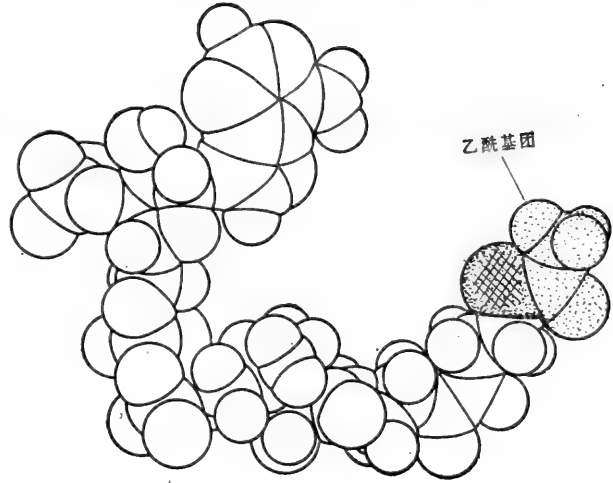


图9-8 乙酰辅酶A的空间结构模型。乙酰基仅是这整个辅酶的一小部分。以S标志的原子是硫原子(见图2-19)。

三分之二。其主要的最终产物是 CO_2 , NADH 和 FADH_2 。 NADH 和 FADH_2 将它们的电子提供给呼吸链。在呼吸链反应的末了, 这些电子被用来将 O_2 还原为 H_2O 。

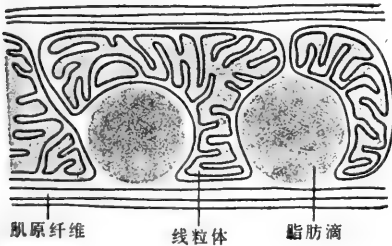
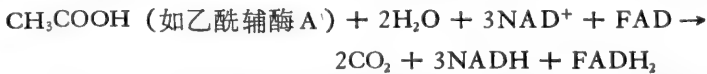


图9-9 在心肌细胞中, 其脂肪滴为线粒体所包围。线粒体氧化从甘油三酯衍生的脂肪酸。

柠檬酸循环开始于乙酰辅酶A与四碳化合物草酰乙酸缩合产生六碳的柠檬酸, 这循环因此而得名。随后, 由于七个连续的酶介导反应的结果, 两个碳原子以 CO_2 方式被转移, 草酰乙酸重新生成。这样的循环每一次周转, 从两个碳原子产生两个 CO_2 分子。这两个碳原子是在以前的循环中进入的(图9-12)。就乙酸而论, 其最终结果是:



这反应借助于一 GTP 中间产物, 通过在酵解作用中发生的一种磷酸化反应, 也产生一分子 ATP。但是, 它对代谢的最重要贡献是从乙酰辅酶A抽取高能电子。这是在乙酰辅酶A的两个碳原子转化成 CO_2 的过程中产生的。这些由 NADH 和 FADH_2 携带的电子随后被传递到线粒体内膜中的呼吸链(图9-13)。

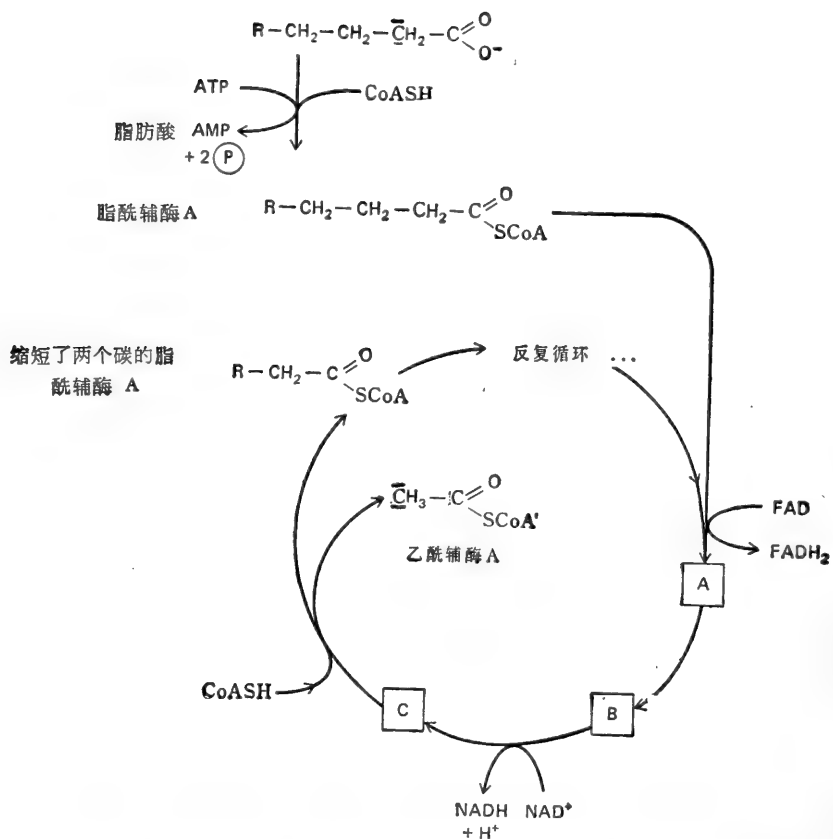


图 9-10 在线粒体基质中被催化的脂肪酸氧化循环,如图所示,这循环每次周转均缩短脂肪酸两个碳,并生成一分子乙酰辅酶 A,以及一分子 NADH 与一分子 FADH₂。

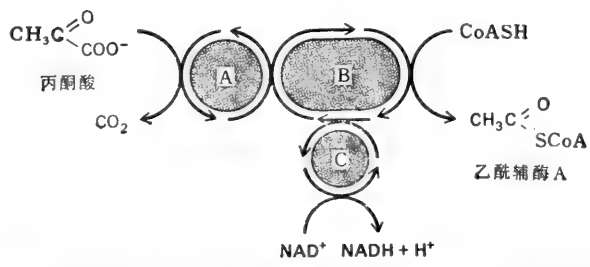


图 9-11 图解线粒体基质中转化丙酮酸为乙酰辅酶 A 的偶联反应。催化这些反应的大酶复合体(丙酮酸脱氢酶)的结构,在前面图 2-40 已有阐述。

在线粒体内膜上化学渗透过程将氧化作用的能量转入 ATP⁶

虽然柠檬酸循环是构成有氧代谢的组成部分,但在通向产生 NADH 和 FADH₂ 的反应中没有一个是可直接利用氧分子。那是发生在线粒体内膜上一系列最终分解代谢反应所特有的功能。在这些反应中, NAD⁺ 和 FAD 氧化底物所转移出来的电子同分子氧结合,形成可利用的能量,驱动 ADP + P_i 转化成 ATP, 因而氧化磷酸化作用 (oxidative phosphorylation) 一词被用来描述这整个过程(图9-14)。

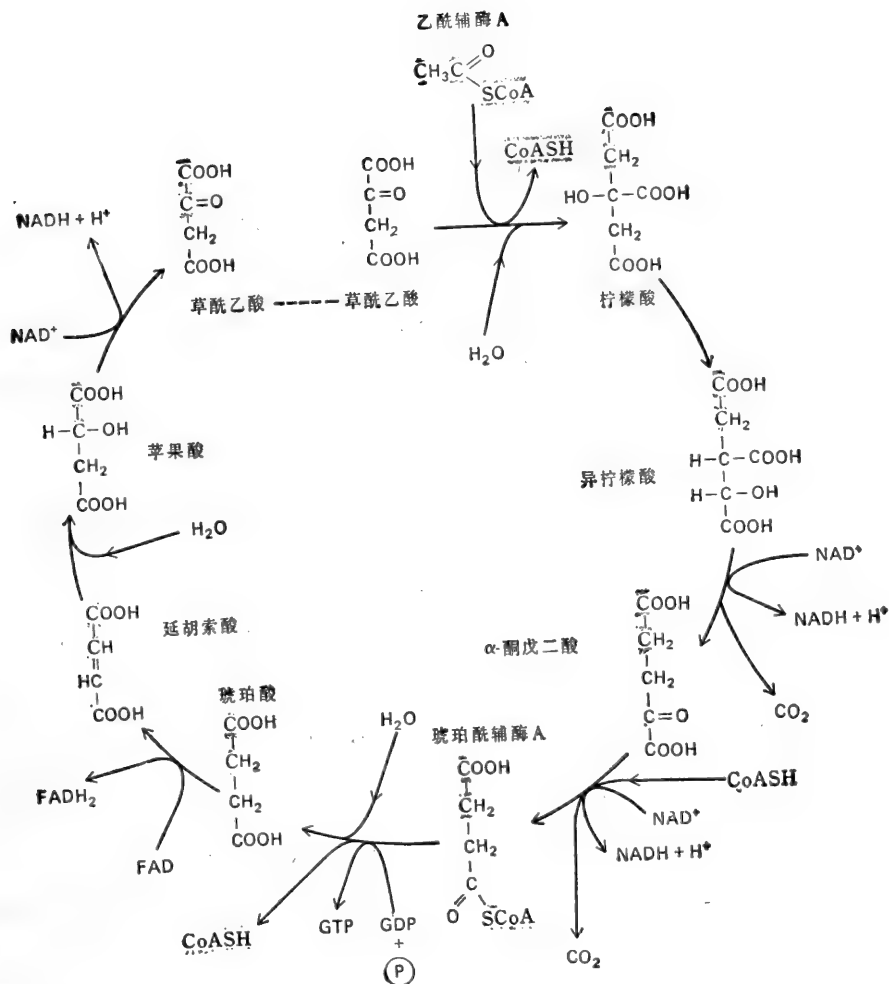


图 9-12 柠檬酸循环。这中间产物以它们的游离酸形式表现，虽然它们实际上是离子化的。所指示的每个步骤均被位于线粒体基质中的各种酶中的一种所催化。从乙酰辅酶A进入这循环的两个碳将在这循环之后的转换中转变成 CO₂。

如我们已经阐述的，借助呼吸链通过氧化磷酸化作用而生成 ATP，是依赖于一种化学渗透过程。当这假设在 1961 年第一次提出时，它的机制解答了细胞生物学中一个长期存在的问题；在积累了足够充分的证据而被人们普遍接受之前的几年，这个思想显得是多么的新颖。先前，人们相信 ATP 是由呼吸链合成的，这是与自 1937 年以来早已认识的由酵解产生 ATP 的机制相同，而酵解产生 ATP 的机制设想是：用氧化作用的能量来产生一联接磷酸基团和某些中间化合物之间的高能键，高能键裂解时所释放的能量推动了 ADP 转化为 ATP。然而，探测这途径中所预期的中间产物被证明是非常困难的；这困难并不出乎意料，因为结果证明，那种中间产物是没有的。

按照化学渗透假说，高能的化学中间产物被一介于化学过程（“chemi”）和渗透过程（“osmosis”来自希腊文 osmos，推动）之间的连接所替代，所以叫做化学渗透（chemiosmosis）（表9-1）。当来自 NADH 和 FADH₂ 上氢的高能电子在线粒体内膜中沿电子传

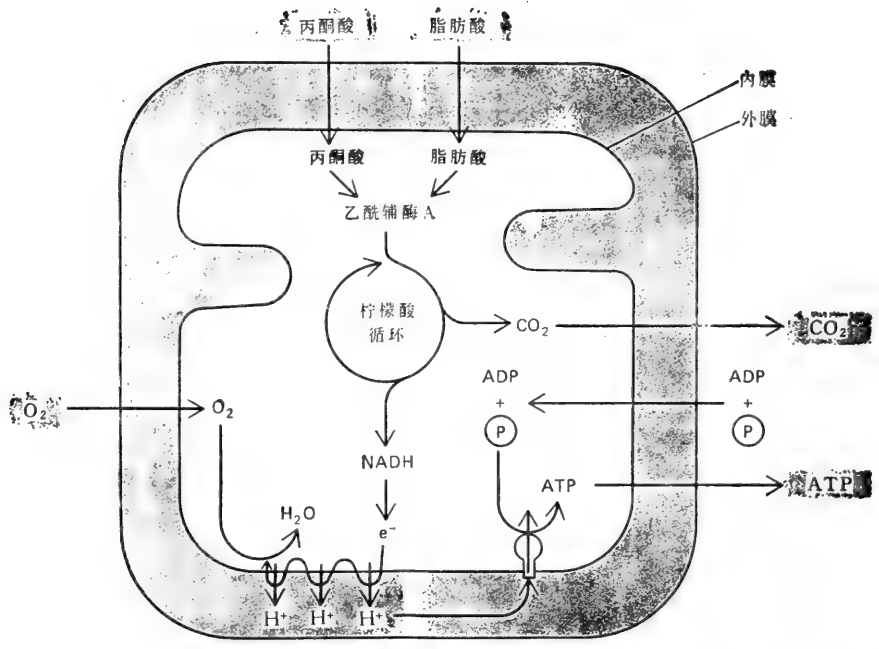


图 9-13 主要反应物进入和排出线粒体的流程。除了所表示的交换外，在胞液中由酵解作用产生了 NADH，从 NADH 所获得的电子参与到电子传递链。这传递是通过几种“穿梭”系统中的一种来间接完成。这些系统传送一还原型化合物进入基质，在这里它被氧化以产生 NADH (或 FADH₂)，随后又被传送出来，被胞液中 NADH 还原成原先的化合物。线粒体内膜对 NADH 是不直接渗透的。

递链传递下去(呼吸链)，从一个载体分子传到下一个载体时所释放出的能量被用以泵送质子从线粒体基质穿过内膜进入膜间空隙。这就产生一跨线粒体内膜的电化学质子梯度，而质子返流降低了梯度，依次被用于推动一膜结合酶，即 ATP 合成酶，它催化 ADP + Pi 转化成 ATP，完成氧化磷酸化过程。

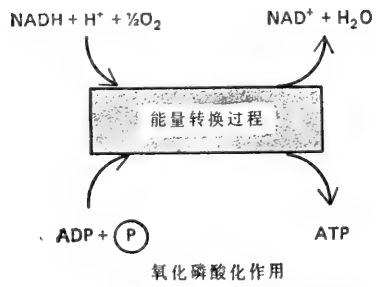


图 9-14 由线粒体催化的最终能量转换。这过程叫做氧化磷酸化，其中 NADH 氧化的部分能量成为 ATP 上的磷酸键能。

NADH 和 FADH₂ 分子上的电子是存储在高能键内，只有在这些电子同 O₂ 结合时细胞氧化作用总的自由能的大部分才被释放出来。因此，在氧化作用的前期阶段，用 NADH 和 FADH₂ 作为电子的载体，可保存从碳水化合物、脂肪和氨基酸燃烧提供的几乎全部可利用的能量，一直到最终阶段。随后，在活性的最后高峰，利用内膜中电子传递中间产物途径，迫使发生最终的氧化作用。这些电子传递中间产物获得被释放出来的能量，并最终用于推动 ADP + Pi → ATP 的反应。按这种方式，内膜具有能量转换机器的功能，它改变 NADH 氧化作用能量为磷酸键能(如 ATP)(图 9-14)。我们现在只概略地叙述这一系列反应，详细的讨论留待 480—491 页。

表 9-1 化学渗透学说

在六十年代早期提出的化学渗透学说,包含四个独立的假设。从线粒体的功能方面来说是:

- (1) 线粒体内膜上的呼吸链是转移质子的,当电子沿着呼吸链传递时,它将 H^+ 从基质空隙泵出。
- (2) 线粒体 ATP 合成酶复合体也可转移质子使之跨过内膜,这是可逆的,它可利用 ATP 水解所产生的能量将 H^+ 泵过内膜;但是,如果有了足够大的 H^+ 梯度,质子就以相反方向流经这复合体,推动 ATP 合成。
- (3) 线粒体内膜对 H^+ 、 OH^- 是不渗透的,对阴离子和阳离子通常也不渗透。
- (4) 线粒体内膜由一组载体蛋白装配而成,这些蛋白质调节主要的代谢产物出入内膜。

呼吸链将电子从 NADH 传递到氧⁷

嵌于线粒体内膜上的呼吸链,以同样的普遍机制捕获其他分解代谢反应中的能量。

$H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$ 反应是分为若干小阶段进行的,所以大部分的能量可转变成贮存形

式,而不以热的形式释放到外界。像在酵解或柠檬酸循环中那样,它包含有用于这反应的间接途径。但是有一重要的差别:被氧化的分子是氢,而不是碳水化合物,其间接途径首先是将氢原子分离成质子和电子。电子进入呼吸链,而质子逸到水溶液的环境中;只有在电子到达呼吸链末端之后,质子又转回来,中和由电子最后加入到氧分子所产生的负电荷(图 9-15)。

由于大部分的反应是从 NADH 上的氢,而不是从 $FADH_2$ 上的氢开始,所以我们将追溯从 NADH 开始的氧化过程。每个氢原子(我们以 $H\cdot$ 表示)含有一个电子(e^-)和一个质子(H^+)。每个 NADH 分子不是携带单个氢原子,而是一氢负离子(一个氢原子加上一额外的电子, $H:-$)。然而,由于质子在水溶液中是以游离形式存在的,所以实际上相等于携带一个氢分子的两个氢原子($H:- + H^+ \rightarrow H_2$)。相应地,在 NADH 的生成反应中,两个氢原子是从底物分子中同时被取出,产生一氢负离子和一个质子,如图 9-16 所示。

当一氢负离子($H:-$)从 NADH 被分离出,重新形成 NAD^+ ,这氢负离子转变为一个质子和两个电子($H:- \rightarrow H^+ + 2e^-$)时,沿着呼吸链的电子传递就开始了。这两个电子被传送到嵌于线粒体内膜上许多电子载体的第一个载体上。这阶段电子处于高能状态。当它们通过呼吸链中 15 个以上的不同电子载体分子的序列时,它们的能量就逐渐地降低。就大部分的载体而言,电子是从一个金属原子传递到另一个金属原子,每一种这些金属均以不同的方式牢固地结合在蛋白质的表面,这就改变了结合原子的电子亲和性。最简单的电子载体是一小的疏水分子,叫做泛醌(ubiquinone)或辅酶 Q(coenzyme Q)。每个泛醌能够获得或给出一个或两个电子,它还可从介质中暂时地获得一个质子,同它所携带的每个电子在一起(图 9-17)。

在呼吸链的许多蛋白质中,了解最清楚的是细胞色素 C,它的三维结构已由 X 光衍射晶体分析法所测定(图 9-18)。在呼吸链内有五种不同的细胞色素,组成一个有色蛋白质族。这些蛋白质均与一种结合的血色素分子有关。每当血色素接受一个电子的时候,它的铁原子就从三价铁(Fe^{III})变成二价铁(Fe^{II}) (图 9-19)。除了细胞色素,至少还有六种不同的铁-硫复合体、两个铜原子和两个黄素,它们同呼吸链蛋白质紧密结合,并携带电子。几个相邻的载体聚集在一起,形成大的呼吸酶复合体(respiratory enzyme comp-

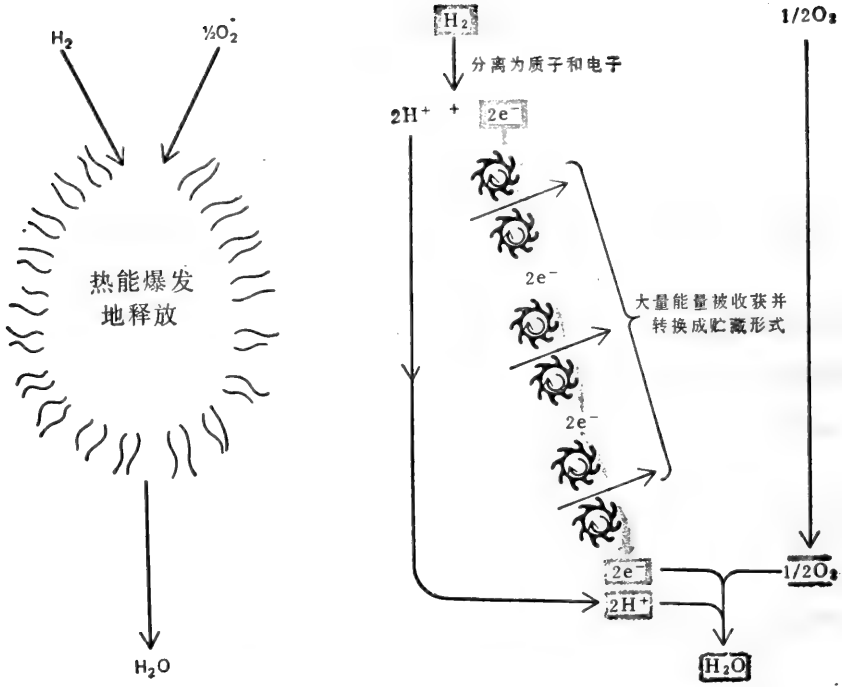


图 9-15 图解说明,当氢被燃烧时,大部分作为热释放的能量(左图)怎样代之以被利用,并通过线粒体内膜上的电子传递链贮藏(右图)。多余的氧化能量则被线粒体以热的方式释放出来。

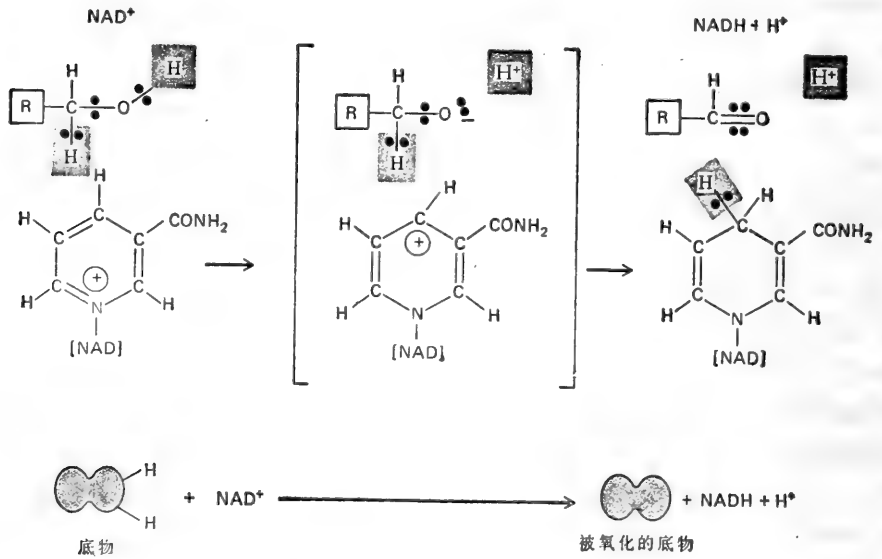


图 9-16 乙醇经生物氧化成乙醛,设想是按图所示的方式进行。两个完整氢原子的组分从乙醇丢失:一个氢负离子传递到 NADH,而一个质子逸出到水溶液中。在这过程中所描述的各个步骤都是发生在一蛋白质的表面,为乙醇脱氢酶上的特殊的化学基团所催化(未表示出来)。(引自 P. F. Cook, N. J. Oppenheimer, and W. W. Cleland, *Biochemistry* 20:1817-1825, 1981, 并作了修改)

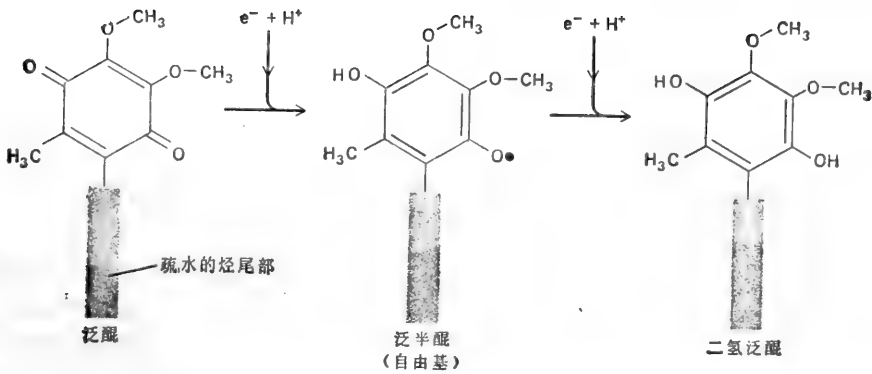


图 9-17 泛醌(辅酶 Q)在电子传递链中是一个重要的载体,可携带一个或两个电子,当它接收每一个电子的时候,它从周围水溶液中拾取一个质子。当它给出它的电子给链中下一个载体时,这些质子被释放出来。其疏水尾部使泛醌与膜连接在一起。在哺乳动物中它一般含有 10 个异戊二烯单体。在植物中相应的电子载体是质醌,它同泛醌基本上是相同的。

lexes), 这在下面将描述。呼吸链中每个后续的载体群对电子的亲水性比它前面的一个要大。其结果,电子以阶梯式从 NADH 传递下来,从一个酶复合体转移到另一个,能量水平逐级降低,一直到最后它们被传递到氧。氧对所有电子具有最大的亲水性。

细胞色素、铁-硫复合体和铜原子每次只能携带一个电子,而每个 NADH 可给出两个电子。每个 O_2 分子需接受四个电子才生成水。沿着电子传递链有几个电子收集点和电子分散点,调节着电子数量的变化。

电子沿呼吸链传递释放出的能量,以跨内膜的电化学质子梯度的形式贮存⁹

如前面所讨论的,在电子传递时所释放出来的许多能量为呼吸链的各部分所利用,以推动质子 (H^+) 从基质空隙到膜间空隙运动,从而流出到线粒体外面。质子的这样运动具有两个重要的后果。

1. 生成一个跨越线粒体内膜的 pH 梯度,同时在基质中的 H^+ 浓度显著地低于细胞的其他部位,这些地方的 pH 一般接近于 7 (记住,小分子可自由地穿过线粒体的外膜达到平衡,所以在膜间空隙内的 pH 将与胞液的 pH 相等)。

2. 跨越线粒体内膜产生一电位梯度(膜电位),其内部为负,外部为正(由于正离子的净外流所致)。

pH 梯度 (ΔpH) 驱动 H^+ 返回进入基质,并驱使 OH^- 从基质中流出。膜电位 ($\Delta \phi$) 则表现吸引任何正离子进入基质并驱使任何负离子外流,因而增强了 pH 梯度对 OH^- 和 H^+ 离子运动的作用。这两种力合起来被认为构成了电化学质子梯度(图 9-20)。

电化学梯度发挥着普通所认为的质子动力 (proton-motive force) 的作用,可以毫伏 (mV) 为单位进行测定。由于每 ΔpH 为 1pH 单位,具有相当于约 60mV 膜电位的效应,所以总质子动力可由下式求得:

$$\text{质子动力} = \Delta \phi - 60(\Delta pH)$$

在一典型细胞中,进行呼吸的线粒体中的质子动力大约为 220mV, 由约为 160mV 的膜电位和约为 -1pH 单位的 pH 梯度组成。

贮于跨内膜的电化学质子梯度的能量被用来产生 ATP 和输送代谢物进入基质空隙^{9,10}

线粒体内膜含有非常高的蛋白质比例,按其重量约 70% 为蛋白质,30% 为脂肪。许多

蛋白质属于建立跨内膜电化学质子梯度的电子传递链。另外的主要成分是催化 ATP 合成的酶。ATP 合成酶是一大的蛋白质复合体,通过它质子逆电化学梯度而返回基质。象涡轮机一样,这个蛋白质复合体可转换一种能量形式为另一种形式。在线粒体基质中,在与质子向内流动相偶联的反应中,这能量形式可使 ADP 和 Pi 合成 ATP (图 9-21)。

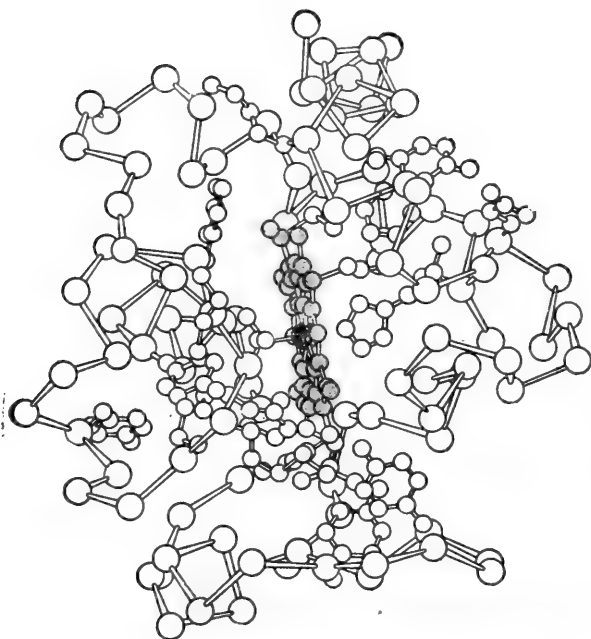


图9-18 细胞色素 c, 电子传递链中的一个载体的结构。这一小分子蛋白质含有比 100 稍多的氨基酸,并较疏松地联结在膜上(见图 9-31)。在结合血红素(浅灰色)上的铁原子(黑色)可携带一个电子。

但是, ATP 合成不是被跨线粒体内膜的电化学梯度所驱动的唯一过程。在线粒体基质(这里发生着柠檬酸循环和其他代谢反应)里的酶需要有高浓度的底物供给,而 ATP 合成酶需要有 ADP 和磷酸盐供应。这意味着许多带电荷的不同物质必须通过通常不能透过的线粒体内膜。在基质与胞液之间的这些物质交换是由埋于内膜中的各种各样重要的转运蛋白质来介导的。在许多情况下,这些蛋白质逆电化学梯度主动运输特定的分子,这是需要输入能量的过程。对大多数的代谢物来说,这能量是从共转运其他分子时降低了它的电化学梯度来提供的。例如, ADP 和磷酸盐两者需要被输入入基质空隙。ADP 是由 -ADP-ATP 反向运输系统所携带:每输入一个 ADP 分子需要输出一个 ATP 分子,而降低它的电化学梯度。在同时,一个同向转运系统(symport system)将磷酸盐的向内移动和 H⁺ 向内流动偶联起来: H⁺ 离子在降低了它们的电化学梯度时进入基质,“拖着”磷酸盐一起。丙酮酸是线粒体中一重要的燃料,也是以这种方式被输送进入基质(图9-22)。

跨线粒体内膜的电化学梯度的另一种生物功能是将 Ca²⁺ 从胞液泵出。在胞液中,游离的 Ca²⁺ 浓度维持在非常低的水平 (<10⁻⁷mol/L) 是必要的,因为胞液中 Ca²⁺ 浓度的微小变化都是调节各种各样细胞活动过程的信号。内膜含有一转运蛋白,它利用贮于跨内膜的电压梯度中的能量,有效地将 Ca²⁺ 运送进入基质(图9-23)。

源于电化学梯度的能量主要是用以输送分子和离子进入线粒体,较少的能量用以驱动 ATP 合成酶。例如,如果相当大浓度的 Ca²⁺ 加到呼吸的线粒体中,那么线粒体就完

全停止了 ATP 的生产，所有电化学梯度的能量被转而用来泵送 Ca^{2+} 。显然这里必定存在着某种机理，它引导贮在电化学梯度中的能量通向任一给定时刻最需能量的那些过程。

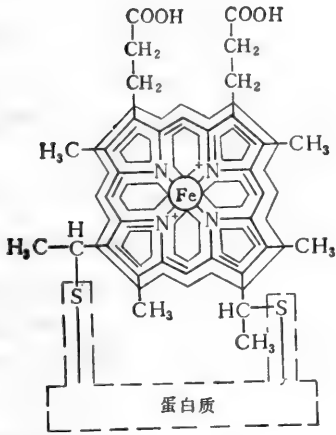


图9-19 共价地联结于细胞色素 c 的血红蛋白基团的结构。由于不同细胞色素中的血红素具有稍为不同的结构，并以不同的方式联结于蛋白质，所以每个细胞色素对电子具有不同的亲和性。

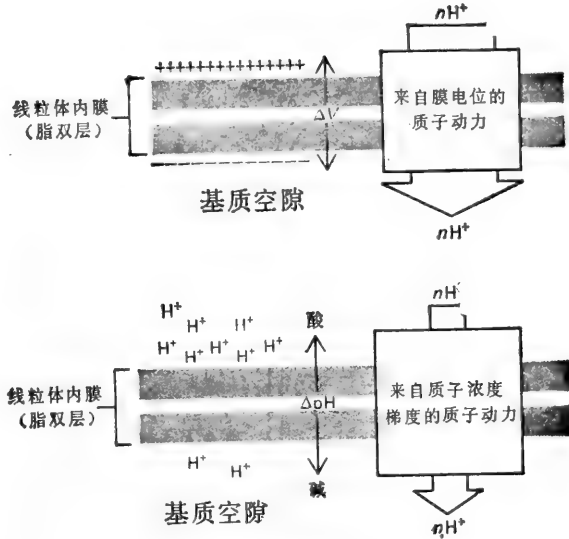


图9-20 跨线粒体内膜的电化学质子梯度的两个组成部分。总的质子动力由两部分组成：大量的力来自膜电位(以 ΔV 或 $\Delta\psi$ 表示)，小量的力来自质子浓度梯度(ΔpH)。这两种力作用于驱动质子进入基质空隙。

线粒体中 ADP 快速转化成 ATP，以维持细胞质的 ATP 库中有充足的 ATP

我们已经知道，在线粒体内膜中有一特殊的转运蛋白质，它执行着一反向转运系统的功能，可利用贮于跨内膜的电化学梯度的能量来运送 ADP 进入基质空隙，并换出 ATP (图 9-22)。其结果，由于胞液中 ATP 水解所产生的 ADP 分子迅速进入线粒体，再次补充基质中的 ADP，而在线粒体基质中经氧化磷酸化所形成的 ATP 分子就迅速逸出到需要它的胞液中。在人体中，典型的 ATP 分子穿梭地进出线粒体，每天数千次地重新补充，以使细胞中 ATP 浓度保持在高于 ADP 浓度的 5—10 倍。

我们也已经知道，细胞中生物合成的酶是怎样地指导它们的底物沿着特定的反应途径进行，它们通常驱使能力学上不利的反应与能力学上有利的 ATP 水解作用相偶联(图 2-29)。所以，高度负荷的 ATP 库被应用以驱动细胞的反应过程，非常象一只电池可用以驱动电动机那样。如果线粒体的活性停止了，ATP 量就降低，细胞的电池耗尽。最终，ATP 水平降低到一定程度，此时能力学上不顺利的反应就不再能被 ATP 水解所驱动了。

初看起来，这样状态的水平似乎是不会达到的，除非 ATP 的浓度降落到零。但事实上，在一限定的 ATP 浓度下，这样的情况会很快地出现，而 ATP 浓度是依赖于细胞中 ADP 和 P_i 的浓度。要阐明为什么是这样的，我们必须转到某些热力学的基本原理上来。

ΔG° 和 ΔG 之间的差别: 大的 ΔG 负值是细胞 ATP 水解作用所需要的¹¹

根据热力学第二定律, 化学反应是自发地沿着与整体的无序状态增加相适应的方向进行的。在第二章里, 我们指明, 以热的形式释放能量到周围环境的反应(例如 ATP 的水解), 由于提高了周围环境中随机分子运动的强烈程度, 其整体的无序状态也趋于增加。

各种反应中, 由于改变了起反应的化学物质的浓度, 也可能影响其无序状态的程度。一个反应所影响的整体无序状态的最终变化, 可以由与这反应相联系的自由能变化 (change of free energy), ΔG , 反映出来: 使自由能大大降低的反应(所以 ΔG 是大的负值), 产生了整体上的最大的无序状态, 反应非常迅速地进行着。

细胞内部正常状态下, 水解 ATP 为 ADP 和无机磷酸所需的自由能变化是在每摩尔-11 和-13 千卡之间, 使得这水解反应极其顺利。但这仅仅由于细胞中 ATP 的浓度保持着比 ADP 和 P_i 的浓度高得多的情况。在所谓的“标准状态”下, ATP、ADP 和 P_i 都以相同的每升一摩尔的浓度存在, ATP 水解的 ΔG ——所谓反应的标准自由能变化 (standard free-energy change) 或 ΔG° ——只有每摩尔-7.3 千卡。在 ATP 浓度相对地低于 ADP 和 P_i 浓度的情况下, ΔG 将等于零。在这一点上, ADP 和 P_i 结合形成 ATP 的速率将正好等于 ATP 水解成 ADP 和 P_i 的速率。换句话说, 当 $\Delta G = 0$, 反应处于平衡状态(图 9-24)。

然而, ΔG° 值是一常数, 它仅依赖于反应物的性质, 而 ΔG 值则是可变的, 依赖于反应物的浓度。事实上, ΔG 值表示一反应距离平衡状态有多远。因此, 是 ΔG , 而不是 ΔG° , 揭示某反应是不是能用来驱动其他反应。在细胞中, 线粒体中 ADP 有效地转变成 ATP, 维持 ATP 的浓度高于 ADP 和 P_i , 并通过保持细胞中 ATP 水解反应远离平衡状态, 从而造成 ΔG 为一大的负值。如果没有这不平衡, ATP 水解就不再能被用来引导细胞中的许多反应, 许多生物合成反应将因此而没有方向

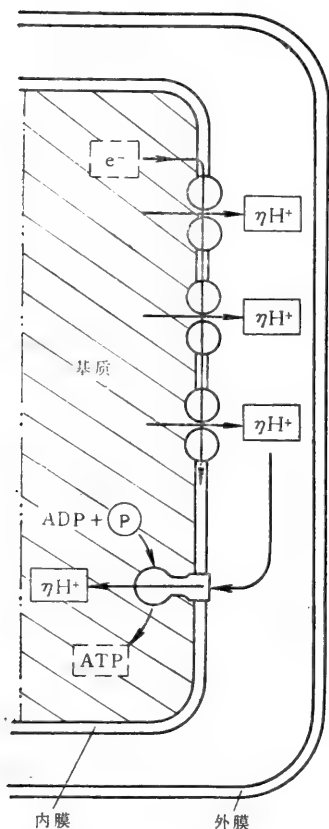


图 9-21 氧化磷酸化的一般机制。当一高能电子沿电子传递链传递而降低能量时, 质子则在三个能量贮存部位的每个部位被泵出基质空隙。这些质子产生了跨内膜的电化学质子梯度。这梯度驱动质子通过 ATP 合成酶返回基质。合成酶是一跨膜蛋白质复合体, 它利用质子流的能量使基质中的 ADP 和 P_i 合成 ATP。地来回进行。

细胞呼吸作用具有显著的高效率

通过氧化磷酸化作用的途径, 当 NADH 中的每对电子传递给氧时, 提供了可形成 3 个 ATP 分子的能量 ($FADH_2$ 中的一对电子能量较低, 只能形成 2 个 ATP 分子)。总计, 每分子乙酰辅酶 A 进入这循环可形成约 12 个 ATP 分子, 这意味着从 1 个葡萄糖分子可产生 24 个 ATP 分子, 从 1 个棕榈酸分子(一种 16 碳脂肪酸)可生成 96 个 ATP 分子。

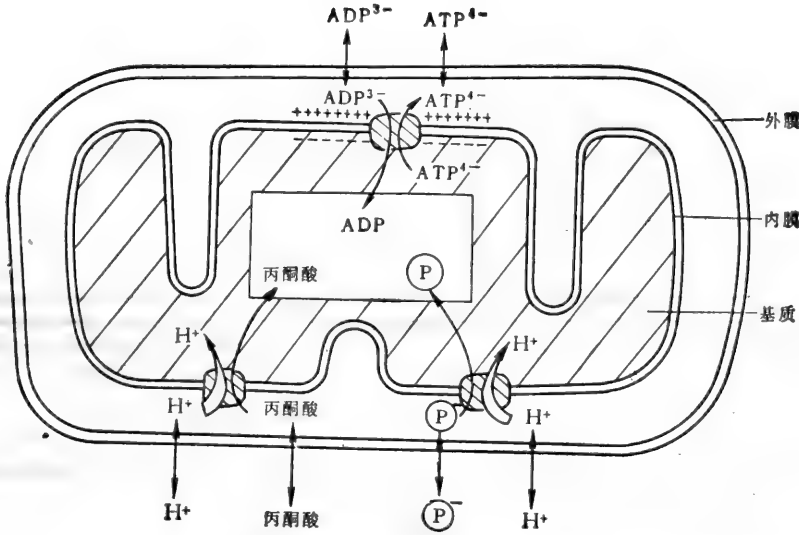


图 9-22 由跨线粒体内膜的电化学质子梯度所驱动的某些主动运输过程。这些化合物可自由地渗透过外膜。关于反向转运和同向转运机制的讨论,见第六章。

如果包括了在乙酰辅酶 A 形成之前所发生的能量生成反应,那么 1 个葡萄糖分子的完全氧化可给出净产量约 36 个 ATP 分子,而一棕榈酸分子完全氧化可得约 129 个 ATP 分子。这些数目接近于最大值,因为线粒体中制造 ATP 的真实数量还依赖于电化学梯度能量中有多少是用于 ATP 合成之外的目的。

当脂肪和碳水化合物燃烧直接成为 CO_2 和 H_2O 所需的自由能变化,与相应的生物氧化时 ATP 磷酸键中贮藏的总能量相比较,结果氧化能量转化成 ATP 键能的效率常常要大于 50%。这明显地优于许多人工制造的能量转换装置的效率。如果细胞以电动机或汽油发动机的效率 (10—20%) 作功的话,那么生物将必须狼吞虎咽地吃大量的食物以维持它自己的生命。而且,由于所有被浪费的能量均以热的形式释放出来,大形体的生物将需要发展出更为有效的机制,才能将热散发到环境中去。

在了解了关于细胞的呼吸作用后,同学们可能很惊奇,为什么细胞中化学的相互转化常常牵涉到这么复杂的途径。柠檬酸循环和呼吸链中的许多步骤的确可被绕道进行,使糖最终氧化成 CO_2 和 H_2O 的反应完成得更为直接。这样,呼吸作用虽可更易于进行,但这对细胞将是一种灾害。因为只有通过包含许多中间物的氧化途径,这些中间物的每个化合物所不同于前面一个的仅在于能量上的些小差异,才能使由氧化作用释放的大量自由能划分成一小部分一小部分,才可能以偶联反应的方式高效率地转化成有用的能量形式(见图 2-17)。

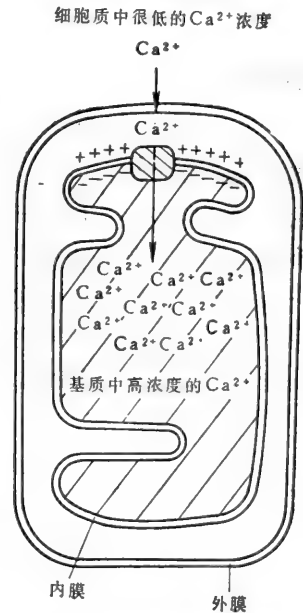
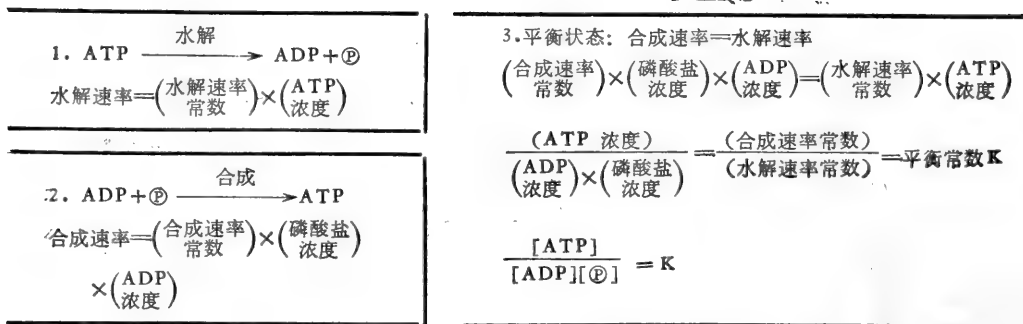
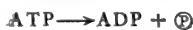


图 9-23 由膜电位驱动的作用,钙主动输入线粒体。因为线粒体内部大部分的钙被设想是以磷酸钙的形式沉淀,所以 Ca^{2+} 的积聚似乎只需作相对少量的功。



4. 对于这反应



适用下列方程式:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} - RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][\textcircled{P}]}$$

这里 ΔG 和 ΔG° 是以每摩尔千卡为单位。R 是气体常数 (2×10^{-3} 千卡摩尔⁻¹·K⁻¹), T 是绝对温度 (°K), 所有的浓度均以每升摩尔数为单位。

当所有反应物的浓度是 1 mol/L, 则 $\Delta G = \Delta G^{\circ}$ (因为 $RT \ln 1 = 0$)。因此 ΔG° 是一常数, 规定为这反应的标准自由能变化。

在平衡状态这反应没有对整体无序状态的净效应, 所以 $\Delta G = 0$, 因此处于平衡状态:

$$RT \ln \frac{[ATP]}{[ADP][\textcircled{P}]} = \Delta G$$

但是在平衡状态下, 反应物的浓度必须满足平衡方程式:

$$\frac{[ATP]}{[ADP][\textcircled{P}]} = K$$

所以在平衡状态 $\Delta G^{\circ} = RT \ln K$ 。因此, 我们可以知道 ΔG° 指示一反应的平衡点, 而 ΔG 则表示这反应距离平衡有多远。

图 9-24 以 ATP 水解反应来阐述自由能变化和平衡之间的基本关系。这里所表示的平衡常数 K 是以每摩尔升数为单位。

小结

线粒体进行着大量的细胞氧化作用, 并产生大量的细胞的 ATP。线粒体基质空隙含有大量的各种酶, 包括氧化丙酮酸和脂肪酸为乙酰辅酶 A 的酶, 以及利用乙酰辅酶 A 生产大量 NADH (和 FADH₂) 的柠檬酸循环的酶。埋于线粒体内膜的电子传递链可利用氧和 NADH 等化合物所携带的活性电子结合所得到的能量, 将基质中的质子泵出, 以产生一跨膜的电化学质子梯度。这梯度——包括膜电位和 pH 差所起的作用——依次被内膜中的蛋白质复合体利用来合成 ATP。这梯度也直接驱动有选择的代谢物主动地输入和输出基质, 给与 ATP-ADP 交换以动力, 使细胞的 ATP 库保持在高度负荷状态。

呼吸链^{7,9}

我们已经概略地考察了线粒体具有怎样的功能, 现在让我们更详细地来研究呼吸链——电子传递链, 它对所有的氧化代谢是如此的关系重大。因为呼吸链的各组成也是线粒体内膜固有的组成, 所以关于它们的研究构成了对膜生物学的主要贡献, 提供了生物膜各个蛋白质组成之间所发生的复杂的相互作用的最清楚的例证。

从线粒体可分离出具有功能的、翻里朝外的颗粒¹²

对于呼吸链的研究, 完整线粒体不容易进行实验处理, 因而必须将其破碎。用超声波破碎线粒体, 就可能分离出亚线粒体颗粒, 包含有破碎的嵴膜。破碎的嵴膜可重新封闭

成密闭的小泡，直径为 100nm (图 9-25)。负染色的亚线粒体颗粒的电子显微镜照片揭示其外表面散布着直径为 9nm 的小球，以小柄连接于膜(图 9-26)。在完整的线粒体中，这些“棒糖”——ATP 合成酶——是包在内膜的内侧(面向基质)。因而这亚线粒体颗粒是内膜里翻朝外的小泡，它们原先面向基质的表面则暴露在周围介质中。结果它们可以自由地与代谢物接触，正常情况下这些代谢物由基质供应。当加入 NADH、ADP 和无机磷，这些小颗粒可从 NADH 传递电子到 O_2 ，并使这一氧化作用与 ATP 合成相偶联。

ATP 合成酶可以被纯化，并可以活性形式加回到膜上^{12,13}

最先使催化氧化磷酸化作用的各种膜蛋白质能彼此分离开而又不破坏它们活性的试验，是在 1960 年完成的。散布在亚线粒体颗粒表面的 9nm 大小的蛋白质小球可以从颗粒上拆离下来，并以溶解状态将其纯化。经拆离的颗粒仍然能够在有氧条件下氧化 NADH，但它们不再能合成 ATP。另一方面，纯化的小球起着 ATP 酶的作用，可水解 ATP 成为 ADP 和 P_i 。当纯化的小球(叫做 F_1 ATP 酶)被加回到被拆离的亚线粒体颗粒上，它们的 ATP 酶活性就逆转；重新构成的亚线粒体颗粒可立即从 ADP 和 P_i 再合成 ATP。

随后的研究表明， F_1 ATP 酶是一个较大的含有九种不同多肽链的跨膜复合体(约 500 000 道尔顿)的一部分，现在已知道即为 ATP 合成酶(也叫做 F_0F_1 ATP 酶)。复合体包含了整个内膜蛋白质的 15%。非常相似的 ATP 合成酶亦存在于叶绿体和细菌膜内。这种普遍存在的蛋白质复合体含有一跨膜的质子通道，当质子流经这通道，降低了电化学梯度时，ATP 便合成。

对 ATP 合成酶功能的一个最令人信服的证据是得自 1974 年完成的一个实验。从那时起，方法学上的发展使被去垢剂溶解的完整的膜蛋白质可移植到脂肪小泡(脂质体)上，小泡是由纯化的磷脂形成。因此，这就有可能组成一种杂交膜，含有纯化的线粒体 ATP 合成酶和细菌视紫质——一种细菌的光驱动质子泵，当这些小泡暴露在光下，被细菌视紫质泵入小泡的质子可通过 ATP 合成酶返回流出，引起了外面溶液中 ATP 的形成(图 9-27)。由于细菌质子泵和哺乳动物的 ATP 合成酶之间直接的相互作用看来极不可能，所以实验强有力地支持了这一观点，即质子转移和 ATP 合成是氧化磷酸化过程中的两个独立的事件。

ATP 合成酶可能方向相反地起着水解 ATP 和泵 H^+ 的作用^{12,14}

ATP 合成酶是一可逆的酶复合体；它能利用 ATP 水解的能量去泵动质子跨过线粒

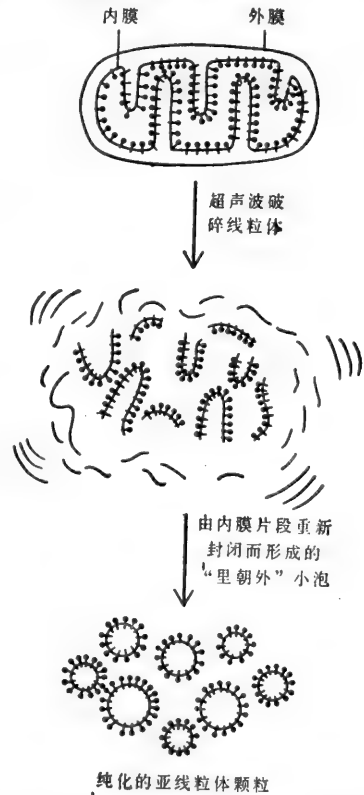


图9-25 从纯化的线粒体制备亚线粒体颗粒的基本程序。这些颗粒是破碎的嗜膜片段所形成的封闭小泡。

体的内膜,也可能利用降低电化学质子梯度的质子流来生产 ATP (图 9-28)。因而,它相当于一可逆的偶联装置,进行电化学质子梯度和化学键能的相互变换。它的作用方向依赖于电化学质子梯度的陡度和因 ATP 水解产生的区域化 ΔG 之间的平衡。

ATP 合成酶的名称是源于这一事实,即它正常地受呼吸链所保持的很大的电化学质子梯度(见图 9-20)的驱动,以产生大部分的细胞 ATP。虽然准确的数量迄今仍有争论,但可能是由每两个或三个质子通过 ATP 合成酶来驱动合成一个 ATP 分子。为了便于下面叙述的计算,我们姑且认定其数量是3。

在任何时刻,无论 ATP 合成酶是以合成 ATP 方向或水解 ATP 方向进行工作,均依赖于为转移 3 个质子穿过内膜进入基质空隙的顺自由能变化 (ΔG_{3H^+} , 小于 0)和为在基质中合成 ATP 的逆自由能变化 ($\Delta G_{ATP合成}$, 大于 0)之间精确的平衡。如上面所讨论的, $\Delta G_{ATP合成}$ 的值依赖于线粒体基质空隙中的 ATP、ADP 和 P_i 三个反应物准确的浓度(图 9-24)。另一方面, ΔG_{3H^+} 值与跨过线粒体内膜的质子动力的值成比例。下面的例子将有助于阐述这两个自由能变化之间的平衡是怎样影响 ATP 合成酶。

如图 9-28 说明中所解释的,单个质子移动进入基质降低 220mV 的电化学梯度,可释放每摩尔 5.06 千卡 (kcal/mol) 的自由能,而 3 个这样的粒子的移动释放出三倍于这样多的自由能 ($\Delta G_{3H^+} = -15.2\text{kcal/mol}$)。因此,如果质子动力恒定地保持在 220 mV, ATP 合成酶将合成 ATP,一直到 ATP 和 ADP 与 P_i 的比例达到 $\Delta G_{ATP合成}$ 正好等于 +15.2 kcal/mol(在这一点上, $\Delta G_{ATP合成} + \Delta G_{3H^+} = 0$) 为止。这时将不再有 ATP 合成酶所催化的 ATP 净合成或水解。

假设大量的 ATP 突然间为细胞胞液中需能反应所水解,引起了基质中 ATP:ADP 的比例下降,这时 $\Delta G_{ATP合成}$ 值将降低(阅图 9-24), ATP 合成酶将开始合成 ATP,而重新恢复到 ATP:ADP 的原先比例。换句话说,如果质子动力突然降低,然后保持在恒定的 200mV 水平上, ΔG_{3H^+} 将变为 -13.8 kcal/mol。其结果, ATP 合成酶将开始水解

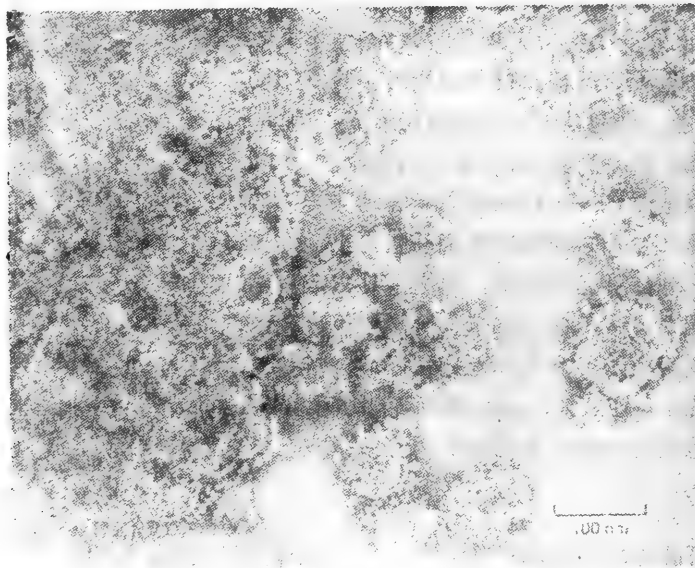


图 9-26 亚线粒体颗粒的电子显微镜照片。(Ephraim Racker 赠)

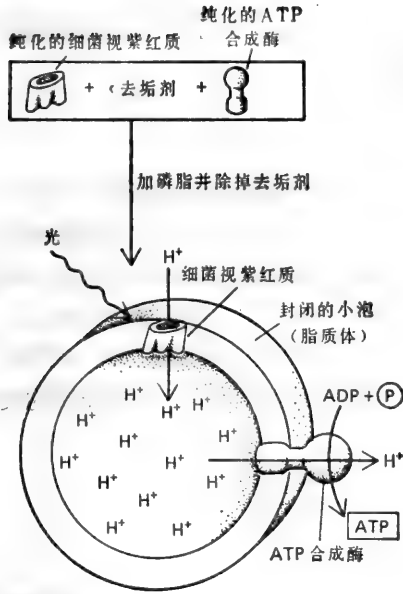


图9-27 证明 ATP 合成酶可被一简单的质子流所驱动的一个重要实验的简略图。把光驱动的细菌质子泵(细菌视紫质)和从中心肌线粒体纯化获得的ATP 合成酶,与磷脂组合形成一小泡,这小泡对光应答而合成 ATP。至于图中所示的质子途径在线粒体中是否常常以短路的方式——这被泵入的质子沿着膜流动进入ATP合成酶,而不是首先进入液相的途径,这个问题在专家中是有争议的。然而实验表明,质子不像是从一呼吸酶复合体直接传递到ATP合成酶。

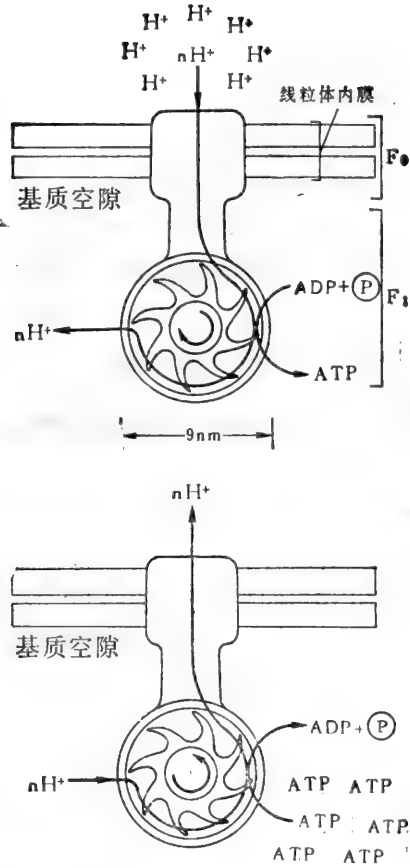


图9-23 ATP 合成酶是一大的复合体,具有约500,000 分子量,由至少九种不同的多肽链组成。整个复合体也可称为 F_0F_1 ATP 酶。其五个多肽链构成复合体的球状头部,可被分离出来,称为 F_1 ATP 酶。如所指出的,ATP 合成酶起着可逆的偶联装置的作用,使电质子梯度和化学键能相互转换。如文中所阐述的,在任何给定的时刻,它的作用方向是依赖于跨膜的质子转移和从ADP 及 P_i 合成 ATP 的偶联过程的净自由能变化。

在上面我们已经指出,ATP水解的自由能变化(ΔG)怎样依赖于三种反应物 ATP、ADP 和 P_i 的浓度(图 9-24); ATP 合成的 ΔG 是这个值的负数。跨膜质子转移的 ΔG 是两个数值的总和: (1) 由膜电位差 $\Delta\psi$ 而使 1 摩尔的任何离子运动的 ΔG , 以及(2)在任何两个区室之间的浓度差使 1 摩尔分子运动的 ΔG 。在 475 页上质子动力的方程式兼有这相同的两种成分,用当量的膜电位的增加替代浓度差,以产生质子“电化学势”。因此,质子转移和质子动力的 ΔG 测量了相同的势能,一种是以千卡表示,而另一则是以毫伏表示。在它们之间的变换因子是法拉第(Faraday)。因而,

$$\Delta G_{H^+} = -0.023 (\text{质子动力})$$

这里 ΔG_{H^+} 是以每 kcal/mol 为单位,而质子动力则以 mV 表示。每 220 mV 的电化学质子梯度

$$\Delta G_{H^+} = 5.06 \text{ kcal/mol.}$$

基质中的一些 ATP——直到 ATP 和 ADP 与 P_i 达到新的平衡 (此时 $\Delta G_{ATP合成} \approx +13.8$ kcal/mol)——等等。

如我们将会在后面看到的,许多细菌中 ATP 合成酶的作用按一定程序在需氧代谢和厌氧代谢之间反向转换。ATP 合成酶的可逆性是把离子运动偶联于 ATP 合成或水解的其他膜蛋白所共有的一种性质。例如,在第六章所叙述的 Na^+-K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵两者均水解 ATP,并可利用水解所释放的能量去泵动特定的离子通过膜。如果这些泵的任一种处于由它所传递的离子梯度异常高的情况下,它将逆向起作用——从 ADP 和 P_i 合成 ATP,而不是水解 ATP。因此,如象 ATP 合成酶,这种离子泵可能把贮藏在跨膜离子梯度中的电化学能量直接转换成 ATP 中的磷酸键能。

呼吸链可表示为泵动 H^+ 跨过线粒体内膜

尽管 ATP 合成酶不能正常地从基质空隙传递 H^+ 穿过线粒体内膜流出,而埋在膜中的呼吸链通常却能做到,从而产生电化学质子梯度,驱动 ATP 合成。呼吸链将质子从基质空隙向外转移的能力可在特定条件下以实验来证明。例如,离体线粒体悬浮液中加进适于氧化作用的底物,通过 ATP 合成酶的 H^+ 流可被一适当的抑制物所阻止。在没有空气条件下,注入小量的氧到这制剂中,引起了短暂的呼吸作用的猝发,在氧耗尽之前持续 1—2 秒钟。当呼吸作用猝发时,由于 H^+ 从基质空隙流出所造成的介质的突然酸

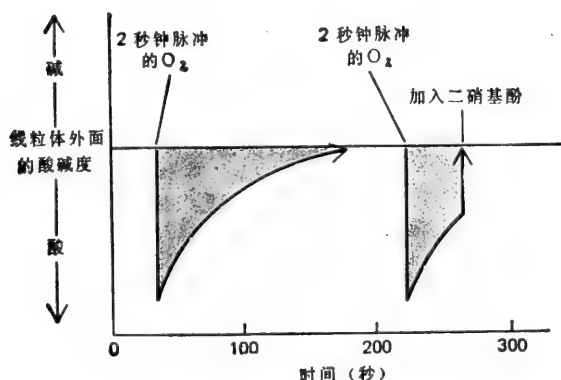


图9-29 线粒体中呼吸作用驱动 H^+ 转移的实验证明。一密封小室,含有作为呼吸作用电子来源的无氧的纯化线粒体的悬浮液,以及可消除膜电位的离子载体(缬氨霉素+ K^+ ,见 291 页)。当以注射器针头脉冲注入氧,结果导致 pH 值变化,如图所示。其后加入二硝基酚,由于使质子流迅速通过线粒体内膜返回,消除了 pH 的变化,如后面曲线所描述。

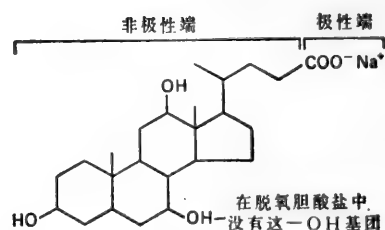


图9-30 相对较温和的阴离子去垢剂,胆酸盐和脱氧胆酸盐的结构。它们的强度足以溶解膜蛋白质,常被应用而不损伤酶的活力。

化,这可用灵敏的 pH 电极来测定。随后经过 1—2 分钟, pH 回复到原先的数值,因为 H^+ 经不同的缓慢途径跨膜渗漏而返回到基质空隙(图 9-29)。

相同的实验也可用亚线粒体颗粒的悬浮液来进行。在这种情况下,当注入氧气时,介质变得更碱,因为由于亚颗粒的位向是翻里朝外,质子被泵入每个小泡中去。

呼吸链包含有埋在内膜中的大的酶复合体^{15,16}

线粒体内膜的纯化制剂已被用来作为纯化包括呼吸链在内的各种各样蛋白质的起始材料。较为温和的离子去垢剂被用来破碎膜,这足以使个别成分优先溶解(图 9-30),最终证实从 NADH 到氧过程中三个主要的膜结合的呼吸酶复合体。

1. NADH 脱氢酶复合体,含有至少 12 个多肽链,接受从 NADH 来的电子,并传递给泛醌(uQ)。泛醌是一小的脂溶性分子。uQ 传递它的电子到第二个呼吸酶复合体, b-c₁ 复合体。

2. b-c₁ 复合体,含有 8 个不同的多肽链,设想是以二聚体形式存在,约 500 000 道尔顿。这复合体本身含有两个细胞色素,接受从泛醌来的电子,并传递给细胞色素 c。细胞色素 c 是一小的外周膜蛋白质,传递它的电子给细胞色素氧化酶复合体。

3. 细胞色素氧化酶复合体(细胞色素 aa₃),是这三种复合体中最具特征性的,包含有 7 个不同的多肽链,可以二聚体形式分离出来,约 250 000 道尔顿。每个单体已证明是以图 9-31 所描述的方式坐落在膜内。

细胞色素氧化酶接受来自细胞色素 c 分子的 4 个电子(每次一个),最终传送这些电子到一单个结合态的 O₂ 分子上,从而形成两个水分子。在每个细胞色素氧化酶单位内有多电子载体,这对其他呼吸链复合体似乎也是存在的。在细胞色素氧化酶中,两个电子先进入低电位的氧化还原中心(细胞色素 a 的血红素和一联结蛋白的铜原子, Cu₁),而后电子依次传递包含另外的铜原子和细胞色素 a₃ 血红素的结合氧部位。每个结合的氧分子是怎样精确地同 4 个电子和 4 个质子起反应而产生 2 分子水,现在还不知道。

经测算,大多数细胞所吸取的总氧量的 90% 为细胞色素氧化酶反应所利用。因为,具强毒性的氰化物、叠氮化物和一氧化碳均能牢固地与这复合体结合,这就阻断了所有的电子传递。

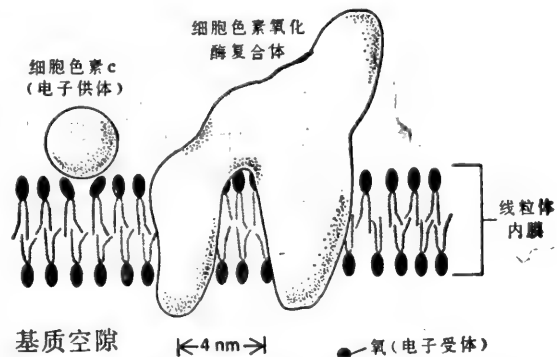


图9-31 细胞色素氧化酶复合体和它的电子供体,以及受体分子的相对大小和形状。图中所示的低分辨率的细胞色素氧化酶复合体的三维结构,是由各不同角度电子显微镜观察的二维晶体(结晶薄片)图像构成的。

在双层膜内,电子传递是由扩散的供体和受体之间的随机碰撞所调节¹⁷

呼吸链的三个主要酶复合体表现以独立的实体在内膜双层膜中扩散着;据计算,每 5 ms 它们平均扩散约 40nm,这距离大约为其本身直径的六倍。在复合体之间携带电子的两个成分——泛醌和细胞色素 c——比较小,但其移动较酶复合体约快 10 倍;它们的扩散系数与磷脂分子的扩散系数相似($\sim 10^{-8} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)。计算表明,在这些载体和酶复合体之间的随机碰撞足以容许所观察到的电子沿呼吸链传递的速率(每个复合体给出和接受一个电子大约每 5—20ms 一次)。因此,就没有必要另假定在脂双层中电子传递蛋白质具有结构上有序的链。

如下观察支持了这个观点。经计算,呼吸链的各种组成是以不同量存在的,对于每分

子 NADH 脱氢酶复合体, 有 3 分子的 b-c₁ 复合体, 7 分子细胞色素氧化酶复合体、9 分子细胞色素 c 和 50 分子的泛醌。此外, 用脂质体同亚线粒体颗粒融合的方法, 使过量的磷脂稀释内膜的蛋白质。以冰冻断裂的电子显微术研究这种颗粒的膜, 认为膜上呼吸链复合体比正常亚线粒体颗粒上的要分开得远得多, 没有观察到有序的排列。

三个呼吸酶复合体的每一个氧化还原电位的很大降落提供了泵压质子所需要的能量^{13,14}

象 H₂O 和 1/2 O₂ (或 NADH 和 NAD⁺) 成对的化合物, 叫做共轭的氧化还原对 (conjugate redox pairs), 这是由于一化合物因加入一个或多个电子和一个或多个质子而可转变成另一个化合物——这些质子可容易地从任何水溶液中得到。例如:



已经知道得很清楚, 一共轭酸碱对的两个成员的 50:50 混合物起着缓冲液的作用, 维持着一定的“H⁺ 压”或 pH, 这是酸解离常数的测量。以完全相同的方式, 共轭的氧化还原对的两个成员的 50:50 混合维持着一定的“电压”或氧化还原(氧化作用—还原作用)电位 (E), 这是测定电子载体对电子的亲性和。

将电极置于含适当共轭氧化还原对的溶液中, 可以测定每个参与生物氧化还原反应

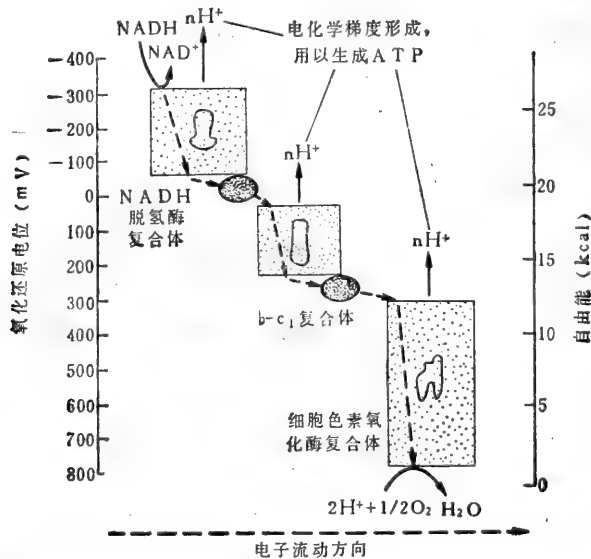


图 9-32 当电子沿呼吸链往下流向氧时, 氧化还原电位降落。氧化还原电位的标准符号采用 E', 或 E_h。由一个 NADH 分子给出的两个电子, 每个电子传递所需的标准自由能变化, 由右边纵坐标来表示。从 FADH₂ 传递的两个电子, 比从 NADH 传递的两个电子产生较少的可利用的能量。其原因是, 结合于蛋白质的 FADH₂ 较之 NADH, 具有不同的氧化还原电位 (在 0 mV 范围内)。这样, 它的电子由一不贮能的过程传递到泛醌。因此, 从 FADH₂ 到氧的电子传递, 仅在两个部位而非三个部位引起质子被泵出 (图中未标明)。

的各种电子载体的氧化还原电位。最负的氧化还原电位的成对化合物具有对电子最弱的亲和性, 因此它们含有最强趋势来给出电子和最弱的趋势去接受电子的载体。这样, NADH 和 NAD⁺ 的 50:50 的混合物具有的氧化还原电位为 -320 mV, 这表明 NADH 具有强的趋势来给出电子, 而 H₂O 和 1/2 O₂ 的 50:50 混合物具有的氧化还原电位为 +820 mV, 表明 O₂ 具有强的趋势去接受电子。

图 9-32 表明沿呼吸链所测定的氧化还原电位。电位经三个大阶段降落，每个阶段是通过每个主要的酶复合体。在任何两个电子载体之间的氧化还原电位变化是与在它们之间的电子传递所释放的自由能成正比(图 9-32)。每个复合体起着能量转换装置的作用，利用自由能变化，随着电子的流动泵质子跨过膜，产生了电化学梯度。这转换可分别以每个纯化的复合体参入脂质体来直接证明(见图 9-27)。当三个离体的复合体的任何一个与适当的电子供体和受体在一起时，电子就能流经复合体，而质子则跨过脂质体膜转移。

以氧化磷酸化为基础的能量转换机制要求每个蛋白质复合体以固定的方向埋在脂双层膜中，所以所有的质子都以同样的方向被泵出基质空隙(图 9-33)。膜蛋白质的这种矢量机构 (vectorial organization) 是用不透过膜的探针标记膜的一侧或另一侧的每个复合

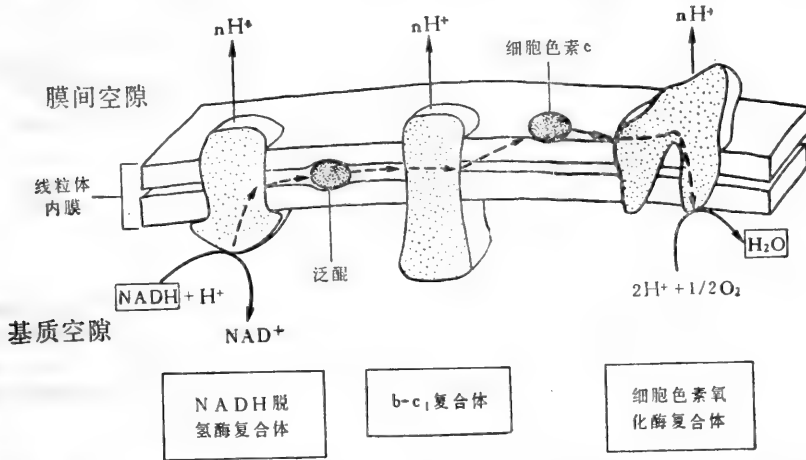


图 9-33 图解当从 NADH 传递两个电子到氧时，电子流经三个主要呼吸酶复合体。泛醌和细胞色素 c 在复合体间起载体作用。

体，而得到证明。双层膜的这种独特的方向性是所有膜蛋白质的共同特性，也是它们的必不可少的功能。

呼吸作用的质子泵机制尚未了解清楚⁹

在氧化磷酸化作用中，每一分子 NADH 被氧化大约可合成最多三个 ATP 分子(即在呼吸链中，每两个电子流都通过所有的三个酶复合体)。如果我们假定，由于 ATP 合成酶每合成一个 ATP 分子就有三个质子流返回，我们就能确定酶复合体每传递一个电子，平均可泵 1.5 质子 (这就是有些酶复合体每传递一个电子可泵一个质子，而另一些则泵两个质子)。

电子传递偶联于质子泵的分子机制，对于不同的呼吸作用酶复合体似乎是不同的。例如，当电子载体泛醌将它的电子给与 b-c₁ 复合体时，质子似乎直接被泛醌泵出。这是可能的，因为泛醌从其水介质中获取一个 H⁺，也一起获得它所携带的电子，当它释放电子时就放出 H⁺ (见图 9-17)。泛醌是自由地溶解于脂双层膜中，设想它可接受靠近膜内表面的电子，并在靠近外表面给出电子予 b-c₁ 复合体，从而每传递一个电子就传送一个质子通过双层膜(图 9-34)。以这种方式，传递一个电子就可能泵一个质子。

同上面这一类型的机制相反，对细胞色素氧化酶复合体来说，没有明显的电子载体

也能携带质子的证据。在这种情况下，似乎是电子传递诱导蛋白质构象的有序的变构，这变构引起蛋白质复合体本身某部分可能泵送质子。这是怎样准确地完成，尚不知道。

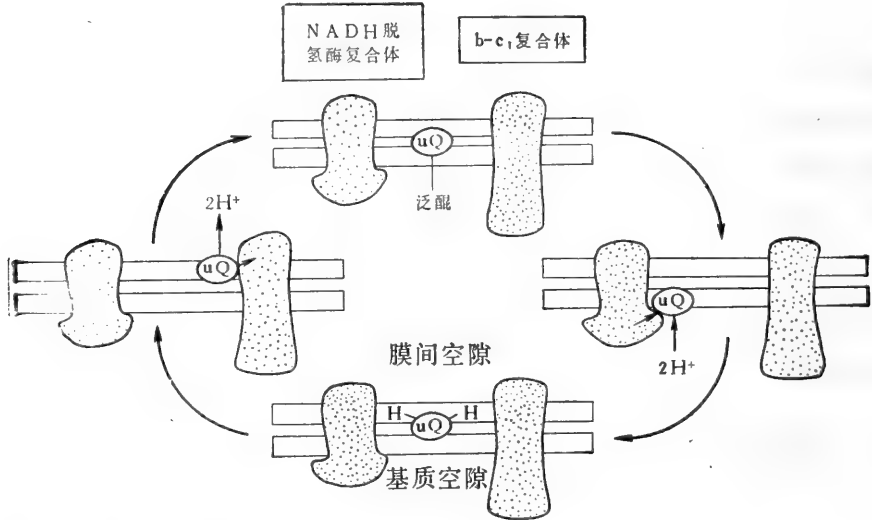


图 9-34 泛醌(uQ)在以定向地接受电子和给出电子的作用下，可将质子从基质中泵出。如图所示，泛醌在脂双层膜中很快地扩散，并可同时携带两个电子和两个质子(见图9-17)。其他具有质子化和去质子的氧化作用和还原作用的电子载体是 NADH 和 FADH₂，设想它们也是以这种方式来泵质子。然而，就所观察的全部质子流来计算，以这样的机制每个电子不可能泵足够的质子。(见正文)

H⁺ 离子载体消散着 H⁺ 梯度，因此使电子传递与 ATP 合成解联²⁰

自本世纪四十年代以来，已知有几种亲脂性弱酸起着解联剂的作用。加入这些低分子量有机化合物到细胞中，可停止线粒体进行 ATP 合成，但并不阻断其氧吸收。在解联剂存在下，电子传递仍以高速率继续着，但不产生 H⁺ 梯度。对这效应的解释是既简单又恰当：解联剂起着 H⁺ 载体或离子载体(质子载体)的作用，提供了另一条 H⁺ 流通过线粒体内膜到 ATP 合成酶的途径。这“短路”所造成的结果是质子动力完全消失，不再合成 ATP。这机制在图 9-35 中以正解联剂 2,4-二硝基酚的精细研究作了阐明。

通常呼吸控制通过呼吸链抑制电子流²¹

当一解联剂如二硝基酚加到细胞中，线粒体显著地增高了它们吸氧的速率，这是由于电子传递速率的增高。这反映了呼吸控制(respiratory control)的存在。这一控制被认为是通过直接抑制电化学质子梯度对电子传递速率的影响而起作用的。当这电化学梯度被一解联剂所消除，电子传递则不受限制地自由进行，在供给底物的情况下可达到最高的速率。然而，当梯度提高，电子传递变得较为困难，其过程就变慢下来。如果用实验方法人为地增大跨内膜的电化学梯度，正常的电子传递就完全停止，并在呼吸链的某些部位能够测到逆向的电子流(reverse electron flow)！最近的观察提示，呼吸控制反映了电子传递所需的自由能变化和联结电子传递的质子泵所需的自由能变化之间的简单平衡——换句话说，电化学质子梯度的大小影响着电子传递的速率和方向，差不多也以同样

的方式影响着 ATP 合成酶的方向性。

呼吸控制正好是反馈控制的一个精巧的连锁系统的组成部分，它与酵解、脂肪酸降解，柠檬酸循环和电子传递的速率相协调。所有这些过程的速率受着 ATP:ADP 比值的调节，每当 ATP 的利用增加了，就引起 ADP 水平上升，速率就增高。控制系统的集中部位被认为正好是线粒体内膜上的 ATP 合成酶。当 ATP 合成酶的底物 ADP 和 P_i 的浓度增加，酶的工作也加快。当其速率升高，酶就让更多的质子流入基质，从而更迅速地消散电化学梯度。梯度的降落，反过来增高了电子传递的速率。

包括 ATP 对几种关键酶的反馈抑制在内的类似控制，作用于调节呼吸链中 NADH 被利用的速率和产生的速率，以及其他等等的调节。这许多控制机制共同作用的结果，使人体在剧烈运动时的脂肪和糖的氧化要比休息时加快 5 至 10 倍。

天然的解联剂可转变褐色脂肪中的线粒体为产生热的机器²¹

在某些特殊的脂肪细胞中，线粒体的呼吸作用天然地与 ATP 合成机制解联。这些细胞已知的有褐色脂肪细胞，其氧化作用的能量全部以热的方式消失，而不转变为 ATP。大线粒体内膜上含有一特殊的传递蛋白质，这蛋白质允许质子自由地流动而降低它们的电化学梯度，使电子传递与呼吸控制解联。其结果细胞以高速率氧化它们贮藏的脂肪，并产生热，而非 ATP。因而，这些组织起着“热垫”的作用，使冬眠动物复苏，并防止新生儿的敏感部位受冻。

在细菌的多样性中化学渗透机制是一普遍的主题²²

细菌利用着多种多样不同种类的能源。某些细菌非常象动物细胞，糖经酵解作用和柠檬酸循环被氧化成 CO_2 和 H_2O ，并合成 ATP。这些细菌在其质膜内含有呼吸链，非常相似于线粒体内膜中的呼吸链。其他类型的细菌是绝对厌氧的，它们仅仅由酵解(发酵作用)或由使用氧以外的分子作为最终电子受体的电子传递链，来获得能量。这些不同的电子受体可能是氮化合物(硝酸盐或亚硝酸盐)、硫化合物(硫酸盐或亚硫酸盐)，或有机化合物(延胡索酸盐或碳酸盐)。电子经质膜中的一系列电子载体被传递到这些受体。这些电子载体类似于线粒体呼吸链上的电子载体。

除了这种差异之外，所有迄今已研究的细菌在其质膜中都嵌有 ATP 合成酶，这是同线粒体(和叶绿体)中所发现的 ATP 合成酶很相似。在缺乏电子传递链的厌氧细菌中，ATP 合成酶的工作是逆向的，应用由酵解所生成的 ATP 去建立跨细菌质膜的质子动力。在其他所有细菌中，由电子传递链产生的质子动力驱动 ATP 合成酶制造 ATP。

所有细菌，包括严格限于发酵作用的类型，都保持有跨过它们质膜的质子动力，这个事实反映了电化学质子梯度在跨质膜逆其浓度梯度运输物质中的重要作用。例如， Na^+ 是由一 Na^+-H^+ 反向转运系统泵出细菌，在真核细胞中 Na^+-H^+ 反向转运系统是由 Na^+-K^+ ATP 酶所取代。同样，携带营养物进入细菌的主动运输系统也是 H^+ 同向转运系统，这系统中所需的代谢物由一特殊载体蛋白质的作用，随同一个或多个质子一起被运进细胞内。大多数的氨基酸和许多糖是以这方式来运输的(图 9-36)。其他来源的能量——包括 ATP 水解或同 Na^+ 一起的向内同向转运——驱动某些细菌载体蛋白质的主动传递，但这些类型是比较稀少的。相反，在动物细胞中跨过质膜的大部分向内运输是由 Na^+ 梯

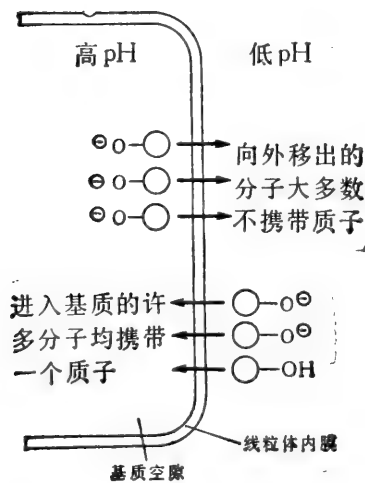
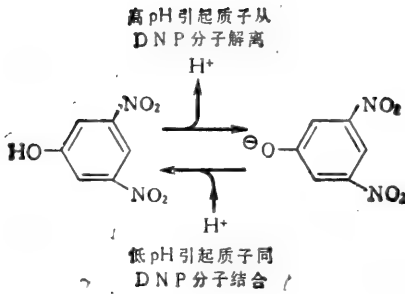
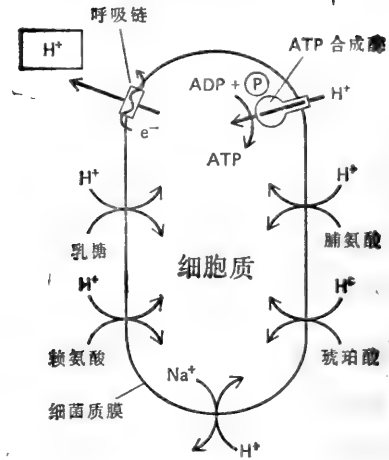


图9-35 解联剂二硝基酚 (DNP)对质子流经线粒体内膜的传导作用。不带电荷(质子化)的和带电荷的二硝基酚都能穿过脂双层膜扩散,而不需要传递蛋白质。由于电化学质子梯度的作用,二硝基酚分子在膜内将携带比膜外更多的质子,一直到质子动力完全消失。

(A) 有氧条件下



(B) 无氧条件下

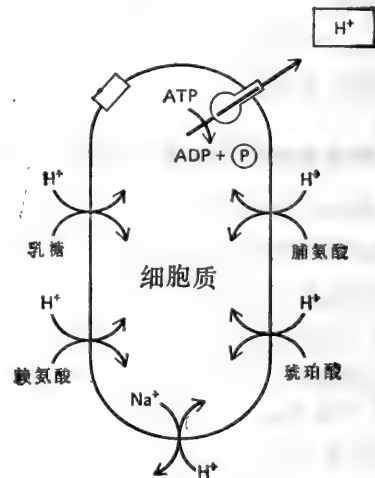


图9-36 跨细菌细胞质膜所产生的质子动力,泵营养物质进入细胞,并排出钠。(A)在需氧细菌中,电化学质子梯度是由呼吸链生成的,然后被 ATP 合成酶用于产生 ATP。(B)相同的细菌在无氧条件下生长,则由酵解作用产生它的ATP。ATP的一部分被 ATP 合成酶水解,建立跨膜质子动力,以驱动运输过程(如文中所述,其他细菌具有的电子传递链,将在无氧条件下泵送质子,用氧以外的分子作为电子的最终受体)。

度来驱动,而 Na^+ 梯度是由 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATP}$ 酶建立。

小结

在从 NADH 到 O_2 的过程中,呼吸链含有三种主要的酶复合体,它们埋在线粒体内膜中。每一种复合体都可被纯化,插到合成的脂肪小泡中,并证明当电子通过这膜被传递

时,也可泵送质子。在天然膜中,可移动的电子载体泛醌和细胞色素c使电子传递链臻于完善。电子流的途径是:

$\text{NADH} \rightarrow \text{NADH 脱氢酶复合体} \rightarrow \text{泛醌} \rightarrow \text{b-c}_1\text{复合体} \rightarrow \text{细胞色素c} \rightarrow \text{细胞色素氧化酶复合体} \rightarrow \text{分子氧} (\text{O}_2)$

呼吸酶复合体是插在膜内,具有一定的方向性,所以所有的质子是泵出基质的。

由呼吸链产生的电化学质子梯度,经另一个叫做ATP合成酶的跨膜蛋白质复合体的作用,可被用于产生ATP。ATP合成酶是一种可逆的偶联装置,在正常情况下它转换进入基质的质子流,成为ATP磷酸键能;但它也能水解ATP,朝外泵质子。在线粒体、叶绿体和细菌中的这一普遍现象证明了在所有细胞中化学渗透机制的重要性。

叶 绿 体²³

所有的动物和大部分微生物依赖于从周围环境中不断地摄取大量的有机化合物而生存。这些化合物为生物合成提供了碳架,并通过有控制的氧化作用提供代谢能量,以驱动所有的细胞活动过程。可以相信,在原始地球上出现的最初的生物,能利用由地球化学过程所产生的丰富的有机化合物(见3页)。但是大多数这些化合物在几十亿年以前就被耗尽了。从那时起,为活细胞所需要的所有有机物质实际上都是由营光合作用的有机体(包括许多不同类型的光合细菌)所生产的。最高等的光合细菌是蓝藻菌(cyanobacteria),它们很少需要营养物质。它们利用从水中来的电子和太阳光的能量去转化大气中的 CO_2 成为有机化合物。此外,在裂解水的过程中,在 $n\text{H}_2\text{O} + n\text{CO}_2 \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + n\text{O}_2$ 反应中,它们将氧化磷酸化反应所需要的氧释放到大气中。如下面我们将阐述的,从更为原始的光合细菌进化成蓝菌,这首先使需氧生命形式的发展成为可能。

其后重要的发展是植物的出现,在植物中光合作用是由细胞内的细胞器——叶绿体来实行的。在白天光照时间内,叶绿体专门执行能量代谢的职能。当夜晚,它们停止了高能代谢物的生产,而植物细胞依靠其线粒体生产ATP。植物线粒体同动物细胞中的线粒体是非常相似的。

基于大量的生物化学证据,普遍认为,叶绿体是蓝菌的后裔,它被原始真核细胞摄入,并以共生方式生活着。按这个观点,叶绿体和线粒体间的许多差别,部分是由于从不同细菌祖先派生出来的,部分由于进化的变化,这反映了它们在真核细胞中的不同作用。然而,叶绿体中有关光驱动ATP合成的基本机制和线粒体中呼吸作用驱动ATP合成的机制是非常相似的。

叶绿体有其特别的区室,但仍与线粒体相象^{9,24}

叶绿体以化学渗透机制进行它们的能量相互转换,这与线粒体的工作方式非常相似,并按相同的原理来组织的(图9-37、9-38、9-39和9-40):它们具有一高度可渗透的外膜,有一渗透性低的内膜,其中埋有某些特殊的转运蛋白,以及在内、外膜之间的狭小空隙。内膜包围着一大的中心空隙,叫做间质(stroma),它同线粒体的基质(matrix)类似,含有许多不同的可溶性酶。

然而,叶绿体和线粒体在结构上有一重要的差别。叶绿体内膜不皱折成嵴,且不含有

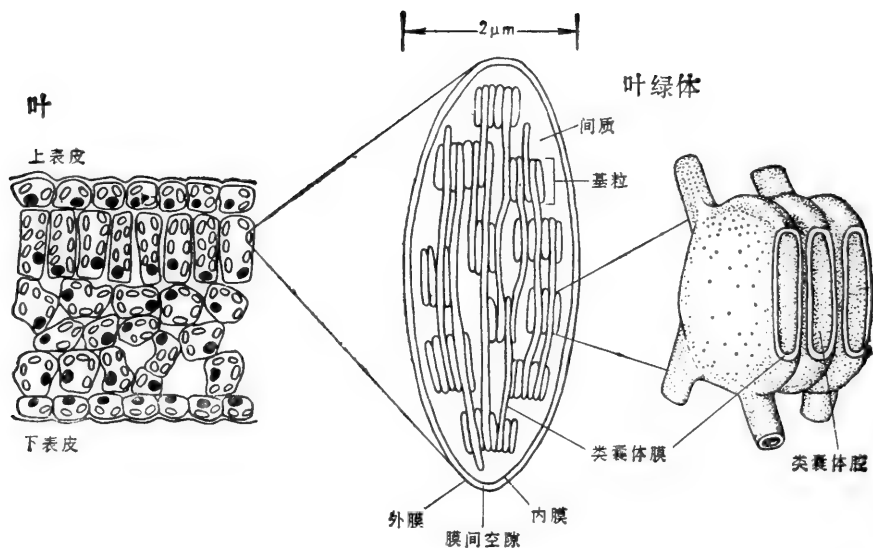


图 9-37 叶绿体含有三种性质不同的膜（外膜、内膜和类囊体膜），划定了三个分隔的内部区室——膜间空隙、间质空隙和类囊体腔。类囊体膜含有叶绿体的全部产生能量的系统。如图所示，个别类囊体是互相联接的，它们趋向于垛叠形成集合体，叫做基粒。

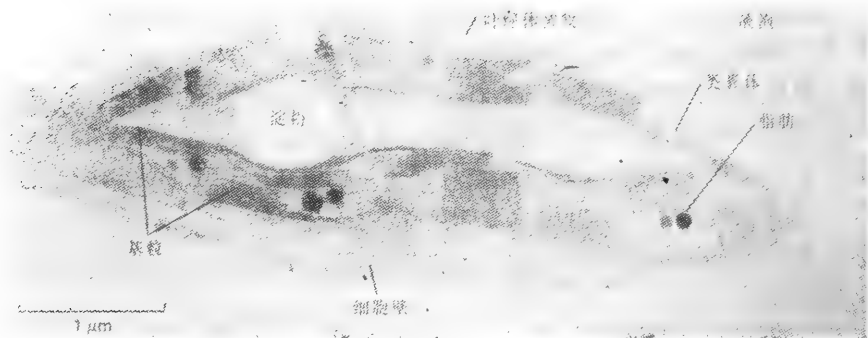


图 9-38 典型叶绿体的薄片电子显微照片，不仅表示叶绿体的各种膜，也显示由生物合成而积累起来的淀粉粒和脂肪滴的贮藏。（Kitty Plaskitt 赠）

电子传递链。光合作用的吸收光系统、电子传递链和 ATP 合成酶均包含在第三种性质特殊的膜上，这膜形成一束扁平的盘状的囊，叫做类囊体（thylakoid）（图 9-37）。每个类囊体的内腔同许多其他类囊体的内腔相连，从而划定出第三种内部空间，叫做类囊体腔（thylakoid space），它由一离子不透过的类囊体膜（thylakoid membrane）与间质相隔离。

图 9-41 解释了线粒体和叶绿体在结构上的相似点和差别。一般来说，人们可以设想，线粒体转变成叶绿体是通过一个过程，该过程使线粒体大大地增大，同时摘除它的内嵴并将其释入基质空隙而成为亚线粒体颗粒。这样过程可使线粒体转变为叶绿体。这里需要指明的，产生 ATP 的叶绿体 ATP 合成酶的球状末端从类囊体膜突出进入间质，这正似 ATP 合成酶从每个线粒体嵴膜伸向基质那样（见图 9-52）。

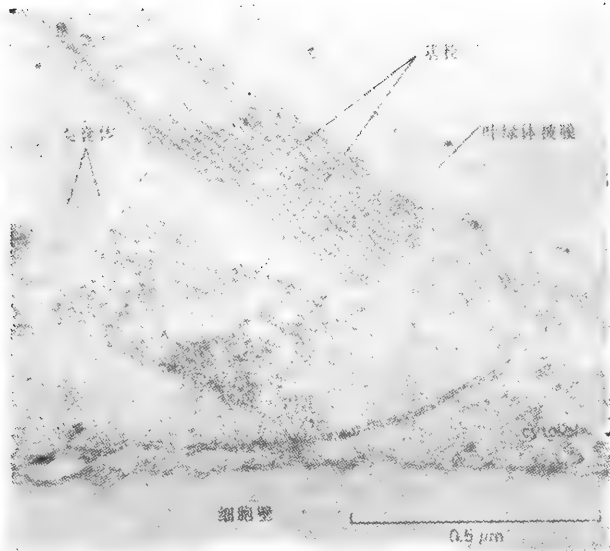


图 9-39 放大倍数高于图9-38 的叶绿体内部膜层。(Kitty Plaskitt 赠)

发生在叶绿体中的两个独特反应：光驱动 ATP 和 NADPH 的产生 以及 CO₂ 转化成碳水化合物

光合作用中所发生的许多不同反应,可归纳为两大类:(1)光依赖反应 (light-dependent reactions), 来源于太阳光的能量激发叶绿素中的一个电子,使这电子在类囊体膜中沿着氧化链行进,这和在线粒体中电子沿着呼吸链转移十分相同。这电子转移过程用来泵质子跨过类囊体膜,由此产生的质子动力驱动 ATP 的合成。同时,这过程还产生转化 NADP⁺ 成 NADPH 的高能电子。在这过程中,水被氧化,提供电子给 NADPH,并释放 O₂。(2)暗反应 (dark reactions),在光依赖反应中所生成的 ATP 和 NADPH 分别作为能量和还原力的来源,驱动 CO₂ 转化成碳水化合物(碳固定作用, carbon fixation)。这些反应在叶绿体间质中开始,一直延续到细胞的胞液中。虽然它们需要光依赖反应的产物,但由于它们不直接同光相联系,所以这些反应叫做暗反应。

因而,氧的形成(需要光)和二氧化碳转化成碳水化合物是分别独立的光合作用过程(图 9-42)。

碳固定是由世界上最丰富的酶,二磷酸核酮糖羧化酶所催化²⁹

在这一章的前面部分我们已经谈到细胞是怎样利用由碳水化合物氧化成 CO₂ 和 H₂O 时所释放的自由能生产 ATP。因此很显然,使 CO₂ 和 H₂O 结合而生成碳水化合物必定是一很不顺利的反应,只有在这合成与其他顺利的反应相偶联,这反应才可能完成。

图 9-43 解释了一个无机碳(如 CO₂) 原子转变成有机碳(如 3-磷酸甘油酸,酵解中的中间产物)的基本反应。1948年发现了碳固定反应,在叶绿体间质中,是由一(~500 000 道尔顿)叫做二磷酸核酮糖羧化酶的大分子酶所催化;每一个 CO₂ 分子同五碳化合物 1,5-二磷酸核酮糖反应,生成两个分子的三碳化合物 3-磷酸甘油酸。因为每个二磷酸

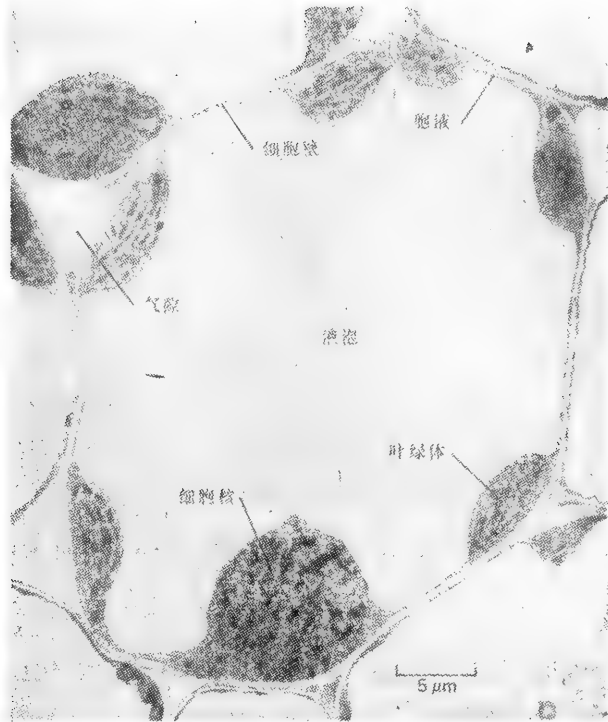


图 9-40 小麦叶细胞的电子显微照片。注意含有叶绿体的细胞质环，包围着一大的液泡。
(Kitty Plaskitt 赠)

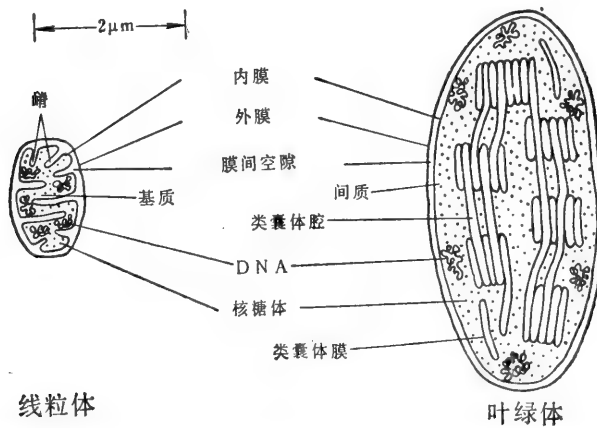


图 9-41 线粒体和叶绿体的比较。通常叶绿体要大得多，并含类囊体膜和类囊体腔作为其附加特征。然而，只有线粒体具有皱折成嵴的内膜。

核酮糖羧化酶工作相当缓慢(它每秒钟只处理约 3 个底物分子, 而一个典型的酶每秒钟可处理 1 000 分子), 所以在每个叶绿体里需要这酶的许多拷贝。其结果, 这酶通常占叶绿体总蛋白质含量的 50% 以上, 因而它被普遍地认为是世界上最丰富的酶。

在碳固定循环中，每分子 CO₂ 的固定需耗用三个分子的 ATP 和两个分子的 NADPH²⁶

在 CO₂ 固定的实际反应中，并不需要额外能量的输入，它依赖于高能化合物 1,5 二磷酸核酮糖的不断供应，每个 CO₂ 分子加在这化合物上(图9-43)。产生这化合物的精确途径的发现，是早期最成功的同位素应用之一，如图 9-44 所示，三个 CO₂ 分子为二磷酸核酮糖羧化酶固定，生成 6 个 3-磷酸甘油酸分子(总共含 6 × 3 = 18 个碳原子：3 个来自 CO₂，15 个来自 1,5-二磷酸核酮糖)，这 18 个碳原子随后进入一反应循环，再次产生 3 分子的 1,5-二磷酸核酮糖(总共含 3 × 5 = 15 个碳原子)，为碳固定最初步骤再利用，余下一分子的甘油醛-3-磷酸(三个碳原子)是为净收益，在这碳固定循环(或 Calvin-Benson 循环)中，3 个 ATP 分子和 2 个 NADPH 分子被用于使每个 CO₂ 分子转化成碳水化合物(图 9-44)。

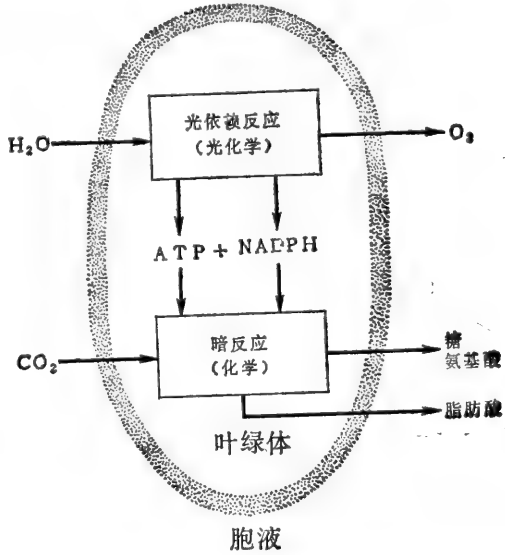


图 9-42 叶绿体中光合作用反应可概括地分为光依赖反应和暗反应。水在光依赖反应中被氧化，而二氧化碳在暗反应中被固定。

在叶绿体中，由碳固定循环所产生的甘油醛-3-磷酸是一个三碳糖，它亦作为糖酵解中的主要中间产物。这三碳糖中有一些经在叶绿体间质中进行的重要的生物合成反应，转化成为脂肪酸、氨基酸和淀粉。其余输送到细胞质，在细胞质中它的大部分经过酵解中几种逆向反应而迅速地转变成果

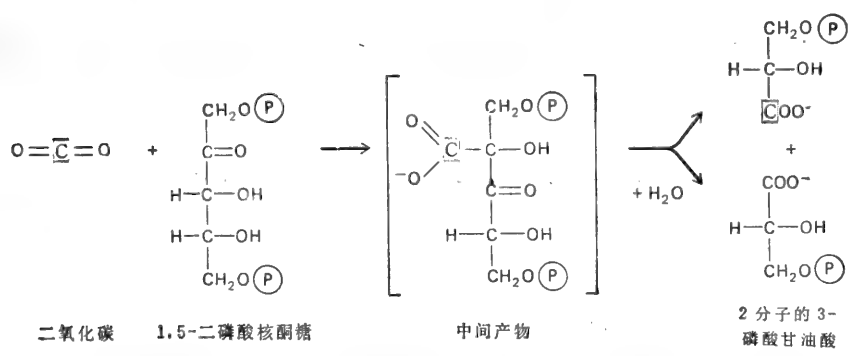


图 9-43 二氧化碳转化为有机碳分子的最初反应。这个反应在叶绿体间质中为含量丰富的酶，二磷酸核酮糖羧化酶所催化。(这个酶也可叫做核酮糖二磷酸羧化酶)

糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸。这两种糖磷酸随后联结在一起，最终生成双糖——蔗糖，葡萄糖在动物细胞中所起的作用，在植物中由蔗糖来承担，在植物细胞间糖的运输是以蔗糖为主要形式。它从叶子，经过维管束(图9-45)输送到植物的其他部位，提供这些部位

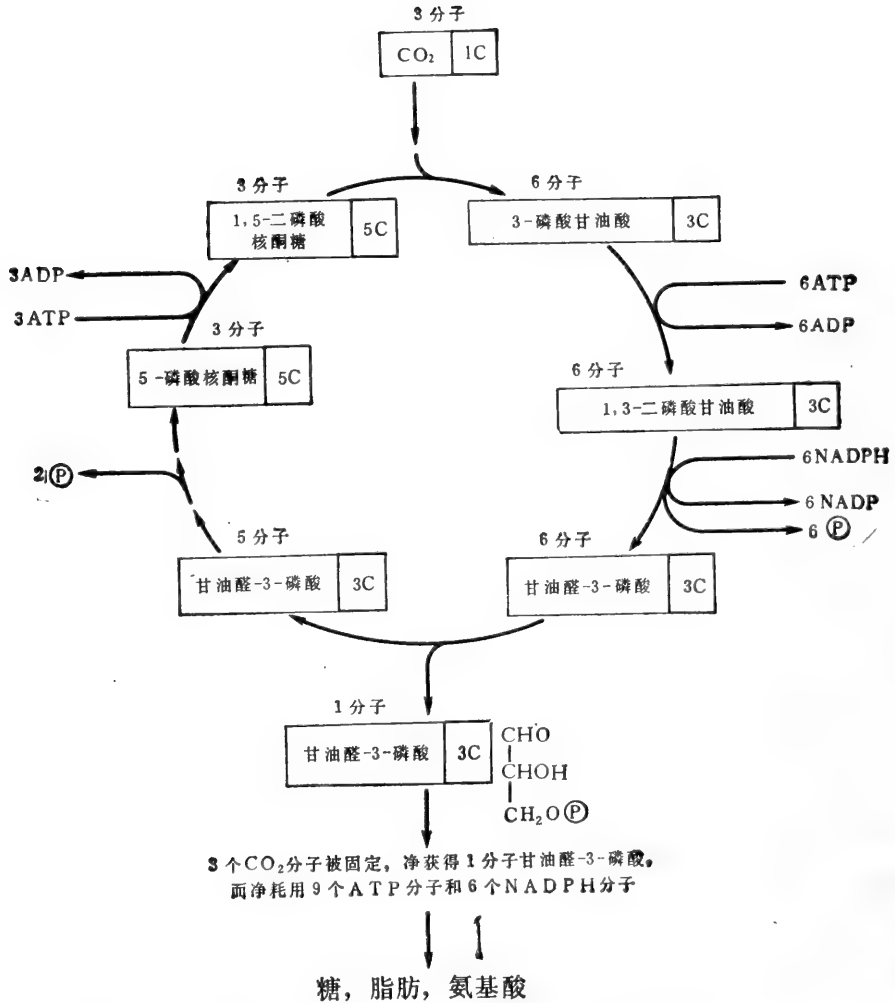


图 9-44 碳固定循环。为了图式清晰起见, 在甘油醛-5-磷酸和 5-磷酸核酮糖之间的许多中间产物在这里没列出来。

所需要的碳水化合物, 正如葡萄糖在动物体中是经血液运输一样。

在热带植物中, 碳固定被区室隔开, 以利于在低浓度 CO₂ 下生长²⁷

许多适应于炎热、干旱环境下生活的植物, 如玉米、甘蔗和马唐, 它们的叶子有一重要的特殊性质。这种特化性状是有用的, 因为在碳固定途径中第一个酶的性质干扰了植物避免水分丧失而进化的机制。其困难在于二磷酸核酮糖羧化酶可以利用 O₂, 也可以利用 CO₂, 作为底物加到 1,5-二磷酸核酮糖上去。虽然 CO₂ 可优先被选择, 但 O₂ 也常常加到 1,5-二磷酸核酮糖上, 产生一分子的 3-磷酸甘油醛 (不是两分子) 和一分子的二碳化合物——乙醇酸盐。乙醇酸盐穿梭地进入植物过氧化物酶体, 开始了转化二分子的乙醇酸盐成为一分子 3-磷酸甘油酸 (三碳的) 和一分子 CO₂ 的过程。因为这整个过程是利用 O₂ 并释放 CO₂, 故称之为光呼吸 (photorespiration)。

在炎热、干旱条件下, 植物被迫关闭它们的气孔 (叶子上气体交换的小孔), 从而阻止

过量的水分蒸发,并引起叶子中 CO_2 水平的急剧下降,此时光呼吸就占优势地位。许多植物逐渐进化形成一种精巧的机制,使得它们即使在非常低的 CO_2 浓度下仍然能够有效地生长。这些植物中,碳固定循环仅在特殊的维管束鞘细胞 (bundle-sheath cell) 的叶绿体中发生,维管束鞘细胞含有植物全部的二磷酸核酮糖羧化酶。这酶保存在具有高浓度 CO_2 的条件下,高浓度 CO_2 是由周围的叶肉细胞 CO_2 泵的活动来提供,从而避免了同

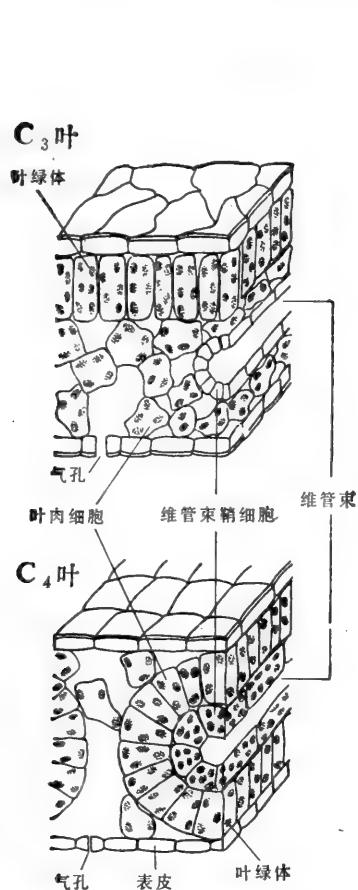


图9-45 C_3 植物叶子和 C_4 植物叶子的形态比较。在这两种情况下,灰色细胞是含有叶绿体的细胞,有可能进行正常的碳固定循环。在 C_4 植物中,叶肉细胞是专门起 CO_2 泵的作用,而不是起碳固定作用。在维管束鞘细胞中它们产生高 $\text{CO}_2:\text{O}_2$ 的比值。维管束输送叶子制造的蔗糖到其他组织。

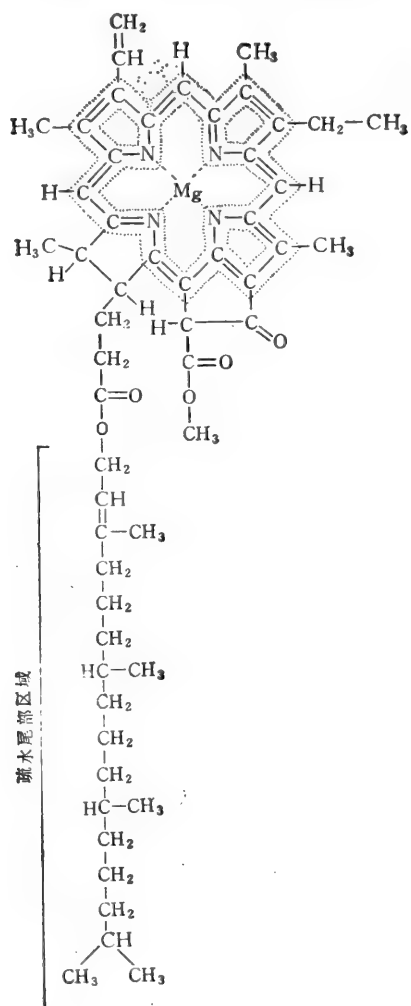


图9-46 叶绿素的结构。电子分布遍及图中以虚点标出的键上。

O_2 作用所发生的耗费反应(图9-45)。

CO_2 “泵”是一个开始于特殊的 CO_2 固定步骤的循环,这固定步骤以一种高亲和力与二氧化碳结合的酶,在叶肉细胞胞液中催化。四碳化合物生成并被运进维管束鞘细胞,在鞘细胞中它被分解产生一分子 CO_2 和一分子三碳化合物。随后三碳化合物又回转到叶肉细胞中,再捕获另外的 CO_2 分子,重新开始 CO_2 泵的循环。

当给泵 CO_2 的植物以一脉冲的放射性 $^{14}\text{CO}_2$ 时, $^{14}\text{CO}_2$ 首先同叶肉细胞相遇,所以被标记的第一个有机化合物含有四个碳;相反,在所有其他植物中首先被标记的是三碳化

合物(阅图 9-43)。由于这个原因,泵 CO_2 的植物被称为 C_4 植物,而其他植物称为 C_3 植物。

就任何矢量运输过程来说, C_4 植物中将 CO_2 泵入维管束鞘细胞的循环是耗费能量的。在炎热、干旱环境中,这耗费与 C_3 植物中因光呼吸造成的损失相比,常常要少得多,因而 C_4 植物是优越的。但是在寒冷、潮湿环境下供给 CO_2 泵的能量是不大用的, C_3 植物在这种条件下可以很好地生长。

叶绿体捕获的光能是用来从弱电子供体产生强电子供体²⁸

现在,我们回过来讨论从 CO_2 和 H_2O 产生碳水化合物这需能很多的反应是怎样被驱动的问题(图 9-44)。在叶绿体中,所需要的能量是来源于由叶绿素分子(图 9-46)所

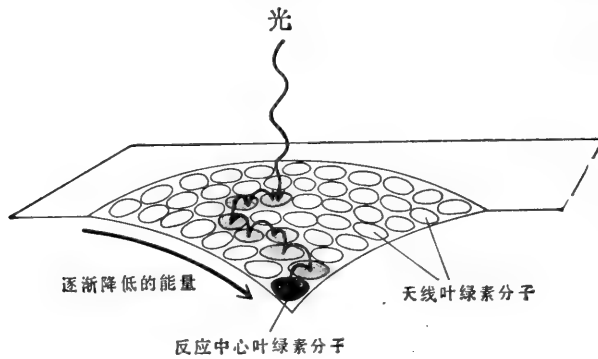


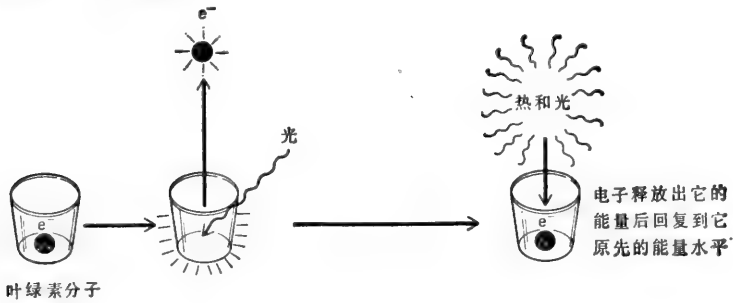
图 9-47 类囊体膜上的天线复合体,其作用有如一个漏斗,传递被光激发的电子到反应中心。

吸收的太阳光。为了捕获光,吸收光的分子(色素)聚集在一起,成为有几百个分子的簇,叫做天线复合体(antenna complex),它们通过特殊的蛋白质牢牢地固定在类囊体膜上。不同植物具有不同数量的辅助色素,叫做类胡萝卜素(carotenoids),它们也分布在每个复合体中。成簇的叶绿素分子与之结合的特殊蛋白质改变了叶绿素分子,使任何一个叶绿素分子所吸收的光能汇集于复合体的一个特殊的叶绿素分子——叫做反应中心叶绿素(reaction-center chlorophyll)上。如此,每个天线复合体象“漏斗”一样,收集光能,并导向一单个的反应中心(图 9-47)。

在溶液中,一个离体的叶绿素分子中电子吸收了光能,当这被激发的电子迅速地回到它原来的能量水平时,光能就以光(荧光)和热的方式释放出来(图 9-48)。但是反应中心叶绿素分子是与一电子受体和一电子供体紧密联结的,这三个分子结合在一起形成光合系统(photosystem)的核心。在由结合的蛋白质所调节的反应中,反应中心中被激发的电子被输送给电子受体,这样就在叶绿素中留下了一带正电荷的空穴,它对电子具有很高的亲和性。这空穴迅速地被从邻近的电子供体拉出的电子所充满(图 9-48)。

这样的光合系统能够使光产生一净电子,从一个弱电子供体(一个具有强电子亲和性的分子)传递到另一分子;由于电子传递的结果,这分子成为一强的电子供体。如此,正常地以荧光和热的方式释放的激发能量消失了,代之以提高电子能量,从而产生了以前所没有的强电子供体。

(A) 离体的叶绿素分子



(B) 完整叶绿体中的叶绿素

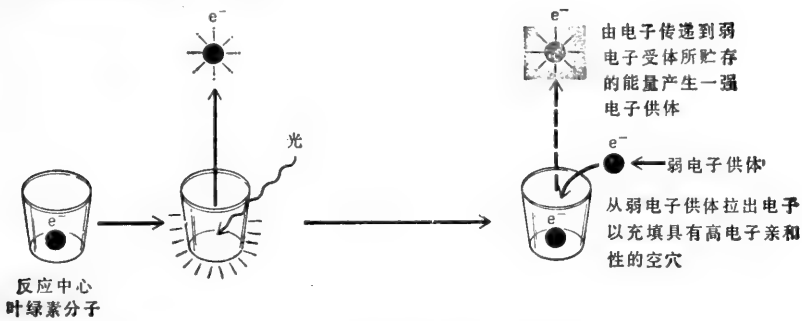


图 9-48 在一离体的叶绿素分子中由一个电子所吸收的光能以光和热的形式被释放出来(A)。相反,一个光系统利用叶绿素所吸收的光能从弱电子供体产生出一强电子供体(B)。

非循环光合磷酸化产生 NADPH 和 ATP^{1,29}

在产生 ATP 和 NADPH (非循环光合磷酸化, noncyclic photophosphorylation) 的最复杂的光合作用形式中,两个光系统顺序地激发每个电子。在第一个光系统(由于历史的原因,叫做光系统 II)中,经一了解甚少的水裂解酶的作用从水分子摘去四个电子,以充填反应中心叶绿素分子由光的作用所产生的空穴,从而经 $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$ 反应而生成分子氧。由于每个水分子的裂解,产生了四个强电子供体,并利用了四个光子。随后每个强电子供体沿电子传递链传递,这电子传递链同线粒体内膜上所发现的呼吸链十分相似。沿着这途径,质子被泵过类囊体膜进入类囊体腔,产生一电化学梯度,经 ATP 合成酶复合体的作用驱动 ATP 合成(图 9-49 和图 9-50)。在电子传递链上的最终电子受体是图式中的第二个光系统(光系统 I),这系统接受电子进入到它的反应中心叶绿素分子被光激发所留下的空穴。最后,离开光系统 I 的电子由于两个光量子的作用,顺序地被激发到这么高的一个能量水平,使两个这种电子(加上从介质中来的一个质子)就能驱动 NADP^+ 还原为 NADPH (图 9-49)。

如图 9-49 所示的光合作用的锯齿样图形,被称之为“Z 方案”(“Z-scheme”)。通过由每个光系统催化一个的两个独立的电子激发步骤,一个电子由束缚电子很牢固(氧化还原电位 = +820mV) 的水传递到束缚电子较松的(氧化还原电位 = -320mV)

NADPH。这两个步骤都是需要的,部分是因为可见光的单个量子不足以激发一个电子使其从光系统 II 的底部直达光系统 I 的顶端;光系统 I 可能是有效地将一个电子从水传递到 NADP^+ 的能量变化所需。更重要的是,两个独立的光系统的作用在于提供足够的能量,以使连接两个光系统的电子传递链能泵 H^+ 穿过类囊体膜,从而利用某些光产生的电子能以生产 ATP。

叶绿体能通过循环光合磷酸化产生 ATP, 而不产生 NADPH

在刚刚讨论的非循环光合磷酸化的图式中,每一对电子从水传递到 NADP^+ 以产生一个 NADPH 分子,可合成比一个分子略多一点的 ATP。但是为了碳的固定需要比 NADPH 多得多的 ATP (阅图 9-44)。叶绿体可以制造额外的 ATP,是因为它有另一条可利用光能生产 ATP,而不生产 NADPH 的途径,这途径叫做循环光合磷酸化(cyclic photophosphorylation)。这过程包括一循环电子流,其中由光系统 I 所产生的高能电子被传递回到电子传递链中的前几个步骤,而不传递到 NADP^+ 上。当电子流经电子传递链,质子被泵穿过类囊体膜,所形成的电化学梯度驱动 ATP 合成(图 9-51)。

总之,包括通过水进行光还原 NADP^+ 的非循环光合磷酸化,是由光系统 I 和光系统 II 的联合介导的,并产生 NADPH、ATP 和 O_2 。可是循环光合磷酸化只包括光系统 I,

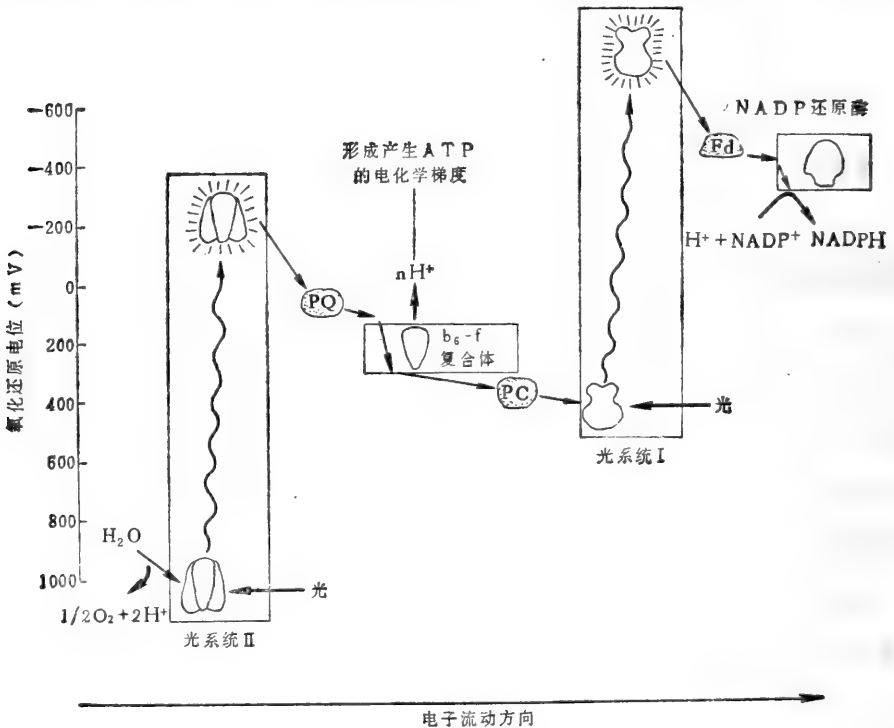


图 9-49 电子通过光合成产生 NADPH 和 ATP 的 Z 方案途径中氧化还原电位的变化。从水到 NADP^+ 的净电子流,产生了 NADPH。此外,ATP 合成酶利用联结光系统 II 和光系统 I 的电子传递链所产生的电化学质子梯度,以合成 ATP。虽然这里没有表示出从水氧化作用所产生的 H^+ ,也有助于电化学梯度的产生,以驱动 ATP 的合成。产生 ATP 的 Z 方案,叫做非循环光合磷酸化,用以区别于图 9-51 所表示的循环图式。更具体的说明,请阅图 9-50。

产生ATP，而没有 NADPH 或 O₂ 的形成。如此，循环和非循环电子流的相对活力将决定有多少光能被转化成还原力(NADPH)，有多少光能转化成高能磷酸键 (ATP)。这两者间的平衡至少部分地是根据对 NADPH 的需要而自动调节的。应注意，电子流是非循环的还是循环的，是取决于铁氧还蛋白把它的重新活化的电子给与 NADP⁺，还是给与导致返回到 b₆-f 复合体的有关成分(比较图 9-49 和图 9-51)。在由 NADPH 积聚而引起的低浓度 NADP⁺ 的情况下，仅生产 ATP 的循环途径将是通畅的。

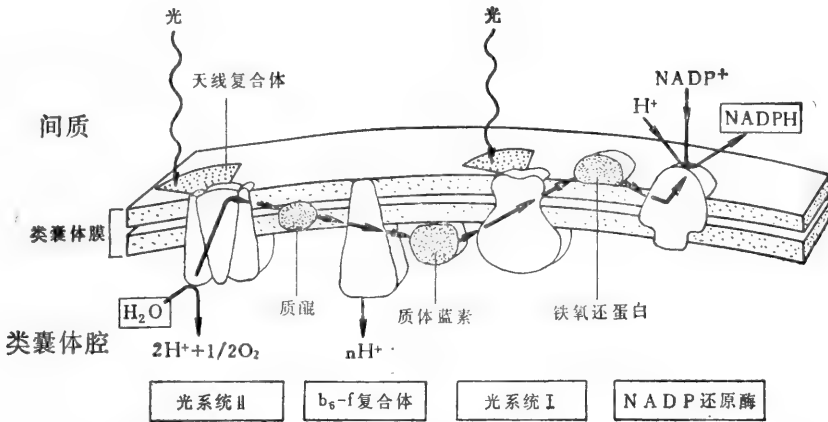


图 9-50 可能发生在类囊体膜上的光合作用中的 Z 方案电子流。链上高度流动性的电子载体是质醌(plastoquinone)(非常类似于线粒体的泛醌)、质体蓝素(一含铜小分子蛋白质)和铁氧还蛋白(一含铁的小分子蛋白质)。b₆-f 复合体同线粒体的 b₆-c₁ 复合体十分相似。注意，被 b₆-f 复合体从间质所泵出的质子，正如它们在线粒体中被 b₆-c₁ 复合体从基质泵出一样(见图 9-52)。

在线粒体和叶绿体中，质子转移的空间途径是相似的⁹

类囊体腔的存在把一个叶绿体分为三个，而不是两个内部区室，使得叶绿体似乎同线粒体完全不一样。然而，在这两种细胞器中，其质子转移的空间途径异常相似。如图 9-52 所阐述的，在叶绿体中质子从间质 (pH8) 被泵出进入类囊体腔 (pH 约 5)，产生了一个 3—3.5 单位的梯度。这代表了跨过类囊体膜大约 200mV 的质子动力(这几乎全部是由 pH 梯度贡献，而不是膜电位的贡献)，随后由埋在类囊体膜中的 ATP 合成酶驱动而合成 ATP。

像叶绿体的间质一样，线粒体基质的 pH 大约是 8，但这 pH 完全是由于质子从线粒体泵出所产生的，而不是由于质子泵入这细胞器的内部空间所引起的。因为细胞质的 pH 保持在 7 左右，所以在一个线粒体中其主要的质子动力是由于所形成的膜电位产生的，而不是由于 pH 梯度所致。然而，在线粒体和叶绿体中，ATP 合成酶的末端催化作用均是在 pH 约等于 8 的条件下，并在大的细胞器区室 (基质和间质) 内进行，其中充满着可溶性的酶。因而，在这里合成了细胞器的全部 ATP (图9-52)。

尽管线粒体和叶绿体之间具有许多相似性，但是叶绿体结构的方式较易于用来研究它们的电子和质子传递过程。因为叶绿体的内膜和外膜经破碎后可获得完整的离体的类囊体盘。这些类囊体与亚线粒体颗粒相似，具有一膜层，膜上的电子传递链具有 NADP⁺、ADP⁻ 和无机磷酸的利用部位，均可自由地与外界相通。但是类囊体是未被扰乱的天然

结构，它们比人工从线粒体所制备的亚线粒体颗粒具有大得多的活性。其结果是用叶绿体，而不是线粒体，所进行的若干初期试验证明了化学渗透机制的主要作用。

象线粒体内膜一样，叶绿体内膜含有载体蛋白，以利于同胞液进行代谢物交换³⁰

虽然在叶绿体制备物中光驱动的光合作用反应大部分都易于研究，但是它们的内膜和外膜均被破坏或被除去，因为缺少了正常存在于间质中的那些重要的物质，这样的叶绿体不能进行光合作用的 CO_2 固定。叶绿体还可用另一种方法来分离，使其保持着内膜的完整性。在这样的叶绿体中，可以证明其内膜具有选择渗透性，这反映了内膜含有特殊的载体蛋白。更为明显的是，由 CO_2 固定作用所催化产生的大量的甘油醛-3-磷酸可被一有效的反向转运系统运送到叶绿体外面，反向传递系统是将三碳

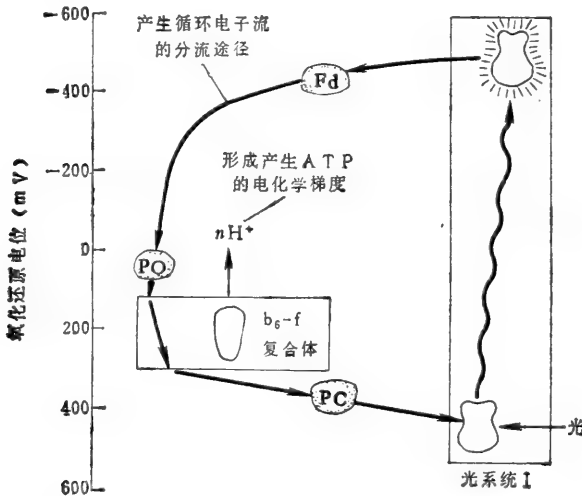


图 9-51 循环光合磷酸化中电子流的途径。这途径可产生 ATP，而不产生 NADPH 或 O_2 。是非循环还是循环的电子流发生，取决于铁氧还蛋白把它的有活性的电子给与 NADP^+ (如图 9-49)，还是给与可致返回到 $\text{b}_6\text{-f}$ 复合体的有关成分。每当 NADPH 积累， NADP^+ 水平即降低，则趋向有利于循环的途径。

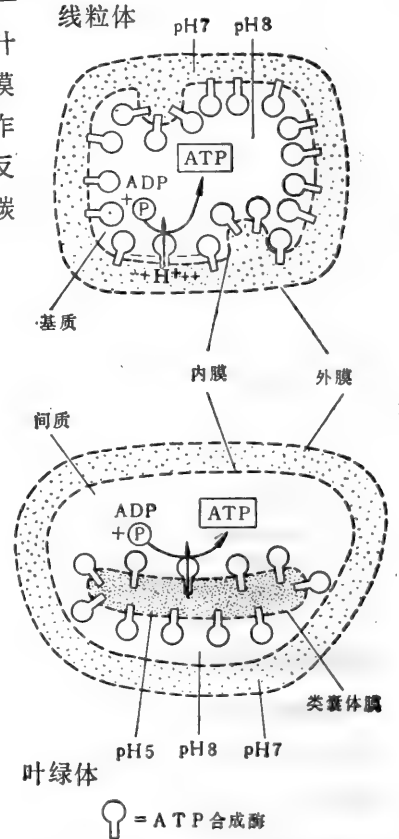


图 9-52 比较在线粒体和叶绿体中质子流和 ATP 合成酶的方向性。pH 相同的区室是以相同的小点密度表示 (见正文)。

糖-磷酸与无机磷酸盐进行交换。

正常情况下，甘油醛-3-磷酸给胞液提供大量的碳水化合物来源，细胞利用碳水化合物作为许多其他生物合成的起始点。但是甘油醛-3-磷酸并不是细胞中三碳化合物来源的全部。一旦它进入到胞液中，就很容易经生成一分子 ATP 和一分子 NADPH 的反应途径转化回去成为 3-磷酸甘油酸 (见图 9-44，碳固定循环中形成甘油醛-3-磷酸的两步反应的逆转)。其结果，从叶绿体输出的甘油醛-3-磷酸也为其余的细胞代谢提供了 NADPH 和 ATP 的主要来源 (图 9-53)。

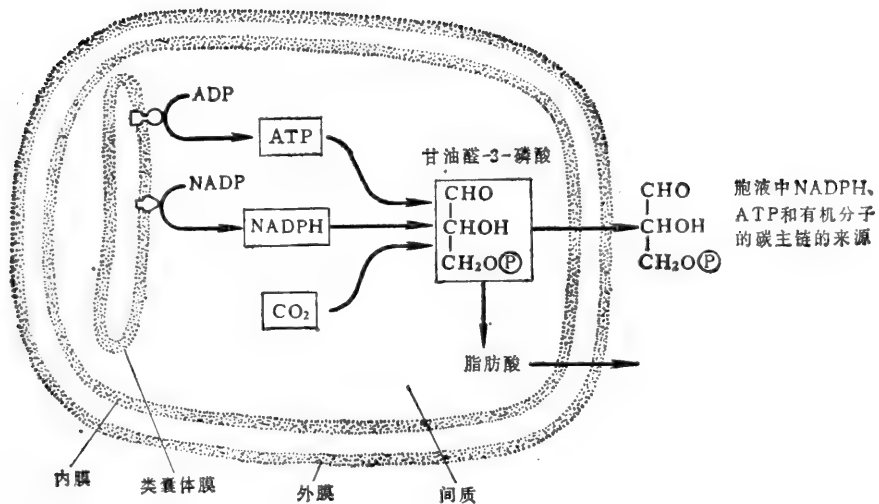


图 9-53 叶绿体主要代谢途径的概图。许多在叶绿体内发生的并对重要的细胞过程起作用的其他反应,在这里并没有都表示出来。注意,由叶绿体所产生的 ATP 和 NADPH 在叶绿体间质中直接被用于生物合成。如图所示,叶绿体不象线粒体那样,只是间接地为胞液提供 ATP。

叶绿体也进行其他生物合成³¹

除了光合作用之外,叶绿体还进行着许多对于植物细胞是重要的生物合成,例如,许多细胞的脂肪酸是由位于叶绿体间质中的酶来形成的,在这里可以方便地利用 ATP、NADPH 和碳水化合物。并且叶绿体中被光所激发的电子的还原力可驱动亚硝酸盐 (NO_2^-) 还原成为氨 (NH_3); 氨为植物提供了氨基酸和核苷酸合成所需要的氮。所以叶绿体在代谢上的重要性远远超出了它在光合作用方面的独特作用; 这些细胞器在细胞质总体积中独特地占据着很大部分,也反映了这一点(图 9-40)。

小结

叶绿体进行光合作用,它利用太阳光激发叶绿素的电子,所获得的高能电子进入电子传递链,而不是从食物氧化来获得能量。因此,它首先是一生物合成的器官,而不是一降解的器官。有两类电子流产生: (1) 非循环电子流,由依次连结的二个光系统来调节,从水传递电子到 NADP^+ , 以产生 NADPH, 并伴随着 ATP 的产生; (2) 循环电子流,仅由一光系统来调节,通过这系统电子在一封闭式的环中进行循环,仅产生 ATP。这两种电子传递过程发生在类囊体上,引起质子被泵入类囊体腔。经过 ATP 合成酶的作用,质子返回流动,然后在间质中产生所有的叶绿体 ATP。

由光合作用所生成的 ATP 和 NADPH 在叶绿体间质中驱动了许多不同的生物合成反应,其中包括极其重要的碳固定循环,从 CO_2 产生碳水化合物。碳水化合物是以三碳糖-磷酸形式,同其他许多叶绿体代谢产物一起运输到细胞胞液中去。

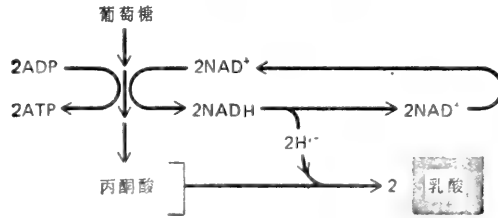
电子传递链的演化

细胞和有机体的许多结构、功能及进化都同它们对能量的需要相联系。我们已经知道,对如此不同来源的能量,如阳光和葡萄糖的氧化作用,其利用的基本机制是相同的。显然,合成 ATP 的有效方法是在进化早期出现的,从此以后,仅以很小的变化一直保持着。这些各个关键的组成成分——ATP 合成酶、驱动氧化还原的质子泵,以及光系统——首先是怎样产生的?对发生在进化年代中的事件,其学说不可避免的只能是推测,而不容易进行试验。但是,某些现代的细菌中所残存的许多不同的原始电子传递链和亿万年前地球环境的地质证据提供了丰富的线索。

最早的细胞是以发酵过程生产 ATP³²

如第一章所述,最初的活细胞被认为是在缺氧而富含地球化学所产生的有机分子的环境下形成的。所以最早产生 ATP 的代谢途径必定类似于现代的发醇形式。

(A) 导致乳酸排出的发酵过程



(B) 导致琥珀酸排出的发酵过程

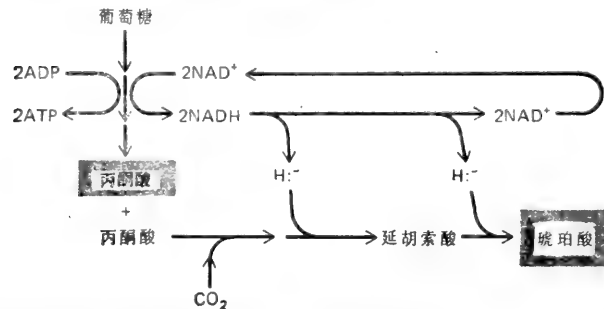


图 9-54 两种不同类型的发酵过程的简图。(A)在酵解中被耗尽了的 NAD⁺,可由 NADH(由溶液中加上一个 H⁺)转移一氢化物离子到丙酮酸以产生乳酸而再次形成(这类反应的逆转,在前面图 9-16 中已说明)。乳酸被排出。(B)在酵解中耗尽了的 NAD⁺,可由 NADH(由溶液中加上一个质子)经两次连续传递氢化物离子到某些产生琥珀酸的化合物上去而再次产生。琥珀酸被排出,而一分子丙酮酸被保存,以供生物合成之用。

在发酵过程中,ATP 是由底物水平的磷酸化事件所产生;磷酸化作用利用富含氢的有机分子,如葡萄糖被部分氧化的反应途径所释放出来的能量。没有可被利用作为氢受

体的氧,所以从被氧化的分子中所丧失的氢只能传递(通过 NADH 或 NADPH)到不同的有机分子(或到同一分子的不同部位),使得这些分子变得更为还原。在发酵过程的末了,所生成的一个(或多个)有机分子被作为代谢废物排泄到介质中;其他物质,如丙酮酸,保留在细胞中为生物合成之用。

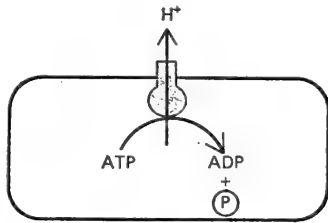
在不同的生物中,其排出的最终产物是不同的,但它们都是有机酸(带有 COOH 基团的碳水化合物)。在细菌细胞中,这些最重要的产物包括乳酸(它在哺乳动物细胞无氧酵解中也可累积)和甲酸、乙酸、丙酸、丁酸,以及琥珀酸。现存细菌中的两种不同发酵途径在图 9-54 作了阐述。

贮存能量的电子传递链的进化使厌氧细菌有可能利用非发酵的有机化合物作为能源³³

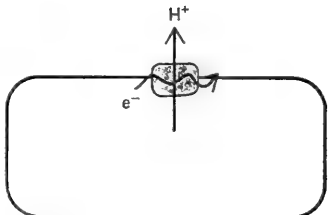
早期的发酵过程想必不仅提供 ATP,而且还提供基本的生物合成所需的还原力(如 NADH 或 NADPH);而当这发酵作用是能量产生的唯一模式的时候,许多主要的代谢途径可能发生演变。然而,在时间的推移中,这些原核生物的代谢活动必然改变其所处的环境,导致新的生物化学途径的进化。下面系列的变化似乎是发酵作用生成的废物累积的结果。

阶段 1 由于连续不断地分泌有机酸,环境中的 pH 值下降,跨膜的质子泵进化成将 H⁺ 泵出细胞;以避免由于细胞内酸化而造成的死亡。这些泵中的一个可能能很好地利用 ATP 水解所产生的能量,并可能是现代 ATP 合成酶的原始类型。

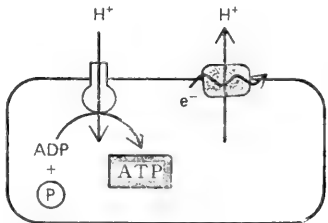
阶段 2 在非发酵的有机酸积聚和有利于消耗 ATP 的质子泵进化的同一时间里,现成的为质子泵和所有其他生命过程提供能量的发酵养料的供应就减少了。结果所造成的选择压力绝对有利于能分泌 H⁺, 而不水解



阶段1



阶段2



阶段3

图 9-56 氧化磷酸化机制进化的三个假设的阶段

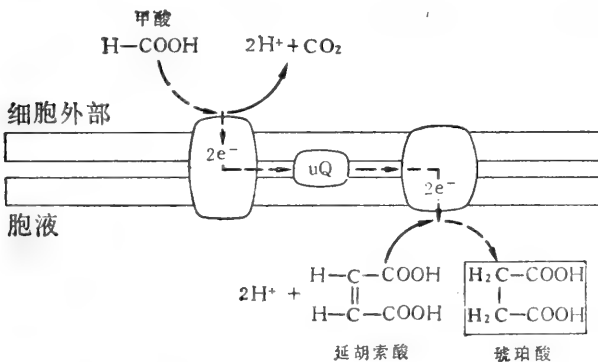


图 9-55 甲酸的氧化由延胡索酸通过贮存能量的电子传递链来调节。现存的细菌,包括大肠杆菌,能利用这种膜结合电子传递系统泵质子跨过质膜。甲酸-CO₂ 对的氧化还原电位是 -420 mV,而延胡索酸-琥珀酸对 的电位是 +30 mV。

ATP 的细菌,并允许 ATP 贮存起来供其他细胞活动之用。这种压力可能导致最初的

膜结合蛋白的产生，膜结合蛋白可以利用具有不同氧化还原电位的分子之间的电子传递，作为传递 H^+ 跨过细胞质膜的能源。某些这类蛋白质必须在所积聚的非发酵的有机酸中找到它们的电子供体和受体。这些电子传递蛋白事实上可以从现存的细菌中找到；例如，图 9-55 表明，某些现存的细菌是怎样利用相对少量的氧化还原能量去泵质子。这些能量来自甲酸到延胡索酸的电子传递。

阶段 3 最后，某些细菌的电子传递系统进化了，它能充分而有效地利用比正好维持其内部 pH 所需要的更多的氧化还原能量。由过量的 H^+ 泵所产生的大的电化学梯度可使质子通过 ATP 驱动的质子泵漏出返回到细胞内，从而使质子泵逆向运转，起着 ATP 合成酶的功能作用，合成 ATP。由于这类细菌越来越少地需要发酵养料的供应，所以它们是依赖消耗它们的邻近者而得以增殖。

这三个关于氧化磷酸化机制进化的假设的阶段，总结在图 9-56 内。

由于还原力取之不尽的来源，在细胞进化过程中光合细菌克服了一个主要危机³⁴

正如上面简述的进化步骤解决了关于维持细胞的中性 pH 和能量的丰富贮存两方面的问题，但它们还留下了另外未解决的同等重要的问题。可发酵的有机养料的耗尽意味着必须寻找碳的某些另外的来源，以合成作为许多其他细胞分子前体的糖。大气中的二氧化碳提供了丰富的潜在的碳的来源。但是，要转化二氧化碳成为像碳水化合物那样的

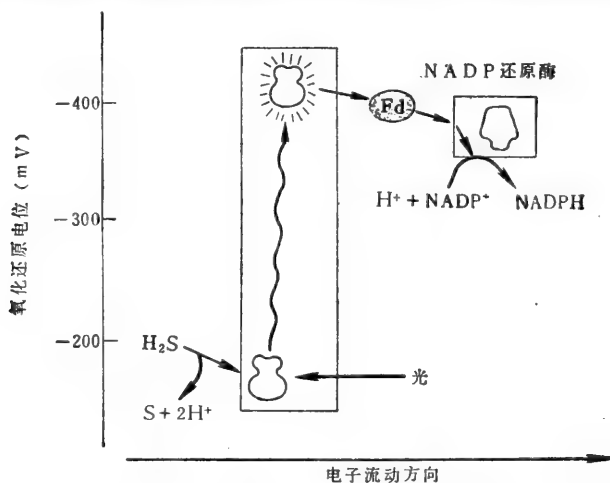


图 9-57 在现存的绿硫菌中观察到的较为原始形式的非循环光合作用中电子的一般流向

有机分子，则要求固定的二氧化碳可被强的氢供体，如 NADH 或 NADPH 所还原，它们提供从 CO_2 生成每个 (CH_2O) 所需的两个电子(见图 9-44)。在细胞进化的早期，这类强的还原剂，如象发酵过程的产物，是很丰富的。但是，当发酵的养料供应减少和大部分 ATP 开始由膜结合的 ATP 合成酶来产生时，NADH 的充分供应也将消失。所以对细胞来说，十分紧迫的则是进化出一条能产生强还原力来源的新途径。

在可发酵分子消失之后，环境中可利用的主要电子供体是由碳水化合物、硫化氢 (H_2S) 和水通过厌氧代谢所产生的有机酸。但是所有这些分子的还原力都太弱了，不能用于二氧化碳的固定。从而设想，这个问题是首先由现存的绿硫菌的祖先解决的。绿硫菌由于发展了可利用太阳光能的机制而实现了必要的进化上的突破。现存的绿硫菌利用

光能从硫化氢传递氢原子(如同一个电子加一个质子)给 NADPH, 从而产生了碳固定所需的强还原力(图 9-57)。由于从 H_2S 转移来的电子是比从水来的电子具有更负的氧化还原电位(与水的 $+820mV$ 比较为 $-230mV$)，这些细菌中所存在的单个光系统所吸收的一个光量子，足以达到一相当高的氧化还原电位，以生成 NADPH，并满足一相对简单的光合作用电子传递链的需要。

第二步，到了约 2×10^9 年以前蓝藻菌的出现，生物进化到可以利用水作为还原二氧化碳的氢源。这就需要增加第二个光系统，按顺序作用于第一光系统，给 H_2O 和 NADPH 之间的氧化还原电位的巨大间隙搭桥(见图9-49)。这进化步骤的生物学后果是具有深远影响的。因为在初始时期，生物对其周围环境仅有很少的化学上的要求，所以它们可能广泛地分布，并且不以需要 H_2S 或有机酸作为电子来源的早期光合细菌那样的方式进化。其结果，大量生物合成的被还原的有机物质积累起来了，这是氧进入大气的最初时期。从而，就开创了后来发展的细菌和更复杂的生命形式。它们是按有氧代谢途径制造ATP——利用降解碳水化合物和其他还原有机分子最终成为 CO_2 和 H_2O 时所释放的大量能量。

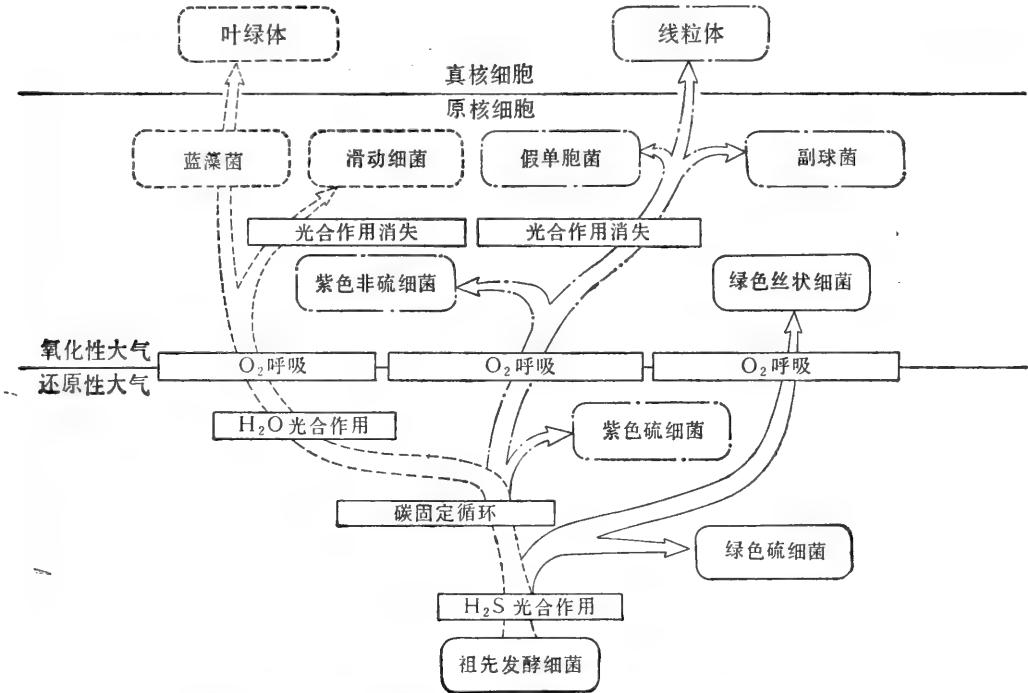


图 9-58 线粒体、叶绿体和它们的细菌祖先的可能进化的系统发育树。如图所示，氧呼吸似乎至少有三不依赖于光合作用而独立进化的：在绿色、紫色和蓝绿色(蓝藻菌)光合细菌的系统上。一种需氧的紫色细菌发展成为线粒体，而另一种需氧的蓝绿色(蓝藻菌)进化成叶绿体。

图 9-58 表明猜想的进化途径的概况。

进化常常是保守的，保持部分旧的，并在它的基础上产生某些新的。因而，我们在高等真核细胞线粒体和叶绿体中所见的很可能就是改变了形式的、在30亿年之前为厌氧细菌所利用的电子传递链的一部分。在线粒体呼吸链中心片段(b-c₁复合体)和现代细菌和叶绿体的电子传递链的相应一段中，在泵质子的酶复合体的功能方面有特别明显

的同源性。

小结

初期的细胞是类似细菌的生物，生活在富含高度还原态的有机分子环境中，这些有机分子是经过亿万年的历程天然造成的。这些分子通过转化成为各种各样的有机酸而衍生出大多数 ATP；有机酸将作为废料被排泄出。这些发酵作用引起介质的酸化，可能导致最初膜结合 H^+ 泵的进化，以作为维持细胞内部中性 pH 的一种方式。从现存细菌的特性可以清楚看出，在这种无氧环境中首先出现了电子传递驱动 H^+ 泵和可逆的 ATP 驱动 H^+ 泵的合作。以这种方式，由所积聚的非发酵化合物之间的氧化还原反应所释放的少量能量可能被用来产生 ATP。

细菌利用预先形成的有机分子作为碳和还原力的来源而增殖不可能进行得很长久，因为仅由地质化学过程来重新补充这些来源是非常缓慢的。因此，可发酵的有机养料的匮乏，必然导致利用二氧化碳制造碳水化合物化合物的光合细菌的进化。通过早期进化的电子传递链各部分的结合，原始细胞象现存的绿硫菌一样可捕获光能，去产生碳固定所需要的还原力。接着蓝藻的更为复杂的光合电子传递链的出现，导致大量的氧出现在大气中。而且由于生物能在地球的广袤区域中增殖，还原态的有机分子再次积累。一旦有机分子和氧两者都十分丰富了，电子传递链就成为能适应从 NADH 传递电子给氧，由此所释放出的大量能量就转化成可利用的形式，如在许多细菌中所发展的高效的需氧代谢。在真核细胞线粒体中运转着完全相同的需氧机制，这是明显的证据说明线粒体是从早期独立的细菌进化来的。

线粒体和叶绿体的生物发生³⁵

新的细胞器必须不断地产生，以跟上细胞的生长和分裂，并补充静止细胞中细胞器的连续不断的降解（更新）。细胞器的生物合成需要有序地合成其必不可少的蛋白质和脂肪，并运送每个成分到恰当的细胞区室。这复杂的过程由两个基本不同的方式来完成。一是制造完全新的细胞器，例如在第七章所讨论的溶酶体，是由高尔基器的特定部位出芽而重新造成。另一个是由现存的细胞器生长，并分裂为二，这是新的线粒体和叶绿体的形成方式。因为它们是以相同的方式产生，所以本节内对这些能量细胞器常常是一起讨论。

线粒体和叶绿体含有为其复制所需的独立的遗传系统³⁶

线粒体和叶绿体两者的生物合成涉及两个独立的遗传系统的作用：比较少的蛋白质是由细胞器 DNA 编码，并在细胞器内的核糖体上制造产生，而多数蛋白质由核 DNA 编码，在胞液的核糖体上制造产生，随后运送进入细胞器。

在完整的细胞中，这两个遗传系统对于建构细胞器的贡献是由一尚很少了解的反馈机制紧密偶联着的。幸运的是，这种偶联对于能量细胞器生物合成的研究，不是绝对的：离体的细胞器短时间置于试管中，将继续制造它们的 DNA、RNA 和蛋白质。这就提供了一种手段，以测定哪些基因是存在于细胞器 DNA 内，哪些蛋白质是在细胞器的核糖

体上制造。另一种方法是采用特殊的抑制剂作用于完整细胞。例如，药物放线菌酮抑制胞液的蛋白质合成，但不影响由叶绿体或线粒体的核糖体合成蛋白质。反之，各种不同的抗生素，如氯霉素、四环素和红霉素均抑制能量细胞器的蛋白质合成，但对胞液中的蛋白质合成无明显效应。某些抑制剂对胞液中和细胞器中蛋白质合成的不同影响在图9-60中表明。

在胞液和能量细胞器之间蛋白质的流动都是以一个方向进行：特定的蛋白质被运入线粒体和叶绿体，但已知没有什么蛋白质从这些细胞器中运送出来。并且在细胞器和细胞其他部分之间也没有 RNA 和 DNA 分子的交换；因此，如果一个具有功能的遗传系统从细胞器中丢失了，细胞不可能使它恢复。

随着细胞的生长，它所含的线粒体和叶绿体的数量因细胞器分裂而增加³⁷

新的线粒体和叶绿体绝对不可能重新产生，它们总是由已有的线粒体和叶绿体生长、分裂而产生。对活细胞的观察表明，线粒体不仅可以分裂，有时它们还可彼此融合在一起。然而，平均来说，每个细胞器在质量上必须加倍，随后在每一细胞世代分成两半。电子显微照片表明，就象许多细菌细胞分裂中所发生的一样，细胞器的分裂是通过其内膜向内形成沟槽开始的(图 9-61 和 9-62)；因而，这表明细胞器的分裂是一个有控制的过程，而不是由于偶然一变为二所引起的事件。

在大多数细胞中，各个能量细胞器是在整个细胞间期进行分裂，而与细胞分裂或彼此之间没有时相的联系。同样细胞器 DNA 的复制是发生在整个细胞周期，并不限于核 DNA 合成期(S 期)内。虽然单个 DNA 分子似乎是随机地进行复制——所以在一定的细胞周期内，某些 DNA 分子可不止一次地复制，而另一些则完全不复制——但在每一细胞周期内细胞器 DNA 分子的总数将只增加一倍，以保持每个细胞的细胞器 DNA 量的恒定。

然而，这普遍的模式有例外的情况：在仅含有一个或少数几个叶绿体的某些藻内，细胞器的分裂正好在胞质分裂之前，其分裂面亦同随后的细胞分裂的分裂面相一致。因此很清楚，细胞器分裂在某些情况下可能受细胞精确的控制(图9-63)。

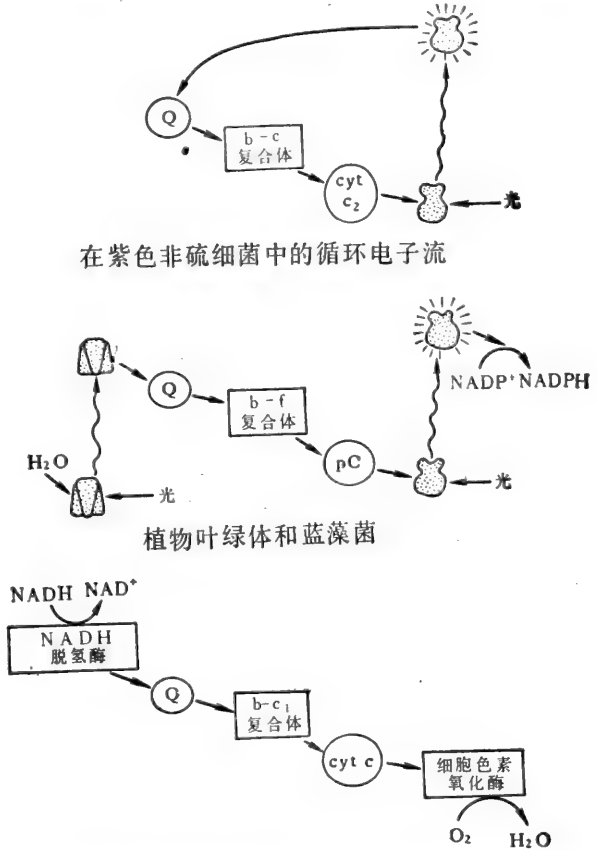


图9-59 细菌、叶绿体和线粒体都含有一电子传递复合体，非常类似于线粒体的 b-c₁ 复合体。这些复合体都接受从泛醌样载体(这里以 Q 表示)来的电子，并泵质子穿过它们各自的膜。它们被假设为在进化上是有关联的。

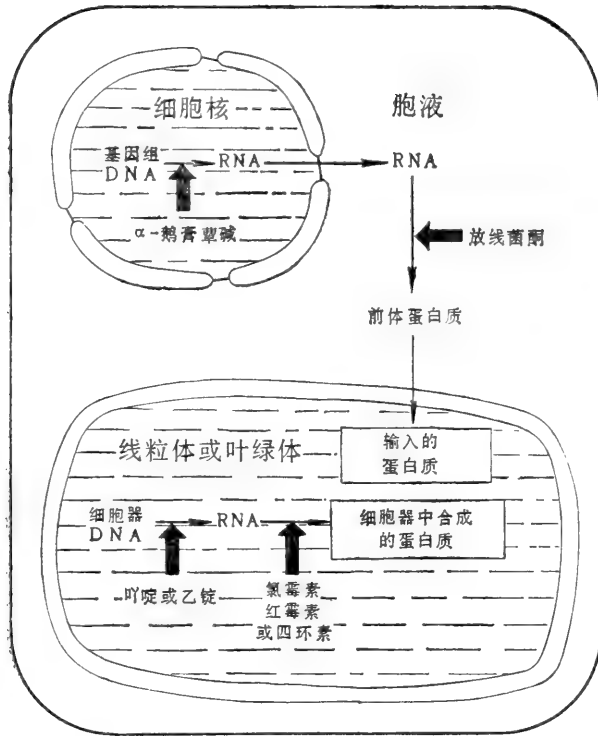


图 9-60 线粒体和叶绿体的蛋白质生物合成的综观。每个粗箭头表示抑制剂对线粒体或胞液蛋白质合成专一的作用部位。详细内容见正文。

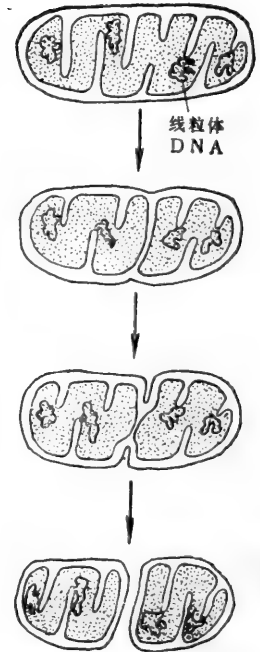


图9-61 分裂中的线粒体图解。图中的分裂方式是从类似9-62图中那样的分裂中线粒体的静态图像推测出来的。

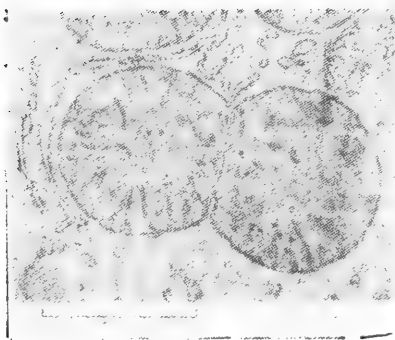


图 9-62 肝细胞中正在分裂的线粒体的电子显微照片

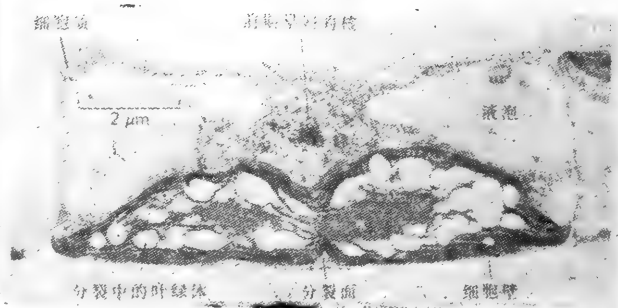


图 9-63 在简单的丝状藻 *Klebsormidium* 中,其叶绿体分裂发生在有丝分裂早期的一特定点上。这细胞只有一个叶绿体,它的分裂面与随后的细胞分裂面是一致的。(引自 J. D. Pickett-Heaps, *Cytobios* 6: 167—183, 1972)

多数线粒体和叶绿体的基因组是较小的环状 DNA 分子³⁹

如表 9-2 所示,细胞器 DNA 是比较小的,而且简单,在高等真核细胞中它们是环状分子。许多细胞器 DNA 分子的大小是与病毒 DNA 分子大小在相同的范围内。在所有生物中,叶绿体基因组的大小是一样的,而线粒体基因组则植物的要比动物的大得多。

在哺乳动物(图 9-64)中,线粒体基因组是单环状 DNA,约 11 000 000 道尔顿(比核基因组要小 10^{-5} 倍)。然而,植物含有的线粒体基因组要大 30—100 倍,由许多不同 DNA 环构成。对高等植物和动物之间这种差别的意义还不了解。

表 9-2 细胞器 DNA 分子的大小和结构

物种	结构	质量 ($\times 10^6$ 道尔顿)*	注释
线粒体 DNA			
动物 (从扁虫到人)	环状	9—12	在任一物种中都只发现均一大小的分子 在所有已研究过的植物中,有几种大小级别的 DNA 环状分子。不同物种具有总的遗传信 息含量为 $300—1\,000 \times 10^6$ 道尔顿。
高等植物	环状	各不相同	
真菌			
面包酵母	环状	50	在任一物种中只发现均一大小的分子
<i>Kluyveromyces</i>	环状	22	
原生动物			
疟原虫	环状	18	
草履虫	线状	27	
叶绿体 DNA			
藻类			
衣藻	环状	120	
眼虫	环状	90	
高等植物	环状	85—97	

* 每 10^6 道尔顿的 DNA 双螺旋中,约有 1 500 DNA 碱基对。

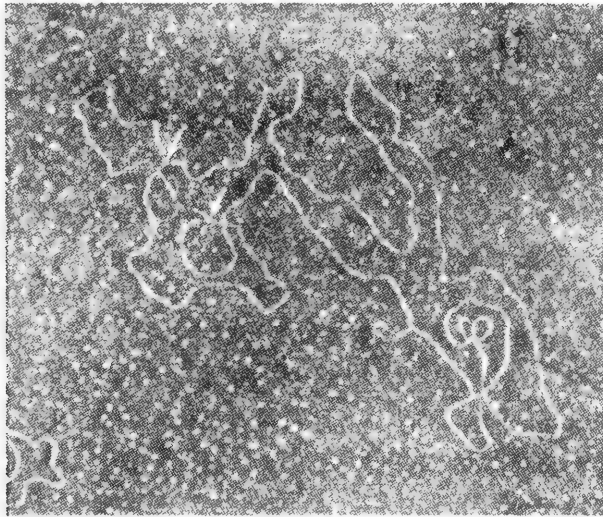


图 9-64 在 DNA 复制过程拍摄的哺乳动物线粒体 DNA 分子电子显微照片。环状 DNA 基因组只在箭头所标志的两点之间进行复制。(David Clayton 赠)

如表 9-3 中的例子所表明的,所有的线粒体和叶绿体均含有多组拷贝的细胞器 DNA 分子。这 DNA 在线粒体的基质中和叶绿体的间质中通常是以几个独立的簇分布着。被认为在那里同内膜相联。细胞器中没有组蛋白,虽然尚不知道这 DNA 是怎样包装的,

但其基因组与细菌的基因组非常相似,而不象真核细胞的染色质。

在哺乳动物细胞中,线粒体 DNA 不到细胞总 DNA 量的 1%。然而,在其他细胞——如高等植物的叶子或两栖类的大的卵细胞中,细胞器所占的 DNA 的比例可能要大得多(表9-3),在其中进行的细胞 RNA 和蛋白质的合成的比例也相应增加。

表 9-3 某些细胞和组织中细胞器 DNA 的相对含量

物种	组织或细胞类型	每个细胞器的 DNA 分子数	每个细胞中的细胞器数量	细胞器 DNA 占细胞总 DNA 的百分比
线粒体 DNA				
大鼠	肝	5—10	1,000	1
小鼠	L-细胞系	5—10	100	<1
青蛙	卵	5—10	10 ⁷	99
酵母	营养双倍体	2—50	2—50	15
叶绿体 DNA				
衣藻	营养双倍体	80	2	7
玉米	叶	20—40	20—40	15

酵母中,每个细胞线粒体在数量和大小上的很大变化是由于线粒体的融合和破碎。

线粒体和叶绿体含有完整的遗传系统^{39,40}

尽管小量的蛋白质是由线粒体和叶绿体基因组编码的,但能量细胞器可进行它们自身的 DNA 复制、DNA 转录和蛋白质合成。这些过程发生在细胞器的内部区室:线粒体的基质和叶绿体的间质中。虽然调节这些过程的蛋白质是细胞器所特有的,但这些蛋白质的大部分不是由细胞器 DNA 编码,而由核基因组编码。这一事实是令人惊奇的:细胞器蛋白质合成机构与细菌的合成机构相似,而不同于真核细胞的合成机构。这种相似性在叶绿体中更为明显。

1. 在对不同抗生素(如氯霉素、链霉素、红霉素和四环素)的敏感性和它们的结构方面,叶绿体的核糖体同大肠杆菌的核糖体非常相象。例如,叶绿体(取自玉米)的核糖体 RNA 的核苷酸顺序有许多部分和大肠杆菌的非常相似。

2. 叶绿体中的蛋白质合成象细菌中的一样,是从 N-甲酰甲硫氨酸开始,而不象真核细胞胞液中的蛋白质合成那样,从甲硫氨酸开始。

3. 叶绿体核糖体可能利用细菌的 tRNA 进行蛋白质合成,甚至还可能由叶绿体的小亚单位和大肠杆菌的大亚单位联结,构建具有功能的杂交核糖体。从所有这些方面来看,叶绿体核糖体不同于同一植物细胞胞液中的核糖体。

4. 叶绿体 mRNA 可有效地利用从大肠杆菌制备的合成蛋白质的抽提液,来进行转译。

线粒体转译系统亦具有细菌系统的许多特性:线粒体核糖体对抗细菌的抗生素敏感;蛋白质合成是从 N-甲酰甲硫氨酸开始。然而,这里也有某些根本的差别。最突出的表现在比较线粒体基因的核苷酸顺序和由它们编码的蛋白质的氨基酸顺序。在细胞核编码蛋白质和细菌的通用遗传密码中用作终止密码子的 UGA; 在哺乳动物和酵母的线粒体中则是为色氨酸密码子。并且,还有几个其他密码子具有不同的意义,而哺乳动物和酵母线粒体的某些密码也不尽相同(表 9-4)。这些差异是由线粒体而不是由核基因组编码的线粒体 tRNA 的独特性所造成,在后面将对这个问题作详细的讨论。为什么线粒体遗传

密码有别于细菌和真核细胞的细胞核,则还不知道。

表 9-4 “普遍的”遗传密码和两种线粒体遗传密码之间的差别*

密 码 子	哺乳动物线粒体的编码	酵母线粒体的编码	普遍的编码
UGA	色氨酸	色氨酸	终止信号
AUA	甲硫氨酸	甲硫氨酸	Ile
CUA	亮氨酸	苏氨酸	亮氨酸
AGA } AGG }	终止信号	精氨酸	精氨酸

* 黑体字表示其编码不同于普遍的编码。

酵母对研究线粒体生物发生有许多方便的地方,包括可用于遗传分析^{11,12}

许多关于线粒体生物发生机制的实验现在都用酿酒酵母 (*saccharomyces carlsbergensis*)

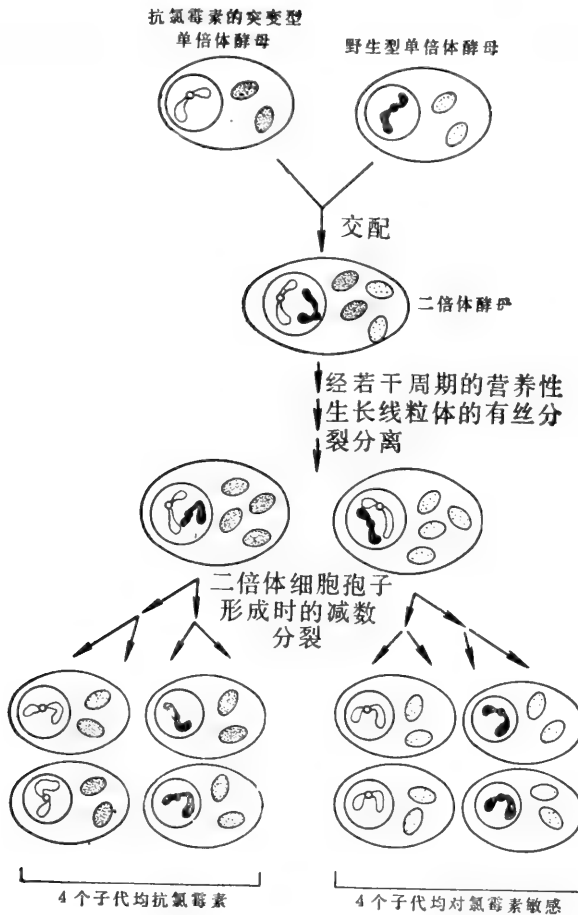


图 9-65 图解酵母线粒体和细胞核基因之间遗传型式的差别。就每个细胞核基因来说,由减数分裂产生的四个细胞中的两个遗传来自一个亲代细胞的基因,其余两个遗传来自另一亲代细胞的基因(孟德尔遗传)。相反,由于在营养性生长时线粒体有丝分裂分离(见正文),所有经减数分裂得到的四个细胞只能遗传其两个亲代细胞之一的线粒体基因(非孟德尔或细胞质遗传)。

sis) 和面包酵母来进行,这有几种原因。第一,这些酵母当生长在葡萄糖培养基中时具有单独靠酵解而生活的特异能力,所以不需要有功能的线粒体。这使得有可能研究强烈地干扰线粒体生物发生的线粒体 DNA 和核 DNA 两者的突变。对几乎所有的其他生物,这种突变是致死的。第二,酵母是简单的单细胞真核生物,容易生长,并具有生物化学特征。最后,酵母能以单倍体或双倍体生长,通常以出芽方式(不对称有丝分裂, asymmetrical mitosis)进行无性生殖。但是它们也能有性生殖:周期性地两个单倍体细胞以有性交配方式融合,形成一双倍体接合子,接合子能以有丝分裂方式生长,或经减数分裂生出新的单倍体细胞。实验地控制有性生殖和无性生殖之间的交替,使有可能对影响线粒体功能的基因进行广泛的遗传分析。也有可能用这些方法来测定这样的基因是位于细胞核还是位于线粒体,因为线粒体基因突变是不按照孟德尔定律遗传的,而细胞核基因的遗传受孟德尔定律支配。

要了解线粒体基因的非孟德尔遗传(细胞遗传),就要考虑当两个酵母单倍体细胞交配形成一个二倍体合子时,该基因所发生的变化。图 9-65 所阐明的例子中;一个酵母携带一个线粒体蛋白质合成的抗氯霉素突变,而另一个是野生型(对氯霉素敏感)的。这些基因在酵母生长在一种诸如甘油的底物上时很易鉴别,因为甘油只能被具完整线粒体的酵母代谢;在氯霉素存在的条件下,只有带突变线粒体基因的细胞才能生长。二倍体合子开始发育时,带有突变型和野生型两种线粒体,但是当接合子进行有丝分裂,以出芽方式产生二倍体子代时,只有有限数量的线粒体进入芽内。随着连续的有丝分裂复制,一个偶然出现的芽将接受全部为突变型的或野生型的线粒体。随后,从芽生出的全部子裔将具有遗传上同一的线粒体。由于这随机的过程,仅具有单一线粒体 DNA 类型的双倍体酵母子代最终产生了一——这叫做有丝分裂分离 (mitotic segregation)过程。当仅含有单一线粒体 DNA 类型的双倍体细胞进行减数分裂,形成四个单倍体子细胞时,每个子细胞接受了相同的线粒体基因。这种遗传型式叫做非孟德尔或细胞质遗传,以区别于核基因的孟德尔遗传(图 9-65)。当这种情况发生了,就证实了该基因是位于线粒体上。

哺乳动物细胞中线粒体基因是母体遗传的¹⁴

细胞质遗传的后果,对某些动物,包括我们自己在内,具有比对酵母更为深远的意义。在酵母中,交配的两个单倍体是同样大小的,贡献出同等数量的线粒体 DNA 给接合子。因此,酵母中线粒体遗传是双亲性的 (biparental), 双亲对子裔线粒体基因库的贡献是相等的(虽然正如我们刚刚看到的,经过营养性生长的若干世代之后,每个子裔通常含有的线粒体只来自一个亲代)。相反在高等动物中,卵细胞提供给合子的细胞质总是比精子提供的多得多,甚至在某些动物中精子可能完全不提供细胞质。所以,可以认为高等动物中线粒体的遗传是单亲性 (uniparental) 的,或者更精确地说,是母体遗传的,而且母体遗传也确已被证实,例如,已经发现分别具有两种类型的在核苷酸顺序上略有不同的线粒体 DNA (A 型和 B 型)的不同品系的实验大鼠。当带有 A 型线粒体 DNA 大鼠同带有 B 型的大鼠交配,其子裔只含有母体型的线粒体 DNA。

酵母的小突变体证明了细胞核在线粒体生物发生中的头等重要性¹⁵

在酵母中有一类线粒体 DNA 突变体,其所含的线粒体 DNA 大部缺失,线粒体蛋

白质合成全部被阻止，所以这种酵母不能建成具有功能的线粒体。因它们生长在低浓度葡萄糖培养基中，形成小的菌落，故称为细胞质小突变体(cytoplasmic petite mutants)。

虽然小突变体一点也不能制造线粒体蛋白质，不能建成有功能的线粒体，不过它们含有前线粒体(promitochondria)，其外表看上去很像正常的线粒体，有正常的外膜和发育不良的嵴的内膜(图 9-66)。前线粒体含有许多重要的酶，这些酶由核基因编码，在胞液的核糖体上生成。它们包括有 DNA 和 RNA 聚合酶，全部的柠檬酸循环的酶和许多内膜蛋白质。这一观察明显地强调了细胞核在线粒体生物发生中的头等重要。

这里附带说明一个很有趣的问题，在这种小突变体中，虽然其线粒体 DNA 基因组片段可以有从 20% 到 99.9% 的不同程度的缺失，但每个细胞的线粒体 DNA 总量却总是大致上同野生型酵母一样。这数量上的相同是由于一个尚缺乏了解的 DNA 扩增过程导致形成“衔接重复”DNA 分子，达到约同野生型线粒体 DNA 同样的大小：如此，一含有 50% 野生型线粒体 DNA 顺序的小突变体，其每个 DNA 分子中同样片段将

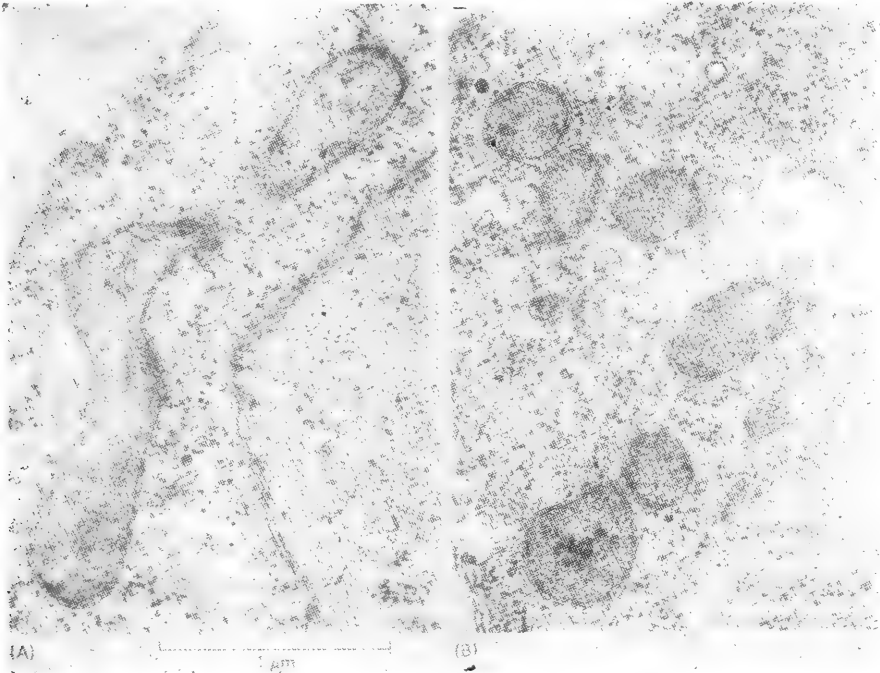


图 9-66 酵母细胞薄切片的电子显微照片，表示正常线粒体的结构(A)和小突变体线粒体的结构(B)。小突变体中全部线粒体编码的基因产物都缺失，细胞器完全由细胞核编码的蛋白质所构成。(Bardara Stevens 赠)

有两个拷贝；而一种只含 0.1% 野生型线粒体 DNA 顺序的突变体则其每个 DNA 分子将含有 1 000 个拷贝的同样片段。因而，小突变体可用来获取大量线粒体 DNA 的特定片段，这实际上是天然的无性繁殖。

酵母线粒体中大部分的 DNA 是不编码的¹¹

应用遗传分析方法与其他手段相结合，已经证明在酵母线粒体基因组内有 2 个 rRNA 基因，约 30 个 tRNA 基因和 8 个编码蛋白质的基因。这 8 个蛋白质中的 7 个是位于线粒体内膜上，而另一个是核糖体蛋白质。每一种这些蛋白质都是一较大的酶复合体的组

成部分，酶复合体大部分是由从胞液中输入的亚单位所构成。

所有已知的酵母线粒体 DNA 基因产物不到 DNA 的潜在密码含量的 20%，然而对那些额外的基因的深入研究还没有成功。造成这不相等的原因是在酵母基因组中有大量的不编码 DNA，它们可分为三类：(1) 某些酵母线粒体基因含有很大的中间插入顺序(内含子)；例如，细胞色素 b 和细胞色素氧化酶亚单位 I 的基因大于由蛋白质产物所预期的基因大小将近 10 倍。在不同的酵母品系中，内含子的数量和大小有明显的差别。(2) 某些线粒体 mRNA 含有不编码的“前导”顺序，它比编码顺序长许多。(3) 将近一半的酵母线粒体 DNA 由包含 95% 以上的 A-T 碱基对的片段所组成。虽然对这些片段的功能尚不了解，但许多这类 DNA 不象是作为任何蛋白质或结构 RNA 的密码。

因为这么多的酵母线粒体 DNA 表现为不编码的，表 9-2 中所列的较小的线粒体 DNA 可能包含大多数具有少量不编码 DNA 的重复基因。虽然这对比是不完全的，但迄今的结果倾向于证实这个推测。

人的线粒体基因组的核苷酸顺序已经全部弄清，并且它具有某些惊人的特征⁴⁵

对酵母线粒体基因组那么容易进行研究的遗传分析方法，对人的细胞却是不能适用。然而，现代 DNA 顺序分析技术的应用(见 185 页)，使相对较小的人线粒体 DNA 成为引人注意的材料，1981 年已经发表了它的 16 569 个核苷酸的整个顺序。把这顺序同已知的线粒体 tRNA 顺序和线粒体 DNA 编码的蛋白质的有限氨基酸顺序相比较，有可能来标定大多数人线粒体基因在其环状 DNA 分子上的位置(图 9-67)。

2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因和 13 个编码蛋白质的人线粒体基因组序列的定位，揭示出若干令人惊讶的特征：(1) 与酵母线粒体基因组不同，几乎整个人线粒体基因组的核苷酸序列看来都编码蛋白质和 RNA。(2) 胞液中氨基酸的顺序至少受 31 个不同的 tRNA 所规定，而 22 个不同的 tRNA 足以满足线粒体的蛋白质合成：正常的密码子-反密码子配对原则在线粒体中是不严格的，所以许多 tRNA 分子能识别在第三(不稳定)位置上的四个核苷酸的任何一个(见 201 页)。这“三个中的二个”读法允许一个 tRNA 与四个不同密码子的任何一个相配对。这就许可以较少数量的不同 tRNA 分子去合成蛋白质，但是这可能是不够精确的。(3) 如上面我们曾指出的，遗传密码是可以变换的，所以 64 个密码子中有 4 个具有不同于它们在胞液蛋白质合成中的“含义”(表 9-4)。

叶绿体的基因组比酵母和动物线粒体的更为复杂^{39,46}

细胞质遗传首先是在研究植物叶绿体突变基因的分离时发现的。在分子水平上对这个过程的认识仍然不完全，这是由于两方面的原因。第一，植物包含两个独立的细胞质遗传系统，常常难以确定特定的细胞质突变基因是位于线粒体还是叶绿体。第二，叶绿体 DNA 较动物和酵母线粒体 DNA 更大、更复杂(阅表 9-2)，这个差别造成了叶绿体 DNA 中的基因分析更加困难。然而，有一个有利方面：叶绿体和细菌遗传系统极为相似，叶绿体 DNA 和 mRNA 在高效率的细菌转录-转译系统里可精确地被转录或被转译(或者兼有两者)。细菌细胞提取物中的叶绿体 DNA 的体外解码，为确证特定的编码蛋白质基因提供了一有用的方法。

所获得的结果证明，许多蛋白质是在叶绿体中制造的，但是它们特殊的功能已被确定

的却是很少。如同线粒体 DNA 一样,叶绿体基因组为许多多酶复合体提供亚单位,这些复合体亦含有由胞液的核糖体制造的亚单位。

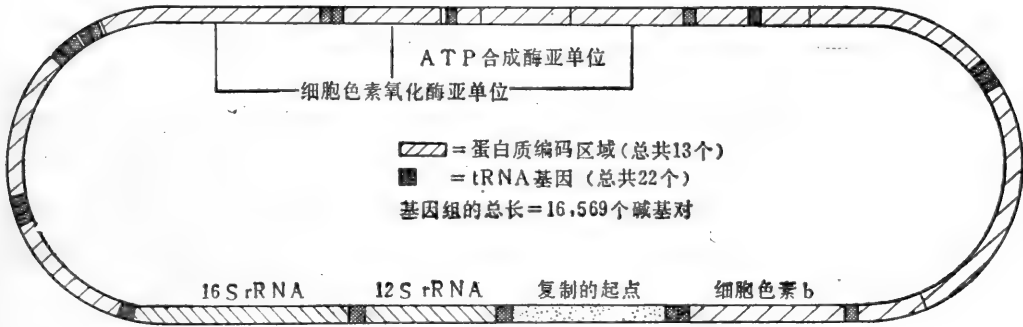


图 9-67 整个核苷酸顺序已被确定的人线粒体基因组的结构。牛和小鼠线粒体基因组 DNA 的顺序也已经测出,并具有相同的结构。注意,虽然有 13 个蛋白质编码区域,而只有 5 个所产生的蛋白质的功能为已知(3 个细胞色素氧化酶的亚单位,1 个 ATP 合成酶亚单位和细胞色素 b)。

线粒体仅以成熟的形态出现,而叶绿体在植物幼年胚胎中是以未成熟的前质体形态出现(第十九章)。倘若植物在黑暗中生长,这些前质体就不会成熟。当叶绿体 DNA 缺失,叶绿体的发育亦被阻留在前质体状态。这样的叶绿体突变对高等植物是致死的。在单细胞藻类,如眼虫中,没有功能的叶绿体的突变细胞,只要供应以氧化的底物,就能很好地生活。这种叶绿体突变体类似于酵母的线粒体小突变体。

在大约三分之二的高等植物中,其雄性亲代的叶绿体(花粉粒中所包含的)不进入接合子,因此叶绿体遗传严格地是母体遗传,在另一些植物中,其花粉叶绿体进入接合子,使这种叶绿体遗传为双亲遗传。有缺陷的叶绿体是植物花斑的一个原因:在一个接合子中混合有正常的和有缺陷的叶绿体,当生长时它们由有丝分裂分离而区分开来,在叶子上现出绿色和白色交错的斑纹;绿色斑纹含正常的叶绿体,而白色斑纹则含缺陷的叶绿体。

在线粒体 DNA 上转录的 RNA 转录本,在它们合成之后进行广泛的加工”

叶绿体中的 RNA 合成同大肠杆菌中的 RNA 合成只有很小的差别;像细菌 mRNA 一样,叶绿体 mRNA 在它们的 5'端或其长的 3'-poly A 尾部不含一帽子结构,这帽子结构是大多数真核细胞 mRNA 的特征。而且广泛的 RNA 加工过程似乎不涉及多数成熟的 mRNA 的生产。

相反,经过详细深入的研究,已知在人和酵母的线粒体系统中 RNA 前体的加工起着重要的作用。在人的细胞中,两股线粒体 DNA 链的转录是从一个启动基因开始,并以相同的速率进行,生成两条巨大的 RNA 分子,每个 RNA 分子含有一 DNA 单链全长的拷贝。因此,转录是完全对称的。在一股单链上转录的转录本——由于它在 CsCl 中的密度,故叫做重链(H链)——被核酸酶广泛地加工,获得了 2 个 rRNA、大部分 tRNA 和约 10 个含 poly A 的 RNA (图 9-68)。而轻链(L链)的转录本被加工,仅生成 8 个 tRNA 和一个小的含 poly A 的 RNA; 转录本的其余 90% 似乎不含有用的信息,并被降解。含 poly A 的 RNA 可被认为是线粒体的 mRNA; 它们的 5'端没有帽子结

构，而在3'端带有一约55个核苷酸的 poly A 尾部。尾部是在转录后由线粒体 poly A 聚合酶的作用而加上去的。

同人的线粒体基因不一样，某些酵母线粒体基因含有内含子，须由 RNA 剪接而被去除。然而，没有酵母的对称转录的证据：除了一个基因之外，其他所有的基因都在同一条 DNA 链上转录，这 DNA 链具有为几个基因所有的独立的启动子。

从线粒体内共生起源学说的观点看来，在酵母线粒体中(和一些叶绿体)基因中发现内含子是惊人的。因为细菌基因中没有发现内含子。并且内含子常常存在于一个品系酵母的线粒体基因中，而在另一品系酵母相同的基因中却没有。由于这样和那样的理由，曾认为在某些能量细胞器的 DNA 中所发现的内含子，是代表转位因子的痕迹。然而，不论在细胞器 DNA 中所观察到的断裂基因的来源，或它们对生物的效应，都是不清楚的。

由需能的过程输送蛋白质进入线粒体和叶绿体⁴⁸

在叶绿体和线粒体中所发现的大部分蛋白质是从细胞胞液运送进去的。这就提出了两个有关的问题：细胞是怎样指挥蛋白质到达恰当的细胞器？这些蛋白质又是怎样进入细胞器？

关于丰富的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶的小亚单位(S)输送进入叶绿体间质的研究，提供了部分的回答。当从单细胞藻(衣藻)或豌豆叶的细胞质中分离出的 mRNA 被用来编制体外蛋白质合成系统时，所产生的许多蛋白质中的一种同专一抗 S 抗体起反应。在体外所形成的 S 蛋白质，叫做前 S(pro-S)，它比成熟的 S 要多大约 50 个氨基酸。当完整的前 S 蛋白质同完整的叶绿体一起保温时，前 S 被吸入细胞器，由叶绿体中的肽链内切酶作用转变成为成熟的 S。成熟的 S 然后同核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶的大亚单位相结合，在叶绿体间质中形成了有活性的酶。核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶的大亚单位是在叶绿体核糖体上生成的。

前 S 蛋白质的输送机制尚不知道。设想前 S 先与叶绿体外膜上一受体蛋白结合，可能是在外膜与内膜之间的粘附部位，随后由一依赖能量的过程，通过跨膜小孔(transmembrane pore)被传送进入间质。

蛋白质输入线粒体的过程一般与叶绿体相同。如果纯化的酵母线粒体与细胞抽提液一起保温，抽取液中含有新合成的放射性标记的酵母蛋白，则核编码的线粒体蛋白可与胞液中非线粒体蛋白区分开来，并且有选择地参入线粒体，其方式与细胞内的选择吸收十分相似。因而，外膜蛋白、内膜蛋白，基质蛋白和膜间空隙蛋白均可找到它们进入到线粒体中各自特定区室的途径。

许多预定进入内膜、基质和膜间空隙的新合成的蛋白质均含有一氨基末端的前导多肽，在输入过程中被位于线粒体基质中的专一蛋白酶切去。此外，被指定到达这三个不同的线粒体区室的蛋白质的输入都需要跨内膜电化质子梯度。而预定进到线粒体外膜的蛋白质的输入机制则不同，因为它既不需要能量，也不发生蛋白酶剪切较长的前体蛋白的情况。这些和其他的观察都认为四种不同类型的线粒体蛋白是按图 9-69 和图 9-70 所示的普遍模式输入线粒体的。曾经设想，除了预定进入外膜的蛋白质之外，其他所有的蛋白质都由发生在膜粘附部位的需能过程而嵌入线粒体内膜。最初嵌入之后的蛋白酶剪切被

认为将引起每个蛋白质的构象变化。构象变化或者使蛋白质固定在内膜上，或是使蛋白质从内膜伸出进入相应的基质空隙或膜间空隙(图 9-70)。

蛋白质通过线粒体或叶绿体膜的运输，原则上与第七章中所描述的蛋白质通过内质网膜的运输相似。然而，有若干重要的差别。第一，进入线粒体基质或叶绿体间质的

运输必须包括穿过细胞器外膜和内膜两层膜的传送，而进入内质网膜的运输仅须穿过一层膜。此外，蛋白质进入内质网膜是通过定向释放的机制，开始于核糖体上仍继续合成未完全的蛋白质的时候(共转译输入, co-translational import);而蛋白质输入线

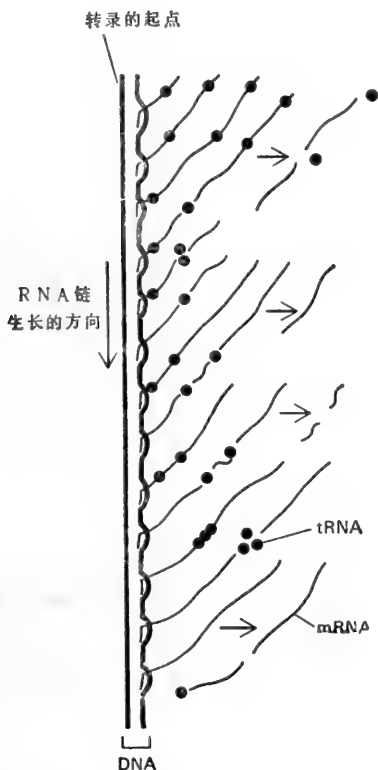


图9-68 在线粒体 DNA 的 H 链上合成的单个的大转录本，经加工生成 2 个 rRNA、14 个 tRNA 和 10 个含 poly A 的 RNA。如图所示，在 RNA 分子仍被转录的同时，大多数 RNA 就进行着加工。黑点表示含有 tRNA 顺序的短的 RNA 区域。(根据 D. Ojala, J. Montoya and G. Attardi, *Nature* 290:470-474, 1981. 略作修改)

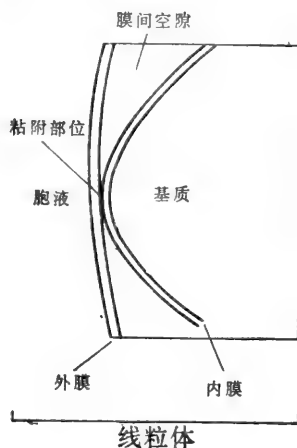


图9-69 含有膜粘附部位的线粒体一小区域的图解。这一部位被认为与有选择地输送蛋白质进入线粒体有关。被输送的蛋白质是由细胞核编码的，并在胞液中合成。

粒体和叶绿体，则设想是发生在蛋白质已合成完全之后(转译后输入, post-translational import)。

尽管有这些差异，细胞在每种情况下均合成一含有“信号序列”(“signal sequence”)的前体蛋白，这信号序列指挥蛋白质到达适当的膜上。在许多情况下，在运输过程完成之后，信号序列就从前体上被切除。然而，某些蛋白质不以前体的形式合成；在这些情况下，信号序列被假定是位于成熟蛋白的序列内。信号序列的特点了解得还不够，但它们必须有几种不同的类型，每种类型指令其蛋白质朝向细胞内的不同区域。例如，可以设想在一植物细胞中某些在胞液中开始合成的蛋白质将被输入线粒体，而另一些则被送入叶绿体，有一些进入过氧化物酶体，还有一些进入内质网膜。蛋白质的精确的细胞内运输路线所包含的复杂过程才开始被认识，这在第七章里已详细讨论过了。

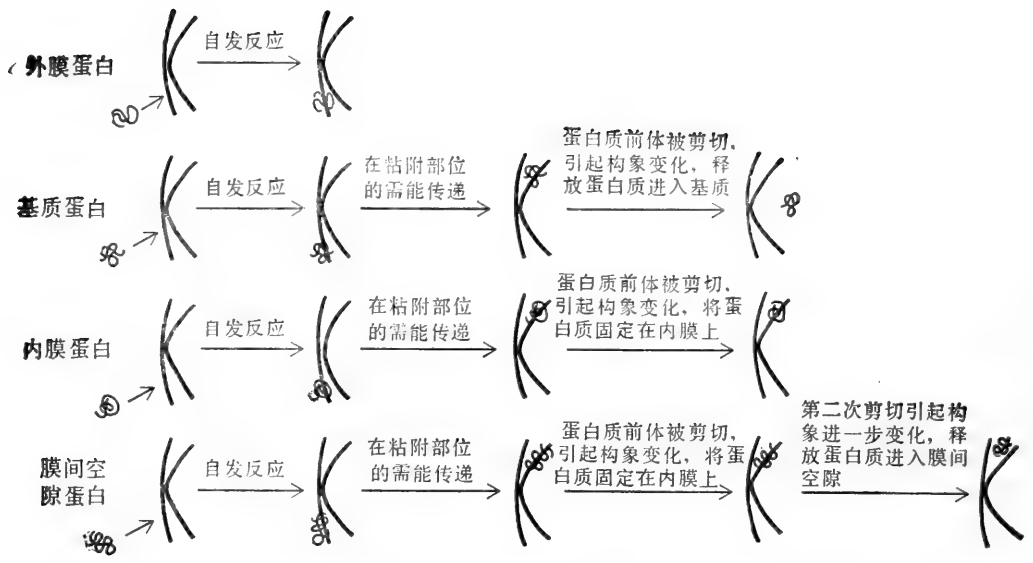


图 9-70 一种假设的途径, 解释被输送的线粒体蛋白有选择地确定目标而到达线粒体中的正确位置 (见图 9-69)。

叶绿体制造它们自己大部分的脂肪, 而线粒体则主要依靠从外面输入³¹

新的线粒体和叶绿体的生物合成除需要核酸和蛋白质之外, 也需要脂肪。叶绿体能合成它们自己所需要的脂肪。例如, 在菠菜叶子中, 虽然脂肪酸的去饱和作用是在叶绿体外面发生, 但细胞所有的脂肪酸合成都在叶绿体中进行。甚至叶绿体的主要糖脂也是在当地合成的。

另一方面, 线粒体所需要的脂肪大部分由外面输入。在动物细胞中, 在内质网膜中所合成的磷脂, 由磷脂转移蛋白的作用运送到线粒体外膜, 随后可能在粘附部位移入内膜。线粒体本身所催化的脂肪生物合成的主要反应是把磷脂酸转化为心磷脂, 这是线粒体内膜中的一种主要的磷脂, 约占线粒体总脂肪量的 20%。

线粒体和叶绿体的生物合成主要受细胞核控制

人们还很少知道细胞核和细胞器的遗传系统是怎样联络, 以协调它们对能量细胞器合成的作用。但所有的控制显然都与核有关。以下事实说明, 在细胞器蛋白质合成受阻的突变体中仍然产生出正常数量的“前细胞器” (“pro-organelles”)。在这些前细胞器中仍然正常地进行细胞器 DNA 和部分细胞器 RNA 的合成。这表明有关酶的合成和运送, 以及这些过程的时间安排与控制, 只需要细胞核的基因。细胞核也必须调节细胞器核糖体上生产的蛋白质的数量; 对于某些叶绿体蛋白质, 有证据表明这种调节可能在叶绿体 DNA 转录水平上发生, 但是怎样实行的则尚不知道。

虽然细胞器生物合成主要受细胞核的控制, 但是至少在线粒体的情况下, 有证据提示有某种来自细胞器的反馈控制。当完整细胞中线粒体蛋白质合成受阻时, 其结果使输入的和线粒体 DNA、RNA 和蛋白质合成有关的酶生产过剩, 细胞好象试着要克服这种合

成受阻。虽然这里一定有着来自线粒体的信号,但其性质尚不知道。

抑制线粒体蛋白质合成的药物怎样能用作抗生素而对病人无害⁴⁹

以抗生素如四环素或氯霉素处理组织培养的人的细胞,经一或二次分裂之后即停止生长。这效应是由于线粒体蛋白合成被抑制,导致线粒体不正常和 ATP 供应不足。然而,这些药物怎样能用于治疗细菌感染而不杀伤病人?有几种答案:

1. 某些抗生素(象红霉素)不能通过哺乳动物线粒体的不通透的内膜。

2. 在人体内大多数细胞是不分裂的,或以低速率分裂,所以已有的线粒体替换很慢(在大多数组织中,每五天或更长时间内才有一半的线粒体被替换)。因此,线粒体蛋白合成完全被阻之后还可能维持许多天,线粒体才完全耗尽。

3. 局部的组织状况可防止某些药物到达特别敏感细胞的线粒体。例如,骨髓中高浓度的 Ca^{2+} 可导致 Ca^{2+} -四环素复合物的形成,这种复合物不能进入快速分裂的(所以是脆弱的)血细胞前体。

这些因素的配合使得某些抑制线粒体生物合成的药物可作为抗生素在高等动物中应用。只有两个例子,其副作用可能归因于对线粒体的效应:以高剂量氯霉素长时间医治病人,可能导致骨髓失去制造红细胞或白细胞的能力;长时间以四环素治疗可能使内脏上皮缺损。在这两个例子中,这些副作用是否确实由所料期的线粒体生物发生受阻所引起,仍然是有争议的。

线粒体和叶绿体可能由内共生的细菌进化而来⁵⁰

我们已经强调了细胞器遗传系统的“原核”特性,叶绿体尤为明显;并且我们认为这可能是由于它们起源于内共生细菌,如第一章所讨论的。按照内共生假说(endosymbiont hypothesis),真核细胞是从没有线粒体或叶绿体的原始生物开始,随后同细菌建立起了稳固的内共生关系;细菌的氧化磷酸化系统被改造而为真核细胞本身所利用。因为动物和植物的线粒体是十分相似的,以致可假设线粒体发生的细胞内吞活动,是发生在真核细胞进化的很早时期,在动物和植物分开之前。以后,可能由于另一独立的涉及蓝藻菌的内吞事件而衍生出叶绿体,出现了第一个植物细胞(见图 1-21)。

因为大多数编码现存的能量细胞器蛋白质的基因都是在细胞核中,似乎在真核细胞进化的早期曾发生了广泛的基因从能量细胞器到细胞核 DNA 的转移。这就可能解释,为什么某些线粒体蛋白的核基因密码保留了和细菌基因显著的相似性:例如,鸡的线粒体酶——超氧歧化酶氨基末端的氨基酸顺序与细菌同样酶的相应片段,比之其与真核细胞胞液中所发现的相同类型酶的氨基末端要相似得多。

线粒体来自什么类型的细菌?许多不同类型细菌的细胞色素的完整氨基酸序列和三维空间 X 射线晶体分析提供了一个重要线索,表明这些蛋白质彼此之间,并与动物和植物线粒体呼吸链的细胞色素 c 都有密切关系。这些数据和其他生物化学的资料提出了在图 9-58 所表明的进化树,看来线粒体是一特殊类型的紫色光合细菌的后代,这种光合细菌已丧失了进行光合作用的能力而只留下了呼吸链。

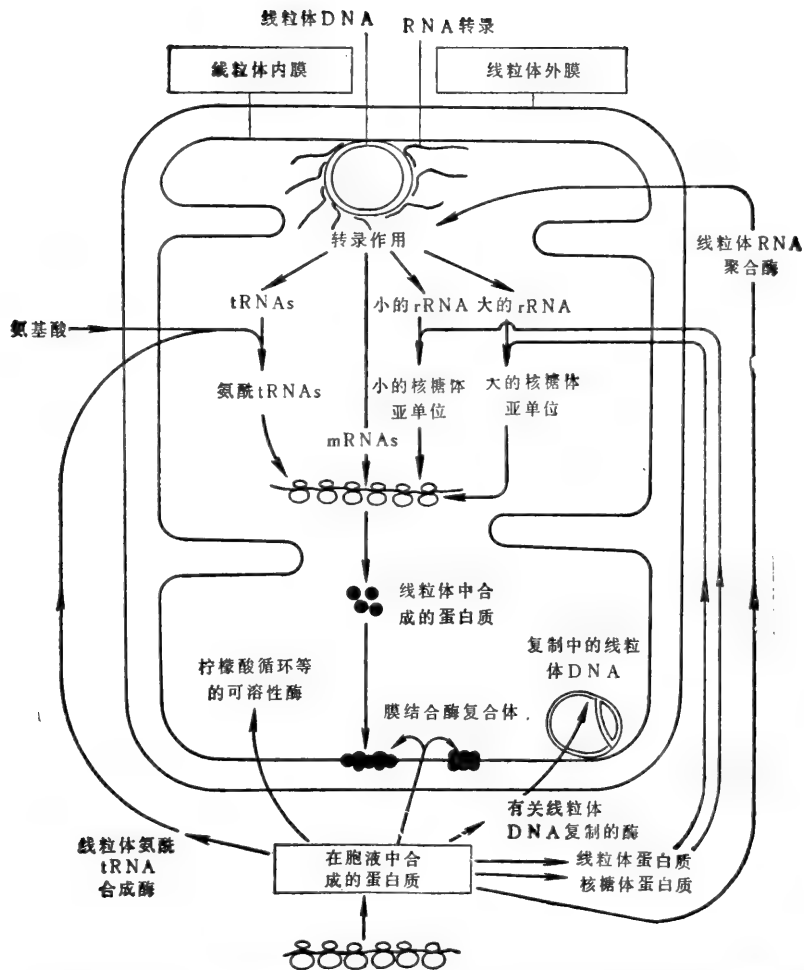


图 9-71 胞液中合成的、而后输送进入线粒体的蛋白质，在线粒体遗传系统的运转中起着重要的作用；此外，并提供大部分细胞器蛋白。

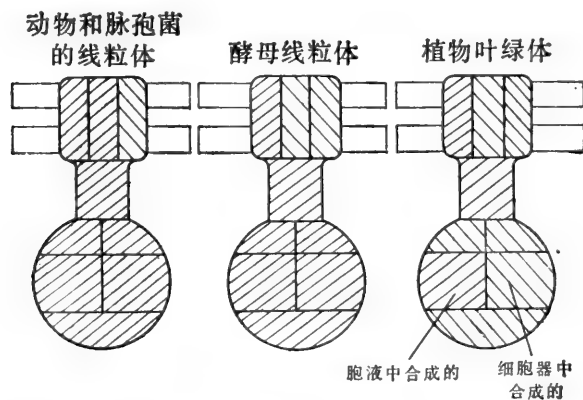


图 9-72 在不同的线粒体和叶绿体中，ATP 合成酶亚单位的合成部位是不同的。本图表示合成酶复合体的图解结构，而不表示亚单位的大小和准量关系。

为什么线粒体和叶绿体具有它们自己的遗传系统？

为什么线粒体和叶绿体需要有它们自己独立的遗传系统，而其它细胞器如过氧化物体和溶酶体没有？这个问题并不是不重要的，要维持一独立遗传系统从所需附加核基因来看，代价是高昂的：总共至少有 90 种蛋白质——核糖体蛋白（至少 53 种）、氨酰tRNA 合成酶、DNA 和 RNA 聚合酶、RNA 加工和修饰的酶，等等——必须由细胞核基因编码（图 9-71）。所研究的线粒体和叶绿体内大多数蛋白质的氨基酸顺序不同于别处这些蛋白质类似物的氨基酸顺序，因而有理由设想这些细胞器与细胞其他部位只有很少的蛋白质是共同的。这就意味着细胞核必须提供至少 90 个基因，以保持每一种能量细胞器的遗传系统。这样高昂代价的安排的安排的原因是不清楚的，从线粒体 DNA 核苷酸顺序分析来提供回答已经证明是没有希望的。我们想不出使人信服的理由来说明线粒体中制造的蛋白质为什么非要在线粒体中，而不能在胞液中制造。

能量细胞器中基因存在的一般解释是，某些蛋白质所以在细胞器内部合成，是因为它们的非常疏水性，很难从外面进入到膜上的一定位置。但图 9-72 中总结的 ATP 合成酶复合体方面的研究结果，使这解释令人难以相信。虽然复合体中个别的蛋白质亚单位在进化中是高度保守性的，但亚单位的合成部位却没有保存下来。在叶绿体中，有若干较亲水的蛋白质——包括复合体的 F_1 ATP 酶部分的五个亚单位中的四个——是在叶绿体核糖体上生成。相反，在真菌的脉孢菌 (*Neurospora*) 和动物细胞中，ATP 酶的膜部分上的一种非常疏水性的亚单位（亚单位 9）是在胞液的核糖体上生成，而后输入线粒体。不同生物中，为功能上等价的蛋白质亚单位的编码的基因位置的多样性（图 9-72），是难以用任何一种假定现存的线粒体或叶绿体遗传系统具有特殊的进化利益的假说来解释的。

通过一消除过程，所有这些留下了不能令人满意的可能性，即这些细胞器遗传系统是进化的盲端。按照内共生假说，这可能意味着内共生体转移其基因到细胞核中去的过程并未进行到底，在只转移了大部分基因之后便停止了。

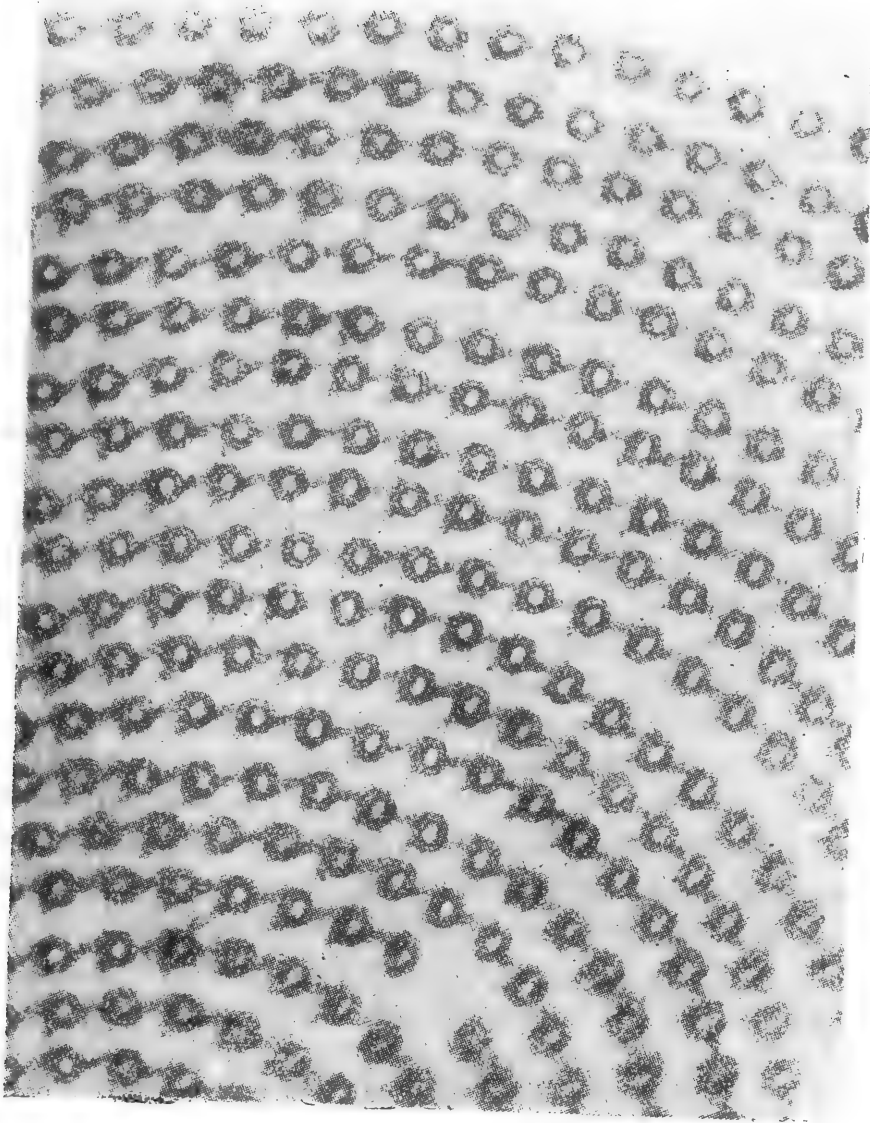
小结

线粒体和叶绿体在需要两个独立的遗传系统（即细胞器和细胞核的遗传系统）协同作用的过程中生长和分裂为两个。这些细胞器中大部分的蛋白质是由细胞核 DNA 编码，在胞液中合成，而后个别地输入细胞器。然而，有少数细胞器蛋白质——同它们所有的 RNA 一起——由细胞器 DNA 编码，并由细胞器本身合成。人线粒体整个基因组的 16 000 个以上核苷酸的全部顺序的测定，揭示出它总共编码 2 个核糖体 RNA，22 个转移 RNA 和 13 个不同的多肽链。叶绿体基因组比人线粒体基因组约大 10 倍，想来是含有更多的基因。而细胞核对于这两种细胞器的生物发生是起着头等重要的作用；事实证明，细胞器基因组功能丧失的突变体仍然可以形成可辨认的“前细胞器”。

叶绿体的核糖体与细菌的核糖体十分相似，而线粒体的核糖体与细菌的既有相似又有差异，这使得追踪它们的起源更为困难。然而，其他蛋白质的相似性表明，这两种细胞器是起源于原始真核细胞同一细菌进入稳定的内共生关系的时候：设想由紫色细菌

产生线粒体，而后由蓝藻菌产生叶绿体。这提示了，虽然这些古代细菌的许多基因仍然具有制造细胞器蛋白质的功能，但它们的大部分由于未知的原因而整合进细胞核基因组。

【罗登译 李有则校】



电子显微镜检查到的微管的横切面。这种外径约 25 nm 的微管是收缩棒或轴基的主要结构成分,见于许多鞭毛状原生动物。(引自 D. Woodrum and R. Linck. *J. Cell Biol.* 87: 404—414. 洛克菲勒出版社同意复制)

第十章 细胞骨架

真核细胞不仅具有特定的形状和高度复杂的内部结构,而且还能改变其形状,重新安排其内部的细胞器位置。在许多情形下,还能从一个地方移动到另一个地方。形状、内部结构和运动这些特性,均有赖于细胞质内由蛋白质丝组成的作为真核细胞“骨骼和肌肉”的复杂网状结构——细胞骨架(cytoskeleton)。

两类最主要的细胞骨架纤维是,肌动蛋白丝(actin filaments)(有时叫做微丝)和微管(microtubules)。二者均由球蛋白亚基组成,可在细胞内迅速装配和解聚。它们由胞质内未聚合的亚基库装配出来,其控制机制颇为精致。在多数动物细胞中,还见有另一类蛋白质丝,因其直径介于肌动蛋白丝与微管之间,而被称之为中等纤维(intermediate filaments)。

除上述三类主要蛋白质丝外,细胞骨架还含有许多不同的辅助蛋白,负责丝间或丝与其他细胞组分如质膜之间的连接,影响丝聚合的速率和程度。一系列专门的辅助蛋白,还会与蛋白质丝相互作用而产生运动。依靠肌动蛋白丝的肌肉收缩和微管的鞭毛挥动,就是两个最为熟悉的例子。尽管这些运动涉及不同的蛋白质系统,但两者均有赖于ATP水解,以及一蛋白质丝相对另一蛋白质丝的滑动。

负责肌肉和鞭毛运动的纤丝其排列情况的异常稳定而又高度有序的特征,已使其组分得以鉴定,其作用机制也得以了解得远比其他细胞骨架成分详尽。故本章从描述肌肉和鞭毛开始,以此作为细胞骨架主要成分的介绍。第二节则介绍肌动蛋白丝和微管的不太有组织而又不甚稳定的排列,并对其装配和解聚的控制进行讨论。随后几节,叙述中等纤维及细胞骨架主要纤丝之间的相互作用。最后,以细胞如何维持其空间结构和细胞如何运动这两个现代细胞生物学中最富挑战性的问题,作为本章的结尾。

肌肉收缩¹

在生物所表现的种种运动形式中,以基于肌肉收缩的最为人们所熟知。跑、走、游泳和飞翔,均有赖于脊椎动物体的肌肉组织在其骨骼上迅速收缩的能力。骨骼肌是一种惊人的、在随意控制下产生快速运动的有效装置。而与此密切相关的肌肉形式——心肌和平滑肌,则已特化为其他非随意运动、如心脏的搏动和肠的蠕动。

各种类型的肌肉都靠积极收缩而产生运动。这种收缩,在几乎所有的细胞中则是依靠细胞内的一种复杂而有力的蛋白质装置,以一种更为基本的形式,产生运动而完成的。最有力的是骨骼肌(及类似的无脊椎动物组织,如昆虫的飞翔肌)。其中的收缩装置是如此高度有序,以致其作用机制可由其超微结构明显地反映出来。因而,我们现在对于肌肉收缩才有了极为详细的了解,以及有了活细胞如何利用化学能作机械功的好模型。

肌原纤维是骨骼肌细胞的收缩单位

骨骼肌由细长的肌纤维组成,其中的每一根肌纤维,均为一个异常巨大的、由许多单细胞融合而成的细胞。尽管肌纤维因此而含有许多细胞核,但其大约三分之二的干重,还是由直径为 $1-2\mu\text{m}$ 沿整个细胞长轴伸展的长圆柱形单位——肌原纤维所组成的(图10-1)。因为分离的肌原纤维能在ATP存在下进行收缩,故其显然就是肌细胞的收缩单位。正如我们即将见到的那样,每根肌原纤维本身还含有一系列由细胞骨架蛋白的重复装配物构成的微小收缩单位。

肌原纤维由粗肌丝和细肌丝的重复装配物构成

在光学显微镜下,很容易看到肌原纤维的收缩单位,它使肌原纤维呈带状或条纹状外形。每个有规则的重复单位或肌节(sarcomere),长约 $2.5\mu\text{m}$ 。相邻肌原纤维的肌节相互对齐排列,致使整个肌细胞也呈类似的条纹状外形(图10-2)。在高倍镜下观察纵切面,可见每个肌节中均有一系列明暗相间的条纹。暗条纹叫A带、明条纹叫I带。在I带中央,还有一条致密线,将一肌节同下一肌节分开,称之为Z线或Z盘(图10-3)。

关于横纹的分子基础以及有关它们的功能意义的一个重要线索,是在1953年最早因电子显微镜研究生物材料薄切片的而被揭示的。结果发现,每个肌节都含有二组平行和部分重叠的蛋白质丝:粗肌丝(thick filament)(长约 $1.6\mu\text{m}$ 、直径约 15nm),从A带一端伸展到另一端;细肌丝(thin filament)(长约 $1\mu\text{m}$,直径约 8nm),穿过I带并部分进入A带(图10-3)。A带粗、细肌丝重叠区的横切面显示,粗肌丝呈有规则的六方晶格阵列,而细肌丝则有规则地分布在它们之间(图10-4)。

在肌丝相互滑动时发生收缩

如让单色光,例如激光,射过一个活的肌细胞,便会产生一系列干涉条纹。这就为肌节间隔提供了一种灵敏的测量方法。测量结果表明,每个肌节都会随肌肉收缩而按比例缩短。这样,如果一根含有2000个肌节的肌原纤维,从5cm缩到4cm(即缩短约20%),那末其中的每个肌节长度便会相应地从 $2.5\mu\text{m}$ 缩至 $2\mu\text{m}$ 。

当肌节缩短时,只是I带长度缩减,致密的A带仍保持不变。是否可把这种改变简单地解释为,收缩系由粗肌丝相对细肌丝滑动所致,而粗、细肌丝的长度并未改变(图10-5)。于1954年创立的这种简单的肌丝滑动模型,对认识收缩机制一直起着至关重要的作用。特别是,注意到相邻粗细肌丝之间引起它们滑动的那种分子间的相互作用。

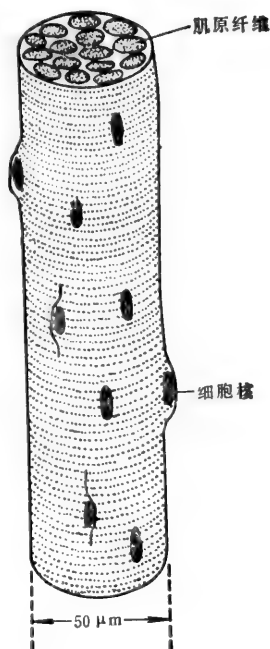


图10-1 骨骼肌细胞(或纤维)的短断片图解

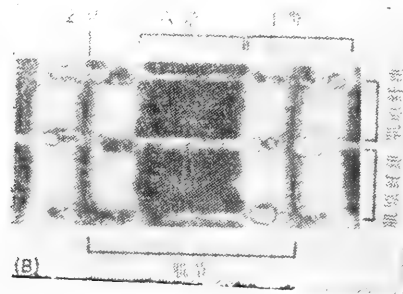
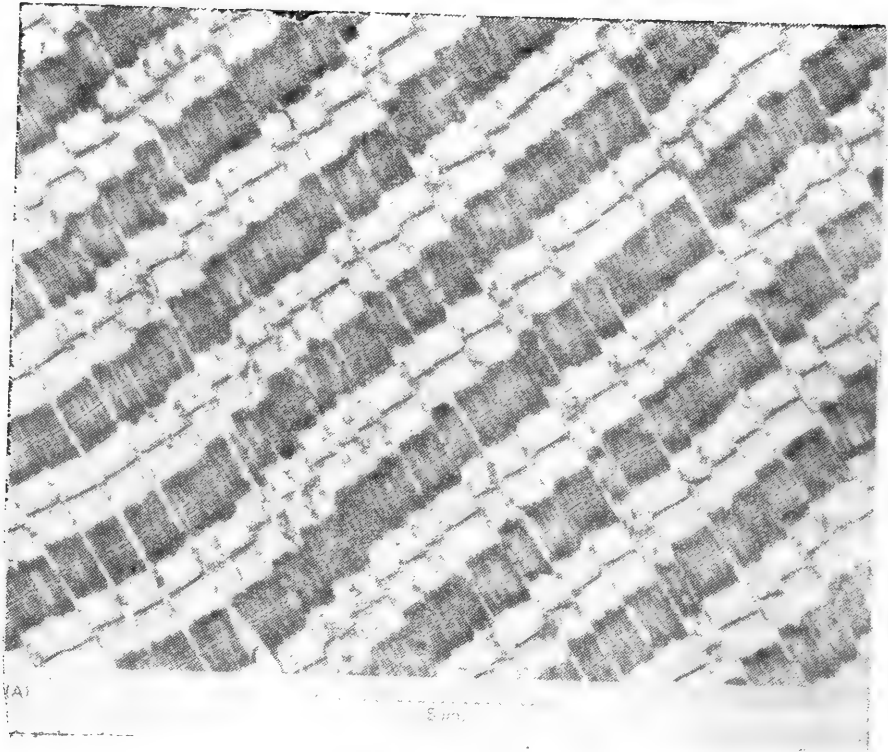


图 10-2 (A)低倍放大的骨骼肌纤维(取自兔子腰肌), 呈有规则的横纹图象。肌纤维及其所含的许多肌原纤维(见图 10-1), 从左上方斜向右下方。(B)A 图电子显微镜照片的细节, 示二相邻肌原纤维部分及轮廓清楚的一个肌节。(Roger Craig 赠)

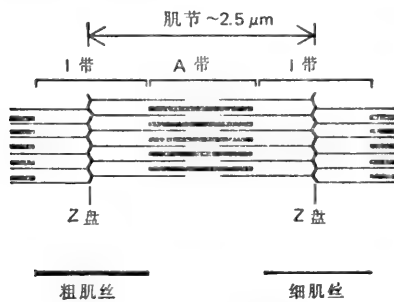


图 10-3 单个肌节的图解, 示在骨骼肌细胞显微镜照片上所见的 I 带和 A 带的由来 [见图10-2 (B)]。

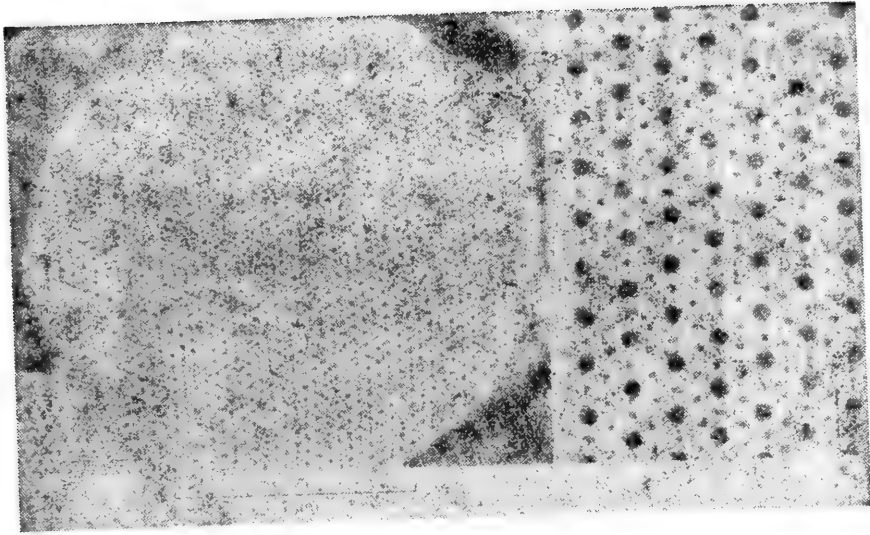


图 10-4 昆虫飞翔肌横切面的电子显微镜照片，示粗、细肌丝如何按晶体规律性包装在一起。与脊椎动物肌肉相应部分不同，粗肌丝具一中空中心，如在右侧的放大照片中所见。（引自 J. Auber, *J. de Microsc.* 8: 197—232, 1969）

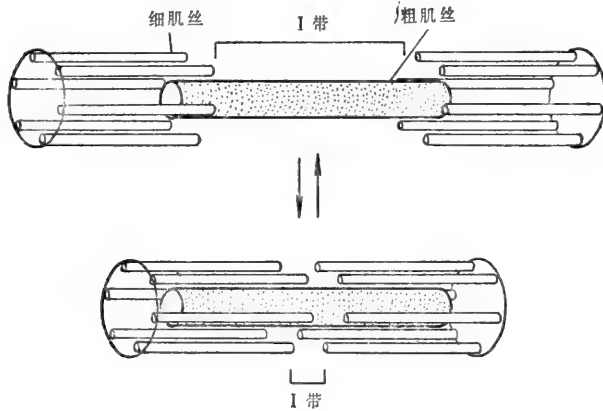


图 10-5 肌肉收缩的滑动肌丝模型，其中的粗、细肌丝相互滑动而未缩短。

肌丝滑动模型已获得几个不同方面的证据的支持。肌丝本身的长度不会随肌肉缩短而改变，已为电镜观察所证实。X 射线衍射分析也表现，每种肌丝中亚基分子的内部包装保持不变。肌肉所能产生的机械张力，则随粗细肌丝之间的重叠程度而变，就好象张力确实是由它们之间的滑动相互作用所产生的一样。

在放大倍数很高的电镜照片中可见到产生张力的相互作用的超微结构基础。其中的粗肌丝具有许多微小侧支或横桥，它们穿过大约 13 nm 的间隙而同邻近的细肌丝相连接（图10-6）。现已知道，在肌肉收缩中，粗细肌丝就是通过这种横桥的犹如成排纤小的船桨的周期性动作而相互滑动的。已对细肌丝与粗肌丝的相互作用蛋白质分别进行了鉴定，

它们就是所有细胞骨架蛋白中最为丰富的肌动蛋白，以及通常与产生运动的细胞结构中的肌动蛋白有关的肌球蛋白。对从肌肉中提取的肌动蛋白和肌球蛋白所进行的生物化学实验，已使我们获得了有关实际上存在于所有真核细胞的这两种重要蛋白质的大部分知识。

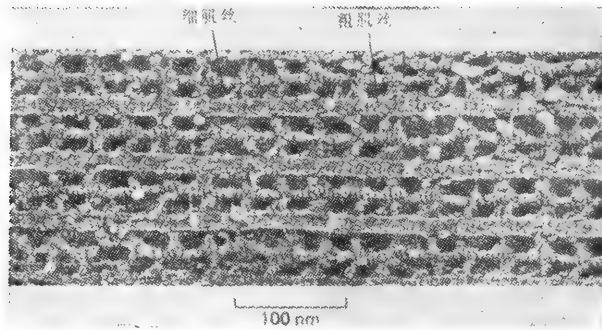


图 10-6 经快速冰冻、断裂和深度蚀刻处理后的昆虫飞翔肌的电子显微镜照片，示粗、细肌丝的近晶格状排列。跨越这两类纤丝的横桥则是肌球蛋白头部。(John Heuser, Roger Cooke 赠)

细肌丝主要由肌动蛋白组成

骨骼肌的肌动蛋白只是脊椎动物细胞合成的至少六种不同肌动蛋白中的一种。所有真核生物，除最原始的如酵母之外，都具有多肌动蛋白基因(multiple actin genes)，它们编码不同组织的细胞中的、或不同发育阶段所表达的、稍微不同的肌动蛋白。但因肌动蛋白基因极为保守，而蛋白质之间的差异又是这样微小，以致至少在体外试验中，来源甚为不同的肌动蛋白分子在功能上可以互换。因此，由骨骼肌抽提的肌动蛋白分子的主要特性，也为其他来源的所有肌动蛋白分子所共有。

肌动蛋白一般是通过以很稀的盐溶液处理肌肉干粉来分离到的。这种处理可使肌动蛋白丝折断为其球状亚基，后者由一条分子量为 41 800、有时称为球状肌动蛋白或 G 肌动蛋白的多肽组成。每分子 G 肌动蛋白与一个紧密结合而使其球状构象得以稳定的 Ca^{2+} ，以及一分子非共价结合的 ATP 关联。当 G 肌动蛋白聚合形成肌动蛋白丝，也叫做丝状肌动蛋白或 F 肌动蛋白时，所结合的 ATP 末端磷酸水解。只要把盐浓度提高到近于细胞内的水平，就会诱导而引起聚合：肌动蛋白的稀盐溶液仅比水溶液稍粘一点，但随着肌动蛋白分子聚合形成纤丝，粘度即迅速显著增高。

虽然 ATP 在肌动蛋白聚合过程中水解，但此过程并不需要能量。肌动蛋白在一种不能水解的 ATP 类似物存在下会照常聚合。然而，ATP 水解却会大大加快肌动蛋白聚合的速度，并对其动力学具有重大影响。这将在我们以后讨论依靠肌动蛋白有控聚合的细胞活性时再作解释。因为肌肉收缩活性依靠的不是这些特性，而是稳定的肌动蛋白丝的性能。

如电镜照片中所见，肌动蛋白丝系由二串直径约为 4 nm 的球状分子螺旋盘绕而成，每圈 13.5 个分子(图 10-7 和 10-8)。根据它们的 X 射线衍射图，和荧光标记的抗肌动蛋

白抗体对肌节 I 带区的染色,已经证明这种纤丝就是骨骼肌细肌丝的主要成分。然而,构成肌肉细肌丝的,除肌动蛋白外,还含有下面将要述及的其他几种蛋白质。

肌动蛋白丝呈极性结构,故其两端有所不同。肌动蛋白的这种极性,为其在细胞运动中的功能所必需,可按其与肌球蛋白相互作用的方式进行检测。但在我们讨论这种相互作用之前,还必须介绍肌球蛋白分子的一些性质。

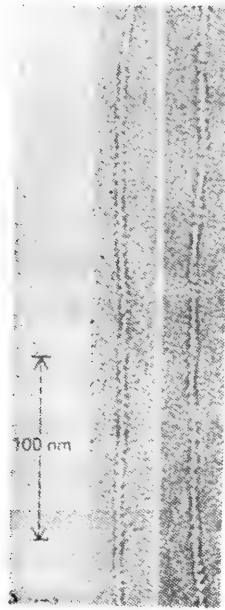


图10-7 负染的肌动蛋白丝的电子显微镜照片。(Roger Craig 赠)

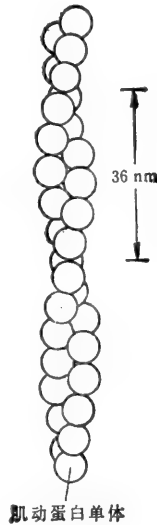


图10-8 肌动蛋白丝图解,示球状肌动蛋白分子的螺旋排列。虽然这里将其画为球形,但X射线衍射研究却表明每个肌动蛋白分子实际上均为梨形,长约6.5 nm,最宽处约4 nm(见图10-7)。

粗肌丝主要由肌球蛋白组成

肌球蛋白几乎可从每种脊椎动物细胞提取,并总是存在于细胞内的由肌动蛋白丝形成收缩束的部位。肌球蛋白在进化过程中,远不如肌动蛋白那样高度保守,已见有数种不同形式。由非肌肉细胞提取的肌球蛋白特性将在后面几节中讨论。骨骼肌肌球蛋白的主要特征是它能在体外自发聚合形成聚合物,这种聚合物比其他类型的肌球蛋白形成的大得多。

可以通过以能溶解肌球蛋白的浓盐溶液处理骨骼肌来提取肌球蛋白。经过这样处理的肌肉仅仅失去了它的粗肌丝。粗肌丝再经裂解,即成为组成它的肌球蛋白分子。肌球蛋白分子量约为 500 000,见于电镜照片的则为长棒状分子,并各具两个球状头(图 10-9)。若用高浓度尿素或去垢剂处理,还可使每个分子进一步解离为六条多肽链:两条完全相同的 200 000 道尔顿的重链,以及两对分别约为 20 000 道尔顿和 16 000 道尔顿的轻链。重链由一个长 α 螺旋部分附着在一个球状头上构成。在完整的肌球蛋白分子中,两条重链的长 α 螺旋就会相互缠绕而成为棒状尾部,从尾部再伸出两个头来;而其中的每一个头部,则是由一条重链和一分子每种轻链组成的球状头复合物(图 10-10)。

即使在高盐浓度下,分离的肌球蛋白分子仍趋于形成二聚体。在生理离子强度下,肌球蛋白溶液则会随着二聚体聚合形成大纤维而变得混浊起来。在一些条件下,后者与天然的肌肉粗肌丝极为类似。不像肌动蛋白丝,肌球蛋白丝的形成不是通过亚基头尾相接,而是通过肌球蛋白分子的尾部相联。天然粗肌丝主体是由几百个肌球蛋白的尾部有规则地交错排列包装而成,从而使其头部得以一个个地向外突出(图 10-11 A 和 B)。这是具有两组方向相反的肌球蛋白尾部会聚的中央裸露区域的双极结构。肌球蛋白分子的球状头部与肌动蛋白相互作用,并形成肌肉的粗细肌丝之间的横桥。

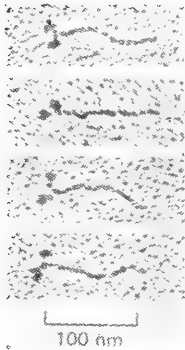


图10-9 以铂投影的肌球蛋白分子
的电子显微镜照片。表明每个分子均由
两个球状头附着在一条纤维状尾巴上
组成。(David shotton 赠)

ATP 水解促使肌肉收缩³

肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用随化学能转换为机械功而产生一种连贯性的收缩力。骨骼肌完成这种转换的效率极高,只有 30—50% 的能量以热量损失。而一台汽车发动机一般却要浪费掉汽油中 80—90% 的能量。

用于肌肉收缩的能量,来自 ATP 水解为 ADP 和无机磷(P_i)。但在静止的肌肉与正在兴奋收缩的肌肉之间却未发现 ATP 水平有何重要差别。造成这种明显矛盾的原因是,在肌肉细胞的细胞质中存在一个十分有效的 ATP 再生系统。其中存有一种高水平的活性磷酸化合物——磷酸肌酸(图 10-12),可在肌酸激酶的催化下与 ADP 反应,形成肌酸和 ATP。所以,在一阵短促的收缩之后,下降的是磷酸肌酸水平,即使收缩装置本身消耗的是 ATP。于是这种磷酸肌酸库便成了一个酷似电池一般的 ATP 能量供应站,而到肌肉静止时再充入通过细胞氧化产生的新的 ATP。

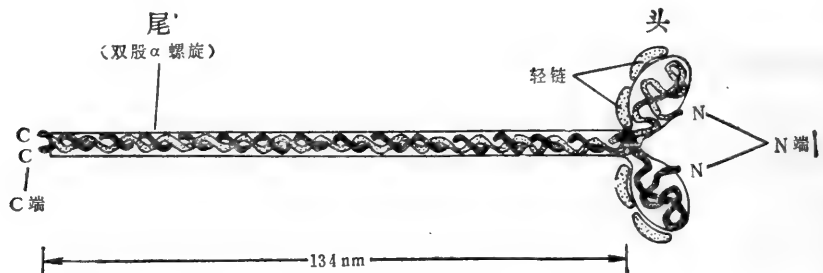


图 10-10 肌球蛋白分子图解,示组成它的两条重链和四条轻链。轻链具有两种不同类型,每一种分子存于两肌球蛋白头的每一个之上。

肌球蛋白是一种为肌动蛋白活化的 ATP 酶^{1,2}

肌肉收缩过程中的 ATP 水解是肌球蛋白与肌动蛋白相互作用的直接结果。甚至肌球蛋白也可独自作为一种水解 ATP 的酶(ATP 酶)。但纯化的肌球蛋白本身,不是一种很活泼的 ATP 酶:每分子肌球蛋白差不多要 30 秒钟才能裂解一个 ATP 分子。限速步骤既不是 ATP 与肌球蛋白的起始结合,也不是水解本身——这两步均极为迅速,而是

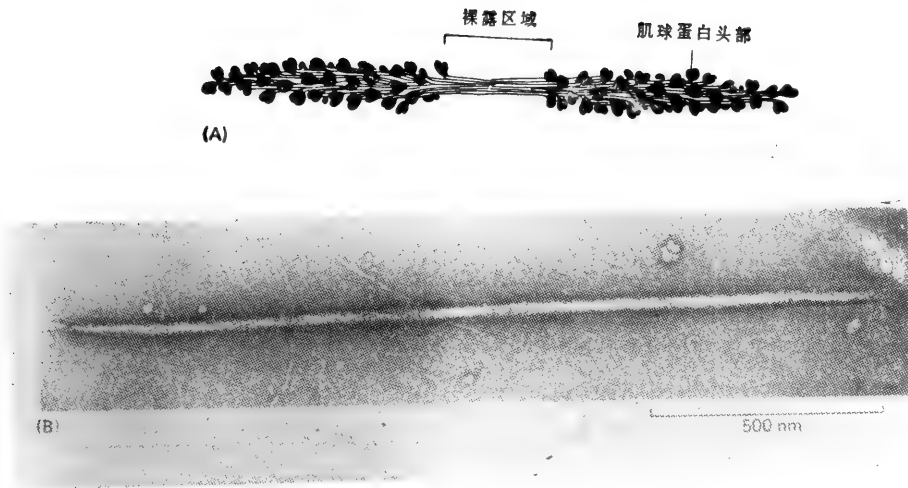


图 10-11 (A)骨骼肌肌球蛋白粗肌丝图解, 未按比例绘制。肌球蛋白分子通过其尾区聚集一起, 从而使其头部得以向外突出。肌丝中央的裸露区域则全由肌球蛋白尾部构成。(B) 由海扇肌肉分离的肌球蛋白粗肌丝的电子显微镜照片。示中央的裸露区域。(Roger Craig 赠)

ATP 水解产物(ADP 和无机磷酸 P_i)的释放, 它们与肌球蛋白分子紧密结合, 形成非共价复合物, 从而阻止了 ATP 的进一步结合和水解。

肌球蛋白水解 ATP 的速度, 可被肌动蛋白大大地加快。在肌动蛋白丝存在下, 每分子肌球蛋白每秒钟能水解 5—10 个 ATP 分子, 而与正在收缩的肌肉中测得的速度相符。肌动蛋白丝对于肌球蛋白 ATP 酶的这种促进反映了两者之间的一种天然联系。这种联系不会影响肌球蛋白水解 ATP 这一步, 而是促使 ADP 和 P_i 更快地从肌球蛋白分子上释放下来。于是, 如下面两节所述, 游离的肌球蛋白又可与另一 ATP 分子结合而重新开始反应。

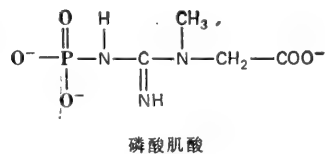


图 10-12 磷酸肌酸在脊椎动物肌肉和其他组织中, 作为高能磷酸基团一种贮备形式。其高能磷酸基团通过肌酸激酶作用而转移到 ADP 上。

肌球蛋白头部同肌动蛋白丝结合^{1,2}

同肌动蛋白丝结合及 ATP 水解都发生在肌球蛋白分子的球状头部。如果通过限制性的蛋白水解酶作用, 把肌球蛋白分子切成较大片段, 即可对这些片段进行分离和分析。例如木瓜蛋白酶在肌球蛋白亚基头部区域的基部将其切开, 而释放出称之为肌球蛋白棒的几乎整个尾部及两个分开的球状头部(图 10-13)。肌球蛋白棒像完整的肌球蛋白分子一样, 可在生理盐浓度自我装配成有规则的大聚集物, 只是没有侧支。酶切得到的两个分开的肌球蛋白头部各约 120 000 道尔顿, 称为肌球蛋白亚片段 1 (S1 片段)。它们保留了完整肌球蛋白分子的所有 ATP 酶活性, 以及和肌动蛋白丝结合的特性, 并可用于分析肌动蛋白与肌球蛋白之间的相互作用。

肌动蛋白丝中的每个肌动蛋白分子都能结合一分子 S1。肌动蛋白丝与 S1 的复合

物仍显示肌动蛋白丝极性。在电镜负染制片中(图 10-14),这类复合物具有一种有规则的特殊结构:每个 S1 片段形成一个侧突,许多这种突起叠加成像,便产生了沿肌动蛋白丝的箭头形外貌。这些经过装饰的肌动蛋白丝上的箭头,在两股丝状肌动蛋白双螺旋上都指向同一方向,从而表明了其固有的结构极性。

在肌动蛋白丝中存在着结构极性,使预测细肌丝在肌节中的取向成为可能。如上所述,构成 S1 片段的肌球蛋白头部区域在粗肌丝裸露区域两侧(即肌节 A 带两侧)的取向相反。由于这些头部区域须同重叠部位中的细肌丝相互作用,便有理由设想,肌节两侧的细肌丝也具有相反极性。可用 S1

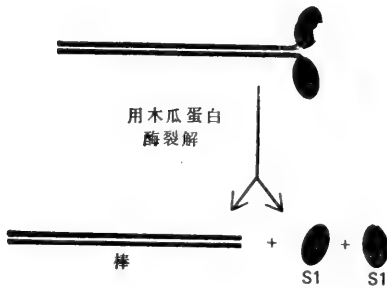


图10-13 以蛋白水解酶木瓜蛋白酶作有限消化,使肌球蛋白分子在其头、尾间裂开,从而产生一根肌球蛋白棒和两个 S1 片段。

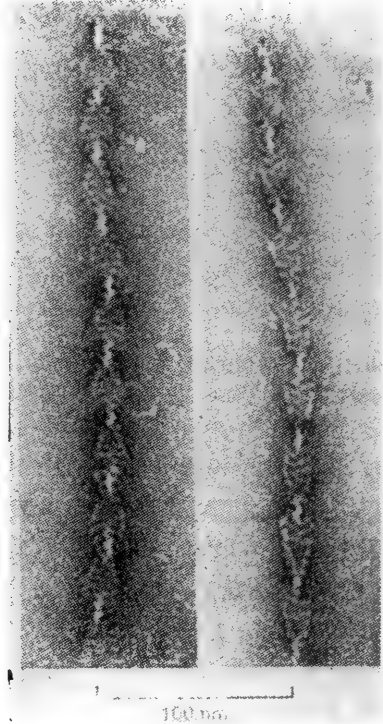


图10-14 以肌球蛋白 S1 片段装饰的肌动蛋白丝的电子显微镜照片。结合的 S1 片段向一面倾斜,其螺旋形排列便呈箭簇状,而表明了各肌动蛋白丝的极性。(Roger Craig 赠)

装饰由分离的 Z 盘及其附着的肌动蛋白丝组成的肌肉片段来验证这一预言。结果发现所有 S1 箭头都背向 Z 盘,而指向肌节中心(图 10-15)。

肌球蛋白头部沿着肌动蛋白丝“滑行”

在肌肉收缩中,粗细肌丝相互滑动而产生机械力的分子机制是什么? 获自电镜、X 射线衍射、动力学分析及其他研究的大量证据都符合下述模型:肌球蛋白头部携带着前一次 ATP 水解的产物 (ADP 和 P_i),从其在粗肌丝上的位置,移到最邻近的一个肌动蛋白亚基。这种运动被认为由随机扩散所致,而需肌球蛋白分子具有挠性。肌球蛋白一与肌动蛋白结合,ADP 和 P_i 即从肌球蛋白头部释放,从而使其倾斜,并将细肌丝拉至粗肌丝其余部分上方。在此有效划动 (power stroke) 末尾,一个新鲜的 ATP 分子与头部结合,使其再次脱离肌动蛋白丝。结合的 ATP 发生水解,使肌球蛋白头部迅速松弛为其原来的构象,为下一次循环作好了准备(图 10-16)。与此有关的一般原理见第 140 页的讨论。

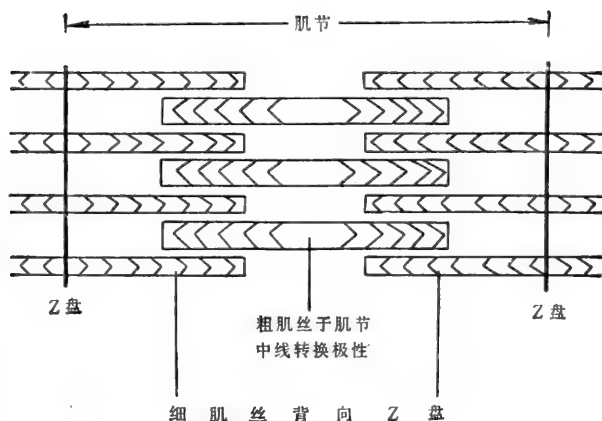


图 10-15 肌节图解，示粗、细肌丝在中线两侧均按相同对应极性重叠。

因此，每个肌球蛋白头都被认为是沿着邻近的一根肌动蛋白丝“滑行”。当其经历周期性的构象变化时，便拉动了肌动蛋白丝，而使其相对于粗肌丝滑动。一旦一个肌球蛋白头脱离肌动蛋白丝，这根纤丝又会借助同一粗肌丝中其他肌球蛋白头的作用，继续向前滑行。因此，若对正在收缩的肌肉中的一根完整的粗肌丝拍一张快照，就会显示出一些肌球蛋白头附着在肌动蛋白丝上，而另一些则是游离的。为此，在肌球蛋白分子中就必需有一定程度的弹簧样的伸缩性。每根粗肌丝约有 500 个肌球蛋白头，在快速收缩过程中，大约每秒循环 5 次。

肌动蛋白和肌球蛋白借助其他蛋白质而固定在肌原纤维中的一定位置

虽然肌动蛋白和肌球蛋白是肌肉收缩中的主要因素，但其并非是肌原纤维中的唯一蛋白质。除此之外，还存在大量的“辅助”肌肉蛋白(表 10-1)。如同将要述及的那样，已知其中一些调节收缩，而另一些似乎仅具结构作用。例如，见于 Z 盘区域的 α -辅肌动蛋白 (α -actinin) 和结蛋白(desmin)，即被认为是分别帮助决定各肌节的纤丝排列和将相邻

表 10-1 肌原纤维的主要蛋白质组分

蛋白质(多肽分子量)	功 能
肌动蛋白(42 000)	细肌丝的主要组分
肌球蛋白($2 \times 200\ 000 + 4 \times 20\ 000$)	粗肌丝的主要组分，一种与肌动蛋白相互作用而产生收缩的 ATP 酶
α -辅肌动蛋白($2 \times 95\ 000$)	将肌动蛋白丝固定于 Z 盘
原肌球蛋白($2 \times 35\ 000$)	沿肌动蛋白丝长轴结合；涉及 Ca^{2+} 的调节
肌钙蛋白($18\ 000 + 21\ 000 + 37\ 000$)	在缺钙时与细肌丝相联，从而阻止此处肌动蛋白同肌球蛋白的相互作用

肌节包装在一起的。在各肌节末端，平行的肌动蛋白丝都被埋于 Z 盘一侧。由于 α -辅肌

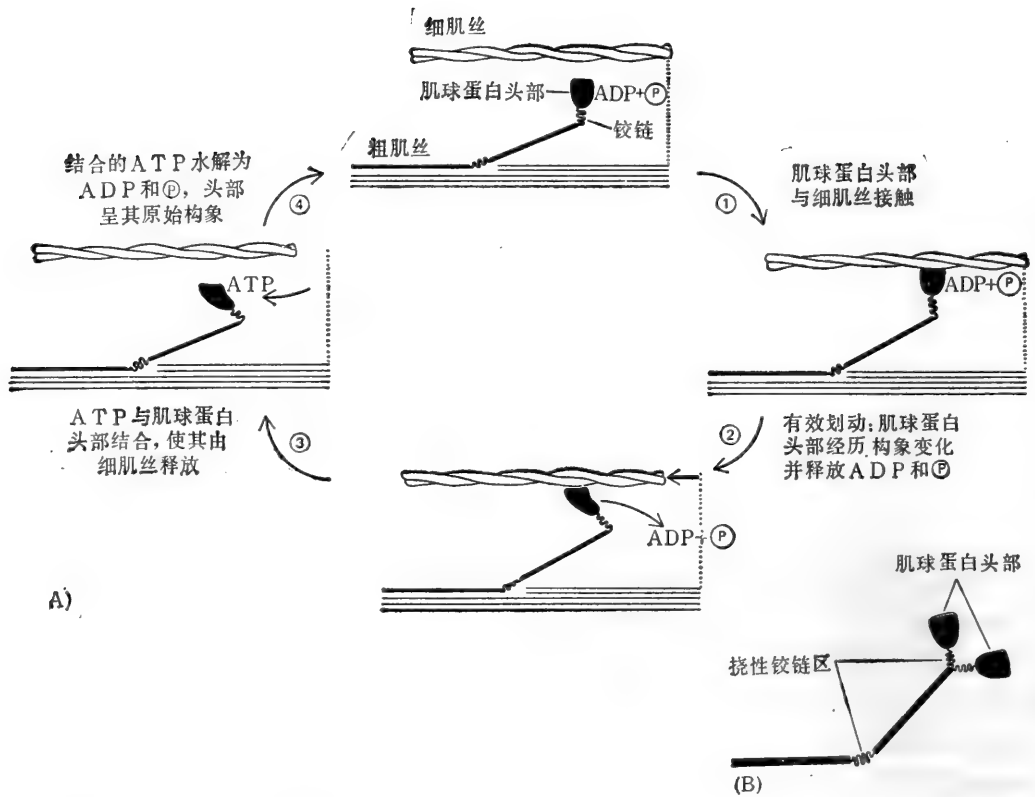


图 10-16 (A) 图示肌球蛋白分子如何利用 ATP 水解的能量沿肌动蛋白丝移动。在第 1 步中，肌球蛋白头部携带着 ATP 水解的产物(ADP + P_i)，移至邻近的细肌丝；这一运动被认为是由扩散所致，并依赖于肌球蛋白分子的挠性铰链区域(见 B)。在有效划动(第 2 步)中，肌球蛋白头部的形状伴随 ADP + P_i 释放而改变，使其得以相对拉动细肌丝。在第 3 步中，ATP 分子与肌球蛋白头部结合，使其由细肌丝释放。在结束这一循环的第 4 步中，结合的 ATP 分子水解，肌球蛋白头部回到它的原始构象。每个肌球蛋白分子的两个头部，则被认为是各自独立循环的。(B) 图示肌球蛋白分子内的挠性铰链区，使其头部得以自由运动。

动蛋白在体外与肌动蛋白丝末端结合，在肌细胞内又专门位于 Z 盘，因而被认为是用来在 Z 盘中固定肌动蛋白丝的。结蛋白则是一种中等纤维蛋白，因此高浓度见于相邻肌原纤维的 Z 盘间区域，而被认为有助于那里的肌原纤维相互对齐(图 10-17)。

肌肉收缩系由细胞内的 Ca²⁺ 浓度升高而启动

所有骨骼肌都处在随意控制之下，只有当信号从其运动神经传来时，它们才会发生收缩。由神经兴奋导致肌肉收缩的一连串事件有赖于借以传送信号的肌细胞膜的重要特化。一旦神经冲动触发肌细胞质膜中一个动作电位，这种电兴奋就会迅速扩散入一系列膜褶，以及由质膜向内延伸而围绕着每根肌原纤维 Z 盘的横小管或 T 小管(图 10-18)。随后，这里的电信号又会被设法转移到邻近的肌质网(sarcoplasmic reticulum)，肌质网是由象网袜一样围绕着每根肌原纤维的内质网衍生的正在融合的扁平小泡所构成的鞘。

当肌质网为 T 小管传来的电信号激活时,就会将原先贮于腔内的大量 Ca^{2+} 释入胞液。于是游离 Ca^{2+} 浓度骤增,启动了肌原纤维的收缩。由于来自肌细胞质膜的信号是在几毫秒之内(通过 T 小管和肌质网)传递到细胞内的每个肌节的,因而细胞内的所有肌原纤维就会同时进行收缩。

肌钙蛋白和原肌球蛋白介导肌肉收缩的 Ca^{2+} 调节

依赖 Ca^{2+} , 因而也依赖神经传递的运动指令的肌肉收缩, 均应完全归因于一组专门同肌动蛋白丝紧密相联的辅助蛋白。在试管中将肌球蛋白与纯净的肌动蛋白丝混合时, 肌球蛋白 ATP 酶即被激活, 而不管 Ca^{2+} 存在与否。然而在一正常肌原纤维中, 肌球蛋白的 ATP 酶活性却有赖于 Ca^{2+} 。这一差异反映了这样一个事实, 即由 Ca^{2+} 调节收缩必须依靠一组专门的辅助蛋白, 而人工重组的纤丝则缺少这些蛋白质(图 10-19)。

在这些辅助蛋白中, 有一种具刚性、呈棒状的蛋白质, 称之为原肌球蛋白 (tropomyosin)。因其位在肌动蛋白丝两侧的斜长槽内, 从而强化了纤丝。

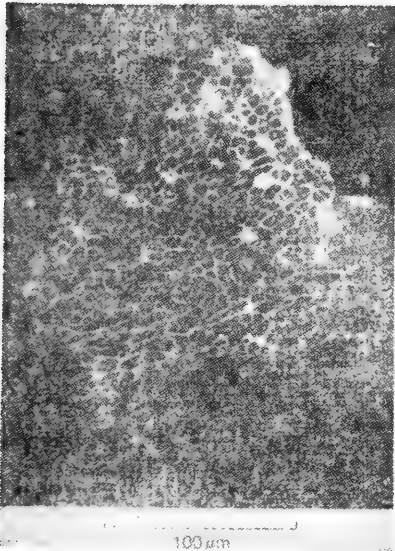


图10-17 用抗结蛋白抗体染色的一片骨骼肌 Z 盘的免疫荧光图。由于相邻肌原纤维的 Z 盘连接在一起, 它们即可作为一个扁平片而被分离。Z 盘作为未染色孔出现, 而它们之间的区域却染色明亮, 提示结蛋白可能在连接 Z 盘中起作用。(Bruce Granger 和 Elias Lazarides 赠)

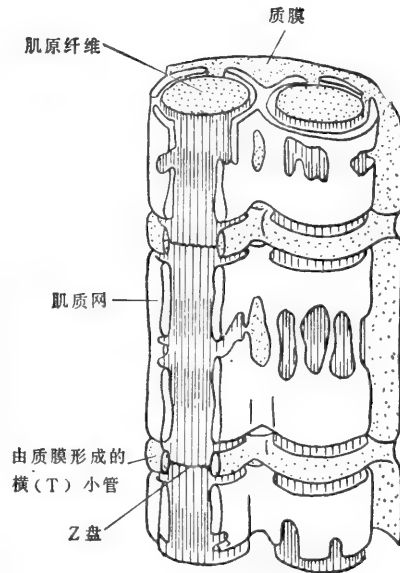


图10-18 涉及收缩信号由肌细胞质膜传递到该细胞中去的所有肌原纤维的膜管道系统图解

涉及 Ca^{2+} 调节的另一主要蛋白质为肌钙蛋白 (troponin), 一种由三条多肽 (肌钙蛋白 T、I 和 C) 组成的复合物。肌钙蛋白 T 有一原肌球蛋白结合部位, 被认为是负责复合物定位的(图 10-19)。当肌钙蛋白 I 和原肌球蛋白 T 和原肌球蛋白时, 即使在 Ca^{2+} 存在下, 此复合物仍会抑制肌动蛋白同肌球蛋白的相互作用。进一步加入肌钙蛋白 C, 复合物即告完成, 但在缺钙条件下, 肌动蛋白同肌球蛋白的相互作用仍受抑制。然而肌钙蛋白可结合 4 分子 Ca^{2+} , 随着 Ca^{2+} 的结合, 即可解除这种抑制。这种由 Ca^{2+} 诱导的, 原肌球蛋白-

肌钙蛋白抑制肌球蛋白与肌动蛋白结合的逆转，便构成了 Ca^{2+} 诱导肌原纤维收缩的基础。

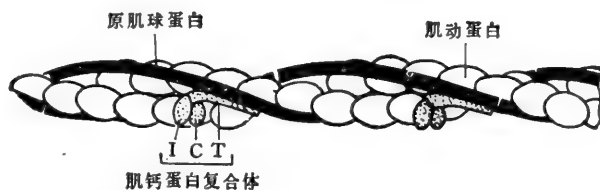


图 10-19 肌肉细肌丝图解，示原肌球蛋白和肌钙蛋白在肌动蛋白丝上的位置。
(引自 Carolyn Cohen 提供的资料)

肌钙蛋白和原肌球蛋白是如何控制肌球蛋白与肌动蛋白的相互作用的？沿肌动蛋白丝，每七个肌动蛋白分子才有一个结合 Ca^{2+} 的多肽(肌钙蛋白 C)(图 10-19),但其控制却达到了整个肌动蛋白丝长轴。详细的结构研究表明，在不产生收缩力的静止状态下，棒状原肌球蛋白分子，掩盖了肌动蛋白丝上在肌肉积极收缩时被肌动蛋白头部占据的位置。因此，原肌球蛋白可在空间上阻断肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用。但当 Ca^{2+} 水平升高时，原肌球蛋白分子稍稍位移(可能是对与之结合的肌钙蛋白分子形状改变的应答)，而这种位移被认为使肌球蛋白头部得以同肌动蛋白丝相互作用(图 10-20)。这就好像肌肉收缩是由一个打入肌动蛋白与肌球蛋白之间的微楔来控制的，微楔阻止了肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用，而仅当应答 Ca^{2+} 信号时方被除去。

平滑肌肌球蛋白为依赖 Ca^{2+} 的磷酸化作用所激活⁶

我们已经详细描述的是脊椎动物体内存在的三种主要肌肉类型之一的骨骼肌。另外两种是心肌和平滑肌：心肌负责心脏搏动(人类平均一生大约收缩 30 亿次)；平滑肌则负责产生诸如胃壁、肠壁及血管壁组织的缓慢而又持续较长时间的收缩。所有这三种肌肉都均含有肌动蛋白和肌球蛋白，并按滑动肌丝机制进行收缩。心肌像骨骼肌一样。呈现横纹，表明其有一类似的由肌动蛋白丝和肌球蛋白丝组成的结构。

相反，平滑肌却无横纹。它由长锥形细胞构成，这种细胞具一单核，并含有与细胞长轴平行排列的粗细肌丝。然而，这些纤丝的排列不像骨骼肌和心肌中见到的那样严格有序，也未出现肌原纤维的形成。

平滑肌的肌动蛋白和肌球蛋白都属于组织专一的一类蛋白质。肌动蛋白的氨基酸顺序和骨骼肌或心肌的稍有不同，不过这些差异对于已知功能无关紧要。而平滑肌的肌球蛋白虽与骨骼肌极为类似，但在功能上的两个十分重要的方面却有所不同：(1)平滑肌的 ATP 酶活性水平，即使在最适条件下，仍比骨骼肌低 9/10 倍，且活性更直接受 Ca^{2+} 的调节。(2)平滑肌的肌球蛋白和非肌肉细胞的肌球蛋白相同，只有当其轻链磷酸化时，才能与肌动蛋白丝相互作用，从而导致收缩；而当其轻链脱磷酸时，肌球蛋白则无法与肌动蛋白相互作用，肌肉也就松弛了。

平滑肌肌球蛋白的磷酸化作用和脱磷酸作用都由专一的酶来进行。平滑肌肌球蛋白的 ATP 酶依赖于 Ca^{2+} ，因为磷酸化酶(肌球蛋白轻链激酶)是受 Ca^{2+} 水平调节的。 Ca^{2+} 的影响是由一结合钙的蛋白质——钙调蛋白(calmodulin)所介导，它在结构及功能上

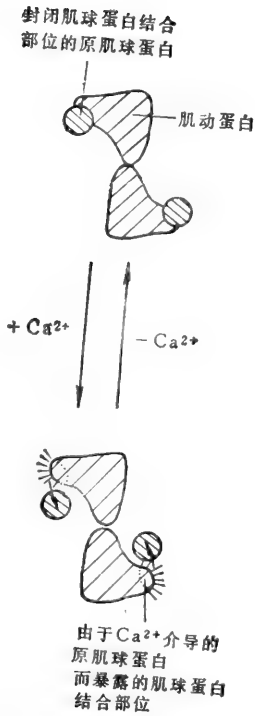


图10-20 细肌丝的截面观，示原肌球蛋白如何在缺 Ca^{2+} 时阻断肌球蛋白头与肌动蛋白的相互作用。

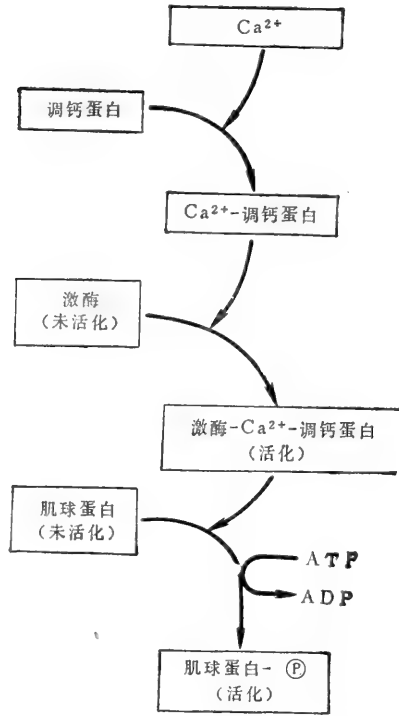


图10-21 平滑肌收缩在 Ca^{2+} 存在下活化的分级反应。图中的激酶，为催化二不同类型肌球蛋白轻链上的一特定部位磷酸化的酶。非肌肉肌球蛋白分子按同一机制调节。

都和肌钙蛋白C极为类似（见722页）。钙调蛋白与 Ca^{2+} 的复合体使肌球蛋白轻链激酶活化，否则该激酶就很少会倾向于磷酸化肌球蛋白（图10-21）。其他几个因子也会影响肌球蛋白轻链激酶的活化，例如细胞内的环腺苷酸水平，而后者又受影响平滑肌收缩的激素调节。因此，平滑肌收缩像骨骼肌一样，也是靠 Ca^{2+} 注入而触发的。但触发机制不同，它不是靠来自随意神经的冲动，而是靠自主系统的神经或激素激活。

紧随 Ca^{2+} 与可溶性蛋白（钙调蛋白）结合之后的酶促步骤则相当缓慢地激活平滑肌收缩。由于平滑肌细胞内的肌球蛋白横桥周期很慢，只容许它们缓慢收缩，因而毋须快速激活。钙调蛋白是一种普遍存在的蛋白质，它在许多细胞中介导依赖 Ca^{2+} 的过程（见第十三章），而肌钙蛋白C最好被看作为一种特化形式的钙调蛋白，它在平滑肌细胞中已发展到直接与细肌丝结合，从而提供了对收缩的更为迅速的 Ca^{2+} 调节。

不能把平滑肌细胞视为骨骼肌细胞的缓慢而构建粗劣的变体，它们完全符合对其为数不多的要求。事实上，它们是被专门设计来长期维持张力，而在完成同一任务时所需水解的ATP只是骨骼肌的1/5—1/10倍。平滑肌中缓慢的肌球蛋白横桥周期阻止了肌肉的快速收缩，但它却使得肌肉能以极高效率保持恒定张力。

小结

肌肉收缩系由肌动蛋白丝相对肌球蛋白丝滑动所致，由肌球蛋白丝伸出的肌球蛋白分子头区，它们附着在邻近的肌动蛋白丝上经受着一种由 ATP 驱动循环：经过一种构象上的变化，而使一纤维相对另一纤维滑动，然后分开。辅助肌肉蛋白可以促进这一循环，它们使肌动蛋白和肌球蛋白丝呈平行、重叠排列，并具有正确走向和产生滑动的空间。其他两种辅助蛋白，即肌钙蛋白和原肌球蛋白，则使骨骼肌收缩可受 Ca^{2+} 调节。在低 Ca^{2+} 水平时，它们以一种能阻止肌球蛋白头部的接近的方式与肌动蛋白丝结合。而当 Ca^{2+} 水平因应答电刺激而升高时，肌钙蛋白-原肌球蛋白复合体位置稍变，致使肌球蛋白头部得以与肌动蛋白丝结合，继而发生收缩。

在平滑肌中，也见有肌动蛋白和肌球蛋白。它们在那里产生收缩的方式与骨骼肌中的基本相同。但平滑肌细胞中的这两种纤维都不如骨骼肌中的那样高度有序，且其运动依赖于 Ca^{2+} 调节的肌球蛋白磷酸化作用。

纤毛运动

除肌肉收缩外，最熟悉的一种细胞运动，就是纤毛挥动。纤毛是微小的毛状附器，直径约 $0.25\ \mu\text{m}$ ，其核心含有一束平行排列的微管。它们从多种细胞表面突出，见于多数动物种类及一些低等植物。其基本功能是，移动细胞表面液体或推动单个细胞穿过液体。例如，原生动物无论捕摄食物颗粒或进行运动都使用纤毛。在人体中，沿呼吸道排列的表皮细胞上的大量纤毛 ($10^9/\text{cm}^2$ 或更多) 可将粘液层连同捕获的尘粒及死细胞一起，一直扫到口腔，而后即被吞咽除去；纤毛还有助于沿输卵管输送卵子。

像基于肌动蛋白丝的肌肉收缩机制一样，基于微量的纤毛运动机制，也清楚地反映在

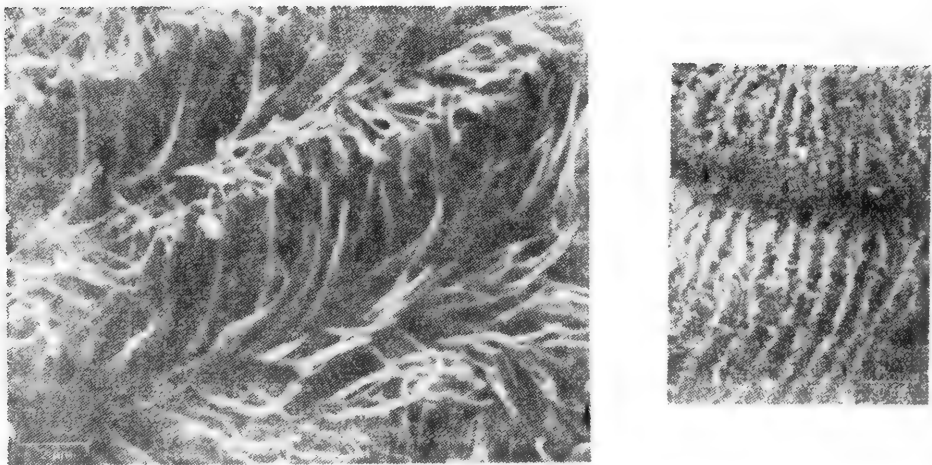


图 10-22 一片海产蠕虫肠纤毛的扫描电子显微镜照片。虽然纤毛分布均匀，但相邻纤毛挥动协调，而产生一系列的单向波动。这些波动在低倍放大下即可十分清晰地见到（右）。（引自 J. S. Mellor and J. S. Hyams, *Micron* 9: 91-94, 1978）

它的超微结构中。我们对纤毛如何挥动的了解，也给洞察微管如何排列才会产生诸如胞内运输及有丝分裂之类的运动，提供了重要线索。

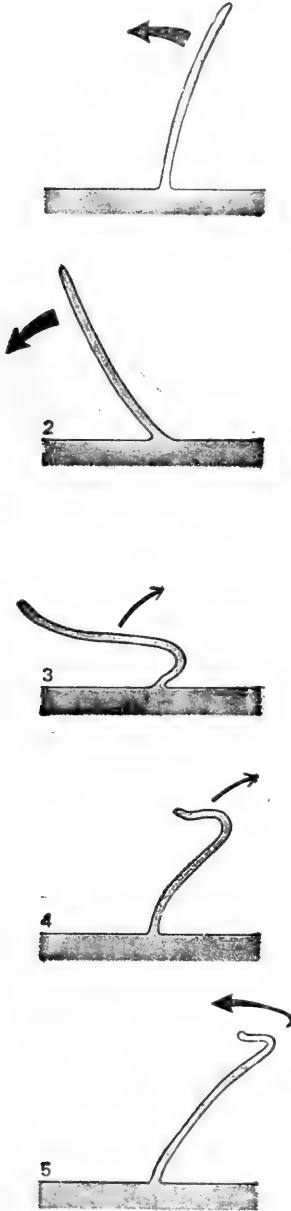


图10-23 真核细胞表面的纤毛运动图解。推动细胞表面液体的有效挥动(第1和第2阶段)，继之以恢复挥动(第3、第4和第5阶段)。

纤毛和鞭毛传播弯曲运动

成片的纤毛，在弯曲时呈协调的单向波动(图10-22)。每根纤毛，似一根纤小的鞭子一样拍打：先是向前一记有效挥动，此时纤毛完全伸展，即可对周围液体使出最大力量；接着是恢复期，纤毛通过使粘滞力降至最低的伸展运动，而回到起始位置(图10-23)。每次循环需0.1—0.2秒。相邻纤毛的周期，几乎是但却不完全是同步而略有延迟，产生如图10-22所示的惊人图像。

精子及许多原生动物的简单鞭毛，其内部结构很像一根大纤毛。但通常很长，因此往往以传播准正弦形波动取代鞭样拍打运动。不过，这一运动的基础几乎肯定像纤毛一样，故就多数情形而言，可在真核细胞中通用纤毛和鞭毛两词。(但切不可将真核细胞的鞭毛和细菌的鞭

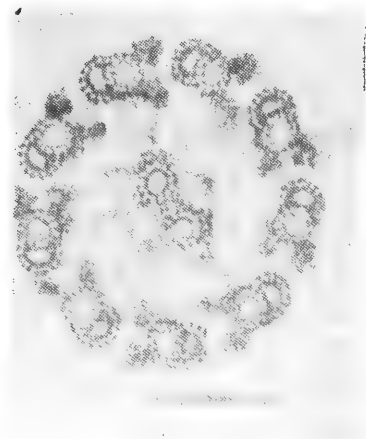


图10-24 绿藻细胞(衣藻)鞭毛横切面电子显微镜照片。在几乎所有纤毛和真核细胞鞭毛中，均有作“9+2”排列的微管。在图10-27的横切面的图解中，可见主要结构组分。(显微图由 Lewis Tilney 赠)

毛混为一谈，它们全然不同。细菌的鞭毛将在731页介绍。))

纤毛核心含有一束呈“9+2”排列的平行微管

纤毛运动是通过纤毛核心或轴丝(axoneme)弯曲而产生的，轴丝是一种完全由微管

及其结合蛋白组成的复杂结构。作为轴丝主要结构成分的微管是外径为 25 nm 的中空蛋白管。它们的奇妙而清晰的排列型式，曾是早期电子显微镜技术最惊人的发现之一。纤毛轴丝由九条二联体微管环绕一对单微管组成(图 10-24)。这种“9 + 2”排列是从原生动物到人的几乎所有类型的纤毛和真核细胞鞭毛的共同特征。微管沿纤毛长轴延伸，通常长约 10 μm ，但在有些细胞中可达 200 μm 。

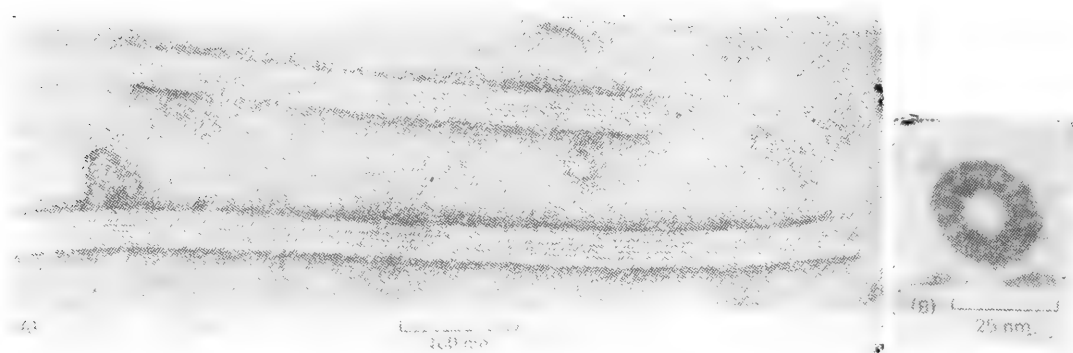


图 10 25 (A)负染微管的电子显微镜照片。(B)一根微管的横切面及其 13 个清晰的亚基，其中的每个亚基相当于一个分开的微管蛋白多肽。(A, Robley Williams 赠; B, Richard Linck 赠)

中央单微管均为完全微管，而外围每条二联体却由分别叫做 A、B 亚纤维的一条完全微管和一条不完全微管融合而成，因此它们有合用管壁。在横切面中，可见每条完全微管均由 13 个球状亚基环绕而成，而外围二联体微管中的不完全的 B 亚纤维，仅由 10 个亚基构成。

微管是由微管蛋白构成的中空管⁸

微管由分子量为 50 000 道尔顿的球状多肽——微管蛋白分子组成。由于沿神经细胞轴突存在大量微管，所以脊椎动物的脑便成了用于生化研究的微管蛋白的最丰富的来源。由此来源抽提得到的微管蛋白是一种约 100 000 道尔顿的二聚体，每个二聚体又由两种氨基酸顺序密切相关的多肽—— α 微管蛋白和 β 微管蛋白构成。当从微管蛋白分子装配成微管时，是通过一个二聚体的 β 微管蛋白与相邻的另一个二聚体的 α 微管蛋白连接，形成成行排列的微管多肽而组成原丝 (protofilaments)。通常由 13 条这种原丝并排围绕着中央核心，在电镜照片中看来是个空腔(图 10-25)。光学和 X 射线衍射技术揭示，相邻原丝中的微管多肽不是呈直线排列，而是左右交错，这样便在每个微管壁中产生了一种由微管蛋白分子组成的有规则的网格结构(图 10-26)。

微管蛋白分子装配成微管有几个重要特征与肌动蛋白装配成纤丝相类似。它会在体外自然发生，并总是伴随着一分子结合核苷酸的水解，即使在微管蛋白情况下，这个核苷酸是 GTP，而非 ATP(表 10-2)。如同肌动蛋白，核苷酸水解对于聚合动力学有着决定性的影响。细胞内的微管装配是由各种特化的结构组织的、它们提供一种微管得以从之生长的基体。这些组织中心便成了微管的种种短暂安排的核心，这将在后面进行讨论。

真核细胞纤毛和鞭毛的微管，通过叫做基体的特化结构而组成轴丝束。基体用作

“9 + 2”排列的模板并产生无法通过体外自然装配得到的二联体。轴丝微管可由各种辅助蛋白进一步加以稳定,而成为较永久的结构。像在肌动蛋白丝中一样,纤毛微管产生运动的能力也有赖于它们的极性。为了认识微管极性对于纤毛运动的重要性,我们现在必须回头对纤毛轴丝作更详细的剖析。

纤毛轴丝含有由蛋白质组成的链杆、辐条和侧臂

与轴丝微管相关联的还有许多其他蛋白质结构,它们相互作用为纤毛运动提供动力,从而使其产生波浪似的运动。其中最重要的结构是由每个外围二联体突出并伸向相邻二联体的臂。它们按24 nm 的规定间隔沿微管成对出现(图10-27)。如下所述,这种由称做动力蛋白(dynein)的蛋白质组成的臂、在纤毛运动中起着必不可少的作用。另一种称为连丝蛋白(nexin)的蛋白质,则以更大间距形成相邻二联管间的链杆;这些链杆被认为极富弹性,环绕整个轴丝形成颇像桶箍的带。

每个二联管还有一个向内伸出的辐条(radial spoke),其末端为一球状部分,很靠近内鞘。内鞘由细长蛋白臂组成,细长蛋白臂从中央一对微管伸出,并弯曲绕过它们(图10-27)。显然,这样就使得中央的一对微管能够协助调节轴丝的运动。从轴丝侧面查看,可将动力蛋白侧臂、连丝蛋白链杆、辐条及内鞘臂等每一种结构都视为一系列有规则的按其固有周期性分布的突起(表10-3)。

纤毛和鞭毛终止于细胞内侧的基体(图10-28)。基体是一种由平行微管构成的短圆柱体,其外径及九重对称均与轴丝本身相同。轴丝的每条外围二联体微管均伸入基体,同那里的另一个部分微管相连。结果基体便含有一圈九条融合的三联体微管。而纤毛的两条中心微管在其到达基体之前即已终止,因此基体中央没有微管(亦见图10-49和10-51)。

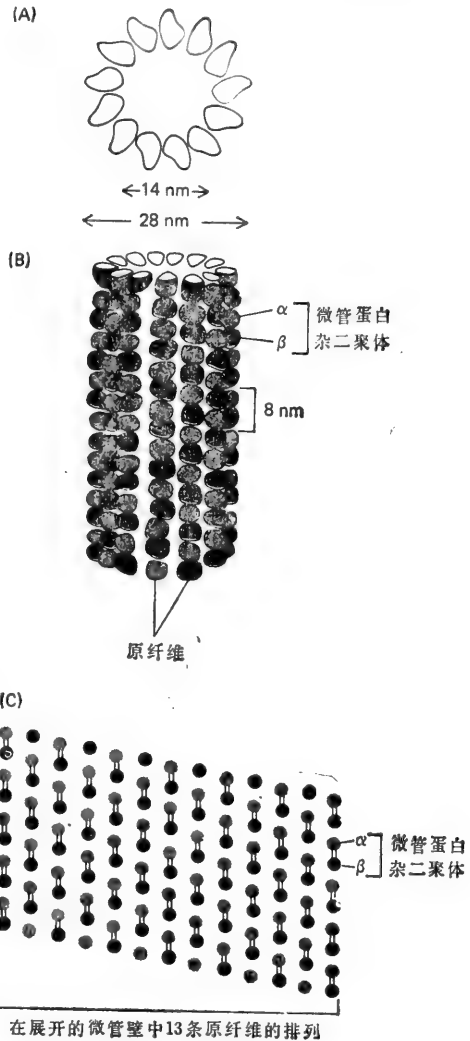


图10-26 微管的图解,示微管蛋白多肽如何包扎在一起而形成圆柱体的壁。(A)横切面中的13条多肽。(B)一小段微管断片的侧视图,其中的微管蛋白多肽成直线或原纤维排列。(C)展开的一部分微管壁,示两类微管蛋白多肽的包扎;13条原纤维中的每一条均由一系列 $\alpha\beta$ 杂二聚体组成。(引自 Linda Amos 提供的资料)

表 10-2 肌动蛋白与微管蛋白的比较

	肌动蛋白	微管蛋白		肌动蛋白	微管蛋白
多肽分子量	42 000	50 000(α 微管蛋白) 50 000(β 微管蛋白)	聚合所需的 因子	Ca^{2+} 或 Mg^{2+} NaCl	Mg^{2+} 除去 Ca^{2+} 的螯合剂 NaCl
未聚合形式 结合核苷酸 (未聚合状态)	球状,单体 ATP(每 个单体一个)	球状,二聚体($1\alpha + 1\beta$) GTP(每个二聚体两 个)	多聚体形式 纤丝直径	双股螺旋 7nm	由 13 条原丝组成的中 空管 25nm

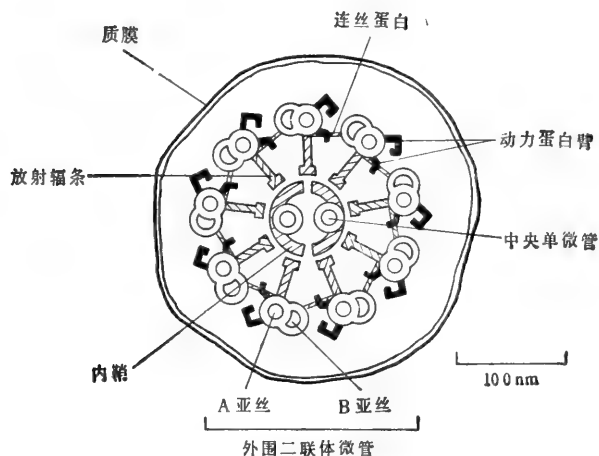


图 10-27 纤毛横切面图解 (这种结构的电子显微照片已示于图 10-24)。微管的各种突起均按表 10-3 所述的规则间隔沿纤毛出现。

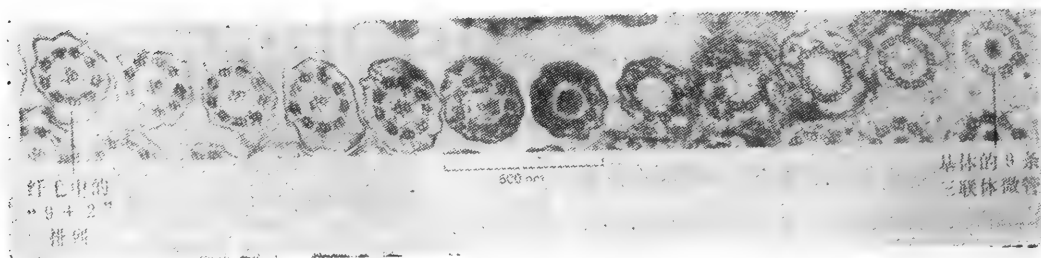


图 10-23 通过纤毛原生动动物四膜虫皮质的横切面的电子显微镜照片。切面轻擦细胞表面,而以连续切片显示出轴丝中微管的“9+2”排列如何导入基体的9条三联体微管。

轴丝按微管滑动机制运动⁹

如用激光束切下细胞的一根鞭毛,这个被分离的结构仍会继续按正常方式传播弯曲运动。因此,显然运动装置包含在轴丝本身之中,且运动不依赖基部的发动机(就像细菌鞭毛一样)。若将一根分离的轴丝置于含有 ATP 、 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 的盐溶液,即使在其质膜除去之后,的确仍会传播弯曲运动。

表 10-3 纤毛轴丝的主要蛋白质结构

轴丝成分(沿轴丝的周期性)	功 能
微管蛋白二聚体(8nm) 动力蛋白臂(24nm)	微管的主要成分 由微管二联体伸出、并同相邻二联体相互作用而产生弯曲
微丝蛋白链杆(86nm) 放射辐条(29nm) 鞘突(14nm)	把相邻微管二联体结合在一起 由 9 条外围二联体中的每一个伸向中央一对微管作为一系列侧臂的突起,由中央一对微管伸出;和放射辐条一起调节纤毛挥动形式

已用蛋白水解酶处理轴丝得到了通过微管滑动产生弯曲力的直接证据。这种处理使连丝蛋白链杆和辐条遭到破坏,而动力蛋白臂及微管本身仍保持完整。经部分消化后的这种结构对 ATP 颇为敏感,在少至 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 ATP 存在下,也会纵裂成为构成它的二联体微管组分。ATP 使轴丝拉长,直至原长的九倍,而轴丝中的纤维成分也同时由松弛结构中伸出(图 10-29)。相邻的外围二联体似乎只要一摆脱其侧向交联(如由连丝蛋白构成的链杆),即可灵活地相对滑动。在完整结构中,这种滑动则被转换为弯曲运动,如图 10-30 所示。

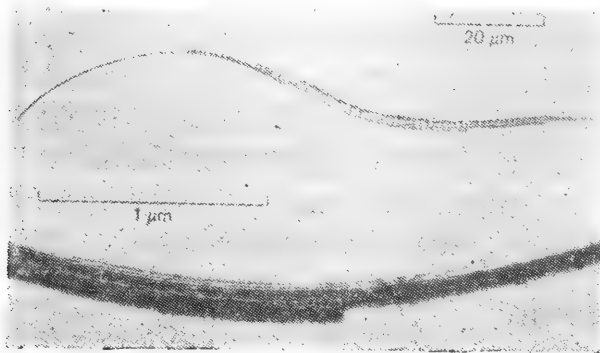


图 10-29 分离的四膜虫纤毛轴丝,在稍经蛋白水解酶胰蛋白酶处理,以解开通常将其结合在一起的蛋白纽带后的电子显微镜照片。继 ATP 处理之后,在本图下部清晰可见的各二联体微管即相对滑动,而使原有结构长度增加 9 倍之多。(引自 F. D. Warner and D. R. Mitchell, *J. Cell Biol.* 89:35—44, 1981. 洛克菲勒大学出版社同意复制)

为支持纤毛弯曲的微管滑动机制而于纤毛弯曲各阶段摄取的电镜照片显示,微管长度并无明显改变。而且由于以规则重复型式出现,并因而可作为每一外围二联体标志的成排辐条,在弯曲区域出现相对位移,从而表明了微管在轴丝内的相对滑动(图 10-31)。

动力蛋白负责滑动¹⁰

由于相邻外围二联体微管相对滑动,其间就必然会产生一种力。在完整轴丝中,有一个连丝蛋白链杆的触点。但因其如上所述的可为蛋白酶处理所破坏,而此时滑动却未受到损害,故其并非为运动所必需。余下的就是动力蛋白臂。通常它们并不完全伸延到相邻二联体之间的整个间隙,但若允许纤毛耗尽其所有的 ATP,即可使动力蛋白臂与邻近

二联体相接触(图 10-32)。此外,动力蛋白臂的取向还会发生改变: 在 ATP 存在时朝下指向基体,而在 ATP 缺乏时则与微管二联体成直角。

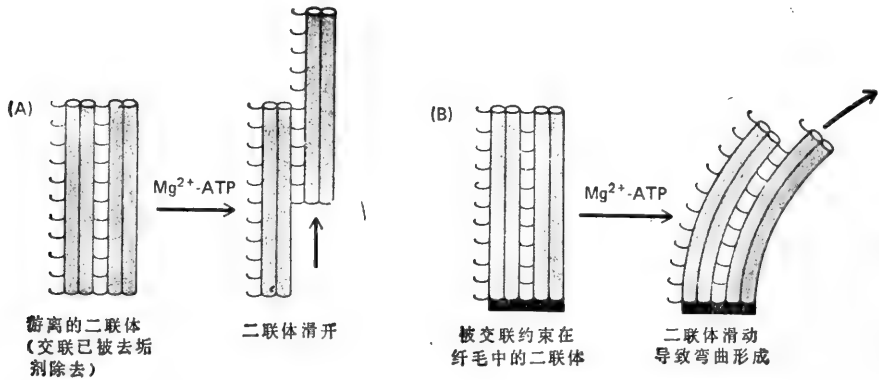


图 10-30 图示外围微管二联体的彼此相对滑动(A), 如何在其一端被相互束缚时引起弯曲(B)。

已有充分证据表明,动力蛋白臂为纤毛运动所必需。在严格控制的条件下,从裸露轴丝选择抽提动力蛋白臂,轴丝运动即随此臂逐渐消失而相应减慢。一旦将其全部除去,运动也就终止了。而且这一程序可以逆转: 加入到被抽提的轴丝外围二联体中去的纯化动力蛋白重新构成侧臂,并恢复微管进行依赖 ATP 的滑动能力。

但是动力蛋白如何产生使相邻微管相互滑动的力? 回答这一问题的一个重要进展是,发现动力蛋白本身就是一种 ATP 酶。动力蛋白是一种由多个多肽组成的巨型蛋白质,其主要多肽分子量约为 400 000。分离的蛋白质的 ATP 酶活性较低,但若加入纯化的微管,活性即随之上升——与加入肌动蛋白丝促进肌球蛋白 ATP 酶活性相似而大小不同的一种效应。每个动力蛋白臂所产生的力约与肌肉中一分子肌球蛋白产生的相似,致使与之接触的相邻微管二联体得以向纤毛顶端移动。

可对纤毛进行遗传学剖析¹¹

要筛选失去运动能力的突变型机体,一般并不困难。在让正常个体通过游、爬、飞或滑等运动形式离开之后,留下的那些不是死的,就是瘫痪了的。因此,如果运动仅仅有赖于一种能动要素,例如骨骼肌或纤毛,那么遗传剖析的全部力量可被用于分析它的内部结构。

这类研究的最好对象,就是单细胞的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*), 它有两根鞭毛,使其能在水中推进。已分离得到许多不会运动的突变型: 一些鞭毛装配机制有缺陷和无鞭毛或鞭毛发育不全;另一些虽有鞭毛,但不会运动。在后一种情况缺陷可能涉及运动机制的一种蛋白质组分。在这种突变型鞭毛的电镜照片中,即可清楚见到各种不同类型的异常结构(图 10-33)。在第一类突变型中,唯一可以察觉的变化是丧失了动力蛋白臂。第二类突变型仅缺少辐条,而第三类突变型既缺一对中央微管,又缺外鞘。在所有这三类突变型中,分离的无膜轴丝都不会在 ATP 存在下发生运动。

在人体中也会出现纤毛缺陷,各种遗传形式的男性不育已表明就是由于精子不会运动。根据这种遗传病的不同类型,精子鞭毛或缺少动力蛋白臂(外臂或内臂)和辐条头,或缺少内鞘及一两个中央微管。完全一样的缺陷也出现在一些患者的呼吸道纤毛中,他们

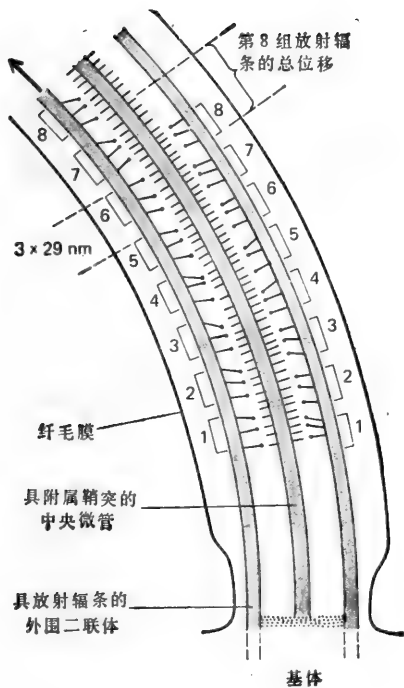


图10-31 弯曲纤毛基部图解,示放射辐条(按三个一组编号)如何作为沿各二联体微管长轴的标记物。纤毛两侧辐条的累进位移表明,两侧的二联体微管在作相对滑动。这种滑动也表现在轴丝顶端,弯曲纤毛内侧的二联体就突出在外侧的二联体之外。(见图10-30B)

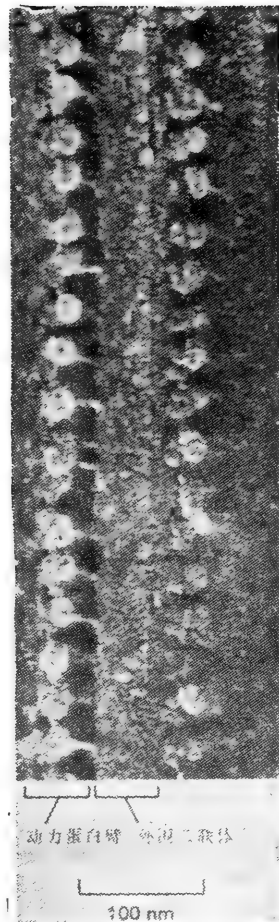


图10-32 纤毛的冰冻蚀刻电子显微镜照片,示动力蛋白臂像间隔有规则的棒糖一样,由外围二联体伸出,而与相邻二联体接触。(John Heuser赠)

由于呼吸道纤毛不会运动,无法清除来自肺、窦的粘液,而通常具有漫长的伴随多发性支气管炎和慢性鼻窦炎的呼吸道病史。

值得注意的是,大约一半患有纤毛不动综合征的病人还具有一种极为罕见的所谓内脏逆位,即通常不对称的心、肠、肝和附属器官的位置与正常的位置正好相反(整个异常的复合体即通常所说的 Kartagener 综合征)。因此,人体早期发育期间的纤毛单向挥动,被认为可能对于法定躯体的正常左右对称起着决定性作用。

微管滑向纤毛弯曲的转化有赖于内鞘¹²

辐条和内鞘看来控制动力蛋白臂的活性,使它能在纤毛中产生一种连贯性的波动。要

是所有动力蛋白臂都像收缩肌中的肌球蛋白头一样被同时激活，轴丝就只会扭曲成为一个柠紧的螺旋。为能产生一种以连贯性波动由纤毛基部传播至顶部的局部弯曲，就要有协调动力蛋白臂作用的控制。这种控制依赖的不会是 Ca^{2+} 或其他离子的注入，因为如上所述，轴丝没有质膜仍会挥动。大概单个动力蛋白臂的活化，必须依靠轴丝其余部分的通过蛋白间相互作用传递的机械运动。

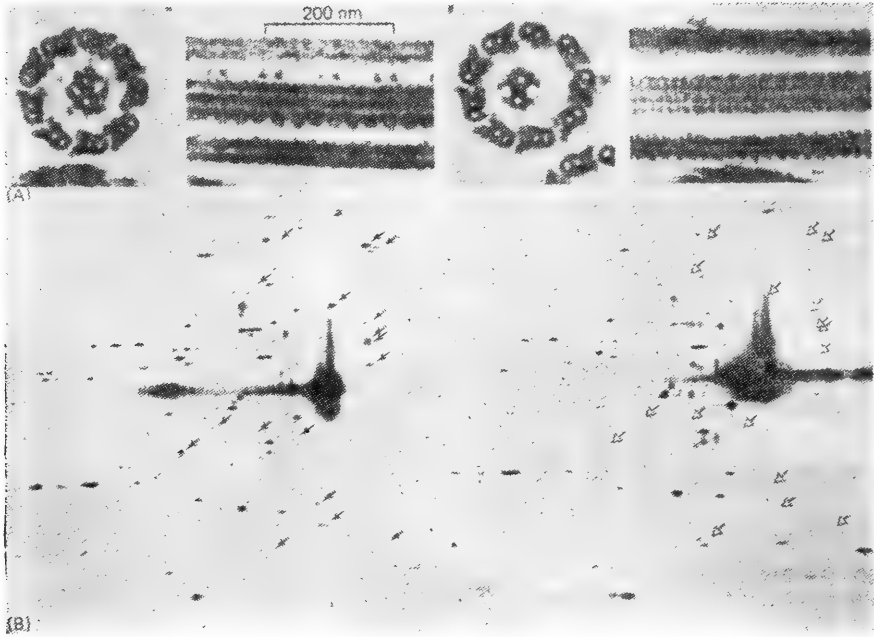


图 10-33 (A)将不会运动的衣藻突变型的无放射辐条鞭毛(右)与野生型的正常鞭毛(左),在横切面和纵切面上进行比较的电子显微镜照片。(B)当用双向凝胶电泳分析这些鞭毛的蛋白质时,发现突变型缺少许多蛋白质。箭头所示即为其中 17 种蛋白质的位置,它们均为辐条组分。在突变型中改变的只是这 17 种中的一种,但因此蛋白质为辐条装配所必需,而由此形成的鞭毛即缺乏所有这些蛋白质。(引自 G. Piperno, B. Huang, Z. Ramanis, and D. Luck, *J. Cell Biol.* 88:73-79, 1981, 洛克菲勒大学出版社同意复制)

纤毛的内鞘看来涉及这种“滑向弯曲”的转变。在一些纤毛中,弯曲方向似由中央微管对的取向所决定,而有效挥动便位在等分二中央微管的平面中。另一些轴丝生来就缺乏中央微管对(故呈“9 + 0”排列)。它们或像多种细胞的分裂间期形成的异常单生纤毛(所谓初级纤毛)一样不会运动,或像一些昆虫精子尾巴一样运动很慢。关于弯曲控制的进一步证据来自缺乏内鞘或辐条的衣藻突变型。虽然这些突变型中的无膜轴丝是瘫痪的,若经蛋白酶处理,二联体微管仍会相对滑动。这一事实表明,动力蛋白臂的活化通常受其蛋白质抑制,通过辐条和内鞘传递的信息则可解除这种抑制,而产生整个鞭毛动力蛋白臂的一种有组织的活化型式。

小结

纤毛具有一个圆柱形核心,内含一圈九条二联体微管,使纤毛通过相对滑动发生弯曲。从每个微管二联体伸出由动力蛋白组成的侧臂。这些动力蛋白臂与一相邻二联体之

间的接触,被认为是通过动力蛋白来激活 ATP 水解,并在微管之间产生一种滑动力。诸如连丝蛋白之类的辅助蛋白将环状排列的微管二联体捆在一起,使其滑动范围受到限制。其他辅助蛋白则同纤毛中央的一对单微管一起,负责调节外围二联体微管的滑动,从而产生构成纤毛挥动基础的周期性纤毛弯曲。

作为动态装配物的微管和肌动蛋白丝的一般特征

肌原纤维和纤毛都是较永久的专门产生重复运动的结构。但多数细胞运动依赖的却是在细胞周期的特定阶段或应答外来信号时出现,而后又消失的不稳定结构。其中最熟悉的是在细胞分裂期间形成的有丝分裂纺锤体及收缩环。这些及其他细胞运动结构都是由微管和肌动蛋白丝形成的。它们从细胞质中的可溶微管蛋白和肌动蛋白库装配,而当其不再需要时即行解聚。

本节将详细描述一些有赖于这种暂时装置的运动,并论及使这些运动成为可能的微管蛋白和肌动蛋白的性质。

微管是对专一抗有丝分裂药物敏感的高变不稳定结构¹³

细胞中的许多微管的排列都是不稳定的,而有些细胞的功能就有赖于这种不稳定性。在有丝分裂间期,微管从细胞中央辐射到细胞质各处,但当有丝分裂刚开始,这些细胞质微管即随有丝分裂纺锤体微管开始形成而解聚。到有丝分裂结束,这一过程又会逆转过来。在一种与变形虫密切相关的单细胞生物太阳虫的摄食触手中,还发现了一种更特别的情形。每个触手都含有包装成一个平行束的数百条微管(图 10-34)。在摄食过程中,触手常常迅速缩进胞体,以摄取被捕获的任何猎物。这种缩进是由于微管的迅速解聚而引起的。解聚也可通过低温或 Ca^{2+} 处理产生;一旦升高温度或除去 Ca^{2+} ,触手和微管又会迅速重新形成。

上述这类过程都有赖于微管与一可溶性胞质库之间的微管蛋白分子的交换:在一典型培养细胞中,已确定只有 50% 的微管蛋白是在正常生长条件下聚合的。但不同微管结构的稳定性差异很大,有丝分裂纺锤体就是最不稳定的一个。这种不稳定性可见于纺锤体对各种与微管蛋白结合并阻止其聚合的药物的高度敏感性。在这些药物中,以由草地藏红花抽提得到的一种生物碱——秋水仙碱的历史最长,早从古埃及时代起即已被用于医治痛风。一分子秋水仙碱(图 10-35)可同一个微管蛋白二聚体紧密结合,从而阻止它的聚合。在分裂细胞中加入秋水仙碱(或相关化合物乙酰甲基秋水仙碱),就会导致有丝分裂纺锤体消失,使细胞阻断于有丝分裂期(见 629 页)。这类化合物因此而叫做抗有丝分裂药物(表 10-4)。除去这类药物即可使纺锤体重新形成,有丝分裂继续进行。长青花碱和长青新碱也会抑制微管形成,而被广泛用作抗癌药物。它们的效用在于有丝分裂纺锤体微管的瓦解优先杀死了迅速分裂的细胞。

加入不同类型的另一药物 taxol 却会增加(而非减少)体外微管蛋白的聚合:若加到细胞,则导致游离微管蛋白装配成为微管。同样, D_2O (重水)也会导致一种向微管蛋白聚合的转变。例如,因此而增加了有丝分裂纺锤体内的微管数。但令人惊异的是,由 taxol 或 D_2O 所导致的细胞内微管稳定性的增加,对于微管功能却像其解聚一样有害:凡由 taxol

或 D_2O 来保持微管稳定的细胞无法通过其生长周期,而停止于有丝分裂期。因此,为正常行使功能,似乎至少要有一些微管处在动态的装配和解聚状态。

调节微管装配或影响其稳定性的因子,将在下一节讨论。现在我们将转向一些依赖于肌动蛋白丝装配的细胞过程及肌动蛋白和微管蛋白聚合的动力学。

在细胞中不断形成和破坏的肌动蛋白丝

肌动蛋白在细胞内迅速装配成为纤维有几个很明显的例子。印象最深的一个是无脊椎动物精子的顶体反应。例如,当海胆精子逼近卵子时,会突然放出一根很细的顶体丝(acrosomal process),像鱼叉一样刺穿卵子被膜,致使精、卵二膜得以融合(图 10-36)。成熟的顶体丝大约含有 25 条很长的肌动蛋白丝,它们是由肌动蛋白分子通过一种几乎是爆发式的聚合而产生的,其延伸速度可达每秒 $10\mu\text{m}$ 。另一个显著例子,则发生在血小板中。血小板为缺乏

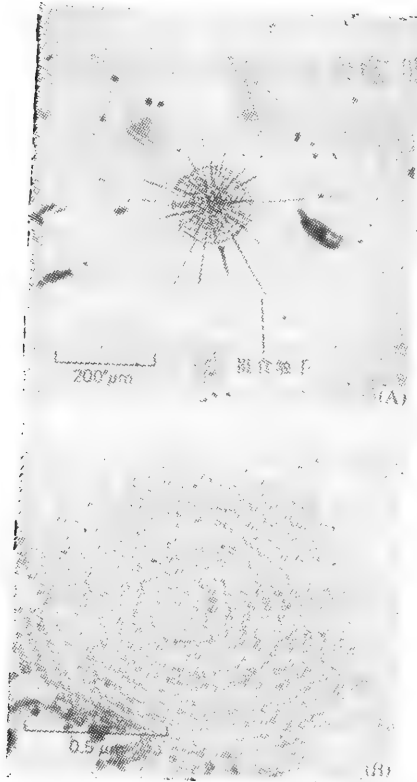


图 10-34 (A)太阳虫 *Anisospaerium* 的光学显微镜照片。(B)*Anisospaerium* 摄食触手横切面的电子显微镜照片。每个触手核心均由微管组成的两个同心螺旋形物所构成。(Lewis Tilney 赠)

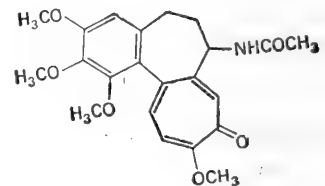


图 10-35 秋水仙碱的化学结构

细胞核和核糖体的圆形细胞片段,它们能在血管损伤时迅速改变形状,并局部分泌一些化学介体来应答(见图 16-35)。在此反应过程中,血小板上出现了许多可在血块形成和收缩中起作用的细突起。这些突起含有大量肌动蛋白丝,是由未聚合的肌动蛋白库迅速形成的。其后的收缩不是由于解离,而是由于这些肌动蛋白丝与肌球蛋白的相互作用所致。

在多种细胞表面,均见有伸出和缩进的指状微绒毛(图 10-37)。这些结构含有一个由肌动蛋白丝组成的核心,它们的伸出和缩进即分别由肌动蛋白的聚合和解聚所引起:例如,在一个未受精的海胆卵表面,大约覆有 130 000 根短微绒毛。当卵受精时,皮质颗粒与质膜的融合使卵的表面积增加一倍以上,这种额外膜就是由微绒毛延伸供给的。每根微绒毛的长度在几秒之内即可由 $0.3\mu\text{m}$ 增至 $1\mu\text{m}$ 。生物化学实验表明,这种延长伴随着肌动蛋白的大规模聚合。

在诸如未活化的精子和圆形血小板之类的细胞中,相当比例的未聚合的肌动蛋白是

同一种称做抑制蛋白(profilin)的蛋白质结合的。实际上,一种相类似的、结合肌动蛋白的蛋白质也见于所有脊椎动物和无脊椎动物细胞。这种 16 000 道尔顿的蛋白质,与肌动蛋白分子形成一种迅速可逆的一对一复合物,从而阻止了它们的聚合。似乎通过隔离肌动蛋白分子,抑制蛋白即可作为一种缓冲剂,使游离肌动蛋白的有效浓度保持在一个恒定水平;而且削弱抑制蛋白-肌动蛋白相互作用的调节机制,原则上也能触发细胞内肌动蛋白分子的聚合。事实上,细胞含有许多其他结合肌动蛋白的蛋白质,其中一些则与抑制蛋白一起协同控制细胞质中肌动蛋白丝聚合的形成和状态。

改变肌动蛋白聚合的状态,从而影响细胞行为的专一性药物¹⁵

在所有细胞的肌动蛋白分子与肌动蛋白丝之间,都存在着一种动态平衡,而这种平衡又在诸如移动和吞噬之类的各种细胞运动中起作用。但是难以在这种情况下

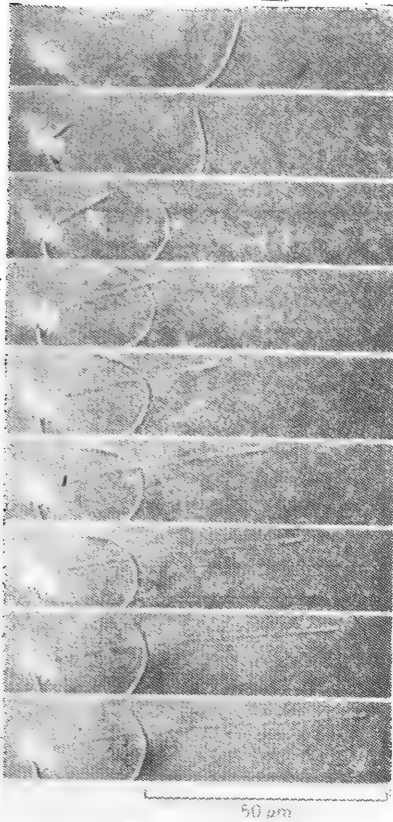


图10-36 显示海胆精子顶体丝延伸进程的光学显微镜照片。在人工活化精子进行顶体反应后 2 秒开始拍摄,每张间隔 0.75 秒。精子头部右方的弧形则是已弯出视野的部分精子尾巴。(引自 L. G. Tilney and S. Inoue, *J. Cell Biol.* 93:820—827,1982. 洛克菲勒大学出版社同意复制)

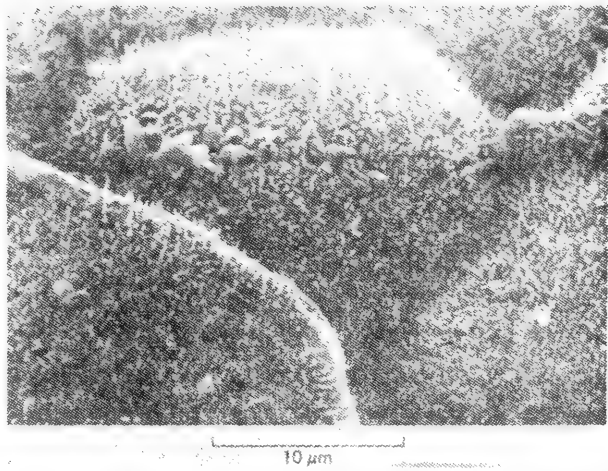


图 10-37 覆盖在培养癌细胞表面的短的肌动蛋白微绒毛的扫描电子显微镜照片。(Günter Albrecht-Buehler 赠)

检测肌动蛋白聚合中的变化。因为它们和精子或血小板的活化不同,不会产生持续时间较长而易于鉴定的效应。

然而,影响肌动蛋白聚合状态的药物已表明会破坏许多这些细胞的运动(表 10-4)。例如,细胞松弛素(图 10-38),是一族由各种霉菌分泌的代谢产物,会使许多不同类型的脊椎动物细胞运动瘫痪——抑制细胞移动、吞噬、胞质分裂,以及抑制叫做微刺的微小细胞附属器的产生(见 565 页)和上皮层的折叠成管。但是,它们不会抑制主要涉及微管的有丝分裂,也不会影响并不涉及肌动蛋白丝装配和解聚的肌肉收缩。细胞松弛素是通过专一地结合肌动蛋白丝一端(相当于以 S1 修饰的肌动蛋白丝的“倒刺”端),从而阻止肌动蛋

白分子在该端添加而起作用的。

鬼笔毒环肽是一种由毒鹅膏 (*Amanita phalloides*) 产生的剧毒生物碱。同细胞松弛

表 10-4 结合肌动蛋白或微管蛋白的一些药物

	作用方式
结合微管蛋白的药物 秋水仙碱、乙酰甲基秋水仙碱 长春花碱、长春新碱 taxol 结合肌动蛋白的药物 细胞松弛素(B、D、E等) 鬼笔毒环肽	抑制微管蛋白分子加到微管,导致微管解聚 诱导形成微管蛋白的拟晶体聚集体 稳定微管 抑制肌动蛋白分子加到肌动蛋白丝,导致纤丝解聚 稳定肌动蛋白丝

素相反,它使肌动蛋白丝保持稳定,并使其解聚受到抑制。这种药物不易穿过质膜,故须事先注入细胞方能奏效。一旦注入之后,即可见鬼笔毒环肽会阻止原生动植物变形虫和各种组织培养的脊椎动物细胞的迁移,从而表明肌动蛋白丝的动态装配和解聚,对于这些

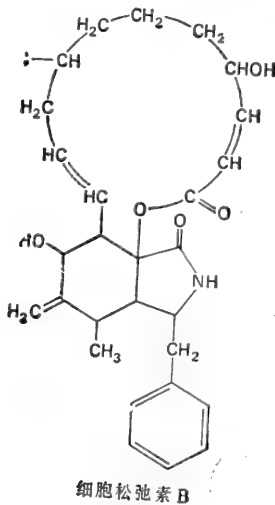


图10-38 细胞松弛素 B 的化学结构

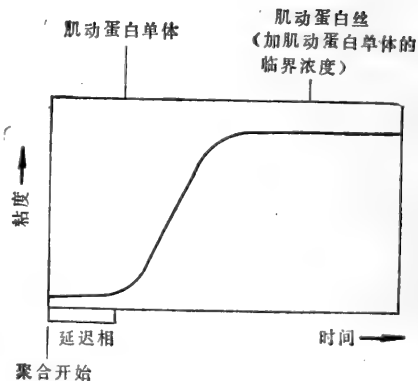


图10-39 按增加粘度度量的肌动蛋白聚合的过程。聚合通常系由离子强度增加所启动,并如此处所示,往往接着起始延迟相进行。

运动至关重要。由于鬼笔毒环肽使肌动蛋白丝保持稳定是通过高度专一地沿长轴与其结合,故其荧光衍生物已被用于细胞内肌动蛋白丝的染色(见图 10-78)。

可在体外研究肌动蛋白和微管蛋白的聚合¹⁶

试管中的纯化肌动蛋白的性质为此蛋白质在活细胞中的聚合是如何被控制的提供了重要线索。像前面已经提到的那样,骨骼肌肌动蛋白能在体外自然装配成为纤维,而其他组织的肌动蛋白也表现出极为类似的情形。确实,从像粘菌和脊椎动物那样相距很远的来源获得的肌动蛋白会共聚为混合肌动蛋白丝。现在我们就来分析这种自发反应的动力

学。

肌动蛋白的有效聚合需要 ATP。这种核苷酸同未聚合的肌动蛋白分子结合,并当肌动蛋白分子加至聚合物时发生水解。聚合的速度则非始终如一,而是开始时有一延迟相,此时粘度无明显增加(图 10-39)。(前已述及,肌动蛋白的聚合,是由肌动蛋白溶液离子强度增加所致,并可通过粘度测量进行监测)。延迟相被认为反映了这样一个事实,即纤丝形成的第一步特别困难。在此期间,必须使二或三个肌动蛋白分子按特殊几何构象聚集在一起。这就是通常所说的集结作用(nucleation)。一旦此步完成,进一步向纤维末端添加肌动蛋白分子即可迅速进行。

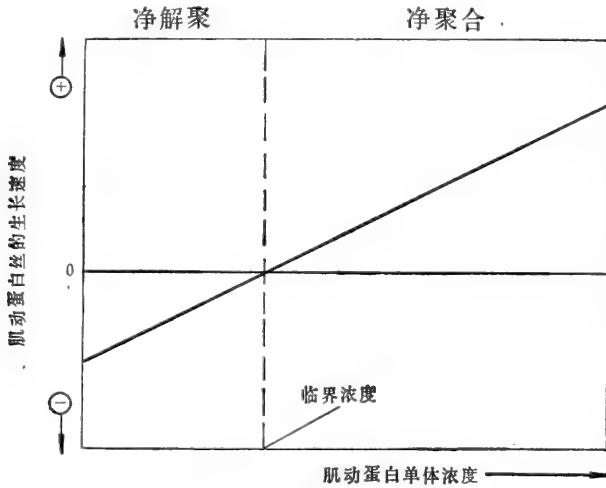


图 10-40 肌动蛋白丝在不同游离肌动蛋白分子浓度下的生长速度。低于临界浓度无纤丝形成,存在的一些纤丝也会进行负生长(亦即解聚)。高于临界浓度则纤丝形成,并可通过在其末端添加肌动蛋白分子进行生长。但随游离肌动蛋白分子消耗,其浓度下降,直至达到临界浓度。此时,净生长速度等于零,而游离肌动蛋白分子与纤丝达到平衡。

肌动蛋白单体浓度最终会降到一点,即分子结合到纤丝和由纤维解离的速度相等的、称之为临界浓度的游离肌动蛋白浓度。低于临界浓度肌动蛋白装配即无法进行,已装配的纤丝也开始解聚(图 10-40)。有一些在细胞内同肌动蛋白结合的蛋白质,在体外已表明具有集结肌动蛋白聚合的作用,而影响肌动蛋白丝的形成。

类似于肌动蛋白的那些装配实验可用纯化的能形成微管的可溶性蛋白——微管蛋白来进行。早已提到,微管蛋白通常以含有一个 α -微管蛋白和一个 β -微管蛋白多肽的二聚体分子存在,并与将在聚合过程中水解的 GTP 结合。但是除了可交换的在聚合过程中水解成 GDP 的 GTP 之外,各微管二聚体还含有一分子紧密结合的 GTP,它不参与反应,作用尚不清楚。因而最终构成微管的每个微管蛋白二聚体含有一分子 GTP 和一分子 GDP。

在试管中聚合形成的微管与细胞中见到的那些微管相似(图 10-41)。它们在高温(37°C)聚合,而于低温(4°C)解聚。在细胞内使微管解聚的药物,如秋水仙碱或长春花碱,以及像 taxol 那样使微管保持稳定的药物,在体外系统中也具有相应效果。此外,微管辅助蛋白(见558页)和钙调节蛋白(钙调蛋白)(见722页)存在时,体外的微管装配即

被完全阻断,或可被微摩尔量的 Ca^{2+} 逆转。这一事实有力地表明, Ca^{2+} 也会调节细胞内的微管装配。

如图 10-39 和 10-40 所示,微管蛋白装配的动力学与肌动蛋白装配的动力学十分相似。由于形成微管起始片段而出现的延迟相发生在较迅速的延长相之前。游离的微管蛋



图 10-41 通过试管内聚合制备的微管的电子显微镜照片。微管是在电镜观察前离心成为沉淀并切片的。(Olav Behnke 赠)。右上角插图中为类似微管制品,放大倍数稍高,以横切面为主。(Richard Linck 赠)

白也有一临界浓度,低于此浓度聚合即无法进行。像基体之类的结构,则在体外和细胞内,都可作为微管集结中心而起作用(这些结构将在本章稍后部分讨论)。

肌动蛋白丝和微管都是两端生长速度不同的极性结构¹⁷

肌动蛋白及微管蛋白聚合物之所以具有极性,是由于其非对称亚基在聚合物中的排列。多聚体的结构极性为肌肉和纤毛产生有组织的运动所必不可少。它还在控制多聚体两端生长程度上有所不同中起重要作用。

专一蛋白质与肌动蛋白和微管蛋白两者的结合,已被有效地用于测定它们的极性。含有肌球蛋白分子头部区域的肌球蛋白 S1 片段,按图 10-14 所示的特有箭头图形,装饰肌动蛋白。微管虽无如此方便的标记,但最近发现,在特定实验条件下,游离微管蛋白分子会加到原有微管外侧,而形成横切面呈钩状的弯曲原丝层。此钩呈顺时针或反时针指向则取

决于微管极性。在神经细胞轴突、纤毛，以及有丝分裂和间期细胞的有中心粒的区域中，也已表明微管以一致的、相同的极性而伸展。

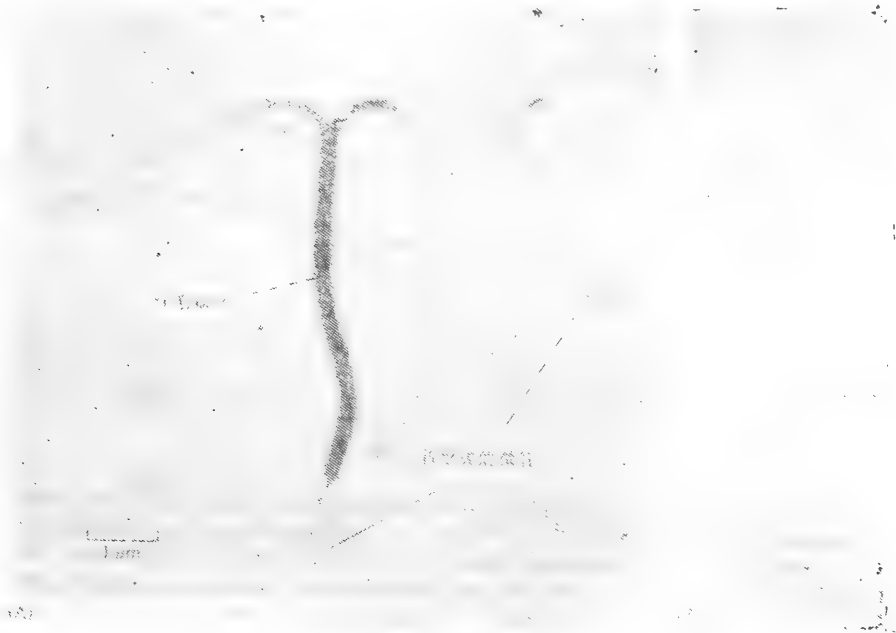


图 10-42 显示微管在一端优先生长的电子显微镜照片。当纤毛轴丝断片与脑微管蛋白在聚合条件下温育时，由轴丝一端（相当于远离完整纤毛基体的一端）产生的微管，比从另一端产生的生长快（A）。在(B)图中，由纤毛外围二联体的小断片产生的微管，也显示出生长的不对称性。
(Gary Borisy 赠)

在肌动蛋白丝和微管中，两相反末端生长和解聚的速度都很不相同。微管生长的这种不对称性，可以通过先让微管蛋白分子在纤毛轴丝的短片段上聚合片刻，而后再作电镜检查来进行观察(图 10-42)。由此即可见到，一端延长的速度是另一端的三倍。生长较快的一端[称为(+)端]，已表明是纤毛中背向基体的一端，也是细胞中向正在生长的纤毛添加微管蛋白分子的一端。对肌动蛋白丝所作的类似实验证明，生长较快的一端相当于肌肉中埋置于Z盘的肌动蛋白丝末端。似乎在所有细胞中都可能存在着选择性地同肌动蛋白丝和微管的一端或另一端结合的蛋白质。据估计，这种覆盖蛋白可能在决定细胞骨架的空间排列上起着关键性作用——使纤丝通过结合端附着到其他细胞结构上，并分别控制亚单位在任一末端的添加或丢失。因此，肌动蛋白丝和微管的空间结构及稳定性也可能主要取决于附着到它们两端的那些蛋白质。

肌动蛋白和微管蛋白的多聚体会出现亚基的“踏板车”现象¹⁸

肌动蛋白和微管蛋白的聚合，实际上并不需要能量，甚至在不能水解的核苷三磷酸类似物存在下也会发生装配。但是核苷三磷酸在聚合期间的水解，使肌动蛋白和微管蛋白分子在其进入多聚体时形状发生改变，就像肌球蛋白头部构象随其 ATP 水解而改变一样。结果游离分子对聚合物一端的亲和力就变得比对另一端的大。换句话说，纤丝一端

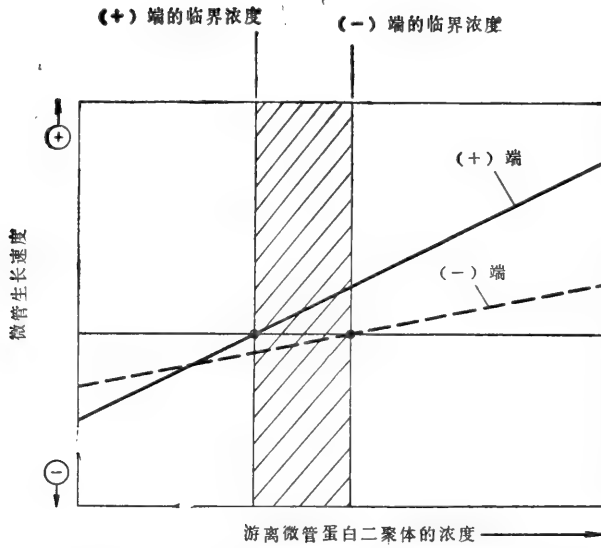


图 10-43 在不同游离微管蛋白二聚体浓度下的微管生长速度。除纤丝(此即微管)两端具有不同生长速度和不同临界浓度外,此图与图 10-40 相似。因此,游离微管蛋白浓度有一个范围(斜线区域),在此微管一端(+)聚合而在另一端(-)解聚。当游离微管蛋白与微管在体外达到平衡时,即无净生长出现,因为微管蛋白分子脱离一端的速度,与其加到另一端上的速度相等。在此条件下,微管长度不变,而出现微管蛋白分子的脚踏车现象(见图 10-44)。

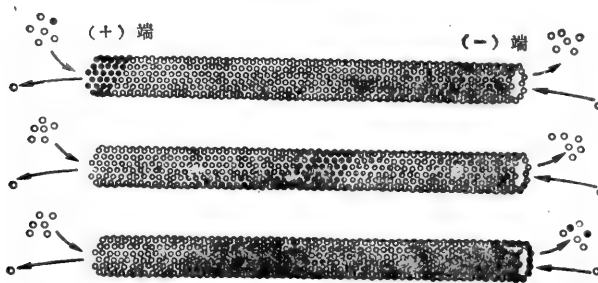


图 10-44 显示微管内的微管蛋白分子脚踏车的图解。在达到平衡时,微管蛋白分子(作为 $\alpha\beta$ 杂二聚体)仍继续加到微管两端和从两端丢失。然而在 GTP 存在下,一端(+)为净增加,而另一端为净丢失。结果微管蛋白(这里用深色表示)便连续不断地从微管一端移动到了另一端。肌动蛋白丝可能存在类似情形,其中的脚踏车则由 ATP 水解驱动。

[(+)端]的临界浓度——定义为添加速度与解离速度相平衡时的浓度(见第 553 页)——将比另一端[(-)端]的来得低。这就导致一个重要后果,即当游离肌动蛋白或微管蛋白分子浓度居中时,纤丝可能会以一端分子解离占优势(但非全部),而另一端添加占优势的稳态——一种称之为脚踏车(treadmilling)的现象——存在(图 10-43)。在此稳态状态下,添加到(+)端的速度等于从(-)端丢失的速度,多聚体的净生长也就等于零。然而,即使多聚体的净长度不变,个别分子仍会被连续不断地从多聚体一端转移到另一端(图 10-44)。分离的肌动蛋白丝或微管脚踏车需要能量,由核苷三磷酸水解提供。否则它就可能成为一种永动机,而违反热力学定律。虽然脚踏车只是在体外相当特殊的条件

微管组织中心和微管相关蛋白

在细胞质中单根微管就像容易弯曲的棒一样，对于细胞的价值将是有限的。它们必须同细胞其他部分相连接，才能作为一种结构骨架或参与细胞运动。多数微管以一端固着：纤毛终止于基体，而间期细胞中的胞质微管则终止于邻近细胞核的叫做细胞中心的特定区域。基体和细胞中心都起集结中心的作用，微管在经实验处理解聚后由之再生；为此，它们被称为微管组织中心。此外，许多微管都是通过附着于其长轴的辅助蛋白，而得以稳定或与其他结构连接。

胞质微管同其他蛋白相关联¹³

高度纯化的微管蛋白在 GTP 存在下会自然装配成微管，但它却远不如不太纯的制剂那么有效。促进微管聚合的杂质是辅助蛋白，它们分为两大类：MAPs（微管相关蛋白），其多肽链分子量为 200 000—300 000，以及 tau 蛋白，分子量为 60 000—70 000（图 10-46）。当被纯化之后，这两类辅助蛋白能诱导纯化的微管蛋白聚合，并与新形成的微管相结合。tau 蛋白看来是同时与几个微管蛋白分子结合，从而促进微管蛋白聚合。MAPs

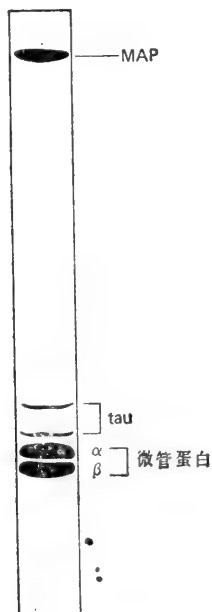


图10-46 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图，显示出存在于部分纯化的脑微管的多肽。

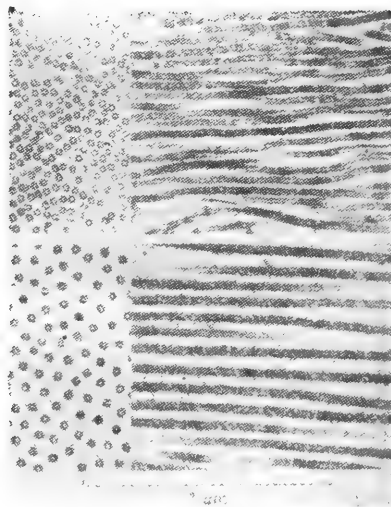


图10-47 显示在缺乏(上部)或存在(下部)MAPs 的情况下聚合的微管横切面和纵切面的电子显微镜照片。注意MAPs 沿微管长轴结合，并增加相邻微管间的间隔。(引自 H. Kim, L.I. Binder, and J. L. Rosenbaum, *J. Cell Biol.* 80:266-276, 1979. 洛克菲勒大学出版社同意复制)

的作用相似，但不同之处在于，它由两个结构域组成：一个同微管结合，另一个向外伸出而可能涉及微管同其他细胞组分的交联(图 10-47)。针对这两类蛋白的抗体沿细胞微管的整个长轴结合。MAPs 和 tau 蛋白见于多数脊椎动物细胞，而被认为——即使尚未证

明——有助于调节这些细胞中的微管装配。

微管从分散的组织中心长出²⁰

采用抗微管蛋白的荧光抗体标记经过固定的细胞，可看到组织培养的间期细胞细胞质中的微管。核周微管密度最高，并以花边状细丝向细胞边缘辐射(见图10-61)。如果先以秋水仙碱解聚，然后使其再生，微管的发生可看得最清楚(图10-48)。最早出现的再生微管是一两个叫做星体的微星状结构，然后向细胞边缘延伸，直至重新建立原有布局。如用微管钩(microtubule hooks)装饰培养细胞的微管，以测定其极性，即可见其(+)端均背向原始星体中心——微管组织中心。

几乎所有动物细胞，在其叫做细胞中心或中心体的主要微管组织中心的中央，都有一对中心粒。其结构如图10-49所示。它是一种直径为 $0.1\mu\text{m}$ 、长度为 $0.3\mu\text{m}$ 的圆柱体，勉强能在光学显微镜下见到。像纤毛和鞭毛的基体一样(图10-49B)，中心粒三联微管也呈九重排布。然而，不是所有微管组织中心都含有中心粒。例如，在高等植物的有丝分裂细胞中，微管就终止于全无中心粒的电子密度不够分明的区域。同样在小鼠卵母细胞的减数分裂纺锤体中，也未见到中心粒，虽然它们后来出现在早期发育的胚胎中。

中心粒和基体在结构上相同，在功能上可以互换²¹

中心粒和基体具有即便不是同一也是极为类似的结构，而在许多情形下可以互相转变。例如，单细胞绿藻——衣藻有两根鞭毛，每根都有一个基体。当有丝分裂开始时，鞭毛被吸收，基体即移至一近核部位，在那里组织有丝分裂纺锤体。在有丝分裂后，中心粒再次变为基体，鞭毛也重新出现。组织培养的脊椎动物细胞往往具有从其细胞中心长出的初级纤毛，其微管呈“ $9 + 0$ ”排列。这种纤毛不会摆动，它仅由成对中心粒中的一个中心粒产生，而在细胞开始有丝分裂之前消失。

在许多生物体中，好像卵子都不具有活性中心粒，而精子却含有基体(或中心粒)，在受精期间供给卵子。这些精子中心粒起着为第一次卵裂组织有丝分裂纺锤体的作用。通过实验，将衣藻或纤毛原生动物四膜虫的纯化基体注入蛙卵，也会产生一种类似的组织作用。这些基体在细胞质中诱导形成有丝分裂星体这一事实证明，当基体存在于具有分裂倾向的细胞质中时，即可起中心粒作用。

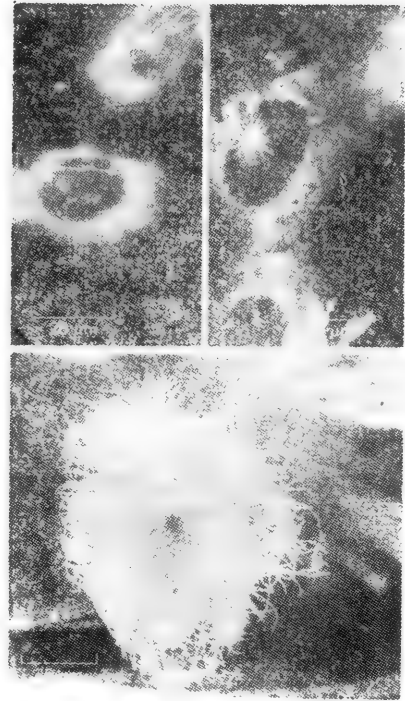
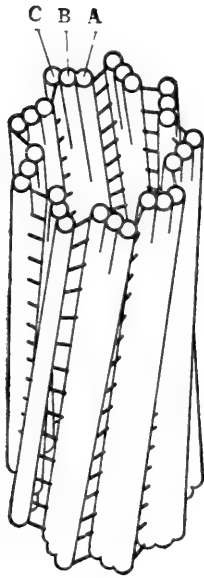


图10-48 显示培养细胞内微管，在接触乙酰甲基秋水仙碱一小时后恢复的免疫荧光显微镜照片。在洗去乙酰甲基秋水仙碱后，再于不同时间使用抗微管蛋白抗体对细胞进行染色。微管首先呈现为星状体，而后向细胞周围延伸。(引自 M. Osborn and K. Weber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:867-871, 1976)



(A)

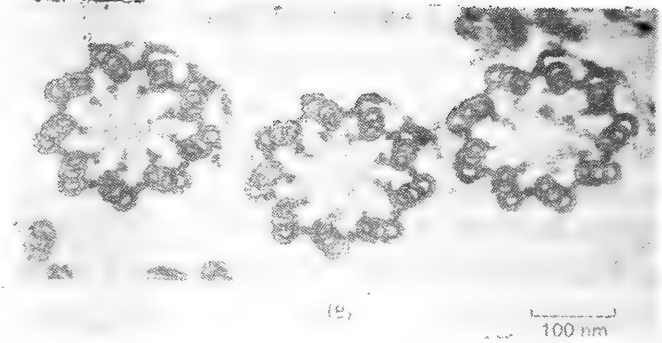


图 10-49 (A)中心粒图解。它由九组三联体微管组成,每组三联体均含有一个完全微管(A亚丝)和两个与之融合的不完全微管(B亚丝和C亚丝)。其他蛋白质形成链杆,把圆柱形排布的微管结合在一起(横短线部分)。中心粒结构与纤毛基体结构基本相同。(B)通过原生动 物 *Saccinobaculus ambloaxostylus* 皮质内三个基体的断面电子显微镜照片。(照片由 D. T. Woodrum 和 R. W. Linck 赠)

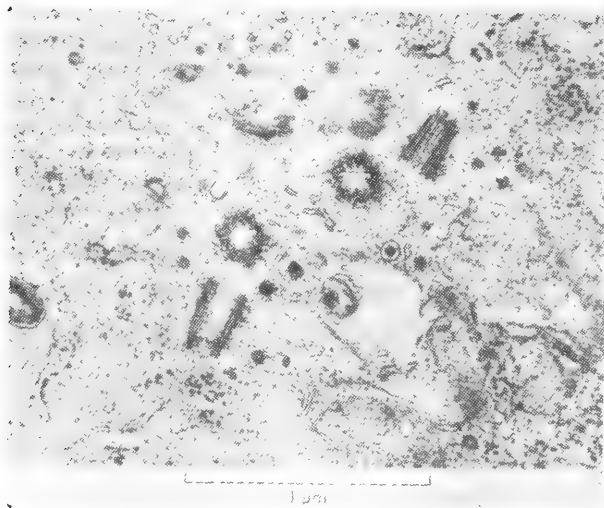


图 10-50 显示新复制的一对中心粒的电子显微镜照片。每对中心粒都是其中一个被横切而另一个被纵切,从而表明,每对中心粒的两个成员均相互成直角排列。(引自 M. McGill, D. P. Highfield, T. M. Monahan, and B. R. Brinkley, *J. Ultrastruct. Res.* 57:43—53,1976)

中心粒通常由复制产生²¹

要不是为 DNA 复制和中心粒加倍这两个分立的复制事件所破坏,细胞质量会在整个动物细胞周期不断增加。中心粒加倍导致纺锤体极形成,使细胞核在有丝分裂时一分为二。在培养的成分纤维细胞中,中心粒加倍约与 DNA 合成同时开始。中心粒通常成对出现,相互成直角排列。新的一对中心粒则在原有一对中心粒附近形成,其过程实际上在所有真核生物中都是一样的。首先,一对中心粒的两成员分开;然后,在每一中心粒基部(可能是离基体中的纤毛最远的一端)分别形成一个与原始中心粒垂直的子中心粒(图 10-50;也见图 11-19)。未成熟的中心粒含有九重对称排列的单微管,大概每条微管均可作为一个装配成熟中心粒的三联体微管的模板。

在可能具有数百根纤毛的脊椎动物细胞中,前体细胞的中心粒直接参与了许多所需基体的形成。例如,在输卵管和气管中内衬纤毛上皮细胞的分化过程中,成对的中心粒从其近核的通常位置移到将由此形成纤毛的细胞顶部。每个中心粒在那里不是以典型方式形成一个子中心粒,而是形成许多电子致密的“卫星”。然后再由这些卫星产生许多基体,并移到质膜而开始形成纤毛。

显然,似乎也有从头形成中心粒的情形。例如,虽然一些种类的未受精卵像是缺乏功能中心粒,而借用精子中心粒来进行第一次有丝分裂(见上面),但在一定条件下(如离子极不平衡或电刺激),一个未受精的卵也可以产生数量不定的许多中心粒。这些中心粒中的每一个都能集结形成小星体,其中的一个星体即可用于卵裂,于是一种单倍体生物就在叫做单性生殖的过程中发育起来了。这些研究提示,可能在未受精卵的细胞质中存在着某种中心粒前体。

中心粒复制的独特模式及其世代连续性表明,它们可能是自我复制的、自主的细胞器,甚至可能携带着它们自己的基因组。虽然尚无直接证据支持这种观点,但是已有中心粒中存在功能 RNA 的间接证据。

中心粒的功能是什么?

要想像九重对称的中心粒或基体、怎样集结装配成具有九重对称排列的二联体微管纤毛是比较容易的。但这种刚性对称似乎并不适于在分裂间期或有丝分裂细胞中集结成近似辐射状或球状排列的数百条微管(图 10-51)。事实上,经仔细检查发现,多数胞质微管都不是直接由中心粒产生,而是从围绕中心粒的一种致密染色物质——中心粒周围物质发出的。在没有中心粒的细胞中,微管也终止于这种致密染色物质,它必然相当于真正的胞质微管组织中心。

那么中心粒的作用是什么?一种极端观点认为,中心粒是一种仅供组构纤毛和鞭毛之用的细胞器,它们与细胞中心及有丝分裂纺锤体极的联系,只是反映了一种计划将形成基体的潜能平分给每个子细胞的机制。然而,在两极含有中心粒的有丝分裂纺锤体是高度集中的,并具有精致的向四面八方延伸的星状微管,而缺乏中心粒的,如植物细胞,则无星体,也较少集中于两极。再者,其他证据也似乎表明,动物细胞中心粒起着决定中心粒周围物质的精确位置,乃至整个细胞极性的主要组织者作用。

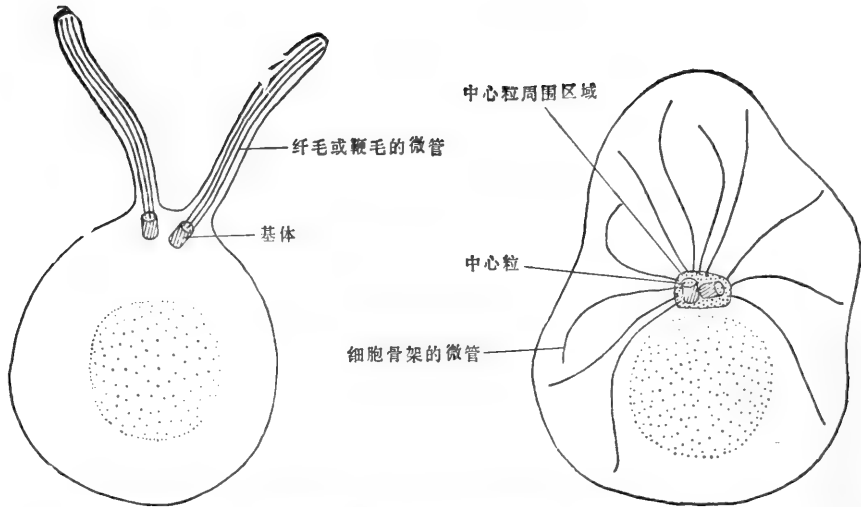


图 10-51 图解显示中心粒与基体在结构上即使不完全相同,也极为相似,它们对于许多不同类型的微管排列均起着组织中心作用。

小结

多数微管都和辅助蛋白相关联。例如 MAPs 和 tau 蛋白,它们被认为能调节微管装配,并影响微管同其他细胞组分的相互作用。其他微管辅助蛋白很可能构成部分微管组织中心,使细胞内微管能以一端附着其上。这些组织中心中最突出的是围绕着一对中心粒的细胞中心。

基体与中心粒,在结构上难以区分,在功能上可以互换,但其在集结微管的方式上有所不同。基体位于纤毛轴丝基部,其微管与轴丝微管相承。相反,中心粒不能直接集结使微管生长,除非通过相关联的无定形中心粒周围物质。中心粒成对存在,通常紧挨已有的中心粒形成。位于细胞中心的一对中心粒,通过它对许多由此向外辐射的胞质微管的影响,很可能在组构细胞骨架中起着关键性作用。

非肌肉细胞中的肌动蛋白丝和结合肌动蛋白的蛋白质²³

肌动蛋白在所有真核细胞的蛋白质中,均占有很大比例。例如在成纤维细胞中,几乎占总蛋白质的 10%,而其中约有一半被聚合成为纤维。在非肌肉细胞中,肌动蛋白丝至少具有两种功能: 形成交联束,为各种细胞结构及延伸物提供机械支持,以及同肌球蛋白一起,构成被认为负责许多细胞运动的各种收缩系统。

在这一节中,我们将首先剖析起机械支持作用的肌动蛋白丝束。然后讨论几个有关非肌肉细胞肌动蛋白和肌球蛋白收缩系统的例子。最后将论及使细胞中的肌动蛋白丝组成三维网络的许多结合肌动蛋白的蛋白质。

微绒毛含有成束的肌动蛋白丝²⁴

许多种类的细胞延伸物都具有交联的肌动蛋白丝核心。虽然其中一些延伸物能够进行诸如迅速伸出和缩进之类的运动,但肌动蛋白核心的主要功能看来还是作为一种机械

加固物。

微绒毛就是最熟悉的具有这种结构的例子。它们覆盖在多种上皮细胞的裸露表面，特别在细胞功能需要最大吸收表面积的地方，如在肠或肾中。这些指状延伸物长约 $1\mu\text{m}$ ，直径约 $0.1\mu\text{m}$ ，并往往像刷毛一样捆扎在一起。在人的小肠中，一个上皮细胞的刷状缘内就有几千根微绒毛（图 10-52），而使其吸收面积约比没有微绒毛时扩大了 25 倍。

一根微绒毛的核心约含 40 条成平行束沿其长轴伸展的肌动蛋白丝。在微绒毛顶端，肌动蛋白丝被埋置在一个难以定义的由无定形物质构成的帽盖中，而在微绒毛基部，它们则延伸进入一个主要由肌动蛋白丝组成的称之为终网的垂直网络。终网也含有肌球蛋白，其部分功能可能是产生使微绒毛保持垂直位置所需的张力。

微绒毛核心的肌动蛋白丝具有按其结合肌球蛋白 S1 片段判断的同一极性，其“倒刺”（+）端均固着在微绒毛顶端（图 10-53）。这是膜上附着的肌动蛋白丝的通常取向，也相当于骨骼肌 Z 盘的肌动蛋白丝的极性（图 10-53）。同微绒毛膜的连接不仅发生在顶端，而且沿其长轴：一个由侧向细微连接构成的螺旋形“楼梯”，就是从肌动蛋白纤维核心伸长到微绒毛膜的。

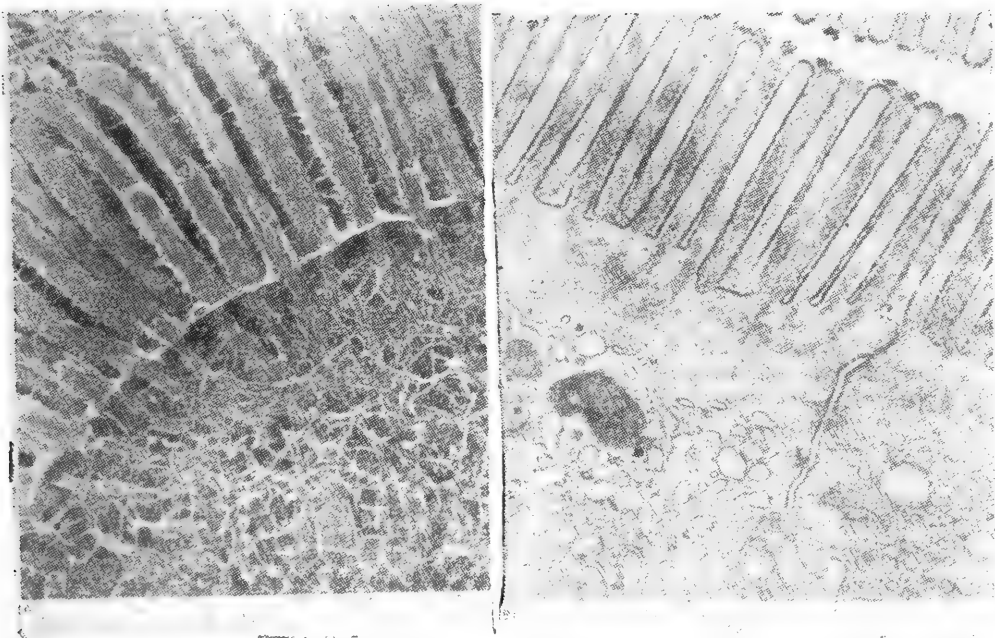


图 10-52 肠刷状缘的两幅照片。(A) 在去垢剂抽提后通过迅速冰冻和深度蚀刻得到的。(B) 采用常规的薄切片电子显微镜技术得到的。(A, John Heuser 赠; B, 引自 P. T. Matsudaira and D. R. Burgess, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46:845-854, 1982)

在刚性微绒毛核心中，横桥也能把邻近的肌动蛋白丝连接在一起。这些横桥的一个重要组分是结合肌动蛋白的蛋白质毛缘蛋白 (fimbrin)。这种蛋白质也见于细胞表面的其他含肌动蛋白延伸物。在微绒毛中，还有各种其他的结合肌动蛋白的蛋白质。其中研究得最广泛的是绒毛蛋白 (villin)，但其功能尚不清楚。对于这些及其他结合肌动蛋白的

蛋白质,稍后将作更详细的讨论。

交联肌动蛋白丝的刚性排列在声音探测中起作用²³

含有肌动蛋白的刚性微绒毛,除吸收外,还具有其他功能。例如,在枪乌贼的眼睛内,每个视网膜细胞都具有数十万根被紧密包装的微绒毛,而每根微绒毛又覆盖着一层光敏膜。相邻细胞的微绒毛有规则地成直角排列,致使动物得以测出入射光的偏振平面(图10-54)。

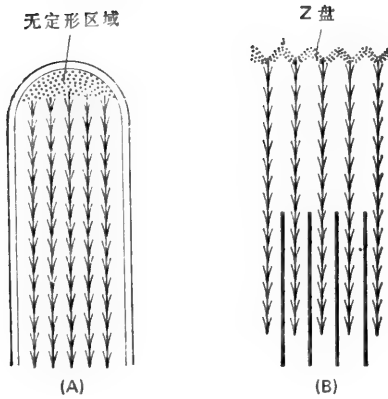


图10-53 显示微绒毛(A)和肌肉肌节(B)中肌动蛋白丝极性的图解。箭头表示以肌球蛋白的S1片段装饰的极性。这些纤丝的(+)端位在微绒毛顶端及肌节Z盘中。

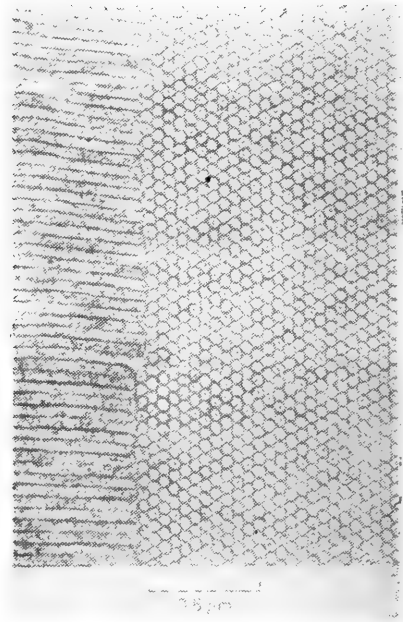


图10-54 枪乌贼眼睛视网膜中微绒毛的电子显微镜照片。微绒毛为光敏膜覆盖,并按平行排列包装在一起。显示二相邻视网膜细胞排布的切面,与视网膜相垂直。一个细胞上的微绒毛与其相邻细胞的微绒毛成直角排列,而使入射光偏振平面可被探测。(Helen Saibil 赠)

一个更为显著的特化,则发生在内耳耳蜗和前庭中的毛细胞上。毛细胞对于微弱运动异常敏感,无论是由于传入声音的振动,还是由于头部位置改变引起的半规管内液体的移动。这些运动都是靠细胞表面巨大的特化微绒毛探测出来的(图10-55)。它们被称之为不动纤毛(stereocilia),虽然这一术语会造成误解,因为它们含有像微绒毛一样由肌动蛋白丝组成的核心,而不像真正的纤毛那样由微管组成的核心。在每个毛细胞表面,都有成排的不动纤毛,它们按长度递减顺序排列,而呈管风琴外形(图10-56)。各个不动纤毛是刚性结构,它逐渐变细形成一尖端而与细胞表面接触。在探测声音时,不动纤毛的微弱运动被转换成为毛细胞中的电信号,再由毛细胞将信号传给脑(见第十八章)。

不动纤毛的特殊机械性质——它们的刚性及在其于基部弯曲的能力,可能对于毛细胞精细调节的灵敏度是必不可少的。例如,使其能在高达数千倍的杂乱噪声背景上,对一特殊频率发生反应(第十八章)。这些机械性质可能取决于不动纤毛核心中肌动蛋白丝交

联的方式。例如，蜥蜴不动纤毛中的数百根肌动蛋白丝，从横切面看来，是间隔不规则的，但纵切面却显示其纵向严格地排成一列，以致肌动蛋白螺旋的交叉点均位在同一平面。如图 10-57 所解释的那样，这种排列是通过一交联蛋白产生的，交联蛋白同二相邻肌动蛋白螺旋上精确的空间部位结合，从而使它们形成有规则的肌动蛋白束，却不需要横切面中的间隔相等。

在许多细胞表面都存在着动态肌动蛋白丝结构²⁶

肠的刷状缘中的微绒毛及耳内的不动纤毛，均属一定类型上皮细胞的较永久特化，但动态肌动蛋白丝延伸物在真核细胞中却极为普遍，如前所提到的，微绒毛从受精后的海胆卵表面迅速伸出的例子一样。当组织培养细胞沉降到培养皿面、迁移或长圆直至分裂时，在培养物表面会伸出大量的毛发样延伸物，叫做微刺 (microspike) 每根宽约 $0.1\mu\text{m}$ ，长 $5-10\mu\text{m}$ (图 10-58)。在发育神经轴突的生长端(生长锥)，则会形成长达 $50\mu\text{m}$ 而有时称之为丝状伪足微刺(见图 18-63)。这些延伸物都是能动的结构，它们能快速形成和缩进，可能是通过肌动蛋白丝的局部聚合和解聚，虽然这一点还很不清楚。肌动蛋白丝在微刺中的定向，均按其在肠微绒毛中的同一极性，尽管它们的排列很不整齐(图 10-59)。细胞微刺被认为起着细胞借以探测环境的感光器或触角的作用(见第十八章)。

非肌肉细胞含有微小的“肌肉样”装配物²⁷

肌动蛋白丝的定向排列，并不限于像微绒毛和微刺一类的表面突起。此外，几乎在所有真核细胞的细胞质中，均含有成束的肌动蛋白丝。这些纤维束通过它们同肌球蛋白的相互作用，能够收缩并产生一种机械力，虽然要比肌肉产生的弱得多。一个最明显的例子是由肌动蛋白丝和肌球蛋白构成的称之为收缩环的带状束。它在细胞分裂期间出现，正好位于质膜下方。由于此环收缩，使细胞中部变窄，而最终导致两子细胞分离(图 10-60)。

收缩环阐明了关于非肌肉细胞中基于肌动蛋白的收缩的两个要点。首先，表明有肌球蛋白的参与，因为当将抗肌球蛋白抗体注入将要分裂的海胆卵时，核的分裂会照常进行，但因收缩环失效而使细胞质无法分裂。这表明，这种收缩像肌肉中的收缩一样，是基于肌动蛋白丝与肌球蛋白分子间的相互作用。第二，收缩环不是一种永久结构，它必须在细胞分裂开始时装配，而到分裂结束时解聚。许多其他基于肌动蛋白的收缩系统，也只是在需要时才形成的暂时结构。

然而，不是所有非肌肉收缩的装配物都是暂时的。例如，与所谓带状桥粒 (belt desmosome) 结构(第 660 页)相关的环状肌动蛋白丝束，就是较持久的。它们见于上皮细胞顶端表面附近，被认为在细胞形状改变中，尤其是在胚胎发生期间，起着重要作用。例

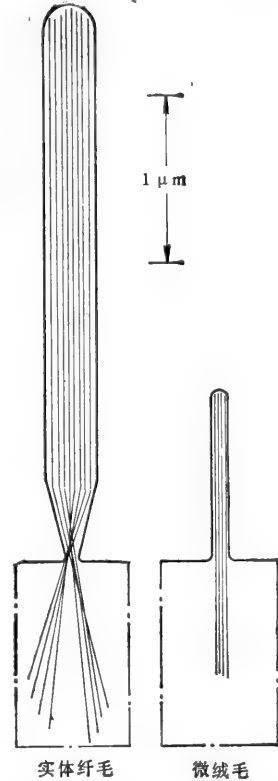


图10-55 比较典型实体纤毛与典型微绒毛大小的图解，它们两者均由其核心内的肌动蛋白丝束来支持。

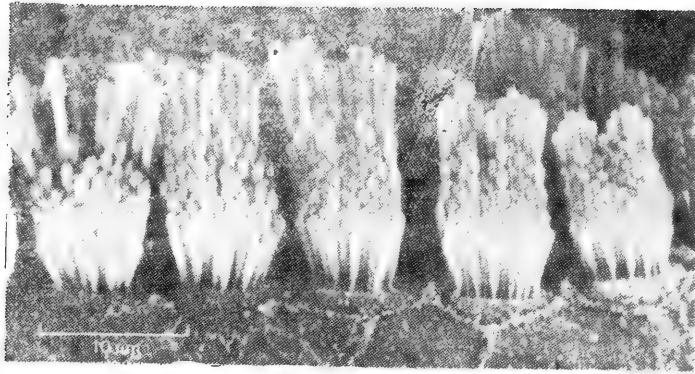


图 10-56 毛细胞表面的扫描电子显微镜照片,示实体纤毛的“管风琴”排列。(Lewis Tilney 赠)

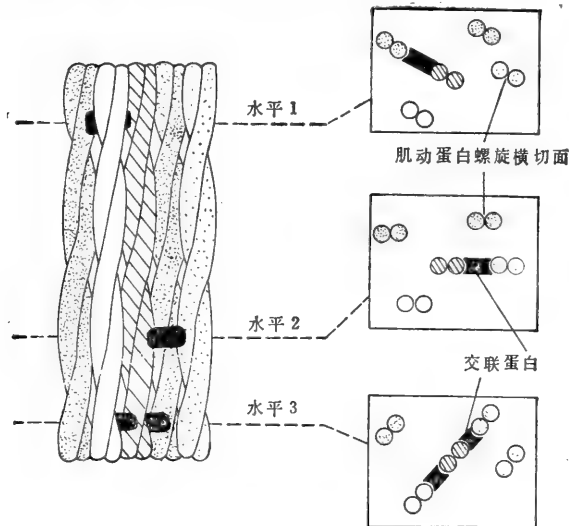


图 10-57 交联的肌动蛋白丝图解。图左描绘的 5 条肌动蛋白丝,不仅平行而且纵向排成一列,故其螺旋对齐(为简单起见,没有显示个别的肌动蛋白分子)。图右所示为通过一束这样排列的肌动蛋白丝所作的横切面。可见像毛缘蛋白这样一类的交联蛋白(黑色),能在几个水平上将相邻肌动蛋白螺旋连成一体,即使蛋白质丝的并排包装是不规则的。

如,这些肌动蛋白束的协同收缩会压缩细胞顶端,而使上皮细胞层在胚胎发育早期出现有规则的折叠(这将在第十五章作更详细的讨论)。

虽然收缩环和带状桥粒的作用已相当清楚,但其他肌动蛋白丝束的功能还不甚明了。一个很好的例子是称为应力纤维(stress fiber)的有组织的肌动蛋白丝束,它是培养细胞的细胞骨架的主要组分(图 10-60)。应力纤维是由肌动蛋白丝和相关蛋白组成的束状物,其典型宽度为 $0.5 \mu\text{m}$, 长约 $5 \mu\text{m}$, 位在邻近培养皿面的细胞下表面附近的细胞质之中。可将这些纤维从其他细胞组分中分离出来,并且若与 ATP 接触,就会发生收缩。采用免疫荧光技术可清晰地将其显示出来(图 10-61), 同时还表明它们含有肌动蛋白、肌球蛋白、 α -辅肌动蛋白和原肌球蛋白。其中一些蛋白质,包括肌球蛋白,沿应力纤维长轴呈有规则的周期性分布,但其结构细节,如同所有其他非肌肉收缩的分子装配一样,尚不清

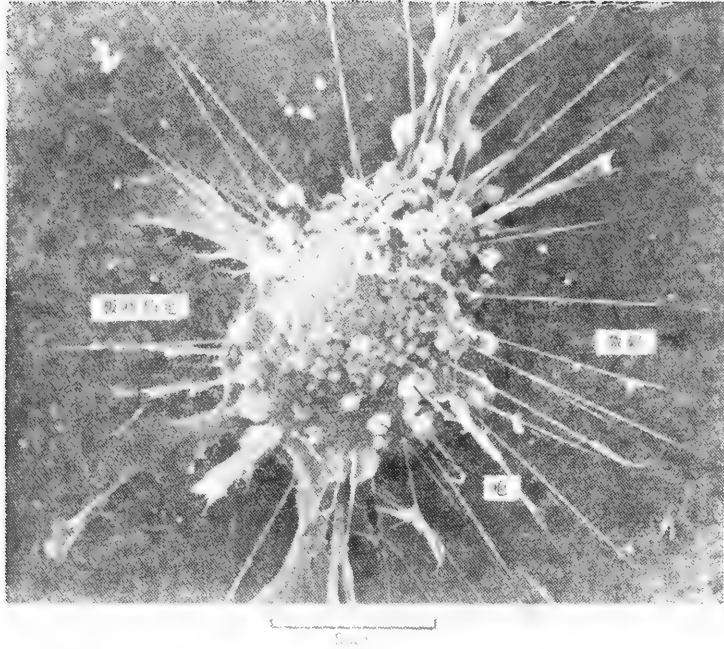


图 10-53 沉降在培养皿面的成纤维细胞的扫描电子显微镜照片。由细胞表面伸出的是三种不同类型的突起：泡、扁平片(或板状伪足)和微刺(见图 10-86)。后者看来像是起着感觉器的作用使细胞得以查明其环境特征。(Günter Albrecht-Buehler 赠)

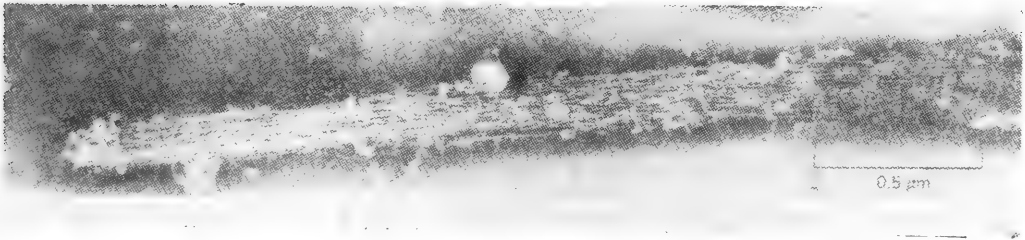


图 10-59 显示培养的人胶质细胞微刺的高倍电子显微镜照片。细胞膜及细胞可溶性蛋白已经去垢剂处理除去,肌动蛋白丝由负染显示。(Uno Lindberg, Anna-Stina Höglund 和 Roger Karlsson 赠)

楚。然而,我们已经知道非肌肉肌球蛋白的一些特性。

非肌肉细胞中肌球蛋白的装配是依赖 Ca^{2+} 的²⁸

几乎在所有真核细胞中都存在各种形式的肌球蛋白。虽然所有肌球蛋白同肌动蛋白的结合,均会导致它们的 ATP 酶活性增加,但只是在骨骼肌和心肌中,才能在电镜下见到肌球蛋白粗丝。在其他细胞中可用免疫荧光来检测肌球蛋白,特别是在肌动蛋白丝组织成为收缩束的区域。但是未能在电镜下见到肌球蛋白分子的详细排列。非肌肉细胞含有的肌球蛋白,相对肌动蛋白而言,要比肌肉细胞少得多,且其肌球蛋白丝也比骨骼肌细胞的粗丝要小得多,也更不稳定。这并不奇怪,因为它们只需产生很微弱的力。

非肌肉肌球蛋白形成的纤丝较小,这只是区别于骨骼肌肌球蛋白的三大特征之一。另外两个特征是,非肌肉肌球蛋白的活化,像平滑肌肌球蛋白一样,依赖于肌球蛋白轻链的

磷酸化作用(见 538 页),以及磷酸化作用诱导非肌肉肌球蛋白分子装配成为小双极聚集体,其中的 10—20 个肌球蛋白分子(同骨骼肌粗丝中 500 个左右的肌球蛋白分子相比),是通过其尾区的聚集作用而结合在一起的(图 10-62 和 10-63)。像平滑肌肌球蛋白一样,磷酸化作用由通过 Ca^{2+} 刺激的肌球蛋白激酶催化,以致非肌肉肌球蛋白的聚合状态及其同肌动蛋白丝相互作用的能力,均可为液中游离 Ca^{2+} 浓度的细微变化所改变。细胞内 Ca^{2+} 的这种变化通常在应答细胞外信号时出现。



图10-60 显示非肌肉细胞中三种不同式样的肌动蛋白丝收缩束的图解。这些收缩束还含有肌球蛋白及其他结合肌动蛋白的蛋白质。

肌动蛋白丝往往锚着在细胞膜内²⁹

会收缩的装置,为发挥机械力就必须锚着在其他细胞成分上。因此,即使不是多数也是许多肌动蛋白丝,都是以其一端锚着在细胞膜上的。甚至对于非收缩性的肌动蛋白装置也是如此(例如,前已述及,微绒毛核心中的肌动蛋白丝不仅以其顶端,而且沿其长轴附着于覆盖的质膜)。培养细胞中的应力纤维也终止于质膜上的称之为附着斑的特化区域(图 10-64)。然而,这种膜附着物在收缩环及带状桥粒肌动蛋白束中的功能意义却极为清楚。因为这些肌动蛋白束的收缩会压缩细胞表面,所以它们必定是直接或间接地同质膜相连的。

肌动蛋白丝是怎样附着到膜上去的尚不清楚。在某些情况下,可见到明显的束状物质从肌动蛋白丝末端伸到质膜(图 10-65)。在另一些情形下,有力的旁证证明称为纽带蛋白(vinculin)的连结蛋白参与。用荧光抗体已经证实,无论是在应力纤维末端的粘连斑或是在带状桥粒中,都鉴定出有纽带蛋白。虽然这一结果表明,纽带蛋白可作为一种锚蛋白(anchoring protein),将肌动蛋白丝连接到质膜上,但其本身并不是一种膜蛋白,故其很可能是用作在肌动蛋白与膜的整合组分之间起连接作用。

变形运动和成纤维细胞移动均有赖于肌动蛋白丝³⁰

肌动蛋白丝的最复杂的动态装置或许是涉及细胞运动的。如同本章最后一节所强调的那样,诸如移动之类的细胞运动,包含着许多细胞骨架成分的协同作用。然而,最直接的依靠,还是正好位在所有细胞质膜下方的一薄层较紊乱的肌动蛋白丝。对此卵表层活性,最易在某些原始真核生物如变形虫及原质团粘菌(plasmodial slime molds)中进行研究。变形虫就是借助不断伸出和缩进的粗短突起而运动的。这种突起看来就像微肢一样支持着虫体,而被称之为伪足(图 10-66)。这种伪足很大(在巨形变形虫中大于

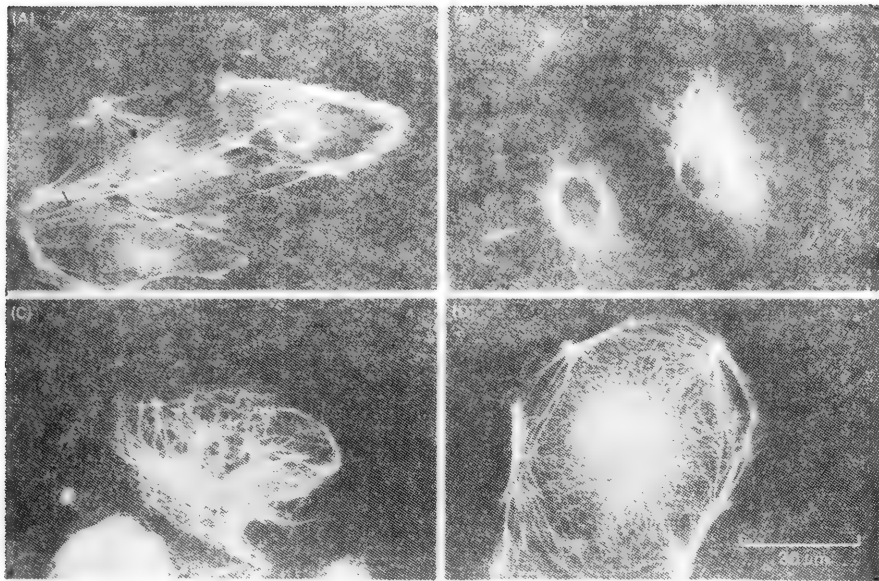


图 10-61 间期的表皮细胞免疫荧光显微镜照片。这些细胞已用下列抗体标记：(A) 抗肌动蛋白抗体，以显示称为应力纤维的肌动蛋白丝束；(B) 抗波形纤维蛋白的抗体——一类中等纤维的组分；(C) 抗微管蛋白抗体，以显示胞质微管；(D) 抗角蛋白抗体，以显示这些细胞的另一类中等纤维。(Mary Osborn 赠)

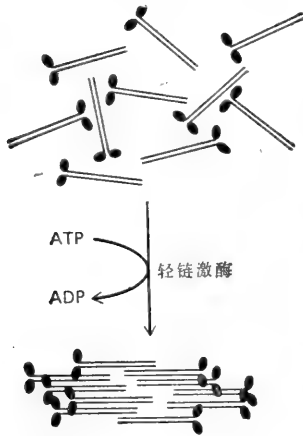


图10-62 由依赖 Ca^{2+} 的蛋白激酶催化的非肌肉肌球蛋白轻链的磷酸化作用，不仅会使肌球蛋白活化(如图10-21对平滑肌肌球蛋白所示的那样)，还会使肌球蛋白分子装配成为短双极聚集体。

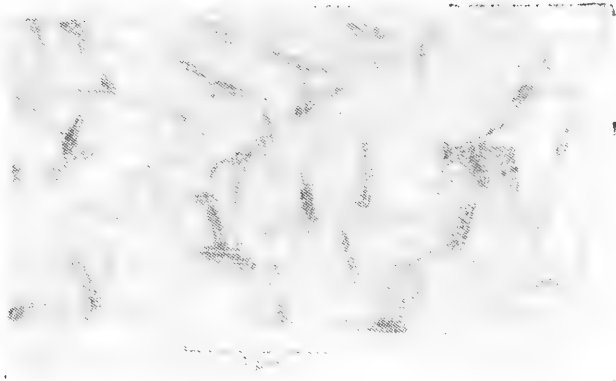


图10-63 通过轻链磷酸化诱导装配的非肌肉肌球蛋白短丝的负染的电子显微镜照片。(John Kendrick-Jones 赠)

100 μm)，在光镜下即可见到它们的皮质层及其他内含物，并且它们的运动很迅速，以致可以直接进行观察。

大多数脊椎动物细胞的移动完全不同于变形虫运动，它们显得极为缓慢。已用成纤维细胞——易于在培养条件下生长和迁移的结缔组织细胞，对脊椎动物细胞移动进行了

最广泛的研究。变形虫的直线长度比成纤维细胞大 10 倍，其运动又很缓慢，以致最易采用定时显微电影术或电视录像进行观察。当成纤维细胞运动时不断地由其前缘形成薄板

状突起称为板状伪足 (lamellipodia)。其中一些成为基质上的永久附着，但是在细胞上表面，会有许多以连绵起伏的波动式(有时称为褶皱)的运动缩回。手指状微刺可从板状伪足伸出，这些微刺也会缩回褶皱表面(图 10-67)。虽然像在组织培养中一样，只有当细胞具有游离的上表面时才会发生褶皱，但它很可能反映了表面膜的活动和(或)细胞内的运动，这也是细胞在其他情况下发生移位的原因。

尽管在变形运动与成纤维细胞的移动之间存在着明显差异，但其机制却可能基本相似。的确，一些脊椎动物细胞，如白细胞，也是以伸出伪足进行运动的，虽然它们的伪足要比变形虫的小得多，运动也不很迅速。而且，成纤维细胞的移动和变形运动对于分别阻止肌动蛋白丝聚合和解聚的结合肌动蛋白的药物细胞松弛素 B 和鬼笔毒环肽，都是敏感的。这说明两种不同形式的移动都有赖于肌动蛋白丝的装配和解聚。

为了解肌动蛋白的装配和解聚如何参与细胞运动，我们必须在转向肌动蛋白和各种结合肌动蛋白的蛋白质之间相互作用(可能在体外是这些运动的基础)之前，考察一下伴随变形运动的胞质运动。

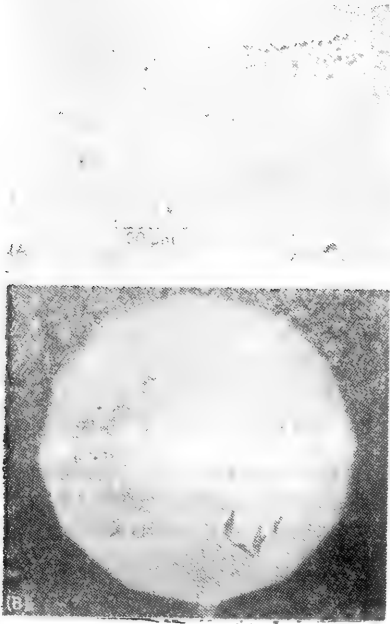


图 10-64 相差(A)和反射干涉(B)显微镜照片，示培养成的纤维细胞的附着斑。附着斑是细胞表面与一表面紧密接触的区域。用反射干涉显微镜进行观察最为清楚(B)，其中的光线是由附着在载玻片的细胞下表面反射的；附着斑表现为变暗的斑纹。(Julian Heath 赠)

变形运动伴随着胞质中的凝胶-溶胶转变³¹

借助光学显微镜检术，可将变形虫细胞质区分为两个区域：由流动胞质构成的中央核心，称为内质(也叫原生质溶胶)，充满折射颗粒和细胞器；周围的透明、凝胶状外质(或原生质凝胶)，相当于正常细胞皮质层的特厚变异体。当细胞伸出伪足，即可见内质顺伸出方向流出，同时像是在其顶端凝结成为较硬的外质；在细胞其他部位，看来外质在变为较易流动的内质而流向伪足。粘性外质与较易流动的内质之间的这些转变就叫做凝胶-溶胶转变。虽然对此尚有争议，但变形虫的运动，仍在某种程度上被认为是由于外质厚皮质层的收缩。这种收缩挤出了较易流动的内质，从而产生一种强有力的胞质流动，导致各伪足的伸出。在无细胞分隔的粘菌绒泡菌和巨型藻类细胞丽藻 (*Nitella*) 中，也会出现明显的胞质流动，这将在第十九章中详细讨论。

大量旁证表明，变形虫和绒泡菌中的胞质流动是一种依赖于肌动蛋白的运动：(1) 肌动蛋白丝肯定是这些生物体中最丰富的丝状蛋白，且集中于外质；(2) 当把结合肌动蛋白的药物鬼笔毒环肽注入这些生物体时，胞质流动便立即停止；(3) 这些细胞的胞质粗提



图 10-65 冰冻蚀刻电子显微镜照片，示肌动蛋白丝附着在鸡耳毛细胞质膜上的一个远离其实体纤毛的区域。深度蚀刻标本的断裂平面穿过质膜进入下面的肌动蛋白丝网络。细小的蛋白束(用箭头表示)把肌动蛋白丝末端连接在质膜上。(N. Hirokawa 和 L. G. Tilney 赠)

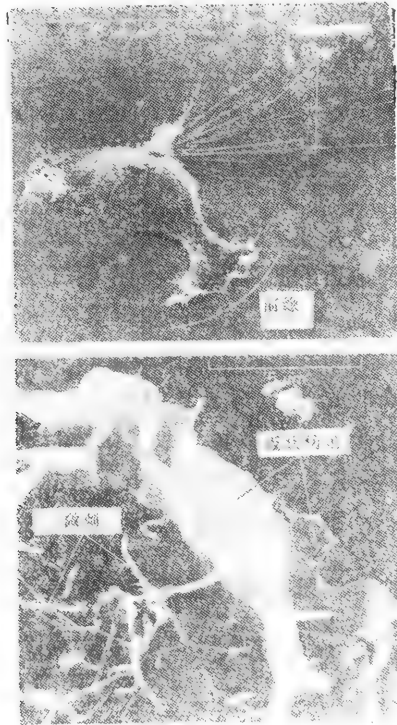


图10-67 在组织培养皿面爬行的人胶质细胞扫描电子显微镜照片。下图是该细胞前缘的一张特写，示板状伪足和微刺。(Ulf Brunk 和 Peter Collins 赠)

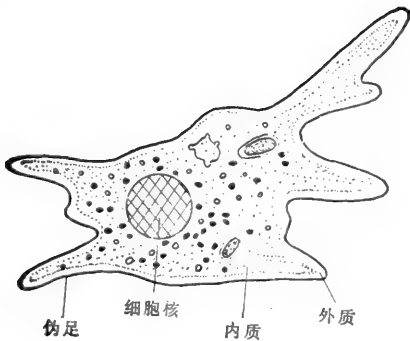


图10-66 正在运动的变形虫示意图。巨型变形虫直径可达 0.5 mm，肉眼可见。

物富于肌动蛋白,能够进行收缩而略显流动。

正是上述第三方面的证据使得研究胞质流动的分子基础成为可能,不仅变形虫,而且像巨噬细胞和成纤维细胞一类的脊椎动物细胞的富含肌动蛋白抽提物均能凝胶化、溶胶化、收缩,并且应答随周围基质的离子组成的轻微变化而呈现强有力的流动。这些抽提物的生化组成复杂,但它们都含有作为其主要纤丝组分的肌动蛋白,以及许多不同的结合肌动蛋白的蛋白质。

交联蛋白能产生一种肌动蛋白凝胶^{23,32}

像毛缘蛋白一样微小致密的交联分子,可将肌动蛋白丝平行整齐而牢固地结合在一起,成为紧密的肌动蛋白丝束(见图

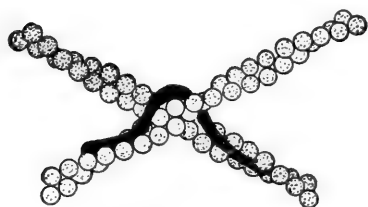


图10-68 丝蛋白通过形成两相邻肌动蛋白丝间的挠性连接而产生肌动蛋白丝的具有凝胶物理性质的三维网络

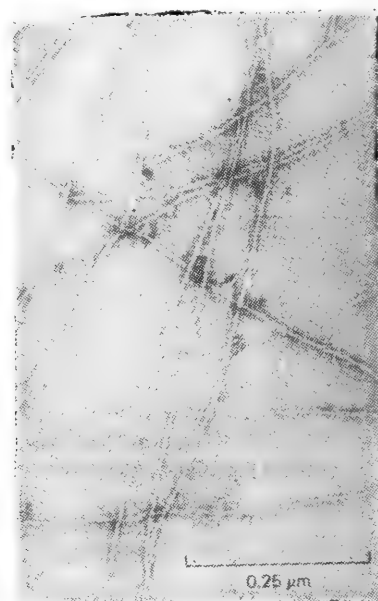


图10-69 负染的 α 辅肌动蛋白交联的肌动蛋白丝的电子显微镜照片。(引自 B. M. Jockusch and G. Isenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3005—3009, 1981)

10-57)。但并非所有的肌动蛋白交联蛋白都是这样起作用:有些很长而能弯曲,并且可连接任何靠近的肌动蛋白丝而不管其相对走向如何,因此产生一种无规则的三维网络(图10-68)。 α 辅肌动蛋白和丝蛋白(filamin)就是两种这样的蛋白质,最初由肌肉分离出,但现在知道在许多其他类型的细胞中也有类似的对应物。例如,丝蛋白是一种又长又能弯曲的分子,分子量约为250 000,在溶液中趋于形成二聚体。每个单体都有一个肌动蛋白丝的结合部位,故二聚体特别适于形成不规则的三维网络。如图10-69所示, α 辅肌动蛋白也具有类似作用。因此,即使向肌动蛋白丝溶液加入数量较少的丝蛋白或 α 辅肌动蛋白分子,对其物理性质也会产生显著影响——由粘性液体变为固体凝胶。

裂解蛋白能使肌动蛋白凝胶产生依赖 Ca^{2+} 的液化作用^{23,33}

在变形虫和其他细胞的胞质粗提物中,凝胶-溶胶转变对于 Ca^{2+} 水平极为敏感。游离 Ca^{2+} 浓度由 10^{-7} mol/L 增至 10^{-5} mol/L,即可使凝胶变为流体,并往往产生强有力的流动。

含有肌动蛋白丝和丝蛋白的重组凝胶不呈现这种 Ca^{2+} 敏感性。这就意味着,必定还有一些别的因子为介导 Ca^{2+} 作用所必需。已对许多候选蛋白质进行了鉴定。若将这些蛋白质加入由肌动蛋白丝和丝蛋白构成的凝胶,就会使其应答 Ca^{2+} 在与 Ca^{2+} 反应下

诱发凝胶而向液态转变。说明在 Ca^{2+} 存在下, 这些蛋白质同肌动蛋白的结合是如此强烈, 以致可以插入到肌动蛋白丝的亚基之间, 使其解聚 (图 10-70), 从而破坏了肌动蛋白丝借助丝蛋白形成的交联网络。每400个肌动蛋白分子, 只要加入不到一分子的这种裂解肌动蛋白的蛋白质, 即可导致凝胶化肌动蛋白丝溶液的粘度急剧下降。值得注意的是, 这种结合仅发生在 Ca^{2+} 水平超过 10^{-6} mol/L 时, 而此浓度通常只有在细胞对其环境改变

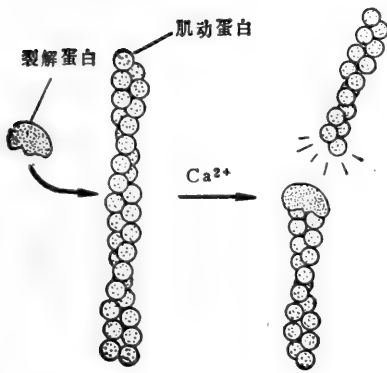


图10-70 裂解蛋白缩短肌动蛋白丝长度, 也许是通过与肌动蛋白分子的有力结合, 以致它们可以切断肌动蛋白丝。这种蛋白质在其作用时一般都是依赖 Ca^{2+} 的。被认为这样起作用的蛋白质, 有绒毛蛋白和凝胶溶胶素。

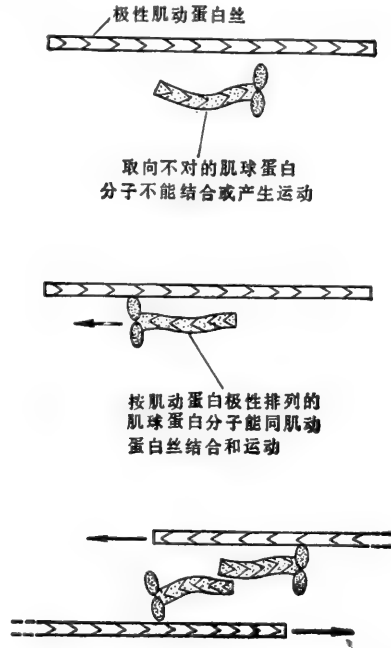


图10-71 图解非肌肉肌球蛋白分子的双极聚集, 怎能像在肌肉中一样, 产生极性相反的两肌动蛋白丝的滑动。

作出反应时, 才会在胞液中暂时出现。

经鉴定发现, 几乎在每一种脊椎动物细胞中, 均存有依赖 Ca^{2+} 的裂解肌动蛋白的蛋白质。最熟悉的一种是最初从巨噬细胞分离的凝胶溶胶素 (gelsolin), 另一种为肠刷状缘微绒毛主要蛋白质之一的绒毛蛋白。但自相矛盾的是, 当这些蛋白质加入游离肌动蛋白分子时, 它们也能作为肌动蛋白聚合的有效集结因子来结合少量肌动蛋白分子。这些蛋白质在活细胞中的基本功能, 究竟是缩短肌动蛋白丝, 还是起始其装配, 目前尚不清楚。

胞质凝胶收缩是由肌球蛋白介导的³⁴

由肌动蛋白丝、丝蛋白和凝胶溶胶素组成的混合物, 能够进行 Ca^{2+} 依赖的凝胶-溶胶转变。但是不像由细胞获得的粗制富肌动蛋白凝胶, 这种人工混合物不会收缩或显示流动。所缺少的因子看来像是非肌肉肌球蛋白, 因为只要选择性地除去粗制富肌动蛋白凝胶中的肌球蛋白就不再出现收缩和流动, 虽然抽提物仍能进行依赖 Ca^{2+} 的液化作用。这说明构成胞质流动基础的动力, 同肌肉收缩中的情形一样, 也是 Ca^{2+} 激活的肌动蛋白

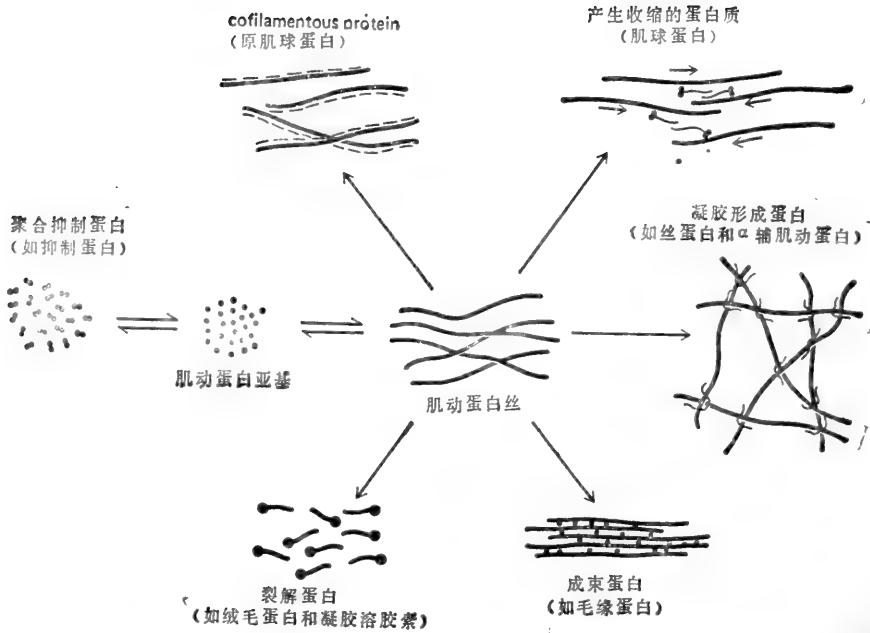


图 10-72 总结由结合肌动蛋白的蛋白质引起的各种肌动蛋白聚合状态变化的详细图解 (表 10-5)。为简便起见,仅显示出结合肌动蛋白的蛋白质的主要类型,并将各种蛋白质均图解为对肌动蛋白只有一种作用模式。把肌动蛋白丝系于其他细胞组分的锚着蛋白(如纽带蛋白)和尚未充分鉴定的各种加帽蛋白,则未示于此图。

与肌球蛋白间的相互作用。

当纤维呈毫无规则的三维网络分布时,肌动蛋白和肌球蛋白如何能产生连贯性的运动?至少在一个水平上看来答案似乎是,肌动蛋白纤维具有很明确的极性,只有当肌球蛋白头部取向与肌动蛋白丝极性相符时,才能同它结合并沿着它运动。因此,非肌肉肌球蛋白分子的小双极聚集体(见图 10-63)很可能是通过相对拉动两组肌动蛋白丝而构成微型肌节,即使肌动蛋白丝和肌球蛋白聚集体还不是一种高度有序的排列的一部分(图 10-71)。

表 10-5 非肌肉细胞中结合肌动蛋白的蛋白质的主要类型

蛋 白 质	在体外对肌动蛋白的作用
非肌肉肌球蛋白	同肌动蛋白丝相互作用而产生肌肉样运动的一种 ATP 酶
非肌肉原肌球蛋白	沿肌动蛋白丝长轴结合的一种棒状蛋白
丝蛋白、 α -辅肌动蛋白	在肌动蛋白丝间形成挠性交联而产生三维网络的蛋白质
毛缘蛋白	把相邻肌动蛋白丝连接在一起成为平行束的一种蛋白质
抑制蛋白	同肌动蛋白单体结合,从而限制其聚合的一种蛋白质
绒毛蛋白、凝胶溶胶素	Ca^{2+} 依赖的裂解肌动蛋白的蛋白质,也集结肌动蛋白丝的装配
加帽蛋白	同肌动蛋白丝一端或另一端结合而阻止肌动蛋白单体添加或丢失的蛋白质

虽然我们还远未详细了解胞质流动的分子基础,但肌球蛋白、丝蛋白及凝胶溶胶素与肌动蛋白丝的相互作用,却为这一现象的基本要素提供了模型。肌动蛋白丝可以通过同交联蛋白如丝蛋白的相互作用而产生一种凝胶样的网络。 Ca^{2+} 的升高则会通过裂解肌动蛋白的蛋白质如凝胶溶胶素的作用,引起肌动蛋白-丝蛋白网络粘度的急剧下降。而同样的 Ca^{2+} 升高,还会激活肌球蛋白分子,以相对拉动肌动蛋白丝,从而产生强有力的流动。

脊椎动物非肌肉细胞的一些结合肌动蛋白的蛋白质的性质,总结在图 10-72 和表 10-5 中。

小结

肌动蛋白见于细胞中的许多不同结构,并与大量不同的结合肌动蛋白的蛋白质相关联。借助毛缘蛋白之类的蛋白质交联的刚性平行肌动蛋白丝束,存于微绒毛和实体纤毛的核心,在那里起着主要的结构作用。同非肌肉肌球蛋白的短双极聚集体结合的肌动蛋白丝束,则见于需要肌肉样收缩的细胞特定区域,如分裂细胞的收缩环,上皮细胞顶部区域的带状桥粒和扁平的组织培养细胞的应力纤维。此外,在整个细胞质中,特别是正好位在质膜下方的皮质层中,还见有组织得不太好的,具有凝胶性质的肌动蛋白丝网络。这些网络,看来像是通过像丝蛋白这样一类能够弯曲和交联肌动蛋白的蛋白质形成的,而在裂解肌动蛋白的蛋白质如凝胶溶胶素介导下,则会出现 Ca^{2+} 诱导的粘度下降。根据这些网络与非肌肉肌球蛋白及使之停泊在质膜上的那些蛋白的相互作用,它们被认为是负责各种细胞表面运动的,并在复杂的细胞移动过程中起着决定性的作用。

中 等 纤 维

中等纤维是一类强韧而持久的蛋白质纤维,在多数真核细胞的电镜照片中,均呈直线或柔和的曲线排列(图 10-61)。其特定直径为 8—10 nm,因此正好介于肌动蛋白丝与微管之间(图 10-73)。它们在细胞承受机械压力的那些部位特别显著,例如沿神经细胞突起的长轴、相邻上皮细胞之间的桥粒附近及平滑肌细胞的细胞质各处。它们在保持骨骼肌中相邻肌节的 Z 盘相互对齐方面的作用,已在前面作过讨论。中等纤维是最稳定的细胞骨架成分,也是最难溶解的细胞组分:若以高或低离子强度溶液或去垢剂抽提细胞,大部分胞液及其他蛋白质纤丝都丧失,而中等纤维却留了下来。事实上,“细胞骨架”这个术语,最初就是杜撰来描述这些异常的不溶纤维的。

中等纤维是由大小差异很大的纤维状多肽构成的³⁵

若先用金属投影,再作电镜观察,中等纤维即表现为不规则的丝状分子,而与呈微球状结构的肌动蛋白或微管蛋白相反。在装配的中等纤维中,这些纤维状多肽被认为是并联结合,而成为一种类似胶原分子的绳索状结构。这样一种排列可以说明中等纤维的许多特殊性质。例如,它能产生抗张强度很高的纤丝,其强度在必要时还可通过增加亚基间的共价键来进一步加强。

况且,只要每个纤维蛋白有一部分参与形成中等纤维的相互作用,余下部分可有相当

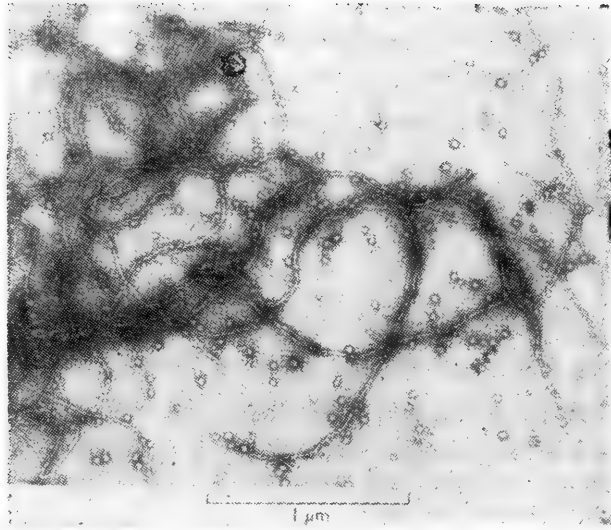


图 10-73 存在于海产蠕虫巨型轴突的轴质样品中的负染神经纤丝的电子显微镜照片。环状小体则为制品中的非纤维蛋白聚集体。(David Gilbert 赠)

大的改变也不致影响整个纤维结构。如下所述，中等纤维实际上是由大小范围异常广泛（从大约 40 000 到 200 000 道尔顿以上）的多肽构成的，它们在不同类型细胞之间和不同种的动物的同一类型细胞之间都不相同。例如哺乳动物轴突的中等纤维（神经丝），含有三种不同的多肽，其分子量分别为 70 000、140 000 和 210 000。而乌贼的神经丝，仅由 60 000 和 200 000 道尔顿的两种多肽构成。

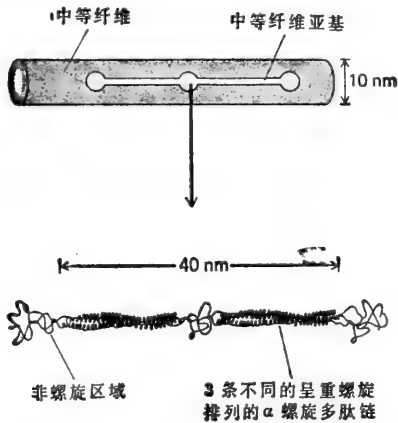


图 10-74 中等纤维的结构模型。基本亚基由三条纤维多肽组成。（据 P. Steinert, *J. Mol. Biol.* 123:49-70, 1978. 修改）

与此成为鲜明对比的是，肌动蛋白和微管蛋白的大小，在数十亿年中竟无明显改变。对此稳定性最合乎情理的解，就是由球状亚基装配多聚体，要求严格限制亚基三维结构的变异性——即使在大小或形状上的微细变化也会干扰装配过程。而中等纤维蛋白，则无类似限制。

多肽链在中等纤维中如何排列，尚不清楚。据认为，它们可能是每三条聚集成为一组，因此纤维亚基就是一个三聚体。生物化学研究表明，每条多肽都有两个不同的 α 螺旋区域。由此推想，一个三聚体中的三条多肽的这些区域会相互缠绕而呈重螺旋排列（图 10-74）。多肽链的其他区域 α 螺旋较少，既可用以稳定纤维，又可从纤维表面突出，以同其他细胞质组分相互作用。正是这些并不

直接参与纤维形成的区域，可能会在中等纤维蛋白簇内的不同多肽之间显示出相当大的差异。

中等纤维解聚可能需要破坏纤维⁶⁶

在存在于细胞质的条件下,中等纤维的分子装配很可能是不可逆的。既无细胞内存在着一个未聚合的中等纤维蛋白库的证据,也无像肌动蛋白和微管蛋白那样,在其可溶形式与聚合形式之间存在一种动态平衡的证据。这种稳定性便提出了如何进行控制的重要问题。细胞是否能够调节所含中等纤维的数量或长度? 如果能够的话,又是怎样实现的。

能够专一地降解一种或另一种中等纤维的蛋白水解酶的发现,已给这些问题提供了部分解答。这些酶的大多数在体外均可被 Ca^{2+} 所激活,但它在活细胞内起作用的条件尚不清楚。然而,细胞能够使其中等纤维解聚的唯一办法,可能就是通过酶切使其多肽成为较小片段。

不同类型的细胞含有不同组成的中等纤维⁶⁷

有多种不同的中等纤维,各由一组不同蛋白亚基构成(表 10-6)。通常一种细胞类型只含有一种中等纤维(图 10-75): (1)神经原含有神经丝,脊椎动物的神经丝由三条不同的中等纤维多肽组成通常称为神经丝三联体。(2)上皮细胞含有角蛋白丝[也叫张力丝(tonofilaments)],这种纤丝是由数量不定的、密切相关的角蛋白构成的。(3)多数的其他细胞则具有由 55 000 道尔顿的波形蛋白(vimentin)组成的中等纤维,这种蛋白质可与其他细胞类型专一的亚基共聚合。例如,肌肉细胞的中等纤维含有波形蛋白和一密切相关的蛋白质,结蛋白,而星形细胞(中枢神经系统中一类特殊的支持或胶质细胞)具有大型中等纤维束由波形蛋白及 50 000道尔顿的胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein)组成,称之为神经胶质丝 α 。成纤维细胞和许多其他类型细胞的中等纤维似乎主要由波形蛋白构成。

表 10-6 脊椎动物细胞的中等纤维

中 等 纤 维	多肽组分(分子量)	细 胞 类 型
角蛋白丝	各种角蛋白 (40 000—650 00)	上皮细胞
神经丝	神经丝三联 体蛋白(70 000; 140 000;210 000)	神经原
含有波形蛋白的纤丝	波形蛋白 (55 000)	成纤维细胞和许多其他类型 的细胞
	波形蛋白 +胶质原纤维酸 性蛋白(50 000)	某些胶质细胞
	波形蛋白 +结蛋白(51 000)	肌肉细胞

为什么会有这么多不同的中等纤维蛋白? 这种异质性暗示,这些纤维在不同类型细胞内介导的相互作用多少有点不同。在不同类型细胞中,通过添加不同辅助蛋白赋予肌动蛋白和微管蛋白的大量差异,可能就是通过多肽组分上的差异而传给了中等纤维。

角蛋白丝加固了上皮细胞层³⁹

在上皮细胞层内,相邻细胞是通过叫做点桥粒的、铆钉似的牢固联结而机械地结合在一起的(见660页)。在其内(细胞质)表面,这些联结作为角蛋白丝的锚着部位,使其形成遍及各上皮细胞的不规则网架(图10-61D)。因为另一种纤维能越过细胞外空隙,从一个细胞伸到另一个细胞,把点桥粒的两半连接起来,角蛋白丝即成为连续蛋白丝网架的一部分,在整个上皮细胞层内伸展而使其具有抗张强度。

角蛋白丝也见于高等动物的坚韧外壳。这些纤维累积在成熟上皮细胞的细胞质中,逐渐相互交联和部分地通过二硫键同相关蛋白交联。细胞最终死亡,但其角蛋白却继续存留,构成动物体表坚韧的保护性外层(第十六章)。毛发、指甲,以及皮肤表层就是这样形成的。

角蛋白丝可通过破坏其二硫键和以尿素之类的变性溶剂抽提蛋白质而进行溶解。这样得到的多肽极为多样,甚至来自像牛鼻上皮这样一种单一组织的角蛋白,也由6种或更多种相关蛋白质组成。而且同一动物的不同部位如蹄和鼻的角蛋白组成也稍有不同,它们是由不同族的相关角蛋白基因编码的。角蛋白的这种多样性,或许并不奇怪,因为这些蛋白质起着重要而又多样的作用:它们不仅给动物设置了防止热量和水分散失的头道屏障,而且还给动物提供了伪装、防护器官和装饰。

中等纤维是否具有非结构功能?³⁹

一些其他类型的中等纤维好像也具有结构作用。例如骨骼肌的中等纤维,看来像是通过将Z盘边缘系在一起而使相邻肌原纤维保持对齐(见图10-17),而神经丝则被认为是用来加强神经细胞轴突的,其长度可在一米以上,通常作为较固定的结构存留于动物一生。

然而,在其他细胞中,中等纤维的分布对其功能提供的线索却很少。例如在培养成的

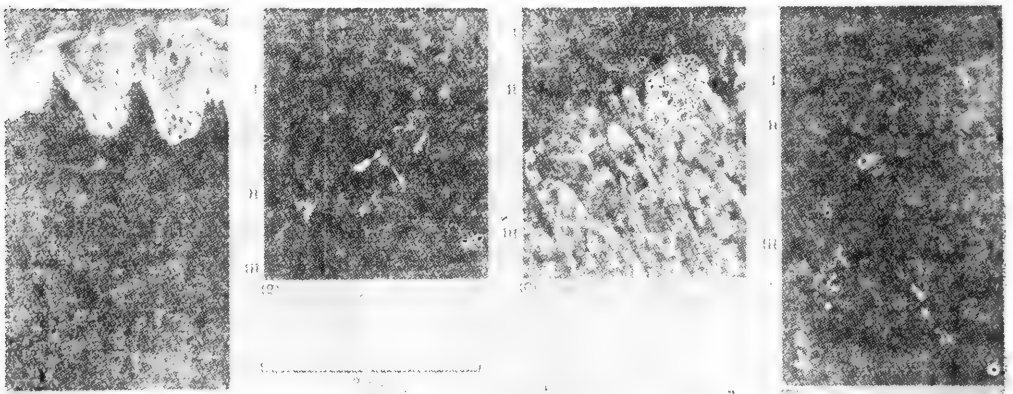


图10-75 用各种中等纤维蛋白抗体染色的大鼠舌冰冻切片的免疫荧光显微镜照片。(A)抗角蛋白抗体使I层的上皮细胞染色;(B)抗波形蛋白抗体使主要位在II层的成纤维细胞及血管染色;(C)抗结蛋白抗体使III层中的肌肉细胞染色;(D)抗神经丝抗体使II、III层中的神经突起染色。(引自M. Osborn, N. Geisler, G. Shaw, G. Sharp, and K. Weber, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46:413-429, 1982)

纤维细胞和白细胞中,它们呈不规则网络(图 10-61)。如果中等纤维仅仅是维持张力的要素,为什么会有这么多不同种类的多肽?而多肽的于纤维形成本身似无必要的那些区域的功能又是什么?

由于缺乏像秋水仙碱及细胞松弛素那样能分别专一地破坏微管和肌动蛋白丝的试剂,能专一地破坏活细胞内的中等纤维,直到最近探索中等纤维的功能仍很困难。然而,现在已有可能将同中等纤维反应的单克隆抗体注入培养细胞。注入成纤维细胞的这种抗体导致含波形蛋白丝瓦解,在近核处形成一个致密的帽子。令人惊奇的是,抗体对于细胞生长、分裂、运动或形状都没有影响。因此,这些中等纤维的功能可能太细微了,以致无法通过显微镜检查培养细胞来辨别。

小结

中等纤维是由纤维性多肽组成的绳索状多聚体,在细胞内起着结构或维持张力的作用。已知种种组织所含的专一多肽类型的不同形式包括:上皮细胞的角蛋白丝、神经细胞的神经丝,以及成纤维细胞和多数其他细胞的波形蛋白丝。不同类型中等纤维的多肽的氨基酸顺序不同,其分子量也常显示出巨大变异。然而,它们都含有被认为参与纤维形成的同源区域。非为纤维形成本身所必需的那些区域很可能在其他尚未确定的细胞功能中起作用。

细胞骨架的组织结构⁴⁰

到此为止,都是把微管、肌动蛋白丝和中等纤维作为它们是独立的细胞组分来处理的。但是很明显,细胞骨架的不同部分必须连接在一起,其功能也必须相互协调,才能调节细胞的形状变化,产生不同类型的细胞运动。例如,当成纤维细胞在培养中变圆直到分裂时,整个细胞骨架即被重新组织:应力纤维和胞质微管解聚,同时有丝分裂纺锤体及随后收缩环形成,一切均按有控制的活动顺序进行。遗憾的是,关于细胞骨架三种主要纤丝系统之间的相互作用却知道得很少,而对于协调这些系统中出现的许多变化的分子机制则了解更少。

在电镜下可见到细胞骨架呈三维结构⁴¹

细胞生物学中最老的争论之一是有有关细胞质的组织结构。使用显微镜对活细胞所作的最早观察揭示,细胞质是一种粘性液体,可从较流动状态变为类似于一种变形的固体状态。1870—1885年间,由于细胞在固定和染色后所呈现的形象,细胞质才被广泛认为含有由蛋白纤维构成的三维网状结构。这种观点曾遭到一些组织学家的激烈反对,他们认为在固定之后所见到的网络是一种假象,它是由粗暴处理细胞产生的凝固蛋白构成的。在100年后的今天,仍能听到类似争论,尽管他们现在涉及的是直径颇小而只能在电镜下见到的纤维。

常规的薄切片电镜术,不是一个观察细胞质内蛋白丝三维排列的好办法。由于切片太薄,以致不能给纤维整个几何结构提供任何指示,且难以辨别纤维之间是否存在连接,或甚至在许多情况下,难以区分不同纤维类型。现已有几种使用电镜观察较厚胞质层的方

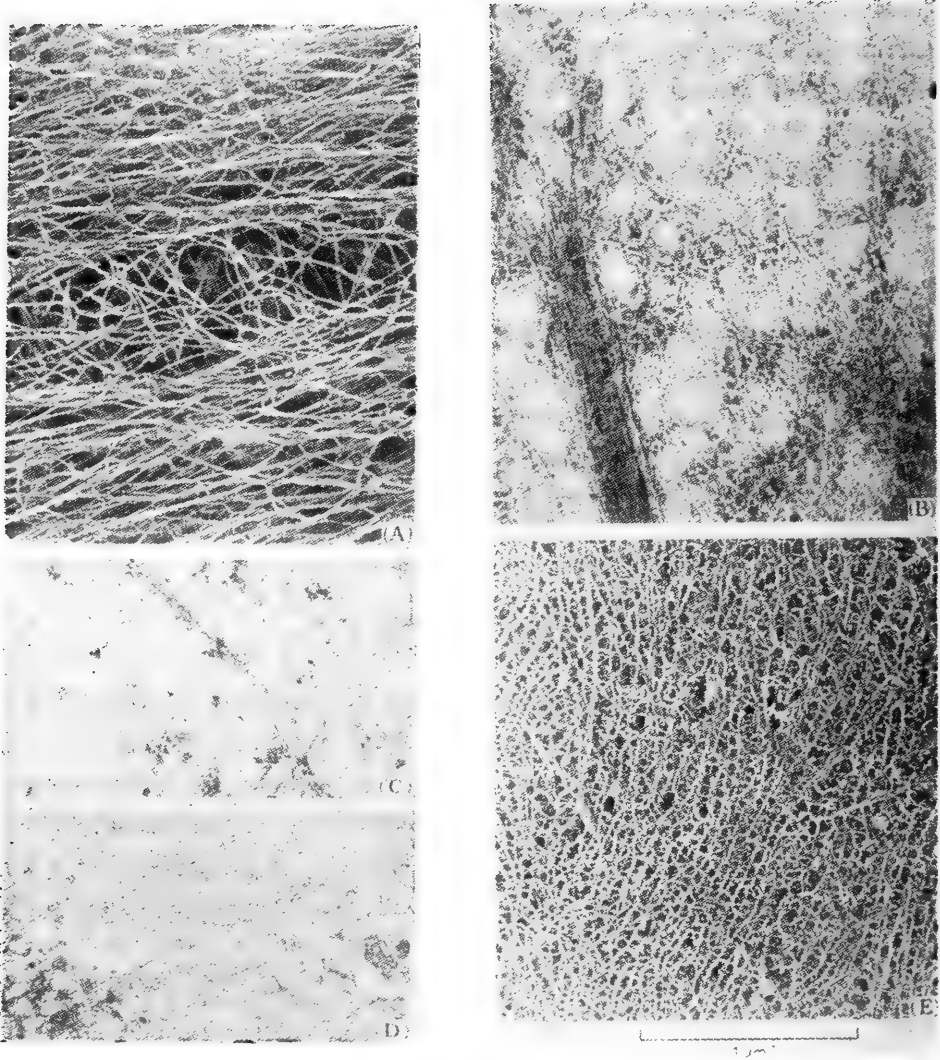


图 10-76 按不同制备程序获得的细胞质照片。(均按同一放大倍数)

(A)经非离子去垢剂抽提的成纤维细胞胞质的深度蚀刻电子显微镜照片。成左右走向的松散束排列的大部分较直的细丝都是肌动蛋白丝,而交叉的那些细丝(位于显微照片中央)则主要是中等纤维。(John Heuser 和 Marc Kirschner 赠)

(B)位于培养人胶质细胞较薄部位的负染蛋白质丝的电子显微镜照片。由于细胞是在非离子去垢剂存在下固定的,故其可溶性蛋白质已经丢失不少。(Uno Lindberg, Anna-Sina Höglund 和 Roger Karlsson 赠)

(C)经去垢剂抽提的部分培养成纤维细胞的高压电子显微镜照片。肌动蛋白纤维是以肌球蛋白的S1片段装饰的。(Manfred Schliwa 赠)

(D)除未用去垢剂抽提外均按图 10-76 C 制备的部分细胞的高压电子显微镜照片。胞质充满广泛的由蛋白质细丝构成的三维网络——所谓微梁网络。(Manfred Schliwa 赠)

(E)未经去垢剂抽提的大鼠轴突的深度蚀刻电子显微镜照片。蛋白质细丝彼此通过交联广泛连接,交联在适当位置表现出周期性地排列。(S. Tsukita 和 H. Ishikawa 赠)

法,由此获得的代表性照片(均约按同一放大倍数),已示于图 10-76。

用非离子去垢剂抽提细胞时所得的图像最为清晰,因为这样可以除去细胞的磷脂和可溶性蛋白。经此处理后的细胞,再作快速冰冻、深度蚀刻,即可揭示出一种特别引人注目的细胞骨架图像(图 10-76 A)。各个肌动蛋白丝和中等纤维仍留在原位,微管在特定条件下也可保存下来。不同类型的蛋白丝可按其直径鉴定,而在某些情况下则可按其蛋白亚基的排列来鉴定。细胞在用去垢剂抽提后,再以重金属显色,也可得到类似的细胞骨架图像:由于细胞边缘很薄,以致往往毋需切片,即可在电镜下进行观察(图 10-76 B)。也可在高压电镜下观察细胞质的厚切片(图 10-76C)。在这些图像中,看来三种类型的蛋白丝大多是分开的,如果有连接在一起的也只是通过偶然的交联。

然而,在未经去垢剂处理的细胞内,细胞骨架的网状结构却看来完全不同。这种细胞可在高压电镜下观察(图 10-76 D),也可在快速冰冻和深度蚀刻后再行观察(图 10-76 E)。现在看来,细胞骨架的主要纤维像是由细丝组成的三维网络来广泛连接的,而构成细丝的则可能就是在用去垢剂处理细胞时被除去的蛋白质。这种网状结构已被称之为微梁网络(microtrabecular network)。目前还不能确定,这种纤细的网络是否是活细胞内的细胞骨架的组成部分,或是由于可溶性大分子在固定和脱水过程中聚集所致。然而,已有足够证据表明,细胞骨架的各种纤维系统都是互相连接的,甚至许多通常被认为是可溶性的和自由扩散的组分,实际上在活体中也是同细胞骨架相关联的。

细胞器和可溶性蛋白会同细胞骨架结合

细胞中的肌动蛋白浓度极高——某些部位达 50 mg/ml 以上。正是这个缘故,可以发现凡具有结合肌动蛋白倾向的任何蛋白质,即便很弱,都至少会同肌动蛋白或肌动蛋白丝或两者暂时结合。

确有不少迹象表明,活细胞的其他组分也会同细胞骨架各个部分结合。膜包围的细胞器,如线粒体和溶酶体,往往会以一种称为跳跃运动(saltatory movement)的特有方式各自运动,即爆发式地迅速沿直线向前移动,但常无踪迹可寻,有时稍事停顿,在再移动:前常按原路返回,惟有时改变方向。往往在电镜下可以见到从这些细胞器伸展到邻近蛋白丝的细微连接。常可见成簇的胞质核糖体与蛋白丝相结合;若用非离子型去垢剂对细胞进行抽提,大量蛋白质合成装置便会与细胞骨架一起存留下来。更令人惊异的是,可溶性酶,例如一些参与酵解的酶,看来是同肌原纤维中的肌动蛋白丝及成纤维细胞的应力纤维结合在一起的,这用免疫荧光即可将其检测出来。

关于神经细胞轴突中蛋白质组分运输的研究也有有力地表明了可溶性蛋白同肌动蛋白的结合。若将神经细胞与放射性氨基酸一起短暂温育,细胞体内合成的细胞骨架蛋白便成为标记蛋白,随后即以每天 1 mm 和 5 mm 的缓慢而稳定的速度,沿轴突输送到神经末端——一个叫做慢轴突运输的过程。在此范围内,经鉴定出的两种主要慢运输速度是在这样的范围内:一个很慢的组分几乎全由微管蛋白和神经丝蛋白组成;稍快的组分包括肌动蛋白及大量其他蛋白质的集合物(图 10-77)。有趣的是,一些通常被认为是可溶性的酶,如肌酸激酶和烯醇酶,也在随肌动蛋白移动的蛋白质之列。因为这些蛋白质作为一条独立的放射性带移动,可达数周乃至数月之久,足见它们不能在细胞质中自由扩散。加之,其移动速度又与肌动蛋白相同,因此似乎有理由推断,它们是以某种物理方式同肌动

蛋白丝结合的。

总之，这些观察在我们的细胞图像中引入了一个新的层次水平。不仅像蛋白丝这样一类不溶性组分通过专一结合的相互作用连接在一起，而且胞液中的许多以前认为是可溶性的和自由扩散的组分也是如此。

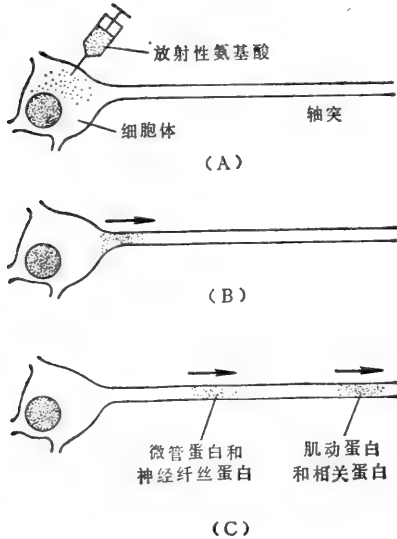


图10-77 如何测量神经轴突中蛋白质慢运输的图解。(A) 神经细胞中的蛋白质为一次用于细胞体的放射性氨基酸的脉冲标记所标记。(B) 一些放射性蛋白质被按每天1至5 μ m的稳定速度沿轴突输送。(C) 几天后，可以分离得到两个不同的带有不同细胞骨架组分的放射性峰：移动稍快的一个含有肌动蛋白及大量其他蛋白质，其中一些通常被认为是细胞质的可溶性组分。时，细胞则表现正常。

最近已经证明，src基因的产物是一种专一性独特的蛋白激酶。这种激酶负责催化细胞蛋白一特定亚组中的酪氨酸残基的磷酸化作用，从细胞骨架的观点看来，细胞蛋白中最有意义的是组带蛋白。如上所述，这种蛋白质与粘着斑结合，而被认为对在质膜上固着肌动蛋白丝束起作用。src基因产物对它的修饰可能引起在细胞被劳氏肉瘤病毒转化后所见到的细胞骨架变化。最为重要的是，这些观察提示，细胞的生长和分裂可能通常就是通过一种有组织的细胞骨架所接受的信号来调节的。

微管可能是细胞骨架的总组织者“

所有真核细胞都有它独特的空间几何结构，按其细胞器位置及外表面特征即可加以识别。细胞骨架的所有组分都反映了这种几何结构，但起决定性作用的似乎往往还是微管。众所周知，微管与细胞长轴成一直线，而在许多情况下，它们的存在对于维持细胞的不对称形状是必不可少的。例如，同秋水仙碱接触会抑制正在生长的神经细胞内长突起的发育，以及某些胚胎上皮细胞的预定伸长——显然都是通过阻止其微管的聚合。秋水仙碱对于一些诸如肌纤维或晶状体细胞之类的伸长了的成熟细胞则无影响。由此看来，后来由其他成分维持的形状由早期暂时存在的微管产生。

细胞骨架内的广泛变化是由转化病毒的单个基因产生的⁴³

组织培养中的癌细胞和正常细胞在生长潜能上的差异往往与细胞骨架的显著改变有关。癌细胞很容易在低血清浓度条件下生长，就是悬浮在琼脂凝胶中也能生长。而且当其铺满组织培养皿底时，不会像正常细胞那样停止生长，而是继续相互堆积直至达到很高密度(见600页)。伴随这些行为改变而出现的细胞骨架重组反映出两个变化：癌细胞通常较圆；应力纤维数目减少或甚至没有(图10-78)。

统称为癌转化的这些和其他变化，可在正常细胞中通过诸如Rous肉瘤病毒之类的肿瘤病毒感染而产生。这种使鸡致癌的简单病毒仅含四个基因，其中一个叫做src的基因就是导致转化的唯一原因：当此基因活化时，细胞即被转化而形成肿瘤；当此基因钝化

微管明显地影响中等纤维在多数培养细胞内的分布。例如在培养的成纤维细胞中,中等纤维以与胞质微管十分相似的辐射型式伸展,从一近核区域向周围延伸。若以秋水仙碱处理细胞,微管网络即迅速解聚(典型的不到 10 分钟),而中等纤维也在随后的数小时之内逐渐瓦解成为一个邻近核的致密纤丝帽。若将药物除去,微管即迅速重新聚合,中等纤维也慢慢恢复到它们的正常分布。

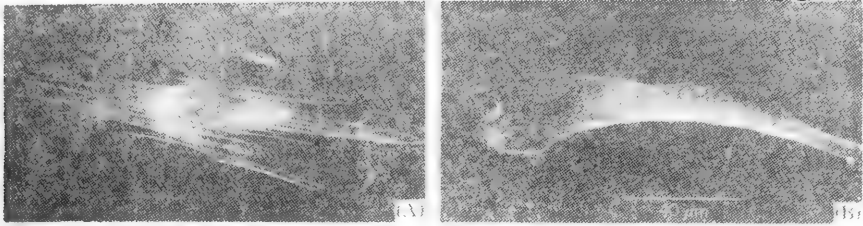


图 10-78 用结合肌动蛋白药物鬼笔毒环肽的荧光衍生物染色的。正常成纤维细胞(A)和肿瘤病毒转化的细胞(B)的免疫荧光显微镜照片。正常细胞具有许多显著的应力纤维,而癌变细胞即使有也很少。(引自 M. Verderame, D. Alcorta, M. Egnor, K. Smith, and R. Pollack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6624—6628, 1980)

有些证据表明,微管也会影响细胞内肌动蛋白丝的分布。最明显的例子,也许就是借以完成细胞分裂过程的收缩环。它总是在与有丝分裂纺锤体赤道垂直的平面上形成。因此,当两个一半纺锤体将两组染色体牵开时,一组染色体便被包入了一个子细胞(见第十一章)。在此情况下,基于肌动蛋白的收缩活性和基于微管的纺锤体活性的协调,显然是不可缺少的。事实上,若将有丝分裂纺锤体的形成部位机械转移,随后形成收缩环的位置就会相应改变(图 10-79)。

大量证据表明,微管还常常起着组构其他细胞质组分的临时支架作用。如在第十九章中所述,这种作用在植物细胞中尤其显著。例如,细胞的分裂平面就是由皮质微管暂时构成的早前期带(preprophase band)决定的,而其他微管则规定了纤维性细胞壁沉积的部位及取向(见第十九章)。在哺乳动物中,由微管构成的螺旋环正好缠绕在发育中的精子尾部轴丝周围,而后消失——仅留下一个为轴丝提供 ATP 的线粒体螺旋环(见图 9-4)。最后,关于微管的这种临时支架作用还有一个特别引人注目的例子。在昆虫飞翔肌早期发育过程中,微管在昆虫飞翔肌中同正在发生的粗、细肌丝一起形成有规律的排列(图 10-80)。不久这些微管消失,便留下了这种特化肌肉所特有的高度有组织的纤丝排列。

在培养的细胞中,基于肌动蛋白的各种局部表面活动,例如膜变皱、微刺形成和吞噬作用,往往看来像是发生在细胞的近微管末端区域,并且这些运动在细胞内的部位可为秋水仙碱处理而显著改变。例如,在秋水仙碱存在下,培养细胞的正常连贯运动就变得混乱了;此刻,膜皱褶出现在整个细胞外缘,致使细胞的运动“犹如无舵之舟”而不能直线运动。

因此,像是胞质微管决定细胞极性,并协调负责复杂细胞运动的各种细胞骨架组分。但是如前所述(第 559 页),许多微管本身又是由细胞中心组织的,故细胞中心可被认为是细胞的“指挥部”。为了支持这一看法,曾对正在迁移的组织培养细胞作了观察,表明细胞中心通常位在核的近变皱膜一例,两个中心粒中的一个常与迁移方向排成一线,而另一个则与培养基质成直角。

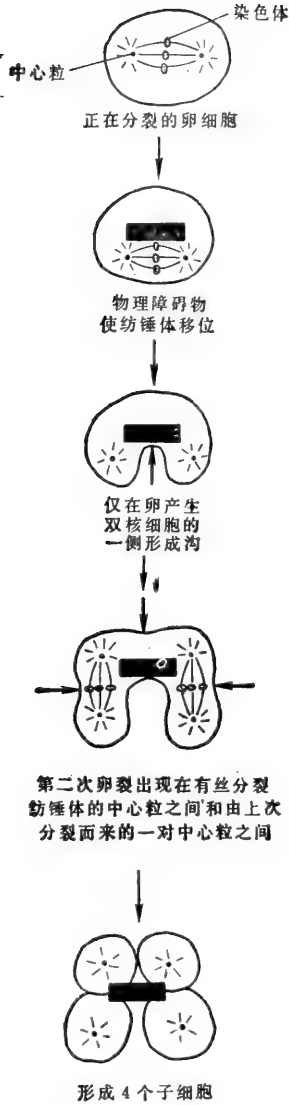


图10-79 示中心粒对细胞分裂平面影响的实验图解。若将有丝分裂细胞的纺锤体推至一侧,在细胞的另一侧就不会发生卵裂。随后的卵裂不仅出现在二有丝分裂纺锤体之间,而且还出现在此异常细胞中的、共有同一胞质但未经有丝分裂纺锤体连接的二相邻中心粒之间。似乎引起卵裂沟的肌动蛋白丝收缩束,总是形成于二中心粒之间的居中区域。



图10-80 处于早期发育阶段的昆虫肌肉的电子显微镜照片。粗、细肌丝聚集体(f)形成与胞质微管(t)并行。当聚集体组合成为肌原纤维时,微管消失,说明微管起着使粗、细肌丝整齐成列的临时骨架作用。(引自 J. Auber, *J. de Microsc.* 8:197-232, 1969)

细胞骨架使细胞能对固体表面的物理性质作出反应

许多种类的细胞,只有当其附着于固体表面时,才会合成蛋白质和增殖。尚不知如何行使这种控制,但有理由假定细胞骨架会以某种方式来参与。当细胞接触固体表面时,细胞骨架及随之细胞形状就会发生根本改变。看来在这些反应中,重要的是表面粘性或附着着力及其三维轮廓这两个表面物理特性。

可以很方便地在玻璃或塑料表面喷上很薄一层金属，制成人工粘性梯度。当细胞在此表面培养时，它们会显示出对粘性较高的金属覆盖部分的优先选择。成纤维细胞已被证明是沿着这样产生的粘性梯度迁移的，而且，在一类似实验中，正在生长的神经细胞轴突的尖端叫做生长核心，在培养皿上从粘性较低的区域伸展到粘性较高的区域。对于局部粘性差异的这种反应，可用细胞骨架的收缩性质来加以解释。从迁移细胞伸出的细长微刺含有一束排列松散的肌动蛋白丝，而显得有些收缩能力。例如，它们能拾起散开的碎片颗粒，并将其送回细胞。看来，像是这些结构能够通过它们的收缩来测试周围环境的粘性，从而起到细胞的“触角”作用(图 10-81)。



图10-81 图解表明位于生长轴突顶端的生长核心已伸出许多含有肌动蛋白的微刺(丝状伪足)。这些微刺不规则地伸出在周围表面，然后缩进生长核心。接触较粘区域的微刺，如同所示的那样，要缩进细胞不那么容易，因此便把生长轴突拉向那个方向。

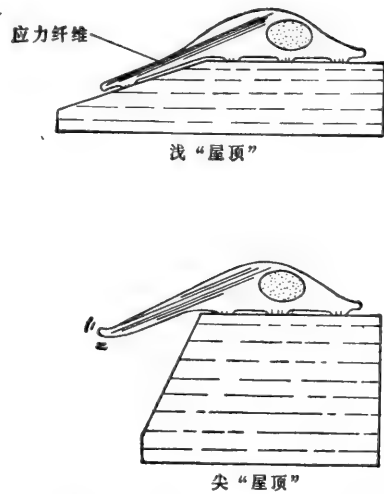


图10-82 如果角度太陡，成纤维细胞就无法越过玻璃“屋顶”。这可能是由于它那时不能在其前缘形成一束线性肌动蛋白丝(应力纤维)。

可在置于倒V形玻璃“屋顶”上的成纤维细胞中见到表面轮廓对于细胞运动的影响。只有当屋顶角度够大时，它们才能移过顶部，到达另外一侧(图 10-82)。同样当成纤维细胞被置于玻璃圆柱体表面时，也只有当圆柱体直径约小于 200 μm 时，它们同其长轴才成一线，而主要按此方向移动。在这两种情况下，细胞都沿曲率最小的路线进行迁移；细胞借以移动的一个可能的机制是依靠应力纤维的组织结构，如图 10-82 所示。

细胞骨架的组织结构可由亲代细胞传予细胞“

简单地讲，细胞骨架的组织结构与功能并不依赖于细胞核。失去核的细胞仍能附着于基质，改变其形状，迁移、摄取颗粒，等等。如果从成纤维细胞上脱落下小的碎片，细胞质膜就会分别将其封闭起来，而这种碎片(可能不到 1% 细胞体积)还会继续显示各种运动达数小时之久。一些仅会扩展膜皱褶，另一些只会伸出和缩进微刺，还有一些则会不断地

在其表面起泡。然而它们都不会移位，说明虽然在局部的细胞骨架亚装配物中会出现基于肌动蛋白的运动性，但整体运动要有局部运动的全面配合，这也许就是由从细胞中心发出的微管提供的。

其他证据表明，在细胞骨架中存有一种“记忆”形式。例如，当细胞在培养期间分裂时，往往在两子细胞中出现排列相似的应力纤维及细胞延伸物，而且当两子细胞分开时，其迁移路线也显示出相似性。但关于细胞骨架遗传的最可靠的例子是来自草履虫的研究。它是一种大型单细胞生物，表面覆盖着成排的可动纤毛。通常，纤毛均呈平行排列，以使挥动得高度协调。也可以通过实验处理打乱这种格局，产生一些其挥动方向与邻近纤毛相反的倒排纤毛(图 10-83)。这种改变了的型式一旦建立，就会永无止境地传给一代又一代的细胞。这种遗传形式同 DNA 无关：经过修饰的细胞通过它们的皮质细胞骨架遗传一种特殊纤毛排列型式。

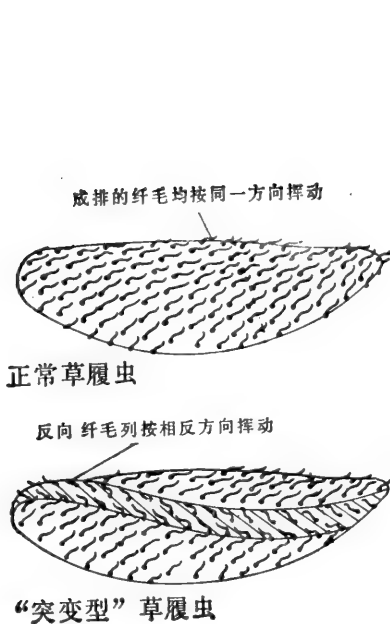


图10-83 图解正常草履虫表面的成排纤毛和“突变型”草履虫表面因排列颠倒而挥动方向相反的纤毛。这种改变了的型式会随草履虫分裂无限传递，即使 DNA 中的信息并未改变。



图10-84 蜗牛受精卵螺旋卵裂示意图。各箭头连接的均为上次分裂形成的一对对细胞(应将此图想像为箭头指向观察者的立体图像)。4 细胞期的带点细胞的所有后代在 8 细胞及 16 细胞期也带点。

直接遗传一种特定细胞骨架组织结构的能力，可能对于负责实现生物成体设计图的形态发生过程具有深远意义。发育的一个明显的例子见于蜗牛(*Limulaca peregra*)，其螺旋形外壳右旋或左旋，由遗传决定。成体的右旋或左旋早在发育的 8 个细胞时期便可在螺旋卵裂的不对称分裂方式(图 10-84)中看到了。胚胎的右旋或左旋，则由早期卵裂期间稍微偏斜的有丝分裂纺锤体位置所决定，而这种偏斜又是由母体遗传决定的：母蜗牛的基因型(不论是右旋还是左旋)决定了卵子的形态结构，而与其外壳形式无关。在卵子

发生过程中,母蜗牛大概产生了一个规定成熟卵子中有丝分裂纺锤体位置的因子,从而决定了胚胎的与其自身基因无关的螺旋方向。

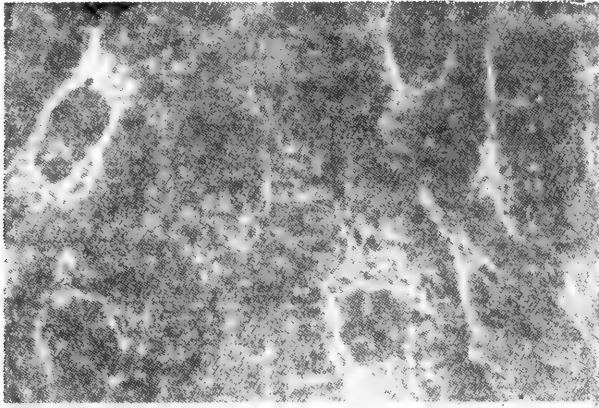


图 10-85 用抗中等纤维抗体染色的一层培养上皮细胞的免疫荧光显微镜照片。许多纤丝均像是连续地从一个细胞伸展到另一个细胞,即使细胞为其质膜及介入的胞外基质所隔开。(Michael Klymkowski 赠)

上述这些例子表明,一个细胞的细胞骨架会影响其子细胞的细胞骨架,乃至整个机体形态。但这种组织结构信息如何在细胞间进行传播,还是一个谜。

细胞骨架的组织结构可以穿过细胞膜

一个细胞的细胞骨架不仅会影响其子细胞的细胞骨架,而且还会影响同一组织中相邻细胞的细胞骨架。这种影响借以起作用的一个机制可能是通过形成细胞间的连接。这种连接能把细胞结合在一起,并可作为相邻细胞的细胞质中蛋白丝的固着位点。如图 10-85 所示在整个上皮细胞层中,中等纤维以连续型式穿过细胞层,即使细胞层是由许多不同细胞所构成。中等纤维图像中的这种连续性可能揭示出它们是固着在相邻细胞膜中的相应点上的。

一个细胞的细胞骨架借以影响相邻细胞骨架的另一机制,依赖于一个细胞的细胞骨架与细胞分泌的胞外基质间的相互作用。如第十二章中所述,一个具有极化细胞骨架的细胞,趋于分泌一种定向胞外基质,而这又会影响到与此基质接触的其他细胞的取向(见图 12-71)。由于通过细胞连接和胞外基质两者介导的细胞之间的相互作用,许多组织中的细胞的细胞骨架,可能是按照整个组织的型式,而不是作为一个个独立的单元进行组构。

细胞如何运动? ⁴⁷

尽管近年对于细胞骨架的了解已取得很大进展,但对吞噬、有丝分裂、跳跃运动和细胞移动这样一类重要运动的分子机制,尚不清楚。造成这种无知的一个重要原因是,负责这些运动的生化装置并不限于诸如一根纤毛或肌原纤维之类的单一结构,而是遍布在细胞各处。而且由于这些装置不太稳定,在破碎细胞时易于破坏,所以难以在功能状态分离

得到。

例如，可以研究一下沿组织培养皿表面爬行的成纤维细胞(图 10-86)。它在变皱过程中不断地从其前缘伸出板状伪足和微刺，其中一些附着于皿面，另一些则沿细胞上表面缩回。粘附于细胞表面的任何颗粒，以与褶皱一样的速度被带回。当细胞前端发生褶皱时，细胞后部仍然粘附在培养皿面，而随着细胞向前运动，便被拉成了很长的缩回纤维(retraction fibers)。这些纤维突然断裂，并缩进胞体，往往留下的只是一块粘附的质膜和胞质碎片。这种运动周期被一再重复，细胞即以每小时约 $40\mu\text{m}$ 的速度稳步向前爬行。

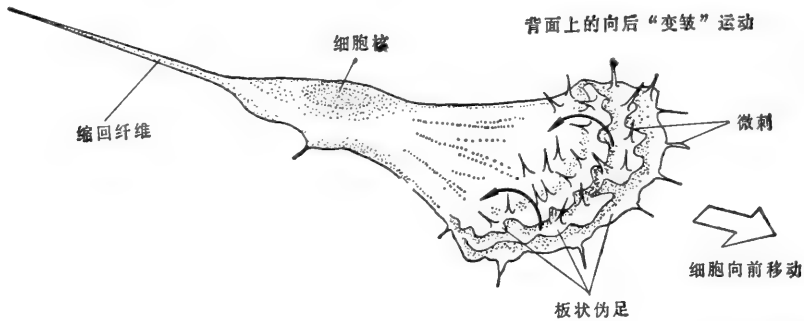


图 10-86 沿组织培养皿表面移动的成纤维细胞图解。(也见图 10-67)

为了越过一个表面，成纤维细胞至少必须完成下列三个过程：(1)它的前缘必须在此表面上伸展；(2)该前缘必须附着在此表面；(3)附着的前缘必须将细胞其余部分牵引向前

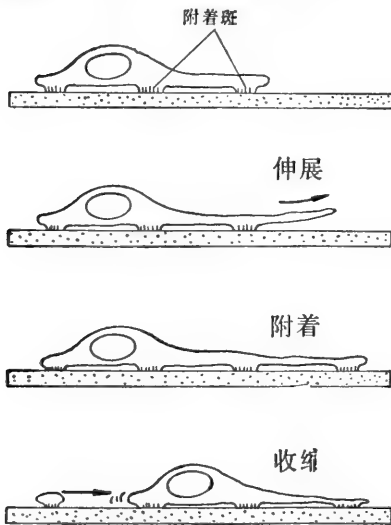


图10-87 成纤维细胞在一表面移动的主要过程的高度简略图解。伸展、附着和收缩周而复始地相继进行。(见正文)

(图10-87)。其中以牵引作用最易被了解，因为细胞含有排列整齐的肌动蛋白丝，它能够通过肌球蛋白的作用进行收缩。然而这些排列中的分子排列细节，以及纤维同组织培养皿和其他细胞骨架连接的可能方式，都还不清楚。

细胞前缘如何向前伸展就更难解释。可以设想各种机制：例如，通过皮质中肌动蛋白丝和肌球蛋白的用力挤压，会产生一种向前的胞质流动(变形虫内的情形可能就是如此)，或肌动蛋白丝有控制地聚合，会以类似于海洋无脊椎动物精子形成顶体丝的方式伸展前缘。围绕新突起所需的质膜，则可由伸出的细胞骨架推进，它或者可能通过胞吐作用优先在前缘加膜提供。质膜不断再循环的可能性，在于细胞前缘的胞吐作用和其他部位通过内吞作用进行的摄食活动——膜流动假说——已在第六章有关“加帽”机制部分讨论。

论。

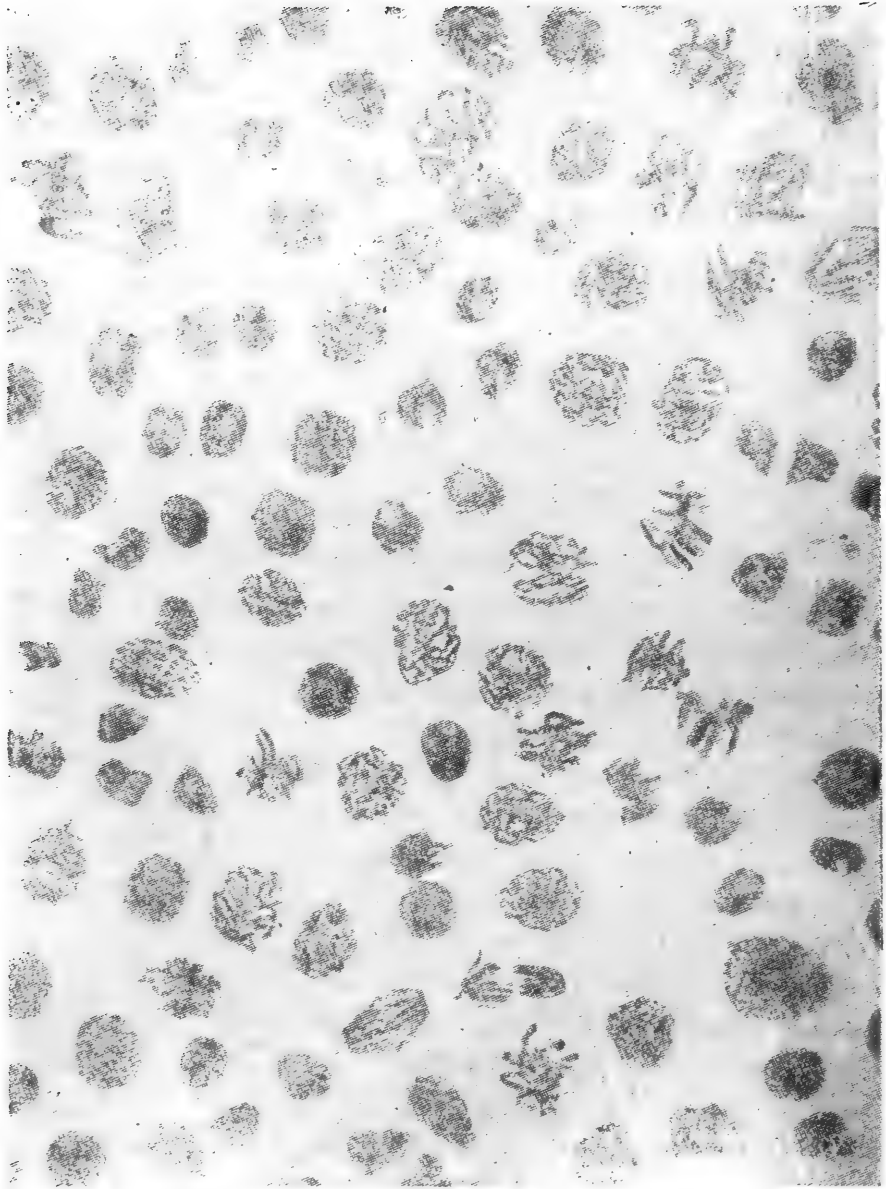
然而，成纤维细胞移动最神秘的方面，还是关于它的控制。如何协调像褶皱、板状伪足及微刺的伸出和缩回等各种局部运动，才能使整个细胞连贯地向前运动？细胞又怎能随

其环境变化而改变这些运动？这些仍是当今细胞生物学中最富挑战性的问题。

小结

肌动蛋白丝、微管、中等纤维及其相关蛋白，受一些尚不清楚的机制调节，而产生细胞形状变化和各種细胞运动。此外，细胞骨架似乎还能通过结合各种膜包围的细胞器及可溶性蛋白来组构细胞质。由细胞中心发出的微管决定了中等纤维的分布，并像是负责建立和维持细胞极性。一个细胞的细胞骨架的组织结构，会通过细胞间的连接或细胞外基质而受到相邻细胞的细胞骨架的影响，并能在细胞分裂时不断地传递给其子细胞。尽管最近在分析各种细胞骨架组分的分子组成方面，已取得巨大进展，但构成多数细胞运动的分子机制，还是一个谜。

【黄嘉陵译 潘玉芝校】



植物根尖的细胞,处在细胞分裂的各个阶段。(John Mcleish 赠)

第十一章 细胞生长和分裂

同宇宙中高度组织单元趋向于无序状态一样,细胞也经常发生耗损和偶然的变故。所以,任何单个的细胞必定要死亡。如果一个有机体要继续生存下去的话,它必须以与它的细胞死亡一样快的速率来产生新的细胞。由于这个原因,细胞分裂是一切有机体生命的中心。例如,在一个成年人,每秒钟必须有成百万细胞分裂,这仅足以维持其原有的形状。

细胞分裂过程在显微镜下清晰可见。它包含着两个连续的过程;核分裂(叫做有丝分裂, mitosis)和细胞质分裂(叫做胞质分裂, cytokinesis)。但是一个典型细胞在分裂之前,体积必先加倍,它的所有组成成分也要倍增。只有这样两个新的子细胞才将含有随着分裂之后开始它们各自生长周期所需要的所有成分。关于细胞分裂前大部分的准备工作是在细胞周期的生长期无形地进行着,这过程十分易为人误解地被叫做分裂间期(interphase)。

虽然一个细胞的大部分生命时间是处于分裂间期,只是间或出现细胞分裂时相,但是细胞周期的早期研究大多集中在短短的分裂活动(有丝分裂和胞质分裂),其主要原因是这些活动可直接用显微镜观察到。最近,通过较间接和精细技术的应用,我们也知道了细胞周期间期阶段的许多情况。这一章,我们将描述新近用于研究细胞周期的某些方法,考察细胞周期的调节,并讨论它的各个不同时期所发生的几个主要事件。虽然我们关于细胞周期分子基础的知识还是残缺不全的,我们仍将尽可能尝试来探讨其可能涉及的机制。

细胞分裂的控制^{1,2}

大部分细胞组分是在两次细胞分裂之间的间期继续不断地生成的。所以,很难把分裂间期中细胞生长进程划分为不同的阶段。DNA合成是一个显著的例外,因为细胞核中DNA只在分裂间期的一定阶段复制。这时期称为细胞周期的S期(S = synthesis, 合成)。细胞周期中另一个明显阶段当然是细胞分裂期,它包括核的分裂(有丝分裂)和随之发生的细胞质分裂(胞质分裂)。整个细胞分裂期称为M期(M = mitotic, 有丝分裂的)。这样,留下了M期与开始DNA合成之间的一个阶段,称为G₁期(G = gap, 间隙)和完成DNA合成与下一个M期之间的阶段,称为G₂期。因此,分裂间期是由连续的G₁、S和G₂三个时期所组成,正常时占据细胞周期全部时间的90%或更长。以高等真核生物快速分裂的细胞为例,中断分裂间期的连续的细胞分裂(M期)通常每隔16—24小时发生一次,而M期本身只持续1—2小时。图11-1说明典型的、包括这四个连续时期的细胞周期,插图说明中概要解说了某些主要的序列活动。

多细胞有机体中各种细胞的分裂速率非常不同³

在单细胞生物中,如细菌和原生动物,每单个细胞都受到强烈的选择压力,使之尽可能快速地生长和分裂。由此细胞分裂的速率一般说来仅受其从生活环境中吸取营养并转化为细胞物质的速率所制约。多细胞动物的情况则迥异。不同类型细胞在不同程度上限制其迅速分裂的能力,以便将它们的数目保持在对整体说来是最适的水平上,因为首要的是有机体的生存,而不是组成它的任何个别细胞的生存。其结果,人体的 10^{13} 个细胞按非常不同的速率进行分裂。某些细胞,例如神经元、骨骼肌细胞和红细胞,它们一旦成熟就不再分裂。其它细胞,例如包被身体内表面和外表面的表皮细胞(如在肠、肺和皮肤中),在机体整个生命期间均持续而迅速地分裂。有些细胞的生长和分裂周期的全过程却只要 8 小时。然而,多数动物细胞的行为是处于这两种极端之间的某一点:它们可能分裂,但却很少分裂。已观察的细胞周期时间(也叫世代时间, generation times)是在 8 小时到 100 天或更长的范围。

不同组织中细胞分裂速率的这些显著差异及其细胞周期时程可采用放射自显影来观

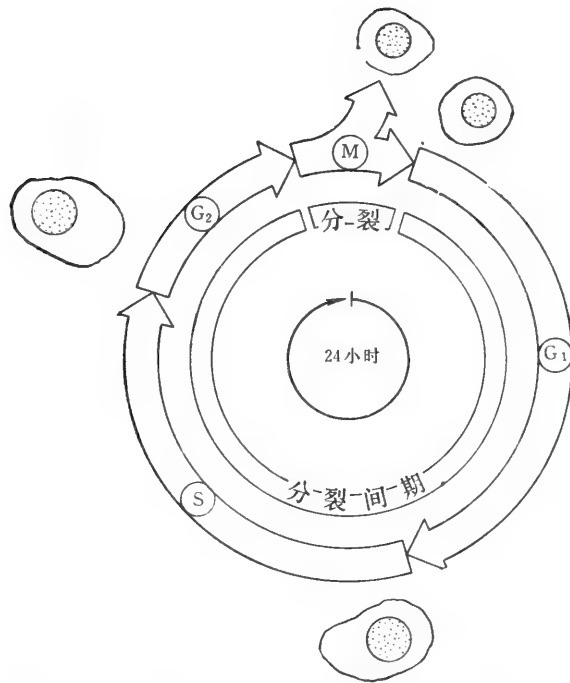


图 11-1 细胞周期的四个连续时期。M期由核分裂(有丝分裂)和细胞质分裂(胞质分裂)组成,其后,子细胞开始新周期的分裂间期。分裂间期开始于G₁期。当有丝分裂时生物合成的活动大大地降低,而分裂间期细胞重新恢复了高效率的生物合成。S期从DNA合成开始,结束于核DNA含量的倍增和染色体的复制(每条染色体这时含有两条相同的“姊妹染色单体”)。之后,细胞进入G₂期,这时期结束于有丝分裂的开始。M期开始于有丝分裂(所以以M表示),结束于胞质分裂。当M期的早期,复制的染色体由分裂间期的伸长状态浓缩起来,在光学显微镜下很容易见到。核被膜破裂,每条染色体经历着准确的有节奏的运动,其结果一对姊妹染色单体分开,核物质分裂,两个新的核被膜随着形成。细胞质分裂产生了两个子细胞,每个细胞含有一个细胞核。胞质分裂过程结束了M期,并标志着下一次细胞周期间期的开始。虽然,这里说明的是典型的24小时周期,

而高等真核细胞中细胞周期的时间长短差异很大,其主要在于G₁期的长度(见正文)。

察和测量。放射自显影术提供了一个途径,专一地标记那些为分裂作准备而合成着 DNA 的细胞。对一个动物反复注射氚标记的胸腺嘧啶,这是一种每个细胞 DNA 合成必不可少的化合物的放射性前体。在注射后一定时间,从动物身上取出组织,洗去未结合的胸腺嘧啶,按显微镜术固定,再切成约一个细胞厚的薄片。然后在这组织切片上涂上一层薄薄的照相乳胶,并曝光数日或几个星期,之后按照通常照相底片的方法来显影。那些在示踪处理时间中正在合成 DNA 的细胞,即处于 S 期的细胞,可以因整个核区出现银粒而被认出(图 11-2)。依次延长动物经放射性胸腺嘧啶的处理时间,从用这方法标记的细胞比例,就可能测定出相邻的 S 期之间的时程。这类试验证明了细胞周期的时间是十分不同的,甚至在同一组织的细胞间也是这样。例如,图 11-3 说明了肠道表层上皮细胞的周期时间随细胞在表皮细胞层上的位置不同而有多大的差异。

细胞周期时间的差异主要由于 G₁ 期长短的不同⁴

分裂快速与缓慢的细胞间的基本差别是它们的细胞周期中 G₁ 期所经历的时间长短不同。某些细胞分裂很慢,它们停留在 G₁ 期好几天,甚或数年。相反,一个细胞从 S 期开始至有丝分裂所经历的时间非常恒定,与其分裂速率没有关系。

细胞生长在离体培养条件下,环境条件可容易地控制和调节,这样能更精确地测定细胞周期。采用以下方法可以使培养中细胞的分裂减慢或停止: 限制主要营养物供应,去除细胞必要的蛋白质生长因子,添加小量蛋白质合成抑制剂,或使细胞过于密集。不论哪种情况,细胞周期均停顿在 G₁ 期。这发现表明细胞一旦通过 G₁ 期,就注定能完成 S、G₂ 和 M 期。事实上,试验证明这不可逆转的点——称为限制点(restriction point, R 点或 R)——是处于 G₁ 的晚期。细胞通过该点之后,它们就以正常的速率完成周期的其他阶段,不管外界环境如何(图 11-4)。

细胞周期时间的测定^{5,6}

细胞周期每个时相的长短是怎样来测定的? 首先,需要确定整个细胞周期的时间。在均一的细胞群中这可以容易地做到,即通过在显微镜下定期地计算细胞的数目,并记录全部细胞数目增加一倍所需的小时数(或者可以检测总的细胞量)。一旦知道了这间隔的时间,可以用添加氚标记胸苷到组织培养液中,经一短暂的时间,这时间远比 S 期短(常用的为 30 分钟或更短些),这样就能够测出 S 期的时间。这些细胞随后按放射自显影术来制

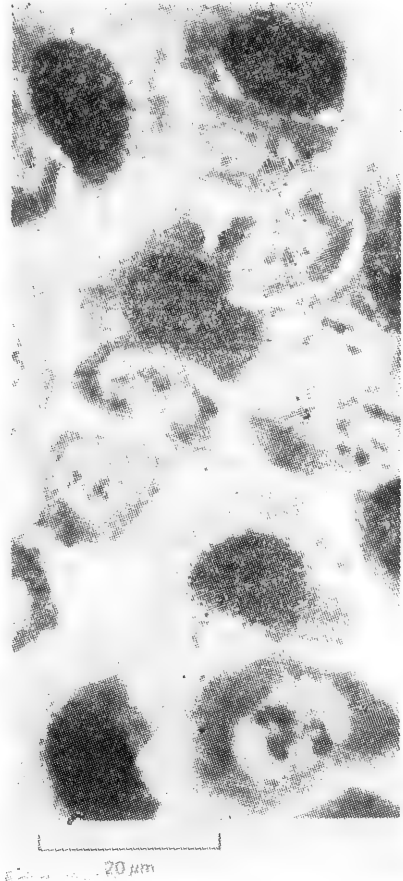


图 11-2 生长在有氚标记胸苷的培养液中的细胞,经短时间温育后所拍摄的放射自显影照片。细胞核上显现银粒的存在(暗区域),表示放射性胸苷参入到 DNA 的细胞,因而是在 S 期,有时是在标记期间。(James Clever 赠)

备,可从细胞核上显现银粒的细胞比值来算出有放射性同位素参入 DNA 的细胞比值(见图 11-2)。如图 11-5 中所解释的,这分数乘以细胞周期的总时间大约相当于这群细胞 S 期的平均时间。

M 期的时间可以相同的方式测定,即用光学显微镜检查细胞群,确定含有浓缩染色体各时相的细胞比值(这比值可叫做分裂指数,mitotic index)。由于在连续生长的细胞群中,通常是“年轻”的细胞比“年老”细胞多(所谓“年轻”和“年老”,是指自最后一次细胞分

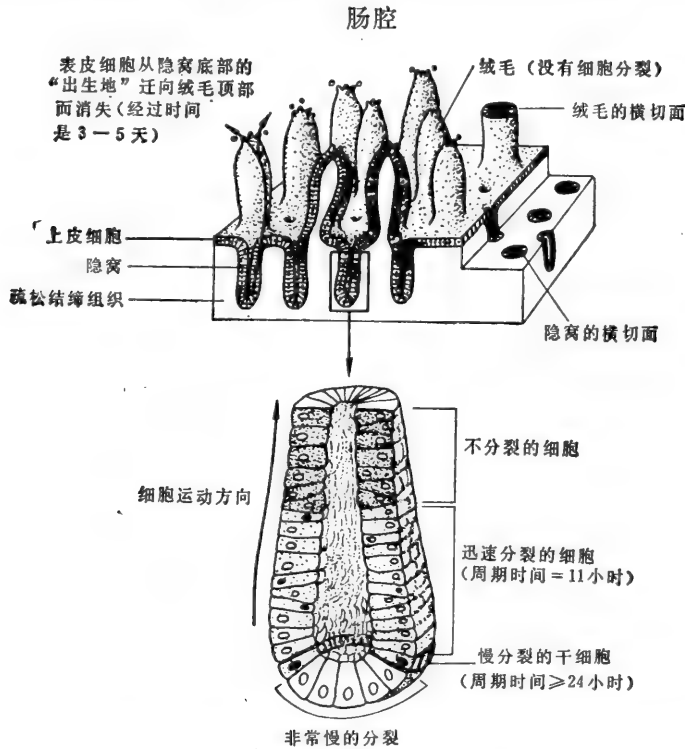


图 11-3 简图表示小鼠的小肠上皮的细胞分裂和迁移。所有的细胞分裂均在瓶状的上皮折叠处,叫做“隐窝”的底部。新生的细胞向上移动,形成上皮,覆盖着绒毛。绒毛的功能是消化和吸收来自肠腔的食物。大多数上皮细胞的生命是很短的,从隐窝处出现,五天内就从绒毛末端脱落。然而,一圈约 20 个缓慢分裂的“永存的”细胞(示以暗色)一直固定在近每个隐窝基部的独特位置上。这些“干细胞”通常分裂而生成两个子细胞:一个留在原位,是未分化的干细胞;另一个向上移动,分化,与绒毛上皮相连接。有时,由单个干细胞可分裂产生两个分化的小细胞。结果所造成的干细胞的缺失,相信可由圈上某一个或少数几个的干细胞分裂来填补;这样的细胞设想是比邻近的细胞分裂慢,当其分裂就产生了两个干细胞。关于干扰肠道上皮正常结构的试验,发现了细胞周期时间的巨大差别,部分由上皮细胞在组织中所处的相对位置所决定,部分由细胞发育的历史定。(引自 C. S. Potten, R. Schofield, and L. G. Lajtha, *Biochim. Biophys. Acta* 560, 281—299, 1979)

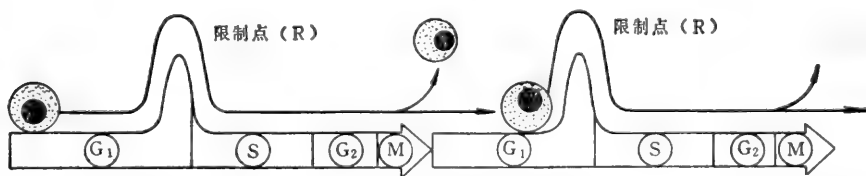


图 11-4 简图说明,当细胞进到 G₁ 晚期的某时刻,细胞就正常地停止了分裂,这时刻叫做限制点(R),只有来了信号才能进入周期其他阶段。

裂起经历过的时间),这事实要求对 S 期和 M 期的计算必须采用不同的微小校正系数。例如,因为一个老细胞在它分裂之后立即变为两个年轻细胞,于是早 G₁ 期的细胞就将比晚 M 期细胞多两倍。

测定周期中 G₁ 和 G₂ 期的长度比较复杂,因为没有特殊地标记 G₁ 或 G₂ 时相细胞的

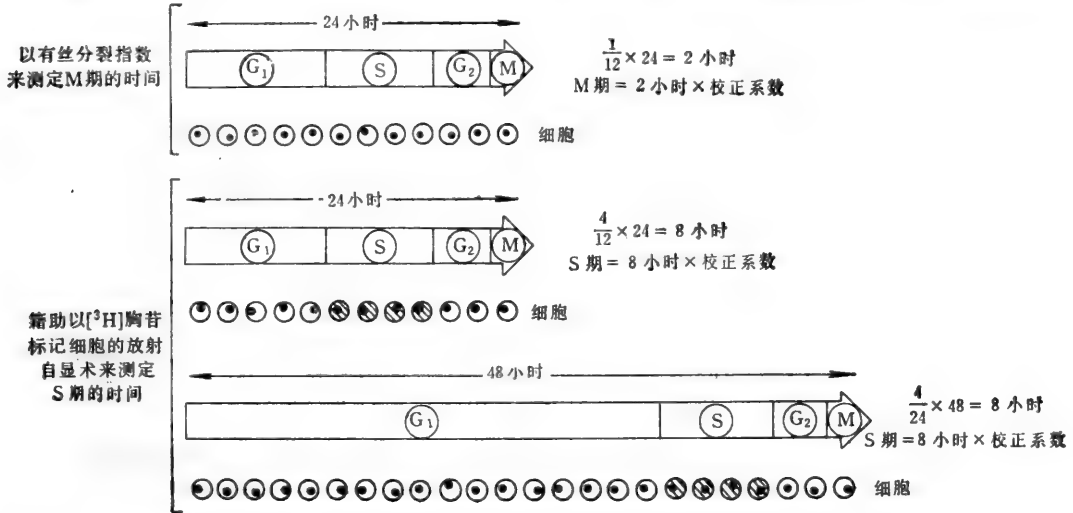


图 11-5 说明一般原理,细胞周期每个时相的时间大约等于这时期的细胞比值乘以细胞周期总时间。这种计算是基于假设细胞群中的所有细胞都以相同的速度生长。所示的“校正系数”的范围是从 G₁ 早期细胞的 0.7 到分裂细胞的 1.4, S 期细胞的数值介于其间。校正系数是必要的,因为在连续分裂的细胞群中通常年轻的细胞比年老的多。精确的“年龄”分布可从公式 $y = 2^{(1-x)}$ 得出,这里 y (变动于 2 到 1 之间)是细胞周期“年龄”× 细胞的相对数(这里 x 是变化在从 G₁ 最早期细胞的 0 到 M 晚期细胞的 1)。

方法。这问题用培养条件下细胞生长的同步化和测定有特殊标记的两个时相间所经历的时间而得到了解决。最简单获得哺乳动物细胞群生长的同步化的方法是利用细胞的这个特性,它们在 M 期进行着细胞骨架的变化,致使细胞“变圆”。因而,当细胞在组织培养皿表面贴壁生长时,由于 M 期细胞对培养皿的粘着力减弱,只要轻轻地摇动就能将这些细胞分离出来(图 11-6)。

用这方法从培养皿分离和收集到的有丝分裂细胞,构成一个同步化的细胞群,它们几乎立刻就将进入其 G₁ 期。从收集时起到氚标记胸苷参入 DNA 的开始,这一段时间相等于 G₁ 期。虽然原则上继续跟踪这同步化的细胞群, G₂ 期就可能测定出来,实际上这些细胞随着时间的进展趋向非同步化。更精确的 G₂ 期时间的测定可以用图 11-7 所描述的方法,由研究非同步化生长的细胞间接地得到。另一种方法,只要了解了 G₁、S 和 M 期的时程,从细胞周期总时间中减去这些时程, G₂ 期的长度就可以计算出来了。

近几年来,通过叫做荧光激活细胞分析仪的现代电子产品的应用,细胞周期的分析已经成为非常容易的了。在这复杂的仪器中,细胞悬液被加压,以每秒数千个细胞的速率通过一微小的喷嘴,当它们短暂地通过一小窗口时,可对每个细胞进行光学测定和记录(见 165 页)。一非同步化生长的细胞群,经固定(停止细胞分裂,并使膜具有可通透性),再用只有与 DNA 结合时才发出荧光的染料染色,然后进行分析。细胞经过这方法处理,其荧光的强度同细胞所含的 DNA 量成正比。细胞通过荧光分析仪时,就能迅速测得大量

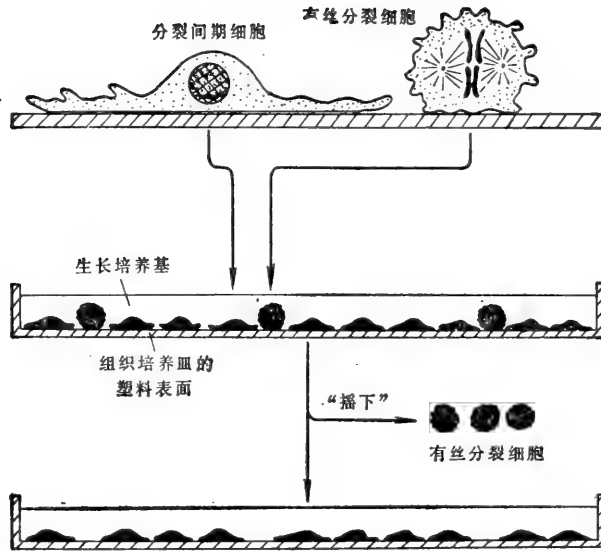


图 11-6 在培养条件下,一种获得同步生长的动物细胞群的普遍使用的方法。细胞生长在培养皿中,温和地摇动培养皿,收集到有丝分裂细胞,这些细胞转移到新的培养皿后,继续同步地进入它们的周期。

细胞的相对荧光强度,亦即其 DNA 的相对量。DNA 最小含量的细胞是处于 G_1 期,双倍含量的细胞不是 G_2 期,就是 M 期, S 期细胞介于中间量(图 11-8 中的暗区域)。细胞周期中 G_1 、 G_2 加上 M 和 S 期的时程可以按这三类中(见图 11-5)中每一种细胞的比值容易地计算出来。

一种特别的“触发蛋白”可能控制细胞分裂¹⁷

现在还不明白是什么决定哺乳类动物细胞使它越过限制点 (R), 并开始新的细胞周期的。一种似乎合理的假说是基于这种观察, 即为了通过 R 点, 从而触发 DNA 的合成和细胞分裂, 细胞似乎需要积累某种触发蛋白(也叫做 U 蛋白, 因为是不稳定的蛋白质)达到一定的阈值。由于其不稳定性, 这假设的蛋白质只有当合成相当迅速时, 才能达到一定的浓度, 足够以发动细胞分裂的周期。其次, 当 M 期蛋白质合成大大地减低时, 它的浓度也立即降下来, 并将再朝向 G_1 期的阈值水平回复。

这控制细胞生长的触发蛋白模型, 对其真实机制来说, 可能是一个过分简单的观点, 但是它对观察到的细胞行为的解释是有用的。例如, 按照这个模型, 任何减弱蛋白质合成速度的条件, 都将延滞 U 蛋白阈值水平的积累, 因而延长了 G_1 期, 并减低细胞分裂的速率。事实上, 当细胞培养在含有不同浓度的蛋白质合成抑制剂的培养基中, 它们的周期时间大大地延长, 而通过 S_1 、 G_2 或 M 期所需的时间并没有实质性的改变。这延长 G_1 期的观察是符合于由这模型所推测的结果, 只要每个 U 蛋白分子在细胞中保留几个小时的活性时间。这模型也说明了细胞密集或饥饿时的生长抑制效应, 降低了蛋白质合成的速率, 使细胞停留在 G_1 期中的最敏感点上, 即 R 点上。

我们会怎样解释只引起组织中相应的细胞进行分裂的专一生长因子的作用呢? 首先, 必须注意, 细胞停留在 R 点, 不仅不能合成 DNA 和分裂, 而且也停止了生长, 这是很重

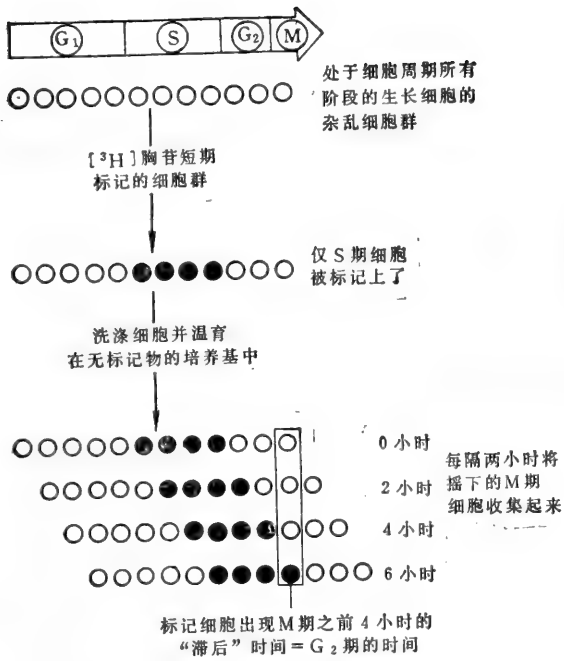


图11-7 一个普通用于测定 G_2 期时间的方法。非同步生长的细胞群给以氚标记胸苷短时间处理。当洗去剩余的氚-胸苷之后,有丝分裂细胞可用在不同间隔时间振荡的方法来收集,这样,有丝分裂细胞第一次出现放射性标记 DNA 的时间就可以确定了。“滞后”的时间等于 G_2 期的时间。此外,也可用放射自显影,在相同的时间间隔之后确定放射性胸苷标记的细胞部分,它们也含有浓缩的有丝分裂染色体。放射自显影方法只适用于组织中的细胞。

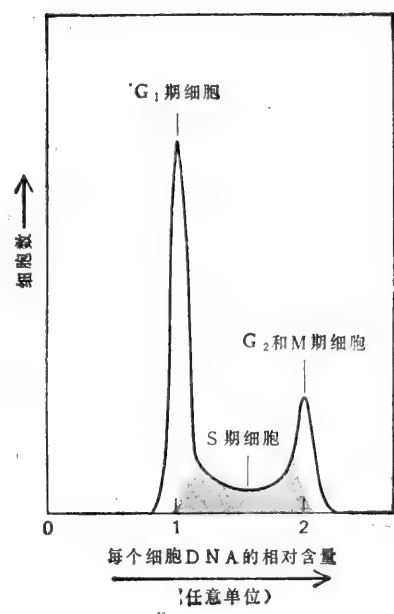


图11-8 由一生长细胞群获得的典型结果,其单个细胞 DNA 含量是用荧光分析仪测得的。DNA 含量是以任意的单位,由所结合的荧光染料的量来确定的。 G_1 期的细胞数大大超过 G_2 期和 M 期的细胞数的事实,表示在这群细胞中 G_1 期较 G_2 期为长。(见图 11-5)

要的。然而,并不能认为它们停止了全部生物合成。尤其是在哺乳动物细胞中,正常的蛋白质分解或转换是非常广泛的。一个生长停滞的细胞必须有生长细胞五分之一的蛋白质合成速率,才能恰好保持它的原有状态。

有人设想,组织中生长控制的机制是直接作用于细胞的蛋白质合成的总速率上的。按这个观点,在不存在专一的刺激因子情况下[和(或)存在抑制因子的情况下],细胞合成蛋白质只处在较低的“维持速率”。虽然像在生长的细胞中一样,具有平均转换速率的蛋白质可能保持在与生长细胞同等的浓度,但是,任何不稳定蛋白质(包括假设的 U 蛋白)的浓度将降低,与其合成速率的降低成正比。另一方面,在可刺激蛋白质合成总速率增高的环境条件下, U 蛋白量也将增加,超过阈限,允许细胞通过它们周期中的限制点(R),并进行分裂(图 11-9)。

离体培养的细胞,其分裂停留在 R 点时,能够长时期地维持着它的生活力和健康,即使在严重的饥饿条件下;然而在周期中其他任何点挨饿,细胞通常就要死亡。这提示,关于这特殊的限制点的生长控制机制可能是进化形成的,部分地由于细胞需要这安全的静止状态(在 R 点),它们的生长状态或与其他细胞的相互作用要求它们停止分裂。 停止在

这稳定的静止状态的细胞,有时被认为是进入了细胞周期的 G_0 期。

与生长控制的触发蛋白模型不同的另一种主要模型,是所谓“转换概率”(transition probability)模型。这模型的提出是根据对均一培养条件下生长的克隆细胞株的缩时电影摄影观察,虽然这些细胞在遗传性上是相同的,但它们的细胞周期时程表现很大的变动范围。这些时程的典型分布(图11-10)的图形,可以看出这周期时程似受或然的或随机事

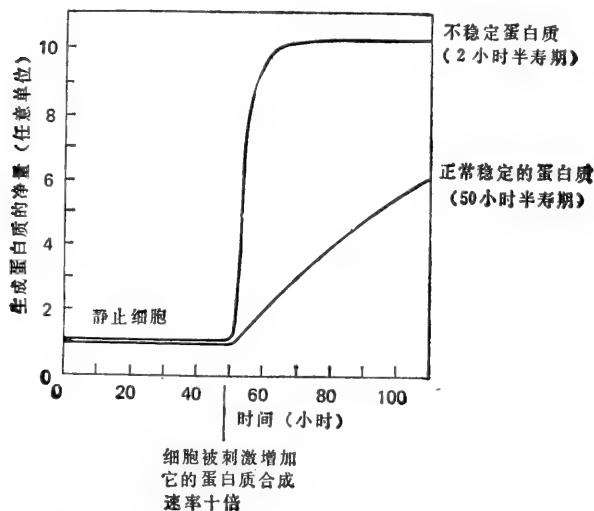


图11-9 说明当细胞受到刺激更迅速地合成它的全部蛋白质时,细胞中高度不稳定蛋白质相对量的增加与平均蛋白质质量的比较。因为细胞生长和分裂同细胞蛋白质质量的平均增加保持着一致的步调(下面曲线),生长的细胞中较之不生长的细胞,其不稳定蛋白质将组成其细胞蛋白质总量的更大部分(所以表现为更高的浓度)。

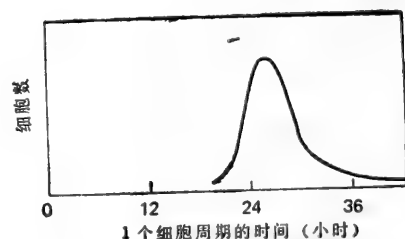


图11-10 绘图说明,组织培养条件下生长的均质细胞群,其细胞周期时间的差异。数据是从单个细胞的显微镜观察获得的,并直接测定它们连续分裂间隔的时间。

件的调节。换句话说,就好像每个细胞都具有单位时间内通过其周期 R 点的恒定的概率,而与其离最后一次分裂后经历多长时间无关。S 期的开始因而是一个随机的过程,如同不稳定原子的放射性衰变。然而值得指出的是,图 11-10 中所表示的细胞周期时程的很大差异也可以纳入更具有生物学意义的触发蛋白模型,因为有证据表明,即使遗传性相同的 G_1 细胞,它们合成蛋白质的速率也有惊人程度的不同。

细胞分裂受多种“反馈控制”机制的调节

组织中细胞分裂的速率受未知的机制控制,假若,仅仅假若需要新的细胞时,这机制就允许细胞进行分裂。例如,切除肝脏一部分,正常静止状态的肝细胞受到刺激,就开始迅速分裂;当恢复到正常肝脏的体积,分裂就停止。同类限制细胞分裂的现象也在损伤后的皮肤中观察到。没有这种细胞分裂的“反馈控制”,多细胞动物的形态和功能将立刻受到破坏——或是无限制地细胞分裂(像肿瘤中发生的),或组织中死亡的细胞得不到恢复,这些组织正常地有不断的细胞损失(如表皮细胞层)。同样的调节机制对胚胎发生时细胞和组织的有序的发育也是重要的(见第十五和十六章)。

离体培养的正常哺乳动物细胞在占满空间时就停止分裂⁹

当成纤维细胞接种在含组织培养液的培养皿中,它们就贴壁、铺展,并分裂。正常情况下,这过程将继续地进行,一直到汇合形成单细胞层,相邻细胞彼此接触为止。此刻,在没有剩余的空间让细胞铺展的时候,正常细胞就停止分裂——这现象叫做细胞分裂的接触抑制。假若用小针把这单细胞层划破,在培养皿上造成一条无细胞的空隙,这样在空隙边缘上的细胞就向空出的地方铺展,并分裂(图 11-11)。

然而,“接触抑制”概念可能被误解。虽进行过另一些试验,在这些试验中,细胞铺展的范围是受细胞在其上生长的表面附着性质改变的控制,而不是受细胞密集所控制。试验获得的结果说明,培养中细胞之分裂的重要决定因素不是细胞的接触,而是细胞铺展的程度——即使没有细胞接触,一个细胞铺展愈少,它的生长周期就愈长。

一个细胞的圆缩是同它蛋白质合成总速率的减低相关联的。所以,以简图11-11表示的试验可用生长控制的触发蛋白机制概念作如下解释:当一个细胞同其他细胞相接触时,由之所产生的限制它的铺展能力的作用也降低了其蛋白质合成的速率,包括U蛋白。U蛋白的浓度从而降低,使细胞停止在G₁期的R点。然而,在损伤边界上的细胞从生长抑制下释放出来同它们铺展开来一样,蛋白质合成速率也增加,从而引起U蛋白浓度升高超过阈限量。

为什么细胞形状的改变就改变蛋白质合成速率?有可能伴随着细胞的平铺开细胞表面积与体积比增加,从而影响了蛋白质的合成。另一种可能性,蛋白质合成速率增加能因细胞发生平铺开时细胞骨架结构的主要改变所引起的。

假若在离体培养细胞上的观察也可用以解释组织中的细胞,同样地帮助控制机体中细胞分裂的一个因素就是相邻细胞之间的接触,这接触限制了细胞铺展的能力。相反,由于损伤或天然的细胞丧失空出来的空间将刺激细胞分裂,直接允许邻近细胞伸展到这空余的位置。然而,我们将会知道,这并不能完全解释组织中细胞生长的控制。

位置信号也控制细胞分裂⁹

一般组织中细胞只有当它们在特定环境下才分裂,不论有没有空间可供利用。例如,在多层皮肤表皮,细胞分裂通常是受到基底表皮单层细胞所限制,这些细胞是位于真皮

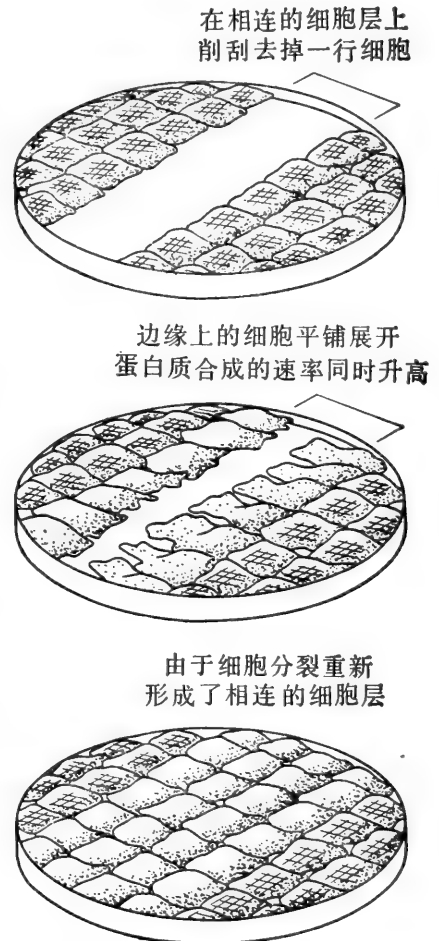


图11-11 一个经典的试验,说明离体培养的细胞当它们形成了相连的单层细胞,它们的分裂就停止,如果用刮削造成了损伤就刺激细胞重新生长。

然而,我们将会知道,这并不能完全解释组织中细胞生长的控制。

层的基板上。这些分裂的细胞生出子细胞，它们在表皮中被推向外移动，达到皮肤的表面。子细胞移动时它们停止分裂，开始制造大量的角蛋白丝堆积在细胞质中，从而形成了一坚韧的表面保护层。假如基底细胞或被移注到真皮层下面或提到上面来，使其失去与基板接触，它们就停止分裂。似乎这些表皮细胞只有当受到某些未知因素的刺激时才能分裂，这些因素存在于真皮和表皮的边界上，或是可弥散分子，或是基板的部分。

细胞分裂的位置条件似乎是十分普遍的，虽然我们目前对它们的了解还很不清楚。例如在哺乳动物，已证明胚胎胰腺上皮细胞的正常分裂和发育需要下衬胰间叶细胞分泌的一种特殊的蛋白质因子。更令人惊奇的是，精致的以发育中昆虫附肢的表皮为材料组织移植试验发现了细胞-细胞相互作用的复杂型式，这控制细胞分裂的方式可能是许多动物组织发育所共有的。例如，当一片表皮移植到同源的位置上，它即“愈合”进去而无明显的细胞分裂。然而如果移植到非同源的位置上，移植物及邻近的宿主细胞都表现增生，而后分化，产生正常时原应位于移植物所取自的区域和被移植所在的区域之间的细胞。

许多离体培养的动物细胞需要微量的(少于 10^{-10} 摩尔每升)特殊的生长因子，从而使细胞分裂和(或)生存，不同类的细胞需要不同因子的混合物。这类生长因子可能是蛋白质或小分子，如多肽或类固醇。某些生长因子是激素类，它经血液循环。其他可能像近距离“局部化学介导因子”(local chemical mediators)的作用，对细胞分裂产生某些位置的效应，如在组织中所观察到的。

癌细胞失去了它们正常的生长控制¹⁰

最近几年，细胞生物学领域的大量研究致力于探索肿瘤的病因和治疗。肿瘤细胞表现许多危及宿主的性质，通常包括浸润其他组织的能力和诱导微血管向肿瘤内生长(保证肿瘤细胞增殖以充分的血液供应)。然而，作为肿瘤细胞定义的一个性质是它们对正常细胞分裂调节的控制机制的不正常反应，它们以相对地无控制的方式连续不断分裂，直至杀死宿主。细胞分裂遏制作用的致命的丧失大大地激励了细胞分裂控制的研究。许多广泛宣传的所谓“突破”，曾一度宣扬提出了对细胞分裂和肿瘤控制的答案。在新近，关于正常细胞和肿瘤细胞间的基本差别有各种的说法，认为是在于细胞环核苷酸水平的变化、质膜的流动性、分泌的蛋白质、细胞骨架和离子通量的变化，这里提到的只是其中的几种设想。尽管还不了解真实的分子机制，但这点是清楚的，不论在组织中或离体培养的条件下，肿瘤细胞主要是缺乏正常细胞分裂控制的反馈机制。例如，肿瘤细胞在离体培养中通常是连续不断地分裂，不存在正常细胞所表现的因接触抑制而停止分裂的限制点，它们增殖，甚至到了它们在培养皿中不再可能平铺开的时候就彼此堆叠起来(图 11-12)。此外，肿瘤细胞较之正常细胞，只需要小量的蛋白质生长因子就能在培养条件下生存和分裂。(在某些例子中，可能由于它们自己产生自己的生长因子)。

正常细胞和肿瘤细胞间的第二个基本差别是，肿瘤细胞作为群体能无限制地进行分裂。相反，差不多所有哺乳动物的正常细胞经一定次数的分裂之后似乎都要死亡。例如，哺乳动物的正常成纤维细胞在离体培养中生长，按它们取材的动物的不同，平均将分裂 20—50 次。随着培养物的老化，每个细胞通过细胞周期的时间逐渐延长，最终整个细胞停

止了分裂而死亡。一般取自老年动物的细胞在培养中分裂次数较取自年轻动物的同样细胞为少,这提示年老细胞已经在动物体内花掉了许多次它们所限定的分裂次数。

这观察使我们相信,当细胞分化时,它们将按程序经过一定次数的分裂而后死亡。这种按程序的细胞死亡(programmed cell death) 可认为是有利于机体,作为对抗某一特定细胞无限制生长的一种附加的防御措施。这就是说,大多数逃逸出细胞分裂正常控制的细胞,在整个细胞群死亡前,只能产生较小的子细胞的克隆。然而,在第十六章里,我们将看到,肿瘤不只涉及不正常的增殖,除分裂控制和按程序衰老之外尚有其他一些因素,共同促使肿瘤成为一种相当稀少的事件。

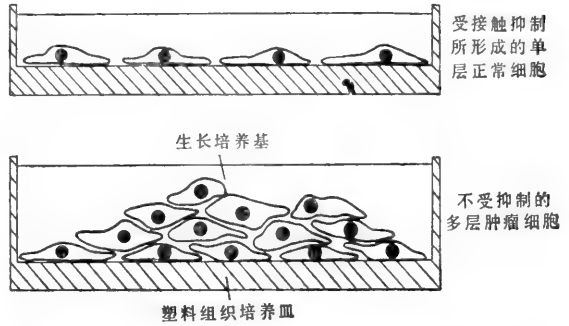


图11-12 图解说明在组织培养中许多肿瘤细胞表现的生长型式。不像正常的细胞,取自肿瘤组织的细胞通常连续不断地生长,在形成相连的单细胞层之后细胞彼此堆叠起来。

小结

多细胞机体中,组织的完整性只有当单个细胞的分裂和生长都同其邻近细胞相协调并按程序进行时,才得以维持。其结果是不同细胞按其所处的精确位置而以极不相同的速率进行分裂。不活跃增殖的细胞,其蛋白质合成速率降低,并停留在 G_1 期。细胞一旦越过细胞周期中 G_1 后期的一特定“限制点”(R) 而注定进行分裂时,它将合成 DNA (在 S 期),进入到 G_2 期和 M 期,并达到下一周期的 G_1 期。一个哺乳动物细胞是否会生长和分裂,是由各种反馈控制机制决定的。这些机制包括细胞所可能用以铺展的空间,以及在紧邻环境中细胞分泌的刺激和抑制因子。肿瘤细胞被证明能逃逸许多这种控制,以致危及了宿主。

肿瘤病毒作为研究细胞周期控制的工具¹¹

许多种病毒(图11-13)在各种脊椎动物中,从爬行类到猴子,均可诱发肿瘤。所以,似乎可同样地认为某些特定的病毒也可能被发现是某些人类肿瘤的病因而。因而,大量的经费已经花费来尝试从人类肿瘤中分离病毒,这是并不奇怪和不无道理的。然而,到目前为止,这方面的探索被证明是困难的,多数科学家现在怀疑病毒是人类肿瘤的主要原因。不过,这些肿瘤病毒的研究也得到巨大的补偿,因为发现了细胞的生长和分裂是怎样被控制的线索。这研究中的关键因素是发展了离体细胞培养系统,在这系统中可以观察由病毒诱发的癌性(瘤性)转化,而这在动物试验中似乎是不可克服的困难。现在已经有了各种离体培养的细胞系,用已知的肿瘤病毒侵染这些细胞,将导致它们转化成为肿瘤的同等物。这些“转化细胞”通常能很快地由于它们改变了的形态或生长要求而被识别。表11-1列举了转化细胞与正常细胞之间的某些主要的差别。

第一个被确认的肿瘤病毒是 Rous 肉瘤病毒(RSV),一种鸡的病毒,它的遗传组分是一9 000 核苷酸长的 RNA 分子。通过对这病毒怎样转化鸡细胞的研究,发现它的

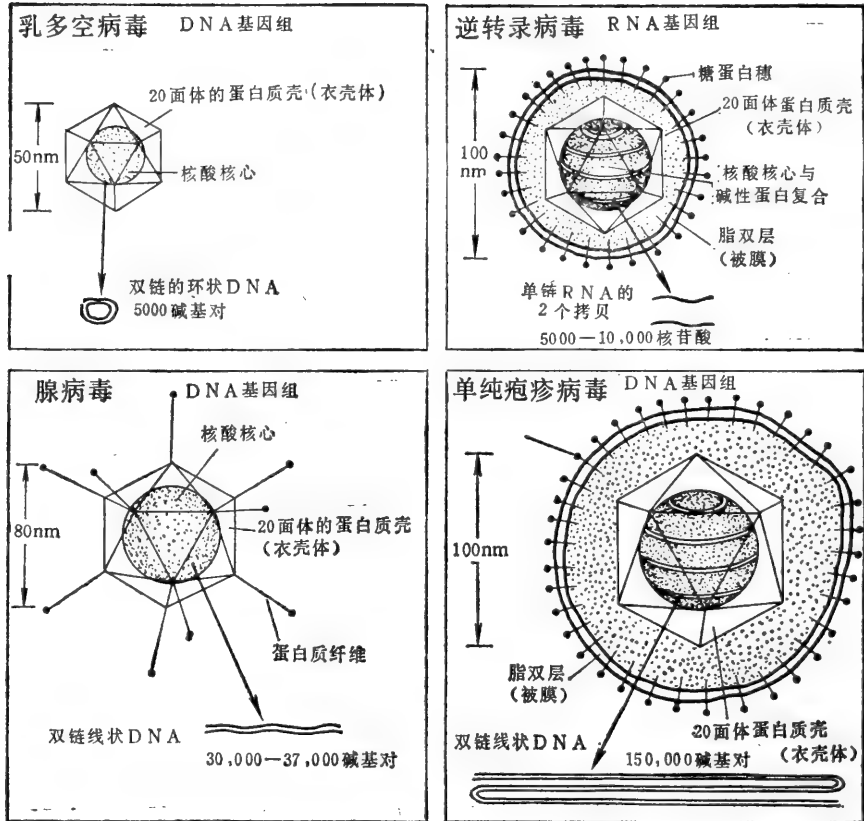


图 11-13 诱发动物肿瘤的四种主要病毒的模式图。如图所示，逆转录病毒和疱疹病毒为一脂双层膜包围。

表 11-1 组织培养的正常细胞经肿瘤病毒转化时通常观察到的某些变化

1. 质膜有关的异常变化

- A 代谢物转运加强。
- B 血纤维蛋白溶酶原激活因子的产生增高,增加了胞外蛋白水解量。
- C 质膜过度起泡。

2. 粘附性的异常变化

- A 表面粘附性减弱,所以细胞保持球形。
- B 肌动蛋白丝不能构成粗束。
- C 胞外的纤维连丝蛋白 (fibronectin) 沉积降低。

3. 生长与分裂的异常

- A 生长达到异常高的细胞密度。
- B 对血清中生长因子的需求降低。
- C 对“固定物依赖”的减弱(即无需在固体表面上铺展开就能生长)。
- D 将细胞注入敏感动物体内可形成肿瘤。

RNA 基因组被转录成 DNA, 然后插入宿主的染色体 DNA (见 232 页)。现在已知有许多不同的 RNA 肿瘤病毒(逆转录病毒, retroviruses) 为肿瘤研究提供转化各种不同类型的正常细胞成为其肿瘤等价物的手段。几种 DNA 肿瘤病毒也已很好地研究过。其中包括几种小的乳多空病毒 (papovaviruses), 尤其是猴肾病毒 SV40 病毒和小鼠的多

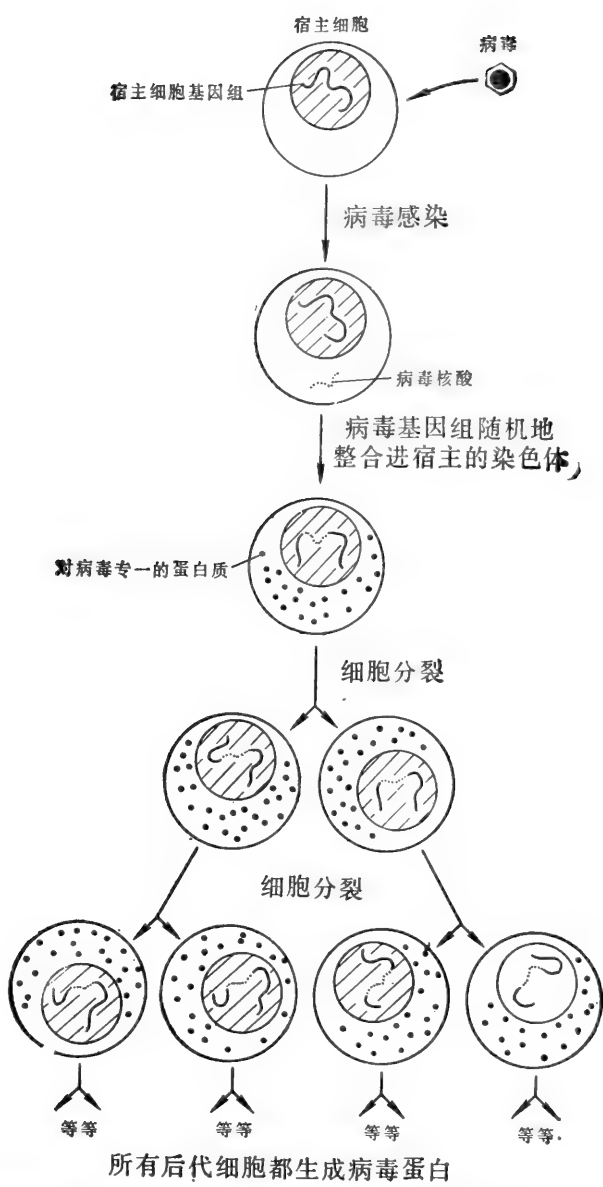


图 11-14 图解说明病毒基因组的核酸序列怎样随机地整合进宿主细胞染色体，致使其子细胞中病毒蛋白长期存在。例如逆转录病毒，病毒 RNA 基因组的 DNA 复制物在细胞中是由一种病毒酶，叫做逆转录酶的作用而产生，这 DNA 复制物整合进宿主的染色体(见图 5-52)。

瘤病毒，这两者的基因组含有仅约 5 000 碱基对。对于较大的腺病毒和 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 也有了许多的了解。Epstein-Barr 病毒是一种疱疹样病毒，它与人类肿瘤 Burkitt's 淋巴瘤有关。与致癌的反转录病毒一样，所有这些 DNA 肿瘤病毒，通过把病毒遗传物质插入宿主染色体 DNA 而转化正常细胞。结果，病毒基因变成感染细胞自身的遗传物质的一部分，同细胞染色体一起复制，并不仅在原来的细胞中表达，而且在所有它的子细胞中也能表达(细胞群叫做克隆)(图 11-14)。这种不能消除的继承下来的额外遗

传物质,能使受感染的细胞克隆具有肿瘤的命运。

病毒怎样干扰细胞生长和分裂的控制?已知有两种不同的机制:(1)病毒 DNA 整合到宿主基因组这件事本身就能引起宿主细胞附近重要基因在结构或表达水平上起变化。这过程叫做插入诱变(insertional mutagenesis),因为这些变化象用常规方法诱发的突变一样可以遗传。插入诱变的几个例子最近已有文献报道。有些是一高度活化的病毒 RNA 聚合酶 II 启动子插入关键的细胞基因的旁边,此基因过量表达引起了肿瘤的表型。

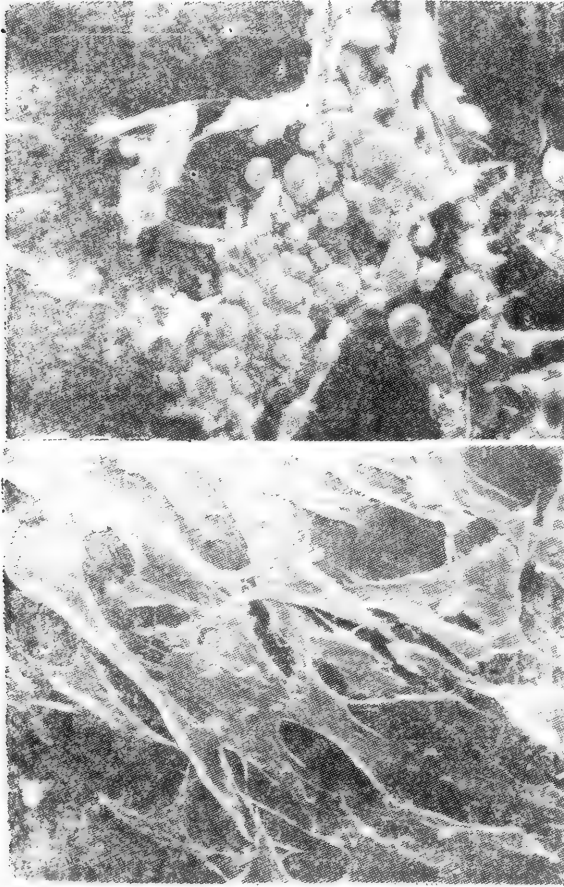


图11-15 一个为携带有温度敏感突变致癌基因的逆转录病毒所转化的离体培养细胞的扫描电镜照片。(A)低温(34°C)下恶性转化的细胞,球形。(B)同样的细胞,由于转移到高温(39°C)条件下使致癌基因产物失去活性,从而恢复了正常的形态。

(GSteven Martin 赠)

内)恢复到正常的表型(图11-15)。这种细胞表型变化的循环可以用升高和降低温度任意地重复,这种变化证明,温度敏感病毒基因是对细胞的癌性转化起作用的基因,因而证明它是一种致癌基因。

一种叫做 DNA 介导转染(DNA-mediated transfection)的方法也可以用来鉴定病毒致癌基因。在这操作过程中,仅带有一个病毒基因的 DNA 片段导入组织培养细胞中,偶尔可整合进基因组并表达。某些 DNA 片段将引起受体细胞的子代变成癌性的,结果如移植到一个适当的宿主动物就会形成肿瘤。由此,可鉴定出病毒基因组中的致癌

由于病毒启动子开动的 mRNA 链参入相邻基因的编码序列,细胞内会合成比正常量大得多的细胞控制蛋白。(2)许多肿瘤病毒携带一个或几个遗传座位(叫做致癌基因),它们与宿主细胞的癌性转化直接和唯一相关,可能不需要改变宿主细胞的基因。已知许多病毒致癌基因,它们在很多种不同动物中是活跃的;这些独特基因的普遍存在和特性使肿瘤病毒作为实验工具具有很大的用途。

应用分子遗传学方法证实了致癌基因的存在¹²

各种技术方法都被用来鉴定病毒的致癌基因。一种通用的遗传学方法发现了致癌基因的突变,当温度升高时基因变得不活跃。这些温度敏感突变基因在随意升高或降低温度时,它可能抑制和随后重新表现基因的效应。在低温(34°C)下,含有病毒致癌基因的敏感细胞表现出肿瘤的表型,并且在缺少细胞正常所需的某些生长因子的条件下依然能生长(表 11-1)。如果将温度升到39°C,致癌基因表达被阻抑,细胞迅速地(通常在几个小时内)

基因,它对受感染细胞的癌性转化负全部责任,使这些细胞在动物体中引起肿瘤。

对 RNA 肿瘤病毒的致癌基因了解得最清楚¹³

各种不同的 DNA 肿瘤基因组的致癌基因部位总是位于在病毒生活史早期就表现功能活动的位置。这类基因被研究得最清楚的是 SV 40 和多瘤病毒。然而,由于这些致癌基因同一组基因重叠,其中一个基因(编码大 T-抗原蛋白),是病毒 DNA 复制所必需,对致癌基因的功能分析因而复杂化了。这些重叠基因所规定的基因产物有多少与恶性转化有关,还不很清楚。然而,其中的一个,即多瘤病毒的“中 T-抗原”(middle T-antigen)却是必需的,某些这类蛋白质分子被发现位于质膜的内表面,它们似乎同能使酪氨酸磷酸化的蛋白质激酶相结合(见下文)。较大的 DNA 肿瘤病毒,如腺病毒,有一个十分复杂的基因组;这里似乎产生几个不同的致癌蛋白,它们的全部组合是使细胞完全恶性转化所必需的。

对研究来说,最简单的致癌基因是反转录病毒的致癌基因,它们包含的单个基因编码的序列与该病毒的其他基因没有重叠。所以,这种致癌基因常会缺失而对病毒增殖没有不利的影响。这种致癌基因区段的内在的可省略性(inherent dispensability)首先是由于发现能正常增殖,但不能把宿主细胞转化为肿瘤细胞的突变 Rous 肉瘤病毒颗粒而被揭示的。许多这类突变体被发现有一编码分子量为 6 000 蛋白质的大的中间片段缺失。这就是使正常鸡细胞转化为肿瘤细胞的所谓 src 基因的产物。

随着发现 src 基因对病毒增殖没有作用,已经弄清楚反转录病毒增殖只需要三类病毒特有的多肽:一是其外被膜(env)蛋白,二是内衣壳(gag)蛋白,三是逆转录酶(pol)蛋白。

在许多逆转录病毒中,一个大的具有功能的致癌基因片段取代了病毒的 gag、pol 或 env 序列的部位。这类病毒是有缺陷的,它们本身不能增殖,而需要一个非致癌的“辅助病毒”同时存在,以提供所缺失基因的产物。像 Rous 肉瘤病毒这样没有缺陷的致癌病毒,较之许多缺乏完整的 gag 或 env 片段的缺陷型逆转录病毒(例如,Harvey 肉瘤病毒和 Abelson 病毒),实际上是非常少的。由这些缺陷型病毒产生的致癌蛋白通常是融合蛋白,gag 序列位于其氨基端,致癌基因序列则在其羧基端。

当逆转录病毒上存在着已知的致癌蛋白的任一种时,对细胞的结构和功能都会产生多方面的影响。这些不同影响是怎样由单个病毒基因的作用所引起的呢?有两种不同的可供选择的解释。由致癌基因编码的蛋白质可能改变单一的细胞成分,这成分进而广泛影响细胞各种功能而产生癌性表型。或者是致癌基因产物本身可能直接改变细胞的许多不同成分。许多研究工作者相信这后一种解释有更大可能性,部分原因是可能使 Rous 肉瘤病毒 src 致癌基因突变到仅仅抑制其对细胞的某些影响。

即使许多致癌基因的蛋白质产物似乎对细胞的许多不同功能产生作用,但仍然可能只有某些影响才是肿瘤发生所需要的。如果无控制的细胞分裂是肿瘤表型的核心,那么肿瘤细胞的根本变化可能是在正常细胞分裂周期停止进展的情况下,它们不能在限制点(R)停止下来。当生长在组织培养条件下,即使有也只是极少的肿瘤细胞能优先选择在 R 点停止下来;反之当处于饥饿或有毒条件下,它们将在细胞周期的各点上均停止生长。致癌基因(或者任何其他致癌因子)的作用是怎样造成这么深刻的变化,还不知道。



图11-16 电镜照片,表示由 Rous 肉瘤病毒致癌基因作用而合成蛋白质激酶,激酶在恶性转化细胞中侵及质膜的内表面。用电子致密铁蛋白颗粒标记的特定抗体与激酶起反应,定出激酶的位置。(Ira Pasten 赠;引自 M. C. Willingham, G. Jay and I. Pasten, *Cell* 18:125-134, © M.I. T.Press)

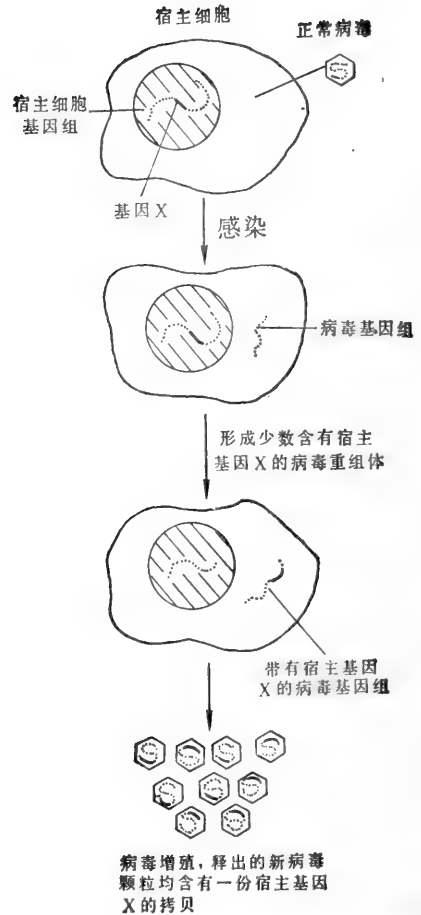


图11-17 简图说明逆转录病毒把相当于特定寄主基因的核苷酸序列参入到其基因组内的罕见的过程。逆转录病毒所以含有致癌基因,似乎始源于这个途径(见正文)。

致癌基因可能破坏生长调节正常机制的一种途径是抑制细胞正常分化为有限的生长潜能的细胞。事实上,许多肿瘤细胞比它们相应的正常细胞分化得差。这一点在人白血病(血细胞癌)尤其显著,并导致一种看法认为这些肿瘤的发生是由于某特定谱系的细胞没能完成它们的成熟。因为血细胞前身看来具有连续不断的分裂能力,结果形成了不断扩大的细胞群——肿瘤。这个观点进一步得到某些病毒致癌基因引起的效应的支持。例如,一种类型逆转录病毒可引起红细胞前身的肿瘤。如果这病毒致癌基因由于突变而失去活性,则原先未成熟的细胞开始分化,并失去其肿瘤特性。

如上所述,肿瘤细胞能够永久存活,与离体培养下生命有限的正常细胞不同。许多肿瘤病毒由于其病毒致癌基因的效应而可能把这种永久生存的能力转给宿主细胞。在腺病毒的例子中已能在病毒基因组中鉴定出能使细胞转化为永久生长而不诱发任何其他方

面的癌性表型的部分。这一类结果表明病毒基因具有作为研究细胞衰老的分子机制以及癌性转化机制的一种工具的价值。

致癌基因常常编码蛋白质激酶¹⁴

一个关键性的突破发生在 1978 年,这是发现了 src 基因产物是一种蛋白质激酶——催化磷酸残基从三磷酸核苷转移到选定的靶蛋白氨基酸侧链上的一种酶(见 718 页)。以后不久,其他几种致癌蛋白也被发现是蛋白质激酶。到目前为止,所检查过的每个病毒专有的激酶可磷酸化许多靶蛋白;这就可解释它们各自的致癌基因的多重效应。许多逆转录病毒激酶专一地作用于酪氨酸侧链的磷酸化,而不是像大多数蛋白质激酶那样磷酸化丝氨酸和苏氨酸残基。由于酪氨酸磷酸化作用是罕见的,所以细胞一为肿瘤病毒侵染其蛋白质的磷酸酪氨酸含量就要比正常细胞高 5—16 倍。这些磷酸化蛋白的鉴别和功能的确定对了解病毒性肿瘤发生是具有关键意义的。已经找出了一些候选的蛋白质——如肌动蛋白结合蛋白纽带蛋白,但是这还不能证明其中任一种参与诱导和(或)维持其转化的表型。

由于病毒致癌基因的作用如此多种多样,我们或许期望在细胞内许多地方找到它们的产物,尤其是在细胞核中,许多细胞分裂事件设想是从这里开始的。令人惊奇的是,迄今经过很好研究的致癌基因产物却并非如此。反之,这些蛋白质的大多数(代表几种非常不同类型肿瘤病毒的产物)已经发现是同质膜相结合的(图 11-16)。某些例子中,蛋白质插入脂双层,在其他例子中,其精确的膜结合性质还不清楚。这些发现支持了一个长期存在的假说,认为细胞分裂的外控制因子主要是作用于细胞表面,并提出了一种可能性,即肿瘤病毒蛋白质激酶的大多数底物将被发现是同质膜紧密结合的。

酪氨酸磷酸化作用也参与正常细胞的控制机制。例如,一种蛋白质激素——表皮生长因子(EGF)——在细胞表面与其受体结合时,导致受体本身和其他几种细胞蛋白的酪氨酸磷酸化。这些磷酸化作用可设想是启动 EGF 的胞内效应的信号,引起原先静止的细胞进行分裂。十分有趣的是,其酪氨酸在 EGF 作用下被磷酸化的几种蛋白质和对某些病毒致癌基因起反应而酪氨酸磷酸化升高的蛋白质是相同的。这些发现提示细胞分裂的正常刺激(EGF)和不正常刺激都可能是通过同样的酪氨酸磷酸化介导的。

正常细胞蛋白水平的升高能破坏正常细胞生长的调节¹⁵

乍一看来,自然界在病毒中如此广布致癌基因,似乎是反常的。然而,目前我们认识到逆转录病毒的致癌基因不过是正常细胞基因的另一形式。由于未知的机制,脊椎动物基因组中的基因可以或多或少随机地、低频率地插入到逆转录病毒基因组内。由于这些带有致癌基因的病毒能保持宿主细胞处于增殖状态,从而维持了最适于病毒增殖的条件,因而推想在进化过程中它们得以从其它病毒中被选择出来(图 11-17)。

虽然,按这种方式结合进病毒的细胞基因是致癌的,但它们的结构或功能似乎均未因重组而发生明显的改变。例如,Rous 肉瘤病毒致癌基因及其在正常细胞中的原始基因两者都编码同样与质膜结合的酪氨酸蛋白质激酶。某些致癌基因的原始正常基因可用 DNA 克隆技术分离出来,并在促进这些克隆基因高效表达的条件下将其放回到正常细胞内,令人惊奇的是,这样的细胞竟变成了癌细胞!

因此，一个病毒性肿瘤发生的新观点提出来了。肿瘤病毒的作用不过是使寄主细胞过量增加一种与控制细胞分裂有关的正常细胞基因产物。这些产物所以驱使转化的细胞无限制地增殖，仅仅因为它过量存在。化学致癌物或天然突变也可能仅仅需要诱发这关键的控制基因不适当地过量表达，而使细胞进入恶性病变的歧途(图 11-18)。

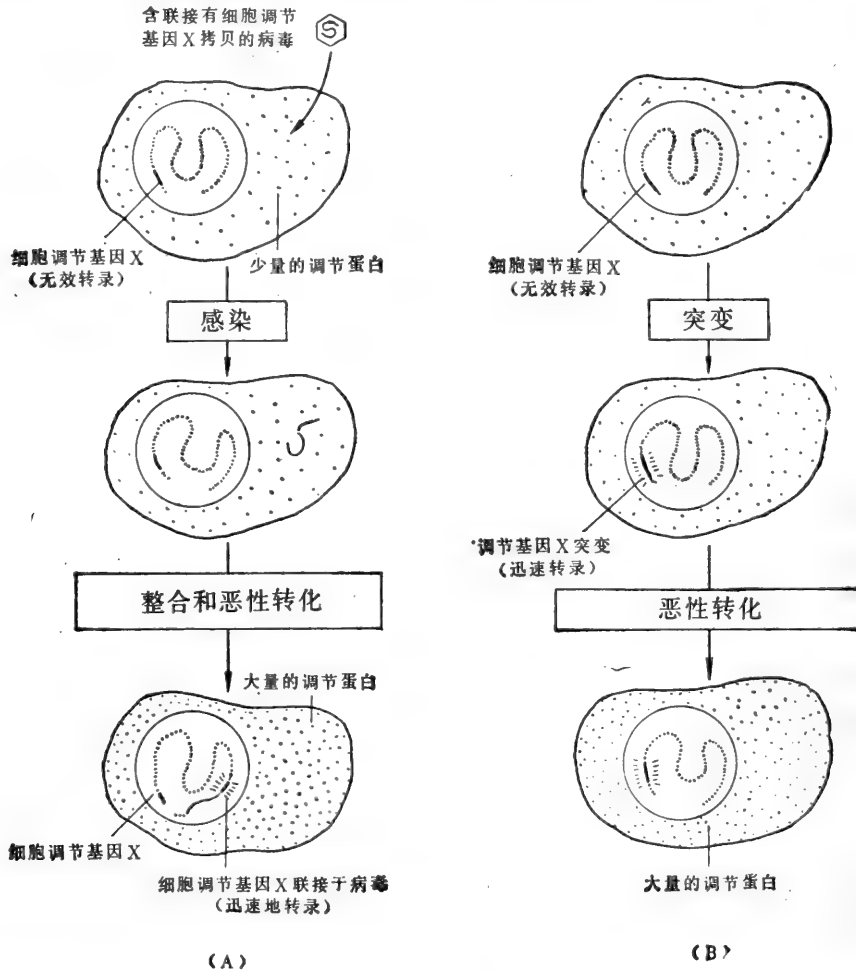


图 11-18 图解说明病毒诱发的和自发的肿瘤的一个可能普遍的机制。在这两个例子中说明无控制的细胞生长是由于一正常细胞调节蛋白的过量生产所致。然而，另外的例子中细胞调节蛋白已知可由一个氨基酸的变化而改变，而没有过量的生产。(A) 逆转录病毒可能由于把一正常细胞基因的拷贝参入到其基因组中而引起过量的生产，由于整合到病毒基因组的 DNA 拷贝而大量地转录该细胞基因的 RNA，因为其表达水平是受病毒启动子控制的。(B) 自发的或致癌物诱发的突变可引起同样的细胞调节蛋白的超量生产，这是由于直接提高其基因转录的效率。在酵母细胞上开展的研究提示，真核细胞基因表达水平的这样明显提高，更像是由于 DNA 小片段的缺失或插入引起的，而不是由于单个碱基对的突变。

已有不少于 15 种不同的逆转录病毒致癌基因被发现，而且每个都是从脊椎动物基因组中不同的正常基因衍生来的。到目前为止，这些致癌基因有一半表明具有蛋白质激酶的活性。总的看来，这些基因可能组成一异源家族，其每个成员都由于它们参与脊椎动物正常细胞分裂和发育的调节而相互关联起来。如果这是正确的，这个观点代表了实验生物学家的一个巨大的意外收获。逆转录病毒借助从脊椎动物基因组中提取活跃的调节

基因,而使这些基因易于供研究之用。

活化的致癌基因已可直接由人体肿瘤分离出来¹⁶

现在已有可能从某些人体和其他动物肿瘤分离出具有活力的致癌基因,而无须病毒的参与。对于一些肿瘤(肺、膀胱、结肠、神经母细胞瘤,淋巴瘤和白血病),从瘤细胞抽提出的 DNA,当导入离体培养的正常细胞,发现能传递肿瘤生长的特性。应用重组 DNA 技术(见 182 页)已经鉴定出几种活性致癌基因的 DNA 序列,然后已将其通过细菌质粒克隆高纯度地分离出来。由不同的人体肿瘤分离出的致癌基因常常是相同的(肺和结肠),其中两个(取自膀胱癌和肺癌)已被证明是两个先前鉴定过的逆转录病毒致癌基因(分别发现在 Harvey 肉瘤病毒和 Kirsten 肉瘤病毒)的细胞同系物。这些 ras 基因编码结合 GTP 和 GDP 的 21 000 道尔顿蛋白质,在正常细胞中存在极小量,其功能至今仍然完全是一个谜。

起致癌基因作用的细胞基因总是遭受了某种遗传缺损,致使或者其活力水平增高,或者其基因产物的功能发生改变,但是其中的细节还不清楚。这些最近的发现有力地提示了,相当小的一群基因能导致许多种类的癌。

小结

诱发动物肿瘤的 DNA 和 RNA 病毒经常也可诱发离体培养的细胞恶性转化。通过我们现有的对肿瘤病毒基因组进行实验操作的能力,已经得到了一些关于癌的特性的基本事实。RNA 肿瘤病毒(逆转录病毒)的致癌基因(引起肿瘤基因)是正常的细胞基因,它们以其原有的形式或略有改变的形式偶然插入到逆转录病毒基因组内。几种逆转录病毒致癌基因编码细胞膜结合的蛋白质激酶,它对特定的细胞蛋白中的酪氨酸残基起磷酸化作用。经逆转录病毒侵染后这种蛋白质超量生产,必定以某种途径放松了调节细胞生长和分裂的正常控制机制。不久以前在某些人体肿瘤的细胞中发现含有一些先前分析致癌逆转录病毒时发现过的同样的改变过的细胞基因。

S 期中的事件^{17,18,19}

用突变的酵母细胞作材料的研究证明,核膜上有一叫做纺锤极体(spindle pole body)的结构,它的复制是 DNA 合成开始之前所需要的。在动物中这一结构的同类物是中心粒(centriole);中心粒有两种作用,一是作为微管的组织中心的一部分,后者与间期核有紧密联系(细胞中心,一是在有丝分裂时作为每个纺锤体极的组分。中心粒似乎以模板过程进行复制,每一细胞周期进行一次(见图 11-19)。如同酵母的纺锤极体那样,达到中心粒复制的特定阶段很可能是 DNA 复制起始的关键事件。遗憾的是目前还没有方法来阻断中心粒的复制,因而尚不能检验这个设想。

事实上,我们还不了解 DNA 合成开始的真正的触发开关;也不知道 S 期 DNA 的复制是突然间在基因组的许多位置上同时开始,还是仅从少数位置上逐渐展开。甚至可能合成是从染色体的一特定区域的复制起始,然后再触发一连串继发的在别地方的起始事件。无论其细节如何,这触发机制明显地是属于“全或无”的类型,因为一旦 S 期开始,

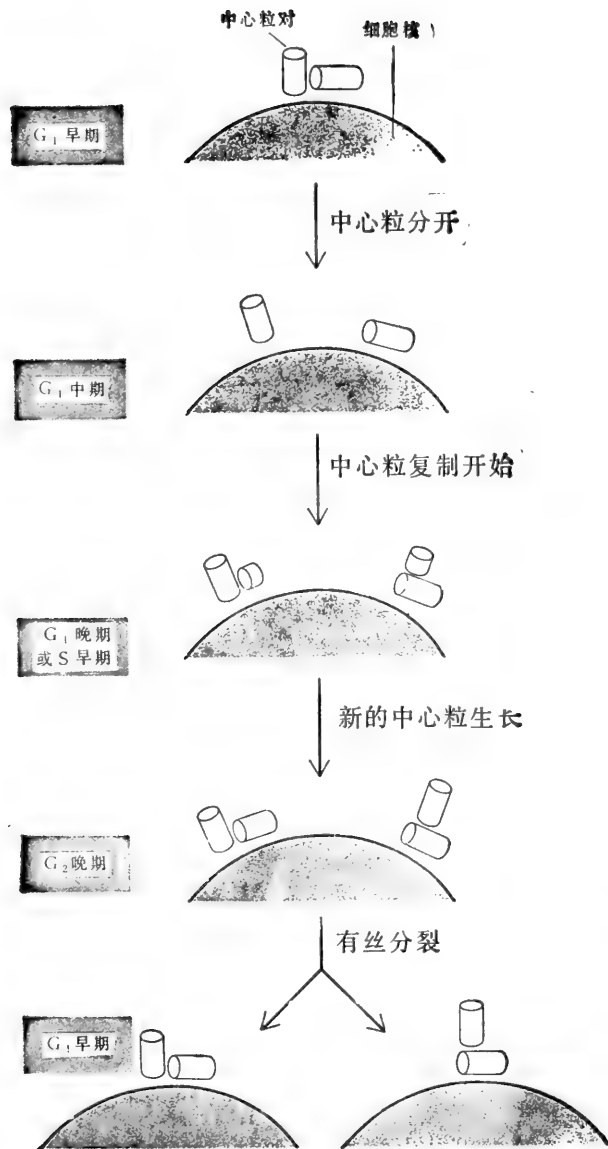


图 11-19 中心粒复制的过程，它同每次细胞周期协调一致。电镜观察发现每个子中心粒当其成长时进行着一系列的形态变化，这提示中心粒复制是一个十分复杂的过程，不像这里画的这么简单。中心粒分离和子中心粒形成的某早期阶段的来临，可能是进入细胞周期 S 期必需的事件。（参阅 P. Sherline and R. N. Mascardo, *J. Cell Biol.* 93:507—511, 1982）

DNA 复制将继续下去，直到细胞 DNA 全部复制完成。

S 期中每个染色体上复制叉簇同时活化¹⁹

如第五章讨论过的，在复制起点产生 DNA 复制叉（replication fork）的特定的事件开始后，DNA 便合成了。此 Y 形构造是不对称的，因为在先导和后随两条链上合成 DNA 的方式彼此不同（图 11-20）。细菌基因组是如此小，以致只需要两个复制叉就能

在每个细胞世代完全复制所有的 DNA。但是一个哺乳动物染色体的 DNA 要长 50 倍，所以必需有许多复制叉同时地移动，从而在一适当的时期内完成复制。整个 S 期中，在每个染色体上，平均大约有 100 个复制叉同时操作。这些复制叉是怎样沿着染色体分布的？在一个细胞中又是怎样保证在每次周期内所有 DNA 的完全复制？

最先用来测定真核染色体怎样复制的方法在 60 年代初期就已经建立起来了。离体培养的细胞用氘化胸苷短时期地标记，从而使这个时期合成的 DNA 带有强放射性。随后细胞被温和地解体，把 DNA 铺展在玻片上，得到长的伸展的 DNA 分子。最后，将玻片涂上一层照像乳胶膜，于是标记 DNA 的图像就可以用放射自显影来测定了。由于放射性标记的时间是选定使每个复制叉沿着 DNA 上移动几个微米，复制的 DNA 在光

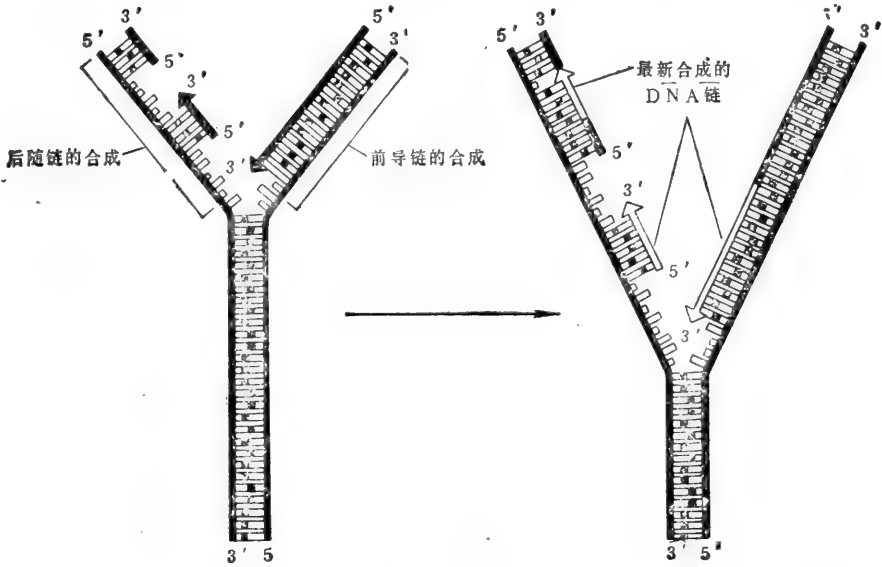


图 11-20 DNA 复制叉的不对称结构。如前面详细讨论过的，DNA 聚合酶只能从 5' 端向 3' 端的方向合成 DNA 链。因为 DNA 双螺旋的两条链是以相反的方向走向，亲代 DNA 模板的一条链必定按一非连续的“反向包扎”（“backstitching”）机制来拷贝。所以，在这条链（叫做后随链）上的合成和另一条链（叫做前导链）上的合成很不相同，因而这复制叉是不对称的。

学显微镜下呈现为银颗粒的线条，虽然 DNA 本身是看不见的（DNA 螺旋的直径仅有 2 nm，而光学显微镜的分辨率是 200 nm）。图 11-21 (A) 表明所得的这种结果，暗黑色轨迹为复制的 DNA，其长度随标记时间的增加而延长，发现真核细胞中复制叉是以大约 50 个核苷酸/秒的速度移动的。这一速度仅是细菌复制叉移动速度的十分之一，这可能反映了包装在染色质中的 DNA 增加了其复制的困难。

由于平均一条人染色体被设想是由一条包含大约 150×10^6 相连接的核苷酸的 DNA 分子组成，如果只由一个复制叉从头到尾以 50 核苷酸/秒速度移动来复制这样一条 DNA 分子，将需要 $0.02 \times 150 \times 10^6 = 3.0 \times 10^6$ 秒（约 800 小时）！事实上，典型的 S 期只经历 8—10 小时。所以，上述放射自显影方法表明，在每条真核染色体上有许多复制叉同时移动是没有什么可奇怪的。令人惊奇的倒是，许多复制叉常常是在同一 DNA 区域紧密地挤在一起，而同条染色体上的其他区域则没有。应用探测复制叉的速度和位置的各种方法，还可能分析复制叉的方向 [图 11-21 (B)]。这类实验证明了如下的事

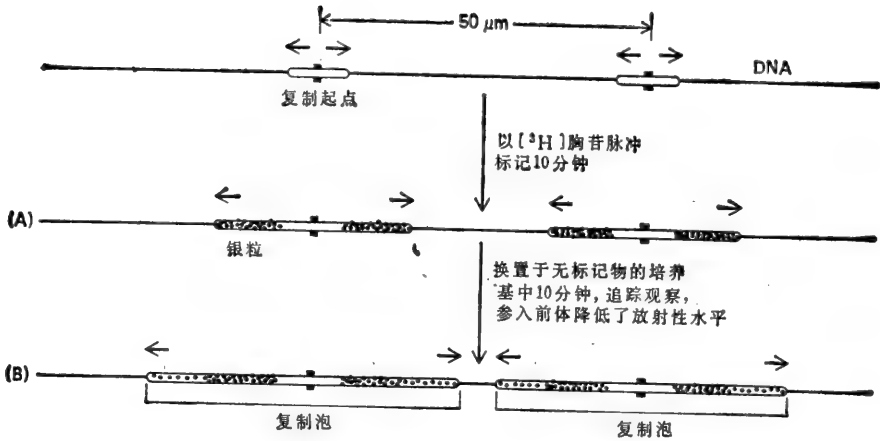


图 11-21 证明 S 期复制叉移动型式的实验的示意图。人体组织培养细胞经短时间强放射性胸苷脉冲量标记。(A) 所示实验中细胞被溶解, DNA 铺展在玻片上, 然后涂上一层照相乳胶。几个月以后, 乳胶曝光, 在放射性 DNA 上呈现银颗粒线条。(B) 同样的实验, 只不过细胞继续培养在无放射性同位素的培养基中, 允许其余的 DNA 继续复制, 但放射性很低。在 (B) 中发现暗色痕迹成对, 记录下相反方向的银粒, 这一事实首先提示, 复制叉是从一个中心复制起点开始双向地分开移动(见图 11-22)。注意, 图中黑色的 DNA 只是帮助解说放射自显影照片; 在这样的实验中无标记的 DNA 是看不见的。

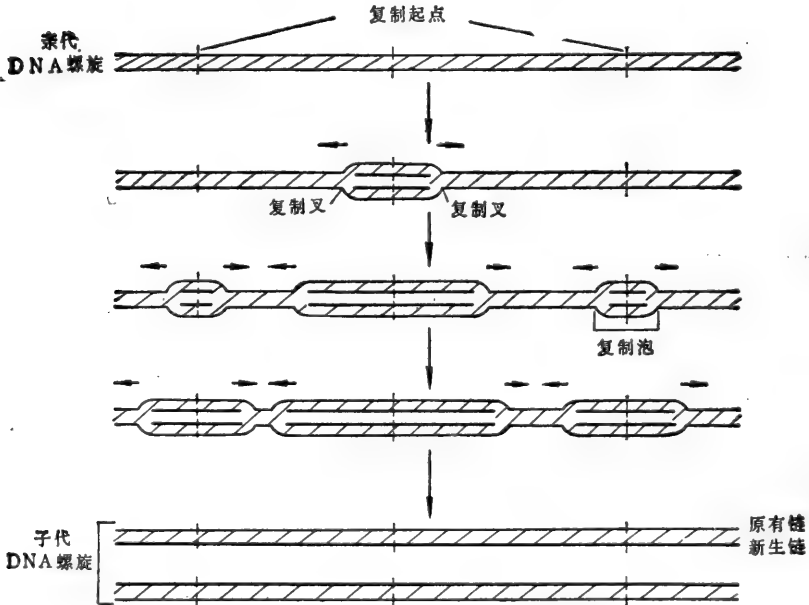


图 11-22 真核细胞染色体上 DNA 复制的型式, 由图 11-20 示明的实验最先证明。在大多数细胞中, 复制起点是以 30 000—300 000 碱基对间隔排列着。设想一复制叉只是在与相反方向来的复制叉相遇时才停止移动; 按这种方式, DNA 最终全部得以复制。

实。

1. 复制叉起点趋向于成簇(叫做复制单位, replication units)地被激活, 每簇或许有 20—80 个起点; 在这样的单位内每个起点同下一个之间以相距 30 000—300 000 碱基

对的间隔排列。

2. S 期自始至终都有新的复制单位簇被激活,直到全部 DNA 都复制完。

3. 发现大多数的复制叉是成对的: 成对的两个叉是从一个共同的起点开始, 向相反的方向移动开, 形成了一种被称为复制泡 (replication bubble) 的结构。

4. 一个复制单位内的复制叉, 当它们遇到从相反方向移动来的邻近的复制叉时就终止了。按这种方式, 区域内的全部 DNA 被复制, 形成两个完整的子代 DNA 螺旋(图 11-22)。

5. 在整个 S 期复制叉以同等的速度移动。

当 DNA 复制时新的组蛋白被装配在染色质上²⁰

真核细胞染色质的结构层次在图 11-23 简明地作了描述。如第八章所评述的, 四种核小体组蛋白 (H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4) 中, 每种的两个拷贝结合成一圆盘形的八聚体蛋

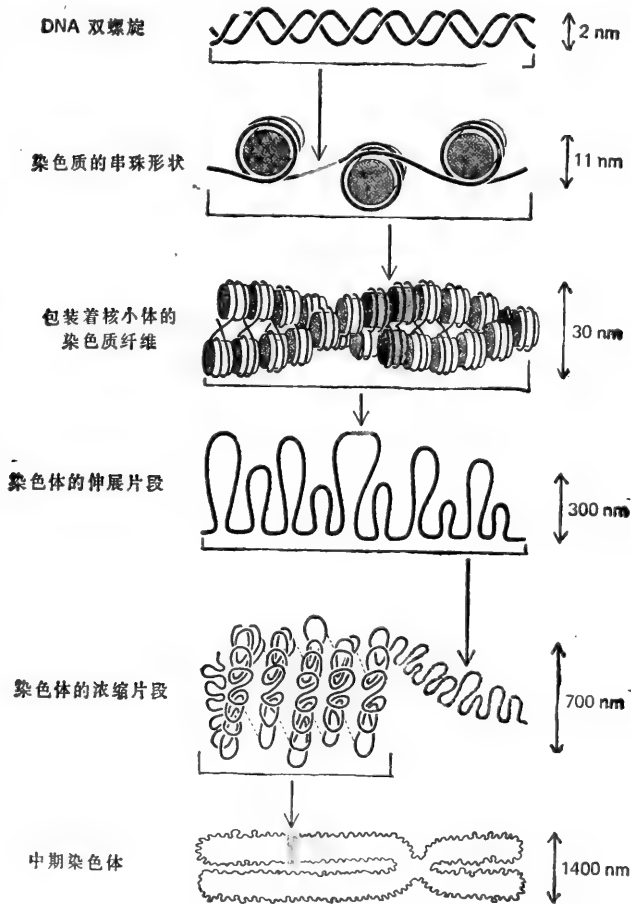


图 11-23 染色质结构概观。从上往下: DNA 双螺旋结构;一串 3 个核小体;直径 30nm 染色质纤维的一段;一串 10 个相连接的由 30nm 纤维折叠形成的环状区域;部分中期染色体的模型, 以及整条中期染色体。对研讨 DNA 复制最重要的实体是核小体本身, 它看来从不与其结合的 DNA 分开;侧环区域设想是起着基因表达功能单位的作用, 并可能包含一个复制起点。

白质核心,染色体的双链 DNA 以 200 碱基对的间隔缠绕着这核心,形成核小体 (nucleosome)。相邻的核小体捆扎在一起形成直径大约 30 nm 的染色质纤维,它的精确结构尚不知道。设想这纤维再次折叠成大的侧环区域,每个侧环区域含有相当数万个 DNA 碱基对长度的染色质。从特化的多线和灯刷染色体来类推,侧环区域被设想是 RNA 转录的功能单位——随着基因的开和关整个区域相应地松解和浓缩。这些侧环区域在分裂间期以未知的方式浓缩,而在有丝分裂时它们进一步浓缩形成分裂中期染色体(图 11-23)。

新染色体的形成需要大量的新的组蛋白,其质量大约相当于新合成的 DNA。假使每种组蛋白只由单个基因编码,那么组蛋白的合成就会落后于 DNA 的合成。由于每种组蛋白基因有多个拷贝,所以组蛋白的合成能保持同步。脊椎动物细胞大约具有 40 套重复的包含所有五种组蛋白的基因。这 40 套基因被设想是簇集在染色体的一个位置上。

大多数蛋白质是在整个分裂间期连续不断地合成(见 620 页),与此不同,组蛋白主要是在 S 期合成。组蛋白的合成似乎是受转录水平和 mRNA 降解水平两者的调节。这是能证明的,即当 DNA 合成停止(如在 S 期末或添加 DNA 合成抑制剂时)组蛋白 mRNA 即变得异常不稳定:没有 DNA 合成时,任何现存的组蛋白 mRNA 都在几秒

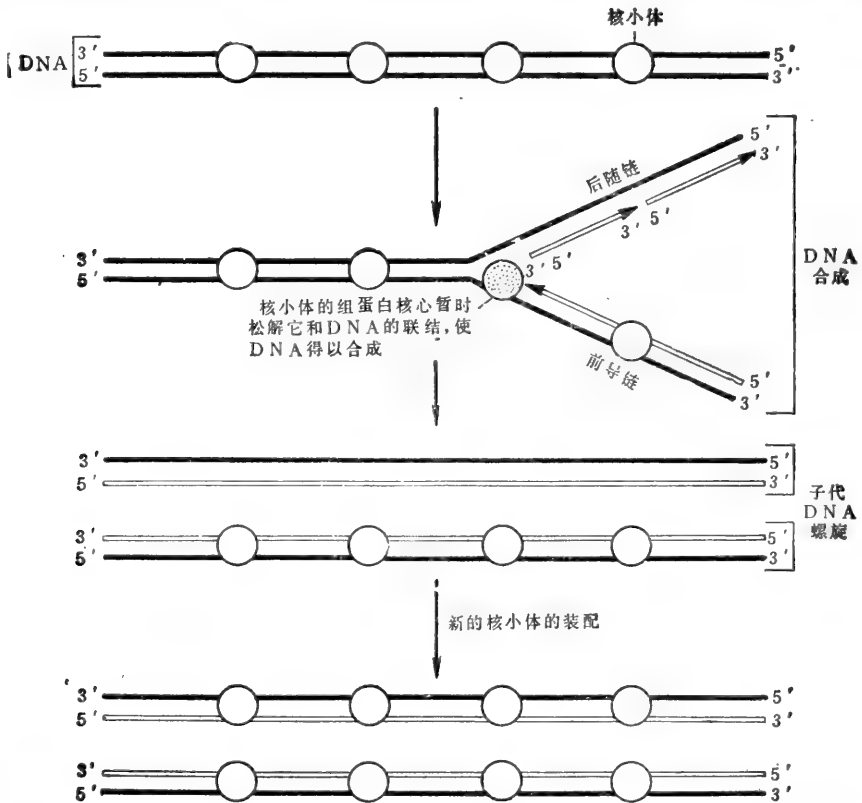


图 11-24 图解说明预先存在的核小体中的组蛋白八聚体转移到子代 DNA 螺旋上的设想。子代螺旋是在复制叉前导链上形成。虽然关于被捆缚在核小体组蛋白上的 DNA 是如何复制的机制尚未知道,但有证据证明,原先的组蛋白八聚体在复制终止了只能移到复制叉上的两个子代螺旋中的一个。

内降解。相反,组蛋白本身是异常稳定的蛋白质,它在细胞整个生命期间都存在。DNA合成与组蛋白合成之间的联系似乎反映出反馈机制,它监控着游离组蛋白的水平,并保证新生成的组蛋白相当于新DNA合成的量。

一旦组蛋白装配进核小体,就不再同与之结合的DNA分开。所以,复制叉的进行必须以某种方式通过亲代的核小体。这是怎样进行的,还不知道。但是有一个实验提示,老的组蛋白八聚体可直接递交给在复制叉的前导侧合成的子代DNA螺旋,如图11-24所示。如果真是这样,那么形成新核小体核心(由新的组蛋白H2A、H2B、H3和H4组成)的全部新的组蛋白八聚体将装配到沿复制叉后随侧生成的无组蛋白的子代DNA螺旋上。

这些新的组蛋白在复制叉通过后最初的几分钟,就装配到子代DNA螺旋上。因而当复制的染色质被铺展开,并在电镜下检查时,可观察到Y形的复制叉,其两个子代DNA螺旋同样包装成核小体。然而,假使蛋白质合成(包括组蛋白合成)为放线菌酮所阻断,而DNA合成继续进行30分钟左右,这染色质的电镜照片表明,从复制叉的一侧延伸出很长的一段缺乏组蛋白的DNA(图11-25)。当去除放线菌酮,组蛋白合成重新开始,所有已积聚的裸露DNA迅速被包装成核小体。S期细胞能经受放线菌酮短时间处理而存活的事实证明,合成的DNA并不一定需要马上包装成核小体而细胞仍能存活。

与基因相关的复制起点的方位可能具有重大的生物学意义^{20,21}

由几种动物病毒上测定的独特的复制起点类推,看来复制起点可能是特殊的DNA序列,因而如图11-22所示的复制泡在正常时仅在DNA的一定部位上开始。其次,复制起点间的平均距离与染色质相邻的侧环区域之间的距离大约相当。因此,一般来说,每个侧环染色质区域可能只有一个复制起点。

按照我们以前的讨论,当两个复制叉从一个复制起点分开移动时,不同的子代DNA螺旋应从起点的各侧接受来自亲代核小体的组蛋白八聚体(见图11-26)。在这种情况下,与转录单位或基因相关的复制起点的精确位置将决定先存的亲代组蛋白是怎样传递给两个子代基因的。并不是所有的核小体都是完全相同的,不同的基因区具有不同的染色质结构。与基因相关的复制起点的精确位置因而将具有重要的生物学意义,决定下一细胞世代中该基因的染色质结构,如图11-27说明中所概述的。

S期中同一染色体上的不同基因区在不同的时间复制²²

一个复制起点同下一个复制起点之间区域中的DNA复制,正常要求于30分钟内完成,这是由测定一个复制单位中复制始点之间的距离和复制叉点移动的速率而得出的。

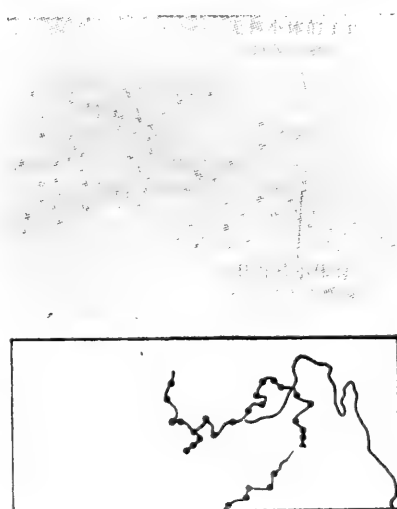


图11-25 铺展开的染色质的电镜照片,表明由于新的组蛋白合成被放线菌酮抑制,无核小体的DNA不正常地伸长。在铺展的适当区段,可看到无组蛋白的DNA仅由复制叉的一条链延伸出来,这同图11-24所示一致。(照片由Harold Weintraub赠)

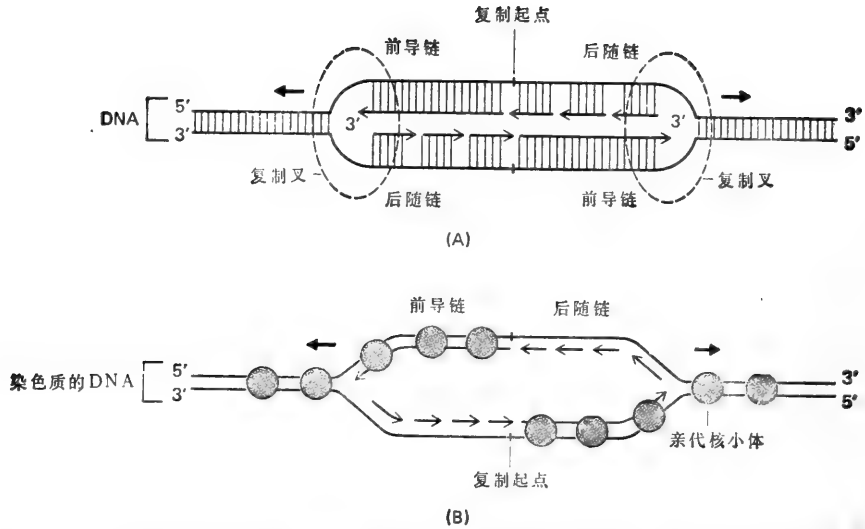


图 11-26 说明先存的组蛋白可预期地分配到 DNA 复制起点两边相反方向的子代 DNA 螺旋去;假若先存组蛋白八聚体的行为像图 11-24 中所设想的。(A), 假若比较从单个复制起点移动开的两个复制叉, 可以看到复制叉的前导链可合成一不同的子代 DNA 螺旋(由于 DNA 双螺旋中两条链的逆平行联结, 在这两个复制叉的每一个上, 不同的 DNA 模板链必须按 5' 端向 3' 端方向来拷贝)。(B), 表明在这些复制叉上亲代组蛋白预期的分配型式, 为了清晰起见省略了新的组蛋白在后随链上的重新装配。

可是, 哺乳动物细胞的 S 期通常大约为 8 个小时。这意味着每个复制单位(包含有一簇大概 20—80 个复制起点)中 DNA 只在整个 S 期期间的一小阶段进行复制。

复制单位是随机地被激活, 还是基因组的不同区域在复制时有着一定的次序? 由于应用胸苷的类似物 5-溴脱氧尿苷 (BrdU), 在整个 S 期间不同的一小时阶段标记同步的细胞群, 这个问题已得到了十分明确的回答。这些有 BrdU 参入其 DNA 的有丝分裂染色体区域, 由于降低了对一定染料的上色而可能被识别出来。所以, 检查下一次有丝分裂时形成的浓缩染色体就可发现前面的 S 期的每一阶段复制的区域。图 11-28 阐述了任意选择的单个染色体的典型结果。对经过这方法处理的染色体的详细分析表明染色体区是以大单位来复制的(如人们可从在 DNA 放射自显影照片上见到的成簇复制叉所预期的)。每个染色体的不同区域在 S 期中都是按着可重复的次序进行复制的, 应用这些技术, 在大多数染色体上至少可分辨出复制单位的三个时间群。

S 期中复制时间与分裂间期染色体结构相关²³

在大多数高等真核细胞中, 某些 DNA 区域明显地比其他区域更浓缩。这种异染色质 (heterochromatin) 甚至在分裂间期仍保持相对浓缩的状态, 这个时期染色体被认为呈较松散的状态, 它们活跃地合成 RNA。由于异染色质上的 DNA 不转录成 RNA, 所以说是失活的。间接的证据提示, 这种染色质异常的浓缩抑制其基因的表达。

对确定复制时间意义的一个重要线索是基于这一观察, 即浓缩的异染色质区, 包括在整个分裂间期均保持浓缩状态的着丝粒的附近区域, 在 S 期的很晚期才复制。看来这迟晚的复制与染色质中 DNA 的包装有关。与此有关的一个重要例子是发生在哺乳动物雌体的失活的 X 染色体。这整条染色体仅仅在 S 期晚期复制, 而其活化的同源染色体在

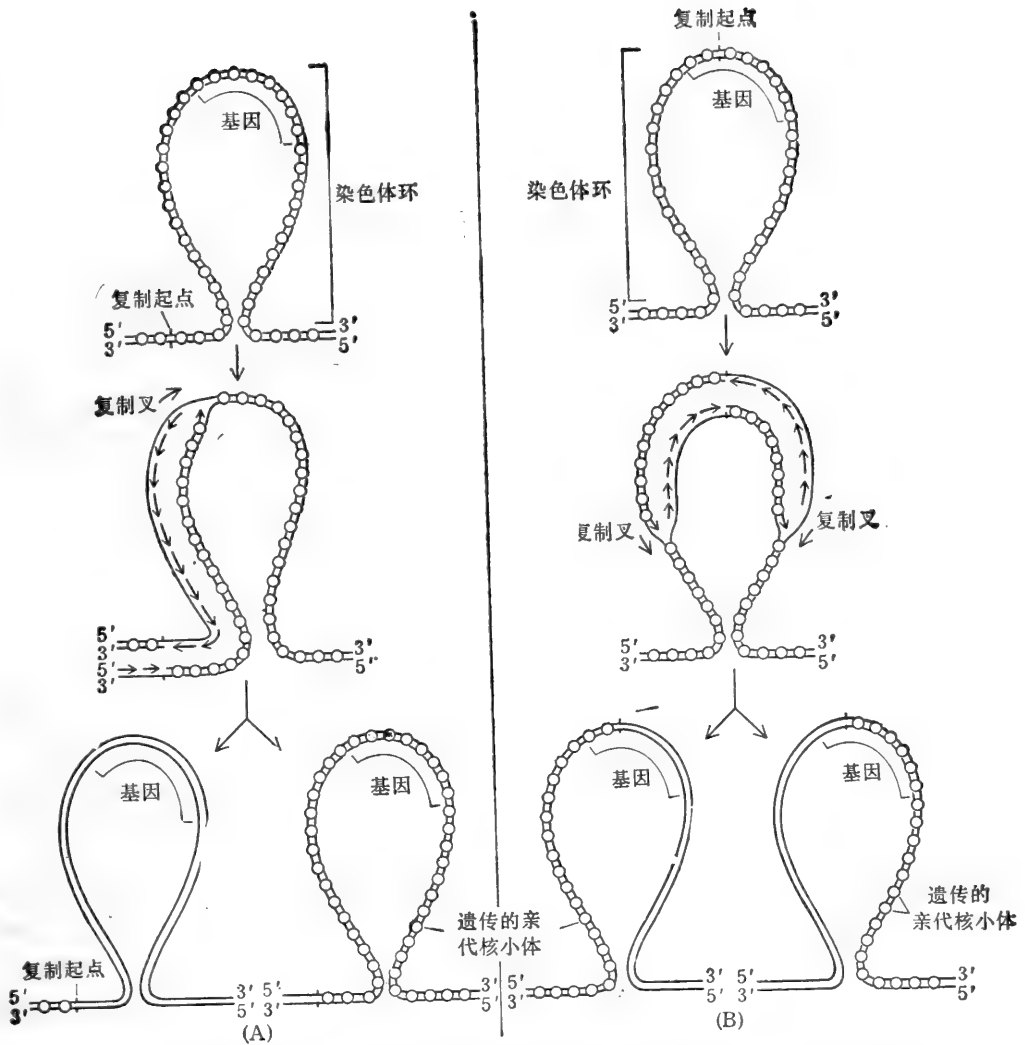


图 11-27 假若亲代的组蛋白八聚体仅转移到一复制叉上两个子代螺旋中的一个，那么在遗传区域亲代组蛋白遗传的型式将视其最接近的复制起点的位置而定。

(A) 假若一复制起点是近处于一个染色体侧环区域的一端，那末在这环上的全部 DNA 复制只由单个复制叉沿着环进行，所有环上原先的组蛋白八聚体将仅转移到两个子代侧环区域中的一个。(B) 假若复制起点正好处在一侧环区域的中心，区域的原先组蛋白八聚体将平分地转移到每个子代染色体。(A) 和 (B) 所示核小体遗传的两种极端的型式间的差异具有重要的生物学意义。

整个 S 期过程均复制。尽管这两条 X 染色体含有完全相同的 DNA 序列，但只有失活的 X 染色体才浓缩成异染色质。因而复制起点被激活的次序必须基于（至少部分地基于）起点所在处的精确的染色质结构。现有证据提示，基因组的在分裂间期最松散的染色质区域，因而最易与复制机构接近的区域，是最先复制的。

这观点同如下的发现是一致的，即图 11-28 所示在有丝分裂中期染色体上见到的许多复制单位同染色体组型分析时用各种固定和染色方法显示的清晰的染色体带纹相当。多达 2000 个分明的染色体带可以在哺乳动物有丝分裂的染色体单倍体组中检测出来，每

条带可能代表具有同样染色质结构的 DNA 邻近区域在有丝分裂时的浓缩。这些相邻区域在 S 期似乎是作为一个单元被激活而进行复制。这事实暗示即使在分裂间期一条带上的染色质也是一结构单位。

在有丝分裂时所见到的形成染色体带的染色质相邻区域是不是也起着基因表达的功能单位的作用呢？如果是这样的话，可以预料，在该基因进行表达的细胞中这样的带上

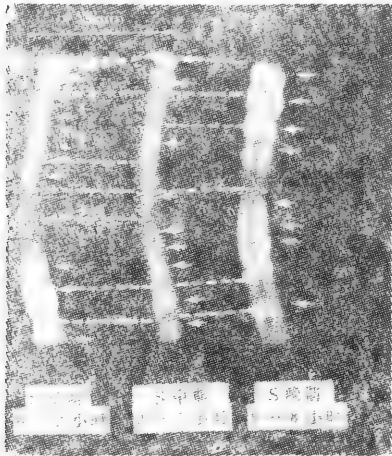


图11-28 经染色的一条有丝分裂染色体的光学显微镜照片，其复制的 DNA 在前面的 S 期的不同时间间隔作了差别标记。在这些特殊的实验中，培养生长在含合成的核苷5-溴脱氧尿苷培养基的细胞，在其 S 期的早、中、晚三个阶段用胸苷作短时间脉冲处理。因为经胸苷处理时合成的 DNA 是一条含 T 的链和另一条含 BrdU 的链的双螺旋，这双螺旋比其余的 DNA（双链均含有 BrdU）染色更深，在负片上呈光亮的带（箭头所指）。虚线连接染色体三个拷贝的对应位置。（Elton Stubblefield 赠）

可能专一地识别每个染色体带，并使它松解，从而使它的 50 个复制起点同时能和复制蛋白起作用，形成复制泡；或是（2），一旦这些复制蛋白找到一组中的几个起点，随之而来的局部复制可能干扰了复制单位中其余部位的染色质结构，从而启动了所有其余起点上的复制。这些模型的任何一个似乎都能够解释 S 期不同的染色体带上 DNA 的“全或无”的复制。

我们还必须说明染色体带复制的有规律的次序安排。曾提出过两种不同的设想来解释这种次序安排。按一个想法，对特定的染色体带专一的不同的复制蛋白是在 S 期内的不同时间合成的。另一种设想，目前看来更为可能，是假设复制蛋白仅作用于它们最易于接近的区域；例如，分裂间期染色体可能发生连续的松解，随着染色体带的解旋，复制蛋白便能一个接一个地和这些带接近。

染色质结合因子保证了 DNA 每一个区域在每次 S 期仅复制一次²⁴

整个 S 期内 DNA 复制的许多新起点被激活了，因为每个复制单位中相连的起点是以间隔 30 000—300 000 碱基对排列着，从任何一个起点起完成合成所需的时间将在 5—50 分钟范围。因为典型的 S 期经历只 8 小时，这就提出了 S 期的中、晚阶段中的大量的

DNA 包装成的染色质结构要比静止细胞中的为松。事实上，有关于比较来自不同组织的细胞的特定染色体带在复制时间上存在差异的报道。假若这些报道是确实的，它们暗示多细胞动物中的细胞分化过程伴随着特定染色体带的染色质结构的精细变化。这些变化反过来又可能在胚胎发育中起中心作用，帮助决定在细胞分化时每类细胞中哪套基因表达。

DNA 复制的时间是怎样控制的？^{19,24}

虽然我们知道了在分子水平复制叉上 DNA 复制的机制，然而复制泡是怎么形成的，复制的时间安排是怎样调节的，仍然还不清楚。例如，在 S 期每个复制单位（或染色体带）上的许多复制起点是怎样一下子全部都被激活的？一个复制单位可能含有平均大约 50 个相邻的侧环区域（每个区域可能有一单独的复制起点），甚至在分裂间期的染色质上也是以特殊方式紧挨在一起。因此，复制至少受两种不同的方式控制：（1）某种总体系统

“记账” (bookkeeping) 问题。那些已经用过的复制起点是已完全复制的，而它们至少在 DNA 序列方面同其他未使用过的复制起点假定是相同的，每个复制起点在每次 S 期必须使用一次，也只能有一次。这是怎么实现的呢？

虽然其分子机制尚不明白，但通过细胞融合实验已揭示了“记账”问题的一般答案。当一个 S 期细胞同 G_1 期细胞融合， G_1 期细胞核就被诱导出现 DNA 合成，这提示了从 G_1 期到 S 期的转移有一可扩散的 DNA 合成启动因子起着介导作用。相反，S 期细胞同 G_2 期的细胞融合则不能诱使 G_2 期细胞核的 DNA 合成，即使 S 期细胞核仍继续合成着 DNA。这说明 G_2 期染色质是不可能复制的，因为有某些不扩散因子与它紧密结合着。

这类不可扩散的抑制因子的存在完满地解释了上述的“记账”问题；或者由于改变了新复制 DNA 的染色质，保证经过复制的 DNA 在同一次 S 期中不再复制了。由于 G_2 期细胞核中所有的染色质均按这种方式被阻断，即使同 S 期的细胞质相结合，它的 DNA 也不可能再复制。另一方面，这抑制因子必须在有丝分裂时或临近有丝分裂时被除去，因为子细胞中出现的 G_1 期细胞核的 DNA 只要受到 S 期细胞质的作用就能复制(图 11-29)。

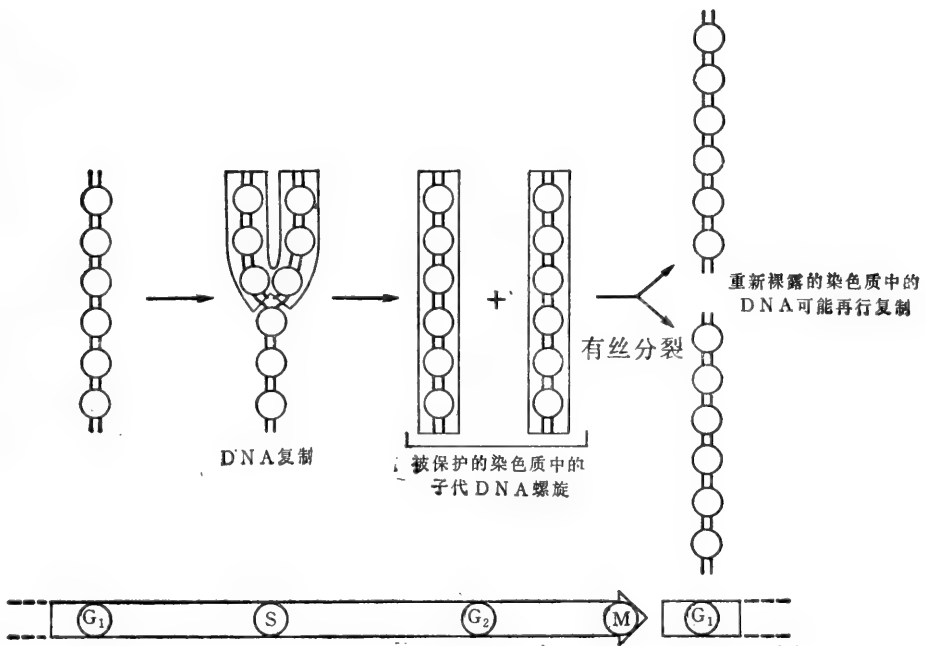


图 11-29 图解表明在同一细胞周期中已经复制了的 DNA 被保护起来，以避免再被复制。这种保护对“信息贮存”的复制是严格的，可是它的分子性质尚不清楚。

小结

在 DNA 复制起点上，两个复制叉向相反方向移动，形成复制泡。复制叉通过之后，染色质的结构随即迅速恢复，旧组蛋白似乎仍以核小体状态结合到一个子代 DNA 螺旋上，而新组蛋白则在另一个子代 DNA 螺旋上装配成核小体。因而设想亲代组蛋白是直

接遗传下来了。

相距约一个染色质区域的许多相邻的复制起点簇,在S期内差不多同时被激活。由于复制叉约按50个核苷酸/秒的速率移动,每个复制起点簇(叫做复制单位)中DNA合成的完成应不到一小时。整个典型的8小时S期内,不同的复制单位按部分地为它们的染色质结构所决定的次序被激活,染色质的最紧密区域最后复制。复制单位和有丝分裂时所见到的染色体带之间的一致性,提示它们是染色质的结构单位,也是功能单位。

细胞周期的逻辑性

大部分蛋白质在整个分裂间期不断地合成

不仅仅DNA及与它关联的蛋白质必须在细胞周期中复制,而且细胞的每个组分,并因而它的体积,在相连的两次有丝分裂之间都必须倍增。按照这一要求细胞中大量的各种各样蛋白质和RNA分子,不同于DNA,在整个分裂间期不断地合成,这或许不是什么令人惊奇的事。图11-30表明一典型的曲线,描述了细胞周期中细胞质量的增加,细胞蛋白质总量或细胞总RNA量的增加。由于细胞变大,它的合成能力也随之增加,当细胞从G₁期到G₂期时这三个参数的每一个都按不断上升的速率升高了。

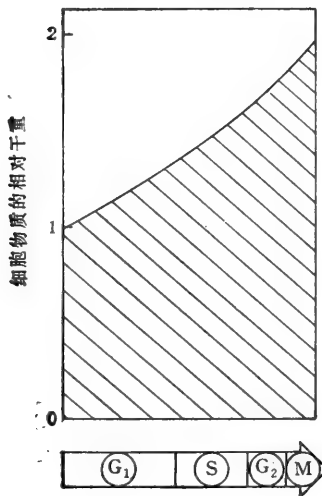


图11-30 所观察到的细胞质量增加对细胞周期时间作图。整个分裂间期过程,细胞的大部分组分不断地生成,通常随着细胞(和它的生物合成能力)的增大而速率提高。注意,如果维持着生长的稳定状态,则细胞周期中每个组分必定精确地增加一倍。

在哺乳动物同步化的细胞群中,用双向凝胶电泳分析细胞周期各个阶段产生的蛋白质指出,在所检测到的1000种主要蛋白质中,仅有少数几种主要在细胞周期的特定时间合成(图11-31)。

细胞周期是按顺序反应的专性系列进行着^{18,23}

由于对只在低温(哺乳动物细胞的24℃,酵母细胞为23℃)下生长和分裂,而高温(哺乳动物为39℃,酵母细胞为36℃)下不生长和分裂的细胞突变株的研究,细胞周期的性质已得到阐明。这种“温度敏感”突变细胞一般含有一种改变了的蛋白质,它只能在低温下表现功能。大多数的这类突变细胞在温度升高后立即表现出生长缺陷。但也有少数突变细胞,它们细胞分裂只在进入一特定的阶段特异性事件时才停止,例如DNA合成的开始、核分裂或胞质分裂时(图11-32)。

这类细胞周期突变体在面包酵母上曾作过最广泛的分析,从其中已分离出代表35个以上不同的细胞分裂周期基因[cell-division-cycle(cdc) genes]的突变体。这些突变体已被用来研究特定蛋白质功能与细胞周期间的普遍关系。

从这类研究得出的主要结论之一是酵母中许多不同的蛋白质对细胞周期特定事件有必不可少的作用。其次,这些蛋白质并非必须在周期中起作用的时刻合成不可,因为已发

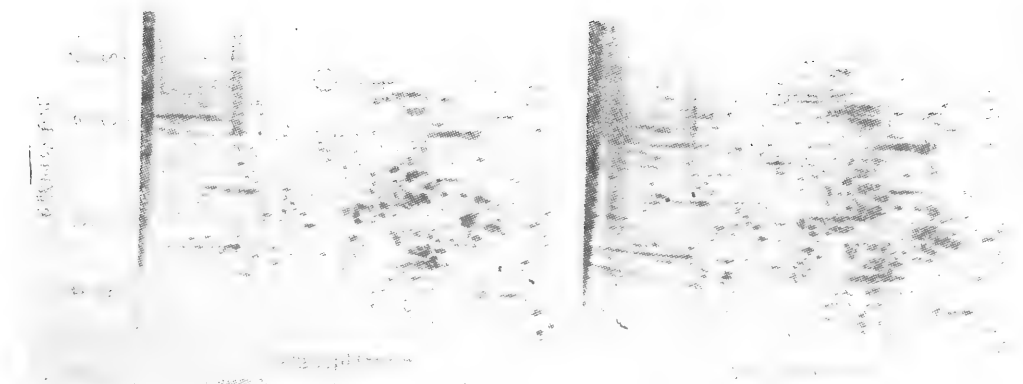


图 11-31 用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳方法分析细胞周期中 G_1 期和 S 期所合成的蛋白质。用放射性氨基酸的混合剂短时间标记同步化的老鼠淋巴瘤的 G_1 早期或 S 晚期的细胞。在放射自显影照片上面可以测出约 1000 种不同的新合成的蛋白质,但只有用圆圈和方框围着的两种蛋白质表现出可测出的不同速率。因为它们带正电荷,组蛋白移出了这凝胶,没被测出。(引自 P. Coffino and V. E. Groppi, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 14:399—410,1981)

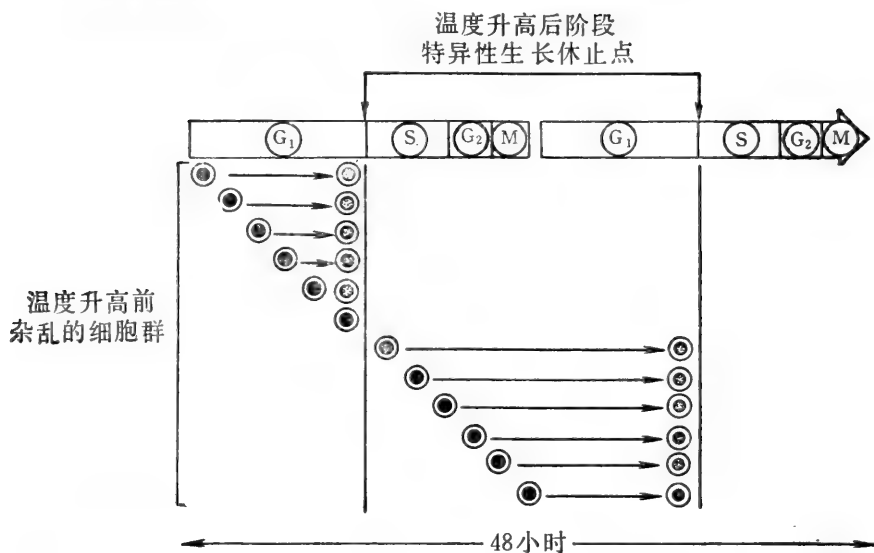
现注射正常(野生型)的细胞质能够使大多数突变细胞在高温下进行数次正常细胞分裂,这暗示这些蛋白的量在整个酵母细胞周期中大大超过一次周期所需要的量。同样在哺乳动物整个细胞周期中以均一的速率产生的许多蛋白质(图 11-31),仍然可能在细胞周期的特定时刻起作用。

酵母突变体也提供了关于细胞周期中所涉及的生化途径的重要资料。例如,可以提问,以 *cdc* 突变体确定的各种蛋白质在细胞周期上有多少个不同的作用点。例如 DNA 复制需要许多不同的蛋白质;为了完成 S 期应同时需要多种不同的 *cdc* 基因产物,而这一点也确被观察到了。同样到目前为止的实验已证明酵母的 *cdc* 蛋白质至少可归为七“组”,代表着周期中所必需的七个不同的生物合成事件。已有可能确定这几组蛋白质作用的时间顺序,并追问在这系列中一个事件的完成是不是下一组蛋白质能够起作用的必要条件。

如果我们的注意力只限制在细胞核内发生的事件,那末出现的是一种细胞周期特异性反应的严格的连续的次序安排的情景,如图 11-33 所示。酵母细胞周期的这几组反应组织成象呈线性排列的七巧板,其中必须先把独特的一块放在一定位置上后,才能加上一块。其结果这些事件总是按一严格的次序循环往复。例如,纺锤极体必须在 DNA 复制之前复制, DNA 必须在核分裂之前复制;在纺锤极体再度复制之前细胞核必须分裂。原则上,这样构成的细胞周期时间安排将只受预制“块”的添加速率控制了而细胞周期某部分专有的蛋白质合成并非必需。

从应用哺乳动物 *cdc* 突变体以及专一的代谢抑制剂进行研究得到的有限资料看来,酵母方面的结果似乎一般也适用于哺乳动物细胞。例如,在哺乳动物和在酵母一样,胞质分裂通常都依赖于细胞核分裂,而后者依次又依赖于 DNA 复制的完成。另一方面,在酵母和哺乳动物细胞,第二次核周期(由 DNA 复制和核分裂构成)的启动不依赖上一次周期中发生的胞质分裂:假若胞质分裂被阻断,结果一个细胞含有两个细胞核。这是对上述线性次序一般规律的一个重要例外。

温度敏感细胞分裂周期 (cdc) 突变体



其他温度敏感突变体

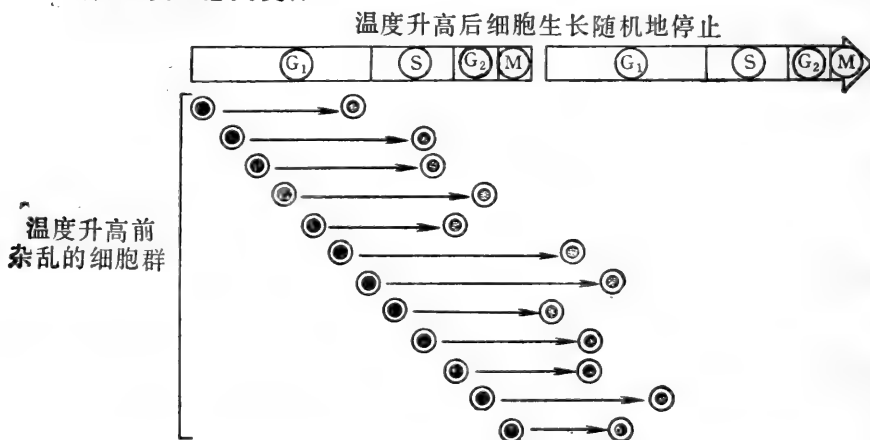


图 11-32 图解一个温度敏感细胞分裂周期 (cdc) 突变体是怎样区别于其它温度敏感突变体。大多数在高温下不能生长的突变细胞将缺失在细胞周期各阶段一般生活所需要的某些过程 (例如, ATP 的生产)。如图所示, 这些突变细胞在高温下一定时间后即停止其周期的行进, 而且停止其周期于任何一点。相反, cdc 突变细胞仅在细胞周期一特定阶段停止其周期的行进, 这是每个特殊突变体的特征 (如图所示的停止于 S 期的开始)。

细胞周期早期的控制大体上决定有丝分裂时细胞的质量^{7,26}

曾测量过各种离体培养细胞在有丝分裂时的细胞体积, 以确定细胞体积调节的精确程度如何。曾观察到有丝分裂时的体积有相当大的变动, 甚至在遗传性相同的细胞也是这样。然而, 比较相关的四倍体、二倍体和单倍体细胞系, 其有丝分裂时细胞的平均体积分别为 4、2 和 1 之比。这提示有一种与核 DNA 含量有关的调节细胞体积的机制存在, 但是这种调节在各个细胞水平上还是相当不精确的。

新形成的子细胞比之它们后来进入有丝分裂时在体积上有较大的差异。子细胞间巨大的体积差异在 S 期开始时即消失了,因为较小的子细胞将停留在 G₁ 期,一直到它们长大到大约同较大的细胞一样大小的时候(图 11-34)。从这时刻开始,分裂的各时相就以同样的速率进行了。同样的,用低剂量的蛋白质合成抑制剂使细胞蛋白合成的速率降低一半,则其 G₁ 期平均将延长三倍,而其后的 S 和 G₂ 期的时间则仍保持不变。因此,一个哺乳动物细胞从开始合成 DNA 的时候起,其有丝分裂时的细胞最终体积似乎就已经决定了。

这些观察指明存在一种特殊的监控系统,它在 G₁ 期的限制点上控制着细胞的周期。这一监控系统似乎被设计来控制延迟进入 DNA 的合成,直到达到有足够的成分来完成未来的 S、G₂ 和 M 期所需的一系列的生物合成中的每一个。从前面的细胞周期示意图(图 11-33)来看,假如第 3 步的生物合成比细胞周期特异性反应系列中任何其他反应对总蛋白合成速率的降低远为敏感的话,细胞将把周期停留至 G₁ 期的限制点上。

细胞分裂中细胞体积是怎样在分子水平上控制的? 曾经假设,某些触发蛋白的量必须积聚到一阈限水平,以允许通过每个周期中的限制点(596页)。如何测定这一阈限水平呢? 在后面关于细胞信号发放部分(见725页)将讨论某些细胞作出全或无判断的一般方法。然而,所观察到的染色体的套数和细胞大小成正比提示另一种可能性: 假设的触发蛋白或许是与染色体上的部位结合的,它的量超过与染色体结合所需的量时才可能进入 S 期(从而进入新的细胞周期)。在这种情形下,染色体想来也作为触发蛋白作用的抑制物,从而提供一个衡量细胞中触发蛋白总量的标尺(图 11-35)。此外,因为一四倍体细胞确定进行分裂将需要比单倍体细胞积聚多四倍的触发蛋白,所以四倍体细胞在进入 S 期之前将需要四倍高的蛋白质合成速率(才能生长到相应大的体积)。

令人感兴趣的是,用来解释哺乳动物细胞周期控制特点的同一个模型,也正好用来解释较原始生物细胞的细胞周期控制。然而,这类细胞中研究得最透彻的[包括裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* amoeba 和 *Physarum*(一种粘菌)], 缺乏 G₁ 期,因而直接从有丝分裂进入 S 期。对于这些细胞,控制细胞分裂的限制点看来在 M 期的开始时刻,而不在 G₁ 期晚期。

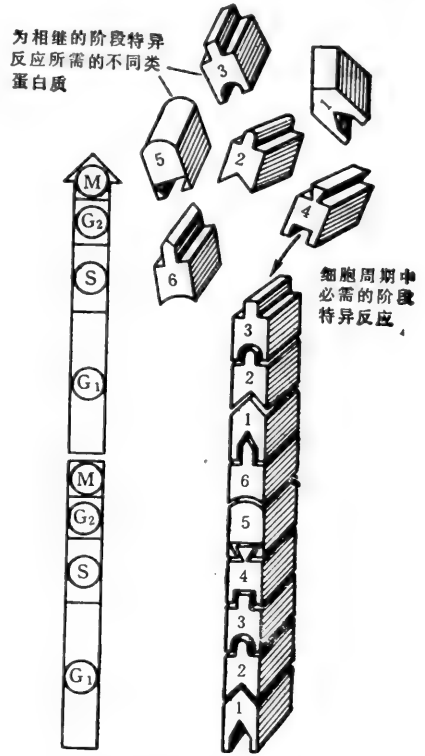


图11-33 图解细胞通过其生长周期各阶段转变的观点。按这观点,周期是由一系列生物合成“事件”所推进,每个事件在下一个事件可能开始之前必须完成。这些事件是阶段特异的生物合成反应,由 cdc 蛋白所催化。酵母遗传学研究资料认为,细胞中约有 10% 总蛋白质是与这阶段特异反应有联系,并且绝大部分这类蛋白质是出现在所有的时候,即使它们仅仅是细胞周期某一时刻所需要。

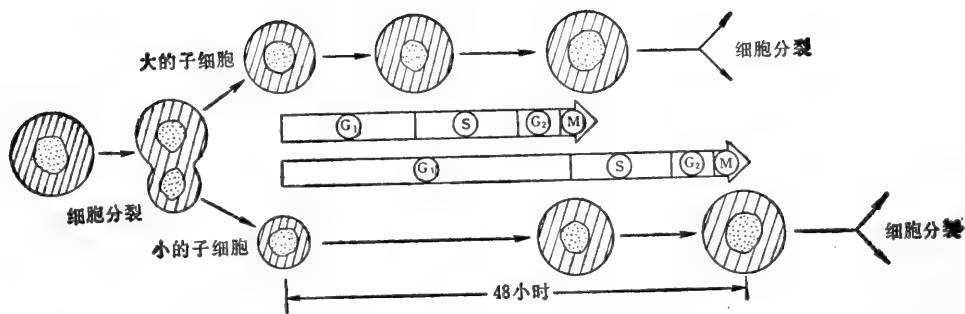


图 11-34 表明当细胞分裂偶然地产生了一个小的子细胞时所观察到的 G_1 期的延长。因为小细胞将以比大细胞降低了的速率合成蛋白质。这类细胞行为符合生长控制的触发蛋白模式。

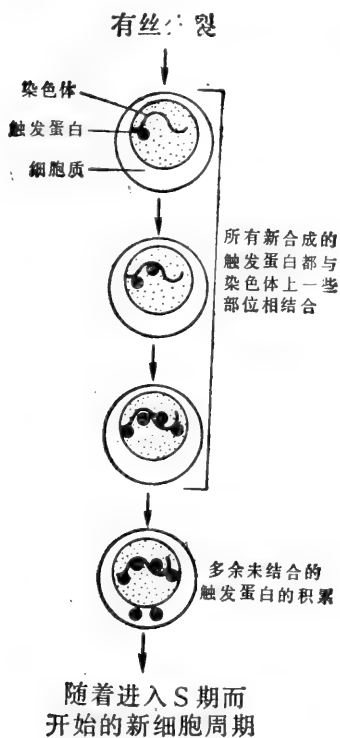


图 11-35 假设图说明每个新细胞周期开始之前，触发蛋白必须积累到一定阈量的模型。这假设图中，只有自由触发蛋白是有活力的。由于这触发蛋白被紧紧地结合着，染色体（或某些有关的核结构）是作为抑制阈限水平下的触发蛋白的作用的抑制物。

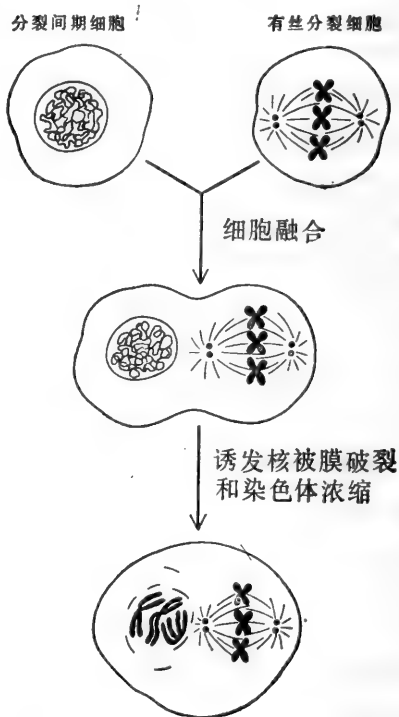


图 11-36 M 期细胞与分裂间期细胞相融合的实验示意图。如图所示，结果出现间期染色体的早熟浓缩（见图 11-37）。

G₁ 期是细胞进入有丝分裂的准备阶段²⁷

甚至晚到细胞的 G_1 期，抑制蛋白质合成也将阻止它们进入有丝分裂，表明这一时期合成的某些蛋白质对细胞分裂是必不可少的。M 期细胞与分裂间期细胞融合的实验提供了关于某些这类蛋白质存在的线索。在这些细胞中，分裂间期细胞核的染色体很快地浓

缩,周围的核膜解体(图 11-36 和图 11-37)。这结果提示某些在分裂间期不存在的可溶性因子出现在 G_2 晚期。

曾经提出过靠近 G_2 末期有一种可溶性的蛋白激酶(催化蛋白质磷酸化)被激活,它推动细胞从 G_2 期转变到M期。例如,该激酶可作用于核片层蛋白质的磷酸化,进而引起M期所观察到的核被膜的破裂,(见639页)。此外,该激酶还被认为负责有丝分裂染色体中

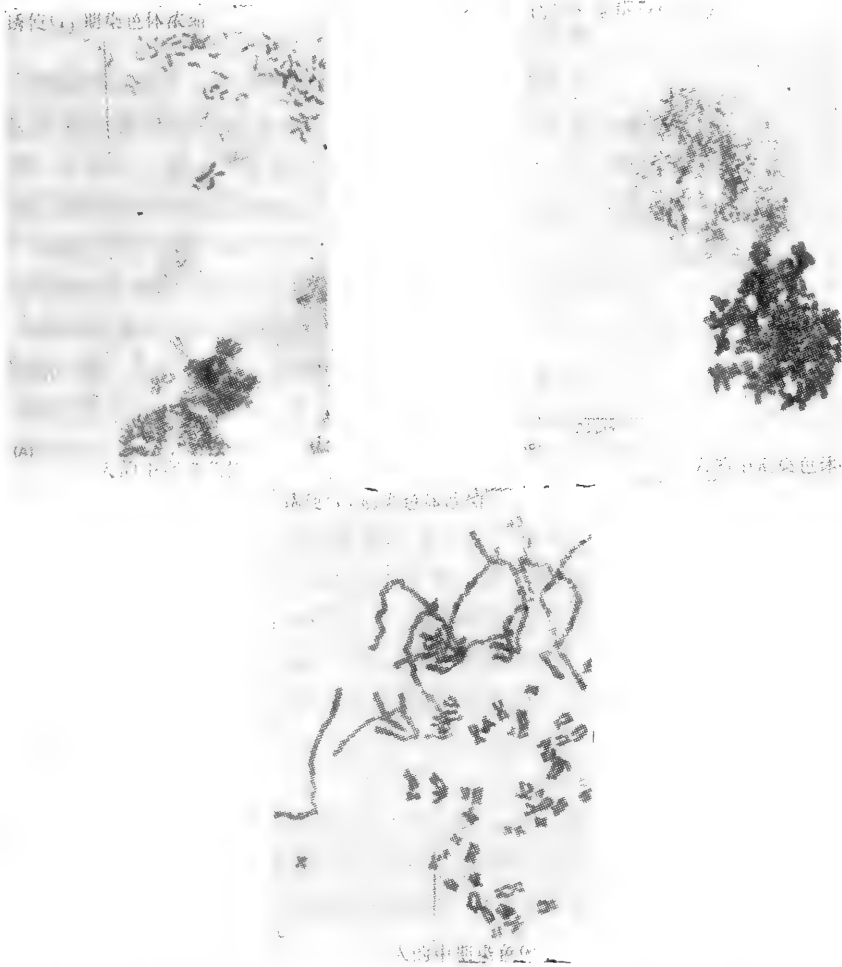


图 11-37 贻 (PTK) 的分裂间期细胞同有丝分裂的 HeLa (人) 细胞融合,出现分裂间期染色体早熟浓缩。(A), PTK 细胞处于 G_1 期,其早熟浓缩的染色体仍是单条的染色单体。(B), PTK 细胞处于 S 期,其染色质现在成“碎片”状。(C), PTK 细胞进入 G_2 期,与正常的分裂中期染色体相比较,虽然它的染色单体现在还很长,但是成双的。(引自 K. Sperlign and P. Rao, *Human-genetik* 23:235—258, 1974)

的组蛋白 H_1 分子(每个分子 6 个磷酸基因)的广泛磷酸化。因为一个核小体有一个组蛋白 H_1 分子,并认为它与核小体的包装有关,因而它正在M期之前的广泛磷酸化可能是染色体浓缩的主要原因。虽然仍是一种暂时的假设,但这一类分子解释阐明了一种水平,人们必将最终在此水平上解释整个细胞周期。

与以上的结果不同,当分裂间期细胞与M期细胞融合时,尽管染色体被浓缩了,但没有形成新的纺锤体。所以,有丝分裂纺锤体精巧机构的关键部件(将在下文描述)是晚在

G₂ 期制备的,一旦纺锤体形成就用光。

G₂ 期结束即M前期的开始。前期 (prophase) 的定义是细胞周期中最早能看到浓缩的染色体的时刻。由于染色体浓缩的程度是自晚 G₂ 期不断增加的,所以确定M期的开始是人为的。

当不受生物合成速率限制时, 细胞周期的时间可急剧地缩短²⁸

对某些生物,其胚胎初期 10^3-10^4 细胞所需要的大部分大分子(除 DNA 外),在未受精卵中就预先存在,所以在受精的时候具有相当大的体积(见第十四章)。例如青蛙卵,第一次分裂之后的 12 次细胞分裂(叫做卵裂)每隔 30 分钟进行一次,产生出囊胚中期的 8 000(2^{13})个细胞。每经一次分裂,细胞就逐渐变小,最后达到正常成年细胞大小为止。这 30 分钟内细胞周期全都是 S 期紧接着 M 期。

如图 11-38 的电镜照片所示,在几种类型早期胚胎中所见到的快速的 S 期,可能是由于许许多多只以几千碱基对相间隔排列着的复制起点所造成的(不象发育后期阶段,其复制起点之间是间隔着几万碱基对)。任何 DNA 注射进蛙卵,都有一定程度的复制,包括细菌 DNA 的小片段,它们不大可能含有正常用于启动 DNA 复制的部位。这似乎同设想存在于成年细胞上的状态相反,在早期胚胎中许多不同的 DNA 顺序都能够作为复制起点。但是,允许其迅速分裂的主要因素是卵中存在着形成新细胞所需要的全部组分(除了 DNA 外),包括纺锤体的成分、组蛋白、核糖体、线粒体和许多酶。

从胚胎中存在快速细胞周期而推导出一个重要的普遍性结论:细胞分裂本身是不需要什么长时期来完成的。例如,染色体可能在有丝分裂预备过程的几分钟内浓缩完成,而不需要如正常的 G₂ 期用几个小时。连续的细胞分裂之间所需要的大部分时间是用来完成许多不同细胞成分的生物合成,除了 DNA,这些成分是从一个细胞生成两个细胞所需要的。




图11-38 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 早期胚胎染色质伸展的电镜照片,观察到紧密排列的复制泡簇。胚胎中相继的核分裂之间经过的时间只约 10 分钟。

小结

大的卵细胞受精之后发生了十分快速的细胞分裂,这表明细胞周期有序的事件能够在 30 分钟或更短的时间内完成,如果已存在着远远超过产生一个新细胞所需的全部成分。然而,正常的情况,细胞在其分裂之前首先需要倍增它的体积,这过程在哺乳动物细胞似乎需 10—20 小时或更长些,在这段时间内大部分的细胞蛋白在不断合成。

酵母突变体的遗传学研究提示，虽然生长细胞是以基本上不依赖于细胞周期的方式倍增其内含物，但它们的生长也触发一次级系列的反应，这些反应在细胞周期内必须依次地进行。许多这种反应是与预先存在的分子装配成结构有关，这一结构装配的完成又触发了下一次装配的事件。完成每个这类反应所需的时间的总和决定了相继的细胞分裂之间的总时间。一般说来，其中的一种反应被用作决定细胞体积的特定的监控系统。在哺乳动物细胞，这监控系统阻止细胞通过 G_1 期的限制点（和开始 DNA 合成），直到有足够的细胞成分可用于完成未来的 S、 G_2 和 M 期所需要的一系列装配反应。

细胞分裂²⁹

从机制上来看，真核细胞周期的M期是非常复杂的。一个细胞要成功地进行分裂，必须经过两个明显的过程。第一，经 S 期复制后的染色体必须排列，分离，并移向细胞相对的两端。第二，细胞质必须按这样一种方式分裂，即能保证每个子细胞不仅接受一套染色体，而且还接受包含必需的细胞质成分和细胞器。虽然这两个过程，核分裂（有丝分裂）和细胞质分裂（胞质分裂）可用实验方法分开，但它们通常是紧接着发生，所以胞质分裂的开始是紧跟在有丝分裂的末尾（图 11-39）。

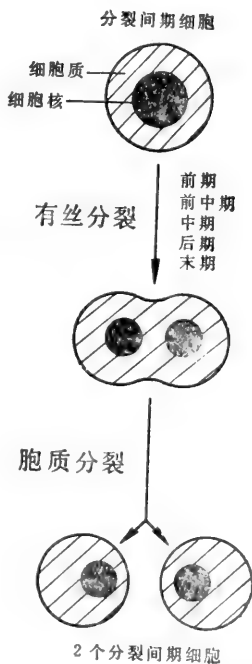


图11-39 细胞周期的M期(即细胞分裂期)分为有丝分裂的5个阶段和随后的胞质分裂

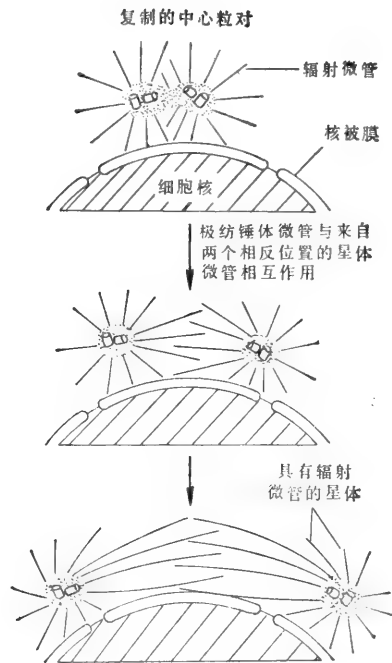


图11-40 分裂前期，在细胞质中，来自两个有丝分裂中心的双极纺锤体的起源。

对复杂的有丝分裂机构的需要是在有了大量增加的 DNA 并包装成许多个染色体的细胞的进化过程中产生的。这机构的功能是保证复制的染色体在分裂中精确地分配到两个子细胞中去。这机构叫做有丝分裂器 (mitotic apparatus)。它工作的精确性曾以酵母细胞作过测定，其染色体分离的误差约为 10^5 次分裂仅有一次。

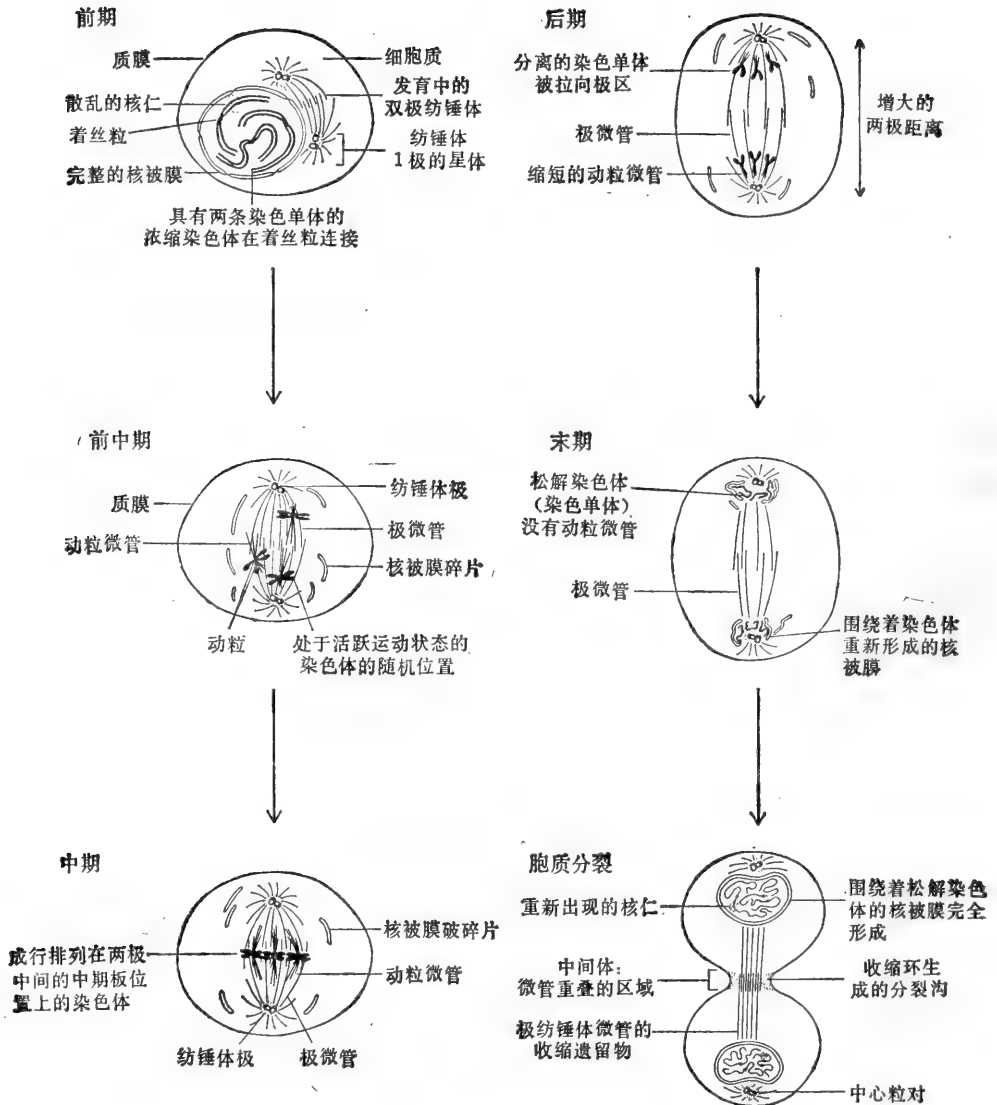


图 11-41 细胞分裂的六个阶段

前期 (prophase)

细胞周期从 G_2 期向 M 期的转移不是很明确的事件。染色质在分裂间期是弥散的,慢慢浓缩成轮廓分明的染色体,其确切的数目代表特定物种的特征;在前面的 S 期每个染色体复制,含有两个姊妹染色单体,它们沿着体长的一定点由一叫做着丝粒的区域联接起来。当染色体浓缩时,核仁开始分解,并逐渐消失。

在前期的开始,细胞质微管(细胞骨架的一部分)的物质分解,形成大的微管蛋白库。这些分子以后可能重新用于建造有丝分裂器的主要组分,有丝分裂纺锤体。这是双极的纤维状结构,主要由微管组成,在细胞核外面开始装配。纺锤体形成的中心在大部分动物细胞中以中心粒为标志。通过正在 S 期之前开始的一个过程,细胞原先的一对中心粒复制产生出两对中心粒。每对中心粒至此成为有丝分裂中心的一部分,这中心造成微管放射线排列的焦点,即星体(星体=星)。这两个星体开始并排地位于近核被膜处。到前期末,极微管束在两个星体(光学显微镜下象极纤维)之间起相反作用,优先地伸长,推动两个中心沿着细胞核外边离开。按这种方式,双极的有丝分裂纺锤体形成了(见图 11-40)。

前中期 (prometaphase)

虽然在各种各样类型细胞中有丝分裂器和它的作用已有详细的描述,但目前对其分子水平情况的了解仍是零碎的。即使如此,我们将企图从其有关的分子构成方面对细胞分裂进行分析,因为只有这样,细胞功能才能真正地被了解。假若我们能够了解微管怎样使染色体排列和移动,肌动蛋白丝怎样使细胞质分裂成为两半,我们也将较好地了解同样的结构在其他细胞过程中的功能。

在讨论关于细胞分裂的机制之前,有必要概述一下在高等动物的一个典型细胞中所发生的有丝分裂和胞质分裂的各个阶段。

细胞分裂传统地分为六个时期³⁰

细胞分裂的前五个时期为有丝分裂,而第六个为胞质分裂。在体内,这六个时期形成连续的动态序列,它的复杂性和完善程度是很难从文字描述或一组静态的图画中体会到的。细胞分裂的描述是基于两个来源的观察:活细胞的光学显微镜检术(通常与显微缩时摄影结合)和以光学显微镜检术和电子显微镜检术固定和染色的细胞。图 11-40 和图 11-41 表示细胞分裂各个时期的图形和简明的概括。图 11-42 和图 11-43 分别为典型动物的和典型植物的细胞分裂的光学显微镜照片。

图 11-41 对细胞分裂的描述是高度图解式的。动物界和植物界都存在着细胞分裂各个时期的千差万别。当我们细致地考查细胞分裂机制时,我们将陈述某些这样的差异,因为这能帮助我们了解哺乳动物有丝分裂器的不同部分。

有丝分裂中某些事件依赖有丝分裂纺锤体,而另一些则不依赖³¹

在核分裂中,可以看到其事件的复杂顺序主要是受有丝分裂纺锤体(mitotic spindle)的形成和活动支配的,纺锤体在分裂前期来源于细胞质(图 11-40)。然而并不是所有的事件均依赖于纺锤体。如可以预期的那样,秋水仙素由于能破坏细胞中的全部微管,故可

前中期从核被膜突然破碎开始,其碎片同内质网小片不能区分出来。这些碎片当有丝分裂时在纺锤体周围一直看得到。原先位于细胞核外面的纺锤体现在可能进入核区域,称为动粒(kinetochores)的特化结构在着丝粒(centromeres)的两面出现,与特定的一组叫做动粒纤维(kinetochore fibers)或动粒微管(kinetochore microtubules)的微管接触。这些纤维从每个染色体的两边向相反方向放射出来,与双极的纺锤丝相互作用。染色体由于它们的动粒纤维与纺锤体其他组分相互作用而摇摆运动。

中期(metaphase)

经前中期摆动的结果,染色体排列成使它们的着丝粒处于同一平面。动粒纤维似乎负责将染色体排列在纺锤体两极的中间,并调整染色体的方位使它们的长轴垂直于纺锤体轴。每个染色体为一对动粒和它们的相连的纤维紧拉着,处于中期板上,这些纤维拉向纺锤体相反的两极。

后期(anaphase)

中期通常要经历一长时间才完结。好象为一特殊的信号所启动,后期开始于每个染色体上的成对动粒突然分离,使每个染色单体慢慢地拉向纺锤体极。所有染色单体以同样的速度,约 $1\mu\text{m}/\text{分}$,移向它们面对着的一极。在这些后期运动期间,动粒纤维缩短,染色体移近极区。差不多在相同的时间,纺锤体纤维伸长,它的两极移离更远。后期一般仅几分钟结束。

末期(telophase)

当分开的子染色单体达到极区时,动粒纤维消失。极纤维继续伸长,新的核被膜重新形成,包围着每套子染色单体。浓缩的染色质再一次松开,核仁开始再现,有丝分裂终止了。

胞质分裂(cytokinesis)

细胞质为称做卵裂(cleavage)的过程所分裂,这过程通常在后期末或末期开始。围绕着细胞中部、垂直于纺锤体轴和在子细胞核之间的细胞膜向内收缩,形成分裂沟。分裂沟逐渐深陷下去,直到同两个核之间有丝分裂纺锤体的细小遗留物相遇。这细小的桥丝或中间体(midbody)在它变细并最终于两头处断裂之前,可能经过一些时间,而后形成两个完全分开的子细胞。

阻抑依赖于纺锤体的染色体排列的子染色单体向细胞的相对两极移动。然而,在某些细胞,如海胆细胞,染色质和核膜的行为并不受秋水仙素处理的影响:在没有有丝分裂纺锤体存在的情况下,染色质的浓缩与随后的松解,两个染色单体在着丝点处突然分离,以及核膜的分解与重新形成,均正常地发生。(相反,哺乳动物细胞中,在秋水仙素处理期间,只有有丝分裂早期的事件发生,每条染色体仍然保持为一对浓缩的姊妹染色单体。)

如前述,细胞融合实验也提示作为中期前导的染色质和核膜的变化是受与有丝分裂纺锤体无关的可溶性因子控制的;因为一中期细胞同分裂间期细胞融合将引起染色体的浓缩和间期核的核膜分解,而没有新纺锤体形成。

纺锤体包含处于装配和分解的动态平衡中的有组织排列的微管³²

有丝分裂纺锤体是由包含微管及微管相关蛋白的纤维构成的。纺锤体纤维按其接触部位可分两类:极纤维(polarfibers),在大多数纺锤体中它的数量是最多的,从纺锤体两极延伸到赤道;动粒纤维(kinetochores fibers),连着每个染色单体的着丝粒(centromere),并伸向纺锤体极区(图11-44)。一个纺锤体平均含有约 10^8 装配成微管的微管蛋白分子。然而,这结构并不包括细胞中全部的微管蛋白;有丝分裂时纺锤体的功能表明它是依赖于纺锤体微管与可溶性微管蛋白分子库之间的动态平衡。

这种动态平衡可以通过对处于可逆移动的微管的聚合和解聚平衡状态下的有丝分裂细胞进行的观察得到证明;纺锤丝的行为在偏振光照明下可以在活细胞内直接观察到,因这些纤维呈双折射(图11-45和图11-46)。如果把有丝分裂细胞放置于重水(D_2O)中,或为用taxol处理,微管的解聚都受到抑制,纺锤丝伸长(图11-46)。这种稳定的纺锤体不能移动染色体,有丝分裂也陷于停顿。另一个极端,当用干扰微管蛋白分子装配成微管的三种方法(药物秋水仙素、低温或高静水压)中的一种可逆地裂解纺锤丝,有丝分裂就被阻抑了。稳定的或解聚的纺锤体微管都不能移动染色体的事实提示,纺锤体必须灵敏地处于聚合和解聚之间的平衡,以完成有丝分裂运动。在详细讨论这些运动的基础之前,我们必须描述纺锤体是如何组构的,染色体是如何被移到一定的位置上的。

前期纺锤体的形成主要是受有丝分裂中心的控制,这中心就是极区^{33,34}

在第十章我们已经知道,微管排列的聚合是由叫做微管组织中心的特定区域来组织的。分裂细胞中这一功能是由两个有丝分裂中心(mitotic centers)来完成,它们最终形成纺锤体的极区。

动物细胞的有丝分裂中心一般是同中心粒(centriole)相关的,长时期以来,这些结构被设想是纺锤体装配的组织中心。然而,许多物种,包括所有的高等植物,在完全没有中心粒的情况下仍然能形成具有完整功能的纺锤体。这种纺锤体没有星体(所以被称为无星纺锤体),比有星纺锤体较少地聚焦于极区(图11-47)。其次,当动物细胞有丝分裂的中心粒被激光微束破坏时,其纺锤体仍继续执行正常的功能。所以,似乎中心粒并不是纺锤体微管装配所必需的,然而当它存在时可能起着聚焦一样的作用。

如果中心粒本身不是纺锤体的微管组织中心,那么,什么是呢?现在有明确的证据,真正的组织中心是电镜下可见的染色浅的没有确定界限的一团云雾状物质,在有星(包括中心粒)和无星(不含中心粒)的纺锤体极区均存在。当从动物细胞分离出有丝分裂中心

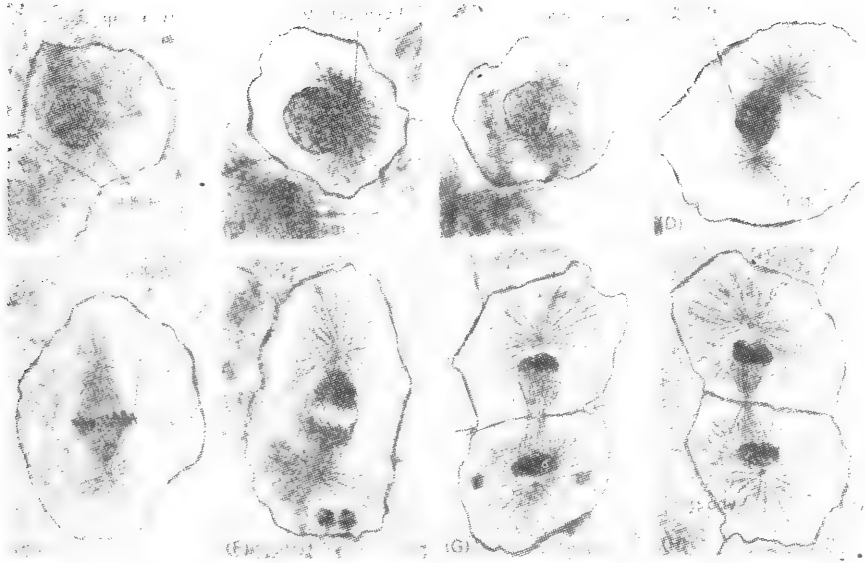


图 11-42 典型的动物细胞[白鱼 (whitefish)]有丝分裂的过程。(A) 分裂间期: 含有中心粒的细胞中心往往很小, 并有些东西从细胞核内跑出来。(B) 早前期: 细胞中心增加一倍, 从它放射出的丝数目增多, 而移近细胞核。(C) 中前期: 二个星体绕着核分开。(D) 前中期: 核被膜破碎, 使纺锤丝与染色体相互作用。(E) 中期: 双极纺锤体结构明显可见, 全部染色体排列至纺锤体的中部。(F) 后期: 在纺锤丝影响下染色单体全部同时地分开, 移向两极。(G) 早末期: 染色单体集合在每极, 分裂沟(箭头所指)紧缩遗留在染色单体之间的纺锤丝。(H) 末期: 子代细胞核重新形成, 虽然仍然致密; 胞质分裂似乎完成; 中间体存在于子细胞核之间。(Jeremy D. Pickett-Heaps 赠)

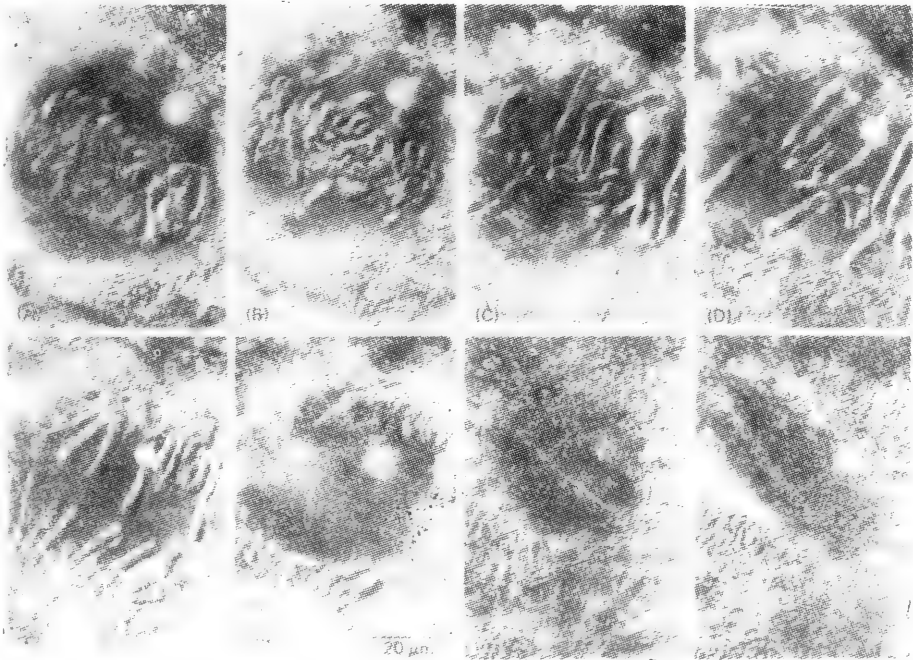


图 11-43 典型的植物细胞有丝分裂过程。这些是用差示-干涉-反差显微镜技术拍摄的活的 *Haemanthus* 细胞的照片。(A) 和 (G) 中, N 表示细胞核的中心, (B) 中的 P 表示每个纺锤体极。(H) 中的箭头表示新的细胞板生长方向, 细胞板亦见于 (G) 图。时间顺序以分钟计算如下: A, 0; B, 15; C, 17; D, 54; E, 83; F, 124; G, 169; H, 199。(Andrew Bajer 赠)

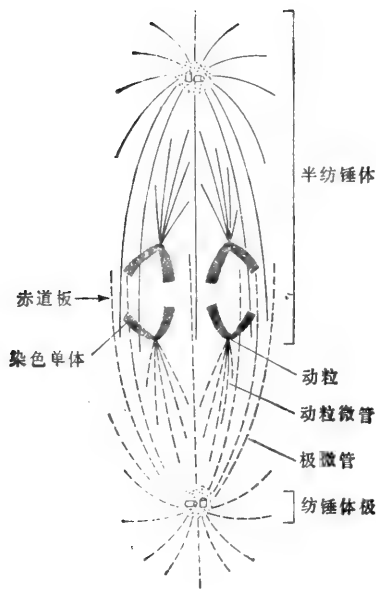


图11-44 早后期的纺锤体,表示它是由两个半纺锤体(黑线和虚线)构成,每个半纺锤体由动粒微管和极微管组成。为了清楚,只画出两条染色体的姊妹染色单体,大量的极微管也省略了。

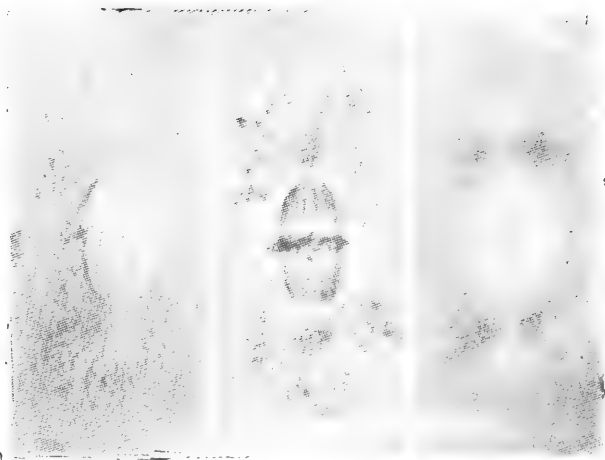
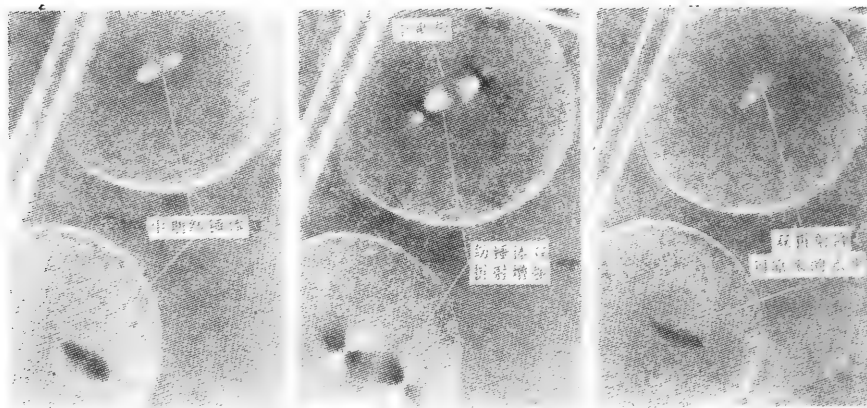


图11-45 用三种不同的光学显微镜技术观察的一个单独的纺锤体:(A)差示-干涉-反差显微镜技术,(B)相差显微镜技术,和(C)偏振光显微镜技术。(E. D. Salmon 和 R. R. Segall 赠;引自 *J. Cell Biol.*86:355—365, 1980. 洛克菲勒大学出版社同意复制)



(A)在海水中的细胞:正常纺锤体 (B)细胞处于含 45%重水的海水中, (C)细胞放回海水,经 3 分钟:纺锤丝数增加 (C)细胞放回海水,经 3 分钟:正常纺锤体

图 11-46 *Pectinaria* 卵母细胞纺锤体经重水 (D₂O) 处理的效应,用偏振光显微镜技术在活细胞上观察。所见到的双折射是正反差或是负反差,决定于和偏振光入射面有关的结构的方位。由于一个纺锤体同另一个的方位成直角,两个纺锤体就表现相反的对比。用这些镜片看不见染色体。(引自 S. Inoué and H. Sato, *J. Gen. Physiol.* 50:259—292,1967. 洛克菲勒大学出版社同意复制)

并在离体条件下作为成核因素 (nucleating agents) 时,星体的极微管是从中心粒周围的无定形物质,而不是从中心粒本身长出的。

成对的中心粒即使不是组织纺锤体所需要,但它们处在纺锤体的两个相对极区的位置,可以推断是起着保证那些对动物细胞极性和运动有重大关系的结构在细胞分裂时能

适当地分离(一个子细胞各一份)的作用。

每个有丝分裂染色体由两个染色单体和一对与微管末端相连接的动粒所组成³⁵

复制的染色体通过叫做动粒 (kinetochores) 的特化结构与有丝分裂纺锤体相连接。每个染色体含有二个姊妹染色单体,由叫做着丝粒的较坚固的区域相连接(图 11-48)。晚前期内,在着丝粒相对的两面各生出一个成熟的动粒,所以两个动粒(每个姊妹染色单体上各一个)是位于相反的方向。动粒在电镜下可见到呈多层结构(图 11-49),但关于它们的组成还了解甚少。

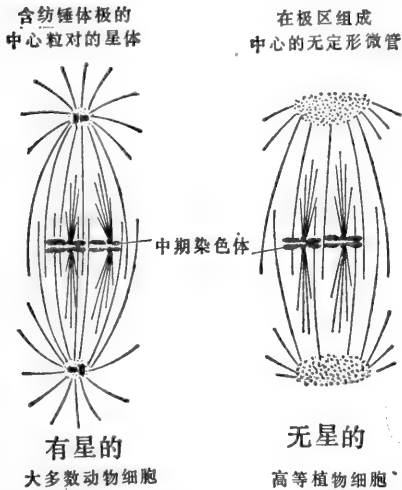


图 11-47 含星体的纺锤体和无星体纺锤体的细胞的中期纺锤体结构

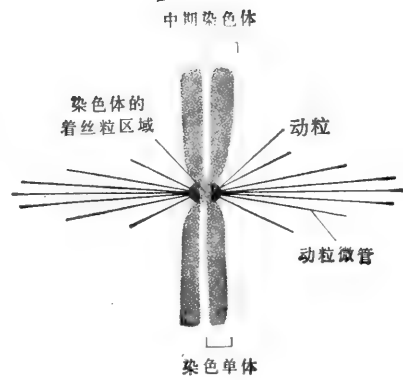


图11-48 早期染色体及其动粒微管的示意图

前中期(prometaphase)开始,核膜破裂时,一組组的纺锤丝同每个染色单体相连。这些纤维由微管组成,从每个染色体的两个动粒区域以相反的方向向外放射(图 11-48)。它们在中期起着固定染色体与纺锤体相对方位的作用;最终,在后期起着传递朝向极区的作用,把染色单体移动到每个极区。与每个动粒相联结的微管数目在不同种间有很大的差异;某些真菌只有一根,人的动粒可以有 20—40 根微管。

由于动粒和极纺锤丝间的相互作用使染色体在中期成行排列^{44,45}

标志着前中期开始的核膜破裂使染色体可能参与到纺锤体机构中去。所以这样做,在于保证它们最终的分离,使每个染色体的一个染色单体可靠地分配到每个子细胞核。有人说,有丝分裂中的染色体像葬礼中的尸体;它们为进行活动提供了理由,但并不起积极的作用。只有动粒连接染色体到有丝分裂机构,而染色体的全部运动是动粒纤维和纺锤丝间相互作用的结果。这相互作用有两个结果:(1)调整着每条染色体相对于纺锤体轴的方位,使每个动粒都面向着其极区;(2)把每个染色体移动到中期板(metaphase plate)上,中期板位于双极纺锤体的中央,并与纺锤体轴成直角。在哺乳动物,这过程经历 10—20 分钟,叫做前中期。

前中期是以一个明显地极活跃的时期为特征,纺锤体开始包容染色体,并使染色体排

列在中期板上。实际上,各个染色体是在剧烈地旋转着,并在两极之间来回摆动着,因为它们的动粒纤维同极纺锤丝是在紊乱地相互作用着,最终,这一组或那一组的极丝成功地永久“捕获”了一个动粒;染色体上的另一个动粒就立即与另一极区的纤维联结。

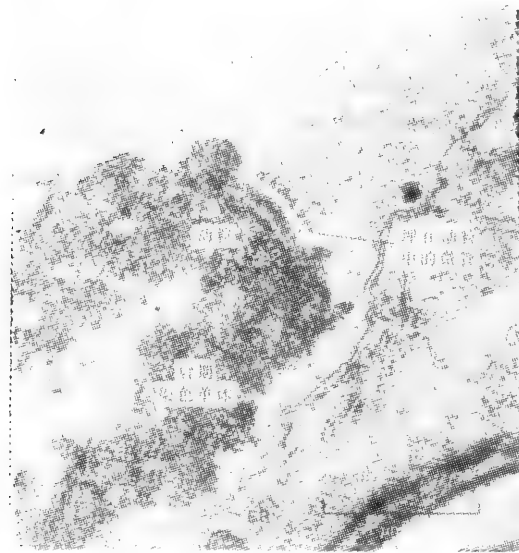


图11-49 动粒与微管一起插在一绿藻精藻属(*Oedogonium*)的后期染色单体中。动粒大多数具有三层结构。这动粒具有不一般的复杂结构,含有附加的层次。(引自 J. D. Pickett-Heaps and L. C. Forrke, *Aust. J. Biol. Sci.* 23:71-92, 1970. CSIRO 同意复制)

精细的显微手术实验提供了关于有丝分裂活动的重要的证据,这实验是应用非常细的玻璃针在活的有丝分裂细胞内拨动和推移染色体。用这方法证明了动粒并不是象磁铁的极性那样预定地朝向一特定的纺锤体极,因为染色体的动粒经拨动转过身来,它将重新安排朝向任何一极。而且,在前中期进行显微手术,可能迫使单个染色体上的两组动粒纤维朝向同一纺锤体极。如果染色体一直保持这个样子,整个染色体(带着相联的两个姊妹染色单体)将被拉向经这样处理的一个极区。(一般地说,这样处理是不稳定的,因为这动粒纤维可弹回,向着它的所选择的相对的方向。)所以十分清楚,一旦每个动粒纤维与纺锤体连接就产生出一种固定的极向拉力。正常的情况下,每个染色体和每个极区都有一动

粒纤维连接着,由此产生的相反的张力终于使每个染色体成行排列在中期板上(见下面)。但是,正是由于前中期的随机运动,以及染色体最后的偶然定向,保证了染色单体随机地分离到子细胞,这在减数分裂时的类似的核分裂中是十分重要的(图 11-50)。

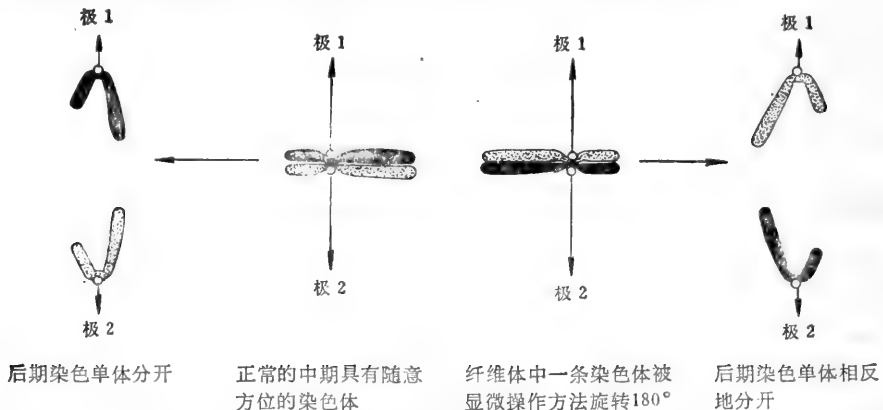


图 11-50 在正常情况下染色单体分配到子细胞中是随机的,仅依据中期染色体的方位。这方位和随后的分配可用显微手术来改变。

中期染色体受平衡的两极拉力的作用而保持着虚假的静态³⁴

在中期,纺锤体和成直线排列在中期板上的染色体似乎处于静止的状态。然而,这表面的安静状态是虚假的,因为在中期纺锤体两个半边的任何细胞质颗粒都被带向其相联

的极区。这些颗粒以每分钟约 $1\mu\text{m}$ 的速度缓慢而有规则地移动,这同后期染色体运动的速度差不多。这表明中期时持续的极向拉力是由纺锤体中产生的,染色体所以保持静态是因为这两个力相等而方向相反。所以,没有什么可惊奇的,每个染色体上的两个动粒一旦在后期分开,两个染色单体就被带到相反的两极。

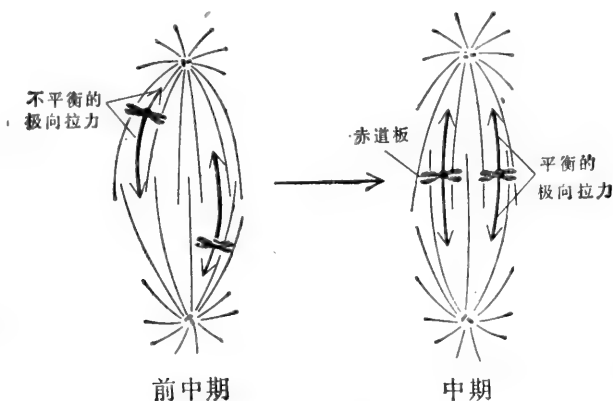


图 11-51 在前中期染色体随机地进入纺锤体,并移到中央,因为在每个动粒上力的降低,达到与拉向极区的力相接近。结果使染色体排列在赤道板上,它们是受平衡的极向力的牵拉而保持在这位置上的。

为什么在中期所有的染色体要成直线排列在与两个纺锤体极等距离的叫做中期板的地方? 这直线排列可能是由于一种力生成系统的简单的结果,在这系统中每个动粒纤维上的拉力随着该动点愈靠近极区就愈降低(图 11-51)。

在后期姊妹染色单体突然分开

后期是开始于每个染色体突然地裂开,这是由于姊妹染色单体在其着丝粒连接点上裂开而引起的。着丝粒裂开而使两个动粒分离,这是一个即使不与纺锤体相连的染色体上也会发生的独立的事件。这就允许作用于中期板上的双极纺锤体的力拉动每个染色单体缓慢而平稳地朝向这个或那个极区移动。

在后期以前,是什么方式的联结使姊妹染色单体联在一起? 虽然关于这问题的回答尚不清楚,有一个设想是,着丝粒特有的 DNA 序列可能编码一特殊的信号,信号阻断了其本身 DNA 在 S 期的复制。按照这个观点,未复制的着丝粒 DNA 维持染色单体联结在一起,而着丝粒上这最后的痕量 DNA 合成的触发则提供后期染色单体分开的动力(图 11-52)。

后期染色体被拉向极区,两极被推离开³⁷

在后期,非常重要的染色单体运动是由纺锤体中两组独立的事件所产生的:(1) 动粒纤维的极向运动,它拉着所联接的染色单体使接近极区,以及(通常开始得迟一点);(2) 在每半个纺锤体中极纤维的伸长和滑动,推着两极离得更远(图 11-53)。利用它们对某些药物的不同敏感性,有可能分辨出这两组事件。例如,低浓度的水合氯醛(chloral hydrate)可抑制极纤维的运动和伸长,但对动粒纤维或染色单体的极向运动没有影响。此

外，使两组染色体最后分开的这两组事件在不同生物中它们各自所起的有关作用也十分不同。在某些细胞，后期两极的分离几乎没有改变，相反，在其他细胞，纺锤体可伸长到这样程度，其极分开的距离比中期纺锤体中起先分开的距离大 15 倍。

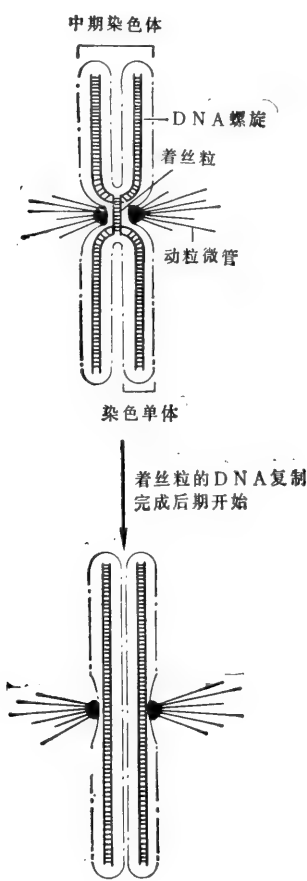


图 11-52 解释姐妹染色单体在M期彼此紧密贴合并在分裂末期又突然分开的假想的示意图之一。无论其真实的机制如何，着丝粒DNA序列必须具有两个特别的效应：(1) 必须使每个姐妹染色单体构成一个动粒，和(2) 在后期以前仍能保持与其同伴染色单体的成对排列。最近，应用DNA重组技术分离出了几种不同的酵母着丝粒的DNA分子。着丝粒的功能因而被证明是由一小于1000碱基对的DNA序列决定的。

这意味着极微管在纺锤体赤道板重叠区域附近有一自由(+)端，也是快速生长端(+)，它在后期的伸长可以设想是由于添加上微管蛋白亚基。现在发现，动粒微管也具有它的(+)端，连接着动粒，以及它的(-)端，靠近极。这也意味着，着丝点微管也具有同样的结构上的极性，象每个半纺锤体中的极微管一样。并曾认为，每条着丝点微管的两端都被“加帽”以防止解聚。这可以说明为什么在各种不同的实验条件下着丝点微管比极微管较为稳定。

使动粒纤维朝向极区的拉力以及使每半纺锤体的极纤维在中央重叠区域彼此推开的

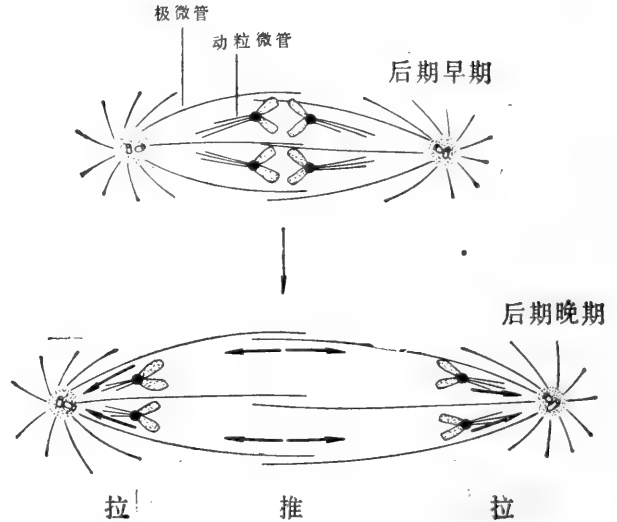


图 11-53 在后期，有曳拉和推动两种力作用而将姊妹染色单体分开。极微管的伸长和滑移推动两极远离，而染色单体却被作用于它们的动粒纤维上的力拉向相反的两极。

把电子显微镜下观察的几百片连续的超薄切片辛勤地重组成整个纺锤体的三维结构，显示出每个半纺锤体的极微管在赤道板附近中央区域彼此重叠(图 11-54)。到了后期，这两组逆向平行的极微管在重叠区域彼此相对地滑动开，并假定在它们的游离端添加微管蛋白亚基而增长(图 11-55 和 11-56)。两极显然受到微管的滑动和生长联合产生的力的推动而分离开。

在第十章我们曾阐明了微管具有明显的极性，并且其一端[(+)端]比另一端[(-)端]长得快。如所期望的，极纺锤体丝与分裂间期时由细胞中心所构成的微管具有相同的极性；所有的极微管具有在极区一边的慢生长端(-)，这一端显然是“加帽”而不能解聚的(见 557 页)。

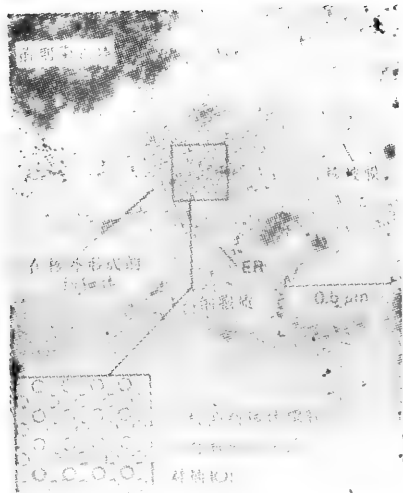


图11-54 直链藻(*Melosira*)的前期纺锤体的横切面,在核膜破裂之前。这切片是通过纺锤体中微管重叠的中央区域,中央区域有来源于相对两极的极微管非常有序而精巧的装配。在高等真核细胞的纺锤体中,微管的相互作用虽然具有共同的一般原理,但没有规律。(引自D. H. Tippit, K. L. McDonald, and J. D. Pickett-Heaps, *Cytobiologie*, 12:52-73, 1975)

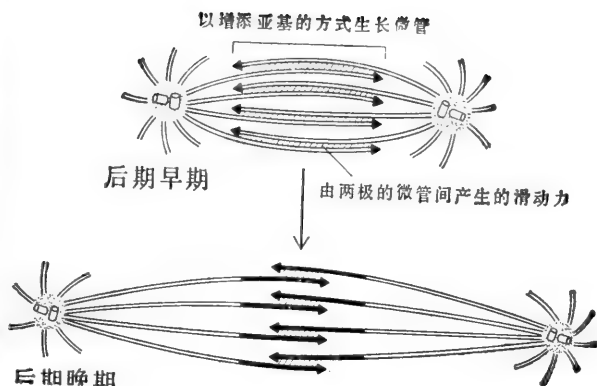


图11-55 表明有丝分裂前期可能有助于增强纺锤体极分开的组分。为了图像清楚,染色体和动粒微管省略。

推力是什么产生的? 如我们已知的,微管的装配和解聚对纺锤体的功能是重要的。然而,主要由微管的装配和解聚过程产生的力似乎并不构成推动染色体的全部动力,因为有证据说明纺锤体还含有其它蛋白质,它们也可能产生一种力。

设想一种动力蛋白样 ATP 酶在后期能生成推动极区分离的力,但是使染色体向极区移动似乎是另一种机理³⁹

为了研究后期中染色体移动的分子机理,理想的是有高度纯化的在离体条件下仍保留着完全功能的有丝分裂纺锤体。虽然迄今这个目的还远不可能达到,一种技术上要求较低的模式系统已被发现,它比正常活着的有丝分裂细胞便于研究。为产生这个系统,有丝分裂细胞的质膜需经一稀的去垢剂溶液处理,使大分子易于透过。只要使用保持微管稳定的缓冲液,仍然能在这样解体的细胞中诱导后期运动的启动和停止。因而这时的纺锤体可自由地与大分子接近,每个大分子探针(包括特定的抗体)对有丝分裂纺锤体运动的效应都有可能被检测出来。

用这方法证明了与肌动蛋白或肌球蛋白结合的抑制剂(例如抗肌球蛋白的抗体)可抑制胞质分裂,但对后期染色体运动是没有作用的。这结果表明,使染色体运动的并不是使肌肉运动的那种肌动蛋白和肌球蛋白的力生成系统。另一种显然可以考虑的力生成系统是动力蛋白,一种与纤毛和鞭毛中的微管相结合的蛋白质,它可由 ATP 水解产生出一种滑动的力(见 545 页)。有几种纤毛蛋白 ATP 酶的抑制剂,它们可抑制纤毛的拍打;在以游离的天然纺锤体为材料,这些抑制剂同样阻断后期的极与极 (pole-to-pole) 的分离。而且,在某些纺锤体中可见到相邻的微管间有“交联桥”(cross bridges),它们类似纤毛外周的二联体微管间的动力蛋白桥(见图 10-32)。因而,似乎可以认为,一种应用 ATP 水

解能量的动力蛋白样分子可引起两组极微管在纺锤体赤道板附近重叠区域互相滑动，从而推动了后期的极与极的分离。

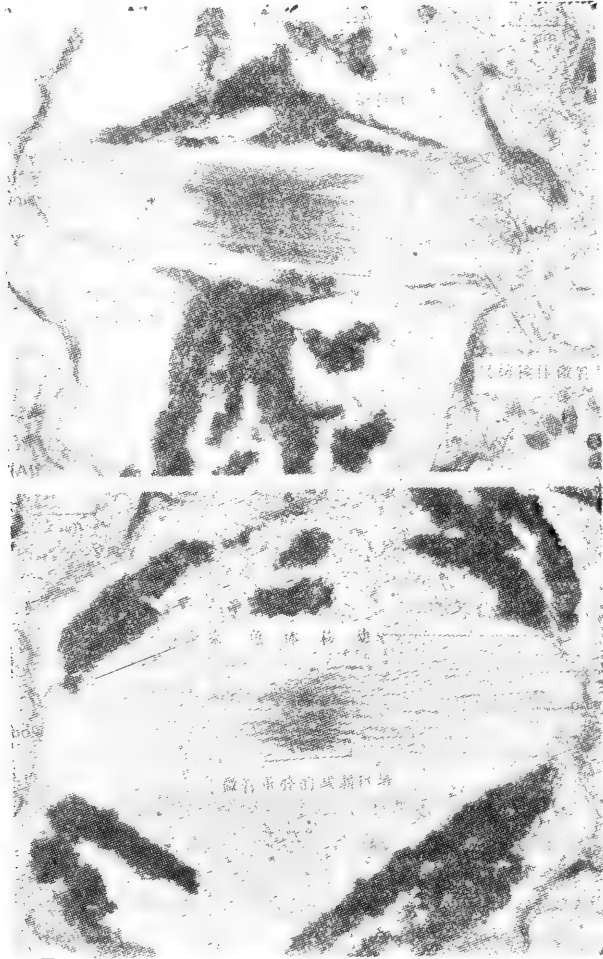


图 11-56 电镜照片表示硅藻有丝分裂时，随极微管重叠的程度纺锤体的伸长和缩短。
(A) 中期；(B) 后期末。(Jeremy D. Pickett-Heaps 赠)

纺锤体的动力蛋白不可能是与传递纤毛拍打的动力蛋白相同的分子。首先，相互作用的纤毛微管是按相同的极性平行排列的，而在纺锤体中互相滑动的极微管是以相反的极性排列着 (图 11-55)。其次，与纤毛的动力蛋白结合的抗体不能使有丝分裂的纺锤体染色。

驱动染色体极向移动的力的产生机制还没有弄清楚。显微手术实验证明，每个染色单体是单独地固定于纺锤体，以它的动粒纤维与近极区纺锤体固定地连接着 (图 11-57)。当染色体移向极区，其动粒纤维变得越来越短，而到了末期就消失了。因此，在相同的时间内，极微管在其近纺锤体赤道板的自由 (+) 端加长，而在近纺锤体极区的动粒微管的 (-) 端则解聚。解聚似乎至少起着某种导致染色体极向运动的作用。不仅这样，假若微管的解聚作用经 taxol 和 D_2O 处理而阻止，运动也就被抑制，但是如果以极微量的秋水仙素处理而升高了微管解聚作用的速率，则其运动加速。当把动力蛋白抑制剂添加到制

备的裂解细胞中,不象后期的极与极离开那样,染色体的极向运动并不被强烈地抑制。所以,这里似乎有不同的力生成装置引起两种不同的后期运动。按照一种普遍公认的观点,驱动染色体极向运动的“发动机”是一复杂的结构,当它们走向极区时,它的速率受动粒微管的解聚速率所制约。

对引起后期运动的机构的分析,由于其所需的力极其微小这一事实,无疑是十分困难的,有人计算在后期每条染色单体运动只需要由20个 ATP 分子水解所产生的能量,故可认为染色单体是由一高效利用能量的过程来运输的。

在末期,核被膜开始围绕着各染色体重新形成³⁹

后期末了,染色体完全分离成相等的两组,每组位于纺锤体的一极。在末期,有丝分裂的最后阶段,核被膜围绕着每组染色体重新形成以建成两个处于分裂间期的子细胞核。有丝分裂中核被膜破裂和重新装配期间,至少三部分核被膜复合物必须考虑。

1. 外核膜和内核膜本身同内质网膜相连续。

2. 膜下的核片层是由三种主要蛋白质组成的一种薄的结构组件,它们同内核膜、染色质和膜孔相互作用。

3. 核膜孔,它们由几种蛋白质的大复合物组成,这些蛋白质的性质到目前还很少描述。

在前期,所观察到的这三种片层蛋白 (lamina proteins) 变得高度磷酸化。这磷酸化作用被认为可促使它们解体,从而破坏核片层,或许其结果使核被膜本身破裂成封闭的膜片段(形态上与内质网小片没有区别),在整个有丝分裂过程中可见到它们一直是围绕着纺锤体。虽然还不肯定,曾认为释放出来的某些核膜孔复合物在有丝分裂期中间染色体居留在一起。

到了末期,核膜的片段结合到单个染色体表面,在重新融合形成完整的核膜之前每个染色体部分地被包被(图 11-58)。在这过程中,核膜孔恢复,去磷酸化的片层蛋白重新结合而形成核片层。核被膜重新装配的过程可能由片层蛋白的重新聚合而起协调作用,尤其因为其中的一种在前期之后一直和核膜片段留在一起,从而可能标记这些膜片段重新向细胞核聚拢。核片层不仅同内核膜起作用,也同染色质和核膜孔起作用,所以当M期,片层蛋白的磷酸化和去磷酸化周期很可能各自发动核被膜的破裂和重新形成。

在核膜重新装配之后, RNA 合成恢复,导致核仁重新出现,同时浓缩的染色质松解,呈现出分裂间期的分散构象。

令人感兴趣的是,在某些较原始的真核细胞中,它们的核被膜在有丝分裂时并不解

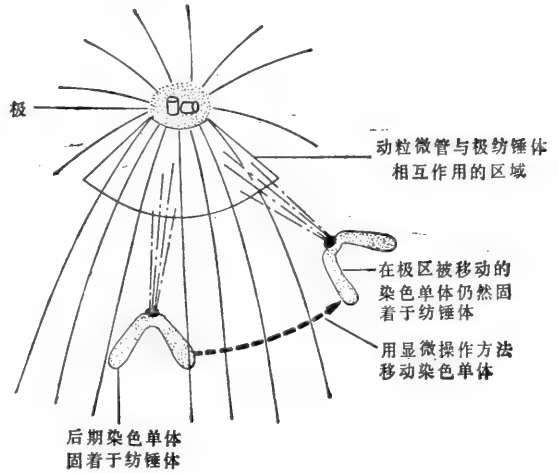


图11-57 显微手术实验说明由于动粒微管同近极区的纺锤体的相互作用,染色单体本来是与纺锤体相连的。后期时细胞的半纺锤体 (half-spindle)在图内示出。

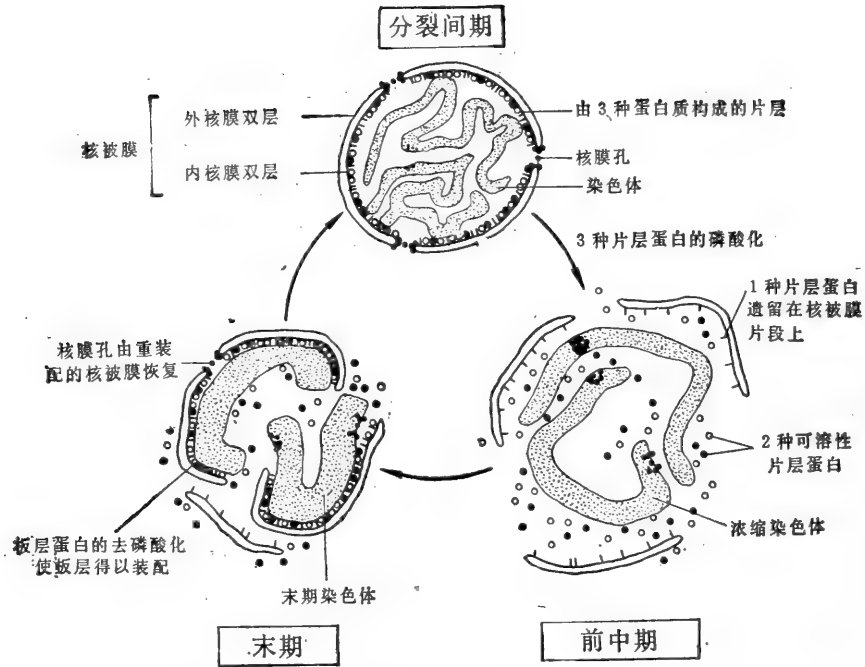


图 11-58 有丝分裂时发生的核被膜周期的图解。核被膜在前中期破裂，到末期再重新装配。在前中期和末期之间，核被膜破裂，发生了全部的有丝分裂运动，使两套染色体移向相对的两极。如图所示，因为新的核被膜是以膜片段与簇状单个染色体并列的方式形成，所以大部分细胞质成分将排除在新细胞核的外面。

体，这些生物可认为是具有一“封闭”的纺锤体，而不是开放的。因而，核被膜破裂并不是成功的M期所绝对必要的。

有丝分裂纺锤体决定胞质分裂时细胞质分裂的方位⁴⁰

虽然核和细胞质的分裂一般是相联的，但是它们是完全可分开的事件。事实上，核分裂并非常常跟着开始胞质分裂。例如，某些菌类和藻类可能连续地进行多次核分裂，而没有细胞质分裂，形成了巨大的多核细胞，这多核细胞可能达到数英尺长！以后，由于围绕着核进行细胞质分裂，产生了许多单核的细胞。

虽然胞质分裂不一定必然伴随着有丝分裂，而有丝分裂纺锤体却起着决定胞质分裂的方位和时间的重要作用。细胞质分裂通常开始于后期，一直贯穿末期，并进入到随后的分裂间期。在动物细胞，其第一个可见的胞质分裂信号是后期质膜的轻度皱缩，这称为分裂沟(图 11-59)。分裂沟总是发生在中期板的平面上，垂直于有丝分裂纺锤体的长轴。如果应用显微手术在足够早的时期移动纺锤体，那么这原先的分裂沟不见了，而一个新的分裂沟出现在新的纺锤体部位。其次，一旦分裂沟形成过程已经真正地进行，则分裂将继续进行下去，即使这时把纺锤体用抽吸法除掉或用秋水仙素破坏掉。

有丝分裂期间细胞骨架的微管和肌动蛋白丝束被解聚成亚基，它们似乎重新被分别地用来构成有丝分裂和胞质分裂的机构。其余的细胞纤丝，中等纤维，在细胞分裂时不被利用，也不解聚。在大多数细胞中，围绕着分裂间期的细胞核周围的中等纤维网架在有丝

分裂时变长,包围着两个子细胞核,最后由于分裂沟的作用而被分开(图 11-60)。

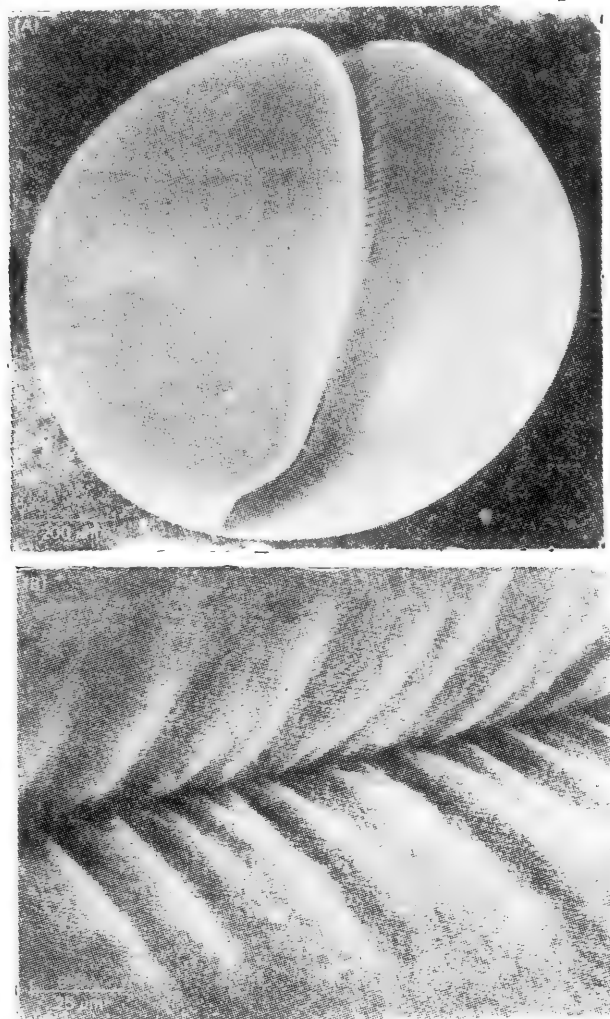


图 11-59 蛙卵早期卵裂的扫描电镜照片。细胞膜的沟陷是由于其底下收缩环的活动所引起。
(A) 卵表面的低倍的图象; (B) 分裂沟表面的高倍放大。(引自 H. W. Beams and R. G. Kessel, *Am. Sci.* 64:279—290, 1976)

卵裂的力由肌动蛋白和肌球蛋白产生¹¹

卵裂主要靠由肌动蛋白丝组成的环的收缩来完成的,象钱包上的细线一样围绕着细胞的中央拉紧。这纤维束叫做收缩环(contractile ring),必定以某种方式贴在质膜的内表面上(图 11-61)。收缩环在后期的早期以一种未知的机制自发地装配形成;一旦装配完成,它就能受电刺激而提前活化,这说明收缩环在真正使用之前,已为它们的作用作好了准备。

卵裂时,收缩环的力足以折弯插进细胞中的细玻璃针,此方法可用来测量这力的大小。毫无疑问,这种力是由收缩环中的肌动蛋白和肌球蛋白丝的肌肉样滑动产生的。例如,在裂解的有丝分裂细胞中,加进失活的肌球蛋白亚基,就能阻断肌动蛋白与正常肌球

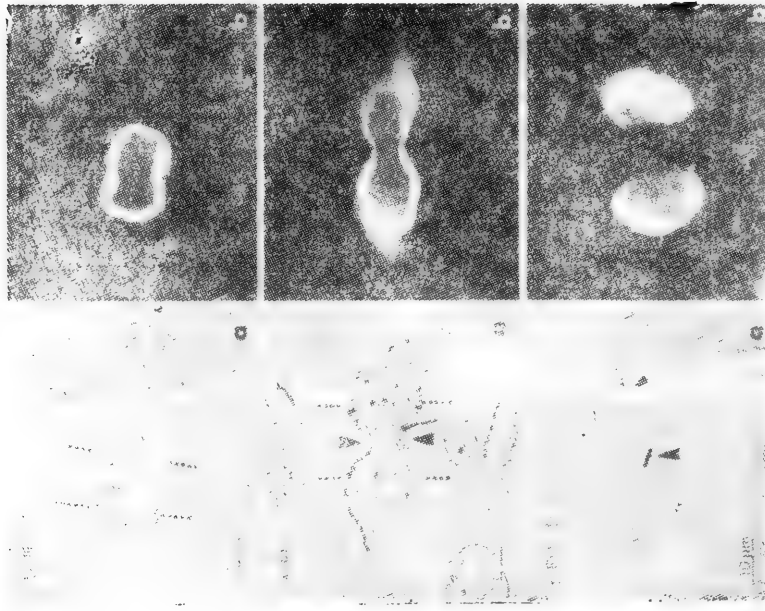


图 11-60 有丝分裂时围绕细胞核周围区域的中等纤维带，它可能会有助于组织细胞的有丝分裂过程。这里所示的显微照片是以可与中等纤维结合的荧光标记抗体浸染可透过的细胞。(a) 相差显微照片：虚线标定染色体的位置，而箭头表示收缩环的位置(末期)或中间体(末期后期)。(b) 荧光显微照片。(引自 S.H. Bloss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3372—3376, 1979)

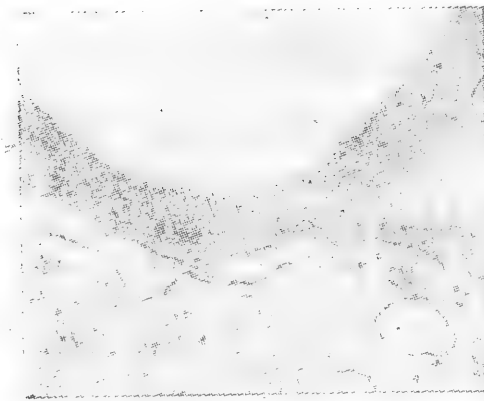
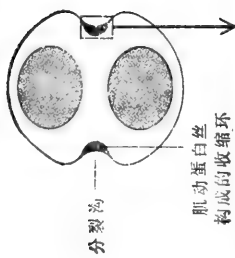


图 11-61 正分裂的动物细胞，其向内长的分裂沟边缘的电镜照片。(引自 H. W. Beams and K. G. Kessel, *Am. Sci.* 64: 279—290, 1976)

蛋白结合的部位，从而阻止了卵裂。同样在海胆卵中注入抗肌球蛋白抗体引起了卵裂沟的松弛，而对核分裂却没有影响。

在收缩过程中收缩环保持着同样的厚度，提示它是以失去纤丝的方式不断地减小它的体积。分裂环在卵裂结束时终于全部消失了，而卵裂沟的质膜变窄，收缩成间体 (midbody)，它像在两个子细胞之间保留着的一条系链。这间体是由二组极微管残留物与稠密的基质物质紧密包装组成(图 11-62)。因为间体持续有几个小时，所以可认为在二个子细胞完全分开之前在它们之间仍保持着某些联系，并可能在最后的“掐断”过程也起着积极作用(图 11-63)。

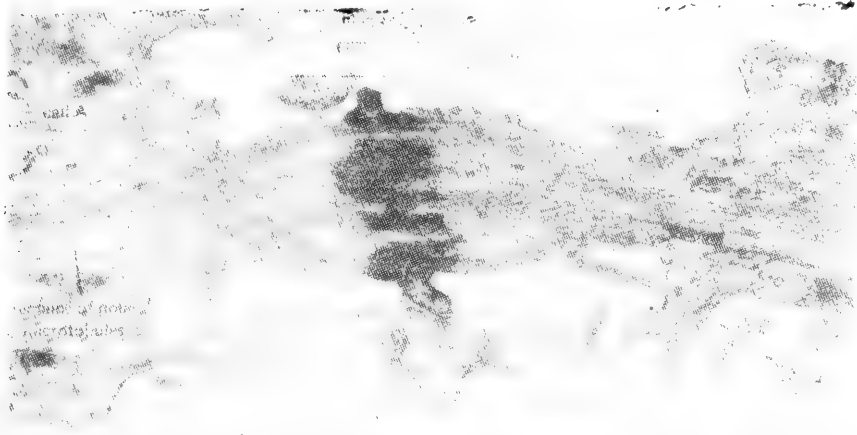


图 11-62 正在分裂的动物细胞中间体的电镜照片。细胞分裂实际上已结束，而子细胞仍由这细胞质细丝而保持着联系(也见图11-40)。(J. M. Mullins 赠)

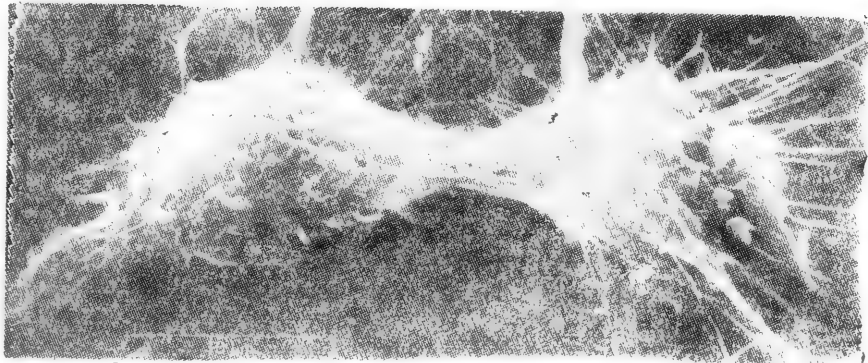


图 11-63 离体培养的动物细胞，它分裂后不久所拍摄的扫描电镜照片。(Guenter Albrecht-Buehler 赠)

在大多数的分裂细胞中，卵裂沟多少是对称的，所以产生的二个子细胞有同样的大小。然而，在某些特殊的例子中，收缩环发生在这样的位置上，以致产生二个大小不同的细胞。这不对称的细胞分裂在卵子发生中是十分重要的(见第十四章)，并在某些胚胎早期发育中普遍见到。在这些胚胎中，不均质的卵质按精巧的方式分配到各群的细胞中，这将产生后来胚胎的不同部位。控制这不对称收缩环的方位和空间位置的机制，还不了解。

由于一个细胞形成两个细胞，细胞质分裂大大增加了细胞的总表面积。所以很清楚，

由细胞质分裂所形成的两个细胞比其原始细胞要求更多的质膜。在动物细胞中，在细胞即将分裂之前增加了膜的净合成。这过量的膜看来以小泡形式贮藏于将要分裂的细胞表面。

在具有细胞壁的植物细胞中细胞质分裂以完全不同的机制发生¹⁴

大多数高等植物细胞被一坚硬的细胞壁所包被，因而是不能活动的。它们的胞质分裂机制与动物细胞有着明显的区别。有丝分裂之后，细胞质是靠细胞内部在两子细胞之间建造一新的细胞壁而分隔开来的，而不是以收缩环的方式在二个子细胞间箍紧。这样分割严格地决定了二个子细胞在植物中最终所占据的相对位置。一个明显的推论是，细胞分裂的平面及细胞长大共同决定了植物的形状(见第十九章)。

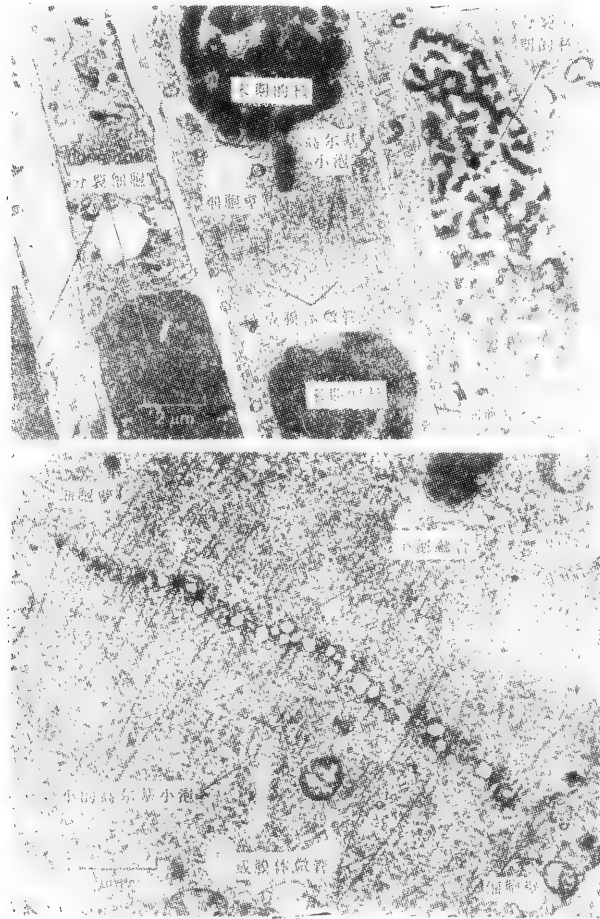


图 11-64 植物细胞的电镜照片，示成膜体和与它相联的小泡，它们融合即形成新的细胞板。
(引自 J. D. Pickett-Heaps, *Dev. Biol.*, 15:206—236, 1967)

像动物细胞一样，胞质分裂与有丝分裂的事件能分别地发生。例如，种子的胚乳组织没有胞质分裂，有丝分裂可连续发生而形成大的多核细胞。很久以后，在分开的核之间才建起了一道横壁，从而产生了新的细胞，而没有包含有丝分裂纺锤体的遗留物，这遗留物早已经分解了。在植物细胞中新的细胞壁建造的控制因子大部分还不知道，但是有关其

事件的顺序现已有许多报道。

新的横壁或细胞板 (cell plate) 的装配通常与残留的纺锤体微管有联系, 它形成了一敞口的柱状的结构, 含有平行排列着的微管, 叫做成膜体 (phragmoplast) (图 11-64)。如图 11-65 所概述的, 从高尔基器大量产生的、其中塞满壁的前体的膜被小泡与成膜体中的微管相联系, 并沿着微管向内转运到赤道板区域。在这里, 它们融合, 形成一盘状的膜被结构, 即初期细胞板。多糖的前身分子从小泡中释放出来, 在初期细胞板内装配成果胶、半纤维素和其他初生细胞壁的成分。这盘状结构这时开始向四侧扩展, 抵达原始的细胞壁。为使其成为可能, 早期成膜体的微管进行解聚, 并在早期细胞板周边重新装配。在这里, 它们吸收了第二批小泡, 再在赤道板上融合, 并扩展细胞板的边缘。这过程一再重复, 直到细胞板抵达质膜, 并将两个新的细胞完全分开。最后, 纤维素微纤维堆积在

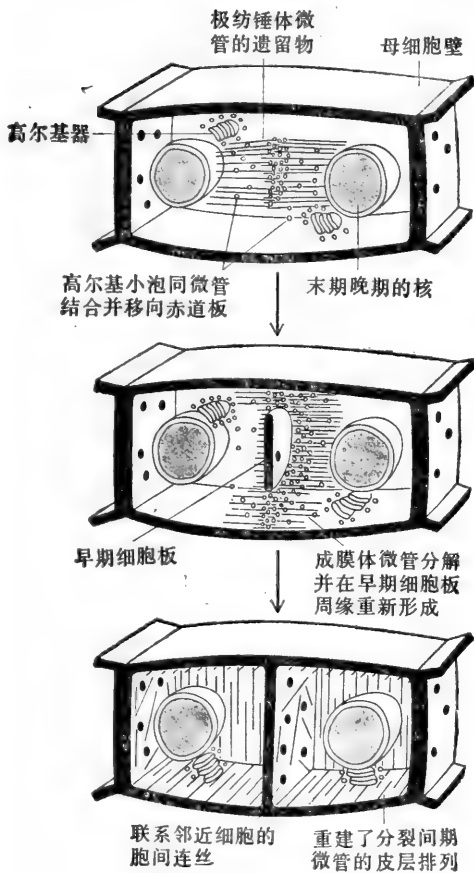


图11-65 具有坚硬细胞壁的高等植物细胞的胞质分裂过程简图

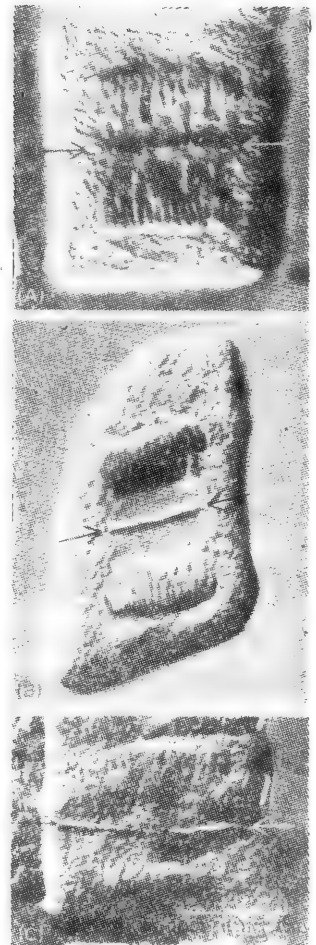


图11-66 植物细胞胞质分裂的光学显微镜照片。(A)、(B)和(C)示细胞板发育的较后的连续阶段, 它形成在垂直于各片的平面上, 平面的边缘由两个箭头标示。(Jeremy D. Pickett-Heaps. 赠)

细胞板内,完成了新细胞壁的形成(图 11-65 和 11-66)。

成膜体中微管的装配似乎是以赤道板区域电子致密物质为核心的。作为一个假定的微管组织中心,致密物质看来对伴随着细胞板形成的成膜体微管明显的重组负责。

内质网成分同形成细胞板的小泡相连,并常常残留而贯穿细胞板。这些结构后来转变成胞间连丝(plasmodesmata),它是一种复杂的横贯成熟细胞壁的小孔。使植物中所有细胞的细胞质相互连通。

胞质分裂必须允许细胞质的细胞器可靠地遗传下去

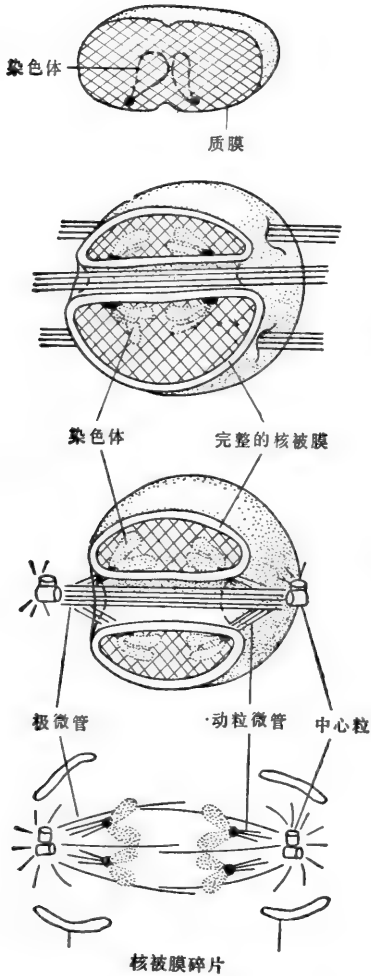
细胞内有着许多如果没有预先存在的模板就不可能倍增的细胞器,细胞核仅是其中的一个。例如,为了产生更多的核糖体显然需要核糖体,因为这需有蛋白合成。同样,线粒体和叶绿体只能从原先存在的相应细胞器生长和分裂产生(见 509 页)。即使现在还不完全清楚,但其他细胞器生长的机制提示,如果没有预先存在的相应结构(或至少是一部分),就不可能生出一个新的高尔基器、质膜或溶酶体来(见第七章)。正常情况下,除了细胞核之外,所有的细胞器都有充足的数量,当胞质分裂时它们每种将由分裂沟来分配,使每个子细胞都接受到各种细胞器的一部分。因为,除非细胞承继了如高尔基器的膜,否则它就不可能生存下来;这里可能不需要什么特别的机制以保证每个子细胞都包含其一份细胞器。确实,由于细胞器数量很多,诸如核糖体,如果其数量平均在每一细胞世代几乎增加一倍,那末继承是没有什么问题的。

在某些藻类细胞分裂的观察中发现一些间接证据,说明细胞器如果没有预先存在的模板就不可能产生。这种藻类只有一个叶绿体或一个高尔基器,在这些细胞中,细胞器的单一拷贝在胞质分裂前分裂成两半。细胞分裂时,原先细胞器的两半个随后分离,分配到每个子细胞中去(见图 9-63)。在动物细胞中,有关的机制操纵着中心粒的有序地复制和分离(见图 11-19)。所以细胞的策略看来是这样制订的:一旦需要,任何细胞成分都能有组织地分离。

高等生物完善的有丝分裂过程是从原核生物的分裂机制逐渐进化来的¹³

原核生物中,其两个子细胞间的 DNA 和细胞质的分裂仅由一单一的过程介导。DNA 复制时,染色体的两个拷贝连接到细胞膜的特定区域,由于其间的膜向内生长而逐渐分开。这样,分裂使每个子细胞获得了一个染色体(图 11-67)。随着真核细胞的进化,遗传器变得复杂化了,染色体的数目和大小都增加了,这就需要发展一种更完善的机制,以便把染色体分配到子细胞。显然,有丝分裂器不可能一下子便进化臻于完善。许多低等的真核细胞中,有丝分裂仍保留着膜连接机制,但由核膜来接管原核细胞中质膜所起的作用。这过渡机制的一个十分清晰的例子见之于一种大的单细胞藻类甲藻中的 *Cryptocodium Cohnii*。这种生物的过渡状态也反映在它染色体的生物化学上,像原核细胞那样,它们具有较少的结合蛋白。

在有丝分裂过程中,*C. cohnii* 的核膜保持不变,其纺锤体微管完全留在核的外面。在纺锤体微管压在核膜外表的地方,使核膜向内,成一组平行的通道(图 11-67)。染色体附着在对着这些通道的核被膜内膜,染色体的分离完全是由通道的核膜内层介导。因而,核外的纺锤体(成一坚硬的棒状物,而没有力学的性质)仅仅是起着指定核膜方位,从而确



细菌

附着在质膜上的子染色体由于它们之间膜的生长而被分开

低等的甲藻

几束微管穿过完好的核被膜上的通道，建立了分裂的极性；染色体与核内膜一起移动分开，而与微管束没有连系。

较高等的甲藻和某些原生动物

中心粒之间的单个纺锤体是在穿过完好的核被膜的通道中形成的；染色体由其动粒附着在核内膜上并通过中止在核外膜的动粒微管与纺锤体间接发生作用。

高等生物

核被膜破裂，使染色体直接与动粒微管连接，依次与极纺锤体的微管发生作用。

图 11-67 图解高等生物有丝分裂纺锤体进化的某些阶段。通过利用较原始细胞对染色体分离机制的研究，这些阶段已得到证明。

定分裂面的作用。

一种较为进步的，但仍是核外纺锤体的例子见之于超鞭毛虫类 (hypermastigotes)。这些昆虫肠道内的大型的原生动物提供了一个独特的例证，清晰说明纺锤体的伸长和使染色单体分离的染色体运动不相互依赖，因为其姊妹动粒首先由于核膜的生长而被拉开 (动粒连接在核膜上) 与纺锤体连接。只有当这动粒靠近纺锤体的极区时，才获得与极纺锤丝相连接所需的动粒纤维。由于纺锤丝为核被膜间隔而与染色体保持着分离状态，在核外形成的动粒纤维必须以某种方式穿过核膜而附着在染色体上。在附着之后，动粒才可以通常的方式被拉向极区 (图 11-67)。

看来可能的是，动粒纤维目前所起的作用是与有丝分裂时核被膜的解体平行地进化的；当进化到这个阶段，单核细胞分裂机制的最后痕迹消失了，有丝分裂纺锤体和染色体间更为密切的相互作用也成为可能了。

小结

细胞分裂的过程包括核的分裂（叫做有丝分裂）和随之而来的细胞质分裂（叫做胞质分裂）。有丝分裂是受高度有序的极纺锤体的形成所支配，由微管及其结合蛋白组成的极纺锤体，由两个处于相对的纺锤体极区的有丝分裂中心组构而成。前期，染色体浓缩，并产生动粒纤维；前中期核膜破裂之后，动粒纤维开始同纺锤体的极纤维发生作用。在相反的极向力牵拉着动粒纤维的张力作用下，在中期，使染色体成直线排列在纺锤体的赤道板上。后期，姊妹染色单体彼此分离开，这张力就突然松弛，姊妹染色单体被拉向相反的两极。在有丝分裂最后阶段，末期，核膜在分开的每组染色体外面重新形成。胞质分裂过程把细胞质内含物分开、染色体松解、RNA 合成恢复时，细胞分裂就结束了。

[罗 登译 王亚辉校]



神经嵴细胞通过复杂的细胞外基质迁移的扫描电镜照片。细胞外基质由包埋在水合多糖凝胶中的大量蛋白质纤维组成。(Jan Löfberg 赠)

第十二章 细胞间的粘连 和细胞外基质

多细胞结构的很大优点之一就是它给细胞特化的自由，这些方法对孤立生存的细胞是不适宜的，但对于一个整体的生物来说是有益的。这样的特化作用甚至可能需要特化细胞的死亡，例如在皮肤的上皮细胞积聚角质并死亡，以形成有机体外侧坚韧的细胞骨骼保护层的时候。多细胞动物的特化细胞通常在显微水平上组织为协同的集合体，称为组织，各种不同的组织转而结合，形成较大的称为器官的功能单位(图12-1)。

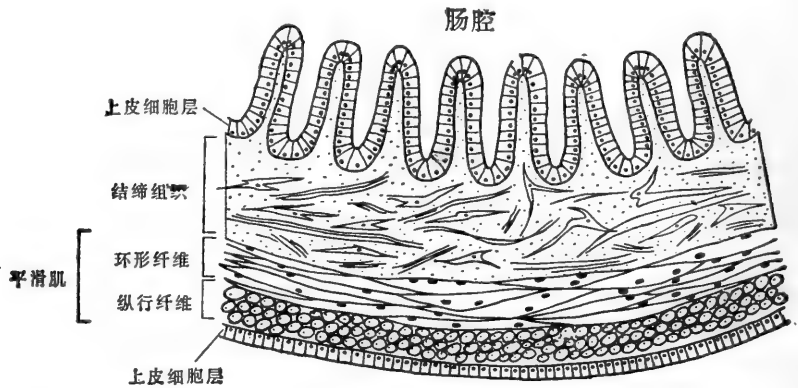


图 12-1 小肠横切面的模式图。表明这个器官如何由上皮组织、结缔组织和肌肉组织构成。每一种组织均由细胞连接和(或)细胞外基质将细胞装配在一起。

组织中所有的细胞都与称为细胞外基质的细胞外大分子的复杂网络相接触。细胞外基质除有助于细胞和组织聚集在一起外，还提供了高度有序的“晶格”结构，在此结构中细胞可以迁移和彼此相互作用。除了靠细胞外基质把细胞聚集在一起之外，细胞与邻近细胞的直接物理接触常常是靠它们质膜上称为细胞连接的特化区把细胞联结起来。一些连接主要是用来使细胞结合在一起，而另一些连接则允许一个细胞内的小分子物质通进邻近细胞内，这有助于协调细胞形成组织的活动。

在本章中我们首先考虑已知的关于细胞在组成组织和器官的过程中彼此如何识别，然后我们讨论细胞间连接和细胞外基质的结构和组织。

细胞间识别和细胞粘连

特化的细胞以两种非常不同的方式彼此相连形成组织。其中最简单的是一个或多个“起始细胞”(founder cell)的后裔，由于细胞外基质大分子物质和特化的细胞连接的形成，使细胞不能游走而形成组织(图12-2)。这就是上皮细胞层的细胞保持在一起的原因，

许多动物的发育都涉及这类细胞层的形成、折叠和分化。

另一种方式看来要复杂得多,包括某些细胞各自迁移一段距离,接着与当地的或其他迁移来的细胞装配成组织。例如在脊椎动物胚胎,细胞从神经嵴迁移到许多不同的区域,在那里它们分化并装配成各种组织,包括外周神经系统(图12-3)。这一过程中需要某些机制来指导细胞迁向其最终目的地。例如,分泌吸引迁移的细胞的化学物质(趋化性),或在细胞外基质中铺设引导迁移细胞的特殊通道(接触向导)。

对形成组织的两种已知方式来说,细胞群都必须相互识别,才能呆在一起并与周围组织的细胞保持清楚的界限。而且所形成的组织在器官中也不是随便排列的。细胞如何相互识别?细胞群如何在器官中成为有序的安排?这些过程中的有关机制迄今所知甚微,但可以从某些单细胞生物表现出来的相当原始的多细胞的行为中得到启示。

粘细菌利用社会行为的优点¹

粘细菌 (myxobacteria) 是少数几个群居原核生物之一。它们是生活在土壤中的杆状细菌,以不溶的大分子为食,借助分泌水解酶来降解这些分子。为了增加进食的效率,细胞呆在一起并在松散的多

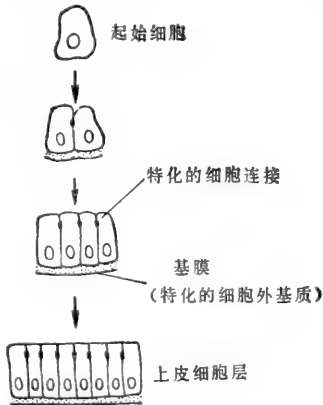


图12-2 细胞装配形成组织的最简单的机制。起始细胞的后裔靠基膜和靠形成细胞间连接而保持在上皮层中。

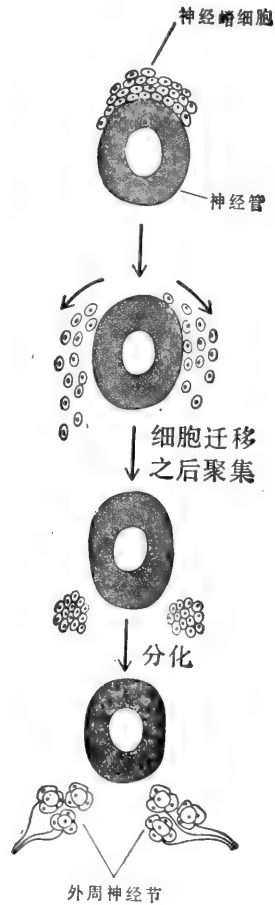


图12-3 细胞装配形成组织的较复杂机制的一个例子。神经嵴细胞从神经管的上表面迁移,形成遍及胚胎的种种不同细胞类型和组织。这里示它们在外周神经系统装配和分化形成两个神经元集合体,这种神经细胞的集合体叫做神经节。另一些神经嵴细胞成为围绕神经元的支持细胞(卫星细胞)。

细胞聚集体即“潮群”内繁殖,这样能使细胞集中它们分泌的消化酶(群狼效应,“wolf-pack” effect)。粘细菌在群居方式的运动和摄食方面很像多细胞生物。粘细菌简单的遗传和结构使其成为研究原始的细胞与细胞间相互作用的分子基础的有吸引力的生物。

在“潮群”内,个体的粘细菌细胞能够独立地以不常见的滑动方式运动,这种滑动不依

鞭毛或其他可见的运动结构，可以包含成千上万个细胞的潮群保持为一个粘着单位，只能慢慢迁移。使每一细菌维持在潮群中的通讯机制是什么？一种是原始形式的接触导向。当细菌运动时，它们留下一条粘液痕（一种原始的细胞外基质），其它粘细菌便沿着这条痕迹运动。虽然运动的细胞偶尔也可越过粘液痕，但通常是与它相合的。第二个机制已在突变体的实验中证实，研究表明粘细菌中的迁移是由两个不同的运动系统所控制的：一个控制单细胞；一个控制细胞群。在至少需要九个不同的基因产物的细胞群系统中，个体细胞只有在与其他细胞接触受刺激时才运动。某些基因产物看来在细胞接触时对邻近细胞发出运动的信号，而其它基因产物看来是充当这些信号的受体（图 12-4）。这种“触走”系统维持了细胞在潮群中一起运动。

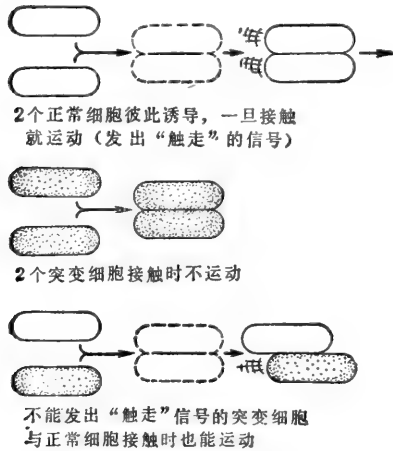


图12-4 如何证明突变的粘细菌存在着一组“触走”的运动系统，即细胞只有受到其他细胞接触的刺激时才运动的示意图。本例说明突变体不能发出信号，但对来自正常细胞的信号作出反应。别的突变体（图中未示）能发出信号，但不能对信号作出反应，因为它们或者缺乏受体，或者运动本身缺乏“动力”，这样的突变细胞与正常细胞接触时不能运动。

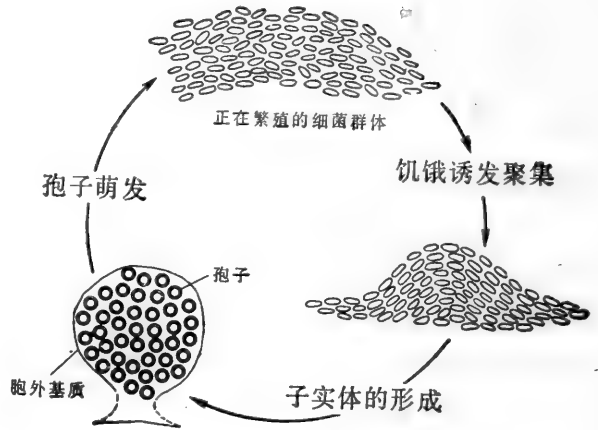


图12-5 粘细菌的生活周期。饥饿引起细胞聚集和分化，形成子实体。子实体的孢子在条件重新变得有利时萌发。

当粘细菌饥饿的时候，它们显示出最令人难忘的多细胞行为，在这种情况下潮群的细胞紧紧成团地聚集在一起，彼此往上堆形成一个多细胞的子实体（图 12-5 和图 12-6）。在子实体内细菌细胞分化成孢子，这些孢子由于细胞外基质的覆盖而被聚集在一起。即使在极恶劣的环境中孢子也能长期存活。只有当条件比较有利的时候孢子才萌发成通常的细菌。具有高浓度孢子的大子实体能保证产生一个稠密的潮群（图 12-5），而不是产生少数自己不能有效进食的分散细胞。

细胞如何调整它们的行为以形成子实体呢？分析子实体有缺陷的突变体表明，细胞聚集在一起至少是对 4 种不同的由细胞本身所分泌的信号的反应。这些信号如何导致形成子实体，在另一种与粘细菌生活周期非常相似的生物——盘基网柄菌（*Dictyostelium discoideum*）中目前了解得最多。这种细胞组成的粘性霉菌是真核生物，它的基因组仅比原核生物的粘细菌的大 4 倍（相当人的百分之一）。

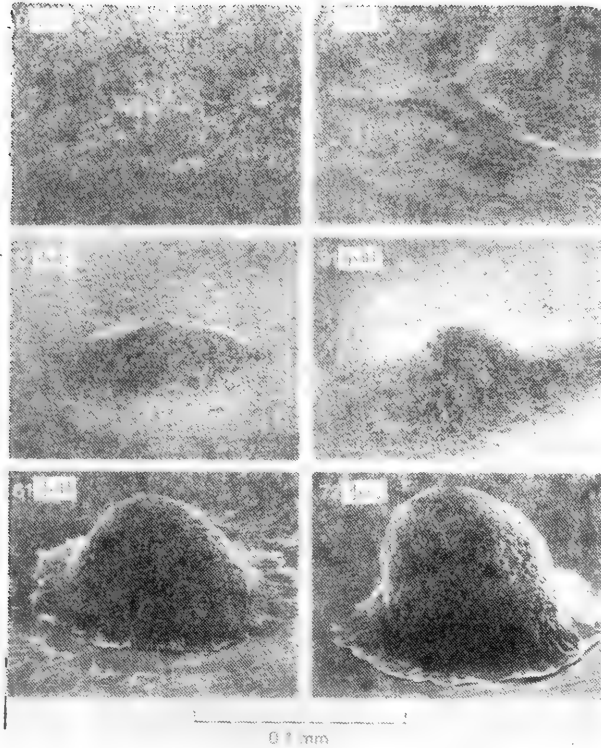


图 12-6 粘细菌的潮群在对饥饿反应中聚集并形成子实体的扫描电镜照片。每张照片上标出了开始饥饿后的小时数。(Jerry Kuner 赠)

粘菌变形虫体装配成多细胞的蛞蝓体涉及趋化性和特异的细胞粘连²

盘基网柄菌的变形虫体是生活在森林地上的单个细胞,以细菌和酵母为食,每隔几小时分裂一次(在实验室里它们能培养在无其它微生物的配方固定的培养液中)。当它们的食物耗尽的时候,变形虫体停止分裂,由自己分泌的趋化性信号的吸引而向一些叫做聚集中心的集中点聚集。在每一聚集中心,细胞以特异的细胞表面分子彼此粘连,形成一个非常细的(1—2mm)垂直的蠕虫样结构,然后倒向一侧,像一条光滑潮湿的蛞蝓似地爬行,在它后面留下一条粘液的痕迹(图12-7)。

多细胞的蛞蝓体(slug)表现出种种自由生活的变形体虫所没有的行为。例如,它对光和热极其敏感,并能向着像夜光表那样弱的光源迁移。随着迁移,蛞蝓体的细胞开始分化,最终形成子实体。这一过程从开始聚集时算起,历时约30小时(图12-8)。在柄和子实体形成中发生的复杂的细胞迁移如图12-9所示。蛞蝓体前部的细胞成为柄区,它后面的细胞分化成孢子,而最后部分的细胞形成足板。柄细胞和孢子细胞两者均有细胞外基质(以纤维素壁的形成)覆盖,最终除了孢子外所有的细胞都死亡。只有在条件有利的时候,孢子萌发产生单细胞的变形虫体,重新开始其生活周期(图12-10)。

在真核细胞中了解最多的趋化性例子是网柄菌的趋化性信号发放。在对饥饿的反应中变形虫体开始制造和脉冲式地分泌环AMP(cAMP)。由于某种未知的原因某些细胞成为聚集中心,它们制造的cAMP结合到其他饥饿变形虫体表面的特异受体上,为它们

的正常的迁移定向,使其朝着 cAMP 源前进。用微量滴管将少量 cAMP 滴加在饥饿变形虫体表面的任何一点,可以直接证明这种趋化性的反应。结果在朝向微量滴管的地方立即长出伪足(图 12-11),通常伪足粘在细胞着落的表面上,并拉着细胞向同一方向移动。

每一聚集中心的影响区域不断增大,这是因为最初的 cAMP 信号以脉冲形式从中心释放,并从一个细胞到另一细胞接续下去。cAMP 的每一脉冲引起周围的细胞一方面朝着脉冲的源迁移,另一方面又分泌它们自己的 cAMP 脉冲,然后稍迟释放的新脉冲又能定向并引起它后边的细胞又一 cAMP 脉冲,以此类推。以这种方式 cAMP 的有规律的脉冲波从每一聚集中心流出,引起较远距离变形虫体以

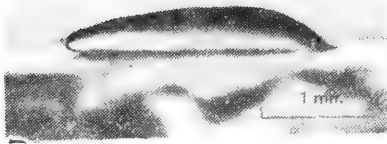


图12-7 盘基网柄菌正在迁移的蛞蝓体的光学显微镜照片

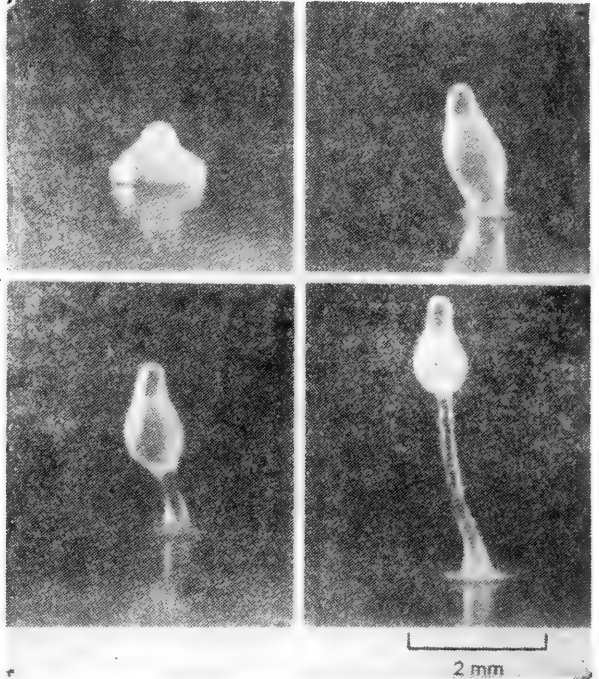


图12-8 示盘基网柄菌子实体形成各阶段的光学显微照片。(经 John Bonner同意)

起伏的同心圆或螺旋波的形式向内迁移,这种迁移波形可在缩时电影上看到(图 12-12)。这样一个接续系统的优点是信号以恒定的速度(距离与时间成正比)从中央向外移动,能影响的面积大。反之,仅仅靠逐步扩散的信号在移动中会慢下来(距离与时间的平方根成正比)。比较盘基网柄菌的和缺乏接续系统的同居微小网柄菌 (*Dictyostelium minutum*) 的聚集过程,可以看出这种差别。后者每一聚集中心所释放的信号的影响范围大大缩小,所形成的蛞蝓体和子实体是很小的。

网柄菌变形虫体饥饿时,它们不仅在趋化定向过程中开始分泌 cAMP 和对 cAMP 的脉冲反应,而且激活了成千个新基因,它们开始合成很多新分子,包括用在细胞间粘连的那些分子。通常在变形虫体汇集成流向着凝集中心迁移时,彼此端部紧密粘连。在之后的蛞蝓体阶段,它们彼此间的大部分表面相互粘连。只有由饥饿变形虫体所合成的大量不同的分子才与细胞粘连有关。例如,最初端部的聚集看来是由细胞表面糖蛋白所介导的,因为直接抗这种糖蛋白的抗体能抑制这种聚集。但细胞间粘连的分子基础在另一种简单生物海绵中了解得较为清楚。



图12-9 盘基网柄菌子实体形成时所涉及的细胞迁移的示意图。蛞蝓体前部的细胞下移成为柄，中部的细胞上移并分化为形成子实体的孢子的集合体。

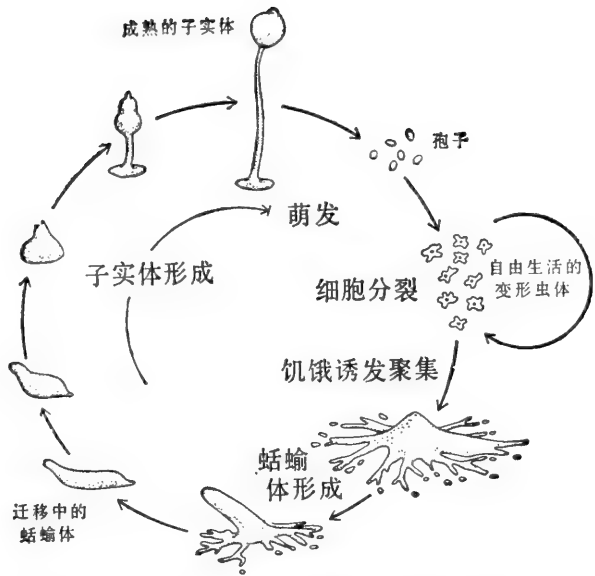


图12-10 盘基网柄菌的生活周期。当饥饿时粘菌变形虫体聚集和分化成一个迁移的蛞蝓体，接着形成子实体。当条件重新有利时释放的孢子萌发，形成变形虫体。

海绵中种特异性的细胞聚集是由大的细胞外聚集因子所介导的³

群居微生物诸如粘细菌和网柄菌用来研究细胞聚集的优点之一，是细胞聚集过程可在适合于研究的培养皿中正常进行。可惜这种细胞间识别过程在多细胞动物发育中是罕见的。因而通常必须将已发育的组织解离成单细胞，然后在体外重新装配。这些被解离的细胞常常重新装配成与原来的组织相似的结构，因而希望重新装配的研究将能说明动物中组织最初形成的过程。这类实验最初在1907年用海绵细胞进行。

海绵是最简单的多细胞动物，仅仅由五类或六类细胞组成。用将成体生物轻轻压过筛子的机械的方法就能将其解离成单个细胞。当把已解离的细胞混在一起时，它们迅速聚集，甚至重新组成正常的海绵。这类实验中的一个经典实验是把两种不同颜色海绵的解离细胞混在一起。细胞以种特异性的方式分别相互粘连形成两种颜色的聚集块(图12-13)。虽然只在某些种类的海绵中得到这样的结果，但说明某些成体海绵的细胞有区别本种细胞与异种细胞的能力。

这种种特异性的聚集是由大的细胞外聚集因子来介导的，被认为是蛋白多糖和(或)糖蛋白分子的复合体。成体海绵在缺 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的海水中温育时即自发地解离成单细胞，聚集因子在解离时被释入海水。假如将分散的细胞清洗，去除了聚集因子后再放回

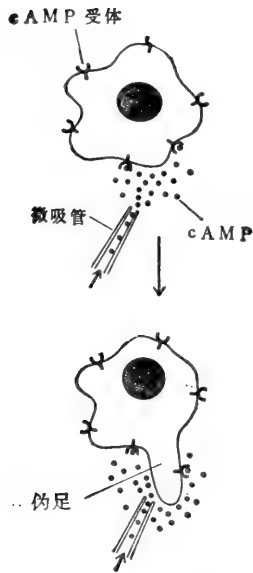


图12-11 将少量的 cAMP 加在饥饿的网柄菌变形虫体(单细胞)的表面的某一点上,立即在此点上诱发出伪足。用这种方法诱导变形虫朝着 cAMP 源运动。cAMP 通过结合到细胞表面受体上而起作用。

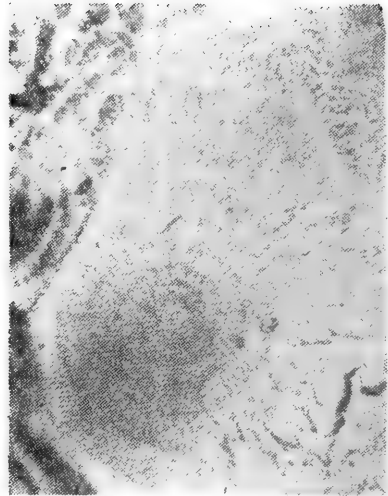


图12-12 光学显微照片示饥饿的网柄菌变形虫体向聚集中心聚集时所形成的波。变形虫体的个体在本图的低倍放大照片中分辨不出。(Gunter Gerisch 赠)

正常海水中,它们便不能重新聚集,除非再加入聚集分子。分子诱导的聚集是快速的,需 Ca^{2+} 而且是特异性的。

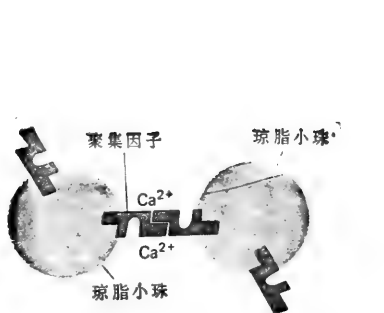
海绵聚集因子是一个大颗粒,直径约为 100nm,分子量约 2 000 万,在 Ca^{2+} 存在下它还能进一步聚合。它结合到同种海绵细胞表面的特异蛋白质受体(称为基板, base plate)上,但不能与异种海绵细胞结合。颗粒首先结合到细胞表面的基板上,然后相互结合,把海绵细胞交联起来,颗粒彼此结合时需要 Ca^{2+} 的存在(图12-14)。这样,当聚集因子共价偶联到琼脂小珠上时,若有 Ca^{2+} 存在,聚集因子就能介导小珠的聚集。另一方面,如果与琼脂小珠偶联的是基板蛋白而不是聚集因子,那么小珠需要聚集因子和 Ca^{2+} 同时存在时方能聚集(图12-15)。

总而言之,海绵细胞识别机制是一个大的多价连结的分子识别两个不同细胞上的相同的蛋白质,从而把它们聚集在一起。

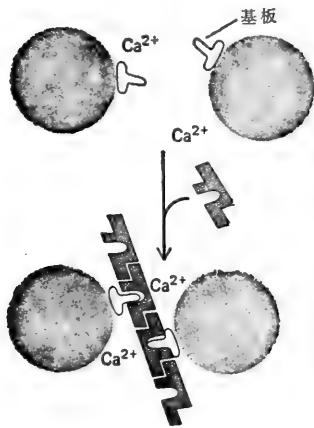
解离的脊椎动物胚胎细胞优先选择与相同组织的细胞相连'

最初用来研究海绵细胞聚集的方法已经广泛地应用于研究脊椎动物胚胎细胞的细胞识别和粘连。脊椎动物的胚胎组织不像成体组织那样难以解离成单细胞,在低浓度的蛋白水解酶、胰蛋白酶的作用下很容易解离。当来自两个不同胚胎组织的解离细胞混在一起时,最初它们形成混合的聚集体,随后分开各自形成两个按组织来源划分的区域。如果混合两个不同种的细胞,它们一般不按种的差异而按组织的特异性划分来形成含有两个物种细胞的聚集体。

即使用非常不同的试验来测定细胞粘连,也会得到相似的结果。试验包括:一种类

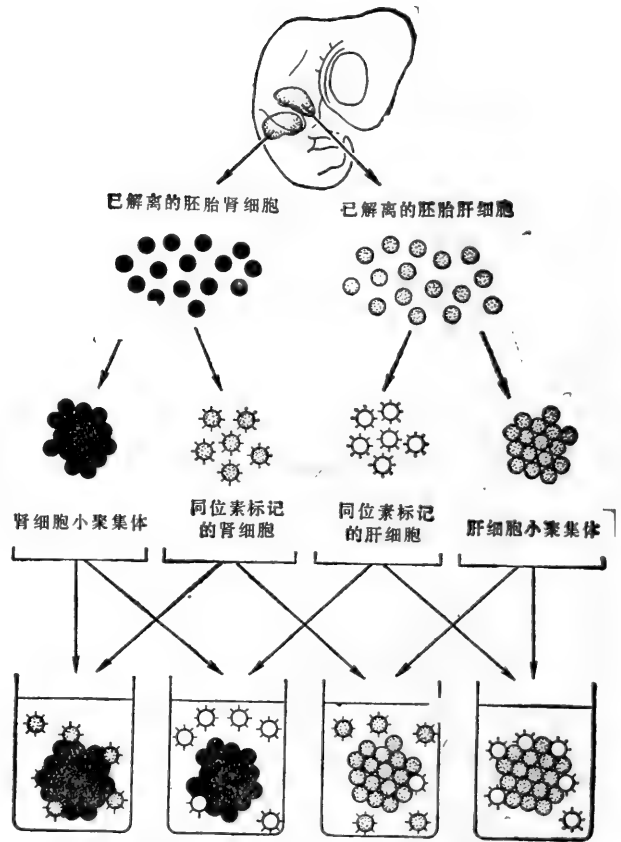


(A) 聚集因子共价连结到小珠上



(B) 基板共价连结到小珠上

图12-15 对图12-14的图解提供的证据。把聚集因子或基板蛋白共价连结到琼脂小珠上。(A)在 Ca^{2+} 存在时接上了聚集因子的小珠聚集；(B)接上了基板的小珠，只有在同时加聚集因子时才聚集。



同位素标记的细胞与细胞聚集体混合

图12-16 用放射活性的细胞结合试验测定解离的脊椎动物胚胎细胞的组织特异性粘连。在不同的时间测定结合到细胞聚集体上同位素标记细胞的数量，能测出细胞粘连的速率。同种细胞之间的粘连速率总是比较大的。

不同组织的细胞表现出粘连的等级⁹

当两种不同组织解离细胞的混合物在体外分类时，一种组织的细胞通常最终留在聚集块内部，另一种组织的细胞包在外层。根据差别粘连假说，这种差别是因不同组织的细胞表现出不同的粘连的等级造成的，在混合聚集体内部的细胞彼此粘连是如此之强，以至于最终排除了其中粘连较弱的细胞。所以假如混合实验显示出：A组织的细胞在实验结束时总是在B组织细胞之内；B组织细胞又总是在C组织细胞之内，则若将A细胞与C细胞混合后，在实验结束时，A细胞应该总是在C细胞之内。事实上，观察到的结果也总是如此(图12-17)。

差别粘连假说对多年前所做的卓越的观察提供了令人满意的解释。如果将两栖类胚胎的三种不同胚层的解离细胞(或组织碎片)混合在一起，细胞(或组织)分别归类的结果是外胚层最终在外、内胚层在内、中胚层在两者之间，这正与它们在完整胚胎中的情形相

同。用不同的组织和不同物种所做的重复实验的结果提示，在胚胎发育过程中细胞粘连的差别可能对胚层结构的稳定性起作用。

我们刚刚讨论了有关体外的细胞间识别和粘连现象之间相互关系的一个重要的、尚未解决的问题。下一节将讨论特化的细胞连接的形成。有两个观察结果提示特化的细胞连接可能在上述的细胞粘连实验中起作用：(1)同种海绵的解离细胞聚集时，虽然未见典型的间隙连接，但它们很快形成了通讯连接，允许小的离子从一个细胞的细胞质跑到另一细胞的细胞质中去。这种的离子偶联并不发生在异种海绵细胞的混合聚集体中；(2)不同脊椎动物胚胎组织的解离细胞在体外分别归类时，集中在聚集块内部的那些粘着力最强的细胞倾向于形成数量最多的特化粘着连接，称为点桥粒 (spot desmosome)。

我们下面将看一下在组织中细胞之间形成的特化连接的类型。

小结

在高等动物中研究细胞装配成复杂组织的分子机制的困难促进了对较为简单系统的研究。某些单细胞生物包括粘细菌和细胞粘菌中的盘基网柄菌在饥饿的时候聚集在一起形成多细胞的子实体。在这两个例子中饥饿细胞在对其本身分泌的化学信号反应中聚集起来。在网柄菌属 (*Dictyostelium*) 这种信号是 cAMP。一些海绵细胞借助于分泌大的种特异性的使相同细胞交联在一起的聚集因子，使同种的海绵细胞相互粘连。把各种脊椎动物胚胎组织的解离细胞混合在一起，它们优先选择与相同组织的细胞连接，这种组织特异性识别过程的分子基础尚属未知。

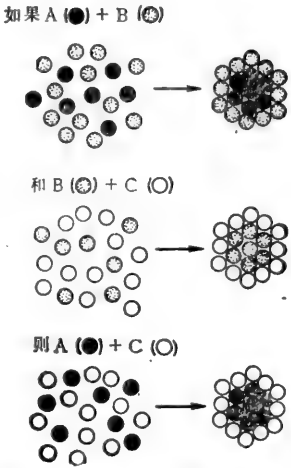


图12-17 差别粘连假说预测：当细胞分类实验结束时，如果A细胞在B细胞之内，而B细胞在C细胞之内，那么在同样实验中混合A和C细胞，A细胞则应该在C细胞之内。正如本例中所示，实验结果总是这样。

细胞连接

细胞连接通常太小，用光学显微镜无法分辨。然而用薄切片和冰冻断裂的电镜术则很容易观察到，两种方法都证实，在这些区域中相互作用的质膜(以及常和其下的细胞质和质膜之间的细胞空隙)是高度特化了的。传统上将这些连接分成三个功能种类：(1)粘着连接 (adhering junctions)，机械地将细胞聚集在一起；(2)不可透过的连接 (impermeable junctions)，不仅能将细胞聚集在一起，而且将细胞封住使分子不能在它们之间渗漏；(3)通讯连接 (communicating junction)，介导小分子从相互作用的一个细胞到另一细胞。

各种类型的细胞间连接如表 12-1 所示。粘着连接的主要类型称为桥粒 (desmosome)。主要的不可透过的连接是紧密连接 (tight junction) 和无脊椎动物的中隔连接 (septate junction)。通讯连接有两个类型：间隙连接 (gap junction) 和化学突触 (chemical synapses)。间隙连接时小分子可以从一个细胞的内部直接通过另一细胞的内部。

表 12-1 细胞间的连接

1. 粘着连接	a. 紧密连接
a. 带状桥粒	b. 中隔连接(仅无脊椎动物有)
b. 点状桥粒	3. 通讯连接
c. 半桥粒	a. 间隙连接
2. 不可透过的连接	b. 化学突触

但化学突触的情况下,即使细胞确有接触,也只能间接通讯(图 12-18)。突触的“发送”细胞(称突触前细胞)分泌化学信号(称为神经递质),扩散通过突触空隙,对另一细胞(称突触后细胞)发出信号。由于在第十八章将谈到化学突触,这里不予讨论。不要将化学突触与较不普通的电突触(electrical synapses)相混淆,在电突触的情况下电冲动从一个神经细胞通过间隙连接直接传到另一个神经细胞。

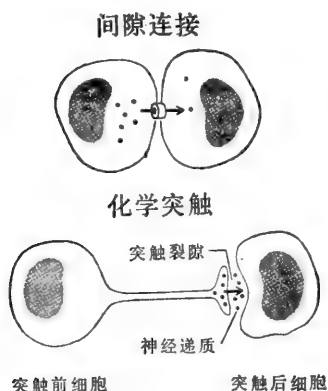


图 12-18 两类通讯细胞连接的图解。在间隙连接,小分子物质从一个细胞的细胞质直接到另一细胞的细胞质中。在化学突触,突触前神经细胞分泌化学信号(神经递质),它通过扩散越过突触缝,向突触后细胞的表面发出信号。

桥粒把细胞固着在一起⁶

桥粒广泛分布于组织中,在那里它们使一群细胞作为结构单位行使功能。在诸如心肌、皮肤上皮和子宫颈等受机械重压的组织中桥粒最丰富,这表明桥粒对于将细胞聚集在一起是很重要的。它们有三种不同的类型:带状桥粒、点桥粒和半桥粒。在大多数上皮细胞中存在着所有这三种桥粒。

带状桥粒形成一个连续的带围绕上皮层中每一相互作用的细胞,靠近细胞的顶端(图 12-19),相邻细胞的带直接对齐,并为细胞空隙中的没什么特征的、可能是将相互作用的膜拉在一起的纤丝样物质所分开。每一细胞内肌动蛋白丝的收缩束就在质膜之下沿着带分布。这些纤丝束可能介导着动物形态发生过程中最基本的过程之一——上皮细胞层折叠成管(图 12-20)。例如,这些肌动蛋白丝束定向收缩被认为是引起神经板中每一上皮细胞顶部变狭窄,结果使上皮板卷起形成神经管。

带状桥粒形成一个连续的带围绕上皮层中每一相互作用的细胞,靠近细胞的顶端(图 12-19),相邻细胞的带直接对齐,并为细胞空隙中的没什么特征的、可能是将相互作用的膜拉在一起的纤丝样物质所分开。每一细胞内肌动蛋白丝的收缩束就在质膜之下沿着带分布。这些纤丝束可能介导着动物形态发生过程中最基本的过程之一——上皮细胞层折叠成管(图 12-20)。

点状桥粒的作用像铆钉一样,在钮扣样接触点将上皮细胞铆在一张(图 12-21)。它们也可以作为角蛋白丝(也称张力纤丝,见 577 页)的固着点。角蛋白丝从细胞的一侧越过细胞内部到另一侧,形成细胞质的结构骨架。因为另一些纤丝在点状桥粒处从一个细胞延伸到另一个细胞(图 12-22),相邻细胞内部角蛋白丝网间接地通过点状桥粒而联结,从而形成跨越整个上皮层的连续纤维网(图 12-23)。半桥粒(hemidesmosome 或 half-desmosomes)类似于点状桥粒,但是它们不是把相邻上皮细胞膜联结在一起,而是将上皮细胞的基部表面联结到下面的基膜(细胞外基质的特殊结构,见后)上。点桥粒和半桥粒共同起着像铆钉样的作用,将所受的任何剪切力分散到整个上皮层和它下面的结缔组织中去(图 12-23)。

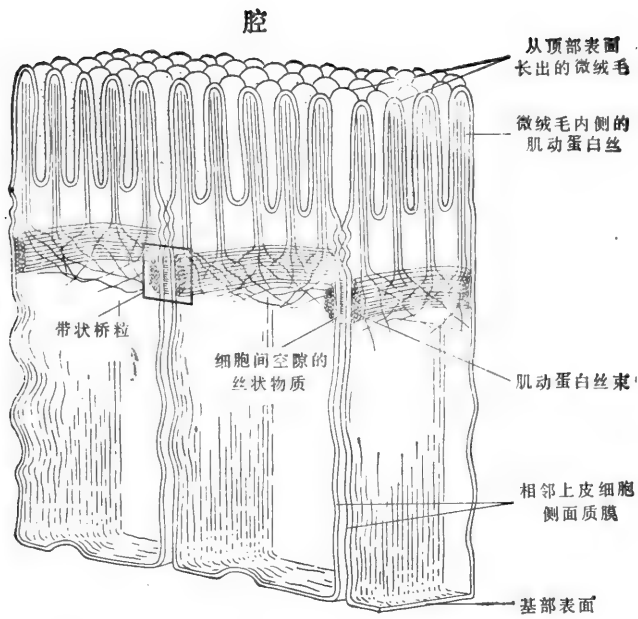


图 12-19 小肠上皮细胞之间带状桥粒图解。这种连接（也称作小带粘连 zonula adherens）绕着每一相互作用的细胞成为一圈，其特征是在细胞间空隙具有丝状物质，能收缩的肌动蛋白束沿着相连质膜的细胞质表面分布。

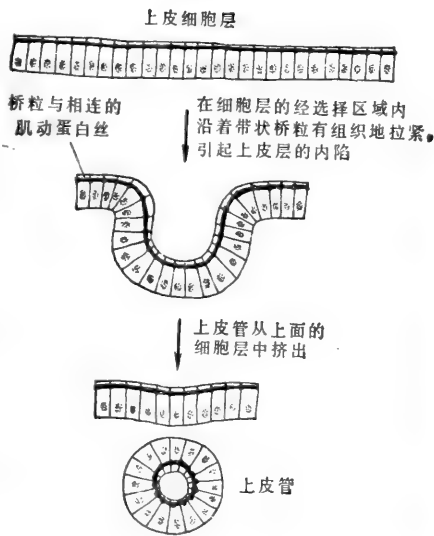


图12-20 上皮层折叠形成上皮管(像形成神经管那样)图解。认为沿着带状桥粒分布的肌动蛋白束进行定向收缩，引起细胞层某些经选择区域的上皮细胞顶端变窄，导致上皮层卷成管，然后通过缢缩从原来的上皮层中挤出来。

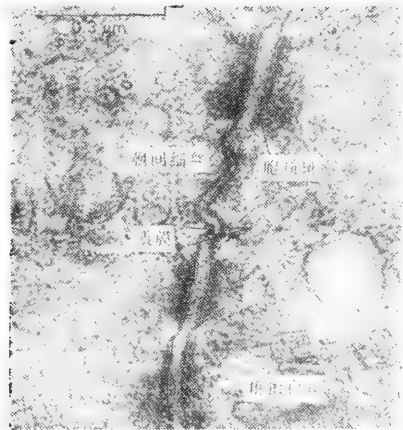


图12-21 大鼠小肠两个上皮细胞之间的三个点状桥粒的电镜照片。(引自 N. B. Gillula, in Cell Communication [R. P. Cox, ed.], pp. 1-29 New York: Wiley, 1974)

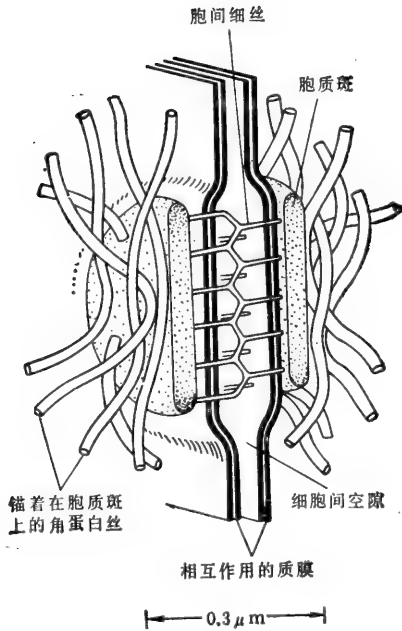


图12-22 高度模式化的点状桥粒图解。每一相互反应细胞质膜的细胞质表面上是一个致密的斑块，角蛋白丝的粗网与它相联结，角蛋白丝或终止在斑块上，或沿着斑块表面通过。无特征的纤维越过细胞间空隙，将相邻的斑块连接起来。

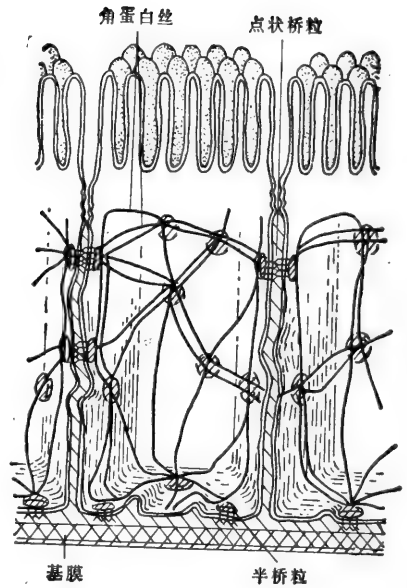


图12-23 点状桥粒和半桥粒在小肠上皮细胞中分布图解。注意相邻细胞的角蛋白丝网如何间接地通过点状桥粒彼此连接，以及通过半桥粒与基膜连接。

紧密连接在细胞层中形成渗透屏障^{6,7}

上皮细胞层覆盖着体表，并对体内所有的囊腔加衬。这些细胞层尽管存在广泛的生化差异，但至少它们有一个重要的功能是相同的，那就是它们作为高度选择性的渗透屏障，从而将化学成分十分悬殊的内侧和外侧液体分开。紧密连接在维持细胞层的选择性屏障的功能中起决定性的作用。例如，衬在小肠里的上皮细胞必须保持最大的肠腔容量，同时细胞必须吸入选中的营养物质使其透过细胞层进入另一侧的细胞外液体中，从那里它们被吸收入血流。这种转运依赖于两套不同的特异膜转运蛋白：一套只分布在上皮细胞的顶表面(面向腔的表面)吸进选中的分子；另一套只在基部和侧部即所谓的基侧表面，将吸收的分子又排出到另一侧(图 12-24)。显然，为了维持方向性的吸收和排出，顶端泵(在质膜中)一定不能扩散到细胞的基侧表面，基侧泵也不能扩散到顶端。而且还必须防止被转运的分子漏回肠腔。紧密连接使这两种不同路线的转运成为可能，首先它们在质膜的脂双层中作为扩散的屏障，这样它们就阻止了在顶端膜上的转运蛋白扩散到基侧膜，或基侧膜上的扩散到顶端膜；其次，紧密连接把相邻细胞封接在一起，产生一个连续的细胞层，即使小分子也不能在细胞之间通过。

紧密连接处相互作用的质膜是贴得相当紧的，以致不存在细胞空隙：假如将电子致密的标记物加在细胞层的一侧，它将不能越过紧密连接(图 12-25)。因为蛋白水解酶处理或 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的螯合物都能破坏这种连接，所以特异蛋白或者两价阳离子对于维持紧密连接的完整是必需的。

在电镜照片上可以看出紧密连接是在两个相互作用的质膜特异蛋白越过细胞空隙直接接触时形成的(图 12-26)。用冰冻断裂电镜术可观察到这些蛋白质是线状排列的膜内颗粒(图 12-27)。由这种颗粒作网状排列组成的带状结构完全包围着细胞层中的每一细胞。

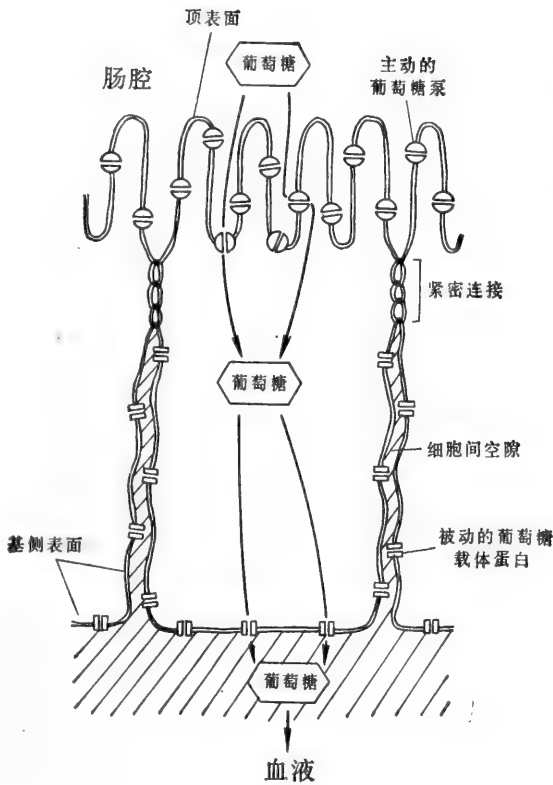


图12-24 说明小肠上皮细胞的紧密连接,如何将不同的转运蛋白限制在质膜的不同区域图解。这就使得营养物质从肠腔越过上皮层转运到血液。在本例中,葡萄糖通过位于顶端表面的葡萄糖泵蛋白的主动运输进入细胞,通过基侧膜上的葡萄糖转运蛋白介导的易化扩散从细胞中扩散出去。

在无脊椎动物中,通常起封闭细胞层作用的是中隔连接而不是紧密连接,这些连接在电子显微镜和冰冻蚀刻照片中的形态有着高度的特征。它们有两点不同于紧密连接:首先,连接蛋白排列成更有规律的、越过细胞空隙相互作用的平行排;其次,连接蛋白本身形成封闭,而并未真正使两个

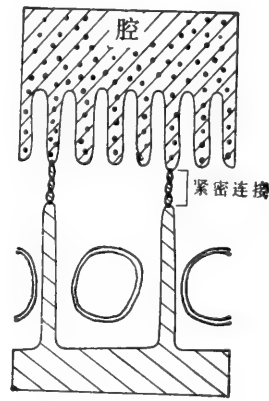


图12-25 图解上皮细胞层一侧的可溶性分子不能通过将相邻细胞密封在一起的紧密连接

相并列的质膜直接接触(图 12-28)。像紧密连接一样,这种“隔膜条”形成一完全的带围绕着每一相互作用的细胞。

间隙连接允许小分子在细胞间直接通过^{6,8}

间隙连接是最常见的一类细胞连接,广泛分布在所有动物的组织中。这种连接被称为是通讯连接,因为它们允许小的水溶性的分子从一个细胞的细胞质直接通到另外的细胞质中去,因而既是电的又是代谢的将细胞偶联起来。

这种类型的细胞偶联是在1958年首次被证实的。将微电极播入龙虾的神经索的两个相互作用的神经细胞中,当两电极之间存在电压梯度时电流迅速通过,说明无机离子(它们在活组织中携带电流)可以自由地从一个细胞内部通到另一细胞内部。这实验做了几年以后,有人用荧光小分子注入组织中的一个细胞内,发现它们很容易地透到邻近的细胞

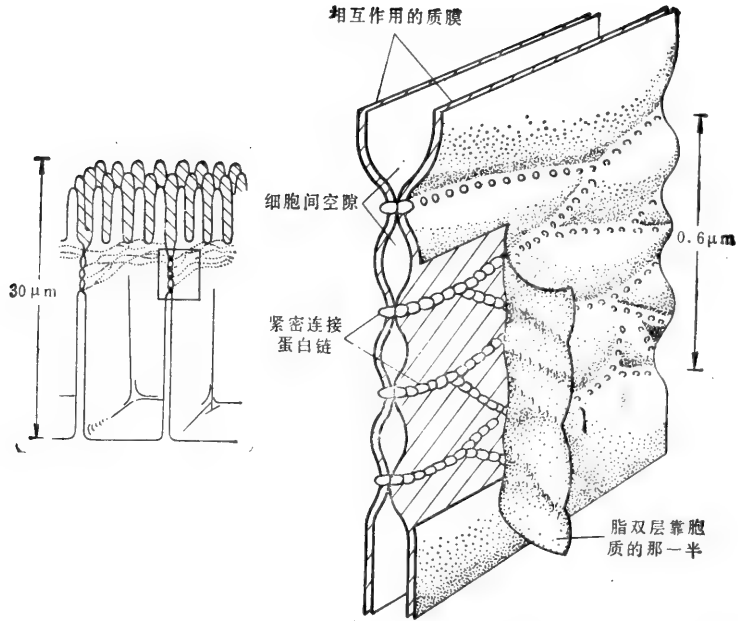


图 12-26 小肠上皮细胞间紧密连接图解。连续的连接蛋白链将相邻的质膜结合在一起,这些蛋白链进行跨细胞间空隙的接触,形成完全的封固。网结样封闭链形成的带围绕着细胞层中每一细胞。质膜的靠胞质的那一半被图解式地剥开,以暴露蛋白链。在冰冻断裂电镜照片中紧密连接蛋白保留在脂双层的细胞质的那一半上(图 12-27B),而不是像这里所示的保留在外侧一半上。

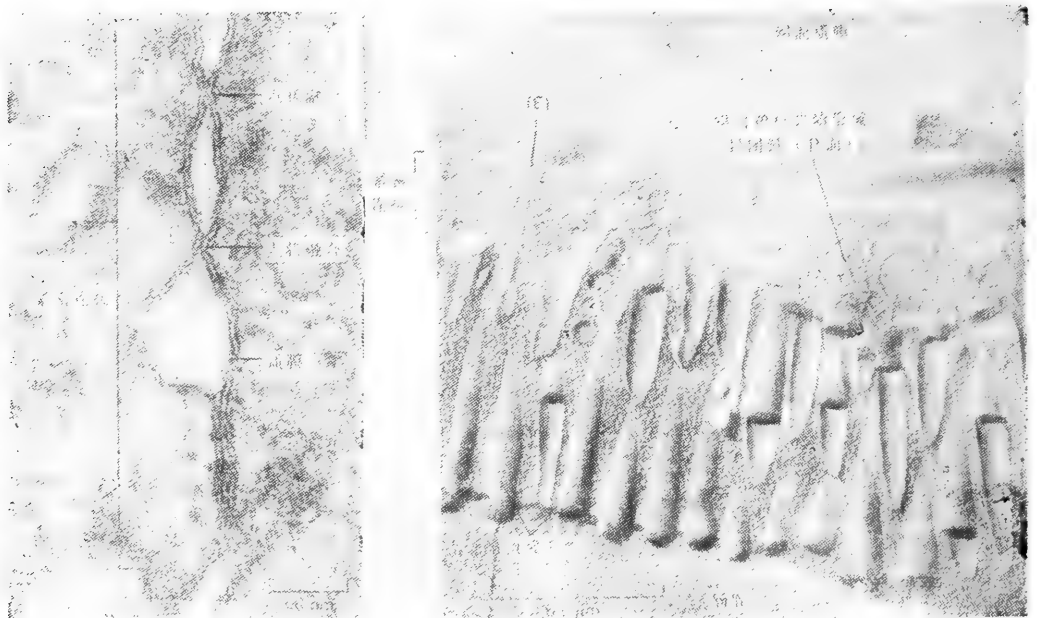


图 12-27 大鼠小肠上皮细胞之间紧密连接的薄切片(A)和冰冻断裂(B)的电镜照片。(A)横切面上所看到的连接好像是相互作用质膜之间的一系列点状融合。(B)与所有的冰冻断裂显微照片一样,照片的平面平行于膜的平面,可以看到封闭链在膜的细胞质断裂面(P面)上像是膜内颗粒的嵴,或在膜的外侧面(E面)上像是与嵴互补的沟。注意(B)中的细胞是以它们的顶端向下。(引自 N. B. Gilula, in *Cell Communication* [R. P. Cox, ed.]pp. 1-29, 1974)

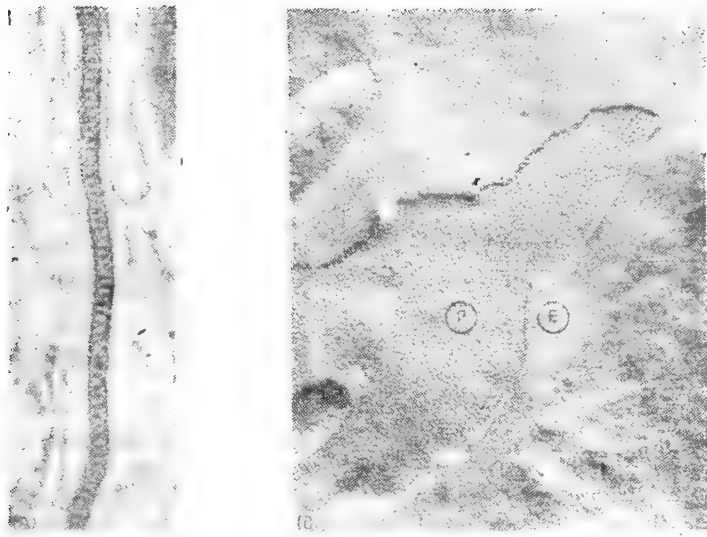


图 12-28 软体动物两个上皮细胞之间的一种无脊椎的中分隔连接的薄片(A)和冰冻断裂(B)的电镜照片。相互作用的质膜是由有规则的周期性平行排列成行的蛋白质连接起来的,这些蛋白质越过细胞间空隙相互作用。在横切面(A)上所看到每一行相互作用的蛋白质像密集的棒或隔膜,而在(B)所看到这些蛋白质像与胞质断裂面(P面)相连接的平行成行的膜内颗粒。(引自 N. B. Gilula, in *Cell Communication* [R. P. Cox ed.], pp. 1-29, 1974)

中,而不渗漏到细胞外去。当注射大小不同的荧光分子时发现:小于1 000—1 500道尔顿的分子可在细胞之间通过,而大分子则不能,提示连接通道有一个直径约1.5 nm的功能孔径(图12-29)。孔的大小说明偶联的细胞共享各种各样的小分子(如无机离子、糖、氨基酸、核苷酸和维生素),但不能共享它们的大分子(蛋白质、核酸和多糖)。

原则上这种类型的偶联应该允许细胞之间的代谢合作,因为组织内仅由某细胞亚群产生的细胞内小分子可以和该组织内的其他细胞共享。虽然仍不能在生物体中直接证明这种代谢合作,但在组织培养中已经证实。例如,缺乏胸苷激酶的突变细胞系不能将放射性标记的胸苷参入DNA,但是,假如这样的细胞与正常(野生型)细胞(含有胸苷激酶的)在一起培养,然后给予放射活性的胸苷,放射自显影表明与野生型细胞直接接触的突变细胞的DNA上有放射标记(图12-30)。这种观察意味着含有放射活性的胸苷的DNA前体,从野生型细胞直接透入与它们相接触的突变细胞。如果用不能形成间隙连接的突变细胞来进行这类实验时,这种代谢合作就不发生。

尽管通常假定在接触的细胞之间所测到的电的、染料的和代谢的偶联是由间隙连接介导的,但仍有详尽的证据表明。不管细胞在什么地方偶联,在那里几乎能发现间隙连接。反之,在脊椎动物细胞之间缺乏间隙连接的地方就不能证明有细胞偶联。然而在人工膜中重组有功能的间隙连接还是不可能的,因而取得分子通过它们的确凿的证据仍将是必要的。

由于间隙连接联结着大多数动物细胞,要排除其他类型的连接也介导着细胞偶联的可能性是困难的。例如不可能找到一种只具有紧密连接,而没有间隙连接的细胞,因而紧密连接偶联细胞的可能性依然存在。

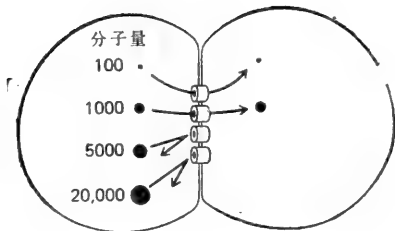


图12-29 将大小不同的荧光分子注入由间隙连接偶联的两个细胞之一中去时, 小于 1 500 道尔顿的分子可到另一细胞中去, 但较大分子则不能。提示连接两个细胞的假定通道的功能直径约 1.5 nm。



图12-30 用放射自显影术证明通过间隙连接联结的培养细胞间代谢协作的图解。缺乏胸苷激酶的突变细胞, 在培养液中加入放射性胸苷时, 不能参入到 DNA 中。正常细胞可以将胸苷参入到它们的 DNA, 所以把它们的核打上黑点, 代表在放射自显影术中显影的银粒。如果正常细胞和突变细胞混合培养, 突变细胞与正常细胞接触, 形成间隙连接, 则在放射自显影术中突变细胞的核也能被标记, 如图所示。这种标记的发生是由于在正常细胞中放射性胸苷参入到小分子的放射活性的 DNA 前体 (胸苷的三磷酸核苷的形式), 然后这些前体经过间隙连接进入突变细胞, 在那里它们参入 DNA。

为什么这么多细胞要通过间隙连接来实现电偶联和代谢偶联?

在一些组织中通过间隙连接偶联的细胞具有明显的功能。例如, 电的偶联使心肌细胞和使负责小肠蠕动的平滑肌细胞同步。同样地, 神经细胞之间的电突触使动作电位从一个细胞迅速地传到另一细胞, 而没有化学突触过程中的那种延迟。像在鱼和昆虫的某些规避反应中那样的对速度和可靠性要求很高的情况下, 电突触是很有用的。

真正的困难在于了解为什么在没有电活动的组织中存在间隙连接。原则上, 小分子代谢物和离子共享的结果提供了这些组织中个体细胞活动和反应的协同机制。例如, 上皮细胞层中某些细胞活动, 像纤毛的摆动或者胚胎发生过程中与卷成管状相关的形状改变, 都可能以这种方式来很好的协作。但迄今为止还不能直接证明间隙连接有这样的功能。

在早期胚胎中大多数细胞是离子偶联的

细胞通过间隙连接偶联在胚胎发生中可能是很重要的。在早期胚胎中(小鼠胚从 8 细胞阶段的后期开始)大多数细胞彼此是电偶联的。在血液循环系统尚未发育的胚胎中, 一般认为代谢偶联可能是分配营养物的重要方法。例如在血液开始循环之前枪乌贼胚胎的卵黄细胞与胚胎中其他所有的细胞偶联, 而在循环系统行使功能之后, 卵黄细胞仅仅彼此偶联。

在分化过程中, 每一个正在发育的组织或器官的细胞通常并不与其周围的组织偶联, 这反映了各个组织身份的确立。例如当两栖类神经管封闭时, 它们的细胞与其上的外胚层不偶联。已知在某些情况下, 在发育过程中的细胞发生暂时偶联: 如未成熟的肌肉细

胞(肌纤维母细胞)在其融合形成多核的肌纤维之前是偶联的。可能这种暂时偶联是发育过程中细胞相互作用中的一种细胞相互识别的机制。根据这种纯属假设的观点,随意偶联的细胞可以尝试彼此的细胞内环境,如“味道”不正,细胞之间的相互作用便结束了。

胚胎中的细胞偶联很可能提供了一个细胞发出长距离信号的通道,通过间隙连接,小分子物质可以从组织中细胞内浓度高的区域跑到浓度低的区域,因而建立起一连续的浓度梯度。局部浓度可向细胞提供一个“位置信息”来控制细胞按其在胚胎中的位置分化。例如,在两栖类神经板的发育中细胞是电偶联的,已经发现沿神经板不同位置的细胞有不同的膜电位。这意味着电(离子)流一定在神经板中不同膜电位区之间流动,产生沿板的离子浓度的梯度。任何这种梯度都可以作为确定细胞相对位置的参考系,指导每一细胞按适合于它在神经板中的位置的方式来发育(图 12-31)。

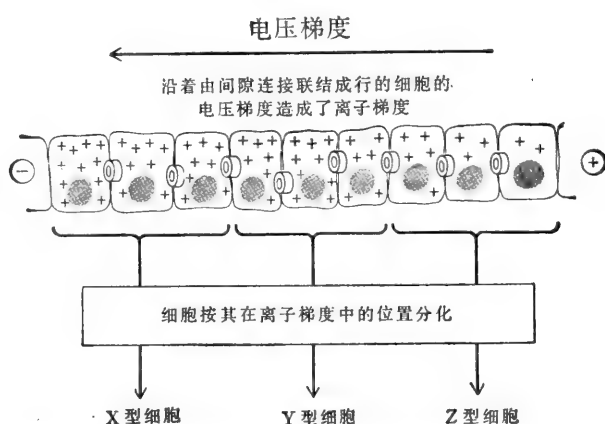


图 12-31 电压梯度会引起电流通过间隙连接,从而在偶联细胞中产生了离子梯度。在这种纯属假设的图解中,离子梯度作为决定细胞层中偶联细胞的相对位置的参照系。

细胞可以控制它们的间隙连接的通透性¹⁰

用降低细胞内 pH 或增加细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的实验操作,可以迅速地(几秒之内)和可逆地降低间隙连接的通透性。但是还不能肯定在正常情况下这种离子的改变是否也调节着细胞偶联。这些观察指出一种可能,即间隙连接是动态结构,其通透性可由形成它们的细胞来控制。

至少有一例能说明细胞偶联的离子控制可能是极重要的。假如一个细胞死亡或受伤,那么它迅速地与邻近细胞去偶联是很重要的。一般认为这是由于细胞内的游离 Ca^{2+} 大量增加而引起,而 Ca^{2+} 的增加或者是经损伤的质膜流入,或者细胞不再能有效地将 Ca^{2+} 泵出胞液的缘故。

间隙连接是由直接联结相互作用细胞内部的通道所组成^{6,11}

如图 12-32 所示,间隙连接是由从质膜伸出的蛋白质形成一个叫连接子 (connexons) 的结构组成的。连接子被认为是将两个细胞内部连接起来的连续的水溶液通道。推测两个相互作用的每一个细胞提供足够的蛋白质形成一个连接子,组成了通道全长的一半。连接子的连接方法与紧密连接不同,相互作用的质膜是由 2—4 nm 的间隙所分开(所

以称间隙连接)。这种连接方法可使相当大的分子也容易地在它们之间透过(图 12-33)。每一连接子可看作是冰冻断裂电镜照片上的一个膜内颗粒,每一间隙连接能含有几百个成簇的连接子(图 12-34)。

由于间隙连接对蛋白水解酶和去垢剂有着不寻常的抵抗力,已从啮齿动物的肝中分离出间隙连接(图 12-35)。这些制品的生化分析指出,间隙连接是主要由一种约 27 000

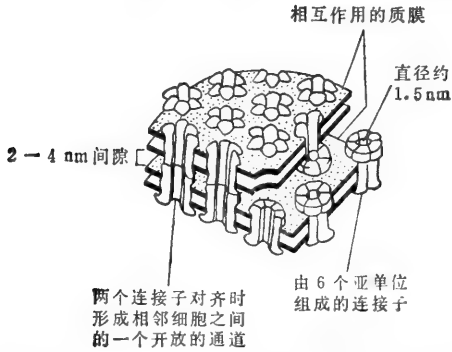


图 12-32 目前流行的基于电子显微镜和 X 光衍射的观察的间隙连接模型图解。图示两个相邻细胞的相互作用的质膜,并列的脂双层由于称为“连接子”的蛋白质装配物而能通透,每一“连接子”由 6 个亚单位组成。两个“连接子”相联越过细胞间空隙,形成联结两个细胞的通道

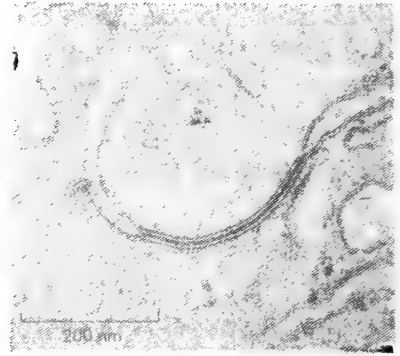


图 12-33 两个小鼠肝细胞之间间隙连接薄切片的电镜照片。相互作用的膜间的间隙由于充满着电子密集的染料(procion brown)而成为电子密集区,染料是先加到细胞外液体中去的。(N. B. Gilula 赠)



图 12-34 培养成纤维细胞间的大小间隙连接的薄切片(A)和冰冻断裂(B)的电镜照片。在 B 中可看到每一间隙连接像是一簇同型的均与质膜的细胞质断裂面(P 面)相联的细胞内颗粒,每一膜内颗粒相当于图 12-32 中所示的一个连接子。(引自 N. B. Gilula, in Cell Communication [R. P. Cox, ed.], pp. 1-29, 1974)

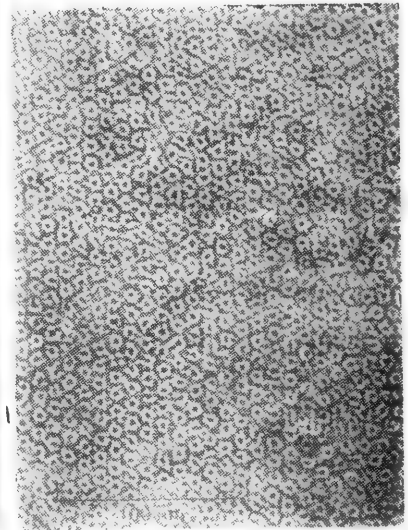


图 12-35 从大鼠肝分离出的间隙连接的电镜照片。标本经负染后显示出六角形网格组成的连接子,在每一连接子中深染的中心孔直径约 2 nm。(引自 N. B. Gilula, in Intercellular Junction and Synapses. [Receptors and Recognition Series B, Vol. 2; J. Feldman, N. B. Gilula and J. D. Pitts ed.], pp. 3-22, 1978)

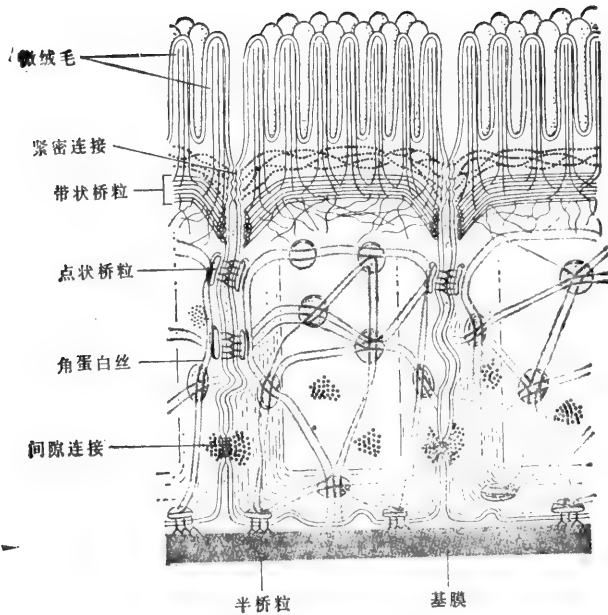


图 12-36 突出小肠上皮细胞之间各种连接分布的图解

道尔顿的蛋白组成。当把分散的细胞放在培养条件下时,几分钟之内(甚至在有新蛋白质合成时)就可以形成间隙连接。在这种情况下,这些连接必须是从预先形成的间隙连接亚单位,也可能由从质膜面上扩散来的亚单位自我装配起来的。当它们结合到靠近对面膜上相似亚单位时即触发了装配。脊椎动物的细胞常常会与培养中任何其他脊椎动物的细胞偶联,证明间隙连接的组分在进化过程中是高度保守的。

图 12-36 中综合表示了上皮细胞层中细胞之间形成的所有各种类型的连接。

小结

组织中相邻细胞的质膜为称做细胞连接的特化接触部位彼此连在一起。大多数脊椎动物中存在三种主要类型的细胞连接:桥粒、紧密连接和间隙连接。桥粒是机械地将细胞聚集在一起——或者通过纽扣样的接触点(点桥粒),或者通过在上皮细胞层中围绕着相互作用细胞的连续接触带(带桥粒)。两种类型的桥粒都以不同的方式起着细胞骨架成分的固着点的作用。紧密连接对转运小的亲水分子越过上皮细胞层时起着间接而关键的作用,它们以两种方式进行:将相邻的细胞封接在一起以使小分子不能在细胞之间漏过;同时在每一脂双层中又作为扩散屏障,使特殊转运蛋白能够限制在上皮细胞质膜的顶端或基侧部分。间隙连接被认为是由成簇的蛋白通道组成,这些通道允许离子和小于约 1 500 道尔顿的分子直接从一个细胞内通到另一个细胞内。由间隙连接联结的细胞共享它们的许多小分子,并被称为代谢偶联和离子电偶联。尽管间隙连接在有电活动的细胞协同活动中极为重要,但仍不清楚为什么很多其他类型的细胞也通过间隙连接互相偶联。

细胞外基质¹²

多细胞生物体中大多数细胞同相互作用的,细胞外大分子的纵横交错的网络相接触,细胞外基质即由这些网络所组成(图 12-37)。这些多种多样的蛋白质和多糖分子由当地的细胞所分泌,并在大多数组织的细胞外空隙中组装成有组织的网络。除了作为普通的生物胶外,它们也形成高度特化的结构,诸如软骨、腱、基膜以及(具有磷酸钙结晶形式的次生沉淀物的)骨头和牙齿。虽然我们将限于讨论脊椎动物的细胞外基质,但在很多其他生物体中能看到独一无二的和有趣的相关结构。如细菌和植物的细胞壁、蠕虫和昆虫的角质层,以及软体动物的贝壳。

直到最近还认为脊椎动物的细胞外基质主要起着相当不活跃的的稳定组织物理结构的支架作用。但目前已很清楚,基质在调节与它接触的细胞行为,在影响它们的发育、迁移、增殖、形状和代谢功能中起着远为积极和复杂的作用。细胞外基质有着相当复杂的分子组成,可惜我们对它的组构了解得还很少。

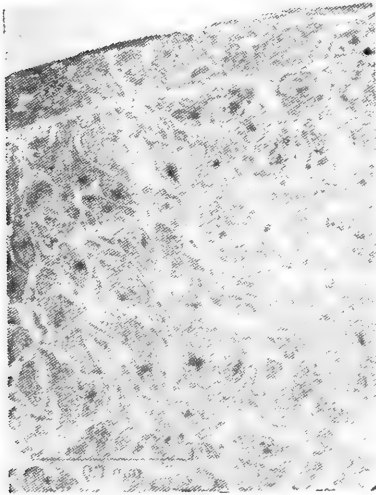


图 12-37 低倍电镜照片示细胞为充满着细胞外基质的空隙所包围。所示的特定细胞是早期鸡肢体的细胞,当时这些细胞的不同特点正在被决定。(Cheryll Tickle 赠)

细胞外基质主要由埋入含水多糖凝胶中的纤维状蛋白质组成

组成细胞外基质的大分子是由就近的细胞、特别是广泛分布在基质中的成纤维细胞分泌出来。在特殊的基质结构,诸如软骨和骨中,它们的大分子是由较特化的细胞就近分泌的,如软骨母细胞形成软骨,骨母细胞形成骨。组成基质的细胞外大分子物质主要有两类:(1)胶原;(2)氨基葡聚糖,它通常与蛋白质共价连接形成蛋白聚糖。氨基葡聚糖和蛋白聚糖分子形成高度水合的凝胶样的“基质”,胶原纤维埋入其中。虽然长的胶原

纤维加固并帮助组成了基质,但水相的多糖凝胶允许营养物、代谢物和激素在血液和组织细胞之间扩散。在很多情况下也存在着橡胶样的弹性蛋白的纤维使基质富于弹性。此外,两个大分子量的糖蛋白也是细胞外基质的主要成分:一个是广泛分布在结缔组织中以及血中的粘连蛋白(fibronectin);另一个是迄今仅在基膜中发现的基膜蛋白(laminin)。无疑许多这种类型的其他蛋白质成分会继续被发现。

结缔组织一词常常用来描述细胞外基质加上在其中发现的细胞,如成纤维细胞、巨噬细胞和肥大细胞(图 12-38 和 12-39)。器官中结缔组织量的变化很大:皮肤和骨头主要由结缔组织组成,而在脑和脊髓中则含量很少。而且不同类型基质大分子的相对含量和它们在基质中组构的方式变化也是多种多样的,这就产生了使人惊讶的形状上的多样性,每一种都高度适应特异组织的功能需要。于是,基质可以钙化成为岩石般坚硬的骨或齿的结构,或者可以采取几乎结晶的形式来形成透明的角膜基质覆盖在眼前部,或者可能组

成肌腱中索状的胶原纤维组织,使肌腱有巨大的强力强度。

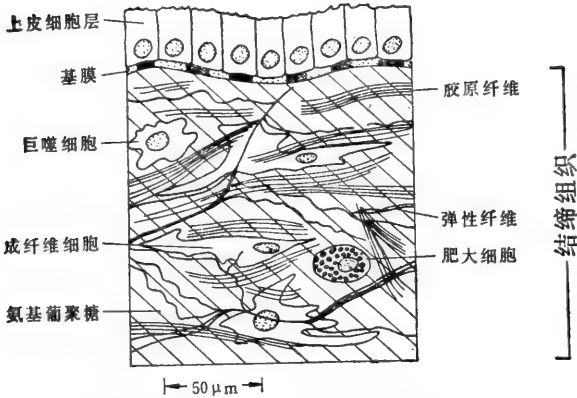


图 12-33 上皮细胞层下结缔组织的示意图。

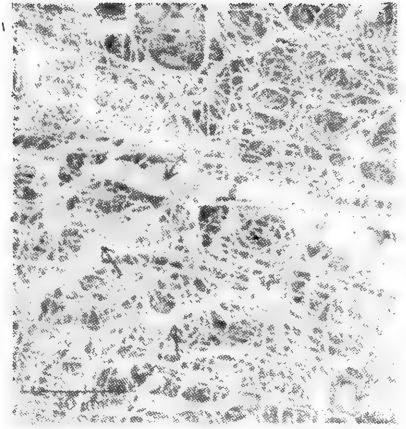


图12-39 在鸡胚角膜的细胞外基质中成纤维细胞(箭头所示)的扫描电镜照片。基质主要是由胶原纤维组成(角膜内没有弹性纤维)。氨基葡多糖通常形成含水凝胶充满纤维网空隙,在样品制备的脱水过程中坍塌在胶原纤维的表面上。

(Robert Treistad 赠)

胶原是细胞外基质的主要蛋白质¹²

胶原是所有多细胞动物中发现的一族高度特征性的纤维状蛋白质。它们是哺乳动物含量最丰富的蛋白质,占总蛋白质的 25%。所有胶原分子的主要特征是它们具有不易弯曲的三股螺旋结构。三条称为 α 链的胶原多肽链以有规律的螺旋状的相互缠绕产生长约 300 nm、直径 1.5 nm 的索状胶原分子(图12-40)。

到目前为止已确定了七种遗传上不同的胶原 α 链(表 12-2),每一种长约 1 000 个氨基酸残基。虽然在原则上从这七种 α 链可以通过不同的结合组装成 100 多种不同类型的三股胶原分子,但实际上已经描述过的胶原分子不足一打。主要类型称作 I、II、III、IV 和 V 型(表 12-2)。I、II、III 型是结缔组织中发现的主要胶原类型,其中 I 型是最普通的,占体内中胶原的 90%。I、II 和 III 型胶原分子在分泌到细胞外空隙以后装配成有序的多聚体,称为胶原纤维。在电镜照片中(图 12-39 和 12-41)可以清楚地看到胶原纤维是长(可达几微米)而细(直径 10—300 nm)的缆状结构。这种纤维常常又组成较大的束,成为在光学显微镜下可看到的直径有几微米的胶原纤维。IV 型分子(基膜的主要胶原)和 V 型分子(少量存在于基膜和任何别的地方)并不形成纤维,它们在组织中的排列尚未确定。

胶原多肽链在与膜结合的核糖体中合成,以大的前体分子叫做前 α 链的形式分泌到内质网(ER)的腔中。这些前体分子不仅具有能使分泌出的蛋白穿过 ER 膜所需的“信号肽”(见 328 页),而且在它们的氨基端和羧基端还有叫做伸展肽的附加的氨基酸。在 ER 的腔中每一前 α 链与另外两个结合在一起,形成具有氢键的三股螺旋分子(图 12-42)。伸展肽可能在引导三股螺旋形成中是重要的,因为有报道说前 α 链在试管条件下自发地装配成三股螺旋,而 α 链在同样条件下则不能。伸展肽也可能对前胶原分子在从细

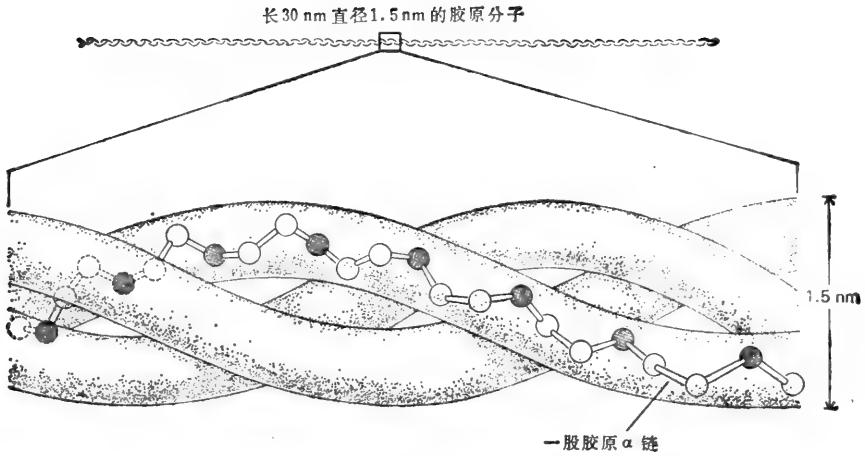


图 12-40 绳索样的胶原分子示意图。三条分开的螺旋形的 α 链相互环绕在一起形成一个三股螺旋棒, 在每一 α 链中的每一第三残基是甘氨酸(深色的), 甘氨酸是三螺旋拥挤内部仅能容纳的小的氨基酸, 这种 $300\text{nm} \times 1.5\text{nm}$ 胶原分子通常叫做原胶原。

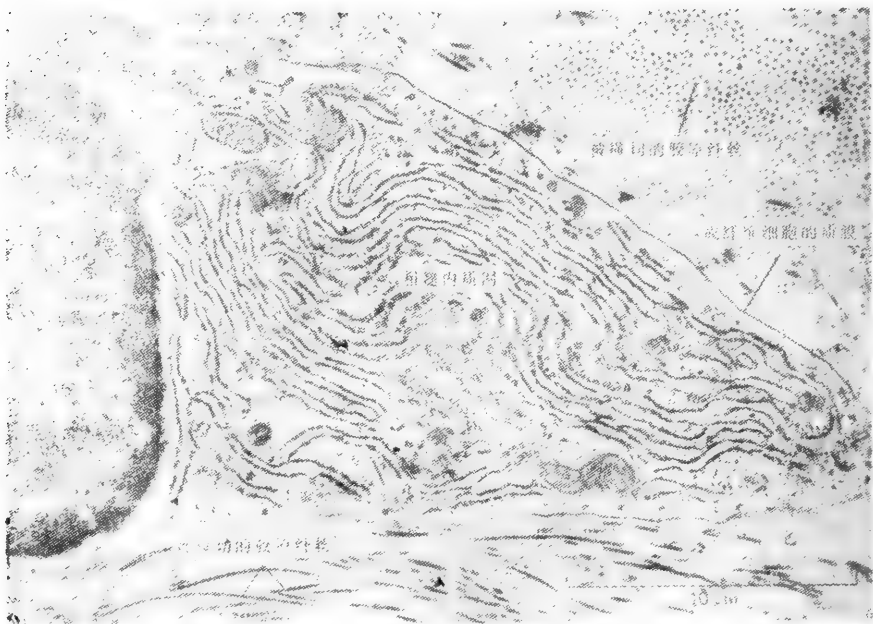


图 12-41 电镜照片示结缔组织中由胶原纤维包围的部分成纤维细胞。成纤维细胞的细胞质中大片的粗面内质网, 反映着细胞主动合成胶原和其他细胞外基质大分子。(Russell Ross 赠)

胞分泌出去之前与其它基质大分子一起的包装是很重要的。

胶原链有不寻常的氨基酸组成和顺序¹⁵

胶原 α 链所含的甘氨酸和脯氨酸特别多, 两者对于形成稳定的三股螺旋有重要作用。甘氨酸是唯一能挤进胶原三股螺旋内部狭小位置的氨基酸, 在 α 链的大部分区域中它们每隔两个残基出现一次, 这是最突出的实际例子说明胶原的氨基酸顺序比典型的球蛋白更有规律。

在前 α 链联结形成三股的溶胶原大分子之前,某些脯氨酸(及赖氨酸)在内质网中被羟化。这样的羟基脯氨酸(及羟基赖氨酸)的残基在其他蛋白质中是很少见的。有间接的证据指出:羟基脯氨酸残基的羟基形成了链间氢键,以帮助稳定三螺旋。例如,阻止脯氨酸羟化的条件[诸如缺氧、缺离子和缺抗坏血酸(维生素 C)]也抑制溶胶原螺旋的形成。在败血病——由食物中缺乏维生素 C 所引起的人类疾病中,未羟化的前 α 链在细胞中降解,血管和皮肤变得极脆。

赖氨酸残基的羟基化对于溶胶原的次级翻译后修饰是关键的。像大多数分泌蛋白一样,溶胶原分子在分泌到细胞外空隙中去之前在细胞内糖基化。然而溶胶原分子的糖基化是不寻常的,不含唾液酸的短短的多糖侧链(仅两个残基)被共价连接到羟基赖氨酸的羟基上(图12-43)。加到溶胶原中去的碳水化合物在量在不同的胶原类型中变化很大(表12-2),其功能还不清楚。就像我们在后面将看到的那样,羟基赖氨酸残基不仅对糖基化是重要的,而且对在分泌之后于细胞外空隙内发生的胶原分子的广泛交联也很重要。

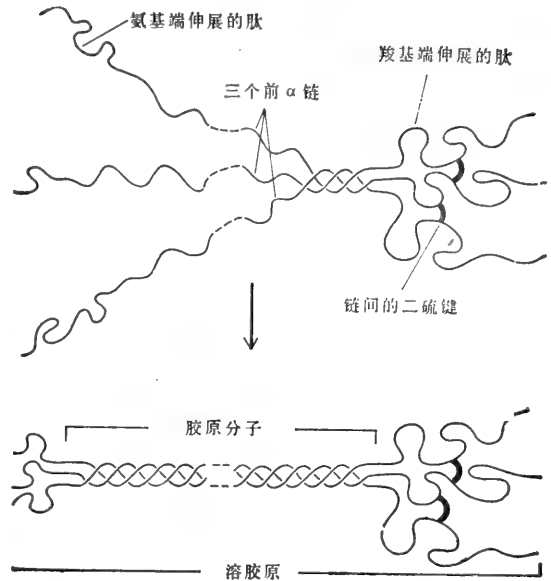


图12-42 最初以前 α 链的形式合成胶原 α 链,前 α 链所含有的额外的(伸展的)多肽后来被去除,这些伸展多肽的功能之一是在装配溶胶原时帮助引导了形成三螺旋。注意溶胶原分子中氨基端伸展多肽由二硫键共价连接在一起。

表 12-2 胶原类型及其性质

类型	分子式*	聚合形式	区别性特征	组织分布
I	$[\alpha 1(I)], \alpha 2(I)$	纤丝	低羟基赖氨酸 低碳水化合物 宽的纤丝	皮肤、腱、骨、韧带、角膜、内脏器官、(占身体胶原的90%)
II	$[\alpha 1(II)]_3$	纤丝	高羟基赖氨酸 高碳水化合物 通常比纤丝细的 I 型	软骨、椎间盘、 脊索、眼睛的 玻璃体
III	$[\alpha 1(III)]_3$	纤丝	高羟基脯氨酸 低羟基赖氨酸 低碳水化合物	皮肤、血管 内脏器官
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$ (有争论)	基膜	非常高的羟基赖氨酸 高碳水化合物 可能保留 溶胶原 伸展肽	基膜
V	$[\alpha 1(V)], \alpha 2(V)$	未知	高羟基赖氨酸 高碳水化合物	广泛分布(量很少)

* 7 种不同的 α 链称为 $\alpha 1(I) - \alpha 1(V), \alpha_2(I)$ 和 $\alpha 2(V)$ 。

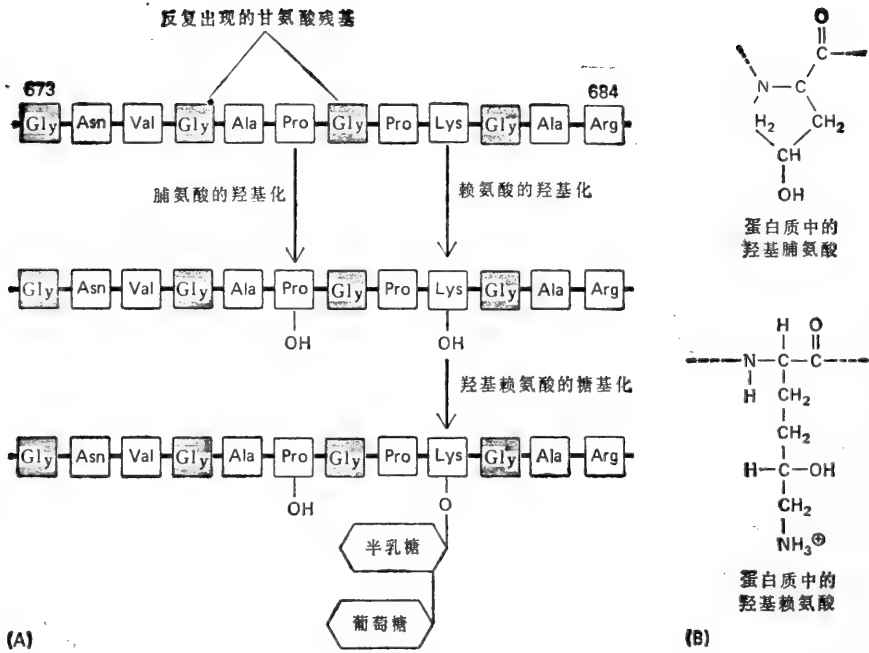


图 12-43 图示前 α 链的 12 个氨基酸片段(从残基 673—684),在它们旋绕在一起形成溶胶原分子之前所经受的三种类型的共价修饰。图中 (A) 选中的赖氨酸和脯氨酸残基羟基化,然后某些羟基化了的氨基酸残基又糖基化。(B) 羟基脯氨酸和羟基赖氨酸残基的结构式。

在分泌过程中溶胶原分子裂解形成胶原分子,并自我装配成纤维^{13,14}

在分泌过程中溶胶原分子 I、II 和 III 型的伸展肽被特异的称作溶胶原多肽酶的蛋白质水解酶水解掉,把溶胶原分子转变成胶原(也称原胶原)分子后,在细胞外空隙它们又合在一起形成更大的胶原纤维。推动纤维的形成过程部分由于胶原分子有自我装配的倾向。然后,纤维紧靠细胞表面形成,看来很像是细胞调节了纤维装配的位置和速度,有点像一只织网上的蜘蛛。

伸展肽至少有两个功能:它们引导细胞内三股胶原分子的形成并阻止了细胞内形成大胶原纤维,否则对细胞将是灾难性的。然而同样重要的是在其一旦完成其功能后就立即被除掉。在某些疾病中溶胶原的水解不完全,结果胶原纤维的形成不配对,受影响的个体有极其脆弱的皮肤和极为易变的联结。IV 型(可能也有 V 型)溶胶原分子是不寻常的,它们在分泌之后似乎保持不裂解。这可能便是这种胶原不能形成典型胶原纤维的原因。

当分离出的胶原纤维经固定、染色后在电镜下观察时,它们每隔 67 nm 呈现交叉条纹,这种图形反映出纤维中个体胶原分子的包装排列。推测大概是为了使胶原分子聚集物对张力(伸长)压力有最大的抗性,个体胶原分子像图 12-44 所示那样错开排列,这样相邻分子以它们长度的几乎 1/4(67 nm 的距离)纵向错开。图 12-45 说明在负染纤维中这种排列如何形成条纹。

虽然一般都同意胶原分子在两维空间上取图 12-44 所示的“67 nm 错开”的方式排

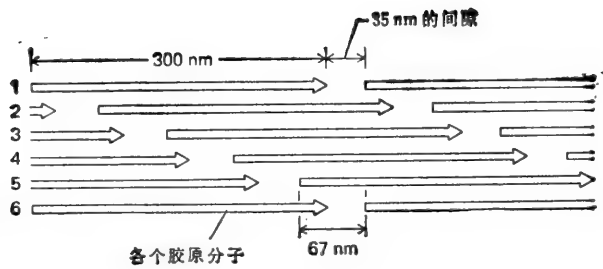
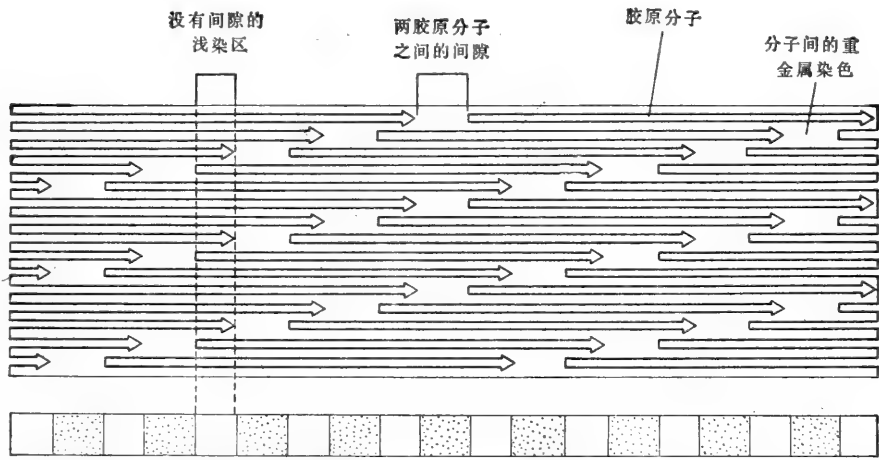


图 12-44 胶原纤丝中胶原分子错开排列的示意图。相邻分子（如箭头所示）错开 67nm，在一列中每两个连续分子之间有 35nm 的间隙。间隙的大小使得每 5 行分子错开排列之后图形又重复，因此第一和第六行的分子是对齐的。



电镜照片上部分经负染的胶原纤丝

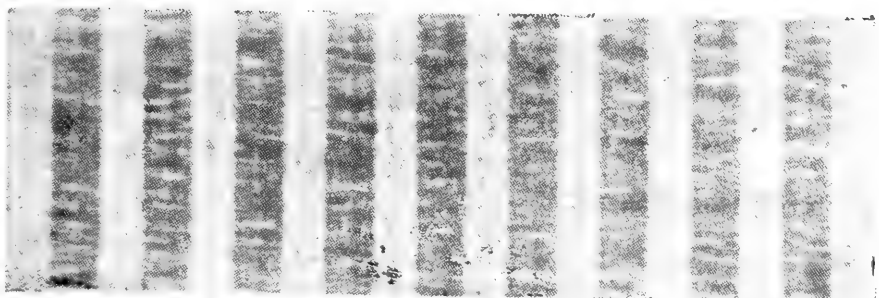


图 12-45 图解胶原分子的错开排列如何在负染的纤丝上产生条纹。由于负染仅充满分子间的空隙，深染区可以用每一行每两分子间的间隙被染色来解释。在图的下部示负染纤丝的电镜照片。（照片由 Robert Horne 赠）

列，但有关柱状纤丝的三维空间中胶原分子是如何排列的意见却较不一致。一个有吸引力的模型指出，一组胶原分子首先（以 67 nm 错开方式）装配成长条的薄的螺旋形亚单位（微纤丝），每 5 个胶原分子组成螺旋的一圈。这圆柱形的微纤丝呈略扁平，当它们依次对齐包装在一起时形成粗得多的胶原纤丝（图 12-46）。与此模型相一致的是观察到当胶原分子在体外组装时，很细的细丝出现在胶原纤丝形成的过渡阶段。

由于胶原分子能在缺乏其他蛋白质的试管中装配成胶原纤丝，装配纤丝的信息一定存在于胶原 α 链的氨基酸顺序中。虽然脯氨酸、羟基脯氨酸和甘氨酸残基对胶原三螺旋的形成起主要作用，但一般认为保留的氨基酸的侧链很大程度上负责纤丝的形成。事实上对 α 链氨基酸顺序的计算机分析已经证明：

(1)带电荷和不具电荷的残基沿着链以约67nm的周期(相当于约234个氨基酸残基)周期性地沿链簇集；(2)当这些链由67nm的倍数彼此错开时，两个 α 链之间能形成的链间电子稳定的亲水键数目最多(图12-47)。

由5个错开的胶原分子组成的微纤丝

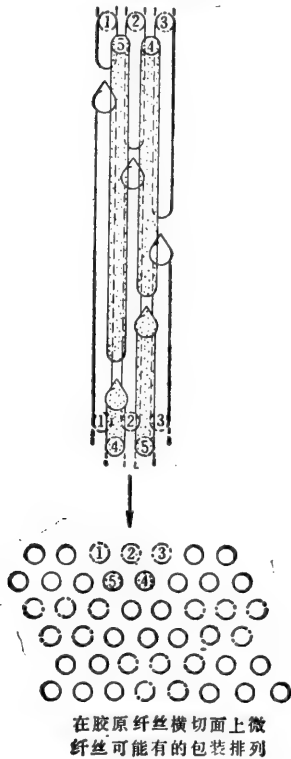


图12-46 纤丝中胶原分子三维包装排列的可能的模型。成组分子以67nm错开格式装配成成长的微纤丝它是每圈有5条错开的胶原分子的螺旋。这种微纤丝是扁平的，以便对齐包装成胶原纤丝。离观察者最近的两行分子在上图以细点表示。

什么决定着胶原纤丝在组织中的排列和直径？在试管中，I、II和III型胶原分子各形成直径约50nm的纤丝，然而在活的生物体内单一类型的胶原分子形成直径一致的纤丝，其直径取决于组织类型，从10—300nm不等，这提示在细胞外基质中的其他分子调节着纤维的直径。已经证明随胶原一起分泌的各种基质大分子如氨基葡聚糖和纤维蛋白能结合到胶原上，但不清楚它们如何影响纤丝的形成。

对各种组织中胶原纤丝的大范围内的次序是如何决定的也不清楚。在哺乳动物皮肤中胶原纤丝看来是随机地分散在细胞外基质中的。然而在肌腱中胶原纤丝则构成平行束，它们沿着腱上承压的主轴排列成行以达到最大的强度。在蝌蚪皮肤和鸡角膜胶原纤丝排列成有序的多重层次，每一层的纤丝彼此平行，但相邻层的纤丝则互成直角(图12-48)。为了既提供强度又提供透明度需要纤丝像晶体样排列，但仍不知道它是如何完成的。像我们在下面将讨论的那样，细胞外基质的定向至少部分地可能是由分泌基质大分子的细胞中细胞骨架的方向所决定。

胶原纤丝一旦形成，共价交联使它大大坚固^{12,14}

当胶原纤丝在细胞外空隙中形成之后，在其胶原分子之内和胶原分子之间因共价键的建立而使其大大坚固(图12-49)。假如交联受抑制，那么胶原样组织就变得很脆，而如皮肤、肌腱和血管组织等结构则易于撕裂。胶原(和弹性蛋白)所涉及的共价键的类型是独特的，它们经过好几步才建成。首先，某些赖氨酸和羟基赖氨酸残基脱去氨基，由细胞外赖氨酰氧化酶的作用产生高反应性的醛基，然后醛基彼此之间，或者与另外的赖氨酸或羟基赖氨酸残基之间形成共价键。其中某些键是相当不稳定的，最终被修饰成各种较稳定的交联。交联的程度和类型随组织不同而不同，例如在抗张力强度是关键性的跟腱中，胶原的交联程度特别高。

现在我们可以看到分泌胶原的细胞以某些方式使细胞外基质的胶原成分适合于组织

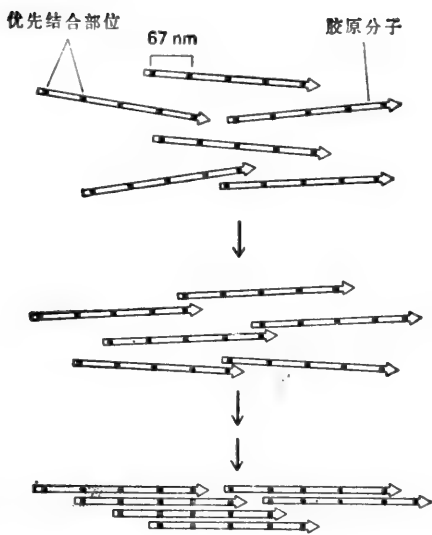


图12-47 高度模式图解带电荷的亲水氨基酸如何沿着各个胶原分子重复分布,以帮助决定纤维中的包装排列。因为这些残基(这里称为优先结合部位)以约 67nm 的周期排成簇。67nm 错开排列使所能形成的链间电子稳定的亲水键数达到最大限度。

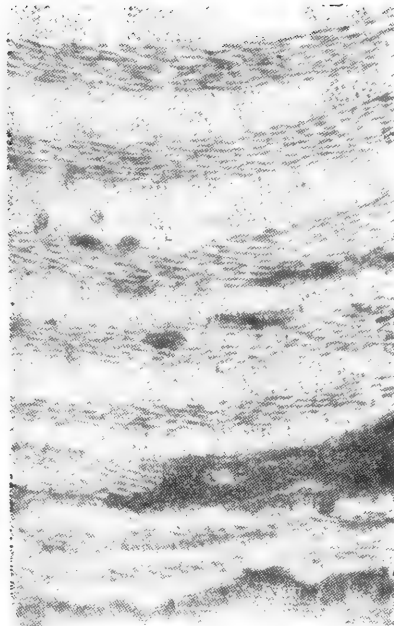


图12-48 蝌蚪皮肤横切面的电镜照片显示了胶原纤丝像胶合板样的排列。其中相接的纤丝层次彼此呈直角。胶原纤丝的这种排列也见于角膜,产生了角膜的强度和透明性。(Jerome Gross 赠)

的需要。它们可以合成一种或多种遗传上不同的胶原分子,每一种都可以在内质网和高尔基器上被转译后的羟基化和糖基化修饰成被调节的形式。分泌到细胞外空隙后胶原分子装配成纤丝,纤丝交联程度的大小取决于所需的张力强度。由于各种不同的种类和数量的非胶原基质大分子和胶原一道分泌,可推测细胞决定了它们环境中纤丝的空间排列和性质。最后我们将看到,由于最初的胶原纤丝在细胞表面上装配,定向的细胞可产生定向的基质。图 12-50 简要地归纳了胶原合成和装配中所包含的各个步骤。

弹性蛋白是一种交联的不规则卷曲的蛋白质,使组织富有弹性¹⁷

像皮肤、血管和肺这样的组织要执行它们的功能,除了张力强度以外还需要弹性。在这些组织的细胞外基质中弹性纤维的广泛网状结构使它们在暂时的伸展之后需要有重新卷曲的能力(图 12-51)。弹性纤维的主要成分是弹性蛋白——一种 70 000 道尔顿的糖蛋白,在富有脯氨酸和甘氨酸方面与胶原相似,不同点在于它含有少量羟基脯氨酸和不含羟基赖氨酸。对于弹性蛋白合成和加工的了解还很少。弹性蛋白分子被分泌到细胞外空隙中,在那里形成细丝和薄片,其中弹性蛋白分子彼此高度交联产生广泛的网状结构。与大多数其他蛋白质不同,弹性蛋白分子的功能需要它们的多肽主干保持展开像所谓“随机卷曲”那样(图 12-52)。弹性纤维网交联和随机卷曲的结构使网能像橡皮筋一样的伸展和重新卷曲(图 12-53)。在这同时,长而没有弹性的胶原纤丝与弹性纤维交织在一起限制了伸展的程度,因此阻止了组织撕裂。

然而,弹性纤维并不是仅由弹性蛋白构成,它们也含有糖蛋白,这些糖蛋白通常作为微纤丝分布在弹性纤维表面。在弹性组织发育过程中,这些糖蛋白微纤丝常常在弹性蛋白之前出现,并可能起着将分泌的弹性蛋白分子组构到后来形成的纤维上和薄层中去的作用。

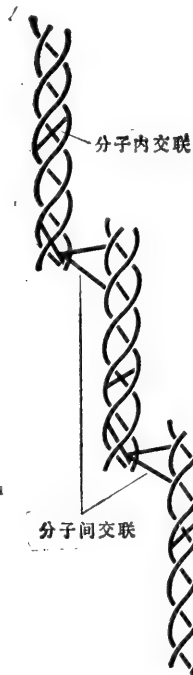


图12-49 胶原纤维内经修饰的赖氨酸侧链之间形成的分子内和分子间共价交联的图解

第三,所有其他的氨基葡聚糖共价连接到蛋白质上形成蛋白多糖分子(以前叫粘蛋白)。像胶原分子一样,氨基葡聚糖在分泌出去之前要经修饰:最初由逐步加单糖或双糖单位形成的多糖链,在高尔基器中由一系列连续而协调的硫酸化和表异构反应进行共价修饰(表异构反应改变了糖分子中一个碳原子周围取代基的构型)。最后,适当的蛋白聚糖在它们离开细胞以前共价地连接到核心蛋白(core protein)的丝氨酸残基上形成蛋白聚糖(图12-56)。

蛋白聚糖与典型的糖蛋白是非常不同的。糖蛋白通常含有占总重复1—60%的碳水化合物。这些碳水化合物以许许多多相当短的(一般少于15个糖残基)成分有变化的支链形式存在。它们常常以唾液酸作为末端。反之,蛋白聚糖要大得多(多至几百万道尔顿),通常含有90—95%按重量计的碳水化合物,以许多长的、不分枝的氨基葡聚糖链的形式存在,一般不含唾液酸。例如,软骨中典型的蛋白聚糖分子可由约100个氨基酸组成的富含丝氨酸的蛋白质核心上(约每12个氨基酸残基有一个氨基葡聚糖链,图12-57)。

在原则上,蛋白质聚糖潜在的异质性几乎是无限的。它们在蛋白质成分、分子大小和每分子中氨基葡聚糖链的数量和类型上可以明显不同。而且,虽然全都有双糖的重复模式,但氨基葡聚糖链的长度和组成,以及沿链的羟基、硫酸根和羧侧基团的空间排列可以有很大的变化。当我们了解更多的蛋白聚糖的合成和装配原理时,这种棘手的复杂情况

蛋白聚糖和透明质酸是细胞外基质的主要成分¹⁶

以前称为粘多糖(mucopolysaccharides)的氨基葡聚糖(GAGS, glycosaminoglycans)是一个由重复的双糖单位组成的长的不分枝的多糖。现在它们所以被称作氨基葡聚糖是因为在重复双糖中的两个糖残基之一常常是氨基糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)。氨基葡聚糖带有强负电荷是由于在很多糖残基上存在着硫酸根或羧基,或者两者都存在(图12-54)。根据其糖残基这些残基之间连接的类型、硫酸根的数量和部位可将氨基葡聚糖分为七类,即透明质酸(唯一没有硫酸化糖的一类);4-硫酸软骨素;6-硫酸软骨素;硫酸皮肤素;硫酸乙酰肝素;肝素和硫酸角质素(表12-3)。

透明质酸是由几千个糖残基以有规则的双糖单位的重复序列所组成的非常长的单条长链(图12-55)。然而透明质酸不是典型的氨基葡聚糖。首先,其他的氨基葡聚糖倾向于含有大量排列成复杂序列的不同的双糖单位;其次,其他的氨基葡聚糖有很多由少于300个糖残基组成的短链;

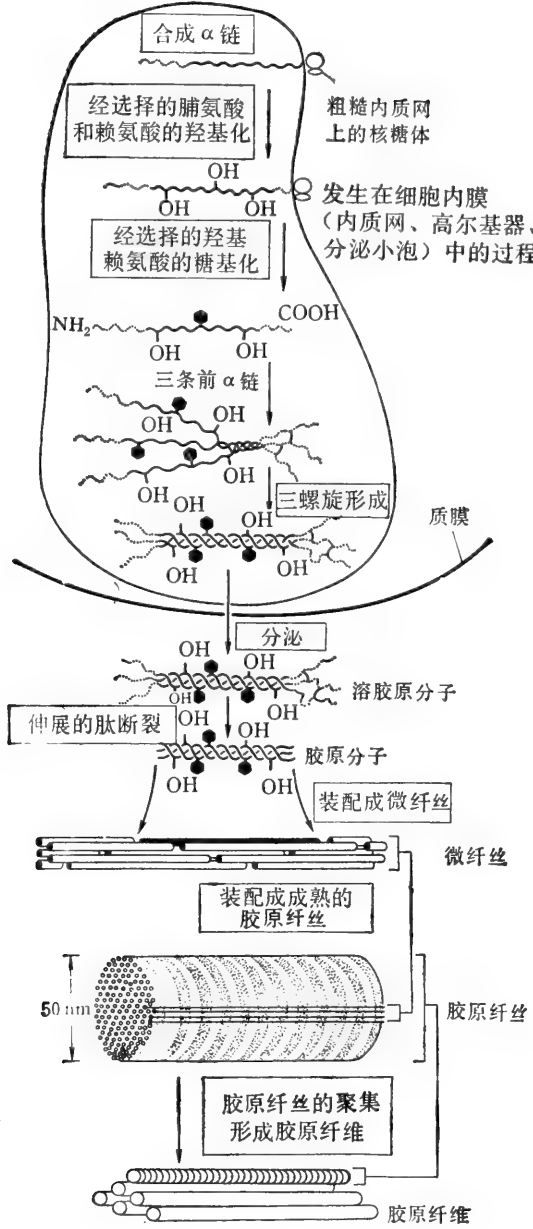


图 12-50 胶原纤丝形成过程中所包括的各种细胞内和细胞外事件的图解。尽管这里表示伸长的肽的断裂和纤丝的形成发生在分泌之后，也有一些证据说明氨基端肽的断裂和胶原分子的某些聚集发生在正要从细胞分泌之前，虽然这在图内未画出，而胶原分子较大的细胞外聚集由共价交联而稳固。作为胶原纤丝在细胞外空隙如何形成有序排列的一个例子，显示了它们进一步被装配成在光学显微镜下可见的大胶原纤维。

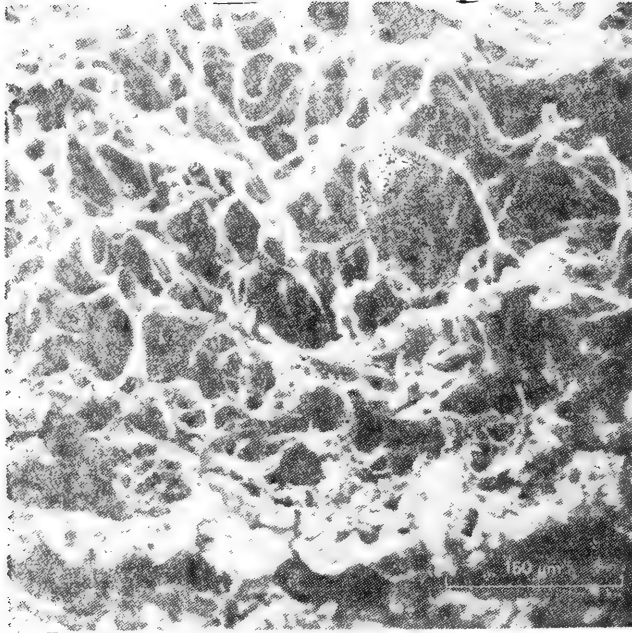


图12-51 人的皮肤(真皮)切片的扫描电镜照片示大片网状的弹性纤维。组织经加热处理,去除了胶原和氨基葡萄糖。(引摘自 T. Tsuji, R. M. Lavker, and A. M. Kligman, *J. Microscop.* 115: 165—173, 1978)



图12-52 弹性蛋白分子各种“随机卷曲”构象的模式图解。与大多数蛋白质不同,弹性蛋白不采用唯一的结构,而是如图所示在种种部分伸展的随机构象之间变动。

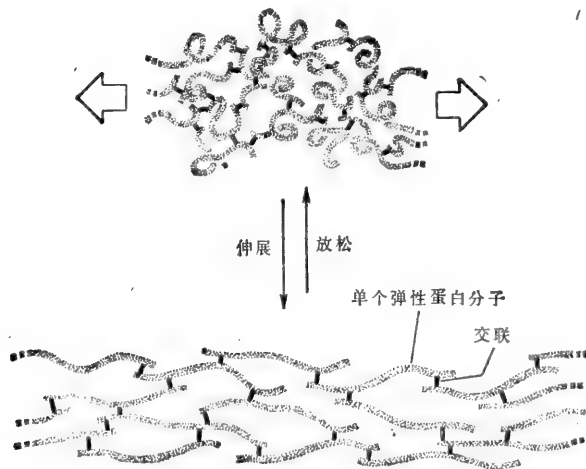


图 12 53 弹性蛋白分子以共价键连接在一起产生一个广泛交联的网状结构。由于网状结构中每一弹性蛋白分子能伸展和因随机卷曲而收缩,整个网状结构就能像橡皮筋那样伸展和重新卷曲。

表 12-3 氨基葡聚糖

氨基葡聚糖	分子量	重复双糖 (A-B) _n		每一双糖单位的硫酸基团	与蛋白的连接	其他糖类组分	组织分布
		单糖 A	单糖 B				
透明质酸	4 000 8 × 10 ⁶	D-葡萄糖醛酸	N-乙酰-D-葡萄糖胺	0	-	0	各种结缔组织 皮肤 玻璃体 软骨 滑液
4-硫酸软骨素	5 000 50 000	D-葡萄糖醛酸	N-乙酰-D-半乳糖胺	0.2—1.0	+	D-半乳糖 D-木糖	软骨 角膜 骨 皮肤 动脉
6-硫酸软骨素	5 000 50 000	D-葡萄糖醛酸	N-乙酰-D-半乳糖胺	0.2—2.3	+	D-半乳糖 D-木糖	角膜 骨 皮肤 动脉
硫酸皮肤素	15 000 40 000	D-葡萄糖醛酸 或 *L-艾杜糖醛酸	N-乙酰-D-半乳糖胺	1.0—2.0	+	D-半乳糖 D-木糖	皮肤 血管 心脏 心瓣膜
硫酸乙酰肝素	5 000 12 000	D-葡萄糖醛酸 或 *L-艾杜糖醛酸	N-乙酰-D-葡萄糖胺	0.2—3.0	+	D-半乳糖 D-木糖	肺 动脉 细胞表面
肝素	6 000 25 000	D-葡萄糖醛酸 或 *L-艾杜糖醛酸	N-乙酰-D-葡萄糖胺	2.0—3.0	+	D-半乳糖 D-木糖	肺 肝 皮肤 肥大细胞
硫酸角质素	4 000 19 000	D-半乳糖	N-乙酰-D-葡萄糖胺	0.9—1.8	+	D-半乳糖胺 D-甘露糖 L-岩藻糖, 唾液酸	软骨 角膜 椎间盘

*L-艾杜糖醛酸由D-葡萄糖醛酸在羧基所在部位的表异构化产生

才有可能简化。

氨基葡聚糖链占据相当大的空间并形成水合凝胶^{16,17}

多糖链太僵硬，不能像许多多肽链那样自己折叠成致密的球状结构形式。因此氨基葡聚糖链倾向于采取高度伸展、随机盘卷的构象，占据了巨大的体积(图 12-58)。它们由于亲水而吸收了大量的水，因而即使浓度很低也能形成亲水凝胶。又因为它们有高密度

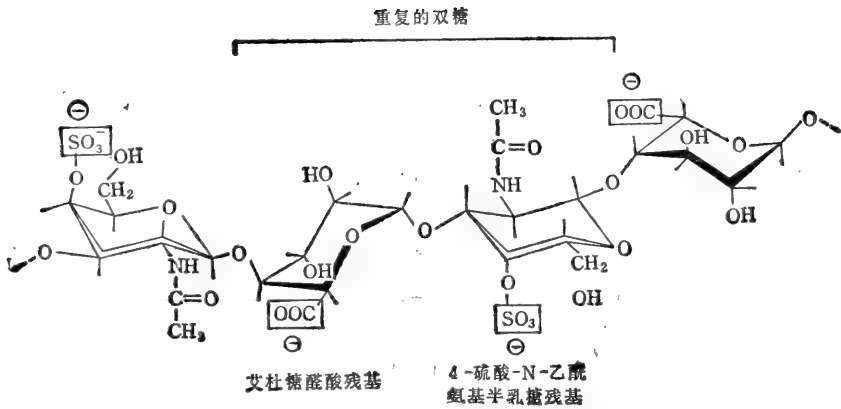


图 12-54 硫酸皮肤素分子氨基葡萄糖链的重复双糖序列。注意沿链存在着高密度负电荷是由于存在着羧基和硫酸根。

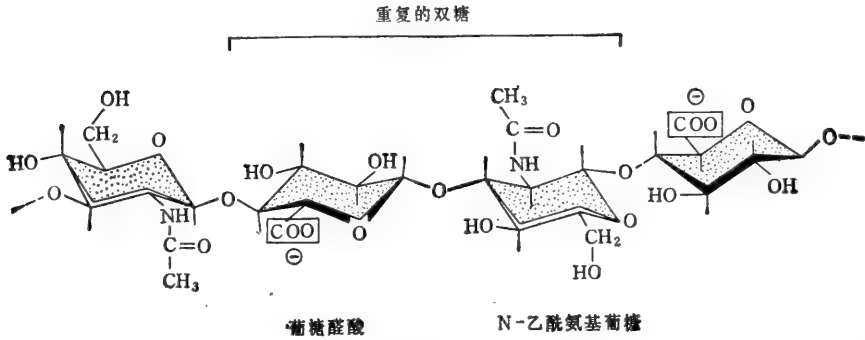


图 12-55 由几个糖残基组成非常长的透明质酸长链上的重复双糖序列。注意缺乏硫酸根。

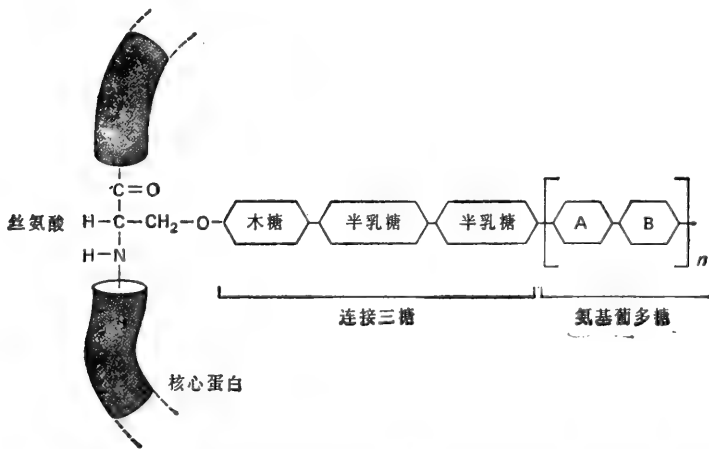


图 12-56 蛋白多糖分子中在氨基葡萄糖链与核心蛋白的丝氨酸残基之间的键合的示意图。在氨基葡萄糖末端特异的“连接三糖”结合到丝氨酸上,氨基葡萄糖的其余部分主要是由重复双糖(包括表 12-3 中的 A 和 B 两个单糖)组成。

的负电荷,吸引了有渗透活性的阳离子而显著增强了这种形成亲水胶的倾向。氨基葡聚糖的这种吸水特性在细胞外基质中产生抗压缩力的膨胀压或膨压(与抗牵张力的胶原纤维相反)。

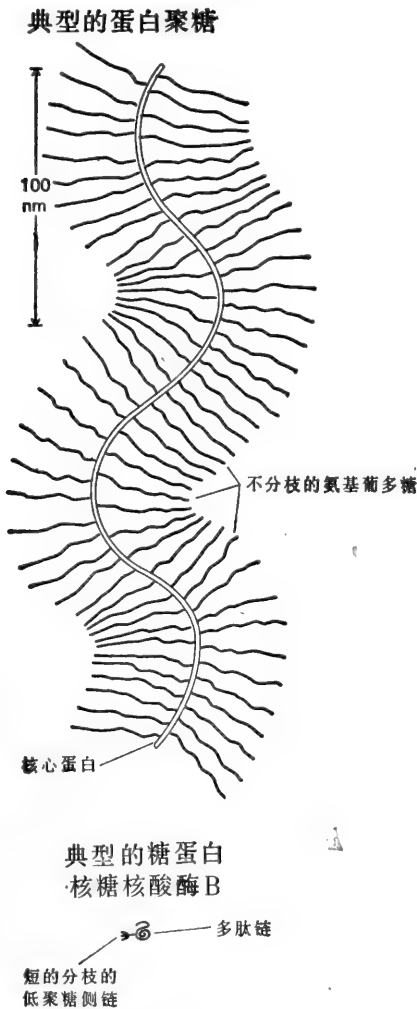


图12-57 由许多氨基葡聚糖链共价连接到核心蛋白而组成的典型蛋白多糖分子的示意图。在同一蛋白多糖分子中常常发现不止一种类型的氨基葡聚糖链。图下方为以同样比例画出的典型的糖蛋白分子(胰脏的核糖核酸酶 B)以作比较。

因为氨基葡聚糖链的多孔性和水合结构,它们允许水溶性分子迅速扩散、允许细胞迁移和允许各种细胞过程的进行。在结缔组织中,即使氨基葡聚糖所占重复还不到纤维蛋白(胶原和弹性蛋白)的10%,它们还是有效地充满了细胞外空隙。

不断增加的证据说明,一些组织中透明质酸在发育或创伤愈合时的细胞迁移中有着特殊的功能。在这些组织中不仅产生大量透明质酸,而且透明质酸被透明质酸酶的降解也与细胞迁移的停止有联系。在各种不同组织中已经被证实的这种相互关系提示透明质酸产生的局部增加,会因其

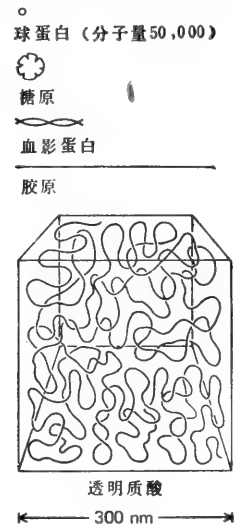


图12-58 各种蛋白质、糖原颗粒和约 8×10^6 道尔顿透明质酸的亲水分子所占的相对体积。

吸水了使基质膨胀,这可能是形态发生和愈合过程中有利于细胞迁移的一种普遍的办法。

氨基葡聚糖链在细胞外基质中可能是高度有组织的¹⁶

假如蛋白聚糖分子有结构异源性,则其功能看来绝不可能仅局限于为细胞周围和细胞之间提供水合空间。可能的情况是,例如,它们能形成大小不同孔径和不同电荷密度的凝胶,因此执行着筛子的功能,根据分子和细胞的大小和(或)电荷来调节它们的通行。有

些证据指出，在肾小球基板中就有这种功能。肾小球将分子从血流中过滤到尿中(见后面)。这种功能要求氨基葡聚糖链在基质中有高度的组织。

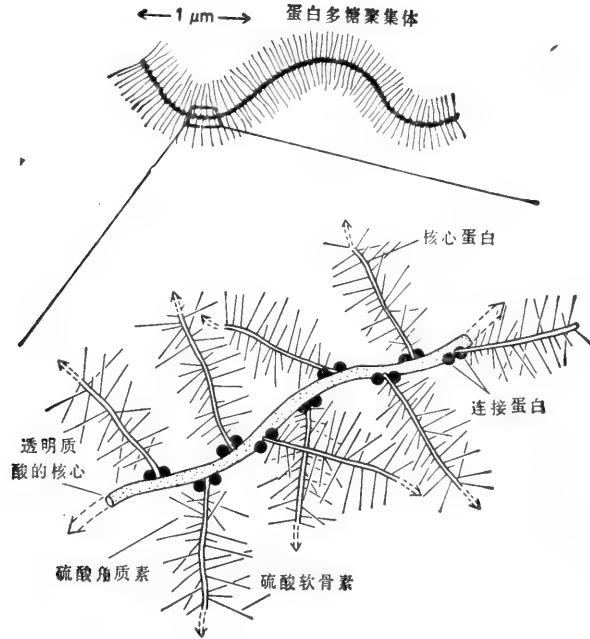


图 12-59 软骨中巨大蛋白多糖聚集体的示意图。约 100 个蛋白多糖的单体(每一单体如图 12-57 所示)通过两个专一的连接蛋白,以非共价键结合到单一的透明质酸链上。这样一个复合物的分子量可能有 10^8 或更大,其体积相当于一个细菌所占的体积。

事实上,氨基葡聚糖和蛋白聚糖在细胞外的组构状况大部分是未知的。其中一些分子能以特殊方式彼此结合,也可以结合到基质的其它大分子成分如胶原、弹性蛋白和纤维蛋白上。如果这些相互作用在有序基质中不重要,那倒是令人惊奇的。举例来说,已发现某些蛋白聚糖存在于大的聚集物中,它们是通过核心蛋白以非共价键结合到透明质酸分子上。在一些例子中,多至 100 个蛋白聚糖单体结合到一条透明质酸链上,形成一种分子量为 10^8 或更大的巨型复合物,所占据的体积相当于一个细菌(图 12-59 和 12-60)。

在一些情况下,组织中蛋白聚糖的有序过程可以用电子显微镜看到,因为氨基葡聚糖链选择性地与某些电子密度高的重金属结合。用这种方法观察大鼠尾部肌腱中的蛋白多糖时,它们看来像排列在胶原纤丝之间和穿过胶原纤丝的线状结构。显然它们以 67 nm 的间隔与胶原纤丝交叉,与胶原纤丝固有的带纹的周期性相同(图 12-61)。氨基葡聚糖的这种规则的带纹看来广布于细胞外基质中。假如知道胶原分子和蛋白聚糖两者的多样性,那末它们一定会形成种种不同的三维结构。

虽然蛋白聚糖链不能像许多多肽链那样折曲成球状结构,但某些却能自发地组装成高度有序的螺旋状或带状结构。例如在高等植物中,纤维素(多聚葡萄糖)链被紧密地包装成带状晶格阵列形成细胞壁的微纤丝组分(图 12-62)。此外,已发现两种不同的多糖链彼此能特异地联接起来,形成具有规则螺旋结构的特定聚集体(图 12-63)。

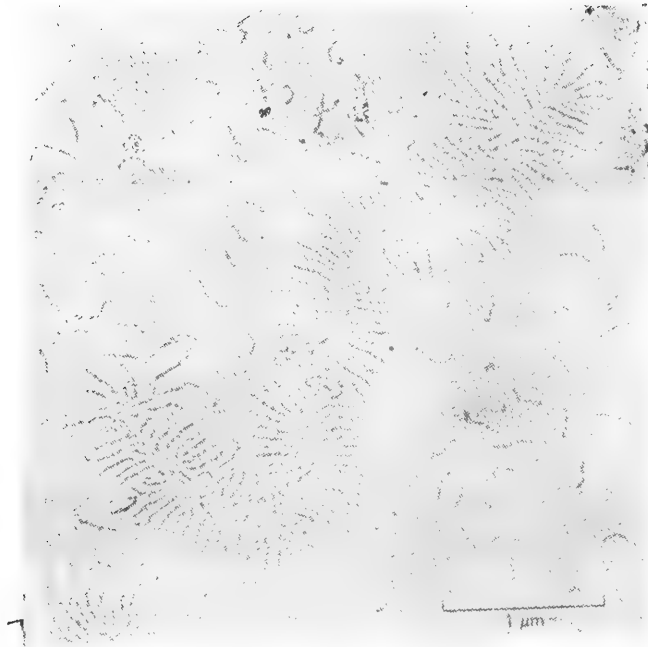


图 12-60 胎牛软骨的蛋白多糖聚集体的电镜照片。聚集体的类型与图 12-59 示意图所示的一样。标本经白金投影。(Lawrence Rosenberg 赠)

氨基葡聚糖本身在固态时可以采取各种各样的螺旋构象；但也可以在基质中存在如图 12-63 所示的那种直接的多糖-多糖相互作用的形式。

若细胞外基质有多种多样的结构和功能，看来可以假定蛋白聚糖分子像它们的化学性质一样能有各式各样的结构构象。如果真是这样的话，我们要着手了解它们是非常困难的。

粘连蛋白是促进细胞粘连的细胞外基质糖蛋白¹⁸

细胞外基质的非胶原糖蛋白在最近才受到重视。但关于粘连蛋白现已知道得很多了，它是一种形成纤维的糖蛋白(碳水化合物约占重量的 5%)由两个二硫键连接的亚基组成，每条亚基的分子量是 220 000 道尔顿(图 12-64)。粘连蛋白在细胞外空隙中以大的聚集体形式存在。大多数蛋白质并不直接与细胞相结合，然而其中一些结合到培养情况下生长的成纤维细胞和其它细胞的表面。在血液和其它体液中相当大量地发现了一种密切相关的蛋白质，称作冷不溶球蛋白(cold insoluble globulin)。

在发现了来自肿瘤细胞的成纤维细胞(肿瘤“转化的”成纤维细胞)表面所存在的粘连蛋白比正常成纤维细胞表面的在量上要少得多时，粘连蛋白首次引起人们的注意。通常，所观察到的细胞表面粘连蛋白的减少与转化细胞重新注射到动物以后的致癌、浸润组织和扩散(广泛扩展)能力之间有很好的相互关系。

培养的转化细胞与正常细胞的行为不同：它们很少粘连在基质上，不能展平并发育出有组织的细胞内称作压力纤维的肌动蛋白丝束(见 565 页)，并且它们能达到的密度比正常细胞高得多(见 600 页)。假如把大量的粘连蛋白加到本身只能产生相当少量粘连蛋白的培养转化细胞中，细胞即迅速粘连、展平并产生非常有组织的细胞内肌动蛋白丝束

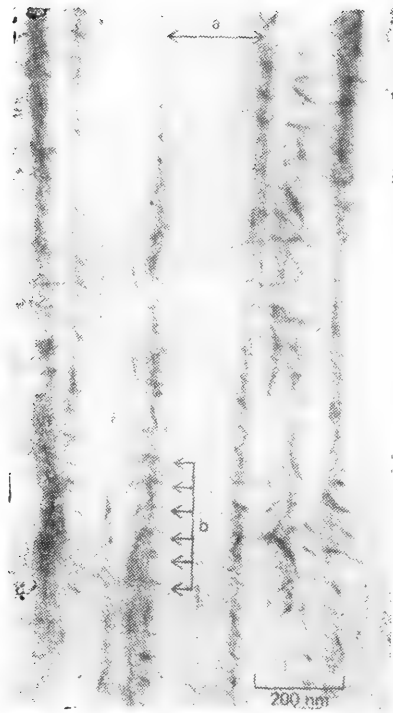
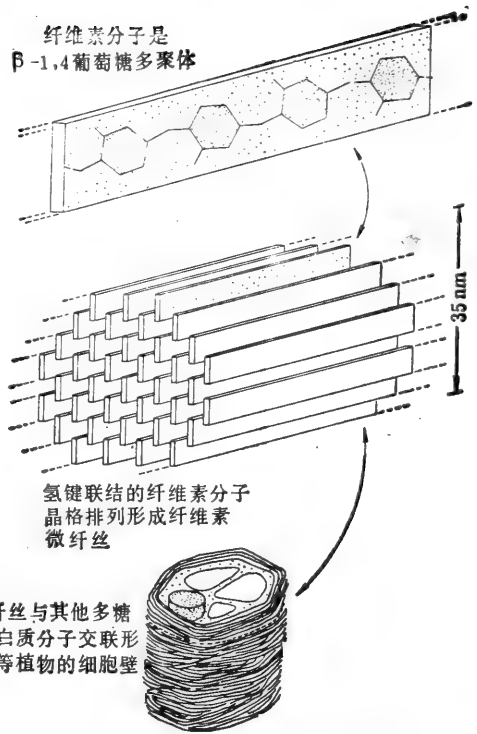


图12-61 大鼠尾巴肌腱纵切的电镜照片。用含铜的染料染色以便观察蛋白多糖分子。蛋白多糖分子以细丝网络围绕着胶原纤丝,未见蛋白多糖丝越过胶原纤丝(纤丝的宽度是以双箭头 a 标出),推测切面是通过纤丝的内部。蛋白多糖丝以约 67nm 的间隔越过胶原纤丝(如箭头 b 所示),这正是胶原带固有的重复距离。这一事实提示蛋白多糖和胶原分子之间有特殊的相互关系。(J. E. Scott *Biochem. J.* 187:887-891,1980)



纤维素分子是 β -1,4 葡萄糖多聚体

氢键联结的纤维素分子晶格排列形成纤维素微纤丝

微纤丝与其他多糖和蛋白质分子交联形成高等植物的细胞壁

图12-62 高等植物细胞壁中纤维素分子结构的示意图。尽管图中没有表示,但实际上纤维素微纤丝在细胞壁中与其他一些多糖和蛋白质分子交联。

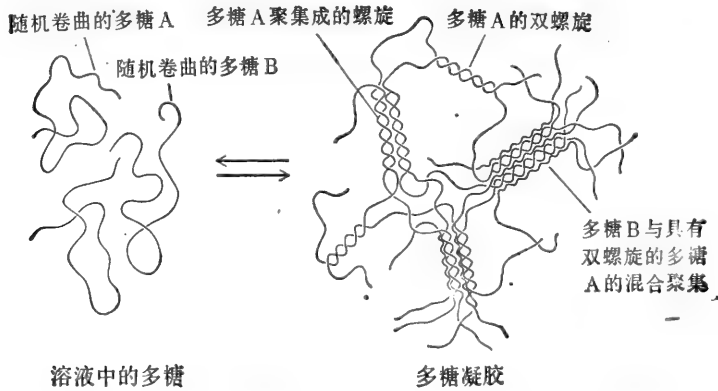


图 12-63 示某些有序的构象: 可以假设有两种不同的多肽链 A 和 B 可以形成凝胶。由于这些分子之间的相互作用被限制在链的某些区域(所谓联结区),而不能沿着整个分子扩展,每一链可与一个以上的分子结合,因而形成凝胶网。形成多糖凝胶的例子是(藻类的)琼脂和(高等植物的)果胶。

(图 12-65)。虽然看上去它们像正常成纤维细胞,但它们仍能生长到不正常的高密度。这提示粘连蛋白促进细胞粘连,但并不直接影响对细胞增殖的控制。现在已经证明纯化的粘连蛋白能促进各类细胞粘连到其他细胞以及胶原和别的基质上。自从发现了发育过程中在细胞迁移区域有高浓度的粘连蛋白以来,这种糖蛋白被认为在体内通过影响细胞粘连来影响细胞的迁移。

基膜是含有单一类型胶原的特化细胞外基质¹⁹

基膜是一薄层特化的细胞外基质,它们可见在所有上皮细胞层或管的下面,它们也围在单个肌肉细胞、脂肪细胞和施旺氏细胞(包在外周神经纤维外形成髓鞘)的外面。因此基膜把这些细胞和细胞层与其下或其外的结缔组织分离开来。在其他部位,如肾小球和肺泡,基膜隔在两层细胞之间,它们起着高选择性滤膜的功能(图 12-66)。然而越来越多的证据表明基膜所起的作用远不止简单的结构和过滤。它们看来能诱导细胞分化,影响细胞代谢,组织相邻质膜的蛋白质,并且为细胞的迁移提供特殊的“公



图12-64 经铂投影的粘连蛋白分子的电镜照片。每一分子由两个完全相同的纤维单体以其一端连接而成。(引自 J. Engel et al., *J. Mol. Biol.* 150: 97-120, 1981)

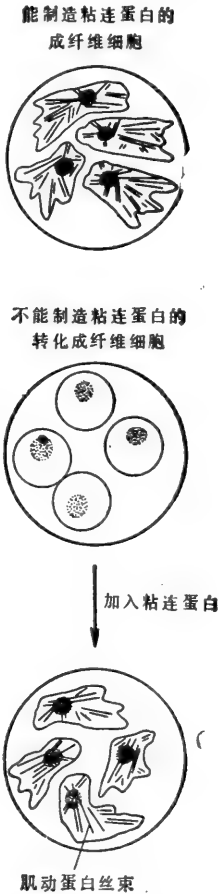


图12-65 图解说明将粘连蛋白(fibronectin)加到已转化的成纤维细胞(不能产生粘连蛋白)中去时,如何诱导它们展平、装配成组构良好的细胞内肌动蛋白丝束。现在这些细胞的形态与能制造它们本身的粘连蛋白的正常成纤维细胞相似。

路”。

基膜是由其上的细胞合成的(图 12-67 和 12-68)。显然不同组织甚至同一基膜的不同区域的精确成分千变万化,但所有基膜的主要成分都是 IV 型胶原。IV 型胶原的前

α 链具有超长的伸展多肽而与一般的不同,可能是在分泌后没有断裂;因而这些溶胶原分子不能形成典型的胶原原纤维,尽管它们确实也共价地相互交联着。除基膜的重要成分蛋白聚糖和粘连蛋白外,大的糖蛋白基膜蛋白已经被认为是迄今所研究过的所有基膜的主要成分。它至少是由两条以二硫键相互结合的亚基(220 000 和 440 000 道尔顿)组成(图 12-69)。基膜无疑含有许多其他有待鉴定的蛋白质。虽然有证据表明基膜蛋白和蛋白聚糖分子集中于基膜的内外表面,胶原分子夹在其中,但基膜的详细分子组构仍不清楚。

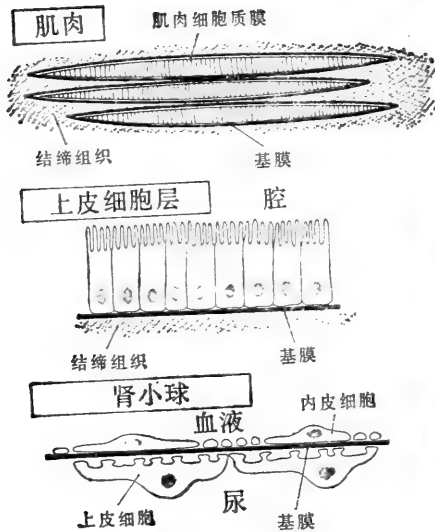


图12-66 基膜(黑线)的三种不同分布解:包围细胞(如肌肉细胞);衬在上皮细胞层下和插在两层细胞之间(如肾小球)的。注意肾小球的两层细胞中有间隙,因此基膜作为决定哪些分子将从血液排入尿中的通透屏障。

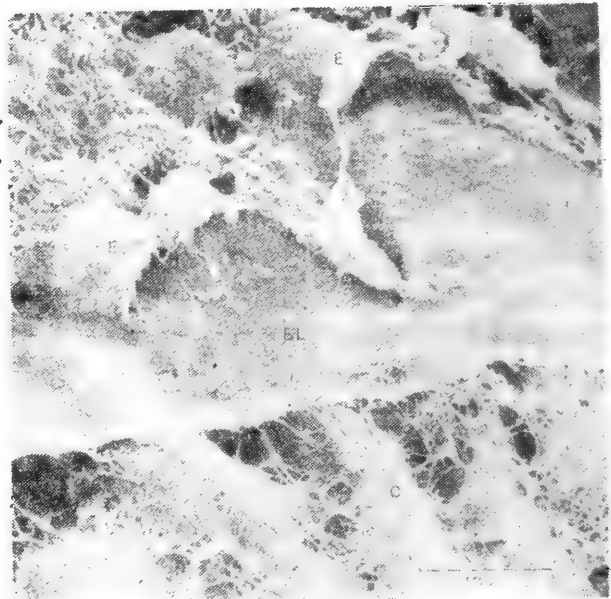


图12 67 鸡胚角膜的基膜的扫描电镜照片。一些上皮细胞(E)已被去除以暴露地毯样的基膜的上表面(BL)。注意胶原纤丝的网络(C)与基膜的下表面相互作用。组成基膜的大分子由位于其上的上皮细胞合成。(Robert Trelstad 赠)

基膜执行着多种多样的复杂功能

已经发现基膜所执行的功能的多样性是惊人的。在肾小球中基膜起半透性的滤膜的作用,调节血液中的大分子进入正在形成的尿中。蛋白聚糖对于这一功能看来是重要的,因为如用专一的酶除去蛋白聚糖,那么基膜的过滤特性就被破坏。基膜也可起选择性的细胞屏障的作用:例如,上皮细胞下的基膜阻止其下结缔组织中的成纤维细胞与上皮细胞接触,但并不阻止巨噬细胞、淋巴细胞或神经突起通过这一层基膜。

很可能基膜在受损伤的组织再生中起重要作用。当组织如肌肉神经和表皮受损伤时,基膜存活并提供了一种可以让再生细胞沿着它迁移的脚手架。以这种方式原先的组织结构迅速地重建。基膜在再生中起作用的最突出例子来自对神经-肌接点方面的研究,在接点处神经细胞与骨骼肌细胞表面产生突触联系。

基膜围着整个肌肉细胞,但在神经-肌接点处基膜有特殊的性质。例如,在这一区域可能产生能与其专一结合的抗体。电镜显示,那种不整齐的和并不显著的神经-肌接点处的

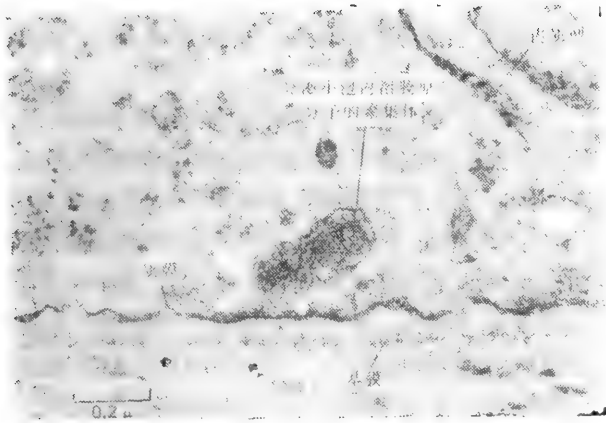


图 12 63 鸡眼角膜上皮细胞基部基膜的横切面的电镜照片。(Robert Trelstad 赠)

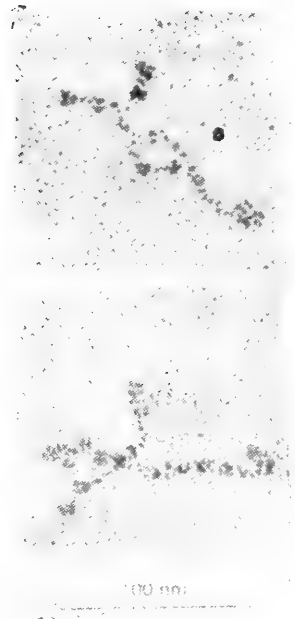


图12 69 经铂投影的基膜蛋白分子的电镜照片。每一个分子至少由两种不同的多肽链组成，有一个长臂和三个短臂的不对称的十字交叉形状。(引自 J. Engel et al., *J. Mol. Biol.* 150:97—120,1981)

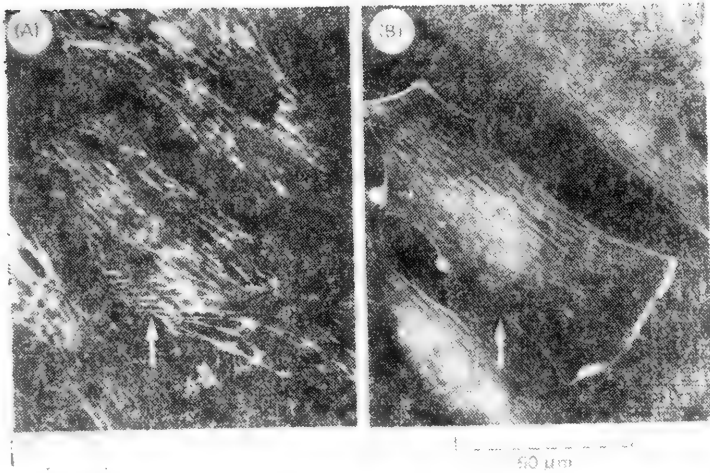


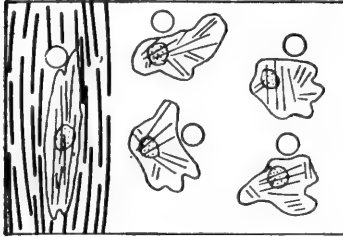
图 12 70 在三个培养的大鼠成纤维细胞中细胞外粘连蛋白丝 (A) 和细胞内肌动蛋白丝束 (B) 的免疫荧光照片。用荧光素偶联的抗粘连蛋白抗体显示粘连蛋白，用若丹明偶联的抗肌动蛋白抗体显示肌动蛋白。(引自 R. O. Hynes and A. T. Destree, *Cell* 15:875—886, 1978)

特化基膜都是协调突触两侧各成分空间结构的关键部分，在突触处神经把它的冲动传递给肌肉。有关突触构造中基膜的这种中心作用的证据将在第十八章详细讨论。这一经过充分研究的有关基膜特性的例子告诉我们，对于这些结构还有许多东西有待我们去了解。也提示细胞外基质中的特殊成分(至今未确定)可能在细胞识别过程，包括胚胎发育中的

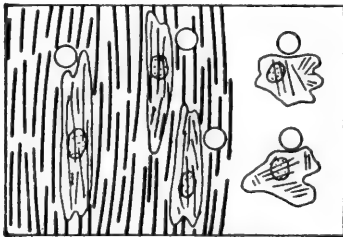
细胞识别过程中起关键的作用。

细胞内肌动蛋白丝束指导细胞表面基质大分子的组构从而组构细胞外基质²⁰

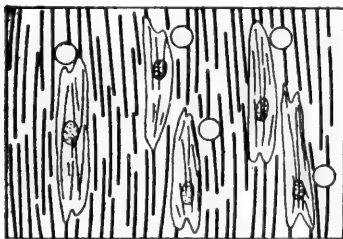
粘连蛋白、胶原、蛋白聚糖和透明质酸分子以及存在于细胞外基质中的物质全都能与细胞表面相连。不清楚的是这些分子是如何附着于质膜外部的，而且与质膜相连的组分到什么地方为止，细胞外基质从哪里开始的问题在很大程度上是一个语义学问题。例如，细胞的糖萼就包含着这两部分的成分。



细胞①中的细胞骨架的方向使邻近分泌出的细胞外基质分子定向装配



已定向的细胞外基质抵达细胞②和③并使这些细胞骨架定向



现在细胞②和③在它们附近又分泌定向的基质，以这种方式有序的细胞骨架传递到细胞④和⑤。

图12-71 细胞外基质在组织内如何将条理性在细胞之间传播假设图解。为了简化，本图只表示了一个细胞影响其邻近细胞的方向，以这种方式细胞可以相互影响彼此的方向。

像它们在完整组织中一样是高度有序的。

同样，如果把转化细胞培养在有组构的粘连蛋白的纤丝上，粘连蛋白诱导它们展平并在细胞内装配肌动蛋白丝束，后者是与细胞外粘连蛋白排齐的。联系细胞内肌动蛋白

当用荧光抗体来观察培养成的纤维细胞表面的粘连蛋白时，可以发现粘连蛋白以明显的纤丝阵列集中分布于邻近细胞之间和细胞与基底之间(图 12-70 A)。假设细胞经能分解内部的肌动蛋白丝束的细胞松弛素处理，则粘连蛋白的纤丝与细胞表面分离(正像它们在有丝分裂过程中细胞变圆时所表现的那样)。看来在细胞外粘连蛋白和细胞内肌动蛋白丝之间存在某些间接的联系。

因此细胞分泌的粘连蛋白束的走向与内部的肌动蛋白丝束的走向一致，两组纤维都是沿着细胞的长轴定向(图 12-70 B)，这一点是不足为奇的。对新合成的胶原分子在培养成的纤维细胞表面上的分布也作了类似的观察，它们可能通过相互作用与粘连蛋白相连接。所以很清楚，细胞内高度有序可以通过细胞分泌的大分子的定向而传递到细胞外基质中去。

以相辅相成的方式，有序的细胞外基质影响着基质中细胞的结构和行为²⁰

细胞外基质的大分子对培养细胞的行为有极明显的作用，影响其形状、运动、代谢和分化。例如，角膜上皮细胞培养在人为的表面上时产生非常少的胶原或蛋白聚糖；当培养在基膜、胶原或蛋白聚糖上时，它们却积累和分泌大量的这种基质大分子。此外，培养在人为表面上时上皮细胞基部表面是不规则的，细胞内紧贴其上的细胞骨架是无组织的。当同样的细胞培养在基膜或基质大分子上时，其基部表面是光滑的，其上覆的骨架

丝束可以影响所分泌的粘连蛋白分子的排列的证据(见前面),所有这些观察指出细胞外粘连蛋白与细胞内肌动蛋白丝的通讯是穿过成纤维细胞质膜双向进行的。

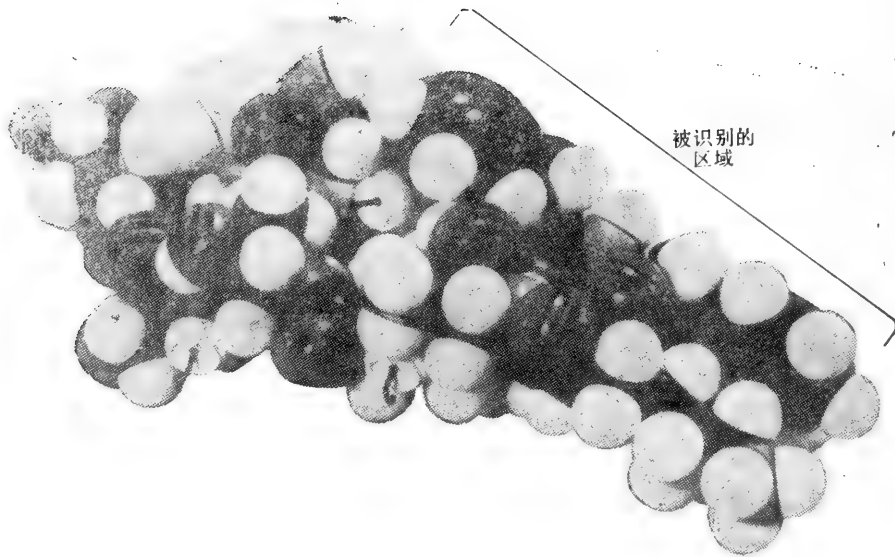
由于细胞的细胞骨架可以整理其所分泌的基质大分子,基质大分子又反过来组织与它们接触的细胞的细胞骨架,因而在原则上细胞外基质能够把一个细胞的条理性传播到另一细胞(图 12-71)。用这种方法,在发育过程中基质能对组织和器官中细胞的格局的产生和维持起主要作用。与细胞表面相联结的基质大分子在这种整顿过程中既作为环节又作为接头,介导着细胞和细胞外围的基质之间的相互作用。

小结

组织中所有的细胞都与错综复杂的细胞外基质接触。基质不仅将细胞结合成组织,将组织结合成器官,而且也影响与它相接触的细胞发育、极性和行为。已知基质含有三种主要的形成纤维的蛋白质——胶原、弹性蛋白和粘连蛋白——交错编织在由氨基葡聚糖链的网格形成的水合凝胶中。所有这些大分子是由与基质接触的细胞局部分泌的。

胶原是三股索状的螺旋分子,它们在细胞外空隙聚集成长的电缆状原纤维或薄片;并进一步装配成各种各样高度有序的阵列。弹性蛋白形成广泛交联的纤维和薄片网,使它们能伸展和卷缩,将弹性传递给基质。粘连蛋白分子形成促进细胞粘连的纤维。氨基葡聚糖是不均一的长的带负电荷的多糖链,它们(除透明质酸外)共价地连接到蛋白质上形成巨大的蛋白聚糖分子。所有这些基质蛋白和多糖被认为是相互作用的并装配成种种不同的三维结构,这种结构的条理性部分取决于分泌基质的细胞。由于基质的定向反过来也影响基质内细胞的定向,所以条理性好像是通过基质从一个细胞传递到另一个细胞。

【刘 黎译 周 郑校】



抑生长素的原子模型,一种具有 14 个氨基酸的多肽激素。图示该多肽被其专一细胞表面受体识别的区域。(Ralph F. Hirschmann 赠)

第十三章 细胞之间的化学信号发放

多细胞有机体的进化是依赖于它们细胞之间的通讯能力。这种通讯对调节其发育和形成组织,控制生长和分裂,以及协调其不同活动都是必要的。高等动物细胞间通讯的重要意义和复杂性表明,这些有机体的大部分基因可能都涉及到此类活动过程。

人们认为,细胞通讯通过三种途径:(1)分泌化学物质,向有一定距离的细胞发送信号;(2)将质膜结合的信号发放分子外露,作用于同它的直接接触细胞;(3)形成间隙连接,使相互作用的细胞的细胞质直接沟通(图 13-1)。

第十二章中已讨论了依赖于间隙连接的细胞间通讯。但是对借助细胞外表面所结合的分子之间的直接相互作用,进行细胞间通讯,还了解甚少。理论上讲,这种通讯方式与靠分泌化学信号发放的差别,仅在于前者的信号发放分子是结合在细胞膜上。由于结合在细胞膜上的分子很难溶解和纯化,所以研究它们的作用机制就成为棘手的问题。因此,至今还未能获得有关这种通讯方式的确切证据,也就不足为怪了。倘若我们观察到某一细胞对其邻近的细胞有作用,又怎样来肯定信号是由细胞表面分子传递,而不是通过间隙

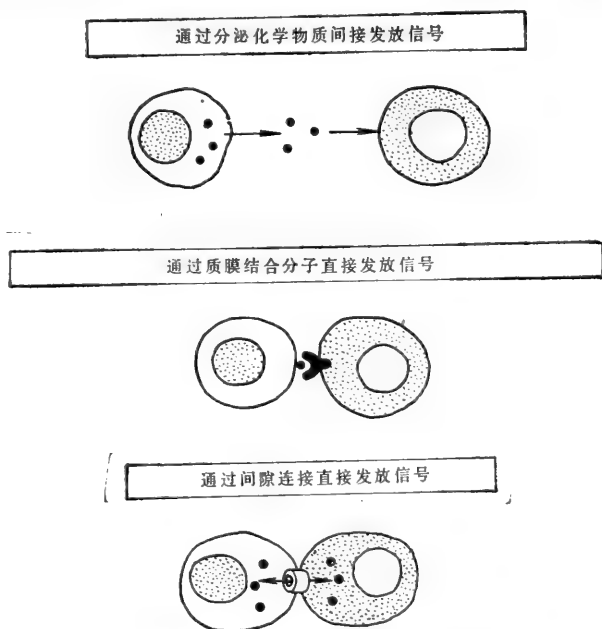


图 13-1 细胞间互相通讯的三种不同方式的示意图

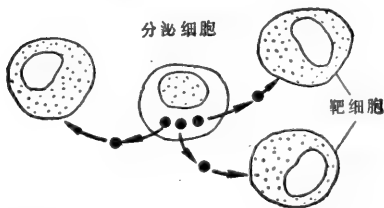
连接或所分泌的小范围的化学介导因子?

本章将主要讨论间接通讯——那些通过分泌化学信号来介导的——的机制。幸运的是研究这些分泌分子远较研究那些膜结合分子为方便,而且我们已经了解不少有关它们的作用情况。

三种不同的化学信号发放策略：局部的 化学介导因子、激素和神经递质

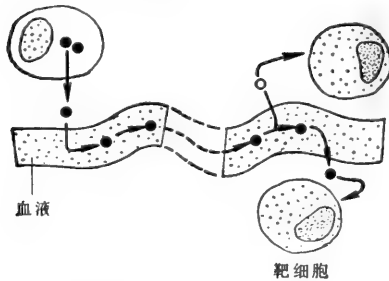
化学信号发放有三种不同方式：(1) 体内大部分细胞分泌一种或多种具有局部化学介导因子功能的化学信号，因为它们很快被吸收或破坏，故只能对邻近的细胞起作用；(2) 特异的内分泌细胞分泌激素，随着血流影响到遍及身体各部的靶细胞；(3) 神经细胞与其靶细胞之间形成特殊的连接(化学突触)，分泌一些仅能在非常近的范围起作用的化学介导因子(称作神经递质)只作用于毗邻的靶细胞(图 13-2)。

局部的化学介导因子



激素

分泌(内分泌)细胞



神经递质

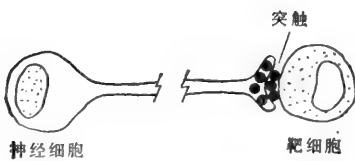


图 13-2 三种不同类型的细胞外信号发放分子

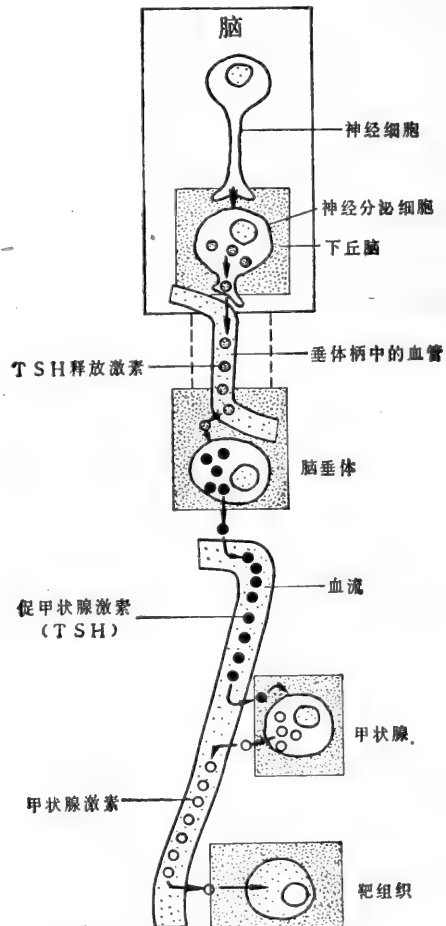
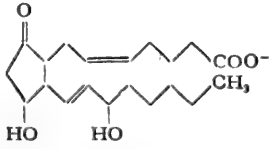
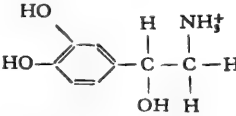


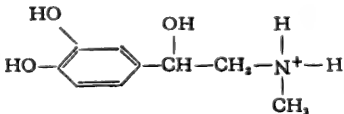
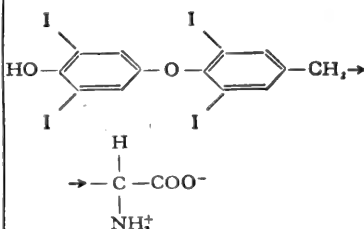
图 13-3 通过神经系统调控甲状腺激素分泌的间接发放方式的示意图。当大脑较高中枢刺激下丘脑的专一神经分泌细胞时，使它们分泌 TSH 释放激素于垂体柄的血管中，TSH 释放激素通过脑垂体中的专一细胞刺激 TSH (促甲状腺激素) 的释放。接着，TSH 又刺激甲状腺细胞合成和分泌甲状腺激素。甲状腺激素促进身体中大部分细胞代谢过程的变化。本图未说明血液中甲状腺激素浓度增加将抑制 TSH 释放激素和 TSH 的分泌。这种反馈抑制作用防止了血甲状腺激素的过分增多。

表 13-1 一些信号发放分子

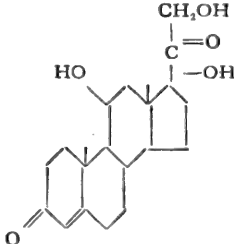
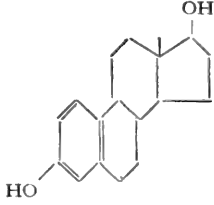
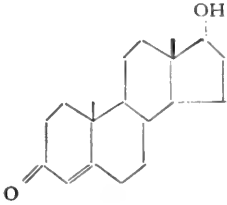
局部化学介导因子	起源部位	结 构	主要作用
蛋白质 神经生长因子	受交感神经支配的所有组织	由 118 个氨基酸组成两条相同的链	感觉和交感神经元的生存和生长
小分子肽 嗜伊红 趋化性因子	肥大细胞	4 个氨基酸	特殊类型的嗜酸性白细胞的趋化性信号
氨基酸衍生物组胺	肥大细胞	$\begin{array}{c} \text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \quad \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \\ \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$	引起血管扩张和渗漏
脂肪酸衍生物 前列腺素E ₂	多种不同类型的细胞		平滑肌的收缩
神经递质*	起源部位	结 构	主要作用
氨基酸及有关化合物 甘氨酸	神经终端	$^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	中枢神经系统的抑制性递质
去甲肾上腺素	神经终端		中枢和周围神经系统的兴奋和抑制性递质
γ-氨基丁酸 (GABA)	神经终端	$^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	中枢神经系统的抑制性递质
乙酰胆碱	神经终端	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \qquad \text{CH}_3 \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	神经肌肉接头处的兴奋性递质；中枢和周围神经系统的兴奋性和抑制性递质
小分子肽 脑啡肽	神经终端	5 个氨基酸	吗啡样作用（抑制中枢神经系统中的痛觉传导）
激素	起源部位	结 构	主要作用
蛋白质和糖蛋白 胰岛素	胰腺的β细胞	蛋白质 α链=21个氨基酸 β链=30个氨基酸	糖的利用，包括细胞摄入葡萄糖；刺激蛋白质合成；刺激脂肪细胞中合成脂质
生长激素	脑垂体前叶	蛋白质 191个氨基酸	刺激肝脏生成生长调节素，由它促进肌肉和骨骼的生长
生长调节素	肝脏	蛋白质(多种)	肌肉和骨骼生长；影响Ca ²⁺ 、磷酸盐、糖和脂质的代谢

*在这类分子中，有些并不完全起到神经递质的作用，而在神经系统中起局部化学介导因子的作用。兴奋性神经递质刺激突触后细胞，而抑制性神经递质可抑制突触后细胞。

续表

促肾上腺皮质激素(ACTH)	脑垂体前叶	蛋白质 32个氨基酸	促肾上腺皮质激素产生皮质醇; 脂肪细胞释放脂肪酸
甲状旁腺素	甲状旁腺	蛋白质 84个氨基酸	增加骨的再吸收,致使血 Ca ²⁺ 和磷酸盐增加;增加 肾小管对 Ca ²⁺ 和Mg ²⁺ 的 重吸收,降低其对磷酸盐 的重吸收
促滤泡激素(FSH)	脑垂体前叶	糖蛋白 α链=92个氨基酸 β链=118个氨基酸	刺激卵巢滤泡生长和分泌雌 二醇;刺激睾丸中的精子 发生
促黄体生成激素(LH)	脑垂体前叶	糖蛋白 α链=92个氨基酸 β链=115个氨基酸	刺激卵母细胞成熟和排卵, 以及卵巢分泌孕酮;刺激 睾丸生成睾酮
上皮生长因子	不清楚	53个氨基酸	刺激上皮细胞和其它细胞 分裂
促甲状腺激素(TSH)	脑垂体前叶	糖蛋白 α链=92个氨基酸 β链=112个氨基酸	刺激甲状腺分泌甲状腺素; 脂肪细胞释放脂肪酸
小分子肽 TSH 释放因子	下丘脑	3个氨基酸	刺激脑垂体前叶分泌促甲状 腺激素(TSH)
激素	起源部位	结 构	主要作用
LH-释放因子	下丘脑	10个氨基酸	刺激垂体前叶分泌 LH
血管加压	脑垂体前叶	9个氨基酸	通过小血管收缩增加血 压;增加肾小管对水分 的再吸收
抑生长素	下丘脑	14个氨基酸	抑制脑垂体前叶释放生 长激素
氨基酸衍生物 肾上腺素	肾上腺髓质		增加血压和心率;增加肝 脏和肌肉的糖原分解; 刺激脂肪细胞释放脂 肪酸
甲状腺素	甲状腺		增加大部分细胞的代谢 活动

续表

<p>甾体 皮质醇</p>	<p>肾上腺皮质</p>		<p>影响蛋白质、糖和脂质的代谢;抑制炎症反应</p>
<p>雌二醇</p>	<p>卵巢, 胎盘</p>		<p>促进和维持雌性的第二性征;促进性腺附属器官的成熟和周期功能变化;促进乳腺管道系统的发育</p>
<p>睾酮</p>	<p>睾丸</p>		<p>促进和维持雄性的第二性征;促进附属性腺器官的成熟和正常功能</p>

内分泌细胞和神经细胞是一些高度专一化的化学信号发放细胞,共同协调着高等动物亿万细胞各类活动。神经细胞传递信息的速度远比内分泌细胞快,因为它们不依赖于扩散或血流传递信息,而是借电脉冲携带信号,快速地沿着神经突起传递。只是在神经终端释放神经递质时,电脉冲才转化为化学信号;神经递质只须经过一段极短距离的扩散就能抵达靶细胞,整个传递过程历时不到一毫秒(图 13-2)。由于激素在血流中被大幅度稀释,因此它必须具备在极低浓度情况下(通常 $<10^{-8}\text{mol/L}$)仍能起作用的性能,而神经递质则很少受到稀释,从而在其作用的靶细胞区域内仍能保持着高浓度水平。例如,在一个活跃的神经-肌连接点的突触间隙中,神经递质乙酰胆碱的浓度约为 $5 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 。在其他方面,激素和神经递质的化学信号发放机制基本相同,内分泌细胞所利用的一些信号发放分子中,有许多也是神经细胞(神经元)所利用的。

下丘脑是内分泌系统的主要调控者¹

不论是在器质方面或是在功能方面,内分泌系统和神经系统都是通过大脑的一个特异区(称作下丘脑)联系在一起。下丘脑位在脑垂体的正上方,两者凭借一根被称作脑垂体柄的下丘脑延伸部连结在一起。下丘脑的这种桥梁作用又是由一些具有神经细胞特性和内分泌细胞特性的细胞所介导的;这些细胞具有传递电脉冲而将信号发放分子释放到血流中的神经突起,因此称为神经分泌细胞。下丘脑的每个神经分泌细胞受到较高位的其他脑神经细胞的刺激,能向脑垂体柄血管中分泌一种特异的肽激素;随之由此种肽激素再专一地刺激或抑制脑垂体分泌二级激素。由下丘脑通过上述方式调控的多种脑垂体

激素,又刺激其它内分泌腺,向血流中分泌三级激素。所以,下丘脑是内分泌系统的主要调控者。图 13-3 以甲状腺激素的分泌调控机制为例,阐明了上述的分级活动。

表 13-1 有选择地例举了一些局部化学介导因子、神经递质和激素,以及它们的产生部位、结构和主要功能。其中大部分物质在本书的其它有关章节中都作了讨论。可以看出,这些分子的结构也类似于它们的功能,具有多样性。所述及的分子包括一些小肽分子、较大的蛋白质和糖蛋白分子、氨基酸及其有关的化合物、胆固醇衍生的甾体分子和结构极相似的分子,以及脂肪酸衍生物。

不同的细胞对于相同的化学信号具有不同的反应²

细胞对细胞外特定信号发放分子的反应能力,取决于该细胞所具有的能与信号发放分子结合的称作受体的专一蛋白质。有不少信号发放分子在极低的浓度条件下(通常 $\leq 10^{-8}$ mol/L)就起作用,而其互补的受体通常以高亲和力(亲和力常数 $K \geq 10^4$ mol/L)

和它们结合。成熟动物的大部分细胞已特化为执行一种主要功能;它们配置着特有的受体,使其能对各种不同的化学信号作出反应,激发或改变细胞的功能。

大部分的化学信号是以改变细胞已有蛋白质的特性或合成速率,或者启动新蛋白质的合成而最终影响靶细胞的。在不同的靶细胞中同一种信号分子影响的蛋白质有所不同,从而产生相异的效应。例如,乙酰胆碱具有刺激骨骼肌细胞收缩的作用,但却降低心肌细胞的收缩速率和力量。就所例举的这一特殊情况,骨骼肌细胞的乙酰胆碱受体蛋白不同于心肌细胞的乙酰胆碱受体蛋白。可是,仅受体的差别还不能完全说明这个问题。在许多情况中,即使是相同的信号发放分子,结合在不同靶细胞上相同的受体蛋白之后,却产生了完全不同的反应。这表明靶细胞是按两种方式被编排程序的:(1)它们配备有一套独特的受体,以便对互补的一套化学信号反应;(2)它们按自己独有的方式对各种信号作出反应(图 13-4)。

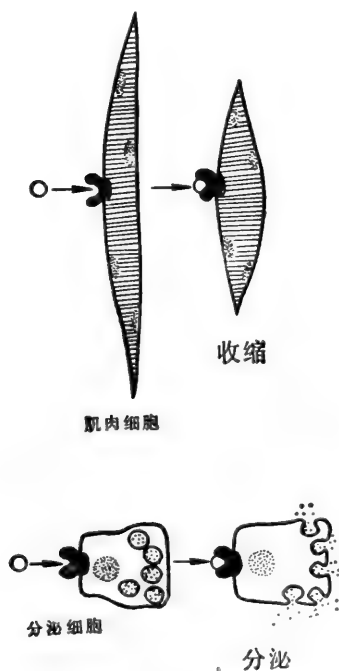


图 13-4 示意图表明一种相同的信号发放分子如何在结合于两种不同靶细胞(肌肉和分泌)的相同受体上之后,引起不同的反应。每一种类型的靶细胞均按其程序编排的特有方式对各种专一信号作出反应。

有些细胞对化学信号的反应是迅速而又短暂的,有些则是缓慢而持久的

在动物体内,当某些化学信号起着协调细胞的反应变化时,它们通常所诱导的反应很快而且短暂。例如,血葡萄糖水平的增加要刺激胰腺内分泌细胞向血流中分泌蛋白质激素胰岛素。但是由于胰岛素浓度的增加很快又刺激了肝脏和肌肉吸收更多的葡萄糖,致使血中葡萄糖的水平下降。结果,胰岛素的分泌速率和肝脏、肌肉吸收葡萄糖的速率,都恢复到原有的水平。通过上述方式,血中葡萄糖的浓度保持着相对的恒定。由神经递质诱发

的反应甚至更快：在神经-肌连接点处，自神经终端释放的乙酰胆碱于几毫秒之内就引起骨骼肌细胞收缩和随后的再松弛。

化学信号在动物发育过程中也起着重要作用。它们往往影响到某些细胞的分化时间和方式。这些作用常常起步慢并且持久。例如，青春期有大量的雌性甾体激素雌二醇自卵巢中的细胞分泌。雌二醇引起了身体各部不同细胞的变化，最终导致雌性第二性征的发育，如乳房增大。虽然雌二醇停止分泌，这种效应又会慢慢地逆转，然而在哺乳动物发育的极早期阶段，有些性甾体激素所引起的反应则是不可逆的。同样的情况，由于蝌蚪血液中甲状腺激素浓度增加到10倍，引起惹人注目的不可逆的变化，即蝌蚪变态为蛙(图13-5)。

信号发放分子可以是水溶性的或脂溶性的

所有已知的神经递质，近乎所有的激素，以及局部的化学介质，都是水溶性的。甾体和甲状腺激素却是例外，它们相对地不溶于水，经与专一的载体蛋白结合之后，才成为水溶状态，随血流转运。由于溶解特性方面的差别，致使两类分子对靶细胞的作用机制存在根本上的区别。水溶性分子是过分亲水的，以致无法直接透过靶细胞的脂双层膜，而是结合于细胞表面的专一受体蛋白上。相反，甾体和甲状腺激素为疏水性分子，一旦从载体蛋

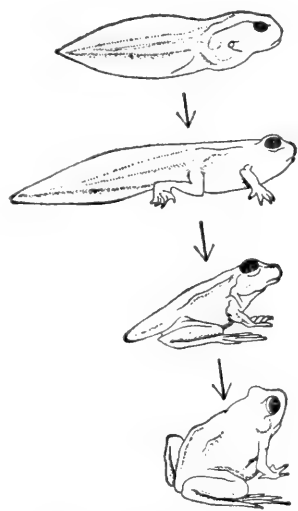


图13-5 蝌蚪变态为蛙的不同阶段。在变态发生期间，所有这些显著的变化都是在甲状腺激素的信号作用下产生的。如果切除发育中胚胎的预定甲状腺，则胚胎不能变态，继续以蝌蚪形式生长。如果将甲状腺激素注射到这种巨大的蝌蚪中，该蝌蚪变态为蛙。

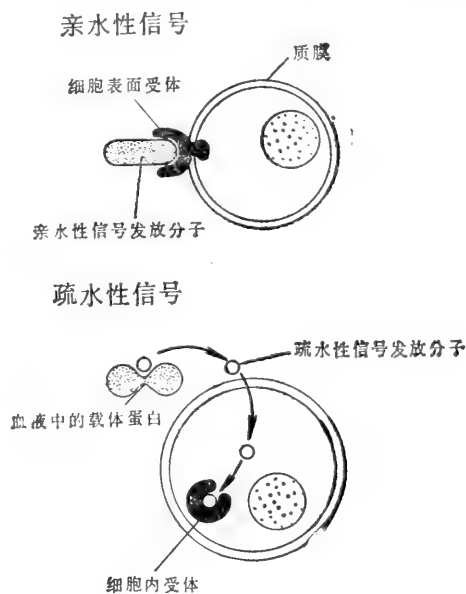


图13-6 亲水性和疏水性信号发放分子发放信号机制的区别。不能直连穿越质膜的亲水性信号发放分子与靶细胞表面的受体结合。能够通过扩散而穿透质膜的疏水性信号发放分子与靶细胞内的受体结合。由于疏水性信号发放分子不溶于水溶液，它们在血流中是靠载体蛋白转运，在进入靶细胞之前自载体解离。

白上释放，就很容易穿透靶细胞的质膜，与细胞内的专一受体蛋白结合(图13-6)。

这两类信号发放分子的另一重要差别表现在滞留于血流或组织液中时间的长短。进

入血流中的水溶性激素,一般在几分钟之内被清除或降解,而局部化学介导因子和神经递质在进入细胞间隙之后几秒或几毫秒就被清除。相反,甾体激素在血液中滞留的时间是数小时,甲状腺激素则达几天。因此,水溶性的信号发放分子往往激起短暂反应,而非水溶性的分子,则倾向于引起较持久的反应。

局部化学介导因子分泌之后很快被破坏³

不少信号发放分子被分泌到细胞外液中,只作用于邻近的细胞。这些局部化学介导因子与激素的区别在于它们很快地就被细胞吸收并(或)受到破坏,致使进入血流中的量一般是微不足道的。

有些局部化学介导因子是由特化为专司这种功能的细胞所分泌。例如,组胺(组氨酸

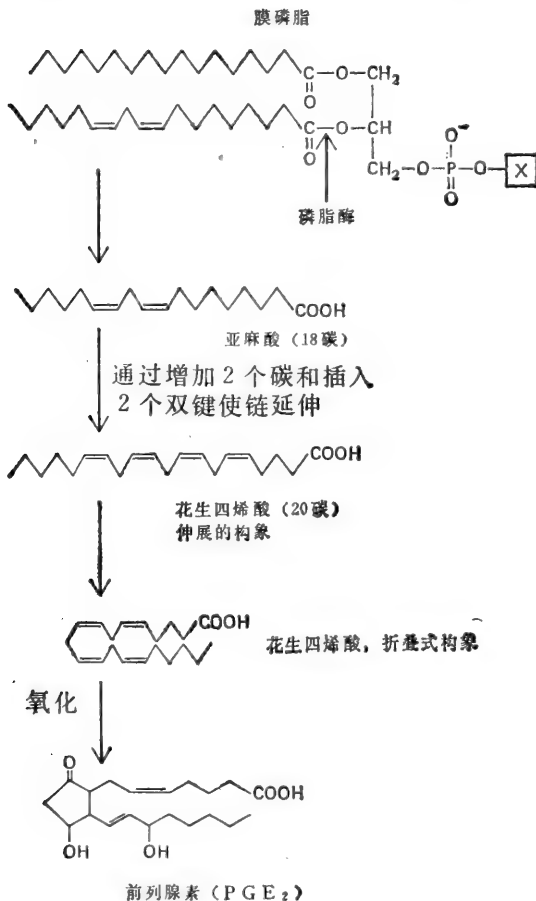


图13-7 前列腺素(PGE₂)的合成过程。PGE₂中的2表示PGE₂环外的两个碳-碳双键。大部分的细胞通过裂解细胞膜的磷脂,不断地合成前列腺素。

衍生物,见表 13-1) 主要是由肥大细胞分泌。这些在全身结缔组织中普遍存在的肥大细胞,将组胺贮存在它的大分泌小泡内,在受到损伤、局部感染和某些免疫反应等刺激时,很快经由细胞外排作用而释放出来。组胺引起局部血管扩张,产生渗漏,导致一些血清蛋白(诸如抗体和补体系统的组分,见第十七章)和具有吞噬能力的白细胞能方便地抵达损伤部位。肥大细胞所释放的介导因子中还有两种四肽,能诱引血液中一类叫嗜伊红细胞的白细胞到四肽释放处;嗜伊红白细胞具有多种酶,这些酶有助于使肥大细胞释放的组织胺以及其它化学介导因子失活。

有些局部化学介导因子,如组织胺,是由专一化的细胞分泌,而另有一些化学介导因子则来源较广。前列腺素就是广源局部化学介导因子的重要代表,它们是一族由 20 个碳组成的脂肪酸衍生物。如同其他一些局部化学介导因子一样,前列腺素很快地就在借助专一酶合成它们的部位附近被破坏。在分属于 9 类(称作 PGA、PGB、PGC……PGI) 的 16 种以上前列腺素中,已知有不少是与不同的细胞表面受体相结合而具有不同的生物效应。前列腺素与其它大部分信号发放分子的差别在于,它们不是贮存于细胞内部,而是连续不断地释放到细胞外面。由磷脂酶降解的膜磷脂产物是前列腺素的前体,细胞膜不断地由之合成前列腺素(图 13-7);合成的前列腺素又被不断地降解。

可是,在细胞由于周围环境变化而活化时,其中有不少使合成前列腺素的速率增加。局部前列腺素浓度增加的结果既影响合成前列腺素的细胞本身,也影响邻近细胞。

多种多样的生物活动都已归因于前列腺素的作用。前列腺素能引起平滑肌收缩、血小板聚集和炎症反应。例如分娩时大量产生的某些前列腺素,看来就是刺激子宫的平滑肌细胞收缩的重要因素。目前这些前列腺素已广泛地用为引产药物。阿司匹林和有些抗炎药物具有抑制前列腺素合成的作用,则是最近重要的发现。

并非所有的局部化学介导因子于分泌之后就很快遭受破坏。例如细胞外基质中的胶原蛋白以及其他大分子,可视为局部化学介导因子的特殊类型,由局部的一些细胞分泌,并向其他局部细胞发放信号,以改变其行为。这些分子不同于其他的局部化学介导因子之处是难以溶解并因而不会向该分子合成区以外扩散。因此不象那些可以扩散的局部化学介质,没有必要为防止其作用的扩散而迅速予以破坏。

有些自神经终端释放的信号发放分子可能象局部化学介导因子那样起作用而不象神经递质¹

释放到突触间隙中的神经递质,或被专一的酶很快破坏(如在神经肌肉接头处释放的乙酰胆碱),或被释放它的神经终端很快回收。迅速清除神经递质具有两种作用:一方面

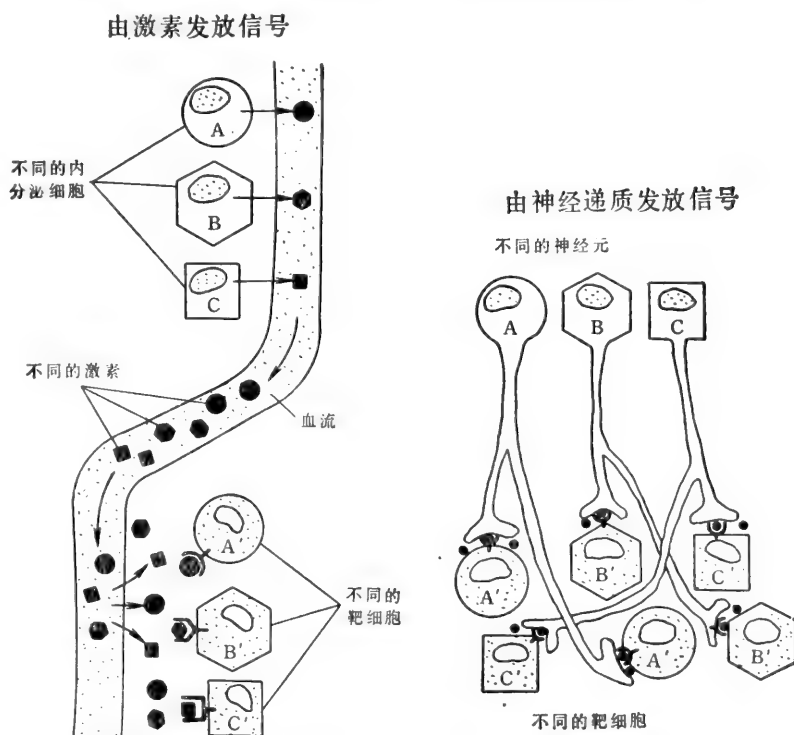


图 13-8 通过激素 (A) 和通过神经递质 (B) 的细胞间信号发放方式的对比图。一些内分泌细胞分泌各种激素至血流中,向专一的靶细胞发放信号。通过与靶细胞专一受体相结合,细胞外液中相应的激素被“捺除”。相反,不少神经细胞是通过神经突起与专一靶细胞接触而专一地发放信号:只有与神经细胞发生突触联系的靶细胞,才暴露在神经终端释放的神经递质的作用之下。虽然不同的内分泌细胞必须以不同的激素与不同的靶细胞通讯,而不同的神经细胞却可以用相同的神经递质仍以专一的方式通讯。

限制神经递质对突触后细胞的作用；另一方面终止神经递质的作用，从而使每个信号时间短促，能几乎立即重复发放。这种作用使得发放信号的过程非常精确。

神经细胞和内分泌细胞发放信号到靶细胞的方式截然不同。各种内分泌细胞分泌特有的激素到血流中，它们所导致的各种专一反应完全取决于哪类靶细胞上存在着某种激素的受体。⁹因此，内分泌系统是以大量不同的激素(和互补的受体)，按特定的方式调控着许多不同靶细胞的活动。另一方面，神经系统发放信号的速度、精确度和复杂性，则很大程度上是取决于解剖学上的一些因素。虽然神经系统的靶细胞也有专一的受体，但大部分的信号专一性是决定于神经细胞和靶之间的突触连结；神经递质是在突触处释放，只影响邻近的突触后细胞(图 13-8)。这些神经递质有些是兴奋性的，刺激突触后细胞；而另外一些是抑制性的，压抑突触后细胞。

如果中枢神经系统中所有的兴奋性和抑制性信号发放都是按上述方式作用在单个细胞上，则所需的信号发放分子只不过是少数几种。但是事实上从脊椎动物的脑中鉴别出来的就已有 30 多种信号发放分子，包括乙酰胆碱，多种氨基酸(甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和 γ -氨基丁酸，或 GABA)，氨基酸衍生物(去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺和组胺)，以及各种多肽。这可能意味着有许多自神经终端释放的信号发放分子并不是按常规的神经递质在起作用，而是像局部化学介导因子(神经调节素)那样在邻近扩散，影响到数量众

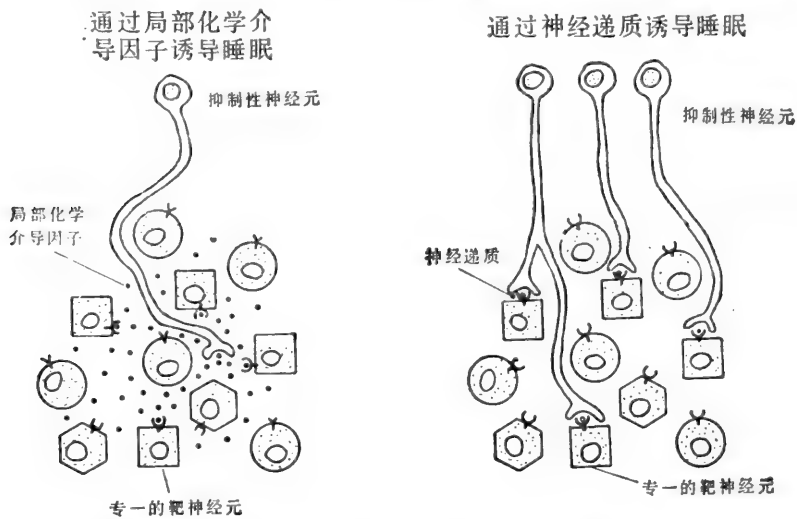


图 13-9 如果某些神经元(以方形细胞表示)的抑制是睡眠的先决条件，则本图中显示了两种可以诱发睡眠的假设方案。理论上，它可通过以突触与方形细胞连系的神经元释放抑制性神经递质达到诱发睡眠的目的，或通过更简单的方式，即由抑制性神经终端释放局部化学介导因子于方形细胞分布区。在后一种情况下，只有那些具有该介质的受体的细胞才被抑制。

多的细胞。因此严格地按字义讲，这种神经系统的信号发放不是突触性的(从一个神经终端到一个靶细胞)，而是类似于内分泌系统，需要有大量的信号发放分子(和互补的受体)，以保证专一性。

为何会出现这种具有局部化学介导因子性质的神经信号发放机制呢？假如睡眠的实现是取决于大脑某特定区域中大量特定神经细胞的抑制，则只有在具抑制性神经递质的专一神经终端与所有的有关大脑神经细胞有突触联系，抑制才实现。或者，一些数量较少的神经终端释放抑制性局部化学介导因子到大脑的特定区域，只要具有这种“睡眠物质”

受体的神经细胞就会受到抑制(图 13-9)。实际上把持续多天醒着的困倦动物脑室中的脑脊液,注射到另一处于警觉状态的动物脑室内,即可使之入眠。

有些激素和局部化学介质具有与专一生长因子相同的作用

有些类型细胞的分裂速率是受化学信号的调控,有的信号就是常见的激素。在哺乳动物的青春期,雌二醇能引起乳腺上皮细胞的分裂;甲状腺素能在蝌蚪变态时诱发特定肌肉和软骨细胞增殖,而同时又促使蝌蚪尾部细胞自毁。脑垂体的生长激素诱导肝脏(或其它细胞)分泌一些能导致某些细胞分裂的蛋白质激素,间接地刺激细胞分裂。这些由肝脏分泌的激素统称为生长调节素,因为它们介导生长激素的反应,刺激肌肉和软骨细胞生长和代谢的作用;凡生长激素合成量过少的儿童均成为侏儒,而合成过旺者则成巨人。

有些生长因子不具有激素的作用,而显示局部化学介导因子的功能。发育期间的有些神经细胞的存活和生长,是依赖于神经生长因子(NGF,为两条各由 118 个氨基酸的相同多肽链组成的蛋白质二聚体)。一般认为,这种神经生长因子是由这些神经细胞的靶细胞所分泌。目前已有三个方面的观察结果表明,NGF 对交感神经系统发育中的神经元的存活具有重要意义:(1)以抗 NGF 的抗体注入新生的小鼠体内,会有选择地使交感神经元死亡(图 13-10);(2)在没有其他细胞混杂在一起的组织培养情况下,如果在培养液中加入 NGF,会使未发育的交感神经元持久生存下去,而没有 NGF 则几天内就要死亡;(3)正常情况下,那些没有与靶细胞发生突触联系的发育中的交感神经元是要死亡的,但在加入 NGF 之后则可得到挽救。

将上述结果归纳起来可得到以下看法,即发育中的许多交感神经元的存活,完全依赖于为它们支配的靶细胞所分泌的少量 NGF 的信号发放(图 13-10)。在正常的发育期间,不少中枢神经细胞和外周神经细胞(包括交感神经元)已知在形成后数天之内死亡,只有那些与适当的靶细胞发生突触联系的才似乎能幸存下来。NGF 似乎只是许多神经元

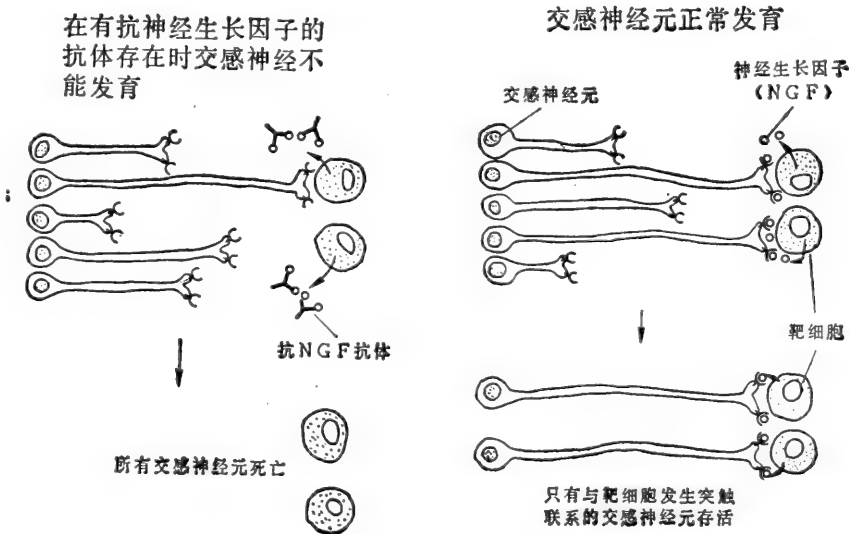


图 13-10 发育中的交感神经元依赖于神经生长因子而生存的示意图。以抗神经生长因子的抗体处理发育中的动物,会导致交感神经元的死亡。一般认为神经生长因子是由靶细胞释放的,并与交感神经元的神经终端上受体结合,使之与靶细胞发生突触联系。

存活因子的一种，不同类型的神经元为了生存需要为其所支配的靶细胞产生不同的专一因子。在神经发生期间出现神经元过量现象可能对所有靶细胞能有神经支配起到保证作用。

在引导交感神经纤维至其靶细胞的过程中，NGF 也可能起了一定作用的。将 NGF 注入新生小鼠脑中，它引导交感神经纤维异常地延伸到从不介入的中枢神经系统内。在体外培养中也可以看到类似的现象。如果以 NGF 不能透过的硅脂分隔为三个小室的培养皿，并在中间小室培养未成熟的交感神经元，结果发现神经纤维只是越过硅屏障向含有 NGF 的邻接培养小室延伸(图 13-11)。

小结

根据传递机制，信号发放分子可以分为三类：(1) 局部化学介导因子是很快地为细胞吸收或遭受破坏，故只能作用于局部区域内的细胞；(2) 激素随血流抵达全身的靶细胞；(3) 神经递质只作用于突触后细胞。体内的各类细胞都具有它们各自独特的一组受体蛋白，使其按预先编排的特有方式与互补的一组信号发放分子结合并引起反应。

根据信号发放分子在水中的溶解度，可以分亲水性和疏水性信号发放分子。疏水性信号发放分子，如甾体激素，穿越质膜，激活细胞质中的受体；亲水性信号发放分子，包括神经递质、大部分激素和局部化学介导因子则激活靶细胞表面的受体蛋白。

细胞内受体所介导的信号发放：甾体激素的作用机制

所有的甾体激素是从胆固醇合成的。由于是分子量较小(分子量 ≈ 300)的疏水性分子，它们的越膜方式是简单的扩散。一旦进入了靶细胞，甾体激素均与细胞质中各种受

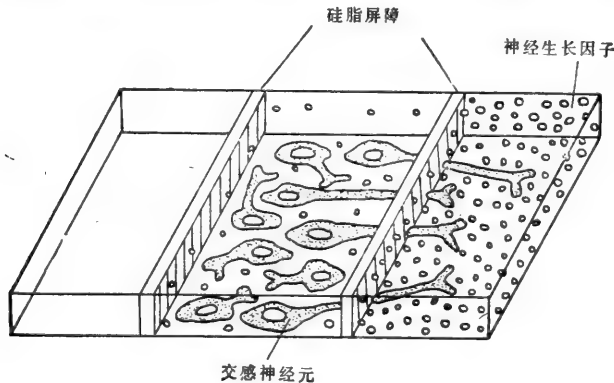


图 13-11 显示神经生长因子影响神经突起外长方向的实验。当交感神经元培养在以硅脂屏障分隔为三个小室的培养皿中间小室中，可以发现神经突起向含有神经生长因子的邻接培养小室中延伸，而不向不含有神经生长因子的另一侧小室中延伸。

体蛋白紧密地而可逆地相结合。同激素结合后的受体构象发生变构变化，从而增加了它与 DNA 的结合能力。由于受体蛋白能通过核孔迁入细胞核内，又由于它与 DNA 的亲合力增加，致使大量的激素受体复合体聚集在细胞核内(图 13-12)。

甲状腺素也是一种与细胞内受体结合的疏水性小分子。一般认为除在激素结合之前

甲状腺受体已大量聚集在细胞核内以外，它与甾体激素的作用方式是一样的。

甾体激素-受体复合体与染色质结合并调控专一基因的转录⁶

一个典型的靶细胞约有 10 000 个甾体受体，每个受体均能可逆地以高亲和力（亲和力常数 $K = 10^8 - 10^{10} \text{mol/L}$ ）与专一甾体激素结合。在激素浓度水平高的情况下，大部分的受体与激素形成复合体，并以这种活化形式与细胞核内的染色质相结合。当激素水平下降时，平衡发生漂移，从而使激素与结合的受体解离，游离的受体又返回到细胞质库中（图13-13）。

有些被活化的与染色质结合的激素受体调控某些专一基因的转录。然而，在任何靶细胞内只有少数基因是直接受到甾体激素的影响。例如，与皮质醇一起培养 30 分钟后的肝细胞，经双向凝胶电泳的分析，只能识别出千分之六的蛋白质显示量的增加，千分之一的蛋白质有量的下降。一旦除去培养液中的激素，这些蛋白质的合成速率又恢复正常。假设利用双向凝胶电泳分析能检测的细胞蛋白质约为 10%，皮质醇可能直接影响到仅仅 50 个左右基因的转录。有趣的是，人们发现同一种激素受体在不同靶细胞中影响不同组的基因。

体外的实验业已揭示，专一甾体激素的结合诱导受体发生变构变化（受体活化），大大增加了这些受体蛋白与分离自不同来源的 DNA 相结合的亲和力。由于设想甾体的激素受体是不断地向核内和核外扩散，据认为这种与 DNA 非专一性结合的增加就是导致大量的活化受体聚集在细胞核内的原因。一般认为受体一旦为激素所激活，也与靶细胞内染色质上调控基因转录的少数有关的专一部位以高亲和力相结合，但是迄今尚未能直接观察到这一现象。

有关支持上述甾体受体作用方式的最有决定性的实验之一，是利用自淋巴细胞肿瘤中（称作淋巴瘤）筛选出对皮质醇反应产生改变的突变细胞株。如同一些正常的淋巴细胞一样，在淋巴瘤细胞培养液中添加低浓度的皮质醇也可以使细胞死亡。然而突变细胞对皮质醇的致死效用有抵御力，甚至还发现有些细胞的皮质醇受体蛋白与皮质醇结合之后，不能从细胞质迁入细胞核（图 13-14）。虽然这些突变受体结合皮质醇的能力仍属正常，但结合 DNA 的能力却已经大部分丧失了。以大量不同突变种的受体蛋白作为材料进行分析，发现在试管中它们与 DNA 的结合力，与细胞内结合的皮质醇迁入细胞内的程度之间具有很强的相关性。因此这些实验提示，DNA 至少也是细胞核内受体识别部位的组成部分之一。

一般都认为结合在染色质专一部位上的甾体激素-受体复合物调控着专一基因的转录，但很难将这些结合部位直接鉴别出来。造成困难的主要原因，是受体能非专一地结合 DNA；此外，在靶细胞的 10 000 个激素-受体复合物之中，只需有少数与 DNA 结合就

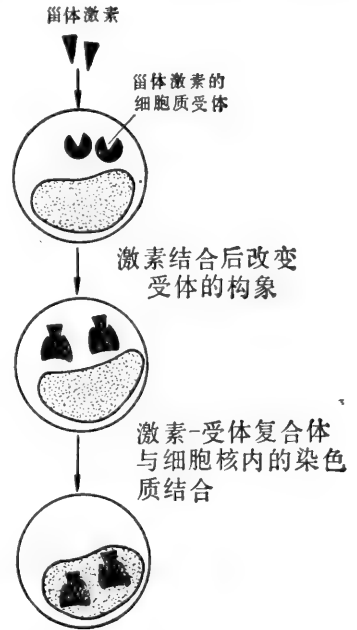


图13-12 甾体激素发放信号机制的示意图。甾体分子扩散穿过靶细胞的质膜，与细胞质中的受体蛋白结合。激素-受体复合体向细胞核内迁移，与染色质结合而调控一些专一基因的转录。

足以调控 50 个基因。况且,即使每个细胞有 10 000 个受体,也只占细胞总蛋白量的五万分之一左右,所以已经获得的高度纯化的受体是很少量的。由于上述的这些原因,很难明确地断定究竟甾体激素-受体的专一性是对专一 DNA 顺序识别的结果,还是对专一染色体蛋白质识别的结果,或由于两者。然而,最近使用 DNA 的重组技术已经克隆到由

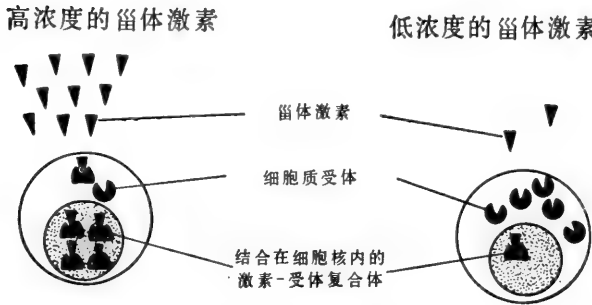


图 13-13 图中显示两种情况,在甾体激素水平高时,靶细胞中的受体蛋白与激素形成复合体,并结合于核内染色体上;在甾体激素水平低时,大部分的受体自细胞质游离出来。

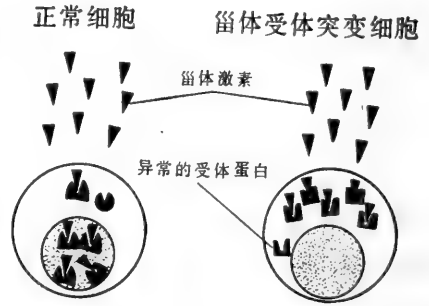


图13-14 一种甾体受体突变细胞,其中异常的受体能结合激素,但不能进入细胞核内。

皮质醇调控的基因,可用于制备大量的专一 DNA。在对这种 DNA 检测时发现,纯化的皮质醇受体是专一地结合在基因的某些 DNA 顺序上,以及它的周围。这一重要的实验结果表明,在诱导基因转录时,甾体受体是能够识别专一 DNA 顺序的。

甾体激素往往诱导初级和次级两个反应⁷

甾体激素引起的反应常常是分两步进行的。对少数基因转录的直接诱导作用,称作初级反应;由这些基因产物依次激活其它基因,产生延缓性次级反应。后者对初始的激素效应起到了较强的扩增作用。

在果蝇中就看到一个明显的例子。注射昆虫蜕皮激素(一种甾体激素)后 5—10 分钟,果蝇唾液腺的巨大多腺染色体上出现六个主要的 RNA 新合成部位(胀泡)。一段延搁时间之后,由此初级反应产生的一些蛋白质又进一步诱导出 100 个左右 RNA 合成部位,致使大量合成次级反应特有的蛋白质产物。次级反应受控于一个或多个初级蛋白质产物的反馈作用,这种反馈调控阻遏了所有初级反应基因的进一步转录(图 13-15)。在激素诱发的许多哺乳动物细胞反应中,似乎都存在着类似的扩增和调控机制。

不同靶细胞中甾体激素调控的基因也不相同⁸

如同一般激素引起的细胞反应一样,甾体激素所引起的反应不仅决定于激素的特性,也决定于靶细胞的特性。理论上,这一现象有两种可能的解释:不同类型细胞对同一种激素有不同的受体,或者受体相同但为其所活化的基因不同。然而,目前已有证据充分表明后一种解释是正确的。

这方面的证据主要来自对特定甾体激素受体异常的哺乳动物突变种的研究。特别是,

在雄性激素睾酮的受体有缺陷时,如果在其胚胎发育期间不给予睾酮处理,所有这些在遗传上属雄性的个体都发育为雌体。这些突变雄体都有能正常分泌睾酮的睾丸,但雄体组织中的睾酮受体有缺陷,致使有关的靶细胞对激素不能作出反应。结果雌性第二性征发

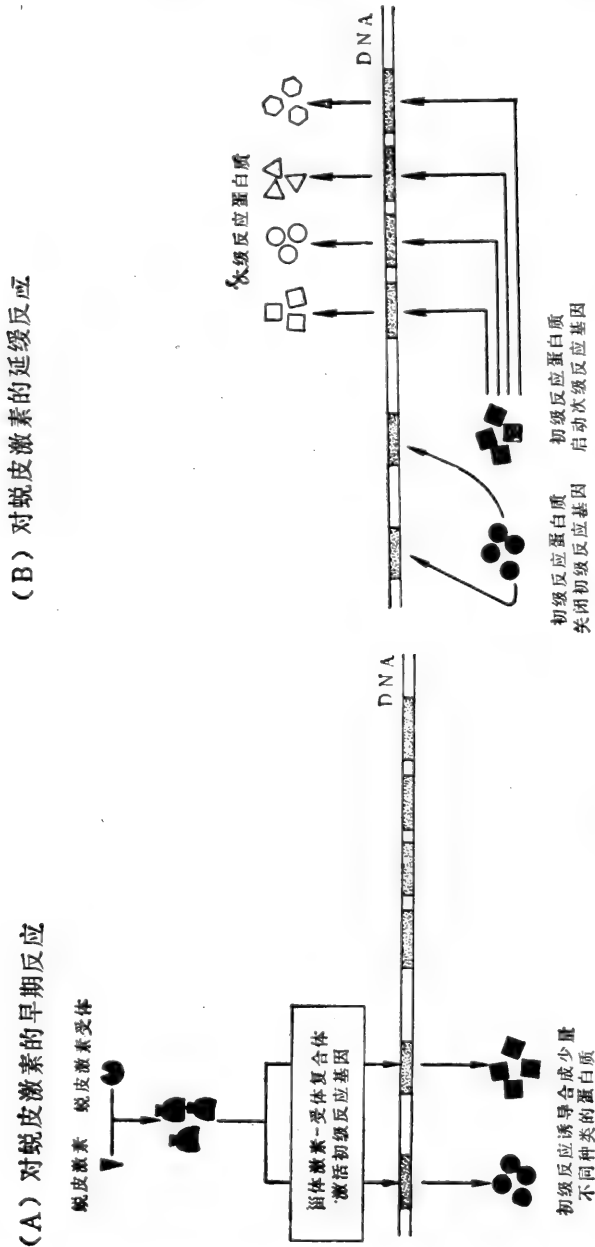


图 13-15 蜕皮激素在果蝇细胞中引起早期的初级反应 (A) 和延缓的次级反应 (B) 示意图。有些初级反应蛋白启动初级反应基因,而另一些关闭初级反应的基因,实际的初级反应和次级反应基因数目要比图中的多。

育,睾丸滞留在腹腔内而不下降到阴囊。这种睾丸雌性化综合症在小鼠、大鼠、牛和人类都有发生。虽然只是编码睾酮受体的基因出现异常,但其影响遍及所有在正常情况下接受睾酮作用的不同类型细胞(图 13-16)。这说明,所有的靶细胞普遍存在着相同的睾酮受体蛋白,虽然激活之后在每一类型靶细胞中调控着完全不同组的基因。

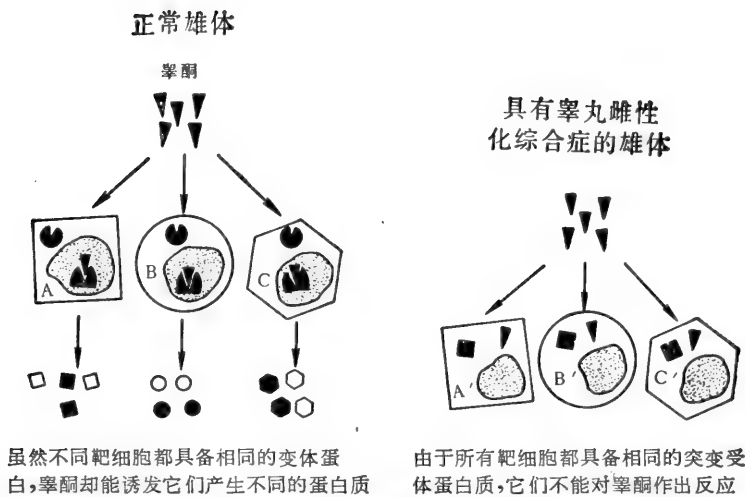


图 13-16 有相同受体蛋白的不同靶细胞对睾酮作出不同的反应。由于在睾丸雌性化综合症患者某个单基因缺陷，导致产生异常的睾酮受体，而使靶细胞不能对睾酮作出反应。

有关甾体激素发放信号的一般原理已经是很清楚了。每种甾体激素均能诱导出相应的有特征性的一系列反应，因为 (1) 只有对特定激素预期作出反应的细胞才产生该激素的相应受体；(2) 靶细胞的染色质很可能是按一定方式组织的，致使甾体受体只能激活其相应的基因(见第十八章)。由于每种类型靶细胞可供活化的基因不同，因此结合在相同甾体受体蛋白上的同一种激素能在不同细胞产生互不相同的效应。

小结

甾体激素是由胆固醇衍生的疏水性小分子，在血液中与专一载体蛋白可逆地结合，成为可溶状态。一旦与载体蛋白解离，便通过扩散穿过细胞膜，与胞液中专一的甾体激素受体蛋白可逆地结合。受体与激素形成复合体之后，便获得与 DNA 结合的亲和力，致使该复合物密集于细胞核内。激素-受体复合体结合在染色质上，调控着少数基因的转录。其中一些基因的产物有可能进一步激活其他基因，引起延缓的次级反应，扩增了激素的初始效应。每种激素均由不同的受体蛋白识别，但是在不同的靶细胞中，同样的受体蛋白却调控着不同的基因。这表明，各种类型细胞的染色质都经过一定的组织，使有关基因只接受其相应的激素-受体复合体调控。

细胞表面受体介导的信号发放：作为第二信使的 cAMP 和钙离子

水溶性信号发放分子，包括所有已知的神经递质、蛋白质激素和生长因子，都与有关靶细胞表面的专一受体蛋白结合。这些细胞表面受体与信号发放分子(配体)结合的亲和力很强，并将细胞外变化转变为细胞内信号，改变了靶细胞的行为。由于这类受体是一些不溶性的固有的膜蛋白，其含量往往不到细胞膜总蛋白量的 1%，所以很难分离和对之进行研究。

利用标记配体改革了细胞表面受体的研究⁹

试用放射性标记的配体揭示靶细胞表面受体的工作开始于 50 年代, 但遇到了两方面问题的阻碍: (1) 放射性同位素(常用的是具有放射活性的碘或氢)结合信号发放分子的过程显著地降低了它的功能活性; (2) 与靶细胞表面的结合大部分是非专一的, 因此在配体所结合的总体中, 只有一小部分为专一的受体。直至 1970 年左右在克服了上述问题之后, 才有可能直接揭示完整细胞和分离膜的表面上专一受体的存在。

目前, 由于使用放射性原子、荧光染料, 或电子密度高的分子(如铁蛋白)标记配体, 致使有可能对细胞表面专一受体的数量、分布和性质进行研究, 并追踪与受体结合后的配体-受体复合体的来龙去脉。业已表明在每个细胞表面某特异配体的受体数目可从 500—100 000 以上不等, 而原初的分布可以是分散的, 也可能局限在细胞膜上某些专一区域。

由受体介导的细胞内吞作用摄取蛋白质激素和生长因子¹⁰

使用标记配体进行的实验表明, 许多蛋白质信号发放分子进入靶细胞是借助由受体介导的细胞内吞作用。例如, 胰岛素与成纤维细胞表面呈弥散分布的受体蛋白相结合, 几分钟内胰岛素-受体复合体就成簇地聚集在所被覆的细胞膜凹陷处, 并被摄入到内吞的小泡中。由此可以想像, 这些蛋白质的信号发放分子(或者它们的降解产物)可直接在细胞内起作用, 十分类似甾体和甲状腺素的作用。然而有一点是我们必须了解的, 即由受体介导的内吞作用往往是把细胞外的分子转送到溶酶体。因此, 这些疏水性分子为了能进入胞液, 就需要有某种特殊的机制, 以便自内吞小泡或溶酶体逃脱(图 13-17)。

直接的实验分析可能显示, 至少有些信号发放分子为达到其施加影响的作用是无须进入细胞的。譬如能与靶细胞表面胰岛素专一受体相结合的抗体, 可以确切地模拟胰岛素的作用。所以尽管胰岛素在正常情况是为靶细胞所内吞, 但被吞入的激素本身并不能成为细胞内的信号。同样, 促甲状腺激素(TSH)通常激活甲状腺细胞合成和分泌甲状腺激素, 而与甲状腺细胞表面 TSH 受体结合的抗体也有此效应(图 13-18)。实际上, 这种抗体往往是患有甲状腺功能亢进的人体

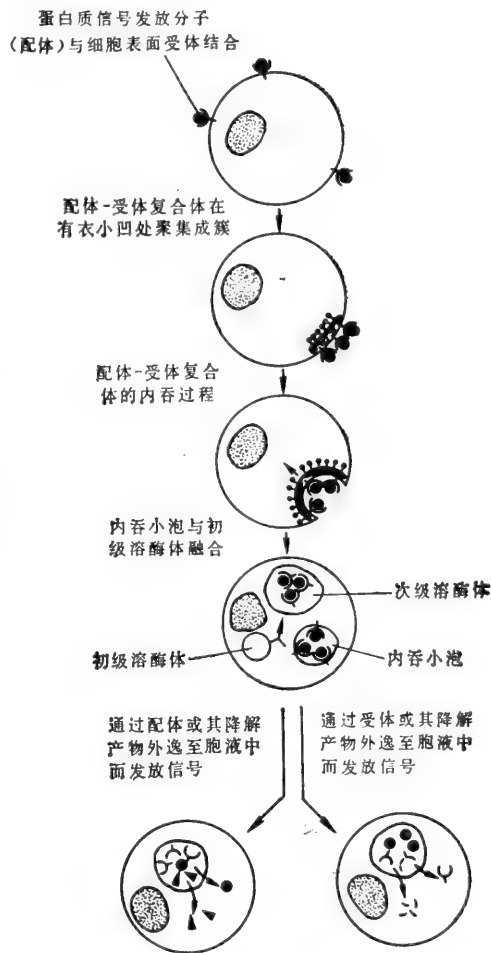


图13-17 假设图解显示为使蛋白质配体或它们的细胞表面受体作为细胞内介质起作用需要什么。必须有一种特别机制, 以保证配体或受体(或它们的降解产物)从细胞内小泡区室逸至胞液中。

中的病因,它促使患者生成过量的甲状腺激素。这些观察证明,胰岛素和 TSH 无须进入细胞就能起作用,但这并不排除它们的细胞表面受体具有细胞内的信号作用,因为受体通常是随着与其结合的激素或抗体一起为细胞所内吞的(图13-17)。

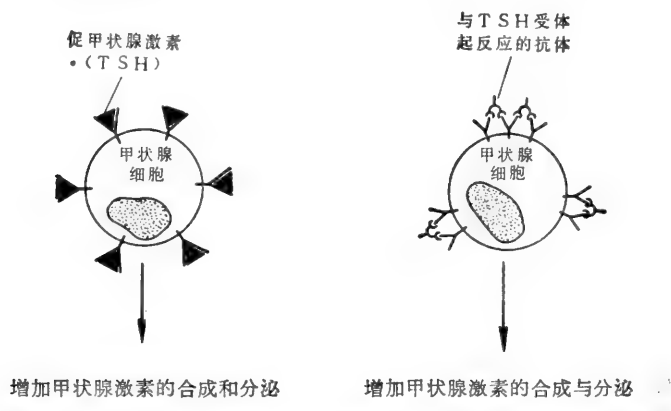


图 13-18 抗细胞表面 TSH 受体的抗体,具有模拟 TSH 结合这些受体的效应。表明在信号发放过程中无须有 TSH,因此 TSH 似乎不作为其自身的细胞内介导因子。

许多亲水性信号发放分子诱发反应的速度非常快,致使其反应机制不可能涉及受体介导的细胞内吞作用。肥大细胞在配体与其表面受体结合的数秒钟内就分泌组织胺,而神经递质引起反应所需的时间仅需数毫秒。在这些情况中,受体必然起了跨膜转换器的作用,以产生新的细胞内信号。

细胞表面受体通过调控酶或质膜中的离子通道而起转换器的作用¹¹

一般认为大量的与亲水性信号分子结合的受体,在结合到细胞表面配体时都经历了构象变化。这种构象变化导致产生细胞内信号,以改变靶细胞的行为。细胞内信号分子又常常称为第二信使,第一信使是细胞外配体本身。

细胞表面的受体已知是经由两条一般途径产生细胞内信号的。其一是借助于结合在细胞膜上的一种酶的活化或失活。这种酶有时催化产生一种可溶性的细胞内介导因子,于是细胞内此种介导因子浓度的变化就起到信号的作用。腺苷酸环化酶就是一种按此方式起作用的重要的酶,它位于细胞膜的内侧面,催化 ATP 为 cAMP (图 13-19)。另外在细胞外为配体所活化了的这种酶,有时也能直接地引起一些细胞蛋白的磷酸化反应。例如上皮生长因子 (EGF) 借助与细胞表面受体蛋白的结合,促使上皮细胞和其它类型细胞分裂。这种受体是经过与 EGF 结合而活化了的蛋白质激酶(或与这种酶密切相关),将 ATP 的磷酸基团转移到专一的细胞蛋白的酪氨酸残基上。这些细胞蛋白包括受体蛋白本身,其它的细胞膜蛋白以及胞液蛋白。

另一途径是,细胞表面受体可以开放或关闭细胞膜的离子通道口,并按下列两种的任一方式发放信号:(1) 引起一个瞬时性的小离子流,使越膜电位发生短暂变化;(2) 引起一个较大的离子内流,进入胞液中,再激起细胞内的反应。前一种机制主要发生在具有电活动的细胞,如神经元和肌肉细胞。例如,大部分的神经递质是通过开放或关闭靶细胞膜的离子通道调控突触后靶细胞的膜电位:在膜电位下降到一定的阈值水平以下时就触发膜的去极化作用(动作电位),并迅速向靶细胞膜的其余部分扩展。膜电位的变化并不伴

有胞液中明显的离子浓度的改变,所以这种突触后细胞膜的初始信号,直至这种动作电位抵达神经终端,均未转化成真正的细胞内信号。然而神经终端的细胞膜具有由电压控制的 Ca^{2+} 通道,在去极化时, Ca^{2+} 通道暂时开放, Ca^{2+} 进入,降低神经终端的高水平电化学梯度,并作为第二信使引起神经终端分泌神经递质(见第十八章)。

许多无电活动的动物细胞表面都存在着与细胞膜中 Ca^{2+} 通道有着功能联系的受体;配体的结合使受体活化,从而通道开放使 Ca^{2+} 进入胞液中,并在这里起着第二信使的作用(图 13-19)。

cAMP是一种普遍存在的细胞内介导因子¹³

在迄今已研究过的所有原核和真核细胞中, cAMP (图 13-20) 都有调控细胞内反应活动的作用。虽然 cAMP 是重要的细胞内信号分子,但对细胞的生存或分裂似乎并不是必要的,因为有些检测不到 cAMP 的突变真核细胞株在培养中仍能正常生长。

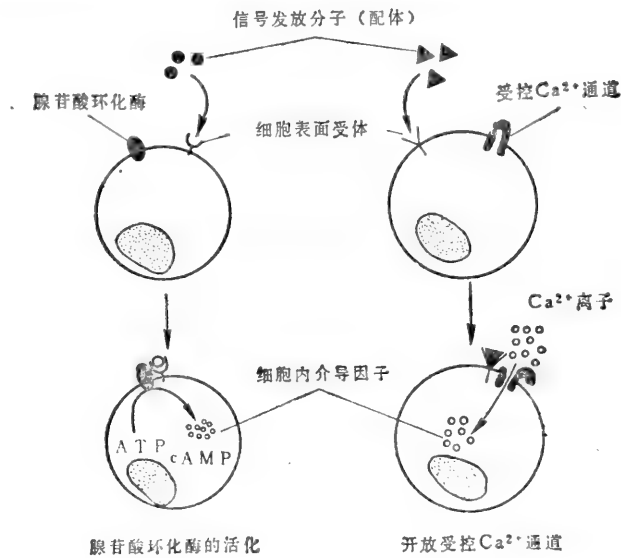


图 13-19 细胞表面受体产生细胞内信号的两种一般机制: (1) 细胞膜结合的腺苷酸环化酶的活化使细胞内 cAMP 的浓度增加; (2) 结合在细胞膜上的 Ca^{2+} 通道装置的开放使 Ca^{2+} 能进入细胞。为了简单化,图中将结合配体的受体画成直接与环化酶分子或离子通道起作用。事实上,其他的膜蛋白介导受体和环化酶分子,也可能和 Ca^{2+} 通道连接。

过去在研究 cAMP 方面的一个主要进展是,证实 cAMP 为许多种激素共同的细胞内介导因子。首先是在研究肾上腺素对肝细胞糖原代谢的影响时,发现了这种可溶性的细胞内介导因子。人们发现肾上腺素引起糖原磷酸化酶活化,并降解糖原。随后又能表明,以肾上腺素处理游离的肝细胞膜(同时加有 ATP),会产生一种小分子量的和对热不稳定的介导因子,这种因子能在没有肝细胞膜的条件下取代激素活化磷酸化酶,至 1959 年该介导因子为 cAMP 才得到证实。

由于 cAMP 具有细胞内介导因子的功能,所以其细胞内的浓度(正常为 $\leq 10^{-6} \text{mol/L}$) 必须受到严格的控制,并能随细胞外的信号而迅速地变化: 在激素的作用下, cAMP 的浓度水平能在数秒钟之内出现五倍之差的变化。在与细胞膜结合的腺苷酸环化酶催化作

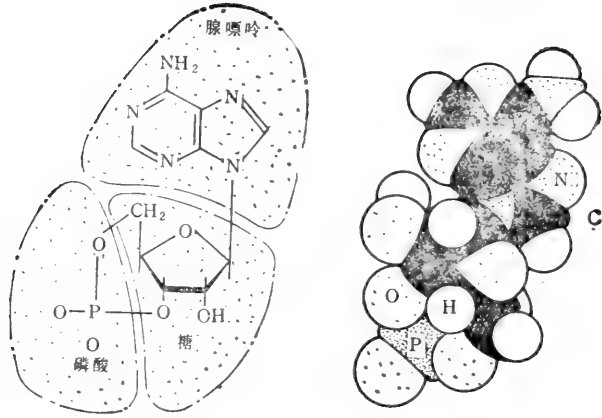


图 13-20 cAMP 的结构式和空间组合模型。(C,H,N,O和P分别表示碳、氢、氮、氧和磷原子)

用下 ATP 变为 cAMP, 但它在细胞中很快受到一种或多种专一酶——磷酸二酯酶的破坏, 水解为腺苷-5-磷酸 (5'-AMP) (图 13-21)。以 cAMP 作为细胞内信使的细胞表面受体具有改变(一般是激活)腺苷酸环化酶而不是改变磷酸二酯酶的作用。如下节所说明的, 为了保持细胞内介导因子浓度的快速增长或快速下降, 对细胞内这种因子的不断快速破坏或清除也是很必要的。

质膜中的受体和腺苷酸环化酶分子是功能上相互作用的不同蛋白质¹³

不少的激素或局部化学介导因子是经由活化腺苷酸环化酶而起作用的。表 13-2 列举了多种激素及其生物效应。正像同一种甾体激素对不同的靶细胞显示不一样的效应, 不同靶细胞对 cAMP 水平改变的反应也是有显著差别的。

由于各个类型的动物细胞对 cAMP 的增加都是按特定方式作出反应, 所以凡能活化某种靶细胞内腺苷酸环化酶的任何配体都能引起相同的效应。例如, 脂肪细胞至少有四种激素能激活腺苷酸环化酶, 由此就都能将甘油三酯(脂肪的贮存形式)降解为脂肪酸(表 13-2)。这种效应可以有两种解释: 不同类型的受体分别与细胞膜中各自的腺苷酸环化

表 13-2 一些通过 cAMP 在不同靶细胞中引起的激素效应

靶组织	激 素	主要效应
甲状腺	促甲状腺激素	分泌甲状腺素
肾上腺皮质	促肾上腺皮质激素(ACTH)	分泌皮质醇
卵巢	促黄体激素	分泌孕酮
肌肉、肝	肾上腺素	降解糖原
骨	甲状旁腺素	骨再吸收
心	肾上腺素	增加心率
肾	血管加压素	水再吸收
脂肪	肾上腺素, ACTH, 胰高血糖素, 促甲状腺激素	降解甘油三酯

酶分子紧密地连接着, 或者不同类型的受体共有—个腺苷酸环化酶分子库。受体的“移植”实验结果表明正如后者的解释一样。例如从去垢剂溶解的细胞膜所分离的肾上腺素

受体. 将其移植到无肾上腺素受体的细胞膜中, 这样移植的受体于激活之后能起功能上的相互作用(图 13-22A)。

早期的以细胞融合代替受体移植的类似实验, 来使受体和环化酶分子连结。把具有肾上腺素受体而腺苷酸环化酶业已失活(热或化学方法处理)的细胞与具有完整环化酶分子而无肾上腺素受体的细胞相融合, 融合后数分钟内这种具有异源核的细胞在肾上腺素作用下就显示出明显的腺苷酸环化酶的活化反应。这一结果再次表明, 源自一种细胞膜的受体能与另一种细胞膜的环化酶在功能上起相互作用(图 13-22B)。因此, 受体和环化酶分子虽被认为属于不同的蛋白质, 但在受体活化之后能在功能方面相互作用。

受体以 GTP-结合蛋白间接地激活腺苷酸环化酶分子¹⁴

活化的受体并不直接激活腺苷酸环化酶; 而是由第三种膜蛋白, 即胞质面的 GTP 结合蛋白, 将两者偶联起来。首次提出上述机制是由于发现激素激活破碎细胞的腺苷酸环化酶需要 GTP。此后, 利用分离出的特异的突变细胞株也取得 GTP-结合蛋白的证据。尽管这种突变细胞的肾上腺素受体的水平正常, 但是肾上腺素的结合并不能激活环化酶。将这种“未偶联”细胞的细胞膜与以去垢剂自其他细胞提取的其它膜组分混合, 能重组需要 GTP 而对激素敏感的腺苷酸环化酶系统。有充分的证据说明, 在上述实验的用去垢剂提取的提取液中含有一种专一的膜蛋白, 即 GTP-结合蛋白 (G 蛋白), 它不存在于“未结合”的突变细胞中, 并为偶联活化受体及激活腺苷酸环化酶所必需。

如果细胞能对激素浓度的变化作出迅速反应, 则激素受体引起的腺苷酸环化酶必须持续到配体存在的时候。由于 G 蛋白本身就是 GTP 酶, 它能将结合的 GTP 水解为 GDP 和无机磷酸盐, 从而自我灭活, 致使上述类型的反应得到保证。如果在用物理方法破碎的正常细胞中, 以 γ 位磷酸根不会被水解的 GTP 类似物取代 GTP, 可以增加由激素引起的腺苷酸环化酶的活化, 其持续时间也大为延长。

与引起霍乱症状有关的细菌毒素能抑制这种正常“关闭”机制。霍乱毒素本身是一种酶, 能使细胞内 NAD^+ 的 ADP-核糖转移到 G 蛋白上, 这样的改变使 G 蛋白不再能水解 GTP。这意味着腺苷酸环化酶一旦被激素-受体复合体和 G 蛋白分子所激活, 将维持在一一种不可逆的活化状态。由于在小肠上皮细胞中 cAMP 量处于持久的高水平状态, 就引起 Na^+ 大量外流, 水分大量逸入肠腔中, 成为霍乱毒素引起严重腹泻的原因。

因此, 看来腺苷酸环化酶的活化过程至少得有三种细胞膜结合蛋白的参与, 它们在

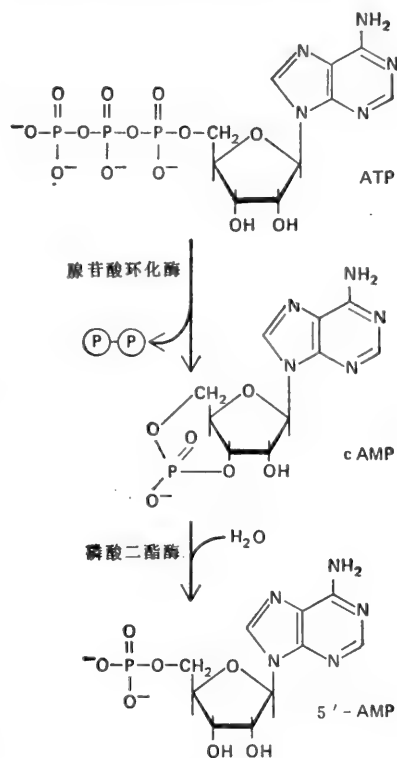


图 13-21 cAMP 的合成和降解

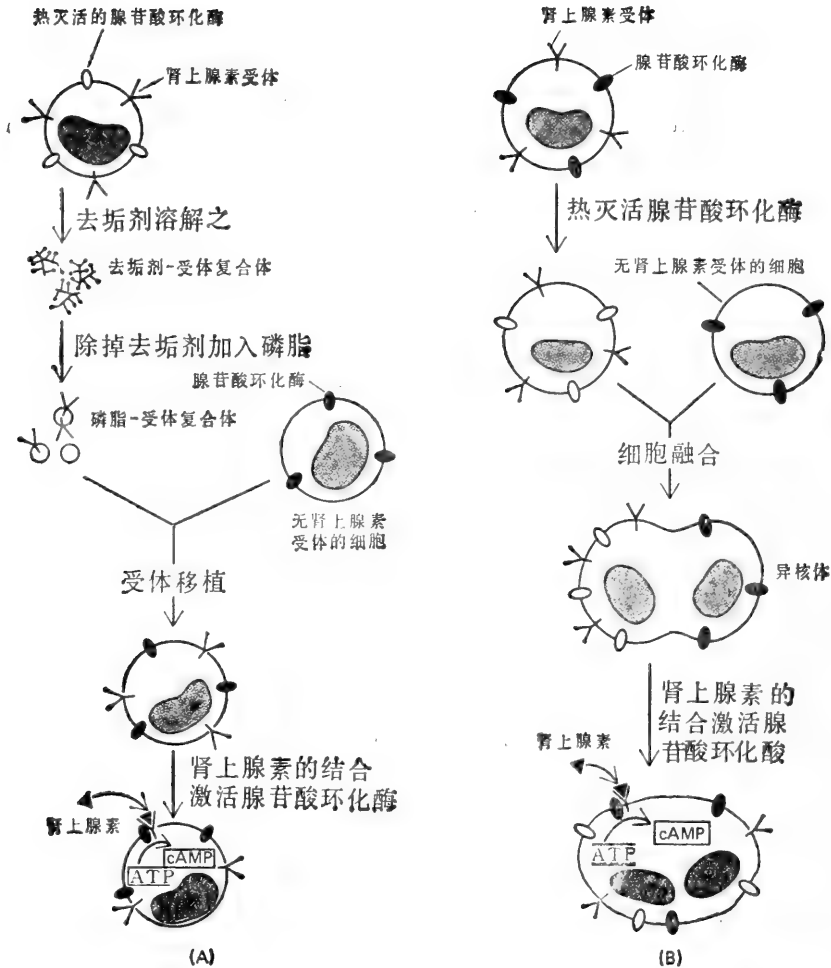


图 13-22 通过溶解受体的“移植”(A)或细胞融合(B)实验,表明来源于不同细胞的受体蛋白和腺苷酸环化酶分子在完整细胞的质膜中有功能上的相互作用。

列程序中相互作用: (1) 当激素与受体蛋白分子在脂双层中相碰撞时,两者相结合,改变了受体的构型使能与G蛋白质结合,并使其活化;(2) G蛋白与 GTP (代替 GDP) 在胞质面结合,从而改变了G蛋白的构象,使能激活腺苷酸环化酶分子以合成 cAMP; (3) 为完成腺苷酸环化酶的活化周期, G蛋白将 GTP 水解为 GDP, 使环化酶恢复到原有的无活性状态。图 13-23 示出偶联过程如何进行的一种模式。

为何细胞形成如此复杂的步骤繁多的信号转导机制? 为何将G蛋白安插在受体和其所激活的酶之间? 理由之一是, 每个活化的受体蛋白都能与许多活化的G蛋白分子相碰撞,从而大大扩增了初始的细胞外信号。另一种可能是, 这样的组织方式在原则上能使一个单一类型的激素, 同时在功能上连接于除环化酶以外的大量的不同细胞膜酶和离子通道。例如, G蛋白的功能像是一个接头, 不同类型的细胞可能具有不同的接头, 使同一类的激素受体蛋白能与不同细胞膜中的不同靶蛋白相偶联。

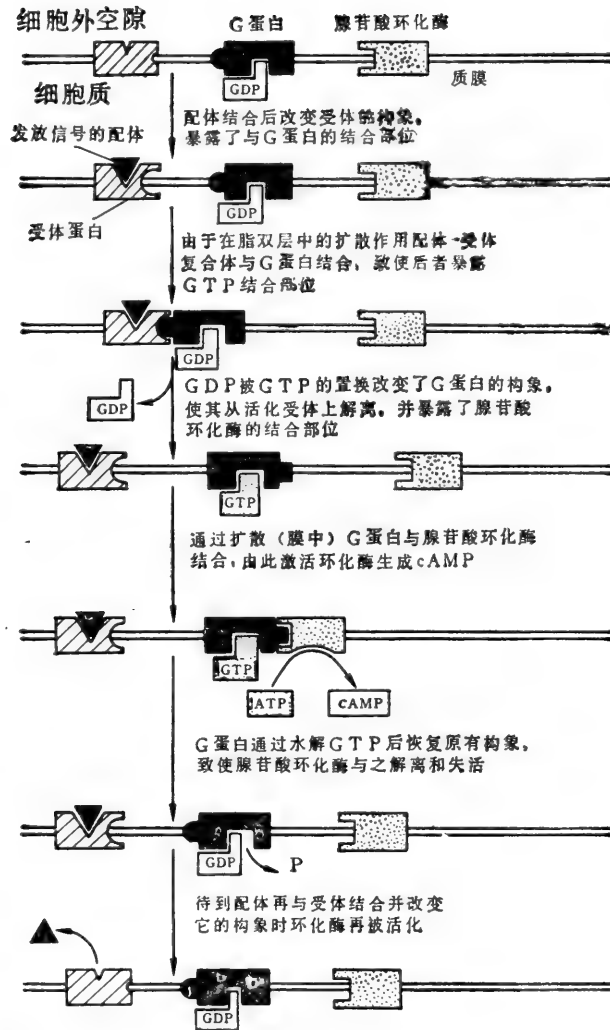
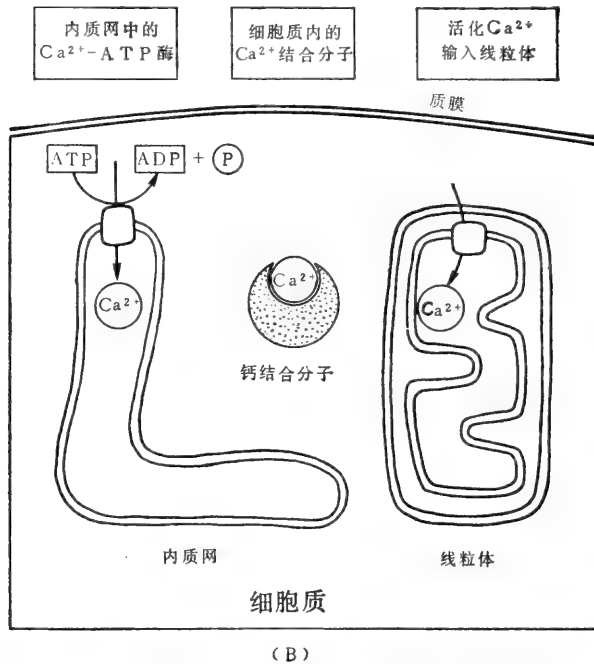
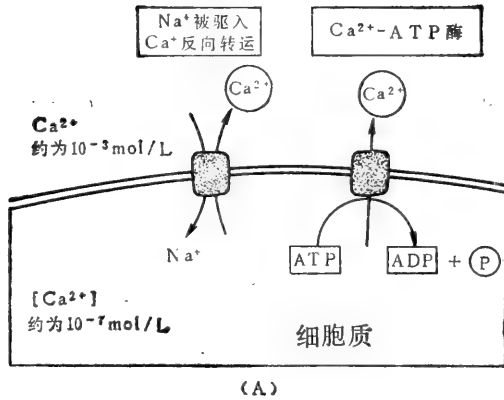


图 13-23 腺苷酸环化酶活化过程的“碰撞结合”模式图。假设受体蛋白、腺苷酸环化酶和结合 GTP 的(G) 蛋白质均能独立地在靶细胞质膜中扩散, 并只有在受体与配体结合之后才相互作用。G 蛋白和环化酶的结合也可能是永久性的。每个活化受体蛋白激活多个 G 蛋白分子, 由此大大扩增了反应, 然而这种扩增效应在图中并未表示出来。

Ca²⁺也作为一种普遍存在的细胞内介导因子而起作用¹³

日益增多的证据表明 Ca²⁺ 像 cAMP 一样也是一种重要的细胞内调节因子, 并且对一些细胞外信号发放分子起到第二信使作用。1947 年, 在骨骼肌细胞内注射少量 Ca²⁺ 能引起收缩的实验结果首次证明了它们的作用。如同 cAMP 一样, 正常时胞液中游离 Ca²⁺ 的浓度很低。虽然细胞内外 Ca²⁺ 的总含量相仿 ($\geq 10^{-3} \text{mol/L}$), 但胞液中的游离 Ca²⁺ 浓度 ($\leq 10^{-7} \text{mol/L}$) 要比总含量低 100 多倍, 因为大部分的 Ca²⁺ 在细胞内是与其它分子相结合, 或隐散在线粒体和别的细胞器中。这一现象意味着, 动物细胞膜两侧游离 Ca²⁺ 浓度的梯度差很大, 使 Ca²⁺ 具有进入细胞的倾向。



■ 13-24 细胞在外周体内高浓度的 Ca^{2+} 情况下，维持低浓度水平胞液游离 Ca^{2+} 的主要途径。胞液中的 Ca^{2+} 经泵积极地向细胞外输出 (A)，同时也被转运到细胞内的膜包被的细胞器中，如内质网和线粒体 (B)。此外，细胞内有各种分子能与游离 Ca^{2+} 紧紧结合。

为了使这种显著的不平衡状态得以维持，越膜的 Ca^{2+} 净流入和净输出必须相当。实现这一功能在很大程度上要依靠细胞膜结合的 Ca^{2+} -ATP 酶，就是利用水解 ATP 后所获得的能量向细胞外泵出 Ca^{2+} 。在有些细胞也依靠其他膜结合泵活跃地排出 Ca^{2+} ，这种泵如同一个 Na^{+} -驱动反向转运器，一方面向外转运 Ca^{2+} ，同时也向内转运 Na^{+} (图 13-24 A)。

可是细胞膜转运并不是清除胞液中 Ca^{2+} 的唯一机制。事实上，一般细胞膜的表面积要比细胞内隐蔽 Ca^{2+} 的所有细胞器膜总面积小 10—100 倍。结合在细胞器膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶能使内质网(特别是肌肉细胞的肌质网)对抗逆向梯度，自胞液中吸收大量 Ca^{2+} ；

而在线粒体进行氧化磷酸化反应的电子传递阶段,利用跨膜的电化学梯度,自胞液中吸收 Ca^{2+} 。

除了各种膜转运蛋白能积极地从胞液泵出 Ca^{2+} 以外,还有多种多样的钙结合分子也有助于清除游离的 Ca^{2+} 。这些包括小分子的例如磷酸盐,以及一些能结合 Ca^{2+} 的大分子蛋白质(见下)。图 13-24 总结了将细胞溶质游离 Ca^{2+} 维持在低水平的各种机制。

一些细胞表面受体的活化打开了膜结合 Ca^{2+} 的通道¹⁶

细胞是利用极大的 Ca^{2+} 跨膜梯度转导细胞外信号。正如有些细胞表面受体在功能上与腺苷酸环化酶相偶联一样,另外一些受体则与质膜上的 Ca^{2+} 通道偶联。受体活化后这些通道的瞬时性开放使 Ca^{2+} 进入胞液,在这里起着第二信使的作用(图 13-25)。由细胞外配体激活的大部分分泌细胞都是按这一机制活动的。有时活化的受体首先使细胞膜去极化,膜电位的改变使依赖电压的 Ca^{2+} 通道开放,离子流入细胞。 Ca^{2+} 通道的开放有时同膜电位的变化并无关系,它如何与受体活化偶联还不清楚。

从细胞器释放 Ca^{2+} (图 13-26)是 Ca^{2+} 所介导的信号发放的另一重要机制。例如在骨骼肌细胞中细胞表面乙酰胆碱受体的活化使细胞膜去极化,并导致 Ca^{2+} 以还不清楚的方式从肌质网中释放出来,从而引起肌原纤维的收缩。同样引起有些分泌细胞外排反应的 Ca^{2+} ,也是来自细胞内原已贮存的。有关配体结合于细胞表面受体如何引起内膜 Ca^{2+} 通道的开放,仍是令人费解的问题。

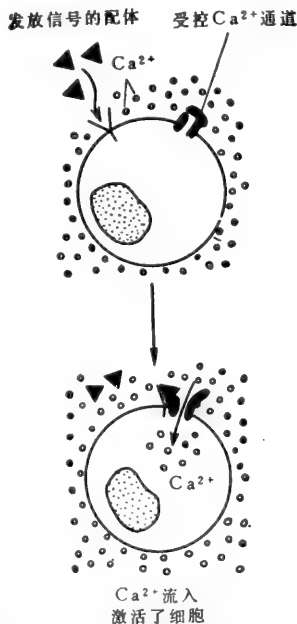


图13-25 细胞表面受体与质膜中 Ca^{2+} 通道之间具有功能性的结合。配体与该受体结合之后开放通道,使 Ca^{2+} 能进入细胞,降低其电化学梯度差。为了简单化,图中将配体-受体复合体画成与 Ca^{2+} 通道直接结合,而实际上两者之间的结合机制还不清楚。

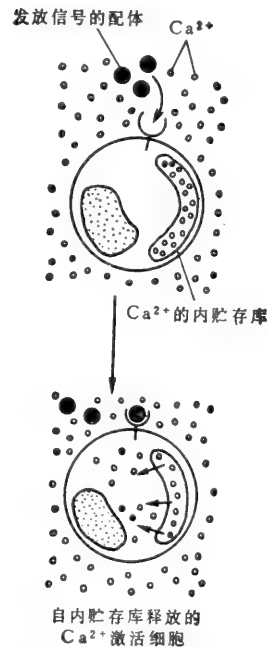


图13-26 示意图表明,自细胞内贮存库释放 Ca^{2+} 至胞液中,作用于细胞表面受体。在肌细胞中, Ca^{2+} 的内贮存库是肌质网。在其他细胞中,内贮存库的位置尚不清楚。有关细胞表面受体活化至细胞内贮存库释放 Ca^{2+} 的机制也不了解。

在细胞发放信号期间,胞液中出现的游离 Ca^{2+} 增加现象总是暂时的。就 cAMP 来说,瞬间反应的发生是由于由 G 蛋白水解的 GTP 引起可逆性的腺苷酸环化酶的活化,同时也因为所产生的 cAMP 很快为磷酸二酯酶所破坏。而 Ca^{2+} 方面, Ca^{2+} 通道门径只是暂时打开,进入胞液中的 Ca^{2+} 很快地被泵出,或通过与细胞内的分子结合而缓冲。

小结

为细胞外发放信号配体所激活的大部分细胞表面受体蛋白,是按下述两种中的任一方式产生细胞内信号的。它们改变了一种质膜结合酶的活性,依次又使细胞内介导因子的浓度发生变化。或者它们改变质膜上离子通道的通透性,从而改变了膜的电位或细胞内转运的离子浓度,或两种变化都存在。

许多细胞表面受体与腺苷酸环化酶有功能性的联结。当这些受体与细胞外发放信号配体结合而活化时,配体-受体复合体在质膜中引起了一系列的蛋白质相互作用,使由腺苷酸环化酶合成的 cAMP 增加(或有时也减少)。细胞内 cAMP 浓度的增加只能持续到配体消失为止,因为腺苷酸环化酶活性的存在时间短暂,而产生的 cAMP 又很快为磷酸二酯酶所水解。

一些其他类型的细胞表面受体的活化具有开放膜结合 Ca^{2+} 通道的作用,致使细胞外液中的 Ca^{2+} 或细胞内贮存库中的 Ca^{2+} 流入胞液。细胞内 Ca^{2+} 的增加是瞬时的,因为 Ca^{2+} 通道的开放只是一时性,而进入胞液中的 Ca^{2+} 又很快被泵出,并通过与 Ca^{2+} 结合分子的结合而缓冲。

作为第二信使的 cAMP 和钙离子的作用方式

虽然 cAMP 和 Ca^{2+} 并非细胞外信号在细胞内仅有的介导因子,但由于它们是如此常用为第二信使,所以对于它们的细胞内作用方式是值得专门思考的问题。此外,它们还很可能证明通过间隙连接或质膜结合信号发放分子在细胞间的直接通讯中起作用,以及在通过分泌信号介导的通讯中起作用。

cAMP 激活细胞内蛋白质激酶^{12,17}

cAMP 在动物的细胞中是由活化的专一细胞酶,即叫做依赖 cAMP 的蛋白质激酶而产生效应的,这种激酶将靶细胞中 ATP 的磷酸基团转移到一小组蛋白质的特定丝氨酸或苏氨酸残基上。这类共价的磷酸化反应又调控着这些蛋白质的活性。

对骨骼肌细胞糖原代谢的研究,首次揭示了这些事件的顺序。糖原是葡萄糖在骨骼肌细胞中的主要贮存形式,它的合成和降解是受到特定激素的严格调控。例如,动物受到惊吓或其他压抑时肾上腺分泌肾上腺素到血液中向体内各种组织“报警”。在其他效应中还有肌细胞的糖原降解为葡糖-1-磷酸,并同时停止合成新糖原;葡糖-1-磷酸转变为葡糖-6-磷酸,再经过酵解氧化,提供肌肉收缩所需的 ATP。肾上腺素就是按着这种方式为肌细胞准备进行强有力的活动的。

肾上腺素通过激活肌细胞膜中腺苷酸环化酶来增加细胞质中 cAMP 的含量。接着 cAMP 又激活了依赖 cAMP 的蛋白质激酶,再由该蛋白质激酶专一地使糖原合成酶磷

酸化，这是完成由葡萄糖合成糖原的最后一个步骤的酶。因为这种磷酸化作用使糖原合成酶失活，从而糖原合成也就停止了。依赖 cAMP 的蛋白质激酶也能使其他酶——如磷酸化酶激酶磷酸化。这最后的磷酸化作用激活磷酸化酶，使之能去除糖原分子上的葡萄糖残基。

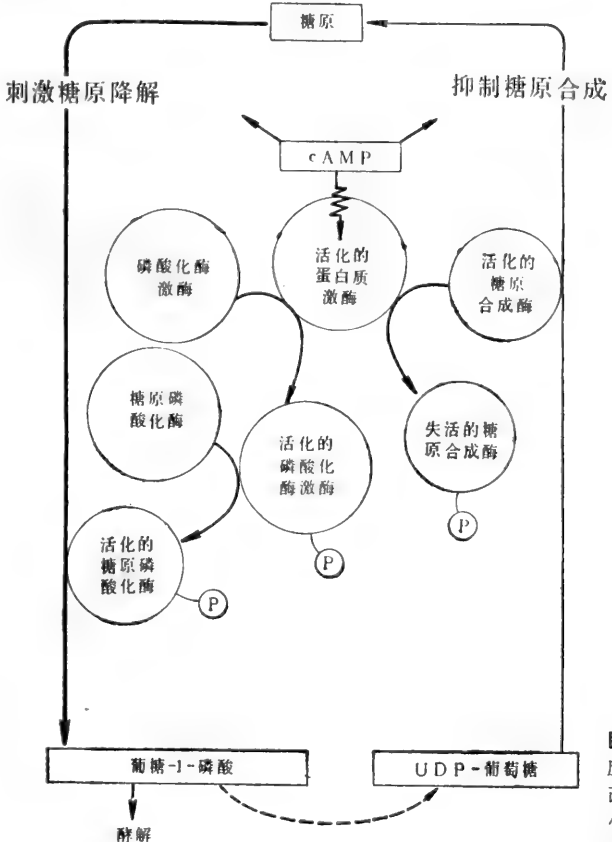


图13-27 图解说明骨骼肌细胞中cAMP含量的增加(由与细胞表面受体结合的肾上腺素诱发)是如何刺激糖原降解和抑制糖原合成的。cAMP与专一蛋白质激酶的结合，使该酶磷酸化从而激活了磷酸化酶激酶，后者磷酸化并激活糖原磷酸化酶，使糖原降解。同时，依赖 cAMP 的蛋白质激酶也使与糖原合成有关的糖原合成酶磷酸化，并使之失活。

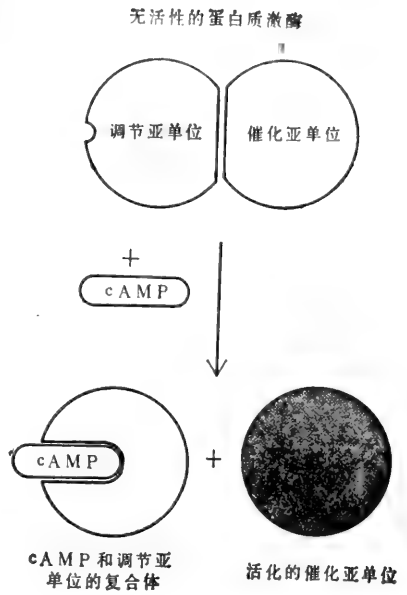


图13-28 依赖 cAMP 的蛋白质激酶的活化反应。由于 cAMP 结合于调节亚单位引起构象的改变，致使该亚单位自复合物解离。此时释出的催化亚单位已具有活性，在图中以黑色表示。为了简单明了，蛋白质激酶以二聚体形式画出，而实际上，一般认为是由两个调节亚单位和两个催化亚单位组成的四聚体。每个调节亚单位有两个 cAMP 结合部位，而催化亚单位的释放是两个以上的 cAMP 分子与四聚体结合所需的合作过程，如同 726 页中所述及的，这一过程大大加强了激酶对 cAMP 量变化的反应。

借助于这样的级联式相互作用，cAMP 含量的增加既抑制了糖原的合成，同时也刺激了糖原的降解，从而提供大量葡萄糖以满足细胞的需要(图 13-27)。通过磷酸化反应来调控糖原代谢阐明了一个通则：由磷酸化反应激活的酶通常参与代谢的降解过程，而那些为磷酸化反应所失活的酶则通常参与代谢的合成过程。

肌细胞中为 cAMP 所激活的蛋白激酶已经得到纯化，并显示由两个亚单位组成——与 cAMP 结合的调节亚单位和催化蛋白质底物分子磷酸化的催化亚单位。在 cAMP 不存在的情况下，调节亚单位和催化亚单位形成无活性的复合物。由于 cAMP 的结合，调节亚单位的构象发生变化，致使复合物解离，从而释放和激活了催化亚单位(图 13-28)。

所有的动物细胞中都存在着依赖 cAMP 的蛋白质激酶,它们可能与 cAMP 引起的所有效应有关。虽然就多数情况来说,这些蛋白质激酶的作用底物都尚属未知,但有一点是已清楚的,即在不同类型的细胞中其作用底物各不相同,从而也阐明了为什么因靶细胞不同 cAMP 的效应也有变化。在细胞内有多种蛋白质激酶,而只是其中的一小部分受到 cAMP 的调控。尽管也有些是受到 Ca^{2+} 或 cGMP 的调控(见下述),不过其大部分的调控机制还不能确定。

cAMP 也调控着细胞蛋白的脱磷酸作用¹⁸

cAMP 引起的细胞效应通常是一时性的,这意味细胞必然具有一种途径,使通过依赖 cAMP 蛋白质激酶磷酸化了的细胞蛋白质能再脱磷酸。这种脱磷酸作用是由磷蛋白质磷酸酶所催化,而该酶本身又是受 cAMP 调控的,在骨骼肌细胞中,单一种磷酸酶就对在糖原代谢过程中由 cAMP 调控的三种关键酶具有脱磷酸作用,包括磷酸化酶激酶、糖原磷

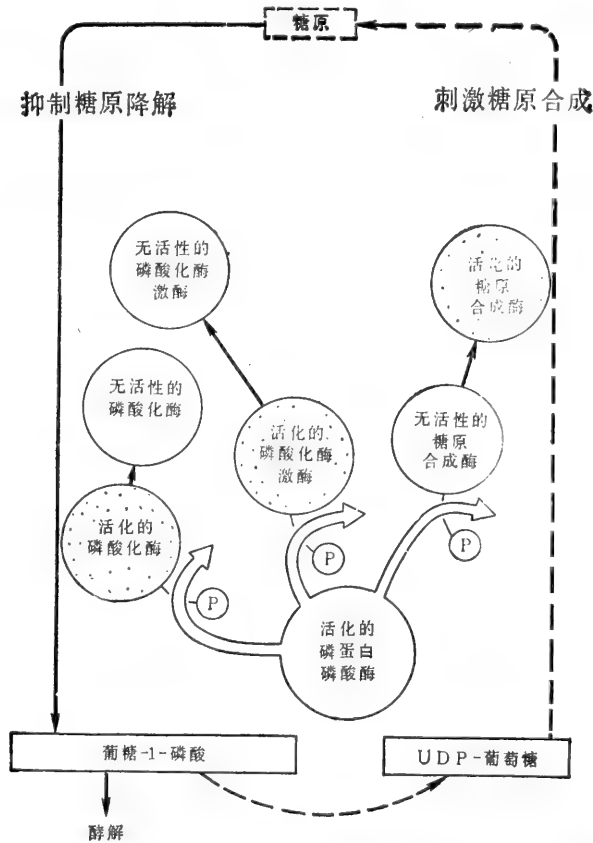


图 13-29 当 cAMP 的含量下降时,单一种磷蛋白磷酸酶就能对由 cAMP 调控的糖原降解级联反应过程中的三个关键酶进行脱磷酸化反应。这些脱磷酸化反应使 cAMP 引起的磷酸化反应逆转,使那些与糖原降解有关的酶失活,糖原合成酶活化。相反,在 cAMP 含量增高的情况下,蛋白质激酶活化,反应又逆转,磷蛋白磷酸酶被抑制。

酸化酶和糖原合成酶(图 13-29)。这些脱磷酸反应倾向于抵消由 cAMP 引起的蛋白质磷酸化反应。然而,依赖 cAMP 的蛋白质激酶的被激活时,它也能使专一的磷酸酶抑制

蛋白磷酸化,从而使其活化。这种被激活的抑制蛋白与磷蛋白磷酸酶相结合,起到灭活这种酶的作用(图13-30)。对糖原的合成和降解,通过激活磷酸化酶激酶并同时抑制磷蛋白磷酸酶的颡颡作用,要比只用其中任何一种途径来调节 cAMP, 具有更强的效应。

以磷酸化酶激酶为例,阐明为什么酶被细胞外化学信号激活只是瞬时的¹⁸

如上所述,在 cAMP 的含量增长时,磷酸化酶激酶通过使糖原磷酸化酶的磷酸化,降解肌细胞中的糖原。磷酸化酶激酶是由多个亚单位组成的,但实际上只是其四个亚单位中的一个具有催化磷酸化反应的作用;其余的三个为调节亚单位,并使酶复合体能为cAMP和 Ca^{2+} 所激活。这些亚单位分别被命名为 α 、 β 、 γ 和 δ , 并且每一个亚单位在酶复合体中存在四个拷贝。 γ 亚单位具有催化活性; δ 亚单位是能结合 Ca^{2+} 的多肽钙调素,与酶的 Ca^{2+} 依赖性有关; α 和 β 亚单位是 cAMP 介导的调节作用的靶子,两者都能被依赖 cAMP 的蛋白质激酶磷酸化(图13-31)。

cAMP 通过 β 亚单位的磷酸化,使磷酸化酶激酶复合体活化。随后 α 亚单位也较缓慢地被同样的依赖 cAMP 蛋白质激酶磷酸化。有人提出,由于 α 亚单位磷酸化改变了 β 亚单位的构象,有助于被磷蛋白磷酸酶很快地脱磷酸,从而使磷酸化酶激酶失活(图13-32)。因此, cAMP 浓度增加所引起的磷酸化酶激酶活化(并因而它的底物糖原磷酸酶活化)的时间是有限的(约1或2分钟)。

只有少数蛋白质按上述比较简单的相互作用方式构成了生物“开关”,即突然开启隔一定时间后又再关闭。在所提出的这样的循环中,依赖 cAMP 的蛋白质激酶具有双重作用:首先是通过 β 亚单位的磷酸化活化了磷酸化酶激酶,然后再借助 α 亚单位的磷酸化,决定磷酸化酶激酶因脱磷酸而失活的时间。

蛋白质可逆的共价变化调控着大量的细胞活动过程¹⁹

目前已知有25种以上的酶是受磷酸化和脱磷酸作用的调控的,同时根据双向凝胶电泳也显示在真核细胞中有几百种磷酸化蛋白质,这些现象表明磷酸化蛋白质必然为数甚多。随着对磷酸化和脱磷酸反应机制的深入了解,又发现了一些其它可逆的共价变化调控着蛋白质的活性,例如其中的甲基化和去甲基、乙酰化和去乙酰、尿苷化和去尿苷、腺嘌呤

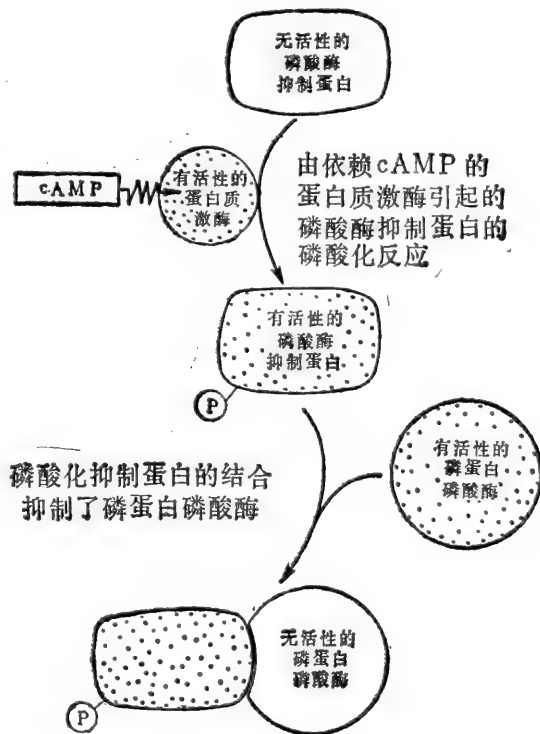


图13-30 图示 cAMP 如何抑制磷蛋白磷酸酶,否则由 cAMP 所引起的磷酸化反应将立刻逆转。依赖 cAMP 的蛋白质激酶使磷酸酶的抑制蛋白磷酸化,从而使其结合并抑制磷蛋白磷酸酶。

呤化和去腺嘌呤,以及 SS 和 SH 的互转化作用等。可逆的共价变化是如此之多,似乎大部分生物反应过程中催化限速步骤的细胞蛋白都受其中的某一途径所调控。鉴于已知不单是在糖原的代谢过程存在着复杂的反馈调控环,显然阐明这些重要调控的机制和动力学,是向人们提出的一个难以对付的挑战。

Ca²⁺ 改变着细胞内 Ca²⁺ 结合蛋白的构象²⁹

由于胞液中游离 Ca²⁺ 的浓度通常低于 10⁻⁷mol/L,即使细胞为 Ca²⁺ 内流所激活时也往往不会超过 10⁻⁵mol/L,因而细胞内任何作为依赖 Ca²⁺ 调控的直接靶子的结构,其结合 Ca²⁺ 的亲合力必然约为 10⁻⁶ mol/L。此外,由于胞液中游离 Mg²⁺ 的浓度比较恒定在 10⁻³ mol/L,所以 Ca²⁺ 结合部位对 Ca²⁺ 的选择性结合能力,必定比对 Mg²⁺ 的结合能力至少强 1 000 倍。事实上,许多专一的能结合 Ca²⁺ 的蛋白质是符合这些条件的。

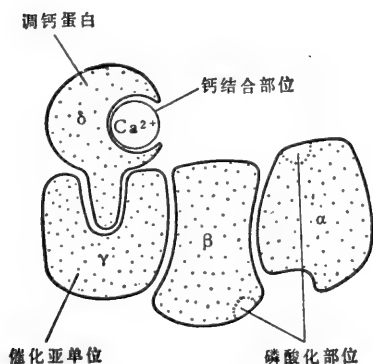


图13-31 哺乳动物肌细胞磷酸化酶激酶四个亚单位粗略的示意图。 γ 亚单位具有活性酶的催化活性, α 、 β 和 δ 亚单位分别介导着 cAMP、Ca²⁺ 对酶的调控作用。实际的酶复合体由每个亚单位的四个拷贝组成。

在此类蛋白质中,骨骼肌细胞的肌钙蛋白 C 是首先被发现的和得到充分鉴定的。第十章已经讨论了它在肌肉收缩中的作用。在所有已经检测过的动植物细胞中,均存在一种有关的 Ca²⁺ 结合蛋白,称作钙调素。在进化过程中,它具有高度的保守性,似乎是一种普遍存在的细胞内 Ca²⁺ 受体,它在由 Ca²⁺ 调控的已经在真核细胞中研究过的大部分活动过程中都起作用。钙调素是由 148 个氨基酸残基组成的单链多肽,其顺序与肌钙蛋白 C 的相关,因此推测肌钙蛋白 C 是钙调素的特异形式。如同肌钙蛋白 C,钙调素具有 4

个高亲和力的 Ca²⁺ 结合部位,并在与 Ca²⁺ 结合后发生很大的构象变化。

已知由依赖 Ca²⁺ 的钙调素调控的许多细胞蛋白中有环核苷酸磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶、膜结合 Ca²⁺-ATP 酶、磷酸化酶激酶以及肌肉和非肌肉细胞中的肌球蛋白轻链激酶。一个典型的动物细胞所含有的钙调素分子的数目要超过 10⁷, 多达细胞总蛋白量的 1%。有些钙调素是与有丝分裂纺锤体、肌动蛋白丝束和 10nm 中等纤维相结合,因此认为它可能也调控着这些结构的活活动。

Ca²⁺ 引起的钙调素变构活化与 cAMP 引起的蛋白质激酶变构活化相似。就磷酸化酶激酶来讲,钙调素已证明是一个恒定的调节亚单位(见图 13-31)。不过在多数情况下, Ca²⁺ 的结合使游离的钙调素能与细胞中各种靶蛋白相结合(图 13-33)。例如,依赖于 Ca²⁺ 的环核苷酸磷酸二酯酶、腺苷酸环化酶和有些膜结合 Ca²⁺-ATP 酶等的活化,都是由于 Ca²⁺ 诱导 Ca²⁺-钙调素复合体与这些酶的一个调节亚单位相结合的结果。因此,靶细胞对胞液内游离 Ca²⁺ 浓度增加所起的反应决定于细胞内存在着哪些钙调素-结合靶蛋白。由于钙调素可以因每个分子所结合的钙的数目而具有多种形式的构象,所以有可能这些不同的构象是与细胞中不同的靶蛋白质起反应。这样,钙调素就能够把细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的量的差异转变为不同的细胞反应。

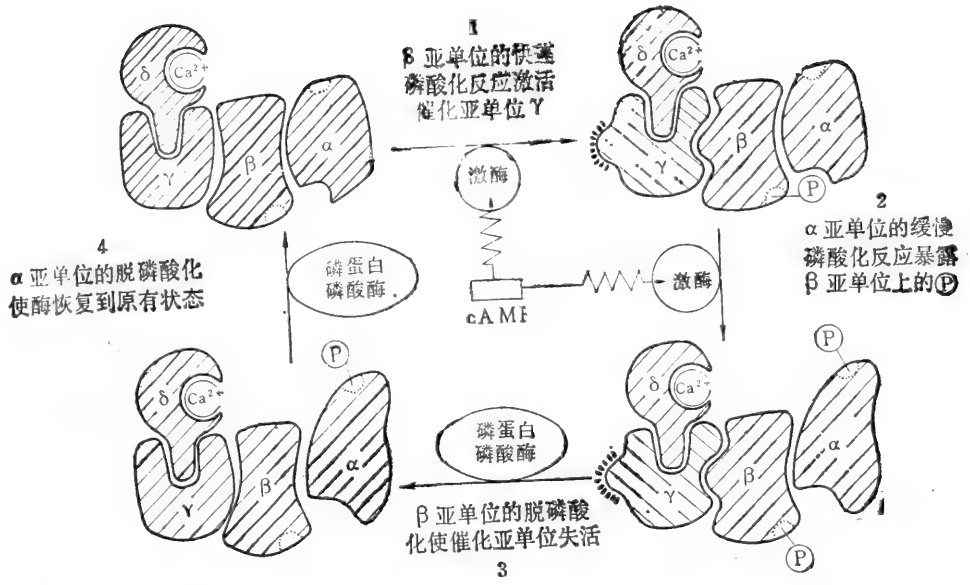


图 13-32 在细胞内 cAMP 浓度增加后磷酸化酶激酶活化和失活的一种假设机制。图示 Ca^{2+} 已与 δ 亚单位结合,而只有与 Ca^{2+} 结合之后, γ 亚单位才能为蛋白质激酶所活化。

由 cAMP 和 Ca^{2+} 调控的细胞活动在很大程度上是重叠的,两者在细胞内的浓度也往往为同一种细胞外信号发放分子所改变。这两种细胞内信号发放途径,至少能以两种方式相互作用:(1) 细胞内 Ca^{2+} 和 cAMP 能相互影响,例如,钙调素能调控一些合成和降解 cAMP 的酶,而依赖 cAMP 的激酶能磷酸化 Ca^{2+} 通道或泵;(2) 同一种蛋白质能接受 Ca^{2+} 和 cAMP 两者的调控,例如,磷酸化酶激酶能被依赖 cAMP 的蛋白质激酶激活,也能被 Ca^{2+} 结合的钙调素激活(见图 13-31)。

cGMP 是否具有细胞内第二信使的作用? ²¹

在动物细胞内还存在着另一种环核苷酸——环鸟苷一磷酸(cGMP)(图 13-34),但它的浓度比 cAMP 要低 10 倍;尽管 cGMP 在细胞内也具有信使的作用,但与 cAMP 的作用略有区别。能把 GTP 催化为 cGMP 的鸟苷酸环化酶不同于腺苷酸环化酶,它并不总是结合在膜上,在破碎的细胞中,鸟苷酸环化酶也并不像腺苷酸环化酶那样能被激素或其它细胞外信号发放分子激活。因此,当完整的细胞对许多不同信号发放配体作出反应的期间,虽然 cGMP 增加,但并不认为是这些反应的细胞内最初的介导因子。

cGMP 的一个功能可能是调变由于细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加而引起的一些反应。胞液中游离 Ca^{2+} 浓度的这种增加,或通过激活鸟苷酸环化酶或通过抑制降解 cGMP 的 cGMP 磷酸二酯酶,有助于 cGMP 水平的提高。如同 cAMP 一样, cGMP 首先是通过激活依赖 cGMP 的专一蛋白质激酶而起作用的。

细胞外信号通过第二信使和酶的级联反应而大为扩增

利用第二信使不仅使细胞表面受体能将细胞外信号向内传递,同时也提供了极大扩增初始信号的条件。我们已经了解,当配体结合在受体上并激活腺苷酸环化酶时,每个受

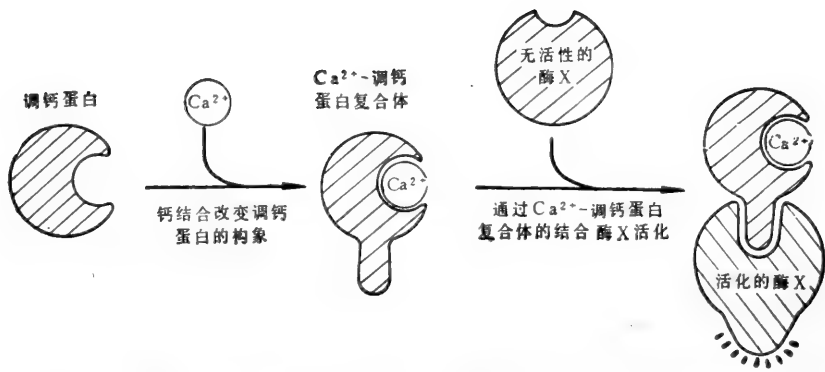


图 13-33 示意图表明,胞液游离 Ca^{2+} 浓度增加后如何间接地通过改变钙调素的构象来激活酶。为简便起见,图中每个钙调素只画出一个 Ca^{2+} 结合部位,而实际上已知它有四个 Ca^{2+} 结合部位。

体蛋白分子能激活多个结合 GTP 的蛋白质分子,因而也激活多个腺苷酸环化酶;接着,每个环化酶分子又能将大量的 ATP 分子催化为 cAMP 分子。同样,当配体结合在受体上并开放 Ca^{2+} 通道时,大量 Ca^{2+} 进入胞液中。这些第二信使本身具有变构效应分子的作用,激活诸如蛋白质激酶等专一的蛋白质,后者又将大量底物分子转变(要是激酶则借助磷酸化作用)为第三信使,等等。在其进程中,酶的级联反应扩增,从而使一个细胞外发放信号的分子能在靶细胞内产生数以千计的效应分子(图 13-35)。

级联反应除了有扩增作用以外,还使许多调节蛋白顺次地相连接,提供了很大的调控潜能。在顺序中,每种蛋白质都可以成为代谢控制的单独靶子;例如,骨骼肌细胞的糖原降解级联反应就是如此。

这种剧烈的代谢级联反应需有严密的调控。所以,细胞具有快速降解 cAMP、缓冲和隔离 Ca^{2+} 的高效机制,以及一旦反应酶和转运蛋白活化,有着使之迅即失效的机制,就都不奇怪了。不过快速清除或灭活信号发放分子,对于快速开放反应如同对于关闭反应一样重要,这一问题往往未予重视。

如果分子经持续快速降解或清除,其浓度能迅即发生变化²²

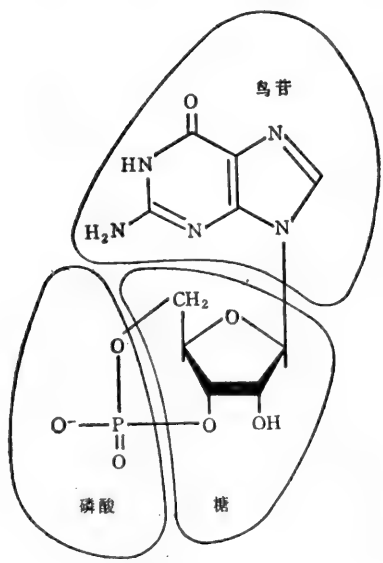


图 13-34 cGMP

的浓度对细胞具有重要意义,那末这种分子就必须持续地快速降解,或以其他方式清除。例如,每个细胞假设含有两种分子——X 和 Y,在正常情况它们的浓度维持在 1 000 个分子水平。X 分子的“更新速率”低,按每秒 10 个分子的速率合成和降解;而分子 Y 的“更新速率”比 X 分子高 10 倍,按每秒 100 个分子的速率合成和降解。如果分子 X 和 Y 的合成速率均增加 10 倍,而降解速率不变,则一秒钟时每个细胞中 Y 分子的浓度已增长近 900

个分子 ($10 \times 100 = 100$), 而X分子的浓度仅有90个分子。实际上, 分子的合成速率增长或下降之后, 要达到新的平衡浓度的50%水平所需的时间相当于该分子的正常半衰期, 即如果在所有合成全部停止的情况下, 其浓度下降一半所需的时间(图13-36)。

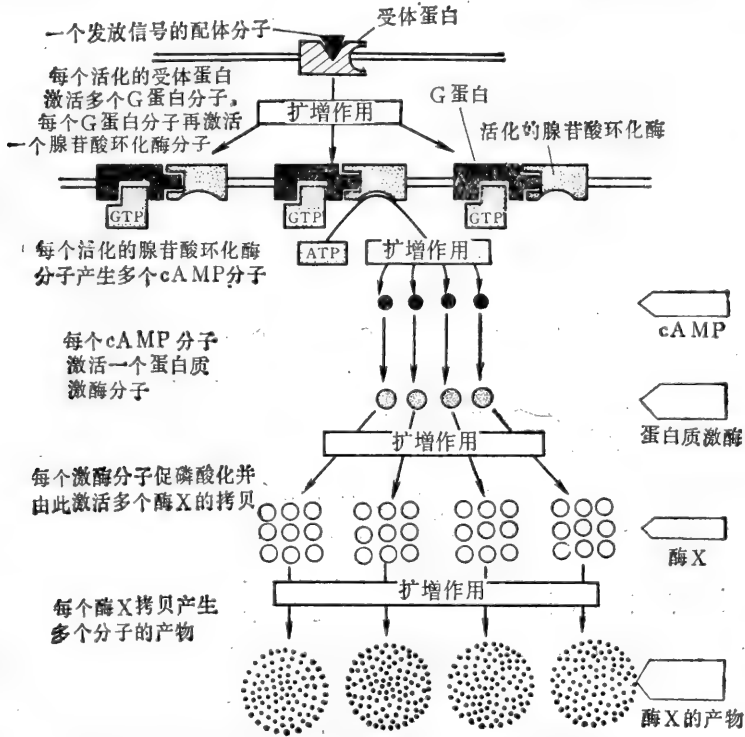


图 13-35 除了将细胞外信号转导为细胞内信号以外, 细胞表面受体与激活的腺苷酸环化酶的结合还大大地扩增了最初的信号。

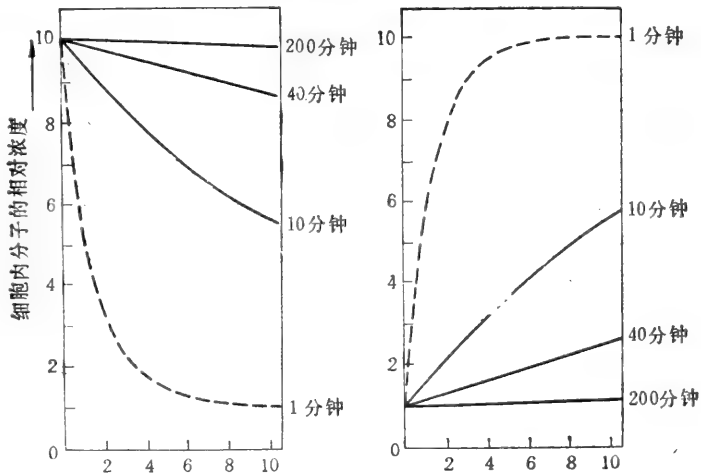


图 13-36 图中预示了不同转换时间的细胞内分子浓度的相对变化速率, 它们的合成速率是以 10 为系数、或减少 (A) 或增加 (B)。无论是在合成速率增加或降低的情况下, 凡细胞内降解很快的分子 (虚线), 其浓度一般也变化很快, 而那些更新慢的分子, 其浓度的变化则按比例减缓。图右侧的数字代表每个不同分子的半衰期。

这些原则同样适用于蛋白质和小分子,以及细胞外空隙和细胞内的分子。许多细胞内快速降解或共价改变的蛋白质,其半衰期为 10 分钟或者更低;它们多数是一些具有重要调控作用的蛋白质,其浓度是以改变合成速率而达到迅速调节的。

细胞能逐渐或骤然地对信号作出反应²³

有些对信号发放配体的细胞反应是渐进性的,并随着配体浓度的增加而成比例地增强。甾体激素引起的反应往往是这种型式,这大概是由于每个受体蛋白只结合一个甾体激素分子,而染色质上的每个专一的结合部位又只结合一个激素-受体复合体的缘故。当激素的浓度增加时,激素-受体复合物的浓度亦成比例增高,与染色质专一部位的结合量也同样增加,因此引起的细胞反应是渐进的和呈线性的。

然而另一些对信号发放配体的反应在其浓度增加时开始得较为骤然,有一些甚至是近于“全或无”方式的。在后一情况中,如果配体的浓度未达到阈值,就检测不到任何反应,而当配体的浓度达到阈值时,则产生最大限度的反应。例如,有些生长因子就是具有“全或无”的信号效用,作为细胞分裂的前奏通知细胞开始复制 DNA。这种对分级信号开关式的反应的分子基础是什么?

“协同作用”可能是引起“全或无”反应的一种作用机制。在这种作用中,一个以上的细胞内效应器分子(或效应器-分子-受体复合体)须与一些大的靶分子相结合,才能引起反应。例如,在有些甾体激素诱发的反应中,似乎需要同时有一个以上的激素-受体复合体结合在染色质的专一部位,才能激活特定的基因。结果,随着激素浓度的增加,基因活化骤然开始,好像只需一个结合复合体就能引起基因活化(图 13-37)。

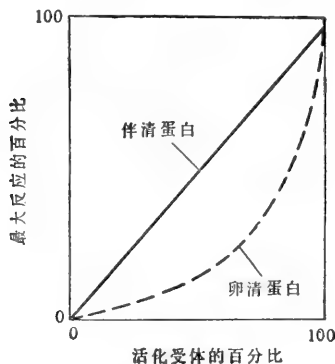


图13-37 鸡输卵管细胞对雌二醇作出的反应。当活化的雌二醇受体进入细胞核,打开了几个不同基因的转录开关活动。图中显示了其中两个基因活动的剂量-反应曲线,其一编码卵清蛋白,另一编码伴清蛋白。伴清蛋白的线性反应曲线表明,每个伴清蛋白基因活动是由单个活化的受体开启的。相反,卵清蛋白的延缓反应曲线表明,必须有一个以上的活化受体(在本例中为 2 个)同时结合在卵清蛋白基因上,才能发动它的转录(引自 E. R. Mulvihill and R. D. Palmiter, *J. Biol. Chem.* 252:2060-2068, 1977)

钙调素所引起的活化反应,也有类似协同作用的机制:因为钙调素需与两个或更多个 Ca^{2+} 结合,才具有活化的构象;当细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加仅 10 倍,钙调素活性的增加可达 50 倍。随着协同作用分子数量的增加,此类协同反应也更为明显,但是当协同作用分子过于大量时,就又会全或无型的反应(图 13-38 和 13-39)。

细胞借以能对逐渐增加的信号发放配体作出全或无反应的另一机制是,细胞产生与细胞内效应器分子紧密结合的竞争性抑制因子,致使效应器分子不能与靶子结合,直到效应器分子数超过抑制因子的时候。这种作用形式曾用来解释细胞分裂的某些方面的调控作用。

第三种可能的机制涉及“加速正反馈”原理。神经和肌细胞就是以此方式产生全或无动作电位,对神经递质作出反应。例如,神经-肌连接处由于乙酰胆碱受体的活化,使肌细胞膜上阳离子通道开放。其结果是使膜局部去极化的 Na^+ 净内流。当去极化反应达到阈值水平时,在同一膜区域中的一些依赖电压的 Na^+ 通道开放,进一步引起 Na^+ 内流,并进一步引

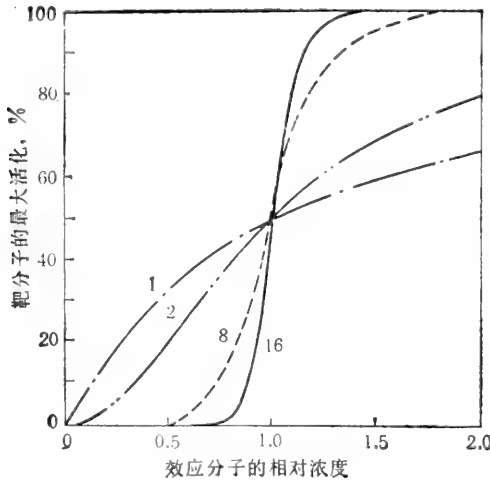


图13-38 表明若要多个效应分子同时与一个靶大分子结合时所导致的“全或无”活化曲线有多陡。这些曲线分别表示如果活化作用需要同时结合1、2、8和16个效应分子所预期的结果。

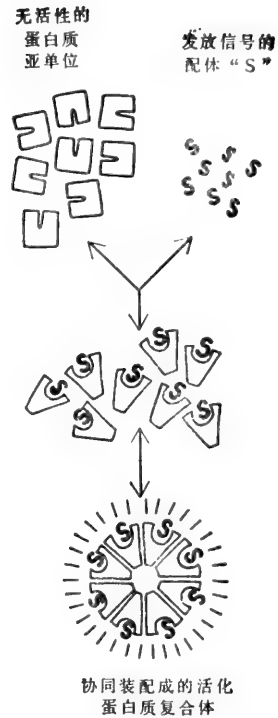


图13-39 反映高阈值反应的一种信号发放机制的高度示意图。这里表明需有8个信号发放配体分子同时结合在一起,才形成一个活性蛋白质复合体。

起膜的去极化,致使更多的 Na^+ 通道开放。去极化波(动作电位)就是这样地扩展到整个肌细胞膜。

这种类型的加速反馈机制可能涉及一种具有酶特性的受体蛋白,而不是离子通道。假定一种特定的信号发放配体激活了一种酶,通过酶反应所产生的两个或更多分子又反过来与该酶结合,并进一步使之活化(图13-40)。其结果将是,酶产物的浓度非常缓慢地上升,直到配体浓度达到一定阈值水平,产物已经聚集足够以加速方式激活酶时,酶的产物浓度才突然增加到很高的水平。就这样,细胞能将一种信号发放配体浓度的逐渐变化,改作为特定酶产物水平的开关样的变化。从原理上看,这种类型的机制比较简单,为使信号发放配体产生全或无反应,它无需有一定数量结合部位的协同相互作用。

如果在配体激活一种酶的同时,又将另一种具有催化对抗反应的酶抑制住,也会大大加强反应。在讨论骨骼肌细胞中糖原降解的有关内容时,已例举过这类共同的调控作用,即细胞内 cAMP 的增多一方面活化了磷酸化酶激酶,另一方面又抑制了具有相反作用的磷酸蛋白磷酸酯酶。

小结

从细胞内连续快速地清除游离 Ca^{2+} 和 cAMP , 使得细胞在对信号作出反应时有可能快速地增加和降低这些细胞内介导因子的浓度。 cAMP 的水平增高能通过促进依赖

cAMP 的蛋白质激酶对一些专一靶蛋白的磷酸化而影响细胞。这些影响是可逆的，因为在 cAMP 的水平下降时，磷酸化的蛋白质很快发生脱磷酸。游离 Ca^{2+} 水平的增加同样以

结合并改变钙调素构象的途径来影响细胞； Ca^{2+} -钙调素复合体依次又激活许多不同的靶蛋白，包括依赖 Ca^{2+} 的蛋白质激酶。由于各类细胞都具有一套由依赖 cAMP 的蛋白质激酶和（或）钙调素调控的特征性的靶蛋白，所以每一种类型的细胞以不同的且具特征性的方式对细胞内的 cAMP 或 Ca^{2+} 水平的变化作出反应。因此，通过用 cAMP 或 Ca^{2+} 作为第二信使，不仅细胞外信号被大大扩增，且对每种细胞都是专一的。

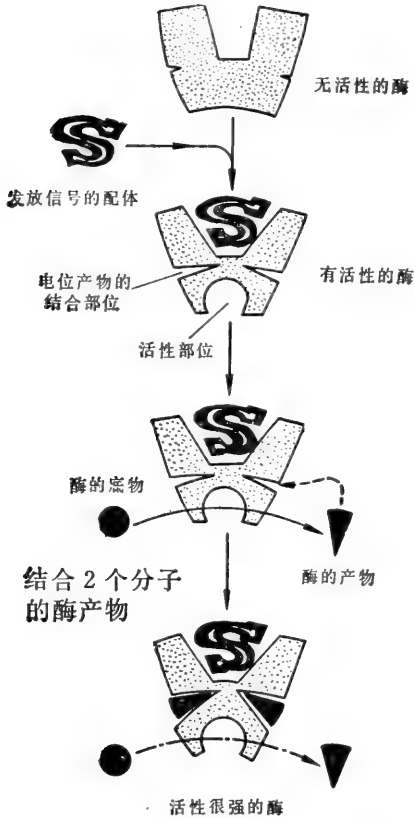


图13-40 “加速正反馈”机制的示意图，描述见正文。

靶细胞的适应

靶细胞与信号发放配体的长期接触，往往使靶细胞对配体的反应能力消失。这种适应或脱敏作用是一种可逆的过程。由于靶细胞的适应特性，许多细胞对化学信号浓度的变化而不是其绝对浓度特别敏感。脱敏的靶细胞与正常敏感的靶细胞究竟有何区别？现在还没有简单的答案。在有些情况下，脱敏作用是由于专一的细胞表面受体蛋白数量减少或失活；而在另一些情况下，则是由于随着受体的活化，转导信号所涉及的蛋白质发生了变化。

有些细胞是通过内吞其表面受体而成为脱敏²

结合在靶细胞表面受体上的蛋白质激素和生长因子，往往由于细胞受体的内吞作用而被消化。内吞小泡一般是将其内含物传递给溶酶体，因而配体和常与其结合的受体就为水解酶所降解。这一过程不仅代表信号发放配体解离的主要途径，同时在调控靶细胞表面某些受体蛋白的浓度方面也具有重要作用。虽然细胞表面受体的降解和取代是连续不断地进行着，但在没有配体的情况下，它们的半衰期通常只有一天左右的时间。有些配体通过诱导内吞作用，使受体的降解速率明显增加，因此在配体高浓度的情况下，细胞表面受体的数目也逐渐减少。结果是靶细胞对配体的敏感度也随着下降。这类靶细胞的脱敏作用被称作受体-下降调控作用。

饮食过量所引起的肥胖是受体下降调控作用的一个有趣的例子。他们有着慢性的高血糖水平，结果是血胰岛素水平的持久上升。这类个体的胰岛素靶细胞对胰岛素较不敏感，因为靶细胞的胰岛素受体量少。这样的个体正常时是以分泌较多的胰岛素作为代偿作用，但是在胰岛素贮备有缺陷的肥胖症个体中，因发生胰岛素不足而导致糖尿病。

长时间的配体结合会使有些细胞表面受体可逆地失活²³

在具有异常高浓度的,例如肾上腺素或乙酰胆碱等小分子的信号发放配体的情况下,往往出现另外一种类型的细胞表面受体调控作用,不是诱导配体-受体复合体的内化(internalization)和消化,而是这些配体引起受体可逆性的失活。例如,将蛙红细胞放在含高浓度的肾上腺素环境中,红细胞对肾上腺素的敏感度和结合肾上腺素的能力两者都逐渐(数小时之后)下降。这种脱敏现象不可能是配体所诱发的受体内存和消化的结果,然而因为(1)在游离的红细胞膜中也发生这类情况;(2)即使没有新蛋白质合成,这些细胞仍逐渐恢复对肾上腺素的敏感度。肾上腺素与受体的结合,似乎导致了受体蛋白长时间而又可逆的构象变化;这种变化在配体与之解离后,仍长时间地阻碍蛋白质受体与配体再结合。目前还不清楚这种失活是否涉及受体蛋白可逆的共价变化。

这种细胞表面受体的可逆失活现象,并不总是涉及受体对配体的结合能力消失。在神经-肌连接点,乙酰胆碱与骨骼肌细胞受体的长时间结合,会使受体发生失活构象变化,但这类无活性的受体仍能与乙酰胆碱结合(甚至具有比正常受体更高的亲和力)。然而这些与乙酰胆碱结合的失活受体不像正常受体那样,不能打开肌细胞膜上的阳离子通道,从而也不能刺激肌肉收缩。尽管受体的活化和阳离子通道的开放出现在乙酰胆碱结合后的数毫秒钟之内,而受体的失活出现时间较慢,需数秒至数分钟。

图 13-41 总结了配体使受体失活的三种不同方式。虽然这些方式都被认为是靶细胞借以降低它对特定配体的反应性的机制,但它们可能还提供其它的对配体作出反应途径。例如,虽然失活的乙酰胆碱受体不能刺激肌肉收缩,但在理论上它能产生一种细胞内介导因子,调控肌细胞的其他性能。

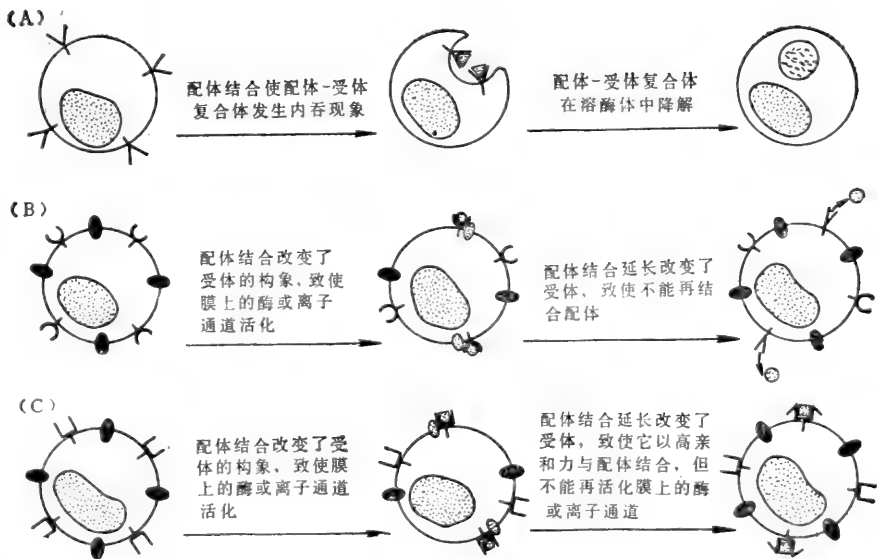


图 13-41 受体能被高浓度配体灭活的三种不同方式。配体结合导致配体-受体复合体内吞,并在溶酶体中降解(A)。配体的长期结合,改变了受体的构象,致使不能再结合配体(B),或结合配体而不能活化膜结合酶或离子通道(C)。

吗啡诱发的靶细胞的脱敏作用并非是受体失活的结果²⁶

并不是所有靶细胞的适应都是因为配体诱发的受体降解或失活。例如，吗啡瘾者大脑中的靶细胞变得对吗啡(图 13-42)不敏感，但这些靶细胞的功能性细胞表面吗啡(鸦片样的)受体水平仍是正常的(这一点说明了为什么消除吗啡患者的疼痛，或使之获得像正常人同样的舒适感，需要给予较正常人高得多的剂量)。如果吗啡导致的脱敏作用与受体蛋白的变化无关，那末又是什么机制呢？鉴于脱敏作用的机制还不清楚，使用体外培养的对吗啡敏感的神经细胞株研究这一问题，是经得起验证的。

这种细胞表面的吗啡受体通过 GTP 结合蛋白与腺苷酸环化酶功能性地偶联，很像肌细胞中肾上腺素受体与腺苷酸环化酶偶联的情况。不过吗啡诱导的受体活化，导致腺苷酸环化酶失活，由此使细胞内 cAMP 水平下降。如果将细胞培养在吗啡浓度恒定的环境中，结果细胞出现脱敏，从而腺苷酸环化酶的活性和 cAMP 的浓度又恢复到正常水平。这种细胞的适应，并不伴有细胞表面吗啡受体的量的变化，同时也阻碍这些细胞对更高浓度的吗啡作出反应。如果将培养液中的吗啡去除，可以使腺苷酸环化酶的活性明显增长，致使细胞内 cAMP 的含量达到高水平。而这种靶细胞内所发生的 cAMP 的大量增长，被认为与吗啡瘾者在注射时所体验的极难受的“冷火鸡”反应(忧虑、出汗、震颤等)有关。

我们怎么会有一些细胞具有像吗啡(源自罂粟种子)这样药物的受体呢？药理学家们长期以来就怀疑吗啡具有模拟某些能调控痛觉和情绪的内源信号发放分子的作用。1975 年从猪脑中分离到两种具有吗啡样活性的五肽化合物，称为脑啡肽，不久又从脑下垂体分离到具有同样活性较大的多肽称为内啡肽。所有这些所谓的内源性鸦片都具有一个相同的四氨基酸顺序，也都能与结合吗啡的同样的细胞表面受体(以及有关的那可汀受体)相结合。但是它们并不像吗啡，而是释放之后就很快被降解，因此不会大量聚集到足以引起在吗啡瘾者中所见的耐受性。

单细胞有机体的化学发放信号提供了有用的研究模型²⁷

多细胞动物细胞间的化学信号发放机制，可能是从单细胞有机体对周围化学变化环境的反应机制进化而来的。实际上这两类有机体都应用着同样的细胞内介导因子。

有些细菌(如大肠杆菌)在缺乏葡萄糖的情况下，会增加合成某些专一的酶，以便利用外环境中的其它能源。这种反应是由增加细胞内 cAMP 的水平来介导的。这些细菌中 cAMP 的作用方式，据认为与甾体激素在许多动物细胞的作用方式相类似：它与细菌中的专一受体蛋白结合成复合体，然后结合在细菌 DNA 的专一部位上，从而增加为所需酶编码的专一基因的转录。

当单细胞草履虫(图 13-43)游走到巨大障碍物时，其纤毛便反向扑打。这种反应是通过细胞膜 Ca^{2+} 通道一时性的开放，并使 Ca^{2+} 内流而实现的。细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加，使纤毛反向运动，因而细胞向后游走，离开了障碍物。数秒钟之内 Ca^{2+} 又从胞液向外泵出，使细胞内的 Ca^{2+} 浓度水平恢复正常，细胞又重新向前游动。有些突变体缺乏这类受控 Ca^{2+} 通道，致使它们只能前游，不能反向游走，因此被称为“卒”(如同国际象棋中的卒只能向前)突变体。

在细胞外信号引起的一些单细胞有机体反应中，研究得最透彻的是趋化性反应，细胞趋向或离开某种专一化学信号的运动。我们已在其他章节简要地讨论了具有细胞结构的

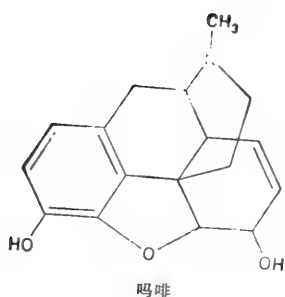


图13-42 咖啡因的结构

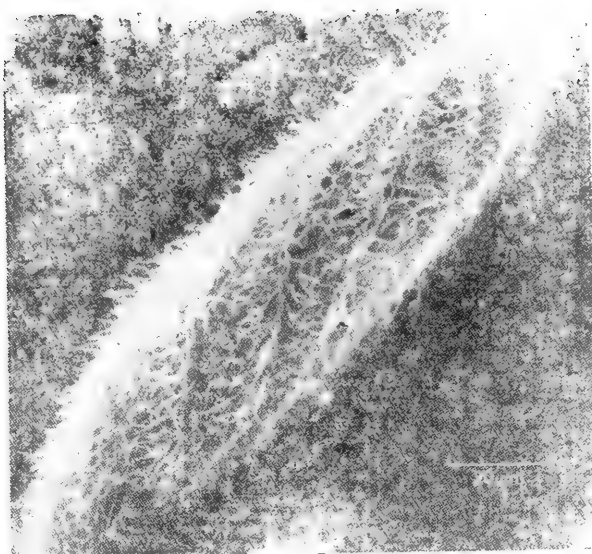


图13-43 草履虫的扫描电镜照片。这些有机体是以纤毛的同步扑打而游走的。(Sidney Tamm赠)

盘基网柄菌的趋化性。由于从细菌中已经得到了大量的突变体，使得我们有可能从中获得大量有关原核细胞趋化性分子机制的重要资料，特别是有关细胞适应的机制。此外，日益增多的证据表明，在细菌中所看到的某些适应机制，同时调控着脊椎动物白细胞的趋化性反应。

细菌的趋化性是一种简单的智力行为²⁸

运动的细菌会朝向具有较高浓度的营养物质例如糖和氨基酸(引诱剂)的方向游动，而游离各种较高浓度的有害化学物质(拒斥剂)(图 13-44)。这种称为趋化性的简单而智慧的行为，在大肠杆菌和鼠伤寒杆菌已作了大量的研究。

细菌是借助鞭毛游动的，其鞭毛结构较真核细胞的简单得多(见 541 页)，只是由单一类型的蛋白质亚单位组成的螺旋管。每根鞭毛靠了一根短而又能弯曲的钩子，把鞭毛的基底部连接在细胞膜中的一小块蛋白质盘状结构上。令人难以置信的是这种盘状结构看来是微“发动机”的一部分，后者利用贮存在跨膜的 H^+ 梯度中的能量，来快速地旋转和弯曲鞭毛(图 13-45)。

由于细菌表面的鞭毛具有一定的“习惯癖”，所以它们的旋转方向就使其产生差别。逆时针方向的旋转使所有鞭毛扭成一束，致使细菌朝着一个方向游动。顺时针方向的旋转使鞭毛散开，致使细菌杂乱无序地滚翻(图 13-46)。在不存在任何刺激的情况下，盘状结构的旋转方向每隔数秒钟便更换一次，产生一特征性的运动型式，平稳的直线游动经常因翻滚引起的方向突然改变而中断。

正常的细菌游动行为，是受到结合在专一受体蛋白上的化学趋化性“引诱剂”或“拒斥剂”所左右的，并且通过延长或缩短鞭毛旋转方向连续变化之间间隔的时间，来影响细菌翻滚的频率。在细菌游向高浓度引诱剂时，其翻滚的频率比反向游动或者无梯度存在时都要低。由于细菌沿梯度向上游动时，朝着高浓度引诱剂平稳游动的时间长些，致使它逐

渐趋向引诱剂(图 13-47)。同样在遇到高浓度的拒斥剂时,细菌翻滚的次数增加,结果逐渐远离拒斥剂。

在其自然环境中,细菌在由一处游向另一处的整个时间中,不断地监视着引诱剂或拒斥剂的浓度变化,并对这些化学物质的空间梯度作出反应。监视空间的梯度要涉及到细

胞能对它两端的浓度作出比较,这对体形微小的细菌是非常困难的。在实验室中,通过突然加入或去除培养液中的化学物质,可以得到引起细菌游动不断变化的时间。如以这种方式加入引诱剂,则如预期的那样,翻滚很快地受到抑制。但是经过一段时间之后,即使仍存在引诱剂,翻滚的频率仍恢复到正常的水平。这一脱敏作用或适应过程只是针对上述特定的引诱剂,而对其它无关的引诱剂,细菌仍能作出反应。只要没有引诱剂梯度,细菌就一直处于适应状态;去除引诱剂后,能短时间地加强翻滚,直至再对新水平的引诱剂产生适应。适应是趋化性反应必不可少的部分,因为它使得细菌对引诱剂浓度的变化而不是对稳定的水平作出反应,所以使它们游动时间延长直到泳向适宜的方向。

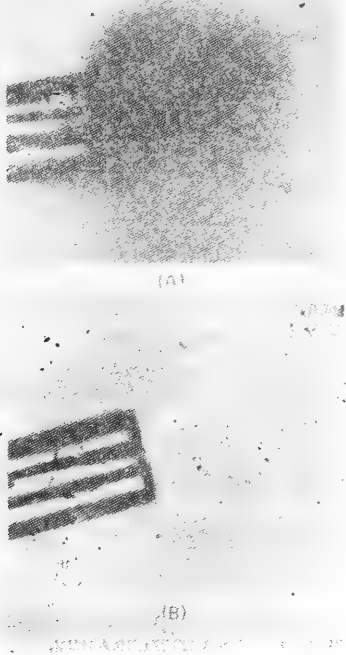


图13-44 有关鼠伤寒杆菌(*Salmonella typhimurium*) 趋向含有丝氨酸的毛细玻管(A)和排离含有酚的毛细玻管(B)的照片。摄影时间是在毛细玻管插入含菌培养皿5分钟后。这种毛细玻管检测法是一种显示细菌趋化性的简单方法。(引自 B. A. Rubik and D. E. Koshland, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 75:2820-2824, 1978)

胞能作出反应。这是由于,为该突变种与特异化学物质有高亲和力的专一周质受体蛋白编码的20个或更多基因中的一个发生了缺损。这些细胞周质受体蛋白呈可溶性,分布在细胞周质空隙,即外膜与质膜之间,它们与具有协助运转特异化学物质穿越质膜的蛋白质相同。虽然转运(化学物质)和趋化系统使用的是相同的起始受体蛋白,但其它的组成不同,如有的突变所表明

的转运功能失灵,但并不影响到趋化性;或者转运功能正常,而趋化性反应消失。第二类为多元非趋化性突变种,其细胞表面的多种受体不能对化学物质作出反应,而其余的受体仍能正常反应。这是由于与传递趋化性信号有关的三种越膜蛋白质中的一种发生了缺损。因为这些蛋白质在趋化性反应期间发生甲基化(见下述),所以称为接受甲基的趋化性蛋白(MCP)。每一种MCP都是由其本身所有的一套周质受体蛋白结合之后而被活化的:MCPI与I型受体结合;MCPII与II型受体结合;MCP III与III型

一些趋化性缺陷突变种揭示细菌的趋化性涉及四种蛋白质²⁹

通过对具有不同趋化性缺陷突变种细菌的分析,澄清了有关细菌趋化性的分子机制。到目前为止,所分离得到的突变种可区分为四大类,反映了从细胞表面受体到鞭毛发动机的连续流动。

第一类为特异的非趋化性突变种,它能正常游动并对大部分趋化性刺激作出反应,但对某种

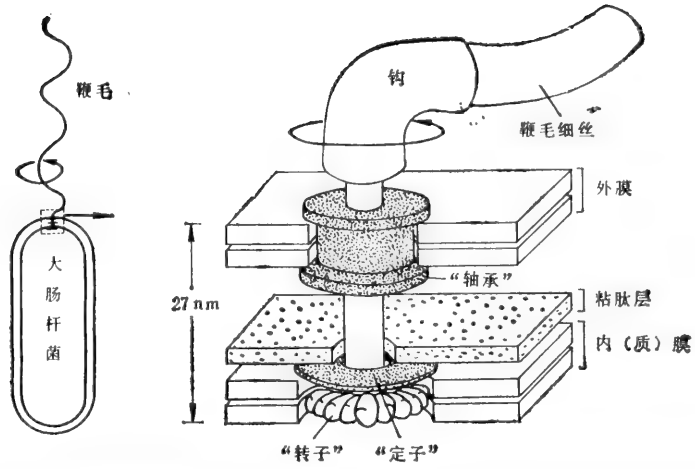


图 13-45 大肠杆菌鞭毛旋转发动机的示意图。“旋转器”是插入质膜中的蛋白盘。由跨膜的 H^+ 梯度驱动,使“转子”对着另一蛋白盘(“定子”)在脂双层中快速旋转(每秒钟~100 转)。定子是附着在粘肽层。借助一根棒,使“转子”与钩和鞭毛连接起来,因而导致它们旋转。蛋白质“轴承”起固定旋转棒于外层膜中的作用。图中凡静止不转的部分着阴暗色,而旋转部分呈白色。

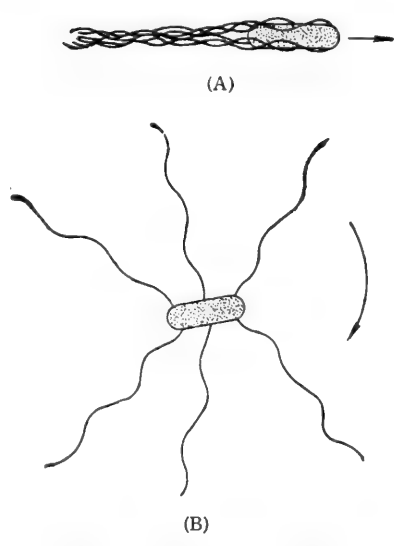


图13-46 表明游动时大肠杆菌鞭毛的方位的示意图。当鞭毛逆时针旋转时(A),它们集成一束,起推动器向前平稳移动的作用。在鞭毛顺时针旋转时(B),它们向四周散开,致使细菌翻转。

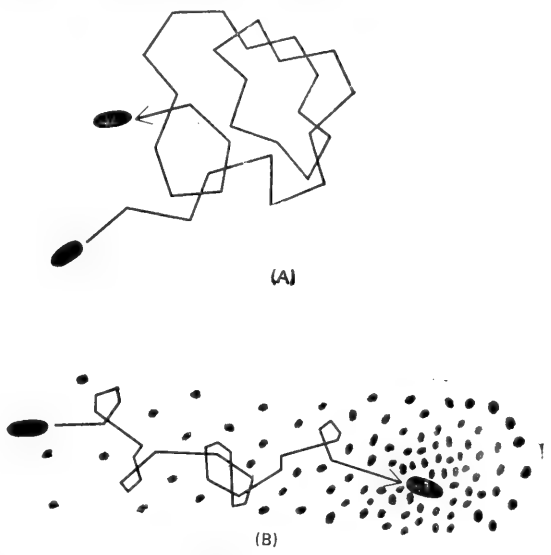


图13-47 游动细菌踪迹的示意图。在没有趋化性信号情况下(A),其平稳的游动期被短暂的翻转中断,并随机地改变了游动的方向。在有趋化性引诱剂的情况下(B),翻转受到抑制,细菌游向较高浓度的引诱剂,从而逐渐向引诱剂方向移动。

受体结合(图 13-48)。当细菌暴露在趋化性引诱剂中,引诱剂与细菌周质受体蛋白的结合改变了它的构象,致使受体与其相应的 MCP 结合,并使其活化。导致活化的 MCP 具有两种独立的效应,分别相当于兴奋相和适应相:(1) 由活化 MCP 产生的细胞内信号使鞭毛发动机继续按逆时针方向旋转,导致对细菌翻滚的抑制,使细菌继续平稳游动,形成兴奋相;(2) 活化的 MCP 为细胞质中的酶甲基化,逆转 MCP 的活性,形成适应相

(见下述)。

第三类为一般非趋化性突变种。它们失去了对任何趋化性刺激作出反应的性能。这是由于该突变种的 8 个不同蛋白质基因中,有一个发生了缺损,包括一些甲基化(和去甲基) MCP 的酶和在受体与鞭毛发动机之间的转换信息所需要的蛋白质发生了缺陷。

最后一类也是对任何趋化性刺激都不能作出反应的突变种,称作无运动力的突变种。在这一类突变种中,2 个控制鞭毛旋转的基因发生了缺损,以及涉及合成和组装鞭毛的 16 种基因也有缺损。

蛋白质甲基化作用与适应有关²⁹

有令人信服的证据表明,细菌对趋化性刺激的适应是 MCP 共价甲基化的结果。因突变而使甲基化受到阻抑,就丧失了适应效应;暴露在引诱剂中需要数天而不是几分钟,才达到抑制细菌的翻滚运动。

MCP 的甲基化反应是由一种可溶性酶(甲基转移酶)催化的,这种酶将甲基基团从称为 S-腺苷甲硫氨酸的公用甲基基团供体中,转移到 MCP 的谷氨酸残基的游离羧基上(图 13-49)。如果加入能结合 I 型受体的引诱剂,则 MCP I 的甲基化水平剧增;加入能结合 II 型或 III 型受体的引诱剂,则分别诱导 MCP II 或 MCP III 的甲基化。只要引诱剂存在,甲基化就始终维持在这一新的水平。在一个 MCP 分子上可引入多至 4 个甲基基团,所以甲基化的程度是随引诱剂浓度的增加而增加。去除引诱剂后, MCP 就被一种可溶性的脱甲基化酶脱甲基(图 13-49)。在趋化性反应期间甲基化的水平有变化,而在细菌处于适应状态时甲基化水平不变,因为甲基化与脱甲基的速率相等。

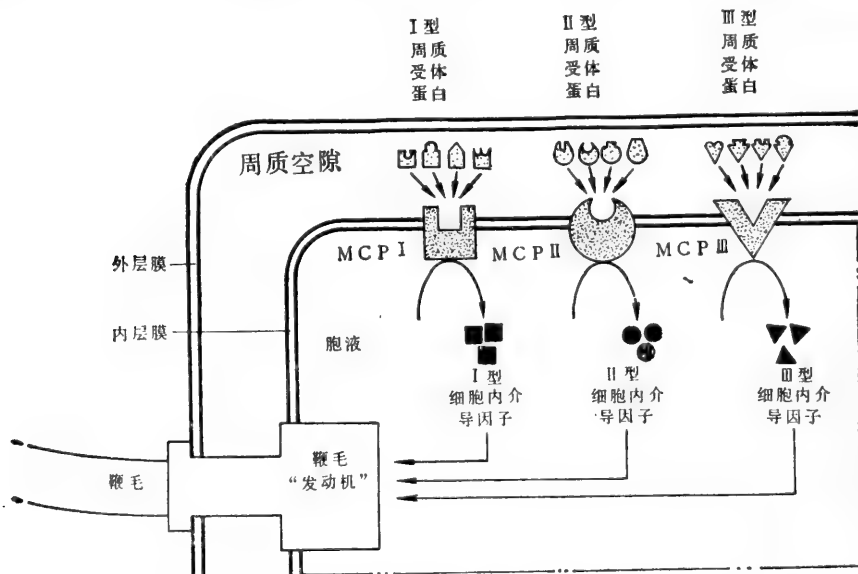


图 13-48 细菌趋化期间信号转导的步骤。化学引诱剂(未显示)与周质空间的专一受体蛋白结合。然后受体与内层(质)膜上的三个接受甲基的趋化性蛋白质(MCPs)相互作用。后者的相互作用使 MCP 活化以产生细胞内介导因子,致使鞭毛“发动机”继续按逆时针方向旋转,从而抑制了翻滚,使继续向前平稳地游动。有三组周质受体蛋白(I型,II型和III型)各自与专一的小分子和其自身的 MCP 相互作用。有些化学引诱剂能直接与 MCP 结合,并使其活化,然而在图中未显示出来。在这种情况下, MCP 本身起着受体和转导者的作用。

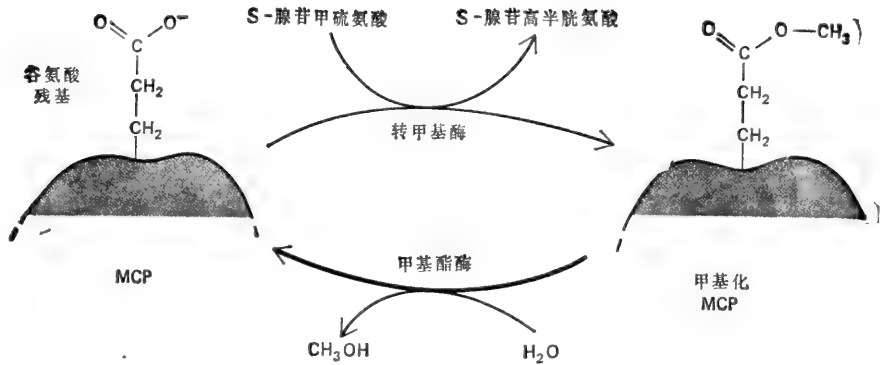


图 13-49 MCP 的甲基化和去甲基反应。每个 MCP 借助酯键能结合 4 个甲基基团。

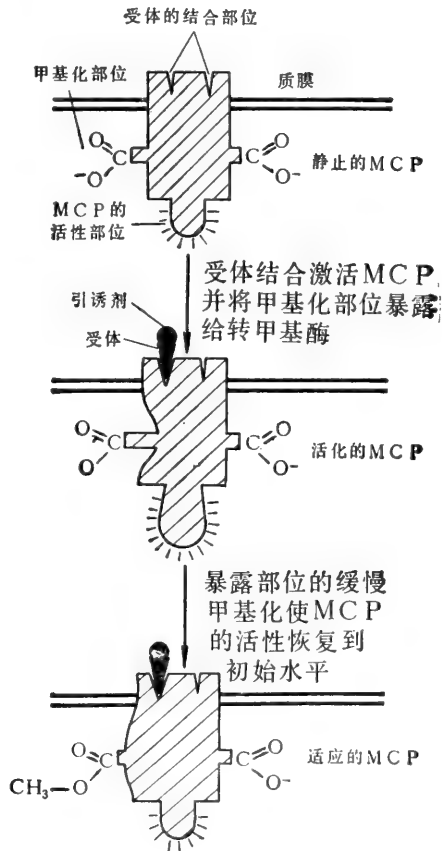


图 13-50 MCP 通过甲基化作用连续活化和适应的高度示意图。注意 MCP 的活性以及细菌翻滚频率在休止和适应状态下都是相同的。为了简化, 每个 MCP 分子只显示了两个甲基化部位 (及受体结合部位), 而一般认为是有四个甲基化部位的 (受体结合部位可能也是四个)。即使在没有趋化性刺激时, MCPs 分子仍有一定程度的甲基化, 图中也未显示。

在分子水平上看,这个机制意味着一个结合了受体的 MCP 是处于活化状态,直到它接受了另一个甲基基团之后(图 13-50);这时只要有第二个受体与 MCP 相结合, MCP 能再次活化。但是这又触发了另一个甲基基团迟滞的结合,致使 MCP 又恢复到原有的低活性水平。这一过程将继续下去,直至 MCP 分子上结合了 4 个活化受体和共价结合了 4 个甲基基团。去除引诱剂时,受体与 MCP 解离, MCP 分子又迅速地去甲基,由此又恢复了这一过程。

最近有证据表明,蛋白质羧基基团类似的可逆性甲基化作用,也参与哺乳动物白细胞的趋化性反应,使白细胞能为炎症部位所释放的某些特异信号发放分子所引诱。当这些细胞暴露在引诱剂中时有些结合在细胞膜上的分子甲基化,而当甲基化反应受到某些特异药物阻抑时细胞的趋化性也受到抑制,正像细菌中所发生的情况一样。

细菌趋化性的模型²⁹

MCP 经活化的受体激活必然导致产生影响鞭毛发动机旋转方向的细胞内信号,有关这种信号的性质尚未弄清。然而通过应用细菌趋化性的假设模型可能予以说明。这一

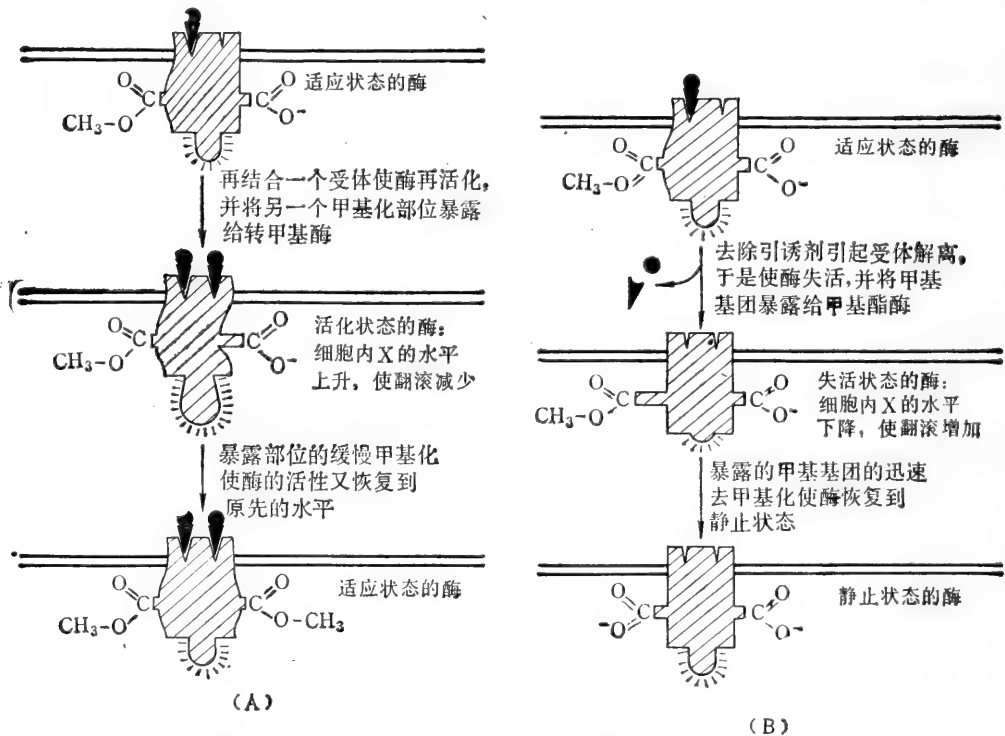


图 13-51 根据 MCP 是一种合成细胞内介导因子 X 的膜结合酶的设想所提出的细菌趋化性的假设模型。在细菌的适应过程中,酶由于受体活化而很快被激活,并由随后的甲基化而缓慢失活。当细胞内 X 分子浓度高时,鞭毛发动机按逆时针方向旋转,致使细菌平稳游动;而在 X 分子浓度低下时,则按顺时针方向旋转,致使细菌翻滚。本图中,在加入更多的引诱剂时,因另外的受体结合使适应状态的 MCP 暂时地被再激活(故翻滚减少)(A);由于去除引诱剂,受体自 MCP 分子上解离,致使暂时失活(故翻滚增加)(B)。注意,不论是在适应状态(或是一个受体结合和加上一个甲基基团,或是有两个受体结合和添加两个甲基基团)还是在休止状态, MCP 的酶活性(以及由此产生的细菌细胞内 X 分子浓度和翻滚频率)都是一样的。

工作模型是以这样的假设为基础的,即细胞内某些小分子 X 的浓度水平高时,鞭毛发动机按逆时针方向旋转,细胞平稳地游动;当细胞内 X 分子浓度低时,则按顺时针方向旋转,细胞翻滚。进一步的假设是, MCP 是一种膜结合酶,它催化细胞质中 X 的合成;同时也设想趋化性反应有激活这种酶的趋势,从而增加了细胞内 X 分子的浓度,而适应(即 MCP 的甲基化)具有使该酶失活的倾向,致使细胞内 X 分子浓度降至其原有的“休止水平”。在这种静止水平, X 分子是处于这样的浓度,即保证了细胞在无趋化性的环境中所表现的平稳游动和偶尔的翻滚。

根据这一模型,在加入引诱剂后,一种细胞周质受体蛋白激活了 MCP,致使 X 分子浓度增加,抑制细胞的翻滚。但是, MCP 甲基化的增加延缓,又使其活性恢复到原有的低水平, X 分子浓度也就恢复到静止水平。这时细胞是处于适应状态,翻滚的状况也是正常的。然而,假如引诱剂浓度有变化,翻滚率又再度发生变化——自 MCP 分子上解离一个结合受体而降低引诱剂浓度(因此瞬时地使酶失活,增加翻滚)(图 13-51B);给 MCP 分子添增第二个受体而增加引诱剂浓度(因此瞬时地使酶活化,抑制了翻滚)(图 13-51A)。只有在引诱剂浓度增高到使 MCP 分子上受体结合部位和甲基化部位饱和时,细菌才不能对进一步增加引诱剂作出反应。

在讨论细菌趋化性反应的机制时,我们集中讨论了对引诱剂的正趋化性反应,而忽略了对拒斥剂的负趋化性反应。遗传学的研究表明,除了所有的反应都是可逆的之外,细菌游离拒斥剂的机制与游向引诱剂的机制是完全相同的。例如在上述的工作模型中,拒斥剂的受体同样会与 MCP 结合,不过是使失活而不是活化,由此降低细胞内 X 分子的浓度。增加拒斥剂的浓度也会使鞭毛发动机按顺时针方向旋转,致使细菌翻滚。

小结

借助于依赖时间的可逆状态下对高浓度的信号发放配体的适应,有些细胞能对配体的浓度变化而不是对配体的绝对浓度水平作出反应。适应可以用种种不同的方法产生:借助配体结合后的内化和降解作用,或受体构象变化都能使细胞表面受体失活。此外它还能通过改变某种非蛋白受体的方式,影响受体活化后的信号传递。在分子水平上了解得最深适应性的例子是发生在细菌的趋化性中,这一过程中膜上的关键信号转导蛋白的可逆性甲基化,使细胞能游向最适环境。

【左嘉客译 姚曾序校】

参 考 文 献

第一章

一般的

- Attenborough, D. *Life on Earth*. Boston: Little Brown, 1979. (A beautifully illustrated evolutionary account of the living world.)
- Curtis, H. *Biology*, 3rd ed. New York: Worth, 1979.
- de Witt, W. *Biology of the Cell: An Evolutionary Approach*. Philadelphia: Saunders, 1977.
- Evolution. *Sci. Am.* 239(3), 1978. (An entire issue devoted to the topic.)
- Fawcett, D.W. *The Cell*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1981. (A picture book of the fine structure of eucaryotic cells.)
- Keeton, W.T. *Biological Science*, 3rd ed. New York: Norton, 1980.
- Luria, S.E.; Gould, S.J.; Singer, S. *A View of Life*. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1981.
- Maynard Smith, J. *The Theory of Evolution*, 3rd ed. New York: Penguin, 1975.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Curtis, H. *Biology of Plants*, 3rd ed. New York: Worth, 1981.
- Thomas, L. *The Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher*. New York: Viking Press, 1974. (A collection of short, thought-provoking essays.)
- Wilson, E.B. *The Cell in Development and Heredity*, 3rd ed. New York: Macmillan, 1928.
- Wolfe, S.L. *Biology of the Cell*, 2nd ed. Belmont, Ca.: Wadsworth, 1981. (Includes a good final chapter on cell evolution.)

引用的

1. Eigen, M.; Gardiner, W.; Schuster, P.; Winkler-Oswatitsch, R. The origin of genetic information. *Sci. Am.* 244(4):88-118, 1981.
Folsome, C.E., ed. *Life: Origin and Evolution*. (Readings from *Sci. Am.*) San Francisco: Freeman, 1979.
Wong, J.T-F. Coevolution of genetic code and amino acid biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 6:33-36, 1981.
2. Dickerson, R.E. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. *Sci. Am.* 242(3):136-153, 1980.
Margulis, L. *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press, 1970.
Origins and Evolution of Eukaryotic Intracellular Organelles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Vol. 361, 1981.
Woese, C.R. Archaeobacteria. *Sci. Am.* 244(6):98-122, 1981.
3. Buchsbaum, R. *Animals Without Backbones*, 2nd ed. Chicago: University of Chicago Press, 1976.
Valentine, J.W. The evolution of multicellular plants and animals. *Sci. Am.* 239(3):140-158, 1978.

第二章

一般的

- Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth, 1982.
- Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed. San Francisco: Freeman, 1981.

Wood, W.B.; Wilson, J.H.; Benbow, R.M.; Hood, L.E. *Biochemistry: A Problems Approach*, 2nd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1981.

引用的

1. Henderson, L.J. *The Fitness of the Environment*. Boston: Beacon, 1927; reprinted 1958. (A classical and readable analysis.)

Masterton, W.L.; Slowinski, E.J. *Chemical Principles*, 4th ed. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1977.
2. Lehninger, A.L. *Bioenergetics: The Molecular Basis of Biological Energy Transformations*, 2nd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1971. (An elegant short treatment.)
3. Klotz, I.M. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. New York: Academic Press, 1967. (Basic thermodynamics.)
Schrödinger, E. *What is Life? Mind and Matter*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1969. (A physicist's view of order and disorder in biological systems, first published in 1944.)
4. Raven, P.H.; Evert, R.F.; Curtis, H. *Biology of Plants*, 3rd ed. New York: Worth, 1981. (Chapter 6 on photosynthesis.)
5. McGilvery, R.W. *Biochemistry: A Functional Approach*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1979. (Particularly good for understanding metabolic pathways: Chapters 23 and 26 cover glycolysis and the citric acid cycle.)
Racker, E. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. New York: Academic Press, 1976. (A personal and historical account by a pioneer in the field)
6. Krebs, H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154-170, 1970.
7. Racker, E. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39:210-215, 1980.
Hinkle, P.C.; McCarty, R.E. How cells make ATP. *Sci. Am.* 238(3):104-123, 1978.
8. Newsholme, E.A.; Start, C. *Regulation in Metabolism*. New York: Wiley, 1973.
9. Hess, B. Oscillating reactions. *Trends Biochem. Sci.* 2:193-195, 1977.
10. Cohen, P. *Control of Enzyme Activity*. London: Chapman and Hall, 1976.
11. Banks, P.; Bartley, W.; Birt, L.M. *The Biochemistry of the Tissues*, 2nd ed. New York: Wiley, 1976.

第三章

一般的

- Judson, H.F. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*. New York: Simon & Schuster, 1979. (A scholarly account of the history of molecular biology.)
- Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth, 1982.
- Schulz, G.E.; Schirmer, R.H. *Principles of Protein Structure*. New York: Springer, 1979.
- Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed. San Francisco: Freeman, 1981.
- Watson, J.D. *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1976.

引用的

1. Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry, Part I and Part III*. San Francisco: Freeman, 1980.
Eisenberg, D.; Crothers, D. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1979.

- Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond*, 3rd ed. Ithaca, N.Y.: Cornell University Press, 1960. (A classical account of the principles of interatomic bonding in organic molecules.)
2. Stent, G.S. *Molecular Genetics: An Introductory Narrative*. San Francisco: Freeman, 1971.
 - Olby, R. *The Path to the Double Helix*. Seattle: University of Washington Press, 1974.
 3. Watson, J.D.; Crick, F.H.C. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738, 1953.
 4. Watson, J.D.; Crick, F.H.C. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964-967, 1953.
 - Meselson, M.; Stahl, F.W. The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:671-682, 1958.
 - Sanger, F.; et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265:687-695, 1977.
 5. Drake, J.W. *The Molecular Basis of Mutation*. San Francisco: Holden-Day, 1970.
 6. Thompson, E.O.P. The insulin molecule. *Sci. Am.* 192(5):36-41, 1955. (Review of the first sequence determination.)
 - Yanofsky, C. Gene structure and protein structure. *Sci. Am.* 216(5):80-94, 1967. (The evidence for colinearity.)
 7. Brenner, S.; Jacob, F.; Meselson, M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576-581, 1961.
 8. Crick, F.H.C. The genetic code: III. *Sci. Am.* 215(4):55-62, 1966.
 9. Rich, A.; Kim, S.H. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 238(1):52-62, 1978.
 10. Lake, J.A. The ribosome. *Sci. Am.* 245(2):84-97, 1981.
 11. Schulz, G.E.; Schirmer, R.H. *Principles of Protein Structure*. New York: Springer, 1979. (Chapters 1 through 5.)
 - Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry*. Part I. The Conformation of Biological Macromolecules. San Francisco: Freeman, 1980. (Chapters 2 and 5.)
 - Dickerson, R.E.; Geis, I. *The Structure and Action of Proteins*. New York: Harper & Row, 1969.
 12. Anfinsen, C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230, 1973.
 13. Richardson, J.S. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 34:167-339, 1981.
 - Pauling, L.; Corey, R.B.; Branson, H.R. The structure of proteins: two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:205-211, 1951.
 - Pauling, L.; Corey, R.B. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37:729-740, 1951.
 14. Hartley, B.S. Homologies in serine proteases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond (Biol.)* 257:77-87, 1970.
 - Smith, E.L. Evolution of enzymes. In *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. 1 (P.D. Boyer, ed.), pp. 267-339. New York: Academic Press, 1970.
 - Doolittle, R.F. Protein evolution. In *The Proteins*, 3rd ed., Vol. 4 (H. Neurath, R.L. Hill, eds.), p. 1-118. New York: Academic Press, 1979.
 15. Rossmann, M.G.; Argos, P. Protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 50:497-532, 1981.
 - Blake, C.C.F. Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces? *Nature* 273:267, 1978.
 - Banks, R.D.; et al. Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature* 279:773-777, 1979.
 16. Metzler, D.E. *Biochemistry*. New York: Academic Press, 1977. (Chapter 4 describes how macromolecules pack together into large assemblies.)

17. Caspar, D.L.D.; Klug, A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27:1-24, 1962.
Harrison, S.C. Structure of simple viruses: specificity and flexibility in protein assemblies. *Trends Biochem. Sci.* 3:3-7, 1978.
Harrison, S.C. Virus crystallography comes of age. *Nature* 286:558-559, 1980.
18. Fraenkel-Conrat, H.; Williams, R.C. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 41:690-698, 1955.
Nomura, M. Assembly of bacterial ribosomes. *Science* 179:864-873, 1973.
Butler, P.J.G.; Klug, A. The assembly of a virus. *Sci. Am.* 239(5):62-69, 1978.
King, J. Regulation of structural protein interactions as revealed in phage morphogenesis. In *Biological Regulation and Development*, Vol. 2 (R.F. Goldberger, ed.), pp. 101-132. New York: Plenum, 1980.
19. Steiner, D.F.; Kemmler, W.; Tager, H.S.; Peterson, J.D. Proteolytic processing in the biosynthesis of insulin and other proteins. *Fed. Proc.* 33:2105-2115, 1974.
20. Metzler, D. *Biochemistry: The Chemical Reactions of a Living Cell*. New York: Academic Press, 1977. (Chapter 6 describes the general features of enzyme catalysis and of allosteric proteins.)
Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*. San Francisco: Freeman, 1977.
21. Wolfenden, R. Analog approaches to the structure of the transition state in enzyme reactions. *Accounts Chem. Res.* 5:10-18, 1972.
22. Wood, W.B.; Wilson, J.H.; Benbow, R.M.; Hood, L.E. *Biochemistry, A Problems Approach*, 2nd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1981. (Chapters 9 and 15 and associated problems.)
23. Reed, L.J.; Cox, D.J. Multienzyme complexes. In *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. 1 (P.D. Boyer, ed.), pp. 213-240. New York: Academic Press, 1970.
Reed, L.J. Multienzyme complexes. *Accounts Chem. Res.* 7:40-46, 1974.
Srere, P.A.; Mosbach, K. Metabolic compartmentation: symbiotic, organellar, multienzymic, and microenvironmental. *Annu. Rev. Microbiol.* 28:61-83, 1974.
24. Adam, G.; Delbrück, M. Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. In *Structural Chemistry and Molecular Biology* (A. Rich and N. Davidson, eds.), pp. 198-215. San Francisco: Freeman, 1968.
25. Monod, J.; Changeux, J.-P.; Jacob, F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* 6:306-329, 1963.
Edelstein, S.J. *Introductory Biochemistry*. San Francisco: Holden-Day, 1973. (Chapter 10 on protein aggregates and allosteric interactions.)
Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry. Part III: The Behavior of Biological Macromolecules*. San Francisco: Freeman, 1980. (Chapters 15 and 17.)
26. Hill, T.L. A proposed common allosteric mechanism for active transport, muscle contraction, and ribosomal translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:267-274, 1969.
Hill, T.L. Biochemical cycles and free energy transduction. *Trends Biochem. Sci.* 2:204-207, 1977.
27. Kyte, J. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. *Nature* 292:201-204, 1981.
Hokin, L.E. The molecular machine for driving the coupled transports of Na^+ and K^+ is an $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase. *Trends Biochem. Sci.* 1:233-237, 1976.
Hopfer, U.; Groseclose, R. The mechanism of Na^+ -dependent D-glucose transport. *J. Biol. Chem.* 255:4453-4462, 1980.

第四章

一般的

Cantor C.R.; Schimmel P.R. *Biophysical Chemistry* (3 vols.). San Francisco: Freeman, 1980. (A comprehensive account of the physical principles underlying many biochemical and biophysical techniques.)

- Freifelder, D. *Physical Biochemistry*. San Francisco: Freeman, 1976.
- Prescott, D., ed. *Methods in Cell Biology*. New York: Academic Press. (A multivolume series containing reviews of current techniques.)
- Work, T.S.; Work, E.; Burden, R.H., eds. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press. (A multivolume series of practical guides to specialized biochemical procedures. Recent volumes include Sequencing of Proteins and Peptides, 1981; Gel Filtration Chromatography, 1980; and An Introduction to Affinity Chromatography, 1979.)

引用的

1. Bradbury, S. *The Evolution of the Microscope*. Elmsford, N.Y.: Pergamon, 1967.
- Bloom, W.; Fawcett, D.W. *A Textbook of Histology*, 10th ed. Philadelphia: Saunders, 1975. (A beautifully illustrated description of the anatomy of cells, as seen by light microscopy and transmission electron microscopy. Chapter 1 introduces the principal methods employed.)
2. Spencer, M. *Fundamentals of Light Microscopy*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1982.
3. Nairn, R.C. *Fluorescent Protein Tracing*, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1976.
- Lillie, R.D. *Biological Stains*, 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1969.
4. Wischnitzer, S. *Introduction to Electron Microscopy*, 3rd ed. Elmsford, N.Y.: Pergamon, 1981.
- Weakley, B.S. *A Beginner's Handbook in Biological Transmission Electron Microscopy*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1981.
5. Pease, D.C.; Porter, K.R. Electron microscopy and ultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 91:287s-292s, 1981. (A short historical account.)
6. Everhart, T.E.; Hayes, T.L. The scanning electron microscope. *Sci. Am.* 226(1):54-69, 1972.
- Hayat, M.A. *Introduction to Biological Scanning Electron Microscopy*. Baltimore: University Park Press, 1978.
- Kessel, R.G. *Tissues and Organs*. San Francisco: Freeman, 1979. (An atlas of vertebrate tissues seen by scanning electron microscopy.)
7. Pinto da Silva, P.; Branton, D. Membrane splitting in freeze-etching. *J. Cell Biol.* 45:598-605, 1970.
- Heuser, J. Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3-D electron microscopy. *Trends Biochem. Sci.* 6:64-68, 1981.
8. Unwin, P.N.T.; Henderson, R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* 94:425-440, 1975.
9. Glusker, J.P.; Trueblood, K.N. *Crystal Structure Analysis: A Primer*. Oxford, Eng.: Oxford University Press, 1972.
- Kendrew, J.C. The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205(6):96-111, 1961.
- Perutz, M.F. The hemoglobin molecule. *Sci. Am.* 211(5):64-76, 1964.
10. Paul, J. *Cell and Tissue Culture*, 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 1975.
11. Harrison, R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* 9:787-848, 1910. (Possibly the first use of tissue culture.)
12. Ham, R.G. Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:288-293, 1965.
- Hayashi, I.; Larner, J.; Sato, G. Hormonal growth control of cells in culture. *In Vitro* 14:23-30, 1978.
13. Harris, H.; Watkins, J.F. Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. *Nature* 205:640-646, 1965.

- Ruddle, F.H.; Creagan, R.P. Parasexual approaches to the genetics of man. *Annu. Rev. Genet.* 9:407-486, 1975.
14. Colowick, S.P.; Kaplan, N.O., eds. *Methods in Enzymology*, Vols. 1-84. New York: Academic Press, 1955-1982. (A multivolume series containing general and specific articles on most procedures commonly employed in the biochemical analysis of cells.)
Cooper, T.G. *The Tools of Biochemistry*. New York: Wiley, 1977.
de Duve, C.; Beaufay, H. A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* 91:293s-299s, 1981.
 15. Jovin, T.M.; Arndt-Jovin, D.J. Cell separation. *Trends Biochem. Sci.* 5:214-219, 1980.
Herzenberg, L.A.; Sweet, R.G.; Herzenberg, L.A. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 234(3):108-117, 1976.
 16. de Duve, C. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189:186-194, 1975.
Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358, 1975.
Claude, A. The coming of age of the cell. *Science* 189:433-435, 1975.
(A. Claude, C. de Duve, and G. Palade shared a Nobel Prize in 1974 for their work on tissue fractionation.)
Meselson, M.; Stahl, F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:671-682, 1958. (Density gradient centrifugation was used to show the semiconservative replication of DNA.)
Scheeler, P. *Centrifugation in Biology and Medical Science*. New York: Wiley, 1981.
 17. Nirenberg, N.W.; Matthaei, J.H. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1588-1602, 1961.
Zamecnik, P.C. An historical account of protein synthesis, with current overtones—a personalized view. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 34:1-16, 1969.
Racker, E. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. New York: Academic Press, 1976. (Cell-free systems in the working out of energy metabolism.)
 18. Andrews, A.T. *Electrophoresis*. New York: Oxford University Press, 1981. (A comprehensive guide to the theory, techniques, and biochemical applications of electrophoresis.)
 19. O'Farrell, P.H. High resolution, two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021, 1975.
 20. Ingram, V.M. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature* 178:792-794, 1956. (The original description of protein fingerprinting.)
Cleveland, D.W.; Fischer, S.G.; Kirschner, M.W.; Laemmli, U.K. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106, 1977.
 21. Walsh, K.A.; Ericsson, L.H.; Parmelee, D.C.; Titani, K. Advances in protein sequencing. *Annu. Rev. Biochem.* 50:261-284, 1981.
 22. Rogers, A.W. *Techniques of Autoradiography*, 3rd ed. New York: Elsevier/North-Holland, 1979.
 23. Calvin, M. The path of carbon in photosynthesis. *Science* 135:879-889, 1962. (A pioneer's account of one of the earliest uses of radioisotopes in biology.)
 24. Coons, A.H. Histochemistry with labeled antibody. *Int. Rev. Cytol.* 5:1-23, 1956.
Hudson, L.; Hay, F.C. *Practical Immunology*, 2nd ed. Oxford, Eng.: Blackwell, 1980.
Eisen, H.N. *Immunology*, 3rd ed. New York: Harper & Row, 1981.
Anderton, B.H.; Thorpe, R.C. New methods of analyzing for antigens and glycoproteins in complex mixtures. *Immunol. Today* 2:122-127, 1980.
 25. Milstein, C. Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243(4):66-74, 1980.
Yelton, D.E.; Scharff, M.D. Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 50:657-680, 1981.

26. Mueller, C.; Graessmann, A.; Graessmann, M. Microinjection: turning living cells into test tubes. *Trends Biochem. Sci.* 5:60-62, 1980.
Furusawa, M. Cellular microinjection by cell fusion: technique and applications in biology and medicine. *Int. Rev. Cytol.* 62:29-67, 1980.
27. Glover, D.M. Genetic Engineering: Cloning DNA. New York: Chapman and Hall, 1980. (A brief, 80-page summary of methodology.)
Williamson, R., ed. Genetic Engineering, Vols. 1-3. New York: Academic Press, 1979, 1981, 1982.
Watson, J.D.; Tooze, J. The DNA Story: A Documentary History of Gene Cloning. San Francisco: Freeman, 1981.
28. Smith, H.O. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases. *Science* 205:455-462, 1979.
29. Novick, R.P. Plasmids. *Sci. Am.* 243(6):102-107, 1980.
Cohen, S.N. The manipulation of genes. *Sci. Am.* 233(1):24-33, 1975.
Maniatis, T.; et al. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15:687-701, 1978.
30. Maniatis, T.; Kee, S.G.; Efstratiadis, A.; Kafatos, F.C. Amplification and characterization of a β -globin gene synthesized *in vitro*. *Cell* 8:163-182, 1976.
31. Abelson, J.; Butz, E., eds. Recombinant DNA. *Science* 209:1317-1438, 1980. (A collection of articles by leaders in the field.)
32. Sanger, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214:1205-1210, 1981.
Gilbert, W. DNA sequencing and gene structure. *Science* 214:1305-1312, 1981.
33. Hood, L.E.; Wilson, J.H.; Wood, W.B. Molecular Biology of Eucaryotic Cells: A Problems Approach, pp. 56-61, 192-201. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1975. (Hybridization analyses clearly explained.)
Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517, 1975.
34. Pardue, M.L.; Gall, J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64:600-604, 1969.
Hennig, W. *In situ* hybridization of nucleic acids. *Trends Biochem. Sci.* 1:285-287, 1976.
35. Gilbert, W.; Villa-Komaroff, L. Useful proteins from recombinant bacteria. *Sci. Am.* 242(4):74-94, 1980.
Itakura, K. Synthesis of genes. *Trends Biochem. Sci.* 5:114-116, 1980.
36. Shortle, D.; Nathans, D. Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2170-2174, 1978.
Hinnen, A.; Hicks, J.B.; Fink, G.R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978.
Berg, P. Dissections and reconstructions of genes and chromosomes. *Science* 213:296-303, 1981.
Anderson, W.F.; Diacumakos, E.G. Genetic engineering in mammalian cells. *Sci. Am.* 245(1):106-121, 1981.

第五章

一般的

- Stent, G.S. Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco: Freeman, 1971.
- Watson, J.D. Molecular Biology of the Gene, 3rd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1976.

引用的

1. Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed. San Francisco: Freeman, 1981. (Chapters 25, 26, and 27).
Hershey, J.W.B. The translational machinery. In *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 4 (D.M. Prescott and L. Goldstein, eds.). New York: Academic Press, 1980.
2. Chamberlin, M.J. RNA polymerase: an overview. In *RNA Polymerase* (R. Losick and M. Chamberlin, eds.), pp. 17-67. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
Pribnow, D. Genetic control signals in DNA. In *Biological Regulation and Development*. Vol. 1 (R. Goldberger, ed.), pp. 219-277. New York: Plenum, 1979.
Rosenberg, M.; Court, D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13:319-353, 1979.
3. Rich, A.; Kim, S.H. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 238(1):52-62, 1978.
4. Schimmel, P.R.; Söll, D. Aminoacyl tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 48:601-648, 1979.
5. Crick, F.H.C. The genetic code: III. *Sci. Am.* 215(4):55-62, 1966.
Schimmel, P.R.; Söll, D.; Abelson, J., eds. *Transfer RNA*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
6. Nomura, M.; Tissières, A.; Lengyel P., eds. *Ribosomes*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974.
Lake, J.A. The ribosome. *Sci. Am.* 245(2):84-97, 1981.
Chambliss, G.; et al., eds. *Ribosomes: Structure, Function and Genetics*. Baltimore: University Park, 1980.
7. Clark, B. The elongation step of protein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:207-210, 1980.
8. Caskey, C.T. Peptide chain termination. *Trends Biochem. Sci.* 5:234-237, 1980.
9. Hunt, T. The initiation of protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:178-181, 1980.
Steitz, J.A. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In *Biological Regulation and Development*, Vol. 1 (R. Goldberger, ed.), pp. 349-399. New York: Plenum, 1979.
10. Ochoa, S; deHaro, C. Regulation of protein synthesis in eucaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:549-580, 1979.
Ranu, R.S. Regulation of protein synthesis in eucaryotes by the protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *FEBS Lett.* 112:211-215, 1980.
11. Jiménez, A. Inhibitors of translation. *Trends Biochem. Sci.* 1:28-30, 1976.
12. Lindahl, T. DNA repair enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 51:61-88, 1982.
13. Dickerson, R.; Geis, I. *The Structure and Action of Proteins*, pp. 59-66. New York: Harper & Row, 1969.
Wilson, A.C.; Carlson, S.S.; White, T.J. Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 46:573-639, 1977.
Jukes, T.H. Silent nucleotide substitutions and the molecular evolutionary clock. *Science* 210:973-978, 1980.
14. Drake, J.W. Comparative rates of spontaneous mutation. *Nature* 221:1132, 1969.
15. Cairns, J. *Cancer: Science and Society*. San Francisco: Freeman, 1978. (Chapter 7 discusses the role of mutation in the development of cancer.)
Ohta, T.; Kimura, M. Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. *Nature* 233:118-119, 1971. (The mutation rate limits the maximum number of genes in an organism.)
16. Schrödinger, E. *What is Life?* Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1945.
17. Lindahl, T. New class of enzymes acting on damaged DNA. *Nature* 259:64-66, 1976.
Kornberg, A. *DNA Replication*. San Francisco: Freeman, 1980. (Chapter 16 covers the enzymology of DNA repair.)

- Coulondre, C.; Miller J.H.; Farabaugh, P.J.; Gilbert, W. Molecular basis of base substitution hotspots in *E. coli*. *Nature* 274:775-780, 1978.
- Arlett, C.F.; Lehmann, A.R. Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. *Annu. Rev. Genet.* 12:95-115, 1978.
18. Kornberg, A. DNA Replication. San Francisco: Freeman, 1980.
- Alberts, B.M.; Sternglanz, R. Recent excitement in the DNA replication problem. *Nature* 269:655-661, 1977.
19. Meselson, M.; Stahl, F.W. The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:671-682, 1958.
- Cairns, J. The bacterial chromosome and its manner of replication as seen by autoradiography. *J. Mol. Biol.* 6:208-213, 1963.
20. Inman, R.B.; Schnös, M. Structure of branch points in replicating DNA: presence of single-stranded connections in lambda DNA branch parts. *J. Mol. Biol.* 56:319-325, 1971. (Electron microscopy demonstrates that the replication fork is asymmetric.)
- Ogawa, T.; Okazaki, T. Discontinuous DNA replication. *Annu. Rev. Biochem.* 49:421-457, 1980.
21. Topal, M.; Fresco, J.R. Complementary base pairing and the origin of substitution mutations. *Nature* 263:285-289, 1976.
- Brutlag, D.; Kornberg, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: a proof-reading function for the 3' to 5' exonuclease activity in DNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 247:241-248, 1972.
- Fersht, A.R. Enzymatic editing mechanisms in protein synthesis and DNA replication. *Trends Biochem. Sci.* 5:262-265, 1980.
22. Alberts, B.M.; Frey, L. T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in the replication and recombination of DNA. *Nature* 227:1313-1318, 1970.
- Coleman, J.E.; Oakley, J.L. Physical chemical studies of the structure and function of DNA binding (helix-destabilizing) proteins. *Crit. Rev. Biochem.* 7:247-290, 1979.
- Abdel-Monem, M.; Hoffmann-Berling, H. DNA unwinding enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 5:128-130, 1980.
23. Wang, J.C. Interaction between DNA and an *E. coli* protein ω . *J. Mol. Biol.* 55:523-533, 1971. (Discovery of the first DNA topoisomerase.)
- Wang, J.C. DNA topoisomerases. *Sci. Am.* 247(1):94-109, 1982.
- Gellert, M. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 50:879-910, 1981.
24. Edenberg, H.J.; Huberman, J.A. Eukaryotic chromosome replication. *Annu. Rev. Genet.* 9:245-284, 1975.
25. Kriegstein, H.J.; Hogness, D.S. Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:135-139, 1974.
- Harland, R. Initiation of DNA replication in eucaryotic chromosomes. *Trends Biochem. Sci.* 6:71-74, 1981.
26. Luria, S.E.; Darnell, J.E.; Baltimore, D.; Campbell, A. General Virology, 3rd ed. New York: Wiley, 1978. (The introductory chapter provides a historical overview of the development of virology.)
27. Gierer, A.; Schramm, G. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* 177:702-703, 1956.
28. Cohen, S.S. Virus-Induced Enzymes. New York: Columbia University Press, 1968.
29. Kornberg, A. DNA Replication. San Francisco: Freeman, 1980. (Chapters 14 and 15 provide up-to-date, beautifully illustrated descriptions of the varieties of ways phage and animal viral DNA's replicate.)
30. Lwoff, A. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.* 17:269-337, 1953.
31. Zinder, N.D. RNA Phages. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1975.
- Fenner, F.; McAuslan, B.R.; Mims, C.A.; Sambrook, J.; White, D.O. The Biology of Animal Viruses, 2nd ed. New York: Academic Press, 1974.

32. Temin, H.M. The participation of DNA in Rous sarcoma virus production. *Virology* 23:486-494, 1964.
 Temin, H.M.; Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213, 1970.
 Baltimore, D. Viral RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature* 226:1209-1211, 1970.
33. Stahl, F.W. Genetic Recombination. San Francisco: Freeman, 1979.
 Fincham, J.R.S.; Day, P.R.; Radford, A. Fungal Genetics, 4th ed. Berkeley: University of California Press, 1979. (Chapter 11.)
 Alberts, B.M., ed. Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination, ICN-UCLA Symposia of Molecular and Cellular Biology, Vol. 19. New York: Academic Press, 1980.
 Dressler, D.; Potter, H. Molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 51:727-762, 1982.
34. Holliday, R. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* 5:282-304, 1964.
 Meselson, M.S.; Radding, C.M. A general model for genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:358-361, 1975.
35. Wolff, S. Sister chromatid exchange. *Annu. Rev. Genet.* 11:183-201, 1977.
36. Radding, C.M. Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* 47:847-880, 1978.
 Radding, C.M. Recombination activities of *E. coli* RecA protein. *Cell* 25:3-4, 1981.
37. Sigal, N.; Alberts, B. Genetic recombination: the nature of a crossed strand-exchange between two homologous DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 71:789-793, 1972.
 Sobell, H.M. Concerning the stereochemistry of strand equivalence in genetic recombination. In *Molecular Mechanisms in Genetic Recombination* (R.F. Grell, ed.), pp. 433-438. New York: Plenum, 1975.
38. Howard-Flanders, P. Inducible repair of DNA. *Sci. Am.* 245(5):72-80, 1981.
39. Campbell, A. Some general questions about movable elements and their implications. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 45:1-9, 1981.
 Landy, A.; Ross, W. Viral integration and excision: structure of the lambda att sites. *Science* 197:1147-1160, 1977.
 Nash, H.A. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservative site specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 15:143-167, 1981.
 Cohen, S.N.; Shapiro, J.A. Transposable genetic elements. *Sci. Am.* 242(2):40-49, 1980.
 Calos, M.P.; Miller, J.H. Transposable elements. *Cell* 20:579-595, 1980.
 Bukhari, A.I. Models of DNA transposition. *Trends Biochem. Sci.* 6:56-59, 1981.

第六章

一般的

- Bretscher, M.S.; Raff, M.C. Mammalian plasma membranes. *Nature* 258:43-49, 1975.
 Finean, J.B.; Coleman, R.; Michell, R.H. Membranes and Their Cellular Functions, 2nd ed., pp. 42-67. London: Blackwell, 1978.
 Harrison, R.; Lunt, G.G. Biological Membranes. Glasgow: Blackie, 1980.
 Quinn, P.J. The Molecular Biology of Cell Membranes. Baltimore: University Park Press, 1976.
 Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731, 1972.
 Weissmann, G.; Claiborne, R., eds. Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology. New York: Hospital Practice, 1975.

1. Gorter, E.; Grendel, F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* 41:439-443, 1925.
2. Ansell, G.B.; Hawthorne, J.N.; Dawson, R.M.C. Form and Function of Phospholipids, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1973.
3. Bangham, A.I. Models of cell membranes. In *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology* (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 24-34. New York: Hospital Practice, 1975.

Kornberg, R.D.; McConnell, H.M. Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:2564-2568, 1971.

Quinn, A.J., ed. *The Molecular Biology of Cell Membranes*, pp. 47-75. Baltimore: University Park Press, 1976.

Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. *Biophysical Chemistry, Part III*, pp. 1348-1377. San Francisco: Freeman, 1980.
4. Chapman, D. Lipid dynamics in cell membranes. In *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology* (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 13-22. New York: Hospital Practice, 1975.

Quinn, A.J.; Chapman, D. The dynamics of membrane structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8:1-117, 1980.

Kimmelberg, H.K. The influence of membrane fluidity on the activity of membrane-bound enzymes. In *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews* (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 205-293. Amsterdam: Elsevier, 1977.
5. Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed., pp. 206-215. San Francisco: Freeman, 1981.
6. Bretscher, M. Membrane structure: some general principles. *Science* 181:622-629, 1973.
- Rothman, J.; Lenard, J. Membrane asymmetry. *Science* 195:743-753, 1977.
7. Fishman, P.H.; Brady, R.O. Biosynthesis and function of gangliosides. *Science* 194:906-915, 1976.

Hakomori, S. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50:733-764, 1981.

Wiegandt, H. The gangliosides. *Adv. Neurochem.* 4:149-223, 1982.
8. Singer, S.J.; Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731, 1972.

Bretscher, M.S.; Raff, M.C. Mammalian plasma membranes. *Nature* 258:43-49, 1975.

Helenius, A.; Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79, 1975.
9. Bretscher, M. Membrane structure: some general principles. *Science* 181:622-629, 1973.

Steck, T.L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.* 62:1-19, 1974.
10. Marchesi, V.T. Spectrin: present status of a putative cyto-skeletal protein of the red cell membrane. *J. Membr. Biol.* 51:101-131, 1979.

Branton, D.; Cohen, C.M.; Tyler, J. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell* 24:24-32, 1981.
11. Marchesi, V.T.; Furthmayr, H.; Tomita, M. The red cell membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 45:667-698, 1976.
12. Steck, T.L. The band 3 protein of the human red cell membrane: a review. *J. Supramol. Struct.* 8:311-324, 1978.

Cabantchik, Z.I.; Knauf, P.A.; Rothstein, A. The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes.' *Biochim. Biophys. Acta* 515:239-302, 1978.
13. Henderson, R.; Unwin, P.N.T. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257:28-32, 1975.
14. Branton, D. Fracture faces of frozen membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55:1048-1056, 1966.

- McNutt, N.S. Freeze-fracture techniques and applications to the structural analysis of the mammalian plasma membrane. In *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews* (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 95-126. Amsterdam: Elsevier, 1977.
15. Juliano, R.L. Techniques for the analysis of membrane glycoproteins. *Curr. Top. Membr. Transp.* 11:107-144, 1978.
 16. Frye, L.D.; Edidin, M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7:319-335, 1970.
 17. de Petris, S.; Raff, M.C. Normal distribution, patching and capping of lymphocyte surface immunoglobulin studied by electron microscopy. *Nature New Biol.* 241:257-259, 1973.
Raff, M.C. Cell-surface immunology. *Sci. Am.* 234(5):30-39, 1976.
 18. Taylor, R.B.; Duffus, W.P.H.; Raff, M.C.; de Petris, S. Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature New Biol.* 233:225-229, 1971.
Schreiner, G.F.; Unanue, E.R. Membrane and cytoplasmic changes in B lymphocytes induced by ligand-surface immunoglobulin interaction. *Adv. Immunol.* 24:38-165, 1976.
de Petris, S. Distribution and mobility of plasma membrane components on lymphocytes. In *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews* (G. Poste; G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 643-728. Amsterdam: Elsevier, 1977.
Abercrombie, M.; Heaysman, J.E.M.; Pegrum, S.M. The locomotion of fibroblasts in culture. III. Movements of particles on the dorsal surface of the leading lamella. *Exp. Cell Res.* 62:389-398, 1970.
 19. Bretscher, M.S. Directed lipid flow in cell membranes. *Nature* 260:21-23, 1976.
de Petris, S. Distribution and mobility of plasma membrane components on lymphocytes. In *Dynamic Aspects of Cell Surface Organization. Cell Surface Reviews* (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 3, pp. 643-728. Amsterdam: Elsevier, 1977.
 20. Poo, M.; Cone, R.A. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* 247:438-441, 1974.
Jacobson, K.; Elson, E.; Koppel, D.; Webb, W. Fluorescence photobleaching in cell biology. *Nature* 295:283-284, 1982.
 21. Hirano, H.; Parkhouse, B.; Nicolson, G.L.; Lennox, E.S.; Singer, S.J. Distribution of saccharide residues on membrane fragments from a myeloma-cell homogenate: its implications for membrane biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2945-2949, 1972.
Luft, J.H. The structure and properties of the cell surface coat. *Int. Rev. Cytol.* 45:291-382, 1976.
 22. Roseman, S. Sugars of the cell membrane. In *Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology and Pathology* (G. Weissmann, R. Claiborne, eds.), pp. 55-64. New York: Hospital Practice, 1975.
Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), pp. 1-84. New York: Plenum, 1980.
Neufeld, E.F.; Ashwell, G. Carbohydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), pp. 241-266. New York: Plenum, 1980.
 23. G6mperts, B.D. *The Plasma Membrane: Models for Its Structure and Function.* New York: Academic Press, 1976.
 24. Finean, J.B.; Coleman, R.; Michell, R.H. *Membranes and Their Cellular Functions*, 2nd ed., pp. 42-67. London: Blackwell, 1978.
Christensen, H.N. *Biological Transport*, 2nd ed. Reading, Pa.: Benjamin, 1975.
Wilson, D.B. Cellular transport mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 47:933-965, 1978.
 25. Singer, S.J. Thermodynamics, the structure of integral membrane proteins and transport. *J. Supramol. Struct.* 6:313-323, 1977.

- Hobbs, A.S.; Albers, R.W. The structure of proteins involved in active membrane transport. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:259-291, 1980.
26. Kuffler, S.W.; Nicholls, J.G. From Neuron to Brain: A Cellular Approach to the Function of the Nervous System, pp. 88-98. Sunderland, Ma.: Sinauer, 1977.
27. Skou, J.C.; Norby, J.G., eds. Na⁺-K⁺ ATPase: Structure and Kinetics. New York: Academic Press, 1979.
- Racker, E. Reconstitution and mechanism of action of ion pumps. In *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*, pp. 127-152. New York: Academic Press, 1976.
28. Sweadner, K.J.; Goldin, S.M. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. *N. Engl. J. Med.* 302:777-783, 1980.
29. MacLennan, D.H.; Campbell, K.P. Structure and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins. *Trends Biochem. Sci.* 4:148-151, 1979.
- de Meis, L.; Vianna, A.L. Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48:275-292, 1979.
30. Racker, E. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. New York: Academic Press, 1976.
31. Postma, P.W.; Roseman, S. The bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Biochim. Biophys. Acta* 457:213-257, 1976.
- Oxender, D.; Quay, S. Binding proteins and membrane transport. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 264:358-372, 1975.
32. Stevens, C.F. The neuron. *Sci. Am.* 241(3):54-65, 1979.
33. Jaffe, L.F. Control of development by steady ionic currents. *Fed. Proc.* 40:125-127, 1981.
34. Pressman, B.C. Biological applications of ionophores. *Annu. Rev. Biochem.* 45:501-530, 1976.
35. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358, 1975.
- Rubin, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22:389-428, 1970.
36. Lawson, D.; Fewtrell, C.; Raff, M. Localized mast cell degranulation induced by concanavalin A-sepharose beads: implications for the Ca²⁺ hypothesis of stimulus-secretion coupling. *J. Cell Biol.* 79:394-400, 1978.
37. Silverstein, S.C.; Steinman, R.M.; Cohn, Z.A. Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:669-722, 1977.
38. Simionescu, N.; Simionescu, M.; Palade, G.E. Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides: evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell Biol.* 64:586-607, 1975.
39. Roth, T.F.; Porter, K.R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* 20:313-332, 1964.
- Goldstein, J.L.; Anderson, R.G.W.; Brown, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279:679-685, 1979.
- Pearse, B.M.F.; Bretscher, M.S. Membrane recycling by coated vesicles. *Annu. Rev. Biochem.* 50:85-101, 1981.
- Ungewickell, E.; Branton, D. Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289:420-422, 1981.
40. Pastan, I.H.; Willingham, M.C. Receptor-mediated endocytosis of hormones in cultured cells. *Annu. Rev. Physiol.* 43:239-250, 1981.
41. Smith, H.O.; Danner, D.B.; Deich, R.A. Genetic transformation. *Annu. Rev. Biochem.* 50:41-68, 1981.
42. Stossel, T.P. Phagocytosis. *N. Engl. J. Med.* 290:717-723, 774-780, 833-839, 1974 (in three parts).
43. Griffin, F.M., Jr.; Silverstein, S.C. Segmental response of the macrophage plasma membrane to a phagocytic stimulus. *J. Exp. Med.* 139:323-336, 1974.

Griffin, F.M., Jr.; Griffin, J.A.; Silverstein, S.C. Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG-coated bone marrow-derived lymphocytes. *J. Exp. Med.* 144:788-809, 1976.

第七章

一般的

- DePierre, J.W.; Ernster, L. Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 46:201-262, 1977.
- Fawcett, D. *The Cell*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1981. (An outstanding collection of micrographs, with limited text and references.)
- Karp, G. *Cell Biology*. New York: McGraw-Hill, 1979. (See Chapter 7 of this textbook.)
- Krstić, R.V. *Ultrastructure of the Mammalian Cell*. New York: Springer-Verlag, 1979. (A superb atlas of drawings made from electron micrographs.)
- Lodish, H.F.; Rothman, J.E. The assembly of cell membranes. *Sci. Am.* 240(1):48-63, 1979.

引用的

1. Palade, G.E.; Farquhar, M.G. Cell biology. In *Pathophysiology: The Biological Principles of Disease* (L.H. Smith, S.O. Thier, eds.), pp. 1-56. Philadelphia: Saunders, 1981.
2. Weibel, E.R.; Stäubli, W.; Gnägi, H.R.; Hess, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J. Cell Biol.* 42:68-91, 1969.
Bolender, R.P. Stereological analysis of the guinea pig pancreas. *J. Cell Biol.* 61:269-287, 1974.
3. Helenius, A.; Kartenbeck, J.; Simons, K.; Fries, E. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell Biol.* 84:404-420, 1980.
Simons, K.; Garoff, H.; Helenius, A. How an animal virus gets into and out of its host cell. *Sci. Am.* 246(2):58-66, 1982.
Miller, D.; Lenard, J. Antihistaminics, local anesthetics, and other amines as antiviral agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3605-3609, 1981.
4. Lenard, J.; Compans, R.W. The membrane structure of lipid-containing viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 344:51-94, 1974. (A review.)
Rodriguez Boulan, E.; Sabatini, D.D. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5071-5075, 1978.
Bergmann, J.E.; Tokuyasu, K.T.; Singer, S.J. Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus in route to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1746-1750, 1981.
5. Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed. San Francisco: Freeman, 1981. (Chapters 27 and 29.)
Fulton, A.B. How crowded is the cytoplasm? *Cell* 30:345-347, 1982.
6. Lake, J.A. The ribosome. *Sci. Am.* 245(2):84-97, 1981.
Wool, I.G. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:719-754, 1979.
7. Rich, A. Polyribosomes. *Sci. Am.* 209(6):44-53, 1963.
8. Dean, D.; Nomura, M. Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3590-3594, 1980.
9. Kozak, M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in mRNA? *Cell* 15:1109-1123, 1978.
Sherman, F.; Stewart, J.W.; Schweingruber, A.M. Mutants of yeast initiating translation of iso-1-cytochrome c within a region spanning 37 nucleotides. *Cell* 20:215-222, 1980.

- Lewin, B. *Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes*, 2nd ed. New York: Wiley, 1980. (Chapter 23 describes the structure of eucaryotic messenger RNA.)
10. Steiner, D.F.; Quinn, P.S.; Chan, S.J.; Marsh, J.; Tager, H.S. Processing mechanisms in the biosynthesis of proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 343:1-16, 1980.
Stark, G.R. Multifunctional proteins: one gene—more than one enzyme. *Trends Biochem. Sci.* 2:64-66, 1977.
 11. Wold, F. *In vivo* chemical modification of proteins (post-translational modification). *Annu. Rev. Biochem.* 50:783-814, 1981.
Schlesinger, M.J. Proteolipids. *Annu. Rev. Biochem.* 50:193-206, 1981.
Neurath, H.; Walsh, K.A. Role of proteolytic enzymes in biological regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3825-3832, 1976. (A review.)
Chock, P.B.; Rhee, S.G.; Stadtman, E.R. Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 49:813-843, 1980.
 12. Hershko, A.; Ciechanover, A. Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Annu. Rev. Biochem.* 51:335-364, 1982.
 13. DePierre, J.W.; Dallner, G. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 415:411-472, 1975.
Fawcett, D. *The Cell*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1981. (See pages 303-352.)
 14. Jones, A.L.; Fawcett, D.W. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. *J. Histochem. Cytochem.* 14:215-232, 1966. (Includes a review of the functions of the smooth ER in liver.)
Mori, H.; Christensen, A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell Biol.* 84:340-354, 1980. (The smooth ER contributes 60% of the total cell membrane of this steroid-hormone-producing cell.)
 15. de Duve, C. Tissue fractionation past and present. *J. Cell Biol.* 50:20d-55d, 1971.
Dallner, G. Isolation of rough and smooth microsomes—general. *Methods Enzymol.* 31:191-201, 1974.
 16. Adelman, M.; Sabatini, D.; Blobel, G. Ribosome-membrane interaction. *J. Cell Biol.* 56:206-229, 1973.
Kreibich, G.; Ulrich, B.; Sabatini, D. Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. *J. Cell Biol.* 77:464-487, 1978.
 17. Sabatini, D.; Blobel, G. Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions: location of the polypeptides in rough microsomes. *J. Cell Biol.* 45:146-157, 1970.
Sabatini, D.; Kreibich, G.; Morimoto, T.; Adesnick, M. Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* 92:1-22, 1982. (A review.)
 18. Redman, C.; Sabatini, D. Vectorial discharge of peptides released by puromycin from attached ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56:608-615, 1966.
Smith, W.P.; Tai, P.C.; Davis, B.D. Interaction of secreted nascent chains with surrounding membrane in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5922-5925, 1978.
 19. Milstein, C.; Brownlee, G.; Harrison, T.; Mathews, M.B. A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol.* 239:117-120, 1972.
Devillers-Thiery, A.; Kindt, T.; Scheele, G.; Blobel, G. Homology in amino-terminal sequence of precursors to pancreatic secretory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:5016-5020, 1975.
Blobel, G.; Dobberstein, B. Transfer of proteins across membranes, II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J. Cell Biol.* 67:852-862, 1975.
Walter, P.; Blobel, G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum, III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J. Cell Biol.* 91:557-561, 1981.

20. Emr, S.D.; Hall, M.N.; Silhavy, T.J. A mechanism of protein localization: the signal hypothesis and bacteria. *J. Cell Biol.* 86:701-711, 1980.
Davis, B.D.; Tai, P.C. The mechanism of protein secretion across membranes. *Nature* 283:433-438, 1980.
21. Wickner, W. Assembly of proteins into membranes. *Science* 210:861-868, 1980.
Kreil, G. Transfer of proteins across membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 50:317-348, 1981.
22. Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Comparative aspects of glycoprotein structure. *Annu. Rev. Biochem.* 45:217-238, 1976.
Gibson, R., Kornfeld, S.; Schlesinger, S. A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:290-294, 1980.
Wagh, P.V.; Bahl, O.P. Sugar residues on proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 10:307-377, 1981.
23. Struck, D.; Lennarz, W. The function of saccharide lipids in synthesis of glycoproteins. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), Chapter 2. New York: Plenum, 1980.
24. Rothman, J.E.; Kennedy, E.P. Rapid transmembrane movement of newly synthesized phospholipids during membrane assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:1821-1825, 1977.
Coleman, R.; Bell, R.M. Evidence that biosynthesis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and triacylglycerol occurs on the cytoplasmic side of microsomal vesicles. *J. Cell Biol.* 76:245-253, 1978.
25. Wirtz, K.W.A. Transfer of phospholipids between membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 344:95-117, 1974. (A review.)
26. Whaley, W.G. *The Golgi Apparatus*. New York: Springer-Verlag, 1975.
Farquhar, M.; Palade, G. The Golgi apparatus (complex)—(1954-1981) from artifact to center stage. *J. Cell Biol.* 91:77s-103s, 1981.
27. Novikoff, A. The endoplasmic reticulum: a cytochemist's view (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:2781-2787, 1976.
28. Schachter, H.; Roseman, S. Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W. J. Lennarz, ed.), Chapter 3. New York: Plenum, 1980.
29. Hubbard, S.C.; Ivatt, R.J. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 50:555-583, 1981.
Tabas, I.; Kornfeld, S. The synthesis of complex-type oligosaccharides, III. *J. Biol. Chem* 253:7779-7786, 1978.
30. Leblond, C.; Bennett, G. In *International Cell Biology* (B. Brinkley, K. Porter, eds.), pp. 326-336. New York: Rockefeller University Press, 1977.
31. Palade, G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358, 1975.
32. Heuser, J.E.; et al. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81:275-300, 1979.
Heuser, J.; Reese, T. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 88:564-580, 1981.
33. Pearse, B.M.F.; Bretscher, M.S. Membrane recycling by coated vesicles. *Annu. Rev. Biochem.* 50:85-101, 1981.
Anderson, R.G.W.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10:351-364, 1977.
Rothman, J.; Fine, R. Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:780-784, 1980.
34. Rothman, J. The Golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* 213:1212-1219, 1981.

35. de Duve, C. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 189:186-194, 1975.
Bainton, D. The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* 91:66s-76s, 1981.
36. Holtzman, E. Lysosomes: A Survey. New York: Springer-Verlag, 1976.
37. Hasilik, A. Biosynthesis of lysosomal enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 5:237-240, 1980.
Erickson, A.H.; Conner, G.E.; Blobel, G. Biosynthesis of a lysosomal enzyme. *J. Biol. Chem.* 256:11224-11231, 1981.
Waheed, A.; Pohlmann, R.; Hasilik, A.; von Figura, K. Subcellular location of two enzymes involved in the synthesis of phosphorylated recognition markers in lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* 256:4150-4152, 1981.
38. Neufeld, E.F.; Lim, T.W.; Shapiro, L.J. Inherited disorders of lysosomal metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 44:357-376, 1975.
39. Kaplan, A.; Achord, D.T.; Sly, W.S. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2026-2030, 1977.
Neufeld, E.F.; Ashwell, G. Carbohydrate recognition systems for receptor-mediated pinocytosis. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), Chapter 6. New York: Plenum, 1980.
Reitman, M.; Varki, A.; Kornfeld, S. Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity. *J. Clin. Invest.* 67:1574-1579, 1981.
40. von Figura, K.; Weber, E. An alternative hypothesis of cellular transport of lysosomal enzymes in fibroblasts. *Biochem. J.* 176:943-950, 1978.
Fischer, H.D.; Gonzalez-Noriega, A.; Sly, W.S.; Morré, D.J. Phosphomannosyl-enzyme receptors in rat liver. *J. Biol. Chem.* 255:9608-9615, 1980.
Varki, A.; Kornfeld, S. Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 255:10847-10858, 1980.
Reitman, M.L.; Kornfeld, S. Lysosomal enzyme targeting; N-acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J. Biol. Chem.* 256:11977-11980, 1981.
41. Novikoff, A.B.; Novikoff, P.M. Microperoxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* 21:963-966, 1973
de Duve, C. Biochemical studies on the occurrence, biogenesis and life history of mammalian peroxisomes. *J. Histochem. Cytochem.* 21:941-948, 1973.
de Duve, C. Evolution of the peroxisome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168:369-381, 1969.
Goldman, B.M.; Blobel, G. Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5066-5070, 1978.
42. de Duve, C.; Baudhuin, P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol. Rev.* 46:323-357, 1966.
Tolbert, N.E.; Essner, E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J. Cell Biol.* 91:271s-283s, 1981.
43. Elbein, A.D. The tunicamycins—useful tools for studies on glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* 6:219-221, 1981.
Green, R.F.; Meiss, H.K.; Rodriguez Boulan, E. Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 89:230-239, 1981.
44. Inouye, M., ed. Bacterial Outer Membranes: Biogenesis and Functions. New York: Wiley, 1980.
Osborn, M.J.; Wu, H.C.P. Proteins of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:369-422, 1980.
45. Smit, J.; Nikaido, H. Outer membrane of gram-negative bacteria; electron microscopic studies on porin insertion sites and growth of cell surface of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 135:687-702, 1978.

46. Bayer, M.E.; Thurow, H.; Bayer, M.H. Penetration of the polysaccharide capsule of *E. coli* by bacteriophage K29. *Virology* 94:95-118, 1979.
- Neupert, W.; Schatz, G. How proteins are transported into mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 6:1-4, 1981.

第八章

一般的

- DNA Structures. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Volume 47, 1983. (A collection of original articles.)
- Hood, L.E.; Wilson, J.H.; Wood, W.B. *Molecular Biology of Eucaryotic Cells*. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1975.
- Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed. New York: Wiley, 1980. (Parts 2, 3, and 4 cover most of the material in this chapter at a more advanced level; also, an excellent source of literature references.)
- Watson, J.D. *The Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1976.

引用的

- Gall, J.G. Chromosome structure and the C-value paradox. *J. Cell Biol.* 91:3s-14s, 1981. (A very readable review.)
- Hsu, T.C. *Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective*. New York: Springer-Verlag, 1979.
- Felsenfeld, G. Chromatin. *Nature* 271:115-122, 1978. (A review.)
- Chambon, P. Summary: the molecular biology of the eukaryotic genome is coming of age. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:1209-1234, 1978.
- Bostock, C.J.; Sumner, A.T. *The Eucaryotic Chromosome*. Amsterdam: North-Holland, 1978. (An advanced treatment.)
- Igo-Kemenes, T.; Hörz, W.; Zachau, H.G. Chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 51:89-122, 1982.
- Isenberg, I. Histones. *Annu. Rev. Biochem.* 48:159-191, 1979.
- Kornberg, R.D.; Klug, A. The nucleosome. *Sci. Am.* 244(2):52-64, 1981.
- McGhee, J.D.; Felsenfeld, G. Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* 49:1115-1156, 1980.
- Worcel, A.; Strogatz, S.; Riley, D. Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1461-1465, 1981.
- McGhee, J.D.; Rau, D.C.; Charney, E.; Felsenfeld, G. Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin. *Cell* 22:87-96, 1980.
- Thoma, F.; Koller, T.; Klug, A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83:403-427, 1979.
- Simpson, R.T. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17:5524-5531, 1978.
- Alfrey, V.G. Post-synthetic modifications of histone structure. In *Chromatin and Chromosome Structure* (H.J. Li, R. Eckhardt, eds.), pp. 167-191. New York: Academic Press, 1977.
- Goodwin, G.H.; Walker, J.M.; Johns, E.W. The high mobility group (HMG) non-histone chromosomal proteins. In *The Cell Nucleus*, Vol. 6 (H. Busch, ed.), pp. 181-219. New York: Academic Press, 1978.
- Sandeén, G.; Wood, W.I.; Felsenfeld, G. The interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 8:3757-3778, 1980.

- Ajiro, K.; Borun, T.W.; Shulman, S.D.; McFadden, G.M.; Cohen, L.H. Comparison of the structures of human histones 1A and 1B and their intramolecular phosphorylation sites during the HeLa S-3 cell cycle. *Biochemistry* 20:1454-1464, 1981.
7. Ptashne, M.; Gilbert, W. Genetic repressors. *Sci. Am.* 222(6):36-44, 1970.
- Ohlendorf, D.H.; Anderson, W.F.; Fisher, R.G.; Takeda, Y.; Matthews, B.W. The molecular basis of DNA-protein recognition inferred from the structure of cro repressor. *Nature* 298:718-723, 1982.
- Tjian, R. T antigen binding and the control of SV40 gene expression. *Cell* 26:1-2, 1981.
- Engelke, D.R.; Ng, S.-Y.; Shastry, B.S.; Roeder, R.G. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19:717-728, 1980.
8. Zachau, H.G.; Igo-Komenes, T. Face to phase with nucleosomes. *Cell* 24:597-598, 1981.
9. Elgin, S.C.R. DNase I—hypersensitive sites of chromatin. *Cell* 27:413-415, 1981.
- Wu, C.; Gilbert, W. Tissue-specific exposure of chromatin structure at the 5' terminus of the rat preproinsulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1577-1580, 1981.
- McGhee, J.D.; Wood, W.I.; Dolan, M.; Engel, J.D.; Felsenfeld, G. A 200 base pair region at the 5' end of the chicken adult β -globin gene is accessible to nuclease digestion. *Cell* 27:45-55, 1981.
- Samal, B.; Worcel, A.; Louis, C.; Schedl, P. Chromatin structure of the histone genes of *D. melanogaster*. *Cell* 23:401-409, 1981.
10. Worcel, A.; Burgi, E. On the structure of the folded chromosome of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 71:127-148, 1972.
- Benyajati, C.; Worcel, A. Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9:393-408, 1976.
11. Marsden, M.; Laemmli, U.K. Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. *Cell* 17:849-858, 1979.
- Georgiev, G.P.; Nedospasov, S.A.; Bakayev, V.V. Supranucleosomal levels of chromatin organization. In *The Cell Nucleus*, Vol. 6 (H. Busch, ed.), pp. 3-34. New York: Academic Press, 1978.
12. Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 428-440. New York: Wiley, 1980.
- Yunis, J.J. High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268-1270, 1976.
13. Beermann, W. Chromosomes and genes. In *Developmental Studies on Giant Chromosomes* (W. Beermann, ed.), pp. 1-33. New York: Springer-Verlag, 1972.
- Bostock, C.J.; Sumner, A.T. *The Eucaryotic Chromosome*, pp. 233-265. Amsterdam: North-Holland, 1978.
14. Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 479-502. New York: Wiley, 1980.
- Judd, B.H.; Young, M.W. An examination of the one cistron: one chromomere concept. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:573-579, 1974.
15. Levinger, L.; Varshavsky, A. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell* 28:375-385, 1982.
- Howard, G.C.; Abmayr, S.M.; Shinefeld, L.A.; Sato, V.L.; Elgin, S.C.R. Monoclonal antibodies against a specific nonhistone chromosomal protein of *Drosophila* associated with active genes. *J. Cell Biol.* 88:219-225, 1981.
- Lezzi, M.; Robert, M. Chromosomes isolated from unfixed salivary glands of *Chironomus*. In *Developmental Studies on Giant Chromosomes* (W. Beermann, ed.), pp. 35-56. New York: Springer-Verlag, 1972.
16. Ohta, T.; Kimura, M. Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. *Nature* 233:118-119, 1971.
- Gall, J.G. Chromosome structure and the C-value paradox. *J. Cell Biol.* 91:3s-14s, 1981.

17. Darnell, J.E., Jr. Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 22:327-353, 1979;
Perry, R.P. RNA processing comes of age. *J. Cell Biol.* 91:28s-38s, 1981.
18. Chambon, P. Eucaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 44:613-638, 1975.
Brown, D.D. Gene expression in eucaryotes. *Science* 211:667-674, 1981.
Grosveld, G.C.; de Boer, E.; Shewmaker, C.K.; Flavell, R.A. DNA sequences necessary for transcription of the rabbit β -globin gene *in vivo*. *Nature* 295:120-126, 1982.
McKnight, S.L.; Kingsbury, R. Transcriptional control signals of a eucaryotic protein-coding gene. *Science* 217:316-324, 1982.
19. Hastie, N.D.; Bishop, J.O. The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissues. *Cell* 9:761-774, 1976.
Lewin, B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 708-719. New York: Wiley, 1980.
20. Miller, O.L. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.* 91:15s-27s, 1981. (A review.)
Foe, V.E.; Wilkinson, L.E.; Laird, C.D. Comparative organization of active transcription in *Oncopeltus fasciatus*. *Cell* 9:131-146, 1976.
21. Beyer, A.L.; Christensen, M.E.; Walker, B.W.; LeSturgeon, W.M. Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* 11:127-138, 1977.
Beyer, A.L.; Miller, O.L.; McKnight, S.L. Ribonucleoprotein structure in nascent hnRNA is nonrandom and sequence-dependent. *Cell* 20:75-84, 1980.
22. Perry, R.P. RNA processing comes of age. *J. Cell Biol.* 91:28s-38s, 1981. (Includes a historical review.)
Chambon, P. Split genes. *Sci. Am.* 244(5):60-71, 1981.
Crick, F. Split genes and RNA splicing. *Science* 204:264-271, 1979.
Darnell, J.E., Jr. Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. *Nature* 297:365-371, 1982.
23. Lerner, M.R.; Steitz, J.A. Snurps and scyrps. *Cell* 25:298-300, 1981.
24. Wozney, J.; Hanahan, D.; Tate, V.; Boedtker, H.; Doty, P. Structure of the pro $\alpha 2$ collagen gene. *Nature* 294:129-135, 1981.
25. Ziff, E.B. Transcription and RNA processing by the DNA tumor viruses. *Nature* 287:491-499, 1980. (A review.)
26. Early, P.; et al. Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* 20:313-319, 1980.
27. Beadle, G. Genes and the chemistry of the organism. *Am. Sci.* 34:31-53, 1946.
28. Gruss, P.; Lai, C.-J.; Dhar, R.; Khoury, G. Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4317-4321, 1979.
29. Long, E.O.; Dawid, I.B. Repeated genes in eucaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 49:727-764, 1980.
Miller, O.L. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. *J. Cell Biol.* 91:15s-27s, 1981.
30. Perry, R.P. Processing of RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 45:605-629, 1976. (Emphasizes ribosomal RNA.)
Jordan, E.G. The Nucleolus, 2nd ed. Oxford, Eng.: Oxford University Press, 1978. (A clear brief review).
31. Ghosh, S. The nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol.* 44:1-28, 1976.
Fawcett, D.W. The Cell, 2nd ed., pp. 243-265. Philadelphia: Saunders, 1981.
32. McClintock, B. The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 21:294-323, 1934.
Anastassova-Kristeva, M. The nucleolar cycle in man. *J. Cell Sci.* 25:103-110, 1977.

33. Franke, W.W.; Scheer, U.; Krohne, G.; Jarasch, E.-D. The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. *J. Cell Biol.* 91:39s-50s, 1981. (A review.)
Wolfe, S.L. *Biology of the Cell*, 2nd ed. Belmont, Ca.: Wadsworth, 1981. (Chapters 11 and 12.)
34. Fawcett, D.W. *The Cell*, 2nd ed., pp. 266-302. Philadelphia: Saunders, 1981.
Krstic, R.V. *Ultrastructure of the Mammalian Cell*, pp. 2-10. New York: Springer-Verlag, 1979.
35. Gerace, L.; Blobel, G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277-287, 1980.
36. Bonner, W.M. Protein migration and accumulation in nuclei. In *The Cell Nucleus*, Vol. 6 (H. Busch, ed.), pp. 97-148. New York: Academic Press, 1978.
Paine, P.L.; Horowitz, S.B. The movement of material between nucleus and cytoplasm. In *Cell Biology: A Comprehensive Treatise*, Vol. 4 (D.M. Prescott, L. Goldstein, eds.), pp. 299-338. New York: Academic Press, 1980.
37. Bostock, C.J.; Sumner, A.T. *The Eucaryotic Chromosome*, pp. 196-208. Amsterdam: North-Holland, 1978.
38. Watson, J.D. *Molecular Biology of the Gene*, 3rd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1976. (Chapters 14 and 17).
Brown, D.D. Gene expression in eucaryotes. *Science* 211:667-674, 1981.
39. Gurdon, J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10:622-640, 1962.
Steward, F.C.; Mapes, M.O.; Mears, K. Growth and organized development of cultured cells. *Am. J. Bot.* 45:705-713, 1958.
40. Garrels, J.I. Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line. *Dev. Biol.* 73:134-152, 1979.
- Van Nest, G.; MacDonald, R.J.; Raman, R.K.; Rutter, W.J. Proteins synthesized and secreted during rat pancreatic development. *J. Cell Biol.* 86:784-794, 1980. (Two-dimensional gels of developing tissues.)
41. Derman, E.; et al. Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell* 23:731-739, 1981.
42. Milier, J.H.; Reznikoff, W.S., eds. *The Operon*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1978. (Reviews of gene regulatory proteins in bacterial systems.)
43. Ptashne, M.; et al. How the lambda repressor and cro work. *Cell* 19:1-11, 1980.
Herskowitz, I.; Hagen, D. The lysis-lysogeny decision of phage lambda: explicit programming and responsiveness. *Annu. Rev. Genet.* 14:399-445, 1980.
44. Gierer, A. Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:951-961, 1974.
45. Ogden, S.; Haggerty, D.; Stoner, C.M.; Kolodrubetz, D.; Schleif, R. The *E. coli* L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3346-3350, 1980.
Yamamoto, K.R.; Alberts, B. Steroid receptors: elements for modulation of eucaryotic transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 45:721-746, 1976.
46. Smith, G.R. DNA supercoiling: another level for regulating gene expression. *Cell* 24:599-600, 1981.
Sinden, R.R.; Pettijohn, D.E. Chromosomes in living *E. coli* cells are segregated into domains of supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:224-228, 1981.
Wang, J.C.C. Superhelical DNA. *Trends Biochem. Sci.* 5:219-221, 1980.
47. Weintraub, H.; Groudine, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193:848-856, 1976.
Garel, A.; Zolan, M.; Axel, R. Genes transcribed at diverse rates have a similar conformation in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4867-4871, 1977.
Foe, V.E. Modulation of ribosomal RNA synthesis in *Oncopeltus fasciatus*: an electron microscopic study of the relationship between changes in chromatin structure and transcriptional activity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42:723-740, 1978.

- Weisbrod, S.; Groudine, M.; Weintraub, H. Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes. *Cell* 19:289-301, 1980.
- Mathis, D.; Oudet, P.; Chambon, P. Structure of transcribing chromatin. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 24:1-55, 1980.
- Weisbrod, S. Active chromatin (a review). *Nature* 297:289-295, 1982.
48. Ashburner, M.; Chihara, C.; Meltzer, P.; Richards, G. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:655-662, 1974.
- Lamb, M.M.; Daneholt, B. Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentaus*. *Cell* 17:835-848, 1979.
- Korge, G. Direct correlation between a chromosome puff and the synthesis of a larval saliva protein in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 62:155-174, 1977. (The "infectious puff" phenomenon.)
49. Sommerville, J.; Malcolm, D.B.; Callan, H.G. The organization of transcription on lampbrush chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 283:359-366, 1978.
- Bostock, C.J.; Sumner, A.T. The Eucaryotic Chromosome, pp. 347-374. Amsterdam: North-Holland, 1978.
50. Hagenbüchle, O.; Tosi, M.; Schibler, U.; Bovey, R.; Wellauer, P.K.; Young, R.A. Mouse liver and salivary gland α -amylase mRNAs differ only in 5' non-translated sequences. *Nature* 289:643-646, 1981.
- Marie, J.; Simon, M.-P.; Dreyfus, J.-C.; Kahn, A. One gene, but two messenger RNAs encode liver L and red cell L' pyruvate kinase subunits. *Nature* 292:70-72, 1981.
- Amara, S.G.; Jonas, V.; Rosenfeld, M.G.; Ong, E.S.; Evans, R.M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298:240-244, 1982.
51. Brown, S.W. Heterochromatin. *Science* 151:417-425, 1966.
- Hsu, T.C.; Cooper, J.E.K.; Mace, M.L.; Brinkley, B.R. Arrangement of centromeres in mouse cells. *Chromosoma* 34:73-87, 1971.
52. Lyon, M.F. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47:1-35, 1972.
- Cattanach, B.M. Control of chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* 9:1-18, 1975.
- Martin, G.R. X-chromosome inactivation in mammals. *Cell* 29:721-724, 1982.
53. Alberts, B.; Worcel, A.; Weintraub, H. On the biological implications of chromatin structure. In *The Organization and Expression of the Eucaryotic Genome* (E.M. Bradbury, K. Javaherian, eds.), pp. 165-191. New York: Academic Press, 1977.
54. Razin, A.; Riggs, A.D. DNA methylation and gene function. *Science* 210:604-610, 1980.
- Naveh-Many, T.; Cedar, H. Active gene sequences are undermethylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4246-4250, 1981.
- Groudine, M.; Eisenman, R.; Weintraub, H. Chromatin structure of endogenous retroviral genes and activation by an inhibitor of DNA methylation. *Nature* 292:311-317, 1981.
55. Simon, M.; Zeig, J.; Silverman, M.; Mandel, G.; Doolittle, R. Phase variation: evolution of a controlling element. *Science* 209:1370-1374, 1980.
- Kushner, P.J.; Blair, L.C.; Herskowitz, I. Control of yeast cell types by mobile genes: a test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5264-5268, 1979.
- Börst, P.; Cross, G.A.M. Molecular basis for trypanosome antigenic variation. *Cell* 29:291-303, 1982.
56. Beermann, S. The diminution of heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda). *Chromosoma* 60:297-344, 1977.
- Spradling, A.C.; Mahowald, A.P. Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1096-1100, 1980.

- Gall, J.G. Chromosome structure and the C-value paradox. *J. Cell Biol.* 91:3s-14s, 1981. (Includes a review of gene amplifications.)
- Sakano, H.; Hüppi, K.; Heinrich, G.; Tonegawa, S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280:288-293, 1979.
57. Hsu, T.C. Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective. New York: Springer-Verlag, 1979. (Chapters 22 and 23.)
- Klein, G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature* 294:313-318, 1981. (A review.)
- Cairns, J. The origin of human cancers. *Nature* 289:353-357, 1981.
- Szostak, J.W.; Blackburn, E.H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29:245-255, 1982.
58. Lewin, B. Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 503-569, 861-930. New York: Wiley, 1980.
59. Hsu, T.C. Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective. New York: Springer-Verlag, 1979.
- Craig-Holmes, A.P.; Shaw, M.W. Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 174:702-704, 1971.
- John, B.; Miklos, G.L.G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int. Rev. Cytol.* 58:1-114, 1979.
60. Ingram, V. Gene evolution and the hemoglobins. *Nature* 189:704-708, 1961.
- Efstratiadis, A.; et al. The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 21:653-668, 1980.
- Proudfoot, N. Pseudogenes. *Nature* 286:840-841, 1980.
- Schimke, R.T. Gene amplification and drug resistance. *Sci. Am.* 243(5):60-69, 1980.
61. Doolittle, R.F. Protein evolution. In *The Proteins*, Vol. 4, 3rd ed. (H. Neurath, R.L. Hill, eds.), pp. 1-118. New York: Academic Press, 1979.
- Darnell, J.E. Implications of RNA-RNA splicing in evolution of eucaryotic cells. *Science* 202:1257-1260, 1978.
62. Jelinek, W.R.; Schmid, C.W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu. Rev. Biochem.* 51:813-844, 1982.
- Jagadeeswaran, P.; Forget, B.G.; Weissman, S.M. Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA Pol III transcripts? *Cell* 26:141-142, 1981.
63. Orgel, L.E.; Crick, F.H.C. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284:604-607, 1980.
- Doolittle, W.F.; Sapienza, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603, 1980.
- Cohen, S.N.; Shapiro, J.A. Transposable genetic elements, *Sci. Am.* 242(2):40-49, 1980.
64. McClintock, B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21:197-216, 1956.
- Cullis, C.A. Molecular aspects of the environmental induction of heritable changes in flax. *Heredity* 38:129-154, 1977. (A review.)
- Spradling, A.C.; Rubin, G.M. *Drosophila* genome organization: conserved and dynamic aspects. *Annu. Rev. Genet.* 15:219-264, 1981.
- Roeder, G.S.; Farabaugh, P.J.; Chaleff, D.T.; Fink, G.R. The origins of gene instability in yeast. *Science* 209:1375-1380, 1980.
- Bingham, P.M.; Kidwell, M.G.; Rubin, G.M. The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: the role of the P element, a P-strain-specific transposon family. *Cell* 29:995-1004, 1982.

第九章

第九章

一般的

- Karp, G. *Cell Biology*, pp. 342-417. New York: McGraw-Hill, 1979.
- Lehninger, A.L. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth, 1982. (Chapters 16, 17, and 23.)
- Nicholls, D.G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. New York: Academic Press, 1982.
- Stryer, L. *Biochemistry*, 2nd ed. San Francisco: Freeman, 1981. (Chapters 13, 14, and 19.)

引用的

1. Ernster, L.; Schatz, G. Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* 91:227s-255s, 1981.
Tzagoloff, A. *Mitochondria*. New York: Plenum, 1982.
Fawcett, D.W. *The Cell*, 2nd ed., pp. 410-485. Philadelphia: Saunders, 1981.
Whittaker, P.A.; Danks, S.M. *Mitochondria: Structure, Function and Assembly*. New York: Longman, 1979.
2. DePierre, J.W.; Ernster, L. Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 46:201-262, 1977.
Srere, P.A. The infrastructure of the mitochondrial matrix, *Trends Biochem. Sci.* 5:120-121, 1980.
3. Krstić, R.V. Ultrastructure of the Mammalian Cell, pp. 28-57. New York: Springer-Verlag, 1979.
Pollak, J.K.; Sutton, R. The differentiation of animal mitochondria during development. *Trends Biochem. Sci.* 5:23-27, 1980.
4. McGilvery, R.W. *Biochemistry: A Functional Approach*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1979. (Chapter 28.)
5. Krebs, H.A. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* 14:154-170, 1970.
6. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:144-148, 1961.
Racker, E. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics. *Fed. Proc.* 39:210-215, 1980.
7. Capaldi, R.A., ed. *Membrane Proteins in Energy Transduction*. New York: Dekker, 1979.
8. Wood, W.B.; Wilson, J.H.; Benbow, R.M.; Hood, L.E. *Biochemistry: A Problems Approach*, 2nd ed. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1981. (See problems, Chapters 9, 12, and 14.)
Nicholls, D.G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*. New York: Academic Press, 1982. (Chapter 3.)
9. Hinkle, P.C.; McCarty, R.E. How cells make ATP. *Sci. Am.* 238(3):104-123, 1978.
10. Klingenberg, M. The ADP, ATP shuttle of the mitochondrion. *Trends Biochem. Sci.* 4:249-252, 1979.
Durand, R.; Briand, Y.; Touraille, S.; Alziari, S. Molecular approaches to phosphate transport in mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 6:211-214, 1981.
Nicholls, D. Some recent advances in mitochondrial calcium transport. *Trends Biochem. Sci.* 6:36-38, 1981.
LaNoue, K.F.; Schoolwerth, A.C. Metabolite transport in mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 48:871-922, 1979.
11. Eisenberg, D.; Crothers, D. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*. Menlo Park, Ca.: Benjamin-Cummings, 1979. (Chapters 4 and 5.)
12. Racker, E. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. New York: Academic Press, 1976. (A personal account of the concepts and history.)

13. Racker, E.; Stoeckenius, W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.* 249:662-663, 1974.
14. Racker, E. Structure and function of ATP-driven ion pumps. *Trends Biochem. Sci.* 1:244-247, 1976.
15. Fillingame, R.H. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 49:1079-1113, 1980.
16. Fuller, S.D.; Capaldi, R.A.; Henderson, R. Structure of cytochrome c oxidase in deoxycholate-derived two-dimensional crystals. *J. Mol. Biol.* 134:305-327, 1979.
17. Hackenbrock, C.R. Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane. *Trends Biochem. Sci.* 6:151-154, 1981.
18. White, A.; Handler, P.; Smith, E.L.; Hill, R.L.; Lehman, I.R. Principles of Biochemistry, 6th ed., pp. 271-282. New York: McGraw-Hill, 1978.
19. Wikström, M.; Krab, K.; Saraste, M. Proton-translocating cytochrome complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 50:623-655, 1981.
20. Hanstein, W.G. Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 1:65-67, 1976.
 holls, D.G. Brown fat mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 1:128-130, 1976.
- Ln, C.S.; Klingenberg, E.M. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.* 113:299-303, 1980.
22. Konings, W.N.; Michels, P.A.M. Electron-transfer-driven solute translocation across bacterial membranes. In *Diversity of Bacterial Respiratory Systems*, Vol. 1 (C.J. Knowles, ed.), pp. 33-86. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
23. Bogorad, L. Chloroplasts. *J. Cell Biol.* 91:256s-270s, 1981. (A historical review.)
 Haliwell, B. Chloroplast Metabolism—The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells. Oxford, Eng.: Clarendon, 1981.
 Hatch, M.D.; Boardman, N.K., eds. Photosynthesis. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*, Vol. 8. New York: Academic Press, 1981.
24. Miller, K.R. The photosynthetic membrane. *Sci. Am.* 241(4):102-113, 1979.
25. Ellis, R.J. The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* 4:241-244, 1979.
26. Bassham, J.A. The path of carbon in photosynthesis. *Sci. Am.* 206(6):88-100, 1962.
27. Björkman, O.; Berry J. High-efficiency photosynthesis. *Sci. Am.* 229(4):80-93, 1973. (C₄ plants.)
 Chollet, R. The biochemistry of photorespiration. *Trends Biochem. Sci.* 2:155-159, 1977.
 Heber, U.; Krause, G.H. What is the physiological role of photorespiration? *Trends Biochem. Sci.* 5:32-34, 1980.
28. Govindjee; Govindjee, R. The absorption of light in photosynthesis. *Sci. Am.* 231(6):68-82, 1974.
 Bennett, J. The protein that harvests sunlight. *Trends Biochem. Sci.* 4:268-271, 1979.
 Thornber, J.P.; Markwell, J.P. Photosynthetic pigment-protein complexes in plant and bacterial membranes. *Trends Biochem. Sci.* 6:122-125, 1981.
29. Levine, R.P. The mechanism of photosynthesis. *Sci. Am.* 221(6):58-70, 1969.
30. Heber, U.; Walker, D.A. The chloroplast envelope—barrier or bridge? *Trends Biochem. Sci.* 4:252-256, 1979.
 Heber, U.; Heldt, H.W. The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:139-168, 1981.
31. Stumpf, P.K. Plants, fatty acids, compartments. *Trends Biochem. Sci.* 6:173-176, 1981.
 Raven, J.A. Division of labor between chloroplast and cytoplasm. In *The Intact Chloroplast* (J. Barber, ed.), pp. 403-443. Amsterdam: Elsevier, 1976.
32. Gest, H. The evolution of biological energy-transducing systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:73-77, 1980.

- Gottschalk, G. *Bacterial Metabolism*. New York: Springer-Verlag, 1979. (Chapter 8 covers fermentations.)
33. Knowles, C.J., ed. *Diversity of Bacterial Respiratory Systems*, Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
 34. Gromet-Elhanan, Z. Electrochemical gradients and energy coupling in photosynthetic bacteria. *Trends Biochem. Sci.* 2:274-277, 1977.
 - Dickerson, R.E. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. *Sci. Am.* 242(3):136-153, 1980.
 - Blankenship, R.E.; Parson, W.W. The photochemical electron transfer reactions of photosynthetic bacteria and plants. *Annu. Rev. Biochem.* 47:635-653, 1978.
 35. Gillham, N.W. *Organelle Heredity*. New York: Raven, 1978.
 - Kirk, J.T.O.; Tilney-Basset, R.A. *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1979.
 - Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed. New York: Wiley, 1980. (Chapter 21 covers organelle genomes.)
 - Kroon, A.M.; Saccone, C., eds. *The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 1980.
 36. Tzagoloff, A.; Macino, G.; Sebald, W. Mitochondrial genes and translation products. *Annu. Rev. Biochem.* 48:419-441, 1979.
 37. Posakony, J.W.; England, J.M.; Attardi, G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 74:468-491, 1977.
 38. Attardi, G.; Borst, P.; Slonimski, P.P. *Mitochondrial Genes*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
 - Cummings, D.J.; Borst, P.; Dawid, I.B.; Weissman, S.M.; Fox, C.F., eds. *Extrachromosomal DNA: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Vol. 15. New York: Academic Press, 1979.
 - Clayton, D.A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28:693-705, 1982.
 39. von Wettstein, D. Chloroplast and nucleus: concerted interplay between genomes of different cell organelles. In *International Cell Biology, 1980-1981* (H.G. Schweiger, ed.), pp. 250-272. New York: Springer-Verlag, 1981.
 40. Buetow, D.E.; Wood, W.M. The mitochondrial translation system. *Subcell. Biochem.* 5:1-85, 1978.
 - Edwards, K.; Kössel, H. The rRNA operon from *Zea mays* chloroplasts: nucleotide sequence of 23S rDNA and its homology with *E. coli* 23S rDNA. *Nucleic Acids Res.* 9:2853-2869, 1981.
 41. Borst, P. The biogenesis of mitochondria in yeast and other primitive eukaryotes. In *International Cell Biology, 1980-1981* (H.G. Schweiger, ed.), pp. 239-249. New York: Springer-Verlag, 1981.
 42. Birky, C.W., Jr. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.* 12:471-512, 1978.
 43. Giles, R.E.; Blanc, H.; Cann, H.M.; Wallace, D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6715-6719, 1980.
 44. Bernardi, G. The petite mutation in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 4:197-201, 1979.
 - Locker, J.; Lewin, A.; Rabinowitz, M. The structure and organization of mitochondrial DNA from petite yeast. *Plasmid* 2:155-181, 1979.
 - Montisano, D.F.; James, T.W. Mitochondrial morphology in yeast with and without mitochondrial DNA. *J. Ultrastruct. Res.* 67:288-296, 1979.
 45. Anderson, S.; et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465, 1981.
 - Bibb, M.J.; Van Etten, R.A.; Wright, C.T.; Walberg, M.W.; Clayton, D.A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26:167-180, 1981.
 46. Ciferri, O. The chloroplast DNA mystery. *Trends Biochem. Sci.* 3:256-258, 1978.
 47. Attardi, G. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome: a lesson in economy. *Trends Biochem. Sci.* 6:86-89, 100-103, 1981.

- Ojala, D.; Montoya, J.; Attardi, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290:470-474, 1981.
- Levens, D.; Ticho, B.; Ackerman, E.; Rabinowitz, M. Transcriptional initiation and 5' termini of yeast mitochondrial RNA. *J. Biol. Chem.* 256:5226-5232, 1981.
- Borst, P.; Grivell, L.A. One gene's intron is another gene's exon. *Nature* 289:439-440, 1981. (Review of the introns found in organelle DNAs.)
48. Chua, N.-H.; Schmidt, G.W. Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:6110-6114, 1978.
- Schatz, G. How mitochondria import proteins from the cytoplasm. *FEBS Lett.* 103:203-211, 1979.
- Neupert, W.; Schatz, G. How proteins are transported into mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 6:1-4, 1981.
- Gasser, S.M.; et al. Imported mitochondrial proteins, cytochrome b₂ and cytochrome c₁ are processed in two steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:267-271, 1982.
- Ellis, R.J. Chloroplast proteins: synthesis, transport, and assembly. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:111-138, 1981.
49. van den Bogert, C.; Kroon, A.M. Tissue distribution effects on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats. *Biochem. Pharmacol.* 30:1706-1709, 1981.
50. Whatley, J.M.; John, P.; Whatley, F.R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 204:165-187, 1979.
- Doolittle, W.F. Revolutionary concepts in evolutionary cell biology. *Trends Biochem. Sci.* 5:146-149, 1980.
- Dickerson, R.E. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism. *Sci. Am.* 242(3):136-153, 1980.
- Schwartz, R.M.; Dayhoff, M.O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* 199:395-403, 1978.

第十章

一般的

- Goldman, R.; Pollard, T.; Rosenbaum, J., eds. *Cell Motility*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
- Inoué, S.; Stephens, R.E. *Molecules and Cell Movement*. New York: Raven, 1975.
- Organization of the Cytoplasm. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46, 1982.
- Stebbins, S.; Hyams, J.S. *Cell Motility*. Harlowe, Eng.: Longman, 1979.

引用的

1. Offer, G. The molecular basis of muscular contraction. In *Companion to Biochemistry* (A.T. Bull, J.R. Lagnado, J.O. Thomas, D.R. Tipton, eds.), pp. 623-671. New York: Longman, 1974.
- Squire, J. *The Structural Basis of Muscle Contraction*. New York: Plenum, 1981.
- Huxley, A.F. *Reflections on Muscle*. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1980.
2. Huxley, H.E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164:1356-1366, 1969.
3. Bessman, S.P.; Geiger, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science* 211:448-452, 1981.
4. Katz, B. *Nerve, Muscle and Synapse*. New York: McGraw-Hill, 1966.
5. Murray, J.M.; Weber, A. The cooperative action of muscle proteins. *Sci. Am.* 230(2):59-71, 1974.
- Taylor, K.A.; Amos, L.A. A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments. *J. Mol. Biol.* 147:297-324, 1981.

6. Adelstein, R.S.; Eisenberg, E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu. Rev. Biochem.* 49:921-956, 1980.
Hartshorne, D.J. Phosphorylation of myosin and the regulation of smooth-muscle actomyosin. In *Cell and Muscle Motility II* (R.M. Dowben, J.W. Shay, eds.), pp. 188-220. New York: Plenum, 1982.
7. Satir, P. How cilia move. *Sci. Am.* 231(4):44-63, 1974.
8. Dustin, P. Microtubules. *Sci. Am.* 243(2):66-76, 1980.
Dustin, P. *Microtubules*. New York: Springer-Verlag, 1978.
Roberts, K.; Hyams, J.S., eds. *Microtubules*. New York: Academic Press, 1979.
9. Summers, K.E.; Gibbons, I.R. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:3092-3096, 1971.
Warner, F.D.; Satir, P. The structural basis of ciliary bend formation. *J. Cell Biol.* 63:35-63, 1974.
10. Warner, F.D.; Mitchell, D.R. Dynein, the mechanochemical coupling adenosine triphosphatase of microtubule-based sliding filament mechanisms. *Int. Rev. Cytol.* 66:1-43, 1980.
Satir, P.; Wais-Steider, J.; Lebduska, S.; Nasr, A.; Avolio, J. The mechanochemical cycle of the dynein arm. *Cell Motility* 1:303-327, 1981.
11. Afzelius, B.A.; Eliasson, R. Flagellar mutants in man: on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome. *J. Ultrastruct. Res.* 69:43-52, 1979.
Afzelius, B.A. Genetic disorders of cilia. In *International Cell Biology, 1980-1981* (H.G. Schweiger, ed.), pp. 440-447. New York: Springer-Verlag, 1981.
12. Brokaw, C.J.; Luck, D.J.L.; Huang, B. Analysis of the movement of *Chlamydomonas* flagella: the function of the radial-spoke system is revealed by comparison of wild-type and mutant flagella. *J. Cell Biol.* 92:722-732, 1982.
Sugino, K.; Naitoh, Y. Simulated cross-bridge patterns corresponding to ciliary beating in *Paramecium*. *Nature* 295:609-611, 1982.
13. Wilson, L. Action of drugs on microtubules. *Life Sci.* 17:303-310, 1975.
Schliwa, M.; Euteneuer, U.; Bulinski, J.C.; Izant, J.C. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1037-1041, 1981.
Schiff, P.B.; Horwitz, S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1561-1565, 1980.
Inoué, S.; Sato, H. Cell motility by labile association of molecules: the nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* 50:259-292, 1967.
14. Tilney, L.G.; Hatano, S.; Ishikawa, H.; Mooseker, M.S. The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59:109-126, 1973.
Carlsson, L.; Nyström, L.-E.; Sundkvist, I.; Markey, F.; Lindberg, U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* 115:465-483, 1977.
15. Lin, D.C.; Tobin, K.D.; Grumet, M.; Lin, S. Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation. *J. Cell Biol.* 84:455-460, 1980.
Wieland, T. Modification of actins by phallotoxins. *Naturwissenschaften* 64:303-309, 1977.
Brenner, S.L.; Korn, E.D. Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 254:9982-9985, 1979.
16. Weisenberg, R.C. Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177:1104-1105, 1972.
Timasheff, S.N. The *in vitro* assembly of microtubules from purified brain tubulin. *Trends Biochem. Sci.* 4:61-65, 1979.
Kirschner, M.W. Microtubule assembly and nucleation. *Int. Rev. Cytol.* 54:1-71, 1978.

- Pollard, T.D.; Craig, S.W. Mechanism of actin polymerization. *Trends Biochem. Sci.* 7:55-58, 1982.
17. Woodrum, D.T.; Rich, S.A.; Pollard, T.D. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *J. Cell Biol.* 67:231-237, 1975.
Bergen, L.G.; Borisy, G.G. Head to tail polymerization of microtubules *in vitro*: electron microscope analysis of seeded assembly. *J. Cell Biol.* 84:141-150, 1980.
 18. Wegner, A. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* 108:139-150, 1976.
Kirschner, M.W. Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers *in vivo*. *J. Cell Biol.* 86:330-334, 1980.
Margolis, R.L.; Wilson, L. Microtubule treadmills—possible molecular machinery. *Nature* 293:705-711, 1981.
 19. Kim, H.; Binder, L.I.; Rosenbaum, J.L. The periodic association of MAP-2 with brain microtubules *in vitro*. *J. Cell Biol.* 80:266-276, 1979.
Amos, L.A. Arrangement of high molecular weight associated proteins on purified mammalian brain microtubules. *J. Cell Biol.* 72:642-654, 1977.
Connolly, J.A.; Kalnins, V.I. The distribution of tau and HMW microtubule-associated proteins in different cell types. *Exp. Cell Res.* 127:341-350, 1980.
 20. Weber, K.; Osborn, M. Intracellular display of microtubular structures revealed by indirect immunofluorescence microscopy. In *Microtubules* (K. Roberts, J.S. Hyams, eds.), pp. 279-313. New York: Academic Press, 1979.
 21. Heidemann, S.R.; Kirschner, M.W. Aster formation in eggs of *Xenopus laevis*: induction by isolated basal bodies. *J. Cell Biol.* 67:105-117, 1975.
 22. Kuriyama, R.; Borisy, G.G. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Biol.* 91:814-821, 1982.
Sorokin, S.P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *J. Cell Sci.* 3:207-230, 1968.
Wheatley, D.N. *The Centriole: A Central Enigma of Cell Biology*. New York: Elsevier, 1982.
 23. Schliwa, M. Proteins associated with cytoplasmic actin. *Cell* 25:587-590, 1981.
Korn, E.D. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol. Rev.* 62:672-737, 1982.
Weeds, A. Actin-binding proteins—regulators of cell architecture and motility. *Nature* 296:811-816, 1982.
 24. Hirokawa, N.; Heuser, J.E. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 91:399-409, 1981.
Mooseker, M.S.; Tilney, L.G. Organization of an actin-filament-membrane complex: filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.* 67:725-743, 1975.
Matsudaira, P.T.; Burgess, D.R. Organization of the cross-filaments in intestinal microvilli. *J. Cell Biol.* 92:657-664, 1982.
 25. DeRosier, D.J.; Tilney, L.G.; Egelman, E. Actin in the inner ear: the remarkable structure of the stereocilium. *Nature* 287:291-296, 1980.
 26. Albrecht-Buehler, G.; Goldman, R.D. Microspike-mediated particle transport towards the cell body during early spreading of 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 97:329-339, 1976.
Albrecht-Buehler, G. Filopodia of spreading 3T3 cells: do they have a substrate-exploring function? *J. Cell Biol.* 69:275-286, 1976.
Burgess, D.R.; Schroeder, T.E. Polarized bundles of actin filaments within microvilli of fertilized sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 74:1032-1037, 1977.
 27. Lazarides, E.; Weber, K. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:2268-2272, 1974.

- Sanger, J.M.; Sanger, J.W. Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells. *J. Cell Biol.* 86:568-575, 1980.
28. Scholey, J.M.; Taylor, K.A.; Kendrick-Jones, J. Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase. *Nature* 287:233-235, 1980.
 - Adelstein, R.S. Calmodulin and the regulation of the actin-myosin interaction in smooth muscle and nonmuscle cells. *Cell* 30:349-350, 1982.
 29. Heath, J.P.; Dunn, G.A. Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J. Cell Sci.* 29:197-212, 1978.
 - Geiger, B.; Tokuyasu, K.T.; Dutton, A.H.; Singer, S.J. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4127-4131, 1980.
 30. Wehland, J.; Osborn, M.; Weber, K. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5613-5617.
 31. Taylor, D.L.; Condeelis, J.S. Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int. Rev. Cytol.* 56:57-144, 1979.
 32. Wang, K. Filamin, a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and nonmuscle cells. Purification and properties of chicken gizzard filamin. *Biochemistry* 16:1857-1865, 1977.
 33. Yin, H.L.; Stossel, T.P. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin—a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281:583-586, 1979.
 34. Stossel, T.P.; Hartwig, J.H. Interactions of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages: role in cytoplasmic movement and phagocytosis. *J. Cell Biol.* 68:602-619, 1976.
 35. Lazarides, E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283:249-256, 1980.
 - Steinert, P.M. Structure of the three-chain unit of the bovine epidermal keratin filament. *J. Mol. Biol.* 123:49-70, 1978.
 - Anderton, B.H. Intermediate filaments: a family of homologous structures. *J. Muscle Res. Cell Motility* 2:141-166, 1981.
 36. Nelson, W.J.; Traub, P. Properties of a Ca^{2+} -activated protease specific for the intermediate-sized filament protein vimentin in Ehrlich Ascites tumour cells. *Eur. J. Biochem.* 116:51-57, 1981.
 37. Lasek, R.J.; Krishnan, N.; Kaiserman-Abramof, I.R. Identification of the subunit proteins of 10nm neurofilaments isolated from axoplasm of squid and *Myxicola* giant axons. *J. Cell Biol.* 82:336-346, 1979.
 - Franke, W.W.; Schmid, E.; Osborn, M.; Weber, K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5034-5038, 1978.
 - Franke, W.W.; Schmid, E.; Winter, S.; Osborn, M.; Weber, K. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp. Cell Res.* 123:25-46, 1979.
 38. Sun, T.-T.; Shih, C.; Green, H. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2813-2817, 1979.
 39. Klymkowsky, M.W. Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filament antibody. *Nature* 291:249-251, 1981.
 40. Cohen, C. Cell architecture and morphogenesis. I. The cytoskeletal proteins. *Trends Biochem. Sci.* 4:73-77, 1979.
 - Cohen, C. Cell architecture and morphogenesis. II. Examples in embryology. *Trends Biochem. Sci.* 4:97-101, 1979.
 - Oliver, J.M.; Berlin, R.D. Mechanisms that regulate the structural and functional architecture of cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.* 74:55-94, 1982.

41. Heuser, J.; Kirschner, M.W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 86:212-234, 1980.
- Wolosewick, J.J.; Porter, K.R. Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance: artifact or reality. *J. Cell Biol.* 82:114-139, 1979.
- Small, J.V. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J. Cell Biol.* 91:695-705, 1981.
- Schliwa, M.; van Blerkom, J. Structural interaction of cytoskeletal components. *J. Cell Biol.* 90:222-235, 1981.
42. Lasek, R.J. The dynamic ordering of neuronal cytoskeletons. In *Cytoskeletons and the Architecture of Nervous Systems. Neurosci. Res. Program Bull.* 19:7-32, 1981.
- Masters, C.J. Interactions between soluble enzymes and subcellular structure. *Trends Biochem. Sci.* 3:206-208, 1978.
- Fulton, A.B. How crowded is the cytoplasm? *Cell* 30:345-347, 1982.
43. Hunter, T. Proteins phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell* 22:647-648, 1980.
- Bishop, J.M. Oncogenes. *Sci. Am.* 246(3):68-78, 1982.
44. Byers, B.; Porter, K.R. Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52:1091-1099, 1964.
- Vasiliev, J.M.; et al. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 24:625-640, 1970.
- Albrecht-Buehler, G.; Bushnell, A. The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells. *Exp. Cell Res.* 120:111-118, 1979.
- Gotlieb, A.I.; May, L.M.; Subrahmanyam, L.; Kalnins, V.I. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J. Cell Biol.* 91:589-594, 1981.
45. Carter, S.B. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature* 208:1183-1187, 1965.
- Dunn, G.A.; Heath, J.P. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp. Cell Res.* 101:1-14, 1976.
- Benecke, B.-J.; Ben-Ze'ev, A.; Penman, S. The control of mRNA production, translation and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* 14:931-939, 1978.
46. Albrecht-Buehler, G. Daughter 3T3 cells. Are they mirror images of each other? *J. Cell Biol.* 72:595-603, 1977.
- Aufderheide, K.J.; Frankel, J.; Williams, N.E. Formation and positioning of surface-related structures in protozoa. *Microbiol. Rev.* 44:252-302, 1977.
- Freeman, G. The multiple roles which cell division can play in the localization of developmental potential. In *Determinants of Spatial Organization* (S. Subtelny, ed.), pp. 53-76. New York: Academic Press, 1979.
47. Bellairs, R.; Curtis, A.; Dunn, G., eds. *Cell Behaviour*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1982.

第十一章

一般的:

- Inoué, S. Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 91:132s-147s, 1981. (A review.)
- John, P.C.L., ed. *The Cell Cycle*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1981.
- Lewin, B. *Gene Expression*, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed. New York: Wiley, 1980. (Chapters 4, 7, and 20 on mitosis, the cell division cycle, and DNA replication, respectively.)
- Mitchison, J.M. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1971.

Prescott, D.M. *Reproduction of Eucaryotic Cells*. New York: Academic Press, 1976.
Zimmerman, A.M.; Forer, A., eds. *Mitosis/Cytokinesis*. New York: Academic Press, 1981.
(A collection of reviews.)

引用的

1. Pardee, A.B.; Dubrow, R.; Hamlin, J.L.; Kletzien, R.F. Animal cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 47:715-750, 1978.
2. Yanishevsky, R.M.; Stein, G.H. Regulation of the cell cycle in eukaryotic cells. *Int. Rev. Cytol.* 69:223-259, 1981.
Lloyd, D.; Poole, P.K.; Edwards, S.W. *The Cell Division Cycle*. New York: Academic Press, 1982.
3. Cheng, H.; LeBlond, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. *Am. J. Anat.* 141:461-480, 1974.
Potten, C.S.; Schofield, R.; Lajtha, L.G. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis, and three regions of surface epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 560:281-299, 1979.
4. Pardee, A.B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1286-1290, 1974.
Smith, J.A.; Martin, L. Do cells cycle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1263-1267, 1973.
5. Mitchison, J.M. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1971.
6. Van Dilla, M.A.; Trujillo, T.T.; Mullaney, P.F.; Coulter, J.R. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163:1213-1214, 1969.
7. Rossow, P.W.; Riddle, V.G.H.; Pardee, A.B. Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G₁ controls animal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4446-4450, 1979.
Tyson, J.; Garcia-Herdugo, G.; Sachsenmaier, W. Control of nuclear division in *Physarum polycephalum*: comparison of cycloheximide pulse treatment, UV irradiation and heat shock. *Exp. Cell Res.* 119:87-98, 1979.
8. Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273:345-349, 1978.
9. Rutter, W.J.; Pictet, R.L.; Morris, P.W. Toward molecular mechanisms of developmental processes. *Annu. Rev. Biochem.* 42:601-646, 1973.
French, V.; Bryant, P.J.; Bryant, S.V. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science* 193:969-981, 1976.
Bryant, P.J.; Bryant, S.V.; French, V. Biological regeneration and pattern formation. *Sci. Am.* 237(1):67-81, 1977.
Sato, G., ed. *Hormones and Cell Culture*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.
10. Pierce, G.B.; Shikes, R.; Fink, L.M. *Cancer: A Problem of Developmental Biology*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1978.
Cairns, J. *Cancer: Science and Society*. San Francisco: Freeman, 1978.
Medrano, E.E.; Pardee, A.B. Prevalent deficiency in tumor cells of cycloheximide-induced cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4123-4126, 1980.
11. Tooze, J., ed. *DNA Tumor Viruses*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
Weiss, R.; Teich, N.; Varmus, H.; Coffin, J., eds. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
12. Eckhardt, W. Properties of temperature-sensitive mutants of polyoma virus. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39:37-40, 1975.
Hassell, J.A.; Topp, W.C.; Rifkin, D.B.; Moreau, P.E. Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragments containing only part of the early region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3978-3982, 1980.

- Houweling, A.; Van Den Elsen, P.J.; Van Der Eb, A.J. Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* 105:537-550, 1980.
13. Smith, A.E.; Smith, R.; Paucha, E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18:335-346, 1979.
- Duesberg, P.H.; Vogt, P.K. Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67:1673-1680, 1970.
- Purchio, A.F.; Erikson, E.; Brugge, J.S.; Erikson, R.L. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus *src* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1567-1571, 1978.
14. Collett, M.S.; Erikson, R.L. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2021-2024, 1978.
- Levinson, A.D.; Oppermann, H.; Levintow, L.; Varmus, H.E.; Bishop, M.J. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* 15:561-572, 1978.
- Hunter, T.; Sefton, B.M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1311-1315, 1980.
- Ushiro, H.; Cohen, S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.* 255:8363-8365, 1980.
15. Bishop, J.M. Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 23:5-6, 1981.
- Oskarsson, M.; McClements, W.L.; Blair, D.G.; Maizel, J.V.; Vande Woude, G.F. Properties of a normal mouse cell DNA sequence (*sarc*) homologous to the *src* sequence of Moloney sarcoma virus. *Science* 207:1222-1224, 1980.
16. Shih, C.; Padhy, L.C.; Murray, M.; Weinberg, R.A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 290:261-264, 1981.
- Krontiris, T.C.; Cooper, G.M. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1181-1184, 1981.
- Perucho, M.; et al. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* 27:467-476, 1981.
- Cooper, G.M. Cellular transforming genes. *Science* 217:801-806, 1982.
- Parada, L.F.; Tabin, C.J.; Shih, C.; Weinberg, R.A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297:474-478, 1982.
- Chang, E.H.; Furth, M.E.; Scolnick, E.M.; Lowy, D.R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297:479-483, 1982.
17. Robbins, E.; Jentsch, G.; Micali, A. The centriole cycle in synchronized HeLa cells. *J. Cell Biol.* 36:329-339, 1968.
- Vorobjev, I.A.; Chentsov, Y.S. Centrioles in the cell cycle: epithelial cells. *J. Cell Biol.* 98:938-949, 1982.
18. Hartwell, L. Cell division from a genetic perspective. *J. Cell Biol.* 77:627-637, 1978.
- Byers, B. Cytology of the yeast life cycle. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (J.N. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach, eds.), pp. 59-96. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
19. Huberman, J.A.; Riggs, A.D. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J. Mol. Biol.* 32:327-341, 1968.
- Hand, R. Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell* 15:317-325, 1978.
20. Riley, D.; Weintraub, H. Conservative segregation of parental histones during replication in the presence of cycloheximide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:328-332, 1979.

- Hereford, L.M.; Osley, M.A.; Ludwig, J.R.; McLaughlin, C.S. Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. *Cell* 24:367-376, 1981.
- Gallwitz, D. Kinetics of inactivation of histone mRNA in the cytoplasm after inhibition of DNA replication in synchronised HeLa cells. *Nature* 257:247-248, 1975.
21. Russev, G.; Hancock, R. Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3143-3147, 1982.
 22. Stubblefield, E. Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using 5-bromodeoxyuridine suppression of 33258 Hoechst fluorescence. *Chromosoma* 53:209-221, 1975.
 23. Lewin, B. *Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes*, 2nd ed., pp. 428-447. New York: Wiley, 1980.
 - Brown, S.W. Heterochromatin. *Science* 151:417-425, 1966.
 24. Harland, R. Initiation of DNA replication in eukaryotic chromosomes. *Trends Biochem. Sci.* 6:71-74, 1981.
 - Rao, P.N.; Johnson, R.T. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225:159-164, 1970.
 25. Pringle, J.R.; Hartwell, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (J.N. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach, eds.), pp. 97-142. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
 - Simchen, G. Cell cycle mutants. *Annu. Rev. Genet.* 12:161-191, 1978.
 26. Prescott, D.M. *Reproduction of Eucaryotic Cells*. New York: Academic Press, 1976.
 - Mitchison, J.M. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1971.
 27. Johnson, R.T.; Rao, P.N. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* 226:717-722, 1970.
 - Bradbury, E.M.; Inglis, R.J.; Matthews, H.R. Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation. *Nature* 247:257-261, 1974.
 - Işenberg, I. Histones. *Annu. Rev. Biochem.* 48:159-191, 1979.
 28. Kreigstein, H.J.; Hogness, D.S. Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:135-139, 1974.
 - Callan, H.G. DNA replication in the chromosomes of eukaryotes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:195-203, 1974.
 29. Wolfe, S.L. *Biology of the Cell*, 2nd ed., pp. 398-431. Belmont, Ca.: Wadsworth, 1981.
 - Mazia, D. Mitosis and the physiology of cell division. In *The Cell*, Vol. 3 (J. Brachet, A.E. Mirsky, eds.), pp. 77-412. London: Academic Press, 1961.
 - Inoué, S. Cell division and the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 91:131s-147s, 1981.
 - Dustin, P. Microtubules, pp. 340-397. New York: Springer-Verlag, 1978.
 30. Nicklas, R.B. Mitosis. In *Advances in Cell Biology*, Vol. 2 (D.M. Prescott, L. Goldstein, E.H. McConkey, eds.), pp. 225-298. New York: Appleton-Century-Crofts, 1971.
 31. Matsui, S.I.; Yoshida, H.; Weinfeld, H.; Sandberg, A.A. Induction of prophase in interphase nuclei by fusion with metaphase cells. *J. Cell Biol.* 54:120-132, 1972.
 32. Inoué, S.; Sato, H. Cell motility by labile association of molecules: the nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J. Gen. Physiol.* 50:259-292, 1967.
 - Bajer, A.S.; Molé-Bajer, J. Spindle dynamics and chromosome movements. *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)* 3:1-271, 1972.
 - Salmon, E.D. Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules. I. Changes in birefringence and spindle length. *J. Cell Biol.* 65:603-614, 1975.
 33. Roos, U.-P. Light and electron microscopy of rat kangaroo cells in mitosis. III. Patterns of chromosome behavior during prometaphase. *Chromosoma* 54:363-385, 1976.

34. Nicklas, R.B. Chromosome movement: current models and experiments on living cells. In *Molecules and Cell Movement* (S. Inoué, R.E. Stephens, eds.), pp. 97-118. New York: Raven Press, 1975.
35. Moens, P.B. Kinetochore microtubule numbers of different-sized chromosomes. *J. Cell Biol.* 83:555-561, 1979.
36. Begg, D.A.; Ellis, G.W. Micromanipulation studies of chromosome movement. *J. Cell Biol.* 82:528-541, 1979.
- McIntosh, J.R. Cell division. In *Microtubules* (K. Roberts, J.S. Hyams, eds.), pp. 381-441. New York: Academic Press, 1979.
37. Ris, H. The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of grasshoppers. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 96:90-106, 1949.
- Kuriyama, R.; Borisy, G.G. Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* 91:822-826, 1981.
- Euteneuer, U.; McIntosh, J.R. Structural polarity of kinetochore microtubules in PtK₁ cells. *J. Cell Biol.* 89:338-345, 1981.
- Pickett-Heaps, J.D.; Tippit, D.H. The diatom spindle in perspective. *Cell* 14:455-467, 1978.
38. Cande, W.Z.; Wolniak, S.M. Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate. *J. Cell Biol.* 79:573-580, 1978.
- Pratt, M.M.; Otter, T.; Salmon, E.D. Dynein-like Mg²⁺-ATPase in mitotic spindles isolated from sea urchin embryos (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *J. Cell Biol.* 86:738-745, 1980.
- Hyams, J. Dynein in the spindle? *Nature* 295:648-649, 1982.
39. Mazia, D. How cells divide. *Sci. Am.* 205(3):101-120, 1961.
- Gerace, L.; Blobel, G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277-287, 1980.
40. Beams, H.W.; Kessel, R.G. Cytokinesis: a comparative study of cytoplasmic division in animal cells. *Am. Sci.* 64:279-290, 1976.
- Blose, S.H. Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3372-3376, 1979.
41. Mabuchi, I.; Okuno, M. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. *J. Cell Biol.* 74:251-263, 1977.
- Schroeder, T.E. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1688-1692, 1973.
- Meeusen, R.L.; Cande, W.Z. N-Ethylmaleimide-modified heavy meromyosin. *J. Cell Biol.* 82:57-65, 1979.
- Pasternak, C.A. Surface membranes during the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.* 1:148-151, 1976.
42. Bajer, A. Fine structure studies on phragmoplast and cell plate formation. *Chromosoma* 24:383-417, 1968.
- Pickett-Heaps, J.D.; Northcote, D.H. Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J. Cell Sci.* 1:109-120, 1966.
- Hepler, P.K.; Newcomb, E.H. Fine structure of cell plate formation in the apical meristem of Phaseolus roots. *J. Ultrastruct. Res.* 19:498-513, 1967.
43. Kubai, D.F. The evolution of the mitotic spindle. *Int. Rev. Cytol.* 43:167-227, 1975.

第十二章

引用书目

1. Kaiser, D.; Manoil, C. Myxobacteria: cell interactions, genetics and development. *Annu. Rev. Microbiol.* 33:595-639, 1979.
- White, D. Cell interactions and the control of development in myxobacteria populations. *Int. Rev. Cytol.* 72:203-228, 1981.

2. Lööms, W.F. *Dictyostelium discoideum*. A Developmental System. New York: Academic Press, 1975.
- Gerisch, G. Chemotaxis in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Physiol.* 44:535-552, 1982.
- Gerisch, G. Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in *Dictyostelium*. *Curr. Top. Dev. Biol.* 14:243-270, 1980.
3. Wilson, H.V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exp. Zool.* 5:245-258, 1907.
- Humphreys, S.; Humphreys, T.; Sano, J. Organization and polysaccharides of sponge aggregation factor. *J. Supramol. Struct.* 7:339-351, 1977.
- Burger, M.M.; Burkart, W.; Weinbaum, G.; Jumblatt, J. Cell-cell recognition: molecular aspects. Recognition and its relation to morphogenetic processes in general. In *Cell-Cell Recognition*. Society for Experimental Biology Symposium, No. 32 (A.S.G. Curtis, ed.), pp. 1-23. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1978.
4. Townes, P.; Holtfreter, J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J. Exp. Zool.* 128:53-120, 1955.
- Moscona, A.A.; Hausman, R.E. Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. In *Cell and Tissue Interactions*. Society of General Physiologists Series (J.W. Lash, M.M. Burger, eds.), Vol. 32, pp. 173-185. New York: Raven, 1977.
- Roth, S.; Weston, J. The measurement of intercellular adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:974-980, 1967.
5. Steinberg, M.S. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. *J. Exp. Zool.* 173:395-434, 1970.
6. Staehelin, L.A.; Hull, B.E. Junctions between living cells. *Sci. Am.* 238(5):141-152, 1978.
- Gilula, N.B. Junctions between cells. In *Cell Communication* (R.P. Cox, ed.), pp. 1-29. New York: Wiley, 1974.
7. Farquhar, M.G.; Palade, G.E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17:375-412, 1963.
- Goodenough, D.A.; Revel, J.P. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *J. Cell Biol.* 45:272-290, 1970.
8. Furshpan, E.J.; Potter, D.D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. *Curr. Top. Dev. Biol.* 3:95-127, 1968.
- Lowenstein, W.R. Permeable junctions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 40:49-63, 1976.
- Hooper, M.L.; Subak-Sharpe, J.H. Metabolic cooperation between cells. *Int. Rev. Cytol.* 69:45-104, 1981.
- Gilula, N.B.; Reeves, O.R.; Steinbach, A. Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. *Nature* 235:262-265, 1972.
9. Furshpan, E.S.; Potter, D.D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. *Curr. Top. Dev. Biol.* 3:95-127, 1968.
- Sheridan, J.D. Cell coupling and cell communication during embryogenesis. In *Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development*. Cell Surface Reviews (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 1, pp. 409-448. Amsterdam: Elsevier, 1977.
- Warner, A.E. The early development of the nervous system. In *British Society of Developmental Biology Symposium 5* (D.R. Garrod, J. Feldman, eds.), pp. 109-127. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1981.
10. Lowenstein, W.R. Permeable junctions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 11:49-63, 1976.
- Turin, L.; Warner, A.E. Intracellular pH in early *Xenopus* embryo: its effect on current flow between blastomeres. *J. Physiol. (Lond.)* 300:489-504, 1980.
11. Caspar, D.L.D.; Goodenough, D.; Makowski, L.; Phillips, W.C. Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74:605-628, 1977.

- Hertzberg, E.L.; Lawrence, T.S.; Gilula, N.B. Gap junctional communication. *Annu. Rev. Physiol.* 43:479-491, 1981.
12. Hay, E.D. Extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 91:205s-223s, 1981.
Hay, E.D., ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum, 1982.
13. Prockop, D.J.; Kivirikko, K.I.; Tuderman, L.; Guzman, N. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Engl. J. Med.* 301:13-23, 77-85, 1979.
Eyre, D.R. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 207:1315-1322, 1980.
Bornstein, P.; Sage, H. Structurally distinct collagen types. *Annu. Rev. Biochem.* 49:957-1003, 1980.
14. Trelstad, R.L.; Hayashi, K. Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev. Biol.* 71:228-242, 1979.
Trus, B.L.; Piez, K.A. Compressed microfibril models of the native collagen fibril. *Nature* 286:300-301, 1980.
15. Sandberg, L.B.; Soskel, N.T.; Leslie, J.G. Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states. *N. Engl. J. Med.* 304:566-577, 1981.
Franzblau, C.; Faris, B. Elastin. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 65-93. New York: Plenum, 1982.
16. Lindhal, U.; Höök, M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* 47:385-417, 1978.
- Chakrabarti, B.; Park, J.W. Glycosaminoglycans: structure and interaction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8:225-313, 1980.
- Rodén, L. Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. In *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), pp. 267-371. New York: Plenum, 1980.
17. Rees, D.A. Polysaccharide Shapes (Outline Studies in Biology), pp. 62-73. London: Chapman and Hall, 1977.
Trelstad, R.L.; Hayashi, K.; Toole, B.P. Epithelial collagens and glycosaminoglycans in the embryonic cornea. Macromolecular order and morphogenesis in the basement membrane. *J. Cell Biol.* 62:815-830, 1974.
Toole, B.P. Morphogenetic role of glycosaminoglycans in brain and other tissues. In *Neuronal Recognition* (S.H. Barondes, ed.), pp. 275-329. New York: Plenum, 1976.
18. Yamada, K.M.; Olden, K. Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275:179-184, 1978.
Ruoslahti, E.; Engvall, E.; Hayman, E.G. Fibronectin: current concepts of its structure and functions. *Coll. Res.* 1:95-128, 1981.
Hynes, R.O. Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 295-334. New York: Plenum, 1982.
19. Kefalides, N.A.; Alper, R.; Clark, C.C. Biochemistry and metabolism of basement membranes. *Int. Rev. Cytol.* 61:167-228, 1979.
Timpl, R.; et al. Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254:9933-9937, 1979.
Farquhar, M.G. The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter. In *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 335-378. New York: Plenum, 1982.
20. Bornstein, P.; Duksin, D.; Balian, G.; Davidson, J.M.; Crouch, E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions *in vitro* and *in vivo*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 312:93-105, 1978.
Hynes, R. Structural relationships between fibronectin and cytoplasmic cytoskeletal networks. In *Cytoskeletal Elements and Plasma Membrane Organization* (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 7, pp. 100-137. Amsterdam: Elsevier, 1981.

第十三章

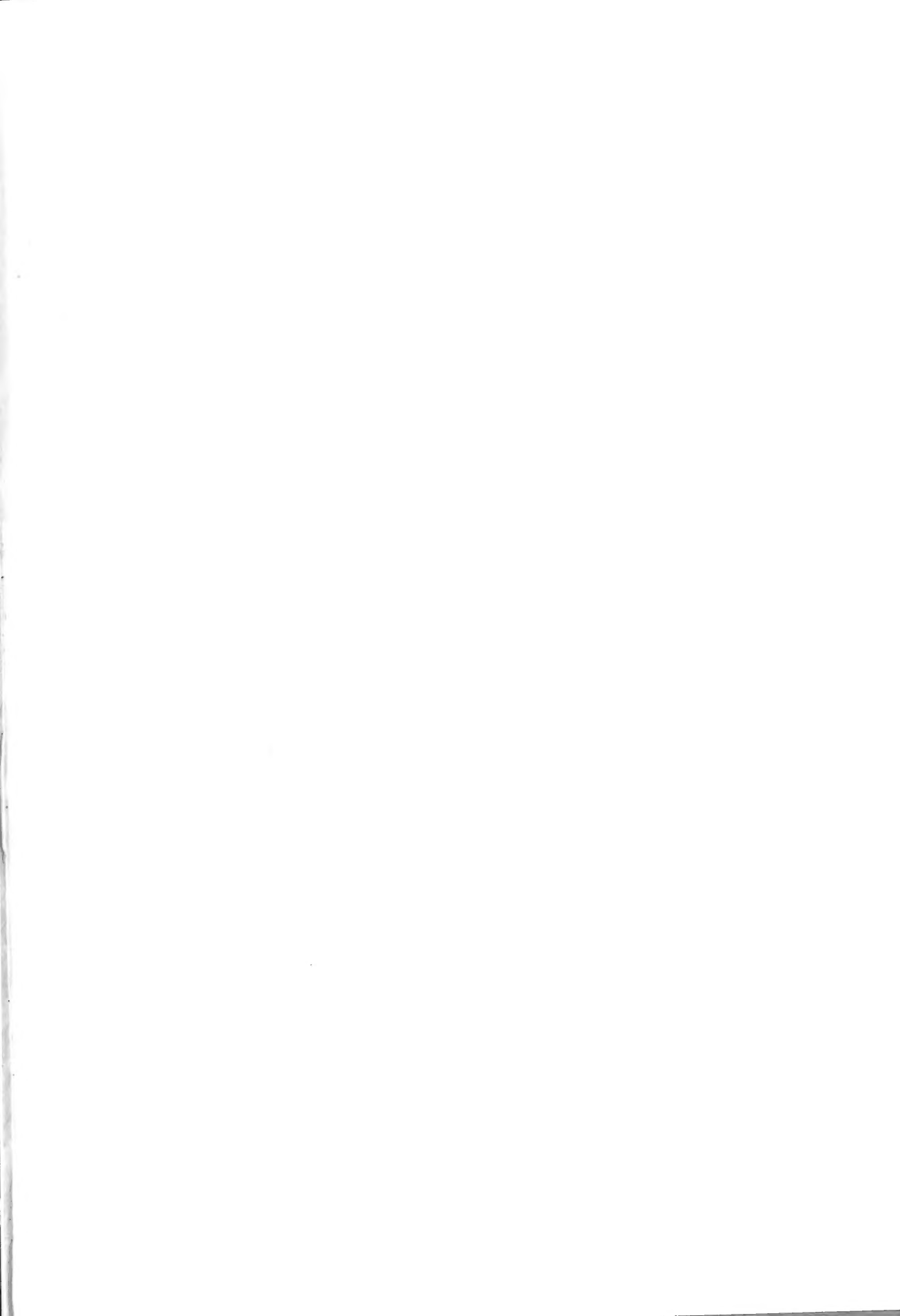
引用的

1. Williams, R.H., ed. *Textbook of Endocrinology*, 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1974.
White, A.; et al. *Principles of Biochemistry*, 6th ed., pp. 1185-1317. New York: McGraw-Hill, 1978.
2. Bradshaw, R.A.; Frazier, W.A. Hormone receptors as regulators of hormone action. *Curr. Top. Cell Regul.* 12:1-37, 1977.
3. Samuelsson, B.; Granström, E.; Green, K.; Hamberg, M.; Hammarström, S. Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* 44:669-695, 1975.
Harris, R.H.; Ramwell, P.W.; Gilmer, P.J. Cellular mechanisms of prostaglandin action. *Annu. Rev. Physiol.* 41:653-668, 1979.
4. Pappenheimer, J.R. The sleep factor. *Sci. Am.* 235(2):24-29, 1976.
5. Levi-Montalcini, R.; Calissano, P. The nerve-growth factor. *Sci. Am.* 240(6):68-77, 1979.
Yankner, B.A.; Shooter, E.M. The biology and mechanism of nerve growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 51:845-868, 1982.
Campenot, R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4516-4519, 1977.
6. Yamamoto, K.R.; Alberts, B.M. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription. *Annu. Rev. Biochem.* 45:721-746, 1976.
Ivarie, R.D.; O'Farrell, P.H. The glucocorticoid domain: steroid-mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins. *Cell* 13:41-55, 1978.
Payvar, F.; et al. Purified glucocorticoid receptors bind selectively *in vitro* to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6628-6632, 1981.
7. Ashburner, M.; Chihara, C.; Meltzer, P.; Richards, G. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38:655-662, 1974.
8. Attardi, B.; Ohno, S. Physical properties of androgen receptors in brain cytosol from normal and testicular feminized (Tfm/y δ) mice. *Endocrinology* 103:760-770, 1978.
9. Lefkowitz, R.J.; Roth, J.; Pricer, W.; Pastan, I. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-¹²⁵I and its relation to adenyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65:745-752, 1970.
Kahn, C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J. Cell Biol.* 70:261-286, 1976.
10. Kahn, C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J. Cell Biol.* 70:261-286, 1976.
Kahn, C.R.; Baird, K.L.; Jarrett, D.B.; Flier, J.S. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4209-4213, 1978.
Rees Smith, B.; Buckland, P.R. Structure-function relations of the thyrotropin receptor. In *Receptors, Antibodies and Disease* (Ciba Foundation Symposium 90), pp. 114-132. London: Pitman, 1982.
11. Sutherland, E.W. Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177:401-408, 1972.
Carpenter, G.; Cohen, S. Epidermal growth factor. *Annu. Rev. Biochem.* 48:193-216, 1979.
Stevens, C.F. The neuron. *Sci. Am.* 241(3):54-65, 1979.
12. Sutherland, E.W. Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177:401-408, 1972.

- Pastan, I. Cyclic AMP. *Sci. Am.* 227(2):97-105, 1972.
13. Ross, E.M.; Gilman, A.G. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu. Rev. Biochem.* 49:533-564, 1980.
- Schramm, M.; Orly, J.; Eimerl, S.; Korner, M. Coupling of hormone receptors to adenylate cyclase of different cells by cell fusion. *Nature* 268:310-313, 1977.
14. Rodbell, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284:17-22, 1980.
- Helmreich, E.J.M.; Zenner, H.P.; Pfeuffer, T.; Cori, C.F. Signal transfer from hormone receptor to adenylate cyclase. *Curr. Top. Cell Regul.* 10:41-87, 1976.
- Johnson, G.L.; Kaslow, H.R.; Farfel, Z.; Bourne, H.R. Genetic analysis of hormone-sensitive adenylate cyclase. In *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (P. Greengard, G.A. Robison, eds.), Vol. 13, pp. 1-38. New York: Raven, 1980.
- Lai, C.-Y. The chemistry and biology of cholera toxin. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 9:171-206, 1980.
- Cassel, D.; Pfeuffer, T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2669-2673, 1978.
15. Heilbrunn, L.V.; Wiercenski, F.J. The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* 29:15-32, 1947.
- Carafoli, E.; Crompton, M. The regulation of intracellular calcium. *Curr. Top. Membr. Transp.* 10:151-216, 1978.
- Racker, E. Fluxes of Ca^{2+} and concepts. *Fed. Proc.* 39:2422-2425, 1980.
16. Rubin, R.P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol. Rev.* 22:389-428, 1970.
- Rasmussen, H.; Waisman, D. The messenger function of calcium in endocrine systems. In *Biochemical Actions of Hormones* (G. Litwack, ed.), Vol. 8, pp. 1-115. New York: Academic Press, 1981.
17. Cohen, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* 296:613-620, 1982.
- Hoppe, J.; Wagner, K.G. Cyclic AMP-dependent protein kinase I, a unique allosteric enzyme. *Trends Biochem. Sci.* 4:282-285, 1979.
- Smith, S.B.; White, H.D.; Siegel, J.B.; Krebs, E.G. Cyclic AMP-dependent protein kinase I: cyclic nucleotide binding, structural changes, and release of the catalytic subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1591-1595, 1981.
18. Cohen, P. The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle. *Curr. Top. Cell Regul.* 14:117-196, 1978.
19. Krebs, E.G.; Beavo, J.A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 48:923-959, 1979.
- Cohen, P. The role of protein phosphorylation in the neural and hormonal control of intermediary metabolism. In *Cellular Controls in Differentiation* (C.W. Lloyd, D.A. Rees, eds.), pp. 81-105. London: Academic Press, 1981.
20. Means, A.R.; Dedman, J.R. Calmodulin—an intracellular calcium receptor. *Nature* 285:73-77, 1980.
- Klee, C.B.; Crouch, T.H.; Richman, P.G. Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* 49:489-515, 1980.
- Cheung, W.Y. Calmodulin. *Sci. Am.* 246(6):48-56, 1982.
- Kretsinger, R.H. Mechanisms of selective signaling by calcium. *Neurosci. Res. Program Bull.* 19:213-328, 1981.
21. Goldberg, N.D.; Haddox, M.K. Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 46:823-896, 1977.
22. Schimke, R.T. On the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in mammalian tissues. *Curr. Top. Cell Regul.* 1:77-124, 1969.

23. Mulvihill, E.R.; Palmiter, R.D. Relationship of nuclear estrogen receptor levels to induction of ovalbumin and conalbumin mRNA in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* 252:2060-2068, 1977.
- Lewis, J.; Slack, J.; Wolpert, L. Thresholds in development. *J. Theor. Biol.* 65:579-590, 1977.
24. Raff, M. Self regulation of membrane receptors. *Nature* 259:255-266, 1976.
- Kahn, C.R.; Roth, J. Cell membrane receptors for polypeptide hormones: applications to the study of disease states in mice and men. *Am. J. Clin. Pathol.* 63:656-668, 1975.
25. Lefkowitz, R.J. Regulation of β -adrenergic receptors by β -adrenergic agonists. In *Receptors and Hormone Action* (L. Birnbaumer, B.W. O'Malley, eds.), Vol. 3, pp. 179-194. New York: Academic Press, 1978.
- Katz, B.; Thesleff, S. A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138:63-80, 1957.
26. Klee, W.A.; Sharma, S.K.; Nirenberg, M. Opiate receptors as regulators of adenylate cyclase. *Life Sci.* 16:1869-1874, 1975.
- Snyder, S.H. Opiate receptors and internal opiates. *Sci. Am.* 236(3):44-56, 1977.
27. Schiffmann, E.; Gallin, J.I. Biochemistry of phagocyte chemotaxis. *Curr. Top. Cell Regul.* 15:203-261, 1979.
28. Berg, H. How bacteria swim. *Sci. Am.* 233(2):36-44, 1975.
- Adler, J. The sensing of chemicals by bacteria. *Sci. Am.* 234(4):40-47, 1976.
- Koshland, D.E., Jr. Biochemistry of sensing and adaptation. *Trends Biochem. Sci.* 5:297-301, 1980.
29. Springer, M.S.; Goy, M.F.; Adler, J. Protein methylation in behavioral control mechanisms and in signal transduction. *Nature* 280:279-284, 1979.
- Koshland, D.E., Jr. Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system. *Annu. Rev. Biochem.* 50:765-782, 1981.







S0013736

收到期	年 月 日
来源	
书价	376.30
单据号	468889
开票日期	90.4.10

68.159 58.157
 索书号: 774 013861

书 名: 细胞分子生物学(上册)

登录号: 定价:

借 者	借 期	还 期
郑志华	90.5.15	
李剑陶	90.6.29	
郑志华	90.9.19	

分 类 编 号	
登 记 号	

013861

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写, 损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请予合作。

成1106-1

08.01.0

40004

10.01

ISBN 7-03-009833-2

Q·130

定价：11.00元

邮费在內：210·101