

# 生物化学教案

任课教师：李妍 理论课学时：54

## 第一章 绪论 (1学时)

本章要求

1. 熟悉生物化学的概念。
2. 熟悉生物化学的研究内容。
3. 了解生物化学的发展简史。
4. 了解生物化学与其他生命科学的关系。

### 第一节 概述

#### 一、生物化学的涵义

利用化学、生物学的理论和方法去研究生物体内各种物质的化学本质及其化学变化规律，认识和阐明生命现象本质的科学，又称为生命的化学。

讲解：生物化学归属为化学的范畴，研究对象为生物体，定义中体现出三项方面的内容，即物质的化学本质、化学变化规律、与生命现象的联系。

生物化学研究的对象：生物体。在医学领域中生物化学的研究对象主要是人体。

#### 二、生物化学的研究内容

1. 研究构成生物机体各种物质的组成、结构、性质及生物学功能。

讲解：各种物质包括糖、蛋白质、脂类、核酸等

2. 研究生物体内各种物质的化学变化、与外界进行物质和能量交换的规律，即物质代谢与能量代谢。

讲解：物质代谢包括食物的消化吸收过程、细胞内的物质代谢等

能量代谢包括水的生成和 ATP 的产生。

举例介绍物质代谢的过程，如淀粉

3. 研究重要生命物质的结构与功能的关系以及环境对机体代谢的影响，从分子水平来阐明生命现象的机制和规律。

讲解：蛋白质的结构与功能的关系，即高级结构决定其生物活性；

DNA 的结构与功能的关系，即 DNA 双螺旋结构与 DNA 复制过程

### 第二节 生物化学与其他生命科学的关系

#### 一、生物化学是分子水平的生物学

1. 从18世纪中叶开始，直到1903年才引进“生物化学”这一名称，成为一门独立的学科。
2. 生物化学的真正蓬勃发展始于20世纪40年代；
3. 细胞和组成细胞物质的分子结构研究；
4. 蛋白质和核酸分子结构的探明。
5. 进而产生分子生物学。

讲解：细胞的结构和组成

核酸分子的结构

二、生物化学是现代生物学科的基础和前沿

1. 必须借助生物化学的理论和方法探讨生命现象；
2. 各生物学科的发展有赖于生物化学研究的进展和成就。
3. 分子生物学与生物化学的关系。
4. 分子生物学的重要事件：

20世纪50年代：

蛋白质  $\alpha$ -螺旋结构的发现；

胰岛素的氨基酸全序列分析的完成；

1953年 Watson和Crick提出了DNA双螺旋结构模型——分子生物学里程碑。

分子遗传学中心法则的提出；

遗传密码的破译等

20世纪70年代：建立了DNA重组技术——基因工程。

基因诊断和基因治疗的发展。

20世纪80年代：发现了核酶（ribozyme）；

PCR技术的发明等。

20世纪90年代：

开始了人类基因组计划（human genome project），约 $2.6 \times 10^9$ 碱基、大约有3万~4万个可翻译基因。

1985年由美国学者提出，1990年正式启动。

5. 我国人民对生物化学做出的贡献

古代：酿酒、制酱和制醋，用动物的肝治疗雀目（夜盲症）等。

近代：吴宪等创立了血滤液的制备和血糖测定法；

在蛋白质研究中，提出了蛋白质变性学说；

在免疫化学方面，确定了抗体和抗原结合的定量关系。

新中国成立后：1965年，首先采用人工方法合成了胰岛素。

1981年又成功的合成了酵母丙氨酰-tRNA。

近年来，我国的基因工程、蛋白质工程、人类基因组计划以及新基因的克隆与功能研究等方面均取得了重要成果。

### 第三节 生物化学与现代工业

一、生物化学对现代化工、轻工、食品、医药工业的渗透

酶、基因工程、蛋白质工程、新型药物等。

举例：开发食品资源，如酶解制备糖浆，微生物发酵制备氨基酸、味精等

研究食品工艺，如加工干酪、果汁、肉类嫩化等

储藏技术，如葡萄糖氧化酶作为脱氧剂使用

## 二、酶工程与自动化

用于食品、轻工、化工、医药、环保、能源等领域。举例：酿醋、制酒、制酱酶及细胞的固定化技术、酶的化学合成、分子修饰、人工模拟和各种应用技术等。

酶及细胞的固定化技术：可重复利用，稳定性高。

讲解：将活细胞固定于载体上，利用细胞内的某些酶来生产某种产品；

1973年，日本固定化大肠杆菌，利用天冬氨酸酶由延胡索酸生产L-天冬氨酸。

## 第四节 21世纪的生物化学发展趋势

大分子结构与功能的关系

蛋白质、核酸、糖类等的结构与功能的关系。

生物膜的结构与功能

承担物质转运、能量交换、细胞识别、神经传导、免疫、激素和药物的作用等。

机体自身调控的分子机理

生物体内的新陈代谢是按高度协调、统一、自动化的方式进行的。

需要进一步揭示其规律。

生化技术的创新与发明

产品分离纯化技术的突破。

生物化学与现代新生物技术

## 生物化学的特点与学习方法

1. 知识点多且分散，需要记忆内容多
2. 注意日常学习的积累，减少期末复习压力
3. 前后联系，将物质的结构组成与代谢联系起来，便于理解和掌握
4. 配合实验操作，加强理论知识的理解和学习

## 本章小结

1. 生物化学的涵义。
2. 生物化学的研究内容。

## 第二章 糖类的化学（4学时）

本章要求

1. 理解单糖结构；

2. 掌握寡糖中蔗糖和麦芽糖的结构;
3. 掌握多糖中淀粉、糖原和纤维素的结构特点
4. 掌握糖类的旋光性和还原性;
5. 了解糖类的生物学功能。

## 第一节 概述

### 一、糖类的定义与元素组成

1. 定义：糖类是多羟基醛或多羟基酮及其缩聚物和某些衍生物的总称。

讲解：糖类结构特征包括多羟基、醛或酮的结构，举例葡萄糖和果糖的结构

缩聚物指寡糖、多糖等，衍生物包括糖酸、糖醇等。

2. 元素组成：C、H、O

讲解：碳水化合物的由来，是否准确？

### 二、糖的分类与命名

#### 1. 分类

单糖：不能水解的最简单糖类，多羟基醛或酮（醛糖或酮糖）

讲解：如葡萄糖

聚糖：分为寡糖和多糖。

寡糖：有2~10个分子单糖缩合而成，如蔗糖、麦芽糖、棉籽糖等

多糖：多分子单糖或其衍生物所组成，如淀粉、糖原

复合糖：糖和非糖物质共价结合而成，如糖蛋白、糖脂

糖的衍生物：糖醇、糖酸、糖胺、糖苷

#### 2. 命名

单糖：通俗名称，葡萄糖

按碳原子数，如丙糖、己糖等；

据羰基位置，分为醛糖和酮糖

寡糖：按所含碳原子数，二糖、三糖等

习惯名称，麦芽糖，蔗糖

### 三、糖类的生物学功能

1. 能源：作为一切生物体维持生命活动所需能量的主要来源；

讲解：运动后补充能量的来源，如葡萄糖，代谢供能速度快。

2. 糖分解代谢的许多中间物是合成氨基酸、脂肪、核苷酸的原料。

讲解：如草酰乙酸转变为天冬氨酸；丙酮酸转变为丙氨酸；脂肪酸分解为乙酰辅酶A后进入三羧酸循环彻底代谢；核糖分解代谢进入磷酸戊糖途径等。

3. 结构组分：纤维素和细菌多糖是细胞壁组分；

4. 其他：复合糖和寡糖具有重要生物功能；

糖类是细胞膜上受体分子的重要组成成分，是细胞识别和信息传递等功能的参与者。

## 第二节 单糖的结构和性质

### 一、单糖的旋光性与开链结构

#### 1. 单糖的旋光性

当普通光通过一个偏振的透镜或尼科尔棱镜时，一部分光就被挡住了，只有振动方向与棱镜晶轴平行的光才能通过。这种只在一个平面上振动的光称为平面偏振光。

旋光性：使平面偏振光的偏振面发生旋转的性质。

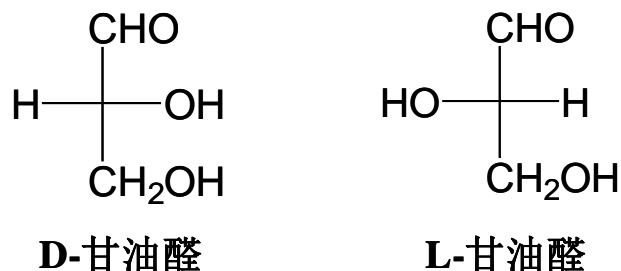
具有旋光性的分子：手性结构分子。

手性碳原子：四个价键与四个不同的原子或原子团相连接。

单糖具有旋光性，物质的旋光性以比旋光度或旋光率表示。比旋光度是一个物理常数，可以此对糖进行定性定量测定。

#### 2. 开链结构——具有游离羰基的结构形式

以甘油醛为例



单糖有D-及L-两种对映异构体。注意构型和旋光性的区别。

含3个碳原子以上的糖，规定构型时以距离醛基或酮基最远的不对称碳原子为准，羟基在右的为D-型，羟基在左为L-型。单糖分子如果有n个手性碳原子，则应该有 $2^n$ 个异构体。如六碳糖，有4个手性碳原子，共有 $2^4=16$ 个异构体。

### 二、单糖的环状结构

#### 1. 环状结构——单糖的半缩醛形式

开链形式无法解释变旋现象、醛基不发生加成反应、只能与一分子醇反应等。

费歇尔提出单糖的环状结构，醛基和其他碳原子上的羟基发生成环反应，称为半缩醛反应（seiacetol reaction）。实验证明具有两类反应：醛基与C5位羟基、醛基与C4位羟基反应。

为了完善环状结构，人们提出了另一种书写法，即哈渥斯式（Haworth）。

将Fischer式书写成Haworth式遵循的两条原则：

（1）将直链碳链右边的羟基写在环的下面，左边的羟基写在环的上面；

（2）当糖的环形成后还有多余的碳原子时，如果直链环是向右的，则未成环碳原子按规定写在环之上，反之写在环之下，酮糖的第一位碳例外。粗线代表靠近读

者一边。

## 2. 构象——单糖的立体结构

葡萄糖的可能构象有椅式和船式，主要是A椅式。

## 三、单糖的重要衍生物

### 1. 取代单糖——氨基糖决定血型和细菌细胞壁的功能

氨基糖，如氨基葡萄糖和氨基半乳糖，C2位的羟基被氨基取代。氨基常被乙酰化，如乙酰胞壁酸。

### 2. 糖醇和糖酸：

糖醇较稳定，易溶于水，有甜味，可作为甜味剂。常见的有甘露醇、山梨醇等；

糖酸：由单糖的氧化而得。葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖酸、葡萄糖二酸等。

### 3. 糖苷：

单糖的半缩醛上羟基与其他含羟基的化合物（醇、酚等）失水缩合而成缩醛式衍生物。糖苷较稳定，大多数易溶于水、乙醇、丙酮等。

## 四、单糖的性质

### 1. 还原性——作为还原剂

单糖的醛基或酮基使其具有还原性。费林定糖法即是应用此性质进行定量定性测定。费林试剂—— $\text{CuSO}_4 + \text{NaOH} + \text{酒石酸钾钠}$ 。试剂形成的配合物与单糖作用时， $\text{Cu}^{2+}$ 还原成 $\text{Cu}^+$ 以 $\text{Cu}_2\text{O}$ 形式沉淀，单糖自身氧化成糖酸。

### 2. 酸反应——糠醛是戊糖与酸反应的产物

戊糖和己糖在非氧化性强酸作用下发生脱水环化，分别生成呋喃甲醛（糠醛）和羟甲基呋喃甲醛。不同单糖脱水生成的呋喃甲醛类化合物，可与酚试剂形成有色物质，借此进行糖的定性定量测定。

表 2-1 糖的呈色反应

反应名称	酚试剂	适用糖类	反应颜色
莫里希反应	$\alpha$ -萘酚	所有糖类	紫红色
塞里万诺夫反应	间苯二酚	酮糖	鲜红色
托伦反应	间苯三酚	戊糖	朱红色(己糖黄色)
拜尔反应	甲基间苯二酚	戊糖	蓝绿色(己糖樱红色)

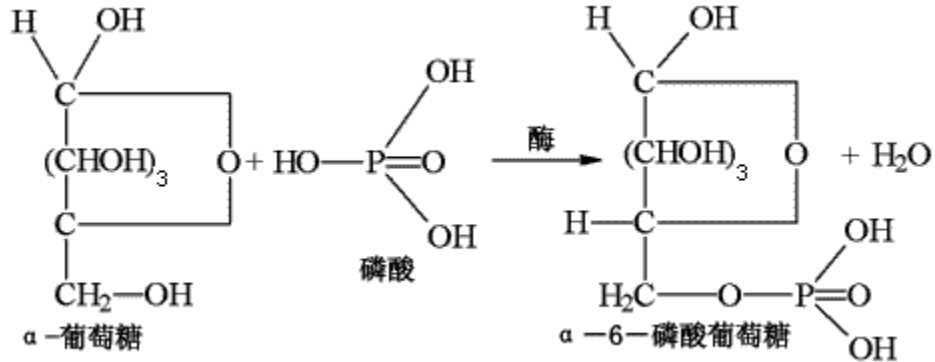
### 3. 碱反应——单糖与氨反应

在稀碱溶液中发生异构化，如葡萄糖在稀碱溶液中通过异构化产生一部分果糖和甘露糖。葡萄糖和甘露糖互为差向异构体。

单糖与弱碱溶液（氨水）缩合并通过一系列反应产生棕褐色聚合物，即美拉德反应。

#### 4. 成酯反应

生化上较重要的糖酯是磷酸酯



5. 成脎反应：可用来鉴别还原糖，生成的脎晶形和熔点不同。

### 第三节 寡糖的结构和性质

#### 一、寡糖的结构

1. 概念——寡糖是单糖的缩醛衍生物。

少数单糖（2~10个）通过糖苷键连接起来的缩醛衍生物。

2. 常见寡糖——二糖和三糖

糖苷键的构型由提供半缩醛羟基的单糖的构型决定。

糖苷键表示方法：指出键连接两个碳原子的位置，由糖基的碳位用箭头指向配基的碳位，如1→4。

自然界中重要的二糖有麦芽糖、蔗糖、乳糖、纤维二糖等。

表 2-2 三种二糖的性质比较

种类	存在	组成	物理性质	化学性质
蔗糖	甘蔗 甜菜	一分子葡萄糖和一分子果糖	白色结晶，味甜。易溶于水，有旋光作用，无变旋作用（无 $\alpha$ ， $\beta$ 型）	无还原性，不能形成糖脎。不被酵母发酵，水解后形成一分子葡萄糖与一分子果糖。加热至200℃以上变成棕黑色焦糖
麦芽糖	五谷 麦芽	二分子葡萄糖	白色结晶，甜度仅次于蔗糖。有旋光作用，易溶于水，有变旋作用（有 $\alpha$ ， $\beta$ 型）	有还原性，可形成糖脎，可被酵母发酵，水解后生成二分子葡萄糖
乳糖	乳类	一分子葡萄糖和一分子半乳糖	白色结晶，微甜，不易溶于水。有旋光作用及变旋作用（有 $\alpha$ ， $\beta$ 型）	有还原性，可形成糖脎，不被酵母发酵，水解后产生葡萄糖和半乳糖

三糖：常见的有棉籽糖、龙胆三糖、松三糖等。棉籽糖：存在于棉籽、桉树和甜菜中，可引起胀气。

## 二、寡糖的性质

### 1. 旋光性和变旋性：

寡糖都有旋光性，由于存在不对称碳原子。

个别没有变旋性，如蔗糖分子中不存在半缩醛羟基。

### 2. 还原性：多数具有还原性。

分子中仍存在半缩醛羟基的糖为还原糖。麦芽糖和乳糖有还原性；蔗糖不具有还原性。

## 三、环糊精

### 1. 结构——含有6~8个葡萄糖基的环状寡糖

环糊精是D-吡喃葡萄糖残基以 $\alpha$ （1→4）糖苷键连接而成的环状结构分子。最常见含有6个、7个、8个残基，分别称为 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精。

性质：一定程度抗酸、碱和酶的作用。

易与某些小分子或离子形成包含化合物，如极性的酸类、胺类、 $\text{SCN}^-$ 和卤素离子、无极性的芳香族碳氢化合物以及稀有气体。

### 2. 应用

分离分析技术方面，识别和选择有机分子的能力，应用于色谱与电泳分离中。香精成分、脂溶性维生素的包结材料；环境监测和废水处理方面，包结农药等；包结药物，发挥增溶等作用。

## 第四节 多糖的结构和性质

多糖是由多个单糖基以糖苷键相连而形成的高聚物。多糖没有还原性和变旋现象，无甜味，多不溶于水。多糖的结构包括单糖的组成、糖苷键的类型、单糖的排列顺序3个基本结构因素。

### 一、同聚多糖

#### 1. 淀粉

天然淀粉由直链淀粉与支链淀粉组成。

直链淀粉：溶于水，一般占10~20%，以 $\alpha$ (1→4)糖苷键连接，每个分子是一条线性无分支的链。

支链淀粉：不溶于水，以 $\alpha$ (1→4)糖苷键连接，11~12个葡萄糖残基后产生一个分支，分支点为 $\alpha$ -(1→6)糖苷键，支链平均长度为24~32个葡萄糖残基。

一个直链淀粉分子具有一个还原端，一个非还原端。

一个支链淀粉分子具有一个还原端和 $n+1$ 个非还原端（ $n$ 为分支数）。

讲解：给出淀粉分子的化学结构，并讲解其中单糖、糖苷键的类型等。

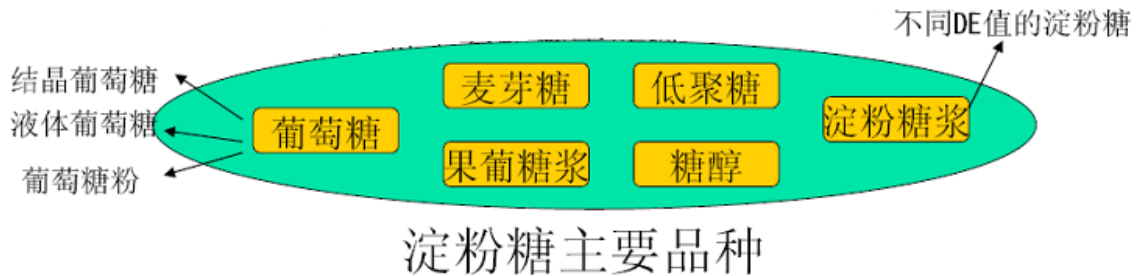
可利用淀粉与碘的颜色反应区分直链和支链淀粉。直链淀粉遇碘呈蓝色，支链



淀粉遇碘呈红色。淀粉与碘的呈色反应与淀粉糖苷链的长度有关：链长小于6个葡萄糖基，不能呈色；聚合度为20左右时，呈红色；聚合度为20~60，呈紫红色，大于60则呈蓝色。

淀粉无还原性，具右旋光性。天然淀粉一般不溶于水，且相对密度较大。

应用形式：淀粉糖；改性淀粉，如预糊化淀粉、酸变性淀粉等。



## 2. 糖原

又称动物淀粉，主要分布在动物的肝脏和骨骼肌。

与支链淀粉相似，但分支更多，支链一般由10~14个葡萄糖单位组成，主链上每隔3~5个葡萄糖基就有一个分支，整个分子呈球形。

无还原性，与碘反应呈红色，具右旋性，能溶于水和三氯乙酸，但不溶于乙醇及其他有机溶剂。

## 3. 纤维素

纤维素是自然界最丰富的有机化合物，是一种线性的由D-吡喃葡萄糖基借 $\beta$ -(1,4)糖苷键连接的没有分支的同聚多糖。主要以结构多糖的形式存在于植物体内，构成植物细胞壁和支撑组织的重要成分。在植物体内集结成一种称为微纤维的生物学结构单元，决定纤维素的化学稳定性和机械性能。

性质：极难溶于一般有机溶剂，也不溶于稀酸、稀碱。人体不能直接消化，但具有保健功能。

## 4. 壳多糖（几丁质）

构成昆虫、甲壳类动物硬壳的主要成分。由N-乙酰-2-氨基葡萄糖以 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)糖苷键连接。性质稳定，不溶于水和绝大多数有机溶剂，溶于少数溶剂，如六氟异丙醇、浓无机酸等。

应用：制成薄膜，用作医用材料、包装材料等；用于组织工程，也可作絮凝澄清剂；人体内几丁质可被溶菌酶等降解，降解速度与结构有关，可作控释载体材料；脱乙酰几丁质可用作黏结剂、上光剂、乳化剂等。

## 二、复合糖类

### 1. 糖蛋白——其中的寡糖具有重要生物功能

由寡糖链与多肽链共价相连所构成的复合糖类。至今发现的构成糖蛋白的糖有10余种，以己糖为主。参与糖肽共价连接的氨基酸常见的是丝氨酸、苏氨酸、天冬

酰胺等。

按连接方式分为O-型和N-型糖蛋白：O-型糖蛋白——肽链的Ser或Thr的羟基与糖基相连；N-型糖蛋白——肽链上的Asn的氨基与糖基相连。

糖蛋白的生物学功能：

机体润滑剂；运输作用；激素及免疫球蛋白；细胞膜上的糖蛋白（受体和载体）。

糖蛋白中寡糖链末端糖基组成的不同决定人体的血型。O型：Fuc（岩藻糖）；A型：Fuc和GNAc（N-乙酰半乳糖胺）；B型：Fuc和Gal（D-半乳糖）。

## 2. 糖脂与脂多糖——生物膜组分

功能：有助于稳定质膜的结构；

使细胞接受胞外信息，调节细胞功能。

常见糖脂：鞘糖脂、甘油糖脂。

鞘糖脂：存在于哺乳动物中，是N-脂酰鞘氨醇的糖苷，由脂肪酸、鞘氨醇和糖组成。

甘油糖脂：甘油二酯与己糖（半乳糖、甘露糖和脱氧葡萄糖）结合而成。参与光合作用。

脂多糖：革兰氏阴性菌细胞壁成分。

### 本章小结

1. 单糖结构：葡萄糖结构
2. 寡糖结构：蔗糖、麦芽糖的结构
3. 多糖结构：淀粉、糖原和纤维素的结构特点
4. 糖类的主要性质：旋光性、还原性

### 作业题

1. 书中第1题、第5题、第7题。
2. 写出蔗糖、麦芽糖、乳糖和纤维二糖的结构式。

## 第三章 脂类和生物膜化学（3学时） (Lipid and Membrane)

### 本章要求

1. 了解脂类的概念、分类和特点，熟悉脂类的生理功能；
2. 掌握脂类的结构组成，熟悉油脂的性质；
3. 掌握生物膜的组成和结构；
4. 掌握生物膜的功能，熟悉生物膜的特性。

### 第一节 概述

## 一、脂质的概念

### 1. 定义——脂质是醇与酸缩合的产物。

脂类(lipids) 是由脂肪酸和醇作用生成的酯及其衍生物。

讲解：脂肪酸是指烷烃或烯烃的长链，末端带有羧基的结构。醇主要是甘油（三元醇），也有鞘氨醇等。

### 2. 特点：通常是水不溶性化合物，而溶于乙醚、三氯甲烷等有机溶剂。

## 二、脂类的分类：单纯脂和复合脂

### 1. 单纯脂——仅含脂肪酸和醇

### 2. 复合脂——含有多种成分，如糖、磷酸和蛋白等。

## 三、脂类的生理功能

### 1. 结构组分——磷脂是生物膜的主要成分。举例：生物膜

### 2. 储存能源——脂质是机体的储存燃料。

大部分能量转变成脂肪并在适宜的组织中积累。

讲解：机体耗能首先利用糖类，即体内贮存的糖原，当糖原耗尽后才会动用脂肪。

### 3. 溶剂——作为一些活性物质的溶剂，如脂溶性维生素。

### 4. 保温和保护——作为润滑剂和防寒剂

机体和组织器官表面脂质起到润滑剂的作用，防止机械损伤，防止热量散失。

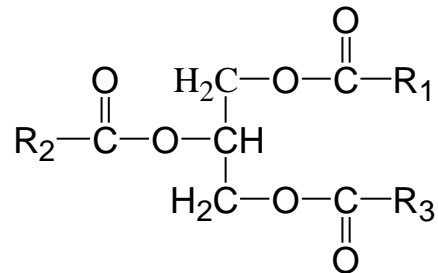
### 5.其他——参与机体代谢调节，如激素。

## 第二节 油脂的结构和性质

### 一、油脂的结构

#### 1. 结构——三酰甘油是甘油的脂肪酸酯

由甘油和脂肪酸共同构成。脂肪是脂肪酸的甘油三元酯，称三酰甘油(triglyceride)或中性脂肪(neutral fats)，见下图。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>相同，为单纯甘油酯；R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>有不同者，称为混合甘油酯。



甘油三酯

#### 2. 脂肪酸——一元羧酸

脂肪酸的表示法：

常用简写法，写出碳原子的数目，再标明双键的数目和位置。如软脂酸可写成

16: 0, 表明软脂酸为具有16个C的饱和脂肪酸; 油酸写成18: 1(9)或18: 1 $\Delta^9$ , 表示油酸具有18个C, 并在第9位C和第10位C之间有一个双键; 亚油酸可写为18: 2 $\Delta^{9,12}$ , 表示该脂肪酸为具有18个C, 且在第9~10、12~13碳原子之间各有一个双键的脂肪酸。

### 某些天然存在的脂肪酸

	简写符号	普通名称	结构简式
饱和脂肪酸	14:0	豆蔻酸	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub> COOH
	16:0	软脂酸	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> COOH
	18:0	硬脂酸	C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> COOH
	20:0	花生酸	C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> COOH
	22:0	山萘酸	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> COOH
	24:0	掬焦油酸	C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> COOH
不饱和脂肪酸	26:0	蜡酸	C <sub>25</sub> H <sub>51</sub> COOH
	16:1 $\Delta^9$	棕榈油酸	C <sub>15</sub> H <sub>29</sub> COOH
	18:1 $\Delta^9$	油酸	C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> COOH
	18:2 $\Delta^{9,12}$	亚油酸	C <sub>17</sub> H <sub>31</sub> COOH
	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	$\alpha$ -亚麻酸	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH
	18:3 $\Delta^{6,9,12}$	$\gamma$ -亚麻酸	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH
	18:3 $\Delta^{9,11,13}$	桐油酸	C <sub>17</sub> H <sub>29</sub> COOH
20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	花生四烯酸	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> COOH	

必需脂肪酸 ( essential fatty acid ) : 是哺乳动物生长所必需的、而体内又不能合成的脂肪酸必须从食物中获得。如亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸。植物能够合成亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸, 所以植物是这些脂肪酸的最初来源。

不饱和脂肪酸的加成反应: 与氢或卤素起加成反应, 生成饱和脂肪酸。可用于推断油脂中脂肪酸的不饱和程度, 用碘值表示。

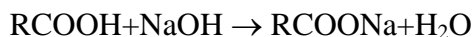
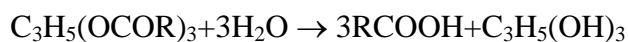
碘值: 指在油脂的卤化作用中, 100g油脂与碘作用所需碘的质量 (g), 用下式计算:

$$\text{碘值} = (cV \times 127/1000) / m \times 100$$

V 为滴定用硫代硫酸钠的体积, mL; c 为硫代硫酸钠的浓度, mol/L; 127 为碘相对原子质量; m 为样品油脂质量, g。

## 二、油脂的性质

1. 溶解性——三酰甘油不溶于水, 可溶于非极性溶剂。
2. 皂化作用——脂肪酸水解生成肥皂



皂化值: 完全皂化1g油脂所需氢氧化钾的质量(mg)

$$\text{皂化值} = 56.1Vc/m$$

V为滴定用HCl体积,mL; c为HCl的浓度; 56.1为KOH的相对分子质量; m为测定所用油脂质量。

皂化值的大小可以推知脂肪中所含脂肪酸的平均相对分子质量。

例题: 5g 三酰甘油需要 0.5mol/L KOH 36.0mL 才能使之完全水解并将其脂肪酸转变为肥皂。试计算样品中脂肪酸的平均相对分子质量。

解: 皂化值=  $0.5 \times 36 \times 56 / 5 = 201.6 \text{mg}$

三酰甘油平均相对分子质量=  $3 \times 56 \times 1000 / 201.6 = 833.3$

脂肪酸的平均相对分子质量:  $(833 - 38) / 3 = 265$

### 3. 乳化作用——用于肥皂去污

乳化剂是一种表面活性物质, 降低水和油两相交界处的界面张力。肥皂去污就是把衣物上的油污变成细小颗粒使之均匀地分散在水中。

### 4. 自动氧化——脂肪的自动氧化及其防止

油脂在空气中暴露过久, 就会产生一种难闻的臭味, 称为油脂的酸败。由油脂的自动氧化或微生物作用造成的。

酸败的化学本质: 不饱和脂肪酸的双键在氧的氧化作用下成为过氧化物, 过氧化物分解生成有臭味的低级醛、酮、羧酸和醛或酮的衍生物。

霉菌或脂酶将油脂水解成低级脂肪酸, 再经过 $\beta$ -氧化过程生成 $\beta$ -酮酸, 脱羧生成低级酮类物质。

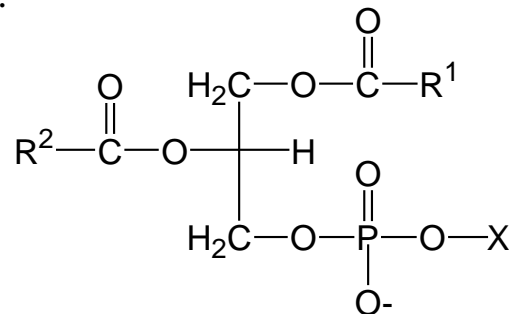
加速油脂自动氧化的因素: 光、热、潮湿、金属离子等。油脂储藏过程应注意保持低温、干燥、避光, 并防止微生物的作用。

酸败程度以酸值表示。酸值: 指中和1g油脂中的游离脂肪酸所需要的KOH的质量(mg)。脂肪的酸价=  $cV \times 56.1 / m$ ; 酸败程度越高, 酸值越大。

## 第三节 磷脂和固醇类

### 一、磷脂

结构如下:



#### 1. 甘油磷脂——磷脂酸的衍生物

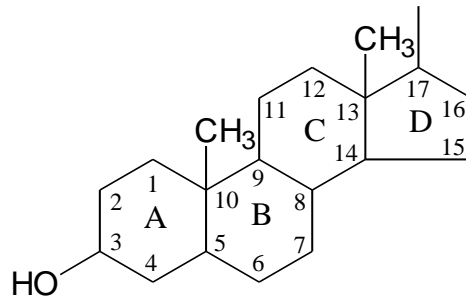
磷脂酸为磷脂的母体结构，其结构为1,2-二脂酰-3-磷酸甘油。最常见的甘油磷脂：磷脂酰胆碱（卵磷脂）、磷脂酰乙醇胺（脑磷脂）。动物心、脑、肾、肝及禽蛋蛋黄中含量丰富。

## 2. 鞘磷脂——鞘氨醇衍生物

存在于神经组织和脑内，动植物细胞膜的重要组分。鞘磷脂是神经酰胺与磷酸胆碱形成的磷酸二酯。维持细胞膜的结构，调节生长因子受体和超细胞基质蛋白的活动，并为一些微生物、微生物毒素、病毒提供结合位点。胞外药物可通过激活鞘磷脂酶从而水解鞘磷脂，释放神经酰胺。

## 二、固醇类

环戊烷多氢菲的衍生物。环戊烷多氢菲是菲的饱和环与环戊烷结合的稠环化合物。甾醇或固醇类物质的结构通式：



### 1. 胆固醇——甾体活性物质前体

存在于动物细胞和组织中，属两性分子。胆固醇与长链脂肪酸形成的胆固醇酯是血浆蛋白及细胞外膜的重要组分。参与神经兴奋传导、脂类代谢，也是一些类固醇物质的前体物质；

测定：与毛地黄糖苷结合生成沉淀；三氯甲烷溶液中与乙酸酐、浓硫酸作用呈蓝绿色，与浓硫酸混合呈蓝紫色。

### 2. 胆酸及胆汁酸

胆汁中的重要成分是胆酸及其衍生物。胆汁中，胆酸与甘氨酸或牛磺酸结合成甘氨酸胆酸或牛磺胆酸，称为胆汁酸，并以钠盐形式存在。胆汁酸盐为水溶性，为表面活性物质，可将脂肪、胆固醇和脂溶性维生素乳化，促进吸收，还可激活脂肪酶。

### 3. 酵母固醇——麦角固醇可转变成VD<sub>2</sub>

某些植物、酵母和麦角菌等微生物中含有麦角固醇。阳光和紫外线的照射可使B环开裂生成维生素D<sub>2</sub>。

## 第四节 生物膜

生物膜是细胞质膜(cytoplasmic membrane)和细胞内膜系统(endomembrane system)的总

称。生物膜由极性脂和蛋白质组成。不仅是维持细胞内环境相对稳定的有高度选择性的半透性屏障，而且直接参与物质转运、能量转换、信息传递、细胞识别等重要的生命活动。

## 一、生物膜的组成及结构模型

细胞膜和各种细胞器膜统称为生物膜。

### 1. 膜成分：含有脂质和蛋白质（40~60%）。

（1）膜蛋白：根据膜蛋白分离难易及与脂质结合的牢固程度，分为两类：

外周膜蛋白：水溶性，靠离子键或其他弱键与膜表面的蛋白质分子或脂质结合。

分离方法：改变离子强度、提高温度。

整合膜蛋白：占70%，与脂质结合紧密。分离方法：加入去垢剂或伸展剂使膜崩解。

（2）脂质是构成生物膜最基本的结构物质。

组成膜的脂质包括：

磷脂：主要成分；胆固醇；糖脂：以脑苷脂为主。

#### ① 磷脂

磷脂可分为甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和心磷脂。

组成生物膜的磷脂分子的主要特征：具有1个亲水头部和2个疏水尾部；有饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。

极性脂在多水介质中自发地形成闭合的双分子层，头部向着两侧的多水介质，尾部形成双分子层中间的疏水区，成为亲水物质的扩散屏障。

#### ② 胆固醇

真核细胞膜含有胆固醇，动物细胞膜比植物含有较多的固醇。高等植物细胞膜的固醇主要是谷甾醇和豆甾醇。动物细胞膜中最多的固醇为胆固醇。

磷脂和糖脂是构成脂质双分子层的物质，胆固醇在调节膜的流动性、增加膜的稳定性以及降低水溶性物质的通透性等方面都起着重要作用。

### 2. 膜结构——液态镶嵌模型

1972年，Singer S.J.等人提出。将膜描述为是由蛋白质在黏滞的流体状脂质双分子层中所形成的镶嵌物。模型要点：

①磷脂双分子层是组成生物膜的基本结构，具有一定的流动性；

②蛋白质分子以不同方式镶嵌在双分子层中，膜蛋白可以侧向运动，但不能翻转滚动。

③膜蛋白与膜脂、膜蛋白之间及其与膜两侧大分子间的复杂相互作用限制了膜的流动性。

## 二、生物膜的特性

### 1. 膜的流动性

主要指脂质分子的侧向运动。生物膜的流动性很大程度上取决于膜的磷脂分子中不饱和脂肪酸的含量及碳链长度。不饱和程度越高，脂肪酸链越短，膜的流动性越大。与温度和胆固醇含量也有关。胆固醇的含量增加会降低膜的流动性。

膜蛋白的运动主要包括旋转运动和侧向扩散运动。

## 2. 膜的不对称性

膜脂、膜蛋白分布的不对称性，进而表现为生物膜不同部位具有功能上的不对称性。膜脂双分子层中，外层以磷脂酰胆碱为主，内层以磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺为主，不饱和脂肪酸主要位于外层；膜蛋白的不对称性表现为膜脂内外两层所含外周蛋白种类及数量的不同。

## 3. 选择性渗透作用：细胞膜的通透性。

### 三、生物膜的功能

#### 1. 物质转运：

吸收养料，排出不需要的物质。主要方式包括：

简单扩散：高浓度→低浓度；依赖膜两侧浓度差和分子大小。

协助扩散：高浓度→低浓度，有特异膜蛋白协助；载体蛋白和通道蛋白。

主动运输：逆浓度梯度与电化学梯度+耗能+膜蛋白。

#### 2. 信息传递：

细胞膜上有接受信息的专一性受体，识别和接受各种特殊信息，包括神经递质、激素等。

#### 3. 能量转换——线粒体：包括氧化磷酸化和光合磷酸化。

#### 4. 免疫功能——识别外源物质

吞噬细胞和淋巴细胞；细胞的免疫性是由于膜上有专一性抗原受体。

讲解：分别对四种功能进行举例图示说明，包括转运方式、胰岛素的作用机理、ATP合成酶、吞噬细胞的作用。

### 四、脂质体（liposome）

脂质体可用于转基因或制备的药物，它可以与细胞膜融合，将药物送入细胞内部。

#### 本章小结

1. 脂类的结构组成和油脂的性质；
2. 生物膜的组成和结构；
3. 生物膜的功能和特性。

作业题：书中 40 页第 1,3,4 题。



## 第四章 蛋白质化学（10学时）

本章要求：

1. 掌握氨基酸的特点、分类和三字符号，了解蛋白质的生物学功能；
2. 初步掌握肽键和多肽的概念以及结构特点；
3. 掌握蛋白质的主要性质，理解分离纯化的方法；
4. 掌握蛋白质的一级结构、二级结构的概念以及二级结构的类型。
5. 了解蛋白质的三级和四级结构。

### 第一节 概述

#### 一、蛋白质的概念

由许多不同的 $\alpha$ -氨基酸按一定的序列通过酰胺键（肽键）缩合而成的，具有较稳定的构象并具有一定生物功能的大分子。

##### 1. 蛋白质是生命的物质基础

凡是有生命的地方，基本上都有蛋白质起作用。蛋白质是细胞内含量最高的组分，占许多生物体干重的45~50%以上。

##### 2. 蛋白质是含氮元素恒定的生命物质。各种蛋白质中N元素的含量平均为16%。

组成蛋白质的元素有：C、H、O、N和S，这些元素在蛋白质中的组成百分比约为：C：50~55%；H：6~8%；O：20~23%；N：15~18%；S：0~4%；其它(P、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 等) 微量。

蛋白质N平均含量为16%的特点作为凯氏（Kjedahl）定氮法测定蛋白质含量的计算依据。蛋白质含量 = N含量 $\times$ 6.25

#### 二、蛋白质的分类

##### 1. 分类依据——蛋白质不能按化学结构分类

常用依据：生物来源、理化性质、分子形状、化学组成等。

##### 2. 三种分类方法——按组成分类常用

1)根据分子形状：球状和纤维状蛋白；球状蛋白：轴比小于10，较易溶解。常见：血红蛋白，血清球蛋白，豆类球蛋白等。纤维状蛋白：轴比大于10，不溶于水。常见：羽毛中的角蛋白和蚕丝中的丝蛋白等。

##### 2)根据溶解度：

清蛋白：白蛋白，溶于水；

精蛋白：溶于水和酸性溶液，含碱性氨基酸多

组蛋白：溶于水及稀酸，含碱性氨基酸较多

球蛋白：微溶于水而溶于稀中性盐溶液

谷蛋白：不溶于水、醇及中性盐溶液，溶于稀酸、稀碱，如麦蛋白。

醇溶蛋白：不溶于水，溶于70~80%乙醇；

硬蛋白：不溶于水、盐、稀酸、稀碱。

### 3)根据组成:

单纯蛋白质: 仅由氨基酸组成。如清蛋白、球蛋白、组蛋白等。

结合蛋白质: 氨基酸、糖、脂肪、核酸、磷酸以及色素等。如核蛋白、色蛋白、糖蛋白、脂蛋白(血浆脂蛋白、膜脂蛋白等)、磷蛋白(酪蛋白、卵黄蛋白等)。

### 三、蛋白质的生物学功能

1. 催化功能: 酶;
2. 调节功能: 激素、受体、毒蛋白等;
3. 结构功能: 构成细胞和组织;
4. 运输功能: 血红蛋白, 载脂蛋白等;
5. 免疫功能: 抗体;
6. 运动功能: 肌肉, 纤毛和鞭毛;
7. 储藏功能: 乳汁中的酪蛋白等;
8. 生物膜的功能: 通透性、信号传递、生理识别等。

## 第二节 蛋白质的基本单位——氨基酸

### 一、蛋白质的水解

#### 1. 酸水解

常以5~10倍的20% HCl煮沸回流16~24h, 或加压力于120℃水解12h。

优点: 水解彻底, 产物为L-氨基酸; 缺点: 色氨酸破坏, 水解液呈黑色。

应用: 氨基酸工业生产、蛋白质分析等。

#### 2. 碱水解

6mol/L NaOH或4 mol/L Ba(OH)<sub>2</sub>煮沸6h。

优点: 色氨酸未破坏, 水解液清亮; 缺点: 氨基酸发生旋光异构。一般很少使用。

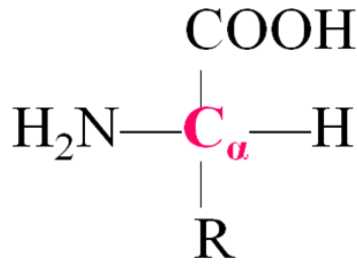
#### 3. 酶水解

条件温和, 常温(36~60℃)、常压和pH2~8, 氨基酸未破坏, 不发生旋光异构; 但水解不彻底。

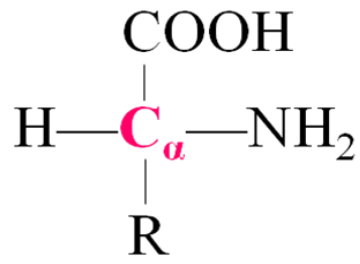
### 二、氨基酸的结构特征

#### 1. 结构特征——氨基酸是氨基取代羧酸

氨基酸的结构通式: 19种氨基酸具有一级氨基(-NH<sub>2</sub>)和羧基(-COOH)结合到α碳原子(C<sub>α</sub>), 同时结合到(C<sub>α</sub>)上的是H原子和各种侧链(R); Pro具有二级氨基(α-亚氨基酸)。



L-氨基酸



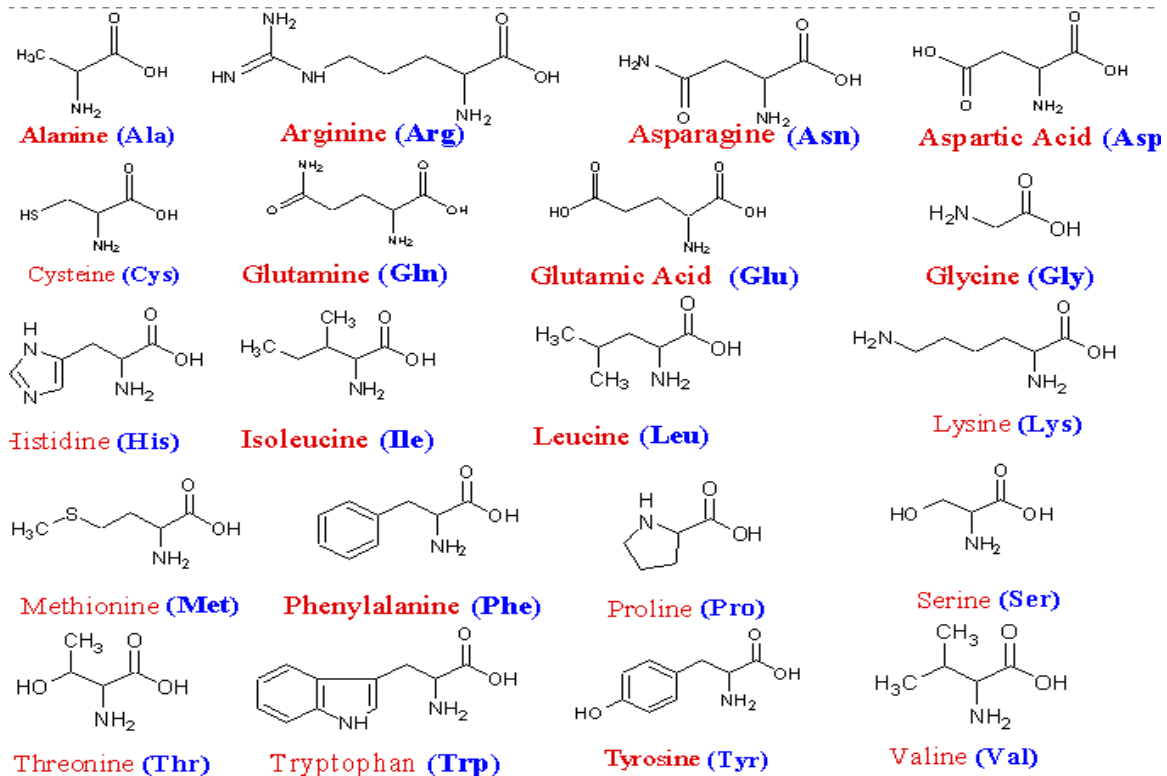
D-氨基酸

$\text{C}_\alpha$ 如是不对称C (除Gly)，则：

1. 具有两种立体异构体 [D-型和L-型]
2. 具有旋光性 [左旋 (-) 或右旋 (+)]

## 2. 常见氨基酸——20种基本氨基酸

从细菌到人类，所有蛋白质都由20种基本氨基酸 (20 standard amino acids)组成。



## 三、氨基酸的分类

### (1) 根据酸碱性质：

酸性氨基酸：谷氨酸和天冬氨酸；

碱性氨基酸：精氨酸、赖氨酸和组氨酸；

中性氨基酸：15种，包括两种酰胺。

### (2) 根据R的化学结构

脂肪族氨基酸：15种。

芳香族氨基酸：Phe、Tyr、Trp

杂环氨基酸：His

杂环亚氨基酸：Pro

(3) 根据R的极性

①极性氨基酸：不带电：Ser、Thr、Tyr(OH)、Asn、Gln(CONH<sub>2</sub>)、Cys(SH)；

带正电：His、Lys、Arg；

带负电：Asp、Glu

②非极性氨基酸：Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Met、Trp、Pro

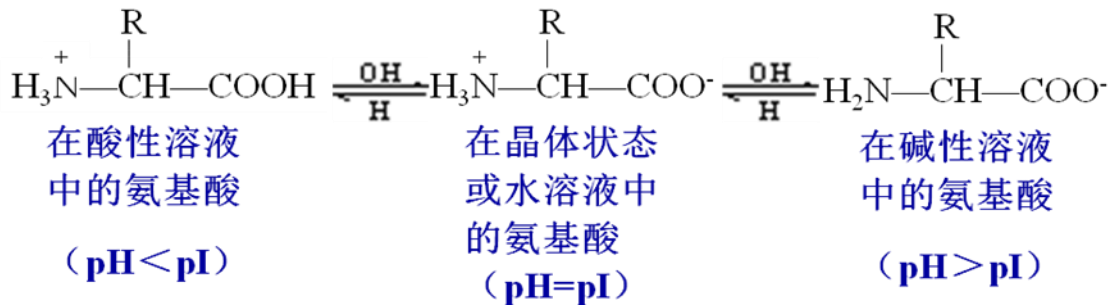
#### 四、氨基酸的性质

##### 1. 一般物理性质

无色晶体，熔点较高(200℃以上)，能溶于水、稀酸或稀碱中，不溶于有机溶剂；除Gly外都有旋光性。

##### 2. 两性解离和等电点

氨基酸在水溶液中或在晶体状态时都以离子形式存在，在同一个氨基酸分子上带有能放出质子的—NH<sub>3</sub><sup>+</sup>正离子和能接受质子的—COO<sup>-</sup>负离子，为两性电解质。



调节氨基酸溶液的pH，使氨基酸分子上的—NH<sub>3</sub><sup>+</sup>基和—COO<sup>-</sup>基的解离程度完全相等时，即所带净电荷为零，此时氨基酸所处溶液的pH值称为该氨基酸的等电点(pI)。生理pH值时，大多数氨基酸以两性离子存在。

氨基酸等电点的确定：

1) 酸碱滴定(滴定曲线)

2) 根据pK值(该基团在此pH一半解离)计算：

等电点等于两性离子两侧pK值的算术平均数。

$$\text{pI} = \frac{\text{pK}_1 + \text{pK}_2}{2}$$

**酸性氨基酸**      $\text{pI} = 1/2(\text{pK}_1' + \text{pK}_R')$

**碱性氨基酸**      $\text{pI} = 1/2(\text{pK}_2' + \text{pK}_R')$

### 练习题

1. 精氨酸的 $pK_1'$ ( $\text{COO}^-$ )值为2.17,  $pK_2'$ ( $\text{NH}_3^+$ )值为9.04,  $pK_3'$ (胍基)值为12.48, 其 $pI$ (等电点时的 $pH$ 值)为\_\_\_\_\_。
2. 用凯氏定氮法测定正常人血清含氮量为11.58 mg/ml, 则此人血清蛋白含量为\_\_\_\_\_g/100ml。
3. 人体八种必需氨基酸分别是\_\_\_\_\_。
4. 写出下列氨基酸的三字母缩写符号: 天冬氨酸、缬氨酸、谷氨酰胺、色氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸。
5. 下列哪种氨基酸溶液不使平面偏振光发生偏转  
A. Pro      B. Gly      C. Leu      D. Lys
6. 含有两个氨基的氨基酸是  
谷氨酸 B.丝氨酸 C.酪氨酸 D.赖氨酸 E.苏氨酸

### 3. 紫外吸收——芳香族氨基酸

带芳香环侧链的氨基酸具有紫外吸收的能力, 最大光吸收在280nm。利用氨基酸的紫外吸收测定蛋白含量。

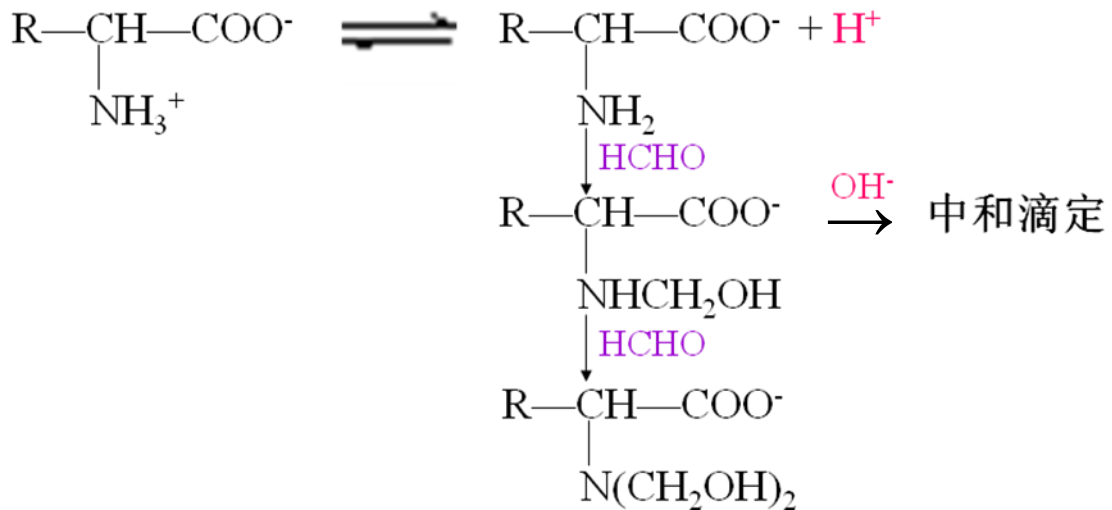
酪氨酸:  $\lambda_{\max}=278\text{nm}$ ; 苯丙氨酸:  $\lambda_{\max}=259\text{nm}$ ; 色氨酸:  $\lambda_{\max}=279\text{nm}$ 。

### 4. 化学性质

(1)  $\alpha$ -氨基参与的反应

①与亚硝酸反应: 得到 $\alpha$ -羟酸并放出氮气。是范斯来克法定量测定氨基酸的基本反应。可以用氨基氮与总蛋白氮的比例表示蛋白质的水解程度。

②与甲醛发生羟甲基化反应:



③与2,4-二硝基氟苯(DNFB)的反应

Sanger首先用此反应鉴定多肽链或蛋白质的 $\text{NH}_2$ 末端氨基酸。

④形成席夫碱反应：与醛类化合物反应。非酶促褐变的一种机制。

⑤脱氨基和转氨基反应

在氨基酸氧化酶作用下，脱氨基生成 $\alpha$ -酮酸。转氨酶催化下实现氨基转移。如谷丙转氨酶。

(2)  $\alpha$ -羧基参与的反应

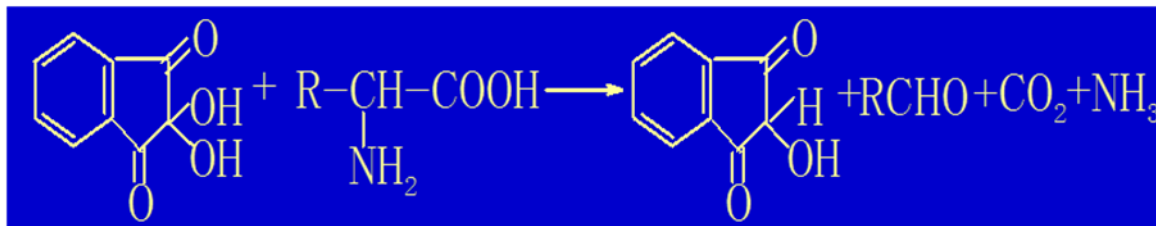
①成盐反应：与碱作用生成盐，如谷氨酸一钠。与重金属离子形成的盐不溶于水。

②脱羧反应：

在氨基酸脱羧酶作用下，生成一级胺。谷氨酸脱羧形成 $\gamma$ -氨基丁酸。

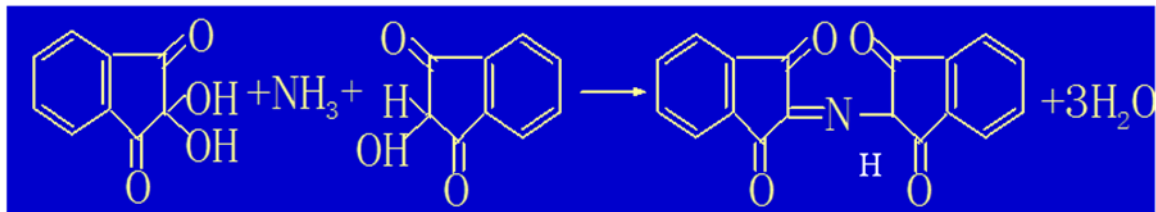
(3) 氨基和羧基共同参与的反应

①与茛三酮的反应：Pro产生黄色物质(440nm)。



水合茛三酮

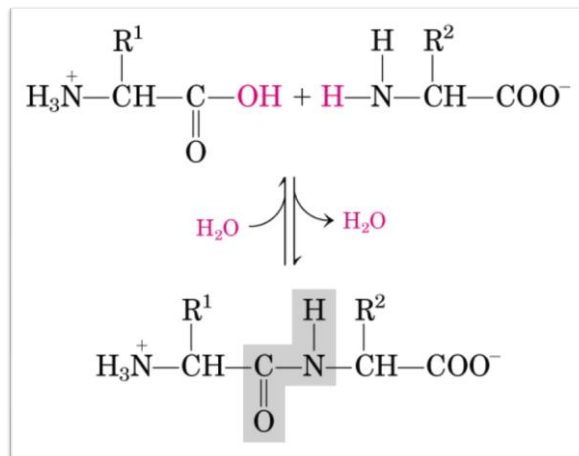
还原茛三酮



蓝紫色物质 (570nm)

②成肽反应

缩合生成酰胺键，通常称为肽键。



(4) 侧链基团的化学性质

①巯基及二硫键：

可与苄氯、碘乙酰胺等结合，保护巯基。两个巯基氧化形成二硫键-S-S-，相互可形成氧化还原体系，并且可以维持多肽分子和蛋白质分子结构。

## ②羟基：

可与酸成酯，如丝氨酸或苏氨酸与乙酸、磷酸反应成酯。

## 第三节 肽

### 一、肽的概念

#### 1. 结构——由氨基酸构成

肽键：由一个氨基酸的 $\alpha$ -氨基与另一个氨基酸的 $\alpha$ -羧基缩合失水而形成的酰胺键。氨基酸的 $\alpha$ -羧基与另一个氨基酸的 $\alpha$ -氨基脱水形成肽。肽键是蛋白质分子中氨基酸连接的基本方式。肽键相连构成了蛋白质的主链。

肽键特点：

1. 氮原子上的孤对电子与羰基具有明显的共轭作用。
2. 组成肽键的原子处于同一平面。
3. 肽键中的C-N键具有部分双键性质，不能自由旋转。
4. 在大多数情况下，以反式结构存在。

肽(peptide)

氨基酸之间通过肽键联结起来的化合物称为肽。两个氨基酸形成的肽叫二肽，三个氨基酸形成的肽叫三肽……，十个氨基酸形成的肽叫十肽，一般将十肽以下称为寡肽(oligopeptide)，以上者称多肽(polypeptide)或称多肽链。

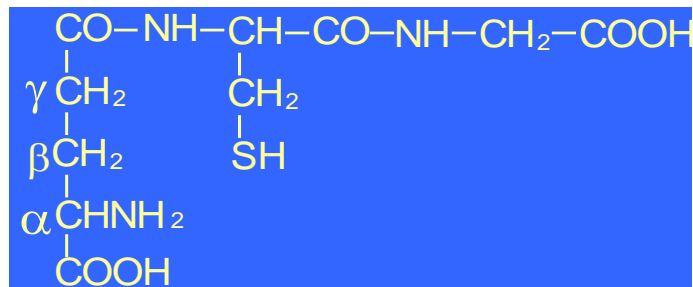
氨基酸残基(amino acid residues)：肽链中的氨基酸在参加肽键形成时失去了1分子水，已经不是原来完整的分子，称为氨基酸残基。

肽的命名及书写方式

一条肽链通常含有一个游离的 $\alpha$ -氨基端(N-末端)和一个游离的 $\alpha$ -羧基端(C-末端)。规定肽链的氨基酸排列顺序从其N-末端开始，到C-末端终止。常把N-末端氨基酸残基放在左边，C-末端氨基酸残基放在右边。小分子肽一般按其氨基酸残基排列顺序命名，如：Tyr-Gly-Gly-Phe-Met称为：酪氨酰甘氨酰甘氨酰苯丙氨酰甲硫氨酸（脑啡肽）。

### 二、生物活性肽

#### 1. 谷胱甘肽——参与体内氧化还原反应



## 2. 神经肽——神经肽与神经体液调节

主要存在于中枢神经系统，包括脑啡肽、内啡肽、强啡肽等和P-物质。具有吗啡一样的镇痛作用。

## 3. 抗菌肽——细菌的一种防御武器

抑制细菌和其他微生物生长或繁殖的物质；由特定微生物产生，最常见的是青霉素，它是由半胱氨酸和缬氨酸结合成的二肽衍生物。主要破坏细菌细胞壁糖肽的合成，引起溶菌。

# 第四节 蛋白质的分子结构

## 一、蛋白质共价结构

### 1. 一级结构概念——特指氨基酸的顺序

1969年，理论和应用化学国际协会特规定蛋白质的一级结构特指肽链中的氨基酸顺序。维持一级结构的化学键：共价键，主要为肽键。

书写方式：从N-末端到C-末端，用氨基酸的3字母缩写或单字母符号连续排列。

### 2. 一级结构的测定——氨基酸序列的自动程序测定

一级结构确定的原则：将大化小，逐段分析，制成两套肽片段，找出重叠位点，排出肽的前后位置，最后确定蛋白质的完整序列。

片段重叠法，主要步骤为：

测定氨基酸末端的数目，确定蛋白质分子由几条肽链构成，并测得末端组成；对几条肽链进行拆分、分离；肽链水解后进行氨基酸组成分析；一种不完全水解，得到片段，分离后测定氨基酸顺序；另一种不完全水解，测定片段氨基酸顺序；比较两套片段氨基酸顺序，得到整个氨基酸顺序；确定多肽链中二硫键的位置。

一级结构的测定方法

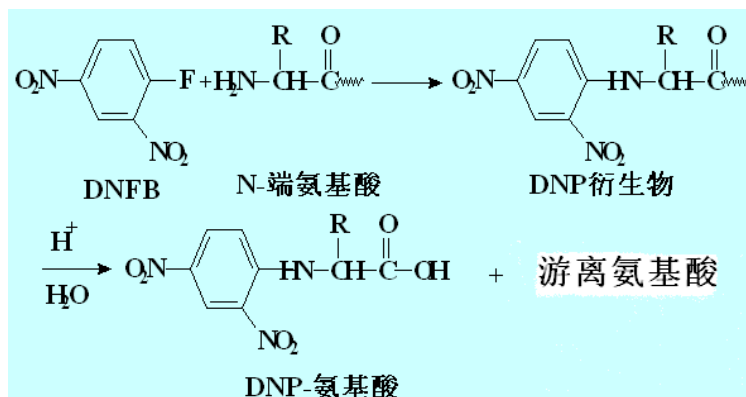
#### (1) 肽链末端分析

末端氨基酸的测定：多肽链端氨基酸分为两类，N-端氨基酸和C-端氨基酸。

##### ① N-末端测定

#### A. 二硝基氟苯（DNFB）法

反应后酸水解，得到一个DNP-氨基酸和其余所有游离氨基酸的混合液。DNP-氨基酸为黄色，可用乙醚抽提，分离鉴定得到末端氨基酸。





B. Edman法：生成苯乙内酰硫脲衍生物，通过层析法分离鉴定，Edman首先用此反应鉴定多肽的N-端AA。

C. 丹磺酰氯法：在碱性条件下，得到丹磺酰-氨基酸。优点是丹磺酰-氨基酸有很强的荧光性质，检测灵敏度可以达到 $1 \times 10^{-9}$  mol。

D. 氨肽酶法：

一种肽链外切酶，它能从多肽链的N-端逐个的向内水解。根据不同的反应时间测出酶水解所释放出的氨基酸种类和数量，按反应时间和氨基酸残基释放量作动力学曲线，从而知道蛋白质的N-末端残基顺序。最常用的氨肽酶是亮氨酸氨肽酶，水解以亮氨酸残基为N-末端的肽键速度最大。

②C-末端测定

A. 胍解法：多肽与胍在无水条件下加热，C-端氨基酸即从肽链上解离出来，其余的氨基酸则变成胍化物。胍化物能够与苯甲醛缩合成不溶于水的物质而与C-端氨基酸分离。

B. 羧肽酶法：

一种肽链外切酶，它能从多肽链的C-端逐个的水解。根据不同的反应时间测出酶水解所释放出的氨基酸种类和数量，从而知道蛋白质的C-末端残基顺序。

常用的羧肽酶至少包括A、B、C三种。羧肽酶A能水解除Pro、Arg和Lys以外的所有C-末端氨基酸残基；B只能水解Arg和Lys为C-末端残基的肽键；C能水解C-末端的任何一个残基。

(2) 二硫键的拆开和肽链的分离

肽链通过非共价键连接，可用酸、碱、高浓度的盐或其他变性剂处理，将肽链分开；二硫键的打开：氧化还原法，即用过量的 $\beta$ -巯基乙醇或二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇处理，然后用碘乙酸( $\text{ICH}_2\text{COOH}$ )保护巯基。也可以用过甲酸( $\text{HCOOOH}$ )处理。

(3) 肽链的部分水解和肽段的分离

蛋白质裂解成小肽，然后分离并测定肽段的氨基酸序列。选用专一性强的蛋白水解酶或化学试剂进行有控制的裂解。

基本要求：选择性强，裂解点少，反应产率高。基本方法：化学裂解（溴化氰裂解和酸水解）、酶解法（胰蛋白酶等）。

①溴化氰水解法：专一性地切断肽链中由甲硫氨酸的羧基所形成的肽键。

专一性强，切点少且产率高，片段较大。

②部分酸水解：测定蛋白质的氨基酸组成，稀酸条件下，肽链Asp的羧基端易断裂，浓酸条件下，含羟基氨基酸的氨基端肽键易断裂。

③酶解法：胰蛋白酶：作用Arg和Lys羧基端肽键；胰凝乳蛋白酶：芳香族氨基酸及

一些有大的非极性侧链的氨基酸的羧基端肽键。

#### (4) 肽段的氨基酸序列测定

采用Edman降解法、酶解法等。

酶解法：利用一种酶水解产生一个或两个可知末端特征的片段，再用另一种酶作用产生另一组片段，然后后一组片段进行色谱分离并进行末端测定，最后进行片段重叠分析，确定氨基酸序列。

#### (5) 肽段在多肽链中次序的推断

采用肽段重叠法。利用两套或多套肽段的氨基酸顺序彼此间的交错重叠，拼凑出整条多肽链的氨基酸顺序。

### 练习题

有一多肽经酸水解后产生等摩尔的Lys, Gly和Ala, 如用胰蛋白酶水解该肽, 仅发现有游离的Gly和一种二肽。下列多肽的一级结构中, 哪一个符合该肽的结构?

A.Gly-Lys-Ala-Lys-Gly-Ala

B.Ala-Lys-Gly

C.Lys-Gly-Ala

D.Gly-Lys-Ala

E.Ala-Gly-Lys

## 二、蛋白质的空间结构

### 1. 概念——蛋白质的空间结构系非共价结构

#### (1) 含义:

二级结构：指肽链借助氢键排列成沿一个方向具有周期性结构的构象，不涉及氨基酸残基的侧链构象。

三级结构：指多肽链借助各种次级键盘绕成特定的不规则的球状结构的构象。

四级结构：指寡聚蛋白质中各亚基之间排布上的相互关系或结合方式。

#### (2) 维持蛋白质分子构象的化学键

①氢键：主要维持 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠结构。

②静电引力：也称离子键或盐键，对蛋白质构象稳定性贡献不大。

③范德华力：对维持蛋白质活性中心构象非常重要。

④疏水相互作用：维持蛋白质高级结构；

⑤二硫键：两个硫原子之间形成的共价键。

维持蛋白质构象的化学键主要是次级键。次级键：除共价键、离子键和金属键外基团间和分子间相互作用力的总称。

#### (3) 蛋白质分子中肽链的空间结构原则

肽平面：两个旋转角： $\varphi$  ( $C\alpha-N$ )、 $\psi$  ( $C\alpha-C$ )

氨基酸残基侧链结构、极性造成空间位阻，使旋转角度不能超过  $0\sim\pm 180^\circ$  范围； $C=O$  和  $N-H$  间的氢键也限制了二者的旋转。

## 2. 二级结构——肽链的螺旋折叠

### (1) $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helix)

1951年Pauling和Corey根据 $\alpha$ -角蛋白( $\alpha$ -keratin)的X射线衍射结果提出的。

#### ① $\alpha$ -螺旋结构模型要点:

- 主链围绕中心轴螺旋上升，每3.6个氨基酸残基上升一圈，相当于0.54nm，每个氨基酸残基沿轴上升0.15nm，每个氨基酸旋转100°。
- 相邻螺圈之间形成链内氢键；
- R侧链在螺旋的外侧；
- 天然蛋白质绝大多数为右手螺旋。

#### ②影响 $\alpha$ -螺旋形成和稳定的因素

- 氨基酸的组成和排列顺序：多聚丙氨酸( $\alpha$ -螺旋)；多聚赖氨酸(无规则卷曲)。遇到脯氨酸螺旋被中断或拐弯。
- 氨基酸所带电荷性质
- R侧链的大小：空间位阻。

### (2) $\beta$ -折叠( $\beta$ -pleated sheet)

#### ① $\beta$ -折叠结构要点

- 肽链几乎是完全伸展的；
- 肽链成锯齿状，按层平行排列，肽平面呈片状；
- 相邻肽链的C=O与N-H形成氢键，氢键几乎垂直于肽链；
- 肽链的R侧链基团在肽平面的上下交替出现；
- 折叠片以反平行式结构更稳定。

#### ② $\beta$ -折叠与 $\alpha$ -螺旋的转变：头发中的角蛋白。

### (3) $\beta$ -转角( $\beta$ -turn)

指肽链出现的180°回折，由弯曲处的第一个氨基酸残基的-C=O与第四个氨基酸残基的-NH之间形成氢键。Gly和Pro出现频率高。

(4) 无规则卷曲：没有确定规律性的部分肽链构象，肽链中肽键平面不规则排列，属于松散的无规卷曲(random coil)。

## 3. 三级结构——肽链非几何形的进一步折叠

蛋白质的三级结构是指一条多肽链在二级结构基础上进一步卷曲折叠，构成一个不规则的特定构象。包括全部主链、侧链在内的所有原子的空间排布，但不包括肽链的相互作用。只有三级结构才是蛋白质生物活性的特征构象。

维系三级结构的作用力：氢键、二硫键、离子键、疏水作用力和范德华力。

## 4. 四级结构——亚基间的相互关系

蛋白质的四级结构：由两条或两条以上的具有三级结构的多肽链通过非共价键键聚合而成的特定构象。

四级结构的蛋白质中每个最小共价单位称为亚基。亚基一般由一条肽链组成。

四级结构涉及亚基的种类和数目以及各亚基在整个分子中的空间排布，包括亚基间的接触位点和相互作用关系。

维持四级结构的主要作用力：疏水作用力。

### 三、蛋白质结构与功能的统一性

#### 一级结构与功能的关系

##### (1) 同功蛋白质氨基酸的种属差异和分子进化

同功蛋白质：不同种属来源的执行同种生物学功能的蛋白质；

结构包括两部分：不变的氨基酸序列，决定蛋白质的空间结构和功能；可变的氨基酸序列：体现种属差异。同功蛋白质组成上的差异体现亲缘关系的远近。

##### (2) 同功蛋白质中氨基酸序列的个体差异和分子病

同种蛋白质：同种生物具有相同生物活性的蛋白质；

个体差异：同种蛋白质氨基酸序列的细微差异。引起分子病，个体蛋白质结构改变，导致生物学功能改变。

##### (3) 一级结构的局部断裂与蛋白质的激活

血液凝固的生化机理；胰岛素原的激活。

## 第五节 蛋白质的性质

### 一、蛋白质分子的大小

1.相对分子质量——蛋白质是巨大分子：相对分子质量一般为1万到几百万。

2.测定方法——蛋白质相对分子质量的测定

#### (1) 根据化学组成测定最低相对分子质量

例如血红蛋白含铁量为0.335%，最低相对分子质量= $55.84/0.335\% \approx 16700$ ；其他方法测定血红蛋白分子量为68000。

#### (2) 物理化学方法测定蛋白质的相对分子质量

##### 渗透压测定法

超离心法：包括沉降速度法（沉降系数S）和沉降平衡法（根据密度分离）。

### 二、两性解离——多价解离

蛋白质的可解离基团主要指侧链的可解离基团，包括氨基、羧基、咪唑基、胍基、巯基、酚基等。蛋白质分子所带电荷的性质和数量是由蛋白质分子中的可解离基团的种类和数目以及溶液pH决定的。

等电点——蛋白质多种性质达到最低值。等电点时，蛋白质在电场中不移动。pH>等电点，蛋白质粒子带负电荷，向正极移动；pH<等电点，蛋白质粒子带正电荷，向负极移动。

蛋白质在等电点时，因没有同性电荷排斥，故最不稳定，溶解度最小，易聚集成较大的颗粒，易沉淀析出（分离提纯蛋白质的方法）。

电泳：带电质点在电场中向电荷相反的电极泳动的现象。实验室、生产、临床诊断等常用电泳分离蛋白质和鉴定蛋白质纯度。

### 三、胶体性质

#### 1. 胶体性质——亲水胶体

胶体形成条件：粒子大小在1~100nm之间；带相同电荷；与溶剂之间形成溶剂化层。蛋白质：2~20nm。

#### 2. 渗析

渗析或透析：蛋白质不能透过半透膜，可将其与一些小分子物质分开。

超滤：利用外加压力或离心力使水和其他小分子通过半透膜，而蛋白质留在膜上。

### 四、沉淀作用

#### 1. 蛋白质溶液的稳定因素：

水化层：蛋白质分子表面的亲水基团(-COOH、-OH、-SH、-CONH<sub>2</sub> 等)+水；

带电层：表面可解离基团在一定pH环境下解离产生，同性电荷相互排斥。

蛋白质的沉淀作用：条件改变时，蛋白质溶液稳定性被破坏，蛋白质分子相互聚集而从溶液中析出现象。

原因：破坏水化层和带电层。

#### 2. 沉淀方法：

##### (1) 盐析

高浓度中性盐、有机溶剂、重金属盐、生物碱试剂等都可引起蛋白质沉淀。加入高浓度的中性盐（如[NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、NaCl等），可有效破坏蛋白质颗粒的水化层，同时又中和了蛋白质的电荷，使蛋白质产生沉淀。这种加盐使蛋白质沉淀析出现象称为盐析(salting out)。当除去盐后，可再溶解。盐析法是最常用的分离蛋白质的方法。

(2) 有机溶剂沉淀法：可与水混合的有机溶剂，如酒精、甲醇、丙酮等，对水的亲和力很大，能破坏蛋白质颗粒的水化膜，使蛋白质颗粒容易凝集而沉淀。调节蛋白质溶液至等电点时，加入有机溶剂可加速蛋白质沉淀。常温下有机溶剂沉淀蛋白质往往引起变性。在低温条件下，则变性进行较缓慢，可用于分离制备蛋白质。

##### (3) 重金属盐沉淀法：

当溶液pH值高于等电点时，蛋白质颗粒带负电荷，它易与重金属离子（Hg<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>）结合成不溶性盐而沉淀。重金属沉淀的蛋白质常是变性的，误食重金属盐后可大量饮用牛奶或豆浆等蛋白质，然后用催吐剂将结合的重金属盐呕吐出来解毒。若在低温条件下，并控制重金属离子浓度，也可用于分离制备不变性的蛋白质。

##### (4) 生物碱试剂和某些酸类沉淀法：

pH小于等电点时蛋白质带正电荷，易与带负电（酸根阴离子）的生物碱试剂(如

苦味酸、钨酸、鞣酸)以及某些酸(如三氯醋酸、过氯酸、硝酸)生成不溶性盐而沉淀。血液化学分析时常利用此原理除去血液中的蛋白质，此类沉淀反应也可用于检验尿中蛋白质。

## 五、蛋白质的变性作用

蛋白质因受理化因素影响，使其维系空间结构的次级键受到破坏，使蛋白质的理化性质和生物活性改变或丧失，称为变性作用(denaturation)。

引起蛋白质发生变性的因素：

化学因素：强酸、强碱、尿素、胍、去污剂、重金属盐、十二烷基磺酸钠(SDS)、苦味酸、乙醇等。

物理因素：加热(70℃~100℃)、加压、脱水、剧烈振荡或搅拌、紫外线、X-射线照射、超声波等。

维持蛋白质空间结构的次级键被破坏，一级结构的共价键(肽键)没有被破坏。分为可逆变性和不可逆变性。

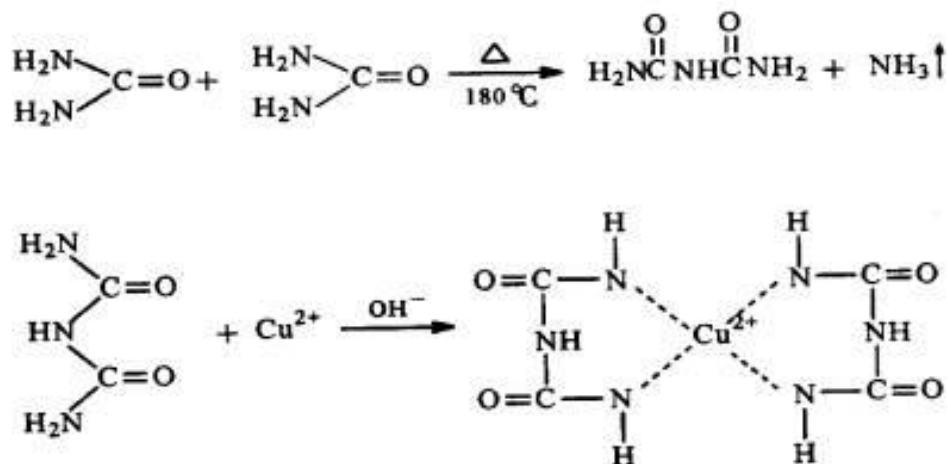
变性后的特点：① 丧失生物活性；② 溶解度降低；③ 易被水解(对水解酶的抵抗力减弱)。

应用：变性因素常用于消毒及灭菌；保存蛋白质制剂时应注意防止蛋白质变性。

## 六、颜色反应

### ①双缩脲反应(Biuret Reaction)

蛋白质在碱性溶液中与硫酸铜作用呈现紫红色(540nm)，称双缩脲反应。凡分子中含有两个或两个以上肽键的化合物都呈此反应，所有蛋白质都能与双缩脲试剂发生反应。



### ②茚三酮反应(Ninhydrin Reaction)

$\alpha$ -氨基酸和所有蛋白质均可与水合茚三酮作用产生蓝色反应。

### ③米隆反应(Millon Reaction)

蛋白质溶液中加入米隆试剂(亚硝酸汞、硝酸汞及硝酸的混合液)，蛋白质首先

沉淀，加热则变为红色沉淀，此为酪氨酸的酚基所特有的反应，因此含有酪氨酸的蛋白质均呈米隆反应。

此外，蛋白质溶液还可与酚试剂、乙醛酸试剂、浓硝酸等发生颜色反应。

## 第六节 蛋白质及氨基酸的分离纯化与测定

### 一、分离纯化的一般原则及基本步骤

#### 1. 一般原则——根据性质设计分离纯化方法

①所用原料来源方便，成本低；目的蛋白质含量、相对活性高；可溶性和稳定性好；基因分子背景如何等要明确；

②破碎细胞条件要温和；尽量去除杂质、脂类、核酸及毒素；

③大部分操作在溶液中进行；

④建立灵敏、特异、精确的检测方法。

#### 2. 基本步骤——分离纯化的战略

①取材：含量丰富，便于提取；

②组织细胞破碎：

机械法：组织分散器、匀浆器等；

物理法：超声波、渗透压、压榨等；

化学法：酸、碱等；

酶法：溶菌酶、纤维素酶等。

③提取：选择适当溶剂；

水溶性蛋白：应用中性缓冲溶液抽提；

酸性蛋白：稀碱性溶液抽提；

脂溶性蛋白：有机溶剂抽提。

④分离纯化\*\*；

⑤结晶；

⑥鉴定、分析。

### 二、分离纯化的基本方法

#### 1. 盐析与等电点沉淀——根据溶解度分离

(1) 盐析：

高浓度中性盐溶液，水化层被破坏和表面电荷被中和，发生沉淀，常用硫酸铵。

(2) 等电点沉淀：

净电荷为零，分子间静电排斥力最小，容易聚集沉淀，此时溶解度最小。沉淀的蛋白质保持天然构象，能再溶解。

#### 2. 离子交换色谱——根据电荷性质不同

一定pH下蛋白质所带电荷不同进行分离；利用离子交换剂，靠相反电荷间的静电吸引，根据带电荷多少进行分离，结合力小的先被洗脱。

常用离子交换剂：**CM-纤维素（弱酸型）**：阳离子交换剂；**DEAE-纤维素（弱碱性）**：阴离子交换剂。

### 3. 凝胶过滤——根据相对分子质量不同

介质：交联葡萄糖（葡聚糖）、琼脂糖或聚丙烯酰胺形成的凝胶颗粒。凝胶颗粒具有多孔的网状结构。这些网孔只允许较小的分子进入颗粒内，而大于网孔的分子则被排阻。当用洗脱液洗脱时，被排阻的相对分子质量大的分子先被洗脱下来，相对分子质量小的分子后下来。

例题1：指出下列蛋白质通过凝胶过滤层析柱时的洗脱顺序，蛋白质分布范围从5000到600000。

肌红蛋白：16900；

过氧化氢酶：247500；

细胞色素C：13370；

肌球蛋白：524800；

胰凝乳蛋白酶原：23240；

血清清蛋白：68500。

### 4. 亲和色谱——根据特异性亲和力不同分离

根据不同蛋白质对特定配体的特异性而非共价结合的能力不同进行分离的。

基本步骤：选择配体；配体与载体（琼脂糖类）共价连接；装柱后蛋白质被特异性吸附，其它物质流出；洗脱。

## 三、氨基酸的分离

### 1. 滤纸色谱——根据溶解度不同进行的分配色谱

当一种溶质在两种一定的不互溶或几乎不互溶的溶剂中分配时，在一定温度下达到平衡后，在两相中的浓度比值与在这两种溶剂中的溶解度比值相等，称为分配定律。

分配系数=溶质在溶剂A中浓度/溶质在溶剂B中浓度

以滤纸为支持物，滤纸纤维吸附水为固定相，有机溶剂为移动相，分离氨基酸。

$R_f$ =原点 to 色谱点中心的距离/原点 to 溶剂前沿的距离

$R_f$ 越大，说明该物质前进越快，在有机相中的溶解度越大。

### 2. 离子交换色谱——根据电荷性质不同

一定pH下氨基酸所带电荷不同进行分离；利用离子交换剂（ $\text{SO}_3^{2-}\text{H}^+$ 或 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$ ），靠相反电荷间的静电吸引，根据带电荷多少进行分离。脱液中氨基酸的浓度由茚三酮反应的颜色深浅来检测。

例题2：

将含有天冬氨酸、甘氨酸、苏氨酸、亮氨酸和赖氨酸的柠檬酸缓冲液（pH=3），加到预先同样缓冲液平衡过的强阳离子交换树脂中，随后用此缓冲液洗脱此柱，并分别收集洗出液，这5种氨基酸将按什么次序洗脱下来？



### 3. 薄层色谱——根据吸附性质不同

将固体吸附剂（纤维素粉末、硅胶粉等）涂布在玻璃板等支持物上，根据吸附剂对样品中各组分的吸附力不同来进行。

### 4. 纸电泳与薄膜电泳——电场下分离

外电场作用下，带电颗粒将向着与其电性相反的电极移动。

$$u=QE/6\pi r\eta$$

#### 例题3:

下列氨基酸的混合物在pH3.9时进行纸电泳，指出哪一些氨基酸朝正极移动，哪一些朝负极移动。

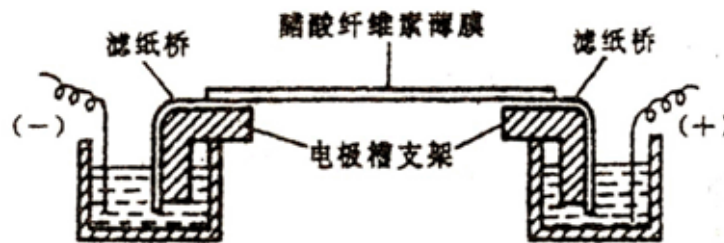
Ala, Ser, Glu, Leu, Arg, Asp, His

#### (1) 纸电泳

常用双向法进行，第一向为电泳，第二向为色谱。

#### (2) 醋酸纤维素薄膜电泳

分离氨基酸速度快，可分别洗脱进行检测。大多采用水平式电泳槽。



醋酸纤维素薄膜电泳装置示意图

#### (3) 薄层电泳——用于氨基酸制备

常用支持介质：硅胶、硅藻土、氧化铝、葡聚糖凝胶等。

## 四、蛋白质及氨基酸的分析测定

### 1. 蛋白质含量测定:

凯氏定氮法：蛋白质的氮经消化转变为无机氮，再通过与碱蒸馏释放出氨，以盐酸滴定氨。

双缩脲法（540nm）：灵敏度较差，所需样品量大

考马斯亮蓝结合法（595nm）

福林-酚试剂法（660nm）：灵敏

紫外吸收法（280nm）

### 2. 电泳技术——凝胶电泳常用于纯度鉴定及相对分子质量测定

实验室常用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）。

纯度鉴定：样品中加入去污剂十二烷基硫酸钠（SDS），在碱性和酸性系统分别进行盘状电泳。

相对分子质量的测定：应用已知分子质量的蛋白作为标准，lgMr与相对迁移率

m呈线性关系。

3. 氨基酸的显色测定——色谱、电泳检测的手段  
常用茚三酮显色。

#### 本章小结

1. 氨基酸的种类、两性解离与等电点；
2. 蛋白质一级和二级结构；
3. 蛋白质的性质，包括两性解离、沉淀作用（盐析）、变性、双缩脲反应。
4. 蛋白质和氨基酸的分离纯化方法，包括电泳、凝胶过滤、氨基酸的纸色谱、醋酸纤维素薄膜电泳。

#### 作业题

1. 构成蛋白质的20种氨基酸中，哪些没有旋光性，哪些带正电荷、哪些带负电荷、哪些有芳香环，哪些具有巯基，并写出上述氨基酸的三字母缩写。
2. 说明蛋白质二级结构 $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -折叠的结构要点。
3. 书中第5题。
4. 名词解释：等电点，盐析，蛋白质的变性作用、电泳。

#### 练习题：

1. 蛋白质变性在于  
A. 一级结构被破坏 B. 亚基的解聚  
C. 空间构象的破坏 D. 辅基的脱落
2. 调节某一蛋白质溶液的pH至等电点时  
A. 蛋白质表面的净电荷增加  
B. 蛋白质表面的净电荷减少  
C. 蛋白质表面的净电荷不变  
D. 可使蛋白质稳定性降低，易于沉淀析出
3. 典型的 $\alpha$ -螺旋中每圈含氨基酸残基数为：  
A、4.6个 B、3.6个 C、2.6个 D、5.6个 E、10个
4. 胰蛋白酶的作用点是  
A、精氨酰—X B、苯丙氨酰—X C、天冬氨酰—X D、X-精氨酸
5. 茚三酮与脯氨酸反应时，在滤纸层析谱上呈现（ ）色斑点  
A、蓝紫 B、红 C、黄 D、绿
6. 用凝胶过滤柱层析分离蛋白质时，一般讲都是  
A、分子体积最大的蛋白质首先洗脱 B、分子体积最小的蛋白首先洗脱  
C、没有吸附的蛋白质首先洗脱 D、不带电荷地先洗脱

填空题:

1. 丝-酪-丝-甲硫-谷-丙-苯丙-精-色-甘-谷酰胺用胰凝乳蛋白酶彻底水解后可得\_\_\_\_\_个肽段。
2. 肽经溴化氰(CNBr)处理后, 在\_\_\_\_\_残基右侧的肽键被裂解。
3. 谷胱甘肽由三种氨基酸通过肽键连接而成, 这三种氨基酸分别是\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_。
4. 蛋白质的最大吸收波长是\_\_\_\_\_。
5. 维持蛋白质构象的次级键主要有\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_。
6. 蛋白质二级结构的四种基本类型是\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_、\_\_\_\_\_和\_\_\_\_\_。
7. 蛋白质是两性电介质, 当溶液的pH在其等电点以上时蛋白质分子带\_\_电荷, 而pH在等电点以下时, 带\_\_电荷。

## 第五章 核酸化学(4学时)

本章要求:

1. 掌握核酸的化学本质及DNA和RNA在组分、结构和功能上的差异。
2. 理解嘌呤、嘧啶、核苷、核苷酸和核酸在分子结构上的关系。
3. 掌握核酸的结构, 了解核酸的性质。
4. 认识核酸在生物科学上的重要性及其实践意义。

### 第一节 核酸的概述

#### 一、核酸和脱氧核酸

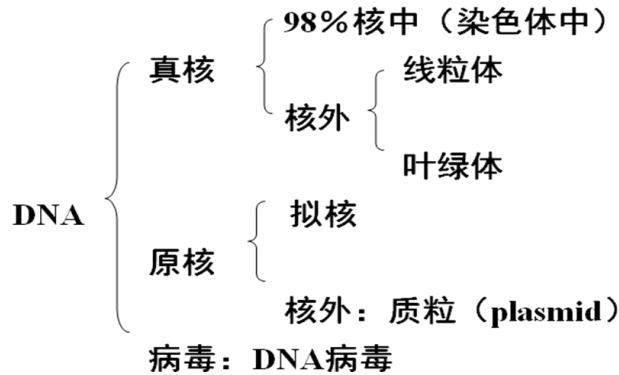
1869年 Miescher 从细胞核中分离出核素 (nuclein)。

1944年 O.T. Avery 等人通过细菌转化实验, 证明 DNA 就是遗传物质。

核酸是遗传变异的物质基础, 是遗传信息的载体。

核酸 { 脱氧核糖核酸  
(deoxyribonucleic acid, DNA)  
核糖核酸  
(ribonucleic acid, RNA)

除少数病毒 (RNA病毒) 以RNA作为遗传物质外, 多数有机体的遗传物质是DNA。



DNA是遗传信息的真正携带者，兼具存储和传递遗传信息的双重功能，主要存在于细胞核内。

RNA的主要作用是将DNA的遗传信息翻译并表达成具有各种功能的蛋白质，主要分布于细胞质中。

### 1. 脱氧核糖核酸（DNA）：

DNA分子含有生物物种的所有遗传信息，分子量一般都很大。DNA为双链分子，其中大多数是链状结构大分子，也有少部分呈环状结构。

### 2. 核糖核酸（RNA）：

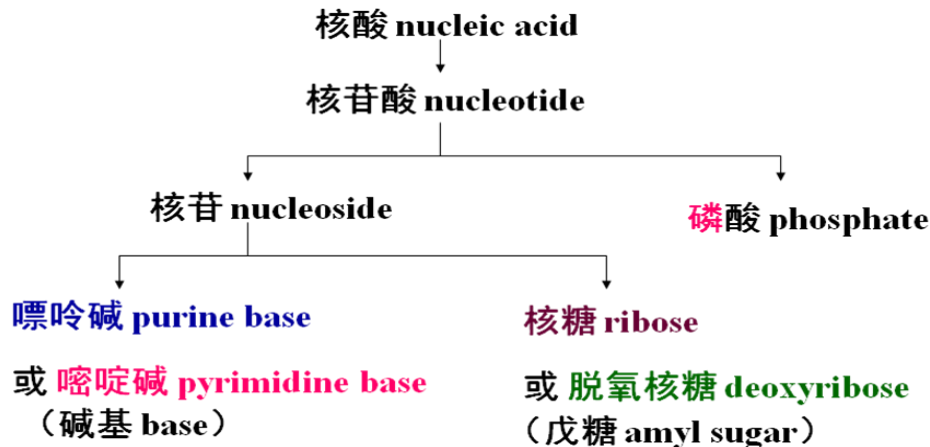
相对分子质量比DNA小得多，为单链分子。包括三种：

mRNA（信使RNA）：占5%，将DNA的遗传信息传递到蛋白质合成基地——核糖核蛋白体。

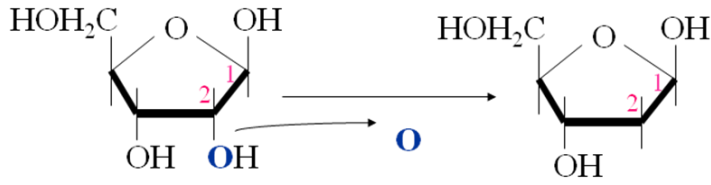
tRNA（转运RNA）：占15%，翻译氨基酸信息，并将相应氨基酸转运到核糖核蛋白体。

rRNA（核糖体RNA）：占80%，是核糖核蛋白体的主要组成部分，功能与蛋白质生物合成有关。

### 3. 核酸的化学组成



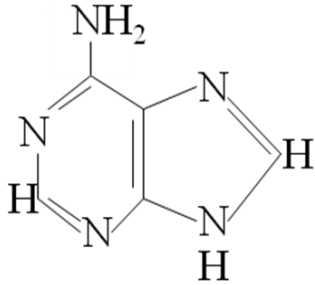
(1)核酸中的糖——核糖和脱氧核糖



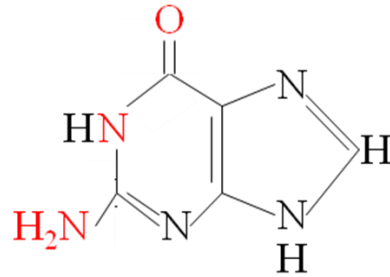
**β-D-核糖**

**β-D-2-脱氧核糖**

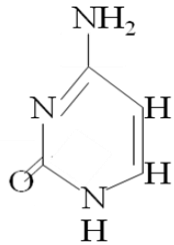
(2)含氮碱基——嘌呤碱和嘧啶碱



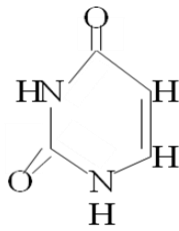
**腺嘌呤 adenine (Ade)**



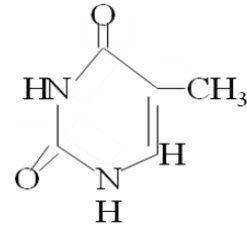
**鸟嘌呤 guanine (Gua)**



**胞嘧啶 Cytosine (Cyt)**

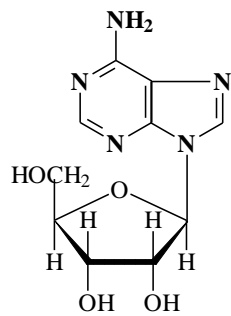


**尿嘧啶 Uracil (Ura)**

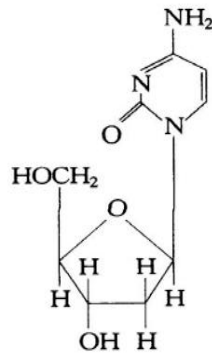


**胸腺嘧啶 Thymine (Thy)**

(3)核苷:

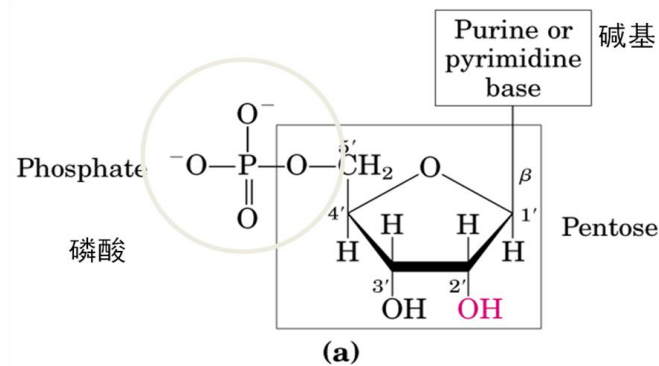


**腺嘌呤核苷**



**胞嘧啶脱氧核苷(脱氧胞苷 dC)**

#### (4)核苷酸



#### (5)核酸组分的表示方式

通常用3个字母表示碱基，用1个字母表示核苷。

如Ade——腺嘌呤；A——腺苷；

腺苷酸——pA（磷酸5'位）或Ap（磷酸3'位）；

B——碱基；N——核苷。

#### (6)核苷酸的衍生物

各种核苷三磷酸和脱氧核苷三磷酸是体内合成RNA和DNA合成的直接原料。

在体内能量代谢中的作用：ATP——能量“货币”；UTP——参加糖的互相转化与合成；CTP——参加磷脂的合成；GTP——参加蛋白质和嘌呤的合成；第二信使——cAMP、cGMP。

**ATP：**含有两个高能磷酸键，水解时释放大量自由能，可以作为推动体内各种需能反应的能量来源。ATP是一种很好的磷酸化剂，用于活化分子。

**氧化磷酸化：**由储能物质氧化分解提供化学能合成ATP的过程。

**光合磷酸化：**由太阳能提供能量合成ATP的过程。

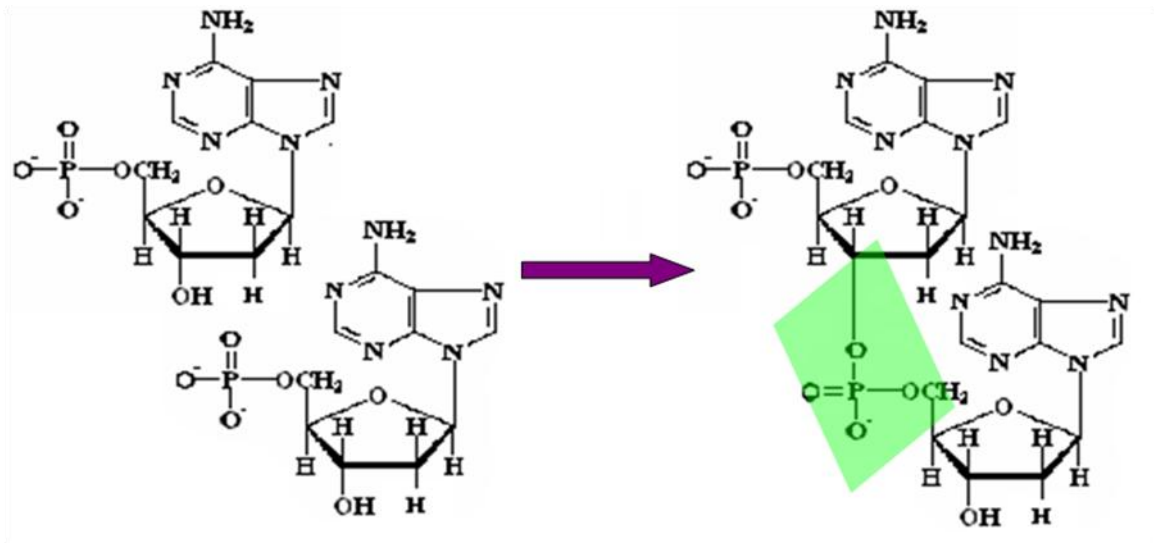
**GTP：**鸟苷三磷酸，作为蛋白质合成中磷酸基供体。可与ATP相互转换。

**cAMP和cGMP：**环状核苷酸（3',5'），作为细胞间信息传递的信使。

### 第二节 核酸的结构

一、核酸的一级结构：核苷酸的排列顺序。

**磷酸二酯键：**一个核苷酸的C3'-OH与另一分子核苷酸的5'-磷酸基形成3',5'-磷酸二酯键。



## 二、核酸的高级结构

### 1. DNA的结构

#### (1) DNA的一级结构

脱氧核苷酸的序列常被认为是碱基序列。通常碱基序列由DNA链的5'→3'方向书写。DNA的碱基序列本身就是遗传信息存储的分子形式。

#### (2) DNA的二级结构——双螺旋结构模型

1953年，Watson 和Crick 提出。双螺旋结构模型要点如下：

##### ①主链：

两条核苷酸链反向平行，沿同一中心轴平行盘绕形成双螺旋结构；碱基位于双螺旋内侧，磷酸和脱氧核糖基位于外侧。碱基平面与纵轴垂直，糖环平面平行于纵轴；两条链均为右手螺旋，其磷酸二酯键的方向相反，即一条为5'→3'，另一条为3'→5'。

##### ②碱基配对：

A 与T（2个氢键）、G与C（3个氢键）严格配对。

③碱基参数：每圈螺旋含有10个核苷酸，螺距3.4nm，双螺旋平均直径2nm。

④螺旋表面：碱基对占据的空间不对称，双螺旋表面形成两条螺旋形凹沟——大沟和小沟。

#### (3) 双螺旋结构的稳定因素

①氢键：比较重要；

②碱基堆积力（base stacking force，是稳定DNA的主要因素；（疏水作用）

③离子键：减少静电排斥。

## 三、RNA 的结构与功能

结构特点：

1. 碱基组成：A、G、C、U（A=U/G≡C），稀有碱基较多，稳定性较差，易

- 水解；配对不严格，除 G-C 还可以 G-U；
2. 多为单链结构，少数局部形成螺旋，不能形成双螺旋的部分则形成突环，称为“发夹型”结构；
  3. 分子较小。

#### tRNA 的二级结构——三叶草结构模型

主要特征：

- (1) 四臂四环；
- (2) 氨基酸臂 3'端有 CCA<sub>OH</sub> 的共有结构；
- (3) D 环上有二氢尿嘧啶 (D)；
- (4) 反密码环上的反密码子与 mRNA 相互作用；
- (5) 可变环上的核苷酸数目可以变动；
- (6) T $\psi$ C 环含有 T 和  $\psi$ (假尿嘧啶)。

### 第三节 核酸的性质及纯度测定

#### 一、核酸的溶解性

核苷酸、核苷、碱基的纯品都是白色粉末或结晶；DNA为疏松的石棉样的纤维状结晶。

1. 溶解性：DNA和RNA一般都微溶于水，其钠盐在水中的溶解度较大。不溶于乙醇、乙醚等有机溶剂。
2. 0.14摩尔法——分离DNA蛋白和RNA蛋白方法

DNA蛋白在0.14mol/L NaCl溶液中的溶解度最低；RNA蛋白在0.14mol/L NaCl溶液中的溶解度较大；可用于提取DNA蛋白和RNA蛋白。

#### 二、核酸的解离

##### 1. 多价解离：

磷酸基在生理条件下可解离形成多价阴离子，即多元酸；碱基具有碱性，故核酸为两性电解质，通常表现为酸性。由于磷酸酸性>碱基的碱性。

##### 2. 带电性：

带电性使核酸、核苷酸可用阳离子交换树脂分离；DNA的等电点为4~4.5，RNA的等电点为2~2.5。由于RNA分子中2'-OH通过氢键促进了磷酸基上质子的解离。

三、紫外吸收：核酸碱基具有共轭双键，有紫外吸收性质，吸收峰在240~290nm，测定时选用260nm。

#### 四、变性与复性

DNA的变性：受到某些理化因素的影响，分子中的氢键、碱基堆积力等被破坏，双螺旋结构解体，分子由双链变为单链的过程。一级结构不变。

引起变性的外部因素：加热、极端的pH条件、有机溶剂、尿素、甲酰胺等。

DNA变性后的表现：分子由具有一定刚性变为无规则线团，DNA溶液的粘度降



低，沉降速度加快；内部碱基全部暴露出来， $A_{260\text{nm}}$ 增大，表现出增色效应。

DNA变性是个突变过程，类似结晶的熔解。将紫外吸收的增加量达到最大增量一半时的温度称熔解温度(melting temperature,  $T_m$ )。近似生理条件下， $T_m$ 一般在85~95℃。

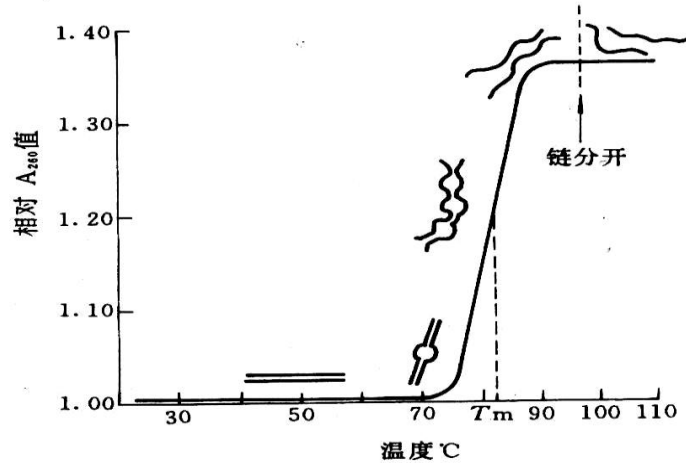


图 5-23 DNA 的热变性曲线

核酸的复性（退火）：变性核酸的互补链在适当条件下重新缔合成双螺旋的过程。

核酸的杂交：在退火条件下，不同来源的DNA互补区形成氢键，或DNA单链和RNA链的互补区形成DNA-RNA杂合双链的过程。

## 五、核酸的含量与纯度测定

### 1. 定磷法、定糖法——测定核酸含量

(1) 定磷法：纯核酸含磷元素量为9.5%左右。

$$\text{核酸含量} = \text{核酸磷含量} \times 10.5$$

测定范围：10~100 $\mu\text{g}$  核酸。

(2) 定糖法：

RNA 或核苷酸 $\rightarrow$ 核糖 $\rightarrow$ 脱水形成糠醛 $\rightarrow$ 与3,5-二羟甲苯(苔黑酚)反应生成绿色物质(670~680nm)。

DNA 水解后，脱氧核糖在浓硫酸或冰醋酸存在下与二苯胺反应生成蓝色物质(595~620nm)。

### 2. 凝胶电泳——DNA 纯度鉴定

(1) 紫外吸收法测定核酸纯度：

纯DNA的 $A_{260}/A_{280}$ 为1.8；纯RNA的 $A_{260}/A_{280}$ 为2.0。纯化DNA时以1.8~2.0为纯度标准。

(2) 凝胶电泳法鉴定DNA纯度：常用琼脂糖凝胶电泳。

## 第四节 核酸的生物合成与生物功能

## 一、核酸与遗传信息的传递

### 1. DNA 是基本遗传物质

有了一定结构的 DNA，才能产生一定结构的蛋白质，根据 DNA 的特定遗传密码产生的蛋白质就代表特定生物的遗传性。

在遗传过程中 DNA 的具体作用：

- (1) 在细胞分裂时按照自己的结构精确复制传给后代
- (2) 作为模板将所贮遗传信息传给 mRNA。

### 2. 分子生物学的中心法则

复制：亲代DNA或RNA在一系列酶的作用下，生成与亲代相同的子代DNA或RNA的过程。

转录：以DNA为模板，按照碱基配对原则将其所含的遗传信息传给RNA，形成一条与DNA链互补的RNA的过程。

翻译：亦叫转译，以mRNA为模板，将mRNA的密码解读成蛋白质的氨基酸顺序的过程。

逆转录：以RNA为模板，在逆转录酶的作用下，生成DNA的过程。

## 二、核酸结构的变化与生物遗传变异

一切生物的变异和进化都可以说是由于 DNA 的结构改变而引起蛋白质改变的结果。类型：碱基顺序颠倒，如 TA 被颠倒成 AT；某个碱基被调换，如 GC 换成 GT；少了或多了一对或几对碱基。

引起 DNA 的结构改变的主要因素：

DNA 分子中碱基的互变异构：酮式-烯醇式或氨基式-亚氨基式；

物理因素：紫外线、高能射线和电离辐射等。

紫外线大剂量照射引起嘧啶碱基共价聚合，形成二聚体。

化学因素：烷基化试剂，亚硝酸盐（A→次黄嘌呤；C→U）及碱基类似物等。

癌细胞：变异性细胞，无控制恶性增殖。应用高能  $\gamma$ -射线、5-氟尿嘧啶、具有生物还原烷基化活性的阿霉素等治疗。

## 四、核酸的催化性质

1981 年，Cech 和 Altman 发现 RNA 的催化活性，提出核酶（ribozyme）。

核酸酶的组成和结构：核酸酶是具有特殊结构的 RNA。最小的核酸酶只含有 3 个核苷酸单元。

催化作用：作用底物基本上都是 RNA 分子。包括水解反应（RNA 限制性内切酶活性）、连接反应（聚合酶活性）和转核苷酰反应等。

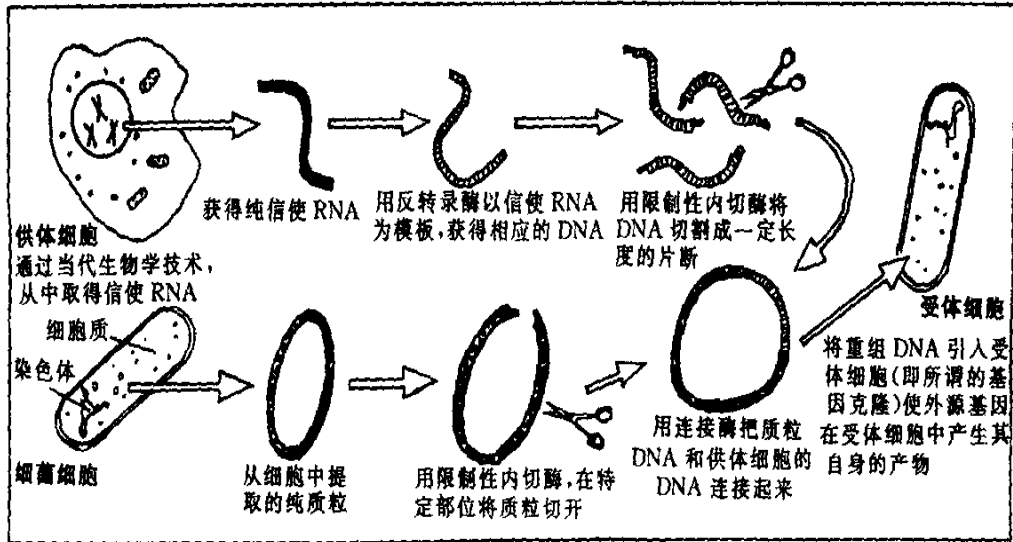
## 第五节 核酸化学中的几种重要技术

### 一、DNA重组技术和基因工程

在体外，将各种来源的DNA片段与载体DNA结合成一个重组载体；重组载体可

转化或转染宿主细胞；在宿主细胞内表达，产生特定的基因产物。

DNA片段：同源的或异源的、原核的或真核的、天然的或人工合成的  
载体DNA：病毒、细菌质粒或噬菌体



## 二、PCR技术

应用待扩增的目的DNA片段两侧互补的引物，在DNA聚合酶作用下，引发目的DNA片段反复复制，从而使目的DNA片段拷贝迅速增加的过程。

## 三、基因定点突变技术

应用人工的方法，合成在某一点或某几点上碱基顺序改变的突变DNA，然后再通过突变DNA的转录、翻译和表达，获得突变蛋白质的技术。

知道蛋白质的氨基酸顺序；相应基因的碱基顺序；分离纯化含有表达基因的质粒。关键是合成一种特殊的引物DNA。还可通过删除某些碱基、将基因进行剪接、应用DNA固相合成法等实现。

## 四、定向分子进化

主要是通过DNA或RNA的突变、筛选和扩增的不断循环，从而获得具有优良性能的新分子品种。

先筛选出一种RNA分子，它具有我们希望的性质，再用一种特殊的RNA复制酶——Q $\beta$ RNA复制酶，在适当的条件下复制扩增。

Q $\beta$ RNA复制酶在催化复制过程中，会出现许多错误，可以得到大量不同的突变RNA分子，从这些突变分子中筛选出具有更好性能的突变分子，经过扩增、再筛选、再扩增，最后获得目标RNA新品种。

## 本章小结

1. 核酸的化学本质及DNA和RNA在组分、结构和功能上的差异。
2. 嘌呤、嘧啶、核苷、核苷酸和核酸在分子结构上的关系。

- 核酸（主要是DNA）的结构。
- 蛋白质生物合成的过程。

#### 练习题

- 核酸中核苷酸之间的连接方式是：（ ）  
A、2', 5'-磷酸二酯键      B、氢键  
C、3', 5'-磷酸二酯键      D、糖苷键
- 下列关于DNA分子中的碱基组成的定量关系哪个是不正确的？（ ）  
A、C+A=G+T      B、C=G      C、A=T      D、C+G=A+T
- 下面关于Watson-Crick DNA双螺旋结构模型的叙述中哪一项是正确的？（ ）  
A、两条单链的走向是反平行的  
B、碱基A和G配对      C、碱基之间共价结合  
D、磷酸戊糖主链位于双螺旋内侧
- 具5'-CpGpGpTpAp-3'顺序的单链DNA能与下列哪种RNA杂交？（ ）  
A、5'-GpCpCpApTp-3'      B、5'-GpCpCpApUp-3'  
C、5'-UpApCpCpGp-3'      D、5'-TpApCpCpGp-3'
- 维系DNA双螺旋稳定的最主要的力是（ ）  
A. 氢键      B. 离子键      C. 碱基堆积力      D.范德华力
- 核酸变性后，可发生哪种效应？（ ）  
A、减色效应      B、增色效应      C、失去对紫外线的吸收能力  
D、最大吸收峰波长发生转移
- 某双链DNA纯样品含15%的A，该中G的含量为  
A、35%      B、15%      C、30%      D、20%

#### 练习题

- 遗传密码的简并性是指  
A.大多数氨基酸有一组以上的密码子  
B.密码子中有许多稀有碱基  
C.一些密码子适用于一种以上的氨基酸  
D.一些三联体密码子可缺少一个嘌呤和嘧啶碱基  
E.以上都不是
- 关于密码子的叙述,哪项是不正确的  
A.共有64个密码子  
B.有起始密码子和终止密码子  
C.一种氨基酸可以有一种或多种密码子  
D.密码子的排列是不间隔的  
E.密码子的阅读方向是3'→5'
- 多数核苷酸对紫外光吸收峰位于

A. 230nm

B. 240nm

C. 260nm

D. 280nm

E. 360nm

### 作业题

1. DNA双螺旋结构基本要点是什么？
2. 名词解释：DNA变性、DNA复性、遗传密码、转录。
3. 十二章习题（248页）第5题。

## 第六章 酶化学（6学时）

### 本章要求：

1. 熟悉酶的概念、分类和组成特点，了解酶的系统编号；
2. 掌握酶促反应中底物浓度对酶促反应的影响，即米氏方程的表达、推导和米氏常数的求取方法以及酶抑制剂的作用方式和对米氏方程的影响情况；
3. 掌握酶的活性中心概念和组成基团；
4. 理解酶活力的定义和相关计算方法；
5. 了解酶的应用。

### 第一节 概述

一、酶的概念：酶是生物细胞产生的、具有催化能力的生物催化剂。

#### 1. 酶是生物催化剂

酶和生命活动密切相关：

- ①几乎所有生命活动或过程都有酶参加，包括代谢、生理机制、信号转化与传递等过程；
- ②酶的组成和分布是生物进化与组织功能分化的基础；
- ③生物具有从酶的合成到酶的结构和活性水平的调节机制。

以举例的方式对酶与生命活动的关系进行说明，如糖代谢、乙酰胆碱酯酶的作用、白化病的形成原因、肝脏中进行的代谢过程、能量代谢酶类的分布等。

#### 2. 酶的化学本质——大多数酶是蛋白质

1926年J.B.Sumner首次从刀豆制备出脲酶结晶，证明其为蛋白质，并提出酶的本质就是蛋白质的观点。酶具有蛋白质的特性：相对分子质量大；由氨基酸组成；两性性质；可变性失活与水解。

1982年T.Cech发现了第1个有催化活性的天然RNA——ribozyme（核酶），以后Altman和Pace等又陆续发现了真正的RNA催化剂。核酶的发现表明酶不一定是蛋白质。

#### 二、酶的催化特性：

酶具有一般催化剂的特征：1) 只能进行热力学上允许进行的反应；2) 可以缩短化学反应到达平衡的时间，而不改变反应的平衡点；3) 通过降低活化能加快化学

反应速度。

酶的催化特性：

1. 高效性：催化效率比化学催化剂高 $10^6\sim 10^{13}$ 倍。

2. 专一性：酶对底物具有严格的选择性。

例子：过氧化氢分解反应，分别由铁粉和过氧化氢酶催化，对比二者的反应速度，说明酶催化作用的高效性。

反应专一性：只能选择性地催化一种或一类相同类型的化学反应，如蛋白水解酶；

底物专一性：只能作用某一种或某一类结构、性质相似的物质。

结构专一性：包括绝对专一性和相对专一性

手性专一性：L-氨基酸，D-葡萄糖

几何专一性：催化某种几何异构体

对每种反应专一性的特征举出对应的实例加以讲解说明，包括脂酶、 $\alpha$ -葡萄糖糖苷酶、苹果酸酶、脲酶等。

3. 反应条件温和：pH=5~8，20~40℃。

三、酶的组成及分类

1. 酶的组成——根据组成为单纯酶和结合酶

单纯酶：只有蛋白质成分。

结合酶：蛋白质+非蛋白成分=全酶，蛋白质部分称为酶蛋白。

非蛋白成分称为辅酶（与酶蛋白结合疏松）或辅基（与酶蛋白结合紧密），可通过透析鉴别两者。

酶的催化专一性主要决定于酶蛋白部分，辅因子通常是作为电子、原子、某些化学基团的载体及搭桥作用，决定酶促反应的类型。

酶的辅因子包括：

(1) 无机金属元素：如铜、铁、锌、锰等；

(2) 小分子的有机物：如维生素、铁卟啉等。

辅因子的功能：

(1) 传递电子：如铁卟啉；

(2) 传递氢（递氢体）：如FMN/FAD、NAD/NADP；

(3) 传递酰基体：如CoA、TPP、硫辛酸；

(4) 传递一碳基团：如四氢叶酸；

(5) 传递磷酸基：如ATP，GTP；

(6) 其它作用：转氨基；传递CO<sub>2</sub>。

2. 酶的命名

1) 习惯名：规律性不强，抢先原则，比较乱，会出现一酶多名或一名多酶，优点是简单明了；

2) 系统命名：酶与名一一对应，要求标名所有底物的名称以及反应的性质，例如乳

酸脱氢酶是习惯名，其系统名为：乳酸： $\text{NAD}^+$ 氧化还原酶，优点是明确，缺点是繁琐。

### 3. 酶的分类——按反应性质分为6大类

(1) 氧化还原酶类：催化氧化还原反应的酶，以催化脱氢为主加氧为次（包括其逆反应：就是加氢脱氧）。

用方程式表示就是： $\text{A} \cdot 2\text{H} + \text{B} \longleftrightarrow \text{A} + \text{B} \cdot 2\text{H}$

这类酶通常都需要辅酶帮忙，辅酶有下列几种： $\text{NAD}$ （尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸）、 $\text{NADP}$ （尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸）、 $\text{FAD}$ （黄素腺嘌呤二核苷酸）、 $\text{FMN}$ （黄素腺嘌呤单核苷酸），这些都是维生素的衍生物。

(2) 转移酶类：催化基团转移反应的。

用方程式表示为： $\text{AX} + \text{B} \longleftrightarrow \text{A} + \text{BX}$

(3) 水解酶类：催化水解反应。

用方程式表示为： $\text{AB} + \text{HOH} \rightarrow \text{AOH} + \text{BH}$

(4) 裂合酶类：从底物中移去一个基团并形成双键的反应，

用方程式可表示为： $\text{A} \cdot \text{B} \longleftrightarrow \text{A} + \text{B}$

(5) 异构酶：催化同分异构反应。用方程式表示为： $\text{A} \longleftrightarrow \text{B}$

(6) 合成酶：催化2种物质合成一种物质，又必须由ATP水解提供能量的反应，

方程式可表示为： $\text{A} + \text{B} + \text{ATP} \rightarrow \text{A} \cdot \text{B} + \text{ADP} + \text{P}_i$

4. 酶的系统编号：为了对酶进行有效的分类和查询，国际酶学委员会对每一种酶都编有一个号，其形式是： $\text{EC} \square \cdot \square \cdot \square \cdot \square$ ，其中 $\text{EC} = \text{Enzyme Commission}$ ，第一个 $\square$ 为6大类之一，第二个 $\square$ 为该大类中的亚类，依此类推。如 $\text{EC} 1.1.1.27$ （乳酸脱氢酶）。

## 第二节 酶的结构与功能的关系

### 一、酶的一级结构与催化功能的关系

#### 1. 必需基团——酶分子中只有少数几个氨基酸侧链基团与活性直接相关

必需基团：若经化学修饰使其改变，则酶活性丧失。包括结合基团和催化基团。

主要包括：

亲核性基团： $\text{Ser}$ 的羟基， $\text{Cys}$ 的巯基和 $\text{His}$ 的咪唑基。

酸碱性基团： $\text{Asp}$ 和 $\text{Glu}$ 的羧基， $\text{Lys}$ 的氨基， $\text{Tyr}$ 的酚羟基， $\text{His}$ 的咪唑基和 $\text{Cys}$ 的巯基等。

#### 2. 酶原激活

没有活性的酶的前体称为酶原。酶原转变成有活性的酶的过程称为酶原的激活。实质上是酶活性部位形成和暴露的过程。

酶原的激活过程是通过去掉分子中的部分肽段，引起酶分子空间结构的变化，从而形成或暴露出活性中心，转变为具有活性的酶。

表 6-3 酶原激活

激活作用	激活剂	激活作用	激活剂
胃蛋白酶原→胃蛋白酶+42肽	H <sup>+</sup> 、胃蛋白酶	羧肽酶原 A →羧肽酶 A+几个碎片	胰蛋白酶
胰蛋白酶原→胰蛋白酶+六肽	肠激酶、胰蛋白酶	凝血酶原→凝血酶+多肽	凝血酶原、激活剂、K <sup>+</sup>
胰凝乳蛋白酶原→胰凝乳蛋白酶+2个二肽	胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶	弹性蛋白酶原→弹性蛋白酶+几个碎片	胰蛋白酶

### 3. 共价修饰——改变一定基团可使酶活性改变

常用修饰剂:

氨基: 顺丁烯二酸酐、乙酸酐、二硝基氟苯等; His咪唑基: 溴丙酮等;

Arg胍基: 丙二醛、环己二酮等; Cys巯基: 碘乙酸等;

Ser羟基: 二异丙基氟磷酸。

### 二、酶的活性与其高级结构的关系

1. 活性中心: 酶分子上必需基团比较集中并构成一定空间构象、与酶的活性直接相关的结构区域。包括结合部位和催化部位。

结合部位(Binding site): 酶分子中与底物结合的部位或区域。

催化部位(Catalytic site): 酶分子中促使底物发生化学变化的部位。

讲解: 以直观的图示形式说明结合部位和催化部位。

注意: 必需基团不仅仅处于活性中心, 在活性中心之外也有必需基团。

2. 同工酶(isoenzyme)

能催化相同的化学反应, 但在蛋白质分子的结构、理化性质和免疫性能等方面都存在明显差异的一组酶。存在器官特异性或细胞部位特异性, 例如乳酸脱氢酶。

## 第三节 酶催化反应的机制

### 一、酶促反应的本质

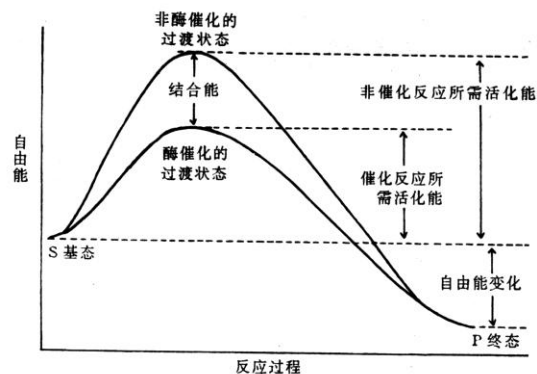


图 4-3 酶降低反应活化能示意图



促使化学反应进行的途径：

1. 用加热或光照给反应体系提供能量。
2. 使用催化剂降低反应活化能。

酶和一般催化剂的作用就是降低化学反应所需的活化能，从而使活化分子数增多，反应速度加快，不能改变反应平衡点。

中间产物学说：解释酶为什么能降低活化能，加速化学反应。

酶先与底物形成过渡态的中间产物，进而分解成为产物和酶，从而降低了反应的活化能。用方程式表示为： $E+S \rightleftharpoons [ES] \rightarrow E+P$ 。

底物具有一定的活化能，当底物和酶结合成过渡态的中间物时，要释放一部分结合能，这部分能量得释放，使得过渡态的中间物处于比E+S更低的能级，因此使整个反应的活化能降低，使反应大大加速。

## 二、酶反应机制

### 1. 酶作用专一性的机制：两种学说

(1) 锁钥学说：解释酶专一性的理论，有缺陷。

酶的活性中心的构象与底物的结构（外形）正好互补，就像锁和钥匙一样是刚性匹配的，这里把酶的活性中心比作钥匙，底物比作锁。

(2) 诱导契合理论：为了修正锁钥学说的不足而提出的一种理论。认为酶的活性中心与底物的结构不是刚性互补而是柔性互补，就好像手与手套的关系一样。酶活性中心的结构有一定的灵活性，当底物与酶分子结合时，酶蛋白的构象发生了有利于与底物结合的变化，使反应所需的催化基团和结合基团正确地排列和定向，转入有效的作用位置，这样才能使酶与底物完全吻合，结合成中间产物。

### 2. 酶作用高效性的机制——共价催化与酸碱催化

(1) 酸碱催化：酶参与的酸-碱催化反应都是广义酸-碱催化方式。

广义酸碱催化指通过质子酸提供部分质子，或是通过质子碱接受部分质子的作用，降低反应活化能。酶活性部位上的某些基团可以作为良好的质子供体或受体对底物进行酸碱催化。

影响酸碱催化反应速度的因素：

酸碱的强度：咪唑基的解离常数为6.0，在中性条件下可作为质子供体或质子受体。

功能基团供出质子或接受质子的速度：咪唑基。

(2) 共价催化：

催化剂通过与底物形成反应活性很高的共价过渡产物，使反应活化能降低，从而提高反应速度的过程，称为共价催化。

酶中参与共价催化的基团主要包括 His 的咪唑基，Cys 的巯基，Asp 的羧基，Ser 的羟基等。

此处引入练习题帮助学生理解和记忆。

## 第四节 酶促反应动力学

### 一、酶促反应的基本动力学

#### 1. 底物浓度对酶促反应速率的影响

在酶浓度、pH、温度等条件不变的情况下研究底物浓度和反应速度的关系。这里仅研究最简单的酶促反应，即单底物单产物的反应： $S \leftrightarrow P$ 。

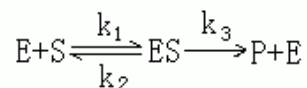
在底物浓度低时，反应速度随底物浓度的增加而急剧加快，反应速率与底物浓度成正比，表现为一级反应；当底物浓度较高时，反应速度不再与底物浓度成正比，表现为混合级反应；当底物浓度达到某一定值后，再增加底物浓度，反应速度不再增加，表现为零级反应。

#### 2. 米氏方程

为了解释上述现象，并说明酶促反应速率与底物浓度间量得关系。1913年，德国化学家Michaelis和Menten根据中间产物学说对酶促反应的动力学进行研究，推导出了表示整个反应中底物浓度和反应速率关系的著名公式——米氏方程。

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

米氏方程的推导：此处为本章的难点，需要由板书和ppt配合讲解。



在反应初始阶段时P很小，  
P+E形成ES的速度极小，  
故可以忽略不计

$$ES \text{生成速度 } v_1 = k_1[E][S]$$

$$ES \text{分解速度 } v_2 = k_2[ES] + k_3[ES]$$

当反应体系处于动态平衡时

$$k_1[E][S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$\Downarrow$$
$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$\text{令 } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$[E_0] = [E] + [ES]$$

$$K_m = \frac{([E_0] - [ES]) [S]}{[ES]}$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{[E_0] [S]}{K_m + [S]}$$

酶促反应速度  $v = k_3 [ES]$

代入  
上式  $\frac{v}{k_3} = \frac{[E_0] [S]}{K_m + [S]}$

$$v = \frac{k_3 [E_0] [S]}{K_m + [S]}$$

当[S]很高使所有  
E都被底物饱和时

$$V_{\max} = k_3 [E_0]$$

代入  
上式  $v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$

$$K_m \gg [S] \quad v = \frac{V_{\max}}{K_m} [S]$$

$$[S] \gg K_m \quad v = V_{\max}$$

米氏常数 $K_m$ 的意义:

由米氏方程可知, 当反应速度等于最大反应速度一半时, 即 $v = 1/2 V_{\max}$ ,  $K_m = [S]$ ; 表明米氏常数是反应速度为最大值的一半时的底物浓度。因此, 米氏常数的单位为mol/L。

$K_m$ 值是酶的一个重要的特征物理常数。

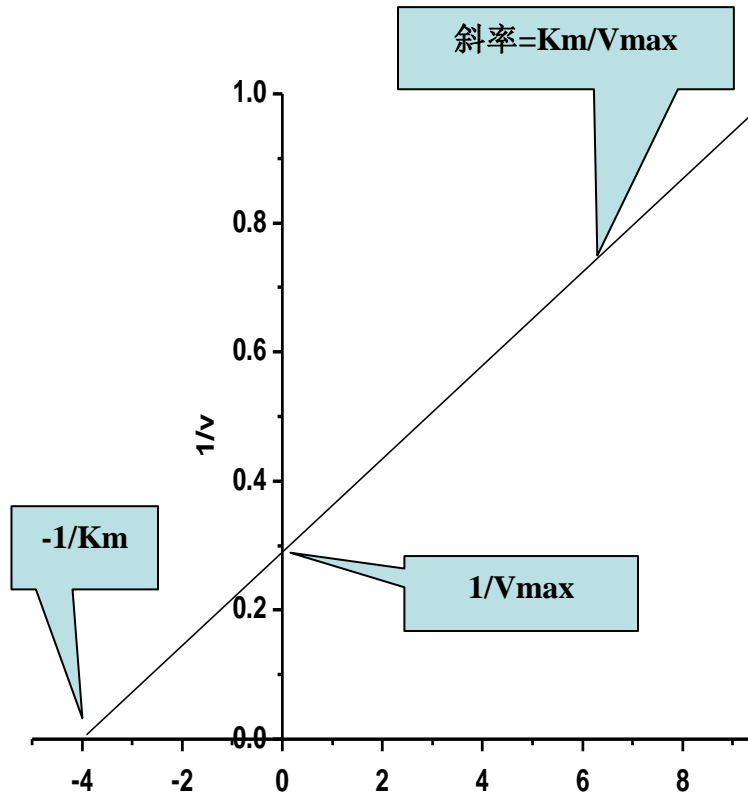
### 3. $K_m$ 值的应用和求法

$K_m$ 的求法:

(1) 双倒数作图法: 将米氏方程两边取倒数, 得到典型的直线方程,  $y = ax + b$ , 只

要测得[S]和v, 就能作出一条直线, 该直线的X轴截距为 $-1/K_m$ , Y轴截距为 $1/V_{max}$ , 这样就能通过作图求出 $K_m$ 和 $V_{max}$ 。

该法的缺点是所测各点过于集中, 不利于确定直线的位置。



(2) Eadie-Hofstee法: 将米氏方程两边乘以 $v \cdot V_{max}$ , 也是一个直线方程, 只要测得[S]和v, 就能作出一条直线, 该直线的X轴截距为 $V_{max}/K_m$ , Y轴截距为 $V_{max}$ , 这样也能通过作图求出 $K_m$ 和 $V_{max}$ 。本法的点分布较为均匀, 直线位置容易定, 但数据处理要麻烦些。

**$K_m$ 值的应用:**

(1) 可表示酶与底物之间的亲和程度:

$K_m$ 值大表示亲和程度小, 酶的催化活性低;  $K_m$ 值小表示亲和程度大, 酶的催化活性高。

(2) 可以用来判断酶的最适底物, 某些酶可以催化几种不同的生化反应, 叫多功能酶, 其中 $K_m$ 值最小的那个反应的底物就是酶的最适底物。此处举例说明同种酶在催化不同底物时, 其 $K_m$ 值有所不同。

(3) 可以通过 $K_m$ 值鉴别酶的种类:  $K_m$ 是一种酶的特征常数, 只与酶的种类有关而与酶的浓度无关, 与底物的浓度也无关, 但是它会随着反应条件(T、pH)的改变而改变。

(4) 了解酶的底物在体内具有的浓度水平: 一般来说, 作为酶的天然底物, 它在体

内的浓度水平应接近它的 $K_m$ 值；

(5) 判断抑制类型：见抑制剂对酶促反应速率的影响。

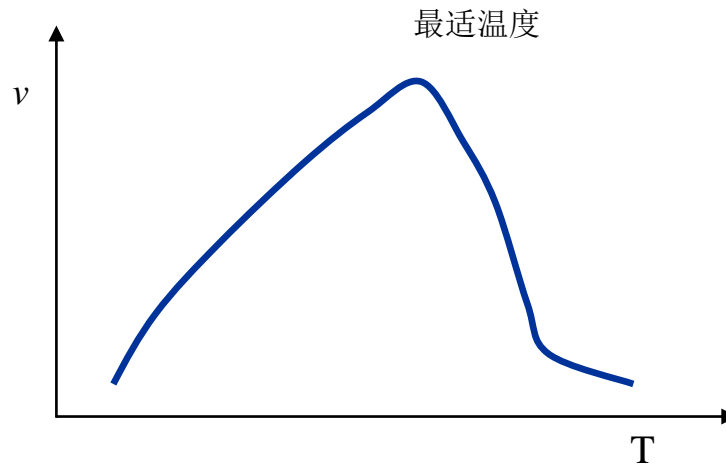
## 二、酶浓度对酶反应速率的影响

保持其它因素不变，当底物浓度大大超过酶浓度时，则 $[E]$ 与反应速率成正比。

三、温度对酶反应速率的影响：温度与酶反应速率的曲线呈现钟形，酶有其对应的最适温度。

温度对酶反应存在两种不同影响：

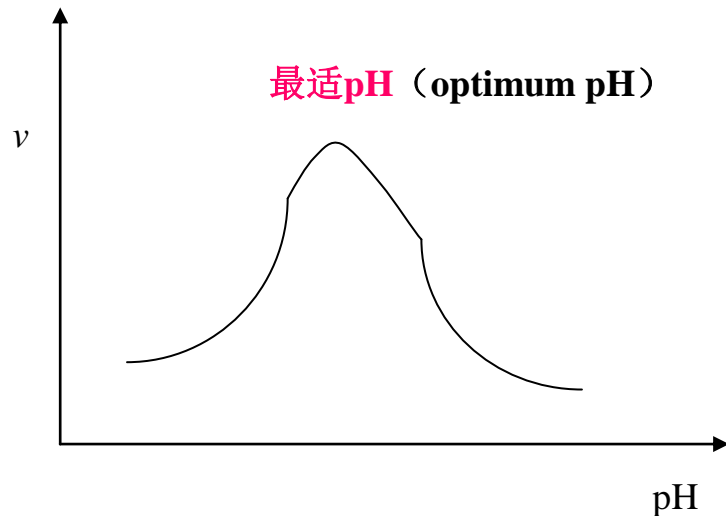
- (1) 温度升高，反应速度加快；温度系数 $Q_{10}$ 为1-2。
- (2) 温度升高，热变性速度加快。



四、pH对酶反应速率的影响：酶存在最适pH，同时要注意pH对酶稳定性的影响。

pH对酶作用的影响机制：

- (1) 环境过酸、过碱使酶变性失活；
- (2) 影响酶活性基团的解离；
- (3) 影响底物的解离。



## 五、激活剂对酶反应速率的影响

主要的酶激活剂:

(1) 无机离子:  $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cl^-$ 、 $Br^-$ 等可作为酶的辅助因子的成分, 或作为酶的激活剂。

(2) 小分子有机物: 如半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、巯基乙醇等还原剂(酶分子中-S-S-还原为-SH)以及金属螯合剂, 如EDTA(除去重金属, 解除其对酶的抑制)。

## 六、抑制剂对酶反应速率的影响:

1. 抑制作用的概念: 指酶的必需基团或活性部位中的基团的化学性质改变而降低酶活力甚至使酶活力丧失的物质(I)。

抑制剂是使酶活性降低或丧失的物质, 用I表示, 根据它与酶的结合情况分为两种, 结合紧密(一般为共价连接)的不可逆性抑制剂以及结合松弛(一般为非共价连接)的可逆性抑制剂, 后者可以通过透析来除去。

抑制剂对酶有一定的选择性, 一般酶并未变性, 仍可恢复活性。抑制剂对酶的作用不同于失活作用和去激活作用。

2. 抑制作用的类型:

(1) 不可逆性抑制剂: 抑制剂与酶的结合(共价键)是不可逆的, 不能用透析、超过滤等方法去除。

例如二异丙基氟磷酸(DIFP): 其中的F能够与酶的Ser的-OH特异性结合(脱HF), 形成DIP-酶, 从而抑制了酶的活性; 对氯汞苯甲酸能够特异性的结合酶中Cys的SH基(脱HCl)。

(2) 可逆性的抑制剂: 抑制剂与酶蛋白以非共价方式结合, 引起酶活性暂时性丧失。抑制剂可以通过透析等方法被除去。

根据抑制剂与酶结合的情况, 又可以分为三类:

I. 竞争性抑制剂: 与底物竞争性的结合酶的活性中心, 它的结构与底物的结构相似, 这种抑制可以通过提高底物的浓度来消除。抑制的结果使 $K_m$ 增大,  $V_{max}$ 不变。最典型的竞争性抑制是丙二酸对琥珀酸脱氢酶的抑制作用。

II. 非竞争性抑制剂: 抑制剂与酶活性中心以外的地方结合, 形成ESI三元复合物, 从而降低了酶活性中心对底物的催化。抑制的结果使 $K_m$ 不变,  $V_{max}$ 减小。

III. 反竞争性抑制剂: I不能和E结合, 只能和ES结合, 形成ESI三元复合物, 从而降低了酶活性中心对底物的催化。抑制的结果使 $K_m$ 和 $V_m$ 均减少。

三种抑制剂对比:

	$K_m$	$V_{max}$
竞争性的抑制剂	↑	不变
非竞争性抑制剂	不变	↓
反竞争性抑制剂	↓	↓

## 第五节 酶的制备

### 一、酶的制备及纯化

包括三个环节：抽提、纯化和制剂制备。

#### 1. 基本原则：

- (1) 注意防止酶变性而失去活性；防止强酸、强碱、高温和剧烈搅拌等；
- (2) 凡是用于蛋白质分离纯化的一切方法都同样适用于酶，允许在不破坏目的酶的限度内，适用各种手段；
- (3) 整个过程的每一步均需要检测酶活性。

#### 2. 酶提取纯化的步骤和方法

- (1) 选材：微生物：微生物发酵物；  
动物：脏器、血液、尿液等  
植物：木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等
  - (2) 细胞破碎和抽提：加入提取液提取。  
胞内酶先要进行细胞破碎，包括机械研磨、超声波破碎、反复冻融或自溶等；
  - (3) 分离：先进行净化处理（过滤，絮凝，离心脱色）和浓缩，再采用沉淀法分离（盐析法，有机溶剂沉淀法，超离心等）。
  - (4) 纯化：可采用离子交换层析，凝胶过滤，液相色谱，亲和色谱和超滤等方法。
- 酶的制剂形式：

- (1) 固体：干燥，可采用冰冻升华、喷雾干燥、真空干燥方法。
- (2) 液体：目前常用。

酶的保存：低温下短期保存。

### 二、酶活性的测定

酶活力是指酶催化某一化学反应的能力。酶活力单位（U）是根据某种酶在最适条件下，单位时间内酶作用底物的减少量或产物的生成量来决定。

国际标准活力单位（IU）：在标准条件（25℃、最适pH、底物过量）下，1min转化1μmol底物的酶量定义为一个酶活力单位：

$$1\text{IU}=1\mu\text{mol}/\text{min} \text{ (1961年)}$$

在最适条件下，1s内使1mol底物转化为产物所需的酶量定为1kat单位，即

$$1\text{kat}=1\text{mol}/\text{s} \text{ (1972年)} \quad 1\text{kat} = 6 \times 10^7 \text{IU}$$

酶的纯度指标：

$$\text{比活力} = \text{活力单位数} / \text{毫克蛋白（氮）}$$

比活力越高，表明酶越纯。还可以用纯化倍数和回收率表示酶的分离纯化效果。

酶的习惯活力单位：

不同酶有各自酶活力单位的规定，如：

①α-淀粉酶活力单位：每小时分解1g可溶性淀粉的酶量为一个酶单位（QB546-80）。

也有规定每小时分解1mL2%可溶性淀粉溶液为无色糊精的酶量为一个酶单位，后者比前一个单位小。

②糖化酶活力单位：在规定条件下，每小时转化可溶性淀粉产生1mg还原糖（以葡萄糖计）所需的酶量为一个酶单位。

③蛋白酶：规定条件下，每分钟分解底物酪蛋白产生1 $\mu$ g酪氨酸所需的酶量。

④DNA限制性内切酶：推荐反应条件下，一小时内可完全消化1 $\mu$ g纯化的DNA所需的酶量。

## 第七节 酶的应用

工业上酶应用的优点：

1. 酶的催化效率高，专一性强，不发生副作用。
2. 酶作用条件温和。
3. 酶及其反应产物大多无毒性。

酶的应用方面：

1. 酶在食品工业中的应用：例如淀粉加工，涉及酶类包括 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、糖化酶、葡萄糖异构酶和脱支酶等。
2. 化工和轻工方面：如氨基酸生产；
3. 医药工业中：如药用酶、诊断用酶；
4. 环境化学中：如含酚废水的处理、含有残留有机氯农药土壤的处理等。

酶的固定化：通过物理或化学的方法将酶束缚在某种载体上，使酶只能在一定的空间内进行催化活动。

作用特点：稳定性提高，易分离，可反复使用，提高操作的机械强度。

方法：吸附法、共价法、交联法、包埋法。

本章小结：

重点：酶的概念、分类、米氏方程、活性中心及酶的抑制剂影响状况。

难点：米氏方程的推导和意义。

思考题：酶在生物体中发挥哪些作用？

作业题：

书中 134 页第 2, 4, 5 题。

## 第七章 维生素和辅酶（1 学时）

本章要求：

1. 熟悉一些主要的水溶性维生素的名称、结构、生理作用和它们的辅酶形式（NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>、FAD、FMN，辅酶 A，硫胺素焦磷酸，磷酸吡哆醛，生物素，四氢叶酸，维生素 B<sub>12</sub>，硫辛酸）；
2. 了解脂溶性维生素中的结构和功能，掌握维生素 A、维生素 D 和维生素 E 的生理



作用。

## 第一节 概述

维生素定义：生命活动不可缺少的一类有机物，在代谢中起调节作用，缺乏时会导致疾病。

特点：植物以及少数微生物能够自我合成，动物以及大多数微生物不能自我合成，故植物是维生素的来源。相对于蛋白质而言为小分子化合物；具有调节作用，可以充当辅酶。

分类：

水溶性：是大多数，如 VC、VB 族等

脂溶性：少数，如 VA、VD、VE、VK

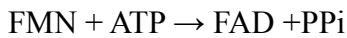
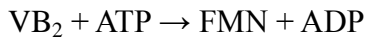
## 第二节 水溶性维生素与辅酶

### 一、维生素 B<sub>1</sub>

维生素 B<sub>1</sub> 由一个含 S 的噻唑环和一个含 NH<sub>2</sub> 的嘧啶环组成，又称硫胺素 (Thiamine)。焦磷酸硫胺素是 α-酮酸脱羧酶和转酮醇酶等的辅酶。

### 二、维生素 B<sub>2</sub> 和黄素辅酶

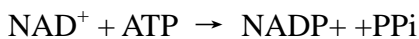
维生素 B<sub>2</sub> 又称核黄素 (riboflavin)，是核糖醇与 6, 7—二甲基异咯嗪的缩合物，自然界多与蛋白质结合成黄素蛋白。



维生素 B<sub>2</sub> 的生理功能是作为递氢辅酶，参与生物氧化作用。

### 三、维生素 PP 和辅酶 I、辅酶 II

维生素 PP 又称抗癞皮病维生素或维生素 B<sub>5</sub>，包括尼克酸 (烟酸) 和尼克酰胺。



功能：以 NAD<sup>+</sup> 或 NADP<sup>+</sup> 形式作为脱氢酶的辅酶而起到递氢体的作用。

### 四、泛酸与辅酶 A

辅酶 A 是生物体内代谢反应中乙酰化酶的辅酶，它是含泛酸的复合核苷酸。它的重要生理功能是传递酰基，是形成代谢中间产物的重要辅酶。

### 五、维生素 B<sub>6</sub> 和磷酸吡哆醛

VB<sub>6</sub> 又称吡哆素，包括吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺。维生素 B<sub>6</sub> 在体内经磷酸化作用转化为相应的磷酸酯，参加代谢的主要的是磷酸吡哆醛和磷酸吡哆胺。作为辅酶参加多种代谢反应，包括脱羧、转氨等。

### 六、生物素

生物素 (维生素 B<sub>7</sub>) 为含硫维生素。

功能：多种羧化酶的辅酶，与细胞内 CO<sub>2</sub> 的固定有关。

### 七、叶酸和叶酸辅酶

维生素 B<sub>11</sub> 又称叶酸，作为辅酶的是叶酸加氢的还原产物四氢叶酸。主要作用是作为一碳基团，如-CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-, -CHO 等的载体，参与多种生物合成过程。

#### 八、维生素 B<sub>12</sub> 与辅酶 B<sub>12</sub>

维生素 B<sub>12</sub> 又称为钴胺素。维生素 B<sub>12</sub> 分子中与 Co<sup>+</sup>相连的 CN 基被 5'-脱氧腺苷所取代，形成辅酶 B<sub>12</sub>。

辅酶 B<sub>12</sub> 的主要功能是作为变位酶的辅酶，催化底物分子内基团(主要为甲基)的变位反应。

#### 九、其他两种辅酶

##### 1. 硫辛酸

硫辛酸是少数不属于维生素的辅酶。硫辛酸是 6,8-二硫辛酸，有两种形式：即硫辛酸（氧化型）和二氢硫辛酸（还原型）。主要作用是传递氢和转移乙酰基。糖代谢中作为 α-酮酸氧化脱羧酶的辅酶。

##### 2. 辅酶 Q (CoQ)

辅酶 Q 又称为泛醌，广泛存在与动物和细菌的线粒体中。辅酶 Q 的活性部分是它的醌环结构，主要功能是作为线粒体呼吸链氧化-还原酶的辅酶，在酶与底物分子之间传递电子。

本章小结：

熟悉主要水溶性维生素的名称、结构和它们的辅酶形式，NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>，FAD、FMN，辅酶 A，硫胺素焦磷酸，磷酸吡哆醛，生物素，四氢叶酸，辅酶 B<sub>12</sub>；硫辛酸、辅酶 Q。

## 第八章 能量代谢与生物能的利用（4学时）

**本章要求：**

1. 理解并掌握氧化磷酸化概念、呼吸链的组成及递氢、递电子的过程；
2. 了解生物氧化中能量的产生、转移及储存；
3. 了解电子传递和 ATP 形成的偶联机理、调节机制；
4. 理解并掌握 P/O 比、解偶联和抑制、化学渗透假说的要点，质子浓度梯度差是如何形成的；
5. 了解胞液中的 NADH 转换为线粒体中的 NADH 的途径。

**本章重点：**

生物氧化的概念；

NADH氧化呼吸链与琥珀酸氧化呼吸链的组成和组分的排列顺序；

呼吸链中ATP分子的生成方式和数量。

本章难点：呼吸链中ATP分子的生成方式和数量。

## 第一节 概述

### 一、生物氧化的概念：

生物氧化（biological oxidation）是生物细胞将糖、脂和蛋白质等有机物进行氧化分解，最终生成 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 并释放能量的过程，也称为细胞呼吸（cellular respiration）。

主要讨论的问题：水的生成；二氧化碳的生成；能量的转换和储存。

代谢物在体内的氧化可以分为3个阶段：

1. 糖、脂肪和蛋白质分解 → 乙酰辅酶A中的乙酰基；
2. 乙酰辅酶A进入三羧酸循环脱氢脱羧，生成 $\text{CO}_2$ 并使NAD和FAD还原成NADH、 $\text{FADH}_2$ ；
3. NADH和 $\text{FADH}_2$ 中的氢→呼吸链→+氧生成水，氧化过程中释放出来的能量用于ATP合成。

狭义地说只有第3个阶段才是生物氧化，这是体内能量生成的主要阶段，即代谢物脱下的氢是如何交给氧生成水，细胞如何将氧化过程中释放的能量转变成ATP分子中的高能键。

### 二、生物氧化的特点和方式：

#### 1. 生物氧化的特点

①生物氧化中底物是在酶的催化下逐步氧化分解的，氧化过程产生的能量也是逐步释放的。

②生物氧化产生的能量部分可转变成生命活动能够利用的形式，即合成ATP，不是全以热的形式释放。

③生物氧化是在常温、常压、近中性pH环境中进行。

在真核细胞内，生物氧化主要是在线粒体中进行，原核细胞内生物氧化是在细胞膜上进行。

#### 2. 生物氧化中 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ 的生成

##### ① $\text{CO}_2$ 的生成

代谢底物在酶的作用下经一系列脱氢、加水等反应，转变为含羧基的化合物，经脱羧反应生成 $\text{CO}_2$ ，包括直接脱羧、氧化脱羧即脱羧同时发生氧化（脱氢）作用。

##### ② 脱氢——生物氧化的主要方式

脱氢氧化反应：脱氢，如烷基脱氢生成烯

醇脱氢生成醛

氧直接参加的氧化反应：

加氧酶：氧分子直接加到有机分子中

氧化酶：以氧分子为电子受体，产物为水

失电子： $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}$

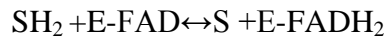
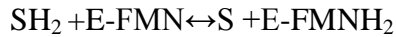
③水的生成机制：氢经呼吸链的传递与氧结合生成水

### 三、参与生物氧化的酶类

#### 1. 脱氢酶——催化呼吸底物的氧化

根据所含辅因子的不同，分为两类：

第一类，以FMN或FAD为辅基；



根据最终受氢体的不同，分为两类：

①需氧黄酶：以氧为直接受氢体；

②不需氧黄酶：经过中间传递体传递给氧生成水

第二类，以NAD或NADP为辅酶；

属不需氧脱氢酶，经中间传递体将氢传递给氧生成水

2. 氧化酶——氧的还原：以氧为直接受电子体的氧化还原酶。一般含金属 $\text{Cu}^{2+}$ 和 $\text{Fe}^{3+}$ 的蛋白质，如细胞色素氧化酶等。

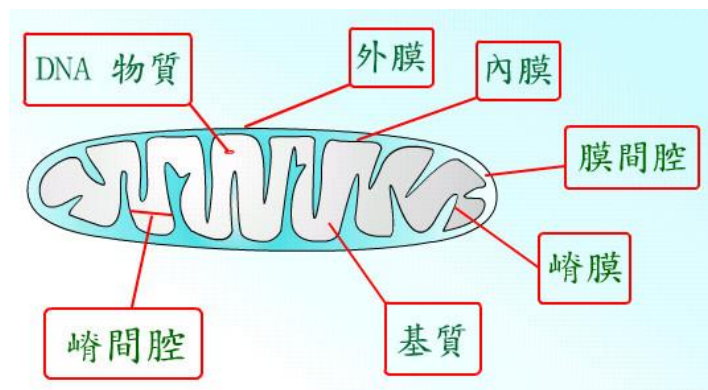
#### 3. 传递体——能量转换的重要环节

传递体：起传递氢或传递电子作用的物质。包括递氢体和递电子体。

## 第二节 线粒体氧化体系

### 一、线粒体的膜相结构

线粒体是生物氧化和能量转换的主要场所。线粒体内膜是能量转换的重要部位，电子传递链和氧化磷酸化有关的组分都存在于此，是线粒体功能的主要担负者。原核细胞没有线粒体结构，它的部分质膜起着这种作用。



### 二、呼吸链（电子传递链）的组成

呼吸链：由供氢体、传递体、受氢体（ $\text{O}_2$ ）以及相应的酶系统组成的生物氧化还原链。

#### 1. 组成——具辅基的结合蛋白类

(1) 以NAD或NADP为辅酶的脱氢酶：催化代谢物脱氢，氢由辅酶NAD<sup>+</sup>或NADP<sup>+</sup>接受；

(2) 黄素酶：以FMN或FAD为辅基的不需氧脱氢酶。催化代谢物脱氢，氢由FMN或FAD接受；

(3) 铁硫蛋白：金属蛋白质，起传递电子作用。

(4) 辅酶Q：递氢体。

(5) 细胞色素（Cyt）：一类含有铁卟啉辅基的色蛋白，属于递电子体。

铁卟啉辅基所含Fe<sup>2+</sup>有Fe<sup>2+</sup> ↔ Fe<sup>3+</sup> + e的互变，因此起到传递电子的作用。线粒体内膜中有细胞色素B、C<sub>1</sub>、C、AA<sub>3</sub>。

### 2. NADH氧化呼吸链：

脱氢酶催化下底物SH<sub>2</sub>脱下的氢交给NAD<sup>+</sup>生成NADH；在NADH脱氢酶作用下，NADH将两个氢原子传递给FMN生成FMNH<sub>2</sub>；再将氢传递至CoQ生成CoQH<sub>2</sub>，此时2个氢原子解离成2H<sup>+</sup> + 2e，2H<sup>+</sup>游离于介质中；2e经Cyt B、C<sub>1</sub>、C、AA<sub>3</sub>传递，最后将2e传递给1/2O<sub>2</sub>，生成O<sup>2-</sup>，O<sup>2-</sup>与介质中游离的2H<sup>+</sup>结合生成水。

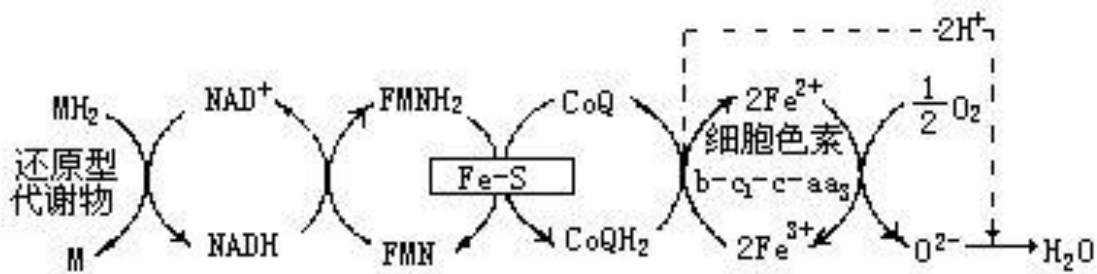


图1 NADH呼吸链

3. 琥珀酸氧化呼吸链：琥珀酸脱氢生成的FADH<sub>2</sub>，将氢传递给CoQ，生成CoQH<sub>2</sub>，此后的传递同上。

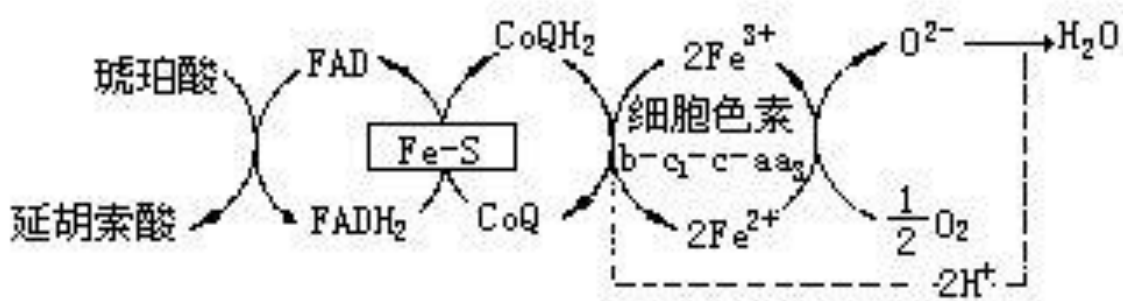


图2 FADH<sub>2</sub>呼吸链

### 第三节 能量代谢中生物能的产生、转移和储存

## 一、氧化还原与自由能变化

自由能(free energy)：在恒温、恒压条件下一个体系可用于做有用功的能量。又称Gibbs自由能，以G表示。

### 1. 反应方向与趋势——自由能变化与浓度的关系

产物与反应物自由能之差就是该反应的自由能变化。

$\Delta G < 0$ ，表示自由能释放，反应可以自发进行；

$\Delta G > 0$ ，表示需要输入自由能以驱动反应进行；

$\Delta G = 0$ ，表示反应处于平衡状态。

反应的标准自由能变化及其平衡常数的关系。 $\Delta G^\circ$ 表示生物体系的标准自由能变化，即25°C (298K)、pH7.0、参加反应物质的浓度为 $1\text{mol L}^{-1}$ 、压力为0.1MPa条件下的自由能变化。 $\Delta G^\circ$ 与平衡常数K'的关系为： $\Delta G^\circ = -RT \ln K' = -2.303RT \lg K'$

对于一个反应序列，自由能的总变化等于每一步反应自由能变化的总和。

### 2. 氧化还原电位

在氧化还原反应中，反应物给出或得到电子的倾向称为氧化-还原电位，用E表示。在25°C，pH=7，所有反应物和产物的浓度均为 $1\text{mol L}^{-1}$ 的半反应的电极电位称为标准氧化-还原电位，用 $E^\circ$ 表示。

$E^\circ$ 越大，得到电子的倾向越大，氧化能力越强；

$E^\circ$ 越小，失去电子的倾向越大，还原能力越强。

反应中电子总是从低电位向高电位流动。

标准状况下氧化还原电位变化： $\Delta E^\circ = \text{氧化剂电极电位} - \text{还原剂电极电位}$

### 3. 氧化还原电位与自由能的关系

$\Delta G^\circ$ 与反应物标准氧化还原电位差( $\Delta E_0'$ )间的关系：

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ$$

n为转移电子数，F为法拉第常数( $96,500\text{J}\cdot\text{V}^{-1}\text{mol}^{-1}$ )。

利用公式可根据氧化还原电位差计算出化学反应的自由能变化。

$\Delta E^\circ > 0$ ，则 $\Delta G^\circ < 0$ ，此反应能够自发进行； $\Delta E^\circ$ 正值越大，反应自发进行趋势越大。

问题：呼吸链中各种传递体为何有此排列顺序？

解释：根据各种组分的标准氧化还原电位来确定。标准氧化还原电位越小，其还原性越强，容易被氧化；标准氧化还原电位越大，其氧化性越强，容易被还原。呼吸链中各种组分的排列顺序是由低电位依次向高电位排列。

## 二、高能磷酸键的生成机制

一般将水解或基团转移时能释放出 $20.9\text{kJ/mol}$ 以上能量的化学键称为高能键。高能磷酸化合物：含有高能键。ATP是最重要的 高能化合物，由ADP磷酸化生成。

生物氧化释放的能量一般先贮藏在高能化合物中，机体用于做功的能量来自高能化合物水解反应。

常见的高能化合物类型\*

高能键型	高能化合物举例	水解时释放的标准自由能 $\Delta G^{\ominus}$	
酰基磷酸化合物 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O} \sim \text{P} \end{array}$	乙酰磷酸 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad   \\ \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$-42.3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-10.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$	
磷氧键型 $-\text{O} \sim \text{P}$	烯醇式磷酸化合物 磷酸烯醇式丙酮酸 $\begin{array}{c} \text{COOH} \quad \text{O} \\   \quad \quad \parallel \\ \text{C}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\    \quad \quad   \\ \text{CH}_2 \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$-61.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-14.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$	
焦磷酸化合物 $\text{P}-\text{O} \sim \text{P}$	腺苷三磷酸 $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{腺苷}-\text{O}-\text{P}-\text{O} \sim \text{P}-\text{O} \sim \text{P}-\text{OH} \\   \quad   \quad   \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$-30.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-7.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$	
磷氮键型 $-\text{N} \sim \text{P}$	胍基磷酸化合物 $\begin{array}{c} -\text{N} \sim \oplus \\   \\ \text{C}=\text{NH} \\   \\ \text{N}- \end{array}$	磷酸肌酸 $\begin{array}{c} \text{HN} \sim \oplus \\   \\ \text{C}=\text{NH} \\   \\ \text{N}-\text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	$-43.1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-10.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$
硫碳键型 $-\text{C} \sim \text{S}$	硫酯键化合物 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C} \sim \text{S}- \end{array}$	乙酰辅酶A $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3-\text{C} \sim \text{SCoA} \end{array}$	$-31.4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-7.5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$
甲硫键化合物 $\text{CH}_3 \sim \text{S}^+$	S-腺苷甲硫氨酸 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \sim \text{S}^+ \sim \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}-\text{COOH} \\   \quad \quad \quad   \\ \text{腺苷} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$-41.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ $(-10.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1})$	

\* “~”表示水解时产生的能量大于  $20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的键。

生物体内通过生物氧化合成ATP的方式有氧化磷酸化和底物水平磷酸化。

### 1. 氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)

氧化磷酸化是需氧生物合成ATP的主要途径。指代谢物在脱氢（氧化）时所释放的能量用于ATP的生成。电子从NADH或FADH<sub>2</sub>经电子传递链传递到分子氧形成水，同时偶联ADP磷酸化生成ATP。

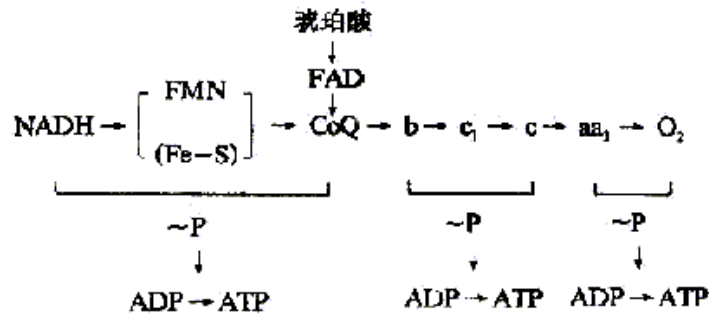
氧化磷酸化与电子传递的偶联：磷酸化的效率可通过测定P/O值来判断。P/O是

指每消耗1mol氧原子时，有多少摩尔无机磷转化为有机磷。

NADH经呼吸链完全氧化测得的P/O值为3；FADH<sub>2</sub>完全氧化时测得的P/O比值为2。

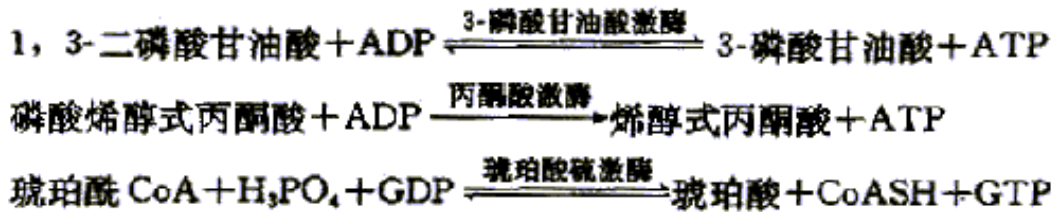
1mol ATP水解生成ADP与Pi所释放的能量为30.5 kJ mol<sup>-1</sup>，凡氧化过程中释放的能量大于30.5 kJ mol<sup>-1</sup>，均有可能生成1mol ATP，即可能存在一个偶联部位。根据 $\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ$ ，当n=2时， $\Delta E^\circ = 0.1583V$ 时可释放30.5 kJ mol<sup>-1</sup>能量。所以反应底物与生成物的标准氧化还原电位的变化大于0.1583V的部位均可能存在着一个偶联部位。

呼吸链中电子传递和磷酸化的偶联部位：



## 2. 底物水平磷酸化(substrate level phosphorylation)

底物分子中的能量直接以高能键形式转移给ADP生成ATP，这个过程称为底物水平磷酸化。



## 3. 氧化磷酸化的机制——化学渗透假说

### (1) 线粒体偶联因子F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>

ATP由位于线粒体内膜上的ATP合成酶催化合成的。ATP合酶可利用电子传递的高能状态将ADP和Pi合成为ATP。

ATP合酶是一个膜蛋白质复合体，主要由疏水的F<sub>0</sub>和亲水的F<sub>1</sub>组成，又称F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPase复合物。F<sub>1</sub>是它的球形头部，伸入到线粒体基质中，由五种亚基组成(α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδε)，是合成ATP的催化部分。F<sub>0</sub>横贯线粒体内膜，主要构成质子通道，由十多种亚基组成。

### (2) 化学渗透学说(chemiosmotic hypothesis)

①在电子传递与ATP合成之间起偶联作用的是质子电化学梯度。

②线粒体内膜必须是完整、封闭的；在传递电子过程中释放的能量不断将线粒



体基质内的 $H^+$ 泵出线粒体内膜。内膜外侧的 $H^+$ 积累，造成线粒体内膜两侧的质子梯度，即跨膜电位。

③当有足够高的跨膜质子电化学梯度时，强大的 $H^+$ 流通过 $F_1-F_0-ATPase$ 进入线粒体基质时，释放的能量推动ATP合成。

化学渗透学说认为在氧化与磷酸化之间起偶联作用的因素是 $H^+$ 的跨膜梯度。每对 $H^+$ 通过 $F_1-F_0-ATPase$ 回到线粒体基质中可以生成1分子ATP。NADH氧化呼吸链，其电子沿呼吸链传递在线粒体内膜中形成3个回路，生成3分子ATP。琥珀酸氧化呼吸链，其电子沿琥珀酸氧化呼吸链传递在线粒体内膜中形成2个回路，所以生成2个ATP分子。

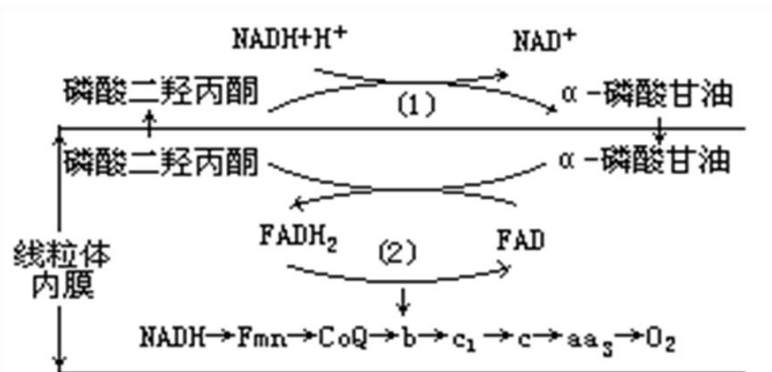
### 三、线粒体外的氧化磷酸化

生物氧化和氧化磷酸化主要在线粒体内进行，在胞液内生成的NADH不能自由地透过线粒体内膜。必须借助某些能自由通过线粒体内膜的物质才能被转入线粒体，这就是所谓穿梭机制。

线粒体穿梭系统：胞浆中NADH由膜外到膜内的转移。已知动物细胞内有两个穿梭系统。

#### ①磷酸甘油穿梭系统(glycerol-3-phosphate shuttle)

胞质中的 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶先将NADH中的H转移至磷酸二羟丙酮形成 $\alpha$ -磷酸甘油； $\alpha$ -磷酸甘油扩散至线粒体外膜与内膜之间，然后在内膜结合的 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶的作用下，将H转移到内膜中的FAD上； $FADH_2$ 经呼吸链进行氧化，同时产生的磷酸二羟基丙酮又返回胞液中参与下一轮穿梭。



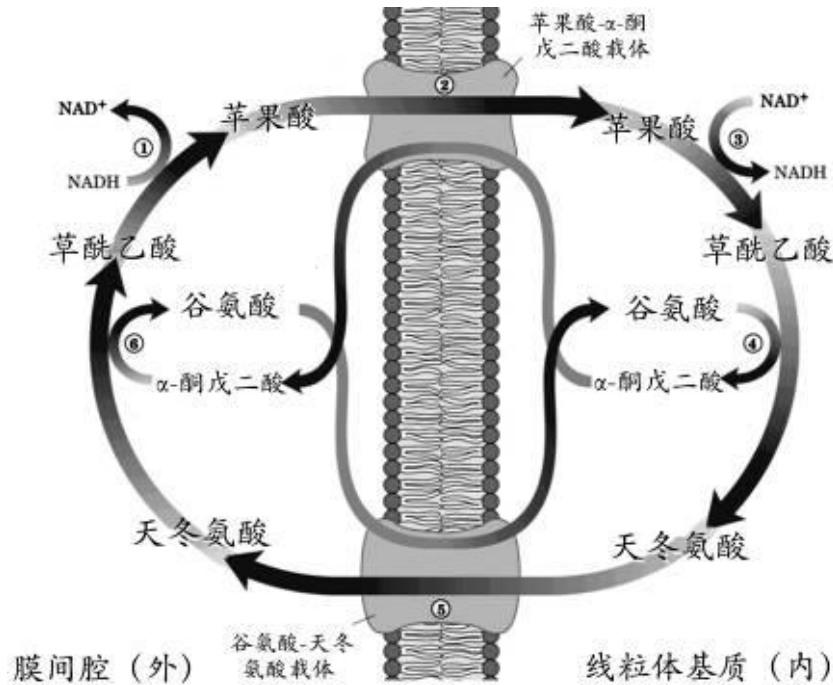
#### ①细胞质 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶

#### ②线粒体内 $\alpha$ -磷酸甘油脱氢酶

#### ②苹果酸穿梭系统(malate-aspartate shuttle)

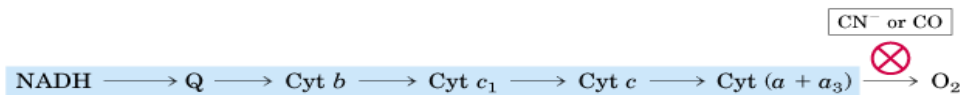
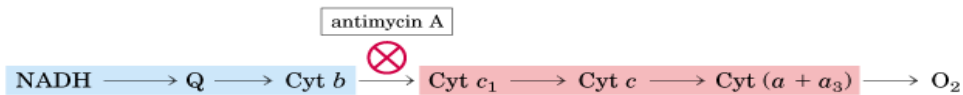
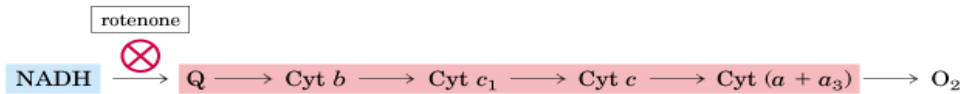
穿梭系统需要两种谷草转氨酶、两种苹果酸脱氢酶和一系列专一的透性酶共同作用。NADH在胞液苹果酸脱氢酶催化下将草酰乙酸还原成苹果酸；苹果酸穿过内膜，经基质苹果酸脱氢酶氧化，生成草酰乙酸和NADH，NADH随即进入呼吸链进行氧化磷酸化；草酰乙酸在基质谷草转氨酶催化下形成天冬氨酸，同时将谷氨酸变

为 $\alpha$ -酮戊二酸，天冬氨酸和 $\alpha$ -酮戊二酸通过内膜进入胞液，再由胞液谷草转氨酶催化变成草酰乙酸参与下一轮穿梭运输。



#### 四、电子传递抑制剂和解偶联剂

1. 电子传递抑制剂能够在呼吸链某一特定部位阻断电子传递。



2. 氧化磷酸化的解偶联

解偶联剂(质子载体)：不抑制呼吸链的电子传递，但能阻止 ATP 的形成，使氧化产生的能量变为热能。主要的解偶联剂有 2,4-二硝基苯酚。

DNP 解偶联原理：破坏跨膜  $\text{H}^+$  梯度。

正常生理条件下 DNP 是解离形式，不能透过线粒体内膜，在酸性环境下 DNP 接受质子成为脂溶性物质，透过内膜，同时将质子  $\text{H}^+$  带入内膜，破坏了跨膜  $\text{H}^+$  梯度而引起解偶联现象。

氧化磷酸化的解偶联效应也被生物所利用。例如冬眠动物和适应寒冷的哺乳动物中，它是一种能够产生热以维持体温的方法。

#### 第四节 生物能的利用

1. 活体生物消耗能量的途径：运动、主动转运和生物合成。
2. 能量储存：  
磷酸肌酸：脊椎动物肌肉和神经组织中；  
磷酸精氨酸：无脊椎动物体内。
3. 能量转换：以多种形式进行能量的转移和释放。与葡萄糖、核糖、氨基酸等反应。
4. 体内能量代谢的调节：ATP、ADP、AMP量的变化。

#### 本章小结

1. 生物氧化的概念；
2. NADH氧化呼吸链与琥珀酸氧化呼吸链的组成和组分的排列顺序；
3. 呼吸链中ATP分子的生成方式和数量。

#### 练习题

- 1、关于电子传递链的下列叙述中哪个是不正确的？  
A、线粒体内有NADH+H<sup>+</sup>呼吸链和FADH<sub>2</sub>呼吸链  
B、电子从NADH传递到氧的过程中有3个ATP生成  
C、呼吸链上的递氢体和递电子体完全按其标准氧化还原电位从低到高排列。  
D、线粒体呼吸链是生物体唯一的电子传递体系。
- 2.线粒体外NADH经 $\alpha$ -磷酸甘油穿梭作用，进入线粒体内实现氧化磷酸化，其p/o值为（ ）  
A、0      B、1      C、2      D、3
3. 各种细胞色素在呼吸链中的排列顺序是：（ ）  
A、b $\rightarrow$ C $\rightarrow$ C<sub>1</sub> $\rightarrow$ aa<sub>3</sub> $\rightarrow$ O<sub>2</sub>  
B、C $\rightarrow$ C<sub>1</sub> $\rightarrow$ b $\rightarrow$ aa<sub>3</sub> $\rightarrow$ O<sub>2</sub>  
C、C<sub>1</sub> $\rightarrow$ C $\rightarrow$ b $\rightarrow$ aa<sub>3</sub> $\rightarrow$ O<sub>2</sub>  
D、b $\rightarrow$ C<sub>1</sub> $\rightarrow$ C $\rightarrow$ aa<sub>3</sub> $\rightarrow$ O<sub>2</sub>
4. 下列哪一种物质最不可能通过线粒体内膜？  
A. Pi      B. 苹果酸      C. 柠檬酸      D. 丙酮酸      E. NADH
5. 含有尼克酰胺的物质是：  
A. FMN      B. FAD      C. 泛醌      D. NAD<sup>+</sup>
6. 呼吸链存在于：（ ）  
A. 细胞膜      B. 线粒体外膜      C. 线粒体内膜  
D. 微粒体      E. 过氧化物酶体
7. 机体生命活动的能量直接供应者是：  
A. 葡萄糖      B. 蛋白质      C. 乙酰辅酶A      D. ATP      E. 脂肪

8.氧化磷酸化的偶联部位发生在(多选):

- A、CoQ→Cyt<sub>c</sub>之间      B、Cyt<sub>c</sub>→O<sub>2</sub>之间  
C、NADH→CoQ之间      D、FAD→CoQ之间  
E、Cyt<sub>c</sub>→cytaa<sub>3</sub>之间

#### 作业题

1. 说明NADH氧化呼吸链和琥珀酸氧化呼吸链中各种传递体的排列顺序，并指出两条呼吸链中的磷酸化部位。
2. 说明化学渗透假说的要点。
3. 名词：呼吸链，氧化磷酸化

### 第九章 糖代谢（5学时）

本章要求：

- 1.了解多糖的降解方式和糖的吸收；
  - 2.理解糖酵解的反应过程，掌握糖酵解的限速步骤；
  - 3.掌握糖的三羧酸循环反应过程，理解其生理意义；
  - 4.理解糖异生过程和生理意义；
  - 5.了解磷酸己糖旁路。
- 重点：糖的无氧酵解和有氧氧化反应过程和生理意义；  
难点：无氧酵解和有氧氧化反应过程。

新陈代谢：生物与周围环境进行物质和能量交换的过程。

包括：同化作用(assimilation)

异化作用(dissimilation)

生物体通过同化作用(合成代谢)不断地从环境中摄取物质，经一系列生化反应转变为自己的组分；

通过异化作用(分解代谢)将原有的组分经一系列生化反应，分解为简单成分重新利用或排出体外。

#### 第一节 概述

糖代谢包括分解代谢和合成代谢。

##### 一、多糖和寡糖的降解

多糖和寡聚糖只有分解成小分子后才能被吸收利用，生产中常称为糖化。

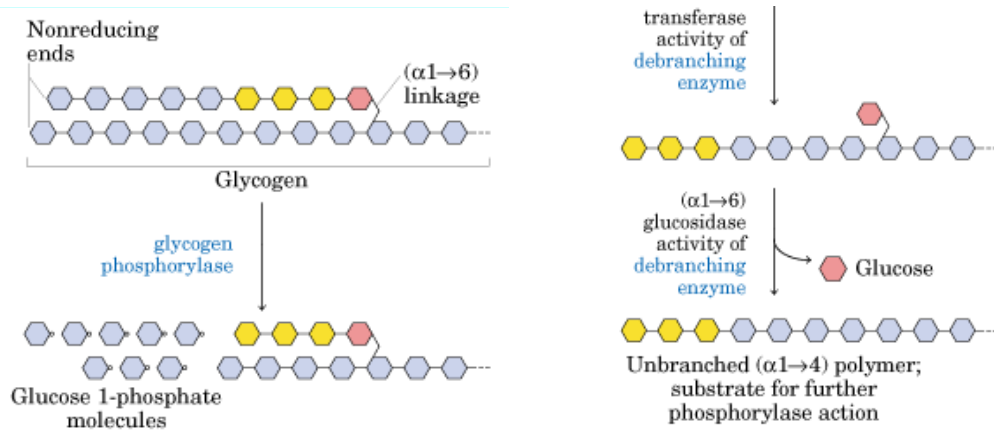
##### 1. 胞外降解——糖苷酶的水解方式

酶催化多糖加水分解，包括 $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、 $\gamma$ -淀粉酶及R酶、纤维素酶等。水解淀粉的淀粉酶有 $\alpha$ 与 $\beta$ 淀粉酶，二者只能水解淀粉中的 $\alpha$ -1,4糖苷键。 $\alpha$ -淀粉

酶可以水解淀粉(或糖原)中任何部位的 $\alpha$ -1,4糖苷键,内切酶。 $\beta$ -淀粉酶只能从非还原端开始水解,水解产物为麦芽糖。 $\gamma$ -淀粉酶:外切酶,水解产物为葡萄糖。R酶:水解淀粉中的 $\alpha$ -1,6糖苷键。纤维素酶:水解 $\beta$ -1,4糖苷键,产物为纤维二糖和葡萄糖。

## 2. 胞内降解——糖原的磷酸解

细胞内糖原降解需要脱支酶和糖原磷酸化酶的催化。脱支酶:水解糖原的 $\alpha$ -1,6糖苷键,切下分支。磷酸化酶能催化糖原的磷酸解,从非还原末端一次切下葡萄糖残基,生成1-磷酸葡萄糖。



## 二、糖的吸收与转运

### 1. 糖的吸收——单糖同钠离子的同向协同运输

葡萄糖和 $\text{Na}^+$ 都是由细胞外向细胞内转运。葡萄糖跨膜运输所需能量来自细胞膜两侧 $\text{Na}^+$ 浓度梯度。

### 2. 糖的转运——血糖的来源和去路

血糖:主要是葡萄糖,正常浓度 $4.4\sim 6.7\text{mmol/L}$ 。过高时,血液中的葡萄糖被合成为肝糖原或肌糖原而存储;降低时,肝糖原分解补充血糖。

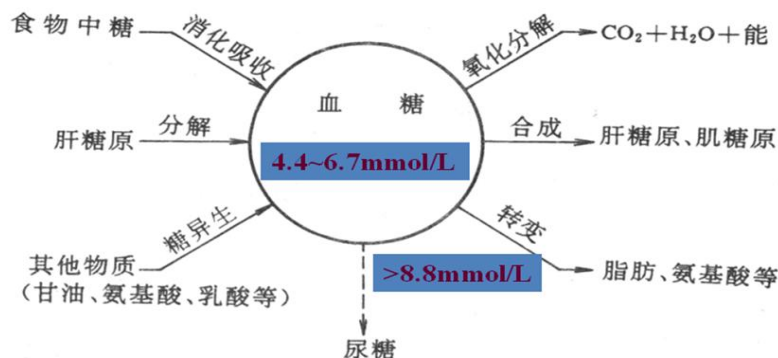


图 9-12 血糖的来源和去路

## 三、糖的分解代谢类型

无氧分解:体内称为糖酵解,起始物是葡萄糖或糖原,终产物是乳酸。产生的

氢以代谢中间产物丙酮酸为氢受体。人和高等动物肌肉及酵母菌可进行无氧呼吸。

需氧分解：糖在有氧存在下彻底分解成 $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ ，同时释放出能量的过程。丙酮酸的氧化脱羧和三羧酸循环，产生的氢以分子氧为氢受体。

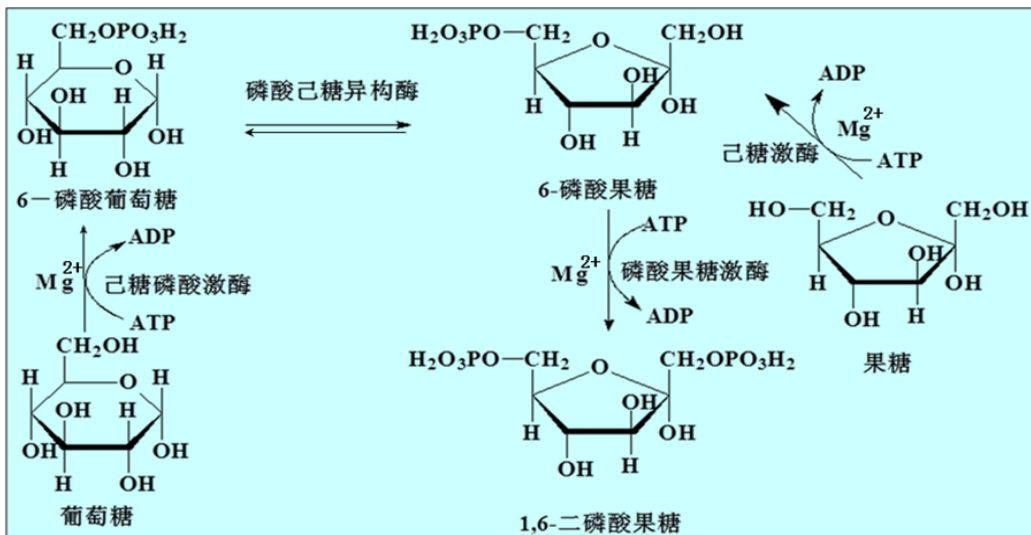
## 第二节 糖的分解代谢

### 一、糖酵解途径（Embden Meyerhof Parnas pathway, EMP）

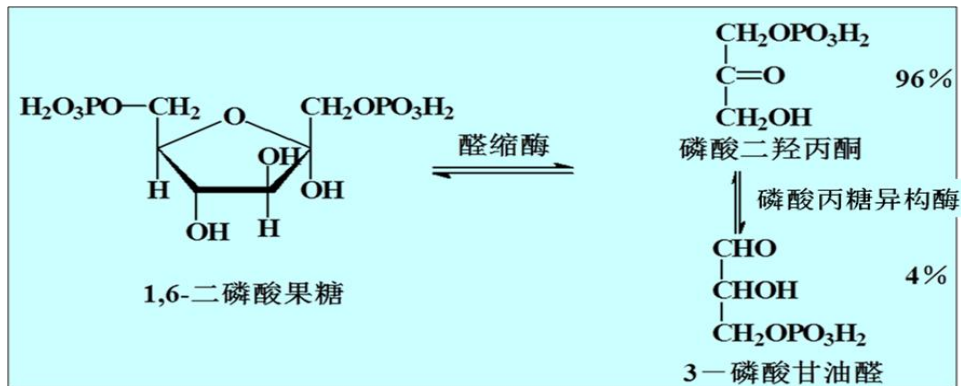
葡萄糖经过酶催化作用降解成丙酮酸，并伴随生成ATP的过程。EMP途径的生化历程：在细胞浆中进行。

#### 1. 第一阶段：耗能

葡萄糖  $\rightarrow$  1,6-二磷酸果糖

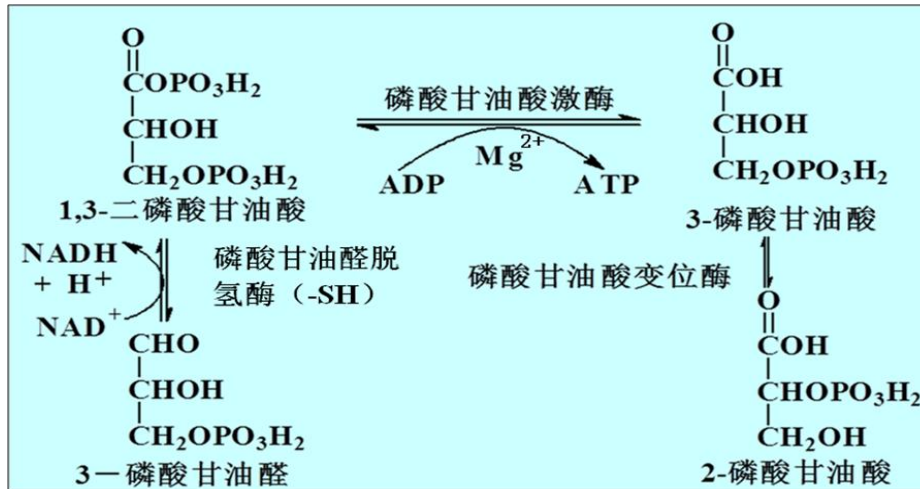


#### ④ 1,6-二磷酸果糖 $\rightarrow$ 3-磷酸甘油醛

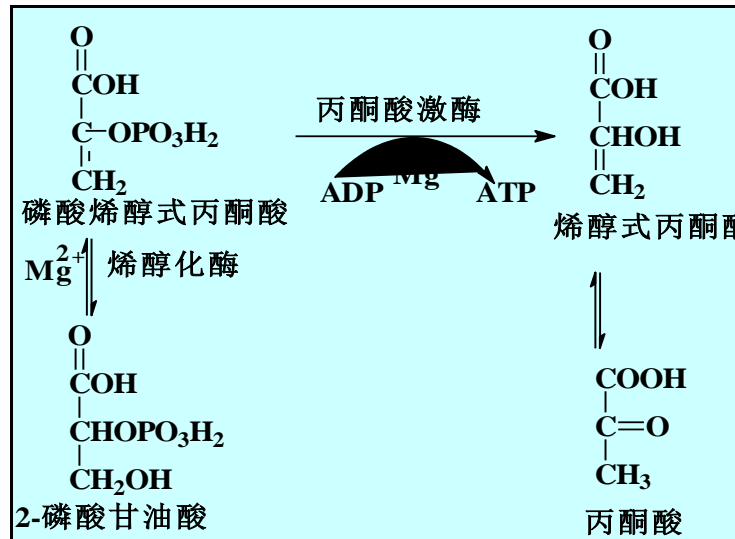


#### 2. 第二阶段：产能

3-磷酸甘油醛  $\rightarrow$  2-磷酸甘油酸



2-磷酸甘油酸 → 丙酮酸

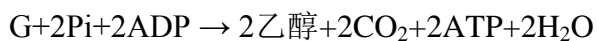


3. 丙酮酸的去向

(1) 乳酸发酵(lactic fermentation): 动物、乳酸菌(乳杆菌、乳链球菌)



(2) 酒精发酵(酵母发酵) alcoholic fermentation



(3) 丙酮酸转变成乙酰CoA

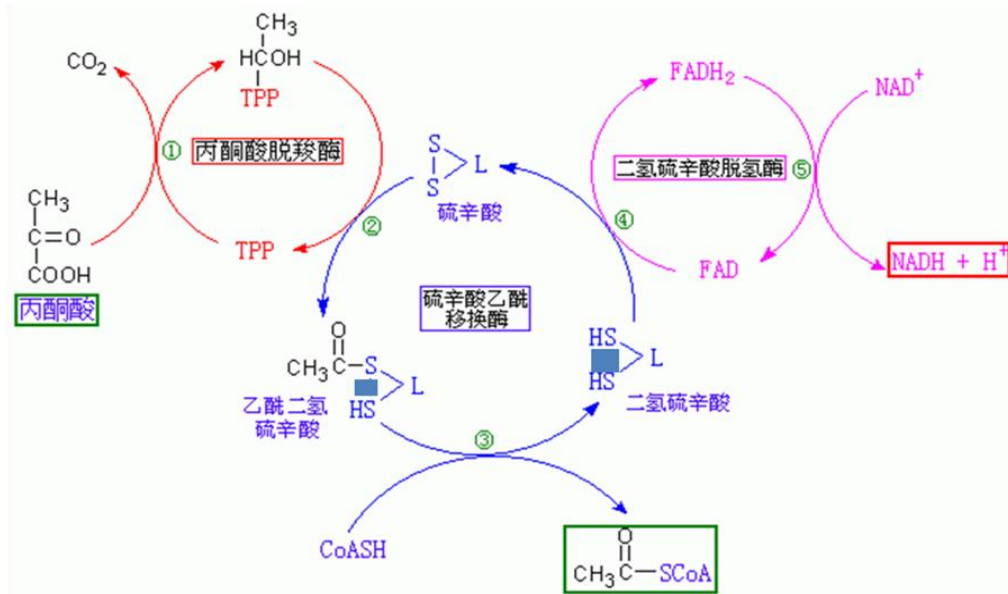
有氧存在的条件下, 丙酮酸氧化脱羧产生乙酰CoA, 再进入三羧酸循环, 被彻底氧化成CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O, 并释放出能量。

二、糖的有氧分解代谢

1. 丙酮酸氧化脱羧——乙酰CoA的生成

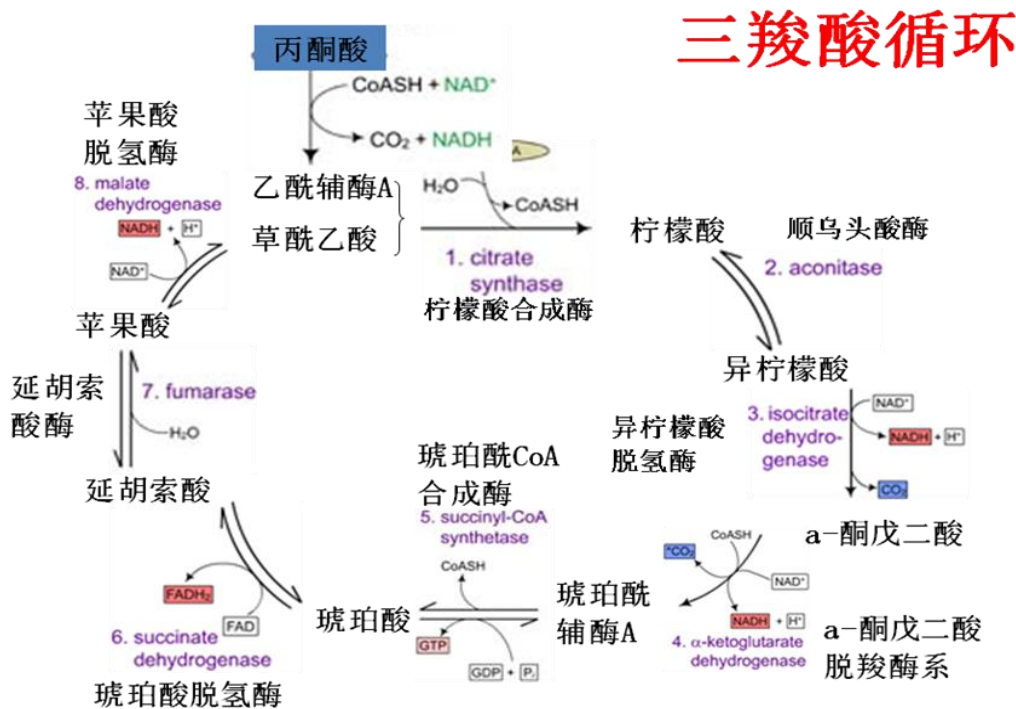
基本反应:

糖酵解生成的丙酮酸可穿过线粒体膜进入线粒体基质。在丙酮酸氧化脱羧酶系的催化下, 生成乙酰辅酶A。



## 2. 乙酰CoA的彻底氧化分解——Tricarboxylic acid cycle, TCA

TCA循环在细胞的线粒体基质中进行。第一个产物是柠檬酸，又称柠檬酸循环  
 化学反应历程：包括10步反应。





(1) 在柠檬酸合成酶催化下，将乙酰CoA的乙酰基上的甲基与草酰乙酸连接，形成柠檬酸，是第一个限速步骤。

(2) 柠檬酸在顺乌头酸酶催化下转变为顺乌头酸，继而又转变为异柠檬酸。

(3) 异柠檬酸在 $\text{NAD}^+$ 或 $\text{NADP}^+$ 存在下，经异柠檬酸脱氢酶催化脱氢，形成草酰琥珀酸；草酰琥珀酸脱去羧基，在异柠檬酸脱氢酶（需 $\text{Mg}^{2+}$ ）催化下，形成 $\alpha$ -酮戊二酸。第二个限速步骤

(4)  $\alpha$ -酮戊二酸在有TPP、硫辛酸、CoA-SH、FAD、 $\text{NAD}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 存在下，经 $\alpha$ -酮戊二酸脱羧酶系催化氧化脱羧形成琥珀酰辅酶A，第三个限速步骤。

(5) 琥珀酰辅酶A经琥珀酰辅酶A合成酶催化，生成琥珀酸和GTP。

(6) 琥珀酸在有FAD存在下，经琥珀酸脱氢酶催化形成延胡索酸。

(7) 延胡索酸在延胡索酸酶催化下形成苹果酸。

(8) 苹果酸在有 $\text{NAD}^+$ 存在下，经苹果酸脱氢酶催化脱氢，再生成草酰乙酸。

三羧酸循环经四次脱氢，这些脱氢酶分别以 $\text{NAD}^+$ 、FAD为氢受体；它们接受的氢经呼吸链最终氧化生成水和ATP。两个系统互相配合完成生物氧化作用。

葡萄糖分解代谢过程中能量的产生：

葡萄糖在分解代谢过程中产生的能量有两种形式：直接产生ATP；生成NADH或 $\text{FADH}_2$ ，后者在线粒体呼吸链氧化并产生ATP。

糖酵解：1分子葡萄糖  $\longrightarrow$  2分子丙酮酸，共消耗了2个ATP，产生了4个ATP，实际上净生成了2个ATP，产生2个NADH。

有氧分解（丙酮酸生成乙酰CoA及三羧酸循环）产生的ATP、NADH和 $\text{FADH}_2$ ，丙酮酸氧化脱羧：丙酮酸  $\longrightarrow$  乙酰CoA，生成1个NADH；三羧酸循环：乙酰CoA  $\longrightarrow$   $\text{CO}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ ，产生一个GTP（即ATP）、3个NADH和1个 $\text{FADH}_2$ 。

反应过程	生成ATP数	
葡萄糖 $\rightarrow$ G-6-P	-1	
G-6-P $\rightarrow$ F-1, 6-2P	-1	
3-磷酸甘油醛 + $\text{NAD}^+$ + $\text{P}_i \rightarrow$ 1,3-二磷酸甘油酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$	<b>2 × 3</b>	每分子葡萄糖生成2分子作用物，故×2
1,3-二磷酸甘油酸 + $\text{ADP} \rightarrow$ 3-磷酸甘油酸 + $\text{ATP}$	2 × 1	
磷酸烯醇式丙酮酸 + $\text{ADP} \rightarrow$ 烯醇式丙酮酸 + $\text{ATP}$	2 × 1	
丙酮酸 + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ 乙酰CoA + $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$	2 × 3	
异柠檬酸 + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ $\alpha$ -酮戊二酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$	2 × 3	
$\alpha$ -酮戊二酸 + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ 琥珀酰CoA + $\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$	2 × 3	
琥珀酰CoA + $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow$ 琥珀酸 + $\text{ATP}$	2 × 1	
琥珀酸 + $\text{FAD} \rightarrow$ 延胡索酸 + $\text{FADH}_2$	2 × 2	
苹果酸 + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ 草酰乙酸 + $\text{NADH} + \text{H}^+$	2 × 3	
总计	38	

产能效率:

糖无氧分解: 生成乳酸反应:  $2 \times 30.54 / 196.6 \times 100\% = 31\%$ ;

生成乙醇反应:  $2 \times 30.54 / 217.6 \times 100\% = 28\%$

需氧分解:  $38 \times 30.54 / 2870 \times 100\% = 40\%$

### 3. 三羧酸循环的生物学意义

(1) 为机体提供能量的主要途径;

(2) 是糖类、蛋白质、脂肪三大物质转化的枢纽;

(3) 草酰乙酸在TCA循环中的作用: 草酰乙酸必须保持一定的浓度, 影响TCA循环的速度。

(4) 获得微生物发酵产品的途径: 柠檬酸、谷氨酸

### 4. 草酰乙酸回补途径

(1) 丙酮酸在丙酮酸羧化酶催化下形成草酰乙酸, 需要生物素为辅酶。

(2) 丙酮酸在苹果酸酶作用下转化成L-苹果酸, 后者经苹果酸脱氢酶催化生成草酰乙酸。

(3) 磷酸烯醇式丙酮酸在磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的催化下形成草酰乙酸。在动物心脏和肌肉组织中存在这个反应。

## 第三节 糖的合成代谢

两个途径: 以葡萄糖为合成基本原料, 称为糖原生成作用; 由非糖物质如乳酸、甘油、丙酮酸以及某些氨基酸为原料合成葡萄糖, 再转变成糖原, 称为糖异生作用。

### 一、糖原生成作用

糖原是由许多葡萄糖分子缩合而成的多糖, 是动物细胞贮存糖的形式。

(1) 葡萄糖先磷酸化生成G-6-P; 受己糖激酶的催化, 由ATP提供磷酸和能量。

(2) G-6-P进一步转化成G-1-P, 变位酶催化;

(3) 在UTP存在下, G-1-P经UDPG焦磷酸化酶催化, 生成UDPG;

(4) 以糖原为“引物”, 由UDPG糖原转葡萄糖基酶、分支酶催化, 最终生成糖原。

### 二、糖异生作用

糖异生是指从非糖物质合成葡萄糖的过程。非糖物质包括乳酸、生糖氨基酸、甘油等均可以在哺乳动物的肝脏中转变为葡萄糖或糖原。

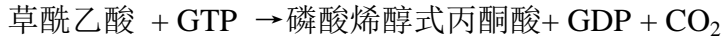
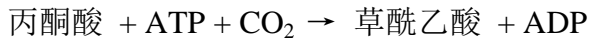
基本上是糖酵解途径的逆过程, 但具体过程并不是完全相同, 因为在酵解过程中有三步是不可逆的反应, 而在糖异生中要通过其它的旁路途径来绕过这三步不可逆反应, 完成糖的异生过程。

糖异生的生理意义:

糖异生作用是一个生物合成葡萄糖的途径; 红细胞和脑需要糖异生来补充糖的不足; 在饥饿或剧烈运动造成糖原下降后, 糖异生能使酵解产生的乳酸、脂肪分解

产生的甘油以及生糖氨基酸等中间产物重新生成糖。维持血糖浓度，满足组织对糖的需要。消除骨骼肌中乳酸的积累。

1. 丙酮酸羧化生成磷酸烯醇式丙酮酸



丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶催化

2. 1,6-二磷酸果糖转化成6-磷酸果糖：由二磷酸果糖磷酸酶催化。

3. 6-磷酸葡萄糖转化为葡萄糖：由葡萄糖-6-P磷酸酶催化。

该酶在肝脏和肾细胞中存在，在肌肉或脑组织中没有此酶存在，因此糖异生作用只能在肝脏和肾中进行。

### 本章小结

1. 淀粉酶解：各种酶的水解特征

2.  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶

3. 葡萄糖的无氧降解：过程和能量

EMP过程（三步限速步骤）；乳酸发酵与酒精发酵的差别

4. 葡萄糖的有氧代谢：过程和能量

丙酮酸氧化脱羧、TCA（限速步骤，脱氢反应）

5. 糖异生作用：与糖酵解逆过程不同的三步反应

### 练习题

1. 糖酵解中，下列哪一个催化的反应不是限速反应？（ ）

A、丙酮酸激酶    B、磷酸果糖激酶    C、己糖激酶    D、磷酸丙糖异构酶

2. 下列与能量代谢有关的途径不在线粒体内进行的是：（ ）

A、三羧酸循环    B、脂肪酸 $\beta$ 氧化    C、氧化磷酸化    D、糖酵解作用

3. 在厌氧条件下，下列哪一种化合物会在哺乳动物肌肉组织中积累？（ ）

A、丙酮酸    B、乙醇    C、乳酸    D、 $\text{CO}_2$

4. 下面哪种酶既在糖酵解又在葡萄糖异生作用中起作用？（ ）

A、丙酮酸激酶    B、3-磷酸甘油醛脱氢酶

C、1,6-二磷酸果糖激酶    D、己糖激酶

5. 在TCA循环中，下列哪一个阶段发生了底物水平磷酸化？（ ）

A、柠檬酸 $\rightarrow$  $\alpha$ -酮戊二酸    B、 $\alpha$ -酮戊二酸 $\rightarrow$ 琥珀酸

C、琥珀酸 $\rightarrow$ 延胡索酸    D、延胡索酸 $\rightarrow$ 苹果酸

6. 丙酮酸脱羧酶系中最终接受底物脱下的2H的辅助因子是（ ）

A、FAD    B、CoA    C、 $\text{NAD}^+$     D、TPP

7. 草酰乙酸经转氨酶催化可转变成为（ ）

A、苯丙氨酸 B、天门冬氨酸 C、谷氨酸 D、丙氨酸

判断题：

1. 每分子葡萄糖经三羧酸循环产生的ATP分子数比糖酵解时产生的ATP多一倍。
2. 6-磷酸葡萄糖转变为1, 6-二磷酸果糖，需要磷酸己糖异构酶及磷酸果糖激酶催化。
3. 葡萄糖是生命活动的主要能源之一，酵解途径和三羧酸循环都是在线粒体内进行的。
4. 动物体内合成糖原时需要ADPG提供葡萄糖基。

### 作业题

1. 书中190页第二题。
2. 说明糖发酵生成乙醇的主要过程。
3. 说明三羧酸循环中的限速步骤。

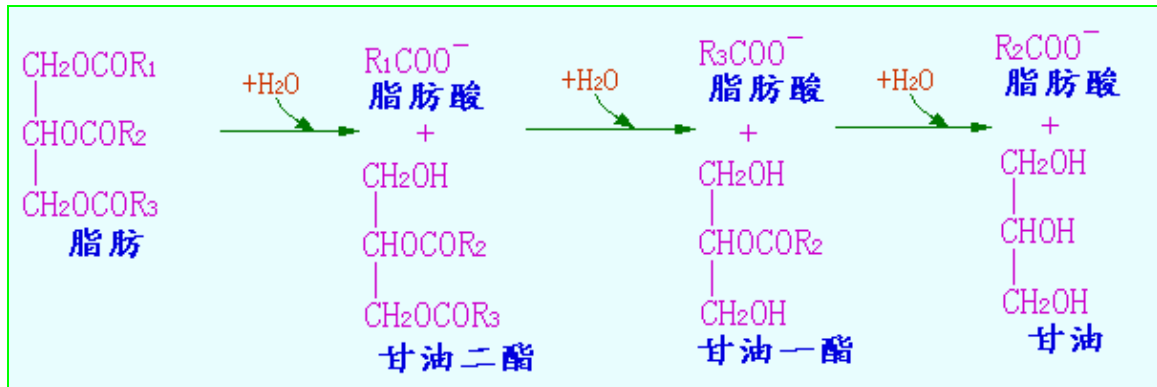
## 第十章 脂类代谢（4学时）

本章要求

1. 了解脂肪消化吸收过程；
2. 掌握脂肪酸的 $\beta$ -氧化过程及能量变化，了解脂肪酸的合成代谢；
3. 了解磷脂和固醇的代谢途径；
4. 了解脂类代谢在工业上的应用。

### 第一节 概述

#### 一、脂肪的降解



#### 1. 脂肪的消化

乳化：脂质与胆汁酸盐作用乳化。脂肪的消化主要在肠中进行，胰液和胆汁经胰管和胆管分泌到十二指肠。胰液中含有胰脂肪酶，能水解部分脂肪成为甘油及游离脂肪酸，但大部分脂肪仅局部水解成甘油一酯。

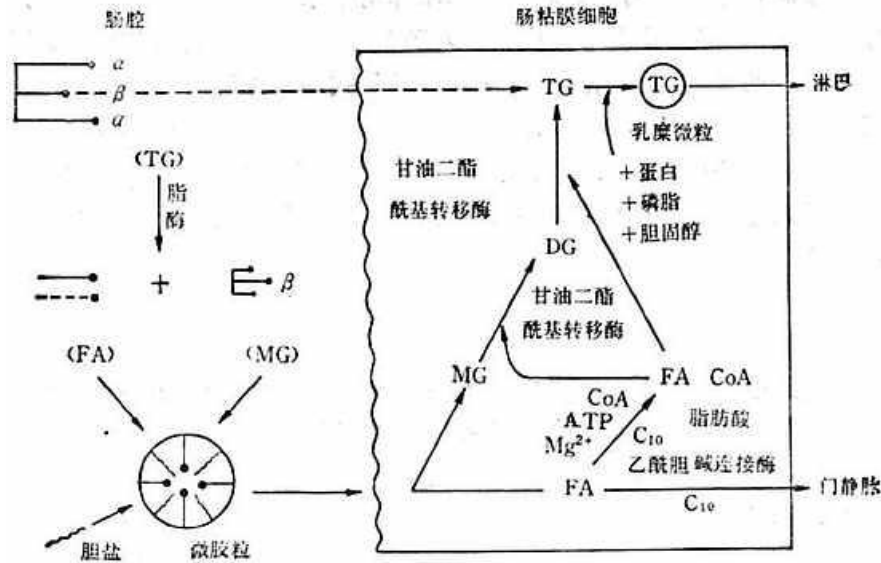
#### 2. 水解脂肪的酶：

酯酶：水解脂肪酸和一元醇组成的酯；

脂酶：非专一性水解酶，易于水解甘油酯的1位和3位的酯键，产物为甘油一酯和脂肪酸。

磷脂酶：水解磷脂，产生甘油、脂肪酸、磷酸、胆碱和胆胺等。

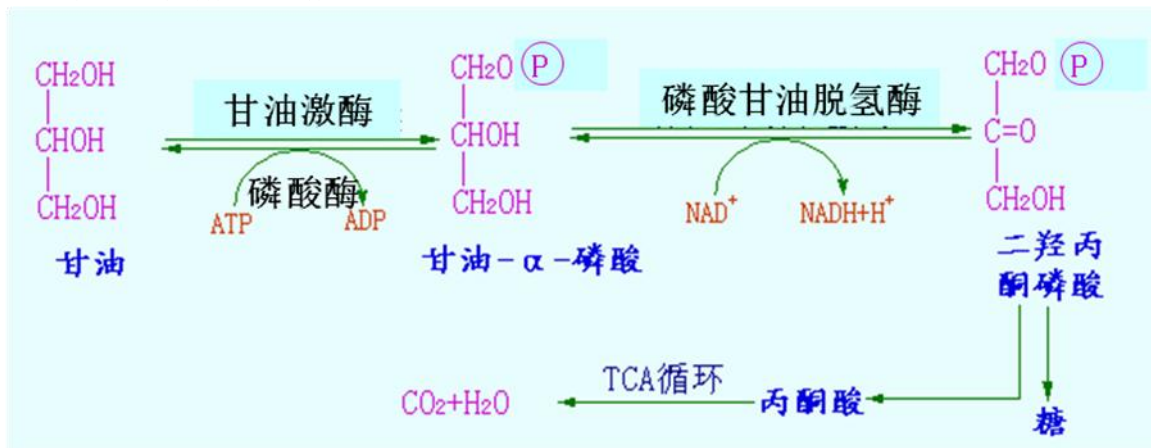
3. 吸收形态：甘油、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯、脂肪微粒等。



## 第二节 脂肪的代谢

### 一、甘油代谢

甘油的分解（肝脏）

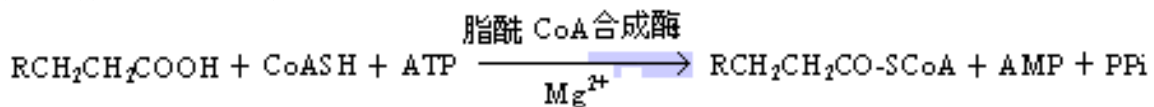


甘油的合成：为分解代谢的逆行。

### 二、脂肪酸的分解代谢

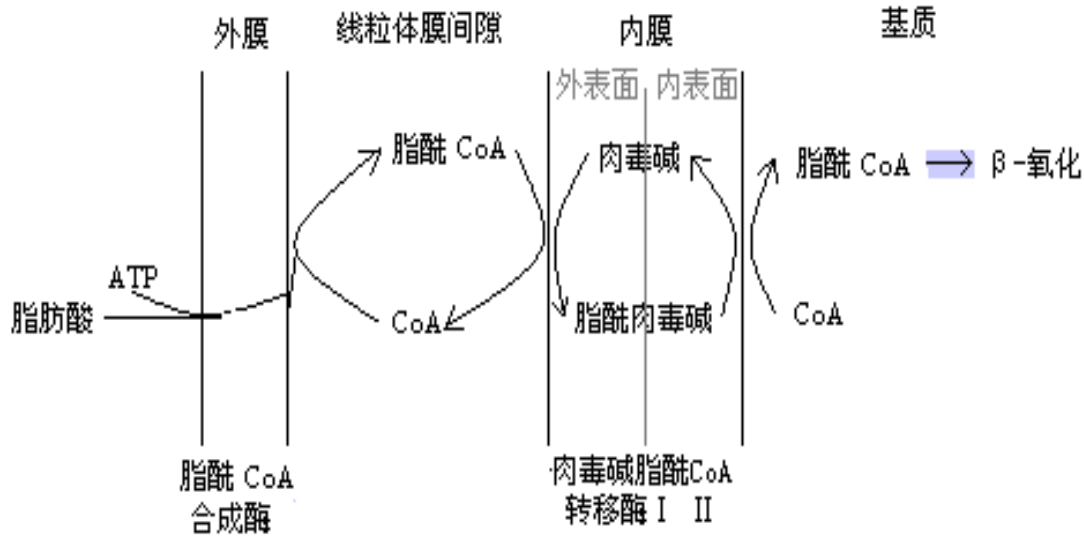
#### 1. $\beta$ -氧化——主要途径

(1) 脂肪酸的活化——脂酰CoA的生成：长链脂肪酸氧化前必须进行活化，活化在线粒体外进行。脂酰CoA合成酶在ATP、CoA-SH、Mg<sup>2+</sup>存在条件下，催化脂肪酸活化，生成脂酰CoA。



(2) 穿膜（脂酰CoA进入线粒体）

脂肪酸活化在细胞液中进行，而催化脂肪酸氧化的酶系是在线粒体基质内，因此活化的脂酰CoA必须进入线粒体内才能代谢。

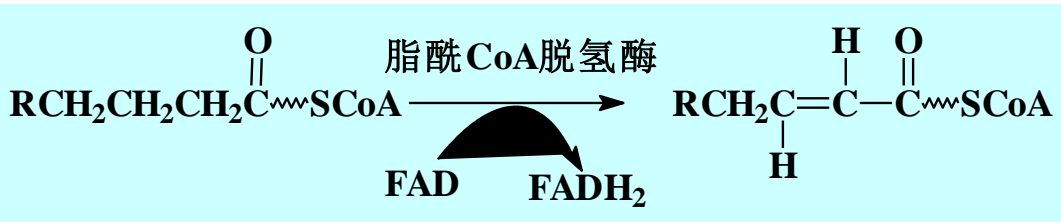


### (3) 脂肪酸的β 氧化

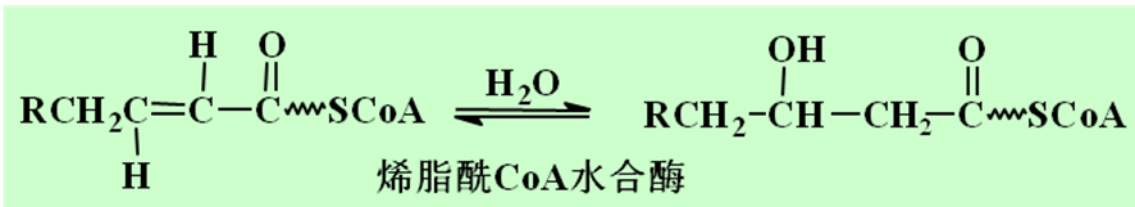
长链脂酰CoA的β -氧化是在线粒体脂肪酸氧化酶系作用下进行的，每次氧化断去二碳单位的乙酰CoA，再经TCA循环完全氧化成二氧化碳和水，并释放大量能量。偶数碳原子的脂肪酸β 氧化最终全部生成乙酰CoA。

脂酰CoA的β -氧化反应过程如下：

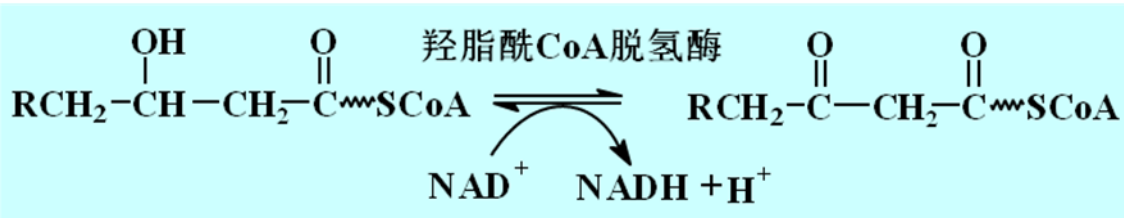
(1) 氧化：脂酰CoA经脂酰CoA脱氢酶催化，在其α 和β 碳原子上脱氢，生成Δ<sup>2</sup>反烯脂酰CoA，该脱氢反应的辅基为FAD。



(2) 水化：Δ<sup>2</sup>反烯脂酰CoA在烯脂酰CoA水合酶催化下，在双键上加水生成L-β -羟脂酰CoA。



(3) 再氧化：L-β -羟脂酰CoA在L-β -羟脂酰CoA脱氢酶催化下，脱去β 碳原子与羟基上的氢原子生成β -酮脂酰CoA，该反应的辅酶为NAD<sup>+</sup>。



(4) 硫解：在 $\beta$ -酮脂酰CoA硫解酶催化下， $\beta$ -酮脂酰CoA与CoA作用，硫解产生1分子乙酰CoA和比原来少两个碳原子的脂酰CoA。



总结：

脂肪酸 $\beta$ 氧化最终的产物为乙酰CoA、NADH和FADH<sub>2</sub>。

如碳原子数为n的脂肪酸进行 $\beta$ -氧化，需要(n/2-1)次循环完全分解为n/2个乙酰CoA，产生(n/2-1)个NADH和(n/2-1)个FADH<sub>2</sub>；生成的乙酰CoA通过TCA循环彻底氧化成二氧化碳和水并释放能量，而NADH和FADH<sub>2</sub>则通过呼吸链传递电子生成ATP。生成的ATP数量为：(n/2-1)×(2+3)+n/2×12-2

以软脂酸（16C）为例计算其完全氧化所生成的ATP分子数：

$$\left(\frac{16}{2}-1\right) \times (2+3) + \frac{16}{2} \times 12 - 2 = 129$$

## 2. 其它脂肪酸的氧化分解方式

奇数碳原子饱和脂肪酸的氧化，除了生成乙酰CoA外，还生成一分子的丙酰CoA。

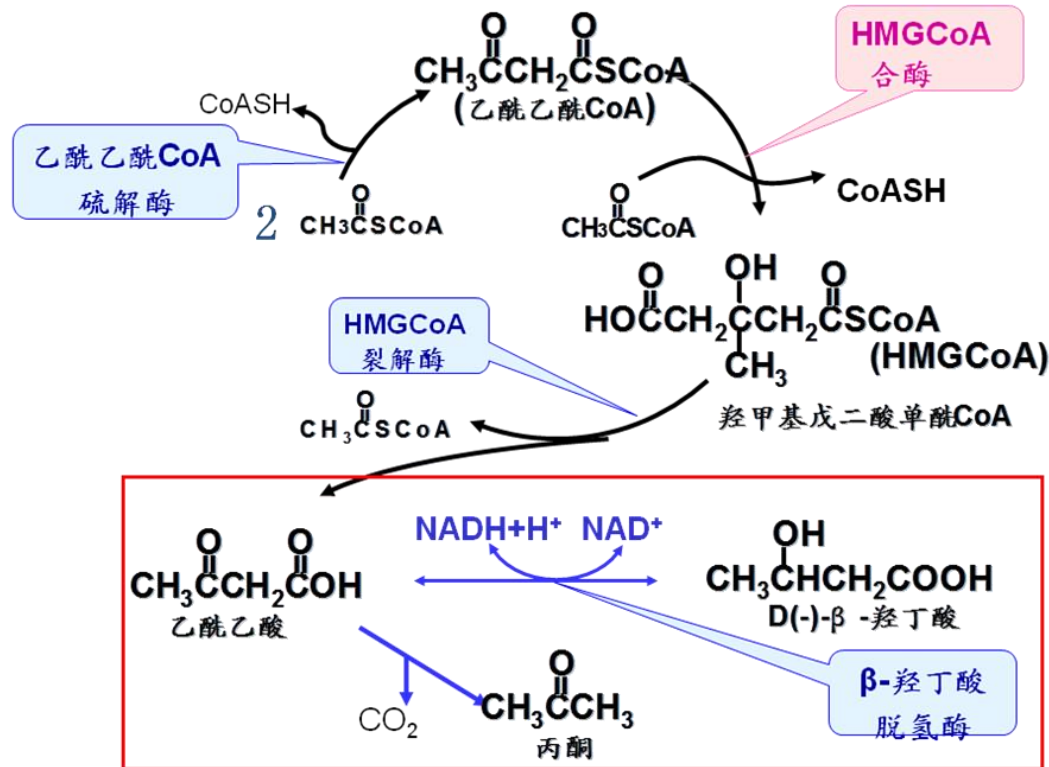
不饱和脂肪酸的氧化途径同饱和脂肪酸的氧化途径基本相同。差异在于含一个双键的不饱和脂肪酸还需要顺-反烯脂酰CoA异构酶将不饱和脂肪酸分解产物中的顺式结构中间产物变为反式结构。

含一个以上双键的脂肪酸除需要顺-反异构酶外，还需要 $\beta$ -羟脂酰-CoA立体异构酶将中间产物中的D- $\beta$ -羟脂酰CoA转变成L- $\beta$ -羟脂酰CoA，才可按照 $\beta$ -氧化途径进行氧化。

## 3. 酮体的生成和利用

酮体是乙酰乙酸、 $\beta$ -羟丁酸及丙酮三种物质的统称。部位：肝脏；原料：乙酰CoA；区域：线粒体。酮体生成后迅速透过肝线粒体膜和细胞膜进入血液，转运至肝外组织利用。

### (1) 酮体的生成



### (3) 酮体代谢的生理意义

酮体是脂肪酸在肝脏代谢的正常中间产物。酮体也是机体在饥饿状态下肝为脑等组织提供的能源物质。在饥饿、糖尿病、高脂低糖膳食时，酮体生成增加，超过肝外组织利用酮体的能力时，导致血中酮体含量异常升高，称为酮血症。此时尿中也可出现大量酮体，称为酮尿症。

## 三、脂肪的合成代谢

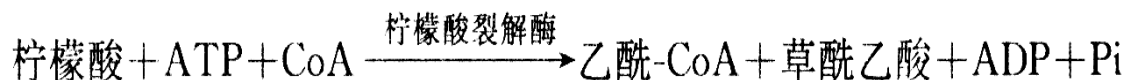
### 1. 脂肪酸的生物合成

脂肪酸合成的碳源主要来自糖酵解产生的乙酰CoA。脂肪酸的生物合成是在细胞液中进行，需要 $\text{CO}_2$ 和柠檬酸参加；而氧化降解是在线粒体中进行的。

分为两条途径：细胞液酶系合成饱和脂肪酸途径（丙二酸单酰CoA途径）；饱和脂肪酸碳链延长途径。

#### (1) 丙二酸单酰CoA途径

乙酰CoA的跨膜转移：在线粒体内，丙酮酸被氧化脱羧生成乙酰CoA。乙酰CoA在线粒体内可与草酰乙酸结合成柠檬酸，柠檬酸可以透过线粒体膜进入细胞液：



由乙酰-CoA起，经缩合、还原、脱水、再还原几个反应步骤，便生成含4个碳原子的丁酰基。总反应是：









和H<sub>2</sub>O产生的ATP摩尔数。

## 第十一章 核酸代谢 (3学时)

本章要求

- 1.掌握嘌呤环和嘧啶环上各个原子的来源;
- 2.了解嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸从头合成的过程以及最初产物,二者合成途径的差异;
- 3.了解核苷酸补救合成途径的重要意义;
- 4.了解核苷酸的分解代谢过程。
- 5.掌握 DNA 复制、RNA 转录机制。

### 第一节 核酸代谢

#### 一、核酸的酶促降解

1.核酸酶(nuclease): 降解核酸中的磷酸二酯键的酶。

分类:

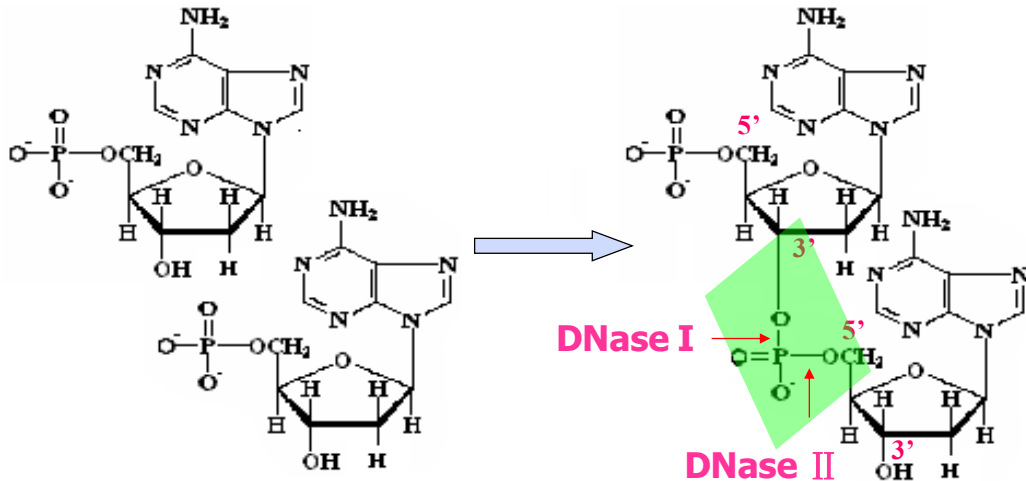
按照底物: 脱氧核糖核酸酶(DNase)

核糖核酸酶(RNase);

按照作用方式: 核酸外切酶 (exonuclease)

核酸内切酶 (endonuclease)

(1) 脱氧核糖核酸酶(DNase): 特异性水解DNA和切断磷酸二酯键的酶类。



### 3',5'-磷酸二酯键

限制性内切酶: 只作用于双链DNA, 只在特定核苷酸序列处切开核苷酸之间的连接键。

(2) 核糖核酸酶(RNase)

切断RNA中的磷酸二酯键的内切酶。

**RNase I:** 特异性作用于RNA中嘧啶核苷酸的C-3'位磷酸与其相邻核苷酸C-5'位所形成的磷酸酯键。

RNase T<sub>1</sub>: 特异性作用于鸟嘌呤核苷酸的C-3'位磷酸与其相邻核苷酸C-5'位所形成的磷酸酯键。

RNase U<sub>2</sub>: 特异性作用于嘌呤核苷酸的C-3'位磷酸与其相邻核苷酸C-5'位所形成的磷酸酯键。

## 二、核苷酸分解代谢

### 1. 核苷酸的分解

由核苷酸酶催化，水解为核苷及无机磷酸。非特异性的核苷酸酶，能作用于一切核苷酸。而特异性强的核苷酸酶只能水解3'-核苷酸或5'-核苷酸。

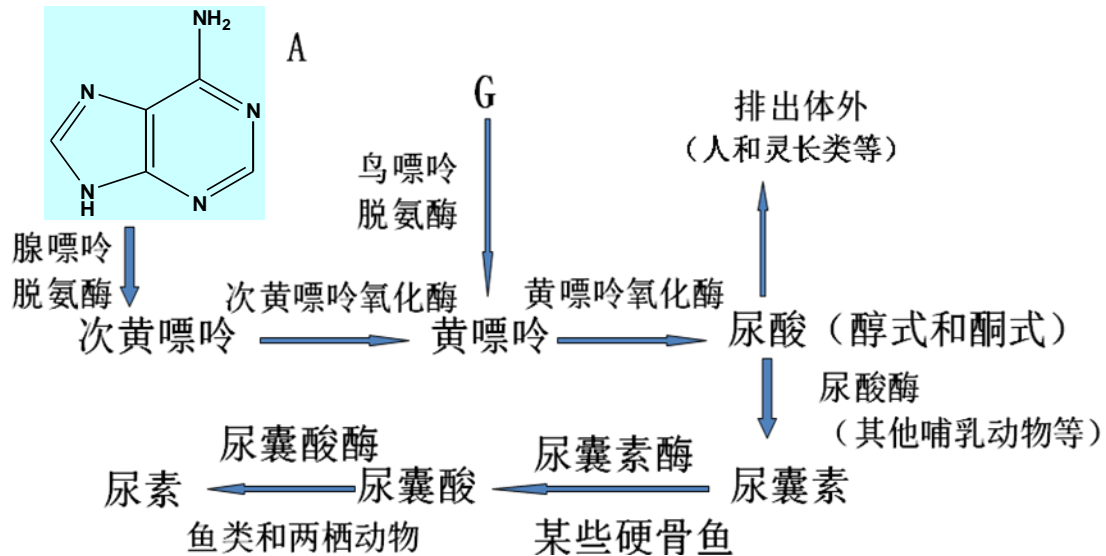
### 2. 核苷的分解

核苷经核苷酶(nucleosidase)作用分解为嘌呤碱或嘧啶碱和戊糖。分解核苷的酶有两类：

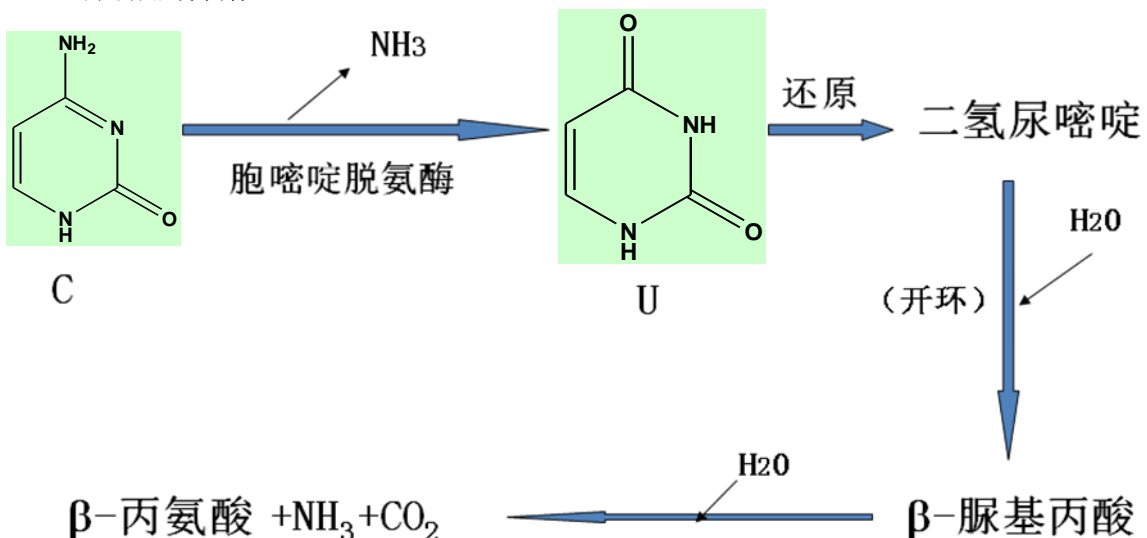
①核苷磷酸化酶：催化可逆反应。

②核苷水解酶：只作用于核糖核苷，催化反应不可逆。

### 3. 嘌呤碱的分解



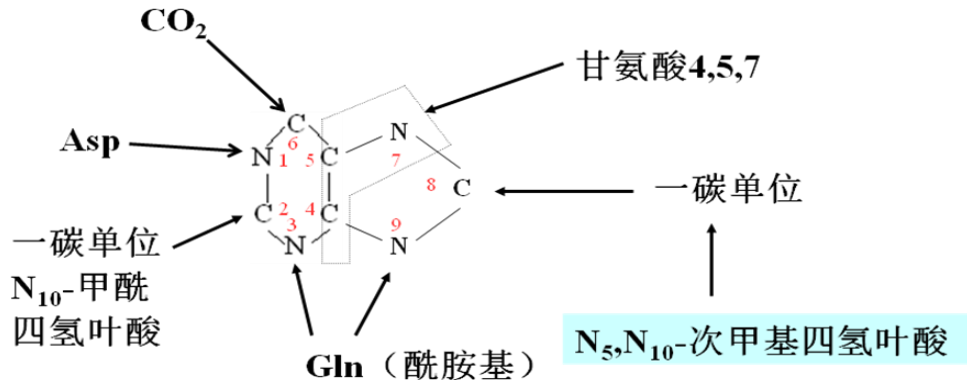
### 4. 嘧啶碱的分解



T的分解产物是NH<sub>3</sub>、CO<sub>2</sub>和β-氨基异丁酸。

### 三、核苷酸的合成代谢

#### 1. 嘌呤核苷酸的合成

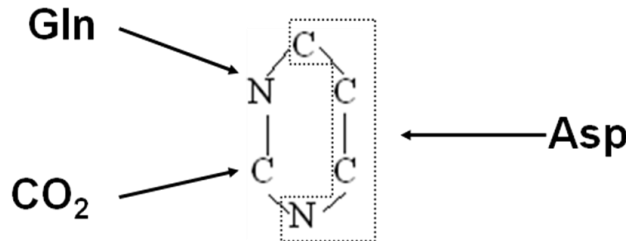


不是先合成嘌呤环，而是核糖与磷酸先合成磷酸核糖，然后逐步由谷氨酰胺、甘氨酸、一碳基团、CO<sub>2</sub>及天冬氨酸掺入碳原子或氮原子形成嘌呤环。

特点：

- ①在PRPP的基础上，逐步加上简单原料而形成嘌呤核苷酸(11步反应)；
- ②IMP是重要的中间产物，AMP、GMP的前体。

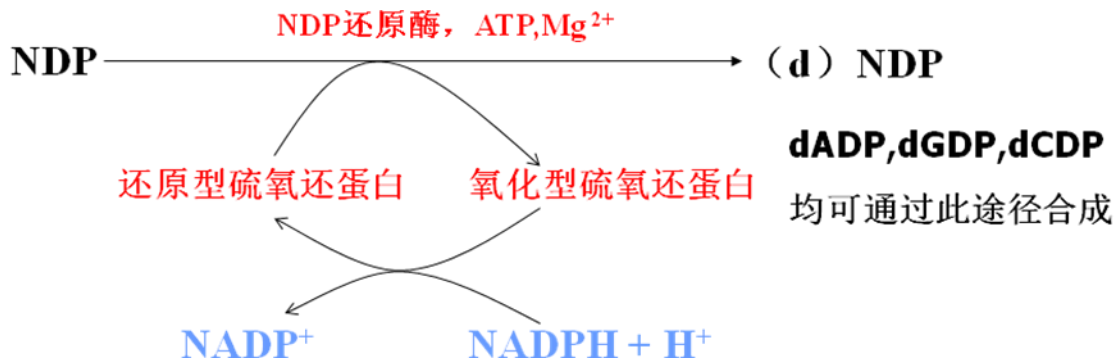
#### 2. 嘧啶核苷酸的合成



先利用小分子化合物合成嘧啶环，再与磷酸核糖结合成乳清酸核苷酸；先合成尿嘧啶和尿苷酸（UMP），再转化成其他嘧啶类核苷酸。

#### 3. 脱氧核糖核苷酸的合成

由核糖核苷酸还原得到；由核苷酸还原酶系催化，包括硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶、核糖核苷酸还原酶。通常核糖核苷酸的还原是在核糖核苷二磷酸水平进行；氢供体为NADPH。



胸腺嘧啶脱氧核糖核苷酸的合成包括两个步骤：由尿嘧啶核苷酸还原形成尿嘧

嘧啶脱氧核糖核苷酸；尿嘧啶环经甲基化转变成 dTMP。

## 第二节 DNA 的复制和 RNA 的转录

### 一、核酸与遗传信息的传递

#### 1. DNA 是基本遗传物质

有了一定结构的 DNA，才能产生一定结构的蛋白质，根据 DNA 的特定遗传密码产生的蛋白质就代表特定生物的遗传性。

在遗传过程中 DNA 的具体作用：

- (1) 在细胞分裂时按照自己的结构精确复制传给后代
- (2) 作为模板将所贮遗传信息传给 mRNA。

#### 2. 分子生物学的中心法则

复制：亲代DNA或RNA在一系列酶的作用下，生成与亲代相同的子代DNA或RNA的过程。

转录：以DNA为模板，按照碱基配对原则将其所含的遗传信息传给RNA，形成一条与DNA链互补的RNA的过程。

翻译：亦叫转译，以mRNA为模板，将mRNA的密码解读成蛋白质的氨基酸顺序的过程。

逆转录：以RNA为模板，在逆转录酶的作用下，生成DNA的过程。

### 二、与 DNA 复制有关的酶和蛋白质

原料：四种脱氧核苷三磷酸（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）；

模板：以 DNA 的两条链为模板链，合成子代 DNA。

引物：一小段 RNA(或 DNA) 为引物。

复制所需酶类：DNA 聚合酶、DNA 连接酶、旋转酶、解旋酶、引发酶、单链结合蛋白等。

#### 1. DNA 聚合酶

##### (1) 原核细胞 DNA 聚合酶

酶种类	作用
DNA 聚合酶 I	5'→3'聚合酶，且具有外切核酸酶作用，可校正/修复 DNA 链，还可切除引物
DNA 聚合酶 II	5'→3'聚合酶，且具有 3'→5'外切酶酶作用，可校正/修复 DNA 链
DNA 聚合酶 III	与酶 I 作用类似，酶活高，是主要的链延伸酶（聚合酶 replicase）

三种 DNA 聚合酶的功能：

DNA 聚合酶 III：真正的 DNA 复制酶，在模板 DNA 上从引物开始的新 DNA 链聚合是由它催化的。

DNA 聚合酶 I：填补引物去除后的空缺（修复功能）

DNA 聚合酶 II：与 DNA 聚合酶 I 一起行使作用或辅助聚合酶 I 的功能。

(2) 真核细胞 DNA 聚合酶：至少五种，命名为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 。

与复制相关的主要聚合酶是 DNA pol  $\alpha$  和 DNA pol  $\delta$ 。

2. DNA 连接酶：1967 年发现，若双链 DNA 中一条链有切口，一端是 3'-OH，另一端是 5'-磷酸基，连接酶可催化这两端形成磷酸二酯键，而使切口连接。但是它不能将两条游离的 DNA 单链连接起来。

细菌的 DNA 连接酶要求  $\text{NAD}^+$  作为辅酶；哺乳动物和噬菌体要求 ATP 作为辅酶。

3. 旋转酶与解旋酶——解除高级结构的酶

解旋酶：解开 DNA 双螺旋，使其成为单链；

DNA 旋转酶：即 DNA 拓扑异构酶，消除 DNA 的超螺旋。

4. 引发酶：催化 RNA 引物合成的 RNA 聚合酶；

5. 单链结合蛋白 (SSB)：一种能与单链 DNA 结合的特异蛋白，结合后 DNA 双链不能再形成双螺旋，让单链可以作为 DNA 合成的模板。

### 三、DNA 的复制方式

1. 半保留复制：

具体机制：

(1) 双螺旋拆分成两条单链；

(2) 分别以每条单链为模板，按照碱基互补配对的原则，在 DNA 聚合酶催化下，合成与模板 DNA 完全互补的新链，并形成两个新的 DNA 分子。

(3) 新的 DNA 分子与原来的 DNA 分子完全相同，子代的两条链中一条来自亲代 DNA 分子，另一条是新合成的，称为半保留复制。

2. 半不连续复制

DNA 两条链是反向平行的，但是 DNA 聚合酶 只能按 5'→3' 方向催化合成 DNA。在 DNA 复制过程中，前导链（以 3'→5' 为模板）能连续合成，而后续链（以 5'→3' 为模板）只能是断续的合成 5'→3' 的多个短片段，然后在 DNA 连接酶 作用下连成一条完整的新链。这些不连续的小片段以其发现者的名字命名为冈崎片段。这种前导链的连续合成和后续链的不连续合成，称为 DNA 的半不连续复制。

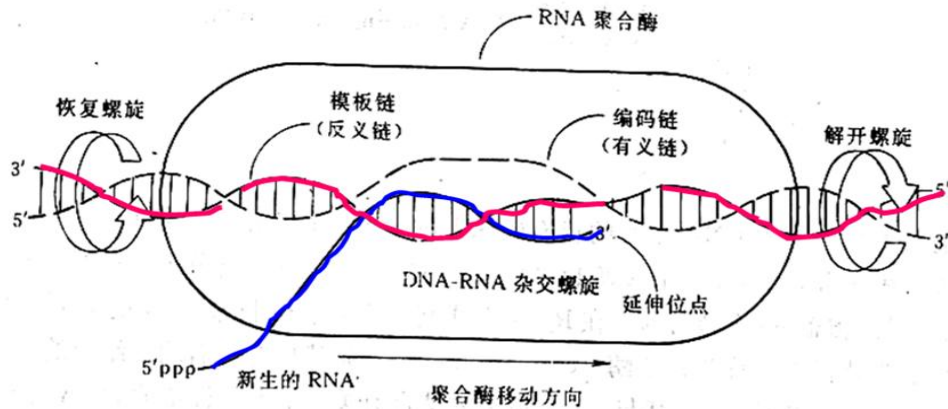
### 四、RNA 转录

RNA 在传递遗传信息上的作用：

mRNA 是蛋白质合成的模板；

tRNA 识别 mRNA 上的遗传密码，转运特定氨基酸到核糖体上合成肽链；

rRNA是核糖体的主要成分，核糖体是蛋白质生物合成的场所。



### 本章小结

1. 核苷酸的水解、嘌呤碱和嘧啶碱的分解代谢；
2. 嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的合成过程以及脱氧核糖核苷酸的合成。
3. DNA 的复制过程；
4. RNA 的转录。

## 第十二章 蛋白质代谢 (5学时)

### 本章要求

1. 掌握一些主要的概念：转氨作用，氧化脱氨，联合脱氨作用、脱羧基作用、鸟氨酸循环、生酮和生糖氨基酸、一碳单位等；
2. 理解并掌握鸟氨酸循环发生的部位，循环中的各步酶促反应，尿素氮的来源；
3. 了解氨基酸碳骨架的氧化途径，特别是与代谢中心途径（糖酵解和柠檬酸循环）的关系；
4. 理解并掌握蛋白质生物合成的过程。

### 第一节 蛋白质的消化和吸收

蛋白质本身不能被生物体直接吸收，必须经过消化降解成氨基酸后才能被生物体吸收利用。消化从胃开始，胃蛋白酶将其水解成相对分子质量较小的多肽；然后进入肠道被胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶(内肽酶)、羧肽酶(外肽酶)和二肽酶(小肠黏膜细胞的刷状缘及胞液)等水解为氨基酸。



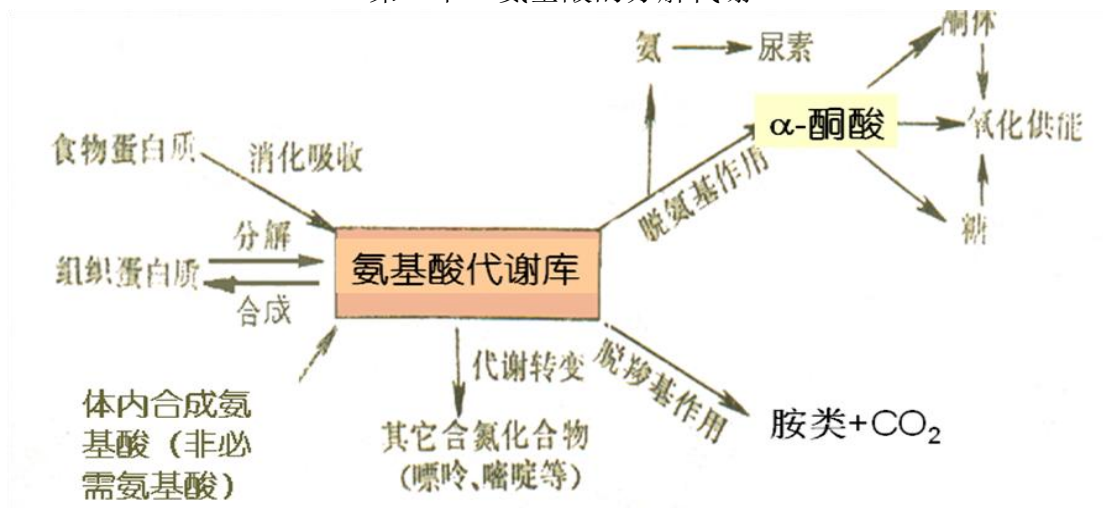
## 蛋白水解酶作用的专一性

酶	专一性	
肽链内切酶:		
胃蛋白酶	$R_4 = \text{Trp, Phe}$	$R_3 = \text{任何氨基酸残基}$
胰蛋白酶	$R_3 = \text{Arg, Lys}$	$R_4 = \text{任何氨基酸残基}$
胰凝乳蛋白酶	$R_3 = \text{Phe, Tyr, Trp}$	$R_4 = \text{任何氨基酸残基}$
弹性蛋白酶	$R_3 = \text{脂肪族氨基酸残基}$	$R_4 = \text{任何氨基酸残基}$
肽链外切酶:		
氨基肽酶	$R_1 = \text{任何氨基酸残基}$	$R_2 = \text{除 Pro 外任何氨基酸残基}$
羧基肽酶 A	$R_5 = \text{任何氨基酸残基}$	$R_6 = \text{除 Arg, Lys, Pro 外任何氨基酸残基}$
羧基肽酶 B	$R_5 = \text{任何氨基酸残基}$	$R_6 = \text{Arg, Lys}$

氨基酸的营养学意义:

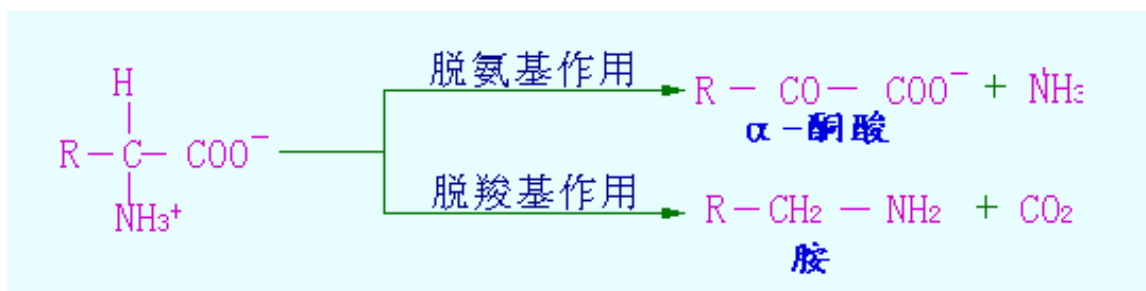
8种必需氨基酸: Lys, Trp, Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe; 对于发育的儿童还有His、Arg。蛋白质的营养价值: 取决于必需氨基酸的种类、含量及其比例是否与人体的需要接近。动物性蛋白>植物性蛋白质。

### 第二节 氨基酸的分解代谢



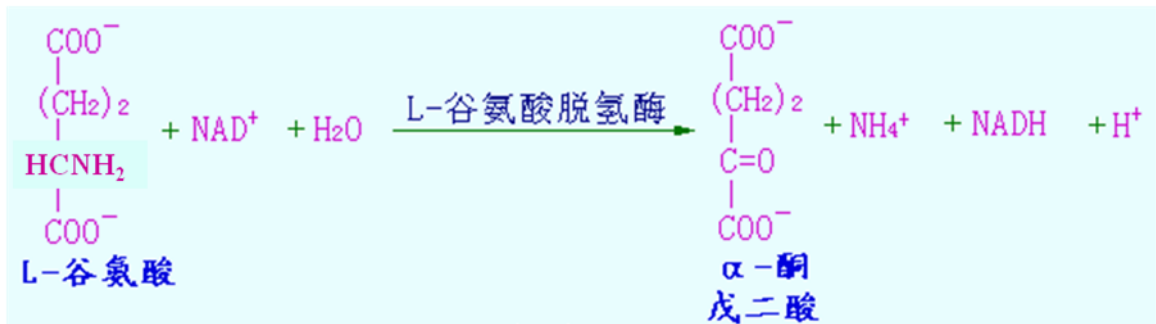
## 氨基酸在体内的代谢变化

### 一、氨基酸分解代谢的共同途径



#### 1. 脱氨基作用

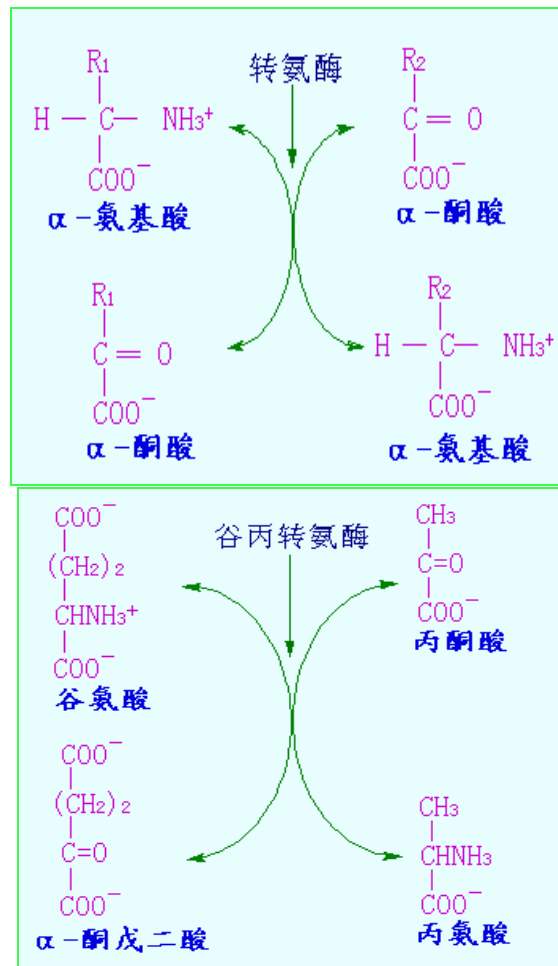
(1) 氧化脱氨基作用  
氨基酸脱氢酶（不需氧）



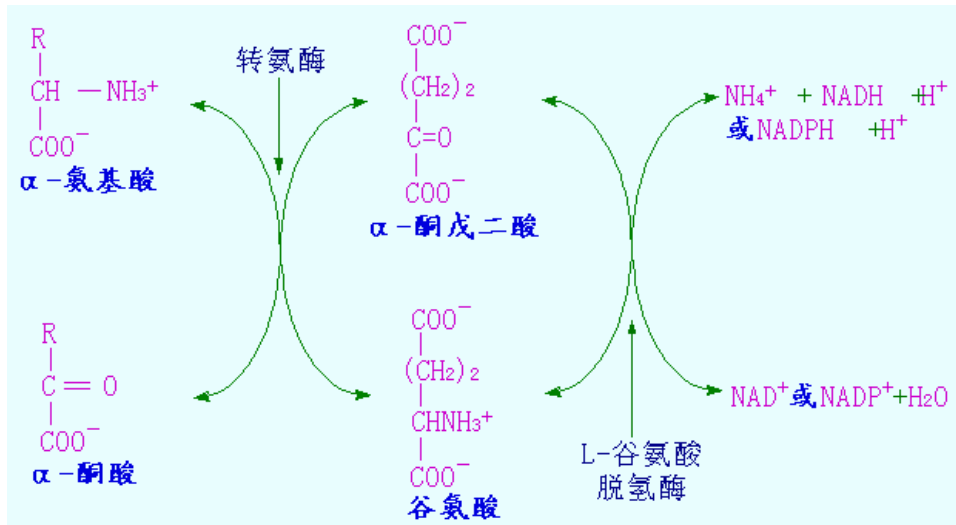
氨基酸氧化酶（需氧）

氨基酸在氧化酶作用下，脱氢形成亚氨基酸，后者再通过加水水解生成  $\alpha$ -酮酸和氨。生物体内分布较少，而且活性低。

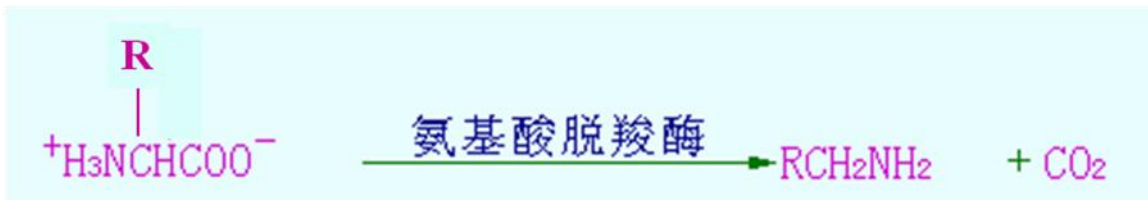
(2) 转氨基作用：为氨基酸生物合成的重要途径；辅酶：磷酸吡哆醛；血液谷丙转氨酶的活性是肝炎病人诊断的重要指标



(3) 联合脱氨基作用：转氨和氧化脱氨联合作用



## 2. 脱羧基作用

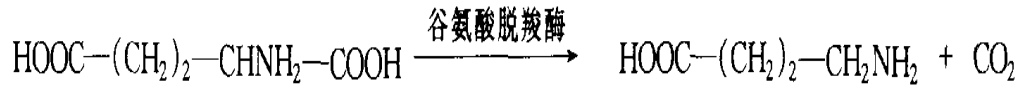


组胺：降低血压、扩张血管、引起支气管痉挛等作用；

$\gamma$ -氨基丁酸：对中枢神经系统有抑制作用；

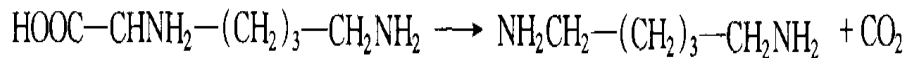
5-羟色胺：促进微血管收缩，增高血压等；

产生的胺类一般都有毒性，可被胺氧化酶氧化分解生成醛和氨，进而参与代谢。



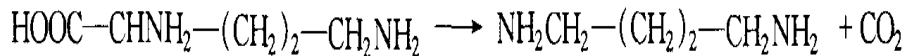
谷氨酸

$\gamma$ -氨基丁酸



赖氨酸

戊二胺(尸胺)



鸟氨酸

丁二胺(腐胺)

## 3. 氨基酸降解产物的进一步代谢

1).  $\text{NH}_3$ ：转变成无毒物质后通过血液输送至肝

A. 丙氨酸-葡萄糖循环（肌肉细胞）

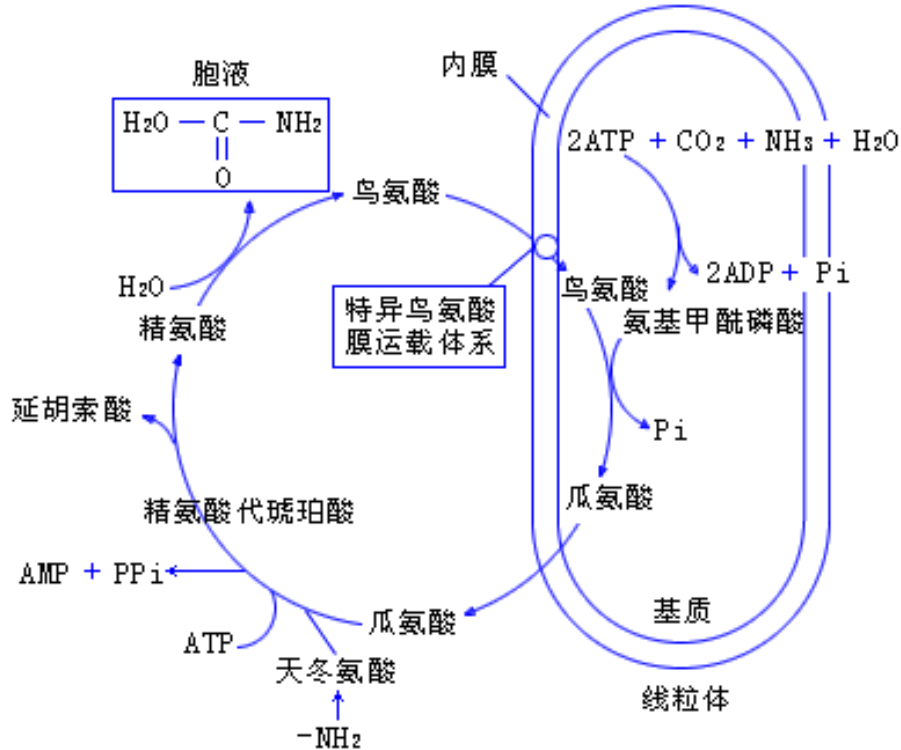
B. 成酰胺（脑、肌肉等组织）：既是生物体贮藏和运输氨的主要方式，也是解除氨毒的一条主要途径。

C. 生成尿素排泄（鸟氨酸循环）

总反应：

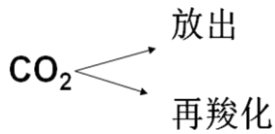


尿素易溶于水，毒性较小，在动物肝脏中形成后，即随尿排出体外。

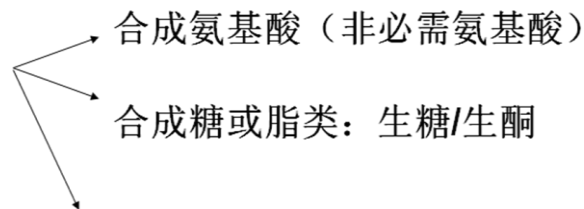


3. 氨基酸降解产物的进一步代谢

2)



3) R-CO-COOH



氧化供能：TCA, ATP

氨基酸的具体代谢途径：

氨基酸 → 丙酮酸

丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、色氨酸、苏氨酸

氨基酸 → 草酰乙酸

天冬氨酸和天冬酰胺，天冬氨酸转氨基作用（谷草转氨酶）生成草酰乙酸；

氨基酸 →  $\alpha$ -酮戊二酸

谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、精氨酸、组氨酸。

氨基酸 → 琥珀酰CoA

缬氨酸、甲硫氨酸、异亮氨酸、苏氨酸

氨基酸 → 延胡索酸

苯丙氨酸和酪氨酸

氨基酸 → 乙酰乙酰CoA

酪氨酸、亮氨酸、赖氨酸、色氨酸和苯丙氨酸

氨基酸 → 乙酰CoA

亮氨酸、色氨酸、异亮氨酸

转变为糖及脂肪：生糖氨基酸和生酮氨基酸：

生糖氨基酸	生酮氨基酸	生糖兼生酮
Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Pro, Val, Met, Ser, Gln, Asn, Thr	Leu, Lys	Phe, Tyr, Ile, Trp

### 第三节 蛋白质的生物合成

#### 1. mRNA与遗传密码

遗传密码实际上是指mRNA中的核苷酸排列顺序与蛋白质中的氨基酸排列顺序的关系。

一个三联体密码（密码子）决定着一个氨基酸。mRNA中共有64种密码子，只有61个密码子编码20种氨基酸。AUG既是Met的密码，也是“起始”密码。UAA、UAG、UGA是终止密码。

遗传密码子的特点：

- 1) 通用性：绝大多数密码子对各种生物都适用，某些线粒体中遗传密码有例外。
- 2) 简并性(degeneracy)：几种密码子对应于同一种氨基酸。这些密码子为同义密码子。
- 3) 无标点、不重叠：每个三联体中的三个核苷酸只编码一个氨基酸，核苷酸不重叠使用。
- 4) 无间隔性 密码子是连续的，阅读时从起始密码开始到终止密码为止。
- 5) 方向性 密码子的阅读方向是从mRNA的5'→3'。
- 6) 起始密码的兼职性

#### 2. 核糖体

1) 核糖体是蛋白质合成的部位

2) 核糖体的组成和结构：总体结构相似

原核细胞的核糖体：rRNA80%，蛋白质20%（大肠杆菌）；沉降系数70S，包

括30S和50S亚基；

真核细胞的核糖体：rRNA60%，蛋白质40%（肝细胞）；沉降系数80S，包括40S和60S亚基；

### 3) 核糖体的功能

核糖体30S亚基上有mRNA和起始tRNA复合物与30S亚基结合的位点

核糖体50S亚基上有两个tRNA结合位点：肽酰基-tRNA结合位（P位）和氨酰基-tRNA接受位（A位）。

### 3. tRNA 的结构和功能

tRNA 的主要作用是转运氨基酸用于合成蛋白质。tRNA 分子上与蛋白质合成有关的位点：3'端-CCA 上的氨基酸接受位点；识别氨酰-tRNA 合成酶的位点；核糖体识别位点，使延长中的肽链附着于核糖体上；反密码子位点。

### 4. 蛋白质生物合成过程

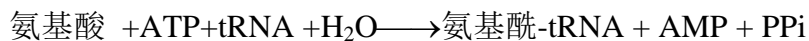
以mRNA为模板，氨基酸经活化获得的氨酰tRNA为原料，GTP、ATP供能，在核糖体中完成。

#### 1) 氨基酸的活化

tRNA 在氨酰-tRNA 合成酶的帮助下，识别相应氨基酸，通过 tRNA 氨基酸臂的 3'-OH 与氨基酸的羧基形成活化酯——氨酰-tRNA。两步反应过程：第一步是氨基酸与 ATP 作用，形成氨酰腺嘌呤核苷酸；第二步是氨酰基转移到 tRNA 的 3'-OH 端上，形成氨酰-tRNA。

氨基酸活化的总反应式是：

氨酰-tRNA 合成酶



每一种氨基酸至少有一种对应的氨酰-tRNA 合成酶。它既催化氨基酸与 ATP 的作用，也催化氨酰基转移到 tRNA。氨酰-tRNA 合成酶具有高度的专一性。tRNA 分子能接受相应的氨基酸，决定于它特有的碱基顺序，而这种碱基顺序能够被氨酰-tRNA 合成酶所识别。

#### 2) 在核糖体上合成肽链

氨酰-tRNA通过反密码臂上的三联体反密码子识别mRNA上相应的遗传密码，并将所携带的氨基酸按mRNA遗传密码的顺序安置在特定的位置，最后在核糖体中合成肽链。

#### 3) 肽链的合成过程（以原核细胞为例）：起始；延伸；终止与释放。

##### A. 肽链合成的起始：

起始密码的识别，辨认出 mRNA 链上的起始点（AUG），核糖体小亚基(30S)和 mRNA 的 SD 序列结合；N-甲酰甲硫氨酸-tRNA 的活化并形成起始复合物。

##### B. 肽链的延长：

进位（氨酰 tRNA 进入 A 位点），参与因子包括延长因子 EF-Tu（Tu）、EF-Ts

(Ts)、GTP、氨酰 tRNA

肽链的形成：肽酰基从 P 位点转移到 A 位点，形成新的肽链。

移位 (translocase)：在移位因子 EF-G (移位酶) 的作用下，核糖体沿 mRNA (5'-3') 作相对移动，使原来在 A 位点的肽酰-tRNA 回到 P 位点。

C. 肽链合成的终止与释放：

识别 mRNA 的终止密码子，水解所合成肽链与 tRNA 间的酯键，释放肽链。RF-1 识别 UAA、UAG；RF-2 识别 UAA、UGA；RF-3 能促进结合；RF 帮助 P 位点的 tRNA 残基脱落，而后核糖体脱落。

4) 多聚核糖体：一条 mRNA 链上结合着多个核糖体。多核糖体可以在一条 mRNA 链上同时合成多条相同的多肽链。

5. 真核细胞蛋白质合成的特点

核糖体为 80S，由 60S 大亚基和 40S 小亚基组成；起始密码 AUG；起始 tRNA 为 Met-tRNA；起始复合物结合在 mRNA 5' 端 AUG 上游的帽子结构，真核 mRNA 无富含嘌呤的 SD 序列 (除某些病毒 mRNA 外)；已发现的真核起始因子有 10 多个 (eIF)，肽链延伸因子 (eEF-1A, eEF-1B, eEF-2) 及释放因子 (eRF1)

#### 蛋白质合成过程小结

1. 肽链合成方向 N→C (同位素证明)
2. 以 mRNA 的 5'-3' 方向阅读遗传密码；
3. 该合成过程是一个耗能过程。

6. 肽链合成后的“加工处理”——后修饰

- (1) N 端改造：fMet 的切除
- (2) 氨基酸的修饰/改造：肽链内或链间二硫键的形成、乙酰化、甲基化、羟化等。
- (3) 糖基化：糖蛋白中 Asn、Ser、Thr 侧链连接上多糖。
- (4) 某些多肽要经特殊的酶切一段肽链后才有生物活性(如：胰岛素原变成胰岛素)
- (5) 高级结构的形成：折叠盘曲形成空间结构。

#### 本章小结

1. 蛋白质消化酶类
2. 氨基酸的代谢途径：脱羧和脱氨
3. 氨的代谢：生成尿素
4. 生酮和生糖氨基酸，与三羧酸循环的联系
5. 蛋白质的生物合成

#### 练习题

- 胰蛋白酶的作用点是  
A、精氨酰—X      B、苯丙氨酰—X  
C、天冬氨酰—X      D、X-精氨酸
- 不出现于蛋白质中的氨基酸是  
A. 半胱氨酸 B.组氨酸 C.瓜氨酸 D.精氨酸
- 合成糖原的活性葡萄糖形式是  
A.葡萄糖      B.G-6-P      C.G-1-P      D.UDPG
- 体内氨基酸脱氨的主要方式是  
A. 氧化脱氨 B.还原脱氨 C.转氨基 D.联合脱氨 E.直接脱氨
- 磷酸戊糖途径的真正意义在于产生( )的同时产生许多中间物如核糖等。  
A、NADPH+H<sup>+</sup> B、NAD<sup>+</sup> C、ADP D、CoASH
- 糖异生途径中哪一种酶代替糖酵解的己糖激酶？  
A、丙酮酸羧化酶      B、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶  
C、葡萄糖-6-磷酸酶      D、磷酸化酶
- 下述氨基酸除哪种外，都是生糖氨基酸或生糖兼生酮氨基酸？（ ）  
A、Asp      B、Arg      C、Leu      D、Phe
- 嘌呤环中第4位和第5位碳原子来自下列哪种化合物？（ ）  
A、甘氨酸      B、天冬氨酸      C、丙氨酸      D、谷氨酸
- 嘌呤核苷酸的嘌呤核上第1位N原子来自（ ）  
A、Gly      B、Gln      C、Asp      D、甲酸

### 第十三章 代谢的调节控制（4学时）

本章要求：

- 了解不同代谢途径之间的关系；
- 掌握酶活性和酶合成的调节机制；
- 理解激素和神经对代谢途径的调控。

#### 第一节 生物体内的代谢调控模式

代谢调节是生物在长期进化过程中，为适应外界条件而形成的一种复杂的生理机能。

代谢调控作用可在不同水平上进行：

- 神经系统的调控：作用短而快，具有整体性，协调全部代谢。
- 体液激素的调控：作用缓慢而持久，局部性作用，协调组织与组织间、器官与器官间的代谢。
- 细胞内的调控：酶的调节。

#### 一、神经系统的调控

神经系统的作用短而快，激素的作用缓慢而持久；激素调节是局部的，神经系统的调节具有整体性。

- 直接调节——神经兴奋的快速作用



某些特殊情况（应激、情绪紧张等）

## 2. 间接调节——神经体液的调节作用

(1) 神经系统直接调节下的内分泌系统：如肾上腺素、胰岛素、前列腺素等的分泌。

(2) 神经系统通过脑下垂体控制下的内分泌调节系统：如甲状腺素、性激素、胰高血糖素等的分泌。

## 二、体液激素的调控

1. 激素：由动植物分泌、含量很低、在体内协调组织与组织之间或器官与器官之间代谢平衡的一类活性物质。

### 2. 动物激素分类：

(1) 含氮激素：蛋白质（生长素、胰岛素等）；多肽（加压素、催产素等）；氨基酸衍生物（甲状腺素）

(2) 类固醇激素：肾上腺皮质激素、性激素等；

(3) 脂肪酸衍生物激素：前列腺素等。

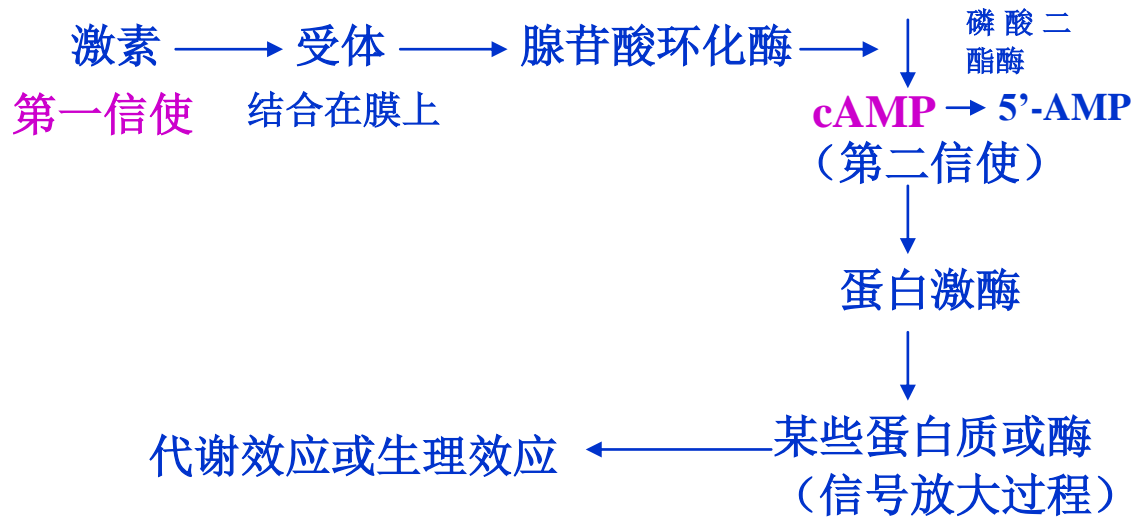
(4) 蛋白质激素的作用机制——第二信使学说

中枢神经系统通过神经网络将信号传递给内分泌系统，再由内分泌系统合成化学信息物质——激素（第一信使）。激素不能直接进入细胞内部。

细胞表面受体接受细胞外信号后转换而来的细胞内信号称为第二信使。它通过与代谢酶的作用对代谢过程起调控作用。

主要的第二信使：cAMP、cGMP、Ca<sup>2+</sup>、IP<sub>3</sub>（三磷酸肌醇）和 DG（二酰甘油）等。

氨基酸、多肽和蛋白质类激素的作用机制相似



## 三、细胞内的调控

细胞内酶的调节是最基本的调节方式。酶的调节是从酶的区域定位、酶的活性和酶的数量三个方面对代谢进行调节的。

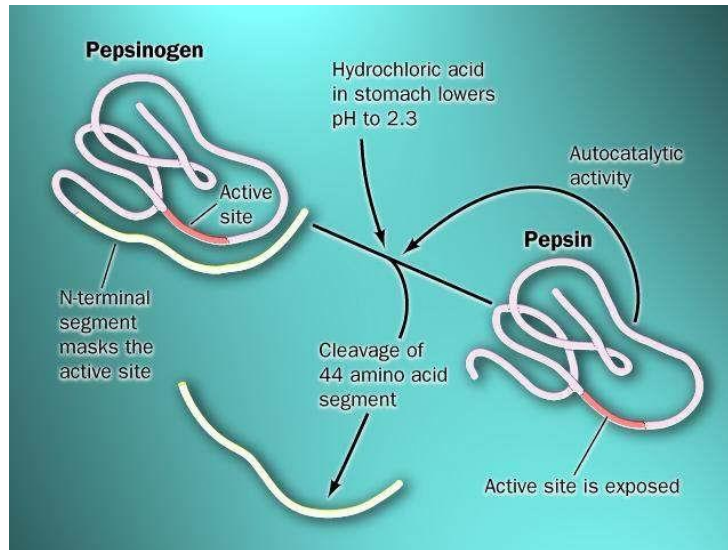
### 1. 区域定位的调节——不同酶分布于细胞的不同部位

某些调节因素可以较专一地影响某一细胞组分中的酶活性，并不影响其它组分的酶活性。

## 2. 酶活性的调节——酶结构的变化改变酶活性

酶原激活；酶的化学修饰；酶分子的聚合和解聚；酶的构象变化（变构调节）。

### 1. 酶原激活



胃蛋白酶原激活

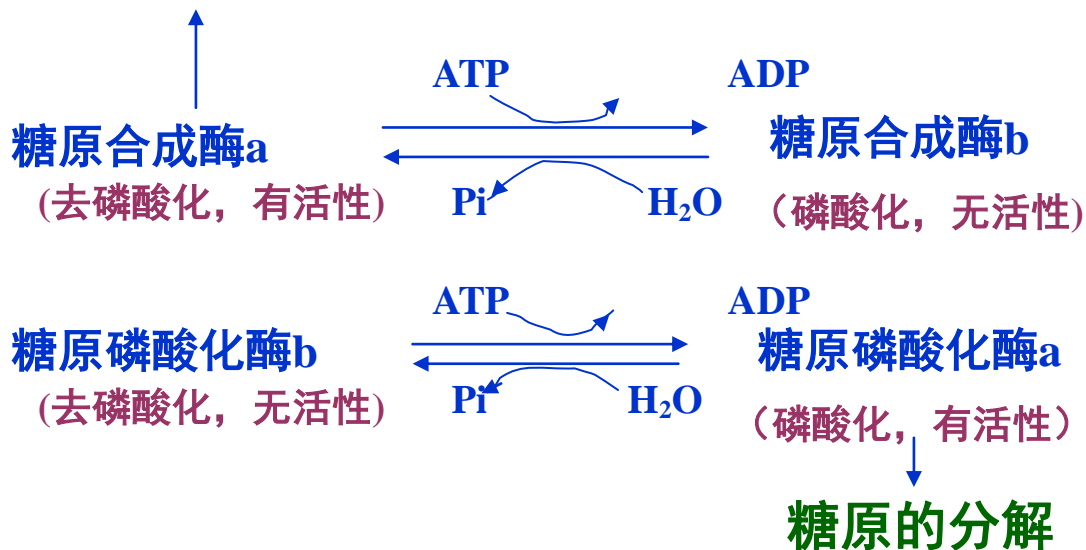
### 2. 酶的化学修饰（共价修饰）

指有些酶在它的某些氨基酸残基上连接一定化学基团或者去掉一定化学基团，从而实现酶的活性态与非活性态的相互转变。共价修饰的类型：

磷酸化/去磷酸化（主要存在于高等动、植物细胞）、腺苷酰化/去腺苷酰化（主要存在细菌中）、乙酰化/去乙酰化、尿苷酰化/去尿苷酰化、甲基化/去甲基化、S-S/S<sub>H</sub>。

### 3. 糖原磷酸化酶和糖原合成酶活性的调节

## 糖原的合成

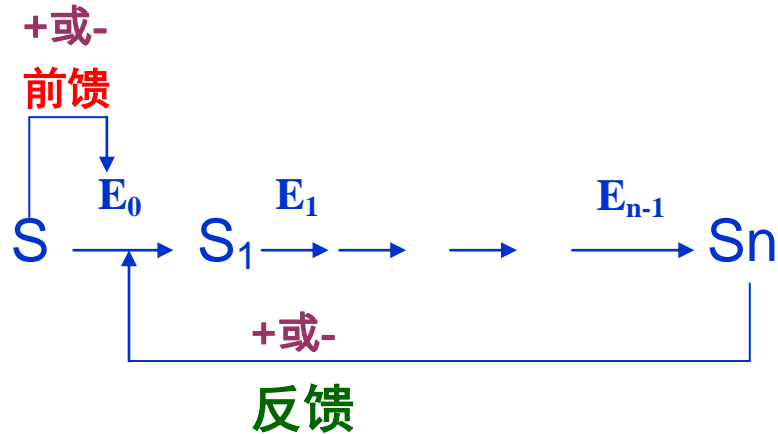


### 3. 酶量的调节——基因的诱导与阻遏

#### 第二节 反馈调节

正作用：凡反应物能使代谢过程速度加快者称为正作用。

负作用：凡反应物能使代谢过程速度变慢者称为负作用。



(1) 前馈作用：在代谢途径中前面的底物对其后某一催化反应的酶有调节作用。

①前馈激活 (feedforward activation)

②前馈抑制(feedforward inhibition): 不多见

(2) 反馈作用 (feedback)：代谢产物对前面的某一个酶有调节作用。

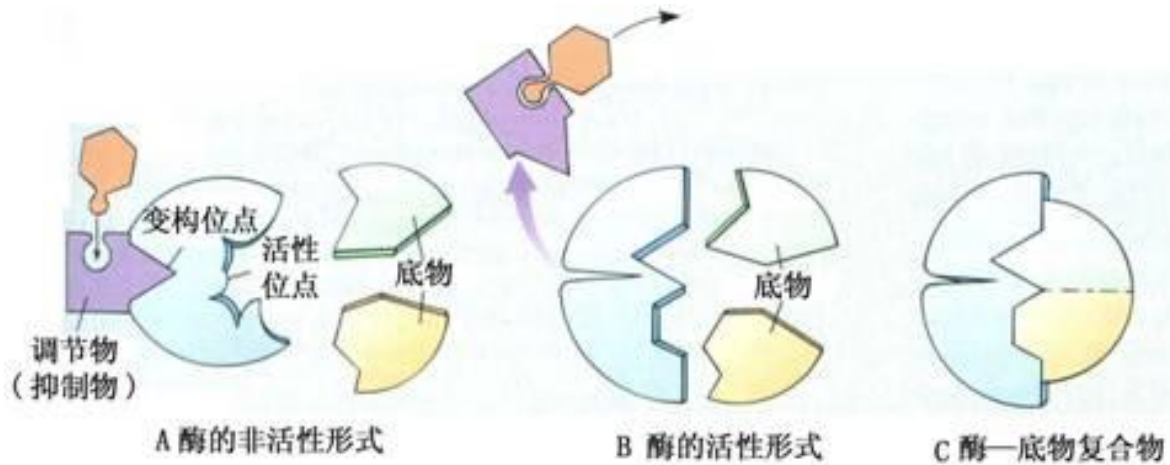
①反馈激活 (feedback activation)

②反馈抑制 (feedback inhibition)：细胞内存在较多

变构酶调节——反馈的普遍机制

变构酶：通过构象的变化来改变酶的活性；

酶分子上具有底物结合部位（催化部位）和产物结合部位（调节部位）。



#### 第三节 诱导与阻遏——酶量的调节

一、为酶蛋白编码的DNA包含三个区域：

1. 结构基因：酶蛋白的氨基酸顺序编码

- 2. 操纵基因：控制结构基因转录开始或停止，可与阻遏蛋白结合
- 3. 调节基因：对整个转录过程起着调控作用。由调节基因转录和翻译产生的蛋白称为阻遏蛋白。

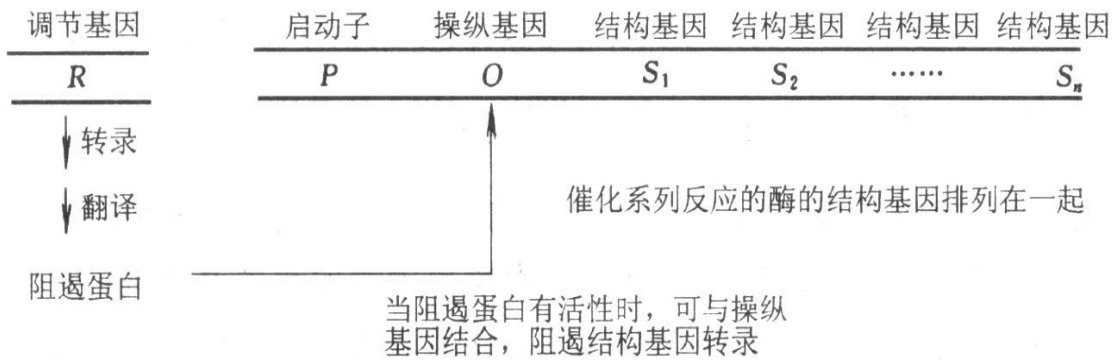
阻遏蛋白有一个特殊部位可与操纵基因结合，使基因转录不能进行。另一个特殊部位可与某种小分子物质结合，引起阻遏蛋白构象的变化。

诱导物：不利于阻遏蛋白与操纵基因结合，通常是酶底物；

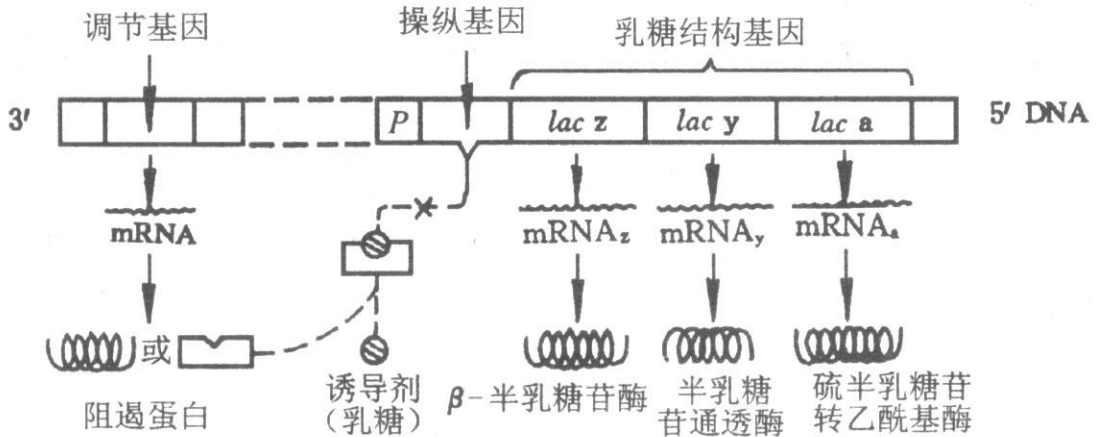
共阻遏物：有利于阻遏蛋白与操纵基因结合。

二、操纵子学说——原核生物基因表达的调节机制

操纵子：DNA 分子中在结构上紧密连锁、在信息传递中以一个单位起作用而协调表达的遗传结构，也就是能够决定一个独立生化功能的相关基因表达的调节单位。

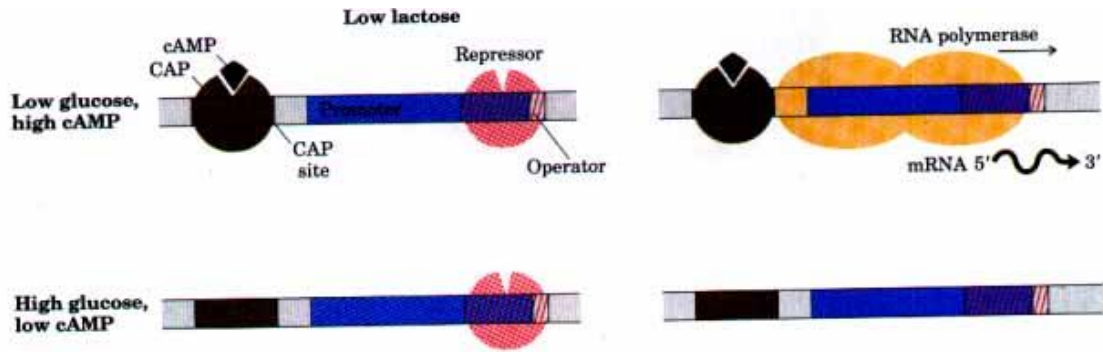


大肠杆菌乳糖操纵子是第一个被发现的可诱导操纵子 (Monod和Jacob, 1961)

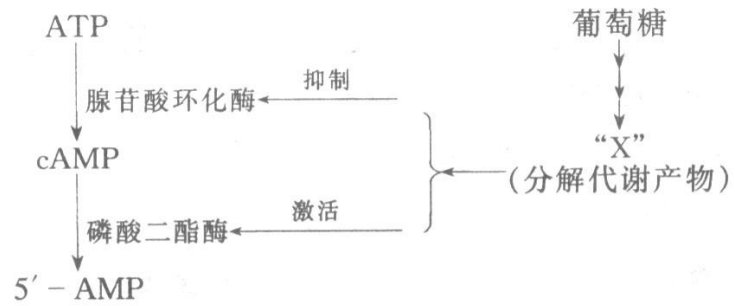


**乳糖操纵子模型**

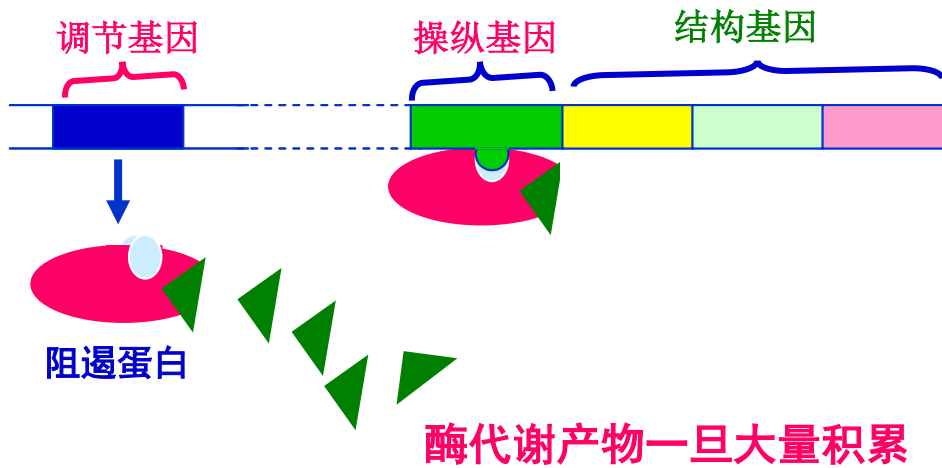
乳糖操纵子的正调控——分解代谢物阻遏



## CAP---降解物基因活化蛋白



## Trp 操纵子----产物阻遏常规酶的合成



本章小结

重点：生物调控的类型和酶水平调控的机制。

难点：变构调节作用和酶蛋白合成的基因调控作用。

# 《生物化学》实验讲义

任课教师：李妍

学时数分配表

序号	实验项目	学时
1	蒽酮比色定糖	3
2	脂肪皂化价的测定	3
3	蛋白质浓度的测定（考马斯亮蓝结合法）	3
4	氨基酸纸层析法	3
5	醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质	3
6	核酸含量的测定（定磷法）	3
合计		18

## 实验一 蒽酮比色定糖

### 一、目的：

1. 掌握蒽酮比色定糖的原理和操作方法；
2. 熟悉分光光度计的使用方法

### 二、原理：

糖类在较高温度下可被浓硫酸作用而脱水生成糠醛或羟甲基糖醛后，与蒽酮( $C_{14}H_{10}O$ )脱水缩合，形成糠醛的衍生物，呈蓝绿色。该物质在 620 nm 处有最大吸收，在 150  $\mu\text{g/mL}$  范围内，其颜色的深浅与可溶性糖含量成正比。

这一方法有很高的灵敏度，糖含量在 30  $\mu\text{g}$  左右就能进行测定，所以可做为微量测糖之用。一般样品少的情况下，采用这一方法比较适合。

### 三、仪器和试剂

1. 仪器：电子天平，超声波清洗器，电热恒温水浴锅，抽滤设备，分光光度计，容量瓶，刻度吸管等

2. 试剂：(1)葡萄糖标准液：100  $\mu\text{g/mL}$ ；(2)浓硫酸；(3)蒽酮试剂：0.2 g 蒽酮溶于 100 mL 浓  $H_2SO_4$  中。当日配制使用。

### 四、操作步骤

#### 1. 葡萄糖标准曲线的制作

取 7 支大试管，按下表数据配制一系列不同浓度的葡萄糖溶液：

管号	1	2	3	4	5	6
葡萄糖标准液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
葡萄糖含量 ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80	100

在每支试管中立即加入蒽酮试剂 4.0mL，迅速浸于冰水浴中冷却，各管加完后一起浸于沸水浴中，管口加盖，以防蒸发。自水浴沸腾起计时，准确煮沸 10 min，取出，用冰浴冷却至室温，在 620nm 波长下以第一管为空白，迅速测其余各管吸光值。以标准葡萄糖含量（ $\mu\text{g}$ ）为横坐标，以吸光值为纵坐标，绘出标准曲线。

2. 样品液的测定：吸取 1 mL 样品液于试管中，加入 4.0 mL 蒽酮试剂，平行三份；空白管以等量蒸馏水替代提取液。以下操作同标准曲线制作。根据  $A_{620}$  平均值在标准曲线上查出葡萄糖的含量（ $\mu\text{g}$ ）。

#### 五、结果处理：

1. 绘制标准曲线
2. 在标准曲线上查出样品的糖含量（ $\mu\text{g}$ ）。

#### 六、注意事项：

1. 该显色反应非常灵敏，溶液中切勿混入纸屑及尘埃。
2.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  要用高纯度的。
3. 不同糖类与蒽酮的显色有差异，稳定性也不同。加热、比色时间应严格掌握。

#### 七、思考题：

1. 用水提取的糖类有哪些？
2. 制作标准曲线时应注意哪些问题？
3. 比色时设 0 号管有什么意义？

## 实验二 脂肪皂化价的测定

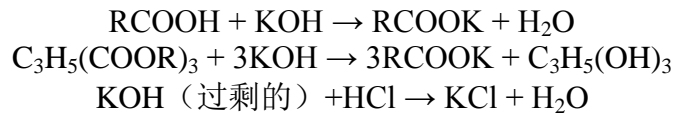
### 一、目的

1. 了解脂肪的组成；
2. 掌握油脂皂化价测定的原理和方法。

### 二、原理

皂化价（皂化值）系指中和 1g 油脂中所含全部游离脂肪酸和结合脂肪酸（甘油脂）所需氢氧化钾的毫克数。

油脂与氢氧化钾乙醇溶液共热时，发生皂化反应，剩余的碱可用标准酸液进行滴定，从而可计算出中和油脂所需的氢氧化钾毫克数。反应式如下：



### 三、试剂和器材

0.1mol/L 的盐酸标准溶液；1%酚酞指示剂；无水乙醚；0.5mol/L 氢氧化钾乙醇溶液：称取化学纯氢氧化钾 30g，溶于 95%乙醇中使成 1L，摇匀，静置 24h，倾出上层清液，贮于装有苏打石灰球管的玻璃瓶中，花生油。圆底烧瓶、冷凝管、三角瓶、酸式滴定管等。

### 四、操作步骤

#### 1. 皂化反应

称取 0.5g 花生油（称准至 0.0002g），准确加入 0.5mol/L 氢氧化钾乙醇溶液 40mL，加入沸石，在水浴上加热回流至皂化完全，约 30min。取下冷凝管，转移至三角瓶，冷却后加入数滴酚酞指示剂，用 0.1mol/L 的盐酸标准溶液滴定至红色消失。

2. 空白试验：不加油脂，其他操作同上。

## 五、结果计算

皂化价按下式计算：

$$\text{皂化价} = \frac{56.1 \times c \cdot (V_0 - V)}{m}$$

式中：c——0.1mol/L 的盐酸标准溶液的浓度，mol/L；

V——试样耗用盐酸标准溶液之体积，mL；

V<sub>0</sub>——空白试验消耗盐酸标准溶液之总体积，mL；

m——试样之质量，g；

56.1——氢氧化钾分子量；

一般植物油的皂化价如下：棉子油 189~198，花生油 188~195，大豆油 190~195，菜子油 170~180，芝麻油 188~195，葵子油 188~194，茶子油 188~196。

## 六、注意事项：

1. 回流前一定要加入沸石，防止暴沸；
2. 空白试验回流时间与样品回流时间一致；

## 七、思考题：

1. 如何确定是否皂化完全？
2. 皂化价的意义是什么？

# 实验三 蛋白质浓度的测定（考马斯亮蓝结合法）

## 一、目的

学习、掌握考马斯亮蓝法（Bradford 法）测定蛋白质含量的方法

## 二、原理

考马斯亮蓝 G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 测定蛋白质含量属于染料结合法的一种。在游离状态下呈红色，最大光吸收在 488nm；当它与蛋白质结合后变为青色，蛋白质-色素结合物在 595nm 波长下有最大光吸收。其光吸收值与蛋白质含量成正比，因此可用于蛋白质的定量测定。蛋白质与考马斯亮蓝 G-250 结合在 2min 左右的时间内达到平衡，完成反应十分迅速；其结合物在室温下 1h 内保持稳定。

该法是 1976 年 Bradford 建立，试剂配制简单，操作简便快捷，反应非常灵敏，灵敏度比 Lowry 法还高 4 倍，可测定微克级蛋白质含量，测定蛋白质浓度范围为 0~1000μg/mL，最小可测 2.5μg/mL 蛋白质，是一种常用的微量蛋白质快速测定方法。

## 三、试剂和器材

1. 标准蛋白质溶液，用牛血清清蛋白（BSA），配制成 1.00mg/ml。

2. 考马斯亮蓝 G-250 染料试剂：称 100mg 考马斯亮蓝，溶于 50ml 95% 的乙醇后，再加入 120ml 85% 的磷酸，用水稀释至 1 升。

722 型可见光分光光度计、漩涡混合器、试管 16 支。

## 四、操作步骤

1. 标准曲线的制作 取 6 支具塞试管，编号后，按下表加入试剂。



管号	1	2	3	4	5	6	7
操作项目							
标准蛋白质溶液(mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.8
0.9%NaCl(mL)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.4	0.3
G-250试剂(mL)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
蛋白质浓度(μg/mL)	0	10	20	30	40	60	80
A <sub>595nm</sub>							

摇匀，室温放置 3min 后在 595 nm 波长下比色测定（比色应在 1h 内完成）。以牛血清白蛋白含量（μg）为横坐标，以吸光度为纵坐标，绘出标准曲线。

## 2. 样品中蛋白质含量的测定

取 1 支试管，准确加入 1.0mL 样品提取液，4.0mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂，充分混合，放置 3min 后，以标准曲线 1 号试管做参比，在 595 nm 波长下比色，记录吸光度。根据所测样品提取液的吸光度，在标准曲线上查得相应的蛋白质浓度（μg/mL）。

## 五、思考题

1. 用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量有何特点，操作过程中应注意什么？

# 实验四 氨基酸纸层析法

## 一、实验目的

通过氨基酸的分离，学习纸层析法的基本原理及操作方法。

## 二、实验原理

纸层析法是用滤纸作为惰性支持物的分配层析法。层析溶剂由有机溶剂和水组成。物质被分离后在纸层析图谱上的位置是用 Rf 值(比移)来表示的：

$$R_f = \frac{\text{原点到层析中心的距离}}{\text{原点到溶剂前沿的距离}}$$

在一定的条件下某种物质的 Rf 值是常数。Rf 值的大小与物质的结构、性质、溶剂系统、层析滤纸的质量和层析温度等因素有关。本实验利用纸层析法分离氨基酸。

## 三、器材与试剂

层析缸，毛细管，喷雾器，培养皿，小烧杯，长颈漏斗，层析滤纸(新华一号)，电吹风。

扩展剂 正丁醇:88%甲酸:水=15:2.5:2.5（体积比），平衡溶剂与扩展剂相同。每组配制 40 mL。

氨基酸溶液 0.5%的赖氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸溶液及它们的混合液(各组份浓度均为 0.5%)。显色剂：0.1% 水合茚三酮正丁醇溶液。

## 四、操作步骤

1. 将盛有扩展剂 10 mL 的小烧杯和培养皿置于密闭的层析缸中。
2. 戴手套取层析滤纸(长 22 cm、宽 14 cm)一张。在纸的一端距边缘 2~3 cm 处用铅笔划一条直线，在此直线上每间隔 2.5 cm 作一记号。
3. 点样：用毛细管将各氨基酸样品分别点在这 5 个位置上，干后重复点一次，

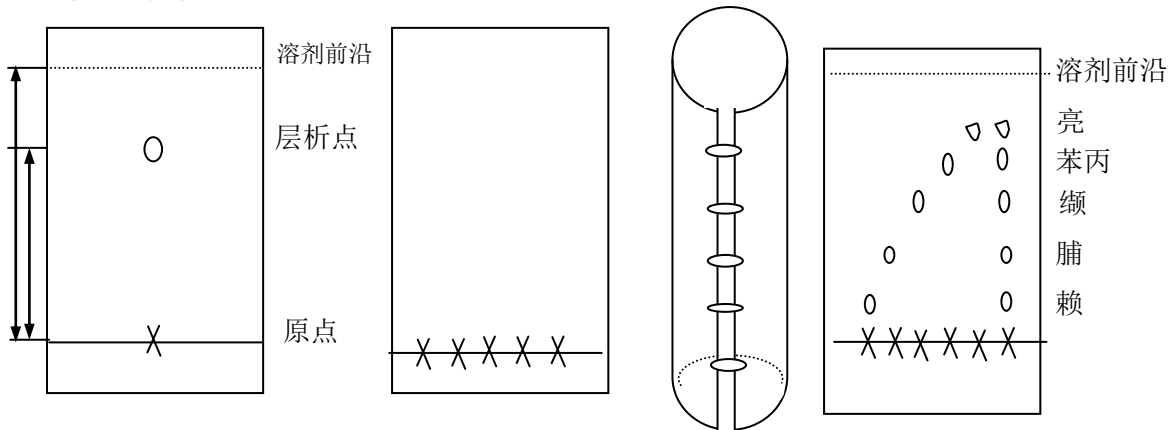
直径最大不超过 3 mm。缝成筒状，两边不能接触。点样面朝外，点样端朝下，盖上层析缸盖，平衡约 10~30 分钟。

4. 展层：用长颈漏斗，扩展剂的液面需低于点样线 1 cm。溶剂扩展至滤纸上沿约 5 厘米时，取出滤纸，用铅笔标出溶剂前沿界线，干燥。

5. 显色：用 0.1% 茚三酮丙酮溶液均匀浸透，用热风吹干。脯氨酸、羟脯氨酸产生黄色物质外，所有  $\alpha$ -氨基酸及一切蛋白质都能和茚三酮产生兰紫色物质。

6. 计算各种氨基酸的 Rf 值，并确定混合液的氨基酸组成。

## 五、实验结果



### 各种氨基酸的 Rf 值：

	赖氨酸	脯氨酸	缬氨酸	苯丙氨酸	亮氨酸
Rf 值					

## 六、思考题

1. 实验过程中切勿用手直接接触滤纸和显色剂，为什么？
2. 点样过程中必须在第一滴样品干后再点第二滴，为什么？

## 实验五 醋酸纤维薄膜电泳法分离血清蛋白质

### 一、目的

学习醋酸纤维薄膜电泳的操作，了解电泳技术的一般原理。

### 二、原理

带电质点在电场中移动的现象称为电泳。电泳有很多类型，如，纸电泳、醋酸纤维薄膜电泳、纤维素或淀粉粉末电泳、淀粉凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳等。

任何一种物质的质点，由于其本身在溶液中的解离或由于其表面对其他带电质点的吸附，会在电场中向一定的电极移动。例如，氨基酸、蛋白质、酶、激素、核酸及其衍生物等物质都具有许多可解离的酸性和碱性基团，它们在溶液中会解离而带电。

不同的质点在同一电场中泳动速度不同，据此可将不同带电物质分开。

醋酸纤维薄膜电泳是用醋酸纤维薄膜作为支持物的电泳方法。

醋酸纤维薄膜由二醋酸纤维素制成，它具有均一的泡沫样的结构，厚度仅 120 微米，有强渗透性，对分子移动无阻力，作为区带电泳的支持物进行蛋白电泳有简便、快速、样品用量少、应用范围广、分离清晰、没有吸附现象等优点。目前已广泛用于血清蛋白、脂蛋白、血红蛋白和同功酶的分​​离及用在免疫电泳中。

### 三、器材及试剂

#### 1. 器材：

- |                 |          |
|-----------------|----------|
| ①醋酸纤维薄膜 (2×8cm) | ⑥玻璃板     |
| ②常压电泳仪          | ⑦竹镊      |
| ③点样器 (盖玻片)      | ⑧白磁反应板   |
| ④培养皿 (染色及漂洗用)   | ⑨人血清或鸡血清 |
| ⑤粗滤纸            |          |

#### 2. 试剂：

①巴比妥缓冲液 (PH8.6)：巴比妥 2.76 克，巴比妥钠 15.45 克，加水至 1000 毫升。

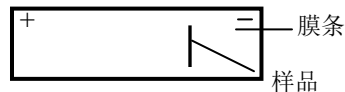
②染色液：氨基黑 10B 0.25 克，甲醇 50 毫升，冰醋酸 10 毫升，水 40 毫升 (可重复用)。

③漂洗液：含甲醇或乙醇 45 毫升，冰醋酸 5 毫升，水 50 毫升。

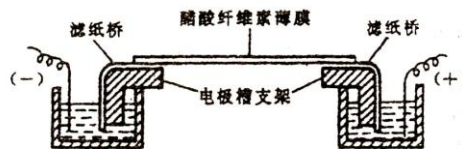
### 四、操作步骤

1. 浸泡：用镊子取醋酸纤维薄膜 1 张 (识别出光泽面与无光泽面，并在无光泽面角上用铅笔做上记号) 放在缓冲液中浸泡 20 分钟。

2. 点样：把膜条从缓冲液中取出，夹在两层粗滤纸内吸干多余的液体，然后平铺在玻璃板上 (无光泽面朝上)，将点样器先在白磁板上的血清中沾一下，再在膜条一端 2~3 厘米处轻轻地水平落下并随即提起，这样即在膜条上点上了细条状的血清样品。



3. 电泳：在电泳槽内加入缓冲液，使两个电极槽内的液面等高，将膜条平悬于电泳槽支架的滤纸桥上。(先剪裁尺寸合适的滤纸条，取双层滤纸条附着在电泳槽的支架上，使它的一端与支架的前沿对齐，而另一端浸入电极槽的缓冲液内。用缓冲液将滤纸全部润湿并驱除气泡，使滤纸紧贴在支架上，即为滤纸桥。它是联系醋酸纤维薄膜和两极缓冲液之间的“桥梁”。) 膜条上点样的一端靠近负极。盖严电泳室。通电。调节电压至 160V，电流强度 0.4—0.7 毫安/厘米膜宽，电泳时间约为 60 分钟。



醋酸纤维薄膜电泳装置示意图

4. 染色：电泳完毕后将膜条取下并放在染色液中浸泡 10 分钟。

5. 漂洗：将膜条从染色液中取出，置漂洗液中漂洗数次至无蛋白区底色脱净为

止，可得色带清晰的电泳图谱。



醋酸纤维素薄膜血清蛋白电泳图谱

从左至右,依次为:血清清蛋白,  $\alpha_1$  球蛋白,  $\alpha_2$  球蛋白,  $\beta$  球蛋白,  $\gamma$  球蛋白

## 五、思考题

1. 血清蛋白质为何形成这样的分离顺序
2. 点样时需要注意什么? 点样端为何放在负极?

## 实验六 核酸含量的测定 (定磷法)

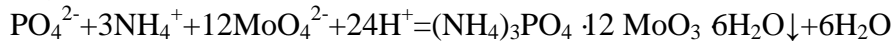
### 一、目的

掌握定磷法测定核酸含量的原理与方法。

### 二、原理

核酸分子中含有一定比例的磷, RNA 中含磷量为 9.0%, DNA 中含磷量为 9.2%, 因此通过测得核酸中磷的量即可求得核酸的量。

用强酸使核酸分子中的有机磷消化成为无机磷, 使之与钼酸铵结合成磷钼酸铵 (黄色沉淀)。



当有还原剂存在时,  $\text{Mo}^{6+}$  被还原成  $\text{Mo}^{4+}$ , 此 4 价钼再与试剂中的其他  $\text{MoO}_4^{2-}$  结合成  $\text{Mo}(\text{MoO}_4)_2$  或  $\text{Mo}_3\text{O}_8$ , 呈蓝色, 称为钼蓝。

在一定浓度范围内, 蓝色的深浅和磷含量成正比, 可用比色法测定。样品中如有无机磷, 应将无机磷扣除, 否则结果偏高。

### 三、实验器材

1、粗核酸 (RNA); 2、克氏烧瓶 50ml ( $\times 2$ ); 3、小漏斗  $\phi$  4cm ( $\times 1$ ); 4、容量瓶 100ml ( $\times 2$ )、50ml ( $\times 1$ ); 5、吸管 0.10ml ( $\times 1$ )、0.20ml ( $\times 2$ )、0.50ml ( $\times 1$ )、1.0ml ( $\times 2$ )、5.0ml ( $\times 4$ ); 6、试管 1.5cm  $\times$  18cm ( $\times 11$ ); 7、722 型或 2000 型分光光度计; 8、电炉; 9、水浴锅。

### 四、实验试剂

1. 标准磷溶液: 将磷酸二氢钾 (A. R.) 于 100°C 烘至恒重, 准确称取 0.8775 溶于少量蒸馏水中, 转移至 500ml 容量瓶中, 加入 5ml 5mol/L 硫酸溶液及氯仿数滴, 用蒸馏水稀释至刻度, 此溶液每毫升含磷 400  $\mu$ g。临用时准确稀释 20 倍 (20  $\mu$ g/ml)。

#### 2. 定磷试剂

(1) 17% 硫酸: 17ml 浓硫酸 (比重 1.84) 缓缓加入 83ml 水中。

(2) 2.5% 钼酸铵溶液: 2.5g 钼酸铵溶于 100ml 水。

(3) 10% 抗坏血酸溶液: 10g 抗坏血酸溶于 100ml 水, 存于棕色瓶中放于冰箱。溶液呈淡黄色尚可用, 呈深黄甚至棕色即失效。

临用时将上述三种溶液与水按如下比例混合,  $V(17\% \text{硫酸}) : V(2.5\% \text{钼酸铵溶液}) : V(10\% \text{抗坏血酸溶液}) : V(\text{水}) = 1 : 1 : 1 : 2$ 。

3. 27% 硫酸: 27ml 硫酸 (比重 1.84, A. R.) 缓缓倒入 73ml 水中。

### 五、操作

### 1. 磷标准曲线的绘制

取干试管 9 支，按表编号及加入试剂。

核酸含量的测定——标准曲线的绘制

管号 试剂	0	1	2	3	4	5	6	7	8
标准磷溶液/mL	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
蒸馏水/mL	3.0	2.95	2.9	2.8	2.7	2.6	2.5	2.4	2.3
定磷试剂/mL	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
A <sub>660nm</sub>									

加毕摇匀，45℃水浴中保温 10min，冷却，测定吸光度（660nm）。以磷含量为横坐标，吸光度为纵坐标作图。

### 2. 总磷的测定

称取样品(粗核酸)0.1g，用少量蒸馏水溶解(如不溶，可滴加 5%氨水至 pH7.0)，转移至 50ml 容量瓶中，加水至刻度（此溶液含样品 2mg/ml）。

吸取上述样液 1.0ml，置于 50ml 克氏烧瓶中，加入少量催化剂，再加 4.0ml 浓硫酸及 3 粒玻璃珠，克氏烧瓶中内插一小漏斗，放在通风厨内加热，消化至透明，表示消化完成。冷却，将消化液移入 100ml 容量瓶中，用少量水洗涤克氏烧瓶两次，洗涤液一并倒入容量瓶，再加水至刻度，混匀后吸取 3.0ml 置于试管中，加定磷试剂 3.0ml，45℃水浴中保温 10min，测 A<sub>660nm</sub>。

### 3. 无机磷的测定

吸取样液（2mg/ml）1.0ml，置于 100ml 容量瓶中，加水至刻度，混匀后吸取 3.0ml 置试管中，加定磷试剂 3.0ml，45℃水浴中保温 10min，测 A<sub>660nm</sub>。

### 4. 计算：

$$\text{总磷 } A_{660\text{nm}} - \text{无机磷 } A_{660\text{nm}} = \text{有机磷 } A_{660\text{nm}}$$

由标准曲线查得有机磷的质量（ $\mu\text{g}$ ），再根据测定时的取样毫升数，求得有机磷的质量浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）。按下式计算样品中核酸的质量分数：

$$W = \frac{CV \times 11}{m} \times 100\%$$

式中 W：核酸的质量分数（%）；

C：有机磷的质量浓度（ $\mu\text{g/ml}$ ）；

V：样品总体积（ml）；

11：因核酸中含磷量为 9% 左右，1 $\mu\text{g}$  磷相当于 11 $\mu\text{g}$  核酸；

M：样品质量（ $\mu\text{g}$ ）。

## 六、思考题

1. 采用紫外光吸收法测定样品的核酸含量，有何优点及缺点？
2. 若样品中含有核苷酸类杂质，应如何校正？