5.蛋白质

·标准aa：组成蛋白质的20种aa均为L-α-氨基酸（除Gly）

非极性aa：Ile、Leu、Phe、Met、Ala、Gly、Pro、Val、Trp　　极性不带电aa：Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln

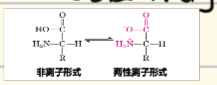
正电(碱性aa)：His、Lys、Arg　　负电(酸性aa)：Asp、Glu

·非标准aa(稀有aa)：标准aa修饰而来；标准aa的代谢产物：组胺，鸟胺

·非核糖体肽中aa(次级代谢产物)

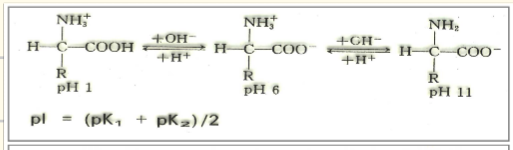
人体必需aa：假设来携一两本书　Met、Trp、Lys、Val、Ile、Leu、Phe、Thr　；　Pro为亚aa　；　Cys常以胱氨酸的形式存在

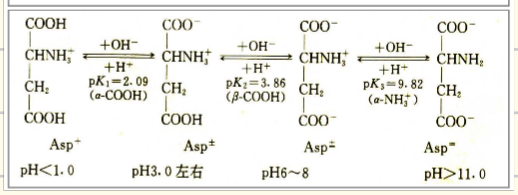
• 理化性质：(1).旋光性：除Gly以外，其余aa的α-C为不对称C原子，它们互为光学异构体　Thr、Ile、羟Pro & 羟Lys还有一个不对称C原子⇒4种异构

(2).酸碱性质： 

两性解离

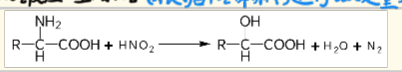
(3).等电点PI：aa分子所带净电荷为0时的溶液pH.（pH>pI，负电；pH<pI，正电）



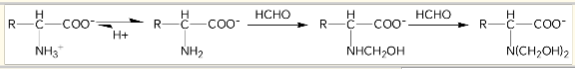


• aa的化学反应：

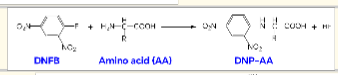
一、α-氨基参与：(i).与HNO_2反应：生成N_2（根据N_2体积，进行aa定量和蛋白水解程度测定）



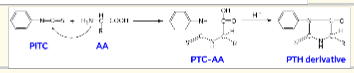
(ii).甲醛滴定



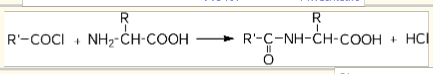
(iii).二硝基氟苯(DNFB)反应(Sanger反应)：鉴定N-末端aa



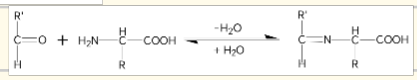
(iv).异硫氰酸苯酯(PITC)反应(Edman反应)：蛋白N端测序



(v).酰基化试剂反应：氨基被酰基化（用作氨基的保护剂）

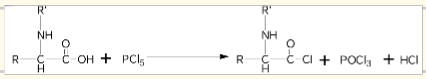


(vi).形成西佛碱反应：氨基与醛类反应形成弱碱（某些酶促反应的中间产物 eg.转氨基反应）



二、α-羧基参加的反应：(i).成盐和成酯反应

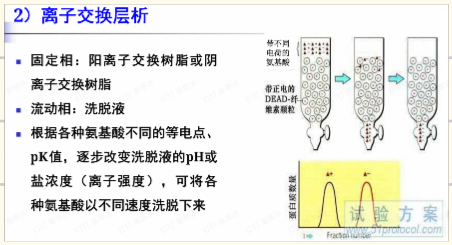
(ii).成酰氯反应：活化羧基，易与另一氨基酸的氨基结合，人工多肽合成中使用



三、α-氨基与α-羧基共同参加的反应

(i).茚三酮反应：检测和定量aa　α-aa紫色产物；Pro & 羟Pro亮黄色产物　(ii).成肽反应

四、aa的分离与分析

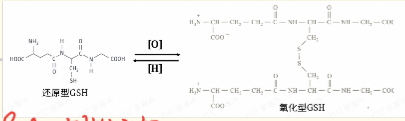


五、多肽

肽链中aa残基按一定顺序排列，称为aa残基顺序

aa的顺序是从N-端的aa残基开始，以C-端aa残基为终点的排列顺序.

谷胱甘肽（GSH）（Glu侧链的-COOH与Cys的-NH_2形成酰胺键）

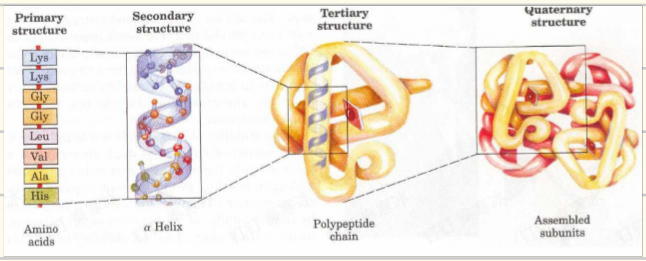


还原型GSH可作为巯基缓冲剂存在

·肽链水解
- 酸水解：不消旋，Trp破坏；含-OH（Ser、Thr）小部分分解；Gln & Asn侧链水解.（刚果环、强酸性、高温条件不稳定.）
- 碱水解：消旋，Trp不破坏；许多aa受不同程度破坏，产率不高（α-碳上的H有酸性取代，之后再加上H后就存在L型与D型两种.）
- 酶解：不破坏aa，不消旋，水解产生较小肽段.

·蛋白质结构.

- 一级结构：即初级结构，蛋白质多肽链的氨基酸残基顺序
- 二级结构：蛋白质多肽链主链在空间的走向，一般为有规律的空间排列，是主链的构象，而不涉及侧链基团的空间上的关系
  - 超二级结构
  - 结构域
- 三级结构：蛋白质分子中所有原子的三维空间排列
- 四级结构：多亚基蛋白质分子内各亚基间的相互关系和空间位置
- 高级结构：二级结构、三级结构和四级结构



·一级结构：1954年Sanger报道胰岛素一级结构（1958年诺贝尔奖） 1965年结晶牛胰岛素的合成.

一级结构决定高级结构，高级结构决定功能

eg. 镰刀状贫血：血红蛋白β亚基6位 Glu ⇒ Val

一级结构分析：

总体思路：

1、如有两个以上亚基，先分离；如有二硫键，先打断；（巯基乙醇；过甲酸氧化法；二硫键；亲核醇还原法）

2、将蛋白质水解成肽段——测定各个肽段中氨基酸残基序列；

3、用两种或两种以上的专一性的水解方法，各自得到一套肽段文库——用片断重叠法拼凑

具体步骤

1. 分离纯化
2. 氨基酸组成（酸水解、碱水解）
3. 末端分析——亚基数量
4. 亚基的拆分（二硫键的打断）
5. 各个亚基氨基酸组成、末端分析
6. 亚基用两种或两种以上的专一性水解方法——肽段文库
7. 肽段测序
8. 肽段序列拼凑成亚基序列

蛋白质专一性水解方法.

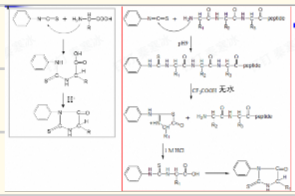
- 酶解法：
  - 胰蛋白酶（碱性氨基酸Lys和Arg的羧基形成的肽键）
  - 胰凝乳蛋白酶（侧链含芳香环的氨基酸的羧基形成的肽键）
  - 胃蛋白酶（疏水性氨基酸的羧基和疏水性氨基酸的氨基形成的肽键）
- 化学裂解法：溴化氰（高度专一地在甲硫氨酸羧基形成地肽键处断裂肽链）

·肽段测序：N-端分析之一：Sanger法（DNFB）

N-末端分析之二：Edman降解（PITC）☆

其他N-末端分析：丹磺酰氯法（DNS法）

氨肽酶法



- Edman降解的优点：除了N-段氨基酸，其它肽段不被水解，可以继续被测定

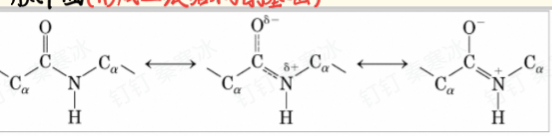
C-末端分析：肼解法，还原法，羧肽酶法.

其他方法 ⇒

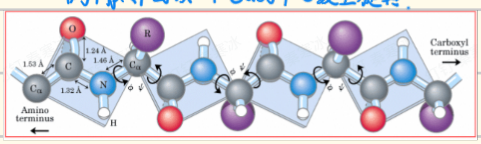
- 分子生物学法
  1. N端测序、C端测序
  2. 5′-、3′-简并引物
  3. PCR克隆出基因
  4. DNA测序
- 微量测序 + 基因组分析
  1. 质谱测序 → 5-6氨基酸序列
  2. 或单分子测序 → Cys、Lys序列
  3. 生物信息学分析基因组序列

·二级结构：构型（改变会涉及共价键的破坏或形成） 构象（取代基团在单键旋转时可能形成的不同立体结构）

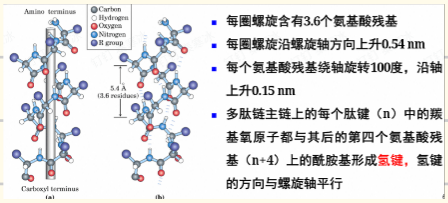
肽平面（形成二级结构的基础）



两个肽平面以一个Cα为中心发生旋转.



1. α-螺旋（蛋白质中最常见，含量最丰富）.



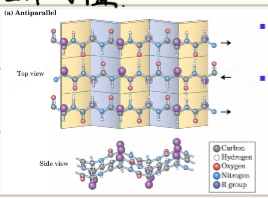
- 每圈螺旋含有3.6个氨基酸残基
- 每圈螺旋沿螺旋轴方向上升0.54 nm
- 每个氨基酸残基绕轴旋转100度，沿轴上升0.15 nm
- 多肽链主链上的每个肽键（n）中的羰基氧原子都与其后的第四个氨基酸残基（n+4）上的酰胺基形成氢键，氢键的方向与螺旋轴平行

限制因素：☆☆☆

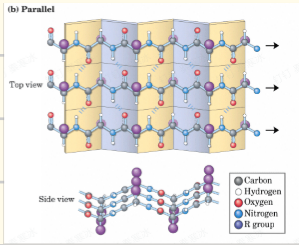
- 凡是有Pro存在的地方，不能形成——因Pro形成的肽键N原子上没有H，不可能形成氢键
- 静电斥力——若一段肽链有多个Glu或Asp相邻，则因pH=7.0时都带负电荷，防碍α螺旋的形成；同样多个碱性氨基酸残基在一段肽段内，正电荷相斥，也防碍α螺旋的形成
- 位阻——如Asn、Leu侧链很大，防碍α螺旋的形成

Ile、Val、Thr、Phe、Trp

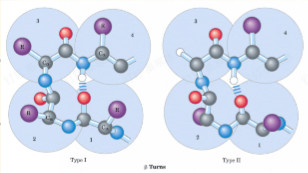
2. β-折叠



- 是蛋白质中另一种常见的二级结构
- 两条或多条伸展的多肽链侧向聚集在一起，相邻肽链主链上的－NH和C=O之间形成有规则的氢键



3. β-转角



- 球状蛋白中的一种二级结构，常出现在蛋白质的表面
- β-折叠反平行式的转折处，第一个残基的C=O与第四个残基的NH形成氢键

Gly & Pro经常出现在中间两个位置，有利于反平行β折叠的形成

4号位最适合Gly

4. 无规卷曲：泛指不能被列入明确的二级结构，如螺旋或折叠的多肽区段

·超二级结构（模体）

指由若干相邻的二级结构单元组合在一起，彼此相互作用，形成的有规则的、在空间结构上能够辨认的二级结构组合体，又可称为折叠模体（folding motif）

- 蛋白质空间构象的正确形成除一级结构为决定因素外，还需要一类称为分子伴侣（chaperon）的蛋白质参加
- 分子伴侣可防止错误的聚集发生，使肽链正确的折叠；也可与错误聚集的肽段结合，使之解聚后，再诱导其正确折叠
- 分子伴侣对二硫键的形成起重要作用

·结构域（domain）

- 结构生物学定义：较大的蛋白质分子或亚基在三维折叠的过程中，多肽链往往先形成两个或两个以上的相对独立的三维实体，然后这些三维实体再通过缔合形成蛋白质的三级结构。一般将这种相对独立的三维实体称为结构域或域结构
- 功能生物学定义：蛋白质分子中能独立执行某项功能的单位

·纤维状蛋白

A). α角蛋白

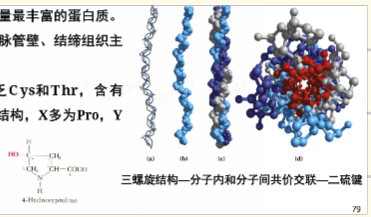
- 属于不溶性的纤维蛋白。主要存在于动物的毛发、皮肤、蹄、角、指甲等组织中
- α-螺旋是α-角蛋白的基本结构单位

B). 丝心蛋白 β角蛋白

- 蚕丝、蜘蛛丝
- 以反平行β-折叠片以平行的方式堆积成多层结构
- Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser重复结构

C). 胶原蛋白

- 是脊椎动物中含量最丰富的蛋白质。皮肤、软骨、动脉管壁、结缔组织主要成分
- 胶原蛋白中缺乏Cys和Thr，含有Gly-X-Y的重复结构，X多为Pro，Y多为4-羟脯氨酸



三螺旋结构—分子内和分子间共价交联—二硫键

79

·三级结构

- 是指蛋白质分子中的所有原子的三维空间排列，包括它的二级结构要素和它的侧链在空间上的相互关系
- 维持蛋白质三级结构的主要作用力为侧链间的相互作用：氢键、离子键、范德华力、疏水键及二硫键

范德华力

包括三种较弱的作用力：

（1）定向效应：发生在极性分子或基团之间，是永久偶极间的静电相互作用，氢键属于这种范德华力

HO· ----- HO·

（2）诱导效应：发生在极性物质与非极性物质之间，是永久偶极与由它诱导而来的诱导偶极之间的相互作用

HO· ----- CH_3

（3）分散效应：为主要的范德华力，是非极性分子或基团间的相互作用。这是瞬时偶极，即偶极方向瞬时变化，是由其所在的分子或基团中电子电荷密度的波动所造成的

CH_3 ----- CH_3

范德华力包括吸引力和斥力两种相互作用，吸引力只有当两个非键原子处于一定距离时才达到最大，这称范德华距离（=两个原子的范德华半径之和）

·四级结构

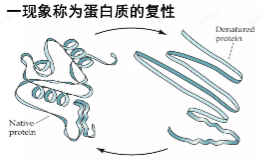
- 四级结构：亚基的种类和数目、各亚基的空间排布
- 亚基（subunit）：有的蛋白质分子由两条以上的肽链通过非共价键或二硫键相连聚合而成，每条多肽链称为一个亚基，即每个三级结构的球状蛋白质。也称单体蛋白质
- 维持四级结构稳定的因素为各亚基之间的作用力如氢键、离子键、范德华力、疏水键及二硫键
- 含有四级结构的蛋白质，单独的亚基一般没有生物学功能，只有完整的四级结构才有生物学功能

·变性与复性

- 变性：天然蛋白质受到某些物理因素如热、紫外线照射、高压和表面张力等或一些化学因素如有机溶剂、尿素、酸、碱等的影响时，生物活性丧失，溶解度降低以及其他的物理化学常数发生改变，这个过程称为蛋白质的变性
- 变性作用的实质是蛋白质分子中的次级键被破坏，引起天然构象解体，但变性不涉及共价键（肽键和二硫键）的破裂，即蛋白质的一级结构保持完整

高级结构破坏、一级结构不破坏

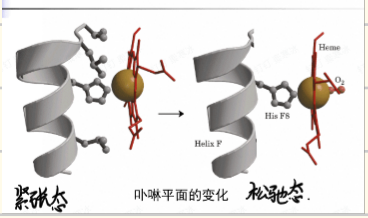
- 当变性因素去除后，变性蛋白又可以重新回复到天然构象，这一现象称为蛋白质的复性



变性易，复性难

·蛋白质结构与功能的关系

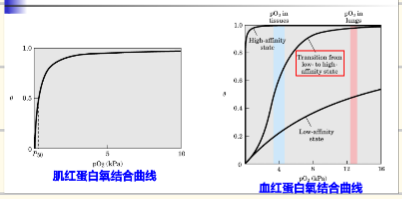
肌红蛋白在与氧结合过程中构像改变



二、血红蛋白（hemoglobin）（多亚基蛋白）

- 由两个α-亚基和两个β-亚基组成的四聚体，α-亚基含141个氨基酸残基，β-亚基含146个氨基酸残基
  - 肌红蛋白含有153个氨基酸残基
- 血红蛋白α-亚基、β-亚基和肌红蛋白的一级结构差别很大（27个氨基酸相同）
- 血红蛋白α-亚基、β-亚基和肌红蛋白的高级结构非常相似

氧结合曲线



肌红蛋白氧结合曲线　　血红蛋白氧结合曲线

·别构效应：

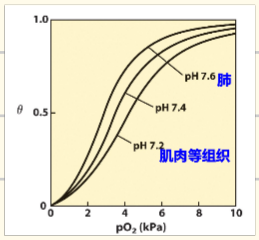
- 多亚基蛋白一般具有多个结合部位，结合在蛋白质分子的特定部位上的配体对该分子的其他部位产生的影响称为别构效应
- 具有别构效应的蛋白质称别构蛋白质，具有别构效应的酶称别构酶
- 别构效应分为同促效应和异促效应

同促效应：发生作用的部位是相同的：一个亚基活性部位与配基的结合会影响另一个亚基活性部位与配基的结合

- 促进作用：正协同效应
- 降低作用：负协同效应

血红蛋白与O_2结合的同促效应与异促效应

- 同促效应：在血红蛋白与O_2的结合过程中，一个O_2的结合能增加同一个血红蛋白分子中其余空的O_2结合部位对O_2的亲和力（正协同效应）
- 异促效应：CO_2、H^+和2,3-二磷酸甘油酸抑制血红蛋白对O_2的结合（抑制剂）
  - H^+结合部位：形成盐键的β亚基C端氨基酸残基、α亚基的N端α-氨基
  - CO_2结合部位：4个亚基的N端α-氨基



·别构效应：

- 有些蛋白质除了活性部位还有别构部位（调节部位），别构部位与效应物的结合影响活性部位与配体的结合
  - 效应物促进活性部位与配基的结合，称为正效应物或者激活剂
  - 效应物抑制活性部位与配基的结合，称为负效应物或者抑制剂

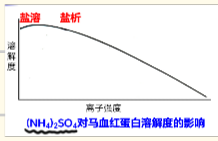
·蛋白质分离纯化

一.沉淀作用

- 蛋白质溶液属于胶体。胶体的稳定条件：
  - 分散相质点大小在1~100 nm
  - 分散相质点带同种电荷
  - 分散相质点与水形成水化层
- 蛋白质表面有一层水化膜，阻碍蛋白质沉淀
- 半透膜：允许小于一定体积的分子自由通过

1、等电点沉淀：蛋白质在等电点的溶解度最小（保持天然构象）

2、盐析&盐溶



$(NH_4)_2SO_4$对马血红蛋白溶解度的影响

- 盐析：蛋白质表面的自由水变为盐离子的水化水
  - 沉淀的蛋白质保持天然构象
- 盐溶：蛋白质吸附某种离子，带同种电荷的数量增多

带电层使蛋白质分子彼此排斥，蛋白质分子与水分子间的相互作用却加强

3.有机溶剂沉淀

- 有机溶剂降低水的介电常数——蛋白质表面可电离基团的离子化程度降低
- 有机溶剂争夺蛋白质表面的自由水
- 往往导致蛋白质变性

4、重金属离子沉淀
- 蛋白质负电荷与重金属离子形成不溶性盐
- 蛋白质变性

5、加热沉淀
- 破坏蛋白质天然构象，疏水基团暴露
- 蛋白质变性

二、层析方法
1. 凝胶过滤层析（分子筛层析）
2. 离子交换层析
3. 亲和层析

三、蛋白质分子量测定
1. 凝胶过滤层析
2. SDS-PAGE电泳
3. 质谱
4. 超速离心法

9 酶化学

- 酶（enzyme）：是生物体内由细胞产生的一类能加快生物化学反应速率，并且具有专一性的蛋白质。酶又可称为生物催化剂biocatalysts。
- 细胞中大部分球蛋白为酶。
- 核酶（ribozyme）：具有高效、特异催化作用的核酸，主要作用参与RNA的剪接。

酶是蛋白质

- 酶具有其他天然蛋白质所具有的性质。
- 酶的催化活性取决于它们完整的天然蛋白质构象。

化学组成

- **单纯酶**（simple enzyme）
  - 仅由氨基酸残基构成的酶，如脲酶、淀粉酶、脂酶
- **结合酶**（conjugated enzyme）
  - 全酶（holo-enzyme）＝酶蛋白（apo-enzyme）＋辅因子（cofactor），辅因子是金属离子或小分子有机化合物
  - 辅因子分为：
    - **辅酶**（coenzyme）：与酶蛋白疏松结合，可用透析、超滤分离
    - **辅基**（prosthetic group）：共价键与酶蛋白牢固结合，不易分离，许多辅基是来源于辅酶的一部分基团

- **单体酶**（monomeric enzyme）：只有一条多肽链构成的酶。
- **寡聚酶**（oligomeric enzyme）：由多个相同或不同亚基以非共价键连接的酶。
- **多酶体系**（multienzyme system）：细胞内存在着许多由几种不同功能的酶彼此聚合形成的多酶复合物。
  - 细菌脂肪酸合酶
- **多功能酶**（multifunctional enzyme）：一些多酶体系在进化过程中由于基因的融合，形成由一条多肽链组成却具有多种不同催化功能的酶。
  - 动物脂肪酸合酶

10

金属离子的作用

- **金属酶**（metalloenzyme）：金属离子与酶蛋白结合紧密，成为酶结构中不可缺少的组成成分。如碳酸酐酶含Zn；谷胱甘肽过氧化物酶含Se；碱性磷酸酶含Zn，羧肽酶A含Zn。
- **金属激活酶**（metal activated enzyme）：金属离子与酶结合疏松，但需金属离子活化，故金属实际上是酶的激活剂。如激酶需Mg和Mn。→ Mg^{2+}
- 有的酶类兼含有机辅基和金属。如琥珀酸脱氢酶含黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）和Fe。

主族金属离子 Mg^{2+}

副族金属离子 $Fe^{2+} \underset{-e^-}{\overset{+e^-}{\rightleftharpoons}} Fe^{3+}$

（变价） $Cu^{2+} \rightleftharpoons Cu^{+}$

关于酶作用专一性的假说：(1). 锁钥学说 (2). 诱导楔合学说 酶分子是高柔性的动态构象分子，当酶分子与底物分子接近时，酶蛋白受底物分子诱导，其构象发生有利于底物结合的变化。

- **酶的活力受到调节控制**
  - 调节酶的浓度：酶合成的调节、酶降解的调节
  - 抑制剂和激活剂调节酶的活性（反馈抑制）
  - 酶一级结构的改变
  - 酶的共价修饰（如磷酸化）
  - 通过激素调节酶的活性

3）国际系统分类法

1、氧化还原酶类
2、转移酶类
3、水解酶类
4、裂合酶类
5、异构酶类
6、合成酶类

•酶的作用机制：

活性部位：酶的结构中只有少数aa残基参与底物的结合及催化作用，这些区域称为酶的活性中心

活性中心有两个功能部位：

1. **结合部位：** 一定的底物靠此部位结合到酶分子上，决定酶的专一性。
2. **催化部位：** 底物的键在此部位被打断或形成新的键，从而发生一定的化学变化，决定酶的催化能力。

酶活性中心的特点

1. 活性部位在酶分子的总体中只占相当小的部分。
2. 酶的活性部位是一个三维实体：活性部位的氨基酸残基在一级结构上可能相距甚远，但在肽链的盘绕、折叠而在空间结构上相互靠近。
3. 酶活性部位的诱导契合：酶的活性部位并不是和底物的形状正好互补的，而是在酶和底物结合过程中，底物分子或/和酶分子构象发生一定变化后才互补的，即"诱导契合"。

4. 酶活性部位是一个疏水区域：酶的活性部位是位于酶分子表面的一个裂缝内，这是相当疏水区域，非极性基团较多，产生一个微环境，提高与底物的结合能力；而其内少量的极性氨基酸残基可与底物结合而发生催化作用。
5. 底物通过次级键较弱的力结合到酶上：酶与底物结合成ES复合物主要靠次级键：氢键、盐键、范德华力和疏水相互作用。
6. 酶活性部位具有柔性或可运动性。

酶催化作用的机理：★★

1）底物和酶的邻近效应和定向效应

邻近效应： 指两个反应的分子，它们反应的基团需要互相靠近，才能反应。

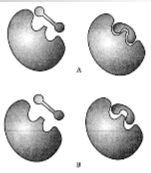
- 酶促反应速度与底物浓度成正比。在反应系统的关键区域底物浓度增高，反应速度也增加。因此，底物与酶活性中心的靠近，提高活性中心的局部底物有效浓度能大大提高酶促反应速度。

定向效应： 底物的反应基团之间、酶的催化基团与底物的反应基团之间的正确定向。

- 除了"靠近"效率外，当底物与活性中心结合时，酶蛋白经诱导而发生构象变化，底物反应部位（基团或键）与酶的催化部位发生楔合，即"定向"作用，从而造成活性中心局部底物有效浓度大大提高。

2）底物的形变和诱导楔合

- 底物分子受酶的作用也发生构象变化，使其敏感键中的某些基团的电子云密度发生变化，产生"电子张力"而引起敏感键的一端更加敏感，发生反应。



底物和酶结合时构象变化示意图
A. 底物分子发生形变；B. 底物分子和酶形变生形变

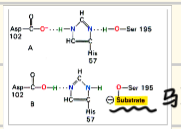
酸碱催化作用

- 通过瞬时的向反应物提供质子或从反应物接受质子以稳定过渡态，加速反应的一类催化机制。
  - **狭义酸碱催化剂：** 通过水溶液中的H^+与OH^-离子进行的催化。由于酶反应的最适pH接近中性，故作用不大。
  - **广义酸碱催化剂：** 即质子供体和质子受体，在酶反应中有重要作用。

广义酸碱催化

质子供体	质子受体
—COOH	—COO^-
—NH_3^+	—NH_2
—SH	—S^-
$H-N=C(NH_2)-NH_2^+$	$H-N=C(NH)-NH_2$
HN—NH^+	HN—N

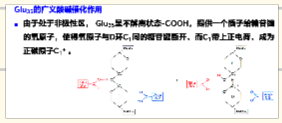
His的咪唑基既是很强的亲核基团，又是有效的广义酸碱功能基。



马上反应

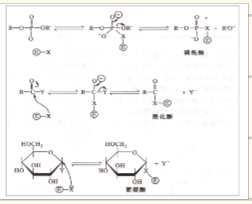
Glu_{35}的广义酸碱催化作用

- 由于处于非极性区，Glu_{35}呈不解离状态-COOH，提供一个质子给糖苷键的氧原子，使得氧原子与D环C_1间的糖苷键断开，而C_1带上正电荷，成为正碳离子C_1^+。



共价催化

- 酶的亲核基团（如羟基、巯基和咪唑基）对底物的亲电子中心进行攻击，形成一个反应活性很高的共价中间物；
- 不稳定的共价中间物被水分子或第二种底物攻击生成产物，底物与酶反应活化能由此大大降低。



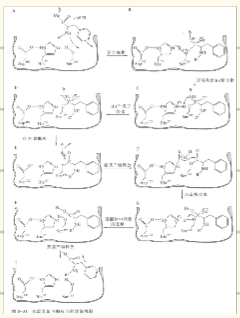
金属离子催化

- 通过结合底物为反应定向；
- 通过静电稳定或屏蔽负电荷；
- 通过可逆地改变金属离子的氧化态调节氧化还原反应。

活性部位微环境的影响

- 某些酶的活性中心穴内相对是非极性的，并排除高极性的水分子，酶的催化基团和底物分子被包围在低介电环境中，底物分子的敏感键和酶的催化基团之间就会有很大的反应力。
- 水会减弱极性基团间的相互作用：水的极性大、介电常数高、形成氢键的能力强，它在离子外通过氢键形成定向的溶剂层，产生自身的电场，从而大大减少了它所包围的离子间的静电作用或氢键作用。

多元催化和协同效应



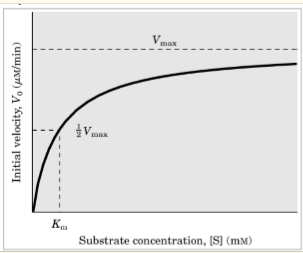
·酶促反应动力学

酶促反应速率(v)：单位时间内反应物的消耗或产物的增加量　单位：浓度/时间　(研究酶反应速度应以初速度为准，常以底物的变化在起始浓度的5%以内的速度)

- **酶活力：在一定条件下催化某一特定反应的能力。**
- **1个酶活力单位：特定条件（温度25℃，pH和底物浓度最适）下，1分钟内能转化1 μmol底物（或有关基团）所需的酶量。**
  - 习惯用法：如淀粉酶，以每小时催化1 g可溶性淀粉液化所需的酶量为1个酶活力单位。
- **酶的比活力：每mg酶蛋白所具有的酶活力。**
  - 单位：单位/毫克蛋白（U/mg蛋白质），比活力可用来比较每单位重量酶蛋白的催化活力。

酶的反应常数k_{cat}

- 为每秒钟每个酶分子转换底物的微摩尔数（μmol）。
- 相当于一旦底物-酶中间物[ES]形成后，酶将底物转换为产物的效率（相当于米氏方程中的k_2）。



在一定的酶浓度下将初速度（v_0）对底物浓度[S]作图

- 当底物浓度较低时，反应速度与底物浓度呈正比关系；
- 随着底物浓度的增加，反应速度不再按正比升高；
- 继续增大底物浓度，反应速度递增为零，这时反应速度已趋向一个极限，说明酶已被底物饱和。

中间产物假说

- 解释这种现象的是"中间产物"假说：酶与底物先络合成一个络合物，它是作为过渡态物质，然后络合物进一步分解，成为产物和游离态酶。
- 简单起见，只考虑单底物和单产物的催化反应。

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

- 反应初期，[P] 非常低，因此整个反应可简化为：

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

- 在反应过程中，游离的酶浓度可以表示为：

  $[E_0]-[ES]$
- 在反应过程中，底物浓度[S]是远远高于酶浓度的[E]，即[S]>>[E]，所以游离的底物浓度可以用[S]计算

稳态：ES的生成速率和分解速率相等，[ES]保持不变的反应状态

米氏常数 Km

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

ES形成速率 $= k_1([E_0]-[ES])[S]$　　ES分解速率 $= k_{-1}[ES]+k_2[ES]$

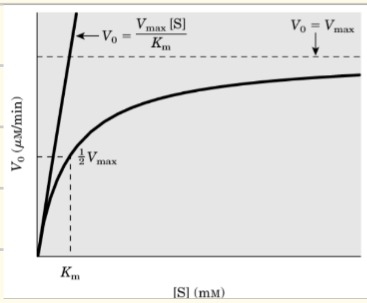
$$k_1([E_0]-[ES])[S] = k_{-1}[ES]+k_2[ES]$$

$$k_1[E_0][S]-k_1[S][ES] = (k_{-1}+k_2)[ES] \Rightarrow [ES] = \frac{k_1[E_0][S]}{k_1[S]+k_{-1}+k_2} = \frac{[E_0][S]}{[S]+(k_{-1}+k_2)/k_1}$$　　$K_m = \frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$

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

反应初速度：$V_0 = k_2[ES] = \frac{k_2[E_0][S]}{K_m+[S]}$　由于[S]≫[E₀]，[S]很高时所有E都形成ES，[ES]=[E₀]，此时达V_{max}　　$V_0 = \frac{\overset{k_2[ES]=V_{max}}{k_2[E_0]}[S]}{K_m+[S]} = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]}$

当 $v=\frac{1}{2}V_{max}$，$K_m=[S]$，K_m等于反应速度达最大反应速度一半时的底物浓度.



- **当[S]<<Km时，**

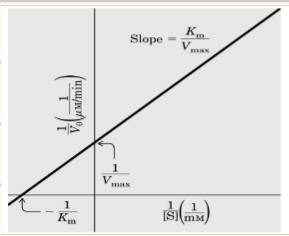
  $v_0 = V_{max}[S]/Km$
- **当[S]>>Km时，**

  $v_0 = V_{max}$

米氏常数K_m的意义

- $v_0 = 1/2\ V_{max}$时，$K_m = [S]$。K_m不依赖于酶浓度，K_m就是酶促反应速度为最大速度一半时底物浓度。
- $K_m = (k_{-1}+k_2)/k_1$，K_m为酶的特征常数，K_m只与酶的性质有关，与酶的浓度无关，随酶的底物、反应温度、pH、离子强度而改变。
- K_m可判断酶的专一性和天然底物，多底物反应的酶对于不同的底物有不同的K_m，其中K_m最小的底物为该酶的天然底物或最适底物。
- K_m可近似表示酶与底物的亲和力。K_m越大，酶与底物的亲和力越小。

Km和Vmax的求解：双倒数作图. $V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m+[S]} \Rightarrow \frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$



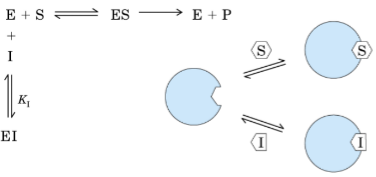
当底物浓度大大超过酶浓度，酶被底物饱和时，反应速度与酶的浓度变化成正比关系。　$V_0 = k_2[E_0]$

·酶的抑制作用

- **酶的抑制剂（inhibitor）：凡能使酶的催化活性下降而不引起酶蛋白变性的物质。**
  - 不可逆抑制：抑制剂与酶共价结合，引起酶的活性丧失。
  - 可逆抑制：抑制剂与酶为非共价结合，引起酶活力的下降或丧失，可通过透析、凝胶过滤等手段除去抑制剂，酶可回复原来的活性。

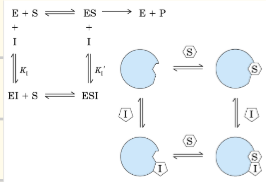
1).可逆抑制：·竞争性，非竞争性，反竞争性

i).竞争性



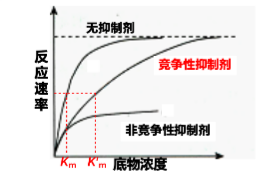
- 抑制剂与底物结构相似，抑制剂与底物结合在酶的同一位点；
- 抑制作用可被高浓度的底物减低以至消除。

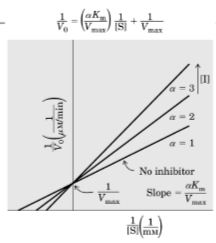
ii).非竞争性



- 这类抑制剂不与酶活性中心结合；
- 酶可同时与底物及抑制剂结合，但中间物ESI不能进一步分解为产物。

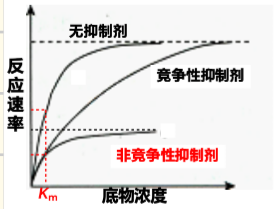
K_m增大，V_{max}不变

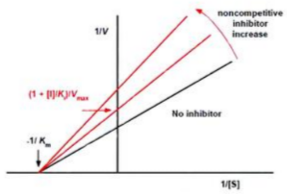




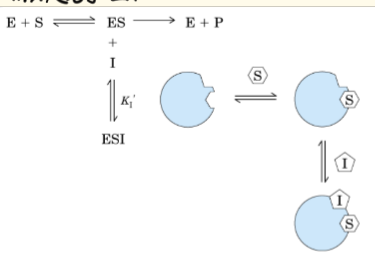
- $V_{max} = k_2[E_0]$
- K_m：酶促反应速率达到最大反应速率一半时的底物浓度

K_m不变，V_{max}变小



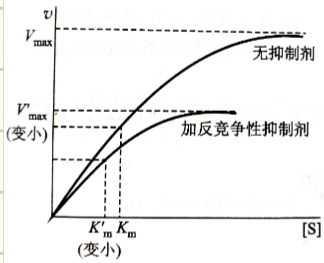


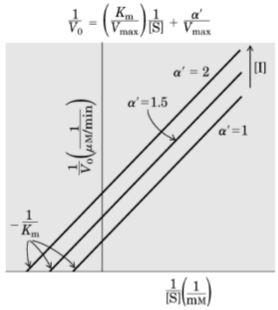
iii).反竞争性



- 抑制剂只能同ES结合，而不能和游离的酶结合
- S、I结构不相似，结合位点不同，增加[S]反而加强抑制

K_m变小，V_{max}变小





2).不可逆抑制剂：抑制剂与酶的必需基团以牢固的共价键结合从而使酶活丧失，不能用透析、超滤等去除抑制剂

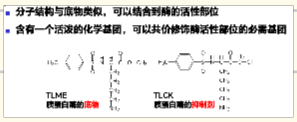
- 非专一性不可逆抑制剂：抑制剂可和酶的一类或几类基团反应
- 专一性不可逆抑制：抑制剂和某一种酶活性部位的必需基团反应

i).有机磷化合物：抑制蛋白酶和酯酶：与酶活性部位的Ser-OH共价结合

ii).有机汞、有机砷化合物：与酶分子中Cys-SH共价结合　iii).重金属盐　iv).烷化试剂　v).氰化物、硫化物、CO　vi).青霉素

vii). K_s型不可逆抑制剂

- 分子结构与底物类似，可以结合到酶的活性部位
- 含有一个活泼的化学基团，可以共价修饰酶活性部位的必需基团

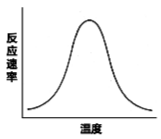


viii). K_{cat}型不可逆抑制剂　ix).抗代谢物　x).过渡态类似物

三、酶反应的影响因素

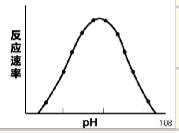
1）温度对活性的影响

- 反应速率随着温度升高而升高
- 蛋白质结构在较高温度下变性
- 酶的最适温度不是酶的特征常数，它与反应进行的时间有关
- 低温一般不使酶破坏，温度回升后，酶可以恢复活性。低温麻醉、低温保存菌种、低温保存酶制剂



2）pH对酶活性的影响

- 通过影响酶蛋白的结构、酶活性部位的解离状态、辅酶的解离以及底物分子的解离，影响酶与底物的结合以及对底物的催化效力。在一定条件下，在一个特定的pH，酶的催化活性最大，这一pH称为最适pH
- 动物体内多数酶的最适pH接近中性
- 最适pH不是酶的特征常数，它受底物浓度、缓冲溶液的种类、浓度及酶的纯度影响



3）激活剂对酶活力的影响

- 激活剂是指能提高酶活力的物质，其中大部分是无机离子或简单的有机化合物，如一些无机离子Na^+、K^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}等阳离子和Cl^-、Br^-、I^-等阴离子
  - 必需激活剂（essential activator）：对酶促反应不可少，与酶、底物结合参加反应
  - 非必需激活剂（non-essential activator）：有些激活剂不存在时，酶仍有一定的催化活性

·酶活性调节：

结构：活性中心：结合底物&起催化作用
别构中心：结合效应物 → 调节反应速度

·别构酶

- 酶的别构部位与某些化合物可逆的非共价结合后发生构象改变，进而改变酶的活性状态，称酶的别构调节，具有别构调节作用的酶称别构酶
- 使酶发生别构作用的物质称效应物、别构剂或调节物

别构酶的特点

- 常含有多个亚基（有四级结构）
- 除催化部位外，还有调节部位
- 酶分子的催化部位和调节部位有的在同一亚基上，也有的不在同一亚基上
- 不符合米氏方程，存在协同效应

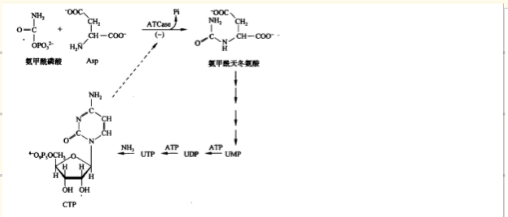
1).同促效应&异促效应

- 同促效应：效应物是底物。酶分子上有两个以上的底物结合中心，调节作用取决于酶上有多少个底物结合中心被结合
- 异促效应：效应物不是底物，而是其他代谢分子

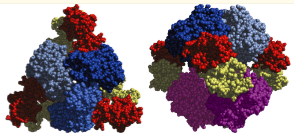
反馈抑制

- 当一个代谢途径的末端产物积累到超过机体需要时，它将对催化该反应途径限速反应的别构酶产生抑制，从而终止该产物的合成
- 异促效应中别构抑制剂的特例

2).天冬氨酸转氨甲酰酶的别构调节



- 天冬氨酸转氨甲酰酶（ATCase）：CTP合成代谢途径中的第一个酶

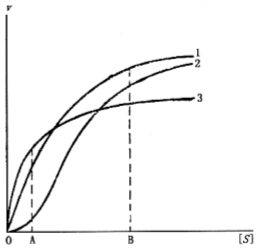


- 催化亚基：3条c链，不能与ATP和CTP结合
- 调节亚基：2条r链，能与ATP和CTP结合
- 天冬氨酸转氨甲酰酶含2个催化亚基和3个调节亚基（共12条多肽链）

- 底物N-氨甲酰磷酸和天冬氨酸促进ATCase活性——同促效应中的正协同效应
- CTP为最终产物，降低了酶与底物的亲和性，抑制ATCase活性——反馈抑制（异促效应中的别构抑制剂）
- ATP为非底物分子，但可增强酶与底物的亲和性而激活ATCase——异促效应中的别构激活剂

3）别构酶的动力学

- 米氏酶：无别构效应——动力学曲线为双曲线
- 正协同别构酶：酶结合底物后构象的变化促进后续分子与酶的结合——S形曲线
- 负协同别构酶：酶结合底物后构象的变化抑制后续分子与酶的结合——表观双曲线



正、负协同别构酶与非调节酶的动力学曲线比较

1：米氏酶；2：正协同别构酶；3：负协同别构酶

K型效应物和V型效应物

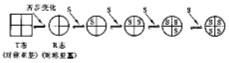
- 能改变底物的$K_{0.5}$而不改变反应V_{max}的效应物称为K型效应物
- 能改变V_{max}而不改变$K_{0.5}$的效应物称为V型效应物（p.419，图10-58）

别构酶的脱敏作用

- 别构酶经加热或化学试剂处理，可引起别构酶解离，失去调节活性，称为脱敏作用
- 脱敏后的酶表现为米氏酶的动力学双曲线（p.420，图10-59）

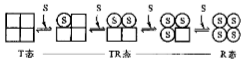
4).别构模型：①.齐变模型

- 别构酶由确定数目的亚基组成，各亚基占有相等的地位，因此每个别构酶都有一个对称轴
- 每个亚基相对一种效应物只有一个结合位点



②.序变模型：

- 当调节物不存在时，别构酶只有一种构象存在（T），只有当调节物与之结合后才诱导T态向R态转变



按次序变化

二、酶原的激活

- 酶原（Zymogen）：有些酶（绝大多数为蛋白酶）在细胞内合成及初分泌时，没有活性
- 酶原的激活：在一定条件下，酶原可转化成有活性的酶。酶原激活的机制是分子内肽键一处或多处断裂，使分子构象发生一定程度改变，从而形成酶的活性中心
- 酶原激活存在级联反应

三、酶的可逆共价修饰

- 酶蛋白肽链上的某些残基侧链在另一组酶的催化下发生可逆的共价修饰，从而引起酶活性改变，调节酶的活性，如磷酸化、乙酰化、甲基化、腺苷化

·磷酸化修饰：蛋白激酶催化可使酶蛋白中Ser，Thr，Tyr —OH 进行P化修饰

又可通过各种蛋白磷酸酶催化使此类磷酸基团水解出来，从而形成可逆的共价修饰来改变酶的构象，调节酶的活性

磷酸化修饰特点

- 磷酸化及脱磷酸化分别由蛋白激酶及蛋白磷酸酶催化
- 可连锁进行，逐级磷酸化或脱磷酸化，出现级联放大
- 磷酸化仅需以ATP供给磷酸基团，耗能远小于合成酶蛋白，作用快速
- 磷酸化修饰常与别构调节相互协作

·同工酶及多酶体系

一、同工酶

- 同工酶（isoenzyme）：指催化相同的化学反应，而酶蛋白的分子结构、理化性质乃至免疫学性质不同的一组酶
- 由不同基因或等位基因编码的多肽链所组成，或由同一基因转录生成的mRNA翻译成不同多肽链组成的蛋白质
- 同工酶存在于同一种属或同一个体的不同组织或同一细胞的不同亚细胞结构中

乳酸脱氢酶

同工酶虽然催化相同的反应，但可以有不同的功能

- 心肌中含量最多的是LDH1（H4），对NAD^+有较大的亲和力，易受丙酮酸抑制，它的作用主要是催化乳酸脱氢生成丙酮酸，有利于心肌利用乳酸氧化供能
- 骨胳肌中含量多的LDH5（M4），对NAD^+亲和力低，不受丙酮酸的抑制，其作用是催化丙酮酸加氢生成乳酸，有利于骨胳肌生成乳酸

心肌：乳酸 $\xrightleftharpoons{LDH_1}$ 丙酮酸

骨胳肌：乳酸 $\xrightleftharpoons{LDH_5}$ 丙酮酸

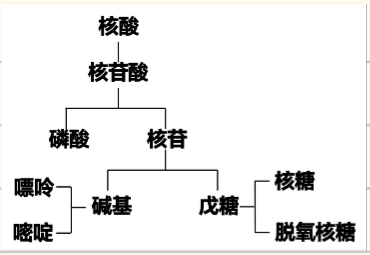
多酶体系的分类

- 可溶性类型：多酶体系中的各种酶在细胞质中以可溶性形式各自独立存在，没有结构上的联系
- 结构化类型：多酶体系中的各种酶彼此有机地组合在一起，形成多酶复合体。如丙酮酸脱氢酶复合体
- 定位于细胞器结构的类型：如呼吸链中的酶定位于线粒体的内膜上

限速步骤

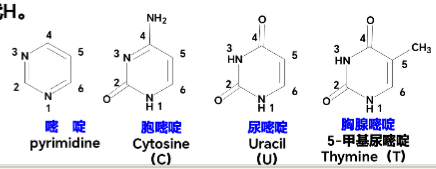
- 多酶体系的总速度决定于其中反应速度最慢的一个反应，这个速度最慢的酶限制着全部反应序列的速度，称为限速步骤
- 大部分具有自我调节能力的多酶体系的第一步反应是限速步骤

·核酸

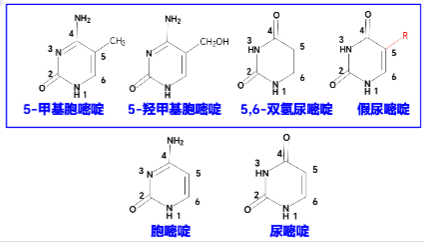


嘧啶碱

- 在嘧啶2位碳原子上由酮基取代H，4位碳原子上有氨基或酮基取代H。

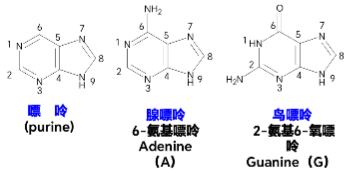


稀有的嘧啶碱

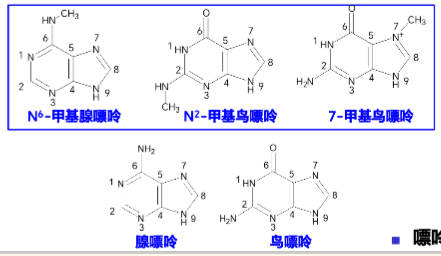


嘌呤碱

- 在嘌呤2位或6位碳原子上H被氨基或酮基取代。



稀有的嘌呤碱



- 嘌呤、嘧啶环上由于有共轭双键，在260nm波长附近对紫外光有较强的吸收

·核苷

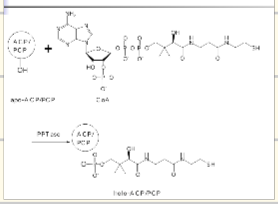
- 由戊糖和碱基之间以糖苷键（C-N糖苷键）缩合而成，连接方式是嘌呤环上的N-9或嘧啶环上的N-1与糖的C-1′以糖苷键相连，β-构型（1位羟基在环的上面）。

五、核苷酸的生物学功能

1、提供能量

- 磷酸之间的焦磷酸键含有很高的能量，称为高能键（~），是生物体内能量利用和贮存的主要物质（30 kJ/mol）。
- 核苷二磷酸：ADP、GDP、CDP、UDP
- 核苷三磷酸：ATP、GTP、CTP、UTP
- 脱氧核苷二磷酸：dADP、dGDP、dCDP、dTDP
- 脱氧核苷三磷酸：dATP、dGTP、dCTP、dTTP

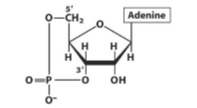
2、辅因子的结构成分



3、信号分子

3',5'-环状腺苷酸，cAMP

- 由腺苷酸上磷酸与核糖的3′，5′碳原子形成双酯环化而成。
- 由腺苷酸环化酶催化ATP脱去一分子焦磷酸而环化成cAMP；它又可被专一性的磷酸二酯酶水解成AMP。

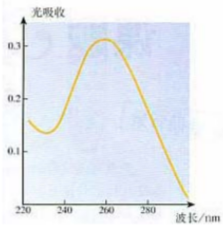


Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cyclic AMP; cAMP)

第三节 碱基的性质和核酸结构

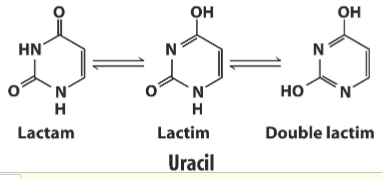
一、紫外吸收

- 嘌呤碱和嘧啶碱具有共轭双键，因此使得碱基、核苷和核苷酸在240~290nm的紫外波段有强烈的吸收峰，最大吸收值在260nm附近。



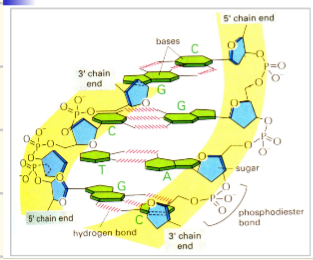
二、互变异构作用

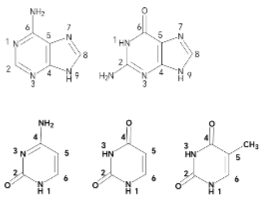
- 含有酮基的嘧啶或嘌呤碱，在溶液中可发生酮式和烯醇式的互变异构现象。



在生物细胞内一般是以酮式存在（这对核酸中氢键结构的形成十分重要）

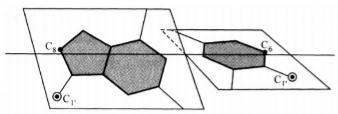
三、碱基的疏水堆积作用





四、碱基的氢键

- 组成碱基对的两个碱基不是在同一个平面上，而是碱基对沿长轴旋转一定角度，称为螺旋桨状扭曲。



·DNA结构：一级结构：核苷酸的排列顺序，二级结构：双螺旋

特殊结构：

1、环形DNA

- 大部分原核生物的DNA是共价封闭的环状双螺旋。包括：某些病毒、噬菌体、细菌质粒、真核生物线粒体和叶绿体、细菌染色体DNA。
- 线形DNA的两端有粘末端，也可借助DNA连接酶将互补的粘末端连接成环形DNA。

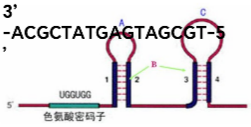
2、超螺旋结构

- 大部分细胞DNA是负超螺旋。
- 超螺旋状态DNA的形状、电泳行为与松弛状态DNA不同。
- DNA超螺旋状态受DNA拓扑异构酶催化。

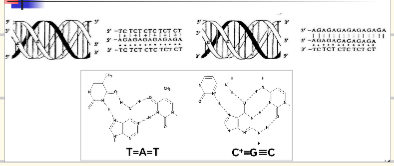
3、回文序列

- 单链DNA或者RNA可以形成发卡结构。
- 双链DNA可以形成十字架结构。
- 往往是DNA限制性内切酶的识别位点。

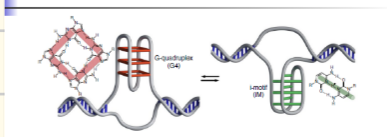
5'-TGCGATACTCATCGCA-3'
3'-ACGCTATGAGTAGCGT-5'



4、H-DNA（三链螺旋）



5、G4与I-motif



- 存在于动物端粒和基因启动子区域

·RNA结构：碱基：AMP、GMP、CMP、UMP、稀有碱基

一、信使RNA（messenger RNA，mRNA）

- mRNA的功能是把核内DNA的碱基顺序按照碱基互补的原则，抄录并转送至胞质，指导蛋白质的合成。

真核生物成熟mRNA的特点

- 在细胞核内合成的mRNA的初级产物，经过剪接成为成熟的mRNA并移到细胞质。
- 5'端帽子结构（cap sequence）：m'GpppNm
  - 帽子结构能促进核糖体与mRNA的结合，加速翻译起始速度，同时可以增强mRNA的稳定性。
- 3'末端多聚A的尾巴
  - 可能与mRNA从核内向胞质的转位及mRNA的稳定有关。

原核生物mRNA的特点

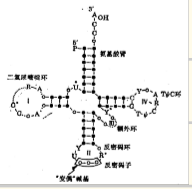
- 多顺反子：编码多个肽链

二、转运RNA（tRNA）

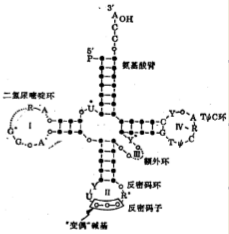
- **tRNA的特点：**

1、tRNA分子中含有10~20%的稀有碱基，包括双氢尿嘧啶（DHU）、假尿嘧啶（Ψ）和甲基化的嘌呤（mG，mA）。

2、tRNA中存在一些能局部互补配对的区域，能形成局部双链，进而形成一种茎-环状或发夹结构，由于茎环结构的存在，使tRNA形成了三叶草形的二级结构。



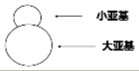
- 氨基酸臂：由7对碱基组成，3'末端为-CCA，接受活化的氨基酸
- 二氢尿嘧啶环：由8-12个碱基组成，具有两个二氢尿嘧啶
- 反密码子环：由7个碱基组成，环中部有3个碱基组成的反密码子，将由此与mRNA上的密码子配对
- 额外环：由3-18个碱基组成，大小不同，为tRNA分类的依据之一
- TψC环：由7个碱基组成，含有假尿嘧啶（ψ，psai）



53

三、核糖体RNA（rRNA）

- 细胞内含量最多的RNA，约占RNA总量的80%以上。
- rRNA与核糖体蛋白共同构成核糖体（ribosome）。



- 现在认为核糖体催化肽键形成的是rRNA，蛋白质只是维持rRNA构象，起辅助作用。
  - 大肠杆菌核糖体：5S rRNA，16S rRNA，23S rRNA
  - 动物细胞核糖体：5S rRNA，5.8S rRNA，18S rRNA，28S rRNA。

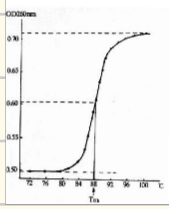
·核酸变性、复性和杂交

一、DNA变性

在某些理化因素作用下，DNA分子互补碱基对之间的氢键断裂，使DNA双螺旋结构松散，变成单链。监测指标为A_{260}的变化。

- 常用的变性方法为加热。
- 增色效应（hyperchromic effect）：DNA解链过程中，其A_{260}增加，并与解链程度有一定的关系。
- 解链曲线：在连续加热过程中以温度对A_{260}的关系作图。

解链曲线



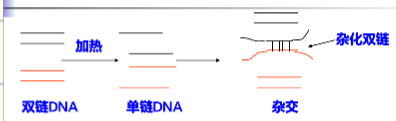
- T_m，解链温度，又称熔解温度（melting temperature）：当50%双链DNA分子双链结构被打开时的温度。
- 解链曲线（DNA熔解曲线）：在连续加热过程中以温度对A_{260}的关系作图。
- DNA变性从开始到完全解链是在一个相当窄的范围内完成的，A_{260}增加值达到最大增加值的50%时的温度即为T_m。

在一定范围内，C+G比例越高，T_m↑

二、DNA的复性

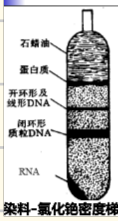
- 变性DNA在适当条件下，两条互补链可重新恢复天然的双螺旋构象，称为复性。热变性DNA经缓慢冷却后即可复性，也称为退火（annealing）。
- DNA复性速度受温度的影响。复性时温度缓慢下降才可使其重新配对复性。如加热后将其迅速冷却至4 ℃以下，则不可能发生复性。
- 比Tm低25℃为DNA复性的最佳条件。

三、核酸的分子杂交（hybridization）



- 在DNA复性过程中，双链分子的再形成既可以发生在序列完全互补的核酸分子之间，也可以发生在碱基序列部分互补的不同的DNA之间或DNA与RNA之间，这种现象称为分子杂交。

沉降特性



- 在超离心机强大的引力场中，不同构象的核酸沉降速度差异很大。

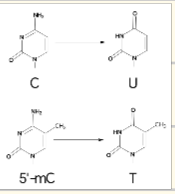
RNA > 闭环形质粒DNA > 开环形及线形DNA > 蛋白质

染料-氯化铯密度梯度超离心

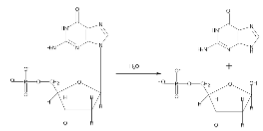
·核酸化学反应和酶学修饰

一、脱氨反应

- 10^{-7}/天，100脱氨反应/哺乳动物基因组/天。
- DNA中不含有U，使得U被修复系统所除去。

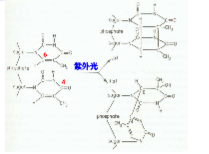


二、糖苷键水解



酸性下更快

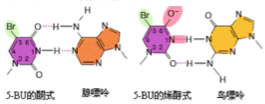
三、嘧啶二聚化和交联作用



四、化学诱变剂

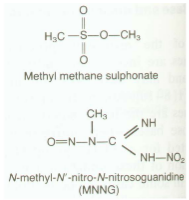
1、碱基类似物

- 在DNA复制时取代正常碱基与互补链上的碱基配对；但是易发生互变异构，在下一轮复制时改变子链配对的碱基。
- 5-溴尿嘧啶（BU）、2-氨基嘌呤（AP）



2、烷基化试剂

- 使碱基上的氮原子烷基化，改变了分子电荷分布从而改变了碱基对配对。
- 如鸟嘌呤（G）甲基化后成为7-甲基鸟嘌呤（MG），原本与胞嘧啶（C）配对改为与胸腺嘧啶（T）配对。



3、脱氨试剂

- 亚硝酸盐
- 腺嘌呤（A）脱氨后成为次黄嘌呤（I），与胸腺嘧啶（T）配对改为与胞嘧啶（C）配对。
- 胞嘧啶（C）脱氨后成为尿嘧啶（U），与鸟嘌呤（G）配对改为与腺嘌呤（A）配对。

4、羟胺　5、嵌入染料　6、能产生自由基、超氧化物的物质（DNA单链或双链的断裂，碱基的破坏）

五、DNA的酶法甲基化

- 细胞防御机制的一部分，区分自身DNA和外源DNA。
- Dam甲基化酶

  GATC → $G^{m}ATC$

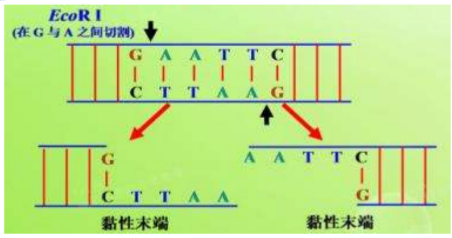
第八节 核酸酶和DNA限制性内切酶

核酸酶的分类

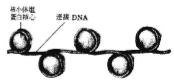
- DNA酶（DNase）：底物为DNA
- RNA酶（RNase）：底物为RNA
- 非特异性核酸酶：底物为DNA和RNA
- 内切核酸酶：在核酸链内部切割
- 外切核酸酶：从核酸链的一段逐个切割
  - 底物为单链核酸
  - 底物为双链核酸

74

DNA限制性内切酶



染色体的基本结构



- 真核生物：DNA和蛋白质组装成染色体，染色体的基本单位是核小体
- 核小体由DNA和组蛋白构成
- 组蛋白有H_1、H_2A、H_2B、H_3和H_4
- H_2A、H_2B，H_3和H_4各两分子构成核小体的核心，称为组蛋白八聚体
- DNA双螺旋分子缠绕在八聚体上构成核小体的核心颗粒
- 核小体的核心颗粒之间再由DNA和组蛋白H_1构成的连接区连接起来形成串珠状结构
- 核小体进一步旋转折叠形成棒状染色体，将近1 m长的DNA分子容纳于直径只有数微米的细胞核中

·生物膜

- 生物膜：是构成细胞所有膜的总称，包括细胞原生质最外面的质膜以及细胞内各种细胞器的内膜。

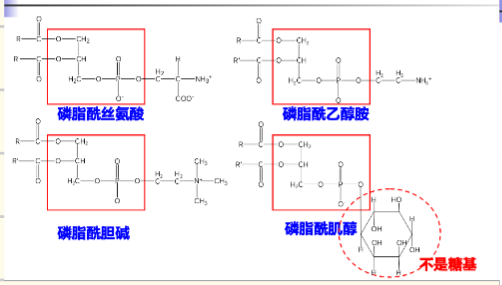
组成：膜脂、膜蛋白、糖

膜脂
- 磷脂：甘油磷脂、鞘磷脂
- 糖脂：鞘糖脂、甘油糖脂
- 胆固醇

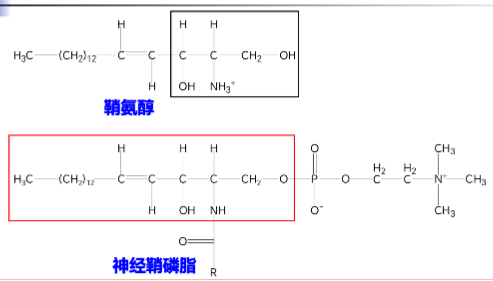
磷脂是生物膜主要组成部分

- 磷脂在膜双层的分布不对称

1、磷脂：甘油磷脂

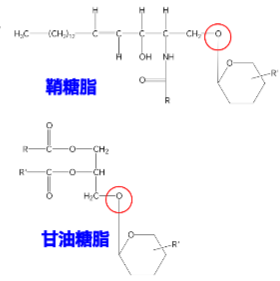


磷脂：鞘磷脂



2、糖脂

- 甘油糖脂
- 鞘糖脂



3、胆固醇

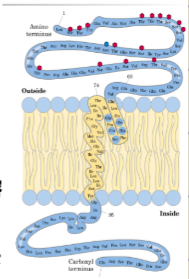
- 真核细胞的细胞膜中含胆固醇
- 真核细胞的细胞器膜不含胆固醇
- 酵母和植物中还存在麦角甾醇

二、膜蛋白

1、内嵌蛋白

- 一个或多个跨膜区域
- 与膜脂结合紧密：疏水相互作用
- 不溶于水
- 由膜上释放时要用特别的试剂（去污剂、有机溶剂、变性剂等）
- 嵌入蛋白由膜上释放出来以后，一旦去除变性剂或去污剂会立即引起蛋白沉淀（不溶聚积物）析出

- 跨膜区域富含疏水性氨基酸，趋向形成α螺旋和β折叠
- α螺旋和β折叠中主链上肽键形成蛋白分子内氢键



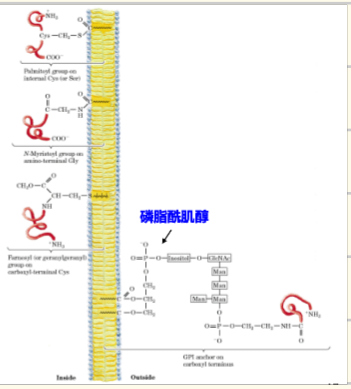
红细胞膜血型糖蛋白

2、外周蛋白

- 位于膜双层的表面
- 水溶性蛋白
- 与膜结合力：离子键、氢键
- 与膜结合位点：磷脂极性头部和内嵌蛋白亲水结构域
- 与膜结合疏松：温度的改变、破坏静电或破坏氢键作用（如加入螯合剂、尿素、碳酸盐或改变pH）可被释放出来
- 生理学功能：这些外周蛋白可作为膜结合酶的**调节因子**、或作为连接膜内蛋白与胞间结构的**中介物**

3、脂锚定膜蛋白

- 有些膜外周蛋白与膜脂有一个或多个共价结合位点，如长链脂肪酸、或磷脂酰肌醇糖基化衍生物。连接的脂提供了一个疏水的锚以插入脂双分子层。



3、糖

- 糖脂
  - 甘油糖脂
  - 鞘糖脂
- 糖蛋白
  - 膜糖蛋白的糖多为氨基糖、乙酰氨基糖
  - 糖基一般与蛋白天冬酰胺侧链上的酰胺N原子、或者丝氨酸/苏氨酸侧链上的羟基O原子相连

·生物膜中分子间作用力：静电力，疏水作用，范德华力　特征：5~8nm；不对称性；流动性；电极性、膜电位；非共价组合体

二、膜组分的不对称分布

1、膜脂的不对称分布

- 膜脂组成因不同的界、不同的种、不同的组织、不同的细胞、不同的细胞器而不同。
- 膜脂在同一个膜内层和外层的分布不对称。

2、膜蛋白的不对称分布

- 不同来源膜的蛋白质组成比其脂质组成的变化更大，反映了功能的不对称。
- 许多膜蛋白在双分子层上有一定的取向，很少发生翻转的情况，即使有速度也非常慢。
- 脊椎动物视网膜杆状细胞对于接受光为高度特化，90%以上的膜蛋白是光吸收蛋白-视紫红质；特化较低的红细胞质膜约含20种显著的蛋白及十几种较少的蛋白，其中多数的蛋白为运输载体，每一种蛋白运输一种跨膜的溶质等。

3、糖的不对称分布

- 细胞膜和细胞器膜中糖脂和糖蛋白的分布都是不对称的。

第三节 被动运输和主动运输

生物膜的主要功能：

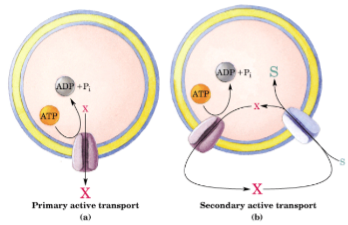
- 能量转换
- 物质运输
- 信息识别与传递

跨膜转运的类型

转运类型		是否需要转运蛋白	是否消耗能量	
被动转运（passive transport）	简单扩散（simple diffusion）	否	否	疏水性小分子（相似相溶）、水分子（多数细胞）
	促进扩散（facilitated diffusion）	是	否	通道蛋白：极性分子或离子，顺电化学梯度
主动转运（active transport）		是	是	“泵”：极性分子或离子，逆电化学梯度

- 被动转运总是顺电化学梯度转运，不会引起物质的积累。
- 主动转运总是逆电化学梯度转运，引起**物质的积累**。
- 主动转运直接或间接地依赖于一些**放能过程**，非热力学自动发生，往往伴随有光的吸收、氧化作用、ATP水解或其他顺电化学梯度的转运。
  - 一级主动转运，物质的积累直接与放能反应（如ATP→ADP+Pi）相连接。
  - 二级主动转运：由一级主动转运引起的逆电化学积累的顺电化学梯度转运。

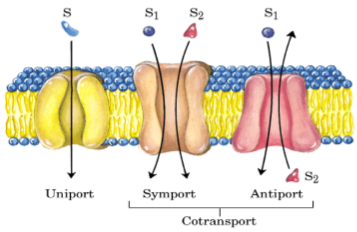
两种类型的主动转运



- 一级主动转运：直接消耗能量，如ATP。
- 二级主动转运：转运目标分子（S）的能量来源于另一种物质（X）主动转运产生的**电化学梯度**。

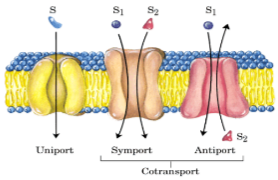
转运蛋白的类型

- 单向转运蛋白
- 偶联转运蛋白
  - 同向转运蛋白
  - 反向转运蛋白

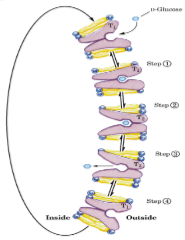


葡萄糖转运蛋白

- 内嵌蛋白
- 单向转运蛋白
- 葡萄糖的转运从高浓度到低浓度，无需消耗能量



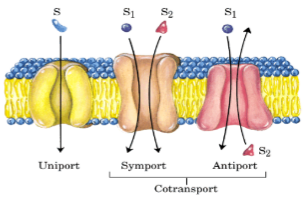
葡萄糖转运蛋白构象的改变



0. 结合葡萄糖之前为T_1构象
1. D-Glc与T_1构象特异结合，构象改变降低活化能
2. T_1构象转变为T_2构象，影响Glc跨膜通道
3. Glc由T_2构象释放到胞质
4. T_2构象变回T_1构象

二、 HCO_3^- —Cl^-交换体

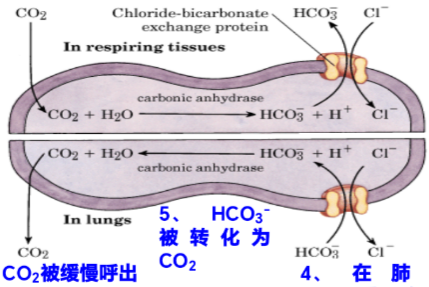
- 内嵌蛋白
- 偶联转运蛋白、反向转运蛋白
- HCO_3^-的转运从高浓度到低浓度，无需消耗能量



1、呼吸组织产生的CO_2由血浆进入红细胞

2、在红细胞中转化为HCO_3^-

3、HCO_3^-回到血浆中被运输到肺组织



5、HCO_3^-被转化为CO_2

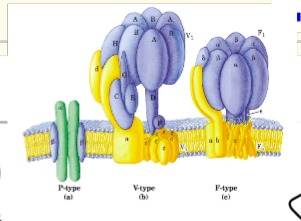
6、CO_2被缓慢呼出

4、在肺中HCO_3^-重回红细胞

- 血液中HCO_3^-比CO_2的溶解度大，这种变化增加了由组织到肺的CO_2运输的血容量

- HCO_3^-—Cl^-交换体也被称为阴离子交换蛋白，可增加HCO_3^-对红细胞膜的透过，这一系统也被称为协同运输系统。
- Cl^-不存在时，HCO_3^- 不被转运。
- HCO_3^-被排出红细胞的同时，Cl^-进入红细胞，避免电荷改变。

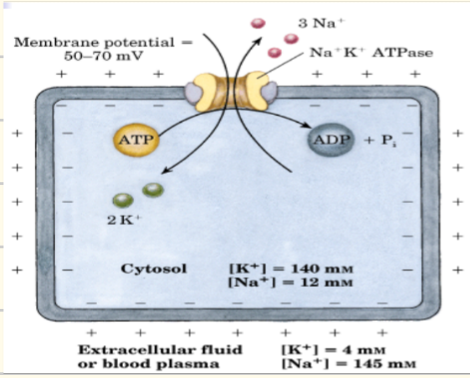
三、转运ATP酶



1、P型ATP酶（Na^+K^+-ATP酶）

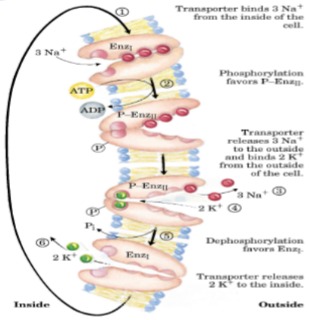
- 哺乳动物：负责H^+和K^+的跨膜转运
- 高等植物和霉菌：H^+泵出细胞，产生跨膜的pH梯度和电位差
- 细菌：排出有毒重金属离子

- 内嵌蛋白
- 偶联转运蛋白、反向转运蛋白
- Na^+和K^+的转运从低浓度到高浓度，消耗能量



- 动物细胞与环境相比：$[Na^+]$低，$[K^+]$高。
- 转运过程中Na^+和K^+必须同时存在，Mg^{2+}是水解ATP所必须的。

P型ATP酶转运蛋白构象的改变



1、转运蛋白为构象I，结合细胞内的3个Na^+

2、ATP水解为ADP，释放的能量使转运蛋白磷酸化，变为构象II

3、结合的3个Na^+被释放到细胞外

4、转运蛋白结合细胞外的2个K^+

5、转运蛋白去磷酸化，变回到构象I

6、结合的2个K^+被释放到细胞内

2、V型ATP酶

广泛存在于动物细胞的内体膜、溶酶体膜、破骨细胞及某些肾小管细胞质膜

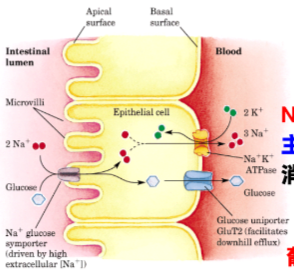
- 真核生物液泡膜中
- 真菌和高等植物：利用胞质ATP作为能量，将H^+泵入细胞内的液泡内。
  - 液泡中pH = 3~6；细胞质中pH = 7.5

3、 F型ATP酶

- H^+可逆的跨膜转运。
- H^+顺电化学梯度转运时，ADP转化为ATP，F型ATP酶也称ATP合成酶。
- H^+逆电化学梯度转运时，消耗ATP。

eg. 线粒体中ATP合酶

四、Na^+-葡萄糖同向转运蛋白



小肠上皮细胞

（2）
Na^+K^+-ATP酶
主动转运Na^+和K^+
消耗能量（ATP）

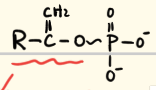
（3）
Na^+-葡萄糖同向转运蛋白
主动转运Na^+和葡萄糖
消耗能量（Na^+和跨膜电势位）

（1）
葡萄糖转运蛋白
被动转运葡萄糖
无需能量

•生物氧化

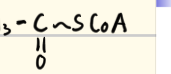
高能磷酸键的类型

- 磷酸酐：ATP、ADP、UTP、CTP、PPi等
- 烯醇磷酸：PEP
- 混合酐：1,3-BP-甘油酸
- 磷酸胍类：磷酸肌酸
- 另有高能硫酯键：乙酰CoA、脂酰CoA等

烯醇磷酸： 

PEP：磷酸烯醇式丙酮酸

烯醇（互变后稳定）

乙酰CoA： 

ATP的作用

- 作为能量载体，提供合成代谢或分解代谢初始阶段所需的能量
- 供给机体生命活动所需的能量
- 生成核苷三磷酸（NTP）
- 将高能磷酸键转移给肌酸以磷酸肌酸（creatine phosphate）形式储存

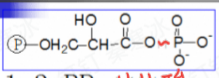
提供合成代谢或分解代谢初始阶段所需的能量

- G + ATP ⟶ G-6-P + ADP
- 脂肪酸 + HS-CoA + ATP ⟶ 脂肪酰~S-CoA + AMP + PPi
- 氨基酸 + ATP ⟶ 氨基酰~AMP + PPi

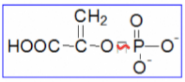
ATP的生成方式

- 氧化磷酸化：代谢物脱下的氢经电子传递链与氧结合成水的同时，逐步释放出能量，使ADP磷酸化为ATP的过程。
- 底物水平磷酸化（substrate level phosphorylation）：高能化合物中高能键的分解直接偶联ATP或GTP的合成，共3个反应。

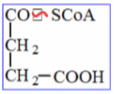
底物水平磷酸化



1, 3-BP-甘油酸 +ADP ⇌（3-P-甘油酸激酶）3-P-甘油酸 +ATP



PEP+ADP ⟶（丙酮酸激酶）丙酮酸+ATP



琥珀酰CoA+Pi+GDP ⇌（琥珀酰CoA合成酶）琥珀酸+CoA+GTP

- 它们都通过底物脱H_2O、H、CO_2形成高能键，并直接转移给ADP或GDP形成ATP或GTP（没有经过呼吸链）

生物氧化与体外氧化的相同点

- 生物氧化中物质的氧化方式有加氧、脱氢、失电子，遵循氧化还原反应的一般规律。
- 物质在体内、外氧化时所消耗的氧量、最终产物（CO_2，H_2O）和释放能量均相同。

生物氧化与体外氧化的不同点

生物氧化	体外氧化
在细胞内温和的环境中由酶催化进行的，能量是逐步释放的，并储存于ATP中	能量是突然释放的
代谢物脱下的氢与氧结合产生H_2O，有机酸脱羧产生CO_2	CO_2、H_2O由物质中的碳和氢直接与氧结合生成

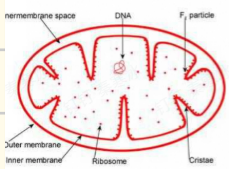
二、电子传递过程

- 来自中间代谢物的还原物质（NADH或$FADH_2$）经电子传递链传递给氧生成水时，释放出大量的能量，这部分能量可推动ADP与Pi合成ATP。
- NADH：$\Delta G^{\circ\prime}$= -221.5 kJ/mol
- $FADH_2$：$\Delta G^{\circ\prime}$= -171.4 kJ/mol

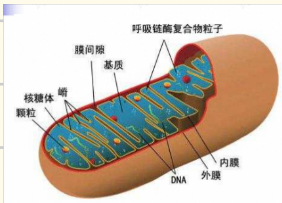
三、电子传递和氧化呼吸链

- 概念：线粒体内膜上存在由多种酶和辅基组成的传递质子和电子的反应链，它们按一定顺序排列，称电子传递链（或氧化呼吸链）（electron transfer chain或respiratory chain）。

线粒体



- 外膜（out membrane）
  含40%的脂类和60%的蛋白质，具有孔蛋白（porin）构成的亲水通道，允许分子量为5 kD以下的分子通过。标志酶为单胺氧化酶。
- 内膜（inner membrane）
  含100种以上的多肽，蛋白质和脂类的比例高于3:1。通透性很低，仅允许不带电荷的小分子物质通过，大分子和离子通过内膜时需要特殊的转运系统，如丙酮酸和焦磷酸是利用H^+梯度协同运输。



- 线粒体氧化磷酸化的电子传递链位于内膜，因此从能量转换角度来说，内膜起主要的作用。内膜的标志酶为细胞色素C氧化酶。

电子传递链的组成

- 从线粒体内膜上分离到四种酶复合体及辅酶Q（CoQ）和细胞色素（Cyt）
  - 复合体I：NADH-CoQ还原酶
  - 复合体II：琥珀酸-CoQ还原酶
  - 复合体III：CoQ-细胞色素C还原酶
  - 复合体IV：细胞色素氧化酶
- NADH呼吸链：含复合体I、III、IV及CoQ、Cyt
- $FADH_2$呼吸链：含复合体II、III、IV及CoQ、Cyt

人线粒体呼吸链复合体

复合体	酶名称	多肽链数	辅基
复合体Ⅰ	NADH-泛醌还原酶	39	FMN，Fe-S
复合体Ⅱ	琥珀酸-泛醌还原酶	4	FAD，Fe-S
复合体Ⅲ	泛醌-细胞色素C还原酶	10	铁卟啉，Fe-S
复合体Ⅳ	细胞色素c氧化酶	13	铁卟啉，Cu

NAD^+：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸　　$NADP^+$：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

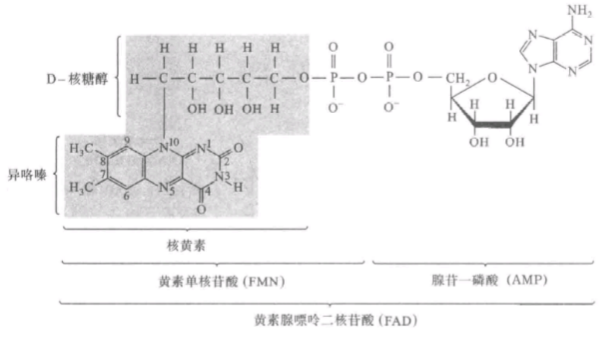
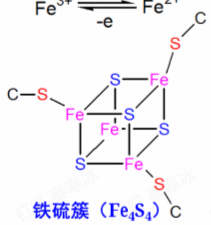


图 13-13　核黄素和黄素辅酶（FMN 和 FAD）的化学结构

铁硫蛋白

功能：单电子传递体

$$Fe^{3+} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} Fe^{2+}$$

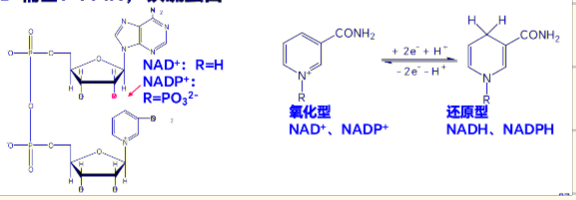


铁硫簇（Fe_4S_4）

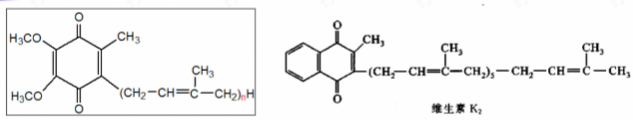
- 呼吸链的几乎每个过程都有Fe-S参与，有9种。含非血红素铁和对酸不稳定的硫。
- 主要分布在线粒体内膜上，它与NAD^+或$NADP^+$共同组成复合体，参与电子传递，而且两个Fe离子中只有一个参与，所以是单电子传递。

1、复合体I：NADH-CoQ还原酶

- 功能：将电子从NADH传递给CoQ
- 辅基：FMN，铁硫蛋白



泛醌（CoQ）



- 是脂溶性醌类化合物，由于在生物中广泛存在，所以也称泛醌。
- 它处于呼吸链的中心枢纽，也是中间传递体。

2、复合体II：琥珀酸- CoQ还原酶

- 功能：将电子从琥珀酸传递给CoQ
- 辅基：FAD、Fe-S、$Cytb_{560}$

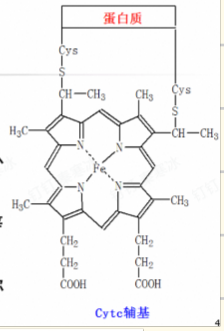
3、复合体III：CoQ -细胞色素C还原酶

- 功能：将电子从CoQ传递给Cytc
- 组成：Cytb、Fe-S、$Cytc_1$
- 细胞色素（Cyt）：含铁卟啉辅基的有色蛋白，分a、b、c三类，每类中又分几种亚类

细胞色素

功能：单电子传递体

$$Fe^{3+} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} Fe^{2+}$$



- 细胞色素为有色蛋白，有效成分是辅基铁卟啉，主要存在有氧呼吸的细胞中
- 根据光吸收带不同分为：Cyt b，c_1，c，aa_3等
- 辅基的Fe起传递电子作用
- 由于$Cytaa_3$靠近O_2，故称为Cyt氧化酶，也称Cyt末端氧化酶

4、复合体IV：细胞色素氧化酶

- 功能：将电子从Cytc最终传递到O_2
- 组成：Cyta、$Cyta_3$、Cu

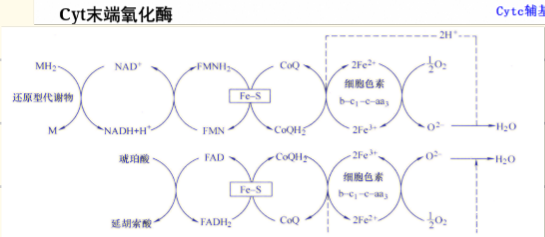


图 8-5　NADH 呼吸链和 $FADH_2$ 呼吸链

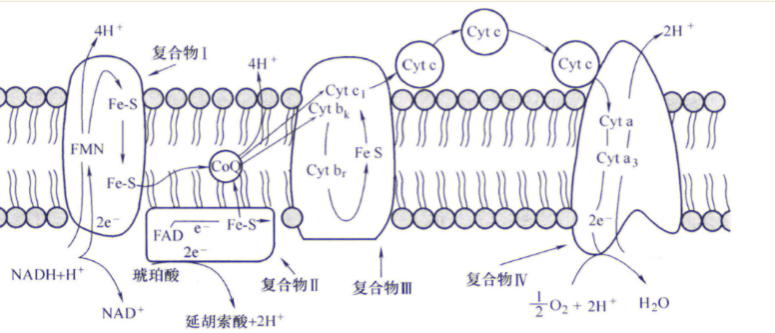


图 8-6　呼吸链蛋白质复合物的组成

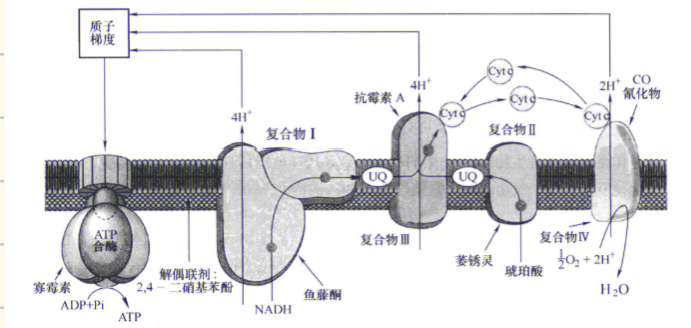


图 8-11　化学渗透学说与 ATP 的生成

$$NADH \xrightarrow{-0.32} FMN \xrightarrow{-0.30} CoQ \xrightarrow{0.04} Cytb \xrightarrow{0.07} Cytc_1 \xrightarrow{0.22} Cytc \xrightarrow{0.25} Cytaa_3 \xrightarrow{0.21} O_2$$

$FADH_2$ (-0.06)　1.5 ATP　2.5 ATP

P/O 比值

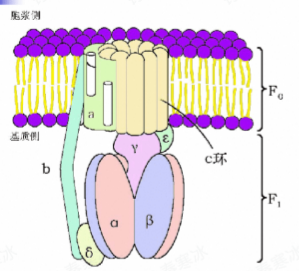
- 每消耗1/2 mol O_2所消耗无机磷酸的mol数（即合成ATP的mol数）

底 物	呼吸链的组成	P/O比值	生成ATP数
β-羟丁酸	$NAD^+ \rightarrow O_2$	2.4~2.8	2.5
琥珀酸	$FAD \rightarrow O_2$	1.7	1.5
抗坏血酸	$Cyt\ c \rightarrow O_2$	0.88	1
细胞色素C	$Cyt\ aa_3 \rightarrow O_2$	0.61~0.68	1

3、化学渗透偶联假说

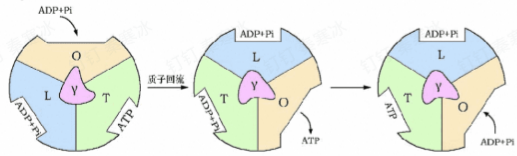
- 在电子传递和ATP形成之间起偶联作用的是质子梯度；
- 在偶联过程中，线粒体内膜必须是完整的、封闭的，才能发挥作用；
- 破坏质子梯度的形成导致氧化磷酸化的破坏；

ATP合酶的结构



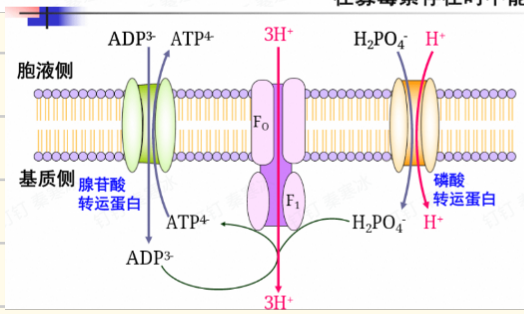
- F_O：为疏水蛋白质，是镶嵌在线粒体内膜中的质子通道；
- F_1：为亲水蛋白质，由$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$亚基组成，催化生成ATP；
- OSCP：寡霉素敏感相关蛋白，位于F_O与F_1之间，使ATP合酶在寡霉素存在时不能生成ATP。

ATP合酶的工作机制



- O：开放状态，不结合底物
- L：松弛结合底物，无催化活性
- T：紧密结合底物，有催化活性

- 每个亚基：O → L → T → O ……
- 所有亚基同时转变，整体保持1个O、1个L、1个T
- 化学计算估计每生成1分子ATP需3个H^+从线粒体内膜外侧回流进入基质中



- 每分子ATP在线粒体中生成并转运到胞浆需4个H+回流进入线粒体基质中

五、NADH的再氧化

- 细胞质中NADH必须经一定转运机制进入线粒体，再经呼吸链进行氧化磷酸化
- 线粒体外膜通透性高，线粒体对物质通过的选择性主要依赖于内膜中不同转运蛋白对各种物质的转运

还原当量的转运

- 线粒体内膜转运蛋白转运的不是NADH，而是NADH上的电子。
- 还原当量的转运
  - α-磷酸甘油穿梭：脑、心肌、骨骼肌
  - 苹果酸-天冬氨酸穿梭：脑、心肌、肝、红肌

α-磷酸甘油穿梭（单向） 1个NADH ~ 2.5个ATP

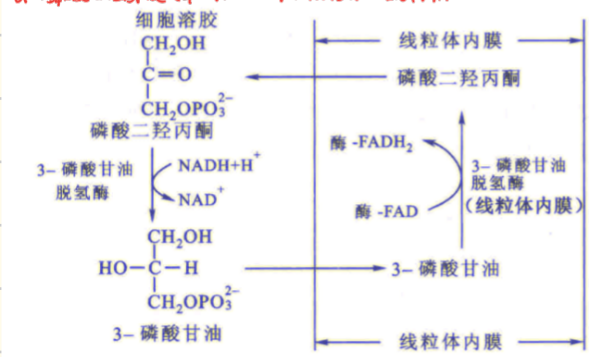


图 19-27 3-磷酸甘油穿梭途径

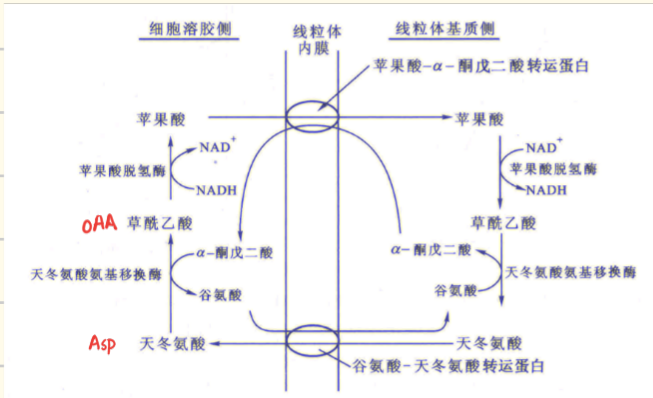
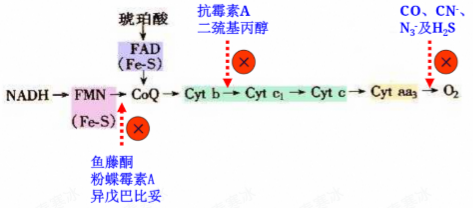


图 19-28 苹果酸-天冬氨酸穿梭示意图

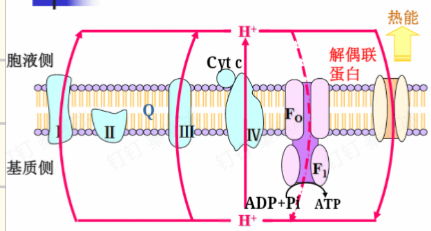
抑制&调控

1、呼吸链抑制剂

- 能阻断呼吸链中某些部位电子传递



2、解偶联剂（uncoupler）



- 使氧化与磷酸化偶联过程脱离
- 二硝基苯酚增加内膜对H^+的通透性，破坏跨膜梯度的形成
- 解偶联蛋白作用机制（棕色脂肪组织线粒体）

4. ADP的调节作用：氧化磷酸化主要受ADP的调节

[ADP]↑，氧化磷酸化↑

5、甲状腺激素

- Na^+,K^+–ATP酶和解偶联蛋白基因表达均增加

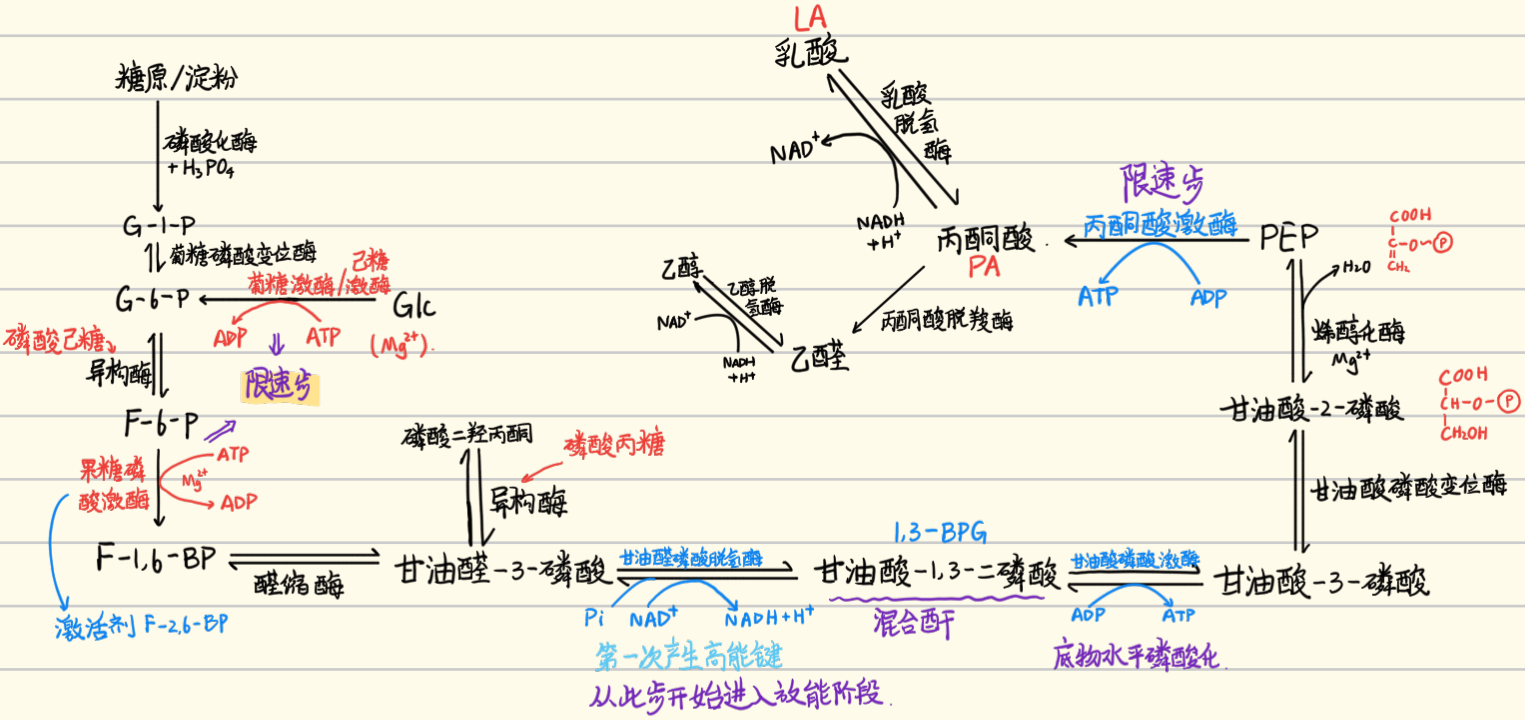
6、线粒体DNA突变

- 与线粒体DNA病及衰老有关

- 糖酵解途径：由葡萄糖生成丙酮酸的过程
- 糖酵解：由葡萄糖生成丙酮酸最终生成乳酸的过程
- 糖发酵：由葡萄糖生成丙酮酸最终生成乙醇的过程

葡萄糖 —糖酵解途径→ 丙酮酸
- —有氧氧化→ CO_2+H_2O
- —酵解→ 乳酸
- —发酵→ 乙醇

糖酵解：

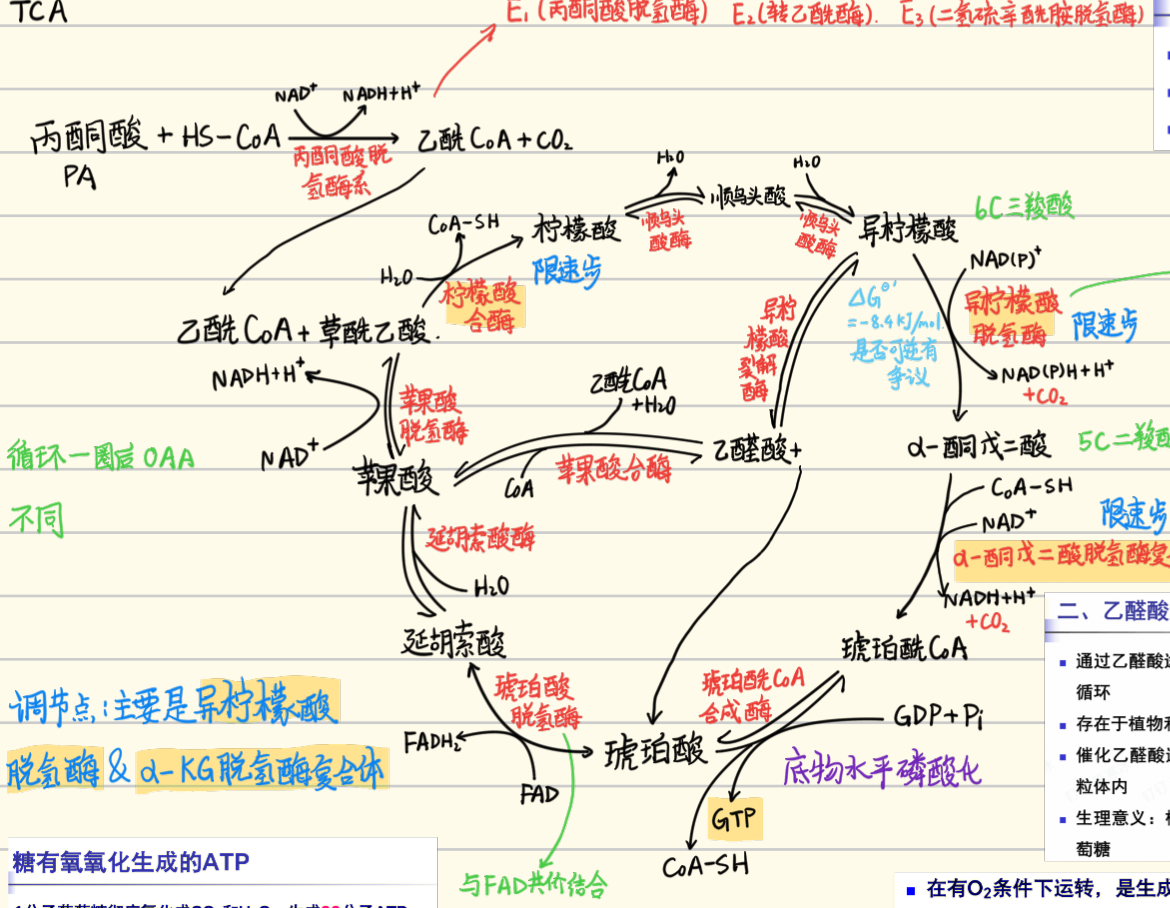


糖酵解总反应方程式

葡萄糖 + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD^+

⟶ 2 丙酮酸 + 2 ATP + 2 NADH + 2 H^+ + 2 H_2O

TCA



三羧酸循环的生理意义

- 是糖、脂肪、蛋白质分解的最终代谢通路
- 是三大物质代谢联系的枢纽
- 可为其他合成代谢提供小分子前体

- 代谢物对异柠檬酸脱氢酶和异柠檬酸裂合酶活性的调节决定异柠檬酸走向乙醛酸循环还是三羧酸循环

二、乙醛酸途径（glyoxylate pathway）

- 通过乙醛酸途径使乙酰-CoA转变为草酰乙酸，从而进入三羧酸循环
- 存在于植物和微生物体内，不存在于动物体内
- 催化乙醛酸途径的酶存在于乙醛酸循环体（glyoxisome）和线粒体内
- 生理意义：植物种子中储存的甘油三酯通过乙酰CoA转变为葡萄糖

糖有氧氧化生成的ATP

1分子葡萄糖彻底氧化成CO_2和H_2O，生成32分子ATP

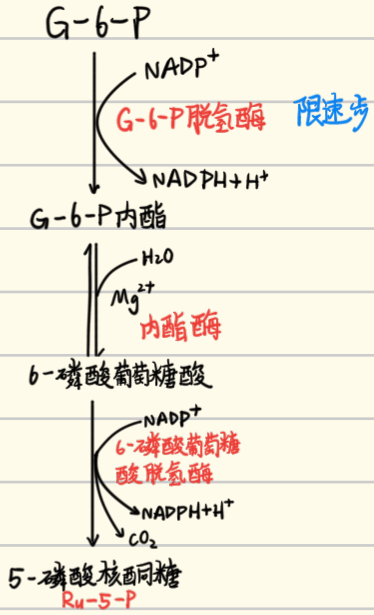
- 葡萄糖 → 2 丙酮酸
  2 ATP + 2 NADH = 7 ATP （NADH在细胞质中）
- 2 丙酮酸 → 2 乙酰CoA
  2 × NADH = 5 ATP （NADH在线粒体中）
- 2 乙酰CoA → 4 CO_2（TCA）
  2 ×（3 NADH + 1 $FADH_2$ + 1 GTP）= 20 ATP
  （NADH、$FADH_2$在线粒体中）

- 在有O_2条件下运转，是生成ATP的主要途径
  - 循环中有4次脱氢，生成3分子NADH，1分子$FADH_2$，另有1次底物水平磷酸化
  - 共生成10分子ATP（1 NADH ≡ 2.5 ATP， 1 $FADH_2$ ≡ 1.5 ATP ）
- 循环一周产生2分子CO_2
  - CO_2来自草酰乙酸而不是乙酰CoA，但净结果是氧化了1分子乙酰CoA

•磷酸戊糖途径（HMP途径）

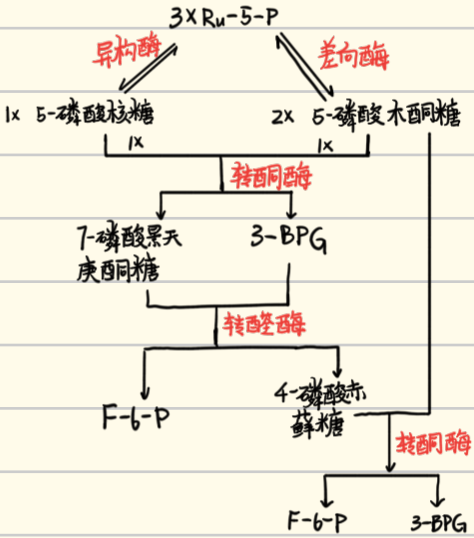
HMP代谢反应的特点

- 葡萄糖在HMP中直接脱羧脱氢，不需经过C3糖过程
- 产生NADPH，为生物合成提供还原力
- 在整个反应过程中，反应不需ATP
- 生物机体利用葡萄糖生成5-P-核糖的唯一途径，参加核酸代谢

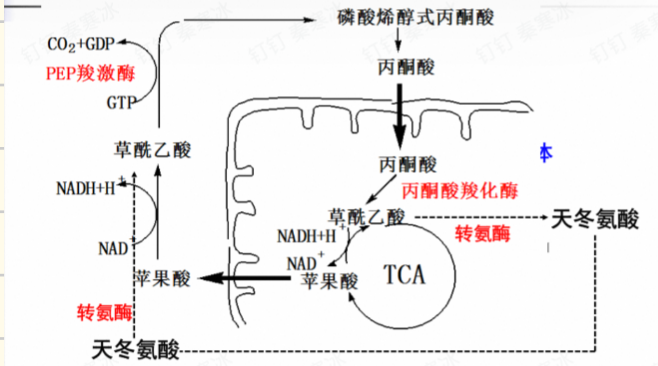


HMP途径的生物学意义

- 产生的NADPH为机体内许多还原性生物合成反应提供H原子
- 产生的核糖参与核苷酸等的生物合成



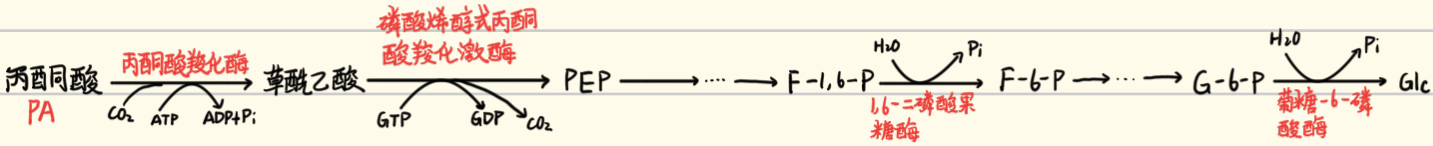
磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶

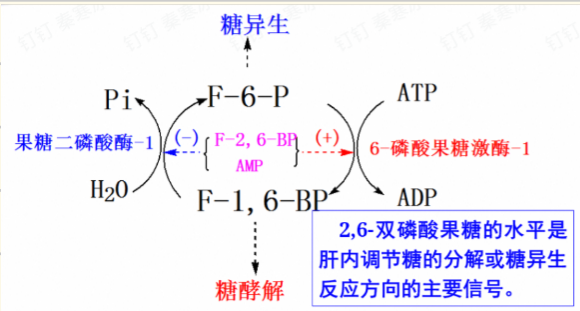


•糖异生：丙酮酸 ⟶ Glc

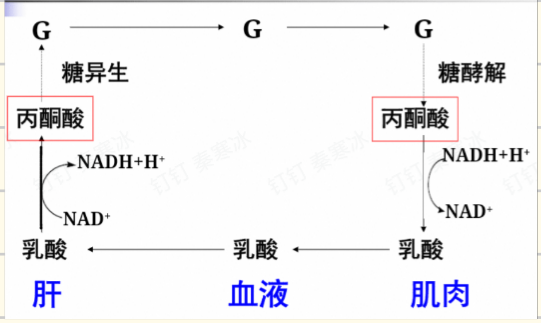
关注 Glycolysis 的三个不可逆反应

- 丙酮酸羧化酶位于线粒体，辅酶为生物素
- 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶，在线粒体和细胞质中都存在



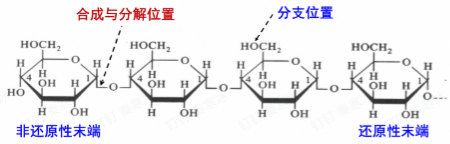


四、乳酸循环（Cori循环）

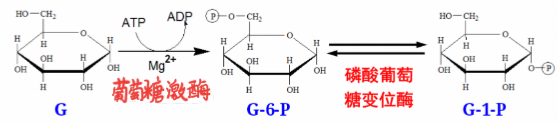


·肝糖原合成与分解

- 糖原的合成与分解都由非还原性末端开始



第一步：G → G-1-P



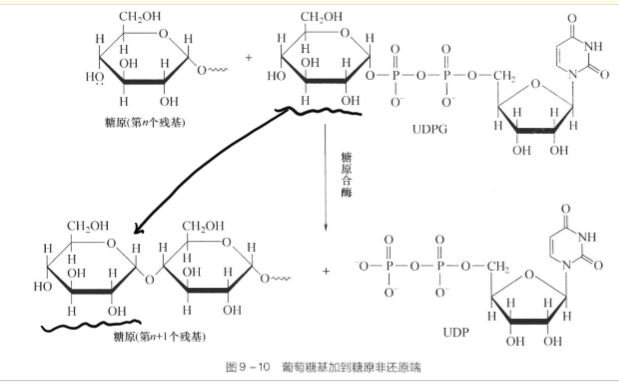
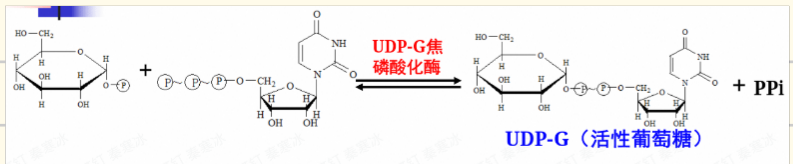


图 9－10　葡萄糖基加到糖原非还原端



- 该反应可逆
- 焦磷酸水解为两个磷酸根，此反应不可逆，总反应不可逆
- 酶的命名

分支合成：分支酶　　每延长一个Glc要消耗2个ATP（1个ATP，1个UTP）

2、肝糖原的分解

分步反应

第一步：从糖链的非还原端开始磷酸解

$$糖原(G_n) + H_3PO_4 \xrightarrow{磷酸化酶} 糖原(G_{n-1}) + G\text{-}1\text{-}P$$

磷酸化酶只能分解α(1→4)糖苷键，对α(1→6)糖苷键无作用

第二步

$$G\text{-}1\text{-}P \xrightarrow[磷酸葡萄糖变位酶]{} G\text{-}6\text{-}P$$

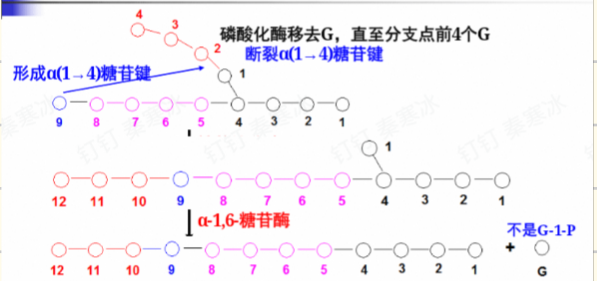
第三步

$$G\text{-}6\text{-}P \xrightarrow{葡萄糖\text{-}6\text{-}磷酸酶（肝、肾）} G + H_3PO_4$$

葡萄糖-6-磷酸酶只存在于肝、肾中，而不存在于肌肉中，所以只有肝和肾可补充血糖，而肌糖原不能分解为葡萄糖，不能补充血糖，只能进行糖酵解或有氧氧化

- 共价修饰
  - 磷酸化酶：糖原分解的限速酶
  - 糖原合成酶：糖原合成的限速酶
- 别构调节
  - 别构效应物：葡萄糖

第四步：脱分支

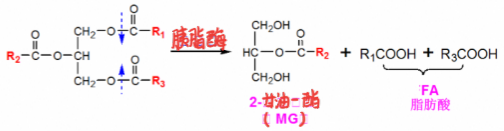


- α-1,6-糖苷酶和转移酶为同一种酶的二种活性，合称脱支酶

脂代谢

脂类
- 脂肪：甘油三酯
- 类脂
  - 胆固醇
  - 胆固醇酯
  - 磷脂
  - 糖脂

- 小肠：胆汁酸盐、胰脂酶、辅脂酶、胰磷脂酶A_2、胆固醇酯酶
- 消化产物：甘油一酯（MG）、脂肪酸（FA）、胆固醇、溶血磷脂

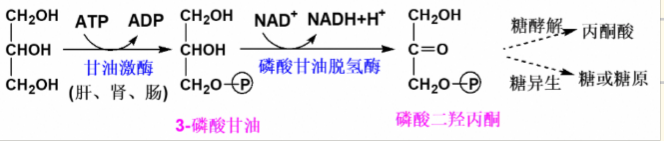


辅脂酶：小蛋白质，没有酶活性。与胰脂酶及脂肪结合，增加胰脂酶活性，促进脂肪水解

脂肪的动员

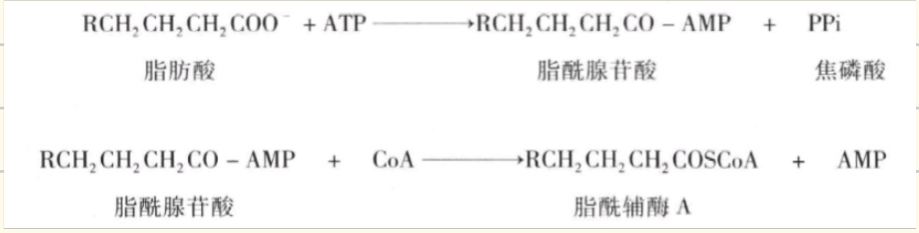
- 限速酶：激素敏感性甘油三酯脂肪酶（HSL）
- 脂解激素：肾上腺素、胰高血糖素等
- 抗脂解激素：胰岛素、前列腺素E_2及烟酸

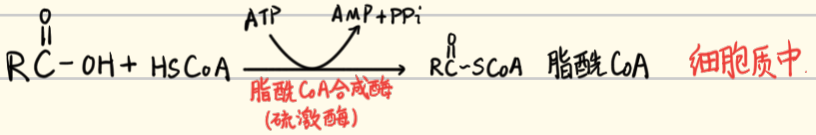
- 甘油的分解代谢基本上沿糖分解代谢进行



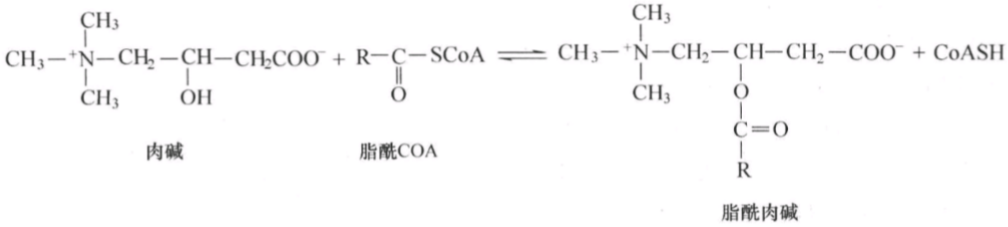
三、脂肪酸的β-氧化

- 概念：脂肪酸氧化从羧基端β-碳原子开始，每次释放出一个二碳片段（乙酰CoA），故称β-氧化
- 过程：脂肪酸的活化 → 进入线粒体 → β氧化 → TCA





10 个碳原子以下的脂酰辅酶 A 分子可以渗透通过线粒体内膜，但长链的脂酰辅酶 A 就不能轻易地透过线粒体内膜。需要极性的肉碱（carnitine）分子结合。肉碱在植物和动物组织中都存在。肉碱脂酰转移酶（carnitine acyltransferase）催化此反应。



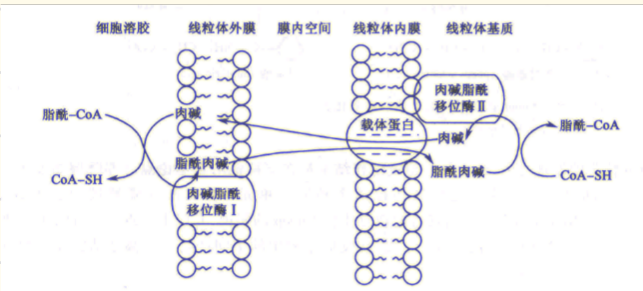


图 24-5 脂酰-CoA 跨线粒体内膜机制

- 脂肪酸仅需活化一次（胞质内），消耗一个ATP的两个高能键
- 脂酰-CoA由肉碱运入线粒体，限速酶：CAT-I
- β-氧化（线粒体内）：包括脱氢、加水、再脱氢、硫解四个重复步骤

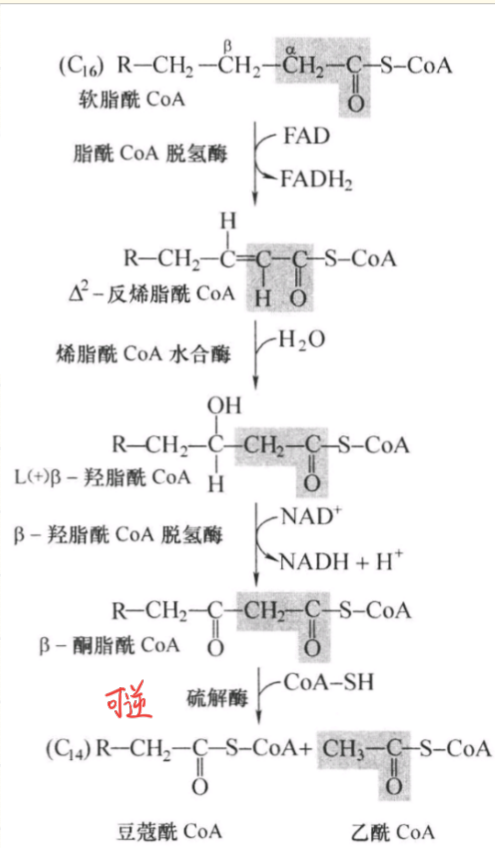


图 10－2 脂肪酸的 β－氧化

如软脂酸（C_{16}）

- 7次β-氧化，生成8分子乙酰CoA、7分子$FADH_2$及7分子NADH

  即 8 ×10 + 7 × 1.5 + 7× 2.5 = 108 ATP
- 脂肪酸活化时消耗2个高能磷酸键
- 净生成108 – 2 = 106 ATP

（2）硬脂酸（18C）部分

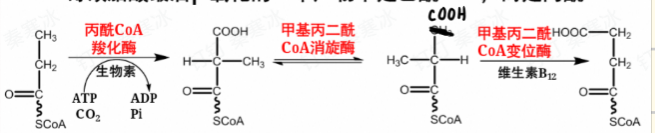
- 每个硬脂酸分子经过8次β-氧化，生成9分子乙酰CoA、8分子$FADH_2$及8分子NADH

  9 ×10 + 8 × 1.5 + 8× 2.5 = 122 ATP
- 硬脂酸活化时消耗2个高能磷酸键，净生成120 ATP
- 3个硬脂酸分子，生成360 ATP
- 一分子三硬脂酸甘油酯共产生

  18.5 + 360 = 378.5 ATP

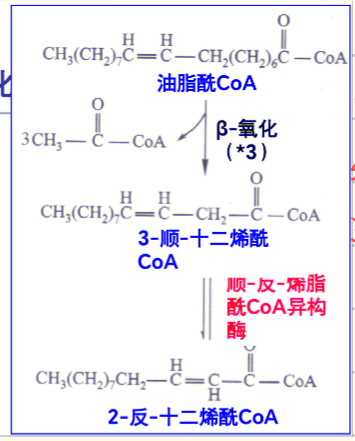
1、饱和奇碳脂酸的β-氧化

- 奇碳脂酸最后β-氧化的一个产物不是乙酰CoA，而是丙酰CoA



2、不饱和脂肪酸的β-氧化

- 参与饱和脂肪酸β-氧化的酶都参与
- 烯键由顺-反-烯脂酰CoA异构酶催化



自然界中不饱和脂肪酸均为顺式.

1、酮体（KB）

- 脂肪酸在肝脏中会发生不完全氧化，产生乙酰乙酸、β-羟丁酸和丙酮，这些统称为酮体

合成部位：肝

亚细胞部位：细胞质

酮体的生成

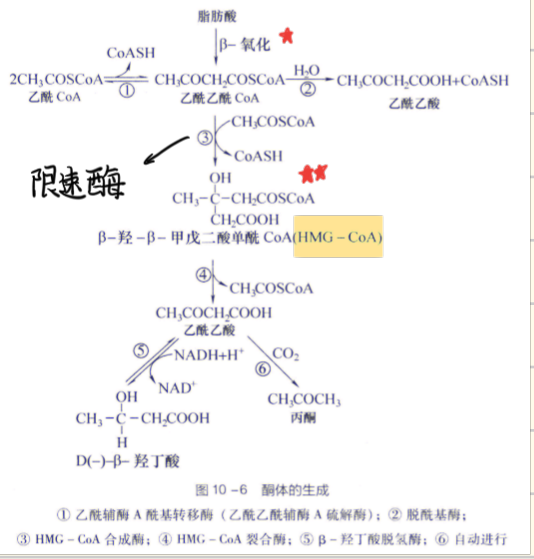
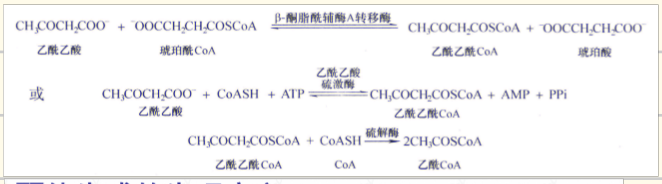


图 10-6 酮体的生成

① 乙酰辅酶 A 酰基转移酶（乙酰乙酰辅酶 A 硫解酶）；② 脱酰基酶；③ HMG-CoA 合成酶；④ HMG-CoA 裂合酶；⑤ β-羟丁酸脱氢酶；⑥ 自动进行

酮体的利用

- 肌肉中的β-羟丁酸首先被氧化成乙酰乙酸（β-羟丁酸脱氢酶）
- 乙酰乙酸通过两条途径转变为乙酰乙酰CoA
  - 琥珀酰CoA转硫酶（心肌、骨骼肌）
  - 乙酰乙酸硫激酶（肾脏）
- 乙酰乙酰CoA硫解，生成2分子乙酰CoA



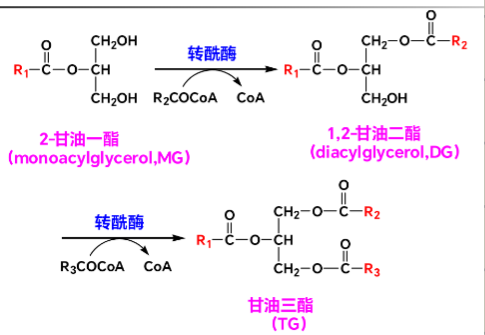
酮体生成的生理意义

- 它是肝为肝外组织提供的一种能源（Fuel）物质，是肌肉和大脑等组织的重要能源
- 正常情况下血中仅含少量酮体，但饥饿、高脂低糖或糖尿病时，酮体生成过多，可引起酮血症（ketonemia）、酮尿症（ketonuria）或酮症酸中毒（Ketoacidosis）

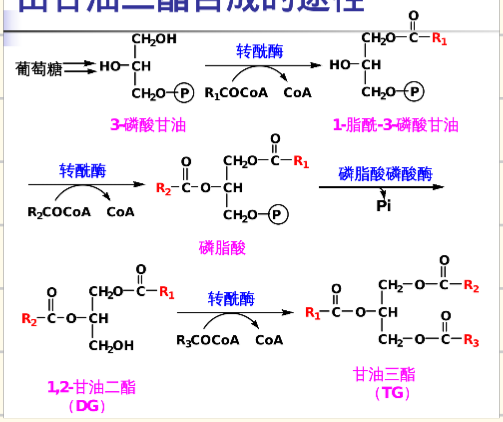
甘油三酯的合成代谢

- 合成部位：肝、脂肪组织和小肠
- 合成原料：葡萄糖、食物脂肪
- 合成过程：
  - 甘油一酯途径
  - 甘油二酯途径

由甘油一酯合成的途径



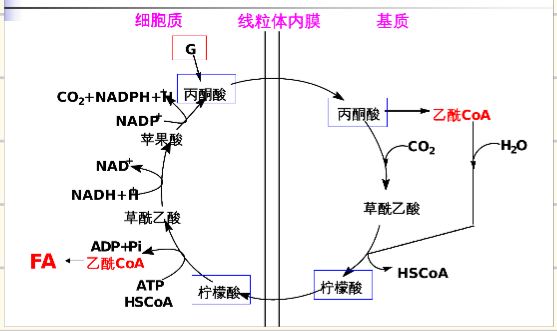
由甘油二酯合成的途径



1、软脂酸的生物合成

- 合成部位：肝（主要部位，VLDL）、肾、乳腺、脂肪组织
  - 亚细胞定位：细胞质
- 合成原料：乙酰CoA
- 合成酶系及合成过程
  - 丙二酰CoA的生物合成
  - 软脂酸的生物合成

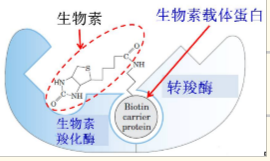
胞质乙酰CoA的来源：柠檬酸-丙酮酸循环



a）丙二酰CoA的合成

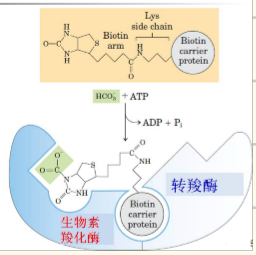
乙酰CoA + CO_2 + ATP —乙酰CoA羧化酶→ 丙二酸单酰CoA + ADP + Pi

- 乙酰CoA羧化酶包含生物素载体蛋白、生物素羧化酶和转羧酶
- 辅酶是生物素

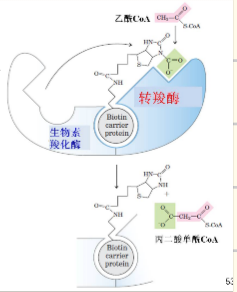


丙二酸单酰CoA的合成分二步

- 第一步，生物素羧化酶催化碳酸氢根转移到生物素上生成生物胞素
- ATP水解提供能量



- 第二步，转羧酶催化羧酸根从生物胞素上转移到乙酰CoA上生成丙二酸单酰CoA



乙酰CoA羧化酶是限速酶.

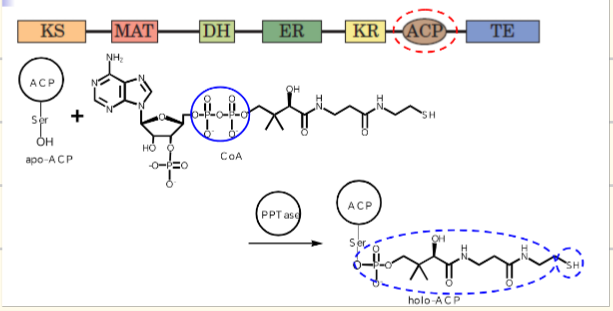
b）软脂酸的合成

- 软脂酸的合成由脂肪酸合酶（FAS）催化
- 动物体FAS包含7个结构域：6种酶和酰基载体蛋白（ACP）

KS — MAT — DH — ER — KR — ACP — TE

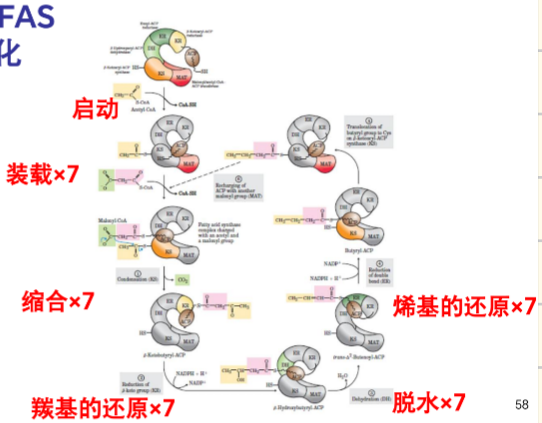
  - 1、丙二酸单酰/乙酰CoA:ACP转酰酶（MAT）
  - 2、β-酮酰-ACP合酶（KS）
  - 3、β-酮酰-ACP还原酶（KR）
  - 4、β-羟酰-ACP脱水酶（DH）
  - 5、烯酰-ACP还原酶（ER）
  - 6、软脂酰-ACP硫酯酶（TE）

脂肪酸合酶的翻译后修饰（活化）



软脂酸合成中FAS高级结构的变化

- 软脂酸合成包括7步反应
- 5步反应循环7次



58

软脂酸合成的方程式

1、合成7个丙二酸单酰CoA

7 乙酰CoA + 7 CO_2 + 7 ATP ⟶ 7 丙二酸单酰CoA + 7 ADP +7 Pi

2、7轮循环

乙酰CoA + 7 丙二酸单酰CoA + 14 NADPH + 14 H^+ ⟶ 软脂酸 +7 CO_2 + 8 CoA + 14 $NADP^+$ + 6 H_2O

3、总方程式

8 乙酰CoA + 7 ATP + 14 NADPH + 14 H^+ ⟶ 软脂酸 + 8 CoA + 14 $NADP^+$ + 6 H_2O + 7 ADP +7 Pi

软脂酸合成与分解的区别

	合成	分解
亚细胞部位	细胞质	线粒体
酰基载体	ACP	CoA
二碳片断	乙酰CoA、丙二酰CoA	乙酰CoA
还原当量	NADPH	FAD、NAD^+
HCO_3^-和柠檬酸	需要	不需要
能量变化	消耗7 ATP + 14 NADPH + 8 乙酰CoA（122 ATP）	产生106 ATP

2、脂酸碳链的加长

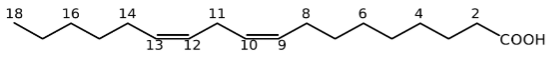
- 内质网脂酸碳链延长酶体系
- 线粒体脂酸碳链延长酶体系

	FAS	内质网延长酶	线粒体延长酶
亚细胞部位	细胞质	内质网	线粒体
起始酰基	乙酰基	软脂酰基	乙酰基
延伸酰基	丙二酰	丙二酰	乙酰基
酰基载体	ACP	CoA	CoA
还原当量	NADPH	NADPH	NADPH
终产物	C_{16}	C_{18-24}，不饱和	C_{12-16}
		在FAS基础上延伸	β-氧化逆过程

顺式

3、不饱和脂肪酸的合成

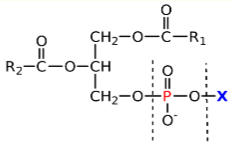
- 不饱和脂肪酸：软油酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸
- 必需脂肪酸：维持哺乳动物正常生长所需而体内又不能合成的脂肪酸，包括亚油酸、亚麻酸，花生四烯酸为半必需脂肪酸



亚油酸

·磷脂代谢

- 甘油磷脂的代谢
  - 甘油磷脂的组成、分类及结构



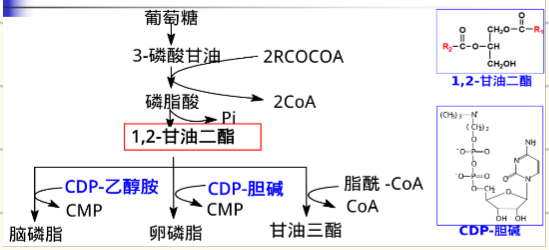
R_2COOH多为花生四烯酸

甘油磷脂的合成

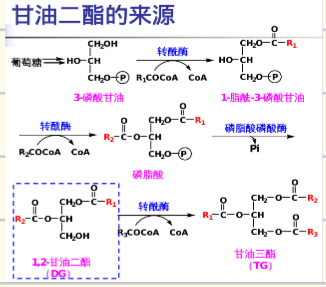
- 合成部位：全身各细胞，主要在肝，肾，肠
  - 亚细胞定位：内质网（ER）
- 合成原料：脂肪酸、甘油、磷酸、含氮碱（胆碱、乙醇胺、丝氨酸、肌醇等）、ATP、CTP
- 含氮碱的直接供体：CDP-含氮碱
- 活性甘油二酯的供体：CDP-甘油二酯

含N碱供体：CDP—含N碱

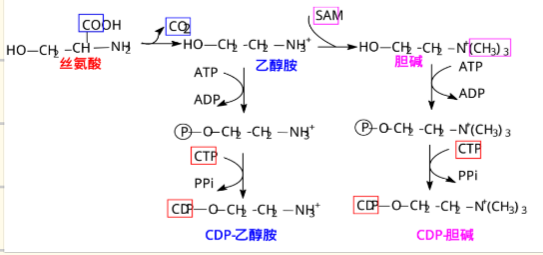
甘油二酯合成途径—脑磷脂、卵磷脂



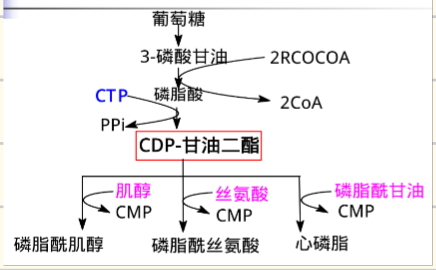
背景
甘油二酯的来源



CDP-含氮碱的合成



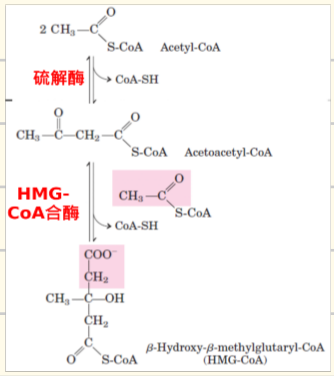
CDP-甘油二酯合成途径—
磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、心磷脂

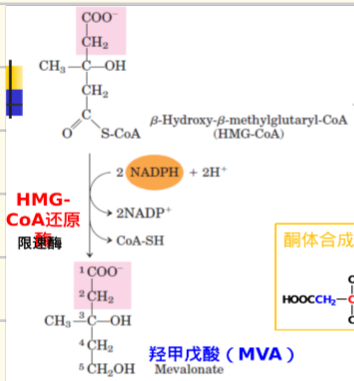


胆固醇

胆固醇的合成

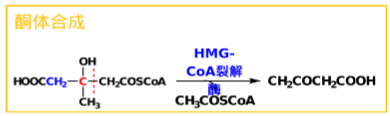
- 合成部位：肝，小肠
  - 亚细胞定位：细胞质及内质网
- 合成原料：18 乙酰CoA、16 NADPH、36 ATP
- 合成基本过程：
  - 乙酰CoA → 甲羟戊酸 → 鲨烯 → 胆固醇

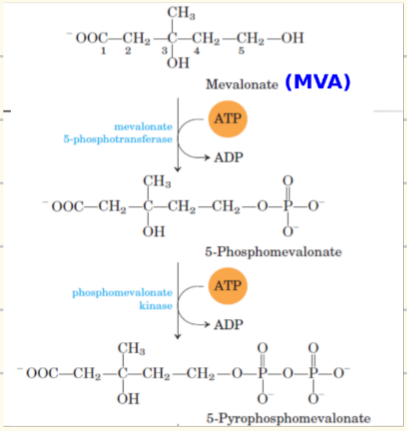


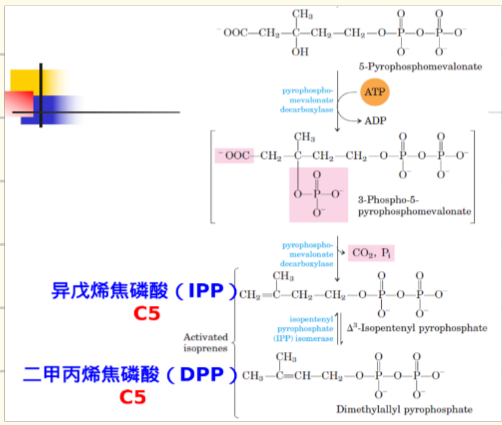


- 从这一步起，与酮体合成不同

酮体合成







aa代谢

- 胃蛋白酶pepsin：水解Phe、Trp、Tyr等疏水氨基酸残基的羧基端肽键

胃蛋白酶原 —脱下N端42个氨基酸残基→ 胃蛋白酶

2、小肠

（1）内肽酶：水解蛋白质（多肽）内部的肽键

- 胰蛋白酶trypsin：水解碱性氨基酸（Lys、Arg）残基的羧基形成的肽键
- 糜蛋白酶：水解芳香族氨基酸（Phe、Tyr、Trp）残基的羧基形成的肽键
- 弹性蛋白酶：水解脂肪族氨基酸（Val、Leu、Ser、Ala）残基的羧基形成的肽键

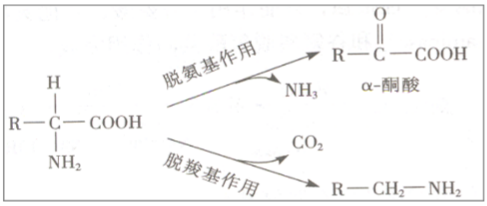
（2）外肽酶：水解蛋白质（多肽）N端或C端的肽键

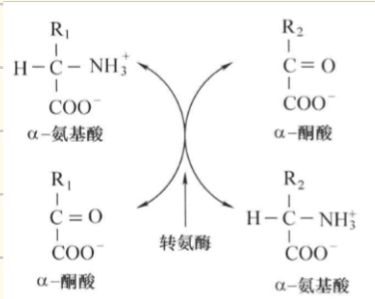
- 羧基肽酶A：水解中性氨基酸残基为羧基末端的肽键
- 羧基肽酶B：水解碱性氨基酸（Lys、Arg）残基为羧基末端的肽键
- 氨肽酶：水解氨基末端的肽键

二、蛋白质的吸收

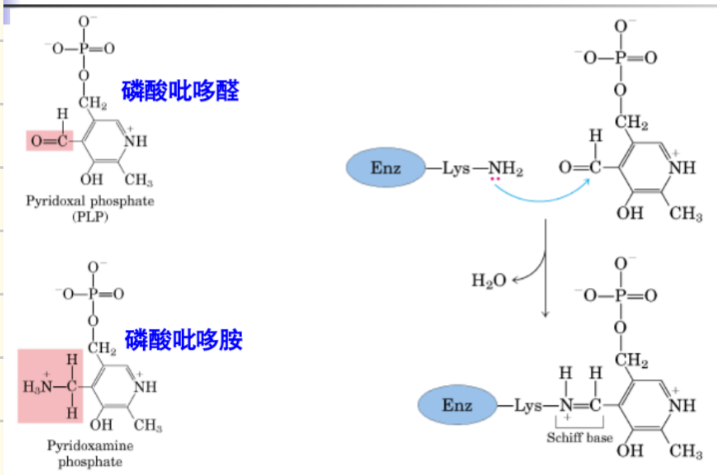
- 载体转运：小肠、肌肉、肾小管细胞
  - 1、中性氨基酸载体（主要载体）：转运芳香族氨基酸、脂肪族氨基酸、含硫氨基酸、组氨酸、谷氨酰胺
  - 2、碱性氨基酸载体：转运Lys、Arg、鸟氨酸
  - 3、酸性氨基酸载体：转运Glu、Asp
  - 4、亚氨基酸及甘氨酸载体：转运脯氨酸、羟脯氨酸和甘氨酸
- γ-谷氨酰基循环：小肠，肾小管细胞，脑细胞

- 外源富余的氨基酸，既不能被贮存，也不能直接排泄，而是转化为其他的代谢中间物

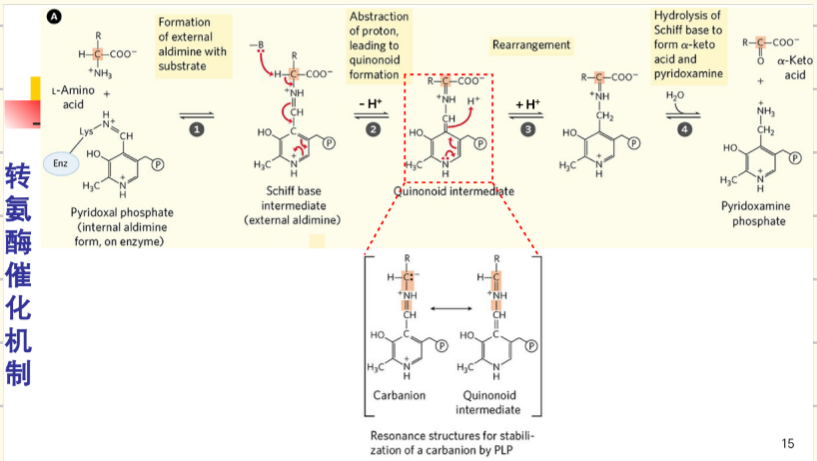




磷酸吡哆醛和酶中心结合示意图



转氨酶催化机制



转氨酶、差向酶、脱羧酶催化机制

转氨酶

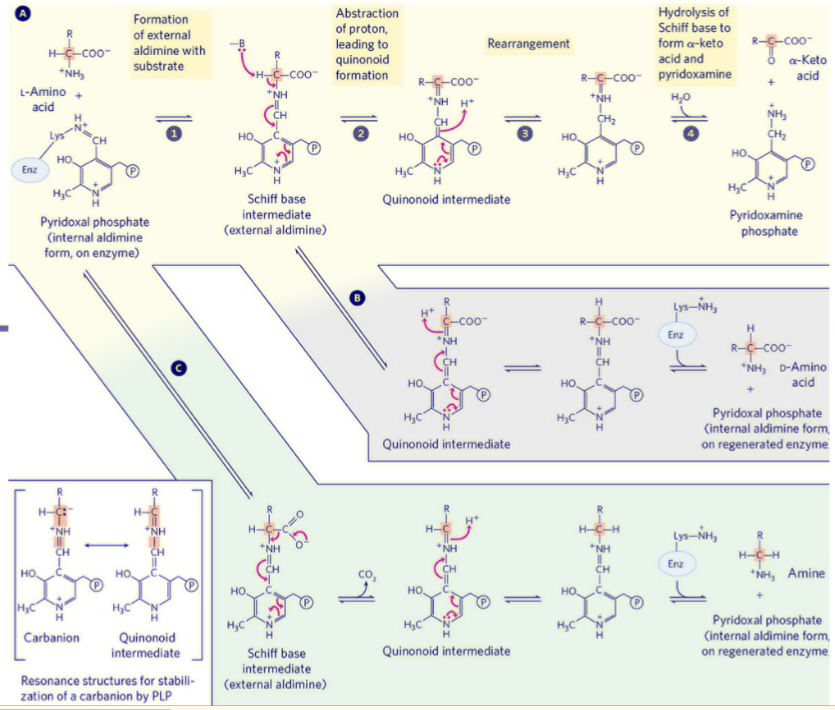
- 脱氢形成碳负离子
- PLP稳定碳负离子

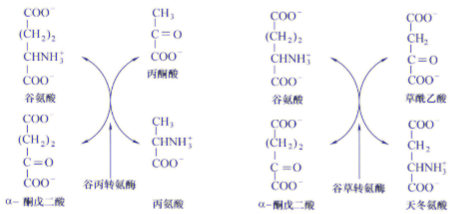
差向酶

- 脱氢形成碳负离子
- PLP稳定碳负离子

脱羧酶

- 脱羧形成碳负离子
- PLP稳定碳负离子





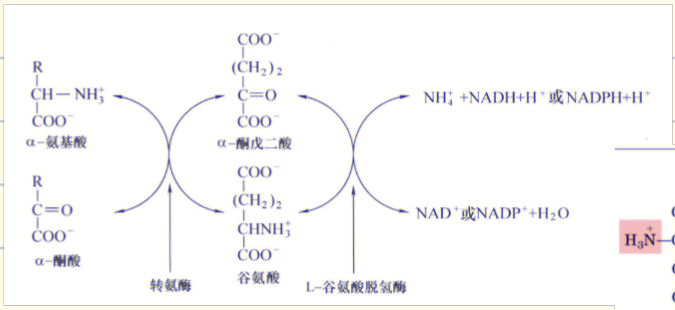
在不同动物或人体组织中，这两种转氨酶活力又各不相同，谷草转氨酶（GOT），又称天冬氨酸氨基转移酶（AST），在心脏中活力最大，其次为肝。谷丙转氨酶（GPT），又称丙氨酸氨基转移酶（ALT），在肝中活力最大，当肝细胞损伤时，酶就释放到血液内，于是血液内酶的活力明显地增加，因此临床上有助于肝病的诊断。血清谷草转氨酶的活力变化同样也用于心脏疾病的诊断。

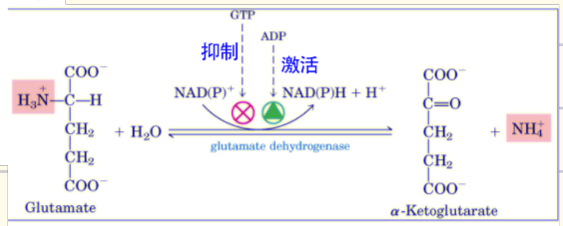
Glu + 草酰乙酸 ⇌ α-酮戊二酸 + Asp

- 转氨酶主要存在于肝细胞内。当肝细胞发生炎症、坏死、中毒等，造成肝细胞受损时，转氨酶便会释放到血液里，使血清转氨酶升高
- 谷丙转氨酶活性升高标志临床发病，常急速上升，缓慢下降
- 谷草转氨酶反映肝细胞线粒体的损害，当谷草转氨酶AST的值高超过谷丙转氨酶ALT时，须警惕是重症或慢性肝炎

·联合脱氨基作用

- 转氨酶与L-谷氨酸脱氢酶的联合脱氨基作用
- 转氨酶与腺苷酸脱氨酶的联合脱氨基作用：嘌呤核苷酸循环





酶：L-谷氨酸脱氢酶

- 先氧化成亚胺，再水解
- 分布：肝、肾、脑
- 不需氧脱氢酶
- 辅酶：NAD^+ or $NADP^+$
- (−)：GTP、ATP、NH_3
- (+)：GDP、ADP

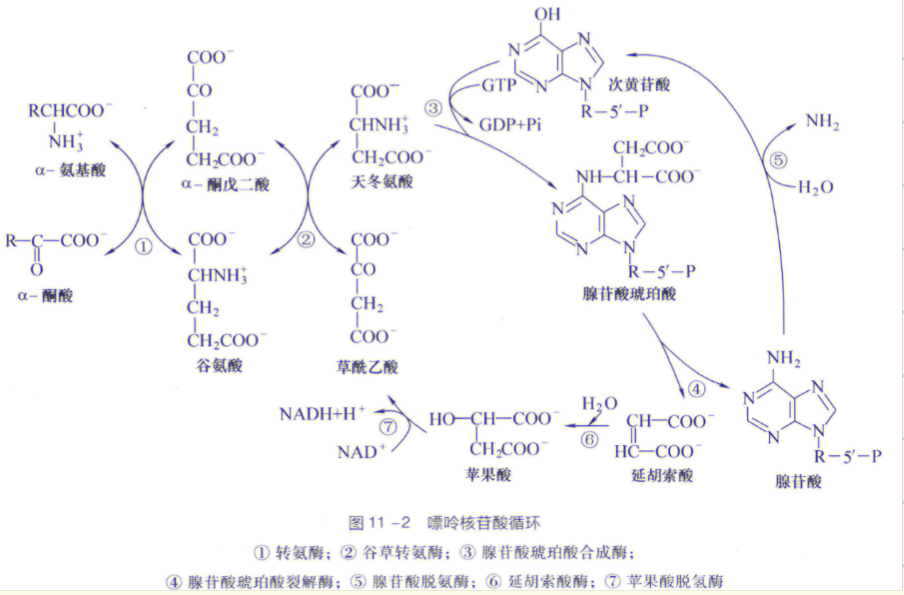


图 11-2 嘌呤核苷酸循环

① 转氨酶；② 谷草转氨酶；③ 腺苷酸琥珀酸合成酶；④ 腺苷酸琥珀酸裂解酶；⑤ 腺苷酸脱氨酶；⑥ 延胡索酸酶；⑦ 苹果酸脱氢酶

·脱羧作用

氨基酸脱去羧基，生成相应的一级胺和CO_2

组氨酸　　组胺

氨基酸脱羧酶特异性高，并需要磷酸吡哆醛（His除外）

- Glu → γ-氨基丁酸：神经递质
- His → 组胺：降血压、促胃液分泌
- Tyr → 酪胺：升血压
- 有毒胺类：通过胺氧化酶，氧化成醛和氨

三、α-酮酸的代谢

- 生成非必需氨基酸
- 转变成糖类及脂类
  - 生糖氨基酸：丙酮酸途径、α-酮戊二酸途径、草酰乙酸途径、琥珀酸途径
  - 生酮氨基酸：乙酰乙酰-CoA途径（Phe、Tyr、Leu、Trp）
  - 生糖兼生酮氨基酸：Phe、Tyr
- 氧化供能

氨的转运

- 氨的转运主要通过谷氨酰胺，将其他组织中的氨经血液运送到肝脏，进行进一步的代谢

·氨代谢

体内氨的来源

- 氨基酸的脱氨基
- 肠道细菌的腐败作用与尿素（Urea）的分解
- 肾小管上皮分泌—Gln的分解

·氨的转运：①

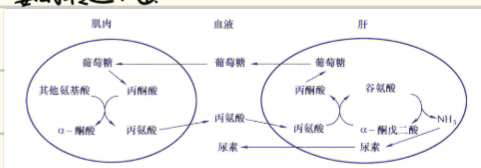


图 11－3　葡萄糖－丙氨酸循环

②.

① 以谷氨酰胺的形式转运　多数动物细胞内都有谷氨酰胺合成酶，可将谷氨酸和氨合成谷氨酰胺，反应需要 ATP。

$$NH_4^+ + \text{谷氨酸} + ATP \xrightarrow{\text{谷氨酰胺合成酶}} \text{谷氨酰胺} + ADP + Pi + H^+$$

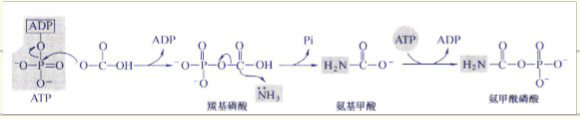
谷氨酰胺是电中性的无毒物质，容易通过细胞膜，进入血液循环，是氨转运的主要形式，而谷氨酸带负电，则不能通过细胞膜。排氨动物，如鱼类，通过鳃内的谷氨酰胺酶，将谷氨酰胺降解为谷氨酸和氨，游离的氨则借助扩散作用排出体外。

$$\text{谷氨酰胺} + H_2O \xrightarrow{\text{谷氨酰胺酶}} \text{谷氨酸} + NH_4^+$$

排尿素的动物则通过血液循环将氨运至肝，在肝中合成尿素，然后由肾排泄。

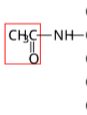
尿素的生成——尿素循环/鸟氨酸循环

①.氨甲酰磷酸合成：



$CO_2 + NH_3 + H_2O + 2ATP$ —CPS-I, AGA→ $H_2N-C(=O)-O-P + 2ADP + Pi$

氨甲酰磷酸（Carbamol phosphate）



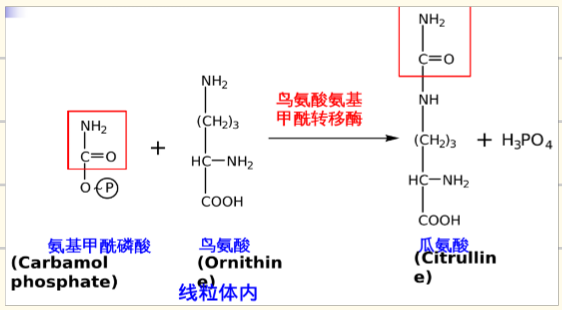
氨甲酰磷酸合成酶I（carbamoyl phophate synthetase I，CPS-I）

N-乙酰谷氨酸（AGA）

不可逆，为限速步骤

线粒体内

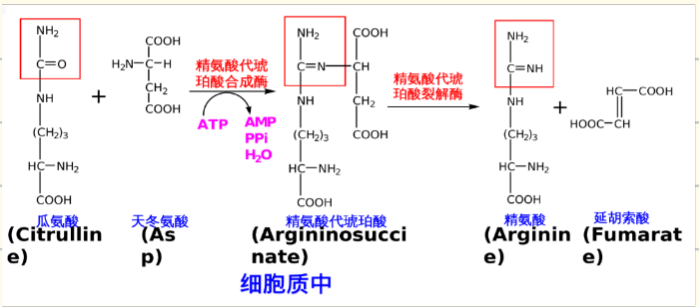
②.瓜氨酸合成



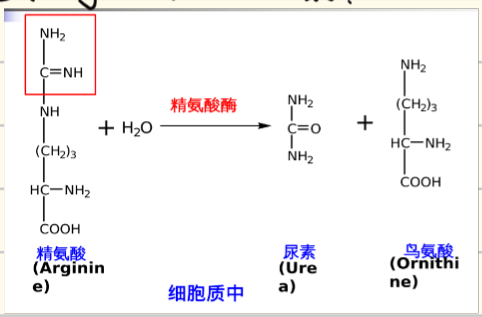
ps.提供NH_3：Asp消除，Gln脱氨

尿素循环，IMP合成，AMP合成

③.精氨酸的合成：



④.Arg水解生成尿素



尿素生物合成总方程式

$2NH_3 + CO_2 + 3\ ATP + 2\ H_2O$　　尿素 $+ 2\ ADP + AMP + 2\ Pi + PPi$

- 1分子NH_3来自于氨基酸联合脱氨基作用
- 1分子NH_3来自于Asp

尿素生物合成的要点

- 尿素生成的要点
  - 亚细胞定位：线粒体和胞质
  - 限速酶：CPS-I、精氨酸代琥珀酸合成酶
  - 耗能过程：4ATP/urea
  - N与C的来源：氨基酸脱下的氨和CO_2
- 尿素合成的调节
  - 食物蛋白质的影响
  - CPS-I的调节
  - 尿素合成酶系的调节

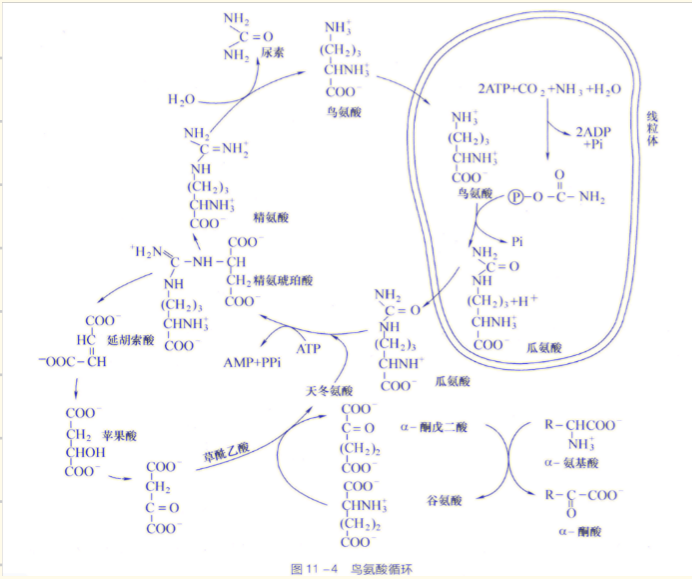


图 11－4　鸟氨酸循环

二、一碳单位（OCU）代谢

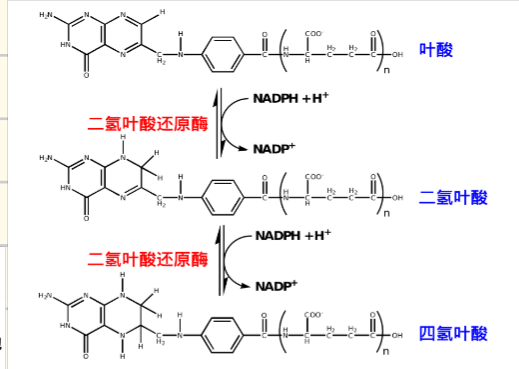
- 概念：含一个碳原子的基团
- 种类：甲基、亚甲基、次甲基、甲酰基、亚氨甲基

—CH_3 甲基　—CH_2— 亚甲基　—CH═ 次甲基

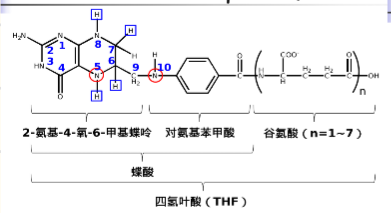
—CHO 甲酰基　—CH═NH 亚氨甲基

一碳单位的生物学功能

- 参与嘌呤、嘧啶核苷酸及甲硫氨酸等的合成
- 参与许多物质的甲基化过程
- 一碳单位代谢障碍会影响DNA、蛋白质的合成，引起巨幼红细胞性贫血
- 磺胺类药及氨甲喋呤等是通过影响一碳单位代谢及核苷酸合成而发挥药理作用

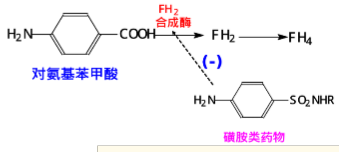


四氢叶酸（THF）—C单位运载体



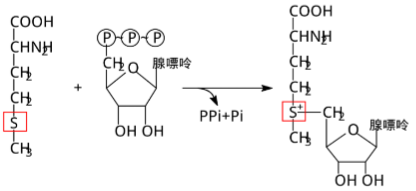
叶酸的生理作用

- 巨幼红细胞贫血（恶性贫血）
  - 原始红细胞 → 早、中、晚幼红细胞 → 网织红细胞 → 成熟红细胞
- 磺胺药竞争性抑制机理

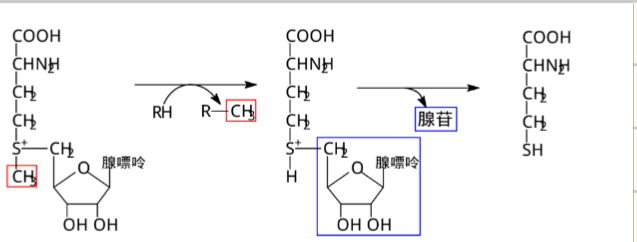


四、含硫氨基酸的代谢

- 甲硫氨酸的代谢：甲硫氨酸与转甲基作用



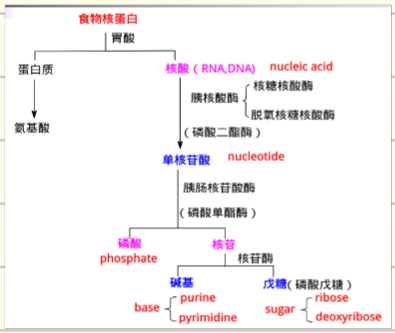
Met　ATP　*S*-腺苷甲硫氨酸（*S*-adenosyl methionine, SAM）



S-腺苷甲硫氨酸（SAM）　*S*-腺苷同型半胱氨酸　同型半胱氨酸

SAM提供甲基.

核苷酸代谢.



1、按作用对象分

- 核糖核酸酶：水解核糖核酸（RNA）
- 脱氧核糖核酸酶：水解脱氧核糖核酸（DNA）

2、降解为戊糖和嘌呤或嘧啶

- 广泛形式

核苷 + 磷酸 $\xrightleftharpoons{\text{核苷磷酸化酶}}$ 嘌呤碱（嘧啶碱）+ 戊糖-1-磷酸

可逆反应（逆反应用于补救合成）

- 植物和微生物内形式

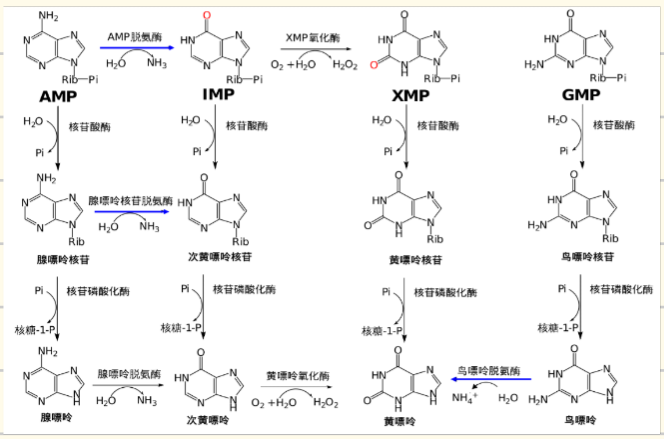
核苷 + H_2O $\xrightarrow{\text{核苷水解酶}}$ 嘌呤碱（嘧啶碱）+ 戊糖

不可逆反应，只能对核糖核苷有作用，对脱氧核糖核苷无作用

核苷酸的功用

- 合成核酸的原料
- 体内能量的利用形式：ATP、GTP、CTP、UTP
- 参与代谢和生理调节：cAMP、cGMP
- 组成辅酶：FAD、NAD^+、$NADP^+$
- 活化中间代谢物：
  - UDP-G、CDP-DG、SAM、PAPS

·嘌呤核苷酸分解代谢.



不同生物分解能力不一样，最终分解产物也不同

1、脱氨基

腺嘌呤 $\xrightarrow{\text{腺嘌呤脱氨酶}}$ 次黄嘌呤（脱6位上的NH_2）

动物组织中该酶含量少，而腺嘌呤核苷酸脱氨酶和腺嘌呤核苷脱氨酶活性高，因此是在核苷或核苷酸水平上进行脱氨

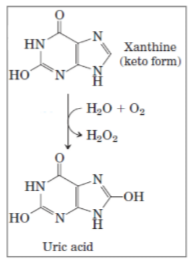
鸟嘌呤 $\xrightarrow{\text{鸟嘌呤脱氨酶}}$ 黄嘌呤（脱2位上的NH_2）

2、氧化成尿酸

次黄嘌呤 + O_2 + H_2O $\xrightarrow{\text{黄嘌呤氧化酶}}$ 黄嘌呤 + H_2O_2

黄嘌呤 + O_2 $\xrightarrow{\text{黄嘌呤氧化酶}}$ 尿酸 + H_2O_2

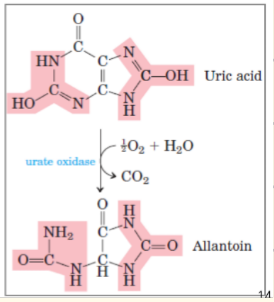
人或排尿动物的最终产物



3、氧化成尿囊素

尿酸 + 2 H_2O + O_2 $\xrightarrow{\text{尿酸氧化酶}}$ 尿囊素 + CO_2 + H_2O_2

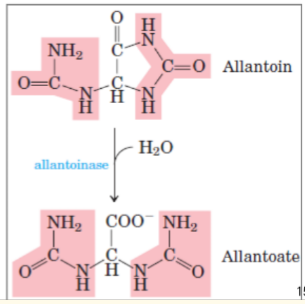
其他哺乳动物的最终产物



4、水解成尿囊酸

尿囊素 + H_2O $\xrightarrow{\text{尿囊素酶}}$ 尿囊酸

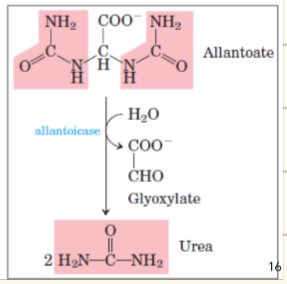
硬骨鱼的最终产物



5、水解成尿素和乙醛酸

尿囊酸 + H_2O $\xrightarrow{\text{尿囊酸酶}}$ 2 尿素 + 乙醛酸

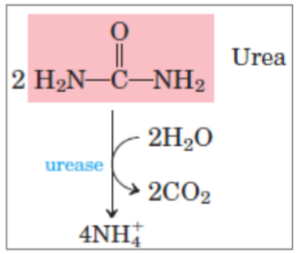
多数鱼类及两栖类的最终产物



6、水解成NH_3和CO_2

2 尿素 + 2 H_2O $\xrightarrow{\text{脲酶}}$ 4 NH_3 + 2 CO_2

海洋无脊椎动物的最终产物



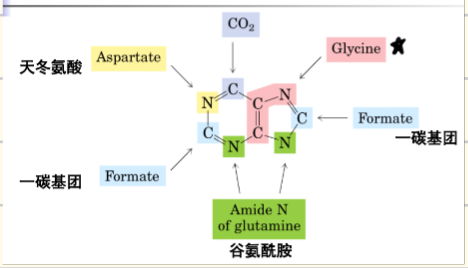
二、嘌呤核苷酸的合成

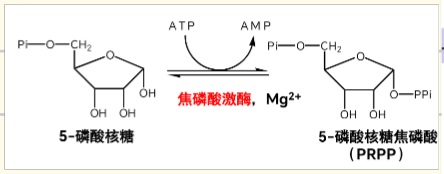
- **从头合成途径**：利用磷酸核糖、氨基酸、一碳单位及CO_2等简单物质为原料，经一系列酶促反应，合成嘌呤核苷酸的途径
- **补救合成途径**：利用体内游离的嘌呤或嘌呤核苷，经过简单的反应过程，合成嘌呤核苷酸的途径

1、嘌呤核苷酸从头合成

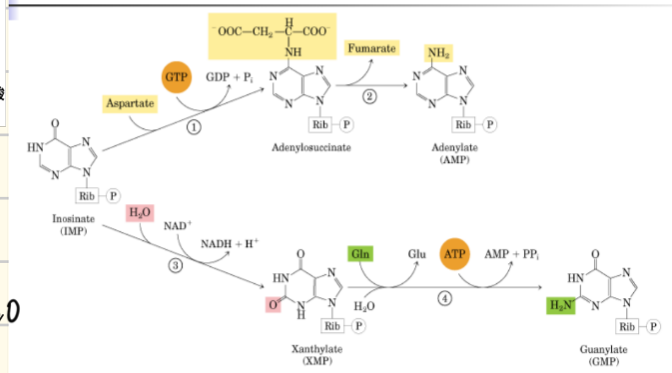
- 原料：磷酸核糖，Gly，Gln，Asp，CO_2，N_5-N_{10}-CH=THF（次甲基四氢叶酸），N_{10}-CHO-FH_4（甲酰四氢叶酸），ATP
- 合成部位：细胞质
- 合成过程：
  - 次黄嘌呤核苷单磷酸（IMP）的合成
  - AMP 和 GMP的合成
  - AMP → ADP → ATP
  - GMP → GDP → GTP

嘌呤碱合成的元素来源





AMP和GMP的生成

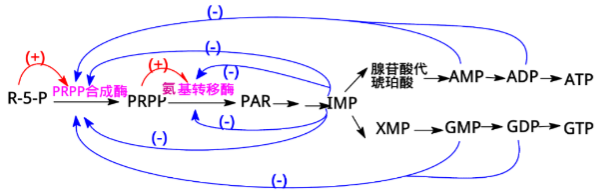


IMP ⟶ XMP

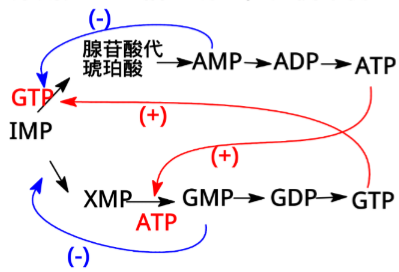
分解代谢中 O来自O_2，合成代谢中来自H_2O

嘌呤核苷酸从头合成的调节

- 原则之一：满足需求，防止供过于求



- 原则之二：相互调整，比例平衡



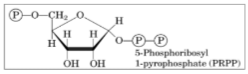
2、嘌呤核苷酸的补救合成（2个）

- 嘌呤与5-磷酸核糖焦磷酸合成嘌呤核苷酸（重要补救途径）

腺嘌呤+PRPP $\xrightleftharpoons[\text{APRT}]{\text{腺嘌呤磷酸核糖转移酶}}$ AMP+PPi

次黄嘌呤+PRPP $\xrightleftharpoons{\text{次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)}}$ IMP+PPi

鸟嘌呤+PRPP $\xrightleftharpoons{\text{次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)}}$ GMP+PPi



- 预先合成碱基，然后合成核苷，再合成核苷酸

核苷的合成

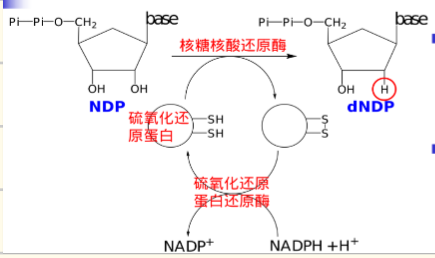
碱基 + 1-磷酸核糖 $\xrightleftharpoons{\text{特异的核苷磷酸化酶}}$ 核苷 + Pi

逆反应用于分解代谢

核苷酸的合成

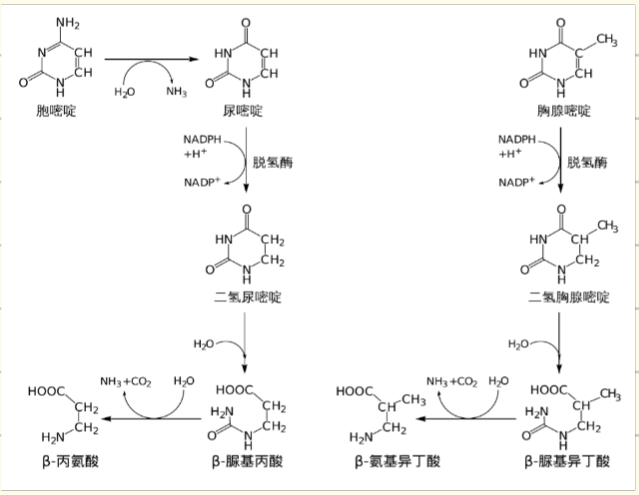
核苷 + ATP $\xrightleftharpoons{\text{核苷磷酸激酶}}$ 核苷酸 + ADP

三、脱氧核苷酸的生成



- 核糖核苷酸通常在核苷二磷酸水平上被还原
- 核糖第二位碳原子上脱氧

嘧啶碱的分解



1、脱氨

胞嘧啶 + H_2O $\xrightarrow{\text{胞嘧啶脱氨酶}}$ 尿嘧啶 + NH_3（脱4位上的NH_2）

也可在核苷或核苷酸水平上脱氨（人或某些动物）

2、还原成二氢尿嘧啶

尿嘧啶 + NAD(P)H + H $\xrightleftharpoons{\text{二氢尿嘧啶脱氢酶}}$ 二氢尿嘧啶 + NAD(P)+

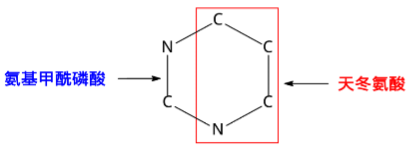
3、水解

二氢尿嘧啶 $\xrightleftharpoons{\text{二氢尿嘧啶酶}}$ β-脲基丙酸

β-脲基丙酸 $\xrightleftharpoons{\text{脲基丙酸酶}}$ β-丙氨酸 + CO_2 + NH_3

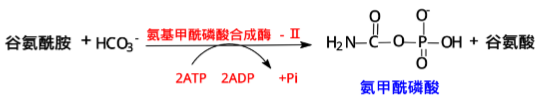
胸腺嘧啶的分解相似，最后产生β-氨基异丁酸

1、嘧啶核苷酸的从头合成



嘧啶环的元素来源

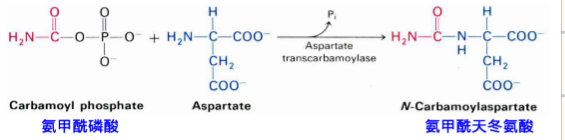
第一步：氨甲酰磷酸的合成



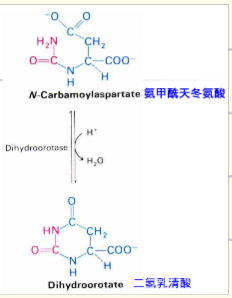
氨基甲酰磷酸合成酶（关键酶）的比较

	氨基甲酰磷酸合成酶-I	氨基甲酰磷酸合成酶-II
分布	线粒体（肝）	细胞质（所有细胞）
氮源	氨	谷氨酰胺
变构激活剂	N- 乙酰谷氨酸	无
功能	尿素合成	嘧啶的合成

第二步：转氨甲酰反应

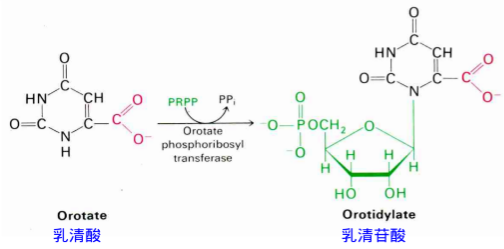


第三步：环化脱水反应

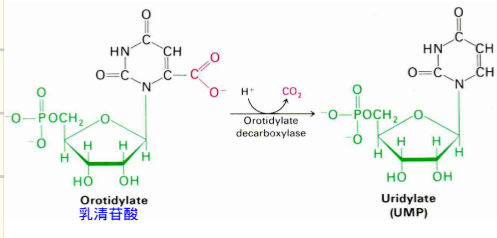


第四步：氧化反应

第五步：与5-磷酸核糖相连接

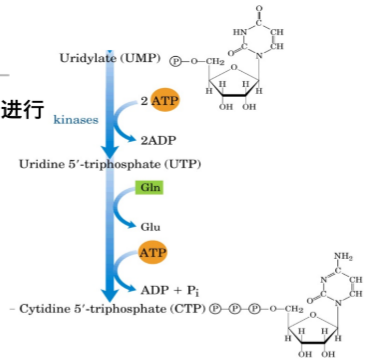


第六步：脱羧反应

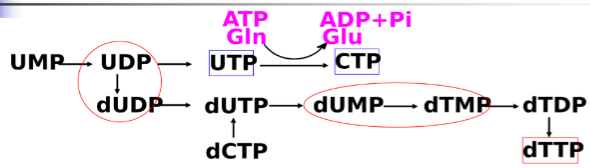


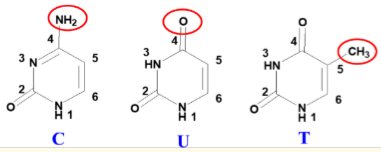
UTP和CTP的合成

- 碱基改变在NTP水平上进行



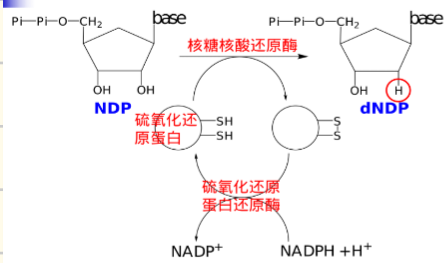
dTTP的合成





- 核糖改变在NDP水平上进行
- 碱基改变在dNMP水平上进行

脱氧核苷酸的生成



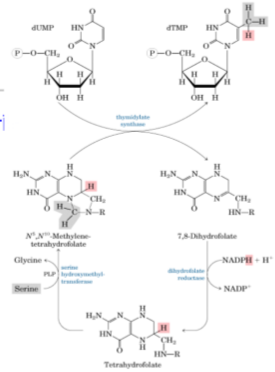
- 核糖核苷酸通常在核苷二磷酸水平上被还原
- 核糖第二位碳原子上脱氧

dTMP的合成

dUMP + N5,N10-亚甲基四氢叶

dTMP合成酶

dTMP + 二氢叶酸



2、嘧啶核苷酸的补救合成

嘧啶+PRPP $\xrightleftharpoons{\text{嘧啶磷酸核糖转移酶}}$ 嘧啶核苷酸+PPi

（嘧啶：尿嘧啶，胸腺嘧啶，乳清酸，不包括胞嘧啶）

尿嘧啶核苷+ATP $\xrightleftharpoons{\text{尿苷激酶}}$ +ADP

胞嘧啶核苷+ATP $\xrightleftharpoons{\text{尿苷激酶}}$ 胞苷酸 +ADP

第二节 DNA复制的酶学

- 底物：dNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）
- 聚合酶：DNA依赖的DNA聚合酶（DNA-polymerase）
- 模板：单链的DNA母链
- 引物（primer）：寡核苷酸引物（RNA）
- 其他酶和蛋白质因子：拓扑异构酶、解螺旋酶、单链结合蛋白、引物酶（primase）、DNA连接酶

DNA聚合酶活性：
- 5′→3′聚合活性
- 外切酶活性
  - 5′→3′
  - 3′→5′

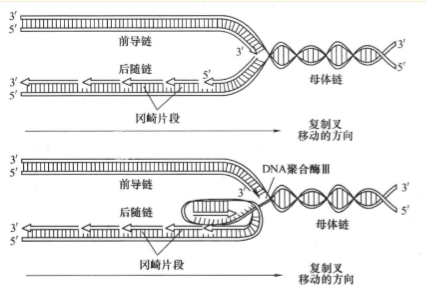
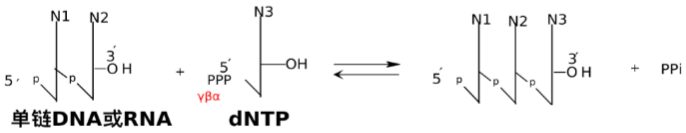


图 13－10 DNA 的半不连续复制

- 形成磷酸二酯键的能量来自α-与β-磷酸基之间高能键的裂解
- 聚合反应可逆，但随焦磷酸的水解可推动反应的完成
- DNA链由5′向3′方向延长
- 需要有游离的3′-羟基，即需要引物链

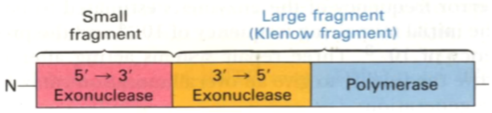


1、原核生物（大肠杆菌，*E. coli*）

DNA聚合酶I（Pol I）：与校对、修复有关

- DNA聚合酶活力：通过核苷酸聚合反应使DNA链沿5′→3′方向延长
- 3′→5′核酸外切酶活力：由3′端水解DNA链（正常情况下该活力受抑制，一旦出现错配碱基，聚合反应停止，该活力会切去错配碱基，起校对作用）
- 5′→3′核酸外切酶活力：由5′端水解DNA链。切除嘧啶二聚体和RNA引物

Pol I的结构



单链多肽，用枯草杆菌蛋白酶进行有限水解，可得两个大小不同的片段

- 小片段：5′→3′核酸外切酶活性
- 大片段（Klenow片段）：聚合酶活性、3′→5′核酸外切酶活性（常用工具酶）

聚合酶反应的逆反应和3′→5′核酸外切酶活性都是从新生DNA单链3′端移去单个核苷酸，是相同的化学反应吗？

大肠杆菌三种DNA聚合酶

	DNA聚合酶I	DNA聚合酶II	DNA聚合酶III
结构基因	*pol* A	*pol* B	*pol* C、*hol* E、*dna* N、*dna* X、*dna* Z、*dna* Q、*hol* A
亚基数目	1	≥7	≥10
分子量	103,000	88,000	830,000
5′→3′聚合作用	+	+	+
3′→5′外切酶	+	+	+
5′→3′外切酶	+	-	-
聚合速度（nt/min）	1,000	2,400	≥15,000
持续合成能力	3 ~ 200	1,500	≥500,000
功能	切除引物、修复	修复	复制
数量/cell	~ 400	~ 100	~ 10

Pol IV、Pol V

- 大肠杆菌DNA polymerase IV和V（Pol IV和Pol V）于1999年被发现
- 功能为DNA的错误倾向修复，当DNA受到严重损伤时，即可诱导产生这两种酶，使修复缺乏准确性，因而出现高的突变率

2、真核生物

- DNA聚合酶α：随从链的部分合成，合成RNA引物和随后4-5 nt的DNA，无外切酶活力
- DNA聚合酶δ：2个DNA聚合酶δ分别合成领头链和随从链，有3′→5′外切酶活力
- DNA聚合酶ε：校读、修复和填补缺口，有3′→5′外切酶活力（相当于原核生物DNA聚合酶I）
- DNA聚合酶β：修复，无外切酶活力
- DNA聚合酶γ：合成线粒体DNA，有3′→5′外切酶活力

表 13－3 真核生物的 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶的类型	α	β	γ	δ	ε
相对分子质量/×10³	100～220	45	60	122	
亚基数	4	1	2	3～5	4
聚合酶活性 5′→3′	+	+	+	+	+
外切（校正）酶活性 3′→5′	−	−	+	+	+
引物（合成）酶活性	+	−	−	−	−
持续合成能力	中	高	高	有 PCNA 时高	高
对抑制剂敏感	蚜肠霉素	双脱氧 TTP	双脱氧 TTP	蚜肠霉素	蚜肠霉素
细胞定位	核	核	线粒体	核	核

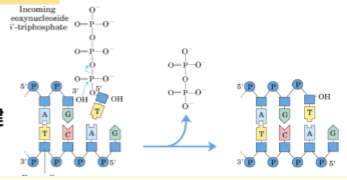
3、复制的保真性

依赖三种机理

- 遵守严格的碱基互补配对规律
- 聚合酶在复制延长中对碱基的选择功能
- 复制中出错时有即时校读功能

碱基选择：先形成氢键，再生成磷酸二酯键

即时校读：3′→5′核酸外切酶活性



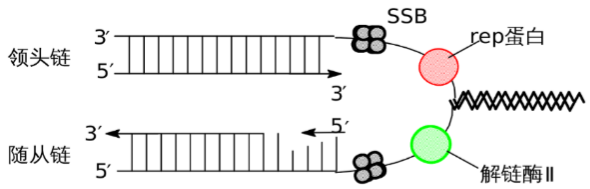
三、DNA拓扑学变化中的酶

1、DNA拓扑异构酶

- 类型I拓扑异构酶：催化DNA双链中的一条链的断裂和再连接，反应无需能量
- 类型II拓扑异构酶：催化DNA双链的断裂和再连接，反应需消耗ATP
- 原核生物中拓扑异构酶只能消除负超螺旋，真核生物中能消除正、负超螺旋

2、解螺旋酶

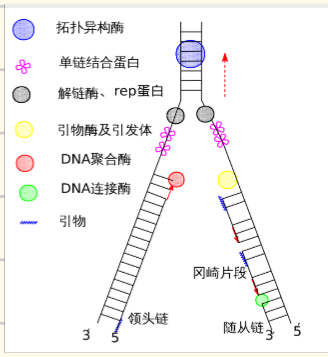
- 领头链：rep蛋白沿模板链的3′→ 5′移动
- 随从链：解螺旋酶II、Dna B沿模板链的5′→ 3′移动



SSB:维持模板处于单链状态，保护单链的完整。

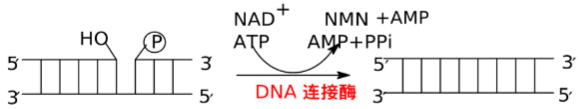
四、引物酶和引发体

- 引物酶：RNA聚合酶（Dna G）
- 引发体：Dna A辨认复制启始点，再结合Dna B、Dna C及其他复制因子形成复合体

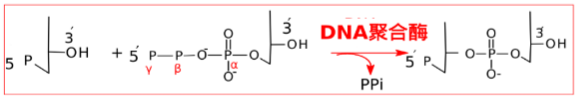


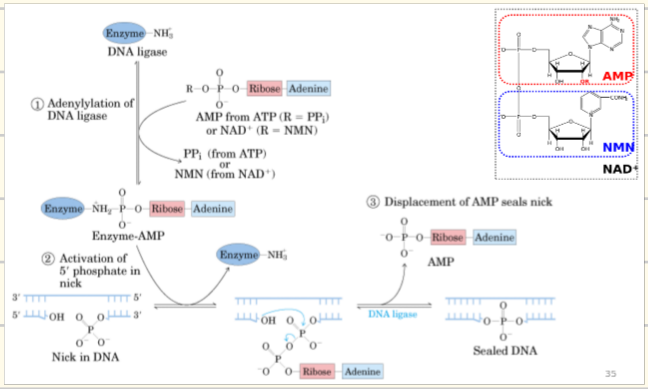
五、DNA连接酶（ligase）

- 催化两段DNA之间的连接



NAD+：烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NMN：烟酰胺单核苷酸





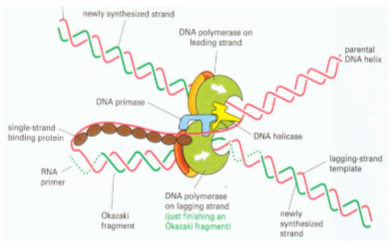
第三节 DNA生物合成过程

复制子（replicon）

- 作为一个单位进行复制的一段DNA序列。含有一个复制起点，有时还含有一个复制终点
- 原核生物：只有一个复制起始区，因此只有一个复制子。通常细菌、病毒和线粒体的DNA分子都是作为单个复制子完成复制的
- 真核生物：有很多复制起点，包含多个复制子，复制方向为双向

复制叉（replication fork）

- 复制叉：复制开始后由于DNA双链解开，在两股单链上进行复制，形成在显微镜下可看到的叉状结构

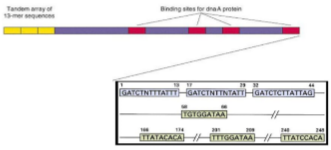


复制起点（origin）

复制子起始复制的一段DNA序列

单个起点

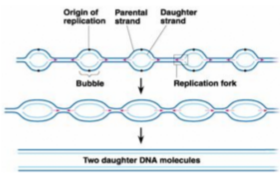
- 原核生物的染色体和质粒、真核生物的细胞器DNA都是环状双链分子，具有单个固定的起点
- *E. coli*复制起点*oriC*为245 bp，含三组串联重复序列和两对反向重复序列



39

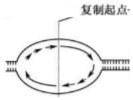
多个起点

- 真核生物染色体是线性双链分子，含有许多起点，同时形成多个复制单位，即多个复制子
- 典型哺乳动物细胞有50,000 ~ 100,000个复制子（40 ~ 200 Kb）
- 正在复制的真核生物染色体上形成许多复制泡。复制叉沿着DNA向两个方向移动，复制泡不断变大，最终两个相邻复制泡的复制叉相遇、融合，完成DNA复制

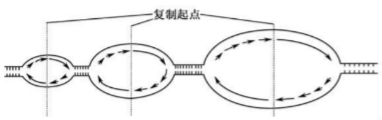


复制方式

- 直线双向式：单起点，双方向



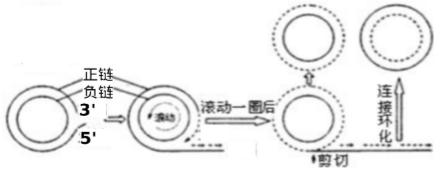
- 多起点双向式：真核生物染色体DNA的复制



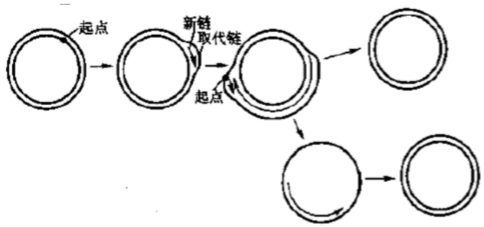
- θ型单向式：环状DNA的复制

- θ型双向式：环状DNA的复制
  - 对称
  - 不对称（一个叉完成1/5，其余4/5由另一个叉完成）

- **滚动环式**：噬菌体、质粒等复制方式
  - 共价闭环双链分子的正链由核酸内切酶在一特定位点切开，以环状负链为模板，从正链的3′-OH末端延长形成正链
  - 两股链均直接作为模板，不需要另外合成引物



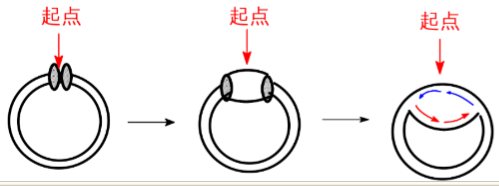
- **D-环式**：在固定点解开后一条链先复制，待复制到一定距离时，露出另一链的复制起点，才开始另一链的复制



一、复制的起始

1、DNA解成单链

- 原核生物从一个固定的起始点开始，同时向两个方向进行的，称为双向复制——θ复制



2、引发体的生成

- 复制过程需要引物——短链RNA（1 ~ 60 nt，因物种而异）
- DnaA辨认复制启始点，然后引物酶（DnaG）进入，加上解螺旋酶、DnaB蛋白和DnaC蛋白等，与DNA的起始复制区域形成引发体
  - 引物酶：合成RNA引物，方向为5′→ 3′
- **DNA聚合酶III**：由其β亚基辨认引物，新链的第一个脱氧核苷酸与引物的3′-OH形成磷酸二酯键，开始复制
- 拓扑异构酶 ：松弛超螺旋

二、复制的延长

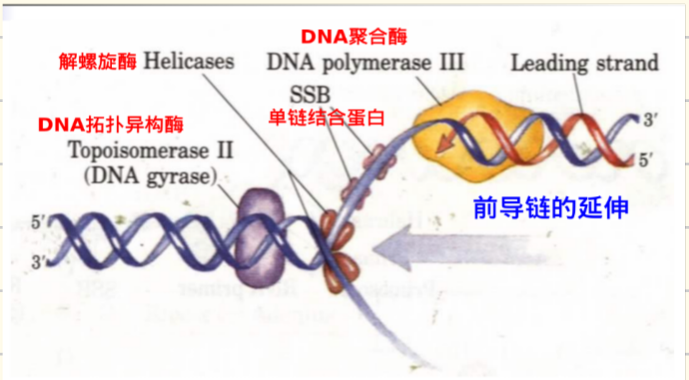
- 原核生物为**Pol III**
- 真核生物为**DNA聚合酶α和δ**，其中α与随从链的部分合成有关，δ与领头链和随从链的合成有关

1、复制延长的生化过程

- 原核生物复制延长的速度很快
- 真核生物复制有多个复制起点

2、复制的半不连续性和冈崎片段

- 领头链是连续合成的，而随从链则是不连续合成
- 冈崎片段：冈崎用电子显微镜看到了DNA复制过程中出现一些不连续片段，这些不连续片段只存在于DNA复制叉上其中的一股，这些不连续的片段称为冈崎片段
- 原核生物冈崎片段长度为1000 ~ 2000 nt，相当于1个顺反子的大小
- 真核生物冈崎片段长度为100 ~ 200 nt，相当于1个核小体DNA的大小



三、复制的终止

1、原核生物复制终止及不连续片段连接

- 复制有终止点*ter*
- 领头链是不间断延长的，随从链是生成一个个的冈崎片段，最后连接成一条完整的DNA链
- **Pol I 5′→ 3′外切酶活性**水解引物
- **Pol I聚合活性**填补空隙
- **DNA连接酶**连接缺口

2、真核生物的端粒和端粒酶

- **端粒**：是真核生物染色体线性DNA分子末端的结构
  - 富含GC的重复序列
  - 人：$(TTAGGG)_n$
- **端粒酶**：RNA-蛋白质复合物，既有模板，又有逆转录酶
  - 以自身的RNA为模板延长DNA单链，然后反折为双链，爬行模式
  - 端粒酶与生物体的衰老、肿瘤的发生有关

第四节 DNA的损伤修复

- 突变-----DNA分子上碱基的改变
- 自发突变、人工诱变

一、突变的意义

- 突变是进化、分化的分子基础
- 只有基因型改变的突变
- 致死性的突变
- 突变是某些疾病的发病基础

三、突变分子改变的类型

- 错配（点突变）
  一个碱基改变
- 缺失、插入和框移突变
  片段插入或缺失
- 重排
  较大片段重组或重排

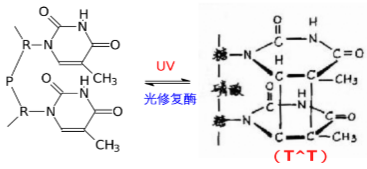
四、损伤的修复

损伤--复制过程中发生的DNA突变

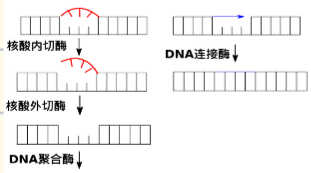
- 光修复
- 切除修复
- 重组修复
- SOS修复

1、光修复

- 紫外光照射可使相邻的两个T形成二聚体（T^T）
- 光修复酶可使二聚体解聚为单体状态，DNA完全恢复正常，光修复酶的激活需300-600 nm波长的光



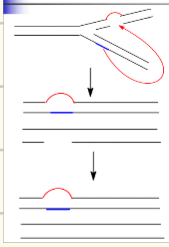
2、切除修复



- 参与的酶有核酸内切酶、核酸外切酶、Pol I、DNA连接酶

1. 核酸内切酶识别损伤部位，切开核酸单链
2. 核酸外切酶切除损伤部位
3. DNA聚合酶I修复
4. DNA连接酶连接

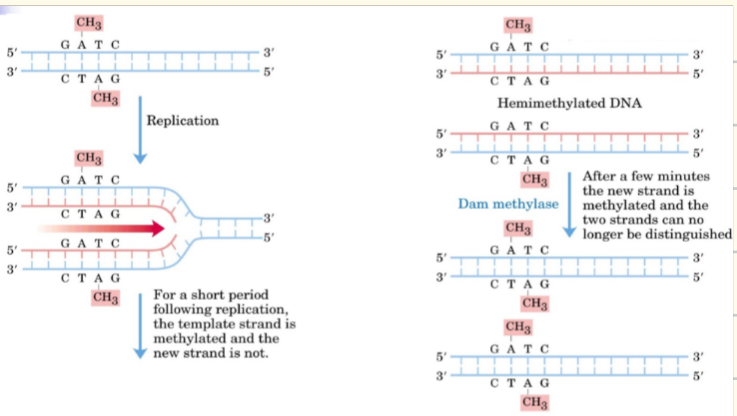
3、重组修复

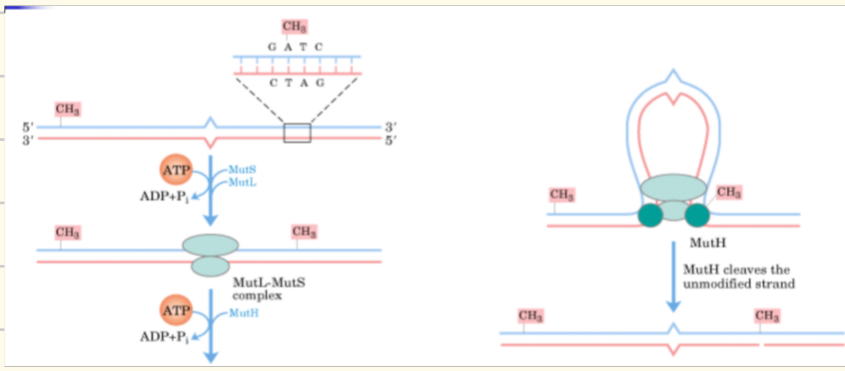


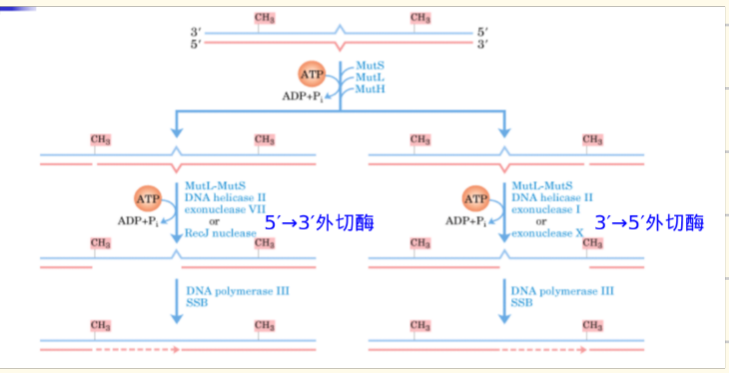
- 重组蛋白RecA，Pol I，连接酶参与
- 聚合酶在损伤部位跳过去，在下一个冈崎片段的起始位置或前导链的相应位置上重新合成引物和DNA链，新链在损伤相对应处留下缺口
- 完整的母链上相对应于损伤部位的正确核苷酸序列片段移到有缺口的新链上，而母链上的空缺则通过聚合来补上
- 损伤链的损伤并未除去，但在后代中已被稀释

4、错配修复

- 甲基化指导的错配修复：
  - 修复在复制过程中错配且没有被校正的单个或少数碱基





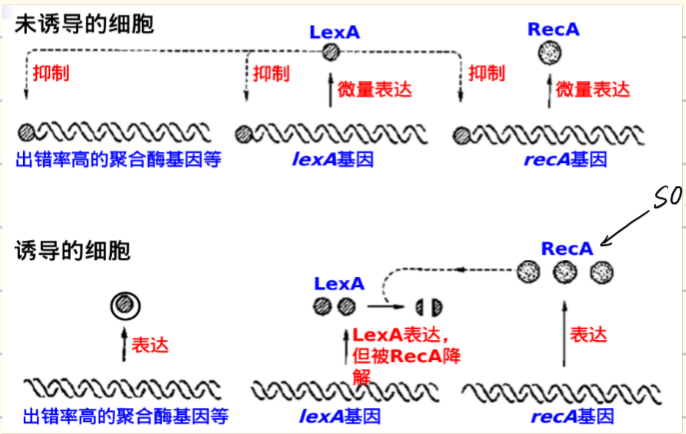


4、SOS修复

- DNA损伤面太大，复制难以继续
- 复制的酶，修复的酶，重组蛋白RecA，调控蛋白LexA等组成一个庞大的调控网络
- 特异性很低
- 着色性干皮病：患者缺乏特异的核酸内切酶，紫外光照射后易患皮肤癌

SOS反应诱导的修复系统

- 避免差错修复：应急反应诱导产生修复所需的酶和蛋白，增强切除修复和重组修复能力
- 倾向差错修复：应急反应诱导产生缺乏校对功能的聚合酶，可在损伤部位进行复制，但带来高变异率



· RNA的转录与修饰

转录

- 转录（Transcription）：生物体以DNA为模板合成RNA的过程
- 转录所需的酶叫RNA聚合酶（依赖DNA的RNA聚合酶）

转录和复制的不同点

	复制	转录
模板	两股链均作为模板	模板链作为模板
原料	dNTP	NTP
聚合酶	DNA聚合酶	RNA聚合酶
产物	子代DNA双链	mRNA、tRNA、rRNA、sRNA、lncRNA
配对	A-T、G-C	A-U、T-A、G-C
引物	需RNA引物	-
方式（特点）	半保留复制	不对称转录

一、转录模板

- 两股DNA单链中只有一股可转录，可作为模板转录成RNA的一股称为模板链，对应的一股互补链称为编码链
- 能转录出mRNA然后指导蛋白质合成的部分称为结构基因，其余的DNA可能转录（rRNA、tRNA），也可能不转录
- 不对称转录：DNA分子上一股可转录，另一股不转录；模板链并非永远在同一单链上

二、RNA聚合酶

反应特点

- 以四种核苷三磷酸（NTP）为底物，以DNA为模板
- 以5′→3′方向合成
- 无需引物，直接在模板上合成RNA链
- 碱基配对是：A-U和G-C &TA
- DNA的两条链中仅一条链可作模板，该链称模板链（负链），另一条链称编码链（正链）
- 一般无校对功能

1、原核生物的RNA聚合酶

大肠杆菌RNA聚合酶

- 分子量为480 kD，由四个亚基组成$\alpha_2\beta\beta'\sigma$（全酶）
- 去掉σ亚基（$\alpha_2\beta\beta'$）称为核心酶
- 原核细胞体内，σ亚基（也称σ因子）有很多个，不同的σ亚基识别不同的启动子，转录不同的基因

大肠杆菌RNA聚合酶各亚基及其功能

亚基	基因	分子量	亚基数目	功能
α	*rpo* A	40,000	2	酶的装配，与启动子上游元件和活化因子结合
β	*rpo* B	155,000	1	结合核苷酸，催化磷酸二酯键形成
β′	*rpo* C	160,000	1	结合DNA模板
σ	*rpo* D	32,000-92,000	1	识别启动子，促进转录起始
ω		9,000	1	未知

2、真核生物的RNA聚合酶

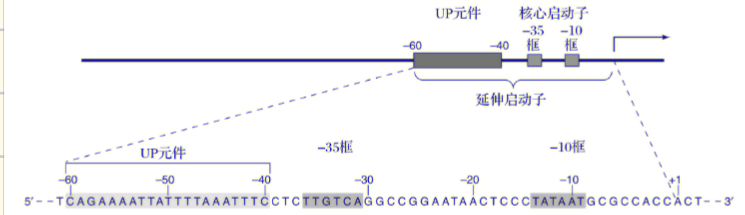
	位置	功能	对鹅膏蕈碱的敏感性
RNA聚合酶I	核仁	转录45S rRNA（5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA的前体）	不敏感
RNA聚合酶II	核基质	转录hnRNA（mRNA的前体）、小RNA	敏感
RNA聚合酶III	核基质	转录tRNA、5S rRNA、U6 snRNA、scRNA	中等敏感
线粒体RNA聚合酶	线粒体	转录线粒体mRNA、tRNA、rRNA，也是线粒体DNA复制的引物酶	不敏感

三、酶与模板的辨认结合

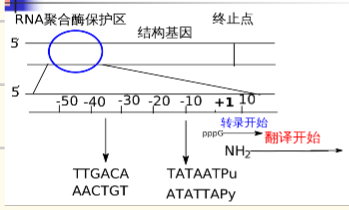
1、原核生物

- 原核生物RNA聚合酶靠σ亚基辨认并结合到DNA启动子开始转录
- 启动子：RNA聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA序列
- 启动子具有共有的序列称为保守序列或一致性序列

原核生物启动子



原核生物RNA聚合酶与DNA启动子的结合

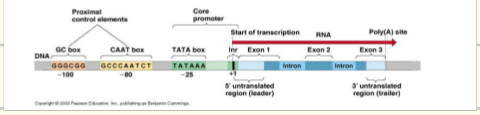


- -35区的序列与起始点的辨认有关，称为辨认位点
- -10区的序列称为Pribnow盒（box）结合位点

16

2、真核生物

- 真核生物启动子很复杂
- 启动子由转录因子而不是RNA聚合酶识别
- 多种转录因子和RNA聚合酶在启动子上形成前起始复合物



一、转录起点

- DNA序列按编码链（与RNA链一样）书写，由左至右为5′→3′方向
- 与mRNA序列相同的为正链（编码链），互补的链为负链（模板链）
- 转录起点：即每个转录单位的起点。该点的核苷酸标号为+1，右侧为下游，用正的数码表示；左侧为上游，用负的数码表示

二、启动子（promoter）

启动子：RNA聚合酶识别、结合和开始转录的一段DNA序列

1、大肠杆菌基因组的启动子

- Pribnow框（-10序列）：起点上游约-10处，保守序列TATAAT，-10序列有助于DNA局部双链解开（A-T配对易解开）
- 识别区（-35序列）：中心位置约在-35处，保守序列TTGACA；-35序列提供了RNA聚合酶识别的信号

2、真核生物基因组的启动子

- Hogness框（TATA框）：中心在-25 ~ -30处，保守序列TAAA(T)AA(T)，有助于DNA局部解开
- CAAT框：-75处，保守序列GGT(C)CAATCT，与RNA聚合酶结合有关
- GC框：更上游处，保守序列GGGCGG，与某些转录因子结合有关
- RNA聚合酶III（转录tRNA等）的启动子在转录区内部

三、终止因子（termination factor）

协助RNA聚合酶识别终止信号的辅助因子

- rho因子：具有核苷酸酶活力（水解三磷酸核苷），在RNA聚合酶遇到终止子暂停作用时，解RNA-DNA螺旋
- NusA：与RNA聚合酶的核心酶结合（$\alpha_2\beta\beta'$-NusA复合物），识别终止序列

四、终止子（terminator）

提供转录停止信号的DNA序列

- 终止子可被RNA聚合酶或其辅助因子识别，但终止信号应位于已转录的序列中
- 原核生物的终止子在终止点之前，有一个回文结构，其转录产生的RNA可形成一个发夹结构，使聚合酶停止移动

大肠杆菌的两类终止子

- 不依赖于rho（ρ）因子的终止子（简单终止子）：除能形成发夹结构外，在终点前还有寡聚U（约6个）序列，这个寡聚U序列可能提供信号使RNA聚合酶脱离模板
  - 由rU-dA组成的RNA-DNA杂交分子具有特别弱的碱基配对作用
- 依赖于rho（ρ）因子的终止子：能形成发夹结构，无寡聚U序列
  - 必须在rho因子存在时才发生终止作用

一、转录的起始

1、原核生物的转录起始

- RNA聚合酶结合到DNA链上，DNA双链部分解开形成转录空泡。原核生物由σ亚基辨认转录起始位点，原核生物基因在-35区有5′-TTGACA，在-10区有TATAAT盒
- 转录起始不需引物
- 第一个核苷酸为GTP或ATG，5′-$_{ppp}G_pN$-OH或5′-$_{ppp}A_pN$-OH
- 合成2-9个nt的RNA后，σ亚基脱落下来

24

2、真核生物的转录起始

- 顺式作用元件（*cis*-acting element）
  - -35区　Hogness盒（TATA盒）
  - -40 ~ -110区　CAAT盒、GC盒
- 反式作用因子（*trans*-acting factor）
  - 转录因子（transcription factor，TF）

二、转录的延伸

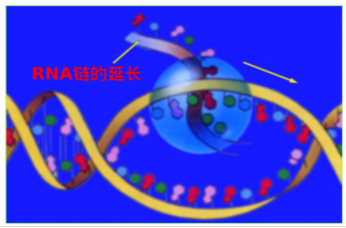
1、原核生物的转录延伸

- 启动子逃逸（promoter escape）：RNA聚合酶开始催化聚合反应，离开启动子并转向延伸的过程
- 启动子解链后，RNA聚合酶开始合成短链RNA；但部分不超过10个核苷酸的RNA链会被释放，不再继续延伸，称为流产转录（abortive transcription）
- 在转录条件合适的时候，转录物超过10个核苷酸，σ亚基脱落，RNA聚合酶离开启动子并转入早期延伸阶段

30

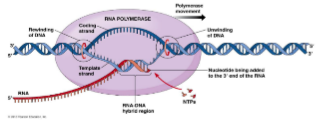
原核生物的转录延伸

- σ亚基脱落，核心酶构象改变，NusA结合
- RNA的5′端伸展在转录空泡之外
- 原核生物的转录和翻译同时进行



转录泡

- 整个转录过程由同一个RNA聚合酶完成
- 转录本RNA生成后，暂时与DNA模板链形成DNA-RNA杂合体，形成一个转录泡
- DNA双链在转录泡前端解开，后端重新聚合



- RNA聚合酶覆盖35 ~ 40 bp区域
- 转录泡的长度为12~14 bp
- DNA-RNA杂合体的长度为8~9 bp

32

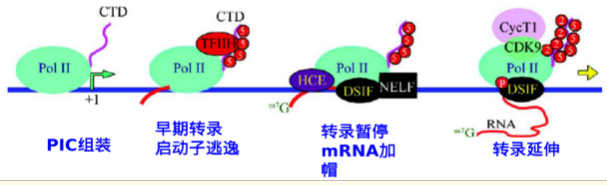
转录暂停（transcription pausing）

- 延伸过程并非一直持续进行，中间经常会发生暂停
- 暂停与多种生物过程相关：真核生物的mRNA加帽、剪接和转录调控，原核生物的转录终止、RNA二级结构形成、调控因子募集、转录-翻译偶联、蛋白质折叠以及DNA修复等都需要转录暂停
- 原核生物σ70依赖性启动子近侧暂停发生在转录15 ~ 25个核苷酸后
- 真核生物RNA Pol II启动子近侧暂停一般发生在转录20 ~ 60个核苷酸后
- 暂停之后可能转录被终止，也可能继续转录，进入生产性延伸阶段，称为暂停释放（pause release）

34

真核生物的延伸因子

- 延伸因子（elongation factor）的功能是阻止转录暂停或终止
- 正转录延伸因子b（positive transcription elongation factor b，pTEFb）含CDK9（一种激酶），磷酸化RNA Pol II和转录暂停因子



38

三、转录的终止

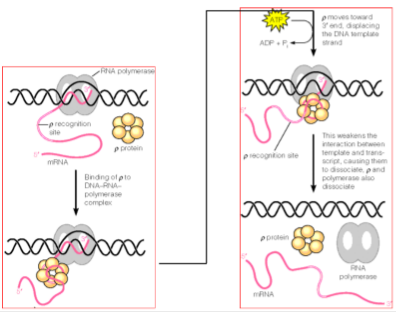
1、原核生物转录终止的模式

- 依赖ρ因子：ρ因子能与RNA结合，还具有ATP酶和解链酶的活性
- 不依赖ρ因子：终止区的碱基可形成特殊的结构，RNA 3′形成茎环结构和一串寡聚U

a）依赖ρ-因子的终止子的终止反应

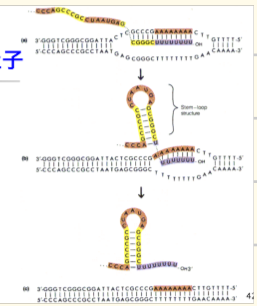
ρ-因子

- 含六聚体的寡聚蛋白，具有依赖RNA的NTP酶活性
- 结合于新生RNA上，借助与水解NTP产生能量推动RNA聚合酶向前移动
- 当酶遭遇终止子时暂停前进，ρ-因子追上酶，与酶相互作用释放RNA
- 还具有RNA-DNA解螺旋酶活性

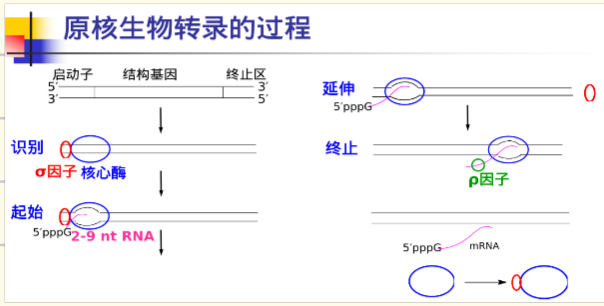


b）不依赖ρ-因子的终止子

- 含富GC的回文序列和寡聚U序列



原核生物转录的过程



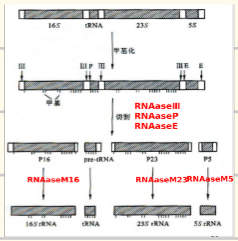
2、真核生物的转录终止

- 真核生物mRNA前体的3′端被内切酶切除，切除位点上游13-20 nt有AAUAAA，下游一般有GUGGUG
- RNA末端腺苷酸转移酶在3′端催化添加polyA尾巴

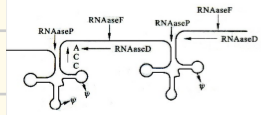
·转录后修饰

1、原核生物rRNA前体的加工

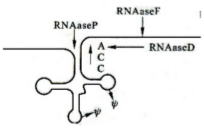
- 拷贝数：大肠杆菌7个
- 结构：每个转录单位由16S、23S、5S rRNA 以及一个或几个tRNA基因所组成
- 甲基化：甲基化碱基和甲基化核糖（2'-甲基核糖）



2、原核生物tRNA前体的加工

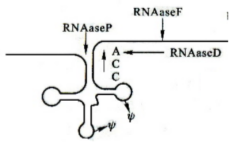


- 拷贝数：大肠杆菌含约60个tRNA，某些tRNA基因有多个拷贝，某些反密码子不只一个tRNA
- 结构：tRNA基因大多成簇存在，或与rRNA、mRNA基因组成混合转录单位



- 1）由核酸内切酶在tRNA两端切断：
  - 5′-核酸内切酶（RNAseP）：在tRNA5′端切开，是tRNA的5′成熟酶
  - 3′-核酸内切酶（RNAseF）：在tRNA近3′端处切开
- 2）核酸外切酶（RNAseD）：从前体3′端逐个切去附加的序列，直至tRNA的3′端，是tRNA的3′成熟酶

52



- 3）在3′端加上-CCA_{OH}
  - -CCA_{OH}结构对接受氨酰基的活性是必要的
  - 一类是本身具有CCA；另一类没有，需要tRNA核苷酰转移酶催化逐个加上CCA
- 4）核苷的修饰：由特定的tRNA修饰酶催化，如假尿嘧啶核苷的糖苷键发生移位反应（由尿嘧啶的N1变为C5）

二、真核生物RNA的一般加工

1、真核生物rRNA前体的加工

- 拷贝数：几十-几千
- 结构：
  - 16~18S、26~28S 和5.8S rRNA基因组成一个转录单位
  - 5S rRNA成簇存在
- 内含子：基因多数不含内含子

- 加工：由RNAseIII以及其他核酸内切酶进行加工
- 甲基化程度比原核生物高

3、原核生物mRNA前体的加工

- 一般不加工
- 少数多顺反子mRNA通过核酸内切酶切成较小的单位，再进行翻译

2、真核生物tRNA前体的加工

- 拷贝数：几百-一千多
- 结构：tRNA基因成簇排列
- 加工
  - 核酸内切酶和外切酶：切去tRNA前体5′端和3′端的附加序列
  - 核苷酰转移酶：在tRNA 3′端逐个加上CCA序列
  - 修饰酶：碱基修饰，甲基化核糖

3、真核生物mRNA前体的一般加工

- 前体：hnRNA（核内不均一RNA）
- 5′-端帽结构的形成（m^7GpppG）
  - O型帽子：$m^7G^{5'}ppp$-
  - I型帽子：$m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1mpN_2p$-
  - II型帽子：$m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1mpN_2mp$-
- 3′-端poly A尾巴的生成
  - 由多聚腺苷酸聚合酶催化，以带3′-OH基的RNA为受体，ATP为供体，在3′端逐个加上A
  - 功能：保护mRNA
- 内含子剪接
- mRNA内部的甲基化

58

SAM：S-腺苷甲硫氨酸（供甲基）

$pppN_1pN_2p\text{-}RNA \xrightarrow{\text{RNA三磷酸酶}} ppN_1pN_2p\text{-}RNA + Pi$

$ppN_1pN_2p\text{-}RNA + GTP \xrightarrow{\text{mRNA鸟苷酰转移酶}} G^{5'}ppp^{5'}N_1pN_2p\text{-}RNA + PPi$

$G^{5'}ppp^{5'}N_1pN_2p\text{-}RNA + SAM \xrightarrow[\text{甲基转移酶}]{\text{mRNA（鸟嘌呤-7）}} m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1pN_2p\text{-}RNA + SAH$

$m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1pN_2p\text{-}RNA + SAM \xrightarrow[\text{甲基转移酶}]{\text{mRNA（核苷-2'）}} m^7G^{5'}ppp^{5'}N_1mpN_2p\text{-}RNA + SAH$

功能：翻译过程中起识别和稳定作用。

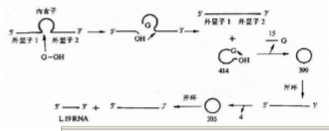
60

三、RNA的拼接

- 断裂基因（split gene）
  - 外显子（exon）
  - 内含子（intron）
- 从中断基因线性表达的方式分
  - 翻译前删除内含子
  - 翻译绕过内含子
  - 翻译后删除内含子
- 内含子定义扩充

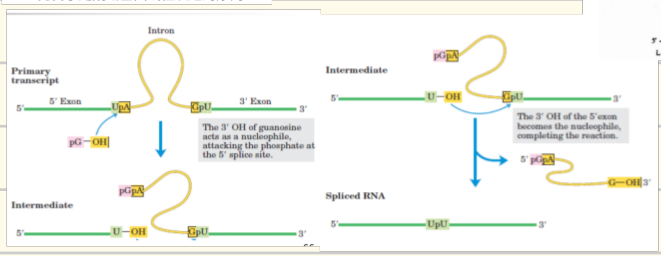
内含子是隔断基因线性表达的序列

- 类型I自我拼接：无需酶的参与，需要游离鸟苷酸发动转酯反应，自我催化拼接



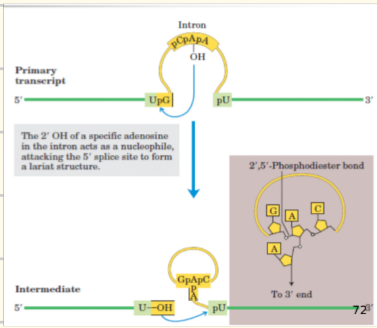
1、类型I自我拼接

- 真核生物细胞器（线粒体、叶绿体）基因、低等真核生物核rRNA基因、细菌和噬菌体的个别基因，需要游离鸟苷酸（GMP）发动转酯反应
- 结构：四膜虫rRNA前体为35S，其中26S rRNA基因中有一内含子

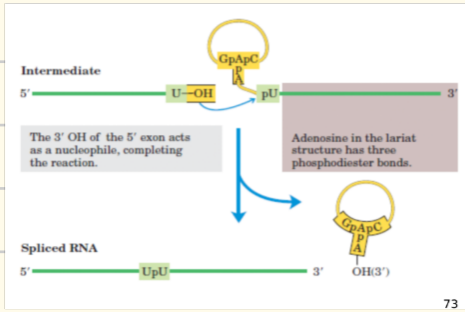


2、类型II自我拼接

- 真菌线粒体、植物叶绿体基因
- 套索状剪接
- 与hnRNA的拼接类似：无GU-AG规则；无核微小核糖核蛋白参与



72



73

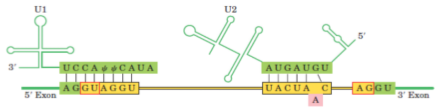
- 第三步，套索状内含子去分支而成线状分子

3、hnRNA的拼接

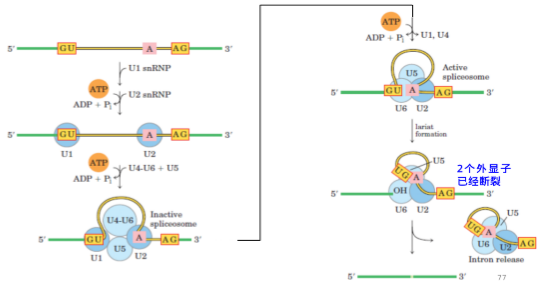
- 套索状剪接
- GU-AG规则：内含子左端（供体）均为GU，右端（受体）均为AG
- 需要核微小核糖核蛋白参与

核微小核糖核蛋白（snRNP）的参与

- 5′GU：U1蛋白-snRNA 复合物（snRNP）
- 分支点A：U2蛋白-snRNA复合物（snRNP）

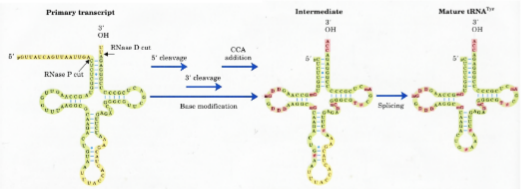


- U1蛋白、 U2蛋白：核内U族蛋白质
- snRNA：300个核苷酸
- snRNP：核内U族蛋白质与snRNA复合物



4、核tRNA的酶促拼接

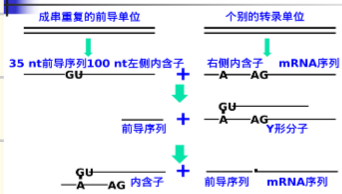
- 结构：内含子插在靠近反密码子处，部分与反密码子碱基配对，这样反密码子环不存在，只有内含子构成的环



5、选择性拼接

- 真核生物大部分mRNA存在选择性拼接

6、反式拼接



- 与hnRNA的拼接类似
- 两个外显子来源于不同的RNA前体

二、蛋白质合成体系

20种氨基酸、mRNA、tRNA、核糖体（rRNA）、酶和蛋白质因子，以及无机离子、ATP 、GTP，合成方向为N→C端

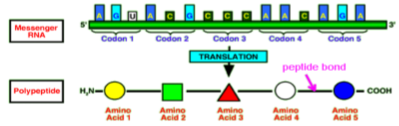
- 氨基酸：原料
- mRNA：模板
- rRNA：蛋白质合成场所
- tRNA：原料搬运；
- 蛋白质因子：起始因子IF、延伸因子EF、释放因子RF等
- 酶：氨基酰-tRNA合成酶、转肽酶、转位酶等
- 无机离子：Mg^{2+}

4

·蛋白质的翻译与转运

一、翻译（Translation）

- 遗传信息传递过程：基因的遗传信息在转录过程中从DNA转移到mRNA，再由mRNA将这种遗传信息表达为蛋白质中的氨基酸
- 翻译：以mRNA为模板合成蛋白质的过程



3

1、核糖体

- rRNA与蛋白质一起构成核糖体，是蛋白质合成的场所。核糖体在细胞中以游离形式存在，或与mRNA结合成串联的多核糖体（~~原核生物~~），或与内质网结合而形成粗糙内质网（真核生物）

2、核糖体组成

由大、小两个在一定条件下可解聚的亲基构成

- 原核生物：
  - 30S小亚基：21种蛋白质和16S rRNA → 亲缘性判断
  - 50S大亚基：34种蛋白质和5S、23S rRNA
- 真核生物：
  - 40S小亚基：30多种蛋白质和18S rRNA
  - 60S大亚基：50多种蛋白质和5S、5.8S、28S rRNA

70S

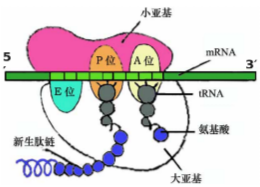
80S

3、核糖体结构

- 小亚基哑铃状，大亚基椅子状，相互结合形成结合面上的一大空隙
- 小亚基中的rRNA识别mRNA上多肽合成的起始位点，所以能与mRNA结合
- 大亚基上有两个tRNA位点：氨酰基位点（A位点）和肽酰基位点（P位点），能与tRNA非专一地结合，另外还有E位点（即空载tRNA的结合位点）

原核生物核糖体结构

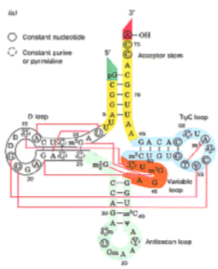
- 30S小亚基
  - mRNA结合位点
- 50S大亚基：
  - E位（Exit site）
  - 具有转肽酶活性
- 大小亚基共同组成
  - A位：氨基酰位（aminoacyl site）
  - P位：肽酰位（peptidyl site）



10

1、tRNA的功能

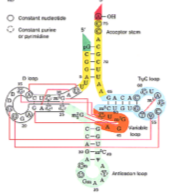
- 结合氨基酸：一种氨基酸由几种tRNA携带，结合需要ATP供能，氨基酸结合在tRNA的3′的CCA-OH
- 反密码子环与mRNA密码配对：每种tRNA的反密码子，决定了所带氨基酸能准确的在mRNA上对号入座
- tRNA的3′端CCA-OH：氨基酸的结合位点



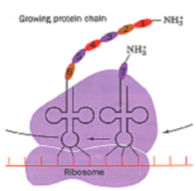
2、密码子与反密码子的配对关系

- 反密码子的第一个核苷酸与mRNA的第三个核苷酸配对时，并不严格遵从碱基配对原则。

反密码子第1个碱基	密码子第3个碱基
G	C或U
C	G
A	U
U	A或G
I（次黄嘌呤核苷）	A、U或C



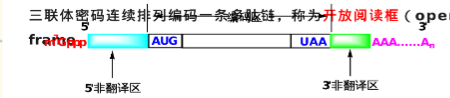
- mRNA携带DNA的遗传信息，是多肽链的合成模板
- mRNA在原核细胞内，存在时间短，在转录的同时翻译；在真核细胞内，较稳定
- 蛋白质合成时，mRNA结合于核糖体小亚基上，大亚基结合携带氨基酸的tRNA；tRNA的反密码子与mRNA密码子配对，ATP供能，合成蛋白质
- mRNA只识别tRNA，与氨基酸无关



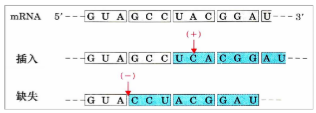
15

mRNA上存在遗传密码

- mRNA分子上从5 至3 方向，由AUG开始，每3个核苷酸为一组，决定肽链上某一个氨基酸或蛋白质合成的起始、终止信号，称为三联体密码（triplet codon）
- 从mRNA 5 端起始密码子AUG到3 端终止密码子之间的核苷酸序列，各个三联体密码连续排列编码一条多肽链，称为开放阅读框（open reading frame）



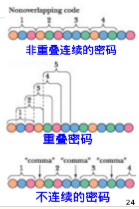
- 框移突变：基因损伤引起mRNA阅读框架内的碱基发生插入或缺失，可能导致框移突变（frame shift mutation）



- mRNA编辑：由于对mRNA外显子的加工，造成mRNA与其DNA模板序列之间不匹配，使同一mRNA前体翻译出序列、功能不同的蛋白质。这种基因表达的调节方式称为mRNA编辑（mRNA editing）

1、连续性

- 密码子是不重叠的，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，噬菌体Φx174中某些基因之间有重叠现象



一、密码子

为一个氨基酸编码进入蛋白质多肽链特定线性位置的三个核苷酸单位称为密码子（Codon）或三联体密码

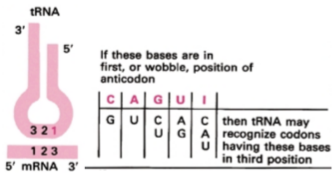
二、遗传密码子特点

- 起始密码子为AUG
  - 真核生物起始密码子编码Met
  - 原核生物起始密码子编码甲酰甲硫氨酸（fMet），翻译后修饰为Met，或fMet被水解
  - 原核生物起始密码子也有GUG（~5%）和UUG（<1%），但编码的氨基酸都是fMet
- 终止信号为UAG、UAA、UGA

2、简并性（degeneracy）

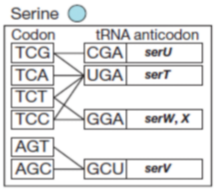
- 由几组密码子编码同一种氨基酸的现象称密码子简并性
- 色氨酸和甲硫氨酸只有一个密码子（UGG和AUG），其他氨基酸由多种密码子对应
- 编码相同氨基酸的密码子称同义密码子
- 简并性的生物意义是减少有害突变

3、摆动性（Wobble规则）



- tRNA上反密码子第1位碱基与mRNA密码子第3位碱基配对时，可以在一定范围内变动，即并不严格遵循碱基配对规律，这一现象称为摆动性（变偶性）

大肠杆菌丝氨酸密码子与tRNA反密码子



简并性

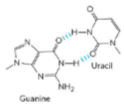
- 6个密码子对应丝氨酸

摆动性

- serT对应TCX
- serW、 serW对应TC(T/C)
- serV对应AG(T/C)

Wobble规则

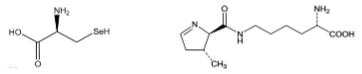
- 反密码子第一位—密码子第三位的配对
  - G-U、I-U、I-A、I-C
  - 大多数已知结构的tRNA的反密码子的第一位为C、G、U、I，没有A
- 原核生物核糖体小亚基中16S rRNA—mRNA的SD序列也存在G-U配对
- tRNA分子内部形成二级结构也存在G-U配对



RNA双链之间的G-U配对

4、通用性

- 几乎所有生物都共用同一套密码
- 某些线粒体（如人）中遗传密码有例外，UGA不是终止密码子，而编码色氨酸；AGA和AGG不编码精氨酸，而是终止密码子
- 第21、22种氨基酸的密码子



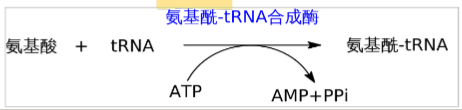
某些高等动物体内，密码子UGA　　某些产甲烷菌（古菌）中，密码子UAG

一、原核细胞翻译的起始

- 翻译起始：指mRNA和起始氨基酰-tRNA分别与核糖体结合而形成翻译起始复合物（translational initiation complex）
  - 肽链合成方向N→C（同位素证明）
  - 以mRNA的5′-3′方向阅读遗传密码
  - 该合成过程是一个耗能过程：合成一个n肽所需能量至少4×n 高能键

1、氨基酸活化（氨基酰-tRNA的合成）

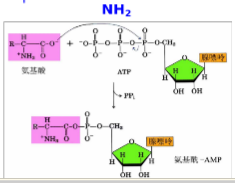
- 氨基酸的活化形式是在氨基酰-tRNA合成酶作用下形成氨基酰-tRNA，氨基酸的活化部位为α-羧基，氨基酸与tRNA连接方式为酯键
- 反应中形成的PPi水解成磷酸，每个氨基酸活化净消耗2个高能磷酸键
- 氨基酰合成酶对氨基酸绝对专一性（专一的L-氨基酸）
- 氨基酰合成酶具有校正活性



第一步：氨基酰-AMP •酶复合物的形成

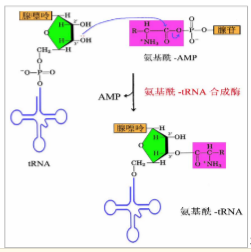
RCHCOOH + ATP + 合成酶 ⇌ RCHCO-AMP•合成酶 + PPi
| NH2　　| NH2

- 氨基酸的羧基通过酸酐键与AMP上的5′-磷酸基相接，形成高能键



第二步：氨基酸的羧基连接tRNA 3′端的AMP

氨基酰-AMP•合成酶 + tRNA
⇕
氨基酰-tRNA + AMP + 合成酶



2、原核细胞翻译的起始步骤

a）原核细胞翻译起始需要物质

- 30S核糖体，包含16S rRNA
- 50S核糖体
- mRNA
- $fMet\text{-}tRNA_i^{fMet}$
- 起始因子（IF-1，IF-2 ，IF-3）
- GTP
- Mg^{2+}

原核细胞起始因子

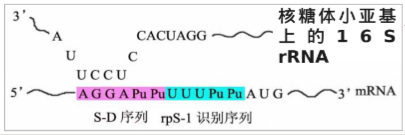
- 参与起始过程的蛋白质因子称起始因子（initiation factor，IF）
- 原核生物起始因子有三种
  - IF-1：占据A位防止结合其他tRNA
  - IF-2：促进起始tRNA与小亚基结合
  - IF-3：促进大小亚基分离，提高P位对结合起始tRNA敏感性

b）原核细胞起始密码的识别

- 首先辨认出mRNA链上的起始密码子（常为AUG，少数为GUG、UUG）
- 起始密码子上游约10个核苷酸处有一段富含嘌呤的序列，称SD序列（Shine-Dalgarno），它与16S rRNA 3′-端的核苷酸序列互补

SD序列

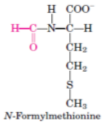
- 在原核生物mRNA起始密码AUG上游，存在4-9个富含嘌呤碱的一致性序列，如-AGGAGG-，称为S-D序列，又称为核糖体结合位点（ribosomal binding site，RBS）



→互补

N-甲酰甲硫氨基酰-tRNA$_i^{fMet}$

- 起始氨基酸是N-甲酰甲硫氨酸，起始的N-甲酰甲硫氨基酰-tRNA$_i^{fMet}$（fMet-tRNA$_i^{fMet}$)是由甲酰化酶催化Met-tRNA$_i^{fMet}$上甲硫氨酸的-NH_2甲基化而成



Met + tRNA$_i^{fMet}$ + ATP $\xrightarrow[\text{-tRNA合成酶}]{\text{甲硫氨基酰}}$ Met-tRNA$_i^{fMet}$ + AMP + PPi

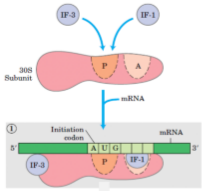
Met-tRNA$_i^{fMet}$ + N^{10}-甲酰基-THF $\xrightarrow{\text{甲酰化酶}}$ fMet-tRNA$_i^{fMet}$ + THF

46

c）原核细胞起始复合物形成过程

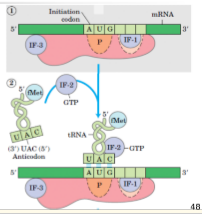
第一步

1. 30S核糖体与IF-1和IF-3结合
2. mRNA与30S核糖体结合，AUG在30S核糖体上准确定位到翻译起始位点（P位）形成mRNA-30S核糖体复合物



第二步

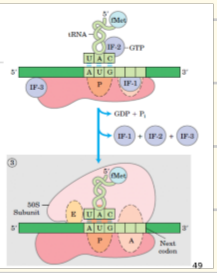
1. IF-2结合GTP，与起始fMet-tRNA$_i^{fMet}$形成复合物
2. 该复合物与mRNA-30S核糖体复合物形成mRNA-30S核糖体-fMet-tRNA$_i^{fMet}$复合物
3. tRNA上的CAU与mRNA上的AUG进行配对



48

第三步

1. 50S核糖体亚基结合，形成功能性的70S核糖体
2. GTP水解产生GDP、Pi，从IF-2解离
3. 起始因子IF-1、IF-2、IF-3解离
4. fMet-tRNA$_i^{fMet}$占据核糖体上的P位点，空着的A位点准备接受另一个氨基酰tRNA



49

二、原核细胞翻译的延伸

- 翻译的延伸（肽链的延长）是在核糖体上连续性循环式进行，又称为核糖体循环（ribosomal cycle），每次循环增加一个氨基酸
- 分为进位（entrance）、成肽（peptide bond formation）、转位（translocation）三步

1、原核细胞翻译延伸需要的物质

- 起始复合物
- mRNA
- 各种氨基酰-tRNA
- 延伸因子
- GTP

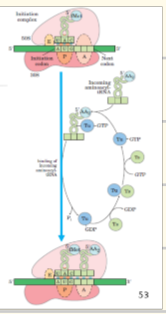
延伸因子（EF）

原核生物	功能	真核生物
EF-Tu EF-Ts	协助氨基酰-tRNA进入A位；结合GTP	EF-1（αβγ）
EF-G	转位酶，协助mRNA前移由A位进入P位；游离tRNA的释放	EF-2

2、原核细胞翻译延伸

第一步：进位

1. 氨基酰-tRNA与EF-Tu-GTP结合形成复合物，该复合物结合到70S核糖体的A位
2. GTP水解成GDP和Pi，EF-Tu-GDP从核糖体上解离
3. 在EF-Ts的帮助下，EF-Tu-GTP中的GDP被交换成GTP，使得EF-Tu-GTP重新生成

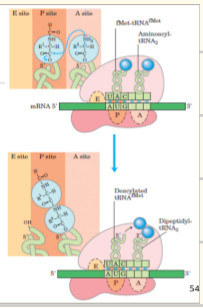


53

第二步：成肽

P位上的氨酰基与A位上的氨酰基之间形成肽键

- 23S rRNA催化肽键合成
- P位上的氨酰基与tRNA解离
- P位上的tRNA仍然保留
- A位上tRNA上的氨基酸数目+1

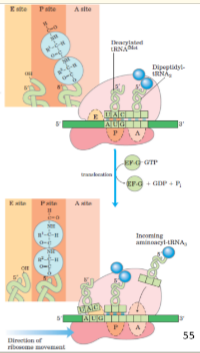


54

第三步：转位

核糖体沿mRNA 3′方向移动一个密码子单位

- A位的肽酰-tRNA移到了P位
- 原来P位脱氨酰基的tRNA从mRNA上释放出来
- 移位是由转位酶EF-G来行使，需要水解GTP



55

1、原核细胞翻译终止需要的物质

- 终止信号：3个终止密码子UAA、UAG、UGA
- 释放因子（RF1、2、3）
- 核糖体释放因子（RRF）

释放因子（RF1、2、3）

- 辨认终止密码
- 促进肽链C端与P位tRNA3′-OH酯键的水解（通过转肽酶的酯酶活性）
- 原核生物中：
  - RF-1识别UAA和UAG
  - RF-2识别UAA和UGA
  - RF-3能促进RF-1和RF-2对核糖体的结合；也是酯酶的激活物

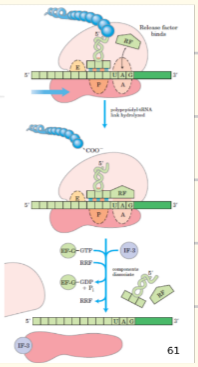
59

核糖体释放因子（RRF）

- 解离核糖体大亚基、小亚基、mRNA和tRNA

2、原核细胞翻译终止

- RF_1和RF_2识别终止信号，RF_3使肽酰转移酶的活力转变为酯酶的水解活力，肽酰从tRNA上水解下来
- RRF促进tRNA从70S核糖体上脱落，mRNA离开核糖体，大、小亚基解离开
- IF-3与小亚基结合，防止大、小亚基结合



61

原核细胞蛋白质合成的能量计算

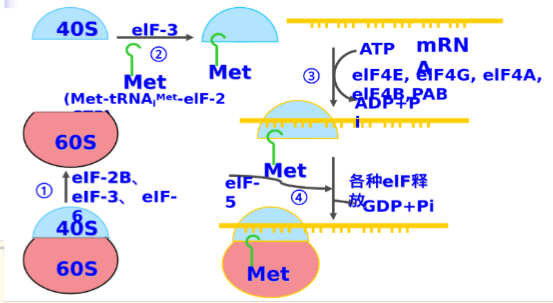
	高能键	能量分子
氨基酸活化×n	2个	ATP
起始复合物形成×1	1个	GTP
进位×（n-1）	1个	GTP
成肽×（n-1）	0	-
转位×（n-1）	1个	GTP
终止×1	1个	GTP

真核细胞翻译的起始

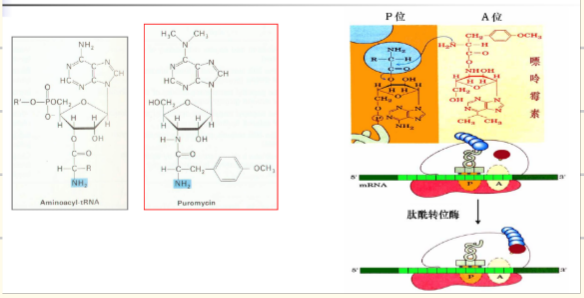
特点

- eIF 1~11
- Met-tRNA$_i^{Met}$
- mRNA的5′端有帽子结构，3′端有poly A
- 核糖体为80 S
- 先结合上Met-tRNA$_i^{Met}$，再结合mRNA

真核细胞起始复合物形成过程



4、嘌呤霉素的结构与作用



1、分子伴侣（molecular chaperon）

- 分子伴侣是细胞中一类保守蛋白质，可识别肽链的非天然构象，促进各功能域和整体蛋白质的正确折叠

a）热休克蛋白（heat shock protein，HSP）

HSP40结合待折叠多肽片段

HSP70-ATP复合物

ATP水解

HSP40-HSP70-ADP-多肽复合物

GrpE

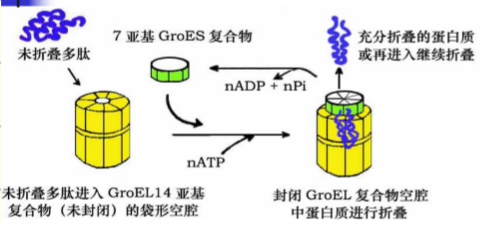
ATP

ADP

复合物解离，释出肽链片段进行正确折叠

- 包括HSP70、HSP40和GreE族，其促折叠的基本作用是结合保护待折叠多肽片段，再释放该片段进行折叠，形成HSP70和多肽片段，依次结合、解离的循环

b）伴侣素（chaperonins）



- 包括GroEL和GroES家族，其主要作用为非自发性折叠蛋白质提供能折叠形成天然空间构象的微环境

2、蛋白二硫键异构酶（protein disulfide isomerase，PDI）

- 二硫键异构酶在内质网腔活性很高，可在较大区段肽链中催化错配二硫键断裂并形成正确二硫键连接，最终使蛋白质形成热力学最稳定的天然构象

3、肽-脯氨酰顺反异构酶（peptide prolyl cis-trans isomerase，PPI）

- 多肽链中肽酰-脯氨酸间形成的肽键有顺反两种异构体，空间构象明显差别
- 肽酰-脯氨酰顺反异构酶可促进上述顺反两种异构体之间的转换
- 肽酰-脯氨酰顺反异构酶是蛋白质三维构象形成的限速酶，在肽链合成需形成顺式构型时，可使多肽在各脯氨酸弯折处形成准确折叠

二、一级结构的修饰

1、切除N-端的甲酰基或N-甲硫氨酸

- 原核生物中，大约半数蛋白N-端的fMet由脱甲酰酶（deformylase）除去甲酰基
- 在原核及真核细胞中fMet或者Met一般都要被除去

2、氨基酸的修饰

- 乙酰化、甲基化氨基酸残基的修饰
- 含-OH的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的磷酸化
- 多肽链二硫键的形成
- 糖基化（Asp、Ser、Thr、Asn）

3、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）

四、蛋白质合成后的靶向输送

1、基本概念

a）蛋白质的靶向输送（protein targeting）

- 蛋白质合成后需要经过复杂机制，定向输送到最终发挥生物功能的细胞靶部位，这一过程称为蛋白质的靶向输送

b）信号序列（signal sequence）

- 所有靶向输送的蛋白质结构中存在分选信号，主要为N末端特异氨基酸序列，可引导蛋白质转移到细胞的适当靶部位，这一序列称为信号序列

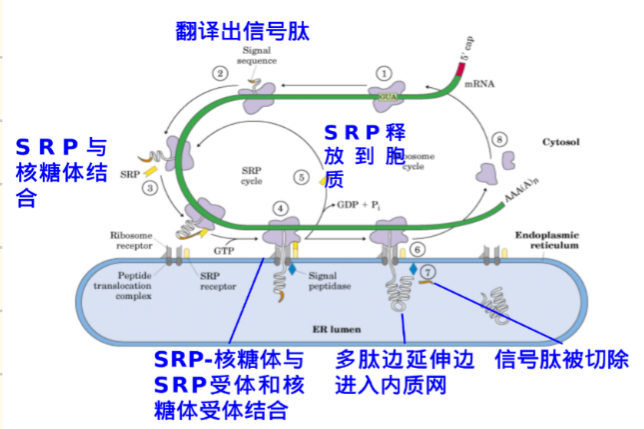
a）信号肽（signal peptide）

各种新生分泌蛋白（多数为酶原）的N端有保守的一段疏水氨基酸（10～40个）序列称信号肽

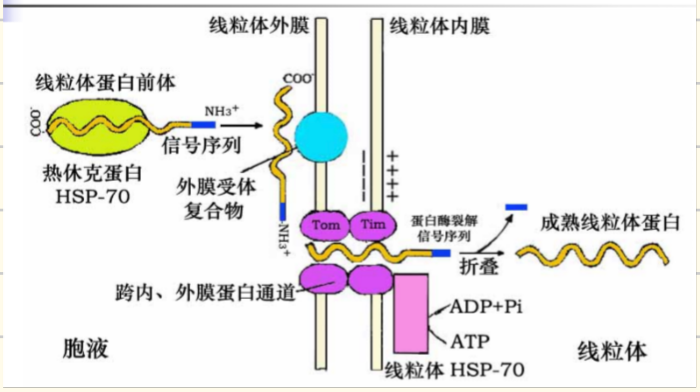
- N端：带正电荷的碱性氨基酸
- 疏水核心区：中性氨基酸
- C端：小分子氨基酸（信号肽酶裂解部位）

b）分泌性蛋白质转运的机制（SRP途径）

1. 翻译出信号肽（N-端的新生肽链），此时多肽链的其余部分还在翻译中
2. 信号肽与信号识别体（SRP）结合（即SRP与核糖体结合），肽链的延伸暂停或延缓
3. SRP-核糖体复合体移至内质网，SRP与SRP受体结合，核糖体与核糖体受体结合，肽链延伸又继续
4. SRP释放到胞质中
5. 多肽边延伸边进入内质网
6. 信号肽被内质网内的信号肽酶切除



3、线粒体蛋白的靶向输送



4、细胞核蛋白的靶向输送