

基本要求在 5.3.8 节, 17502 秒

Date

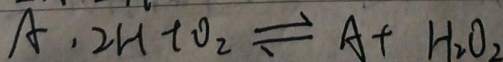
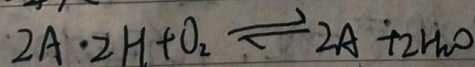
酶: Enzyme

研究历史

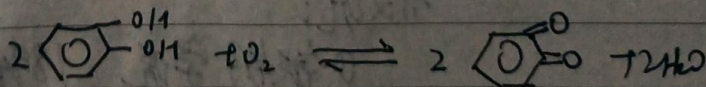
- 1810年 Gaylussac 发现糖 ~~酒精~~ 酒精。
- 1857年 Pasteur 认为发酵是酵母细胞活动结果, 活细胞必须。
- 而 Liebig 认为发酵是细胞液中酶引起。
- 1876年 William Kuhne 提出用 Enzyme 表示统一名称的酵素
- 1897年 Buchner 验证 Liebig 观点
- 1903年 Henri 提出中间复合物学说:
- 1913年 米氏学说 / 米氏方程
- 1925年 Briggs 和 Handlane 修正米氏方程 提出稳态学说
- 1926年 Sumner 从刀豆中提纯脲酶, 证明酶是催化性蛋白质
- 1930年~1936年 Northrop 得脲酶、胰蛋白酶等
- 1969年, Memphill 等合成膜 RNase (降解RNA的蛋白酶)
- 1982年 Cech 和 Altman 发现有催化活性的RNA。
- 1986年 Schultz 和 Lerner 研成 abzyme; Boyer 和 Walker 阐明 ATP 酶机理

氧化还原酶

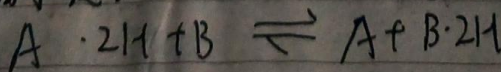
氧化酶类:



例: 邻苯二酚: 氧氧化酶

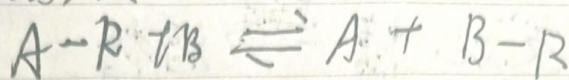


脱氢酶类:



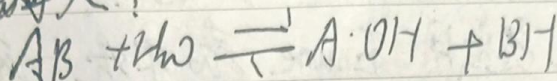
例 乳酸脱氢酶: 乳酸: NAD⁺ 氧化还原酶

转氨酶类:

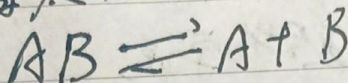


例: 谷丙转氨酶.

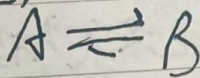
水解酶类:



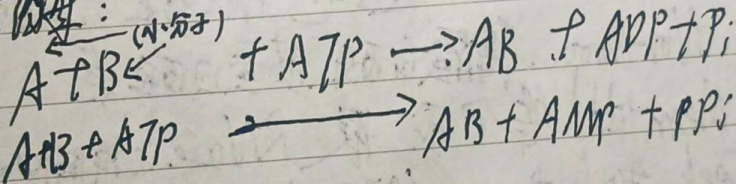
裂合酶类:



异构酶类



连接酶:



专一性:

结构专一性

底物化学结构有要求, 分绝对/相对专一性

立体专一性

在结构专一的基础上对立体异构有要求
旋光异构专一性, 几何异构专一性

为什么专一?

假说:

- ① 锁钥学说 1894年 Fischer (不完全)
- ② 诱导契合学说 1958年 Koshland

→ 酶活力测定与分离纯化

→ → 什么是酶活力?

→ → → 酶活力指在一定条件下所催化的某一反应速率(酶活性)
指单位时间/体积中底物的减少/增加量

底物浓度 ↓

酶部分失活

产物抑制酶

T/V

→ → 酶单位(U): 酶的活力单位, 一定条件下, 一定时间内
将一定量的底物转化为产物所需酶量

国际单位: IU 最适条件下, $1IU = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$

(注: $\mu = 10^{-6}$) Kat, $1\text{Kat} = 1 \text{mol}/\text{s}$

→ → 酶的比活力: 每毫克酶具有的活力单位数 (U/mg; IU/mg; Kat/mg)
表示单位酶的催化能力

酶活力的测定:

测定完成一定量反应所需时间

测定单位时间的化学产量

方法:

分光光度法: 要求产物底物对目标光吸收不同

优: 简单, 速, 准, 方便监测

荧光法: 要求产/底物有荧光性质, 灵敏, 易被干扰

同位素标记法 灵敏最高

电化学方法: pH计 氧电极法

提纯:

总活力: 损失

比活力: 增加

Date

核酶

最初发现 四膜虫 26S rRNA 成熟过程中, 其通过 ^{2'-19 RNA} 自我剪接自身的内含子, 连接两个外显子以成成熟 RNA, 没有蛋白质参与

有经典的酶促催化标志

高度专一

符合米氏方程

对竞争性抑制剂敏感

抗体酶: abzyme

有催化活性的免疫球蛋白, 在可变区有酶属性意义:

① 制药

② 了解蛋白质

→ 酶促反应动力学

研究酶促反应速率及其因素

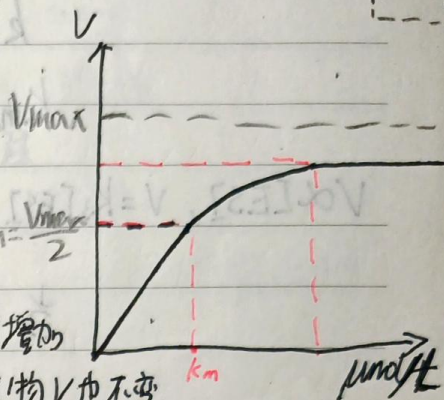
→ 底物浓度对酶促反应速度的影响

酶与底物的中间络合物学说

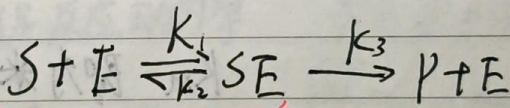
现象 { 一级反应低浓度的时候成正比
混合级反应中浓度的时候不成比例增加
零级反应高浓度时达 V_{max} , 再加底物 V 也不变

猜想 { 指酶首先和底物生成中间络合物 (ES) 再成产物 (P) 并释放酶
即 $S + E \rightleftharpoons ES \rightarrow P + S$

验证 { 电镜直接观察到了 ES



Menten & Michaelis 提出假说:

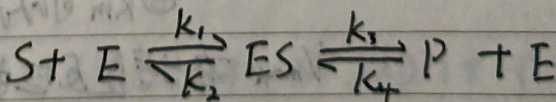


快速建立平衡, 即: $k_1 \gg k_3$ 或 k_2

推导出:

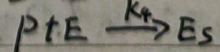
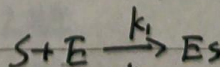
$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_s + [S]}$$

Briggs & Haldane 提出稳态理论:



$$\frac{d[ES]}{dt}$$

反应



初期 $k_4 \sim 0$

$$= k_1([E] - [ES]) \cdot [S] \quad (1)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2)$$

$$k_1([E] - [ES])[S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} \quad (3)$$

$$V \propto [ES], V = k_3[ES], \text{ 又 } [ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]}, \text{ 所以 } V = k_3 \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

当 $[S] \gg [E]$ 时, 有 $[E] = [ES]$

$$\text{此时有 } V_{max} = k_3[E] \quad (5)$$

$$\textcircled{4} \textcircled{5}: V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{米氏方程}$$

$$K_m \gg [S] \text{ 时, } V = \frac{K_{max}}{K_m} [S]$$

$$K_m \ll [S] \text{ 时 } V = V_{max}$$

$$K_m = [S] \text{ 时 } V = (V_{max})/2$$

K_m 即为米氏常数 (mol/L)

② K_m 可以判定酶的特一性和天然底物

③ K_m 可以计算 V 与 V_{max} 间关系

注意! $K_m \neq K_s$ 仅在 $k_1 \gg k_3$ 或 k_2 时 K_m 可看作 K_s . 此时, $\frac{1}{K_m}$ 近似表示酶与底物结合难度.

④ K_m 可以判定某一反应方向与途径

V_{max} 在特定反应中是常数

$[S]$ 大时 $V_{max} = k_3[E]$, 在这里 k_3 即为 k_{cat}

催化常数
转换数

TN

米氏方程作图之双倒数法

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

作图法 Eadie-Hofstee 法

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

Hanes-Woolf 法

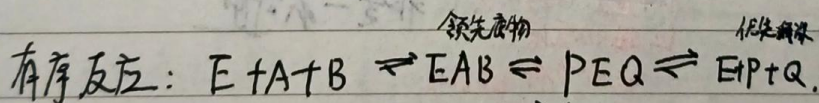
$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}$$

直接作图法

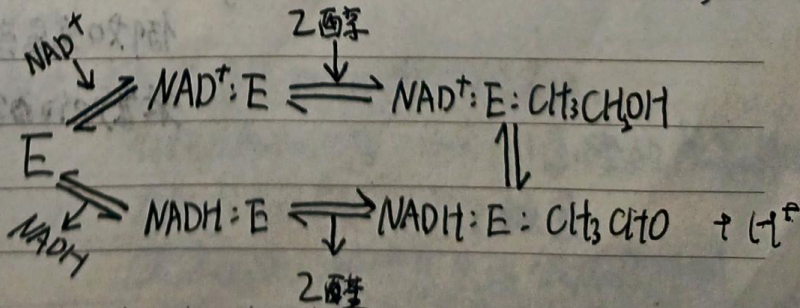
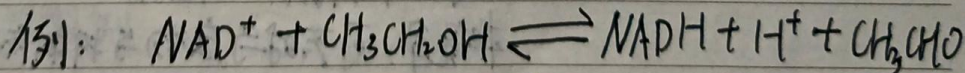
$$V_{max} = v + \frac{v}{[S]} K_m$$

多底物反应的酶促反应动力学

双底物 { 单-置换反应 (序列反应) } 有序反应
 { 双-置换反应 (乒乓反应) } 随机反应



A 与 P 构成竞争关系.



随机反应

随便.

乒乓反应: E与底物A先反应产出 E^{Mod} 与 P,
 E^{Mod} 与底物B再反应产出 E 与 Q.

例: 转氨酶反应

酶的抑制作用:

酶的必需基团变性, 酶活性下降, 但不引起酶变性
 抑制程度的表示:

相对活力分数:

$$\alpha = \frac{V_i}{V_0}$$

相对活力百分数: $\alpha\%$

抑制分数 $1 - \alpha$

抑制百分数: $(1 - \alpha)\%$

抑制剂分类

可逆抑制剂

反之

竞争

非竞争

反竞争

不可逆抑制剂

专一不可逆

非专一不可逆

不可逆/物理方法
 让酶恢复活力

一般给抑制剂结合

例: 5-FU

联胺类过渡态类似物

竞争抑制剂: 与底物相似. 少量?

非竞争: 可共时与底物与抑制剂结合, 但三元中间产物不同

例如金属离子改变酶活性部位中-SH的作用
 来影响酶的立体构象

反竞争抑制剂: 只有与底物结合后才能与抑制剂结合 多见于底物结合

鉴别可逆抑制作用和不可逆抑制作用
物理方法:

抑制剂动力学

竞争性抑制的动力学

K_i : 抑制剂常数

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m (1 + \frac{[I]}{K_i}) + [S]}$$

V_{max} 不变
 K_m 增加

双倒数式: $\frac{1}{V} = \frac{K_m}{K_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$

非竞争性:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{(K_m + [S]) (1 + \frac{[I]}{K_i})}; \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_i}) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$$

K_m 不变 V_{max} 下降

反竞争性:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S] (1 + \frac{[I]}{K_i})}; \quad \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (1 + \frac{[I]}{K_i})$$

K_m 下降 V_{max} 下降

重要抑制剂

不可逆抑制剂

非专一性: 作用在酶的某些基团、

有机磷化合物: 作用于丝氨酸的羟基和组氨酸的咪唑基

有机汞有机砷: 作用于巯基

重金属盐: 高浓度失活, 低浓度抑制

烷化剂: 使巯基、羟基、氨基、羧基、咪唑基、组氨酸的咪唑基

专一性不可逆抑制剂

专一地作用于某酶的活性部位的必需基团

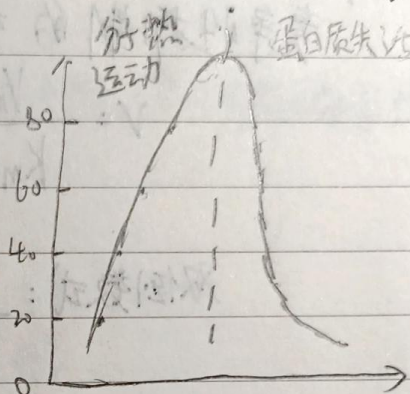
K_{cat} 型抑制剂是酶的底物, 经酶催化后产生反应基团使失活

K_s 型抑制剂: 与底物结构类似带一活泼化学基团
可对酶中心基团反应进行修饰

温度对酶促反应的影响:

温度系数 Q_{10} :

指每加 10°C 前后
反应速率之比.



pH 对酶促反应的影响:

在一定 pH 下, 酶的反应速率达最大

大多数酶的适宜 pH 在 5-8 间

动物: 6.8 ~ 8.0 植物微生物 4.8 ~ 6.5

原因:

过酸/碱 破坏空间构象

pH 影响底物解离, 影响酶有基团解离影响
络合物解离. 活性中心

pH 解离其它基团造成空间构象改变

激活剂对酶促反应的影响:

可以提高反应速率的物质:

无机离子:

小分子有机化合物 (GSH; EDTA)

某些酶

酶可激活酶原(激活酶)

—— 时间缺失

酶的活性部位

指酶分子结合底物并将其转化为产物的区域

结合部位 (专一性)

催化部位 (决定催化反应性质)

特点:

1. 占比小

2. 三维实体

3. 不完全性契合 (诱导)

4. 位于酶分子表面的一个裂隙内

5. 结合底物靠较弱次级键

6. 有一定柔性与运动性

酶的必需基团

(氧化烷化等)

指经过化学修饰后会使整个酶失活的基团

非必需基团

修饰后无影响

研究活性部位的方法

① 酶侧链基团的化学修饰法

鉴别标准:

① 酶活力丧失率与修饰剂浓度成正比

② 底物或活性部位结合的可逆抑制剂可保护其免受共价修饰剂的影响

非特异性共价修饰

特异性共价修饰 如 DFP 作用于胰凝乳蛋白酶
亲和标记 (Ks Rove)

② 动力学参数识别定法

(如: RNase 酶其活性中心位于 H612, H6119 是跟据改变 pH 影响 K_m 推断出来的。) 等等

③ X-射线晶体衍射技术

④ **定点诱变法**

一个个残基改变后识别试

酶的催化机理

影响酶催化效率的因素

底物与酶的 邻近效应 及 定向效应

→ 指由于酶促反应中底物与酶间有亲和力
会使底物向酶活性中心靠近

底物在酶活性中心的局部浓度增加
从而增加反应速率。

2023/01/15: 0035

定向效应指底物向酶的活性中心
靠近时会诱导酶的空间构象向底物
反应基团与酶活性基团正确方向
排列的方向改变, 使反应易于发生

酶中某些基团/离子使底物中敏感
键中某些基团的电子云密度升高或
降低使之更敏感自然发生形变以更接
近过渡态, 降低反应活化能

三、酸碱催化

广义酸碱催化：质子酸提供质子或质子碱接受部分质子以降低活化能

酶分子中可作广义酸/碱的基团：

Glu Asp

Lys Arg

Cys

His

Ser

Tyr

四、共价催化

即亲核/亲电子催化，反应时，分别放出/获得电子，作用于底物中心，可形成中间复合物，降低活化能，加速反应

参与共价催化的基团：亲核 His 咪唑基

20240211

Cys 巯基

Asp 羧基

Ser 羟基

亲电子： H^+ Mg^{2+} Mn^{2+} Fe^{3+}

辅酶/辅基可以参与共价催化

例：磷酸酯酶
酰化酶
葡萄糖酶

有未成对电子，形成共价键易断裂

五、金属离子的催化作用

(1) 金属酶

：紧密结合的金属离子

(2) 金属-激活酶

：松散结合的金属离子

作用原理：

① 传递电子

(许多氧化还原酶含 Cu^{2+} , Fe^{3+})

② 电荷屏蔽以促反 (许多激酶底物为 ATP-Mg^{2+} 复合物)

③ 促进水的离子化以促进亲核催化

六、多元催化与协同效应

几个基元配合作用 (胰凝乳蛋白酶 $\text{Asp102, His57, Ser195}$)

电荷网络

七、活性部位的微环境

底物分子与酶的活性部位结合, 此时形成疏水环境因此环境极性有所降低, 底物与活性基团静电作用力加大, 利于酶催化作用

1. 例溶菌酶 Lysozyme 切 NAG (N-乙酰氨基葡萄糖)

2024.02.25, 16:45

$[\text{S}] (10^{-4} \text{ mol/L})$	相对水解率	
引入: 我们发现:		
$(\text{NAG})_2$	0	A-B
$(\text{NAG})_3$	1	A-B-C
$(\text{NAG})_4$	8	A-B-C-D
$(\text{NAG})_5$	4000	A-B-C-D-E
$(\text{NAG})_6$	30000	A-B-C-D-E-F
$(\text{NAG})_8$	30000	

可得: Lysozyme 切 D-E 的效率

现在考虑真实细胞壁:

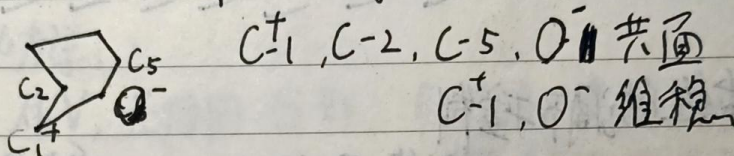
考虑 A-B-C-D-E-F, C 不能为 NAM

于是 $\text{NAG-NAM-NAG-NAM-NAG-NAM}$

进一步的, Lysozyme 形如凹, 中间的疏水裂缝恰好容纳以上寡糖, Lysozyme 发挥重要作用的氨基酸是 Glu35 Asp52

Glu35 上的质子转移到 E 环糖苷键上使之裂解, 此时, D 环 C_2^+ 。Asp52 的 O^- 能稳定 C_2^+ 的, 其后 OH^- 和 H^+ 分别至 C_2^+ 和 Glu35 侧链, 水解成 (失去 C_2^+ 上的氢键来角)

以上, D 环在反应中为半椅式构象, 由此:



2. Ser 蛋白酶家族

- 胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶
- 枯草杆菌蛋白酶 *subtilisin*、凝血酶、纤溶酶 plasmin
- tPA、乙氧酰胺羧基酯酶

以上三种酶虽一级结构不太相似, 但三维结构相似。

催化三联体: Asp102 His57 Ser195
定位 His57 酸碱催化 共价结合, 使其断裂

以胰凝乳蛋白酶为例: Ser 转移一个质子给组氨酸, 使其咪唑基带正电, 可以与带负电的 Asp 静电稳定

更具体的, 给到了 N 上, 此时 Ser 的 O 带负电荷, 亲核攻击带部分正电荷的羰基上的 C, 形成共价化合物 (酰基酶)

其后, His57 的 N 上的 H 流向 酰基羧基上的 N.

形成不稳定化合物。

发生肽键断裂, 氨基酸释放

H₂O 发亲核攻击。

OH 接 原氨基酸的 C

H 接 His57 和 Ser195

四面体瓦解, 释放羧基产物。

核酸催化 略 (二轮复习再学)

酶活性的调节控制

一、别构调控

一般是多亚基酶

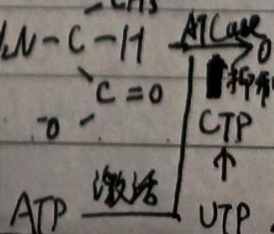
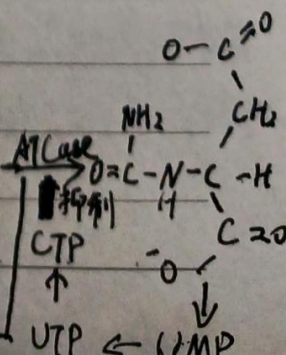
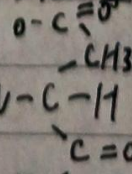
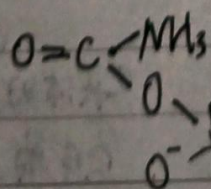
引入: 酶分子的非催化部位与某些化合物非共价结合后, 酶的空间构象发生改变, 酶的活性改变。(变构酶/别构酶)

使酶别构的物质为别构剂/效应物
一般是小分子代谢物/辅因子

正效应物/别构激活剂

负效应物/别构抑制剂

ATCase 天冬氨酸转氨甲酰酶



R: regulative submit

C: catalytic submit

Date

ATCase 的亚基排列: $3R_2 + 2C_3$

性质: 酶分子上有和底物及调节物结合的部位, 这两种部位可以在不同或同一亚基上

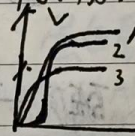
同促效应: 活性部位和调节部位相同

异促效应: $\downarrow$ 不同, 但可能相互影响, 产生协同效应

别构酶酶促反应动力学:

$[S]$ 对 V , 正协同 S 形, 负协同: 表现双曲线
不符合米氏方程

对正协同来说, 底物细微的变化以浓度酶促反应 V 大



1: 一般酶

2: 正协同

3: 负协同

对负协同来说: $[S]$ 小时酶活力大
但上限不高

Koshland 标准:

协同指数 (CI) 又 饱和比值 (RS)

$$\frac{\text{结合位点饱和 } [S]}{\text{结合位点饱和 } 10\% \text{ 时 } [S]} = 81^{\frac{1}{n}}$$

n : Hill 系数

$n=1$ 米氏酶

$n>1$ 正协同效应别构酶

$n<1$ 负协同酶

别构调节机制

Date

MWC

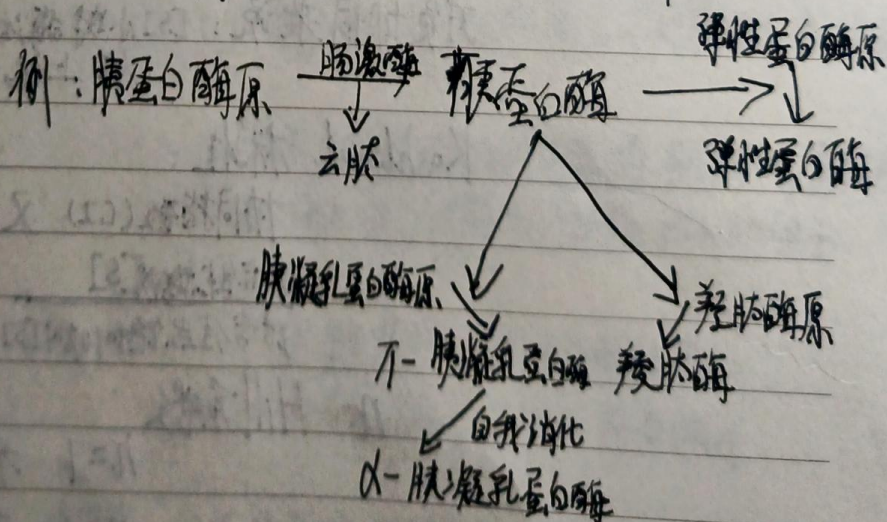
① 齐变模型 (对称或协同模型)

② 序变模型 (KNF)

- MWC:
- (1) 别构酶是由确定数目亚基组成的寡聚酶, 各亚基平等, 酶有对称轴
 - (2) 每个亚基对一种调节物是只有一个结合位点
 - (3) 每种亚基都有 R, T 状态
 - (4) 构象状态改变, 对称性不变
对称亚基 $\rightarrow$ 齐步变化 $\rightarrow$ 对称亚基

- KNF:
- (1) 配体不存在时酶全 T
 - (2) 按序变化
 - (3) 亚基间可呈正/负协同作用
全 T $\rightarrow$ 有 T 有 R $\rightarrow$ 全 R

四、酶原激活: 酶原 $\xrightarrow[\text{不可逆}]{\text{水解酶}}$ 酶: 一种按控制制



凝血过程

五、酶的可逆共价修饰：

共价修饰酶可通过其它酶来共价修饰自己的肽链上的一些基团来调节活性

特点：反应灵敏，节约能量，机制多样，常受激素、以及神经之指令；级联放大、高效性

例：

磷酸化

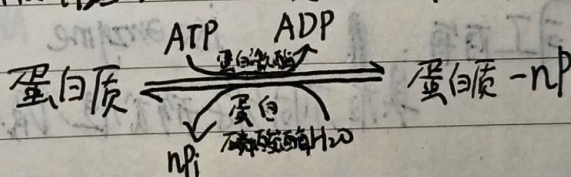
腺苷酰化

尿苷酰化

ADP-糖基化

甲基化

重点介绍：蛋白质的磷酸化



催化

两类蛋白激酶：① Ser/Thr 羟基~
② Tyr 羟基磷酸化

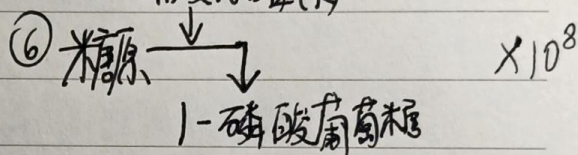
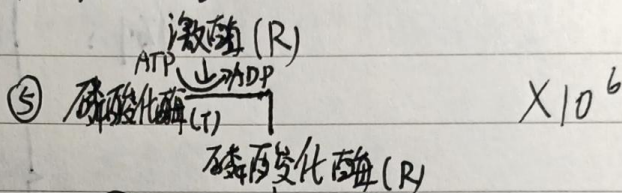
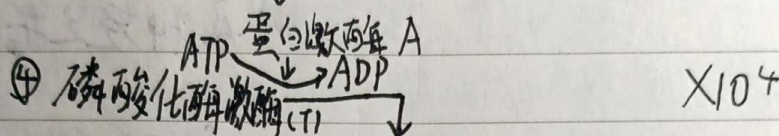
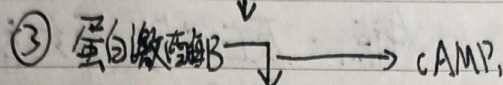
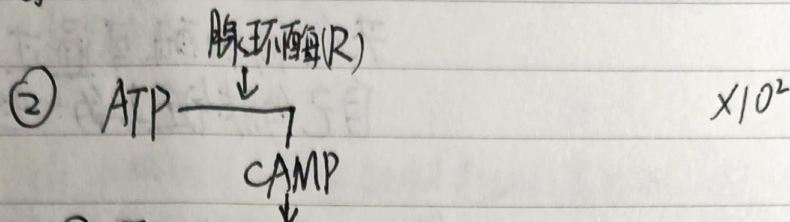
三类蛋白磷酸酶 ① Ser/Thr
② Tyr
③ 双重底物型

(cAMP 依赖型)

蛋白激酶 A 之 激活

R_2C_2 ，每个 R 上有两个 cAMP 结合点。
略 动员糖原

① 腺苷酸环化酶(T) —



六. 同工酶: isoenzyme

具有不同分子形式但催化 same 化学反应的一组酶

是遗传标志

和个体发育, 分化有密切关系

适应不同的代谢需求而产生的差异

例: 乳酸脱氢酶 LHD 由 4 个 2 种不同亚基组成 $C_4^2 - 1 = 5$
 $H_4 \sim M_4$

在不同组织, 细胞中 $\text{LHD}_1 \sim \text{LHD}_5$ 水平不同, 可诊断疾病

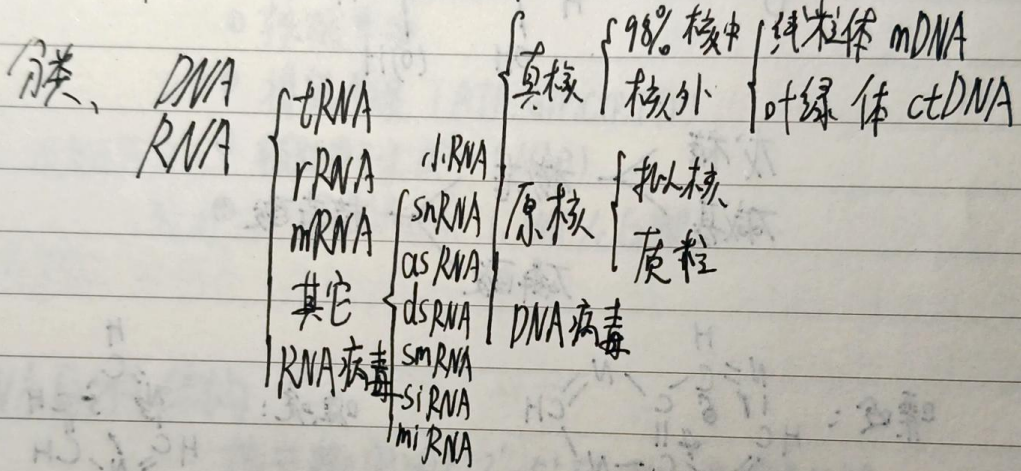
大肠杆菌中的天冬氨酸激酶的同工酶

本章重点: 6.2.3, 32分25秒

核酸 Nucleic acids

Date

1868年 Mescher 从脓细胞中分离出含磷酸有机物 → 核素 nucleon
 1879年 Kossel 查明 A, T, C, G
 1889年 Altmann 核素 → 核酸
 Levene 阐明核苷酸/化学键等
 1928年 Griffith DNA是遗传物质
 1953年 Watson, Crick DNA双链
 1958年 Crick 中心法则



核酸的生物学功能:

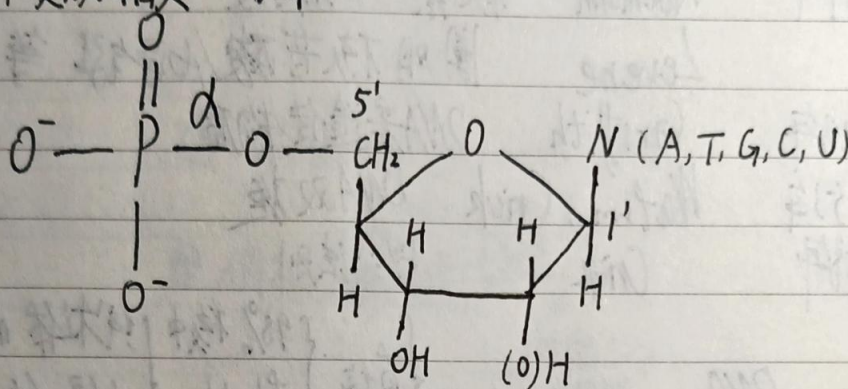
- 属性: ① 通过复制来传递遗传信息
 ② 通过转录控制生物表型
 ③ 通过突变形成各等位基因

rRNA 80% 组成核糖体, 合成蛋白质
 tRNA 15% 携带氨基酸进行翻译
 mRNA 1-5% 蛋白质的合成模板

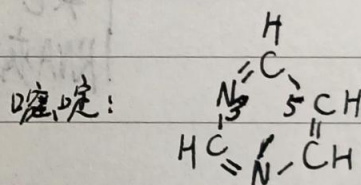
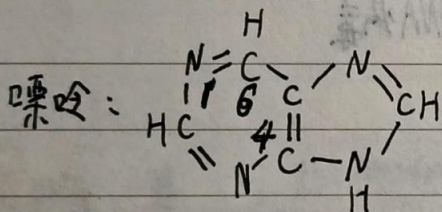
- RNA: ① 遗传物质
 ② 参与蛋白质合成
 ③ 遗传信息加工
 ④ 调控基因表达及细胞功能
 ⑤ 催化

核酸的结构:

5'-磷酸核糖核苷酸 MP



戊糖
 碱基
 磷酸
 核糖
 核苷
 核苷酸



A (腺嘌呤) 在 6' 的 C 上有氨基

G (鸟嘌呤) 在 2' 的 C 上有氨基, 6' 的 C 上是酮基

C (胞嘧啶) 2' 酮基, 4' 氨基

U (尿嘧啶) 4', 2' 酮基

T (胸腺嘧啶) 2', 4' 酮基 5' 甲基

稀有核苷:

假尿嘧啶 (ψ)

二氢尿嘧啶 (DHU)

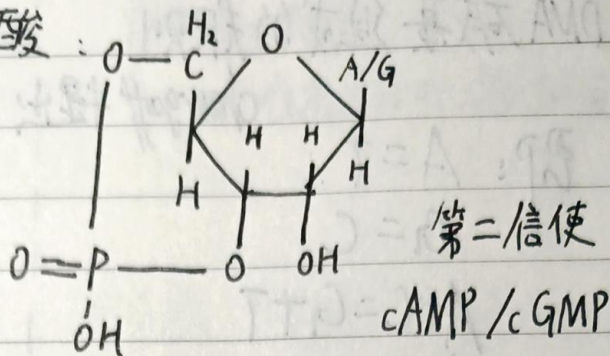
Am

m⁶G

腺苷核糖核苷酸及衍生物

NMP, NDP, NTP

环化的核苷酸



生物学功能：核苷酸：

- ① 核酸单体
- ② 携能物质 (ATP, GTP, CTP, TTP)
- ③ 辅助因子之成分 (NAD)
- ④ 细胞通讯媒介 (cAMP / cGMP)

DNA的分子结构：

核苷酸间通过 3'-5' 磷酸二酯键连接

连接键及排列顺序 是 DNA 的一级结构

走向：5' → 3'

一级结构之表示：

① 结构式：直接写结构

② 线条式：s a t a t a t a t o h₃

③ 字母式：5' p A p C p T p G 3'

5' A C T G 3'

5' p A - C - T - G 3'

2.26
晚

三、DNA 碱基组成的规则

Chargaff 提出

$$\text{即: } A = T$$

$$G = C$$

$$A + C = G + T$$

$$A + G = C + T$$

DNA 的二级结构:

双螺旋

a. 两条反向平行的多聚核苷酸沿一个假想中心轴右旋盘绕

b. 磷酸和核糖单位为骨架, 碱基内侧 互补配对

螺旋中 2nm

上下碱基平面 $d = 0.34 \text{ nm}$

10 个 bp 重复一次 3.4 nm (一个旋)

双螺旋的维系

碱基中间的氢键

碱基堆积力

磷酸基上的 O⁻ 被胞内组蛋白/正离子中和

碱基处于疏水环境

意义: 是其复制、转录/反转录的分子基础
是遗传信息传递、表达的分子基础
奠定了分子生物学的基石

双螺旋的构象

A-DNA

B-DNA

C-DNA

D-DNA

Z-DNA

DNA的三螺旋:

往往出现在同型碱基

DNA的三级结构:

双螺旋分子通过扭曲及折叠形成不同结构

例: 超螺旋DNA

定量: $L = T + W$

L : 连环数: 一条绕另一条链的圈数

T : 实际缠绕数; DNA的超螺旋数

W : 超螺旋数

$$\lambda = (L - L_0) / L_0 \quad \text{超螺旋度}$$

L_0 : 即松弛态DNA环数

意义: 加增压缩比

推动DNA结构变化以完成功能需求

L 不同的, 其它相同的DNA互为异构DNA

拓扑异构酶I通过使DNA一条链断后再连接使超螺旋DNA松弛。一次, $L - 1$ 。不需能量

拓扑异构酶II: 断两链, 引入负超螺旋, $L - 2$ 。需能

蛋白质与核酸形成核蛋白

核小体：组蛋白与DNA的组合单位。有200 bp 11nm 链长
 $H_{2A}, H_{2B}, H_{1}, H_{3}, H_{4}$ 长110Å 高55Å, DNA绕1.8圈

纤维 30nm, 每圈6个核小体

突环 130nm, 约75000 bp

玫瑰花结 300nm, 6个突环

螺旋圈 700nm, 每圈30个玫瑰花结

染色体 1400nm

RNA的一级结构

和DNA差不多, tRNA含稀有碱基

tRNA的二级结构：三叶草

四环四臂：IV环即T ψ C环
 含有假尿嘧啶

III环：可变环

II环：反密码子环

I环：DHU环

三级结构：折叠弯曲：rRNA 单链，与蛋白质组成核糖体
 氨基酸臂：3' (= 氢尿嘧啶)

mRNA: 原核: 5' 顺反子 顺反子 顺反子 3'
 5' 帽区 插入顺序 插入顺序 末端顺序
 即: 先导区 + 多顺反子 (翻译区) + 末端顺序

真核: 帽子 顺反子 poly A
 $m^7G-5'ppp5'-N-3'P + \text{单顺反子} + \text{poly A (AAAAAAAA-OH)}$

核酸的理化性质

对酸: 糖苷键 > 磷酸酯键

嘌呤糖苷键 > 嘧啶糖苷键

酸水解 去嘌呤: pH 1.6 37°C / pH 2.8 100°C, 1h
 去嘧啶: 98~100% HClOH 175°C, 2h / CF₃COOH 155°C, 1h
 DNA
 80min
 RNA

碱水解: RNA 磷酸酯键敏感, 室温, 0.3~1mol/L KOH, 24h 得 2'-核苷酸
 DNA 抗碱水解 mixed

意义: DNA 要传递遗传信息
 RNA 完成任务就要降解

酶水解: 非特异磷酸二酯酶

蛇毒磷酸二酯酶, 产物 5'-核苷酸
 牛脾 ~ 产物 3'-核苷酸

核酸酶

分类: 底物专一性 RNase DNase

Date

作用方式:

断裂方式:

核酸外切酶
核酸内切酶

5'-(端)核苷酸

3'-(端)核苷酸

单链 ~

双链 核酸酶

杂链 ~

RNase:

cDNA

RNase H:

作用于 DNA-RNA 中的 RNA 链

RNase I: 4种核糖核苷酸酶

产物: (3'-嘧啶核苷酸); 以 () 结尾的[寡核苷酸]

RNase T₁

产物: 3'-鸟苷酸; 以 3'-GMP 结尾的 []

RNase T₂

产物以 3'-AMP 结尾的 []

DNase:

核酸 S₁: 作用于单链 DNA

DNase I:

产物: 以 5'-磷酸为末端的寡核苷酸

DNA 限制性内切酶:

严格的识别特异性, 如 E_{co}RI - E_{co}

黏性末端
黏性末端

N-糖苷酶

核酸之酸碱碱性:

碱基的解离:

胞嘧啶: 1. 3位上的H $PK'_1 = 4.6$

2. 2位O变O⁻ $PK'_2 = 12.5$

尿嘧啶: 3位上的H, $U: PK'_1 = 9.5$
T: $PK'_1 = 9.9$

腺嘌呤: 1. 1位N上的H $PK'_1 = 4.15$

2. 9位N $PK'_2 = 9.8$

G: 1. 7位N上的H $PK'_1 = 3.2$

2. 1位N上的H $PK'_2 = 9.6$

3. 9位N上的H $PK'_3 = 12.4$

核苷的解离:

脱糖 可增强碱基的酸性解离

核糖 羟基可解离 ($PK'_1 > 12$)

核酸吸收紫外光: 波长 260nm

天然 DNA 吸收最弱

变性 DNA 吸收还行

$OD_{260} = 1.0 \Rightarrow 50 \mu g/ml$ 双链 DNA

$40 \mu g/ml$ 单链 DNA (RNA)

$20 \mu g/ml$ 寡核苷酸

DNA 纯品 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$

RNA $\sim \sim \sim = 2.0$

含蛋白质/苯酚

降低

$$\epsilon(P) = \frac{30.98A}{WL}$$

ϵ : mol 吸光系数

A : 吸收值

W : 每 L 溶液磷酸质量(g)

L : 比色杯内径

一般 DNA $\epsilon(P) \sim 6000$

RNA $\epsilon(P) 700 \sim 7800$

核酸的复变性/杂交。

变性: bp 氢键断裂 (改变)

变化: $A_{260} \uparrow$ 粘度 $\downarrow$ $T_m \uparrow$, 耗能
(土鲁巴效应)

办法: 加热 $\rightarrow T_m$ 值: $\frac{A_{260max}}{2}$ 时, T 值

$$T_m \propto (G+C)$$

$$T_m \text{ poly d(G-C)} > T_m \text{ DNA} > T_m \text{ poly d(A-T)}$$

$$\text{经验公式: } G-C(\%) = (T_m - 69.3) \times 2.44$$

复性: 碱基重新配对

办法: 缓慢冷却

印迹法

核酸的研究方法

64.2 27分29秒

提取 分离 定量测定

制备原则: 防变性及降解。

浓盐法: SDS-浓盐 (1mol/L NaCl) buffer 破碎细胞

离心取清液

加 0.14mol/L NaCl 溶液 使 DNA 沉淀

酚/氯仿去 protein. 纯化

→ RNA的分离

→ 注意: ① 所选器皿须高温烘烤/高压灭菌/1% DEPC 处理后煮沸处理

② 破碎细胞时加强变性剂 (胍盐)

③ 在RNA反应体系加入 RNase 抑制剂

分离总RNA 用 异硫氰酸胍/苯酚/氯仿

分离 poly(A) mRNA 用 寡聚 TMP 亲和层析法

紫外分光法

→ 测浓度: 定磷法: 加浓 H_2SO_4 / 过氯酸, 水解有机磷在酸性条件下 H_3PO_4 与 $H_2M.O_4$ 反应生成 $24M.O_3 \cdot P_2O_5 \cdot 3H_2O$ ($H_3PO_4 \cdot 12M.O_3$) 用还原剂还原之为钼蓝 $660nm$ 测含量。

定糖法: RNA 与 HCl 共热, 核糖 → 糠醛, 其与甲基苯二酚反应呈鲜绿 $670nm$ ($FeCl_3$ 作催化剂)
DNA, 酸性, 二苯胺共热, → 蓝色化合物 $595nm$

超速离心

CsCl 密度梯度沉降:

测 P 核酸

测 DNA 中 G-C

测 核酸组成

制备核酸

凝胶电泳:

琼脂糖

聚丙烯酰胺

测序:

酶法测序 Sanger 测序 加碱法终止法

化学测序 Maxam & Gilbert

终止法:

分为4份, 每份加入一定比例

的 2',3'-双脱氧核苷三磷酸

即 ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP 再加 ddAMP, ddCMP, ddTMP 其在 DNA 的合成中, 可能会取代 ddAMP 的位置。

一经取代, 合成停止。在数量大的前提下, 最终会产出长度不一的片段。可知, 片段末端一定是 ddNTP 4份样本经过电泳, 直接得出序列

DNA 聚合酶链反应 PCR $\times 10^6$ (1985, Mullis)

1. 模板DNA

2. 引物

3. ~~dNTP~~ ~~dNTP~~ ~~dNTP~~ dNTP

5. 缓冲液, Mg^{2+}

步骤:

① 变性: 解链 ($94^{\circ}C$, 30s)

② 退火: 退到 T_m 引物 ($-3^{\circ}C \sim 5^{\circ}C$) $^{\circ}C$, 30s.

③ 延伸: 中温, DNA聚合酶催化 $70 \sim 72^{\circ}C$

25~30
次循环

DNA的化学合成:

固相开磷酸三酯

DNA微阵列: gene chip 略

应用: ① 测定基因型, 突变

② DNA测序

③ 检测DNA表达谱

下册 代谢点论

Date

生物与环境进行物质与能量交换的过程
活细胞内所有化学变化的总和。

代谢过程是连续的，在过程中，连续转变的酶促反应产物称为中间产物，又：代谢物

物质代谢：物质的合成分解。
能量代谢：能量的转移存储、释放

分解代谢：有机物转变为更小的终产物。释放能量。
合成代谢：从物合成，小的前体 → 更大的分子。耗能，需要ATP，也有还原力(NADH)

自养：以 CO_2 为唯一C源。
异养：从其它环境获取C源。

$ATP \rightleftharpoons ADP + P_i$ 起捕获、释放能量的作用

① 提供生物合成所需能

② 机体活动及肌肉收缩所需能

③ 物质跨膜运输 ~

④ DNA, RNA, 蛋白质的合成中, ~, 保证基因 info 传递 true

此外，还以质子/电子形式提供能量 辅酶I (NAD) 辅酶II (NADP), FMN

NAD: 烟酰胺腺嘌呤核糖苷

NADP: ~ 磷酸

辅酶A: Co-A

$VB_3 - ADP$

研究方法:

① 酶抑制法

② 同位素示踪

③ 气体测量

④ 核磁共振波谱法

⑤ 遗传缺陷症来研究代谢

1/3

生物能学

体系: system. 指研究对象所涉物质全部总称

环境: surrounding: 除体系外的一切

open 能量+物质
closed 能量
isolated 无

能是多样的, 主要是热与功 system & surrounding 交互的形式

内能: $U(E)$

焓: (H) : $\Delta H = \Delta U + \Delta PV$

热力学第一定律, $\Delta U = Q - W$

热力学第二定律: 只能高温 $\rightarrow$ 低温

熵: (S)

熵变 $\Delta S = \Delta S_{\text{体系}} + \Delta S_{\text{环境}} \geq 0$

自由能 G : $\Delta G = W$

$\Delta G < 0$ 自发

$\Delta G = 0$ 平衡

$\Delta G > 0$ 不自发



ΔG° : 标准自由能变化: ^{25°C} room temperature, 1 大气压, $\frac{\text{反应物}}{\text{产物}} 1 \text{ mol/L}$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{\text{生成物}}{\text{反应物}}$$

$\Delta G'$: 生化中的自由能变化, $\text{pH}=7$

$$\Delta G' = -RT \ln K'$$

例: $G-1-P \rightleftharpoons G-6-P$ 在 38°C 平衡了。

$G-1-P$: 5%, $G-6-P$: 95%, 求 $\Delta G'$

未平衡时, 设 $[G-1-P]$ 为 0.01 mol/L ,

$[G-6-P]$ 为 0.001 mol/L , 求 $\Delta G'$

答: $\frac{[G-6-P]}{[G-1-P]} = K_{eq} = 19$

$$\Delta G' = -RT \ln K_{eq} = -7.6 \text{ kJ mol}^{-1}$$

第=10同上

高能化合物: 水解/基团转移时, 释放 21 kJ/mol 以上能量。

① 磷氧键: ATP $\Delta G' = -30.5 \text{ kJ mol}^{-1}$, 磷酸基团中载体

② 氮磷~: 磷酸肌酸

③ 硫酯~: 酰基 CoA

④ 甲硫~: S-腺苷甲硫氨酸

Date

Glycolysis

h3 ** 糖酵解作用 ** h3

葡萄糖在厌氧条件下降解 丙酮酸 伴随ATP生成过程

Embden-Meyerhof-Parnas, EMP途径

地点: 细胞质

过程: 10步 2阶段

准备阶段, 产能阶段

起始

G

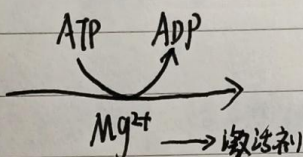
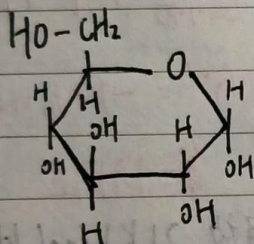
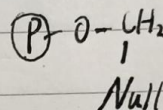
G-6-P

F-6-P

F-1,6-BP

① 葡萄糖的磷酸化

关键步骤



葡萄糖-6-磷酸

抑制

A 己糖激酶 (专一性不强) (别构酶) [G-6-P, ADP]

B 葡萄糖激酶 (D-G) (不受 G-6-P 抑制) [主要造糖原]

胰岛素

A 对 D-G, $K_m = 0.1 \text{ mmol/L}$
B 对 D-G, $K_m = 10 \text{ mmol/L}$

胞内 D-G 浓度 5 mmol/L

②

G-6-P

磷酸葡萄糖异构酶

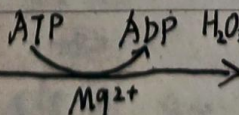
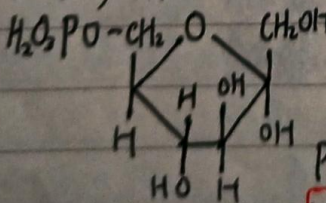
F-6-P

平衡, 竞争抑制剂: 6PG, E4P, S7P 等

果糖-6-磷酸 P1PP

关键步骤

③



果糖-1,6-二磷酸

PFK 磷酸果糖激酶

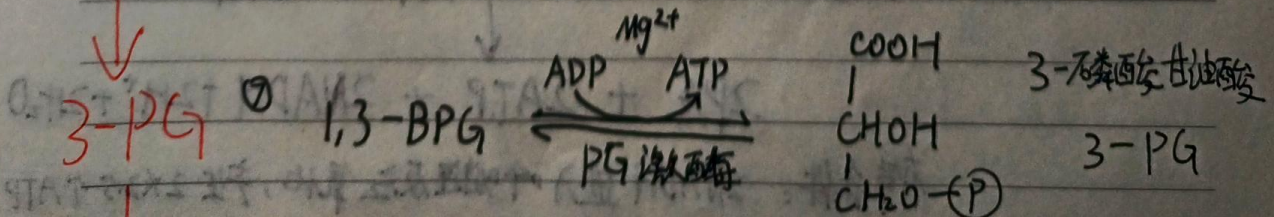
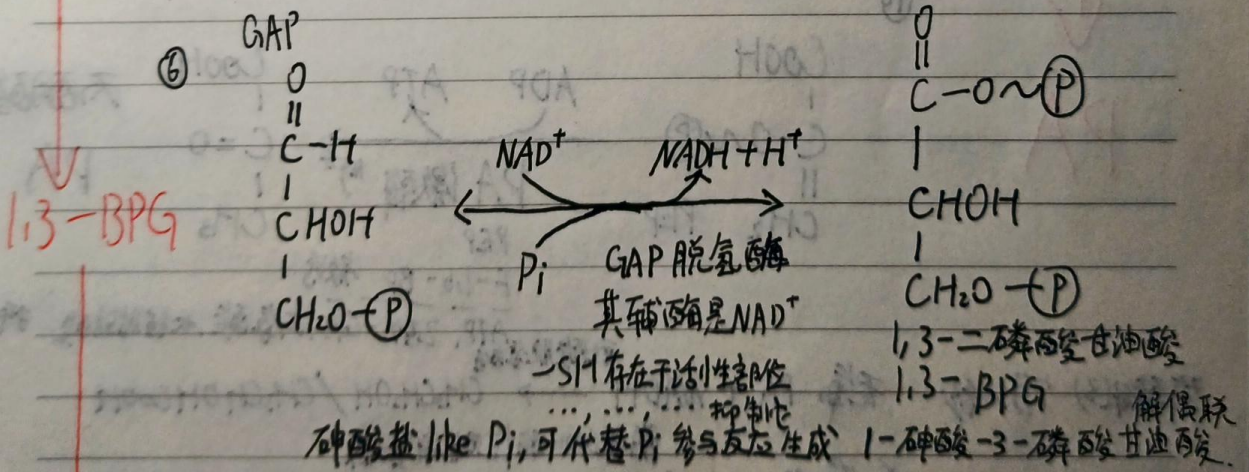
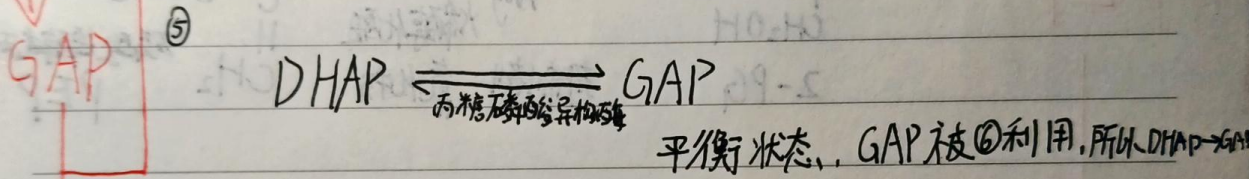
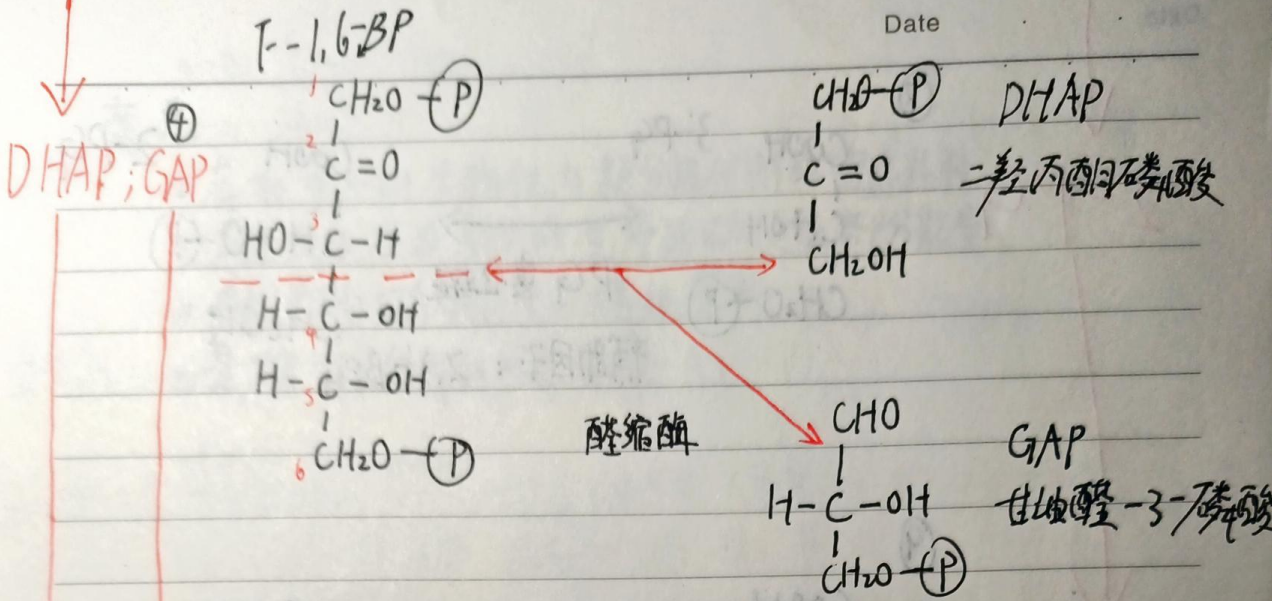
F-1,6-BP

此ATP是其别构抑制剂, 对糖酵解

AMP/无机磷酸消除抑制

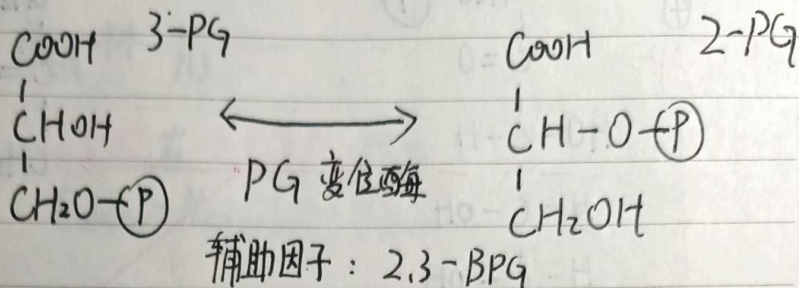
pH ↓, 抑制其

胰高血糖素 重要调控 F-1,6-BP 是激活剂 (15分00秒 8.1.3)



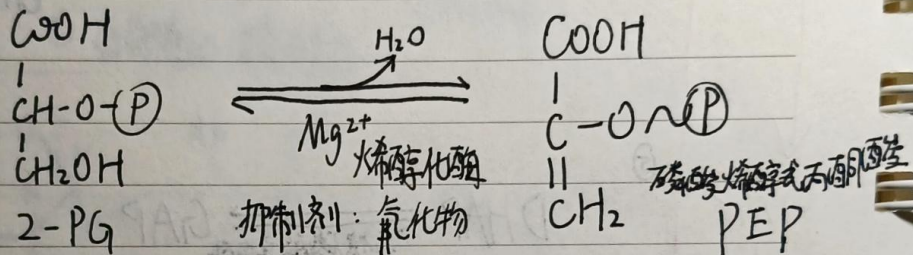
2-PG

⑧



PEP

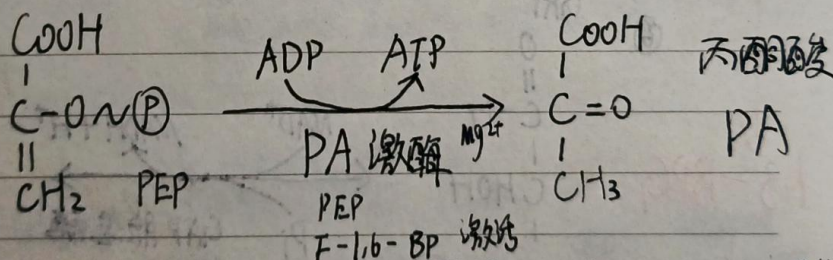
⑨



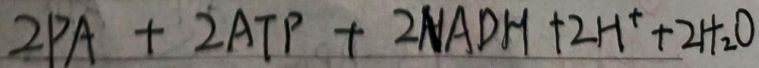
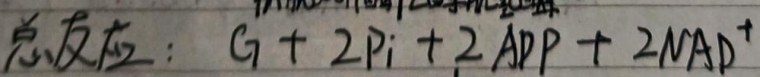
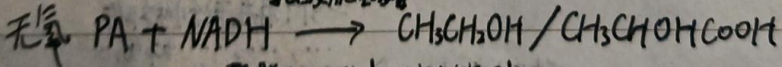
PA

⑩

关键步骤



糖酵解(3) 2分30秒



有氧条件: 2NADH 进入呼吸链反应氧化, 产生 2x2.5 个ATP

所以, 无氧: 1G 产出 2ATP

有氧: 1G 产出 7ATP

Date

意义:

- ① 存在于一切生物体内糖分解代谢的普遍途径
- ② 通过反应生成ATP为生命活动提供部分能量
- ③ 中间产物可为其它反应提供原料
- ④ 是糖有氧分解的预备阶段