

## 第十四章 生物化学

### ——生命物质组成成分与结构研究

#### 一、引言

在 19 世纪，生物化学研究经常受到人们的轻视。它被看作是粗糙不精的，因为生物化学家们很少去研究纯物质，并且实验常常是在缺乏适当控制下进行的。然而，这些批评者却往往站不住脚，并且批评者也常常不能理解那些研究者们遇到的问题；尽管如此，生物化学对于许多从事更精密研究的化学家们来说仍然是一个前途渺茫的领域。

自 1900 年以来，生物化学家们开始受到人们的极大注意。自然，他们所获得成功部分归因于早期的基础研究工作，而大部分则归因于人们对他们所持有的更严厉的批评态度和利用的那些更为先进的实验方法。生物化学只有依靠分析、有机、物理化学方面的先进技术才会成为一门精密科学。

生物化学的重要研究目标是蛋白质。动物机体中的蛋白质含量约为 45%。植物机体中含蛋白质要少些。19 世纪 60 年代前对蛋白质的研究，如同对动植物机体其它物质的研究一样，只是限于化学—分析时期的水平。研究蛋白质分子结构及蛋白质分子的合成工作，基本上在 20 世纪才得到发展。

除蛋白质外，生物化学还研究动植物机体中的其他各种各样物质，其中包括核酸、碳水化合物、类脂物、酶、维生素、激素，还有一些生理活性物质。它们对生物器官的各种功能首先是新陈代谢功能产生影响。

## 二、蛋白质和酶

类蛋白质，如蛋清、粘液质及动物胶，自古以来就被人们认识了。“蛋白”一词的来源是因为机体中含的这些物质在很多方面与禽蛋中的蛋白相似。1838年荷兰鹿特丹医学校的一位教师N·穆尔德(Gerardus Johannes Mulder, 1802—1880)，发表意见认为生物机体基本上由他称之为蛋白质(英文为protein, 来自希腊文的“proteus”, 原意为是占主要的)组成的。到1842年李比希写《动物化学》一书时，蛋白质已被视为生命系统中所发现的最重要的物质了。1865年，有机的结构化学兴起，提供了越来越多的证据，证明所有的各类分子不仅有一定的组成，而且还有一定的结构。到了19世纪70年代人们已经认识到，分子的几何构型影响到分子的化学性质。与此同时，有机化学家已经逐渐了解到，证明一种分子的实际结构最方便的途径是在实验室里直接合成这种分子。19世纪60年代至70年代，出现了一个新的化学领域，这就是合成有机化学。

蛋白质的研究受到有机化学本身的各种流派的深刻影响。1860年到1900年，人们就已经收集了大量有关蛋白质的物理、化学性质的资料。到20世纪初，已经知道了以下几点：蛋白质必定是相当大的分子；蛋白质在溶液中呈胶状；用热、物理性干扰(如振荡蛋清)，或用强酸、强碱处理蛋白质，蛋白质的物理、化学性质(如溶解度)必然要发生改变；蛋白质与大多数动物的氮和尿素代谢密切相关；蛋白质以繁多的、各式各样的化学类型存在着，不仅在不同的生物体里，而且在同一生物体内蛋白质种类也是很多的；蛋白质能被强酸、强碱分解，被某些盐类氧化，以及被诸如胰蛋白酶或胃蛋白酶这样的蛋白酶消化成较小的片段。

然而，某些其他的观察结果，使得任何一种打算建立蛋白质结构的学说都陷入了混乱之中。例如曾发现当蛋白质被强酸或某些酶降解时(降解的过程叫水解)，就会产生许多长短不一的片段。虽然被处理的蛋白质是相同的，但每次处理所得的这些片段却不尽相同。有机化学家也已知道，从蛋白质上分解下来的小的、一定的化学单位叫做氨基酸。然而这些氨基酸和大的蛋白质分子之间的关系一直还是个谜。

到了20世纪初，蛋白质化学的中心问题可以归纳为：蛋白质是不是具有一定化学结构的物质？或者说，它们是由较小的分子以各种不规则的方式聚集而成的吗？与这个问题有关的是另一个不大明确的问题，即蛋白质在生命系统中的化学作用是什么？两个重要的思想流派都对蛋白质的性质提出了“解释”。其一是特别受到威廉·奥斯特瓦尔德(Wilhelm Ostwald)和其他物理化学家所拥护的胶体学派。胶体学派坚持认为，蛋白质是由无一定比例的较小的组分聚集而成的大分子。由于蛋白质无固定的组成，奥斯特瓦尔德认为，研究蛋白质的化学结构是不可能的。由于这个原因及其他因素，胶体学派轻视了蛋白质结构的研究，而集中精力研究蛋白质溶液的物理、化学性质。

第二个学派认为，蛋白质像其他分子一样，是由原子按一定比例排列而组成的。特别是1900至1910年间，由于化学家爱米尔·费歇尔(Emil Fischer, 1852—1919)有关蛋白质的研究工作而使这个学派占了显著的地位。

费歇尔是一个富商的儿子，于1871年进入波恩大学学习化学，他的老师

是结构有机化学的鼻祖凯库勒 (Frederick August Kekule)。1874 年费歇尔在斯特拉斯堡大学获得了博士学位后，他就在埃尔兰根 (Erlangen) 和维尔茨堡 (Wurzburg) 大学任教，1892 年，他终于成了柏林大学的化学教授。鉴于他早期研究决定蛋白质和碳水化合物化学结构的成就，使他获得了 1902 年的诺贝尔化学奖。在此之前 (1899 年)，费歇尔已经开始详细地研究了蛋白质。作为一个结构化学家，费歇尔确信，蛋白质像其他分子一样，是有一定结构的，如果用正确的方法加以研究，就可以确定蛋白质的固定组成和几何结构。

费歇尔之所以对蛋白质感兴趣，主要是受了生理学的影响。正如他在 1906 年的一篇论文里所说的：

“由于蛋白质以一种或另一种方式参与了生命体内的所有化学过程，所以人们可以期待，通过阐明蛋白质的结构和变化将获得极有意义的生化资料。因此，化学家放弃对这些物质的研究就不足为怪了……而生理学家早已日益重视研究它们，并获得了明显的成就。毫无疑问，发源于蛋白质的有机化学，将最终转向对蛋白质的研究。当生物学与化学成功地合作时，依然存在的分歧意见将仅仅由于涉及不同的资料而引起。”

正是由于研究蛋白质时应用了结构化学，费歇尔才看到了未来生物学可能与化学合作。其后，他为此目标竟不懈地奋斗了十五年。费歇尔有资格称为生物化学之父，他在三个主要领域进行了极其广泛的工作：嘌呤、糖和肽，特别是后两项研究建立在有机化学的坚实基础上。

费歇尔开始从事蛋白质研究时，已知有十多种氨基酸是从蛋白质上水解下来的。费歇尔确信，氨基酸是组成蛋白质分子的原材料。他面临的基本问题是，要从对水解产物的分析中推断出完整的蛋白质结构。实际上，直到今天这还是蛋白质化学研究中的一项中心工作。进行这项工作的主要困难，是没有分离各种蛋白质水解产物的满意方法。1901 年，费歇尔引进了一项十分重要的技术。他发现通过酯化作用修饰后的分解产物 (即单个氨基酸)，可以在不改变氨基酸组成的情况下，用蒸馏法将各种氨基酸彼此分开。费歇尔采用这种方法，不仅证明某些氨基酸是蛋白质的降解产物，而且获得了比较纯的样品，他可以估算出蛋白质中各种氨基酸的数量。然后，费歇尔又把这种技术与一系列繁杂的、发展了的程序结合起来，由此，他能分解出单个氨基酸，这是一个两性物质，并把它们联结在一起成为小的单位，分别称为二肽、三肽和四肽等等。通过这些研究，费歇尔发展了肽键学说。肽键是一种化学键，各种氨基酸以肽键相连，形成各种各样的蛋白质。

到 1907 年，费歇尔已能用他的合成方法，合成含有 18 个氨基酸的肽链 (由三个亮氨酸和十五个甘氨酸组成)，由于这个肽链较长，所以叫做“多肽”。费歇尔及其他人在为此目标而进行工作时，发展了许多新的化学方法。费歇尔相信，人工合成的多肽有许多性质类似于天然多肽 (尽管天然多肽远远超过 18 个氨基酸)。正如他 1907 年所写的：“人们不可避免地会产生这样的想法：这 (指 18 个氨基酸单位) 是与蛋白质密切有关的产物吗？我相信，由于合成的继续进行……人们将最终搞清楚蛋白质的内部结构。”在这项研究中，费歇尔把两个迥然不同、但又互相补充的化学过程结合起来：将天然蛋白质分解为单个氨基酸，并对分离出来的氨基酸作定量分析；将各个氨基酸重新联结起来形成类似于蛋白质的多肽，这是引进生物学研究中的经典的有机化学方法。

在 20 世纪的最初 10 年，随着蛋白质学说的发展也产生了一些问题。其一，费歇尔的方法使他只能将某些氨基酸合成为多肽，他首次合成的 18 个氨基酸的多肽链只含有两种氨基酸（亮氨酸和甘氨酸），而大多数天然蛋白质是含有很多氨基酸的。其二，他的分离方法只能对天然蛋白质的氨基酸数目和种类作定量分析，而对这些氨基酸在整个肽链中的物理构型却全然不知。

由于发现任一特定的蛋白质总是产生数量大致相同的各种氨基酸，进而使人联想到，蛋白质具有一定的和重复的结构。有愈来愈多的有机化学家应用了费歇尔的方法。显然，胶体学派不得不放弃关于所有蛋白质均无一定结合顺序的断言。费歇尔坚信原子有实际结构这一点，为他研究蛋白质提供了一条比那些相信不可知论及烦琐的唯心论的化学家更确定、更迷人的途径。费歇尔的工作证明了生命过程可以还原成纯粹化学的相互作用。

费歇尔的蛋白质分子观，是 20 世纪头 10 年兴起的酶学说的一个重要组成部分。许多“酵素”被认为是蛋白质或是类似于蛋白质的物质。然而，没有任何迹象表明，蛋白质实际上是有一定组成的分子。用严格的化学方法去阐明酵素的催化作用总是比较困难的。那些曾拥护毕希纳酶学说的年轻、热情而激进的化学家，1897 年后发现费歇尔工作中有一个著名的已确证的观点，这就是所有的生化、生理反应都是由专一的酶所控制的。

然而，在此期间，费歇尔的多肽研究工作也遇到了非难。费歇尔自己几乎没有意识到他的多肽学说对酶学说的巨大含义。虽然他相信，蛋白质的一般特性符合多肽学说，但他不相信：所有、或大多数酶是蛋白质；作为蛋白质的酶具有专一性。例如，1907 年费歇尔（和其他人）主张，酶不是真正的专一性的蛋白质，而是很小的催化分子，它们粘附在一些蛋白质状的胶体物质上。事实上，当年费歇尔就被卷入到一场关于蔗糖酶（它催化某些糖降解）是不是蛋白质的争论之中。费歇尔认为，蔗糖酶的蛋白质成分并没有表现出专一性，并且可以用化学方法同酶的催化部分分开，因此，他认为蛋白质是一种被动的、与催化作用无关的载体。费歇尔虽然不是一个胶体学派的追随者，但在 20 世纪初，他还是不能完全摆脱胶体学派思想的束缚。20 世纪初的头几十年，在能否认识到催化作用是由像蛋白质那样的大分子来执行这一点上，还存在着很大的知识方面的障碍。对于大多数工作者来说，有机催化剂不过是像无机催化剂铂金那样的、很小的分子。

费歇尔的研究有几个方面被承袭下来了。他所使用的精确的定量方法，为有机化学、特别是为蛋白质化学建立了一套新的标准。20 世纪初，这些方法对于与蛋白质研究紧密相关的各个生化领域都产生了相当大的影响。费歇尔的方法，尤其是人工合成多肽的方法，亦为探讨蛋白质分子的精确结构和确切组成（即分析和合成）开辟了一条新的途径。当时，还没有一定的方法能证实费歇尔的研究。比如，他提出自然界中的蛋白质是以肽键相连而形成，如同实验室中合成的含有 18 个氨基酸的肽一样，这样的观点就无法被证实。1907 年后的 20 年，人们才有可能认为蛋白质分子是有一定结构的，自然状态下的蛋白质和费歇尔在实验室里合成的蛋白质很不相同。1910 年至 1935 年，来自几方面的研究成果，使人们逐渐接受了蛋白质是具有一定的原子组成和专一结构的大分子这样的观点。

其中一方面的研究工作主要是围绕蛋白质的物理性质——大小及形状——而进行的。费歇尔和他同时代的学者曾提出，分子量超过 5000 的蛋白质是不存在的。然而，1917 年，丹麦化学家索伦·索伦森（Soren Sorensen, 1868

—1939)对蛋白质溶液进行了一系列的渗透压研究,索伦森根据研究结果断言,某些蛋白质(如蛋清蛋白)的分子量大于34,000(今天测得的值大约是45,000)。1925年,瑞典物理化学家西奥多尔·斯维德伯格(Theodor Svedberg, 1884—1971),介绍了一种全新的技术,革新了确定生物大分子分子量的方法。他发展了一种称为超速离心机的仪器,当含有各种分子的溶液在里面以很高的速度旋转时,在一定的转速下,分子密度越大,沉淀的速度越快。通过对分子的大小和密度作出几种假定,斯维德伯格能够精确地计算出蛋白质分子的重量。他证明了,像血红蛋白这样的蛋白质,它的分子量大约在66,000以上。今天,超速离心法仍被用作精确测定分子量的方法。由此证明蛋白质是很大的分子,比20世纪初人们所设想的要大得多。由于发现相同的蛋白质有同样的分子量,斯维德伯格进一步证明,蛋白质具有一定的大小和组成。

到20世纪20年代中期,胶体学派逐渐销声匿迹了。不过那些试图更精确地证明蛋白质分子有一定组成的人,仍然面临着许多棘手的问题。一是很难得到纯的蛋白质,即保证用于分析的样品只应含有一种蛋白质分子。另一个问题是充分地分离大蛋白质的降解产物(氨基酸的分离)有困难。第三个问题是还不能在实验室里合成含有所有氨基酸的多肽。1920年至1950年,由于一系列研究的进展,才解决了其中的一些问题。

进展之一是结晶蛋白质技术的完善。詹姆斯·B·萨姆纳(James B. Sumner, 1887—1955)首先成功地作出了结晶体。1926年,他制出了脲酶(尿酶能把尿素转化为二氧化碳和氨)的结晶。1935年,美国化学家诺思洛普(J. H. Northrup, 1891—1987)成功地得到另一种蛋白质——普通的胃蛋白酶(一种消化蛋白质的酶)的结晶。这就意味着可以得到蛋白质的纯品。这足以使化学家们最终信服萨姆纳是正确的,而维尔施泰特(Richard Willstätter)所作酶是非蛋白质的断言则是错误的。

另一个进展是德国化学家马克斯·伯格曼(Max Bergman, 1886 - 1944)和利奥尼达斯·泽尔瓦斯(Leonidas Zervas, 1902—)进一步完善了多肽的合成法。1932年,他们发展了用各种氨基酸随意合成人工多肽的技术。他们工作的价值在于,通过使用这些技术,能够合成大小及形态更接近于天然蛋白质的多肽。在化学上合成某一物质的能力往往是一种有力的工具,如果有可能用实验技术合成一定的分子,那么就为分子的原子排列学说提供了强有力的证据。

第三方面的进展是层析(chromatography)技术的完备。此项技术是俄国化学家米契尔·塞门诺维奇·茨维特(Michael Semenovich Tswett, 1872—1919)于1906年发明的。层析法是利用混合物溶液流经某种固体表面时各成分吸附在固体表面能力的不同、从而将混合物分开的一种技术。例如,让一种具有不同染料的溶液,流过一长条有吸附能力的滤纸或注入装有树脂或淀粉的吸附柱时,由于每种染料的分子彼此不同,它们在溶液中的滞留性也各异,(当它们流过滤纸或通过吸附柱时)被吸附在固体物质上的情形也不同。因此,经过一段时间之后,染料中的所有同种分子将被吸附在滤纸或柱的同一位置上,(在这种情况下)就形成了一套不同颜色的染料带。20世纪40年代初,两位英国蛋白质化学家阿切尔·J·P·马丁(Archer J. P. Martin, 1910—)和理查德·L·M·辛格(Richard L. M. Synge, 1914—)看到了这种技术对分离蛋白质各种水解产物的价值,他们将层析法应用于由天然蛋

白质水解产生的各种单一氨基酸、二肽、三肽等的均质混合物上。运用这种方法得到了惊人地精确和简明的结果。层析技术的主要优点在于，运用这种技术可以分离出任一蛋白质所含有的各种氨基酸，并有可能定量地分析这些氨基酸。

由于这些技术不断地得到改进，英国的一群化学家在弗雷德里克·桑格（Frederick Sanger, 1918—）的领导下，于 40 年代中期搞清了一种蛋白质的完全而详细的氨基酸顺序。他们选择了胰岛素这种激素作为研究对象，一方面因为它普遍存在（所有哺乳动物都产生），另一方面也因为比其他蛋白质小。桑格和他的小组用各种方法水解胰岛素，每种方法都得到了不同的水解产物。例如，用消化蛋白质的酶——胃蛋白酶（pepsin），总是得到末端为某种氨基酸的片段；用胰蛋白酶（trypsin）（另一种消化蛋白质的酶），通常得到末端为另一种氨基酸的片段。反之，若用强酸处理，则各种末端氨基酸的片段是随机的。由此他们设想 酸水解肽键是随机的；消化蛋白质的酶是专一性的，只断裂某些氨基酸之间的肽键。桑格研究出了测定胰岛素中多肽链的氨基酸顺序的巧妙方法。关键的步骤是 N 端的标记和肽的酶解，他用二硝基氟苯标记 N 端。桑格和他的同事们一旦分离出各种片段，他们就能确定每个片段的化学特性（鉴定每个片段所含的氨基酸种类），并确定它们的数量。用这种方法，他们鉴定了数百个片段并确定了每种片段出现的频率。最后，桑格不仅搞清了胰岛素中氨基酸的数目和种类，而且还揭示了它们彼此连接的特定顺序。40 年代中期，桑格和他的小组已经描绘出一种胰岛素——牛胰岛素的氨基酸排列顺序图。这个胰岛素分子总共由 51 个氨基酸组成，排成两条多肽链（标为 a 链和 b 链），两条肽链之间由二硫键相连。桑格的工作第一次证明了蛋白质是氨基酸通过肽键连结在一起的聚合物。

经过多年的研究，桑格终于在 1954 年确定了胰岛素的全部结构式。这一重要发现不仅提供了有计划合成胰岛素的可能性，而且也指出了揭示其他蛋白质分子结构，进而合成其他蛋白质分子的途径。差不多与此同时，P·艾曼在 1949 年提出了类似的研究蛋白质结构的方法，将氨基酸残基逐步降解。他用苯巯基与蛋白质作用，与游离氨基生成硫脲的衍生物。然后在硝基甲烷中将这种衍生物与盐酸作用，这样，末端的氨基酸就会分解出去。稍后一些时候，人们又提出了确定蛋白质多肽链中氨基酸顺序的其他方法。其中比较有希望的是 M·M·谢米亚金（1908—1970）和 M·H·科洛索夫、H·C·乌尔夫松一起提出的一种方法。这种方法采用质谱法（1968 年）。

早在 50 年代，科学家们就试图合成胰岛素分子的各个片段，这种新奇方法是先把多肽链逐步接到载体上。把二硫键遵照严格规定的位置引入分子中遇到一些困难。美国化学家 V·杜维尼奥（Vincent du Vigneand, 1901—1974）用合成垂体后叶催产素的方法规定了将二硫键引入分子中的途径（1953 年）。

1958 年底，中国科学院生物化学研究所首先进行了天然胰岛素的拆合工作，即将胰岛素中三个硫硫键拆开，再通过硫硫键的接合；使重新成为与天然胰岛素活力相同的分子。天然胰岛素拆合成功，把人工合成胰岛素的工作简化到先行分别合成二十一肽和三十肽。

1964 年世界上共有三组科学家经过相当紧张的工作，各自独立地用人工方法合成了胰岛素。特别要提到我国化学家汪猷、邢其毅、邹承鲁、钮经义

1965年夏在世界上首次用化学方法全合成具有生物活力的牛胰岛素。这一工作需要按严格顺序实现约220个反应，可见它是多么困难！瑞典乌普萨拉大学生物化学研究所所长、诺贝尔奖获得者蒂萨利乌斯（Tiselius）说：“核能力说明了中国的进展，但更有说服力的是胰岛素。因为，人们可以在书本中学习制造原子弹，但不能在书本中学习制造胰岛素。”

早在50年代确定胰岛素结构和部分合成胰岛素获得成功，使得科学家们对研究其他蛋白质结构发生了很大的兴趣。其中核糖核酸酶引起了化学家们的注意，它与胰岛素不同，只含有一个链状结构。美国科学家海尔斯（Hires）、斯坦（Stein）与S·穆尔（S.Moor）三人根据桑格和其他科学家的实验于1960年测定了核糖核酸酶的全部结构式。他们采用了一种叫做“氨基酸自动分析器”十分有效的新方法。这是斯坦、穆尔和D·斯佩克曼（C.Speckmann）三位科学家不久以前研制成功的。

以后在60—70年代人们发现了其他蛋白质的结构式。在研究工作中应用鉴定氨基酸的最新方法和采用自动装置大大地减轻了并加速了操作过程。确定蛋白质结构以至合成蛋白质这样的事实，决不是表明人工合成“活”物质的问题差不多已经得到解决。然而，正如一位积极研究生物化学的科学家J·肯德鲁（Kendrew, 1917—）所说的：“生物化学这门科学现在发展得既深入又全面，毫无疑问，我们不久将在理解生物学中心问题之一，即构成活细胞分子的结构和它的生物学功能之间的相互关系方面取得进展。”

然而，桑格的工作只是确定了胰岛素的氨基酸顺序，而对于a链和b链的三维结构却没有提供任何线索：它们是长的、类似于梯子那样的，还是自行缠绕、折叠而呈球状的？30年代到40年代由于两方面的研究而发展了蛋白质三维空间结构的观点。其一是林纳斯·鲍林（Linus Pauling, 1901—1994）有关蛋白质缠绕的理论工作。其二是马克斯·佩鲁茨（Max Perutz, 1914—）和约翰·C·肯德鲁（John C. Kendrew, 1917—）对某种蛋白质晶体的X射线衍射资料进行的试验和理论分析。

20世纪30年代中期，美国化学家林纳斯·鲍林根据他的通用化学键学说，发展了一个关于蛋白质结构的新观点。鲍林具有理论化学家的敏锐洞察力，他证明了像蛋白质这样的巨大分子之间起作用的化学键有多种类型。特别值得一提的是他创立了“弱相互作用”这种概念。认为原子和原子群之间的引力比所谓共价键（肽键就是共价键）的引力要弱（因此容易断裂）。溶液的温度或酸度等因素的略微增高，不足以使肽键破裂，但已证明它们对蛋白质的某些物理、化学性质已有严重的影响。然而，只要变化不大，当回复到正常状态后，蛋白质的性质又可恢复正常。鲍林和他的同事A·E·米尔斯基（A.E. Mirsky, 1900—）在30年代中期就提出，蛋白质的氨基酸链不是一条简单的线形分子长链，而是以种种不同的方式自行折叠的。他们认为，这种折迭是精确地依靠氨基酸两侧的弱化学键来维持的，其中有一类称为氢键的弱的相互作用尤为重要。氨基酸链中最主要的一种几何构型—— $\alpha$ -螺旋就是由氢键维持的。 $\alpha$ -螺旋是一种最常见的盘绕，形状颇似弹簧，造成 $\alpha$ -螺旋折叠的关键是氢键。鲍林和米尔斯基的模型与通过加热和提高酸度使蛋白质变性和复性的化学研究资料非常相符，而且也符合于后来使用X射线衍射研究晶体蛋白质的数据。 $\alpha$ -螺旋的概念有两重意义：它为蛋白质有精确的三维结构提供了第一个清晰的证据；它为蛋白质化学家提供了一种愈来愈有用的确定分子结构的方法——建立化学模型。由于鲍林的研究，到40年代初，

已经确认了蛋白质具有三维结构；这种三维结构在决定蛋白质的功能上，与氨基酸的特定排列顺序一样重要。显然，每种蛋白质都有一定的分子构型；这时，胶体学派的观点对化学家和生物化学家已经没有什么影响了。蛋白质化学领域的进一步发展，主要是对 X 射线的晶体图象作分析，这个问题将在分子生物学一章进行讨论。