

上海生化学会

一九八三年年会论文摘要汇编

一九八四年三月

目 录

一、蛋白质

1. 慈菇双头蛋白酶的抑制剂 B 的氨基酸顺序测定……………戚正武等 (1)
2. 天花粉多肽类双头胰蛋白酶抑制剂……………张国娣等 (2)
3. 黑斑蛙皮肤中一个新的四肽的分离及其结构特征……………华家桎等 (2)
4. 黑斑蛙皮肤中一个新肽的分离及其 N-端顺序分析……………华家桎等 (3)
5. 从蝾蛇科毒蛇毒首次分离的突触后毒素……………张景康 徐 科 (4)
6. 从猪肝纯化 β -N-乙酰氨基已糖苷酶……………孙 册等 (5)
7. 神经元特异烯醇化酶 (NSE) 的分离纯化、抗血清制备及免疫
细胞化学的研究……………谭复隆等 (5)
8. 马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 I 的部分氨基酸顺序……………吉永华 徐 科 (6)
9. 鲤鱼促黄体素释放激素 (LRH) 的纯化及其结构测定的初步结果
……………王育西等 (7)
10. 舒缓激肽增强肽衍生物结构与功能的研究……………王守真等 (8)
11. 纯化 RNase 的抑制因子及其抗体的制备……………王道苑等 (9)
12. 浙江蝾蛇毒碱性磷酸酯酶 A 的溶液构象……………武祥福等 (9)
13. 甲状腺微粒体抗原的分离纯化及其抗体的免疫放射检测法……………戴嵩善等 (10)
14. 血红蛋白 Andrew—Minneapolis 结构和功能研究……………曾溢滔等 (11)
15. 哺乳动物糖苷水解酶的研究 I, 猪糖苷水解酶的组织分布……………朱运松等 (12)
16. 人淋巴细胞中腺苷脱氨酶的活性……………章有章等 (13)
17. 正常小鼠肝脏和 HepA 腹水型肝癌中芳香酰胺酶的比较研究
……………查锡良 陈惠黎 (14)
18. 丙酮酸激酶同工酶的放射免疫测定……………邵明川等 (15)
19. 免疫不育的诊断及治疗……………孙 册等 (15)
20. 螯虾腹屈肌粗肌丝的收缩蛋白质……………陈 明等 (16)
21. 家兔子宫液中的一种孕酮结合蛋白……………史丽烈 刘虹 (17)
22. 麦稻等禾本科作物种子蛋白质等电聚焦电泳的分析……………孙崇荣等 (17)
23. 长江、珠江水系鲢、草鱼鱼种的肌肉蛋白和乳酸脱氢酶同工酶
电泳的比较研究……………李思发等 (18)
24. 辐射对淋巴细胞蛋白质合成的影响……………刘克良 (19)

二、核酸

1. 在质粒上直接进行 DNA 顺序分析……………郭礼和 (20)
2. 2'-5' 和 5'-5' 的相连的核苷酸的圆二色性……………陆德长等 (21)
3. Tn233(CH) 中转座功能基因的研究……………王宗阳 洪孟民 (22)
4. 蚕豆叶系体 rRNA 基因的物理地图……………孙崇荣 (22)

5. 蚕豆RUBP羧化酶——加氧酶大亚基(LSU)基因的部分顺序分析
.....孙崇荣(23)
6. 简便快速制备寡聚核苷酸的新方法.....王启松 商金宝(24)
7. 快速简便分离tRNA的方法.....王启松 商金宝(24)
8. 采用Southern印踪法分析肝癌细胞核转录RNA的异常.....徐亚男等(25)
9. 分析比较大鼠正常肝和肝癌转录活性染色质DNA.....彭素芬 张玉砚(26)
10. ^{60}Co γ 线对不同类型淋巴细胞内两种核酸合成的抑制效应.....刘克良等(27)
11. 原始生命体可能存在过仅由两种核苷酸构成的简单遗传信息系统
.....詹克明(27)

三、糖、生物膜、受体及生物小分子

1. 肝癌细胞与正常肝细胞中神经节苷脂的比较.....郭能华 顾天爵(30)
2. 正常小鼠肝脏和HepA腹水型肝癌芳香酰胺酶分子中唾液酸对性质的影响
.....查锡良 陈惠黎(31)
3. 强效镇痛剂(^3H)P—7548与小鼠脑阿片受体结合的某些特征
.....周德和(32)
4. 黑斑双鳍电鳐(*Narcine maculata*)电器官Ach受体的分离、纯化
及其某些特性的研究.....陈丽筠等(32)
5. α -银环蛇毒素与辣根过氧化物酶的结合物对肌肉神经接头处
乙酰胆碱受体的电镜定位方法.....陈 志等(33)
6. 乳腺癌和淋巴瘤的运铁蛋白受体.....任顺林等(34)
7. 运铁蛋白及其抗血清的制备和癌细胞株运铁蛋白受体的检测
.....周惠人 顾天爵(35)
8. 绵羊精细胞凝集素受体.....郭晓惠(35)
9. 肝素琼脂糖对于雌微素受体的提纯效果.....季钟煜 倪 端(36)
10. 金环蛇毒素与乙酰胆碱受体结合的特点.....徐 科等(37)
11. 磷酸吡哆醛对孕激素受体的作用.....杨常仁 袁云萍(38)
12. 小牛胸腺小分子提取物在体外对小鼠胸腺细胞花生凝集素受体的影响
.....邵幼吾等(39)
13. 兔子宫内膜雌激素受体的凝胶过滤行为.....程伊洪等(40)
14. 兔子宫内膜核小体组分的超离心分析及雌激素受体的结合作用
.....徐琦玲 程伊洪(41)
15. 未成年小鼠子宫胞浆受体的补充(Replenishment).....史丽烈 刘虹(41)
16. 人红细胞质膜不存在5'-核苷酸酶活性.....孔良曼等(42)
17. Na泵和铈的转运研究.....蒋 斌 孙祺薰(42)
18. 青蒿素脂钠对 ^3H -UR掺入小鼠脾细胞的影响.....宋千里等(44)

四、研究方法及其他

1. 水牛脑神经节苷脂的分离纯化及其层析图谱.....夏霞娟等(46)
2. 抗新浦东鸡红血球单克隆抗体的杂交瘤细胞株的建立.....熊立民等(47)
3. 人红细胞膜血型糖蛋白A的分离纯化.....魏尧梅等(48)

4. 应用聚丙烯酰胺凝胶电泳检定DNases.....陈石根等 (48)
5. 蛋白质的硝酸纤维纸转移电泳.....朱运松等 (49)
6. 用于等电聚焦的载体两性电解质的合成.....戎积圻等 (49)
7. 一种新的放射性碘化试剂.....薛嘉渔 (50)

五、医学生化

1. 脂蛋白的研究概况 (综述摘要).....庄汉忠 (51)
2. 糖类及人类血型糖蛋白A对恶性疟原虫裂殖子入侵红细胞的影响
.....李建新等 (52)
3. 人类珠蛋白基因分析及其在HbBart's水肿胎儿综合症产前诊断的应用
.....黄淑贞等 (54)
4. 地中海贫血的诊断——珠蛋白链体外生物合成.....仇效坤等 (55)
5. 化学荧光分光光度法测定血清总胆汁酸.....魏尧梅等 (56)
6. 肺结核病人T、B淋巴细胞的合成代谢.....苏燎原等 (56)
7. 血浆粘度的分子生物学基础及其回归方程的研究.....施永德等 (57)
8. 实验性家兔粥样硬化动脉壁三种氧化还原酶活性的动态变化
及运动的影响.....邓景惕 (58)
9. 限制运动对实验性高胆固醇血症家兔血清脂蛋白浓度的影响.....崔 行 (59)
10. 上海地区健康青年血清铁的正常值.....孔祥瑞 丁 霆 (60)
11. 血清铁的昼夜周期性变化.....孔祥瑞 丁 霆 (60)
12. 血清铁的临床生化意义.....孔祥瑞 陈家伦 (61)
13. 严重骨折前后头发内微量元素 (铜、锌、锰) 的变化——
用静电加速器产生的质子X荧光法 (PIXE) 分析.....王智典等 (62)
14. 血清铜的临床生化意义.....孔祥瑞 李立群 (63)
15. 某些皮肤疾病时血清铜和锌的AAS测定及其临床生化意义.....孔祥瑞 (63)
16. 上海地区青年血清铜的正常值.....孔祥瑞 (64)
17. 血清铁/铜比值及其临床意义.....孔祥瑞 (65)

一、蛋白质

慈菇双头蛋白酶抑制剂B的氨基酸顺序测定

戚正武 朱德煦* 林南琴 徐烈贤* 谭复隆 王丽秀

(中科院上海生物化学研究所 *南京大学生物系)

慈菇中蛋白酶抑制剂含量极高,从50公斤新鲜慈菇可制取20克以上结晶抑制剂,此结晶抑制剂在DEAE——纤维素层析上又可分成A、B两组份。两者性质极其相似;仅在氨基酸组成上略有差异,各含140个左右氨基酸残基,其中包括两对二硫键及两个甲硫氨酸残基,都是双头抑制剂,能抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶及舒缓激肽释放酶,今对纯化后的B组份进行氨基酸顺序测定,结果如下。

Amino Acid Sequence of Arrowhead Inhibitor B

10
Asp. Pro. Val. Val. Asp. Ser. Asp. Gly. Asp. Ala Val. Gln. Leu. Asn. Leu. Gly.
20 30
Gly. Arg. Tyr. Pro. Leu. Tyr. Thr. Ile. Glu. Ser. Ala. Ala. Ile. Gly. Phe. His.
40
Gly. Gly. Leu. Ser. Ala. Leu. His. Lys. Asp. Val. Cys. *Lys. Ser. Tyr. Val. Tyr.
50 60
Glu. Ala. Pro. Glu. Thr. Asp. Arg. Gly. Leu. Pro. Val. Ser. Phe Ser. Thr. (Ala.
70 80
Glx. Ser. Ala) Met. Asp. Val. Pro. Gly. Leu. Gly. Asp. Phe. Ala. Glu. Lys. Val.
90
Gly. Ser. Gly. Glu. Val. Asp. Phe. Gly. Thr. Phe. Arg. Gly. Arg*. Gly. Lys. Phe.
100 110
Ile. Ala. Phe. Glu. Tyr. Ala. Pro. Thr. Ser. Val. Cys. (^{Leu}_{Ile}). Ser. Cys. Ala. Gln.
120
Tyr. (^{Leu}_{Ile}). Cys. Pro. Trp. (^{Leu}_{Ile}). Thr. Asn. Thr. Ser. (^{Leu}_{Ile}). Lys. Gln. Asp. (Ser.
130 140
Glx. His). Met. Glu. Leu. Gly. Ser. Arg. Tyr. Lys. Phe. Ser. Phe. Leu.

*Assumed reactive sites.

用化学修饰试剂甲基顺丁烯二酸酐及苯乙二酮分别修饰 Lys及Arg 残基。证实慈菇抑制剂中的两个活性中心分别为 Lys及 Arg。从已测定的一级结构看,参考其它抑制活性中心附近

44 45 91 92

的氨基酸顺序,此两活性中心位置很可能位于 Lys.Ser 及 Arg.Gly。此外慈菇抑制剂与其它各种不同族的抑制剂相比在一级结构上无明显的共同之处,因而它应属于新的一族抑制剂。

天花粉多肽类双头胰蛋白酶抑制剂

张国娣 谭复隆 慕县凤 林南琴 戚正武

(中科院上海生物化学研究所)

蛋白酶及其抑制剂在一些重要生理体系、如凝血、纤溶、补体、激肽等体系中起着生物调控作用,一些病理状态如炎症,弥散性出血(DIC)、过敏或低血压休克等往往与蛋白酶——抑制剂的调控失去平衡有关,临床上曾用蛋白酶抑制剂(胰脏 Kunitz 抑制剂、商品名为 Trasylol)加以治疗,具有明显疗效,因而寻找无过敏反应的小分子蛋白酶抑制剂具有重要的理论与实践意义。我国传统的中草药是一丰富的药物宝库,来源丰富价格低廉。今以天花粉中通过亲和层析、离子交换层析分离纯化了一种多肽类双头抑制剂。用 DABITC 双偶合法测定了其全部一级结构:

10

Leu. Leu. Met. Pro. Val. Lys. Pro. Asn. Asp. Asp. Leu. Val. Ile. Gly. Cys. Trp.

20

30

Cys. Ile. Ser. Arg. Gly. Tyr. Leu. Cys. Gly. Cys. Met. Pro. Cys. Lys. Leu. Asn.

Asp. Asp. Ser. Leu. Cys. Gly. Arg

由一级结构计算其分子量为4,800左右,但以其与胰蛋白酶等当量抑制时的重量比计算,其分子量仅为2,400。显然此抑制剂与绿豆抑制剂一样也含有二个活性中心,从结构上推测此两活性中心的位置可能分别位于^{20 21}Arg.Gly和^{30 31}Lys.Leu,这是至今已知多头胰蛋白酶抑制剂中分子量最小的,已属于多肽的范畴,此外它与其它各种不同族的胰蛋白酶抑制剂相比在一级结构上也无明显的类似之处。应属于新的一族抑制剂。

黑斑蛙皮肤中一个新的四肽的分离及其结构特征

华家桢 唐易全 田盛海 汪淑华

陈润莲 吴时祥 张慧芝 邹 冈

(中国科学院上海药物研究所)

两栖动物皮肤活性肽的研究是寻找新的神经肽,并进而寻找新的药物肽的重要途径之一。

上海地区黑斑蛙(*Rana nigro maculata*)皮肤的甲醇提取物经碱性氧化铝层析,所得50%乙醇-水洗脱液冻干后,用反相高效液相色谱(HPLC)分离[μ Bondapak C18, 乙腈-三氟醋酸(0.05%), 梯度洗脱, UV 235nm检测]。其中9~10组峰进一步用HPLC分离得纯品“9-10-10”(550克鲜皮得135微克肽)。此肽的氨基酸组成分析为Gly(1), Glu(1), Phe(1), Arg(1)。用DABITC/PITC双偶合手工微量顺序法分析表明肽的N-端封闭。遂用 Glutamate Aminopeptidase 酶解此肽(10微克肽为原料, 40℃酶解5分钟, 100%转化。室温下40分钟, 90%转化)。酶解过程用HPLC监测并分离酶解产物, 此产物的氨基酸组成为Gly(1), Phe(1), Arg(1)。再用上述双偶合顺序分析得其氨基酸顺序为 Arg、Phe、Gly。作顺序用的肽是3微克。由上可定此肽结构为: <Glu、Arg、Phe、Gly。

此四肽已人工合成, 生物活性正在研究当中。

比较已知两栖动物的30—40种皮肤肽及其它活性肽后知“9-10-10”为一新肽。此肽与 Bombesin 的N-端, P物质的中部有相似之处:

Bombesin	<Glu. Gln. Arg. Leu. Gly. Asn. Gln. Trp. Ala. Val. Gly. His. Leu. Met. NH ₂
Sub. p	Gln. Phe. Phe. Gly. Leu. Met. NH ₂
“9-10-10”	<Glu. Arg. Phe. Gly

此肽是天然存在的, 还是分离过程中从大肽上裂解的片段, 待今后的实验来证明。

黑斑蛙皮肤中一个新肽的分离及其 N-端 顺序分析

华家桢 唐易全 田盛海 陈润莲
张慧芝 吴时祥 邹 冈

(中国科学院上海药物研究所)

两栖动物皮肤活性肽与哺乳动物的脑肽和肠肽之间存在某种对应关系。为了研究新的神经肽, 我们开始了对蛙皮活性肽的研究。

作者前已报导上海地区黑斑蛙皮中缓激肽及其二个类似物的分离与鉴定。本文介绍上述蛙皮中又一个新肽的工作。

黑斑蛙(*Rana nigro maculata*)皮肤的甲醇提取物经碱性氧化铝层析, 所得50%乙醇—水洗脱液冻干后, 用反相高效液相色谱分离。其中第15组峰再用HPLC纯化得到“15-5-2”峰。(550克鲜皮得纯品100微克)。此峰的氨基酸组成分析结果为Ser(2), Gly(1), Pro(1), Val(2), Ile(2), Leu(2)。按DABITC/PITC双偶合法手工微量顺序分析结果为 Val•Ile•Pro•Ile•Val•Ser•Gly•(Ser•Leu•Leu)。DABTH-Leu/-Ile 两个衍生物, 用展开剂(10% 甲酸:

乙醇 = 10:9) 作单相展开能清晰分辨。供顺序分析用的肽为 4 毫微克分子。

此肽的生物活性正在研究中。

比较已知两栖动物的 30—40 种皮肤肽及其它活性肽结构后知“15-5-2”为一新肽。

从蝰蛇科毒蛇毒首次分离的突触后毒素

张景康 徐 科

(中国科学院 上海生理研究所)

能致人死命的毒蛇分属 3 科：眼镜蛇科、海蛇科和蝰蛇科。后者又分为蝰亚科和蝮亚科。毒蛇的毒液含两类毒蛋白：血循毒素与神经毒素。按作用部位，后者又分为突触前毒素与突触后毒素。迄今从蛇毒分离的突触后毒素虽近百种，但它们均系来自眼镜蛇科与海蛇科。我们从江浙产蝮蛇 (*Agkistrodon halys* Pallas) 蛇毒首次分离一种突触后毒素，建议命名为蝮蛇突触后毒素 (Post-Agkistrodotoxin, 简称 Post-ATX)。

用 SDS-PAA 电泳测得 Post-ATX 的分子量为 7900，亚基数为 1，等电点为 7.9，无磷酸酶活性。氨基酸组成见表 1。分子内含 5 对半胱氨酸。小鼠 LD_{50} (iP) 为 275mg/kg。在小鸡

表1 突触后神经毒素氨基酸组成的比较

氨基酸名称	蝮蛇毒素	α -银环蛇毒素	眼镜蛇毒素A (N. Naja)
Asp	11	4	9
Thr	4	7	9
Ser	6	6	3
Glu	7	5	1
Pro	—	8	6
Gly	5	4	5
Ala	3	5	2
$\frac{1}{2}$ Cys	10	10	10
Val	3	5	4
Met	—	1	—
Ile	4	2	5
Leu	4	2	1
Tyr	1—2	2	1
Phe	2	1	3
Lys	6	6	4
His	2	2	1
Arg	2	3	6
Trp	未测定	1	1
残基总数	71	74	71
分子量	7831	7983	7834

颈二腹肌标本, Post-ATX (25mg/ml) 阻断接头传递约需3小时, 此时肌肉的 ACh 敏感性消失, 用正常溶液冲洗, 接头传递稍有恢复。以¹²⁵I 标记 Post-ATX 在小鼠膈肌所做放射自显影亦表明, Post-ATX 的作用点应在接头后膜。综上所述, Post-ATX 应属毒性较弱的长链突触后毒素。

从猪肝纯化 β -N-乙酰氨基己糖苷酶

孙 册 丁昌荣 沈昭文

(中国科学院生物化学研究所)

糖苷酶是糖链结构分析的工具酶。可分内切和外切两大类, 具有很强的结构专一性。例如从 *Aspergillus Saitoi* 纯化的 α -甘露糖苷酶, 只分解 Man $\alpha 1 \rightarrow 2$ Man, 不分解 Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man 或 Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ Man。从伴刀豆 (jack bean) 纯化的 α -甘露糖苷酶能水解以上三种糖苷键, 但它们的水解速度不同: Man $\alpha 1 \rightarrow 2$ Man = Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ Man > Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man。不同来源的同一糖苷酶常常表现不同的结构专一性。

我们从猪肝里纯化了 β -N-乙酰氨基己糖苷酶。猪肝的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.2) 抽提液经乙酸沉淀部分, 然后先后经羧甲基纤维素 (CM₅₂) 和 DEAE-纤维素 (DE₅₂) 离子交换柱层析分离, 得到的酶制剂活力比提取液提高 100 倍, 酶活力回收为提取液的 10%, 既能水解对硝基酚-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷亦水解对硝基酚-N-乙酰- β -D-氨基半乳糖苷。经测试, 酶制剂水解对硝基酚- α -D-甘露糖苷、对硝基酚- β -D-半乳糖苷和对硝基酚- β -D-葡萄糖苷的活力小于水解对硝基酚-N-乙酰- β -D-氨基己糖苷活力的 1%。

在 SDS-聚丙烯酰胺电泳胶上显示两条主要的和一条极浅的蛋白质着色带, 主带的表现分子量分别为 35500 ± 3500 和 59000 ± 1000 。两条着色带均具有 β -N-乙酰氨基己糖苷酶活力, 提示它们可能是同工酶。

神经元特异烯醇化酶 (NSE) 的分离纯化、抗血清制备及免疫细胞化学的研究

谭复隆 鲍 璿 徐维奇 窦月梅

(中国科学院上海脑研究所)

神经元特异烯醇化酶 (NSE)、即神经特异蛋白 (NSP) 14-3-2, 与神经胶质细胞及其它组

织的烯醇化酶不同,含有二个相同的Y亚基,免疫化学性质完全不同。近年来以神经元特异烯醇化酶的专一抗体作为神经细胞的特异标记物,研究NSE在中枢神经系统神经元中的分布,神经元在生长发育及衰老过程中NSE的变化以及体外培养神经元的生理状态与NSE的相关,引起高度重视,进展速度很快。

今使用硫酸铵分级沉淀、超离心、离子交换层析、凝胶过滤等手段分离纯化得到神经元特异烯醇化酶的纯制剂,经SDS电泳,末端定测,活力测定证实其亚基分子量为39000, N末端为Pro,酶活力为300单位/mg。与文献报导相比较,此分离纯化步骤有较大改进,不但简便易行而且得率提高二倍。

抗原NSE以1 mg/ml加福氏全佐剂免疫家兔,经两次免疫后采得抗血清,用琼脂板双向扩散法检测,抗原2.5 μ g即可出现明显沉淀线。免疫酶标记细胞化学显示神经元特异烯醇化酶分布在神经元的胞体及其突起的细胞质内呈深棕色颗粒。体外培养的脊髓,大脑皮质和小脑皮质的神经元显示的棕色颗粒比在位组织切片的神经元更为清晰。

神经元特异烯醇化酶的纯化,抗血清的取得为脑的生物化学、细胞化学、解剖学、生理学的研究提供一新的有力手段,在临床检测中也可能有广泛的应用。

马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 I 的部分氨基酸顺序

吉永华 徐 科

(中国科学院上海生理研究所)

顾梓伟

(中国科学院上海有机化学研究所)

前文我们曾报道,从国产马氏钳蝎(*Buthus martensi* Karsch)毒中分离并纯化了被命名为毒素 I 和 II 的两种哺乳动物神经毒蛋白,其中毒素 I 的毒性较强,并已测知它是由67个氨基酸残基组成,内含8个半胱氨酸,最小分子量为7567。为今后在神经生物学研究中利用这一毒素提供基础资料,我们对它的一级结构进行了测定。

测定方法采用了DABITC/PITC双偶合微量手工顺序测定法与利用蛋白顺序自动分析仪进行自动分析测定法。两法都测定到第30步,并且所得到的结果是一致的(图1)。

图1中第18号位置上的氨基酸在测定中亦未被检出,暂用X表示;第8号位置的上氨基酸残基尚不能肯定是Asp还是Lys?在第27、28号位置上是否是Asx与Val也尚未能最后确定,故也用X表示。测定过程中,当测到第12、16、22和26号位置上时呈现空白点,参考国外的有关文献,我们认为在这些位置上应是Cys。在图1中用括号指明。

据文献报道,在世界范围内已从各种蝎毒中分离出40余种神经毒蛋白,并已测出其中近20种的全部氨基酸顺序和近10余种的部分氨基酸顺序。有人根据一级结构的相似性,将这些

蝎神经毒蛋白分成若干组。比较本工作所测定的国产马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 I (缩写为 BmK I) 的部分氨基酸顺序时,便可发现,它与非州苏丹产的毒蝎 *Buthus occitanus tunctanus* 的哺乳动物神经毒素 I、II 和 VII (缩写为 Bot I、Bot II 和 Bot VII) 和毒蝎 *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* 的哺乳动物神经毒素 III (缩写为 Lqq III) 非常相似 BmK I 和 Bot VII、Lqq III 除在第 9、10、17、20 号位置上以及和 Bot VII 在第 15 号位置上,和 Lqq III 在第 25 号位置上的氨基酸有差别外,其余已检出的氨基酸位置都是一样的,并且这 3 种毒蛋白在 N 一端都有一个共同的七肽顺序。至于 BmK I 与 Bot I、Bot II 相比较,则除 N-末端的 Gly 被 Val 所取代以及在第 10、20 和 25 号位置上的氨基酸明显不同外,其余已检出的氨基酸位置也都是相同的。

10

-Val-Arg-Asp-Ala-Tyr-Ileu-Ala-X-Pro-Asn-Asn-(Cys)-Val-Tyr-Glu-(Cys)-Ala-
20 30
-X-Asn-Asn-Tyr-(Cys)-Asn-Asp-Ileu-(Cys)-X-X-Asn-Gly-...

图 1 国产马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 I 的部分氨基酸顺序

		10	20	30	40
Bot	II	-GRDAYIAQPE-NCVYECAKNS-YCNDLCTKNG-AKSGYCQWLG			
		50	60		
		-RWGNACYCID-LPDKVPIRIE-GKCHF			
Bot	I	-GRDAYIAQPE-NCVYECAQNS-YCNDLCTKQG-ATSGYCDWLG			
		-KYGNACWCKD-LPDNVPIRIP-GKCHF			
Bot	VII	-VRDAYIAQNY-NCVYTCTFKND-YCNDICTKNG-AXXGYC...			
Lqq	III	-VRDAYIAKNY-NCVYECFRNS-YCNDLC...			
BmK	I	-VRDAYIAXPN-NCVYECAXNN-YCNDICXXNG...			

图 2 马氏钳蝎哺乳动物神经毒素 I 和四种哺乳动物神经毒素的氨基酸顺序

鲤鱼促黄体素释放激素(LRH)的纯化及其结构测定的初步结果

王育西 俞鹤年 徐佐杰 陈志民
罗珊珊 潘家秀 戚正武

(中国科学院生化所)

四大家鱼(草、青、鲢、鳙)是我国特产,品质和产量均居世界首位,以往我所曾合成哺乳动物的LRH类似物,用于家鱼的催情排卵对草鱼的效果非常显著,但对其它家鱼则不理想,因而若能阐明家鱼的LRH结构,不仅有其理论意义,也将会产生很大的经济效益。

取鲤鱼下丘脑丙酮干粉150克,约相当二万尾鲤鱼,用70%甲醇抽提,超细 Sephadex G-25凝胶过滤,固相抗猪LRH抗体亲和层析,其生物活力用碘标的放射免疫测定,氨基酸组成用邻苯二甲醛(CPA)荧光法测定,灵敏度为0.6nm。

高压液相层析时有三个免疫活性组份,三者的氨基酸组成相似,由此提纯的其中一主要活性组份在微晶纤维素薄膜上电泳时出现三个弱的茚三酮显色点,再用氯气显色时又出现一新的较深斑点,表明后者即为LRH(因其N端为环谷、对茚三酮基本上不显色),而前者则为制剂中所含的少量杂质,由于LRH含量太少(少于20微克)进一步纯化损失大有困难,因而用乙酸酐先将其它肽类杂质保护,然后用环谷酶专一降解LRH的N端环谷氨基酸,并结合超微量法DABITC有色Edman试剂降解测定顺序,结果如下:

鲤鱼 <Glu·His·Trp·Ser·Tyr·Gly(Gly)·Trp·(X)·GlyNH₂

猪 <Glu·His·Trp·Ser·Tyr·Gly·Leu·Arg·Pro·GlyNH₂

鸡 <Glu·His·Trp·Ser·Tyr·Gly·Leu·Gln·Pro·GlyNH₂

鲑鱼 <Glu·His·Trp·Ser·Tyr·Gly·Tyr·Leu·Pro·GlyNH₂

从以上初步结果看,并与其它已知种属的LRH相比较,值得提出的是,鲤鱼LRH中两个变换的氨基酸是在第7、8位的可变区域,上述结果正在进一步重复,并用人工合成后,用生物活性检测加以验证。

舒缓激肽增强肽衍生物结构与功能的研究

王守真 徐来根 管利丰

黄维德 戚正武

(中国科学院上海生物化学研究所)

前曾证实浙江蝮蛇蛇毒中舒缓激肽增强肽(BPP)(Glu·Gly·Arg·Pro·Pro·Gly·Pro·Pro·Ile·Pro·Pro)经环谷氨肽酶及Edman试剂降解后的C端三肽Ile·Pro·Pro仍保留原有生物活力90%左右,鉴于BPP同时又是血管紧张素转化酶(ACE)的有效抑制剂,临床曾用于治疗肾型高血压患者,获得显著疗效,因而合成BPP小肽衍生物,并研究其结构与功能的关系,在理论与实际上都将具有重要意义。

用经典法合成了BPP C端三肽及其衍生物,Ile·Pro·Pro,Ile·(L)-Ala·Pro,Ile·(D)-Ala·Pro, Glu·Ala·Pro, His·Ala·Pro并测定它们对舒缓激肽的增强效应及对血管紧张素转化酶的抑制活力,实验结果表明:Ile·Pro·Pro三肽的两种生物活力都较高,第二位的Pro,并非活力所必需,若代之以L-Ala,对舒缓激肽的增强效应大致上相当,对ACE的抑制活力偏低,若用D-Ala取代,则两种生物活力都显著下降,说明氨基酸L-构型是活力所必需的,第一位的Ile若用带负电荷的Glu取代,两种生物活力也都下降,若Ile以带正电荷的His取代,

两种生物活力类似于 Glu 取代的肽的情况, 此外, 以无侧链的 Gly 取代 Ile, 对舒缓激肽的增强效应几乎全丧失, 看来, 第一位残基应以疏水的氨基酸为宜。

纯化 RNase 的抑制因子及其抗体的制备

王道范 周德和 蔡国强 白天瑜

(中国科学院上海药物研究所)

核糖核酸酶的抑制因子(简称 RI)是一种糖蛋白, 具有保护 m-RNA 和调节核酸代谢的作用, 作者曾观察到黄芪多糖具有增强 RI 的功效, 为了深入研究 RI 的功能, 本文报道我们用 Sepharose 4B-RNase 亲和层析柱, 从人的胎盘中分离纯化到 RI, 并用此致敏日本大耳兔, 首先制备了 RI 的抗体。

新鲜的人胎盘, 用含 0.25M 蔗糖的 Tris·HCl (20mM pH7.5) 缓冲液冲洗去血, 在同样的缓冲液中制备匀浆, 以 $16,000 \times g$ 离心 30min, 上清液依次用 35% 与 60% 的饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, 沉淀部分用磷酸缓冲液溶解, 透析, 再以 $48,000 \times g$ 离心 60min, 上清液应用于亲和层析柱, 依次用磷酸缓冲液 (pH 6.4)、含 0.5M NaCl 的磷酸缓冲液 (pH 6.0) 及含有 3M NaCl 与 15% 甘油 (v/v) 的 0.1M 醋酸 (pH 5.0) 洗脱, 各管收集液用 UV280nm 检测, 同时测定每管 RI 抑制 RNase 的活力, 将含 RI 的部分合并, 再经透析与冷冻真空干燥, 以上操作均在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 进行, 所有的缓冲液均含有 2~5mM DTT 以保护 RI 的活性。

纯化后的 RI 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (7.5% pH 8.9 不连续) 鉴定为单一成份, 活力回收约为 43%, 纯化倍数约 1000。

RI 用福氏完用佐剂 (1:1) 乳化致敏日本大耳兔, 接种于后肢脚掌, 二周后再接种于后肢淋巴结, 以后每周加强一次, 共 4 次, 末次接种后第 5 天放血取血清, 经琼脂糖凝胶板扩散, 测定抗血清的效价为 1:8, 对 RI 与 RI 抗体的深入研究正在进行中。

浙江蝮蛇毒碱性磷酸酯酶 A 的溶液构象

武祥福 施庆洛 陈远聪 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所)

从浙江蝮蛇毒中分离纯化得到等电点为 9.3 的单链碱性磷酸酯酶 A (以下简称 PLA), 含有 120 个残基, 7 对二硫键。为对 PLA 的骨架和侧链构象有初步了解, 测定了此酶的圆二色 (CD) 谱和紫外差光谱。

PLA在中性溶液中的近紫外CD谱(320—250nm)显示306nm宽的小负峰,和287、280nm的峰形很尖的较大负峰。306nm负峰一直延伸到320nm以上,可能属二硫键贡献。在碱性pH范围内,287、280nm两峰随pH值升高而缩小;但在pH5.6—3.0范围内,仅280nm峰受pH值变化的影响。由于280nm峰属酪氨酸酚羟基贡献,287nm处色氨酸吡咯环和酚羟基都可能贡献,因而上述现象说明287nm峰主要由吡咯环贡献。此两峰的峰形与一些模型化合物在低温下的CD峰相似,指示PLA分子内贡献CD的色,酪氨酸残基的可动性很小。pH<3或>11时,PLA的近紫外CD谱发生显著变化:芳香残基峰形消失,只剩下二硫键的宽负峰。

和近紫外CD谱形成对照,PLA的远紫外CD谱在pH3—11范围里维持不变,说明在此范围主链构象不受影响。远紫外CD谱形为223、210—212nm的双负峰,和其它一些蛇毒磷酸酯酶A的远紫外CD谱形非常相似。说明此酶主链构象的保守性很强。pH2或pH12时,远紫外双负峰形消失,但pH2时的谱形表示样品此时仍保留一定的有序结构。

PLA的活力最适pH在8.5左右,Ca⁺⁺是此酶的激活剂,Zn⁺⁺是抑制剂。鉴于此,测定了pH, Ca⁺⁺, Zn⁺⁺引起的紫外差光谱,以及Ca⁺⁺, Zn⁺⁺对CD谱的影响。结果显示Ca⁺⁺, Zn⁺⁺对PLA主链构象无影响,但对芳香残基造成微扰。pH对芳香残基引起的微扰和Ca⁺⁺引起的不同。

本实验观察到PLA在100℃沸水浴加热15分钟冷却后,其近、远紫外CD谱均与天然酶的相同。30分钟热处理后,芳香残基的峰形开始模糊,但远紫外CD谱仍未受影响。主链构象的异常热稳定性显然与样品分子中7对二硫键的存在有关。

甲状腺微粒体抗原的分离纯化及其抗体的免疫放射检测法

戴蔼善 张光正 李建林 沈江帆 张玉华 贵瑞银

(上海普陀区中心医院)

美国良

(上海中国科学院药物所)

甲状腺微粒体(TM)抗原的分离提取有重要的临床意义,但其纯化国内外尚未见有成功的报道。由其粗提物所制备之TM抗体血凝检测试剂在临床甲状腺病,特别是现已证实为多发病的自体免疫性甲状腺炎(AIT)的诊断上具有决定性的价值,但更灵敏、特异的免疫放射检测法则由于尚未能取得纯化抗原而迟迟未能建立。我院则于建立上述血凝检测法后继续进行了对TM抗原的分离提纯获得成功并从而建立了TM抗体的双抗体免疫放射检测法,报道如下:

(一) 抗原的分离纯化 (1) 甲状腺手术取下组织制成匀浆, (2) 经差速离心, 超声处理及超速离心后取得TM抗原粗品。 (3) 上述粗品经高效液相色谱, 凝胶过滤(HPLC, TSK 3000 SW) 分离可见有二个主峰, 二峰均具免疫活性, 且重复上柱, 第一峰可能成第二峰。 (4) 取上述一个峰再经HPLC反相柱(μ -Bondapak C-18) 见二个主峰。收集作组份分析, 结果二峰均具完全相同的氨基酸组份。 (5) S.D.S.电泳, 结合氨基酸组份提示TM抗原为一分子量18,000 $\pm$ 的蛋白质。 (6) P.A.S.染色提示其为一糖蛋白。

(二) 上述纯化抗原按改良的Hunter和Greenwood氯胺T法进行¹²⁵I标记。以羊抗人血清作第二抗体建立免疫放射测定法。经证定: (1) 精确度: 批内变异系数(CV)<5.7%。批间变异系数<16.5%。 (2) 稳定性: 标记抗原及参考血清均可保存六周。证定结果显示可完全满足临床要求。

(三) 临床测定 (1) 正常人100名, Grave's病71例, AIT 28例及非自体免疫性甲状腺肿(NAIG) 45例(其中有腺瘤, 囊肿、散发性甲状腺肿等)。测定结果。显示正常人结合率除1例外余均低于20%, NAIG全部低于20%, 甲元46%高于20%, 而AIT则除1例外, 余均高于20%, 差别极为明显。 (2) 各种甲状腺病297例的免疫放射法与血凝法检测的对照, 显示二者有良好的相关性, 其中个别病例证明免疫放射测定较血凝精确。

血红蛋白 Andrew-Minneapolis 结构和功能研究

曾溢滔 黄淑慎 程观炽
仇效坤 任兆瑞 董庆元

(上海市儿童医院医学遗传研究室)

王大云 唐明徽 陈文斌 陈荷美
(桂林市人民医院)

我们在广西桂林的一名汉族妇女中发现了一种快速泳动的异常血红蛋白, 家系调查表明七名成员为这种异常血红蛋白携带者, 异常血红蛋白的含量约为50%, 临床上突出表现为红细胞增多症。患者珠蛋白通过8 m尿素的CM 22柱层析, 能分离出一种异常的 β 链。异常的 β 链TPCK-胰蛋白酶消化液作指纹图分析, 发现在正常的 β^A T14和T15肽斑的右上方出现了一个新的肽斑 β^X T14 $\cdot$ 15, 氨基酸组成和氨基酸顺序测定证实该异常血红蛋白的 β 144(HC 1)位的赖氨酸被门冬酰胺所替代, 称为Hb Andrew-Minneapolis [β 144(HC 1) Lys $\rightarrow$ Asn]。这种异常血红蛋白在我国尚属首次发现。

对患者的溶血液进行功能测定, 证实Hb Andrew-Minneapolis是一种氧亲和力增高的

异常血红蛋白。在25℃ pH7.4的0.1M磷酸盐缓冲液中, P_{50} 为3.60mmHg, (正常值6.83mmHg)。氧平衡曲线显著左移, 玻尔系数为-0.46, Hill系数n为2.53, 表明它具有正常的亚单位间的协同效应。由于氨基酸的替代发生在 β HC1位置上, 紧邻 β HC2酪氨酸, 这样就限制了 β HC2酪氨酸移入HC内螺旋窝内, 同时 β HC1(β 144)的门冬酰胺与 β HC3(β 146)组氨酸的咪唑基之间形成氢键, 使这种异常血红蛋白易于氧合构型。由于血红蛋白氧亲和力的增加, 导致组织摄氧量减少, 红细胞代偿性的生成形成红细胞增多症。

哺乳动物糖苷水解酶的研究

猪糖苷水解酶的组织分布

朱运松 顾银良 顾天爵

(上海第一医学院 生化教研室)

糖苷水解酶广泛存在于动植物界, 它们水解糖链中的糖苷键。有一类遗传性疾病如糖脂累积症、粘多糖累积症等就是由于体内缺乏某种糖苷酶所致。糖苷酶也是研究糖链结构的重要工具酶, 它们多数自植物种子及微生物中提取。近年报告动物与植物(包括微生物)来源的糖苷酶, 在专一性及辅因子方面有许多不同, 这方面的工作刚开始, 需要更深入的工作。本文测定了六种猪糖苷水解酶在猪内脏中的分布。

从屠宰场取来猪的九种脏器, 储存于-60℃低温冰箱中。取出冷藏的材料, 融化后, 剪成碎末, 以1:3(W/V)蒸馏水, 用FS-1型高速分散器(江苏省金坛县环保仪器厂)匀浆。105,000×g离心60分钟得上清液。糖苷酶活性的测定使用的底物均为Sigma产品, 用0.05M柠檬酸缓冲液配成2mM。1ml底物液37℃预保温10分钟后加入适当稀释的酶液(蛋白质浓度在5mg/ml左右)0.1ml, 37℃保温20~30分钟, 加入3ml pH9.8的硼酸缓冲液终止反应, 10000×g离心, 5分钟。测定上清液400nm的光度密, 根据对硝基酚的克分子消光值($1.77 \times 10^4 \text{m}^{-1} \text{cm}^{-1}$)计算酶活性。蛋白质测定用考马斯亮兰法, 以牛血清白蛋白作标准。测定结果表示于表1中。

从表1中可见, 所测6种糖苷酶中, N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶的活性在所测脏器中均为最高, β -半乳糖苷酶和N-乙酰- β -氨基半乳糖苷酶为其次, 最低活性的为 α -半乳糖苷酶。所测脏器中, 肾脏含糖苷酶最丰富, 其次是小肠粘膜, 肝和肺。从表1中猪的肾脏含N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶, β -半乳糖苷酶, N-AC-氨基半乳糖苷酶最高, 是分离纯化这些糖苷酶的好材料。

表1 猪糖苷水解酶的组织分布

酶活性 单位 组织	底物 对硝基苯基- β -半乳糖苷	对硝基苯基-N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷	对硝基苯基- α -半乳糖苷	对硝基苯基- α -L-岩藻糖苷	对硝基苯基-N-乙酰- β -氨基半乳糖苷	4-甲基伞形酮- α -甘露糖苷
大 脑	0.03	1.08	0.02	0.19	0.07	0.04
心 肌	0.13	0.38	0.01	0.21	0.16	0.01
肝	0.53	0.93	0.07	0.13	0.26	0.04
肾 脏	2.09	3.79	0.06	0.22	1.46	0.11
肺	0.38	2.39	0.06	0.24	0.45	0.07
胃	0.41	1.11	0.02	0.14	0.37	0.04
骨 骼 肌	0.05	0.26	0.01	0.03	0.04	0.01
大 肠	0.24	1.14	0.04	0.22	0.11	0.07
小肠粘膜	1.07	1.17	0.05	0.45	1.50	0.10

注：酶活性单位：37℃ 1小时水解底物产生一微克分子对硝基酚或4-甲基伞形酮的酶量为一个酶活性单位。

人淋巴细胞中腺苷脱氨酶的活性

章有幸 郭慧芬 陈诗书

(上海第二医学院生化教研室)

(上海市免疫学研究所免疫生化室)

应大明

(上海第二医学院附属新华医院儿内科)

腺苷脱氨酶 ADA (EC.3.5.4.4) 是核酸分解代谢中的一个关键酶。它催化腺苷水解脱氨生成次黄苷，后者在磷酸化酶作用下再脱糖生成次黄嘌呤。1972 年 Giblett 首先报道了原发性免疫缺陷病人红细胞中该酶活性降低。其机制近年来陆续都有讨论，并曾第一个在临床上用此酶作了替代治疗。获得性免疫缺陷病和白血病时此酶活性亦有异常，人肠肿瘤组织中该酶的分子结构和同功酶谱也有改变。小鼠不同分化成熟程度的胸腺细胞及外周血淋巴细胞中该酶活性有显著差异，淋巴细胞经 PHA 刺激后腺苷脱氨酶活性升高，因此提出了腺苷脱氨酶是 T-淋巴细胞分化成熟标志酶的观点。

腺苷脱氨酶活性的测定七十年代一般都用直接分光光度法或偶联黄嘌呤氧化酶的紫外光度法，我们曾用此法测定了部分正常人和病人红细胞中该酶的活性。由于灵敏度不高，若测外周血淋巴细胞中该酶的活性，需抽血 10 毫升结果还尚欠稳定。1974 年 Van der Weyder 报道