

中国科学院生物物理研究所

一九八七年度学术年会
主要论文摘要汇编

中国科学院生物物理研究所

一九八七年度学术年会

88年1月20日 星期三

上午 8:30—11:30

地点: 电子所阶梯教室

* 开幕式

主持人: 王大成副所长

* 致开幕词

王书荣所长

* 宣布学术年会日程安排

郭绳武

* 综述报告

1. 新生肽链的折叠

邹承鲁

2. 信号肽与导肽 —— 生物膜研究的一个活跃领域

杨福愉

3. 神经科学与疾病和技术

王书荣

4. 关于胰岛素与受体结合的可能结构机理

梁栋材

5. 怎样设计蛋白质分子

王书荣

下午 2:00—4:00

地点: 高能楼三楼会议室

学术报告

主持人: 林政炯

* 3 埃分辨率去 B 链羧端七肽胰岛素晶体结构测定

王大成 (七室)

* 天花粉蛋白分子结构的精化 (3Å) 及其立体化学研究

王家槐 (七室)

* 在蛋白质二硫键异构酶的存在下使二硫键错接的胰岛素
变成天然胰岛素

唐建国 (十二室)

* 几种酶的变性过程与化学修饰的研究

侯立向 (十二室)

* 我国人载脂蛋白 A₁ 基因的多形性观察

申同健 (二室)

* 青霉素 G 酰化酶的基因克隆与表达

张其玖 (二室)

* 高等植物含 pro A 片断的克隆与鉴定

陈受宜 (三室)

88 年 1 月 21 日 星期四

上午 8:30—11:30

地点: 高能楼三楼会议室

学术论文报告

主持人: 郭爱克

* Mg^{2+} 促进 H^+ -ATP 酶重建作用模型的新证据

黄有国 (三室)

* 山莨菪碱对生物膜上 ATP 酶活性及膜脂相变行为的
影响

黄 芬 (三室)

* 低温下生物大分子内水的亚稳性

张极震 (十四室)

* 空间飞行对卤虫卵发育影响的研究

陈去恶 (八室)

* 视觉运动与模式信息的神经计算

郭爱克 (五室)

* 雄蝇追逐飞行及其神经信息加工机理

张少吾 (五室)

* 黑蝉 (*C. atrata* Fabricius) 发声膜的动力学特性

蒋锦昌 (十一室)

下午 2:00—5:00

地点: 高能楼三楼会议室

学术论文报告 主持人: 江丕栋

* 国产光卟啉光敏作用机理的研究

张志义 (一室)

* 高剂量测量技术的研究

孟香琴 (一室)

* 人多形核白细胞呼吸爆发活性氧自由基的产生及抗氧化剂对氧自由基的清除作用

赵保路 (十四室)

* 微机化高帧(300HZ)条纹及伪随机块立体图象发生器

张思和 (四室)

* 蚯蚓纤溶酶原激活因子(PAF)及其溶栓效应研究

吴 骋 (八室)

* 14种临床检验试剂盒的研制

张占勤 (生化厂)

* 科学管理(待定)

88年1月22日 星期五

上午 8:30—11:30

地点: 高能楼三楼会议室

研究生学术论文报告 主持人: 金 磊

* 1.9Å 分辨率三方四锌胰岛素的晶体结构研究

李 密 (七室 导师: 梁栋材 王大成)

* 二硫键异构酶对胰岛素A、B链配对的影响

唐建国 (十二室 导师: 邹承鲁)

* 浙江蝮蛇中性磷脂酶A₂的晶体学研究

金 磊 (七室 导师: 林政炯)

* 样品介电性质对ST-ESR谱的影响

项柏松 (四室 导师: 万 谦 陈炳焕)

下午 2:00—5:00

专题讨论会

1. 神经科学与信息科学

主持人: 郭爱克 汪云九

地 点: 高能楼三楼会议室

2. 自由基生物学

主持人: 忻文娟 张志义

地 点: 高能楼地下会议室

3. “863”有关生物技术研究现状和组织协调

主持人: 雷克健 申同健

地 点: 高能楼二楼会议室

4. 管理科学

主持人: 陈玉敏 王谷岩

地 点: 高能楼514室

88年1月23日 星期六

上午 8:30

地点: 高能楼地下会议室

所学术委员会评议会议

88年1月30日 星期六

上午 8:30—11:30

地点: 电子所阶梯教室

总结表彰大会

主持人: 张仲伦副所长

*年会和年度工作总结

王大成副所长

*表彰奖励

*颁发专业技术职务聘书

目 录

1. 3 埃分辨率去 B 链羧端七肽胰岛素晶体结构测定·····	1
2. 天花粉蛋白分子结构的精化 (3Å) 及其立体化学研究·····	2
3. 胰岛素 B ₂₆₋₃₀ 五肽的二维核磁共振研究·····	3
4. 血纤维蛋白溶酶原激活剂 - e - PTA 酶的喇曼光谱研究·····	4
5. 在蛋白质二硫键异构酶的存在下使二硫键错接的胰岛素变成天然胰岛素·····	5
6. 几种酶的变性过程与化学修饰的研究·····	6
7. 泛醌结合蛋白的标记和新型泛醌抑制剂的发现·····	7
8. 蚯蚓纤溶酶原激活因子 (PAF) 及其溶栓效应研究·····	8
9. 低温下生物大分子内水的亚稳性·····	9
10. 我国人载脂蛋白 A1 基因的多形性观察·····	10
11. 青霉素 G 酰化酶的基因克隆与表达·····	11
12. 高等植物含 pro A 片断的克隆与鉴定·····	12
13. Mg ²⁺ 促进 H ⁺ - ATP 酶重建作用模型的新证据·····	13
14. 山莨菪碱对生物膜上 ATP 酶活性及膜脂相变行为的影响·····	14
15. 线粒体 H ⁺ - ATPase 构象与活力的关系·····	15
16. 外加电场与 PH 对人工膜 (BLM) 中菌紫质分子 (bR) 光电响应的影 响·····	16
17. 细胞间隙连接的研究·····	17
18. 空间飞行对卤虫卵发育影响的研究·····	18
19. 干扰素诱生剂对正常人与白血病人淋巴细胞 SCE 与细胞周期的 影响·····	19

20. 视觉运动与模式信息的神经计算及时空整合原理	20
21. 雄蝇追逐飞行及其神经信息加工机理	21
22. 黑蝉 (<i>C. atrata Fabricius</i>) 发声膜的动力学特性	22
23. 坛形电感受器的离子依赖性	23
24. 国产光卟啉光敏作用机理的研究	24
25. 高剂量测量技术的研究	25
26. 一九八七年我国发射的两颗卫星内辐射水平和辐射危险度的评价	26
27. 宽频带各向同性射频电磁辐射场监视仪及其校正装置的研究	27
28. 人多形核白细胞呼吸爆发活性氧自由基的产生及抗氧化剂对氧自 由基的清除作用	28
29. 应用电子显微镜 X 射线显微分析方法研究神经细胞内钙离子的贮 存与释放	29
30. DYS - 86 型低本底全自动液体闪烁计数器	30
31. 离心逆流色谱仪的研制	31
32. 微机化高帧 (300 Hz) 条纹及伪随机块立体图象发生器	32
33. 血清 3, 3', 5 三碘甲腺原氨酸 (T_3) 的固相放射免疫分析	33
34. 14 种临床诊断试剂盒和新型稳定剂的研制	34
35. 沙棘黄食用色素的研制	35
36. 人和家兔体表物理信息地形图的研究	36
37. A1-(L-型-色氨酸) 胰岛素晶体结构的研究	37
38. 1.9 Å 分辨率三方四锌牛胰岛素晶体结构研究	39
39. 用蛋白质二硫键异构酶 (PDI) 来研究胰岛素 (Ins) 分子的相对 稳定性	40
40. 蝮蛇毒中性磷脂酶 A_2 晶体学研究	41
41. 样品介电性质对 ST - ESR 谱的影响	42

3 埃分辨率去B链羧端七肽胰岛素晶体结构测定

王大成 陆国光 张季平 谢殿霖
常文瑞 梁栋材

去B链羧端七肽胰岛素(DHPI)是经限制性酶解后产生的一种胰岛素类似物,它基本上丧失了天然胰岛素的生物活力,从而在研究胰岛素三维结构与功能关系中具有重要地位。用于结构分析的DHPI晶体为晶型B,空间群 $P2_1 2_1 2_1$,晶胞参数 $a=59.195$ 埃, $b=54.807$ 埃, $c=22.995$ 埃,一个不对称单位中含二个DHPI分子。结构解析综合运用Patterson搜索,R因子搜索和最小二乘刚体修正等方法获得成功,已在3埃分辨率建立初结构模型。

自身旋转相关计算在6埃分辨率获得肯定结果,确定不对称单位中两个分子有近似的二重对称性,非晶体学二重对称轴垂直于 b 并与 a 轴相交 44° 。两个独立分子在晶胞中的正确取向由交叉旋转函数求得。取经大幅度修饰后的三方二锌胰岛素结构作初始模型,对不同分辨率不同积分半径作系统的交叉旋转相关分析,最后在25-6埃数据范围求得两个分子的正确取向。分子在晶胞中的位置通过平移函数测定。平移函数分析中的多重解困难,借助于R因子搜索和晶胞中分子密堆积合理性分析圆满解决。

随之应用生物大分子最小二乘刚体修正技术对分子的初始取向和位置进行36轮精化,R因子从0.543降到0.509。再根据胰岛素分子的组装特征,将分子按A1-A11,A12-A20和B9-B19分子三个结构域,进一步修正29轮,使R因子降到0.488。由此出发,扩展到3埃分辨率,用最小二乘能量制约修正对原子初始座标精化10轮,R因子进一步降到0.384。至此结构解析的基本正确性已无疑。

初始的($ZF_e - F_c$)电子密度图中,分子的一些特征氨基酸残基(如TYR-A19,B16,-S-S-A6-A11,A20-B19,HIS-B5,B10)都有较好的表现,显示出结果的可靠性。肽链走向已初步确定,与三方二锌胰岛素结构比较,A、B链的三段螺旋仍存在,但各自都有不小于 10° 的取向旋转;A链的总体构象有较大的保守性,而B1-B8和B20-B23的构象有戏剧性改变,其折叠方式既不同于二锌胰岛素分子,也不同于去五肽胰岛素分子。通过进一步的模型建造和晶体学修正,将更详细地了解DHPI的结构特征及其与生物活力的关系。

天花粉蛋白分子结构的精化 ($3\text{\AA}$) 及其立体化学研究

吴 伸 张学军 陈世芝 董贻诚 王家槐

继 C 2 晶型的天花粉蛋白晶体结构测定后, 我们现在用 EREF 程序 (从 MUNICH 引进) 对这个晶体结构模型作了精化修正。我们用 $7 - 3\text{\AA}$ 范围内 8200 个独立衍射点和 8600 个立体化学约束条件对 3600 个原子的座标参数进行修正, 修正过程中几次对模型作进一步调整, 调整所用的差值电子密度图是用 SIM 加权方法计算的, 模型的调整使用了 PRODO 程序, 在 PS 300 图象显示仪上进行, 目前的 R 因子是 31%, 键长标准偏差 $0.04\text{\AA}$, 键角标准偏差 6° 。模型与电子密度的拟合及结构的立体化学合理性均有了很大的改善。

在此基础上, 我们对天花粉蛋白的立体化学特点作了一些研究, 前已报导, 天花粉蛋白的特点是 α -螺旋相对集中在分子中央, β -折叠在外围。现在我们进一步发现, 正是由于这个特点使天花粉蛋白分子大结构域内有一个与外界相通的空穴, 此空穴由 α -螺旋 $\alpha_1, \alpha_4, \alpha_5$, 与 β 折叠链 $\beta_1, \beta_4, \beta_5$ 和 β_6 围成。这个洞穴至少可容纳 40 个以上水分子, 这种独特的肽链折叠方式的含义是值得深入探讨的。

我们计算了分子的各段螺旋的相对暴露分数, 发现只有 α_2 和 α_1 显著暴露于溶剂相, 仔细分析这两段 α -螺旋的特点后, 我们相信它们与天花粉蛋白作为核糖体失活蛋白 (RIP) 发挥活性作用有关, α_2 含有 3 个碱性残基, 而且正处于两个结构域之间的裂缝区, 这一区域集中了较多的带正电的碱性残基, 我们推测 α_2 参与了和 RNA 的结合, 近于 N 端的 α_1 是一两亲性螺旋, 且含有 4 个丝氨酸和二碱性残基, 它具有穿膜蛋白导肽的特点, 因此, 我们推测它可能是与穿膜过程有关的结构元件。

天花粉蛋白与蓖麻毒蛋白起毒性作用的 A 亚基不仅有序列同源性, 而且两者的立体结构也是极其相似的, 由于 RIP 蛋白在结构与功能上的高度相似, 我们认为前面讨论到的天花粉蛋白分子结构的特点是有普遍意义的, 我们建议用“RIP 折叠”来命名这类特殊的肽链折叠方式。

胰岛素 B₂₆₋₃₀ 五肽的二维核磁共振研究

丁继贞 雷克健 周淑华

二维核磁共振技术是目前分析测定生物大分子溶液中三维结构最重要的手段。特别是对多肽分子共振峰的识别和其溶液构象的研究是强有力的工具。

本文用 XL-400 MHz 超导核磁共振谱仪提供的最新软件 PHASE-SENSITIVE 二维技术测定了胰岛素 B₂₆₋₃₀ (Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala) 简称 YTPLA 的同核相关谱 (HOMCOR) 和 NOESY 谱, 得到了许多有意义的信息: 1. 通过 YTPLA 的 HOMCOR 谱分析, 识别了其组成的五个氨基酸各自的自旋体系, 对 32 个质子的共振峰进行了明确的分配。从 YTPLA 的一维谱可见各残基的 α -H 和一部分 β -CH₂ 的化学位移相对其单个氨基酸时明显向低场移动, 这可能因形成肽后的化学环境发生了变化, 如受肽键 NH, C=O 等基团的影响。更有兴趣的是 Ala- β CH₂ 和 Thr-rCH₂ 以及 Pro- β CH₂ (B) 和 Lys- β CH₂ (B) 等基团均有明显的高场位移。这可能暗示了这些基团的质子邻近 Tyr 的芳香环, 受其环流场影响, 产生正屏蔽效应而向高场移动。另外从 Pro 的 HOMCOR 谱、NOESY 谱与 YTPLA 五肽的 HOMCOR 谱比较, 发现 Pro- β CH₂ (A) (B) 和 Pro-rCH₂ 的峰组的化学位移次序在单个 Pro 时为: β CH₂ (A) 2.14 ppm- β CH₂ (B) 1.86 ppm-rCH₂ 1.80 ppm, 而在 YTPLA 谱中的次序变为 β CH₂ (A) 2.14 ppm-rCH₂ 1.82 ppm- β CH₂ (B) 1.76 ppm。以上这些变化反映出 YTPLA 在溶液中可能有较确定的三维构象。2. YTPLA 的 NOESY 实验结果出现了不少远程 NOE 效应, 如 Lys 的 ϵ CH₂ 与 Thr 的 β -CH 与 Tyr 的 β CH₂ (B); Lys 的 rCH₂ 与 Pro 的 δ CH₂ (A) 之间均有强 NOE 交叉峰。另外 Ala 的 β CH₂ 与 Pro 的 rCH₂、 α -H 之间分别有明显的 NOE 交叉峰等。这些结果进一步表明 YTPLA 在溶液中可能具有下列构象:

(1) Lys 的侧链可能倒向 Pro 和 Thr 方向, 使得 Lys- ϵ CH₂ 容易接近 Tyr- β CH₂ (A) 和 Thr- β CH₂, 因而均出现强的 NOE 交叉峰。同时 Lys-rCH₂ 与 Pro- δ CH₂ (A) 可能由于空间距离比较近因而出现很强的 NOE 交叉峰。另外 Ala- β OH₂ 与 Pro 的 α -H 和 r-CH₂ 之间也能见到明显的 NOE 交叉峰, β -CH₂ Ala- β CH₂ 还呈现高场位移。综上所述, 可能提示了从 Lys 肽段是否出现一个转折, 使 Ala 折向 Tyr 方向, 这与晶体状态下 Lys、Ala 残基呈舒展构象是不同的。

(2) Tyr 的芳香环部分可能仍保留原胰岛素分子晶体状态时朝向 Thr 和 Pro 方向, 但方位可能有变动, 使得 Ala- β CH₂、Thr-rCH₂、Pro- β CH₂ (B)、Lys- β CH₂ (B) 等可因邻近 Tyr 芳香环而出现高场位移。YTPLA 呈现上述三维构象可能与 Pro 的顺、反异构化有关。

血纤维蛋白溶酶原激活剂 - e - TPA 酶的喇曼光谱研究

许以明 吴 骋 樊 蓉

e-TPA 是一种有效的血栓溶解剂。它是从动物组织中分离纯化得到的血纤维蛋白溶酶原激活剂。

心脑血管栓塞是危害人们生命和健康的主要疾病, 为了探讨 e-TPA 治疗这些疾病的机理我们用喇曼光谱法对 e-TPA 的组成、二级结构以及 e-TPA 与含血纤维蛋白溶酶原的人血纤维蛋白的相互作用进行了系统的研究。

本文用喇曼光谱分析了 e-TPA 的组成, 认为它是一种带有多核苷酸辅基的蛋白水解酶。其蛋白质部份的组成氨基酸主要有 12 种, 它们与其它蛋白水解酶的活性部位肽的氨基酸种类有较多的相同之处; e-TPA 含有较多的 SH 基团。它的 C-S-S-C 的构象是反-顺-反式 (trans-gauche-trans); 它的 C-S 构象有顺, 反 (gauche, trans) 两种。初步认为其色氨酸残基为“埋入”的, 而其酪氨酸残基为“暴露”的, 并且酚侧链是 $-O^-$ 型式。

e-TPA 的辅基是聚鸟苷酸及聚胞苷酸。

要研究 e-TPA 的结构与功能的关系, 阐明其空间结构是一个重要的方面。本工作还用激光喇曼光谱研究了它的水溶液和重水溶液并据此计算了该激活剂分子的 α -螺旋, β -折叠和无规卷曲构象的残基百分率分别为 61%、29% 和 10%。这些结果为探讨 e-TPA 有效地治疗血管栓塞症的机理积累了必要的据。

本工作进一步用喇曼光谱从分子水平对 e-TPA 与含纤溶酶原的人血纤维蛋白的相互作用进行研究。

加入 e-TPA 酶以后含纤溶酶原的人血纤维蛋白的主链构象—酰胺 I、II、C-C、C-N 伸张振动、氢键的 NH 对称及反对称伸张振动以及它的与酶的活性紧密相关的侧链构象—SH 基团, S-S 键和酪氨酸残基双峰均有明显的变化。从而可知其空间结构的变化。

人血纤维蛋白凝块变成流体的现象表明纤溶酶原的激活及人血纤维蛋白的溶解。上述喇曼光谱方面的变化正是这个现象的本质。

在蛋白质二硫键异构酶的存在下 使二硫键错接的胰岛素变成天然胰岛素

唐建国 王志珍 邹承鲁

蛋白质二硫键异构酶(PDI)可催化巯基-二硫键交换。PDI使二硫键错接的蛋白质分子中的二硫键的重排,通常伴有蛋白分子构象和活力的恢复。但是,迄今为止,这类反应仅在单链分子中实现,对多条肽链的分子尚无报导。

前已报导,Ins A、B链间存在着相互识别和广泛的相互作用。由此,我们用从牛肝中纯化的PDI,不仅从二硫键错接的胰岛素(S-Ins),而且从氧化的A、B链的混合物,从磺胺型A、B链的混合物,都得到了恢复天然结构和活性的Ins分子。

1. 从s-Ins生成天然Ins。经DTT充分还原的Ins溶于4.2 M胍中, pH 10.8, 4℃经空气氧化30小时,得s-Ins。s-Ins (0.6mg/ml)在PDI (0.68 mg/ml)及DTT (0.7μM)存在下,可经二硫键重排而生成20—25%的天然Ins。(DTT/SS=0.055)

2. 从氧化的A、B链(1:1)生成Ins。磺胺型A、B链经DTT还原后,在4℃, pH 0.8分别氧化。氧化的A、B链混合物(0.2mg/ml)在PDI (0.23mg/ml)及DTT (13μM)存在下,同样可经重排而生成8—13%的天然Ins。(DTT/SS=0.13)。

3. 从磺胺型A、B链(1:1)生成天然Ins。磺胺型A、B链混合物(0.6 mg/ml)在PDI (0.68 mg/ml)及DTT (375μM)存在下,也可以生成25—30%的天然Ins。(DTT/SSO₂=1.25)

关于Ins还原型A、B链在PDI存在下,可以10—15%的产率重组成天然Ins分子已有文献报导,但PDI催化磺胺型A、B链的重组则未见报导。至于PDI对s-Ins的复活作用,过去一直未曾成功,我们则成功地用PDI对s-Ins中错接的二硫键的改正作用而得到20—25%的天然Ins。并进一步用PDI对分别在A链和B链内部已经形成的链间或链内的二硫键的重排作用,也得到8—13%的天然Ins。这一事实,再一次证明,Ins A、B链的确具有足够的结构信息,能够相互识别,在一定条件下,Ins是含有A链和B链的产物中最稳定的分子。

实验表明,温度是生成Ins的重要因素。当温度比较高时(37℃),产物中Ins的产率很低,随着温度的降低,Ins的产率随之增高。这可能由于低温能够降低多肽链在溶液中的流动性,进而使Ins A、B链间的弱的相互作用得以表达,增加了A、B链间正确配对的几率。

几种酶的变性过程与化学修饰的研究

袁志安 陈挹芳 侯立向 *Sara Vollmer
吴 虹 赫荣乔 居 鸣 邹承鲁

一、鸡肝二氢叶酸还原酶(DHFR)的蛋白内源荧光发射光谱的峰位随胍浓度的增加从330 nm红移到355 nm,强度也大幅度下降,这一变化主要发生在1.3—1.8 mol/l 胍浓度范围。酶活力的变化则较为复杂,在0.5 mol/l 以下胍中,该酶的活力未见降低,反有明显升高。这可能是DHFR天然态构象,虽为热力学稳定状态,却非最适;低浓度胍增加了催化活力所需的柔性,故呈激活现象。使DHFR完全失活的胍浓度为2.0 mol/l。变性过程的动力学测定结果表明活力经包括快、慢二相的过程变化($k_1 \sim 10^{-3} s^{-1}$, $k_2 \sim 10^{-5} s^{-1}$)。构象变化亦为二相,相应速度常数与前者的为同一量级。即DHFR活性部位与整体的构象在胍致变性过程中同步变化。初步研究了复性过程,发现蛋白内源荧光发射光谱的峰位复原较峰值复原为快。活力在最初2分内约能恢复50%。

二、前已发现经LDS(十二烷基硫酸锂)变性的兔肌肌酸激酶(ck)在底物存在时,构象和活力能部分恢复,即有“底物修复作用”。与胍变性酶的结果相比,作者之一认为二级结构完整为此作用的必要条件,并认为底物修复作用是完全不同于底物保护作用的另一类酶-底物相互作用。进一步研究表明变性酶被修复的程度取决于变性的程度,而且活性与构象恢复的程度一致。在ck的两个底物中ATP对修复作用的影响较大。牛血清白蛋白等能结合已与ck结合的LDS,使ck成为游离酶,从而影响修复。ck表面巯基的必须性的判断,是至今仍未解决的重要问题。用带-SCH₃的修饰剂使ck的大部分巯基氧化,再将修饰酶加入测活系统,活力逐渐升高,表明底物能使被修饰酶巯基发生变化。用MNP修饰ck的结果基本说明被修饰的巯基是必须的。

三、经盐酸胍变性的兔肌D-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表征蛋白质分子整体构象的多项参数均随胍浓度增加而呈陡变-平台-陡变-平台四个区段,意味着有热力学意义下的变性中间态存在。酶的催化活力和NAD荧光衍生物的特征荧光光谱,这两种与活性部位构象密切相关的指标仅有与上述第一区段相应的变化。动力学研究表明构象参数与活力的变化均由两个速度常数相差一个量级的平行一级反应组成,且活力变化快于构象变化。Apo-和holo-酶的变性终态和动力学的结果都说明NAD⁺有保护酶分子构象的作用。酵母酶类似研究还给出了一些与兔肌酶不同的结果:似乎并无较稳定的变性中间态存在;经全位和半位修饰制备的NAD荧光衍生物的特征荧光光谱参数随胍浓度的增加而变化的趋势明显不一,这一现象为说明蛋白质分子的微观不对称性提供线索。

泛醌结合蛋白的标记和新型泛醌抑制剂的发现

徐建兴 古练权* 张震平 李淑莲

在生物能研究领域围绕着泛醌的功能问题出现了三件大事, 第一是从实验中肯定了泛醌参与呼吸链的电子传递过程。第二是P. Mitchell 提出了泛醌循环(Q - Cycle)机制。这个机制是他获得诺贝尔奖的“化学渗透”学说的重要组成部分。在此机制中泛醌兼有传递电子和跨膜转移质子的功能, 第三是发现了泛醌与蛋白结合的证据并建立了泛醌结合蛋白的概念。现在, 人们所了解的呼吸链组分全部是蛋白质, 唯独泛醌是脂溶性的小分子有机化合物, 它是琥珀酸脱氢酶, NADH脱氢酶等的电子受体, 同时又是细胞色素组分的电子给体。在参与电子传递时泛醌分子经历着以丰醌为中间体的两步氧化还原反应。这些特点使泛醌在生物能量转化中的作用充满了神秘色彩。

为了搞清呼吸链中哪些蛋白组分参与了与泛醌有关的反应和阐明泛醌作为脱氢酶和细胞色素之间电子传递的枢纽作用机制, 我们从两个方面进行了研究。一方面是设计并合成具有高重组活性的又能进行光敏标记的活性泛醌, 用来鉴定参与泛醌反应的呼吸链蛋白组分。另一方面是寻找具有特并断泛醌反应的抑制剂并确定其抑制位点。这两方面的实验结果可使我们更深入地了解泛醌在呼吸链中的作用机制, 经过几年的努力, 我们从几十种人工合成的有机化合物中筛选出了比较理想的活性泛醌类似物和泛醌反应抑制剂。

我们发现的活性泛醌类似物在其醌环上连结着一个光敏叠氮基, 侧链被 H^3 标记的2—叠氮基—3,6—二甲基—5—(3,7—二甲基—2,3,6,7—四氟—辛基)—1,4苯醌, 用它取代琥珀酸细胞色素C还原酶中的天然泛醌并进行光敏标记, 我们发现静态的酶不论是氧化态还是还原态, 其标记图谱基本相同, 在分子量10,000—29,000之间出现标记峰, 而还原进行态的酶标记图谱明显不同, 在29,000左右标记峰增高, 而15,000左右标记峰下降。这种差别反映了泛醌与蛋白质的结合。

我们发现的泛醌反应抑制剂也独具特色, 它是一类水杨酰胺化合物, 其低级同系物3—硝基—N—甲基水杨酰胺只抑制复合物II中的Succinate—DCIP活力。而它的高级同系物如3—硝基—N—癸基水杨酰胺不仅抑制复合物II中的Succinate—DCIP活力而且抑制复合物III的QH₂—Cyt·C活力, 对两个复合物都具有抑制效应的抑制剂还是首次被发现, 复合物II和III之间是以泛醌为媒介传递电子的, 因此, 这类抑制剂的发现为我们研究泛醌作为复合物II和III之间的枢纽作用机制提供了有效手段。

• 外单位协作人员(下同)。

蚯蚓纤溶酶原激活因子(PAF)及其溶栓效应研究

吴 聘 樊 蓉 华新宇 徐 薇

本研究旨在从蚯蚓(中医药剂方)中分离一种有效的溶解血栓的物质(PAF),用以治疗心、脑血管栓塞病。

从蚯蚓中分离出的PAF能使部分未活化的纤溶酶原激活为纤溶酶,具有了活力的纤溶酶再使血栓中的纤维蛋白网降能。因此PAF具有类似尿激酶(UK)的功能,是一种新型血栓溶栓药物。

据对PAF进行的纯度测定,表明其是一种高纯度蛋白。对其进行了氨基酸分析、喇曼光谱分析、单个活性分子的高纯度分离、等电点聚焦电泳分析以及其它理化特异性研究。对PAF进行的体内药理学研究表明,它能快速,明显缩短优球蛋白溶解时间(ETL),溶解人血纤维蛋白的速率远比尿激酶快,对体外复制血栓的溶解效应远比尿激酶强,对动物体内复制血栓的溶解效应显著,对凝血时间(CT)无影响。用PAF制作的口服胶囊,在纯度、活力、体外溶血栓效应以及胶囊性质诸质量方面均优于新近由日本和南朝鲜合作生产的“龙心”胶囊。

本研究已于今年6月由本所组织鉴定(生物物理研究所《87》成鉴字002号),认为该项研究已取得了阶段性成果,为从蚯蚓中提取有效的溶栓新药打下良好基础,在国内处于领先地位,是一项具有实际意义和较好临床应用前景的研究成果。为发扬祖国医学作出了贡献,为治疗血栓性疾病提供新的途径。

本项研究成果已与药厂签定了共同申请临床研究的技术合同。获得全部临床经费和申报费用外,还获得35万元的经济收益,把基础应用研究成果推向开发应用迈出了可喜的一步。

低温下生物大分子内水的亚稳性

张极震 张玉柱

自60年代起,多种研究表明,每种生物大分子内都有一恒定量的不冻水。例如据报导, DNA和溶菌酶的不冻水量 R_{nf} 分别为0.61和 0.33 ± 0.02 克水/克大分子,并认为这部分水以氢键结合于大分子,维系着其结构和功能,故 R_{nf} 广泛用作刻画水同大分子相互作用的重要特征参量,并依此提出有关大分子水合的较系统的假说和分子模型。近来我们用差示扫描量热法对多种生物大分子的研究发现,水-大分子是个非平衡体系,冻结是个动力学过程,提出了水冻结的时间依赖性模型和恒温非平衡冻结动力学方程。

样品降温至218K时取恒温时间 $t_K = 0$ 。恒温不同时间后升温测量得到不同 t_K 下的积分熔融热 Q_f 和未冻水量 R_{uf} 。含水0.52(A)、0.79(B)、1.88克水/克大分子的DNA在144小时内及含水0.32(A)、0.44(B)、0.90克/克的溶菌酶在96小时内的冻结度遵循方程:

$$\alpha = 1 - \exp(-Kt^n) \quad (1)$$

由方程1得到未冻水量的时间依赖关系:

$$R_{uf} = \exp(\alpha - Kt^n) \times \Delta H_f^\circ \quad (2)$$

及恒温非平衡冻结速率方程:

$$\frac{d\alpha}{dt} = K n t^{n-1} (1 - \alpha) \quad (3)$$

不同大分子在不同 R 下遵循同样的动力学方程,然而其 K 和 n 值及冻结速率完全不同,表明不同大分子在不同 R 下的微观冻结过程及驱动力不同。

成核热力学表明,在过冷和过饱和态下,当晶核半径 r 大于一临界值 r_c 时,过程的 $\Delta G < 0$,冰为稳定相,冻结是自发过程。方程1和2表明,在相同 t_K 下不同 R 的样品具有不同的 α 和 R_{uf} ,但只要过程的 $\Delta G < 0$,在不同 t_K 下,却可能达到相同的 α 和 R_{uf} 。例如上述含水量的DNA和溶菌酶样品冻至相同 $\alpha = \frac{e-1}{e} = 0.63212$ 所需时间分别为 5.73×10^{12} 、 1.00×10^{10} 、 2.95×10^{13} 和 7.97×10^{13} 、 4.44×10^7 、 6.19×10^{13} 小时。含水0.49克/克的DNA和0.28克/克的溶菌酶在218K恒温0.25小时即测到冰的熔融峰,而在高 R 下,如上述DNA和溶菌酶样品A、B、C欲冻至 R_{uf} 为0.49和0.28克/克则分别需要完全不同和极长时间: 2.16 、 7.91×10^7 、 1.51×10^{10} 和 1.08×10^6 、 2.81×10^4 、 9.75×10^7 小时。小牛眼球 r -晶体蛋白和RNase A的低温结果与此相似。本动力学结果同在 T_g 下估算的水的扩散周期 $\tau > 3$ 年/微米吻合,含水0.30克/克的溶菌酶低温恒温15小时给出大量In冰晶衍射点,直观而有力地证实了本动力学结果。

实验表明,低温下水-大分子是个亚稳体系,水冻结是个扩散控制过程,目前热力学不能断定冻结的平衡点,故文献中依“不冻水”量对大分子水合提出的一系列假说和分子模型有待重新予以澄清、生物水的这种亚稳性对低温下生物体活性的保持及对严寒的抗性和耐性有着重要意义。生物水的这种亚稳性同生病过程内在联系的揭示必将有助于进一步深入了解许多生命现象。