SHENGWUHUAXUEYICONG

生物化学译丛

第4辑

58'173
178
011846
生物化学译丛（第四輯）

58'173
178
011846
生物化学译丛（第四輯）

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期

58-173
178

目　录

干扰素诱导的酶活性和它们在抗病毒状态中的作用……(1)
依赖 cAMP 的蛋白激酶 I：一种独特的变构酶……(9)
革兰氏阴性细菌外膜蛋白质的生物合成和功能……(13)
现代 DNA 核苷酸序列分析的方法……(30)
不用载体的酶稳定化……(37)
用杂交法分离细胞表面蛋白……(46)
测定红细胞表面唾液酸残余物的新比色法……(54)
酶标记免疫测定中蛋白质结合的新方法……(58)
酶促制备[^{15}N]标记 L-谷氨酸的简单方法……(64)
肾(尿)激肽释放酶……(66)
前列腺素和动脉硬化……(67)
前列腺素和凝血机能……(68)
有关生化文献的近年情况……(69)

中国科学院
图书室藏
011840
植物研究所北京

中科院植物所图书馆
S0017368

011846

干扰素诱导的酶活性和它们在抗病毒状态中的作用

C. Baglioni

干扰素是细胞受病毒感染后所分泌的糖蛋白，它能促使尚未受到感染的细胞建立起一种抗病毒状态。组织培养的动物细胞用干扰素处理就会通过一种还不了解的机制降低它们复制RNA和DNA病毒的能力。干扰素作用机制的早期研究是用病毒感染的细胞进行的。这些研究表明了病毒模板的积累和(或)受到抑制，但未能揭示其抑制的原因。根据一些研究者的报道，最近的工作集中于了解干扰素处理的和未处理的细胞抽提液间酶活性的差别。这些酶活性和抗病毒状态之间的确切关系至今还没有搞清楚，但是在不久的将来很可能会从分子水平上对抗病毒状态作出某些解释。

dsRNA(双链RNA)是干扰素合成最有效的诱导剂。合成的dsDNA(双链DNA)和病毒的dsRNA都能诱导动物细胞合成与分泌干扰素。这些事实引出一个假设，即双链复制形式的病毒RNA(由RNA病毒形成的"复制中间物")能通过一种未知的机制激发干扰素的合成。从mengo病毒感染的细胞得到的复制中间物的确是干扰素合成的一种有效诱导剂。Marcus和Sekellick对dsRNA在和细胞相互作用中的巨大能力作了出色的说明。含有dsRNA的水泡性口膜炎病毒(VSV)单缺失型的干扰颗粒能诱导干扰素合成。这种缺失型的干扰颗粒可以看成是注射到细胞里的单个dsRNA分子，它足以诱导干扰素合成。而且，对干扰素处理过的细胞抽提液来说，dsRNA是蛋白质合成的强力抑制剂；有关dsRNA这种对抑制敏感性的促进作用的研究导致了发现两种酶活性。这两种酶为干扰素所诱导并依赖于dsRNA(图1)，它们是寡聚核苷酸聚合酶和蛋白激酶，前者能催化从ATP合成一系列含有特殊的2′,5′磷酸二酯键的寡聚核苷酸；后者能使启动因子eIF-2的小亚基磷酸化。寡聚核苷酸聚合酶的产物pppA $(2'p5'A)_n$(简称2′,5′寡聚A或2,5A)是一种核酸内切酶的激活剂；这种能合成寡聚核苷酸的酶称为2,5A聚合酶。

本评论主要讨论蛋白激酶和2,5A聚合酶-核酸内切酶系统的最近的工作以及介绍细胞抽提物中2,5A稳定性方面的研究。这些研究可能帮助我们了解核酸内切酶在病毒感染、并经干扰素处理过的细胞内如何发挥功能。另外关于病毒mRNA甲基化抑制作用的一些研究，也将作简要介绍，虽然这种抑制机构目前还未从分子水平加以阐明。在

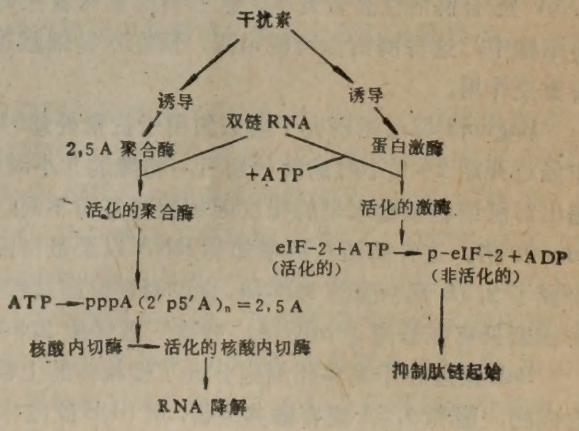

图1　干扰素对动物细胞二种效应的图解说明

这里进行讨论，是因为它是细胞抽提物中和干扰素有关而且不需要加入dsRNA的一种活性，病毒mRNA甲基化的这种抑制也可能是其翻译受阻的原因之一。

2′,5′寡聚(A)聚合酶

据Roberts等报道，将dsRNA与ATP和干扰素处理过的L细胞保温后，在这种细胞的抽提物中就会形成一种低分子量的蛋白质合成抑制剂。Kerr及其同事接着把工作推向这种抑制剂的分离与化学鉴定。由于观察到结合在琼脂糖上的合成的dsRNA poly(I)·poly(C)能用来吸附并活化与抑制剂合成有关的酶活性，从而使这些研究变得容易了。按照Kerr等设计的程序，先使细胞抽提液通过小的poly(I)·poly(C)-琼脂糖柱，接着再和ATP一起保温，然后将形成的抑制剂洗脱下来，并用DEAE-纤维素层析进行纯化。这种程序现已成为人们从各种细胞抽提液中制备该抑制剂所采用的方法。但是最近在溶液中用dsRNA有效地合成抑制剂的条件已有报道。这种方法对于研究反应过程中2,5A合成的动力学，或研究不同的dsRNA以及其他成分的影响，都是方便的。

低分子量抑制剂的结构已从α-和γ-^{32}P-ATP标记的图谱中，通过用DEAE-纤维素层析测定了其电荷，以及通过用DEAE-纤维素和薄层层析鉴别了其不同核酸酶的降解产物，得到确定。简言之，这种抑制剂是由腺苷酸彼此通过磷酸二酯键连接而成的，它能抵抗裂解3′—5′键的酶作用。磷酸酯酶可以切下末端三磷酸酯，用蛇毒磷酸二酯酶消化的产物只有5′AMP。此外还可借助过碘酸氧化降解，β-消去法证明它连接有2′,5′磷酸二酯。抑制剂制剂中主要成分是一种三聚核苷酸pppA2′p5′A2′p5′A，但是也存在一些具有类似结构的其他寡聚核苷酸，这类寡聚核苷酸系列的一般通式是pppA(2′p5′A)$_n$，其中n为1～10。在这些寡聚核苷酸中，除了二聚体外，全都能抑制蛋白质合成。这种2,5A的结构已通过化学合成得到了证实。化学合成的2,5A在生物活性、质子与磷的核磁共振谱等方面都和生物合成的2,5A完全相同。

据Ball等人报道，他们分别在干扰素处理的小鸡鸡胚3T6和Hela细胞中观察到2,5A的合成。Hovanessian和Kerr描述了在兔网织红血球裂解液中2,5A的合成，并表明没有经过干扰素处理的细胞抽提液通常也能合成少量的寡聚核苷酸。Stark等指出除两栖动物非洲爪蟾和昆虫Drosophila melanogaster以外，在鸟类和哺乳动物的不同细胞和组织中都已测出不同水平的2,5A聚合酶活性。小鸡输卵管当消除雌激素的刺激作用以后，可以看到2,5A聚合酶活性显著升高。这些情况意味着在那些高度分化的细胞，如网织红血球或输卵管细胞中，这种酶活性可能很高，而在这些细胞建立特异性功能的过程中，mRNA的降解起着重要作用。

Baglioni等已经研究了当细胞用干扰素处理时，2,5A聚合酶的活性增加。在Hela细胞中经过开始2～3小时的潜伏期后，相继的几小时内酶活性线性地上升，大约24小时后停止。超出对照细胞基础水平的程度因细胞株系而不同，在干扰素处理的小鸡鸡胚细胞中可高达10,000倍。这种酶活性的增加和RNA以及蛋白质合成有关，说明在用干扰素处理的细胞中合成了2,5A聚合酶的mRNA，也说明要提高这种酶活性，它的mRNA还必需翻译。不过这些推断只有在分离了mRNA，并将它翻译成2,5A之后才能得到直接证明。

Ball报道在小鸡鸡胚细胞分去了核糖体的上清液中存在一种多肽，它是在干扰素处理后合成的，能和2,5A聚合酶共层析，用SDS胶电泳分析表明其表观分子量约为56,000。这种多肽能和dsRNA结合并可借此进行部分纯化，它的合成和干扰素处理的剂量与时间有关，

同时为放线菌素 D所阻断，说明它可能就是 2,5A 聚合酶。Ratner 等报道，他们部分地纯化了一种能合成核酸内切酶激活剂的酶，并推测这种激活剂为 2,5A。Zilberstein 等也从干扰素处理的细胞中纯化了一种能使 ATP 聚合为 2,5A 的酶。Hovanessian 和Kerr 通过 poly(I)·poly(C)-Sepharose 柱吸附，用*M* KCl 洗脱纯化了 2,5A 聚合酶和依赖于 dsRNA 的蛋白激酶，这两种酶还能进一步通过 DEAE-纤维素层析分离开来。令人惊奇的是，没有激酶的 2,5A 聚合酶对其最适活性来说还需要第二个因子，而纯化的激酶则不再依赖 dsRNA。

Baglioni 等在感染 EMCV(脑心肌炎病毒)的 Hela 细胞中观察到 2,5A 聚合酶的诱导和病毒 RNA 合成抑制之间的相互关系。当细胞用干扰素处理时，2,5A 聚合酶活性升高，病毒 RNA 的合成就逐渐地降低(图 2A)。用不同浓度的干扰素处理，在其他细胞中也观察到类似的相关性，这些细胞中 2,5A 聚合酶的活性随着用来处理细胞的干扰素浓度增加而升高，同时 EMCV RNA 的合成受到抑制。关于干扰素处理时间及其浓度对小鸡鸡胚细胞中 VSV 复制的影响，Ball 也做了类似的观察。将用干扰素处理的 Hela 细胞洗净并放在缺乏这种抗病毒因子的条件下培养时，2,5A 聚合酶的水平则随细胞质量的增加而减少。同时 EMCV RNA 合成的抑制也逐渐减少(图 2B)。这些结果说明，2,5A 聚合酶与病毒RNA 的积聚以及病毒复制的抑制有关。

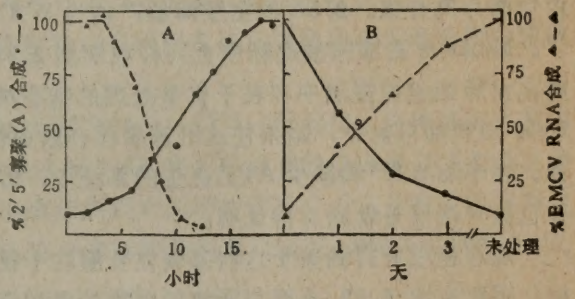

图2　在感染的细胞中干扰素对 2,5A 聚合酶活性的诱导和对 EMCV RNA 合成的抑制(A)；移去干扰素后 2,5A 聚合酶活性的衰减和 EMCV RNA 的合成 (B)

在图 2 中，(A) 为 Baglioni 等观察的结果。细胞培养物用 100 单位/毫升人纤维母细胞干扰素处理，为了测定抽提物制剂中 ^{3}H-尿嘧啶 30 分钟的脉冲数，将培养物分份制成细胞抽提物并预先用 EMCV 感染 5 小时。(B) 为 Minks 等测得的 2,5A 聚合酶活力数据；而 EMCV RNA 合成的资料则根据 Maroney 和 Baglioni 提供的。细胞用 100 单位/毫升的干扰素保温 30 小时，洗涤并在未加干扰素的培养基中培养。移除干扰素之后（时间为 0）每隔 24 小时取出一份以制备细胞抽提物并用 EMCV 感染。EMCV RNA 的合成通过 ^{3}H-尿嘧啶 30 分钟的脉冲数来测定。2,5A 聚合酶活性以与干扰素接触 24 小时(A)或 30 小时 (B) 的细胞抽提物中测得的最大合成百分数表示。EMCV RNA 的合成以未经干扰素处理的细胞中所测得的最大合成百分数表示。

依赖于 2′5′ 寡聚(A)的核酸内切酶

Lengyel 及其同事观察到干扰素处理的细胞抽提液和 dsRNA 及 ATP 一起保温会导致 mRNA 断裂，核酸内切酶降解 mRNA 的过程可以分为两个阶段：活化阶段——需要 dsRNA 和 ATP，核酸水解阶段——不需要 dsRNA 和 ATP。上述观察到的情况可以这样解释：在第一个阶段中合成2,5A；在第二个阶段中活化的核酸内切酶降解 mRNA。这种两步式过程已被一些研究者直接证明。他们根据 Hovanessian 等的方法合成了 2,5A，并将纯化了的寡聚核苷酸加到细胞抽提物和核酸内切酶底物组成的保温系统中，这种核酸内切酶不论其处于游离的状态还是与多聚核糖体结合的状态，都能断裂细胞的 mRNA 和病毒的 mRNA。由此可见，2,5A 对蛋白质合成的抑制是由于核酸内切酶的活化及相继对 mRNA 的降解而引起的。这初步说明，不同的 RNA 被 2,5A 活化的核酸内切酶断裂的速度是不同的；但是其他研究者

没有检出病毒 mRNA 和细胞 mRNA 在断裂速度上有何差别，而且看来这样核酸内切酶似乎不大可能象限制性核酸内切酶一样能断裂特定的核苷酸顺序。

Schmidt 等及Ratner 等已纯化了依赖于 2,5A 的核酸内切酶；Baglioni 等指出这种酶活性与干扰素作用机制有关；Baglioni 等又揭示它和机制有关的某些独特的特征。这种酶存在于干扰素处理的和未处理的细胞中，也存在于网织红血球裂解液中；它的活性取决于 2,5A 的连续存在(当这种活化剂除去时，酶即回复为潜伏的非活性状态)；它能和 2,5A 结合；但是只有 2,5A 三聚体或较高的寡聚体才能活化核酸内切酶，才是蛋白质合成的强力抑制剂。这些情况意味着如果寡聚核苷酸形成的量有限而且很快就被分解时，那么这种酶在体内就能被 2,5A 以一种瞬时的方式活化。最近 Williams 和 Kerr 将 2,5A 寡聚核苷酸加到透性的 BHK 细胞中，表明在完整细胞内 2,5A 能抑制蛋白合成。在这种透性细胞内有一种核酸酶能被瞬时地活化，同时它的活性取决于 2,5A 的加入量。

2′5′ 寡聚(A)的分解代谢

Schmidt 等观察到部分纯化的核酸内切酶和 2,5A 预保温，结果导致核酸内切酶活性丧失，这是因为有降解 2,5A 的杂酶存在的缘故。这种杂物可以通过进一步的分级分离和核酸内切酶分离开来。2,5A 的主要降解产物为 5′AMP 和 ATP，说明磷酸二酯键被专一性切断了。Minks 等在细胞抽提物中也同样观察到 2,5A 的降解。这些研究者指出，2,5A 的降解速度在对照细胞抽提液中和在干扰素处理的细胞抽提液中是接近的。将 2,5A 加到 L 细胞或 Hela 细胞抽提物中，结果使这种寡聚核苷酸很快就被分解，同时核酸内切酶活性相应地降低。在不加 ATP 和缺少 ATP 再生的系统中，2,5A 降解特别快，但是在完整细胞中 2,5A 是否也被很快地分解尚有待证明。

现在还没有得到关于这些寡聚核苷酸在干扰素处理并经病毒感染的细胞内合成的直接证据，因此有关 2,5A 合成与降解的观察的确切资料，只限于细胞抽提物。不同研究者的工作表明，2,5A 活化的核酸内切酶以及降解这些寡聚核苷酸的酶，在干扰素处理的和未经处理的细胞中其存在量相近，并表明在干扰素处理后只有合成 2,5A 的酶活性显著地增加；但是有些研究者观察到核酸内切酶活性也稍有增加。在未经干扰素处理的细胞中为什么有这些酶存在，这是个谜，这个事实说明了这些酶活性可能在细胞 mRNA 的分解代谢中起着某种作用。

病毒与细胞 mRNA 间的辨别机制

关于依赖于 2,5A 的核酸内切酶在病毒感染并经干扰素处理的细胞中的功能，现在还没有获得直接证据。在这些细胞中病毒 mRNA 的积累受到抑制，但是不清楚这种抑制是否由于转录或翻译损伤，或者由于病毒模板断裂。用完整细胞进行的实验，要解释它往往是很复杂的，这是因为在感染循环过程中病毒模板和复制酶重新合成而使病毒 mRNA 放大了。病毒 mRNA 的断裂、翻译或转录的缺失能够阻止这种放大。

为了研究干扰素处理对不受放大影响的病毒 mRNA 积累的效应，Marcus 和 Sekellick 测定了用 VSV 温度敏感突变株感染的细胞中或用环己亚胺处理的细胞中病毒模板的积累。在这两种情况下，转录都依赖随感染病毒进入细胞的病毒复制酶。在干扰素处理的细胞中，这种初级的 (primary) 转录比对照要低几倍，但是在干扰素处理的细胞中，合成的 VSV mRNA 在大小和半寿期方面都和对照细胞相等。Marcus 和 Sekellick 推测，干扰素处理降低了起动病毒 mRNA 转录的可能性，但他们不能排除另一种可能，即某些 mRNA 在干扰素处理的细胞内过早地被终止或被完全降解。

Baglioni 等推测，2,5A 聚合酶可能被 RNA 病毒部分双链化的复制中间络合物(RI)活化，而合成的 2,5A 又可能局部地活化依赖于 2,5A 的核酸内切酶。在这种情况下，病毒 mRNA 就将首先被裂解。Nilson 和 Baglioni 在干扰素处理的细胞抽提物中证明了这种识别机制（识别可定义为区别病毒模板和细胞模板的过程）。这些研究者观察到，在干扰素处理的 Hela 细胞抽提液中，共价偶联到 dsRNA 上的 mRNA 比没有连结到 dsRNA 上的 mRNA 先被裂解，而在对照细胞抽提液中，这种选择性降解却较少。这些研究最初是用模式底物进行的，包括和 poly(U)一起退火带有 poly(A)的病毒或细胞 mRNA 以及和 poly(I)一起退火带有 poly(C)的 EMCV RNA，不管 dsRNA 的位置是在 mRNA 的 3′-末端还是近 EMCV RNA 的 5′-末端，也不管 dsRNA 的碱基组成如何，都观察到在干扰素处理的细胞抽提物中，与 dsRNA 连接的单链 RNA 优先降解。这种降解可能是通过 2,5A 聚合酶和依赖于 2,5A 的核酸内切酶的共同作用而发生的，因为在阻止 2,5A 合成的条件下将使 mRNA 的内切降解消除，而有利于大量 2,5A 合成的条件则将导致上述识别力损失。标记的 RI（从 EMCV 感染的细胞中获得）和干扰素处理的细胞抽提液一起保温，结果被降解产生一种 20S 的“核心”，这种“核心”能抵抗 RNase A 的消化作用，这就清楚地说明，在干扰素处理的细胞中存在着一种酶活性，它能从复制中间络合物的双链核心上“切削”单链的早期病毒 RNA 链。如果这种现象能在干扰素处理并经病毒感染的细胞中得到证明，也许就能解释许多研究者在不同细胞或病毒系统中观察到的病毒 mRNA 积累的降低。

2,5A 的合成被 EMCV 的 RI 和模式底物 $mRNA(A)_n \cdot (U)_n$ 所活化，这种底物含有和 mRNA 的 3′poly(A)一起退火的 poly(U)。如果这种 2,5A 寡聚核苷酸的合成量有限而且又被很快地分解，那么 2,5A 的浓度可能随其与合成位点距离的增加而减少。在这种扩散限制过程中，依赖于 2,5A 的核酸内切酶的局部活化，似乎最能解释病毒与细胞 mRNA 之间的识别。

依赖于 dsRNA 的蛋白激酶

Hunt 和 Ehrenfeld报道了多瘤病毒感染的细胞浆能抑制网织红血球裂解物中的蛋白合成。以后又报道了 dsRNA 或病毒能抑制肽链起动。Hunter 等报道，多种 dsRNA 在 0.01～0.1 微克/毫升浓度范围内具有最大的抑制力，但使人惊奇的是，较高浓度的 dsRNA 没有抑制能力。这些研究者还确定，只有配对适当，50 个碱基对以上的 dsRNA 才具有抑制力。最近，Farrell 等发现，在网织红血球裂解物中起动的抑制和一种蛋白激酶有关，这个酶能使起动因子 eIF-2 的最小亚基(α)磷酸化，并同时抑制起动子 tRNA 结合到40S 的天然核糖体亚基上。这种抑制可细分为两个明显的步骤：第一步是活化，需要 dsRNA 和 ATP，它能使分子量约为 65,000 的蛋白质(P1)磷酸化；第二步是 eIF-2α 的磷酸化，这一步需要 ATP，但不需要 dsRNA。现在已有迹象表明，P1 蛋白就是依赖于 dsRNA 的蛋白激酶。

那些研究 dsRNA 影响的工作者已经在干扰素处理的细胞作成的非细胞系统中获得了类似的证据，即蛋白激酶和促进两种多肽的磷酸化有关。但是，这种蛋白激酶的活性检测是复杂的，因为它的底物选择范围相当有限，也因为在细胞抽提物中存在着蛋白质磷酸酯酶活性，同时还因为 dsRNA 对它的特殊的活化作用。

激酶能使 P1 蛋白与eIF-2α高效地磷酸化，P1 蛋白的分子量在各种哺乳动物中是不同的。Roberts 等曾用组蛋白作为激酶的底物。Zilberstein 等报道认为富含精氨酸的组蛋白 H_3 和 H_4 能被这种激酶磷酸化，而 Sen 等则用 Drosophila HI 组蛋白作为底物。Kerr 等推测，组蛋白的磷酸化可能对转录与细胞生长有某些生理学方面的影响，但是说明蛋白激酶在这种功能方

面依赖于 dsRNA 的证据目前还没有得到。

Revel等报道有一种磷酸酯酶，它能使蛋白 P1 和 eIF-2 脱磷酸。这种磷酸酯酶的存在使得没有经过分级分离的细胞抽提液中激酶活性的检测复杂化了，而且有些研究者发现，在分离出来的核糖体中有利于这种酶的检测。激酶和它的底物与核糖体共沉淀，而磷酸酯酶一般认为是留在分去了核糖体的上清液中。核糖体和 ATP 以及 dsRNA 一起作短时间保温就能使激酶活化。它的活性可用两种方法检测，即采用 ^{32}P-γ-ATP 进行反应，而后借助胶电泳分离磷酸化的产物；或者直接测出它对蛋白合成的抑制能力。

应用这些检测方法，某些研究者研究了干扰素处理的剂量与处理时间对蛋白激酶活性诱导的影响。Jarvis 等报道，在 3T6 细胞中蛋白激酶的活性水平和抗病毒状态的程度与应用的干扰素浓度具有对数关系。Samuel 等根据 P1 和 eIF-2α 磷酸化的测定，观察到激酶活性的诱导和时间有关；这种活性与结合在核糖体上的翻译抑制剂的诱导相关；活性的升高和干扰素的剂量成比例，并为放线菌素 D 所切断。Sen 等已经将这种激酶纯化了几百倍，在许多未经干扰素处理的细胞中，激酶也具有一定的水平。在干扰素处理的 L 细胞中和 Hela 细胞中激酶活性升高约 5 倍。

激酶能和 dsRNA-琼脂糖结合，而且在和 dsRNA 结合时就被活化；但是在溶液中用 dsRNA 活化这种酶仅能在一定的ds RNA浓度范围发生；一旦活化后，RNase Ⅲ对 dsRNA 的降解就不会影响激酶的活性。磷酸化的速度与环状核苷酸的关系不大，而在没有外加 KCl 的情况下达到最高。后一特征可以解释为在高盐浓度下，含有痕量 dsRNA 的病毒 mRNA 明显地优先翻译。蛋白激酶对蛋白合成的抑制随盐浓度升高而减弱。Cooper 等人的实验表明，dsRNA 活化的激酶抑制 Met-$tRNA_f$/40S 核糖体亚基络合物的形成。Cooper 等是将干扰素处理的 L 细胞抽提物加到网织红血球裂解物中观察到的；而 Lewis 等则是在 dsRNA 加到对照和干扰素处理的细胞抽提物中时追踪到这种络合物的形成的。激酶能催化 eIF-2 的最小亚基磷酸化，它作用的位点和 hemin 调节的激酶催化的磷酸化位点没有区别。

现在还没有证据说明在干扰素处理并经病毒感染的细胞内激酶是被活化的。Gupta 在与 dsRNA 一起保温的完整的 L 细胞内检测到激酶的活性；但是用两种不同的 RNA 病毒感染干扰素处理的细胞时并没有看到活性有什么升高。在某些干扰素处理并经病毒感染的细胞内的确可以观察到蛋白质合成受到了普遍抑制，但其原因没有得到解释。很可能是，如果激酶被活化，那么病毒和寄主的蛋白合成都将受到抑制，因为所有蛋白质的合成起动都要通过 eIF-2。dsRNA 对激酶的活化作用很可能代表一条与2,5A聚合酶-核酸内切酶的抑制病毒复制不同的途径；如果病毒 mRNA 的积累不能被这些酶的联合作用所阻止，那末激酶就可能在为病毒装配所需生产足够量的病毒结构蛋白以前就切断蛋白质的合成。

在干扰素处理的细胞中病毒 mRNA 的帽的甲基化

Sen 等将对照的小鼠腹水细胞抽提液中和用干扰素处理的细胞抽提液中戴了帽但未甲基化的呼肠孤病毒 mRNA 的甲基化作用进行了比较，表明在干扰素处理的细胞抽提液中 5′末端鸟苷的甲基化受到了损伤，但这不能用病毒 mRNA 的降解来解释。Shaila 等用人干扰素处理 Hela 细胞的抽提液得到了基本上相同的结果。在这两种情况下，甲基化的损伤随所用的病毒 mRNA 的浓度升高而降低。Sen 等进一步研究了这一现象，他们排除了由于 S- 腺苷甲硫氨酸耗尽或 S- 腺苷同型半胱氨酸积累这二种作为甲基化损伤原因的解释，并进一步表明，也不是由于甲基化酶的不可逆失效。甲基化作用的抑制剂是一种大分子，它可能使 mRNA 不能

被甲基化；这种抑制剂在低温时被活化。此外他们也观察到，当病毒 mRNA 被呼肠孤病毒结合的转录酶重新合成时，抑制程度较小。

Samuel 等检测出干扰素处理的 L 细胞与对照细胞的细胞液之间对呼肠孤病毒 mRNA 的甲基化能力方面没有任何明显的不同，这一结果和 Lengyel 等得到的结果不同，其差异可以用制备细胞液的方法——涉及到胶过滤——不同来解释。因为抑制剂是不稳定的，在这一分级分离步骤中很可能丢失。此外，Ball 和 White 也对干扰素处理的小鸡鸡胚细胞和对照细胞的抽提液中病毒粒子转录的 VSV mRNA 的甲基化作用进行了研究，同样没有观察到任何不同；但是，这些细胞抽提液经过预保温，其内源蛋白合成比较低，并且很可能在预保温过程中不稳定的抑制剂被钝化。Lengyel 及其同事观察的可靠性是不容怀疑的，除非采用完全相同的实验条件。为了确定帽甲基化的抑制在干扰素作用机制中是否具有普遍意义，看来应将这些观察扩大到干扰素处理的其他细胞中去。

在干扰素处理的细胞中帽甲基化的损伤至今还未得到满意地证实。Desrosiers 和 Lengyel 报道，在干扰素处理的 L 细胞中，合成的呼肠孤病毒 mRNA 比对照细胞中的病毒 mRNA 所含的“帽 II”少 50%（在呼肠孤病毒 mRNA 中有⅔～½含“帽 I”，它带有甲基化的倒数第二个核苷酸的核糖；其余的包含“帽 II”，它带有甲基化的倒数第二个核苷酸的核糖和甲基化的邻近核苷酸的核糖）。Muthukrishnan 等证明，带有帽 I 的牛痘病毒 mRNA 比带有帽 0 相应的 mRNA 能更有效地和核糖体结合，帽 0 缺少核糖甲基化。因此，帽甲基化作用的损伤很可能使体内翻译效率降低。Kroath 等报道，不管是否经过牛痘病毒感染，用干扰素处理的小鸡成纤维细胞中病毒的和细胞的 mRNA，其倒数第二个核苷酸核糖的甲基化都降低了 50% 以上，而 5′端 G 的甲基化则没有减少。

某些研究者研究了干扰素对在裂解循环过程中 SV40 基因表达的影响。细胞预先用干扰素处理，并用这种 DNA 病毒感染后，结果使 SV40mRNA 的量降低。但是在感染后用干扰素处理，不能抑制病毒 mRNA 的合成；病毒 19S 和 16S mRNA 相对对照细胞来说在裂解循环的后期达到正常量，但是这些 mRNA 和多聚核糖体的结合受到了损伤，而且它们的翻译产物也显著减少。Revel 等报道，从干扰素处理的细胞来源的 SV40 RNA 和对照的感染细胞来源的细胞 mRNA 或病毒 RNA 相比较，表明前者的 RNA 中缺少 m^7GpppX 帽式结构。但是最近的实验表明，SV40 RNA 帽的甲基化作用没有减少，而且内部 m^6A 甲基化作用有相当大的增加。

结　论

组织培养细胞中干扰素诱导的酶活性的发现，极大地提高了我们对于抗病毒状态在分子水平上的认识。留下来的问题是要搞清楚在动物体内，干扰素处理或病毒感染是否也诱导这些酶活性。在 EMCV 感染的小鼠中进行的 2,5A 聚合酶活性的研究表明，这种酶在脾脏和肺中都升高，但是在动物体内干扰素诱导的酶活性还未检定；而且我们至今还不知道这些酶活性如何干扰病毒 mRNA 的积累、病毒的翻译与复制。因为上述过程是彼此关联的，可以假定，病毒的生长能够在几个不同的环节上受特定的一些机制所阻断。2,5A 聚合酶-核酸内切酶系统可能是一个例子，通过这种机制病毒 mRNA 的积累被阻断。如果这些酶是在 RNA 病毒的复制络合物水平上起作用的话，那末它们就能有效地切断病毒 mRNA，并阻止其积累。但是这种机制是否在完整细胞内发挥作用还是仅能在体内影响复制中间络合物，尚未得到证明。dsRNA 活化的激酶一旦为病毒的 dsRNA 活化，就可能阻断蛋白质的合成；但是留下

来的问题是，在某些情况下干扰素处理并经病毒感染的细胞中观察到的蛋白合成抑制是否就是由于激酶的作用。最后，帽的甲基化抑制可能代表另一种机制，这种机制能损伤病毒 mRNA 的翻译。干扰素的这种影响还没有详细研究，而且为了证实一种特定的抑制并在分子水平上解释它的作用机制还有许多工作要做。这种抑制可能是抗病毒状态的一个重要内容，因为它能影响受 DNA 病毒编码的 mRNA 的翻译，但是它对那些没有帽结构的病毒 mRNA，如 picornaviruses 的 mRNA 则没有影响。

某些研究者报道了干扰素处理的其它一些效应，例如 Eppstein 和 Samuel 从干扰素处理的 L 细胞的盐洗核糖体部分纯化了已活化的一种核酸内切酶。虽然这种核酸酶似乎在体外已和用 γ-P^{32}-ATP 体外标记的低分子量活化剂结合了，但它和 2,5A 活化的核酸酶的关系却完全不清楚；看来这种核酸酶降解呼肠孤病毒 mRNA 比细胞的 mRNA 要快。Marcus, Terry等报道了另一种核糖核酸酶活性，它是从干扰素处理的小鸡鸡胚细胞的膜部分中获得的，在干扰素处理过程中有 RNA 和蛋白质合成抑制剂存在时却没有观察到这种核糖核酸酶活性。Aujean 等在干扰素处理并经 mengovirus 感染 L 细胞的膜部分也观察到核糖核酸酶活性升高。这个膜部分包含病毒复制络合物，它可能与核糖核酸酶以及激酶的活化有关。上述核糖核酸酶能降解mengovirus RNA 和 poly(A)，poly(U)以及 poly(C)，在这一方面，它似乎不同于 2,5A 活化的核酸内切酶，因为后者不能裂解poly(A)。

干扰素的某些抗病毒效应可能和核酸酶有关，这一点和 Lengyel 等的报道一致，他们观察到呼肠孤病毒 mRNA 的平均半寿期在对照细胞中大约 12.7 小时，但在干扰素处理的 L 细胞中只有 4.8 小时。对照细胞及干扰素处理的细胞抽提液之间的另一差别是某些 tRNA 的钝化速度不同；这种钝化是明显地依赖于抽提物的预保温，但是它的生理意义有待确定。Yan 等最近指出，蛋白质合成延伸的速度因抑制剂的存在而稍稍下降，如环己亚胺专一地抑制某些病毒蛋白的合成。降低延伸速度的一种可能的机理是干扰素诱导的某些较小的 tRNA 分子失效，但是在干扰素处理并经病毒感染的细胞中是否存在这种假定的失效，有待阐明。

应该指出的是，干扰素象很多激素一样，是影响多种细胞活性的一种多型性效应剂。特定的酶的诱导可能是一种最简单的效应，这种效应能在分子水平上加以描述。但是能和这些酶相互作用的其它细胞成分是作为组成物质存在在细胞中的，2,5A 活化的核酸内切酶和 2′5′核酸外切酶看来就是属于这种情形的。干扰素的其它效应是非常有趣的，然而至今不能从分子水平上加以解释。例如，Halbach 等最近报道在干扰素处理的细胞中溶酶体具有易脆性，同时人们也逐渐认识到干扰素对肿瘤细胞增殖的抑制作用。随着在成骨肉瘤病人身上进行有希望的临床试验之后，干扰素的这种效应受到了广泛的注意。显然，对于干扰素和其它激素在控制细胞增殖和诱导特殊蛋白合成方面的作用机制，我们还有许多东西需要了解。有关干扰素诱导上述两种酶的研究工作已经取得了可喜的进展，但是在认识这些酶对抗病毒状态的作用以及揭示干扰素和细胞相互作用引起的其它分子效应以前，我们还有许多工作要做。不过，有一点看来是清楚的，就是这两种酶代表了 dsRNA 抑制蛋白质合成的两种不同的途径。有趣的是，2,5A 聚合酶在高浓度 dsRNA (>10 微克/毫升)情况下活化最好，而激酶则在较低的 dsRNA 浓度范围(<10 微克/毫升)内活化。

研究干扰素作用机制的另一条有希望的途径是由于分离到了一些细胞突变株，这些突变株能在没有诱导剂存在的情况下合成可以检测出来的少量干扰素。这些突变的 3T6 细胞株是

(下转第29页)

依赖cAMP的蛋白激酶Ⅰ：一种独特的变构酶

J. Hoppe　　K. G. Wagner

已知依赖cAMP的蛋白激酶通过解聚而激活，在哺乳动物胞液内，这些酶有两种类型，它们具有类似的催化亚基，但亚基调节不同。ATP可阻止cAMP活化蛋白激酶Ⅰ。本文综述此类酶的配体连结部位的近期研究情况。

亲水性激素不能透过其靶细胞膜，它通过 Satherland 发现的机制起作用。激素在细胞表面与其特异受体接触后，在细胞内合成"第二信使"cAMP。一般认为在高等生物中 cAMP 只通过活化蛋白激酶，将 ATP 分子 γ-磷酰基转移到各蛋白底物分子上。

蛋白激酶同工酶

在哺乳动物细胞的胞液中，至少有两种不同类型的依赖 cAMP 的蛋白激酶，其相对比例随种族及组织而异。Ⅰ型和Ⅱ型两种同工酶都是四聚体蛋白，cAMP 通过将无活性的全酶解聚成为 cAMP 连结的二聚调节亚基(R_2)和 2 个催化亚基(2C)，使它们活化

$$R_2C_2 + 2cAMP \rightleftharpoons R_2(cAMP)_2 + 2C$$

(无活性)　　(有活性)

两种同工酶的催化亚基具有非常相似的分子量(约40,000)、氨基酸组成和底物专一性；可是，调节亚基分子量却明显不同，Ⅰ型为49,000，Ⅱ型为56,000。由于调节亚基不同所引起的两种同工酶之间主要差异是其对 ATP的作用不同。在 ATP存在下，Ⅱ型酶可自动磷酸化，ATP可提高此酶对 cAMP的敏感性。催化亚基从 ATP分子内将一个磷酰基转移至二聚调节亚基(R_2)的每个多肽分子上。此型同工酶的解聚或活化需要的 cAMP 浓度较低，在 cAMP 除去后，亚基间的重新聚合很慢。

另一方面，Ⅰ型蛋白激酶不受自动磷酸化调节，它系通过另一种机制（虽然也牵涉到 ATP）来改变其对cAMP的敏感性，其效应与Ⅱ型蛋白激酶自动磷酸化的效应相反。未解聚的蛋白激酶Ⅰ以极高的亲和力与 2 分子ATP相连结，ATP可降低该酶对cAMP的亲和力，故需高浓度的第二信使才能使此蛋白激酶解聚和活化。并且，在缺cAMP时，ATP 尚能促进酶的重新聚合。在生理条件下，当细胞内 ATP浓度相当高时，要使激酶活化，cAMP 浓度就需上升到微克分子水平；然而，在体外条件下，ATP 缺乏时，cAMP 浓度达到毫微克分子水平时，就足以使激酶解聚。

蛋白激酶Ⅰ的配体部位

在生理条件下，蛋白激酶Ⅰ活化的平衡方程是：

$$R_2C_2(ATP)_2 + 2cAMP \rightleftharpoons R_2(cAMP)_2 + 2C(ATP)$$

cAMP牢固地连结于R_2亚基，促进酶的解聚。ATP 与未解聚的激酶以及游离的催化亚基皆可作用。当ATP连结于游离的催化亚基时，ATP 是用于蛋白底物($K_m = 10\mu M$)的磷酸化反应；但ATP如连结于未解聚的全酶时，则ATP不被水解。因为未解聚的酶蛋白和ATP的亲和力高

(K_d=50～100μM)，所以高浓度ATP使平衡趋向无活性形式。这样，ATP 作为一种效应剂，在生理条件下，当cAMP缺乏时，可使酶完全失活。

解聚的R_2和C都有各自的特殊配体连结部位。对在未解聚的R_2C_2分子上的ATP有高亲和力部位(ATP效应剂部位)，究竟是第三配体部位，还是原来在解聚亚基上的部位转化而生成的呢？通过cAMP的连结控制蛋白激酶的解聚从而调节磷酸转移酶活性的机制，有助于回答这个问题。

对三个配体部位的本质进行比较将会搞清楚R_2C_2分子上的ATP效应剂部位究竟是与C亚基上ATP部位有关，还是与R亚基上cAMP 部位有关，还是与两者均无关。当配体的特异化学结构改变(如引进烷基或用硫原子取代氧)引起配体亲和力产生类似改变(通常是减少)时，使用不同的配体类似物，就能确定这些部位是相同的还是相似的。同一技术也可用于比较与有关配体作用的部位，如 cAMP(R_2)部位和ATP(R_2C_2)部位。因为这些配体一般都有腺嘌呤部分。

用一系列核苷酸类似物作为配体，所获结果列于图1。

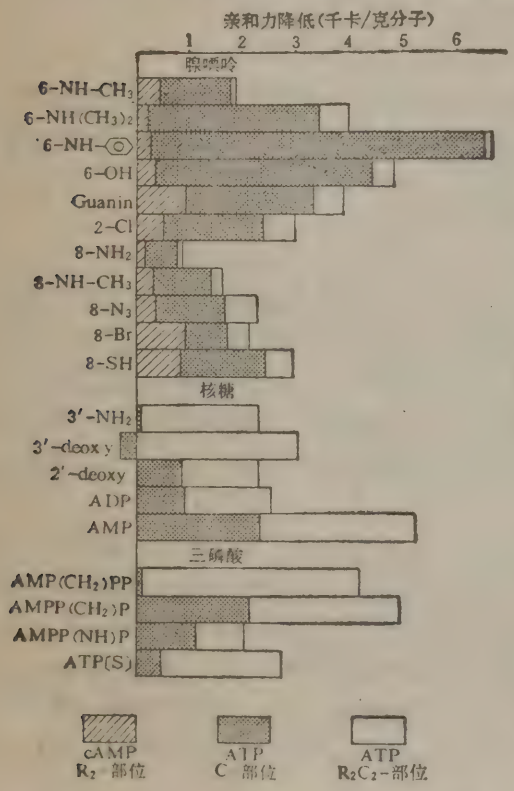

图1 用核苷酸类似物作配体所绘制的核蛋白激酶 I 上的配体部位图

在图 1 中，天然配体(ATP 或 cAMP)的化学修饰，通常降低对配体的亲和力。柱长表示亲和力降低的千卡 / 克分子数。 cAMP 和 ATP 对 R_2C_2 的连结是通过与 ^3H 标记的天然配体的竞争性结合用过滤技术进行测定的。通过测定游离催化亚基的磷酸转移酶活性，从竞争性酶动力学数据 (K_i 值) 中求得 ATP 类似物与 C 亚基的作用。

图 1 资料表示不同部位对化学结构改变的配体所引起的千卡/克分子减低。对蛋白激酶 I 的三个核苷酸部位的本质可作如下结论：(i) R_2 上 cAMP 部位与 R_2C_2 上的 ATP 部位比较，有很大差异，尤其在改变腺嘌呤的 6- 氨基时，差异更大，说明 R_2C_2 上 ATP 结合部位不是由 R_2 上的 cAMP 结合部位生成的。 cAMP 和 ATP 对 R_2C_2 无竞争性结合，支持这种论点；(ii)R_2C_2 上 ATP 部位与 C 亚基上的 ATP 部位相比，当配体的腺嘌呤部分改变时，其亲和性变化的差异很小，这说明 R_2C_2 和 C 上的 ATP 结合部位对其核苷酸碱基的亲和性是非常相似的；但是，对 ATP 的核糖和三磷酸部分则显然不同。

放射性8-叠氮-ATP的光亲和标记直接显示，亚基与ATP的腺嘌呤部分连结。光照射后，这种类似物与 R_2C_2 上的ATP 部位连结，且是共价连结，解聚的亚基的SDS- 凝胶电泳表明，ATP类似物仅结合在催化亚基上，并且光亲和标记后，cAMP使 R_2C_2 解聚可显示出磷酸转移酶活性丧失，其程度与连结到R_2C_2上的ATP类似物的量相平行。

ATP底物部位转化成高亲和力连结部位时，R_2C_2的磷酸转移酶活性被阻止。

实验资料证实了这种概念，即R_2C_2上高亲和力ATP部位，是由游离的催化亚基上的ATP底物部位生成的。这种转化作用保留了腺嘌呤部位未变，但改变了核糖和三磷酸结合部位。此变化可能是由于C与R聚合而诱导C亚基构象改变而引起的，或是如图2所示，是由于ATP直接连结到R亚基上所致。这里R_2C_2上ATP部位定位于R-C界面上，R能有区别地、较强地与ATP的核糖三磷酸部分结合。三磷酸部分的特异连结可抑制R_2C_2上磷酸转移酶的活性，或许是阻止了三磷酸部分接到C亚基的催化中心上。

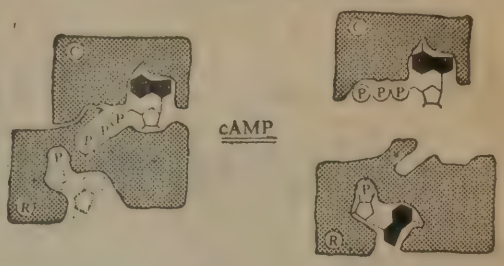

图2　蛋白激酶Ⅰ激活的可能机制

在图2中，活细胞的高浓度cAMP引起全酶R_2C_2解聚和活化(右图)：cAMP以高亲和力与R亚基连结，C亚基将ATP分子上的γ-磷酸基转移到其蛋白底物分子上。降低cAMP浓度，解聚的亚基重新聚合成无活性的R_2C_2全酶(左图)，通过这种聚合，在C亚基上ATP底物部位转变成高亲和力ATP连结部位。ATP的腺嘌呤部分连结于C亚基上，而核糖和三磷酸部分则连结在R亚基上。磷酸转移酶活性的抑制系通过ATP部位的转化作用而直接引起的。另一方面，游离的R_2中高亲和力的cAMP部位，通过酶的聚合而转化成低亲和力cAMP连结部位。R上的星是代表蛋白激酶Ⅱ的磷酸化部位。R_{II}的磷酸化作用促进了激酶Ⅱ的解聚，并抑制了连结在$(R_{II})_2C_2$的高亲和力ATP部位。这个概念的细节是理论推测，连结在R_2C_2部位上高亲和力的腺嘌呤亚位是位于催化亚基上的，这点已被证实。但却未证实R_I上有这种结合部位。在R_{II}上的自动磷酸化部位的位置也是理论推测的，然后，未解聚的全酶发生自动磷酸化时，其部位看来位于两亚基之间。

近来，对于调节亚基如何抑制催化亚基的细节有进一步发现。蛋白激酶Ⅰ和Ⅱ的多肽底物必须在磷酸化的丝氨酸附近有精氨酸。R亚基与同工酶ⅠC亚基连结时，或热稳定性抑制酶时，精氨酸可参与其盐桥的形成，因为用特殊试剂封闭精氨酸则阻止连结，使催化活性受抑制。对同工酶Ⅱ来说，自动磷酸化是一种分子内反应。所有这些结果提示了一个亚基图像：其中调节亚基会妨碍催化亚基的底物结合部位。因此，有理由假定C_2R_2上的ATP连结部位定位于亚基界面附近。

虽然还需进一步研究其细节，但是，现有的观测结果与图2的描述是一致的。这说明蛋白激酶Ⅰ是一种具有独特性质的变构蛋白：酶与底物ATP的牢固连结可导致酶的抑制，而ATP又可成为解除cAMP的活化作用的效应剂。此过程包括C亚基上ATP底物部位转化成R_2C_2上高亲和力连结部位，R很可能参与此部位。

配体连结如何影响酶的解聚和活化

cAMP使蛋白激酶解聚而释出催化亚基，活化该酶，可能有两种途径。如图3所示，其区别在于(a) cAMP仅仅连结于游离的二聚体调节亚基(R_2)，或(b)cAMP连结于全酶R_2C_2而形成中间复合物R_2C_2(cAMP)，用cAMP自旋标记的衍生物进行ESR（电子自旋共振）测定，已得到这一中间产物。cAMP结合到果蝇胚胎蛋白激酶的速率数据，也进一步证实了(b)通路。

图3中，当cAMP与游离亚基R_2相连的亲和力比全酶R_2C_2相连的亲和力高时，cAMP促进

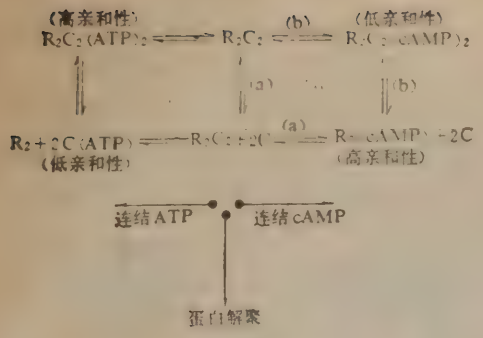

图3 配体连结和蛋白激酶Ⅰ解聚的相互依赖的简单说明

全酶解聚(活化)。当ATP与全酶R_2C_2相连的亲和力比与游离亚基C相连的亲和力高时，ATP促进解聚的亚基重新聚合(解除cAMP活化作用)，

图3中所描述的配体(cAMP和ATP)的结合和解聚-聚合偶联的平衡，可由实验和计算机计算所证明，但实验及计算的细节超过本文范围，所以仅将此工作的总结果归纳如下：(i) 2分子cAMP的连结为正协同过程。(ii) 2分子ATP连结为非协同方式。(iii) 2个C亚基与R_2聚合也是正协同过程。后一结论是由于配体(ATP和cAMP)连结曲线与近似模式的计算曲线相符合而得出的。虽然是间接的，但却是调节酶中协同蛋白相互作用的良好证据。

配体结合曲线的形状反映了两种性质：即近似配体亲和力和当有一个以上配体部位时的近似结合协同性。因为蛋白本身解聚，所以曲线的形状也决定于酶浓度。在酶浓度衡定时，实验曲线和模拟曲线都决定于蛋白解聚常数。

提高离子强度可促进蛋白解聚，ATP能牢固地连结于未解聚的R_2C_2并使之稳定，因此，会降低蛋白解聚。cAMP与之牢固结合，对解聚的亚基R_2有正协同作用。故当反应条件有利于蛋白解聚时(高离子强度，低酶浓度，ATP缺乏)，cAMP结合曲线显示高度正协同。当蛋白聚合牢固时(低离子强度，高酶浓度和ATP存在)，cAMP连结曲线为非协同性，甚至为负协同效应。此情况定量地列于表1。表1还说明近似结合亲和力的相关变化。

表1 cAMP连结的近似参数如何取决于蛋白内部解聚常数

蛋白解聚常数 (K_d)	近似结合亲和性	近似结合协同性
小	低	负协同
中等	中等	非协同
大	高	正协同

以上所提到的关于cAMP在蛋白激酶Ⅰ和Ⅱ分子中连结的差异，用蛋白解聚常数的不同易于说明。显然蛋白激酶Ⅱ的蛋白亚基间相互作用要比导致蛋白解聚常数低的蛋白激酶Ⅰ的强，这说明为什么cAMP连结到激酶Ⅱ要比连结到激酶Ⅰ差，也说明为什么与激酶Ⅱ的连结出现负协同效应，而与激酶Ⅰ则为正协同。有证据证明自动磷酸化可促进蛋白解聚，因此，激酶Ⅱ磷酸化会导致较牢固地连结cAMP，并使负协同连结变为非协同连结。

如表2所示，ATP与R_2C_2的连结也依赖于蛋白浓度和蛋白解聚常数(受离子强度影响)。但是，这种依赖性和cAMP连结是不同的。在有利蛋白聚合的条件下(高酶浓度和低离子强度)，当ATP与R_2C_2有力地、非协同性地作用时，其连结曲线是线性的(Scatchard作图为非协同性)。但在增高离子强度而促进蛋白解聚时，则变成正协同效应。这种效应是通过蛋白聚合时的正协同效应而产生的。

两种类似的依赖cAMP的蛋白激酶同时存在有其生理作用问题。两类同工酶之间的差异在

(下转第53页)

革兰氏阴性细菌外膜蛋白质的生物合成和功能

J. M. DiRienzo等

展望与摘要

和真核细胞一样，革兰氏阴性菌是由一层其内分散着蛋白质的脂双层所组成的质膜（或称细胞质膜）包围着。这种膜可用著名的流动镶嵌模型予以描述。细菌细胞质膜恢有主动运输、氧化磷酸化以及某些大分子生物合成的系统。但是，革兰氏阴性菌在细胞质膜的外表面还有一层膜，它的形态类似于细胞质膜，但含有较少的磷脂、少数几种蛋白质和一种独特的碳水化合物——脂多糖(lipopolysaccharide 缩写为 LPS)。外膜(outer membrane)的机能是完全不同的：它对各种化合物（如抗菌素）起着扩散壁障的作用；它含有噬菌体和大肠杆菌素受体；它参与细胞结合和分裂(更精确地说是隔膜的形成)过程；它含有各种对营养物(如铁、维生素和碳水化合物)特异的摄入系统；它还含有非特异性的被动扩散孔，以容许低分子量底物的扩散。外膜对居留于胞外质区(periplasmic region，即在细胞质膜与外膜之间的区域）的某些水解酶类和结合蛋白质类提供了一种起保护作用的包裹物。它还和肽聚糖（peptidoglycan）一起参与维持细胞结构的完整性。

如上所述，外膜含有变化不大的蛋白质。但是这些蛋白质似乎给予外膜许多上述功能，因此对外膜蛋白的探究是理解外膜功能的关键。又因为这种蛋白成分的种类不多而又大量地存在着，因此容易分离，亦利于对外膜蛋白进行特性描述。所以，外膜对研究膜蛋白合成机制、分子穿越生物膜的移位等提供了一种优良的系统。可以期望，这些类型的研究将导致确定膜分化过程的理解。

由于这类蛋白质在六十年代末和七十年代初就已完成分离和鉴定，从而使外膜蛋白在生物合成方面取得很大进展，今天有关外膜蛋白生物合成所具深远意义的图景已经形成。最近发现，脂蛋白和另一些主要的外膜蛋白系由一种氨基末端附加有约 20 个氨基酸肽段的前体蛋白质所组成。这类延伸肽类(extension peptides)是非常疏水的，因此对细胞质膜有高度的亲和力。这种性质暗示延伸肽类在结合于细胞质膜的那些多核糖体中——它特异地合成外膜蛋白和胞外质蛋白质(periplasmic protein)——以及在这类蛋白穿越细胞质膜的移位中是决定因子。外膜和胞外质蛋白的生物合成机制和移位作用看来似乎非常类似于真核系统中分泌蛋白类的作用。

在外膜蛋白的研究中另一项迷人而又重要的方面是脂蛋白 mRNA 的分离和特性描述。迄今仅从 *E. coli* 中分离出有生物活性的 mRNA，它的部分核苷酸顺序已经确定，而且该顺序也证实在脂蛋白前体中存在着一种延伸肽段。

本文评述了有关 *E. coli* 和 *Salmonella typhimurium* 外膜蛋白现已积累的知识。我们讨论了外膜蛋白生物合成、它们的分子特征及其与外膜中其它成份的相互作用。已经知道，肽聚糖和脂多糖是和某些外膜蛋白紧密地连在一起的，因此认识这些大分子的结构与功能将是

重要的。

外膜的一般特征

电子显微镜早期的研究揭示，革兰氏阴性菌的细胞被膜系由两种不同的膜——内部的细胞质膜(或称质膜)和外膜所组成。在超薄切片中证明这两种膜都显双轨 (double-track) 或双层状。肽聚糖层位于这两种膜之间。细胞质膜与外膜之间的这一区域称为胞外质区(periplasmic region)。细胞质膜与外膜厚度分别为 75Å 和 100Å。冰冻蚀刻研究也揭示革兰氏阴性菌细胞被膜中存在着多层结构。

Miura 和Mizushima 用蔗糖密度梯度离心法首先成功地分离出 *E. coli* 的细胞质膜与外膜。Osborn 及其同事扩大了前述研究，用一种等密度蔗糖密度梯度离心法从 *S. typhimurium* 中分离出这两种膜。用 EDTA-溶菌酶制得的球状体经超声振荡破碎，自 30～50% 蔗糖梯度范围一步离心即得粗的被膜分部。最近曾用此法分离制备了 *E. coli* 的细胞质膜和外膜。

根据不同膜在去污剂中的溶解度而发展起另一种提纯方法。非离子型去污剂——三通X-100 是一种细胞质膜增溶剂(solubilizer)，这种去污剂和 Mg^{++} 结合，能成功地用来除去外膜粗制剂中被污染的细胞质膜。曾发现十二烷基肌氨酸钠能完全地增溶细胞质膜而不能增溶外膜。为了确定类脂的分布，一种包括粒子电泳在内的方法也曾用作两种膜的分离。

细胞质膜与外膜的有效分离使得有可能研究各种膜的特性。*S. typhimurium* 外膜的电子显微镜揭露了一种大小均一、直径为 0.1 毫微米的封闭着的双轨膜囊泡的超结构。当外膜从含有盐的全膜制剂中分离出来时，它们展开成开放的 C 状螺圈结构。如同细胞质膜那样，外膜由磷脂和蛋白质所组成，但是除了这两种成份外，外膜还含有脂多糖 (LPS)。每个 *S. typhimurium* 细胞约有 2.5×10^6 个脂多糖分子，而且它们在外膜上占据着特定位置。事实上，由于脂多糖多糖链的存在，使外膜的密度较大于细胞质膜，因此用蔗糖密度梯度离心能把它们分离开来。脂多糖约占外膜表面的 45%。在脂双层外层中脂多糖分子的类脂 A 部分替代了磷脂部分，多糖链伸向细胞外侧。彼此紧密连在一起的脂多糖分子可由二价阳离子 (主要是 Mg^{++})使之稳定，磷脂几乎只集中在外膜双层的内层。在 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 中，外膜的组分主要由磷脂酰己醇胺、磷脂酰甘油和心磷脂组成。外膜的其余组成部分是蛋白质，也即是本文所留下的论题。

外膜蛋白质

主要蛋白的名称

1970 年，Schnaitman 报道，*E. coli* 外膜是由一种分子量为 44,000 的 "主要外膜蛋白" 组成，其量约占蛋白总量的 70%。但是 Inouye 和 Yee 证明由于膜蛋白异常的特性，这种"主要蜂"是一种矫作物，并指出此蜂实际上是由几种不同的蛋白质组成。现已确定，Schnaitman 氏的"主要外膜蛋白"至少由四种不同的蛋白成分所组成，但是研究者对这些蛋白质采用了不同的命名系统(表 1)。

除了这些高分子量的主要外膜蛋白外还存在着另一些称为脂蛋白的主要蛋白质。根据分子数目，这些蛋白质被认为是 *E. coli* 细胞中最多的蛋白质。但是在早期大多数作者忽视了

表 1　研究者所述 *E. coli* K-12 外膜主要蛋白的名称的比较

	Inouye	Bragg	Schnaitnan	Henning	Mizushima	Lugtenberg	依同一标准命名[a]
基质蛋白 Ia	峰4	A_1, A_2	1 Ia	I Ia	0—9	b	PG1-2
基质蛋白 Ib			1 Ib	Ib	0—8	c	PG1-3
蛋白2[b]	—	—	2	—	—	—	PG1-1
Tol G蛋白	峰7	B	3a	I*	0—10	d	HM1-2
蛋白3b	(峰6)[c]	nd[d]	3b	nd[d]	(0—11)	a	HM1-1
脂蛋白	峰11	F	nd[d]	V	0—18	nd[d]	

(a) 系1977年9月在 Tübingen 会上提出的，PG 和HM 分别代表连有肽聚糖的蛋白质和热变更蛋白质 (heat-modifiable Protein)。

(b) 蛋白 2 仅存在于对噬菌体 PA-2 有溶原作用的菌株中。

(c) 括弧内蛋白带名称表示该蛋白和另一些研究者所述这种蛋白的关系尚未很好规定(见正文)。

(d) 表示没有检出。

E. coli 和 *S. typhimurium* 中脂蛋白的存在，甚至还证明它们缺少脂蛋白。这种错误主要是使用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶系统的结果，这种系统不能分辨较小分子量的蛋白质。

E. coli K-12 外膜的主要蛋白质所采用的名称总结于表 1 。本文所用"基质蛋白 Ia和 Ib"是指那些和肽聚糖紧密结合的蛋白质；"tol G 蛋白"是指热变更蛋白质，即在 *tol* G 突变株中缺失了对胰蛋白酶敏感的蛋白质；"脂蛋白"是指分子量最小的那种膜蛋白质。

外膜的"蛋白 3b"还没有经过很好的特征描述。Schnaitman 指出，他用 Bragg 和 Hou 氏含碱 SDS 凝胶系统分辨出来的带 3，是由 3a 和 3b 两种不同蛋白质所组成。这些蛋白质曾在 DEAE-离子交换柱上得到分离，并产生了不同的溴化氰片断。蛋白 3a 与 tol G 蛋白相同。至于 Mizushima 小组的蛋白 0—10 和 0—11 可以用高交联度凝胶——脲-SDS 凝胶系统分离开来，但不能被 Bragg 和 Hou 的含碱 SDS 凝胶系统分离。蛋白 0—10 和 tol G 蛋白等同，因为这种蛋白会热变更且对胰蛋白酶敏感。蛋白质 0—11 可能和蛋白 3b 相同，与蛋白 0—10 对照，蛋白 0—11 是抗蛋白水解酶的，而且在 EDTA 处理时能从它和脂多糖缔合着的细胞中释放出来一种较大的部分。Bassford 等人最近证明 Lugtenberg 等人的带 a 即是蛋白 3b。这就使人怀疑 Brags和 Hou 的带 B 和 Henning小组的带 II*是否由单一的多肽所组成，因为看到 3a和 3b 在使用 SDS 凝胶系统时迁移为单一的带。但是近来，Henning等人证实了他们的带 II* 蛋白质的异质性。另方面，当细胞在低温情况下生长时已知蛋白 3b 的量会大大减少，就如Henning 等人所采用的那样，此时这些作者就不能检出它来。大概，Inouye 和 Yee 的峰 6 相当于蛋白 3b，因为峰 6 是主要的外膜蛋白之一，它不同于基质蛋白，是抗蛋白水解酶的。峰 6 曾被称为 Y 蛋白，并认为它的制造与 DNA 合成有关。

主要外膜蛋白的分辨率和迁移顺序主要取决于所用 SDS 凝胶系统的具体情况，如象丙烯酰胺的浓度、交联度、缓冲液的 pH、离子强度、电流和电压，以及样品在这种方法中的增溶情况。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对膜蛋白的分析是一种非常有用的技术，但在推断这些蛋白带是否单一时需要慎重，因为某些带有异常电荷或构型的蛋白质以及某些糖蛋白的迁移率很不规则。而且，外膜蛋白的组成和数量可能很大，这取决于所用菌株和培养条件。*E. coli* B 菌株仅有基质蛋白 Ia，K-12 菌株既有 Ia 而又有 Ib，而另一些 *E. coli* 菌株有着类似于K-12 菌株的那两种和肽聚糖紧紧连结的蛋白质，但是，在电泳迁移率上它们却又不同于 K-12 菌株的这两种蛋白。不论是 tol G 蛋白还是蛋白 3b 都可在一种 *E. coli* 变株中找到。培养条

件——尤其是生长介质的组分——也明显影响两种基质蛋白 Ia 和 Ib 的相对量，就如下面将要谈到的那样。

基质蛋白

基质蛋白的特征是它们紧紧地(但不是共价结合)和肽聚糖连在一起。它们的组分和电泳迁移率的改变取决于原始菌株，而且用 Rosenbusch 所述的方法能很容易地把它们分离出来。当整个细胞被膜在 60°C、2%SDS 中增溶时，这些蛋白质可在不溶物中找到，此时它们是一种肽聚糖复合物，而且和脂蛋白结合着。这种复合物无论在 SDS 中于 100°C下加热 5 分钟，还是用含有 0.5*M* NaCl 的 SDS 于 37°C下提取，都能从肽聚糖中释放出基质蛋白。显然，前一种方法会引起蛋白质变性，而后一种方法却不会。两种基质蛋白——K-12 菌株的 Ia 和 Ib——既可从生长在不同条件下的培养物中各自分离出来[51]，也可从缺少这两种蛋白质中的任一种之突变株中分离出来。

Rosenbusch 曾把菌株 B 的基质蛋白 Ia 提纯为均质的蛋白。由几种不同方法测得的它们的分子量是 36,500；似乎是一种有着 336 个氨基酸残基的单一多肽；它似乎没有任何非蛋白质的半分子。氨基酸组成分析表明，它仅有中等程度的疏水性和极性指数，根据 Capaldi 和 Vanderkooi的计算为 45%。这种蛋白质的等电点约是 6。在 N-末端最前面的 8 个残基的顺序测定为：

$$NH_2\text{-Ala-X-Tyr-Tyr-Asx-His-Lys-Glx-}$$

K-12 菌株的基质蛋白 Ia 和 Ib 之间，或者这类蛋白和其它蛋白种类之间的化学关系还不了解。这些蛋白质具有种种性能，它们仅在专一的条件下，例如含有 8*M* 脲的圆盘凝胶系统或者按 Laemmli 法的平板凝胶系统所用的那种条件下，才能在 SDS 凝胶系统中分离开来。Schmitges 和 Henning 比较了这两种蛋白质的溴化氰片断，在 6 个片断中仅有一个在电泳迁移率上显出差异。因为这一片断和该蛋白质的 C-末端或 N-末端区不符，所以排除了该多肽末端部分是经加工处理而被移去的可能性。基质蛋白 Ia 和 Ib 基本上是同种多肽的说法得到溴化氰片断分析、胰蛋白酶降解的酶解图谱技术、以及 N-末端氨基酸顺序分析的进一步支持。从它们在电聚焦上和在 QAE-Sephadex 柱上所看到的行为推断，基质蛋白 Ib 比 Ia 更酸，并且这些蛋白可以因氨基酸残基的变更而不同。

基质蛋白 Ia 和 Ib 的相对量依生长条件，尤其是生长介质的组分，而有很大的不同。细菌在没有发酵碳源的肉汤或酵母汁上生长时，其所含蛋白 Ib 的含量随蛋白 Ia 量之增加而减少。相反，生长在增补有发酵性碳源，如葡萄糖和乳酸盐以及多少加一些甘油的复合培养基上的细胞则蛋白 Ia 量随蛋白 Ib 之增大而下降。当生长培养基增补有 NaCl 时，蛋白 Ia 量也和蛋白 Ib 成比例地减少。NaCl 的这种影响可能是由于介质的渗透性所引起，因为加入 300m*M* NaCl 或 KCl，或 600n*M* 蔗糖到酵母汁中几乎得到同样的影响。这些变更的生理学作用，以及是谁调节基质蛋白质总量的机制还不知道。

基质蛋白 Ia 和 Ib 的一个最明显的特征是它们有非常高含量的 β-结构。这和其它许多显出高含量 α-螺旋的"内在"膜蛋白大不相同。天然外膜所发现的高含量 β-结构可以归因于这些蛋白和 tol G 蛋白的存在。Nakamura 和 Mizushima 指出，K-12 菌株中基质蛋白 Ia 和 Ib 的 β-结构在 SDS 溶液中是稳定的，如果不把它们加热的话。但在 SDS 溶液中于 70°C以上的温度下加热时就发生明显的构型变化。加热样品的圆二色散光谱和在许多 SDS-蛋白复合物上所看到的光谱类似。Rosenbusch 指出，菌株 B 的蛋白 Ia 不能和 SDS 结合，除非加热到 100°C。

在SDS中的这种稳定性并非是基质蛋白质独有的性质，其它几种外膜蛋白，如tol G蛋白、磷脂酶A_1以及ton A蛋白，它们在SDS溶液中除非加热，否则它们也是稳定的。

基质蛋白Ia和Ib仅在70°C以上加热了的SDS溶液中，才以单体类型在SDS凝胶上迁移。这些蛋白质的低聚态存在于没有肽聚糖的未经加热的SDS溶液中，就如同在活体中那样。当该蛋白质-肽聚糖复合物在SDS溶液中加热到70°C以上时，基质蛋白可以从肽聚糖中释放出来。这些结果表明，加热70°C以上基质蛋白构型明显变化，从而引起了低聚物分解为亚单位，自肽聚糖释放出蛋白质。但是，当加入并不引起构型变化的0.5*M* NaCl时，基质蛋白也能从肽聚糖中释放出来，这暗示基质蛋白与肽聚糖是因离子间的相互作用而结合在一起的。

活体内基质蛋白和肽聚糖相互作用是没有疑问的。Mizushima及其同事指出，活体外基质蛋白在SDS溶液中可以特异地结合于肽聚糖。在5m*M* Mg^{++}存在下pH8最适于结合，而高浓度NaCl则抑制结合。热变性了的蛋白质丧失了它们的结合能力。曾有人证明，肽聚糖的D-二氨基庚二酸残基对其结合于基质蛋白起着重要的作用。Yu和Mizushima指出，脂多糖刺激基质蛋白Ia和Ib与肽聚糖结合。用提纯了的基质蛋白使噬菌体失活的作用也因脂多糖的存在而被促进，这证明了活体内基质蛋白和脂多糖的相互作用。基质蛋白也和另一种主要蛋白，即下一节所要讨论的脂蛋白紧密地结合着。

染色阴性的基质蛋白-肽聚糖复合物的电子显微图显示出基质蛋白分子排列成以7.7毫微米重复的六角形晶格层，每个细胞约有1.1×10^5个基质蛋白分子，六角形晶格结构覆盖着肽聚糖外表面的60%或更多。最可能的是每三个蛋白质分子成为一单位。从缺失肽聚糖层的、由溶菌酶处理所得原生质球状体制得的蛋白质层也观察到几乎相同的超级构。这表明，在保持蛋白质六角形排列中蛋白质-蛋白质之间的作用是一种主要的力。这种六角形小室单元最显著的特征是一种能让染料容易渗入、直径为2毫微米的三个一组的凹穴。基质蛋白贯穿外膜厚度的这一概念也被下列证据所支持，即这些蛋白质担负着噬菌体受体的作用。近来，Kamio和Nikaido根据使用非渗透性标记物——CNBr活化了的葡聚糖更明确地指出基质蛋白露于外膜的外表面。

Nakae指出，把*S. typhimurium*和*E. coli* B的基质蛋白渗入到人造的脂多糖-磷脂囊泡中能大大提高它们对蔗糖的渗透性。用基质蛋白重组的囊泡表明它具有几乎与完整外膜同样的分子筛性质，排阻具有分子量高于900的寡糖和多糖。这些结果表明基质蛋白的一种功能是形成被动扩散孔，容许亲水的小分子量分子迅速扩散通过外膜。对缺乏基质蛋白的突变株的分析进一步支持了这种结论。如象*S. typhimurium*的这种突变株在β-丙酰胺抗菌素——孢头利定穿越外膜的扩散中是有缺陷的。筛选出来的能特异地抗Cu^{++}的*E. coli* B变株缺乏基质蛋白，这些突变株细胞显示出利用几种低分子量代谢物——如低浓度的糖和氨基酸——的能力大大下降。正如Von Meyenburg所述，底物(如糖、氨基酸、尿嘧啶和无机阴离子)摄入亲和力下降了的"多效性运载突变株"(pleiotropic transport mutans)，也发现没有基质蛋白。基于这些性质这种蛋白称为"Porin"(现译作"微孔蛋白"，因为Pore有微孔之意，而该蛋白又具被动通路——微孔之性质——译者)。

Schnaitman所述蛋白2是在被λ-噬菌体PA-2(它利用基质蛋白Ib作为受体)溶原了的*E. coli* K-12菌株中发现的。在这种溶原了的菌株中基质蛋白量大大减少。蛋白2所显示的性质类似于基质蛋白，例如有类似的分子量，和肽聚糖牢固地结合等。而且，在缺失基质蛋白Ia和Ib的*omp* B突变株上恢复了*omp* B亲株所失去的对大肠杆菌素E2和E3的敏感性。

这些结果表明，蛋白 2 和基质蛋白有密切的关系。但是，从它的氨基酸组分分析、溴化氰和胰蛋白酶酶解片断分析、以及免疫化学分析推断，蛋白 2 是和基质蛋白全然不同的多肽。曾认为，蛋白 2 可以为一种原噬菌体基因（prophage gene）译码，并对超感染噬菌体（Superinfecting phage)产生表面排阻。如果情况属实，那末什么是蛋白 2 和基质蛋白之间同源的分子基础呢？生长培养基组分的变化如何相应地调节蛋白 2 的量呢？如前所述，这样的变化也调节基质蛋白 Ia 和 Ib 的相对量。

tol G 蛋白

在 SDS 凝胶上，tol G 蛋白可以根据下列两项特征把它从其它主要外膜蛋白中分辨出来：(a)当整个被膜或外膜用胰蛋白酶或链霉蛋白酶消化时，在外膜主要蛋白质中只有这种蛋白质被消化而在膜内剩下一种更小的多肽。(b) tol G 蛋白在 SDS 凝胶上显出不规则的“热变更”（“heat-modifiability”）。当膜在 50°C以上的 SDS 溶液中时其分子量增大。在加热下基质蛋白也改变它的迁移率，但在这种情况下其表观分子量在加热下减小。所报道的 tol G 蛋白之表观分子量各不相同：在加热下，表观分子量自 27,000 增到 36,000；38,000 增大到 48,000；或自 28,500 增大到 33,000。这些矛盾最可能是由于采用了不同的 SDS 凝胶系统所致。

无论是热变更型还是非热变更型 tol G 蛋白都曾经提纯过。氨基酸组成分析表明，它仅具中等程度的疏水性（Capaldi 和 Vanderkoov 从 Garten 等人所报告的氨基酸组成中计算的极性指数是 43%）。假如一克分子这种蛋白质能得到两个磺基丙氨酸，那末最小化学式的分子量是 27,000。溴化氰片断的表观分子量总和也得到 27,000。这些结果增强了这样的可能性，即热变更型(不是非热变更型)在 SDS 凝胶上迁移率不规则。两个半胱氨酸残基似乎没有在链间形成二硫桥，因为用 β-巯基乙醇处理不能改变该蛋白质在 SDS 凝胶电泳上的迁移率。

有几位研究者曾研究过这种蛋白质的受热变更现象。Schnaitman 报道，加热下该 SDS-蛋白复合物内在的粘滞性增大。Reithmeier 和 Bragg 的结果证明，在热变更型中呈现出一种更加展开的结构。与基质蛋白相反，tol G 蛋白在和 SDS 结合时其热变作用并不随之增大，因此加热所显示的分子量增大与其说是由于增大了 SDS 的结合，倒不如说是由于增强了分子形状的不对称性。Nakamura 和 Mizushima 指出，该蛋白也具高含量的 β-结构。和基质蛋白一样，这种构型在 SDS 溶液中是稳定的，但加热到 50°C以上时便被破坏。

在用胰蛋白酶处理外膜的情况下，tol G 蛋白的一部分对蛋白水解酶消化敏感，这一事实证明该蛋白的一部分是露在膜的外表面的。这一点也为它可以供作某些噬菌体受体这一事实所支持。对缺失 tol G 蛋白的变株所作的分析也显示出它在 F-pilus 居间结合作用中具有重要的功能。这种缺失 tol G 蛋白的突变株由于缺乏配对结构(pair formation)因此在结合作用中作为受体是有缺陷的。提纯了的 tol G 蛋白抑制结合作用，并使噬菌体 K3 和 TuⅡ*失去活性。脂多糖的存在大大刺激了 Tol G 蛋白对噬菌体的钝化和接合之抑制，这暗示了 tol G 蛋白和脂多糖在体内的相互作用。

脂蛋白

1969 年，Braum 和 Rehn 报道了一种脂蛋白的存在，它共价键合于肽聚糖，分子量约为 7000。该蛋白的全部化学结构已由 Braum 及其同事所测定。这种脂蛋白系由 58 个氨基酸残基所组成，它缺少组氨酸、色氨酸、甘氨酸、脯氨酸和苯丙氨酸。其 C-末端赖氨酸的 ϵ-氨基键合于每个肽聚糖第十到第十二位内消旋-二氨基庚二酸残基的羧基上。该脂蛋白 N-末端部分由甘油基半胱氨酸[S-(丙烷-2′,3′-二烯)-3-硫氨基丙酸] 所组成，它由两个酯键连接于

脂肪酸，再由一个酰胺键和另一个脂肪酸连结。以酯键结合的脂肪酸类似于在磷脂中发现的脂肪酸，而酰胺键合之脂肪酸系由65%的软脂酸盐所组成，余下的主要是一元不饱和脂肪酸。

Inouye及其同事发现，脂蛋白也存在于*E. coli*膜中，但它没有共价键合于肽聚糖（即游离型替代了结合型），这是用SDS凝胶电泳分析*E. coli*膜分部得到的。主要峰之一，峰11，具有约为7500的最小分子量，且其组氨酸含量很低。只有当*E. coli*膜用溶菌酶处理后才在SDS凝胶上显示出结合型脂蛋白的一个新的峰。因为溶菌酶处理后2～3个肽聚糖亚单位还继续与脂蛋白结合，所以结合型脂蛋白在SDS凝胶上的迁移要比游离型稍慢些。峰11蛋白（即游离型）有着结合型脂蛋白完全相同的化学结构，除了不含有任何肽聚糖组分之外。由于对该蛋白质进行了氨基酸和脂肪酸组分分析、肽聚糖组分分析以及溴化氰肽断分析，上述这一点已经得到证明。

游离型和结合型脂蛋白几乎只存在于外膜中。每个细胞约有2.4×10^5个结合型分子，游离型更大一倍，即每个细胞有4.8×10^5个分子。游离型加结合型脂蛋白分子的总数达7.2×10^5，按数字计算这种脂蛋白在细胞中是最丰富的蛋白质了。

脂蛋白的氨基酸顺序显出有几项显著的特点。首先，它具有高度的重复性；在N-末端部分有三个几乎相同的邻接顺序；该多肽链的C-末端部分则是多变的区域，但是当把某种氨基酸插入该顺序的短缺处，它又显出了明显的相同性。据此推测脂蛋白基因最初可能是由15个氨基酸基因密码重复复制伸展出来的。第二，疏水氨基酸毫无例外地按3～4个可重复的疏水残基间隔排列成有规则的图形，致使3、6残基构成了一种有规则的向右旋转的α螺旋，而所有的疏水残基分两行排列在螺杆的一面。这一点和脂蛋白具有高含量α螺旋的事实是一致的。由于缺乏脯氨酸和甘氨酸残基，α螺旋结构上没有显出弯曲。这一模型也和具有高含量α螺旋的原肌球蛋白C-末端部分惊人地类似。

基于上述理由，Inouye提出了一种由脂蛋白组成的三维分子模型。在此模型中，一级顺序构成了α螺旋，六条这样的螺旋排列形成一种具有亲水内心和疏水外表的螺旋管集合体，这种集合体由邻接α螺旋之间七个离子键使之稳定。集合体高76Å，它横跨整整75Å厚的外膜，因此认为它担负着通过外膜的被动扩散微孔的任务。三个脂肪酸链沿螺旋脊连结于脂蛋白的N-末端，并与磷脂双层及集合体的疏水面相互作用。六个脂蛋白分子的外面两个共价键合于肽聚糖。Inouye小组广泛研究过纯游离型脂蛋白的构型，红外光谱指出它有一种α螺旋构型而没有证明其β-结构的存在。从圆二色散光谱来看，在0.01～0.03% SDS且有$10^{-5}M$ Mg^{++}存在的情况下，发现游离型脂蛋白α螺旋的含量高达88%。

Braun根据已知氨基酸顺序和结合型脂蛋白构型研究所作的计算，提出了一种完全不同的脂蛋白之结构模型。在这个模型中由25—29位氨基酸组成的β-搭扣把螺杆折为由5—24位和30—47位氨基酸组成的两部分。象这样排列的两段螺杆不论是由亲水作用还是由疏水作用，其分子内均是稳定的。三个脂肪酸残基自蛋白质半分子延伸并穿入外膜脂双层的内层，致使蛋白部分自外膜内表面伸出来。在这个模型中结合型脂蛋白起着把外膜和肽聚糖层连结起来作用，就如同"绞链"那样的作用。但是数量更多的游离型脂蛋白有何功能还不清楚。

Lee等人指出，用凝胶过滤法和荧光胺标记的赖氨酸残基的方法分析显示，在0.1%SDS溶液中游离型脂蛋白能在体外通过离子作用形成聚合物。当外膜和肽聚糖组成的细胞壁分部用交联试剂处理，游离型脂蛋白则形成一个二聚体，并很可能是三聚体。当*E. coli*突变株

(*lpp*-1) 的被膜分部——在该突变株被膜分部中脂蛋白具有一种额外的半胱氨酸残基——在氧化条件下分离并在没有 β-巯基乙醇的 SDS 凝胶电泳上分析时，脂蛋白在体内所形成的二聚体可被检出。这些结果表明，脂蛋白分子在体内能互相结合在一起。

游离型脂蛋白已被大规模提纯和类结晶，又在不被染色的制剂中用电子显微镜检查了它的超微结构。这种类晶呈针状，说明它具有高度有序的超微结构。4.7 毫微米厚的电子透明带具有重复距离为 22 毫微米的有规则的间隔。曾提出过类晶的基本单位是由若干脂蛋白分子所组成，这些脂蛋白分子以它们长为 2.3 毫微米的脂质碳氢链和它们长为 8.7 毫微米自类脂区伸出的蛋白质半分子并排地排列着。在这种基本单位中，脂蛋白分子可以如 Inouye所建议的那样装配成一种超螺旋结构，或者装配成一种简单的一圈圈的结构。

如果脂蛋白是如 Inouye 所建议的那样，露在外膜的外表面，那就不明白了。虽说至少在那些有着脂多糖结构缺陷的 *E. coli* 菌株中，脂蛋白似乎能和抗脂蛋白血清反应。这些结果暗示脂蛋白的一部分是露在外膜的表面的。

虽说脂蛋白的功能现在还没有了解清楚，但在缺乏这种蛋白的突变株中已看到了一些生理学和形态学上的缺陷(见下文)。

次要蛋白质

外膜中约存在有 10～20 种“次要蛋白质”。术语“次要蛋白质”可能误解，因为在某些生长条件下这类蛋白质中的量多如“主要蛋白质”。除了上述主要的外膜蛋白质之外，许多次要蛋白质已证实是噬菌体和大肠杆菌素的受体。它们中的大多数——未知受体功能的另一些蛋白质除外——现在已知具有对细胞生长必不可少的作用，例如通过外膜摄入营养物。另一些具有全然不同功能的次要蛋白质也被证明属于外膜蛋白质。表 2 所列的为迄今已验证过的外膜次要蛋白质。

表 2　*E. coli* 外膜的次要蛋白质

蛋白质	分子量[a]	功　能	受　体
83K	83,000	(被铁抑制)	—
feu B[b]	81,000	Fe^{+++}-enterochelin摄入	ColB
cit	80,500	Fe^{+++}-柠檬酸盐摄入	—
ton A[b]	78,000	Fe^{+++}-正铁铬摄入	T1, T5, ϕ80 Albomycin, ColM
cir[b]	74,000	(被铁抑制)	ColI, ColV
bfe[b]	60,000	维生素 B_{12} 摄入	BF23, ColE1 ColE2, ColE3
lam B[b]	55,000	麦芽糖摄入	λ
tsx[b]	27,000	核苷酸摄入	T6, ColK
蛋白 G	15,000	DNA 复制和细胞分裂	—
蛋白 D	80,000	同上	—
磷脂酶 A	29,000	?	—

(a) 这里所述分子量值多数是根据SDS-凝胶电泳测定的，此值依所用 SDS-凝胶系统而有变化。
(b) 这些蛋白质名称是根据它们的基因符号来称呼的，就如 Braum 所用的那样。

E. coli 摄入维生素 B_{12} 需要一种位于外膜的特异的受体，它和E型大肠杆菌素以及噬菌体 BF23 受体属同一种类。这些物质竞争同一结合位点。此受体已证实是一种具有分子量为 60,000 的外膜蛋白，它系由 *bfe* 基因编码的。提纯了的 bfe 蛋白能和大肠杆菌素 E3 结合，但丧失了对维生素 B_{12} 之亲和力。在三通 X-100 存在下补加脂多糖似乎能恢复结合维生素 B_{12}

之亲和力。通常，每个细胞有200～250个这样的受体，但是突变株细胞只具有1或2个却仍能对噬菌体BF23敏感，并能输送维生素B_{12}满足其生长的需要。

E. coli 由三种独立的高亲和力系统从介质中摄入铁离子，即：铁铬传递系统、enterochelin传递系统和柠檬酸传递系统。曾发现，抗噬菌体T5和T1的*ton* A变株，其摄入铁的铁铬系统受到损伤而enterochelin或柠檬酸传递系统未受损伤。几个竞争实验清楚地表明，正铁铬、albomycin、噬菌体T1、T5和ϕ80，以及大肠杆菌素M都共同享用同一种ton A蛋白作为受体。ton A蛋白分子量为78,000，其特性已有人描述过。已经知道，由于enterochelin阻止大肠杆菌素B之吸收作用从而保护了对大肠杆菌素B敏感的细胞之致死作用。而且，所有对大肠杆菌素B有耐药力的变株都特异地损伤了摄入铁的enterochelin传递系统。Hancock等人指出，对Fe^{+++}摄入的enterochelin传递系统有缺陷的*feu* B突变株不能吸收大肠杆菌素B，而且少了一种分子量为81,000的外膜蛋白。这些结果暗示，feu B蛋白是大肠杆菌素B和enterochelin的共同受体。生长在柠檬酸盐上的细胞能诱导出柠檬酸盐传递系统(citrate-mediated systems)。曾发现一种分子量为81,000的外膜蛋白能被柠檬酸盐诱导出来。因为其它高亲和力摄入铁的系统不能被柠檬酸盐诱导，故证明这种Cit蛋白是柠檬酸盐-铁复合物的受体。几个小组曾看到，*E. coli* K-12的这三种外膜蛋白之产生均被生长培养基中的铁所抑制。这些蛋白质中的两种被鉴定为feu B蛋白和大肠杆菌素I的受体蛋白(Cit蛋白)。Cit蛋白和第三种分子量为83,000的蛋白质是否有摄入铁的功能证据还不足。近来所报道的结果表明，在缺乏Cir蛋白的*Cir*变株中有正常的enterochelin摄入铁系统。提纯了的Cir蛋白和大肠杆菌素Ia生成了一种稳定的复合物，这种蛋白质在SDS凝胶上显示出一种热变更的迁移率。每个细胞约有2000～3000个大肠杆菌素I受体。噬菌体λ受体蛋白(lam B蛋白)的结构基因位于参与麦芽糖利用的*lam* B操纵子之内。lam B蛋白对麦芽糖的运转是必需的。*lam* B变株不能生长在以麦芽糖作为碳源且其浓度低于10μM的培养基上，又发现在麦芽糖运转中它是有缺陷的。当野生型细胞用提纯了的该受体蛋白之抗体处理，在低浓度时麦芽糖的运转大大减低。除了麦芽糖外，lamB蛋白也可以促进糖类，如葡萄糖和乳糖的扩散。

在抗噬菌体T6的突变株(*tsx*)中，失去了一种分子量约为25,000的外膜蛋白。这种变株也抗大肠杆菌素K，并显出对胸腺嘧啶、尿嘧啶、腺苷和脱氧腺苷的摄入降低了。

外膜蛋白质显然参与了DNA的复制和细胞分裂过程。James提出，分子量为15,000的蛋白G在协调DNA复制和细胞延伸中担任角色。Gudas等人报道，一种分子量为80,000的蛋白质在细胞一生的特定时刻，在DNA合成之前瞬间开始合成，而且它的合成受萘啶酮酸抑制。此外，在体外蛋白D优先地结合于DNA双螺旋中。这些结果暗示这种蛋白参与DNA起始。蛋白D也许和Portalier和Worcell所述的80,000道尔顿的蛋白质相同，在活体内它是光化学交联于DNA的两种蛋白质中的一种。但是据报道，后一种蛋白质位于细胞质膜中。

磷脂酶A是仅有的经很好地描述过特性的提纯了的外膜蛋白，也是迄今已知具有酶活性的外膜蛋白质。它可能参与磷脂的周转，但它在生理学上的作用还不知道。近来曾证明该酶参与EDTA裂解外膜的过程。

主要外膜蛋白质的生物合成

主要外膜蛋白质生物合成的研究已取得了重大进展。这种研究大多数是用*E. coli* 脂蛋白

来完成的，因为它的独特性质使允许用许多不同的手段来解决这个问题。

体内系统

外膜脂蛋白缺失了几种通常在细菌蛋白中找到过的一般氨基酸。当这些氨基酸中的一个不给细胞时，它还能合成这种蛋白质吗？在一项使用 *E. coli* 组氨酸营养缺陷型的研究中，在不给组氨酸1小时后，全部蛋白的合成中约有95%受抑制，但却产生了90%脂蛋白的正常成份。可见在此条件下制造的蛋白质仅是脂蛋白。这对研究体内单个外膜蛋白的生物合成提供了一种可靠的方法而无需使用缺一种或几种外膜蛋白质的突变株了。

在另一种可取的方法中，曾研究了六种特异性抗菌素对单个或整个主要外膜蛋白生物合成的影响。Hirashima 等人测定了春日霉素、四环素、氯霉素、稀疏霉素(Sparsomycin)、嘌呤霉素和利福霉素对蛋白质合成的影响。前五种是针对核糖体的抗菌素，而利福霉素抑制RNA的合成。在有或没有抗菌素的情况下，放射性氨基酸渗入到总的细胞被膜或分离出的外膜蛋白之比例差异被用作抗菌素抑制作用的量度。通常发现，对总的被膜蛋白之合成而言，嘌呤霉素、春日霉素和利福霉素比稀释霉素更加拮抗，而对氯霉素和四环素却非常敏感。在浓度分别为500，900，200，60，4和0.02微克/毫升时达到抑制(50%)。在用某些抗菌素的被膜蛋白中间可看到不同的抑制效应。当春日霉素浓度大大地影响基质蛋白、蛋白6和脂蛋白的生物合成时，tol G 蛋白的合成仅受到轻微的抑制。tol G 蛋白之合成比其它主要膜蛋白的合成更明显地不受氯霉素和稀疏霉素影响，而且脂蛋白对氯霉素也更敏感。虽说 tol G 蛋白也高度地抗嘌呤霉素，而脂蛋白合成在抗菌素300微克/毫升那么多的时候就完全拮抗了。

有关嘌呤霉素对脂蛋白合成的影响的更精确测定表明，在施于嘌呤霉素时，放射标记了的脂肪酸渗入到脂蛋白的量并未减少，而且即使不给组氨酸的细胞在嘌呤霉素处理时也合成了脂蛋白。当用 EDTA 或甲苯处理使细胞的渗透性增大时，脂蛋白的合成仍保持着比所有其它被膜蛋白更抗嘌呤霉素的性质。嘌呤霉素抗性也在无细胞聚核糖体系统中作了试验，它和具有抗脂蛋白血清的蛋白质制剂所作的免疫沉淀试验都证明，脂蛋白合成保持着拮抗抗菌素。这些结果表明，嘌呤霉素抗性是脂蛋白生物合成机构的一种内在特性。这种独特抗性的缘由至今尚不知道，虽然后面将讨论到可能的解释。

无细胞合成

脂蛋白特异的生物合成是使用分离了的聚核糖体和一种可溶性酶部来研究的。产物系用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和用抗脂蛋白血清免疫沉淀法来分析的。结果表明，脂蛋白是在小的聚核糖体上——可能是在3～4个核糖体范围内——有选择地合成的。

有一些时候，曾争论到是否有某种核糖体和 RNA 的区域化作用 (Compartmentalization)，也就是说，某些蛋白质，如外膜蛋白和胞外质酶类的生物合成是否在结合于细胞质膜的核糖体上优先发生。无论是采用化学方法还是免疫学方法其结果都支持这样的意见，即分离了的结合于膜的聚核糖体带有为总量70～80% 新生的碱性磷酸酶(APase)肽化物。证明运转到质膜外侧功能位点的那些蛋白质之聚核糖体紧密地结合于细胞质膜。但有人提出异议，认为结合于膜的聚核糖体可能是所用分离方法引起的矫作物。Randall 和 Hardy 比较了参与外膜合成的聚核糖体核蛋白(它抗利福霉素)和参与制造总蛋白质合成的聚核糖体核蛋白，发现二者没有量上的差别。经进一步鉴定，他们确定结合于膜的聚核糖体有选择地合成隐蔽着的蛋白质，其中包括外膜蛋白质和胞外质的结合着麦芽糖的蛋白质。除此他们又确定，在活体外结合于膜的聚核糖体活性非常抗嘌呤霉素。如上讨论，嘌呤霉素抗脂蛋白生物合成可以由结合于对

脂蛋白生物合成特异的那些聚核糖体的细胞质膜所引起。对各种外膜蛋白来说，结合部位或结合方式是不同的，因此它们的生物合成对噁唑霉素敏感度的差异可能是由于各个聚核糖体对细胞质膜亲和力不同的结果。

当把脂蛋白 mRNA 从 *E. coli* 中提纯约 200 倍时，就对体外研究外膜蛋白生物合成提供了一种更确切的系统。在无细胞培养液中实现了脂蛋白的生物合成，而且它取决于提纯 mRNA 的夹杂物。产物用免疫沉淀法和肽谱法鉴定都得相同的C-末端肽，即自残基 53 到 58 位是：Ala-Thr-Lys-Tyr-Arg-Lys，它象脂蛋白。

前体蛋白质

用甲苯处理细胞的研究对外膜蛋白生物合成有了新的理解。过去用甲苯处理来研究 DNA、RNA 和肽聚糖之合成，并且知道它可使大分子和 ATP 透过细胞。采用甲苯处理细胞时，种蛋白质合成系统完全取决于 ATP，取决于对四环素、氯霉素和噁唑霉素的敏感度，并发现产生的全是膜蛋白。当这些膜蛋白用抗脂蛋白血清处理时，两个清晰的峰发现在免疫沉淀物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中；一个峰有着和活体中脂蛋白相同的迁移率，另一个峰显出表观分子量为 15,000 的新型脂蛋白。根据肽谱分析，这种新型脂蛋白有着象脂蛋白同样的羧基末端结构，因此设想在脂蛋白的氨基末端处有一延伸肽段。由双标记实验确定此延伸肽段至少含有 18～19 个外延氨基酸。该新型脂蛋白——命名为脂蛋白原 (prolipoprotein)——设想在脂蛋白的生物合成中主要起着作为前体的作用。这样，甲苯处理显示出阻碍脂蛋白原到脂蛋白的进程。

脂蛋白原的完整氨基酸顺序已通过对由纯的脂蛋白 mRNA 指导而合成的无细胞产物的分析而测定了。该产物用[^{3}H]亮氨酸标记并经 46 次连续的 Edman 法降解，记下放射性峰的位置，然后用其它经 ^{3}H 标记的氨基酸无细胞产物作重复实验。

通过比较脂蛋白已知顺序和无细胞产物的氨基酸顺序，可以确定外延氨基酸的顺序。由甲苯处理的细胞所产生的脂蛋白原和无细胞产物是相同的。该顺序含有自脂蛋白 N-末端延伸的 20 个外延氨基酸残基（图 1）。这种外延顺序的特性是：(a) 外延区是碱性的，在中性 pH 时带有正电荷，这是因为它含有两个赖氨酸而不是酸性氨基酸残基；(b)该外延区含有三个甘氨酸残基，而脂蛋白中并不存在；(c)在外延区有 60% 氨基酸残基是疏水的，而脂蛋白中只含 38%；(d)肽链中这些疏水氨基酸的分布与脂蛋白中它们的周期性分布完全不同。

膜蛋白前体通常是如何存在的？在较短时间里处理细胞，即是 1.5 分钟而不是 10 分钟，能提高[^{35}S]甲硫氨酸掺入到新的具较高分子量的膜蛋白中。根据免疫沉淀法、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳以及放射自显影所得结果，两种新膜蛋白能清晰地产生出来，并证明这些新的蛋白质相当于具有分子量约 2000(这较高于两种主要外膜蛋白)的基质蛋白和 tol G 蛋白的假设前体。因此所有三种主要外膜蛋白质都可由含有约 20 个外延氨基酸残基的前体所形成，这似乎包括了它们生物合成所共有的机制。无论是基质蛋白原还是脂蛋白原，它们的 N-末端都是甲硫氨酸。在基质蛋白原的 N-末端区亮氨酸残基的分布不同于基质蛋白，这暗示此肽的外延区位于 N-末端，就如在脂蛋白原中那样。前已提及，基质蛋白系由两种各别的、分别命名为基质蛋白 Ia 和 Ib 的肽类所组成，因此需要确定基质蛋白原是 Ia 的前体，还是 Ib 或两者混合物的前体？

胞外质蛋白好象也是由前体产生的。在前面所述的无细胞系统中合成了一种 APase产物，它在免疫遗传学上的特征和能二聚形成一种活性酶方面，极象天然的 APase 蛋白。但是，活

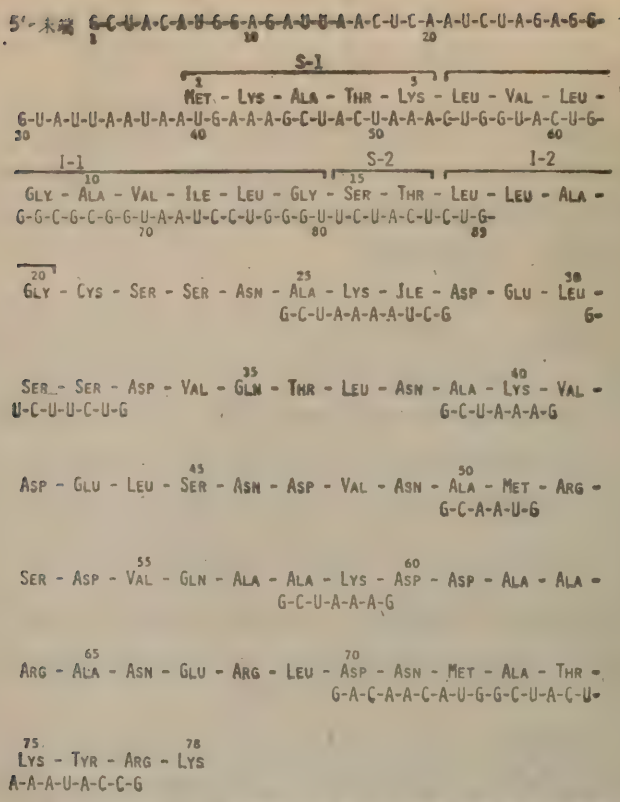

图 1　脂蛋白mRNA 5′-末端核苷酸顺序和脂蛋白原的氨基酸顺序

同时表示出指定氨基酸顺序的核苷酸顺序。1～20 位氨基酸相当于外延肽区。所列 S-1,I-1,S-2 和 I-2 片断系指转位过程中认为有特殊功能的部分(详见正文)

体外所得产物比体内合成的酶单体有着较高的分子量且更疏水。这种较大的蛋白质非常疏水，因此它不可逆地结合于葵基琼脂糖(decylagarose)，而天然酶则可用 0.2*M* NaCl 定量地洗脱下来。不幸的是，到目前为止还没有得到有关 APase 前体氨基酸组成有用的资料。

在原核细胞中，外膜和胞外质蛋白质生物合成的可能机制和真核细胞中分泌蛋白的可能机制之间可以做一个有趣的比较。真核细胞中许多分泌蛋白是由 N-末端处含 16～25 个外延氨基酸残基的前体产生的。至少有这样一种情况：脂蛋白原和鸡输卵管前溶菌酶(prelysozyme)的氨基酸顺序之间存在着明显的类似性。

外膜蛋白信使核糖核酸的特性

在加入 RNA 合成的起始抑制剂(利福霉素)后观察其后不同外膜蛋白的合成，可以看到这些蛋白质 mRNA 具有不同稳定性。经计算，基质蛋白、蛋白 b、tol G 蛋白和脂蛋白的 mRNA 之半衰期分别为 3.4、4.5、4.0 和 11.5 分。曾报道 *E. coli* 小型细胞中存在着稳定的 mRNA。从小型细胞该稳定 mRNA 所合成的蛋白质，经鉴定象是主要外膜蛋白。

脂蛋白 mRNA 的重要特性是：它能分离；它有惊人的稳定性；它的有效性，因为在 *E. coli* 中脂蛋白是最丰富的蛋白质之一；以及它很小，只有 7200 分子量。近来该mRNA被提纯到 85～90% 左右，并且开始了结构研究。为此目的曾采用了一种提纯方法以分离 [^{32}P] 标记了的 mRNA，最终产物鉴定是脂蛋白 mRNA。因为它和同种无放射性的功能脂蛋白 mRNA 具有相同的迁移率，更重要的是它经T1核酸酶消化产生了许多寡核苷酸，它们能指导脂蛋白一部分的

氨基酸顺序。所有33个T1片断以及得自膜核糖核酸酶消化的mRNA片断的碱基顺序都已测定。图1指出了寡核苷酸指导的部分脂蛋白顺序。为了测定mRNA全部核苷酸顺序，把mRNA局部消化然后采用几种补充方法进行检查。

下面摘录了现在已知的有关脂蛋白mRNA的化学结构：(a) mRNA的大小为8.2S；(b)它含有360±10个核苷酸；(c)因为脂蛋白含有78个氨基酸残基，因此234个核苷酸在其编码中是必须的，约120个核苷酸是处于mRNA的非译码区；(d) mRNA在起始密码子AUG之前有一个38个碱基的非译码区(如图1所示)：它的5′-端结构含有与菠萝镶嵌病毒RNA4(一种真核细胞的mRNA)中80S核糖体结合部位所含的相同的12个碱基(G-U-A-U-U-A-A-U-A-A-U-G)；(e)已确定该mRNA 3′-末端碱基顺序是：-G-C-C-A-U-U-U-U-U-U-U_{OH}。

外膜的结构与功能

表面接受

超结构和生物化学资料都表明外膜成分的结构是高度不对称的。Mühlradt和Golecki指出仅有脂多糖分子位于外膜的外层。Nikaido及其同事提出，磷脂在外膜中有这样的不对称位置，即大多数磷脂分子位于内层。这些结论是根据化学分析、冰冻蚀刻电子显微镜、自旋标记，以及应用不能渗入外膜的特异性标记试剂等方法所得的结果。Kamio和Nikaido使用CNBr活化的葡聚糖（一种不能渗入外膜并标记了氨基的试剂)处理含有带很短多糖链的脂多糖*S. typhimurium*突变株，以防止由碳氢链所造成的位阻。18种外膜蛋白质中仅有2或3种不能和该试剂反应，这暗示外膜中的大多数蛋白质是露于外部介质中的。使用*E. coli* B完整细胞也得到类似结果。

对*E. coli*和*S. typhimurium*冰冻蚀刻的研究也指出外膜切面的不对称形象。这些研究揭露外膜的外面那一半(即凹的切面)密集地覆盖着直径为8～10毫微米的颗粒，而凸的切面仅仅显出少数散乱的颗粒。由下述观察可以判断这些颗粒大概相当于外膜蛋白质：(a)损失约50%主要外膜蛋白的*S. typhimurium*和*E. coli*的深度粗糙LPS突变株（deep rough LPS mutants)显出颗粒密度减少，这种颗粒密度减少程度和主要外膜蛋白缺失量之间有着量的关系；(b)颗粒密度的减少也在含有正常脂多糖但缺少基质蛋白和tol G蛋白的突变株细胞中观察到，但在缺失这些蛋白质中任一种，或缺失其它蛋白质的突变株细胞中却不能看到。然而在另一些冰冻蚀刻研究中，深度粗糙LPS突变株——这是一种缺失庚糖的突变株，它有基质蛋白和tol G蛋白的丰富补体——显示出外膜中颗粒密度的某种减少。在用EDTA处理的野生型细胞中一种除去50% LPS而不除去蛋白质的过程也使颗粒密度发生减少。由此得出结论，这些颗粒相当于复合LPS和蛋白质的聚合物，且位于外膜的外面那一半上。蛋白质位于外膜表面位置也由这样的事实所说明，即大多数外膜蛋白担任各种营养物、噬菌体和大肠杆菌素的受体。脂多糖也作为许多噬菌体的受体。过去曾推论这些外膜蛋白质可以促进营养物的吸收或助长接合过程。以后又推论出噬菌体或大肠杆菌素利用这些蛋白质作为受体。

外膜受体蛋白一个明显的特征是，一种蛋白质可作为几种结构上不相关的底物之受体。曾证明lam B蛋白存在着对噬菌体λ和麦芽糖或麦芽三糖不同的活性部位，因为抗噬菌体λ的误义突变株比无意义突变株运输麦芽糖要好得多，而且麦芽糖或麦芽三糖不能阻止噬菌体

λ之结合。与此类似，高浓度核苷不能抑制噬菌体T6之结合。相反，曾证明铁铬化物、噬菌体T1、T5和φ80，以及大肠杆菌素M直接结合于同一种受体蛋白的粗制剂中而且共同竞争结合位点。与此类似，维生素B_{12}、噬菌体BF23和大肠杆菌素E结合于同一种受体蛋白，而且彼此竞争结合位点。对酶反应所建立的对底物结构精细特异性的概念似乎不适用于这些外膜受体蛋白质。Braun指出了外膜受体蛋白所显示的多功能结合和抗原-抗体反应（它显示具有不同结合常数的重迭结合区）之间的类似性。

虽说许多外膜受体蛋白作为各种底物的共同受体，但这并非意味着它们对各种底物以同样的方式起作用。根据采用遗传学上的技术所得的结果认为，外膜中bfe蛋白存在着不同的功能状态。已证明bfe蛋白在其合成后的很长一段时期内还充分保留着摄入维生素B_{12}的效应。而且维生素B_{12}的摄入发生两步反应，即在第一步维生素B_{12}结合于受体之后还发生与能量有关的第二步，这一步需要ton B的基因功能。但是大肠杆菌素E和噬菌体BF23的致死作用并不需要完整的*ton* B基因功能。而且耐大肠杆菌素E的突变株仍显示出对噬菌体BF23和运输维生素B_{12}的正常的灵敏度。这些结果表明，这些底物在开始结合后再穿越被膜而运转的机制是彼此不同的。

ton B基因的功能和产物现在还不知道。除维生素B_{12}外，所有摄入螯合铁复合物的过程都需要*ton* B基因的功能，而且*ton* B突变株是抗噬菌体T1、φ80以及大肠杆菌素B的致死作用的。因为所有这些摄入过程都依赖于能量，因此假定*ton* B基因的产物之作用是使外膜偶联到供能的细胞质膜上。换句话说，为了以后的摄入，*ton* B基因产物可能参与了保持受体所具结合位点（它大概在细胞质膜上）的正确方位。营养物的摄入，噬菌体DNA的注入以及大肠杆菌素的传送等复杂过程的进一步分析，揭露了外膜蛋白功能结构及外膜和细胞质膜之间的亲密关系。

结构完整性的维持

细菌细胞结构的完整性通常归因于肽聚糖层或"刚性"层（"rigid" layer）。但是，许多研究已经证明是由于外膜蛋白和肽聚糖层之间的强力的相互作用，这种作用在前面论述各个外膜蛋白的章节中已作讨论。

为了证明外膜蛋白如何帮助维持细胞结构，已着手用化学交联的研究来检验蛋白质-蛋白质的相互作用。连续用三通X-100，脲，胰蛋白酶以及最后用溶菌酶处理*E. coli*细胞，分离出了杆状"影泡"膜，它们由50～60%蛋白质和20～30%磷脂所组成，但是它们缺失了大量肽聚糖。"影泡"膜的蛋白组成主要是由主要外膜蛋白所组成。在另一些实验中*E. coli*细胞用双功能交联剂处理，然后分离出影泡膜。这种膜交联在整个表面上并保持着原有细胞的相同大小和形状。当脱了脂的膜被交联时发现它们由80～90%的蛋白质组成，而且这些蛋白质基本上是主要外膜蛋白。由此，Henning及其同事首先断定主要外膜蛋白（即基质蛋白和tolG蛋白）参与细胞形状的限定，但是这种推断后来就收回了，因为发现了缺失这些主要蛋白质的杆状突变体。然而，这些结果也证明在外膜的整个表面上广泛存在着蛋白质-蛋白质的相互作用。

用"最近邻方法"（The nearest-neighobor approach）也提供了关于外膜蛋白间特异性配对作用（specific pairwise interaction）的信息。使用了两类裂解剂——酒石酸衍生物和亚二胺酸酯来控制交联，结果仅有基质蛋白发生二聚作用。更精确的检验发现，基质蛋白的二聚体、三聚体和高寡聚体，tol G蛋白的高分子量寡聚体，以及脂蛋白的二聚体相继形成。也发现

tol G 蛋白和游离型脂蛋白交联于肽聚糖以及彼此交联。

外膜蛋白质的组分显示出有伸缩性，即：当一种或几种蛋白质因突变缺失或急剧减少时，另一种或几种其它蛋白质则补偿似地增加。当没有基质蛋白 Ia 时，基质蛋白 Ib 或者 Ib 和 tol G 蛋白水平就增加，以致外膜蛋白的总量保持恒定。在一种缺失基质蛋白 Ia 和 Ib 的突变株中，tol G 蛋白量大致上等于亲本中所有三种蛋白质的总量。相反，缺失了 tol G 蛋白的突变株，为了部分补偿这种损失，变株通过合成增大了基质蛋白量。关于这种伸缩性构成的原因还不知道。一些蛋白质补偿另一些蛋白质有助于使外膜强度保持某种水平。另一方面，对 LPS 有缺陷的突变株中主要外膜蛋白质的量下降了，也许是因为 LPS对外膜蛋白的装配是必须的。

曾分离出既缺基质蛋白又缺 tol G 蛋白的 *E. coli* 突变株，这些变株并不显示出细胞结构完整性方面有任何明显的缺陷。因而它们可能并不存在上述假定的功能。缺少基质蛋白、tol G 蛋白和脂蛋白的三重突变株至今还没有被分离出来。

底物的渗透

Payne 和 Gilvarg 首先证明细胞壁起着一种扩散壁障的作用，并因此确定了可渗入细胞的分子大小。这种概念以后得到了 Nakae 和 Nikaido 工作的支持。曾发现 *E. coli* 和 *S. typhimurium* 外膜对寡糖的排阻极限约为 900 道尔顿。当外膜囊泡由来自 *S. typhimurium* 分离的磷脂、LPS 和外膜蛋白重组时，蔗糖及小分子量寡糖的渗入仅仅在有膜蛋白参与重组的系统中发生。这种重组囊泡的扩散特性类似于完整的外膜制剂。下述发现也支持了这样的观点，即类似于天然外膜的封闭着的膜囊泡仅在外膜蛋白质包括入重组混合物时才能重新装配。当混合物中蛋白用细胞质膜蛋白质取代时就不能改善膜囊泡。由于供水微孔(water-filled pores)的存在而提出了外膜的分子筛性质 (molecular-sieving properties)。用选择过的外膜蛋白质进行重组的研究指出基质蛋白产生扩散通路。重组具有类似扩散性质的含有脂蛋白的膜囊泡是不可能的。缺乏基质蛋白的 *S. typhimurium* 突变株在 β-内酰胺抗菌素和头孢利定穿越外膜的扩散中是有缺陷的。缺失基质蛋白的突变株表现出利用低浓度的几种低分子量代谢物的能力大大下降。这些结果强烈指出，被动扩散孔的形成需要基质蛋白。

基质蛋白以断断续续的单分子层排列着，并覆盖了肽聚糖外表面的大部分。从电镜分析来看，这些蛋白质分子中的三个似乎排成一个单元小室，并显出每个直径约 2 毫微米的三联体凹穴。这些凹穴很可能是脂蛋白，因为：(a)脂蛋白和基质蛋白之间有着强烈的作用；(b)均匀分散在细胞表面面上的脂蛋白的分子数目大于基质蛋白。无论是脂蛋白的游离型还是结合型都能参与作用。基质蛋白牢固地结合于肽聚糖层，而且即使在 2%SDS、50°C时也不能解离，除非有 NaCl 存在。在一种缺失脂蛋白的突变株(*lpo*)中，在没有 NaCl 的情况下它的基质蛋白比野生型细胞更容易从肽聚糖中抽提出来，即：在 *lpo* 突变株中可以抽提出 80%，而在野生株中是 30%。当野生型培养物的结合型脂蛋白用胰蛋白酶从肽聚糖中裂解出来时，基质蛋白对肽聚糖的亲和力下降到如 *lpo* 突变株中那样的同等水平。这些结果暗示，结合型脂蛋白在基质蛋白和肽聚糖的结合作用中起着重要作用。在活体外，结合型脂蛋白不需要基质蛋白简单地结合于肽聚糖上，但是却需要类似于外膜结构的重组膜囊泡。

根据这些研究和前已讨论过的有关基质蛋白和脂蛋白的性质，这两种蛋白质可以形成一种能形成扩散孔或通路的相互作用的复合物(图 2)。三分子的基质蛋白——主要由 β-结构组成——形成了一种具有直径为 1.5～2.0 毫微米的亲水扩散孔，每一个基质蛋白分子由一个三

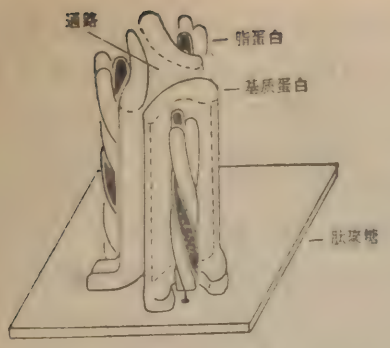

图 2　基质蛋白和脂蛋白的装配模型

个一组的脂蛋白（系由一分子结合型和两分子游离型脂蛋白所组成）盘绕着的螺旋结构所固定或使之稳定。因此脂蛋白是在稳定基质蛋白孔这一方面起作用的。此模型和基质蛋白电子显微图的判断是一致的，即某些空隙证明是由脂蛋白分子充满着的。尚待确定的是：(a)电子显微图上看到的凹穴真是充满着脂蛋白的复合物吗？(b)电子显微图中所显示的周期性蛋白质排列的具有三面匀称中心的电子透明区真的有孔存在吗？(c)脂蛋白对扩散孔的稳定是必须的吗？在 *lpo* 突变株细胞中所看到的对 EDTA 的极度敏感和对 Mg^{++} 的高度需求可以对这些问题提供一点线索。

虽说基质蛋白微孔对小分子量亲水性底物是非常特异的，但另一些专一性扩散或摄入系统看来似乎也存在于外膜中。例如，缺失基质蛋白的抗 Cu^{++} 突变株细胞在摄入尿嘧啶、尿苷或胸腺嘧啶方面没有减少。而且，基质蛋白微孔容许具有分子量小于 650 的亲水物质快速地跨膜扩散(transmembrane diffnsion)，但不容许具有分子量高于 900～1000 的糖类透过。因此低分子量营养物(如氨基酸、糖和盐)可能穿越外膜通过基质蛋白微孔进入胞外质区，接着再主动运转到细胞质。另一方面，分子量大于微孔排阻限度的其它营养物则要求它们自身的受体穿越外膜。如铁是以一种铁铬(740 道尔顿)或 enterochelin(746道尔顿)复合物的形式摄入，而维生素 B_{12}(1357 道尔顿) 的摄入则取决于受体的存在。较大的麦芽糖糊精之运转比麦芽糖更需要 lam B 蛋白。

麦芽糖通过 lam B 蛋白的运转、核苷通过 tsx 蛋白的运转和铁螯合复合物及维生素 B_{12} 之运转不同，麦芽糖和核苷的摄入不需要 *ton* B 基因功能，而维生素 B_{12} 及铁螯合复合物的摄入是需要的。缺失受体蛋白的突变株仅在低浓度底物时显示出对麦芽糖或核苷摄入的缺陷。显然，这些底物在较高浓度时可以通过其它扩散孔。与此类似，缺失基质蛋白的突变株在低浓度底物时不能摄入糖或氨基酸。这些突变株能生长在浓度分别为＞0.2 或 1％葡萄糖或乳糖上。lam B 蛋白显现出促进除麦芽糖之外的糖类，如葡萄糖或乳糖的扩散，但不促进氨基酸的扩散。

结　论

通过过去几年来的工作积累，现在我们能够勾划出有关外膜蛋白生物合成的轮廓，不久我们将理解这些过程正确的分子机制。对外膜蛋白的研究是生物化学中最有成果最先进的领域之一，因为外膜是一种简单的膜系统，它有着其它生物膜许多共有的特征。

图 3 为根据现在的 *E. coli* 细胞被膜知识所绘的被膜分子可能的结构示意图。

正如我们从这篇综述中所看到的那样，最引起兴趣的有如下问题：

(a) 对外膜蛋白前体而言，修饰过程是什么？这些蛋白质穿越细胞质膜的移位作用正确的分子机制，也将对动物细胞中激素的分泌机制和其它许多蛋白质的分泌机制提供重要线索。

(b) 调节外膜蛋白产生的机制。关于这一点，一个有趣的问题是涉及到特殊的外膜蛋白

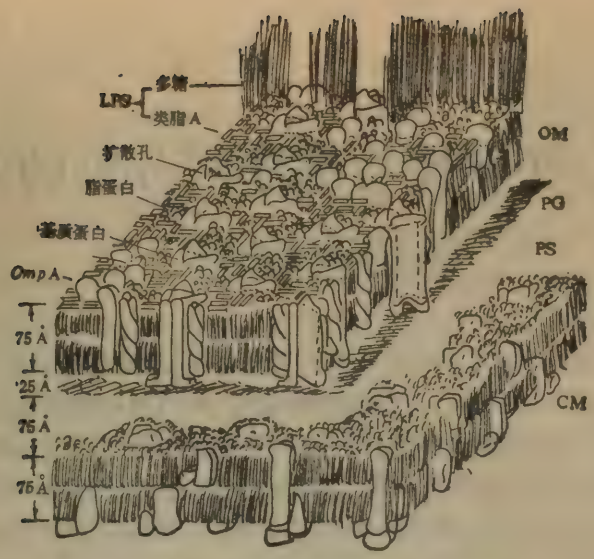

图 3　*E. coli* 细胞被膜可能的分子结构图

PL, 磷脂; OM, 外膜; PG, 肽聚糖; PS, 胞外质区; CM, 细胞质膜。图中仅划出一些PLS 分子的多糖链。所指ompA 等于 tol G。仅有很少的磷脂分布于外膜之外叶

复制数目，以及在这方面的控制方式。某些外膜蛋白出现了多达 10^5拷贝，而另一些可能仅有 10^2拷贝。

(c) 脂蛋白 mRNA 的整个碱基顺序。由 120 个核苷酸组成的 mRNA 非翻译区(nontranslated region)碱基顺序的确定，必将对了解mRNA在重组膜蛋白中翻译调节机制和参与mRNA高度稳定的机理提供重要的信息。

(d) 膜结构与功能的变异机制。导致两种各别的膜形成的机制是什么?

(e) 主要外膜蛋白的结构与功能，以及和其它膜成分的相互作用。基质蛋白、 tol G 蛋白以及脂蛋白已经提纯，以致能直接研究这种相互作用。

范培昌译自《Ann. Rev. Biochem.》47: 481～517, 1978. 毛一平校

(上接第 8 页)

通过它们对不同类病毒的抗性以及与干扰素作用有关的两种 ds RNA 活化的酶活性水平的升高而选择出来的。Jarvis 和 Colby 偶而观察到细胞突变株的抗病毒感染的能力降低了，他们假定这是由于这些细胞受到了负的选择力，而其回变子(revertant) 可能具有超过突变株的选择优越性。这种突变性态是作为一种细胞融合得到的种内杂合子的显性表现。

近年来在解释干扰素作用机制的分子基础方面的进展似乎是使人乐观的。通过干扰素诱导的酶的生化研究并与干扰素处理的细胞中不同病毒的复制研究相结合，看来在不远的将来可以从分子基础了解到抗病毒状态。

周润琦译自《*Cell*》17(2):255～264, 1979. 陈石根校

现代DNA核苷酸序列分析的方法

Sherman M. Weissman

随着人类对分子遗传学认识的加深，对大分子DNA核苷酸序列的分析也愈来愈迅速简便，并取得了巨大的进展。应用分子无性繁殖技术，人们可以得到各种纯化的、具有生物作用的DNA片段。当今的无性繁殖技术，使得基因的无性繁殖和序列分析成为一系列操作过程中最初的一个环节，通常也是鉴定基因产物和初步确定基因控制区的一种简便可靠的方法。一般来说，基因核苷酸序列的分析是测定比较长的多肽链氨基酸序列的最简便、最实用的方法，至少它部份地避免了对氨基酸序列的直接分析，是人们用来测定蛋白质一级结构的最主要方法。

虽然分析DNA序列的各种技术都在不断地发展，但是那些最成功的分析方法都是根据下述两点的：

1. 运用单向聚丙烯酰胺凝胶电泳能否将链长仅有0.2% 微小差异的寡核苷酸区分开来；2. 能否得到具有特殊的3′端或5′端的多核苷酸。某些生物状态，例如病毒染色体DNA分子的末端，或者DNA松弛络合物的缺口部位，有时就可以得到具有独特末端的DNA片段。然而通常用来获取这种DNA分子的方法，以及这种方法之所以有如此大的功能，很大程度上是由于使用了DNA限制性核酸内切酶。这种酶系能在专一的部位切割双链DNA分子，因此不仅可以用来产生专一的DNA片段，而且还可以用来有效地制备无性繁殖DNA片段的载体。鉴于许多文章都对这种限制性核酸内切酶作过广泛的论述，本文不再赘述。

本文主要论述当前用来分析长链DNA分子一级结构的方法，重点是报道作者实验室所使用的方法。本综述分以下几个部份：用于分析双链DNA片段的方法的探讨；用于分析单链DNA分子的方法；简单叙述分析新近离析出的大DNA分子的方法以及对序列数据的处理。时间上将着重介绍一九七七年一月至一九七九年五月这一期间的进展。

双链DNA分子核苷酸序列的分析

一般来说，双链DNA分子是一种最常见的形式，它是从一些生物物质——其中也包括许多目前能利用的无性繁殖的DNA片段——中离析出来的。继Smith，Nathans及其同事的开拓性工作之后，目前常用来分析双链DNA分子序列的方法的大体步骤是：首先用一种限制性核酸内切酶将DNA分子切开，在聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶中电泳，分离限制性核酸内切酶裂解的各个DNA片段，然后整理出裂解部位相互之间的位置关系。如果这些DNA片段整个或末端经放射标记，或者被甲基蓝、吖啶橙等染色，凝胶上的这些片段通过放射自显影就会显现出来。目前通常是用溴化乙锭将凝胶染色，这样在长波或短波紫外光下，核酸-乙锭络合物立即就可辨认出来。用聚丙烯酰胺凝胶分离，测定水平可达亚微克量级，如果运用

琼脂糖凝胶，则可达几个毫微克量级。

从凝胶中回收 DNA 片段的方法有多种多样。一般来说，运用抽提法（从凝胶中抽提 DNA 片段）比较简单。采用一定的方法将凝胶破碎，用透析袋使DNA片段从凝胶透析到水溶液缓冲剂中，分离聚丙烯酰胺碎片，就可得到满意的结果。在作者实验室里，用的是 Tekmar 匀浆器和 0.1×SSC（SSC 为 0.15*M* 盐酸溶液、0.015*M* 柠檬酸钠溶液，pH6.7），每个凝胶片段用 2～5 毫升溶液，凝胶碎片在 SSC 溶液中浸泡过夜，然后经过两次离心使碎片分离。后一次离心在圆锥管中进行，并必须注意除去所有可见的聚丙烯酰胺。用乙醇沉淀上清液回收DNA（注意用机械进一步除去残存的聚丙烯酰胺）。这样得到的 DNA 非常纯净，可直接供化学法或酶促序列分析法使用。如果条件许可，我们常常从含有 7% 或更高的聚丙烯酰胺凝胶中抽提 DNA，因为这样便于从凝胶中滤去稀释的聚丙烯酰胺聚合而成的聚丙烯酰胺低聚物。从琼脂糖凝胶中抽提 DNA 片段要稍许困难一些，因为这种抽提极易夹杂一些琼脂糖凝胶中的可溶物质，它们会与 DNA 片段一起沉淀，结果使 DNA 片段的浓缩液变得粘稠，甚至有时还可能会影响到 DNA 片段后来的酶促反应。但是，如果能应用电洗脱（electroelution）法，使DNA片段从琼脂糖凝胶上洗脱下来；或将 DNA 片段吸附到玻璃粉上，洗去琼脂糖后再将DNA片段洗脱下来；或将 DNA 片段吸附到羟磷灰石短柱上，洗去琼脂糖后再将 DNA 片段重新洗脱下来；以及运用碘化物溶液使琼脂糖增溶溶解等，均能收到较好的效果。在作者实验室里，使用的是冷冻和解冻技术。用机械方法使 DNA 片段从琼脂糖凝胶上洗脱下来，在用乙醇沉淀 DNA 片段之前，先使超速离心机旋转叶片转子中残留的琼脂糖成球。回收率略小于原始 DNA 数量的 80%。

在早期的 DNA 限制性片段序列分析技术中，不是用 RNA 聚合酶将 DNA 先转录成带放射性的 RNA，然后再分析所得到的RNA产物，就是采用多核苷酸激酶使 DNA 5′端磷酸化，或者是在DNA片段的 3′端加上放射性的核苷酸，给 DNA 片段冠上一个放射性的标记，转录离析的 DNA 片段就可了解到内部的核苷酸序列。不过这种方法还需要对转录产物作进一步分析，审慎判断，以排出转录的矫作物，如 RNA 聚合酶两次返回所造成的矫作物，或 RNA 聚合酶从一个 DNA 模板跳跃到另一个模所产生的矫作物等。鉴于分析放射性 RNA 转录产物的工作极为繁琐，另外排列核酸酶消化 RNA 后所得的寡核苷酸顺序的工作又颇为困难，故这种分析方法现已被新的方法所代替。

由于在实验室里通过酶促交换反应，可以用无载体的无机磷酸盐廉价地制备出 γ-ATP 底物，故现在用多核苷酸激酶使 DNA 片段 5′端的羟基磷酸化已成为一种有效的标记法。在有利条件下，对 DNA 片段标记的比活性可以接近于原来加入的[γ-^{32}P]ATP 的比活性。换言之，所产生的标记的比活性可达到每微克分子几个居里的放射性比度。这种激酶反应通常是应用噬菌体 T4 编码的多核苷酸激酶，目前工业制备的这种激酶已完全合乎要求。作者实验室所应用的激酶基本上是根据 Richardson 法自己制备的。如若在激酶反应的混合物中加入少许亚精胺，据说磷酸化作用相应会有某种程度的增强。另外，如果在进行激酶反应之前，采用高温加热随后迅速冷却的方法使 DNA 片段变性，磷酸化作用也会相应地增强。据作者实验室的结果来看，影响激酶反应效果的决定因素是双链 DNA 片段末端的类型。DNA 片段如果含有一段突出的游离 5′端，它就非常容易磷酸化，也易受激酶的作用；如果 DNA 片段含有一段突出的 3′端，它就不易被激酶作用；假若 DNA 片段末端呈平端，也能被激酶作用和脱磷酸化。但是如果能用核酸外切酶Ⅲ将 DNA 简单处理一下，使其单链 5′端暴露，激酶反

应的效果就会得到改善。

还会常常遇到这样的问题：在DNA中可能存在有超过相当大克分子量的低核苷酸小片段。这些片段对DNA片段的大小并无多大影响，但是却都是争夺多核苷酸激酶的一种有效竞争子，结果就会大大地减少掺入到大片段的标记数量。假若磷酸化的片段是在脱磷酸化和用多核苷酸激酶重新磷酸化之前直接从聚丙烯酰胺凝胶或琼脂糖凝胶中得到的，一般来说就不会出现这种问题了。

另外还有一种标记双链DNA片段每条单链3′端的方法，它是运用α-^{32}P标记的核苷三磷酸和末端转移酶来完成的。采用这种方法时，用哌啶水解双链DNA，每条DNA单链的3′端就会加上一个标记的磷酸残基，加入一个放射性的双脱氧核苷三磷酸，这时不必预先作碱性水解DNA序列就可分析出来。有时DNA的3′端隐藏在内面，此时末端转移酶就扮演着DNA聚合酶的作用，通过复制反应使这种末端填满。在这一反应中，最好能加入一个α-^{32}P标记的脱氧核苷三磷酸，以便在DNA聚合酶催化的交换反应中只有末端残基被标记，或者说只有DNA片段3′端的残基被标记。运用这样的标记方法时，DNA的两个5′端或两个3′端都可得到标记，因此还必须将这两条链分离开来。将DNA片段变性，然后走凝胶电泳进行分离，或上RPC-5层析(高压逆相层析)进行分离；或用限制性核酸内切酶将标记的DNA片段从内部裂解等，均可达到这一目的。在应用后一种方法时，会出现两个较短的片段，每个片段上都只有一个标记位置，所以还必须再走一次凝胶电泳才能使它们分离开来。对那些内部没有裂解部位的DNA大片段，以及那些不易从大的标记片段上切下所需要的单一标记的片段来说，运用片段变化使链分离的方法就显得更加有用了。在实际中，采用各式各样的方法均可将DNA的两条链分离开来。分离的效果随加到凝胶中的双链DNA数量的增加而减少。仅在一条链上有标记的DNA片段通常是应用限制性核酸内切酶裂解双标记片段后而制备出来的。

Maxam和Gilbert发明了一系列极有价值的、目前为人们所广泛应用的化学断裂法。这种方法可以从单个末端标记的DNA片段上切下特异的碱基，这些反应可产生一套从标记末端开始，到DNA片段上某一特定碱基重复出现的部位处断开的、长短不一的DNA片段，以及一系列未标记的断裂产物，通常这种断裂产物不能被放射自显影术所发现。这些降解产物根据其链长大小的不同可在聚丙烯酰胺凝胶上分离开来。由于每一种裂解反应所产生的带都对应于原来DNA链上受影响的残基的部位，因此根据带谱就可立即读出各个碱基在DNA链上的排列顺序。在嘌呤断裂的反应中，目前通常都用硫酸二甲酯使嘌呤碱基甲基化，其有关反应如下：嘌呤环第三位的脱氧腺苷和第七位的脱氧鸟苷甲基化。由于7-甲基脱氧鸟苷对水解特别敏感，在较温和的碱性条件下，嘌呤就会脱出，紧接着多核苷酸链就会在脱嘌呤的部位断裂。如果在温和的酸性条件下，鸟嘌呤的脱嘌呤作用会相对地受到抑制，而甲基化的腺苷残基就会脱嘌呤，那么，大多数断裂产物的末端在原来DNA链上的脱氧腺苷残基部位，而只有少量的产物的末端位于原来DNA链上的脱氧鸟苷部位。嘧啶的特异断裂，是通过先将DNA链肼解，除去胸，然后用哌啶断裂DNA来达到的。在高盐环境下，胞嘧啶被选择性地除去，而在低盐浓度时，胸腺嘧啶不会受到进攻。除去两种脱氧嘧啶。如果将这些方法组合使用，断裂的碱基就可以达到相当高的专一性。所以根据四组清除法所得的每一种凝胶图谱就可读出DNA的排列序列。必须指出，在这些断裂图谱中，有一点例外，即由于5-甲基脱氧胞苷对所有四种清除反应都有抗性，因而在凝胶碱基顺序图谱上，它通常是一个空白位置。

Maxam-Gilbert 法已被广泛地用来分析序列资料。此外，在某些情况下，只有最近应用的凝胶序列分析法才能取得较好的效果。Maxam-Gilbert 法仅适用于分析不用复制反应的、在某一特殊部位被标记的单链 DNA 的序列。这种底物只有在分离末端标记的双链 DNA 片段的链时才能得到。同样，运用反转录法分析 mRNA 序列时，由于 RNA 转录后的重排，可能会出现各式各样预测不到的情况，因此必须运用标记的引物，以便在进一步分析之前将 cDNA（互补脱氧核糖核酸）的产物相互分开。一般来说，在分析之前经反转录酶作用，这些 cDNA 是能够转换成双链 DNA 的，但是这种反应的效率却各不相同。从实际效果来看，最好还是应用 Maxam-Gilbert 法来分析分离的 cDNA 片段，而不要再进一步将这些 cDNA 进行酶促反应。

除了 Maxam-Gilbert 的化学法能选择性地断裂标记的DNA片段之外，Friedmann 和Brown 也提出了一些反应，在这些反应中，利用亚甲基蓝的光氧化作用也可以选择性地在鸟苷酸部位断裂 DNA，或者是利用锇的氧化作用选择性地在胸苷酸部位断裂。这种方法可以进一步为 Maxam-Gilbert法提供极有价值的补充材料。但是目前还没有能区分所有四种碱基的"碱基专一性反应"的报道，而且现有的报道还表明，采用这种方法时，单个鸟苷酸的感受性范围比采用 Maxam-Gilbert 的甲基化和脱嘌呤作用要广得多，例如，鸟苷酸也会受到亚甲基蓝氧化作用的影响。

根据酶促反应能在某一特异碱基部位终止的原理，Sanger 及其同事也发明了分析 DNA序列的方法。在这种方法刚刚建立时，首先是应用特异的 DNA 引物复制单链 DNA 模板，在放射性三磷酸作用下引物部份延伸，在存在三种或一种脱氧核苷三磷酸时，引物进一步延伸。在前一种情形下（即加反应），当产物延伸到最初需要第四种脱氧核苷三磷酸来补充模板链的位置时，反应就会立即终止；而在后一种情形下（即减反应），反应的成败主要取决于 DNA 聚合酶的 3′ 核酸外切酶能否将如此之长的引物正好切在这样的位置：当该部位的碱基被核酸外切酶切下后，DNA 聚合酶活性能运用这一碱基作为底物来修复 DNA 链。实践证明这种加减反应能得到高质量的专一碱基带谱供序列分析之用。当然，这种反应也有缺点，其中之一就是在众多的残基中很难确定碱基的确切数目。

近几年来，这种加减反应在很大程度上已被向酶促合成反应中掺入链的末端抑制剂的方法所代替，用的抑制剂是双脱氧核苷三磷酸或阿拉伯糖核苷三磷酸。用 DNA 聚合酶或反转录酶就可将这些残基掺入到 DNA 链中。但是，由于它们不能成为核苷三磷酸的受体，所以它们掺入到 DNA 链的那一个部位就成为链延伸反应的终止部位。脱氧核苷三磷酸与链的末端抑制剂双脱氧核苷三磷酸或阿拉伯糖核苷三磷酸比例的选择，通常都是根据有关的聚合酶对天然底物和链末端抑制剂的底物的相对亲合性来决定的。在所得的凝胶图谱上，寡核苷酸的排列顺序清晰可辨，极少有模糊不清的部份。在有关这一方法的起初报道中，要求使用单链 DNA 作为模板和运用小的限制性片段作为 DNA 的引物。现在，延伸是在有 α-^{32}P 标记的脱氧核苷三磷酸的条件下进行的，因此较长的延伸产物就可在多个部位有标记的残基，其结果是，即使是靠近引物 5′端的带也很少会出现"模糊"的现象，但是仅依靠标记引物的方法就不同了。经过过夜曝光，极少量的（几个微微克分子）DNA 所产生的凝胶图谱都可读出。

最近，Maat 和 Smith 对 Sanger 的这一基本方法略加改进，建立了可分析一条链的 5′端有标记的双链 DNA 片段的方法，因此非常适用于 Maxam-Gilbert 化学序列分析法所常用的底物。Maat-Smith 的方法是这样的：用胰脱氧核糖核酸酶在DNA片段上任意截一缺口，在四

组不同的反应中，每次都运用脱氧核苷三磷酸和一种双脱氧核苷三磷酸(总共四种)，此时缺口部位就成为 DNA 聚合酶延伸的引物。几个实验室对原来的方法略作修改，使保温反应在37°C条件下进行，这时反应产物经过聚丙烯酰胺凝胶分离后，一次就可读出引物5′端30～40个核苷酸以至250多个核苷酸的序列。后来又经过进一步改进，使保温在有 DNA 聚合酶、脱氧核糖核酸酶和一种双脱氧核苷三磷酸的条件下进行，这时就不会出现原来在 Maat-Smith 法中偶尔见到的"模糊"带了。另外，在原来的 Maat-Smith 方法中，加反应总是使多个相同残基的第一条带或第二条带格外明显，而减反应则使多个相同残基的最后一条带明显，所以在很大的程度上这两个图谱是互补的。最后，经过这样的改进再也用不着调节链末端抑制剂核苷酸与脱氧核苷酸的比例了。在序列排列的凝胶图谱上偶尔也会出现"模糊"区，少则一、二个带，多则甚至四组反应的区带图谱都不太清楚。

开始建立的引物延伸法必须首先制备一条单链模板，这是一个很大的缺点。最近研究出了无性繁殖的方法，DNA 片段可以与单链 DNA 噬菌体的双链复制型连接起来，然后用这种重组分子转化细菌，产生的细菌继续生长，就可得到大量含有原来 DNA 片段的噬菌体，它们具有原来 DNA 片段的极性，也就是说原来的片段已经整合到单链噬菌体的 DNA 之中。将这种噬菌体释放到培养基上，加入低浓度的聚乙烯乙二醇，噬菌体就会很快地沉淀出来，最后抽提出的 DNA 就可直接用来作为 Sanger 引物延伸法的模板。根据需要也可得到在两个方向插入的无性繁殖株，此时用一个双链引物就可分析插入部位两个方向上的序列，而那种与插入部位附近的噬菌体序列互补的"万能"引物则可用来分析所有插入片段的序列。

通过另一改进，用对双链 DNA 专一的核酸外切酶系（例如λ核酸外切酶，核酸外切酶或核酸外切酶Ⅲ）处理未标记的双链 DNA 片段，Sanger 的引物延伸法还可用于分析没有标记的双链 DNA 片段，这时反应的产物绝大多数都是单链 DNA 分子，只有原来双链片段长度的一半。在应用核酸外切酶Ⅲ时，虽然这些分子的3′端也许会相互碱基配对，既可为延伸反应提供模板，也可提供引物，但是，实际上由于延伸的产物非常之大，故一般不会与退火到模板上的短 DNA 片段延伸所得的产物作用。这一方法已取得了显著的成功，例如，Robert 运用它分析了腺病毒 2 DNA 的核苷酸序列，同时这种方法对分析质粒中无性繁殖的 DNA 片段序列也极为有用，只需 1/10 微微克分子的模板和相当数量的引物就可得到 200～300 个核苷酸的序列。

有人认为，向 DNA 中掺入核糖核酸，然后在核糖核苷酸部位断裂也是一种序列分析的方法。但是这种方法与运用链末端抑制剂核苷酸的分析方法并无实质上的差别。

根据作者的经验，当底物相同时，应用链末端抑制剂核苷酸三磷酸的酶促法所得的区带图谱较 Maxam-Gilbert 法所得的图谱清晰，而分析单链 DNA 的引物延伸法则更胜一筹，此时放射性可掺入到整个延伸链上，直至链末端抑制剂核苷酸三磷酸掺入的部位。因此当人们继续向外进行链延伸时，就可部份补偿每条单独带的不足，使整个图谱准确可靠，只需作几小时放射自显影就可得到有用的图谱。另外，引物延伸反应所需的底物和模板量极少，也不需以后走凝胶电泳就可将标记的 DNA 片段分离。因此，只要制备足够的模板，走一次凝胶电泳，提供一组引物，就可得到分析长 DNA 片段序列所需的底物。所以，在某种程度上来说，当人们应用引物延伸法时，主要取决于能否得到合成的引物，或者象经常所遇到的情况那样，取决于限制性核酸内切酶裂解后能否得到较短的 DNA 引物(在有利环境下，也可使用较长的引物，然后用可以切割引物内部或引物末端的限制性酶切下延伸的产物)。另一方面，

在采用依赖于末端标记的 DNA 方法时，如果 DNA 片段只有一端有标记，人们可以(通常也是)选用大的片段。限制性片段可以用核酸外切酶Ⅲ将其缩短，这可得到链长只及原来双链片段一半的片段。如果是在酶过剩的情况下，也许还会产生更短的片段。这是解决引物延伸反应必须要有较短引物的一种好方法。除此之外，人们还可以在一段短 DNA 序列——与一段较长的未知插入序列连接、与已知引物序列互补——间重建一些重组体。

如果能将几种分析方法组合使用，分析效果就会得到改进。例如，将一个大的 DNA 片段在单链噬菌体 M13 中无性繁殖，这时从单链噬菌体 M13 复制型分离出来的就是双链限制性片段，然后用两种或更多的限制性酶混合物"盲目"消化该片段，消化产物溶于制备性的聚丙烯酰胺凝胶。此时较小的片段就可用作单链噬菌体 DNA 或核酸外切酶处理的大 DNA 分子的引物，而最大的片段则作为一组被磷酸化，用 Maat-Smith 法重新切割就可供序列分析用。无论采用何种具体做法，在进行 DNA 片段序列分析之前，再也用不着首先建立一个详细的限制性核酸内切酶裂解图了。

用于分离 DNA 延伸产物或裂解片段的凝胶电泳系统技术的发展，为提高 DNA 序列分析法的准确性起了极大的作用。在理想条件下，DNA 片段的迁移率是与其分子量的对数成直线关系的，所以，当人们需要进一步读出核苷酸的序列时，毗邻带的分离度就降低。在低百分浓度凝胶中电泳，可使较长的片段在通常所用的一段时间内分开，而且走一次凝胶电泳就可排列出一段较长的序列。目前除特殊用途时聚丙烯酰胺浓度可减少到 6% 外，通常用来进行序列分析的凝胶含 8% 聚丙烯酰胺。此外，如果应用较薄的凝胶，电泳期间产生的热量就少，放射自显影期间就不会因几何因素或走电泳过程中因变形使带变宽，并可以减少 β 颗粒吸收。当前所用的凝胶一般厚度约为 0.30 毫米(这一厚度是由柔软的聚乙烯塑料的微孔构成的)。也可以使用更薄的凝胶，但随之就会给灌注和上样带来困难。序列分析用的凝胶一般长约 40 厘米。据 Sanger 报道，若采用对每份样品多次上样的方法，在最理想的情况下，一片这样的凝胶就可读出 400 多个核苷酸的序列。现在人们正试图改变凝胶的尺寸以提高分辨率。例如，有几个小组正在使用 80 厘米长的凝胶。原则上说来，若相邻核苷酸带的迁移距离能越接近于这样长的凝胶的长度，就可以把它们分离得越开。但是这样长的凝胶不能用于普通的 X 射线暗盒，或者说不符合 X 射线底片的标准尺寸，因此不便于机械操作。根据作者本人的经验，采用在 40 厘米长的凝胶上多次上样的方法可获得良好的分辨率。为了加宽凝胶带间的等距离，有些科研人员正在进行这样的实验：增加靠近底边的凝胶宽度，这样，当样品下行时电场就会愈来愈弱。作者并未进行过这样的实验，不过，既然使用标准的序列分析凝胶已能取得良好效果，看来，再不遗余力地研讨改进办法来进一步提高效率的作法不能说是明智的。

目前使用的放射自显影技术已经非常灵敏，只要使用少量放射性标记的 DNA，用醋酸固定凝胶，在室温下经过较短一段时间就可使底片曝光，得到清晰的、可供序列分析用的放射自显影图。在有些场合下，如在研究稀少的 RNA 转录产物的 DNA 拷贝时，由于放射性不足，最好是采用其它方法以增加放射自显影术的灵敏度。目前有几种 X 射线增光屏。如能选用恰当的增光屏和底片，凝胶又是在低温下曝光(最好是低于 -70°C)，就可得到放大 10～20 倍的放射自显影图象。如果能小心地将底片预曝光，在背景上产生出一系列的光子俘获效应，从而克服"倒易失效"现象或底片显影前单个光子俘获的余辉，有时也能提高灵敏度。但是，倘若预曝光控制不好，就会使底片起粒或变黑。作者认为一般不要采用这种技术。但是，即使是使用增光屏和冷冻凝胶，也不可避免地会对带的清晰度带来一定的损失。

无论是使用何种凝胶序列分析法，还必须注意一点：DNA 链的二级结构可能会引起凝胶中某些区带的"崩溃"。对于这一点单凭检测凝胶是不一定能查出原因的。如果进行凝胶分离时凝胶的温度较高，这种"崩溃"现象就会减少。作者曾碰到过这样的 DNA 区段：在这一区域，只有当 DNA 片段两条链相邻之限制性部位的序列分析出来之后，才能得到精确的核苷酸序列。

随着 DNA 序列分析速度的加快，确立和描述 DNA 序列的问题就愈来愈取决于能否系统准确地记录和比较所得的整个序列资料了。当前利用计算机处理已成为分析长序列计划的重要一环。例如在确立核苷酸排列顺序时，人们经常会得到一些可能是从 DNA 的重叠部份所推断出的不可靠数据。在有些方法中，如采用 5′端标记的核酸外切酶Ⅲ引物延伸法，有时就无法确定所得的序列到底对应于 DNA 的哪一条链。但是，一个简单的计算机程序就能把这一序列及其补体与 DNA 片段序列的其它资料比较。如果是处理较短的序列，只有 1 千个或更少的碱基对，用肉眼也可有效地完成这一检索过程；但是，倘若是要处理一段较长的序列，或者需要同时分析多个各有 1 千多个碱基对的 DNA 片段，这时最好是将各种数据储存到计算机的存储器中，用计算机来比较这些序列。许多小组业已广泛应用这种方法来分析较长序列的 DNA 片段。

造成序列分析误差的主要根源有二：一是将原始底片上的数据录成永久记录时所产生的错误；二是将一种永久记录转换成另一种永久记录时所产生的错误。对于后者来说，如果有关的数据是以可用的型式长期地存储在计算机的磁带或磁盘中，那么这一问题就可基本避免。至于转换原始数据的问题也可以这样处理：如果不同的人读出了不同的结果，那么就将这些结果全部记录下来，供以后比较用，并标出相互的差异。也许会有这样一种自动装置，它能识别和直接读出凝胶带中的序列，并将这种序列存储到计算机中去。不过作者还从未见过这样的方法。本文发表之时，很可能有多达 25 万个残基的 DNA 片段已被全部测定出来，或即将全部分析出来。可以有把握地说，再过 1～2 年，人们将着手向 100 多万个残基的 DNA 片段进军了。随着时间的推移，可望一大批高等生物细胞基因组的 DNA 序列将相继揭晓。通过对它们的广泛比较，人们的认识将逐步深入。就生物功能而论，目前对一级结构的解释的能力也各不相同，存在着一些问题。譬如在遗传密码方面，对原核生物 DNA 核苷酸序列的解读就能立即排列出可能的编码区以及由这些区段编码的蛋白质的氨基酸序列。但是对真核生物 DNA 来说，由于转录后的拼接作用，尽管也能辨认出蛋白质的各个区段，但并非永远都能得到如同原核生物那样的理想结果。目前人们对拼接部位还了解得较少，很有可能通过对一级结构序列的研究，会搞清几个(不一定是全部)拼接部位的序列。一段时间以来，许多人都认为识别，至少是识别原核生物中的一种转录终止部位是完全可能的，特别是转录产物中尿苷酸丰富的序列之前含有发夹干和发夹环的部位。目前虽然对这种序列的生物作用，如体内抗终止因子和严格依赖 ρ 部位的识别还不甚十分明瞭，但是却可以通过这种部位较准确地定出潜在的转录终止部位的位置。现在看来，如若采用类似的标准，也可识别真核生物中的一部份转录终止信号。目前用聚合酶Ⅱ转录产物所进行的关键工作主要取决于忠实的体外转录系统的发育。原核生物启动子都有一些共同的特征，所以基因组序列中相当大一部份这种启动子都可以识别出来。但是，如果缺乏其它生物资料，依赖环腺苷酸(cAMP)或依赖其它因子的启动子目前都无法推断出来。真核生物启动子的性质及其识别当前正是人们所热心研

(下转第45页)

不用载体的酶稳定化

V. P. Torchilin　K. Martinek

本文论述不用载体的酶稳定化问题，稳定作用主要有以下类型：加入低分子量的化合物；加入有机溶剂；化学修饰酶的关键功能团；用双功能试剂进行分子内交联。此外还论述了酶稳定化所用方法的机制，并提出了不用载体使酶稳定化的方法。

酶制剂在化工、医学、农业、食品工业和分析化学等各个领域中的应用正不断扩大，但起初却受到成本、稳定性差以及不能再生的限制，而现在已发展成为一个大的生物化学分支，它的任务在于研究酶的变性(钝化)机制和建立稳定性较高的体系，主要是要防止温度、变性剂和极端 pH 引起的变性。

为了制得稳定的酶，所采用的第一个而且是最常用的方法，是将酶固定在不溶性的聚合物或无机物载体上。其原理是使蛋白质分子与载体的互补表面进行多点相互反应（包括化学的、吸附的、机械的），从而使其天然构象得到固定。在这个基础上，将蛋白质结合到聚合物上也成功地制得了水溶性的稳定性酶制剂。用双功能试剂进行蛋白质分子间的交联也为制取稳定的酶制剂提供了一种可能。

虽然取得了这样的成就，但却没有回答这样一个非常重要的问题，即不用载体能否获得一种稳定的可溶性酶？解决这个问题很重要，原因有：第一，在大分子底物的转化中，聚合物载体基块的存在，即使在一种水溶性的酶制剂中，也会显著地降低酶的反应性和结合能力(binding capacity)；第二，在各种疾病的治疗中，所用的酶在许多情况中必须能与受体或细胞膜的其他成分相作用，在这情况中，载体基块可以明显地改变关键性的反应通路。

虽然还没有一种能制造不需载体的稳定酶体系的统一方法，但是，这个领域的研究工作正在进行，某些方面也已有了发展，本文将加以介绍。现将有关创造满意酶体系的一些方法概括如下：(1)用低分子量添加剂使溶液中的酶稳定；(2)用低分子量化合物修饰酶；(3)用双功能试剂使酶分子内交联。至今在这方面取得了哪些成绩呢？

用可溶性添加剂使酶稳定

文献中经常论述到通过二价金属离子(Ca^{++}、Mg^{++}、Sr^{++}、Zn^{++}、Co^{++}、Mn^{++})、硫酸铵和各种阴离子(通常为磷酸盐和硫酸盐)，多元醇(主要是甘油或乙二醇)、糖、表面活性剂和有机溶剂等添加剂的作用使酶稳定化(一般是指热稳定作用)，而且还远不止这些方面。由于以下原因我们不讨论这些类型的酶稳定作用：第一，所观察到的效果不是普遍存在的。一种或其类似的效应剂在稳定一种酶时，同时可能降低另一些酶的稳定性。同样，酶可以被上述一种添加剂所稳定，而被其它添加剂所钝化。第二，这个方法似乎不是"工艺上的"方法，因为要从反应产物中分离去除许多添加剂特别困难。第三，在大多数情况下，效应剂使酶稳定

的物理-化学机制仍然不清楚。

用盐类使酶热稳定化

说明这个效果的一个例子是α-糜胰蛋白酶的特性，它随着溶液中离子强度增加而变得对热更为稳定（图 1）。表示酶热钝化特征的一级速度常数至少减少 99%。众所周知，糜胰蛋白酶分子至少有两种构象状态，两者的平衡情况取决于溶液的离子强度，这些构象被假定是具有不同的热稳定性的。

观察到的盐的稳定作用显然不是静电性质的：第一，由于用 1-氨基-3-丙醇对 17 个暴露羧基中的 15 个羧基进行修饰，形成不带电荷的酰胺基 $CONH(CH_2)_3OH$，使分子的负电荷减少，这种电荷的减少实际上并不影响酶的热稳定性对离子强度的依赖性（见图 1）。第二，分子的负电荷减少（在所有可滴定 NH_2 基被琥珀酰化之后）并不影响盐诱导的糜胰蛋白酶的热稳定性（图 1）。

得到的结果与通常的假设一致，即通常在中性 pH 值时，盐类和带电基团的相互作用对蛋白质的变性的影响是较小的。其解释是，事实上，在蛋白质分子表面的带电荷的基团，在“摺叠”和“伸展”（变性）二种状态下与溶液作用都是相同的。

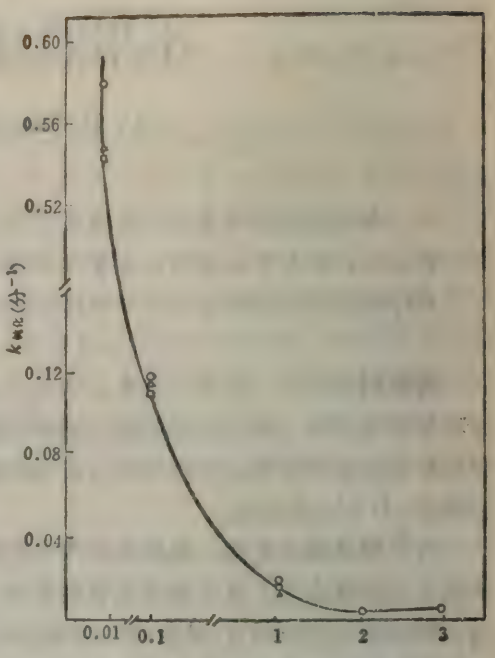

图 1 糜胰蛋白酶($5\times10^{-7}M$ 在 50℃、pH8)钝化的一级速度常数与 KCl 溶液离子强度的关系

○、天然酶；△，完全琥珀酰化的酶；□，用 1-氨基-3-丙醇酰胺化取代的羧基

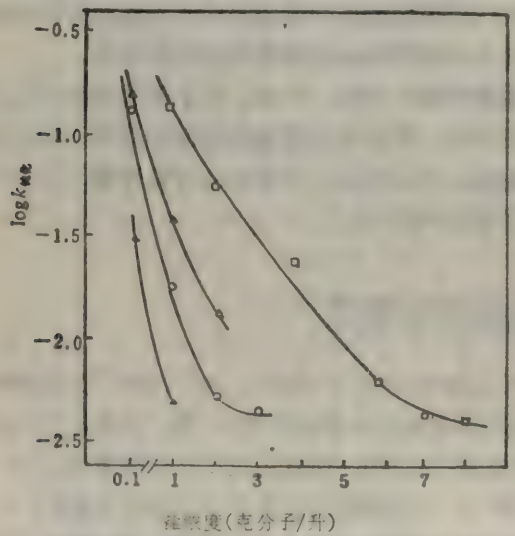

图 2 α-糜胰蛋白酶钝化的一级速度常数（分$^{-1}$）对盐浓度的依赖性（条件与图 1 同）

□，CCl_3COOK；△，$(CH_3)_4NBr$；○，KCl；▲Na_2SO_4

解释这个结果的一条线索是在盐的存在下分子非带电区的活性系数发生变化。这一点与下面的结果是相符的。图 2 表明，糜胰蛋白酶的热稳定性对所加入盐的性质是很敏感的。稳定效果最好的是加 Na_2SO_4，加 NaCl 和 KCl 的效果较少，而 CCl_3COOK 是最差的效应剂。在许多蛋白质变性过程中，所观察到的盐的效率是类似的。由于这个原因，图 2 中所示的数据，可以解释为所加入的盐类（根据 Hofmeiste 的感胶离子序）改变了分子非带电部位的活性系数。结果蛋白质分子试图通过转变构象，以另一种状态同溶剂接触。从理论上来看，苯丙氨酸残基的苄基在糜胰蛋白酶中正好处于分子的表面，它可能就是这些非带电的基团。但是，这点与用 $(CH_3)_4NBr$ 处理所观察到的效果相反（图2）。

这种盐的盐析效果很小，甚至会引起一种相反的现象——苯"盐溶"现象。假定图2中所观察到的盐效应是由蛋白质芳香族碎片的活性系数的改变所引起，那么按照这个假设，$(CH_3)_4NBr$产生的稳定效果应比CCl_3COOK弱得多，甚至会使酶失去稳定。但是，图2表明$(CH_3)_4NBr$对糜胰蛋白酶的影响几乎与KCl一样。

这个结果与浓的盐溶液和乙酰四甘氨酸乙酯的活性系数有关。就乙酰四甘氨酸乙酯当作多肽链的模型来说，可以断定在浓盐液中，酶的稳定作用是由多肽链(酰胺基)的"盐析"作用所引起的。随后，由于某些多肽链的碎片或某些部分失去与水溶液接触，可能促进分子的表面层的疏水相互作用。自然，也可以假定构型上可被压缩的"盐析"链将更难伸展，因此表现出有较高的热稳定性。

因为酶是由多肽链组成，所以加入盐可能就是防止酶链伸展而使其稳定的一个十分通常的方法。这方面的例子已有人作了介绍。

包含在表面活性剂"反向"胶束内的酶在有机溶剂中的催化作用

许多酶本来的性质是在水溶液中起作用。这一点是限制酶在实际反应中作为催化剂使用的主要因素。例如在热力学上有许多化学反应只有在一定的有机溶剂中才向生成所需产物的方向进行，有时在产生所需产物时也生成水，所以在水溶液中反应平衡明显地移向起始物质，从而妨碍了生物催化剂引入到重要的过程，如合成酯类、酰胺、氨基酸、或糖的聚合作用和脱水反应等。

显然，解决这个难题就是用非水溶液代替水溶液作为反应介质。为了评价这一想法，已用有机溶剂或水-有机溶剂混合液做了大量酶促反应的研究。所有这些研究都发现，以有机溶剂代替水作为反应介质，酶的催化活力明显地降低，而且对底物的专一性也消失。

这个问题可通过选择一种能使酶的变性减到最小的有机溶剂而得到部分解决。然而，另外两种方法似乎更引人注意：一种是用水-有机溶剂两相系统(一种水和不溶于水的有机溶剂混合物)，另一种是将酶包含于表面活性剂"反向"胶束中。我们将较详细地研究后一方法，因为这是本文的范围。

在有机溶剂中，许多表面活性剂形成"反向"胶束缔合物，在胶束中，表面活性剂的极性(离子)基团形成核心，而亲水基团形成外层。众所周知，这样的"反向"胶束可以溶解离子、极性有机化合物、和相当数量的水(几十个水分子/表面活性剂分子)。最近已知，形成胶束的表面活性剂也有可能溶解在有机溶剂-表面活性剂混合物中和相当高浓度的生物聚合体-酶的混合物中。浓度达到1毫克/毫升，相当于$10^{-5}M$活性中心(酶分子量<100,000)，对大多数的酶来说，这个浓度大大地超过大多数酶所需要的"催化浓度"。同时，酶几乎保持了其所有的催化活力和底物的专一性。显然，酶分子当其被反向的胶束所吸收时(图3)避免了变性(结构上伸展)，因为蛋白质分子(或其表面水层)和有机溶剂之间的"相界"表面被表面活性剂的分子所稳定。因此，生物催化剂可以处于只含有几十个水分子/酶分子的微型反应器中，而不直接与不利的有机介质相接触。这个量相当于比有机溶剂-表面活性剂系统中总含水量的1%(体积比)还少。

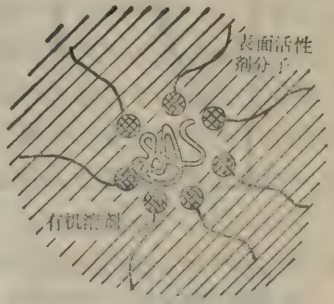

图3 在有机溶剂中酶缔合到表面活性剂物质反向胶束中

作为例子，图4列出有关过氧化物酶催化焦棓酚氧化的资料。从图中可以看到，当反应从水转移到由辛烷中反向胶束所

组成的基质时，反应的机制立即发生变化。这可以解释为在水-有机溶剂系统中不存在底物对反应的抑制所致。

表面活性剂的稳定效果是明显的，因此溶于苯烷(含有1%水，体积比)中的任一酶(α-糜胰蛋白酶)在室温下相对催化活力可维持几个月。

用低分子量试剂化学修饰法使酶稳定化

在加工过程和临床应用中存在有使酶稳定的添加剂，这是个问题，但它可以用化学修饰法来避免。这项技术在蛋白质结构与功能关系的研究中已广泛应用。然而，重要的是要知道蛋白质即使稍加修饰，也常会导致其性质的显著变化。但要预言化学修饰的结果使其热稳定性将有多大改变是困难的。这关系到生物催化剂的复杂的分子结构，例如，α-淀粉酶的乙酰化作用可使它在70℃以上的热稳定性增加，而在较低的湿度下它反而变得不稳定。然而，目前一种比较流行的看法可以概括为：同类型的蛋白质功能团，当其被修饰时，可表现出高度的非均质性(heterogeneity)。有些功能团的修饰对酶所起的作用(例如热稳定性)是很小的(如果是有的话)，而有些功能团当其被修饰时对生物催化剂性质发生决定性的影响，这些功能团我们可称之为"关键"基团。

这种说法可以从 NH_2 基被修饰的 α-糜胰蛋白酶的热稳定性所作研究的结果得到解释。图5表明烷化作用和酰化作用(琥珀酰化作用)虽然容易修饰 NH_2 基，但对糜胰蛋白酶的热稳

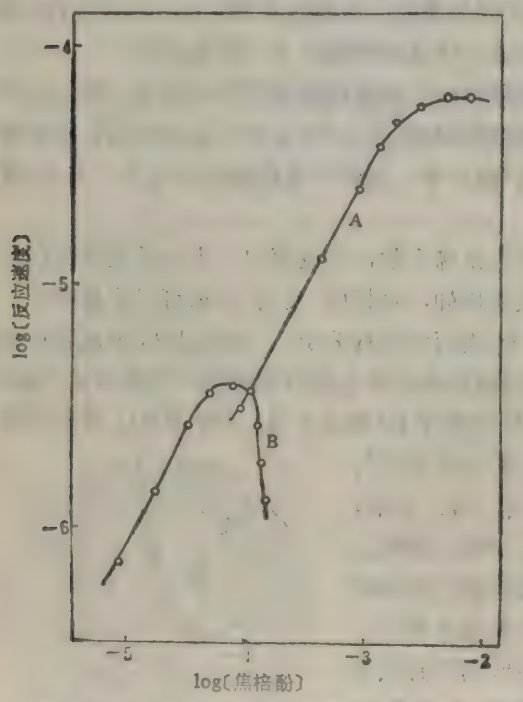

图4　在水饱合有2%(体积比)水的辛烷中焦棓酚过氧化作用的初速度(克分子/升·分)对底物浓度的依赖性

反应在26℃、$3\times10^{-4}M$ 过氧化氢酶、$3\times10^{-3}MH_2O_2$ 中进行。A，在反向胶束中；B，在水中

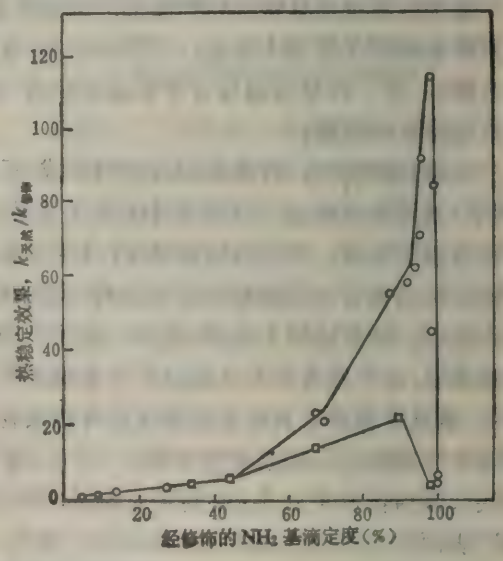

图5　α-糜胰蛋白酶的热稳定作用，以天然酶($k_{天然}$)和修饰酶($k_{修饰}$)钝化作用的一级速度常数与氨基被烷化(○)和琥珀酰化(□)作用取代程度的比例来表示。热钝化的条件如图1所述

定性影响甚小，而最不反应的蛋白质功能团（即位于不容易达到的分子内部深处的基团）的修饰却起着重要作用。在酶高度修饰的情况下，即16个修饰的基团中非取代的氨基在不到20%时，热稳定性首先明显的增加（10～100倍），然后当氨基几乎全部被修饰以后，就出现热稳定性明显下降。由于修饰的结果，蛋白质在280毫微米处的光谱特性发生了同样的变化（图6）。这个现象显然是受酶分子中的构象变化所限制。

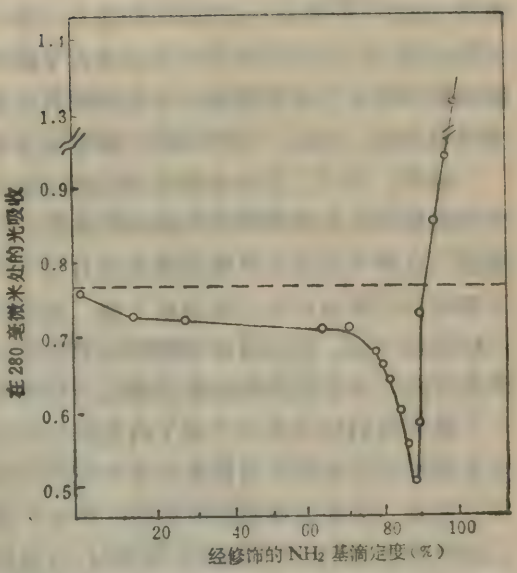

图6　在280毫微米处α-糜蛋白酶的光吸收随NH_2基团烷基化程度而变化
……非修饰酶

“关键”功能团的修饰引起酶的热稳定化，在不同酶中这些关键功能团对于专一的修饰剂的可获得能力可能是不同的。因此糖原磷酸化酶在低水平修饰时是稳定的，而核糖核酸酶的稳定性仅在修饰水平高时才有提高，或许蛋白质结构通过预修饰而有些松散之后，“关键”基团变得较容易接近修饰剂。所有这些事实都表明，只有在对每一种特定酶的研究参数（如热稳定性）对稳定速度依赖性作了严密研究后，才可用这种方法制备稳定的酶。而且从这些研究结果看出，稳定效果可用一个狭窄的取代作用范围来表示。基于这个理由可能使寻找酶的游离基团和修饰的功能团的最适比例成为一个困难的任务，尤其是如果分子中有许多基团的话。

用双功能团试剂作分子内交联的酶稳定化

在进化过程中，出现了分子内部交联可使酶稳定。这些交联可能是共价二硫键，或者是较弱的盐桥、结合在蛋白质中的钙离子。分子内交联的存在，阻碍了大分子的伸展，从而使得其更加稳定。还出现了用双功能试剂处理的人工键合的想法。为了增加酶的稳定性，仅形成一个交联已经足够，当酶固定于聚合物基块上时因为一个交链相当于两个键，后者已知是产生一种肯定的稳定效果。

出于一般考虑，可以假设双功能团试剂与酶的相互作用可以产生三种产物——分子间交联酶，分子内交联酶以及一点被修饰的酶（图7）。如果前一种情况可以通过适当地选择反应条件（例如通过降低反应介质中酶的浓度）而加以避免，那么更困难的是在于区别第二和第三产物。显然，酶分子中分子内交联的成败将取决于双功能试剂的长度相当于在分子中被连结的位点之间距离的程度。此外，形成的交联越多，显然酶抗伸展的稳定性就越大。

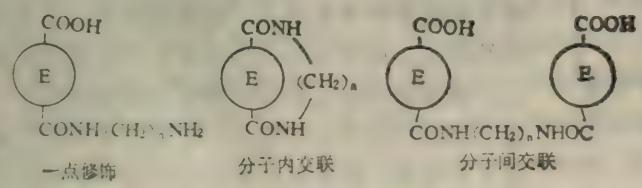

图7　双功能试剂与酶反应的可能途径

以上表明，为了用分子内交联得到稳定的酶，必须对大量的双功

能试剂进行试验，以便找到一种适合于每一种酶的试剂。由于种种原因，这种试剂在市场上无现成供应，大多数研究工作已致力于研究用戊二醛稳定酶的可能性。不用说，不能期望这种交联剂的长度是每种酶分子内交联所要求的。因此，精确地评价用戊二醛稳定酶的许多数据是值得的。同时，我们不进一步讨论分子间交联所形成的稳定酶聚合物的各种数据。

通常，用戊二醛处理所达到的酶的稳定作用是由于亚基间交联的结果，例如，生产了稳定的乳酸脱氢酶和葡糖氧化酶的衍生物。前者是由于被修饰的蛋白质的微环境发生变化而引起的，这种变化同交联酶的催化活力对 pH 的依赖性有关；在用戊二醛处理的胰蛋白酶中，尽管在两个胰蛋白酶之间形成了键，但仍未看到热稳定性明显地增加。在某些情况中，用戊二醛处理之后，发现形成可溶的分子间交联酶，其中不存在热稳定性的效果，葡糖苷酶、糜胰蛋白酶、天冬酰胺酶和溶菌酶以及醛缩酶的情况就是这样。

然而我们的兴趣在于分子内交联的衍生物，对其研究不仅可指出制备稳定酶系统的途径，而且也提供了溶液中蛋白质结构和表面形态图(topography)的资料。

用戊二醛处理糖原磷酸化酶，产生一种相当稳定的产物，稳定效果与用丁二醛(单功能戊二醛类似物)处理所产生的效果相似。这可能就是把稳定作用中起决定性的作用归因于修饰的理由。在排除分子间形成交联衍生物的条件下，用戊二醛处理糜胰蛋白酶不会产生对热较稳定的酶制剂。在这种情况中，因为还没有与单功能类似物的效果作一比较，所以不能说形成了分子内交联。一般来说，许多报告都没有将双功能试剂处理所产生的效果与单功能类似物处理所产生的效果相比较，所以阻碍了对修饰作用和分子内交联两者之间的区别。所以，Zaborsky 的看法是正确的。他认为在许多情况下对于在用双功能试剂观察到的稳定化中起作用的是修饰而不是分子内的交联。甚至对于把木瓜蛋白酶可逆地固定在琼脂糖上的情况下，用戊二醛处理，不可能形成分子间交联，而且在转移到溶液中后产生热稳定的衍生物（作者认为是由于分子内交联所致)，这个说法也不能作为结论，因为没有在相同的条件下与单功能的类似物作过比较。

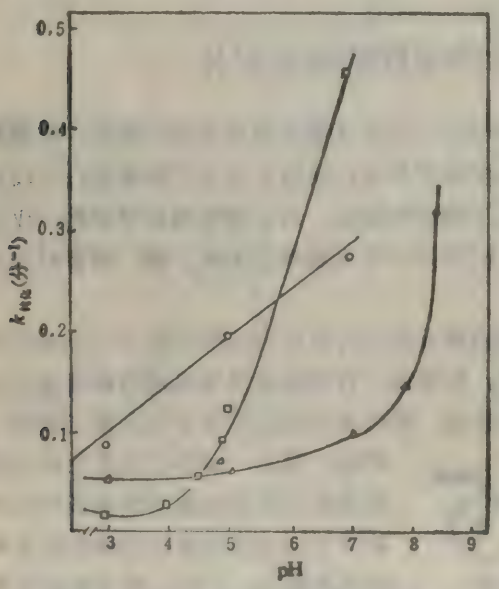

图 8　糜胰蛋白酶在 60℃下热钝化的一级速度常数对 pH 的依赖性

□，天然酶；△，用戊二醛处理的酶；○，用丙醛处理的酶

有些资料假设在许多情况中，戊二醛引起了酶非共价键的缔合，因为凝胶电泳用二醛处理所形成的蛋白质缔合物中，没有得到蛋白质分子之间共价结合的任何证据，而且，也没有得到形成分子内交联的证据。也不能把用戊二醛处理引起酶特性(如比旋光)的变化看作是分子内形成交联的证据，因为由一点修饰所引起的微环境中的变化可以产生同样的结果，因而难于得到资料来证明戊二醛处理对酶分子内交联的影响。但它的可能性并不能完全排除，例如，象聚赖氨酸这样的多聚氨基酸的修饰中，由于具有大量的反应氨基，很适合于与戊二醛分子内交联，研究者已经证实其分子内交联的存在。然而，即使在这种情况下，它们也只有在一定的条件下才能形成。最近全面地研究了

在排除分子间交联的条件下，用戊二醛和单功能类似物——丙醛处理 α-糜胰蛋白酶的热稳定性。看来（图 8）两种醛类使酶的热稳定性发生相同的变化——pH<4.5 时不稳定，pH>5.5 时稳定，但是，稳定的效果是小的，而且它们只能用化学修饰作用来进行解释，而不能用分子内交联来解释。因此，对为了通过分子内交联得到稳定的酶而广泛地应用戊二醛便产生了怀疑。

有一些报告中试图用其它双功能化合物——二酰亚胺酯、二异氰酸酯以及双重氮盐——来产生分子内交联。尽管在这些情况中热稳定的效果不大，但我们仍将对它们作较为严密的讨论。

用甲醛处理酶，有时可得到热稳定的衍生物，例如糜胰蛋白酶；有时则不能，如汞化木瓜蛋白酶。用苯二磺酰氯处理溶菌酶也获得了一种抗某种变性作用的较高的稳定性。在上述情况下，作者们把看到的效果归因于分子内交联，虽然形成分子内交联的唯一证据只是效果的本身。同时这个效果可解释为是由于所用的试剂对酶分子作一点修饰所致。Zaborsky 有上述同样的看法。在另一些情况下，例如在用二甲基己二酸处理的苷糖酶的研究中，所看到的热稳定效果没有与单功能类似物作过比较。这又把分子内交联的问题搁了下来没有解决。

在某些情况中，用双功能试剂处理使分子内形成交联已有充分的论证。例如，用六甲撑二异氰酸酯处理半乳糖苷酶，可大大提高其热稳定性，而用单功能异氰丁酯处理，则不会改变其热稳定性。这可以作为形成分子内交联的第一个迹象。用二甲基己二酸盐处理核糖核酸酶也可引起酶的热稳定化。此外作者用核磁共振波谱法证实，稳定效果与酶分子的刚性有关，这种刚性是分子形成内交联的必然结果。

用聚硫醇作用之后再用不同长度的双碘乙酰胺处理，作两步交联，得到了热稳定的核酸酶制剂，虽然稳定效果不大。作者认为，这是由于交联太长。不同的紫外吸收也证实了酶的构象的稳定性增加——这是分子内交联的结果。类似的方法也导致产生交联的糜胰蛋白酶，它对氯化胍的作用比天然酶更稳定，而且已经表明稳定化的效果取决于交联的长度，用较短的双功能试剂稳定化的效果增加。

因此，对可引用的文献进行分析，所得出结论是，对分子内交联的形成和酶的稳定化（二者之间的关系）了解得还很少。其他结果都可以用酶的一点修饰或者用微环境的变化进行很好的解释。在许多情况下对所观察到的效果与交联剂的单功能类似物缺乏进行比较，致使我们未能作出最后的结论。而且，适合于用作比较的类似物的挑选上也有些问题。这种试剂不仅具有同样的基团，还必须在结构上类似于交联剂，而且还要求在分子的惰性末端有一个不起反应的亲水基团，以便阻止因修饰而使"蛋白质分子变得更加疏水"。换句话说，长链脂肪的二异氰酸酯类似物必须不是单异氰酸酯，而是一种一端为异氰酸酯基另一端为氨羟基或羧基的化合物。能否找到一种能对特定的酶形成交联的双官能试剂？理论上说是可能的。为此目的，使用了一系列同类型而分子大小不同的双官能试剂，对选定的酶进行连续试验，并将所得的数据与选定的单官能类似物作比较，应当可以鉴别出能形成交联的试剂。这种试验，不应该是一种随意的，而应该是有指导的。已应用一系列有相同功能团的双功能试剂进行了某些研究（虽然这些研究还很少）。在低聚蛋白、醛缩酶和乳酸脱氢酶的研究中，使用了一系列不同链长的二亚氨酸酯。不同大小的试剂得到不同的结果，从而作者得出了功能团在蛋白质分子表面的几何学结论。对低聚物酶——延胡索酸酶、乳酸脱氢酶和醇脱氢酶——的对称性所作的类似研究是用一些链中有 3～12 个碳原子的亚二胺盐进行的。

上述研究目的不是为了寻找增加酶稳定性的交联的适当大小。有关酶的稳定作用缺乏类似的研究，其原因可以解释为市上缺少现成的适合于与酶作用的双功能化合物，而且它们的合成是很费劲的。值得注意的是使用通常不与蛋白质作用、但在酶经过预修饰之后可与它反应的现成的试剂。

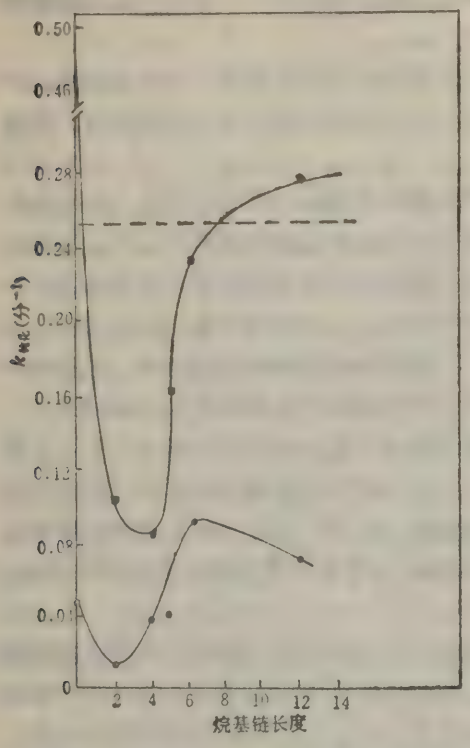

图9　α-糜胰蛋白酶热钝化的一级速度常数对胺链长度的依赖关系

■天然酶；●用不同链长的二胺类交联的酶(50℃，pH8)；------天然酶和琥珀酰化的酶的热稳定性

在另一些研究中，也用一些商业上现成的具有 $NH_2(CH_2)_nNH_2$ 型(n=0～12)的脂肪族二胺进行分子内交联可能性的研究。α-糜胰蛋白酶的羧基用水溶性碳化亚胺预先激活，然后碳化亚胺能使它与二胺类反应。通过对被修饰酶的热钝化速度常数对二胺链长度的依赖性的研究证明（图9)，其依赖性最小(即在用 n=4 的二胺类)时可以观察到明显的稳定效果。既然在实验条件下不形成分子间的交联，而且此交联剂的单功能类似物1-氨-3-丙烷-3-醇甚至会引起酶的某些不稳定，那么结论是，在适当的预修饰和用 1,4-四甲撑二胺处理之后，在糜胰蛋白酶中形成了分子内交联。其他二胺类按照一点修饰的机制也可以和酶作用。如果上述的系统中形成的分子内交联是正确的，那么，具有反应基团的酶的富集必须首先增加交联数即增加其热稳定性。其次，由于大量反应性基团分布在分子表面上，最适交联的长度可以减少。通过与琥珀酐的作用，使氨基转变为羧基，而将外加的羧基引入糜胰蛋白酶中，从而证实了这一观点。首先是稳定作用的明显地增加(图9)，其次是最大的稳定作用由 1,4-四甲撑二胺变为 1,2-乙二胺。

这样，一系列有相同功能团的双功能试剂的应用，使有可能定向地选择能在特定的酶中形成分子内交联并增加酶的热稳定性的试剂。而且，将外加的反应基引进到酶分子中也为改变其交联长度和其效果值提供了一个机会。重要的是注意在所有这些情况中，稳定效果是明显的(热稳定性增加几倍到几十倍)，而使得到的制剂适合于实用。如果考虑到用双功能试剂处理酶的活性损失通常是很少的这一情况，那么这就特别可靠。

显然，如果一引进的交联在分子的两个可能交联点之间有适当的跨度，则双功能试剂能达到最佳的效果，即可能形成最多的分子内交联并得到最大的稳定效果。这个方法要求用可逆的交联。这意味着如果平行地形成一点修饰和两点交联是可能的，那么在分子两端都受到影响的情况下，从热力学上考虑，修饰剂的裂解会受到限制。只有一个反应端的修饰剂，将不难裂解。将酶和不同长度的可逆双功能试剂混合物一起保温，意味着会渐渐地发生两点交联代替一点修饰，因而修饰酶的稳定性将会增加。这样的方法可称之为"酶的自己稳定作用"(Enzyme Self-stabilization)。

作为这种类型的一个例子可能是硫赶-二硫化合物的互换反应。Reiner 和其他人早已证

实过这个反应可用于酶固定化和分子内的交联。事实上，如果酶分子含有活化的 SH 基，那么可以预料，当其用不同长度的 $SH(CH_2)_nSH$ 型二硫赶处理时会形成交联。同时，在游离的二硫赶的 SH 基变成 S—S 键的亲核反应的情况下，这个过程的可逆性取决于下面的假设：当使用有不同长度的二硫赶混合物时，由二硫赶开始的一点修饰将被热力学上更为有利和更为稳定的两点修饰——分子内交联所代替。这意味着，酶会从各种长度的双功能试剂中选择最适长度的分子内交联。于是这种酶得以自己稳定。

这种系统的研究是通过用二硫赶修饰糜胰蛋白酶来进行的。在排除分子间交联的条件下，发现了 1,5-戊撑二醇能形成分子内交联(巯基乙醇被用作一点修饰剂)。图 10a 表明修饰的酶对氯化胍的变性作用的稳定效果是双功能试剂链长的函数。从而也证明了用不同的二硫赶等分子混合物修饰酶时，同时发生稳定作用，其效果与 1,5-二硫赶的情况相似。在这种交联修饰剂不存在时，其他二硫赶混合物引起酶稳定化的效果与巯基乙醇相比并没有明显差别(图10b)。

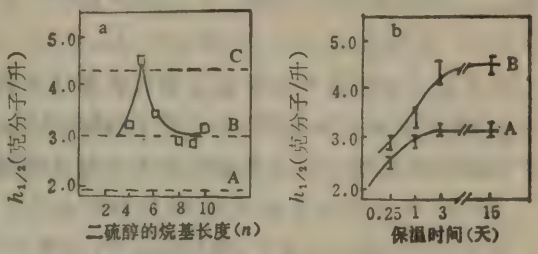

图 10

(a) α-糜胰蛋白酶的最大热稳定效果对二硫赶的烷基链长度的关系（$h_{1/2}$ 是相当于高浓度氯化胍中酶总活力减少50%的氯化胍浓度)。A，天然酶；B，用单官能硫醇处理过的酶；C，用二硫赶(20℃，pH7)等分子混合物处理过的酶。

(b) 用不同的硫赶的等分子混合物处理 α-糜胰蛋白酶的稳定作用与保温时的效果。A，未用 1,5-戊撑二硫赶处理；B，加有1,5-戊撑二硫赶处理。

所得的结果从理论上指出了实现酶稳定作用的可能性。显然，二硫赶-二硫化物互换可用于含许多 SH 基的亚单位酶的稳定作用。也可以提出其他的交联系统。

结　论

我们的目的不在于对所有有关酶稳定作用的报告进行评论。考虑到这种研究的不断增加，已越出一篇文章的范围，我们的主要目的是揭示多种方法和最可靠的物理-化学原理，它可能为解决在不用聚合物为载体的溶液中，怎样稳定酶的问题提供机会。最近得到的资料表明，稳定作用的效果(减少热钝化速度常数)只有在适当减少比活力的情况下才达到两个数量级。进一步发展所考虑的这些方法，特别是选择新的效应剂和试剂，当将会提供更好的结果。

陆敬懿译自《Enzyme Microb. Technol.》1(2):74～86,1979.胡学智校

(上接第 36 页)

究的一个课题，目前还暂无答案。限制性部位的识别比较容易，它对阐明 DNA 片段在重新装配合成基因时所起的潜在作用是极为有用的，不过在解释 DNA 分子的体内功能时就无多大作用了。鉴于 DNA 复制源相当大的一部份序列都是对称的，故有些DNA复制源也是可以识别的。但是，假若没有可靠数据，其准确性就较差。DNA 序列所有的这些特性目前基本上都可用计算机程序来进行测定。当前，在鉴定已知序列的生物功能时，仔细地审核计算机输出的数据已成为设计实验方案的重要一步。

龚义台译自《Anal. Biochem.》98(2):243～253, 1979. 傅利平校

用杂交法分离细胞表面蛋白

L. P. WENNOGLE　　H. C. BERG

用一种不能透入细胞质膜的试剂（低聚脱氧胸苷酸5′-对氨基苯磷酸盐的重氮盐）处理人血红细胞，分离出影泡(ghost)，把低聚物的5′末端共价结合于膜的外表面，在脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐的存在下用末端脱氧核苷酰转移酶处理使之延伸。将膜溶于SDS，借助聚核糖腺苷酸-琼脂糖的杂交作用，分离出含有细胞表面成分的复合物。在三通X 100的存在下，用核酸酶 P_1 处理使细胞表面成分再生。再生物质的SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳谱上呈现出带Ⅲ，PAS-1，PAS-2和PAS-3，即可以得到的人红血球的主要蛋白质。本法对其他细胞类型表面成分的分离将是有用的。

引　言

功能上最有意义，结构上独具一格的质膜成份是一些附在细胞外表面的蛋白质。为了分离它们，已发展了很多方法。例如用于人红细胞的方法就有：用化学试剂（如液态酚、二碘水杨酸锂、氯仿/甲醇和吐温20等）有选择地抽提，用磷脂囊泡(phospolipid vesicles)提取，用对半抗原特异的抗体Sepharose（琼脂糖商品名）衍生物亲和层析，以及用某些外源凝集素〔如伴刀豆球蛋白A(Concara valin A)或 *Lens culinaris* phytohemagglutinin〕和小麦胚芽凝集素等的Sepharose衍生物作亲和层析。对于其它细胞类型（如淋巴细胞），也曾采用免疫沉淀法。

我们发明了一种分离细胞表面通常的蛋白的方法，所谓通常，意思就是包括了所有这样的蛋白质，此法无需预先分离质膜，而且可在SDS存在下进行，即膜可完全溶解于介质中。此法的根据是核酸在SDS的存在下杂交。核酸共价结合于完整细胞的表面，含有细胞表面成分的复合物通过杂交到互补的核酸柱上而被分离，除去核酸后就可对细胞表面成分进行特性描述。我们用人红细胞作为模式并描述其蛋白质。此法可用于其他细胞类型及其他细胞表面成分。

我们曾叙述过低聚脱氧胸苷酸5′-对氨基苯磷酸盐的重氮盐的合成，它们键合于完整人红细胞。通过用末端转移酶处理延伸DNA链，以及把细胞杂交到聚核糖腺苷酸-琼脂糖〔poly(A)-agarose〕柱。在本文中，我们叙述了膜-多聚脱氧胸苷酸复合物在SDS中的增溶作用，它们对poly(A)-agarose的杂交作用（在SDS的存在下），通过用核酸酶 P_1 处理后细胞表面成分的再生（在三通X100的存在下），以及所再生的蛋白质用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳所作的分析。

材料与方法

(a) 试　剂

放射性脱氧胸腺嘧啶5′-三磷酸盐（铵盐，甲基-^{3}H标记，49居里/毫克分子），此物用非放射性脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐稀释2000倍；放射性五脱氧胸苷酸（^{3}H标记，0.28毫居里/毫克分

子碱基)；放射性多聚脱氧胸苷酸，由低聚物(10微克分子)和稀释的脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐(2毫克分子)通过末端脱氧核苷酰转移酶的作用而制得；多聚脱氧胸苷酸；链霉蛋白酶(Ⅵ型)；胰蛋白酶(Ⅲ型，两次结晶，取自牛胰脏)以及三通 X100；核酸酶 P_1；DNase I；牛胰脏；顺丁烯二酰亚胺；氨基脲(semicarbazide)盐酸盐(99%)；甲硫氨酸和二硫苏糖醇；大豆胰蛋白酶抑制剂。

(b) 缓冲液

稀聚合缓冲液(pH7.2)含 33m*M* 二甲胂酸钾，1m*M* $CaCl_2$，0.1m*M*二硫苏糖醇以及2m*M* 脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐。巴比妥缓冲液(pH5.3)含 29m*M* 巴比妥钠，29m*M* 醋酸钠。pH 用 1*M* HCl调节。此外，三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)是含 0.1% 三通 X100 的巴比妥缓冲液。SDS/磷酸盐缓冲液(pH7.0)是 0.1%SDS，50m*M* 磷酸钠，另外，SDS/NaCl/磷酸盐缓冲液(pH7.0)是此缓冲液中含 300m*M* NaCl。SDS/硼酸盐缓冲液(pH9.1)是含0.1%SDS 和50(或100，见说明) m*M*硼酸钠。

(c) 聚脱氧胸苷酸的共价结合

用于分离细胞表面蛋白的操作步骤见图1，操作步骤标以罗马数字，除了另作说明者外，含有 SDS 的操作在室温下进行，其它均在 4℃ 下进行。(i)开始，我们把五脱氧胸苷酸 5′-对氨基[^{14}C]磷酸盐的重氮盐[$N_2\phi(pT)_5$]偶联到完整红细胞的外表面。

完整红细胞
(i) 以 NaCl/硼酸盐缓冲液/1.3(pH9.1)洗 5 次；用[^{14}C]$N_2\phi(pT)_5$ 处理
↓ 以磷酸缓冲液 (pH7.4)洗 5 次
原细胞 (primed cell)
(ii) 于磷酸缓冲液/20(pH7.4)溶胞；离心
→上清液
↓ 以磷酸缓冲液 /20(pH7.4)洗 4 次，二甲胂酸钾缓冲液 /20(pH7.2)洗一次
原影泡
(iii) 在稀聚合缓冲液(pH7.2)中用末端转移酶处理，离心；取上清液样品
→上清液
↓ 重新悬浮
修饰后的影泡
(iv) 加 SDS，EDTA；在SDS/硼酸缓冲液 (0.05*M*，pH9.1)中透析，用[^{35}S]$N_2\phi SO_3$处理；在 SDS/硼酸缓冲液
↓ (0.1*M*，pH9.1)中透析
标记的膜成分
(v) 在 SDS/NaCl/磷酸缓冲液(pH7.0)中透析
加到聚(A)-琼脂糖柱；用相同缓冲液洗
↓ →柱洗脱液
杂交了的表面成分
(vi) 用三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)洗
用核酸酶 P_1 处理琼脂糖珠
通过过滤除去琼脂糖珠；用 SDS/NaCl/磷酸盐缓冲液(pH7.0)洗
→残留的琼脂糖珠
↓ 在 SDS/磷酸缓冲液(pH7.0)中透析；浓缩
再生表面蛋白

图 1 用于分离细胞表面成分的操作步骤流程图

本文中的缩写：SDS：十二烷基硫酸钠；$(pT)_n$：具有n个核苷酸的低聚脱氧胸苷酸；$N_2\phi(pT)_n$：低聚脱氧胸苷酸5′-对氨基苯磷酸盐的重氮盐；$N_2\phi SO_3$：对氨基苯磺酸(sulfanilic acid)的重氮盐；$H_2N\phi(pT)_n$：低聚脱氧胸苷酸5′-对氨基苯磷酸盐

细胞悬液(50%,体积比)用溶在 NaCl/硼酸缓冲液 /1.3(pH9.1)中的 1.1m*M* 试剂在 4°C 处理 4 小时。细胞沉下并用磷酸缓冲液(pH7.4)洗 5 次。(ii)如Bender等人(1971)所述,在磷酸缓冲液/20(pH7.4)中制得影泡,然后用二甲胂酸钾缓冲液 /20(pH7.2)洗涤。溶胞液中的血红蛋白在Sephadex G100柱上纯化,其放射性用闪烁光度计测定。(iii)用末端转移酶延伸低聚物。在二甲胂酸钾缓冲液 /20(pH7.2)中的影泡悬液(50微升,50%,体积比)用 50 微升含有 50 单位转移酶的稀的聚合缓冲液(pH7.2)混合,并且将此混合液于 37°C保温 4.5 小时。影泡沉下形成小球,除去 10 微升悬浮液,再将影泡重新混悬。悬浮液放射性在闪烁光度计上测定(在 Aquasol-2中)。

(d)比活性的提高

在合成$N_2\phi(pT)_5$中所使用的对 -[^{14}C]硝基酚的比活性较低(1.76 毫居里/毫克分子)。为了使蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶上更易鉴别,我们发现用一种高比活性(4.83居里/毫克分子)试剂——[^{35}S]对氨基苯磺酸的重氮盐——来标记膜成分是合适的。(iv)影泡加温到室温,加 SDS 和 EDTA〔最终浓度分别为3%(体积比)和 0.1m*M*〕增溶。混合液在 SDS/硼酸盐缓冲液(0.05 *M*, pH9.1)中透析,冷到5°C并加到冰冻干燥了的[^{35}S]$N_2\phi SO_3$ 样品中(最终浓度 0.07m*M*),此[^{35}S]$N_2\phi SO_3$已由 Wennogle 和Berg 的方法制得。混合液加温到室温并在 SDS/ 硼酸盐缓冲液(0.1*M*, pH9.1)中透析。

(e)杂交到聚(A)-琼脂糖

杂交作用在室温下进行。聚(A)-琼脂糖柱(0.2 毫升)制得后用 SDS/NaCl/ 磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤。(v)标记了的膜材料对同种缓冲液透析,然后上柱。此柱用 2 毫升相同的缓冲液洗涤,柱不允许流干。

(f)细胞表面成分的再生

通过用核酸酶 P_1 处理从膜蛋白上除去 DNA,此酶不含可检出的蛋白水解酶或糖苷酶活力(见下文)。核酸酶 P_1 可在三通 X100——一种抑制膜蛋白聚集作用的去垢剂——存在下使用。(vi)聚(A)-琼脂糖柱用三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)充分洗涤。停止流动后,将此琼脂糖珠移入装有 0.4 毫升缓冲液的 1 厘米×10 厘米的试管中。加入核酸酶 P_1(25微升的2毫克/毫升的溶在巴比妥缓冲液,pH5.3 的溶液;用 1/10 的量试验就足够了)。混合液在65°C保温 30分钟。此琼脂糖珠通过一个具有玻璃纤维塞的巴斯德吸管(Pastear pipette)过滤除去,并用 SDS/NaCl/磷酸缓冲液 (pH7.0)洗涤;合并滤液和洗液。在 SDS/磷酸缓冲液 (pH7.0) 中透析除去低分子量成分。在透析袋中的物质通过将袋浸到干燥的 Sephadex G 200进行浓缩,直到其体积减少到约 0.4 毫升为止。此浓缩物用 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析,胶片要计算得足够地长,以使样品减去背景的计算误差减小到2%。

(g)对照实验

如果最后浓缩物确是蛋白质,那么它对蛋白酶的水解将是敏感的。为此将 0.2 毫升样品在 15m*M*Tris 缓冲液 (pH7.6)中透析。加入蛋白酶(50微升的 2 毫克/毫升的相同缓冲液的溶液),混合液在 37°C保温 30 分钟。加热到 70°C终止消化反应,加 SDS(最后浓度为 3 %,重量/体积),凝胶电泳同前。

蛋白质可能会非专一性地被保持在聚 (A)-琼脂糖柱上,即没有被共价结合于多聚脱氧胸苷酸上。为了检验它,我们在没有脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐的情况下用末端转移酶处理一些原影泡:正常的存在于聚合缓冲液〔步骤(iii)〕中的脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐用等量的 A_{260} 的多聚

脱氧胸苷酸代替，样品操作同前。

胰蛋白酶水解某些(而不是所有的)在人红细胞外表面的蛋白质。因此，我们比较了来自正常的和胰蛋白酶水解了的细胞的再生蛋白所得到的凝胶图谱。磷酸缓冲液(pH7.4)中的完整红细胞悬浮液(17%，体积比)用胰蛋白酶(0.4毫克/毫升)在37℃下处理1小时。细胞用含有大豆胰蛋白酶抑制剂(0.1毫克/毫升)的磷酸缓冲液(pH7.4)洗一次，其后的操作步骤同前(图1)。

用末端转移酶延伸结合着膜的低聚物〔在此实验中，我们用[^{14}C]$N_2\phi(pT)_6$〕的效率是这样检验的：完成步骤(i)到(iii)，省略步骤(iv)中用[^{35}S]$N_2\phi SO_3$的处理，测定在步骤(v)中被聚(A)-琼脂糖柱所保留的总放射性的分部。

核酸酶 P_1从蛋白质〔步骤(vi)〕中除去核酸程度的检验是，步骤(iii)中采用[^{3}H]脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐，省略在步骤(iv)用[^{35}S]$N_2\phi SO_3$的处理，并在闪烁光度计中测定再生蛋白质的氚含量。

原始的细胞色素C样品(图2，管15到23)是在二甲胂酸钾缓冲液/20(pH7.2)中透析，并用上述的Sephadex G 200浓缩。此浓缩物用末端转移酶处理，杂交到聚(A)-琼脂糖，并通过图1的操作步骤用核酸酶 P_1处理使之再生。比较原蛋白和再生蛋白的凝胶图谱。

在核酸酶 P_1处理的前与后，我们用放射性多聚脱氧胸苷酸来检验聚(A)-琼脂糖柱的保留效力。也试验了[^{3}H]$(pT)_5$和[^{14}C]$H_2N\phi(pT)_5$。这些化合物的样品($0.6A_{260}$单位，3×10^3到4×10^4计数/分)溶解于每份1.5毫升SDS/NaCl/磷酸盐缓冲液(pH7.0)中，并上不同的柱。这些柱用2毫升同样的缓冲液洗，对洗液计数。然后，这些柱用三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)洗，并如图1步骤(vi)用核酸酶 P_1处理。滤液、剩余的琼脂糖珠和玻璃纤维塞等均作计数。少量琼脂糖珠会损失在玻璃制品上。

(h) 污染有酶活力的试验

首先将核酸酶 P_1在整体膜蛋白上试验。将一部分柱洗脱液[图1步骤(v)]在三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)中透析，和0.2毫升聚(A)-琼脂糖混合，并如上述(f)部分用核酸酶 P_1处理。过滤除去聚(A)-琼脂糖，滤液在SDS/磷酸缓冲液(pH7.0)中透析，并用SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。将另一部分柱洗脱液在SDS/磷酸缓冲液(pH7.0)中透析，并用SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。比较两份样品的凝胶图谱。

其次，我们于细胞表面蛋白上试验核酸酶 P_1。实验已在前面叙述了，在这实验中，得自用[^{35}S]对氨基苯磺酸的重氮盐处理的细胞的影泡受到末端转移酶作用(图4)。此实验所用的某些影泡溶于SDS，在三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)中透析，并在聚(A)-琼脂糖(如上面)的存在下用核酸酶 P_1处理。过滤除去聚(A)-琼脂糖，滤液在SDS/磷酸缓冲液(pH7.0)中透析，并用SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。比较用核酸酶处理和不处理样品的凝胶图谱。

结果和讨论

(a)细胞表面蛋白的分离

再生蛋白的凝胶图谱如图2所示。图2表明红细胞的主要细胞表面蛋白是存在的：在图(a)中有带Ⅲ〔阴离子孔(通路)蛋白〕，带PAS-1，带PAS-2，和带PAS-3。其它主要红细胞膜蛋白(如收缩蛋白Spectrin)不存在，即使把它们用放射性标记〔图1步骤(iv)〕也不能发现。注意，

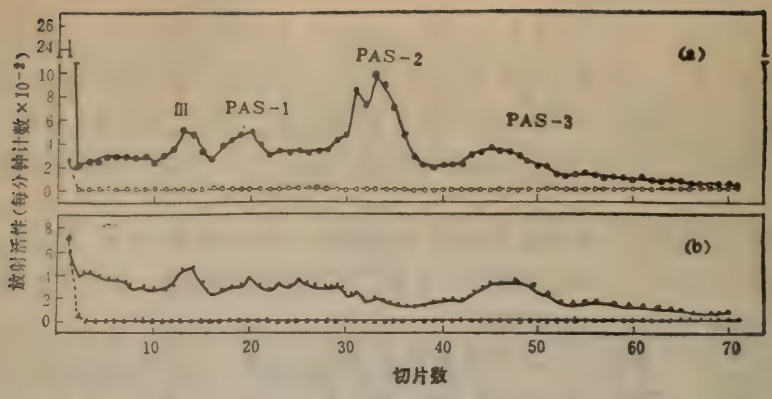

图 2　用图 1 流程分离的细胞表面蛋白的 SDS/聚丙烯酰胺凝胶(7.5%)

(a)从正常细胞得到的蛋白(—·—·—)，用蛋白酶处理后的相同的物质(—○—○—)。(b)从胰蛋白酶水解细胞得到的蛋白(—▲—▲—)，和当正常存在于聚合缓冲液中的脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐(图 1，步骤(iii))用一种A_{20}。相等的多聚脱氧胸苷酸替代时，正常细胞得到的结果(—△—△—)。凝胶经切片并计数。胶的顶端在左面。带 PAS-2 在许多重复的凝胶上表现为单一的带；在第一根胶的32号切片上放射性异常地低。

带 PAS-2比带 PAS-1含有更多的放射性物质；当从完整细胞简单地用 $[^{14}C]N_2\phi(pT)_5$处理而制得的膜进行凝胶电泳时就看不到这种情况。图 3 是一种含有多于 10 倍的同样糖蛋白的凝胶。其它人已注意到红细胞膜糖蛋白集聚状态下的类似变化；集聚的状态取决于浓度、pH、温度和去垢剂的性质。

被聚(A)-琼脂糖保留以及用核酸酶 P_1 处理而再生的所有的物质是含有蛋白质的；这种物质可被蛋白酶完全水解[图 2(a)]。假如多聚脱氧胸苷酸没有共价联结到蛋白质上就分离不出什么东西 [图2(b)]。当从胰蛋白酶水解细胞中分离出细胞表面蛋白时，带Ⅲ表现得完整，但带 PAS-1 和 PAS-2 不完整[图 2(b)]。现知道当用胰蛋白酶处理完整细胞时，阴离子孔道蛋白(带Ⅲ)是拮抗的而血型糖蛋白A(带 PAS-1和 PAS-2)是有选择地被降解。带 PAS-3也表现出拮抗[图 2(b)]。图2(b)类似于用[^{35}S]对氨基苯磺酸的重氮盐标记的胰蛋白酶解细胞所得到的凝胶图谱。

通过聚(A)-琼脂糖柱的蛋白的凝胶图谱表示在图3(a)。对照图2(a)，基本上所有的膜蛋白均存在。仅仅约2%细胞表面蛋白被柱保留。这部分是因为某些目的：(1)为了使膜的损坏减小到最低限度，细胞受到比较少的$N_2\phi(pT)_5$作用，因此仅仅约30%表面蛋白变为放射性物质(约 3×10^5位点/细胞)；(2)只有约 25 %膜结合的引物被末端转移酶作用而延伸；(3)大约60%的引物（或多聚脱氧胸苷酸）和蛋白质之间的结合键对 SDS 不稳定。但低产并不引起严重关注，因为来自大批细胞的蛋白不断流过柱，这样就浓缩了。

图2(a)和 3(a)的凝胶图谱是不同的，因为低聚物试剂 $[N_2\phi(pT)_5]$ 不能自由地穿透细胞膜。我们通过比较溶胞液上清液的比活性[图 1 步骤(ii)]和膜沉淀物中的血红蛋白的比活性以测定穿透速率。在膜沉淀物中血红蛋白的比活只有 1.4%，即仅有细胞表面蛋白比活的 0.2%。通常，磷酸酯不能穿透人红细胞膜。用 $[^{14}C]N_2\phi(pT)_5$ 处理完整细胞与用 $[^{35}S]N_2\phi SO_3$处理完整细胞所得的凝胶图谱是相似的。

可以想象某些表面蛋白能从共价联结到多聚胸苷酸上的膜中抽出。为此，我们通过用末端转移酶处理[图 1 步骤(iii)]，测定所得上清液 ^{14}C 含量来检验它。因为某些膜-低聚物键是

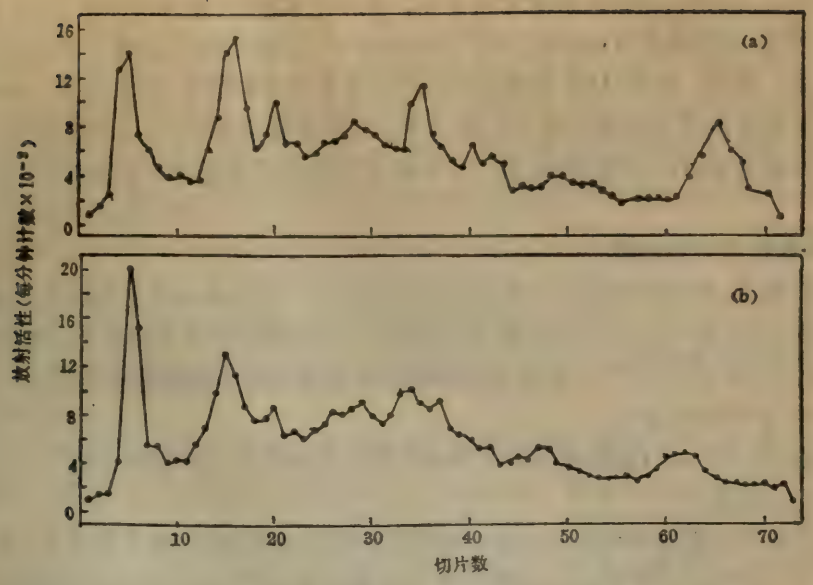

图 3　柱洗脱液(图 1 步骤(v)的 SDS/聚丙烯酰胺凝胶(7.5%)

(a)受核酸酶 P_1 作用前，(b)受核酸酶 P_1 作用后

不稳定的，我们对含有脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐的聚合缓冲液与代之以含有 A_{260} 相等的多聚脱氧胸苷酸的聚合缓冲液，二者所得上清液的放射性作了比较。没有检出什么差别(联结到膜上的计数少于1%)。我们认为多聚脱氧胸苷酸是共价结合于紧紧嵌入膜中的那些成分。

(b)其他对照实验

多聚脱氧胸苷酸被聚(A)-琼脂糖吸着基本上可由它用核酸酶 P_1 处理所释放量来定量(见下表)。被核酸酶 P_1 溶解的物质不能杂交到第二根聚(A)-琼脂糖柱上，残留的琼脂糖珠也不能吸住新鲜的[^{3}H]多聚脱氧胸苷酸(数据未列出)。低聚物[^{3}H](pT)$_5$和[^{14}C]$H_2N\phi$(PT)$_5$通过柱的情况见下表。

表　从聚(A)-琼脂糖柱上物质的得率

样　品	在洗脱液中的数量(总量的%)*	被核酸酶P_1溶解的数量(总量的%)*	留在琼脂糖珠和玻璃纤维上的数量(总量的%)
[^{3}H]多聚脱氧胸苷酸	1.8±0.1	96.4±4.4	0
[^{3}H](PT)$_5$	93.6±1.8	<0.1	0
[^{14}C]$H_2N\phi$(PT)$_5$	96.1±1.8	<0.1	<0.1

* 实验时以四倍测定；误差系用标准误差表示。

核酸酶 P_1 既有核酸外切酶的酶解活力又有核酸内切酶的酶解活力。它降解核酸不顾糖和碱基的性质，是破裂磷酸盐和3′-羟基间的键，产生5′-核苷酸。它作用于脱氧胸腺嘧啶3′-对硝基苯磷酸盐，但不与脱氧胸腺嘧啶 5′-对硝基苯磷酸盐作用。因此，脱氧胸腺嘧啶 5′-对重氮苯基磷酸盐残基将保留下来，联结于再生蛋白上(图 4)。

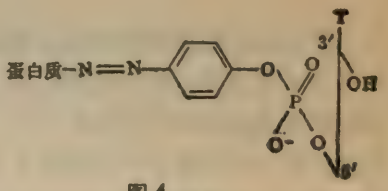

图 4

当小儿麻痹症(灰脊髓炎)病毒的 RNA-蛋白复合物用酶处理时，联结于蛋白质上的单一的核苷酸被保留着。我们没有严格地表示只有一个核苷酸被保留联结到我

们的再生蛋白上，但我们相信这是确实的情况。在一个实验里，聚合缓冲液中[图 1 步骤 (iii)]使用了[^{3}H]脱氧胸腺嘧啶三磷酸盐，即：用核酸酶 P_1 处理后[图 1 步骤 (vi)]，有 99% 以上的氚通过透析袋。此外，在 SDS/聚丙烯酰胺凝胶上再生蛋白的位置[见图 2(a)]与用[^{35}S]对氨基苯磺酸的重氮盐处理完整细胞的膜上相同蛋白的位置没有显著的差别(数据未列出)。天然的和再生的细胞色素 C 的凝胶图谱，除了后一情况在胶的顶端有某些放射活力外，两者也是没有区别的。

(c)污染着酶活力的试验

商品核酸酶 P_1 制剂没有蛋白水解酶和糖苷酶活力。在核酸酶处理和未处理的大多数膜蛋白凝胶图谱之间，唯一的恒定的差别[图 3(b)和(a)]是那些归因于酶本身的存在。关于细胞表面蛋白，即当完整细胞用[^{35}S]对氨基苯磺酸的重氮盐处理时被标记的那种蛋白，其凝胶图谱也是成立的(数据未列出)。

另一些酶，如 DNase I和蛇毒磷酸二酯酶的商品制剂也曾用于再生蛋白质，也发现它们是高活力的蛋白水解酶。

上文曾已提及因末端转移酶处理而产生的凝胶图谱中的变化(图 4)：带Ⅲ(阴离子孔道蛋白)明显；带 IV a已失去；带 PAS-1 变化为低分子量的物质。我们发现即使当影泡处于没有酶的聚合缓冲液中，后一种效应还是发生。可能，前两种效应因用较纯的酶制剂而减到最小程度。

(d)蛋白质的聚集

正如 Fujimoto 等人介绍的那样，当在巴比妥缓冲液中使用核酸酶 P_1，并且用 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳测定再生蛋白时，在凝胶的顶端保留了大部分的蛋白质。在巴比妥缓冲液中所形成的聚集物，不能被 SDS 离解。

当 1 毫克分子氨基脲加到聚合缓冲液以抑制因类脂过氧化产物交联时，或者当 1 毫克分子甲硫氨酸加到聚合缓冲液以抑制自由基形成时，用N-乙基顺丁烯胺处理以防止二硫键形成的膜中也发生这样的聚集作用。

当透析从 SDS/磷酸缓冲液 (pH7.0)进入到巴比妥缓冲液(pH5.3)时，大量的膜蛋白趋向于沉淀。当透析使物质回到 SDS/磷酸缓冲液 (pH7.0)时，沉淀物消失，但蛋白仍保留在胶的顶端。假如蛋白质经高度修饰，例如用对氨基苯磺酸的重氮盐作用，则聚集作用更加严重。

相反，当蛋白质在三通/巴比妥缓冲液(pH5.7)中透析时，聚集作用不是个严重的问题，只有少量沉淀形成，也只有少量蛋白质被保留在胶的顶端。在三通 X100 中核酸酶保持着活性，因此，再生步骤[图 1 步骤 (vi)]可在三通 X100存在下进行。据我们所知，在一种去垢剂中使用核酸酶 P_1 这还是第一次报道。

摘 要 与 展 望

我们已将脱氧胸苷酸的低聚物共价结合到完整人红细胞的表面，用酶促方法延伸核酸链，并通过杂交到聚 (A)-琼脂糖(有 SDS 存在下)分离出了含有细胞表面成分的复合物，然后用核酸酶 P_1处理成分(在三通 X100 的存在下)使细胞表面成分再生。最后的浓缩物包含着所有的蛋白质——已知的可得到的人红细胞外表面的蛋白质。这些蛋白质牢固地裹在膜内，还没有人用结合到核酸上面的办法把它们抽提出来。

本实验可按另一些方式来做：(1)不需要分离出细胞质膜部分。我们之所以分离此部分是因为它的蛋白质能用[^{35}S]对氨基苯磺酸标记[图1步骤(iv)]。用完整细胞进行低聚物的酶促延伸完成得很好。没有共价结合到多聚脱氧胸苷酸上的成分将从聚(A)-琼脂糖柱通过；而联结到多聚脱氧胸苷酸上的成分则有选择地被浓集起来；(2)可以用一种固定化的核酸酶 P_1。根据图1的操作步骤，最后的浓缩物含有游离核酸酶P_1。这对本工作是没有关系的，因为酶没有被放射性标记。膜蛋白能用100 ℃加热10分钟的SDS/NaCl/磷酸缓冲液（pH7.0）从聚(A)-琼脂糖柱中洗脱下来。此洗脱液可以用固定化核酸酶 P_1 处理。相反，重氮键可以用二硫苏糖醇还原使之裂解。

当用红细胞外的细胞系统操作时，需要核对和制止能干扰聚合步骤[图1步骤(iii)]的任何核酸酶活力。在人红细胞膜上我们未发现核酸酶活力，但这样的活力在其它类型细胞(如肝脏)中则是很普通的。

应用这种技术可以更多地了解存在于细胞表面的蛋白质。例如，把位于膜外表面的蛋白质联结(如通过二硫键)到处在内表面的蛋白质上，然后后一种蛋白质可通过用二硫苏糖醇的处理，从聚(A)-琼脂糖柱中洗脱下来。图1所示的实验中，这样的二硫键可以通过在聚合缓冲液中的二硫苏糖醇来还原。它亦能鉴定横跨膜的蛋白质。如把多聚脱氧胸苷酸联结膜的外部，而用第二种非渗透性试剂联结到膜的内部。这种蛋白质的最后浓缩物在SDS/聚丙烯酰胺凝胶上，将以氚化物带子显现出来。

毛一平译自《Journal of Molecular Biology》124(4):689～699, 1978.

范培昌校

(上接第12页)

表2 ATP连结的近似参数如何取决于蛋白内部解聚常数

蛋白解聚常数 (K_d)	近似结合亲和性	近似结合协同性
小	高	非协同
大	低	正协同

于R亚基的不同。从体外实验结果可以推测其在体内作用上的差异：激酶Ⅰ对cAMP浓度的升高比激酶Ⅱ更敏感；然而，由于激酶Ⅱ中R-C接触较紧，cAMP浓度下降后重新聚合就比激酶Ⅰ快。通过磷酸酶的作用将磷酸从R_2亚基移去，还可进一步加速激酶Ⅱ的重新聚合。因此，促进腺苷酸环化酶使cAMP堆积时，同工酶Ⅰ活化比同工酶Ⅱ快。当cAMP除去后，同工酶Ⅱ的失活比同工酶Ⅰ快。不同的R亚基在细胞内空间定位很可能不同，因此相似的催化亚基C能催化细胞内不同的底物。

张在和译自《Trends in Biochemical Sciences》

4(12):282～285, 1979.李茂深校

测定红细胞表面唾液酸残余物的新比色法

Y. Massamiri 等

应用3-甲基-2-苯骈噻唑啉酮腙法测定红细胞膜的唾液酸残余物。这种方法要求温和地氧化唾液酸以形成类似物。将类似物标记后，通过色层分离来选择最好的氧化条件，并测定同时产生的甲醛。这个方法与 Warren 的高碘酸盐-硫代巴比妥酸方法不同，它不需预先释放唾液酸。本文对这两种方法进行了比较。

细胞表面酸性残余物的生物化学资料大量记载 *N*-乙酰神经氨酸(NANA)具有多种生物活性。因此人们需要有一种快速、灵敏和可靠的分析方法来测定细胞膜的唾液酸残余物。

为了定量测定红细胞膜唾液酸残余物，本文介绍一种改进的 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮腙(MBTH)法。由于人红细胞的全部 NANA 都位于其外表面，可以用神经氨酸酶将其全部除去，故本法选择人红细胞作为材料。

本法所选择的条件列于下面"方法"一节。这些条件的根据是，高碘酸盐温和地氧化唾液糖蛋白时，在唾液酸残基C8 和 C9 之间断裂而去除一克分子甲醛。与NANA 的反应是等克分子反应。因此，通过用本法和MBTH试剂测定甲醛就能将唾液酸定量而不需要将其预先释放出来。

为确定高碘酸盐氧化红细胞的最适条件，我们逐渐增加 $NaIO_4$ 浓度来处理细胞，然后测定所释放的甲醛并鉴定 C8(NANA8)类似物。其次，我们将直接用高碘酸盐-MBTH 法所得结果和 Warren 法的预先水解并用高碘酸盐-硫代巴比妥酸试验所得结果进行了比较。

方　法

(1) 用逐渐增加浓度的高碘酸盐处理红细胞膜表面，并测定所释放的甲醛

试管内进行 MBTH 法的步骤：

(a) 用高碘酸盐氧化红细胞表面　3毫升浓度为1.5×10^8 细胞/毫升的红细胞悬浮液中加入1.5 毫升用 PBS (磷酸缓冲生理盐水)配制的 $NaIO_4$ 溶液，使 $NaIO_4$ 最终浓度为0.5×10^{-4}～$2\times10^{-3}M$。混合液置于 4°C黑暗中轻轻振摇15 分钟。离心后，上清液用于比色分析，沉淀留作 ^3H标记。

(b) 对照的制备　3 毫升红细胞悬液多份于 4°C 黑暗中放置 15 分钟，然后离心。取 2毫升上清液加 1 毫升 $NaIO_4$ 溶液制成对照，混合液在 4°C 黑暗中再放 15 分钟。

(c) 用 MBTH 方法测定甲醛　每种溶液取 2 毫升，加 0.5 毫升 $ZnSO_4$ 溶液和 0.3 毫升 1*N* NaOH。混合液静置 5 分钟，然后离心。2 毫升上清液与 0.2 毫升 MBTH 试剂混合，混合液在室温静置 20 分钟。然后加入 0.2 毫升 $FeCl_3$ 溶液，猛烈振摇，并静置 15 分钟，再加 0.5 毫升蒸馏水。每种溶液对照各自的空白，于 625 毫微米处测定光密度。同时标准溶液按前述方法进行测定。

(2)鉴定 ^3H 标记的 NANA 类似物(NANA8和7)

高碘酸盐处理过的细胞用 PBS 洗涤三次，然后以每毫升 10^8 个细胞的浓度悬浮于新鲜配制的 [^{3}H] 氢硼化钾溶液(将 25 毫居里的 KB^3H_4 溶解于 8 毫升 PBS 中制得)。细胞在室温下保温 30 分钟，并用 PBS 充分洗涤。对照实验除氧化步骤外，其余全按上述方法进行。

$NaIO_4$-[^{3}H] 氢硼化物标记的红细胞，在 80℃ 下用 0.1*N* H_2SO_4 处理 60 分钟，离心除去沉淀。上清液用1*N* NaOH 调节到 pH7.0。得到的产物在华德曼 3MM滤纸上层析。展开剂为正丁醇：吡啶：1*N* HCl=5:3:2(体积比)，并按上述方法同时将NANA9、^{3}H 标记的NANA8和7，以及多元醇作为层析对照。

(3)用 Warren 的硫代巴比妥酸法测定红细胞膜唾液酸残余物

将 4.5×10^8 个细胞悬浮在 1 毫升 pH7.4 PBS 中，用100微升霍乱弧菌(*Vibro Cholerae*)神经氨酸酶于 37℃ 处理 1 小时。对照样品只用 PBS 处理，冷却后离心，弃去沉淀。上清液用 Warren 法直接测定唾液酸。

结　果

高碘酸盐对红细胞表面唾液残余物的影响

下图说明了高碘酸盐对红细胞表面唾液酸残余物的影响。氧化型 NANA 量与释放出的甲醛量相等，它的量在 $NaIO_4$ 浓度为 $0.5\sim5\times10^{-4}M$ 范围时，随 $NaIO_4$ 量的增加而增加。在 $NaIO_4$ 浓度达到 $10\times10^{-4}M$ 前出现一个平峰，高碘酸盐浓度再高(25 和 $50\times10^{-4}M$)便发生溶血，吸收值稍有升高。

同时，试用了 [^{3}H] 氢硼化物和化学水解来鉴定被氧化的膜成份。水解产物作纸上层析并测定其放射性。

放射性位于 NANA 衍生物的泳动区带，$NaIO_4$ 浓度为 $0.5\times10^{-4}M$ 时，只鉴定出NANA8；$NaIO_4$ 浓度为 $5\times10^{-4}M$ 及 $7.5\times10^{-4}M$ 时，鉴定出 NANA8 和 NANA7 两个斑点。

当知道了相应于 NANA8 和 NANA7 泳动区带内每分钟的计数时（见表），就可以说明 $NaIO_4$ 作用于膜上唾液酸残余物的效率。用 $0.5\times10^{-4}M$ $NaIO_4$ 浓度 ($NaIO_4$/NANA 克分子比=10)时，小部分NANA转变成NANA8；$5\times10^{-4}M$($NaIO_4$/NANA克分子比≃100)及7.5×10^{-4} ($NaIO_4$/NANA 克分子比≃150)的 $NaIO_4$ 浓度时，所有 NANA 均转变成它的 8-和 7-碳类似物。NANA8和 NANA7 区带内每分钟测定的总计数保持恒定，但NANA7的比例随$NaIO_4$浓度增加而加大。

相应于典型的降解产物(正如赤鲜糖醇，1,2-丙二醇和甘油)的位置上仅有微量放射性，这证明红细胞表面其它碳水化合物降解极少。

用Warren 法测定红细胞表面唾液酸残余物

为了应用于唾液酸测定，Warren法需用神经氨酸酶进行预先水解，将唾液酸水解出来。

以前的研究证明，0.02 单位的霍乱弧菌神经氨酸酶(0.2 单位/毫升)足够使 4.5×10^8 个红细胞（悬浮于 1 毫升 PBS 中）释放出表面唾液酸残余物。在作者的实验条件下，用两个供体作了五次重复试验检查重现性。其红细胞表面唾液酸含量〔±SD(标准偏差)〕分别为：第一种供体 16.3±0.95 微克或 52.75±3.07 毫微克分子/10^9细胞；第二种供体，22.4±0.82 微克或 72.5±2.65 毫微克分子/10^9 细胞。

用 MBTH 法测定红细胞表面唾液酸含量

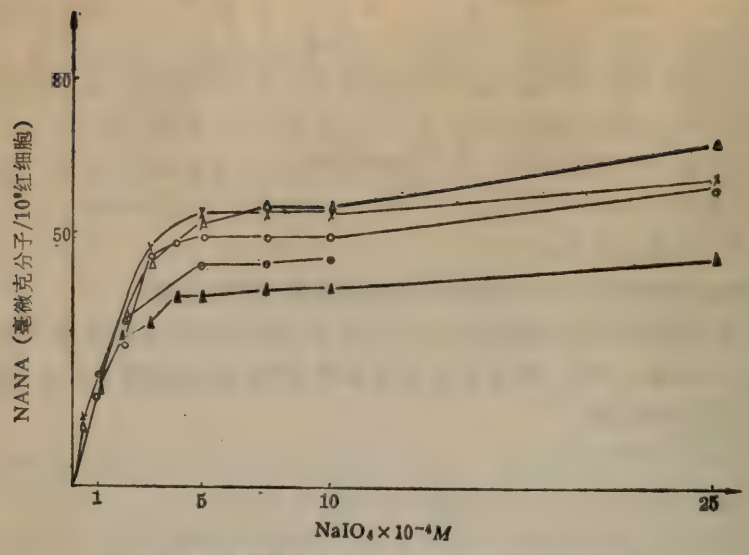

图　增加高碘酸盐浓度对红细胞唾液酸测定的影响

每根曲线表示对一个供体红细胞的分析，每个点是二次试验的平均值

表　经高碘酸盐氧化及[^{3}H]氢硼化物处理的红细胞通过温和酸水解所释放的^{3}H*

	用 $NaIO_4$(M)处理完整红细胞后的 ^{3}H 标记			
	0	0.5×10^{-4}	5×10^{-4}	7.5×10^{-4}
NANA8 (cpm)	0	12,000	13,000	11,000
NANA7 (cpm)	0	0	27,500	32,000

* 经高碘酸盐-[^{3}H]氢硼化物处理的红细胞(10^8细胞/毫升)用1毫升0.1N H_2SO_4 在 80℃下水解1小时，中和上清液，然后在华德曼(Whatmam) 3MM滤纸上层析，展开剂为正丁醇:吡啶:1N HCl=5:3:2(体积比)，以标准 NANA9、^{3}H标记的 NANA8 和 NANA7，多元醇作对照。含有水解产物的纸条剪成1厘米大小的小片，放入闪烁管内测定 cpm (每分钟计数)。每个 cpm 值是两次试验的平均值。

将红细胞经逐渐增加浓度的 $NaIO_4$ 处理后，对它们表面释放的甲醛及形成的NANA衍生物进行比较。用 $5\times10^{-4}M$ 和 $7.5\times10^{-4}M$ $NaIO_4$ 时，从 10^9 个红细胞释放出来的甲醛量以及在NANA衍生物泳动区带内测定的每分钟总计数总是保持恒定。当$NaIO_4$ 浓度高于$10\times10^{-4}M$ 时，不再有唾液酸残余物被氧化，而且偶尔会发生一些溶血，同时吸收值也稍有增加。

为了验证甲醛与膜表面氨基酸反应生成西夫氏碱(Schiff base)或通过细胞内扩散而被丢失的可能性，我们作了两种试验。第一种，2 毫升浓度为 2×10^8 细胞/毫升的红细胞悬浮液，在 1 毫升 $0.5\times10^{-4}M$甲醛溶液的条件下，用 1 毫升 $NaIO_4$ 溶液处理(最终浓度为 $7.5\times10^{-4}M$ $NaIO_4$)。混合物在 4°C 黑暗中放 15 分钟，离心后，用 MBTH 法测定 2 毫升上清液中甲醛的含量。第二种试验，将 2 毫升上述红细胞悬液与 1 毫升 $NaIO_4$ 混合(最终 $NaIO_4$ 浓度为$7.5\times10^{-4}M$)置于 4°C 黑暗中 15 分钟，离心后，上清液 1.5 毫升与 0.5 毫升 0.5×10^{-4} 甲醛溶液混合并测定甲醛含量。两种试验所测定的甲醛量是一致的。

用递增浓度的红细胞悬浮液(从 4×10^8 到 8×10^8细胞/毫升)做试验，甲醛含量也无明显差别。这可以推断：唾液酸在高碘酸盐氧化过程中形成的甲醛没有任何局部的损失。

因此，提出了一个用MBTH法分析红细胞表面唾液酸的方法。用高碘酸盐预先氧化的条

件如下：3 毫升浓度为1.5×10^8细胞/毫升的红细胞悬浮液与 1.5 毫升 pH7.4 的 $NaIO_4$ 溶液(配于 PBS 中)混合，最终 $NaIO_4$浓度为 $7.5\times10^{-4}M$，将其置于 4℃黑暗中 15 分钟。按上述"方法"中所述用 MBTH 法测定。

上面所使用的相同健康供体的五次重复试验证实了重现性。唾液酸含量(±SD)分别为：第一种供体，16.10±0.84 微克或 52.03±2.7毫微克分子/10^9 细胞；第二种供体，21.2±1.10 微克或 68.1±3.55 毫微克分子/10^9细胞。

高碘酸盐-MBTH 法和高碘酸盐-硫代巴比妥酸法的比较

正如上述试验的结果和许多其它试验证明的那样，这两种方法之间有很好的相关性，而 MBTH 法灵敏度较高。但是，我们希望知道是否有某些唾液酸残余物不能被神经氨酸酶水解，却能被高碘酸盐氧化而释放甲醛。为了验证这一点，将红细胞用神经氨酸酶处理，再用 PBS 洗涤以去除释放出来的唾液酸，最后用高碘酸氧化并用MBTH 试剂处理。神经氨酸酶处理后并未发现有对高碘酸氧化敏感的残余唾液酸。此外，高碘酸也不能进入细胞内。

这两个数据表明，所有红细胞表面的唾液酸残余物，而且也只有这种残余物，能完全被神经氨酸酶和高碘酸盐两种试剂所作用。

讨　论

用高碘酸盐氧化可溶性结合唾液酸的最适条件早已确定。依次用高碘酸及[^{3}H]氢硼化物处理的方法已普遍用于制备具放射性的可溶性结合糖类 (glycoconjugates)，如激素、血浆糖蛋白和神经节甘脂。

对比之下，有关用高碘酸盐氧化完整细胞唾液酸的资料不多。这方面资料的缺乏可能是由于细胞膜比可溶性结合糖远为复杂，并且含有对 $NaIO_4$ 氧化敏感的其它化合物(如脂质)。

此外，细胞是悬浮在生理溶液(等渗 pH7.4)中，这种溶液不是高碘酸盐氧化和氢硼化物还原的最好介质。

然而，Gahmberg 等人在 $NaIO_4$/NANA 克分子比约为 10 时，似已能使完整红细胞表面 NANA 转变为其类似物 NANA7。这结果较难评论，但可以注意的是：作者所用的[^{3}H]氢硼化物浓度不高，不足以还原所有由于高碘酸盐氧化所产生的醛。

我们的数据与 Liao 等人的结果较为一致。Liao 等人证明，用 $NaIO_4$/NANA 克分子比为 30 的高碘酸盐处理不能使 ^{3}H 掺入到红细胞膜中。的确，在我们的条件下，如上述一样，已清楚地证明：$NaIO_4$/NANA 克分子比为 100 是使一克分子表面 NANA 释放出一克分子甲醛并生成 NANA8 所需的最小比。克分子比高于 200，便发生溶血，高碘酸盐就会氧化内部的化合物。

因此，$NaIO_4$/NANA 克分子比若在 100～200 之间，本方法就可以测定红细胞表面的唾液酸残余物。在此种情况下，只要所有的唾液酸均能为高碘酸盐和神经氨酸酶作用（当它处于红细胞膜上时），Warren 法和 MBTH 法就可得到相同的结果。但并非所有细胞都是此种情况。有时，只有周围的唾液酸对神经氨酸酶敏感，一些隐蔽的残余物则不能用预先水解的方法来测定。在这种情况下，MBTH 法却可以测出全部表面唾液酸残余物。

这个方法容易实行、灵敏、精确、不需预先水解，而且可以测定红细胞的全部外膜唾液酸。

罗纪盛译自《*Analytical Biochemistry*》97(2)：346～351，1979.左大珏校

酶标记免疫测定中蛋白质结合的新方法

J. Müller　　G. Pfleiderer

我们提出了一种将抗体和标记酶逐步结合的新方法。第一步是将两个蛋白质的氨基，通过与4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐反应，使之有选择地变更，然后加以还原，使其中一个成分重氮化。偶联反应使取代基团之间形成偶氮(—N:N—)桥。特征功能团(暴露的SH可能除外)不参与这一步反应。与另一个成分进行选择性反应时，其中一个成分的活化作用可避免形成均聚物。结合抗体的免疫反应为80～100%。标记的碱性磷酸酶在结合物中保全了全部活性。不论是具有一个分子的标记酶与单个抗体分子的结合，还是两者多个分子的结合，均能大量产生。低分子的结合在减少限制性扩散这一点上最为有用。

引　言

检测微微克分子范围内抗原可以通过与适当的标记抗体反应来达到。放射性原子如^{125}I标记抗体，已被广泛应用，但放射免疫测定法有放射性不利的一面。因此，用酶标记来代替。

应用酶标记免疫测定法要求将两种不同的蛋白质(抗体和标记酶)偶联成一种稳定的结合物。结合作用通常是通过两种具有双功能或多功能交联剂（如戊二醛）的蛋白质的反应来达到。典型结果是形成免疫活性和酶活性都降低了的不同结合的混合物，酶活性的丧失也许是由于交联剂与蛋白质的基本功能团发生了反应，形成伴随位抑和游动性丧失的分子内交联，或是由于活动中心被包围在结合分子内而受阻。

另外，均二聚物或多均聚物也会产生免疫酶活性，它们在测定中是不利的。从理论上看，较理想的方法是将一种蛋白质活化，使之与另一种蛋白质的特殊基团进行选择性反应，因为它避免了分子内部发生交联，产生均聚物。

材料和方法

材料

乳糖脱氢酶（猪心）EC 1·1·1·27，35 单位/毫克，碱性磷酸酶（小牛肠）EC 3·1·3·1，100 单位/毫克(在最适条件下)以及过氧化物酶(辣根)EC 1·11·1·7，250 单位/毫克(以邻联茴香胺和 H_2O_2 为基质)。

4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐的合成

4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐用20倍量的 100%HNO_3以及在 0℃下反应5小时，得到的4-羟基-3-硝基苯腈不必用层析提纯就可达到80%的纯度。

蛋白质的修饰和偶联

修饰和偶联反应示于图 1。下列从(a)到(e)的步骤按同样的字母示于图 1。

(a) 4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐 (20mM) 与蛋白质的反应是在室温下，于0.1M的硼酸缓冲液(pH9.0)中进行的。反应时间不同，蛋白质修饰的程度亦不同。

(b) 把不含乙酰亚胺酸酯的碱(最终浓度为0.2M)加到0.1M硼酸缓冲液(pH8.7～9.0)的修饰了的蛋白质溶液中，进行完全乙脒化作用。反应 30 分钟后，溶液在0.1M缓冲液(pH8.0)中透析。

(c) 硝基的还原是用连二亚硫酸钠得以实现的。反应物用 Sephadex G-25层析柱、0.1M硼酸缓冲液(pH8.0)除去。所得溶液的浓度以这一步骤中 95% 的产量为基础进行计算。蛋白质的浓度无法准确测定，因为不知道氨基苯酚基的光谱。此外，在缩二脲或 Lowry 法中，可以看到这些基团的广泛干扰。后一种影响可以用 Cu^{++} 的络合以及氨基苯酚基的氧化作用来解释。

(d) 芳香类氨基的重氮化作用是在 0°C、pH4 的条件下与 0.1M $NaNO_2$ 作用一分钟而达到的。在 pH 滴定至 8.5 时，把重氮化组分液加到氨基苯酚组分中。

(e) 在室温下，偶联继续进行到第二天。为除去亚硝酸盐，溶液在此阶段于 0.1M 硼酸缓冲液(pH8.0)中进行透析。

分析方法

蛋白质溶液的浓度用分光仪器测定。对4-羟基-3-硝基苯并咪化蛋白质，其色谱需要用 $\epsilon_{405}=4500$ 厘米²/毫克分子和 $\epsilon_{280}=14500$ 厘米²/毫克分子进行解释。表 1 所示是本试验所用的蛋白质的独特消光及其分子量。

乳酸脱氢酶，碱性磷酸酶以及醛缩酶的活性是根据前次发表的方法测定的。酶活性以国际单位(U)表示。抗体和结合物的免疫反应能力用免疫沉淀法测定。游离氨基用它和三硝基苯磺酸的反应来测定。那些硝基苯酚基含量高的蛋白质，其在 342 毫微米处的光吸收可用 $\epsilon_{342}=2700$ 厘米²/毫克分子处的消光系数来校正。

表 1　用于结合的蛋白质特性

蛋白质	$E_{280}^{1\%}$ (厘米$^{-1}$)	M_r
乳酸脱氢酶(猪心)	13.8	144,000
碱性磷酸酶(小牛肠)	10.0	120,000
兔 IgG	12.5	160,000

碱性磷酸酶用亲和层析法来提纯。此法使用通过组氨酸间隔基联结于 Sepharose 4B的4-偶氮苯基磷酸。吸附是在 0.1M 的 Tris(pH8.0)上进行，而把 1mM磷酸盐加到此缓冲液中即可解吸。本法通常可以得到 2000 单位/毫克的比活性和80% 的产量，总的纯化效率提高了20倍。

兔子抗血清(抗碱性磷酸酶)是在蛋白质 A 层析柱上提纯的。每一毫克 IgG 可沉降 20 微克(40 单位)的碱性磷酸酶。

结　果

蛋白质的修饰及偶联

图 1 表示修饰和偶联过程中的反应。下述(a)～(e)各节指的是图1中相应字母所示步骤。

(a) 偶联步骤中有效的反应基团数目由第一次修饰的程度来确定。图 2 示出一些蛋白质与 4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐反应的速度。

(b) 在与 4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐反应之后，进行完全乙脒化作用以避免残留的氨基在重氮化过程中与亚硝酸发生反应，以及防止同重氮基团形成三氮烯。在 pH8.7～9.0 时与 0.2M 的乙酰亚胺反应，会导致完全丧失与三硝基苯磺酸反应的能力。只有通过蛋白质热变性后才能检出少量的内氨基。

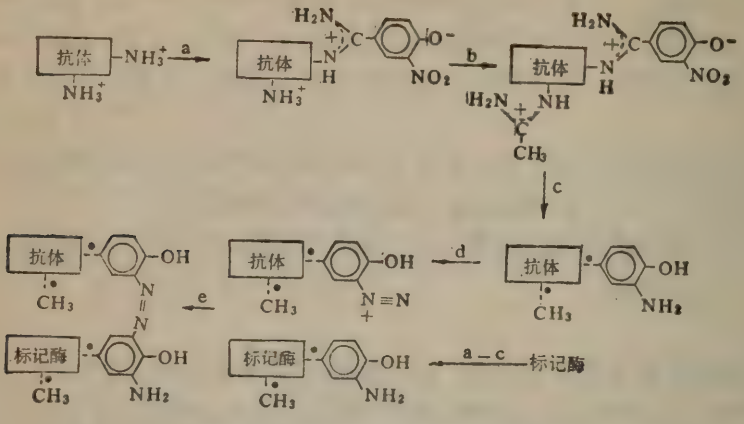

图 1 蛋白质的修饰和偶联反应

(a—e)反应试剂和条件如"方法"一节中所述，亦可参阅"结果"一节(a)～(e)各段。
(*)表示脒基。这里仅表示几种可能的氮桥结构之一

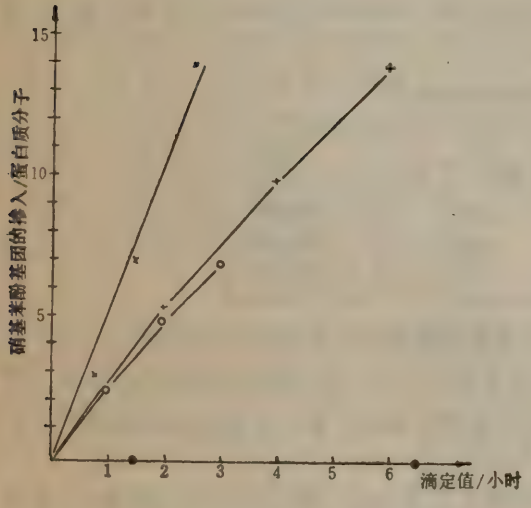

图 2 某些蛋白质与4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐反应的速度

反应在 0.1M 硼酸盐缓冲液(pH9.0) 中于室温下进行，使用了浓度为 20mM 的试剂掺入蛋白质的硝酸苯酚基用分光光度法测定。用 ϵ_{405}=4500 厘米²/毫克分子 和 ϵ_{280}=14500 厘米²/毫克分子。×，兔IgG；+，碱性磷酸酶；○，乳酸盐脱氢酶；●，过氧化物酶。横座标表示反应的时间(小时)

(c) 硝基用连二亚硫酸钠进行还原。通过用 Cu^{++} 滴定所形成的邻氨基苯酚基，可以近乎定量（95%）地测出还原值，这同硝基酪氨酸的还原一样。未发现连二亚硫酸盐还原对酶活性或免疫反应能力有什么影响。这一点是预料中的，因为这步温和的反应中不存在副反应。把修饰的蛋白质贮藏于 pH8.0 的硼酸缓冲液中，氨基苯酚基可以稳定数日。

(d) 重氮化过程是在很温和的条件下进行的，尽管这种条件会使蛋白质变性，然而，IgG 不会受这一处理的影响(见下文"结合物特性"一节)。因此，这一组分就被选来进行重氮化。当它与 α-萘酚反应(在硼酸缓冲液中为 1mM，pH8.5，25°C) 一分钟后，重氮基的产率达到最高。重氮化的蛋白质在 pH 8.5，25°C贮藏时，重氮基与 α-萘酚的偶联作用在 30 分钟内就降到最高值的一半。

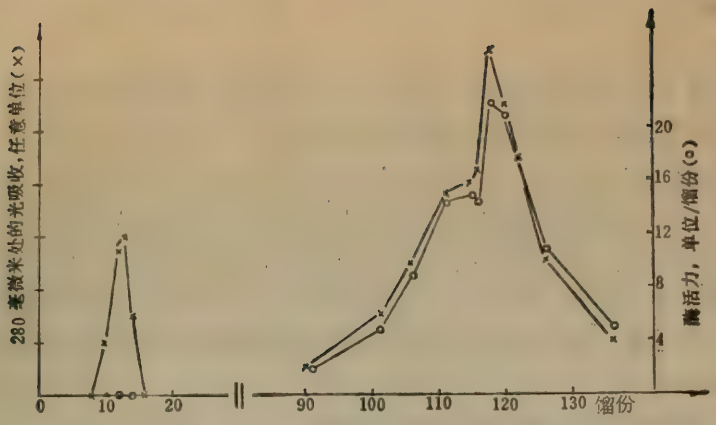

图 3 结合物C I 在DEAE-Sepharose CL_4B 的离子交换层析

从 2×20 厘米的层析柱上收集 7 毫升馏分在 10mM 磷酸缓冲液（pH7.5，含 50nMNaCl）中进行吸附，用 500 毫升的吸附缓冲液和 500 毫升 0.2M 的磷酸盐（pH7.5）按线性梯度进行解吸。梯度是从馏分 20 开始，把乳酸脱氢酶（670U）加入层析柱，在主吸收峰处恢复了 500单位的活性，那些以橙色带结合在层析柱上并可用 0.5M 磷酸盐洗脱（pH7.5）的结合物馏分显示出酶活性和免疫活性，但未进一步描述 115～125 馏分含有结合物分子和游离乳酸脱氢酶，主吸收峰的其它馏分仅仅含有 M_r～300,000 克/克分子的结合物（由盘式电泳法测出）

表 2 偶联的条件*

结　合	成　分	第一步中导入的基团数/M_r	成分的相对分子数
C I	抗碱性磷酸酶	4/160,000	1
	乳酸盐脱氢酶	11/144,000	2
C I	抗醛缩酶B	7/160,000	1
	碱性磷酸酶	24/120,000	1.3
C II	抗醛缩酶B	3.5/160,000	1
	碱性磷酸酶	10/120,000	1.5

* 偶联反应混合物中 IgG 的浓度在所有反应都是约为 0.25 毫克/毫升。IgG 的重氮基与氨基苯酚/标记酶的反应 在pH8.5 连续进行过夜

表 3 结合 CII 的酶活力得率

方　法	碱性磷酸酶的衍生物	总活力(U)	总得力(%)
	天然(纯净)的	9,500	100
与4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐反应	硝基苯酚	8,600	90
乙脒化作用，还原	氨基苯酚	7,500	80
与抗醛缩酶B偶联	结合 C I	7,500	80

(e) 用分光光度法测定，发现重氮化蛋白质只与芳香族化合物偶联。这些化合物非常强烈地活化成被间苯二酚、α-萘酚、氨基苯酚之类亲电子的化学浸蚀物。苯酚、酪氨酸、咪唑以及组氨酸不产生反应，这表明不会和标记酶中的氨基酸基团产生反应。然而，不含任何氨基苯酚基的乙脒化乳酸脱氢酶反应极慢，形成一种活性很低的沉淀物(见“讨论”一节)。代替

标记酶的重氮化 IgG 与氢基苯酚偶联产生红紫色，这种颜色在大约 2 小时后最深。

结合物特性

制备结合物 CⅠ 时，各阶段的酶活性示于表3。结合物 CⅡ 的结果极为相似。标记酶-乳酸脱氢酶则酶活性较低(30～50%)(见"讨论"一节)。

结合物的免疫活性

对于结合物 CⅠ以及其它含乳酸脱氢酶抗碱性磷酸酶结合物，免疫反应性的保持力是通过免疫沉淀法测出为80%。抗醛缩酶 B 和碱性磷酸酶结合物没有用此法检定，因为在碱性磷酸酶存在时，要测定醛缩酶的活性是困难的。猪抗血清(抗兔 IgG 血清)与碱性磷酸酶的结合物(与 CⅡ 相似)，用正常兔血清进行放射性免疫扩散法测定，并未显示出免疫活性有所丧失。

结合物的色层分析

结合物的离子交换层析和胶体过滤的结果分别示于图 3 和图 4。

结合物的使用

结合物 CⅠ 和 CⅡ 不加提纯即可用来测定人血清中醛缩酶的含量。在夹层测定中，先让抗原吸收过量的结合于 Sepharose 4B中的抗醛缩酶 B，然后，被结合的抗原的游离决定簇与标记抗体(结合物 CⅠ 或 CⅡ)反应。在洗去过量的结合物和 CⅡ 中的游离碱性磷酸酶之后，再测定结合于 Sepharose 4B 颗粒上的碱性磷酸酶的酶活性。发现 1 毫微克的醛缩酶 B 可结合具2mU碱性磷酸酶活性(这样的活性相当于 1 毫微克碱性磷酸酶)的结合物 CⅠ。对结合物 CⅡ，则 1 毫微克的醛缩酶 B 结合 1mU 的碱性磷酸酶。20 微升血清就是以作精确的测定，因为这一方法在 2～50 毫微克醛缩酶 B 的范围内是很灵敏的。这一结果与免疫沉淀法测出的结果很一致，这就表明在检定肝病时，测定醛缩酶 B 是很有用的。

其它结合物对人体组织切片的抗原定位中亦很有用。

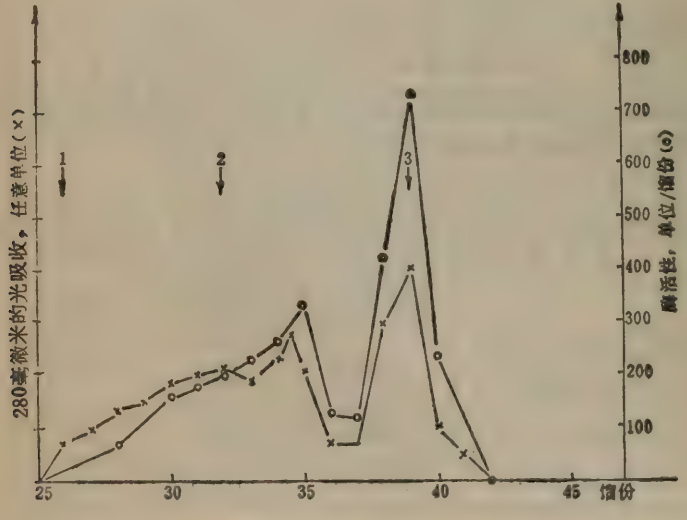

图 4　CⅡ在 Sephacryl S-300 上进行凝胶透性层析

在 2.5×110 厘米的层析柱上层析，用 0.1*M* 缓冲液 (pH8.0) 作为洗脱液，收集7毫升的馏分，箭头所示为标准物洗脱的部位：(1)蓝葡聚糖(排阻容积)；(2)铁蛋白(M_r=480,000)；(3)碱性磷酸酶 (M_r=120,000)。结合物 CⅠ在排阻容积中洗脱

讨　论

所述有关抗体和标记酶结合的方法具有下列特性：在两种蛋白质中，只有氨基参与结合。这些基团的正电荷被贮存起来。这种特性对蛋白质的活性和稳定性可能是重要的。

辣根过氧化物酶在我们的方法中不能用作标记酶，因为它不能和4-羟基-3-硝甲基苯并咪盐酸盐试剂(图2)进行反应。缺乏这种反应可能是由于糖残留物含量高(大约50%)而削弱了赖氨酰氨基的接触。

在不影响标记酶——碱性磷酸酶(20%蛋白质在脱盐过程中损失掉)的专一性和免疫反应性的附加步骤(两种蛋白质中的亚氨逐乙酸酯化和还原，抗体中的重氮化)之后，经修饰的抗体重氮基与导入到标记酶的氨基苯酚基产生特异反应。由于抗体的重氮化取代物与两个蛋白质中的内在功能团不发生反应，从而排除了产生均二聚物和均聚物的可能性。不含任何氨基苯酚基的乙脒化乳酸脱氢酶的反应缓慢，可用其主要的SH基与重氮盐发生反应来解释。虽然乳酸脱氢酶在氨基苯酚基存在时没有出现沉淀，但在偶联步骤中，活性的丧失可能是巯基参与反应。即使是高分子量的结合物(CⅠ)，标记酶——碱性磷酸酶的活性仍被完全保存下来。结合物的免疫反应性为80～100%。

应用高度取代的蛋白质和稍许过量的标记酶，几乎可定量地得到高分子量的结合物(CⅠ)。若用两种较低取代的蛋白质和较为过量的标记酶，则可得到低分子量的结合物(CⅠ和CⅡ)、最适取代量和标记酶的超出量必须逐个加以测定。

CⅠ的离子交换层析提纯示于图3。少量非结合IgG未结合到层析柱上。IgG分子对结合物在pH7.5时的净电荷仅有极小的作用，结果，含有一个分子乳酸脱氢酶和一个分子IgG的结合物，在原来的酶的位置周围被洗出，那些没有从层析柱上按梯度洗脱下来的结合物被认为含有两个分子或更多的乳酸脱氢酶，而且，因为乳酸脱氢酶带有很多负电荷，被结合得更紧。这一结论被盘式电泳和Sephacryl S-300上进行的凝胶过滤所证实(未示出)。

如有必要，可以用Sephacryl S-300更好地提纯。结合物CⅡ的洗脱图形(图4)显出一个未结合的过量碱性磷酸酶吸收峰和一个与含一个分子IgG、一个分子碱性磷酸酶(结合物M_r=280,000)以及一些分子量较高的物质的结合物相应的吸收峰。

这些结合物可以用作酶免疫检定或为抗原作组织化学定位。由于碱性磷酸酶(2000单位/毫克)有高度专一活性以及在碱性磷酸酶测定中(18.200平方厘米/毫克分子)产生高的硝基苯酚消光系数，因此，应用碱性磷酸酶结合物进行酶免疫测定，灵敏度是很高的。在10^{-14}毫克分子范围内可以毫无困难地进行测定(1.6毫微克的醛缩B=10^{-14}克分子)，而且，在夹层检定的第一阶段应用较好的载体，则测定10^{-15}克分子似乎也是可能的。如果应用荧光来测定碱性磷酸酶的活性，可进一步提高其灵敏度。

赵传凯译自《Journal of applied biochemistry》1(4):301～310, 1979.　徐崇敬校

(上接第66页)

et al.; Endocrinol. Jap., 1979)。Bartter指出，本病的病因是肾小管氯的再收吸不全。尿激肽释放酶是由肾小管分泌的，所以本症候群的发病原因也许与肾小管机能异常有关。

孙桂芳译自《代谢》16(2):182, 1979．何开玲校

酶促制备[^{15}N]标记L-谷氨酸的简单方法

O. BOJAN 等

由于放射性同位素在检测和使用剂量方面敏感性不同于稳定同位素，在细胞代谢研究中，放射性同位素的应用总是比稳定性同位素的应用广泛得多。但对氨基酸这一特定情况，由于稳定同位素 ^{15}N 可以测定体内和体外系统中氨基酸氨基的去向，故其使用显然又优越于其他标记技术。

这类研究的限制因素仍是制备小量、试验用的^{15}N-标记氨基酸。本文介绍一种酶促制备L-[^{15}N]-谷氨酸的简单方法。此法通过两种反应的偶联，一个反应是谷氨酸脱氢酶（GDH, EC 1.4.1.3)所催化的，另一个是乙醇脱氢酶(ADH, EC 1.1.1.1)所催化的：

$$\text{2-酮戊二酸} + NADH + H^+ + {}^{15}NH_3 \overset{GDH}{\rightleftharpoons} \text{L-[}^{15}\text{N]谷氨酸} + NAD^+ + H_2O \cdots\cdots (1)$$

$$\text{乙醇} + NAD^+ \overset{ADH}{\rightleftharpoons} \text{乙醛} + NADH + H^+ \cdots\cdots (2)$$

$$\text{2-酮戊二酸} + \text{乙醇} + {}^{15}NH_3 \overset{GDH,ADH,\ NAD^+}{\rightleftharpoons} \text{L-[}^{15}\text{N]谷氨酸} + \text{乙醛} + H_2O \cdots\cdots (3)$$

写出有关 NADH 形成的反应(1)和(2)后，按(4)和(5)式便得到平衡常数 K_1 和 K_2，在25°C取水浓度为 1，Kaplan 等和 Racker 分别得到 K_1和 K_2值为：

$$K_1 = \frac{[\text{2-酮戊二酸}][NH_3][NADH][H^+]}{[\text{谷氨酸}][NAD^+][H_2O]} = 6.1 \times 10^{-14} \cdots\cdots (4)$$

$$K_2 = \frac{[\text{乙醛}][NADH][H^+]}{[\text{乙醇}][NAD^+]} = 1.15 \times 10^{-11} \cdots\cdots (5)$$

知道了 2-酮戊二酸、NH_3、NAD^+ 和乙醇的最初浓度，就可以算出在任何 pH 值时，反应(3)中反应物的平衡浓度(见表)。当 NH_4Cl 超过 2-酮戊二酸 1.5 倍，pH 为 7、8 及 9 时，有 96% 的 2-酮戊二酸转变为谷氨酸。另方面，GDH 和 ADH 催化反应的一些确定的动力学性质表明其最适 pH 偏碱(菜牛肝 GDH 为 8.5，酵母 ADH 为 8.4～9.5)。因为菜牛肝 GDH 对 NADH 的 K_m 为 0.02mM 左右，为使 NADH 浓度稳定在同一范围（使转变成谷氨酸的速率合适)，采用的 pH 约为 8.5。最后，考虑到乙醛有高度的挥发性，乙醛的去除使反应 (3) 几乎完全向右移位。

我们做过一个代表性的制备试验。200 毫升反应混合物含有下列试剂：

25mM Tris-乙酸盐(pH8.5)，40mM 2-酮戊二酸，60mM $^{15}NH_4Cl$(含有 99.7% 同位素，从 $H^{15}NO_3$ 制得的)，0.5mM NAD^+（高于 1mM 的浓度会抑制反应)，2% 乙醇，0.1mM ADP(菜牛肝 GDH 的活化剂)。加入 GDH(50% 的甘油制剂，相当于 250 酶单位) 和 ADH (冰冻干燥的粉末制品，相当于 3000 酶单位)使反应开始。在 30°C，不断搅拌并由水泵提供适当真空条件下保温 60 分钟后，反应混合物中再补充 250 单位的 GDH 和 3000单位的ADH。再次保温 60 分钟后，将反应混合物煮沸 5 分钟以停止反应，用 2NHCl 调节 pH 到3.0～3.5，

过滤除去沉淀的蛋白质。溶液在50℃减压(18毛)蒸发浓缩至10毫升左右，置冰箱过夜。过滤后，白色沉淀用5毫升冷的重蒸馏水洗三次，5毫升95%乙醇洗二次。重结晶后，产物置于60℃干燥。约得0.6g粉末，表示有70%的2-酮戊二酸转变成L-[^{15}N]谷氨酸。无机离子分析为阴性。

表　偶联谷氨酸脱氢酶和乙醇脱氢酶反应所得的平衡浓度

	最初浓度(mM)	平衡时浓度(mM)		
		pH7	pH8	pH9
2-酮戊二酸	40	1.4	1.5	1.5
NH_4Cl	60	21.4	21.5	21.5
乙醇	300	261.4	261.5	261.5
NAD^+	1	0.999	0.992	0.928
NADH	0	7.79×10^{-4}	7.74×10^{-3}	7.22×10^{-2}
谷氨酸	0	38.5	38.5	38.5
乙醛	0	38.6	38.5	38.5

^{15}N-标记L-谷氨酸的同位素含量用带有气体分子入口系统的Atlas M86质谱仪测定。在抽空至10^{-4}毛后样品经过微燃烧转变成氮气。同位素^{15}N原子数含量为98.14±0.08%。

L-[^{15}N]谷氨酸的质谱(见图)没有显示出分子离子信号，除含氮碎片离子m/e 84和56向上移动一个质子单位外，它与非标记化合物的已发表资料一致。

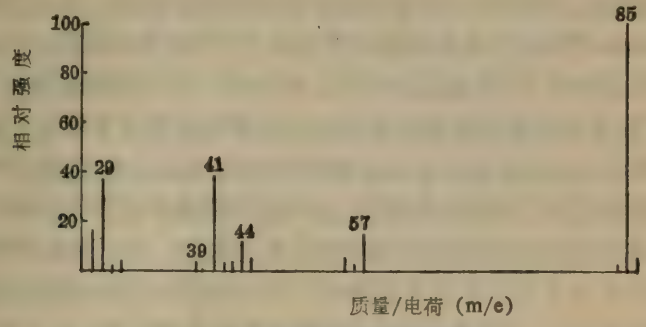

图　L-[^{15}N]谷氨酸质谱

使用仪器为Varian MAT 3U双聚焦质谱仪，具有165℃样品的直接入口并有用70电子伏的电子轰击离子化装置

总之，上述酶促制备L-[^{15}N]谷氨酸的方法有如下优点：

(1) 以简单的反应条件得到高的产量，不需要高纯度的酶(10～20单位/毫克蛋白质已足够)；(2)反应产物于酸性pH时，沉淀，容易分离；(3)一些反应物，特别是$^{15}NH_4Cl$和核苷酸可以通过专门处理回收。只要增加反应体积并维持恒定的试剂浓度，本方法也可用于大规模的制备。

罗纪盛译自《Analytical Biochemistry》101: 23～25, 1980.　左大珏校

肾(尿)激肽释放酶

激肽释放酶-激肽系统(K-K 系统)的研究，在半世纪前，由 Frey 发现尿中存在降血压性物质时开始的。激肽释放酶大致分为存在于血浆中的血浆激肽释放酶和存在于肾脏、胰脏和唾液腺等组织里的腺性激肽释放酶两种。一般认为血浆激肽释放酶以激肽释放酶原存在于血浆中，并通过血液凝固第Ⅻ因子(Hageman factor)而激活，以高分子激肽原为基质，而腺性激肽释放酶以存在于组织内的低分子激肽原为基质，各自产生激肽。特别到最近，K-K 系统与循环动态密切相关，及其在肾脏水盐代谢中的重要作用，正在引起人们的注意。

由于肾脏是体液调节最重要的脏器，因而认为 K-K系统既与肾素-血管紧张素-醛固酮系统和前列腺素 (PG) 系统保持密切的关系，又要发挥它的机能。一般认为从尿中排泄的激肽释放酶不是来自血浆，而是来自肾脏。激肽释放酶通过游离激肽发挥它的生理作用，如果将激肽注入肾动脉，就会使肾血流量、尿量、尿中的电解质特别是钠明显的增加而引起利尿，一般认为肾内血流量与肾内的激肽释放酶分布状态密切相关，两者在肾皮质表层多，随着进入内层而减少。因而，将激肽注入肾动脉时，可清楚地看到内层比表层血流增加，由此引起肾髓质血流量显著的增加，而不是渗透压梯度紊乱引起利尿作用。

其次，肾 K-K 系统的激活所致的肾血流量增加、肾内血流再分布、利尿和钠排泄增加等作用，是激肽的直接作用或是通过其他什么因子还是个问题。McGiff(Circ. Res. 31:36, 1972)等报告了将激肽注入肾动脉时，可促进肾静脉中前列腺素 E(PGE)样物质的游离；而一般认为由于激肽激活磷脂酶 A，提高了 PG 前身的花生四烯酸的合成，促进 PG 的合成分泌，所以这些 K-K 系统的生理作用，也有通过 PG 系统的可能性。另一方面通过交感神经刺激、去甲肾上腺素和血管紧张素Ⅱ的刺激，可促进 PG 样物质的游离；但是与此相反，PG 和血管紧张素Ⅱ也有直接刺激 K-K 系统的作用。近年来，已知醛固酮等盐皮质激素调节着 K-K 系统，而认为升压物质和降压物质是这样地构成程序来调节肾脏的水盐代谢。

那末，肾 K-K 系统在疾病方面，显示出怎样的动态，这点是有趣的。Margolius 等(Circ. Res., 35:820, 1974)报告了原发性醛固酮症时，尿中激肽释放酶的排泄有增加。还弄清楚了给予醛固酮的拮抗剂安体舒通时，尿中激肽释放酶的量就减少。这个事实似乎是强有力地提示醛固酮在肾远曲小管中直接调节肾激肽释放酶的产生，而那个部位与醛固酮受体部位是有密切关系的。Margolius (Lancet, 2:1063, 1971)检查原发性高血压患者尿中激肽释放酶的排泄量，作了偏低值的报告。另一方面，阿部等(日本临床，36:2912, 1978)报告，虽然持续性原发性高血压病尿中激肽释放酶的排泄量是低值，而波动性原发性高血压病与正常人比较，并不降低。一般认为原发性高血压病尿中的 PG 也显示低值，这些抗升压系统的物质被抑制，从原发性高血压病病因论的观点来看，是颇有趣味的。

近年来，Bartter 症候群尿中激肽释放酶和 PGE_2 的排泄增加，给予 PG 合成抑制剂消炎痛可看到生化方面的改善，提示这两个肾性降压物质产生过多，对本病的病因可能起着重要作用(McGiff: Ann. Int. Med., 87:369, 1977)。我们在与守屋宽教授的共同研究中，提取并精制 Bartter 症候群 1 例患者尿中激肽释放酶，研究了它的特性，测出了分子量为 42,000，比正常人的(分子量 27,000, 29,000)大得多，等电点、V_{max} 和 K_m 值也与正常人不同(Yam ada,

(下转第 63 页)

前列腺素和动脉硬化

近年来，有人尝试用阿斯匹林抑制血小板凝集以预防动脉硬化。其效果在临床上也得到肯定，Pick 等(J. Clin. Invest., 63:158, 1979)给喂食 6 个月高胆固醇的猴子服用阿斯匹林，血清胆固醇值虽没有改变，但血小板凝集几乎完全被抑制，动脉硬化症也被阻止。有人还报告了服用保泰松系统的乌头属碱(anthorane)8 个月，使心肌梗塞患者的死亡率减少 50%(N. Engl. J. Med., 298:289, 1978)。

在 Bailey 等的兔实验 (Atherosclerosis, 32:195, 1979)中，也看到了给予各种非类固醇抗炎剂 12 周阻止动脉硬化症的作用。保泰松、flufenamic acid、含氧保泰松和 mefenamic acid 有效，阿斯匹林和氨茶碱作用较差。可是，上述药剂都抑制了血小板凝集和从 ^{14}C-花生烯酸合成凝血噁烷(thromboxane)。

最近，已弄清楚前列腺素(PG)与血小板凝集有关，对动脉硬化症的发展起着作用。在脂肪酸环加氧酶的作用下，由花生烯酸生成的 PGG_2，通过 PG 过氧化物酶转变为 PGH_2，在合成酶的作用下生成前列腺素环衍生物 (prostacyclins; PGI_2) 或凝血噁烷 A_2 (TXA_2)；另一方面在异构酶的作用下，从 PGH_2 生成 PGD_2 或 PGE_2。可以认为，在使得血管内皮细胞对血小板凝集有抵抗性的作用中，PGI_2 是重要的；不抑制 PGI_2 的生成而抑制 TXA_2 的合成与阻止动脉硬化有关。TXA_2 可使血小板凝集、冠状动脉的平滑肌收缩，至于 TXA_2 合成酶抑制剂，就不容易看到有选择性的。例如异吡唑抑制碳酸脱水酶，而使磷酸二酯酶活化。许多 PG 桥(环)过氧化物类系物对 TXA_2 合成酶和 PGI_2 合成酶两者都抑制。镇痛(benzydamine)可抑制 TXA_2 合成酶和环加氧酶。Fitzpatrick 等(Biochim. Biophys. Acta, 573:238, 1979)弄清楚了 9,11-亚胺基环氧前列腺-5,13-二烯酸选择性地抑制血小板和肺的微粒体内 TXA_2 合成酶，而对大动脉和肺的 PGI_2 合成酶没有影响。在天然的血小板凝集的抑制物中，PGI_2 是最强的，PGE_1、PGE_2 和 6-酮基 -$PGF_{1\alpha}$ 次之。这些作用和对血小板膜表面受体的亲和性大致平行。只是 PGD_2 在阻止血小板凝集方面，是比 PGE_1 强；而在结合方面则较弱 (Siegl, A. M. et al, J. Clin. Invest., 63:215, 1979)。

那么，谈到 Ca^{++} 和 PG-TX 的关系，则 Ca^{++} 拮抗剂(8N,N-二乙氨基)辛-3,4,5-三甲氧基苯甲酸酯：① 抑制由于 PGH_2 产生的血小板凝集；② 抑制 5-羟色胺和 ADP 分泌；③ 抑制由 PGH_2 对 PGI_2、E_1、D_2 刺激的人血小板 cAMP 上升作用产生的阻止效果；④ 对 PGH_2 转变为 TX 过程丝毫没有作用。TXA_2 促进 Ca^{++} 从贮存场所动员出来，这种 Ca^{++} 抑制由于 PGI_2 刺激产生的腺苷酸环化酶，另一方面促进 ADP 和 5-羟色胺的放出。与此相反，cAMP 抑制 Ca^{++} 的动员，还抑制环加氧酶从而抑制 PGH_2 生成。这是 R. R. Gorman 等(Biochim. Biophys. Acta, 572:95, 1979)所提出的一系列假说。Reed 等(Ann. N. Y. Acad. Sci., 307:445, 1978)指出了 Ca^{++} 可促进肾髓质内 PGD_2、PGE_2 和 $PGF_{2\alpha}$ 等的合成，与此同时，即使细胞外 PG 虽不作为离子载体起作用，但 PG 桥(环)过氧化物和 TX 也可能作为钙离子载体起作用。

(下转第75页)

前列腺素与凝血机能

自 1963 年 Bergström 将前列腺素(PG)E_1 和 $F_{1\alpha}$ 结晶以来，已取得了许多关于 PG 的成绩，特别这几年来关于 PG 的研究有了飞跃的进展。被鉴定的许多种 PG 中，相继发现了活性最强的凝血噁烷(thromboxane, TXA_2; 1975)和前列腺素环衍生物(prostacyclins, PGI_2; 1976)，并逐渐弄清了 PG 的代谢及其对体内循环系统和血液凝固系统的作用机制。

PG 的结构由有 20个碳和 4 个不饱和键的花生烯酸生成的，而且几乎是在全身组织中进行合成。然而，血小板细胞膜中磷脂质含有多量的花生烯酸，通过由凝血酶激活的血小板磷脂酶 A_2，使磷脂质游离出花生烯酸。这种磷脂酶的作用，被认为是 PG生成的限速阶段，生成的花生烯酸通过环加氧酶变成 PGG_2 和 PGH_2。一般认为这些物质有微弱的血小板凝集能力，通过血小板微粒体中的凝血噁烷合成酶形成 TXA_2。TXA_2 的半衰期为 32 秒，是非常不稳定的物质，它具有强的血小板凝集作用和由动脉壁平滑肌导致的血管收缩作用。

另一方面，在血管内皮的微粒体中，有前列腺素环衍生物合成酶，从 PGH_2 生成 PGI_2。PGI_2 也是不稳定的物质，有拮抗 TXA_2 的作用，具有强烈抑制血小板凝集作用和舒张血管壁的效果。于是，认为两者作用于血管壁和血小板，对血管紧张度的保持、血流的调节、血栓形成的防止或者止血作用的发现等发挥作用。由于都是从花生烯酸到 PGH_2 的共同前身物质开始、代谢速度快的活性物质，因而它们都参与局部血管内的灵敏而又微细的血流调节，而局部的血行动态被看作是由 PGI_2/TXA_2 的比例调节的。还有意见认为，它们是随着机体的条件而倾向某方以进行调节，从而维持内环境恒定；另一方面，由于过于偏向一方，便产生各种病态。

实验性地动脉内注射 TXA_2，尤其在脑神经系统，可产生局部的一过性缺血和梗塞；与此相反，选择性地抑制 TXA_2 的合成，则可看到出血时间的延长。人服用 PGI_2 可明显地招致血小板凝集能力降低(Gryglewski, R. et al.: Thromb.Res., 13:153, 1978)，并且给予抑制PGI_2合成的 tranylcypromine 和大量的阿斯匹林可引起血栓症。

一般认为，如果血管产生损伤，由于血小板的凝集而磷脂酶 A_2 被激活，使得从花生烯酸大量地产生 TXA_2，通过更进一步强烈的血小板凝集和血管收缩而发挥止血效果。另一方面，血小板往粥样硬化灶的粘着，使 TXA_2 的产生增加，在病灶中产生的过氧化脂质抑制 PGI_2 的合成系统 (Salmon, J. A. et al. Biochim. Biophys. Acta, 523: 250, 1978)从而促进病灶的发展。

已清楚知道，二丁酰基 cAMP 可抑制血小板凝集，显示了 cAMP 参与 PG 系统的可能性。近年来认为，PGI_2 抑制血小板凝集的同时，使血小板的腺苷酸环化酶活化，显示出 cAMP 量的增加 (Gorman, R. R.: Fed. Proc., 38: 83, 1979)。一般认为，cAMP抑制磷脂酶 A_2 或环加氧酶的活性，阻碍花生烯酸的放出和 TXA_2 的生成，使血小板凝集能力降低。另一方面，虽然 TXA_2 显示出拮抗像 cAMP 这样促进效果的抗 cAMP活性，但在单独情况下没有积极地减少 cAMP 量的作用。Ca 离子载体激活磷脂酶 A_2，促进花生烯酸的游离，基于作为 Ca 离子

(下转第75页)

有关生化文献的近年情况

Eugene Garfield

每个生化学家直观地感觉到生化文献正在不断地增长，然而要想准确地估计这种增长的速度不是一件容易的事情。但是最近 Robert Harte[1] 的工作引起了我在这个问题上的兴趣，我想阐述一下如何正确而有益地看待生化文献。

根据SCI(Science Citation Index)基本资料的摘录报告，我发现发表的文章中生化文献比总的科学文献增长得快。此外，一篇典型的生化文章，参考文献的数目正在增加，而且引证比原文早五年以上的资料所占的比例也增加。

我们已查阅了 37 种"核心"原始杂志，研究了 1968～1977 年全部的核心杂志（表 1），而且也研究了Harte所引用的 1962～1967 年的杂志。我称 Harte 研究过的杂志为"CEBJ（生化杂志编辑委员会）杂志"，因为这些杂志的编辑是 IUB 的生化杂志编辑委员会的正式成员。

所研究的 37 种杂志中，16 种是在 1962 年或其后开始出版，其中 8 种是在 1970 年或以后开始出版。于是仅从被生化学家重视的生化杂志增长数来看，16 年来增加了 76%。

表 1 说明每年由核心生化杂志发表的文章数目从 1968 年的 9060 篇增加到 1977 年的 14,418 篇，相当于年增长率为 5.3%或 13.4 年增加一倍。如果我们只查看这一时期的CEBJ杂志，则发现一年发表的文章数目从 6766 篇增加到 8491 篇。年增长率为 2.6%，而非 CEBJ 杂志其平均年增长率达 11.1%

非 CEBJ 杂志的较高的增长率，部分是由于新杂志的诞生，部分也由于发表的文章篇数增加所致。表 2 列出了 CEBJ 杂志每年发表的文章的平均数目从 1968 年的615篇增加到1977年的 772 篇——增加 26%。非 CEBJ 核心杂志发表的文章的平均数目从 1968 年的 143篇增加到 1977 年的 228 篇——增加 59%。

在 1962～1977 这段长时期中，CEBJ 杂志平均年增长率为 5.1%。这个增长率与Harte在同时期、同杂志的报道（增长率 9.8%）相矛盾，但由于在 Harte 的报道中没有提供详细的资料，因此我们不能鉴定这个差别的原因。

在 1962～1967 年的一段时期中 CEBJ杂志的平均年增长率 8.1%——大约是1968～1977年时 CEBJ 杂志增长率的三倍。这些资料明显地确定六十年代文献呈指数增长，而七十年代文献的增长一般减慢。

在 1968～1977 年之间核心生化杂志的平均年增长率为 5.3%，比 SCI 基本资料（代表全部科学文献）的平均年增长率稍多一点（表 1）。SCI 从 1968 年的 311,959 篇增加到 1977 年的 465,067 篇，其平均年增长率为 4.5%。因此生化文献的增长率比 SCI 至少高 18%。

如将我们未发表的有关数学和植物学文献的初步资料与生化文献增长的情况作比较，与生化文献增长有显著的不同，在 1968～1977 年中，纯数学的核心杂志的量几乎保持不变而植物学文章的数目其年增长率仅3%。

表 1　每种核心生化杂志在 1968～1977 年每年总共发表的文章

杂　志	发表年份										总　计
	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	
Acta Biochim. Biophys.	93	52	65	116	50	97	46	38	204	51	812
Acta Biochim. Pol.	37	35	37	46	29	37	51	36	41	33	382
Anal. Biochem.	354	388	413	435	437	480	462	557	563	538	4627
Arch. Biochem. Biophys.[a]	608	539	439	516	492	529	528	514	509	544	5218
Biochem. Biophys. Res. Commun.	620	601	834	888	987	1178	1208	1162	1124	1202	9804
Biochem. J.[a]	990	986	1019	1106	1307	680	653	685	777	704	8907
Biochem. Soc. Trans.	—	—	—	—	—	520	246	489	442	645	2342
Biochemistry U.S.A.[a]	604	729	720	772	724	825	854	871	878	923	7900
Biochim. Biophys. Acta[a]	1831	1932	2070	2068	2176	2365	1960	1994	2325	2080	20801
Biochimie[a]	211	155	132	157	175	200	204	185	185	136	1740
Bioinorg. Chem.	—	—	—	6	25	19	33	39	48	34	204
Biokhimiya[a]	173	190	159	201	202	198	200	197	330	300	2150
Bioorg. Chem.	—	—	—	33	11	25	37	39	36	45	226
Bioorg. Khim.	—	—	—	—	—	—	—	212	183	201	596
Can. J. Biochem.	227	194	212	205	175	224	161	184	154	186	1922
Chem. Phys. Lipids	34	46	59	100	85	63	71	68	78	90	694
Eur. J. Biochem.[a]	317	393	473	507	523	676	665	755	797	710	5816
FEBS Lett.	286[b]	364	640	682	788	806	999	950	960	963	7438
H.-S. Z. Physiol. Chem.[a]	458	418	454	305	599	641	492	447	560	824	5918
Indian J. Biochem. Biophys.	54	76	88	81	101	98	115	115	314	379	1421
Int. J. Biochem.	—	—	136	67	93	75	124	126	105	140	866
Int. J. Pept. Prot. Res.	—	33	32	46	44	55	54	62	71	95	492
Ital. J. Biochem.	28	28	34	16	26	24	54	146	79	114	549
J. Biochem.-Tokyo[a]	252	245	222	298	296	344	352	353	401	468	3227
J. Biol. Chem.[a]	900	912	947	1065	1078	1233	1163	1372	1154	1384	11208
J. Cyclic Nucl. Res.	—	—	—	—	—	—	—	35	39	40	114
J. Lipid Res.	119	108	85	105	101	95	86	65	96	97	957
J. Mol. Biol.[a]	422	382	394	401	448	467	482	436	435	418	4285
Lipids	118	129	185	188	145	157	181	161	153	197	1614
Mol. Cell Biochem.	76	59	75	69	69	42	63	72	70	110	705
Nucleic acids Res.	—	—	—	—	—	—	148	240	301	372	1061
Physiol. Chem. Phys.	—	54	60	57	61	54	60	62	67	59	534
Postepy Biochem.	41	36	36	42	29	30	26	21	26	25	312
Prep. Biochem.	—	—	—	24	28	47	38	33	30	35	235
Rev. Roum. Biochem.	41	42	38	44	41	34	38	42	40	43	403
Seikagaku	39	33	33	31	52	31	29	24	38	91	401
Ukr. Biokhim. Zh.	127	126	124	137	148	146	150	130	140	142	1370
总计	9060	9285	10215	10814	11541	12495	12033	12917	13753	14418	116531
平均	335.6	320.2	340.5	327.7	349.7	367.5	343.8	349.1	371.7	389.7	
SCI 基本资料	312	345	355	365	381	400	401	429	441	465	

a. 根据 1978 年 12 月的资料 IUB 的 CEBJ 的正式成员。　b. 1968 年 7 月创刊，年计算是一种外推法。

如果我们看一看个别的杂志，表 1 列出 1977 年发表的文章最多的是Biochim. Biophys. Acta(2080), J. Biol. chem.(1384)和Biochem. Biophys. Res. Commun. (1202)，而增长率最大的是 Indian J. Biochem. Biophys. (24.2%), FEBS Lett. (14.4%)和Eur.J.Biochem.(9.4%)。

表 2　CEBJ 杂志发表文章的总数以及 CEBJ 杂志、核心生化杂志和所有的 SCI 杂志每篇文章的平均参考文献(R/S)

	1962	1963	1964	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977
CEBJ 杂志总的原始文章	4183	4261	4773	5413	5759	6184	6766	6881	7029	7396	8016	8158	7553	7809	8351	8491
CEBJ 杂志平均 R/S 值	18.2	18.4	19.3	19.4	20.6	20.6	21.6	21.9	21.6	23.0	22.4	24.4	25.8	27.0	26.7	26.1
37种核心杂志的平均R/S值	—	—	—	—	—	—	21.2	21.7	21.0	22.3	21.7	22.8	23.9	24.1	23.6	23.4
所有的SCI杂志的平均R/S值	—	—	—	—	—	—	12.0	11.6	11.6	12.1	12.4	12.6	13.1	13.3	13.7	13.5

表 3　1977 年核心生化杂志最经常引证的 50 种杂志，按照核心杂志引文的数目由大到小的次序排列

杂　志	从核心杂志中收集的引文	杂　志	从核心杂志中收集的引文
J. Biol. Chem.[a]	41,665	Virology	1058
Biochim. Biophys. Acta[a]	25,193	J. Virol.	1465
Biochemistry-U. S. A[a]	18,151	J. Neurochem.	1362
Proc. Natl. Acat. Sci. U. S. A.	16,699	Cancer Res.	1331
Biochem. J.[a]	12,370	Cold Spring Harb. Sym.	1313
Biochem. Biophys. Res. Commun.[a]	11,518	Anal. Chem.	1303
J. Mol. Biol.[a]	10,934	Exp. Cell Res.	1277
Nature/Nature-New Biology[b]	10,000	Enzymes	1275
Eur. J. Biochem.[a]	9751	Nucleic Acids Res.[a]	1210
FEBS Lett.[a]	7309	Endocrinology	1175
Arch. Biochem. Biophys.[a]	7229	Can. J. Biochem.[a]	1143
Meth. Enzymol.	5210	Biopolymers	995
Anal. Biochem.[a]	4949	Biochem. Pharmacol.	959
J. Am. Chem. Soc.	4768	Am. J. Physiol.	910
Science	4128	J. Gen. Physiol.	887
J. Biochem.-Tokyo[a]	3431	J. Physiol.-London	864
J. Bact.	2919	Lipids[a]	860
J. Cell. Biol.	2691	Mol. General Genet.	835
Fed. Proc.	2452	Plant Physiol.	832
Ann. NY Acad. Sci.	2119	Proc. Soc. Exp. Biol. Med.	816
H.-S. Z. Physiol. Chem.[a]	2091	J. Chromatogr	800
Annu. Rev. Biochem.[a]	1800	Mol. Pharmacol.	795
J. Lipid Res.[a]	1804	J. Exp. Med.	745
J. Clin. Invest	1728	Adv. Enzymol. RAMB[a]	728
Cell	1644	Biochimie[a]	703

a. 核心杂志。　b. New Biology 在 1971～1973 年与 Nature 分开出版，但引文数计在一起。

这三种杂志都发表了大量的文章，在这些年中文章数稳步增加。Ital. J. Biochem.也有一个高的年增长率(16.9%)，但是它发表的文章数较少而且它的增长也是不稳定的。

我已经说过核心生化杂志在 1977 年发表了 1400 篇文章，但需注意，生化文章除登于核心杂志外也出现在其他杂志上——特别是多科学的杂志上，例如 Science, Nature 和 Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.。在表 3 和表 4 中可看到这些证据。表 3 列了五十种杂志，这些杂志中的文章经常被核心生化杂志所引证；表 4 有五十种杂志，这些杂志中的文章经常引用核心生化杂志。每个表都有大量的杂志，它们并非是核心生化杂志。

表 4　1977 年 50 种杂志最经常引证的核心杂志，按照给予的核心杂志引文的数目由大到小的程序排列

杂　志	有核心杂志的引文	杂　志	有核心杂志的引文
Biochim. Biophys. Acta[a]	27,357	J. Am. Chem. Soc.	2293
J. Biol. Chem.[a]	22,817	J. Virol.	2187
Biochemistry-U. S. A.[a]	15,601	Exp. Cell Res.	2004
Eur. J. Biochem.[a]	11,359	Plant Physiol.	1972
Biochem. J.[a]	10,165	Virology	1950
Arch. Biochem. Biophys.[a]	8994	Int. J. Biochem[a]	1921
Biochem. Biophys. Res. Commun.[a]	8945	J. Cell Biol.	1884
FEBS Lett.[a]	8216	Biochimie[a]	1818
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	8140	Life Sci.	1815
J. Biochem.-Tokyo[a]	6655	Agr. Biol. Chem. Tokyo	1795
J. Mol. Biol.[a]	5637	Lipids[a]	1693
J. Bact.	5362	Mol. Cell. Biochem.[a]	1691
Anal. Biochem.[a]	4338	Endocrinology	1683
Nucleic Acids Res.	4057	Science	1613
Biochem. Soc. Trans.[a]	3085	J. Nutr.	1572
Nature	2954	J. Gen. Microbiol.	1487
H.-S. Z. Physiol. Chem.[a]	2922	Bact. Rev.	1485
Biochem. Pharmacol.	2695	Bioorg. Khim.[a]	1467
Can. J. Biochem.[a]	2642	Phytochemistry	1464
Annu. Rev. Biochem.[a]	2608	Am. J. Physiol.	1455
Mol. Gen. Genet.	2495	J. Clin. Invest.	1420
Cell	2473	Biopolymers	1414
Biokhimiya[a]	2466	J. Lipid. Res.[a]	1344
Cancer Res.	2456	Fed. Proc.	1339
J. Neurochem.	2438	Postepy Biochem.[a]	1340

a. 核心杂志。

为了估计在非核心生化杂志中出现多少生化文章，我们分析核心与非核心杂志中文章被引证的频率，指出了在非核心杂志中每年也提供大约 5,000～10,000篇属于生化的文章。显然，这数字不是非常精确的，然而当非核心的杂志发表的生化文章的估计数被加到核心杂志发表的 14,000 篇文章中时，则 1977 年发表了最少 20,000～25,000 篇生化文章。

既然 Proc. Natl. Acaol. Sei. U. S. A.占被引用的杂志中的第四位，因此有人认为把它作为核心生化杂志看待。但是如果这样的话，Nature, Science, J. Am. Chem. Soc., J. Bact.' J. Cell Biol.和其他重要的杂志，它们不是生化专门杂志，由于它们被引证得很多，都要称为核心生化杂志了，因此我们感到最好还是按照过去的划分继续这种研究为好。

另一"增长"的标志是在一篇典型文章中参考文献的平均数目也有增加。为了估计这个因素我使用"R/S"值检测每种核心杂志，那就是在一特定的年份中一份杂志中所有文章的参考文献数目(R)的总和被这一年发表的文章篇数(S)除的值。表 2 是所有 CEBJ 杂志的平均R/S 值和 SCI 杂志的平均 R/S 值的对比。

在 1968～1977 年中每年平均生化文章含有的参考文献比 SCI 基础资料至少多 70%。例如，在 1977 年生化文章平均有 23.4 篇参考资料而 SCI 文章平均仅有 13.5 篇参考资料。对这样的差别可认为 SCI 基础资料包括许多象信件和摘要，这些文章的参考资料较少，因而SCI

的 R/S 比生化文章的 R/S 低。但 SCI 中因信件和摘要的参考文献少，仅仅对 70% 的差别有部分影响。

表 2 指出在十年中核心杂志的平均R/S 值从 1968 年的 21.2 增加到 1977 年的23.4，增加了 10.4%。虽然在 1962～1977 年的十六年时期中某些 CEBJ 杂志的 R/S 值高达 64% (Biochim.Biophys. Acta)，但总的说来CEBJ杂志的R/S值从 1962 年到 1977 年增加了43%(18.2～26.1)(表 2)。

我再次查阅了有关数学和植物学杂志研究的初步资料，看到生化文章中 R/S 值的增加的另一情况。根据 1977 年的资料，生化文章的参考文献数平均比植物学多 12%(23.4 对21.0)，比数学多 85%(23.4 对 12.6)。从 1968 到 1977 年数学和植物学文章的 R/S 值分别增加 8% 和 7%。这一增长率明显低于同时期生化 R/S 值的 10.4% 的增长率，而所有这三个领域都表明文章所引的参考文献平均数量有所增加。除了现在文章的长短，它的性质或报告的量有改变外，为什么当今作者要引证比以前更多的参考文献呢？

有几种可能的原因：首先与协作研究的增加有关[2~6]。因为科学的奖励制度着重放在第一个原作者上，这就促使研究组把文章分成几部分发表，而早期这样的文章往往作为一篇文章发表。当研究组的一项研究成果被分为几个部分发表时，则每个协作者都有成为排列在第一名的机会。后来的工作者发表文章时必须引证所有的部分。

其次是文献本身的增加。Price 指出引证的增加是文献指数增加的必然结果[7]。如果可被引证文献数目增加，那么就会造成平均引文的增加。这在增长的早期是必然的，但最终必须达到平衡。否则所有的文章将都是综述了！

第三个理由也可能与 SCI 有关，我称它为引证意识(citation consciousness)。从实践中使人看到引证另外人的工作是会增加你自己的工作出现在引证索引中的机会，这种引证索引增加了其它人和它接触的可能性。只有谨慎地参考才可以防止滥用过量的引文，但是我们很难反对在发表文章时，为了弥补某些不足而引用有关文献，同样我对某些杂志武断地限制作者只能引证 15 篇文献持怀疑。

第四点很可能是由于改进了作者对新出版物的了解。因为近期通讯系统有所改善。诸如 Current Contents 和其它服务机构使得现在更易得知近期的文献资料。

有关的第五可能的解释是研究者更注意 SCI 及其它索引和文摘，增进了他们查阅过期资料的能力。

不管增加的原因是什么，我们的研究指出不仅在生化文章中有较多的参考文献而且在参考文献中陈旧的资料比过去占的百分率也高。在表 5 的 18 种核心杂志中，我调查了五个出版年，计算了比原文早五年多的参考文献的百分率。从主要目录中选择出来的杂志，它包括了所有的 CEBJ 杂志。除了四种杂志外，在 1969～1977 年之间上述百分率有了增加。最突出的例子是在 1969 年 Act. Biochem.Biophys.为 54.5%，而且一直增加到 1977 年达 71.7%。这些杂志年增长率（仍指引证文献比本文早五年者占全部引证文献的百分数）为 10%。数学和植物学杂志也有类似的增加。

我们研究的最后一个方面是那一种核心生化杂志人们引用得最多。我们采用它们的“相遇因素”(impact factor)来排。所谓“相遇因素”是指在一个指定的时期中，某一杂志被每篇文章引用的平均数。这种计算方法可以使不同杂志间虽然发表的文章数目不等，但仍可以彼此相互比较。通过比较“相遇因素”那么我们就消除了多出版杂志具有绝对的引证数的优点，

中科院植物所图书馆
S0017368

表 5　比原文早五年多的参考文献的百分率(挑选了 18 种核心杂志的五个出版年)

杂　志	引证文献的发表的日期				
	1969	1972	1974	1975	1977
Acta Biochim. Biophys.	54.5	57.8	64.4	65.7	71.1
Anal. Biochem.	54.6	59.2	58.6	58.3	57.2
Annu. Rev. Biochem.	—	26.9	30.0	28.9	40.0
Arch. Biochem. Biophys.	52.4	51.5	53.0	53.1	58.5
Biochem. Biophys. Res. Commun.	32.2	36.2	38.9	41.0	42.9
Biochem. J.	45.3	51.7	52.5	54.9	56.1
Biochemistry-U. S. A.	44.5	49.3	48.8	47.5	51.1
Biochem. Biophys. Acta	43.6	49.2	49.5	50.3	53.3
Biochimie	—	45.5	48.3	52.8	55.9
Biokhimiya	—	58.7	68.0	64.9	55.9
Can. J. Biochem.	54.0	54.1	52.9	56.7	57.0
Eur. J. Biochem.	43.5	49.1	49.3	49.8	51.7
FEBS Lett.	37.3	35.8	40.0	35.3	41.0
H.-S. Z. Physiol. Chem.	47.4	47.4	50.5	49.2	48.0
Int. J. Biochem.	—	50.2	61.3	60.3	59.1
J. Biochem. Tokyo	55.9	60.2	60.0	61.0	62.7
J. Biol. Chem.	44.6	49.1	48.8	49.1	51.0
J. Mol. Biol.	35.4	40.4	41.4	43.0	45.8

表 6　37 种核心杂志加三种评论杂志按照相遇因素由大到小的顺序排列

顺序	杂　志	1977年相遇因素	顺序	杂　志	1977年相遇因素
1.	Annu. Rev. Biochem.[a]	26.67	21.	Lipids	1.92
2.	Adv. Enzymol. RAMB[a]	9.80	22.	J. Biochem.-Tokyo	1.86
3.	CRC Crit. R. Biochem.[a]	8.60	23.	Can. J. Biochem.	1.83
4.	J. Mol. Biol.	7.47	24.	Bioorg. Chem.	1.55
5.	J. Biol. Chem.	5.84	25.	Bioinorg. Chem.	1.43
6.	J. Cyclic Nucl. Res.	5.81	26.	Prep. Biochem.	1.22
7.	Biochemistry-U. S. A.	5.14	27.	Ukr. Biokhim. Zh.	1.19
8.	Eur. J. Biochem.	3.76	28.	Biochimie	1.13
9.	J. Lipid Res.	3.65	29.	Ital. J. Biochem.	1.11
10.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	3.39	30.	Seikagaku	1.05
11.	Biochem. J.	3.22	31.	Int. J. Pept. Prot. Res.	0.85
12.	Biochem. Biophys. Acta	3.18	32.	Acta Biochem. Biophys.	0.80
13.	Nucleic Acids Res.	3.11	33.	Int. J. Biochem.	0.77
14.	FEBS Lett	2.91	34.	Bioorg. Khim.	0.70
15.	Arch. Biochem. Biophys.	2.88	35.	Acta Biochim. Pol.	0.57
16.	H.-S. Z. Physiol. Chem.	2.31	36.	Biokhimiya	0.56
17.	Mol. Cell. Biochem.	2.20	37.	Postepy Biochem.	0.34
18.	Biochem. Soc. Trans.	2.16	38.	Indian J. Biochem. Biophys.	0.33
19.	Anal. Biochem.	1.96	39.	Rev. Roum. Biochim	0.32
20.	Chem. Phys. Lipids	1.95	40.	Physiol. Chem. Phys.	0.28

a. 评论杂志。

所以，“相遇因素”是一种定性计算。

我们对R/S值有兴趣的一个原因也正是由于此值是和“相遇因素”有关。我在其它文章中[8]曾指出一种杂志的页数不影响“相遇因素”，而引证文献的多少都与之有关，所以R/S值与“相遇因素”平行。

在表6中37种核心杂志加上三种综述性杂志按相遇因素排列。表中的相遇因素是指1977年的杂志所引1975及1976年的文章再用1975及1976两年所发表的文章总数除之。通常在这类目录中，评论性杂志居首位[9,10]，依次是J. Mol.Biol (7.47)，J. Biol. Chem. (5.84)，J. Cyclic Nucl. Res. (5.81)和Biochemstry (5.12)。象大家所预料的，这些国际性的杂志基本上比东欧的或第三世界办得好。

正象我在这篇文章的开始所说，对科学文献的任何一个部分的进展的精确估计不是轻而易举的。我仅触及了这个问题的皮毛，但是我在这里的描述是花费了大量的时间和精力。变化因素是无止境的。我只是抛砖引玉，希望导致更多的研究，对于接受挑战的人，ISI随时准备给予支助。（参考文礼略）

夏霞娟译自《Trends in Biochem. Sci.》4(12)：290～295，1979. 顾天爵校

（上接第67页）

Hemler等(Arch. Biochem. Biophys.,193：340，1979)指出了过氧化脂质和PGG_2使环加氧酶活化而促进PG生成的可能性这一点，从动脉硬化病因论的观点来说趣味深长。

最后，再提一下作为动脉硬化促进因子的高血压和PG的关系。一般认为花生烯酸和PGE_2可促进血管紧张肽原酶的释放。Tan等(Ann. Intern.Med.，90：783，1970)指出了消炎痛可引起使人尿PGE_2减少的低血管紧张肽原酶性的低醛固酮症。另一方面，Pace-Asciak等(Biochim. Biophys. Acta，574：182，1979)报告了在给予大鼠PGI_2时，看到血压下降的作用，更进一步在自发性高血压的大鼠中，随着年龄增加而血压上升，大动脉PGI_2合成能力作为适应现象越来越高(同上，574：177，1979)。

黄华楼译自《代谢》16(11)1770，1979. 徐 科校

（上接第68页）

拮抗物质的TMB_8在PGH_2的存在下，抑制通过PGI_2产生的cAMP的蓄积效果，因此认为TXA_2的作用是通过Ca离子在血小板内移动的间接效果。也就是在TXA_2生成的状态下，出现Ca离子的移动，抑制腺苷酸环化酶，使cAMP的量减少。

阿斯匹林和消炎痛激活作为从花生烯酸合成PG初期阶段的环加氧酶而抑制PG的合成，大量给予时不仅抑制TXA_2系统，而且也抑制PGI_2系统的合成，有时也看到相反的效果，现在，对于专一地抑制TXA_2合成的药物所进行的探讨已获得了某种程度的实验效果，可以说出现了在最近的将来实用化的前景。

黄华楼译自《代谢》16(10)：1674，1979. 徐 科校

收到期	82年2月3日
来源	63.65(46折)
书价	0.65
单据号	487991
开票日期	82.2.2

生物化学译丛

（第四辑）

《生物化学译丛》编辑组编

*

上海科学技术文献出版社出版

（上海高安路六弄一号）

新华书店上海发行所发行

江苏宜兴南漕印刷厂印刷

*

开本787×1092 1/16 印张4.75 字数118,000

1981年10月第1版 1981年10月第1次印刷

印数：1- 3050

书号：13192.29 定价：0.65 元

《科技新书目》3—253